

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-520667

(P2015-520667A)

(43) 公表日 平成27年7月23日(2015.7.23)

(51) Int.Cl.

B01D 15/00 (2006.01)
G01N 30/46 (2006.01)
G01N 30/26 (2006.01)
G01N 30/32 (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)

F 1

B01D 15/00
G01N 30/46
G01N 30/26
G01N 30/32
G01N 30/88

1 O 1 A
A
M
Q
A

テーマコード(参考)

4 D 0 1 7

4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-507400 (P2015-507400)
(86) (22) 出願日 平成25年3月26日 (2013.3.26)
(85) 翻訳文提出日 平成26年12月24日 (2014.12.24)
(86) 國際出願番号 PCT/EP2013/000910
(87) 國際公開番号 WO2013/159858
(87) 國際公開日 平成25年10月31日 (2013.10.31)
(31) 優先権主張番号 12002828.7
(32) 優先日 平成24年4月23日 (2012.4.23)
(33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)
(31) 優先権主張番号 61/666,453
(32) 優先日 平成24年6月29日 (2012.6.29)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591032596

メルク パテント ゲゼルシャフト ミック
ト ベシュレンクテル ハフツング
Merck Patent Gesell
schaft mit beschrae
nker Haftung
ドイツ連邦共和国 テー-64293 ダ
ルムシュタット フランクフルター シュ
トラーゼ 250
Frankfurter Str. 25
O, D-64293 Darmstadt
, Federal Republic o
f Germany

(74) 代理人 100102842

弁理士 葛和 清司

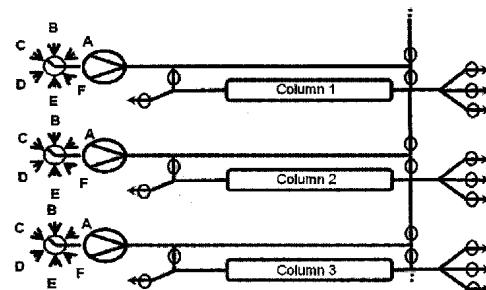
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】クロマトグラフィー法

(57) 【要約】

本発明は、連続アフィニティクロマトグラフィー法およびかかる方法において用いる装置に関する。該方法は、高い結合容量を維持しつつ、高い操作速度の使用を可能とする。

Fig. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の 1 または 2 以上の不純物から標的分子を精製する方法であって、該方法が、以下のステップ：

a) 同一のクロマトグラフィーマトリックスを有する少なくとも 3 つの分離ユニットであって、これらが、液体が少なくとも、1 つの分離ユニットから後続のものへと、および最後のものから第 1 の分離ユニットへと流れることができるように接続された、前記分離ユニットを提供すること、

b) 試料を第 1 の分離ユニット上にフィードして、試料がこの分離ユニット上（ここで試料は、標的分子がこの分離ユニットに結合することを可能とする第 1 の pH および伝導率にある）にロードされている間、前記分離ユニットは、ローディング時間の少なくとも一部において次の分離ユニットと流体連通しており、これにより前記第 1 分離ユニットに結合していない標的分子が、次の分離ユニットに、ロードされている分離ユニットともロードされている分離ユニットと流体連通している分離ユニットとも異なる 1 つの分離ユニットを少なくとも洗浄、溶出、および再平衡化するのと同時に、結合することができるようすること、

c) フィードを、次の分離ユニットへと切り替えること、

d) 試料を次の分離ユニット上にフィードして、試料が前記次の分離ユニット上（ここで試料は、標的分子が前記次の分離ユニットに結合することを可能とする第 1 の pH および伝導率にある）にロードされている間、前記次の分離ユニットは、ローディング時間の少なくとも一部において、次の後の分離ユニットと流体連通しており、これにより前記次の分離ユニットに結合していない標的分子が、次の後の分離ユニットに、ロードされている分離ユニットともロードされている分離ユニットと流体連通している分離ユニットとも異なる 1 つの分離ユニットを少なくとも洗浄、溶出、および再平衡化するのと同時に、結合することができるようすること、

e) ステップ c) および d) を 1 または 2 回以上繰り返すこと、

を含み、

フィードは停止されず 800 cm/h を超える速度を有すること、および分離ユニットのクロマトグラフィーマトリックスは、40 ~ 200 μm の直径および 50 nm ~ 200 nm の範囲の細孔径を有する粒子を含むこと、を特徴とする、前記方法。

【請求項 2】

フィードが、800 cm/h を超える速度を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

同一のクロマトグラフィーマトリックスを有する 3、4 または 5 個の分離ユニットが、ステップ a) で提供されることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

分離ユニットのクロマトグラフィーマトリックスが、直径 55 ~ 100 μm の粒子を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

分離ユニットのクロマトグラフィーマトリックスが、60 nm ~ 100 nm の範囲の細孔径の粒子を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

ステップ b) 、 c) および d) において、ロードされている分離ユニットが、ローディング時間の一部のみでなく、ローディング時間の全体を通して、次の分離ユニットと流体連通していることを特徴とする、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 b) 、 c) および d) において、ロードされている分離ユニットと次の分離ユニットの間の流体連通が、ローディング時間の後半に開始されることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 8】

ロードされた分離ユニットを洗浄する場合に、前記ロードされた分離ユニットから溶出される洗浄液体が、別の分離ユニットの入口に向けられることを特徴とする、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

試料が清澄化された試料であることを特徴とする、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

分離ユニットから溶出される標的分子が、少なくとも1つのフロースルー精製ステップにさらに供されることを特徴とする、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 11】

以下を含む装置：

- 同一のクロマトグラフィーマトリックスを有する少なくとも3つの分離ユニットであって、これらは接続線によって、液体が、第1の分離ユニットから後続のものへと、および最後のものから第1の分離ユニットへと流れることができるように接続されており、ここで2つの分離ユニットの間の各接続線が、少なくとも1つのオン／オフ弁を含む、前記分離ユニット、

- 分離ユニットの間の接続線における各分離ユニットの入口に近い分岐を介して、各分離ユニットの入口と流体連通している、溶媒送達システム、

- 分離ユニットの出口近くの、分離ユニットの間の各接続線から分岐する流体出口線であって、線および少なくとも2つの分岐（各分岐はオン／オフ弁を含む）を含む前記流体出口線。 20

【請求項 12】

本発明に記載の方法を含む、タンパク質を精製するためのプロセス。

【請求項 13】

プロセスがさらに、1または2以上の以下のステップ：

- 清澄化
- ウィルスの不活化
- フロースルー精製
- 滅菌濾過

を含むことを特徴とする、請求項12に記載のプロセス。 30

【請求項 14】

プロセスの少なくとも2つのステップが、それらの持続時間の少なくとも一部において重複していることを特徴とする、請求項12または13に記載のプロセス。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、連続クロマトグラフィー法および、かかる方法で用いられる装置に関する。本方法は、高い結合容量を維持しつつ高い操作速度の使用を可能とする。

【背景技術】**【0002】**

バイオ医薬品分子の精製には、広く確立された技術の一つとしてクロマトグラフィー分離法の使用が関与する。通常の用途には、標的分子のキャプチャーおよびポリッシングが伴う。多様なクロマトグラフィー法および樹脂を、これらのタスク（例えば、順相、逆相、サイズ排除、イオン交換クロマトグラフィーモード）を行うために適用することができる。特殊な分野では、アフィニティーコロマトグラフィーなどのより特異的かつ効率的な分離方法が開発されている。抗体精製の最先端では、ProtA修飾されたアフィニティーコロマトグラフィー支持体材料を用いて、最も豊富な不純物（宿主細胞タンパク質、宿主細胞DNA、糖、アミノ酸、成長因子等）の大部分から、標的分子を結合して分離する。様々な特性の30以上のクロマトグラフィー樹脂が、現在市場で利用可能であり、顧客

10

20

30

40

50

に対してその用途に最適なものを見出す機会を提供している。これらの生成物の主な相違点は、物理的特性（支持体材料、粒子サイズ、粒子形状および細孔サイズ）および化学的特性（ProtAリガンド、リガンド密度、支持マトリックス型）であり、これらは結合容量、物質移動特性、圧縮性および堅牢性に影響する。

【0003】

結合容量は、アフィニティーリガンド、表面上でのその密度、およびそのアクセシビリティに強く依存する。修飾技術の改善により、支持マトリックスの化学からは独立して、 $> 30 \text{ g/L}$ の高い結合容量に > 3 分の滞留時間で到達することができる。

【0004】

一方、物質移動特性は非常に変化しやすく、用途において根本的な違いを引き起こす。
薄膜物質移動および細孔拡散は、吸着部位に向かう標的分子の拡散性に影響する2つの主要なパラメータである。薄膜物質移動は、主に粒子サイズおよび形状に影響される。粒子および粒子間の体積が小さいほど、物質移動および流動抵抗は大きくなる。したがって、分析規模の用途には小さな粒子サイズを用いて、高速物質移動と高効率を確保する。しかし、圧力耐性の問題のため、工業規模での操作は < 3 バールの操作圧で行われる。より大きい粒子 ($60 \mu\text{m} \sim 120 \mu\text{m}$) が通常選択される。

【0005】

上記の論点により、細孔拡散は物質移動を規定する最も影響力の強い特性の一つである。いくつかの材料は広い細孔を呈して ($50 \sim 500 \text{ nm}$)、高速の物質移動を可能にすることが示された。しかしこれらの材料は、小さい表面積のために低い結合容量 ($\sim 20 \text{ g/L}$) を示す。結合容量を高めるためにはより大きな表面積が必要であり、これは通常、小さな細孔サイズによって達成される。 $\sim 100 \text{ nm}$ の細孔サイズを示す材料は、 40 g/L の結合容量を示し (Prosep-vA High Capacity (Millipore Bioprocessing, Consett, UK))、さらに $\sim 70 \text{ nm}$ の細孔サイズを示す材料は、 56 g/L の結合容量を示した (Prosep-vA Ultra (Millipore Bioprocessing, Consett, UK))。匹敵する範囲の広い細孔サイズ分布を有する支持体材料も、類似の結合容量を示した (MabSelect Sure (登録商標) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden))。小さい細孔サイズのために、標的分子の拡散は遅く、 40 g/L を超える結合容量を達成するためには、一定の標的分子滞留時間が必要となる。使用される滞留時間の通常の範囲は、標的分子が結合部位に向かって拡散することを保証するために $3 \sim 6$ 分の範囲である。これは、支持体材料が標的分子を含む溶液で処理される、クロマトグラフィープロセスのローディング段階において重要である。アフィニティークロマトグラフィー法の残りの必要なステップ（例えば洗浄、溶出、ストリップ、定置洗浄、再平衡化など）をより高速で実施して、より短い処理時間を確保することができる。この場合の操作速度は、支持材料の剛性の影響を受ける。

【0006】

しかしながら、この特異的かつ非常に選択的な方法を約20年間適用の後に、より高い経済的効率および生産性を追求して、さらなる方法の最適化の必要性が高まっている ($\text{g} (\text{標的分子}) / \text{m}^2 (\text{固定相}) / \text{h} (\text{操作時間})$)。現状は、より多量の樹脂へのより高い投資によって、より高いスループットのために大きなカラムを用いることである。直径 1.2 m および $10 \sim 20 \text{ cm}$ の床高さのカラムが、 mAb の精製に使用されることもある。経済的な処理を可能とし得る代替的技術、すなわち連続クロマトグラフィーの存在も認識されていた。この方法の基本は、生成物の損失なしで、標準のバッチにおける 60% の代わりに 80% の樹脂結合容量にローディングするというより高い樹脂の利用と、逐次的バッチ処理を多数のカラムでの並行操作に分割することによる、より短い操作時間であり、したがってより小さいカラムの利用を可能とすることである。

【0007】

連続クロマトグラフィーにおいては、複数の同一のカラムは、方法の要請に応じてカラムが直列および/または並列に操作されることを可能にする配置で、接続されている。したがって、すべてのカラムは原理的に同時に、しかし方法ステップにおいてわずかにシフトされて、実行することができる。手順は繰り返すことができて、各カラムはプロセス中

10

20

30

40

50

に複数回ロードされ、溶出され、および再生される。単一のクロマトグラフィーサイクルがローディング、洗浄、溶出、および再生などの複数の連続したステップに基づく、「従来の」クロマトグラフィーと比較すると、複数の同一カラムに基づく連続クロマトグラフィーにおいては、これらの全ステップは、異なるカラムそれぞれにおいて、同時に実施される。連続クロマトグラフィー操作は、クロマトグラフィー樹脂のより良好な利用、処理時間の低減、およびバッファー要件の低減をもたらし、これらは全て、プロセスの経済性に利益となる。連続クロマトグラフィーの一例は、擬似移動床（SMB）クロマトグラフィーである。

近年この擬似移動床（SMB）技術は、バイオ医薬品市場、特に抗体の精製にも導入されている。以前の通常のバッチクロマトグラフィーにおいて、クロマトグラフィーカラムのローディングが標的分子のブレークスルーの特定のパーセンテージにおいて停止されていたとしても、現在のローディングは、標的分子を損失することなく、結合容量を増加させるために継続することができるが、これは、ブレークスルー画分が、最初の次のカラムにロードされるからである。

【0008】

しかしながら、より優れた経済性のためには、処理時間は、これが生産性に直接影響を与えるので、非常に重要である。結合容量の増加は、どれだけ多くの物質を表面に結合させることができるかというレベルで、既に生産性を増加させているが（～20から40%）、しかし、標的分子が修飾された表面に結合するのに必要な滞留時間の減少は、経済効率をさらに高めるであろう。おそらく、滞留時間を0.3分に減少させると、3分の滞留時間と比較して、生産性の10倍の増加につながるであろう。残念ながら、標的分子の吸着段階の間の滞留時間を減少させることは、物質移動速度が減少するために、動的結合容量の低下につながる。その結果、カラムのローディングは典型的には、US 20090209736に開示されているように、約600cm/hまで上昇した速度で実施される。しかし、E. M ahajan et al., Journal of Chromatography A, 1227 (2012) 154-162に実際に記載されているように、より高い流量においてカラムの結合容量は低減されるため、カラムのローディングに対して高い流量は実現不可能である。

驚くべきことに、我々は、適切な支持材料の物理的特性（粒子サイズ、細孔サイズ）の選択を一定の連続クロマトグラフィー法と組み合わせて、800cm/hを超えるローディング速度が可能となることを見出した。

【発明の開示】

【0009】

発明の簡単な説明

アフィニティー樹脂の60%を超える総結合容量を、ローディング中に<5%の低い標的分子損失有りまたは無しで、800cm/hを超える、さらに1000cm/hを超える速度を用いて、ロード中に浸出標的分子を、第1キャプチャーアフィニティーカラムから第2キャプチャーアフィニティーカラムへと移動することにより、実現することができる。同時に、少なくとも第3のカラムを別のクロマトグラフィープロセスステップに用いて、並行ユニット操作を実現することができる。これにより、バッチユニット操作と直接比較した場合に（同一のユニット操作条件）、>20%の結合容量の増加と、操作時間の>3倍の減少がもたらされる（通常のバッチユニット操作は、300cm/hで実施される）。これは、アフィニティークロマトグラフィー用途のためのみではなく、イオン交換クロマトグラフィー用途に対しても機能する。

【0010】

本発明は、結果として、標的分子を試料中の1または2以上の不純物から精製する方法に関し、この方法は以下のステップ：

a) 同一のクロマトグラフィーマトリックスを有する少なくとも3つの分離ユニットであって、これらが、液体が1つの分離ユニットから後続のものへと、および最後のものから第1の分離ユニットへと流れることができるように少なくとも接続されている、前記分離ユニットを提供すること、

b) 試料を第 1 の分離ユニット上にフィードして、試料がこの分離ユニット上(ここで試料は、標的分子がこの分離ユニットに結合することを可能とする第 1 の pH および伝導率にある)にロードされている間、前記分離ユニットは、ローディング時間の少なくとも一部において次の分離ユニットと流体連通 (fluid communication) しており、これにより前記第 1 分離ユニットに結合していない標的分子が、次の分離ユニットに、ロードされている分離ユニットともロードされている分離ユニットと流体連通している分離ユニットとも異なる 1 つの分離ユニットを少なくとも洗浄、溶出、および / または再平衡化するのと同時に、結合することができるようすること、

【0011】

c) フィードを、次の分離ユニットへと切り替えること、

d) 試料を次の分離ユニット上にフィードして、試料が前記次の分離ユニット(ここで試料は、標的分子が前記次の分離ユニットに結合することを可能とする第 1 の pH および伝導率にある)上にロードされている間、前記次の分離ユニットは、ローディング時間の少なくとも一部において、次の後の分離ユニットと流体連通しており、これにより前記次の分離ユニットに結合していない標的分子が、次の後の分離ユニットに、ロードされている分離ユニットともロードされている分離ユニットと流体連通している分離ユニットとも異なる 1 つの分離ユニットを少なくとも洗浄、溶出、および再平衡化するのと同時に、結合することができるようすること、

e) ステップ c) および d) を 1 または 2 回以上繰り返すこと、
を含み、

フィードフローは停止されず 800 cm / h を超える速度を有すること、および分離ユニットのクロマトグラフィーマトリックスは、30 ~ 200 μm の平均直径および 40 nm ~ 300 nm の範囲の平均細孔径を有する粒子を含むこと、を特徴とする。

【0012】

好ましい態様において、フィードは、1000 cm / h を超える速度を有する。

好ましい態様において、同一のクロマトグラフィーマトリックスを有する 3、4 または 5 個の分離ユニットが、ステップ a) で提供される。非常に好ましい態様において、同一のクロマトグラフィーマトリックスを有する 3 個のみの分離ユニットが、ステップ a) で提供される。

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、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスである。

別の好ましい態様において、分離ユニットのクロマトグラフィーマトリックスは、平均粒子径 (d50) が 40 ~ 120 μm の粒子を含む。さらに好ましくは、55 ~ 100 μm である。

【0013】

別の好ましい態様において、分離ユニットのクロマトグラフィーマトリックスは、40 nm ~ 300 nm の範囲の平均細孔径の粒子を含む。さらに好ましくは、分離ユニットに存在する粒子の細孔は、50 nm ~ 150 nm の範囲の平均細孔径の細孔を有する。さらに好ましくは、粒子の細孔は、60 nm ~ 100 nm の範囲の平均細孔径を有する。

好ましい態様において、ステップ b) 、c) および d) において、ロードされている分離ユニットは、ローディング時間の一部のみでなく、ローディング時間の全体を通して、サークルにおける次の分離ユニットと流体連通している。

別の好ましい態様において、ステップ b) 、c) および d) において、ロードされている分離ユニットとサークルにおける次の分離ユニットの間の流体連通は、ローディング時間の後半に開始される。

【0014】

別の態様において、ロードされた分離ユニットを洗浄する場合に、前記ロードされた分離ユニットから溶出される洗浄液体は、別の分離ユニットの入口に向けられる。

別の態様において、ロードされた分離ユニットを洗浄する場合に、前記ロードされた分離ユニットから溶出される洗浄液体は、フィードストック (feedstock) に向けられる。

10

20

30

40

50

好ましい態様において、試料は、清澄化された試料である。清澄化された試料は、前に清澄化ステップに供された試料である。

別の好ましい態様において、分離ユニットからの溶出液である精製された標的分子、したがって本発明の方法からもたらされる精製された標的分子は、少なくとも1つのフロースループ精製ステップにさらに供される。

【0015】

本発明はさらに、以下を含む装置に向けられる：

- 同一のクロマトグラフィーマトリックスを有する少なくとも3つの分離ユニットであって、これらは接続線によって、液体が、第1の分離ユニットから後続のものへと、および最後のものから第1の分離ユニットへと流れることができるように接続されており、ここで2つの分離ユニットの間の各接続線が、少なくとも1つのオン／オフ弁を含む、前記分離ユニット、

- 分離ユニットの間の接続線における各分離ユニットの入口に近い分岐を介して、各分離ユニットの入口と流体連通している、溶媒送達システム、

- 分離ユニットの出口近くの、分離ユニットの間の各接続線から分岐する流体出口線であって、線および少なくとも2つの分岐（各分岐はオン／オフ弁を含む）を含む前記流体出口線。

【0016】

本発明はさらに、本発明による方法を含む、標的分子を精製するためのプロセス、典型的にはバイオ医薬品生産プロセスに向けられる。バイオ医薬品生産プロセスは、生物反応器内の細胞培養物中で產生された標的分子を、製薬用途に用いることができるよう精製するプロセスである。

好ましい態様において、プロセスはさらに、1または2以上の以下のステップを含む：

- 清澄化（遠心分離および／または濾過および／または沈下）
- ウィルスの不活化
- 少なくとも1つのフロースループ精製ステップ、これはフロースループリッシングとも呼ばれる
- 滅菌濾過。

好ましい態様において、プロセスの少なくとも2つのステップは、それらの持続時間の少なくとも一部において重複している。

【図面の簡単な説明】

【0017】

図面

【図1】図1は、本発明による装置の好ましい態様の概略図を示す。ここには、3つのキャプチャー分離ユニット（ProtA、またはIEX）、溶媒リザーバA、B、C、D、E、Fへの接続部および接続線、弁およびポンプが示されている。

【図2】図2a-eは、3つのカラムの連続プロセスの一部の概略図を示し、ここで第1および第2分離ユニットはローディング段階（フィード）の間流体連通しており、ロードされている分離ユニットおよびロードされている分離ユニットと流体連通している分離ユニットとは異なる第3の分離ユニットは、多様なプロセスサブステップ：a)溶液Aによる洗浄、b)溶液Bによる洗浄、c)結合した標的分子の溶出、d)定置洗浄、およびe)分離ユニットの再生、に供されている。

【図3】図3a-cは、3つのカラムの連続プロセスの、ローディング段階の間の流体連通について強調表示した選択された部分の概略図であり、ここでa)ローディングの間に分離ユニット1は分離ユニット2と流体連通しており、分離ユニット3は洗浄段階にあり、b)分離ユニット2は分離ユニット3と流体連通しており、分離ユニット1は洗浄段階にあり、c)分離ユニット3は分離ユニット1と流体連通しており、分離ユニット2は洗浄段階にある。

【0018】

【図4】図4は、3つの分離ユニットおよび2つの溶媒送達システムの本質的特徴に主に

10

20

30

40

50

限定された、セットアップの図である。

【図5】図5a-dは、4つのカラムの連続プロセスの、ローディング段階の間の流体連通について強調表示した、選択された部分の概略図であり、ここでa)ローディングの間に分離ユニット1は分離ユニット2と流体連通しており、洗浄段階に対して、分離ユニット4は分離ユニット3と流体連通しており、b)分離ユニット2は分離ユニット3と流体連通しており、洗浄段階に対して、分離ユニット1は分離ユニット4と流体連通しており、c)分離ユニット3は分離ユニット4と流体連通しており、洗浄段階に対して、分離ユニット2は分離ユニット1と流体連通しており、d)分離ユニット4は分離ユニット1と流体連通しており、洗浄段階に対して、分離ユニット3は分離ユニット2と流体連通している。

10

【0019】

【図6】図6a-eは、4つのカラムの連続プロセスの一部の概略図を示し、ここで第1および第2分離ユニットはローディング段階(フィード)の間流体連通しており、ロードされている分離ユニットおよびロードされている分離ユニットと流体連通している分離ユニットとは異なる第4の分離ユニットは、多様なプロセスサブステップ:a)溶液Aによる洗浄、および前記洗浄溶液を、この分離ユニットから、洗浄されている分離ユニットと流体連通している前のものへと移動させること、b)溶液Bによる洗浄、c)結合した標的分子の溶出、d)定置洗浄、およびe)分離ユニットの再生、に供されている。

【図7】図7aは、弱くまたは非結合の標的分子の洗浄のための代替的流路の概略図を示し、前記分子の、別の分離ユニットへの移動を明らかにしている。一方図7bは、不純物の洗浄のための流路を示す。

20

【0020】

【図8】図8は、標準的なバッチ法に対する連続クロマトグラフィーの魅力的な利点を示し、ProSep vA Ultra Plus樹脂について、滞留時間にわたる結合容量で表わしたものである。

【図9】図9は、ProSep vA Ultra Plusカラムを適用したmA b A精製実験において、3分離ユニットの連続クロマトグラフィーシステム上で実施した103サイクルについての、UVシグナルトレースのオーバーレイを示す図である。

【図10】図10は、ProSep vA Ultra Plusカラムを適用して3分離ユニットの連続クロマトグラフィーシステム上で実施した103サイクルについての、mA b A入力濃度およびmA b溶出濃度を示す図である。

30

【図11】図11は、mA b A精製について、ProSep vA Ultra Plusカラムを適用した3分離ユニットの連続クロマトグラフィーシステム上で実施した103サイクルについての、溶出プールでのHCP濃度を示す図である。

【図12】図12は、バッチおよび連続操作モードにおける、様々なProtA樹脂および様々なmA b濃度に対する動的結合容量を示す図である。材料が示されていない凡例はPUP材料を指すことに注意。すべてのカラムは0.8*10cmの同一サイズを有していた。

【0021】

【図13】図13は、標準的なバッチ法に対する連続クロマトグラフィーの魅力的な利点を示し、Eshmuno S樹脂について、滞留時間にわたる結合容量で表わしたものである。

40

【図14】図14は、Eshmuno Sカラムを適用したmA b A精製実験において、3分離ユニットの連続クロマトグラフィーシステムでの実施についての、UVシグナルトレースのオーバーレイを示す図である。

【図15】図15は、結合および溶出クロマトグラフィー(キャプチャー)ステップに本発明の方法を用いた、標的分子を精製するためのプロセスを示す。示された精製プロセスには細胞培養用バイオリアクターを使用し、続いて以下のプロセスステップを用いる：清澄化；プロテインA結合および溶出クロマトグラフィー(キャプチャー)；ウイルス不活化；フロースループ精製；および製剤化。示されるように、各プロセスステップは、プロセスステップの意図する結果を達成するために用いる1または2以上の装置を使用する。

50

示されるように、清澄化には沈殿およびデブス濾過を使用する；プロテインA結合および溶出クロマトグラフィーは、本発明のプロセスを用いて行われる；ウイルス不活化には、2つのインライнстティックミキサーを使用する；フロースルー精製には、活性炭（A C）、次にアニオンイオン交換（A E X）クロマトグラフィー、次にインライнстティックミキサーとサージタンクを用いるp H変化、次にフロースルーカチオン交換（C E X）クロマトグラフィーおよびウイルス濾過を用いる；および製剤化には、透析濾過／濃縮タンジェンシャルフロー濾過装置、次に滅菌濾過を用いる。1または2以上の滅菌フィルターも、プロセス全体を通して使用される。

【0022】

定義

10

本発明を詳細に記載する前に、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ず、それら自体は変更されてもよいことが理解されるべきである。本明細書および添付の請求の範囲において用いられる場合、文脈が明らかに異なることを示さない限りにおいて、単数形「a」「an」および「the」は、複数形の指示対象を含むことに留意しなければならない。したがって、例えば、「リガンド」は複数のリガンドを含み、「抗体」は複数の抗体を含み、他も同様である。

別に定義されない限り、本明細書において用いられる全ての技術および科学用語は、本発明が関連する分野の当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。以下の用語を、本明細書において記載されるような本発明の目的のために定義する。

【0023】

20

本明細書において用いられる場合、用語「標的分子」または「標的化合物」は、試料中の1または2以上の不純物から単離、分離または精製されるべき、任意の分子、物質もしくは化合物、またはそれらの混合物を指す。好ましい態様において、標的分子はタンパク質、または1もしくは2以上のタンパク質の混合物である。非常に好ましい態様において、標的分子は抗体である。代替的に、「標的分子」または「標的化合物」は、1または2以上の所望の化合物から除去されるべき不所望の化合物であり得る。

【0024】

30

用語「抗体」は、抗原に特異的に結合する能力を有するタンパク質を指す。典型的には、抗体は、2つの重鎖および2つの軽鎖からなる基本的な4ポリペプチド鎖構造を有しており、前記鎖は、例えば鎖間ジスルフィド結合により安定化されている。抗体は、モノクローナルであってもポリクローナルであってもよく、単量体形態で存在しても多量体形態で存在してもよく、例えば、五量体形態で存在するI g M抗体、および／または単量体、二量体もしくは多量体形態で存在するI g A抗体であってもよい。抗体はまた、多選択性抗体（例えば二選択性抗体）、および、リガンド特異的結合ドメインを保持するかまたはそれを含むように改変される限りにおいて、抗体フラグメントを含んでもよい。用語「フラグメント」とは、インタクトもしくは完全な抗体または抗体鎖よりも少ないアミノ酸残基を含む抗体または抗体鎖の一部または部分を指す。フラグメントは、インタクトもしくは完全な抗体または抗体鎖の、化学的または酵素的処理を介して得ることができる。フラグメントはまた、組換え的手段により得ることができる。組換えにより生成される場合、フラグメントは、単独で、または融合タンパク質と称されるより大きなタンパク質の一部として、発現させることができる。例示的なフラグメントとして、F a b、F a b'、F (a b') 2、F c および／またはF v フラグメントが挙げられる。例示的な融合タンパク質としては、F c 融合タンパク質が挙げられる。本発明により、融合タンパク質はまた、用語「抗体」により包含される。

40

【0025】

上で議論されるように、一部の態様において、抗体は、F c 領域を含有するタンパク質、例えば免疫グロブリンである。一部の態様において、F c 領域を含有するタンパク質は、別のポリペプチドまたはそのフラグメントに融合した免疫グロブリンのF c 領域を含む、組換えタンパク質である。例示的なポリペプチドとして、例えば以下が挙げられる：レニン；ヒト成長ホルモンおよびウシ成長ホルモンを含む成長ホルモン；成長ホルモン放出

50

因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リボタンパク質； - 1 - アンチトリプシン；インスリン鎖；インスリン鎖；プロインスリン；卵胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体ホルモン；グルカゴン；VIIIC因子、IX因子、組織因子およびフォン・ウヴィルブラント因子などの凝固因子；プロテインCなどの抗凝固因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺サーファクタント；ウロキナーゼまたはヒト尿もしくは組織型プラスミノーゲン活性化因子(t-PAs)などの、プラスミノーゲン活性化因子；ボンベシン；トロンビン；造血系増殖因子；腫瘍壞死因子- および- ；エンケファリナーゼ；ランテス(RANTES: regulated on activation normally T-cell expressed and secreted)；ヒトマクロファージ炎症タンパク質(MIP-1-)；ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミン；ミュラー管抑制因子；リラキシン鎖；リラキシン鎖；プロリラキシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド； - ラクタマーゼなどの微生物タンパク質；DNAse；IgE；細胞障害性Tリンパ球関連抗原(CTLA)(例えば、CTLA-4)；インヒビン；アクチビン；血管内皮増殖因子(VEGF)；ホルモンまたは増殖因子のための受容体；プロテインAまたはD；リウマトイド因子；骨由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン-3、-4、-5、もしくは-6(NT-3、NT-4、NT-5またはNT-6)などの神経栄養因子、またはNGF-などの神経増殖因子；

【0026】

血小板由来増殖因子(PDGf)；FGFおよびFGFなどの線維芽細胞増殖因子；上皮増殖因子(EGF)；TGF-1、TGF-2、TGF-3、TGF-4またはTGF-5を含むTGF-アルファおよびTGF-などのトランスフォーミング増殖因子(TGF)；インスリン様増殖因子-Iおよび-II(IGF-IおよびIGF-II)；des(1-3)-IGF-I(脳IGF-I)、インスリン様増殖因子結合タンパク質(IGFBP)；CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD34、およびCD40などのCDタンパク質；エリスロポエチン；骨誘導因子；イムノトキシン；骨形成タンパク質(BMP)；インターフェロン-、-、および-などのインターフェロン；コロニー刺激因子(CSF)、例えばM-CSF、GM-CSFおよびG-CSF；インターロイキン(IL)、例えば、IL-1～IL-10；スーパーオキシドジムスター；T細胞受容体；表面膜(surface membrane)タンパク質；崩壊促進因子；例えばAIDSエンベロープの一部などのウイルス抗原；輸送タンパク質；ホーミング受容体；アドレシン；調節タンパク質；CD1_Ia、CD1_Ib、CD1_Ic、CD18、ICAM、VLA-4およびVCAMなどのインテグリン；HER2、HER3またはHER4受容体などの腫瘍関連抗原；ならびに上で列記されるポリペプチドのいずれかのフラグメントおよび/またはバリアント。さらに、本発明による抗体は、上で列記されるポリペプチドのいずれかに特異的に結合する任意のタンパク質またはポリペプチド、そのフラグメントまたはバリアントである。

【0027】

本明細書において用いられる場合、および特に指定されない限り、用語「試料」は、標的分子を含有する任意の組成物または混合物を指す。試料は、生物学的ソースまたは他のソースから誘導することができる。生物学的ソースとして、植物および動物細胞、組織または器官などの、真核生物または原核生物のソースが挙げられる。試料はまた、標的分子と混合されて見出される希釈剤、バッファー、洗剤、および混入する種、デブリなどを含んでもよい。試料は、「部分的に精製され」ていても(すなわち、濾過ステップなどの1または2以上の精製ステップに供されていても)、または、標的分子を生成する宿主細胞または生物から直接的に得てもよい(例えば、試料は、収集された細胞培養液を含んでもよい)。

用語「不純物」または「混入物」とは、本明細書において用いられる場合、任意の外来のまたは好ましくない分子を指し、本発明のプロセスを用いて1または2以上の外来のまたは好ましくない分子から分離されている標的分子を含む試料中に存在し得る、DNA、RNA、1または2以上の宿主細胞タンパク質、エンドトキシン、脂質、および1または2以上の添加物などの生物学的巨大分子を含む。

10

20

30

40

50

【0028】

さらに、かかる不純物は、本発明の方法に先立って行われてもよいステップにおいて用いられる、任意の試薬を含んでもよい。

用語「精製する」、「分離する」、または「単離する」は、本明細書において交換可能に用いられ、標的分子および1または2以上の不純物を含む組成物または試料からの、標的分子の純度の程度を増大させることを指す。典型的には、標的分子の純度の程度は、組成物から少なくとも1つの不純物を（完全にまたは部分的に）取り除くことにより、増大する。

用語「結合および溶出モード」および「結合および溶出プロセス」は、本明細書において交換可能に用いられ、試料中に含有される少なくとも1つの生成物（例えば、Fc領域を含有するタンパク質）をクロマトグラフィー用樹脂または媒質に結合させて、それをその後に溶出させる、生成物分離技術を指す。10

【0029】

本明細書において用いられる場合、用語「リザーバ」とは、本明細書において用いられる場合、任意の容器、タンクまたはバッグであって、本発明の方法を行う場合に用いられるべき任意のバッファー、または本発明の方法において用いられるであろう試料もしくは任意の他の液体を貯蔵するために用いることができるものを指す。さらに「リザーバ」は、任意の容器、タンクまたはバッグであって、プロセスステップのアウトプット（例えば、カラムからの溶出液）を収集するために使用されるものを指す。

用語「クロマトグラフィー」とは、混合物中に存在する他の分子から目的の分析物（例えば標的分子）を分離する任意の種類の技術を指す。通常、標的分子は、移動相の影響下において、または結合および溶出プロセスにおいて、混合物の個々の分子が固定媒体中を通して移動する速度の差異の結果として、他の分子から分離される。20

【0030】

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、本明細書において相互交換可能に用いられ、任意の種類の粒子状吸着剤、樹脂または固相であって、分離プロセスにおいて、混合物中に存在する他の分子から標的分子（例えば、免疫グロブリンなどのFc領域を含有するタンパク質）を分離するものを指す。通常、標的分子は、移動相の影響下において、または結合および溶出プロセスにおいて、混合物の個々の分子がマトリックス中を通じて移動する速度の差異の結果として、他の分子から分離される。樹脂粒子からなるマトリックスを、カラムまたはカートリッジ中に入れることができる。マトリックスを形成するための材料の例として、多糖（アガロースおよびセルロースなど）；ならびにシリカ（例えば孔制御ガラス）、ポリ（スチレンジビニル）ベンゼン、ポリアクリルアミド、セラミック粒子および上のいずれかの誘導体などの、他の機械的に安定なマトリックスが挙げられる。典型的には、マトリックスは1または2以上のタイプのリガンドを担持する。30

【0031】

「リガンド」とは、クロマトグラフィーマトリックスに付着して、当該マトリックスの結合特性を決定する官能基である。「リガンド」の例として、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、thiophilic相互作用基、金属アフィニティ基、アフィニティー基、バイオアフィニティー基、およびミックスモード基（前述のものの組み合わせ）が挙げられる。本明細書において用いることができる幾つかの好ましいリガンドとして、限定されないが、スルホプロピル、スルホン酸などの強力なカチオン交換基；トリメチル塩化アンモニウムなどの強力なアニオン交換基；カルボン酸などの弱いカチオン交換基；N,NジエチルアミノまたはDEAEなどの弱いアニオン交換基；フェニル、ブチル、プロピル、ヘキシルなどの疎水性相互作用基；ならびに、プロテインA、プロテインGおよびプロテインLなどのアフィニティー基が挙げられる。40

【0032】

用語「アフィニティークロマトグラフィー」とは、標的タンパク質（例えば、目的のFc領域を含有するタンパク質または抗体）が、当該標的タンパク質に対して特異的なリガ50

ンドに特異的に結合する、タンパク質分離技術を指す。かかるリガンドは、一般に、生物特異的リガンドとして言及される。一部の態様において、生物特異的リガンド（例えば、プロテインAまたはその機能的バリアント）は、クロマトグラフィーマトリックス材料に共有結合し、溶液が当該クロマトグラフィーマトリックスに接触した際に、当該液中の標的タンパク質にアクセス可能である。標的タンパク質は、一般に、クロマトグラフィーのステップの間、生物特異的リガンドに対するその特異的結合アフィニティーを保持するが、一方、混合物中の他の溶質および／またはタンパク質は、当該リガンドに対して、感知できるほどには、または特異的には、結合しない。固定されたリガンドへの標的タンパク質の結合により、標的タンパク質を固相材料上に固定されたリガンドに特異的に結合させたまで、混入しているタンパク質またはタンパク質不純物をクロマトグラフィーマトリックスに通過させることが可能になる。特異的に結合した標的タンパク質を、次いで、活性形態において、固定されたリガンドから、好適な条件下（例えば、低pH、高pH、高塩、競合するリガンドなど）において取り除き、前にカラムを通過させられた混入タンパク質またはタンパク質不純物フリーで、溶出バッファーによりクロマトグラフィーカラムを通過させる。そのそれぞれの特異的結合タンパク質、例えば抗体を精製するために、任意の成分をリガンドとして用いてよい。しかし、本発明による多様な方法において、プロテインAを、Fc領域を含有する標的タンパク質のためのリガンドとして用いる。生物特異的リガンド（例えばプロテインA）からの標的タンパク質（例えば、Fc領域を含有するタンパク質）の溶出のための条件は、当業者により、容易に決定され得る。一部の態様において、プロテインGもしくはプロテインLまたはそれらの機能的バリアントを、生物特異的リガンドとして用いてよい。一部の態様において、Fc領域を含有するタンパク質への結合、生物特異的リガンド／標的タンパク質コンジュゲートの洗浄または再平衡化のために、プロテインAなどの生物特異的リガンドを、5～9のpH範囲において用い、その後、約4またはそれより低いpHを有する、少なくとも1つの塩を含有するバッファーにより溶出する。
10

【0033】

用語「イオン交換」および「イオン交換クロマトグラフィー」とは、目的の溶質または分析物が、混合物中の溶質不純物または混入物より高くまたは低く、荷電された化合物と非特異的に相互作用するように、混合物中の目的の溶質または分析物（例えば、Fc領域を含有する標的タンパク質）が、固相イオン交換材料に結合（共有結合によるものなど）した荷電された化合物と相互作用する、クロマトグラフィーのプロセスを指す。混合物中に混入している溶質は、イオン交換材料のカラムから、目的の溶質より速くまたは遅く溶出するか、目的の溶質に相対的に樹脂に結合するかまたはこれから取り除かれる。「イオン交換クロマトグラフィー」は特に、カチオン交換、アニオン交換およびミックスモードイオン交換クロマトグラフィーを含む。例えば、カチオン交換クロマトグラフィーを、標的分子（例えば、Fc領域を含有する標的タンパク質）に結合させ、その後溶出させても（カチオン交換結合および溶出クロマトグラフィーまたは「CIEX」）、あるいは、標的分子がカラムを貫流する間に、不純物に優先的に結合してもよい（カチオン交換フロースルーコロマトグラフィーFT-CIEX）。アニオン交換クロマトグラフィーは、標的分子（例えば、Fc領域を含有する標的タンパク質）を結合してその後溶出することも、標的分子がカラムを貫流する間に、不純物に優先的に結合することもできる。一部の態様において、および本明細書に記載される例において示されるように、アニオン交換クロマトグラフィーステップは、フロースルーモードにおいて行われる。
20

【0034】

句「イオン交換マトリックス」とは、負に荷電（すなわちカチオン交換樹脂）または正に荷電（すなわちアニオン交換樹脂）されたクロマトグラフィーマトリックスを指す。電荷は、例えば共有結合によって、1または2以上の荷電されたリガンドをマトリックスに付着させることにより、提供することができる。代替的に、またはさらに、電荷はマトリックスの固有の特性であってもよい（例えば、全体的に負の電荷を有するシリカについての場合のように）。

10

20

30

40

50

【0035】

「カチオン交換マトリックス」とは、負に荷電したクロマトグラフィーマトリックスを指し、これはしたがって、固相の上または中を通過する水溶液中のカチオンとの交換のための、遊離のカチオンを有する。固相に付着してカチオン交換樹脂を形成する負に荷電されたリガンドは、例えばカルボン酸またはスルホン酸であつてよい。市販のカチオン交換樹脂として、カルボキシメチルセルロース、アガロース上に固定されたスルホプロピル(S P) (例えば、SP-SEPHAROSE FAST FLOW (商標) またはSP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE (商標) 、Pharmacia製) およびアガロース上に固定されたスルホニル (例えばS-SEPHAROSE FAST FLOW (商標) 、Pharmacia製) が挙げられる。好ましいものは、Fractogel (登録商標) EMD SO₃、Fractogel (登録商標) EMD SE Highcap、Eshmuno (登録商標) SおよびFractogel (登録商標) EMD COO (Merck) である。

10

【0036】

「ミックスモードイオン交換マトリックス」とは、カチオン性および/またはアニオン性ならびに疎水性の部分で共有的に修飾されているクロマトグラフィーマトリックスを指す。市販のミックスモードイオン交換樹脂は、シリカゲル固相支持マトリックスに付着した弱いカチオン交換基、低濃度のアニオン交換基、および疎水性リガンドを含有する、BAKERBOND ABX (商標) (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) である。ミックスモードカチオン交換材料は、典型的には、カチオン交換基および疎水性部分を有する。好適なミックスモードカチオン交換材料は、Capto (登録商標) MMC (GE Healthcare) およびEshmuno (登録商標) HCX (Merck) である。ミックスモードアニオン交換材料は、典型的には、アニオン交換基および疎水性部分を有する。好適なミックスモードアニオン交換材料は、Capto (登録商標) Adhere (GE Healthcare) である。

20

【0037】

用語「アニオン交換マトリックス」は、本明細書において、正に荷電した、例えばそれに付着した四級アミノ基などの1または2以上の正に荷電されたリガンドを有する、クロマトグラフィーマトリックスを指す。市販のアニオン交換樹脂として、DEAEセルロース、QAE SEPHADEX (商標) およびFAST Q SEPHAROSE (商標) (Pharmacia) が挙げられる。好ましい材料は、Fractogel (登録商標) EMD TMAE、Fractogel (登録商標) EMD TMAE highcap、Eshmuno (登録商標) QおよびFractogel (登録商標) EMD DEAEである。

30

用語「プロテインA」および「Protein A」は、本明細書において相互交換可能に用いられ、そのネイティブのソースから回収されたプロテインA、合成で(例えば、ペプチド合成により、または組換え技術により)生成されたプロテインA、および、Fc領域などのCH₂/CH₃領域を有するタンパク質に結合する能力を保持するそれらのバリアントを包含する。プロテインAは、Repligen、PharmaciaおよびFermatechから市販で購入することができる。プロテインAは、一般に、クロマトグラフィーマトリックス上に固定される。用語「Protein A」はまた、プロテインAが共有結合するクロマトグラフィー用固体支持マトリックスを含有する、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスまたはカラムを指す。

【0038】

本発明による方法において用いられるプロテインAの機能的誘導体、フラグメントまたはバリアントは、マウスIgG2aまたはヒトIgG1のFc領域について、少なくともK = 10⁻⁸ M、および好ましくはK = 10⁻⁹ Mの結合定数により特徴づけることができる。結合定数についてのかかる値を遵守する相互作用は、本文脈において「高アフィニティー結合」と称される。好ましくは、プロテインAのかかる機能的誘導体またはバリアントは、天然のドメインE、D、A、B、C、またはその操作された変異体であつてIgG結合機能を保持しているものから選択される、野生型プロテインAの機能的IgG結合ドメインの少なくとも一部を含む。

40

また、一点付着(single-point attachment)を可能にするように操作されたプロテインAの誘導体またはバリアントもまた、請求される方法におけるアフィニティークロマトグラフィーステップにおいて用いることができる。

50

【0039】

一点付着は、一般に、タンパク質部分が、単一の共有結合を介してプロテインAアフィニティークロマトグラフィーのクロマトグラフィー支持材料に付着することを意味する。かかる一点付着はまた、NまたはC末端の近傍、またはタンパク質折り畳みの外周のどこかにおける、暴露されたアミノ酸位置に、すなわちループにおいて位置する、好適な反応性残基の使用によっても起こる。好適な反応性基は、例えばスルフヒドリルまたはアミノ官能基である。

用語「アフィニティークロマトグラフィーマトリックス」は、本明細書において、アフィニティークロマトグラフィーに好適なリガンドを担持するクロマトグラフィーマトリックスを指すように用いられる。典型的には、リガンド（例えば、プロテインAまたはその機能的バリアント）は、クロマトグラフィーマトリックス材料に共有結合しており、溶液がクロマトグラフィーマトリックスと接触した際に、溶液中の標的分子に対してアクセス可能である。アフィニティークロマトグラフィーマトリックスの一例は、プロテインAマトリックスである。アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは典型的には、抗原／抗体または酵素／受容体結合などのロック／キー機構に基づき、高い特異性で標的分子に結合する。

アフィニティーマトリックスの例は、SEPHAROSE（商標）またはPROSEP（登録商標）-Aなどの、プロテインAリガンドを担持するマトリックスである。

【0040】

用語「結合する」とは、本明細書において、標的分子（例えば、Fc領域を含有するタンパク質）とマトリックスに付着したリガンド（例えば、固相マトリックスまたは樹脂に結合したプロテインA）との間の相互作用を記載するために用いられる場合、例えば、結合部位におけるタンパク質およびリガンドの構造の空間的相補性と、結合部位における静電力、水素結合、疎水力、および／またはファンデルワールス力との組み合わせ効果を通しての、標的分子のリガンドへの一般には可逆的な結合を指す。一般に、空間的相補性が高いほど、および結合部位における他の力が強いほど、タンパク質のそのそれぞれのリガンドに対する結合特異性は高くなるであろう。特異的結合の非限定的な例として、抗体-抗原結合、酵素-基質結合、酵素-コファクター結合、金属イオンキレート、DNA結合タンパク質-DNA結合、調節タンパク質-タンパク質相互作用などが挙げられる。理想的には、アフィニティークロマトグラフィーにおいては、特異的結合は、遊離溶液（free solution）中で、約 10^{-4} ～ 10^{-8} Mのアフィニティーにより起こる。

【0041】

用語「洗剤」とは、ポリソルベート（例えばポリソルベート20または80）；ポリクサマー（例えばポリクサマー188）；Triton；ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）；ラウリル硫酸ナトリウム；オクチルグリコシドナトリウム；ラウリル-、ミリスチル-、リノレイル-、またはステアリル-スルホベタイン；ラウリル-、ミリスチル-、リノレイル-、またはステアリル-サルコシン；リノレイル-、ミリスチル-、またはセチル-ベタイン；ラウロアミドプロピル-、コカミドプロピル-、リノールアミドプロピル-、ミリスタミドプロピル-、パルミドプロピル-、またはイソステアラミドプロピル-ベタイン（例えばラウロアミドプロピル）；ミリスタミドプロピル-、パルミドプロピル-、またはイソステアラミドプロピル-ジメチルアミン；メチルココイルナトリウム-、またはメチルオレイルタウリン酸二ナトリウム；およびMONAQUAT（商標）シリーズ（Mona Industries, Inc., Paterson, N. J.）などの、イオン性および非イオン性界面活性剤を指す。有用な洗剤は、ポリソルベート20（TWEEN 20（登録商標））またはポリソルベート80（TWEEN 80（登録商標））などのポリソルベート、またはオクタン酸などの多様な酸である。

【0042】

「バッファー」は、その酸-塩基コンジュゲート成分の作用によりpHの変化を耐容する溶液である。例えばバッファーの所望されるpHに依存して使用することができる多様なバッファーは、Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems, Gueffroy, D.編、Calbiochem Corporation (1975年)において記載され

10

20

30

40

50

る。バッファーの非限定的な例として、MES、MOPS、MOPSO、Tris、HEPES、リン酸、酢酸、クエン酸、コハク酸、およびアンモニウムバッファー、ならびにこれらの組み合わせが挙げられる。

本発明によれば、用語「バッファー」または「溶媒」は、分離ユニットをロード、洗浄、溶出、および再平衡化するために使用される任意の液体組成物について用いられる。

【0043】

分離カラムに「ロードする」場合、バッファーは、標的分子（例えば、Fc領域を含有する標的タンパク質）と1または2以上の不純物を含む試料または組成物を、クロマトグラフィーカラム（例えば、アフィニティーカラムまたはイオン交換カラム）上にロードするために用いられる。バッファーは、標的分子はクロマトグラフィーマトリックスに結合するが、一方、理想的には全ての不純物は当該カラムに結合せずそれを貫流するような、伝導率および/またはpHを有する。

標的分子を「貫流させる」ために分離カラムに「ロードする」場合、バッファーは、標的分子（例えば、Fc領域を含有する標的タンパク質）と1または2以上の不純物を含む試料または組成物を、クロマトグラフィーカラム（例えば、アフィニティーカラムまたはイオン交換カラム）上にロードするために用いられる。バッファーは、標的分子はクロマトグラフィーマトリックスに結合せずカラムを貫流するが、一方、理想的には全ての不純物は当該カラムに結合するような、伝導率および/またはpHを有する。

【0044】

用語「再平衡化する」とは、標的分子をロードする前にクロマトグラフィーマトリックスを再平衡化するための、バッファーの使用を指す。典型的には、ローディングバッファーは、再平衡化のために用いられる。

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」により、バッファーなどの適切な液体を、マトリックスの中または上を通過させることが意味される。典型的には、洗浄は、標的分子を溶出させる前に、マトリックスから弱く結合した混入物を取り除くため、および/または未結合もしくは弱く結合した標的分子を取り除くために、用いられる。

この場合において、典型的には、洗浄バッファーとローディングバッファーは同一である。ウイルス不活化バッファーが用いられる場合、それは、標的分子を溶出させる前に、特定の存在するウイルスを不活化するために用いられる。この場合において、典型的には、ウイルス不活化バッファーは、ローディングバッファーとは異なる。なぜならば、それは、1種または2種以上の洗剤を含有するか、または異なる特性（pH/伝導率/塩およびそれらの量）を有する場合があるからである。

【0045】

クロマトグラフィーマトリックスから分子（例えば、目的のポリペプチドまたは不純物）を「溶出させる」とは、バッファーが目的の分子とクロマトグラフィー樹脂上のリガンド部位について競合するように、溶液の条件を変更することにより、クロマトグラフィーマトリックスから分子を取り除くことを意味する。非限定的な例は、バッファーがイオン交換材料上の荷電された部位について分子と競合するように、イオン交換材料を取り囲むバッファーのイオン強度を変更することにより、イオン交換樹脂から分子を溶出させることである。

本発明によれば、「分離ユニット」は、クロマトグラフィーによる分離ステップを実行することができる設備である。分離ユニットは、典型的には、吸着剤マトリックスで充填されたクロマトグラフィーカラムまたはクロマトグラフィーカートリッジである。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、典型的には、液体入口および液体出口のための末端接続器具（end-fitting）を備えたカラムチューブを含む。カラムチューブは、好適なクロマトグラフィーマトリックスで充填される。

【0046】

本発明によれば、「連続的（continuous）」プロセスとは、バッチモードで実行されないプロセスである。本発明による連続的プロセスにおいて、新たな試料は、1または2以

10

20

30

40

50

上の分離ユニットに連続的に、間に任意の中斷なしでロードされる。本発明による連続的プロセスにおいて、フィードが停止されることはない。

本発明によれば、「半連續的プロセス」とは、フィードが少なくとも一回、典型的には数回、逐次的な様式で中断されるプロセスである。

本発明によれば、「逐次的(sequential)」とは、2回または3回以上である。

【0047】

本発明によれば、「接続線」は、それらを通して液体を流すために好適である任意のチューブ、ホース、パイプまたはチャネルである。接続線は、1または2以上の弁により断続されていてもよい。接続線は、直線状であっても分枝状であってもよい。

本発明によれば、装置の2つの部分が「流体接続(fluid connection)にある」場合、それは、装置の2つの部分の間に、液体が一方の部分から他方へ流れることができるような接続線が存在することを意味する。この接続線は、直接的であっても、あるいは1または2以上の弁により、分離ユニットまたは装置の他の部分により、断続されていてもよい。用語「流体接続にある」とは、永続的である流体接続を包含するが、それはまた、永続的でなく、接続線を通る液体のフローが、必要な場所であればどこでも開始して停止することができるよう、例えば1または2以上の弁により断続される接続線から作られるものも包含する。典型的には、流体接続にある装置の部分のほとんどは、永続的ではない流体接続を有する。例えば、バッファーリザーバが分離ユニットと流体接続にある場合、これは、バッファーのカラムへのフローは必要な場合に実現することができるが、典型的には、必要な時に液体のフローを停止させ、必要な時に開始することができるよう、リザーバと分離ユニットとの間の接続線に位置する少なくとも1つの弁が存在することを意味する。

【0048】

液体のフローが、液体接続にある装置の2つの部分の間で実際に実現され、したがって液体が、2つの部分の間の接続線を貫流していれば、これらの2つの部分は、「流体連通」にある。その結果、本発明による「流体連通」とは、液体が接続線を貫流することによって、「流体接続」が実際に用いられている状態を記述する。システムの2つの部分が部分的に流体連通にある場合、それは、流体連通が永続的でなく、液体は、一方の部分から他方へ永続的には流動せず、一部の時間にのみ流動することを意味する。典型的には、システムの2つの部分の間の液体のフローは、液体のフローを指揮する弁の補助により開始および/または停止される。

【0049】

「流体入口」または「入口」は、液体の導入を可能にする任意の手段である。分離ユニット入口は、例えば、接続線を接続することができる、クロマトグラフィーカラムの末端接続器具である。入口はまた、接続線における液体の導入を提供する弁であってもよい。入口はまた、接続線の末端であってもよい。

「出口」または「流体出口」は、液体の取出しを可能にする任意の手段である。分離ユニット出口は、例えば、接続線を接続することができる、クロマトグラフィーカラムの末端接続器具である。出口はまた、接続線における液体の導入を提供する弁であってもよい。出口はまた、接続線の末端であってもよい。

【0050】

「流体選択弁」は、任意の接続された流体とシステムの部分との間で選択的に流体連通を可能にする任意の手段である。流体選択弁は、例えば、接続線を接続することおよび選択的に選択することができる、分離ユニット入口より前にある弁であって、選択された線と分離ユニット入口との間の流体連通を可能にすることができるものである。流体選択弁は、例えば、接続線を接続することおよび選択的に選択することができる、分離ユニット出口の後にある弁であって、選択された線と分離ユニット出口との間の流体連通を可能にすることができるものである。流体選択弁はまた、接続線における液体の導入を提供する弁であってもよい。流体選択弁はまた、接続線の末端であってもよい。

「溶媒選択弁」は、任意の接続された溶媒リザーバとシステムの部分との間で選択的に

10

20

30

40

50

流体連通を可能にする、流体選択弁である。溶媒選択弁は、例えば、溶媒リザーバから接続線を接続することができ、選択的に選択することができる、溶媒ポンプより前にある弁であって、選択された溶媒とポンプとの間の流体連通を可能にするものである。

【0051】

「流体選択弁」および「溶媒選択弁」は、同一の型のものであっても異なる型のものであってもよい。

溶媒送達システムは、液体の送達を可能にするシステムである。典型的には、装置の溶媒送達システムは、少なくとも1つのリザーバ、および、液体をリザーバから該リザーバと液体接続にある装置の別の部分へと輸送する少なくとも1つのポンプを含む。当業者には公知であるが、液体がリザーバから分離ユニットへと移動される場合は毎回、これは、ポンプの補助により行われる。ポンプはまた、2または3以上のリザーバから来る2または3以上の液体の流れを混合するために用いることができる。10

【0052】

用語「フィード」は、分離されるべき2つ以上の化合物を含有する液体をいう。この文脈において、用語「化合物」は、分子、化学的化合物(chemical compound)、細胞などの任意の実体に対して、広い意味で使用されている。典型的には、フィードは、標的分子を含有する試料である。

用語「ブレークスルー」とは、充填されたクロマトグラフィーカラムなどのクロマトグラフィーマトリックスまたは分離ユニットへのフィードの添加の間に、マトリックス上に吸着される化合物が、最初にアウトフローに現れる時点を意味する。言い換えれば、「ブレークスルー」は、標的化合物の損失が始まる時点である。20

用語「再生」は本明細書において、クロマトグラフィーマトリックスを処理して、これをクロマトグラフィーで再び有用にするプロセスを意味する。したがって「再生」は、化合物の溶出としても知られている結合した化合物の放出、ならびに適切な吸着バッファーを使用する再平衡化を含む。後述するように、「再生」はまた、定置洗浄(CIP)を含んでよい。

【0053】

用語「フロープログラミング」とは、フィードをクロマトグラフィーカラムに適用する間の、フィード流量における意図的な変化を意味する。

用語「キャップチャー」とは、クロマトグラフィー法の文脈において、多量の標的化合物を捕獲(キャップチャー)する最初のクロマトグラフィーステップを意味する。30

「完全結合」とは、例えば充填されたクロマトグラフィーカラムのクロマトグラフィーマトリックスが、多量の目的化合物を吸着したために、与えられた条件下でそれ以上吸着することができなくなった時点を意味する。典型的には、完全結合は、マトリックスが、対応する静的結合容量測定の間に推定されたその元の容量の60%以上を吸着したときに到達される。

【0054】

ローディング時間とは、充填されたクロマトグラフィーカラムなどの吸着剤を飽和させて、その「完全結合」状態にするのに必要な時間を意味する。

用語「平均粒子径」またはd₅₀は、累積粒子径分布の50%での、平均粒子径分布値を意味する。40

用語「平均細孔サイズ」とは、累積細孔サイズ分布の50%での、平均細孔サイズ分布値を意味する。

【0055】

本明細書で使用する場合、用語「清澄化する」、「清澄化」および「清澄化ステップ」は、懸濁粒子およびまたはコロイドを除去して、標的分子含有溶液の、NTU(比濁度単位)で測定される濁度を低減するプロセスステップを指す。清澄化は、遠心分離、沈降または濾過を含む、種々の手段によって達成することができる。遠心分離は、バッチまたは連続モードで行うことができ、一方濾過は、通常のフロー(例えばデブス濾過)またはタンジェンシャルフローモードで行うことができる。今日の産業で使用されるプロセ50

スにおいて、遠心分離には典型的にはデプスフィルターが続き、これは、遠心分離により除去されていない可能性のある不溶性の不純物を除去することを目的とする。さらに、清澄化効率を向上させるための方法を使用することができ、例えば沈殿である。不純物の沈殿は種々の手段により、例えばフロキュレーション、pH調整（酸沈殿）、温度変化、刺激応答性ポリマーまたは小分子による相変化、またはこれらの方法の任意の組み合わせにより、行うことができる。本明細書に記載の一部の態様において、清澄化は、遠心分離、濾過、デプス濾過および沈殿の2または3以上の任意の組み合わせを含む。一部の態様において、本明細書に記載のプロセスおよびシステムは、遠心分離の必要性を取り除く。

【0056】

用語「沈殿させる」、「沈殿している」または「沈殿」は本明細書において用いる場合、望ましくない不純物の性質を改変して、それらをより容易に可溶性の標的分子から分離されるようにする、清澄化で使用されるプロセスを指し、例えば、化合物を可溶性の状態から沈殿させて不溶性の状態にすること、または細かい粒子を溶液から凝集させること（agglutinating）および／または凝集させること（aggregating）によって、それらの沈下および／または濾過および／または遠心分離が改善され、したがって濁度の低減が達成される。これは典型的には、望ましくない不純物を含む、大きな凝集粒子および／または不溶性の錯体を形成することによって達成される。これらの粒子は、それらを可溶性の標的分子を含有する液相から、濾過または遠心分離などによってより容易に分離することができるよう特性（例えば密度またはサイズ）を有している。いくつかのケースでは相変化が行われて、望ましくない不純物を可溶性標的分子からより容易に分離することができるようになっている。相変化による沈殿は、ポリマーまたは小分子などの沈殿剤を添加することによって行うことができる。特定の態様において、沈殿剤は、スマートポリマーとも称される刺激応答性ポリマーである。本明細書に記載の一部の態様において、沈殿剤（precipitant）または沈殿剤（precipitating agent）は凝集剤である。フロキュレーションは、本明細書で使用する場合、性能が典型的には使用される凝集剤濃度に依存するところの（「用量依存性」）、沈殿を実行する一方法である。典型的な凝集剤は、逆に荷電した不純物と錯体化するポリカチオンなどの、高分子電解質である。

【0057】

本明細書に記載の一部の態様において、清澄化には、標的分子と1または2以上の不純物とを含む試料への沈殿剤の添加が用いられる。いくつかの場合には、溶液条件の変化（例えば、温度、pH、塩分など）を用いて、例えば刺激応答性ポリマーの場合のように、沈殿を開始させることができる。1または2以上の不純物を含む沈殿物質ならびに沈殿剤は除去され、それによって標的分子を液相中に回収し、ここで液体は次に典型的には、標的分子を精製するためにさらなるプロセステップに供される。

沈殿は、精製されるべき標的分子を発現する細胞培養物を含むバイオリアクター内で直接行ってもよく、ここで沈殿剤は、バイオリアクターに直接添加される。代替的に沈殿剤は、別の容器内で、典型的には標的分子を含有する細胞培養物に添加してもよい。

【0058】

沈殿した物質を除去するための、当業者に周知の多くの方法があり、例えば遠心分離、濾過または沈下、またはそれらの任意の組合せなどである。

本明細書で使用される「沈下」という用語は、沈殿した物質が重力の影響下で容器の底に移動する、沈降プロセスを指す。沈下に続いて、液相または上清のデカンテーションおよび／または濾過を行うことができる。

【0059】

本明細書において互換的に使用される用語「（単数）刺激」または「（複数）刺激」は、刺激応答性ポリマーによる応答を生じさせる、環境における物理的または化学的变化を意味する。したがって、かかるポリマーは刺激に応答性であり、この刺激はポリマーの溶解性の変化をもたらす。本明細書で使用される1または2以上のポリマーが応答する刺激の例としては、例えば、温度変化、伝導率の変化および／またはpHの変化を含むが、これらに限定されない。一部の態様において、刺激は、試料への錯化剤または錯体形成塩の

10

20

30

40

50

添加を含む。様々な態様において、刺激は一般に、ポリマーの試料への添加後に添加される。なお、刺激はまた、ポリマーの試料への添加中またはその前に添加してもよい。

【0060】

本明細書で用いられる用語「刺激応答性ポリマー」は、刺激を加えた後に物理的および／または化学的特性の変化を示す、ポリマーまたはコポリマーを指す。典型的な刺激応答は、ポリマーの溶解性の変化である。例えば、ポリマーのポリ(N - イソプロピルアクリルアミド)は、約 35 ℃ の温度で水溶性であるが、約 35 ℃ の温度で水に不溶性となる。特定の態様において、刺激応答性ポリマーは、多価イオン刺激(例えばリン酸の刺激) に応答する、ポリアリルアミンまたはポリビニルアミンポリマーである。

一部の態様において、細胞培養物は、1 または 2 以上の不純物を除去するために、デブスフィルターにかけられる。

【0061】

本明細書で用いられる用語「デブスフィルター」または「デブス濾過」は、単にフィルター表面だけでなく、フィルター媒体全体に粒子状物質を保持することができるフィルターを指す。本明細書に記載の一部の態様において、1 または 2 以上のデブスフィルターは、清澄化のプロセスステップで使用される。

一部の態様において、清澄化は、後に精製プロセスにおけるプロセスステップで使用されるフィルターまたはデバイスの汚染をもたらし得る、試料中の可溶性および／または不溶性不純物の除去をもたらし、これにより、全体的な精製プロセスをより経済的にする。

【0062】

用語「フロースループロセス」、「フロースルーモード」、および「フロースルーオペレーション」は、本明細書において交換可能に用いられて分離技術を指し、ここで、バイオ医薬製剤中に1 または 2 以上の不純物と共に含有される少なくとも1 つの標的分子(例えば、Fc 領域を含有するタンパク質または抗体) が、通常は1 または 2 以上の不純物に結合するが標的分子には通常結合しない(すなわち貫流する) 材料を、貫流することが意図されている。

本明細書において用いられる用語「結合および溶出モード」および「結合および溶出プロセス」とは、試料中に含有される少なくとも1 つの標的分子(例えば、Fc 領域を含有するタンパク質) を好適な樹脂または媒質(例えばアフィニティクロマトグラフィー用媒質またはカチオン交換クロマトグラフィー用媒質) に結合させて、それをその後に溶出させる、分離技術を指す。

【0063】

発明の詳細な説明

本発明は、高い結合容量を短い滞留時間で可能とする連続クロマトグラフィープロセスのための方法を、初めて提供する。

したがってこれは、高速であるだけでなく、経済的な精製(キャプチャー) 技術であり、指定のステップの生産性を通常は > 2 倍増加させる。我々の新規で革新的な方法論では、生産性(g (標的分子) / m l (充填床) / h (生成時間)) は、バッチプロセスの1 つより通常 6 ~ 10 倍高い範囲である。

【0064】

方法

本発明による方法は、特定タイプのクロマトグラフィーマトリックスと、特定タイプの連続クロマトグラフィープロセスとの組み合わせに基づく。

本発明の方法で使用されるクロマトグラフィーマトリックスは、粒子状吸着剤である。平均吸着剤粒子径(d 50) は、30 ~ 200 μm の間である。細孔は、40 nm ~ 300 nm の間の平均細孔サイズを有する。

【0065】

好みしい態様において、粒子の平均サイズは 40 ~ 120 μm 、より好みしくは 55 ~ 100 μm である。別の好みしい態様において、粒子は、平均細孔サイズが 50 ~ 150 nm 、最も好みしくは 60 ~ 100 nm の範囲の細孔を有する。

10

20

30

40

50

平均細孔サイズの値と平均粒子サイズの値は、集団の半分がこの値の上にあり、半分がこの値の下にある値として定義される。粒子径分布に対して、この平均細孔サイズはd₅₀と呼ばれる。

d₅₀とは、この直径より半分が上、半分が下に分布が分かれる、ミクロン単位で表したサイズである。d₅₀は、累積サイズ分布の50%に相当する。

【0066】

粒子サイズ推定のための標準的な方法は、イメージングおよび画像解析、光散乱技術、ふるい分け技術、沈降技術、音響分光技術などであってよい。(K.K. Unger et al. "Particled packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography - comparison and critical appraisal" J. Chrom. A. 1184 (2008) 393 - 415)。平均粒子径の値の推定に使用される特徴付け方法は、光散乱であった。本発明によれば、レーザー回折が直径30nmまでの粒子について用いられ、単一粒子光学感知(SPOS)が、0.5nm~400nmの間の直径を有する粒子に使用される。

細孔サイズは、インバースサイズ排除クロマトグラフィー、水銀侵入、ガス吸着技術などによって測定することができる(M. Thommes et al., "Textural characterization of native and n-alky-bonded silica monoliths by mercury intrusion/extrusion, inverse size exclusion chromatography and nitrogen sorption", J. Chrom. A, 2008)。

【0067】

細孔容積は、細孔サイズ推定に使用したものと同じ方法によって推定することができる。本発明によれば、平均細孔サイズ推定および平均細孔容積推定のために、マトリックスが乾燥状態の場合はその物理特性が変化するので、乾燥状態においては測定することができないマトリックスに対して、インバースサイズ排除クロマトグラフィーを用いる。乾燥状態で測定することができるマトリックスに対しては、窒素吸着法が使用される。

【0068】

粒子は、規則的または不規則に形成することができる。これらはクロマトグラフィー吸着剤に適した任意の材料で作ることができ、例えば多糖(例えばアガロースおよびセルロース)；および他の機械的に安定なマトリックス、例えばシリカ(例えば、孔制御ガラス)、ポリ(スチレンジビニル)ベンゼン、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、セラミック粒子、または、親水性置換されたアルキルビニルエーテル(例えば1,2-エタンジオールモノビニルエーテル、1,3-プロパンジオールモノビニルエーテル、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、1,6-ヘキサ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)のコポリマー、および架橋剤(例えば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)またはジビニルプロピレン尿素(1,3-ジビニルテトラヒドロピリミジン-2-オン))、および上記のいずれかの誘導体である。親水性置換されたアルキルビニルエーテルのコポリマーの例は、EP1910433に開示されている。好ましいのは、高剛性を示すために、1000cm/hを超える速度を適用可能な材料である。

【0069】

本発明による方法は、好ましくは、アフィニティーまたはイオン交換クロマトグラフィーに基づいているため、クロマトグラフィーマトリックスとして使用される粒子は、典型的には、プロテインAまたはその機能性バリアントなどのアフィニティーリガンド、またはイオン交換リガンドを担持する。

本発明による方法は、同一のクロマトグラフィーマトリックスを有する少なくとも3つの分離ユニットであって、これらが、液体が少なくとも、1つの分離ユニットから後続のものへと、および最後のものから第1の分離ユニットへと流れることができるよう接続された、前記分離ユニットの使用に基づく。すなわち、システムのすべての分離ユニットが、サークル状に接続されている(図1)。

【0070】

方法は、以下のステップを含む：

10

20

30

40

50

a) 同一のマトリックス、好ましくはアフィニティーまたはイオン交換クロマトグラフィーマトリックスを有する少なくとも 3 つの分離ユニットであって、これらが、液体が少なくとも、1 つの分離ユニットから後続のものへと、および最後のものから第 1 の分離ユニットへと流れることができるように接続された、前記分離ユニットを提供すること；

b) 試料を第 1 の分離ユニット上にフィードして、試料がこの分離ユニット上（ここで試料は、標的分子がこの分離ユニットに結合することを可能とする pH および伝導率にある）にロードされる間、前記分離ユニットは、ローディング時間の少なくとも一部において次の分離ユニットと流体連通しており、これにより前記第 1 分離ユニットに結合していない標的分子が、次の分離ユニットに（図 2 a）、ロードされている分離ユニットともロードされている分離ユニットと流体連通しているものとも異なる 1 つの分離ユニットを少なくとも溶出（図 2 c）、および再平衡化（図 2 e）するのと同時に、結合することができるようにすること。これは、クロマトグラフィー分離プロセスで必要とされる洗浄、溶出、および再平衡化などの他のプロセスステップが、分離ユニットと流体連通していない 1 または 2 以上の分離ユニットまたはロードされているユニット上で実施されることを意味する。

【 0 0 7 1 】

c) フィードを、次の分離ユニットへと切り替えること。これは、その時丁度ロードされた分離ユニットが完全にロードされたときに、この分離ユニットへの試料のフィードが停止され、中断なしの同時のシステム弁の操作により、フィードはサークル内の次の分離ユニットへと向けられる（図 3 b）。サークル内の次の分離ユニットは、ローディング時間の少なくとも一部の前に、ロードされた分離ユニットの出口に接続されていたものである。したがって、この分離ユニットには、第 1 の分離ユニットに結合しなかった標的分子が、既に部分的にロードされている。

d) 試料を次の分離ユニット上にフィードして、試料が前記次の分離ユニット上（ここで試料は、標的分子が前記次の分離ユニットに結合することを可能とする pH および伝導率にある）にロードされている間、前記次の分離ユニットは、ローディング時間の少なくとも一部において、次の後の分離ユニットと流体連通しており、これにより前記次の分離ユニットに結合していない標的分子が、次の後の分離ユニットに、ロードされている分離ユニットともロードされている分離ユニットと流体連通しているものとも異なる 1 つの分離ユニットを少なくとも溶出および再平衡化するのと同時に、結合することができるようにすること、

e) ステップ c) および d) を 1 または 2 回以上繰り返すこと。

【 0 0 7 2 】

本発明の連続法が実行される時間の間、フィードが停止されることではなく、これは 800 cm / h を超える速度を有する。好ましくは、これは 1000 cm / h を超える速度を有する。

また、分離ユニットのクロマトグラフィーマトリックスは、平均粒子径が 30 ~ 200 μm で、平均細孔径が 40 nm ~ 300 nm の範囲の粒子を含む。

好ましい態様において、追加の洗浄ステップを行って（図 2 b）、分離ユニットから混入物を洗浄することができる。

【 0 0 7 3 】

好ましい態様において、洗浄は、2 または 3 以上の異なる洗浄バッファーを用いて 2 または 3 以上のステップで行われる。例えば、第 1 洗浄バッファーによる第 1 洗浄ステップを、分離ユニットから未結合または弱く結合した標的分子を洗浄するために用いることができ（図 2 a）、第 2 洗浄バッファーによる第 2 洗浄ステップは、分離ユニットから混入物を洗浄するために用いることができる（図 2 b）。

好ましい態様において、未結合または弱く結合した標的分子を含む溶液は、通常は洗浄段階の間に、フィードストック溶液または専用の出口へと、方向を変えることができる。

【 0 0 7 4 】

好ましい態様において、未結合または弱く結合した標的分子を含む溶液は、通常は洗浄

段階の間に、別の分離ユニットへと、方向を変えることができる。

別の好ましい態様において、定置洗浄は(図2d)、結合した標的分子の溶出の後で再平衡化ステップの前に行われる。

別の好ましい態様において、単一の溶媒送達システムは、フィード送達専用にすることができる(図4)。

好ましい態様において、標的分子がロードされる分離ユニットは所定の条件において最大にロードされ、これは、完全結合までロードされることを意味する。

【0075】

本発明の一態様において、標的分子がロードされる分離ユニットは、全ローディング時間の間、別の分離ユニットと流体連通している。

別の態様において、ロードされる分離ユニットは、ローディング時間の一部のみの間、別の分離ユニットと流体連通している。好ましい態様において、前記2つの分離ユニットは、ローディング時間の後半の全体または一部の間のみ、流体連通している。これは、ローディングが開始されると、一般的に全ての標的分子がロードされた分離ユニットに結合するという事実による。この分離ユニットが部分的に既にロードされている場合にのみ、標的分子が分離ユニットに結合せず、これを通過することもある。バッチクロマトグラフィーでは、典型的には、あまりにも多くの標的分子が分離ユニットを通過し始めた場合に、ローディングが停止される。本発明による方法では、標的分子が分離ユニットに結合せずにこれを通過し始める、少なくともローディングのこの最後の段階の間に、前記分離ユニットの出口が別の分離ユニットの入口に接続され、このため第1分離ユニットに結合していない標的分子は、第2ユニットに結合する。当業者は、ローディングの間に、ロードされる分離ユニットに結合していない標的分子の量が、前記分離ユニットの出口を別の分離ユニットの入口に接続することが必要となる程度に高くなる時を、容易に決定することができる。

【0076】

一態様において、洗浄される1分離ユニットまたは複数分離ユニットの出口は、別の分離ユニットの入口と液体連通しており、前記洗浄により除去された標的分子は失われることなく、別の分離ユニット上にロードされる。このアプローチは、システムが4または5以上の分離ユニットを含む場合に、特に適している。

一態様において、洗浄される1分離ユニットまたは複数分離ユニットの出口は、前の分離ユニットと液体連通しており、前記洗浄により除去された標的分子は失われることなく、前の分離ユニット上にロードされる。

【0077】

一態様において、かかる方法は、以下のステップを含む：

a) 同一のアフィニティーやイオン交換クロマトグラフィーマトリックスを有する少なくとも4つの分離ユニットであって、これらが、液体が、1つの分離ユニットから後続のものへと、および最後のものから第1の分離ユニットへと流れることができるように接続された、前記分離ユニットを提供すること；

b) 試料を第1の分離ユニット上にフィードして、試料がこの分離ユニット上(ここで試料は、標的分子がこの分離ユニットに結合することを可能とするpHおよび伝導率にある)にロードされる間、前記分離ユニットは、ローディング時間の少なくとも一部において次の分離ユニットと液体連通しており、これにより前記第1分離ユニットに結合していない標的分子が、次の分離ユニットに(図5a)、前の分離ユニットと液体連通している1つの分離ユニットを洗浄してこの洗浄により除去された標的分子が失われずに前の分離ユニットにロードされるようにするのと、少なくとも同時に、結合することができるようになること(図6a)。次に逐次的に、ロードされる分離ユニットともロードされる分離ユニットと液体連通しているものとも異なる1つの分離ユニットを、溶出(図6c)、および再平衡化(図6e)すること。これは、クロマトグラフィー分離プロセスで必要とされる洗浄、溶出、および再平衡化などの他のプロセスステップが、分離ユニットと液体連通していない1または2以上の分離ユニットまたはロードされているユニット上で実施され

10

20

30

40

50

ることを意味する。

【0078】

c) フィードを、次の分離ユニットへと切り替えること。これは、その時丁度ロードされた分離ユニットが完全にロードされたときに、この分離ユニットへの試料のフィードが停止され、中断なしの同時のシステム弁の操作により、フィードはサークル内の次の分離ユニットへと向けられる(図5b)。サークル内の次の分離ユニットは、ローディング時間の少なくとも一部の前に、ロードされた分離ユニットの出口に接続されていたものである。したがって、この分離ユニットには、第1の分離ユニットに結合しなかった標的分子が、既に部分的にロードされている。

【0079】

d) 試料を次の分離ユニット上にフィードして、試料が前記次の分離ユニット上(ここで試料は、標的分子が前記次の分離ユニットに結合することを可能とする第1のpHおよび伝導率にある)にロードされている間、前記次の分離ユニットは、ローディング時間の少なくとも一部において、次の後の分離ユニットと流体連通しており、これにより前記第1分離ユニットに結合していない標的分子が、次の後の分離ユニットに(図6b)、前の分離ユニットと液体連通している1つの分離ユニットを洗浄してこの洗浄により除去された標的分子が失われずに前の分離ユニットにロードされるようにするのと、少なくとも同時に、結合することができるようになる。次に逐次的に、ロードされる分離ユニットともロードされる分離ユニットと流体連通しているものとも異なる1つの分離ユニットを、溶出および再平衡化すること。これは、クロマトグラフィー分離プロセスで必要とされる洗浄、溶出、および再平衡化などの他のプロセスステップが、分離ユニットと流体連通していない1または2以上の分離ユニットまたはロードされているユニット上で実施されることを意味する。

e) ステップc)およびd)を1または2回以上繰り返すこと。

【0080】

上記ステップb)からe)に記載され図6に図示されているプロセスはまた、ローディングのために3つの分離ユニットを接続することによっても、実施することができる。すなわち、例えば分離ユニット1がロードされる場合、これは分離ユニット2と流体連通しており、分離ユニット3は分離ユニット2と流体連通しているが、しかし分離ユニット1、2および3はこの間、分離ユニット4とは流体連通していないことを意味する。分離ユニット1、2および3が流体連通しており、これらがロードされる場合、分離ユニット4は典型的にはスタンバイモードにある。当業者であれば、マトリックスの種類、試料の種類、流量などの特定のプロセスパラメータに基づいて、3つの分離ユニットをローディング用に接続するのが有利か、または2つのみなのかを決めることができる。図1は、以下に記載の連続クロマトグラフィー法に適した、3つの分離ユニットシステムを概略的に示す。システムは、溶媒送達システム(図4に示すように、少なくとも2つの)、3つの分離ユニット、溶媒送達システムと分離ユニットの間の流体連通チャネル、分離ユニットの入口と出口、溶媒のフローを分離ユニットへおよび分離ユニットから方向を変えるための切替え弁を有する。任意に、図1は、必要なプロセスステップまたはサブステップのために必要な溶媒を選択する、溶媒送達システムの前の溶媒選択弁を示す。当業者による決定は、選択された用途およびその要件に基づく溶媒送達システムや分離ユニットの種類、および溶媒フローを制御する手段など特定のプロセスパラメータに基づき、行うことができる。

【0081】

図2a-eは、3つのカラムのシステムによる、本発明の方法のステップを概略的に示す。図2aでは、フィードは分離ユニット1の入口に切替えられて分離ユニット1を貫流し、これにより標的分子の少なくとも一部は分離ユニット1に結合する。分離ユニット1の出口は、分離ユニット2の入口と液体連通しており、こうして分離ユニット1に結合しなかったフィードの全部分は分離ユニット2をさらに通り抜ける。これにより、分離ユニット1に結合しなかった標的分子が、分離ユニット2に結合することが可能となる。分離

10

20

30

40

50

ユニット2の出口は、廃物に接続される。分離ユニット1および2にロードする間、前にロードされた分離ユニット3は例えば洗浄され(図2aおよび図2b)、溶出され(図2c)、定置洗浄(図2d)および再平衡化(図2e)、および、必要となり得てかつローディングとは異なる他の全てのプロセスステップに供される。分離ユニット3の出口は、収集タンクにまたは前記洗浄によって除去された弱く結合または未結合の標的分子がさらに処理される別のユニットに接続することができる(図2a)。標的分子が分離ユニット3から溶出されている限り、分離ユニット3の出口は標的分子収集タンク(図2cに「生成物」として示す)または標的分子がさらに処理される別のユニットに(図2cに図示されず)接続される。他のプロセスステップについては、分離ユニット3の出口は、図2b、図2dおよび図2eに示すように出口の一つに接続されている。任意に、分離ユニット3における定置洗浄および再平衡化ステップは、図2dおよび図2eに示すように、逆流モードで実行することができる。

10

【0082】

図3bに示す次のステップにおいて、フィードは分離ユニット2の入口に切替えられて分離ユニット2を貫流し、これにより標的分子の少なくとも一部は分離ユニット2に結合する。分離ユニット2の出口は、分離ユニット3の入口と液体連通しており、こうして分離ユニット2に結合しなかったフィードの全部分は分離ユニット3をさらに通り抜ける。これにより、分離ユニット2に結合しなかった標的分子が、分離ユニット3に結合することが可能となる。分離ユニット3の出口は、廃物に接続される。分離ユニット2および3にロードする間、前にロードされた分離ユニット1は例えば洗浄され、溶出され、定置洗浄および再平衡化、および、必要となり得てかつローディングとは異なる他の全てのプロセスステップに供される。分離ユニット1の出口は、収集タンクにまたは前記洗浄によって除去された弱く結合または未結合の標的分子がさらに処理される別のユニットに接続することができる。標的分子が分離ユニット1から溶出されている限り、分離ユニット1の出口は、標的分子収集タンクまたは標的分子がさらに処理される別のユニットに接続される。他のプロセスステップについては、分離ユニット1の出口は、出口の一つに接続される。任意に、分離ユニット1における定置洗浄および再平衡化ステップは、逆流モードで実行することができる。

20

【0083】

図3cに示す次のステップにおいて、フィードは分離ユニット3の入口に切替えられて分離ユニット3を貫流し、これにより標的分子の少なくとも一部は分離ユニット3に結合する。分離ユニット3の出口は、分離ユニット1の入口と液体連通しており、こうして分離ユニット3に結合しなかったフィードの全部分は分離ユニット1をさらに通り抜ける。これにより、分離ユニット3に結合しなかった標的分子が、分離ユニット1に結合することが可能となる。分離ユニット1の出口は、廃物に接続される。分離ユニット3および1にロードする間、前にロードされた分離ユニット2は例えば洗浄され、溶出され、定置洗浄および再平衡化、および、必要となり得てかつローディングとは異なる他の全てのプロセスステップに供される。分離ユニット2の出口は、収集タンクにまたは前記洗浄によって除去された弱く結合または未結合の標的分子がさらに処理される別のユニットに接続することができる。標的分子が分離ユニット2から溶出されている限り、分離ユニット2の出口は、標的分子収集タンクまたは標的分子がさらに処理される別のユニットに接続される。他のプロセスステップについては、分離ユニット2の出口は、出口の一つに接続される。任意に、分離ユニット2における定置洗浄および再平衡化ステップは、逆流モードで実行することができる。

30

【0084】

次のステップにおいて、フィードは分離ユニット1に再度切替えられ(図3a)、図2a-eに記載されたプロセスステップが再度実行される。典型的には、プロセスステップは3回以上実行される。

図2a-eおよび図3a-cに示すプロセスの記載からわかるように、フィードは停止されることではなく、各プロセスステップにおいて(図2a-eには1つのプロセスステッ

40

50

プが示されている)、標的分子は少なくとも1つの分離ユニットから溶出される。

本発明の別の態様において、ロードされた分離ユニットを洗浄して、未結合または弱く結合した標的分子を除去するために使用される洗浄液は、ロードされた分離ユニットから溶出される場合に、選択されたシステムの出口に向けられるのではなく、別の分離ユニットの入口に向けられる。これにより、洗浄中に、ロードされた分離ユニットから溶出され得る標的分子が、出口に行くのではなく、別の分離ユニットに結合することを保証する。

【0085】

図6a-eは、4つのカラムのシステムによる、本発明の方法のステップを概略的に示す。図6aでは、フィードは分離ユニット1の入口に切替えられて分離ユニット1を貫流し、これにより標的分子の少なくとも一部は分離ユニット1に結合する。分離ユニット1の出口は、分離ユニット2の入口と液体連通しており、こうして分離ユニット1に結合しなかったフィードの全部分は分離ユニット2をさらに通り抜ける。これにより、分離ユニット1に結合しなかった標的分子が、分離ユニット2に結合することが可能となる。分離ユニット2の出口は、廃物に接続される。分離ユニット1および2にロードする間、前にロードされた分離ユニット4は、例えば洗浄され(図6aおよび図6b)、溶出され(図6c)、定置洗浄(図6d)および再平衡化(図6e)、および、必要となり得てかつローディングとは異なる他の全てのプロセスステップに供される。分離ユニット4の洗浄段階または洗浄段階の一部の間、分離ユニット4の出口は、分離ユニット3と流体連通しており、該分離ユニット3においては、前記洗浄によって除去された弱く結合または未結合の標的分子であって、分離ユニット4に結合しないものが、分離ユニット3をさらに通り抜ける。これにより、分離ユニット4に結合しなかった標的分子が、分離ユニット3に結合することが可能となる(図6a)。また、分離ユニット4の出口は分離ユニット3の入口と(図6aには図示されず)、または分離ユニット3の出口と(図6a)、流体連通することができる。さらに、分離ユニット3は分離ユニット2と、流体連通することができる(図6b-e)。標的分子が分離ユニット4から溶出されている限り、分離ユニット4の出口は標的分子収集タンク(図6cに「生成物」として示す)または標的分子がさらに処理される別のユニットに(図6cに図示されず)接続される。他のプロセスステップについては、分離ユニット4の出口は、図6b、図6dおよび図6eに示すように出口の一つに接続されている。任意に、分離ユニット4における定置洗浄および再平衡化ステップは、図4dおよび図4eに示すように、逆流モードで実行することができる。

【0086】

図5bに示す次のステップにおいて、フィードは分離ユニット2の入口に切替えられて分離ユニット2を貫流し、これにより標的分子の少なくとも一部は分離ユニット2に結合する。分離ユニット2の出口は、分離ユニット3の入口と液体連通しており、こうして分離ユニット2に結合しなかったフィードの全部分は、分離ユニット3をさらに通り抜ける。これにより、分離ユニット2に結合しなかった標的分子が、分離ユニット3に結合することが可能となる。分離ユニット3の出口は、廃物に接続される。分離ユニット2および3にロードする間、前にロードされた分離ユニット1は、例えば洗浄され、溶出され、定置洗浄および再平衡化、および、必要となり得てかつローディングとは異なる他の全てのプロセスステップに供される。分離ユニット1の洗浄段階または洗浄段階の一部の間、分離ユニット1の出口は、分離ユニット4と流体連通しており、該分離ユニット4においては、前記洗浄によって除去された弱く結合または未結合の標的分子であって、分離ユニット1に結合しないものが、分離ユニット4をさらに通り抜ける。これにより、分離ユニット1に結合しなかった標的分子が、分離ユニット4に結合することが可能となる。また、分離ユニット1の出口は分離ユニット4の入口と、または分離ユニット4の出口と流体連通することができる。さらに、分離ユニット4は分離ユニット3と、流体連通することができる。標的分子が分離ユニット1から溶出されている限り、分離ユニット1の出口は、標的分子収集タンクまたは標的分子がさらに処理される別のユニットに接続される。他のプロセスステップについては、分離ユニット1の出口は、出口の一つに接続される。任意に、分離ユニット1における定置洗浄および再平衡化ステップは、逆流モードで実行する

10

20

30

40

50

ことができる。

【0087】

図5cに示す次のステップにおいて、フィードは分離ユニット3の入口に切替えられて分離ユニット3を貫流し、これにより標的分子の少なくとも一部は分離ユニット3に結合する。分離ユニット3の出口は、分離ユニット4の入口と液体連通しており、こうして分離ユニット3に結合しなかったフィードの全部分は、分離ユニット4をさらに通り抜ける。これにより、分離ユニット3に結合しなかった標的分子が、分離ユニット4に結合することが可能となる。分離ユニット4の出口は、廃物に接続される。分離ユニット3および4にロードする間、前にロードされた分離ユニット2は、例えば洗浄され、溶出され、定置洗浄および再平衡化および、必要となり得てかつローディングとは異なる他の全てのプロセスステップに供される。分離ユニット2の洗浄段階または洗浄段階の一部の間、分離ユニット2の出口は、分離ユニット1と流体連通しており、該分離ユニット1においては、前記洗浄によって除去された弱く結合または未結合の標的分子であって、分離ユニット2に結合しないものが、分離ユニット1をさらに通り抜ける。これにより、分離ユニット2に結合しなかった標的分子が、分離ユニット1に結合することが可能となる。また、分離ユニット2の出口は分離ユニット1の入口と、または分離ユニット1の出口と流体連通することができる。さらに、分離ユニット1は分離ユニット4と、流体連通することができる。標的分子が分離ユニット2から溶出されている限り、分離ユニット2の出口は、標的分子収集タンクまたは標的分子がさらに処理される別のユニットに接続される。他のプロセスステップについては、分離ユニット2の出口は、出口の一つに接続される。任意に、分離ユニット2における定置洗浄および再平衡化ステップは、逆流モードで実行することができる。
10

【0088】

図5dに示す次のステップにおいて、フィードは分離ユニット4の入口に切替えられて分離ユニット4を貫流し、これにより標的分子の少なくとも一部は分離ユニット4に結合する。分離ユニット4の出口は、分離ユニット1の入口と液体連通しており、こうして分離ユニット4に結合しなかったフィードの全部分は、分離ユニット1をさらに通り抜ける。これにより、分離ユニット4に結合しなかった標的分子が、分離ユニット1に結合することが可能となる。分離ユニット1の出口は、廃物に接続される。分離ユニット4および1にロードする間、前にロードされた分離ユニット3は、例えば洗浄され、溶出され、定置洗浄および再平衡化および、必要となり得てかつローディングとは異なる他の全てのプロセスステップに供される。分離ユニット3の洗浄段階または洗浄段階の一部の間、分離ユニット3の出口は、分離ユニット2と流体連通しており、該分離ユニット2においては、前記洗浄によって除去された弱く結合または未結合の標的分子であって、分離ユニット3に結合しないものが、分離ユニット2をさらに通り抜ける。これにより、分離ユニット3に結合しなかった標的分子が、分離ユニット2に結合することが可能となる。また、分離ユニット3の出口は分離ユニット2の入口と、または分離ユニット2の出口と流体連通することができる。さらに、分離ユニット2は分離ユニット1と、流体連通することができる。標的分子が分離ユニット3から溶出されている限り、分離ユニット3の出口は、標的分子収集タンクまたは標的分子がさらに処理される別のユニットに接続される。他のプロセスステップについては、分離ユニット3の出口は、出口の一つに接続される。任意に、分離ユニット3における定置洗浄および再平衡化ステップは、逆流モードで実行することができる。
20
30

【0089】

次のステップにおいて、フィードは分離ユニット1に再度切替えられ(図5a)、図6a-eに記載されたプロセスステップが再度実行される。典型的には、プロセスステップは3回以上実行される。

3つの分離ユニットを有するシステムでは、典型的には、プロセス内のある時間において、1つの分離ユニット1が完全にロードされ、洗浄の必要があり、1つの分離ユニット2は、完全にロードされるためにフィードに接続され、1つの分離ユニット3は、溶出お
40
50

よび再平衡化されている。本発明によれば、分離ユニット2のローディング時間の少なくとも一部において、分離ユニット2の出口は分離ユニット3の入口と流体連通して、未結合の標的分子が分離ユニット3に結合できるであろう。この流体接続は典型的には、ローディング時間の一部の間にのみ必要とされ、ローディングの開始時には、分離ユニット1の出口は分離ユニット2の入口に接続することが、さらに可能である(図7a)。かかるケースにおいて、分離ユニット2について2つの流体連通、すなわち、1つはフィードの流れを含有し、もう1つは、前記洗浄段階の間に分離ユニット1から除去された、弱く結合または未結合の標的分子を含有する流体連通が可能であろう(図7a)。この流体連通は、ロードされた分離ユニット1の洗浄の間維持されるべきであり、これにより、洗浄中に分離ユニット1から溶出する可能性のある標的分子を、分離ユニット2にキャプチャーすることができる。洗浄の完了後、分離ユニット1と2の間の流体連通は停止される。分離ユニット1が、追加の洗浄(例えば、標的分子以外の分子の除去)(図7b)、CIP、溶出、再平衡化などの別のステップに供されている間、分離ユニット3の入口は、分離ユニット2の出口に接続されて、これにより、ローディング時間の少なくとも一部において、分離ユニット2と3の間の流体連通により、分離ユニット2から溶出される未結合の標的分子が、分離ユニット3に結合することができる。フィードが次の分離ユニットおよびそれぞれの分離ユニットにシフトされる場合に、同じステップが実行されることが、容易に理解できる。

【0090】

好みの態様において、本発明の方法に供される試料は、清澄化された試料である。すなわち、試料は、本発明による結合および溶出クロマトグラフィープロセス用の分離ユニットにローディングされる前に、清澄化ステップに供されることを意味する。

清澄化ステップは、標的分子から、1または2以上の可溶性および/または不溶性の不純物を分離することを意図している。例えば、細胞および細胞デブリなどの不溶性不純物を試料から除去して、溶液中に標的分子および他の可溶性の不純物を含有する清澄液が得られる。清澄化ステップは、以下の1または2以上を単独または任意の組み合わせで含んでよい:遠心分離、沈下、および/または濾過、好ましくはタンジェンシャルフロー濾過またはデブス濾過。好ましくは、清澄化ステップは遠心分離を含まず、濾過および/または沈下のみを含む。好みの態様において、濾過は、デブス濾過である。

【0091】

一部の態様において、デブスフィルターは、1または2以上の不溶性不純物を取り除くために用いられる。デブスフィルターは、単に媒質の表面上だけでなく媒質全体において粒子を保持するための、多孔質濾過媒質を用いるフィルターである。かかるデブスフィルターの一般的なクラスは、結合(または他の手段で固定)されて、複雑な、入り組んだ流路の迷路を形成する線維のランダムマトリックスを含むものである。これらのフィルターでの粒子の分離は、一般に、線維マトリックスによる捕捉、またはこれへの吸着をもたらす。細胞培養プロスおよび他のフィードストックの生物学的処理のために最も頻繁に用いられるデブスフィルター媒質は、通常、セルロース繊維、DE(珪藻土)などのフィルター補助剤、および正に荷電された樹脂結合剤からなる。

【0092】

多孔質デブスフィルターが異方性である場合に、粒子性不純物の一次除去において特に良好な結果が達成されることが見出されている。一部の態様において、細孔は、>約25μmと評価される名目細孔サイズを有する。一部の態様において、デブスフィルターは、少なくとも2つの段階的な不織布の層を含み、ここで、段階的な層は、約0.3cm~約3cmの合計の厚みを有する。

一部の態様において、デブスフィルターは、不織布、セルロースおよび珪藻土の段階的な層の複合体を含む。不織布は、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリエチレン、ナイロンまたはそれらの組み合わせを含む。

例示的なデブスフィルターは、本明細書において参考として援用される米国仮出願第61/571994号において見出すことができる。

10

20

30

40

50

一部の態様において、遠心分離および／またはタンジェンシャルフロー濾過ステップは、デブス濾過ステップに先立ち用いられる。代替的に、遠心分離および／またはタンジェンシャルフロー濾過ステップを必要とすることなく、デブス濾過ステップを行うことができる。

【0093】

一態様において、遠心分離および／または濾過および／または沈下による清澄化に先立ち、試料を、沈澱組成物で前処理して、望ましくない混入物を沈澱させて試料から取り除く。沈澱組成物は、試料からHCP's、DNA、ホルモンなどの混入物を沈澱させることができる沈澱剤を、少なくとも含む。沈澱剤は、水性および／または可溶性の状態から非水性および／または不溶性の状態への化合物の沈澱を引き起こすか、あるいは、溶液から微粒子を凝集(aggregate)および凝集(agglutinate)させて、液相からのそれらの沈下および溶液の濁度の減少をもたらす

好適な沈澱剤の例は、有機酸(例えばオクタン酸)、無機酸(例えばHCl)、pHを酸性に向かって実質的に低下させる他の酸性剤、塩(例えば安息香酸ナトリウム、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウムなど)、酸性溶媒中で沈澱する他の一価の塩または有機酸である。沈澱剤の他の例は、カプリル酸などの短鎖脂肪酸である。穏和に酸性な条件においては、カプリル酸などの短鎖脂肪酸の付加は、典型的には、非IgGタンパク質を沈澱させるが、一方、IgGは沈澱しない。

【0094】

他の好適な沈澱剤は、多価電解質ポリマーである(例えば、本明細書において参考として援用される国際PCT特許出願第WO2008/091740号を参照)。

好ましい態様において、1または2以上の不純物を沈殿させるために、刺激応答性ポリマーを用いる。かかる刺激応答性ポリマーの例は、例えば、本明細書において参考として援用される米国公開第20080255027号、同第20090036651号、同第20090232737号および同第20110020327号において見出すことができる。刺激応答性ポリマーは、一般に、pH、温度および／または塩濃度などの特定のプロセス条件のセットの下で、水ベースの溶媒中で可溶性であり、かかる条件のうちの1または2以上の変化により不溶性となり、その後沈澱する。例示的な刺激応答性ポリマーとして、限定されないが、ポリアリルアミン、ベンジル基で修飾されたポリアリルアミン、またはポリビニルアミンおよびベンジル基で修飾されたポリビニルアミンが挙げられ、ここで、刺激はリン酸またはクエン酸である。

【0095】

沈澱組成物はさらに、洗剤(Triton X-100、triton X-114、NP-40、Tween-20、OTD、SDS、CHAPS)、および／またはポリエチレングリコール(PEG)(PEG-1000、PEG 10000)および／またはポリビニルアルコールおよび／または多価電解質を含んでもよい。

沈澱した混入物を、次いで、試料を分離ユニット上にロードする前に、清澄化により試料から取り除く。

好ましい態様において、沈澱の後に、遠心分離のステップを行うことなくデブス濾過を行い、清澄化された試料を提供する。

【0096】

好ましい態様において、試料の清澄化は、その期間の少なくとも一部の間、本発明の方法によるクロマトグラフィー精製と同時に進行。言い換えれば、標的分子を含有する液体試料は、全試料容積が清澄化されるまで待つために清澄化後にプールタンク中に貯蔵されることはなく、しかし清澄化された試料が清澄化プロセスからもたらされると直ちに、それを連続的に本発明の方法のための試料溶液として用いて、分離ユニット上にロードされる。

したがって、本発明の方法はまた、清澄化された試料溶液を用いる場合は、試料溶液の全容積を貯蔵することができるプールタンクの使用を必要としない。好ましくは、プールタンクを用いないか、試料溶液の全容積の25%未満、好ましくは10%未満を貯蔵することができるプールタンクのみを用いる。

【0097】

10

20

30

40

50

別の態様において、本発明による方法を用いて精製された標的分子は、ウイルス不活化および／またはフロースルー精製などのさらなるプロセスステップに供される。

ウイルス不活化は、ウイルスを不活化するか、または感染できなくし、これは特に標的分子の治療的使用が意図されている場合に重要である。

多くのウイルスは、化学的变化によって不活化することができる脂質またはタンパク質の被覆を含む。単純にウイルスを不活化するのではなく、いくつかのウイルス不活化のプロセスは、ウイルスを完全に変性することができる。ウイルスを不活化する方法は、当業者によく知られている。より広く使用されているウイルス不活化プロセスには、例えば、以下の 1 または 2 以上の使用が含まれる：溶媒 / 洗剤による不活化（例えば Triton X100 による）；低温殺菌（加熱）；酸性 pH 不活化；および紫外線（UV）不活化。2 または 3 以上のこれらのプロセスを組み合わせることが可能である；例えば、高温で酸性 pH 不活化を行うなど。

10

【 0 0 9 8 】

完全かつ効果的なウイルス不活化を確実にするため、ウイルス不活化は多くの場合、ウイルス不活化剤と試料の適切な混合を確実にするために定常的に攪拌しながら、長期間にわたって行われる。例えば、今日の産業で使用される多くのプロセスでは、キャプチャーステップからの出力または溶出液はプールタンクに回収され、長期間にわたってウイルス不活化に供される（例えば、> 1 ~ 2 時間、続いて多くの場合、一晩の貯蔵）。

ウイルス不活化に要する時間は、インラインのウイルス不活化を行うことにより、またはこのステップのプールタンクの代わりに、サージタンクを使用することにより、大幅に低減される。

20

【 0 0 9 9 】

好ましい態様において、ウイルスの不活化は酸性 pH の使用を用い、ここで、本発明の方法による結合および溶出クロマトグラフィーステップからの出力が、サージタンクまたはインラインのいずれかを用いて、ウイルス不活化のために酸性 pH へ曝露される。ウイルス不活化に用いる pH は、典型的には 5 . 0 未満、または好ましくは 3 . 0 ~ 4 . 0 の間である。一部の態様において、pH は約 3 . 6 以下である。インライン法を用いたウイルス不活化のために使用される時間は、10 分以下、5 分以下、3 分以下、2 分以下、または約 1 分以下のいずれかであることができる。サージタンクの場合には、不活化に要する時間は、典型的には 1 時間未満、好ましくは 30 分未満である。

30

任意にウイルス不活化に供された本発明の結合および溶出クロマトグラフィー法からの出力は、次に、フロースルー精製に供されてもよい。

【 0 1 0 0 】

好ましい態様において、フロースルー精製プロセスステップは、1 または 2 以上の不純物の除去を意図したフロースルー精製を実現するための、2 または 3 以上のステップまたはデバイスまたは方法を使用する。

40

好ましい態様において、本明細書に記載のフロースルー精製プロセスは、フロースルーモードで実施される 1 または 2 以上の次のステップを含む：活性炭；アニオン交換クロマトグラフィー；カチオン交換クロマトグラフィー、混合モード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、サイズ排除、ウイルス濾過またはこれらの組み合わせ。一部の態様において、1 または 2 以上の弁、インラインスタティックミキサーおよび／またはサージタンクをこれらのステップの間に使用して、溶液条件を変更することができる。

好ましい態様において、フロースルー精製は、少なくとも一つのフロースルーアニオン交換クロマトグラフィー（AEX）ステップを用い、ここでは、標的分子を含有する試料中に依然として残っている 1 または 2 以上の不純物は、アニオン交換クロマトグラフィーマトリックスに結合し、一方標的分子は貫流する。

【 0 1 0 1 】

用いることのできる例示のアニオン交換マトリックスとしては、限定はされないが、第四級アンモニウムイオンに基づくもの、ならびに第一、第二、および第三級アミンに基づ

50

くものなどの弱アニオン交換体が挙げられる。

フロースルー精製ステップにおいて使用されるマトリックスは、粒子、膜、纖維多孔質材料またはモノリス材料の形態であり得る。活性炭の場合には、例えば多孔質纖維材料などの多孔性材料に含浸させることができる。当業者は、これらのマトリックスを保持するための適切な分離ユニット、例えばカラムまたはカートリッジなどを知っている。また、1つの分離ユニットに2または3以上の異なるマトリックスを、例えばカチオン交換マトリックスとアニオン交換マトリックスを組み合わせることも可能である。分離ユニットはまた、例えば、Millistak(登録商標)Podなどのように使い捨てであってもよい。

好ましい態様において、フロースルー精製ステップにおいて使用されるマトリックスは膜ベースのマトリックスで、これは膜吸着器とも称される。膜吸着器は、好ましくは、当技術分野で周知の相分離方法によって作られた多孔質膜シートである。10

【0102】

好ましい態様において、フロースルー精製ステップは、少なくともアニオン交換ステップおよび活性炭ステップを含む。活性炭ステップは、アニオン交換クロマトグラフィーに先立ち、クロマトグラフィーと組み合わせて、またはクロマトグラフィーの後に、実施してよく、好ましくはアニオン交換ステップに先立って実施される。一部の態様において、活性炭は、セルロース媒体で充填される。代替的に、活性炭をアニオン交換マトリックスと組み合わせることができ（例えばカラムまたはカートリッジにおいて）、それによって、標的分子を含む試料から1または2以上の不純物をさらに除去する。

【0103】

好ましい態様において、フロースルー精製はさらに、サイズ排除に基づく凝集体の除去および／またはウイルス濾過のための1または2以上の追加のフロースルーステップを含む。一部の態様において、試料を、凝集体の除去のために、正常フロー濾過モードの操作において、吸着デプスフィルターまたは荷電もしくは改変された微孔質層（単数または複数）を通過させる。一部の態様において、追加のフロースルーステップは、カチオン交換クロマトグラフィー（CEX）マトリックスを使用する。20

フロースルーカチオン交換ステップ（CEX）の使用は、抗体凝集体などの不純物に対する親和性および容量を高めるために、溶液のpHの低下を必要とする場合がある。かかるpHの低下は、三方弁、T型コネクタ、スタティックミキサー、または当技術分野で周知の他の適切なデバイスを介して、酸を含有する適当な溶液の単純なインライン添加によって行うことができる。また、小さなサージ容器を用いて、追加の混合およびサンプリングのためのアクセスを提供することができる。バッグ、容器、またはタンクの形態であってもよいサージ容器の容積は、通常は、フロースルーの設定で処理される流液体積よりもかなり少なく、例えば流液体積の10%以下である。30

【0104】

全体のフロースルー精製操作（本明細書に記載のアニオン交換クロマトグラフィーステップおよび1または2以上の追加のステップを含む）は、好ましくは、フロースループロセスステップの間でプールタンクを使用することなく、連続的に行われる。

好ましい態様において、フロースルーステップは、試料を、活性炭マトリックス、アニオン交換マトリックス、カチオン交換マトリックスおよびサイズ排除マトリックスと接触させることを含む。好ましくは、バッファー交換は、これをカチオン交換マトリックスに通す前に行われる。40

【0105】

清澄化ステップが本発明の方法の前に実施されるか、および／またはフロースルー精製ステップが本発明の方法の実施後に行われる場合、好ましい態様において、少なくとも清澄化および結合・溶出クロマトグラフィーステップは、それらの持続時間の少なくとも一部において重なって実施される。非常に好ましくは、清澄化ステップと結合・溶出クロマトグラフィーステップは、それらの持続時間の少なくとも一部において重なり、また結合・溶出クロマトグラフィーステップとフロースルー精製ステップは、それらの持続時間の少なくとも一部において重なる。50

好ましい態様において、本発明の結合 - 溶出クロマトグラフィー法および、すべてのさらなる任意のプロセスステップは、プロセスステップ中に試料溶液を貯蔵するためのタンクを用いずに実施され、該タンクは、最初にプロセスに供された試料体積の 25 %より多く、好ましくは 10 %未満を有するものである。

【0106】

システム

本発明はまた、少なくとも 1 つの標的分子を分離するための液体クロマトグラフィーシステム（図 1）であって、該システムがサークル状に接続された少なくとも 3 つの分離ユニットから構成され、各分離ユニットはカラムに充填されたクロマトグラフィーマトリックスを含む、前記システムに向けられる。各分離ユニットには、液体の入口と出口のための手段が設けられている。前記入口用の手段は、少なくとも、溶媒送達システムと、サークル内の前の分離ユニットの出口に、接続されている。

前記出口用の手段は、少なくとも、リザーバまたは廃物と、サークル内の次の分離ユニットの出口に接続されている。好ましい態様において、サークル内の各分離ユニットの出口は、サークル内の各分離ユニットの入口に接続され、こうして任意の選択された分離ユニットの出口と、任意の別の選択された分離ユニットの入口との間の流体連通が可能となる。

本発明によるシステムにおいて、接続線は、好ましくは、各流体入口および各流体出口に近接して分岐している。

【0107】

サークル内の 1 つの分離ユニットの出口と次の分離ユニットの入口の間に位置する全ての接続線には、入口流れを選択するための「オン - オフ」弁が提供され、ここで入口流れは、溶媒送達システムに直接接続されるか、または前のカラムの出口に直接接続される。さらに、すべての出口には溶媒流れの方向を選択するための「オン - オフ」弁が提供され、ここで前記溶媒は、廃物または溶媒リザーバに、または別の分離ユニットの入口に向けることができる。このセットアップでは、第 1 キャプチャー分離ユニットからの（ローディングの最後における）浸出生成物の、第 2 分離ユニット（ちょうど再平衡化されて、キャプチャーの準備完了）へのキャプチャーを可能とする。これにより、標的分子の損失なしに、より高いスループットと結合容量の使用が可能となる。

【0108】

さらに、溶媒送達システムの前の溶媒の選択は、溶媒選択弁と少なくとも 2 つの、さらに 4 またはそれ以上の入口によって、実施される。

一態様において、好ましくは、オン / オフ弁は、この線を介した溶媒のフローを停止するために、この接続線上に配置されている。さらにシステムは、ちょうど 2 つの溶媒送達システムを含むことができるが、しかしこれは上記の 3 つのカラムの方法によっても実施可能である（図 4）。

別の態様において、本発明によるシステムは、4 つの分離ユニットを含んでもよい（図 5 a ; 図 6 a）

別の好ましい態様において、装置はさらに、1 または 2 以上の検出器を含む。検出器は、カラムの間の試料輸送の制御のため、試料の品質を分析するため、モニタリングのために用いることができる。

【0109】

検出器は、好適な場所であればどこにでも配置でき、典型的には、分離カラムの流体入口の前および / または流体出口の後に配置される。適切な検出器の例は、pH 検出器、UV 検出器、赤外線検出器、または伝導率を測定する検出器である。

別の好ましい態様において、装置はさらに、コンピュータシステムを含む。検出器ならびにポンプおよび弁は、コンピュータシステムに接続される。このコンピュータシステムは、ポンプおよび弁および検出器の制御を可能にする。好ましくは、コンピュータシステムは、装置を部分的または完全な自動化モードで使用することが可能な、ソフトウェアおよびアルゴリズムを含む。

10

20

30

40

50

別の好ましい態様において、装置は、イベント（例えば、検出器信号）を制御用のトリガとして使用することができる、コンピュータシステムを含む。

【0110】

システムは、さらに、フィルタユニット、検出ユニット、またはクロマトグラフィー分離手順に必要なもしくは好適な他の機器を含んでもよい。

本発明による装置は、カラム、弁、リザーバ、およびクロマトグラフィーシステムで通常使用される他の機器を含む。分離ユニットは例えば、それぞれのクロマトグラフィーマトリックスが充填され、溶媒入口および出口に適した先端接続器具を有する、ステンレス鋼カラム、プラスチックカラムまたはガラスカラムであってよい。

本発明による装置は、同一のクロマトグラフィーマトリックスを有する、3個以上、好ましくは3、4または5個、最も好ましくは3個の分離ユニットを含む。10

【0111】

装置はまた、溶媒送達システムとも呼ばれる、少なくとも2つのバッファーリザーバおよび少なくとも2つのポンプであって、例えば標的分子のローディング、洗浄および溶出に必要なバッファーの貯蔵および供給を提供するものも含む。典型的には、すべての分離ユニットは、少なくとも1つのバッファーリザーバに接続された少なくとも1つの流体入口を有する。

非常に好ましい態様において、本発明の装置は、3つの分離ユニットと2つの溶媒送達システムを有する。20

以下では、装置および方法の説明は、同一のクロマトグラフィーマトリックスを有する3つのキャブチャー分離ユニットの装置に焦点を当てている。これは限定を意味せず、説明をより包括的にするためである。当業者は、上記のように3つより多くのユニットを有するシステムに対しても、記述を移行することができる。20

【0112】

別の態様において、装置は、他のバッファー、定置洗浄、再平衡化などのために追加のリザーバを含むことができる。

典型的には、リザーバおよび分離ユニットは、接続線、弁およびポンプを介して接続される。ポンプ前の溶媒の選択のため的好ましい溶媒選択弁は、多数の溶媒入口およびポンプに直接接続することができる1つの溶媒出口を有する弁である。必要な入口の数量は、個々の用途に特定的に使用される様々なバッファーの量に対応する。溶媒のフローを保証する任意のポンプを使用することができ、蠕動ポンプ、アイソクラティックポンプ、グラジエントポンプ、高圧ポンプ等、低圧ポンプ等を含む。システム部分の流体入口の前の、流体導入を選択するため的好ましい流体選択弁は、多数の流体入口およびシステム部分の流体入口に接続することができる1つの出口を有する弁である。システム部分の流体出口の後の、流体取り出しの選択用的好ましい流体選択弁は、多数の流体出口およびシステム部分の流体出口に接続することができる1つの入口を有する弁である。30

【0113】

好ましい態様において、少なくとも一つの溶媒送達システムはフィードストックリザーバに接続されて、装置に一定のフィードストックの流れを確保する。これにより、連続的なフィード流に関して連続操作を可能にする。フィード流の範囲は、与えられた時間範囲内でのカラムへの結合を確保するために制御され得る。通常、アフィニティー用途に対して、フィード流の中の標的分子の量は、フィード流の決定的な基準である。40

別の好ましい態様においては、フィードの流量を制御して各カラムの生産性を向上させ、より好ましくはフィードの流量は、フィード流中の標的分子の量に応じてある範囲内に維持される。

別の好ましい態様において、1または2以上の追加の液体流の流量が制御される。

【0114】

その他の問題

別の好ましい態様において、装置はさらに、定置洗浄のための追加のリザーバを含む。定置洗浄（CIP）は、当業者に知られた技術である。定置洗浄とは、クロマトグラフィ50

ーマトリックスからの、非常に緊密に結合、沈殿または変性された物質の除去である。かかる混入物がクロマトグラフィーマトリックスから除去されない場合、これらは、カラムのクロマトグラフィー特性に影響を与え、結合容量を低下させ、次のランにおいて現れて、これはサイクル間での混入物または生成物のキャリーオーバーをもたらす可能性がある。

標準の CIP プロトコルは、典型的には、以下のような成分を含む水性バッファーの 1 ~ 3 カラム容積を用いた 1 ~ 5 回の洗浄を含む。

- 6 M の塩酸グアニジン、
- 10 mM ~ 500 mM の NaOH、
- 10 mM ~ 500 mM の NaOH および 1 M の NaCl、
- 50 mM の NaOH および 1 M の Na_2SO_4 、
- 150 mM のリン酸溶液、
- 6 M の尿素、
- 20 % エタノール、
- 20 % エタノールおよび 0.5 M の酢酸、
- 20 % エタノールおよび 2 M の酢酸、
- 1 % の Tween または Triton (登録商標) 界面活性剤 X-100 など。

NaOH などの成分の濃度、カラムへの CIP バッファーの接触時間、ならびに CIP を実施する頻度は、当業者により調整および決定することができる。

【0115】

本発明による装置は、好ましくは、CIP バッファーを含有する少なくとも 1 つのリザーバを有する。CIP バッファーは、適切な場合、すべての分離ユニットの CIP のために使用することができる。次にバッファーリザーバは、CIP バッファーのフローを独立して各カラムに向けることができるよう、すべての分離ユニットと液体接続している。定置洗浄の洗浄は、各分離サイクルの後に行うことができる。典型的には、CIP は、試料に応じて、したがって分離ユニットを汚染する可能性のある混入物の量および種類に応じて、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 番目の分離リサイクル毎に実施される。

別の好ましい態様において、装置は、吸着剤から結合した不純物を部分的または完全に除去するための、追加のリザーバを備える(洗浄)。不純物の精製、特に HCP および DNA の除去は、バイオ医薬化合物中の宿主細胞の DNA レベルが FDA によって規制されているために、バイオ医薬化合物の生産に重要な役割を果たしている。ロードされた吸着剤を種々の溶液にさらに暴露することにより、吸着剤に結合した HCP の数および DNA レベルを低減することができる。この技術は当業者に知られている。標準の洗浄プロトコルは、典型的には、以下のような成分を含む水性バッファーの 1 ~ 20 カラム体積での、1 ~ 10 回の洗浄を含む。

【0116】

- 0.02 M ~ 2 M の NaCl、
- 0.02 M ~ 2 M の NaCl および Na_2SO_4 、
- 0.02 M ~ 2 M の Na_2SO_4 、
- 0.02 M ~ 2 M の CaCl_2 、
- 0.02 M ~ 2 M の MgCl_2 、
- 0.02 M ~ 2 M の MgSO_4 、
- 10 ~ 20 % の有機溶媒、
- 10 ~ 20 % のポリエチレングリコールおよびポリプロピレングリコール、
- アルギニンおよびグリシンなどの 0.5 M のアミノ酸、
- 0.1 ~ 1 % の Tween または Triton (登録商標) 界面活性剤 X-100 など。

【0117】

NaCl などの成分の濃度、カラムへの洗浄バッファーの接触時間、バッファーの pH 値、および洗浄を実施する頻度は、当業者により調整および決定することができる。

10

20

30

40

50

別の好ましい態様において、洗浄ステップは異なるバッファーを使用して行われる。

別の好ましい態様において、各吸着剤は、複数の洗浄ステップにより洗浄される。

一態様において、システムは、1つのアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを有する3または4以上の分離ユニットを含む。好適なアフィニティーマトリックスは、プロテインA、プロテインG、プロテインLまたはプロテインr官能基を有するマトリックスである（例えばProsep（登録商標）Highcap（Merck Millipore）、Prosep（登録商標）Ultra Plus（Merck Millipore）、Poros（登録商標）Prot A（Life Technologies）、A650F（Tosoh）、MabSelect（登録商標）Sure（GE））。

【0118】

本発明の装置で使用されるアフィニティークロマトグラフィーマトリックスは、平均直径が40～200μmの粒子を含み、好ましい直径および細孔サイズは、本発明による方法を記述する際に上に記されている。

粒子は、規則的または不規則に形成することができる。これらは、多糖（アガロース、セルロースなど）などのクロマトグラフィーの吸着剤として適した任意の材料から、および以下のようなその他の機械的に安定なマトリックスから作ることができる：シリカ（例えば、孔制御ガラス）、ポリ（スチレンジビニル）ベンゼン、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、セラミック粒子または親水性置換されたアルキルビニルエーテル、例えば1,2-エタンジオールモノビニルエーテル、1,3-プロパンジオールモノビニルエーテル、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、1,6-ヘキサ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などの、コポリマー、および架橋剤、例えば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）またはジビニルプロピレン尿素（1,3-ジビニルテトラヒドロピリミジン-2-オン）、および上記のいずれかの誘導体。親水性置換されたアルキルビニルエーテルのコポリマーの例は、EP1910433に開示されている。好ましいのは、1000cm/hを超える速度を適用可能な高剛性を示す材料である。

【0119】

別の好ましい態様において、記載された装置は、バイオリアクター、灌流バイオリアクター、および/または部分的な不純物除去のために適用される精製方法であって、例えばデブスフィルター、遠心分離、清澄化、沈降、一定のフィード流を保証する変動技術などに、接続することができる。これは、連続フィード流を必要とする方法の必要性のために必須であるばかりでなく、より短い処理時間を提供し、生成物の品質を維持し（低レベルの凝集など）、一方で標的分子の生成および/またはフィード流精製および標的分子キャプチャの間の、長い貯蔵時間を回避する。

【0120】

別の好ましい態様において、生成物出口の流れは、イオン交換クロマトグラフィー、混合モードクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、HICクロマトグラフィー、SECクロマトグラフィーのモード、デブス濾過、沈降、変動技術などの別の精製技術に直接接続することができ、または、リザーバ、サージバッグ、貯蔵バッグなどに収集することができる。

別の好ましい実験において、生成物出口流れは、1つの吸着剤からの少なくとも1つの溶出プールが適合するリザーバに接続され、ここで、プールされた溶液からの連続または半連続的な取り出しが行われて、続く精製技術への直接接続を可能とする。これにより、続く精製技術に対して標的濃度、pHおよび伝導率の値の点でより安定な条件（標準的なクロマトグラフィー溶出プロファイルと比較して）を保証するだけでなく、短い全精製プロセスを可能とするためにより少ない量の処理標的分子がさらなる技術によって直接精製されるので、より迅速な処理をも保証するであろう。

【0121】

別の好ましい態様において、最適な操作を保証するために、適切なカラムの直径および長さを選択しなければならない。より好ましくは、吸着床の高さは10cm未満、より好

10

20

30

40

50

ましくは4～6cmの高さであるべきである。これにより、工業規模用途では3barを超えるべきでない、カラムの圧力降下に影響を与える。利点は、圧力限界を超えることなく、1000cm/h以上での操作である。

上および下で引用される全ての出願、特許および刊行物、ならびに、2012年4月23日に出願された対応するEP出願EP 12002828.7、ならびに、2012年6月29日に出願された対応する米国仮出願61/666,453の開示の全体は、本明細書に参照により組み込まれる。

【0122】

例I

PUP上>100サイクルのmAb-x(1mg/ml)の連続的精製と対応するデータ

溶液の全成分の21%を構成する（分析SECにより）1mg/mlのモノクローナル抗体を有する細胞培養溶液（SP2/0）中のモノクローナル抗体mAb-x（ここで、HCPの量は抗体600000ng/mgであった（酵素免疫測定アッセイSP2/0により））を、ProtA樹脂（PUP）上で以下の条件下で精製した。クロマトグラフィーカラム：PUP樹脂を16×55mmカラム中に充填した；カラムを次いで、25mMのPBSバッファー（pH7.2）で33.3ml/分にて平衡化した。合計3つのカラムに充填した。試料の調製のために：モノクローナル抗体細胞培養液を0.45μmのフィルターを通して濾過した。溶液の伝導率は、約16mS/cmおよびpH6.4であった。3つのカラム全てを連続クロマトグラフィーシステムに接続し、第1カラムと第2カラムの間の接続、および第2カラムと第3カラムの間の接続、および第3カラムと第1カラムの間の接続を可能とした。全実験は3つのステップに分けられる。第1のステップが開始されると、第1カラムが第2カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を1500cm/hでロードし、この間第3カラムは、25mMのTRISおよび1.5MのNaClバッファー（pH7）で1500cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、次に25mMのTRISバッファー（pH7.2）で1500cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、次に50mMのグリシンバッファー（pH2.7）で1500cm/hにて溶出し、次にカラムクリーニングを150mMのリン酸で1500cm/hにて行い、次に25mMのTRISバッファー（pH7.2）で1500cm/hにて再平衡化する。

【0123】

第2のステップが開始されると、第2カラムが第3カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を1500cm/hでロードし、この間第1カラムは、25mMのTRISおよび1.5MのNaClバッファー（pH7）で1500cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、次に25mMのTRISバッファー（pH7.2）で1500cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、次に50mMのグリシンバッファー（pH2.7）で1500cm/hにて溶出し、次にカラムクリーニングを150mMのリン酸で1500cm/hにて行い、次に25mMのTRISバッファー（pH7.2）で1500cm/hにて再平衡化する。

第3のステップが開始されると、第3カラムが第1カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を1500cm/hでロードし、この間第2カラムは、25mMのTRISおよび1.5MのNaClバッファー（pH7）で1500cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、次に25mMのTRISバッファー（pH7.2）で1500cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、次に50mMのグリシンバッファー（pH2.7）で1500cm/hにて溶出し、次にカラムクリーニングを150mMのリン酸で1500cm/hにて行い、次に25mMのTRISバッファー（pH7.2）で1500cm/hにて再平衡化する。

【0124】

指名のステップは少なくとも100回繰り返され、定常状態動作は第2のサイクルで得られた。UVシグナルトレースは図9に示され、各単一サイクルにおいて各カラムが通る全てのプロセスステップUVトレースを示す。ロードされた第1カラムの洗浄から開始して、同時にシリーズの次のカラムと、シリーズの次の後のカラムが一緒にローディングさ

10

20

30

40

50

れる。指名されたカラムがまだロードされているときに、以前にロードされたカラムが溶出され（第1ピーク）、CIPされ、再平衡化される。18分において、次のカラムのローディングが完了し、ロードはシリーズの次の後のカラムに、続いて第1にカラム切り替えられ、その結果、洗浄、溶出（第2ピーク）、CIPおよび再平衡化を含む、次のカラムに必要なプロセスが進められる。同時に、次の後のカラムおよび第1カラムがロードされる。36分において、次の後のカラムのローディングが完了し、ロードは第1カラムに、続いて次のカラムに切り替えられ、その結果、洗浄、溶出（第3ピーク）、CIPおよび再平衡化を含む、次の後のカラムに必要なプロセスが進められる。

【0125】

溶出画分は7～9mg/mlの抗体を含有し（図10参照）、>35mg/mlの充填床結合容量および<5%の標的分子の損失および50g/ml/hの平均生産性（バッチ操作の生産性9.6g/ml/hと比較）をもたらし、これは全成分の99.9%を構成しており（分析SECによる）、ここでHCP量は120～250ppmであった（酵素免疫測定アッセイSP2/0により）（図11参照）。浸出ProtAの量はすべての実験を通して安定であり、10～60ppmの間の値が得られた。

10

【0126】

例I I

以下の実施例は、バッチおよび記載の連続クロマトグラフィー法についての、滞留時間に対する結合容量値の依存性の潜在的な差を探索するために行った。図8に示すように、標準的なバッチ操作について、1%のブレーカスルーバリュートまで測定された結合容量値は、滞留時間の減少と共に減少し、<0.45分の滞留時間で<20mg/mlの結合容量値がもたらされた。対照的に、連続クロマトグラフィー法についての結合容量値は、測定された>0.2分の滞留時間の範囲において、>35mg/mlのままであった。この例は、純粋なmAb-xの例で異なる初期力価（1mg/mlおよび5mg/ml）について実施された。

20

これらの結果に基づき、フィードストック例を以下に示す。

【0127】

a) mAb-y (0.5mg/ml) のPUP上での連続精製

溶液中の全成分の9%を構成する（分析SECによる）0.5mg/mlのモノクローナル抗体を有する、細胞培養（CHO）溶液中のモノクローナル抗体mAb-y（ここでHCP量は抗体250000ng/mgであった（酵素免疫測定アッセイCHOにより））を、以下の条件のもとでProtA樹脂（PUP）上で精製した。クロマトグラフィーカラム：PUP樹脂は $16 \times 55\text{ mm}$ カラムに充填した：カラムを次に25mMのPBSバッファー（pH7.2）で33.3ml/分で平衡化した。合計3つのカラムに充填した。試料の調製のために：モノクローナル抗体細胞培養液を0.45μmのフィルターを通して濾過した。溶液の伝導率は、約14mS/cmおよびpH6.8であった。3つのカラム全てを連続クロマトグラフィーシステムに接続し、第1カラムと第2カラムの間の接続、および第2カラムと第3カラムの間の接続、および第3カラムと第1カラムの間の接続を可能とした。全実験は3つのステップに分けられる。

30

【0128】

第1のステップが開始されると、第1カラムが第2カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を1500cm/hでロードし、この間第3カラムは、25mMのTRISおよび0.05MのNaClバッファー（pH7）で1500cm/hにて少なくとも5CV洗浄し、次に25mMのTRISバッファー（pH7.2）で1500cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、次に50mMのグリシンバッファー（pH2.8）で1500cm/hにて溶出し、次にカラムクリーニングを150mMのリン酸で1500cm/hにて行い、次に25mMのTRISバッファー（pH7.0）で1500cm/hにて再平衡化する。

40

第2のステップが開始されると、第2カラムが第3カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を1500cm/hでロードし、この間第1カラムは、25

50

mMのTRISおよび0.05MのNaClバッファー(pH7)で1500cm/hにて少なくとも5CV洗浄し、次に25mMのTRISバッファー(pH7.2)で1500cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、次に50mMのグリシンバッファー(pH2.8)で1500cm/hにて溶出し、次にカラムクリーニングを150mMのリン酸で1500cm/hにて行い、次に25mMのTRISバッファー(pH7.2)で1500cm/hにて再平衡化する。

【0129】

第3のステップが開始されると、第3カラムが第1カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を1500cm/hでロードし、この間第2カラムは、25mMのTRISおよび0.05MのNaClバッファー(pH7)で1500cm/hにて少なくとも5CV洗浄し、次に25mMのTRISバッファー(pH7.2)で1500cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、次に50mMのグリシンバッファー(pH2.8)で1500cm/hにて溶出し、次にカラムクリーニングを150mMのリン酸で1500cm/hにて行い、次に25mMのTRISバッファー(pH7.2)で1500cm/hにて再平衡化する。

指名のステップは少なくとも2回繰り返した。

溶出画分は、>37mg/mlの充填床結合容量および<5%の標的分子の損失および136.12g/ml/hの平均生産性(バッチ操作の生産性7.12g/ml/hと比較)をもたらし、これは全成分の99.9%を構成しており(分析SECによる)、ここで平均HCP量は1300ppmであった(酵素免疫測定アッセイCHOにより)。

【0130】

【表1】

	RT (min)	速度 (cm/h)	回収 (%)	BC (mg/ml)	生産性 (g/L/h)	純度 (ppm)
バッチ低速	4	83	95	38.7	7.12	1251
バッチ高速	0.22	1500	95	7.01	19.4	1198
連続 3カラム	0.22	1500	95	37.1	136.12	1300

実験条件を2つの個別のバッチのケースと比較した：該バッチケースにおいては、バッチ精製の標準的な条件を、4分の滞留時間を用いてローディングに適用し、洗浄、溶出、CIPおよび再平衡条件は上記と同じであった。2番目のケースについては、標準バッチ操作のローディングは0.22分の滞留時間で実施した。このケースで得られた生産性は、19.4g/ml/hであった。

【0131】

b) PUP上のmAb-z(1mg/ml)の連続精製

溶液の全成分の14%を構成する(分析SECにより)1mg/mlのモノクローナル抗体を有する細胞培養溶液(CHODG44)中のモノクローナル抗体mAb-z(ここで、HCPの量は抗体200000ng/mgであった(酵素免疫測定アッセイCHOにより))を、ProtA樹脂(PUP)上で以下の条件下で精製した。クロマトグラフィーカラム：PUP樹脂を16×55mmカラム中に充填した；カラムを次いで、25mMのPBSバッファー(pH7.2)で33.3ml/分にて平衡化した。合計3つのカラムに充填した。試料の調製のために：モノクローナル抗体細胞培養液を0.45μmのフィルターを通して濾過した。溶液の伝導率は、約13mS/cmおよびpH6.2であった。3つのカラム全てを連続クロマトグラフィーシステムに接続し、第1カラムと第2カラムの間の接続、および第2カラムと第3カラムの間の接続、および第3カラムと第1カラムの間の接続を可能とした。全実験は3つのステップに分けられる。第1のステップが開始さ

10

20

30

40

50

れると、第1カラムが第2カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を1500cm/hでロードし、この間第3カラムは、25mMのTRISおよび0.05MのNaClバッファー(pH7)で1500cm/hにて少なくとも5CV洗浄し、次に25mMのTRISバッファー(pH7.2)で1500cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、次に50mMのグリシンバッファー(pH2.8)で1500cm/hにて溶出し、次にカラムクリーニングを150mMのリン酸で1500cm/hにて行い、次に25mMのTRISバッファー(pH7.0)で1500cm/hにて再平衡化する。

【0132】

第2のステップが開始されると、第2カラムが第3カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を1500cm/hでロードし、この間第1カラムは、25mMのTRISおよび0.05MのNaClバッファー(pH7)で1500cm/hにて少なくとも5CV洗浄し、次に25mMのTRISバッファー(pH7.2)で1500cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、次に50mMのグリシンバッファー(pH2.8)で1500cm/hにて溶出し、次にカラムクリーニングを150mMのリン酸で1500cm/hにて行い、次に25mMのTRISバッファー(pH7.2)で1500cm/hにて再平衡化する。

第3のステップが開始されると、第3カラムが第1カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を1500cm/hでロードし、この間第2カラムは、25mMのTRISおよび0.05MのNaClバッファー(pH7)で1500cm/hにて少なくとも5CV洗浄し、次に25mMのTRISバッファー(pH7.2)で1500cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、次に50mMのグリシンバッファー(pH2.8)で1500cm/hにて溶出し、次にカラムクリーニングを150mMのリン酸で1500cm/hにて行い、次に25mMのTRISバッファー(pH7.2)で1500cm/hにて再平衡化する。

【0133】

指名のステップは少なくとも2回繰り返した。

溶出画分は、>37mg/mlの充填床結合容量および<5%の標的分子の損失および271.4g/ml/hの平均生産性(バッチ操作の生産性14.27g/ml/hと比較)をもたらし、これは全成分の99.9%を構成しており(分析SECによる)、ここで平均HCP量は1551ppmであった(酵素免疫測定アッセイCHOにより)。

【表2】

	RT (min)	速度 (cm/h)	回収 (%)	BC (mg/ml)	生産性 (g/L/h)	純度 (ppm)
バッチ低速	4	83	95	38.7	14.27	1500
バッチ高速	0.22	1500	95	7.01	45.13	1487
連続 3カラム	0.22	1500	96	37.1	271.4	1551

【0134】

実験条件を2つの個別のバッチのケースと比較した:該バッチケースにおいては、バッチ精製の標準的な条件を、4分の滞留時間を用いてローディングに適用し、洗浄、溶出、CIPおよび再平衡条件は上記と同じであった。2番目のケースについては、標準バッチ操作のローディングは0.22分の滞留時間で実施した。このケースで得られた生産性は、45.13g/ml/hであった。

【0135】

c) PUP上のmAb-w(2.4mg/ml)の連続精製

溶液の全成分の35%を構成する(分析SECにより)2.4mg/mlのモノクローナル抗体を有する細胞培養溶液(NHO)中のモノクローナル抗体mAb-z(ここで、

10

20

30

40

50

H C P の量は抗体 3 5 0 0 0 0 n g / m g であった（酵素免疫測定アッセイ N H 0 により）を、 P r o t A 樹脂（ P U P ）上で以下の条件下で精製した。クロマトグラフィーカラム： P U P 樹脂を 1 6 × 5 5 m m カラム中に充填した；カラムを次いで、 2 5 m M の P B S バッファー（ p H 7 . 2 ）で 3 3 . 3 m l / 分にて平衡化した。合計 3 つのカラムに充填した。試料の調製のために：モノクローナル抗体細胞培養液を 0 . 4 5 μ m のフィルターを通して濾過した。溶液の伝導率は、約 1 7 m S / c m および p H 5 . 8 であった。3 つのカラム全てを連続クロマトグラフィーシステムに接続し、第 1 カラムと第 2 カラムの間の接続、および第 2 カラムと第 3 カラムの間の接続、および第 3 カラムと第 1 カラムの間の接続を可能とした。全実験は 3 つのステップに分けられる。第 1 のステップが開始されると、第 1 カラムが第 2 カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を 1 0 3 2 c m / h でロードし、この間第 3 カラムは、 2 5 m M の TRIS および 0 . 0 5 M の Na C 1 バッファー（ p H 7 ）で 1 5 0 0 c m / h にて少なくとも 5 C V 洗浄し、次に 2 5 m M の TRIS バッファー（ p H 7 . 2 ）で 1 5 0 0 c m / h にて少なくとも 3 C V 洗浄し、次に 5 0 m M のグリシンバッファー（ p H 2 . 8 ）で 1 5 0 0 c m / h にて溶出し、次にカラムクリーニングを 1 5 0 m M のリン酸で 1 5 0 0 c m / h にて行い、次に 2 5 m M の TRIS バッファー（ p H 7 . 0 ）で 1 5 0 0 c m / h にて再平衡化する。
10

【 0 1 3 6 】

第 2 のステップが開始されると、第 2 カラムが第 3 カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を 1 0 3 2 c m / h でロードし、この間第 1 カラムは、 2 5 m M の TRIS および 0 . 0 5 M の Na C 1 バッファー（ p H 7 ）で 1 5 0 0 c m / h にて少なくとも 5 C V 洗浄し、次に 2 5 m M の TRIS バッファー（ p H 7 . 2 ）で 1 5 0 0 c m / h にて少なくとも 3 C V 洗浄し、次に 5 0 m M のグリシンバッファー（ p H 2 . 8 ）で 1 5 0 0 c m / h にて溶出し、次にカラムクリーニングを 1 5 0 m M のリン酸で 1 5 0 0 c m / h にて行い、次に 2 5 m M の TRIS バッファー（ p H 7 . 0 ）で 1 5 0 0 c m / h にて再平衡化する。
20

第 3 のステップが開始されると、第 3 カラムが第 1 カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を 1 0 3 2 c m / h でロードし、この間第 2 カラムは、 2 5 m M の TRIS および 0 . 0 5 M の Na C 1 バッファー（ p H 7 ）で 1 5 0 0 c m / h にて少なくとも 5 C V 洗浄し、次に 2 5 m M の TRIS バッファー（ p H 7 . 2 ）で 1 5 0 0 c m / h にて少なくとも 3 C V 洗浄し、次に 5 0 m M のグリシンバッファー（ p H 2 . 8 ）で 1 5 0 0 c m / h にて溶出し、次にカラムクリーニングを 1 5 0 m M のリン酸で 1 5 0 0 c m / h にて行い、次に 2 5 m M の TRIS バッファー（ p H 7 . 2 ）で 1 5 0 0 c m / h にて再平衡化する。
30

指名のステップは少なくとも 2 回繰り返した。

溶出画分は、 > 3 0 m g / m l の充填床結合容量および < 5 % の標的分子の損失および 4 0 7 . 2 4 g / m l / h の平均生産性（バッチ操作の生産性 3 4 . 9 7 g / m l / h と比較）をもたらし、これは全成分の 9 9 . 9 % を構成しており（分析 S E C による）、ここで平均 H C P 量は 9 0 0 p p m であった（酵素免疫測定アッセイ N H 0 により）。

【 0 1 3 7 】

【 表 3 】

	RT (min)	速度 (cm/h)	回収 (%)	BC (mg/ml)	生産性 (g/L/h)	純度 (ppm)
バッチ低速	4	83	95	38.7	34.97	700
バッチ高速	0.32	1032	95	9.6	101.95	1200
連続 3カラム	0.32	1032	95	30	407.24	900

実験条件を 2 つの個別のバッチのケースと比較した：該バッチケースにおいては、バッ

チ精製の標準的な条件を、4分の滞留時間用いてローディングに適用し、洗浄、溶出、CIPおよび再平衡条件は上記と同じであった。2番目のケースについては、標準バッチ操作のローディングは0.32分の滞留時間で実施した。このケースで得られた生産性は、101.95g/ml/hであった。

【0138】

d) PUP上のmAb-x(3.5mg/ml)の連続精製

溶液の全成分の45%を構成する(分析SECにより)3.5mg/mlのモノクローナル抗体を有する細胞培養溶液(SP2/0)中のモノクローナル抗体mAb-x(ここで、HCPの量は抗体450000ng/mgであった(酵素免疫測定アッセイSP2/0により))を、ProtA樹脂(PUP)上で以下の条件下で精製した。クロマトグラフィーカラム:PUP樹脂を16×55mmカラム中に充填した;カラムを次いで、25mMのPBSバッファー(pH7.2)で33.3ml/minにて平衡化した。合計3つのカラムに充填した。試料の調製のために:モノクローナル抗体細胞培養液を0.45μmのフィルターを通して濾過した。溶液の伝導率は、約17mS/cmおよびpH5.8であった。3つのカラム全てを連続クロマトグラフィーシステムに接続し、第1カラムと第2カラムの間の接続、および第2カラムと第3カラムの間の接続、および第3カラムと第1カラムの間の接続を可能とした。全実験は3つのステップに分けられる。第1のステップが開始されると、第1カラムが第2カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を920cm/hでロードし、この間第3カラムは、25mMのTRISおよび0.05MのNaClバッファー(pH7)で1500cm/hにて少なくとも5CV洗浄し、次に25mMのTRISバッファー(pH7.2)で1500cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、次に50mMのグリシンバッファー(pH2.8)で1500cm/hにて溶出し、次にカラムクリーニングを150mMのリン酸で1500cm/hにて行い、次に25mMのTRISバッファー(pH7.0)で1500cm/hにて再平衡化する。

10

20

30

40

【0139】

第2のステップが開始されると、第2カラムが第3カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を920cm/hでロードし、この間第1カラムは、25mMのTRISおよび0.05MのNaClバッファー(pH7)で1500cm/hにて少なくとも5CV洗浄し、次に25mMのTRISバッファー(pH7.2)で1500cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、次に50mMのグリシンバッファー(pH2.8)で1500cm/hにて溶出し、次にカラムクリーニングを150mMのリン酸で1500cm/hにて行い、次に25mMのTRISバッファー(pH7.2)で1500cm/hにて再平衡化する。

第3のステップが開始されると、第3カラムが第1カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を920cm/hでロードし、この間第2カラムは、25mMのTRISおよび0.05MのNaClバッファー(pH7)で1500cm/hにて少なくとも5CV洗浄し、次に25mMのTRISバッファー(pH7.2)で1500cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、次に50mMのグリシンバッファー(pH2.8)で1500cm/hにて溶出し、次にカラムクリーニングを150mMのリン酸で1500cm/hにて行い、次に25mMのTRISバッファー(pH7.2)で1500cm/hにて再平衡化する。

指名のステップは少なくとも2回繰り返した。

溶出画分は、>57.1mg/mlの充填床結合容量および、ローディングにおける<5%の標的分子の損失と溶出における<5%の標的分子の損失をもたらし、90%の生成物回収と572g/ml/hの平均生産性(バッチ操作の生産性46.19g/ml/hと比較)をもたらし、これは全成分の99.9%を構成しており(分析SECによる)、ここでHCP量は2100ppmであった(酵素免疫測定アッセイSP2/0により)。

【0140】

【表4】

	RT (min)	速度 (cm/h)	回収 (%)	BC (mg/ml)	生産性 (g/L/h)	純度 (ppm)
バッチ低速	4	83	95	38.7	46.19	1800
バッチ高速	0.36	920	90	9.6	88.7	1700
連続 3カラム	0.36	920	90	57.2	572	2100

10

4

実験条件を2つの個別のバッチのケースと比較した：該バッチケースにおいては、バッチ精製の標準的な条件を、4分の滞留時間を用いてローディングに適用し、洗浄、溶出、CIPおよび再平衡条件は上記と同じであった。2番目のケースについては、標準バッチ操作のローディングは0.36分の滞留時間で実施した。このケースで得られた生産性は、88.7 g / ml / h であった。

【0141】

例I I I

MabSelect Sureなどの他の材料も、本出願において用いることができるが、ただし、操作条件は上述のPUP材料についての条件と同じではないことを考慮すべきである。一例として、MabSelect Sureは通常500 cm / h で、およびMabSelect Xtraは300 cm / h で適用される。3つの異なる材料 (PUP、MabSelect Xtra、MabSelect Sure) および2つの異なるmAb力価 (1 mg および5 mg / ml) についての、バッチ操作および我々の連続的アプローチの、達成可能な結合容量の差を示す下の図を参照されたい。

20

【0142】

溶液の全成分の10%を構成する（分析SECにより）0.68 mg / ml のモノクローナル抗体を有する細胞培養溶液 (SP 2/0) 中のモノクローナル抗体 mAb - x (ここで、HCPの量は抗体 450000 ng / mg であった（酵素免疫測定アッセイ SP 2/0により）) を、ProtA樹脂 (MabSelect Sure) 上で以下の条件下で精製した。クロマトグラフィーカラム：MabSelect Sure樹脂を 10 × 60 mm カラム中に充填した；カラムを次いで、25 mM の PBS バッファー (pH 7.2) で 20 ml / 分にて平衡化した。合計3つのカラムに充填した。試料の調製のために：モノクローナル抗体細胞培養液を 0.45 μm のフィルターを通して濾過した。溶液の伝導率は、約 16 mS / cm および pH 6.8 であった。3つのカラム全てを連続クロマトグラフィーシステムに接続し、第1カラムと第2カラムの間の接続、および第2カラムと第3カラムの間の接続、および第3カラムと第1カラムの間の接続を可能とした。全実験は3つのステップに分けられる。第1のステップが開始されると、第1カラムが第2カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を 917.2 cm / h でロードし、この間第3カラムは、50 mM の酢酸塩および 1.5 M の NaCl バッファー (pH 6.8) で 1000 cm / h にて少なくとも 5 CV 洗浄し、次に 50 mM の酢酸塩バッファー (pH 6.8) で 1000 cm / h にて少なくとも 3 CV 洗浄し、次に 20 mM の酢酸バッファー (pH 3.2) で溶出し、次にカラムクリーニングを 50 mM の水酸化ナトリウムで行い、次に 50 mM の酢酸塩バッファー (pH 6.8) で再平衡化する。

30

【0143】

第2のステップが開始されると、第2カラムが第3カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を 917.2 cm / h でロードし、この間第1カラムは、50 mM の酢酸塩および 1.5 M の NaCl バッファー (pH 6.8) で 1000 cm / h にて少なくとも 5 CV 洗浄し、次に 50 mM の酢酸塩バッファー (pH 6.8) で 1000 cm / h にて少なくとも 3 CV 洗浄し、次に 20 mM の酢酸バッファー (pH 3.2) で溶出し、次にカラムクリーニングを 50 mM の水酸化ナトリウムで行い、次に 50 mM

40

50

の酢酸塩バッファー（pH 6.8）で再平衡化する。

第3のステップが開始されると、第3カラムが第1カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を917.2 cm/hでロードし、この間第2カラムは、50 mMの酢酸塩および1.5 MのNaClバッファー（pH 6.8）で1000 cm/hにて少なくとも5 CV洗浄し、次に50 mMの酢酸塩バッファー（pH 6.8）で1000 cm/hにて少なくとも3 CV洗浄し、次に20 mMの酢酸バッファー（pH 3.2）で溶出し、次にカラムクリーニングを50 mMの水酸化ナトリウムで行い、次に50 mMの酢酸塩バッファー（pH 6.8）で再平衡化する。

指名のステップは少なくとも2回繰り返した。

【0144】

溶出画分は、>38 mg/mlの充填床結合容量および、ローディングにおける<5%の標的分子の損失と溶出における~2%の標的分子の損失をもたらし、93%の生成物回収と102 g/ml/hの平均生産性（バッチ操作の生産性12.1 g/ml/hと比較）をもたらし、これは全成分の99.9%を構成しており（分析SECによる）、ここでHCP量は120~150 ppmであった（酵素免疫測定アッセイSP2/0により）。

【表5】

	RT (min)	速度 (cm/h)	回収 (%)	BC (mg/ml)	生産性 (g/L/h)	純度 (ppm)
バッチ低速	3	122	95	35.5	12.1	133
連続3カラム	0.39	917.2	93	38.38	102.34	120-150

10

20

【0145】

例IV

前述したように、上記の連続クロマトグラフィーの概念は、異なるクロマトグラフィーモード（例えば、イオン交換クロマトグラフィー）で用いることができる。この記載されたアプローチの可能性について、結合容量対滞留時間のスケールで表した図13を参照のこと。Eshmuno Sを充填した単一カラムの操作では、mAb xに対する結合容量は、物質移動抵抗のために滞留時間の減少と共に減少する。連続クロマトグラフィーアプローチでは、結合容量は、一定の滞留時間の値まで減少せず、より短い滞留時間においてより高い生産性の可能性を示す。さらに、結合容量の値は調査された滞留時間窓においてより高い。このケースについての例を以下に示す：

溶液の全成分の98%を構成する（分析SECにより）5.5 mg/mlのモノクローナル抗体を有するpost-ProtA溶出プール溶液中のモノクローナル抗体mAb-y（ここで、HCPの量は抗体2000 ng/mg（酵素免疫測定アッセイCHOにより）であった）を、イオン交換樹脂（Eshmuno S）上で以下の条件下で精製した。クロマトグラフィーカラム：Eshmuno S樹脂を16×63 mmカラム中に充填した；カラムを次いで、50 mMの酢酸塩バッファー（pH 4.5）で33 ml/分にて平衡化した。合計4つのカラムに充填した。

30

30

【0146】

試料の調製のために：post-ProtA溶液を0.45 μmのフィルターを通して濾過した。溶液の伝導率は、約2 mS/cmおよびpH 4.8であった。したがって、3または4のカラムを連続クロマトグラフィーシステムに接続し、第1カラムと第2カラムの間の接続、および第2カラムと第3カラムの間の接続、および第3カラムと第1カラムの間の接続を可能とするか、または、第1カラムと第2カラムの間の接続、および第2カラムと第3カラムの間の接続、および第3カラムと第4カラムの間の接続、および第4カラムと第1カラムの間の接続を可能とした。

【0147】

40

40

50

3つのカラムのアプローチについての全実験は、3つのステップに分けられる。第1のステップが開始されると、第1カラムが第2カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を810 cm/hでロードし、この間第3カラムは、50 mMの酢酸塩(pH 4.5)で1000 cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、次に50 mMのTRISバッファー、250 mMのNaCl(pH 7.5)で溶出し、次にカラムクリーニングを500 mMの水酸化ナトリウムで行い、次に50 mMの酢酸塩バッファー(pH 4.5)で再平衡化する。

第2のステップが開始されると、第2カラムが第3カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を810 cm/hでロードし、この間第1カラムは、50 mMの酢酸塩(pH 4.5)で1000 cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、次に50 mMのTRISバッファー、250 mMのNaCl(pH 7.5)で溶出し、次にカラムクリーニングを50 mMの水酸化ナトリウムで行い、次に50 mMの酢酸塩バッファー(pH 4.5)で再平衡化する。
10

第3のステップが開始されると、第3カラムが第1カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を810 cm/hでロードし、この間第2カラムは、50 mMの酢酸塩(pH 4.5)で1000 cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、次に50 mMのTRISバッファー、250 mMのNaCl(pH 7.5)で溶出し、次にカラムクリーニングを50 mMの水酸化ナトリウムで行い、次に50 mMの酢酸塩バッファー(pH 4.5)で再平衡化する。

指名のステップは少なくとも2回繰り返した。
20

【0148】

したがって、4つのカラムのアプローチについての全実験は、4つのステップに分けられる。第1のステップが開始されると、第1カラムが第2カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を810 cm/hでロードし、この間第4カラムは、50 mMの酢酸塩(pH 4.5)で810 cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、これを第3カラムに接続し、次に第3カラムを第2カラムに接続し、そして第4カラムを、50 mMの酢酸塩(pH 4.5)で1000 cm/hにて洗浄し、次に50 mMのTRISバッファー、250 mMのNaCl(pH 7.5)で溶出し、次にカラムクリーニングを500 mMの水酸化ナトリウムで行い、次に50 mMの酢酸塩バッファー(pH 4.5)で再平衡化する。
30

【0149】

第2のステップが開始されると、第2カラムが第3カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を810 cm/hでロードし、この間第1カラムは、50 mMの酢酸塩(pH 4.5)で810 cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、これを第4カラムに接続し、次に第4カラムを第3カラムに接続し、そして第1カラムを、50 mMの酢酸塩(pH 4.5)で1000 cm/hにて洗浄し、次に50 mMのTRISバッファー、250 mMのNaCl(pH 7.5)で溶出し、次にカラムクリーニングを500 mMの水酸化ナトリウムで行い、次に50 mMの酢酸塩バッファー(pH 4.5)で再平衡化する。

第3のステップが開始されると、第3カラムが第4カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を810 cm/hでロードし、この間第2カラムは、50 mMの酢酸塩(pH 4.5)で810 cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、これを第1カラムに接続し、次に第1カラムを第4カラムに接続し、そして第2カラムを、50 mMの酢酸塩(pH 4.5)で1000 cm/hにて洗浄し、次に50 mMのTRISバッファー、250 mMのNaCl(pH 7.5)で溶出し、次にカラムクリーニングを500 mMの水酸化ナトリウムで行い、次に50 mMの酢酸塩バッファー(pH 4.5)で再平衡化する。
40

【0150】

第4のステップが開始されると、第4カラムが第1カラムに接続される。このカラムのグループに、調製された試料を810 cm/hでロードし、この間第3カラムは、50 m
50

Mの酢酸塩（pH 4.5）で810 cm/hにて少なくとも3CV洗浄し、これを第2カラムに接続し、次に第2カラムを第1カラムに接続し、そして第3カラムを、50 mMの酢酸塩（pH 4.5）で1000 cm/hにて洗浄し、次に50 mMのTRISバッファー、250 mMのNaCl（pH 7.5）で溶出し、次にカラムクリーニングを500 mMの水酸化ナトリウムを行い、次に50 mMの酢酸バッファー（pH 4.5）で再平衡化する。

【0151】

指名のステップは少なくとも2回繰り返した。

溶出画分は、>55 mg/mlの充填床結合容量および、ローディングにおける<5%の標的分子の損失と溶出における~4%の標的分子の損失をもたらし、3カラムの概念について91%の生成物回収、および4カラムの概念について96%の回収をもたらした。3カラムの概念についての666 g/ml/hの平均生産性、および4カラムの概念についての720 g/ml/hの平均生産性は（バッチ操作の生産性76.8 g/ml/hと比較）、全成分の99.9%を構成しており（分析SECによる）、ここでHCP量は400~430 ppmであった（酵素免疫測定アセイCHOにより）。

10

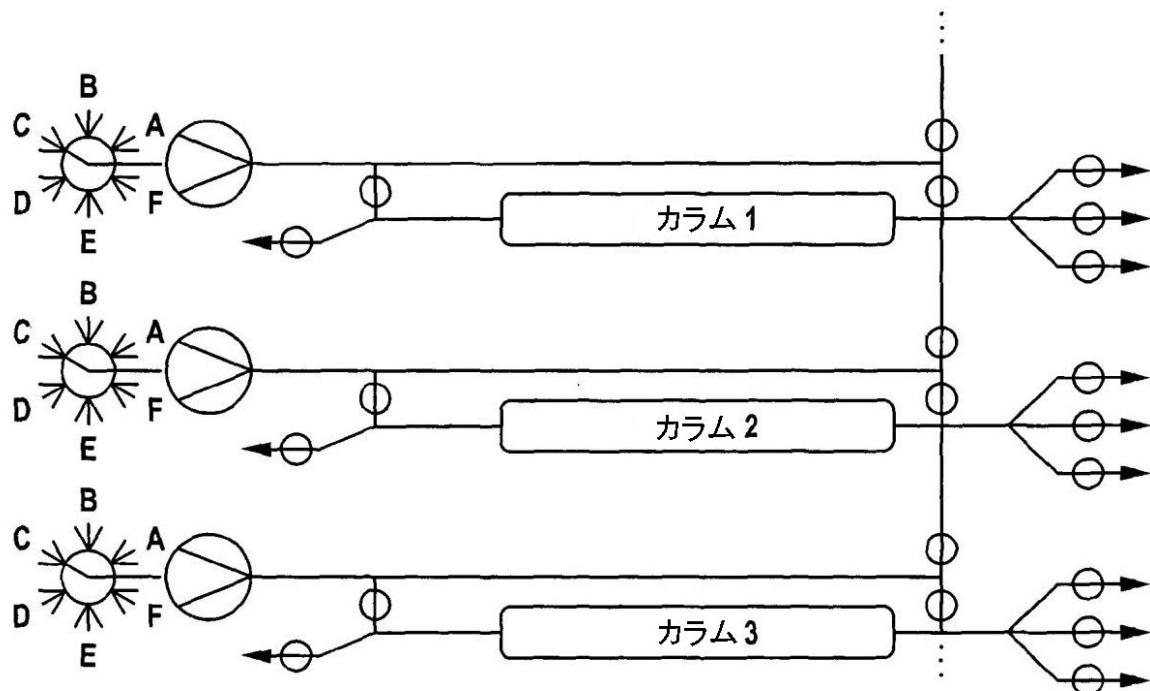
20

【表6】

	RT (min)	速度 (cm/h)	回収 (%)	BC (mg/ml)	生産性 (g/L/h)	純度 (ppm)
バッチ低速	3	120	95	45.67	76.8	425
バッチ高速	0.48	810	94	22.43	172.56	418
連続 3カラム	0.48	810	91 速度	55.5	666	408
連続 4カラム	0.48	810	96	60	720	433

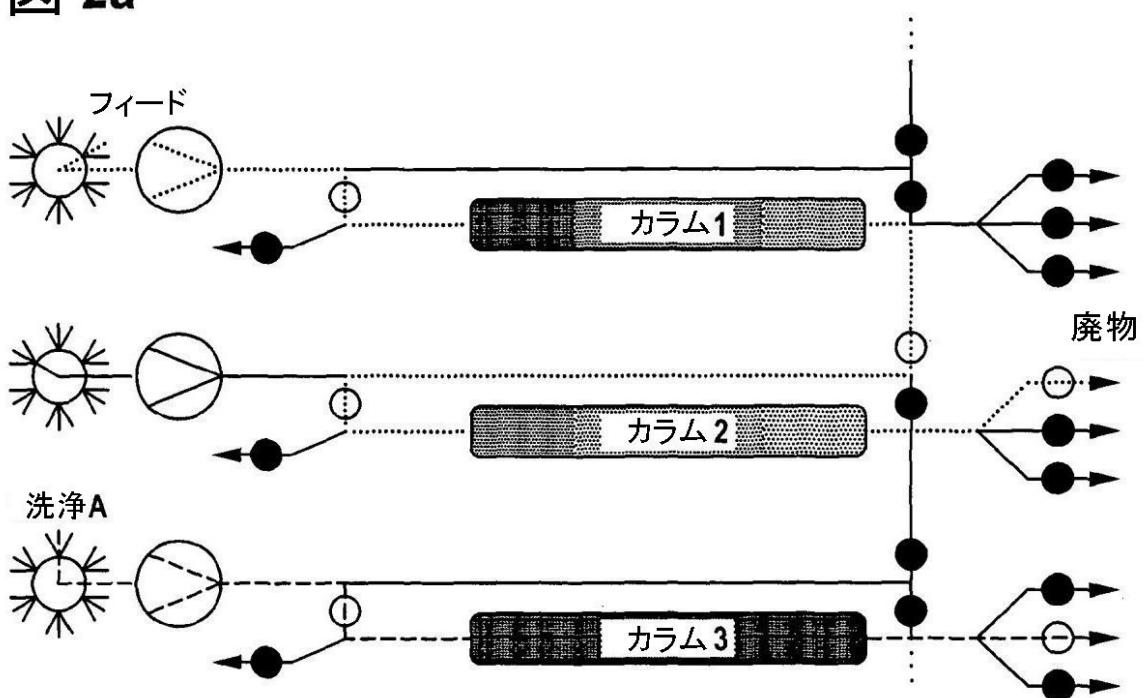
【図 1】

図 1



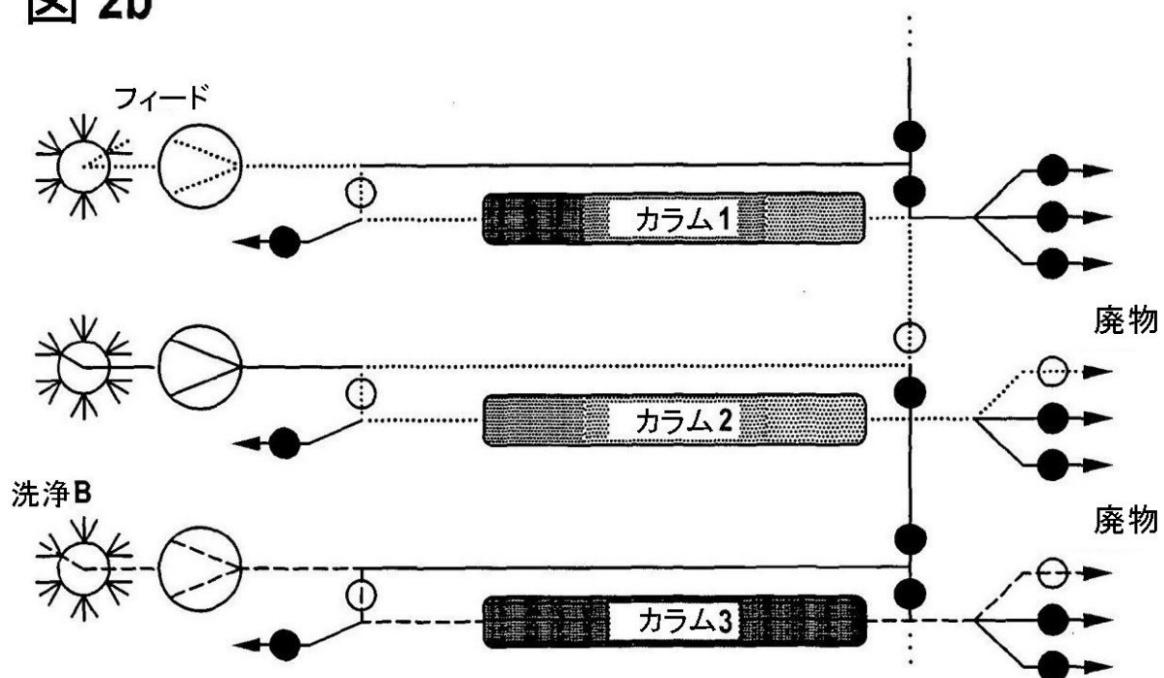
【図 2 - 1】

図 2a



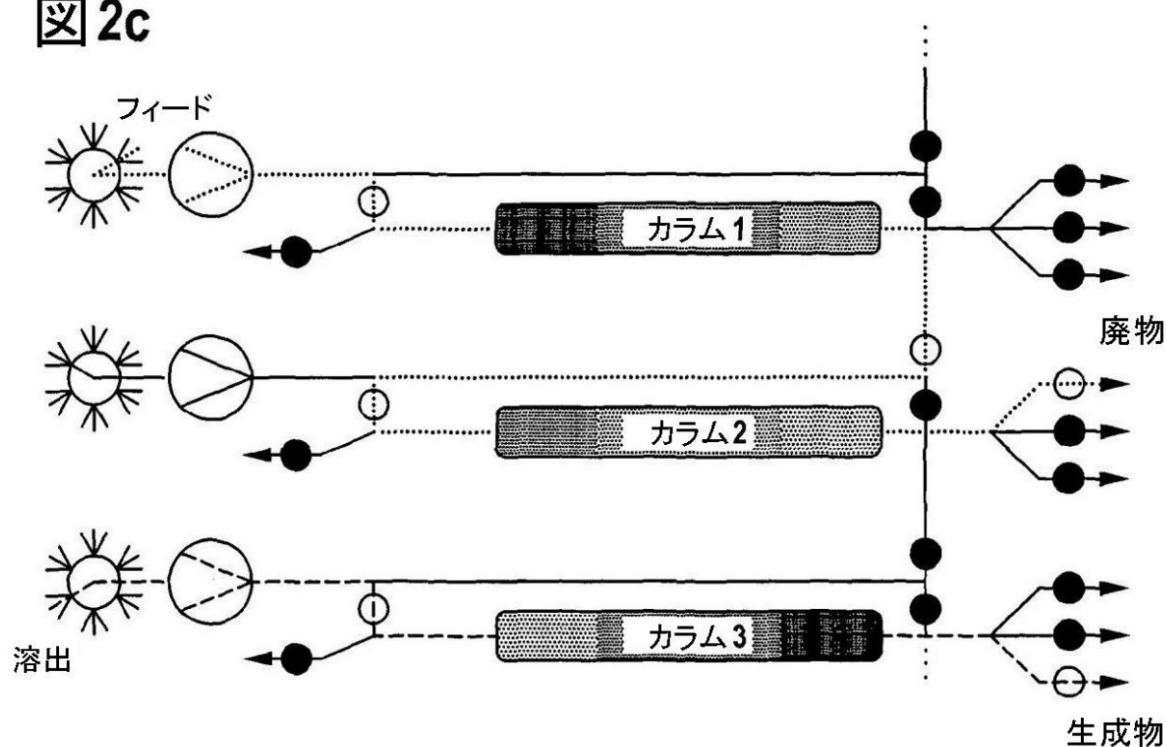
【図 2 - 2】

図 2b



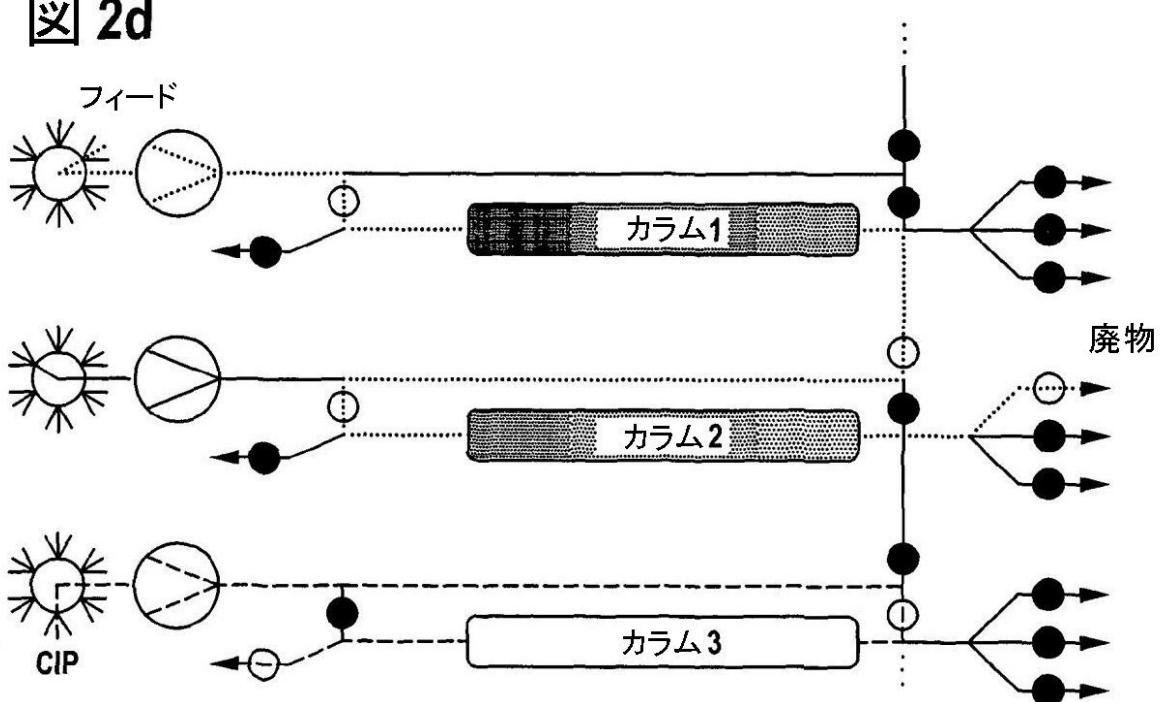
【図 2 - 3】

図 2c



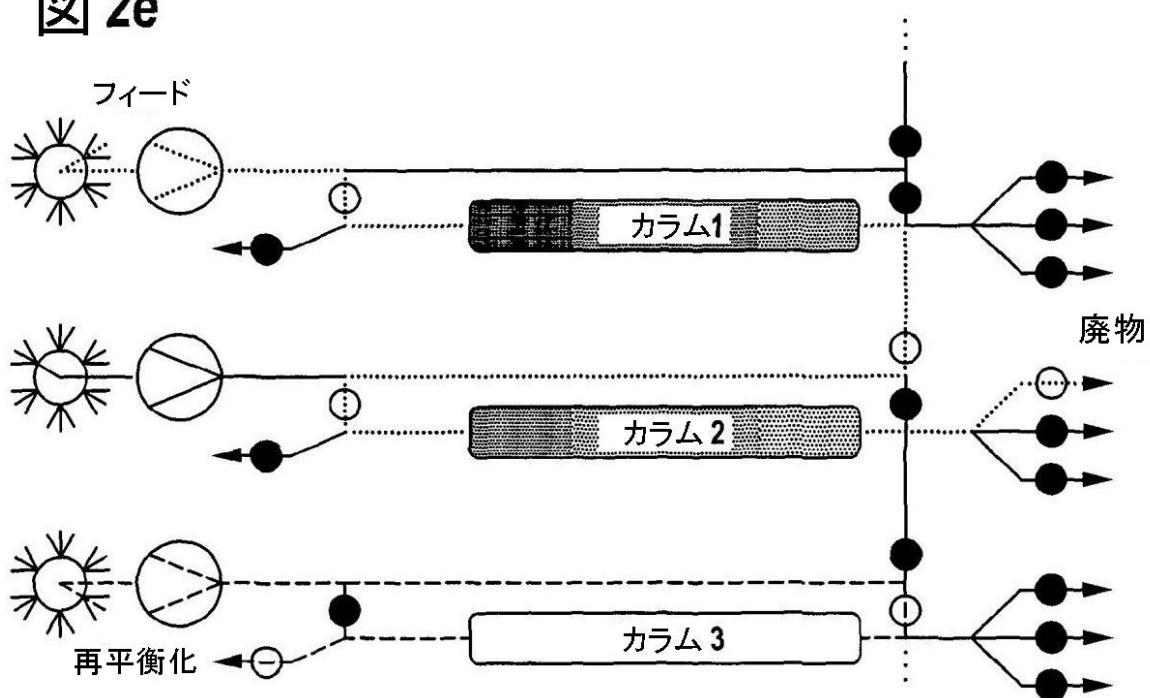
【図 2 - 4】

図 2d



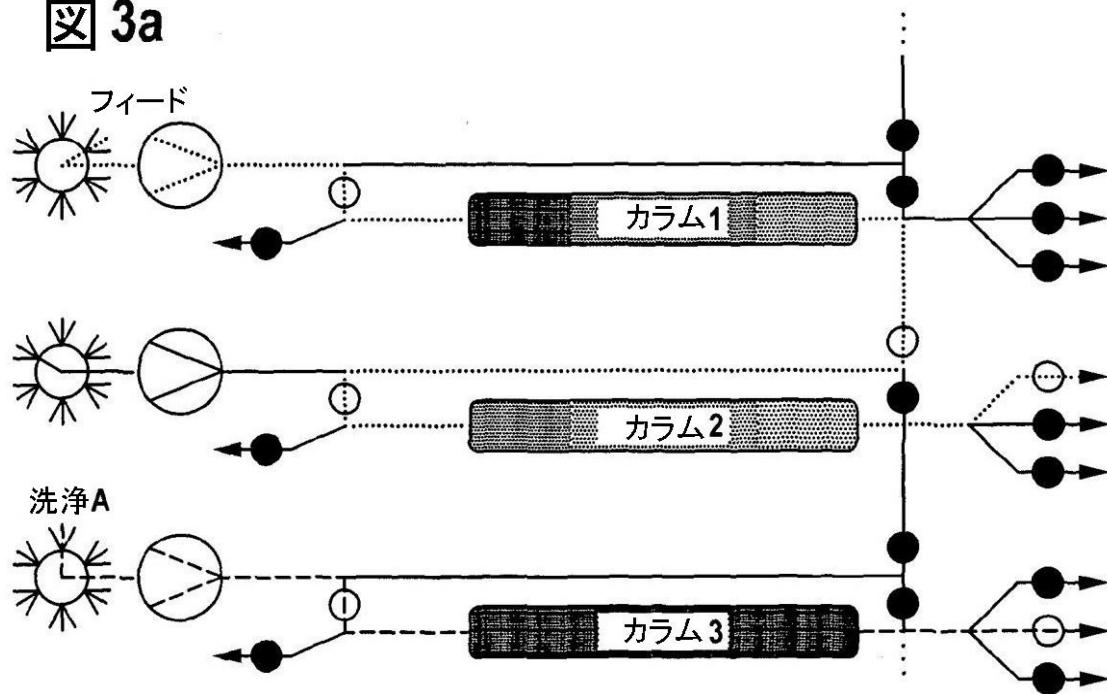
【図 2 - 5】

図 2e



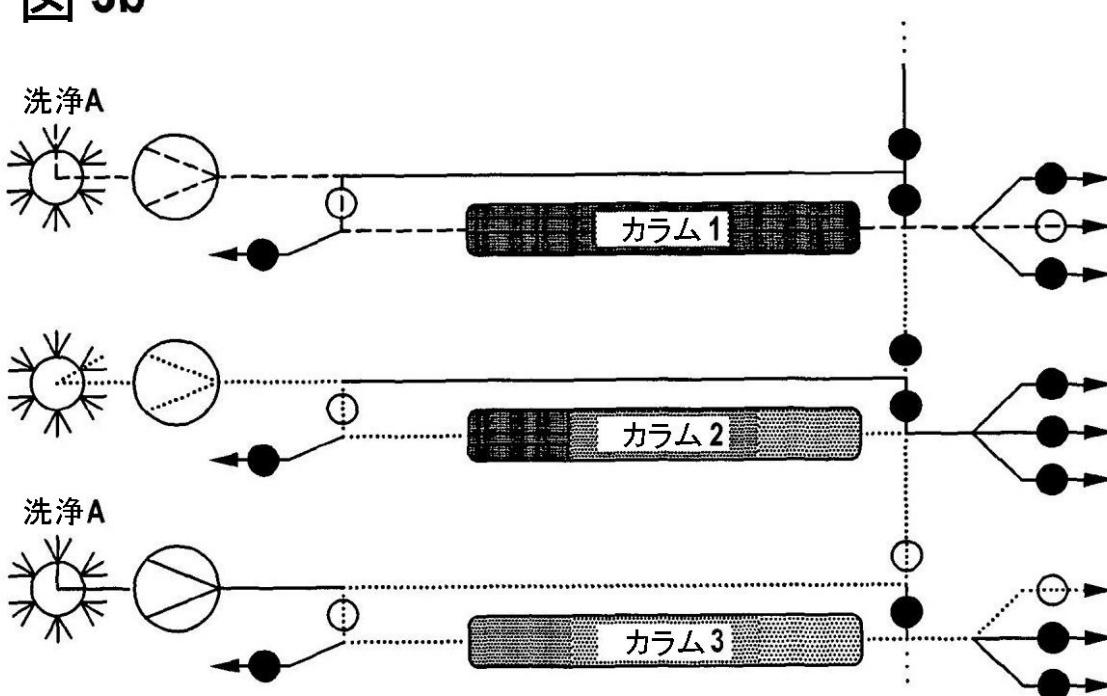
【図 3 - 1】

図 3a



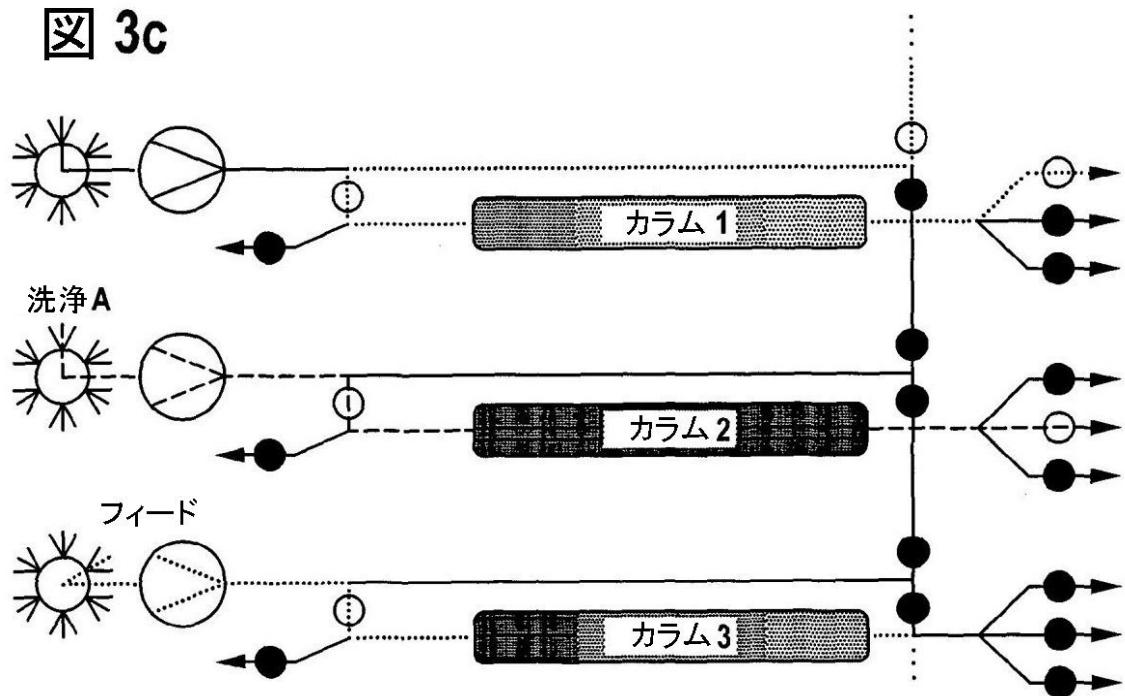
【図 3 - 2】

図 3b



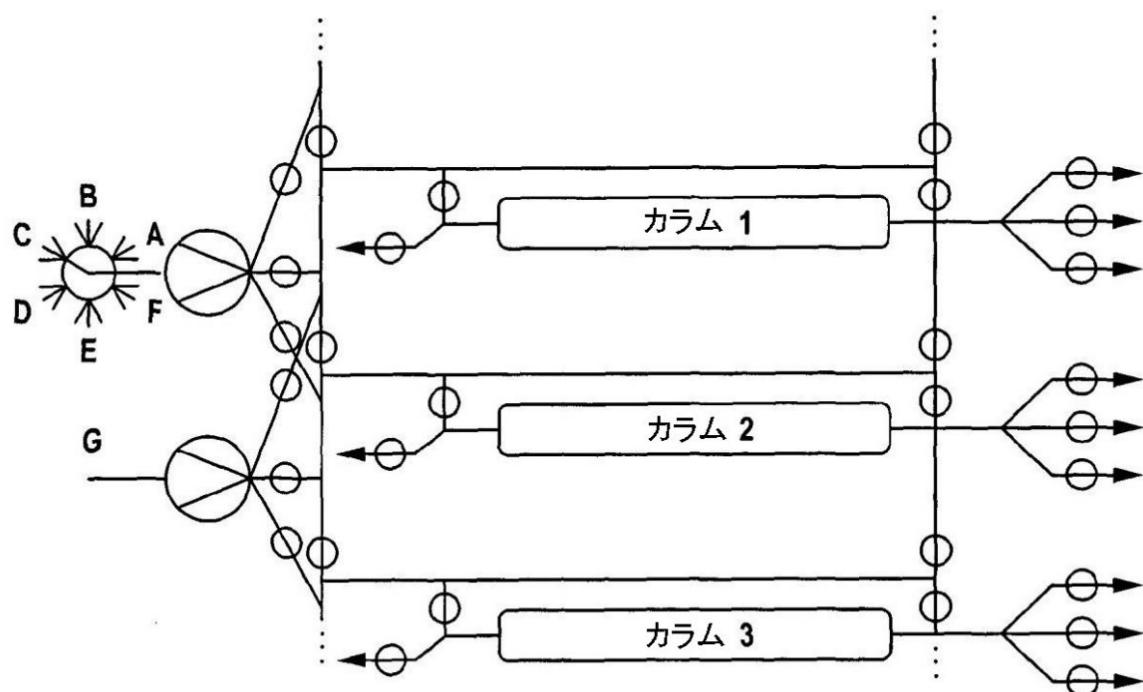
【図 3 - 3】

図 3c



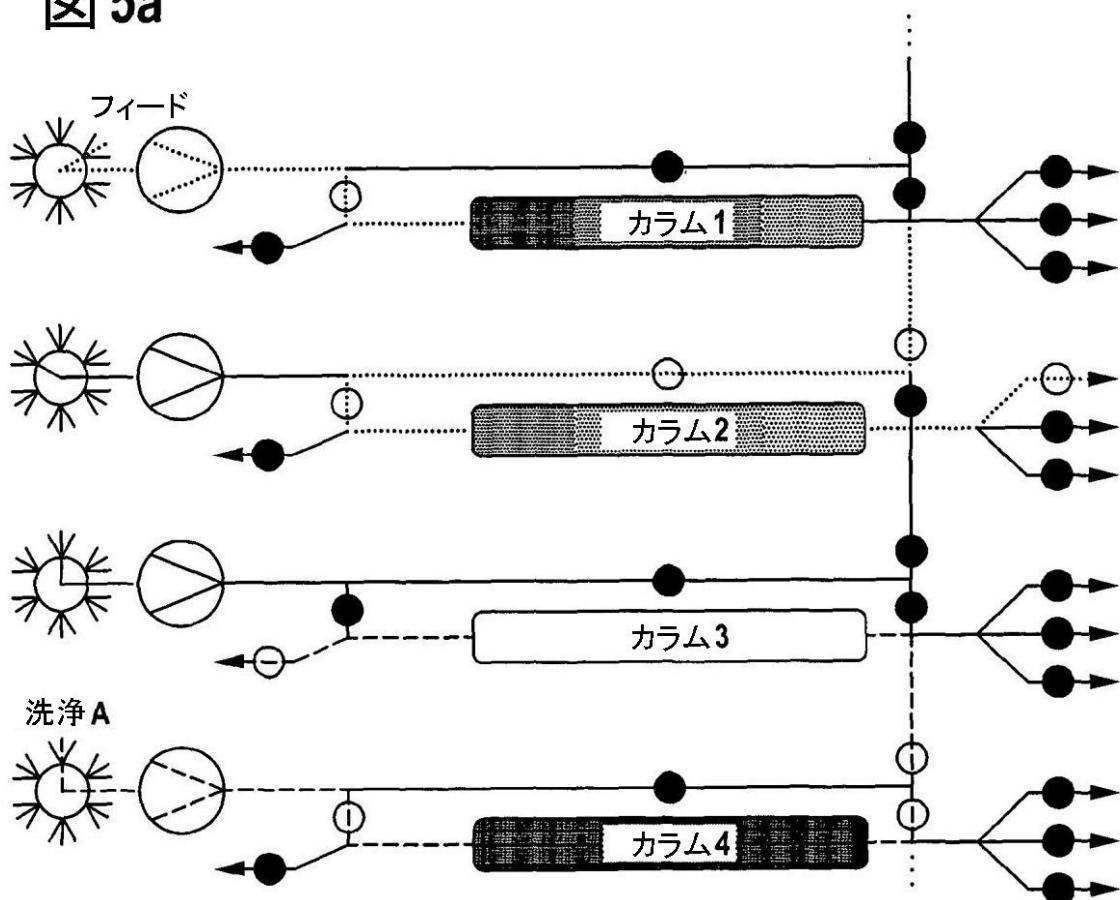
【図 4】

図 4



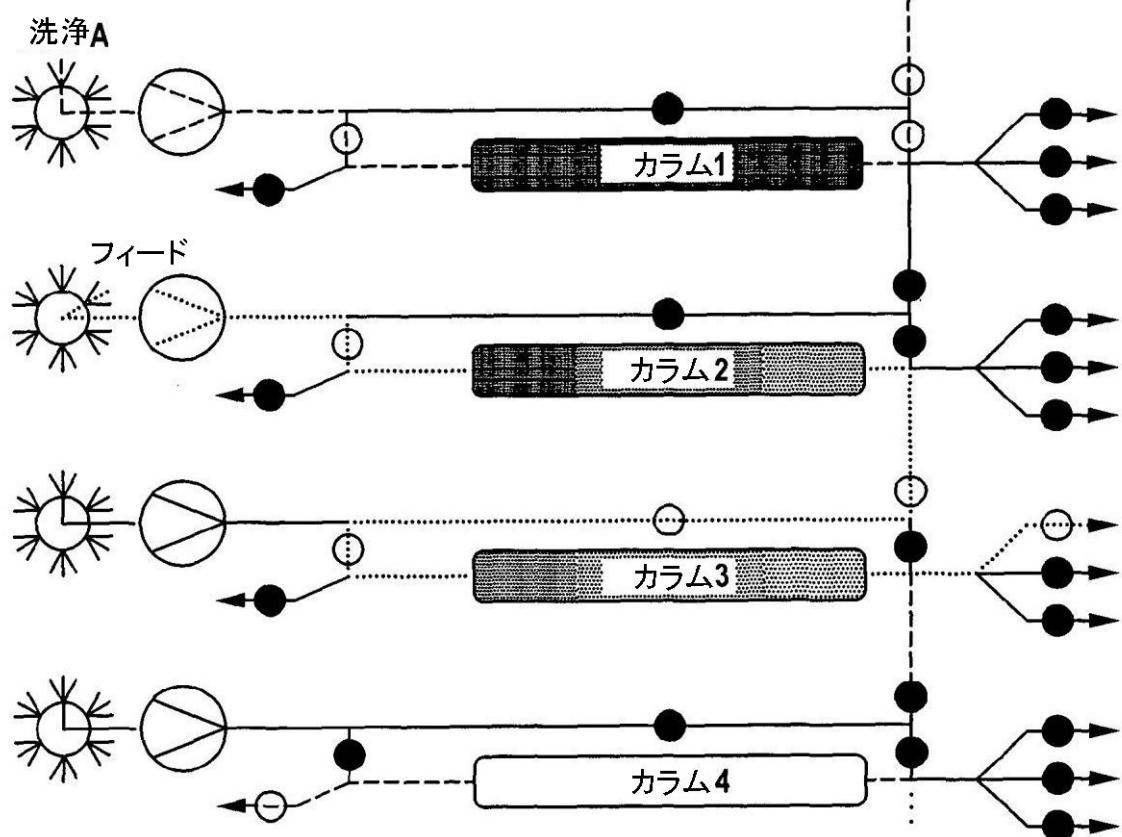
【図 5 - 1】

図 5a



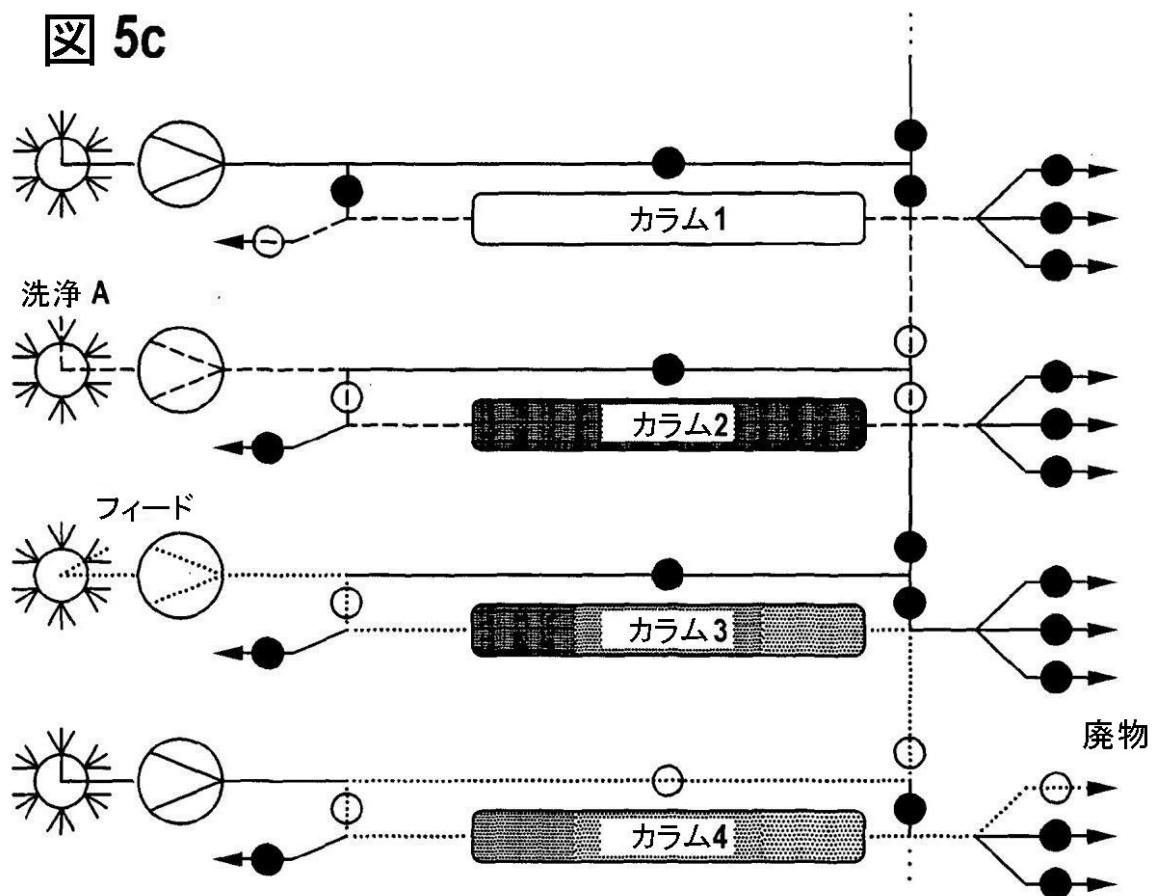
【図 5 - 2】

図 5b



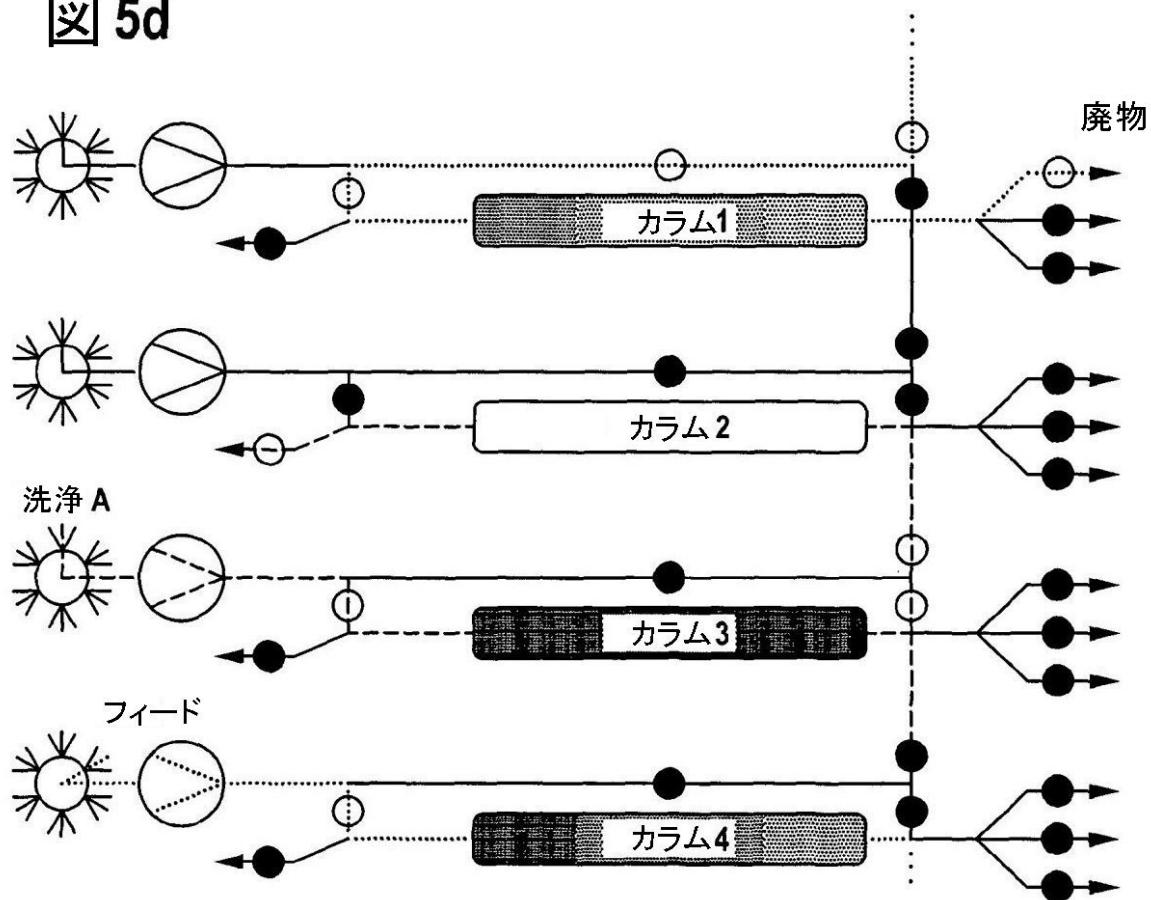
【図 5 - 3】

図 5c



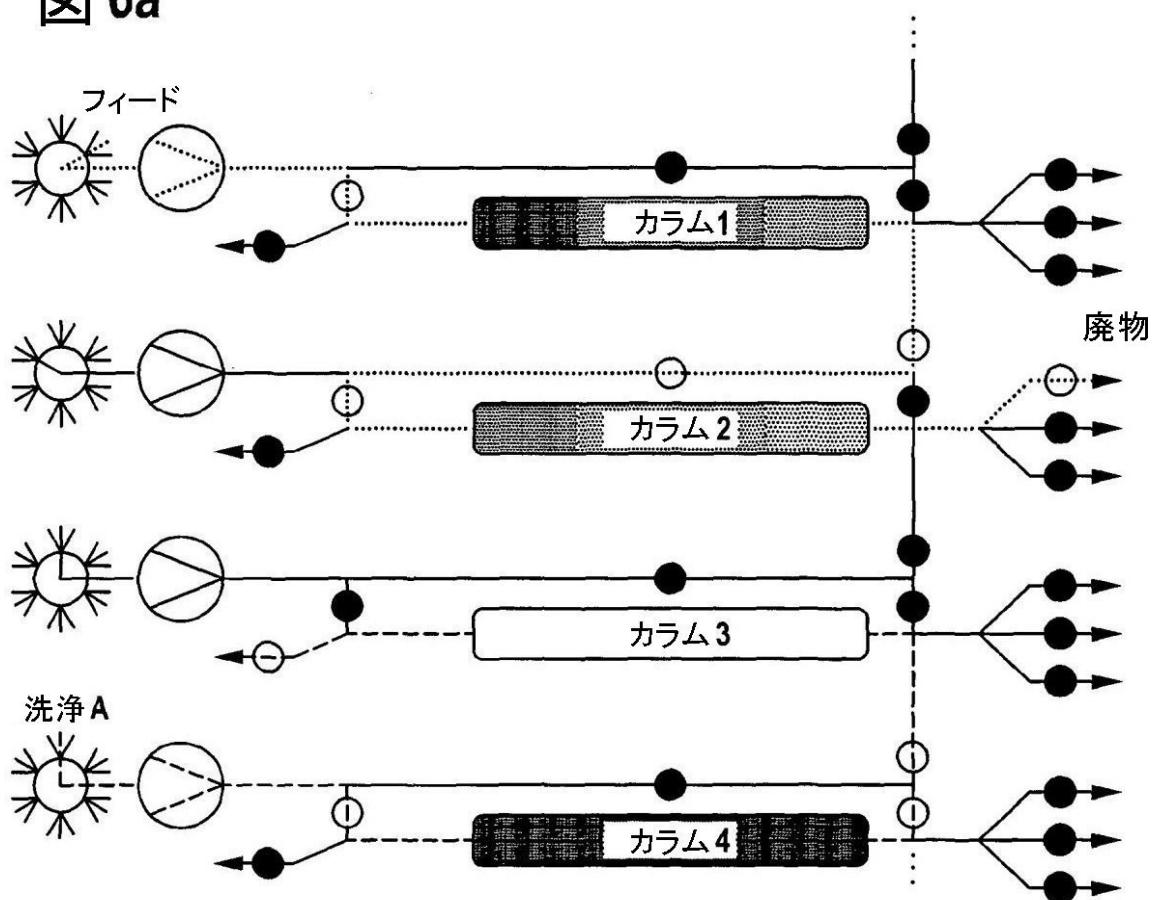
【図 5 - 4】

図 5d



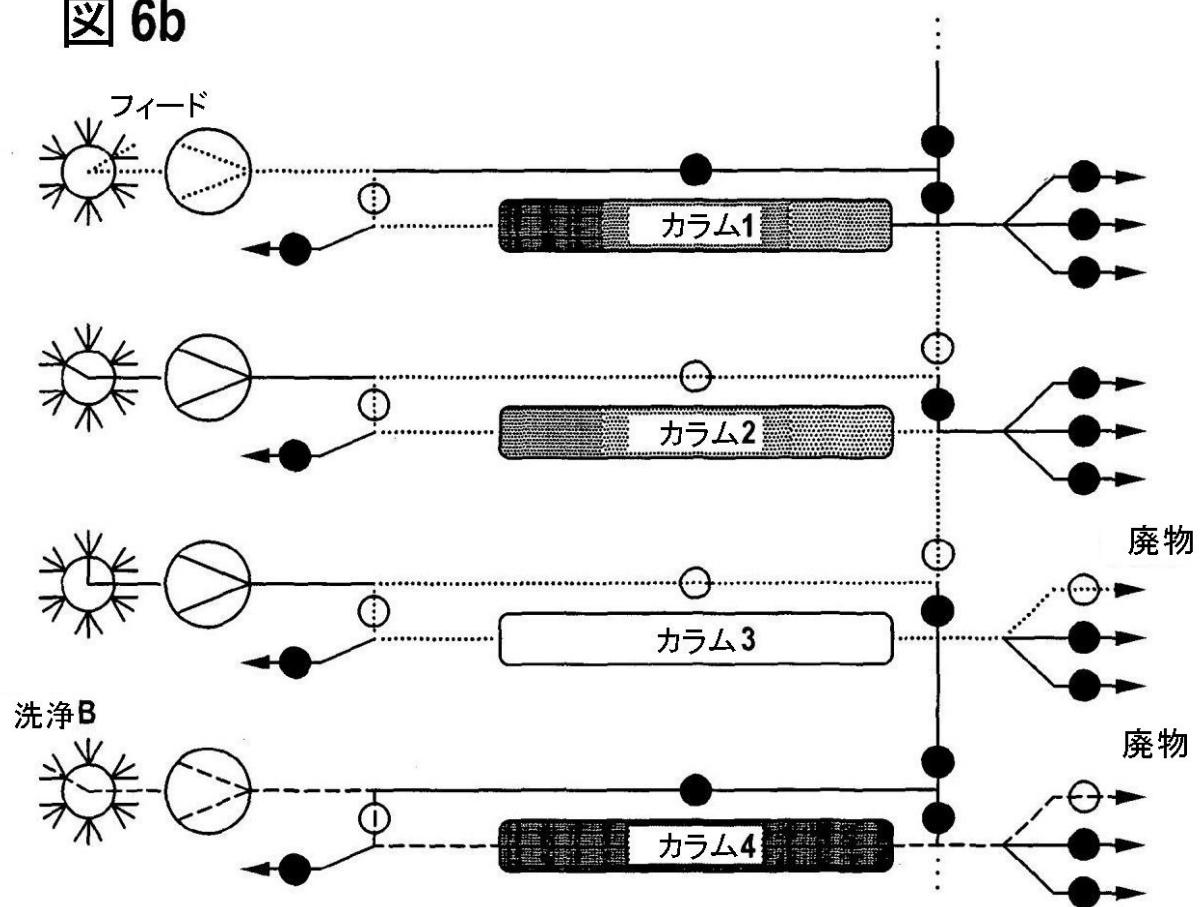
【図 6 - 1】

図 6a



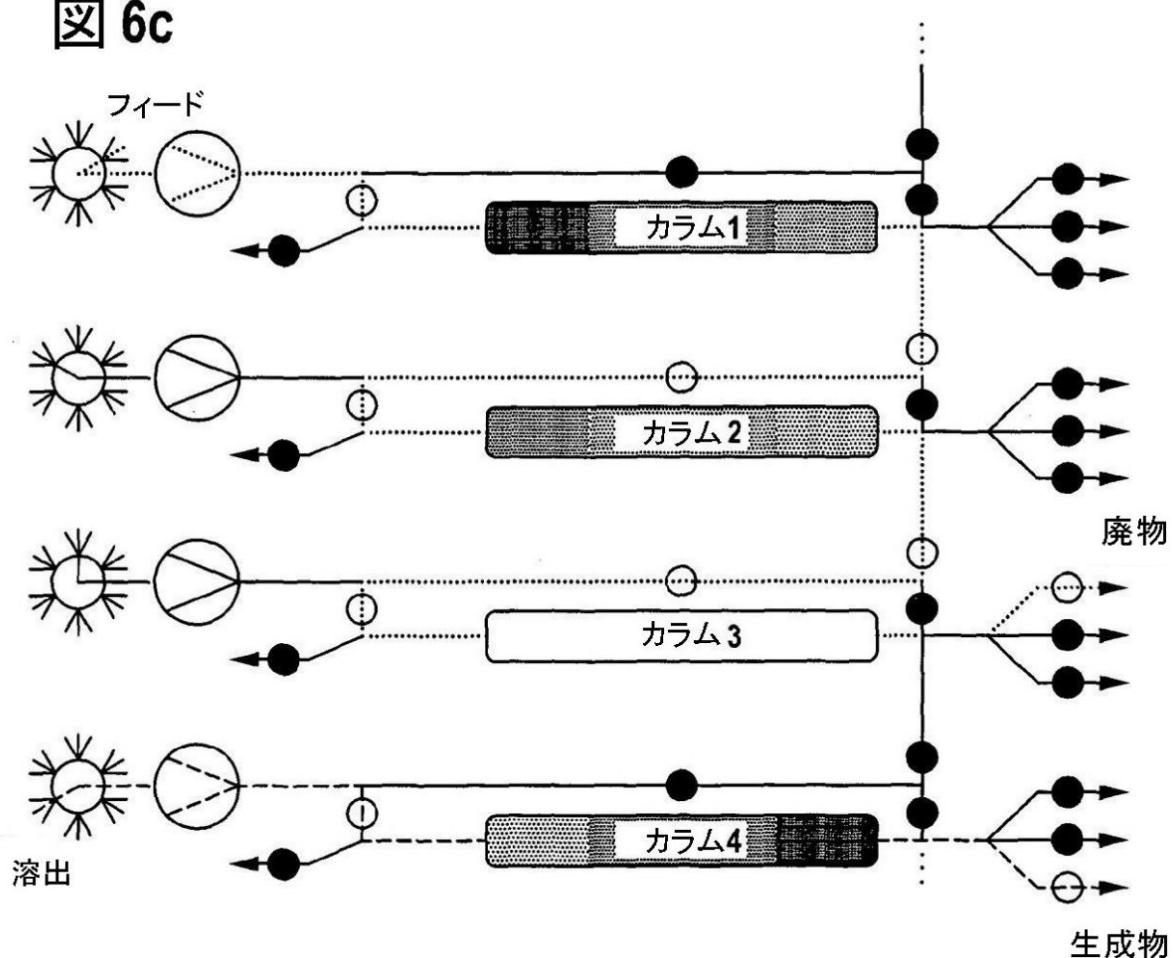
【図 6 - 2】

図 6b



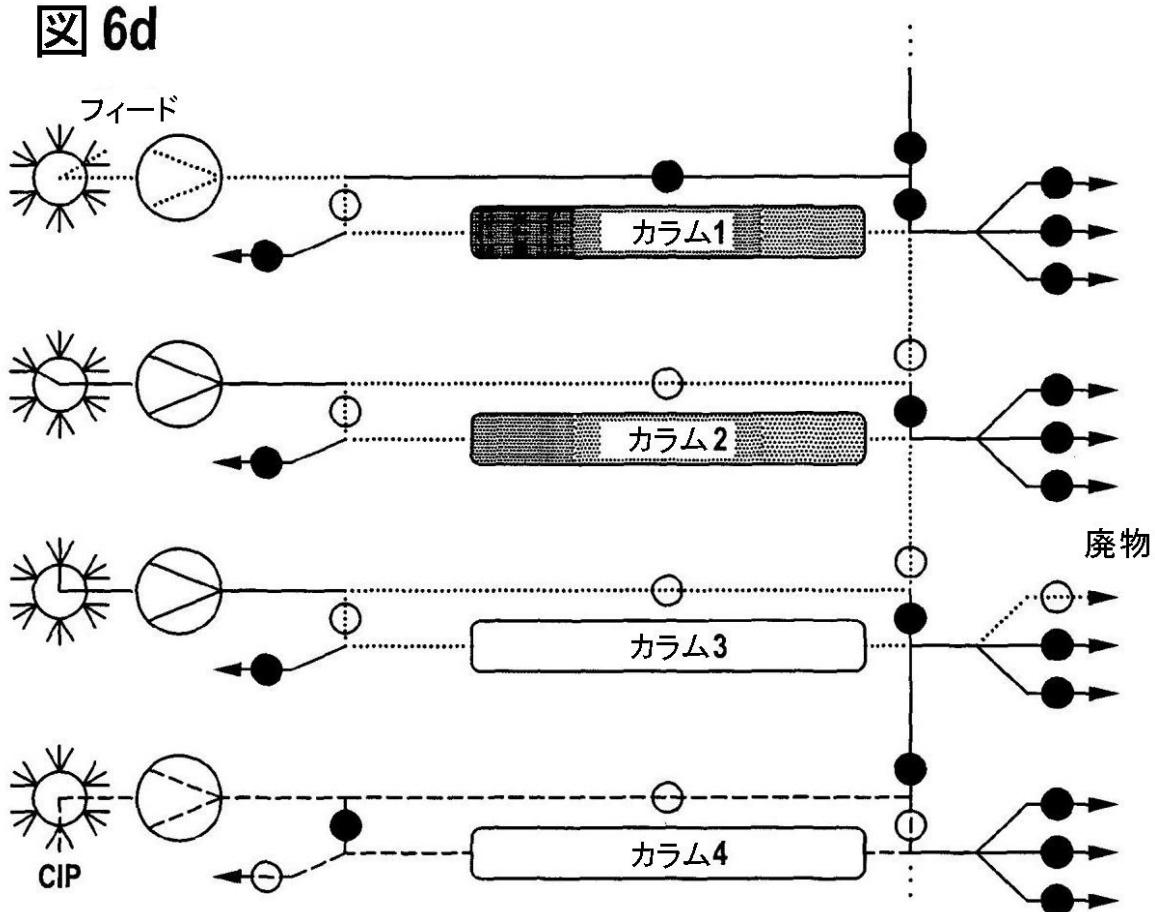
【図 6 - 3】

図 6c



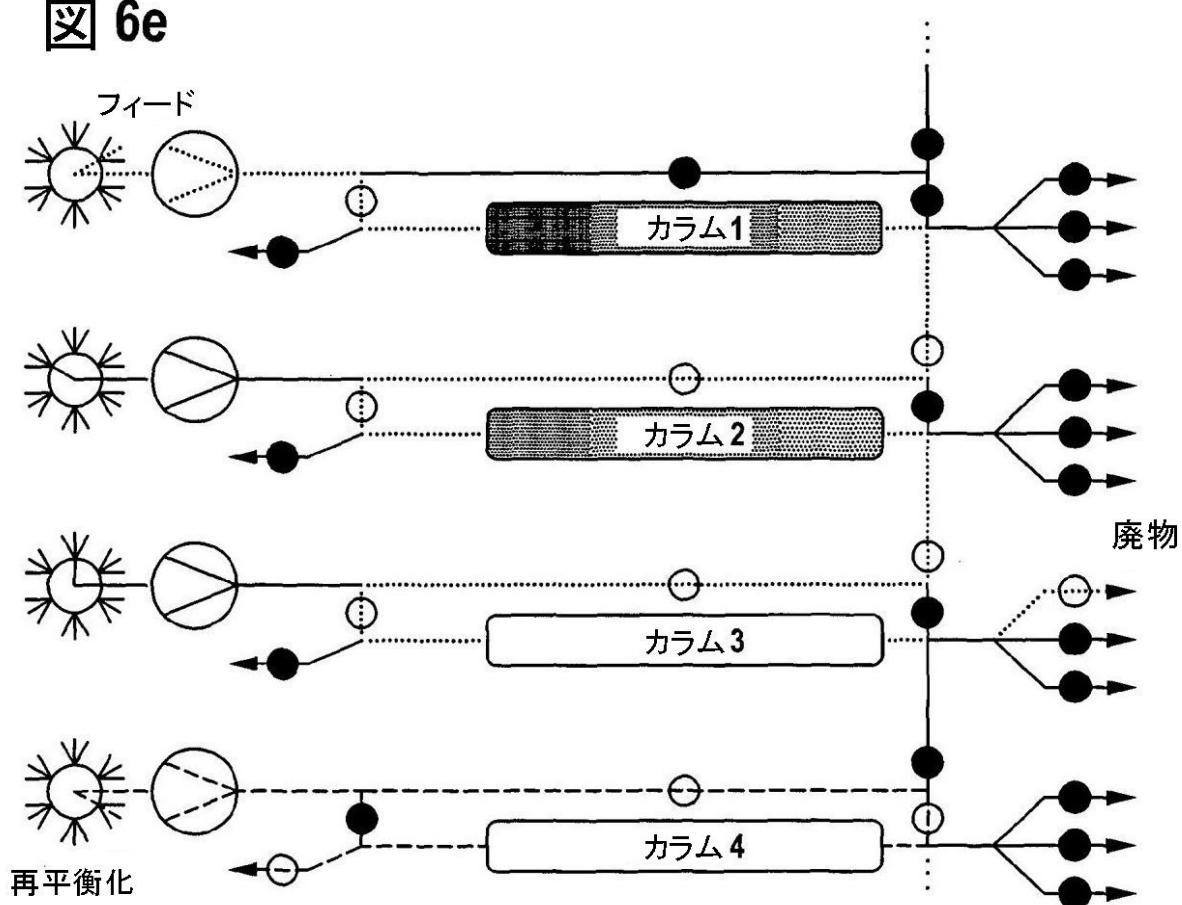
【図 6 - 4】

図 6d



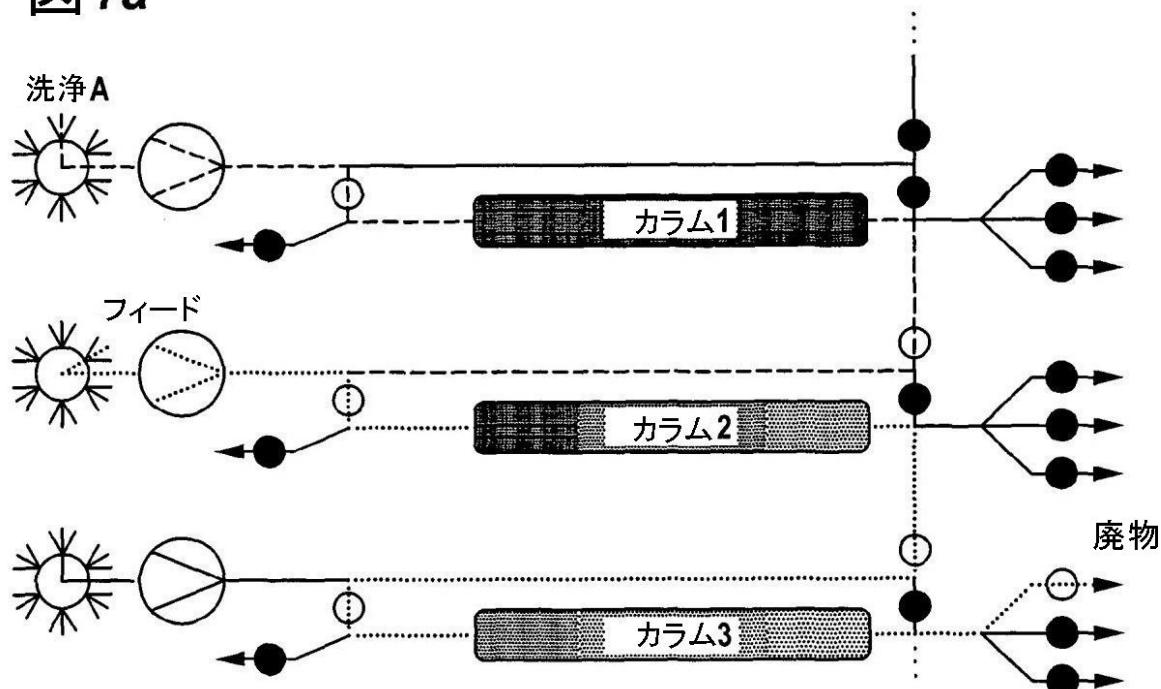
【図 6 - 5】

図 6e



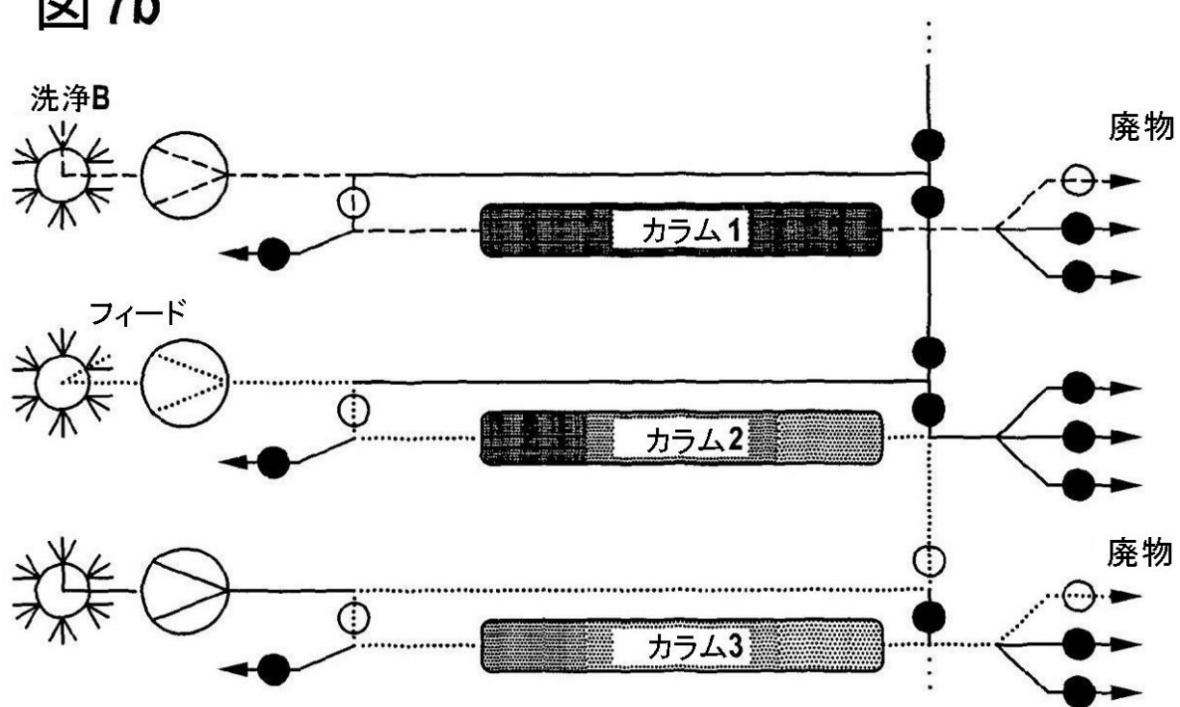
【図 7 - 1】

図 7a



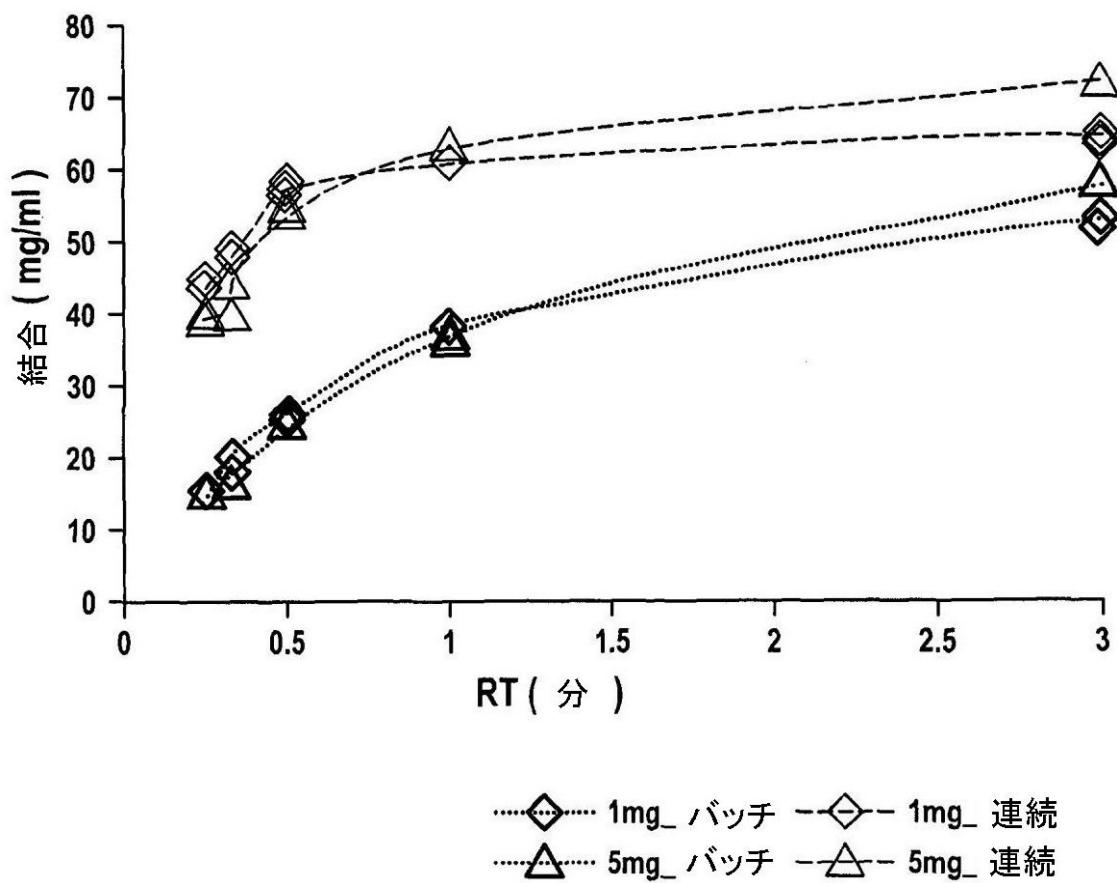
【図 7 - 2】

図 7b



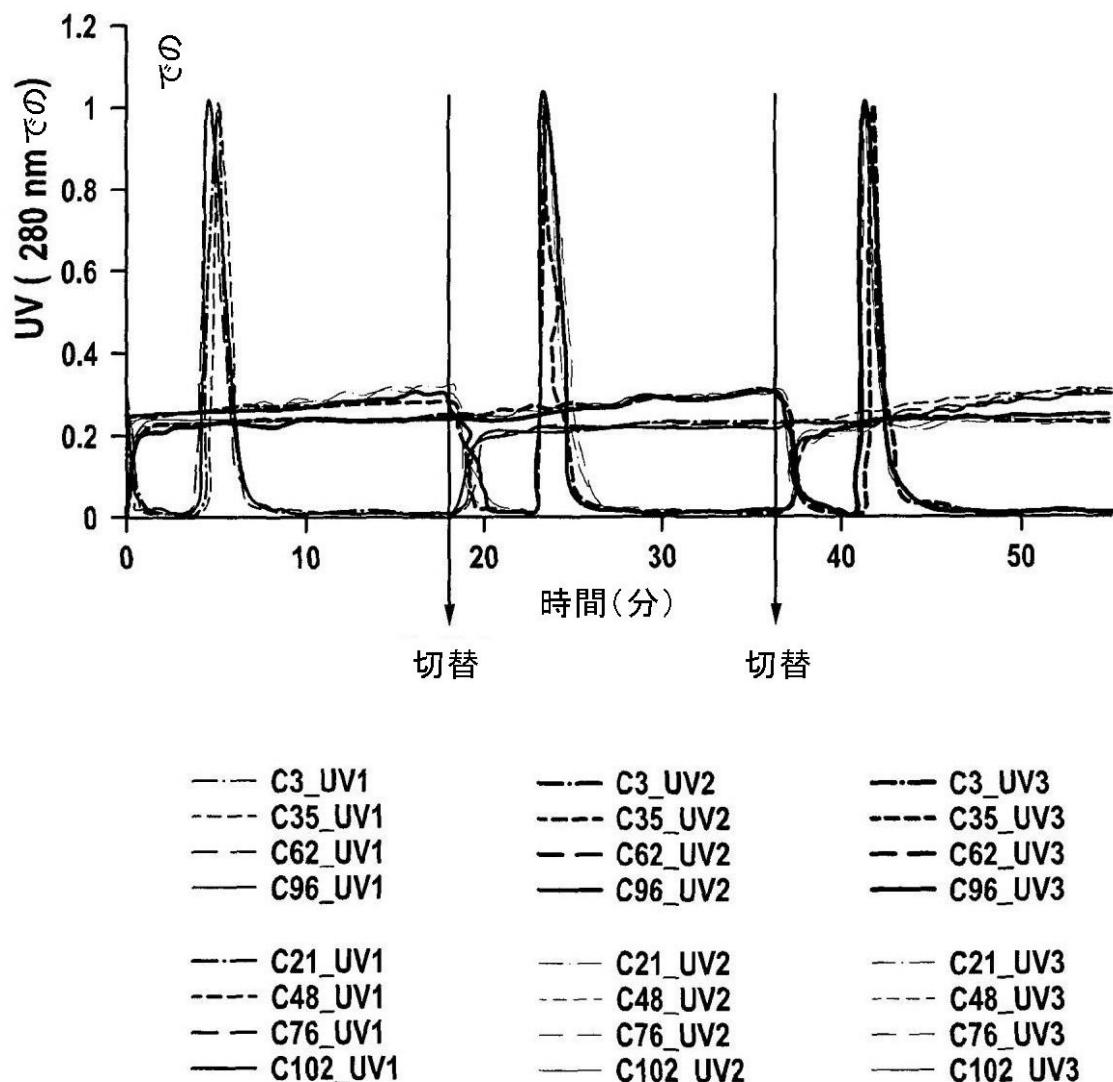
【図8】

図8



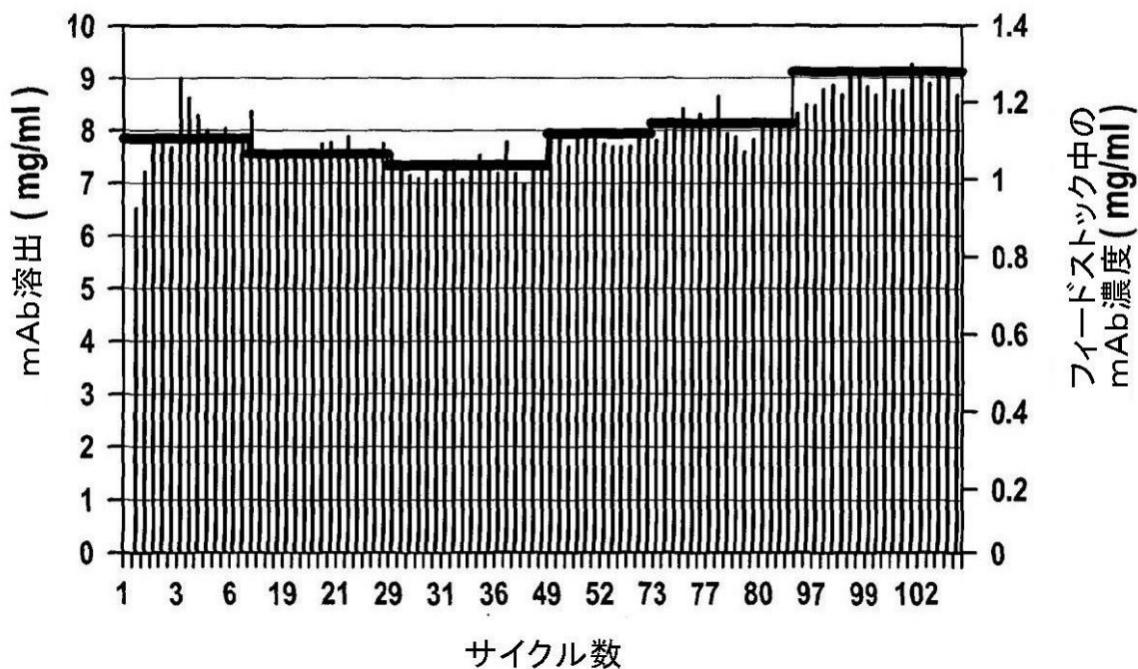
【図9】

図9



【図 10】

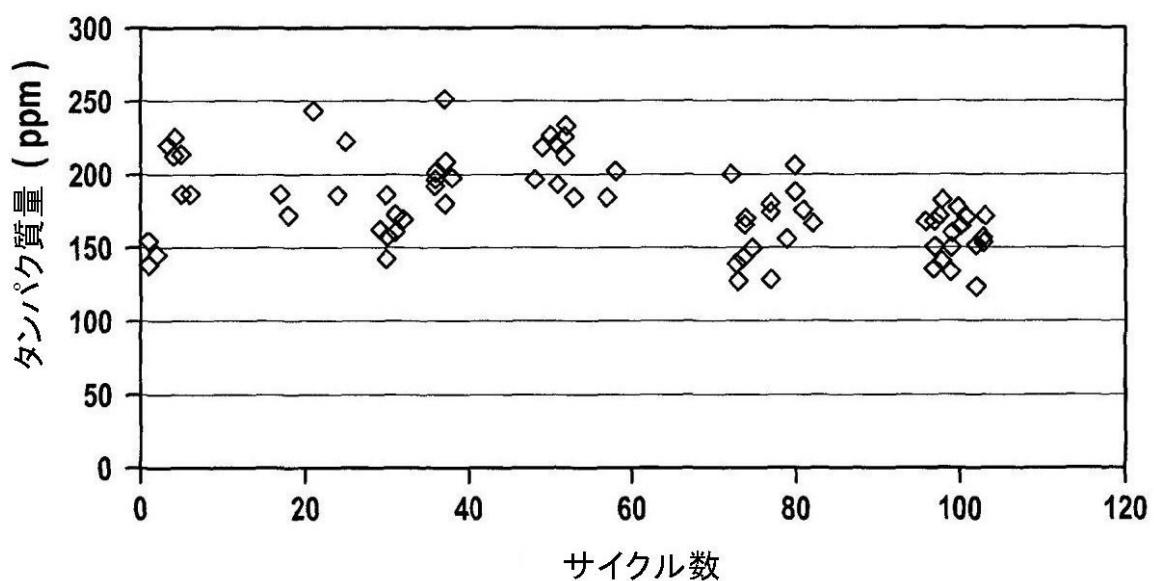
図 10



【図 11】

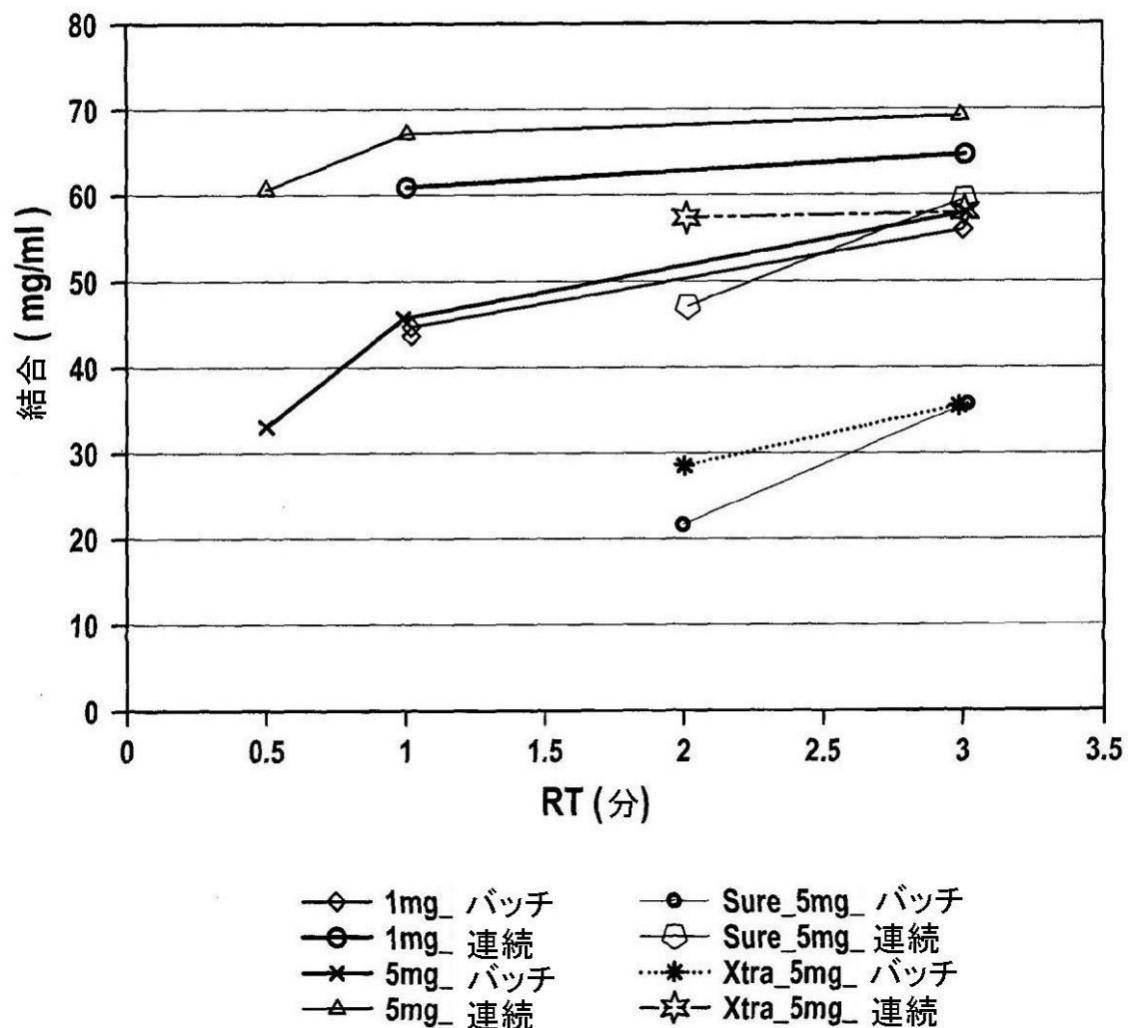
図 11

HCP



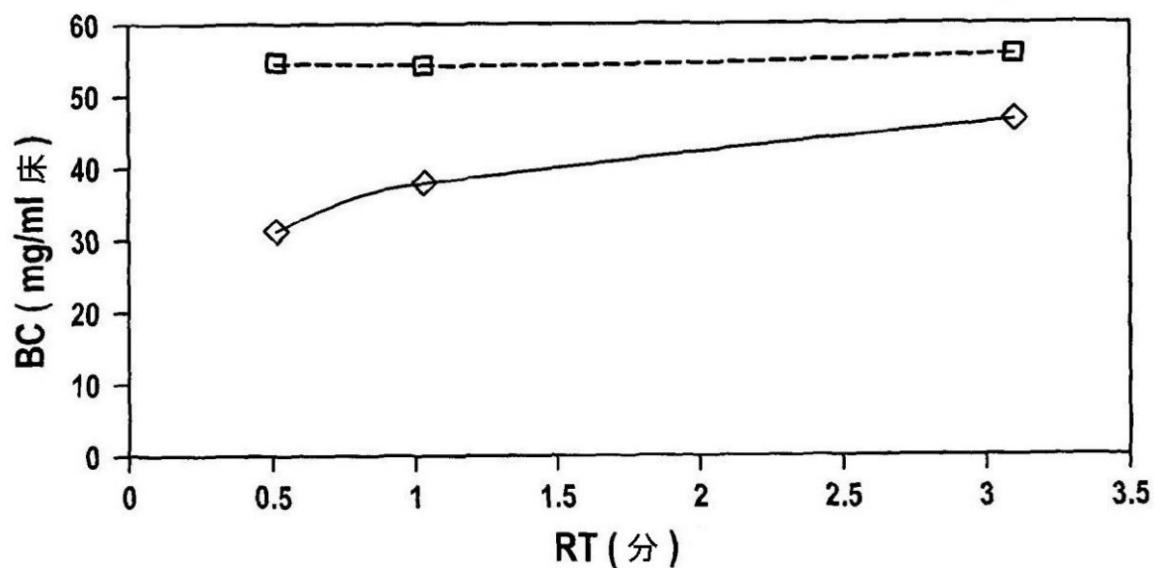
【図 12】

図12



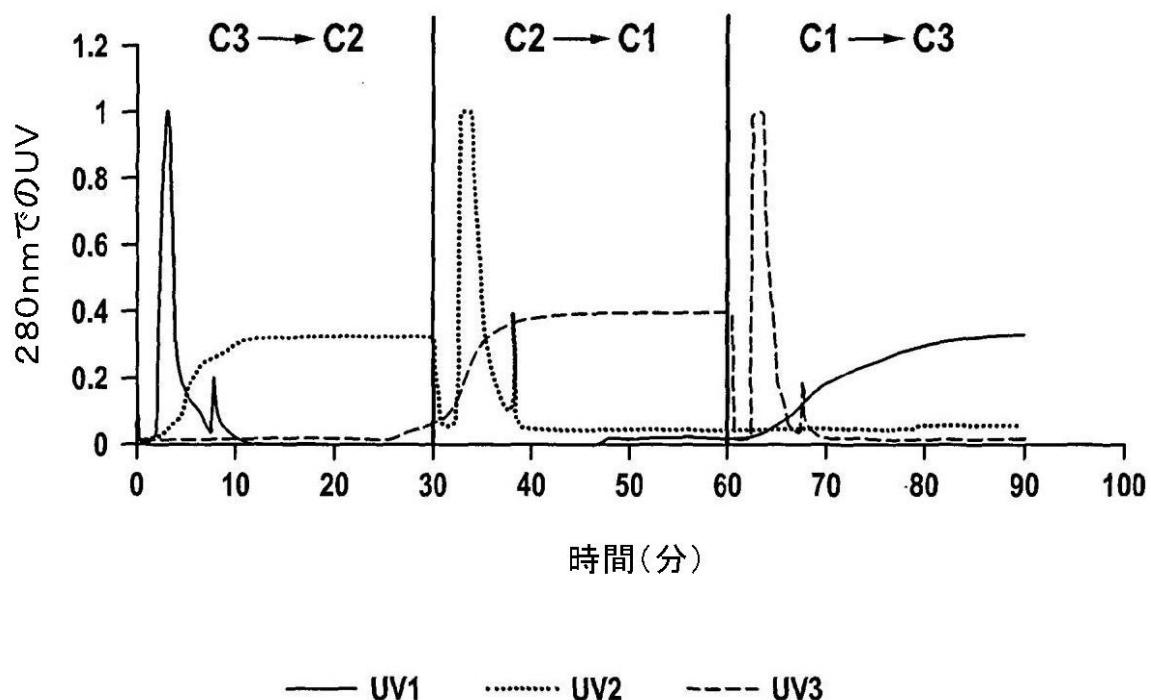
【図 13】

図 13



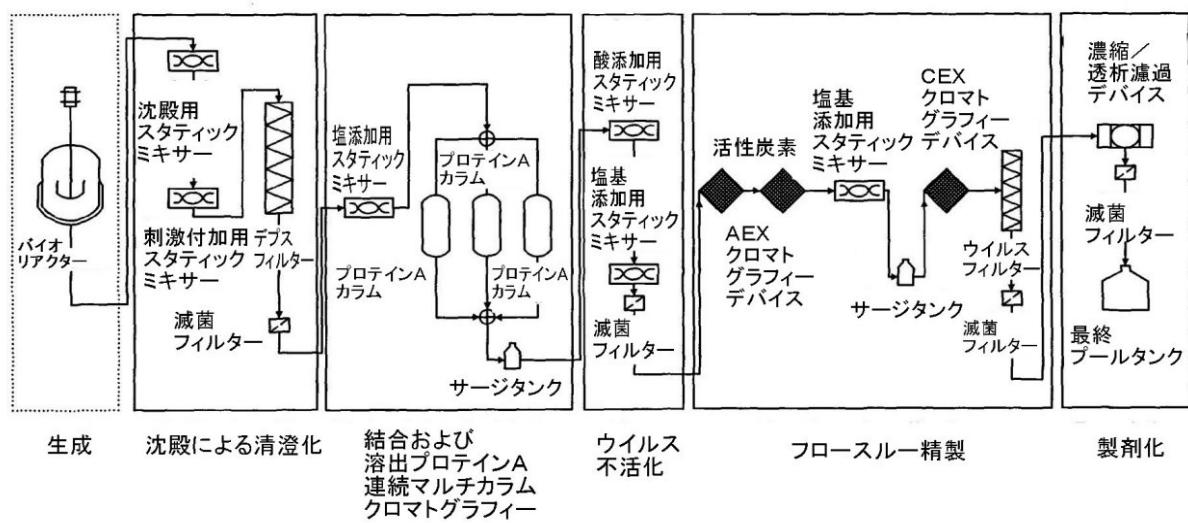
【図 14】

図 14



【図15】

図15



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2013/000910									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. B01D15/18 G01N30/46 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) B01D G01N											
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 <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">CN 101 948 399 A (UNIV JIANGNAN) 19 January 2011 (2011-01-19) claims; figure; examples -----</td> <td style="padding: 2px;">1-11</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">T. MÜLLER-SPÄTH ET AL: "Two step capture and purification of IgG2 using multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP)", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 107, no. 6, 15 December 2010 (2010-12-15), pages 974-984, XP055005554, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.22887 Paragraph "Capture step with MCSGP"; tables I, IV ----- -/-</td> <td style="padding: 2px;">1-10, 12-14</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	CN 101 948 399 A (UNIV JIANGNAN) 19 January 2011 (2011-01-19) claims; figure; examples -----	1-11	X	T. MÜLLER-SPÄTH ET AL: "Two step capture and purification of IgG2 using multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP)", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 107, no. 6, 15 December 2010 (2010-12-15), pages 974-984, XP055005554, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.22887 Paragraph "Capture step with MCSGP"; tables I, IV ----- -/-	1-10, 12-14
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	CN 101 948 399 A (UNIV JIANGNAN) 19 January 2011 (2011-01-19) claims; figure; examples -----	1-11									
X	T. MÜLLER-SPÄTH ET AL: "Two step capture and purification of IgG2 using multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP)", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 107, no. 6, 15 December 2010 (2010-12-15), pages 974-984, XP055005554, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.22887 Paragraph "Capture step with MCSGP"; tables I, IV ----- -/-	1-10, 12-14									
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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 25 April 2013	Date of mailing of the international search report 07/05/2013										
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Fourgeaud, Damien										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/000910

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 409 922 B1 (KANEKO KIKUZO [JP] ET AL) 25 June 2002 (2002-06-25) figures; examples -----	11
X	EP 2 108 423 A1 (AMPAC FINE CHEMICALS LLC [US]) 14 October 2009 (2009-10-14) claims; figures -----	11
A		1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2013/000910

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
CN 101948399	A	19-01-2011	NONE			
US 6409922	B1	25-06-2002		AT 261751 T 15-04-2004 AU 1687299 A 19-07-1999 CA 2282429 A1 08-07-1999 DE 69822445 D1 22-04-2004 DE 69822445 T2 04-11-2004 DK 969909 T3 13-04-2004 EP 0969909 A1 12-01-2000 JP 3478325 B2 15-12-2003 JP H11183459 A 09-07-1999 US 6409922 B1 25-06-2002 WO 9933540 A1 08-07-1999		
EP 2108423	A1	14-10-2009		AT 515302 T 15-07-2011 EP 2108423 A1 14-10-2009 US 2009242486 A1 01-10-2009		

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
B 0 1 D 15/08	(2006.01)	G 0 1 N 30/32 A
C 0 7 K 1/16	(2006.01)	G 0 1 N 30/88 J
		G 0 1 N 30/88 2 0 1 G
		B 0 1 D 15/08
		C 0 7 K 1/16

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,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,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,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,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(72)発明者 スクダス , ローマス

ドイツ連邦共和国 5 5 1 1 6 マインツ , ローフスシュトラーセ 4

F ターム(参考) 4D017 AA09 BA07 CB01 DA02 DA03 EA05 EB02
4H045 AA20 DA76 FA74 GA23 GA26