

【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 4 年 4 月 18 日(2022.4.18)

【公開番号】特開 2022-16605(P2022-16605A)

【公開日】令和 4 年 1 月 21 日(2022.1.21)

【年通号数】公開公報(特許)2022-011

【出願番号】特願 2021-190717(P2021-190717)

【国際特許分類】

C 0 7 K 14/78(2006.01)

C 1 2 P 21/02(2006.01)

【F I】

C 0 7 K 14/78

C 1 2 P 21/02

C

10

【手続補正書】

【提出日】令和 4 年 4 月 6 日(2022.4.6)

【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】

細胞培養から生成された組換えヒト 7 型コラーゲンを捕捉する方法において、

a) 前記細胞培養から採取された上清であって、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) 前記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) からの前記溶液を限外濾過ステップに供するステップであって、前記組換えヒト 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、前記溶液を限外濾過ステップに供するステップと、

d) ステップ b) からの前記溶液中に含まれる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) 前記組換えヒト 7 型コラーゲンを回収し、組換えヒト 7 型コラーゲンを含んでなる第 2 の保持液を得よう、前記限外濾過膜に隣接する前記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) 前記組換え 7 型コラーゲンを含んでなる未精製バルク液体を得よう前記第 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

を備える、方法。

【請求項 2】

ステップ a) の前に、

a) 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と、

b) 培養された宿主細胞から上清を採取するステップと

をさらに含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記未精製バルク液体は、ステップ b) から収集された前記溶液中の組換え 7 型コラーゲンのうち 40 ~ 80 % を含有する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記細胞培養は、少なくとも 200 リットル、好適には少なくとも 1500 リットルの

20

30

40

50

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 1 から 3 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記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】

前記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 1 から 5 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のうちいずれか一項に記載の方法であって、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、ドデシル硫酸ナトリウム、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一つを含んでなる、方法。

10

【請求項 8】

前記可溶化剤はアルギニンを含んでなる、請求項 1 から 7 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

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、前記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、前記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ことを防止し、十分に小さい不純物は前記不活性シェルを通り抜けて前記リガンド活性化コアに結合する、前記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、

20

b) 前記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) からの前記第 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、

30

d) 前記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、前記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 f) の第 2 の流出液を、前記組換えヒト 7 型コラーゲンを濃縮するよう限外濾過ステップに供するステップと、

g) ステップ f) からの濃縮された組換えヒト 7 型コラーゲンを、バッファーを用いて透析濾過するステップと、

h) 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

40

を含んでなり、
一つ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 10】

前記限外濾過ステップは接線流フィルタを含んでなり、前記接線流フィルタは親水性膜を含んでなる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ f) に先立ち、ステップ e) からの前記第 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をさらに含んでなる、請求項 9 又は 10 に記載の方法。

50

【請求項 1 2】

前記一つ以上のウイルス低減ステップは、ステップ a) に先立って組換えヒト 7 型コラーゲンを含有する前記試料を照射するステップと、ステップ b) からの前記第 1 の流出液に界面活性剤を添加するステップと、ステップ e) からの前記第 2 の流出液を多孔質フィルタに供するステップとを含んでなる、請求項 9 から 1 1 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記エンドヌクレアーゼ処理ステップは、ステップ d) からの前記溶出した組換えヒト 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 9 から 1 2 のうちいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

前記バッファーは、少なくとも一つの塩、可溶化剤、又は糖を含んでなる、請求項 9 から 1 3 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記少なくとも一つの塩は、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の一つ以上である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記可溶化剤はアルギニンである、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記糖はスクロースである、請求項 1 4 に記載の方法。

20

【請求項 1 8】

前記少なくとも一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の一つ以上であり、前記可溶化剤はアルギニンであり、かつ前記糖はスクロースである、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 9】

ステップ h) の前記精製された組換えヒト 7 型コラーゲンは、ステップ a) からの前記試料中の組換えヒト 7 型コラーゲンの量の平均 1 5 ~ 3 0 % を含有する、請求項 9 から 1 8 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

ステップ a) における前記試料は少なくとも 2 5 グラムの組換えヒト 7 型コラーゲンを含有する、請求項 9 から 1 9 のうちいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 2 1】

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 h) において回収される、請求項 9 から 2 0 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

ステップ h) の前記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 1 m g あたり 2 0 0 0 n g 以下、好適には 1 0 0 0 n g / m g 以下、及びより好適には 6 0 0 n g / m g 以下しか含有しない、請求項 9 から 2 1 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

ステップ h) の前記精製された組換えヒト 7 型コラーゲンは、宿主細胞 D N A を組換えヒト 7 型コラーゲン 1 m g あたり 4 2 p g 以下、好適には 2 5 p g / m g 以下、及びより好適には 1 5 p g / m g 以下しか含有しない、請求項 9 から 2 2 のうちいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 2 4】

ステップ h) の前記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 1 m g あたり 1 . 0 E U / m g 以下、好適には 0 . 7 0 E U / m g 以下、及びより好適には 0 . 5 0 E U / m g 以下しか含有しない、請求項 9 から 2 3 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

50

ステップ a) の前に、

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

b) 前記デブ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) からの前記溶液を限外濾過ステップに供するステップであって、前記組換え 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、前記溶液を限外濾過ステップに供するステップと、

d) ステップ b) からの前記溶液中に含有される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 7 型コラーゲンを回収し、組換え 7 型コラーゲンを含んでなる第 2 の保持液を得よう、前記限外濾過膜に隣接する前記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よう、前記第 2 の保持液を透析濾過ステップに供するステップと、

g) 任意選択で前記未精製バルク液体を凍結するステップと

をさらに含んでなる、請求項 9 から 24 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

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、ドデシル硫酸ナトリウム、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一つを含んでなる、請求項 11 から 25 のうちいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

宿主細胞タンパク質を組換えヒト 7 型コラーゲン 1 mg あたり 200 ng 以下、宿主細胞 DNA 組換えヒト 7 型コラーゲン 1 mg あたり 42 pg 以下、及び / 又は、エンドトキシンを組換えヒト 7 型コラーゲン 1 mg あたり 1.0 EU / mg 以下しか含有しない、精製された組換え 7 型コラーゲンを含んでなる医薬組成物。

10

20

30

40

50