

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6544808号  
(P6544808)

(45) 発行日 令和1年7月17日(2019.7.17)

(24) 登録日 令和1年6月28日(2019.6.28)

(51) Int.Cl.	F I	
<b>C O 7 K 14/31 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/31	Z N A
<b>C O 7 K 19/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 19/00	
<b>C 1 2 N 15/31 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/31	
<b>C 1 2 N 15/62 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/62	Z
<b>C 1 2 N 15/63 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/63	Z
請求項の数 11 (全 18 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-525329 (P2016-525329)	(73) 特許権者	516105833
(86) (22) 出願日	平成26年7月8日(2014.7.8)		ジーイー・ヘルスケア・バイオプロセス・
(65) 公表番号	特表2016-523959 (P2016-523959A)		アールアンドディ・アクチボラダ
(43) 公表日	平成28年8月12日(2016.8.12)		スウェーデン国 エスイー-75184
(86) 国際出願番号	PCT/SE2014/050872		ウプサラ プョルクガタン 30
(87) 国際公開番号	W02015/005859	(74) 代理人	100188558
(87) 国際公開日	平成27年1月15日(2015.1.15)		弁理士 飯田 雅人
審査請求日	平成29年7月5日(2017.7.5)	(74) 代理人	100154922
(31) 優先権主張番号	1350860-1		弁理士 崔 允辰
(32) 優先日	平成25年7月10日(2013.7.10)	(74) 代理人	100207158
(33) 優先権主張国	スウェーデン(SE)		弁理士 田中 研二
(31) 優先権主張番号	1350859-3	(74) 代理人	100137545
(32) 優先日	平成25年7月10日(2013.7.10)		弁理士 荒川 聡志
(33) 優先権主張国	スウェーデン(SE)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 突然変異免疫グロブリン結合ポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリペプチドであって、配列番号 1 又は配列番号 2 によって特定されるブドウ球菌プロテイン A (S p A) の B 又は C ドメインの変異体或いは配列番号 3 によって特定されるプロテイン Z の変異体を含み、少なくとも 9 位のグルタミン残基が、アスパラギン以外のアミノ酸に変異しており、

配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 20、配列番号 25、配列番号 26 及び配列番号 27 からなる群から選択される配列を含んでおり、免疫グロブリン又は F c 含有タンパク質に結合することができる、ポリペプチド。

【請求項 2】

システイン残基、複数のリジン残基及び複数のヒスチジン残基からなる群から選択される 1 つ以上のカップリング要素を C 末端又は N 末端にさらに含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の複数のポリペプチドユニットを含む、免疫グロブリン又は F c 含有タンパク質に結合することができる多量体。

【請求項 4】

請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチド又は請求項 3 に記載の多量体をコードする、核酸又はベクター。

【請求項 5】

10

20

請求項 1 又は 2 に記載の複数のポリペプチド又は請求項 3 に記載の多量体が固体支持体に例えばチオエーテル結合を介してカップリングされている、分離マトリックス。

【請求項 6】

免疫グロブリンを単離する方法であって、請求項 5 に記載の分離マトリックスを使用する、方法。

【請求項 7】

a) 免疫グロブリンを含む液体サンプルを、前記分離マトリックスと接触させる工程、  
b) 洗浄液で分離マトリックスを洗浄する工程、  
c) 溶出液を用いて、分離マトリックスから免疫グロブリンを溶出する工程、及び  
d) クリーニング液で分離マトリックスをクリーニングする工程  
を含んでおり、任意には工程 a) ~ d) を少なくとも 10 回、例えば少なくとも 50 回又は 50 ~ 200 回繰り返す、請求項 6 に記載の方法。

10

【請求項 8】

クリーニング液が、アルカリ性であって、例えば 13 ~ 14 の pH を有しているか、及び/又はクリーニング液が 0.1 ~ 1.0 M NaOH 又は KOH、例えば 0.5 ~ 1.0 M NaOH 又は KOH を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記配列が、配列番号 6、配列番号 7 及び配列番号 8 からなる群から選択される、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

前記配列が、配列番号 9、配列番号 10 及び配列番号 20 からなる群から選択される、請求項 1 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 11】

前記配列が、配列番号 25、配列番号 26 及び配列番号 27 からなる群から選択される、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アフィニティークロマトグラフィーの分野、より具体的には、免疫グロブリンのアフィニティークロマトグラフィーに有用なプロテイン A の突然変異免疫グロブリン結合ドメインに関する。本発明はまた、突然変異ドメインの多量体、及び突然変異ドメイン又は多量体を含有する分離マトリックスに関する。

30

【背景技術】

【0002】

免疫グロブリンは、製造又は開発のいずれかで世界的に最も普及しているバイオ医薬品の代表である。この特定の治療市場に対する高い商業上の需要及びそれ故のその価値のため、製薬会社は、関連コストを管理しながら、それぞれの mAb の製造プロセスの生産性を最大限にすることに重点を置いている。

【0003】

アフィニティークロマトグラフィーは、ほとんどの場合、これらの免疫グロブリン分子、例えばモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の精製における重要な工程の 1 つとして使用される。特に興味深いクラスのアフィニティー試薬は、免疫グロブリン分子の不変の部分に特異的に結合することができるタンパク質であり、このような相互作用は、抗体の抗原結合特異性と無関係である。このような試薬は、限定されないが、血清調製物もしくは血漿調製物又は細胞培養由来の供給材料などの様々なサンプルから、免疫グロブリンをアフィニティークロマトグラフィーによって回収するために広く使用することができる。このようなタンパク質の一例は、異なる種由来の IgG 免疫グロブリンの Fc 及び Fab 部分に結合することができるドメインを含有するブドウ球菌プロテイン A である。

40

【0004】

50

ブドウ球菌プロテインA (SpA) をベースとする試薬は、親和性及び選択性が高いため、バイオテクノロジーの分野 (例えば、抗体の捕捉及び精製、並びに検出又は定量に関するアフィニティークロマトグラフィー) において、広範な用途が見出されている。現在、SpA をベースとするアフィニティー媒体は、おそらく、工業用の細胞培養上清を含む様々なサンプルからモノクローナル抗体及びその断片を単離するための最も広く使用されているアフィニティー媒体である。したがって、プロテインA - リガンドを含む様々なマトリックスが、例えば、天然のプロテインA (例えば、Protein A SEPHAROSE (商標), GE Healthcare, Uppsala, Sweden) の形態で市販されており、組換えプロテインA (例えば、rProtein A SEPHAROSE (商標), GE Healthcare) から構成されるものもある。より具体的には、市販の組換えプロテインA製品で行われる遺伝子操作は、支持体へのその付着を容易にするためのものである。

10

#### 【0005】

これらの用途では、他のアフィニティークロマトグラフィー用途のように、混入物質の確実な除去に総合的な配慮が必要とされる。例えば、このような混入物質は、クロマトグラフィー法において固定相又はマトリックスに吸着される非溶出分子、例えばタンパク質、炭水化物、脂質、細菌及びウイルスを含む望ましくない生体分子又は微生物であり得る。後の使用の前にマトリックスを再生するために、マトリックスからのこのような混入物質の除去は、通常、所望の産物が最初に溶出した後に行われる。このような除去は、通常、混入物質を固定相から溶出することができる薬剤を使用するクリーンインプレイス (CIP) として公知の手法を用いる。多くの場合に使用されるこのようなクラスの薬剤の1つは、固定相を通過するアルカリ性溶液である。現在最も広く使用されているクリーニング及び消毒薬剤はNaOHであり、その濃度は混入の程度及び性質に応じて、0.1M ~ 例えば最大1Mの範囲であり得る。この戦略は、マトリックスを13超のpH値に曝露することに関連する。タンパク質性のアフィニティーリガンドを含有する多くのアフィニティークロマトグラフィーマトリックスについて、このようなアルカリ性環境は極めて苛酷な条件であるため、関連の高pHに対するリガンドの不安定性を原因とする能力の低下をもたらす。

20

#### 【0006】

したがって、広範な研究では、アルカリ性pH値に耐える改善された能力を示す人工タンパク質リガンドの開発に焦点が当てられている。例えば、Gulichら (Susanne Gulich, Martin Linhult, Per-Ake Nygren, Mathias Uhlen, Sophia Hober, Journal of Biotechnology 80 (2000), 169 - 178) は、連鎖球菌のアルブミン結合性ドメイン (ABD) のアルカリ性環境における安定性を改善するためにタンパク質工学を提案している。Gulichらは、4つのアスパラギン残基すべてがロイシン (1つの残基)、アスパラギン酸 (2つの残基) 及びリジン (1つの残基) により置換されたABDの突然変異体を作り出した。さらに、Gulichらは、彼らの突然変異体が、天然のタンパク質のものと類似の標的タンパク質結合挙動を示すこと、人工リガンドを含有するアフィニティークラムが、アルカリ性条件に繰り返し曝露した後に、親の非人工リガンドを使用して調製したカラムよりも高い結合能を示すことを報告している。したがって、そこでは、構造及び機能に対するいかなる重大な影響も及ぼさずに、4つのアスパラギン残基すべてを置換することができると結論されている。

30

40

#### 【0007】

最近の研究は、プロテインA (SpA) を変化させて同様の特性をもたらす得ることを示している。米国特許出願公開第2005/0143566号では、1以上のアスパラギン残基がグルタミン及びアスパラギン酸以外のアミノ酸に突然変異すると、突然変異は、最大約13 ~ 14のpH値において、親SpA (例えば、SpAのBドメイン、又はSpAのBドメイン由来の合成構築物であるプロテインZ (米国特許第5,143,844号)) と比較して増加した化学安定性を付与することが開示されている。著者らは、これら

50

の突然変異タンパク質をアフィニティリガンドとして使用すると、その分離媒体は、予想通り、アルカリ性薬剤を使用するクリーニング手順により耐性良好であり得ることを示している。国際公開第2008/039141号、特開2006304633号、欧州特許第1992692号、欧州特許第2202310号、国際公開第2010/110288号、国際公開第2012/086660号及び国際公開第2012/083425号では、アルカリ安定性を高めることを目的とするプロテインAドメインのさらなる突然変異も公表されている。しかしながら、現在利用可能な突然変異は依然として、アルカリ性pHに対して感受性であり、クリーニング中のNaOH濃度は通常、0.1Mに制限されている（これは、完全なクリーニングを達成することが困難であることを意味する）。クリーニングを改善するより高いNaOH濃度は、許容され得ない能力喪失につながる。

10

【0008】

したがって、この分野では、アルカリクリーニング手順に関して、さらに改善された安定性を有するタンパク質リガンドを含有する分離マトリックスを得る必要性が依然として存在する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】米国特許出願公開第20130046056号

【発明の概要】

【0010】

20

本発明の一態様は、アルカリ安定性が向上したポリペプチドを提供することである。これは、請求項1に記載されているポリペプチドを用いて達成される。

【0011】

1つの利点は、アルカリ安定性が親ポリペプチドよりも改善されることである。さらなる利点は、免疫グロブリン及び他のFc含有タンパク質に対する高選択的結合である。

【0012】

本発明の第2の態様は、アルカリ安定性が向上した多量体であって、複数のポリペプチドを含む多量体を提供することである。これは、特許請求の範囲に記載されている多量体を用いて達成される。

【0013】

30

本発明の第3の態様は、アルカリ安定性が向上したポリペプチド又は多量体をコードする核酸又はベクターを提供することである。これは、特許請求の範囲に記載されている核酸又はベクターを用いて達成される。

【0014】

本発明の第4の態様は、アルカリ安定性が向上したポリペプチド又は多量体を発現することができる発現系を提供することである。これは、特許請求の範囲に記載されている発現系を用いて達成される。

【0015】

本発明の第5の態様は、免疫グロブリン及び他のFc含有タンパク質に選択的に結合することができる分離マトリックスであって、改善されたアルカリ安定性を示すことができる分離マトリックスを提供することである。これは、特許請求の範囲に記載されている分離マトリックスを用いて達成される。

40

【0016】

本発明の第6の態様は、免疫グロブリン又は他のFc含有タンパク質を単離する効率的かつ経済的な方法を提供することである。これは、特許請求の範囲に記載されている方法を用いて達成される。

【0017】

本発明のさらなる適切な実施形態は、従属請求項に記載されている。

【0018】

定義

50

用語「抗体」及び「免疫グロブリン」は、本明細書では互換的に使用され、抗体の断片、抗体又は抗体断片を含む融合タンパク質、及び抗体又は抗体断片を含むコンジュゲートを含むと理解される。

#### 【0019】

用語「Fc結合ポリペプチド」及び「Fc結合タンパク質」はそれぞれ、抗体の結晶化可能部分（Fc）に結合することができるポリペプチド又はタンパク質を意味し、例えば、プロテインA及びプロテインG、又は結合特性が維持されているそれらの任意の断片もしくは融合タンパク質を含む。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0020】

【図1】SPRバイオセンサーチップにカップリングした突然変異及び非突然変異単量体Zvar（配列番号4）ポリペプチド変異体のアルカリ安定性に関する実施例1の結果を示す。

【図2】最高のアルカリ安定性を有するポリペプチド変異体に関する図1の拡大図である。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0021】

一態様では、本発明は、配列番号1もしくは配列番号2によって特定されるブドウ球菌プロテインA（SpA）のBもしくはCドメインの、又は配列番号3もしくは配列番号4によって特定されるプロテインZの1つ以上の突然変異体を含むか、又はこれらから本質的になるポリペプチドであって、少なくとも9位のグルタミン残基が、アスパラギン以外のアミノ酸に突然変異しているポリペプチドを開示する。配列番号4は、突然変異N3A、N6D、N23Tを有するプロテインZの変異体（本明細書ではZvarと称される）を表す。これらのドメインにおけるQ9の突然変異は、免疫グロブリン結合特性を損なわずに、親ドメイン/ポリペプチドと比較して改善されたアルカリ安定性を付与する。したがって、ポリペプチドは、Fc結合ポリペプチド又は免疫グロブリン結合ポリペプチドとも記載され得る。

#### 【0022】

配列番号1（SpA Bドメイン）

ADNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLNEEQRNGF IQSLKDD  
PSQ SANLLAEAKK LNDAQAPK

配列番号2（SpA Cドメイン）

ADNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNGF IQSLKDD  
PSV SKEILAEAKK LNDAQAPK

配列番号3（プロテインZ）

VDNKFNKEQQ NAFYEILHLP NLNEEQRNAF IQSLKDD  
PSQ SANLLAEAKK LNDAQAPK

配列番号4（Zvar）

VDAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDD  
PSQ SANLLAEAKK LNDAQAPK

いくつかの実施形態では、配列番号1～4の少なくとも9位のグルタミン残基は、アスパラギン、プロリン及びシステイン以外のアミノ酸に、例えばアラニンに突然変異している。これの利点は、アミド分解に感受性のアスパラギンが導入されないこと、プロリンの導入によって鎖のコンフォメーションが障害されないこと、及びジスルフィド架橋のための部位が導入されないことである。Q9突然変異（例えば、Q9A突然変異）は唯一の突然変異であり得るか、又はポリペプチドは、例えば、位置N3、N6、Q10、E15、H18、N21、N23、N28、G/A29、D36、Q/V40、A/K42、N/E43、L/I44、E47、Q55及びP57の少なくとも1つにおいて、さらなる突然変異も含み得る。これらの位置の1つ以上において、元のアミノ酸残基は、例えば、アスパラギン、プロリン及びシステインではないアミノ酸で置換され得る。元のアミノ酸残

10

20

30

40

50

基は、例えば、アラニン、バリン、トレオニン、セリン、リジン又はアスパラギン酸で置換され得る。

【0023】

特定の実施形態では、23位のアミノ酸残基は、トレオニン又はアラニンである。

【0024】

いくつかの実施形態では、3位のアミノ酸残基はアラニンであり、及び/又は6位のアミノ酸残基はアスパラギン酸である。特定の実施形態では、3位及び6位のアミノ酸残基の少なくとも1つは、アスパラギンである。

【0025】

特定の実施形態では、33位のセリン残基は、アスパラギン、グルタミン、プロリン及びシステイン以外のアミノ酸に、例えばリジンに突然変異している。代替的な実施形態では、33位のアミノ酸残基は、セリンである。

10

【0026】

いくつかの実施形態では、10位のグルタミン残基は、アスパラギン、グルタミン、プロリン及びシステイン以外のアミノ酸に、例えばアラニンに突然変異している。代替的な実施形態では、10位のアミノ酸残基は、グルタミンである。

【0027】

特定の実施形態では、32位のグルタミン残基は、アスパラギン、グルタミン、プロリン及びシステイン以外のアミノ酸に、例えばアラニンに突然変異している。代替的な実施形態では、32位のアミノ酸残基は、グルタミンである。

20

【0028】

いくつかの実施形態では、40位のグルタミン残基は、アスパラギン、グルタミン、プロリン及びシステイン以外のアミノ酸に、例えばアラニン又はバリンに突然変異している。代替的な実施形態では、40位のアミノ酸残基は、グルタミンである。

【0029】

特定の実施形態では、55位のグルタミン残基は、アスパラギン、グルタミン、プロリン及びシステイン以外のアミノ酸に、例えばアラニン、セリン又はグルタミン酸に突然変異している。代替的な実施形態では、55位のアミノ酸残基は、グルタミンである。

【0030】

いくつかの実施形態では、26位のアミノ酸残基は、グルタミンである。Q9突然変異を有するポリペプチドのアルカリ安定性は、Q26がトレオニン又はアラニンに突然変異していない場合よりも優れていると思われる。代替的な実施形態では、26位のアミノ酸残基は、アスパラギン、グルタミン、プロリン、システイン、トレオニン及びアラニン以外のアミノ酸に突然変異し得る。

30

【0031】

特定の実施形態では、15位のグルタミン酸残基は、アスパラギン、グルタミン、プロリン及びシステイン以外のアミノ酸に突然変異している。特定の実施形態では、15位のグルタミン酸残基は、リジンに突然変異している。この偶発的突然変異は、Q9突然変異を有するポリペプチドのアルカリ安定性をさらに改善する。代替的な実施形態では、15位のアミノ酸残基は、グルタミン酸である。

40

【0032】

いくつかの実施形態では、47位のグルタミン酸残基は、アスパラギン、グルタミン、プロリン及びシステイン以外のアミノ酸に、例えばアラニン又はトレオニンに突然変異している。代替的な実施形態では、47位のアミノ酸残基は、グルタミン酸である。

【0033】

いくつかの実施形態では、21位のアスパラギン残基は、グルタミン、プロリン及びシステイン以外のアミノ酸に、例えばアスパラギン酸に突然変異している。代替的な実施形態では、21位のアミノ酸残基は、アスパラギンである。

【0034】

特定の実施形態では、36位のアスパラギン酸残基は、グルタミン、プロリン及びシス

50

ティン以外のアミノ酸に突然変異している。特定の実施形態では、36位のアスパラギン酸残基は、アラニン又はトレオニンに突然変異している。代替的な実施形態では、36位のアミノ酸は、アスパラギン酸である。

【0035】

いくつかの実施形態では、突然変異は、Q9A、Q9A、E15K、Q9A、E47T、Q9A、D36T、Q9A、D36A及びQ9T、E47Tからなる群から選択される。これらの突然変異は、特に高いアルカリ安定性を提供する。

【0036】

特定の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号20、配列番号21、配列番号22及び配列番号23並びにさらに配列番号25、配列番号26及び配列番号27からなる群から選択される配列を含む。それは、例えば、配列番号6～10及び20～23からなる群から選択される配列によって定義され得るが、それはまた、さらなるアミノ酸残基をC末端及び/又はN末端に含み得る。

【0037】

配列番号6 Zvar(Q9A)

VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDD  
PSQ SANLLAEAKK LNDAQAPK

配列番号7 Zvar(Q9A, E15K)

VDAKFDKEAQ NAFYKILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDD  
PSQ SANLLAEAKK LNDAQAPK

配列番号8 Zvar(Q9A, E47T)

VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDD  
PSQ SANLLATAKK LNDAQAPK

配列番号9 Zvar(Q9A, D36T)

VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKTD  
PSQ SANLLAEAKK LNDAQAPK

配列番号10 Zvar(Q9A, D36A)

VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKAD  
PSQ SANLLAEAKK LNDAQAPK

配列番号20 Zvar(Q9T, E47T)

VDAKFDKETQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDD  
PSQ SANLLATAKK LNDAQAPK

配列番号21

VDAKFDKEAQ NAFYKILHLP NLTEEQRNAF IQSLKTD  
PSV SKNILAAAKK LNDAQAPK

配列番号22

VDNKFNKEAQ NAFYKILHLP NLTEEQRNAF IQSLKTD  
PSV SKNILAAAKK LNDAQAPK

配列番号23

VDNKFNKEAQ NAFYKILHLP NLTEEQRAAF IQSLKTD  
PSV SKNILAAAKK LNDAQAPK

配列番号24 Zvar4

AQ VDAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSL  
KDDPSQ SANLLAEAKK LNDAQAPK VDAKFDKEQQ NA  
FYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAK  
K LNDAQAPK VDAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQR  
NAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK LNDAQAPK VDAKF  
DKEQQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ S  
ANLLAEAKK LNDAQAPKC

10

20

30

40

50

## 配列番号25 Zvar(Q9A)4

AQ VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSL  
 KDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAAPK VDAKFDKEAQ NA  
 FYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAK  
 K LNDQAAPK VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQR  
 NAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAAPK VDAKF  
 DKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ S  
 ANLLAEAKK LNDQAAPKC

## 配列番号26 Zvar(Q9A,E15K)4

AQ VDAKFDKEAQ NAFYKILHLP NLTEEQRNAF IQSL  
 KDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAAPK VDAKFDKEAQ NA  
 FYKILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAK  
 K LNDQAAPK VDAKFDKEAQ NAFYKILHLP NLTEEQR  
 NAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAAPK VDAKF  
 DKEAQ NAFYKILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ S  
 ANLLAEAKK LNDQAAPKC

10

## 配列番号27 Zvar(Q9A,E47T)4

AQ VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSL  
 KDDPSQ SANLLATAKK LNDQAAPK VDAKFDKEAQ NA  
 FYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLATAK  
 K LNDQAAPK VDAKFDKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQR  
 NAF IQSLKDDPSQ SANLLATAKK LNDQAAPK VDAKF  
 DKEAQ NAFYEILHLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ S  
 ANLLATAKK LNDQAAPKC

20

第2の態様では、本発明は、上記に開示されるいずれかの実施形態によって定義される複数のポリペプチドユニットを含むか、又はこれらから本質的になる、多量体を開示する。多量体は、例えば、二量体、三量体、四量体、五量体又は六量体であり得る。それは、多量体中のすべてのユニットが同一であるホモ多量体であり得るか、又はそれは、1以上のユニットが他のものと異なるヘテロ多量体であり得る。有利には、多量体中のすべてのユニットは、上記に開示される突然変異を含むことなどによって、アルカリ安定性である。ポリペプチドは、ポリペプチドのC末端とN末端との間のペプチド結合によって、直接連結され得る。或いは、多量体中の2つ以上のユニットは、オリゴマー種又はポリマー種を含む要素、例えば最大15アミノ酸又は30アミノ酸、例えば1~5、1~10又は5~10アミノ酸を含む要素によって、連結され得る。好ましくは、このような連結の性質は、タンパク質ユニットの空間的立体構造を不安定化すべきではない。これは、例えば、連結におけるプロリンの存在を回避することによって達成され得る。さらに、連結はまた、好ましくは、アルカリ性環境において、突然変異タンパク質ユニットの特性を損なわない程十分に安定であるべきである。このために、連結がアスパラギンを含有しない場合には、有利である。連結がグルタミンを含有しない場合には、さらに有利であり得る。多量体は、クローニングプロセスに由来するか、又は切断されるシグナル配列由来の残基を構成する複数のアミノ酸残基をN末端にさらに含む。さらなるアミノ酸残基の数は、例えば、15以下、例えば10以下又は5以下であり得る。具体的な例として、多量体は、AQ配列をN末端に含み得る。

30

40

## 【0038】

いくつかの実施形態では、上記の開示されるポリペプチド及び/又は多量体は、システイン残基、複数のリジン残基及び複数のヒスチジン残基からなる群から選択される1つ以上のカップリング要素をC末端又はN末端にさらに含む。カップリング要素は、例えば、C末端の単一のシステインであり得る。カップリング要素は、C末端もしくはN末端に直接連結され得るか、又はそれは、最大15アミノ酸、例えば1~5、1~10又は5~10アミノ酸を含むリンカーを介して連結され得る。このストレッチはまた、好ましくは、

50



アルカリ性環境において、突然変異タンパク質の特性を損なわない程十分に安定であるべきである。このために、ストレッチがアスパラギンを含有しない場合には、有利である。ストレッチがグルタミンを含有しない場合には、さらに有利であり得る。C末端システインを有することの利点は、タンパク質の端点のカップリングが、システインチオールと支持体上の求電子基との反応によって達成され得ることである。これは、結合能に重要なカップリングタンパク質の優れた可動性を提供する。

#### 【0039】

第3の態様では、本発明は、上記に開示されるいずれかの実施形態のポリペプチド又は多量体をコードする核酸を開示する。したがって、本発明は、ポリペプチド又は多量体をコードする本核酸配列のすべての形態、例えばRNA及びDNAを包含する。本発明は、コード配列に加えて、本発明のポリペプチド又は多量体の発現に必要なシグナル配列を含むベクター、例えばプラスミドを包含する。一実施形態では、ベクターは、本発明の多量体をコードする核酸を含み、各ユニットをコードする別個の核酸は、同種DNA配列又は異種DNA配列を有し得る。

#### 【0040】

第4の態様では、本発明は、上記に開示される核酸又はベクターを含む発現系を開示する。発現系は、例えば、本ポリペプチド又は多量体を発現するように改変されているグラム陽性又はグラム陰性原核生物宿主細胞系、例えば*E. coli*種又は*Bacillus*種であり得る。代替的な実施形態では、発現系は、真核生物宿主細胞系、例えば酵母、例えば*Pichia pastoris*又は*Saccharomyces cerevisiae*である。

#### 【0041】

第5の態様では、本発明は、上記に開示されるいずれかの実施形態の複数のポリペプチド又は多量体が固体支持体にカップリングされている分離マトリックスを開示する。このようなマトリックスは、免疫グロブリン又は他のFc含有タンパク質の分離に有用であり、ポリペプチド/多量体の改善されたアルカリ安定性により、マトリックスは、クリーニング中の高アルカリ条件（これは、バイオプロセス分離の状況において、長期の反復使用に必須である）に耐えるであろう。

#### 【0042】

当業者であれば理解するように、発現されたポリペプチド又は多量体を、支持体に固定化する前に適切な程度に精製されなければならない。このような精製方法は当技術分野で周知であり、支持体へのタンパク質系リガンドの固定化は、標準的な方法を使用して容易に行われる。適切な方法及び支持体を以下でより詳細に議論する。

#### 【0043】

本発明のマトリックスの固体支持体は、任意の適切な周知の種類のものであり得る。従来のアフィニティー分離マトリックスは、多くの場合、有機性であり、使用する水性媒体に親水性表面が露出する（すなわち、ヒドロキシ（-OH）、カルボキシ（-COOH）、カルボキサミド（-CONH<sub>2</sub>、おそらくN-置換形態）、アミノ（-NH<sub>2</sub>、おそらく置換形態）、オリゴ-もしくはポリエチレンオキシ基をその外部表面上に、及び存在する場合にはその内部表面上に露出する）ポリマーをベースとするものである。固体支持体は、適切には、多孔質であり得る。多孔性は、例えば、Gel Filtration Principles and Methods, Pharmacia LKB Biotechnology 1991, pp 6-13に記載されている方法にしたがって、逆サイズ排除クロマトグラフィーによって測定されるK<sub>av</sub>値又はK<sub>d</sub>値（利用可能な細孔容積と、特定サイズのプローブ分子との割合）と表され得る。定義では、K<sub>d</sub>値及びK<sub>av</sub>値は両方とも常に、0~1の範囲内にある。プローブ分子として分子量（M<sub>w</sub>）110 kDaのデキストランを用いて測定する場合、K<sub>av</sub>値は、有利には、0.6~0.95、例えば0.7~0.90又は0.6~0.8であり得る。この利点は、本発明のポリペプチド/多量体、及びポリペプチド/多量体に結合する免疫グロブリンの両方に適合可能な多数の細孔であって、結合部位への及び結合部位からの免疫グロブリンの大量輸送を提供

可能な多数の細孔を支持体が有することである。

【0044】

ポリペプチド又は多量体は、例えば、リガンドに存在するチオール、アミノ及び／又はカルボキシ基を利用する従来のカップリング技術によって支持体に結合され得る。ビスエポキシド、エピクロロヒドリン、CNBr、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)などは、周知のカップリング試薬である。支持体とポリペプチド／多量体との間に、ポリペプチド／多量体のアベイラビリティを改善し、支持体へのポリペプチド／多量体の化学的カップリングを容易にする分子(スペーサーとして公知である)を導入し得る。或いは、ポリペプチド／多量体は、物理的吸着又は生物特異的な吸着などの非共有結合によって支持体に結合され得る。

10

【0045】

いくつかの実施形態では、マトリックスは、支持体にカップリングされた5~20、例えば5~15mg/ml、5~11mg/ml又は6~11mg/mlのポリペプチド／多量体を含む。カップリングされるポリペプチド／多量体の量は、カップリングプロセスに使用されるポリペプチド／多量体の濃度、使用されるカップリング条件及び／又は使用される支持体の細孔構造によって制御され得る。原則として、マトリックスの絶対的な結合能は、少なくとも、カップリングされたポリペプチド／多量体によって細孔が著しく狭窄されるようになる時点までは、カップリングされるポリペプチド／多量体の量と共に増加する。高いカップリングレベルでは、カップリングされるポリペプチド／多量体1mg当たりの相対結合能は低下し、上記範囲内で最適な費用便益となる。

20

【0046】

特定の実施形態では、ポリペプチド又は多量体は、チオエーテル結合を介して支持体にカップリングされる。このようなカップリングを実施する方法は当技術分野で周知であり、標準的な技術及び装置を使用して当業者により容易に実施される。チオエーテル結合は柔軟かつ安定であり、アフィニティークロマトグラフィーにおける使用に一般に適切である。特に、チオエーテル結合が、ポリペプチド又は多量体の末端又は末端付近のシステイン残基を介したものである場合、カップリングされるポリペプチド／多量体の移動度が増強されて、改善された結合能及び結合速度が提供される。いくつかの実施形態では、ポリペプチド／多量体は、上記のようにタンパク質上に存在するC末端のシステインを介してカップリングされる。これにより、システインチオールと、支持体上の求電子基(例えば、エポキシド基、ハロヒドリン基など)との効率的なカップリングが可能となり、チオエーテル架橋結合が生じる。

30

【0047】

特定の実施形態では、支持体は、多糖などのポリヒドロキシポリマーを含む。多糖の例としては、例えばデキストラン、デンプン、セルロース、プルラン、寒天、アガロースなどが挙げられる。多糖は本来的に親水性であり、非特異的な相互作用の程度が低く、高含量の反応性(活性化可能な)ヒドロキシル基を提供し、バイオプロセッシングで使用されるアルカリ性クリーニング溶液に対して一般に安定である。

【0048】

いくつかの実施形態では、支持体は、寒天又はアガロースを含む。本発明で使用される支持体は、逆懸濁ゲル化(S Hjerten: Biochim Biophys Acta 79(2), 393-398(1964))などの標準的な方法にしたがって容易に調製され得る。或いは、ベースマトリックスは、SEPHAROSE(商標)FF(GE Healthcare)などの市販の製品である。大規模な分離に特に有利な一実施形態では、支持体は、米国特許第6602990号又は米国特許第7396467号(これらは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている方法を使用してその剛性を増加するように適合されているので、マトリックスは、高流速により適切になる。

40

【0049】

特定の実施形態では、多糖又はアガロース支持体などの支持体は、例えばヒドロキシア

50

ルキルエーテル架橋により架橋されている。このような架橋を生成する架橋剤試薬は、例えばエピクロロヒドリンのようなエピハロヒドリン、ブタンジオールジグリシジルエーテルのようなジエポキシド、アリルハライド又はアリルグリシジルエーテルのようなアリル化試薬であり得る。架橋は、支持体の剛性に有益であり、化学的安定性を改善する。ヒドロキシアルキルエーテル架橋は、アルカリ安定性であり、有意な非特異的吸着を生じない。

#### 【0050】

或いは、固体支持体は、合成ポリマー、例えばポリビニルアルコール、ポリヒドロキシアルキルアクリレート、ポリヒドロキシアルキルメタクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミドなどをベースとする。ジビニル置換ベンゼン及びモノビニル置換ベンゼンをベースとするマトリックスなどの疎水性ポリマーの場合、マトリックスの表面は、上記に定義される親水性基を周囲の水性液体に露出するように親水化されることが多い。このようなポリマーは、標準的な方法にしたがって容易に生産される。例えば、「Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization」(R Arshady: Chimica e L'Industria 70(9), 70-75(1988))を参照のこと。或いは、SOURCE(商標)(GE Healthcare)などの市販の製品が使用される。別の代替方法では、本発明の固体支持体は、支持体、例えばシリカ、酸化ジルコニウムなどを含む。

#### 【0051】

さらに別の実施形態では、固体支持体は、表面、チップ、毛細管又はフィルター(例えば、膜又はデプスフィルタマトリックス)などの別の形態である。

#### 【0052】

本発明のマトリックスの形状に関して、一実施形態では、マトリックスは、多孔質モノリスの形態である。代替的な実施形態では、マトリックスは、多孔質又は非多孔質であり得るビーズ形態又は粒子形態である。ビーズ形態又は粒子形態のマトリックスは、充填層として、又は懸濁形態で使用され得る。懸濁形態としては、粒子又はビーズが自由に移動する膨張床及び純粋な懸濁液として公知のものが挙げられる。モノリス、充填層及び膨張床の場合、分離手順は、一般に、濃度勾配を有する従来のクロマトグラフィーに従う。純粋な懸濁液の場合、バッチ式モードが使用される。

#### 【0053】

第6の態様では、本発明は、免疫グロブリンを単離する方法であって、上記に開示される分離マトリックスを使用する方法を開示する。

#### 【0054】

特定の実施形態では、本方法は、

- a) 免疫グロブリンを含む液体サンプルを、上記に開示される分離マトリックスと接触させる工程、
  - b) 洗浄液で分離マトリックスを洗浄する工程、
  - c) 溶出液を用いて、分離マトリックスから免疫グロブリンを溶出する工程、及び
  - d) クリーニング液で分離マトリックスをクリーニングする工程
- を含む。

#### 【0055】

本方法はまた、工程a)の前に、上記に開示される実施形態のいずれかのアフィニティ分離マトリックスを提供する工程、並びに免疫グロブリン及び1以上の他の物質を含む溶液を液体サンプルとして提供する工程を含み得、工程c)の後に、溶出液を回収する工程、及び場合により溶出液を、例えば陰イオン交換クロマトグラフィーもしくは陽イオン交換クロマトグラフィー、マルチモーダルクロマトグラフィー及び/又は疎水性相互作用クロマトグラフィーによるさらなる分離工程に供する工程を含み得る。液体サンプル、洗浄液及び溶出液の適切な組成、並びに分離を実施するための一般的な条件は、アフィニティクロマトグラフィーの技術分野、特にプロテインAクロマトグラフィーの技術分野で

周知である。Fc含有タンパク質及び1以上の他の物質を含む液体サンプルは、宿主細胞タンパク質(HCP)、例えばCHO細胞又はE. coliタンパク質を含み得る。便利に、CHO細胞及びE. coliタンパク質の内容物は、これらのタンパク質に対するイムノアッセイ、例えばCygnum TechnologiesのCHO HCP又はE. coli HCP ELISAキットによって決定され得る。工程b)において、宿主細胞タンパク質又はCHO細胞/E. coliタンパク質を脱着し得る。

#### 【0056】

溶出は、プロテインA媒体からの溶出に使用される任意の適切な溶液を使用することによって実施され得る。これは、例えば、pH5以下、例えばpH2.5~5又は3~5の溶液又は緩衝液であり得る。いくつかの場合では、それは、pH11以上、例えばpH11~14又はpH11~13の溶液又は緩衝液であり得る。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液又は溶出緩衝液勾配は、1以上の一官能性カルボン酸、二官能性カルボン酸もしくは三官能性カルボン酸又はこのようなカルボン酸の塩を含む。特定の実施形態では、溶出緩衝液又は溶出緩衝液勾配は、酢酸塩、クエン酸塩、グリシン、コハク酸塩、リン酸塩及びギ酸塩からなる群から選択される1以上の陰イオン種を含む。

#### 【0057】

いくつかの実施形態では、クリーニング液は、アルカリ性であり、例えば13~14のpHを有する。このような溶液は、特に間隔の上限において、マトリックスの効率的なクリーニングを提供する。

#### 【0058】

特定の実施形態では、クリーニング液は、0.1~2.0M NaOH又はKOH、例えば0.5~2.0又は0.5~1.0M NaOH又はKOHを含む。

#### 【0059】

いくつかの実施形態では、工程a)~d)を少なくとも10回、例えば少なくとも50回又は50~200回繰り返す。

#### 【実施例】

#### 【0060】

##### タンパク質の突然変異誘発

アスパラギン置換体をコードするオリゴヌクレオチドを使用してツーステップPCRにより、部位特異的突然変異誘発を行った。鋳型として、Z又はCのいずれかの単ドメインを含有するプラスミドを使用した。PCR断片をE. coli発現ベクター(pGO)にライゲーションした。DNA配列決定を使用して、挿入された断片の正しい配列を確認した。

#### 【0061】

突然変異体の多量体を形成するために、C又はZドメインの開始コドン(GTA GAC)(アミノ酸VDに対応する)内に位置するAccI部位を使用した。単量体ドメイン用のpGOをAccIで消化し、CIP処理した。各変異体に特異的なAccI粘着末端プライマーを設計し、2つのオーバーラップPCR産物を各鋳型から作製した。PCR産物を精製し、2%アガロースゲル上のPCR産物を比較することによって、濃度を評価した。連結緩衝液中で、等量の対合PCR産物をハイブリダイズさせた(45分で90~25)。得られた産物は、AccI部位(正しいPCR断片及び/又は消化ベクター)にライゲーションされる可能性が高い断片の約1/4からなる。ライゲーション及び形質転換の後、コロニーをPCRスクリーニングして、所望の突然変異体を含む構築物を同定した。DNA配列決定によって、陽性クローンを確認した。

#### 【0062】

##### 構築物の発現及び精製

標準培地中、E. coli K12の発酵により、構築物を細菌のペリプラズム内で発現させた。発酵後、細胞を熱処理して、ペリプラズム内容物を培地中に放出させた。0.2µmの細孔径を有する膜を用いて精密ろ過により、培地中に放出された構築物を回収した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 3 】

アフィニティーにより、各構築物（この時点では、ろ過工程からの透過液である）を精製した。この透過液を、固定化 I g G を含有するクロマトグラフィー媒体にロードした。ロードした産物をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、pH を低下させることによって溶出した。

## 【 0 0 6 4 】

溶出プールを中性の pH に調整し、ジチオトレイトールの追加により還元した。次いで、サンプルを陰イオン交換体にロードした。洗浄工程後、構築物を NaCl 勾配で溶出して、混入物質からそれを分離した。限外ろ過によって、溶出プールを 40 ~ 50 mg / ml に濃縮した。固定化 I g G 媒体上の構築物のアフィニティー精製の成功は、問題の構築物が I g G に対して高い親和性を有することを示すことに留意すべきである。

## 【 0 0 6 5 】

LC - MS で精製リガンドを分析して純度を決定し、分子量が（アミノ酸配列に基づいて）予想されたものに対応することを確認した。

## 【実施例 1】

## 【 0 0 6 6 】

GE Healthcare のアミンカップリングキット（アミンをチップ上のカルボキシメチル基にカルボジイミドカップリングするためのもの）を使用して、表 1 に記載されている精製単量体リガンドを Biacore CM5 センサーチップ（GE Healthcare, Sweden）上に十分な量で固定化して、Biacore 機器（GE Healthcare, Sweden）で約 1000 RU のシグナル強度を得た。固定化表面の I g G 結合能を把握するために、1 mg / ml のヒトポリクローナル I g G（Gammanorm）をチップ上に流し、シグナル強度を記録した。次いで、表面をクリーンインプレイス（CIP）した（すなわち、500 mM NaOH によって室温（22 + / - 2）で 10 分間洗い流した）。これを 96 サイクル繰り返し、固定化リガンドのアルカリ安定性を、各サイクル後の I g G 結合能（シグナル強度）の相対喪失として把握した。結果は、図 1 及び表 1 に示されており、少なくともリガンド Zvar（Q9A）1、Zvar（Q9A, E15K）1、Zvar（Q9A, E47T）1、Zvar（Q9A, D36T）1、Zvar（Q9A, D36A）1 及び Zvar（Q9T, E47T）1 が、親構造 Zvar 1 と比較してアルカリ安定性が向上したことを示している。

## 【 0 0 6 7 】

## 【表 1】

表 1

リガンド	配列番号	96 サイクル後の残存容量(%)
Zvar1	4	54
Zvar(Q9A)1	6	61
Zvar(Q9A,E15K)1	7	67
Zvar(Q9A,E47T)1	8	63
Zvar(Q9A,D36T)1	9	60
Zvar(Q9A,D36A)1	10	65
Zvar(Q9T,Q26A,E47T)1	11	5
Zvar(Q9A,Q26T,D36T,E47T)1	12	15
Zvar(Q9T,Q26T,N43T)1	13	16
Zvar(Q9T,Q26A)1	14	20
Zvar(Q9A,Q26T,D36T,K58R)1	15	23
Zvar(Q9T,D36A,E47T)1	16	41
Zvar(Q9T, D36T)1	17	42
Zvar(Q9A,Q26A,D36A,E47A)1	18	45
Zvar(Q9A,E47T,K49E,N52S)1	19	47
Zvar(Q9T,E47T)1	20	58

## 【実施例 2】

## 【 0 0 6 8 】

下記方法を使用して、表 2 の精製四量体リガンド（すべてが、さらなる N 末端システインを有する）をアガロースビーズ上に固定化し、能力及び安定性について評価した。

【 0 0 6 9 】

【表 2】

表 2

リガンド	配列番号	リガンド 含量 (mg/ml)	初期 IgG 容量 Qb10 (mg/ml)	100 サイクル 後の残存 IgG 容量 (mg/ml)	100 サイクル 後の残存 IgG 容量(%)
Zvar4	24	6.4	47.6	34.1	71.7
Zvar(Q9A)4	25	6.3	46.3	38.8	83.9
Zvar(Q9A,E15K)4	26	6.2	49.8	41.0	82.3
Zvar(Q9A,E47T)4	27	7.2	50.5	40.8	80.8

10

活性化

使用したベースマトリックスは、平均直径 85 マイクロメートル（容積重量）の堅く架橋されたアガロースビーズであり、米国特許第 6602990 号の方法にしたがって調製し、Gel Filtration Principles and Methods, Pharmacia LKB Biotechnology 1991, pp6-13 に記載されている方法にしたがって、分子量（Mw）110 kDa のデキストランについて 0.70 の逆ゲルろ過クロマトグラフィー Kav 値に相当する細孔径を有する。

【 0 0 7 0 】

100 mL フラスコ中で、25 mL（g）のドレインしたベースマトリックス、10.0 mL の蒸留水及び 2.02 g の NaOH（s）を、機械的に攪拌しながら 25 で 10 分間混合した。4.0 mL のエピクロロヒドリンを追加し、反応を 2 時間進行させた。10 ゲル堆積容量（GV）の水で活性化ゲルを洗浄した。

20

【 0 0 7 1 】

カップリング

50 mL Falcon チューブ中の 20 mL のリガンド溶液（50 mg/mL）に、169 mg の NaHCO<sub>3</sub>、21 mg の Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、175 mg の NaCl 及び 7 mg の EDTA を追加した。Falcon チューブをローラーテーブル上に 5～10 分間置き、次いで、77 mg の DTE を追加した。還元を 45 分間超行った。次いで、Sephadex G-25 を充填した PD10 カラムで、リガンド溶液を脱塩した。276 nm の UV 吸収を測定することによって、脱塩溶液中のリガンド含量を決定した。

30

【 0 0 7 2 】

3～5 GV の { 0.1 M リン酸塩 / 1 mM EDTA pH 8.6 } で活性化ゲルを洗浄し、次いで、米国特許第 6399750 号に記載されている方法にしたがって、リガンドをカップリングした。実験で使用したすべての緩衝液を、窒素ガスによって少なくとも 5～10 分間脱気した。リガンド溶液の濃度を变化させることによって、ゲルのリガンド含量を制御することができる。

【 0 0 7 3 】

固定化後、3×GV の蒸留水でゲルを洗浄した。ゲル + 1 GV { 0.1 M リン酸塩 / 1 mM EDTA / 10% チオグリセロール pH 8.6 } を混合し、チューブを振盪台に室温で一晩放置した。次いで、3×GV の { 0.1 M TRIS / 0.15 M NaCl pH 8.6 } 及び 0.5 M HAc で、次いで 8～10×GV の蒸留水で、ゲルを交互に洗浄した。アミノ酸分析のために、ゲルサンプルを外部の試験所に送付し、リガンド含量（mg/mL ゲル）を総アミノ酸含量から計算した。

40

【 0 0 7 4 】

2 mL の樹脂を TRICORN（商標）5100 カラムに充填した。

【 0 0 7 5 】

タンパク質

平衡化緩衝液で 1 mg/mL に希釈した Gammanorm 165 mg/mL（Octapharma）。

【 0 0 7 6 】

50

平衡化緩衝液

A P B リン酸緩衝液 20 mM + 0.15 M NaCl、pH 7.4 (E l s i c h r o m A B )。

【0077】

吸着緩衝液

A P B リン酸緩衝液 20 mM + 0.15 M NaCl、pH 7.4 (E l s i c h r o m A B )。

【0078】

溶出緩衝液

クエン酸緩衝液 0.1 M、pH 6

クエン酸緩衝液 0.1 M、pH 3。

【0079】

C I P

0.5 M NaOH。

【0080】

滞留時間 2.4 分において、A K T A E x p l o r e r 10 システムを用いて、貫流容量を決定した。安定ベースラインが得られるまで、平衡緩衝液をバイパスカラムに流した。自動ゼロ化の前に、これを行った。100% UV シグナルが得られるまで、サンプルをカラムに添加した。次いで、安定ベースラインが得られるまで、平衡緩衝液を添加した。

【0081】

最大吸光度の 85% の UV シグナルが達成されるまで、サンプルをカラムにロードした。次いで、流速 0.5 ml / 分で、最大吸光度の 20% の UV シグナルまで、カラムを平衡緩衝液で洗浄した。流速 0.5 ml / 分で、pH 6.0 から開始して pH 3.0 で終了する 10 カラム容量の直線勾配で、タンパク質を溶出した。次いで、流速 0.5 ml / 分の 0.1 M NaOH でカラムをクリーニングし、平衡緩衝液で再平衡化してから、20% エタノールでクリーニングした。この最終工程は、100% UV シグナルが得られるまでサンプルをバイパスカラムにロードすることにより、サンプル濃度をチェックするためのものであった。

【0082】

10% における貫流容量の計算では、以下の式を使用した。それは、カラム流出液中の I g G 濃度が供給液中の I g G 濃度の 10% になるまでカラムにロードされる I g G の量である。

【0083】

【数 1】

$$q_{10\%} = \frac{C_0}{V_C} \left[ V_{app} - V_{sys} - \int_{V_{sys}}^{V_{app}} \frac{A(V) - A_{sub}}{A_{100\%} - A_{sub}} * dv \right]$$

$A_{100\%}$  = 100% UV シグナル、

$A_{sub}$  = 非結合性 I g G サブクラスによる吸光度寄与、

$A(V)$  = 所定の添加量における吸光度、

$V_C$  = カラム容量、

$V_{app}$  = 10% 貫流までに添加した量、

$V_{sys}$  = システムのデッドボリューム、

$C_0$  = 供給液濃度。

【0084】

10% 貫流における動的結合容量 (D B C) を計算し、曲線の外観を検討した。結合、溶出及び C I P ピークに関しても、曲線を検討した。10 及び 80% 貫流について、動的結合容量 (D B C) を計算した。

## 【 0 0 8 5 】

アルカリ性クリーニング溶液に繰り返し曝露する前後に、10%貫流DBC(Qb10)を決定した。各サイクルには、0.5M NaOHをカラムに速度5マイクロリットル/分でポンピングして、1サイクル当たり10分間の曝露時間をもたらすCIP工程が含まれていた。曝露を室温( $22 \pm 2$ )で行った。表2は、100サイクル後の残存容量(すなわち、(0.5M NaOHに対する1000分間の累積曝露時間)を、絶対数及び初期容量に対する相対数の両方で示す。

## 【 0 0 8 6 】

本発明(最良の形態を含む)を開示するために、そしてさらに、当業者が本発明を実施すること(任意のデバイス又はシステムを作製及び使用すること、並びに組み込まれている任意の方法を実施することを含む)ができるように、本明細書では実施例を使用している。本発明の特許可能な範囲は特許請求の範囲によって規定され、当業者が想到する他の例を含み得る。このような他の例は、特許請求の範囲の文言と相違しない構成要素を有する場合、又は特許請求の範囲の文言と実質的な相違を有する均等な構成要素を含む場合には、特許請求の範囲の範囲内にあるものである。

10

【 図 1 】

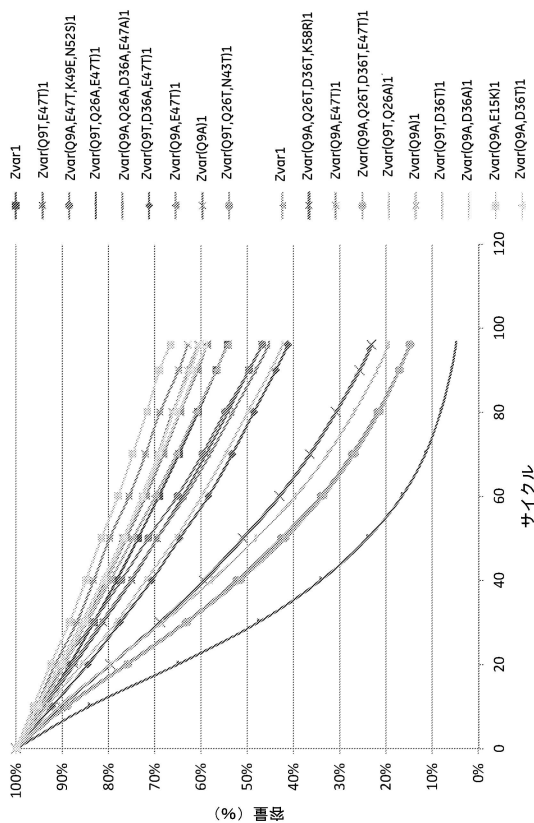


Figure 1

【 図 2 】

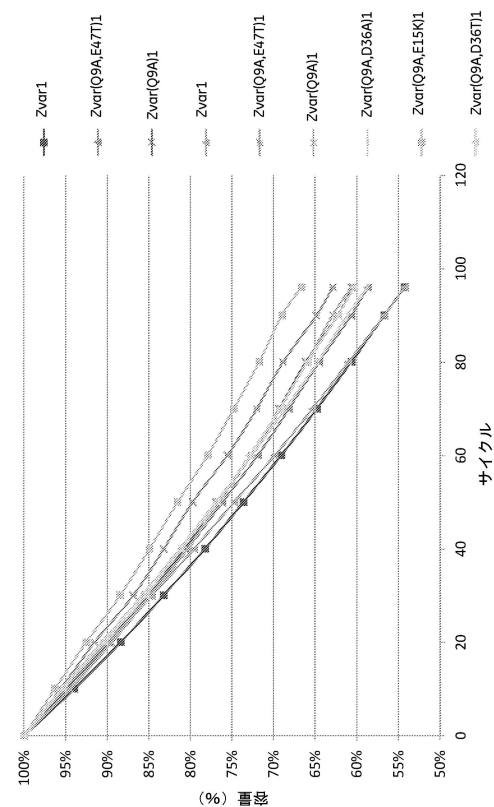


Figure 2



【配列表】

0006544808000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 0 7 K	1/22	(2006.01)	C 0 7 K	1/22	
C 0 7 K	16/00	(2006.01)	C 0 7 K	16/00	
B 0 1 J	20/24	(2006.01)	B 0 1 J	20/24	C
B 0 1 J	20/34	(2006.01)	B 0 1 J	20/34	G
B 0 1 D	15/38	(2006.01)	B 0 1 D	15/38	

- (72)発明者 ロドリゴ , グスタフ  
スウェーデン国、エス - 7 5 1 8 4、ウブサラ、ピョルクガタン、3 0、ジーイー・ヘルスケア
- (72)発明者 アンデル , マッツ  
スウェーデン国、エス - 7 5 1 8 4、ウブサラ、ピョルクガタン、3 0、ジーイー・ヘルスケア
- (72)発明者 バウレン , ゴラン  
スウェーデン国、エス - 7 5 1 8 4、ウブサラ、ピョルクガタン、3 0、ジーイー・ヘルスケア
- (72)発明者 ビョルクマン , トマス  
スウェーデン国、エス - 7 5 1 8 4、ウブサラ、ピョルクガタン、3 0、ジーイー・ヘルスケア

審査官 竹内 祐樹

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 2 / 1 6 5 5 4 4 ( W O , A 1 )  
特表 2 0 0 2 - 5 4 2 2 5 9 ( J P , A )  
特表 2 0 0 7 - 5 3 7 7 0 0 ( J P , A )  
特表 2 0 0 5 - 5 3 8 6 9 3 ( J P , A )  
特開 2 0 1 0 - 1 5 6 6 8 7 ( J P , A )  
国際公開第 2 0 1 2 / 0 8 3 4 2 5 ( W O , A 1 )  
Nat. Biotechnol., 1997, 15(8), pp.772-777

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
- C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0  
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )  
U n i P r o t / G e n e S e q