

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-131886

(P2017-131886A)

(43) 公開日 平成29年8月3日(2017.8.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
B O 1 D 61/14 (2006.01)	B O 1 D 61/14 5 0 0	4 D 0 0 6
B O 1 D 61/22 (2006.01)	B O 1 D 61/14 5 1 0	4 H 0 4 5
C O 7 K 1/34 (2006.01)	B O 1 D 61/22	
C O 7 K 16/00 (2006.01)	C O 7 K 1/34	
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/00	
審査請求 有 請求項の数 38 O L (全 28 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-41820 (P2017-41820)	(71) 出願人	000003311
(22) 出願日	平成29年3月6日 (2017.3.6)		中外製薬株式会社
(62) 分割の表示	特願2014-510575 (P2014-510575) の分割	(71) 出願人	509012625
原出願日	平成24年8月31日 (2012.8.31)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(31) 優先権主張番号	61/530, 158		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
(32) 優先日	平成23年9月1日 (2011.9.1)		ス サンフランシスコ ディーエヌエー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ウェイ 1
		(74) 代理人	100102978
			弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		最終頁に続く	

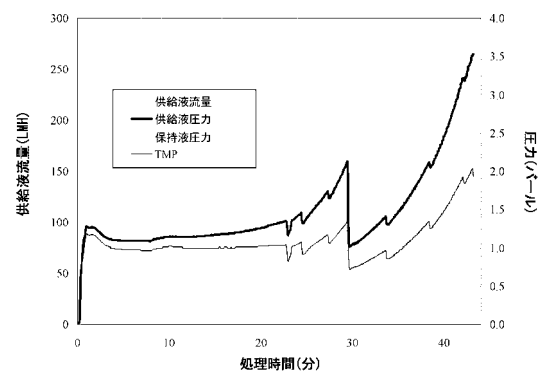
(54) 【発明の名称】 限外ろ過によって高度に濃縮された抗体を含む組成物を調製するための方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 限外ろ過によって高度に濃縮された抗体を含む組成物を調製する方法の提供。

【解決手段】 (1) 限外ろ過膜に適用される供給液圧力の値が限外ろ過膜の指定された最大供給液圧力の85～100%に上昇することを可能にするように、供給液流量を調節する工程であって、当該最大供給液圧力の値が2.0バールまたは2.0バールを超える値である、工程;および(2)工程(1)の後に、限外ろ過膜に適用される供給液圧力の値を維持するかまたは低下させるように、供給液流量を低下させる工程、を含む、濃縮された抗体を含む組成物を調製するための方法。

【選択図】 図4



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む、限外ろ過によって200g/Lを上回る高濃度または10mPa・sを上回る粘度を有する濃縮された抗体を含む組成物を調製するための方法：

(1) 限外ろ過膜に適用される供給液圧力の値が限外ろ過膜の指定された最大供給液圧力の85～100%に上昇することを可能にするように、供給液流量を調節する工程であって、当該最大供給液圧力の値が2.0バールまたは2.0バールを超える値である、工程；および

(2) 工程(1)の後に、限外ろ過膜に適用される供給液圧力の値を維持するかまたは低下させるように、供給液流量を低下させる工程。

【請求項 2】

10

抗体調製物が室温で処理される、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

抗体調製物が10～30℃の温度で処理される、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

抗体調製物が15～30℃の温度で処理される、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

濃縮された抗体を含む組成物が、250g/Lを上回る高濃度または40mPa・sを上回る粘度を有する、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

工程(1)における供給液流量が200LMH(L/m²/時間)以上に維持される、請求項1記載の方法。

20

【請求項 7】

工程(1)における供給液流量が250LMH(L/m²/時間)以上に維持される、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

工程(1)における供給液流量が一定流量に維持される、請求項1、6、または7記載の方法。

【請求項 9】

工程(1)において限外ろ過膜に適用される供給液圧力の最大値が、2.0バール～4.0バールである、請求項1記載の方法。

30

【請求項 10】

工程(1)において限外ろ過膜に適用される供給液圧力の最大値が、3.5バールである、請求項1記載の方法。

【請求項 11】

工程(1)において限外ろ過膜に適用される供給液圧力の最大値が、限外ろ過膜の指定された最大供給液圧力の85～100%である、請求項1記載の方法。

【請求項 12】

保持溶液が200g/Lを上回るタンパク質濃度に濃縮されると、工程(1)が工程(2)へと移行する、請求項1記載の方法。

【請求項 13】

40

保持溶液が220g/L以上のタンパク質濃度に濃縮されると、工程(1)が工程(2)へと移行する、請求項1記載の方法。

【請求項 14】

保持溶液が240g/Lに等しいタンパク質濃度に濃縮されると、工程(1)が工程(2)へと移行する、請求項1記載の方法。

【請求項 15】

工程(2)において供給液圧力の値を低下させた後の供給液流量が、一定流量に維持される、請求項11記載の方法。

【請求項 16】

工程(2)において供給液圧力の値を低下させた後の供給液流量が、120LMH(L/m²/時間)以

50

下に維持される、請求項11または15記載の方法。

【請求項17】

工程(2)において供給液圧力の値を低下させた後の供給液流量が、80LMH(L/m²/時間)以下に維持される、請求項11または15記載の方法。

【請求項18】

工程(2)において限外ろ過膜に適用される供給液圧力の値が、一定値に維持される、請求項1記載の方法。

【請求項19】

工程(2)において限外ろ過膜に適用される供給液圧力の値が、供給液流量を低減させることによって限外ろ過膜の指定された最大供給液圧力の85～100%以内に維持される、請求項1記載の方法。

10

【請求項20】

供給液圧力と供給液流量の間のフィードバック制御によって、限外ろ過膜の指定された最大供給液圧力の85～100%以内に供給液圧力を維持するよう供給液流量が自動的に調節される、請求項18または19記載の方法。

【請求項21】

工程(1)と工程(2)の間に以下の工程をさらに含む、請求項1記載の方法：

(3) 透過液バルブが閉じた状態で抗体調製物を膜に通して再循環させる工程。

【請求項22】

保持液圧力制御バルブが完全に開いた状態で抗体調製物を再循環させる、請求項21記載の方法。

20

【請求項23】

工程(3)における供給液流量が、5～120LMH(L/m²/時間)の間の一定流量に維持される、請求項21記載の方法。

【請求項24】

工程(3)における供給液流量が、10～80LMH(L/m²/時間)の間の一定流量に維持される、請求項21記載の方法。

【請求項25】

抗体調製物の緩衝液組成が10～30mmol/Lの間のヒスチジンである、請求項1記載の方法。

30

【請求項26】

抗体調製物の緩衝液組成が20mmol/Lのヒスチジンである、請求項1記載の方法。

【請求項27】

抗体調製物のpHがpH3.0～pH10.0の間である、請求項1記載の方法。

【請求項28】

抗体調製物のpHがpH5.5～pH6.5の間である、請求項1記載の方法。

【請求項29】

抗体調製物のpHがpH6.0である、請求項1記載の方法。

【請求項30】

限外ろ過膜が50kDa以下の分画分子量を有する、請求項1記載の方法。

40

【請求項31】

限外ろ過膜が30kDa以下の分画分子量を有する、請求項1記載の方法。

【請求項32】

抗体が、抗ヒトインターロイキン-6受容体モノクローナル抗体である、請求項1記載の方法。

【請求項33】

抗体が、トシリズマブである、請求項32記載の方法。

【請求項34】

以下の工程を含む、薬学的抗体含有液体組成物の製造方法；

(1) 請求項1記載の方法によって200g/Lを上回る抗体濃度または10mPa・sを上回る粘度

50

を有する濃縮された抗体を含む組成物を調製する工程；および
(2) 前記組成物に薬学的に許容される担体を添加する工程。

【請求項 35】

抗体が抗ヒトインターロイキン-6受容体モノクローナル抗体である、請求項34記載の製造方法。

【請求項 36】

以下の工程を含む、限外ろ過によって200g/Lを上回る高濃度または10mPa・sを上回る粘度を有する、濃縮されたタンパク質を含む組成物を調製するための方法：

(1) 限外ろ過膜に適用される供給液圧力の値が2.0バールまたは2.0バールを超える値にまで上昇することを可能にするように、供給液流量を調節する工程；および

(2) 工程(1)の後に、限外ろ過膜に適用される供給液圧力の値を維持するかまたは低下させるように、供給液流量を低下させる工程。

【請求項 37】

以下の工程を含む、限外ろ過によって200g/Lを上回る高濃度または10mPa・sを上回る粘度を有する、濃縮されたタンパク質を含む組成物を調製するための方法：

(1) 限外ろ過膜に適用される供給液圧力の値が3.5バールにまで上昇することを可能にするように、供給液流量を調節する工程；および

(2) 工程(1)の後に、限外ろ過膜に適用される供給液圧力の値を維持するかまたは低下させるように、供給液流量を低下させる工程。

【請求項 38】

タンパク質が抗体である、請求項36または37記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物科学の分野、より具体的には抗体調製の分野に関する。特に、本発明は、限外ろ過によって高度に濃縮された抗体を含む組成物を調製するための方法に関する。本発明で使用される方法により、抗体療法において、例えば100g/Lを上回る、好ましくは200g/Lを上回る、特に好ましくは250g/Lを上回る高濃度製剤を室温で獲得することが可能になる。

【背景技術】

【0002】

特に慢性疾患治療法の分野において、外来治療を提供することによって患者の利便性およびコンプライアンスを向上させるために、皮下投与向けの高度に濃縮された抗体療法用小容量製剤に対する需要が高まっている。

【0003】

抗体原薬を製造する場合、典型的には、限外ろ過/ダイアフィルトレーション(UF/DF)が最終処理工程である。限外ろ過は、溶液中の分子をサイズに基づいて分離する、膜分離方法である。ダイアフィルトレーションは、水性緩衝液が保持液に添加される特殊なタイプの限外ろ過である。この工程において、精製された原薬は濃縮され、医薬製剤化に必要なタンパク質濃度および賦形剤組成に置き換えられる。

【0004】

限外ろ過/ダイアフィルトレーション(UF/DF)処理のために産業界で使用されている主な技術は、接線ろ過(TFF)方式である(一般には、Shiloach J. et al., 1988, Van Reis R. et al., 2001を参照されたい)。この技術では、加圧下でタンパク質溶液を限外ろ過膜に対して接線方向に再循環させる。このTFFアプローチは、低～中濃度の原薬に適しており、たいいていの場合、ある1種類の抗体に対するUF/DF処理は、最小限の変更によって別の抗体に高度に適応可能である。しかしながら、タンパク質濃度が高い状況では、処理パフォーマンスに一連の技術的難題が生じている(一般には、Shire SJ. et al., 2004, Luo R. et al., 2006, Shire SJ., 2009を参照されたい)。

【0005】

10

20

30

40

50

TFF技術によって高濃度製剤を獲得することは困難であり得る。これは、高度に濃縮されたタンパク質溶液が、流束低下が原因で物質移動を限定し、最終的にファウリングを引き起こす場合があるためである(例えば、Suki A. et al., 1984, 1986, Kim KJ. et al., 1992を参照されたい)。膜の表面積を増加させるか、または膜を交換することによってこれを克服することはできるものの、収率の低下を招く場合がある。別の制約は、高粘度によって供給液圧力が高まり、膜が完全であるための上限を処理中に超えてしまう場合があるということである(例えば、Turker M. et al., 1987, Liu J. et al., 2005を参照されたい)。イオン強度を高めることまたは特定の化合物を添加することなど適切な製剤設計を実行することは、粘度を低下させるのに寄与し得る(例えば、Liu J. et al., 2006を参照されたい)が、安定な製剤組成を確保しつつ粘度を低下させることは難易度の高い課題であり得る。より大きな粘度低下が必要とされる状況では、昇温させて処理することによって取り組むことができる(例えば、Winter C., 2009を参照されたい)。しかしながら、このような場合、高温に長くさらされることによってタンパク質の安定性が損なわれる可能性がある。したがって、本発明が解決しようとする課題は、他の処理パラメーターを操作することによって高タンパク質濃度を実現するための新規処理方法を提供することである。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】Liu J, Shire SJ. Reduced-viscosity concentrated protein formulations. US Patent Dec. 15, 2006, US20070116700 A1

20

【特許文献2】Winter C. Process for concentration of antibodies and therapeutic products thereof. US Patent Feb. 19, 2009, US20090214522 A1

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Kim KJ, Fane AG, Fell CJD, Joy DC. Fouling mechanisms of membranes during protein ultrafiltration, J. Membr. Sci. 68 (1992) 79.

【非特許文献2】Liu J, Nguyen MDH, Andya JD, Shire SJ. Reversible selfassociation increases the viscosity of a concentrated monoclonal antibody in aqueous solution. J Pharm Sci (2005), 94:1928-1940.

30

【非特許文献3】Luo R, Waghmare R, Krishnan M, Adams C, Poon E, Kahn D. High concentration UF/DF of a monoclonal antibody. Strategy for optimization and scale-up, BioProcess Int. 4 (2006) 44.

【非特許文献4】Shiloach J, Martin N, Moes H. Tangential flow filtration. Adv Biotechnol Process (1988), 8:97-125.

【非特許文献5】Shire SJ, Shahrokh Z, Liu J. Challenges in the development of high protein concentration formulations. J Pharm Sci (2004), 93:1390-1402.

【非特許文献6】Shire SJ. Formulation and manufacturability of biologics. Curr Opin Biotechnol (2009), 20:708-714.

【非特許文献7】Suki A, Fane AG, Fell CJD. Flux decline in protein ultrafiltration, J. Membr. Sci. 21 (1984) 269.

40

【非特許文献8】Suki A, Fane AG, Fell CJD. Modeling fouling mechanisms in protein ultrafiltration, J. Membr. Sci. 27 (1986) 181.

【非特許文献9】Turker M, Hubble J. Membrane fouling in a constant-flux ultrafiltration cell, J. Membr. Sci. 34 (1987) 267.

【非特許文献10】Van Reis R, Zydney A. Membrane separations in biotechnology. Curr Opin Biotechnol (2001), 12:208-211.

【発明の概要】

【0008】

製造規模でタンパク質を濃縮するための業界標準技術は、接線流による限外ろ過である

50

。高い最終濃度を有する製品を得るための鍵となる課題は、膜のファウリングを防止することおよび高い供給液圧力という課題を克服することである。

【0009】

大まかに言えば、本開示は、タンパク質の濃縮を成功させるための、例えば抗体調製物のための処理パラメーターの具体的な操作、そのような調製物を含む薬学的製剤、およびヒト治療法または動物治療法におけるそれらの使用を説明する。

【0010】

態様において、本開示は、最適なタンパク質濃度になるまで供給液流量を高流量に維持し、次いで、低い値に低減させてさらなる濃縮を継続する方法を提供する。例えば、濃縮は、保持溶液が200g/Lを上回るタンパク質濃度に濃縮されるまで、200LMH以上の供給液流量で実施され、ここで供給液圧力は、限外ろ過膜の指定された最大供給液圧力の85~100%まで上昇し、次いで、さらなる濃縮が、120LMH以上の供給液流量で継続される。稼働制限値内で達成可能なタンパク質濃度は、一定の供給液流量を用いる1工程または初期の移行期に供給液を減少させる流量制御を用いる2工程のいずれかを含む従来の処理の場合より高い。

【0011】

本開示はまた、態様において、濃縮処理の最後まで供給液流量をできるだけ高く維持する、より好ましい方法も提供する。例えば、一定の供給液流量下で供給液圧力が限外ろ過膜の指定された最大供給液圧力の85~100%に一度到達すると、供給液圧力を限外ろ過膜の指定された最大供給液圧力の85~100%以内に維持するよう供給液流量が自動的に制御される。

【0012】

本開示はまた、態様において、濃縮処理の最中に挿入される循環工程の有効性も提供する。例えば、一定の供給液流量下で供給液圧力が限外ろ過膜の指定された最大供給液圧力の85~100%に一度到達した後、10~80LMHの供給液流量での20分間の循環を挿入する。この循環工程は、その後の限外ろ過処理における供給液圧力上昇を緩和することができる。

【0013】

まとめると、本発明の目的は、以下の[1]~[33]を提供することである。

[1] 以下の工程を含む、限外ろ過によって高度に濃縮された抗体を含む組成物を調製するための方法:

(1) 限外ろ過膜に適用される供給液圧力の値が限外ろ過膜の指定された最大供給液圧力の85~100%に上昇することを可能にするように、供給液流量を調節する工程;および

(2) 工程(1)の後に、限外ろ過膜に適用される供給液圧力の値を維持するかまたは低下させるように、供給液流量を低下させる工程。

[2] 抗体調製物が室温で処理される、[1]記載の方法。

[3] 抗体調製物が10~30℃の温度で処理される、[1]記載の方法。

[4] 抗体調製物が15~30℃の温度で処理される、[1]記載の方法。

[5] 高度に濃縮された抗体が、100g/Lを上回る高濃度または2mPa・sを上回る粘度を有する、[1]記載の方法。

[6] 高度に濃縮された抗体が、200g/Lを上回る高濃度または10mPa・sを上回る粘度を有する、[1]記載の方法。

[7] 高度に濃縮された抗体が、250g/Lを上回る高濃度または40mPa・sを上回る粘度を有する、[1]記載の方法。

[8] 工程(1)における供給液流量が200LMH(L/m²/時間)以上に維持される、[1]記載の方法。

[9] 工程(1)における供給液流量が250LMH(L/m²/時間)以上に維持される、[1]記載の方法。

[10] 工程(1)における供給液流量が一定流量に維持される、[1]、[8]、および[9]記載の方法。

[11] 工程(1)において限外ろ過膜に適用される供給液圧力の最大値が、2.0バール~4.0バ

10

20

30

40

50

ールである、[1]記載の方法。

[12] 工程(1)において限外ろ過膜に適用される供給液圧力の最大値が、3.5バールである、[1]記載の方法。

[13] 工程(1)において限外ろ過膜に適用される供給液圧力の最大値が、限外ろ過膜の指定された最大供給液圧力の85～100%である、[1]記載の方法。

[14] 保持溶液が200g/Lを上回るタンパク質濃度に濃縮されると、工程(1)が工程(2)へと移行する、[1]記載の方法。

[15] 保持溶液が220g/L以上のタンパク質濃度に濃縮されると、工程(1)が工程(2)へと移行する、[1]記載の方法。

[16] 保持溶液が240g/Lに等しいタンパク質濃度に濃縮されると、工程(1)が工程(2)へと移行する、[1]記載の方法。

[17] 工程(2)において供給液圧力の値を低下させた後の供給液流量が、一定流量に維持される、[13]記載の方法。

[18] 工程(2)において供給液圧力の値を低下させた後の供給液流量が、120LMH(L/m²/時間)以下に維持される、[13]または[17]記載の方法。

[19] 工程(2)において供給液圧力の値を低下させた後の供給液流量が、80LMH(L/m²/時間)以下に維持される、[13]または[17]記載の方法。

[20] 工程(2)において限外ろ過膜に適用される供給液圧力の値が、一定値に維持される、[1]記載の方法。

[21] 工程(2)において限外ろ過膜に適用される供給液圧力の値が、供給液流量を低減させることによって限外ろ過膜の指定された最大供給液圧力の85～100%以内に維持される、[1]記載の方法。

[22] 供給液圧力と供給液流量の間のフィードバック制御によって、限外ろ過膜の指定された最大供給液圧力の85～100%以内に供給液圧力を維持するよう供給液流量が自動的に調節される、[20]または[21]記載の方法。

[23] 工程(1)と工程(2)の間に以下の工程をさらに含む、[1]記載の方法：

(3) 透過液バルブが閉じた状態で抗体調製物を膜に通して再循環させる工程。

[24] 保持液圧力制御バルブが完全に開いた状態で抗体調製物を再循環させる、[23]記載の方法。

[25] 工程(3)における供給液流量が、5～120LMH(L/m²/時間)の間の一定流量に維持される、[23]記載の方法。

[26] 工程(3)における供給液流量が、10～80LMH(L/m²/時間)の間の一定流量に維持される、[23]記載の方法。

[27] 抗体調製物の緩衝液組成が10～30mmol/Lの間のヒスチジンである、[1]記載の方法。

[28] 抗体調製物の緩衝液組成が20mmol/Lのヒスチジンである、[1]記載の方法。

[29] 抗体調製物のpHがpH3.0～pH10.0の間である、[1]記載の方法。

[30] 抗体調製物のpHがpH5.5～pH6.5の間である、[1]記載の方法。

[31] 抗体調製物のpHがpH6.0である、[1]記載の方法。

[32] 限外ろ過膜が50kDa以下の分画分子量を有する、[1]記載の方法。

[33] 限外ろ過膜が30kDa以下の分画分子量を有する、[1]記載の方法。

[34] 組成物が、高度に濃縮された抗ヒトインターロイキン-6受容体モノクローナル抗体を含む、[1]記載の方法。

[35] 組成物が、高度に濃縮されたトシリズマブを含む、[34]記載の方法。

[36] [1]記載の方法によって調製された高度に濃縮された抗体を含む、液体組成物。

[37] [1]記載の方法によって調製された高度に濃縮された抗体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的液体組成物。

[38] 以下の工程を含む、限外ろ過によって高度に濃縮されたタンパク質を含む組成物を調製するための方法：

(1) 限外ろ過膜に適用される供給液圧力の値が限外ろ過膜の指定された最大供給液圧力の85～100%に上昇することを可能にするように、供給液流量を調節する工程；および

10

20

30

40

50

(2) 工程(1)の後に、限外ろ過膜に適用される供給液圧力の値を維持するかまたは低下させるように、供給液流量を低下させる工程。

【0014】

また、本発明の前述の概要および以下の詳細な説明の両方とも、例示的な態様のものであり、本発明も本発明の他の代替の態様も限定しないことが理解される。本発明の他の目的および特徴は、添付の図面および実施例と共に以下の詳細な説明を読むと、さらに十分に明らかになるであろう。特に、いくつかの特定の態様に関して本発明を本明細書において説明するが、その説明は本発明を例示するものであり、本発明を限定するとは解釈されないことが認識されることが考えられる。添付の特許請求の範囲によって説明される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、当業者は様々な修正および応用を思い付き得る。同様に、本発明の他の目的、特徴、利益、および利点は、本概要および後述するいくつかの態様から明らかになり、当業者には容易に明らかになるであろう。このような目的、特徴、利益、および利点は、ここに示す実施例、データ、図面、およびそれらから導かれるすべての妥当な推論と組み合わせて、単独で、または本明細書に組み入れられる参考文献を考慮して、前述の内容から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0015】

本発明の様々な局面および応用は、以下の図面の簡単な説明ならびに本発明およびその好ましい態様の詳細な説明を考察することにより、当業者に明らかになるであろう。

【図1】本開示の態様におけるUF/DF処理のための装置を示す。

【図2】実験室規模での供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。処理全体を通じて、供給液流量を250LMH(L/m²/時間)の一定流量に設定した。

【図3】実験室規模での供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。保持液体積が100g/Lのタンパク質濃度に相当する値に達した時に、供給液流量を80LMHに低減させた。

【図4】実験室規模での供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。保持液体積が200g/Lのタンパク質濃度に相当する値に達した時に、供給液流量を80LMHに低減させた。

【図5】実験室規模での供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。供給液圧力が、240g/Lのタンパク質濃度に相当する3.5バールを超えた時に、供給液流量を80LMHに低減させた。

【図6】実験室規模での供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。一定の供給液流量(250LMH)下で供給液圧力が3.5バールを一度超えると、供給液圧力を3.5バールに維持するよう供給液流量が自動流量制御に供された。供給液流量が80LMHまで低下した時に、稼働を終了させた。

【図7】実験室規模での供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。供給液圧力が3.5バールを一度超えると、流路が循環様式に切り換えられた。一定の供給液流量(80LMH)下での20分間の循環の後、同じ供給液流量下で限外ろ過を再開させた。

【図8】実験室規模での供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。一定の供給液流量(10LMH)下で循環を実施した。

【図9】本開示の態様において実験室規模で回収されたプールのタンパク質濃度をまとめている。

【図10】本開示の態様における濃縮されたヒト化IL-6Rモノクローナル抗体の粘度プロフィールを示す。

【図11】パイロット規模でのUF1/DF/UF2工程において供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMP、および保持液体積に関して経時的に測定された値を示す。

【図12】パイロット規模でのUF3/UF4工程において供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMP、および保持液体積に関して経時的に測定された値を示す。

【図 1 3】パイロット規模でのUF1/DF/UF2工程において供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMP、および保持液体積に関して経時的に測定された値を示す。

【図 1 4】パイロット規模でのUF3/UF4工程において供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMP、および保持液体積に関して経時的に測定された値を示す。

【図 1 5】製造規模でのUF1/DF/UF2工程において供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMP、および保持液体積に関して経時的に測定された値を示す。

【図 1 6】製造規模でのUF3/UF4工程において供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMP、および保持液体積に関して経時的に測定された値を示す。

【図 1 7】製造規模でのUF1/DF/UF2工程において供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMP、および保持液体積に関して経時的に測定された値を示す。

【図 1 8】製造規模でのUF3/UF4工程において供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMP、および保持液体積に関して経時的に測定された値を示す。

【図 1 9】供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。供給液流量は、250LMH(L/m²/時間)の一定流量で稼働させ、次いで、保持液体積が60g/Lのタンパク質濃度に相当する値に達した時に、80LMHに低減させた。

【図 2 0】供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。供給液圧力が3.5バールを超えた時に、供給液流量を80LMHに低減させた。この時点での保持液体積の値は、145g/Lのタンパク質濃度に相当する。

【図 2 1】供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。一定の供給液流量(250LMH)下で供給液圧力が3.5バールを一度超えると、供給液圧力を3.5バールに維持するよう供給液流量が自動流量制御に供された。供給液流量が80LMHまで低下した時に、稼働を終了させた。

【発明を実施するための形態】

【0016】

態様の説明

本明細書において説明するものと同様または等価な任意の方法および材料を、本発明の態様を実施または試験する際に使用することができるが、好ましい方法を以下に説明する。しかしながら、本発明の方法を説明する前に、本明細書において説明する特定のサイズ、形状、寸法、材料、方法論、プロトコールなどは、日常的な実験法および最適化手法に従って変化し得るため、本発明はそれらに限定されないことを理解すべきである。また、本説明において使用される専門用語は、特定の種類または態様を説明することだけを目的とし、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定することは意図しないことも理解すべきである。

【0017】

本明細書において言及する各刊行物、特許、または特許出願の開示内容は、その全体が参照により本明細書に具体的に組み入れられる。しかしながら、本明細書における何事も、以前の発明によるそのような開示内容に本発明が先行する権利がないことを認めるものとして解釈されるべきではない。

【0018】

他に規定されない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合には、定義を含む本明細書が優先される。さらに、材料、方法、および実施例は、例示にすぎず、限定することを意図しない。

【0019】

本発明は、限外ろ過によって高度に濃縮された抗体を含む組成物を調製するための方法に関する。

【0020】

本発明は、限外ろ過によって高度に濃縮された抗体を含む組成物を調製するための方法を含み、ここで、限外ろ過膜に適用される供給液流量および供給液圧力は可変であり、ろ過処理の間に変更される。

【0021】

本発明の特に好ましい態様を以下に説明する。

以下の工程を含む、限外ろ過によって高度に濃縮された抗体を含む組成物を調製するための方法：

(1) 限外ろ過膜に適用される供給液圧力の値が限外ろ過膜の指定された最大供給液圧力の85～100%に上昇することを可能にするように、供給液流量を調節する工程；および

(2) 工程(1)の後に、限外ろ過膜に適用される供給液圧力の値を維持するかまたは低下させるように、供給液流量を低下させる工程。

【0022】

本発明で使用される「限外ろ過」という用語は、溶液中の分子をサイズに基づいて分離する、膜分離方法を意味する。「接線ろ過(TFF)」という用語は、流体が膜に対して接線方向に流れる特殊なろ過方法を意味する。タンパク質分子を含む溶液は、加圧下で限外ろ過膜の表面に沿って、すなわち接線方向に流れることによって濃縮される。限外ろ過膜は、一定のカットオフ値を有するポアサイズを有する。1つの態様において、カットオフ値は、50kDa以下、好ましくは30kDa以下の範囲である。

【0023】

「供給液流」という用語は、供給液ポンプから膜への流体の流れを意味する。「供給液流量」という用語は、膜に向けた溶液の体積流量を意味する。通常、供給液流量は、リットル/分として、単位時間当たりの体積で与えられ、リットル/m²/h(LMH)として、単位時間当たり単位膜面積当たりの体積に標準化される。「流束」という用語は、リットル/m²/h(LMH)として単位時間当たり単位膜面積当たりの体積で表される、膜を通った透過液流を標準化したものを意味する。

【0024】

「供給液圧力」という用語は、限外ろ過膜の入口にかかる圧力を意味する。「最大供給液圧力」という表現は、限外ろ過膜の製品規格として販売業者によって指定されている、供給液圧力の許容される最大値を意味する。「保持液圧力」という用語は、限外ろ過膜の出口にかかる圧力を意味する。「透過液圧力」という用語は、限外ろ過膜の透過液側にかかる圧力を意味する。「膜間圧(TMP)」という用語は、流体を限外ろ過膜にわたってろ過させる圧力を意味する。TMPの値は以下のように計算することができる。

$$TMP = (P_{\text{供給液}} + P_{\text{保持液}}) / 2 - P_{\text{透過液}}$$

TMPは、TFF機器において透過液側が開いている場合の、供給液圧力と保持液圧力の平均である。通常、圧力の値は、「バール」または「MPa」または「psi」で与えられる。

【0025】

「抗体」という用語は、抗原を特異的に認識するタンパク質を指す。抗体は、モノクローナルであってもまたはポリクローナルであってもよい。抗体は、例えば、Fv、Fab、およびF(ab)₂、ならびに単鎖(scFv)またはダイアボディを含む様々な形態で存在し得る。さらに、抗体の任意の断片または改変型(例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体など)も、本発明の方法のために使用され得る。これらの種類の抗体を調製するための方法は、当技術分野において周知であり、任意の方法を本発明において使用して、このような抗体およびそれらの断片を調製することができる。

【0026】

本発明で使用されるモノクローナル抗体には、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ラクダ、およびサルなどの動物由来のモノクローナル抗体だけでなく、キメラ抗体、ヒト化抗体、および二重特異性抗体など人為的に改変した遺伝子組み換え型抗体も含まれる。本発明の抗体にはまた、血中滞留性およびインビボ薬物動態の改善を目的とした抗体分子の物性の変更(具体的には、等電点(pI)の変更、Fc受容体に対する親和性の改善など)を行うために抗体の定常領域を人為的に改変することによって生じる遺伝子組み換え型抗体も含まれる。

【0027】

本発明で使用される抗体の免疫グロブリンクラスは特に限定されるものではなく、IgG1

、IgG2、IgG3、およびIgG4などのIgG、IgA、IgD、IgE、ならびにIgMを含むいずれのクラスでもよい。しかしながら、IgGおよびIgMが好ましい。

【0028】

本発明で使用される抗体には、抗組織因子抗体、抗IL-6受容体抗体、抗IL-6抗体、抗HM1.24抗原モノクローナル抗体、抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体(抗PTHrP抗体)、抗グリピカン-3抗体、抗ガングリオシドGM3抗体、抗TP0受容体アゴニスト抗体、凝固第VIII因子の機能を代替する抗体、抗IL31受容体抗体、抗HLA抗体、抗AXL抗体、抗CXCR4抗体、抗NR10抗体、ならびに第IX因子および第X因子に対する二重特異性抗体などが含まれるが、これらに限定されない。

【0029】

本発明で使用される好ましいヒト化抗体には、ヒト化抗インターロイキン6(IL-6)受容体抗体(トシリズマブ、hPM-1、およびMRA)(W092/19759参照)、ヒト化抗HM1.24抗原モノクローナル抗体(W098/14580参照)、ヒト化抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体(抗PTHrP抗体)(W098/13388参照)、ヒト化抗組織因子抗体(W099/51743参照)、抗グリピカン-3ヒト化IgG1κ抗体(PCT/JP05/013103参照)、抗NR10ヒト化抗体(W02009/072604参照)が含まれる。本発明で使用される特に好ましいヒト化抗体は、ヒト化抗IL-6受容体抗体である。

【0030】

好ましいヒトIgM抗体には、抗ガングリオシドGM3組み換え型ヒトIgM抗体(W005/05636参照)が含まれる。

【0031】

好ましいミニボディには、抗TP0受容体アゴニストダイアボディ(W002/33072参照)および抗CD47アゴニストダイアボディ(W001/66737参照)が含まれる。

【0032】

さらに、等電点が改善された抗体には、例えば、W02011/090088に記載された抗IL-6受容体抗体であるMab1(H鎖/文献中の配列番号:1、L鎖/文献中の配列番号:2)、および抗NR10ヒト化抗体であり、W02009/072604の実施例12に記載の方法によって作製された、完全ヒト化NS22抗体が含まれる。

【0033】

本発明はまた、限外ろ過によって高度に濃縮された抗体以外のタンパク質を含む組成物を調製するための方法にも関する。本発明は、限外ろ過によって高度に濃縮されたタンパク質を含む組成物を調製するための方法を含み、ここで、限外ろ過膜に適用される供給液流量および供給液圧力は可変であり、ろ過処理の間に変更される。本発明において使用されるタンパク質には、酵素、サイトカイン、およびペプチドアプタマーが含まれるが、これらに限定されない。

【0034】

本出願で使用される「高度に濃縮された抗体を含む組成物」という表現は、高度に濃縮された抗体を含む水性の緩衝溶液を意味する。本出願で使用される「緩衝液」という用語は、酸性物質または塩基性物質の添加または遊離に起因するpH変化が緩衝物質によって抑えられる溶液を意味する。このような効果を生じる任意の緩衝物質が使用され得る。1つの態様において、例えば、リン酸もしくはその塩、酢酸もしくはその塩、クエン酸もしくはその塩、モルホリンもしくはその塩、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸もしくはその塩、またはトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(TRIS)もしくはその塩などの薬学的に許容される緩衝物質が使用される。好ましい態様において、抗体調製物の緩衝液組成は、10~30mmol/Lの間のヒスチジンである。より好ましい態様において、抗体調製物の緩衝液組成は、20mmol/Lのヒスチジンである。

【0035】

任意で、緩衝溶液は、例えば、塩化ナトリウム、および/または硫酸ナトリウム、および/または塩化カリウム、および/または硫酸カリウム、および/またはクエン酸ナトリウム、および/またはクエン酸カリウムなどのさらなる塩を含み得る。

【0036】

10

20

30

40

50

本発明の1つの態様において、抗体調製物のpHは、pH3.0～pH10.0の間、好ましくはpH5.5～pH6.5の間、より好ましくはpH6.0である。

【0037】

本発明の1つの態様において、抗体調製物は、室温、好ましくは10～30℃の温度で、より好ましくは15～30℃の温度で処理される。

【0038】

1つの態様において、高度に濃縮された抗体は、100g/Lを上回るタンパク質濃度または2mPa・sを上回る粘度を有する。好ましい態様において、高度に濃縮された抗体は、200g/Lを上回るタンパク質濃度または10mPa・sを上回る粘度を有する。より好ましい態様において、高度に濃縮された抗体は、250g/Lを上回るタンパク質濃度または40mPa・sを上回る粘度を有する。 10

【0039】

1つの態様において、工程(1)における供給液流量は200LMH(L/m²/時間)以上に維持される。好ましい態様において、工程(1)における供給液流量は250LMH(L/m²/時間)以上に維持される。これらの態様において、工程(1)における供給液流量は、好ましくは、一定流量に維持される。

【0040】

1つの態様において、工程(1)において限外ろ過膜に適用される供給液圧力の最大値は、限外ろ過膜の指定された最大供給液圧力の85～100%以内である。好ましい態様において、供給液圧力の最大値は2.0バール～4.0バールである。より好ましい態様において、工程(1)において限外ろ過膜に適用される供給液圧力の最大値は、3.5バールである。 20

【0041】

1つの態様において、保持溶液が200g/Lを上回るタンパク質濃度に濃縮されると、工程(1)は工程(2)へと移行する。好ましい態様において、保持溶液が220g/L以上のタンパク質濃度に濃縮されると、工程(1)は工程(2)へと移行する。より好ましい態様において、保持溶液が240g/Lに等しいタンパク質濃度に濃縮されると、工程(1)は工程(2)へと移行する。

【0042】

この態様において、工程(2)において供給液圧力の値を低下させた後の供給液流量は、一定流量、好ましくは120LMH(L/m²/時間)もしくはそれ以下、またはより好ましくは80LMH(L/m²/時間)もしくはそれ以下に維持される。 30

【0043】

1つの態様において、工程(2)において限外ろ過膜に適用される供給液圧力の値は、一定値に維持される。

【0044】

1つの態様において、工程(2)において限外ろ過膜に適用される供給液圧力の値は、供給液流量を低減させることによって限外ろ過膜の指定された最大供給液圧力の85～100%以内に維持される。

【0045】

1つの態様において、供給液圧力と供給液流量の間のフィードバック制御によって、限外ろ過膜の指定された最大供給液圧力の85～100%以内に供給液圧力を維持するよう供給液流量が自動的に調節される。 40

【0046】

本発明による生産方法の1つの態様において、本方法は、工程(1)と工程(2)の間に以下の工程をさらに含む：

(3) 透過液バルブが閉じた状態で抗体調製物を膜に通して再循環させる工程。

【0047】

この態様において、抗体調製物は、保持液圧力制御バルブが完全に開いた状態で再循環させる。

【0048】

この態様において、工程(3)における供給液流量は、好ましくは、5～120LMH(L/m²/時間) 50

)の間、およびより好ましくは10~80LMH(L/m²/時間)の間の一定流量に維持される。

【0049】

本発明はまた、本発明の方法によって調製された高度に濃縮された抗体を含む液体組成物にも関する。

【0050】

本発明はまた、薬学的液体組成物にも関する。本発明の薬学的液体組成物は、薬学的に許容される担体を含み得る。

【0051】

本発明において、通常、薬学的液体組成物とは、疾患を治療、予防、試験、または診断するための薬剤を指す。

【0052】

本発明の薬学的液体組成物は、当業者に公知の方法によって製剤化することができる。例えば、これらは非経口的に、水または薬学的に許容される他の液体を含む無菌の溶液または懸濁液の注射剤の形態で使用する事ができる。例えば、このような液体組成物は、薬学的に許容される担体または媒体と、具体的には滅菌水、生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁液、界面活性剤、安定化剤、矯味矯臭剤、賦形剤、ビヒクル、保存剤、または結合剤などと適切に組み合わせることによって、一般に承認されている医薬製造業務において必要とされる単位用量の形態で混合することにより、製剤化され得る。このような製剤において、有効成分の量は、予め決められた範囲の適切な量となるように調整される。

【0053】

注射用の無菌組成物は、標準的な製剤化業務に従って注射用蒸留水などのビヒクルを用いて製剤化することができる。

【0054】

注射用の水溶液には、例えば、生理食塩水およびデキストロースまたは他の補助剤(例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、および塩化ナトリウム)を含む等張性溶液が含まれる。また、適切な可溶化剤、例えば、アルコール(エタノールなど)、多価アルコール(プロピレングリコールおよびポリエチレングリコールなど)、非イオン系界面活性剤(ポリソルベート80(商標)およびHCO-50など)と組み合わせて使用することも可能である。

【0055】

油にはゴマ油およびダイズ油が含まれる。安息香酸ベンジルおよび/またはベンジルアルコールを可溶化剤として組み合わせて使用することができる。また、緩衝液(例えば、リン酸緩衝液および酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば塩酸プロカイン)、安定化剤(例えば、ベンジルアルコールおよびフェノール)、ならびに/または抗酸化剤を組み合わせることも可能である。調製した注射剤を適切なアンプルに充填する。

【0056】

本発明の薬学的液体組成物は、好ましくは、非経口的に投与される。例えば、液体組成物は、注射、経鼻投与、経肺投与、または経皮投与用の剤形であり得る。例えば、静脈注射、筋肉内注射、腹腔内注射、または皮下注射などによって全身的にまたは局所的にこれらを投与することができる。

【0057】

投与方法は、患者の年齢および症状を考慮して適切に選択することができる。抗原結合分子を含む薬学的液体組成物の用量は、例えば、各投与用に0.0001~1000mg/kgであり得る。あるいは、用量は、例えば、患者1名当たり0.001~100,000mgであり得る。しかしながら、本発明は前述の数値によって限定されない。用量および投与方法は、患者の体重、年齢、および症状などによって変わる。当業者は、前述の因子を考慮して、適切な用量および投与方法を定めることができる。

【実施例】

【0058】

以下の実施例は、前述の開示内容を使用する様式をより十分に説明するのに、ならびに

10

20

30

40

50

開示内容の様々な局面を実施するために企図される最良の形態を説明するのに役立つ。これらの実施例は本開示内容の真の範囲を限定する働きは決してせず、むしろ例示的な目的で提示されることが理解されよう。

【0059】

比較例1

図1は、限外ろ過処理を実施するのに使用される装置の主要構成要素を示す。リサイクルタンクは初期材料および保持液を含む。混合装置は、移送ラインを介して添加される初期プールと限外ろ過膜からリサイクルタンクへと戻る保持液とを均一に混合することを徹底する。供給液ポンプは、膜の上に接線流を作り出す。供給液圧力は、膜の入口で測定される。保持液圧力制御バルブは膜の下流の保持液側で使用されて、例えば膜間圧(TMP)制御下で保持液圧力を調整する。膜と保持液圧力制御バルブの間で、圧力センサーが保持液圧力を測定する。膜の透過液側では、膜を通過してろ過された液体の圧力が透過液圧力センサーによってモニターされる。

10

【0060】

実験室規模の限外ろ過処理のために、自動TFFシステムAKTAcrossflow(GE Healthcare, US)を使用した。Hydrosart再生セルロース膜を用い、公称分画分子量が30kDaであり、最大供給液圧力規格が4.0バールである0.02m² Sartocnスライスカセット(Sartorius, Germany)を使用して、限外ろ過処理を実施した。

【0061】

使用する前に、膜カセットを1mol/L水酸化ナトリウムを用いて洗浄し、精製水ですすいだ。比較可能な膜特性を確保するために、標準化された流束を決定した。処理の前に、30mmol/Lヒスチジン緩衝液(pH5.8)を用いて膜カセットを平衡化した。限外ろ過は室温で稼働させた。

20

【0062】

出発原料は、ヒト化抗ヒトインターロイキン-6受容体(IL-6R)モノクローナル抗体(トシリズマブ(登録商標:ACTEMRA、RoACTEMRA)(PCT公報番号W092/19759、米国特許第5795965号参照)の精製プールから調製した。精製プールを60mg/mLになるまで濃縮し、30mmol/Lヒスチジン緩衝液(pH5.8)へと緩衝液交換を行った。

【0063】

緩衝液交換を行ったプール(DFプール)を、625g抗体/m²でTFFシステムに添加した。処理全体を通じて、供給液流量を250LMH(L/m²/時間)の一定流量に設定した。保持液圧力制御バルブが完全に開いた状態になるまで、TMPを1.0バールに制御した。限外ろ過処理は、透過液側を開放したまま稼働させた。供給液圧力が3.5バールを超えた時に、稼働を終了させた。限外ろ過処理後、一定の保持液流量(10mL/分)下で15分間、透過液側が閉じた状態で濃縮溶液を循環させ、次いで、メスシリンダー中に回収した。回収されたプールを、視覚的に均一になるまで攪拌した。

30

【0064】

タンパク質濃度測定のために、回収されたプールを、密度計DMA 4500(Anton Paar, Austria)によって測定された密度の値を用いて重量測定によって希釈した。UV/Vis分光光度計DU800(Beckman Coulter, US)を用いて、280nmのUV吸光度を測定した。

40

【0065】

図2は、供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。表1は、タンパク質濃度測定の結果を示す。

【0066】

【表1】

タンパク質濃度 (g/L)	
DF プール	53.0
回収されたプール	209

50

【 0 0 6 7 】

比較例2

以下の点を除いて、比較例1を繰り返した。保持液体積が100g/Lのタンパク質濃度に相当する値に達した時に、供給液流量を80LMHに低減させた。

【 0 0 6 8 】

図3は、供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。表2は、タンパク質濃度測定の結果を示す。

【 0 0 6 9 】

【表 2】

タンパク質濃度 (g/L)	
DF プール	51.2
回収されたプール	230

10

【 0 0 7 0 】

比較例3

以下の点を除いて、比較例1を繰り返した。保持液体積が200g/Lのタンパク質濃度に相当する値に達した時に、供給液流量を80LMHに低減させた。

【 0 0 7 1 】

図4は、供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。表3は、タンパク質濃度測定の結果を示す。

20

【 0 0 7 2 】

【表 3】

タンパク質濃度 (g/L)	
DF プール	51.2
回収されたプール	227

【 0 0 7 3 】

実施例4

以下の点を除いて、比較例1を繰り返した。供給液圧力が3.5バールを超えた時に、供給液流量を80LMHに低減させた。この時点での保持液体積の値は、240g/Lのタンパク質濃度に相当する。

30

【 0 0 7 4 】

図5は、供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。表4は、タンパク質濃度測定の結果を示す。

【 0 0 7 5 】

【表 4】

タンパク質濃度 (g/L)	
DF プール	49.5
回収されたプール	263

40

【 0 0 7 6 】

実施例5

以下の点を除いて、実施例4を繰り返した。一定の供給液流量(250LMH)下で供給液圧力が3.5バールを一度超えると、供給液圧力を3.5バールに維持するよう供給液流量が自動流量制御に供された。供給液流量が80LMHまで低下した時に、稼働を終了させた。

【 0 0 7 7 】

図6は、供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す

50

す。表5は、タンパク質濃度測定の結果を示す。

【0078】

【表5】

タンパク質濃度 (g/L)	
DF プール	51.2
回収されたプール	273

【0079】

実施例6

以下の点を除いて、実施例4を繰り返した。供給液圧力が3.5バールを一度超えると、流路が循環様式に切り換えられた。循環様式では、保持液圧力制御バルブが完全に開きかつ透過液バルブが閉じた状態で保持液を膜に通して循環させた。一定の供給液流量(80LMH)下での20分間の循環の後、同じ供給液流量下で限外ろ過を再開させた。

【0080】

図7は、供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。表6は、タンパク質濃度測定の結果を示す。

【0081】

【表6】

タンパク質濃度 (g/L)	
DF プール	50.0
回収されたプール	268

【0082】

実施例7

以下の点を除いて、実施例6を繰り返した。一定の供給液流量(10LMH)下で循環を実施した。

【0083】

図8は、供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。表7は、タンパク質濃度測定の結果を示す。

【0084】

【表7】

タンパク質濃度 (g/L)	
DF プール	51.7
回収されたプール	270

【0085】

図9は、実施例1～7において回収されたプールの濃度をまとめている。

【0086】

実施例8

ヒト化IL-6Rモノクローナル抗体の濃縮プールの粘度を、AR1000レオメーターならびに直径40mm、角度2度、およびトランケーション53マイクロメートルのコーンおよびプレート寸法を用いて測定した(TA Instruments, US)。

【0087】

図10は、15℃、25℃、および35℃の温度における濃度に対する粘度のプロットを示す。

【0088】

比較例9

スケールアップした研究のために、UF/DF処理をパイロット規模で実施した。異なるサ

10

20

30

40

50

イズのTFFシステムを用いて2段階で処理を稼働させた。1.20m² Sartococonカセットを使用する、より大型のTFFシステムを用いて、UF1/DF/UF2工程を処理した。0.30m² Sartococonカセットを使用する、より小型のTFFシステムを用いて、UF3/UF4工程を処理した。処理全体を通じて、透過液側を開放したまま室温で稼働させた。使用したSartococonカセットは30kDa(カットオフ値)のHydrosart膜(Sartorius, Germany)であった。

【0089】

使用する前に、膜カセットを1mol/L水酸化ナトリウムを用いて洗浄し、精製水ですすいだ。比較可能な膜特性を確保するために、標準化された流束を決定した。

【0090】

処理の前に、大型システムでは30mmol/Lヒスチジン緩衝液(pH5.8)を、小型システムでは20mmol/Lヒスチジン緩衝液(pH6.1)をそれぞれ用いて、膜カセットを平衡化した。処理は全体にわたって室温で実施した。

【0091】

大型システムでは、ヒト化抗ヒトIL-6Rモノクローナル抗体の精製プールを259g抗体/m²で添加した。供給液流量を710LMHの一定流量に設定した。TMPを1.0バールに制御した。精製プールをUF1工程で20g/Lに濃縮し、次いで、7倍量のダイアフィルトレーション容量(diavolume)の30mmol/Lヒスチジン緩衝液(pH5.8)を用いてダイアフィルトレーションを行った。ダイアフィルトレーション後、UF2工程でプールをさらに60g/Lに濃縮した。UF2プールを、5psiの低差圧下で15分間、膜に通して循環させ、次いで別の容器中に回収した。

【0092】

小型システムでは、回収されたUF2プールを990g抗体/m²で添加した。UF3工程において、供給液流量を250LMHの一定流量に設定した。保持液体積が100g/Lのタンパク質濃度に相当する値に達した時に、UF3工程を終了させた。UF4工程において、供給液流量を80LMHの一定流量に設定した。保持液圧力制御バルブが完全に開いた状態になるまで、TMPを1.0バールに制御した。保持液体積が240g/Lのタンパク質濃度に相当する値に低下した時に、稼働を終了させた。保持液体積が目標体積に達する前に供給液圧力が上限に近づきつつあったため、80分後に供給液流量を手動で低減させたことは、かなり注目に値する。

【0093】

UF4プールを、15psiの低差圧下で15分間、膜に通して循環させ、次いで別の容器中に回収した。容器を逆さにすることによって、回収されたUF4プールをよく混合した。

【0094】

タンパク質濃度測定のために、回収されたUF4プールを、密度計Densito 30PX(Mettler Toledo, Switzerland)によって測定された密度の値を用いて重量測定によって希釈した。UV/Vis分光光度計UV-1700(Shimadzu, Japan)を用いて、280nmのUV吸光度を測定した。

【0095】

図11は、UF1/DF/UF2工程における供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMP、および保持液体積に関して経時的に測定された値を示す。

【0096】

図12は、UF3/UF4工程における供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。

【0097】

表8は、タンパク質濃度測定の結果を示す。

【0098】

10

20

30

40

【表 8】

	タンパク質濃度 (g/L)
精製プール	3.06
回収されたUF2プール	63.5
回収されたUF4プール	221

【0099】

表9は、工程の収率を計算した結果を示す。

10

【0100】

【表 9】

	工程の収率 (%)
精製プール	N/A
回収されたUF2プール	98.8
回収されたUF4プール	79.8

【0101】

20

実施例10

以下の点を除いて、比較例9を繰り返した。30kDaカットオフ値のHydrosart膜を用いる0.40m² Sartocoonカセット (Sartorius, Germany) を使用してUF3/4工程を実施した。大型システムでは、精製プールを274g抗体/m²で添加した。小型システムでは、回収されたUF2プールを804g抗体/m²で添加した。保持液体積が220g/Lのタンパク質濃度に相当する値に達した時に、処理はUF3工程からUF4工程へと移行した。

【0102】

図13は、UF1/DF/UF2工程における供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMP、および保持液体積に関して経時的に測定された値を示す。

【0103】

30

図14は、UF3/UF4工程における供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMP、および保持液体積に関して経時的に測定された値を示す。

【0104】

表10は、タンパク質濃度測定の結果を示す。

【0105】

【表 10】

	タンパク質濃度 (g/L)
精製プール	1.78
回収されたUF2プール	65.6
回収されたUF4プール	231

40

【0106】

表11は、工程の収率を計算した結果を示す。

【0107】

【表 1 1】

	工程の収率 (%)
精製プール	N/A
回収されたUF2プール	95.6
回収されたUF4プール	93.3

【0108】

実施例11

以下の点を除いて、実施例10を繰り返した。生産規模のTFFシステムをGMP製造施設において使用した。35.10m² Sartocanカセットを使用してUF1/DF/UF2工程を実施し、30kDaカットオフ値のHydrosart膜を用いる17.55m² Sartocanカセット(Sartorius, Germany)を使用してUF3/4工程を実施した。大型システムでは、精製プールを243g抗体/m²で添加した。小型システムでは、回収されたUF2プールを478g抗体/m²で添加した。DF緩衝液を39mmol/Lヒスチジン緩衝液(pH5.8)に交換した。UF2プールの目的タンパク質濃度を75g/Lまで上昇させた。UF2工程の最後に、供給液流量を低減させて、リサイクルタンク中で泡立ちが起こるのを防止した。回収を最大にするために、UF2プールおよびUF4プールをそれぞれ70Lおよび1Lの緩衝液置換によって回収した。回収されたUF4プールを、20mmol/Lヒスチジン緩衝液(pH6.0)、30mmol/Lメチオニン、100mmol/Lアルギニン、および0.2%ポリソルベート80中、180g/Lで製剤化した(PCT公報番号W02009/084659参照)。タンパク質濃度測定のために、UF4プールおよび回収されたUF4プールを、密度標準を用いて重量測定によって希釈した。UV/Vis分光光度計UV-2450(Shimadzu, Japan)を用いて、280nmのUV吸光度を測定した。

【0109】

図15は、UF1/DF/UF2工程における供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMP、および保持液体積に関して経時的に測定された値を示す。

【0110】

図16は、UF3/UF4工程における供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMP、および保持液体積に関して経時的に測定された値を示す。

【0111】

表12は、タンパク質濃度測定の結果を示す。

【0112】

【表 1 2】

	タンパク質濃度 (g/L)
精製プール	2.78
UF2の最後	73.2
回収されたUF2プール	46.4
UF4の最後	239
回収されたUF4プール	231
製剤化原薬	181

【0113】

表13は、工程の収率を計算した結果を示す。

【0114】

【表 1 3】

工程の収率 (%)	
精製プール	N/A
回収されたUF2プール	99.5
回収されたUF4プール	90.9

【0 1 1 5】

HPLCシステムAlliance 2695(Waters, US)およびYMC-Pack ODSA、250×4.6mmカラム (YMC, Japan)を用いて、ヒスチジン濃度を測定した。表14は、ヒスチジン定量アッセイの結果を示す。 10

【0 1 1 6】

【表 1 4】

ヒスチジン濃度 (mmol/L)	
回収されたUF4プール	17.5
製剤化原薬	19.9

【0 1 1 7】

HPLCシステムAlliance 2695(Waters, US)およびTSK G3000SW_{XL}カラム (Tosoh, Japan)を用いて、工程中のプールにおけるモノマー含有量を測定した。表15は、SECアッセイの結果を示す。 20

【0 1 1 8】

【表 1 5】

モノマー (%)	
精製プール	99.9
回収されたUF2プール	99.9
製剤化原薬	99.7

【0 1 1 9】

実施例12

以下の点を除いて、実施例11を繰り返した。大型システムでは、精製プールを246g抗体/m²で添加した。小型システムでは、回収されたUF2プールを482g抗体/m²で添加した。

【0 1 2 0】

図17は、UF1/DF/UF2工程における供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMP、および保持液体積に関して経時的に測定された値を示す。

【0 1 2 1】

図18は、UF3/UF4工程における供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。 40

【0 1 2 2】

表16は、タンパク質濃度測定の結果を示す。

【0 1 2 3】

【表 1 6】

	タンパク質濃度 (g/L)
精製プール	1.95
UF2 の最後	73.7
回収されたUF2プール	46.0
UF4 の最後	239
回収されたUF4プール	231
製剤化原薬	180

10

【0 1 2 4】

表17は、工程の収率を計算した結果を示す。

【0 1 2 5】

【表 1 7】

	工程の収率 (%)
精製プール	N/A
回収されたUF2プール	99.2
回収されたUF4プール	94.5

20

【0 1 2 6】

HPLCシステムAlliance 2695(Waters, US)およびYMC-Pack ODSA、250×4.6mmカラム(YMC, Japan)を用いて、ヒスチジン濃度を測定した。表18は、ヒスチジン定量アッセイの結果を示す。

【0 1 2 7】

【表 1 8】

	ヒスチジン濃度 (mmol/L)
回収されたUF4プール	17.3
製剤化原薬	19.4

30

【0 1 2 8】

HPLCシステムAlliance 2695(Waters, US)およびTSK G3000SW_{XL}カラム(Tosoh, Japan)を用いて、工程中のプールにおけるモノマー含有量を測定した。表19は、SECアッセイの結果を示す。

【0 1 2 9】

【表 1 9】

	モノマー (%)
精製プール	99.9
回収されたUF2プール	99.9
製剤化原薬	99.7

40

【0 1 3 0】

比較例13

実験室規模の自動TFFシステムAKTAcrossflow(GE Healthcare, US)を限外ろ過処理のた

50

めに使用した。Ultracel再生セルロース膜を用い、公称分画分子量が30kDaである2つの88 cm² Pellicon3カセット(Merck Millipore, Germany)を使用して、限外ろ過処理を実施した。

【0131】

使用する前に、膜カセットを0.5mol/L水酸化ナトリウムを用いて洗浄し、精製水ですすいだ。比較可能な膜特性を確保するために、標準化された流束を決定した。処理の前に、20mmol/L tris、150mmol/Lアルギニン緩衝液(pH7.0)を用いて膜カセットを平衡化した。限外ろ過は室温で稼働させた。

【0132】

抗体クラスIgG2に属するモノクローナル抗NR10ヒト化抗体(W02009/072604の実施例12で示された方法に従って調製した、完全にヒト化されたNS22抗体)の精製プールから出発原料を調製した。これは、pIが5.6まで低くなるようにアミノ酸配列が改変された抗体である。精製プールを20mg/mLになるまで濃縮し、20mmol/L tris、150mmol/Lアルギニン緩衝液(pH7.0)へと緩衝液交換を行った。

【0133】

緩衝液交換を行ったプール(DFプール)を、625g抗体/m²で添加した。供給液流量は、250 LMH(L/m²/時間)の一定流量で稼働させ、次いで、保持液体積が60g/Lのタンパク質濃度に相当する値に達した時に、80LMHに低減させた。保持液圧力制御バルブが完全に開いた状態になるまで、TMPを1.0バールに制御した。限外ろ過処理は、透過液側を開放したまま稼働させた。供給液圧力が3.5バールを超えた時に、稼働を終了させた。限外ろ過処理後、一定の供給液流量(10mL/分)下で15分間、透過液側が閉じた状態で濃縮溶液を循環させ、次いで、メスシリンダー中に回収した。回収されたプールを、視覚的に均一になるまで攪拌した。

【0134】

タンパク質濃度測定のために、回収されたプールを密度計DMA 4500(Anton Paar, Austria)によって測定された密度の値を用いて重量測定によって希釈した。UV/Vis分光光度計DU800(Beckman Coulter, US)を用いて、280nmのUV吸光度を測定した。

【0135】

図19は、供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。表20は、タンパク質濃度測定の結果を示す。

【0136】

【表20】

タンパク質濃度 (g/L)	
DFプール	20.6
回収されたプール	222

【0137】

実施例14

以下の点を除いて、比較例13を繰り返した。供給液圧力が3.5バールを超えた時に、供給液流量を80LMHに低減させた。この時点での保持液体積の値は、145g/Lのタンパク質濃度に相当する。

【0138】

図20は、供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。表21は、タンパク質濃度測定の結果を示す。

【0139】

【表 2 1】

タンパク質濃度	
(g/L)	
DF プール	21.7
回収されたプール	236

【 0 1 4 0 】

実施例 15

以下の点を除いて、実施例14を繰り返した。一定の供給液流量(250LMH)下で供給液圧力が3.5バールを一度超えると、供給液圧力を3.5バールに維持するよう供給液流量が自動流量制御に供された。供給液流量が80LMHまで低下した時に、稼働を終了させた。

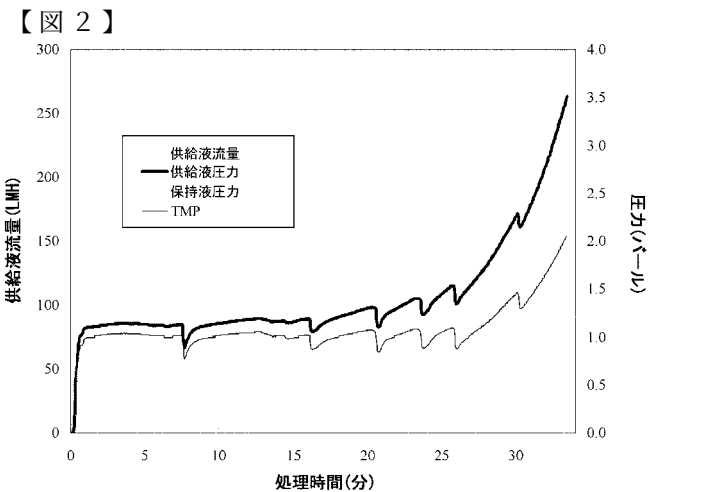
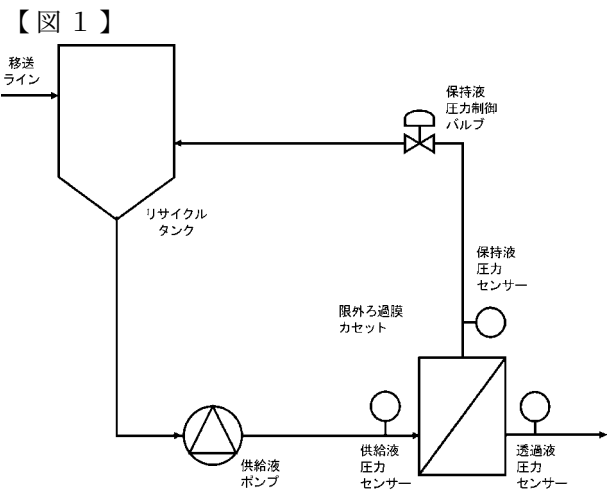
【 0 1 4 1 】

図21は、供給液流量、供給液圧力、保持液圧力、TMPに関して経時的に測定された値を示す。表22は、タンパク質濃度測定の結果を示す。

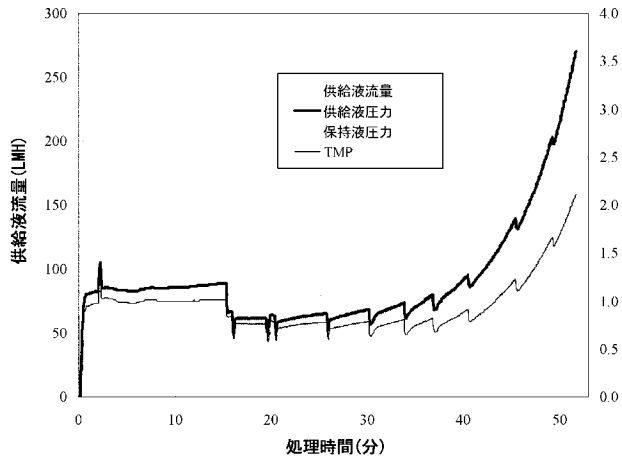
【 0 1 4 2 】

【表 2 2】

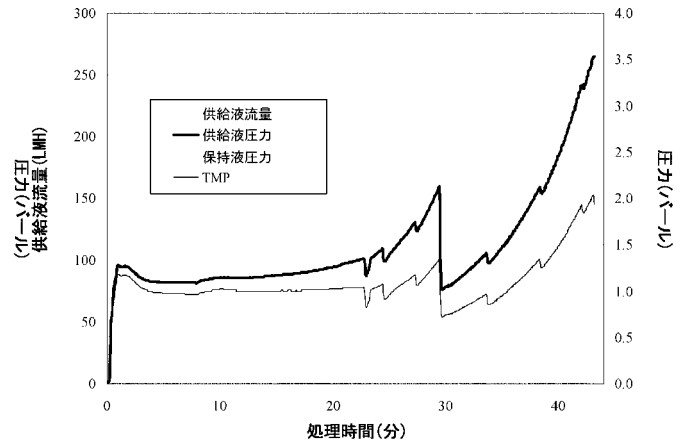
タンパク質濃度	
(g/L)	
DF プール	20.4
回収されたプール	246



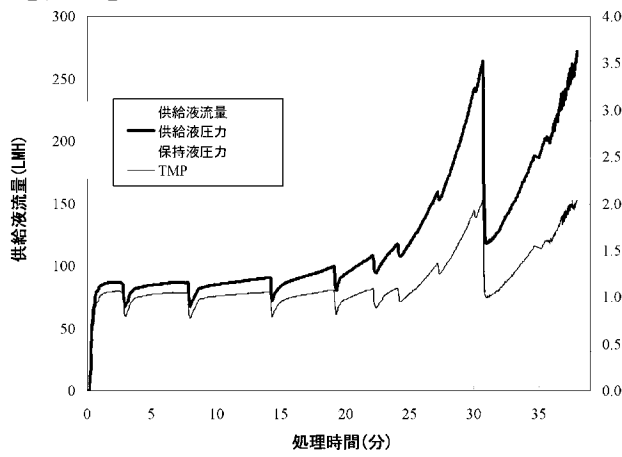
【図 3】



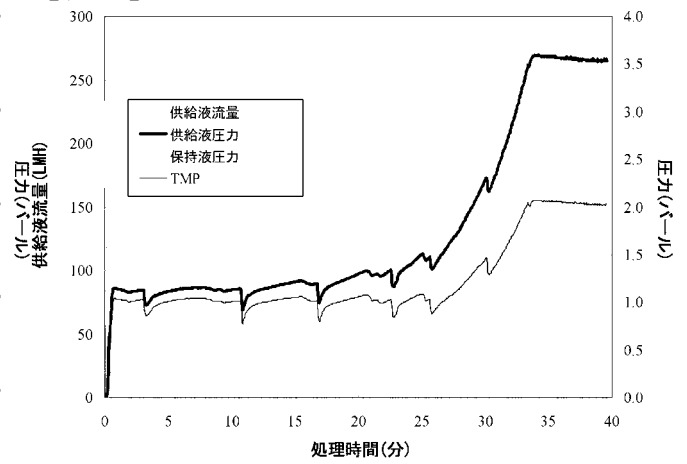
【図 4】



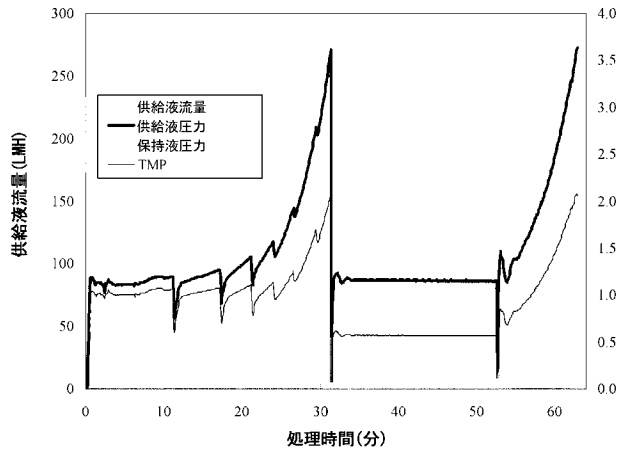
【図 5】



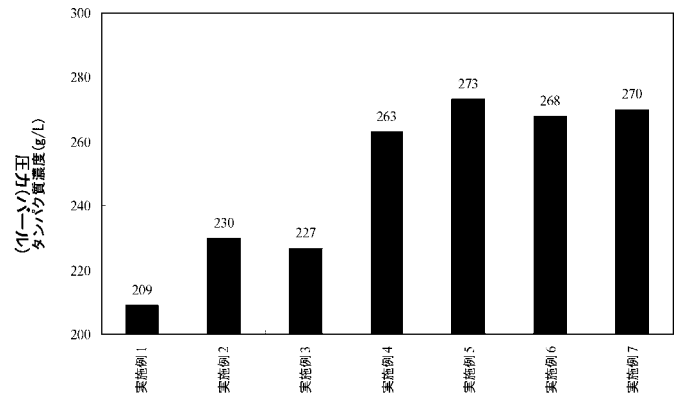
【図 6】



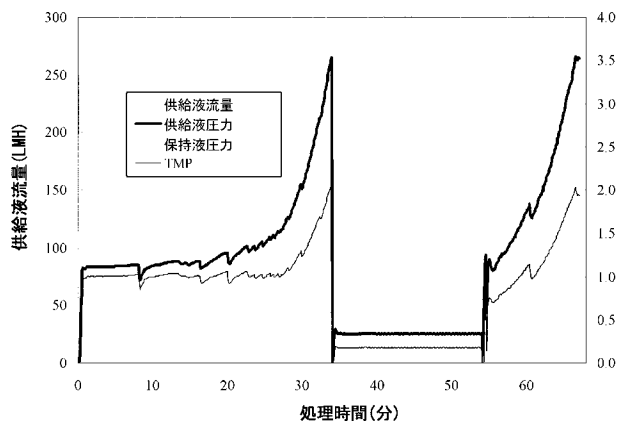
【図 7】



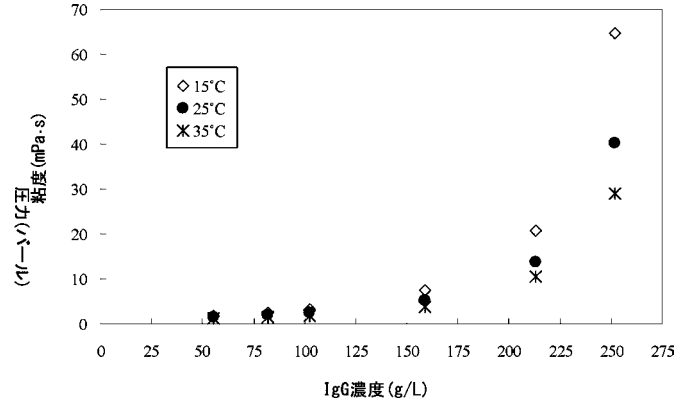
【図 9】



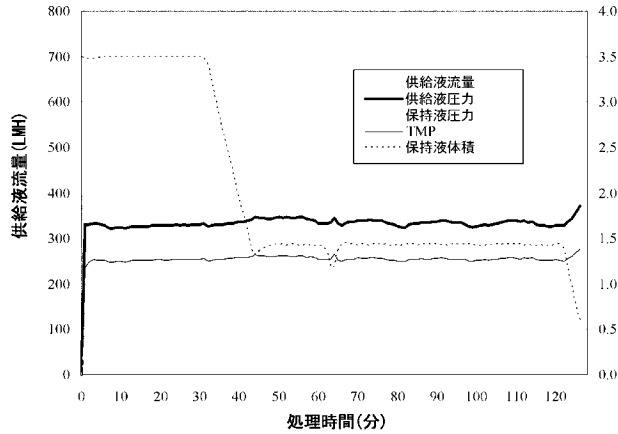
【図 8】



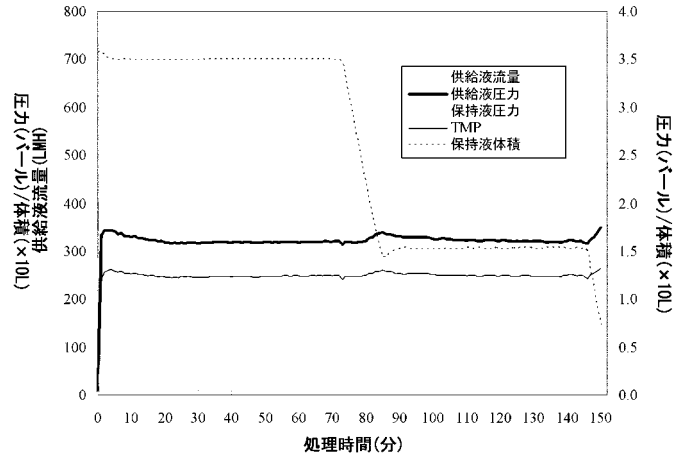
【図 10】



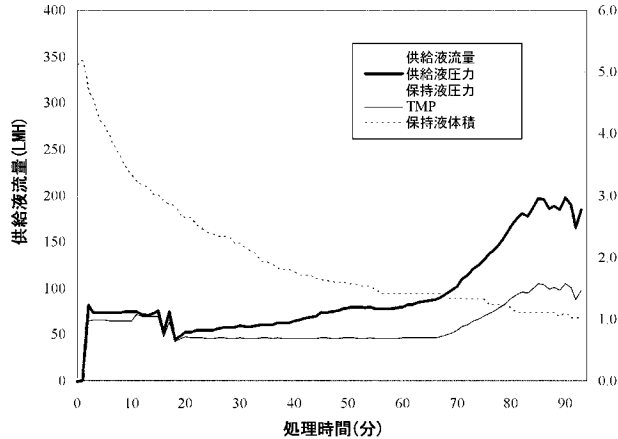
【図 11】



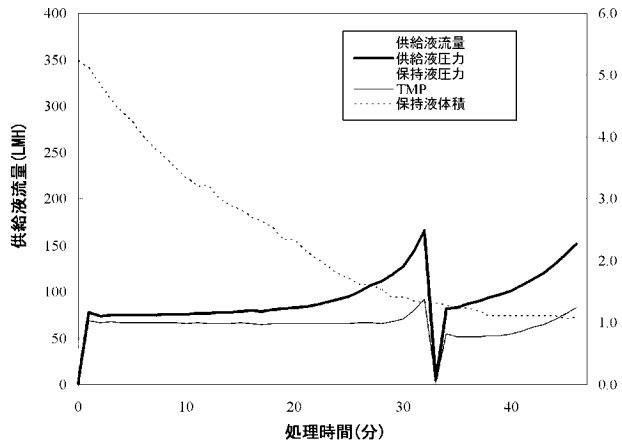
【図 13】



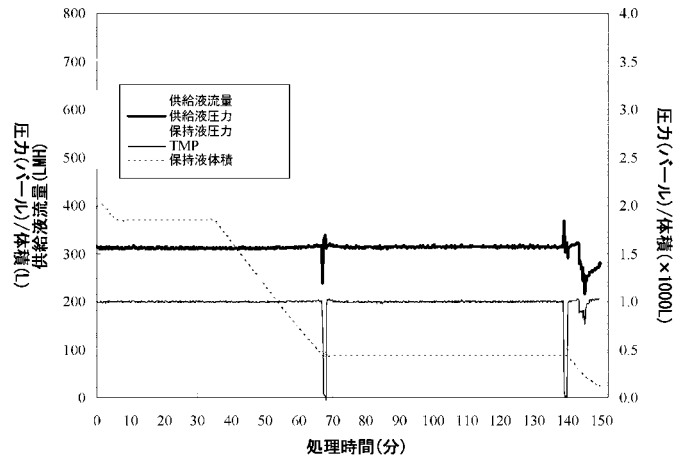
【図 12】



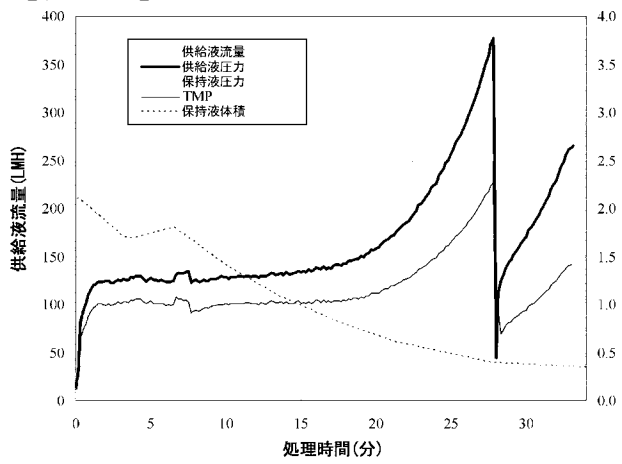
【図 14】



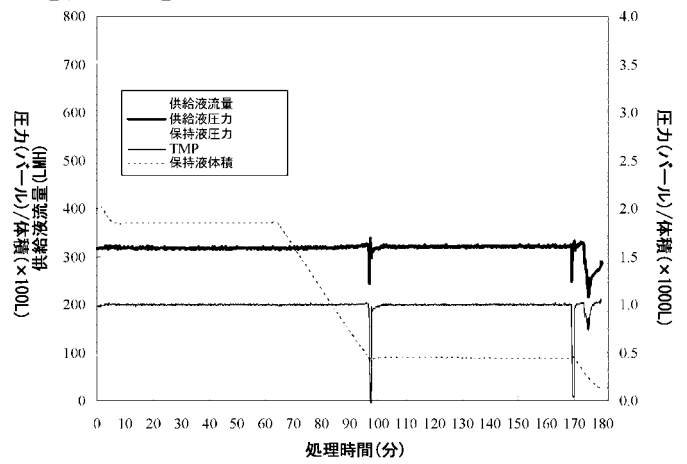
【図 15】



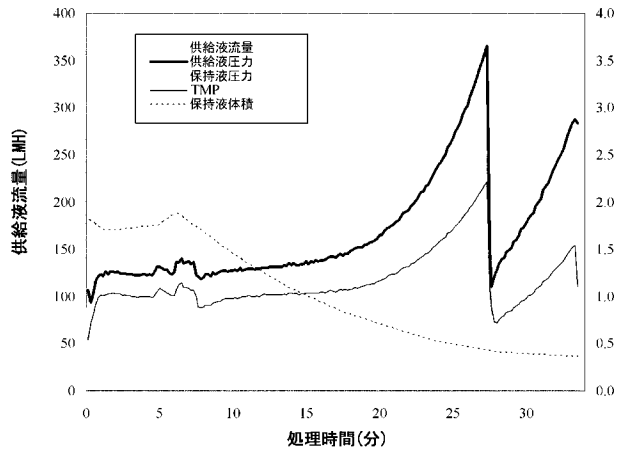
【図 16】



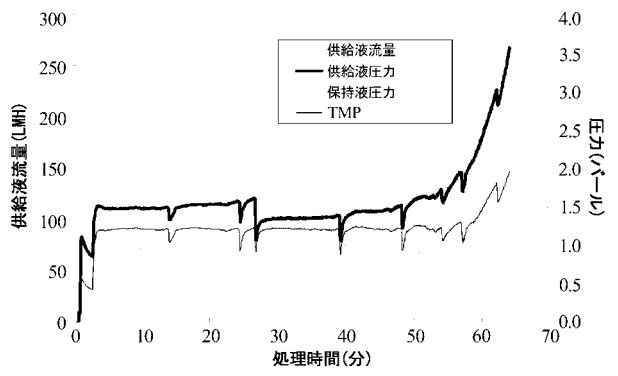
【図 17】



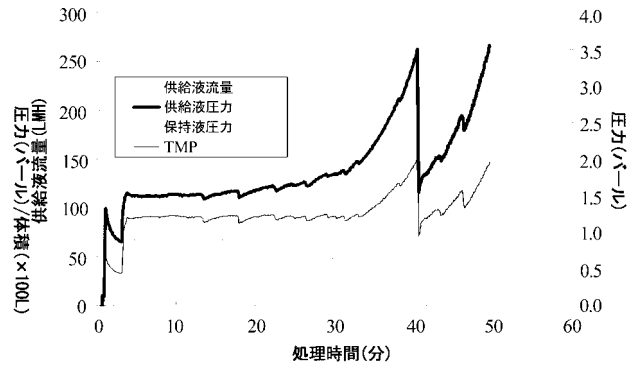
【図 18】



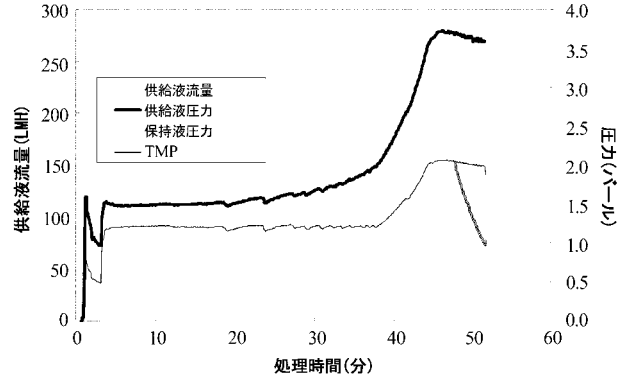
【図 19】



【図 20】



【図 21】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

C O 7 K 16/28

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ラウ ケルビー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンフランシスコ バルボア ストリート 3 0 1 1

(72)発明者 ベンダー ジーン

アメリカ合衆国 メリーランド州 ゲイサーズバーグ マーケット ストリート ウェスト 3 5
3 # 3 2 3

(72)発明者 田中 佐依子

東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 中外製薬株式会社内

(72)発明者 若山 瑠美子

東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 中外製薬株式会社内

(72)発明者 山田 秀成

東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 中外製薬株式会社内

(72)発明者 磯田 知紀

東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 中外製薬株式会社内

(72)発明者 大枝 匡義

東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 中外製薬株式会社内

F ターム(参考) 4D006 GA06 JA53Z JA65Z JA67Z KA12 KA63 KE02Q KE02R KE07P KE07R

KE08P KE09P KE14R KE15R KE16R KE22Q KE24Q KE30R MB05 MC12

PA02 PB52 PB53 PC41

4H045 AA11 AA20 DA76 GA10