

(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2007-530971

(P2007-530971A)

(43) 公表日 平成19年11月1日(2007.11.1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 30/26 (2006.01)	GO 1 N 30/26 A	4 D O 1 7
BO 1 D 15/08 (2006.01)	BO 1 D 15/08	
GO 1 N 30/46 (2006.01)	GO 1 N 30/46 A	
GO 1 N 30/00 (2006.01)	GO 1 N 30/00 B	
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88 2 O 1 R	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-506111 (P2007-506111)  
 (86) (22) 出願日 平成17年3月31日 (2005.3.31)  
 (85) 翻訳文提出日 平成18年10月2日 (2006.10.2)  
 (86) 国際出願番号 PCT/SE2005/000467  
 (87) 国際公開番号 W02005/094960  
 (87) 国際公開日 平成17年10月13日 (2005.10.13)  
 (31) 優先権主張番号 0400886-8  
 (32) 優先日 平成16年4月2日 (2004.4.2)  
 (33) 優先権主張国 スウェーデン (SE)

(71) 出願人 597064713  
 ジーイー・ヘルスケア・バイオサイエンス  
 ・アクチボラグ  
 スウェーデン国エスエー751 84  
 ウプサラ ビヨルクガタン 30  
 (74) 代理人 100093908  
 弁理士 松本 研一  
 (74) 代理人 100105588  
 弁理士 小倉 博  
 (74) 代理人 100129779  
 弁理士 黒川 俊久

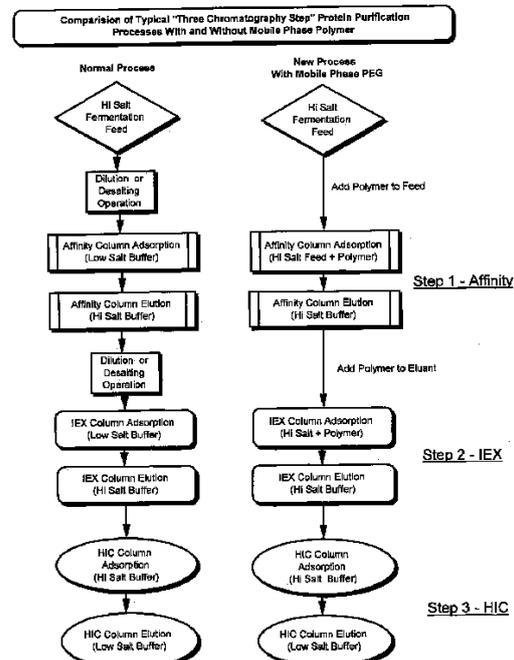
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 精製方法

(57) 【要約】

本発明は、液体の他の成分から標的化合物を分離する方法に関し、この方法は、2以上のクロマトグラフ工程を任意の順序で含み、移動相をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス、及び/又はイオン交換クロマトグラフィーマトリックス、及び/又は疎水性相互作用クロマトグラフィーマトリックスと接触させて、1以上のマトリックスとの接触が1以上の非イオンポリエーテルの存在下で行われること、並びに最後のクロマトグラフ工程から別の分留において標的化合物を得ることを含む。最も好ましい実施形態では、非イオンポリエーテルは、ポリ(エチレングリコール)(PEG)である。

【選択図】 図3



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

2 以上のクロマトグラフ工程により液体の他の成分から 1 以上の標的化合物を分離する方法であって、前記液体を、アフィニティークロマトグラフィーマトリックス、及び/又はイオン交換クロマトグラフィーマトリックス、及び/又は疎水性相互作用クロマトグラフィーマトリックスと任意の順序で接触させて、前記標的化合物と前記マトリックスとの間に相互作用を生じさせ、その際に 1 以上の前記マトリックスとの前記接触は 1 以上の非イオンポリエーテルの存在下で行われること、並びに最後のクロマトグラフ工程から別の分留において前記標的化合物を得ることを含む方法。

## 【請求項 2】

前記標的化合物は、前記クロマトグラフィーマトリックスのうちの 1 以上に吸着される請求項 1 記載の方法。

10

## 【請求項 3】

前記吸着標的化合物は、前記クロマトグラフィーマトリックスを溶出液と接触させることにより放出される請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

2 以上の連続的イオン交換クロマトグラフィ工程を含む請求項 1 乃至請求項 3 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 5】

アフィニティー工程とその後続くイオン交換クロマトグラフィ工程を含む請求項 1 乃至請求項 3 のいずれか 1 項記載の方法。

20

## 【請求項 6】

イオン交換クロマトグラフィ工程とその後続く疎水性相互作用クロマトグラフィ工程を含む請求項 1 乃至請求項 3 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 7】

3 つのクロマトグラフィ工程を含む請求項 1 乃至請求項 6 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 8】

前記第 1 のクロマトグラフィ工程は、非イオンポリエーテルの存在下で実施される請求項 1 乃至請求項 7 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 9】

2 以上の工程は、非イオンポリエーテルの存在下で実施される請求項 1 乃至請求項 8 のいずれか 1 項記載の方法。

30

## 【請求項 10】

前記非イオンポリエーテルは、ポリ(エチレングリコール)(PEG)である請求項 1 乃至請求項 9 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 11】

前記標的化合物は、抗体又は抗体化合物である請求項 1 乃至請求項 10 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 12】

多孔性担体に固定化されたタンパク質リガンドからなるマトリックスを使用するアフィニティー工程を含む請求項 1 乃至請求項 11 のいずれか 1 項記載の方法。

40

## 【請求項 13】

前記タンパク質リガンドは、タンパク質 A の 1 以上の免疫グロブリン結合ドメインを含む請求項 12 記載の方法。

## 【請求項 14】

前記担体は、架橋多糖類粒子からなる請求項 12 又は請求項 13 記載の方法。

## 【請求項 15】

帯電基を含むリガンドからなるマトリックスを使用するイオン交換工程を含み、前記リガンドは、エキステンダーを介して担体に固定化されている請求項 1 乃至請求項 14 のいずれか 1 項記載の方法。

50

## 【請求項 16】

前記エキステンダーは、担体表面をデキストランでコーティングすることにより得られる請求項 15 記載の方法。

## 【請求項 17】

前記担体は、多孔性架橋多糖類粒子からなる請求項 15 又は請求項 16 記載の方法。

## 【請求項 18】

それぞれ、アフィニティークロマトグラフィーマトリックス、イオン交換クロマトグラフィーマトリックス、及び疎水性相互作用クロマトグラフィーマトリックスからなる群から選択されたマトリックスを詰めた、2 以上のクロマトグラフィーカラム、前記移動相に加える非イオンポリエーテルを含む緩衝液、並びに抗体精製に関する使用説明書を備えるキット。 10

## 【請求項 19】

前記非イオンポリエーテルは、ポリ(エチレングリコール)(PEG)である請求項 18 記載のキット。

## 【請求項 20】

液体の他の成分から抗体化合物を分離する方法であって、1 以上のクロマトグラフ工程を含み、1 工程で、前記液体をイオン交換クロマトグラフィーマトリックスと接触させて、非イオンポリエーテルを含む緩衝液の存在下で 200 mM 以上の NaAc に相当する伝導度で前記抗体化合物を吸着する方法。 20

## 【請求項 21】

前記非イオンポリエーテルは、ポリ(エチレングリコール)(PEG)である請求項 20 記載の方法。

## 【請求項 22】

前記イオン交換クロマトグラフィーマトリックスは、エキステンダーを介して 1 以上の多孔性担体に固定化された、帯電リガンドを含む請求項 20 又は請求項 21 記載の方法。

## 【請求項 23】

前記エキステンダーは、担体表面をデキストランでコーティングすることにより得られる請求項 22 記載の方法。

## 【請求項 24】

前記担体は、架橋多糖類粒子からなる請求項 20 乃至請求項 23 のいずれか 1 項記載の方法。 30

## 【請求項 25】

液体の他の成分から抗体又は抗体化合物を分離する方法であって、1 以上のクロマトグラフ工程を含み、1 工程で、前記液体をイオン交換クロマトグラフィーマトリックスと接触させて、非イオンポリエーテルを含む緩衝液の存在下で前記抗体化合物を吸着し、前記イオン交換クロマトグラフィーマトリックスの前記リガンドは、デキストランエキステンダーを介して 1 以上の多孔性担体に固定化されている方法。

## 【請求項 26】

前記非イオンポリエーテルは、ポリ(エチレングリコール)(PEG)である請求項 25 記載の方法。 40

## 【請求項 27】

前記担体は、架橋多糖類粒子からなる請求項 25 又は請求項 26 記載の方法。

## 【請求項 28】

抗体を分離するためのキットであって、別の区画内に、前記リガンドがデキストランエキステンダーを介して多孔性担体に固定化されているイオン交換クロマトグラフィーマトリックス、ポリ(エチレングリコール)(PEG)を含む緩衝液、及び抗体を前記マトリックスに吸着するための使用説明書を備えるキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】 50

本発明は、バイオテクノロジーの分野に関するものであり、より具体的には、タンパク質、抗体などの生体化合物の精製に関するものである。そこで、本発明は、液体の1以上の他の構成要素から標的化合物の精製を行う液体クロマトグラフィーの方法と共に、そのような精製を行うことを可能にするキットに関する。

【背景技術】

【0002】

バイオテクノロジー手法は、研究目的のためだけでなく、今までにない種類の薬物を製造するために、タンパク質、ペプチド、核酸、及び他の生体化合物の生成において広範囲に使用されている。クロマトグラフィーは、化合物に対する多目的性及び感度の点から、多くの場合、このような状況において好ましい精製方法である。クロマトグラフィーという用語は、密接に関係する分離方法の一族を包含し、これらの方法は、すべて、2つの互いに混合しにくい相を接触させるという原理に基づいている。より具体的には、標的化合物は、固定相と接触する移動相内に導入される。次いで、標的化合物は、移動相によりシステムに通されるときに固定相と移動相との間の一連の相互作用を受ける。これらの相互作用では、サンプル内の構成要素の物理的又は化学的特性の相違を利用する。

10

【0003】

簡単に液体クロマトグラフィーと通例呼ばれる液体 - 固体クロマトグラフィーでは、標的化合物は、1以上の汚染物質又は望ましくない物質と共に液体中に存在する。前記液体は、一般に、同質、多孔性、若しくは非多孔性の粒子の集合体、又は有機物若しくは無機物由来のモノリスのいずれかからなる、マトリックスと呼ばれる、固定相と接触させられる。分離マトリックスの特性は、概して、クロマトグラフィーなどの分離プロセスで使用したときに得られる効率を決定する。通常、分離マトリックスは、標的と相互作用できる、リガンドと呼ばれる基が結合されている担体からなる。そのため、リガンドは、担体に、注目する分子の分離、同定、及び/又は精製を行わせる能力を付与する。タンパク質精製に使用できるさまざまなクロマトグラフィー法の総説は、例えば、Protein Purification - Principles, High Resolution Methods and Applications (J. C. Janson and L. Ryden, 1989 VCH Publishers, Inc.) を参照されたい。

20

【0004】

そこで、簡単に述べると、イオン交換クロマトグラフィーは、タンパク質などの生体化合物の分離に頻繁に使用される周知の分留方法であるということである。イオン交換クロマトグラフィープロセスの基礎となるのは、塩イオンなどの他方の種類のイオンに対するタンパク質などの一方の種類のイオンの、イオン交換体と呼ばれる逆帯電したマトリックスへの競合的結合である。タンパク質とイオン交換体との間の相互作用は、タンパク質の正味電荷及び表面電荷分布、溶媒中の特定のイオンのイオン強度及び性質、プロトン活性(pH)などの複数の因子に依存する。より具体的には、イオン交換クロマトグラフィーの吸着段階は、通常、希釈塩溶液、つまり、電荷 - 電荷間の相互作用が強い、比較的伝導性の低い溶液中で発生するが、溶出段階は、比較的伝導性の高い溶液中で発生する。物質の混合物の示差溶出は、多くの場合、塩濃度増大の勾配を持つ溶出を必要とする。さらに、2つのイオン交換クロマトグラフィー工程が組み合わせられた場合、高伝導溶液が第1のカラムの溶出に使用されるため、注目する溶出液を後続のイオン交換体上に充填する前に溶出工程が必要になる。このような理由から、移動相が例えば組換えタンパク質を含む培養液である場合に、第1のカラムの前に希釈工程も必要である。しかし、希釈が必要なので、必要な機器の体積及びサイズが増え、したがって、プロセスのコストが増え、作業も厄介なものとなる。

30

40

【0005】

アフィニティークロマトグラフィーの名前は、固相に吸着することに対するさまざまな親和性の利用に由来する。アフィニティークロマトグラフィーで使用されるのは、例えば、タンパク質と低分子量物質との間の相互作用、ホルモンなどの生体情報分子と受容体と

50

の間の相互作用、及び生体ポリマー、特にタンパク質同士の間の相互作用である。実施例は、多分子集合体、エフェクター - 受容体相相互作用、DNAタンパク質相互作用、及び抗原 - 抗体結合などにおける構造的及び生理学的生化学のあらゆる分野に見られる。タンパク質 A 及びタンパク質 G アフィニティークロマトグラフィーは、今日ではおそらく、主に使いやすい、選択性が卓越している、得られる純度が高いという理由から、免疫グロブリンの分離及び精製、特にモノクローナル抗体の分離を行う最良の確立された方法であろう。多くの場合、アフィニティマトリックスからの溶出は、電荷間相互作用又は他の相互作用を低減するために溶液伝導度を高める、又は pH を変えること必要とする。しかし、上述の理由があるため、多段階クロマトグラフィー手順では、塩勾配溶出を使用する従来のアフィニティークロマトグラフィーは、イオン交換クロマトグラフィーの次の工程の前に後続溶出工程を必要とする。 10

#### 【0006】

疎水クロマトグラフィー (HIC) では、タンパク質などの標的化合物と、疎水性リガンドを与えるマトリックスと結合に疎水相互作用が使用される。より具体的には、球状タンパク質の表面は、典型的に、マトリックス上の疎水性リガンドに結合する、広い疎水性パッチを持つ。したがって、HIC 吸着は、典型的には、高伝導度溶液中で行われる。標的化合物の放出は、塩濃度を一定勾配で減少させ、標的とリガンドとの間の相互作用の強度の差を利用することにより、通常得られる。場合によっては、溶媒極性の減少も、溶出には必要である。そのため、結合された化合物は、リオトロピック塩の濃度を連続的又は段階的勾配で下げて行くことによりマトリックスから放出することができる。非常に純度の高い生成物が対象である場合、たいてい、疎水クロマトグラフを他の工程と組み合わせることが推奨される。しかし、HIC を前のイオン交換クロマトグラフィー工程と組み合わせる場合、HIC 上に充填する前に移動相内の必要な伝導度を得るために、塩を加える必要がある。 20

#### 【0007】

そのため、今のところ、タンパク質などの大半の生体分子は、1 以上のクロマトグラフィー工程を多くの場合伴う一連の精製工程を伴うプロセスにより精製される。しかし、多くのプロセスのコスト及び効率、希釈、pH 変更、及びさまざまな分離工程を仲立ちするために必要なその他の操作により、劇的な影響を受ける。上では、より類似性の高い塩組成又は伝導度の溶液を使用して、つまり広範な塩変化又は希釈なしで、多段階クロマトグラフィープロセスを操作することが可能な場合に、そのようなプロセスをより効果的にすることを提案している。このような多段階クロマトグラフィープロセスは、マトリックスの動的増大を伴った場合に特に有利であろう。 30

#### 【0008】

2 以上の精製工程の他の組合せは、米国特許第 3869436 号 (Statens Baktteriologiska Laboratorium) で開示されており、これは、イオン交換クロマトグラフィーを使用して血漿タンパク質を分留する方法に関するものである。より具体的には、米国特許第 3869436 号では、簡単にいうと、血漿中のグロブリンをポリ (エチレングリコール) で沈殿し、すべての沈殿物を残留溶液から遠心分離機で分離し、沈殿物を酢酸ナトリウムに溶解し、陽イオン交換体上に溶解されている沈殿物からグロブリンを吸着し、ポリ (エチレングリコール) (PEG) で溶出液を沈殿させ、沈殿物をリン酸緩衝液中に溶解し、溶解されている沈殿物からのグロブリンを陽イオン交換体上に吸着する方法を開示している。PEG 6000 を、約 13% の最終濃度で使用して、イオン強度、タンパク質濃度、温度、及び pH の影響も受ける所望の沈殿物を得る。米国特許第 3869436 号によれば、前のほうで提案されているような中性塩と比較して、有機溶媒による沈殿の利点は、揮発性であるため凍結真空乾燥を使って簡単に取り除けるという点である。 40

#### 【0009】

ポリ (エチレングリコール) (PEG) は、さらに、モノクローナル抗体を含むさまざまなタンパク質の精製に疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) 内の移動相修飾剤 50

として提案されている (Pete Gagnon, Purification Tools for Monoclonal Antibodies, Ch. 6, pp. 103 - 126 in Validated Biosystems, Tucson, AZ, 1996, ISBN 0 - 9653515 - 9 - 9)。PEGは、さらに、HICに類似しているが、より親水性の高いマトリックスを採用し、疎水性相互作用よりも共水和に依存するクロマトグラフ法である、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) の移動相添加剤として提唱されている (Pete Gagnon, Purification Tools for Monoclonal Antibodies, Ch. 8, pp. 138 - 143, Validated Biosystems, Tucson, AZ, 1996, ISBN 0 - 9653515 - 9 - 9)。PEGは、塩の従来の使用法どおり、一定勾配で流される。塩及びPEGの明らかなメカニズムは、移動相水を結合するものであり、これは多くの水和水が保持されるマトリックスとのタンパク質共水和相互作用に有利である。

#### 【0010】

アフィニティークロマトグラフィーの結合効率を改善するために、P. Gagnon (Pete Gagnon, Purification Tools for Monoclonal Antibodies, Ch. 9, pp. 159, Validated Biosystems, Tucson, AZ, 1996, ISBN 0 - 9653515 - 9 - 9) は、IgGのタンパクA結合の主操作変数のいくつかを探索し、その結合は、主に疎水性であると文書に記載した。タンパクA結合を最適化する基本的手段を特徴付けるために、表面張力、体積排除、及び誘電定数を個々に、また限られた組合せで、ベタイン又はポリ (エチレングリコール) (PEG) を結合緩衝液に加えることにより、評価した。表面張力及び体積排除は、両方とも、結合を高めると共に、ほぼ等しい有効性をもたらしたが、誘電定数には明らかな効果はなかったと結論された。さらに、ポリ (エチレングリコール) (PEG) は、沈殿する塩に似た応答を発生することにも注意した。

#### 【0011】

最後に、ポリ (エチレングリコール) (PEG) は、イオン交換クロマトグラフィーの動的結合能力を高める高伝導レベルの培養液の充填に対する添加剤として提案されている (Chavez et al: "Increased Dynamic Binding Capacity in Ion-exchange Chromatography by Addition of Poly (ethylene glycol)", Abstract from Recovery of Biological Products XI meeting, Banff, Canada, September 14 - 19, 2003)。モデルタンパク質を、マトリックス Fractogel (商標) SO<sub>3</sub> 及び Fractogel (商標) TMAE (EM Industries) 並びに SP Spharose 及び Q Spharose FF (スウェーデン、ウプサラの Amersham Biosciences) でテストした。Fractogel (商標) は、架橋ポリメタクリル酸塩の担体を含み、孔の大きさは約 800 であり、線状ポリマー鎖を介してイオン交換官能基が結合される。Spharose (商標) は、多孔性架橋アガロース担体であり、これに、S 又は Q 基が共有結合する。提案されているメカニズムは、水和水された PEG がタンパク質及び樹脂水和水殻をバラバラにするというものである。したがって、タンパク質が、高伝導度条件の下であっても、樹脂に結合することが有利である。開示されている効果は、3350 よりも上などのより高い PEG MW、及びタンパク質 MW の両方で最も顕著である。このような観察結果が PEG 沈殿特性に類似していることは驚きではない。

#### 【0012】

しかし、単一のマトリックスの能力を高める移動相 PEG に関係する上記の作業があるとしても、それでも、そのような効果に適応し多段階生物分離プロセスの効率を改善するさらに深い科学的評価が必要である。

- 【特許文献1】米国特許第3869436号明細書
- 【特許文献2】米国特許第6399750号明細書
- 【特許文献3】国際公開第03/046063号パンフレット
- 【特許文献4】国際公開第98/33572号パンフレット
- 【非特許文献1】Protein Purification - Principles, High Resolution Methods and Applications (J. - C. Janson and L. Ryden, 1989 VCH Publishers, Inc.)
- 【非特許文献2】Pete Gagnon, Purification Tools for Monoclonal Antibodies, Ch.6, pp.103 - 126 in Validated Biosystems, Tucson, AZ, 1996, ISBN 0-9653515-9-9 10
- 【非特許文献3】Pete Gagnon, Purification Tools for Monoclonal Antibodies, Ch.8, pp.138 - 143, Validated Biosystems, Tucson, AZ, 1996, ISBN 0-9653515-9-9
- 【非特許文献4】Pete Gagnon, Purification Tools for Monoclonal Antibodies, Ch.9, pp.159, Validated Biosystems, Tucson, AZ, 1996, ISBN 0-9653515-9-9 20
- 【非特許文献5】Chavez et al: "Increased Dynamic Binding Capacity in Ion-exchange Chromatography by Addition of Poly (ethylene glycol)", Abstract from Recovery of Biological Products XI meeting, Banff, Canada, September 14-19, 2003
- 【非特許文献6】S Hjerten: Biochim Biophys Acta 79 (2), 393-398 (1964)
- 【非特許文献7】"Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization" (R Arshady: Chimica e L'Industria 70(9), 70-75 (1988)) 30
- 【非特許文献8】P F Rempp, P J Lutz: Comprehensive Polymer Science vol.6, pp.403-421, Eds. G Allen et al, Oxford 1989

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明は、クロマトグラフプロセスの結合能力を高めることに関係する。

【課題を解決するための手段】 40

【0014】

本発明の一態様は、クロマトグラフィーマトリックスの動的結合能力を高める、第1及び第2のクロマトグラフ工程を含むクロマトグラフィーにより1以上の標的化合物を分離する方法である。これは、アフィニティークロマトグラフィー及び/又はイオン交換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の2以上の工程の組合せを使用することにより達成することができ、その場合、ポリ(ポリエチレングリコール)(PEG)などの非イオンポリエーテルが、1以上のマトリックスに標的化合物が吸着されるときに存在する。

【0015】

本発明の他の態様は、希釈工程又は体積を減らすことにより効率が改善される、多段階 50

クロマトグラフ法である。

【0016】

そのため、本発明の特定の態様は、前記工程間に移動相を希釈する必要性が減じられるか、さらには必要がなくなる、2以上の連続イオン交換クロマトグラフ工程を含むクロマトグラフ法である。

【0017】

本発明の他の態様は、第2の工程に充填する前に第1の工程から溶出液を希釈する必要がない、イオン交換クロマトグラフ工程が後に続くアフィニティー工程を含むクロマトグラフ法である。

【0018】

本発明のさらに他の態様は、第2の工程に充填する前に第1の工程から溶出液に塩を添加する必要性が減じられるか、又は必要がなくなる、疎水性相互作用クロマトグラフ工程が後に続くイオン交換クロマトグラフ工程を含むクロマトグラフ法である。

【0019】

本発明の他の態様は、ポリ(エチレングリコール)(PEG)などの非イオンポリエーテルが吸着工程の前に移動相に加えられるが、溶出工程には含まれない、タンパク質などの生体化合物を精製する方法であり、この方法を使用すると、残留PEGを生成物から除去する必要がなくなる。

【0020】

本発明の他の態様及び利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。

定義

「溶出液」という用語は、その化学組成又は物理的特性により、クロマトグラフィーマトリックスから吸着化合物を放出することができる緩衝液などの液体を意味する。

【0021】

「生体化合物」という用語は、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、細胞、核酸などの生体分子又は化合物を意味する。

【0022】

「アフィニティー」クロマトグラフィー及びマトリックスという用語は、生物学的な「錠/鍵」メカニズムに基づいて生体分子、又は分子の一部を特定のリガンドに結合することを指す。アフィニティー結合の一般的な例は、特異抗体への抗原の結合、特異受容体への酵素の結合などである。

【0023】

「移動相」という用語は、吸着工程で使用される緩衝液を意味する。

【0024】

「マトリックス」という用語は、本明細書では、リガンドが固定化された多孔性又は非多孔性担体を意味する。

【0025】

「リガンド」という用語は、本明細書では、標的化合物と相互作用できる官能基を含む化合物を意味する。

【0026】

「帯電リガンド」という用語は、帯電状態において、反対極性の電荷を持つ標的化合物と静電気により相互作用できる基を含むリガンドを意味する。

【0027】

「担体表面」という用語は、外部表面を含み、多孔性担体の場合には、細孔表面を含む。

【0028】

「抗体化合物」という用語は、機能的抗体断片、及び抗体を含む融合タンパク質を包含する。この文脈において、「機能的」抗体断片は、抗体の元々の結合特性を本質的に保持している断片を意味する。

【発明を実施するための最良の形態】

10

20

30

40

50

## 【0029】

本発明は、クロマトグラフィーによる、抗体及び抗体化合物などの標的化合物の精製に関するものである。より具体的には、本発明者は、吸着緩衝液として表されることが多い、移動相内に非イオンポリエーテルが存在すると、特にそのような非イオンポリエーテルを使用する2以上のクロマトグラフィー工程が組み合わされた場合に、予想されない結合能力が生じることを見いだした。

## 【0030】

また、本発明は、高塩濃度であっても効率的であり、これは、標的化合物生成セルの発酵により生成された場合には一般的なことであることが示されている。したがって、本発明を採用すれば、吸着前に希釈する必要性が減じ、プロセス効率を高めることができる。

10

## 【0031】

そのため、第1の態様では、本発明は、2以上のクロマトグラフ工程により液体の他の成分から1以上の標的化合物を分離する方法に関するものであり、この方法は、任意の順序で液体を、アフィニティークロマトグラフィーマトリックス、及び/又はイオン交換クロマトグラフィーマトリックス、及び/又は疎水性相互作用クロマトグラフィーマトリックスと接触させて、標的化合物とマトリックスとの間に相互作用を生じさせ、その際に1以上のマトリックスとの接触は1以上の非イオンポリエーテルの存在下で行われること、並びに最後のクロマトグラフ工程から別の分留において標的化合物を得ることを含む。一実施形態では、クロマトグラフィーマトリックスとの1以上の接触は、2以上の非イオンポリエーテルの混合物の存在下で実施される。

20

## 【0032】

前記非イオンポリエーテルは、従来の移動相塩緩衝溶液などの、有利な吸着条件をもたらす従来の緩衝液中に存在することが好ましい。標的化合物を含む液体は、透明又は不透明培養液として発酵から得ることができ、その場合、第1の工程は、一般に、捕捉工程と呼ばれる。一実施形態では、1以上の非イオンポリエーテルは、そのような捕捉工程の吸着時に存在する。それとは別に、標的化合物の含む液体は、先行するクロマトグラフィー工程からの溶質液である。

## 【0033】

一実施形態では、非イオンポリエーテルは、適宜緩衝液中にあるが、標的化合物を含む液体と組み合わせられ、その結果得られる混合物は、その後のクロマトグラフィーにおいて移動相をなす。他の実施形態では、非イオンポリエーテルは、第1のクロマトグラフィー工程に先立って2つの相分配を使用することから生じる。従来、このような2つの相分配の後に、非イオンポリエーテルの除去が続くが、本発明では、代わりに非イオンポリエーテルを使用して、クロマトグラフィーにおける吸着を高めることができる。したがって、非イオンポリエーテル及び標的化合物を含む相は、場合によっては先行する希釈剤、例えば、水と共に、クロマトグラフィーのカラム上に直接施すことができる。

30

## 【0034】

この文脈では、標的化合物とマトリックスの間にもたらされる相互作用は、吸着、つまり、標的の結合、又は他の化合物に関する標的化合物の遅延であってよいと理解される。そのため、一実施形態では、本発明は、2以上のクロマトグラフ工程により液体の他の成分から1以上の標的化合物を分離する方法であり、この方法は、任意の順序で液体を、アフィニティークロマトグラフィーマトリックス、及び/又はイオン交換クロマトグラフィーマトリックス、及び/又は疎水性相互作用クロマトグラフィーマトリックスと接触させ、標的化合物をマトリックスに吸着させ、その際に1以上のマトリックスとの接触は1以上の非イオンポリエーテルの存在下で行われること、並びに最後のクロマトグラフ工程から別の分留において標的化合物を得ることを含む。一実施形態では、1以上の吸着工程は、2以上の非イオンポリエーテルの混合物の存在下で実施される。分離された標的化合物を得るために、この実施形態の後に前記吸着された標的化合物を溶出する工程が続くのが好ましい。吸着された標的化合物の溶出は、当該技術分野で周知の通り、吸着工程と比較して、pH及び/又は塩条件の変更により得ることができる。

40

50

## 【0035】

非イオンポリエーテルを移動相に加えることを除き、本発明のクロマトグラフィー工程は、従来一般的な操作条件に従って実施され、これは当該技術分野では周知である。従来のクロマトグラフィーカラムは、それぞれの工程において都合よく使用され、そのサイズは、リガンドの官能基などを含む、出発物質、緩衝液、マトリックスのように、それぞれの場合について適合される。

## 【0036】

第1の実施形態では、本発明は、2以上の連続的イオン交換クロマトグラフィー工程を含む。イオン交換クロマトグラフィーは、標的化合物の電荷に応じて、陽イオン交換クロマトグラフィー又は陰イオン交換クロマトグラフィーとすることができる。周知の通り、標的の電荷は、周囲のpHを変えることにより変更できる。これまた周知の通り、イオン交換体は、すべてのpH値で帯電することを意味する、強イオン交換体であるか、又はpHをシフトすることにより帯電可能であることを意味する、弱イオン交換体とすることができる。以下の実験部に示されているように、第2の工程に適用される移動相における、PEGなどの非イオンポリエーテルの存在により、2つの連続イオン交換クロマトグラフィー工程を中間希釈なしで、第1のカラムの溶出に使用される塩勾配に関係なく実施できる。そのため、本発明により、多くの場合発酵を介してタンパク質及びペプチドの組換え製造から結果として生じる伝導度など、標的化合物が通常溶出する伝導度の下でイオン交換クロマトグラフィーを実施できる。したがって、先行するイオン交換クロマトグラフィー工程からの培養液又は溶出液の実質的希釈が不要なので、本発明では、操作体積及び総コストの両方に関してかなり節約することができる。さらに以下に示されているように、PEGを本発明によるイオン交換クロマトグラフィー工程の移動相に加えると、モデルタンパク質の動的結合能力(DBC)を、従来のイオン交換クロマトグラフィーに比べて、4倍から6倍高めることが思いがけなく示された。この効果は、本明細書では、「PEG効果」と示すことがある。酢酸ナトリウムなどの通常の緩衝液を使用して、この効果を修飾することができ、塩濃度が高いと、PEGが高まるのが、本発明者により示されている。本発明の一実施形態では、イオン交換クロマトグラフィー工程におけるPEGの濃度は、8%程度などのPEGなど約6~10%である。

## 【0037】

他の実施形態では、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー工程が後に続くアフィニティー工程を含む。ここでもまた、この実施形態は、後続の工程に充填する前に第1の工程からの溶出液を希釈しなくても実施することができ、これにより、かなりプロセス体積を縮小し、節約することができる。以下の実験部では、非イオンポリエーテルを添加せずに対応する従来の工程の1.5倍などの値により、本発明によるアフィニティー工程における動的結合能力(DBC)をどのように高められるかが示される。アフィニティー工程における、PEGなどの非イオンポリエーテルの例示的濃度は、約6%のPEGなど、約4~8%である。具体的一実施形態では、本発明は、3工程プロセスであり、アフィニティークロマトグラフィー工程とその後に続く2つのイオン交換クロマトグラフィー工程を含む。

## 【0038】

他の実施形態では、本発明は、イオン交換クロマトグラフィー工程とその後に続く疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)工程を含む。この実施形態では、非イオンポリエーテルを加えない場合の対応する工程の組合せと比較した利点は、第1の工程は従来の希釈を行わずに実施できるため、塩を加えることにより2つの工程の間の移動相の伝導度を高める必要性が大幅に減じられるか、又は必要がなくなるという点である。当業者であれば理解するように、この利点は、組換え生産されたタンパク質又はペプチドを含む培養液など、元々高い伝導度を持つ液相の場合にも当てはまる。具体的一実施形態では、このプロセスは、3工程プロセスであり、アフィニティークロマトグラフィー工程は、イオン交換クロマトグラフィー及びHICの前に来る。

## 【0039】

本発明で添加剤として使用される非イオンポリエーテルは、酸素を豊富に含む基を含む。このような標的物質は、好ましい実施形態では、ポリ(エチレングリコール)(PEG)などのポリエーテル、ポリプロピレングリコール(PPG)、PEG-PPGブロック共ポリマー、PEG-PPG共ポリマー、Pluronic(商標)(BASF)及び他のPEG-PPG-PEGトリブロックポリマー、エチルヒドロキシエチルセルロース(EHEC)及び類似のポリマー、重合アリル-グリシジルエーテル、重合フェニルグリシジルエーテル、それに加えてさまざまな界面活性剤及び上述のポリエーテルを使用する他の化合物である。最も都合のよい実施形態では、非イオンポリエーテルは、ポリ(エチレングリコール)(PEG)である。この文脈では、PEGという用語は、さらに、本明細書で開示されている都合のよい特性に影響を及ぼすことなく修飾されたポリ(エチレングリコール)も包含することは理解されるであろう。

10

## 【0040】

クロマトグラフィー工程で移動相への添加剤としてPEGを使用することについては、以下の実験部で詳細に説明する。簡単に言うと、PEGは、Sigmaなどの多くの調達先から入手できる。市販のPEGは、PEG 4600、PEG 8000など、分子量に合わせて示されている。一実施形態では、5000~15000など、約1000から20000の範囲の分子量、例えば約10000のPEGが使用される。

## 【0041】

一実施形態の本発明の方法では、アフィニティマトリックスは、担体に固定化されたタンパク質リガンドからなる。アフィニティークロマトグラフィーにおいてタンパク質又はタンパク質断片をリガンドとして使用することは、当該技術分野では周知であり、そのさまざまな実施例が多数ある。一実施形態では、リガンドは、タンパク質A又はタンパク質Gなどの免疫グロブリン結合タンパク質、又はその免疫グロブリン結合断片である。都合のよい一実施形態では、タンパク質リガンドはタンパク質Aである。周知の通り、タンパク質Aは、その固有の形態におけるアフィニティリガンドとして、また組換えタンパク質として公知であり、両方ともこの実施形態に含まれる。

20

## 【0042】

アフィニティリガンドが固定化されている担体は、有機物又は無機物とすることができる。したがって、担体は、一般に固体物質であり、液体クロマトグラフィーで従来から使用されているように、多孔性でも非多孔性でもよい。都合のよい一実施形態では、担体は多孔性である。担体は、球形粒子、モノリス、帯、膜、フィルタ、マイクロチップなどの形態を取りうる。一実施形態では、担体は、本質的に球状であり、直径約1 $\mu$ m~1000 $\mu$ mの範囲にある、例えば、10~500 $\mu$ m、好ましくは40~130 $\mu$ m、例えば約85 $\mu$ mの粒子を含む。特定の一実施形態では、粒子は、流動床吸着とも呼ばれる、膨張床吸着のため専用設計された種類のものである。この実施形態では、粒子は、比較的高密度であり、通例、石英又はステンレスなど、高密度充填剤を与えることにより得られる。膨張床吸着分離マトリックスは、スウェーデン、ウプサラのAmersham Biosciencesから入手可能なStreamline(商標)製品グループなどが市販されている。

30

## 【0043】

一実施形態では、担体は、アガロース、寒天、セルロース、デキストラン、キトサン、こんにゃく、カラギーナン、ゼラン、又はアルギン酸塩などの架橋炭水化物からなる。最も好ましい実施形態では、この担体は、架橋アガロースから作られた多孔性粒子である。本発明の炭水化物担体は、当業者であれば、逆懸濁ゲル化などの標準的方法により容易に製造できる(S Hjerten: Biochim Biophys Acta 79(2), 393-398(1964))。それとは別に、担体は、Sephacrose(商標)FF(スウェーデン、ウプサラのAmersham Biosciences ABの多孔性架橋アガロースゲル)などの市販生成物に基づき、この生成物は、標準的方法に従ってアフィニティリガンドを容易に備えられる(例えば、組換えタンパク質Aを担体に結合する例示的方法について、また参考文献については、米国特許第639975

40

50

0号(Pharmacia Biotech)を参照のこと)。

【0044】

それとは別に、アフィニティリガンドの担体は、スチレン、スチレン誘導体、ジビニルベンゼン、アクリルアミド、アクリル酸エステル、メタクリル酸エステル、ビニルエステル、ビニルアミドなどの周知の架橋合成ポリマーからなる。このようなポリマーは、標準的方法により容易に生成することができるが、これについては、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。それとは別に、Source(商標)(スウェーデン、ウプサラのAmersham Biosciences AB)などの市販の生成物は、例えば、グラフトによりアフィニティリガンドを備え、本発明による方法で使用することができる。(グラフトの異なる原理の総説については、例えば、P F Rempp, P J Lutz: Comprehensive Polymer Science vol. 6, pp. 403-421, Eds. G Allen et al, Oxford 1989を参照のこと。グラフトによる合成クロマトグラフィー担体の製造については、国際公開第03/046063号、Amersham Biosciences AB (Ihret al)を参照のこと)。

10

【0045】

例示的な一実施形態では、本発明の方法のアフィニティ工程は、Mab Select(商標)(スウェーデン、ウプサラのAmersham Biosciences)を利用するが、これは、多孔性架橋アガロース担体に固定化された組換えタンパク質Aリガンドからなる。

20

【0046】

イオン交換クロマトグラフィーリガンドが固定化された担体は、アフィニティ工程に関して上述されている種類のものであってよい。したがって、一実施形態では、担体は、帯電した基を示すリガンドが固定化されている多孔性架橋多糖類粒子からなる。一実施形態では、粒子は、本質的に球状であり、直径約1 $\mu$ m~1000 $\mu$ mの範囲、例えば10~500 $\mu$ m、約90 $\mu$ mである。前記帯電リガンドは、陰イオン交換体の場合には正に帯電し、陽イオン交換体の場合には負に帯電してよい。

30

【0047】

一実施形態では、イオン交換クロマトグラフィーリガンドは、エキステンダーを介して担体に固定化されている。好適なエキステンダーは、親水性でなければならず、例えば、水酸基、カルボキシ、アミノ、反復エチレンオキシド(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-)、アミドなどのうちから選択された複数の基を含むことができる。エキステンダーは、ホモポリマー又は共ポリマーなどのポリマーの形態をとりうる。親水性ポリマーエキステンダーは、合成又は天然ポリマーとすることができる。典型的な合成ポリマーは、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリビニルエーテルなどである。典型的な天然ポリマーは、デンプン、セルロース、デキストラン、及びアガロースなどの多糖類である。好ましいポリマーエキステンダーは、多くの場合、遊離状態で、つまり、担体に結合されていないときに、水溶性である。不水溶性ポリマー又は元の親水性が低いポリマーは、親水基を導入することにより親水性を高めることができる。エキステンダーのサイズは、担体への付着点の数、エキステンダーの化学的性質、リガンドの構造及びサイズ、置換度、架橋度などの複数の因子に依存する。担体上にエキステンダーにより形成されるコーティング又は層の柔軟性は、エキステンダー分子1個当たりのベースマトリックスへの付着点の数、及び/又はエキステンダーの架橋度が減少すると高まる。例えば末端単量体単位のところでは1点付着を可能にするエキステンダーは小さくてもよい。付着及び/又は架橋が複数の単量体単位のところでは可能なポリマーエキステンダー、つまり連結エキステンダーについては、より大きなサイズが好ましいと考えられる。一実施形態では、エキステンダーは、それぞれ30以上の単量体単位からなり、デキストランなどの多糖類t

40

50

については、 $MW > 5000 Da$ を示す。

【0048】

エキステンダーの柔軟性を制御するために、まず、ベースマトリックスを活性化し、次いで、導入された活性化された基との反応によりエキステンダーをマトリックスに連結すると都合がよい場合が多い。典型的な活性化試薬は、求電子官能基と2回反応できるという意味で2官能性である。例示的な実施例は、エピハロヒドリン、ビスエポキシド、CNBrなどである。他の二官能性試薬、例えば、アリルグリシジルエーテル及びスチリルグリシジルエーテルは、中間活性化反応を必要とする。後者の試薬では、第1の反応は、オキシラン基のところでも発生し、その後、炭素炭素二重結合にハロゲンが付加することにより活性化が引き起こされる。好ましい二官能性試薬は、液体クロマトグラフィーで使用されるpH間隔で加水分解に対し安定している橋を形成すべきである。(エキステンダーの詳細については、例えば、国際公開第98/33572号(スウェーデンのAmersham Pharmacia Biotech)を参照のこと)。エキステンダーは、代わりに、例えば、上述の国際公開第03/046063号、Amersham Biosciences AB (Ihret al)で説明されているように、担体にグラフトすることができる)。

10

【0049】

最も好ましい実施形態では、前記エキステンダーは、担体に連結されている、つまり、エキステンダーは、担体との平均して複数の接点をそれぞれ示す。都合のよい実施形態では、エキステンダーは、担体に連結されたデキストランのコーティングからなる。そのため、この実施形態では、Fractogel(商標)又はSephacrose(商標)のいずれかを使用した上述のChavez et al: "Increased Dynamic..."でテストされたのと実質的に異なるイオン交換クロマトグラフィーマトリックスを使用する。上で述べたように、Fractogel(商標)は、線状ポリマー鎖を介して担体に結合されたイオン交換基を含み、その結果、連結されたエキステンダーよりもかなり柔軟な構造を示す。他方、SP及びQ Sepharose(商標)は、リガンドが従来のスペースを介して結合されたアガロース担体である。このようなスペースは、エキステンダーよりも実質的に小さい分子であり、通常は、単に、導入された活性化及び/又はカップリング剤を介して与えられる残留物を含むだけである。

20

【0050】

例示的な一実施形態では、本発明の方法のイオン交換クロマトグラフィー工程は、SP又はQ Sepharose(商標)XL(スウェーデン、ウプサラのAmersham Biosciences)を利用するが、これは、それぞれデキストランエキステンダーを介して架橋アガロース担体に固定化された陽イオン交換リガンド及び陰イオン交換リガンドからなる。

30

【0051】

特定の一態様では、本発明は、液体の他の成分から抗体又は抗体化合物を分離する方法に関し、この方法は、1以上のクロマトグラフ工程を含み、1工程で、液体をイオン交換クロマトグラフィーマトリックスと接触させて、非イオンポリエーテルを含む緩衝液の存在下で200mM以上のNaAcに相当する伝導度で抗体化合物を吸着する。非イオンポリエーテルを含む緩衝液及びイオン交換クロマトグラフィーマトリックスの性質は、好ましくは上述のとおりである。

40

【0052】

疎水性リガンドが固定化された担体は、アフィニティー工程に関して上述されている種類のものであってよい。好ましい実施形態では、担体は、本質的にそのようなものとして疎水性である、合成ポリマーから作られるか、又はヒドロキシ基などの親水基の修飾により疎水性にされた炭水化物から作られる。本発明のHICマトリックスの疎水基は、疎水性アルキル鎖、芳香族基などの周知の種類のものでよい。一実施形態では、粒子は、本質的に球状であり、直径約1µm~1000µmの範囲、例えば5~500µm、約15µmである。

50

## 【0053】

さらに、本発明は、連続する2以上のクロマトグラフ工程の移動相に対しPEGなどの非イオンポリエーテルを使用することに関係する。このような工程は、従来のクロマトグラフィーとして、つまり、本明細書で説明されているように分離マトリックスを詰めたカラムに移動相を通すか、又は流動床が使用される場合には膨張床吸着（EBA）により、実施することができる。そのため、上記に加えて、本発明は、さらに、又はそれとは別に、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（IMAC）及び/又は親硫黄性クロマトグラフィーの工程を含み、両方とも、クロマトグラフ分離の周知の原理である。

## 【0054】

上述のように、本発明の方法は、タンパク質などの生体化合物、例えば、抗体及び抗体化合物、ペプチド、及び核酸を液体の1以上の他の成分から精製するために使用される。10  
特定の一実施形態では、本発明の方法は、1以上の標的化合物から液体を精製するために使用される、つまり、所望の生成物は、前記化合物を含まない液体である。本発明の方法の一実施形態では、標的化合物は、タンパク質である。タンパク質の例としては、例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、オボアルブミン、及びラクトフェリンがある。都合のよい一実施形態では、標的化合物は、モノクローナル若しくはポリクローナル抗体などの抗体、又はそのような抗体の機能的断片である。抗体は、ヒトなどの哺乳類由来であっても、ヒト化抗体でもよい。本発明の方法を使用して精製された抗体は、IgG、IgA、IgM、IgD、及びIgEからなるグループから選択することができる。

## 【0055】

さらに、周知の通り、治療用タンパク質及び既存のFDA承認タンパク質は、最近、可溶性、加水分解安定性、及び凝集などの物理的特性だけでなく、抗原性、タンパク質分解安定性、血清循環時間、及び送達の容易さなどの生物医学的特性をも増強する化合物で修飾されることが多い。今のところ、ポリ（エチレングリコール）（PEG）による修飾は、ペグ化と一般に呼ばれ、治療用途に最も広く使用されている。しかし、PEG誘導体及び中性親水性ポリマーなどの他の化合物、例えば、デキストランは、そのような修飾に代替使用される。同じ種類の修飾は、さらに、低分子量有機薬剤及び薬剤候補など、タンパク質以外の分子にも適用される。そこで、特定の一実施形態では、標的化合物は、上述のように修飾された、好ましくはポリ（エチレングリコール）（PEG）を含む、化合物である。そのような化合物は、一般に、ペグ化化合物として公知である。本発明により得られたペグ化化合物は、タンパク質又は非タンパク質薬剤が特定の個人を治療するように設計されている個人医療などの医療で都合よく使用される。それとは別に、本発明による分離は、血液中にある種の生体化合物が存在しないかどうかをスクリーニングすることにより個人を診断する、又は特定の生体化合物の量を定量的に測定するなどの診断目的に使用することができる。

## 【0056】

第2の態様では、本発明は、それぞれ、アフィニティークロマトグラフィーマトリックス、イオン交換クロマトグラフィーマトリックス、及び疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）マトリックスからなる群から選択されたマトリックスを詰めた、2以上のクロマトグラフィーカラム、移動相に加える非イオンポリエーテルを含む緩衝液、並びに使用説明書を備えるキットに関する。特定の一実施形態では、本発明によるカラムは、ルアーアダプタ、管コネクタ、及びドーム型ナットを備える。カラムは、周知の種類及び材料のものでよく、カラムの体積は、実験室規模又は生産規模、つまり小規模又は大規模に合わせることができる。カラムには、上述の種類マトリックスのうちの2つが予め詰め込まれている。このようなマトリックスの詳細は、本発明の第1の態様の状況において上で提示されているとおりでよい。非イオンポリエーテルは、本発明の第1の態様に関して上で説明されているとおりでよい。最も都合のよい実施形態では、非イオンポリエーテルは、ポリ（エチレングリコール）（PEG）である。本発明によるキットに用意されている使用説明書では、本発明による方法の上述の実施形態のいずれか1つについて説明すればよい。

10

20

30

40

50

## 【0057】

最後に、本発明は、液体の他の成分から抗体化合物を分離する方法に関係し、この方法は、1以上のクロマトグラフ工程を含み、1工程で、液体をイオン交換クロマトグラフィーマトリックスと接触させて、非イオンポリエーテルを含む緩衝液の存在下で抗体化合物を吸着し、イオン交換クロマトグラフィーマトリックスのリガンドは、デキストランエキステンダーを介して1以上の多孔性担体に固定化されている。イオン交換クロマトグラフィーマトリックス及びポリエーテルの性質は、上述のとおりでよい。したがって、最も都合のよい実施形態では、非イオンポリエーテルは、ポリ(エチレングリコール)(PEG)である。一実施形態では、担体は、架橋多糖類粒子からなる。本発明は、さらに、抗体を分離するためのキットを含み、このキットは、別の区画内に、リガンドがデキストラン

10

図面の詳細な説明

図1は、非イオンポリエーテル、この場合PEGがある場合(右)とない場合(左)の本発明による3段階タンパク質精製プロセスを比較している。より具体的には、例示しているプロセスは、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、及び疎水性相互作用クロマトグラフィーの工程を含む。本発明を使用することで、どのようにして、クロマトグラフ工程とインターフェイスするために必要な単位操作、例えば緩衝液希釈/脱塩の回数を減らすことができるかは明らかであろう。

20

## 【0058】

図2は、非イオンポリエーテル、この場合PEGがある場合(右)とない場合(左)の本発明による3段階タンパク質精製プロセスを比較している。より具体的には、例示しているプロセスは、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、及びイオン交換クロマトグラフィーの工程を含む。ここでもまた、本発明を使用することで、どのようにして、クロマトグラフ工程とインターフェイスするために必要な単位操作、例えば緩衝液希釈/脱塩の回数を減らすことができるかは明らかであろう。

## 【0059】

図3は、2つの市販イオン交換クロマトグラフィーマトリックス、つまりSP Sepharose(商標)FF(スウェーデン、ウプサラのAmersham Biosciences)及び、さらに大きなものとして、ウシ血清アルブミン(BSA)用の、デキストランエキステンダーを含む、SP Sepharose(商標)XL(スウェーデン、ウプサラのAmersham Biosciences)の動的能力の増大で8%のPEG 10000の効果を示している。得られた結果を、異なる離液性緩衝液の予想されるイオン交換効果と比較する。

30

## 【0060】

図4は、酢酸ナトリウムpH4.75緩衝液+8%PEG10000タンパク質負荷と共にBSAを使用するSP Sepharose(商標)XL前端分析(クロマトグラフ装填及び溶出)、カラム上にタンパク質を保持したまたの、タンパク質を含まない同じ溶液中での洗浄、及びpH5.25の同じ緩衝液中の、PEGなしの溶出を示すクロマトグラムである。溶出緩衝液塩濃度を1.1Mに上げて、回収は高まらない。

40

## 【0061】

図5は、PEG10000の添加移動相濃度(吸着時に添加)と共に110mMの酢酸ナトリウム(pH4.75)中のBSAのSP Sepharose(商標)XLのBSA動的能力がどのように増大するかを示している。

## 【0062】

図6は、移動相添加PEGがBSA及びラクトフェリンを含む各種タンパク質についてSP Sepharose(商標)FF及びSP Sepharose(商標)XLの動的能力をどのように高めるかを示しており、またPEGが存在しない場合は、SP Sepharose(商標)XLとSP Sepharose(商標)FFのマトリックスの

50



### 実施例 2

この実施例では、タンパク質が最初に 8% PEG 10000 (Fluka) を含む 0.22 M 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 4.75 から吸着される SPXL マトリックスについて 5/10 カラム内で実施された単純な BSA 前端分析データを得た (図 3 について上で説明されているように)。これは、4 × 通常の IEX 吸着塩濃度、例えば、0.05 M であり、上の実施例 1 を参照のこと。これらの結果は、図 4 に例示されている。10% の破過点で、カラムを、PEG を含む同じ緩衝液で洗浄し、タンパク質がカラムから洗い流されないことを示す。次いで、添加 PEG なしの pH 5.25 (BSA の pI に近い) の同様の 0.22 M の酢酸ナトリウム緩衝液を使用してカラム上のタンパク質を溶出する。タンパク質は、合計 180 mg のタンパク質又は 90 mg/ml の SPXL の場合に急激なピークで溶出することがわかり、これは図 3 及び酢酸ナトリウム 0.05 M の SPXL 上の BSA に対する 20 及び 60 mg/ml の値と比較すべきである。同じプロセスに従い、1.1 M の緩衝液で溶出しても、タンパク質の動的能力は著しく高まることはない。

10

【0068】

### 実施例 3

この実施例では、上述のように得られた BSA に対する SPXL マトリックスの動的能力データに対する増大する移動相添加 PEG 10000 (Fluka) の影響を研究したが、pH 4.75 の 110 mM 酢酸ナトリウム緩衝液を使用して吸着した。これらの結果は、図 5 に例示されている。予想どおり、PEG 濃度が 10% に近づくと、相対的に高い塩濃度では、溶液の曇りとタンパク質沈殿が生じた。

20

【0069】

### 実施例 4

この実施例では、8% (w/w) PEG 8000 (Sigma) を移動相に加え、図 1 から 3 について上で説明されているのと似た手順を使用して、複数のタンパク質の SPXL 動的結合能力を定量した。より具体的には、タンパク質は、Sigma-Aldrich の BSA 及びラクトフェリン、並びに OctaFarma の Gamma Norm (商標) ポリクローナルヒト IgG であった。これらの結果は、図 6 に例示されている。吸着緩衝液は、8% 添加 PEG 8000 (Sigma) がある場合とない場合の pH 4.75 の 110 mM 酢酸ナトリウムであった。相対的に高い塩濃度のこれらの条件の下で、ラクトフェリン及び BSA は両方とも、通常、SPFF マトリックスに比べて SPXL の動的能力が低く、劣っていることを示すことに留意されたい。しかし、PEG を移動相に加えると、これらのタンパク質の動的能力だけでなくモノクローナルヒト抗体の動的能力も大幅に高まった。

30

【0070】

### 実施例 5

この実施例では、複数のタンパク質の SPXL 動的結合能力に対する添加された 8% (w/w) PEG 8000 (Sigma) の効果は、図 3 及び 4 について上で説明されているのと似た手順を使用して定量され。より具体的には、タンパク質は、Sigma-Aldrich の BSA、OctaFarma の Gamma Norm (商標) ポリクローナルヒト IgG 製剤、及び Amersham Biosciences の実験用モノクローナル抗体サンプルであった。これらの結果は、図 7 に例示されている。SPXL 1 ml を詰めた HR5/5 カラムを 0.33 ml/分で実施した。吸着緩衝液は、添加 200 mM NaCl が 10 mS/cm に達する、pH 5 (約 2 mS/cm) の 15 mM 酢酸ナトリウム及び pH 5 の 15 mM 酢酸ナトリウムであった。

40

【0071】

### 実施例 6

この実施例では、ポリクローナルヒト抗体について、タンパク質アリガンドを含む、アフィニティークロマトグラフィーマトリックス、つまり、Mab Select (商標) (ウブサラの Amersham Biosciences) の動力能力に対する移動相添加 PEG (Fluka の 0 から 8% w/w PEG 10000) の効果を研究した。これ

50

らの結果は、図8に例示されている。マトリックスは、Amersham BiosciencesのMabSelect研究サンプル(通常のタンパク質A含量よりもわずかに高いU631029A)であり、タンパク質はOctaFarmaのGammaNormであった。マトリックス約2mlをHR5/10カラム(Amersham Biosciences)内に詰め、150mM NaCl及びpH7.4の20mMリン酸ナトリウムを含む緩衝液を使用して2.4分の滞留時間、240cm/hの速さで実施した。pH3、30mMのクエン酸ナトリウム溶液中でタンパク質を溶出し、0.01MのNaOH溶液を使用して残留タンパク質をカラムから除去した。わずかに低い動的能力値(つまり、6%のPEGで43mg/ml)についても市販のMabSelectマトリックス(図に示されていない)を使用して類似の結果を得た。さらに、上の条件の下で行ったゲル濾過研究は、動的能力の明らかな増大は、凝集などのタンパク質間相互作用によるものではないこと(結果は図に示されていない)、及びPEGを実際の発酵供給物(図に示されていない)に最大6%まで加えられることを示唆していた。

10

【図面の簡単な説明】

【0072】

【図1】仮説的アフィニティーキャプチャー、IEX精製、及びHIC研磨工程の比較を提示することにより非イオンポリエーテルがある場合(右)とない場合(左)の本発明による3段階タンパク質精製プロセスを比較した図である。後者がコストの高い希釈又は脱塩工程、及び高と低の塩緩衝液の切り換えをどのように回避しているかに注意されたい。関係するpH調整工程は比較可能であるが、図に示されていない。

20

【図2】非イオンポリエーテルのある場合(右)とない場合(左)の本発明による3段階タンパク質精製プロセス、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、及びイオン交換クロマトグラフィーを図1と類似の流れ図で比較している図である。

【図3】2つの市販クロマトグラフィーマトリックスの両方で移動相添加非イオン性ポリマーがウシ血清アルブミンタンパク質の動的能力( $Q_{B,10\%}$ )を高める能力に対する異なる離液順列塩の効果を示す図である。効果は、通常のイオン交換(IEX)順、 $NaI < NaCl < NaAc = NaF$ で大きくなる。

【図4】PEGを緩衝液に加えたBSAを使用した前端分析を示すクロマトグラムである。

30

【図5】PEGの添加移動相濃度(吸着時に添加)と共にBSAの市販の移動相陽イオン交換体のBSA動的能力がどのように増大するかを示す図である。

【図6】移動相添加PEG、つまり、吸着の前に添加された非イオンポリエーテルが、2つの市販陽イオン交換体の動的能力をどれだけ高めるかを示す図である。

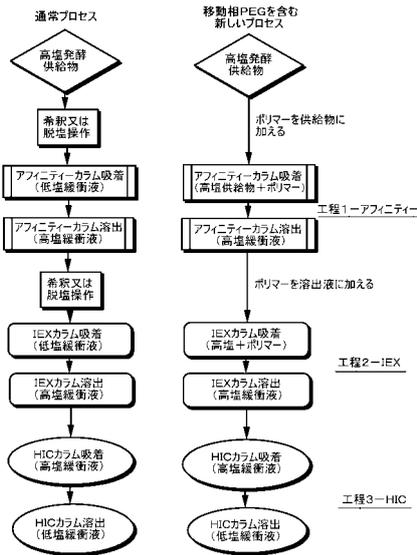
【図7】移動相添加PEGが、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方のサンプルについて、塩濃度の高い緩衝液ほど効果が高い、市販の陽イオン交換体マトリックスの動的能力をどのように高めるかを示す図である。

【図8】移動相添加PEGがポリクローナル抗体に対する市販のアフィニティーマトリックスの動的能力もどのように高められるかを示す図である。

【 図 1 】

FIGURE 1

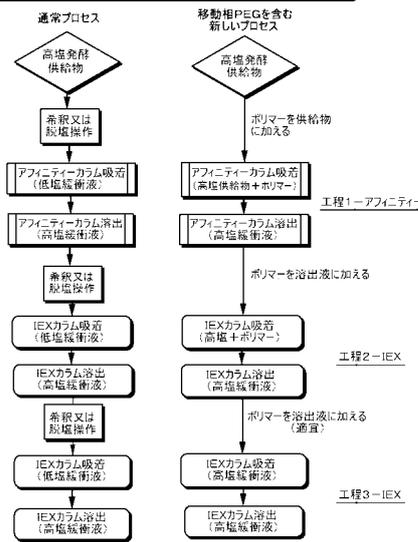
移動相ポリマーを含む場合と含まない場合の典型的な「3クロマトグラフィー工程」タンパク質精製プロセスの比較



【 図 2 】

FIGURE 2

移動相ポリマーを含む場合と含まない場合の典型的な「3クロマトグラフィー工程」タンパク質精製プロセスの比較



【 図 3 】

Figure 3

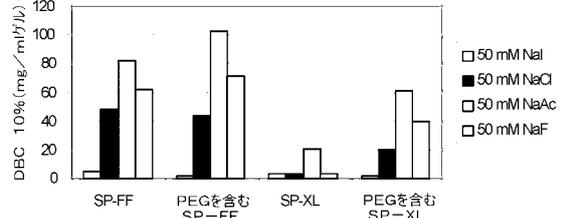


Figure 3

【 図 4 】

Figure 4

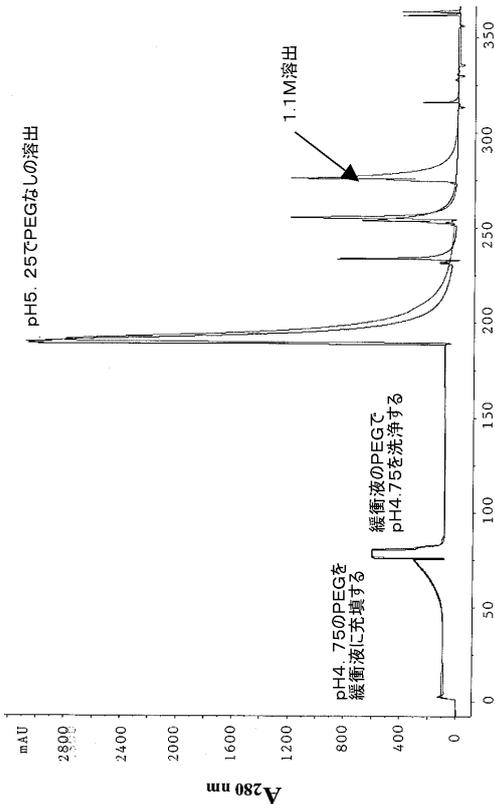


Figure 4

【 図 5 】

Figure 5

SPXLへのBSA QB10%に対する[PEG10]の効果  
110 mM NaAc, pH 4.75, BSA 4mg/ml

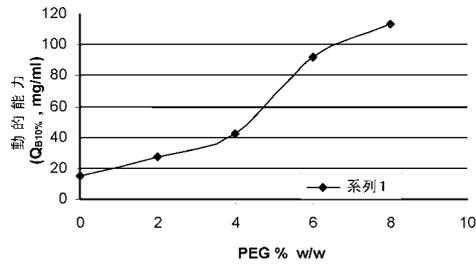


Figure 5

【 図 6 】

Figure 6

110 mM NaCl, pH 4.75におけるSP-XLに関するQB10%に対する8% PEG 8000の効果

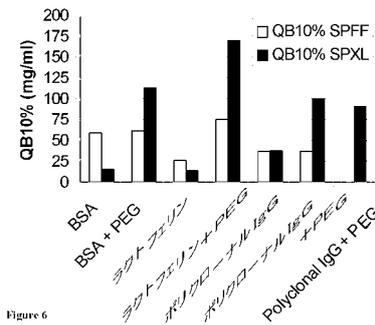


Figure 6

【 図 7 】

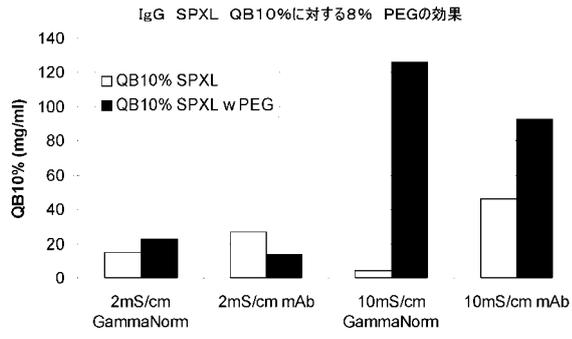


Figure 7

【 図 8 】

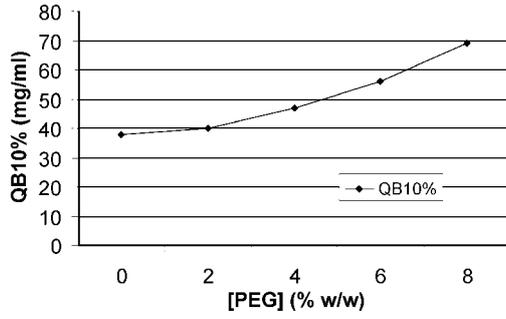


Figure 8

## 【 国際調査報告 】

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE 2005/000467

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: B01D 15/08, C07K 1/36 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)		
IPC7: B01D, C07K, C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI, PAJ, EPODOC, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 3869436 A (FALKSVEDEN, LARS-GUNNAR ALBINSSON), 4 March 1975 (04.03.1975), abstract  --	1-4, 8, 10-11, 15-28
A	EP 1319711 A2 (VICAL INCORPORATED SAN DIEGO), 18 June 2003 (18.06.2003), page 4, line 1 - line 25, claims 1-11  --	1-28
A	Journal of Chromatography B, vol. 696, 1997, page 25-31, Yoichi Shibusawa et al; "Purification of lactic acid dehydrogenase from bovine heart crude extract by counter-current chromatography" abstract  --	1-28
<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	"T"
"B"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	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
"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)	"X"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	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
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"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	Date of mailing of the international search report	
30 June 2005	06-07-2005	
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86	Authorized officer  Jens Waltin/MP Telephone No. +46 8 782 25 00	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 2005/000467

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol 58, No 4, May 20 1998, Stevin H. Gehrke et al. "Protein Sorption and Recovery by Hydrogels Using Principles of Aqueous Two-Phase Extraction" abstract  --	1-28
A	US 5151358 A (HENRY G. HEINSOHN ET AL), 29 Sept 1992 (29.09.1992), claim 1  --	1-28
A	US 6383393 B1 (METIN COLPAN ET AL), 7 May 2002 (07.05.2002), claim 1, abstract  --	1-28
A	US 4683294 A (FRANS VAN WIJNENDAELE ET AL), 28 July 1987 (28.07.1987), abstract  -- -----	1-28

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

28/05/2005

International application No.

PCT/SE 2005/000467

US	3869436	A	04/03/1975	NONE		
EP	1319711	A2	18/06/2003	CA	2179603 A	10/08/1995
				DE	69530183 D,T	08/01/2004
				EP	0742820 A,B	20/11/1996
				SE	0742820 T3	
				JP	9509313 T	22/09/1997
				US	5561064 A	01/10/1996
				WO	9521250 A	10/08/1995
US	5151358	A	29/09/1992	AT	126531 T	15/09/1995
				AT	146525 T	15/01/1997
				AU	624968 B	25/06/1992
				AU	624969 B	25/06/1992
				AU	5842190 A	08/01/1991
				AU	5842790 A	08/01/1991
				CA	2058934 A,C	14/12/1990
				CA	2058948 A,C	14/12/1990
				DE	69021729 D,T	21/03/1996
				DE	69029471 D	00/00/0000
				DK	477284 T	02/01/1996
				EP	0477284 A,B	01/04/1992
				SE	0477284 T3	
				EP	0477285 A,B	01/04/1992
				ES	2078345 T	16/12/1995
				ES	2099097 T	16/05/1997
				FI	98642 B,C	15/04/1997
				FI	98643 B,C	15/04/1997
				FI	915811 D	00/00/0000
				FI	915813 D	00/00/0000
				JP	2534587 B	18/09/1996
				JP	2578384 B	05/02/1997
				JP	5500602 T	12/02/1993
				JP	5500603 T	12/02/1993
				NO	914885 A	12/12/1991
				NO	914887 A	12/02/1992
				NZ	234060 A	25/02/1992
				US	5139943 A	18/08/1992
				WO	9015864 A	27/12/1990
				WO	9015866 A	27/12/1990

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

28/05/2005

International application No.

PCT/SE 2005/000467

US	6383393	B1	07/05/2002	AT	200293	T	15/04/2001
				CA	2142910	A,C	12/01/1995
				DE	4321904	A	12/01/1995
				DE	59409712	D	00/00/0000
				DK	658164	T	18/06/2001
				EP	0658164	A,B	21/06/1995
				SE	0658164	T3	
				ES	2155477	T	16/05/2001
				JP	8501321	T	13/02/1996
				PT	658164	T	28/09/2001
				WO	9501359	A	12/01/1995
-----							
US	4683294	A	28/07/1987	AR	241596	A	30/09/1992
				AT	66694	T	15/09/1991
				AU	580494	B	12/01/1989
				AU	5378686	A	09/10/1986
				CA	1272457	A	07/08/1990
				CN	86101798	A	15/10/1986
				CS	259537	B	14/10/1988
				CS	8602233	A	15/02/1988
				DE	3681058	A	02/10/1991
				DK	152286	A	04/10/1986
				EG	17972	A	30/06/1991
				EP	0199698	A,B	29/10/1986
				SE	0199698	T3	
				ES	553633	A	01/06/1987
				ES	8706166	A	16/08/1987
				FI	85027	B,C	15/11/1991
				FI	861251	A	04/10/1986
				GR	860874	A	30/07/1986
				HU	40810	A	27/02/1987
				HU	206125	B	28/08/1992
				IE	58854	B	17/11/1993
				IE	860826	L	03/10/1986
				IL	78824	A	15/04/1991
				JP	2512430	B	03/07/1996
				JP	61249398	A	06/11/1986
				KR	9410283	B	22/10/1994
				NO	170421	B,C	06/07/1992
				NO	861234	A	06/10/1986
				NZ	215618	A	30/08/1988
				PH	22110	A	01/06/1988
				PL	152568	B	31/01/1991
				PT	82219	A,B	01/04/1986
				RO	95349	A	15/09/1988
				SU	1604144	A	30/10/1990
				US	4857317	A	15/08/1989
				YU	46386	A	29/02/1988
				ZA	8602374	A	24/06/1987
-----							

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 30/02 (2006.01)</b>	G 0 1 N 30/02	B
	G 0 1 N 30/88	J
	G 0 1 N 30/88	2 0 1 G
	G 0 1 N 30/88	1 0 1 N
	G 0 1 N 30/88	2 0 1 X

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (72) 発明者 ヴァン・アルスティン, ジェイムズ  
スウェーデン、エス - 7 5 1 ・ 8 4 ・ ウプサラ、ビヨルクガタン・3 0 番、アメルシャム・バイオサイエンシーズ・アクチボラグ
- (72) 発明者 ハウッシュマンド, ハミッド  
スウェーデン、エス - 7 5 1 ・ 8 4 ・ ウプサラ、ビヨルクガタン・3 0 番、アメルシャム・バイオサイエンシーズ・アクチボラグ
- (72) 発明者 ルングロフ, アンダース  
スウェーデン、エス - 7 5 1 ・ 8 4 ・ ウプサラ、ビヨルクガタン・3 0 番、アメルシャム・バイオサイエンシーズ・アクチボラグ
- (72) 発明者 オーバーグ, パー - ミカエル  
スウェーデン、エス - 7 5 1 ・ 8 4 ・ ウプサラ、ビヨルクガタン・3 0 番、アメルシャム・バイオサイエンシーズ・アクチボラグ

Fターム(参考) 4D017 AA03 BA07 CA12 CA14 CA17 CB01 DA03 EA05 EB10