

明 細 書

発明の名称： 活性炭材料を使用する工程を含む抗体精製方法

技術分野

[0001] 本発明は、抗体を高純度に精製する方法に係わる。

背景技術

[0002] 近年、医薬品としてのモノクローナル抗体への注目・期待が著しい。抗体は、標的抗原に対して特異的に結合することから、高い薬効と少ない副作用が期待され、特に抗がん剤として注目されている。

[0003] 多くの抗体医薬品はCHO細胞を宿主とした生産系によって製造されている（非特許文献1）が、培養上清には、目的物質である抗体の他に、宿主細胞由来不純物（タンパク質、DNA等）、目的物質由来不純物（凝集体、類縁物質等）、及びウイルス様粒子が含まれている。宿主細胞由来タンパク質（Host cell protein; HCP）は、ヒトに対して異種タンパク質として認識され抗原性を呈すだけでなく、造腫瘍性リスクも存在することが知られている。また、宿主細胞由来DNAにも造腫瘍性の懸念がある。目的物質由来不純物である凝集体は、免疫原性の原因となる可能性があり、断片体及び目的タンパク質の翻訳後修飾体には安全性や薬効に悪影響を及ぼす懸念がある。加えて、内在性ウイルス及び内在性ウイルス由来のDNAには感染性の懸念もある。また、外来性ウイルスの混入に対する対策も必要である。多くの場合、細胞基材（例えば主として生産に使用されるCHO細胞）、培地原材料、調製培地からの外来性ウイルス混入リスクの回避に様々な工夫を凝らし、各種in vitroウイルス試験、in vivoウイルス試験等で製造工程に混入する可能性のある代表的ウイルスの混入を否定することが重要となる。さらに、代表的モデルウイルスの精製プロセスにおける減衰率及び除去性能を評価することによって、最終的に得られる原薬中のウイルス混入リスクを限りなく低減し、安全な医薬品の製造を行うことが必要である。そのため、精製プロセスにおいては、目的物質である抗体を

高収率で回収することに加え、不純物を再現性良く効果的に除去できる精製方法として完成させることが必要である。

[0004] 抗体の精製方法は、上記の目的のために、複数のクロマトグラフィーを含む工程を組み合わせて構築される。一般的には、プロテインAをはじめとした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、疎水性相互作用クロマトグラフィー、セラミックハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー等が用いられる。これらのクロマトグラフィーは、目的物質と不純物の電荷、疎水性の度合い、若しくは分子サイズ、又は目的物質と固定化されたりガンドとの間の特異的結合作用に基づき、宿主細胞由来不純物、目的物質由来不純物、浸出プロテインA、ウイルス様粒子等を効率良く分離し、除去できる。

[0005] 特に、抗体精製法の一般的なクロマトグラフィー手法として、プロテインAクロマトグラフィー、陰イオン交換（AEX）クロマトグラフィー及び陽イオン交換（CEX）クロマトグラフィーの3ステップを組合せて抗体を高純度に精製する例が多く報告されている。これらのクロマトグラフィーは、一般的に結合／溶出（B/E）モード又はフロースルー（F/T）モードを用いて実施される。中でも、プロテインAクロマトグラフィー及びCEXクロマトグラフィーにおいては、目的物質である抗体を樹脂等に吸着させた後、適切な条件で不純物との分離を行うB/Eモードが汎用され、上記の不純物のうち内在性ウイルスを含むウイルスの除去能以外は高度に目的物質を精製することを可能にした。しかし、B/Eモードでは目的物質を樹脂等に吸着させるため、大量の樹脂及び大型のカラムが必要となり、製造コスト高の一因となっていた。

[0006] 一方で、技術の進展とともに近年CEXクロマトグラフィーでは、オーバーロードモードを含むF/Tモードによる精製手法の例が報告されている。目的物質と比較して混入量が少ない不純物を樹脂等に吸着させた状態で目的物質である抗体を素通りさせることにより、カラムの小型化と作業工程の簡素化、効率化を実現し、その結果、クロマトグラフィー樹脂の使用量の低減

によるコスト削減も達成できる可能性が示されている。実際に、これまでの B/E モードでは高性能樹脂を使用したとしても 100 g/L 樹脂以下での使用条件であったのに対し、F/T モードではその 10 倍量の 1000 g/L 樹脂を超える条件によっても目的物質の精製に利用できる。すなわち、1/10 以下の樹脂容量で同等の精製性能を引き出せることから、カラムの小型化、低コスト化につながることを期待される。このようなカラムの小型化は、使用バッファー量の削減及び各種タンク容量のサイズダウンにもつながり、作業負荷の大幅低減による製造効率化に寄与すると報告されている（特許文献 1、非特許文献 2 及び非特許文献 3）。しかし、高効率精製工程として期待される CEX クロマトグラフィーの F/T モードは、混在する不純物を少量の樹脂等に吸着させ分離除去することから、B/E モードと比較して、混在する不純物の量あるいは種類によって分離能が影響を受けることが課題であった。

[0007] さらに近年、培養工程における生産性の向上により、多くの生成物がクロマトグラフィーカラムにロードされ、クロマトグラフィーカラムへの負担が増加している。これに対して、高効率精製工程として期待される AEX クロマトグラフィー及び CEX クロマトグラフィーの F/T モードに活性炭材料を組合せることによって、HCP を含む複数の不純物が低減され、結果としてクロマトグラフィーカラムの使用期間を延ばすことが報告されている（特許文献 2）。

[0008] しかし、これらの報告は、一般的な宿主細胞由来不純物（タンパク質、DNA）及び目的物質由来不純物（凝集体、類縁物質等）を除去できる可能性のみに限定されており、本来の精製プロセスとして望まれる宿主細胞由来不純物及び目的物質由来不純物のより確実な除去、並びに内在性及び外来性ウイルスのより確実かつ安価な除去を実現する具体的な精製プロセスが望まれていた。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開第W02011/150110号

特許文献2：国際公開第W02013/028330号

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Reichert, J. (2012). Marketed therapeutic antibodies compendium. MABs 4:3, 413-415.

非特許文献2：Brown, A., Bill, J., Tully, T., Radhamohan, A., & Dowd, C. (2010). Overloading ion-exchange membranes as a purification step for monoclonal antibodies. Biotechnol. Appl. Biochem., 56:59-70.

非特許文献3：Liu, H.F., McCooey, B., Duarte, T., Myers, D.E., Hudson, T., Amanullah, A., van Reis, R., & Kelley, B.D. (2011). Exploration of overloaded cation exchange chromatography for monoclonal antibody purification. J. Chromatogr. A., 1218, 6943-6952.

発明の概要

発明の解決しようとしている課題

[0011] 高効率精製工程として期待されるCEXクロマトグラフィーのF/Tモードでは、B/Eモードと比較して、混在する不純物の量や種類が分離能へ影響を与えることが課題であった。また、AEXクロマトグラフィー及びCEXクロマトグラフィーのF/Tモードに活性炭材料を組合せた抗体精製方法は、クロマトグラフィーカラムの使用期間を延ばすことはできるが、精製ステップ数が多いことが課題であった。すなわち、プロテインAクロマトグラフィー、AEXクロマトグラフィー及びCEXクロマトグラフィーの3ステップのクロマトグラフィーに加え、活性炭材料による処理を実施することから、精製ステップ数が多く、それにより製造コストが高くなり、また精製期間が長くなる。また、低コスト化を目指した精製プロセスの工程簡略化においては、宿主細胞由来不純物及び目的物質由来不純物の除去能の低下のみでなく、内在性及び外来性ウイルスクリアランス能の低下が懸念される。したがって、より確実な不純物の除去、特に内在性、外来性ウイルスクリアランスは重要な課題である。上記課題の解決は低コストかつ高効率な抗体医薬品

の製造方法の提供だけでなく、高品質な抗体医薬品の安定供給につながり、結果として患者の安全性の確保が達成されるため、産業上、非常に重要である。

課題を解決するための手段

[0012] 本願発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意検討した結果、従来の精製方法と同等の品質を維持した上で、精製のステップ数を低減する効率的な精製方法を見出した。すなわち、C E XクロマトグラフィーのF / Tモードに活性炭材料による処理を組合せることによって、活性炭材料により不純物が低減され、安価で利用できることが期待される一方で混在する不純物の量又は種類によって分離能が低下することが課題であったC E XクロマトグラフィーのF / Tモードにおいて、安定的かつ高純度に目的抗体医薬品等が精製できることを見出した。また、本願発明者らは、活性炭材料によりウイルスが確実に除去されることを見出し、C H O細胞を用いた抗体医薬品の精製工程において高いウイルスクリアランス能を有するA E Xクロマトグラフィー工程の機能を補完し、結果としてA E Xクロマトグラフィー工程の省略を可能とする製造プロセスを構築した。すなわち、本願発明者らは、プロテインAクロマトグラフィー及びC E XクロマトグラフィーのF / Tモードの2ステップのクロマトグラフィーに活性炭材料による処理を組合せた効率的な精製方法を見出し、従来の精製方法と比較して精製ステップ数及び製造コストを低減し、抗体をヒト治療用途に十分な品質まで効率的に精製することを可能として、本発明を完成させた。

[0013] すなわち本発明は以下の通りである。

[1] 抗体を一又は複数の不純物を含む組成物から精製するための手法であって、

- a 1. 抗体を含有する細胞培養上清を用意し、
- b 1. 前記細胞培養上清をアフィニティークロマトグラフィー樹脂により処理して、抗体を含むアフィニティークロマトグラフィープール液を得、
- c 1. 前記アフィニティークロマトグラフィープール液においてウイルスを

不活化して、ウイルス不活化液を得、

d 1. 前記ウイルス不活化液を活性炭材料により処理して、活性炭材料プール液を得、

e 1. 前記活性炭材料プール液を陽イオン交換材料により処理して、陽イオン交換材料プール液を得る、

の a 1. 乃至 e 1. の工程を含む方法。

[2] 抗体を一又は複数の不純物を含む組成物から精製するための手法であって、

a 2. 抗体を含有する細胞培養上清を用意し、

b 2. 前記細胞培養上清をアフィニティークロマトグラフィー樹脂により処理して、抗体を含むアフィニティークロマトグラフィープール液を得、

c 2. 前記アフィニティークロマトグラフィープール液においてウイルスを不活化して、ウイルス不活化液を得、

d 2. 前記ウイルス不活化液をデプスフィルターにより処理して、デプスフィルターろ過プール液を得、

e 2. 前記デプスフィルターろ過プール液を活性炭材料により処理して、活性炭材料プール液を得、

f 2. 前記活性炭材料プール液を陽イオン交換材料により処理して、陽イオン交換材料プール液を得る、

の a 2. 乃至 f 2. の工程を含む [1] に記載の方法。

[3] アフィニティークロマトグラフィー樹脂がプロテイン A 樹脂である [1] 又は [2] に記載の方法。

[4] プロテイン A 樹脂が、KanCap A、KanCap A 3 G、MabSelect SuRe、MabSelect SuRe pcc、MabSelect PrismA、又はAmsphere A3である [3] に記載の方法。

[5] ウイルス不活化が、酸、界面活性剤、化学物質、核酸架橋剤、紫外線、ガンマ線及び熱での処理からなる群から選択される少なくともいずれか

一つである、[1]乃至[4]のいずれか一つに記載の方法。

[6] ウイルス不活化が、アフィニティークロマトグラフィープール液のpHを3～4に低下させることを含む[5]に記載の方法。

[7] ウイルス不活化中に、アフィニティークロマトグラフィープール液を60～120分間インキュベートする[6]に記載の方法。

[8] ウイルス不活化中に、アフィニティークロマトグラフィープール液を15～30℃でインキュベートする[6]又は[7]に記載の方法。

[9] 活性炭材料にロードする溶液、活性炭材料の平衡化バッファー及び洗浄バッファーのpHが、4.5～7.5である[1]乃至[8]のいずれか一つに記載の方法。

[10] 活性炭材料にロードする溶液、活性炭材料の平衡化バッファー及び洗浄バッファーのpHが、4.5～5.5である[9]に記載の方法。

[0014] [11] 活性炭材料にロードする溶液、活性炭材料の平衡化バッファー及び洗浄バッファーの電気伝導度が、2～10mS/cmである[1]乃至[10]のいずれか一つに記載の方法。

[12] 活性炭材料にロードする溶液、活性炭材料の平衡化バッファー及び洗浄バッファーの電気伝導度が、2～5mS/cmである[11]に記載の方法。

[13] 活性炭材料による処理が、活性炭材料を含むフィルターを用いて行われる、[1]乃至[12]のいずれか一つに記載の方法。

[14] フィルターが、Millistak+ Pod CR40、Zetta Plus活性炭吸着デプスフィルター、又はSUPRAcap 50 Seitz AKS filterである[13]に記載の方法。

[15] 陽イオン交換材料に対し、活性炭材料プール液が、該陽イオン交換材料の吸着容量を超えてロードされる[1]乃至[14]のいずれか一つに記載の方法。

[16] 陽イオン交換材料に対する活性炭材料プール液のローディング密度が、500～2000g/Lである[15]に記載の方法。

[17] 陽イオン交換材料に対する活性炭材料プール液のローディング密度が1000～1500 g/Lである[16]に記載の方法。

[18] 陽イオン交換材料が、樹脂、モノリスカラム、又は膜である[1]乃至[17]のいずれか一つに記載の方法。

[19] 陽イオン交換材料の官能基が、スルホプロピル、スルホエチル、スルホイソブチル、又はカルボキシルである[18]に記載の方法。

[20] 陽イオン交換材料が、POROS XS、Eshmuno CPX、Eshmuno CP-FT、又はCaptos ImpActである[19]に記載の方法。

[0015] [21] 陽イオン交換材料にロードする溶液のpHが、4～6である[1]乃至[20]のいずれか一つに記載の方法。

[22] 陽イオン交換材料にロードする溶液のpHが、4.5～5.5である[21]に記載の方法。

[23] 陽イオン交換材料にロードする溶液の電気伝導度が、3～7 mS/cmである[1]乃至[22]のいずれか一つに記載の方法。

[24] 陽イオン交換材料にロードする溶液の電気伝導度が、3～5 mS/cmである[23]に記載の方法。

[25] 陽イオン交換材料プール液を、さらに疎水性相互作用クロマトグラフィーにより処理して、プール液を得る[1]乃至[24]のいずれか一つに記載の方法。

[26] 疎水性相互作用クロマトグラフィーが、フロースルーモードである[25]に記載の方法。

[27] 疎水性相互作用クロマトグラフィーが、樹脂又は膜を用いて実施される[26]に記載の方法。

[28] 疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂又は膜が、Phenyl基、Benzyl基又はHexyl基を有する[27]に記載の方法。

[29] 疎水性相互作用クロマトグラフィー材料が、POROS Benzyl Ultra、POROS Benzyl、Hexyl-650

C、Phenyl Sepharose 6 Fast Flow、Phenyl Sepharose High Performance、Sartobind Phenyl又はReadyToProcess Adsorber Phenylである[28]に記載の方法。

[30] 活性炭材料プール液を、疎水性相互作用クロマトグラフィーにより処理して、プール液を得、さらに陽イオン交換材料により処理して、プール液を得る[1]乃至[14]のいずれか一つに記載の方法。

[0016] [31] 疎水性相互作用クロマトグラフィーが、フロースルーモードである[30]に記載の方法。

[32] 疎水性相互作用クロマトグラフィーが、樹脂又は膜を用いて実施される[31]に記載の方法。

[33] 疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂又は膜が、Phenyl基、Benzyl基又はHexyl基を有する[32]に記載の方法。

[34] 疎水性相互作用クロマトグラフィー材料が、POROS Benzyl Ultra、POROS Benzyl、Hexyl-650C、Phenyl Sepharose 6 Fast Flow、Phenyl Sepharose High Performance、Sartobind Phenyl又はReadyToProcess Adsorber Phenylである[33]に記載の方法。

[35] 陽イオン交換材料に対し、疎水性相互作用クロマトグラフィープール液が、該陽イオン交換材料の吸着容量を超えてロードされる[30]乃至[34]のいずれか一つに記載の方法。

[36] 陽イオン交換材料に対する疎水性相互作用クロマトグラフィープール液のローディング密度が、500~2000g/Lである[35]に記載の方法。

[37] 陽イオン交換材料に対する疎水性相互作用クロマトグラフィープール液のローディング密度が1000~1500g/Lである[36]に記載の方法。

[38] 陽イオン交換材料が、樹脂、モノリスカラム、又は膜である [30] 乃至 [37] のいずれか一つに記載の方法。

[39] 陽イオン交換材料の官能基が、スルホプロピル、スルホエチル、スルホイソブチル、又はカルボキシルである [38] に記載の方法。

[40] 陽イオン交換材料が、POROS XS、Eshmuno CPX、Eshmuno CP-FT、又はCaptos ImpActである [39] に記載の方法。

[0017] [41] 陽イオン交換材料にロードする溶液のpHが、4～6である [30] 乃至 [40] のいずれか一つに記載の方法。

[42] 陽イオン交換材料にロードする溶液のpHが、4.5～5.5である [41] に記載の方法。

[43] 陽イオン交換材料にロードする溶液の電気伝導度が、3～7 mS/cmである [30] 乃至 [42] のいずれか一つに記載の方法。

[44] 陽イオン交換材料にロードする溶液の電気伝導度が、3～5 mS/cmである [43] に記載の方法。

[45] 少なくとも一つの不純物が、宿主細胞由来タンパク質 (Host cell protein; HCP)、phospholipase B-like 2 (PLBL2)、ウイルス、ウイルス様粒子、高分子量体 (high molecular weight species; HMWS)、低分子量体 (low molecular weight species; LMWS)、培地成分、浸出プロテインA及び／又はDNAからなる群から選択される [1] 乃至 [44] のいずれか一つに記載の方法。

[46] 工程が連続的である [1] 乃至 [45] のいずれか一つに記載の方法。

[47] [1] 乃至 [46] のいずれか一つに記載の方法によって精製された抗体。

[48] 抗体を一又は複数の不純物を含む組成物から精製するための手法であって、

- a 1. 抗体を含有する細胞培養上清を用意し、
 - b 1. 前記細胞培養上清をアフィニティークロマトグラフィー樹脂により処理して、抗体を含むアフィニティークロマトグラフィープール液を得、
 - c 1. 前記アフィニティークロマトグラフィープール液においてウイルスを不活化して、ウイルス不活化液を得、
 - d 1. 前記ウイルス不活化液を活性炭材料により処理して、活性炭材料プール液を得る、
- の a 1. 乃至 d 1. の工程を含み、工程 d 1 を実施することにより P L B L 2 クリアランス能が向上する、方法。

[49] 抗体を一又は複数の不純物を含む組成物から精製するための手法であって、

- a 2. 抗体を含有する細胞培養上清を用意し、
 - b 2. 前記細胞培養上清をアフィニティークロマトグラフィー樹脂により処理して、抗体を含むアフィニティークロマトグラフィープール液を得、
 - c 2. 前記アフィニティークロマトグラフィープール液においてウイルスを不活化して、ウイルス不活化液を得、
 - d 2. 前記ウイルス不活化液をデプスフィルターにより処理して、デプスフィルターろ過プール液を得、
 - e 2. 前記デプスフィルターろ過プール液を活性炭材料により処理して、活性炭材料プール液を得る、
- の a 2 乃至 e 2. の工程を含み、工程 e 2 を実施することにより P L B L 2 クリアランス能が向上する、方法。

[50] 抗体を一又は複数の不純物を含む組成物から精製するための手法であって、

- a 1. 抗体を含有する細胞培養上清を用意し、
- b 1. 前記細胞培養上清をアフィニティークロマトグラフィー樹脂により処理して、抗体を含むアフィニティークロマトグラフィープール液を得、
- c 1. 前記アフィニティークロマトグラフィープール液においてウイルスを

不活化して、ウイルス不活化液を得、

d 1. 前記ウイルス不活化液を活性炭材料により処理して、活性炭材料プール液を得、

e 1. 前記活性炭材料プール液を陽イオン交換材料により処理して、陽イオン交換材料プール液を得る、

の a 1. 乃至 e 1. の工程を含み、工程 d 1 を実施することにより P L B L 2 クリアランス能が向上する、方法。

[5 1] 抗体を一又は複数の不純物を含む組成物から精製するための手法であって、

a 2. 抗体を含有する細胞培養上清を用意し、

b 2. 前記細胞培養上清をアフィニティークロマトグラフィー樹脂により処理して、抗体を含むアフィニティークロマトグラフィープール液を得、

c 2. 前記アフィニティークロマトグラフィープール液においてウイルスを不活化して、ウイルス不活化液を得、

d 2. 前記ウイルス不活化液をデプスフィルターにより処理して、デプスフィルターろ過プール液を得、

e 2. 前記デプスフィルターろ過プール液を活性炭材料により処理して、活性炭材料プール液を得、

f 2. 前記活性炭材料プール液を陽イオン交換材料により処理して、陽イオン交換材料プール液を得る、

の a 2 乃至 f 2. の工程を含み、工程 e 2 を実施することにより P L B L 2 クリアランス能が向上する、方法。

発明の効果

[0018] 本願発明者らは、従来までの抗体精製プロセスに活性炭材料による処理を追加することで、後段の精製工程への不純物負荷を低減し、混在する不純物の量又は種類によらず、抗体を安定的に目標とする純度にまで精製できることを見出した。さらに、本願発明者らは、活性炭材料による処理で高いウイルスクリアランス能を達成できることを見出し、C H O細胞を用いた抗体医

薬品の精製工程においてウイルスクリアランス能を有するAEXクロマトグラフィー工程の機能を補完し、結果としてAEXクロマトグラフィーの省略を可能とする製造プロセスを構築した。これにより従来の精製方法と比較して精製ステップ数及び製造コストを低減し、ヒト治療に使用するに十分な純度まで効率的に抗体を精製することができた。

発明を実施するための形態

[0019] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0020] 1. 定義

本明細書において、「抗体」なる用語は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、少なくとも2つのインタクトな抗体から形成される多重特異性抗体（二重特異性抗体）、Fc融合タンパク質、及び生物学的活性を呈する抗体断片等を意味する。なお、本発明を適用可能な抗体は、該抗体が特異的に結合する抗原によって限定されるものではない。また、本発明を適用可能な抗体は、該抗体のアミノ酸配列によって限定されるものでもない。

[0021] 本明細書において、「結合／溶出（B／E）モード」なる用語は、試料中に含まれる少なくとも1つの生成物がクロマトグラフィー樹脂又は媒体に結合し、その後溶出される生成物分離技術を意味する。

[0022] 本明細書において、「フロースルー（F／T）モード」なる用語は、試料中の少なくとも1つの生成物がクロマトグラフィー樹脂又は媒体を通して流動することを意図するが、少なくとも1つの潜在的な成分がクロマトグラフィー樹脂又は媒体に結合する生成物分離技術を意味する。

[0023] 本明細書において、「オーバーロードモード」なる用語は、カラム等の吸着容量を超えてロードすることを意図し、目的物質と不純物の吸着量の強さの差を利用した生成物分離技術を意味する。本明細書においては、陽イオン交換材料に対し、抗体粗精製物が、該陽イオン交換材料の吸着容量を超えてロードされる。陽イオン交換材料への抗体粗精製物の吸着容量は、陽イオン交換材料1L当たり約100gの蛋白質質量である。オーバーロードモードに

おけるローディング密度は、陽イオン交換材料 1 L 当たり 150～4000 g の蛋白質量であるが、好適なローディング密度は 500～2000 g/L の範囲であり、さらに好適なローディング密度は 1000～1500 g/L の範囲である。

- [0024] 本明細書において、「アフィニティークロマトグラフィー」なる用語は、標的タンパク質（例えば、目的のFc領域を含有するタンパク質又は抗体）が、標的タンパク質に特異的なリガンドに特異的に結合されるタンパク質分離技術を指す。抗体を精製する場合には、そのようなリガンドは、プロテインA若しくはプロテインG又はその機能的変異体であり、これはクロマトグラフィー固相材料に共有結合し、抗体溶液がクロマトグラフィー固相材料と接触する際に溶液中の抗体と結合する。
- [0025] 本明細書において、「デプスフィルター」なる用語は、抗体溶液から粒子を除去する目的で使用される、次第に減少する孔径を有する連続的に配置された一連のフィルターを意味する。デプスフィルターの三次元マトリックスは抗体溶液が通過する迷路状経路を形成し、該マトリックスの深さ全体にわたってランダムに粒子を吸着し機械的に捕捉する。種々のデプスフィルターは、巻かれた綿、ポリプロピレン、レーヨンセルロース、ガラス繊維、焼結金属、磁器、珪藻土又は他の公知成分で構成される。
- [0026] 本明細書において、「陽イオン交換材料」又は「CEX (; c a t i o n e x c h a n g e) 材料」なる用語は互換的に使用され、負に荷電し、かくして、固相上を又は固相中を通過した水性溶液中の陽イオンとの交換のための遊離陽イオンを有する固相を意味する。
- [0027] 本明細書において、「陰イオン交換材料」又は「AEX (; a n i o n e x c h a n g e) 材料」なる用語は互換的に使用され、固相に結合した、第一級、第二級、第三級又は第四級アミノ基等の1又は複数の正に荷電したリガンドを有する、正に荷電した固相を意味する。
- [0028] 本明細書において、「疎水性相互作用クロマトグラフィー」又は「HIC (; H y d r o p h o b i c I n t e r a c t i o n C h r o m a t o

graphy)」なる用語は、分子の疎水性、すなわち、水性溶液から疎水性表面に吸着する分子の能力に基づいて分子を分離するためのプロセスを意味する。疎水性相互作用クロマトグラフィー、典型的には、溶質分子の表面上の疎水性基の差異に依存する。これらの疎水性基は、不溶性マトリックスの表面上の疎水性基に結合する傾向を有する。HICは逆相液体クロマトグラフィーよりも極性が高く、変性が少ない環境を用いるため、しばしばイオン交換又はゲル濾過クロマトグラフィーと組合せることによって、抗体精製において一般的に使用される。

[0029] 本明細書において、「活性炭材料」なる用語は、炭素から構成された又は炭素を含有する任意の物質、活性炭を意味する。「活性炭 (activated carbon)」は、その細孔構造を強化するために処理された炭素質材料を意味する。活性炭は、非常に高い表面積を有する多孔質の固体である。これらは石炭、木材、ヤシ殻、木の実の殻、泥炭をはじめとする種々の供給源から得ることができる。活性炭は、制御された環境下での加熱を伴う物理的な活性化、又は強酸、塩基、又は酸化剤を使用する化学的活性化を使用して、これらの材料から製造することができる。活性化方法は、高い不純物クリアランス能を活性炭に与えるための高い表面積を有する多孔質構造を作り出す。ほとんどの他の吸着材料とは対照的に、活性炭は、比較的弱いファンデルワールス力を使用して分子と相互作用をされると考えられている。本発明の精製方法に用いられる活性炭としては、1種類の活性炭を単独で使用しても、2種類以上の活性炭を単独で又は混合して用いても良い。

[0030] 本明細書において、「連続的」なる用語は、直接連結された各材料間で連続的な流れを可能にする何らかの他の機構を有することを意味する。すなわち、1つのプロセスステップからの出力が、介入なくプロセス中の次のプロセスステップに直接流動するような2つ以上のプロセスステップ（又は単位操作）を含み、2つ以上のプロセスステップをその期間の少なくとも一部について同時に実施することができる、目的物質を精製するためのプロセスを意味する。

- [0031] 本明細書において、「除去」、「低減」、「クリアランス」なる用語は互換的に使用され、精製されるべき抗体を含む試料中の1つ以上の不純物量を低下させることを意味する。
- [0032] 本明細書において、「精製」、「純度を高めること」なる用語は互換的に使用され、試料から1つ以上の不純物を除去することにより、試料中の1つ以上の不純物に対する標的抗体の比を増加させることを意味する。
- [0033] 本明細書において、「電気伝導度」なる用語は、2つの電極間に電流を伝導する水溶液の能力を意味する。溶液中で、電流はイオン輸送によって流れる。よって、水溶液中に存在するイオンの量が増加すると溶液はより高い電気伝導度を有することになる。電気伝導度は、電気伝導度測定器を使用して測定することができ、電気伝導度の測定単位は1センチメートル当たりのミリジーメンズ (mS/cm 又は mS) である。溶液の電気伝導度は、その中のイオンの濃度を変えることによって変更することができる。例えば、溶液中の緩衝液の濃度及び／又は塩の濃度は、所望の電気伝導度を達成するために変更することができる。好ましくは、種々の緩衝液の塩濃度は所望の電気伝導度を達成するように修正される。
- [0034] 本明細書において、「画分」なる用語は、例えば活性炭材料に試料を負荷する工程において、標的抗体を含む試料を供した後に収集された小容量の液体を意味する。
- [0035] 本明細書において、「HCP ; host cell protein」なる用語は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞培養液から誘導された宿主細胞由来タンパク質の混合物を意味する。HCPは一般的にはCHO細胞中で発現された抗体等の目的のタンパク質を含む細胞培養液中に不純物として存在する。
- [0036] 本明細書において「HMWS ; high molecular weight species」なる用語は、分子量の異なる抗体変異体のうち、単量体より高分子量領域側に溶出するものを意味する。
- [0037] 本明細書において「LMWS ; low molecular weight

s p e c i e s」なる用語は、分子量の異なる抗体変異体のうち、単量体より低分子量領域側に溶出するものを意味する。

[0038] 本明細書において、「ウイルス」なる用語は、生きた細胞の内部でのみ複製することができる小型の感染体又は粒子を意味する。これらは一般的に、タンパク質のキャプシドの内側に封入された核酸（RNA又はDNA）、及び場合により脂質エンベロープから構成される。

[0039] 本明細書において、「ウイルス様粒子」なる用語は、電子顕微鏡下で形態的に既知ウイルスとの関連性がうかがわれる構造体を意味する。

[0040] 本明細書において、「レトロウイルス」なる用語は、逆転写されたDNA中間体を介して感染した細胞のゲノムDNAにその遺伝情報を統合することが可能なRNAウイルスを意味する。

[0041] 本明細書において、「レトロウイルス様粒子」なる用語は、そのゲノム中にレトロウイルス由来のDNAの部分の有する細胞によって生成された粒子を意味する。これらの粒子はレトロウイルスに似ているが多くの場合、非感染性である。本明細書の実施例で使用されるマウス白血病ウイルス（MLV）は、モデルレトロウイルス又はレトロウイルス様粒子をあらわす。

[0042] 本明細書において、「パルボウイルス」なる用語は、5000ヌクレオチドの平均ゲノムサイズ及び18から26nmの直径を有する、直鎖、非セグメント化一本鎖DNA非エンベロープウイルスを指す。本明細書に記載されている方法において使用される典型的なパルボウイルスはマウス微小ウイルス（MMV）である。

[0043] 本明細書において、「対数除去値」又は「LRV」なる用語は、既知量の不純物をカラム、フィルター等に通過させた時に、カラム、フィルター等による不純物の除去能力を表す値である。Cfがフィード液中の不純物の濃度であり、Cpがカラム、フィルターを通過した後の不純物の濃度であるとき、 $LRV = \log(Cf) - \log(Cp)$ である。

[0044] 本明細書において、「培地成分」としては、血清、成長因子（インスリン等）、又は抗生物質等が挙げられる。

[0045] 2. F/TモードCEXクロマトグラフィーによるHCPの除去

特許文献1、非特許文献2及び非特許文献3に示される先行技術にしたがい、プロテインAクロマトグラフィー、AEXクロマトグラフィーに引き続き、F/TモードCEXクロマトグラフィーで抗体培養液を精製したところ、抗体種（宿主細胞、あるいは培養方法の違いによる混在する不純物の量や種類の違いを含む）によってはHCPが十分に除去できない例があることが分かった。プロテインAクロマトグラフィー、AEXクロマトグラフィーに引き続き、F/TモードCEXクロマトグラフィーからなるプロセスは、コスト、労力及び作業時間の面からは優れていたが、不純物、特にHCPの除去という点で効果が安定していないことが明らかとなった。

[0046] HCPは様々な機構を介して免疫原性を誘導する可能性があることが広く知られている。実際に、ソマトロピンのバイオ後続品の治験において、HCPの残留により患者の全てで抗HCP抗体が産生され、患者の最大60%で非中和抗ソマトロピン抗体が産生された報告がある（M. Pavlovic et al., Horm. Res. 69:14-21(2008)）。HCPをさらに除去することにより抗ソマトロピン抗体は他の成長ホルモン抗体で報告されている程度に改善された。また、CHO細胞で産生させた組換え第IX因子の臨床試験において、抗HCP抗体がかなりの高い割合で産生され、有害事象は報告されなかったものの規制当局から保留命令を受けたことが報告されている

(<https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/FractionatedPlasmaProducts/UCM448429.pdf>)

Food and Drug Administration

STATISTICAL REVIEW AND EVALUATION BLA FINAL, Product Name: IB1001, Indication(s): Control and prevention of bleeding episodes and perioperative management in patients with hemophilia B, CBER Receipt Date: April 6 2012

又は<https://www.news-medical.net/news/20120710/Inspiration-receives-F>

DA-clinical-hold-order-for-IB1001-phase-III-studies-on-hemophilia-B.a
spx

News-Medical.net - An AZoNetwork Site

Inspiration receives FDA clinical hold order for IB1001 phase III studies on hemophilia B, Jul 10 2012)。

[0047] 安全性に関連した有害事象が報告される場合はもちろん、安全性に関連した有害事象が報告されない場合でも規制当局は潜在的风险の可能性を考慮し、残留するHCPをさらに低減した後、臨床試験を実施するよう指示する可能性がある。さらに近年、残留するHCP（リポプロテインリパーゼ）により製剤中のポリソルベートが分解され、医薬品の安定性に影響した例が報告されており（T Hall et al., J. Chromatogr. A 105:1633-1642(2016)）、医薬品の安定性の面からも精製工程で適切にHCPを除去することが重要である。

[0048] HCPの残留による安全性及び安定性への影響については、宿主細胞の種類や残留するHCPの種類に加え、製品の用法・用量によっても異なると考えられる。したがってHCPの残留許容値については、製造工程、最大投与量、投与部位、投与頻度等を考慮し、製品毎に適切な値を設定する必要があるが、製造工程で可能な限り低減することが望まれる。

[0049] 以上のことから、CEXクロマトグラフィーとしてF/Tモードを用いた精製フローにおいてもHCPをはじめとした不純物を低減できる、抗体種に依らない汎用的な方法が望まれた。

[0050] 3. 活性炭材料の適用による不純物の除去

本願発明者らは、製造コストを低減した上で抗体を確実に高純度に精製する方法を特定することを目指し、従来の精製工程に活性炭材料による処理を追加することで、抗体種によらず高純度に精製できることを見出した。

[0051] HCPは、異種タンパク質としてヒトに対して抗原性を示し得ること、また哺乳動物細胞由来タンパク質には造腫瘍性リスクが存在すること、さらには医薬品中のポリソルベート分解による安定性への観点から、充分低いレベ

ルまで精製工程で除去する必要があることは前述のとおりである。また、*phospholipase B-like 2* (PLBL2) はHCPの一種であるが、抗体との相互作用により残留するヒッチハイクHCPとして報告されている (B. Tran et al., J. Chromatogr. A 1438:31-38(2016))。さらに、抗体製剤中へのPLBL2の残留により、レブリキズマブの臨床試験において抗ハムスターPLBL2抗体が高頻度で発生した報告がある (国際公開第W02015/038888号)。抗ハムスターPLBL2抗体の発生についての臨床的重要性は知られておらず、レブリキズマブの臨床試験で抗ハムスターPLBL2抗体が高頻度で発生しても安全性イベントと関連しなかった。しかし、依然として反復投与による長期曝露がアレルギー又は過敏症の患者集団において、アナフィラキシー、過敏症といった望ましくない影響を増大させる懸念があるため、製剤中のPLBL2は可能な限り低減することが望ましいと考えられる。

[0052] これらの要求に対して、活性炭材料による処理を追加することにより、CEXクロマトグラフィーへのこれらの不純物負荷が低減され、その結果、HCPを充分低いレベルまで除去できた。また、抗体との相互作用により残留するヒッチハイクHCPであるPLBL2は一般的な精製方法では低減することが難しいため、活性炭材料によりロード液の約50%が低減されること、すなわち活性炭材料によりPLBL2の対数除去値(LRV)0.27が得られることには大きな意義がある。

[0053] さらに、活性炭材料により目的物質由来不純物であるHMWS及びLMWSが低減された。活性炭材料によるHMWSの低減により、CEXクロマトグラフィーへの負荷を減らすことが可能となり、結果として最終精製物中のHMWS量を安定的に低減できることとなった。また、LMWSは一般的な精製方法では低減することが難しいため、活性炭材料による最終精製物の純度向上に対する寄与が大きい。

[0054] これらに加えて、活性炭材料にロードする抗体溶液のpHを調節することによってウイルスクリアランス能を向上させた。活性炭材料によりレトロウ

イルス及び/又はレトロウイルス様粒子、あるいは抗体溶液によって限定的ではあるがパルボウイルスを除去できる可能性があることが示されている（国際公開第W02015/005961号）が、溶液pHは7.0の条件である。一方、本発明ではpH5.0の条件でウイルスが除去できることを見出しており、さらにpH5.0の条件におけるウイルスクリアランス能は既報の条件よりも良好であることを示した。

[0055] 一般的な抗体の精製法ではプロテインAクロマトグラフィー、低pHによるウイルス不活化処理を実施しており、不活化後にpH5.0付近に中和される場合がある。また後段のCEXクロマトグラフィーではpH5.0付近の条件で実施される例が多いことから、これらの工程間に活性炭材料による処理を実施する際、特別なpH調整や希釈操作等を実施することなく活性炭材料による処理ができることは、製造作業を単純化することに大きく寄与する。さらに、抗体によってはpH変化により不安定化する場合があることから、pH調整せずに活性炭処理ができることは、抗体の安定性の維持にも大きく寄与すると考えられる。

[0056] CHO細胞を用いた抗体医薬品の精製工程において、一般的にAEXクロマトグラフィー工程はウイルスクリアランス能を有することが知られているが、活性炭材料がAEXクロマトグラフィーと同等のウイルスクリアランス能を有することが明らかとなったことから、AEXクロマトグラフィー工程の代替として活性炭材料による処理が可能となり、これにより、AEXクロマトグラフィーを省略できる可能性が示された。AEXクロマトグラフィーをはじめとしたクロマトグラフィーはその作業性が煩雑であり、吸着フィルターとして活性炭材料を用いることで、作業性が煩雑なクロマトグラフィーを省略することができ、より単純で効率的なプロセスとなり得る。また、高価なAEX樹脂やMembrane Adsorber等を安価な活性炭吸着フィルターとすることで、ランニングコストの大幅な低減が達成される。さらに、高額なクロマトグラフィー装置が不要で、安価なフィルターユニットに置き換えられることから、製造設備の初期投資の低減にも大きく寄与で

きと考えられる。

[0057] 4. 本発明で採用される精製工程

本明細書においては、抗体を一又は複数の不純物を含む組成物から精製するための手法であって、

a 1. 抗体を含有する細胞培養上清を用意し、

b 1. 前記細胞培養上清をアフィニティークロマトグラフィー樹脂により処理して、抗体を含むアフィニティークロマトグラフィープール液を得、

c 1. 前記アフィニティークロマトグラフィープール液においてウイルスを不活化して、ウイルス不活化液を得、

d 1. 前記ウイルス不活化液を活性炭材料により処理して、活性炭材料プール液を得、

e 1. 前記活性炭材料プール液を陽イオン交換材料により処理して、陽イオン交換材料プール液を得る、

の a 1. 乃至 e 1. の工程を含む方法（以下、改良方法 2）、を提供する。

[0058] b 1. 工程におけるアフィニティークロマトグラフィー樹脂の好適な例として、プロテイン A 樹脂を挙げることができる。採用可能なプロテイン A 樹脂として、プロテイン A 樹脂が、KanCapA (KANEKA)、KanCapA3G (KANEKA)、MabSelect SuRe (GE Healthcare Life Science)、MabSelect SuRe pcc (GE Healthcare Life Science)、MabSelect Prisma (GE Healthcare Life Science)、又はAmsphere A3 (JSR Life Sciences) を挙げることができるが、これらの樹脂に限定されるものではない。

[0059] c 1. の工程におけるウイルス不活化については、酸、界面活性剤、化学物質、核酸架橋剤、紫外線、ガンマ線及び熱での処理からなる群から選択されるいずれかひとつの方法を挙げることができる。ウイルス不活化処理として酸処理が選択される場合の好適な pH の範囲は、アフィニティークロマト

グラフィーブール液のpHを3～4に低下させる処理であり、ウイルス不活化処理としてさらに好適なpHは3.5である。この場合の好適な処理時間は60～120分であり、好適な処理温度は15～30℃である。

[0060] d1. の工程における活性炭材料は、クロマトグラフィーカラム中に充填される。他の実施形態において、活性炭材料はフィルタータイプであり、ディスプレイザブル形式のMillistak+（登録商標）Pod等の密閉使い捨てデバイス中に充填される。さらに他の実施形態において、活性炭材料はカートリッジ又はカプセル中に充填される。フィルタータイプの多くは、セルロースマトリックス等の強度のある構造のろ材に活性炭材料が混合される。

[0061] 市販の活性炭フィルターの例として、Millistak+（登録商標）Pod CR40（Merck Millipore）、Zeta Plus 活性炭吸着デプスフィルター（3M）、SUPRAcap 50 Seitz（登録商標）AKS filter（PALL）を挙げることができるが、これらの活性炭材料に限定されるものではない。いくつかの実施形態において、活性炭フィルターはセルロースマトリックス中に活性炭材料を保持した構造を有する。d1. の工程における活性炭材料にロードする溶液、活性炭材料の平衡化バッファー及び洗浄バッファーの好適なpHは4.5～7.5であり、より好適なpHは4.5～5.5であり、さらに好適なpHは5.0である。また、d1. の工程の活性炭材料にロードする溶液、活性炭材料の平衡化バッファー及び洗浄バッファーの好適な電気伝導度は2～10mS/cmであり、より好適な電気伝導度は2～5mS/cmである。

[0062] e1. の工程における陽イオン交換材料は、樹脂、モノリスカラム、又は膜のいずれか一つが選択される。陽イオン交換材料の官能基は、スルホプロピル、スルホエチル、スルホイソブチル、又はカルボキシルである。市販の陽イオン交換材料の例としては、POROSXS（Thermo Fisher Scientific）、Eshmun（登録商標）CPX（Merck Millipore）、Eshmun（登録商標）CP-F

T (Merck Millipore)、又はCanto S Impact (GE Healthcare Life Science) を挙げることができるが、これらの陽イオン交換材料に限定されるものではない。

[0063] e 1. の工程においては、d 1. の工程で得られた活性炭材料プール液が陽イオン交換材料の吸着容量を超えてロードされる。ローディング密度は、陽イオン交換材料 1 L 当たり 150～4000 g の蛋白質量の範囲で選択可能であるが、好適なローディング密度は 500～2000 g/L の範囲であり、さらに好適なローディング密度は 1000～1500 g/L の範囲である。ロードされる活性炭材料プール液の好適な pH は pH 4～6 であり、より好適な pH は 4.5～5.5 であり、さらに好適な pH は 5.0 である。また、e 1. の工程の陽イオン交換材料にロードする溶液の好適な電気伝導度は 3～7 mS/cm であり、より好適な電気伝導度は 3～5 mS/cm である。

[0064] 上記改良方法 2 においては、a 1. 乃至 e 1. の各工程の前後に 1 種類以上の任意の工程が追加されていても良い。

[0065] 例えば、改良方法 2 においては、c 1. の工程と d 1. の工程の間にデプスフィルターによる処理が追加されていても良い。デプスフィルターは、吸着作用と通常の多孔性ろ材による機械的ろ過作用との二側面から、おおむね 1 μ m を超えるサイズの粒子を捕捉することができるフィルターであり、セルロースマトリックスとケイソウ土等のろ材からなる。無数の長い流路を持つ厚みのあるろ材によって、フィルター内部で対象物をトラップできる特徴を有する。デプスフィルターは、Millistak+ (登録商標) Pod 等の密閉使い捨てデバイス中に充填される。市販のデプスフィルターの例としては、Millistak+ (登録商標) A1HC、D0HC、X0HC を挙げることができるが、これらのデプスフィルターに限定されるものではない。

[0066] デプスフィルターを追加した具体的な例として、抗体を一又は複数の不純物を含む組成物から精製するための手法であって、

- a 2. 抗体を含有する細胞培養上清を用意し、
 - b 2. 前記細胞培養上清をアフィニティークロマトグラフィー樹脂により処理して、抗体を含むアフィニティークロマトグラフィープール液を得、
 - c 2. 前記アフィニティークロマトグラフィープール液においてウイルスを不活化して、ウイルス不活化液を得、
 - d 2. 前記ウイルス不活化液をデプスフィルターにより処理して、デプスフィルターろ過プール液を得、
 - e 2. 前記デプスフィルターろ過プールを活性炭材料により処理して、活性炭材料プール液を得、
 - f 2. 前記活性炭材料プール液を陽イオン交換材料により処理して、陽イオン交換材料プール液を得る、
- の a 2. 乃至 f 2. の工程を含むことからなる、改良方法 2 の c 1. の工程と d 1. の工程の間にデプスフィルターによる処理が追加された方法（以下、改良方法 1）、を提供する。

[0067] また、上記改良方法 2 の c 1. の工程と d 1. の工程の間、又は上記改良方法 1 の d 2. の工程と e 2. の工程の間に陰イオン交換材料による処理が追加されていても良い。陰イオン交換材料は、樹脂、モノリスカラム、又は膜のいずれか一つが選択されるが、膜の場合は Q 膜を選択することができる。通常、陰イオン交換材料は F/T モードで使用される。市販の陰イオン交換材料の例としては、N a t r i F l o（登録商標）H D - Q、M u s t a n g（登録商標）Q、又は S a r t o b i n d（登録商標）Q を挙げることができるが、これらの陰イオン交換材料に限定されるものではない。

[0068] 上記改良方法 2 の e 1. の工程又は上記改良方法 1 の f 2. の工程で得られた陽イオン交換材料プール液を、さらに疎水性相互作用クロマトグラフィーにより処理してプール液を得ても良い（以下、改良方法 3）。また、上記改良方法 2 の d 1. の工程又は上記改良方法 1 の e 2. の工程で得られた活性炭材料プール液を、さらに疎水性相互作用クロマトグラフィーにより処理して疎水性相互作用クロマトグラフィープール液を得、さらに陽イオン交換

材料により処理して陽イオン交換材料プール液を得ても良い（以下、改良方法4）。前記の疎水性相互作用クロマトグラフィーは、好ましくはF/Tモードである。また、前記の疎水性相互作用クロマトグラフィーは、Phenyl基、Benzyl基若しくはHexyl基を有する樹脂又は膜を用いて実施される。市販の疎水性相互作用クロマトグラフィー材料の例としては、Phenyl Sepharose High Performance (GE Healthcare Life Science)、Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Life Science)、Sartobind (登録商標) Phenyl (sartorius)、ReadyToProcess Adsorber Phenyl (GE Healthcare Life Science)、POROS Benzyl Ultra (Thermo Fisher Scientific)、POROS Benzyl (Thermo Fisher Scientific)、Hexyl-650C (東ソー) を挙げることができるが、これらの疎水性相互作用クロマトグラフィー材料に限定されるものではない。

[0069] ここに記載されている何れかの方法の幾つかの実施形態においては、精製された抗体を回収することを更に含む。幾つかの実施形態では、精製抗体は、ここに記載されている何れかの精製工程から回収される。

[0070] 上記の工程によって、HCP、PLBL2、ウイルス、ウイルス様粒子、HMWS、LMWS、培地成分、浸出プロテインA及びDNAから選択される少なくとも一つの不純物が除去される。

実施例

[0071] 本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

[0072] 実施例1. 一般方法

本実施例では、実施例2以降に示す実施例で共通して使用する一般的な方法について説明する。

[0073] 1) 抗体濃度測定

抗体濃度は、PA ID Sensor Cartridge (2.1 mm×3 mm、Applied Biosystems) カラムを用いたHPLC法により測定した。

[0074] 2) HCP測定

Cygnus Technologies社のthird-generation CHO host cell proteinキットあるいはBioGENES社のCHO|360 HCP ELISAキットを用いて、酵素結合免疫吸着法(ELISA)により測定した。得られたHCP濃度を抗体濃度で除し、ng HCP/mg 抗体に換算した。

[0075] 実施例2～5では、Cygnus Technologies社のthird-generation CHO host cell proteinキットを、実施例6～8では、BioGENES社のCHO|360 HCP ELISAキットを使用した。

[0076] 3) PLBL2測定

Immunology Consultants Laboratory, INC.のHamster Phospholipase B-Like 2 (PLBL2) ELISAキットを用いて、酵素結合免疫吸着法(ELISA)により測定した。得られたPLBL2濃度を抗体濃度で除し、ng PLBL2/mg 抗体に換算した。さらに各精製工程でのPLBL2クリアランス能(対数除去値、Log Reduction Value; LRV)を、以下の計算により算出した。Cfがフィード液中のPLBL2の濃度であり、Cpがカラム、フィルターを通過した後のPLBL2の濃度であるとき、 $LRV = \log(Cf) - \log(Cp)$ とした。

[0077] 4) 高分子量体(HMWS)、低分子量体(LMWS)及びMonomer(単量体)含量

TSK gel G3000SWXL column (5 μm、7.8 mm×300 mm、Tosoh) 又はACQUITY UPLC Prot

ein BEH SEC column (1.7 μ m、4.6 mm $\times$ 300 mm、Waters) を用いたHPLC法により測定した。移動相は、0.4 M塩化ナトリウムを含有する0.1 Mリン酸緩衝液を用いた。

[0078] 5) プロテインA測定

Cygnus Technologies社のプロテインA ELISA キットを用いて、酵素結合免疫吸着法 (ELISA) により測定した。得られたプロテインA濃度を結果比較のために抗体濃度で除し、ng プロテインA/mg 抗体に換算した。

[0079] 6) ウイルス力価測定及びウイルスクリアランス能 (対数除去値、Log Reduction Value; LRV) の算出

ウイルス力価は、ウイルスに感染すると細胞の形状が変化する現象 (細胞変性) を利用した、50%の細胞に感染するウイルス量を測定する方法 (組織培養感染性試験; TCID₅₀) により測定した。対象ウイルスとしては、マウス白血病ウイルス (MLV)、マウス微小ウイルス (MMV)、仮性狂犬病ウイルス (PRV)、レオウイルス3型 (Reo3) とした。また指示細胞として、PG4細胞 (MLVの指示細胞)、324K細胞あるいはA9細胞 (MMVの指示細胞)、Verocells細胞 (PRVの指示細胞)、L-929細胞 (Reo3の指示細胞) を用いた。ウイルスクリアランス試験の前には、緩衝液やサンプルが指示細胞に望ましくない影響を及ぼしていないかを調べるために、ウイルス力価測定法に対する毒性作用又は干渉作用を評価した。ウイルスクリアランス能 (対数除去値、LRV) を、以下の計算により算出した。C_f がフィード液中のウイルスの濃度であり、C_p がカラム、フィルターを通過した後のウイルスの濃度であるとき、 $LRV = \log(C_f) - \log(C_p)$ とした。

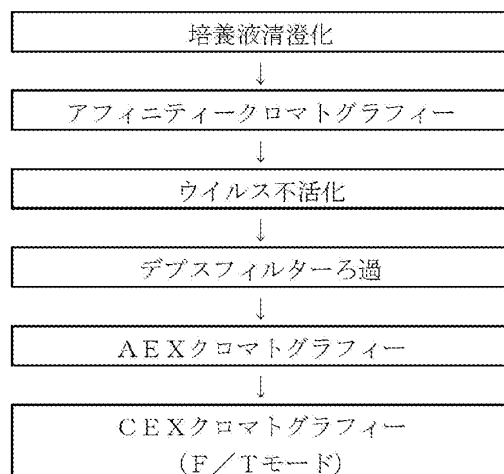
[0080] 7) DNA測定

CHOに特異的なプライマー、プローブを用いたqPCR法により測定した。得られたDNA濃度を抗体濃度で除し、pg DNA/mg 抗体に換算した。

[0081] 実施例 2. CEXクロマトグラフィー工程を F/T モードで精製した参考例 (M a b A)

本実施例は、以下の表 1 に示される精製フローにおける M a b A と呼ばれるモノクローナル抗体の不純物クリアランスについて説明する。

[0082] [表1]



[0083] 1) 材料及び方法

M a b A を産生した C H O 細胞培養液について、デプスフィルターろ過により細胞を除去し、清澄化して細胞培養上清を得た。細胞培養上清を、K a n C a p A 樹脂を用いたプロテイン A クロマトグラフィーにより精製した。20 mM 塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (pH 7.5) でカラムを平衡化した後、培養上清をロードし、その後、1 M 塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (pH 7.5)、続いて 20 mM 塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (pH 7.5) で洗浄を行った。酢酸バッファー (pH 3.6) で M a b A をカラムから溶出した。280 nm の吸光度をモニタリングし、M a b A を含む画分を取得した (アフィニティークロマトグラフィープール液)。アフィニティークロマトグラフィープール液に塩酸を加え、pH を 3.5 に調整し、1 時間、ウイルス不活化処理を行った。該工程は室温で実施した。1 時間のウイルス不活化処理の後、トリス水溶液を用いて pH

5.0に中和した。中和液を、予め酢酸バッファー（pH 5.0）で洗浄したデプスフィルター（Millistak（登録商標） Pod A1HC）にロードし、続いて酢酸バッファー（pH 5.0）で押し出しを実施し、Mab Aを回収した。続いて、0.2 μ mのフィルターでろ過し、保存した（デプスフィルターろ過プール液）。デプスフィルターろ過プール液をトリス水溶液でpH 7.5に調整し、AEX材料ロード液とした。予め1M塩化ナトリウムを含むトリスバッファー（pH 7.5）、続いてトリスバッファー（pH 7.5）で平衡化したAEX Membrane Adsorber（Natriflo（登録商標） HD-Q）にAEX材料ロード液を通液し、続いてトリスバッファー（pH 7.5）で洗浄することによりMab Aを回収した。回収液は酢酸を用いてpH 5.0に調整した後、0.2 μ mのフィルターでろ過し、AEX材料プール液として保存した。予め1M塩化ナトリウムを含む酢酸バッファー（pH 5.0）、続いて酢酸バッファー（pH 5.0）で平衡化したPOROS XSを充填したCEXカラムにAEX材料プール液を通液した。CEXカラムへのローディング密度は2000 g/L樹脂以下と設定した。ロード後、酢酸バッファー（pH 5.0）で押し出しを実施した。280 mmの吸光度をモニタリングし、Mab Aを含む画分を取得し、F/TモードによるCEX材料プール液とした。

[0084] 2) 結果

CEXクロマトグラフィー工程のF/TモードによるMab A回収率は、92%であった。不純物クリアランスの結果（表2）を示す。

[0085]

[表2]

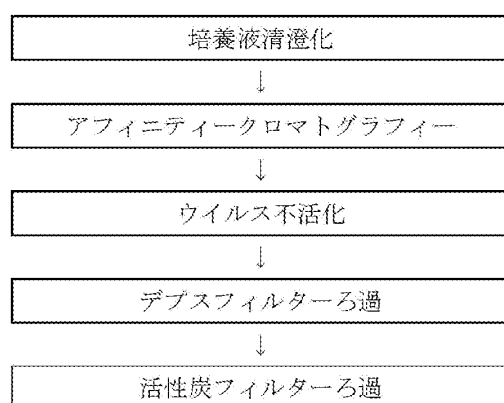
表2 CEXクロマトグラフィーのF/Tモードで精製した場合の不純物クリアランス

工程液	Monomer含量 (%)	HCP含量 (ng/mg)
細胞培養上清	—	2.1×10^6
アフィニティークロマトグラフィープール液	98.43	3.9×10^3
デプスフィルターろ過プール液	97.93	7.5×10^2
AEX材料プール液	97.81	6.3×10^2
CEX材料プール液 (F/Tモード)	98.52	3.5×10^1

[0086] 実施例3. 活性炭材料による不純物クリアランス (Mab A、Mab B、Mab C、Mab D)

本実施例は、以下の表3に示される精製フローにおけるMab A、Mab B、Mab C、又はMab Dと呼ばれる複数の抗体の活性炭材料による不純物クリアランスについて説明する。なお、Mab A、Mab B、Mab C、又はMab Dのアミノ酸配列及び結合する抗原は、それぞれ異なっている。

[0087] [表3]



[0088] 1) 活性炭材料における不純物クリアランス（ウイルス以外）

活性炭材料としてMillistak+（登録商標）Pod CR40を用いて、Mab B及びMab Aについて、抗体回収率及び不純物クリアランスの評価をおこなった。実施例2に示す方法に準じて得られたMab B及びMab Aのデプスフィルターろ過プール液を活性炭フィルターへのロード液（活性炭材料ロード液）として用いた。ただし、活性炭フィルターでのHCPのクリアランス能を評価しやすくするために、Mab BについてはプロテインAクロマトグラフィーにおいて、培養上清をロード後の1M塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー（pH7.5）による洗浄は実施しなかった。活性炭フィルターは予め取扱説明書にしたがって適切な洗浄を実施した後、酢酸バッファー（pH5.0）で平衡化した。なお、平衡化以降の流速は、109LMHと設定した。平衡化後、活性炭材料ロード液をMab Bでは、約300L/m²で、Mab Aでは約117L/m²で負荷し、通液後、酢酸バッファーでMab B及びMab Aを回収した（活性炭材料プール液）。

[0089] 各抗体についての精製条件（表4）、抗体回収率（表5）、HCPクリアランス（表6）、PLBL2クリアランス（表7）、及びHMWS、LMWSクリアランス（表8）を示す。いずれの抗体でも、活性炭フィルターろ過によってHCP、PLBL2が低減された。さらにHMWS及びLMWSが低減され、Monomer含量の向上が確認された。特にHCPに関して活性炭フィルターろ過により大幅に低減された（実施例2では、AEXクロマトグラフィー処理の前後においてHCP除去の程度が低く、CEXクロマトグラフィーに対するHCPの負荷が低減されていない）。さらに、抗体との相互作用により、一般的な抗体精製フローでは低減し難いヒッチハイクHCPとして報告があるPLBL2についても（国際公開第W02015/038888号）、活性炭フィルターろ過で低減されることが明らかになった。ヒッチハイクHCPであるPLBL2は一般的な精製方法では低減することが難しいため、活性炭材料によりロード液の約50%が低減されること、すなわち活性炭材

料により P L B L 2 の対数除去値 (L R V) 0. 2 7 が得られることには大きな意義がある。

[0090] [表4]

表 4 各抗体についての精製条件一覧

精製条件	M a b B	M a b A
アフィニティークロマトグラフィーにおける 1 M 塩化ナトリウム洗浄	無し	有り
活性炭フィルターへの負荷量 (L/m ²)	3 0 0	1 1 7

[0091] [表5]

表 5 活性炭フィルターろ過における抗体回収率 (%)

工程液	M a b B	M a b A
活性炭材料ブール液	9 5	9 4

[0092] [表6]

表 6 活性炭フィルターろ過における H C P クリアランス (n g / m g)

工程液	M a b B	M a b A
活性炭材料ロード液	2. 2 × 1 0 ³	6. 1 × 1 0 ²
活性炭材料ブール液	6. 0	6. 0 × 1 0 ¹

[0093] [表7]

表 7 活性炭フィルターろ過における P L B L 2 クリアランス (対数除去値)

精製工程	M a b A
活性炭フィルターろ過	0. 2 7

[0094]

[表8]

表8 活性炭フィルターろ過におけるHMWS, LMWSクリアランス (%)

工程液	M a b B	M a b A
活性炭材料ロード液	HMWS : 1. 8 0 LMWS : 0. 9 4 Monomer : 97. 2 6	HMWS : 1. 4 2 LMWS : 0. 2 4 Monomer : 98. 3 4
活性炭材料プール液	HMWS : 1. 5 5 LMWS : 0. 5 1 Monomer : 97. 9 5	HMWS : 1. 4 0 LMWS : 0. 1 9 Monomer : 98. 4 1

[0095] 2) 活性炭材料におけるウイルスクリアランス

活性炭材料としてMillistak+（登録商標）Pod CR40を用いて、ウイルスクリアランスを評価した。Mab B、Mab C、及びMab Dへのスパイク試験によりウイルスクリアランス能を確認した。スパイク対象ウイルスとしては、CHO細胞を用いた抗体医薬品のウイルスクリアランス試験で一般的に用いられている4ウイルス（MLV, MMV, Reo3及びPRV）とした。活性炭フィルターろ過によるウイルスクリアランス能に影響を及ぼす可能性がある因子として、流速、pH及び抗体種類をあげ、それらの影響を確認する試験を計画した。実施例2に示す方法に準じて得られたMab B、Mab C、及びMab Dのデプスフィルターろ過プール液を活性炭フィルターへのロード液（活性炭材料ロード液）として用いた（pH 5. 0）。さらに、pH 7. 5の条件のロード液については、トリス水溶液によりpHを7. 5に調整した。活性炭フィルターは予め取扱説明書にしたがって適切な洗浄を実施した後、酢酸バッファ（pH 5. 0）あるいはトリスバッファ（pH 7. 5）で平衡化した。なお、平衡化以降の流速は、109 LMHあるいは54. 5 LMHと設定した。平衡化後、活性炭材料ロードを約55 L/m²あるいは約110 L/m²で負荷し、通液後、酢酸バッファ（pH 5. 0）あるいはトリスバッファ（pH 7. 5）でMab B、Mab C、及びMab Dを回収し（活性炭材料プー

ル液)、活性炭材料ロード液及び活性炭材料プール液のウイルス力価からウイルス対数除去値(LRV)を算出した(表9)。この結果、活性炭フィルターは4種のウイルスに対してクリアランス能を有することが判明した。ウイルスクリアランス能は、流速、共存する抗体種、及び負荷量によって影響を受けず、CHO細胞を用いた抗体医薬品のウイルスクリアランス試験で用いる4種のウイルスについてLRVがいずれも ≥ 4 と高いクリアランス能を有していた。一方、MLVの評価においてpH5.0及び7.5でウイルスクリアランス能を比較した結果、pH7.5でLRVが低下していることが分かり、pHが活性炭材料におけるウイルスクリアランスに影響する重要パラメータであることが明らかとなった。

[0096] [表9]

表9 活性炭フィルターろ過におけるウイルスクリアランス(対数除去値)

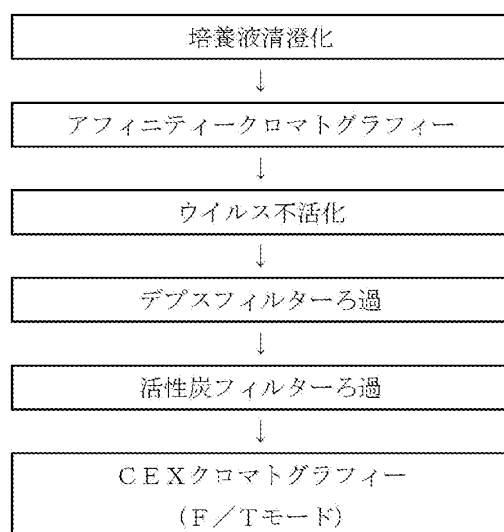
Virus	pH	流速 (LMH)	負荷量 (L/m ²)	抗体	ウイルス対数除去値 (LRV)
MLV	5.0	109	110	Ma b C	≥ 5.26
MLV	5.0	54.5	110	Ma b C	≥ 5.09
MLV	7.5	109	110	Ma b C	2.31
MLV	5.0	109	110	Ma b B	≥ 4.82
MLV	5.0	109	110	Ma b D	4.81
MMV	5.0	109	55	Ma b C	4.29
MMV	5.0	109	110	Ma b D	5.87
Reo3	5.0	109	55	Ma b C	≥ 7.67
PRV	5.0	109	55	Ma b C	6.32

[0097] 実施例4. 改良方法1による精製例(Ma b A、Ma b C)

本実施例は、以下の表10に示される精製フローにおけるMa b A又はMa b Cと呼ばれるモノクローナル抗体の不純物クリアランスについて説明する。

[0098]

[表10]



[0099] 1) 材料及び方法

Mab Aを産生したCHO細胞培養液について、デプスフィルターろ過により細胞を除去し、清澄化した。細胞培養上清を、KanCapA樹脂を用いたプロテインAクロマトグラフィーにより精製した。20 mM塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (pH 7.5) でカラムを平衡化した後、培養上清をロードし、その後、1 M塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (pH 7.5)、続いて20 mM塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (pH 7.5) で洗浄を行った。酢酸バッファー (pH 3.6) でMab Aをカラムから溶出した。280 nmの吸光度をモニタリングし、Mab Aを含む画分を取得した (アフィニティークロマトグラフィープール液)。アフィニティークロマトグラフィープール液に塩酸を加え、pHを3.5に調整し、1時間、ウイルス不活化処理を行った。該工程は室温で実施した。1時間のウイルス不活化処理の後、トリス水溶液を用いてpH 5.0に中和し、0.2 μmのフィルターでろ過し、保存した (ウイルス不活化液)。ウイルス不活化液を、予め酢酸バッファー (pH 5.0) で洗浄したデプスフィルター (Millistak+ (登録商標) Pod A1HC) に約109

L/m²で負荷し、続いて酢酸バッファー（pH 5.0）で押し出しを実施し、M a b Aを回収した（デプスフィルターろ過プール液）。

[0100] デプスフィルターろ過プール液を予め酢酸バッファー（pH 5.0）で洗浄した活性炭フィルター（M i l l i s t a k +（登録商標） P o d C R 4 0）に117 L/m²で負荷し、続いて酢酸バッファー（pH 5.0）で押し出しを実施し、M a b Aを回収した。続いて、0.2 μmのフィルターでろ過し、保存した（活性炭材料プール液）。予め1 M塩化ナトリウムを含む酢酸バッファー（pH 5.0）、続いて酢酸バッファー（pH 5.0）で平衡化したP O R O S X Sを充填したC E Xカラムに活性炭材料プール液を通液した。C E Xカラムへのローディング密度は約2000 g/L樹脂とした。ロード後、酢酸バッファー（pH 5.0）で押し出しを実施した。280 mmの吸光度をモニタリングし、M a b Aを含む画分を取得し、F/TモードによるC E X材料プール液とした。

[0101] 実施例3で調製したM a b Cのアフィニティークロマトグラフィープール液、デプスフィルターろ過プール液及び活性炭材料プール液を用いて、ウイルスクリアランスを評価した。スパイク対象ウイルスとしては、CHO細胞を用いた抗体医薬品のウイルスクリアランス試験で一般的に用いられている4ウイルス（M L V, M M V, R e o 3及びP R V）とした。ウイルス力価からウイルス対数除去値（L R V）を算出した。

[0102] 2) 結果

改良方法1におけるM a b A回収率、及び不純物クリアランスの結果を表11及び表12に示す。また、M a b Cについて、改良方法1におけるウイルスクリアランス能を有する工程の精製工程総クリアランスを表13に示す。

[0103] 改良方法1におけるM a b Aの回収率は良好であった。HMWS及びLMWSが除去され、高いM o n o m e r含量の抗体が得られた。H C P含量は適切に低減された。P L B L 2含量についても、低減できた。また、D N Aについても定量限界未満まで除去されていることが確認された。

[0104] 改良方法1におけるM a b Cのウイルスクリアランス能を有する工程の精製工程総クリアランスも良好な結果を示した。

[0105] 活性炭材料による処理と組み合わせることで、高純度に精製できること、さらに活性炭材料による処理でウイルスが除去されることが見出されたため、実施例2に示す方法からA E Xクロマトグラフィーを活性炭材料に置き換えることが可能となった。製造コストについては、C E Xクロマトグラフィーを一般的に使用されているB / EモードからF / Tモードとすることで、樹脂へのローディング密度が約100 g / L樹脂から約2000 g / L樹脂へと増大し、高価なC E X樹脂コストを約1 / 20とすることが可能となった。また、高価なA E X樹脂や膜を安価な活性炭材料とすることで製造コスト低減が達成された。さらにA E Xクロマトグラフィーを削除し、フィルターカートリッジタイプのデプスフィルターに続けて同タイプの活性炭フィルターを使用することにより、製造日数も1日短縮できた。多くの医薬品メーカーにとって製造の効率化は必須であり、年間の製造ロット数を最大化することにより製造の効率化がはかられていることから、製造日数が1日短縮できることには大きな意義がある。

[0106] 該改良方法により、ヒト治療用として使用するに十分な純度まで、しかも製造コストを低減し、製造期間を短縮し、効率的に抗体を精製することが可能となった。

[0107] [表11]

表11 改良方法1における回収率（改良した工程についてのみ記載）

精製工程	回収率 (%)
デプスフィルターろ過	9.6
活性炭フィルターろ過	9.4
C E Xクロマトグラフィー (F / Tモード)	9.4

[0108]

[表12]

表12 改良方法1における不純物クリアランス

工程液	Monomer 含量 (%)	HCP含量 (ng/mg)	PLBL2含量 (対数除去値)	DNA含量 (pg/mg)
細胞培養上清	N. T.	N. T.	—	1.52×10^2
アフィニティークロマトグラフィーブール液	N. T.	N. T.	0.42	5.50
ウイルス不活化液	97.99	2.12×10^3	0.13	2.40
デプスフィルターろ過ブール液	98.34	6.12×10^2	0.15	<QL
活性炭材料ブール液	98.45	4.70×10^1	0.28	<QL
CEX材料ブール液 (F/Tモード)	98.77	1.30×10^1	0.06	<QL

(QL : 定量限界)

[0109] [表13]

表13 改良方法1におけるウイルスクリアランス (対数除去値)

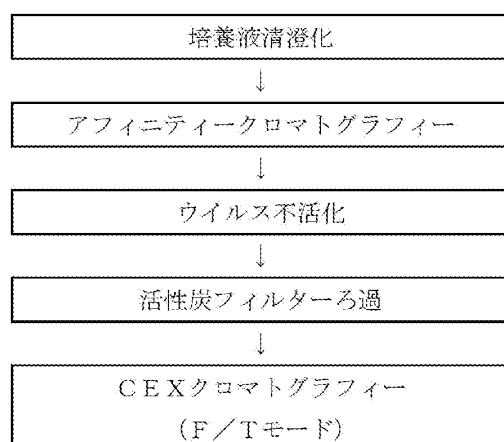
精製工程	MLV	MMV	Reo3	PRV
ウイルス不活化	5.71	N. T.	N. T.	N. T.
活性炭フィルターろ過	≥ 5.26	4.29	≥ 7.67	6.32
CEXクロマトグラフィー (F/Tモード)	6.09	2.62	8.03	≥ 5.71
精製工程総クリアランス	≥ 17.06	≥ 6.91	≥ 15.70	≥ 12.03

[0110] 実施例5. 改良方法2による精製例 (Mab A、Mab D)

本実施例は、実施例4の表10の精製フローよりデプスフィルターろ過を省略した、以下の表14に示される精製フローにおけるMab A及びMab Dと呼ばれるモノクローナル抗体の不純物クリアランスについて説明する。なお、Mab Dのアミノ酸配列及び結合する抗原は、Mab A、Mab B又はMab Cとは異なっている。

[0111]

[表14]



[0112] 1) 材料及び方法

1) - 1) Mab Aの場合

Mab Aを産生したCHO細胞培養液について、デプスフィルターろ過により細胞を除去し、清澄化した。細胞培養上清を、KanCapA樹脂を用いたプロテインAクロマトグラフィーにより精製した。20 mM塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (pH 7.5) でカラムを平衡化した後、培養上清をロードし、その後、1 M塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (pH 7.5)、続いて20 mM塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (pH 7.5) で洗浄を行った。酢酸バッファー (pH 3.6) でMab Aをカラムから溶出した。280 nmの吸光度をモニタリングし、各抗体を含む画分を取得した (アフィニティークロマトグラフィープール液)。アフィニティークロマトグラフィープール液に塩酸を加え、pHを3.5に調整し、1時間、ウイルス不活化処理を行った。該工程は室温で実施した。1時間のウイルス不活化処理の後、トリス水溶液を用いてpH 5.0に中和し、0.2 μmのフィルターでろ過し、保存した (ウイルス不活化液)。ウイルス不活化液を予め酢酸バッファー (pH 5.0) で洗浄した活性炭フィルター (Millistak+ (登録商標) Pod CR40) に70 L/m²で負荷

し、続いて酢酸バッファ（pH 5.0）で押し出しを実施し、各抗体を回収した。続いて、0.2 μ mのフィルターでろ過し、保存した（活性炭材料プール液）。予め1 M塩化ナトリウムを含む酢酸バッファ（pH 5.0）、続いて酢酸バッファ（pH 5.0）で平衡化したPOROS XSを充填したCEXカラムに活性炭材料プール液を通液した。CEXカラムへのローディング密度は約2000 g/L樹脂と設定した。ロード後、酢酸バッファ（pH 5.0）で押し出しを実施した。280 mmの吸光度をモニタリングし、各抗体を含む画分を取得し、続いて0.2 μ mのフィルターでろ過しF/TモードによるCEX材料プール液とした。

[0113] 1) - 2) Mab Dの場合

Mab Dを産生したCHO細胞培養液について、デプスフィルターろ過により細胞を除去し、清澄化した。細胞培養上清を、KanCapA樹脂を用いたプロテインAクロマトグラフィーにより精製した。20 mM塩化ナトリウムを含むリン酸バッファ（pH 7.5）でカラムを平衡化した後、培養上清をロードし、その後、1 M塩化ナトリウムを含むリン酸バッファ（pH 7.5）、続いて20 mM塩化ナトリウムを含むリン酸バッファ（pH 7.5）で洗浄を行った。酢酸バッファ（pH 3.6）でMab Dをカラムから溶出した。280 mmの吸光度をモニタリングし、各抗体を含む画分を取得した（アフィニティークロマトグラフィープール液）。アフィニティークロマトグラフィープール液に塩酸を加え、pHを3.4に調整し、1時間、ウイルス不活化処理を行った。該工程は室温で実施した。1時間のウイルス不活化処理の後、トリス水溶液を用いてpH 5.0に中和し、保存した（ウイルス不活化液）。ウイルス不活化液を予め酢酸バッファ（pH 5.0）で洗浄した活性炭フィルター（Millistak+（登録商標）Pod CR40）に178 L/m²で負荷し、続いて酢酸バッファ（pH 5.0）で押し出しを実施し、各抗体を回収した。続いて、0.2 μ mのフィルターでろ過し、保存した（活性炭材料プール液）。予め1 M塩化ナトリウムを含む酢酸バッファ（pH 5.0）、続いて酢酸バッファ（pH 5.0）

． 0）で平衡化した P O R O S X S を充填した C E X カラムに活性炭材料
プール液を通液した。C E X カラムへのローディング密度は約 1 5 0 0 g /
L 樹脂と設定した。ロード後、酢酸バッファー（p H 5． 0）で押し出しを
実施した。2 8 0 m m の吸光度をモニタリングし、各抗体を含む画分を取得
し、続いて 0． 2 μ m のフィルターでろ過し F / T モードによる C E X 材料
プール液とした。

[0114] 2) 結果

改良方法 2 における M a b A 回収率、及び不純物クリアランスの結果を
表 1 5 及び表 1 6 に、M a b D 回収率、及び不純物クリアランスの結果を
表 1 7 及び表 1 8 に示す。なお、改良方法 2 におけるウイルスクリアランス
能を有する工程の精製工程総クリアランスについては、実施例 4 の表 1 3 と
対象工程が同じであるため、同等のクリアランスが期待できる。

[0115] M a b A 及び M a b D とともに、改良方法 2 における回収率は良好であ
った。また、H M W S 及び L M W S が除去され、高い M o n o m e r 含量の
抗体が得られた。H C P 含量についても、M a b D で十分に除去された。
また、D N A についても定量限界未満まで除去されていることが確認された
。さらに、P L B L 2 及び浸出プロテイン A の含量も低減できた。以上の結
果から、抗体によっては該精製方法によりデプスフィルターろ過を実施しな
くても高純度に精製できることが明らかとなった。

[0116] [表15]

表 1 5 改良方法 2 における回収率（改良した工程についてのみ記載、M a b A）

精製工程	回収率（%）
活性炭フィルターろ過	9 3
C E X クロマトグラフィー （F / T モード）	8 5

[0117]

[表16]

表16 改良方法2における不純物クリアランス (Ma b A)

工程液	Monomer 含量 (%)	HCP含量 (ng/mg)	PLBL2 含量 (対数除去 値)	DNA含量 (pg/mg)	浸出プロテインA 含量 (ng/mg)
細胞培養上清	N. T.	N. T.	—	1.52×10^2	N. T.
アフィニティークロマトグラフィーブール液	N. T.	N. T.	0.42	5.50	5.86×10^1
ウイルス不活化液	98.13	2.06×10^3	0.13	2.40	5.98×10^1
活性炭材料ブール液	98.31	6.95×10^2	0.30	<QL	2.32×10^1
CEX材料ブール液 (F/Tモード)	98.79	4.00×10^1	0.14	<QL	1.55×10^1

[0118] [表17]

表17 改良方法2における回収率 (改良した工程についてのみ記載、Ma b D)

精製工程	回収率 (%)
活性炭フィルターろ過	100
CEXクロマトグラフィー (F/Tモード)	90

[0119]

[表18]

表18 改良方法2における不純物クリアランス (M a b D)

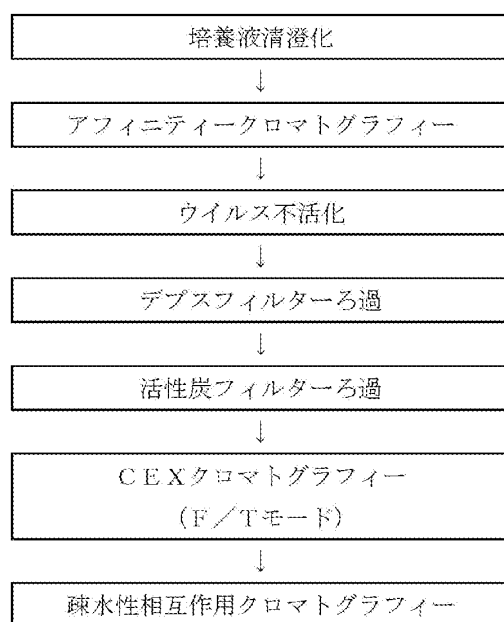
工程液	Monomer 含量 (%)	HCP含量 (ng/mg)	PLBL2含量 (対数除去値)	DNA含量 (pg/mg)	浸出プロテインA含量 (ng/mg)
細胞培養上清	N. T.	7.13×10^{-3}	—	3.1×10^{-1}	N. T.
アフィニティーク ロマトグラフィー プール液	98.49	8.70×10^{-1}	0.94	< QL	1.40×10^{-1}
ウイルス不活化液	97.65	3.90×10^{-1}	0.01	< QL	1.10×10^{-1}
活性炭材料プール 液	97.96	1.70×10^{-1}	0.59	< QL	7.40
C E X 材料プール 液 (F/Tモード)	99.02	3.00×10^{-6}	-0.13	< QL	4.25

[0120] 実施例6. 改良方法3による精製例 (M a b F、M a b G)

本実施例は、実施例4の表10の精製フローにおける陽イオン交換クロマトグラフィーの後に疎水性相互作用クロマトグラフィーを追加した、以下の表19に示される精製フローによる抗体の不純物クリアランスを例示する。なお、本実施例で使用されるM a b E、M a b F及びM a b Gのアミノ酸配列及び結合する抗原は、それぞれ異なっており、M a b A、M a b B、M a b C又はM a b Dとも異なっている。

[0121]

[表19]



[0122] 1) 疎水性相互作用クロマトグラフィーにおけるウイルスクリアランス (Mab E)

本実施例は、疎水性相互作用クロマトグラフィーにおけるMab Eと呼ばれるモノクローナル抗体のウイルスクリアランスについて説明する。POROS Benzyl Ultra HIC 樹脂を用いて、Mab EへのMLV, MMVのスパイク試験により、ウイルスクリアランスを評価した。

[0123] Mab Eを産生したCHO細胞培養液について、デプスフィルターろ過により細胞を除去し、清澄化した。細胞培養上清を、KanCapA樹脂を用いたプロテインAクロマトグラフィーにより精製した。20 mM塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (pH 7.5) でカラムを平衡化した後、培養上清をロードし、その後、1 M塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (pH 7.5)、続いて20 mM塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (pH 7.5) で洗浄を行った。酢酸バッファー (pH 3.6) でMab Eをカラムから溶出した。280 nmの吸光度をモニタリングし、Mab Eを

含む画分を取得した（アフィニティークロマトグラフィープール液）。アフィニティークロマトグラフィープール液に塩酸を加え、pHを3.4に調整し、1時間、ウイルス不活化処理を行った。該工程は室温で実施した。1時間のウイルス不活化処理の後、トリス水溶液を用いてpH5.0に中和した（ウイルス不活化液）。ウイルス不活化液を、予め酢酸バッファー（pH5.0）で洗浄したデプスフィルター（Millistak+（登録商標）Pod A1HC）に114L/m²で負荷し、続いて酢酸バッファー（pH5.0）で押し出しを実施し、Mab Eを回収した（デプスフィルターろ過プール液）。デプスフィルターろ過プール液を、予め酢酸バッファー（pH5.0）で洗浄した活性炭フィルター（Millistak+（登録商標）Pod CR40）に129L/m²で負荷し、続いて酢酸バッファー（pH5.0）で押し出しを実施し、0.2μmのフィルターでろ過し、保存した（活性炭材料プール液）。予め注射用水、続いて酢酸バッファー（pH5.0）で平衡化したPOROS Benzyl Ultraを充填したHICカラムに活性炭材料プール液を通液した。HICカラムへのローディング密度は約1000g/L樹脂とした。ロード後、酢酸バッファー（pH5.0）で押し出しを実施した。280mmの吸光度をモニタリングし、Mab Eを含む画分を取得し、F/TモードによるHIC材料プール液とした。ロード液及びプール液のウイルス力価からウイルス対数除去値（LRV）を算出した（表20）。この結果、疎水性相互作用クロマトグラフィーはクリアランス能を有することが判明した。

[0124] [表20]

表 20 疎水性相互作用クロマトグラフィーにおけるウイルスクリアランス（対数除去値）

Virus	ウイルス対数除去値 (LRV)
MLV	2.92
MMV	4.22

[0125] 2) 改良方法3による不純物クリアランス（Mab F）

本実施例は、表 19 に示される精製フローにおける M a b F と呼ばれるモノクローナル抗体の不純物クリアランスについて説明する。

[0126] M a b F を産生した C H O 細胞培養液について、デプスフィルターろ過により細胞を除去し、清澄化した。細胞培養上清を、K a n C a p A 樹脂を用いたプロテイン A クロマトグラフィーにより精製した。20 mM 塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (p H 7. 5) でカラムを平衡化した後、培養上清をロードし、その後、1 M 塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (p H 7. 5)、続いて 20 mM 塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (p H 7. 5) で洗浄を行った。酢酸バッファー (p H 3. 6) で M a b F をカラムから溶出した。280 mm の吸光度をモニタリングし、M a b F を含む画分を取得した (アフィニティークロマトグラフィープール液)。アフィニティークロマトグラフィープール液に塩酸を加え、p H を 3. 7 に調整し、1 時間、ウイルス不活化処理を行った。該工程は室温で実施した。1 時間のウイルス不活化処理の後、トリス水溶液を用いて p H 5. 0 に中和した (ウイルス不活化液)。ウイルス不活化液を、予め酢酸バッファー (p H 5. 0) で洗浄したデプスフィルター (M i l l i s t a k + (登録商標) P o d A 1 H C) に約 900 g / m² で負荷し、続いて酢酸バッファー (p H 5. 0) で押し出しを実施し、M a b F を回収した (デプスフィルターろ過プール液)。デプスフィルターろ過プール液を、予め酢酸バッファー (p H 5. 0) で洗浄した活性炭フィルター (M i l l i s t a k + (登録商標) P o d C R 40) に約 800 g / m² で負荷し、続いて酢酸バッファー (p H 5. 0) で押し出しを実施し、0. 2 μ m のフィルターでろ過し、保存した (活性炭材料プール液)。予め 1 M 塩化ナトリウムを含む酢酸バッファー (p H 5. 0)、続いて酢酸バッファー (p H 5. 0) で平衡化した P O R O S X S を充填した C E X カラムに活性炭材料プール液を通液した。C E X カラムへのローディング密度は約 1300 g / L 樹脂と設定した。ロード後、酢酸バッファー (p H 5. 0) で押し出しを実施した。280 mm の吸光度をモニタリングし、M a b F を含む画分を取得し、続いて 0.

2 μ mのフィルターでろ過しF/TモードによるCEX材料プール液とした。予め注射用水、続いて酢酸バッファー (pH 5.0) で平衡化したPOROS Benzyl Ultraを充填したHICカラムにCEX材料プール液を通液した。HICカラムへのローディング密度は約300 g/L樹脂とした。ロード後、酢酸バッファー (pH 5.0) で押し出しを実施した。280mmの吸光度をモニタリングし、Mab Fを含む画分を取得し、F/TモードによるHIC材料プール液とした。

[0127] 改良方法3における不純物クリアランスの結果を表21に示す。疎水性相互作用クロマトグラフィーによってMonomer含量は増加した。陽イオン交換クロマトグラフィー後に残留したHCP及びPLBL2は、疎水性相互作用クロマトグラフィーによって除去され、特にPLBL2は定量限界未満まで除去された。

[0128] [表21]

表21 改良方法3における不純物クリアランス (Mab F)

工程液	Monomer含量 (%)	HCP含量 (ng/mg)	PLBL2含量 (ng/mg)
細胞培養上清	N. T.	2.87×10^5	1.11×10^3
アフィニティークロマトグラフィープール液	98.17	2.74×10^2	4.21×10^2
ウイルス不活化液	96.60	N. T.	N. T.
デブスフィルターろ過 プール液	97.15	8.61×10^1	1.71×10^2
活性炭材料プール液	97.77	7.75×10^1	1.14×10^2
CEX材料プール液 (F/Tモード)	98.30	2.12×10^1	9.74×10^1
HIC材料プール液 (F/Tモード)	98.55	1.14×10^1	< 0.35

[0129] 3) 改良方法3による不純物クリアランス (Mab G)

本実施例は、表19に示される精製フローにおけるMab Gと呼ばれるモ

ノクローナル抗体の不純物クリアランスについて説明する。

[0130] M a b Gを産生したC H O細胞培養液について、デプスフィルターろ過により細胞を除去し、清澄化した。細胞培養上清を、K a n C a p A樹脂を用いたプロテインAクロマトグラフィーにより精製した。20 mM塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー（pH 7.5）でカラムを平衡化した後、培養上清をロードし、その後、1 M塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー（pH 7.5）、続いて20 mM塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー（pH 7.5）で洗浄を行った。酢酸バッファー（pH 3.6）でM a b Gをカラムから溶出した。280 nmの吸光度をモニタリングし、M a b Gを含む画分を取得した（アフィニティークロマトグラフィープール液）。アフィニティークロマトグラフィープール液に塩酸を加え、pHを3.7に調整し、1時間、ウイルス不活化処理を行った。該工程は室温で実施した。1時間のウイルス不活化処理の後、トリス水溶液を用いてpH 5.0に中和した（ウイルス不活化液）。ウイルス不活化液を、予め酢酸バッファー（pH 5.0）で洗浄したデプスフィルター（M i l l i s t a k +（登録商標） P o d A 1 H C）に約800 g/m²で負荷し、続いて酢酸バッファー（pH 5.0）で押し出しを実施し、M a b Gを回収した（デプスフィルターろ過プール液）。デプスフィルターろ過プール液を、予め酢酸バッファー（pH 5.0）で洗浄した活性炭フィルター（M i l l i s t a k +（登録商標） P o d C R 40）に約700 g/m²で負荷し、続いて酢酸バッファー（pH 5.0）で押し出しを実施し、0.2 μmのフィルターでろ過し、保存した（活性炭材料プール液）。予め1 M塩化ナトリウムを含む酢酸バッファー（pH 5.0）、続いて酢酸バッファー（pH 5.0）で平衡化したP O R O S X Sを充填したC E Xカラムに活性炭材料プール液を通液した。C E Xカラムへのローディング密度は約1500 g/L樹脂と設定した。ロード後、酢酸バッファー（pH 5.0）で押し出しを実施した。280 nmの吸光度をモニタリングし、M a b Gを含む画分を取得し、続いて0.2 μmのフィルターでろ過しF/TモードによるC E X材料プール液とした。

。予め注射用水、続いて酢酸バッファー（pH 5.0）で平衡化したPOROS Benzyl Ultraを充填したHICカラムにCEX材料プール液を通液した。HICカラムへのローディング密度は約300 g/L樹脂とした。ロード後、酢酸バッファー（pH 5.0）で押し出しを実施した。280 nmの吸光度をモニタリングし、Mab Gを含む画分を取得し、F/TモードによるHIC材料プール液とした。

[0131] 改良方法3における不純物クリアランスの結果を表22に示す。疎水性相互作用クロマトグラフィーによってMonomer含量は増加した。陽イオン交換クロマトグラフィー後に残留したHCP及びPLBL2は、疎水性相互作用クロマトグラフィーによって除去され、特にPLBL2は定量限界付近まで除去された。

[0132] [表22]

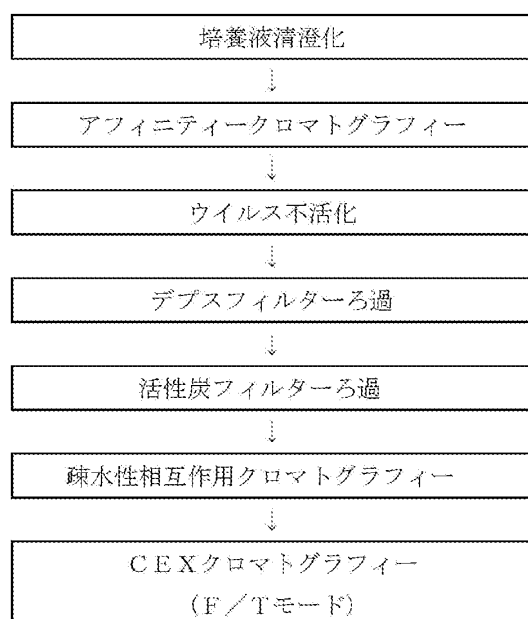
表22 改良方法3における不純物クリアランス (Mab G)

工程液	Monomer含量 (%)	HCP含量 (ng/mg)	PLBL2含量 (ng/mg)
細胞培養上清	N. T.	3.51×10^5	1.39×10^3
アフィニティークロマトグラフィープール液	97.88	8.88×10^3	3.92×10^2
ウイルス不活化液	98.90	N. T.	N. T.
デブスフィルターろ過 プール液	97.44	1.52×10^2	2.18×10^2
活性炭材料プール液	97.94	9.76×10^3	1.53×10^2
CEX材料プール液 (F/Tモード)	98.32	1.84×10^1	1.52×10^2
HIC材料プール液 (F/Tモード)	98.63	8.14×10^0	0.44

[0133] 実施例7. 改良方法4による精製例 (Mab F、Mab G)

本実施例は、実施例4の表10の精製フローにおける陽イオン交換クロマトグラフィーの前に疎水性相互作用クロマトグラフィーを追加した、以下の表23に示される精製フローによる抗体の不純物クリアランスを例示する。

[0134] [表23]



[0135] 1) 改良方法4による不純物クリアランス (Mab F)

本実施例は、表23に示される精製フローにおけるMab Fと呼ばれるモノクローナル抗体の不純物クリアランスについて説明する。

[0136] Mab Fを産生したCHO細胞培養液について、デプスフィルターろ過により細胞を除去し、清澄化した。細胞培養上清を、KanCapA樹脂を用いたプロテインAクロマトグラフィーにより精製した。20 mM塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (pH 7.5) でカラムを平衡化した後、培養上清をロードし、その後、1 M塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (pH 7.5)、続いて20 mM塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (pH 7.5) で洗浄を行った。酢酸バッファー (pH 3.6) でMab Fをカラムから溶出した。280 nmの吸光度をモニタリングし、Mab Fを含む画分を取得した (アフィニティークロマトグラフィープール液)。アフィニティークロマトグラフィープール液に塩酸を加え、pHを3.7に調整し、1時間、ウイルス不活化処理を行った。該工程は室温で実施した。1時間のウイルス不活化処理の後、トリス水溶液を用いてpH 5.0に中和した。

(ウイルス不活化液)。ウイルス不活化液を、予め酢酸バッファー (pH 5.0) で洗浄したデプスフィルター (Millistak+ (登録商標) Pod A1HC) に約 900 g/m^2 で負荷し、続いて酢酸バッファー (pH 5.0) で押し出しを実施し、Mab F を回収した (デプスフィルターろ過プール液)。デプスフィルターろ過プール液を、予め酢酸バッファー (pH 5.0) で洗浄した活性炭フィルター (Millistak+ (登録商標) Pod CR40) に約 800 g/m^2 で負荷し、続いて酢酸バッファー (pH 5.0) で押し出しを実施し、 $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターでろ過し、保存した (活性炭材料プール液)。予め注射用水、続いて酢酸バッファー (pH 5.0) で平衡化した POROS Benzyl Ultra を充填した HIC カラムに活性炭材料プール液を通液した。HIC カラムへのローディング密度は約 300 g/L 樹脂とした。ロード後、酢酸バッファー (pH 5.0) で押し出しを実施した。280 mm の吸光度をモニタリングし、Mab F を含む画分を取得し、F/T モードによる HIC 材料プール液とした。予め 1 M 塩化ナトリウムを含む酢酸バッファー (pH 5.0)、続いて酢酸バッファー (pH 5.0) で平衡化した POROS XS を充填した CEX カラムに HIC 材料プール液を通液した。CEX カラムへのローディング密度は約 1300 g/L 樹脂と設定した。ロード後、酢酸バッファー (pH 5.0) で押し出しを実施した。280 mm の吸光度をモニタリングし、Mab F を含む画分を取得し、続いて $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターでろ過し F/T モードによる CEX 材料プール液とした。

[0137] 改良方法 4 における不純物クリアランスの結果を表 24 に示す。疎水性相互作用クロマトグラフィーによって Monomer 含量は増加した。活性炭材料プール液に残留した HCP 及び PLBL2 は、疎水性相互作用クロマトグラフィーによって除去され、特に PLBL2 は定量限界付近まで除去された。

[0138]

[表24]

表 2 4 改良方法 4 における不純物クリアランス (M a b F)

工程液	Monomer 含量 (%)	HCP 含量 (ng/mg)	PLBL2 含量 (ng/mg)
細胞培養上清	N. T.	2.87×10^{-5}	1.11×10^{-3}
アフィニティークロマトグラフィープール液	98.17	2.74×10^{-2}	4.21×10^{-2}
ウイルス不活化液	96.60	N. T.	N. T.
デプスフィルターろ過 プール液	97.15	8.61×10^{-1}	1.71×10^{-2}
活性炭材料プール液	97.77	7.75×10^{-1}	1.14×10^{-2}
HIC 材料プール液 (F/Tモード)	98.26	4.31×10^{-1}	6.50×10^{-1}
CEX 材料プール液 (F/Tモード)	98.60	< 10.52	6.60×10^{-1}

[0139] 2) 改良方法 4 による不純物クリアランス (M a b G)

本実施例は、表 2 3 に示される精製フローにおける M a b G と呼ばれるモノクローナル抗体の不純物クリアランスについて説明する。

[0140] M a b G を産生した CHO 細胞培養液について、デプスフィルターろ過により細胞を除去し、清澄化した。細胞培養上清を、K a n C a p A 樹脂を用いたプロテイン A クロマトグラフィーにより精製した。20 mM 塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (pH 7.5) でカラムを平衡化した後、培養上清をロードし、その後、1 M 塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (pH 7.5)、続いて 20 mM 塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー (pH 7.5) で洗浄を行った。酢酸バッファー (pH 3.6) で M a b G をカラムから溶出した。280 nm の吸光度をモニタリングし、M a b G を含む画分を取得した (アフィニティークロマトグラフィープール液)。アフィニティークロマトグラフィープール液に塩酸を加え、pH を 3.7 に調整し、1 時間、ウイルス不活化処理を行った。該工程は室温で実施した。1 時

間のウイルス不活化処理の後、トリス水溶液を用いてpH 5.0に中和した（ウイルス不活化液）。ウイルス不活化液を、予め酢酸バッファー（pH 5.0）で洗浄したデプスフィルター（Millistak+（登録商標）Pod A1HC）に約800g/m²で負荷し、続いて酢酸バッファー（pH 5.0）で押し出しを実施し、Mab Gを回収した（デプスフィルターろ過プール液）。デプスフィルターろ過プール液を、予め酢酸バッファー（pH 5.0）で洗浄した活性炭フィルター（Millistak+（登録商標）Pod CR40）に約700g/m²で負荷し、続いて酢酸バッファー（pH 5.0）で押し出しを実施し、0.2 μmのフィルターでろ過し、保存した（活性炭材料プール液）。予め注射用水、続いて酢酸バッファー（pH 5.0）で平衡化したPOROS Benzyl Ultraを充填したHICカラムに活性炭材料プール液を通液した。HICカラムへのローディング密度は約300g/L樹脂とした。ロード後、酢酸バッファー（pH 5.0）で押し出しを実施した。280mmの吸光度をモニタリングし、Mab Gを含む画分を取得し、F/TモードによるHIC材料プール液とした。予め1M塩化ナトリウムを含む酢酸バッファー（pH 5.0）、続いて酢酸バッファー（pH 5.0）で平衡化したPOROS XSを充填したCEXカラムにHIC材料プール液を通液した。CEXカラムへのローディング密度は約1300g/L樹脂と設定した。ロード後、酢酸バッファー（pH 5.0）で押し出しを実施した。280mmの吸光度をモニタリングし、Mab Gを含む画分を取得し、続いて0.2 μmのフィルターでろ過しF/TモードによるCEX材料プール液とした。

[0141] 改良方法4における不純物クリアランスの結果を表25に示す。疎水性相互作用クロマトグラフィーによってMonomer含量は増加した。活性炭材料プール液に残留したHCP及びPLBL2は、疎水性相互作用クロマトグラフィーによって除去され、特にPLBL2は定量限界付近まで除去された。

[0142]

[表25]

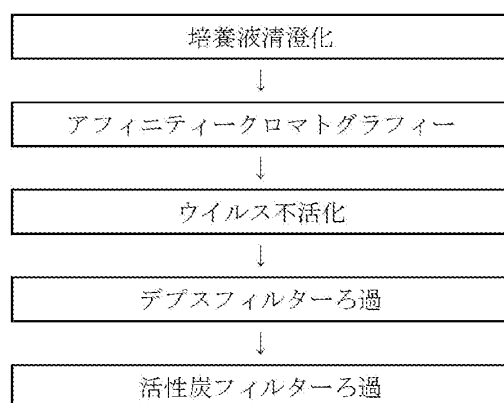
表25 改良方法4における不純物クリアランス (M a b G)

工程液	Monomer含量 (%)	HCP含量 (ng/mg)	PLBL2含量 (ng/mg)
細胞培養上清	N. T.	3.51×10^5	1.39×10^3
アフィニティークロマトグラフィーブール液	97.88	8.88×10^2	3.92×10^2
ウイルス不活性化液	96.90	N. T.	N. T.
デプスフィルターろ過ブール液	97.44	1.52×10^2	2.18×10^2
活性炭材料ブール液	97.94	9.76×10^1	1.53×10^2
HIC材料ブール液 (F/Tモード)	98.31	7.05×10^1	1.11×10^0
CEX材料ブール液 (F/Tモード)	98.62	5.05×10^0	1.03×10^0

[0143] 実施例8. 活性炭材料による不純物クリアランス (M a b A)

本実施例は、以下の表26に示される精製フローにおけるM a b Aと呼ばれるモノクローナル抗体の活性炭材料による不純物クリアランスについて説明する。

[0144] [表26]



[0145] 1) 材料及び方法

M a b Aを産生したCHO細胞培養液について、デプスフィルターろ過

により細胞を除去し、清澄化した。細胞培養上清を、K a n C a p A樹脂を用いたプロテインAクロマトグラフィーにより精製した。20 mM塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー（pH 7.5）でカラムを平衡化した後、培養上清をロードし、その後、1 M塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー（pH 7.5）、続いて20 mM塩化ナトリウムを含むリン酸バッファー（pH 7.5）で洗浄を行った。酢酸バッファー（pH 3.6）でM a b Aをカラムから溶出した。280 nmの吸光度をモニタリングし、M a b Aを含む画分を取得した（アフィニティークロマトグラフィープール液）。アフィニティークロマトグラフィープール液に塩酸を加え、pHを3.5に調整し、1時間、ウイルス不活化処理を行った。該工程は室温で実施した。1時間のウイルス不活化処理の後、トリス水溶液を用いてpH 5.0に中和した（ウイルス不活化液）。ウイルス不活化液を、予め酢酸バッファー（pH 5.0）で洗浄したデプスフィルター（M i l l i s t a k +（登録商標）P o d A 1 H C）に124 L/m²で負荷し、続いて酢酸バッファー（pH 5.0）で押し出しを実施し、M a b Aを回収した（デプスフィルターろ過プール液）。デプスフィルターろ過プール液を塩酸又はトリス水溶液によりpH 4.5、pH 5.0、pH 5.5、pH 6.0、pH 6.5、pH 7.0、pH 7.5に調整し、0.2 μmのフィルターでろ過し、保存した（pH調整活性炭材料ロード液）。デプスフィルターろ過プール液を限外ろ過・ダイアフィルトレーションにより電気伝導度2 mS/cm、4 mS/cm、5 mS/cm、6 mS/cm、8 mS/cm、10 mS/cmに調整し、0.2 μmのフィルターでろ過し、保存した（電気伝導度調整活性炭材料ロード液）。

- [0146] pH調整活性炭材料ロード液を予めロード液と同じpHの酢酸バッファー（pH 4.5、pH 5.0、pH 5.5、pH 6.0、pH 6.5、pH 7.0、pH 7.5）でそれぞれ洗浄した活性炭フィルター（M i l l i s t a k +（登録商標）P o d C R 4 0）に60 L/m²又は100 L/m²で負荷し、続いてロード液と同じpHの酢酸バッファー（pH 4.5、pH

5.0、pH 5.5、pH 6.0、pH 6.5、pH 7.0、pH 7.5)でそれぞれ押し出しを実施し、Mab Aを回収しpH調整活性炭材料プール液とした。電気伝導度調整活性炭材料ロード液を酢酸バッファー (pH 5.0)でそれぞれ洗浄した活性炭フィルター (Millistak+ (登録商標) Pod CR40) に60L/m²で負荷し、続いて酢酸バッファー (pH 5.0)でそれぞれ押し出しを実施し、Mab Aを回収し電気伝導度調整活性炭材料プール液とした。

[0147]

2) 結果

表26に示される精製フローのうち負荷量60L/m²の活性炭フィルターろ過における不純物クリアランスの結果を表27及び表28に示す。pH及び電気伝導度によりHCP除去率は大きな影響を受けなかった。PLBL2はpHが低いほど、又は電気伝導度が低いほど除去率が大きくなる傾向があった。浸出Protein AはpHが低いほど、除去率が大きくなる傾向にあった。MLV及びMMVはpHが低いほど、又は電気伝導度が低いほど除去率が大きくなる傾向があった。表26に示される精製フローで得られる活性炭材料ロード液のpH及び電気伝導度の条件は、活性炭フィルターろ過において高い不純物除去率を示す条件であることが確認された。

[0148] [表27]

表27 活性炭フィルターろ過におけるpHと不純物クリアランス (対数除去値)

pH	HCP	PLBL2	浸出Protein A	MLV	MMV
4.5	0.16	0.42	0.31	>2.43	1.69
5.0	0.25	0.27	0.24	2.74	2.31
5.5	0.16	0.09	0.12	1.19	1.94
6.0	0.16	0.03	0.16	1.38	1.19
6.5	0.17	0.07	0.05	1.56	0.56
7.0	0.17	0.07	0.05	1.00	0.19
7.5	0.17	0.00	0.01	1.06	0.25

[0149]

[表28]

表 28 活性炭フィルターろ過における電気伝導度と不純物クリアランス（対数除去値）

電気伝導度	HCP	PLBL2	浸出Protein A	MLV	MMV
2 mS/cm	0.20	0.93	>0.20	4.92	4.64
4 mS/cm	0.22	0.63	>0.09	5.24	5.14
5 mS/cm	0.18	0.51	>0.11	4.14	5.20
6 mS/cm	0.21	0.34	>0.16	3.77	4.36
8 mS/cm	0.16	0.24	>0.08	3.03	4.20
10 mS/cm	0.19	0.13	>0.06	3.04	4.22

産業上の利用可能性

[0150] 本発明の抗体精製法によって、精製期間を短縮した上で不純物を効率的に除去し、抗体をヒト治療用として使用するに十分な純度まで精製し、かつ製造コストを低減することが可能となった。

請求の範囲

- [請求項1] 抗体を一又は複数の不純物を含む組成物から精製するための手法であって、
- a 1. 抗体を含有する細胞培養上清を用意し、
 - b 1. 前記細胞培養上清をアフィニティークロマトグラフィー樹脂により処理して、抗体を含むアフィニティークロマトグラフィープール液を得、
 - c 1. 前記アフィニティークロマトグラフィープール液においてウイルスを不活化して、ウイルス不活化液を得、
 - d 1. 前記ウイルス不活化液を活性炭材料により処理して、活性炭材料プール液を得、
 - e 1. 前記活性炭材料プール液を陽イオン交換材料により処理して、陽イオン交換材料プール液を得る、
- の a 1. 乃至 e 1. の工程を含む方法。
- [請求項2] 抗体を一又は複数の不純物を含む組成物から精製するための手法であって、
- a 2. 抗体を含有する細胞培養上清を用意し、
 - b 2. 前記細胞培養上清をアフィニティークロマトグラフィー樹脂により処理して、抗体を含むアフィニティークロマトグラフィープール液を得、
 - c 2. 前記アフィニティークロマトグラフィープール液においてウイルスを不活化して、ウイルス不活化液を得、
 - d 2. 前記ウイルス不活化液をデプスフィルターにより処理して、デプスフィルターろ過プール液を得、
 - e 2. 前記デプスフィルターろ過プール液を活性炭材料により処理して、活性炭材料プール液を得、
 - f 2. 前記活性炭材料プール液を陽イオン交換材料により処理して、陽イオン交換材料プール液を得る、

の a 2. 乃至 f 2. の工程を含む請求項 1 に記載の方法。

- [請求項3] アフィニティークロマトグラフィー樹脂がプロテイン A 樹脂である請求項 1 又は 2 に記載の方法。
- [請求項4] プロテイン A 樹脂が、KanCapA、KanCapA3G、MabSelect SuRe、MabSelect SuRe pcc、MabSelect PrismA、又はAmsphere A3 である請求項 3 に記載の方法。
- [請求項5] ウイルス不活化が、酸、界面活性剤、化学物質、核酸架橋剤、紫外線、ガンマ線及び熱での処理からなる群から選択される少なくともいずれか一つである、請求項 1 乃至 4 のいずれか一つに記載の方法。
- [請求項6] ウイルス不活化が、アフィニティークロマトグラフィープール液の pH を 3 ～ 4 に低下させることを含む請求項 5 に記載の方法。
- [請求項7] ウイルス不活化中に、アフィニティークロマトグラフィープール液を 60 ～ 120 分間インキュベートする請求項 6 に記載の方法。
- [請求項8] ウイルス不活化中に、アフィニティークロマトグラフィープール液を 15 ～ 30℃でインキュベートする請求項 6 又は 7 に記載の方法。
- [請求項9] 活性炭材料にロードする溶液、活性炭材料の平衡化バッファー及び洗浄バッファーの pH が、4.5 ～ 7.5 である請求項 1 乃至 8 のいずれか一つに記載の方法。
- [請求項10] 活性炭材料にロードする溶液、活性炭材料の平衡化バッファー及び洗浄バッファーの pH が、4.5 ～ 5.5 である請求項 9 に記載の方法。
- [請求項11] 活性炭材料にロードする溶液、活性炭材料の平衡化バッファー及び洗浄バッファーの電気伝導度が、2 ～ 10 mS / cm である請求項 1 乃至 10 のいずれか一つに記載の方法。
- [請求項12] 活性炭材料にロードする溶液、活性炭材料の平衡化バッファー及び洗浄バッファーの電気伝導度が、2 ～ 5 mS / cm である請求項 11 に記載の方法。

- [請求項13] 活性炭材料による処理が、活性炭材料を含むフィルターを用いて行われる、請求項1乃至12のいずれか一つに記載の方法。
- [請求項14] フィルターが、Millistak+ Pod CR40、Zetaplus 活性炭吸着デプスフィルター、又はSUPRAcap 50 Seitz AKS filterである請求項13に記載の方法。
- [請求項15] 陽イオン交換材料に対し、活性炭材料プール液が、該陽イオン交換材料の吸着容量を超えてロードされる請求項1乃至14のいずれか一つに記載の方法。
- [請求項16] 陽イオン交換材料に対する活性炭材料プール液のローディング密度が、500～2000 g/Lである請求項15に記載の方法。
- [請求項17] 陽イオン交換材料に対する活性炭材料プール液のローディング密度が1000～1500 g/Lである請求項16に記載の方法。
- [請求項18] 陽イオン交換材料が、樹脂、モノリスカラム、又は膜である請求項1乃至17のいずれか一つに記載の方法。
- [請求項19] 陽イオン交換材料の官能基が、スルホプロピル、スルホエチル、スルホイソブチル、又はカルボキシルである請求項18に記載の方法。
- [請求項20] 陽イオン交換材料が、POROS XS、Eshmuno CPX、Eshmuno CP-FT、又はCaptos ImpActである請求項19に記載の方法。
- [請求項21] 陽イオン交換材料にロードする溶液のpHが、4～6である請求項1乃至20のいずれか一つに記載の方法。
- [請求項22] 陽イオン交換材料にロードする溶液のpHが、4.5～5.5である請求項21に記載の方法。
- [請求項23] 陽イオン交換材料にロードする溶液の電気伝導度が、3～7 mS/cmである請求項1乃至22のいずれか一つに記載の方法。
- [請求項24] 陽イオン交換材料にロードする溶液の電気伝導度が、3～5 mS/cmである請求項23に記載の方法。

- [請求項25] 陽イオン交換材料プール液を、さらに疎水性相互作用クロマトグラフィーにより処理して、プール液を得る請求項1乃至24のいずれか一つに記載の方法。
- [請求項26] 疎水性相互作用クロマトグラフィーが、フロースルーモードである請求項25に記載の方法。
- [請求項27] 疎水性相互作用クロマトグラフィーが、樹脂又は膜を用いて実施される請求項26に記載の方法。
- [請求項28] 疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂又は膜が、Phenyl基、Benzyl基又はHexyl基を有する請求項27に記載の方法。
- [請求項29] 疎水性相互作用クロマトグラフィー材料が、POROS Benzyl Ultra、POROS Benzyl、Hexyl-650C、Phenyl Sepharose 6 Fast Flow、Phenyl Sepharose High Performance、Sartobind Phenyl又はReady To Process Adsorber Phenylである請求項28に記載の方法。
- [請求項30] 活性炭材料プール液を、疎水性相互作用クロマトグラフィーにより処理して、プール液を得、さらに陽イオン交換材料により処理して、プール液を得る請求項1乃至14のいずれか一つに記載の方法。
- [請求項31] 疎水性相互作用クロマトグラフィーが、フロースルーモードである請求項30に記載の方法。
- [請求項32] 疎水性相互作用クロマトグラフィーが、樹脂又は膜を用いて実施される請求項31に記載の方法。
- [請求項33] 疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂又は膜が、Phenyl基、Benzyl基又はHexyl基を有する請求項32に記載の方法。
- [請求項34] 疎水性相互作用クロマトグラフィー材料が、POROS Benz

yl Ultra、POROS Benzyl、Hexyl-650C、Phenyl Sepharose 6 Fast Flow、Phenyl Sepharose High Performance、Sartobind Phenyl又はReady To Process Adsorber Phenylである請求項33に記載の方法。

- [請求項35] 陽イオン交換材料に対し、疎水性相互作用クロマトグラフィープール液が、該陽イオン交換材料の吸着容量を超えてロードされる請求項30乃至34のいずれか一つに記載の方法。
- [請求項36] 陽イオン交換材料に対する疎水性相互作用クロマトグラフィープール液のローディング密度が、500～2000g/Lである請求項35に記載の方法。
- [請求項37] 陽イオン交換材料に対する疎水性相互作用クロマトグラフィープール液のローディング密度が1000～1500g/Lである請求項36に記載の方法。
- [請求項38] 陽イオン交換材料が、樹脂、モノリスカラム、又は膜である請求項30乃至37のいずれか一つに記載の方法。
- [請求項39] 陽イオン交換材料の官能基が、スルホプロピル、スルホエチル、スルホイソブチル、又はカルボキシルである請求項38に記載の方法。
- [請求項40] 陽イオン交換材料が、POROS XS、Eshmuno CPX、Eshmuno CP-FT、又はCaptos ImpActである請求項39に記載の方法。
- [請求項41] 陽イオン交換材料にロードする溶液のpHが、4～6である請求項30乃至40のいずれか一つに記載の方法。
- [請求項42] 陽イオン交換材料にロードする溶液のpHが、4.5～5.5である請求項41に記載の方法。
- [請求項43] 陽イオン交換材料にロードする溶液の電気伝導度が、3～7mS/cmである請求項30乃至42のいずれか一つに記載の方法。

- [請求項44] 陽イオン交換材料にロードする溶液の電気伝導度が、3～5 mS/cmである請求項43に記載の方法。
- [請求項45] 少なくとも一つの不純物が、宿主細胞由来タンパク質 (H o s t c e l l p r o t e i n ; H C P) 、 p h o s p h o l i p a s e B - l i k e 2 (P L B L 2) 、 ウィルス、ウィルス様粒子、高分子量体 (h i g h m o l e c u l a r w e i g h t s p e c i e s ; H M W S) 、 低分子量体 (l o w m o l e c u l a r w e i g h t s p e c i e s ; L M W S) 、 培地成分、浸出プロテインA及び／又はDNAからなる群から選択される請求項1乃至44のいずれか一つに記載の方法。
- [請求項46] 工程が連続的である請求項1乃至45のいずれか一つに記載の方法。
- [請求項47] 請求項1乃至46のいずれか一つに記載の方法によって精製された抗体。