

(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2010-503683

(P2010-503683A)

(43) 公表日 平成22年2月4日(2010.2.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/00 (2006.01)	C07K 14/00	4C084
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 37/02	4H045
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	N
A01K 67/027 (2006.01)	A01K 67/027	
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁)

(21) 出願番号 特願2009-528327 (P2009-528327)
 (86) (22) 出願日 平成19年9月17日 (2007.9.17)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年5月12日 (2009.5.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/020128
 (87) 国際公開番号 W02008/033556
 (87) 国際公開日 平成20年3月20日 (2008.3.20)
 (31) 優先権主張番号 60/844,996
 (32) 優先日 平成18年9月15日 (2006.9.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507344520
 バロフォールド, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 コロラド 80301,
 ボールダー, 38ティールエイチ スト
 リート 1745
 (74) 代理人 100079108
 弁理士 稲葉 良幸
 (74) 代理人 100109346
 弁理士 大貫 敏史
 (72) 発明者 ランドルフ, セオドール, ダブリュー,
 アメリカ合衆国, コロラド州 80503
 , ニウオット, ウエスト サセックス コ
 ート 7916

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫原性低下のためのタンパク質の高圧処理

(57) 【要約】

【課題】 低下した免疫原性を有するタンパク質組成物、およびかかる組成物を生成するための方法を提供する。

【解決手段】

単離されたタンパク質および薬学的に許容される担体を含むことを特徴とする低下した免疫原性を有する高圧処理された治療タンパク質組成物。

【選択図】 図1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離されたタンパク質および薬学的に許容される担体を含むことを特徴とする低下した免疫原性を有する高圧処理された治療タンパク質組成物。

【請求項 2】

前記治療タンパク質組成物に対する個体の免疫応答は、高圧による処理を有しない同一のタンパク質の組成物に対する免疫応答と比較して少なくとも50%低下することを特徴とする請求項1に記載の治療タンパク質組成物。

【請求項 3】

前記タンパク質は前記個体の種に内因性であることを特徴とする請求項2に記載の治療タンパク質組成物。

10

【請求項 4】

前記タンパク質組成物は、高圧処理後の総タンパク質の割合として、約10%未満の凝集したタンパク質を含有することを特徴とする請求項1に記載のタンパク質組成物。

【請求項 5】

前記タンパク質組成物は、高圧処理後の総タンパク質の割合として、約5%未満の凝集したタンパク質を含有することを特徴とする請求項1に記載のタンパク質組成物。

【請求項 6】

前記タンパク質組成物は、高圧処理後の総タンパク質の割合として、約1%未満の凝集したタンパク質を含有することを特徴とする請求項1に記載のタンパク質組成物。

20

【請求項 7】

前記凝集したタンパク質の量は、分析超遠心分離法、サイズ排除クロマトグラフィー、フィールドフローフラクシオネーション、光散乱、光遮蔽、蛍光分光、ゲル電気泳動、GEMMA分析、および核磁気共鳴分光法から構成される群から選択される方法によって測定されることを特徴とする請求項5に記載のタンパク質組成物。

【請求項 8】

タンパク質組成物であって、単離されたタンパク質および薬学的に許容される担体を含み、前記タンパク質をコードする導入遺伝子を有するトランスジェニック動物において、高圧によって処理された治療タンパク質組成物に対する免疫応答が、高圧による処理前の同一タンパク質の組成物に対する前記免疫応答と比較して少なくとも約50%低下したことを特徴とするタンパク質組成物。

30

【請求項 9】

タンパク質組成物であって、単離されたタンパク質および薬学的に許容される担体を含み、前記タンパク質に対して誘導された寛容を有する動物において、高圧によって処理された治療タンパク質組成物に対する免疫応答が、高圧による処理前の同一タンパク質の組成物に対する前記免疫応答と比較して少なくとも約50%低下することを特徴とするタンパク質組成物。

【請求項 10】

前記寛容は、前記タンパク質への新生仔期曝露によって誘導されることを特徴とする請求項9に記載のタンパク質組成物。

40

【請求項 11】

高圧によって処理された前記タンパク質組成物は、高圧を用いた処理前の前記タンパク質組成物よりも少なくとも約50%低い可溶性凝集体濃度を有することを特徴とする請求項1に記載の組成物。

【請求項 12】

請求項1に記載の組成物を含む治療タンパク質製剤を、投与のために調製する方法であって、

a) 前記治療タンパク質製剤を、高圧および凝集体形成を誘導しない溶液条件に供するステップと、

b) 圧力を開放するステップと、

50

c) 個体に前記治療タンパク質製剤を投与するステップと、
を備えることを特徴とする方法。

【請求項 13】

前記高圧は、約 1000 パールと 3500 パールとの間であることを特徴とする請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記治療タンパク質製剤は、前記圧力の開放から約 6 ヶ月以内に前記個体に投与されることを特徴とする請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記高圧または溶液条件は、高圧の大きさ、高圧力処理の期間、タンパク質濃度、温度、pH、イオン強度、カオトロブ濃度、界面活性剤濃度、緩衝液濃度、および優先的に排除する化合物の濃度から選択される条件を含むことを特徴とする請求項 12 に記載の方法。

10

【請求項 16】

高圧によって処理された前記治療タンパク質組成物に対する前記個体の免疫応答が、高圧による処理前の同一タンパク質の組成物に対する前記個体の前記免疫応答と比較して少なくとも約 50% 低下することを特徴とする請求項 12 に記載の方法。

【請求項 17】

高圧によって処理された前記治療タンパク質組成物は、高圧を用いた処理前の前記治療タンパク質組成物よりも少なくとも約 50% 低い可溶性凝集体濃度を有することを特徴とする請求項 12 に記載の方法。

20

【請求項 18】

高圧処理されたタンパク質の免疫原性を、高圧で処理されていない同一のタンパク質と比較する方法であって、

a) 前記タンパク質の溶液を高圧処理に供するステップと、

b) ステップ a の前または後に、前記高圧処理されたタンパク質が既に薬学的に許容される担体に入っていない場合は、かかる担体に担持するステップと、

c) 前記高圧処理されたタンパク質を第 1 の個体に投与するステップと、

d) 前記方法の任意の時点で、前記高圧処理されたタンパク質が既に薬学的に許容される担体中に存在していない場合は、かかる担体に担持するステップと、

30

e) 前記薬学的に許容される担体に担持するステップの後の前記方法における任意の時点で、前記高圧処理されていないタンパク質を第 2 の個体に投与するステップと、

f) 前記第 1 の個体の免疫応答を前記第 2 の個体と比較するステップと、を備え

、前記第 2 の個体と比較して低下した前記第 1 の個体の前記免疫応答は、前記高圧処理されたタンパク質が低下した免疫原性を有することを示唆することを特徴とする方法。

【請求項 19】

前記免疫応答は、抗体レベルもしくは抗体力価、Biacore アッセイ、または臨床的な免疫反応によってアッセイが行われることを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記第 1 および第 2 の個体は、トランスジェニック動物および前記方法において用いられる前記タンパク質を発現する導入遺伝子であることを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

40

【請求項 21】

前記第 1 および第 2 の個体は、前記方法において用いられる前記タンパク質に寛容化されることを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

前記高圧処理されたタンパク質を前記第 1 の個体に投与するステップは、高圧の開放から少なくとも約 6 ヶ月後に行われることを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、高圧を加えることにより、低下した免疫原性を有するタンパク質治療薬を生成するための方法、およびかかるタンパク質を含有する組成物に関連する。より具体的には、本発明は組換えタンパク質に関連する。

【背景技術】

【0002】

本非仮特許出願は、米国特許法119条(e)に基づき、2006年9月15日に出願された米国仮特許出願番号第60/844,996号、発明の名称「HIGH PRESSURE TREATMENT OF PROTEINS FOR REDUCED IMMUNOGENICITY (免疫原性低下のためのタンパク質の高圧処理)」の優先権を主張するものであり、該仮特許出願の全体は、参照することにより本明細書に援用される。

10

【0003】

治療タンパク質は、ヒト疾患の治療に膨大な可能性を提供する。現在、数多くのタンパク質治療薬が入手可能であり、さらに多くの治療薬が臨床開発中である。残念ながら、タンパク質の凝集は、組換えタンパク質生成の全段階、特に、発酵、精製、および長期保存中において生じる共通した問題である (Schwarz, E., H. Lilie, et al. (1996), *Biological Chemistry* 377(7-8): 411-416; Carpenter, J.F., M.J. Pikal, et al. (1997), *Pharmaceutical Research* 14(8): 969-975; Baneyx, F. (1999), *Current Opinion in Biotechnology* 10(5): 411-421; Clark, E.D. (2001), *Current Opinion in Biotechnology* 12(2): 202-207; Chi, E.Y., S. Krishnan, et al. (2003), *Protein Science* 12(5): 903-913)。タンパク質の凝集は、天然タンパク質の立体構造の不安定性またはタンパク質間相互作用と関連するコロイドの不安定性によって開始される特異的な経路を介して進行する。温度、溶液pH、配位子および共存溶質、塩の種類および濃度、保存剤、ならびに界面活性剤等の条件のすべてが、タンパク質構造やタンパク質間相互作用、ひいては凝集傾向を調節する。

20

30

【0004】

天然タンパク質の不安定性から形成する凝集体については、拡張された立体構造を示す天然の状態に存在するタンパク質構造から凝集体が形成し得ると考えられ、また多くの場合、非特異的な疎水性相互作用の結果であると考えられる (Kendrick, B.S., J.F. Carpenter, et al. (1998), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(24): 14142-14146; Kim, Y.S., J.S. Wall, et al. (2000), *Journal of Biological Chemistry* 275(3): 1570-1574)。そのため、凝集の転移状態と比較して、凝集は、天然タンパク質の立体構造の安定性によって制御することができる。近頃、熱力学的に天然の立体構造を大いに好む溶液条件においてさえも、コロイドの不安定性により、タンパク質が凝集体を形成することが可能であるということも報告されている (Chi, E.Y., S. Krishnan, et al. (2003), *Protein Science* 12(5): 903-913)。これらの分子集合反応は、分子間引力の結果である。例えば、pH7.0のGCSFは、大きなグアンフォールディングを有することが実証されているが、タンパク質は、求引性の静電気相互作用から生じるコロイドの不安定性により、容易に凝集する (Chi, E.Y., S. Krishnan, et al. (2003), *Protein Science* 12(5): 903-913)。すべてのタンパク質中に無数の凝集機構が存在するため、タンパク質の凝集が、体内および体外の両方におけるタンパク

40

50

質処理のすべての側面における広範な問題であることは、驚くに値しない。

【0005】

可溶性のタンパク質凝集体は、免疫系から「自然」であると認識されないことが多く（恐らくは、非凝縮タンパク質中で曝露されない凝集体中のタンパク質上にある新しいエピトープの曝露によるものであるか、または恐らくは、新しい、認識されないエピトープの凝集体における形成による）、その結果として、投与される組換えタンパク質凝集体に免疫系が感作される。多くの場合、免疫系は、タンパク質の治療効果を中和しない、凝集体に対する結合抗体を生成する。しかし、場合によっては、組換えタンパク質に結合して治療作用を妨げ、結果的に治療の有効性を低下させる抗体が生成されることがある。さらに、場合によっては、組換えタンパク質の反復投与が、急性および慢性の免疫学的反応を引き起こす可能性がある（Schellekens, H., *Nephrol. Dial. Transplant.* 18:1257 (2003); Schellekens, H., *Nephrol. Dial. Transplant.* 20 [Suppl 6]:vi3-vi9 (2005); Purohit et al. *J. Pharm. Sci.* 95:358 (2006) を参照）。

10

【0006】

免疫系の発達期には、個体自身のタンパク質に対する寛容が発達するため、免疫系は、通常体内に存在する抗原を攻撃しなくなる（Singh et al., *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2:44 (2006)）。この「自己成分」に対する特異的な免疫寛容の状態は、中枢および末梢の両方の機構に関係する。中枢寛容（陰性選択）は、胸腺内に常在しながら、強い細胞間シグナル伝達を受信する未熟なT細胞によるものであり、自己反応性細胞のクローン除去をもたらす。末梢寛容は、胸腺とは対照的に、T細胞が機能的に成熟したと推察され、免疫系が末梢に存在する抗原に対して未反応になった時に生じる。末梢寛容は、抗原特異的サブレッサー細胞または能動的な寛容の他の手段の発達、クローン除去、およびアネルギーを含む様々な機構の結果であると提案されている。自己反応性細胞は、寛容化する抗原を認識した後、アポトーシスの誘導により物理的に除去される可能性があるか、除去されずにアネルギーになる可能性があるか、または調節サイトカインもしくは細胞によって機能的に阻害される可能性がある。

20

【0007】

寛容の喪失または「破壊」は、急性および慢性の免疫反応および自己免疫疾患の発症を含む、深刻な影響を及ぼす可能性がある。組換えタンパク質の反復投与の際に、寛容が破壊され、組換えタンパク質に対して生成された免疫応答が個体の内因性タンパク質と交差反応する時に、破壊的な免疫反応が生じ得る。自己寛容の破壊の機構は、ヒトインターフェロン γ に免疫寛容であるトランスジェニックマウス中に示された。組換えヒトインターフェロン γ 2bの凝集体を含有する製剤をマウスに投与した時、マウスは、用量依存的にインターフェロン γ 2に対する寛容を喪失した（Hermeling et al., *J. Pharm. Sci.* 95:1084 (2006) を参照）。

30

【0008】

内因的に生成されるタンパク質に対する寛容の喪失は、組換えエリスロポエチン製剤を使用する患者において既に認められている。欧州においてEPREX（登録商標）という商標の下に販売されている、特定のエリスロポエチン製剤（Johnson & Johnson, New Brunswick, New Jersey）は、自身の内因性エリスロポエチンのために患者の免疫寛容を破壊し、抗体による赤芽球癆（PRCA）を引き起こすことが分かっている。赤血球生成における欠陥を矯正するために投与された外因性エリスロポエチン製剤は、抗体を生成するために患者の免疫系を呼び覚まし、赤血球の分化において完全なブロックの原因となる内因的に生成されたエリスロポエチンを中和した。免疫応答の原因としては、凝集体等の他の要因も関係していた可能性もあったものの、エリスロポエチンとアジュバントを形成した製剤中の浸出液（Boven et al., *Nephrol. Dial. Transplant.* 20 Suppl 3:iii33 (2005)）によるものと考えられてきた（Schellekens and Jis

40

50

koot, Nature Biotech. 24:613 (2006)。

【0009】

可溶性凝集体をタンパク質治療薬から除去するための方法は、治療タンパク質の安全性に著しく貢献するであろう。タンパク質をリフォールディングする1つの方法は、タンパク質を脱凝集し、アンフォールディングし、そして適切にフォールディングするために、タンパク質の溶液に高圧を用いる。かかる方法は、米国特許第6,489,450号、米国特許出願公開第2004/0038333号、および国際特許出願WO第02/062827号に記載される。それらの開示は、生物学的活性を保持する脱凝集したタンパク質を高収率で回収する結果となった(すなわち、生物学的活性に必要なように、適切にタンパク質がフォールディングされた)凝集タンパク質またはミスフォールドしたタンパク質の、特定の高圧処理について述べている。米国特許第6,489,450号、米国特許第2004/0038333号、および国際特許出願WO第02/062827号は、参照することにより、その全体が本明細書に援用される。

10

【0010】

しかしながら、下の例に示すように、モノマー含有量の高いタンパク質製剤中の可溶性凝集体の減少または排除に有利な条件は、高度に凝集した溶液から最大収率のタンパク質を回収するために有利な条件とは類似していない可能性がある。この特徴は、多くの溶液条件において圧力処理がモノマー種の凝集を誘導することができる、という一般的な見解から生じる(Ferrao-Gonzales, A.D., S.O. Souto, et al. (2000), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(12):6445-6450, Kim, Y.S., T.W. Randolph, et al. (2002), Journal of Biological Chemistry 277(30):27240-27246, Seefeldt, M.B., Y.S. Kim, et al. (2005), Protein Science 14(9):2258-2266, Dzwolak, W. (2006), Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins And Proteomics 1764(3):470-480, Grudzielanek, S., V. Smirnovas, et al. (2006), Journal Of Molecular Biology 356(2):497-509, Kim, Y.S., T.W. Randolph, et al. (2006), High-pressure studies on protein aggregates and amyloid fibrils. Amyloid, Prions, And Other Protein Aggregates, Pt C. 413:237-253)。処理によって誘導される凝集体に関する以前の研究は、>90%の組成で凝集体を含む溶液を検査するという結果に終わっている(Foguel, D., C.R. Robinson, et al. (1999), Biotechnology and Bioengineering 63(5):552-558, Randolph, T.W., M. Seefeldt, et al. (2002), Biochimica Et Biophysica Acta

20

30

40

a-Protein Structure and Molecular Enzymology 1595(1-2):224-234, Lefebvre, B.G., N.K. Comolli, et al. (2004), Protein Science 13(6):1538-1546, Seefeldt, M.B. (2005), High pressure refolding of protein aggregates: Efficacy and thermodynamics, Doctoral thesis. Department of Chemical and Biological Engineering. Boulder, CO, University of Colorado; Seefeldt, M.B., C. Crouch, et al. (2006), Journal of Biotechnology and Bioen

50

gineering In Press,)。必然的に、より少ない凝集体を有する、よりモノマー性である物質を含む溶液の凝集体解離について、高圧リフォールディングの結果は発表されていない。これらの溶液は、患者における免疫原性をもたらず溶液のさらに典型的なものである。高圧がモノマー物質に凝集体を誘導することが明らかとなっているため、この相違は有意であり、かつ新規性を付与するものである (Ferrao - Gonzales, A. D., S. O. Souto, et al. (2000), Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 97(12): 6445 - 6450, Kim, Y. S., T. W. Randolph, et al. (2002), Journal of Biological Chemistry 277(30): 27240 - 27246, Seefeldt, M. B., Y. S. Kim, et al. (2005), Protein Science 14(9): 2258 - 2266, Dzwolak, W. (2006), Biochimica Et Biophysica Acta - Proteins And Proteomics 1764(3): 470 - 480, Grudzielanek, S., V. Smirnovas, et

10

al. (2006), Journal Of Molecular Biology 356(2): 497 - 509, Kim, Y. S., T. W. Randolph, et al. (2006), High-pressure studies on protein aggregates and amyloid fibrils. Amyloid, Prions, And Other Protein Aggregates, Pt C. 413: 237 - 253)。

20

【0011】

より多くの組換えヒトタンパク質が市場で入手可能となり、免疫原性の問題が増加してきている。治療タンパク質に対して形成される抗体は、有効性の喪失および必要不可欠な生物学的機能を有する内因性タンパク質の中和等、深刻な臨床影響をもたらす可能性がある (Hermeling, S., D. J. A. Crommelin, et al. (2004), Pharmaceutical Research 21(6): 897 - 903)。アミノ酸配列、グリコシル化、化学的分解、および物理的分解等、治療タンパク質の処理後に免疫原性の発達をもたらす可能性のある数多くの要因が存在する (Hermeling, S., D. J. A. Crommelin, et al. (2004), Pharmaceutical Research 21(6): 897 - 903)。アミノ酸配列およびグリコシル化に関連する免疫原性は種特異的であり、したがって、組換え技術を用いたヒトタンパク質を確実に患者に服用させることにより改変され得る。結果として、化学的および物理的分解が、依然としてタンパク質治療薬から免疫原性を発達させる主要な基盤となっている。

30

【0012】

治療タンパク質投与の結果としての免疫原性に関するデータ量は少ないが、その件数は増加している (Braun, A., L. Kwee, et al. (1997), Pharmaceutical Research 14: 1472 - 1478; Schellekens, H. (2002), Nature Reviews 1(6): 457 - 462; Schellekens, H. (2003), Nephrol Dial Transplant 18: 1257 - 1259; Deisenhammer, F., H. Schellekens, et al. (2004), J Neurol 251: 31 - 39; Hermeling, S., D. J. A. Crommelin, et al. (2004), Pharmaceutical Research 21(6): 897 - 903)。タンパク質治療薬の投与後に患者に発生する免疫応答の出現率についての検討は、インスリン、第VII因子、エボジェン、成長ホルモン、インターフェロン およびインターフェロン 1bを含む (Moore, W. and P. Leppert (1980), Journal of Clinical Endocrinology

40

50

and Metabolism 51:691-697; Runkel, L., W. Meier, et al. (1998), Pharmaceutical Research 15(4):641-649; Schellekens, H. (2003), Nephrol Dial Transplant 18:1257-1259; Hermeling, S., D. J. A. Crommelin, et al. (2004), Pharmaceutical Research 21(6):897-903; Hermeling, S., W. Jiskoot, et al. (2005), Pharmaceutical Research 22(6):847-851; Hermeling, S., H. Schellekens, et al. (2006), Journal Of Pharmaceutical Sciences 95(5):1084-1096)。凝集体形成の結果としての免疫原性は、インターフェロン および 1bのネズミ科動物モデルおよび本明細書に示す実施例の試験を用いて、さらにモデル化されてきた (Braun

, A., L. Kwee, et al. (1997), Pharmaceutical Research 14:1472-1478; Hermeling, S., W. Jiskoot, et al. (2005), Pharmaceutical Research 22(6):847-851; Hermeling, S., H. Schellekens, et al. (2006), Journal Of Pharmaceutical Sciences 95(5):1084-1096)。

【0013】

凝集体は免疫応答を引き起こし得る、という知識にもかかわらず、治療タンパク質中に存在する凝集体を除去することは自明ではない。そのプロセス自体が、凝集を誘導する可能性がある。タンパク質治療薬を生成する間の、無数の潜在的な凝集経路の検討は、Chi, E. Y., S. Krishnan, et al. (2003), Protein Science 12(5):903-913に提供されている。多くの凝集体は、正しい処理工程を用いることにより除去することができるが、100%の純度を持たせることは難しい。また、タンパク質が界面活性であり、膜を横断して移動するタンパク質として凝集が誘導される場合もある (Maa, Y. F. and C. C. Hsu (1998), Journal Of Pharmaceutical Sciences 87(7):808-812)。処理中の凝集体は、下流の処理工程を妨害し、純度の低い産物をもたらす可能性がある (Sin, S. C., H. Baldascini, et al. (2006), Bioprocess And Biosystems Engineering 28(6):405-414)。

【0014】

高圧処理は、凝集を誘導する可能性がある濾過または精製を伴わないので、タンパク質凝集体の除去に効果的なプロセスを提供する。しかしながら、条件は、凝集体を解離している間はモノマーの凝集を誘導しない(いずれの形態においても)と同定されなければならない。当業者は、高収率のためには、90%以上の凝集体を含む溶液をリフォールディングすることを予期するであろう。それとは反対に、モノマー物質が最初に存在する場合には、その条件で低レベルの凝集体を含有する溶液を提供することはできないため、条件は下流の処理溶液についても実用的である必要がある。

【0015】

本発明は、一部分において、組換えタンパク質製剤、中でも比較的モノマー含有量の高い組換えタンパク質の製剤、および実質的には可溶性凝集体を含んでいない組換えタンパク質の製剤における、可溶性凝集体の問題を軽減するための高圧技術の使用に関する。

【0016】

低下した免疫原性を有するタンパク質治療薬は、少なくとも、これらの課題のうちのいくつかに対処するであろう。また、逆に免疫原性を低下するタンパク質治療薬から可溶性凝集体を除去するための方法は、安全性、生物活性の増大、および治療タンパク質の有効性の増加に著しく貢献するであろう。このことおよび当該技術分野において既知である

最新技術を所与とすると、免疫原性を低下するプロセスは本業界にジレンマを与える。本発明は、これらの問題に対処し、組換えタンパク質治療薬の技術分野における進歩および改良を提供する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

本発明は、タンパク質治療薬、より具体的には、組換えタンパク質治療薬における免疫原性の低下に、特に効果的かつ効率的な方法を提供する。本発明は、高圧処理の使用を採用することにより、タンパク質治療薬の免疫原性および関連する困難を克服するための経路を提供する。これらの方法は、本来ならば生物活性、有効性、免疫原性等に関連するであろう問題を回避しつつ、高品質な組換えタンパク質治療薬の生成を可能にする。当該方法は、組換えタンパク質に関する処理効果および治療効果を有利に提供する。

10

【0018】

高圧リフォールディングは、概して天然タンパク質の立体構造を好む「圧力ウィンドウ」内の条件で発生すると同定されてきた。しかしながら、90%を上回る凝集体を含むリフォールディング溶液についての条件には、モノマー溶液中で凝集を誘導するものもあるため、モノマーを完全に安定させる条件を同定することは困難である。高圧が多くのタンパク質の種類においてモノマー物質に凝集体を誘導することが明らかになっているため、本発明のこの特徴は有意かつ新規である (Ferrao - Gonzales, A. D., S. O. Souto, et al. (2000), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(12): 6445 - 6450; Kim, Y. S., T. W. Randolph, et al. (2002), Journal of Biological Chemistry 277(30): 27240 - 27246; Seefeldt, M. B., Y. S. Kim, et al. (2005), Protein Science 14(9): 2258 - 2266; Dzwolak, W. (2006), Biochimica Et Biophysica Acta - Proteins And Proteomics 1764(3): 470 - 480; Grudzielanek, S., V. Smirnovas, et al. (2006), Journal Of Molecular Biology 356(2): 497 - 509; Kim, Y. S., T. W. Randolph, et al. (2006), High-pressure studies on protein aggregates and amyloid fibrils. Methods in Enzymology: Amyloid, Prions, And Other Protein Aggregates, Pt C. 413: 237 - 253)。本発明は、いかなるモノマーも凝集することなく、凝集体を解離する条件を同定する。

20

30

【課題を解決するための手段】

【0019】

具体的には、本発明は、治療タンパク質製剤中のタンパク質凝集体を減少する方法と、かかる方法で処理したタンパク質製剤とを包含する。一実施形態においては、本発明は、タンパク質製剤を高静水圧に一定の期間供するステップと、圧力を大気圧まで下げるステップとを備え、該タンパク質製剤は高圧処理前のタンパク質製剤と比較して低下した免疫原性を有する、凝集体を含有する疑いのあるタンパク質製剤を処理する方法を備える。別の実施形態では、タンパク質製剤は治療タンパク質製剤である。

40

【0020】

モノマー含有量が高い(例えば、モノマー約80%またはモノマー約80%を上回る、モノマー約90%またはモノマー約90%を上回る、モノマー約95%またはモノマー約95%を上回る、モノマー約98%またはモノマー約98%を上回る)または凝集体含有量が比較的低い(例えば、約20%の凝集体含有量または約20%を下回る凝集体含有量、約10%の凝集体含有量または約10%を下回る凝集体含有量、約5%の凝集体含有

50

量または約 5 % を下回る凝集体含有量、約 2 % の凝集体含有量または約 2 % を下回る凝集体含有量) 多くの治療タンパク質の製剤において、リフォールディング条件の無分別な選択は、実際に凝集体含有量を増加させることになりかねないため、凝集体を減少するための条件は慎重に選択されなければならない。したがって、一実施形態においては、本発明は、凝集を誘導しない高圧条件に製剤を供するステップを備える、モノマー含有量の高いまたは凝集体含有量の低いタンパク質の製剤において、凝集体含有量を減少するまたはモノマー含有量を増加する方法を包含し、上記条件は、高圧値、高圧処理の期間、タンパク質の濃度、温度、pH、イオン強度、カオトロブ濃度、界面活性剤濃度、緩衝液濃度、優先的な排除化合物の濃度、または本明細書に記載されるその他の溶液パラメータを含む。一実施形態においては、モノマー含有量の高いまたは凝集体含有量の低いタンパク質製剤において、凝集体含有量を減少するまたはモノマー含有量を増加する方法は、タンパク質の精製が完了した後、つまり、タンパク質が治療薬として使用するための所望の純度レベルに到達した後に行われる(純度は、対象となるタンパク質以外の望ましくない成分を指すものであって、対象のタンパク質の凝集体を指すものではない)。

10

20

30

40

50

【0021】

本発明の一実施形態においては、治療タンパク質製剤中の可溶性凝集体は、高圧法で処理されると、高圧法で処理されていない同一のタンパク質の製剤と比較して少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、または少なくとも約 99 % 減少される。本発明の別の実施形態では、治療タンパク質製剤中の可溶性凝集体は、高圧法で処理されると、高圧法で処理されていない同一タンパク質の製剤と比較して検出不可能なレベルまで減少される。

【0022】

本発明の別の実施形態では、高圧法で処理される前のタンパク質の初期製剤と比較して、治療タンパク質製剤中の可溶性凝集体を少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 25 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、または少なくとも約 99 % 減少するために、少なくとも約 80 % のモノマー含有量を有する初期の治療タンパク質製剤が、本発明の高圧法で処理される。本発明の別の実施形態では、少なくとも約 80 % のモノマー含有量を有する初期の治療タンパク質製剤中の可溶性凝集体は、高圧法で処理されると、高圧法で処理される前のタンパク質の初期の製剤と比較して検出不可能なレベルまで減少される。

【0023】

別の実施形態では、本発明は、高圧によって処理された治療タンパク質製剤、および高圧によって処理された治療タンパク質製剤を作製する方法を包含し、該治療タンパク質製剤は、高圧によって処理されていない同一のタンパク質の製剤に対する免疫応答と比較して、タンパク質組成物を必要とする固体に該タンパク質組成物を投与した後のタンパク質に対して低下したまたは検出不可能な免疫応答を引き起こす。本発明の一実施形態においては、本発明は、高圧によって処理された治療タンパク質製剤、および高圧によって処理された治療タンパク質製剤を作製する方法を包含し、高圧によって処理された治療タンパク質製剤に対する免疫応答は、高圧によって処理されていない同一のタンパク質の製剤に対する免疫応答と比較して、少なくとも約 50 % 減少される。一実施形態においては、高圧によって処理された治療タンパク質製剤と、高圧によって処理されていない同一のタンパク質の製剤との唯一の相違は、圧力処理そのものであり、高圧処理は、高度にモノマー性であるタンパク質溶液において凝集体を減少する条件下(約 90 % 以上のモノマーを含む、高度にモノマー性である溶液)で行われる。本発明の別の実施形態では、高圧によって処理された治療タンパク質製剤に対する免疫応答は、高圧によって処理されていない同一のタンパク質の製剤に対する免疫応答と比較して、少なくとも約 75 % 減少される。本発明の別の実施形態では、高圧によって処理された治療タンパク質製剤に対する免疫応答は、高圧によって処理されていない同一のタンパク質の製剤に対する免疫応答と比較して

、少なくとも約90%減少される。本発明の別の実施形態では、高圧によって処理された治療タンパク質製剤に対する免疫応答は、高圧によって処理されていない同一のタンパク質の製剤に対する免疫応答と比較して、約95%減少される。本発明の別の実施形態では、高圧によって処理された治療タンパク質製剤に対する免疫応答は、高圧によって処理されていない同一のタンパク質の製剤に対する免疫応答と比較して、約99%減少される。本発明の別の実施形態では、高圧によって処理された治療タンパク質製剤に対する免疫応答は、高圧によって処理されていない同一のタンパク質の製剤に対する免疫応答と比較して、実質的に検出不可能である。

【0024】

別の実施形態では、本発明は、治療タンパク質製剤を一定の期間高圧に供するステップと、圧力を開放するステップと、治療タンパク質製剤を個体に投与するステップとを備える、免疫原性の低下した治療タンパク質製剤を投与する方法を包含する。高圧は、約500バールと約10,000バールの間、約500バールと約5000バールの間、約1000バールと約3500バールの間、約1000バールと約3000バールの間、または約2000バールであってもよい。圧力は、10バール/分と100バール/分との間等、制御された減圧速度で開放されてもよい。治療タンパク質製剤は、圧力開放から約24時間、約12時間、約4時間、約1時間、または約15分以内に個体に投与される。一部の実施形態においては、タンパク質は個体が属する種に内因性であり、他の実施形態においては、タンパク質は個体が属する種に内因性ではない。

【0025】

一実施形態においては、本発明は、タンパク質および薬学的に許容される担体を含むタンパク質組成物を包含し、該タンパク質組成物は個体に投与され、投与後のタンパク質特異的抗体のレベルは実質的に検出不可能である。他の実施形態では、本発明は、タンパク質および薬学的に許容される担体を含むタンパク質組成物を包含し、該タンパク質組成物は個体に投与され、タンパク質特異的抗体のレベルは、実質的にタンパク質投与前のタンパク質特異的抗体のレベルと同じである。別の実施形態では、本発明は、タンパク質および薬学的に許容される担体を含むタンパク質組成物を包含し、該タンパク質組成物は個体に投与され、タンパク質特異的抗体のレベルは、凝集タンパク質組成物の投与によって生成されたタンパク質特異的抗体のレベルを下回る。一部の実施形態においては、タンパク質は個体が属する種に内因性であり、他の実施形態においては、タンパク質は個体が属する種に内因性ではない。

【0026】

別の実施形態では、タンパク質および薬学的に許容される担体を含むタンパク質組成物を包含し、該タンパク質組成物は、総タンパク質に対する割合として約20%未満の凝集タンパク質を含有するか、または該タンパク質組成物は、総タンパク質に対する割合として約10%未満の凝集タンパク質を含有するか、または該タンパク質組成物は、総タンパク質に対する割合として約5%未満の凝集タンパク質を含有するか、または該タンパク質組成物は、総タンパク質に対する割合として約1%未満の凝集タンパク質を含有するか、または該タンパク質組成物は、総タンパク質に対する割合として実質的に検出可能な量の凝集タンパク質を含有しない。タンパク質組成物中の凝集タンパク質の量は、これらに限定されないが、超遠心分析法、サイズ排除クロマトグラフィー、フィールドフローフラクショネーション、光散乱、光遮蔽、蛍光分光、ゲル電気泳動、GEMMA分析、および核磁気共鳴分光法を含む、任意の方法によって測定される。割合は、他の分析方法を除外した上記分析方法のうちのいずれに基づいていてもよい。代替として、タンパク質組成物中の凝集タンパク質の量は、これらに限定されないが、超遠心分析法、サイズ排除クロマトグラフィー、フィールドフローフラクショネーション、光散乱、光遮蔽、蛍光分光、ゲル電気泳動、GEMMA分析、および核磁気共鳴分光法を含む、少なくとも1つの方法によって測定される。つまり、割合は、必ずしも他の分析方法を除外することなく、いずれか1つの分析法に基づいていてもよい。

【0027】

他の実施形態では、本発明は、タンパク質および薬学的に許容される担体を含むタンパク質組成物を包含し、タンパク質組成物は、タンパク質に対する個体の免疫寛容を破壊しない。

【0028】

他の実施形態では、本発明は、タンパク質および薬学的に許容される担体を包含し、タンパク質組成物は、タンパク質をコードする導入遺伝子を有するトランスジェニック動物のタンパク質に対する免疫寛容を破壊しない。

【0029】

他の実施形態では、本発明は、タンパク質および薬学的に許容される担体を包含し、タンパク質組成物は、タンパク質に対して誘導された寛容を有する動物のタンパク質に対する免疫寛容を破壊しない。

【0030】

本発明は、a) タンパク質の溶液を高圧処理に供するステップと、b) ステップaの前または後に、高圧処理されたタンパク質が既に薬学的に許容される担体に存在しない場合は、かかる担体に担持するステップと、c) 高圧処理されたタンパク質を第1の個体に投与することと、d) 当該方法における任意の時点で、高圧処理されていないタンパク質が既に薬学的に許容される担体に存在しない場合は、かかる担体に担持するステップと、e) 薬学的に許容される担体に担持した後の当該方法における任意の時点で、高圧処理されていないタンパク質を第2の個体に投与するステップと、f) 第1の個体の免疫応答を第2の個体と比較するステップとを備え、第2の個体と比較して低下した第1の個体の免疫応答は、高圧処理されたタンパク質が免疫原性を低下させることを意味する、高圧で処理されていない同一のタンパク質に対して低下した高圧処理タンパク質の免疫原性の検査を包含する。免疫応答は、抗体力価、存在する抗体の相対量または絶対量、アナフィラキシーと関連した炎症および反応(脱力感、痒み、腫れ、蕁麻疹、痙攣、下痢、嘔吐、呼吸困難、胸苦しさ、血圧低下、意識不明、およびショック)等の臨床的免疫反応、検出可能な抗体を誘導するための調製に必要な時間、特異的な抗体力価を誘導するための調製に必要な時間、および特定の濃度レベルの抗体を誘導するための調製に必要な時間によって、測定することができる。免疫応答は、Biacoreアッセイによって測定することができる。第1および第2の個体は、その誘導遺伝子が本発明において用いられるタンパク質を発現するトランスジェニック動物であってもよく、または第1および第2の個体は、本発明において用いられるタンパク質に寛容化されていてもよい。

【0031】

上述した方法のいずれにおいても、免疫応答は、抗体力価、存在する抗体の相対量または絶対量、アナフィラキシーと関連した炎症および反応(脱力感、痒み、腫れ、蕁麻疹、痙攣、下痢、嘔吐、呼吸困難、胸苦しさ、血圧低下、意識不明、およびショック)等の臨床的免疫反応、検出可能な抗体を誘導するための調製に必要な時間、特異的な抗体力価を誘導するための調製に必要な時間、および特定の濃度レベルの抗体を誘導するための調製に必要な時間を含む、当業者に既知である任意の好適なアッセイを用いて測定することができる。

【0032】

本発明の方法および組成物は、低下した免疫原性を有するタンパク質治療薬を可能にする。いくつかの実践様式において、組換えタンパク質治療薬の生成の改良方法を提供するために、当該方法が有利に用いられる。当該方法は、かかる改良を、生物活性の増大および/または有効性の増大と合わせた免疫原性の低下として、およびタンパク質の収率および/または品質における改良として、提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】90%を超えて凝集したCTLA-4-Igのリフォールディングに与える高圧およびイオン強度の影響を示す図である。

【図2】モノマーCTLA-4-Ig融合タンパク質の安定性に与える圧力およびイオン

10

20

30

40

50

強度の影響を示す図である。

【図3】中程度の凝集体レベルを有する溶液のリフォールディングに与えるイオン強度および圧力の影響を示す図である。

【図4】治療レベルの関数として、未感作マウス（4世代目）に投薬されたノルディフレックス（Nordiflex）rhGHに対する抗体応答を示す図である。

【図5】高圧の使用によるIFN凝集体の解離を示す図である。凝集体は、Shakedらによって教示されたプロセスの修正版の（Shaked, Stewart et al. 1993）（方法を参照）結果として形成された。

【図6】モノマー、凝集体、および高圧で処理したrmIFNの凝集体を投薬された未感作マウスのELISA反応を示す図である。服薬は、0.5ug/投薬または2.3ug/投薬のいずれかで15日間行われた。

【発明を実施するための形態】

【0034】

本明細書に記載されるすべての出版物および特許は、参照することにより各々の全体が本明細書に援用される。本明細書に開示される出版物および特許は、それらの開示目的のためだけに提供される。本発明者らが、本明細書中において引用されるいかなる出版物および/または特許も含む、いかなる出版物および/または特許に先行する権利も有しないことを認めるものと解釈されるべきではない。

【0035】

以下に記載する本発明の実施形態は、本発明を網羅することや、以下の発明を実施するための形態に開示される厳密な形態に限定することを意図するものではない。むしろ、実施形態は、当業者が本発明の原理および実践を認識および理解できるように選択され、説明される。

【0036】

本発明の方法は、低下した免疫原性を有する組換えタンパク質を作製するために用いることができ、該タンパク質から可溶性凝集体を除去するために特に有用である。

【0037】

より具体的には、本明細書に記載される方法は、タンパク質溶液を高圧に供するステップと、その後で圧力を周囲圧力まで下げるステップとを備える、タンパク質製剤の免疫原性を低下するためにタンパク質を高圧下で処理するためのステップを含む。選択される高圧レベル、温度、pH、および本明細書に記載されるその他の条件を含む条件は、タンパク質の凝集をさらに誘導することなく、可溶性凝集体を解離するために選択される。このことは、タンパク質の可溶性凝集体を最小限に抑えるかまたは排除し、したがって、タンパク質治療薬の品質を向上する。

【0038】

「高圧」とは、少なくとも250バールである圧力を意味する。本発明の方法が使用される圧力は、少なくとも約250バールの圧力、少なくとも約400バールの圧力、少なくとも約500バールの圧力、少なくとも約1キロバールの圧力、少なくとも約2キロバールの圧力、少なくとも約3キロバールの圧力、少なくとも約5キロバールの圧力、または少なくとも約10キロバールの圧力である。

【0039】

本明細書で用いられる「タンパク質凝集体」とは、非天然の非共有相互作用および/または非天然の共有結合（非天然の分子間ジスルフィド結合等）がともにタンパク質分子を支える、数多くのタンパク質分子から構成されるものとして定義される。必ずしもそうであるとは限らないが、典型的には、凝集体は不溶性となるように十分な分子を含有しており、かかる凝集体は不溶性凝集体である。溶液中に残存する非天然の凝集体を形成するタンパク質があり、かかる凝集体は可溶性凝集体である。また、典型的には（必ずしもそうであるとは限らないが）、凝集体の表面には、天然の、非凝集タンパク質の表面上には見られない、少なくとも1つのエピトープまたは領域がある。「封入体」とは、本発明が適用可能である特に興味深い凝集体の一種である。その他のタンパク質凝集体には、これ

10

20

30

40

50

らに限定されないが、可溶性および不溶性の沈殿物、可溶性非天然オリゴマー、ゲル、原繊維、膜、フィラメント、プロトフィブリル、アミロイド沈着物、ブランク、および分散性の非天然細胞内オリゴマーを含む。

【0040】

「大気圧」、「周囲圧力」、または「標準」気圧は、およそ15ポンド/平方インチ (psi) またはおよそ1バールまたはおよそ100,000パスカルとして定義される。

【0041】

本明細書における、タンパク質の「生物学的活性」とは、既知のまたは意図されるタンパク質の有用性と相関することが当該技術分野において一般に認められるアッセイで測定される、既知の最大比活性の少なくとも約10%を保持するタンパク質を意味する。治療的使用を意図するタンパク質については、選択されるアッセイは、タンパク質の安全性および有効性に関するデータが提出されなければならない規制当局によって認められるアッセイである。既知の最大比活性度の少なくとも10%を有するタンパク質は、本発明の目的に対しては、「生物学的に活性」である。

10

【0042】

本文脈においてタンパク質に適用される「変性した」とは、天然の2次構造、3次構造、および/または4次構造が、そのタンパク質が生物学的活性を持たない程度まで乱れることを意味する。

【0043】

「変性した」とは対照的に、タンパク質の「天然の立体構造」とは、タンパク質がその生物学的に活性した状態において自然に発生する際の、タンパク質の2次構造、3次構造、および/または4次構造を指す。

20

【0044】

本明細書で用いられる「寛容」または「免疫寛容」とは、本来であれば正常な免疫系の設定において、特異的な抗原に対する免疫応答がないことを指す。寛容は、免疫応答のすべてまたはその一部が低下する一般的な免疫抑制とは異なる。

【0045】

本明細書で用いられる「トランスジェニック動物」とは、マイクロインジェクションまたは組換えウイルスとの感染等の遺伝子操作によって、1つ以上の動物の細胞が直接的または間接的に受け取った核酸を含有する、ヒト以外の任意の動物を指す。導入された核酸は、染色体内で一体化されてもよく、または染色体外で複製されてもよい。「生殖細胞系トランスジェニック動物」という用語は、核酸が生殖系列細胞に導入され、子孫に情報を伝達する能力を有する動物を指す。かかるヒト以外の動物には、これらに限定されないが、げっ歯類、ヒト以外の霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ブタ、およびネコを含む。

30

【0046】

「個体」とは、脊椎動物、鳥類、哺乳類、またはヒト等の、機能的な免疫系を有する動物を意味する。個体は、ラット、マウス、またはウサギ等の実験動物であってもよい。個体は、治療または処置の必要な脊椎動物であってもよい。個体は、治療または処置の必要なヒト患者であってもよい。

40

【0047】

「実質的に同じ」とは、レベルにおける相違が、実験測定値における標準偏差の約3倍、約2倍、または約1倍未満であること、好ましくは標準偏差の約1倍未満であることを意味する。「実質的に検出不可能」とは、零点測定または対照測定と試料測定との間の相違が、実験測定値における標準偏差の約3倍、約2倍、または約1倍未満であること、好ましくは標準偏差の約1倍未満であることを意味する。

【0048】

「治療タンパク質製剤」とは、タンパク質を含む任意の組成物、好ましくはタンパク質を含む液体組成物であり、該タンパク質は薬物として使用されることが意図される。治

50

療タンパク質製剤は、必ずしも薬物として使用される最終剤形でなくともよい。該タンパク質は、タンパク質を調製または処理するために好適であるいずれの剤形であってもよく、これに限定されないが、薬物として投与されるための最終剤形であってもよい。液体タンパク質組成物中の液体は、これらに限定されないが、水、緩衝液、薬学的に許容される担体、または変性溶液を含む溶液であってもよい。

【0049】

「可溶性凝集体およびその他の免疫原性種を除去するための圧力処理についての考察

本発明の方法で処理することのできるタンパク質組成物は、これらに限定されないが、タンパク質の試験室試料、バルク医薬品、および個別投与量または個別投薬単位を含む。本発明の一実施形態においては、タンパク質のバルク医薬品は、該医薬品を個別投与量、個別投薬単位、または個別容器に分割する前に、高圧で処理される。この処理は、該医薬品の使用前にいつでも行うことができる。たとえば、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する少なくとも約3年前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する少なくとも約2年前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する少なくとも約1年前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する少なくとも約6ヶ月前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する少なくとも約3ヶ月前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する少なくとも約1ヶ月前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する少なくとも約2週間前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する少なくとも約1週間前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する少なくとも約3日前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する少なくとも約1日前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する少なくとも約12時間前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する少なくとも約4時間前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する少なくとも約1時間前、またはタンパク質組成物を個体に投与することを意図する少なくとも約15分前である。代替として、該処理は、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する早くても約3年前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する早くても約2年前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する早くても約1年前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する早くても約6ヶ月前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する早くても約3ヶ月前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する早くても約1ヶ月前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する早くても約2週間前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する早くても約1週間前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する早くても約3日前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する早くても約1日前、タンパク

質組成物を個体に投与することを意図する早くても約12時間前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する早くても約4時間前、タンパク質組成物を個体に投与することを意図する早くても約1時間前、またはタンパク質組成物を個体に投与することを意図する早くても約15分前に行われてもよい。凝集した種および/または非天然の種を除去することが、さらに非天然種を凝集および/または形成する核形成部位を除去することにもなり、ひいては、かかる望ましくない結果を遅らせることになるため、圧力処理の利点の1つとして、しばしば治療タンパク質製剤の有効期間が延長され得るということがある。本発明のその他の実施形態では、本発明は、治療タンパク質製剤の有効期間が、治療タンパク質製剤の高圧処理によって少なくとも約100%、治療タンパク質製剤の高圧処理によって少なくとも約50%、治療タンパク質製剤の高圧処理によって少なくとも約25%、または治療タンパク質製剤の高圧処理によって少なくとも約10%延長される、タンパク質組成物を調製する方法を包含する。本発明の他の実施形態では、本発明は、少なくとも約100%、治療タンパク質製剤の高圧処理によって少なくとも約50%、治療タンパク質製剤の高圧処理によって少なくとも約25%、または治療タンパク質製剤の高圧処理によって少なくとも約10%延長される有効期間を有する、圧力処理したタンパク質組成物を包含する。

10

20

30

40

50

【0050】

上述したように、「治療タンパク質製剤」は、投与のための最終剤形でなくてもよい。ある場合において、市販の治療タンパク質製剤は投与に好適である剤形において供給されるが、可溶性凝集体および/またはその他の非天然タンパク質の除去という目的のためには、製剤は、可溶性凝集体および/またはその他の非天然タンパク質の除去により好適である剤形に変更されてもよい。したがって、例えば、可溶性凝集体タンパク質を除去するために市販の治療タンパク質製剤（投与に好適な剤形である）を処理するためには、pHを変更すること（例えば、最終製剤のpHをpH7からpH3に）、可溶性凝集体および/またはその他の非天然タンパク質を除去するためにタンパク質製剤を処理すること、そして投与に好適な値までpHを戻すことによって、製剤を変更することが可能である。治療タンパク質製剤は、様々なリフォールディングおよびクロマトグラフィー、または高度にモノマー性であるタンパク質の製剤（例えば、約90%以上モノマー性である）をもたらすその他の精製ステップの後に、依然として相当量の可溶性凝集体を含有する「加工処理」から回収された形態であってもよい。タンパク質濃度、塩濃度、緩衝液濃度、温度、およびカオトロブ濃度等の他のパラメータは、かかる様式において調節することができる。

10

【0051】

代替として、製造者は、可溶性凝集体および/またはその他の非天然タンパク質を除去するための高圧処理に好適な剤形で治療タンパク質製剤を供給してもよく、その後、該治療タンパク質製剤は、薬物としての投与に好適な剤形から成るように調節され得る。

20

【0052】

治療タンパク質製剤の比較試験を行う場合、圧力処理の後（すなわち、高圧を開放した後で）であって、高圧処理されたタンパク質製剤を第1の個体に投与する前の経過時間は、医薬品を使用する前の高圧処理前の上述のいずれの時間枠であってもよい。

【0053】

「リフォールディングのためのタンパク質」

本発明は、組換えタンパク質、天然源から単離されたタンパク質、または化学合成によって生成されたタンパク質等、リフォールディングが所望されるいずれのタンパク質をも包含する。本発明の方法で処理することが可能な特異的なタンパク質は以下を含むものとする：インターフェロン；インターフェロン 2a（ロフェロンA；ペガシス）；インターフェロン 1b（ベータセロン）；インターフェロン 1a（アボネックス）；インスリン（ヒューマリンR）；DNAase（パルモザイム）；ニューロジェン；エボジェン；プロクリット（エポエチンアルファ）；アラネズ（2世代プロクリット）；イントロンA（インターフェロン 2b）；リツキサ（リツキシマブ抗CD20）；IL-2（プロリユウキン）；IL-1ra（キネレット）；BMP-7（オステオゲニン）；TNF 1a（ベロミュン（Beromun））；ヒュミラ（抗TNF MAB）；tPA（テネクテプラゼ）；PDGF（レグラネクス（登録商標））；インターフェロン 1b（アクティミューン）；uPA；GMCSF；第VII因子；レミケード（インフリキシマブ）；エンブレル（エタネルセプト）；ベータフェロン（インターフェロン 1a）；サイゼン（ソマトロピン）；アービタックス（セツキシマブ）；サイゼン（ソマトロピン）；ノルディトロピン（ソマトロピン）；ニュートロピン（ソマトロピン）；ジェノトロピン（ソマトロピン）；ヒューマトロブ（ソマトロピン）；レピフ（インターフェロン 1a）；ハーセプチン（トラスツズマブ）；およびヒュミラ（アダリムマブ）。免疫グロブリン（IgG等）およびその他のタンパク質も、本明細書の方法で処理することができる。

30

40

【0054】

「タンパク質分析」

凝集したタンパク質を分析および定量化するためには、いくつかの方法が利用可能である。いくつかの高分子の分析方法に関する優れた概説は、Cantor, C. R. and P. R. Schimmel, Biophysical Chemistry Par

50

t II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function, W. H. Freeman & Co., New York: 1980に見られる。その他の一般的な技術は、米国特許出願公開第2003/0022243号に記載される。

【0055】

タンパク質治療薬の凝集を特徴付けるために超遠心分析法を使用することは、American Biotechnology Laboratory (2003年10月、Philo, J. S. 著)の22ページに具体的に論じられている。超遠心分析法を用いることが可能な実験は、溶液中に複数の溶質(例えば、モノマー、ダイマー、トリマー等)が存在するかどうかを判断するため、そして該溶質の分子量を推定するために行うことが可能である、沈降速度および沈降平衡実験を含む。

10

【0056】

サイズ排除クロマトグラフィーおよびゲル浸透クロマトグラフィーが、分子量およびタンパク質の凝集数を推定するため、ならびに異なる凝集体の分離のために用いられてもよい。Handbook of Size Exclusion Chromatography and Related Techniques, Second Edition (Chromatographic Science) (Wu, C. - S. 編集)、Marcel Dekker: New York, 2004 (特に、15章の439~462ページの“Size Exclusion Chromatography of Proteins” (Baker et al. 著)、およびColumn Handbook for Size Exclusion Chromatography (Wu, C. - S. 編集)、San Diego: Academic Press, 1999 (特に2章および18章)等の参考資料を参照のこと。

20

【0057】

分子の液流に対して垂直な磁場を利用するフィールドフローフラクシオネーションも、タンパク質のモノマー、ダイマー、トリマー等の凝集タンパク質を分析および分離するために用いることができる。Zhu et al., Anal. Chem. 77: 4581 (2005); Litzen et al., Anal. Biochem. 212: 469 (1993); および Reschiglian et al., Trends Biotechnol. 23: 475 (2005)を参照。

30

【0058】

レーザー光散乱を用いた方法等(しばしば、サイズ排除クロマトグラフィーまたはその他の方法と組み合わせる)の光散乱法も、タンパク質凝集体を含むタンパク質の分子量を推定するために用いることができる。例えば、Mogridge, J., Methods Mol Biol. 261: 113 (2004)およびYe, H., Analytical Biochem. 356: 76 (2006)を参照。動的光散乱法は、Pecora, R., ed., Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy, New York: Springer Verlag, 2003およびBerne, B. J. and Pecora, R., Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics, Mineola, NY: Dover Publications, 2000に論じられている。レーザー光散乱は、Johnson, C. S. and Gabriel, D. A., Laser Light Scattering, Mineola, NY: Dover Publications, 1995に論じられており、タンパク質凝集を判断するために適用することができる他の光散乱法は、Kratohvil, P., Classical Light Scattering from Polymer Solutions, Amsterdam: Elsevier, 1987に論じられている。

40

【0059】

50

光遮蔽も、タンパク質凝集を測定するために用いることができる。Seeffeldt et al., Protein Sci. 14: 2258 (2005); Kim et al., J. Biol. Chem. 276: 1626 (2001); および Kim et al., J. Biol. Chem. 277: 27240 (2002) を参照。

【0060】

蛍光異方性測定等の蛍光分光が、タンパク質凝集体の存在を判断するために用いられてもよい。凝集体の分析を補助するために、蛍光プローブ(染料)が共有結合的にまたは非共有結合的に凝集体と結合されてもよい(例えば、Lindgren et al., Biophys. J. 88: 4200 (2005)、米国特許出願公開第2003/0203403号)、または Royer, C. A., Methods Mol. Biol. 40: 65 (1995) を参照)。内部のトリプトファン残基も、タンパク質凝集を検出するために用いることができる。例えば、Dusa et al., Biochemistry 45: 2752 (2006) を参照。

10

【0061】

多くのゲル電気泳動の方法が、タンパク質およびタンパク質凝集を分析するために用いることができる。ゲル電気泳動の方法で最も一般的なものは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)である。凝集体が共有結合的に連結している場合は、変性PAGE(例えば、ドデシル硫酸ナトリウムを用いて)が採用されてもよい。非共有結合的に連結した凝集体を調査するために、天然PAGE(非変性PAGE)が用いられてもよい。例えば、Hermeling et al. J. Phar. Sci. 95: 1084-1096 (2006); Kilic et al., Protein Sci. 12: 1663 (2003); Westermeyer, R., Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations 4th edition, New York: John Wiley & Sons, 2005; および Hames, B. D. (Ed.), Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach, 3rd edition, New York: Oxford University Press, USA, 1998 を参照。

20

【0062】

気相における電気泳動法と質量分析法を組み合わせた、気相式電気泳動移動度分子解析(gas-phase electrophoretic mobility molecular analysis (GEMMA)) (Bacher et al., J. Mass Spectrom. 36: 1038 (2001), Kaufman et al., Anal. Chem. 68: 1895 (1996) および Kaufman et al., Anal. Biochem. 259: 195 (1998) を参照) は、タンパク質複合体および凝集体を分析する別の方法を提供する。

30

【0063】

核磁気共鳴分光法は、タンパク質凝集に関連する流体力学的パラメータを推定するために用いられてもよい。例えば、James, T. L. (ed.), Nuclear Magnetic Resonance of Biological Macromolecules, Part C, Volume 394: Methods in Enzymology, San Diego: Academic Press, 2005; James, T. L., Dotsch, V. and Schmitz, U. (eds.), Nuclear Magnetic Resonance of Biological Macromolecules, Part A (Methods in Enzymology, Volume 338) および Nuclear Magnetic Resonance of Biological Macromolecules, Part B (Methods in Enzymology, Volume 339), San Diego: Academic Press, 2001, および Mansfield, S.

40

50

L. et al., J. Phys. Chem. B, 103: 2262 (1999) を参照。パラメータ中の線幅、相関時間、および緩和時間は、溶液における反転時間を推定するために測定してもよく、また、タンパク質凝集の状態と相関可能なパラメータである。電子常磁性共鳴法 (EPR または ESR) も、凝集状態を判断するために用いられてもよい。例えば、Squier et al., J. Biol. Chem. 263: 9162 (1988) を参照。

【0064】

一実施形態においては、本発明は、低下したレベルのタンパク質凝集体を有する治療タンパク質製剤を包含する。本発明の一実施形態においては、高圧法で処理されると、治療タンパク質製剤中の可溶性凝集体は、高圧法で処理されていない同一のタンパク質の製剤と比較して、少なくとも約10%減少される。本発明の別の実施形態では、高圧法で処理されると、治療タンパク質製剤中の可溶性凝集体は、高圧法で処理されていない同一のタンパク質の製剤と比較して、少なくとも約20%減少される。本発明の別の実施形態では、高圧法で処理されると、治療タンパク質製剤中の可溶性凝集体は、高圧法で処理されていない同一のタンパク質の製剤と比較して、少なくとも約25%減少される。本発明の別の実施形態では、高圧法で処理されると、治療タンパク質製剤中の可溶性凝集体は、高圧法で処理されていない同一のタンパク質の製剤と比較して、少なくとも約30%減少される。本発明の別の実施形態では、高圧法で処理されると、治療タンパク質製剤中の可溶性凝集体は、高圧法で処理されていない同一のタンパク質の製剤と比較して、少なくとも約40%減少される。本発明の別の実施形態では、高圧法で処理されると、治療タンパク質製剤中の可溶性凝集体は、高圧法で処理されていない同一のタンパク質の製剤と比較して、少なくとも約50%減少される。本発明の別の実施形態では、高圧法で処理されると、治療タンパク質製剤中の可溶性凝集体は、高圧法で処理されていない同一のタンパク質の製剤と比較して、少なくとも約75%減少される。本発明の別の実施形態では、高圧法で処理されると、治療タンパク質製剤中の可溶性凝集体は、高圧法で処理されていない同一のタンパク質の製剤と比較して、少なくとも約90%減少される。本発明の別の実施形態では、高圧法で処理されると、治療タンパク質製剤中の可溶性凝集体は、高圧法で処理されていない同一のタンパク質の製剤と比較して、少なくとも約95%減少される。本発明の別の実施形態では、高圧法で処理されると、治療タンパク質製剤中の可溶性凝集体は、高圧法で処理されていない同一のタンパク質の製剤と比較して、少なくとも約99%減少される。本発明の別の実施形態では、高圧法で処理されると、治療タンパク質製剤中の可溶性凝集体は、高圧法で処理されていない同一のタンパク質の製剤と比較して、実質的に検出不可能なレベルまで減少される。

【0065】

本発明の一実施形態においては、超遠心分析法が、圧力処理した試料と未処理の試料における凝集体の比較のために用いられる。本発明の別の実施形態では、サイズ排除クロマトグラフィーが、圧力処理した試料と未処理の試料における凝集体の比較のために用いられる。本発明の別の実施形態では、フィールドフローフラクショネーションが、圧力処理した試料と未処理の試料における凝集体の比較のために用いられる。本発明の別の実施形態では、光散乱分析が、圧力処理した試料と未処理の試料における凝集体の比較のために用いられる。本発明の別の実施形態では、光遮蔽分析が、圧力処理した試料と未処理の試料における凝集体の比較のために用いられる。本発明の別の実施形態では、蛍光分光が、圧力処理した試料と未処理の試料における凝集体の比較のために用いられる。本発明の別の実施形態では、ゲル電気泳動が、圧力処理した試料と未処理の試料における凝集体の比較のために用いられる。本発明の別の実施形態では、GEMMA が、圧力処理した試料と未処理の試料における凝集体の比較のために用いられる。本発明の別の実施形態では、核磁気共鳴分光法が、圧力処理した試料と未処理の試料における凝集体の比較のために用いられる。本発明の別の実施形態では、電子常磁性共鳴法が、圧力処理した試料と未処理の試料における凝集体の比較のために用いられる。

【0066】

「免疫原性を判断するための方法」

組換えタンパク質の免疫原性は、動物モデルにおいて評価されてもよい。これらのモデルは、対象となる組換えタンパク質を発現しないが、モノマーと比較すると凝集体に対してより強い免疫応答を示した未感作動物を含む (Braun et al.)。これらのモデルは、特異的な抗原に対する寛容を有するように誘導された動物、または特異的な誘導遺伝子を有するように作られ、該誘導遺伝子によってコードされる特異的なタンパク質に対して免疫寛容であるトランスジェニック動物も含む。

【0067】

寛容の誘導：

動物モデルにおいて、例えば、多発性硬化症（もしくは実験的アレルギー性脳炎、EAE）または糖尿病等の自己免疫疾患に関して抗原特異的寛容を誘導するために、また同種組織移植の拒絶反応を回避するために、様々なストラテジが開発されてきた。マウスおよびラットモデルにおいて開発された主な方法は、高用量の可溶性抗原投与、抗原の経口摂取、または胸腺内注射を伴う。これらの方法の有効性は、クローン除去、クローンアレルギー、抗原特異的T細胞による能動抑制、および細胞免疫応答から液性免疫応答への免疫偏向の様々な程度に依存する。例えば、Friedman et al. PNAS 91:6688-6692 (1994); Higgins et al. J. Immunol. 140:440 (1988); Meyer et al. J. Immunol. 157:4230 (1996) を参照。

10

【0068】

例えば、マウスまたはラット等の動物において、未熟な免疫系を抗原に曝露することにより、寛容を発達させることが可能である。寛容を誘導するためにげっ歯類の新生仔を抗原に曝露することは、当該技術分野において周知である。Burtles, S. S. and Hooper, D. C., Immunology 75:311 (1992); Yamaguchi et al., Journal of Immunological Methods 181:115 (1995); Forsthuber et al., Science 271:1728 (1996); Maverakis et al., J. Exp. Med. 191:695 (2000); Kramar et al., Journal of Autoimmunity 8:177 (1995); Kruijsbeek et al., Journal of Experimental Medicine, 161:1029 (1985); および Cobbold, S. P., Phil. Trans. R. Soc. B 360, 1695 (2005) も参照のこと。

20

30

【0069】

例えば、マウスまたはラット等の動物における経口寛容は、高用量で一回給餌するか、または選択された期間中に低用量で間欠的に隔日給餌することのいずれかによる、タンパク質の投与によって誘導することができる。その後、動物は、当該技術分野において既知である標準的な方法を用いて寛容について検査される。

【0070】

抗原特異的免疫寛容は、抗原に対する宿主の寛容を生じさせるために十分な期間、免疫抑制療法と組み合わせて抗原を投与することにより、誘導することもできる。免疫抑制は免疫抑制剤の投与を伴う。抗原投与および免疫抑制スケジュールの後には、免疫抑制剤の投与が中止されても、動物は抗原に対する特異的免疫寛容を維持することができるようになる。例えば、米国特許出願公開第2004/0009906号、および Cobbold, S. P., Phil. Trans. R. Soc. B 360, 1695 (2005) を参照。

40

【0071】

免疫寛容を有するトランスジェニック動物：

異種タンパク質に対する免疫寛容を調査するために、トランスジェニック動物が用いられてもよい。トランスジェニック動物は、その動物をタンパク質に対して免疫学的に寛容にする特異的な異種タンパク質をコードする核酸または「導入遺伝子」を有する。トラ

50

ンスジェニック動物（通常はトランスジェニックマウス）は、販売供給者もしくは他の経路から入手可能であるか、または必要に応じて生成されてもよい。例えば、米国特許第5,470,560号；Hermeling et al. J. Phar. Sci. 95:1084-1096 (2006)；Hermeling et al. Pharm. Res. 22:847-851 (2005)；Whiteley et al. J. Clin. Invest. 84:1550-1554 (1989)を参照。

【0072】

導入遺伝子は、動物種に異種であっても、特定の個体のレシピエントまたは動物株にのみ異種であってもよく、または既にレシピエントに所有されている核酸物質もしくは遺伝子の変異体であってもよい。導入遺伝子は、例えば、遺伝子源からの単離によって、単離したmRNAテンプレートからのcDNAの調製によって、指向性合成によって、またはそれらの組み合わせによって、任意の既知の方法を用いて当業者により取得されてもよい。導入遺伝子は、発現のために機能的にプロモーターに作用可能に連結されるべきである。プロモーターおよび他の制御要素は、導入遺伝子の特異的な組織発現を増加、減少、制御、または制限するために用いられてもよい。プロモーターは導入遺伝子と関連した自然のプロモーターである必要は無く、レシピエント動物から単離されたプロモーターであることが多い。

【0073】

トランスジェニック動物は、導入遺伝子をレシピエント動物の生殖系列細胞に導入することによって生成することができる。遺伝子物質を細胞内へ導入するための方法は、一般に利用可能であり当業者に周知である。一般的に用いられる方法には、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染、レトロウイルス導入、およびDNAトランスフェクションを含む。例えば、Gordon et al. PNAS 77:7380-7384 (1980)；Hammer et al. J. Animal Sci. 63:269-278 (1986)；Nagy et al. PNAS 90:8424-8428 (1993)を参照。

【0074】

異種タンパク質を発現する遺伝子物質を有するトランスジェニック動物は、該動物の免疫系がその異種タンパク質を「自身」として認識するはずなので、タンパク質に対して免疫学的に寛容であるはずである。したがって、トランスジェニック動物は、特異的タンパク質、特に、凝集および脱凝集した状態/剤形にあるタンパク質の免疫寛容および免疫原性を調査するためのモデルとしての役割を果たすことができる。

【0075】

特異的な導入遺伝子を有するトランスジェニック系統を生成した後、動物は、血清またはその他の体液中の異種ポリペプチドの存在についてスクリーニングされる。ポリペプチドは、上昇したレベルで、または任意の内因性相同体のレベルでさえも生成される必要は無い。動物は、該動物がポリペプチドに対して寛容となるように、免疫系が成熟する間に十分なポリペプチドを生成すればよいだけである。最も一般的には、ポリペプチドが動物に投与された場合に、その動物が該ポリペプチドに対する抗体を生成することができないという観察によって、寛容が示される。

【0076】

免疫寛容を有するトランスジェニック動物は、異なる剤形または凝集/脱凝集状態にあるタンパク質の免疫原性を評価するために用いることができる。対照として、トランスジェニック動物と同じ遺伝子的背景を有する非トランスジェニック動物が、実験に組み入れられるべきである。免疫原性を検査するために、タンパク質に対して免疫寛容である非トランスジェニックまたはトランスジェニック動物に、異種タンパク質が注射される。動物は、これらに限定されないが、腹腔内(i.p.)、筋肉内(i.m.)、皮下(s.c.)、または静脈内(i.v.)を含むいずれの経路で注射されてもよい。動物は、例えば、1、7、14、21および28日目、または1、3、7、10、14、17および21日目、または1~4日、7~11日および14~18日のように、特定のスケジュール

10

20

30

40

50

ルに従って注射されてもよい。血清試料は、いずれの注射の前にも採取され、その後は、例えば、毎週および最後の注射から3日後または7日後のように、特定の間隔で採取される。

【0077】

トランスジェニック動物が免疫学的応答を有し、導入遺伝子によってコードされたタンパク質にのみ寛容であることを実証するために、動物は、試験タンパク質に用いられたのと同じ注射スケジュールを用いて、ヒト血清アルブミンまたはオバルブミン等の関連のないタンパク質を注射される。かかる異種タンパク質に対する反応は、トランスジェニック動物の免疫系が正常に機能していることを示す陽性対照としての役割を果たす。

【0078】

非トランスジェニック動物およびトランスジェニック動物からの血清は、当業者に既知である従来のアッセイを用いて、特定のタンパク質に対する特異的抗体の存在について評価することができる。これらのアッセイには、ラジオイムノアッセイ、酵素免疫測定 (ELISA)、および表面プラズモン共鳴 (SPR、例えばBIACORE (登録商標) : BIACORE (登録商標) はスウェーデンのウプサラに所在する Biacore AB Corp. の登録商標であり、生体分子の相互作用を測定および調査するための分析に用いられる) を含むが、これらに限定されない。標準的な間接ELISA法を、例示的な実施例として簡略に説明する。PBS、TBSまたは炭酸-重炭酸等の緩衝液に、タンパク質を2~10 μg/mlの濃度まで希釈する。96ウェルプレートに100 μl/ウェルの試験タンパク質で充填し、4で一晚インキュベートする。洗浄緩衝液 (例えば、0.05~0.1%のTween-20を含むPBS) でプレートを数回洗浄する。ウェルの使われていない部位は、200~300 μl/ウェルのブロッキング溶液 (例えば、1~5%のウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBS) を添加することにより、室温で1時間ブロックする。プレートを洗浄緩衝液で洗浄し、試験タンパク質を注射したマウスからの血清試料を3通りウェルに添加する (50~100 μl/ウェル)。プレートを室温で1時間インキュベートし、その後3回洗浄する。100 μlの酵素標識抗マウスIgG複合体を各ウェルに添加し、プレートを室温で1時間インキュベートする。プレートを洗浄し、適切な基質を含有する緩衝液100 μlを各ウェルに添加する。着色のためのインキュベーション時間の後、マイクロプレートリーダーで、使用した基質に適切な波長の吸光度を読み取る。

【0079】

表面プラズモン共鳴 (SPR) に基づくシステムは、血清試料における免疫応答の検出および特徴づけを提供する。SPRは、抗体アイソタイプ、特異性、動的特性、および親和性に関する情報を提供することが可能である。さらに、SPRは、他のイムノアッセイでは見逃される可能性のある低親和性抗体を確実に検出することが分かっている。BIACOREについての一般情報は、Nagata, K. および Handa, H. (編集) による、Real-Time Analysis of Biomolecular Interactions: Applications of Biacore, Tokyo: Springer-Verlag, 2000で提供される。抗体を検出するための表面プラズモン共鳴 (BIACORE) の使用に関する具体的な例は、Kure et al., Intern. Med. 44: 100 (2005) (インスリンに対する抗体) および Mason et al., Curr. Med. Res. Opin. 19: 651 (2003) (赤血球生成分子に対する抗体) に見られる。

【0080】

本発明の一実施形態においては、本発明は、高圧によって処理された治療タンパク質製剤、および高圧によって処理された治療タンパク質製剤を作製する方法を包含し、高圧によって処理された治療タンパク質製剤に対する免疫応答は、高圧によって処理されていない同一のタンパク質の製剤に対する免疫応答と比較して、少なくとも約50%減少される。好ましい実施形態において、高圧によって処理された治療タンパク質製剤と、高圧によって処理されていない同一のタンパク質の製剤との間の唯一の相違は、圧力処理そのも

10

20

30

40

50

のである。本発明の別の実施形態では、高圧によって処理された治療タンパク質製剤に対する免疫応答は、高圧によって処理されていない同一のタンパク質の製剤に対する免疫応答と比較して、少なくとも約75%減少される。本発明の別の実施形態では、高圧によって処理された治療タンパク質製剤に対する免疫応答は、高圧によって処理されていない同一のタンパク質の製剤に対する免疫応答と比較して、少なくとも約90%減少される。本発明の別の実施形態では、高圧によって処理された治療タンパク質製剤に対する免疫応答は、高圧によって処理されていない同一のタンパク質の製剤に対する免疫応答と比較して、少なくとも約95%減少される。本発明の別の実施形態では、高圧によって処理された治療タンパク質製剤に対する免疫応答は、高圧によって処理されていない同一のタンパク質の製剤に対する免疫応答と比較して、少なくとも約99%減少される。本発明の別の実施形態では、高圧によって処理された治療タンパク質製剤に対する免疫応答は、高圧によって処理されていない同一のタンパク質の製剤に対する免疫応答と比較して、実質的に検出不可能である。

10

20

30

40

50

【0081】

免疫応答は、これらに限定されないが、抗体力価、存在する抗体の相対量または絶対量、アナフィラキシーと関連した炎症および反応（脱力感、痒み、腫れ、蕁麻疹、痙攣、下痢、嘔吐、呼吸困難、胸苦しさ、血圧低下、意識不明、およびショック）等の臨床的免疫反応、検出可能な抗体を誘導するための調製に必要な時間、特異的な抗体力価を誘導するための調製に必要な時間、および特定の濃度レベルの抗体を誘導するための調製に必要な時間等を含む、当業者に既知であるいずれの方法によっても測定することができる。当業者が理解するように、望ましくない抗体が産生される免疫応答における改良は、抗体量の減少、または望ましくない抗体を産生するために必要とされる時間の増加である。

【0082】

以下の例を、免疫応答における低下率を計算するための例示的な計算として提供する。抗体レベルを比較として用いる場合に、高圧によって処理した治療タンパク質製剤に対する免疫応答が、例えば、高圧によって処理されていない同一のタンパク質の製剤に対する免疫応答と比較して、少なくとも約75%減少されるためには、高圧によって処理された治療タンパク質製剤に応じて産生される抗体のレベルは、高圧によって処理されていない同一のタンパク質の製剤に応じて産生される抗体のレベルと比較して、多くても約25%のみである。所与のレベルの抗体生成を誘導する時間を免疫応答の測定値として用いる際に、高圧によって処理されていないタンパク質の製剤によって、所与のレベルが、例えば約3ヶ月以内に誘導される場合、免疫応答における少なくとも約75%の低下は、高圧によって処理された治療タンパク質製剤によって誘導された抗体のレベルは、1) 3ヶ月で、高圧によって処理されていないタンパク質の製剤に誘導されたレベルの多くても約25%であるか、または2) 高圧によって処理されていないタンパク質の製剤に約3ヶ月以内に誘導された同じレベルの抗体は、高圧によって処理された治療タンパク質製剤によって少なくとも約12ヶ月以内に誘導されるか、のいずれかである（つまり、免疫応答における低下は同じレベルの抗体を誘導するための時間を延長する結果となる）（時間の測定については、少なくとも約(X)% 応答を低下することは、少なくとも約 $(100 \div (100 - X))$ の因数だけ該時間を延長することと同等であるため、時間応答を75%減じ

40

40

【0083】

個体の免疫応答は、治療タンパク質製剤を一回投与した後に測定されてもよい。また、個体の免疫応答は、2回投与後、3回投与後、約5回または約5回以上の投与後、約10回または約10回以上の投与後、約20回または約20回以上の投与後、約30回または約30回以上の投与後、約50回または約50回以上の投与後、約75回または約75回以上の投与後、または約100回または100回以上の投与後等、治療タンパク質製剤の複数回投与後に測定されてもよい。代替として、個体の免疫応答は、治療タンパク質製剤を一回または複数回投与から約1週間またはそれ以上後、2週間またはそれ以上後、3

50

週間またはそれ以上後、1ヶ月またはそれ以上後、2ヶ月またはそれ以上後、3ヶ月またはそれ以上後、4ヶ月またはそれ以上後、6ヶ月またはそれ以上後、9ヶ月またはそれ以上後、12ヶ月またはそれ以上後、18ヶ月またはそれ以上後、または24ヶ月またはそれ以上後等、任意の期間後に測定されてもよい。

【0084】

「その他の考察」

免疫原性を低下させるためのタンパク質製剤の最適な処理のために、いくつかの条件を調節することができる。タンパク質は、容器（高圧可変容量ローディング装置であってもよい）に配置した後に、ペンシルバニア州エリーの High Pressure Equipment Co. から入手可能な高圧発生器等の高圧発生器に配置することにより、高圧を用いて処理することができる。高圧法は、米国特許第6,489,450号および第7,064,192号、米国特許出願公開第2004/0038333号、および国際特許出願WO第02/062827号に記載される。それらに記載される高圧を発生させるための方法は、参照することにより、そのすべてが本明細書に援用される。高圧化におけるタンパク質のリフォールディングに特に好適である特定の装置が開発されてきた。参照することでそのすべてが本明細書に援用される国際特許出願公開WO第2007/062174号を参照のこと。調節可能な条件のいくつかを以下に記載する。

【0085】

タンパク質濃度：タンパク質の濃度は、免疫原性における最適な低下のために調節することができる。少なくとも0.1mg/ml、少なくとも約1.0mg/ml、少なくとも約5.0mg/ml、少なくとも約10mg/ml、または少なくとも約20mg/mlのタンパク質濃度が用いられてもよい。混合物中のタンパク質は、約0.001mg/ml～約300mg/mlの濃度で存在してもよい。したがって、一部の実施形態においては、タンパク質は、約0.001mg/ml～約250mg/ml、約0.001mg/ml～約200mg/ml、約0.001mg/ml～約150mg/ml、約0.001mg/ml～約100mg/ml、約0.001mg/ml～約50mg/ml、約0.001mg/ml～約30mg/ml、約0.05mg/ml～約300mg/ml、約0.05mg/ml～約250mg/ml、約0.05mg/ml～約200mg/ml、約0.05mg/ml～約150mg/ml、約0.05mg/ml～約100mg/ml、約0.05mg/ml～約50mg/ml、約0.05mg/ml～約30mg/ml、約10mg/ml～約300mg/ml、約10mg/ml～約250mg/ml、約10mg/ml～約200mg/ml、約10mg/ml～約150mg/ml、約10mg/ml～約100mg/ml、約10mg/ml～約50mg/ml、約10mg/ml～約30mg/ml、約0.1mg/ml～約100mg/ml、約0.1mg/ml～約10mg/ml、約1mg/ml～約100mg/ml、約1mg/ml～約10mg/ml、約10mg/ml～約100mg/ml、または約50mg/ml～約100mg/mlの濃度で存在してもよい。

【0086】

本発明の文脈において用いられる場合、「一定の期間」という語句およびその同族語は、免疫原性を低下させるためにタンパク質製剤を高圧下で処理するために必要な時間を指す。典型的には、該時間は約15分～約50時間か、または特定のタンパク質に依存して、場合によってはそれより長い（例えばそのタンパク質に必要なだけ、例えば、約1週間、約5日間、約4日間、約3日間等まで）。したがって、当該方法の一部の実施形態においては、タンパク質製剤の処理に十分な時間は、約2～約30時間、約2～約24時間、約2～約18時間、約1～約10時間、約1～約8時間、約1～約6時間、約2～約10時間、約2～約8時間、約2～約6時間、または約2時間、約6時間、約10時間、約16時間、約20時間、または約30時間、約2～約10時間、約2～約10時間、約2～約8時間、約2～約6時間、約12～約18時間、約10～約20時間であってもよい。

【0087】

10

20

30

40

50

タンパク質製剤は、典型的には水溶液の状態である。また、タンパク質製剤は、タンパク質製剤中に存在してもよい、またはタンパク質製剤に添加されてもよい、他の成分を含んでもよい。これらの追加成分は、1つ以上の安定化剤、1つ以上の緩衝剤、1つ以上の界面活性剤、1つ以上のジスルフィドシャッフリング剤 (shuffling agent) の対、1つ以上の塩、1つ以上のカオトロップ、または上記のうちの2つ以上の組み合わせを含む、1つ以上の追加の薬剤であってもよい。タンパク質製剤が医薬品として使用され、追加成分が該製剤に添加される際には、該成分は薬学的に許容されるべきであり、または、もし薬学的に許容されない場合は、該追加成分が医薬品として投与される前にタンパク質製剤から除去されるべきである。例えば、尿素等のカオトロップは、透析によって除去することができる。

10

【0088】

追加の薬剤の量は、タンパク質の選択に依存して変化するが、各追加の薬剤または薬剤の組み合わせの存在 (および量) もしくは不在の効果は、本明細書に提供する教示を用いて判断および最適化することができる。

【0089】

例示的な追加の薬剤は、これらに限定されないが、緩衝液 (例として、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、HEPES, MEPSを含むが、これらに限定されない)、塩 (例として、ナトリウムの塩化物、硫酸塩、および炭酸塩、亜鉛、カルシウム、アンモニア、およびカリウムを含むが、これらに限定されない)、カオトロップ (例として、尿素、塩酸グアニジン、硫酸グアニジン、およびサルコシンを含むが、これらに限定されない)、および安定化剤 (例えば、優先的な排除化合物等) を含む。

20

【0090】

非特異的なタンパク質安定化剤は、タンパク質の最も小さい立体構造に有利に作用する。かかる薬剤には、これらに限定されないが、1つ以上の遊離アミノ酸、1つ以上の優先的に排除する化合物、トリメチルアミノオキシド、シクロデキストラン、分子シャペロン、および上記のうちの2つ以上の組み合わせを含む。

【0091】

アミノ酸は、再凝集を防ぎ、水素結合の解離を促進するために用いることができる。使用することのできる典型的なアミノ酸には、これらに限定されないが、アルギニン、リジン、プロリン、グリシン、ヒスチジン、グルタミン、または上記のうちの2つ以上の組み合わせを含む。一部の実施形態においては、遊離アミノ酸は、約0.1 mMの濃度からアミノ酸溶解度の限界まで、およびいくつかの変形例では約0.1 mM ~ 約2 Mで存在する。最適濃度は所望のタンパク質の関数であり、天然の立体構造に有利であるべきである。優先的に排除する化合物は、対象となるタンパク質の天然の立体構造を安定化するために用いられてもよい。可能性のある優先的に排除する化合物には、これらに限定されないが、スクロース、ヘキシレングリコール、糖 (例えば、スクロース、トレハロース、デキストロース、マンノース)、およびグリセロールを含む。使用することができる濃度の範囲は、0.1 mMから特異的化合物の溶解性限度における最大濃度までである。最適な優先的な排除濃度は、対象となるタンパク質の関数である。

30

【0092】

特定の実施形態において、優先的に排除する化合物は、1つ以上の糖 (例えば、スクロース、トレハロース、デキストロース、マンノース、または上記のうちの2つ以上の組み合わせ) である。一部の実施形態においては、糖は、約0.1 mMから特定の化合物のおよそ溶解限度までの濃度で存在する。一部の実施形態においては、濃度は、約0.1 mM ~ 約2 M、約0.1 mM ~ 約1.5 M、約0.1 mM ~ 約1 M、約0.1 mM ~ 約0.5 M、約0.1 mM ~ 約0.3 M、約0.1 mM ~ 約0.2 M、約0.1 mM ~ 約0.1 M、約0.1 mM ~ 約50 mM、約0.1 mM ~ 約25 mM、または約0.1 mM ~ 約10 mMである。

40

【0093】

一部の実施形態においては、安定化剤は、1つ以上のスクロース、トレハロース、グリ

50

セロール、ベタイン、アミノ酸、またはトリメチルアミンオキsidである。

【0094】

ある実施形態においては、安定化剤はシクロデキストランである。一部の実施形態においては、シクロデキストランは、約0.1 mMからおよそシクロデキストランの溶解限度までの濃度で存在する。いくつかの変形例では約0.1 mM～約2 Mである。

【0095】

ある実施形態においては、安定化剤は分子シャペロンである。一部の実施形態においては、分子シャペロンは、約0.01 mg/ml～10 mg/mlの濃度で存在する。

【0096】

単一の安定化剤が用いられてもよく、または2つ以上の安定化剤の組み合わせ（例えば、少なくとも2つ、少なくとも3つ、または2つもしくは3つもしくは4つの安定化剤）が用いられてもよい。1つより多くの安定化剤が用いられる場合、例えば、少なくとも1つの優先的に排除する化合物と少なくとも1つの遊離アミノ酸、少なくとも1つの優先的に排除する化合物とベタイン等、該安定化剤は異なる種類であってもよい。

10

【0097】

所望のpH値またはpH域を維持するために緩衝剤が存在してもよい。当業者には夥しい数の好適な緩衝剤が既知であり、対象となるタンパク質の天然の立体構造を好む（または、少なくとも嫌わない）pHに基づいて選択されるべきである。無機または有機いずれかの緩衝剤が使用されてもよい。好適な濃度は当業者には既知であり、所望のタンパク質の特徴に基づいて提供される教示に従って、本明細書に記載される方法のために最適化されるべきである。

20

【0098】

このように、一部の実施形態においては、少なくとも1つの無機緩衝剤が用いられる（例えば、リン酸、炭酸等）。ある実施形態においては、少なくとも1つの有機緩衝剤が用いられる（例えば、クエン酸、アセテート、トリス、MOPS、MES、HEPES等）。さらなる無機または有機緩衝剤が当業者に周知である。

【0099】

一部の実施形態においては、1つ以上の緩衝剤は、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝剤、クエン酸緩衝液、HEPES、MEPS、MOPS、MES、またはアセテート緩衝液である。一部の実施形態においては、1つ以上の緩衝剤は、リン酸緩衝液、炭酸緩衝剤、クエン酸、トリス、MOPS、MES、アセテートまたはHEPESである。単一の緩衝剤が用いられてもよく、または2つ以上の緩衝剤の組み合わせ（例えば、少なくとも2つ、少なくとも3つ、または2つもしくは3つもしくは4つの緩衝剤）が用いられてもよい。

30

【0100】

本明細書の文脈で用いられる「界面活性剤」とは、水の表面張力を減少する表面活性化合物である。

【0101】

表面活性剤は特定のタンパク質の可溶性を向上するために用いられる。表面活性剤は、大抵はその臨界ミセル濃度（CMC）を上回るまたは下回る（例えば、CMCを約5%～約20%上回るまたは下回る）濃度で用いられる。しかしながら、これらの値は、選択される界面活性剤に依存して変化し、例えば、オクチルグルコピラノシド等の界面活性剤は、例えば、TWEEN-20（ポリソルベート20）のような界面活性剤よりも低い濃度で効果を発揮する可能性がある。最適濃度は、独自のCMCを有する各表面活性剤の関数である。

40

【0102】

有用な界面活性剤は、非イオン（これらに限定されないが、t-オクチルフェノキシポリエトキシ-エタノールおよびポリオキシエチレンソルビタンを含む）、陰イオン（例えば、ドデシル硫酸ナトリウム）および陽イオン（例えば、塩化セチルピリジニウム）、ならびに両性の薬剤を含む。好適な界面活性剤は、これらに限定されないが、デオキシコール

50

酸、オクチル硫酸ナトリウム、テトラデシル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレンエーテル、コール酸ナトリウム、オクチルチオグルコピラノシド、n-オクチルグルコピラノシド、臭化アルキルトリメチルアンモニア、塩化アルキルトリメチルアンモニア、非界面活性剤型スルホベタイン、およびビス(2-エチルヘキシル)スルホコハク酸ナトリウムを含む。一部の実施形態においては、界面活性剤は、ポリソルベート80、ポリソルベート20、サルコシル、Triton X-100、
-オクチル-グルコ-ピラノシド、またはBrig 35であってもよい。

【0103】

一部の実施形態においては、1つ以上の界面活性剤は、ポリソルベート、ポリオキシエチレンエーテル、臭化アルキルトリメチルアンモニア、ピラノシド、または上記のうちの2つ以上の組み合わせであってもよい。ある実施形態においては、1つ以上の界面活性剤は、
-オクチル-グルコ-ピラノシド、Brig 35、またはポリソルベートであってもよい。

10

【0104】

ある実施形態においては、1つ以上の界面活性剤は、エトキシ酸オクチルフェノール、
-オクチル-グルコ-ピラノシド、ポリオキシエチレングリコール、ドデシルエーテル、サルコシル、ドデシル硫酸ナトリウム、ポリエトキシソルビタン、デオキシコール酸、オクチル硫酸ナトリウム、テトラデシル硫酸ナトリウム、コール酸ナトリウム、オクチルチオグルコピラノシド、n-オクチルチオグルコピラノシド、ビス(2-エチルヘキシル)スルホコハク酸ナトリウム、または上記のうちの2つ以上の組み合わせであってもよい。単一の界面活性剤が用いられてもよく、または2つ以上の界面活性剤の組み合わせ(例えば、少なくとも2つ、少なくとも3つ、または2つもしくは3つもしくは4つの表面活性剤)が用いられてもよい。

20

【0105】

所望のタンパク質が、天然の立体構造にジスルフィド結合を含有する場合は、少なくとも1つのジスルフィドシャッフリング剤の対を混合物中に含んでいることが、一般的に有利である。ジスルフィドシャッフリング剤の対は、歪んだ非天然のジスルフィド結合の破壊および天然のジスルフィド結合の修復を促進する。ジスルフィドシャッフリング剤は、透析によって除去することができる。

【0106】

一般に、ジスルフィドシャッフリング剤の対は、還元剤および酸化剤を含む。例示的な酸化剤は、酸化型グルタチオン、シスチン、シスタミン、分子状酸素、ヨードソ安息香酸、亜硫酸分解、およびペルオキシドを含む。例示的な還元剤は、グルタチオン、システイン、システアミン、ジチオトレイトール、ジチオエリトリトール、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩、または
メルカプトエタノールを含む。

30

【0107】

例示的なジスルフィドシャッフリング剤の対は、酸化型/還元型グルタチオン、シスタミン/システアミン、およびシステイン/システインを含む。

【0108】

付加的なジスルフィドシャッフリング剤の対は、Gilbert HF.(1990).
“Molecular and Cellular Aspects of Thiol Disulfide Exchange.” Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology 63:69-172、およびGilbert HF.(1995). “Thiol/Disulfide Exchange Equilibria and Disulfide Bond Stability.” Biothiols, Pt A. p8-28によって記載され、参照することにより、それらの全体は本明細書に援用される。

40

【0109】

ジスルフィドシャッフリング剤の対の選択および濃度は、所望のタンパク質の特徴に依存する。典型的には、ともに用いられるジスルフィドシャッフリング剤の対(還元剤および

50

酸化剤の両方を含む)の濃度は、酸化チオールの相当物の約0.1 mM ~ 約100 mMであるが、ジスルフィドシャッフリング剤の対の濃度は、該対の存在がジスフィルド結合の再配置において速度を限定するステップとならないように、調節されるべきである。

【0110】

一部の実施形態においては、濃度は約1 mM、約2 mM、約3 mM、約5 mM、約8 mM、約9 mM、約10 mM、約20 mM、約30 mM、約40 mM、約50 mM、約60 mM、約70 mM、約80 mM、約90 mM、約100 mM、約80 mM ~ 約100 mM、約0.1 mM ~ 約20 mM、約10 mM ~ 約50 mM、約1 mM ~ 約100 mM、約50 mM ~ 約100 mM、約20 mM ~ 約100 mM、約0.1 mM ~ 約10 mM、約0.1 mM ~ 約8 mM、約0.1 mM ~ 約6 mM、約0.1 mM ~ 約7 mM、約0.1 mM ~ 約5 mM、約0.1 mM ~ 約3 mM、約0.1 mM ~ 約1 mMである。

10

【0111】

ジスルフィドシャッフリング剤の単一の対が用いられてもよく、またはジスルフィドシャッフリング剤の対の2つ以上の組み合わせ(例えば、少なくとも2つ、少なくとも3つ、または2つもしくは3つもしくは4つのジスルフィドシャッフリング剤の対)が用いられてもよい。

【0112】

カオトロップ剤(「カオトロップ」とも称される)は、グアニジン、塩酸グアニジン(塩酸グアニジウム、GdmHCl)、硫酸グアニジン、尿素、チオシアン酸ナトリウム、および/またはタンパク質内の非共有結合的な分子間結合を破壊し、ポリペプチド鎖が実質的にランダムな立体構造をとることを可能にする、他の化合物を制限無く含む化合物である。

20

【0113】

カオトロップ剤は、約10 mM ~ 約8 Mの濃度で用いられてもよい。カオトロップ剤の最適濃度は、所望のタンパク質および選択される特定のカオトロップ剤に依存する。特定のカオトロップ剤の選択および最適濃度の判断は、本明細書に提供される教示を考慮して当業者により最適化され得る。カオトロップ剤は、タンパク質製剤を医薬品として使用する前に、例えば透析によって、タンパク質製剤から除去することができる。

【0114】

一部の実施形態においては、カオトロップ剤の濃度は、例えば、約10 mM ~ 約8 M、約10 mM ~ 約7 M、約10 mM ~ 約6 M、約0.1 mM ~ 約8 M、約0.1 mM ~ 約7 M、約0.1 mM ~ 約6 M、約0.1 mM ~ 約5 M、約0.1 mM ~ 約4 M、約0.1 mM ~ 約3 M、約0.1 mM ~ 約2 M、約0.1 mM ~ 約1 M、約10 mM ~ 約4 M、約10 mM ~ 約3 M、約10 mM ~ 約2 M、約10 mM ~ 約1 M、または約、10 mM、約50 mM、約75 mM、約0.1 mM、約0.5 mM、約0.8 mM、約1 M、約2 M、約3 M、約4 M、約5 M、約6 M、約7 M、約8 Mである。

30

【0115】

本発明の方法において使用する場合は、水素結合の解離を促進するために、カオトロップ剤を非変性濃度(non-denaturing concentrations)で使うことが有利であることが多い。非変性濃度は所望のタンパク質に依存して変化するが、非変性濃度の範囲は典型的には約0.1 ~ 約4 Mである。一部の実施形態においては、該濃度は約0.1 M ~ 約2 Mである。

40

【0116】

ある実施形態においては、塩化グアニジンまたは尿素がカオトロップ剤である。単一のカオトロップ剤が用いられてもよく、または2つ以上のカオトロップ剤(例えば、少なくとも2つ、少なくとも3つ、または2つもしくは3つもしくは4つのカオトロップ剤)が用いられてもよい。

【0117】

攪拌: タンパク質溶液は、リフォールディングの前および/または最中に攪拌することができる。攪拌は、これらに限定されないが、超音波エネルギー(超音波処理)、機械攪拌

50

、攪拌機によるポンピングを含む方法によって、またはカスケード溶液 (cascading solutions) を介して行うことができる。

【0118】

温度：本明細書に記載する方法は、対照となる特定のタンパク質に依存して、様々な温度値で行うことができる。最適温度は、他の要因と合わせて、本明細書に説明されるように最適化することができる。タンパク質は、およそ室温、約25、約30°C、約37°C、約50、約75、約100、約125、または約20~約125、約25~約125、約25~約100、約25~約75、約25~約50、約50~約125、約50~約100、約50~約75、約75~約125、約5~約100、または約100~約125の範囲を含む様々な温度でリフォールディングすることが可能である。

10

【0119】

本発明の一部の実施形態においては、室温に戻す前に混合物が凍結しない温度まで達していることを条件として、温度は対象のタンパク質に悪影響を与えることなく約-20から約100までの範囲であってよい。したがって、ある実施形態においては、温度は約0~約75、0~約55、約0~約35、約0~約25、約20~約75、約20~約65、約20~約35、約20~約25であってよい。

【0120】

タンパク質の凝集を引き起こすためには、通常、温度上昇を用いるが、不可逆的な変性を引き起こすほどには温度が高くないことを条件として、静水圧の上昇と組み合わせられた場合に、温度上昇が、高圧処理によって達成されるリフォールディングの回収を促進することが可能であることが明らかになっている。通常、リフォールディングのための温度上昇は、不可逆的な活性の損失が生じる温度よりも約20低くあるべきである。減圧の前に好適な低温まで温度が下げられることを条件として、溶液が圧力下にある間に比較的高温（例えば、約100、約105、約110、約115、約120、および約125を含む約60~約125、約80~約110）が用いられてもよい。かかる好適な低温は、大気条件で熱によって誘導される変性または凝集が発生する温度よりも1度低い温度として定義される。

20

【0121】

本発明の目的のための「高圧」または「高静水圧」は、約500バール~約40,000バールとして定義される。一部の実施形態においては、上昇した静水圧は、約500バール~約10,000バール、約500バール~約5,000バール、約500バール~約4,000バール、約500バール~約2,000バール、約500バール~約2,500バール、約500バール~約3,000バール、約500バール~約6,000バール、約1,000バール~約5,000バール、約1,000バール~約4,000バール、約1,000バール~約2,000バール、約1,000バール~約2,500バール、約1,000バール~約3,000バール、約1,000バール~約6,000バール、約1,500バール~約5,000バール、約1,500バール~約3,000バール、約1,500バール~約4,000バール、約1,500バール~約2,000バール、約2,000バール~約5,000バール、約2,000バール~約4,000バール、約2,000バール~約3,000バール、約1,000バール、約1,500バール、約2,000バール、約2,500バール、約3,000バール、約3,500バール、約4,000バール、約5,000バール、約6,000バール、約7,000バール、約8,000バール、約9,000バールであってよい。

30

40

【0122】

減圧：圧力における低減が持続的に行われる場合、圧力が低減される期間中、減圧の速度は一定であっても、または増加もしくは減少してもよい。ある変形例では、減圧の速度は、約5,000バール/1秒~約5,000バール/4日（または約3日、約2日、約1日）である。したがってある変形例では、減圧の速度は、約5,000バール/1秒~約

50

5,000 パール / 80 時間、約 5,000 ~ / 1 秒 ~ 約 5,000 パール / 72 時間、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 5,000 パール / 60 時間、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 5,000 パール / 50 時間、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 5,000 パール / 48 時間、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 5,000 パール / 32 時間、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 5,000 パール / 24 時間、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 5,000 パール / 20 時間、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 5,000 パール / 18 時間、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 5,000 パール / 16 時間、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 5,000 パール / 12 時間、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 5,000 パール / 8 時間、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 5,000 パール / 4 時間、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 5,000 パール / 2 時間、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 5,000 パール / 1 時間、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 1,000 パール / 分、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 500 パール / 分、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 300 パール / 分、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 250 パール / 分、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 200 パール / 分、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 150 パール / 分、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 100 パール / 分、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 80 パール / 分、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 50 パール / 分、約 5,000 パール / 1 秒 ~ 約 10 パール / 分である。例えば、約 10 パール / 分、約 250 パール / 5 分、約 500 パール / 5 分、約 1,000 パール / 5 分、約 250 パール / 5 分、約 2,000 パール / 50 時間、約 3,000 パール / 50 時間、約 4,000 パール / 50 時間等である。一部の実施形態においては、減圧はほぼ瞬間的であってもよく、単純に試料が含有される装置を開けて、直ちに圧力を開放することにより圧力が開放される。

10

20

【0123】

圧力の低減が段階式に行われる場合、そのプロセスは、用いられる最も高い圧力から、少なくとも 2 次レベル（最も高いレベルと大気圧との間の中間である）まで圧力を低下させることを含む。目的は、タンパク質が所望の立体構造をとることを可能にするこの中間の圧力域で、またはその周辺で、インキュベーションおよび保持期間を提供することである。

【0124】

一部の実施形態においては、少なくとも 2 回の段階的な減圧が行われる場合、介在するステップの間に一定圧力での保持期間が存在してもよい。保持期間は、約 10 分 ~ 約 50 時間（あるいは、対象となるタンパク質の性質に依存してさらに長く）であってもよい。一部の実施形態においては、保持期間は約 2 ~ 約 30 時間、約 2 ~ 約 24 時間、約 2 ~ 約 18 時間、約 1 ~ 約 10 時間、約 1 ~ 約 8 時間、約 1 ~ 約 6 時間、約 2 ~ 約 10 時間、約 2 ~ 約 8 時間、約 2 ~ 約 6 時間、または、約 2 時間、約 6 時間、約 10 時間、約 20 時間、約 30 時間、約 2 ~ 約 10 時間、約 2 ~ 約 8 時間、約 2 ~ 約 6 時間であってもよい。

30

【0125】

いくつかの変形例において、減圧は、少なくとも 2 段階の減圧を含む（例えば、最も高い圧力が 2 番目の圧力に低減されてから大気圧まで低減されれば、それは 2 段階減圧である）。他の実施形態においては、減圧は、2 段階より多い減圧（例えば、3、4、5、6 段階等）を含む。一部の実施形態においては、少なくとも 1 つの保持期間が存在する。ある実施形態においては、1 つより多くの保持期間（例えば、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、少なくとも 5 つの保持期間）が存在する。

40

【0126】

当該方法のいくつかの変形例において、最初の段階的な低減後の一定圧力は、約 500 パール ~ 約 5,000 パール、約 500 パール ~ 約 4,000 パール、約 500 パール ~ 約 2,000 パール、約 1,000 パール ~ 約 4,000 パール、約 1,000 パール ~ 約 3,000 パール、約 1,000 パール ~ 約 2,000 パール、約 1,500 パール ~ 約 4,000 パール、約 1,500 パール ~ 約 3,000 パール、約 2,000 パール ~ 約 4,000 パール、約 2,000 パール ~ 約 3,000 パールの静水圧であってもよい。

【0127】

50

特定の変形例において、段階的な低減後の圧力は、段階的な減圧直前の圧力の約 4 / 5 から段階的な減圧前の約 1 / 10 である。例えば、一定圧力は、段階的な減圧直前の圧力の約 4 / 5 ~ 約 1 / 5、約 2 / 3 ~ 約 1 / 10、約 2 / 3 ~ 1 / 5、約 2 / 3 ~ 約 1 / 3、約 1 / 2、または約 1 / 4 の圧力である。1 つより多くの段階的な減圧ステップが存在する場合は、圧力は、最後の減圧直前の圧力を指す（例えば、2000 パールから 1000 パールまで、それが 500 パールまで低減される場合、500 パールの圧力は、直前の前回の減圧値（1000 パール）の 1 / 2 である）。

【0128】

圧力が段階的に低減される場合、減圧の速度（例えば、保持期間の前および後の減圧の期間）は、持続的な低減（例えば、非段階式の）について記載される減圧の速度と同じ範囲であってもよい。本質的に、段階的な減圧は、中間的な一定圧力までの持続的な減圧であり、その後には保持期間、およびその後さらに持続的な減圧が続く。各保持期間の前および後の持続的な減圧の期間は、持続的な減圧の各期間と同じ持続的速度であってもよく、または各期間は異なる低減速度であってもよい。いくつかの変形例において、2 回の持続的な減圧の期間および 1 回の保持期間が存在する。ある実施形態においては、各持続的な減圧期間は、同じ減圧の速度を有する。他の実施形態においては、各期間は異なる減圧の速度を有する。特定の実施形態においては、持続期間は約 8 ~ 約 24 時間である。一部の実施形態においては、持続期間は約 12 ~ 約 18 時間である。特定の実施形態においては、持続期間は約 16 時間である。

10

【0129】

上記条件の組み合わせ：リフォールディングの収率を最適化するために、必要に応じて、上記条件の様々な組み合わせおよび順序（カオトロブおよび酸化還元試薬の存在下において上昇温度での高圧下におけるタンパク質の攪拌等）が採用され得る。

20

【0130】

「高圧装置および考察」

実施例に記載されるような市販の高圧装置および反応容器が、本明細書に記載される方法に従って静水圧を実現するために用いられてもよい（BaroFold Inc.、Boulder Co. を参照）。補足的な装置、容器、および本明細書に記載される方法を実行するためのその他の物質、ならびに上昇圧力法の実行に関する指針は、米国特許第 6,489,450 号および第 7,064,192 号（その全体は本明細書に援用される）に詳細に説明されている。当業者は、9 段目の 39 ~ 62 行目および実施例 2 ~ 4 に特に注目されたい。国際特許出願公開 WO 第 02 / 062827 号（その全体が援用される）も、タンパク質の高静水圧処理のための装置およびその使用に関する詳細な教示を当業者に提供する。高圧装置の使用に関する特定の装置および教示も、国際特許出願公開 WO 第 2007 / 062174 号に提供され、参照することによりその全体は本明細書に援用される。

30

【0131】

マルチウェル試料ホルダーが使用されてもよく、自己接着性のプラスチックカバーを用いて好都合にシールされてもよい。容器、またはマルチウェル試料ホルダー全体は、Flow International Corp. または High Pressure Equipment Co. から市販されるような圧力容器に設置されてもよい。高圧力容器の内部容積の残りは、水またはその他の圧力を伝える液体で充填されてもよい。

40

【0132】

機械的には、主要な高圧力処理の方法には、バッチ式と連続式の 2 つがある。バッチ式処理は、指定されたチャンバを充填し、該チャンバを一定の期間加圧してから、バッチを再加圧するステップを単純に伴う。反対に、連続式処理は、凝集体が圧力チャンバ内に絶えず送り込まれ、可溶性のリフォールディングされたタンパク質が圧力チャンバから出される。どちらの設定においても、温度および圧力における変動は一貫性のない収率の原因となる可能性があるため、これらのパラメータの良好な制御が必要不可欠である。温度および圧力の両方とも、圧力チャンバの内側で測定され、適切に制御されるべきである。

50

【0133】

各標的タンパク質の特異的な安定性の課題に依存して、バッチ試料を扱うための方法が数多く存在する。試料は直接圧力チャンバ内に充填されてもよく、その場合は、水溶液および/または懸濁液が圧力媒体として用いられる。

【0134】

代替的には、試料は、本明細書に記載される容器を含む様々なシールされた柔軟性のある容器内に充填されてもよい。このことは、圧力媒体および混合物が曝露される表面により大きな柔軟性を与える。試料容器は、所望のタンパク質を化学的分解から保護する役割を果たすことさえも可能だと考えることができる（例えば、酸素を除去するプラスチックが利用可能である）。

10

【0135】

連続的処理では、大容積の試料混合物をリフォールディングするために、圧力下において小容積を用いることができる。また、連続的処理の排出口に適切なフィルタを使用して、可溶性および不溶性の両方の凝集体を貯留しつつ、可溶性の所望のタンパク質をチャンバから選択的に放出する。

【0136】

加圧は、圧力（通常は、大気圧または周囲圧力）をより高い圧力まで上昇させるプロセスである。加圧は、0.1秒～10時間におよぶ所定の期間に渡って行う。かかる時間は、1秒、2秒、5秒、10秒、20秒、1分、2分、5分、30分、60分、2時間、3時間、4時間、および5時間を含む。

20

【0137】

減圧は、圧力を高い圧からより低い圧力（通常は、大気圧または周囲圧力）まで降下させるプロセスである。減圧は、10秒～10時間に及ぶ所定の期間に渡って行われ、中間的（しかし、周囲圧力と比較すると30%高い）な圧力レベルで最適なりフォールディングを実現するために1つ以上の時点で中断されてもよい。減圧または中断は、1秒、2秒、5秒、10秒、20秒、1分、2分、5分、10分、30分、60分、2時間、3時間、4時間、および5時間であってもよい。

【0138】

脱ガスは、溶液中に溶解したガスの除去であり、本明細書に記載する方法の実践において有利であることが多い。大気圧と比較して、ガスは高圧ではよりいっそう液体に可溶性であるため、試料中のいずれのヘッドスペースガスも加圧時に溶液中に入り込む。溶液中の余分な酸素が、タンパク質産物を化学的に分解する可能性があり、加圧時に溶液中に存在するガスが、余分な凝集の原因となる可能性がある、という二通りの結果が生まれる。したがって、試料は脱ガス溶液を用いて調製されてもよく、すべてのヘッドスペースは加圧前に液体で充填されるべきである。

30

【実施例1】

【0139】

「CTLA-4-Ig凝集体の減少」

凝集体含有量の高い同一のタンパク質製剤の処理と等しい条件下における、モノマー含有量の高い製剤の高圧処理は、非常に異なる結果をもたらす。溶液の効果的なリフォールディング収率を示す、90%を超える凝集体を含むCTLA-4-Igを用いて、2000パール、pH7で試験を行ったところ、最終的な凝集体組成は高イオン強度および低イオン強度でそれぞれ7%および6%であった。低イオン強度で、高圧（2000パール）で処理されたモノマーは、その天然構造およびサイズ（凝集体1%）を維持した。しかしながら、高圧でのモノマー処理は、最終的には7%の凝集体組成を有する、圧力によって誘導された凝集をもたらした。従って、90%未満の凝集体を含有する試料のリフォールディングは、90%を超える凝集体を有する溶液のリフォールディングに効果的な条件を単純に模倣することはできない。下流精製後の溶液はモノマーと凝集体の両方を含有するため、これらの結果は免疫原性に関する懸念に直接的な影響を与える。したがって、モノマー含有量の高いタンパク質溶液のリフォールディングには、このCTLA-4-Igの例

40

50

に見られるように慎重に取り組まなければならない。高イオン強度で2000バールでリフォールディングされた、凝集体を14%含む凝集溶液は、最終的な凝集体組成6.4%という結果であった。これらの凝集体レベルは、典型的には患者における免疫原性を産生するのに十分であり、医薬規制当局からは一般的には許可されない。しかしながら、凝集体を14%含むCTLA-4-Ig溶液が、2000バール、低イオン強度でリフォールディングされた場合は、最終的な凝集体組成は1%未満である。これらのリフォールディングのステップは、免疫原性を誘導するためにタンパク質溶液の電位を有意に減少するのに効果的である。

【0140】

CTLA-4-Ig (Orencia (登録商標)、アバタセプト) 融合タンパク質製剤における可溶性凝集体のレベルを減少するための手順を決定するために、試験を行った。CTLA-4-Ig 融合タンパク質は、抗体のFc領域と結合したCTLA-4の分子の非膜結合部分(見掛けの分子量25kDaのダイマー)から構成される。タンパク質はグリコシル化されており、SDS-PAGEおよび光散乱を用いて分析すると、見掛けの分子量92kDaを有する。

10

【0141】

90+/-1%の凝集体を含有するCTLA-4-Ig融合物の凝集溶液について試験を行った。凝集した物質を、0mMまたは250mMいずれかのNaClを含有する、10mM TES (pH7.0)を含む緩衝液に、タンパク質濃度0.5mg/mlまで希釈した。凝集溶液を2000バールで16時間25で圧力処理して、リフォールディングについて分析した。その結果を図1に示す。圧力処理後、凝集体レベルは、6.9%+/-0.4%および5.8%+/-0.3%までイオン強度の関数として減少した(それぞれNaCl250mMおよび0mM)。

20

【0142】

モノマー性CTLA-4-Ig融合物の安定性を、圧力および溶液条件の関数として調べた。10mM TES (pH7.0)中タンパク質濃度0.5mg/mlで、イオン強度の関数として(0mMおよび250mMのNaCl)、モノマー性CTLA-4-Igを圧力処理した。圧力が、塩を含有する溶液中に、およそ7%の最終凝集体濃度となった凝集を誘導することが明らかとなった(図2)。塩を含有しない条件では、圧力処理後、タンパク質は凝集体を形成しなかった。

30

【0143】

14.5+/-0.1%の凝集体(「中程度の」凝集体レベル)を含有するCTLA-4-Ig融合物の凝集溶液をリフォールディングするために、高圧試験を行った。凝集物質を、0mMまたは250mMいずれかのNaClを含有する10mM TES緩衝液に、タンパク質濃度0.5mg/mlまで希釈した。凝集溶液を2000バールで16時間25で圧力処理して、リフォールディングについて分析した。高圧処理は、250mM NaClを含有する緩衝液中の凝集体レベルの減少を引き起こし、最終的な割合(6%)は典型的には医薬品としては過度であった。低イオン強度では、凝集体レベルは1%未満まで減少され、本質的に試料から凝集体を排除することになった。その結果を図3に示す。圧力処理後、凝集体レベルは6.9%+/-0.4%および5.8%+/-0.3%までイオン強度の関数として減少した(それぞれNaCl250mMおよび0mM)。

40

【0144】

最初の精製から得られるタンパク質凝集体の溶液を模倣するために、中間的レベルの凝集体(約18%)を含むCTLA-4-Ig溶液を調製した。市販のCTLA-4-Ig融合物の製剤をタンパク質濃度12mg/mlまで希釈して、pH3で3時間23でインキュベートして凝集を誘導した。2回行った結果、最終凝集体濃度はそれぞれ15%および21%であった。凝集体の分析はSE-HPLCを用いて定量化した。高度に凝集した(>90%)CTLA-4-Ig製剤も作製した。凍結乾燥したケーキ66mgを1mlの水に溶解させることにより、CTLA-4-Ig凝集体を調製した。バイアルはシリコンオイルフリーであった。このストックを、10mMクエン酸(pH3)および240m

50

M NaClを含有する緩衝液に、最終タンパク質濃度5mg/mlまで希釈した。周囲条件で17日間放置したところ、約85%の凝集体が生成された。19日目に、周囲条件で1時間溶液を急速に振動させ、さらに凝集を誘導した。この時点で、目に見える沈殿物が観察された。溶液は、直ちにリフォールディングに使用した。90%を超えるの凝集体レベルを確立するために、残りの可溶性物質のSEC分析を用いた。

【0145】

加圧のために、所望の圧力が達成されるまで500バール/分の速度で圧力を上昇させた。リフォールディング中、温度は22（室温）を維持した。試料をおよそ16時間圧力下に置いてから、250バール/5分の速度で減圧した。減圧後、SE-HPLCのために直ちに試料を調製した。

10

【0146】

TSK G3000 SW_{xL}サイズ排除カラム(Tosoh Haas)を装着したBeckman Gold HPLCシステム(Beckman Coulter, Fullerton, CA)上で、タンパク質画分のSE-HPLC分析を行った。Beckman 507eオートサンプラーからタンパク質試料10~25ugを注入するとともに、1.0ml/分の速度で濾過したPBSの移動相(pH7.2)を用いた。吸光度を215nmでモニタリングした。

【実施例2】

【0147】

「組換えヒト成長ホルモン(rhGH)リフォールディング試験」

20

組換えヒト成長ホルモン(rhGH)の免疫原性に関する後の試験(下に示す「組換えヒト成長ホルモン(rhGH)リフォールディング試験」の項目の実施例を参照)において使用するために、rhGHのリフォールディングでの「最良条件」を判断するための試験に着手した。St. John et al.による調査で、rhGHは、振動による凝集に敏感であることが実証されている(St. John, R. J., J. F. Carpenter, et al. (2001), Journal of Biological Chemistry 276(50):46856-46863)。調製用緩衝液または0.75MグアニジンHCl(ibid)を含有する調製用緩衝液中で穏やかに攪拌することにより、2種類の凝集体を産生した。調製用緩衝液は10mMクエン酸ナトリウム(pH6.0)、1mM EDTA、0.1%アジ化ナトリウムとして定義し、90%を超える凝集体(ibid)を含有する凝集rhGH溶液を得た。圧力、温度、およびグアニジンHCl濃度が、2種類の振動により誘導した凝集体のリフォールディングに与える影響を判断するために、高圧リフォールディング試験を行った。調製用緩衝液単独中に形成された凝集体については、2000バールで48時間、タンパク質濃度0.87mg/mlで高圧処理し、90%を上回る回収率の可溶性rhGH(ibid)を得た。同様に、0.75Mグアニジンを含有する調製用緩衝液中の凝集体は、同等の圧力、タンパク質濃度、およびインキュベーション時間(ibid)で1Mグアニジンを追加することで、2000バールでの圧力処理により90%を超える収率でリフォールディングした。これらの条件を、rhGHのリフォールディングのための「最良条件」として採用した。リフォールディング混合物にグアニジンを追加しなかった場合、リフォールディング収率は20% (ibid)を超えなかった。温度上昇も、これらの凝集体をリフォールディングする上で重要な役割を果たすことが明らかとなった。両方の種類の凝集体を、タンパク質濃度0.65mg/mlのリフォールディング緩衝液中で、2000バールの温度でリフォールディングしたところ、少なくとも90%の回収率の可溶性形態(ibid)のrhGHを得た。同等のリフォールディングを25で行ったところ、回収率は20%未満(ibid)であった。

30

40

【0148】

市販のSomatropin(登録商標)(rhGH)を液体剤形で購入した。Pierce(登録商標)のマイクロダイアリスカップを用いて、該物質200ul(濃度10mg/ml)を、10mMクエン酸ナトリウム(pH6.0)を含有する緩衝液中で一晩

50

透析した。この物質を、500mMストックからのEDTAおよび6Mストックからのグアニジンを加えることによって、その最終的な圧力処理条件においた。St. John, R. J., J. F. Carpenter, et al. (2001), Journal of Biological Chemistry 276(50): 46856-46863に記載されるように圧力処理を行った。

【0149】

SE-HPLCアッセイのためにSuperdex 75 10/300 GLカラムを用いた。280nmの波長に設定した紫外線式検出器セットとともに、126溶媒モジュールを有するBeckman Coulter System Gold HPLCおよびWatersのオートサンプラーをオンライン上で使用した。移動相緩衝液はPhosphate Buffered Saline (リン酸緩衝生理食塩水)を使用し、流速は0.6ml/分で、50µlの試料を注入した。試料は注入するまでオートサンプラー内で4に維持した。90分間に渡ってデータを収集した。

10

【0150】

10mMクエン酸ナトリウム(pH6.0)、1mM EDTA、0.1%アジ化ナトリウムを含有する緩衝液中で、グアニジンHCl濃度の関数としてのモノマー性rhGHの安定性、ならびに温度および圧力を調べた。モノマー性のSomotropin (登録商標)を調製用緩衝液中で透析して、2000パール、60、および0.25、0.5、0.75、1、1.5、および2MのグアニジンHClを加えて、2000パール、25で圧力処理した。どちらの処理も、SE-HPLCで判断されたようにモノマー性rhGHの凝集を誘導しなかった。そのため、これらの条件は、中間的な量の凝集体を含有する溶液のリフォールディングに効果的であり、凝集体を含有するrhGH製剤の免疫原性を低下させるために効果的である、という仮説を立てた。しかしながら、1)温度の上昇が不均質な医薬品をもたらす化学的分解の経路を促進し(Manning et al., Pharmaceutical Research, v6, 903-918, 1989)、2)リフォールディングプロセスに加えた試薬は最終剤形の前に容易に除去されなければならないため、これらの結果は、下流処理用途のために免疫原性を低下するリフォールディングプロセスには、さらなる制約があることを実証した。この場合、グアニジンHClは、その毒性のために最終剤形で存在することはできない。必然的に、リフォールディングに用いられる技術についてさらなる考察がなされなければならない。この実施例は、圧力処理の最中のモノマーの安定性を調べることの必要性を示している。

20

30

【実施例3】

【0151】

「組換えヒト成長ホルモン(rhGH)免疫原性試験」

様々な形態のrhGHを投薬された未感作マウスにおいて、凝集体が高圧処理の前および後に免疫原性反応に与える影響を判断するために、Braun et al.によって教示される免疫原性モデル(Braun et al., Pharmaceutical Research, v14, pg. 1472-1478, 1997)と同様に試験を行った。

【0152】

Nordiflex (NovoNordiskが製造するrhGHの液体製剤)からrhGH試料を生成した。Nordiflexの15mgバイアルをコロラド大学の薬局から購入した。1mg/mlの濃度までrhGHを希釈した。使用した希釈剤は、(1)調製用緩衝液、または(2)プルロニックF-68を含まない調製用緩衝液の2つの条件のうちの1つを満たした。Norditropin調製用緩衝液は、希釈剤としての水1.5ml中にヒスチジン1.7mg、プルロニックF-68を4.5mg、フェノール4.5mg、マンニトール58mgを含有した。冷凍解凍サイクル(「FT」と記載)を用いて、希釈した試料を振動させるか(「振動」と記載)またはストレスをかけて、凝集体の形成について調べた。

40

【0153】

50

冷凍 解凍試料は、Nordiflexを適切な調製用緩衝液中に希釈することによって作製した。タンパク質濃度1mg/mlの容積0.75mlのrhGHであるNordiflexを、2mlのポリプロピレンチューブに挿入し、液体窒素に1分浸漬して、確実に完全冷凍した。その後、試料を22℃の水に入れて10分間解凍させた。このサイクルを合計20回繰り返した。

【0154】

モノマー性対照として、未処理のNordiflexの追加試料を調製用緩衝液(Nordiflex 1mg/ml)に希釈し、ストレス条件下に供さずにおいた。

【0155】

この物質に対する圧力の影響は、試料を分割して、該試料(冷凍 解凍を20回繰り返したものの、およびモノマー性対照)を2000バールの圧力で70℃で一晩置くことによって調べた。

10

【0156】

加圧のために、2000バールの圧力が達成されるまで500バール/分の速度で圧力を上昇させた。2000バールで、高圧容器の温度を70℃に上昇し、試料を16時間インキュベートした。減圧(250バール/5分)の前に、圧力容器を室温まで冷却した。減圧後、SE-HPLCのために直ちに試料を調製した。

【0157】

Superdex 75 10/300GLカラムをサイズ排除クロマトグラフィー(SE-HPLC)アッセイに用いた。280nmの波長に設定した紫外線式検出器セットとともに、126溶媒モジュールを有するBeckman Coulter System Gold HPLCおよびWatersのオートサンプラーをオンライン上で使用した。移動相緩衝液はPhosphate Buffered Saline(リン酸緩衝生理食塩水)を流速0.6ml/分で使用した。試料の注入量は50μlであった。試料は注入するまでオートサンプラー内で4℃に維持した。90分間に渡ってデータを収集した。

20

【0158】

6週齢の未感作マウスに、モノマー性rhGH 10ug、rhGHの「FT」凝集体10ug、および高圧で処理した「FT」凝集体10ugを投薬して、「HP FT凝集体」と記載した。投薬は7、14、および21日目に行った。緩衝液も、同等の容積および回数で、対照として投薬した。

30

【0159】

採血の前に、イソフルラン吸入ガスを用いてマウスを麻酔した。各マウスを一匹ずつ持ち、イソフルラン吸入ガスの定常流が流れるチューブの中に鼻を入れた。マウスが少なくとも10回深呼吸をして脱力したら、ガスの流れを5%から3~4%に減少した。足指へのピンチ刺激にマウスが応答しなくなってから、Proparacaine(プロバラカイン)を片目に1滴滴下した。50μlの毛細管を用いて後眼窩静脈洞から2回採血した。マウスは、採血処理の間中、イソフルラン吸入ガスで沈静させた。約100μl程度の十分な血液を採取してから、滅菌ガーゼで目を拭い、プロバラカイン1滴をさらに投与した。処置した目を1~2分軽く押さえた。次に、4つの条件、すなわち、(1)激しい振動、(2)冷凍 解凍、(3)高圧処理、および(4)製造者の推奨する保存条件、のうちの1つに供した等張性の緩衝化した溶液中にヒト成長ホルモン10μgを含有する注射液100μlを、マウスの腹腔内に注射した。耳パンチを用いてマウスを分類表示した。各マウスには、0.1mlの一回注射中にタンパク質10μgを与えた。この投薬間隔および量は、以前の実験から判断された(Hermeling, S., W. Jiskoot, et al. (2005), Pharmaceutical Research 22(6): 847-851)。各群内の雌マウス8匹を0、7、14、21、および28日目に出血させた。

40

【0160】

ELISAを用いて、収集した血清を特異的抗体反応について検査した。Immulon

50

4 High Binding Affinity (HBA) プレートのウェルを、試験室の温度で一晩穏やかに攪拌することによって Norditropin 製剤から調製した、希釈 rhGH (16 µg/ml) 200 µl でインキュベートした。その後、ウェル内の液を排出して、1倍濃度の Phosphate Buffered Saline (リン酸緩衝食塩水 (PBS)) で3回洗浄した。最終洗浄後、ペーパータオルでウェルの水気を拭き取って乾燥させた。その後、1倍濃度の1%ウシ血清アルブミン (BSA) 溶液 200 µl で1時間ウェルをブロックした。ブロッキング溶液が吸収された時点で、1倍濃度の PBS 溶液でウェルを3回洗浄した。B~H行のウェルに希釈緩衝液 100 µl (200 mM HEPES、50 mM 二ナトリウム EDTA、1% BSA を含む 750 mM 塩化ナトリウム、および 0.1% Triton X-100) を充填した。血清を希釈緩衝液に 1:20 で希釈し、A行のウェルに添加した。多チャンネルピペットを用いて、A行の血清希釈液 100 µl を、B行のウェルに移した (1:2の希釈)。C行のウェルに 100 µl を移す前に、B行の溶液 100 µl を、5回ウェル内で吸い上げて排出することにより混合した。G行まで2倍の希釈を続けた。プレートをシールして、試験室の温度で30分間インキュベートした。その後、200 mM HEPES、50 mM 二ナトリウム EDTA、750 mM 塩化ナトリウム、および 0.1% Triton X-100 の溶液でウェルを3回洗浄し、ペーパータオルで水気を拭き取って乾燥させた。希釈緩衝液中で 1:8000 で希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ヤギ抗ラット IgG (Chemicon) 100 µl を用いてインキュベートした。1時間後、ウェルを1倍濃度 PBS で1回洗浄し、ペーパータオルで水気を拭き取って乾燥させ、各ウェルに 3, 3', 5, 5' テトラメチルベンジジン (TMB) 100 µl を添加した。20分後、0.5 M 硫酸 50 µl をウェルに添加して反応をクエンチした。動力学的プレートリーダー Molecular Devices 「Vmax」を用いて、波長 450 nm および基準波長 595 nm で吸光度を記録した。ELISA 反応は、吸光度を標準曲線の直線部分と比較して希釈係数で乗算することにより算出された、存在する結合抗体の濃度として報告した。

【0161】

データは、1つの応答および各試験における群の数に適切なレベルを有する、一般的な要因デザインとしてモデル化した。各群は8つの複写物を有した。ソフトウェアプログラム Stat-Ease 7.2.1 を用いて線形分散解析 (ANOVA) を行った。群の平均値間の [t] の確率を 90% 信頼区間と比較した。平均値を比較した時、選択した 90% 信頼区間に基づいて、[t] < 0.1 の確率は有意であった。

【0162】

Nordiflex の FT 凝集体は、77% の凝集体を含有し、該凝集体の 85% は不溶性であることが分かった。高圧処理後、凝集体レベルは 5% に減少された。

【0163】

6週齢の未感作マウスにモノマー性 rhGH 10 µg、rhGH の「FT」凝集体 10 µg、および高圧で処理した凝集体 10 µg を投薬し、「HP FT 凝集体」と記載した。Nordiflex を開始物質として用いることにより、すべての試料を産生した。各群の雌マウス 8 匹に、投薬を 7、14、および 21 日目に行い、出血は 0、7、14、21、および 28 日目に行った。緩衝液も、同等の容積および回数で、対照として投薬した。

【0164】

血液中のモノマー性成長ホルモンに対する抗体の存在を検出するために、ELISA を行った。4番目の血液に最も高い ELISA 反応が得られた (データは記載せず)。4番目の血液における ELISA 反応の箱ひげ図を図 4 に示す。本試験の結果は、高圧処理した FT 凝集体と比較して、rhGH の「FT」凝集体が有意な反応を生じたこと (確率 (Probability) > 0.0001 未満である [t]) を実証した。モノマー性 rhGH は、緩衝液と比較して微妙な免疫応答を生じ (確率 > 0.07 である [t])、それはマウス中のヒトタンパク質の自然の免疫原性を考慮すれば予想されることである。「HP FT 凝集体」は、モノマー性 rhGH を投薬したマウスと有意差 (確率 > 0.245

である [t]) のないマウスにおける免疫応答を生じ、高圧処理した凝集体のモノマー性の性質および免疫原性の低下を実証した。統計分析を行い、21日目の血液のみが、ベースラインを超える有意な抗体反応を有したと判断した。

【実施例4】

【0165】

「ヒトインターフェロン 1b (IFN) 試験」

以下の例が示すように、高度に凝集した物質のためのリフォールディング条件は、高度にモノマー性である物質のリフォールディングに必ずしも有用であるとは限らない。ヒトインターフェロン 1b (IFN) は、多発性硬化症の治療のために用いられる治療タンパク質である。IFN の発現、リフォールディング、および生成の元のプロセスは米国特許第4,462,940号 (Hanisch and Fernandes 1983; Konrad and Lin 1984) に記載される。遊離システインを除去するために、野生型タンパク質をC17部位で突然変異させてあり、そのためジスフィルドが1つしかなく、分子量は約20kDaである。タンパク質のpIは8.9である。

10

【0166】

Shaked et al. が教示する当該方法の変形例を用いて、IFN を生成した (米国特許第5,183,746号)。2-ブタノールを用いた抽出により、IFN を封入体から精製した。酸沈殿に続いて、Shaked法で使用された2本カラムステップとは対照的に、SDS中で操作した1本のSE-HPLCカラムを用いて物質を精製した。以前に教示された方法と類似する方法において、IFN の酸化を行った。酸化の後、pH9.0で0.1%ラウリン酸ナトリウムを含有する溶液に物質の緩衝液交換を行った。このステップは、タンパク質に結合した全てのSDSを除去するために用いられた。ラウリン酸ナトリウムは、pHを3.0に調節することにより沈殿させた。その後、Tosoh Biosciences 2000SW_{XL}を用いた2回目のSE-HPLC法によって、IFN の凝集体をモノマー形態から分離した。凝集体は、精製ステップの30~40%を占めていた。

20

【0167】

TSK G2000 SW_{XL} サイズ排除カラム (Tosoh Haas) を装着した Beckman Gold HPLCシステム (Beckman Coulter, Fullerton, CA) 上で、タンパク質画分のSE-HPLC分析を行った。Beckman 507eオートサンプラーからタンパク質試料10~25ugを注入するとともに、1ml/分の半分の速度で濾過した10mM HCl (約pH2.0)の移動相を用いた。吸光度を215nmでモニタリングした。

30

【0168】

封入体のリフォールディングに有用なリフォールディング条件下 (90%を超えるの凝集体を含む溶液) でIFN の精製したモノマーを処理した時、高圧処理が凝集をもたらし、SE-HPLCで判断されたように、凝集体含有量は0.1%から29 +/- 2%まで増加した。

【0169】

米国特許第4,462,940号および第5,183,746号に教示されるSDSリフォールディングおよび精製プロセスに従ってIFN 凝集体 (凝集体80%を含む溶液) を形成した。ラウリン酸ナトリウムの沈殿後、10mMのHCl泳動緩衝液を用いたサイジングによりモノマーと凝集体の画分を分離して、10mMのHClを含有する緩衝液中に調合した。タンパク質濃度80ug/mlで、凝集体の画分を2700パールで16時間25 で圧力処理した。250パール/分での減圧を用いた。図5に示すように、封入体のリフォールディングには適用することのできない溶液条件において、高圧処理は、凝集体の大半を凝集体 (左側のピーク) からモノマー (右側のピーク) に変換する結果となった。この例は、精製プロセスの後に免疫原性を低下するためのリフォールディング条件は、封入体のリフォールディングに有用ではないことを示すものである。

40

【実施例5】

50

【0170】

「組換えマウスインターフェロン (rmIFN)」
 様々な形態のrmIFN - を投薬されたマウスにおいて、凝集体が高圧処理の前および後に免疫原性反応に与える影響を判断するために、試験を行った。上述のrhGHホルモン試験とは反対に、ネズミ科動物由来なので、投薬されたタンパク質に対して固有の免疫反応はないはずである。

【0171】

モノマー性rmIFN - を調製するために、PBL Biomedical Laboratoriesからモノマー性rmIFN - を購入し、20mMヒスチジン(pH6.0)、166mM NaCl、およびグリセロール6%を含有する緩衝液中で透析した。透析ステップは凝集を誘導する可能性があるが、凝集体は遠心分離によって除去することができる。可溶性画分をSE-HPLCによって分析すると、完全にモノマー性であることが分かった。透析ステップ中の予期せぬタンパク質の損失によって、本試料中のグリセロール含有量が高くなった。結果として、本試料は予測したとおりには希釈されなかった。物質は投薬前に滅菌濾過し、濾過することにより凝集が誘導されなかったことを確認するためにSE-HPLC分析を行った。

10

【0172】

凝集したrmIFN - を産生するために、PBL Biomedical Laboratoriesからモノマー性rmIFN - (0.33mg/ml)を購入し、滅菌濾過してボルテックスのレベル3で5分撹拌することにより凝集させた。該物質を1:3で希釈し、0.1mg/mlのタンパク質濃度で、不溶性凝集体53%、可溶性凝集体7%、およびモノマー40%を含有する最終物質を産生した。SE-HPLCによって凝集体含有量を判断した。該物質を、20mMヒスチジン(pH6.0)、166mM NaCl、2%グリセロールを含有する緩衝液中に調合した。

20

【0173】

rmIFN - の不溶性凝集体(凝集した物質の産生を参照)を、20mMヒスチジン(pH6.0)、166mM NaCl、2%グリセロールを含有するリフォルディング緩衝液に再懸濁して、2000パールで16時間25 で圧力処理した。250パール/5分の速度で減圧を行った。SE-HPLCにより、圧力によって調節されたリフォルディング収率は39%であると算出されたが、滅菌濾過後に凝集体を含まない物質を産生するために不溶性物質を遠心分離によって除去した(SE-HPLC)。

30

【0174】

C57Bl/6マウス(6~7週齢、雌)に、モノマー性(モノマー100%)の、凝集させた(不溶性凝集体53%、可溶性凝集体7%、モノマー40%)または高圧処理した凝集体(モノマー100%)を、投薬レベル0.5および2.3ug/日で、1~5日目、8~12日目、および15~20日目に以下に説明するように投薬した。8、15、23日目に眼窩から採血し、40日目に全採血した。内部開発したELISAを用いて、異なる用量の関数としてモノマー性IFN - に対する抗体の発達をモニタリングした。

【0175】

Washington Bioにおいて、C57Bl/6マウス(6~7週齢、雌)に、モノマー性の(モノマー100%)、凝集させた(不溶性凝集体53%、可溶性凝集体7%、モノマー40%)または高圧処理した凝集体(モノマー100%)を、投薬レベル0.5および2.3ug/日で投薬した。1群あたり8匹のマウスに1~5日目、8~12日目、および15~20日目に投薬し、8、15、23日目に眼窩から採血し、40日目にプロトコルPK-BF-1に従って全採血した。血液試料を2つのバイアルに分注し、BaroFoldに発送する前にドライアイス上で-70 で保存した。ELISAで分析するまで、-70 で試料を維持した。

40

【0176】

収集した血清を、特異的抗体応答についてELISAを用いて検査した。rMuIFN - (PBL Biomedical Laboratories)から調製した希釈rM

50

uIFN- γ 150 μ l (pH 9.5の炭酸 重炭酸緩衝液50 mM中250 ng/ml)を用いて、Immulon 4 High Binding Affinity (HBA) プレートのウェルを、試験室の温度で一晩コーティングした。その後、ウェル内の液を排出して、1倍濃度のPhosphate Buffered Saline (リン酸緩衝食塩水 (PBS)) で2回洗浄した。最終洗浄後、ペーパータオルでウェルの水気を拭き取って乾燥させた。その後、HEPES 40 mM、EDTA 10 mM、pH 7.4のNaCl 150 mM溶液中の1%ウシ血清アルブミン (BSA) 200 μ lで1時間ウェルをブロックした。ブロッキング溶液が吸収された時点で、1倍濃度のPBS溶液でウェルを3回洗浄した。直ちに使用しないプレートを10%スクロース200 μ lでコーティングして、10分間放置した。スクロース溶液をウェルから排出し、プレートをシールして、必要な時まで4℃で保存した。1週間保存されたプレートの有効性が損なわれないことを確認するために、試験を行った。

10

【0177】

希釈緩衝液150 μ l (1% BSA、0.1% Triton X-100、40 mM HEPES、10 mM EDTA、pH 7.4の150 mM NaCl)を各ウェルに充填することによりプレートを平衡化し、残りの物質を除去する前に室温で20分間インキュベートした。B~H行のウェルに希釈緩衝液100 μ lを充填した。ウェルA1およびA2には、標準的なモノクローナル抗体150 μ l (PBL Biomedical Laboratoriesのラット抗MuIFN- γ) (200 ng/ml)を充填した。血清を希釈緩衝液に1:10で希釈し、A行のウェルに150 μ l添加した。ELISAを用いて試料を1:3で希釈し、最後の列をブランクとした。その後プレートをシールし、試験室の温度で60分間インキュベートした。洗浄緩衝液1 (HEPES 40 mM、EDTA 10 mM、pH 7.4のNaCl 150 mMおよび0.1% Triton X-100)でウェルを3回洗浄し、ペーパータオルで水気を拭き取って乾燥させた。

20

【0178】

標準物質を含有するウェルを、希釈緩衝液中で1:15,000で希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ヤギ抗ラットIgG (Chemicon) 100 μ lを用いてインキュベートした。試料を含有するウェルを、希釈緩衝液中で1:2000で希釈したワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ヤギ抗ラットIgG (Chemicon) 100 μ lを用いてインキュベートした。1時間後、ウェルを洗浄緩衝液1で2回、1倍濃度PBSで1回洗浄し、ペーパータオルで水気を拭き取って乾燥させた。各ウェルを3, 3', 5, 5' テトラメチルベンジジン (TMB) 100 μ lで充填した。20分後、0.5 M 硫酸50 μ lをウェルに添加して反応をクエンチした。動力学的プレートリーダー-Molecular Devices「Vmax」を用いて、波長450 nmおよび基準波長595 nmで吸光度を記録した。

30

【0179】

450 nmでの吸光度の数値として報告されたELISA反応を、標準曲線上の直線部分の希釈係数で乗算した。選択した希釈係数が結果に影響を与えなかったことを確認するために試験が行われた。

【0180】

TSK G2000 SW_{xL} サイズ排除カラム (Tosoh Haas) を装着したBeckman Gold HPLCシステム (Beckman Coulter, Fullerton, CA) 上で、タンパク質画分のSE-HPLC分析を行った。Beckman 507eオートサンプラーからタンパク質試料10~25 μ gを注入するとともに、1 ml/分の半分の速度で濾過した10 mM HCl (約pH 2.0)の移動相を用いた。吸光度を215 nmでモニタリングした。

40

【0181】

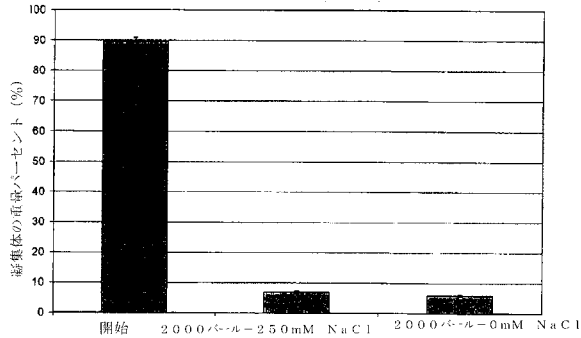
23日目の血液に関するデータ分析 (投薬終了後に行われた) は、rmIFN- γ の凝集体を投薬されたマウスのみが、確率>0.0001未満の[t]モノマー性対照と比較して、有意な免疫応答を有することを示唆した。また、高用量の凝集体は、確率>0.0

50

19である [t] と上昇した応答をもたらす結果となり、モノマー性IFN- γ を投薬された動物または高圧処理した凝集体を投薬された動物のいずれにおいても反映されなかった。モノマーまたはHP処理した凝集体を投薬された動物は、有意差のない免疫応答を示した。8日目の血液の分析はベースラインの応答を示し、15日間の凝集体投薬に供された動物における陽性応答を示唆するものであった(図6、モノマー性の、凝集させた、高圧処理したrmIFN- γ の凝集体を投薬された未感作マウスのELISA反応を参照。投薬は、0.5ug/投薬または2.3ug/投薬のいずれかの用量で15日間行われた)。

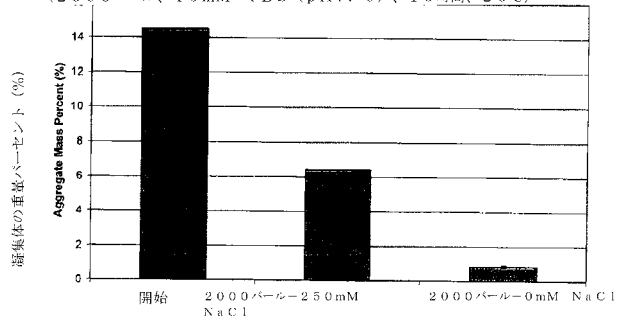
【 図 1 】

凝集>90%のCTLA-4-Fcの高圧リフォールディング：イオン強度の影響
(2000バール、10mM TES (pH7.0)、16時間、25℃)



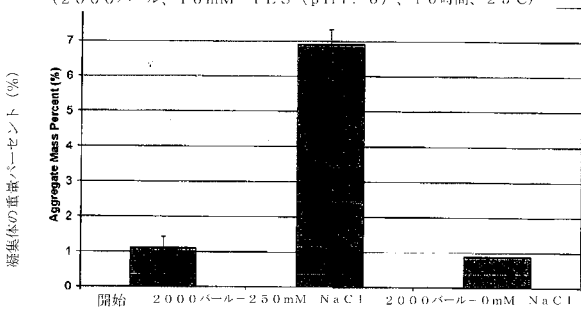
【 図 3 】

凝集15%のCTLA-4-Fcの高圧リフォールディング：イオン強度の影響
(2000バール、10mM TES (pH7.0)、16時間、25℃)

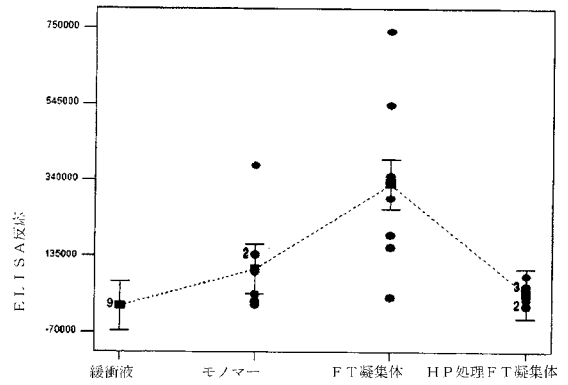


【 図 2 】

凝集>90%のCTLA-4-Fcの高圧リフォールディング：イオン強度の影響
(2000バール、10mM TES (pH7.0)、16時間、25℃)

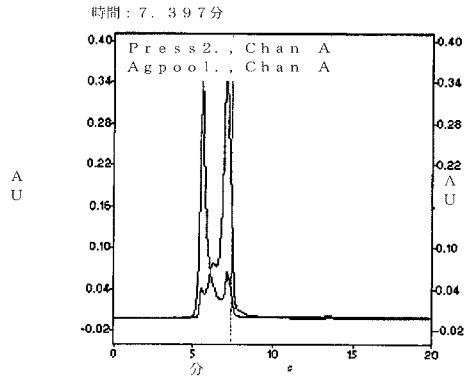


【 図 4 】

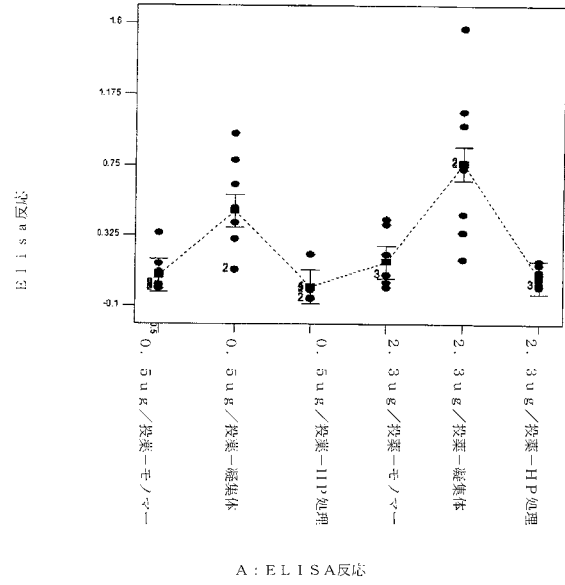


投薬

【 図 5 】



【 図 6 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/020128

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K1/113 A61K38/27 A61K38/21 A61K38/17		
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) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/062827 A (UNIV TECHNOLOGY CORP [US]; RANDOLPH THEODORE W [US]; CARPENTER JOHN F) 15 August 2002 (2002-08-15) cited in the application	1-17
Y	examples	18-22
X	ST JOHN R J ET AL: "HIGH PRESSURE REFOLDING OF RECOMBINANT HUMAN GROWTH HORMONE FROM INSOLUBLE AGGREGATES. STRUCTURAL TRANSFORMATIONS, KINETIC BARRIERS, AND ENERGETICS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.(MICROFILMS), AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 276, no. 50, 14 December 2001 (2001-12-14), pages 46856-46863, XP002227219	1-17
Y	the whole document	18-22
----- -/--		
<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 *E* earlier document but published on or after the international filing date *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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* 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 *X* 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 *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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 August 2008		Date of mailing of the international search report 29/08/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bayrak, Sinasi

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/020128

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/02901 A (UNIV TECHNOLOGY CORP [US]) 20 January 2000 (2000-01-20) the whole document	1-17
Y	BRAUN A ET AL: "Protein aggregates seem to play a key role among the parameters influencing the antigenicity of interferon alpha (IFN-alpha) in normal and transgenic mice." PHARMACEUTICAL RESEARCH OCT 1997; vol. 14, no. 10, October 1997 (1997-10), pages 1472-1478, XP002492311 ISSN: 0724-8741 the whole document	18-22
E	WO 2008/033555 A (BAROFOLD INC [US]; RANDOLPH THEODORE W [US]; CARPENTER JOHN F [US]; JO) 20 March 2008 (2008-03-20) the whole document	1-17
P,X	WO 2007/062174 A (BAROFOLD INC [US]; ANTMAN JEFFREY DAVID [US]; CRISMAN RYAN LESLEY [US]) 31 May 2007 (2007-05-31) cited in the application the whole document	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/020128

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02062827 A	15-08-2002	AT 390436 T	15-04-2008
		CA 2434045 A1	15-08-2002
		DK 1434789 T3	07-07-2008
		EP 1434789 A2	07-07-2004
		JP 2004530651 T	07-10-2004
		JP 2008031182 A	14-02-2008
		MX PA03003867 A	15-10-2004
WO 0002901 A	20-01-2000	AT 349460 T	15-01-2007
		AU 4975699 A	01-02-2000
		DE 69934585 T2	25-10-2007
		DK 1095056 T3	23-04-2007
		EP 1095056 A1	02-05-2001
WO 2008033555 A	20-03-2008	NONE	
WO 2007062174 A	31-05-2007	AU 2006318435 A1	31-05-2007

フロントページの続き

(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, LV, MC, MT, 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, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 カーペンター, ジョン, エフ.
アメリカ合衆国, コロラド州 80127, リトルトン, ウェスト ボウルズ ドライブ 12478

(72)発明者 セイント ジョン, リチャード
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94080, サウス サン フランシスコ, ジャシント レーン 7

(72)発明者 ヘスターバーグ, リンダ, ケー.
アメリカ合衆国, コロラド州 80304, ボールダー, マップルトン アベニュー 501

(72)発明者 ゼーフェルト, マシュー, ビー.
アメリカ合衆国, コロラド州 80305, ボールダー, ベア マウンテン ドライブ 1285-シー

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA06 AA07 BA03 BA50 NA06
4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA40 DA15 DA31 DA76 DA86 EA22
EA30 FA65

专利名称(译)	高压处理蛋白质以降低免疫原性		
公开(公告)号	JP2010503683A	公开(公告)日	2010-02-04
申请号	JP2009528327	申请日	2007-09-17
[标]申请(专利权)人(译)	BAROFOLD		
申请(专利权)人(译)	Baroforudo公司		
[标]发明人	ランドルフセオドルダブリュー カーペンタージョンエフ セイントジョンリチャード ヘスターバーグリンダルケー ゼーフェルトマシュービー		
发明人	ランドルフ,セオドル,ダブリュー, カーペンター,ジョン,エフ, セイント ジョン,リチャード ヘスターバーグ,リンダル,ケー, ゼーフェルト,マシュー,ビー.		
IPC分类号	C07K14/00 A61K38/00 G01N33/53 A01K67/027 C07K19/00		
CPC分类号	C07K1/1136 A61K38/1774 A61K38/215 A61K38/27		
FI分类号	C07K14/00 A61K37/02 G01N33/53.N A01K67/027 C07K19/00		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA03 4C084/BA50 4C084/NA06 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA15 4H045/DA31 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA30 4H045/FA65		
优先权	60/844996 2006-09-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供具有降低的免疫原性的蛋白质组合物，以及生产这种组合物。[解决方案] 具有降低的免疫原性的高压处理的治疗性蛋白质组合物，其特征在于其包含分离的蛋白质和药学上可接受的载体。[选型图]图1

【 2 】

凝集>90%のCTLA-4-Fcの高压リフォールディング：イオン強度の影響
(2000バル、10mM TES (pH7.0)、16時間、25℃)

