

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号  
特表2025-502157  
(P2025-502157A)

(43)公表日 令和7年1月24日(2025.1.24)

|            |                  |         |        |             |                   |
|------------|------------------|---------|--------|-------------|-------------------|
| (51)国際特許分類 |                  | F I     |        | テーマコード (参考) |                   |
| C O 7 K    | 1/22 (2006.01)   | C O 7 K | 1/22   | 4 H 0 4 5   |                   |
| B O 1 J    | 20/281 (2006.01) | B O 1 J | 20/281 | R           |                   |
| G O 1 N    | 30/26 (2006.01)  | G O 1 N | 30/26  | A           |                   |
| G O 1 N    | 30/88 (2006.01)  | G O 1 N | 30/88  | J           |                   |
| G O 1 N    | 30/44 (2006.01)  | G O 1 N | 30/44  |             |                   |
|            |                  | 審査請求    | 未請求    | 予備審査請求      | 未請求 (全44頁) 最終頁に続く |

|                   |                               |         |                                                                                                                                          |
|-------------------|-------------------------------|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21)出願番号          | 特願2024-541632(P2024-541632)   | (71)出願人 | 597160510<br>リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド<br>REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.<br>アメリカ合衆国10591-6707 ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソー・ミル・リバー・ロード777番 |
| (86)(22)出願日       | 令和5年1月11日(2023.1.11)          |         |                                                                                                                                          |
| (85)翻訳文提出日        | 令和6年8月27日(2024.8.27)          |         |                                                                                                                                          |
| (86)国際出願番号        | PCT/US2023/010594             |         |                                                                                                                                          |
| (87)国際公開番号        | WO2023/137062                 |         |                                                                                                                                          |
| (87)国際公開日         | 令和5年7月20日(2023.7.20)          |         |                                                                                                                                          |
| (31)優先権主張番号       | 63/298,745                    |         |                                                                                                                                          |
| (32)優先日           | 令和4年1月12日(2022.1.12)          |         |                                                                                                                                          |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US)                        | (74)代理人 | 100083806<br>弁理士 三好 秀和                                                                                                                   |
| (31)優先権主張番号       | 63/430,477                    | (74)代理人 | 100111235<br>弁理士 原 裕子                                                                                                                    |
| (32)優先日           | 令和4年12月6日(2022.12.6)          | (74)代理人 | 100195257<br>弁理士 大淵 一志                                                                                                                   |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US)                        | (72)発明者 | チェン、 シンディ                                                                                                                                |
| (81)指定国・地域        | AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ |         |                                                                                                                                          |

|        |  |        |  |
|--------|--|--------|--|
| 最終頁に続く |  | 最終頁に続く |  |
|--------|--|--------|--|

(54)【発明の名称】 アフィニティークロマトグラフィーを使用した不純物からのヘテロ二量体タンパク質の分離能を改善する方法

(57)【要約】

一連のクロマトグラフィーサイクルを通して不純物からヘテロ二量体タンパク質（例えば、二重特異性抗体）を精製する方法が開示される。様々な実施形態では、溶出緩衝液のpHは、一連の中のサイクルの増加とともに増加して、結合不純物による汚染を最小限に維持し、かつヘテロ二量体タンパク質の回収の著しい喪失を伴わない。

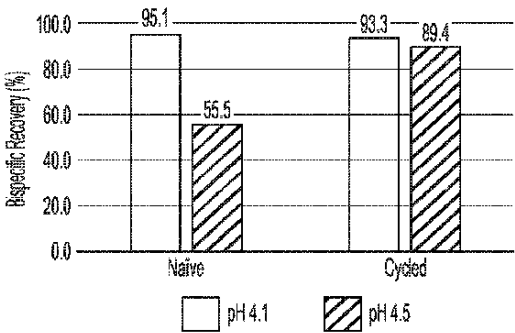


FIG. 4B

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヘテロ二量体タンパク質を精製する方法であって、

(a) 一連のクロマトグラフィーサイクルを実施することであって、各サイクルが、

(i) ヘテロ二量体タンパク質と不純物との混合物を、タンパク質結合リガンドを含有するアフィニティーマトリクスに導入することであって、前記ヘテロ二量体タンパク質が、前記タンパク質結合リガンドに対して異なるアフィニティを有する第一および第二のポリペプチドを含み、少なくとも一つの不純物が、前記タンパク質結合リガンドに結合し、少なくとも一つの不純物が、前記タンパク質結合リガンドに結合しない、導入することと、

10

(ii) 前記アフィニティーマトリクスを、5～9の第一のpHで第一の洗浄緩衝液で洗浄して、非結合不純物を除去することと、

(iii) 第二のpHで第一の溶出緩衝液中の前記アフィニティーマトリクスから前記ヘテロ二量体タンパク質を溶出することと、

(iv) 前記アフィニティーマトリクスを、4未満の第三のpHで第二の洗浄緩衝液で洗浄して、結合不純物を除去することと、を含み、

前記第二のpHが、前記一連のクロマトグラフィーサイクル内の予備的な一連のサイクル中の予備的なpHであり、前記第二のpHが、前記一連のクロマトグラフィーサイクル内の後続の一連のサイクル中に、前記予備的なpHよりも高い後続のpHまで上昇し、前記予備的なpHおよび前記後続のpHが、4.0～5.2の範囲内である、実施すること、および

20

(b) 溶出物中の前記アフィニティーマトリクスから前記ヘテロ二量体タンパク質を収集すること、を含む、方法。

## 【請求項 2】

前記予備的な一連のサイクルが20サイクルからなる、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記予備的な一連のサイクルが30サイクル、または40サイクルからなる、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記予備的な一連のサイクルが50サイクル、または60サイクルからなる、請求項1に記載の方法。

30

## 【請求項 5】

前記予備的な一連のサイクルが70サイクル、または80サイクルからなる、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記後続の一連のサイクルが、少なくとも20サイクルからなる、請求項2～5のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記後続の一連のサイクルが、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、または少なくとも80サイクルからなる、請求項6に記載の方法。

40

## 【請求項 8】

前記予備的なpHが4.0～4.2である、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記予備的なpHが4.1±0.05である、請求項8に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記後続のpHが4.3～4.7である、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記後続のpHが4.5±0.05である、請求項10に記載の方法。

## 【請求項 12】

50

ヘテロ二量体タンパク質を精製する方法であって、

(a) 一連のクロマトグラフィーサイクルを実施することであって、各サイクルが、

(i) ヘテロ二量体タンパク質と不純物との混合物を、タンパク質結合リガンドを含有するアフィニティマトリクスに導入することであって、前記ヘテロ二量体タンパク質が、前記タンパク質結合リガンドに対して異なるアフィニティを有する第一および第二のポリペプチドを含み、少なくとも一つの不純物が、前記タンパク質結合リガンドに結合し、少なくとも一つの不純物が、前記タンパク質結合リガンドに結合しない、導入することと、

(i i) 前記アフィニティマトリクスを、5～9の第一のpHで第一の洗浄緩衝液で洗浄して、非結合不純物を除去することと、

(i i i) 第二のpHで第一の溶出緩衝液中の前記アフィニティマトリクスから前記ヘテロ二量体タンパク質を溶出することと、

(i v) 前記アフィニティマトリクスを、4未満の第三のpHで第二の洗浄緩衝液で洗浄して、結合不純物を除去することと、を含む、実施すること、

(b) 前記一連のクロマトグラフィーサイクル内の前記サイクルのうちのいずれか一つ以上の後に、前記ヘテロ二量体タンパク質を含有する溶出物中の結合不純物のレベルを測定すること、および前記測定された結合不純物のレベルを、結合不純物の参照レベルと比較することであって、前記結合不純物の測定されたレベルが、前記結合不純物の参照レベルを超える場合、前記一連のクロマトグラフィーサイクル内の後続のサイクルにおいて前記第二のpHを増加させ、前記第二のpHは、前記一連のクロマトグラフィーサイクル内の各サイクルまたは後続のサイクルの間、4.0～5.2の範囲内である、比較すること、ならびに、

(c) 前記溶出物中の前記アフィニティマトリクスから前記ヘテロ二量体タンパク質を収集すること、を含む、方法。

【請求項13】

前記結合不純物の参照レベルが、2%～10%である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記結合不純物の参照レベルが、3%～7%である、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記結合不純物の参照レベルが、5%±0.5%である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記溶出物中の前記結合不純物のレベルが、前記一連のクロマトグラフィーサイクル内の各サイクル後に測定される、請求項12～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記溶出物中の前記結合不純物のレベルが、前記一連のクロマトグラフィーサイクルの5番目のサイクルごとの後に測定される、請求項12～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

前記溶出物中の前記結合不純物のレベルが、前記一連のクロマトグラフィーサイクルの、10番目のサイクルごと、または20番目のサイクルごとの後に測定される、請求項12～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記溶出物中の前記結合不純物のレベルが、前記一連のクロマトグラフィーサイクルの、40番目のサイクルまたは50番目のサイクルに続いて測定される、請求項12～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

前記溶出物中の前記結合不純物のレベルが、一連のサイクルから収集された組み合わされた溶出物プールで測定される、請求項12～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

前記結合不純物の測定されたレベルが前記結合不純物の参照レベルを超える場合、前記

10

20

30

40

50

第二の pH が、4.0～4.2 の範囲から 4.3～4.7 の範囲に増加する、請求項 12～20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記結合不純物の測定されたレベルが前記結合不純物の参照レベルを超える場合、前記第二の pH が、 $4.1 \pm 0.05$  から  $4.5 \pm 0.05$  に増加する、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

ヘテロ二量体タンパク質を精製する方法であって、

(a) 一連のクロマトグラフィーサイクルを実施することであって、各サイクルが、

(i) ヘテロ二量体タンパク質と不純物との混合物を、タンパク質結合リガンドを含有するアフィニティマトリクスに導入することであって、前記ヘテロ二量体タンパク質が、前記タンパク質結合リガンドに対して異なるアフィニティを有する第一および第二のポリペプチドを含み、少なくとも一つの不純物が、前記タンパク質結合リガンドに結合し、少なくとも一つの不純物が、前記タンパク質結合リガンドに結合しない、導入すること、

(ii) 前記アフィニティマトリクスを、5～9 の第一の pH で第一の洗浄緩衝液で洗浄して、非結合不純物を除去することと、

(iii) 第二の pH で第一の溶出緩衝液中の前記アフィニティマトリクスから前記ヘテロ二量体タンパク質を溶出することと、

(iv) 前記アフィニティマトリクスを、4 未満の第三の pH で第二の洗浄緩衝液で洗浄して、結合不純物を除去することと、を含み、

前記第二の pH が、前記一連のクロマトグラフィーサイクル内の一次的な一連のサイクル中の一次 pH であり、前記第二の pH が、前記一連のクロマトグラフィーサイクル内の前記一次的な一連のサイクルに続く二次的な一連のサイクル中に、前記一次 pH よりも高い二次 pH まで上昇し、前記第二の pH が、前記一連のクロマトグラフィーサイクル内の前記二次的な一連のサイクルに続く三次的な一連のサイクル中に、前記二次 pH よりも高い三次 pH まで上昇し、前記一次 pH、前記二次 pH、および前記三次 pH は、4.0～5.2 の範囲内である、実施すること、および

(b) 溶出物中の前記アフィニティマトリクスから前記ヘテロ二量体タンパク質を収集すること、を含む、方法。

【請求項 24】

前記一次的な一連のサイクルが、5～50 サイクルを含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記一次的な一連のサイクルが、最大 20 サイクルを含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記一次的な一連のサイクルが、最大 40 サイクルを含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

前記二次的な一連のサイクルが、5～50 サイクルを含む、請求項 23～26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記二次的な一連のサイクルが、10～25 サイクルを含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記三次的な一連のサイクルが、5～50 サイクルを含む、請求項 23～28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記三次的な一連のサイクルが、10～25 サイクルを含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記一次 pH が、4.0～4.2 の範囲である、請求項 23～30 のいずれか一項に記

10

20

30

40

50

載の方法。

【請求項 3 2】

前記一次 p H が  $4.1 \pm 0.05$  である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記二次 p H が、 $4.2 \sim 4.4$  の範囲である、請求項 2 3 ～ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記二次 p H が  $4.3 \pm 0.05$  である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記三次 p H が、 $4.4 \sim 4.6$  の範囲である、請求項 2 3 ～ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 3 6】

前記三次 p H が  $4.5 \pm 0.05$  である、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記第二の p H が、前記一連のクロマトグラフィーサイクル内の前記三次的な一連のサイクルに続く第 4 の一連のサイクル中、前記三次 p H よりも高い第 4 の p H まで上昇し、前記第 4 の p H は  $4.0 \sim 5.2$  の範囲内である、請求項 2 3 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記第二の p H が、前記一連のクロマトグラフィーサイクル内の前記第 4 の一連のサイクルに続く第 5 の一連のサイクル中、前記第 4 の p H よりも高い第 5 の p H まで上昇し、前記第 5 の p H は  $4.0 \sim 5.2$  の範囲内である、請求項 3 7 に記載の方法。 20

【請求項 3 9】

前記第二の p H が、前記一連のクロマトグラフィーサイクル内の前記第 5 の一連のサイクルに続く第 6 の一連のサイクル中、前記第 5 の p H よりも高い第 6 の p H まで上昇し、前記第 6 の p H は  $4.0 \sim 5.2$  の範囲内である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記二次 p H が、前記一次 p H よりも  $0.1 \sim 0.9$  高い p H であり、前記三次 p H が、前記二次 p H よりも  $0.1 \sim 0.9$  高い p H であり、前記第 4 の p H が、前記三次 p H よりも  $0.1 \sim 0.9$  高い p H であり、前記第 5 の p H が、前記第 4 の p H よりも  $0.1 \sim 0.9$  高い p H であり、および／または前記第 6 の p H が、前記第 5 の p H よりも  $0.1 \sim 0.9$  高い p H であり、前記一次 p H は、 $4.0 \sim 4.2$  の範囲内である、請求項 3 7 ～ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 4 1】

前記一次 p H が  $4.1 \pm 0.05$  である、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記一次的な一連のサイクル、前記二次的な一連のサイクル、前記三次的な一連のサイクル、前記第 4 の一連のサイクル、前記第 5 の一連のサイクル、および／または前記第 6 の一連のサイクルの各々が、前記一連のクロマトグラフィーサイクル内で 5 ～ 50 サイクルを含む、請求項 3 7 ～ 4 1 のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 4 3】

前記不純物が、前記第一および第二のポリペプチドのホモ二量体種を含む、請求項 1 ～ 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記タンパク質結合リガンドが、プロテイン A であり、前記アフィニティマトリクスが、基質に貼り付けられた前記プロテイン A リガンドを含む、請求項 1 ～ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記プロテイン A リガンドが、Z ドメイン四量体を含む操作されたプロテイン A、Y ドメイン四量体を含む操作されたプロテイン A、または D ドメインおよび E ドメインを欠く 50

操作されたプロテイン A である、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

前記基質が粒子であり、前記アフィニティマトリクスが、 $25\text{ }\mu\text{m}\sim 100\text{ }\mu\text{m}$ の平均直径を備える多数の前記粒子を含む、請求項 44 または 45 に記載の方法。

【請求項 47】

前記粒子が  $40\text{ }\mu\text{m}\sim 60\text{ }\mu\text{m}$ の平均直径を備える、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記粒子が  $45\text{ }\mu\text{m}\sim 55\text{ }\mu\text{m}$ の平均直径を備える、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記粒子が約  $50\text{ }\mu\text{m}$ の平均直径を備える、請求項 48 に記載の方法。

10

【請求項 50】

前記基質が、アガロース、ポリ（スチレンジビニルベンゼン）、ポリメタクリレート、セルロース、制御多孔ガラス、および球状シリカのうちのいずれか一つ以上を含む、請求項 44～49 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

前記粒子が約  $1100\text{ }\text{\AA}$ の平均直径を有する細孔を備える、請求項 46～50 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 52】

前記溶出緩衝液が、少なくとも  $250\text{ mM}$ の濃度の塩を含む、請求項 1～51 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 53】

前記塩濃度が、 $300\text{ mM}$ 超または  $400\text{ mM}$ 超である、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

前記塩濃度が約  $500\text{ mM}$ である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

前記塩が、(i)  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{Cs}^+$ 、 $\text{Rb}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{H}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、(ii)  $\text{Na}^+$ 、 $\text{H}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、もしくは  $\text{Al}^{3+}$ と、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、もしくは  $\text{ClO}_4^-$ との組み合わせ、または (iii)  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、もしくは  $\text{NaCl}$ 、を含む塩から選択される、請求項 52～54 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 56】

前記第一のポリペプチドが、前記タンパク質結合リガンドに結合することができる CH3ドメインを含み、前記第二のポリペプチドが、前記タンパク質結合リガンドに結合できない CH3ドメインを含む、請求項 1～55 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 57】

前記第一のポリペプチドが、プロテイン A に結合することができる CH3ドメインを含み、前記第二のポリペプチドが、プロテイン A に結合できない CH3ドメインを含む、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 58】

前記第二のポリペプチドが、前記 CH3ドメインに H435R 修飾および Y436F 修飾（EU 付番）を含む、請求項 57 に記載の方法。

40

【請求項 59】

前記第一の pH が 6～8 である、請求項 10～58 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 60】

前記第三の pH が 2.8～3.5 である、請求項 1～59 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 61】

前記ヘテロ二量体タンパク質が、抗体である、請求項 1～60 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 62】

50

前記ヘテロ二量体タンパク質が、二重特異性抗原結合タンパク質である、請求項 1 ～ 60 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 63】

前記二重特異性抗原結合タンパク質が二重特異性抗体である、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 64】

前記ヘテロ二量体タンパク質の少なくとも 85% が、前記一連のクロマトグラフィーサイクル内の各サイクルで前記溶出物中に回収される、請求項 1 ～ 63 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 65】

前記ヘテロ二量体タンパク質の少なくとも 87% が、前記一連のクロマトグラフィーサイクル内の各サイクルで前記溶出物中に回収される、請求項 64 に記載の方法。

【請求項 66】

前記ヘテロ二量体タンパク質の少なくとも 89% が、前記一連のクロマトグラフィーサイクル内の各サイクルで前記溶出物中に回収される、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 67】

前記一連のクロマトグラフィーサイクルが、100 以上のサイクルを含む、請求項 1 ～ 66 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 68】

前記アフィニティーマトリクスが、各サイクル後に少なくとも 11 の pH を有する塩基性溶液と接触する、請求項 1 ～ 67 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 69】

前記アフィニティーマトリクスが、3 サイクルごとの後に少なくとも 11 の pH を有する塩基性溶液と接触する、請求項 1 ～ 67 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 70】

前記アフィニティーマトリクスが、5 サイクルごとの後に少なくとも 11 の pH を有する塩基性溶液と接触する、請求項 1 ～ 67 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 71】

前記アフィニティーマトリクスが、7 サイクルごとの後に少なくとも 11 の pH を有する塩基性溶液と接触する、請求項 1 ～ 67 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 72】

前記塩基性溶液の前記 pH が、少なくとも 12 である、請求項 68 ～ 72 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 73】

前記塩基性溶液が、0.1 N ～ 0.5 N の濃度の塩基を含む、請求項 68 ～ 72 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 74】

前記濃度が、0.1 N ～ 0.3 N である、請求項 73 に記載の方法。

【請求項 75】

前記塩基性溶液が NaOH を含む、請求項 68 ～ 74 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 76】

各サイクルが、(v) 前記アフィニティーマトリクスを少なくとも 11 の pH を有する塩基性溶液と接触させることによって、前記アフィニティーマトリクスを洗浄すること、をさらに含む、請求項 1 ～ 63 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 77】

前記塩基性溶液の前記 pH が、少なくとも 12 である、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 78】

前記塩基性溶液が、0.1 N ～ 0.5 N の濃度の塩基を含む、請求項 76 または 77 に記載の方法。

【請求項 79】

前記濃度が、 $0.1\text{ N} \sim 0.3\text{ N}$ である、請求項 78 に記載の方法。

【請求項 80】

前記塩基性溶液が  $\text{NaOH}$  を含む、請求項 76 ～ 79 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 81】

前記ヘテロ二量体タンパク質の少なくとも 75 % が、前記一連のクロマトグラフィーサイクル内の各サイクルで前記溶出物中に回収され、前記結合不純物が 6.5 % を超えない、請求項 76 ～ 80 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 82】

前記ヘテロ二量体タンパク質の少なくとも 78 % が、前記一連のクロマトグラフィーサイクル内の各サイクルで前記溶出物中に回収される、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 83】

前記ヘテロ二量体タンパク質の少なくとも 80 % が、前記一連のクロマトグラフィーサイクル内の各サイクルで前記溶出物中に回収される、請求項 82 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、タンパク質産物の精製、例えば、タンパク質の複雑な混合物からのヘテロ二量体タンパク質の精製のためのアフィニティークロマトグラフィーカラムの分離能寿命の改善に関する。具体的には、方法は、ヘテロ二量体タンパク質（例えば、二重特異性抗体）の回収の喪失を最小化しながら、不純物による汚染を最小化するために、増加したサイ

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

タンパク質産物の精製は、宿主細胞タンパク質、DNA、およびタンパク質産物の望ましくない種などの不純物を除去するために、様々なクロマトグラフィー工程を利用することを必要とすることが多い。

【0003】

多重特異性抗体または二重特異性抗体を含むヘテロ二量体タンパク質は、アフィニティークロマトグラフィーを使用して精製のためにフォーマットされ得る。かかるフォーマットの一つは、薬物動態プロファイルが改善され、免疫原性が最小限である標準的な完全ヒト IgG 抗体に基づく（その全体が本明細書に組み込まれる米国特許第 8,586,713 号を参照されたい）。単一の共通軽鎖と二つの別個の重鎖が結合して、二重特異性抗体を形成する。重鎖のうちの一つは、置換 Fc 配列（以下、「Fc\*」）を含有し、これはプロテイン A への Fc\* の結合を低減または除去する。例えば、そのような Fc\* 配列のうちの一つは、CH3 ドメインでの H435R/Y436F（EU 付番システムによる；IMGT エクソン付番システムによると H95R/Y96F）置換を含有する。二つの重鎖と共通軽鎖との共発現は、三つの産物をもたらす、そのうちの二つは重鎖に対するホモ二量体であり、そのうちの一つは所望のヘテロ二量体二重特異性産物である。Fc\* 配列は、高アビディティ FcFc 重鎖ホモ二量体、または弱結合 Fc\*Fc\* ホモ二量体と比較した、プロテイン A に対する中間結合アフィニティにより、市販のアフィニティークラム上の FcFc\* 二重特異性産物の選択的な精製を可能にする。

【0004】

ヘテロ二量体タンパク質（例えば、二重特異性抗体）の商業規模の精製を達成するためには、FcFc ホモ二量体、Fc\*Fc ヘテロ二量体、および Fc\*Fc\* ホモ二量体の間の良好な分離能が必要である。しかしながら、多くのサイクルにわたってアフィニティークラムを繰り返し使用することは、概して、バッチ故障につながる可能性がある結合不純物による汚染の増加につながる。こうした問題は、カラムの樹脂（基質に貼り付けられたタンパク質結合リガンド）の交換によって対処することができるが、カラムの交換は高価であり（樹脂 1 L 当たり約 15000 ドル）、カラムのアンパッキングおよび再パッキ

ングの時間に関連する遅延をもたらす。アフィニティークロマトグラフィーを介した精製については、精製されたヘテロ二量体タンパク質を産生するコストは、許容可能な純度および回収率を維持しながら、アフィニティー樹脂で実施され得るサイクル数によって変化する関数である。したがって、より多くのサイクル数にわたってカラム機能を改善する方法が望ましい。

#### 【発明の概要】

##### 【0005】

本開示の一態様では、本発明は、ヘテロ二量体タンパク質を精製する方法を提供し、方法は、(a)一連のクロマトグラフィーサイクルを実施することであって、ここで各サイクルが、(i)ヘテロ二量体タンパク質と不純物との混合物を、タンパク質結合リガンドを含有するアフィニティマトリクスに導入することであって、ここでヘテロ二量体タンパク質が、タンパク質結合リガンドに対して異なるアフィニティーを有する第一および第二のポリペプチドを含み、少なくとも一つの不純物がタンパク質結合リガンドに結合し、かつ少なくとも一つの不純物がタンパク質結合リガンドに結合しない、導入することと、(ii)アフィニティマトリクスを、5～9の第一のpHで第一の洗浄緩衝液で洗浄して、非結合不純物を除去することと、(iii)第二のpHで第一の溶出緩衝液中のアフィニティマトリクスからヘテロ二量体タンパク質を溶出することと、(iv)アフィニティマトリクスを、4未満の第三のpHで第二の洗浄緩衝液で洗浄して、結合不純物を除去することと、を含み、ここで第二のpHが、一連のクロマトグラフィーサイクル内の予備的な一連のサイクル(preliminary series of cycles)中、予備的なpH(preliminary pH)であり、第二のpHは、一連のクロマトグラフィーサイクル内の後続の一連のサイクル中、予備的なpHよりも高い後続のpHまで上昇し、予備的なpHおよび後続のpHが、4.0～5.2の範囲内である、実施すること、および(b)溶出物中のアフィニティマトリクスから、ヘテロ二量体タンパク質を収集すること、を含む。

##### 【0006】

いくつかの実施形態では、予備的な一連のサイクルは、20サイクルからなる。いくつかの実施形態では、予備的な一連のサイクルは、30サイクルからなる。いくつかの実施形態では、予備的な一連のサイクルは、40サイクルからなる。いくつかの実施形態では、予備的な一連のサイクルは、50サイクルからなる。いくつかの実施形態では、予備的な一連のサイクルは、少なくとも50サイクル、少なくとも60サイクル、少なくとも70サイクル、または少なくとも80サイクル、またはそれ以上からなる。

##### 【0007】

いくつかの実施形態では、後続の一連のサイクルは、少なくとも20サイクルからなる。いくつかの実施形態では、後続の一連のサイクルは、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、または少なくとも80サイクルからなる。

##### 【0008】

いくつかの実施形態では、予備的なpHは、4.0～4.2である。いくつかの事例では、予備的なpHは4.1±0.05である。いくつかの実施形態では、後続のpHは、4.3～4.7である。いくつかの事例では、後続のpHは4.5±0.05である。

##### 【0009】

本開示の一態様では、本発明は、ヘテロ二量体タンパク質を精製する方法を提供し、方法は、(a)一連のクロマトグラフィーサイクルを実施することであって、ここで各サイクルが、(i)ヘテロ二量体タンパク質と不純物との混合物を、タンパク質結合リガンドを含有するアフィニティマトリクスに導入することであって、ここでヘテロ二量体タンパク質が、タンパク質結合リガンドに対して異なるアフィニティーを有する第一および第二のポリペプチドを含み、少なくとも一つの不純物がタンパク質結合リガンドに結合し、少なくとも一つの不純物がタンパク質結合リガンドに結合しない、導入することと、(ii)アフィニティマトリクスを、5～9の第一のpHで第一の洗浄緩衝液で洗浄して、非結合不純物を除去することと、(iii)第二のpHで第一の溶出緩衝液中のアフィニ

ティーマトリクスからヘテロ二量体タンパク質を溶出することと、(i v) アフィニティーマトリクスを、4 未満の第三の pH で第二の洗浄緩衝液で洗浄して、結合不純物を除去することと、を含む、実施すること、(b) 一連のクロマトグラフィーサイクル内の任意の一つ以上のサイクルの後、ヘテロ二量体タンパク質を含有する溶出物中の結合不純物のレベルを測定し、結合不純物の測定されたレベルと結合不純物の参照レベルとを比較することであって、ここで結合不純物の測定されたレベルが結合不純物の参照レベルを超える場合、一連のクロマトグラフィーサイクル内の後続のサイクルの第二の pH を増加する、第二の pH は一連のクロマトグラフィーサイクル内の各サイクルまたは後続のサイクル中、4.0 ~ 5.2 の範囲内である、比較すること、および (c) 溶出物中のアフィニティーマトリクスから、ヘテロ二量体タンパク質を収集すること、を含む。

10

【0010】

いくつかの実施形態では、結合不純物の参照レベルは、2% ~ 10% である。いくつかの事例では、結合不純物の参照レベルは、3% ~ 7% である。いくつかの事例では、結合不純物の参照レベルは、5% ± 0.5% である。

【0011】

いくつかの実施形態では、溶出物中の結合不純物のレベルは、一連のクロマトグラフィーサイクル内の各サイクル後に測定される。いくつかの実施形態では、溶出物中の結合不純物のレベルは、一連のクロマトグラフィーサイクルの五番目のサイクルごとの後に測定される。いくつかの実施形態では、溶出物中の結合不純物のレベルは、一連のクロマトグラフィーサイクルの10番目のサイクルごとの後に測定される。いくつかの実施形態では、溶出物中の結合不純物のレベルは、一連のクロマトグラフィーサイクルの20番目のサイクルに続いて測定される。いくつかの実施形態では、溶出物中の結合不純物のレベルは、一連のクロマトグラフィーサイクルの40番目のサイクルまたは50番目のサイクルに続いて測定される。いくつかの事例では、溶出物は、一連のサイクル（例えば、5サイクル、または10サイクル）にわたって収集され、結合不純物のレベルは、組み合わされた溶出物プールで測定される。

20

【0012】

いくつかの実施形態では、第二の pH は、結合不純物の測定されたレベルが結合不純物の参照レベルを超える場合、4.0 ~ 4.2 の範囲から 4.3 ~ 4.7 の範囲に増加する。いくつかの事例では、結合不純物の測定されたレベルが結合不純物の参照レベルを超える場合、第二の pH は、4.1 ± 0.05 から 4.5 ± 0.05 に増加する。

30

【0013】

本開示の一態様では、本発明は、ヘテロ二量体タンパク質を精製する方法を提供し、方法は、(a) 一連のクロマトグラフィーサイクルを実施することであって、ここで各サイクルが、(i) ヘテロ二量体タンパク質と不純物との混合物を、タンパク質結合リガンドを含有するアフィニティーマトリクスに導入することであって、ここでヘテロ二量体タンパク質が、タンパク質結合リガンドに対して異なるアフィニティを有する第一および第二のポリペプチドを含み、少なくとも一つの不純物がタンパク質結合リガンドに結合し、少なくとも一つの不純物がタンパク質結合リガンドに結合しない、導入することと、(i i) アフィニティーマトリクスを、5 ~ 9 の第一の pH で第一の洗浄緩衝液で洗浄して、非結合不純物を除去することと、(i i i) 第二の pH で第一の溶出緩衝液中のアフィニティーマトリクスからヘテロ二量体タンパク質を溶出することと、(i v) アフィニティーマトリクスを、4 未満の第三の pH で第二の洗浄緩衝液で洗浄して、結合不純物を除去することと、を含み、ここで第二の pH が、一連のクロマトグラフィーサイクル内の一次的な一連のサイクル (primary series of cycles) 中、一次 pH (primary pH) であり、第二の pH は、一連のクロマトグラフィーサイクル内の一次的な一連のサイクルに続く二次的な一連のサイクル中、一次 pH よりも高い二次 pH (secondary pH) まで上昇し、および二次 pH は、一連のクロマトグラフィーサイクル内の二次的な一連のサイクルに続く三次的な一連のサイクル中、二次 pH より高い三次 pH (tertiary pH) まで上昇し、ここで一次 pH、二次 pH、

40

50

および三次 pH は、4.0～5.2 の範囲内である、実施すること、および (b) 溶出物中のアフィニティマトリクスから、ヘテロ二量体タンパク質を収集すること、を含む。

【0014】

いくつかの実施形態では、一次的な一連のサイクルは、5～50 サイクルを含む。いくつかの事例では、一次的な一連のサイクルは、最大 20 サイクルを含む。いくつかの事例では、一次的な一連のサイクルは、最大 40 サイクルを含む。

【0015】

いくつかの実施形態では、二次的な一連のサイクルは、5～50 サイクルを含む。いくつかの事例では、二次的な一連のサイクルは、10～25 サイクルを含む。

10

【0016】

いくつかの実施形態では、三次的な一連のサイクルは、5～50 サイクルを含む。いくつかの事例では、三次的な一連のサイクルは、10～25 サイクルを含む。

【0017】

いくつかの実施形態では、一次 pH は、4.0～4.2 の範囲である。いくつかの事例では、一次 pH は  $4.1 \pm 0.05$  である。いくつかの実施形態では、二次 pH は、4.2～4.4 の範囲である。いくつかの事例では、二次 pH は  $4.3 \pm 0.05$  である。いくつかの実施形態では、三次 pH は、4.4～4.6 の範囲である。いくつかの事例では、三次 pH は  $4.5 \pm 0.05$  である。

【0018】

いくつかの実施形態では、第二の pH は、一連のクロマトグラフィーサイクル内の三次的な一連のサイクルに続く第 4 の一連のサイクル中、三次 pH よりも高い第 4 の pH まで上昇し、ここで第 4 の pH は 4.0～5.2 の範囲内である。

20

【0019】

いくつかの実施形態では、第二の pH は、一連のクロマトグラフィーサイクル内の第 4 の一連のサイクルに続く第 5 の一連のサイクル中、第 4 の pH よりも高い第 5 の pH まで上昇し、ここで第 5 の pH は 4.0～5.2 の範囲内である。

【0020】

いくつかの実施形態では、第二の pH は、一連のクロマトグラフィーサイクル内の第 5 の一連のサイクルに続く第 6 の一連のサイクル中、第 5 の pH よりも高い第 6 の pH まで上昇し、ここで第 6 の pH は 4.0～5.2 の範囲内である。

30

【0021】

いくつかの事例では、二次 pH は、一次 pH よりも 0.1～0.9 高い pH であり、三次 pH は、二次 pH よりも 0.1～0.9 高い pH であり、第 4 の pH は、三次 pH よりも 0.1～0.9 高い pH であり、第 5 の pH は、第 4 の pH よりも 0.1～0.9 高い pH であり、および／または第 6 の pH は、第 5 の pH よりも 0.1～0.9 高い pH であり、一次 pH は、4.0～4.2 の範囲である。いくつかの実施形態では、一次 pH は  $4.1 \pm 0.05$  である。

【0022】

いくつかの実施形態では、一次的な一連のサイクル、二次的な一連のサイクル、三次的な一連のサイクル、第 4 の一連のサイクル、第 5 の一連のサイクル、および／または第 6 の一連のサイクルの各々は、一連のクロマトグラフィーサイクル内で 5～50 サイクルを含む。

40

【0023】

上記または本明細書で考察される方法のいずれかの様々な実施形態では、不純物は、第一および第二のポリペプチドのホモ二量体種を含む。

【0024】

上記または本明細書で考察される方法のいずれかの様々な実施形態では、タンパク質結合リガンドは、プロテイン A であり、アフィニティマトリクスは、基質に貼り付けられたプロテイン A リガンドを含む。

50

## 【0025】

いくつかの事例では、プロテインAリガンドは、Zドメイン四量体を含む操作されたプロテインA、Yドメイン四量体を含む操作されたプロテインA、またはDドメインおよびEドメインを欠く操作されたプロテインAである。

## 【0026】

いくつかの事例では、基質は粒子であり、アフィニティマトリクスは、 $25\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$ の平均直径を備える多数の粒子を含む。いくつかの実施形態では、粒子は、 $40\mu\text{m}\sim 60\mu\text{m}$ の平均直径を備える。いくつかの実施形態では、粒子は、 $45\mu\text{m}\sim 55\mu\text{m}$ の平均直径を備える。いくつかの実施形態では、粒子は、 $50\mu\text{m}$ の平均直径を備える。

10

## 【0027】

いくつかの事例では、基質は、アガロース、ポリ（スチレンジビニルベンゼン）、ポリメタクリレート、セルロース、制御多孔ガラス、および球状シリカのうちのいずれか一つ以上を含む。

## 【0028】

いくつかの事例では、粒子は、約 $1100\text{\AA}$ の平均直径を有する細孔を備える。

## 【0029】

上記または本明細書で考察される方法のいずれかの様々な実施形態では、溶出緩衝液は、少なくとも $250\text{mM}$ の濃度の塩を含む。いくつかの事例では、塩濃度は、 $300\text{mM}$ 超または $400\text{mM}$ 超である。いくつかの事例では、塩濃度は約 $500\text{mM}$ である。

20

## 【0030】

いくつかの実施形態では、塩は、(i)  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{Cs}^+$ 、 $\text{Rb}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{H}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、(ii)  $\text{Na}^+$ 、 $\text{H}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、もしくは $\text{Al}^{3+}$ と、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、もしくは $\text{ClO}_4^-$ との組み合わせ、または(iii)  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、もしくは $\text{NaCl}$ 、を含む塩から選択される。

## 【0031】

上記または本明細書で考察される方法のいずれかの様々な実施形態では、第一のポリペプチドは、タンパク質結合リガンドに結合することができるCH3ドメインを含み、第二のポリペプチドは、タンパク質結合リガンドに結合することができないCH3ドメインを含む。

30

## 【0032】

タンパク質結合リガンドがプロテインAである、上記または本明細書で考察される方法のいずれかの様々な実施形態では、第一のポリペプチドは、プロテインAに結合することができるCH3ドメインを含み、第二のポリペプチドは、プロテインAに結合することができないCH3ドメインを含む。いくつかの事例では、第二のポリペプチドは、CH3ドメインにH435R修飾およびY436F修飾（EU付番）を含む。

## 【0033】

上記または本明細書で考察される方法のいずれかの様々な実施形態では、第一のpHは、6～8である。

40

## 【0034】

上記または本明細書で考察される方法のいずれかの様々な実施形態では、第三のpHは、2.8～3.5である。

## 【0035】

上記または本明細書で考察される方法のいずれかの様々な実施形態では、ヘテロ二量体タンパク質は、抗体である。方法の様々な実施形態では、ヘテロ二量体タンパク質は、二重特異性抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、二重特異性抗原結合タンパク質は、二重特異性抗体である。

## 【0036】

上記または本明細書で考察される方法のいずれかの様々な実施形態では、ヘテロ二量体

50

タンパク質の少なくとも 85% が、一連のクロマトグラフィーサイクル内の各サイクルにおいて溶出物中に回収される。いくつかの事例では、ヘテロ二量体タンパク質の少なくとも 87% は、一連のクロマトグラフィーサイクル内の各サイクルで溶出物中に回収される。いくつかの事例では、ヘテロ二量体タンパク質の少なくとも 89% は、一連のクロマトグラフィーサイクル内の各サイクルで溶出物中に回収される。

【0037】

上記または本明細書で考察される方法のいずれかの様々な実施形態では、一連のクロマトグラフィーサイクルは、100 サイクル以上を含む。

【0038】

上記または本明細書で考察される方法のいずれかの様々な実施形態では、アフィニティーマトリクスは、各サイクル後に少なくとも 11 の pH を有する塩基性溶液と接触してもよい。いくつかの事例では、アフィニティーマトリクスは、3 サイクルごとの後に少なくとも 11 の pH を有する塩基性溶液と接触する。いくつかの事例では、アフィニティーマトリクスは、5 サイクルごとの後に少なくとも 11 の pH を有する塩基性溶液と接触する。いくつかの事例では、アフィニティーマトリクスは、7 サイクルごとの後に少なくとも 11 の pH を有する塩基性溶液と接触する。いくつかの実施形態では、塩基性溶液の pH は、少なくとも 12 である。いくつかの実施形態では、塩基性溶液は、0.1 N ~ 0.5 N の濃度の塩基を含む。いくつかの事例では、塩基濃度は、0.1 N ~ 0.3 N である。いくつかの実施形態では、塩基性溶液は、NaOH を含む。

【0039】

上記または本明細書で論じた方法のいずれかの様々な実施形態では、各サイクルは、(v) アフィニティーマトリクスを少なくとも 11 の pH を有する塩基性溶液と接触させることによって洗浄することをさらに含み得る。いくつかの事例では、塩基性溶液の pH は、少なくとも 12 である。いくつかの実施形態では、塩基性溶液は、0.1 N ~ 0.5 N の濃度の塩基を含む。いくつかの事例では、濃度は、0.1 N ~ 0.3 N である。いくつかの実施形態では、塩基性溶液は、NaOH を含む。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体タンパク質の少なくとも 75% は、一連のクロマトグラフィーサイクル内の各サイクルで溶出物中に回収され、結合不純物は 6.5% を超えない。いくつかの事例では、ヘテロ二量体タンパク質の少なくとも 78% は、一連のクロマトグラフィーサイクル内の各サイクルで溶出物中に回収される。いくつかの事例では、ヘテロ二量体タンパク質の少なくとも 80% は、一連のクロマトグラフィーサイクル内の各サイクルで溶出物中に回収される。

【0040】

様々な実施形態では、上記または本明細書で考察される実施形態の特徴または構成要素のうちのいずれかが、組み合わせられてもよく、そのような組み合わせは、本開示の範囲内に包含される。上記または本明細書で考察される任意の具体的な値は、範囲の上限および下限を表す値を有する範囲を列挙するように、上記または本明細書で考察される別の関連する値と組み合わせられてもよく、そのような範囲は、本開示の範囲内に包含される。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】図1は、本開示の実施形態による例示的なヘテロ二量体タンパク質（例えば、二重特異性Fc\*Fc）および関連する不純物（ホモ二量体種）の説明図である。ヘテロ二量体タンパク質は、タンパク質結合リガンドに結合する一つのポリペプチド、およびタンパク質結合リガンドに結合しない一つのポリペプチドを含む（Φ）。図示した二つの不純物はホモ二量体であり、タンパク質結合リガンドに結合しない（Φ）二つのポリペプチドから構成される非結合不純物、およびタンパク質結合リガンドに結合する二つのポリペプチドから構成される結合不純物である。

【0042】

【図2】図2は、本開示の実施形態による例示的なクロマトグラフィーサイクルの図である。示されるように、サイクルは、ヘテロ二量体タンパク質および不純物の混合物をアフ

ィニティーマトリクス上に装填することと、アフィニティーマトリクスを洗浄して非結合不純物を除去することと、ヘテロ二量体タンパク質を溶出することと、アフィニティーマトリクスを洗浄して結合不純物を除去することと、を含む。結合不純物およびヘテロ二量体タンパク質の、アフィニティーマトリクス中のタンパク質結合リガンドへの結合を、最初の二つのパネルに示す。

【0043】

【図3】図3は、溶出pHと溶出物中の結合不純物の存在との間の関係、およびナイーブクロマトグラフィーカラム (naive chromatography column) 中のヘテロ二量体タンパク質 (例えば、二重特異性抗体) の対応する回収率を示す。

【0044】

【図4】図4Aおよび図4Bは、溶出物中の結合不純物の存在に関する、ナイーブカラム (naive column) (7サイクル) および循環されたカラム (cycled column) (84サイクル) 中の溶出pHの増加の影響 (図4A)、ならびにヘテロ二量体タンパク質 (例えば、二重特異性抗体) の対応する回収率 (図4B) を示す。結合不純物レベルに関して図4Aに示す「目標<5%」は例示的であり、精製されるヘテロ二量体タンパク質に応じて変化し得る。

【0045】

【図5】図5Aおよび図5Bは、検定力分析 (図5A) および設計スペースプロットの割合 (図5B) を含む、設計診断パラメータを示す。検定力分析は、提案された設計が特定のサイズのパラメータ効果を区別できる確率を決定する。図5Aに示すように、主要効果項 (main effect term) の検定力は>0.7である。図5Bに示すように、相対的な予測分散は、設計スペースの50%にわたって0.32未満である。

【0046】

【図6-1】図6は、実施例3で評価された相関関係のグレースケールマップを示す。示されるように、全ての相関関係は0.6未満であり、十分に直交する設計を示す。マップに対応するデータの表も図6に含まれる。

【図6-2】図6は、実施例3で評価された相関関係のグレースケールマップを示す。示されるように、全ての相関関係は0.6未満であり、十分に直交する設計を示す。マップに対応するデータの表も図6に含まれる。

【0047】

【図7】図7Aおよび図7Bは、二重特異性収率% (図7A) および結合不純物% (図7B) のモデル予測プロファイラを示す。分離溶出緩衝液のpHが低下し、水酸化物接触時間が増加するにつれて、二重特異性収率および結合不純物レベルの両方が増加する。さらに、カラム装填が増加するにつれて、二重特異性収率が増加する。

【発明を実施するための形態】

【0048】

本発明を記載する前に、記載される特定の方法および実験条件が変化し得るため、本発明は、そのような方法および条件に限定されないことを理解されたい。本発明の範囲は添付の特許請求の範囲のみによって制限されるものとなることから、本明細書に使用される用語は、特定の実施形態のみを記載するために使用されており、制限することを意図しないことも理解されるべきである。

【0049】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるもの同一の意味を有する。本明細書で使用される場合、「約」という用語は、特定の言及される数値に関して使用されると、値が言及される値から1%以下だけ変化し得ることを意味する。例えば、本明細書で使用される場合、「約100」という表現には、99および101、ならびにその間の全ての値 (例えば、99.1、99.2、99.3、99.4など) が含まれる。

【0050】

本明細書に記載したものと類似または同等な任意の方法および材料を本発明の実施また

10

20

30

40

50

は試験に使用することができるが、好ましい方法および材料をこれから記述する。本明細書で言及される全ての特許、出願、および非特許刊行物は、参照によりそれらの全体で本明細書に組み込まれる。

#### 【0051】

##### 総則

アフィニティークロマトグラフィーを介した二重特異性抗体の精製は、前述されている。簡潔に述べると、タンパク質結合リガンドに結合する一つのポリペプチドと、タンパク質結合リガンドに結合しない一つのポリペプチドとを含む対象のヘテロ二量体タンパク質が、ホモ二量体不純物とともにアフィニーマトリクス（タンパク質結合リガンドを含む）上に導入される。理解される通り、二つのホモ二量体種は、アフィニーマトリクスのタンパク質結合リガンドに結合する一対のポリペプチド、またはアフィニーマトリクスのタンパク質結合リガンドに結合しない一対のポリペプチドのいずれかを含む（例えば、図1を参照）。

10

#### 【0052】

多数のサイクルにわたってアフィニティークロマトグラフィーカラムを繰り返し使用することで、機能性タンパク質ーリガンド密度の喪失が生じ、結果的に不純物レベルが増加する。いかなる特定の理論にも束縛されることを意図するものではないが、機能性タンパク質ーリガンド密度の喪失は、不純物の蓄積、構造リガンドの変化、および／またはリガンドの物理的喪失に起因すると考えられる。いくつかの事例では、機能性タンパク質ーリガンド密度の喪失は、クロマトグラフィーカラムを定期的にクリーニングするために使用される水酸化物イオン（例えば、NaOH由来）への曝露に、少なくとも部分的に、関連すると考えられる。原因にかかわらず、機能性タンパク質ーリガンド密度の喪失は、結合不純物および対象のヘテロ二量体タンパク質の両方のアフィニーマトリクスについて、アビディティの低下をもたらす。より低いアビディティは、再結合事象の可能性の低下と相まって、非結合不純物を用いた対象のヘテロ二量体タンパク質の早期除去、または溶出中の対象のヘテロ二量体タンパク質を用いた結合不純物の早期除去をもたらす得る。

20

#### 【0053】

本発明は、少なくとも部分的に、循環されたアフィニティークロマトグラフィーカラムにおける溶出pHの増加が、ヘテロ二量体タンパク質の高回収率を維持しながら、結合不純物からのヘテロ二量体タンパク質（例えば、二重特異性抗体）の分離能を改善し得るという予想外の発見に基づいて、予測される。治療用タンパク質（例えば、二重特異性抗体）の大規模な商業製造および精製のための材料のコストは、重大な懸念であり、100Lカラムを交換するコストは、容易に150万ドルを超え、精製プロセスを遅らせ得る。したがって、アフィニティークロマトグラフィーカラムの使用可能な寿命をより多くのサイクル数にわたって延長することは、著しいコスト利点を達成することができる。

30

#### 【0054】

以下でより詳細に論じるように、アフィニティークラムの分離能を延長し、ヘテロ二量体タンパク質の回収率を維持する方法には、以下が含まれる：（i）予備的な（preliminary）溶出pHで予備的な一連のサイクルを実施し、後続の（およびより高い）pHで後続の一連のサイクルを実施すること、（ii）溶出物中の不純物レベルが、各サイクルの後に、または定期的に、測定される一連のサイクルを実施すること、および一連のサイクル全体を通して最小不純物レベルを維持するために、後続のサイクルで溶出pHを上昇させること、ならびに（iii）溶出pHが複数のサイクルのセットにわたって段階的に上昇する一連のサイクルを実施すること（例えば、溶出pHが、5、10、15、20、または25サイクルごとの後に0.1～1ポイント上昇する）。さらに、いくつかの実施形態では、（例えば、カラムを少なくとも11のpHを有する塩基性溶液と接触させることによる、）クロマトグラフィーカラムの洗浄頻度を低減するか、またはクロマトグラフィーカラムを洗浄するために使用される溶液中の塩基の濃度を低減することによっても、アフィニティークラムの分離能を延長することができる。

40

#### 【0055】

50

## 定義

「抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、四つのポリペプチド鎖、すなわちジスルフィド結合によって相互結合した二つの重（H）鎖と二つの軽（L）鎖から構成されるイムノグロブリン分子を含む。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではH C V RまたはV Hと省略される）、および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、三つのドメイン、C H 1、C H 2、およびC H 3を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではL C V RまたはV Lと省略される）、および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、一つのドメインC Lを含む。V HおよびV L領域は、フレームワーク領域（F R）と呼ばれる、より保存された領域が点在する相補性決定領域（C D R）と呼ばれる超可変性の領域へとさらに細分化することができる。各V HおよびV Lは、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端まで配列された三つのC D Rおよび四つのF Rから構成される：F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4（重鎖C D Rは、H C D R 1、H C D R 2、およびH C D R 3として省略されることがあり、軽鎖C D Rは、L C D R 1、L C D R 2、およびL C D R 3として省略されることがある。用語「高アフィニティー」抗体は、それらの標的への結合アフィニティーが、表面プラズモン共鳴、例えばB I A C O R E（商標）または溶液アフィニティーE L I S Aによって測定された場合に、少なくとも $10^{-9}$  M、少なくとも $10^{-1}$  M、少なくとも $10^{-11}$  M、または少なくとも $10^{-12}$  Mである抗体を指す。

10

## 【0056】

語句「二重特異性抗体」は、二つ以上のエピトープを選択的に結合することができる抗体を含む。二重特異性抗体は、通例二つの異なる重鎖を含み、各重鎖は、異なるエピトープ—二つの異なる分子（例えば抗原）上または同一の分子（例えば同一の抗原）上のどちらかの—と特異的に結合する。二重特異性抗体が二つの異なるエピトープ（第一のエピトープおよび第二のエピトープ）を選択的に結合することができる場合、第一のエピトープに対する第一の重鎖のアフィニティーは、概して、第二のエピトープに対する第一の重鎖のアフィニティーよりも少なくとも一桁から二桁、または三桁もしくは四桁低く、その逆もまた同様である。二重特異性抗体により認識されるエピトープは、同一の標的の上にも異なる標的の上にも（例えば、同一のタンパク質の上にも異なるタンパク質の上にも）ありうる。二重特異性抗体は、例えば、同一の抗原の異なるエピトープを認識する重鎖を組み合わせることによって作製することができる。例えば、同一の抗原の異なるエピトープを認識する重鎖可変配列をコードする核酸配列は、異なる重鎖定常領域をコードする核酸配列に融合可能であり、こうした配列は、イムノグロブリン軽鎖を発現する細胞内で発現することができる。典型的な二重特異性抗体は、三つの重鎖C D Rとそれに続いて（N末端からC末端へ）C H 1ドメイン、ヒンジ、C H 2ドメイン、およびC H 3ドメインを各々が有する二つの重鎖と、抗原結合特異性を付与しないが各重鎖と結合可能であるか、または各重鎖と結合できかつ重鎖抗原結合領域により結合されるエピトープのうちの一以上を結合できるか、または各重鎖と結合できかつ重鎖の一方もしくは両方をエピトープの一方もしくは両方に結合させることができるイムノグロブリン軽鎖とを有する。

20

30

## 【0057】

本明細書で考察される方法の様々な実施形態では、ヘテロ二量体タンパク質、二重特異性抗体、F c含有タンパク質などは、アイソタイプI g Gであってもよい。いくつかの事例では、ヘテロ二量体タンパク質、二重特異性抗体、F c含有タンパク質などは、アイソタイプI g G 1、I g G 2、I g G 3、またはI g G 4のものである。いくつかの事例では、ヘテロ二量体タンパク質、二重特異性抗体、F c含有タンパク質などは、アイソタイプI g G 1のものである。いくつかの事例では、ヘテロ二量体タンパク質、二重特異性抗体、F c含有タンパク質などは、アイソタイプI g G 4のものである。様々な実施形態では、ヘテロ二量体タンパク質、二重特異性抗体、F c含有タンパク質などは、完全ヒト型である。

40

## 【0058】

語句「重鎖」または「イムノグロブリン重鎖」は、任意の生物由来のイムノグロブリン

50

重鎖定常領域配列を含み、別段に指定のない限り、重鎖可変ドメインを含む。別段の指定のない限り、重鎖可変ドメインは、三つの重鎖CDRと四つのFR領域とを含む。重鎖の断片としては、CDR、CDRおよびFR、ならびにそれらの組み合わせが挙げられる。典型的な重鎖は、可変ドメインに続いて（N末端からC末端へ）、CH1ドメイン、ヒンジ、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを有する。重鎖の機能性断片としては、抗原を特異的に認識する（例えば、抗原をマイクロモル濃度、ナノモル濃度、またはピコモル濃度の範囲のKDで認識する）ことが可能であり、かつ細胞から発現および分泌することが可能であり、かつ少なくとも一つのCDRを含む、断片が挙げられる。

#### 【0059】

語句「軽鎖」は、任意の生物由来のイムノグロブリン軽鎖定常領域配列を含み、別段の指定のない限り、ヒトカップ軽鎖およびヒトラムダ軽鎖を含む。軽鎖可変（VL）ドメインは、別段の指定のない限り、典型的には三つの軽鎖CDRと四つのフレームワーク（FR）領域とを含む。一般に、完全長軽鎖には、アミノ末端からカルボキシル末端の方向に、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4を含むVLドメインと、軽鎖定常ドメインとが含まれる。本発明で使用可能な軽鎖は、例えば、抗原結合タンパク質が選択的に結合する第一の抗原と第二の抗原のどちらにも選択的に結合しない軽鎖を含む。適切な軽鎖としては、既存の抗体ライブラリー（ウェットライブラリーまたは*in silico*）で最も一般的に採用される軽鎖をスクリーニングすることによって特定できるものが挙げられ、この軽鎖は、抗原結合タンパク質の抗原結合ドメインのアフィニティーおよび／または選択性に実質的に干渉しない。適切な軽鎖としては、抗原結合タンパク質の抗原結合領域が結合するエピトープの一方または両方を結合できる軽鎖が挙げられる。

#### 【0060】

語句「可変ドメイン」には、次のアミノ酸領域をN末端からC末端の配列に含む（特に明記されない限り）、イムノグロブリン軽鎖または重鎖（所望通りに修飾済）のアミノ酸配列が含まれる：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。「可変ドメイン」は、二連のベータシート構造を有する標準ドメイン（VHまたはVL）内にフォールディングできるアミノ酸配列を含み、このベータシートは、第一のベータシートと第二のベータシートの残基間がジスルフィド結合によって連結されている。

#### 【0061】

語句「相補性決定領域」または用語「CDR」には、生物体のイムノグロブリン遺伝子の核酸配列でコードされるアミノ酸配列が含まれ、該アミノ酸配列は、通常（すなわち、野生型動物では）イムノグロブリン分子（例えば、抗体またはT細胞受容体）の軽鎖または重鎖の可変領域における二つのフレームワーク領域の間に見られる。CDRは、例えば生殖系列配列または再構成もしくは非再構成の配列によってコードされ、例えば、ナイーブB細胞もしくは成熟B細胞またはT細胞によってコードされ得る。一部の環境下（例えば、CDR3に関して）では、CDRは、二つ以上の配列（例えば、生殖細胞系配列）によってコードされ得、その二つ以上の配列は（例えば、非再構成核酸配列においては）連続していないが、例えば、配列のスプライシングまたは接続（例えば、重鎖CDR3を形成するためのV-D-J再構成）の結果として、B細胞核酸配列では連続している。

#### 【0062】

語句「Fc含有タンパク質」には、イムノグロブリンCH2およびCH3領域の少なくとも機能性部分を含む、抗体、二重特異性抗体、ヘテロ二量体タンパク質、イムノアドヘシン、および他の結合タンパク質が含まれる。「機能性部分」は、Fc受容体（例えば、FcγRまたはFcRn、すなわち胎児性Fc受容体）を結合できる、および／または補体の活性化に関与できるCH2領域およびCH3領域を指す。CH2領域およびCH3領域が、任意のFc受容体を結合不能にし、かつ補体の活性化も不能にする欠失、置換、および／もしくは挿入、または他の修飾を含有する場合、CH2領域およびCH3領域は、機能的ではない。

#### 【0063】

F c 含有タンパク質は、イムノグロブリンDメインに修飾部を含むことができ、その修飾部が結合タンパク質の一つ以上のエフェクター機能に影響を及ぼす箇所を含んでいる（例えば、F c γ R 結合、F c R n 結合に影響を及ぼし、したがって半減期および／またはC D C 活性に影響を及ぼす修飾部など）。そのような改変としては、以下に限定されないが、イムノグロブリン定常領域のE U 付番を参照して、以下の改変およびそれらの組み合わせが挙げられる：2 3 8、2 3 9、2 4 8、2 4 9、2 5 0、2 5 2、2 5 4、2 5 5、2 5 6、2 5 8、2 6 5、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2 7 0、2 7 2、2 7 6、2 7 8、2 8 0、2 8 3、2 8 5、2 8 6、2 8 9、2 9 0、2 9 2、2 9 3、2 9 4、2 9 5、2 9 6、2 9 7、2 9 8、3 0 1、3 0 3、3 0 5、3 0 7、3 0 8、3 0 9、3 1 1、3 1 2、3 1 5、3 1 8、3 2 0、3 2 2、3 2 4、3 2 6、3 2 7、3 2 8、3 2 9、3 3 0、3 3 1、3 3 2、3 3 3、3 3 4、3 3 5、3 3 7、3 3 8、3 3 9、3 4 0、3 4 2、3 4 4、3 5 6、3 5 8、3 5 9、3 6 0、3 6 1、3 6 2、3 7 3、3 7 5、3 7 6、3 7 8、3 8 0、3 8 2、3 8 3、3 8 4、3 8 6、3 8 8、3 8 9、3 9 8、4 1 4、4 1 6、4 1 9、4 2 8、4 3 0、4 3 3、4 3 4、4 3 5、4 3 7、4 3 8、および4 3 9。

10

#### 【0 0 6 4】

例えば、限定を意図されず、結合タンパク質は、F c 含有タンパク質であり、（記載された改変を含まない同一のF c 含有タンパク質と比較して）血清半減期の改善を示し、2 5 0 位（例えば、E もしくはQ）；2 5 0 位および4 2 8 位（例えば、L もしくはF）；2 5 2 位（例えば、L / Y / F / W もしくはT）、2 5 4 位（例えば、S もしくはT）、および2 5 6 位（例えば、S / R / Q / E / D もしくはT）での改変；または4 2 8 位および／もしくは4 3 3 位（例えば、L / R / S I / P / Q もしくはK）および／もしくは4 3 4 位（例えば、H / F もしくはY）での改変；または2 5 0 位および／もしくは4 2 8 位での改変；または3 0 7 位もしくは3 0 8 位（例えば、3 0 8 F、V 3 0 8 F）、および4 3 4 位での改変を有する。別の例では、改変は、4 2 8 L（例えば、M 4 2 8 L）および4 3 4 S（例えば、N 4 3 4 S）の改変；4 2 8 L、2 5 9 I（例えば、V 2 5 9 I）、および3 0 8 F（例えば、V 3 0 8 F）の改変；4 3 3 K（例えば、H 4 3 3 K）および4 3 4（例えば、4 3 4 Y）の改変；2 5 2、2 5 4、および2 5 6（例えば、2 5 2 Y、2 5 4 T、および2 5 6 E）の改変；2 5 0 Q および4 2 8 L の改変（例えば、T 2 5 0 Q およびM 4 2 8 L）；3 0 7 および／または3 0 8 の改変（例えば、3 0 8 F もしくは3 0 8 P）を含み得る。

20

30

#### 【0 0 6 5】

「スター置換」、「F c \*」、および「H C \*」という用語は、プロテインAに結合することを妨害する配列をC H 3 ドメイン内に含有する、任意の分子、イムノグロブリン重鎖、F c 断片、F c 含有分子、ヘテロ二量体タンパク質などを含む。C H 3 ドメイン中のプロテインA 結合を低減または妨害することができる、H 9 5 R およびY 9 6 F などの特定の修飾は、米国特許第8, 5 8 6, 7 1 3 号に考察されている。このジペプチド変異は、「スター置換」として指定される。

#### 【0 0 6 6】

「細胞」という用語は、組換え核酸配列の発現に好適な任意の細胞を含む。細胞としては、原核生物および真核生物（単細胞または多細胞）の細胞、細菌細胞（例えば、大腸菌、バチルス属、ストレプトマイセス属などの株）、マイコバクテリア細胞、真菌細胞、酵母細胞（例えば、出芽酵母、分裂酵母、ピキアパストリス、ピキアメタノリカなど）、植物細胞、昆虫細胞（例えば、S F - 9、S F - 2 1、バキュロウイルス感染昆虫細胞、イラクサギンウワバなど）、非ヒト動物細胞、ヒト細胞、または例えば、ハイブリドーマもしくはクアドローマなどの細胞融合が挙げられる。いくつかの実施形態では、細胞は、ヒト、サル、類人猿、ハムスター、ラット、またはマウス細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は真核細胞であり、以下の細胞から選択される：C H O（例えば、C H O K 1、D X B - 1 1 C H O、V e g g i e - C H O）、C O S（例えば、C O S - 7）、網膜細胞、V e r o、C V 1、腎臓（例えば、H E K 2 9 3、2 9 3 E B N A、M S R

40

50

293、MDCK、HaK、BHK)、HeLa、HepG2、WI38、MRC 5、Colo205、HB 8065、HL-60、(例えば、BHK21)、Jurkat、Daudi、A431(表皮)、CV-1、U937、3T3、L細胞、C127細胞、SP2/0、NS-0、MMT 060562、セルトリ細胞、BRL 3A細胞、HT1080細胞、骨髓腫細胞、腫瘍細胞、および前述細胞から派生する細胞株。

【0067】

「移動相修飾剤」という語句は、タンパク質間の非特異的(すなわち、非アフィニティー)イオン性および他の非共有結合性相互作用の影響を低減するか、または破壊する部分を含む。「移動相修飾剤」としては、例えば、塩や、酢酸塩、重炭酸塩、炭酸塩、ハロゲン(例えば、塩化物またはフッ化物)、硝酸塩、リン酸塩、または硫酸塩を有する第Ⅰ族金属および第Ⅱ族金属のイオン組み合わせが挙げられる。「移動相修飾剤」の非限定的な例示的なリストには、酢酸のベリリウム塩、リチウム塩、ナトリウム塩、およびカリウム塩;重炭酸ナトリウム、および重炭酸カリウム;炭酸リチウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、および炭酸セシウム;塩化リチウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化セシウム、および塩化マグネシウム;フッ化ナトリウム、およびフッ化カリウム;硝酸ナトリウム、硝酸カリウム、および硝酸カルシウム;リン酸ナトリウム、およびリン酸カリウム、ならびに硫酸カルシウム、および硫酸マグネシウムが含まれる。

【0068】

「移動相修飾剤」には、非共有結合力を弱めるか、さもなくば非共有結合性に干渉し、生体分子系内のエントロピーを増加させるカオトロピック剤も含まれる。カオトロピック剤の非限定的な例としては、ブタノール、塩化カルシウム、エタノール、塩化グアニジニウム、過塩素酸リチウム、酢酸リチウム、塩化マグネシウム、フェノール、プロパノール、ドデシル硫酸ナトリウム、チオ尿素、および尿素が挙げられる。カオトロピック剤は、タンパク質の溶解度に影響を及ぼす塩を含む。よりカオトロピックなアニオンとしては、例えば塩化物、硝酸塩、臭化物、塩素酸塩、ヨウ化物、過塩素酸塩、およびチオシアネートが挙げられる。よりカオトロピックなカチオンとしては、例えばリチウム、マグネシウム、カルシウム、およびグアニジニウムが挙げられる。

【0069】

「移動相修飾剤」には、pH勾配もしくは工程の添加時、または「移動相修飾剤」中のプロテインA支持体の平衡化時、およびpH工程もしくは勾配の適用時に、ホモ二量体IgGとヘテロ二量体IgG(例えば、野生型ヒトIgG、および同じIgGであるが、本明細書に記載されるそのCH3ドメインの一つ以上の修飾を有するIgG)の溶出の間に、pH単位距離の拡大をもたらす、イオン相互作用または他の非共有相互作用に影響を及ぼす部分が含まれる。「移動相修飾剤」の適切な濃度は、所与のpH工程またはpH勾配で最大pH距離に達するまで、「移動相修飾剤」の濃度が増加することにより、同じカラム、pH工程、または勾配を用いるその濃度によって決定することができる。「移動相修飾剤」はまた、例えば、プロピレングリコール、エチレングリコールなどを含む、非極性修飾剤を含み得る。

【0070】

本明細書で使用される場合、「アフィニティークロマトグラフィー」は、等電点、疎水性、またはサイズなどの生体分子の一般的な特性ではなく、生体分子間の特異的な、可逆的な相互作用を利用して、クロマトグラフィー分離をもたらすクロマトグラフィー法である。「プロテインAアフィニティークロマトグラフィー」または「プロテインAクロマトグラフィー」は、イムノグロブリン分子のFc部分に対してプロテインAのIgG結合ドメインのアフィニティーを利用する特異的なアフィニティークロマトグラフィー法を指す。このFc部分は、ヒトもしくは動物イムノグロブリン定常ドメインCH2およびCH3、またはこれらと実質的に類似したイムノグロブリンドメインを含む。プロテインAは、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)の細胞壁由来の天然タンパク質、組換えまたは合成方法によって産生されるプロテインA、およびFc領域に結合する能力を保持するバリエーションを包含する。実際には、プロテインAクロマトグラフィー

は、固体支持体に固定化されたプロテインAを使用することを含む。G a g n o n , P r o t e i n A A f f i n i t y C h r o m o t o g r a p h y , P u r i f i c a t i o n T o o l s f o r M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s , p p . 1 5 5 - 1 9 8 , V a l i d a t e d B i o s y s t e m s , 1 9 9 6 を参照されたい。プロテインGおよびプロテインLもまた、アフィニティークロマトグラフィーに使用され得る。固体支持体は、プロテインAが付着する非水性マトリクスである。こうした支持体としては、アガロース、セファロース、ガラス、シリカ、ポリスチレン、ニトロセルロース、木炭、砂、セルロース、および任意の他の適切な材料が挙げられる。かかる物質は、当該技術分野で既知である。任意の適切な方法を使用して、第二のタンパク質を固体支持体に貼り付けることができる。タンパク質を適切な固体支持体に貼り付ける方法は、当該技術分野で周知である。例えば、O s t r o v e , i n G u i d e t o P r o t e i n P u r i f i c a t i o n , M e t h o d s i n E n z y m o l o g y , 1 8 2 : 3 5 7 - 3 7 1 , 1 9 9 0 を参照されたい。固定化プロテインAを有する、または有しないこのような固体支持体は、ベクター実験室（カリフォルニア州バーリングヘム）、サンタクルーズバイオテクノロジー（カリフォルニア州サンタクルーズ）、バイオラッド（カリフォルニア州ハーキュリーズ）、サイティバ（マサチューセッツ州マールボロ）、ポール（ニューヨーク州ポートワシントン）、およびEMD-ミリポア（マサチューセッツ州ビレリカ）などの多くの商業的供給源から容易に入手可能である。細孔ガラスマトリクスに固定化されたプロテインAは、PROSE P（登録商標）-A（ミリポア）として市販されている。固相はまた、アガロースベースのマトリクスであってもよい。アガロースマトリクス上に固定化されたプロテインAは、M A B S E L E C T（商標）（サイティバとして商業的に入手可能である。

10

20

【0071】

アフィニティークロマトグラフィーはまた、抗体、抗体の断片、またはイムノグロブリンドメインおよび／もしくは配列を含有するキメラ融合タンパク質に選択的に結合し、それ故にこれらを精製するために使用され得る媒体を含む。抗体としては、I g G、I g A、I g M、I g Y、I g D、およびI g E型が挙げられる。抗体はまた、ラクダ抗体、操作されたラクダ抗体、単鎖抗体、単ドメイン抗体、ナノボディなどの一本鎖抗体を含む。抗体断片は、V H、V L、C L、C H配列を含む。抗体断片、および抗体配列を含有する融合タンパク質としては、例えば、F ( a b ' )<sub>3</sub>、F ( a b ' )<sub>2</sub>、F a b、F c、F v、d s F v、( s c F v )<sub>2</sub>、s c F v、s c A b、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、F c融合タンパク質、トラップ分子などが挙げられる（A y y a r e t a l . , M e t h o d s 5 6 ( 2 0 1 2 ) : 1 1 6 - 1 2 9 を参照）。かかるアフィニティークロマトグラフィー媒体は、抗体、それらの断片、およびそれらの断片を含有する融合タンパク質に選択的に結合するリガンドを含有し得る。かかるリガンドとしては、抗体結合タンパク質、細菌由来受容体、抗原、レクチン、または標的分子（すなわち、精製を必要とする分子）に向けられた抗抗体が挙げられる。例えば、I g G - C H 1、I g G - F c、I g G - C H 3、I g G 1、L C - カップ、L C - ラムダ、I g G 3 / 4、I g A、I g Mなどのうちのいずれか一つ以上に対して向けられたラクダ由来アフィニティリガンドを、アフィニティリガンドとして使用してもよい（C A P T U R E S E L E C T クロマトグラフィー樹脂、ライフテクノロジーズ社カリフォルニア州カールズバッド、として商業的に入手可能）。

30

40

【0072】

ヘテロ二量体タンパク質を精製する方法

本開示による（アフィニティークラムの分離能を延長し、ヘテロ二量体タンパク質の回収率を維持することを介した）ヘテロ二量体タンパク質を精製する方法の実施形態は、以下を含む：（i）予備的な溶出pHで予備的な一連のサイクルを実施し、後続の（およびより高い）pHで後続の一連のサイクルを実施すること、（ii）溶出物中の不純物レベルが、各サイクルの後にまたは定期的に、測定される一連のサイクルを実施すること、および一連のサイクル全体を通して最小不純物レベルを維持するために、後続のサイクルで

50

溶出 pH を上昇させること、ならびに ( i i i ) 溶出 pH が複数のサイクルのセットにわたって段階的に上昇する一連のサイクルを実施すること (例えば、溶出 pH が、10、15、20、または25サイクルごとの後に、0.5、0.75、または1ポイント上昇する)。

#### 【0073】

ヘテロ二量体タンパク質を精製する方法の各々は：(a) 一連のクロマトグラフィーサイクルを実施することであって、ここで各サイクルが、(i) ヘテロ二量体タンパク質と不純物との混合物を、タンパク質結合リガンドを含有するアフィニティーマトリクスに導入することであって、ここでヘテロ二量体タンパク質が、タンパク質結合リガンドに対して異なるアフィニティを有する第一および第二のポリペプチドを含み、少なくとも一つの不純物がタンパク質結合リガンドに結合し、少なくとも一つの不純物がタンパク質結合リガンドに結合しない、導入すること、(ii) アフィニティーマトリクスを、5～9の第一の pH で第一の洗浄緩衝液で洗浄して、非結合不純物を除去すること、(iii) 第二の pH で第一の溶出緩衝液中のアフィニティーマトリクスからヘテロ二量体タンパク質を溶出すること、および (iv) アフィニティーマトリクスを、4未満の第三の pH で第二の洗浄緩衝液で洗浄して、結合不純物を除去すること、を含み、ここで第二の pH が4.0～5.2である、実施すること、を含む。

#### 【0074】

様々な実施形態では、ヘテロ二量体タンパク質および不純物の混合物をアフィニティーマトリクス上に装填することは、ヘテロ二量体タンパク質をコードするヌクレオチド配列を発現する細胞を含有する一つ以上のバイオリアクターから清澄化された細胞培養物を装填することを含む。例えば、細胞は、二重特異性抗体を形成する重鎖および軽鎖の各々をコードするヌクレオチドを発現してもよい。いくつかの事例では、二重特異性抗体の抗原結合アームの各々は、共通軽鎖を含む。清澄化された細胞培養物は、ホモ二量体種、宿主細胞タンパク質、および DNA などの不純物とともに、ヘテロ二量体タンパク質 (例えば、二重特異性抗体) を含む。いくつかの事例では、ヘテロ二量体タンパク質は、真核細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞などで産生されてもよい。

#### 【0075】

いくつかの実施形態では、アフィニティーマトリクス上に装填された混合物は、(i) 第一のポリペプチドの二つのコピーを含む第一のホモ二量体、(ii) 第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドを含むヘテロ二量体、および (iii) 第二のポリペプチドの二つのコピーを含む第二のホモ二量体、を含むタンパク質の混合物を含む。第一および第二のポリペプチドは、アフィニティーマトリクスに対して異なるアフィニティを有し、その結果、第一のホモ二量体、ヘテロ二量体、および第二のホモ二量体は、アフィニティーマトリクスへの差次的結合に基づいて分離され得る。アフィニティーマトリクスへの差次的結合は、特に、アフィニティーマトリクスを通過する溶液の pH および／またはイオン強度を変更することによって操作され得る。

#### 【0076】

清澄化された細胞培養物の装填後、アフィニティーマトリクスを、5～9の pH を有する洗浄緩衝液 (第一の洗浄緩衝液) で洗浄する。いくつかの事例では、洗浄緩衝液の pH は、6～8である。いくつかの事例では、洗浄緩衝液の pH は、約7～約7.5である。様々な実施形態では、洗浄緩衝液の pH は、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、もしくは9.0であるか、または約5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、もしくは

9.0である。いくつかの実施形態では、洗浄緩衝液のpHは、7.2であるか、または約7.2である。様々な実施形態において、緩衝液は、pHを所望のポイントに、または所望の範囲内に維持することができる任意の緩衝液であってもよい。様々な実施形態では、緩衝液濃度は、約5mM～約100mMであってもよい。いくつかの事例では、緩衝液濃度は、約5mM～約15mMである。いくつかの事例では、緩衝液濃度は、約5mM～約50mMである。いくつかの事例では、緩衝液濃度は、約10mM～約25mMである。いくつかの事例では、緩衝液濃度は、約20mM～40mMである。いくつかの事例では、緩衝液濃度は、約30mM～約50mMである。様々な実施形態では、緩衝液濃度は、5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、11mM、12mM、13mM、14mM、15mM、16mM、17mM、18mM、19mM、20mM、21mM、22mM、23mM、24mM、25mM、26mM、27mM、28mM、29mM、30mM、31mM、32mM、33mM、34mM、35mM、36mM、37mM、38mM、39mM、40mM、41mM、42mM、43mM、44mM、45mM、46mM、47mM、48mM、49mM、もしくは50mMであるか、または約5mM、6mM、7mM、8mM、9mM、10mM、11mM、12mM、13mM、14mM、15mM、16mM、17mM、18mM、19mM、20mM、21mM、22mM、23mM、24mM、25mM、26mM、27mM、28mM、29mM、30mM、31mM、32mM、33mM、34mM、35mM、36mM、37mM、38mM、39mM、40mM、41mM、42mM、43mM、44mM、45mM、46mM、47mM、48mM、49mM、もしくは50mMである。いくつかの実施形態では、洗浄緩衝液濃度は、10mMであるか、または約10mMである。いくつかの実施形態では、洗浄緩衝液濃度は、40mMであるか、または約40mMである。いくつかの実施形態では、洗浄緩衝液は、リン酸ナトリウムである。洗浄緩衝液（第一の洗浄緩衝液）はまた、以下で論じるように塩を含有し得る。

10

20

30

40

50

【0077】

いくつかの事例では、洗浄緩衝液は、約200mM～約800mMの濃度の塩を含む。いくつかの事例では、洗浄緩衝液は、約250mM～約750mMの濃度の塩を含む。いくつかの事例では、洗浄緩衝液は、約300mM～約700mMの濃度の塩を含む。いくつかの事例では、洗浄緩衝液は、約350mM～約650mMの濃度の塩を含む。いくつかの事例では、洗浄緩衝液は、約400mM～約600mMの濃度の塩を含む。いくつかの事例では、洗浄緩衝液は、約450mM～約550mMの濃度の塩を含む。いくつかの事例では、洗浄緩衝液は、200mM、210、mM、220mM、225mM、230mM、240mM、250mM、260mM、270mM、275mM、280mM、290mM、300mM、310mM、320mM、325mM、330mM、340mM、350mM、360mM、370mM、375mM、380mM、390mM、400mM、410mM、420mM、425mM、430mM、440mM、450mM、460mM、470mM、475mM、480mM、490mM、500mM、510mM、520mM、525mM、530mM、540mM、550mM、560mM、570mM、575mM、580mM、590mM、600mM、610mM、620mM、625mM、630mM、640mM、650mM、660mM、670mM、675mM、680mM、690mM、700mM、710mM、720mM、725mM、730mM、740mM、750mM、760mM、770mM、780mM、790mM、もしくは800mMの濃度の塩を含むか、または約200mM、210、mM、220mM、225mM、230mM、240mM、250mM、260mM、270mM、275mM、280mM、290mM、300mM、310mM、320mM、325mM、330mM、340mM、350mM、360mM、370mM、375mM、380mM、390mM、400mM、410mM、420mM、425mM、430mM、440mM、450mM、460mM、470mM、475mM、480mM、490mM、500mM、510mM、520mM、525mM、530mM、540mM、550mM、560mM、570mM、575mM、580mM、590mM、600mM、610

mM、620mM、625mM、630mM、640mM、650mM、660mM、670mM、675mM、680mM、690mM、700mM、710mM、720mM、725mM、730mM、740mM、750mM、760mM、770mM、780mM、790mM、もしくは800mMの濃度の塩を含む。いくつかの実施形態では、洗浄緩衝液の塩濃度は、500mMであるか、または約500mMである。いくつかの実施形態では、洗浄緩衝液は、約500mMのNaClを含む。いくつかの事例では、アフィニティマトリクスのこの洗浄は、アフィニティマトリクス材料（例えば、プロテインA）に対するアフィニティがほとんどまたは全くない宿主細胞タンパク質、DNA、およびホモ二量体種などの非結合不純物を除去する。

【0078】

10

いくつかの実施形態では、方法は、ヘテロ二量体タンパク質の溶出前に、5～9のpHで塩をほとんど含まない（<25mM）か、または全く含まない洗浄緩衝液を用いた、任意の第二の洗浄を含む。いくつかの実施形態では、この洗浄緩衝液は、約10mM～約50mMのトリス〔トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン〕、リン酸ナトリウム、もしくは酢酸塩、またはそれらの組み合わせを含む。様々な実施形態では、この洗浄緩衝液は、上述の第一の洗浄緩衝液のpHと等しいpHを有する。

【0079】

上述の洗浄の後、ヘテロ二量体タンパク質は、溶出緩衝液中のアフィニティマトリクスから溶出され、溶出物中に収集される。溶出緩衝液は、約4～約5.2（または4.0～4.9）のpHを有し、200mMを超える濃度の塩を含む。様々な方法に関連して以下でより詳細に論じるように、いくつかの実施形態では、溶出緩衝液のpHは、約4.0～約4.2である。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液のpHは、約4.4～約4.6である。様々な実施形態では、溶出緩衝液のpHは、4.0、4.05、4.1、4.15、4.2、4.25、4.3、4.35、4.4、4.45、4.5、4.55、4.6、4.65、4.7、4.75、4.8、4.85、4.9、4.95、もしくは5.0であるか、または約4.0、4.05、4.1、4.15、4.2、4.25、4.3、4.35、4.4、4.45、4.5、4.55、4.6、4.65、4.7、4.75、4.8、4.85、4.9、4.95、もしくは5.0である。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液のpHは、4.1±0.05である。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液のpHは、4.5±0.05である。様々な実施形態において、緩衝液は、pHを所望のポイントに、または所望の範囲内に維持することができる任意の緩衝液であってもよい。様々な実施形態では、緩衝液濃度は、約5mM～約100mMであってもよい。いくつかの事例では、緩衝液濃度は、約25mM～約55mMである。いくつかの事例では、緩衝液濃度は、約30mM～約50mMである。様々な実施形態では、緩衝液濃度は、30mM、31mM、32mM、33mM、34mM、35mM、36mM、37mM、38mM、39mM、40mM、41mM、42mM、43mM、44mM、45mM、46mM、47mM、48mM、49mM、もしくは50mMであるか、または約30mM、31mM、32mM、33mM、34mM、35mM、36mM、37mM、38mM、39mM、40mM、41mM、42mM、43mM、44mM、45mM、46mM、47mM、48mM、49mM、もしくは50mMである。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液濃度は、40mMであるか、または約40mMである。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は酢酸である。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は酢酸塩である。

20

30

40

【0080】

いくつかの事例では、溶出緩衝液は、約200mM～約800mMの濃度の塩を含む。いくつかの事例では、溶出緩衝液は、約250mM～約750mMの濃度の塩を含む。いくつかの事例では、溶出緩衝液は、約300mM～約700mMの濃度の塩を含む。いくつかの事例では、溶出緩衝液は、約350mM～約650mMの濃度の塩を含む。いくつかの事例では、溶出緩衝液は、約400mM～約600mMの濃度の塩を含む。いくつかの事例では、溶出緩衝液は、約450mM～約550mMの濃度の塩を含む。いくつかの事例では、溶出緩衝液は、200mM、210mM、220mM、225mM、230

50

mM、240mM、250mM、260mM、270mM、275mM、280mM、290mM、300mM、310mM、320mM、325mM、330mM、340mM、350mM、360mM、370mM、375mM、380mM、390mM、400mM、410mM、420mM、425mM、430mM、440mM、450mM、460mM、470mM、475mM、480mM、490mM、500mM、510mM、520mM、525mM、530mM、540mM、550mM、560mM、570mM、575mM、580mM、590mM、600mM、610mM、620mM、625mM、630mM、640mM、650mM、660mM、670mM、675mM、680mM、690mM、700mM、710mM、720mM、725mM、730mM、740mM、750mM、760mM、770mM、780mM、790mM、もしくは800mMの濃度の塩を含むか、または約200mM、210、mM、220mM、225mM、230mM、240mM、250mM、260mM、270mM、275mM、280mM、290mM、300mM、310mM、320mM、325mM、330mM、340mM、350mM、360mM、370mM、375mM、380mM、390mM、400mM、410mM、420mM、425mM、430mM、440mM、450mM、460mM、470mM、475mM、480mM、490mM、500mM、510mM、520mM、525mM、530mM、540mM、550mM、560mM、570mM、575mM、580mM、590mM、600mM、610mM、620mM、625mM、630mM、640mM、650mM、660mM、670mM、675mM、680mM、690mM、700mM、710mM、720mM、725mM、730mM、740mM、750mM、760mM、770mM、780mM、790mM、もしくは800mMの濃度の塩を含む。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液の塩濃度は、500mMであるか、または約500mMである。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、約500mMのNaClを含む。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、約500mMのCaCl<sub>2</sub>を含む。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、約500mMのMgCl<sub>2</sub>を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0081】

アフィニティマトリクスからのヘテロ二量体タンパク質の溶出および収集後、アフィニティマトリクスを、約4未満のpHで洗浄緩衝液（第二の洗浄緩衝液）で洗浄する。いくつかの実施形態では、洗浄緩衝液のpHは、約2.5～約3.5である。いくつかの実施形態では、洗浄緩衝液のpHは、3.0±0.2である。様々な実施形態では、洗浄緩衝液のpHは、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、もしくは3.9であるか、または約2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、もしくは3.9である。洗浄緩衝液は、上述のpHまたはpHの範囲を提供するために任意の適切な材料を含むことができる。いくつかの実施形態では、洗浄緩衝液は、約20mM～約60mMの濃度の酢酸を含む。いくつかの実施形態では、洗浄緩衝液は、約30mM～約50mMの濃度の酢酸を含む。いくつかの事例では、洗浄緩衝液は、約40mMの酢酸を含む。いくつかの事例では、アフィニティマトリクスのこの洗浄は、ヘテロ二量体タンパク質よりも、アフィニティマトリクス材料（例えば、プロテインA）に対して大きいアフィニティを有する、ホモ二量体種などの以前の結合不純物を除去する。いくつかの事例では、本発明の方法はまた、アフィニティマトリクスを、直前に考察した洗浄緩衝液よりも低いpH（例えば、2.45±0.2）およびより高い濃度の緩衝液材料（例えば、500mM酢酸）を含む緩衝液でさらに洗浄することを含み得る。

#### 【0082】

上述の洗浄で追加の不純物を除去した後、アフィニティマトリクスは、次のサイクルを開始する前に5～9のpHに再平衡化され得る。様々な実施形態では、アフィニティマトリクスは、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5

． 8． 5． 9． 6． 0． 6． 1． 6． 2． 6． 3． 6． 4． 6． 5． 6． 6． 6． 7． 6  
． 8． 6． 9． 7． 0． 7． 1． 7． 2． 7． 3． 7． 4． 7． 5． 7． 6． 7． 7． 7  
． 8． 7． 9． 8． 0． 8． 1． 8． 2． 8． 3． 8． 4． 8． 5． 8． 6． 8． 7． 8  
． 8． 8． 9． もしくは 9． 0 の pH か、または約 5． 0、5． 1、5． 2、5． 3、5  
． 4、5． 5、5． 6、5． 7、5． 8、5． 9、6． 0、6． 1、6． 2、6． 3、6  
． 4、6． 5、6． 6、6． 7、6． 8、6． 9、7． 0、7． 1、7． 2、7． 3、7  
． 4、7． 5、7． 6、7． 7、7． 8、7． 9、8． 0、8． 1、8． 2、8． 3、8  
． 4、8． 5、8． 6、8． 7、8． 8、8． 9、もしくは 9． 0 の pH に、平衡化され  
る。いくつかの実施形態では、アフィニティマトリクスは、約 7． 2 の pH に平衡化され  
る。平衡化は、所望の pH を有する平衡化緩衝液を用いて実施することができる。様々  
な実施形態において、緩衝液は、pH を所望のポイントに、または所望の範囲内に維持す  
ることができる任意の緩衝液であってもよい。様々な実施形態では、緩衝液濃度は、約 5  
mM ～ 約 100 mM であってもよい。いくつかの事例では、緩衝液濃度は、約 10 mM ～  
約 30 mM である。いくつかの事例では、緩衝液濃度は、約 30 mM ～ 約 50 mM である  
。いくつかの事例では、緩衝液濃度は、約 40 mM ～ 約 60 mM である。様々な実施形態  
では、緩衝液濃度は、10 mM、11 mM、12 mM、13 mM、14 mM、15 mM、  
16 mM、17 mM、18 mM、19 mM、20 mM、21 mM、22 mM、23 mM、  
24 mM、25 mM、26 mM、27 mM、28 mM、29 mM、30 mM、31 mM、  
32 mM、33 mM、34 mM、35 mM、36 mM、37 mM、38 mM、39 mM、  
40 mM、41 mM、42 mM、43 mM、44 mM、45 mM、46 mM、47 mM、  
48 mM、49 mM、50 mM、51 mM、52 mM、53 mM、54 mM、55 mM、  
56 mM、57 mM、58 mM、59 mM、もしくは 60 mM か、または約 10 mM、1  
1 mM、12 mM、13 mM、14 mM、15 mM、16 mM、17 mM、18 mM、1  
9 mM、20 mM、21 mM、22 mM、23 mM、24 mM、25 mM、26 mM、2  
7 mM、28 mM、29 mM、30 mM、31 mM、32 mM、33 mM、34 mM、3  
5 mM、36 mM、37 mM、38 mM、39 mM、40 mM、41 mM、42 mM、4  
3 mM、44 mM、45 mM、46 mM、47 mM、48 mM、49 mM、50 mM、5  
1 mM、52 mM、53 mM、54 mM、55 mM、56 mM、57 mM、58 mM、5  
9 mM、もしくは 60 mM である。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、20 mM で  
あるか、または約 20 mM である。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、40 mM で  
あるか、または約 40 mM である。いくつかの実施形態では、緩衝液濃度は、50 mM で  
あるか、または約 50 mM である。いくつかの実施形態では、緩衝液は、リン酸ナトリウ  
ムである。いくつかの実施形態では、この緩衝液は、約 10 mM ～ 約 50 mM のトリス、  
リン酸ナトリウム、もしくは酢酸塩、またはそれらの組み合わせを含む。

10

20

30

40

50

【0083】

アフィニティマトリクスの平衡化後、（ここではホモ二量体汚染物質および他の不純  
物から精製される）ヘテロ二量体タンパク質を含有する中和された溶出物を、5 ～ 9 の p  
H で上記で考察した精製プロセス工程で使用されるのと同じアフィニティマトリクスに  
再適用する。様々な実施形態では、中和された溶出物は、5． 0、5． 1、5． 2、5．  
3、5． 4、5． 5、5． 6、5． 7、5． 8、5． 9、6． 0、6． 1、6． 2、6．  
3、6． 4、6． 5、6． 6、6． 7、6． 8、6． 9、7． 0、7． 1、7． 2、7．  
3、7． 4、7． 5、7． 6、7． 7、7． 8、7． 9、8． 0、8． 1、8． 2、8．  
3、8． 4、8． 5、8． 6、8． 7、8． 8、8． 9、もしくは 9． 0 の pH か、また  
は約 5． 0、5． 1、5． 2、5． 3、5． 4、5． 5、5． 6、5． 7、5． 8、5．  
9、6． 0、6． 1、6． 2、6． 3、6． 4、6． 5、6． 6、6． 7、6． 8、6．  
9、7． 0、7． 1、7． 2、7． 3、7． 4、7． 5、7． 6、7． 7、7． 8、7．  
9、8． 0、8． 1、8． 2、8． 3、8． 4、8． 5、8． 6、8． 7、8． 8、8．  
9、もしくは 9． 0 の pH で、アフィニティマトリクスに再適用される。いくつかの実  
施形態では、pH は、7． 2 であるか、または約 7． 2 である。

【0084】

いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体タンパク質を精製する方法は、(a)一連のクロマトグラフィーサイクルを実施することであって、ここで各サイクルが、(i)ヘテロ二量体タンパク質と不純物との混合物を、タンパク質結合リガンドを含有するアフィニティーマトリクスに導入することであって、ここでヘテロ二量体タンパク質が、タンパク質結合リガンドに対して異なるアフィニティを有する第一および第二のポリペプチドを含み、少なくとも一つの不純物がタンパク質結合リガンドに結合し、少なくとも一つの不純物がタンパク質結合リガンドに結合しない、導入することと、(ii)アフィニティーマトリクスを、5~9の第一のpHで第一の洗浄緩衝液で洗浄して、非結合不純物を除去することと、(iii)第二のpHで第一の溶出緩衝液中のアフィニティーマトリクスからヘテロ二量体タンパク質を溶出することと、(iv)アフィニティーマトリクスを、4未満の第三のpHで第二の洗浄緩衝液で洗浄して、結合不純物を除去することと、を含み、ここで第二のpHが、一連のクロマトグラフィーサイクル内の予備的な一連のサイクル中、予備的なpHであり、第二のpHは、一連のクロマトグラフィーサイクル内の後続の一連のサイクル中、予備的なpHよりも高い後続のpHまで上昇し、予備的なpHおよび後続のpHが、4.0~5.2の範囲内である、実施すること、および(b)溶出物中のアフィニティーマトリクスから、ヘテロ二量体タンパク質を収集すること、を含む。

10

【0085】

様々な実施形態では、予備的な一連のサイクルは、20サイクルからなる。いくつかの実施形態では、予備的な一連のサイクルは、30サイクルからなる。いくつかの実施形態では、予備的な一連のサイクルは、40サイクルからなる。いくつかの実施形態では、予備的な一連のサイクルは、50サイクルからなる。いくつかの実施形態では、予備的な一連のサイクルは、60サイクルからなる。いくつかの実施形態では、予備的な一連のサイクルは、70サイクルからなる。いくつかの実施形態では、予備的な一連のサイクルは、80サイクルからなる。いくつかの事例では、予備的な一連のサイクルは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、もしくは100サイクルを含むか、またはそれからなる。

20

【0086】

いくつかの実施形態では、後続の一連のサイクルは、少なくとも20サイクルからなる。いくつかの実施形態では、後続の一連のサイクルは、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、または少なくとも80サイクルからなる。いくつかの事例では、後続の一連のサイクルは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、85、90、95、または100を含むか、またはそれからなる。

30

40

【0087】

いくつかの実施形態では、予備的なpHは、4.0~4.2である。いくつかの事例では、予備的なpHは4.1±0.05である。いくつかの事例では、予備的なpHは、4.0、4.025、4.05、4.075、4.1、4.125、4.15、4.175、または4.2である。いくつかの実施形態では、後続のpHは、4.3~4.7である。いくつかの事例では、後続のpHは4.5±0.05である。いくつかの事例では、後続のpHは、4.4、4.425、4.45、4.475、4.5、4.525、4.55、4.575、または4.6である。

【0088】

いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体タンパク質を精製する方法は、(a)一連のク

50

ロマトグラフィーサイクルを実施することであって、ここで各サイクルが、(i) ヘテロ二量体タンパク質と不純物との混合物を、タンパク質結合リガンドを含有するアフィニティーマトリクスに導入することであって、ここでヘテロ二量体タンパク質が、タンパク質結合リガンドに対して異なるアフィニティを有する第一および第二のポリペプチドを含み、少なくとも一つの不純物がタンパク質結合リガンドに結合し、少なくとも一つの不純物がタンパク質結合リガンドに結合しない、導入することと、(ii) アフィニティーマトリクスを、5～9の第一のpHで第一の洗浄緩衝液で洗浄して、非結合不純物を除去することと、(iii) 第二のpHで第一の溶出緩衝液中のアフィニティーマトリクスからヘテロ二量体タンパク質を溶出することと、(iv) アフィニティーマトリクスを、4未満の第三のpHで第二の洗浄緩衝液で洗浄して、結合不純物を除去することと、を含む、実施すること、(b) 一連のクロマトグラフィーサイクル内の任意の一つ以上のサイクルの後、ヘテロ二量体タンパク質を含有する溶出物中の結合不純物のレベルを測定し、結合不純物の測定されたレベルと結合不純物の参照レベルとを比較することであって、ここで結合不純物の測定されたレベルが結合不純物の参照レベルを超える場合、一連のクロマトグラフィーサイクル内の後続のサイクルの第二のpHを増加する、第二のpHは一連のクロマトグラフィーサイクル内の各サイクルまたは後続のサイクル中、4.0～5.2の範囲内である、比較すること、および(c) 溶出物中のアフィニティーマトリクスから、ヘテロ二量体タンパク質を収集すること、を含む。

10

#### 【0089】

いくつかの実施形態では、結合不純物の参照レベルは、2%～10%である。いくつかの事例では、結合不純物の参照レベルは、3%～7%である。いくつかの事例では、結合不純物の参照レベルは、5%±0.5%である。様々な実施形態では、結合不純物の参照レベルは、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、もしくは10%であるか、または約1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、もしくは10%である。

20

#### 【0090】

いくつかの実施形態では、溶出物中の結合不純物のレベルは、一連のクロマトグラフィーサイクル内の各サイクル後に測定される。いくつかの実施形態では、溶出物中の結合不純物のレベルは、一連のクロマトグラフィーサイクルの五番目のサイクルごとの後に測定される。いくつかの実施形態では、溶出物中の結合不純物のレベルは、一連のクロマトグラフィーサイクルの10番目のサイクルごとの後に測定される。いくつかの実施形態では、溶出物中の結合不純物のレベルは、一連のクロマトグラフィーサイクルの20番目のサイクルに続いて測定される。いくつかの実施形態では、溶出物中の結合不純物のレベルは、一連のクロマトグラフィーサイクルの40番目のサイクルまたは50番目のサイクルに続いて測定される。様々な実施形態において、溶出物中の結合不純物のレベルは、サイクル1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、および／またはサイクル100の後測定される。様々な実施形態において、溶出物中の結合不純物のレベルは、2サイクルごと、3サイクルごと、4サイクルごと、5サイクルごと、6サイクルごと、7サイクルごと、8サイクルごと、9サイクルごと、10サイクルごと、15サイクルごと、20サイクルごと、25サイクルごと、30サイクルごと、35サイクルごと、40サイクルごと、45サイクルごと、または50サイクルごとの後に測定される。いくつかの事例では、溶出物は、一連のサイクル（例え

30

40

50

ば、5サイクル、または10サイクル)にわたって収集され、結合不純物のレベルは、組み合わされた溶出物プールで測定される。様々な実施形態において、組み合わされた溶出物プールは、一連の2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100サイクル、またはそれ以上にわたって収集される。

10

#### 【0091】

いくつかの実施形態では、第二のpHは、結合不純物の測定されたレベルが結合不純物の参照レベルを超える場合、4.0~4.2の範囲から4.2~5.2の範囲(または4.3~4.7)に増加する。いくつかの事例では、結合不純物の測定されたレベルが結合不純物の参照レベルを超える場合、第二のpHは、4.1±0.05から4.5±0.05に増加する。いくつかの事例では、第二のpHは、4.0、4.025、4.05、4.075、4.1、4.125、4.15、4.175、または4.2であり、結合不純物の測定されたレベルが結合不純物の参照レベルを超える場合、4.4、4.425、4.45、4.475、4.5、4.525、4.55、4.575、または4.6に増加する。

20

#### 【0092】

いくつかの実施形態では、第二のpHは、4.0~4.2であり、結合不純物の測定されたレベルが結合不純物の参照レベルを超える場合、後続のサイクルにおいて0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3、3.25、3.5、3.75、4、4.25、4.5、4.75、または5ポイントだけ増加する。したがって、いくつかの事例では、第二のpHは、結合不純物の測定されたレベルが結合不純物の参照レベルを超える場合、後続のサイクルで段階的に増加し、次いで、結合不純物の測定されたレベルが次のサイクルにおいて結合不純物の参照レベルを超える場合、再び(および必要に応じて繰り返して)段階的に増加し得る。このようにして、溶出pHは、一連のクロマトグラフィーサイクルの過程にわたってヘテロ二量体タンパク質の最大回収を維持しながら、溶出物中の結合不純物を最小限にするレベルで維持され得る。

30

#### 【0093】

いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体タンパク質を精製する方法は、(a)一連のクロマトグラフィーサイクルを実施することであって、ここで各サイクルが、(i)ヘテロ二量体タンパク質と不純物との混合物を、タンパク質結合リガンドを含有するアフィニティーマトリクスに導入することであって、ここでヘテロ二量体タンパク質が、タンパク質結合リガンドに対して異なるアフィニティを有する第一および第二のポリペプチドを含み、少なくとも一つの不純物がタンパク質結合リガンドに結合し、少なくとも一つの不純物がタンパク質結合リガンドに結合しない、導入することと、(ii)アフィニティーマトリクスを、5~9の第一のpHで第一の洗浄緩衝液で洗浄して、非結合不純物を除去することと、(iii)第二のpHで第一の溶出緩衝液中のアフィニティーマトリクスからヘテロ二量体タンパク質を溶出することと、(iv)アフィニティーマトリクスを、4未満の第三のpHで第二の洗浄緩衝液で洗浄して、結合不純物を除去することと、を含み、ここで第二のpHが、一連のクロマトグラフィーサイクル内の一次的な一連のサイクル中、一次pHであり、第二のpHは、一連のクロマトグラフィーサイクル内の一次的な一連のサイクルに続く二次的な一連のサイクル中、一次pHよりも高い二次pHまで上昇し、および二次pHは、一連のクロマトグラフィーサイクル内の二次的な一連のサイクルに続

40

50

く三次的な一連のサイクル中、二次 pH より高い三次 pH まで上昇し、ここで一次 pH、二次 pH、および三次 pH は、4.0～5.2 の範囲内である、実施すること、および (b) 溶出物中のアフィニティマトリクスから、ヘテロ二量体タンパク質を収集することを含む。

【0094】

いくつかの実施形態では、一次的な一連のサイクルは、5～50 サイクルを含む。いくつかの事例では、一次的な一連のサイクルは、最大20 サイクルを含む。いくつかの事例では、一次的な一連のサイクルは、最大40 サイクルを含む。いくつかの事例では、一次的な一連のサイクルは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、もしくは75 サイクルを含むか、または最大で5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、もしくは75 サイクルを含む。

10

【0095】

いくつかの実施形態では、二次的な一連のサイクルは、5～50 サイクルを含む。いくつかの事例では、二次的な一連のサイクルは、10～25 サイクルを含む。いくつかの事例では、二次的な一連のサイクルは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、もしくは75 サイクルを含むか、または最大で5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、もしくは75 サイクルを含む。

20

【0096】

いくつかの実施形態では、三次的な一連のサイクルは、5～50 サイクルを含む。いくつかの事例では、三次的な一連のサイクルは、10～25 サイクルを含む。いくつかの事例では、三次的な一連のサイクルは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、もしくは75 サイクルを含むか、または最大で5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、もしくは75 サイクルを含む。

30

40

【0097】

いくつかの実施形態では、一次 pH は、4.0～4.2 の範囲である。いくつかの事例では、一次 pH は4.1±0.05 である。いくつかの事例では、一次 pH は、4.0、4.025、4.05、4.075、4.1、4.125、4.15、4.175、または4.2 である。いくつかの実施形態では、二次 pH は、4.2～4.4 の範囲である。いくつかの事例では、二次 pH は4.3±0.05 である。いくつかの事例では、二次 pH は、4.2、4.225、4.25、4.275、4.3、4.325、4.35、4.375、または4.4 である。いくつかの実施形態では、三次 pH は、4.4～4.6 の範囲である。いくつかの事例では、三次 pH は4.5±0.05 である。いくつかの事

50

例では、三次 pH は、4.4、4.425、4.45、4.475、4.5、4.525、4.55、4.575、または 4.6 である。

【0098】

いくつかの実施形態では、第二の pH は、一連のクロマトグラフィーサイクル内の三次的な一連のサイクルに続く第 4 の一連のサイクル中、三次 pH よりも高い第 4 の pH まで上昇し、ここで第 4 の pH は 4.0～5.2 の範囲内である。

【0099】

いくつかの実施形態では、第二の pH は、一連のクロマトグラフィーサイクル内の第 4 の一連のサイクルに続く第 5 の一連のサイクル中、第 4 の pH よりも高い第 5 の pH まで上昇し、ここで第 5 の pH は 4.0～5.2 の範囲内である。

【0100】

いくつかの実施形態では、第二の pH は、一連のクロマトグラフィーサイクル内の第 5 の一連のサイクルに続く第 6 の一連のサイクル中、第 5 の pH よりも高い第 6 の pH まで上昇し、ここで第 6 の pH は 4.0～5.2 の範囲内である。

【0101】

いくつかの事例では、二次 pH は、一次 pH よりも 0.1～0.9 高い pH であり、三次 pH は、二次 pH よりも 0.1～0.9 高い pH であり、第 4 の pH は、三次 pH よりも 0.1～0.9 高い pH であり、第 5 の pH は、第 4 の pH よりも 0.1～0.9 高い pH であり、および／または第 6 の pH は、第 5 の pH よりも 0.1～0.9 高い pH であり、一次 pH は、4.0～4.2 の範囲である。いくつかの実施形態では、一次 pH は  $4.1 \pm 0.05$  である。

【0102】

いくつかの実施形態では、二次、三次、四次、五次、または六次の pH（または七次、八次、九次の pH など）は、次の一連のサイクルにおいて、直前の pH より、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、または 1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3、3.25、3.5、3.75、4、4.25、4.5、4.75、またな 5 ポイントだけ増加する（例えば、二次 pH は一次 pH に対して増加し、三次 pH は二次 pH に対して増加する、など）。それ故に、いくつかの事例では、溶出 pH は、後続する一連のサイクルそれぞれにおいて、段階的に増加されてもよい。このようにして、溶出 pH は、一連のクロマトグラフィーサイクルの過程にわたってヘテロ二量体タンパク質の最大回収を維持しながら、溶出物中の結合不純物を最小限にするレベルで維持され得る。

【0103】

いくつかの実施形態では、一次的な一連のサイクル、二次的な一連のサイクル、三次的な一連のサイクル、四次的な一連のサイクル、五次的な一連のサイクル、および／または六次的な一連のサイクル（所望であれば、さらなる一連のサイクル）の各々は、一連のクロマトグラフィーサイクル内で 5～50 サイクルを含む。様々な実施形態では、各々の一連のサイクルは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、もしくは 75 サイクル、もしくはそれ以上を含むか、または少なくともそれを含む。

【0104】

様々な実施形態では、清澄化された細胞培養物からの、またはヘテロ二量体タンパク質を含有する中和された溶出物からのアフィニティマトリクスの装填は、最大約 75 g/L のアフィニティマトリクス樹脂の材料添加を含み得る。様々な実施形態では、アフィニティマトリクスは、65 g/L 以下、60 g/L 以下、55 g/L 以下、または 50 g/L 以下の材料を装填される。

【0105】

いくつかの実施形態では、アフィニティマトリクスは、基質に貼り付けられたリガンド（例えば、プロテインA）を含む。いくつかの事例では、アフィニティマトリクスがリガンドで貼り付けられた複数の粒子であるように、基質はビーズまたは粒子である。様々な実施形態では、リガンドは、プロテインAまたはプロテインGである。リガンドがプロテインAである場合、プロテインAは、天然に存在するか、または修飾されたブドウ球菌プロテインAであってもよく、または操作されたプロテインAであってもよい。操作されたプロテインAは、例えば、Zドメイン四量体、Yドメイン四量体、またはDおよびEドメインを欠く操作されたプロテインAであってもよい。これらの操作されたプロテインAの例は、イムノグロブリンのVH3ドメインに結合できない（または、もしできるとしても非常に低いアフィニティで結合する）が、IgG1、IgG2およびIgG4のCH3ドメインには依然として結合することができる。

10

#### 【0106】

いくつかの事例では、アフィニティマトリクス基質は、アガロース、ポリ（スチレンジビニルベンゼン）、ポリメタクリレート、制御多孔ガラス、球状シリカ、セルロースなどを含有するか、またはそれからなる。基質がビーズまたは粒子として形作られる実施形態において、粒子の平均直径は25  $\mu\text{m}$ ～100  $\mu\text{m}$ である。いくつかの実施形態では、粒子の平均直径は、約40  $\mu\text{m}$ ～約60  $\mu\text{m}$ である。いくつかの実施形態では、粒子の平均直径は、約45  $\mu\text{m}$ ～約55  $\mu\text{m}$ である。いくつかの実施形態では、粒子の平均直径は、約40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54または55  $\mu\text{m}$ である。いくつかの事例では、粒子の平均直径は約45  $\mu\text{m}$ である。いくつかの事例では、粒子の平均直径は約50  $\mu\text{m}$ である。いくつかの実施形態では、粒子は、35  $\mu\text{m}$ 、45  $\mu\text{m}$ 、60  $\mu\text{m}$ 、75  $\mu\text{m}$ 、または85  $\mu\text{m}$ の平均直径を有する。いくつかの実施形態では、粒子は、約1000  $\text{\AA}$ 、1050  $\text{\AA}$ 、1100  $\text{\AA}$ 、1150  $\text{\AA}$ または1200  $\text{\AA}$ の平均直径を有する細孔を含む。いくつかの実施形態では、粒子は、約1100  $\text{\AA}$ の平均直径を有する細孔を含む。

20

#### 【0107】

様々な実施形態では、溶出緩衝液または洗浄緩衝液は、塩を含んでもよい。いくつかの事例では、塩は、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{Cs}^+$ 、 $\text{Rb}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{H}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、または $\text{Al}^{3+}$ を含む。いくつかの実施形態では、塩は、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{H}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、または $\text{Al}^{3+}$ を含む。いくつかの実施形態では、塩は、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、または $\text{ClO}_4^-$ を含む。いくつかの実施形態では、塩は、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{H}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、または $\text{Al}^{3+}$ と、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、または $\text{ClO}_4^-$ との組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、塩は、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、または $\text{NaCl}$ から選択される。いくつかの実施形態では、塩は、 $\text{NaCl}$ である。いくつかの実施形態では、塩は、 $\text{CaCl}_2$ である。いくつかの実施形態では、塩は、 $\text{MgCl}_2$ である。

30

#### 【0108】

本方法のいくつかの実施形態では、ヘテロ二量体タンパク質は、プロテインAに結合することができる（「Fc」）CH3ドメインを含む第一のポリペプチドと、プロテインAに結合できない（「Fc\*」）CH3ドメインを含む第二のポリペプチドとを含む、二重特異性抗体である。いくつかの事例では、第二のポリペプチドは、そのCH3ドメインに、H435R/Y436F（EU付番システムによる；IMGTエクソン付番システムによるとH95R/Y96F）置換を含む（別名「Fc\*」または「スター置換」）。したがって、いくつかの実施形態では、第一のホモ二量体は、二つの非置換CH3ドメイン（すなわち、FcFc）を有する単一特異性抗体であり、第二のホモ二量体は、二つのH435R/Y436F置換CH3ドメイン（すなわち、Fc\*Fc\*）を有する単一特異性抗体であり、ヘテロ二量体タンパク質は、一つの非置換CH3ドメインおよび一つのH435R/Y436F置換CH3ドメイン（すなわち、Fc\*Fc）を有する二重特異性抗体である。

40

#### 【0109】

50

方法のいくつかの実施形態では、クロマトグラフィーカラムが洗浄（例えば、カラムを少なくとも 11 の pH を有する塩基性溶液と接触させることによる）に供される頻度は、タンパク質ーリガンド機能への影響を最小限に抑えるために低減され得る。同様に、方法のいくつかの実施形態では、クロマトグラフィーカラムを洗浄するために使用される溶液中の塩基の濃度は、より多数のサイクルにわたってカラム分離能を最大化するために、0.1 N ~ 0.5 N の範囲に低減され得る。

#### 【0110】

様々な実施形態では、アフィニティマトリクスは、各サイクル後に少なくとも 11 の pH を有する塩基性溶液と接触してもよい。いくつかの事例では、アフィニティマトリクスは、3 サイクルごとの後に少なくとも 11 の pH を有する塩基性溶液と接触する。いくつかの事例では、アフィニティマトリクスは、5 サイクルごとの後に少なくとも 11 の pH を有する塩基性溶液と接触する。いくつかの事例では、アフィニティマトリクスは、7 サイクルごとの後に少なくとも 11 の pH を有する塩基性溶液と接触する。様々な実施形態では、アフィニティマトリクスは、2 サイクルごと、3 サイクルごと、4 サイクルごと、5 サイクルごと、6 サイクルごと、7 サイクルごと、8 サイクルごと、9 サイクルごと、または 10 サイクルごとのみ、それに続いて少なくとも 11 の pH を有する塩基性溶液と接触する。

10

#### 【0111】

いくつかの実施形態では、塩基性溶液の pH は、少なくとも 12 である。いくつかの実施形態では、塩基性溶液の pH は、少なくとも 11、少なくとも 11.1、少なくとも 11.2、少なくとも 11.3、少なくとも 11.4、少なくとも 11.5、少なくとも 11.6、少なくとも 11.7、少なくとも 11.8、少なくとも 11.9、少なくとも 12、少なくとも 12.1、少なくとも 12.2、少なくとも 12.3、少なくとも 12.4、少なくとも 12.5、少なくとも 12.6、少なくとも 12.7、少なくとも 12.8、少なくとも 12.9、または少なくとも 13 である。

20

#### 【0112】

いくつかの実施形態では、塩基性溶液は、0.1 N ~ 0.5 N の濃度の塩基を含む。いくつかの事例では、塩基濃度は、0.1 N ~ 0.3 N である。いくつかの事例では、塩基濃度は、0.1 N、0.15 N、0.2 N、0.25 N、0.3 N、0.35 N、0.4 N、0.45 N、または 0.5 N である。いくつかの実施形態では、塩基性溶液は、アルカリ金属水酸化物を含む。いくつかの事例では、塩基は NaOH である。いくつかの事例では、塩基は KOH である。

30

#### 【実施例】

#### 【0113】

実施例 1：アフィニティークロマトグラフィーにおける、結合不純物の存在に関する溶出 pH、およびヘテロ二量体タンパク質の回収率の評価

16.2 mL の Mab Select SuRe (商標) pcc カラム (内径 1.0 cm、ベッド高 20.6 cm) を、ナイーブ樹脂 (naive resin) で充填し、この実験のために AKTA Avant 25 ベンチトップ液体クロマトグラフィーコントローラに組み込んだ。アフィニティ分離プロセスを、以下の表 1 に概説するように実施したが、溶出 pH は 3.90 ~ 4.30 に変動した。

40

#### 【0114】

【表 1】

表 1 : M a b S e l e c t S u R e (商標) p c c を用いた b s A b 1 アフィニティー分離クロマトグラフィーに対する溶出緩衝液決定プロセス

| 工程 | 説明           | 溶液                                   | 体積                         | 滞留時間<br>(分) |
|----|--------------|--------------------------------------|----------------------------|-------------|
| 1  | 保管エタノールを除去する | RODI                                 | 2CV                        | 10          |
| 2  | ストリップ前       | 500mM酢酸、pH 2.45±0.20                 | 2CV                        | 6           |
| 3  | 平衡化          | 40mMリン酸ナトリウム、500mM NaCl、pH 7.20±0.10 | 2CV                        | 6           |
| 4  | 装填           | 清澄化された細胞培養物                          | 55.0gの結合種/L樹脂 <sup>a</sup> | 6           |
| 5  | 洗浄1          | 40mMリン酸ナトリウム、500mM NaCl、pH 7.20±0.10 | 3CV                        | 6           |
| 6  | 洗浄2          | 40mMトリス、10mM酢酸塩、pH 7.20±0.10         | 2CV                        | 6           |
| 7  | 溶出           | 40mM酢酸塩、500mM NaCl<br>pH 4.10±0.05   | 6CV <sup>b</sup>           | 6           |
| 8  | ストリップ1       | 40mM酢酸、pH 3.00±0.10                  | 2CV                        | 6           |
| 9  | ストリップ2       | 500mM酢酸、pH 2.45±0.20                 | 2CV                        | 6           |
| 10 | 再平衡化         | 20mMリン酸ナトリウム、pH 7.20±0.10            | 2CV                        | 6           |
| 11 | 保管           | 20%(v/v)エタノール                        | 2CV                        | 10          |

10

20

<sup>a</sup> 結合種とは、二重特異性および結合不純物種を指す。結合力価を使用して、カラム装填を決定した。

30

<sup>b</sup> 溶出物収集は、溶出ブロックに 0.5 CV 入ったところで開始した。

CV、カラム体積；RODI、逆浸透脱イオン水

## 【0115】

アフィニティー分離溶出物を分画して、溶出長さ 5、6、および 7 CV で、溶出物組成を表す模擬プールの調製を可能にした。溶出物収集は、溶出ブロックに 0.5 CV 入ったところで開始した。CV 0.5～5 をバルクで収集し、続いて CV 5～6 および CV 6～7 を個別に収集した。分画後、適切な体積を各画分から合わせて、6 CV および 7 CV の模擬プールを生成し、次いで、5、6、および 7 CV のプールを個別のランとして統計的に評価した。

## 【0116】

40

各模擬プールの濃度を、Solo VPE 機器を用いた UV (280 nm) によって決定した。各模擬プールを、混合モードクロマトグラフィーアッセイを使用して測定された二重特異性純度について分析した。各模擬プールの溶出物体積、溶出物タンパク質濃度、結合不純物、および非結合不純物データを使用して、各ランのアフィニティー分離二重特異性収率を計算した。モデルを、0.25 の進入確率、0.05 の退出確率、および 95 % に設定された p 値閾値停止ルールを有する逆方向段階的回帰ツールから選択される因子を使用して生成し、結合不純物レベルおよびヘテロ二量体タンパク質回収率を計算するために使用した。

## 【0117】

図 3 に示されるように、溶出物中の結合不純物の割合およびヘテロ二量体タンパク質回

50

収率の両方は、ナイーブカラムの pH の増加と共に減少した（0 前のサイクル）。示されるように、pH 4.1 は、溶出物中に最小レベルの結合不純物（例えば、2.0%）をもたらし、一方で有意なレベルのヘテロ二量体タンパク質回収を維持する（例えば、92.5%）。特に、溶出緩衝液の pH を 4.2 まで上昇させることは、ヘテロ二量体タンパク質の回収率を劇的に減少させる（例えば、約 80% まで）。

【0118】

実施例 2：ナイーブおよび循環されたアフィニティークロマトグラフィーカラムにおける、結合不純物の存在に関する溶出 pH、およびヘテロ二量体タンパク質の回収率の評価

Akta Avant 25（サイティバ）液体クロマトグラフィーシステムに組み込まれた Mab Select SuRe（商標）pcc カラム（内径 1.0 cm、ベッド高 20 cm）を使用して、この実験を実施した。アフィニティー分離プロセスを、以下の表 2 に概説するように実施したが、以下の表 3 に示すように、溶出 pH およびサイクル数を変化させた。

【0119】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2 : ナイーブおよび循環されたカラムにおける、M a b S e l e c t S u R e (商標) p c c を用いた b s A b 1 アフィニティー分離クロマトグラフィーに対する溶出緩衝液決定プロセス

| 工程 | 説明           | 溶液                                                                                      | 体積                                             | 滞留時間<br>(分) |
|----|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------|
| 1  | 保管エタノールを除去する | 逆浸透脱イオン水                                                                                | 2CV                                            | 10          |
| 2  | ストリップ前       | 500mM酢酸、pH 2.45±0.20                                                                    | 2CV                                            | 6           |
| 3  | 平衡化          | 20mMリン酸ナトリウム、<br>pH 7.20±0.10                                                           | 2CV                                            | 6           |
| 4  | 装填           | 清澄化された細胞培養物                                                                             | 樹脂1L当たり<br>52~63gの<br>結合種(結合<br>不純物+二<br>重特異性) | 6           |
| 5  | 洗浄1          | 10mMリン酸ナトリウム、525mM<br>NaCl、<br>pH 7.10±0.10                                             | 3CV                                            | 6           |
| 6  | 洗浄2          | 20mMリン酸ナトリウム、<br>pH 7.20±0.10                                                           | 2CV                                            | 6           |
| 7  | 溶出           | 40mM酢酸塩<br>500mM NaCl、<br>pH 4.10±0.05<br>または<br>40mM酢酸塩<br>500mM NaCl、<br>pH 4.50±0.05 | ≤7.25CV                                        | 8           |
| 8  | ストリップ1       | 40mM酢酸、<br>9mM NaCl、<br>pH 3.10±0.10                                                    | 2CV                                            | 6           |
| 9  | ストリップ2       | 500mM酢酸、<br>pH 2.45±0.20                                                                | 2CV                                            | 6           |
| 10 | 再平衡化         | 20mMリン酸ナトリウム、<br>pH 7.20±0.10                                                           | 2CV                                            | 6           |
| 11 | ストリップ3       | 0.5M NaOH                                                                               | 2CV                                            | 7.5         |
| 12 | 再平衡化         | 20mMリン酸ナトリウム、<br>pH 7.20±0.10                                                           | 2CV                                            | 6           |
| 13 | 保管           | 20%(v/v)エタノール                                                                           | 2CV                                            | 10          |

10

20

30

40

【0120】

50

## 【表 3】

表 3：pH および樹脂のサイクル数

| ラン        | 樹脂のサイクル数 |
|-----------|----------|
| 4.1 ナイーブ  | 1        |
| 4.1 循環された | 78       |
| 4.5 ナイーブ  | 6        |
| 4.5 循環された | 83       |

## 【0121】

10

図 4 A に示すように、ナイーブカラム（ $\leq 6$  サイクル）中の溶出 pH を増加させること（4.1 から 4.5 へ）は、溶出物中の結合不純物の割合をわずかに減少させ（2.7 % から 1.2 % へ）、一方で循環されたカラム（78～83 サイクル）中の溶出 pH を増加させること（4.1 から 4.5 へ）は、溶出物中の結合不純物の割合を劇的かつ予想外に減少させる（17.4 % から 2.0 % へ）。図 4 B は、溶出 pH の増加（4.1 から 4.5 へ）はまた、ヘテロ二量体タンパク質（例えば、二重特異性抗体）の回収率に悪影響を与えるが、循環されたカラムにおける回収率の減少は予想外に極めてわずかである（ナイーブカラムと比較して約 10 分の 1）ことを示す。図 4 B に示すように、溶出 pH が 4.1 から 4.5 に上昇したときに、ヘテロ二量体タンパク質の回収は、ナイーブカラムで約 40 % 低減したが、循環されたカラムでの減少は、同じ pH 上昇に対して約 4 % に過ぎなかった。

20

## 【0122】

実施例 3：pH 溶出試験において測定されたアウトプットに対するインプットパラメータの評価

A K T A pure 150（サイティバ）液体クロマトグラフィーシステムに別個に組み込まれた、三つの M a b S e l e c t S u R e（商標）p c c カラム（内径 1.0 cm、ベッド高 21 cm；カラム体積 16.5 mL）を使用して、この実験を実施した。アフィニティー分離プロセスを、以下の表 4 に概説するように行ったが、以下の表 5 に示すように、様々なカラム装填（樹脂 1 L 当たり 33～55 g の結合種（二重特異性＋結合不純物））、溶出 pH（4.0～4.5）、および水酸化物サイクルまたは水酸化物曝露時間（1～109 サイクルまたは 0.28～30.56 時間）で行った。カラム装填、溶出 pH、および水酸化物サイクル（または曝露時間）に関連して、収率（二重特異性＋結合不純物の %）、結合不純物（%）、および凝集（S E - U P L C 高分子量 %）を測定した。

30

## 【0123】

40

50

## 【表 4】

表 4 : b s A b 1 の p H 溶出試験のためのプロセス

| 工程 | 説明     | 溶液                                    | 体積    | 滞留時間(分)   |
|----|--------|---------------------------------------|-------|-----------|
| 1  | 水洗浄    | 精製水                                   | 3CV   | 31.5      |
| 2  | ストリップ前 | 500mM酢酸、pH 2.45±0.2                   | 2CV   | 12.6      |
| 3  | 平衡化    | 20mMリン酸ナトリウム、pH 7.20±0.1              | 2CV   | 12.6      |
| 4  | 装填     | 清澄化された細胞培養物                           | 表xを参照 | 51.4~85.7 |
| 5  | 洗浄1    | 10mMリン酸ナトリウム、500mM塩化ナトリウム、pH 7.20±0.1 | 3CV   | 18.9      |
| 6  | 洗浄2    | 20mMリン酸ナトリウム、pH 7.20±0.1              | 2CV   | 12.6      |
| 7  | 溶出     | 40mM酢酸塩、500mM塩化ナトリウム<br>溶液pH: 表xを参照   | 6CV   | 37.8      |
| 8  | ストリップ1 | 40mM酢酸、pH 3.00±0.2                    | 2CV   | 12.6      |
| 9  | ストリップ2 | 500mM酢酸、pH 2.45±0.2                   | 2CV   | 12.6      |
| 10 | 再平衡化   | 20mMリン酸ナトリウム、pH 7.20±0.1              | 2CV   | 12.6      |

10

## 【0124】

## 【表 5】

20

表 5 : 実験ランにおけるパラメータの変動

| ラン | 分離pH | 装填(g/L) | 水酸化物サイクル | 水酸化物接触時間(時間) |
|----|------|---------|----------|--------------|
| 1  | 4.00 | 55      | 105      | 29.44        |
| 2  | 4.50 | 33      | 1        | 0.28         |
| 3  | 4.00 | 33      | 2        | 0.56         |
| 4  | 4.25 | 44      | 106      | 29.72        |
| 5  | 4.25 | 44      | 50       | 14.02        |
| 6  | 4.50 | 55      | 3        | 0.84         |
| 7  | 4.00 | 55      | 4        | 1.12         |
| 8  | 4.25 | 33      | 51       | 14.30        |
| 9  | 4.25 | 55      | 52       | 14.58        |
| 10 | 4.25 | 44      | 53       | 14.86        |
| 11 | 4.50 | 44      | 54       | 15.14        |
| 12 | 4.25 | 44      | 55       | 15.42        |
| 13 | 4.50 | 55      | 107      | 30.00        |
| 14 | 4.00 | 33      | 108      | 30.28        |
| 15 | 4.00 | 44      | 56       | 15.70        |
| 16 | 4.25 | 44      | 5        | 1.40         |
| 17 | 4.50 | 33      | 109      | 30.56        |

30

40

## 【0125】

実験ランは、上記表 5 に列挙した順序で実施された。設計診断を図 5 A、図 5 B および図 6 に示す。実験は、上述のように、少ない（1～5）、中程度（50～56）、または多い（105～109）数の水酸化物サイクルを有する、三つのカラムにわたって実施された。水酸化物サイクルを水酸化物サイクル時間に変換して、分析を容易にした。水酸化物接触時間は、1 サイクル当たり 16.82 分（0.28 時間）であった。分離溶出緩衝液（resolving elution buffer）を、pH 耐性 ± 0.05 内で

50

調製した。溶出物収集は、溶出ブロックに 0.5 CV 入ったところで開始した。

#### 【0126】

各プールの濃度を、Solo VPE 機器を用いた UV (280 nm) によって決定した。プールが二重特異性タンパク質のみを含有したと仮定して、溶出物体積および溶出物タンパク質濃度を使用して、各ランについてアフィニティー分離二重特異性収率を計算した（すなわち、不純物（結合不純物）に起因して、結果として得られた収率を > 100 % で測定することができた）。二重特異性純度を、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）アッセイを使用して測定した。凝集を、サイズ排除超高速液体クロマトグラフィーアッセイ（SE-UPLC）を使用して測定した。

#### 【0127】

モデルは、フルモデルから始まる逆方向段階的回帰ツールから選択された因子を使用して生成され、ルールと 0.05 の p 値閾値とを組み合わせるそのままだにした。プロセス知識および／またはさらなる統計解析も、必要に応じてモデル項（model terms）を追加または除去するために使用した。二重特異性ステップ収率（%）、結合不純物（%）、および凝集（% HMW）について回帰解析を実施した。

#### 【0128】

モデル予測プロファイルを図 7 A および図 7 B に示す。有意な項を有するモデルを、二重特異性収率および結合不純物について作成した。凝集について有意な項は見出されなかった。より低い pH およびより高いカラム装填、ならびに水酸化物接触時間は、より高い二重特異性収率をもたらした。このより高い収率の主な構成要素は、図 7 B に示すように、結合不純物の増加の存在に起因し、これは pH および水酸化物接触時間に対する同じ傾向に続くものであった。

#### 【0129】

これらのモデルが新しいデータを予測する能力を評価するために、三つの確認ランを実施した。清澄化された細胞培養物を、樹脂の 1 L 当たり 44 g の平均カラム装填を使用して、三つのカラムの各々で精製した。モデルを使用して、樹脂寿命の異なる段階でカラム上の固定結合不純物レベル（約 6 %）を標的とするために、どの pH を使用するべきかを予測した。結果を下記の表 6 に示す。

#### 【0130】

#### 【表 6】

表 6：モデル確認ラン

| ラン | 分離溶出<br>緩衝液 pH | 装填（樹脂 1L 当<br>たりの g） | 水酸化物<br>サイクル | 水酸化物<br>接触時間<br>（時間） | 分離二重特異<br>性ステップ収<br>率<br>（%、予測） | 分離二重特異<br>性ステップ収<br>率<br>（%、実際） | 結合不純物<br>（%予測） | 結合不純物<br>（%、実際） |
|----|----------------|----------------------|--------------|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------|-----------------|
| 1  | 4.10           | 44                   | 6            | 1.68                 | 76.3                            | 80.4                            | 6.41           | 6.20            |
| 2  | 4.25           | 44                   | 57           | 15.98                | 71.7                            | 78.7                            | 6.43           | 5.97            |
| 3  | 4.35           | 44                   | 110          | 30.84                | 80.4                            | 83.2                            | 6.24           | 6.22            |

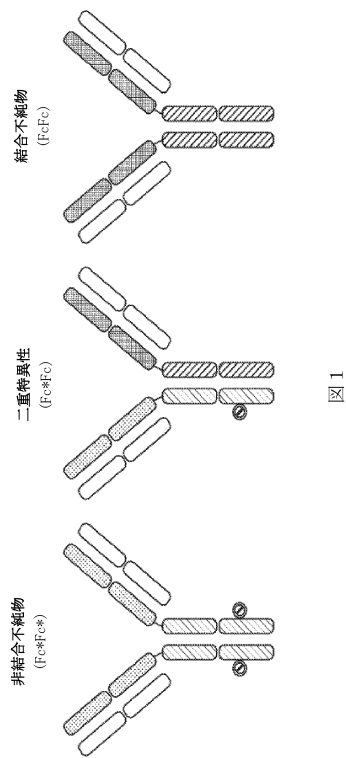
#### 【0131】

二重特異性収率モデルは、評価範囲にわたって一貫して低いと予測したが、実際の 7 % 以内であった。カラム装填は、結合不純物の予測において有意な因子ではなかった。結合不純物モデル予測は、実際のものよりも高かったが、0.5 % 以内であった。

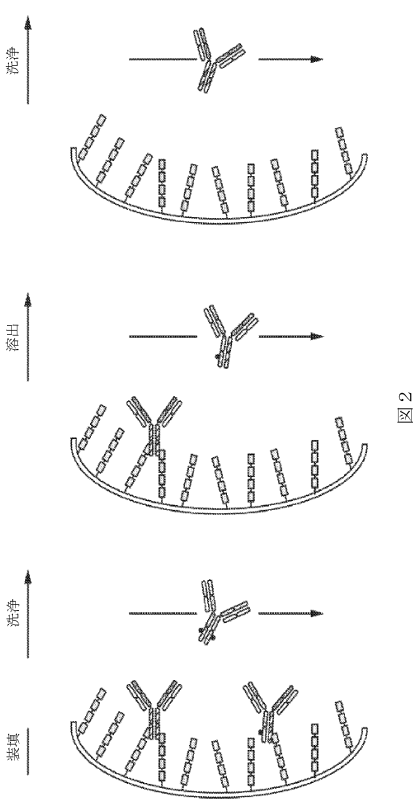
#### 【0132】

本発明は、本明細書に記載される具体的な実施形態によって範囲を限定されるものではない。実際には、本明細書に記載されるものに加えて本発明の様々な修正が、前述の記載から当業者に明らかとなるであろう。そのような修正は、添付される特許請求の範囲内にあることを意図している。

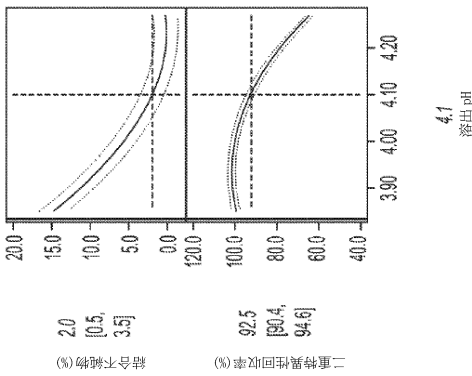
【図面】  
【図 1】



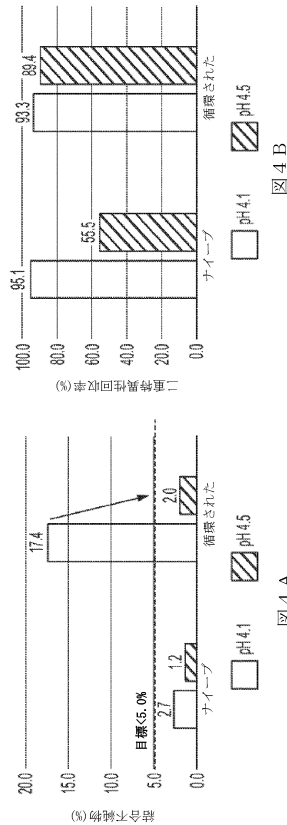
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

20

30

40

50

【図 5】

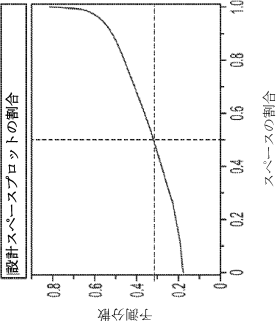


図 5 B

| 検定力分析                       |         |       |
|-----------------------------|---------|-------|
| 有意性レベル                      | 0.05    |       |
| 予想される RMSE                  | 1       |       |
| 項                           |         |       |
| 項                           | 予想される係数 | 検定力   |
| インターセプト                     | 1       | 0.525 |
| 分離溶出 pH                     | 1       | 0.773 |
| カラム装填 (g/L)                 | 1       | 0.72  |
| 水酸化物接触時間 (時間)               | 1       | 0.743 |
| 分離溶出 pH*分離溶出 pH             | 1       | 0.289 |
| 分離溶出 pH*カラム装填 (g/L)         | 1       | 0.881 |
| カラム装填 (g/L)*カラム装填 (g/L)     | 1       | 0.289 |
| 分離溶出 pH*水酸化物接触時間 (時間)       | 1       | 0.655 |
| カラム装填 (g/L)*水酸化物接触時間 (時間)   | 1       | 0.655 |
| 水酸化物接触時間 (時間)*水酸化物接触時間 (時間) | 1       | 0.247 |

図 5 A

【図 6 - 1】

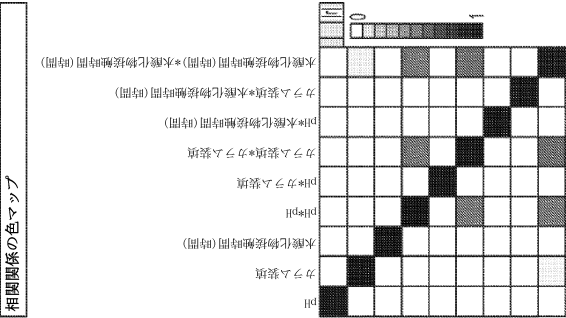


図 6

【図 6 - 2】

| 効果                            | pH       | カラム装填    | 水酸化物接触時間 (時間) | pH * pH  | pH * カラム装填  | カラム装填 * カラム装填 | pH * 水酸化物接触時間 (時間) | カラム装填 * 水酸化物接触時間 (時間) | 水酸化物接触時間 * 水酸化物接触時間 (時間) |
|-------------------------------|----------|----------|---------------|----------|-------------|---------------|--------------------|-----------------------|--------------------------|
| P <sub>H</sub>                | 1        | 0        | 0.019208      | 0        | 0           | 0             | 0.002132783        | 0.02988511            | 0.054580238              |
| カラム装填                         | 0        | 1        | 0             | 0        | 0           | 0             | 0.02133902         | 0.07062263            | 0.04438458               |
| 水酸化物接触時間 (時間)                 | 0.019208 | 0        | 1             | 0.021538 | 0.002147507 | 0.000704      | 0.02132062         | 0.08868002            | 0.04438458               |
| pH * pH                       | 0        | 0        | 0.021538      | 1        | 0           | 0             | 0.01386402         | 0.00323702            | 0.59073007               |
| カラム装填 * カラム装填                 | 0        | 0        | 0.0021475     | 0        | 1           | 0             | 0.02238575         | 0.002394524           | 0.05584197               |
| pH * 水酸化物接触時間 * カラム装填         | 0        | 0        | 0.000704      | 0.514286 | 0           | 1             | 0.05281592         | 0                     | 0.54113573               |
| 水酸化物接触時間 * 水酸化物接触時間           | 0.002134 | 0.002134 | 0.0213209     | 0.001389 | 0.00238575  | 0.00238575    | 1                  | 0.00423257            | 0.01152256               |
| カラム装填 * 水酸化物接触時間 (時間)         | 0.002133 | 0.017082 | 0.038836      | 0.003324 | 0.002394524 | 0             | 0.00423257         | 1                     | 0.009346306              |
| 水酸化物接触時間 (時間) * 水酸化物接触時間 (時間) | 0.029885 | 0.05458  | 0.0244385     | 0.59073  | 0.05584197  | 0.541136      | 0.01152256         | 0.009346306           | 1                        |

図 6 続き

【図 7】

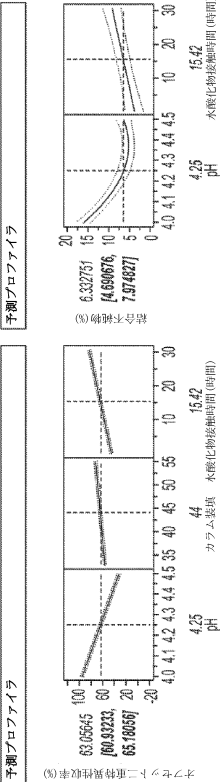


図 7 B

図 7 A

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
**PCT/US2023/010594**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br><b>INV. C07K1/22</b><br><b>ADD.</b><br><br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                             |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br><b>C07K</b><br><br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br><br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br><b>EPO-Internal</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                             |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                             |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                              | Relevant to claim No.                                                       |
| <b>A</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b>ANDREW D. TUSTIAN ET AL: "Development of purification processes for fully human bispecific antibodies based upon modification of protein A binding avidity",<br/>MABS,<br/>vol. 8, no. 4, 10 March 2016 (2016-03-10),<br/>pages 828-838, XP055411787,<br/>US<br/>ISSN: 1942-0862, DOI:<br/>10.1080/19420862.2016.1160192<br/>the whole document</b><br>----- | <b>1-83</b>                                                                 |
| <b>A</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b>WO 2015/035180 A1 (GENENTECH INC [US];<br/>HOFFMANN LA ROCHE [CH])<br/>12 March 2015 (2015-03-12)<br/>examples</b><br>-----<br>-/--                                                                                                                                                                                                                          | <b>1-83</b>                                                                 |
| <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 :<br><br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br><br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                             |
| Date of the actual completion of the international search<br><br><b>12 April 2023</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Date of mailing of the international search report<br><br><b>19/04/2023</b> |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Authorized officer<br><br><b>Schleifenbaum, A</b>                           |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2023/010594

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                 |                       |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages              | Relevant to claim No. |
| A                                                    | WO 2020/214792 A1 (BRISTOL MYERS SQUIBB CO [US]) 22 October 2020 (2020-10-22) examples<br>----- | 1-83                  |
| A                                                    | WO 2019/016154 A1 (UCB BIOPHARMA SPRL [BE]) 24 January 2019 (2019-01-24) examples<br>-----      | 1-83                  |

1

10

20

30

40

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/010594

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 2015035180 A1                          | 12-03-2015          | CA 2922832 A1              | 12-03-2015          |
|                                           |                     | CN 105848746 A             | 10-08-2016          |
|                                           |                     | EP 3041593 A1              | 13-07-2016          |
|                                           |                     | JP 6602765 B2              | 06-11-2019          |
|                                           |                     | JP 2016530533 A            | 29-09-2016          |
|                                           |                     | JP 2019094334 A            | 20-06-2019          |
|                                           |                     | JP 2021155421 A            | 07-10-2021          |
|                                           |                     | KR 20160050062 A           | 10-05-2016          |
|                                           |                     | RU 2016112549 A            | 10-10-2017          |
|                                           |                     | US 2015093800 A1           | 02-04-2015          |
|                                           |                     | US 2019054396 A1           | 21-02-2019          |
|                                           |                     | WO 2015035180 A1           | 12-03-2015          |
| WO 2020214792 A1                          | 22-10-2020          | CN 113747960 A             | 03-12-2021          |
|                                           |                     | EP 3956046 A1              | 23-02-2022          |
|                                           |                     | JP 2022530852 A            | 04-07-2022          |
|                                           |                     | KR 20210148349 A           | 07-12-2021          |
|                                           |                     | US 2022220423 A1           | 14-07-2022          |
|                                           |                     | WO 2020214792 A1           | 22-10-2020          |
| WO 2019016154 A1                          | 24-01-2019          | AU 2018304867 A1           | 02-01-2020          |
|                                           |                     | BR 112019027760 A2         | 07-07-2020          |
|                                           |                     | CA 3067496 A1              | 24-01-2019          |
|                                           |                     | CL 2020000087 A1           | 24-07-2020          |
|                                           |                     | CN 110945008 A             | 31-03-2020          |
|                                           |                     | CO 2020000090 A2           | 24-04-2020          |
|                                           |                     | EA 202090262 A1            | 12-05-2020          |
|                                           |                     | EP 3655420 A1              | 27-05-2020          |
|                                           |                     | IL 271790 A                | 27-02-2020          |
|                                           |                     | JP 7145196 B2              | 30-09-2022          |
|                                           |                     | JP 2020527553 A            | 10-09-2020          |
|                                           |                     | KR 20200027552 A           | 12-03-2020          |
|                                           |                     | SG 11201911880U A          | 30-01-2020          |
|                                           |                     | US 2020331960 A1           | 22-10-2020          |
|                                           |                     | WO 2019016154 A1           | 24-01-2019          |

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

B 0 1 J 20/285 (2006.01)  
 B 0 1 J 20/283 (2006.01)  
 B 0 1 J 20/282 (2006.01)  
 C 0 7 K 16/00 (2006.01)  
 C 0 7 K 14/31 (2006.01)

## F I

B 0 1 J 20/281  
 B 0 1 J 20/285  
 B 0 1 J 20/285  
 B 0 1 J 20/285  
 B 0 1 J 20/285  
 B 0 1 J 20/283  
 B 0 1 J 20/282  
 C 0 7 K 16/00  
 C 0 7 K 14/31

## テーマコード (参考)

G  
 N  
 M  
 S  
 T  
 Z

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,D  
 E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S  
 M,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,  
 AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,  
 ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,L  
 A,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL  
 ,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,V  
 N,WS,ZA,ZM,ZW

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソー ミル リバー ロード  
 7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 バルマッセ、 アンドリュー

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソー ミル リバー ロード  
 7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 チボロスキ、 マーク

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソー ミル リバー ロード  
 7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 セヴィンスキ、 クリストファー

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソー ミル リバー ロード  
 7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ディン、 ショーン

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州 タリータウン オールド ソー ミル リバー ロード  
 7 7 7 リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド 気付

F ターム (参考) 4H045 AA10 AA30 BA09 CA11 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74 GA26