(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7091238号
(P7091238)

(45)発行日　令和4年6月27日(2022.6.27)

(24)登録日　令和4年6月17日(2022.6.17)

(51)国際特許分類

C07K 16/46 (2006.01)	C07K	16/46	ZNA
C07K 16/24 (2006.01)	C07K	16/24	
C07K 1/16 (2006.01)	C07K	1/16	
C07K 1/18 (2006.01)	C07K	1/18	
C07K 1/20 (2006.01)	C07K	1/20	

FI

請求項の数　40　（全207頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-509536(P2018-509536)
(86)(22)出願日　平成28年8月19日(2016.8.19)
(65)公表番号　特表2018-533355(P2018-533355A)
(43)公表日　平成30年11月15日(2018.11.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2016/047912
(87)国際公開番号　WO2017/031476
(87)国際公開日　平成29年2月23日(2017.2.23)
審査請求日　令和1年8月19日(2019.8.19)
(31)優先権主張番号　62/210,378
(32)優先日　平成27年8月26日(2015.8.26)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/207,910
(32)優先日　平成27年8月20日(2015.8.20)
最終頁に続く

(73)特許権者　509012625
ジェネンテック， インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
(74)代理人　110002077
園田・小林特許業務法人
(72)発明者　フォン， クリス ビー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080， サウス サンフランシスコ， ディーエヌエー ウェイ 1， シー／オー ジェネンテック， インコーポレイテッド
(72)発明者　ラディワラ， アシフ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080， サウス サンフランシスコ， デ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＦＫＰＡの精製、及び組換えポリペプチドの産生のためのその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

多重特異性抗体及び１つ以上の不純物を含む組成物からの多重特異性抗体の精製方法であって、方法が、以下の順序で、

ａ）組成物を親和性クロマトグラフィーに供して、親和性溶出物を産生することと、

ｂ）親和性溶出物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成することと、

ｃ）混合モード溶出物を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、陰イオン交換溶出物を生成することと、

ｄ）陰イオン交換溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し、多重特異性抗体を含む画分を収集することと、

ｅ）疎水性相互作用溶出物を陽イオン交換クロマトグラフィーに供し、多重特異性抗体を含む画分を収集することと、を含み、

多重特異性抗体が、１つ以上のシャペロンを発現するように操作された原核生物細胞によって産生され、

不純物が、１つ以上のシャペロンを含み、

組成物からの１つ以上のシャペロンの量を低減する、方法。

【請求項２】

多重特異性抗体及び１つ以上の不純物を含む組成物からの多重特異性抗体の精製方法であって、多重特異性抗体が、複数のアームを含み、各アームが、ＶＨ／ＶＬ単位を含み、方

法が、以下の順序で、
ａ）組成物をタンパク質Ａクロマトグラフィーに供して、タンパク質Ａ溶出物を産生するステップと、
ｂ）タンパク質Ａ溶出物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成するステップと、
ｃ）混合モード溶出物を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、陰イオン交換溶出物を生成するステップと、
ｄ）陰イオン交換溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し、多重特異性抗体を含む画分を収集するステップと、
ｅ）疎水性相互作用溶出物を陽イオン交換クロマトグラフィーに供し、多重特異性抗体を含む画分を収集するステップと、を含み、
多重特異性抗体が、１つ以上のシャペロンを発現するように操作された原核生物細胞によって産生され、
不純物が、１つ以上のシャペロンを含み、
組成物からの１つ以上のシャペロンの量を低減する、方法。
【請求項３】
多重特異性抗体の精製方法であって、多重特異性抗体が、複数のアームを含み、各アームが、ＶＨ／ＶＬ単位を含み、多重特異性抗体の各アームが、別個に産生され、方法が、以下順序で、
ａ）多重特異性抗体の各アームをタンパク質Ａクロマトグラフィーに供して、多重特異性抗体の各アームのタンパク質Ａ溶出物を産生するステップと、
ｂ）多重特異性抗体を含む組成物を産生するのに十分な条件下で、多重特異性抗体の各アームのタンパク質Ａ溶出物を含む混合物を形成するステップと、
ｃ）多重特異性抗体を含む組成物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成するステップと、
ｄ）混合モード溶出物を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、陰イオン交換溶出物を生成するステップと、
ｅ）陰イオン交換溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し、多重特異性抗体を含む画分を収集するステップと、
ｆ）疎水性相互作用溶出物を陽イオン交換クロマトグラフィーに供し、多重特異性抗体を含む画分を収集するステップと、を含み、
多重特異性抗体の各アームが、１つ以上のシャペロンを発現するように操作された原核生物細胞によって産生され、
組成物からの１つ以上のシャペロンの量を低減する、方法。
【請求項４】
多重特異性抗体の精製方法であって、多重特異性抗体が、複数のアームを含み、各アームが、ＶＨ／ＶＬ単位を含み、方法が、以下の順序で、
ａ）組成物をタンパク質Ａクロマトグラフィーに供して、タンパク質Ａ溶出物を産生するステップと、
ｂ）タンパク質Ａ溶出物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成するステップと、
ｃ）混合モード溶出物を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、陰イオン交換溶出物を生成するステップと、
ｄ）陰イオン交換溶出物をヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーに供し、多重特異性抗体を含む画分を収集するステップと、を含み、
多重特異性抗体が、１つ以上のシャペロンを発現するように操作された原核生物細胞によって産生され、
組成物からの１つ以上のシャペロンの量を低減する、方法。
【請求項５】
多重特異性抗体の精製方法であって、多重特異性抗体が、複数のアームを含み、各アーム

が、ＶＨ／ＶＬ単位を含み、多重特異性抗体の各アームが、別個に産生され、方法が、以下の順序で、
ａ）多重特異性抗体の各アームをタンパク質Ａクロマトグラフィーに供して、多重特異性抗体の各アームのタンパク質Ａ溶出物を産生するステップと、
ｂ）多重特異性抗体を含む組成物を産生するのに十分な条件下で、多重特異性抗体の各アームのタンパク質Ａ溶出物を含む混合物を形成するステップと、
ｃ）多重特異性抗体を含む組成物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成するステップと、
ｄ）混合モード溶出物を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、陰イオン交換溶出物を生成するステップと、
ｅ）陰イオン交換溶出物をヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーに供し、多重特異性抗体を含む画分を収集するステップと、を含み、
多重特異性抗体の各アームが、１つ以上のシャペロンを発現するように操作された原核生物細胞によって産生され、
組成物からの１つ以上のシャペロンの量を低減する、方法。
【請求項６】
混合モードクロマトグラフィーが、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィーである、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
親和性クロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
タンパク質Ａクロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、請求項２～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
混合モードクロマトグラフィー、及び／または陰イオン交換クロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、請求項１～５及び８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーが、貫流モードで行われる、請求項４または５に記載の方法。
【請求項１１】
多重特異性抗体を含むヒドロキシアパタイト相互作用クロマトグラフィー画分を限外濾過に供するステップを更に含む、請求項４または５に記載の方法。
【請求項１２】
多重特異性抗体を含む陽イオン交換画分を限外濾過に供するステップを更に含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
多重特異性抗体を含むヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー画分を限外濾過に供するステップを更に含む、請求項４、５、及び１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
限外濾過が、第１の限外濾過、透析濾過、及び第２の限外濾過を逐次的に含む、請求項１１～１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
タンパク質Ａクロマトグラフィーが、アガロースに結合しているタンパク質Ａを含む、請求項２～１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
タンパク質Ａクロマトグラフィーが、ＭＡｂＳｅｌｅｃｔ（商標）、ＭＡｂＳｅｌｅｃｔ（商標）ＳｕＲｅ、及びＭＡｂＳｅｌｅｃｔ（商標）ＳｕＲｅ ＬＸ、Ｐｒｏｓｅｐ－ＶＡ、Ｐｒｏｓｅｐ－ＶＡ Ｕｌｔｒａ Ｐｌｕｓ、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ｆａｓｔ ｆｌｏｗ、またはＴｙｏｐｅａｒｌ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａクロマトグラフィーである、請求項１５に記載の方法。

【請求項１７】
混合モードクロマトグラフィーが、四級アミン及び疎水性部分、四級アミン及び高架橋アガロースに結合している疎水性部分、またはＮ－ベンジル－ｎ－メチルエタノールアミンを含む、請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
混合モードクロマトグラフィーが、Ｃａｐｔｏ（商標）ａｄｈｅｒｅクロマトグラフィーである、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）が、疎水性部分を含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
疎水性相互作用クロマトグラフィーが、フェニル部分、フェニル部分架橋アガロース、または架橋アガロースに結合しているブチル部分を含む、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
疎水性相互作用クロマトグラフィーが、ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）クロマトグラフィーまたはＢｕｔｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）クロマトグラフィーである、請求項１９に記載の方法。
【請求項２２】
疎水性相互作用クロマトグラフィーが、ヘキシル部分、ヒドロキシル化メタクリルポリマーに結合している疎水性部分、またはヒドロキシル化メタクリルポリマーに結合しているヘキシル部分を含む、請求項１９～２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
疎水性相互作用クロマトグラフィーが、ＴＯＹＯＰＥＡＲＬ（登録商標）Ｈｅｘｙｌ６５０Ｃである、請求項１９～２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーが、セラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーである、請求項４、５、１０、及び１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５】
ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーが、ＣＨＴ　Ｉ型セラミックヒドロキシアパプタイト（ｈｙｄｒｏｘｙａｐａｐｔｉｔｅ）クロマトグラフィーである、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
陽イオン交換クロマトグラフィーが、カルボン酸部分、スルホン酸部分、カルボン酸部分架橋アガロース、または架橋アガロースに結合しているスルホン酸部分を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７】
陽イオン交換材料が、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ２０、ＳＯ３　Ｍｏｎｏｌｉｔｈ、Ｓ　Ｃｅｒａｍｉｃ　ＨｙｐｅｒＤ、スルホプロピル－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＳＰＳＦＦ）、ＳＰ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＸＬ（ＳＰＸＬ）、ＣＭ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ、Ｃａｐｔｏ（商標）Ｓ、Ｆｒａｃｔｏｇｅｌ　Ｓｅ　ＨｉＣａｐ、Ｆｒａｃｔｏｇｅｌ　ＳＯ３、またはＦｒａｃｔｏｇｅｌ　ＣＯＯである、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
原核生物細胞が、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞である、請求項１～２７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９】
シャペロンが、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、またはＤｓｂＣのうちの１つ以上である、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
多重特異性抗体が、二重特異性抗体である、請求項１～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】

多重特異性抗体の第１のアームが、ＩＬ１３に結合する、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
ＩＬ１３が、ヒトＩＬ１３である、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
ＩＬ１３が、配列番号１または配列番号２のアミノ酸配列を含む、請求項３１または３２に記載の方法。
【請求項３４】
（ａ）多重特異性抗体の第１のアームが、配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号１０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、
（ｂ）多重特異性抗体の第１のアームが、配列番号１３のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号１４のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む、または
（ｃ）多重特異性抗体の第１のアームが、配列番号１５、１６、または１７のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、請求項３１～３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５】
抗体の第２のアームが、ＩＬ１７に結合する、請求項３０～３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６】
ＩＬ１７が、ヒトＩＬ１７である、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
ＩＬ１７が、配列番号３、配列番号４、配列番号５、または配列番号６のアミノ酸配列を含む、請求項３５または３６に記載の方法。
【請求項３８】
ａ）多重特異性抗体の第２のアームが、配列番号１８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号１９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号２０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号２１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、
ｂ）多重特異性抗体の第２のアームが、配列番号２５のアミノ段配列を含むＶＨ配列、及び配列番号２６のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む、または
ｃ）多重特異性抗体の第２のアームが、配列番号２７、２８、または２９のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、請求項３５に記載の方法。
【請求項３９】
多重特異性抗体を含む組成物を生産するための方法であって、請求項１～３８のいずれか一項に記載の方法によって多重特異性抗体を精製することを含む、方法。
【請求項４０】
組成物が、約５％、４％、３％、２％、または１％以下の１つ以上のシャペロンを含む、請求項３９に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１５年８月２０日出願の米国仮出願第６２／２０７，９０８号、２０１５年８月２０日出願の米国仮出願第６２／２０７，９１０号、及び２０１５年８月２６日出願の米国仮出願第６２／２１０，３７８号の利益を主張するものであり、これらの各々の開示は、全ての目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
ＡＳＣＩＩテキストファイルでの配列表の提出
ＡＳＣＩＩテキストファイルでの以下の提出物の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる：コンピュータ可読形態（ＣＲＦ）の配列表（ファイル名：１４６３９２

０３３６４０＿Ｓｅｑｕｅｎｃｅ＿Ｌｉｓｔｉｎｇ．ｔｘｔ、記録日：２０１６年８月１９日、サイズ：５８ＫＢ）。

【０００３】

本発明は、ＦＫＢＰ型ペプチジル－プロリルシス－トランスイソメラーゼ（ＦｋｐＡ）ポリペプチドの非常に高いレベルの純度での産生方法を提供する。超高純度ＦｋｐＡ、及び、例えば、細菌中に産生された生物製剤からのＦｋｐＡの除去または低減を示すための免疫アッセイで使用するための、その使用方法も提供される。いくつかの実施形態では、本発明は、ポリペプチド及び少なくとも１つの不純物を含む組成物からのポリペプチド（例えば、多重特異性抗体）の精製方法、ならびに本方法によって精製された産物を含む製剤を提供する。いくつかの実施形態では、不純物は、産物特異的不純物、例えば、多重特異性抗体の前駆体、凝集体、及び／または変異形である。

【背景技術】

【０００４】

発酵条件下における細菌宿主細胞での発現によって大量に産生される真核生物ポリペプチドの産生収率及び品質は、多くの場合、分泌ヘテロ多量体タンパク質（例えば、抗体）の適切な組み立て及び折り畳みを改善するように修正される。ＦＫＢＰ型ペプチジル－プロリルシス－トランスイソメラーゼ（ＦｋｐＡ）等のシャペロンタンパク質の過剰発現により、細菌宿主細胞内で産生された抗体等の異種タンパク質の適切な折り畳み及び溶解が容易になる。ＦｋｐＡは、オリゴペプチド中のプロリンイミドペプチド結合のシス－トランス異性化を触媒する（Ｍｉｓｓｉａｋａｓ，Ｄ．ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ（１９９６）２１（４），８７１－８８４）。

【０００５】

ヒト患者への投与に許容される組換え生物薬剤学的タンパク質の場合、製造及び精製プロセスによって生じる残留不純物が最終生物学的産物から除去されるか、またはその中で少量まで低減されることが重要である。これらのプロセス成分としては、培養培地タンパク質、免疫グロブリン親和性リガンド、ウイルス、内毒素、ＤＮＡ、及び宿主細胞タンパク質が挙げられる。これらの宿主細胞不純物は、プロセス特異的宿主細胞タンパク質（ＨＣＰ）を含み、ＨＣＰは、組換えＤＮＡ技法から得られる生物学的産物中のプロセス関連不純物、例えば、過剰発現されてタンパク質折り畳みを容易にするＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、及びＤｓｂＣ等のシャペロンである。ＨＣＰが典型的には最終薬物物質中に少量で（目的とする組換えポリペプチド１ミリグラム当たり１００万分の１またはナノグラム単位で）存在する一方で、ＨＣＰが望ましくなく、それらの量が最小限に抑えられるべきであることが認識されている。例えば、米国食品医薬品局（Ｆｏｏｄ ａｎｄ Ｄｒｕｇ Ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）（ＦＤＡ）は、ヒトにおけるインビボ使用を目的とする生物薬剤が可能な限り外来不純物を含むべきではないことを要求しており、また、ＨＣＰ等の潜在的不純物の検出及び定量の試験を要求している。加えて、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｏｎｆｅｒｅｎｃｅ ｏｎ Ｈａｒｍｏｎｉｚａｔｉｏｎ（ＩＣＨ）は、生物工学的／生物学的産物の試験手順及び受け入れ基準についてのガイドラインを提供している。このガイドラインは、ＨＣＰの場合、広範囲のタンパク質不純物を検出することができる高感度免疫アッセイが利用されるべきであることを示唆している。免疫グロブリン、ＤＮＡ、内毒素、ウイルス、及び全ＨＣＰ、例えば、全Ｅ．ｃｏｌｉタンパク質（ＥＣＰ）または全ＣＨＯタンパク質（ＣＨＯＰ）を検出するためのアッセイ及び試薬が開発されているが、かかるアッセイ及び試薬は、ＦｋｐＡ等の付属タンパク質不純物を正確には検出しない。典型的には細菌で高レベルでは発現されないが、組換え細菌宿主細胞で過剰発現されて生物学的産物の折り畳み及び分泌を容易にし得る、ＦｋｐＡ等のタンパク質の検出及び定量化に十分な特異度及び感度を有する市販試薬または分析方法は、現在のところ存在しない。

【０００６】

ＦｋｐＡの検出のための試薬、方法、及びキットは、十分な一貫性、感度、特異度、または効率を有する既存のアッセイ及び試薬が存在しない場合に、特に必要とされている。本明細書に記載の発明は、上述の必要性をいくらか満たし、他の利点を提供する。加えて、

多重特異性抗体の調製物は、非対合抗体アーム及び誤組み立て抗体等の特有の産物特異的不純物を有する。したがって、これらの産物特異的不純物を除去する、多重特異性抗体のための精製スキームを開発する必要性が存在する。

【０００７】

特許出願及び公報を含む本明細書で引用される全ての参考文献は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。

【発明の概要】

【０００８】

本発明は、ＦｋｐＡポリペプチドを含む細胞溶解物からのＦｋｐＡポリペプチドの精製方法であって、ａ）遠心分離により細胞溶解物を浄化することと、ｂ）ＦｋｐＡポリペプチドを含む浄化された細胞溶解物を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に適用することと、ｃ）陽イオン交換クロマトグラフィー材料からＦｋｐＡポリペプチドを溶出させて、ＦｋｐＡポリペプチドを含む陽イオン交換溶出物を生成することと、ｄ）ＦｋｐＡポリペプチドを含む陽イオン交換溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）材料に適用することと、ｅ）ＨＩＣ材料からＦｋｐＡポリペプチドを溶出させて、ＨＩＣ溶出物を生成することと、ｆ）ＦｋｐＡポリペプチドを含むＨＩＣ溶出物をサイズ排除クロマトグラフィー材料に適用することと、ｇ）サイズ排除クロマトグラフィーから精製されたＦｋｐＡポリペプチドを含む画分を収集することとを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡポリペプチドを含む溶解物は、約ｐＨ６．０である。

【０００９】

いくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は、強陽イオン交換体である。いくつかの実施形態では、強陽イオン交換体は、スルホプロピル基を含む。いくつかの実施形態では、スルホプロピル基は、架橋アガロースに結合している。いくつかの実施形態では、陽イオン交換材料は、溶出前に２５ｍＭの２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸（ＭＥＳ）中で洗浄される。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡは、塩勾配を使用して陽イオンクロマトグラフィー材料から溶出される。いくつかの実施形態では、塩勾配は、線形勾配である。いくつかの実施形態では、塩勾配は、９カラム体積にわたって、２５ｍＭのＭＥＳ、３００ｍＭのＮａＣｌから２５ｍＭのＭＥＳ、３００ｍＭのＮａＣｌまでの０～３０％の勾配である。いくつかの実施形態では、陽イオン交換溶出物は、画分で収集される。いくつかの実施形態では、画分は、疎水性相互作用クロマトグラフィー前にサイズ排除クロマトグラフィーによって分析される。いくつかの実施形態では、少なくとも約２５％のＦｋｐＡを含む画分が、更なる精製のために選択される。

【００１０】

本発明のいくつかの実施形態では、ＨＩＣ材料は、ブチル部分を含む。いくつかの実施形態では、ブチル部分は、架橋アガロースに結合している。いくつかの実施形態では、陽イオン交換溶出物は、約０．６Ｍの硫酸ナトリウム及び約５０ｍＭのＰＯ４（ＨＩＣ前約ｐＨ７）を含むように調整される。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡ結合ＨＩＣ材料は、溶出前に４０ｍＭのリン酸塩、３００ｍＭの硫酸ナトリウム（ｐＨ７．０）で洗浄される。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡは、水を使用してＨＩＣ材料から溶出される。いくつかの実施形態では、ＨＩＣ溶出物は、画分で収集される。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡを含む画分が、プールされる。いくつかの実施形態では、少なくとも約２５％のＦｋｐＡを含む画分が、プールされる。

【００１１】

本発明のいくつかの実施形態では、サイズ排除クロマトグラフィー材料は、架橋アガロースとデキストランとの球状複合体を含む。いくつかの実施形態では、サイズ排除貫流物は、画分で収集される。いくつかの実施形態では、ＨＩＣ溶出物は、サイズ排除クロマトグラフィー前に濃縮される。いくつかの実施形態では、ＨＩＣ溶出物は、サイズ排除クロマトグラフィー前に約６倍～約１０倍に濃縮される。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡを含むサイズ排除画分が、プールされる。

【００１２】

上記の実施形態のうちのいくつかの実施形態では、ＦｋｐＡポリペプチドは、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ＦｋｐＡポリペプチドである。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡポリペプチドは、配列番号１のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも約８０％の同一性を含む。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡは、細胞で発現される。いくつかの実施形態では、細胞は、原核生物細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、ＦｋｐＡの内因性発現を超えるレベルでＦｋｐＡを発現するように操作される。いくつかの実施形態では、細胞は、微小流動化剤を使用して溶解される。

【００１３】

いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載の方法によって精製されたＦｋｐＡポリペプチドを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本組成物は、少なくとも約９８％のＦｋｐＡポリペプチド（例えば、９８％の単量体ＦｋｐＡポリペプチド、例えば、サイズ排除クロマトグラフィーによって測定される）を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、約２％未満の低分子量種を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、約５％以下の高分子量種を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、約２％未満の高分子量種を含む。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡポリペプチド（例えば、単量体ＦｋｐＡ）の割合は、サイズ排除クロマトグラフィーによって検出される。いくつかの実施形態では、本組成物は、約５％、約４％、約３％、約２％、約１％の不純物を含むか、または不純物を実質的に含まない。いくつかの実施形態では、不純物は、ＦｋｐＡに対して高分子量及び／または低分子量のポリペプチド種である。いくつかの実施形態では、不純物は、Ｅ．ｃｏｌｉタンパク質（ＥＣＰ）、ＦｋｐＡ凝集体、ＦｋｐＡ断片、核酸、または細胞培養培地成分のうちの１つ以上である。

【００１４】

上述の組成物のいくつかの実施形態では、精製されたＦｋｐＡは、１回以上の凍結融解サイクルに対して安定している。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡは、３回の凍結融解サイクルに対して安定している。いくつかの実施形態では、本組成物は、凍結融解後に少なくとも約７０％のＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、凍結融解後に少なくとも約８０％のＦｋｐＡを含む。

【００１５】

上述の組成物のいくつかの実施形態では、組成物中のＦｋｐＡポリペプチドの純度は、クロマトグラフィー、ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはウエスタンブロット分析のうちの１つ以上によって測定される。いくつかの実施形態では、組成物中のＦｋｐＡポリペプチドの純度は、高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）によって測定される。いくつかの実施形態では、組成物中のＦｋｐＡポリペプチドの純度は、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）によって測定される。いくつかの実施形態では、組成物中のＦｋｐＡポリペプチドの純度は、蛍光画像化または銀染色を使用してＳＤＳゲル電気泳動によって測定される。いくつかの実施形態では、組成物中の非ＦｋｐＡポリペプチドの存在は、ウエスタンブロット分析により示される抗ＦｋｐＡ抗体と免疫反応しないゲル電気泳動によって特定される種の存在によって特定される。いくつかの実施形態では、組成物中のＦｋｐＡポリペプチドの凝集体の存在は、ウエスタンブロット分析により、天然ＦｋｐＡを超える分子量を有する種の存在によって特定される。

【００１６】

いくつかの態様では、本発明は、ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体の生成方法であって、動物を、本明細書に記載の方法によって精製されたＦｋｐＡを含む組成物に曝露または免疫化することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体の生成方法は、動物を、本明細書に記載のＦｋｐＡの組成物に曝露または免疫化することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、動物から血清を収集することを更に含み、血清は、ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体を含む。いくつかの実施形態では、血清は、ＦｋｐＡに特異的に結合するポリクローナル抗体を含む。他の実施形態では、１

つ以上のモノクローナル抗体が、血清から単離される。いくつかの実施形態では、動物は、ヤギ、ウサギ、マウス、モルモット、ハムスター、ラット、ロバ、またはニワトリである。

【００１７】

いくつかの態様では、本発明は、ＦｋｐＡに特異的に結合するポリクローナル抗体を含む組成物を提供し、ポリクローナル抗体は、動物を、本明細書に記載の方法のうちのいずれかによって精製されたＦｋｐＡを含む組成物に免疫化することによって生成される。いくつかの実施形態では、ポリクローナル抗体は、動物を、本明細書に記載の精製されたＦｋｐＡ組成物に免疫化することによって生成される。いくつかの実施形態では、ポリクローナル抗体は、動物の血清から収集される。他の実施形態では、本発明は、ＦｋｐＡに特異的に結合するモノクローナル抗体を含む組成物を提供し、モノクローナル抗体は、動物を、本明細書に記載の方法のうちのいずれかによって精製されたＦｋｐＡを含む組成物に免疫化することによって生成される。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、動物を、本明細書に記載の精製されたＦｋｐＡ組成物に免疫化することによって生成される。いくつかの実施形態では、動物は、ヤギ、ウサギ、マウス、モルモット、ハムスター、ラット、ロバ、またはニワトリである。

【００１８】

いくつかの態様では、本発明は、ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体の精製方法であって、抗ＦｋｐＡ抗体を含む組成物を、約６０％の最終濃度の硫酸アンモニウムになるまで、硫酸アンモニウムと接触させることと、溶液を遠心分離することと、上清を除去することと、ペレットをリン酸緩衝液中に溶解することとを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、リン酸緩衝液は、約５０ｍＭのリン酸ナトリウム（約ｐＨ７．０）を含む。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体の精製方法は、ａ）抗ＦｋｐＡ抗体を含む組成物を、約６０％の最終濃度の硫酸アンモニウムになるまで、硫酸アンモニウムと接触させることと、溶液を遠心分離することと、上清を除去することと、ペレットをリン酸緩衝液中に溶解して、抗ＦｋｐＡ抗体溶液を生成することと、ｂ）抗ＦｋｐＡ抗体溶液を親和性クロマトグラフィー材料に適用することと、ｃ）親和性材料から抗体を溶出させて、抗ＦｋｐＡ抗体を含む親和性溶出物を生成することと、ｄ）親和性溶出物をサイズ排除クロマトグラフィーに供することであって、精製された抗体を含む画分が、サイズ排除クロマトグラフィーから収集される、供することとを含む。いくつかの実施形態では、リン酸緩衝液は、約５０ｍＭのリン酸ナトリウム（約ｐＨ７．０）を含む。いくつかの実施形態では、親和性クロマトグラフィー材料は、クロマトグラフィー培地に結合している精製されたＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、クロマトグラフィー培地は、架橋デキストランである。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡは、本明細書に記載の方法のうちのいずれかによって精製される。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡは、本明細書に記載の組成物のうちのいずれかに由来する。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡは、クロマトグラフィー培地に共有結合している。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡは、グリセリル－制御孔ガラスカラム（グリセリル－ＣＰＧ）を使用してクロマトグラフィー培地に結合している。いくつかの実施形態では、抗ＦｋｐＡ抗体は、リン酸緩衝生理食塩水（約ｐＨ２．０）を使用して親和性カラムから溶出される。いくつかの実施形態では、溶出物プールは、約１ＭのＴｒｉｓ（約ｐＨ８．０）中に収集される。いくつかの実施形態では、サイズ排除クロマトグラフィー材料は、架橋アガロースとデキストランとの球状複合体を含む。いくつかの実施形態では、架橋アガロースとデキストランとの球状複合体は、１０，０００ダルトン～６００，０００ダルトンの分子量を有する分子の分離範囲を有する。いくつかの実施形態では、サイズ排除貫流物は、画分で収集される。いくつかの実施形態では、抗ＦｋｐＡ抗体を含むサイズ排除画分が、プールされる。いくつかの実施形態では、抗体は、ポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、本明細書に記載の方法のうちのいずれかに従って調製される。いくつかの実施形態では、抗体の約１％未満が、非ＦｋｐＡ化合物に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載の方法のうちのいずれかによって精製された、単離された抗ＦｋｐＡ抗

体を提供する。
【００１９】
いくつかの実施形態では、本発明は、試料中のＦｋｐＡの定量化方法であって、検出システムを使用して試料中のＦｋｐＡを検出することと、試料中で検出されたＦｋｐＡの量を１つ以上の濃度の超高純度ＦｋｐＡ参照標準物の検出と比較することとを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡ参照標準物は、少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、または約９８％の単量体ＦｋｐＡポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡ参照標準物は、本明細書に記載の方法のうちのいずれかによって調製されるか、または本明細書に記載のＦｋｐＡ組成物のうちのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、検出システムは、免疫アッセイである。いくつかの実施形態では、免疫アッセイは、超高純度ＦｋｐＡ参照標準物に特異的に結合する抗体を含む。
【００２０】
いくつかの実施形態では、本発明は、ＦｋｐＡの存在及び／または分量についての組換えポリペプチド試料の分析方法であって、免疫アッセイを使用して試料中のＦｋｐＡを検出することと、試料中で検出されたＦｋｐＡの量を１つ以上の濃度の超高純度ＦｋｐＡ参照標準物の検出と比較することとを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡ参照標準物は、少なくとも約９８％の単量体ＦｋｐＡポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡ参照標準物は、本明細書に記載の方法のうちのいずれかによって調製される。いくつかの実施形態では、免疫アッセイは、超高純度ＦｋｐＡ参照標準物に特異的に結合する抗体を含む。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体は、ポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体は、免疫アッセイにおいて捕捉抗体として使用される。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体は、検出抗体として使用される。いくつかの実施形態では、検出抗体は、検出剤にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、検出剤は、西洋ワサビペルオキシダーゼである。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体は、本明細書に記載の方法のうちのいずれかに従って調製される。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡは、Ｅ．ｃｏｌｉ ＦｋｐＡである。いくつかの実施形態では、試料は、宿主細胞内で調製される組換えポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、ＦｋｐＡを過剰発現する。いくつかの実施形態では、試料は、細胞溶解物である。いくつかの実施形態では、試料は、組換えポリペプチド調製物から得られ、組換えポリペプチド調製物は、１つ以上のクロマトグラフィー精製ステップに供されている。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチド調製物は、最終精製産物である。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチド試料中に含有される組換えポリペプチドは、抗体またはイムノアドヘシンである。いくつかの実施形態では、抗体は、多重特異性抗体、二重特異性抗体、半抗体、または抗体断片である。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４である。
【００２１】
いくつかの実施形態では、本発明は、試料中のＦｋｐＡの検出のための免疫アッセイ方法であって、試料が、宿主細胞株に由来する組換えポリペプチド調製物から得られ、（ａ）ＦｋｐＡに結合する捕捉抗体を試料と接触させ、それにより試料－捕捉抗体組み合わせ材料を生成することと、（ｂ）ＦｋｐＡに結合する検出抗体を試料－捕捉抗体組み合わせ材料と接触させることと、（ｃ）試料－捕捉抗体組み合わせ材料に結合している抗体を検出することとを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、免疫アッセイは、標準滴定曲線を使用して結合している検出抗体のレベルを定量化することを更に含む。いくつかの実施形態では、免疫アッセイは、結合している検出抗体のレベルに基づいて試料中に存在するＦｋｐＡの量を計算することを更に含む。いくつかの実施形態では、試料中に存在するＦｋｐＡの量は、標準滴定曲線を超高純度ＦｋｐＡ組成物で生成された標準滴定曲線と比較することによって決定される。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡ組成物は、少なくとも約９８％のＦｋｐＡポリペプチド（例えば、単量体ＦｋｐＡ）を含む。い

くつかの実施形態では、組成物中の超高純度ＦｋｐＡは、本明細書に記載の方法のうちのいずれかによって調製される。いくつかの実施形態では、捕捉抗体は、超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、検出抗体は、超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体は、ポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡに結合する第２の検出抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、ポリクローナル抗体は、本明細書に記載の方法のうちのいずれかに従って生成される。いくつかの実施形態では、免疫アッセイは、サンドイッチアッセイである。いくつかの実施形態では、サンドイッチアッセイは、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）である。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡは、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＦｋｐＡである。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチド調製物または宿主細胞株は、Ｅ．ｃｏｌｉから得られる。いくつかの実施形態では、宿主細胞株は、外因性ＦｋｐＡを発現する。いくつかの実施形態では、試料は、細胞溶解物である。いくつかの実施形態では、試料は、組換えポリペプチド調製物から得られ、組換えポリペプチド調製物は、１つ以上のクロマトグラフィー精製ステップに供されている。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチド調製物は、最終精製産物である。

【００２２】

いくつかの実施形態では、免疫アッセイは、抗体またはイムノアドヘシンの調製物を分析するために使用される。いくつかの実施形態では、抗体は、多重特異性抗体、二重特異性抗体、半抗体、または抗体断片である。いくつかの実施形態では、抗体は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４である。いくつかの実施形態では、抗体は、ＩＬ１３に結合する第１の結合ドメイン、及びＩＬ１７に結合する第２の結合ドメインを含む二重特異性抗体である。いくつかの実施形態では、ＩＬ１３は、配列番号４または配列番号５のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第１の結合ドメインは、配列番号１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号１３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第１の結合ドメインは、配列番号１０のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号１１のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第１の結合ドメインは、配列番号１８のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第１の結合ドメインは、配列番号１９のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第１の結合ドメインは、配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ１７は、ヒトＩＬ１７である。いくつかの実施形態では、第２の結合ドメインは、ヒトＩＬ１７ＡＡ、ＩＬ１７ＦＦ、及びＩＬ１７ＡＦに結合する。いくつかの実施形態では、ＩＬ１７Ａは、配列番号６または配列番号７のアミノ酸配列を含み、ＩＬ１７Ｆは、配列番号８または配列番号９のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第２の結合ドメインは、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号２４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号２５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号２６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第２の結合ドメインは、配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号２２のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第２の結合ドメインは、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第２の結合ドメインは、配列番号３０のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第２の結合ドメインは、配列番号３１のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【００２３】

いくつかの実施形態では、本発明は、細菌細胞から調製された組換えポリペプチドを含む

薬学的組成物の品質アッセイであって、本明細書に記載の免疫アッセイ方法に供して、薬学的組成物中のＦｋｐＡの存在または量を検出することを含む、品質アッセイを提供する。いくつかの実施形態では、薬学的組成物中で検出されるＦｋｐＡの量は、免疫アッセイによって決定される、約３０ｐｐｍ、約２５ｐｐｍ、約２０ｐｐｍ、約１５ｐｐｍ、約１４ｐｐｍ、約１３ｐｐｍ、約１２ｐｐｍ、約１１ｐｐｍ、約１０ｐｐｍ、約９ｐｐｍ、約８ｐｐｍ、約７ｐｐｍ、約６ｐｐｍ、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍ以下である。いくつかの実施形態では、細菌細胞は、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞である。いくつかの実施形態では、細菌細胞は、外因性ＦｋｐＡを発現する。いくつかの実施形態では、試料は、細胞溶解物である。いくつかの実施形態では、試料は、組換えポリペプチド調製物から得られ、組換えポリペプチド調製物は、１つ以上のクロマトグラフィー精製ステップに供されている。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチド調製物は、最終精製産物である。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドは、抗体またはイムノアドヘシンである。いくつかの実施形態では、抗体は、多重特異性抗体、二重特異性抗体、半抗体、または抗体断片である。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４である。

【００２４】

いくつかの実施形態では、本発明は、ＩＬ１３に結合する第１の結合ドメイン、及びＩＬ１７に結合する第２の結合ドメインを含む二重特異性抗体の品質アッセイを提供する。いくつかの実施形態では、ＩＬ１３は、配列番号４または配列番号５のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第１の結合ドメインは、配列番号１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号１３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第１の結合ドメインは、配列番号１０のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号１１のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第１の結合ドメインは、配列番号１８のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第１の結合ドメインは、配列番号１９のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第１の結合ドメインは、配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ１７は、ヒトＩＬ１７である。いくつかの実施形態では、第２の結合ドメインは、ヒトＩＬ１７ＡＡ、ＩＬ１７ＦＦ、及びＩＬ１７ＡＦに結合する。いくつかの実施形態では、ＩＬ１７Ａは、配列番号６または配列番号７のアミノ酸配列を含み、ＩＬ１７Ｆは、配列番号８または配列番号９のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第２の結合ドメインは、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号２４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号２５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号２６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第２の結合ドメインは、配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号２２のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第２の結合ドメインは、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第２の結合ドメインは、配列番号３０のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第２の結合ドメインは、配列番号３１のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、薬学的組成物中のＤｓｂＡ及び／またはＤｓｂＣの量を検出するステップを更に含むアッセイ。いくつかの実施形態では、ＤｓｂＡの量は、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍ以下で

ある。いくつかの実施形態では、ＤｓｂＣの量は、免疫アッセイによって決定される、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍ以下である。

【００２５】

いくつかの実施形態では、本発明は、細菌細胞から調製された組換えポリペプチドを含む薬学的組成物中のＦｋｐＡの検出のためのキットであって、本明細書に記載の方法のうちのいずれかによって調製された抗ＦｋｐＡ抗体、または本明細書に記載の抗ＦｋｐＡ抗体の組成物のうちのいずれかを含む、キットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、試料中のＦｋｐＡを定量するための標準曲線を生成する際の参照標準物として使用するための、かつ／または陽性対照として使用するための超高純度ＦｋｐＡを更に含む。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡは、本明細書に記載の方法のうちのいずれかによって調製される。

【００２６】

いくつかの態様では、本発明は、組換えポリペプチドを含む組成物であって、組換えポリペプチドが、内因性ＦｋｐＡを発現する宿主細胞内で産生され、組成物が、約６ｐｐｍ、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍ以下の濃度のＦｋｐＡを含む、組成物を提供する。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡの濃度は、免疫アッセイによって決定される。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡの濃度は、本明細書に記載の免疫アッセイのうちのいずれかによって決定される。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドは、外因性ＦｋｐＡを発現するように操作されている宿主細胞内で産生され、本組成物は、約１５ｐｐｍのＦｋｐＡ、約６ｐｐｍ、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍのＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドは、抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、二重特異性抗体である。いくつかの実施形態では、本組成物は、少なくとも約０．１ｐｐｍのＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、外因性ＦｋｐＡを発現し、本組成物は、約１３ｐｐｍ以下を含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、外因性ＦｋｐＡを発現し、本組成物は、約０．７ｐｐｍ以下を含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、外因性ＦｋｐＡを発現し、本組成物は、約６ｐｐｍ以下を含む。

【００２７】

いくつかの実施形態では、本発明は、二重特異性抗体を含む組成物を提供し、二重特異性抗体は、ＩＬ１３に結合する第１の結合ドメイン、及びＩＬ１７に結合する第２の結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ１３は、配列番号４または配列番号５のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第１の結合ドメインは、配列番号１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号１３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第１の結合ドメインは、配列番号１０のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号１１のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第１の結合ドメインは、配列番号１８のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第１の結合ドメインは、配列番号１９のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第１の結合ドメインは、配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ１７は、ヒトＩＬ１７である。いくつかの実施形態では、第２の結合ドメインは、ヒトＩＬ１７ＡＡ、ＩＬ１７ＦＦ、及びＩＬ１７ＡＦに結合する。いくつかの実施形態では、ＩＬ１７Ａは、

配列番号６または配列番号７のアミノ酸配列を含み、ＩＬ１７Ｆは、配列番号８または配列番号９のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第２の結合ドメインは、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号２４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号２５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号２６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第２の結合ドメインは、配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号２２のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第２の結合ドメインは、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第２の結合ドメインは、配列番号３０のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第２の結合ドメインは、配列番号３１のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＤｓｂＡの量は、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍ以下である。いくつかの実施形態では、ＤｓｂＡの量は、免疫アッセイによって決定される。いくつかの実施形態では、ＤｓｂＣの量は、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍ以下である。いくつかの実施形態では、ＤｓｂＣの濃度は、免疫アッセイによって決定される。いくつかの実施形態では、本組成物は、ＦｋｐＡを実質的に含まない。いくつかの実施形態では、本組成物は、ＤｓｂＡを実質的に含まない。いくつかの実施形態では、本組成物は、ＤｓｂＣを実質的に含まない。

【００２８】

いくつかの実施形態では、本発明は、二重特異性抗体を含む組成物を提供し、組換えポリペプチドは、ａ）宿主細胞に、第１の重鎖及び第１の軽鎖をコードする核酸であって、第１の重鎖及び第１の軽鎖が、第１の抗原結合ドメインを形成する、核酸と、ｉｉ）第２の重鎖及び第２の軽鎖をコードする核酸であって、第２の重鎖及び第２の軽鎖が、第２の抗原結合ドメインを形成する、核酸と、ｉｉｉ）ＦｋｐＡポリペプチドをコードする核酸とを導入することであって、第１の重鎖及び第２の重鎖が、Ｆｃドメインを形成する、導入することと、ｂ）抗体を精製することとを含み、組成物が、約５ｐｐｍ未満のＦｋｐＡを含む、方法によって産生された。いくつかの実施形態では、本発明は、二重特異性抗体を含む組成物を提供し、二重特異性抗体は、ａ）第１の宿主細胞に、ｉ）第１の重鎖及び第１の軽鎖をコードする核酸であって、第１の重鎖及び第１の軽鎖が、第１の抗原結合ドメインを形成する、核酸と、ｉｉ）ＦｋｐＡポリペプチドをコードする核酸とを導入することと、ｂ）第２の宿主細胞に、ｉ）第２の重鎖及び第２の軽鎖をコードする核酸であって、第２の重鎖及び第２の軽鎖が、第２の抗原結合ドメインを形成する、核酸と、ｉｉ）ＦｋｐＡポリペプチドをコードする核酸とを導入することと、ｂ）第１の抗原結合ドメイン及び第２の結合ドメインを単離することと、ｃ）第１の抗原結合ドメイン及び第２の抗原結合ドメインが組み立てられて、二重特異性抗体を形成する条件下で、第１の抗原結合ドメイン及び第２の抗原結合ドメインを組み合わせることと、ｂ）二重特異性抗体を精製することとを含み、組成物が、約５ｐｐｍ未満のＦｋｐＡを含む、方法によって産生された。いくつかの実施形態では、本組成物は、約１ｐｐｍ未満のＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、原核生物宿主細胞である。いくつかの実施形態では、第１の宿主細胞及び第２の宿主細胞は、原核生物宿主細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、グラム陰性菌である。いくつかの実施形態では、グラム陰性菌は、Ｅ．ｃｏｌｉである。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡは、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＦｋｐＡである。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、ＩＬ１３に結合する第１の結合ドメイン、及びＩＬ１７に結合する第２の結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ１３は、配列番号４または配列番号５のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、二重特異

性抗体の第１の結合ドメインは、配列番号１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号１３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第１の結合ドメインは、配列番号１０のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号１１のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第１の結合ドメインは、配列番号１８のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第１の結合ドメインは、配列番号１９のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第１の結合ドメインは、配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ１７は、ヒトＩＬ１７である。いくつかの実施形態では、第２の結合ドメインは、ヒトＩＬ１７ＡＡ、ＩＬ１７ＦＦ、及びＩＬ１７ＡＦに結合する。いくつかの実施形態では、ＩＬ１７Ａは、配列番号６または配列番号７のアミノ酸配列を含み、ＩＬ１７Ｆは、配列番号８または配列番号９のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第２の結合ドメインは、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号２４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号２５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号２６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第２の結合ドメインは、配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号２２のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第２の結合ドメインは、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第２の結合ドメインは、配列番号３０のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の第２の結合ドメインは、配列番号３１のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、約１５ｐｐｍ以下のＤｓｂＡを含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、約５ｐｐｍ以下のＤｓｂＡを含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、約１５ｐｐｍ以下のＤｓｂＣを含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、約５ｐｐｍ以下のＤｓｂＣを含む。いくつかの実施形態では、ＤｓｂＡは、免疫アッセイによって決定される。いくつかの実施形態では、ＤｓｂＣは、免疫アッセイによって測定される。

【００２９】

本発明は、多重特異性抗体及び１つ以上の不純物を含む組成物からのポリペプチドの精製方法であって、逐次的に、ａ）組成物を親和性クロマトグラフィーに供して、親和性溶出物を産生するステップと、ｂ）親和性溶出物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成するステップと、ｃ）混合モード溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し、ポリペプチドを含む画分を収集するステップとを含む、方法を提供し、本方法は、組成物からの産物特異的不純物の量を低減する。いくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーは、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィーである。いくつかの実施形態では、親和性クロマトグラフィーは、結合及び溶出モードで行われる。いくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーは、結合及び溶出モードで行われる。いくつかの実施形態では、ＨＩＣは、貫流モードで行われる。

【００３０】

本発明は、多重特異性抗体及び不純物を含む組成物からの多重特異性抗体の精製方法であって、多重特異性抗体が、複数のアームを含み、各アームが、ＶＨ／ＶＬ単位を含み、方法が、逐次的に、ａ）組成物をタンパク質Ａクロマトグラフィーに供して、タンパク質Ａ溶出物を産生するステップと、ｂ）タンパク質Ａ溶出物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成するステップと、ｃ）混合モード溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し、多重特異性抗体を含む画分を収集するステップとを含み、組成物からの産物特異的不純物の量を低減する、方法を提供する。いくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーは、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィーで

ある。いくつかの実施形態では、親和性クロマトグラフィーは、結合及び溶出モードで行われる。いくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーは、結合及び溶出モードで行われる。いくつかの実施形態では、ＨＩＣは、貫流モードで行われる。

【００３１】

いくつかの態様では、本発明は、多重特異性抗体及び不純物を含む組成物からの多重特異性抗体の精製方法であって、多重特異性抗体が、複数のアームを含み、各アームが、ＶＨ／ＶＬ単位を含み、多重特異性抗体の各アームが、別個に産生され、方法が、逐次的に、ａ）多重特異性抗体の各アームをタンパク質Ａクロマトグラフィーに供して、多重特異性抗体の各アームのタンパク質Ａ溶出物を産生するステップと、ｂ）多重特異性抗体を含む組成物を産生するのに十分な条件下で、多重特異性抗体の各アームのタンパク質Ａ溶出物を含む混合物を形成するステップと、ｃ）多重特異性抗体を含む組成物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成するステップと、ｄ）混合モード溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）に供し、多重特異性抗体を含む画分を収集するステップとを含み、組成物からの産物特異的不純物の量を低減する、方法を提供する。いくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーは、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィーである。いくつかの実施形態では、親和性クロマトグラフィーは、結合及び溶出モードで行われる。いくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーは、結合及び溶出モードで行われる。いくつかの実施形態では、疎水性相互作用クロマトグラフィーは、貫流モードで行われる。いくつかの実施形態では、混合モード溶出物は、疎水性相互作用クロマトグラフィー前に陰イオン交換クロマトグラフィーに供される。いくつかの実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィーは、結合及び溶出モードで行われる。

【００３２】

上述の態様のいくつかの実施形態では、本方法は、多重特異性抗体を含む疎水性相互作用クロマトグラフィー画分を陽イオン交換クロマトグラフィーに供し、多重特異性抗体を含む画分を収集するステップを更に含む。いくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィーは、結合及び溶出モードで行われる。

【００３３】

いくつかの態様では、本発明は、ポリペプチド及び１つ以上の不純物を含む組成物からのポリペプチドの精製方法であって、逐次的に、ａ）組成物を親和性クロマトグラフィーに供して、親和性溶出物を産生するステップと、ｂ）親和性溶出物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成するステップと、ｃ）混合モード溶出物を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、陰イオン交換溶出物を生成するステップと、ｄ）陰イオン交換溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し、ポリペプチドを含む画分を収集するステップとを含み、組成物からの産物特異的不純物の量を低減する方法を提供する。

【００３４】

いくつかの態様では、本発明は、多重特異性抗体及び不純物を含む組成物からの多重特異性抗体の精製方法であって、多重特異性抗体が、複数のアームを含み、各アームが、ＶＨ／ＶＬ単位を含み、方法が、逐次的に、ａ）組成物をタンパク質Ａクロマトグラフィーに供して、タンパク質Ａ溶出物を産生するステップと、ｂ）タンパク質Ａ溶出物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成するステップと、ｃ）混合モード溶出物を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、陰イオン交換溶出物を生成するステップと、ｄ）陰イオン交換溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し、多重特異性抗体を含む画分を収集するステップとを含み、組成物からの産物特異的不純物の量を低減する、方法を提供する。

【００３５】

いくつかの態様では、本発明は、多重特異性抗体及び不純物を含む組成物からの多重特異性抗体の精製方法であって、多重特異性抗体が、複数のアームを含み、各アームが、ＶＨ／ＶＬ単位を含み、多重特異性抗体の各アームが、別個に産生され、方法が、逐次的に、

ａ）多重特異性抗体の各アームをタンパク質Ａクロマトグラフィーに供して、多重特異性抗体の各アームのタンパク質Ａ溶出物を産生するステップと、ｂ）多重特異性抗体を含む組成物を産生するのに十分な条件下で、多重特異性抗体の各アームのタンパク質Ａ溶出物を含む混合物を形成するステップと、ｃ）多重特異性抗体を含む組成物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成するステップと、ｄ）混合モード溶出物を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、陰イオン交換溶出物を生成するステップと、ｅ）陰イオン交換溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し、多重特異性抗体を含む画分を収集し、多重特異性抗体を含む画分を収集するステップとを含み、組成物からの産物特異的不純物の量を低減する、方法を提供する。

【００３６】

上述の態様のいくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーは、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィーである。いくつかの実施形態では、親和性クロマトグラフィーは、結合及び溶出モードで行われる。いくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーは、結合及び溶出モードで行われる。いくつかの実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィーは、結合及び溶出モードで行われる。いくつかの実施形態では、疎水性相互作用クロマトグラフィーは、貫流モードで行われる。いくつかの実施形態では、本方法は、多重特異性抗体を含む疎水性相互作用クロマトグラフィー画分を陽イオン交換クロマトグラフィーに供するステップを更に含む。いくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィーは、結合及び溶出モードで行われる。いくつかの実施形態では、本方法は、多重特異性抗体を含む疎水性相互作用クロマトグラフィー画分を限外濾過に供するステップを更に含む。いくつかの実施形態では、本方法は、多重特異性抗体を含む陽イオン交換画分を限外濾過に供するステップを更に含む。いくつかの実施形態では、限外濾過は、第１の限外濾過、透析濾過、及び第２の限外濾過を逐次的に含む。

【００３７】

いくつかの態様では、本発明は、ポリペプチド及び１つ以上の不純物を含む組成物からのポリペプチドの精製方法であって、ａ）組成物を親和性クロマトグラフィーに供して、親和性溶出物を産生することと、ｂ）親和性溶出物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成することと、ｃ）混合モード溶出物を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、陰イオン交換溶出物を生成することと、ｄ）陰イオン交換溶出物をヒドロキシアパパタイト（ｈｙｄｒｏｘｙａｐａｐａｔｉｔｅ）クロマトグラフィーに供し、ポリペプチドを含む画分を収集することとを含み、組成物からの産物特異的不純物の量を低減する、方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、多重特異性抗体及び１つ以上の不純物を含む組成物からの多重特異性抗体の精製方法であって、多重特異性抗体が、複数のアームを含み、各アームが、ＶＨ／ＶＬ単位を含み、方法が、逐次的に、ａ）組成物をタンパク質Ａクロマトグラフィーに供して、タンパク質Ａ溶出物を産生するステップと、ｂ）タンパク質Ａ溶出物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成するステップと、ｃ）混合モード溶出物を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、陰イオン交換溶出物を生成するステップと、ｄ）陰イオン交換溶出物をヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーに供し、多重特異性抗体を含む画分を収集するステップとを含み、組成物からの産物特異的不純物の量を低減する、方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、多重特異性抗体及び１つ以上の不純物を含む組成物からの多重特異性抗体の精製方法であって、多重特異性抗体が、複数のアームを含み、各アームが、ＶＨ／ＶＬ単位を含み、多重特異性抗体の各アームが、別個に産生され、方法が、逐次的に、ａ）多重特異性抗体の各アームをタンパク質Ａクロマトグラフィーに供して、多重特異性抗体の各アームのタンパク質Ａ溶出物を産生するステップと、ｂ）多重特異性抗体を含む組成物を産生するのに十分な条件下で、多重特異性抗体の各アームのタンパク質Ａ溶出物を含む混合物を形成するステップと、ｃ）多重特異性抗体を含む組成物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成するステップと、ｄ）混合モード溶出物を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、陰イオン交換溶出物を生成するステップと、ｅ）陰イオン交換溶出物をヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーに供

し、多重特異性抗体を含む画分を収集し、多重特異性抗体を含む画分を収集するステップとを含み、組成物からの産物特異的不純物の量を低減する、方法を提供する。いくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーは、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィーである。いくつかの実施形態では、親和性クロマトグラフィーは、結合及び溶出モードで行われる。いくつかの実施形態では、タンパク質Ａクロマトグラフィーは、結合及び溶出モードで行われる。いくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーは、結合及び溶出モードで行われる。いくつかの実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィーは、結合及び溶出モードで行われる。いくつかの実施形態では、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーは、貫流モードで行われる。

【００３８】

上述の態様及び実施形態のいくつかの実施形態では、タンパク質Ａクロマトグラフィーは、アガロースに結合しているタンパク質Ａを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質Ａクロマトグラフィーは、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ（商標）、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（商標）、及びＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（商標）ＬＸ、ＰｒｏＳｅｐ（登録商標）－ｖＡ、ＰｒｏＳｅｐ（登録商標）Ｕｌｔｒａ　Ｐｌｕｓ、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ、またはＴｏｙｏｐｅａｒｌ（登録商標）ＡＦ－ｒＰｒｏｔｅｉｎ　Ａクロマトグラフィーである。いくつかの実施形態では、タンパク質Ａクロマトグラフィーは、タンパク質Ａ平衡化緩衝液、タンパク質Ａ装填緩衝液、またはタンパク質Ａ洗浄緩衝液のうちの１つ以上を使用し、平衡化緩衝液、装填緩衝液、及び／または洗浄緩衝液は、約ｐＨ７～約ｐＨ８である。いくつかの実施形態では、タンパク質Ａ平衡化緩衝液は、約ｐＨ７．７である。いくつかの実施形態では、タンパク質Ａ平衡化緩衝液は、約２５ｍＭのＴｒｉｓ及び約２５ｍＭのＮａＣｌを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質Ａクロマトグラフィーは、装填後に平衡化緩衝液で洗浄される。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、ｐＨ勾配によってタンパク質Ａクロマトグラフィーから溶出される。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、低ｐＨを有するタンパク質Ａ溶出緩衝液をタンパク質Ａクロマトグラフィーに適用することによって、タンパク質Ａから溶出される。いくつかの実施形態では、タンパク質Ａ溶出緩衝液は、約１５０ｍＭの酢酸（約ｐＨ２．９）を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質Ａ溶出物は、プールされ、溶出物のＯＤ２８０は、約０．５を超える。

【００３９】

上述の態様及び実施形態のいくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーは、四級アミン及び疎水性部分を含む。いくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーは、四級アミン及び高架橋アガロースに結合している疎水性部分を含む。いくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーは、Ｎ－ベンジル－ｎ－メチルエタノールアミンを含む。いくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーは、Ｃａｐｔｏ（商標）ａｄｈｅｒｅクロマトグラフィーである。いくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーは、混合モード事前平衡化緩衝液、混合モード平衡化緩衝液、混合モード装填緩衝液、または混合モード洗浄緩衝液のうちの１つ以上を使用し、混合モード事前平衡化緩衝液、混合モード平衡化緩衝液、及び／または混合モード洗浄緩衝液は、約ｐＨ６～約ｐＨ７である。いくつかの実施形態では、混合モード事前平衡化緩衝液、混合モード平衡化緩衝液、及び／または混合モード洗浄緩衝液は、約ｐＨ６．５である。いくつかの実施形態では、混合モード事前平衡化緩衝液は、約５００ｍＭの酢酸塩を含む。いくつかの実施形態では、混合モード平衡化緩衝液は、約５０ｍＭの酢酸塩を含む。いくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーは、装填後に洗浄緩衝液で洗浄される。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、ｐＨ勾配によって混合モードクロマトグラフィーから溶出される。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、低ｐＨを有する混合モード溶出緩衝液を混合モード陰イオン交換クロマトグラフィーに適用することによって、混合モードクロマトグラフィーから溶出される。いくつかの実施形態では、混合モード溶出緩衝液は、約２５ｍＭの酢酸塩（約ｐＨ５．２）を含む。いくつかの実施形態では、混合モード溶出物は、プールされ、溶出物のＯＤ２８０は、約０．５超～約１．０であ

る。
【００４０】
上述の態様及び実施形態のいくつかの実施形態では、疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）は、疎水性部分を含む。いくつかの実施形態では、疎水性相互作用クロマトグラフィーは、フェニル部分を含む。いくつかの実施形態では、疎水性相互作用クロマトグラフィーは、架橋アガロースに結合している疎水性部分を含む。いくつかの実施形態では、疎水性相互作用クロマトグラフィーは、架橋アガロースに結合しているフェニル部分またはブチル部分を含む。いくつかの実施形態では、疎水性相互作用クロマトグラフィーは、Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）クロマトグラフィーまたはＢｕｔｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）クロマトグラフィーである。いくつかの実施形態では、疎水性相互作用交換クロマトグラフィーは、ＨＩＣ平衡化緩衝液、ＨＩＣ装填緩衝液、またはＨＩＣ洗浄緩衝液のうちの１つ以上を使用し、ＨＩＣ平衡化緩衝液、ＨＩＣ装填緩衝液、及び／またはＨＩＣ洗浄緩衝液は、約ｐＨ５～約ｐＨ６である。いくつかの実施形態では、ＨＩＣ平衡化緩衝液、装填緩衝液、及び／または洗浄緩衝液は、約ｐＨ５．５である。いくつかの実施形態では、ＨＩＣ平衡化緩衝液及び洗浄緩衝液は、約１７０ｍＭの酢酸塩を含む。いくつかの実施形態では、ＨＩＣ装填緩衝液は、５０ｍＭのＴｒｉｓ、１００ｍＭの酢酸ナトリウム（ｐＨ約５．５）である。
【００４１】
いくつかの実施形態では、疎水性相互作用クロマトグラフィーは、ヘキシル部分を含む。いくつかの実施形態では、疎水性相互作用クロマトグラフィーは、ヒドロキシル化メタクリルポリマーに結合している疎水性部分を含む。いくつかの実施形態では、疎水性相互作用クロマトグラフィーは、ヒドロキシル化メタクリルポリマーに結合しているヘキシル部分を含む。いくつかの実施形態では、疎水性相互作用クロマトグラフィーは、ＴＯＹＯＰＥＡＲＬ（登録商標）Ｈｅｘｙｌ６５０Ｃである。いくつかの実施形態では、疎水性相互作用交換クロマトグラフィーは、ＨＩＣ平衡化緩衝液、ＨＩＣ装填緩衝液、またはＨＩＣ洗浄緩衝液のうちの１つ以上を使用し、ＨＩＣ平衡化緩衝液、ＨＩＣ装填緩衝液、及び／またはＨＩＣ洗浄緩衝液は、約ｐＨ６～約ｐＨ８である。いくつかの実施形態では、ＨＩＣ平衡化緩衝液、装填緩衝液、及び／または洗浄緩衝液は、約ｐＨ７．０である。いくつかの実施形態では、ＨＩＣ平衡化緩衝液及び洗浄緩衝液は、約５０ｍＭの３－（Ｎ－モルホリノ）プロパンスルホン酸（ＭＯＰＳ）及び１２５ｍＭの酢酸塩を含む。
【００４２】
いくつかの実施形態では、疎水性相互作用クロマトグラフィーは、装填後にＨＩＣ洗浄緩衝液で洗浄される。いくつかの実施形態では、疎水性相互作用溶出物は、プールされ、溶出物のＯＤ２８０は、約０．５超～約１．０である。
【００４３】
上述の態様及び実施形態のいくつかの実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィーは、四級アミンを含む。いくつかの実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィーは、架橋アガロースに結合している四級アミンを含む。いくつかの実施形態では、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィーは、Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＱＳＦＦ）クロマトグラフィーである。いくつかの実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィーは、陰イオン交換事前平衡化緩衝液、陰イオン交換平衡化緩衝液、または陰イオン交換装填緩衝液のうちの１つ以上を使用し、陰イオン交換事前平衡化緩衝液、陰イオン交換平衡化緩衝液、及び／または陰イオン交換装填緩衝液は、約ｐＨ８～約ｐＨ９である。いくつかの実施形態では、陰イオン交換事前平衡化緩衝液、陰イオン交換平衡化緩衝液、及び／または陰イオン交換装填緩衝液は、約ｐＨ８．５である。いくつかの実施形態では、陰イオン交換事前平衡化緩衝液は、約５０ｍＭのＴｒｉｓ、５００ｍＭの酢酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、陰イオン交換平衡化緩衝液は、約５０ｍＭのＴｒｉｓを含む。いくつかの実施形態では、装填後に陰イオン交換クロマトグラフィーは、陰イオン交換平衡化緩衝液で洗浄される。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、塩勾配によって陰イオン交換クロマトグラフィーから溶出される。いくつかの実施形

態では、多重特異性抗体は、増加した塩濃度を有する陰イオン交換溶出緩衝液を陰イオン交換クロマトグラフィーに適用することによって、陰イオン交換クロマトグラフィーから溶出される。いくつかの実施形態では、陰イオン交換溶出緩衝液は、約５０ｍＭのＴｒｉｓ、１００ｍＭの酢酸ナトリウム（約ｐＨ８．５）を含む。いくつかの実施形態では、陰イオン交換溶出物は、プールされ、溶出物のＯＤ２８０は、約０．５超～約１．０である。

【００４４】

上述の態様及び実施形態のいくつかの実施形態では、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーは、セラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーである。いくつかの実施形態では、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーは、ＣＨＴ　Ｉ型セラミックヒドロキシアパプタイト（ｈｙｄｒｏｘｙａｐａｐｔｉｔｅ）クロマトグラフィーである。いくつかの実施形態では、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーは、ヒドロキシアパタイト緩衝液Ａまたはヒドロキシアパタイト緩衝液Ｂのうちの１つ以上を使用し、ヒドロキシアパタイト緩衝液Ｂは、ヒドロキシアパタイト緩衝液Ａと比較してより高い伝導度を有する。いくつかの実施形態では、ヒドロキシアパタイト緩衝液Ａは、約１０ｍＭのリン酸ナトリウム（約ｐＨ６．８）を含む平衡化緩衝液である。いくつかの実施形態では、ヒドロキシアパタイト緩衝液Ｂは、約１０ｍＭのリン酸ナトリウム及び約１Ｍ塩化ナトリウム（約ｐＨ６．８）を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたは多重特異性抗体は、ヒドロキシアパタイト緩衝液Ａ中のヒドロキシアパタイト緩衝液Ｂの勾配を使用して、ヒドロキシアパタイド（ｈｙｄｒｏｘｙａｐａｐｔｉｄｅ）クロマトグラフィーから溶出される。いくつかの実施形態では、勾配は、線形勾配である。いくつかの実施形態では、勾配は、約０％のヒドロキシアパプタイト緩衝液Ｂから約１００％のヒドロキシアパプタイト緩衝液Ｂへと増加する。いくつかの実施形態では、勾配は、約２０カラム体積中、０％のヒドロキシアパプタイト緩衝液Ｂから１００％のヒドロキシアパプタイト緩衝液Ｂへと増加する。いくつかの実施形態では、ヒドロキシアパタイト溶出物は、プールされ、溶出物のＯＤ２８０は、約０．５超～約１．０である。

【００４５】

上述の態様及び実施形態のいくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィーは、カルボン酸部分またはスルホン酸部分を含む。いくつかの実施形態では、カルボン酸部分またはスルホン酸部分は、スルホプロピル、スルホエチル、スルホイソブチル、またはカルボキシル部分である。いくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィーは、架橋アガロースに結合しているカルボン酸部分またはスルホン酸部分を含む。いくつかの実施形態では、陽イオン交換材料は、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ２０、SO_3Ｍｏｎｏｌｉｔｈ、Ｓ　Ｃｅｒａｍｉｃ　ＨｙｐｅｒＤ（登録商標）、スルホプロピル－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＳＰＳＦＦ）、ＳＰ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＸＬ（ＳＰＸＬ）、ＣＭ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ、Ｃａｐｔｏ（商標）Ｓ、Ｆｒａｃｔｏｇｅｌ（登録商標）ＥＭＤ　Ｓｅ　Ｈｉｃａｐ、Ｆｒａｃｔｏｇｅｌ（登録商標）ＥＭＤ　SO_3^-、またはＦｒａｃｔｏｇｅｌ（登録商標）ＥＭＤ　COO^-である。いくつかの実施形態では、陽イオン交換装填密度は、約２０ｇ／Ｌ未満である。いくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィーは、陽イオン交換事前平衡化緩衝液、陽イオン交換平衡化緩衝液、陽イオン交換装填緩衝液、または陽イオン交換洗浄緩衝液のうちの１つ以上を使用し、陽イオン交換事前平衡化緩衝液、陽イオン交換平衡化緩衝液、陽イオン交換装填緩衝液、及び／または陽イオン交換洗浄緩衝液は、約ｐＨ５．０～約ｐＨ６．０である。いくつかの実施形態では、陽イオン交換陽イオン交換、平衡化緩衝液、陽イオン交換装填緩衝液、及び／または陽イオン交換洗浄緩衝液は、約ｐＨ５．５である。いくつかの実施形態では、陽イオン交換平衡化緩衝液は、５０ｍＭの酢酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、陽イオン交換洗浄緩衝液は、５０ｍＭの酢酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィーは、装填後に平衡化緩衝液で洗浄される。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、塩勾配によって陽イオン交換クロマトグラフィーから溶出される。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、増加した塩濃度

を有する陽イオン交換溶出緩衝液を陽イオン交換クロマトグラフィーに適用することによって、陰イオン交換クロマトグラフィーから溶出される。いくつかの実施形態では、陽イオン交換溶出緩衝液は、５００ｍＭの酢酸ナトリウム（ｐＨ５．８）を含む。いくつかの実施形態では、溶出は、１０％～１００％の陽イオン交換溶出緩衝液の勾配溶出である。いくつかの実施形態では、陽イオン交換溶出物は、プールされ、溶出物のＯＤ２８０は、約０．５超～約１．０である。

【００４６】

上述の態様及び実施形態のいくつかの実施形態では、多重特異性抗体のアームは、細胞内で産生される。いくつかの実施形態では、細胞は、原核生物細胞である。いくつかの実施形態では、原核生物細胞は、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞内にある。いくつかの実施形態では、細胞は、１つ以上のシャペロンを発現するように操作される。いくつかの実施形態では、シャペロンは、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、またはＤｓｂＣのうちの１つ以上である。いくつかの実施形態では、シャペロンは、Ｅ．ｃｏｌｉシャペロンである。いくつかの実施形態では、細胞は溶解されて、タンパク質Ａクロマトグラフィー前に多重特異性抗体または多重特異性抗体のアームを含む細胞溶解物を生成する。いくつかの実施形態では、細胞は、微小流動化剤を使用して溶解される。いくつかの実施形態では、ポリエスリエンイミン（ｐｏｌｙｅｔｈｌｙｅｎｅｉｍｉｎｅ）（ＰＥＩ）が、クロマトグラフィー前に細胞溶解物に添加される。いくつかの実施形態では、ＰＥＩは、約０．４％の最終濃度になるまで溶解物に添加される。いくつかの実施形態では、細胞溶解物は、遠心分離によって浄化される。

【００４７】

上述の態様及び実施形態のいくつかの実施形態では、産物特異的不純物は、非対合抗体アーム、抗体ホモ二量体、凝集体、高分子量種（ＨＭＷ）、低分子量種（ＬＭＷ）、酸性変異形、または塩基性変異形のうちの１つ以上である。いくつかの実施形態では、本方法は、組成物中のＥ．ｃｏｌｉタンパク質（ＥＣＰ）、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、ＤｓｂＣ、浸出タンパク質Ａ、核酸、細胞培養培地成分、またはウイルス不純物のうちのいずれか１つの量を低減する。

【００４８】

いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、二重特異性抗体である。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体の第１のアームは、ＩＬ１３に結合する。いくつかの実施形態では、ＩＬ１３は、ヒトＩＬ１３である。いくつかの実施形態では、ＩＬ１３は、配列番号１または配列番号２のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体の第１のアームは、配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号１０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体の第１のアームは、配列番号１３のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号１４のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体の第１のアームは、配列番号１５のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体の第１のアームは、配列番号１６のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体の第１のアームは、配列番号１７のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体の第２のアームは、ＩＬ１７に結合する。いくつかの実施形態では、ＩＬ１７は、ヒトＩＬ１７である。いくつかの実施形態では、ＩＬ１７は、配列番号３、配列番号４、配列番号５、または配列番号６のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体の第２のアームは、配列番号１８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号１９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号２０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号２１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体の第２のアームは、配列番号２５のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号２６のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体の第２のアー

ムは、配列番号２７のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体の第２のアームは、配列番号２８のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体の第２のアームは、配列番号２９のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【００４９】

いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載の方法のうちのいずれかによって精製された多重特異性抗体を含む組成物であって、約５％、４％、３％、２％、または１％以下の産物特異的不純物を含む、組成物を提供する。いくつかの実施形態では、産物特異的不純物は、非対合抗体アーム、抗体ホモ二量体、凝集体、高分子量種（ＨＭＷ）、低分子量種（ＬＭＷ）、酸性変異形、または塩基性変異形のうちの１つ以上である。いくつかの実施形態では、本組成物は、約未満を含み、本組成物は、組成物中、約５％、４％、３％、２％、または１％以下のＥ．ｃｏｌｉタンパク質（ＥＣＰ）、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、ＤｓｂＣ、浸出タンパク質Ａ、核酸、細胞培養培地成分、またはウイルス不純物のうちのいずれか１つを含む。

【図面の簡単な説明】

【００５０】

【図１】ＦｋｐＡの精製のための、強陽イオン－交換培地ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＧＥ）で充填された重力流カラムからの画分のＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）を示す。レーンマーカーは、右側に示される通り。

【図２】ＦｋｐＡの精製のための、ステップ溶出を使用したＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＧＥ）クロマトグラフィーからのクロマトグラムを示す。

【図３Ａ】ＦｋｐＡの精製のための、ステップ溶出を使用したＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＧＥ）クロマトグラフィーからの画分３～１３（図３Ａ）及び１４～２３（図３Ｂ）のＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）を示す。レーンマーカーは、右側に示される通り。

【図３Ｂ】ＦｋｐＡの精製のための、ステップ溶出を使用したＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＧＥ）クロマトグラフィーからの画分３～１３（図３Ａ）及び１４～２３（図３Ｂ）のＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）を示す。レーンマーカーは、右側に示される通り。

【図４】ＦｋｐＡの精製のための、勾配溶出を使用したＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＧＥ）クロマトグラフィーからのクロマトグラムを示す。

【図５】ＦｋｐＡの精製のための、陰イオン－交換クロマトグラフィー培地Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＧＥ）及び疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）培地Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（低置換）（ＧＥ）で充填された重力流カラムからの画分のＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）を示す。レーンマーカーは、以下に示される通り。

【図６】ＦｋｐＡの精製のための、疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）培地Ｂｕｔｙｌ－Ｓ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＧＥ）で充填された重力流カラムからの画分のＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）を示す。レーンマーカーは、以下に示される通り。

【図７Ａ】ＦｋｐＡの精製のための、疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）培地Ｂｕｔｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）４Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＧＥ）で充填された重力流カラムからの画分のＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）を示す。レーンマーカーは、右側に示される通り。

【図７Ｂ】ＦｋｐＡの精製のための、疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）培地Ｂｕｔｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）４Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＧＥ）で充填された重力流カラムからの画分のＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）を示す。レーンマーカーは、右側に示される通り。

【図８】ＦｋｐＡの精製のための、疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）培地Ｂ

ｕｔｙｌ－Ｓ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（ＧＥ）で充填された重力流カラムからの画分のＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）を示す。レーンマーカーは、以下に示される通り。

【図９】ＦｋｐＡの精製のための、Ｂｕｔｙｌ－Ｓ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（ＧＥ）クロマトグラフィーからのクロマトグラムを示す。

【図１０Ａ】ＦｋｐＡの精製のための、Ｂｕｔｙｌ－Ｓ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）材料で充填された重力流カラムからの画分のＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）を示す。レーンマーカーは、示される通り。

【図１０Ｂ】ＦｋｐＡの精製のための、Ｂｕｔｙｌ－Ｓ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）材料で充填された重力流カラムからの画分の、ＳＹＰＲＯ Ｒｕｂｙで画像化したＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）を示す。レーン１－ブランク、レーン２－精度標準物、レーン３－ブランク、レーン４－ＳＰ画分２２～５０の１０μＬ試料、レーン５－ブランク、レーン６－Ｆ－Ｔ／Ｗ２０の１０μＬ試料、レーン７－ブランク、レーン８－ＰＷ溶出物の２０μＬ試料、レーン９－ブランク、レーン１０－プール後の２０μＬ試料。

【図１１】ＦｋｐＡのＢｕｔｙｌ－Ｓ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）精製からプールされた画分の高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）クロマトグラムを示す。

【図１２】ＦｋｐＡの精製のための、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００（ＧＥ）クロマトグラフィーの運転１からのクロマトグラムを示す。

【図１３Ａ】ＦｋｐＡの精製のための、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００の運転１からの画分のＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）を示す。

【図１３Ｂ】ＦｋｐＡの精製のための、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００の運転１からの画分の、ＳＹＰＲＯ Ｒｕｂｙで画像化したＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）を示す。レーンマーカーは、図１３Ｂの下に示される通り。

【図１４】ＦｋｐＡの精製のための、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００の運転１からの画分３７の、ＳＹＰＲＯ Ｒｕｂｙ及びウエスタンブロットで画像化したＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）を示す。レーンマーカーは、示される通り。

【図１５】ＦｋｐＡの精製のための、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００の運転２からのクロマトグラムを示す。

【図１６】ＦｋｐＡの精製のための、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００の運転２からのプールされた画分３７～４４の高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）からのクロマトグラムを示す。

【図１７】ＦｋｐＡの精製のための、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００の運転１からのプールされた画分３５～４０、及びＳｕｐｅｒｄｅｘ２００の運転２～４からの３７～４４のＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）を示す。レーンマーカーは、示される通り。

【図１８】０～３回の凍結融解後の、超高純度ＦｋｐＡのＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）を示す。レーンマーカーは、示される通り。

【図１９Ａ】０回の凍結融解後の、超高純度ＦｋｐＡの高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）からのクロマトグラムを示す。

【図１９Ｂ】３回の凍結融解後の、超高純度ＦｋｐＡの高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）からのクロマトグラムを示す。

【図２０】ウサギＡ、Ｂ、及びＣの予備免疫血清及び抗血清を使用した直接結合ＥＬＩＳＡの結果を示す。白円はウサギＡの予備免疫血清を表し、白四角はウサギＢの予備免疫血清を表し、白三角はウサギＣの予備免疫血清を表し、白菱形はウサギＡの抗血清を表し、黒円はウサギＢの抗血清を表し、黒四角はウサギＣの抗血清を表す。

【図２１】ＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体のＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）を示す。レーンマーカーは、示される通り。

【図２２】ＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体を使用した直接結合ＥＬＩＳＡの結果を示す。

【図２３】ＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体を使用したサンドイッチＥＬＩＳＡの結果を示す。白円

は１：６０に希釈した検出抗体を表し、白四角は１：８０に希釈した検出抗体を表し、白三角は１：１００に希釈した検出抗体を表し、白菱形は１：１１０に希釈した検出抗体を表す。

【図２４】ＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体の親和性精製からのクロマトグラムを示す

【図２５】ＡＦ－精製抗ＦｋｐＡ抗体のＳｕｐｅｒｄｅｘ２００精製からのクロマトグラムを示す。

【図２６Ａ】ＡＦ－精製抗ＦｋｐＡ抗体のＳｕｐｅｒｄｅｘ２００精製の画分４１～６３の高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）クロマトグラムを示す。

【図２６Ｂ】ＡＦ－精製抗ＦｋｐＡ抗体のＳｕｐｅｒｄｅｘ２００精製の画分６４～８６の高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）クロマトグラムを示す。

【図２７】ＡＦ抗ＦｋｐＡ抗体を使用したサンドイッチＥＬＩＳＡの結果を示す。白円は１：２０００に希釈した検出抗体を表し、白四角は１：４０００に希釈した検出抗体を表し、白三角は１：６０００に希釈した検出抗体を表し、白菱形は１：８０００に希釈した検出抗体を表す。

【図２８Ａ】ＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体を使用したサンドイッチＥＬＩＳＡの結果を示す。

【図２８Ｂ】ＡＦ抗ＦｋｐＡ抗体を使用したサンドイッチＥＬＩＳＡの結果を示す。

【図２９】ＡＦ抗ＦｋｐＡ抗体の高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）サイズ排除クロマトグラフィーからのクロマトグラムを示す。

【図３０】０～３回の凍結融解後の、ＡＦ－精製抗ＦｋｐＡ抗体のＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）を示す。レーンマーカーは、示される通り。

【図３１Ａ】０回の凍結融解後の、ＡＦ－精製抗ＦｋｐＡ抗体の高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）からのクロマトグラムを示す。

【図３１Ｂ】３回の凍結融解後の、ＡＦ－精製抗ＦｋｐＡ抗体の高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）からのクロマトグラムを示す。

【図３２】ＡＦ抗ＦｋｐＡ抗体の凍結融解安定性試料の機能試験を示す。

【図３３】ウサギＡ、Ｂ、及びＣのその後の採血からのＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体を使用したサンドイッチＥＬＩＳＡの結果を示す。白円は親和性精製コート抗体を表し、白四角は非溶解コート抗体を表し、白三角は溶解コート抗体を表す。

【図３４】－７０℃及び２～８℃での、超高純度ＦｋｐＡの経時的な制御安定性の監視を示す。

【図３５Ａ】０．２％の魚ゼラチン、１ｍｇ／ｍＬのＡｐｏＭａｂ、または緩衝液Ｃ中、３ｎｇ／ｍＬに希釈した場合の、超高純度ＦｋｐＡの経時的な制御安定性の監視を示す。

【図３５Ｂ】０．２％の魚ゼラチン、１ｍｇ／ｍＬのＡｐｏＭａｂ、または緩衝液Ｃ中、１５ｎｇ／ｍＬに希釈した場合の、超高純度ＦｋｐＡの経時的な制御安定性の監視を示す。

【図３６】異なるＦｋｐＡ標準物を使用したサンドイッチＥＬＩＳＡの結果を示す。白円は超高純度ＦｋｐＡ標準物を表し、白四角はＭｙＢｉｏＳｏｕｒｃｅ　ＦｋｐＡ標準物カタログ番号ＭＢＳ１０３７４０２を表し、白三角はＭｙＢｉｏＳｏｕｒｃｅ　ＦｋｐＡ標準物カタログ番号ＭＢＳ１１８２１２０を表す。

【図３７Ａ】混合モード陰イオン交換（Ｃａｐｔｏ（商標）Ａｄｈｅｒｅ、図３７Ｂ）及び従来のイオン交換（ＱＳＦＦ、図３７Ａ）樹脂での、産物関連不純物の解像度のハイスループットスクリーニングを示す。

【図３７Ｂ】混合モード陰イオン交換（Ｃａｐｔｏ（商標）Ａｄｈｅｒｅ、図３７Ｂ）及び従来のイオン交換（ＱＳＦＦ、図３７Ａ）樹脂での、産物関連不純物の解像度のハイスループットスクリーニングを示す。

【図３８Ａ】疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂での、酢酸ナトリウム中の産物結合能力のハイスループットスクリーニング結果を示す。

【図３８Ｂ】疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂での、酢酸ナトリウム中の産物結合能力のハイスループットスクリーニング結果を示す。
【図３９】酢酸ナトリウムの存在下、疎水性相互作用クロマトグラフィー樹脂での、貫流でのＦｋｐＡレベルのハイスループットスクリーニング結果を示す。最適以下のクリアランスのため、ＷＰ　ＨＩ－Ｐｒｏｐｙｌ、Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ（登録商標）ＰＰＧ－６００Ｍ、Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ（登録商標）Ｐｈｅｎｙｌ－６５０Ｍ、Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ（登録商標）Ｅｔｈｅｒ－６５０Ｍについて、完全な試験は行わなかった。
【図４０Ａ】二重特異性抗体産生プロセス１、２、３、及び４の流れ図を示す。
【図４０Ｂ】二重特異性抗体産生プロセス１、２、３、及び４の流れ図を示す。
【図４０Ｃ】二重特異性抗体産生プロセス１、２、３、及び４の流れ図を示す。
【図４０Ｄ】二重特異性抗体産生プロセス１、２、３、及び４の流れ図を示す。
【発明を実施するための形態】
【００５１】
本発明は、ＦｋｐＡの超高純度組成物の生成方法を提供する。かかる組成物を使用して、ＦｋｐＡに高度に特異的かつ高感度な抗体を生成する。本抗体は、転じて、ＦｋｐＡが発現されて、組換えポリペプチドの折り畳み及び組み立てを容易にする細菌発酵培養物内で調製された組換えポリペプチド中のＦｋｐＡの検出に有用である。例えば、本抗体は、多重特異性抗体を含む抗体等の組換えポリペプチドの薬学的製剤の開発における放出アッセイにおいて有用であり得る。
【００５２】
いくつかの態様では、本発明は、外因性ＦｋｐＡを発現する宿主細胞内で産生された組換えポリペプチドの組成物であって、組成物が、約１０ｐｐｍ以下のＦｋｐＡ、約９ｐｐｍ、約８ｐｐｍ、約７ｐｐｍ、約６ｐｐｍ、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、または約１ｐｐｍのＦｋｐＡを含む、組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドは、ＩＬ１３及びＩＬ１７に結合する二重特異性抗体等の多重特異性抗体である。
【００５３】
いくつかの態様では、本発明は、逐次的に、多重特異性抗体を含む組成物を、ａ）タンパク質Ａクロマトグラフィー、ｂ）混合モードクロマトグラフィー、及びｃ）疎水性相互作用クロマトグラフィーに供するステップを含む、多重特異性抗体の精製方法を提供する。
いくつかの態様では、本発明は、多重特異性抗体の個々のアームが別個の培養物内で産生され、タンパク質Ａクロマトグラフィーによって精製される、多重特異性抗体の精製方法を提供する。その後、精製された抗体アームは組み立てられて、多重特異性抗体を産生する。その後、組み立てられた多重特異性抗体は、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィーに続いて疎水性相互作用クロマトグラフィーに供される。
【００５４】
いくつかの実施形態では、本発明は、非対合抗体アーム、ホモ二量体、凝集体、低分子量種、酸性変異形及び塩基性変異形等の産物特異的不純物を実質的に含まない多重特異性抗体を含むことを提供する。いくつかの実施形態では、本組成物は、Ｅ．ｃｏｌｉタンパク質及びＤＮＡならびにシャペロン（ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、及びＤｓｂＣを含む）等のプロセス特異的不純物を実質的に含まない。
【００５５】
Ｉ．定義
「検出」という用語は、標的分子の定性的測定及び定量的測定の両方を含むために本明細書で最も広義に使用される。検出は、試料中の標的分子の単なる存在を特定すること、ならびに標的分子が検出可能なレベルで試料中に存在するかを決定することを含む。
【００５６】
「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、任意のアミノ酸長のポリマーを指すために本明細書で互換的に使用される。ポリマーは、直鎖状または分岐状であってもよく、修飾アミノ酸を含んでもよく、非アミノ酸によって中断されていてもよい。これらの用

語は、天然にまたは介入（例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または任意の他の操作もしくは修飾、例えば、標識成分とのコンジュゲーション）により修飾されたアミノ酸ポリマーも包含する。例えば、アミノ酸（例えば、非天然アミノ酸等を含む）の１つ以上の類似体を含有するポリペプチド、ならびに当該技術分野で既知の他の修飾もこの定義に含まれる。本明細書で使用されるとき、「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、抗体を具体的に包含する。

【００５７】

「精製された」ポリペプチド（例えば、抗体またはイムノアドヘシン等）とは、ポリペプチドがその天然環境下で存在するよりも純粋な形態で存在するように、かつ／または実験室条件下で最初に合成及び／もしくは増幅されたときにポリペプチドの純度が増加することを意味する。純度は、相対用語であり、必ずしも絶対純度を意味しない。

【００５８】

本明細書で使用されるとき、「超高純度ＦｋｐＡ」とは、組成物中のタンパク質の少なくとも約９５％が所望のタンパク質ＦｋｐＡである、ＦｋｐＡ組成物を指す。いくつかの例では、超高純度ＦｋｐＡは、少なくとも約９６％、９７％、９８％、９９％、または９９．５％のＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡ純度は、ＳＥＣによって決定される。

【００５９】

ポリペプチドに関して使用されるとき、「ＦｋｐＡ」タンパク質とは、細菌ＦＫＢＰ型ペプチジル－プロリルシス－トランスイソメラーゼを指す。ＦｋｐＡは、周辺質タンパク質ジスルフィドイソメラーゼＩは、シス／トランスペプチジル－プロリルイソメラーゼ（ＰＰＩａｓｅ）活性及びシャペロン活性の両方を呈する。

【００６０】

本明細書で使用されるとき、「ＦｋｐＡ」は、ＦＫＢＰ型ペプチジル－プロリルシス－トランスイソメラーゼ（ＦｋｐＡ）周辺質タンパク質ジスルフィドイソメラーゼＩとしても知られ得る。例示的なＦｋｐＡタンパク質は、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＦｋｐＡである。Ｅ．ｃｏｌｉ　ＦｋｐＡのアミノ酸配列は、配列番号１または配列番号２に提供される。Ｅ．ｃｏｌｉ　ＦｋｂＡ遺伝子の核酸配列は、（配列番号３）によって提供される。いくつかの実施形態では、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＦｋｐＡとは、ＥｃｏＧｅｎｅ受託番号ＥＧ１２９００によって表されるｆｋｐＡ遺伝子によってコードされるタンパク質を指す。いくつかの実施形態では、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＦｋｐＡとは、ＮＣＢＩ　ＲｅｆＳｅｑ受託番号ＮＰ＿４１７８０６によって表される配列を有するタンパク質を指す。他のＦｋｐＡタンパク質が、当該技術分野で既知である。ＦｋｐＡタンパク質の例としては、Ｓ．ｂｏｙｄｉｉペプチジル－プロリルイソメラーゼ（ＮＣＢＩ　ＲｅｆＳｅｑ番号ＷＰ＿０００８３８２５２）、Ｃ．ｙｏｕｎｇａｅペプチジル－プロリルイソメラーゼ（ＮＣＢＩ　ＲｅｆＳｅｑ番号ＷＰ＿００６６８７３６６）、Ｋ．ｏｘｙｔｏｃａペプチジル－プロリルイソメラーゼ（ＮＣＢＩ　ＲｅｆＳｅｑ番号ＷＰ＿００４１２５９４３）、Ｓ．ｅｎｔｅｒｉｃａペプチジル－プロリルイソメラーゼ（ＮＣＢＩ　ＲｅｆＳｅｑ番号ＷＰ＿０００８３８２３３）、Ｋ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅペプチジル－プロリルイソメラーゼ（ＮＣＢＩ　ＲｅｆＳｅｑ番号ＷＰ＿０１９７０４６４２）、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ　ＦＰＲ３ｐ（ＮＣＢＩ　ＲｅｆＳｅｑ番号ＮＰ＿０１３６３７）、Ｍ．ｍｕｓｃｕｌｕｓ　Ｆｋｐｂ１ａ（ＮＣＢＩ　ＲｅｆＳｅｑ番号ＮＰ＿０３２０４５）、Ｍ．ｍｕｓｃｕｌｕｓ　Ｆｋｐｂ２（ＮＣＢＩ　ＲｅｆＳｅｑ番号ＮＰ＿０３２０４６）、Ｈ．ｓａｐｉｅｎｓ　ＦＫＢＰ２（ＮＣＢＩ　ＲｅｆＳｅｑ番号ＮＰ＿００１１２８６８０）、及びＤ．ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ　ＣＧ１４７１５（ＮＣＢＩ　ＲｅｆＳｅｑ番号ＮＰ＿６５０１０１）が挙げられ得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本開示のＦｋｐＡタンパク質は、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＦｋｐＡと少なくとも約８０％、少なくとも約８１％、少なくとも約８２％、少なくとも約８３％、少なくとも約８４％、少なくとも約８５％、少なくとも約８６％、少なくとも約８７％、少なくとも約８８％、少なくとも約８９％、少なくとも約９０％、少なくとも約９１％、少なくとも約９２％、少なくとも約９３％、少なくとも約９４％、少なくとも

約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の同一性を有する。ある特定の実施形態では、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＦｋｐＡは、配列番号１のアミノ酸配列を含む。

【００６１】

ポリペプチドに関して使用されるとき、「Ｄｓｂ」タンパク質とは、細菌ジスルフィドオキシドレダクターゼを指す。細菌ジスルフィドオキシレダクターゼは、酵素のジスルフィド結合ファミリーのメンバーである。Ｄｓｂファミリーのメンバーとしては、ＤｓｂＡ、ＤｓｂＢ、ＤｓｂＣ、ＤｓｂＤ、及びＤｓｂＧが挙げられる。ＤｓｂＡは、ペプチドが細胞の周辺質内に出現すると鎖内ジスルフィド結合を形成し、ＤｓｂＣは、細胞の周辺質内での酸化的タンパク質折り畳み中にジスルフィド結合イソメラーゼとしての機能を果たす。

【００６２】

本明細書で使用されるとき、「ＤｓｂＡ」は、周辺質タンパク質ジスルフィドイソメラーゼＩとしても知られ得る。例示的なＤｓｂＡタンパク質は、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤｓｂＡである。Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤｓｂＡのアミノ酸配列は、ＮＣＢＩ受託番号ＮＰ＿４１８２９７によって提供され、Ｅ．ｃｏｌｉ　ｄｓｂＡ遺伝子の核酸配列は、ＮＣＢＩ受託番号ＮＣ＿０００９１３．３またはＥｃｏＧｅｎｅ：ＥＧ１１２９７によって提供される。

【００６３】

本明細書で使用されるとき、「ＤｓｂＣ」は、周辺質タンパク質ジスルフィドイソメラーゼＩＩとしても知られ得る。例示的なＤｓｂＣタンパク質は、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤｓｂＣである。Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤｓｂＣのアミノ酸配列は、ＮＣＢＩ受託番号ＮＰ＿４１７３６９．１によって提供され、Ｅ．ｃｏｌｉ　ｄｓｂＣ遺伝子の核酸配列は、ＮＣＢＩ受託番号ＮＣ＿０００９１３．３またはＥｃｏＧｅｎｅ：ＥＧ１１０７０によって提供される。

【００６４】

「試料」とは、より大量の材料のほんの一部を指す。一般に、本明細書に記載の方法に従う試験は、試料に対して行われる。試料は、典型的には、例えば、培養された組換えポリペプチド発現細胞株（本明細書で「産物細胞株」とも称される）から、または培養された宿主細胞から得られる組換えポリペプチド調製物から得られる。本明細書で使用されるとき、「宿主細胞」は、目的とする組換えポリペプチドまたは産物の発現のための遺伝子を含有しない。試料は、例えば、採取された細胞培養液から、精製プロセスのある特定のステップでのインプロセスプールから、または最終精製産物から得られ得るが、これらに限定されない。

【００６５】

「捕捉抗体」とは、試料中の標的分子に特異的に結合する抗体を指す。ある特定の条件下で、捕捉抗体は、標的分子と複合体を形成し、これにより、抗体－標的分子複合体が残りの試料から分離されることが可能になる。ある特定の実施形態では、かかる分離は、捕捉抗体に結合しなかった試料中の物質または材料を洗い流すことを含み得る。ある特定の実施形態では、捕捉抗体は、例えば、プレートまたはビーズ等であるが、これらに限定されない固体支持体表面に結合し得る。

【００６６】

「検出抗体」とは、試料中または試料－捕捉抗体組み合わせ材料中の標的分子に特異的に結合する抗体を指す。ある特定の条件下で、検出抗体は、標的分子または標的分子－捕捉抗体複合体と複合体を形成する。検出抗体は、増幅され得る標識を通して直接的に、または例えば、標識され、かつ検出抗体に結合する別の抗体の使用を通して間接的にのいずれかで検出されることができる。直接標識の場合、検出抗体は、典型的には、例えば、ビオチンまたはルテニウムを含むが、これらに限定されないいくつかの手段によって検出可能な部分にコンジュゲートされる。

【００６７】

「標識」または「検出可能な標識」という用語は、検出または定量される物質に結合し得る任意の化学基または部分、例えば、抗体を指す。典型的には、標識は、物質の高感度検出または定量化に好適な検出可能な標識である。検出可能な標識の例としては、発光標識

、例えば、蛍光、リン光、化学発光、生物発光、及び電気化学発光標識、放射性標識、酵素、粒子、磁性物質、ならびに電気活性種等が挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、検出可能な標識は、特異的結合反応に関与することによってその存在をシグナル伝達し得る。かかる標識の例としては、ハプテン、抗体、ビオチン、ストレプトアビジン、Ｈｉｓタグ、ニトリロ三酢酸、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ、及びグルタチオン等が挙げられる。

【００６８】

「検出手段」という用語は、あるアッセイで後に読み取られるシグナル報告により検出可能な抗体の存在を検出するために使用される部分または技法を指す。典型的には、検出手段は、マイクロタイタープレート上で捕捉される標識等の固定化標識を増幅する試薬、例えば、アビジンまたはストレプトアビジン－ＨＲＰを用いることを意味する。

【００６９】

「光ルミネセンス」とは、材料がその材料による光（あるいは、電磁放射線とも称される）の吸光後に発光するプロセスを指す。蛍光及びリン光は、２つの異なる種類の光ルミネセンスである。

【００７０】

「化学発光」プロセスは、化学反応による発光種の作製を伴う。「電気化学発光」または「ＥＣＬ」とは、ある種、例えば、ある抗体が、適切な周辺化学環境下でその種の電気化学的エネルギーへの曝露時に発光するプロセスである。

【００７１】

目的とする抗原、例えば、宿主細胞タンパク質に「結合する」抗体は、その抗体が、アッセイ試薬、例えば、捕捉抗体または検出抗体として有用であるように十分な親和性で抗原に結合するものである。典型的には、かかる抗体は、他のポリペプチドと有意に交差反応しない。

【００７２】

ポリペプチドの標的分子への結合に関して、特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド標的上のエピトープの「特異的結合」、またはそれに「特異的に結合する」、またはそれに「特異的な」という用語は、非特異的相互作用とは測定可能な程度に異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、一般に、結合活性を有しない同様の構造を有する分子である対照分子の結合と比較して標的分子の結合を決定することによって測定され得る。いくつかの実施形態では、本発明は、ＦｋｐＡに特異的に結合するポリクローナル抗体の調製物を提供する。例えば、ポリクローナル抗体調製物中の少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、または約９９％の抗体が、所望のポリペプチド（例えば、ＦｋｐＡ）に結合する。

【００７３】

「親和性」とは、ある分子（例えば、抗体）の単一結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有結合相互作用の合計の強度を指す。別途示されない限り、本明細書で使用されるとき、「結合親和性」とは、結合対のメンバー（例えば、抗体及び抗原）間の１：１の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子Ｘのそのパートナー Ｙに対する親和性は、一般に、解離定数（Ｋｄ）によって表され得る。親和性は、本明細書に記載の方法を含む当該技術分野で既知の一般的な方法によって測定され得る。

【００７４】

本明細書における目的のための「活性な」または「活性」とは、天然のまたは天然に存在するポリペプチドの生物学的及び／または免疫学的活性を保持するポリペプチドの形態（複数可）を指し、「生物学的」活性とは、天然のまたは天然に存在するポリペプチドが有する抗原エピトープに対する抗体の産生を誘導する能力以外の天然のまたは天然に存在するポリペプチドによって引き起こされる生物学的機能（阻害または刺激のいずれか）を指し、「免疫学的」活性とは、天然のまたは天然に存在するポリペプチドが有する抗原エピトープに対する抗体の産生を誘導する能力を指す。

【００７５】

「アンタゴニスト」という用語は、最も広義に使用され、天然ポリペプチドの生物学的活性を部分的または完全に遮断、阻害、または中和する任意の分子を含む。同様の様式で、「アゴニスト」という用語は、最も広義に使用され、天然ポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子を含む。好適なアゴニストまたはアンタゴニスト分子としては、具体的には、アゴニストまたはアンタゴニスト抗体または抗体断片、天然ポリペプチドの断片またはアミノ酸配列変異形等が挙げられる。ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの特定方法は、ポリペプチドを候補アゴニストまたはアンタゴニスト分子と接触させることと、ポリペプチドに通常関連する１つ以上の生物学的活性の検出可能な変化を測定することとを含み得る。

【００７６】

本明細書における「抗体」という用語は、最も広義に使用され、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、半抗体、少なくとも２つの無傷抗体から形成された多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び抗体断片を具体的に包含するが、これは、それらが所望の生物学的活性を呈する場合に限る。「免疫グロブリン」（Ｉｇ）という用語は、本明細書で抗体と互換的に使用される。

【００７７】

抗体は、様々な構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子であり、それらの構造は全て免疫グロブリン折り畳みに基づく。例えば、ＩｇＧ抗体は、ジスルフィド結合して機能的抗体を形成する２つの「重」鎖及び２つの「軽」鎖を有する。別の例として、１つ以上のジスルフィド結合によって結合している１つの重鎖及び１つの軽鎖は、機能的半抗体を形成する。各重鎖及び軽鎖はそれ自体、「定常」（Ｃ）領域及び「可変」（Ｖ）領域を含む。Ｖ領域が抗体の抗原結合特異性を決定する一方で、Ｃ領域は構造的支持を提供し、免疫エフェクターとの非抗原特異的相互作用において機能する。抗体または抗体の抗原結合断片の抗原結合特異性は、特定の抗原に特異的に結合する抗体の能力である。

【００７８】

抗体の抗原結合特異性は、Ｖ領域の構造的特徴によって決定される。可変性は、可変ドメインの１１０アミノ酸長にわたって均等には分布していない。代わりに、Ｖ領域は、各々９～１２アミノ酸長である「超可変領域」と呼ばれる極度に可変性のより短い領域によって分離される、１５～３０アミノ酸長のフレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる比較的不変の伸展からなる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメインは各々、主にβシート構成を採用し、３つの超可変領域によって連結され、βシート構造に連結し、場合によってはその一部を形成するループを形成する、４つのＦＲを含む。各鎖内の超可変領域は、ＦＲによって近接近して一緒に保持され、他方の鎖の超可変領域とともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９９１）を参照されたい）。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接的には関与していないが、抗体の抗体依存性細胞毒性（ＡＤＣＣ）への関与等の様々なエフェクター機能を呈する。

【００７９】

各Ｖ領域は、典型的には、３つの相補性決定領域（各々が「超可変ループ」を含有する「ＣＤＲ」）、及び４つのフレームワーク領域を含む。したがって、有意な親和性で特定の所望の抗原に結合するのに必要な最小構造単位である抗体結合部位は、典型的には、それらの３つのＣＤＲと、それらの間に散在する少なくとも３つ、好ましくは４つのフレームワーク領域とを含み、適切な立体配座にＣＤＲを保持及び提示する。古典的な４つの鎖抗体は、V_Hドメイン及びV_Lドメインによって協働して定義される抗原結合部位を有する。ラクダ及びサメ抗体等のある特定の抗体は、軽鎖を欠き、重鎖のみによって形成された結合部位に依存する。V_HとV_Lとの間の協働の不在下で、結合部位が重鎖のみまたは軽鎖のみによって形成された単一ドメイン操作免疫グロブリンが、調製され得る。

【００８０】

「可変」という用語は、可変ドメインのある特定の部分の配列が抗体間で大いに異なり、各特定の抗体のその特定の抗原に対する結合及び特異性において使用されるという事実を指す。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメイン全体にわたって均等には分布していない。これは、軽鎖可変ドメインでも重鎖可変ドメインのいずれにおいても、超可変領域と呼ばれる３つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメインは各々、主にβシート構成を採用し、３つの超可変領域によって連結され、βシート構造に連結し、場合によってはその一部を形成するループを形成する、４つのＦＲを含む。各鎖内の超可変領域は、ＦＲによって近接近して一緒に保持され、他方の鎖の超可変領域とともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ．（１９９１）を参照されたい）。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接的には関与していないが、抗体の抗体依存性細胞毒性（ＡＤＣＣ）への関与等の様々なエフェクター機能を呈する。

【００８１】

「超可変領域」という用語は、本明細書で使用されるとき、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、「相補性決定領域」または「ＣＤＲ」からのからのアミノ酸残基（例えば、V_Lでは残基約２４～３４（Ｌ１）、５０～５６（Ｌ２）、及び８９～９７（Ｌ３）前後、V_Hでは約３１～３５Ｂ（Ｈ１）、５０－６５（Ｈ２）、及び９５～１０２（Ｈ３）前後（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９９１））、ならびに／または「超可変ループ」由来の残基（例えば、V_Lでは残基２６～３２（Ｌ１）、５０～５２（Ｌ２）、及び９１～９６（Ｌ３）、V_Hでは２６～３２（Ｈ１）、５２Ａ～５５（Ｈ２）、及び９６～１０１（Ｈ３）（Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７））を含み得る。

【００８２】

「フレームワーク」または「ＦＲ」残基は、本明細書に定義される超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【００８３】

抗体または半抗体の文脈での「ヒンジ領域」は、一般に、ヒトＩｇＧ１のＧｌｕ２１６からＰｒｏ２３０までの伸展と定義される（Ｂｕｒｔｏｎ，Ｍｏｌｅｃ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２２：１６１－２０６（１９８５））。他のＩｇＧアイソタイプのヒンジ領域は、重鎖内Ｓ－Ｓ結合を形成する最初及び最後のシステイン残基を同じ位置に置くことによって、ＩｇＧ１配列と整列し得る。

【００８４】

Ｆｃ領域の「下部ヒンジ領域」は、通常ヒンジ領域のすぐＣ末端にある残基の伸展、すなわち、Ｆｃ領域の残基２３３～２３９と定義される。本発明以前、ＦｃγＲ結合は、一般に、ＩｇＧ　Ｆｃ領域の下部ヒンジ領域におけるアミノ酸残基が原因であるとされていた。

【００８５】

ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域の「ＣＨ２ドメイン」は、通常ＩｇＧの残基約２３１から約３４０まで延びる。ＣＨ２ドメインは、それが別のドメインと密接に対合されないという点で特有である。むしろ、２つのＮ結合分岐状炭水化物鎖が無傷天然ＩｇＧ分子の２つのＣＨ２ドメイン間に介在する。炭水化物がドメイン－ドメイン対合の代替を提供し、ＣＨ２ドメインを安定させるのに役立ち得ることが推測されている。（Ｂｕｒｔｏｎ，Ｍｏｌｅｃ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２２：１６１－２０６（１９８５））。

【００８６】

「ＣＨ３ドメイン」は、Ｆｃ領域におけるＣ末端からＣＨ２ドメインまで（すなわち、Ｉ

ｇＧのアミノ酸残基約３４１からアミノ酸残基約４４７）の残基の伸展を含む。
【００８７】
「抗体断片」は、好ましくはその抗原結合領域を含む、無傷抗体の一部分を含む。抗体断片の例としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）2、及びＦｖ断片；ダイアボディ；タンデムダイアボディ（ｔａＤｂ）、直鎖状抗体（例えば、米国特許第５，６４１，８７０号、実施例２；Ｚａｐａｔａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ．８（１０）：１０５７－１０６２（１９９５））；一アーム抗体、単一可変ドメイン抗体、ミニボディ、一本鎖抗体分子；抗体断片から形成された多重特異性抗体（例えば、Ｄｂ－Ｆｃ、ｔａＤｂ－Ｆｃ、ｔａＤｂ－ＣＨ３、（ｓｃＦＶ）４－Ｆｃ、ｄｉ－ｓｃＦｖ、ｂｉ－ｓｃＦｖ、またはタンデム（ｄｉ，ｔｒｉ）－ｓｃＦｖを含むが、これらに限定されない）；ならびに二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ＢｉＴＥ）が挙げられる。
【００８８】
抗体のパパイン消化により、「Ｆａｂ」断片と呼ばれる２つの同一の抗原結合断片と、容易に結晶化する能力を反映して表記される１つの残留「Ｆｃ」断片とが産生される。Ｆａｂ断片は、Ｈ鎖の可変領域ドメイン（ＶＨ）を有する全Ｌ鎖、及び１つの重鎖の第１の定常ドメイン（ＣＨ１）からなる。抗体のペプシン処理により、単一の大きいＦ（ａｂ’）2断片が産出され、これは、一般に、二価の抗原結合活性を有する２つのジスルフィド結合Ｆａｂ断片に対応し、依然として抗原に架橋することができる。Ｆａｂ’断片は、抗体ヒンジ領域由来の１つ以上のシステインを含むＣＨ１ドメインのカルボキシ末端に更なる数個の残基を有する点で、Ｆａｂ断片とは異なる。Ｆａｂ’－ＳＨは、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が遊離チオール基を持つＦａｂ’の本明細書における表記である。Ｆ（ａｂ’）２抗体断片は、元来、それらの間にヒンジシステインを有するＦａｂ’断片の対として産生されたものであった。抗体断片の他の化学的カップリングも既知である。
【００８９】
「Ｆｖ」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含有する最小抗体断片である。この領域は、１つの重鎖可変ドメイン及び１つの軽鎖可変ドメインが密接な非共有結合性会合にある二量体からなる。各可変ドメインの３つの超可変領域が相互作用してV_H－V_L二量体の表面上に抗原結合部位を画定するのは、この構成においてである。集合的に、６つの超可変領域は、抗体に抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一可変ドメイン（または抗原に特異的な超可変領域を３つのみ含むＦｖの半分）でさえも、全結合部位よりも低い親和性であるが、抗原を認識し、それに結合する能力を有する。
【００９０】
Ｆａｂ断片は、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第１の定常ドメイン（ＣＨ１）も含有する。Ｆａｂ’断片は、抗体ヒンジ領域由来の１つ以上のシステインを含む重鎖ＣＨ１ドメインのカルボキシ末端への数個の残基の付加だけＦａｂ断片とは異なる。Ｆａｂ’－ＳＨは、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が少なくとも１つの遊離チオール基を持つＦａｂ’の本明細書における表記である。Ｆ（ａｂ’）2抗体断片は、元来、間にヒンジシステインを有するＦａｂ’断片の対として産生されたものであった。抗体断片の他の化学的カップリングも既知である。
【００９１】
任意の脊椎動物種由来の抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）及びラムダ（λ）と呼ばれる２つの明らかに異なる種類のうちの１つに割り当てられ得る。
【００９２】
それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、抗体は、異なるクラスに割り当てられ得る。５つの主要な無傷抗体のクラス、つまり、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭが存在し、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、及びＩｇＡ２に更に分けられ得る。異なるクラスの抗体に対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、α、δ、ε、γ、及びμと呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び三次元構成は、周

知である。

【００９３】

「一本鎖Ｆｖ」または「ｓｃＦｖ」抗体断片は、抗体のＶ$_H$ドメイン及びＶ$_L$ドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖内に存在する。いくつかの実施形態では、Ｆｖポリペプチドは、Ｖ$_H$ドメインと Ｖ$_L$ドメインとの間にポリペプチドリンカーを更に含み、これにより、ｓｃＦｖが抗原結合に望ましい構造を形成することが可能になる。ｓｃＦｖに関する概説については、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ ｉｎ Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ｖｏｌ．１１３，Ｒｏｓｅｎｂｕｒｇ ａｎｄ Ｍｏｏｒｅ ｅｄｓ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．２６９－３１５（１９９４）を参照されたい。

【００９４】

「ダイアボディ」という用語は、２つの抗原結合部位を有する小さい抗体断片を指し、これらの断片は、同じポリペプチド鎖内の軽鎖可変ドメイン（Ｖ$_L$）に連結している重鎖可変ドメイン（Ｖ$_H$）（Ｖ$_H$－Ｖ$_L$）を含む。同じ鎖上のこれらの２つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用することにより、これらのドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対合させられ、２つの抗原結合部位を作製する。ダイアボディについては、例えば、例えば、ＥＰ４０４，０９７、ＷＯ９３／１１１６１、及びＨｏｌｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：６４４４－６４４８（１９９３）により完全に記載されている。

【００９５】

本明細書で使用されるとき、「半抗体」または「ヘミマー」という用語は、一価抗原結合ポリペプチドを指す。ある特定の実施形態では、半抗体またはヘミマーは、ＶＨ／ＶＬ単位と、任意に、少なくとも免疫グロブリン定常ドメインの一部分とを含む。ある特定の実施形態では、半抗体またはヘミマーは、１つの免疫グロブリン軽鎖に関連する免疫グロブリン重鎖、またはその抗原結合断片を含む。ある特定の実施形態では、半抗体またはヘミマーは、単一特異性であり、すなわち、単一の抗原またはエピトープに結合する。ある特定のかかる実施形態では、半抗体は、ＩＬ－１３に結合するが、ＩＬ－１７には結合しない。ある特定の他の実施形態では、半抗体は、ＩＬ－１７に結合するが、ＩＬ－１３には結合しない。当業者は、半抗体が、例えば、ラクダ科動物に起源を持つ単一可変ドメインからなる抗原結合ドメインを有し得ることを容易に理解するであろう。

【００９６】

「ＶＨ／ＶＬ単位」という用語は、少なくとも１つのＶＨ　ＨＶＲ及び少なくとも１つのＶＬ　ＨＶＲを含む抗体の抗原結合領域を指す。ある特定の実施形態では、ＶＨ／ＶＬ単位は、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＨＶＲと、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＨＶＲとを含む。ある特定の実施形態では、ＶＨ／ＶＬ単位は、フレームワーク領域（ＦＲ）の少なくとも一部分を更に含む。いくつかの実施形態では、ＶＨ／ＶＬ単位は、３つのＶＨ　ＨＶＲ及び３つのＶＬ　ＨＶＲを含む。いくつかのかかる実施形態では、ＶＨ／ＶＬ単位は、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、または４つ全てのＶＨ　ＦＲと、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、または４つ全てのＶＬ　ＦＲとを含む。

【００９７】

「多重特異性抗体」という用語は、最も広義に使用され、多重エピトープ特異性を有する（すなわち、１つの生物学的分子上の２つ以上の異なるエピトープに特異的に結合することができるか、または２つ以上の異なる生物学的分子上のエピトープに結合することができる）抗原結合ドメインを含む抗体を具体的に包含する。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体（二重特異性抗体等）の抗原結合ドメインは、２つのＶＨ／ＶＬ単位を含み、第１のＶＨ／ＶＬ単位は、第１のエピトープに特異的に結合し、第２のＶＨ／ＶＬ単位は、第２のエピトープに特異的に結合し、各ＶＨ／ＶＬ単位は、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）及び軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。かかる多重特異性抗体としては、全長抗体、２つ以上のＶＬ及びＶＨドメインを有する抗体、抗体断片（Ｆａｂ、Ｆｖ、ｄｓＦｖ、ｓｃＦ

ｖ等）、ダイアボディ、二重特異性ダイアボディ及びトリアボディ、共有結合または非共有結合している抗体断片が挙げられるが、これらに限定されない。重鎖定常領域の少なくとも一部分及び／または軽鎖定常領域の少なくとも一部分を更に含むＶＨ／ＶＬ単位は、「ヘミマー」または「半抗体」とも称され得る。いくつかの実施形態では、半抗体は、単一重鎖可変領域の少なくとも一部分及び単一軽鎖可変領域の少なくとも一部分を含む。いくつかのかかる実施形態では、２つの半抗体を含み、２つの抗原に結合する二重特異性抗体は、第１の抗原または第１のエピトープに結合するが、第２の抗原または第２のエピトープには結合しない第１の半抗体と、第２の抗原または第２のエピトープに結合するが、第１の抗原または第１のエピトープには結合しない第２の半抗体とを含む。いくつかの実施形態によると、多重特異性抗体は、５Ｍ～０．００１ｐＭ、３Ｍ～０．００１ｐＭ、１Ｍ～０．００１ｐＭ、０．５Ｍ～０．００１ｐＭ、または０．１Ｍ～０．００１ｐＭの親和性で各抗原またはエピトープに結合するＩｇＧ抗体である。いくつかの実施形態では、ヘミマーは、第２のヘミマーと分子内ジスルフィド結合が形成されることを可能にするのに十分な重鎖可変領域の部分を含む。いくつかの実施形態では、ヘミマーは、例えば、相補的ホール変異またはノブ変異を含む第２のヘミマーまたは半抗体とのヘテロ二量体化を可能にする、ノブ変異またはホール変異を含む。ノブ変異及びホール変異は、以下で更に考察される。

【００９８】

「二重特異性抗体」という用語は、１つの生物学的分子上の２つの異なるエピトープに結合可能であるか、または２つの異なる生物学的分子上のエピトープに特異的に結合することができる抗原結合ドメインを含む、多重特異性抗体である。本明細書において、二重特異性抗体はまた、「重複特異性」を有するもの、または「重複特異性である（ｄｕａｌ ｓｐｅｃｉｆｉｃ）」とも称され得る。別途示されない限り、二重特異性抗体によって結合される抗原が二重特異性抗体名に列挙される順序は、任意である。つまり、いくつかの実施形態では、「抗ＩＬ－１３／ＩＬ－１７二重特異性抗体」及び「抗ＩＬ－１７／ＩＬ－１３二重特異性抗体」という用語は、互換的に使用され得る。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、２つの半抗体を含み、各半抗体は、単一重鎖可変領域及び任意に重鎖定常領域の少なくとも一部分と、単一軽鎖可変領域及び任意に軽鎖定常領域の少なくとも一部分とを含む。ある特定の実施形態では、二重特異性抗体は、２つの半抗体を含み、各半抗体は、単一重鎖可変領域及び単一軽鎖可変領域を含み、２つ以上の単一重鎖可変領域は含まず、２つ以上の単一軽鎖可変領域は含まない。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、２つの半抗体を含み、各半抗体は、単一重鎖可変領域及び単一軽鎖可変領域を含み、第１の半抗体は、第１の抗原に結合し、第２の抗原には結合せず、第２の半抗体は、第２の抗原に結合し、第１の抗原には結合しない。

【００９９】

本明細書で使用されるとき、「ノブ・イン・ホール」または「ＫｎＨ」技法という用語は、２つのポリペプチドを、それらが相互作用する界面において、一方のポリペプチドに隆起（ノブ）を誘導し、他方のポリペプチドに空洞（ホール）を導入することにより、インビトロまたはインビボでともに対合することを指向する技法を指す。例えば、ＫｎＨは、抗体のＦｃ：Ｆｃ結合界面、ＣＬ：ＣＨ１界面、またはＶＨ／ＶＬ界面に導入されている（例えば、ＵＳ２０１１／０２８７００９、ＵＳ２００７／０１７８５５２、ＷＯ９６／０２７０１１、ＷＯ９８／０５０４３１、及びＺｈｕ ｅｔ ａｌ．，１９９７，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ６：７８１－７８８を参照されたい）。いくつかの実施形態では、ＫｎＨにより、多重特異性抗体の製造中に２つの異なる重鎖をともに対合することが促進される。例えば、それらのＦｃ領域内にＫｎＨを有する多重特異性抗体は、各Ｆｃ領域に結合している単一可変ドメインを更に含んでも、同様のもしくは異なる軽鎖可変ドメインと対合する異なる重鎖可変ドメインを更に含んでもよい。ＫｎＨ技法を使用して、２つの異なる受容体の細胞外ドメインをともに対合しても、異なる標的認識配列を含む任意の他のポリペプチド配列（例えば、アフィボディ、ペプチボディ、及び他のＦｃ融合体を含む）を対合してもよい。

【０１００】
本明細書で使用されるとき、「ノブ変異」という用語は、ポリペプチドが別のポリペプチドと相互作用する界面において、隆起（ノブ）をポリペプチドに導入する変異を指す。いくつかの実施形態では、他のポリペプチドは、ホール変異を有する（例えば、ＵＳ５，７３１，１６８、ＵＳ５，８０７，７０６、ＵＳ５，８２１，３３３、ＵＳ７，６９５，９３６、ＵＳ８，２１６，８０５、ＷＯ２０１１／１３３８８６、ＷＯ２０１３０５５９５８を参照されたく、これらは、各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。
【０１０１】
本明細書で使用されるとき、「ホール変異」という用語は、ポリペプチドが別のポリペプチドと相互作用する界面において、空洞（ホール）をポリペプチドに導入する変異を指す。いくつかの実施形態では、他のポリペプチドは、ノブ変異を有する（例えば、ＵＳ５，７３１，１６８、ＵＳ５，８０７，７０６、ＵＳ５，８２１，３３３、ＵＳ７，６９５，９３６、ＵＳ８，２１６，８０５を参照されたく、これらは、各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。
【０１０２】
「単一ドメイン抗体」（ｓｄＡｂ）または「単一可変ドメイン（ＳＶＤ）抗体」という表現は、一般に、単一可変ドメイン（ＶＨまたはＶＬ）が抗原結合を付与し得る抗体を指す。言い換えれば、単一可変ドメインは、標的抗原を認識するために別の可変ドメインと相互作用する必要はない。単一ドメイン抗体の例としては、ラクダ科動物（ラマ及びラクダ）ならびに軟骨魚類（例えば、テンジクザメ）由来の抗体と、ヒト及びマウス抗体由来の組換え方法から得られる抗体とが挙げられる（Ｎａｔｕｒｅ（１９８９）３４１：５４４－５４６、Ｄｅｖ Ｃｏｍｐ Ｉｍｍｕｎｏｌ（２００６）３０：４３－５６、ＴｒｅｎｄＢｉｏｃｈｅｍ Ｓｃｉ（２００１）２６：２３０－２３５、Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ（２００３）：２１：４８４－４９０、ＷＯ２００５／０３５５７２、ＷＯ０３／０３５６９４、ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ（１９９４）３３９：２８５－２９０、ＷＯ００／２９００４、ＷＯ０２／０５１８７０）。
【０１０３】
本明細書で使用されるとき、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、同一であり、かつ／または同じエピトープに結合するが、モノクローナル抗体の産生中に生じ得る可能な変異形を除き、かかる変異形は、一般に、少量で存在する。異なる決定基（エピトープ）に対して指向される異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向される。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、それらに他の免疫グロブリンが混入していないという点で有利である。「モノクローナル」という修飾語句は、実質的に同種の抗体集団から得られるという抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものと解釈されるべきではない。例えば、本明細書に提供される方法に従って使用するためのモノクローナル抗体は、Ｋｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ２５６：４９５（１９７５）が初めて説明したハイブリドーマ法によって作製されても、組換えＤＮＡ法（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号を参照されたい）によって作製されてもよい。「モノクローナル抗体」はまた、Ｃｌａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ３５２：６２４－６２８（１９９１）及びＭａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１－５９７（１９９１）に記載される技法を使用して、ファージ抗体ライブラリから単離されてもよい。
【０１０４】
本明細書におけるモノクローナル抗体は、重鎖及び／または軽鎖の一部分が、特定の種に由来するか、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一または同種である一方で、残りの鎖（複数可）が、別の種に由来するか、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一または同種である「キメラ」抗体（免疫グロブリン）、ならびにかかる抗体の断片を具体的に含む

が、これは、それらが所望の生物学的活性を呈する場合に限る（米国特許第４，８１６，５６７号、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８１：６８５１－６８５５（１９８４））。本明細書において目的とするキメラ抗体としては、非ヒト霊長類（例えば、ヒヒ、アカゲザル、またはカニクイザル等の旧世界ザル）に由来する可変ドメイン抗原結合配列と、ヒト定常領域配列とを含む、「霊長類化」抗体が含まれる（米国特許第５，６９３，７８０号）。

【０１０５】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含有するキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類等の非ヒト種（供与体抗体）の超可変領域由来の残基に置き換えられる、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの事例では、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（ＦＲ）残基が、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも供与体抗体にも見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体性能を更に洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、上述のＦＲ置換（複数可）を除いて、超可変ループの全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、かつＦＲの全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のＦＲである、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、任意に、免疫グロブリンの定常領域、典型的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部分を含む。更なる詳細については、例えば、Ｊｏｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ３２１：５２２－５２５（１９８６）、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ３３２：３２３－３２９（１９８８）、及びＰｒｅｓｔａ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．２：５９３－５９６（１９９２）を参照されたい。

【０１０６】

本明細書における目的のために、「無傷抗体」とは、重可変ドメイン及び軽可変ドメイン、ならびにＦｃ領域を含むものである。定常ドメインは、天然配列の定常ドメイン（例えば、ヒト天然配列の定常ドメイン）またはそのアミノ酸配列変異形であり得る。好ましくは、無傷抗体は、１つ以上のエフェクター機能を有する。

【０１０７】

「天然抗体」は、通常２つの同一の軽（Ｌ）鎖及び２つの同一の重（Ｈ）鎖からなる約１５０，０００ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖が１つのジスルフィド共有結合により重鎖に結合している一方で、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なる。各重鎖及び軽鎖は、規則的に離間した鎖内ジスルフィド架橋も有する。各重鎖は、一方の端に可変ドメイン（V_H）を有し、いくつかの定常ドメインが続く。各軽鎖は、一方の端（V_L）に可変ドメインを有し、その他方の端に定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第１の定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整列する。特定のアミノ酸残基が、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間に界面を形成すると考えられている。

【０１０８】

「ネイキッド抗体」は、細胞毒性部分等の異種分子または放射性標識にコンジュゲートされない（本明細書に定義される）抗体である。

【０１０９】

本明細書で使用されるとき、「イムノアドヘシン」という用語は、異種タンパク質（「アドヘシン」）の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能とを組み合わせた分子を指す。構造的に、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を有するアミノ酸配列（このアミノ酸配列は、抗体の抗原認識部位及び結合部位以外のものである（すなわち、抗体の定常領域と比較して「異種」である））と、免疫グロブリン定常ドメイン配列（例えば、ＩｇＧのＣＨ２及び／またはＣＨ３配列）との融合体を含む。例示的なアドヘシン配列としては、目的とするタンパク質に結合する受容体またはリガンドの一部分を含

む、連続したアミノ酸配列が挙げられる。アドヘシン配列は、目的とするタンパク質に結合するが、受容体またはリガンド配列ではない配列（例えば、ペプチボディにおけるアドヘシン配列）でもあり得る。かかるポリペプチド配列は、ファージディスプレイ技法及びハイスループット選別法を含む様々な方法によって選択または特定され得る。イムノアドヘシンにおける免疫グロブリン定常ドメイン配列は、ＩｇＧ－１、ＩｇＧ－２、ＩｇＧ－３、またはＩｇＧ－４サブタイプ、ＩｇＡ（ＩｇＡ－１及びＩｇＡ－２を含む）、ＩｇＥ、ＩｇＤ、またはＩｇＭ等の任意の免疫グロブリンから得られ得る。

【０１１０】

いくつかの実施形態では、抗体の「エフェクター機能」とは、抗体のＦｃ領域（天然配列Ｆｃ領域またはアミノ酸配列変異形Ｆｃ領域）に起因する生物学的活性を指し、抗体アイソタイプにより異なる。抗体エフェクター機能の例としては、Ｃ１ｑ結合及び補体依存性細胞毒性、Ｆｃ受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性（ＡＤＣＣ）、食作用、細胞表面受容体の下方調節が挙げられる。

【０１１１】

「補体依存性細胞毒性」または「ＣＤＣ」とは、補体の存在下で標的を溶解する分子の能力を指す。補体活性化経路は、補体系（Ｃ１ｑ）の第１の成分の、同族抗原と複合した分子（例えば、ポリペプチド（例えば、抗体））への結合によって開始される。補体活性化を評価するために、例えば、Ｇａｚｚａｎｏ－Ｓａｎｔｏｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ２０２：１６３（１９９６）に記載のＣＤＣアッセイが行われ得る。

【０１１２】

「抗体依存性細胞媒介細胞毒性」及び「ＡＤＣＣ」は、Ｆｃ受容体（ＦｃＲ）を発現する非特異的細胞毒性細胞（例えば、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、好中球、及びマクロファージ）が標的細胞上の結合した抗体を認識し、その後、標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介反応を指す。ＡＤＣＣを媒介するための初代細胞であるＮＫ細胞が、ＦｃγＲＩＩＩのみを発現する一方で、単球は、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、及びＦｃγＲＩＩＩを発現する。造血細胞でのＦｃＲ発現は、Ｒａｖｅｔｃｈ ａｎｄ Ｋｉｎｅｔ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ９：４５７－９２（１９９１）の４６４頁の表３に要約されている。目的とする分子のＡＤＣＣ活性を評価するために、米国特許第５，５００，３６２号または同第５，８２１，３３７号に記載されるもの等のインビトロＡＤＣＣアッセイを行ってもよい。かかるアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞が挙げられる。あるいは、または加えて、目的とする分子のＡＤＣＣ活性は、インビボで、例えば、Ｃｌｙｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）９５：６５２－６５６（１９９８）に開示されるもの等の動物モデルにおいて評価され得る。

【０１１３】

「ヒトエフェクター細胞」は、１つ以上のＦｃＲを発現し、エフェクター機能を果たす白血球である。いくつかの実施形態では、これらの細胞は、少なくともＦｃγＲＩＩＩを発現し、ＡＤＣＣエフェクター機能を果たす。ＡＤＣＣを媒介するヒト白血球の例としては、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、単球、細胞毒性Ｔ細胞、及び好中球が挙げられ、ＰＢＭＣ及びＮＫ細胞が好ましい。

【０１１４】

「Ｆｃ受容体」または「ＦｃＲ」という用語は、抗体のＦｃ領域に結合する受容体を説明するために使用される。いくつかの実施形態では、ＦｃＲは、天然配列ヒトＦｃＲである。更に、好ましいＦｃＲは、ＩｇＧ抗体（ガンマ受容体）に結合するものであり、これらの受容体の対立遺伝子変異形及びあるいはスプライシング形態を含む、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、及びＦｃγＲＩＩＩサブクラスの受容体を含む。ＦｃγＲＩＩ受容体は、ＦｃγＲＩＩＡ（「活性化受容体」）及びＦｃγＲＩＩＢ（「阻害受容体」）を含み、これらは、主にその細胞質ドメインが異なる同様のアミノ酸配列を有する。活性化受容体ＦｃγＲＩＩＡは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシン系活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）を

含有する。阻害受容体ＦｃγＲＩＩＢは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシン系阻害モチーフ（ＩＴＩＭ）を含有する（Ｄａｅｒｏｎ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５：２０３－２３４（１９９７）を参照されたい）。ＦｃＲは、Ｒａｖｅｔｃｈ ａｎｄ Ｋｉｎｅｔ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ９：４５７－９２（１９９１）、Ｃａｐｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｍｅｔｈｏｄｓ４：２５－３４（１９９４）、及びｄｅ Ｈａａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｌａｂ．Ｃｌｉｎ．Ｍｅｄ．１２６：３３０－４１（１９９５）に概説されている。今後特定されるものも含む他のＦｃＲが、本明細書における「ＦｃＲ」という用語に包含される。この用語は、母体ＩｇＧの胎児への移行に関与する新生児受容体ＦｃＲｎも含む（Ｇｕｙｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１７：５８７（１９７６）及びＫｉｍ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：２４９（１９９４））。

【０１１５】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養物」という用語は、互換的に使用され、外因性核酸が中に導入された細胞を指し、かかる細胞の子孫を含む。宿主細胞としては、「形質転換体」及び「形質転換細胞」が挙げられ、これらは、初代形質転換細胞及び継代数に関わらずそれに由来する子孫を含む。子孫は、親細胞と核酸含有量の点で完全に同一ではない可能性があるが、変異を含み得る。元来形質転換された細胞についてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物学的活性を有する変異子孫が、本明細書に含まれる。

【０１１６】

本明細書で使用されるとき、「不純物」という用語は、所望のポリペプチド産物とは異なる材料または物質を指す。ある特定の実施形態では、ポリペプチド産物は、二重特異性抗体を含む抗体を含む。不純物としては、宿主細胞材料（Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞タンパク質（ＥＣＰ）等）；浸出タンパク質Ａ；核酸；所望のポリペプチドの変異形、断片、凝集体、または誘導体、別のポリペプチド；内毒素；ウイルス；細胞培養培地成分等が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例では、不純物は、例えば、細菌細胞（Ｅ．ｃｏｌｉ細胞（例えば、ＥＣＰ）等）、真核生物細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、鳥類細胞、真菌細胞等であるが、これらに限定されないものに由来する、宿主細胞タンパク質（ＨＣＰ）であり得る。いくつかの実施形態では、不純物は、クリッピングされたＦｋｐＡ及び／またはＦｋｐＡの凝集体であり得る。いくつかの実施形態では、不純物は、多重特異性抗体（例えば、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、及びＤｓｂＣ等のシャペロン）の発現、折り畳み、または組み立てを容易にするために使用される付属タンパク質を指し得る。いくつかの実施形態では、不純物は、一アーム抗体及び誤組み立て抗体等の産物特異的ポリペプチド、塩基性変異形及び酸性変異形を含む抗体変異形、ならびに凝集体を指し得る。

【０１１７】

「単離された」核酸とは、その天然環境の成分から分離された核酸分子を指す。単離された核酸は、通常核酸分子を含有する細胞内に含有される核酸分子を含むが、その核酸分子が染色体外に、またはその天然染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【０１１８】

参照ポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」は、配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入して、最大の配列同一性パーセントを達成した後の、かつ配列同一性の一環としていずれの保存的置換も考慮しない、参照ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一の候補配列におけるアミノ酸残基の割合と定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するための整列は、当該技術分野の技術範囲内の様々な方法で、例えば、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ等の公的に入手可能なコンピュータソフトウェア、またはＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアを使用して達成され得る。当業者であれば、比較される配列の全長にわたって最大整列を達成するのに必要な任意のアルゴリズムを含む、配列の整列に適切なパラメータを決定することができる。ある特定の実施形態では、アミノ酸配列同一性％値は、配列比較コンピュータプログラムＡＬＩＧＮ－２を使用して生成される。ＡＬＩＧＮ－２配列比較コンピュータプロ

グラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．によって記述され、ソースコードは、ユーザ文書とともに米国著作権庁（Ｕ．Ｓ．Ｃｏｐｙｒｉｇｈｔ　Ｏｆｆｉｃｅ）（Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ　Ｄ．Ｃ．，２０５５９）に提出されており、米国著作権番号ＴＸＵ５１００８７の下に登録されている。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓｏｕｔｈ　Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａから公的に入手可能であるか、またはソースコードからコンパイルされ得る。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、デジタルＵＮＩＸ　Ｖ４．０Ｄを含むＵＮＩＸオペレーティングシステムでの使用のためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータは、ＡＬＩＧＮ－２プログラムによって設定されており、変動しない。

【０１１９】

ＡＬＩＧＮ－２がアミノ酸配列比較に用いられる状況下で、所与のアミノ酸配列Ｂへの、それとの、またはそれに対する所与のアミノ酸配列Ａのアミノ酸配列同一性％（あるいは、所与のアミノ酸配列Ｂへの、それとの、またはそれに対するある特定のアミノ酸配列同一性％を有するか、または含む所与のアミノ酸配列Ａと表現され得る）は、以下のように計算される。

１００×画分Ｘ／Ｙ

【０１２０】

式中、Ｘは、配列整列プログラムＡＬＩＧＮ－２によって、そのプログラムのＡ及びＢの整列において完全な一致としてスコア化されたアミノ酸残基の数であり、Ｙは、Ｂ中のアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Ａの長さがアミノ酸配列Ｂの長さと等しくない場合、ＢへのＡのアミノ酸配列同一性％は、ＡへのＢのアミノ酸配列同一性％と等しくはならないことが理解されるであろう。別途具体的に述べられない限り、本明細書で使用される全てのアミノ酸配列同一性％値は、直前の段落に記載されるように、ＡＬＩＧＮ－２コンピュータプログラムを使用して得られる。

【０１２１】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体の抗原への結合に関与する抗体の重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖及び軽鎖（それぞれ、ＶＨ及びＶＬ）の可変ドメインは、一般に、各ドメインが４つの保存フレームワーク領域（ＦＲ）及び３つの超可変領域（ＨＶＲ）を含む、同様の構造を有する。（例えば、Ｋｉｎｄｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｋｕｂｙ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，６ｔｈ　ｅｄ．，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｃｏ．，ｐａｇｅ９１（２００７）を参照されたい。）単一のＶＨドメインまたはＶＬドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。更に、特定の抗原に結合する抗体を、抗原に結合する抗体のＶＨドメインまたはＶＬドメインを使用して単離して、それぞれ、相補的ＶＬドメインまたはＶＨドメインのライブラリをスクリーニングすることができる。例えば、Ｐｏｒｔｏｌａｎｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：８８０－８８７（１９９３）、Ｃｌａｒｋｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ３５２：６２４－６２８（１９９１）を参照されたい。

【０１２２】

本明細書で使用されるとき、「ベクター」という用語は、それが結合している別の核酸を増殖させることができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、ならびにそれが中に導入される宿主細胞のゲノム内に組み込まれたベクターを含む。ある特定のベクターは、それらが作動可能に結合している核酸の発現を指向することができる。かかるベクターは、本明細書で「発現ベクター」と称される。

【０１２３】

クロマトグラフィーに関して本明細書で使用される「逐次的」という用語は、第１のクロマトグラフィーステップに続いて第２のクロマトグラフィーステップを有することを指す。いくつかの実施形態では、「逐次的」という用語は、第１のクロマトグラフィーステップに２つ以上の追加のステップが続く文脈で使用される。いくつかの例では、クロマトグラフィーに関して本明細書で使用されるとき、「逐次的」という用語は、特定の順序でのクロマトグラフィーステップを指し、例えば、第１のクロマトグラフィーステップに第２

のクロマトグラフィーステップが続き、その後に第３のクロマトグラフィーステップが続くこと等である。非クロマトグラフィーステップ（例えば、ｐＨ及び／または伝導度調整、濾過、濃縮）を含むが、これらに限定されない追加のステップが、第１のクロマトグラフィーステップと追加のクロマトグラフィーステップとの間に含まれてもよい。

【０１２４】

クロマトグラフィーに関して本明細書で使用されるとき、「連続」という用語は、直接、または第１のクロマトグラフィー材料と第２のクロマトグラフィー材料との間の連続流を可能にするいくつかの他の機構を介してのいずれかで連結された、これらの２つのクロマトグラフィー材料を有することを指す。

【０１２５】

「装填密度」とは、クロマトグラフィー材料の体積（例えば、リットル）と接触した組成物の質量（例えば、グラム）を指す。いくつかの例では、装填密度は、ｇ／Ｌで表わされる。

【０１２６】

本明細書における「約」値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータ自体を対象とする変動を含む（かつ説明する）。例えば、「約Ｘ」に言及する説明は、「Ｘ」の説明を含む。

【０１２７】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるとき、単数形「１つの」、「または」、及び「その」は、別途文脈が明確に指示しない限り、複数の指示対象を含む。本明細書に記載の本発明の態様及び変形形態は、態様及び変形形態「からなる」及び／または「から本質的になる」を含むことが理解される。

【０１２８】

ＩＩ．ＦｋｐＡの精製方法

ＦｋｐＡの超高純度調製物の生成方法が、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、調製物は、約９５．０％、約９６．０％、約９７．０％、約９８．０％、約９９．０％、約９９．１％、約９９．２％、約９９．３％、約９９．４％、約９９．５％、約９９．６％、約９９．７％、約９９．８％、約９９．９％のうちのいずれかを超える純度のＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、９９％の純度の調製物は、調製物中の材料の１％以下が、ＦｋｐＡの産生中に存在する細胞または細胞溶解物中に存在する物質（例えば、タンパク質、核酸、脂質等）であることを示す。ＦｋｐＡの９９％の純度の調製物は、ＦｋｐＡの精製または製剤化に使用される緩衝液、塩、または他の賦形剤を含有し得る。

【０１２９】

いくつかの態様では、本発明は、ＦｋｐＡの超高純度調製物の生成方法を提供する。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡは、Ｅ．ｃｏｌｉ培養物等の細菌発酵培養物でＦｋｐＡを過剰発現することによって産生される。いくつかの実施形態では、Ｅ．ｃｏｌｉ培養物等の細菌発酵培養物は、内因性ＦｋｐＡに加えて外因性ＦｋｐＡを発現する。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡは、Ｅ．ｃｏｌｉ培養物等の細菌発酵培養物で外因性ＦｋｐＡを発現することによって産生される。したがって、ある特定の実施形態では、本方法は、外因性ＦｋｐＡの発現を可能にする条件下でＥ．ｃｏｌｉ培養物を培養するステップを更に含む。発酵後、細菌細胞は収集され、遠心分離される。結果として生じる細胞ペーストが溶解緩衝液（例えば、２５ｍＭのＭＥＳ（ｐＨ６．０））中に再懸濁され、（例えば、微小流動化剤を使用することによって）溶解される。いくつかの実施形態では、細胞溶解物は、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）で調整される。いくつかの実施形態では、細胞溶解物は、約０．０１％、約０．０５％、約０．１％、約０．２％、約０．３％、約０．４％、約０．５％、約０．６％、約０．７％、約０．８％、約０．９％、または約１．０％のうちのいずれかを超える最終濃度で、ＰＥＩで調整される。いくつかの実施形態では、細胞溶解物は、約１５分間、約３０分間、約４５分間、約１時間、約２時間、約３時間、約４時間、約５時間、約６時間、約８時間、約１２時間、約１６時間、約２０時間、または約２４時間のうちのいずれかを超えて、ＰＥＩで調整される。いくつかの実施形態では、細胞

溶解物は、約０℃、約４℃、または約２１℃のうちのいずれかを超える温度で、ＰＥＩで調整される。いくつかの実施形態では、細胞溶解物は、周囲温度（約２１℃）で、ＰＥＩで調整される。いくつかの実施形態では、ＰＥＩで調整された溶解物を遠心分離して、粒子状物質を除去する。いくつかの実施形態では、ＰＥＩで調整された溶解物は、クロマトグラフィー前に濾過される。いくつかの実施形態では、ＰＥＩで調整された溶解物は、クロマトグラフィー前に２２μｍのフィルターを通して濾過される。

【０１３０】

いくつかの実施形態では、本方法は、ＦｋｐＡポリペプチド及び不純物を含む細胞溶解物からのＦｋｐＡポリペプチドの精製方法であって、ｂ）遠心分離により細胞溶解物を浄化することと、ｃ）ＦｋｐＡポリペプチドを含む浄化された細胞溶解物を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に適用することと、ｄ）陰イオン交換クロマトグラフィー材料からＦｋｐＡポリペプチドを溶出させて、ＦｋｐＡポリペプチドを含む陽イオン交換溶出物を生成することと、ｅ）ＦｋｐＡポリペプチドを含む陽イオン交換溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）材料に適用することと、ｆ）ＨＩＣ材料からＦｋｐＡポリペプチドを溶出させて、ＨＩＣ溶出物を生成することと、ｇ）ＦｋｐＡポリペプチドを含むＨＩＣ溶出物をサイズ排除クロマトグラフィーに適用することと、ｈ）サイズ排除クロマトグラフィーから精製されたＦｋｐＡポリペプチドを含む画分を収集することとを含む、方法を含む。

【０１３１】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は、負に荷電した基（「リガンド」）を含有し、固相上またはその中を通過した水溶液中の陽イオンと交換するための遊離陽イオンを有する、固相である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、陽イオン交換材料は、膜、モノリス、または樹脂であり得る。一実施形態では、陽イオン交換材料は、樹脂であり得る。上述のいくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィーカラムである。上述のいくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー膜である。

【０１３２】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、陽イオン交換材料は、従来のクロマトグラフィー材料または対流クロマトグラフィー材料を利用し得る。従来のクロマトグラフィー材料としては、例えば、灌流材料（例えば、ポリ（スチレン－ジビニルベンゼン）樹脂）及び拡散材料（例えば、架橋アガロース樹脂）が挙げられる。いくつかの実施形態では、ポリ（スチレン－ジビニルベンゼン）樹脂は、ＰＯＲＯＳ（登録商標）樹脂であり得る。いくつかの実施形態では、架橋アガロース樹脂は、スルホプロピル－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（「ＳＰＳＦＦ」）樹脂であり得る。対流クロマトグラフィー材料は、膜（例えば、ポリエーテルスルホン）またはモノリス材料（例えば、架橋ポリマー）であり得る。ポリエーテルスルホン膜は、Ｍｕｓｔａｎｇであり得る。架橋ポリマーモノリス材料は、架橋ポリ（グリシジルメタクリレート－コ－エチレンジメタクリレート）であり得る。

【０１３３】

本方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、陽イオン交換材料は、カルボン酸官能基またはスルホン酸官能基を含む。いくつかの実施形態では、官能基は、スルホプロピル、スルホエチル、スルホイソブチル、またはカルボキシルである。いくつかの実施形態では、陽イオン交換材料は、膜、モノリス、または樹脂粒子である。いくつかの実施形態では、陽イオン交換材料は、樹脂である。いくつかの実施形態では、陽イオン交換材料は、Ｍｕｓｔａｎｇ　Ｓ、Ｓａｒｔｏｂｉｎｄ　Ｓ、ＳＯ３　Ｍｏｎｏｌｉｔｈ、Ｓ　Ｃｅｒａｍｉｃ　ＨｙｐｅｒＤ、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ２０、スルホプロピル－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＳＰＳＦＦ）、ＳＰ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＸＬ（ＳＰＸＬ）、ＣＭ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ、Ｃａｐｔｏ（商標）Ｓ、Ｆｒａｃｔｏｇｅｌ　Ｓ

ｅ ＨｉＣａｐ、Ｆｒａｃｔｏｇｅｌ ＳＯ３、またはＦｒａｃｔｏｇｅｌ ＣＯＯである。いくつかの実施形態では、陽イオン交換材料は、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０である。陰イオン交換材料の例は、当該技術分野で既知であり、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＱ５０、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＰＩ５０、ＰＯＲＯＳ（登録商標）Ｄ、Ｍｕｓｔａｎｇ Ｑ、Ｑ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＦＦ（ＱＳＦＦ）、及びＤＥＡＥ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）、またはこれらの等価物が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、陰イオン交換材料は、弱陰イオン交換材料、例えば、ＤＥＡＥである。他の実施形態では、陰イオン交換材料は、強陰イオン交換材料、例えば、ＱＳＦＦである。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡの精製に使用される陰イオン交換材料は、弱陰イオン交換材料である。いくつかの実施形態では、弱陰イオン交換材料は、第四級アミンを含む。いくつかの実施形態では、第四級アミンは、架橋アガロースに結合している。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡの精製に使用される陰イオン交換材料は、ＤＥＡＥ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）である。

【０１３４】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）は、生体分子を疎水性に従って分離する液体クロマトグラフィー技法である。ＨＩＣ材料の例としては、Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ（登録商標）ｈｅｘｙｌ６５０、Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ（登録商標）ｂｕｔｙｌ６５０、Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ（登録商標）ｐｈｅｎｙｌ６５０、Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ（登録商標）ｅｔｈｅｒ６５０、Ｓｏｕｒｃｅ、Ｒｅｓｏｕｒｃｅ、Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｈｉ－Ｔｒａｐ、ｂｕｔｙｌ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）、Ｏｃｔｙｌ ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）、ｐｈｅｎｙｌ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）が挙げられるが、これらに限定されない。上述のうちのいくつかの実施形態では、ＨＩＣ材料は、ＨＩＣカラムである。上述のうちのいくつかの実施形態では、ＨＩＣ材料は、ＨＩＣ膜である。いくつかの実施形態では、ＨＩＣ材料は、ブチル部分を含む。いくつかの実施形態では、ブチル部分は、架橋アガロースに結合している。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡの精製に使用されるＨＩＣ材料は、ｂｕｔｙｌ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）である。

【０１３５】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、サイズ排除クロマトグラフィーは、生体分子をそれらのサイズ及び形状に従って分離する液体クロマトグラフィー技法である。サイズ排除クロマトグラフィー材料は、特定の重量範囲の効率的な分子分離のために異なる孔径を有する。サイズ排除クロマトグラフィー材料の例としては、デキストラン、多孔質アガロース粒子、架橋アガロース、架橋アガロース及びデキストラン、ならびに架橋アクリルアミドが挙げられるが、これらに限定されない。サイズ排除クロマトグラフィー材料の例としては、Ｓｅｐｈａｄｅｘ、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ、Ｓｅｐｈａｃｒｙｌ、ＴＳＫｇｅｌ、及びＢｉｏ－Ｇｅｌが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ７５サイズ排除クロマトグラフィーが、ＦｋｐＡの精製に使用される。

【０１３６】

ＦｋｐＡを含む組成物のクロマトグラフィー材料への装填は、不純物からのＦｋｐＡ産物の分離のために最適化され得る。いくつかの実施形態では、組成物のクロマトグラフィー材料への装填は、不純物のクロマトグラフィー材料への結合のために最適化される。例えば、本組成物は、装填緩衝液の伝導度を一定に保ちながら、いくつかの異なるｐＨ値の装填緩衝液中のクロマトグラフィー材料、例えば、クロマトグラフィーカラムに装填され得る。あるいは、本組成物は、装填緩衝液のｐＨを一定に保ちながら、いくつかの異なる伝導度の装填緩衝液中のクロマトグラフィー材料に装填され得る。組成物のクロマトグラフィー材料への装填、及びクロマトグラフィー材料からの産物のプール画分中への後の溶出を完了させた時点で、プール画分中の不純物の量は、所与のｐＨまたは伝導度での産物の不純物からの分離に関する情報を提供する。

【０１３７】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、ＦｋｐＡを含む組成物は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料の約１０ｍｇ／ｍＬ、約９ｍｇ／ｍＬ、約８ｍｇ／ｍＬ、約７ｍｇ／ｍＬ、約６ｍｇ／ｍＬ、約５ｍｇ／ｍＬ、約４ｍｇ／ｍＬ、約３ｍｇ／ｍＬ、約２ｍｇ／ｍＬ、または約１ｍｇ／ｍＬのうちのいずれか以下のポリペプチドの装填密度で陽イオン交換クロマトグラフィー材料に装填される。本組成物は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料の約１ｍｇ／ｍＬ～約２ｍｇ／ｍＬ、約２ｍｇ／ｍＬ～約３ｍｇ／ｍＬ、約３ｍｇ／ｍＬ～約４ｍｇ／ｍＬ、約４ｍｇ／ｍＬ～約５ｍｇ／ｍＬ、約５ｍｇ／ｍＬ～約６ｍｇ／ｍＬ、約６ｍｇ／ｍＬ～約７ｍｇ／ｍＬ、約７ｍｇ／ｍＬ～約８ｍｇ／ｍＬ、約８ｍｇ／ｍＬ～約９ｍｇ／ｍＬ、または約９ｍｇ／ｍＬ～約１０ｍｇ／ｍＬのうちのいずれかのポリペプチドの装填密度で陽イオンクロマトグラフィー材料に装填され得る。いくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は、アガロースに架橋しているスルホプロピル基、例えば、ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）である。

【０１３８】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、ＦｋｐＡを含む組成物は、ＨＩＣ材料の約１０ｍｇ／ｍＬ、約９ｍｇ／ｍＬ、約８ｍｇ／ｍＬ、約７ｍｇ／ｍＬ、約６ｍｇ／ｍＬ、約５ｍｇ／ｍＬ、約４ｍｇ／ｍＬ、約３ｍｇ／ｍＬ、約２ｍｇ／ｍＬ、または約１ｍｇ／ｍＬのうちのいずれか以下のポリペプチドの装填密度でＨＩＣ材料に装填される。本組成物は、ＨＩＣ材料の約１ｍｇ／ｍＬ～約２ｍｇ／ｍＬ、約２ｍｇ／ｍＬ～約３ｍｇ／ｍＬ、約３ｍｇ／ｍＬ～約４ｍｇ／ｍＬ、約４ｍｇ／ｍＬ～約５ｍｇ／ｍＬ、約５ｍｇ／ｍＬ～約６ｍｇ／ｍＬ、約６ｍｇ／ｍＬ～約７ｍｇ／ｍＬ、約７ｍｇ／ｍＬ～約８ｍｇ／ｍＬ、約８ｍｇ／ｍＬ～約９ｍｇ／ｍＬ、または約９ｍｇ／ｍＬ～約１０ｍｇ／ｍＬのうちのいずれかのポリペプチドの装填密度でＨＩＣ材料に装填され得る。いくつかの実施形態では、ＨＩＣ材料は、架橋アガロースに架橋しているブチル部分、例えば、Ｂｕｔｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）である。

【０１３９】

クロマトグラフィー材料からのＦｋｐＡの溶出は、最小不純物及び最小プール体積でのＦｋｐＡの収率のために最適化され得る。例えば、本組成物は、装填緩衝液中のクロマトグラフィー材料、例えば、クロマトグラフィーカラムに装填され得る。装填を完了させた時点で、クロマトグラフィー材料をまず洗浄し、その後、溶出緩衝液の伝導度を一定に保ちながら、いくつかの異なるｐＨの緩衝液で溶出させる。あるいは、産物は、溶出緩衝液のｐＨを一定に保ちながら、いくつかの異なる伝導度の溶出緩衝液中のクロマトグラフィー材料から溶出され得る。クロマトグラフィー材料からの産物の溶出を完了させた時点で、プール画分中の不純物の量は、所与のｐＨまたは伝導度での産物の不純物からの分離に関する情報を提供する。多数の画分（例えば、８カラム体積）における産物の溶出は、溶出プロファイルの「テーリング」を示す。本発明のいくつかの実施形態では、溶出のテーリングが最小限に抑えられる。

【０１４０】

例えば、緩衝液の所望のｐＨ、緩衝液の所望の伝導度、目的とするタンパク質の特徴、及び精製方法に応じて用いられ得る、様々な緩衝液。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、本方法は、緩衝液を使用することを含む。緩衝液は、装填緩衝液、平衡化緩衝液、または洗浄緩衝液であり得る。いくつかの実施形態では、装填緩衝液、平衡化緩衝液、及び／または洗浄緩衝液のうちの１つ以上は、同じである。いくつかの実施形態では、装填緩衝液、平衡化緩衝液、及び／または洗浄緩衝液は、異なる。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、緩衝液は、塩を含む。装填緩衝液は、塩化ナトリウム、酢酸ナトリウム、またはそれらの混合物を含み得る。いくつかの実施形態では、装填緩衝液は、塩化ナトリウム緩衝液である。いくつかの実施形態では、装填緩衝液は、酢酸ナトリウム緩衝液である。

【０１４１】

本明細書で使用されるとき、装填物とは、クロマトグラフィー材料に装填された組成物で

ある。装填緩衝液は、ＦｋｐＡを含む組成物をクロマトグラフィー材料に装填するために使用される緩衝液である。クロマトグラフィー材料は、精製される組成物の装填前に平衡化緩衝液で平衡化され得る。いくつかの例では、洗浄緩衝液は、組成物をクロマトグラフィー材料に装填した後、かつ目的とするポリペプチドを固相から溶出させる前に使用される。

【０１４２】

本明細書で使用されるとき、溶出とは、クロマトグラフィー材料からの産物、例えば、ＦｋｐＡの除去である。溶出緩衝液は、クロマトグラフィー材料から目的とするポリペプチドまたは他の産物を溶出させるために使用される緩衝液である。多くの場合、溶出緩衝液は、装填緩衝液とは異なる物理的特徴を有する。例えば、溶出緩衝液は、装填緩衝液とは異なる伝導度または装填緩衝液とは異なるｐＨを有し得る。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、装填緩衝液よりも低い伝導度を有する。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、装填緩衝液よりも高い伝導度を有する。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、装填緩衝液よりも低いｐＨを有する。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、装填緩衝液よりも高いｐＨを有する。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、装填緩衝液とは異なる伝導度及び異なるｐＨを有する。溶出緩衝液は、より高いまたはより低い伝導度、及びより高いまたはより低いｐＨの任意の組み合わせを有し得る。

【０１４３】

伝導度とは、２つの電極間に電流を伝導する水溶液の能力を指す。溶液中、電流は、イオン輸送により流れる。したがって、水溶液中に存在するイオンの量が増加すると、この溶液は、より高い伝導度を有するようになる。伝導度の尺度の基本単位は、ジーメンス（またはｍｈｏ）、ｍｈｏ（ｍＳ／ｃｍ）であり、様々なモデルのＯｒｉｏｎ伝導度計等の伝導度計を使用して測定され得る。電解質伝導度は、電流を搬送する溶液中のイオンの能力であるため、溶液の伝導度は、その中のイオンの濃度を変化させることによって改変され得る。例えば、溶液中の緩衝剤の濃度及び／または塩（例えば、塩化ナトリウム、酢酸ナトリウム、もしくは塩化カリウム）の濃度を改変して、所望の伝導度を達成し得る。好ましくは、様々な緩衝液の塩濃度を修正して、所望の伝導度を達成する。

【０１４４】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、陽イオン交換装填緩衝液は、約４．０ｍＳ／ｃｍ、約４．５ｍＳ／ｃｍ、約５．０ｍＳ／ｃｍ、約５．５ｍＳ／ｃｍ、約６．０ｍＳ／ｃｍ、約６．５ｍＳ／ｃｍ、約７．０ｍＳ／ｃｍ、約７．５ｍＳ／ｃｍ、約８．０ｍＳ／ｃｍ、約８．５ｍＳ／ｃｍ、約９．０ｍＳ／ｃｍ、約９．５ｍＳ／ｃｍ、または約１０ｍＳ／ｃｍのうちのいずれかを超える伝導度を有する。伝導度は、約４ｍＳ／ｃｍ～約１７ｍＳ／ｃｍ、約４ｍＳ／ｃｍ～約１０ｍＳ／ｃｍ、約４ｍＳ／ｃｍ～約７ｍＳ／ｃｍ、約５ｍＳ／ｃｍ～約１７ｍＳ／ｃｍ、約５ｍＳ／ｃｍ～約１０ｍＳ／ｃｍ、または約５ｍＳ／ｃｍ～約７ｍＳ／ｃｍのうちのいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、伝導度は、約４ｍＳ／ｃｍ、約４．５ｍＳ／ｃｍ、約５．０ｍＳ／ｃｍ、約５．５ｍＳ／ｃｍ、約６．０ｍＳ／ｃｍ、約６．５ｍＳ／ｃｍ、約７．０ｍＳ／ｃｍ、約７．５ｍＳ／ｃｍ、約８．０ｍＳ／ｃｍ、約８．５ｍＳ／ｃｍ、約９．０ｍＳ／ｃｍ、約９．５ｍＳ／ｃｍ、または約１０ｍＳ／ｃｍのうちのいずれかである。一態様では、伝導度は、装填緩衝液、平衡化緩衝液、及び／または洗浄緩衝液の伝導度である。いくつかの実施形態では、装填緩衝液、平衡化緩衝液、及び洗浄緩衝液のうちの１つ以上の伝導度は、同じである。いくつかの実施形態では、装填緩衝液の伝導度は、洗浄緩衝液及び／または平衡化緩衝液の伝導度とは異なる。

【０１４５】

いくつかの実施形態では、陽イオン交換溶出緩衝液は、装填緩衝液の伝導度を超える伝導度を有する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、約５ｍＳ／ｃｍ、約１０ｍＳ／ｃｍ、約１５ｍＳ／ｃｍ、約２０ｍＳ／ｃｍ、約２５ｍＳ／ｃｍ、約３０ｍＳ／ｃｍ、約３５ｍＳ／ｃｍ、約４０ｍＳ／ｃｍ、約４５ｍＳ／ｃｍ、約５０ｍＳ／ｃｍ、約５５ｍＳ／ｃｍ、約６０ｍＳ／ｃｍ、約６５ｍＳ／ｃｍ、

約７０ｍＳ／ｃｍ、約７５ｍＳ／ｃｍ、約８０ｍＳ／ｃｍ、約８５ｍＳ／ｃｍ、約９０ｍＳ／ｃｍ、約９５ｍＳ／ｃｍ、または約１００ｍＳ／ｃｍのうちのいずれかを超える伝導度を有する。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液の伝導度は、溶出緩衝液の塩濃度を改変することによって改変される。

【０１４６】

いくつかの実施形態では、ＨＩＣ装填緩衝液は、溶出緩衝液の伝導度を超える伝導度を有する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、ＨＩＣ装填緩衝液は、約５ｍＳ／ｃｍ、約１０ｍＳ／ｃｍ、約１５ｍＳ／ｃｍ、約２０ｍＳ／ｃｍ、約２５ｍＳ／ｃｍ、約３０ｍＳ／ｃｍ、約３５ｍＳ／ｃｍ、約４０ｍＳ／ｃｍ、約４５ｍＳ／ｃｍ、約５０ｍＳ／ｃｍ、約５５ｍＳ／ｃｍ、約６０ｍＳ／ｃｍ、約６５ｍＳ／ｃｍ、約７０ｍＳ／ｃｍ、約７５ｍＳ／ｃｍ、約８０ｍＳ／ｃｍ、約８５ｍＳ／ｃｍ、約９０ｍＳ／ｃｍ、約９５ｍＳ／ｃｍ、または約１００ｍＳ／ｃｍのうちのいずれかを超える伝導度を有する。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液の伝導度は、溶出緩衝液の塩濃度を改変することによって改変される。

【０１４７】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、ＨＩＣ溶出緩衝液は、約４．０ｍＳ／ｃｍ、約４．５ｍＳ／ｃｍ、約５．０ｍＳ／ｃｍ、約５．５ｍＳ／ｃｍ、約６．０ｍＳ／ｃｍ、約６．５ｍＳ／ｃｍ、約７．０ｍＳ／ｃｍ、約７．５ｍＳ／ｃｍ、約８．０ｍＳ／ｃｍ、約８．５ｍＳ／ｃｍ、約９．０ｍＳ／ｃｍ、約９．５ｍＳ／ｃｍ、または約１０ｍＳ／ｃｍのうちのいずれか未満の伝導度を有する。

【０１４８】

上記の実施形態のうちのいずれかのいくつかの態様では、溶出緩衝液の伝導度は、段階勾配または線形勾配により装填物及び／または洗浄緩衝液から均一濃度で変化したものである。

【０１４９】

いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡは、９カラム体積にわたって、約０％～約６０％の１０ｍＭのＭＥＳ及び３００ｍＭのＮａＣｌの塩勾配で陽イオン交換クロマトグラフィー材料から溶出される。

【０１５０】

いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡは、ＦｋｐＡがＨＩＣ材料から溶出するまで、精製水を使用してＨＩＣ材料から溶出される。

【０１５１】

ＦｋｐＡの等電点の計算値は、タンパク質のアミノ酸含有量に基づいて、約７．０１である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、陽イオン交換装填緩衝液は、約１０、約９、約８、約７、約６、または約５のうちのいずれか未満のｐＨを有する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、装填緩衝液は、約４、約５、約６、約７、約８、または約９のうちのいずれかを超えるｐＨを有する。いくつかの実施形態では、装填緩衝液、平衡化緩衝液、及び／または洗浄緩衝液のうちの１つ以上のｐＨは、同じである。いくつかの実施形態では、装填緩衝液のｐＨは、平衡化緩衝液及び／または洗浄緩衝液のｐＨとは異なる。いくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィーの装填緩衝液のｐＨは、約ｐＨ６．０である。

【０１５２】

いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、装填緩衝液のｐＨ未満のｐＨを有する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、約８、約７、約６、約５、約４、約３、または約２のうちのいずれか未満のｐＨを有する。溶出緩衝液のｐＨは、約４～約９、約４～約８、約４～約７、約４～約６、約４～約５、約５～約９、約５～約８、約５～約７、約５～約６、約６～約９、約６～約８、約６～約７のうちのいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液のｐＨは、約４．０、約４．５、約５．０、約５．５、約６．０、約６．５、約７．０、約７．５、約８．０、約８．５、または約９．０のうちのいずれかである。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡを含

む組成物は、ｐＨ８の装填緩衝液中の陰イオン交換材料に装填され、ｐＨ約７．０または７．１の溶出緩衝液中の陰イオン交換材料から溶出される。

【０１５３】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、ＨＩＣ装填緩衝液は、約６．０、約７．０、または約８．０のうちのいずれか未満のｐＨを有する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、装填緩衝液は、約６．０、約７．０、または約８．０のうちのいずれかを超えるｐＨを有する。いくつかの実施形態では、装填緩衝液、平衡化緩衝液、及び／または洗浄緩衝液のうちの１つ以上のｐＨは、同じである。いくつかの実施形態では、装填緩衝液のｐＨは、平衡化緩衝液及び／または洗浄緩衝液のｐＨとは異なる。

【０１５４】

いくつかの実施形態では、サイズ排除クロマトグラフィーは、貫流モードまたは示差分配モードで使用される。いくつかの実施形態では、サイズ排除クロマトグラフィーに使用される緩衝液は、ＰＢＳ（ｐＨ７．５±０．４）である。

【０１５５】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、流量は、約５０ＣＶ／時間、約４０ＣＶ／時間、または約３０ＣＶ／時間のうちのいずれか未満である。流量は、約５ＣＶ／時間～約５０ＣＶ／時間、約１０ＣＶ／時間～約４０ＣＶ／時間、または約１８ＣＶ／時間～約３６ＣＶ／時間のうちのいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、流量は、約９ＣＶ／時間、約１８ＣＶ／時間、約２５ＣＶ／時間、約３０ＣＶ／時間、約３６ＣＶ／時間、または約４０ＣＶ／時間のうちのいずれかである。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、流量は、約２００ｃｍ／時間、約１５０ｃｍ／時間、約１００ｃｍ／時間、約７５ｃｍ／時間、または約５０ｃｍ／時間のうちのいずれか未満である。流量は、約２５ｃｍ／時間～約２００ｃｍ／時間、約２５ｃｍ／時間～約１７５ｃｍ／時間、約２５ｃｍ／時間～約１５０ｃｍ／時間、約２５ｃｍ／時間～約１００ｃｍ／時間、約５０ｃｍ／時間～約１００ｃｍ／時間、または約６５ｃｍ／時間～約８５ｃｍ／時間のうちのいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、流量は約０．１ｍＬ／分、約０．２５ｍＬ／分、約０．５ｍＬ／分、約０．７５ｍＬ／分、約１ｍＬ／分、約２ｍＬ／分、約３ｍＬ／分、約４ｍＬ／分、約５ｍＬ／分、約６ｍＬ／分、約７ｍＬ／分、約８ｍＬ／分、約９ｍＬ／分、約１０ｍＬ／分、約１１ｍＬ／分、約１２ｍＬ／分、約１３ｍＬ／分、約１４ｍＬ／分、約１５ｍＬ／分、約２０ｍＬ／分、約２５ｍＬ／分、及び約５０ｍＬ／分を超える。いくつかの実施形態では、流量は、約０．１ｍＬ／分～約１ｍＬ／分、約１ｍＬ／分～約５ｍＬ／分、約１ｍＬ／分～約１０ｍＬ／分、約５ｍＬ／分～約１０ｍＬ／分、約１０ｍＬ／分～約１５ｍＬ／分、約１０ｍＬ／分～約２５ｍＬ／分、及び約１５ｍＬ／分～約２５ｍＬ／分である。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡの陰イオン交換クロマトグラフィーの流量は、約１３．３ｍｌ／分である。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡの疎水性相互作用クロマトグラフィーの流量は、約１３．２ｍｌ／分である。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡのサイズ排除クロマトグラフィーの流量は、約１ｍｌ／分である。

【０１５６】

床高さとは、使用されるクロマトグラフィー材料の高さである。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、床高さは、約３ｃｍ、約１０ｃｍ、約１５ｃｍ、約２０ｃｍ、約２５ｃｍ、約３０ｃｍ、約３５ｃｍ、約４０ｃｍ、約４５ｃｍ、約５０ｃｍ、約６０ｃｍ、約７０ｃｍ、約８０ｃｍ、約９０ｃｍ、または約１００ｃｍのうちのいずれかを超える。床高さは、約３ｃｍ～約５０ｃｍ、約５ｃｍ～約３５ｃｍ、約３ｃｍ～約３５ｃｍ、または約５ｃｍ～約５０ｃｍのうちのいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、床高さは、装填物中のポリペプチドまたは不純物の量に基づいて決定される。

【０１５７】

いくつかの実施形態では、クロマトグラフィーは、約１ｍＬ、２ｍＬ、３ｍＬ、４ｍＬ、

５ｍＬ、６ｍＬ、７ｍＬ、８ｍＬ、９ｍＬ、１０ｍＬ、１５ｍＬ、２０ｍＬ、２５ｍＬ、３０ｍＬ、４０ｍＬ、５０ｍＬ、７５ｍＬ、１００ｍＬ、または２００ｍＬを超える体積を有する容器のカラム内で行われる。

【０１５８】

本発明のいくつかの実施形態では、画分は、クロマトグラフィーから収集される。いくつかの実施形態では、収集される画分は、約０．０１ＣＶ、０．０２ＣＶ、０．０３ＣＶ、０．０４ＣＶ、０．０５ＣＶ、０．０６ＣＶ、０．０７ＣＶ、０．０８ＣＶ、０．０９ＣＶ、０．１ＣＶ、０．２ＣＶ、０．３ＣＶ、０．４ＣＶ、０．５ＣＶ、０．６ＣＶ、０．７ＣＶ、０．８ＣＶ、０．９ＣＶ、１．０ＣＶ、２．０ＣＶ、３．０ＣＶ、４．０ＣＶ、５．０ＣＶ、６．０ＣＶ、７．０ＣＶ、８．０ＣＶ、９．０ＣＶ、または１０．０ＣＶを超える。いくつかの実施形態では、産物、例えば、ポリペプチドを含有する画分が、プールされる。いくつかの実施形態では、装填画分及び溶出画分からのポリペプチドを含有する画分が、プールされる。画分中のポリペプチドの量は、当業者によって決定され得、例えば、画分中のポリペプチドの量は、紫外分光法によって決定され得る。いくつかの実施形態では、検出可能なポリペプチド断片を含有する画分が、プールされる。いくつかの実施形態では、画分中のＦｋｐＡの存在及び純度は、サイズ排除クロマトグラフィーによって決定される。

【０１５９】

例示的な実施形態

いくつかの実施形態では、本発明は、ＦｋｐＡの超高純度調製物を産生するための、以下の例示的ではあるが非限定的な方法を提供する。ＦｋｐＡを、Ｅ．ｃｏｌｉで発現させる。細胞ペーストを、１０体積で、２５ｍＭのＭＥＳ（ｐＨ６．０）（溶解緩衝液）中に懸濁させ、懸濁液が均質になるまで混合する。室内圧力（６０００～８０００ｐｓｉ）での４回通過で、微小流動化剤ＨＣ－８０００を使用して、細胞溶解を行う。ＳＳ－３４回転子を使用してＲＣ６遠心分離機内で、懸濁液を１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心分離する。

【０１６０】

他の実施形態では、細胞ペーストを、５０ｍＭのＭＥＳ（ｐＨ６．０）中に懸濁させ（５０ｇ細胞ペースト／１Ｌ）、懸濁液が均質になるまで混合する。室内圧力（約７０００ｐｓｉ）での３回通過で、微小流動化剤１１０Ｆを使用して、細胞溶解を行う。ホモジネートを（１０％ＰＥＩストック溶液を使用して）０．１％のＰＥＩになるように調整し、周囲温度（約２１℃）で３０分間混合する。「ＧＳＡ」回転子を使用してＳｏｒｖａｌ　ＲＣ－５Ｂ＋遠心分離機内で、懸濁液を８５００ｒｐｍで３０分間遠心分離する。遠心分離物を収集し、０．２２ｕｍのＤｕｒａｐｏｒｅフィルターを通して濾過する。

【０１６１】

（ａ）ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ

浄化された遠心分離物（１．５ＭのＴｒｉｓ塩基でｐＨ８．０に調整）を、結合及び溶出モードでＤＥＡＥ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を含有するカラムに装填する。カラムは、以下の特性を有し、つまり、カラムは、２７．０ｃｍ（高さ）×２．６ｃｍ（直径）、体積１４５ｍＬ、タンパク質容量５０ｍｇ／ｍＬ以下の樹脂であった。カラムを、３ＣＶの２５０ｍＭのＭＥＳ（ｐＨ６．０）で事前平衡化し、２５ｍＭのＭＥＳ（ｐＨ６．０）で平衡化する。装填終了時、カラムを３ＣＶの平衡化緩衝液で洗浄する。０～３０％の緩衝液Ｂ（２５ｍＭのＭＥＳ、３００ｍＭのＮａＣｌ）の９ＣＶの勾配を使用して、ＦｋｐＡを溶出させる。画分を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析する。

【０１６２】

（ｂ）Ｂｕｔｙｌ－Ｓ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）

その後、プールされたＳＰ画分を、結合及び溶出モードでＢｕｔｙｌ－Ｓ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）クロマトグラフィー材料に適用する。カラムは、以下の特性を有し、つまり、カラム寸法は、９．４ｃｍ（高さ）×２．６ｃｍ（直径）、体積５０ｍＬ、タン

パク質容量２０ｍｇ／ｍＬ以下の樹脂であった。カラムを、３００ｍＭの硫酸ナトリウム、５０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ７．０）で平衡化する。等体積の５０ｍＭのリン酸塩、０．６Ｍの硫酸ナトリウム（ｐＨ７．０）の添加によってＳＰプールを調整してから、Ｂｕｔｙｌ－Ｓ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）カラムに装填する。その後、カラムを５０ｍＭのリン酸塩、３００ｍＭの硫酸ナトリウム（ｐＨ７．０、３ＣＶ）で洗浄する。ＦｋｐＡを、精製水でカラムから溶出させる。画分を収集し、カラム画分のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析によって分析する。

【０１６３】

（ｃ）Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００

その後、プールされたＢｕｔｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）画分を、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００を使用してサイズ排除クロマトグラフィーに供する。このステップを使用して、いかなる残留高分子量種及び低分子量種も除去し、ＦｋｐＡを製剤化する。Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００は、１０～６００ｋＤａｌの分子量を有する分子の分画範囲を有し、ＦｋｐＡ等のタンパク質に適している。カラムは、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００であり、以下の特性を有し、つまり、カラムは、６０ｃｍ×２．６ｃｍの直径、体積３２０ｍＬ、装填体積１６ｍＬ以下であった。遠心分離フィルターを使用して、ＨＩＣプール（画分７～１１）を１６ｍＬ以下（ＳＥＣ　ＣＶの５％以下）の体積に濃縮する。これらの装置を、２０分間隔でＥｐｐｅｎｄｏｒｆ臨床遠心分離機を使用して目標体積に到達するまで３０００ｒｐｍで遠心分離する。Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００サイズ排除カラムを、３ＣＶのＰＢＳ（ｐＨ７．５±０．４）で平衡化する。Ｂｕｔｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）画分を、カラムに装填し、ＰＢＳ（ｐＨ７．５±０．４）で１ｍＬ／分の流量でさせる。

【０１６４】

ＦｋｐＡの純度の決定方法

ＦｋｐＡの調製物の純度の決定方法は、当該技術分野で既知である。いくつかの実施形態では、調製物中のＦｋｐＡの純度は、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）によって決定される。いくつかの実施形態では、調製物中のＦｋｐＡの純度は、高性能液体クロマトグラフィーサイズ排除クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ　ＳＥＣ）によって決定される。いくつかの実施形態では、調製物中のＦｋｐＡの純度は、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）によって決定される。いくつかの実施形態では、ＳＤＳ　ＰＡＧＥゲル上のタンパク質は、蛍光タンパク質画像化を使用して特定される。いくつかの実施形態では、ＳＤＳ　ＰＡＧＥは、Ｓｙｐｒｏ（登録商標）Ｒｕｂｙを使用して画像化される。いくつかの実施形態では、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上のタンパク質は、Ｈｅｕｋｅｓｈｏｖｅｎ銀染色を使用して可視化される。他の実施形態では、ＦｋｐＡ分子の同一性は、Ｎ末端配列分析、ペプチド質量フィンガープリント法（ＰＭＦ）、ＣＨＩＰ　ＴＯＦによる無傷／還元質量、及びウエスタンブロット分析を含むが、これらに限定されない特性評価アッセイを使用して確認される。

【０１６５】

いくつかの実施形態では、本発明は、ＦｋｐＡの超高純度調製物を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、ＦｋｐＡが調製物の少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、または約９９．５％のうちのいずれかを構成するＦｐｋＡの調製物を提供する。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡは、調製物の約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、及び／または約９９．５％のうちのいずれかである。いくつかの実施形態では、調製物は、約１％、約０．９％、約０．８％、約０．７％、約０．６％、約０．５％、約０．４％、約０．３％、約０．２％、約０．１％、約０．０９％、約０．０８％、約０．０７％、約０．０６％、約０．０５％、約０．０４％、約０．０３％、約０．０２％、または約０．０１％のうちのいずれか未満の不純物を含む。不純物としては、Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞タンパク質等の宿主細胞タンパク質、核酸、ウイルス、細胞培養培地成分等の細胞培養成分、及びＦｋｐＡの凝集体またはＦｋｐＡの断片（例えば、ＦｋｐＡの非機能的断片）が挙げられ得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、調製物は、約２％、約１．５％、または約１％未満のうちのいずれかの低分子

量種を含む。いくつかの実施形態では、調製物は、約１％、０．５％、または０．１％未満の高分子量種を含む。いくつかの実施形態では、高分子量種は、検出不能である。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡ、低分子量種、及び／または高分子量種の存在は、ＳＥＣによって検出される。

【０１６６】

いくつかの実施形態では、本発明は、ＦｋｐＡの超高純度調製物を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、ＦｋｐＡが調製物の少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、または約９９．５％のうちのいずれかを構成するＦｋｐＡの調製物を提供する。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡは、調製物の約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、約９９％、及び／または約９９．５％のうちのいずれかである。いくつかの実施形態では、調製物は、約１％、約０．９％、約０．８％、約０．７％、約０．６％、約０．５％、約０．４％、約０．３％、約０．２％、約０．１％、約０．０９％、約０．０８％、約０．０７％、約０．０６％、約０．０５％、約０．０４％、約０．０３％、約０．０２％、または約０．０１％のうちのいずれか未満の不純物を含む。不純物としては、Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞タンパク質等の宿主細胞タンパク質、核酸、ウイルス、細胞培養培地成分等の細胞培養成分、及びＦｋｐＡの凝集体またはＦｋｐＡの断片（例えば、ＦｋｐＡの非機能的断片）が挙げられ得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、調製物は、約１％、約０．５％、または約０．１％のうちのいずれか未満の低分子量種を含む。いくつかの実施形態では、調製物は、約１％、０．５％、または０．１％未満の高分子量種を含む。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡ、低分子量種、及び／または高分子量種の存在は、ＳＥＣによって検出される。

【０１６７】

宿主細胞ＤＮＡ等のＤＮＡの測定方法は、当該技術分野で既知であり、実施例の項に記載される。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、ＤＮＡの量は、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、または約９０％のうちのいずれかを超えて低減される。ＤＮＡの量は、約１０％～９９％、約３０％～９５％、約３０％～９９％、約５０％～９５％、約５０％～９９％、約７５％～９９％、または約８５％～９９％のうちのいずれかだけ低減され得る。ＤＮＡの量は、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９５％、または約９９％のうちのいずれかだけ低減され得る。いくつかの実施形態では、低減は、精製ステップ（複数可）から回収された組成物中のＤＮＡの量を、精製ステップ（複数可）前の組成物中のＤＮＡの量と比較することによって決定される。

【０１６８】

細胞培養培地成分とは、細胞培養培地中に存在する成分を指す。細胞培養培地は、細胞の採取時の細胞培養培地であり得る。いくつかの実施形態では、細胞培養培地成分は、ゲンタマイシンである。ゲンタマイシンの量は、ＥＬＩＳＡによって測定され得る。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、細胞培養培地成分の量は、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、または約９０％のうちのいずれかを超えて低減される。細胞培養培地成分の量は、約１０％～９９％、約３０％～９５％、約３０％～９９％、約５０％～９５％、約５０％～９９％、約７５％～９９％、または約８５％～９９％のうちのいずれかだけ低減され得る。いくつかの実施形態では、細胞培養培地成分の量は、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９５％、または約９８％のうちのいずれかだけ低減される。いくつかの実施形態では、低減は、精製ステップ（複数可）から回収された組成物中の細胞培養培地成分の量を、精製ステップ（複数可）前の組成物中の細胞培養培地成分の量と比較することによって決定される。

【０１６９】

ＩＩＩ．ポリペプチド－ＦｋｐＡ

本発明は、ＦｋｐＡの超高純度調製物の生成方法を提供する。「ＦｋｐＡ」タンパク質と

いう用語は、細菌ＦＫＢＰ型ペプチジル－プロリルシス－トランスイソメラーゼを指す。ＦｋｐＡは、周辺質タンパク質ジスルフィドイソメラーゼＩは、シス／トランスペプチジル－プロリルイソメラーゼ（ＰＰＩａｓｅ）活性及びシャペロン活性の両方を呈する。ＦｋｐＡは、ペプチドが細胞の周辺質内に出現するとき、ポリペプチドの折り畳みを補助し得る。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡは、細菌由来である。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡポリペプチドは、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＦｋｐＡポリペプチドである。他の実施形態では、ＦｋｐＡポリペプチドは、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａ、Ａｚｏａｒｃｕｓ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ、Ｂｕｃｈｎｅｒａ、Ｘａｎｔｈｍｏｎａｓ、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ、Ｓｈｉｇｅｌｌａ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ、Ｙｅｒｓｉｎａ、Ｅｒｗｉｎｉａ、及びＮｅｉｓｓｅｒｉａのうちのいずれかの種由来である。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡポリペプチドは、配列番号１または配列番号２のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡポリペプチドは、配列番号１または配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、または約９９％のうちのいずれかの同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１７０】

本明細書に記載の方法を使用して精製されるＦｋｐＡポリペプチドは、一般に、組換え技法を使用して産生される。細菌中での組換えポリペプチドの産生方法は、当該技術分野で既知である。組換え技法を使用する場合、ポリペプチドは、細胞内で産生され得るか、周辺質空間に産生され得るか、または培地に直接分泌され得る。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡをコードする核酸は、ポリペプチドを過剰発現するために宿主細胞に導入される。ある特定の実施形態では、ＦｋｐＡを過剰発現するように操作された宿主細胞は、遺伝子操作されていない宿主細胞によって産生されるレベルを超えるレベルで、ＦｋｐＡを発現する。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡをコードする核酸は、発現ベクター、例えば、プラスミドから発現される。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡポリペプチドをコードする核酸は、配列番号３の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡをコードする核酸は、配列番号３の核酸配列と少なくとも約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、または約９９％のうちのいずれかの同一性を有する核酸配列を含む。

【０１７１】

ポリペプチドは、培養培地または宿主細胞溶解物から回収され得る。ポリペプチドの発現に用いられる細胞は、様々な物理的または化学的手段（凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤等）によって破壊され得る。ポリペプチドが細胞内で産生される場合、第１のステップとして、宿主細胞または溶解された断片のいずれかの粒子状残屑が、例えば、遠心分離または限外濾過によって除去される。Ｃａｒｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ１０：１６３－１６７（１９９２）は、Ｅ．ｃｏｌｉの周辺質空間に分泌されるポリペプチドを単離するための手順を記載する。簡潔には、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム（ｐＨ３．５）、ＥＤＴＡ、及びフッ化フェニルメチルスルホニル（ＰＭＳＦ）の存在下で、約３０分間にわたって融解する。細胞残屑は、遠心分離によって除去され得る。ポリペプチドが培地に分泌される場合、かかる発現系由来の上清が、一般に、市販のポリペプチド濃縮フィルター、例えば、ＡｍｉｃｏｎまたはＭｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｐｅｌｌｉｃｏｎ限外濾過装置を使用して最初に濃縮される。タンパク質分解を阻害するためにＰＭＳＦ等のプロテアーゼ阻害剤が前述のステップのうちのいずれかに含まれてもよく、外来性汚染物質の成長を阻止するために抗生物質が含まれてもよい。

【０１７２】

ＩＶ．産生時にＦｋｐＡが使用され得るポリペプチド。

タンパク質折り畳み及び組み立てがＦｋｐＡ（例えば、外因性ＦｋｐＡ）の発現によって支援され得る、細菌（例えば、Ｅ　ｃｏｌｉ）中に産生され得るポリペプチドの例としては、免疫グロブリン、イムノアドヘシン、抗体、半抗体、抗体断片、酵素、ホルモン、融合タンパク質、Ｆｃ含有タンパク質、免疫コンジュゲート、サイトカイン、及びインターロイキンが挙げられるが、これらに限定されない。ポリペプチドの例としては、レニン等

の哺乳類タンパク質；ホルモン；ヒト成長ホルモン及びウシ成長ホルモン等の成長ホルモン；成長ホルモン放出因子；副甲状腺ホルモン；甲状腺刺激ホルモン；リポタンパク質；アルファ－１－抗トリプシン；インスリンＡ－鎖；インスリンＢ－鎖；プロインスリン；卵胞刺激ホルモン；カルシトニン；黄体形成ホルモン；グルカゴン；第ＶＩＩＩＣ因子、第ＩＸ因子、組織因子、及びフォン・ヴィレブランド因子等の凝固因子；タンパク質Ｃ等の抗凝固因子；心房性ナトリウム利尿因子；肺表面活性剤；ウロキナーゼまたはヒト尿もしくは組織型プラスミノーゲン活性化因子（ｔ－ＰＡ）等のプラスミノーゲン活性化因子；ボンベシン；トロンビン；造血成長因子；腫瘍壊死因子－アルファ及び－ベータ；エンケファリナーゼ；ＲＡＮＴＥＳ（活性化時に調節され、正常Ｔ細胞が発現及び分泌している）；ヒトマクロファージ炎症性タンパク質（ＭＩＰ－１－アルファ）；ヒト血清アルブミン等の血清アルブミン；ミュラー管抑制物質；レラキシンＡ－鎖；レラキシンＢ－鎖；プロリラキシン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；酵素；ベーターラクタマーゼ等の微生物タンパク質；ＤＮａｓｅ；ＩｇＥ；ＣＴＬＡ－４等の細胞毒性Ｔリンパ球関連抗原（ＣＴＬＡ）；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）；ホルモンまたは成長因子の受容体；タンパク質ＡまたはＤ；リウマチ因子；骨由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）、ニューロトロフィン－３、－４、－５、もしくは－６（ＮＴ－３、ＮＴ－４、ＮＴ－５、もしくはＮＴ－６）等の神経栄養因子、またはＮＧＦ－ｂ等の神経成長因子；血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）；ａＦＧＦ及びｂＦＧＦ等の線維芽細胞成長因子；表皮成長因子（ＥＧＦ）；ＴＧＦ－β１、ＴＧＦ－β２、ＴＧＦ－β３、ＴＧＦ－β４、またはＴＧＦ－β５を含むＴＧＦ－アルファ及びＴＧＦ－ベータ等の形質転換成長因子（ＴＧＦ）；インスリン様成長因子－Ｉ及び－ＩＩ（ＩＧＦ－Ｉ及びＩＧＦ－ＩＩ）；ｄｅｓ（１－３）－ＩＧＦ－Ｉ（脳ＩＧＦ－Ｉ）、インスリン様成長因子結合タンパク質（ＩＧＦＢＰ）；サイトカイン；ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１９、及びＣＤ２０等のＣＤタンパク質；エリスロポエチン；骨誘導因子；免疫毒素；融合ポリペプチド、すなわち、２つ以上の異種ポリペプチドまたはその断片からなり、組換え核酸によってコードされるポリペプチド；Ｆｃ含有ポリペプチド、例えば、第２のポリペプチドに融合した免疫グロブリンＦｃ領域を含む融合タンパク質、またはその断片；免疫コンジュゲート；骨形成タンパク質（ＢＭＰ）；インターフェロン－アルファ、－ベータ、及び－ガンマ等のインターフェロン；コロニー刺激因子（ＣＳＦ）、例えば、Ｍ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、及びＧ－ＣＳＦ；インターロイキン（ＩＬ）、例えば、ＩＬ－１～ＩＬ－１０、ＩＬ１３、ＩＬ１７；スーパーオキシドジスムターゼ；Ｔ細胞受容体；表面膜タンパク質；分解促進因子；例えば、ＡＩＤＳエンベロープの一部分等のウイルス抗原；輸送タンパク質；ホーミング受容体；アドレシン；調節タンパク質；ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１８、ＩＣＡＭ、ＶＬＡ－４、及びＶＣＡＭ等のインテグリン；ＣＡ１２５（卵巣癌抗原）またはＨＥＲ２、ＨＥＲ３、もしくはＨＥＲ４受容体等の腫瘍関連抗原；イムノアドヘシン；ならびに上記に列挙されるタンパク質のうちのいずれかの断片及び／または変異形、ならびにタンパク質、例えば、上述のタンパク質のうちのいずれか等を含むタンパク質に結合する抗体断片を含む抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１７３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアッセイ方法のうちのいずれかで使用するためのポリペプチド調製物は、目的とする抗体を含有し、すなわち、宿主細胞によって産生される組換えポリペプチドは、抗体である。

【０１７４】

かかる抗体の分子標的としては、（ｉ）ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ１３、ＣＤ８、ＣＤ１９、ＣＤ１１ａ、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ３４、ＣＤ４０、ＣＤ７９α（ＣＤ７９ａ）、及びＣＤ７９β（ＣＤ７９ｂ）、（ｉｉ）ＥＧＦ受容体、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、またはＨＥＲ４受容体等のＥｒｂＢ受容体ファミリーのメンバー、（ｉｉｉ）ＬＦＡ－１、Ｍａｃ１、ｐ１５０，９５、ＶＬＡ－４、ＩＣＡＭ－１、ＶＣＡＭ、及びαｖ／β３インテグリン（それらのアルファサブユニットまたはベータサブユニットのいずれか（例えば、抗ＣＤ１１ａ、抗ＣＤ１８、または抗ＣＤ１１ｂ抗体）を含む）等の細胞接着分子、（ｉｖ）Ｖ

ＥＧＦ、ＩｇＥ、血液型抗原；ｆｌｋ２／ｆｌｔ３受容体；肥満（ＯＢ）受容体；ｍｐｌ受容体；ＣＴＬＡ－４；タンパク質Ｃ、ＢＲ３、ｃ－ｍｅｔ、組織因子、β７等の成長因子、ならびに（ｖ）米国特許第７，５２１，５４１号に記載されるもの等の細胞表面及び膜貫通腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）等であるが、これらに限定されない、ＣＤタンパク質及びそれらのリガンドが挙げられる。

【０１７５】

他の例示的な抗体としては、抗エストロゲン受容体抗体、抗プロゲステロン受容体抗体、抗ｐ５３抗体、抗ＨＥＲ－２／ｎｅｕ抗体、抗ＥＧＦＲ抗体、抗カテプシンＤ抗体、抗Ｂｃｌ－２抗体、抗Ｅ－カドヘリン抗体、抗ＣＡ１２５抗体、抗ＣＡ１５－３抗体、抗ＣＡ１９－９抗体、抗ｃ－ｅｒｂＢ－２抗体、抗Ｐ－糖タンパク質抗体、抗ＣＥＡ抗体、抗網膜芽細胞腫タンパク質抗体、抗ｒａｓ癌タンパク質抗体、抗ルイスＸ抗体、抗Ｋｉ－６７抗体、抗ＰＣＮＡ抗体、抗ＣＤ３抗体、抗ＣＤ４抗体、抗ＣＤ５抗体、抗ＣＤ７抗体、抗ＣＤ８抗体、抗ＣＤ９／ｐ２４抗体、抗ＣＤ１０抗体、抗ＣＤ１１ａ抗体、抗ＣＤ１１ｃ抗体、抗ＣＤ１３抗体、抗ＣＤ１４抗体、抗ＣＤ１５抗体、抗ＣＤ１９抗体、抗ＣＤ２０抗体、抗ＣＤ２２抗体、抗ＣＤ２３抗体、抗ＣＤ３０抗体、抗ＣＤ３１抗体、抗ＣＤ３３抗体、抗ＣＤ３４抗体、抗ＣＤ３５抗体、抗ＣＤ３８抗体、抗ＣＤ４１抗体、抗ＬＣＡ／ＣＤ４５抗体、抗ＣＤ４５ＲＯ抗体、抗ＣＤ４５ＲＡ抗体、抗ＣＤ３９抗体、抗ＣＤ１００抗体、抗ＣＤ９５／Ｆａｓ抗体、抗ＣＤ９９抗体、抗ＣＤ１０６抗体、抗ｕｂｉｑｕｉｔｉｎ抗体、抗ＣＤ７１抗体、抗ｃ－ｍｙｃ抗体、抗サイトケラチン抗体、抗ビメンチン抗体、抗ＨＰＶタンパク質抗体、抗カッパ軽鎖抗体、抗ラムダ軽鎖抗体、抗メラノソーム抗体、抗前立腺特異抗原抗体、抗Ｓ－１００抗体、抗タウ抗原抗体、抗フィブリン抗体、抗ケラチン抗体、及び抗Ｔｎ－抗原抗体から選択されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１７６】

モノクローナル抗体

いくつかの実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、実質的に同種の抗体の集団から得られ、すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、同一であり、かつ／または同じエピトープに結合するが、モノクローナル抗体の産生中に生じる可能な変異形を除き、かかる変異形は、一般に、少量で存在する。したがって、「モノクローナル」という修飾語句は、別個の抗体またはポリクローナル抗体の混合物ではないという抗体の特徴を示す。

【０１７７】

例えば、モノクローナル抗体は、Ｋｏｈｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ２５６：４９５（１９７５）が初めて説明したハイブリドーマ法を使用して作製されても、組換えＤＮＡ法（米国特許第４，８１６，５６７号）によって作製されてもよい。

【０１７８】

ハイブリドーマ方法では、マウスまたは他の適切な宿主動物が本明細書に記載されるように免疫化されて、免疫化に使用されるポリペプチドに特異的に結合する抗体を産生するか、または産生することができるリンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫化され得る。その後、ポリエチレングリコール等の好適な融合剤で、リンパ球を骨髄腫細胞と融合して、ハイブリドーマ細胞を形成する（Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ，ｐｐ．５９－１０３（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，１９８６））。

【０１７９】

そのように調製されたハイブリドーマ細胞を播種し、融合されていない親骨髄腫細胞の成長または生存を阻害する１つ以上の物質を好ましくは含有する好適な培養培地で成長させる。例えば、親骨髄腫細胞が、酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴまたはＨＰＲＴ）を欠く場合、ハイブリドーマ用の培養培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン（ＨＡＴ培地）を含み、これらの物質は、ＨＧＰＲＴ欠損細胞の成長を阻止する。

【０１８０】
いくつかの実施形態では、骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による安定した高レベルの抗体産生を支持し、ＨＡＴ培地等の培地に対して高感度であるものである。これらのうち、いくつかの実施形態では、骨髄腫細胞株は、Ｓａｌｋ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ Ｃｅｌｌ Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ Ｃｅｎｔｅｒ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ ＵＳＡから入手可能なＭＯＰＣ－２１及びＭＰＣ－１１マウス腫瘍等のマウス骨髄腫株、ならびにＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄ ＵＳＡから入手可能なＳＰ－２またはＸ６３－Ａｇ８－６５３細胞由来のものである。ヒト骨髄腫及びマウス－ヒトヘテロ骨髄腫細胞株も、ヒトモノクローナル抗体の産生に関して記載されている（Ｋｏｚｂｏｒ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３３：３００１（１９８４）、Ｂｒｏｄｅｕｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｐｐ．５１－６３（Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８７））。

【０１８１】
ハイブリドーマ細胞が成長する培養培地は、抗原に対して指向されたモノクローナル抗体の産生についてアッセイされる。いくつかの実施形態では、ハイブリドーマ細胞によって産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降またはインビトロ結合アッセイ、例えば、放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）もしくは酵素結合免疫吸収アッセイ（ＥＬＩＳＡ）によって決定される。

【０１８２】
モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Ｍｕｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１０７：２２０（１９８０）のＳｃａｔｃｈａｒｄ分析によって決定され得る。

【０１８３】
所望の特異性、親和性、及び／または活性を有する抗体を産生するハイブリドーマ細胞が特定された後、クローンは、限界希釈手順によりサブクローニングされ、標準の方法により成長され得る（Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｐｐ．５９－１０３（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，１９８６））。この目的に好適な培養培地としては、例えば、Ｄ－ＭＥＭ培地またはＲＰＭＩ－１６４０培地が挙げられる。加えて、ハイブリドーマ細胞は、動物における腹水腫瘍としてインビボで成長し得る。

【０１８４】
サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えば、ポリペプチドＡ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、または親和性クロマトグラフィー等の従来の免疫グロブリン精製手順によって、培養培地、腹水、または血清から好適に分離される。

【０１８５】
モノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、従来の手順を使用して（例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用して）容易に単離され、配列決定される。いくつかの実施形態では、ハイブリドーマ細胞は、かかるＤＮＡの供給源としての機能を果たす。単離後、ＤＮＡを発現ベクター内に置き、その後、これを宿主細胞（Ｅ．ｃｏｌｉ細胞、サルＣＯＳ細胞、ヒト胚腎臓（ＨＥＫ）２９３細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞等）、またはさもなければ免疫グロブリンポリペプチドを産生しない骨髄腫細胞にトランスフェクトして、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を得ることができる。抗体をコードするＤＮＡの細菌における組換え発現に関する概説論文としては、Ｓｋｅｒｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ．５：２５６－２６２（１９９３）及びＰｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖｓ．，１３０：１５１－１８８（１９９２）が挙げられる。

【０１８６】
更なる一実施形態では、抗体または抗体断片は、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ３４８：５５２－５５４（１９９０）に記載される技法を使用して生成される抗体ファージライブラリから単離され得る。Ｃｌａｃｋｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ３５２：６２４－６２８（１９９１）及びＭａｒｋｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１－５９７（１９９１）はそれぞれ、ファージライブラリを使用したマウス抗体及びヒト抗体の単離について記載している。続報は、鎖シャッフリングによる高親和性（ｎＭ範囲）ヒト抗体の産生（Ｍａｒｋｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ１０：７７９－７８３（１９９２））、ならびに非常に大きいファージライブラリを構築するための戦略としての組み合わせ感染及びインビボ組換え（Ｗａｔｅｒｈｏｕｓｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．２１：２２６５－２２６６（１９９３））について記載している。したがって、これらの技法は、モノクローナル抗体を単離するための従来のモノクローナル抗体ハイブリドーマ技法に対する実行可能な代替案である。
【０１８７】
ＤＮＡはまた、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を相同性マウス配列の代わりに用いることによって（米国特許第４，８１６，５６７号、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８１：６８５１（１９８４））、または非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全てもしくは一部を免疫グロブリンコード配列に共有結合することによって修飾されてもよい。
【０１８８】
典型的には、かかる非免疫グロブリンポリペプチドは、ある抗体の定常ドメインの代わりに用いられるか、またはそれらは、ある抗体の１つの抗原結合部位の可変ドメインの代わりに用いられて、ある抗原に対して特異性を有する１つの抗原結合部位及び異なる抗原に対して特異性を有する別の抗原結合部位を含む、キメラ二価抗体を作製する。
【０１８９】
本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、抗体は、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、またはＩｇＭである。いくつかの実施形態では、抗体は、ＩｇＧモノクローナル抗体である。
【０１９０】
抗体断片
いくつかの実施形態では、抗体は、抗体断片である。抗体断片を産生するための様々な技法が、開発されている。従来、これらの断片は、無傷抗体のタンパク質消化によって得られていた（例えば、Ｍｏｒｉｍｏｔｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　ａｎｄ　Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ２４：１０７－１１７（１９９２）及びＢｒｅｎｎａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ２２９：８１（１９８５）を参照されたい）。しかしながら、これらの断片は現在、組換え宿主細胞から直接産生することができる。例えば、抗体断片は、上記に考察される抗体ファージライブラリから単離することができる。あるいは、Ｆａｂ’－ＳＨ断片をＥ．ｃｏｌｉから直接回収し、化学的にカップリングして、Ｆ（ａｂ’）２断片を形成することができる（Ｃａｒｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ１０：１６３－１６７（１９９２））。別のアプローチに従って、Ｆ（ａｂ’）２断片は、組換え宿主細胞培養物から直接単離することができる。抗体断片を産生するための他の技法は、当業者に明らかである。他の実施形態では、最適な抗体は、一本鎖Ｆｖ断片（ｓｃＦｖ）である。ＷＯ９３／１６１８５、米国特許第５，５７１，８９４号、及び米国特許第５，５８７，４５８号を参照されたい。抗体断片はまた、例えば、米国特許第５，６４１，８７０号に記載される「直鎖状抗体」であってもよい。かかる直鎖状抗体断片は、単一特異性または二重特異性であり得る。
【０１９１】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体の断片が提供される。いくつかの実施形態では、抗体断片は、抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、抗原結合断片は、Ｆａｂ断片、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、及びダイアボディから

なる群から選択される。
【０１９２】
ポリペプチド変異形及び修飾
ある特定の実施形態では、本明細書におけるタンパク質のアミノ酸配列変異形が企図される。例えば、タンパク質の結合親和性及び／または他の生物学的特性を改善することが望ましくあり得る。タンパク質のアミノ酸配列変異形は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列に適切な修飾を導入することによって、またはペプチド合成によって調製され得る。かかる修飾としては、例えば、タンパク質のアミノ酸配列内の残基からの欠失、及び／またはそれへの挿入、及び／またはその置換が挙げられる。欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせにより、最終構築物に到達することができるが、但し、最終構築物が所望の特徴を有することを条件とする。
【０１９３】
変異形ポリペプチド
「ポリペプチド変異形」とは、ポリペプチドの全長天然配列、シグナルペプチドを欠くポリペプチド配列、シグナルペプチドを有するかまたは有しないポリペプチドの細胞外ドメインと少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性を有する本明細書に定義されるポリペプチド、例えば、活性ポリペプチドを意味する。かかるポリペプチド変異形としては、例えば、１つ以上のアミノ酸残基が全長天然アミノ酸配列のＮ末端またはＣ末端に付加または欠失されたポリペプチドが挙げられる。通常、ポリペプチド変異形は、全長天然配列ポリペプチド配列、シグナルペプチドを欠くポリペプチド配列、シグナルペプチドを有するかまたは有しないポリペプチドの細胞外ドメインと、少なくとも約８０％のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約８５％、約９０％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、または約９９％のうちのいずれかのアミノ酸配列同一性を有する。任意に、変異形ポリペプチドは、天然ポリペプチド配列と比較して１つ以下の保存的アミノ酸置換を有し、あるいは天然ポリペプチド配列と比較して約２、約３、約４、約５、約６、約７、約８、約９、または約１０個以下のうちのいずれかの保存的アミノ酸置換を有する。
【０１９４】
変異形ポリペプチドは、Ｎ末端またはＣ末端で切断され得るか、または例えば、全長天然ポリペプチドと比較して、内部残基を欠き得る。ある特定の変異形ポリペプチドは、所望の生物学的活性にとって不可欠ではないアミノ酸残基を欠き得る。切断、欠失、及び挿入を有するこれらの変異形ポリペプチドは、いくつかの従来の技法のうちのいずれかによって調製され得る。所望の変異形ポリペプチドは、化学的に合成されたものであり得る。別の好適な技法は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって所望の変異形ポリペプチドをコードする核酸断片を単離し、増幅することを伴う。核酸断片の所望の末端を画定するオリゴヌクレオチドは、ＰＣＲにおいて５’プライマー及び３’プライマーで用いられる。好ましくは、変異形ポリペプチドは、本明細書に開示される天然ポリペプチドと少なくとも１つの生物学的及び／または免疫学的活性を共有する。
【０１９５】
アミノ酸配列挿入としては、長さが１残基から１００以上の範囲の残基を含有するポリペプチドへのアミノ末端及び／またはカルボキシル末端の融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入が挙げられる。末端挿入の例としては、Ｎ末端メチオニル残基を有する抗体または細胞毒性ポリペプチドに融合した抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入変異形としては、抗体の血清半減期を増加させる酵素またはポリペプチドへの抗体のＮ末端またはＣ末端の融合が挙げられる。
【０１９６】
例えば、ポリペプチドの結合親和性及び／または他の生物学的特性を改善することが望ましくあり得る。ポリペプチドのアミノ酸配列変異形は、適切なヌクレオチド変化を抗体核酸に導入することによって、またはペプチド合成によって調製される。かかる修飾としては、例えば、ポリペプチドのアミノ酸配列内の残基からの欠失、及び／またはそれへの挿入、及び／またはその置換が挙げられる。欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせによ

り、最終構築物に到達するが、但し、最終構築物が所望の特徴を有することを条件とする。アミノ酸変化はまた、グリコシル化部位の数または位置の変化等のポリペプチド（例えば、抗体）の翻訳後プロセスも改変し得る。

【０１９７】

所望の活性に悪影響を及ぼすことなく、どのアミノ酸残基が挿入、置換、または欠失され得るかを決定する際の手引きは、ポリペプチドの配列を同種の既知のポリペプチド分子の配列と比較し、相同性の高い領域に作製されるアミノ酸配列変化の数を最小限に抑えることによって見出され得る。

【０１９８】

変異誘発に好ましい位置であるポリペプチド（例えば、抗体）のある特定の残基または領域の特定に有用な方法は、Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍ ａｎｄ Ｗｅｌｌｓ，Ｓｃｉｅｎｃｅ２４４：１０８１－１０８５（１９８９）によって説明される「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。ここで、残基または標的残基群（例えば、Ａｒｇ、Ａｓｐ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、及びＧｌｕ等の荷電残基）を特定し、中性または負に荷電したアミノ酸（最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン）に置き換えて、アミノ酸と抗原との相互作用に影響を及ぼす。その後、置換に対する機能的感度を実証するアミノ酸位置は、更なるまたは他の変異形を置換部位に、またはそのために導入することによって洗練される。したがって、アミノ酸配列変異を導入するための部位が事前決定されている一方で、変異自体の性質は事前決定される必要はない。例えば、所与の部位での変異の性能を分析するために、アラニンスキャニングまたはランダム変異誘発が標的コドンまたは領域で行われ、発現した抗体変異形が所望の活性についてスクリーニングされる。

【０１９９】

別の種類の変異形は、アミノ酸置換変異形である。これらの変異形は、異なる残基に置き換えられた抗体分子内に少なくとも１つのアミノ酸残基を有する。置換変異誘発に関する最も対象となる部位としては、超可変領域が挙げられるが、ＦＲ改変も企図される。かかる置換が生物学的活性に変化をもたらす場合、表１に「例示的な置換」と表示されるか、またはアミノ酸クラスを参照して以下に更に記載されるより実質的な変化が導入され、産物がスクリーニングされ得る。

表１。

元の残基	例示的な置換	保存的置換
Ａｌａ（Ａ）	Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ	Ｖａｌ
Ａｒｇ（Ｒ）	Ｌｙｓ、Ｇｌｎ、Ａｓｎ	Ｌｙｓ
Ａｓｎ（Ｎ）	Ｇｌｎ、Ｈｉｓ、Ａｓｐ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ	Ｇｌｎ
Ａｓｐ（Ｄ）	Ｇｌｕ、Ａｓｎ	Ｇｌｕ
Ｃｙｓ（Ｃ）	Ｓｅｒ、Ａｌａ	Ｓｅｒ
Ｇｌｎ（Ｑ）	Ａｓｎ、Ｇｌｕ	Ａｓｎ
Ｇｌｕ（Ｅ）	Ａｓｐ、Ｇｌｎ	Ａｓｐ
Ｇｌｙ（Ｇ）	Ａｌａ	Ａｌａ
Ｈｉｓ（Ｈ）	Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ	Ａｒｇ
Ｉｌｅ（Ｉ）	Ｌｅｕ、Ｖａｌ、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｐｈｅ、ノルロイシン	Ｌｅｕ
Ｌｅｕ（Ｌ）	ノルロイシン、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｐｈｅ	Ｉｌｅ
Ｌｙｓ（Ｋ）	Ａｒｇ、Ｇｌｎ、Ａｓｎ	Ａｒｇ
Ｍｅｔ（Ｍ）	Ｌｅｕ、Ｐｈｅ、Ｉｌｅ	Ｌｅｕ
Ｐｈｅ（Ｆ）	Ｔｒｐ、Ｌｅｕ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ａｌａ、Ｔｙｒ	Ｔｙｒ
Ｐｒｏ（Ｐ）	Ａｌａ	Ａｌａ
Ｓｅｒ（Ｓ）	Ｔｈｒ	Ｔｈｒ
Ｔｈｒ（Ｔ）	Ｖａｌ、Ｓｅｒ	Ｓｅｒ
Ｔｒｐ（Ｗ）	Ｔｙｒ、Ｐｈｅ	Ｔｙｒ
Ｔｙｒ（Ｙ）	Ｔｒｐ、Ｐｈｅ、Ｔｈｒ、Ｓｅｒ	Ｐｈｅ
Ｖａｌ（Ｖ）	Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ａｌａ、ノルロイシン	Ｌｅｕ

【０２００】

ポリペプチドの生物学的特性の実質的な修飾は、（ａ）置換領域におけるポリペプチド骨格の構造（例えば、シートもしくは螺旋立体配座としてのもの）、（ｂ）標的部位における分子の電荷または疎水性、または（ｃ）側鎖のバルクの維持に対するそれらの影響が著しく異なる置換を選択することによって達成される。アミノ酸は、それらの側鎖の特性の類似性に従って群分けされ得る（Ａ．Ｌ．Ｌｅｈｎｉｎｇｅｒ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｓｅｃｏｎｄ ｅｄ．，ｐｐ．７３－７５，Ｗｏｒｔｈ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９７５））。

（１）非極性：Ａｌａ（Ａ）、Ｖａｌ（Ｖ）、Ｌｅｕ（Ｌ）、Ｉｌｅ（Ｉ）、Ｐｒｏ（Ｐ）、Ｐｈｅ（Ｆ）、Ｔｒｐ（Ｗ）、Ｍｅｔ（Ｍ）

（２）非荷電極性：Ｇｌｙ（Ｇ）、Ｓｅｒ（Ｓ）、Ｔｈｒ（Ｔ）、Ｃｙｓ（Ｃ）、Ｔｙｒ（Ｙ）、Ａｓｎ（Ｎ）、Ｇｌｎ（Ｑ）

（３）酸性：Ａｓｐ（Ｄ）、Ｇｌｕ（Ｅ）

（４）塩基性：溶解（Ｋ）、Ａｒｇ（Ｒ）、Ｈｉｓ（Ｈ）

【０２０１】

あるいは、天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて群分けされ得る。

（１）疎水性：ノルロイシン、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ

（２）中性親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ

（３）酸性：Ａｓｐ、Ｇｌｕ
（４）塩基性：Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ
（５）鎖配向に影響を及ぼす残基：Ｇｌｙ、Ｐｒｏ
（６）芳香族：Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ。
【０２０２】
非保存的置換は、これらのクラスのうちの１つのあるメンバーを別のクラスと交換することを伴う。
【０２０３】
抗体の適切な立体配座の維持に関与しないいかなるシステイン残基も、一般にセリンで置換されて、分子の酸化的安定性を改善し、異常な架橋を阻止することができる。逆に、システイン結合（複数可）がポリペプチドに付加されて、その安定性を改善することができる（具体的には、抗体がＦｖ断片等の抗体断片である場合）。
【０２０４】
置換変異形の一例は、親抗体（例えば、ヒト化抗体）の１つ以上の超可変領域残基の置換を伴う。一般に、更なる開発のために選択された結果として生じる変異形（複数可）は、それらが生成される親抗体と比較して改善された生物学的特性を有する。かかる置換変異形を生成するための好都合な方法は、ファージディスプレイを使用した親和性成熟を伴う。簡潔には、いくつかの超可変領域部位（例えば、６～７つの部位）が変異されて、各部位に全ての可能なアミノ置換を生成する。そのように生成された抗体変異形は、各粒子内にパッケージングされたＭ１３の遺伝子ＩＩＩ産物への融合物として、線維状ファージ粒子から一価様式でディスプレイされる。その後、ファージディスプレイされた変異形は、本明細書に開示されるそれらの生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。修飾のための候補超可変領域部位を特定するために、アラニンスキャニング変異誘発を行って、抗原結合に著しく寄与する超可変領域残基を特定することができる。あるいは、または加えて、抗原－抗体複合体の結晶構造を分析して、抗体と標的との間の接触点を特定することが有益であり得る。かかる接触残基及び隣接残基は、本明細書に詳述される技法に従う置換の候補である。かかる変異形が生成されると、変異形のパネルが本明細書に記載されるスクリーニングに供され、１つ以上の関連アッセイにおいて優れた特性を有する抗体が更なる開発のために選択され得る。
【０２０５】
ポリペプチドの別の種類のアミノ酸変異形は、抗体の元のグリコシル化パターンを改変する。ポリペプチドは、非アミノ酸部分を含み得る。例えば、ポリペプチドは、グリコシル化され得る。かかるグリコシル化は、宿主細胞または宿主生物でのポリペプチドの発現中に天然に存在し得るか、またはヒト介入に起因する計画的な修飾であり得る。改変とは、ポリペプチドに見られる１つ以上の炭水化物部分の欠失、及び／またはポリペプチド中に存在しない１つ以上のグリコシル化部位の付加を意味する。
【０２０６】
ポリペプチドのグリコシル化は、典型的には、Ｎ結合またはＯ結合のいずれかである。Ｎ結合とは、炭水化物部分のアスパラギン残基の側鎖への結合を指す。トリペプチド配列であるアスパラギン－Ｘ－セリン及びアスパラギン－Ｘ－トレオニン（式中、Ｘは、プロリン以外の任意のアミノ酸である）は、炭水化物部分のアスパラギン側鎖への酵素結合の認識配列である。したがって、ポリペプチド中でのこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在により、潜在的なグリコシル化部位が作製される。Ｏ結合グリコシル化とは、糖類であるＮ－アセイルガラクトサミン（ａｃｅｙｌｇａｌａｃｔｏｓａｍｉｎｅ）、ガラクトース、またはキシロースのうちの１つのヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはトレオニンへの結合を指すが、５－ヒドロキシプロリンまたは５－ヒドロキシリジンも使用され得る。
【０２０７】
グリコシル化部位のポリペプチドへの付加は、（Ｎ結合グリコシル化部位のための）上述のトリペプチド配列のうちの１つ以上を含有するようにアミノ酸配列を改変することによ

って、好都合に達成される。改変は、（Ｏ結合グリコシル化部位のための）元の抗体の配列への１つ以上のセリンまたはトレオニン残基の付加、またはそれによる置換によっても行われ得る。

【０２０８】

ポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的もしくは酵素的に、またはグリコシル化の標的としての機能を果たすアミノ酸残基をコードするコドンの変異置換によって達成され得る。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、様々なエンド－及びエキソ－グリコシダーゼの使用によって達成され得る。

【０２０９】

他の修飾としては、それぞれ、グルタミニル残基及びアスパラギニル残基の対応するグルタミル残基及びアスパルチル残基への脱アミド化、プロリン及びリジンのヒドロキシル化、セリルまたはトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖のγ－アミノ基のメチル化、Ｎ末端アミンのアセチル化、ならびに任意のＣ末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

【０２１０】

キメラポリペプチド

本明細書に記載のポリペプチドは、別の異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列に融合したポリペプチドを含むキメラ分子を形成するような方法で修飾され得る。いくつかの実施形態では、キメラ分子は、ポリペプチドと、抗タグ抗体が選択的に結合し得るエピトープを提供するタグポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般に、ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端に位置する。ポリペプチドのかかるエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を使用して検出され得る。エピトープタグの提供により、抗タグ抗体またはエピトープタグに結合する別の種類の親和性マトリックスを使用して、ポリペプチドが親和性精製によって容易に精製されることも可能になる。

【０２１１】

多重特異性抗体

ある特定の実施形態では、本明細書に提供される抗体は、多重特異性抗体、例えば、二重特異性抗体である。ある特定の実施形態では、多重特異性抗体は、少なくとも２つの異なる部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある特定の実施形態では、結合特異性の一方は１つの抗原に対するものであり、他方は任意の他の抗原に対するものである。ある特定の実施形態では、二重特異性抗体は、同じ抗原の２つの異なるエピトープに結合し得る。二重特異性抗体を使用して、特定の抗原を発現する細胞に細胞毒性剤を局在化させることもできる。二重特異性抗体は、全長抗体または抗体断片として調製され得る。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、１つのアームがＩＬ１３に結合し、１つのアームがＩＬ１７に結合する二重特異性抗体である。

【０２１２】

多重特異性抗体を作製するための技法としては、異なる特異性を有する２つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖対の組換え同時発現（Ｍｉｌｓｔｅｉｎ ａｎｄ Ｃｕｅｌｌｏ，Ｎａｔｕｒｅ３０５：５３７（１９８３）、ＷＯ９３／０８８２９、及びＴｒａｕｎｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．１０：３６５５（１９９１）を参照されたい）、ならびに「ノブ・イン・ホール」操作（例えば、米国特許第５，７３１，１６８号を参照されたい）、ならびに加えて、二重特異性抗体の半分の抗原結合断片（Ｆａｂ）内の１つ以上の重鎖及び軽鎖ドメインの交換（ＣｒｏｓｓＭａｂ、ＷＯ２００９／０８０２５１、ＷＯ２００９／０８０２５２、ＷＯ２００９／０８０２５３、及びＷＯ２００９／０８０２５４を参照されたい）が挙げられるが、これらに限定されない。多重特異性抗体はまた、静電ステアリング効果を操作して、抗体Ｆｃ－ヘテロ二量体分子を作製すること（ＷＯ２００９／０８９００４Ａ１）、２つ以上の抗体または断片を架橋すること（例えば、米国特許第４，６７６，９８０号、及びＢｒｅｎｎａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２９：８１（１９８５）を参照されたい）、ロイシンジッパーを使用して、二重特異性抗体を産生すること（例えば、Ｋｏｓｔｅｌｎｙ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４８（５）

：１５４７－１５５３（１９９２）を参照されたい）、「ダイアボディ」技法を使用して、二重特異性抗体断片を作製すること（例えば、Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：６４４４－６４４８（１９９３）を参照されたい）、ならびに一本鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）二量体を使用すること（例えば、Ｇｒｕｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５２：５３６８（１９９４）を参照されたい）、ならびに例えば、Ｔｕｔｔ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：６０（１９９１）に記載される三重特異性抗体を調製することによって、作製され得る。以下に考察されるように、いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、細胞（例えば、ＦｋｐＡを発現するＥ．ｃｏｌｉ細胞）内で半抗体を生成し、この半抗体を単離し、この半抗体を二重特異性抗体へと組み立てることによって調製される。

【０２１３】

「オクトパス抗体」を含む、３つ以上の機能的抗原結合部位を有する操作された抗体もまた、本明細書に含まれる（例えば、ＵＳ２００６／００２５５７６Ａ１を参照されたい）。

【０２１４】

本明細書の抗体または断片には、１つの抗原及び別の異なる抗原に結合する抗原結合部位を含む「二重作用ＦＡｂ」または「ＤＡＦ」も含まれる（例えば、ＵＳ２００８／００６９８２０を参照されたい）。

【０２１５】

二重特異性抗体の作製方法は、当該技術分野で既知である。従来、二重特異性抗体の組換え産生は、２つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖対の同時発現に基づいており、これらの２つの重鎖は、異なる特異性を有する（Ｍｉｌｓｔｅｉｎ ａｎｄ Ｃｕｅｌｌｏ，Ｎａｔｕｒｅ３０５：５３７（１９８３））。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のランダムな組み合わせのため、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、１０個の異なる抗体分子の混合物を産生する可能性があり、それらのうちの１つのみが正しい二重特異性構造を有する。通常親和性クロマトグラフィーステップによって行われる正しい分子の精製は幾分厄介であり、産物収率は低い。同様の手順が、１９９３年５月１３日公開のＷＯ９３／０８８２９、及びＴｒａｕｎｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．，１０：３６５５（１９９１）に開示されている。

【０２１６】

異なるアプローチに従って、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン（抗体－抗原組み合わせ部位）が、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合される。融合は、好ましくは、ヒンジ、ＣＨ２、及びＣＨ３領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。融合物のうちの少なくとも１つに存在する軽鎖結合に必要な部位を含有する、第１の重鎖定常領域（ＣＨ１）を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物、及び所望の場合、免疫グロブリン軽鎖融合物をコードするＤＮＡが、別個の発現ベクターに挿入され、好適な宿主生物に同時トランスフェクトされる。これにより、構築に使用される不均等な比率の３つのポリペプチド鎖が最適収率を提供する実施形態において、３つのポリペプチド断片の相互割合を調整する際に優れた柔軟性が提供される。しかしながら、等しい比率での少なくとも２つのポリペプチド鎖の発現が高収率をもたらす場合、またはそれらの比率が特に重要でない場合に、２つまたは３つ全てのポリペプチド鎖をコードする配列を１つの発現ベクターに挿入することが可能である。

【０２１７】

このアプローチの一実施形態では、二重特異性抗体は、一方のアームにある第１の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖と、他方のアームにある（第２の結合特異性を提供する）ハイブリッド免疫グロブリン重鎖－軽鎖対とからなる。二重特異性分子の半分のみでの免疫グロブリン軽鎖の存在により容易な分離方法が提供されるため、この非対称構造が、望ましくない免疫グロブリン鎖の組み合わせからの所望の二重特異性化合物の分離を容易にすることが見出された。このアプローチは、ＷＯ９４／０４６９０に開示されている。二重特異性抗体の生成についての更なる詳細については、例えば、Ｓｕｒｅｓｈ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１２１：２１０（１

９８６）を参照されたい。
【０２１８】
別のアプローチに従って、抗体分子の対間の界面は、組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体の割合を最大にするように操作され得る。好ましい界面は、抗体定常ドメインのＣＨ３ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第１の抗体分子の界面由来の１つ以上の小さいアミノ酸側鎖は、より大きい側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）に置き換えられる（ノブまたは隆起）。大きい側鎖（複数可）と同一または同様の大きさの補償「空洞」（ホール）は、大きいアミノ酸側鎖をより小さいアミノ酸側鎖（例えば、アラニンまたはトレオニン）に置き換えることによって、第２の抗体分子の界面上に作製される。これにより、ホモ二量体等の他の望ましくない最終産物と比べてヘテロ二量体の収率を増加させるための機構が提供される。ノブ及びホールは、本明細書に更に記載されている。
【０２１９】
ノブ・イン・ホール
多重特異性抗体及び／またはーアーム抗体及び／またはイムノアドヘシンの産生方法としてノブ・イン・ホールを使用することは、当該技術分野で周知である。Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈに譲渡された米国特許第５，７３１，１６８号（１９９８年3月２４日付与）を参照されたい。多重特異性抗体の生成方法を記載する他の参考文献としては、Ａｍｇｅｎに譲渡されたＰＣＴ公開第ＷＯ２００９０８９００４号（２００９年7月１６日公開）、及びＮｏｖｏ Ｎｏｒｄｉｓｋ Ａ／Ｓに譲渡された米国特許公開第２００９０１８２１２７号（２００９年7月１６日公開）が挙げられる。Ｍａｒｖｉｎ ａｎｄ Ｚｈｕ，Ａｃｔａ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａ Ｓｉｎｃｉａ（２００５）２６（６）：６４９－６５８及びＫｏｎｔｅｒｍａｎｎ（２００５）Ａｃｔａ Ｐｈａｒａｃｏｌ．Ｓｉｎ．，２６：１－９もまた参照されたい。簡潔な考察が、本明細書に提供されている。
【０２２０】
「隆起」とは、第１のポリペプチドの界面から突出し、それ故に隣接した界面（すなわち、第２のポリペプチドの界面）の補償空洞内に位置付け可能になるために、例えば、ヘテロ多量体を安定させ、それによりホモ多量体形成よりもヘテロ多量体形成を好むようになる、少なくとも１つのアミノ酸側鎖を指す。隆起は、元の界面に存在し得るか、または合成的に（例えば、界面をコードする核酸を改変することによって）導入され得る。通常、第１のポリペプチドの界面をコードする核酸は、隆起をコードするように改変される。これを達成するために、第１のポリペプチドの界面の少なくとも１つの「元の」アミノ酸残基をコードする核酸が、元のアミノ酸残基よりも大きい側鎖体積を有する少なくとも１つの「移入」アミノ酸残基をコードする核酸で置き換えられる。２つ以上の元の残基及び対応する移入残基が存在し得ることが、理解される。置き換えられる元の残基の数の上限は、第１のポリペプチドの界面における残基の総数である。様々なアミノ残基の側鎖体積が、以下の表に示される。
表２。アミノ酸の特性

アミノ酸	一文字略語	ＭＡＳＳ[a]（ダルトン）	体積[b]（オングストローム^3）	アクセス可能な表面積[c]（オングストローム^2）
アラニン（Ａｌａ）	Ａ	７１．０８	８８．６	１１５
アルギニン（Ａｒｇ）	Ｒ	１５６．２０	１７３．４	２２５
アスパラギン（Ａｓｎ）	Ｎ	１１４．１１	１１７．７	１６０
アスパラギン酸（Ａｓｐ）	Ｄ	１１５．０９	１１１．１	１５０
システイン（Ｃｙｓ）	Ｃ	１０３．１４	１０８．５	１３５
グルタミン（Ｇｌｎ）	Ｑ	１２８．１４	１４３．９	１８０
グルタミン酸（Ｇｌｕ）	Ｅ	１２９．１２	１３８．４	１９０
グリシン（Ｇｌｙ）	Ｇ	５７．０６	６０．１	７５
ヒスチジン（Ｈｉｓ）	Ｈ	１３７．１５	１５３．２	１９５
イソロイシン（Ｉｌｅ）	Ｉ	１１３．１７	１６６．７	１７５
ロイシン（Ｌｅｕ）	Ｌ	１１３．１７	１６６．７	１７０
リジン（Ｌｙｓ）	Ｋ	１２８．１８	１６８．６	２００
メチオニン（Ｍｅｔ）	Ｍ	１３１．２１	１６２．９	１８５
フェニルアリニン（Ｐｈｅｎｙｌａｌａｉｎｉｎｅ）（Ｐｈｅ）	Ｆ	１４７．１８	１８９．９	２１０
プロリン（Ｐｒｏ）	Ｐ	９７．１２	１２２．７	１４５
セリン（Ｓｅｒ）	Ｓ	８７．０８	８９．０	１１５
トレオニン（Ｔｈｒ）	Ｔ	１０１．１１	１１６．１	１４０
トリプトファン（Ｔｒｐ）	Ｗ	１８６．２１	２２７．８	２５５
チロシン（Ｔｙｒ）	Ｙ	１６３．１８	１９３．６	２３０
バリン（Ｖａｌ）	Ｖ	９９．１４	１４０．０	１５５

ａ水の分子量を差し引いたアミノ酸の分子量。Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｐｈｙｓｉｃｓ，４３ｒｄ ｅｄ．Ｃｌｅｖｅｌａｎｄ，Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｕｂｂｅｒ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，１９６１からの値。
ｂＡ．Ａ．Ｚａｍｙａｔｎｉｎ，Ｐｒｏｇ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２４：１０７－１２３，１９７２からの値。
ｃＣ．Ｃｈｏｔｈｉａ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１０５：１－１４，１９７５からの値。アクセス可能な表面積は、この参考文献の図６～２０に定義されている。

【０２２１】

隆起の形成に好ましい移入残基は、一般に、天然に存在するアミノ酸残基であり、好ましくはアルギニン（Ｒ）、フェニルアラニン（Ｆ）、チロシン（Ｙ）、及びトリプトファン（Ｗ）から選択される。トリプトファン及びチロシンが最も好ましい。一実施形態では、

隆起を形成するための元の残基は、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、セリン、トレオニン、またはバリン等の小さい側鎖体積を有する。隆起を形成するためのＣＨ３ドメインにおける例示的なアミノ酸置換としては、Ｔ３６６Ｗ置換が挙げられるが、これに限定されない。

【０２２２】

「空洞」とは、第２のポリペプチドの界面から凹んでおり、それ故に隣接する第１のポリペプチドの界面上の対応する隆起を収容する少なくとも１つのアミノ酸側鎖を指す。空洞は、元の界面に存在しても、合成的に（例えば、界面をコードする核酸を改変することによって）導入されてもよい。通常、第２のポリペプチドの界面をコードする核酸は、空洞をコードするように改変される。これを達成するために、第２のポリペプチドの界面の少なくとも１つの「元の」アミノ酸残基をコードする核酸が、元のアミノ酸残基よりも小さい側鎖体積を有する少なくとも１つの「移入」アミノ酸残基をコードするＤＮＡに置き換えられる。２つ以上の元の残基及び対応する移入残基が存在し得ることが、理解される。置き換えられる元の残基の数の上限は、第２のポリペプチドの界面における残基の総数である。様々なアミノ残基の側鎖体積が、上記の表２に示されている。空洞の形成に好ましい移入残基は、通常、天然に存在するアミノ酸残基であり、好ましくはアラニン（Ａ）、セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）、及びバリン（Ｖ）から選択される。セリン、アラニン、またはトレオニンが最も好ましい。一実施形態では、空洞を形成するための元の残基は、チロシン、アルギニン、フェニルアラニン、またはトリプトファン等の大きい側鎖体積を有する。空洞を生成するためのＣＨ３ドメインにおける例示的なアミノ酸置換としては、Ｔ３６６Ｓ置換、Ｌ３６８Ａ置換、及びＹ４０７Ａ置換が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２２３】

「元の」アミノ酸残基とは、元の残基よりも小さいまたは大きい側鎖体積を有し得る「移入」残基に置き換えられるものである。移入アミノ酸残基は、天然に存在するか、または天然に存在しないアミノ酸残基であり得るが、好ましくは、天然に存在するアミノ酸残基である。「天然に存在する」アミノ酸残基とは、遺伝子コードによってコードされ、上記の表２に列挙される残基である。「天然に存在しない」アミノ酸残基とは、遺伝子コードによってコードされないが、ポリペプチド鎖内の隣接するアミノ酸残基（複数可）に共有結合することができる残基を意味する。天然に存在しないアミノ酸残基の例は、ノルロイシン、オルニチン、ノルバリン、ホモセリン、及びＥｌｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍ．２０２：３０１－３３６（１９９１）に記載されるもの等の他のアミノ酸残基類似体である。かかる天然に存在しないアミノ酸残基を生成するために、Ｎｏｒｅｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ２４４：１８２（１９８９）及びＥｌｌｍａｎら（上記）の手順が使用され得る。簡潔には、これは、天然に存在しないアミノ酸残基を有するサプレッサーｔＲＮＡの化学的活性化、その後のＲＮＡのインビトロ転写及び翻訳を伴う。本発明の方法は、少なくとも１つの元のアミノ酸残基の置き換えを伴うが、２つ以上の元の残基が置き換えられてもよい。通常、第１または第２のポリペプチドの界面における合計残基より多くが、置き換えられる元のアミノ酸残基を含むことはない。典型的には、置き換えられる元の残基は「埋められる」。「埋められる」とは、残基が溶媒に本質的にアクセス不能であることを意味する。一般に、移入残基は、ジスルフィド結合の可能な酸化または誤対合を阻止するために、システインではない。

【０２２４】

隆起は、空洞内で「位置付け可能」であり、これは、第１のポリペプチド及び第２のポリペプチドそれぞれの界面の隆起及び空洞の空間的位置、ならびに隆起及び空洞の大きさが、界面での第１のポリペプチドと第２のポリペプチドとの正常な会合を著しく乱すことなく隆起が空洞内に位置し得るようなものであることを意味する。Ｔｙｒ、Ｐｈｅ、及びＴｒｐ等の隆起が、典型的には、界面の軸から垂直には延びず、好ましい立体配座を有しないため、隆起と対応する空洞との整列は、Ｘ線結晶学または核磁気共鳴（ＮＭＲ）によって得られるもの等の三次元構造に基づく隆起／空洞対のモデリングに依存する。これは、

当該技術分野で広く受け入れられている技法を使用して達成され得る。
【０２２５】
「元のまたは鋳型核酸」とは、隆起または空洞をコードするように「改変され」得る（すなわち、遺伝子操作され変異され得る）目的とするポリペプチドをコードする核酸を意味する。元のまたは開始核酸は、天然に存在する核酸であり得るか、または事前改変に供されている核酸（例えば、ヒト化抗体断片）を含み得る。核酸を「改変する」とは、元の核酸が、目的とするアミノ酸残基をコードする少なくとも１つのコドンの挿入、欠失、または置き換えによって変異されることを意味する。通常、元の残基をコードするコドンは、移入残基をコードするコドンに置き換えられる。この様式でＤＮＡを遺伝子修飾するための技法は、Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ：ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｍ．Ｊ．ＭｃＰｈｅｒｓｏｎ，Ｅｄ．，（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ，ＵＫ．（１９９１）に概説されており、例えば、部位特異的変異誘発、カセット変異誘発、及びポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）変異誘発を含む。元の／鋳型核酸を変異させることによって、元の／鋳型核酸によってコードされた元の／鋳型ポリペプチドが、それに従って対応して改変される。
【０２２６】
隆起または空洞は、合成手段によって、例えば、組換え技法、インビトロペプチド合成、前述の天然に存在しないアミノ酸残基を導入するための技法、ペプチドの酵素または化学的カップリング、またはこれらの技法のいくつかの組み合わせによって、第１または第２のポリペプチドの界面に「導入」され得る。したがって、「導入」される隆起または空洞は、「天然に存在しない」か、または「非天然」であり、これは、それが天然または元のポリペプチド（例えば、ヒト化モノクローナル抗体）には存在しないことを意味する。
【０２２７】
一般に、隆起を形成するための移入アミノ酸残基は、比較的少数の「回転異性体」（例えば、約３～６つ）を有する。「回転異性体」とは、アミノ酸側鎖のエネルギー的に好ましい立体配座である。様々なアミノ酸残基の回転異性体の数は、Ｐｏｎｄｅｒｓ ａｎｄ Ｒｉｃｈａｒｄｓ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９３：７７５－７９１（１９８７）に概説される。
【０２２８】
一実施形態では、第１のＦｃポリペプチド及び第２のＦｃポリペプチドは、界面で交わる／相互作用する。第１のＦｃポリペプチド及び第２のＦｃポリペプチドが界面で交わるいくつかの実施形態では、第２のＦｃポリペプチドの界面（配列）は、第１のＦｃポリペプチドの界面（配列）の空洞（「ホール」とも称される）内に位置付け可能な隆起（「ノブ」とも称される）を含む。一実施形態では、第１のＦｃポリペプチドが、空洞をコードするように鋳型／元のポリペプチドから改変されているか、または第２のＦｃポリペプチドが、隆起をコードするように鋳型／元のポリペプチドから改変されているか、またはこれらの両方である。一実施形態では、第１のＦｃポリペプチドが、空洞をコードするように鋳型／元のポリペプチドから改変されており、かつ第２のＦｃポリペプチドが、隆起をコードするように鋳型／元のポリペプチドから改変されている。一実施形態では、第２のＦｃポリペプチドの界面が、第１のＦｃポリペプチドの界面の空洞内に位置付け可能な隆起を含み、空洞もしくは隆起またはこれらの両方がそれぞれ、第１のＦｃポリペプチド及び第２のＦｃポリペプチドの界面に導入されている。第１のＦｃポリペプチド及び第２のＦｃポリペプチドが界面で交わるいくつかの実施形態では、第１のＦｃポリペプチド（配列）の界面は、第２のＦｃポリペプチドの界面（配列）の空洞内に位置付け可能な隆起を含む。一実施形態では、第２のＦｃポリペプチドが、空洞をコードするように鋳型／元のポリペプチドから改変されているか、または第１のＦｃポリペプチドが、隆起をコードするように鋳型／元のポリペプチドから改変されているか、またはこれらの両方である。一実施形態では、第２のＦｃポリペプチドが、空洞をコードするように鋳型／元のポリペプチドから改変されており、かつ第１のＦｃポリペプチドが、隆起をコードするように鋳型／元のポリペプチドから改変されている。一実施形態では、第１のＦｃポリペプチドの界面

が、第２のＦｃポリペプチドの界面の空洞内に位置付け可能な隆起を含み、隆起もしくは空洞またはこれらの両方がそれぞれ、第１のＦｃポリペプチド及び第２のＦｃポリペプチドの界面に導入されている。

【０２２９】

一実施形態では、隆起及び空洞は各々、天然に存在するアミノ酸残基を含む。一実施形態では、隆起を含むＦｃポリペプチドは、鋳型／元のポリペプチドの界面由来の元の残基を、元の残基よりも大きい側鎖体積を有する移入残基に置き換えることによって生成される。一実施形態では、隆起を含むＦｃポリペプチドは、該ポリペプチドの界面由来の元の残基をコードするポリヌクレオチドが、元の残基よりも大きい側鎖体積を有する移入残基をコードするポリヌクレオチドに置き換えられるステップを含む方法によって、生成される。一実施形態では、元の残基は、トレオニンである。一実施形態では、元の残基は、Ｔ３６６である。一実施形態では、移入残基は、アルギニン（Ｒ）である。一実施形態では、移入残基は、フェニルアラニン（Ｆ）である。一実施形態では、移入残基は、チロシン（Ｙ）である。一実施形態では、移入残基は、トリプトファン（Ｗ）である。一実施形態では、移入残基は、Ｒ、Ｆ、Ｙ、またはWである。一実施形態では、隆起は、鋳型／元のポリペプチドの２つ以上の残基を置き換えることによって生成される。一実施形態では、隆起を含むＦｃポリペプチドは、３６６位のトレオニンのトリプトファンでの置き換えを含む（アミノ酸番号付けは、Ｋａｂａｔら（ｐｐ．６８８－６９６ｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ ｅｄ．，Ｖｏｌ．１（１９９１；ＮＩＨ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ））のＥＵ番号付けスキームに従う）。

【０２３０】

いくつかの実施形態では、空洞を含むＦｃポリペプチドは、鋳型／元のポリペプチドの界面の元の残基を、元の残基よりも小さい側鎖体積を有する移入残基に置き換えることによって生成される。例えば、空洞を含むＦｃポリペプチドは、該ポリペプチドの界面由来の元の残基をコードするポリヌクレオチドが、元の残基よりも小さい側鎖体積を有する移入残基をコードするポリヌクレオチドで置き換えられるステップを含む方法によって、生成され得る。一実施形態では、元の残基は、トレオニンである。一実施形態では、元の残基は、ロイシンである。一実施形態では、元の残基は、チロシンである。一実施形態では、移入残基は、システイン（Ｃ）ではない。一実施形態では、移入残基は、アラニン（Ａ）である。一実施形態では、移入残基は、セリン（Ｓ）である。一実施形態では、移入残基は、トレオニン（Ｔ）である。一実施形態では、移入残基は、バリン（Ｖ）である。空洞は、鋳型／元のポリペプチドの１つ以上の元の残基を置き換えることによって生成され得る。例えば、一実施形態では、空洞を含むＦｃポリペプチドは、トレオニン、ロイシン、及びチロシンからなる群から選択される２つ以上の元のアミノ酸の置き換えを含む。一実施形態では、空洞を含むＦｃポリペプチドは、アラニン、セリン、トレオニン、及びバリンからなる群から選択される２つ以上の移入残基を含む。いくつかの実施形態では、空洞を含むＦｃポリペプチドは、トレオニン、ロイシン、及びチロシンからなる群から選択される２つ以上の元のアミノ酸の置き換えを含み、該元のアミノ酸は、アラニン、セリン、トレオニン、及びバリンからなる群から選択される移入残基に置き換えられる。いくつかの実施形態では、置き換えられる元のアミノ酸は、Ｔ３６６、Ｌ３６８、及び／またはＹ４０７である。一実施形態では、空洞を含むＦｃポリペプチドは、３６６位のトレオニンのセリンでの置き換えを含む（アミノ酸番号付けは、Ｋａｂａｔら（上記）のＥＵ番号付けスキームに従う）。一実施形態では、空洞を含むＦｃポリペプチドは、３６８位のロイシンのアラニンでの置き換えを含む（アミノ酸番号付けは、Ｋａｂａｔら（上記）のＥＵ番号付けスキームに従う）。一実施形態では、空洞を含むＦｃポリペプチドは、４０７位のチロシンのバリンでの置き換えを含む（アミノ酸番号付けは、Ｋａｂａｔら（上記）のＥＵ番号付けスキームに従う）。一実施形態では、空洞を含むＦｃポリペプチドは、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、及びＹ４０７Ｖからなる群から選択される２つ以上のアミノ酸置き換えを含む（アミノ酸番号付けは、Ｋａｂａｔら（上記）のＥＵ番号付けスキームに従う

）。これらの抗体断片のいくつかの実施形態では、隆起を含むＦｃポリペプチドは、３６６位のトレオニンのトリプトファンでの置き換えを含む（アミノ酸番号付けは、Ｋａｂａｔら（上記）のＥＵ番号付けスキームに従う）。

【０２３１】

一実施形態では、本抗体は、ＷＯ２００５／０６３８１６に記載される「ノブ」及び「ホール」を構成するＦｃ変異を含む。例えば、ホール変異は、ＦｃポリペプチドにおけるＴ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、及び／またはＹ４０７Ｖのうちの１つ以上であり得、ノブ変異は、Ｔ３６６Ｗであり得る。

【０２３２】

本発明の一態様において、多重特異性抗体が精製され、本抗体は第１の半抗体及び第２の半抗体を含み、第１の半抗体はＩＬ－１７に結合する第１のＶＨ／ＶＬ単位を含み、第２の半抗体はＩＬ－１３に結合する第２のＶＨ／ＶＬ単位を含む。いくつかの実施形態では、第１の半抗体はＩＬ－１３には結合せず、第２の半抗体はＩＬ－１７には結合しない。

【０２３３】

ＩＬ－１７ファミリーには６つのメンバー、つまり、ＩＬ－１７Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、及びＦが存在する。ＩＬ－１７ファミリーのメンバーはホモ二量体を形成し、ＩＬ－１７Ａ及びＩＬ－１７Ｆはヘテロ二量体を更に形成する。例えば、Ｇａｆｆｅｎ，Ｓ．Ｌ．，２００９，Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗ９：５５６－５６７、Ｈｙｍｏｗｉｔｚ　ｅｔ　ａｌ．，２００１，ＥＭＢＯ　Ｊ．２０：５３３２－４１、及びＷＯ２００５／０１００４４を参照されたい。ＩＬ－１７は、当該技術分野では、ＩＬ－１７ファミリーのプロトタイプであるＩＬ－１７Ａを指すために使用される場合がある。ある特定の実施形態では、本明細書に提供される多重特異性抗体は、ＩＬ－１３及びＩＬ－１７ＡＡに結合し、それらの活性を阻害する。

【０２３４】

ある特定の実施形態では、本明細書に提供される多重特異性抗体は、ＩＬ－１７ＡＡ、ＩＬ－１７ＡＦ、及びＩＬ－１７ＦＦに結合し、ＩＬ－１７ＡＡ誘導性活性、ＩＬ－１７ＡＦ誘導性活性、及びＩＬ－１７ＦＦ誘導性活性を阻害し、またＩＬ－１３誘導性活性を阻害する。ある特定の実施形態では、抗ＩＬ－１３／ＩＬ－１７二重特異性抗体は、抗ＩＬ－１３／ＩＬ－１７ＡＡ、ＦＦ、及びＡＦ抗体を指す。ある特定のかかる実施形態では、抗ＩＬ－１３／ＩＬ－１７ＡＡ、ＡＦ、及びＦＦ二重特異性抗体は、ＩＬ－１７ＡまたはＩＬ－１７Ｆ単独によって誘導される活性とは対照的に、ＩＬ－１７Ａ及びＦサイトカインの全てによって誘導される活性を有利に遮断する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される多重特異性抗体は、ＩＬ－１７ＡＡ、ＩＬ－１７ＡＦ、及びＩＬ－１７ＦＦに結合する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１７ＡＡ誘導性活性は、ＩＬ－１７ＡＡ誘導性遺伝子発現及び／またはインビボもしくはインビトロでの細胞の増殖である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１７ＡＦ誘導性活性は、ＩＬ－１７ＡＦ誘導性遺伝子発現及び／またはインビボもしくはインビトロでの細胞の増殖である。いくつかのかかる実施形態では、ＩＬ－１７ＦＦ誘導性活性は、ＩＬ－１７ＦＦ誘導性遺伝子発現及び／またはインビボもしくはインビトロでの細胞の増殖である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１３誘導性活性は、ＩＬ－１３誘導性遺伝子発現及び／またはインビボもしくはインビトロでの細胞の増殖である。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される多重特異性抗体は、ＩＬ－１３のＩＬ－１３Ｒα１への結合を阻害しない。

【０２３５】

いくつかの実施形態では、抗ＩＬ１３／ＩＬ１７ＡＡ　ＡＦ　ＦＦ二重特異性抗体は、第１の半抗体及び第２の半抗体を含み、第１の半抗体は、ＩＬ－１７ＡＡ、ＡＦ、及びＦＦに結合する第１のＶＨ／ＶＬ単位を含み、第２の半抗体は、ＩＬ－１３に結合する第２のＶＨ／ＶＬ単位を含み、第１のＶＨ／ＶＬ単位は、配列番号２０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号２１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号２２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ

３を含み、第２のＶＨ／ＶＬ単位は、配列番号９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号１０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、第１の半抗体はＩＬ－１３には結合せず、第２の半抗体はＩＬ－１７には結合しない。

【０２３６】

いくつかの実施形態では、第１のＶＨ／ＶＬ単位は、配列番号１８のアミノ酸配列と少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の配列同一性を有するＶＨ配列、及び配列番号１９のアミノ酸配列と少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の配列同一性を有するＶＬ配列を含み、第２のＶＨ／ＶＬ単位は、配列番号７のアミノ酸配列と少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の配列同一性を有するＶＨ配列、及び配列番号８のアミノ酸配列と少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の配列同一性を有するＶＬ配列を含む。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体が提供され、第１のＶＨ／ＶＬ単位は、配列番号１８のアミノ酸配列を有するＶＨ配列及び配列番号１９のアミノ酸配列を有するＶＬ配列を含み、第２のＶＨ／ＶＬ単位は、配列番号７のアミノ酸配列を有するＶＨ配列及び配列番号８のアミノ酸配列を有するＶＬ配列を含む。

【０２３７】

ある特定の実施形態では、第１の半抗体は、配列番号２６のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号２８のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むＩＬ１７ＡＡ、ＡＦ、及びＦＦに結合し、第２の半抗体は、配列番号１５のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号１７のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むＩＬ１３に結合する。ある特定の実施形態では、第１の半抗体は、配列番号２７のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号２８のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むＩＬ１７ＡＡ、ＡＦ、及びＦＦに結合し、第２の半抗体は、配列番号１６のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号１７のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むＩＬ１３に結合する。抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７抗体に関連する配列を、表３に提示する。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ／ＵＳ２０１５／０１７１６（ＷＯ２０１５／１２７４０５）を参照されたい。

表３

配列番号	説明	配列
４	ヒトＩＬ－１３前駆体（Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ受託番号Ｐ３５２２５．２）	MALLLT TVIALTCLGG FASPGPVPPS TALRELIEEL VNITQNQKAP LCNGSMVWSI NLTAGMYCAA LESLINVSGC SAIEKTQRML SGFCPHKVSA GQFSSLHVRD TKIEVAQFVK DLLLHLKKLF REGRFN
５	ヒトＩＬ－１３、成熟形態（シグナル伝達配列を有しない）	SP GPVPPSTALR ELIEELVNIT QNQKAPLCNG SMVWSINLTA GMYCAALESL INVSGCSAIE KTQRMLSGFC PHKVSAGQFS SLHVRDTKIE VAQFVKDLLL HLKKLFREGR FN
６	ヒトＩＬ－１７Ａ前駆体（Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ受託番号Ｑ１６５５２．１）	MTPGKTSLVS LLLLLSLEAI VKAGITIPRN PGCPNSEDKN FPRTVMVNLN IHNRNTNTNP KRSSDYYNRS TSPWNLHRNE DPERYPSVIW EAKCRHLGCI NADGNVDYHM NSVPIQQEIL VLRREPPHCP NSFRLEKILV SVGCTCVTPI VHHVA
７	ヒトＩＬ－１７Ａ、成熟形態（シグナル伝達配列を有しない）	GITIPRN PGCPNSEDKN FPRTVMVNLN IHNRNTNTNP KRSSDYYNRS TSPWNLHRNE DPERYPSVIW EAKCRHLGCI NADGNVDYHM NSVPIQQEIL VLRREPPHCP NSFRLEKILV SVGCTCVTPI VHHVA
８	ヒトＩＬ－１７Ｆ前駆体（Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ受託番号Ｑ９６ＰＤ４．３）	MTVKTLHGPA MVKYLLLSIL GLAFLSEAAA RKIPKVGHTF FQKPESCPPV PGGSMKLDIG IINENQRVSM SRNIESRSTS PWNYTVTWDP NRYPSEVVQA QCRNLGCINA QGKEDISMNS VPIQQETLVV RRKHQGCSVS FQLEKVLVTV GCTCVTPVIH HVQ
９	ヒトＩＬ－１７Ｆ、成熟形態（シグナル伝達配列を有しない）	RKIPKVGHTF FQKPESCPPV PGGSMKLDIG IINENQRVSM SRNIESRSTS PWNYTVTWDP NRYPSEVVQA QCRNLGCINA QGKEDISMNS VPIQQETLVV RRKHQGCSVS FQLEKVLVTV GCTCVTPVIH HVQ
１０	抗ＩＬ１３　ＶＨ	EVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTVSGFSLS AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVVL TMTNMDPVDT ATYYCAGDGY YPYAMDNWGQ GSLVTVSS
１１	抗ＩＬ１３　ＶＬ	DIVLTQSPDS LSVSLGERAT INCRASKSVD SYGNSFMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQNNEDPR TFGGGTKVEI KR
１２	抗ＩＬ１３　ＨＶＲＨ１	ＡＹＳＶＮ
１３	抗ＩＬ１３　ＨＶＲＨ２	ＭＩＷＧＤＧＫＩＶＹＮＳＡＬＫＳ
１４	抗ＩＬ１３　ＨＶＲＨ３	ＤＧＹＹＰＹＡＭＤＮ
１５	抗ＩＬ１３　ＨＶＲＬ１	ＲＡＳＫＳＶＤＳＹＧＮＳＦＭＨ

配列番号	説明	配列
１６	抗ＩＬ１３　ＨＶＲＬ２	ＬＡＳＮＬＥＳ
１７	抗ＩＬ１３　ＨＶＲＬ３	ＱＱＮＮＥＤＰＲＴ
１８	Ｃ末端Ｋを有しないヒンジにノブＴ３６６Ｗ　Ｓ２２８Ｐを有する抗ＩＬ１３　ＩｇＧ４重鎖	EVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTVSGFSLS AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVVL TMTNMDPVDT ATYYCAGDGY YPYAMDNWGQ GSLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTKTYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSQEEMTKNQ VSLWCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSLG
１９	ヒンジにノブＴ３６６Ｗ　Ｓ２２８Ｐを有する抗ＩＬ１３　ＩｇＧ４重鎖	EVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTVSGFSLS AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVVL TMTNMDPVDT ATYYCAGDGY YPYAMDNWGQ GSLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTKTYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSQEEMTKNQ VSLWCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSLGK
２０	抗ＩＬ１３軽鎖	DIVLTQSPDS LSVSLGERAT INCRASKSVD SYGNSFMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQNNEDPR TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
２１	抗ＩＬ１７Ａ及びＦ交差反応性ＶＨ	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG INWSSGGIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCARDI GGFGEFYWNF GLWGRGTLVT VSS
２２	抗ＩＬ１７Ａ及びＦ交差反応性ＶＬ	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVR SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPATFG GGTKVEIK
２３	抗ＩＬ１７Ａ及びＦ交差反応性ＨＶＲ－Ｈ１	ＤＹＡＭＨ
２４	抗ＩＬ１７Ａ及びＦ交差反応性ＨＶＲ－Ｈ２	ＧＩＮＷＳＳＧＧＩＧＹＡＤＳＶＫＧ
２５	抗ＩＬ１７Ａ及びＦ交差反応性ＨＶＲ－Ｈ３	ＤＩＧＧＦＧＥＦＹＷＮＦＧＬ

配列番号	説明	配列
２６	抗ＩＬ１７Ａ及びＦ交差反応性ＨＶＲ－Ｌ１	ＲＡＳＱＳＶＲＳＹＬＡ
２７	抗ＩＬ１７Ａ及びＦ交差反応性ＨＶＲ－Ｌ２	ＤＡＳＮＲＡＴ
２８	抗ＩＬ１７Ａ及びＦ交差反応性ＨＶＲ－Ｌ３	ＱＱＲＳＮＷＰＰＡＴ
２９	ホールＴ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ、及びＣ末端Ｋを有しないヒンジＳ２２８Ｐを有する抗ＩＬ１７Ａ及びＦ交差反応性ＩｇＧ４重鎖	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG INWSSGGIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCARDI GGFGEFYWNF GLWGRGTLVT VSSASTKGPS VFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLVSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG
３０	ホールＴ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ、及びヒンジＳ２２８Ｐを有する抗ＩＬ１７Ａ及びＦ交差反応性ＩｇＧ４重鎖	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG INWSSGGIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCARDI GGFGEFYWNF GLWGRGTLVT VSSASTKGPS VFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLVSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK
３１	抗ＩＬ１７Ａ及びＦ交差反応性軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVR SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPATFG GGTKVEIKRT VAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
３２	抗ＩＬ１３　ＶＨコード配列	GAAGTTACCC TGCGCGAGAG CGGCCCAGCC CTGGTGAAGC CAACCCAGAC CCTGACCCTG ACCTGCACCG TCAGCGGCTT CAGCCTGAGC GCCTACAGCG TGAACTGGAT CCGCCAGCCA CCAGGCAAGG CCCTGGAGTG GCTGGCCATG ATCTGGGGCG ACGGCAAGAT CGTGTACAAC AGCGCCCTGA AGAGCCGCCT GACCATCAGC AAGGACACCA GCAAGAACCA GGTGGTGCTG ACCATGACCA ACATGGACCC AGTGGACACC GCCACCTACT ACTGCGCCGG CGACGGCTAC TACCCATACG CCATGGACAA CTGGGGCCAG GGCAGCCTGG TGACCGTGAG CAGC

配列番号	説明	配列
３３	抗ＩＬ１３　ＶＬコード配列	GATATCGTGC TGACCCAGAG CCCAGACAGC CTGTCTGTGA GCCTGGGCGA GCGCGCCACC ATCAACTGCC GCGCCAGCAA AAGCGTGGAC AGCTACGGCA ACAGCTTCAT GCACTGGTAT CAGCAGAAGC CAGGCCAGCC ACCCAAGCTG CTGATCTACC TGGCCAGCAA CCTGGAGAGC GGCGTGCCAG ACCGCTTCAG CGGCAGCGGC AGCGGCACCG ACTTCACCCT GACCATCAGC TCTCTGCAGG CCGAGGATGT GGCCGTGTAC TACTGCCAGC AGAACAACGA GGACCCACGC ACCTTCGGTG GCGGTACCAA GGTGGAGATC AAA
３４	抗ＩＬ１３　ＩｇＧ４　Ｔ３６６Ｗ／Ｓ２２８Ｐ重鎖コード配列、Ｃ末端溶解なし	GAAGTTACCC TGCGCGAGAG CGGCCCAGCC CTGGTGAAGC CAACCCAGAC CCTGACCCTG ACCTGCACCG TCAGCGGCTT CAGCCTGAGC GCCTACAGCG TGAACTGGAT CCGCCAGCCA CCAGGCAAGG CCCTGGAGTG GCTGGCCATG ATCTGGGGCG ACGGCAAGAT CGTGTACAAC AGCGCCCTGA AGAGCCGCCT GACCATCAGC AAGGACACCA GCAAGAACCA GGTGGTGCTG ACCATGACCA ACATGGACCC AGTGGACACC GCCACCTACT ACTGCGCCGG CGACGGCTAC TACCCATACG CCATGGACAA CTGGGGCCAG GGCAGCCTGG TGACCGTGAG CAGCGCTTCC ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCA CCCTGCTCCC GCAGTACTTC TGAGTCCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT CAAGGACTAC TTCCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCCC TGACCAGCGG CGTGCACACC TTCCCGGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACTGTGCCC TCTAGCAGCT TGGGCACCAA GACCTACACG TGCAACGTGG ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA AACGCGTTGA GTCCAAATAT GGTCCCCCAT GCCCACCATG CCCAGCACCT GAGTTCCTGG GGGGACCATC AGTCTTCCTG TTCCCCCCAA AACCCAAGGA CACTCTCATG ATCTCCCGGA CCCCTGAGGT CACGTGCGTG GTGGTGGACG TGAGCCAGGA AGACCCCGAG GTCCAGTTCA ACTGGTACGT GGATGGCGTG GAGGTGCATA ATGCCAAGAC AAAGCCGCGG GAGGAGCAGT TCAACAGCAC GTACCGTGTG GTCAGCGTCC TCACCGTCCT GCACCAGGAC TGGCTGAACG GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG GTCTCCAACA AAGGCCTCCC GTCCTCCATC GAGAAAACCA TCTCCAAAGC CAAAGGGCAG CCCCGAGAGC CACAGGTGTA CACCCTGCCC CCATCCCAGG AGGAGATGAC CAAGAACCAG GTCAGCCTGT GGTGCCTGGT CAAAGGCTTC TACCCCAGCG ACATCGCCGT GGAGTGGGAG AGCAATGGGC AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCCTC CCGTGCTGGA CTCCGACGGC TCCTTCTTCC TCTACAGCAG GCTAACCGTG GACAAGAGCA GGTGGCAGGA GGGGAATGTC TTCTCATGCT CCGTGATGCA TGAGGCTCTG CACAACCACT ACACACAGAA GAGCCTCTCC CTGTCTCTGG GT

配列番号	説明	配列
３５	抗ＩＬ１３　ＩｇＧ４　Ｔ３６６Ｗ／Ｓ２２８Ｐ重鎖コード配列	GAAGTTACCC TGCGCGAGAG CGGCCCAGCC CTGGTGAAGC CAACCCAGAC CCTGACCCTG ACCTGCACCG TCAGCGGCTT CAGCCTGAGC GCCTACAGCG TGAACTGGAT CCGCCAGCCA CCAGGCAAGG CCCTGGAGTG GCTGGCCATG ATCTGGGGCG ACGGCAAGAT CGTGTACAAC AGCGCCCTGA AGAGCCGCCT GACCATCAGC AAGGACACCA GCAAGAACCA GGTGGTGCTG ACCATGACCA ACATGGACCC AGTGGACACC GCCACCTACT ACTGCGCCGG CGACGGCTAC TACCCATACG CCATGGACAA CTGGGGCCAG GGCAGCCTGG TGACCGTGAG CAGCGCTTCC ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCA CCCTGCTCCC GCAGTACTTC TGAGTCCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT CAAGGACTAC TTCCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCCC TGACCAGCGG CGTGCACACC TTCCCGGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACTGTGCCC TCTAGCAGCT TGGGCACCAA GACCTACACG TGCAACGTGG ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA AACGCGTTGA GTCCAAATAT GGTCCCCCAT GCCCACCATG CCCAGCACCT GAGTTCCTGG GGGGACCATC AGTCTTCCTG TTCCCCCCAA AACCCAAGGA CACTCTCATG ATCTCCCGGA CCCCTGAGGT CACGTGCGTG GTGGTGGACG TGAGCCAGGA AGACCCCGAG GTCCAGTTCA ACTGGTACGT GGATGGCGTG GAGGTGCATA ATGCCAAGAC AAAGCCGCGG GAGGAGCAGT TCAACAGCAC GTACCGTGTG GTCAGCGTCC TCACCGTCCT GCACCAGGAC TGGCTGAACG GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG GTCTCCAACA AAGGCCTCCC GTCCTCCATC GAGAAAACCA TCTCCAAAGC CAAAGGGCAG CCCCGAGAGC CACAGGTGTA CACCCTGCCC CCATCCCAGG AGGAGATGAC CAAGAACCAG GTCAGCCTGT GGTGCCTGGT CAAAGGCTTC TACCCCAGCG ACATCGCCGT GGAGTGGGAG AGCAATGGGC AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCCTC CCGTGCTGGA CTCCGACGGC TCCTTCTTCC TCTACAGCAG GCTAACCGTG GACAAGAGCA GGTGGCAGGA GGGGAATGTC TTCTCATGCT CCGTGATGCA TGAGGCTCTG CACAACCACT ACACACAGAA GAGCCTCTCC CTGTCTCTGG GTAAATAA
３６	抗ＩＬ１３軽鎖コード配列	GATATCGTGC TGACCCAGAG CCCAGACAGC CTGTCTGTGA GCCTGGGCGA GCGCGCCACC ATCAACTGCC GCGCCAGCAA AAGCGTGGAC AGCTACGGCA ACAGCTTCAT GCACTGGTAT CAGCAGAAGC CAGGCCAGCC ACCCAAGCTG CTGATCTACC TGGCCAGCAA CCTGGAGAGC GGCGTGCCAG ACCGCTTCAG CGGCAGCGGC AGCGGCACCG ACTTCACCCT GACCATCAGC TCTCTGCAGG CCGAGGATGT GGCCGTGTAC TACTGCCAGC AGAACAACGA GGACCCACGC ACCTTCGGTG GCGGTACCAA GGTGGAGATC AAACGAACTG TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA TCTGGAACTG CTTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCCGTGA GGCCAAAGTA CAGTGGAAGG TGGATAACGC CCTCCAATCG GGTAACTCCC AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC AGCACCCTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA ACAGGGGAGA GTGTTAA

配列番号	説明	配列
３７	抗ＩＬ１７Ａ及びＦ交差反応性ＶＨコード配列	GAAGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGCAGGTC CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTGAT GATTATGCCA TGCACTGGGT CCGGCAAGCT CCAGGGAAGG GCCTGGAGTG GGTCTCAGGT ATTAATTGGA GCAGTGGTGG CATAGGCTAT GCGGACTCTG TGAAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAT CTGCAAATGA ACAGTCTGAG AGCTGAGGAC ACGGCCTTGT ATTACTGTGC AAGAGATATC GGGGGGTTCG GGGAGTTTTA CTGGAACTTC GGTCTCTGGG GCCGTGGCAC CCTGGTCACT GTCTCCTCA
３８	抗ＩＬ１７Ａ及びＦ交差反応性ＶＬコード配列	GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGA AGCTACTTAG CCTGGTACCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC AGGTTCAGTG GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT GAAGATTTTG CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGCCTCCGGC CACTTTCGGC GGAGGGACCA AGGTGGAGAT CAAA
３９	抗ＩＬ１７Ａ及びＦ交差反応性ＩｇＧ４　Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ／Ｓ２２８Ｐ重鎖コード配列、Ｃ末端溶解なし	GAAGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGCAGGTC CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTGAT GATTATGCCA TGCACTGGGT CCGGCAAGCT CCAGGGAAGG GCCTGGAGTG GGTCTCAGGT ATTAATTGGA GCAGTGGTGG CATAGGCTAT GCGGACTCTG TGAAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAT CTGCAAATGA ACAGTCTGAG AGCTGAGGAC ACGGCCTTGT ATTACTGTGC AAGAGATATC GGGGGGTTCG GGGAGTTTTA CTGGAACTTC GGTCTCTGGG GCCGTGGCAC CCTGGTCACT GTCTCCTCAG CCTCCACCAA GGGCCCATCG GTCTTCCCCC TGGCACCCTG CTCCCGCAGT ACTTCTGAGT CCACAGCGGC CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGT GGAACTCAGG CGCCCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC GGCTGTCCTA CAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACTG TGCCCTCTAG CAGCTTGGGC ACCAAGACCT ACACGTGCAA CGTGGATCAC AAGCCCAGCA ACACCAAGGT GGACAAACGC GTTGAGTCCA AATATGGTCC CCCATGCCCA CCATGCCCAG CACCTGAGTT CCTGGGGGGA CCATCAGTCT TCCTGTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACTC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACGT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CAGGAAGACC CCGAGGTCCA GTTCAACTGG TACGTGGATG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTTCAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAACGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGGC CTCCCGTCCT CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAGCCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCAGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGAGCTGC GCTGTCAAAG GCTTCTACCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTCGTT AGCAGGCTAA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGGAGGGGA ATGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACA CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCTGGGT

配列番号	説明	配列
４０	抗ＩＬ１７Ａ及びＦ交差反応性ＩｇＧ４　Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ／Ｓ２２８Ｐ重鎖コード配列	GAAGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGCAGGTC CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTGAT GATTATGCCA TGCACTGGGT CCGGCAAGCT CCAGGGAAGG GCCTGGAGTG GGTCTCAGGT ATTAATTGGA GCAGTGGTGG CATAGGCTAT GCGGACTCTG TGAAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAT CTGCAAATGA ACAGTCTGAG AGCTGAGGAC ACGGCCTTGT ATTACTGTGC AAGAGATATC GGGGGGTTCG GGGAGTTTTA CTGGAACTTC GGTCTCTGGG GCCGTGGCAC CCTGGTCACT GTCTCCTCAG CCTCCACCAA GGGCCCATCG GTCTTCCCCC TGGCACCCTG CTCCCGCAGT ACTTCTGAGT CCACAGCGGC CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGT GGAACTCAGG CGCCCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC GGCTGTCCTA CAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACTG TGCCCTCTAG CAGCTTGGGC ACCAAGACCT ACACGTGCAA CGTGGATCAC AAGCCCAGCA ACACCAAGGT GGACAAACGC GTTGAGTCCA AATATGGTCC CCCATGCCCA CCATGCCCAG CACCTGAGTT CCTGGGGGGA CCATCAGTCT TCCTGTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACTC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACGT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CAGGAAGACC CCGAGGTCCA GTTCAACTGG TACGTGGATG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTTCAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAACGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGGC CTCCCGTCCT CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAGCCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCAGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGAGCTGC GCTGTCAAAG GCTTCTACCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTCGTT AGCAGGCTAA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGGAGGGGA ATGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACA CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCTGGGTAAA TAA
４１	抗ＩＬ１７ＡＦ交差反応性軽鎖コード配列	GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGA AGCTACTTAG CCTGGTACCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC AGGTTCAGTG GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT GAAGATTTTG CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGCCTCCGGC CACTTTCGGC GGAGGGACCA AGGTGGAGAT CAAACGAACT GTGGCTGCAC CATCTGTCTT CATCTTCCCG CCATCTGATG AGCAGTTGAA ATCTGGAACT GCTTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC TATCCCCGTG AGGCCAAAGT ACAGTGGAAG GTGGATAACG CCCTCCAATC GGGTAACTCC CAGGAGAGTG TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG CAGCACCCTG ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAAGTCTACG CCTGCGAAGT CACCCATCAG GGCCTGAGCT CGCCCGTCAC AAAGAGCTTC AACAGGGGAG AGTGTTAA

配列番号	説明	配列
４２	抗ＩＬ１７Ａ及びＦ交差反応性ＩｇＧ４　Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ／Ｓ２２８Ｐ重鎖コドン最適化コード配列、Ｃ末端溶解なし	GAAGTTCAGC TGGTTGAAAG CGGTGGTGGT CTGGTTCAGC CTGGTCGTAG CCTGCGTCTG AGCTGTGCAG CAAGCGGTTT TACCTTTGAT GATTATGCCA TGCATTGGGT TCGTCAGGCA CCGGGTAAAG GTCTGGAATG GGTTAGCGGT ATTAATTGGA GCAGCGGTGG TATTGGTTAT GCAGATAGCG TTAAAGGTCG TTTTACCATT AGCCGTGATA ATGCCAAAAA TAGCCTGTAC CTGCAGATGA ATAGTCTGCG TGCAGAAGAT ACCGCACTGT ATTATTGTGC ACGTGATATT GGTGGTTTTG GCGAATTCTA TTGGAATTTT GGTCTGTGGG GTCGTGGCAC CCTGGTTACC GTTAGCAGCG CCTCCACCAA GGGCCCATCG GTCTTCCCCC TGGCACCCTG CTCCCGCAGT ACTTCTGAGT CCACAGCGGC CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGT GGAACTCAGG CGCCCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC GGCTGTCCTA CAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACTG TGCCCTCTAG CAGCTTGGGC ACCAAGACCT ACACGTGCAA CGTGGATCAC AAGCCCAGCA ACACCAAGGT GGACAAACGC GTTGAGTCCA AATATGGTCC CCCATGCCCA CCATGCCCAG CACCTGAGTT CCTGGGGGGA CCATCAGTCT TCCTGTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACTC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACGT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CAGGAAGACC CCGAGGTCCA GTTCAACTGG TACGTGGATG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTTCAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAACGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGGC CTCCCGTCCT CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAGCCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCAGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGAGCTGC GCTGTCAAAG GCTTCTACCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTCGTT AGCAGGCTAA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGGAGGGGA ATGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACA CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCTGGGT
４３	抗ＩＬ１７Ａ及びＦ交差反応性ＩｇＧ４　Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ／Ｓ２２８Ｐ重鎖コドン最適化コード配列	GAAGTTCAGC TGGTTGAAAG CGGTGGTGGT CTGGTTCAGC CTGGTCGTAG CCTGCGTCTG AGCTGTGCAG CAAGCGGTTT TACCTTTGAT GATTATGCCA TGCATTGGGT TCGTCAGGCA CCGGGTAAAG GTCTGGAATG GGTTAGCGGT ATTAATTGGA GCAGCGGTGG TATTGGTTAT GCAGATAGCG TTAAAGGTCG TTTTACCATT AGCCGTGATA ATGCCAAAAA TAGCCTGTAC CTGCAGATGA ATAGTCTGCG TGCAGAAGAT ACCGCACTGT ATTATTGTGC ACGTGATATT GGTGGTTTTG GCGAATTCTA

配列番号	説明	配列
		TTGGAATTTT GGTCTGTGGG GTCGTGGCAC CCTGGTTACC GTTAGCAGCG CCTCCACCAA GGGCCCATCG GTCTTCCCCC TGGCACCCTG CTCCCGCAGT ACTTCTGAGT CCACAGCGGC CCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGT GGAACTCAGG CGCCCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC GGCTGTCCTA CAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACTG TGCCCTCTAG CAGCTTGGGC ACCAAGACCT ACACGTGCAA CGTGGATCAC AAGCCCAGCA ACACCAAGGT GGACAAACGC GTTGAGTCCA AATATGGTCC CCCATGCCCA CCATGCCCAG CACCTGAGTT CCTGGGGGGA CCATCAGTCT TCCTGTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACTC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACGT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CAGGAAGACC CCGAGGTCCA GTTCAACTGG TACGTGGATG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTTCAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAACGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGGC CTCCCGTCCT CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAGCCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCAGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGAGCTGC GCTGTCAAAG GCTTCTACCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTCGTT AGCAGGCTAA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGGAGGGGA ATGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACA CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCTGGGTAAA TAA
４４	抗ＩＬ１７Ａ及びＦ交差反応性軽鎖コドン最適化コード配列	GAAATTGTTC TGACCCAGAG TCCGGCAACC CTGAGCCTGA GTCCGGGTGA ACGTGCCACC CTGAGCTGTC GTGCAAGCCA GAGCGTTCGT AGCTATCTGG CATGGTATCA GCAGAAACCG GGTCAGGCAC CGCGTCTGCT GATTTATGAT GCAAGCAATC GTGCAACCGG TATTCCGGCA CGTTTTAGCG GTAGCGGTAG TGGCACCGAT TTTACCCTGA CCATTAGCAG CCTGGAACCG GAAGATTTTG CAGTGTATTA TTGTCAGCAG CGTAGCAATT GGCCACCGGC AACCTTTGGT GGTGGCACCA AAGTTGAAAT TAAACGAACT GTGGCTGCAC CATCTGTCTT CATCTTCCCG CCATCTGATG AGCAGTTGAA ATCTGGAACT GCTTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC TATCCCCGTG AGGCCAAAGT ACAGTGGAAG GTGGATAACG CCCTCCAATC GGGTAACTCC CAGGAGAGTG TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG CAGCACCCTG ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAAGTCTACG CCTGCGAAGT CACCCATCAG GGCCTGAGCT CGCCCGTCAC AAAGAGCTTC AACAGGGGAG AGTGTTAA

【０２３８】

Ｖ．ベクター、宿主細胞、及び組換え方法

ＦｋｐＡを使用した異種ポリペプチド（例えば、多重特異性抗体）の組換え産生について、ポリペプチド（例えば、多重特異性抗体）をコードする核酸は、単離され、更なるクローニング（ＤＮＡの増幅）または発現のために複製可能なベクターに挿入される。ポリペプチド（例えば、多重特異性抗体）をコードするＤＮＡは、従来の手順を使用して（例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離され、配列決定される。多くのベクターが利用可能である。ベクターの選択は、使用される宿主細胞に部分的に依存する。一般に、好ましい宿主細胞は、原核生物起源のいずれかのものである。ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、及び、ＩｇＥ定常領域を含む任意のアイソタイプの定常領域が、この目

的のために使用され得、かかる定常領域が任意のヒトまたは動物種から得られ得ることが理解される。

【０２３９】

Ａ．原核生物宿主細胞を使用した抗体の生成

ｉ．ベクター構築

本発明の多重特異性抗体のポリペプチド成分をコードするポリヌクレオチド配列は、標準の組換え技法を使用して得られ得る。所望のポリヌクレオチド配列は、ハイブリドーマ細胞等の抗体産生細胞から単離され、配列決定され得る。あるいは、ポリヌクレオチドは、ヌクレオチド合成機またはＰＣＲ技法を使用して合成され得る。得られた後、ポリペプチドをコードする配列は、原核生物宿主内で異種ポリヌクレオチドを複製し、発現することができる組換えベクターに挿入される。利用可能かつ当該技術分野で既知の多くのベクターが、本発明の目的のために使用され得る。適切なベクターの選択は、ベクターに挿入される核酸の大きさ及びベクターで形質転換される特定の宿主細胞に主に依存する。各ベクターは、その機能（異種ポリヌクレオチドの増幅もしくは発現、またはこれらの両方）及びそれが存在する特定の宿主細胞とのその適合性に応じて、様々な成分を含有する。ベクター成分としては、一般に、複製起点、選択マーカー遺伝子、プロモーター、リボソーム結合部位（ＲＢＳ）、シグナル配列、異種核酸挿入、及び転写終結配列が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２４０】

一般に、宿主細胞と適合性のある種由来のレプリコン及び制御配列を含有するプラスミドベクターが、これらの宿主に関連して使用される。このベクターは、通常、複製部位、及び形質転換細胞において表現型選択を提供することができるマーキング配列を持つ。例えば、Ｅ．ｃｏｌｉは、典型的には、Ｅ．ｃｏｌｉ種由来のプラスミドであるｐＢＲ３２２を使用して形質転換される。ｐＢＲ３２２は、アンピシリン（Ａｍｐ）及びテトラサイクリン（Ｔｅｔ）耐性をコードする遺伝子を含有し、それ故に形質転換細胞を特定するための容易な手段を提供する。ｐＢＲ３２２、その誘導体、または他の微生物プラスミドもしくはバクテリオファージは、微生物によって内因性タンパク質の発現のために使用され得るプロモーターも含有し得るか、またはそれを含有するように修飾され得る。特定の抗体の発現のために使用されるｐＢＲ３２２誘導体の例は、Ｃａｒｔｅｒらの米国特許第５，６４８，２３７号に記載される。

【０２４１】

加えて、宿主微生物と適合性のあるレプリコン及び制御配列を含有するファージベクターは、これらの宿主に関連して形質転換ベクターとして使用され得る。例えば、ＧＥＭ（商標）－１１等のバクテリオファージを利用して、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＬＥ３９２等の感受性宿主細胞を形質転換するために使用され得る組換えベクターを作製することができる。

【０２４２】

本発明の発現ベクターは、ポリペプチド成分の各々をコードする２つ以上のプロモーター－シストロン対を含み得る。プロモーターは、その発現を調節するシストロンの上流（５’）に位置する非翻訳調節配列である。原核生物プロモーターは、典型的には、２つのクラス、つまり誘導プロモーター及び構成プロモーターに分けられる。誘導プロモーターは、培養条件の変化、例えば、栄養素の存在もしくは不在、または温度の変化に応答して、その制御下で増加したレベルのシストロンの転写を開始するプロモーターである。

【０２４３】

様々な潜在的宿主細胞によって認識される多数のプロモーターが、周知である。選択されたプロモーターは、制限酵素消化によりソースＤＮＡからプロモーターを除去し、単離されたプロモーター配列を本発明のベクターに挿入することによって、軽鎖または重鎖をコードするシストロンＤＮＡに作動可能に結合し得る。天然プロモーター配列及び多くの異種プロモーターの両方が、標的遺伝子の増幅及び／または発現を指向するために使用され得る。いくつかの実施形態では、異種プロモーターが、一般に、天然標的ポリペプチドプロモーターと比較して、発現された標的遺伝子のより大きい転写及びより高い収率を可能

にするため、異種プロモーターが利用される。
【０２４４】
原核生物宿主との使用に好適なプロモーターとしては、ＰｈｏＡプロモーター、－ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、トリプトファン（ｔｒｐ）プロモーター系、ならびにハイブリッドプロモーター（ｔａｃまたはｔｒｃプロモーター等）が挙げられる。しかしながら、細菌において機能的な他のプロモーター（他の既知の細菌またはファージプロモーター等）も好適である。それらのヌクレオチド配列が公開されており、それにより、当業者が、任意の必要とされる制限部位を提供するためにリンカーまたはアダプターを使用して、それらを標的軽鎖及び重鎖をコードするシストロンに作動可能に連結することが可能になっている（Ｓｉｅｂｅｎｌｉｓｔ　ｅｔ　ａｌ．，（１９８０）Ｃｅｌｌ２０：２６９）。
【０２４５】
翻訳開始領域（ＴＩＲ）は、タンパク質の全体的な翻訳レベルの主要な決定因子である。ＴＩＲは、シグナル配列をコードするポリヌクレオチドを含み、シャイン・ダルガノ配列のすぐ上流から開始コドンのおよそ２０ヌクレオチド下流まで延びている。一般に、このベクターは、ＴＩＲを含み、ＴＩＲ及び変異形ＴＩＲは、当該技術分野で既知であり、ＴＩＲの生成方法は、当該技術分野で既知である。一連の核酸配列変異形が様々な翻訳強度で作製され、それにより多くの異なるポリペプチドの最適な分泌のためにこの因子を調整するための好都合な手段を提供することができる。ＰｈｏＡ等のこれらの変異形に融合するレポーター遺伝子の使用により、異なる翻訳開始領域の相対翻訳強度の定量方法が提供される。変異形または変異体ＴＩＲがプラスミドベクターのバックグラウンドに提供され、それにより、成熟ポリペプチドの最大発現のための翻訳強度の最適範囲を確立するように、目的とする遺伝子が挿入される、一組のプラスミド及び測定されるその発現を提供することができる。変異形ＴＩＲは、ＵＳＰ８，２４１，９０１に開示されている。
【０２４６】
本発明の一態様では、組換えベクター内の各シストロンは、膜にわたる発現ポリペプチドの転位を指向する分泌シグナル配列成分を含む。一般に、シグナル配列は、ベクターの成分であり得るか、またはそれは、ベクターに挿入される標的ポリペプチドＤＮＡの一部であり得る。本発明の目的のために選択されるシグナル配列は、宿主細胞によって認識され、プロセシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものであるべきである。異種ポリペプチド原産のシグナル配列を認識及びプロセシングしない原核生物宿主細胞の場合、シグナル配列は、例えば、本発明のシグナルポリペプチドから選択される原核生物シグナル配列により置換される。加えて、ベクターは、アルカリ性ホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ｌｐｐ、または熱安定性エンテロトキシンＩＩ（ＳＴＩＩ）リーダー、ＬａｍＢ、ＰｈｏＥ、ＰｅｌＢ、ＯｍｐＡ、及びＭＢＰからなる群から選択されるシグナル配列を含み得る。
【０２４７】
一態様では、１つ以上のポリヌクレオチド（例えば、発現ベクター）が、抗体を集合的にコードする。一実施形態では、単一のポリヌクレオチドが、抗体の軽鎖をコードし、別個のポリヌクレオチドが、抗体の重鎖をコードする。一実施形態では、単一のポリヌクレオチドが、抗体の軽鎖及び重鎖をコードする。いくつかの実施形態では、１つ以上のポリヌクレオチド（例えば、発現ベクター）が、一アーム抗体を集合的にコードする。一実施形態では、単一のポリヌクレオチドが、（ａ）一アーム抗体の軽鎖及び重鎖、ならびに（ｂ）Ｆｃポリペプチドをコードする。一実施形態では、単一のポリヌクレオチドが、一アーム抗体の軽鎖及び重鎖をコードし、別個のポリヌクレオチドが、Ｆｃポリペプチドをコードする。一実施形態では、別個のポリヌクレオチドがそれぞれ、一アーム抗体の軽鎖成分、一アーム抗体の重鎖成分、及びＦｃポリペプチドをコードする。一アーム抗体の産生は、例えば、ＷＯ２００５０６３８１６に記載されている。
【０２４８】
本発明の抗体の発現に好適な原核生物宿主細胞としては、グラム陰性菌またはグラム陽性

菌等のＡｒｃｈａｅｂａｃｔｅｒｉａ及びＥｕｂａｃｔｅｒｉａが挙げられる。有用な細菌の例としては、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）、Ｂａｃｉｌｌｉ（例えば、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ種（例えば、Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｃｅｓｃａｎｓ、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ、Ｐｒｏｔｅｕｓ、Ｓｈｉｇｅｌｌａ、Ｒｈｉｚｏｂｉａ、Ｖｉｔｒｅｏｓｃｉｌｌａ、またはＰａｒａｃｏｃｃｕｓが挙げられる。一実施形態では、グラム陰性細胞が使用される。一実施形態では、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞が、本発明の宿主として使用される。Ｅ．ｃｏｌｉ株の例としては、株Ｗ３１１０（Ｂａｃｈｍａｎｎ，Ｃｅｌｌｕｌａｒ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｖｏｌ．２（Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，Ｄ．Ｃ．：Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｆｏｒ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，１９８７），ｐｐ．１１９０－１２１９、ＡＴＣＣ寄託番号２７，３２５）及びその誘導体（遺伝子型Ｗ３１１０ΔｆｈｕＡ（ΔｔｏｎＡ）ｐｔｒ３ ｌａｃ Ｉｑ ｌａｃＬ８ ΔｏｍｐＴΔ（ｎｍｐｃ－ｆｅｐＥ）ｄｅｇＰ４１ ｋａｎＲを有する株３３Ｄ３（米国特許第５，６３９，６３５号）、ならびに株６３Ｃ１及び６４Ｂ４を含む）が挙げられる。いくつかの実施形態では、Ｅ．ｃｏｌｉ株は、６２Ａ７（ΔｆｈｕＡ（ΔｔｏｎＡ）ｐｔｒ３、ｌａｃＩｑ、ｌａｃＬ８、ｏｍｐＴΔ（ｎｍｐｃ－ｆｅｐＥ）ΔｄｅｇＰ ｉｌｖＧ修復型）と命名されたＷ３１１０誘導体である。Ｅ．ｃｏｌｉ２９４（ＡＴＣＣ３１，４４６）、Ｅ．ｃｏｌｉ Ｂ、Ｅ．ｃｏｌｉ λ１７７６（ＡＴＣＣ３１，５３７）、及びＥ．ｃｏｌｉ ＲＶ３０８（ＡＴＣＣ３１，６０８）等の他の株及びその誘導体も、好適である。これらの例は、限定的なものではなく、むしろ例示的なものである。定義された遺伝子型を有する上述の細菌のうちのいずれの誘導体の構築方法も、当該技術分野で既知であり、例えば、Ｂａｓｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，８：３０９－３１４（１９９０）に記載されている。一般に、細菌の細胞内でのレプリコンの複製可能性を考慮して適切な細菌を選択することが必要である。例えば、ｐＢＲ３２２、ｐＢＲ３２５、ｐＡＣＹＣ１７７、またはｐＫＮ４１０等の周知のプラスミドを使用して、レプリコンを提供する場合、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｓｅｒｒａｔｉａ、またはＳａｌｍｏｎｅｌｌａ種が、宿主として好適に使用され得る。典型的には、宿主細胞は、最小量のタンパク質分解酵素しか分泌すべきでなく、更なるプロテアーゼ阻害剤が、細胞培養物に組み込まれることが望ましくあり得る。

【０２４９】

細菌培養物におけるポリペプチドの産生収率及び品質を改善するために、細菌細胞が修飾され得る。例えば、分泌抗体ポリペプチドの適切な組み立て及び折り畳みを改善するために、細菌宿主細胞は、宿主原核生物細胞を同時形質転換するために使用され得るＦｋｐＡ及びＤｓｂタンパク質（ＤｓｂＢ、ＤｓｂＣ、ＤｓｂＤ、及び／またはＤｓｂＧ）等のシャペロンタンパク質を発現する追加のベクターを含み得る。シャペロンタンパク質は、細菌宿主細胞内で産生される異種タンパク質の適切な折り畳み及び溶解を容易にすることが実証されている。

【０２５０】

ｉｉ．抗体産生

宿主細胞は、上述の発現ベクターで形質転換され、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅に適切になるように修飾された従来の栄養素培地で培養される。

【０２５１】

形質転換とは、ＤＮＡが、染色体外要素として、または染色体組み込み体によってのいずれかで複製可能になるように、ＤＮＡを原核生物宿主に導入することを意味する。使用される宿主細胞に応じて、かかる細胞に適切な標準の技法を使用して、形質転換が行われる。一般に、塩化カルシウムを用いるカルシウム処理が、頑丈な細胞壁障壁を含有する細菌細胞に使用される。形質転換の別の方法は、ポリエチレングリコール／ＤＭＳＯを用いる。使用されるなお別の技法は、電気穿孔である。

【０２５２】

本発明のポリペプチドを産生するために使用される原核生物細胞は、当該技術分野で既知であり、かつ選択された宿主細胞の培養に好適な培地で成長する。好適な培地の例としては、必要な栄養素補助剤を含むルリアブロス（ＬＢ）が挙げられる。いくつかの実施形態では、培地は、発現ベクターを含有する原核生物細胞の成長を選択的に許容するために、発現ベクターの構築に基づいて選択された選択剤も含有する。例えば、アンピシリン耐性遺伝子を発現する細胞を成長させるために、アンピシリンが培地に添加される。

【０２５３】

炭素、窒素、及び無機リン酸塩源に加えて、任意の必要な補助剤も、単独で、または複合窒素源等の別の補助剤もしくは培地との混合物として導入される適切な濃度で含まれ得る。任意に、培養培地は、グルタチオン、システイン、シスタミン、チオグリコレート、ジチオエリトリトール、及びジチオスレイトールからなる群から選択される１つ以上の還元剤を含有し得る。

【０２５４】

原核生物宿主細胞は、好適な温度で培養される。Ｅ．ｃｏｌｉ成長の場合、例えば、好ましい温度は、約２０℃～約３９℃の範囲、より好ましくは約２５℃～約３７℃の範囲、更により好ましくは約３０℃である。培地のｐＨは、主に宿主生物に応じて約５～約９の範囲の任意のｐＨであり得る。Ｅ．ｃｏｌｉの場合、ｐＨは、好ましくは約６．８～約７．４、より好ましくは約７．０である。

【０２５５】

誘導プロモーターが本発明の発現ベクターに使用される場合、タンパク質発現は、プロモーターの活性化に好適な条件下で誘導される。本発明の一態様では、ポリペプチドの転写を制御するために、ＰｈｏＡプロモーターが使用される。したがって、形質転換宿主細胞は、誘導のためにリン酸塩制限培地で培養される。好ましくは、リン酸塩制限培地は、Ｃ．Ｒ．Ａ．Ｐ培地（例えば、Ｓｉｍｍｏｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ（２００２），２６３：１３３－１４７を参照されたい）、またはＷＯ２００２／０６１０９０に記載の培地である。当該技術分野で既知であるように、用いられるベクター構築物に従って、様々な他の誘導因子が使用され得る。

【０２５６】

一実施形態では、本発明の発現ポリペプチドは、宿主細胞の周辺質に分泌され、それから回収される。タンパク質回収は、典型的には、一般に浸透圧ショック、超音波処理、または溶解等の手段による微生物の破壊を伴う。細胞が破壊されると、細胞残屑または全細胞は、遠心分離または濾過によって除去され得る。タンパク質は、例えば、親和性樹脂クロマトグラフィーによって更に精製され得る。あるいは、タンパク質は、培養培地に輸送され、その中で単離され得る。細胞が、培養物から除去され得、培養上清が、産生されたタンパク質の更なる精製のために濾過され、濃縮される。発現ポリペプチドは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ）及びウエスタンブロットアッセイ等の一般に既知の方法を使用して、更に単離され、特定され得る。

【０２５７】

本発明の一態様では、抗体産生は、発酵プロセスによって大量に行われる。様々な大規模供給バッチ発酵手順が、組換えポリペプチドの産生に利用可能である。大規模発酵は、少なくとも１０００リットルの容量、好ましくは約１，０００～１００，０００リットルの容量を有する。これらの発酵槽は、酸素及び栄養素、特にグルコース（好ましい炭素／エネルギー源）を分布させるために撹拌インペラーを使用する。小規模発酵とは、一般に、容積がおよそ１００リットル以下であり、約１リットル～約１００リットルの範囲であり得る発酵槽での発酵を指す。

【０２５８】

発酵プロセスにおいて、タンパク質発現の誘導は、典型的には、細胞が所望の密度、例えば、約１８０～２２０のＯＤ５５０になるまで好適な条件下で成長した後に開始され、その段階で、細胞は初期静止期にある。当該技術分野で既知であり、上述されるように、用いられるベクター構築物に従って、様々な誘導因子が使用され得る。細胞は、誘導前によ

り短い期間成長し得る。細胞は、通常、約１２～５０時間誘導されるが、より長いまたはより短い誘導時間も使用され得る。

【０２５９】

本発明のポリペプチドの産生収率及び品質を改善するために、様々な発酵条件が修正され得る。例えば、分泌抗体ポリペプチドの適切な組み立て及び折り畳みを改善するために、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、及び／またはＤｓｂＣ等のシャペロンタンパク質を発現する追加のベクターを使用して、宿主原核生物細胞を同時形質転換することができる。シャペロンタンパク質は、細菌宿主細胞内で産生される異種タンパク質の適切な折り畳み及び溶解を容易にすることが実証されている。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、及び／またはＤｓｂＣは、細菌宿主細胞で発現される。

【０２６０】

発現異種タンパク質（特にタンパク質分解感受性のもの）のタンパク質分解を最小限に抑えるために、タンパク質分解酵素が欠損したある特定の宿主株が、本発明に使用され得る。例えば、宿主細胞株は、既知の細菌プロテアーゼ、例えば、プロテアーゼＩＩＩ、ＯｍｐＴ、ＤｅｇＰ、Ｔｓｐ、プロテアーゼＩ、プロテアーゼＭｉ、プロテアーゼＶ、プロテアーゼＶＩ、及びこれらの組み合わせをコードする遺伝子において遺伝子変異（複数可）をもたらすように修飾され得る。いくつかのＥ．ｃｏｌｉプロテアーゼ欠損株が利用可能であり、例えば、例えば、Ｊｏｌｙら（１９９８）（上記）、Ｇｅｏｒｇｉｏｕらの米国特許第５，２６４，３６５号、Ｇｅｏｒｇｉｏｕらの米国特許第５，５０８，１９２号、Ｈａｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｄｒｕｇ Ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ，２：６３－７２（１９９６）に記載されている。

【０２６１】

一実施形態では、タンパク質分解酵素が欠損し、かつ１つ以上のシャペロンタンパク質を発現するプラスミドで形質転換されたＥ．ｃｏｌｉ株が、本発明の発現系における宿主細胞として使用される。

【０２６２】

Ｂ．抗体精製

当該技術分野で既知の標準のタンパク質精製方法が、用いられ得る。以下の手順、つまり、免疫親和性またはイオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、シリカまたは陽イオン交換樹脂（ＳＰ等）または陰イオン交換（ＤＥＡＥ等）でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、硫酸アンモニウム沈殿、及び例えば、Ｓｅｐｈａｄｅｘ Ｇ－７５を使用したゲル濾過が、好適な精製手順のうちの例示的なものである。

【０２６３】

一態様では、固相に固定化されたタンパク質Ａが、本発明の抗体産物の免疫親和性精製に使用される。タンパク質Ａは、高親和性で抗体のＦｃ領域に結合するＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅａｓ由来の４１ｋＤの細胞壁タンパク質である。Ｌｉｎｄｍａｒｋ ｅｔ ａｌ．，（１９８３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．６２：１－１３。タンパク質Ａが固定化される固相は、好ましくは、ガラスまたはシリカ表面を含むカラム、より好ましくは、制御孔ガラスカラムまたはケイ酸カラムである。いくつかの用途では、カラムは、不純物の非特異的結合を阻止するためにグリセロール等の試薬でコーティングされている。

【０２６４】

精製の第１のステップとして、上述の細胞培養物由来の調製物を、タンパク質Ａ固定化固相に適用して、目的とする抗体のタンパク質Ａへの特異的結合を可能にする。その後、固相を洗浄して、固相に非特異的に結合している不純物を除去する。最後に、目的とする抗体を、溶出により固相から回収する。

【０２６５】

本発明のいくつかの実施形態では、精製ステップのうちの１つ以上から得られる画分を、ＦｋｐＡの除去について分析する。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡの除去は、免疫ア

ッセイによって、例えば、本明細書に記載の免疫アッセイによって決定される。
【０２６６】
本発明は、例えば、化学療法剤、薬物、成長阻害剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素的に活性な毒素、もしくはその断片）、または放射性同位体（すなわち、放射性コンジュゲート）等の細胞毒性剤にコンジュゲートされる本明細書に記載の抗体のうちのいずれかを含む、免疫コンジュゲート（互換的に「抗体－薬物コンジュゲート」または「ＡＤＣ」と称される）も提供する。
【０２６７】
本発明の二重特異性抗体のための精製スキームが、以下に記載される。
【０２６８】
ＶＩ．ＦｋｐＡの組成物
いくつかの態様では、本発明は、超高純度ＦｋｐＡを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本組成物は、約９５．０％、約９６．０％、約９７．０％、約９８．０％、約９９．０％、または約９９．５％のうちのいずれかを超えるＦｋｐＡである、ＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、９５％のＦｋｐＡを含む組成物は、調製物中の材料の５％未満が、ＦｋｐＡの産生中に存在する細胞または細胞溶解物（例えば、タンパク質、核酸、脂質等）中に存在した他の物質である、組成物である。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡポリペプチドの割合は、サイズ排除クロマトグラフィー（例えば、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ）によって測定される。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡを含む組成物は、約５％、約４％、約３％、約２％、約１％、約０．５％、または約０．１％のうちのいずれか未満の低分子量種（例えば、ＳＥＣまたはＳＤＳ－ＰＡＧＥによって測定される、ＦｋｐＡ未満の分子量を有する種）を含む。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡを含む組成物は、約２％未満の低分子量種を含む。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡを含む組成物は、約５％、約４％、約３％、約２％、約１％、約０．５％、または約０．１％のうちのいずれか未満の高分子量種（例えば、ＳＥＣまたはＳＤＳ－ＰＡＧＥによって測定される、ＦｋｐＡを超える分子量を有する種）を含む。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡを含む組成物は、約１％未満の高分子量種を含む。
【０２６９】
いくつかの実施形態では、高度に精製されたＦｋｐＡを含む組成物が、使用のために製剤化される。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡを含む組成物は、例えば、アジュバントを添加して、免疫応答の生成を容易にすることによって、動物の免疫化して、ＦｋｐＡに対する抗体を生成させるために製剤化される。他の実施形態では、超高純度ＦｋｐＡを含む組成物は、免疫アッセイにおける使用、例えば、陽性対照または標準曲線としての使用のために製剤化される。
【０２７０】
ＶＩＩ．ＦｋｐＡに対する抗体の生成
ある特定の態様では、本発明は、ＦｋｐＡの存在について組換えポリペプチド試料を分析するための免疫アッセイにおいて使用するための抗体（例えば、ポリクローナル抗体及び／またはモノクローナル抗体）を生成するための、免疫原として使用するための超高純度ＦｋｐＡを提供する。例えば、本抗体は、組換えポリペプチド（例えば、多重特異性抗体）が外因性ＦｋｐＡを発現する細菌細胞で産生された組換えポリペプチド試料中の、ＦｋｐＡを検出及び／または定量するための免疫アッセイにおいて使用され得る。いくつかの実施形態では、本発明は、超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合するポリクローナル抗体を提供する。いくつかの態様では、ポリクローナル抗体は、ＦｋｐＡの異なるエピトープに特異的に結合し、それ故にＦｋｐＡ断片、変異形、誤折り畳みタンパク質等を検出するための有用性を提供する。免疫アッセイで測定される試料中のＦｋｐＡのレベルの過剰定量または過剰評価をもたらし得る、宿主細胞タンパク質不純物に対するウサギ抗体の生成を最小限に抑えるために、動物（例えば、ウサギ）は、超高純度ＦｋｐＡで免疫化される。
【０２７１】
本発明は、ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体を提供する。いくつかの実施形態では、抗体

は、ポリクローナル抗体である。ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連抗原及びアジュバントの複数回の皮下（ｓｃ）または腹腔内（ｉｐ）注入によって動物において産生される。二官能性または誘導体化剤、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を介するコンジュゲーション）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（リジン残基を介する）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、ＳＯＣｌ２、またはＲ１Ｎ＝Ｃ＝ＮＲ（式中、Ｒ及びＲ１は、異なるアルキル基である）を使用して、関連抗原を、免疫化される種において免疫原性であるポリペプチド、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、またはダイズトリプシン阻害剤にコンジュゲートすることが有用であり得る。

【０２７２】

例えば、１００μｇまたは５μｇのタンパク質またはコンジュゲート（それぞれ、ウサギまたはマウスの場合）を、３体積のフロイント完全アジュバントと組み合わせ、複数の部位で溶液を皮内注入することにより、動物を、抗原、免疫原性コンジュゲート、または誘導体に対して免疫化する。１ヶ月後、動物を、複数の部位での皮下注入によって、完全フロイントアジュバント中のペプチドまたはコンジュゲートの最初の量の１／５～１／１０で追加免疫する。７～１４日後、動物を採血し、血清を抗体力価についてアッセイする。動物を、力価が水平状態になるまで追加免疫する。いくつかの実施形態では、動物を、同じ抗原のコンジュゲートであるが、異なるポリペプチドにコンジュゲートされ、かつ／または異なる架橋試薬によりコンジュゲートされたもので追加免疫する。コンジュゲートは、ポリペプチド融合物として組換え細胞培養物で作製することもできる。ミョウバン等の凝集剤も、免疫応答を増強するために好適に使用される。

【０２７３】

いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡで免疫化される動物は、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、マウス、モルモット、ハムスター、ラット、ロバ、またはニワトリである。

【０２７４】

いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体は、モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、実質的に同種の抗体の集団から得られ、すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、同一であり、かつ／または同じエピトープに結合するが、モノクローナル抗体の産生中に生じる可能な変異形を除き、かかる変異形は、一般に、少量で存在する。したがって、「モノクローナル」という修飾語句は、別個の抗体またはポリクローナル抗体の混合物ではないという抗体の特徴を示す。上述のように、モノクローナル抗体は、Ｋｏｈｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ２５６：４９５（１９７５）が初めて説明したハイブリドーマ法を使用して作製されても、組換えＤＮＡ法（米国特許第４，８１６，５６７号）によって作製されてもよい。

【０２７５】

いくつかの態様では、本発明は、ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体の精製方法であって、抗ＦｋｐＡ抗体を含む組成物を支持材料に結合している超高純度ＦｋｐＡを含むクロマトグラフィー材料と接触させることと、クロマトグラフィー材料を洗浄して、結合していない化合物を除去することと、抗ＦｋｐＡ抗体を溶出させることとを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、支持材料に結合している超高純度ＦｋｐＡは、約１％、約０．９％、約０．８％、約０．７％、約０．６％、約０．５％、約０．４％、約０．３％、約０．２％、約０．１％、約０．０５％、約０．０１％のうちのいずれか未満の不純物を含む。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡは、本明細書に記載の方法によって調製される。いくつかの実施形態では、本発明は、ＦｋｐＡに特異的に結合するポリクローナル抗体の精製方法を提供する。いくつかの実施形態では、ポリクローナル抗体の約１％、約０．９％、約０．８％、約０．７％、約０．６％、約０．５％、約０．４％、約０．３％、約０．２％、約０．１％、約０．０５％、約０．０１％のうちのいずれか未満が、非ＦｋｐＡ化合物に特異的に結合する。

【０２７６】

いくつかの実施形態では、抗ＦｋｐＡ抗体は、抗体を、クロマトグラフィー材料に固定化

された超高純度ＦｋｐＡ（例えば、活性化グリセリル制御孔ガラスに固定化された超高純度ＦｋｐＡ）と接触させることによって精製される。いくつかの実施形態では、抗体は、固定化ＦｋｐＡとの接触前に、例えば、硫酸アンモニウム沈殿によって濃縮される。いくつかの実施形態では、抗体を固定化ＦｋｐＡに結合させ、その後、固定化ＦｋｐＡ抗体複合体を洗浄して、結合していない不純物を除去する。更なる実施形態では、抗体は、装填緩衝液として異なるｐＨの緩衝液で溶出させることによって、固定化ＦｋｐＡから溶出され、例えば、抗体は、中性ｐＨ（例えば、ｐＨ７．２）の固定化ＦｋｐＡに結合し、酸性ｐＨ（例えば、ｐＨ２．０）で溶出される。いくつかの更なる実施形態では、抗ＦｋｐＡ抗体は、更なるクロマトグラフィー、例えば、サイズ排除クロマトグラフィーに供される。いくつかの実施形態では、精製抗ＦｋｐＡ抗体（例えば、ポリクローナル抗体）はそれぞれ、超高純度ＦｋｐＡへのそれらの結合についてアッセイされる。

【０２７７】

ＶＩＩＩ．ＦｋｐＡに対する抗体を使用した免疫アッセイ

いくつかの実施形態では、本発明は、ＦｋｐＡの存在及び／または分量についての組換えポリペプチド（例えば、多重特異性抗体）試料の分析方法であって、免疫アッセイを使用して試料中のＦｋｐＡを検出することと、試料中で検出されたＦｋｐＡの量を１つ以上の濃度の超高純度ＦｋｐＡ参照標準物の検出と比較することとを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、調製物は、約１％、約０．９％、約０．８％、約０．７％、約０．６％、約０．５％、約０．４％、約０．３％、約０．２％、約０．１％、約０．０９％、約０．０８％、約０．０７％、約０．０６％、約０．０５％、約０．０４％、約０．０３％、約０．０２％、または約０．０１％のうちのいずれか未満の不純物を含む。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡ参照標準物は、本明細書に記載の方法によって調製される。いくつかの実施形態では、免疫アッセイは、超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体を含む。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体は、約１％、約０．９％、約０．８％、約０．７％、約０．６％、約０．５％、約０．４％、約０．３％、約０．２％、約０．１％、約０．０９％、約０．０８％、約０．０７％、約０．０６％、約０．０５％、約０．０４％、約０．０３％、約０．０２％、または約０．０１％のうちのいずれか未満の非ＦｋｐＡ化合物に結合する。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体は、ポリクローナル抗体である。他の実施形態では、超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体は、免疫アッセイにおいて捕捉抗体として使用される。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体は、検出抗体として使用される。いくつかの実施形態では、検出抗体は、検出剤（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ）にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡは、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＦｋｐＡである。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドは、宿主細胞（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞）内で調製される。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、ＦｋｐＡを過剰発現する（例えば、ＦｋｐＡを過剰発現したＥ．ｃｏｌｉ宿主細胞）。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、外因性ＦｋｐＡを発現する（例えば、外因性ＦｋｐＡを発現したＥ．ｃｏｌｉ宿主細胞）。いくつかの実施形態では、試料は、細胞溶解物であるか、または組換えポリペプチド調製物から得られ、組換えポリペプチド調製物は、１つ以上のクロマトグラフィー精製ステップに供されている。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチド調製物は、最終精製産物である。いくつかの実施形態では、超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体は、免疫アッセイにおいて、約５０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、及び／または約１．５ｎｇ／ｍＬ未満、及び／またはそれらのうちのいずれかのＦｋｐＡを検出することができる。

【０２７８】

いくつかの態様では、本発明は、ＦｋｐＡの検出及び定量化のための免疫アッセイ方法を提供する。かかる方法は、ＦｋｐＡが発現されて、ポリペプチド折り畳み及び組み立てを容易にする、宿主細胞、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉで産生された組換えポリペプチド調製物中

のＦｋｐＡの検出及び定量化のために使用され得る。いくつかの実施形態では、免疫アッセイ方法は、本明細書に記載の捕捉及び検出抗ＦｋｐＡ抗体を使用する。いくつかの実施形態では、本抗体は、サンドイッチアッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）アッセイ、電気化学的アッセイ（ＥＣＬ）アッセイ、磁気免疫アッセイを含むが、これらに限定されない当該技術分野で既知の任意の免疫アッセイ方法で使用される。ある特定の実施形態では、本方法は、ＦｋｐＡへの抗ＦｋｐＡ抗体の結合を許容する条件下で、組換えポリペプチド調製物の試料を本明細書に記載の抗ＦｋｐＡ抗体と接触させることと、抗ＦｋｐＡ抗体とＦｋｐＡとの間で複合体が形成されるかどうかを検出することとを含む。

【０２７９】

ある特定の実施形態では、標識抗ＦｋｐＡ抗体が提供される。標識としては、直接検出される標識または部分（蛍光標識、発色団標識、電子密度の高い標識、化学発光標識、及び放射性標識等）、ならびに間接的に、例えば、酵素反応または分子相互作用により検出される酵素またはリガンド等の部分が挙げられるが、これらに限定されない。例示的な標識としては、放射性同位体３２Ｐ、１４Ｃ、１２５Ｉ、３Ｈ、及び１３１Ｉ、フルオロフォア（希土類キレートまたはフルオレセイン及びその誘導体等）、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルセリフェラーゼ（ｌｕｃｅｒｉｆｅｒａｓｅ）、例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ（米国特許第４，７３７，４５６号）、ルシフェリン、２，３－ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖質オキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース－６－リン酸塩デヒドロゲナーゼ、過酸化水素を用いて色素前駆体を酸化させる酵素（ＨＲＰ等）、ラクトペルオキシダーゼ、またはマイクロペルオキシダーゼとカップリングされたウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ等の複素環式オキシダーゼ、ビオチン／アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、ならびに安定した遊離ラジカル等が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２８０】

ある特定の実施形態では、捕捉抗ＦｋｐＡ抗体は、固相に固定化される。いくつかの実施形態では、固定化のために使用される固相は、例えば、表面、粒子、多孔質マトリックス、ビーズ等の形態の支持体を含む、本質的に水不溶性であり、免疫測定アッセイに有用な任意の不活性支持体または担体である。一般に使用されている支持体の例としては、小シート、ＳＥＰＨＡＤＥＸ（登録商標）、ゲル、ポリ塩化ビニル、プラスチックビーズ、及びポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン等から製造されたアッセイプレートまたは試験管、例えば、９６ウェルマイクロタイタープレート、ならびに濾紙等の粒子状材料、アガロース、架橋デキストラン、及び他の多糖類が挙げられる。あるいは、米国特許第３，９６９，２８７号、同３，６９１，０１６号、同４，１９５，１２８号、同４，２４７，６４２号、同４，２２９，５３７号、及び同４，３３０，４４０号に記載の反応性水不溶性マトリックス、（臭化シアン活性化炭水化物等）ならびに反応性基質が、捕捉－試薬固定化に好適に用いられる。いくつかの実施形態では、固定化捕捉試薬は、一度にいくつかの試料を分析するために使用され得るマイクロタイタープレート上にコーティングされる。例示的なマイクロタイタープレートとしては、ＭＩＣＲＯＴＥＳＴ（登録商標）、ＭＡＸＩＳＯＲＰ（登録商標）、ＮＵＮＣ　ＭＡＸＩＳＯＲＢ（登録商標）、及びＩＭＭＵＬＯＮ（登録商標）が挙げられるが、これらに限定されない。固相は、非共有結合もしくは共有結合相互作用、または所望の場合、物理的結合によって結合し得る、上記に定義される捕捉試薬でコーティングされる。結合技法としては、米国特許第４，３７６，１１０号及びその中で引用されている参考文献に記載されるものが挙げられる。共有結合の場合、プレートまたは他の固相が、室温で１時間等の当該技術分野で周知の条件下で、捕捉試薬と一緒に、架橋剤とともにインキュベートされる。いくつかの実施形態では、プレートが積み重ねられ、アッセイ自体のかなり前にコーティングされ、その後、アッセイが、手動、半自動、または自動の様式で（ロボット工学を使用することによって等）いくつかの試料で同時に行われる。

【０２８１】
いくつかの実施形態では、コーティングされたプレートは、結合部位に非特異的に結合してそれを飽和させる遮断剤で処理されて、遊離リガンドのプレートのウェル上の過剰部位への望ましくない結合を阻止する。この目的に適切な遮断剤の例としては、例えば、ゼラチン、ウシ血清アルブミン、卵アルブミン、カゼイン、及び脱脂乳が挙げられるが、これらに限定されない。遮断処理は、典型的には、周囲温度の条件下である期間、典型的には、約１～４時間行われる。
【０２８２】
いくつかの実施形態では、コーティング及び遮断後、分析される、適切には、希釈される試料が、固定化相に添加される。この目的のために希釈に使用され得る例示的な緩衝液としては、（ａ）０．５％のＢＳＡ、０．０５％のＴＷＥＥＮ２０（登録商標）洗剤（Ｐ２０）、０．０５％のＰＲＯＣＬＩＮ（登録商標）３００抗生物質、５ｍＭのＥＤＴＡ、０．２５％の３－（（３－コールアミドプロピル）ジメチルアンモニオ）－１－プロパンスルホネート（ＣＨＡＰＳ）界面活性剤、０．２％のベーターガンマグロブリン、及び０．３５ＭのＮａＣｌを含有する、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、（ｂ）０．５％のウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、０．０５％のＰ２０、及び０．０５％のＰＲＯＣＬＩＮ（登録商標）３００を含有する、ＰＢＳ（ｐＨ７）、（ｃ）０．５％のＢＳＡ、０．０５％のＰ２０、０．０５％のＰＲＯＣＬＩＮ（登録商標）３００、５ｍＭのＥＤＴＡ、及び０．３５ＭのＮａＣｌを含有する、ＰＢＳ（ｐＨ６．３５）、（ｄ）０．５％のＢＳＡ、０．０５％のＰ２０、０．０５％のＰＲＯＣＬＩＮ（登録商標）３００、５ｍＭのＥＤＴＡ、０．２％のベーターガンマグロブリン、及び０．３５ＭのＮａＣｌを含有する、ＰＢＳ、ならびに（ｅ）０．５％のＢＳＡ、０．０５％のＰ２０、０．０５％のＰＲＯＣＬＩＮ（登録商標）３００、５ｍＭのＥＤＴＡ、０．２５％のＣＨＡＰＳ、及び０．３５ＭのＮａＣｌを含有するＰＢＳが挙げられるが、これらに限定されない。
【０２８３】
試料及び固定化捕捉試薬のインキュベーションの条件は、アッセイの感度を最大にし、解離を最小限に抑えるように、かつ試料中に存在する目的とするいかなる検体（ＦｋｐＡ等）も固定化捕捉試薬に確実に結合するように選択される。任意に、試料は、捕捉されていない材料を除去するために、（例えば、洗浄によって）固定化捕捉試薬から分離される。洗浄に使用される溶液は、一般に、緩衝液（例えば、「洗浄緩衝液」）である。架橋剤または他の好適な薬剤もこの段階で添加されて、目的とする捕捉された材料がその後のステップである程度解離されるという懸念がある場合に、目的とする現在結合した材料（例えば、ＦｋｐＡ）が捕捉試薬に共有結合することを可能にし得る。
【０２８４】
存在する目的とする任意の結合した材料を有する固定化捕捉試薬を、検出抗ＦｋｐＡ抗体と接触させる。いくつかの実施形態では、検出抗体は、ビオチン化される。いくつかの実施形態では、ビオチン化標識のための検出手段は、アビジンまたはストレプトアビジン－ＨＲＰである。いくつかの実施形態では、検出手段の読み出しは、蛍光または比色である。
【０２８５】
捕捉試薬に現在結合している試料由来の目的とするいかなる遊離材料（例えば、ＦｋｐＡ）のレベルも、検出抗体の検出手段を使用して測定または定量化される。いくつかの実施形態では、測定または定量化は、上記のステップの結果として生じる反応を標準曲線と比較して、既知の量に対する目的とする材料（例えば、ＦｋｐＡ）のレベルを決定することを含む。
【０２８６】
固定化捕捉試薬に添加される抗体は、直接標識されるか、または過剰な第１の抗体を洗い流した後に、第１の抗体の動物種のＩｇＧに対して指向されたモル過剰の第２の標識抗体を添加することによって間接的に検出されるかのいずれかである。後者の間接アッセイでは、第１の抗体に対する標識抗血清が試料に添加されて、標識抗体をインサイチュで産生する。

【０２８７】
第１の抗体または第２の抗体のいずれかに使用される標識は、目的とする遊離材料（例えば、ＦｋｐＡ）の第１の抗体または第２の抗体への結合と干渉しない、任意の検出可能な官能基である。好適な標識の例としては、免疫アッセイでの使用に既知のもの、例えば、上記に列挙されるものが挙げられる。
【０２８８】
これらの標識をタンパク質またはポリペプチドに共有結合させるための、従来の方法が利用可能である。例えば、ジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド、ビス－イミデート、及びビス－ジアゾ化ベンジジン等のカップリング剤を使用して、抗体を、上述の蛍光標識、化学発光標識、及び酵素標識でタグすることができる。例えば、米国特許第３，９４０，４７５号（蛍光測定法）及び米国特許第３，６４５，０９０号（酵素）、Ｈｕｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ１４４：９４５（１９６２）、Ｄａｖｉｄ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１３：１０１４－１０２１（１９７４）、Ｐａｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ４０：２１９－２３０（１９８１）、及びＮｙｇｒｅｎ，Ｊ．Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ．ａｎｄ Ｃｙｔｏｃｈｅｍ．，３０：４０７－４１２（１９８２）を参照されたい。
【０２８９】
ＩＸ．製剤化に使用するための多重特異性抗体の取得及び方法
本明細書に記載の精製方法で使用される多重特異性抗体は、組換え方法を含む、当該技術分野で周知の方法を使用して得ることができる。以下の項は、これらの方法に関する手引きを提供する。
【０２９０】
（Ａ）ポリヌクレオチド
ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ポリペプチドｍＲＮＡを有し、かつそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製されたｃＤＮＡライブラリを含むが、これらに限定されない任意の供給源から得ることができる。したがって、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ヒト組織から調製されたｃＤＮＡライブラリから好都合に得ることができる。ポリペプチドをコードする遺伝子もまた、ゲノムライブラリから、または既知の合成手順（例えば、自動核酸合成）によって得ることができる。
【０２９１】
例えば、ポリヌクレオチドは、軽鎖及び重鎖等の全免疫グロブリン分子鎖をコードし得る。完全な重鎖は、重鎖可変領域（V_H）だけでなく、重鎖定常領域（C_H）も含み、これは、典型的には、３つの定常ドメイン、つまり、C_H1、C_H2、及びC_H3、ならびに「ヒンジ」領域を含む。いくつかの状況では、定常領域の存在が望ましい。
【０２９２】
ポリヌクレオチドによってコードされ得る他のポリペプチドとしては、単一ドメイン抗体（「ｄＡｂ」）、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ'、及び$F(ab')_2$等の抗原結合抗体断片、ならびに「ミニボディ」が挙げられる。ミニボディは、（典型的には）C_H1及びC_KまたはC_Lドメインが切除されている、二価抗体断片である。ミニボディは、従来の抗体よりも小さいため、それらは、臨床的／診断的用途においてより良好な組織浸透を達成するはずであるが、二価であるため、それらは、ｄＡｂ等の一価抗体断片よりも高い親和性を保持するはずである。したがって、別途文脈が指示しない限り、本明細書で使用されるとき、「抗体」という用語は、全抗体分子だけでなく、上記に考察される種類の抗原結合抗体断片も包含する。好ましくは、コードされたポリペプチド中に存在する各フレームワーク領域は、対応するヒトアクセプターフレームワークと比較して、少なくとも１つのアミノ酸置換を有する。したがって、例えば、フレームワーク領域は、アクセプターフレームワークと比較して、合計で、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５個のアミノ酸置換を含み得る。
【０２９３】
好適には、本明細書に記載のポリヌクレオチドは、単離及び／または精製され得る。いく

つかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、単離されたポリヌクレオチドである。
【０２９４】
「単離されたポリヌクレオチド」という用語は、分子がその正常または天然環境から除去または分離されるか、またはそれがその正常または天然環境に存在しないような方法で産生されていることを示すことが意図される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、精製されたポリヌクレオチドである。精製されたという用語は、少なくともいくらかの混入分子または物質が除去されていることを示すことが意図される。
【０２９５】
好適には、ポリヌクレオチドは、関連ポリヌクレオチドが、組成物中に存在する支配的な（すなわち、最も豊富な）ポリヌクレオチドを構成するように、実質的に精製される。
【０２９６】
（Ｂ）ポリヌクレオチドの発現
以下の説明は、主にポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターで形質転換またはトランスフェクトされた細胞を培養することによる、ポリペプチドの産生に関する。当然ながら、当該技術分野で周知の代替の方法を用いて、ポリペプチドを調製することができることが企図される。例えば、適切なアミノ酸配列またはその部分は、固相技法を使用する直接ペプチド合成によって産生され得る（例えば、Ｓｔｅｗａｒｔ ｅｔａｌ．，Ｓｏｌｉｄ－Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ Ｃｏ．，Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，Ｃａｌｉｆ．（１９６９）、Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．８５：２１４９－２１５４（１９６３）を参照されたい）。インビトロタンパク質合成は、手動技法を使用して、または自動で行われ得る。自動合成は、例えば、製造業者の指示を使用して、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ（Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ，Ｃａｌｉｆ．）を使用して達成され得る。ポリペプチドの様々な部分を別個に化学的に合成し、化学的または酵素的方法を使用して組み合わせて、所望のポリペプチドを産生することができる。
【０２９７】
本明細書に記載のポリヌクレオチドは、ポリペプチドの産生のために発現ベクター（複数可）に挿入される。「制御配列」という用語は、特定の宿主生物における、作動可能に結合されたコード配列の発現に必要なＤＮＡ配列を指す。制御配列としては、プロモーター（例えば、天然会合プロモーターまたは異種プロモーター）、シグナル配列、エンハンサーエレメント、及び転写終結配列が挙げられるが、これらに限定されない。
【０２９８】
ポリヌクレオチドは、それが別のポリヌクレオチド配列と機能的な関係性に置かれているとき、「作動可能に結合」されている。例えば、プレ配列または分泌リーダーの核酸は、それがポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現する場合、ポリペプチドの核酸に作動可能に結合しているか、プロモーターまたはエンハンサーは、それがコード配列の転写に影響を及ぼす場合、その配列に作動可能に結合しているか、あるいはリボソーム結合部位は、それが翻訳を容易にするように位置付けられている場合、コード配列に作動可能に結合している。一般に、「作動可能に結合」するとは、結合している核酸配列が連続的であること、及び分泌リーダーの場合では、連続的かつリーディング相にあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは、連続的でなくてもよい。結合は、好都合な制限部位での連結によって達成される。かかる部位が存在していない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが、従来的な慣例に従って使用される。
【０２９９】
抗体の場合、軽鎖及び重鎖は、同じまたは異なる発現ベクター内でクローニングされ得る。免疫グロブリン鎖をコードする核酸セグメントは、免疫グロブリンポリペプチドの発現を確実にする発現ベクター（複数可）内の制御配列に作動可能に結合される。
【０３００】
ポリヌクレオチド配列を含有するベクター（例えば、可変重鎖及び／または可変軽鎖コー

ド配列ならびに任意の発現制御配列）は、細胞宿主の種類に応じて異なる周知の方法によって宿主細胞に移行され得る。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションは、一般的に原核生物細胞に利用される一方で、リン酸カルシウム処理、電気穿孔、リポフェクション、微粒子銃、またはウイルス系トランスフェクションは、他の細胞宿主に使用され得る。（一般に、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｐｒｅｓｓ，２ｎｄ　ｅｄ．，１９８９を参照されたい）。哺乳動物細胞を形質転換するために使用される他の方法としては、ポリブレン、プロトプラスト融合、リポソーム、電気穿孔、及び微量注入の使用が挙げられる。遺伝子導入動物を産生するためには、導入遺伝子が受精卵母細胞に微量注入され得るか、または胚性幹細胞のゲノムに組み込まれ、かかる細胞の核が除核された卵母細胞に移行され得る。

【０３０１】

ベクター

「ベクター」という用語は、発現ベクター及び形質転換ベクター及びシャトルベクターを含む。

【０３０２】

「発現ベクター」という用語は、インビボまたはインビトロ発現することができる構築物を意味する。

【０３０３】

「形質転換ベクター」という用語は、１つの主体から別の主体（その種のものであっても、異なる種のものであってもよい）へと移行され得る構築物を意味する。構築物が１つの種から別の種へと（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉプラスミドから、Ｂａｃｉｌｌｕｓ属等の細菌へ等）移行され得る場合、形質転換ベクターは、「シャトルベクター」と呼ばれる場合がある。それは、Ｅ．ｃｏｌｉプラスミドから植物に対するＡｇｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍへと移行され得る構築物ですらあり得る。

【０３０４】

ベクターは、ポリペプチドの発現を提供するために、以下に記載される好適な宿主細胞へと形質転換され得る。様々なベクターが、公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、またはファージの形態であり得る。適切な核酸配列が、様々な手順によってベクターに挿入され得る。一般に、ＤＮＡは、当該技術分野で既知の技法を使用して、適切な制限エンドヌクレアーゼ部位（複数可）に挿入される。これらの成分のうちの１つ以上を含有する好適なベクターの構築は、当業者に既知の標準の連結技法を用いる。

【０３０５】

ベクターは、例えば、複製起点、任意に該ポリヌクレオチドの発現のためのプロモーター、及び任意にプロモーターの調節因子を有して提供される、プラスミド、ウイルス、またはファージベクターであり得る。ベクターは、当該技術分野で周知の１つ以上の選択可能なマーカー遺伝子を含有し得る。

【０３０６】

これらの発現ベクターは、典型的には、エピソームまたは宿主染色体ＤＮＡの不可欠な部分のいずれかとして、宿主生物において複製可能である。

【０３０７】

宿主細胞

宿主細胞は、例えば、細菌、酵母もしくは他の真菌細胞、昆虫細胞、植物細胞、または哺乳動物細胞であり得る。

【０３０８】

遺伝子操作されている遺伝子導入多細胞宿主生物を使用して、ポリペプチドを産生することができる。この生物は、例えば、遺伝子導入哺乳動物生物（例えば、遺伝子導入ヤギまたはマウス株）であり得る。

【０３０９】

好適な原核生物としては、Ｅｕｂａｃｔｅｒｉａ（グラム陰性またはグラム陽性生物等、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ等のＥｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ）が挙げられるが、これらに限定されない。Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｋ１２株ＭＭ２９４（ＡＴＣＣ３１，４４６）、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｘ１７７６（ＡＴＣＣ３１，５３７）、Ｅ．ｃｏｌｉ株Ｗ３１１０（ＡＴＣＣ２７，３２５）、及びＫ５７７２（ＡＴＣＣ５３，６３５）等の様々なＥ．ｃｏｌｉ株が、公的に入手可能である。他の公的な原核生物宿主細胞としては、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ等、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ、Ｅｒｗｉｎｉａ、Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ、Ｐｒｏｔｅｕｓ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ、例えば、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ、Ｓｅｒｒａｔｉａ、例えば、Ｓｅｒｒａｔｉａ　ｍａｒｃｅｓｃａｎｓ、及びＳｈｉｇｅｌｌａ）、ならびにＢａｃｉｌｌｉ（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ及びＢ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ（例えば、Ｂ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ４１Ｐ）等）、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ等）、及びＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓが挙げられる。これらの例は、限定的なものではなく、むしろ例示的なものである。株Ｗ３１１０は、組換えポリヌクレオチド産物発酵にとって一般的な宿主株であるため、それは、１つの特に好ましい宿主または親宿主である。好ましくは、宿主細胞は、最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株Ｗ３１１０は、宿主に内因性であるポリペプチドをコードする遺伝子において遺伝子変異をもたらすように修飾されてもよく、かかる宿主の例としては、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｗ３１１０株１Ａ２（完全な遺伝子型ｔｏｎＡを有する）、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｗ３１１０株９Ｅ４（完全な遺伝子型ｔｏｎＡ　ｐｔｒ３を有する）、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｗ３１１０株２７Ｃ７（ＡＴＣＣ５５，２４４）（完全な遺伝子型ｔｏｎＡ　ｐｔｒ３　ｐｈｏＡ　Ｅ１５（ａｒｇＦ－ｌａｃ）１６９　ｄｅｇＰ　ｏｍｐＴ　ｋａｎ'を有する）、Ｅ．ｃｏｌｉＷ３１１０株３７Ｄ６（完全な遺伝子型ｔｏｎＡ　ｐｔｒ３　ｐｈｏＡ　Ｅ１５（ａｒｇＦ－ｌａｃ）１６９　ｄｅｇＰ　ｏｍｐＴ　ｒｂｓ７　ｉｌｖＧ　ｋａｎ'を有する）、Ｅ．ｃｏｌｉＷ３１１０株４０Ｂ４（非カナマイシン耐性ｄｅｇＰ欠失変異を有する株３７Ｄ６である）、及び変異周辺質プロテアーゼを有するＥ．ｃｏｌｉ株が挙げられる。あるいは、インビトロのクローニング方法、例えば、ＰＣＲまたは他の核酸ポリメラーゼ反応が好適である。いくつかの実施形態では、原核生物宿主細胞（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞）が、１つ以上のシャペロンを発現して、抗体の折り畳み及び組み立てを容易にする。いくつかの実施形態では、シャペロンは、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、またはＤｓｂＣのうちの１つ以上である。いくつかの実施形態では、シャペロンは、内因性シャペロン遺伝子から発現される。いくつかの実施形態では、シャペロンは、外因性シャペロン遺伝子から発現される。いくつかの実施形態では、シャペロン遺伝子は、Ｅ．ｃｏｌｉシャペロン遺伝子（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＦｋｐＡ遺伝子、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤｓｂＡ遺伝子、及び／またはＥ．ｃｏｌｉ　ＤｓｂＣ遺伝子）である。

【０３１０】

これらの原核生物宿主内では、典型的には、宿主細胞と適合性のある発現制御配列（例えば、複製起点）を含有する、発現ベクターを作製することができる。加えて、ラクトースプロモーター系、トリプトファン（ｔｒｐ）プロモーター系、ベータ－ラクタマーゼプロモーター系、またはファージラムダ由来のプロモーター系等の、任意の数の様々な周知のプロモーターが存在する。プロモーターは、典型的には、任意にオペレーター配列によって発現を制御し、リボソーム結合部位配列等を有することで、転写及び翻訳を開始し、完了する。

【０３１１】

真核生物微生物が、発現に使用され得る。糸状真菌または酵母等の真核生物微生物は、ポリペプチドをコードするベクターの好適なクローニングまたは発現宿主である。Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅは、一般的に使用される下等真核生物宿主微生物である。他には、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｐｏｍｂｅ、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ宿主（例えば、Ｋ．ｌａｃｔｉｓ（ＭＷ９８－８Ｃ、ＣＢＳ６８３、ＣＢＳ４５７４）、Ｋ．ｆｒａｇｉｌｉｓ（ＡＴＣＣ１２，４２４）、Ｋ．ｂｕｌｇａｒ

ｉｃｕｓ（ＡＴＣＣ１６，０４５）、Ｋ．ｗｉｃｋｅｒａｍｉｉ（ＡＴＣＣ２４，１７８）、Ｋ．ｗａｌｔｉｉ（ＡＴＣＣ５６，５００）、Ｋ．ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａｒｕｍ（ＡＴＣＣ３６，９０６）、Ｋ．ｔｈｅｒｍｏｔｏｌｅｒａｎｓ、及びＫ．ｍａｒｘｉａｎｕｓ等）、ｙａｒｒｏｗｉａ（ＥＰ４０２，２２６）、Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ、Ｃａｎｄｉｄａ、Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ ｒｅｅｓｉａ、Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ ｃｒａｓｓａ、Ｓｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ（Ｓｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ ｏｃｃｉｄｅｎｔａｌｉｓ等）、ならびに糸状真菌（例えば、Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ、Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ、Ｔｏｌｙｐｏｃｌａｄｉｕｍ、及び（Ａ．ｎｉｄｕｌａｎｓ及びＡ．ｎｉｇｅｒ等の）Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ宿主等）が挙げられる。メチロトローフ（Ｍｅｔｈｙｌｏｔｒｏｐｉｃ）酵母は、本明細書において好適であり、Ｈａｎｓｅｎｕｌａ、Ｃａｎｄｉｄａ、Ｋｌｏｅｃｋｅｒａ、Ｐｉｃｈｉａ、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ、Ｔｏｒｕｌｏｐｓｉｓ、及びＲｈｏｄｏｔｏｒｕｌａからなる属から選択される、メタノール上で成長することができる酵母を含むが、これらに限定されない。Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓは、好ましい酵母宿主であり、好適なベクターは、所望の場合、発現制御配列（例えば、プロモーター）、複製起点、及び終結配列等を有する。典型的なプロモーターは、３－ホスホグリセリン酸キナーゼ及び他の解糖酵素を含む。誘導酵母プロモーターとしては、中でも、アルコールデヒドロゲナーゼ、イソシトクロムＣ、及びマルトース及びガラクトース利用に関与する酵素由来のプロモーターが挙げられる。

【０３１２】

微生物に加えて、哺乳動物組織細胞培養物を使用して、本明細書に記載のポリペプチドを発現し、産生することもでき、いくつかの事例では、これが好ましい（Ｗｉｎｎａｃｋｅｒ，Ｆｒｏｍ Ｇｅｎｅｓ ｔｏ Ｃｌｏｎｅｓ ＶＣＨ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｎ．Ｙ．，Ｎ．Ｙ．（１９８７）を参照されたい）。いくつかの実施形態の場合、異種ポリペプチド（例えば、無傷免疫グロブリン）を分泌することができるいくつかの好適な宿主細胞株が、当該技術分野で開発されており、ＣＨＯ細胞株、様々なＣｏｓ細胞株、ＨｅＬａ細胞、好ましくは、骨髄腫細胞株、または形質転換Ｂ細胞もしくはハイブリドーマが挙げられるため、真核生物細胞が好ましくあり得る。いくつかの実施形態では、哺乳動物宿主細胞は、ＣＨＯ細胞である。

【０３１３】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、脊椎動物宿主細胞である。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、ＳＶ４０によって形質転換されたサル腎臓ＣＶ１（ＣＯＳ－７、ＡＴＣＣ ＣＲＬ１６５１）、ヒト胚腎臓株（成長のために懸濁液培養物内でサブクローニングされた２９３または２９３細胞）、ベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ、ＡＴＣＣ ＣＣＬ１０）、チャイニーズハムスター卵巣細胞／－ＤＨＦＲ（ＣＨＯまたはＣＨＯ－ＤＰ－１２株）、マウスセルトリ細胞、サル腎臓細胞（ＣＶ１ ＡＴＣＣ ＣＣＬ７０）、アフリカミドリザル腎臓細胞（ＶＥＲＯ－７６、ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１５８７）、ヒト子宮頸癌細胞（ＨＥＬＡ、ＡＴＣＣ ＣＣＬ２）、イヌ腎臓細胞（ＭＤＣＫ、ＡＴＣＣ ＣＣＬ３４）、バッファローラット肝臓細胞（ＢＲＬ３Ａ、ＡＴＣＣ ＣＲＬ１４４２）、ヒト肺細胞（Ｗ１３８、ＡＴＣＣ ＣＣＬ７５）、ヒト肝臓細胞（Ｈｅｐ Ｇ２、ＨＢ８０６５）、マウス乳腺腫瘍（ＭＭＴ０６０５６２、ＡＴＣＣ ＣＣＬ５１）、ＴＲＩ細胞、ＭＲＣ５細胞、ＦＳ４細胞、及びヒト肝臓癌株（Ｈｅｐ Ｇ２）である。

【０３１４】

Ｘ．半抗体の多重特異性抗体組立体の産生

いくつかの実施形態では、本発明は、多重特異性抗体を産生するための方法及び試薬を提供する。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、半抗体を別個に産生することによって産生され、各半抗体は、特定のエピトープに結合するＶＨ／ＶＬ単位を含む。いくつかの実施形態では、各半抗体は、宿主細胞内で別個に産生される。いくつかの実施形態では、各半抗体は、同じ宿主細胞内でともに産生される。半抗体は、混合され、多重特異性抗体へと組み立てられる。いくつかの実施形態では、各半抗体は、同じ宿主細胞内でともに産生される。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、及び／また

はＤｓｂＣ等のシャペロンを発現して、半抗体の折り畳みを容易にする。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、ＩＬ１３に結合する半抗体及びＩＬ１７に結合する半抗体から組み立てられる。

【０３１５】

各半抗体は、米国特許第７，６４２，２２８号に記載されるように、重鎖内に操作されるノブ（隆起）またはホール（空洞）のいずれかを有し得る。簡潔には、ＣＨ３ノブ変異体が、まず産生され得る。その後、パートナーＣＨ３ドメイン上のノブに近接する残基３６６、３６８、及び４０７をランダム化することによって、ＣＨ３ホール変異体のライブラリが作製され得る。ある特定の実施形態では、ノブ変異はＴ３６６Ｗを含み、ホール変異は変異を有し、ＩｇＧ１またはＩｇＧ４骨格においてＴ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、及びＹ４０７Ｖを含む。当業者であれば、他の免疫グロブリンアイソタイプにおける同等の変異を作製することができる。更に、当業者であれば、二重特異性に使用される２つの半抗体が同じアイソタイプのものであることが好ましいことを容易に理解するであろう。

【０３１６】

いくつかの実施形態では、ノブ変異またはホール変異のいずれかを含有する半抗体は、細菌宿主細胞（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）内で重鎖及び軽鎖構築物を発現することによって、別個の培養物内で生成される。各半抗体は、タンパク質Ａ親和性クロマトグラフィーによって別個に精製することができる。ノブ半抗体及びホール半抗体から浄化された細胞抽出物は、ＨｉＴｒａｐ（登録商標）ＭａＢＳｅｌｅｃｔ（商標）ＳｕＲｅ（商標）カラムによって精製され得る。異なる特異性を有するタンパク質Ａ精製半抗体を組み立てて、還元剤の存在下、インビトロの酸化還元反応において二重特異性抗体を形成することができる。

【０３１７】

いくつかの実施形態では、ノブ変異またはホール変異のいずれかを含有する半抗体は、同じ細菌宿主細胞（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）内で重鎖及び軽鎖構築物を発現することによって、同じ培養物内で生成される。半抗体は、タンパク質Ａ親和性クロマトグラフィーによって精製することができる。ノブ半抗体及びホール半抗体から浄化された細胞抽出物は、ＨｉＴｒａｐ（登録商標）ＭａＢＳｅｌｅｃｔ（商標）ＳｕＲｅ（商標）カラムによって精製され得る。異なる特異性を有するタンパク質Ａ精製半抗体を組み立てて、還元剤の存在下、インビトロの酸化還元反応において二重特異性抗体を形成することができる。

【０３１８】

任意の好適な方法を使用して、所望の還元条件を調製することができる。例えば、所望の還元条件は、還元体／還元剤を反応物（本発明の組み立て混合物等）に添加することによって調製され得る。好適な還元体としては、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）、チオグリコール酸、アスコルビン酸、チオール酢酸、グルタチオン（ＧＳＨ）、ベーター－メルカプトエチルアミン、システイン／シスチン、ＧＳＨ／グルタチオンジスルフィド（ＧＳＳＧ）、システアミン／シスタミン、グリシルシステイン、及びベーター－メルカプトエタノールが挙げられるが、これらに限定されず、好ましくは、ＧＳＨである。ある特定の実施形態では、還元体は、弱還元体であり、弱還元体としては、ＧＳＨ、ベーター－メルカプトエチルアミン、システイン／シスチン、ＧＳＨ／ＧＳＳＧ、システアミン／シスタミン、グリシルシステイン、及びベーター－メルカプトエタノールが挙げられるが、これらに限定されず、好ましくは、ＧＳＨである。ある特定の好ましい実施形態では、還元体は、ＧＳＨである。ある特定の実施形態では、還元体は、ＤＴＴではない。所望の還元条件を反応において達成するために、好適な実験条件下で好適な濃度の好適な還元体を選択することは、当業者の能力の範囲内である。例えば、２０℃の二重特異性抗体タンパク質濃度が１０ｇ／Ｌである溶液中の１０ｍＭのＬ還元グルタチオンは、約－４００ｍＶの開始酸化還元電位をもたらすことになる。例えば、組み立て混合物に添加されるグルタチオンは、ノブ・イン・ホール二重特異性組み立てに有利な弱還元条件を創出する。ＢＭＥＡ（ベーター－メルカプトエチルアミン）等の同様のクラスの他の還元体は、同様の効果を有し得る。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、ＷＯ２０１３／０５５９５８を参照されたい。反応の還元条件は、当該技

術分野で既知の任意の好適な方法を使用して評価され、測定され得る。例えば、還元条件は、レザズリンインジケーター（還元条件で青色から無色への変色）を使用して測定され得る。より正確に測定するためには、酸化還元電位メーター（ＢＲＯＡＤＬＥＹ　ＪＡＭＥＳ（登録商標）によって作製されるＯＲＰ電極等）が使用され得る。

【０３１９】

ある特定の実施形態において、還元条件は、弱還元条件である。本明細書で使用されるとき、「弱還元体」または「弱還元条件」という用語は、２５℃で負の酸化電位を有する還元剤によって調製される還元剤または還元条件を指す。還元体の酸化電位は、ｐＨが７～９、かつ温度が１５℃～３９℃である場合に、好ましくは、－５０～－６００ｍＶ、－１００～－６００ｍＶ、－２００～－６００ｍＶ、－１００～－５００ｍＶ、－１５０～－３００ｍＶ、より好ましくは、約－３００～－５００ｍＶ、最も好ましくは、約－４００ｍＶである。当業者は、所望の還元条件を調製するための好適な還元体を選択することができるであろう。当業者であれば、強還元体、すなわち、同じ濃度、ｐＨ、及び温度で上述の還元体よりも大きい負の酸化電位を有するものが、より低い濃度で使用され得ることを認識するであろう。好ましい実施形態では、タンパク質は、上記に引用される条件下でインキュベートされる場合に、還元体の存在下でジスルフィド結合を形成することができる。弱還元体の例としては、グルタチオン、ベーターメルカプトエチルアミン、システィン／システイン、ＧＳＨ／ＧＳＳＧ、システアミン／シスタミン、グリシルシステイン、及びベーターメルカプトエタノールが挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、ＧＳＨ：抗体の２００倍のモル比のものと同様の酸化電位を、他の還元体を使用した効率的な組み立てが期待できる弱還元条件の参照点として使用することができる。

【０３２０】

グルタチオン濃度は、モル濃度の観点から、または組み立て混合物中に存在する半抗体の量に対するモル比もしくはモル過剰の観点から表され得る。還元体の標的モル比を使用することで、組み立て混合物中のタンパク質濃度が制御され、これにより、様々なタンパク質濃度による還元過剰または還元不足を阻止する。ある特定の他の実施形態では、還元体は、半抗体の総量に対して、２～６００倍、２～２００倍、２～３００倍、２～４００倍、２～５００倍、２～２０倍、２～８倍、２０～５０倍、５０～６００倍、５０～２００倍、または１００～３００倍のモル過剰、好ましくは５０～４００倍、より好ましくは１００～３００倍、最も好ましくは２００倍のモル過剰で、組み立て混合物に添加される。ある特定の実施形態では、組み立て混合物は、７～９のｐＨ、好ましくはｐＨ８．５を有する。

【０３２１】

ＸＩ．多重特異性抗体を含むポリペプチドの精製

シャペロン（例えば、ＦｋｐＡ、Ｄｓｂａ、及び／またはＤｓｂＣ）を使用して、Ｅ．ｃｏｌｉ内で生成されるポリペプチド（例えば、多重特異性抗体）の精製方法が、本明細書に提供される。いくつかの態様では、多重特異性抗体の精製は、親和性クロマトグラフィー、混合モードクロマトグラフィー、及び疎水性相互作用クロマトグラフィーの逐次的ステップを含む。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、親和性クロマトグラフィー前に組み立てられる。他の態様では、多重特異性抗体は、親和性クロマトグラフィー後に組み立てられる。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、抗体の一方のアーム（すなわち、一方のＶＨ／ＶＬ単位）がＩＬ１３に結合し、他方のアームがＩＬ１７に結合する、二重特異性抗体である。

【０３２２】

いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、２つ以上の抗体アームで構成され、異なる抗体アームが、異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体アームは、ＶＨ／ＶＬ単位を含む。いくつかの実施形態では、抗体アームは、半抗体としても知られるヘミマーを含む。組み立てを容易にするために、いくつかの実施形態では、一方の抗体アームの重鎖が「ノブ」を含むように修飾され、別の抗体アームの重鎖が第１の重鎖のノブが第２の重鎖のホールにフィットするように「ホール」を含む。

【０３２３】
いくつかの実施形態では、多重特異性抗体の各アームは、別個の細胞培養物で産生される。宿主細胞内での抗体アームの発現後、全細胞ブロスが収集され、ホモジナイズされ、抗体アームが抽出される。いくつかの実施形態では、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）が、クロマトグラフィー前に細胞溶解物に添加される。いくつかの実施形態では、細胞溶解物は、クロマトグラフィー前に遠心分離される。その後、多重特異性抗体の各アームは、親和性クロマトグラフィーによって精製される。いくつかの実施形態では、親和性クロマトグラフィーは、タンパク質Ａクロマトグラフィーである。この時点で、精製抗体アームは、例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ　ＳＥＣクロマトグラフィー、質量分析法等によって分析され得る。その後、多重特異性抗体の精製されたアームは、本明細書に記載の方法によって組み合わされ、組み立てられる。

【０３２４】
他の実施形態では、多重特異性抗体の各アームは、別個の細胞培養物で産生される。宿主細胞内での抗体アームの発現後、全細胞ブロスが収集され、ホモジナイズされる。その後、各培養物由来の細胞ホモジネートは混合され、組み合わされた抗体アームが抽出される。いくつかの実施形態では、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）が、クロマトグラフィー前に細胞溶解物に添加される。いくつかの実施形態では、細胞溶解物は、クロマトグラフィー前に遠心分離される。その後、多重特異性抗体の組み合わされたアームは、親和性クロマトグラフィーによって精製される。いくつかの実施形態では、親和性クロマトグラフィーは、タンパク質Ａクロマトグラフィーである。この時点で、精製抗体アームは、例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ　ＳＥＣクロマトグラフィー、質量分析法等によって分析され得る。その後、多重特異性抗体の精製されたアームは、本明細書に記載の方法によって組み合わされ、組み立てられる。

【０３２５】
他の実施形態では、多重特異性抗体の各アームは、同じ細胞培養物で産生される。宿主細胞内での抗体アームの発現後、全細胞ブロスが収集され、ホモジナイズされ、抗体アームが抽出される。いくつかの実施形態では、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）が、クロマトグラフィー前に細胞溶解物に添加される。いくつかの実施形態では、細胞溶解物は、クロマトグラフィー前に遠心分離される。その後、多重特異性抗体のアームは、親和性クロマトグラフィーによって精製される。いくつかの実施形態では、親和性クロマトグラフィーは、タンパク質Ａクロマトグラフィーである。この時点で、精製抗体アームは、例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ　ＳＥＣクロマトグラフィー、質量分析法等によって分析され得る。その後、多重特異性抗体の精製されたアームは、本明細書に記載の方法によって組み立てられる。

【０３２６】
いくつかの実施形態では、細胞溶解物中のＰＥＩの最終濃度は、少なくとも約０．１％、約０．２％、約０．３％、約０．４％、約０．５％、約０．６％、約０．７％、約０．８％、約０．９％、約１．０％、約２．０％、約３．０％、約４．０％、または約５．０のうちのいずれかである。いくつかの実施形態では、細胞溶解物中のＰＥＩの最終濃度は、約０．１％～５％、約０．１％～１％、約０．１％～０．５％、約０．５％～５％、約０．５％～１％、または約１％～５％のうちのいずれか１つである。いくつかの実施形態では、ＰＥＩを含む細胞溶解物は、約１時間、約２時間、約３時間、約４時間、約５時間、約６時間、約７時間、約８時間、約９時間、約１０時間、約１２時間、約１４時間、約１６時間、約１８時間、約２０時間、または約２４時間のうちのいずれかを超えて保持される。いくつかの実施形態では、ＰＥＩを含む細胞溶解物は、約１時間～２４時間、約１時間～６時間、約６時間～１２時間、約１２時間～１８時間、約１８時間～２４時間のうちのいずれか１つの間保持される。いくつかの実施形態では、ＰＥＩを含む細胞溶解物は、約１０時間～１４時間のうちのいずれか１つの間保持される。いくつかの実施形態では、ＰＥＩを含む細胞溶解物は、約４℃～３７℃で保持される。いくつかの実施形態では、ＰＥＩを含む細胞溶解物は、およそ周囲温度で保持される。

【０３２７】
いくつかの実施形態では、細胞溶解物は、クロマトグラフィー前に遠心分離によって浄化される。いくつかの実施形態では、細胞溶解物は、クロマトグラフィー前に濾過される。いくつかの実施形態では、細胞溶解物は、クロマトグラフィー前に０．２２μｍのフィルターを通して濾過される。
【０３２８】
親和性クロマトグラフィーの例としては、タンパク質Ａまたはタンパク質Ｇで誘導体化されるを使用するクロマトグラフィーが挙げられるが、これらに限定されない。親和性クロマトグラフィー材料の例としては、ＰｒｏＳｅｐ（登録商標）－ｖＡ、ＰｒｏＳｅｐ（登録商標）Ｕｌｔｒａ　Ｐｌｕｓ、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ、Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ（登録商標）ＡＦ－ｒＰｒｏｔｅｉｎ　Ａ、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ（商標）、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（商標）、及びＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（商標）ＬＸが挙げられるが、これらに限定されない。上述のうちのいくつかの実施形態では、親和性クロマトグラフィー材料は、カラム内にある。上述のうちのいくつかの実施形態では、親和性クロマトグラフィー材料は、膜である。いくつかの実施形態では、親和性クロマトグラフィーは、タンパク質Ａクロマトグラフィーである。いくつかの実施形態では、タンパク質Ａクロマトグラフィーは、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（商標）クロマトグラフィーである。
【０３２９】
いくつかの実施形態では、親和性クロマトグラフィーステップからの溶出物は、その後、混合モードクロマトグラフィーに適用される。いくつかの実施形態では、混合モード材料は、以下の機能性、つまり、陰イオン交換、陽イオン交換、水素結合、疎水性相互作用のうちの１つ以上をすることができる官能基を含む。いくつかの実施形態では、混合モード材料は、陰イオン交換及び疎水性相互作用をすることができる官能基を含む。いくつかの実施形態では、混合モード材料は、陽イオン交換及び疎水性相互作用をすることができる官能基を含む。混合モード材料は、Ｎ－ベンジル－Ｎ－メチルエタノールアミン、４－メルカプト－エチル－ピリジン、ヘキシルアミン、またはフェニルプロピルアミンをリガンドとして含有しても、架橋ポリアリルアミンを含有してもよい。混合モード材料の例としては、Ｃａｐｔｏ（商標）ａｄｈｅｒｅ樹脂、Ａｃ細胞（商標）Ｐｌｕｓ　Ｑｕａｔｅｒｎａｒｙ　Ｍｅｔｈｙｌ　Ａｍｉｎｅ（ＱＭＡ）樹脂、Ｃａｐｔｏ（商標）ＭＭＣ樹脂、ＭＥＰ　ＨｙｐｅｒＣｅｌ（商標）樹脂、ＨＥＡ　ＨｙｐｅｒＣｅｌ（商標）樹脂、ＰＰＡ　ＨｙｐｅｒＣｅｌ（商標）樹脂、またはＣｈｒｏｍａＳｏｒｂ（商標）膜もしくはＳａｒｔｏｂｉｎｄ　ＳＴＩＣ（登録商標）が挙げられる。いくつかの実施形態では、混合モード材料は、Ｃａｐｔｏ（商標）ａｄｈｅｒｅ樹脂である。いくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーは、結合及び溶出モードで行われ、多重特異性抗体は、混合モードクロマトグラフィー材料に結合し、その後、混合モードクロマトグラフィー材料から溶出される。上述のうちのいくつかの実施形態では、混合モード材料は、カラム内にある。上述のうちのいくつかの実施形態では、混合モード材料は、膜内にある。
【０３３０】
いくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーステップからの溶出物は、その後、疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）クロマトグラフィーに適用される。いくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーステップからの溶出物は、疎水性相互作用クロマトグラフィー前に陰イオン交換クロマトグラフィーに適用される。疎水性相互作用クロマトグラフィーは、生体分子を疎水性に従って分離する液体クロマトグラフィー技法である。ＨＩＣクロマトグラフィー材料の例としては、Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ（登録商標）Ｈｅｘｙｌ－６５０、Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ（登録商標）Ｈｅｘｙｌ－６５０Ｃ、Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ（登録商標）Ｂｕｔｙｌ－６５０、Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ（登録商標）Ｐｈｅｎｙｌ－６５０、Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ（登録商標）Ｅｔｈｅｒ－６５０、ＨｉＴｒａｐ（登録商標）Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ、Ｏｃｔｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）、Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）、またはＢｕｔｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ

（登録商標）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＨＩＣクロマトグラフィー材料は、Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）を含む。他の実施形態では、ＨＩＣクロマトグラフィー材料は、Ｂｕｔｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）を含む。いくつかの実施形態では、ＨＩＣクロマトグラフィーは、貫流モードで行われ、多重特異性抗体は、ＨＩＣクロマトグラフィーを貫流する。上述のうちのいくつかの実施形態では、ＨＩＣクロマトグラフィー材料は、カラム内にある。上述のうちのいくつかの実施形態では、ＨＩＣクロマトグラフィー材料は、膜内にある。

【０３３１】

本発明のいくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィー溶出物は、ＨＩＣクロマトグラフィー前に陰イオン交換クロマトグラフィーに適用される。いくつかの実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は、正に荷電しており、固相を通り越えるか、または通過した水溶液中の陰イオンとの交換のために遊離陰イオンを有する固相である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、陰イオン交換材料は、膜、モノリス、または樹脂であり得る。一実施形態では、陰イオン交換材料は、樹脂であり得る。いくつかの実施形態では、陰イオン交換材料は、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、または第四級アンモニウムイオン官能基、ポリアミン官能基、またはジエチルアミノアエチル（ｄｉｅｔｈｙｌａｍｉｎｏａｅｔｈｙｌ）官能基を含み得る。陰イオン交換材料の例は、当該技術分野で既知であり、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＱ５０、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＰＩ５０、ＰＯＲＯＳ（登録商標）Ｄ、ＭｕｓｔａｎｇＱ、Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＱＳＦＦ）、及びＤＥＡＥ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は、ＱＳＦＦクロマトグラフィー材料である。いくつかの実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィーは、結合及び溶出モードで行われる。上述のうちのいくつかの実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は、カラム内にある。上述のうちのいくつかの実施形態では、膜内の陰イオン交換クロマトグラフィー材料。

【０３３２】

本発明のいくつかの実施形態では、ＨＩＣクロマトグラフィーからの多重特異性抗体を含む画分は、陽イオン交換クロマトグラフィーに適用される。いくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は、正に荷電しており、固相を通り越えるか、または通過した水溶液中の陽イオンとの交換のために遊離陽イオンを有する固相である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、陽イオン交換材料は、膜、モノリス、または樹脂であり得る。いくつかの実施形態では、陽イオン交換材料は、樹脂であり得る。陽イオン交換材料は、例えば、スルホン酸塩、カルボキシル、カルボキシメチルスルホン酸、スルホイソブチル、スルホエチル、カルボキシル、スルホプロピル、スルホニル、スルホキシエチル、またはオルトリン酸塩であるが、これらに限定されないカルボン酸官能基またはスルホン酸官能基を含み得る。上述のいくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィーカラムである。上述のいくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー膜である。陽イオン交換材料の例は、当該技術分野で既知であり、Ｍｕｓｔａｎｇ（登録商標）Ｓ、Ｓａｒｔｏｂｉｎｄ（登録商標）Ｓ、ＳＯ３　Ｍｏｎｏｌｉｔｈ、ＣＩＭ（登録商標）、ＣＩＭｍｕｌｔｕｓ（登録商標）及びＣＩＭａｃ（登録商標）ＳＯ３、Ｓ　Ｃｅｒａｍｉｃ　ＨｙｐｅｒＤ（登録商標）、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＸＳ、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ２０、Ｓｕｌｐｈｏｐｒｏｐｙｌ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＳＰＳＦＦ）、ＳＰ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＸＬ（ＳＰＸＬ）、ＣＭ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ、Ｃａｐｔｏ（商標）Ｓ、Ｆｒａｃｔｏｇｅｌ（登録商標）ＥＭＤ　Ｓｅ　Ｈｉｃａｐ、Ｆｒａｃｔｏｇｅｌ（登録商標）ＥＭＤ　ＳＯ３－、またはＦｒａｃｔｏｇｅｌ（登録商標）ＥＭＤ　ＣＯＯ－が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、陽イオン交換材料

は、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０である。いくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィーは、結合及び溶出モードで行われる。上述のうちのいくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は、カラム内にある。上述のうちのいくつかの実施形態では、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は、膜内にある。

【０３３３】

本発明のいくつかの実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィーからのポリペプチド（例えば、多重特異性抗体）を含む画分は、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーに適用される。いくつかの実施形態では、ヒドロキシアパタイトは、（$Ca_5(PO_4)_3OH)_2$を含む。いくつかの実施形態では、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー材料は、固相クロマトグラフィーである。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、ヒドロキシアパタイト材料は、膜、モノリス、または樹脂であり得る。いくつかの実施形態では、陽イオン交換材料は、樹脂であり得る。いくつかの実施形態では、樹脂は、セラミックである。いくつかの実施形態では、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーは、セラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーである。いくつかの実施形態では、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーは、ＣＨＴセラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーである。ヒドロキシアパタイト材料の例は、当該技術分野で既知であり、ＣＨＴセラミックヒドロキシアパタイトのＩ型及びＩＩ型が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーは、結合及び溶出モードで行われる。上述のうちのいくつかの実施形態では、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー材料は、カラム内にある。上述のうちのいくつかの実施形態では、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー材料は、膜内にある。

【０３３４】

多重特異性抗体を含む溶液の、本明細書に記載のクロマトグラフィー材料のうちのいずれかへの装填は、不純物からの多重特異性抗体の分離のために最適化され得る。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体を含む溶液の、クロマトグラフィー材料への装填は、結合及び溶出モードで使用される場合（例えば、本明細書に表記される親和性クロマトグラフィー、混合モードクロマトグラフィー、及びイオン交換クロマトグラフィー）、多重特異性のクロマトグラフィー材料への結合のために最適化され得る。例えば、多重特異性抗体を含む溶液は、装填緩衝液の伝導度を一定に保ちながら、いくつかの異なるｐＨの装填緩衝液中のクロマトグラフィー材料、例えば、クロマトグラフィーカラムに装填され得る。あるいは、多重特異性抗体を含む溶液は、装填緩衝液のｐＨを一定に保ちながら、いくつかの異なる伝導度の装填緩衝液中のクロマトグラフィー材料に装填され得る。多重特異性抗体を含む溶液のクロマトグラフィー材料への装填、及びクロマトグラフィー材料からの多重特異性抗体のプール画分中への溶出を完了させた時点で、プール画分中の汚染物質の量は、所与のｐＨまたは伝導度での産物の汚染物質からの分離に関する情報を提供する。同様に、多重特異性抗体がクロマトグラフィー材料を貫流するクロマトグラフィーの場合（例えば、ＨＩＣ）、装填緩衝液は、多重特異性抗体がクロマトグラフィーを貫流する一方で、不純物がクロマトグラフィー材料によって保持されるか、または多重特異性抗体とは異なる速度でクロマトグラフィー材料を貫流するように、ｐＨ及び伝導度について最適化される。

【０３３５】

いくつかの実施形態では、多重特異性抗体または抗体アームを含む溶液の装填密度は、親和性クロマトグラフィー材料（例えば、タンパク質Ａクロマトグラフィー材料）の約１０ｇ／Ｌ、約２０ｇ／Ｌ、約３０ｇ／Ｌ、約４０ｇ／Ｌ、約５０ｇ／Ｌ、約６０ｇ／Ｌ、約７０ｇ／Ｌ、約８０ｇ／Ｌ、約９０ｇ／Ｌ、約１００ｇ／Ｌ、約１１０ｇ／Ｌ、約１２０ｇ／Ｌ、約１３０ｇ／Ｌ、約１４０ｇ／Ｌ、約または１５０ｇ／Ｌのうちのいずれかを超える。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体または抗体アームを含む溶液の装填密度は、親和性クロマトグラフィー材料（例えば、タンパク質Ａクロマトグラフィー材料）の約１０ｇ／Ｌ～２０ｇ／Ｌ、約２０ｇ／Ｌ～３０ｇ／Ｌ、約３０ｇ／Ｌ～４０ｇ／Ｌ、約４０ｇ／Ｌ～５０ｇ／Ｌ、約５０ｇ／Ｌ～６０ｇ／Ｌ、約６０ｇ／Ｌ～７０ｇ／Ｌ、約７

０ｇ／Ｌ～８０ｇ／Ｌ、約８０ｇ／Ｌ～９０ｇ／Ｌ、約９０ｇ／Ｌ～１００ｇ／Ｌのうちのいずれかである。

【０３３６】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、親和性クロマトグラフィーの溶出物は、混合モードクロマトグラフィー材料（例えば、Ｃａｐｔｏ（商標）ａｄｈｅｒｅクロマトグラフィー材料）の約３０ｇ／Ｌ、約４０ｇ／Ｌ、約５０ｇ／Ｌ、約６０ｇ／Ｌ、約７０ｇ／Ｌ、約８０ｇ／Ｌ、約９０ｇ／Ｌ、約１００ｇ／Ｌ、約１１０ｇ／Ｌ、約１２０ｇ／Ｌ、約１３０ｇ／Ｌ、約１４０ｇ／Ｌ、または約１５０ｇ／Ｌのうちのいずれかを超えるポリペプチドの装填密度で混合モードクロマトグラフィー材料に装填される。いくつかの実施形態では、親和性クロマトグラフィーの溶出物の装填密度は、混合モードクロマトグラフィー材料（例えば、Ｃａｐｔｏ（商標）ａｄｈｅｒｅクロマトグラフィー材料）の約１０ｇ／Ｌ～２０ｇ／Ｌ、約２０ｇ／Ｌ～３０ｇ／Ｌ、約３０ｇ／Ｌ～４０ｇ／Ｌ、約４０ｇ／Ｌ～５０ｇ／Ｌ、約５０ｇ／Ｌ～６０ｇ／Ｌ、約６０ｇ／Ｌ～７０ｇ／Ｌ、約７０ｇ／Ｌ～８０ｇ／Ｌ、約８０ｇ／Ｌ～９０ｇ／Ｌ、約９０ｇ／Ｌ～１００ｇ／Ｌのうちのいずれかである。

【０３３７】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーまたは陰イオン交換クロマトグラフィーの溶出物は、ＨＩＣクロマトグラフィー材料（例えば、Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）またはＢｕｔｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）クロマトグラフィー材料）の約３０ｇ／Ｌ、約４０ｇ／Ｌ、約５０ｇ／Ｌ、約６０ｇ／Ｌ、約７０ｇ／Ｌ、約８０ｇ／Ｌ、約９０ｇ／Ｌ、約１００ｇ／Ｌ、約１１０ｇ／Ｌ、約１２０ｇ／Ｌ、約１３０ｇ／Ｌ、約１４０ｇ／Ｌ、または約１５０ｇ／Ｌのうちのいずれかを超えるポリペプチドの装填密度でＨＩＣクロマトグラフィー材料に装填される。いくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーまたは陰イオン交換クロマトグラフィーの溶出物の装填密度は、混合モードクロマトグラフィー材料（例えば、Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）またはＢｕｔｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）クロマトグラフィー材料）の約１０ｇ／Ｌ～２０ｇ／Ｌ、約２０ｇ／Ｌ～３０ｇ／Ｌ、約３０ｇ／Ｌ～４０ｇ／Ｌ、約４０ｇ／Ｌ～５０ｇ／Ｌ、約５０ｇ／Ｌ～６０ｇ／Ｌ、約６０ｇ／Ｌ～７０ｇ／Ｌ、約７０ｇ／Ｌ～８０ｇ／Ｌ、約８０ｇ／Ｌ～９０ｇ／Ｌ、約９０ｇ／Ｌ～１００ｇ／Ｌのうちのいずれかである。

【０３３８】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーの溶出物は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料（例えば、ＱＳＦＦクロマトグラフィー材料）の約３０ｇ／Ｌ、約４０ｇ／Ｌ、約５０ｇ／Ｌ、約６０ｇ／Ｌ、約７０ｇ／Ｌ、約８０ｇ／Ｌ、約９０ｇ／Ｌ、約１００ｇ／Ｌ、約１１０ｇ／Ｌ、約１２０ｇ／Ｌ、約１３０ｇ／Ｌ、約１４０ｇ／Ｌ、または約１５０ｇ／Ｌのうちのいずれかを超えるポリペプチドの装填密度で陰イオン交換クロマトグラフィー材料に装填される。いくつかの実施形態では、混合モードクロマトグラフィーの溶出物の装填密度は、陰イオン交換クロマトグラフィー材料（例えば、ＱＳＦＦクロマトグラフィー材料）の約１０ｇ／Ｌ～２０ｇ／Ｌ、約２０ｇ／Ｌ～３０ｇ／Ｌ、約３０ｇ／Ｌ～４０ｇ／Ｌ、約４０ｇ／Ｌ～５０ｇ／Ｌ、約５０ｇ／Ｌ～６０ｇ／Ｌ、約６０ｇ／Ｌ～７０ｇ／Ｌ、約７０ｇ／Ｌ～８０ｇ／Ｌ、約８０ｇ／Ｌ～９０ｇ／Ｌ、約９０ｇ／Ｌ～１００ｇ／Ｌのうちのいずれかである。

【０３３９】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、ＨＩＣクロマトグラフィーからの多重特異性抗体を含む画分は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料（例えば、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０クロマトグラフィー材料）の約３０ｇ／Ｌ、約４０ｇ／Ｌ、約５０ｇ／Ｌ、約６０ｇ／Ｌ、約７０ｇ／Ｌ、約８０ｇ／Ｌ、約９０ｇ／Ｌ、約１００ｇ／Ｌ、約１１０ｇ／Ｌ、約１２０ｇ／Ｌ、約１３０ｇ／Ｌ、約１４０ｇ／Ｌ、または約１５０ｇ／Ｌのうちのいずれかを超えるポリペプチドの装填密度で陽イオン交換ク

ロマトグラフィー材料に装填される。いくつかの実施形態では、ＨＩＣクロマトグラフィーからの多重特異性抗体を含む画分の装填密度は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料（例えば、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０クロマトグラフィー材料）の約１０ｇ／Ｌ～２０ｇ／Ｌ、約２０ｇ／Ｌ～３０ｇ／Ｌ、約３０ｇ／Ｌ～４０ｇ／Ｌ、約４０ｇ／Ｌ～５０ｇ／Ｌ、約５０ｇ／Ｌ～６０ｇ／Ｌ、約６０ｇ／Ｌ～７０ｇ／Ｌ、約７０ｇ／Ｌ～８０ｇ／Ｌ、約８０ｇ／Ｌ～９０ｇ／Ｌ、約９０ｇ／Ｌ～１００ｇ／Ｌのうちのいずれかである。

【０３４０】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、陰イオン交換クロマトグラフィーからの多重特異性抗体を含む画分は、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー材料（例えば、ＣＨＴ　Ｉ型セラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー材料）の約５ｇ／Ｌ、１０ｇ／Ｌ、約１５ｇ／Ｌ、約２０ｇ／Ｌ、約２５ｇ／Ｌ、約３０ｇ／Ｌ、約４０ｇ／Ｌ、約５０ｇ／Ｌ、約６０ｇ／Ｌ、約７０ｇ／Ｌ、約８０ｇ／Ｌ、約９０ｇ／Ｌ、約１００ｇ／Ｌ、約１１０ｇ／Ｌ、約１２０ｇ／Ｌ、約１３０ｇ／Ｌ、約１４０ｇ／Ｌ、または約１５０ｇ／Ｌのうちのいずれか未満のポリペプチドの装填密度でヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー材料に装填される。いくつかの実施形態では、ＨＩＣクロマトグラフィーからの多重特異性抗体を含む画分の装填密度は、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー材料（例えば、ＣＨＴ　Ｉ型セラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー材料）の約５ｇ／Ｌ～１０ｇ／Ｌ、約１０ｇ／Ｌ～１５ｇ／Ｌ、約１５ｇ／Ｌ～２０ｇ／Ｌ、約２０ｇ／Ｌ～２５ｇ／Ｌ、約２５ｇ／Ｌ～３０ｇ／Ｌ、約３０ｇ／Ｌ～５０ｇ／Ｌ、約５０ｇ／Ｌ～１００ｇ／Ｌ、及び約１００ｇ／Ｌ～１５０ｇ／Ｌのうちのいずれかである。

【０３４１】

クロマトグラフィー材料からの多重特異性抗体の溶出は、最小汚染物質及び最小プール体積を有する産物の収率のために最適化され得る。例えば、多重特異性抗体または抗体アームを含有する溶液は、装填緩衝液中のクロマトグラフィー材料、例えば、クロマトグラフィーカラムに装填され得る。装填を完了させた時点で、多重特異性抗体または抗体アームを、溶出緩衝液の伝導度を一定に保ちながら、いくつかの異なるｐＨの緩衝液で溶出させる。あるいは、多重特異性抗体または抗体アームは、溶出緩衝液のｐＨを一定に保ちながら、いくつかの異なる伝導度の溶出緩衝液中のクロマトグラフィー材料から溶出され得る。クロマトグラフィー材料からの多重特異性抗体または抗体アームの溶出を完了させた時点で、プール画分中の不純物の量は、所与のｐＨまたは伝導度での多重特異性抗体または抗体アームの不純物からの分離に関する情報を提供する。多数の画分（例えば、８カラム体積）における多重特異性抗体または抗体アームの溶出は、溶出プロファイルの「テーリング」を示す。本発明のいくつかの実施形態では、溶出のテーリングが最小限に抑えられる。

【０３４２】

例えば、緩衝液の所望のｐＨ、緩衝液の所望の伝導度、目的とするタンパク質の特徴、及び精製方法に応じて用いられ得る、様々な緩衝液。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、本方法は、緩衝液を使用することを含む。緩衝液は、装填緩衝液、平衡化緩衝液、または洗浄緩衝液であり得る。いくつかの実施形態では、装填緩衝液、平衡化緩衝液、及び／または洗浄緩衝液のうちの１つ以上は、同じである。いくつかの実施形態では、装填緩衝液、平衡化緩衝液、及び／または洗浄緩衝液は、異なる。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、緩衝液は、塩を含む。装填緩衝液は、塩化ナトリウム、酢酸ナトリウム、またはそれらの混合物を含み得る。いくつかの実施形態では、装填緩衝液は、塩化ナトリウム緩衝液である。いくつかの実施形態では、装填緩衝液は、酢酸ナトリウム緩衝液である。いくつかの実施形態では、緩衝液は、Ｔｒｉｓを含む。いくつかの実施形態では、緩衝液は、アルギニンを含む。

【０３４３】

本明細書で使用されるとき、装填物とは、クロマトグラフィー材料に装填された組成物で

ある。装填緩衝液は、多重特異性抗体または抗体アームを含む溶液をクロマトグラフィー材料に装填するために使用される緩衝液である。クロマトグラフィー材料は、精製される溶液の装填前に平衡化緩衝液で平衡化され得る。いくつかの例では、洗浄緩衝液は、溶液をクロマトグラフィー材料に装填した後、かつ目的とする多重特異性抗体または抗体アームを固相から溶出させる前に使用される。しかしながら、目的とする産物、例えば、多重特異性抗体のうちのいくつかは、洗浄緩衝液によってクロマトグラフィー材料から除去され得る（例えば、ＨＩＣの場合、貫流モード）。

【０３４４】

本明細書で使用されるとき、溶出は、産物、例えば、多重特異性抗体または抗体アームのクロマトグラフィー材料からからの除去である。溶出緩衝液は、クロマトグラフィー材料から目的とする多重特異性抗体または他の産物を溶出させるために使用される緩衝液である。多くの場合、溶出緩衝液は、装填緩衝液とは異なる物理的特徴を有する。例えば、溶出緩衝液は、装填緩衝液とは異なる伝導度または装填緩衝液とは異なるｐＨを有し得る。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、装填緩衝液よりも低い伝導度を有する。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、装填緩衝液よりも高い伝導度を有する。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、装填緩衝液よりも低いｐＨを有する。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、装填緩衝液よりも高いｐＨを有する。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、装填緩衝液とは異なる伝導度及び異なるｐＨを有する。溶出緩衝液は、より高いまたはより低い伝導度、及びより高いまたはより低いｐＨの任意の組み合わせを有し得る。

【０３４５】

伝導度とは、２つの電極間に電流を伝導する水溶液の能力を指す。溶液中、電流は、イオン輸送により流れる。したがって、水溶液中に存在するイオンの量が増加すると、この溶液は、より高い伝導度を有するようになる。伝導度の尺度の基本単位は、ジーメンス（またはｍｈｏ）、ｍｈｏ（ｍＳ／ｃｍ）であり、様々なモデルのＯｒｉｏｎ伝導度計等の伝導度計を使用して測定され得る。電解質伝導度は、電流を搬送する溶液中のイオンの能力であるため、溶液の伝導度は、その中のイオンの濃度を変化させることによって改変され得る。例えば、溶液中の緩衝剤の濃度及び／または塩（例えば、塩化ナトリウム、酢酸ナトリウム、もしくは塩化カリウム）の濃度を改変して、所望の伝導度を達成し得る。好ましくは、様々な緩衝液の塩濃度を修正して、所望の伝導度を達成する。

【０３４６】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、装填緩衝液は、約１．０ｍＳ／ｃｍ、約１．５ｍＳ／ｃｍ、約２．０ｍＳ／ｃｍ、約２．５ｍＳ／ｃｍ、約３．０ｍＳ／ｃｍ、約３．５ｍＳ／ｃｍ、約４．０ｍＳ／ｃｍ、約４．５ｍＳ／ｃｍ、約５．０ｍＳ／ｃｍ、約５．５ｍＳ／ｃｍ、約６．０ｍＳ／ｃｍ、約６．５ｍＳ／ｃｍ、約７．０ｍＳ／ｃｍ、約７．５ｍＳ／ｃｍ、約８．０ｍＳ／ｃｍ、約８．５ｍＳ／ｃｍ、約９．０ｍＳ／ｃｍ、約９．５ｍＳ／ｃｍ、約１０ｍＳ／ｃｍ、または約２０ｍＳ／ｃｍのうちのいずれかを超える伝導度を有する。伝導度は、約１ｍＳ／ｃｍ～約２０ｍＳ／ｃｍ、約４ｍＳ／ｃｍ～約１０ｍＳ／ｃｍ、約４ｍＳ／ｃｍ～約７ｍＳ／ｃｍ、約５ｍＳ／ｃｍ～約１７ｍＳ／ｃｍ、約５ｍＳ／ｃｍ～約１０ｍＳ／ｃｍ、または約５ｍＳ／ｃｍ～約７ｍＳ／ｃｍのうちのいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、伝導度は、約１．０ｍＳ／ｃｍ、約１．５ｍＳ／ｃｍ、約２．０ｍＳ／ｃｍ、約２．５ｍＳ／ｃｍ、約３．０ｍＳ／ｃｍ、約３．５ｍＳ／ｃｍ、約４ｍＳ／ｃｍ、約４．５ｍＳ／ｃｍ、約５．０ｍＳ／ｃｍ、約５．５ｍＳ／ｃｍ、約６．０ｍＳ／ｃｍ、約６．５ｍＳ／ｃｍ、約７．０ｍＳ／ｃｍ、約７．５ｍＳ／ｃｍ、約８．０ｍＳ／ｃｍ、約８．５ｍＳ／ｃｍ、約９．０ｍＳ／ｃｍ、約９．５ｍＳ／ｃｍ、約１０ｍＳ／ｃｍ、または約２０ｍＳ／ｃｍのうちのいずれかである。一態様では、伝導度は、装填緩衝液、平衡化緩衝液、及び／または洗浄緩衝液の伝導度である。いくつかの実施形態では、装填緩衝液、平衡化緩衝液、及び洗浄緩衝液のうちの１つ以上の伝導度は、同じである。いくつかの実施形態では、装填緩衝液の伝導度は、洗浄緩衝液及び／または平衡化緩衝液の伝導度とは異なる。

【０３４７】
いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、装填緩衝液の伝導度未満の伝導度を有する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、約０．０ｍＳ／ｃｍ、約０．５ｍＳ／ｃｍ、約１．０ｍＳ／ｃｍ、約１．５ｍＳ／ｃｍ、約２．０ｍＳ／ｃｍ、約２．５ｍＳ／ｃｍ、約３．０ｍＳ／ｃｍ、約３．５ｍＳ／ｃｍ、約４．０ｍＳ／ｃｍ、約４．５ｍＳ／ｃｍ、約５．０ｍＳ／ｃｍ、約５．５ｍＳ／ｃｍ、約６．０ｍＳ／ｃｍ、約６．５ｍＳ／ｃｍ、または約７．０ｍＳ／ｃｍのうちのいずれか未満の伝導度を有する。伝導度は、約０ｍＳ／ｃｍ～約７ｍＳ／ｃｍ、約１ｍＳ／ｃｍ～約７ｍＳ／ｃｍ、約２ｍＳ／ｃｍ～約７ｍＳ／ｃｍ、約３ｍＳ／ｃｍ～約７ｍＳ／ｃｍ、または約４ｍＳ／ｃｍ～約７ｍＳ／ｃｍ、約０ｍＳ／ｃｍ～約５．０ｍＳ／ｃｍ、約１ｍＳ／ｃｍ～約５ｍＳ／ｃｍ、約２ｍＳ／ｃｍ～約５ｍＳ／ｃｍ、約３ｍＳ／ｃｍ～約５ｍＳ／ｃｍ、または約４ｍＳ／ｃｍ～約５ｍＳ／ｃｍのうちのいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液の伝導度は、約０．０ｍＳ／ｃｍ、約０．５ｍＳ／ｃｍ、約１．０ｍＳ／ｃｍ、約１．５ｍＳ／ｃｍ、約２．０ｍＳ／ｃｍ、約２．５ｍＳ／ｃｍ、約３．０ｍＳ／ｃｍ、約３．５ｍＳ／ｃｍ、約４ｍＳ／ｃｍ、約４．５ｍＳ／ｃｍ、約５．０ｍＳ／ｃｍ、約５．５ｍＳ／ｃｍ、約６．０ｍＳ／ｃｍ、約６．５ｍＳ／ｃｍ、または約７．０ｍＳ／ｃｍのうちのいずれかである。
【０３４８】
いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、装填緩衝液の伝導度を超える伝導度を有する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、５．５ｍＳ／ｃｍ、６．０ｍＳ／ｃｍ、６．５ｍＳ／ｃｍ、７．０ｍＳ／ｃｍ、７．５ｍＳ／ｃｍ、８．０ｍＳ／ｃｍ、８．５ｍＳ／ｃｍ、９．０ｍＳ／ｃｍ、９．５ｍＳ／ｃｍ、１０ｍＳ／ｃｍ、１１ｍＳ／ｃｍ、１２ｍＳ／ｃｍ、１３ｍＳ／ｃｍ、１４ｍＳ／ｃｍ、１５ｍＳ／ｃｍ、１６ｍＳ／ｃｍ、１７．０ｍＳ／ｃｍ、１８．０ｍＳ／ｃｍ、１９．０ｍＳ／ｃｍ、２０．０ｍＳ／ｃｍ、２１．０ｍＳ／ｃｍ、２２．０ｍＳ／ｃｍ、２３．０ｍＳ／ｃｍ、２４．０ｍＳ／ｃｍ、２５．０ｍＳ／ｃｍ、２６．０ｍＳ／ｃｍ、２７．０ｍＳ／ｃｍ、２８．０ｍＳ／ｃｍ、２９．０ｍＳ／ｃｍ、または３０．０ｍＳ／ｃｍのうちのいずれかを超える伝導度を有する。伝導度は、約５．５ｍＳ／ｃｍ～約３０ｍＳ／ｃｍ、約６．０ｍＳ／ｃｍ～約３０ｍＳ／ｃｍ、約７ｍＳ／ｃｍ～約３０ｍＳ／ｃｍ、約８ｍＳ／ｃｍ～約３０ｍＳ／ｃｍ、約９ｍＳ／ｃｍ～約３０ｍＳ／ｃｍ、または約１０ｍＳ／ｃｍ～約３０ｍＳ／ｃｍのうちのいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液の伝導度は、５．５ｍＳ／ｃｍ、６．０ｍＳ／ｃｍ、６．５ｍＳ／ｃｍ、７．０ｍＳ／ｃｍ、７．５ｍＳ／ｃｍ、８．０ｍＳ／ｃｍ、８．５ｍＳ／ｃｍ、９．０ｍＳ／ｃｍ、９．５ｍＳ／ｃｍ、１０ｍＳ／ｃｍ、１１ｍＳ／ｃｍ、１２ｍＳ／ｃｍ、１３ｍＳ／ｃｍ、１４ｍＳ／ｃｍ、１５ｍＳ／ｃｍ、１６ｍＳ／ｃｍ、１７．０ｍＳ／ｃｍ、１８．０ｍＳ／ｃｍ、１９．０ｍＳ／ｃｍ、２０．０ｍＳ／ｃｍ、２１．０ｍＳ／ｃｍ、２２．０ｍＳ／ｃｍ、２３．０ｍＳ／ｃｍ、２４．０ｍＳ／ｃｍ、２５．０ｍＳ／ｃｍ、２６．０ｍＳ／ｃｍ、２７．０ｍＳ／ｃｍ、２８．０ｍＳ／ｃｍ、２９．０ｍＳ／ｃｍ、または３０．０ｍＳ／ｃｍのうちのいずれかである。上記の実施形態のうちのいずれかのいくつかの態様では、溶出緩衝液の伝導度は、段階勾配または線形勾配により装填物及び／または洗浄緩衝液から変化したものである。
【０３４９】
本発明のいくつかの実施形態では、多重特異性抗体を含む溶液は、約６．５ｍＳ／ｃｍ未満の伝導度を有する緩衝液中の混合モードクロマトグラフィー材料に装填され、ポリペプチドは、約１．５ｍＳ／ｃｍの伝導度を有する溶出緩衝液中のクロマトグラフィー材料から溶出される。いくつかの実施形態では、装填緩衝液は、約６．５ｍＳ／ｃｍの伝導度を有し、溶出緩衝液は、約３ｍＳ／ｃｍの伝導度を有する。いくつかの実施形態では、装填緩衝液は、約５．５ｍＳ／ｃｍの伝導度を有し、溶出緩衝液は、約２ｍＳ／ｃｍの伝導度を有する。いくつかの実施形態では、装填緩衝液は、約５．５ｍＳ／ｃｍの伝導度を有し、溶出緩衝液は、約１ｍＳ／ｃｍの伝導度を有する。上記の実施形態の更なる実施形態で

は、クロマトグラフィー材料は、Ｃａｐｔｏ（商標）ａｄｈｅｒｅ樹脂である。
【０３５０】
上記の実施形態のうちのいずれかのいくつかの態様では、溶出緩衝液の伝導度は、段階勾配または線形勾配により装填物及び／または洗浄緩衝液から変化したものである。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体を含む組成物は、６．５ｍＳ／ｃｍ未満で混合モードクロマトグラフィー（例えばＣａｐｔｏ（商標）ａｈｅｒｅクロマトグラフィー）に装填され、多重特異性抗体は、段階伝導度勾配により混合モードクロマトグラフィーから約約１．５ｍＳ／ｃｍになるまで溶出される。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体を含む組成物は、２．５ｍＳ／ｃｍ未満で陰イオン交換クロマトグラフィー（例えば、ＱＳＦＦクロマトグラフィー）に装填され、多重特異性抗体は、段階伝導度勾配により陰イオン交換クロマトグラフィーから約８．６ｍＳ／ｃｍになるまで溶出される。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体を含む組成物は、約５．０ｍＳ／ｃｍで陽イオン交換クロマトグラフィー（例えば、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０クロマトグラフィー）に装填され、多重特異性抗体は、段階伝導度勾配により陽イオン交換クロマトグラフィーから約２７．５ｍＳ／ｃｍになるまで溶出される。
【０３５１】
いくつかの実施形態では、多重特異性抗体を含む組成物、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー（例えば、ＣＨＴ　Ⅰ型セラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー）に装填され、多重特異性抗体は、線形伝導度勾配によりヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーから溶出される。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、約１０ｍＭのリン酸ナトリウムを含むヒドロキシアパタイト緩衝液Ａ中のヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーに装填される。いくつかの実施形態では、線形勾配は、約１０ｍＭのリン酸ナトリウム、約１Ｍの塩化ナトリウムを含むヒドロキシアパタイト緩衝液Ｂを徐々に添加することによって形成される。いくつかの実施形態では、ヒドロキシアパプタイト緩衝液Ａ及び／またはＢは、約６．３、約６．４、約６．５、約６．６、約６．７、約６．８、約６．９、約７．０、約７．１、約７．２、約７．３のいずれかである。いくつかの実施形態では、ヒドロキシアパプタイト緩衝液Ａ及び／またはＢは、約ｐＨ６．８である。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液のヒドロキシアパタイト緩衝液Ｂ含有量は、勾配にわたって増加する。いくつかの実施形態では、線形勾配は、約０％のヒドロキシアパタイト緩衝液Ｂで開始し、約１００％のヒドロキシアパタイト緩衝液Ｂで終了する。いくつかの実施形態では、線形勾配は、約１０、１５、２０、２５、または３０カラム体積（ＣＶ）のいずれかにわたって、約０％のヒドロキシアパタイト緩衝液Ｂで開始し、約１００％のヒドロキシアパタイト緩衝液Ｂで終了する。いくつかの実施形態では、線形勾配は、約２０カラム体積（ＣＶ）にわたって、約０％のヒドロキシアパタイト緩衝液Ｂで開始し、約１００％のヒドロキシアパタイト緩衝液Ｂで終了する。
【０３５２】
本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、装填緩衝液は、約１０、約９、約８、約７、約６、または約５のうちのいずれか未満のｐＨを有する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、装填緩衝液は、約４、約５、約６、約７、約８、または約９のうちのいずれかを超えるｐＨを有する。装填緩衝液は、約４～９、約４～８、約４～７、約５～９、約５～８、約５～７、約５～６のうちのいずれかのｐＨを有し得る。いくつかの実施形態では、装填緩衝液のｐＨは、約４、約４．５、約５、約５．５、約６、約６．５、約７、約７．５、または約８のうちのいずれかである。ｐＨは、装填緩衝液、平衡化緩衝液、または洗浄緩衝液のｐＨであり得る。いくつかの実施形態では、装填緩衝液、平衡化緩衝液、及び／または洗浄緩衝液のうちの１つ以上のｐＨは、同じである。いくつかの実施形態では、装填緩衝液のｐＨは、平衡化緩衝液及び／または洗浄緩衝液のｐＨとは異なる。
【０３５３】
いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、装填緩衝液のｐＨ未満のｐＨを有する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、約８、約７

、約６、約５、約４、約３、または約２のうちのいずれか未満のｐＨを有する。溶出緩衝液のｐＨは、約４～約９、約４～約８、約４～約７、約４～約６、約４～約５、約５～約９、約５～約８、約５～約７、約５～約６、約６～約９、約６～約８、約６～約７のうちのいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液のｐＨは、約４．０、４．５、５．０、５．５、６．０、６．５、７．０、７．５、８．０、８．５、または９．０のうちのいずれかである。

【０３５４】

いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、装填緩衝液のｐＨを超えるｐＨを有する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、約５、約６、約７、約８、または約９のうちのいずれかを超えるｐＨを有する。溶出緩衝液のｐＨは、約４～約９、約５～約９、約６～約９、約７～約９、約８～約９、約４～約８、約５～約８、約６～約８、約７～約８、約４～約７、約５～約７、及び約６～約７のうちのいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液のｐＨは、約４．０、４．５、５．０、５．５、６．０、６．５、７／０、７．５、８．０、８．５、または９．０のうちのいずれかである。

【０３５５】

いくつかの実施形態では、多重特異性抗体または抗体アームを含む溶液は、約ｐＨ７．７で親和性クロマトグラフィー（例えば、タンパク質Ａクロマトグラフィー）に装填され、多重特異性抗体または抗体アームは、段階勾配により親和性クロマトグラフィーから約２．９のｐＨになるまで溶出される。

【０３５６】

上記の実施形態のうちのいずれかのいくつかの態様では、溶出緩衝液のｐＨは、段階勾配または線形勾配により装填物及び／または洗浄緩衝液から変化したものである。

【０３５７】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、流量は、約５０ＣＶ／時、４０ＣＶ／時、または３０ＣＶ／時のうちのいずれか未満である。流量は、約５ＣＶ／時～５０ＣＶ／時、約１０ＣＶ／時～４０ＣＶ／時、または約１８ＣＶ／時～３６ＣＶ／時のうちのいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、流量は、９ＣＶ／時、１８ＣＶ／時、２５ＣＶ／時、３０ＣＶ／時、３６ＣＶ／時、または４０ＣＶ／時のうちのいずれかである。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、流量は、１００ｃｍ／時、７５ｃｍ／時、または５０ｃｍ／時のうちのいずれか未満である。流量は、２５ｃｍ／時～１５０ｃｍ／時、２５ｃｍ／時～１００ｃｍ／時、５０ｃｍ／時～１００ｃｍ／時、または６５ｃｍ／時～８５ｃｍ／時のうちのいずれかであり得る。

【０３５８】

床高さとは、使用されるクロマトグラフィー材料の高さである。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、床高さは、約５ｃｍ、約１０ｃｍ、約１５ｃｍ、約２０ｃｍ、約２５ｃｍ、約３０ｃｍ、約３５ｃｍ、約４０ｃｍ、約４５ｃｍ、または約５０ｃｍのうちのいずれかを超える。いくつかの実施形態では、床高さは、約５ｃｍ～５０ｃｍである。いくつかの実施形態では、床高さは、装填物中のポリペプチドまたは汚染物質の量に基づいて決定される。

【０３５９】

いくつかの実施形態では、クロマトグラフィーは、約１ｍＬ、約２ｍＬ、約３ｍＬ、約４ｍＬ、約５ｍＬ、約６ｍＬ、約７ｍＬ、約８ｍＬ、約９ｍＬ、約１０ｍＬ、約１５ｍＬ、約２０ｍＬ、約２５ｍＬ、約３０ｍＬ、約４０ｍＬ、約５０ｍＬ、約７５ｍＬ、約１００ｍＬ、約２００ｍＬ、約３００ｍＬ、約４００ｍＬ、約５００ｍＬ、約６００ｍＬ、約７００ｍＬ、約８００ｍＬ、約９００ｍＬ、約１Ｌ、約２Ｌ、約３Ｌ、約４Ｌ、約５Ｌ、約６Ｌ、約７Ｌ、約８Ｌ、約９Ｌ、約１０Ｌ、約２５Ｌ、約５０Ｌ、約１００Ｌ、約２００Ｌ、約３００Ｌ、約４００Ｌ、約５００Ｌ、約６００Ｌ、約７００Ｌ、約８００Ｌ、約９００Ｌ、または約１００Ｌを超える体積を有する容器のカラム内にある。

【０３６０】

本発明のいくつかの実施形態では、画分は、クロマトグラフィーから収集される。いくつかの実施形態では、収集される画分は、約０．０１ＣＶ、０．０２ＣＶ、０．０３ＣＶ、０．０４ＣＶ、０．０５ＣＶ、０．０６ＣＶ、０．０７ＣＶ、０．０８ＣＶ、０．０９ＣＶ、０．１ＣＶ、０．２ＣＶ、０．３ＣＶ、０．４ＣＶ、０．５ＣＶ、０．６ＣＶ、０．７ＣＶ、０．８ＣＶ、０．９ＣＶ、１．０ＣＶ、２．０ＣＶ、３．０ＣＶ、４．０ＣＶ、５．０ＣＶ、６．０ＣＶ、７．０ＣＶ、８．０ＣＶ、９．０ＣＶ、または１０．０ＣＶを超える。いくつかの実施形態では、産物、例えば、多重特異性抗体または抗体アームを含有する画分が、プールされる。画分中のポリペプチドの量は、当業者によって決定され得、例えば、画分中のポリペプチドの量は、紫外分光法によって決定され得る。いくつかの実施形態では、ＯＤ２８０が約０．５、約０．６、約０．７、約０．８、約０．９、及び約１．０のうちのいずれかを超えるときに、画分が収集される。いくつかの実施形態では、ＯＤ２８０が約０．５～１．０、約０．６～１．０、約０．７～１．０、約０．８～１．０、または約０．９～１．０のうちのいずれかであるときに、画分が収集される。いくつかの実施形態では、産物、例えば、検出可能な多重特異性抗体または抗体アームを含有する画分が、プールされる。

【０３６１】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、不純物は、産物特異的不純物である。産物特異的不純物の例としては、非対合半抗体、非対合抗体鎖、抗体断片、ホモ二量体、凝集体、高分子量種、超高分子量種、低分子量種、ならびに電荷変異形（酸性変異形及び塩基性変異形等）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３６２】

いくつかの実施形態では、本方法は、非対合半抗体及び／またはホモ二量体（例えば、同じ結合ドメインを含む対合半二量体）の低減または除去を提供する。非対合半抗体及びホモ二量体の存在の測定方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、疎水性相互作用クロマトグラフィー高性能液体クロマトグラフィー（ＨＩＣ－ＨＰＬＣ）を含む疎水性相互作用クロマトグラフィーによるものである。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、半抗体及び／またはホモ二量体の量は、約５％、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、または約９５％を超えて低減される。半抗体及び／またはホモ二量体の量は、約１０％～９９％、約３０％～９５％、約３０％～９９％、約５０％～９５％、約５０％～９９％、約７５％～９９％、または約８５％～９９％のうちのいずれかだけ低減され得る。いくつかの実施形態では、低減は、精製ステップ（複数可）から回収された組成物中の半抗体及び／またはホモ二量体の量を、精製ステップ（複数可）前の組成物中の半抗体及び／またはホモ二量体の量と比較することによって決定される。

【０３６３】

凝集したポリペプチド（例えば、凝集した多重特異性抗体または凝集した抗体アーム）は、高分子量（ＨＭＷ）タンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、凝集したポリペプチドは、目的とするポリペプチドの多量体である。ＨＭＷタンパク質は、目的とするポリペプチドの二量体であっても、その最大８倍の単量体であっても、それよりも大きくてもよい。凝集したタンパク質（例えば、ＨＭＷタンパク質）の測定方法は、当該技術分野で既知であり、実施例の項に記載される。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、凝集したタンパク質の量は、約５％、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、または約９５％のうちのいずれかを超えて低減される。凝集したタンパク質の量は、約１０％～９９％、約３０％～９５％、約３０％～９９％、約５０％～９５％、約５０％～９９％、約７５％～９９％、または約８５％～９９％のうちのいずれかだけ低減され得る。凝集したタンパク質の量は、約５％、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、または約９５％のうちのいずれかだけ低減され得る。いくつかの実施形態では、低減は、精製ステップ（複数可）から回収された組成物中の凝集したタンパク質（例えば、ＨＭＷタンパク質）の量を、精製ステップ（複数可）前の組成物

中の凝集したタンパク質（例えば、ＨＭＷタンパク質）の量と比較することによって決定される。

【０３６４】

断片ポリペプチドは、低分子量（ＬＭＷ）タンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、断片化ポリペプチドは、目的とする多重特異性抗体または抗体アームの断片である。ＬＭＷタンパク質の例としては、Ｆａｂ（断片抗原結合）、Ｆｃ（断片、結晶化可能）領域、もしくはこれらの両方の組み合わせ、または目的とする抗体の任意のランダム断片化部分が挙げられるが、これらに限定されない。断片化タンパク質（例えば、ＬＭＷタンパク質）の測定方法は、当該技術分野で既知であり、実施例の項に記載される。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、ＬＭＷタンパク質の量は、約５％、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、または約９５％のうちのいずれかを超えて低減される。ＬＭＷタンパク質の量は、約１０％～９９％、約３０％～９５％、約３０％～９９％、約５０％～９５％、約５０％～９９％、約７５％～９９％、または約８５％～９９％のうちのいずれかだけ低減され得る。ＬＭＷタンパク質の量は、約５％、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、または約９５％のうちのいずれかだけ低減され得る。いくつかの実施形態では、低減は、精製ステップ（複数可）から回収された組成物中の断片化タンパク質（例えば、ＬＭＷタンパク質）の量を、精製ステップ（複数可）前の組成物中の断片化タンパク質（例えば、ＬＭＷタンパク質）の量と比較することによって決定される。

【０３６５】

抗体の酸性変異形は、抗体のｐＩが天然無傷抗体のｐＩ未満である変異形である。抗体の塩基性変異形は、抗体のｐＩが天然無傷抗体のｐＩを超える変異形である。電荷変異形（例えば、酸性及び塩基性変異形）は、酸化、脱アミド化、リジン残基のＣ末端プロセシング、Ｎ末端ピログルタミン酸形成、及び抗体の糖化等の天然プロセスの結果であり得る。電荷変異形の測定方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、画像化毛管等電点電気泳動（ｃＩＥＦ）である。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、電荷変異形（酸性及び／または塩基性変異形）の量は、約５％、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、または約９５％を超えて低減される。電荷変異形（酸性及び／または塩基性変異形）の量は、約１０％～９９％、約３０％～９５％、約３０％～９９％、約５０％～９５％、約５０％～９９％、約７５％～９９％、または約８５％～９９％のうちのいずれかだけ低減され得る。いくつかの実施形態では、低減は、精製ステップ（複数可）から回収された電荷変異形（酸性及び／または塩基性変異形）の量を、精製ステップ（複数可）前の組成物中の電荷変異形の量と比較することによって決定される。

【０３６６】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、不純物は、プロセス特異的不純物である。例えば、不純物は、宿主細胞材料；ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、及びＤｓｐＣ等のシャペロン；浸出タンパク質Ａ；核酸；別のポリペプチド；内毒素；ウイルス汚染物質；細胞培養培地成分、カルボキシペプチダーゼＢ、ゲンタマイシン等のうちのいずれか１つ以上であり得る。いくつかの例では、汚染物質は、例えば、細菌細胞（Ｅ．ｃｏｌｉ細胞等）、昆虫細胞、原核生物細胞、真核生物細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、鳥類細胞、真菌細胞等であるが、これらに限定されないものに由来する、宿主細胞タンパク質（ＨＣＰ）であり得る。

【０３６７】

宿主細胞タンパク質（ＨＣＰ）は、ポリペプチドが産生された細胞に由来するタンパク質である。例えば、ＥＣＰは、宿主細胞、すなわち、Ｅ．ｃｏｌｉタンパク質に由来するタンパク質である。ＣＨＯＰの量は、酵素結合免疫吸着アッセイ（「ＥＬＩＳＡ」）によって測定され得る。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、ＨＣＰ（例えば、ＥＣＰ）の量は、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、

約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、または約９５％のうちのいずれかを超えて低減される。ＨＣＰの量は、約１０％～９９％、約３０％～９５％、約３０％～９９％、約５０％～９５％、約５０％～９９％、約７５％～９９％、または約８５％～９９％のうちのいずれかだけ低減され得る。いくつかの実施形態では、ＨＣＰの量は、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、または約９８％のうちのいずれかだけ低減される。いくつかの実施形態では、低減は、精製ステップ（複数可）から回収された組成物中のＨＣＰの量を、精製ステップ（複数可）前の組成物中のＨＣＰの量と比較することによって決定される。

【０３６８】

シャペロンタンパク質、例えば、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、及び／またはＤｓｂＣは、多くの場合、細胞内での抗体の産生において抗体の折り畳み及び組み立てを容易にするために使用される。シャペロンは、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、またはＤｓｂＣに特異的に結合する抗体を使用して、ＥＬＩＳＡによって検出され得る。例えば、抗体は、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、またはＤｓｂＣの超高純度組成物に対して生成され得る。いくつかの実施形態では、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、及び／またはＤｓｂＣは、質量分析法によって決定される。

【０３６９】

浸出タンパク質Ａは、それが結合している固相から剥離または洗浄されたタンパク質Ａである。例えば、浸出タンパク質Ａは、タンパク質Ａクロマトグラフィーカラムから浸出され得る。タンパク質Ａの量は、例えば、ＥＬＩＳＡによって測定され得る。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、浸出タンパク質Ａの量は、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、または約９０％のうちのいずれかを超えて低減される。浸出タンパク質Ａの量は、約１０％～９９％、約３０％～９５％、約３０％～９９％、約５０％～９５％、約５０％～９９％、約７５％～９９％、または約８５％～９９％のうちのいずれかだけ低減され得る。いくつかの実施形態では、浸出タンパク質Ａの量は、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、または約９５％のうちのいずれかだけ低減される。いくつかの実施形態では、低減は、精製ステップ（複数可）から回収された組成物中の浸出タンパク質Ａの量を、精製ステップ（複数可）前の組成物中の浸出タンパク質Ａの量と比較することによって決定される。

【０３７０】

宿主細胞ＤＮＡ等のＤＮＡの測定方法は、当該技術分野で既知であり、実施例の項に記載される。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、ＤＮＡの量は、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、または約９０％のうちのいずれかを超えて低減される。ＤＮＡの量は、約１０％～９９％、約３０％～９５％、約３０％～９９％、約５０％～９５％、約５０％～９９％、約７５％～９９％、または約８５％～９９％のうちのいずれかだけ低減され得る。ＤＮＡの量は、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９５％、または約９９％のうちのいずれかだけ低減され得る。いくつかの実施形態では、低減は、精製ステップ（複数可）から回収された組成物中のＤＮＡの量を、精製ステップ（複数可）前の組成物中のＤＮＡの量と比較することによって決定される。

【０３７１】

細胞培養培地成分とは、細胞培養培地中に存在する成分を指す。細胞培養培地は、細胞の採取時の細胞培養培地であり得る。いくつかの実施形態では、細胞培養培地成分は、ゲンタマイシンである。ゲンタマイシンの量は、ＥＬＩＳＡによって測定され得る。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、細胞培養培地成分の量は、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、または約９０％のうちのいずれかを超えて低減される。細胞培養培地成分の量は、約１０％～９９％、約３０％～９５％、約３０％～９９％、約５０％～９５％、約５０％～９９％、約７５％～９９％、または約８５％～９９％のうちのいずれかだけ低減され得る。いく

つかの実施形態では、細胞培養培地成分の量は、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、約９０％、約９５％、または約９８％のうちのいずれかだけ低減される。いくつかの実施形態では、低減は、精製ステップ（複数可）から回収された組成物中の細胞培養培地成分の量を、精製ステップ（複数可）前の組成物中の細胞培養培地成分の量と比較することによって決定される。

【０３７２】

いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、ウイルス濾過によって更に精製される。ウイルス濾過は、ポリペプチド精製供給流中のウイルス汚染物質の除去である。ウイルス濾過の例としては、限外濾過及び微量濾過が挙げられる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、パルボウイルスフィルターを使用して精製される。

【０３７３】

いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、クロマトグラフィー後（例えば、ＨＩＣクロマトグラフィー後または陽イオン交換クロマトグラフィー後）に濃縮される。濃縮方法の例は、当該技術分野で既知であり、限外濾過及び透析濾過が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、第１の限外濾過、透析濾過、及び第２の限外濾過によって濃縮される。いくつかの実施形態では、限外濾過及び／または透析濾過は、約５ｋＤａｌ、約１０ｋＤａｌ、約５ｋＤａｌ、約２０ｋＤａｌ、または約２５ｋＤａｌのうちのいずれか未満のカットオフを有するフィルターを使用する。いくつかの実施形態では、第１の限外濾過の残余分は、薬学的製剤へと透析濾過される。

【０３７４】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、本方法は、本精製方法の精製されたポリペプチドを、薬学的に許容される担体と組み合わせることを更に含む。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、限外濾過／透析濾過によって薬学的製剤へと製剤化される。

【０３７５】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド（例えば、多重特異性抗体）の濃度は、約１０ｍｇ／ｍＬ、約２０ｍｇ／ｍＬ、約３０ｍｇ／ｍＬ、約４０ｍｇ／ｍＬ、約５０ｍｇ／ｍＬ、約６０ｍｇ／ｍＬ、約７０ｍｇ／ｍＬ、約８０ｍｇ／ｍＬ、約９０ｍｇ／ｍＬ、約１００ｍｇ／ｍＬ、約１１０ｍｇ／ｍＬ、約１２０ｍｇ／ｍＬ、約１３０ｍｇ／ｍＬ、約１４０ｍｇ／ｍＬ、約１５０ｍｇ／ｍＬ、約１６０ｍｇ／ｍＬ、約１７０ｍｇ／ｍＬ、約１８０ｍｇ／ｍＬ、約１９０ｍｇ／ｍＬ、約２００ｍｇ／ｍＬ、または約３００ｍｇ／ｍＬのうちのいずれかを超える。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体の濃度は、約１０ｍｇ／ｍＬ～２０ｍｇ／ｍＬ、約２０ｍｇ／ｍＬ～３０ｍｇ／ｍＬ、約３０ｍｇ／ｍＬ～４０ｍｇ／ｍＬ、約４０ｍｇ／ｍＬ～５０ｍｇ／ｍＬ、約５０ｍｇ／ｍＬ～６０ｍｇ／ｍＬ、約６０ｍｇ／ｍＬ～７０ｍｇ／ｍＬ、約７０ｍｇ／ｍＬ～８０ｍｇ／ｍＬ、約８０ｍｇ／ｍＬ～９０ｍｇ／ｍＬ、約９０ｍｇ／ｍＬ～１００ｍｇ／ｍＬ、約１００ｍｇ／ｍＬ～１１０ｍｇ／ｍＬ、約１１０ｍｇ／ｍＬ～１２０ｍｇ／ｍＬ、約１２０ｍｇ／ｍＬ～１３０ｍｇ／ｍＬ、約１３０ｍｇ／ｍＬ～１４０ｍｇ／ｍＬ、約１４０ｍｇ／ｍＬ～１５０ｍｇ／ｍＬ、約１５０ｍｇ／ｍＬ～１６０ｍｇ／ｍＬ、約１６０ｍｇ／ｍＬ～１７０ｍｇ／ｍＬ、約１７０ｍｇ／ｍＬ～１８０ｍｇ／ｍＬ、約１８０ｍｇ／ｍＬ～１９０ｍｇ／ｍＬ、約１９０ｍｇ／ｍＬ～２００ｍｇ／ｍＬ、約２００ｍｇ／ｍＬ～３００ｍｇ／ｍＬのうちのいずれかである。

【０３７６】

ＸＩＩ．製剤及び製剤の作製方法

本明細書に記載の方法によって精製された多重特異性抗体を含む、製剤及び製剤の作製方法もまた、本明細書に提供される。例えば、精製されたポリペプチドは、薬学的に許容される担体と組み合わされてもよい。

【０３７７】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド製剤は、所望の程度の純度を有するポリペプチドを、凍結乾燥製剤または水溶液の形態の任意の薬学的に許容される担体、賦形剤、または

安定剤と混合することによって、保管のために調製され得る（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ １６ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｏｓｏｌ，Ａ．Ｅｄ．（１９８０））。

【０３７８】

本明細書で使用されるとき、「担体」としては、用いられる投薬量及び濃度で、それに曝露されている細胞または哺乳動物にとって無毒である、薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤が挙げられる。多くの場合、生理的に許容される担体は、ｐＨ緩衝水溶液である。

【０３７９】

許容される担体、賦形剤、または安定剤は、用いられる投薬量及び濃度で、レシピエントにとって無毒であり、それらには、リン酸、クエン酸、他の有機酸等の緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；保存剤（オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、もしくはベンジルアルコール；メチルもしくはプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３－ペンタノール、及びｍ－クレゾール等）；低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジン等のアミノ酸；単糖類、二糖類、及び他の炭水化物（グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む）；ＥＤＴＡ等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Ｚｎ－タンパク質錯体）；ならびに／またはＴＷＥＥＮ（商標）、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（商標）、もしくはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【０３８０】

いくつかの実施形態では、ポリペプチド製剤中のポリペプチドは、機能的活性を維持する。

【０３８１】

インビボ投与に使用される製剤は、滅菌されていなければならない。これは、滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。

【０３８２】

本明細書の製剤は、治療されている特定の適応症の必要に応じて２つ以上の活性化合物、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有する活性化合物も含有し得る。例えば、ポリペプチドに加えて、１つの製剤中に追加のポリペプチド（例えば、抗体）を含むことが望ましくあり得る。あるいは、または加えて、本組成物は、化学療法剤、細胞毒性剤、サイトカイン、成長阻害剤、抗ホルモン剤、及び／または心臓保護剤を更に含み得る。かかる分子は、意図される目的のために有効な量の組み合わせで好適に存在する。

【０３８３】

ＸＩＩＩ．ＦｋｐＡを発現する細胞内で産生されたポリペプチドの組成物

いくつかの態様では、本発明は、ＦｋｐＡを発現する宿主細胞内で産生された組換えポリペプチドを含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物中の組換えポリペプチドは、ＦｋｐＡを含む宿主細胞タンパク質から精製されている。いくつかの実施形態では、本組成物は、ＦｋｐＡを発現する宿主細胞内で産生された組換えポリペプチドと、薬学的に許容される賦形剤とを含む。

【０３８４】

いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドを含む組成物は、約５０ｐｐｍ、約４０ｐｐｍ、約３０ｐｐｍ、約２０ｐｐｍ、約１０ｐｐｍ、約９ｐｐｍ、約８ｐｐｍ、約７ｐｐｍ、約６ｐｐｍ、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍのうちのいずれか未満または以下のＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドを含む

組成物は、約０．２ｐｐｍのＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドを含む組成物は、約０．１ｐｐｍのＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、少なくとも約５ｍｇ／ｍＬ、約１０ｍｇ／ｍＬ、約１５ｍｇ／ｍＬ、約２０ｍｇ／ｍＬ、約２５ｍｇ／ｍＬ、約５０ｍｇ／ｍＬ、約７５ｍｇ／ｍＬ、約１００ｍｇ／ｍＬ、約１２５ｍｇ／ｍＬ、約１５０ｍｇ／ｍＬ、約１７５ｍｇ／ｍＬ、約２００ｍｇ／ｍＬ、約２５０ｍｇ／ｍＬ、または約３００ｍｇ／ｍｌのうちのいずれかの濃度の組換えポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、少なくとも約５ｍｇ／ｍＬ、約１０ｍｇ／ｍＬ、約１５ｍｇ／ｍＬ、約２０ｍｇ／ｍＬ、約２５ｍｇ／ｍＬ、約５０ｍｇ／ｍＬ、約７５ｍｇ／ｍＬ、約１００ｍｇ／ｍＬ、約１２５ｍｇ／ｍＬ、約１５０ｍｇ／ｍＬ、約１７５ｍｇ／ｍＬ、約２００ｍｇ／ｍＬ、約２５０ｍｇ／ｍＬ、または約３００ｍｇ／ｍｌのうちのいずれかの濃度の組換えポリペプチド、ならびに約５０ｐｐｍ、約４０ｐｐｍ、約３０ｐｐｍ、約２０ｐｐｍ、約１０ｐｐｍ、約９ｐｐｍ、約８ｐｐｍ、約７ｐｐｍ、約６ｐｐｍ、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍのうちのいずれか未満のＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドを含む組成物は、約０．２ｐｐｍのＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドを含む組成物は、約０．１ｐｐｍのＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、約５ｍｇ／ｍｌ～約１００ｍｇ／ｍＬ、約５０ｍｇ／ｍＬ～約１５０ｍｇ／ｍＬ、約１００ｍｇ／ｍＬ～約２００ｍｇ／ｍＬ、約１５０ｍｇ／ｍＬ～約２５０ｍｇ／ｍＬ、約２００ｍｇ／ｍＬ～約３００ｍｇ／ｍｌの濃度の組換えポリペプチド、ならびに約５０ｐｐｍ、約４０ｐｐｍ、約３０ｐｐｍ、約２０ｐｐｍ、約１０ｐｐｍ、約９ｐｐｍ、約８ｐｐｍ、約７ｐｐｍ、約６ｐｐｍ、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍのうちのいずれか未満のＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドを含む組成物は、約０．２ｐｐｍのＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドを含む組成物は、約０．１ｐｐｍのＦｋｐＡを含む。

【０３８５】

いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドを含む組成物は、約５０ｐｐｍ、４０ｐｐｍ、３０ｐｐｍ、２０ｐｐｍ、１０ｐｐｍ、９ｐｐｍ、８ｐｐｍ、７ｐｐｍ、６ｐｐｍ、５ｐｐｍ、４ｐｐｍ、３ｐｐｍ、２ｐｐｍ、１ｐｐｍ、０．９ｐｐｍ、０．８ｐｐｍ、０．７ｐｐｍ、０．６ｐｐｍ、０．５ｐｐｍ、０．４ｐｐｍ、０．３ｐｐｍ、０．２ｐｐｍ、または０．１ｐｐｍのうちのいずれか未満または以下のＤｓｂＡ及び／またはＤｓｂＣを含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、少なくとも約５ｍｇ／ｍＬ、約１０ｍｇ／ｍＬ、約１５ｍｇ／ｍＬ、約２０ｍｇ／ｍＬ、約２５ｍｇ／ｍＬ、約５０ｍｇ／ｍＬ、約７５ｍｇ／ｍＬ、約１００ｍｇ／ｍＬ、約１２５ｍｇ／ｍＬ、約１５０ｍｇ／ｍＬ、約１７５ｍｇ／ｍＬ、約２００ｍｇ／ｍＬ、約２５０ｍｇ／ｍＬ、または約３００ｍｇ／ｍｌのうちのいずれかの濃度の組換えポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、少なくとも約５ｍｇ／ｍＬ、約１０ｍｇ／ｍＬ、約１５ｍｇ／ｍＬ、約２０ｍｇ／ｍＬ、約２５ｍｇ／ｍＬ、約５０ｍｇ／ｍＬ、約７５ｍｇ／ｍＬ、約１００ｍｇ／ｍＬ、約１２５ｍｇ／ｍＬ、約１５０ｍｇ／ｍＬ、約１７５ｍｇ／ｍＬ、約２００ｍｇ／ｍＬ、約２５０ｍｇ／ｍＬ、または約３００ｍｇ／ｍｌのうちのいずれかの濃度の組換えポリペプチド、ならびに約５０ｐｐｍ、約４０ｐｐｍ、約３０ｐｐｍ、約２０ｐｐｍ、約１０ｐｐｍ、約９ｐｐｍ、約８ｐｐｍ、約７ｐｐｍ、約６ｐｐｍ、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍのうちのいずれか未満のＤｓｂＡ及び／またはＤｓｂＣを含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、約５ｍｇ／ｍｌ～約１００ｍｇ／ｍＬ、約５０ｍｇ／ｍＬ～約１５０ｍｇ／ｍＬ、約１００ｍｇ／ｍＬ～約２００ｍｇ／ｍＬ、約１５０

ｍｇ／ｍＬ～約２５０ｍｇ／ｍＬ、約２００ｍｇ／ｍＬ～約３００ｍｇ／ｍｌの濃度の組換えポリペプチド、ならびに約５０ｐｐｍ、約４０ｐｐｍ、約３０ｐｐｍ、約２０ｐｐｍ、約１０ｐｐｍ、約９ｐｐｍ、約８ｐｐｍ、約７ｐｐｍ、約６ｐｐｍ、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍのうちのいずれか未満のＤｓｂＡ及び／またはＤｓｂＣを含む。ＤｓｂＡ及びＤｓｂＣを検出するための試薬及び方法は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許仮出願第６２／１２９，７０１号に提供される。

【０３８６】

いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドは、抗体である。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドは、多重特異性抗体である。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドは、二重特異性抗体である。いくつかの実施形態では、本組成物は、ＦｋｐＡを発現する、例えば、外因性ＦｋｐＡを発現する細胞内で産生された多重特異性抗体を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、ＦｋｐＡを発現する細胞内で産生された多重特異性抗体を含み、本組成物は、ＦｋｐＡを本質的に含まない。いくつかの実施形態では、本組成物は、ＦｋｐＡを発現する細胞内で産生された多重特異性抗体を含み、本組成物は、約５０ｐｐｍ、約４０ｐｐｍ、約３０ｐｐｍ、約２０ｐｐｍ、約１０ｐｐｍ、約９ｐｐｍ、約８ｐｐｍ、約７ｐｐｍ、約６ｐｐｍ、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍ未満のＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドを含む組成物は、約０．２ｐｐｍのＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドを含む組成物は、約０．１ｐｐｍのＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、少なくとも約５ｍｇ／ｍＬ、約１０ｍｇ／ｍＬ、約１５ｍｇ／ｍＬ、約２０ｍｇ／ｍＬ、約２５ｍｇ／ｍＬ、約５０ｍｇ／ｍＬ、約７５ｍｇ／ｍＬ、約１００ｍｇ／ｍＬ、約１２５ｍｇ／ｍＬ、約１５０ｍｇ／ｍＬ、約１７５ｍｇ／ｍＬ、約２００ｍｇ／ｍＬ、約２５０ｍｇ／ｍＬ、または約３００ｍｇ／ｍｌのうちのいずれかの濃度の多重特異性抗体を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、少なくとも約５ｍｇ／ｍＬ、約１０ｍｇ／ｍＬ、約１５ｍｇ／ｍＬ、約２０ｍｇ／ｍＬ、約２５ｍｇ／ｍＬ、約５０ｍｇ／ｍＬ、約７５ｍｇ／ｍＬ、約１００ｍｇ／ｍＬ、約１２５ｍｇ／ｍＬ、約１５０ｍｇ／ｍＬ、約１７５ｍｇ／ｍＬ、約２００ｍｇ／ｍＬ、約２５０ｍｇ／ｍＬ、または約３００ｍｇ／ｍｌのうちのいずれかの濃度の多重特異性抗体、ならびに約５０ｐｐｍ、約４０ｐｐｍ、約３０ｐｐｍ、約２０ｐｐｍ、約１０ｐｐｍ、約９ｐｐｍ、約８ｐｐｍ、約７ｐｐｍ、約６ｐｐｍ、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍのうちのいずれか未満のＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドを含む組成物は、約０．２ｐｐｍのＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドを含む組成物は、約０．１ｐｐｍのＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、約５ｍｇ／ｍｌ～約１００ｍｇ／ｍＬ、約５０ｍｇ／ｍＬ～約１５０ｍｇ／ｍＬ、約１００ｍｇ／ｍＬ～約２００ｍｇ／ｍＬ、約１５０ｍｇ／ｍＬ～約２５０ｍｇ／ｍＬ、約２００ｍｇ／ｍＬ～約３００ｍｇ／ｍｌの濃度の多重特異性抗体、ならびに約５０ｐｐｍ、約４０ｐｐｍ、約３０ｐｐｍ、約２０ｐｐｍ、約１０ｐｐｍ、約９ｐｐｍ、約８ｐｐｍ、約７ｐｐｍ、約６ｐｐｍ、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍのうちのいずれか未満のＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドを含む組成物は、約０．２ｐｐｍのＦｋｐＡを含む。いくつかの実施形態では、組換えポリペプチドを含む組成物は、約０．１ｐｐｍのＦｋｐＡを含む。

【０３８７】

いくつかの実施形態では、本組成物は、ＦｋｐＡを発現する、例えば、外因性ＦｋｐＡを発現する、例えば、外因性ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、及び／またはＤｓｂＣを発現する細胞内で産生された多重特異性抗体を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、ＦｋｐＡを発現する細胞内で産生された多重特異性抗体を含み、本組成物は、ＦｋｐＡを本質的に含まない。いくつかの実施形態では、本組成物は、ＦｋｐＡを発現する細胞内で産生された多重特異性抗体を含み、本組成物は、約５０ｐｐｍ、約４０ｐｐｍ、約３０ｐｐｍ、約２０ｐｐｍ、約１０ｐｐｍ、約９ｐｐｍ、約８ｐｐｍ、約７ｐｐｍ、約６ｐｐｍ、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍ未満のＤｓｂＡ及び／またはＤｓｂＣを含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、少なくとも約５ｍｇ／ｍＬ、約１０ｍｇ／ｍＬ、約１５ｍｇ／ｍＬ、約２０ｍｇ／ｍＬ、約２５ｍｇ／ｍＬ、約５０ｍｇ／ｍＬ、約７５ｍｇ／ｍＬ、約１００ｍｇ／ｍＬ、約１２５ｍｇ／ｍＬ、約１５０ｍｇ／ｍＬ、約１７５ｍｇ／ｍＬ、約２００ｍｇ／ｍＬ、約２５０ｍｇ／ｍＬ、または約３００ｍｇ／ｍｌのうちのいずれかの濃度の多重特異性抗体を含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、少なくとも約５ｍｇ／ｍＬ、約１０ｍｇ／ｍＬ、約１５ｍｇ／ｍＬ、約２０ｍｇ／ｍＬ、約２５ｍｇ／ｍＬ、約５０ｍｇ／ｍＬ、約７５ｍｇ／ｍＬ、約１００ｍｇ／ｍＬ、約１２５ｍｇ／ｍＬ、約１５０ｍｇ／ｍＬ、約１７５ｍｇ／ｍＬ、約２００ｍｇ／ｍＬ、約２５０ｍｇ／ｍＬ、または約３００ｍｇ／ｍｌのうちのいずれかの濃度の多重特異性抗体、ならびに約５０ｐｐｍ、約４０ｐｐｍ、約３０ｐｐｍ、約２０ｐｐｍ、約１０ｐｐｍ、約９ｐｐｍ、約８ｐｐｍ、約７ｐｐｍ、約６ｐｐｍ、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍのうちのいずれか未満のＤｓｂＡ及び／またはＤｓｂＣを含む。いくつかの実施形態では、本組成物は、約５ｍｇ／ｍｌ～約１００ｍｇ／ｍＬ、約５０ｍｇ／ｍＬ～約１５０ｍｇ／ｍＬ、約１００ｍｇ／ｍＬ～約２００ｍｇ／ｍＬ、約１５０ｍｇ／ｍＬ～約２５０ｍｇ／ｍＬ、約２００ｍｇ／ｍＬ～約３００ｍｇ／ｍｌの濃度の多重特異性抗体、ならびに約５０ｐｐｍ、約４０ｐｐｍ、約３０ｐｐｍ、約２０ｐｐｍ、約１０ｐｐｍ、約９ｐｐｍ、約８ｐｐｍ、約７ｐｐｍ、約６ｐｐｍ、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍのうちのいずれか未満のＤｓｂＡ及び／またはＤｓｂＣを含む。

【０３８８】

いくつかの実施形態では、本組成物は、ＦｋｐＡを発現する細胞内で産生された二重特異性抗体を含み、本組成物は、ＦｋｐＡを本質的に含まない。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は第１の半抗体及び第２の半抗体を含み、第１の半抗体はＩＬ－１７に結合する第１のＶＨ／ＶＬ単位を含み、第２の半抗体はＩＬ－１３に結合する第２のＶＨ／ＶＬ単位を含む。いくつかの実施形態では、第１の半抗体はＩＬ－１３には結合せず、第２の半抗体はＩＬ－１７には結合しない。ある特定の実施形態では、本明細書に提供される多重特異性抗体は、ＩＬ－１７ＡＡ、ＩＬ－１７ＡＦ、及びＩＬ－１７ＦＦに結合し、ＩＬ－１７ＡＡ誘導性活性、ＩＬ－１７ＡＦ誘導性活性、及びＩＬ－１７ＦＦ誘導性活性を阻害し、またＩＬ－１３誘導性活性を阻害する。ある特定のかかる実施形態では、抗ＩＬ－１３／ＩＬ－１７ＡＡ、ＡＦ、及びＦＦ二重特異性抗体は、ＩＬ－１７ＡまたはＩＬ－１７Ｆ単独によって誘導される活性とは対照的に、ＩＬ－１７Ａ及びＦサイトカインの全てによって誘導される活性を有利に遮断する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される多重特異性抗体は、ＩＬ－１７ＡＡ、ＩＬ－１７ＡＦ、及びＩＬ－１７ＦＦに結合する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１７ＡＡ誘導性活性は、ＩＬ－１７ＡＡ誘導性遺伝子発現及び／またはインビボもしくはインビトロでの細胞の増殖である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１７ＡＦ誘導性活性は、ＩＬ－１７ＡＦ誘導性遺伝子発現及び／またはインビボもしくはインビトロでの細胞の増殖である。いくつかのかかる実施形態では、

ＩＬ－１７ＦＦ誘導性活性は、ＩＬ－１７ＦＦ誘導性遺伝子発現及び／またはインビボもしくはインビトロでの細胞の増殖である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１３誘導性活性は、ＩＬ－１３誘導性遺伝子発現及び／またはインビボもしくはインビトロでの細胞の増殖である。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される多重特異性抗体は、ＩＬ－１３のＩＬ－１３Ｒα１への結合を阻害しない。

【０３８９】

いくつかの実施形態では、組成物中の抗ＩＬ１３／ＩＬ１７ＡＡ　ＡＦ　ＦＦ二重特異性抗体は、第１の半抗体及び第２の半抗体を含み、第１の半抗体は、ＩＬ－１７ＡＡ、ＡＦ、及びＦＦに結合する第１のＶＨ／ＶＬ単位を含み、第２の半抗体は、ＩＬ－１３に結合する第２のＶＨ／ＶＬ単位を含み、第１のＶＨ／ＶＬ単位は、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号２４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号２５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号２６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含み、第２のＶＨ／ＶＬ単位は、配列番号１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号１３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、第１の半抗体はＩＬ－１３には結合せず、第２の半抗体はＩＬ－１７には結合しない。

【０３９０】

いくつかの実施形態では、第１のＶＨ／ＶＬ単位は、配列番号２１のアミノ酸配列と少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の配列同一性を有するＶＨ配列、及び配列番号２２のアミノ酸配列と少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の配列同一性を有するＶＬ配列を含み、第２のＶＨ／ＶＬ単位は、配列番号１０のアミノ酸配列と少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の配列同一性を有するＶＨ配列、及び配列番号１１のアミノ酸配列と少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％の配列同一性を有するＶＬ配列を含む。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体が提供され、第１のＶＨ／ＶＬ単位は、配列番号２１のアミノ酸配列を有するＶＨ配列及び配列番号２２のアミノ酸配列を有するＶＬ配列を含み、第２のＶＨ／ＶＬ単位は、配列番号１０のアミノ酸配列を有するＶＨ配列及び配列番号１１のアミノ酸配列を有するＶＬ配列を含む。

【０３９１】

ある特定の実施形態では、第１の半抗体は、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号３１のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むＩＬ１７ＡＡ、ＡＦ、及びＦＦに結合し、第２の半抗体は、配列番号１８のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むＩＬ１３に結合する。ある特定の実施形態では、第１の半抗体は、配列番号３０のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号３１のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むＩＬ１７ＡＡ、ＡＦ、及びＦＦに結合し、第２の半抗体は、配列番号１９のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むＩＬ１３に結合する。

【０３９２】

いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、本明細書に記載の半抗体を組み立てることによって調製される。半抗体は、宿主細胞を培養して、半抗体の２つの鎖を発現させ、それにより発現時に２つの鎖が折り畳み、組み立てられて、宿主細胞内で生物学的に半抗体を形成することによって、原核生物宿主細胞内で産生される。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、ポリペプチドの第１の鎖をコードする第１の翻訳単位、ポリペプチドの第２の鎖をコードする第２の翻訳単位；ならびにペプチジル－プロリルイソメラーゼ（例えば、ＦｋｐＡ）、タンパク質ジスルフィドオキシドレダクターゼ（例えば、ＤｓｂＡ及びＤｓｂＣ）からなる

群から選択される、少なくとも１つのシャペロンタンパク質をコードする翻訳単位をコードする、１つ以上のポリヌクレオチドを含む。翻訳単位は、同じポリペプチド分子上にあっても、異なるポリペプチド分子上にあっても、または任意の組み合わせであってもよい。例えば、第１及び第２の翻訳単位は、第１のポリペプチド分子上にあってもよく、１つ以上のシャペロンタンパク質をコードする翻訳単位は、第２のポリペプチド分子上にあってもよい。宿主細胞は、成長温度及び成長撹拌速度を含む成長相と、産生温度及び産生撹拌速度を含む産生相とを含む条件下、培養培地中で培養される。いくつかの実施形態では、成長温度は、産生温度を２～１０℃上回り、成長撹拌速度は、産生撹拌速度を５０～２５０ｒｐｍ上回る。半抗体は、細胞から回収され、上述のように組み立てられる。いくつかの実施形態では、半抗体は、組み立て前にタンパク質Ａクロマトグラフィーによって精製される。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許仮出願第６２／０７５，７９２号を参照されたい。

【０３９３】

組み立てられた多重特異性抗体は、例えば、ＦｋｐＡを含む不純物を除去するために更に精製される。いくつかの実施形態では、組み立てられた多重特異性抗体は、混合モードクロマトグラフィー（例えば、陰イオン交換混合モードクロマトグラフィー）によって、続いて疎水性相互作用クロマトグラフィーによって精製される。いくつかの実施形態では、組み立てられた多重特異性抗体は、混合モードクロマトグラフィー（例えば、陰イオン交換混合モードクロマトグラフィー）によって、続いて陰イオン交換クロマトグラフィーによって、続いて疎水性相互作用クロマトグラフィーによって精製される。いくつかの実施形態では、組み立てられた多重特異性抗体は、混合モードクロマトグラフィー（例えば、陰イオン交換混合モードクロマトグラフィー）によって、続いて陰イオン交換クロマトグラフィーによって、続いて疎水性相互作用クロマトグラフィーによって、続いて陽イオン交換クロマトグラフィーによって精製される。いくつかの実施形態では、精製された多重特異性抗体は、本明細書に記載のアッセイを使用して、ＦｋｐＡの除去について分析される。

【０３９４】

ＸＩＶ．製品及びキット

本明細書に記載の方法によって精製されたポリペプチド（例えば、多重特異性抗体）及び／または本明細書に記載の方法によって精製されたポリペプチドを含む製剤は、製品に含有され得る。いくつかの実施形態では、製品は、本明細書に記載の超高純度ＦｋｐＡポリペプチドを使用して生成された抗体を含む。製品は、ポリペプチド、抗体、ポリペプチド及び／またはポリペプチド製剤を含有する容器を含み得る。好ましくは、製品は、（ａ）本明細書に記載のポリペプチド及び／またはポリペプチド製剤を含む組成物を容器内に含む容器、ならびに（ｂ）対象への製剤の投与に関する指示を有する添付文書を含む。

【０３９５】

製品は、容器と、容器上または容器に関連するラベルまたは添付文書とを含む。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ等が挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチック等の様々な材料から形成され得る。容器は、製剤を保持または含有し、滅菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、皮下注射針によって穿刺可能なストッパーを有する静脈用溶液袋またはバイアルであり得る）。組成物中の少なくとも１つの活性薬剤は、ポリペプチドである。ラベルまたは添付文書は、提供されているポリペプチド及び任意の他の薬物の投薬量及び間隔についての具体的な手引きにより、対象における本組成物の使用を示す。製品は、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業的観点及びユーザの観点から望ましい他の材料を更に含み得る。いくつかの実施形態では、容器は、シリンジである。いくつかの実施形態では、シリンジは、注入デバイス内に更に含有される。いくつかの実施形態では、注入デバイスは、自己注入器である。

【０３９６】

「添付文書」は、かかる治療薬若しくは薬品の適応症、使用法、投薬量、投与、禁忌症についての情報、パッケージングされた製品と組み合わされる他の治療薬、及び／またはか

かる治療薬の使用に関する警告を含有する、治療薬の商業用パッケージに習慣的に含まれる指示書を指すように使用される。

【０３９７】

いくつかの実施形態では、本発明は、細菌細胞から調製された組換えポリペプチドを含む薬学的組成物中のＦｋｐＡの検出のためのキットであって、本明細書に記載の抗ＦｋｐＡ抗体を含む、キットを提供する。なお他の実施形態では、本発明は、細菌細胞から調製された組換えポリペプチドを含む薬学的組成物中のＦｋｐＡの検出のためのキットであって、本明細書に記載の抗ＦｋｐＡ抗体を含む、キットを提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、細菌細胞から調製された組換えポリペプチドを含む薬学的組成物中のＦｋｐＡの検出のためのキットであって、細菌細胞（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞）が、ＦｋｐＡを発現する、キットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、使用に関する指示を含む。いくつかの実施形態では、キットは、試料中のＦｋｐＡを定量するための標準曲線を生成する際の参照標準物として使用するための超高純度ＦｋｐＡを更に含む。いくつかの実施形態では、キットは、試料中のＦｋｐＡを検出するためのアッセイにおける陽性対照として使用するための超高純度ＦｋｐＡを更に含む。

【０３９８】

本明細書に開示される特徴は全て、任意の組み合わせで組み合わせることができる。本明細書に開示される各特徴は、同じ、同等、または同様の目的を果たす代替の特徴に置き換えられてもよい。したがって、別途明確に述べられない限り、開示される各特徴は、一般的な一連の同等または同様の特徴の一例にすぎない。

【０３９９】

本発明の更なる詳細が、以下の非限定的な実施例によって例示されている。本明細書における全ての参考文献の開示は、参照により本明細書に明確に組み込まれる。

【実施例】

【０４００】

以下の実施例は、単に本発明の例示となるよう意図されており、それ故に決して本発明を限定するものと解釈されるべきではない。以下の実施例及び詳細な説明は、限定的なものではなく、例示として提供されている。

【０４０１】

実施例１。Ｅ．ｃｏｌｉタンパク質のアッセイは、ＦｋｐＡを適切に測定しない。

ＦｋｐＡは、典型的には高レベルでは発現されないＥ．ｃｏｌｉ内のシャペロンタンパク質であるが、ＦｋｐＡを過剰発現するＥ．ｃｏｌｉが、抗体を含むヘテロ多量体真核生物タンパク質の適切な組み立て及び折り畳みを改善するために使用されている（Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００３，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，３５：１０３２－１０４２）。

【０４０２】

Ｅ．ｃｏｌｉタンパク質（ＥＣＰ）のアッセイが、ＦｋｐＡの存在を適切に検出し、定量することができるかを決定するために、超精製されたＦｋｐＡの試料（実施例２を参照されたい）を、アッセイ希釈剤（０．１５ＭのＮａＣｌ／０．１ＭのＮａＰＯ４／０．１％の魚ゼラチン／０．０５％のＰｏｌｙｓｏｒｂａｔｅ２０／０．０５％のＰｒｏｃｌｉｎ３００）に異なる濃度で添加し、ＥＣＰアッセイで試験した（Ｚｈｕ－Ｓｈｉｍｏｎｉ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．，２０１４，Ｂｉｏｔｅｃｈ　ａｎｄ　Ｂｉｏｅｎｇ．１１１：２３６７－２３７９）。Ｅ．ｃｏｌｉタンパク質のアッセイが、ウシ血清アルブミンは検出しないはずであるため、この哺乳類タンパク質を陰性対照として使用した。結果を表４に示す。

表４。ＥＣＰアッセイ検出

ＦｋｐＡ			ウシ血清アルブミン		
理論値（μｇ／ｍＬ）	観察値（μｇ／ｍＬ）	回収％	理論値（μｇ／ｍＬ）	観察値（μｇ／ｍＬ）	回収％
１０００．０	１５．９	１．６	２０００．０	ＬＴＲ	ＮＤ
５００．０	８．６	１．７	１０００．０	ＬＴＲ	ＮＤ
２５０．０	４．５	１．８	５００．０	ＬＴＲ	ＮＤ
１２５．０	２．０	１．６	２５０．０	ＬＴＲ	ＮＤ
６２．５	０．８	１．３	１２５．０	ＬＴＲ	ＮＤ
３１．３	０．１	０．３	６２．５	ＬＴＲ	ＮＤ
１５．６	ＬＴＲ	ＮＤ	３１．３	ＬＴＲ	ＮＤ
７．８	ＬＴＲ	ＮＤ	１５．６	ＬＴＲ	ＮＤ

ＬＴＲ＝範囲未満、ＮＤ＝検出されず

【０４０３】

これらの結果は、ＥＣＰアッセイがＦｋｐＡを適切に検出及び定量しないことを示す。更に、Ｅ．ｃｏｌｉ内で調製される治療用タンパク質の放出アッセイの一部として、Ｅ．ｃｏｌｉ残物（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉタンパク質及び核酸）を検出するための市販のアッセイは、ＦｋｐＡを具体的に特定しない。したがって、ＦｋｐＡ検出アッセイと干渉し得る他のＥ．ｃｏｌｉタンパク質及び／または核酸への反応性が最小限に抑えられたＦｋｐＡに高度に特異的なポリクローナル抗体を生成する必要が存在する。加えて、ＦｋｐＡの超高純度調製物は、治療用ポリペプチド調製物中のＦｋｐＡを正確に検出するためのＦｋｐＡ標準物の生成、ならびに研究及び商業的ポリペプチド産生のためのアッセイ品質を保証するためのＦｋｐＡ陽性対照の生成に有用である。

【０４０４】

実施例２。超高純度ＦｋｐＡの調製

材料及び方法

抽出ステップ

ＦｋｐＡを、Ｅ．ｃｏｌｉ（６６Ｆ８：ΔｆｈｕＡ ΔｐｈｏＡ ｉｌｖＧ２０９６（Ｖａｌｒ）Δｐｒｃ ｓｐｒ４３Ｈ１ ΔｄｅｇＰ ΔｍａｎＡ ｌａｃＩＱ ΔｏｍｐＴ ΔｍｅｎＥと命名されたＷ３１１０誘導体）内で発現させた。そのために、ＦｋｐＡのＯＲＦを含有する適合性プラスミド（ｐＡＣＹＣ、Ｎｏｖａｇｅｎ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）を、ＥＰ１３５６０５２に記載されるように構築した（例えば、実施例９～１０、特に段落［０２０７］を参照されたい）。０．５ｍＬの凍結ストック培養物（１０～１５％のＤＭＳＯを含有）を融解し、使用して、０．５ｍｌのテトラサイクリン溶液（５ｍｇ／ｍｌ）ならびに／または２ｍＬのカナマイシン溶液（５ｍｇ／ｍＬ）及び２．５ｍｌの１Ｍのリン酸ナトリウム溶液で補助した５００ｍｌのＳｏｙ ＬＢ培地を含有する２Ｌの振盪フラスコに植え付けた。培養物を、大規模培養物に拡大した。２００ｍＭのＩＰＴＧの５０ｍＬのボーラス添加を、およそ２００のＯＤで発酵物に添加した。ＩＰＴＧを使用して、ＦｋｐＡオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）の発現を制御するために使用されるｔａｃＩＩプロモーターを誘導した。発酵運転時間は、５０時間であった。

【０４０５】

別途記載のない限り、全ての細胞溶解ステップ及び遠心分離ステップを、２～８℃で行った。

【０４０６】

１０ＬのＥ．ｃｏｌｉ発酵物から回収した３０４ｇの一定分量の細胞ペーストを、一晩融解した。細胞ペーストを、１０体積の２５ｍＭの２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン

酸（ＭＥＳ）（ｐＨ６．０（溶解緩衝液）中に懸濁させ、６０分間混合して、均一な懸濁液を生成した。温度制御ユニット（５℃以下の初期設定点）を備えた微小流動化剤ＨＣ－８０００ホモジナイザー（Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を、細胞溶解に使用した。微小流動化剤を、細胞懸濁液の導入前に、１Ｌの冷やした溶解緩衝液で濯いだ。細胞懸濁液を微小流動化剤に移行させ、室内圧力（６，０００～８，０００ｐｓｉ）で、合計４回の通過を行った。冷やした溶解緩衝液を使用して、微小流動化剤から残留懸濁液を追跡した。２００ｍＬの一定分量の溶解した細胞懸濁液を、遠心分離及びその後の精製のために得た。残りの約３．２Ｌのホモジネートを、－６０℃以下で保管した。

【０４０７】

２００ｍＬの一定分量を６つの等体積に分け、５０ｍＬの遠心分離管に移行させた。１５，０００ｒｐｍの速度の、ＳＳ－３４回転子（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を備えたＲＣ６Ｐｌｕｓ遠心分離機を、２０℃の温度で３０分間使用して、管を遠心分離した。ＦｋｐＡを含有する上清を２～８℃の温度で保管し、ペレットを処分した。

【０４０８】

ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆｌｏｗ陽イオン－交換クロマトグラフィーの分析評価

（成熟タンパク質のアミノ酸配列に基づく）ＦｋｐＡの等電点（ｐＩ）の計算値は、７．０１である。ｐＨ６．０で行われる陽交換クロマトグラフィーは、標的タンパク質の良好な結合をもたらすはずである一方で、（３～６のｐＩ値を有する）Ｅ．ｃｏｌｉタンパク質（ＥＣＰ）不純物の大半は、カラムを貫流するはずである。

【０４０９】

強陽イオン－交換培地ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）で充填された１ｍＬの重力流カラムを使用して、この潜在的な第１のクロマトグラフィーステップの分析評価を行った。

【０４１０】

カラムを、３カラム体積（ＣＶ）の５０ｍＭのＭＥＳ、１．０ＭのＮａＣｌ（ｐＨ６．０）（溶出緩衝液）で事前平衡化し、その後、３ＣＶの５０ｍＭのＭＥＳ（ｐＨ６．０）（平衡化緩衝液）で平衡化した。１．０ｍＬの一定分量の溶解物上清を、カラムに装填し、続いて平衡化緩衝液で５ＣＶ洗浄した。（平衡化緩衝液と溶出緩衝液とをブレンドすることによって生じる）１００ｍＭ～１０００ｍＭまで増加するＮａＣｌ濃度を使用して、カラムを段階溶出させた。

【０４１１】

ジスルフィド結合還元を有しないドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）を使用して、カラム画分中のＦｋｐＡの相対純度を決定した。結果は、ＦｋｐＡがこれらの条件下で陽イオン交換培地に完全に結合していること（貫流画分及び洗浄画分中のＦｋｐＡの欠如によって証明される通り）を示す（図１、レーン２及び３）。ＦｋｐＡは、１００ｍＭのＮａＣｌステップによってカラムから完全に溶出され、これは、ＦｋｐＡが陽イオン－交換培地に弱く結合していることを示し、ＥＣＰの大半がカラムを貫流するという仮説を確認する。結果として生じるＦｋｐＡ含有プールは非常に清潔であり、少量の残留ＥＣＰを有するにすぎない（図１、レーン４）。

【０４１２】

ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆｌｏｗ陽イオン－交換クロマトグラフィーの段階溶出評価

ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ陽イオン－交換クロマトグラフィーを使用する、ＦｋｐＡ精製物の分取評価を、ＡＫＴＡ　Ｅｘｐｌｏｒｅｒ１００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）で行った。２．６ｃｍ（幅）×２７．３ｃｍ（長さ）のカラム（１ＣＶ＝１４５ｍＬ）を、この操作に使用した。全てのステップを、８．８５ｍＬ／分（１００ｃｍ／時）の流量で行った。カラムを、３ＣＶの５０ｍＭの溶出緩衝液（２５ｍＭのＭＥＳ、１．０ＭのＮａＣｌ（ｐＨ６．０））で事前平衡化し、その後、３ＣＶの平衡

化緩衝液（２５ｍＭのＭＥＳ（ｐＨ６．０））で平衡化した。溶解物上清をカラムに装填し、２０ｍＬの平衡化緩衝液で追跡した。カラムを５ＣＶの平衡化緩衝液で洗浄し、その後、５０ｍＭのＭＥＳ、１００ｍＭのＮａＣｌ（ｐＨ６．０）で段階溶出させた。段階溶出後、カラムから３ＣＶの溶出緩衝液をストリップした。

【０４１３】

クロマトグラムを図２に示す。カラム画分のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析（図３Ａ及び３Ｂ）は、ＦｋｐＡが主要溶出ピークに関連し、主に画分１１～１７において見出されることを示す。画分１８～２３中には、少量のＦｋｐＡも存在する。

【０４１４】

ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆｌｏｗ陽イオン－交換クロマトグラフィーの勾配溶出評価

残留ＥＣＰを除去するためのＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗの潜在性を更に評価するために、第１の分取評価からの画分１１～１８の再クロマトグラフィーを行った。

【０４１５】

画分１１～１８をプールし、Ｓｅｐｈａｄｅｘ（登録商標）Ｇ－２５を使用して、ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ平衡化緩衝液へと緩衝液交換して戻した。

【０４１６】

緩衝液交換した画分を、先程の分取運転で使用したものと同じＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗカラムで、同じ装填及び洗浄パラメータに従って再クロマトグラフした。９ＣＶにわたって、０～３０％の勾配（０～３００ｍＭのＮａＣｌ）を使用して溶出を行い、これは、ＦｋｐＡの元の段階溶出に必要な相対塩量を考慮する。

【０４１７】

クロマトグラム（図４）は、比較的低い（５～１１ｍＳ／ｃｍ）イオン強度の条件下で溶出する大きな主要ピークを示す。勾配プロファイルは、段階溶出プロファイル（図２）に対する強い類似性を示し、より小さいプレピークが不在である（それらの画分は、再クロマトグラフィーのために選択したものの中には含まれなかった）。

【０４１８】

溶出プロファイルのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析。ＦｋｐＡに対するＥＣＰバンドの検査は、これらの不純物のうちのいくつかの部分的な解像度のみが、線形勾配の使用によって達成されることを示す（データ示さず）。これは、これらのＥＣＰがＦｋｐＡと同等のｐＩ値を有し得ること、またはいくつかの他の相互作用様式（複数可）がそれらの同時精製に関与し得ることを示す可能性がある。

【０４１９】

潜在的な第２の精製ステップの分析評価：Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ ＦｌｏｗとＰｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）との比較

Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ

強陰イオン－交換培地Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（ＱＳＦＦ）（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）で充填された１ｍＬの重力流カラムを使用して、この潜在的な第２のクロマトグラフィーステップの分析評価を行った。

【０４２０】

カラムを、５ｍＬの５０ｍＭのＴｒｉｓ１．０ＭのＮａＣｌ（ｐＨ８．０）（ＱＳＦＦ溶出緩衝液）で事前平衡化し、その後、５ｍＬの５０ｍＭのＴｒｉｓ（ｐＨ８．０）（ＱＳＦＦ平衡化緩衝液）で平衡化した。上述のＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）の勾配評価からの画分２２～５０の２．５ｍＬの一定分量のミニプールを、ＰＤ－１０カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して、３．５ｍＬのＱＳＦＦ平衡化緩衝液へと緩衝液交換し、カラムに装填した。カラムを３．５ｍＬのＱＳＦＦ平衡化緩衝液で洗浄し、その後、３．０ｍＬのＱＳＦＦ溶出緩衝液で段階溶出させた。

【０４２１】

ＱＳＦＦ及びＰｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）（以下に記載される）の評価からのカラム画分を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した（図５）。Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）カラムは、ＦｋｐＡに結合しないが、カラムに結合している高分子量（ＭＷ）種のうちの３つを除去することができた。しかしながら、約３５ｋＤａ、約４０ｋＤａ、及び約２６ｋＤａでのバンドは、ＦｋｐＡとともに、カラム貫流物中で依然検出することができる。回収データを表５及び６に要約する。Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗゲルは、良好な全体的回収（９５％）をもたらした。

表５。ＱＳＦＦ及びＰｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）カラム画分からの分光光度データ

試料	希釈係数	ＦｋｐＡ（ｍｇ／ｍＬ）	吸光度＜２８０ｎｍ＞	吸光度＜３２０ｎｍ＞
ＰＷブランク	１．０	１．１６５６Ｅ－３	－８．３４４７Ｅ－５	－７．１２８７Ｅ－４
ＳＰプール	１．０	１．５１３６０	０．８２６２８	８．９３３５Ｅ－３
Ｑ　Ｆ－Ｔ／洗浄	１．０	０．４６１３７	０．２４９４８	３．４５２３Ｅ－４
Ｑストリップ	１．０	０．１２２７８	６．５１８４Ｅ－２	－１．１１９６Ｅ－３
Ｐｈ　Ｆ－Ｔ／Ｗ	１．０	６．８９５２Ｅ－２	３．２５８９Ｅ－２	－４．６４５３Ｅ－３
Ｐｈ０．５ＭＷ	１．０	１．８１８９Ｅ－２	７．５０６８Ｅ－３	－２．３１５０Ｅ－３
Ｐｈ０．４ＭＷ	１．０	２．３８３０Ｅ－２	１．１４９７Ｅ－２	－１．３７１４Ｅ－３
Ｐｈ０．３ＭＷ	１．０	２．０９４８Ｅ－２	８．４６３９Ｅ－３	－２．８４８１Ｅ－３
Ｐｈ０．２ＭＷ	１．０	１．８９２４Ｅ－２	９．６９２２Ｅ－３	－５．２６９１Ｅ－４
Ｐｈ０．１ＭＷ	１．０	３．４４１９Ｅ－２	２．０３０５Ｅ－２	１．７１９０Ｅ－３
Ｐｈ０Ｍ　Ｗ	１．０	０．１４３２６	８．２１２９Ｅ－２	４．７６７４Ｅ－３
Ｐｈ　ＰＷストリップ	１．０	０．２０２０７	０．１１３０１	３．８８９６Ｅ－３

ＦｋｐＡ（ｍｇ／ｍＬ）＝（吸光度（２８０ｎｍ）－吸光度（３２０ｎｍ））／０．５４

表６。Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ回収データ

画分	体積（ｍＬ）	濃度（ｍｇ／ｍＬ）	ｍｇ	回収％
ＳＰミニプール画分２２～５０	２．５	１．５１	３．８	１００％
Ｆ－Ｔ／洗浄	７．０	０．４６	３．２	８５％
１ＭのＮａＣｌストリップ	３．０	０．１２	０．４	１０％
質量平衡			３．６	９５％

【０４２２】
Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）
疎水性相互作用培地Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（低置換）（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）で充填された１ｍＬの重力流カラムを使用して、この潜在的な第２のクロマトグラフィーステップの分析評価を行った。
【０４２３】
カラムを、５ｍＬの５０ｍＭのリン酸塩（ｐＨ７．０）（Ｐｈｅｎｙｌ溶出緩衝液）で事前平衡化し、その後、５ｍＬの０．６Ｍの硫酸ナトリウム、５０ｍＭのリン酸塩（ｐＨ７．０）（Ｐｈｅｎｙｌ平衡化緩衝液）で平衡化した。２．５ｍＬの１．２Ｍの硫酸ナトリウムを、上述のＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）の勾配評価からの画分２２～５０の２．５ｍＬの一定分量のミニプールに添加した。ミニプールを緩徐に混合し、室温で３０分間静置し、その後、カラムに装填した。カラムを３．０ｍＬのＰｈｅｎｙｌ平衡化緩衝液で洗浄し、その後、Ｐｈｅｎｙｌ溶出緩衝液中、３．０ｍＬの体積の減少する硫酸ナトリウム（０．５Ｍ、０．４Ｍ、０．３Ｍ、０．２Ｍ、０．１Ｍ、及び０Ｍ）で段階溶出させた。最後に、３．０ｍＬの精製水（ＰＷ）を使用して、カラムをストリップした。
【０４２４】
Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）（低置換）ゲルは、Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗとは反対の挙動を示し、ＱＳＦＦに結合している不純物は、Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）（低置換）カラムを貫流することができる。ＱＳＦＦでＦｋｐＡとともに同時精製した約３５ｋＤａのバンドは、Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）カラムも貫流する。ＦｋｐＡは、ＰＷストリップだけでなく、減少する塩プロファイルにおいても非常に後期に、０Ｍの硫酸ナトリウムで溶出され、これは、それが非常に疎水性であることを示す。ＦｋｐＡ含有画分は、ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗプール中に存在したＥＣＰ不純物を欠くようである。回収データを表５及び６に要約する。Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（低置換）ゲルは、５１％しか回収することができなかった。残りのタンパク質は、カラムに結合している可能性があり、これは、Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）（低置換）ゲルがＦｋｐＡに密接に結合し過ぎることを示す。Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（低置換）は、残留ＥＣＰの除去に成功することができたが、より低い回収が代償であった。
表６。Ｐｈｅｎｙ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）（低置換）回収データ

画分	体積（ｍＬ）	濃度（ｍｇ／ｍＬ）	ｍｇ	回収％
ＳＰミニプール画分２２～５０	２．５	１．５１	３．８	１００％
Ｆ－Ｔ／洗浄	８．０	０．０７	０．６	１５％
０．５Ｍ洗浄	３．０	０．０２	０．１	１％
０．４Ｍ洗浄	３．０	０．０２	０．１	２％
０．３Ｍ洗浄	３．０	０．０２	０．１	２％
０．２Ｍ洗浄	３．０	０．０２	０．１	２％
０．１Ｍ洗浄	３．０	０．０３	０．１	３％
０Ｍ洗浄	３．０	０．１４	０．４	１１％
ＰＷストリップ	３．０	０．２０	０．６	１６％
質量平衡			１．９	５１％

【０４２５】

潜在的な第２の精製ステップの分析評価：Ｐｈｅｎｙｌ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）と、Ｂｕｔｙｌ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）と、Ｏｃｔｙｌ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）との比較

第２の精製ステップの疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）の潜在性を実証したところで、異なる疎水性を有する３つのＨＩＣ培地、つまり、Ｐｈｅｎｙｌ Ｓｅｐｈａｒｏｓ（登録商標）（低置換）と、Ｏｃｔｙｌ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗと、Ｂｕｔｙｌ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）４Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）とを比較する、第２の評価を行った。

【０４２６】

Ｐｈｅｎｙｌ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）について上述のように、各カラムについてクロマトグラフィーを行い、各３．０ｍＬの精製水（ＰＷ）を使用してカラムをストリップした後、３ｍＬの２％の水酸化ナトリウムを使用して各カラムを再生させるステップを追加した。

【０４２７】

各カラムからのカラム再生画分を比較した（表７及び８）。表７及び８において、ＦｋｐＡに関して疎水性が増加する順序で、異なるカラムを列挙する。Ｂｕｔｙｌ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）４Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗゲルは、３つのうちで最低の再生値（１５％）を有する一方で、Ｏｃｔｙｌ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ及びＰｈｅｎｙｌ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（低置換）はそれぞれ、４５及び５６％の回収を示す。したがって、Ｏｃｔｙｌ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ及びＰｈｅｎｙｌ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（低置換）ゲルは、第２のクロマトグラフィーステップとして使用するには疎水性であり過ぎる。

表７。カラム再生画分からの分光光度データ

試料	希釈係数	ＦｋｐＡ（ｍｇ／ｍＬ）	吸光度＜２８０ｎｍ＞	吸光度＜３２０ｎｍ＞
ＰＷブランク	１．０	－５．６８６７Ｅ－４	６．１９８９Ｅ－５	３．６９０７Ｅ－４
Ｂｕｔｙｌ再生	１．０	０．１８８７０	０．１０７９８	６．０７８２Ｅ－３
Ｏｃｔｙｌ再生	１．０	０．５６６４２	０．３１５５７	９．７０９８Ｅ－３
Ｐｈｅｎｙｌ再生	１．０	０．７０１０６	０．３８７８１	９．２３９２Ｅ－３

ＦｋｐＡ（ｍｇ／ｍＬ）＝（吸光度（２８０ｎｍ）－吸光度（３２０ｎｍ））／０．５４

表８。ＨＩＣゲル再生

画分	体積（ｍＬ）	濃度（ｍｇ／ｍＬ）	ｍｇ	回収％
ＳＰミニ２２～５０	２．５	１．５１	３．８	１００％
Ｂｕｔｙｌ再生	３．０	０．１９	０．６	１５％
Ｏｃｔｙｌ再生	３．０	０．５７	１．７	４５％
Ｐｈｅｎｙｌ再生	３．０	０．７０	２．１	５６％

【０４２８】

潜在的な第２の精製ステップの分析評価：Ｂｕｔｙｌ－Ｓ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ

異なる疎水性を有する３つのＨＩＣ培地を比較した後、追加のＨＩＣゲル、つまり、Ｂｕｔｙｌ－Ｓ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を評価した。このゲルは、評価されたＨＩＣゲルのクロマトグラフィー培地において最も弱いＨＩＣリガンドを有する。

【０４２９】

１ｍＬの重力流カラムを、Ｂｕｔｙｌ－Ｓ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）で充填した。カラムを、５ｍＬの５０ｍＭのリン酸塩（ｐＨ７．０）（Ｂｕｔｙｌ－Ｓ溶出緩衝液）で事前平衡化し、その後、５ｍＬの０．６Ｍの硫酸ナトリウム、５０ｍＭのリン酸塩（ｐＨ７．０）（Ｂｕｔｙｌ－Ｓ平衡化緩衝液）で平衡化した。２．５ｍＬの１．２Ｍの硫酸ナトリウムを、上述のＳＰ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）の勾配評価からの画分２２～５０の２．５ｍＬの一定分量のミニプールに添加した。ミニプールを緩徐に混合し、室温で３０分間静置し、その後、カラムに装填した。カラムを３．０ｍＬのＢｕｔｙｌ－Ｓ平衡化緩衝液で洗浄し、その後、Ｂｕｔｙｌ－Ｓ溶出緩衝液中、３．０ｍＬの体積の減少する硫酸ナトリウム（０．５Ｍ、０．４Ｍ、０．３Ｍ、０．２Ｍ、０．１Ｍ、及び０Ｍ）で段階溶出させた。３．０ｍＬの精製水（ＰＷ）を使用してカラムを２回ストリップし、その後、３ｍＬの２％の水酸化ナトリウムを使用して再生させた。

【０４３０】

Ｂｕｔｙｌ－Ｓの評価からのカラム画分を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した（図６）。ＳＰ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗミニプールからのｅｃｐは、平衡化条件下（０．６Ｍの硫酸ナトリウム）でカラムによって捕捉されない。加えて、Ｎ

ａＯＨ再生画分中に非常にわずかなＦｋｐＡが存在するようであり、これは、このクロマトグラフィー培地が、大きな回収損失を維持しないでおきながら、ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗプールから残留ＥＣＰを除去できる可能性があることを示す。

【０４３１】

潜在的な第２の精製ステップの分析評価：Ｂｕｔｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）４Ｆａｓｔ　ＦｌｏｗとＢｕｔｙｌ－Ｓ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗとの比較

Ｂｕｔｙｌ－Ｓ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ　ＦｌｏｗまたはＢｕｔｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）４Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗのいずれかを含有する１ｍＬの重力流カラムを、直接比較した。手順は、２×３ｍＬのＰＷではなく、６．０ｍＬのＰＷを使用してカラムを１回ストリップしたことを除いて、Ｂｕｔｙｌ－Ｓ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗについて上述の通りであった。

【０４３２】

Ｂｕｔｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）４Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ及びＢｕｔｙｌ－Ｓ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗからのカラム画分のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析をそれぞれ、図７Ａ及び７Ｂに示す。Ｂｕｔｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）４Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ試料の場合、ＦｋｐＡは、非常に後期に溶出する（５０ｍＭのリン酸塩にＰＷが続く）。再生画分中には、顕著な量のＦｋｐＡ及びより低い分子量の不純物が存在する。Ｂｕｔｙｌ－Ｓ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ試料の場合、ＦｋｐＡは、いくつかの洗浄濃度にわたって溶出し、ほとんどがＰＷストリップステップ前に溶出する。再生画分は、依然としていくらかのより低い分子量の不純物及び少量のＦｋｐＡを含有する。この実験のＢｕｔｙｌ－Ｓ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗアームの回収データを、表９及び１０に示す。質量平衡は定量的であり、全タンパク質のうちの６％のみが再生画分中に見出される。Ｂｕｔｙｌ－Ｓ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗゲルは、非常に高い回収だけでなく、ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗプールからの残留ＥＣＰの優れたクリアランスも提供する。

表９。分光光度データ：Ｂｕｔｙｌ－Ｓ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ

試料	希釈係数	ＦｋｐＡ（ｍｇ／ｍＬ）	吸光度＜２８０ｎｍ＞	吸光度＜３２０ｎｍ＞
ＰＷブランク	１．０	－１．０５９６Ｅ－４	－１．０５８６Ｅ－４	－４．８６３７Ｅ－５
Ｆ－Ｔ／洗浄	１．０	９．４５２２Ｅ－２	４．９９１９Ｅ－２	－１．１２３４Ｅ－３
０．５Ｍ洗浄	１．０	２．１２７２Ｅ－２	７．１１３５Ｅ－３	－４．３７３６Ｅ－３
０．４Ｍ洗浄	１．０	１．９３４１Ｅ－２	９．２６６９Ｅ－３	－１．１７７３Ｅ－３
０．３Ｍ洗浄	１．０	４．０８６５Ｅ－２	２．０３４７Ｅ－２	－１．７２００Ｅ－３
０．２Ｍ洗浄	１．０	０．１７２７８	９．４４９２Ｅ－２	１．１９０７Ｅ－３
０．１Ｍ洗浄	１．０	０．３１２５８	０．１７０３３	１．５３６４Ｅ－３
０Ｍ洗浄	１．０	０．２７０１３	０．１４８２２	２．３４１８Ｅ－３
ＰＷ溶出	１．０	６．１６３７Ｅ－２	３．２２９８Ｅ－２	－９．８０８５Ｅ－４
２％のＮａＯＨ再生	１．０	７．７３１４Ｅ－２	４．６３３４Ｅ－２	４．５８４３Ｅ－３

ＦｋｐＡ（ｍｇ／ｍＬ）＝（吸光度（２８０ｎｍ）－吸光度（３２０ｎｍ））／０．５４

表１０。Ｂｕｔｙｌ－Ｓ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）回収データ

画分	体積（ｍＬ）	濃度（ｍｇ／ｍＬ）	ｍｇ	回収％
ＳＰミニ２２～５０	２．５	１．５１	３．８	１００％
Ｂｕｔｙｌ－Ｓ　Ｆ－Ｔ／洗浄	８．０	０．０９	０．８	２０％
０．５Ｍ洗浄	３．０	０．０２	０．１	２％
０．４Ｍ洗浄	３．０	０．０２	０．１	２％
０．３Ｍ洗浄	３．０	０．０４	０．１	３％
０．２Ｍ洗浄	３．０	０．１７	０．５	１４％
０．１Ｍ洗浄	３．０	０．３１	０．９	２５％
０Ｍ洗浄	３．０	０．２７	０．８	２１％
ＰＷストリップ	６．０	０．０６	０．４	１０％
２％のＮａＯＨ再生	３．０	０．０８	０．２	６％
質量平衡			３．９	１０２％

【０４３３】

Ｂｕｔｙｌ－Ｓ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗの最適化

この実験の目的は、カラムの、０．３Ｍの硫酸ナトリウムの中間洗浄が、潜在的な減少する硫酸ナトリウム勾配と同等の精製（回収及び純度）を提供するかどうかを評価することであった。

【０４３４】

１ｍＬの重力流カラムを、Ｂｕｔｙｌ－Ｓ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）で充填した。カラムを、５ｍＬの５０ｍＭのリン酸塩（ｐＨ７．０）（Ｂｕｔｙｌ－Ｓ溶出緩衝液）で事前平衡化し、その後、５ｍＬの０．６Ｍの硫酸ナトリウム、５０ｍＭのリン酸塩（ｐＨ７．０）（Ｂｕｔｙｌ－Ｓ平衡化緩衝液）で平衡化した。２．５ｍＬの０．６Ｍの硫酸ナトリウムを、上述のＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）の勾配評価からの画分２２～５０の２．５ｍＬの一定分量のミニプールに添加した。ミニプールを緩徐に混合し、室温で３０分間静置し、その後、カラムに装填した。カラムを、５．０ｍＬの０．３Ｍの硫酸ナトリウム、５０ｎＭのリン酸塩（ｐＨ７．０）で洗浄し、その後、５．０ｍＬの精製水（ＰＷ）で溶出させ、その後、３ｍＬの２％の水酸化ナトリウムを使用して再生させた。

【０４３５】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥによるカラム画分の分析（図８）は、ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗプール中のより高い分子量の不純物が、還元硫酸ナトリウム条件下でＢｕｔｙｌ－Ｓ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）カラムを貫流し、非常に清潔な溶出物プールを残したことを示す。装填レーン内のいくつかのより低い分子量のバンドは、カラムに結合し、再生を介して除去された（先程のゲルにおいて見られる通り、図３）。

【０４３６】

回収データを表１１及び１２に示す。Ｆ－Ｔ／洗浄プールにおける回収は、先の実験の回収値よりも約５％高い。ＰＷ溶出回収は、わずかにより低い。追加のＰＷ溶出は、収率を増加させた可能性がある。再生ステップもまた、再生前のより長い溶出ステップに対する可能な必要性と一貫して、段階溶出よりもわずかに高い。

表１１。Ｂｕｔｙｌ－Ｓ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ回収データ

試料	希釈係数	ＦｋｐＡ（ｍｇ／ｍＬ）	吸光度＜２８０ｎｍ＞	吸光度＜３２０ｎｍ＞
ＰＷブランク	１．０	－１．８６３２Ｅ－４	－２．６５１２Ｅ－４	－１．６４５１Ｅ－４
Ｆ－Ｔ／洗浄	１．０	０．１１８７８	６．３１３９Ｅ－２	－１．００４７Ｅ－３
ＰＷ溶出	１．０	０．４５３２８	０．２４６０２	１．２５１２Ｅ－３
２％のＮａＯＨ再生	１．０	０．１２８９５	７．２４００Ｅ－２	２．７６５２Ｅ－３

ＦｋｐＡ（ｍｇ／ｍＬ）＝（吸光度（２８０ｎｍ）－吸光度（３２０ｎｍ））／０．５４

表１２。Ｂｕｔｙｌ－Ｓ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ回収データ

画分	体積（ｍＬ）	濃度（ｍｇ／ｍＬ）	ｍｇ	回収％
ＳＰミニ２２～５０	２．５	１．５１	３．８	１００％
Ｂｕｔｙｌ－Ｓ Ｆ－Ｔ／洗浄	１０．０	０．１２	１．２	３１％
ＰＷ溶出	５．０	０．４５	２．３	６０％
２％のＮａＯＨ再生	３．０	０．１３	０．４	１０％
質量平衡			３．８	１０２％

【０４３７】
Ｂｕｔｙｌ－Ｓ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＨＩＣ培地は、ＦｋｐＡの非常に良好な回収とともに、ＳＰ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗプールからの ＥＣＰの優れた分離を示す。これらの分析評価からのデータに基づいて、それを拡大し、ＦｋｐＡ精製プロセスにおける第２の回収ステップとして使用する。
【０４３８】
Ｂｕｔｙｌ－Ｓ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗステップの拡大
Ｂｕｔｙｌ－Ｓ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）クロマトグラフィーステップを拡大して、Ｂｕｔｙｌ－Ｓ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）クロマトグラフィーステップに対して回収及び純度を比較した。一連の開発運転を行って、ステップを最適化した。分析ＨＩＣ運転は、ＦｋｐＡがＢｕｔｙｌ－Ｓ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ゲルに比較的密接に結合したことを示した。延長溶出ステップを評価して、ＦｋｐＡ回収の増加が得られ得るかどうかを確認した。
緩衝液及び溶液
調整緩衝液：０．６Ｍの硫酸ナトリウム、５０ｍＭのリン酸塩（ｐＨ７．０）
平衡化緩衝液：０．３Ｍの硫酸ナトリウム、５０ｍＭのリン酸塩（ｐＨ７．０）（Ａ１１）
溶出溶液：精製水（ＰＷ、Ａ１２）
再生溶液：２％のＮａＯＨ
カラム調製

この評価のために、２．６ｃｍ×９．４ｃｍ（５０ｍＬ）のカラムを調製した。カラムを３ＣＶの平衡化緩衝液で平衡化した。

【０４３９】

装填調整

１４０ｍＬの調整緩衝液を、添加全体を通して緩徐に混合しながら、１４０ｍＬのＳＰ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＦＦプールに徐々に添加した。全ての調整緩衝液を添加した後、室温で３０分間混合を続けた。

【０４４０】

クロマトグラフィー

クロマトグラムを図９に示す。少量のブレークスルーＯＤが観察され、これは分析評価に基づいて期待されていた。溶出ピークは、明白なテーリングを有し、約６ＣＶの溶出後に１０ｍＡＵＦＳに到達する。プール後物を別個の画分として収集した。２％（０．５Ｍ）の水酸化ナトリウムを再生溶液として使用して、カラム再生を行った。紫外可視分光光度分析カラム画分を表１３に示す。質量平衡は、分析運転のものよりも高かったが、データは、先の分析運転から生成されたものと同様である。拡大運転は、ＦｋｐＡの純度及び回収に関して同様のカラム性能を示す。第２のカラム運転は、同等のカラムプロファイルを示した。

表１３。Ｂｕｔｙｌ－Ｓ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）回収

画分	体積（ｍＬ）	濃度（ｍｇ／ｍＬ）	ｍｇ	回収％
ＳＰ ＦＦ画分２２～５０	１４０	１．４８	２０７	１００％
Ｆ－Ｔ／洗浄	４５０	０．１２	５３	２６％
プール前	５４	０．０３	１	１％
プール	２３２	０．６０	１４０	６７％
プール後	２３２	０．０３	８	４％
２％のＮａＯＨ再生	１５０	０．１６	２３	１１％
質量平衡			２２５	１０９％

【０４４１】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥ

ＳＤＳ－ＰＡＧＥによるカラム画分の分析（図１０Ａ）は、この精製ステップが分析評価と同等であることを示し、これは、このＨＩＣステップの拡大が、ＳＰ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗプール中に存在する宿主細胞タンパク質不純物の除去を複製することができたことを実証する。より高い分子量の不純物はカラムを貫流し、より低い分子量の不純物は（先のゲルによって証明される通り）カラムに密接に結合した。溶出物プールは非常に清潔であり、非常に少量のＦｋｐＡがプール後物中に観察された。染色溶液中で一晩インキュベートした後、ＳＹＰＲＯ Ｒｕｂｙ試薬（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用して、同じゲルを画像化した。ＳＹＰＲＯ Ｒｕｂｙ画像化は、タンパク質含有試料の分析のより高感度の検出方法である。ＳＹＰＲＯ Ｒｕｂｙ画像化（図１０Ｂ）は、精製されたＦｋｐＡの画分が、依然として、宿主細胞タンパク質不純物及び／またはクリッピングされた形態のＦｋｐＡであり得る、いくつかのより低い分子量のバンドを有することを示す。

【０４４２】

結論
Ｂｕｔｙｌ－Ｓ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）クロマトグラフィーステップの拡大は、異なるＨＩＣ培地の分析評価から選択されたパラメータにより、線形であった。Ｂｕｔｙｌ－Ｓ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）は、それがこの第２の精製ステップについて評価されたＨＩＣ培地のうちで最も弱いリガンドを有するため、ＦｋｐＡの最良の回収を提供する。分子純度は、この単位操作によって大いに増強され、主要な不純物バンドは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析に基づいて、貫流中に存在するか、またはより高度に保持されているかのいずれかである。

【０４４３】
ＨＰＬＣ－ＳＥＣ分析評価
その一次配列に基づいて、ＦｋｐＡは、約２６ｋＤａのモル質量を有する。ＦｋｐＡについての先の公開情報は、分子がより高い分子量で非共有結合性会合を通して泳動することを示唆する。ＦｋｐＡを含有するＢｕｔｙｌ－Ｓ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）プールと並んで、タンパク質参照物を使用して、分析評価を行って、ＦｋｐＡがサイズ排除クロマトグラフィーカラム上のどこで遊走するかを決定した。

【０４４４】
材料及び方法
ＴＳＫｇｅｌ Ｇ３０００ＳＷｘｌ ＨＰＬＣ－ＳＥＣカラム（７．８ｍｍ×３０ｃｍ、Ｔｏｓｏｈ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を、評価に使用した。移動相は、０．２５ＭのＫＣｌ、０．２Ｍのリン酸カリウム（ｐＨ６．２）であった。カラム流量は、０．５ｍＬ／分であった。ＦｋｐＡを、タンパク質標準物、つまり、抗体（約１５０ｋＤａ）、ウシ血清アルブミン（約６６．５ｋＤａ）、及びＮｕｔｒｏｐｉｎ（登録商標）（約２２ｋＤａ）と比較した。

【０４４５】
クロマトグラフィー
ＨＰＬＣ－ＳＥＣ結果を図１１に示す。ＦｋｐＡは、抗体とＢＳＡとの間に保持時間を有し、これは、ＦｋｐＡがその一次配列から予測されるよりもずっと大きな溶液モル質量を有するという、先の参考文献を確認する（表１４）。
表１４。ＦｋｐＡ及び標準物のＨＰＬＣ－ＳＥＣ

	ＭＷ予測値	保持時間（分）
抗体	約１５０ｋＤａ	１３．４２０
		１４．７３３
		１５．５７７
ＢＳＡ	約６６．５ｋＤａ	１７．７８７
Ｎｕｔｒｏｐｉｎ	約２２ｋＤａ	２０．７３０
ＦｋｐＡ	約２６ｋＤａ	１４．４３０
		１６．１００

【０４４６】
Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００サイズ排除クロマトグラフィー
Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）を選択して、ＦｋｐＡから残留するより高い分子量種及びより低い分子量種を分離し、タンパク質を製剤化した。

【０４４７】
運転１：１．６ｃｍ×６０ｃｍのＳｕｐｅｒｄｅｘ２００カラムを使用するパイロット法初期Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００運転を、１２０ｍＬのカラムで行った。最終製剤化バルクの生成のためにＳｕｐｅｒｄｅｘ２００ＳＥＣステップを拡大する前に、カラム画分を純度について特性評価した。

【０４４８】

材料及び方法
１．６ｃｍ×６０ｃｍ（１ＣＶ＝１２０ｍＬ）のＳｕｐｅｒｄｅｘ２００カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を、このパイロット運転に使用した。カラムを１ＣＶの０．１ＭのＮａＯＨで浄化し、その後、３ＣＶのリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）（ｐＨ７．５）（平衡化緩衝液）で平衡化した。
【０４４９】
試料調製
１対のＡｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ１０ｋＤａユニット（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を使用して、３０ｍＬのＢｕｔｙｌ－Ｓ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）プールを濃縮した。Ａｍｉｃｏｎユニットを、残余分体積が６ｍＬ以下（１ＣＶの５％以下）になるまで、２０分間のサイクルを使用して、Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ５８１０Ｒ遠心分離機内、３０００ｒｐｍで遠心分離した。
【０４５０】
クロマトグラフィー
Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００クロマトグラフィーステップのクロマトグラムを、図１２に示す。プロファイルは、ＴＳＫｇｅｌ Ｇ３０００ＳＷｘｌ ＨＰＬＣ－ＳＥＣカラムがより高い分子量種のより良好な解像度を産出したことを除いて、ＴＳＫｇｅｌ Ｇ３０００ＳＷｘｌ ＨＰＬＣ－ＳＥＣカラムを使用するＨＰＬＣ－ＳＥＣプロファイルと実質的には違わないようである。
【０４５１】
ＳＤＳ－ＰＡＧＥ
カラム画分３２～４２を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した。ＳＤＳ試料緩衝液とともに室温（加熱なし）で１時間インキュベートすることによって、試料をＳＤＳ－ＰＡＧＥのために調製した。通常の試料調製に対するこの修正は、試料の加熱がより低い分子量種の存在に関与するかどうかを確認するために行った。
【０４５２】
無染色画像（図１３Ａ）及び同じゲルのＳＹＰＲＯ Ｒｕｂｙ画像化（図１３Ｂ）は、無傷タンパク質と同時遊走するより低い分子量のバンドの存在を示す。未加熱の試料中により低い分子量のバンドが存在するため、８５℃で５分間加熱する従来の試料調製が、より低い分子量のバンドの存在に関与しないということを結論付けることができる。
【０４５３】
ウエスタンブロット分析
ウエスタンブロット分析を行って、材料が、ウサギの免疫化に使用するのに十分に純粋であるか、または追加の精製作業が必要とされるかどうかどうかを決定した。この分析では、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００カラムの画分３７（ピーク画分、図１２）を使用した。
【０４５４】
ゲル及びウエスタンブロット結果を図１４に示す。ウエスタンブロットの抗体は、抗ＥＣＰであった。タンパク質をＰＶＤＦシートに移行し、各ＰＶＤＦシートをヤギ抗ＥＣＰとともにインキュベートする。第２のインキュベーションに、西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートされたウサギ抗ヤギ抗体を続ける。その後、ＰＶＤＦシートを、西洋ワサビペルオキシダーゼとの反応によって発光する増強化学発光基質とともにインキュベートする。分子量マーカーは、ＳｔｒｅｐＴａｃｔｉｎ及び西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート系でも発光する。抗ＥＣＰとともにインキュベートした免疫ブロットは、試料中のＥＣＰを明らかにする。ゲル結果は、先に生成されたＳＹＰＲＯ Ｒｕｂｙ画像化結果を確認する（図１３Ｂ）。ウエスタンブロットは、３７ｋＤａと５０ｋＤａとの間に、Ｓｙｐｒｏ Ｒｕｂｙ画像化では見られない薄いバンドを示す。
【０４５５】
質量分析
タンパク質をトリプシンによって消化させ、ＵＰＬＣ－ＭＳ／ＭＳによって分析して、１）材料中に存在するＦｋｐＡペプチド配列、及び２）試料中に他のタンパク質不純物が存

在しないことを決定した。分析は、０～４０％のアセトニトリルの４５分間のＵＰＬＣ勾配からなり、これを高解像度四重極飛行時間質量分析計に直接スプレーし、この質量分析計は、ＭＳ調査スキャンに続いて、クロマトグラフィー分離中の各連続ＭＳスキャンから上位２０個の最も豊富な前駆体イオンのＭＳ／ＭＳを収集した。ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ生データファイルを、ＵｎｉｐｒｏｔのＥ　ｃｏｌｉ規準及びアイソフォームデータベースに対して検索し、３５６のＦｋｐＡペプチドを特定した（高ＭＳ／ＭＳサンプリング速度のため、多くは同じペプチドの複数の事例であった）。質量分析計の較正に使用した内部標準物に起源を持つ、２つのβ－ガラクトシダーゼペプチドもまた見出され、それ故にＦｋｐＡ試料には含有されていなかった。質量分析法を使用して、ＦｋｐＡを更に特性評価し、ベーターガラクトシダーゼを内部対照として使用した。

【０４５６】

結果を表１５に示す。質量分析法での分析は、ＦｋｐＡ配列の約９１％の網羅を示し、シグナル配列が、期待通り、ＦｋｐＡペプチド網羅における９％の不在を表した。他のタンパク質に由来するいかなる他のペプチドも観察されず、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びウエスタンブロット分析によって観察されるより低い分子量のバンドは、ＦｋｐＡ関連のものであるという結論をもたらした。他の不純物が存在する場合、それらのレベルは質量分析計の検出限度のレベル未満である、かつ／またはそれらの組成物は結果が比較されるデータベースに存在しない。

表１５。質量分析の結果

網羅％	受託番号	名称	種	ペプチド（９５％）
９０．７	ｔｒ｜Ｅ２ＱＦＫ２｜Ｅ２ＱＦＫ２＿ＥＣＯＬＸ	ペプチジループロリルシストランスイソメラーゼＯＳ＝Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ、ＧＮ＝ｆｋｐＡ、ＰＥ＝４、ＳＶ＝１	ＥＣＯＬＸ	３５６
４．１	ｔｒ｜Ｅ２ＱＧＡ４｜Ｅ２ＱＧＡ４＿ＥＣＯＬＸ	Ｂｅｔａ－ｇａｌａｃｔｏｓｉｄａｓｅ　ＯＳ＝Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ、ＧＮ＝ｌａｃＺ、ＰＥ＝３、ＳＶ＝１	ＥＣＯＬＸ	２

【０４５７】

Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００運転２～４

初期パイロット運転後、その後の運転２～４を３２０ｍＬのカラムで行って、最終製剤化バルクを生成した。

【０４５８】

カラム調製

２．６ｃｍ×６０ｃｍのカラム（３２０ｍＬの床体積）を１ＣＶの０．１ＭのＮａＯＨで浄化し、その後、３ＣＶのＰＢＳ（ｐＨ７．５）（平衡化緩衝液）で平衡化した。

【０４５９】

試料調製

一定分量の６０ｍｇ～９５ｍｇを、運転２～４に使用した。運転１に使用したものと同じ

手順を使用して、ＳＥＣのための一定分量を調製した。標的最終体積は、１６．０ｍＬ以下（床体積の５％以下）であった。図１５は、運転２中に得られたクロマトグラムを示す。画分３７～４４をプールし、ＴＳＫｇｅｌ　Ｇ３０００ＳＷｘｌ　ＨＰＬＣ－ＳＥＣカラムを使用して再分析した。図１６は、運転２の画分３７～４４のＴＳＫｇｅｌ　Ｇ３０００ＳＷｘｌ　ＨＰＬＣ－ＳＥＣクロマトグラムを示す。約２％の凝集体を確認することができる。この量の凝集は、凝集体に対して生成された抗体を有するために望ましい。結果は、運転３及び４でも同様であった。

【０４６０】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥ

運転１からのカラム画分３５～４０及び運転２～４からの３７～４４を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した。図１７（それぞれレーン２～５）を参照されたい。運転１からの材料は分解したようであり、その後の実験には使用しなかった。

【０４６１】

限外濾過及び濾過

Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００プールを、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ１０ｋＤａユニットを使用して２．０ｍｇ／ｍＬの標的タンパク質濃度まで濃縮した。運転１の材料の不測かつ未知の分解原因のため、運転２～４からの材料のみを最終バルクに含めた。

【０４６２】

２つのＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ１０ｋＤａユニットを使用した。運転２～４からの１３ｍＬの組み合わせた画分（各運転からの画分３７～４４）を各ユニットに移行させた。試料を前述のように遠心分離した。濾液を流し出し、ＵＦ残余分を、組み合わせた画分からの追加の材料と混合した（ユニット内のより高いタンパク質濃度を最小限に抑えるため）。タンパク質濃度が標的の２．０ｍｇ／ｍＬをわずかに上回るまで、プロセスを繰り返した。濃縮された試料を０．２μのフィルターを通して濾過し、５ｍＬのＵＦ濾液で追跡した。表１６に示されるように、標的タンパク質濃度でのＦｋｐＡの回収は、実質的に定量的であった。

表１６。限外濾過及び濾過ステップからの回収

画分	体積（ｍＬ）	濃度（ｍｇ／ｍＬ）	ｍｇ	回収％
Ｓｕｐｅｒｄｅｘプール	１５４	１．４９	２２８	１００％
ＵＦ濾液	４４	０．００	０	０％
製剤プール	１１０	２．０２	２２３	９８％

【０４６３】

超高純度ＦｋｐＡの凍結融解安定性

凍結融解安定性試験の背後にある目的は、試薬が、活性を損失することも、電気泳動またはＳＥＣプロファイルを変化させることもなく、最大３回の凍結融解に好適であることを確実にすることである。

【０４６４】

材料及び方法

７５μＬの一定分量の超高純度ＦｋｐＡを、この研究に使用した。１つの一定分量を冷室に保持し、残りの３つを－８０℃以下の冷凍庫内に置いた。１時間後、３つの凍結した一定分量を融解し、緩徐に混合した。１つの一定分量（「１回の凍結融解」）を冷室に置き、他の２つを冷凍庫に戻した。残り２つの試料についてプロセスを繰り返し、第２の凍結融解試料を試料に移行させ、第３の凍結融解試料を－８０℃以下の冷凍庫内で一晩保持した。第３の試料を翌日融解した。

【０４６５】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥ
１０μｇの一定分量の凍結融解試料の各々を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した。ゲル結果（図１８）は、４つの試料の各々の間の同等性を示す。

【０４６６】
ＨＰＬＣ－ＳＥＣ
１００μｇの一定分量の凍結融解試料の各々を、ＨＰＬＣ－ＳＥＣによって分析した。サイズ分類結果（図１９Ａ及び１９Ｂならびに表１７）は、４つの試料間の同等性を示す。より高い分子量種及び単量体における非常に小さな差異は、おそらく手動でのピークの統合よるものである。Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００運転２～４からの超高純度ＦｋｐＡバルクは、タンパク質の明らかな変化はなく、３回の凍結融解に好適である。試薬を、ウサギにおいて抗体を産生するための免疫原として使用するのに、ならびにＥＬＩＳＡアッセイの参照物として、及びウサギ抗血清からの抗ＦｋｐＡを精製するための親和性カラムを構築するためのリガンドとしての機能を果たすのに、好適であると見なした。

表１７。ＦｋｐＡの凍結融解アッセイのＨＰＬＣ－ＳＥＣ分析

凍結／融解	ピークＩＤ	分	ｍＡＵ*分	ｍＡＵ	%
0	1	１４．３７７	２．３１９４	３．９７２	２．０６
	2	１６．０７０	１１０．５１０２	２４１．５６５	９７．９４
	合計：		１１２．８２９６	２４５．５３７	１００．００
1	1	１４．３６７	２．４０９７	４．３０３	２．１３
	2	１６．０５３	１１０．５９５２	２３９．３８９	９７．８７
	合計：		１１３．００４９	２４３．６９１	１００．００
2	1	１４．３８０	２．３７３０	４．２５５	２．１０
	2	１６．０６７	１１０．５７９８	２４１．０８７	９７．９０
	合計：		１１２．９５２９	２４５．３４２	１００．００
3	1	１４．３７３	２．４７４７	４．２８６	２．２０
	2	１６．０６７	１１０．２６３３	２３８．６８６	９７．８０
	合計：		１１２．７３８	２４２．９７２	１００．００

【０４６７】
最終産物を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（図１４）、ＨＰＬＣ－ＳＥＣ（表１７）、Ｎ末端配列分析、及びペプチド質量フィンガープリント法（表１５）によって特性評価した。濃度は、ＦｋｐＡの減衰係数を使用して分光光度的に決定される２．０２ｍｇ／ｍＬであり、１０

０μｇ／ｍＬまで希釈した。希釈した溶液を標準ストックＩと表記し、－７０℃以下の温度で保管した。

【０４６８】

実施例３。抗ＦｋｐＡ抗体の生成及び精製

治療用ポリペプチドの調製物中のＦｋｐＡの除去を測定するためのアッセイで使用するために、ポリクローナル抗体を超高純度ＦｋｐＡに対して生成した。以下の実施例は、ポリクローナルＦｋｐＡ抗体を生成するために使用される精製方法を説明する。これらの試薬は、ＦｋｐＡ免疫原とともに、特異的ＦｋｐＡ　ＥＬＩＳＡの開発に必要であった。

【０４６９】

３匹のウサギを、超高純度ＦｋｐＡで免疫化した。４２日目に、個々のウサギから採血し、ＦｋｐＡ抗血清を使用して、抗ＦｋｐＡ抗体を精製した。ウサギＡ、Ｂ、及びＣからの抗血清及び予備免疫血清を、直接結合ＥＬＩＳＡによってアッセイした。超高純度ＦｋｐＡを、炭酸塩緩衝液（ｐＨ９．６）中、４μｇ／ｍＬまで希釈し、Ｃｏｓｔａｒ９６ウェルプレート（カタログ番号９０１８）上に直接コーティングし、２～８℃で１２～７２時間インキュベートした。各ウェルを洗浄し、プレート洗浄機を使用しておよそ４００μＬの洗浄緩衝液（リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）及び０．０５％のＰｏｌｙｓｏｒｂａｔｅ２０）で３回吸引し、完全にブロットした。プレートを廃棄物リザーバー上で反転させても、溶液がウェルから除去されなかった。およそ２００μＬのアッセイ希釈剤を各ウェルに添加し、撹拌しながら周囲温度で１～２時間インキュベートした。洗浄ステップを繰り返した。試料を、アッセイ希釈剤（０．１５ＭのＮａＣｌ、０．１ＭのＮａＰＯ４（ｐＨ７．２）、０．０５％のＰｏｌｙｓｏｒｂａｔｅ２０、０．１％の魚ゼラチン、０．０５％のＰｒｏｃｌｉｎ３００）中、１：５００に希釈し、その後、最大１２回で４倍に段階希釈し、対応するウェルに添加した。プレートを、撹拌しながら室温で２時間インキュベートした。プレートをＥＬＩＳＡ洗浄緩衝液で洗浄し、アッセイ希釈剤中で希釈したヤギ抗ウサギ－ＨＲＰを各ウェルに添加し、撹拌しながら室温で２時間インキュベートした。プレートをＥＬＩＳＡ洗浄緩衝液で洗浄し、ＳｕｒｅＢｌｕｅ　Ｒｅｓｅｒｖｅ（商標）ＴＭＢ　Ｍｉｃｒｏｗｅｌｌ　Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ＆Ｐｅｒｒｙ　Ｌａｂｓ［ＫＰＬ］、カタログ番号５３－００－００）（基質溶液）をプレートに添加、室温でおよそ２０分間色を発現させた。０．６Ｎの硫酸で反応を停止させた。４５０ｎｍの波長でＯＤを読み取り、Ｓｏｆｔｍａｘ　Ｐｒｏデータ整理ソフトウェアを使用してデータを分析した。ウサギＡ、Ｂ、及びＣからの抗血清の、ＦｋｐＡに対する免疫反応は同等（図２０）、それ故に試料をプールした。

【０４７０】

ＦｋｐＡ抗体の精製

プールされた抗血清に、６０％の硫酸アンモニウム沈降（ＡＳＰ）ステップを行った。５２．７ｍＬの硫酸アンモニウム溶液（３．８Ｍの硫酸アンモニウム、５０ｍＭのリン酸塩（ｐＨ７．０））を、添加全体を通して緩徐に撹拌しながら、７３．０ｍＬの抗ＦｋｐＡウサギ抗血清に緩徐に添加した。添加の完了後、溶液を冷室に移行させ、一晩緩徐に混合した。

【０４７１】

その後、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）を使用して、ＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体の相対純度を決定し、タンパク質のモル質量も確認した。２×１０μＬの一定分量のＡＳ懸濁液を、別個のＥｐｐｅｎｄｏｒｆ管に移行させた。９０μＬのＰＢＳ（ｐＨ７．２）を各試料に添加し、緩徐に混合して、懸濁液を溶解した。１００μＬの試料をＥｐｐｅｎｄｏｒｆ管に移行させた。試料を、最高速度で５分間微量遠心分離した。上清を取り除き、別個のＥｐｐｅｎｄｏｒｆ管に移行させた。残りのペレットを、１００μＬのＰＢＳ（ｐＨ７．２）中で再構成した。２×１０μＬの一定分量の上清を、別個のＥｐｐｅｎｄｏｒｆ管に移行させた。９０μＬのＰＢＳ（ｐＨ７．２）を各上清試料に添加し、緩徐に混合して、緩徐に混合した。

【０４７２】

各条件からの１０μＬの試料を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した。電気泳動をジスルフィド結合還元あり及びなしで行い、抗体の共有結合凝集について評価した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥを、Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｃｒｉｔｅｒｉｏｎ（商標）４～２０％のＴＧＸ（Ｔｒｉｓ－Ｇｌｙｃｉｎｅ ｅＸｔｅｎｄｅｄ）Ｓｔａｉｎ－Ｆｒｅｅ（商標）ゲルを使用して行い、Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｃｒｉｔｅｒｉｏｎ Ｓｔａｉｎ Ｆｒｅｅ（商標）画像化装置（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）で画像化した。ゲル結果を図２１に示す。６０％の分画ステップは、矢印によってマークされる上清中の抗体の不在によって証明される通り、ウサギ抗体の全ての抗血清の枯渇に成功した。

【０４７３】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分析の後、残りの硫酸アンモニウム懸濁液を、Ｓｏｒｖａｌｌ ＲＣ６Ｐｌｕｓ遠心分離機内、２～８℃の温度、１１，０００ｒｐｍで３０分間遠心分離した。上清を除去し、ペレットを－８０℃で保管した。

【０４７４】

その後、ペレットをリン酸緩衝液中に溶解した。ＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体の濃度を、ＵＶ分光光度法によって６．６９ｍｇ／ｍＬであると決定した。

【０４７５】

ＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体を、上述の直接結合ＥＬＩＳＡによってアッセイした。超高純度ＦｋｐＡを、炭酸塩緩衝液（ｐＨ９．６）中、４μｇ／ｍＬまで希釈し、Ｃｏｓｔａｒ９６ウェルプレート（カタログ番号９０１８）上に直接コーティングした。試料を、アッセイ希釈剤中、１：５００に希釈し、その後、最大１２回で２倍に段階希釈した。ヤギ抗ウサギ－ＨＲＰを使用して、結合を検出した。ＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体は、１：２５６，０００の希釈で開始する超高純度ＦｋｐＡに対して、線形用量応答を示す（図２２）。これらの結果は、ＥＬＩＳＡサンドイッチアッセイの追求を促した。

【０４７６】

ＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体を有するＥＬＩＳＡサンドイッチアッセイの開発

製造業者の指示に従ってＰｉｅｒｃｅ Ｋｉｔ ＥＺ－Ｌｉｎｋ Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ（カタログ番号３１４８９）を使用して、１ｍｇのＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体をＨＲＰにコンジュゲートした。ＨＲＰコンジュゲートされたＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体を、アッセイ希釈剤中、１／２０に更に希釈し、ＡＳＰ ＨＲＰコンジュゲートストックＩと表記した。ＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体を一定分量に分け、ＡＳＰコーティング源と表記した。その後、ＡＳＰコーティング源を、ＰＢＳ中１ｍｇ／ｍＬまで希釈し、ＡＳＰコーティングストックＩと表記した。

【０４７７】

ＡＳＰコーティングストックＩを、炭酸塩緩衝液（ｐＨ９．６）中、４μｇ／ｍＬまで希釈し、Ｃｏｓｔａｒ９６ウェルプレート（カタログ番号９０１８）上に直接コーティングした。ＦｋｐＡを、０．７８～１００ｎｇ／ｍＬの範囲の様々な濃度に希釈し、各対応するウェルに添加した。ＡＳＰ ＨＲＰコンジュゲートストックＩを、１：６０、１：８０、１：１００、及び１：１１０に希釈し、各対応するウェルに添加した。１００μＬの希釈したＡＳＰコーティングストックＩマイクロタイタープレートの各ウェルにピペットで移し、２～８℃で１２～７２時間インキュベートした。各ウェルを洗浄し、プレート洗浄機を使用しておよそ４００μＬの洗浄緩衝液で３回吸引し、完全にブロットした。プレートを廃棄物リザーバー上で反転させても、溶液がウェルから除去されなかった。およそ２００μＬのアッセイ希釈剤を各ウェルに添加し、撹拌しながら周囲温度で１～２時間インキュベートした。洗浄ステップを繰り返した。１ウェル当たり１００μＬの希釈標準（二連で）、対照（二連で）、及び試料を適切なウェルにピペットで移した。プレートを、撹拌しながら周囲温度で２時間±１０分間インキュベートした。ウェルを上記のように洗浄し、プレートを回転させ、洗浄ステップを繰り返した。ＡＳＰ ＨＲＰ－コンジュゲートストックＩをアッセイ希釈剤で希釈して、１．５～２．０ＯＤの最大ＯＤ値を目標とした最高標準と最低標準との間に有意なＯＤ範囲を得た。１００μＬの希釈ＨＲＰ－コンジュゲートストックＩを各ウェルにピペットで移し、撹拌しながら周囲温度で２時間±１０分

間インキュベートした。ウェルを上記のように洗浄し、プレートを回転させ、洗浄ステップを繰り返した。１ウェル当たり１００μＬの基質溶液をウェルにピペットで移し、暗所、周囲温度で十分な時間インキュベートして、最適標準曲線色発現を可能にした。１００μＬの０．６Ｎの硫酸を、各ウェルにピペットで移した。ＯＤを、２つのフィルター（検出吸光度の場合４５０ｎｍ及び参照吸光度の場合６２０～６３０ｎｍ（参照波長は任意であった））を使用したプレートリーダーを使用して、読み取った。試料濃度を、最低４パラメータのロジスティック曲線フィッティングプログラムを有するデータ処理ソフトウェアを使用して決定した。結果を図２３に示す。標準曲線は、約２５ｎｇ／ｍＬで水平状態となるようである。作業範囲を約０．１５６～２０ｎｇ／ｍＬであると決定し、期待される約１．７の最大ＯＤによって決定される最適ＡＳＰ　ＨＲＰコンジュゲートストックＩ希釈は１：９０であった。

【０４７８】

ＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体を有するＥＬＩＳＡサンドイッチアッセイの使用

ＥＬＩＳＡサンドイッチアッセイを行って、実施例６に記載されるように生成された抗ＩＬ１３／ＩＬ１７二重特異性抗体試料中のＦｋｐＡの量をアッセイした。ＡＳＰ　ＨＲＰコンジュゲートストックＩを１：９０に希釈した。結果は非線形性（表１８）を示し、それ故に追加の抗体精製が好ましくあり得ることを示唆する。

表１８。ＡＳＰ　ＥＬＩＳＡサンドイッチアッセイ

各ステップでのαＩＬ１３及び／またはαＩＬ１７の濃度（ｍｇ／ｍＬ）					
αＩＬ１３	αＩＬ１７	組み立て	Ｃａｐｔｏ（商標）	ＱＳＦＦ	ＰＨＳ Ｆ／Ｔ
１０．２６	９．０１	８．２６	４．８	５．３１	４．３７

各ステップでのＦｋｐＡの濃度（ｎｇ／ｍＬ）						
希釈	αＩＬ１３	αＩＬ１７	組み立て	Ｃａｐｔｏ（商標）	ＱＳＦＦ	ＰＨＳ Ｆ／Ｔ
１０	ＧＴＲ	ＧＴＲ	ＧＴＲ	ＧＴＲ	２８．５０５*	１．４３７
４０	ＧＴＲ	ＧＴＲ	ＧＴＲ	ＧＴＲ	１１．５５４	ＬＴＲ
１６０	ＧＴＲ	ＧＴＲ	ＧＴＲ	ＧＴＲ	ＬＴＲ	ＬＴＲ
６４０	ＧＴＲ	３０．９６２	３０．７２５	８２．８２８*	ＬＴＲ	ＬＴＲ
２５６０	２０．７８３	８．６９４	７．６１６	１５．３１７	ＬＴＲ	ＬＴＲ
１０２４０	４．５５５	２．３０１	１．７４３	３．７００	ＬＴＲ	ＬＴＲ
４０９６０	１．１６３	ＬＴＲ	ＬＴＲ	０．８５７	ＬＴＲ	ＬＴＲ
１６３８４０	ＬＴＲ	ＬＴＲ	ＬＴＲ	ＬＴＲ	ＬＴＲ	ＬＴＲ

αＩＬ１３及び／またはαＩＬ１７のＦｋｐＡ／濃度の濃度（ｎｇ／ｍｇ）						
希釈	αＩＬ１３	αＩＬ１７	組み立て	Ｃａｐｔｏ（商標）	ＱＳＦＦ	ＰＨＳ Ｆ／Ｔ
１０					５３．７*	３．３
４０					８７．０	
１６０					１０９．７	
６４０		２１９９．３	２３８０．６	１１０４３．７*	１２６．１	
２５６０	５１８５．６	２４７０．２	２３６０．４	８１６７．１		
１０２４０	４５４６．１	２６１５．１	２１６０．８	７８９３．３		
４０９６０	４６４２．９			７３１３．１		
１６３８４０						

平均	４７９１．６	２４２８．２	２３００．６	７７９１．８	１０７．６	３．３
標準偏差	３４４．７	２１１．１	１２１．５	４３６．９	１９．６	該当なし
ＣＶ	7	9	5	6	１８	該当なし

＊＝データを計算に含めなかった、Ｎ／Ａ＝該当なし、ＧＴＲ＝範囲超、ＬＴＲ＝範囲未満

【０４７９】

ＦｋｐＡ抗体の親和性精製

ＥＬＩＳＡサンドイッチアッセイの線形性を改善するために、一定分量のＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体を、親和性（ＡＦ）精製及びサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）によって更に精製した。活性化グリセリルＣＰＧに共有結合している超高純度ＦｋｐＡを使用して親和性カラムを構築して、非ＦｋｐＡ抗体から標的抗ＦｋｐＡ抗体を分離した。

【０４８０】

グリセリル制御孔ガラスカラムへのカップリングのための超高純度ＦｋｐＡの調製

２．０２ｍｇ／ｍＬの超高純度ＦｋｐＡの、２０×１ｍＬのバイアルを２～８℃で一晩融解し、含有物をプールした。１２５ｍＬのＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－２５カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して、ＦｋｐＡをカップリング緩衝液（０．１Ｍの重炭酸ナトリウム、０．５Ｍの塩化ナトリウム（ｐＨ８．３））へと緩衝液交換した。カラム１ＣＶの０．１ＭのＮａＯＨで浄化し、その後、３ＣＶのカップリング緩衝液で平衡化した。

【０４８１】

カップリング手順

グリセリル－ＣＰＧ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）を、その高流量特徴、及び溶出相中の低ｐＨ条件に耐えるその能力のために、親和性カラムを構築するための支持体として選択した。支持体のグリセリル部分は、アミノ化学カップリング前にアルデヒドに酸化されるアルコール官能基を有する。全てのカップリングステップを室温で行った。

【０４８２】

乾燥グリセリル－ＣＰＧを、ドラフト内で適切な量の精製水に添加した（１グラムのグリセリル－ＣＰＧは、約３ｍＬの水和ゲルを産生する）。グリセリル－ＣＰＧを水と緩徐に混合して、ゲルを完全に水和させた。水和ゲルを１５～３０分間沈定させた。水和ゲルの場合、１０～１２ｍＬの沈定体積の体積を標的とした。

【０４８３】

（微細物を含有する）液体層を除去し、沈定したゲルに精製水を添加した。ゲルを緩徐に混合し、その後、１５～３０分間沈定させた。液体層を除去し、液体層に微細物が観察されなくなるまで必要に応じてステップを繰り返した。

【０４８４】

グリセリル－ＣＰＧゲル上のヒドロキシル基をアルデヒドに酸化させるのに、メタ過ヨウ素酸ナトリウム（ＮａＩＯ４）を選択した。等体積の新たに調製した１％（ｍ／ｖ）のメタ過ヨウ素酸ナトリウムを、水和グリセリル－ＣＰＧに添加し、その後、好適なサイズの容器に移行させた。容器を軌道回転機に固定し、３０分間緩徐に混合した。酸化ステップの終了時、容器を回転機から取り外し、ゲルを沈定させた。

【０４８５】

液体を除去し、３～４体積のリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）（ｐＨ７．２）を、ゲルに添加した。ゲルを緩徐に懸濁させ、その後、１５分間沈定させた。液体を除去し、ＰＢＳを更に３回繰り返して、残留メタ過ヨウ素酸ナトリウムを除去してから、カップリングされるタンパク質を添加した。最後に、３～４体積の０．１Ｍの重炭酸ナトリウム、０．５ＭのＮａＣｌ（ｐＨ８．３）（カップリング緩衝液）を、沈定したゲルに添加し、緩徐に混合し、１５分間沈定させた。カップリングステップ前に、液体を除去した。

【０４８６】

緩衝液交換したＦｋｐＡ（Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－２５ステップより）を、酸化グリセリル－ＣＰＧに添加した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム（ＮａＢＨ３ＣＮ）を使用して、中間体シッフ塩基を還元し、ＦｋｐＡと支持体との間に安定した共有結合を形成した。ＮａＢＨ３ＣＮを、１ｍＬの沈定グリセリル－ＣＰＧ当たり約１ｍｇのシアノ水素化ホウ素ナトリウムで反応混合物に添加した。反応混合物を、密封容器に移行させ、軌道回転機に固定し、室温で一晩緩徐に混合した。

【０４８７】
回転機からカップリングしたゲルを除去し、１５～３０分間沈定させた。沈定後、２ｍＬの一定分量の上清を除去し、１対の１ｍＬのＥｐｐｅｎｄｏｒｆ管に移行させた。管を、最高速度で２分間微量遠心分離して、いかなる残留固体も除去した。残留タンパク質の上清を測定して、カップリング効率を決定した。酸化グリセリル－ＣＰＧへのＦｋｐＡの結合は定量的であり、タンパク質から上清を枯渇させるはずである。上清中のタンパク質濃度は、いかなる残留ＦｋｐＡ徴候も示さず、これは、カップリング効率が１００％であることを示した（データ示さず）。
【０４８８】
ＦｋｐＡ－ＣＰＧゲルを洗浄して、ＮａＩＯ４の除去について上述のように、残留ＮａＢＨ３ＣＮを除去した。
【０４８９】
等体積の１．０ＭのＴｒｉｓ（ｐＨ８．０）をＦｋｐＡ－ＣＰＧゲルに添加した。ＦｋｐＡのカップリングを使用して、追加のアミン基を導入して、ゲルを親和性支持体として使用する前にいかなる残りの反応性部位も遮断した。
【０４９０】
ＦｋｐＡ－ＣＧＰを再度上述のように洗浄した。
【０４９１】
親和性カラム調製
親和性ゲルを、１．６ｃｍのＸＫカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に充填した。最終寸法は、１．６ｃｍ×６．３ｃｍ（ＣＶ＝１２．６ｍＬ）であった。カラムを、５ＣＶのＰＢＳ、０．０２％のアジ化ナトリウム（ｐＨ７．２）で洗浄し、その後、使用するまで冷室で保管した。
【０４９２】
ＦｋｐＡ－ＣＰＧ親和性クロマトグラフィー
運転１：ＦｋｐＡ－ＣＰＧ親和性ゲルの初期評価
６０％の硫酸アンモニウムペレットのうちの２５％を使用して、親和性カラム性能の初期評価を行った。ペレットを－６０℃以下から融解し、室温まで温めた。１２０ｍＬの３．８Ｍの硫酸アンモニウム、５０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ７．０）をペレットに添加し、ペレットを緩徐に混合して、それを懸濁させた。懸濁液を４つのＳＳ－３４遠心分離管に分け、Ｓｏｒｖａｌｌ　ＲＣ６Ｐｌｕｓ遠心分離機内、１５，０００ｒｐｍで３０分間遠心分離した。上清を処分し、４つの遠心分離管のうちの３つを、後日の精製のために－６０℃以下の冷凍庫内に再び移行させた。
【０４９３】
３０ｍＬの５０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ７．０）を、残りの遠心分離管に添加した。管を実験室回転機に固定し、室温で１時間緩徐に混合して、ペレット中のタンパク質を完全に溶解させた。
【０４９４】
試料を１５，０００ｒｐｍで１５分間遠心分離し、その後、０．２μのフィルターを通して濾過した。濾過した試料を、３０ｍＬのＰＢＳ、０．０２％のアジ化ナトリウム（ｐＨ７．５）（親和性カラムの平衡化緩衝液）で追跡して、親和性カラムに装填される供給ストックを生成した。
【０４９５】
試料をカラムに装填し、２０ｍＬの平衡化緩衝液で追跡した。洗浄後、溶出物プールを、プールの収集全体を通して緩徐に混合しながら、１７ｍＬの１．０ＭのＴｒｉｓ（ｐＨ８．０）を含有するビーカー中に収集した。クロマトグラムを図２４に示す。
【０４９６】
０．２μフィルターを使用してｐＨ調整プールを濾過し、５．０ｍＬの平衡化緩衝液で追跡してから、タンパク質濃度を測定し、プール中に回収した。濃度を、ＵＶ－ＶＩＳ分光光度法によって０．０５８ｍｇ／ｍＬであると決定した。ｐＨ調整プールを２～８℃で保

管した。
【０４９７】
Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００クロマトグラフィー
Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００カラム（ＧＥ）を使用してＳＥＣを行って、凝集体を除去し、ｐＨ調整親和性プールを製剤化した。
【０４９８】
１．６ｃｍ×６０ｃｍ（１ＣＶ＝１２０ｍＬ）のＳｕｐｅｒｄｅｘ２００カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を１ＣＶの０．１ＭのＮａＯＨで浄化し、その後、３ＣＶのＰＢＳ（ｐＨ７．５）（平衡化緩衝液）で平衡化した。
【０４９９】
運転１：ＦｋｐＡ－ＣＰＧ運転１のクロマトグラフィー
ＦｋｐＡ－ＣＰＧ運転１からの８３ｍＬのｐＨ調整プールを、Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ １０ｋＤａユニットを使用して６．０ｍＬ以下（１ＣＶの≦５％）の体積まで濃縮した。１３ｍＬのｐＨ調整プールを各ユニットに移行させた。濃縮機を、Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ遠心分離機内、３，０００ｒｐｍで３０分間スピンさせた。濾液を除去し、ｐＨ調整プールを補充した。ＵＦ残余分の標的体積（ＵＦ残余分体積＝３．８ｍＬ）が達成されるまで、プロセスを繰り返した。
【０５００】
ＵＦ残余分をカラムに装填し、ＰＢＳ（ｐＨ７．５）で追跡した。クロマトグラム（図２５）は、標的単量体種から分離されるいくつかのより高い分子量種を示す。
【０５０１】
より高い分子量種を含有する画分（画分４１～６３）及び主要ピークを含む画分（画分６４～８６）を、ＨＰＬＣ－ＳＥＣによって分析した。アッセイ結果（図２６Ａ及び２６Ｂ）は、主要ピークが、約９６％の単量体種を含有することを示し、これは、サイズ排除クロマトグラフィーステップの使用によって大いに増強された。
【０５０２】
Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００画分をプールし、Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ濃縮ユニット（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用して濃縮した。濃度を、ＵＶ分光光度法によって３．１ｍｇ／ｍＬであると決定した
【０５０３】
製造業者の指示に従ってＰｉｅｒｃｅ Ｋｉｔ ＥＺ－Ｌｉｎｋ Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ（カタログ番号３１４８９）を使用して、１ｍｇの親和性精製抗ＦｋｐＡ抗体を、ＨＲＰにコンジュゲートした。ＨＲＰコンジュゲートされた親和性精製抗ＦｋｐＡ抗体を、アッセイ希釈剤中、１／２０に更に希釈し、ＡＦ ＨＲＰコンジュゲートストックＩと表記した。親和性精製抗ＦｋｐＡ抗体を一定分量に分け、ＡＦコーティング源と表記した。ＡＦコーティング源を、ＰＢＳ中１ｍｇ／ｍＬまで希釈し、ＡＦコーティングストックＩと表記した。
【０５０４】
ＡＦコーティングストックＩを、炭酸塩緩衝液（ｐＨ９．６）中、４μｇ／ｍＬまで希釈し、Ｃｏｓｔａｒ９６ウェルプレート（カタログ番号９０１８）上に直接コーティングした。ＦｋｐＡを、０．７８～１００ｎｇ／ｍＬの範囲の様々な濃度に希釈し、各対応するウェルに添加した。ＡＦ ＨＲＰコンジュゲートストックＩを、１：２０００、１：４０００、１：６０００、及び１：８０００に希釈し、各対応するウェルに添加した。アッセイを上述のように行った。結果を図２７に示す。作業範囲を０．７８～１００ｎｇ／ｍＬであると決定し、最大ＯＤは約１．７であったため、最適ＡＦ ＨＲＰコンジュゲートストックＩ希釈は１：６０００であった。
【０５０５】
ＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体と親和性精製抗ＦｋｐＡ抗体との比較
ＥＬＩＳＡサンドイッチアッセイを行って、ＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体及び親和性精製抗ＦｋｐＡ抗体の能力を比較して、５．３１ｍｇ／ｍＬの抗ＩＬ１３／ＩＬ１７を含有する、実

施例６に記載されるように調製した抗ＩＬ１３／ＩＬ１７二重特異性抗体試料中のＦｋｐＡの量をアッセイした。アッセイパラメータを表１９に示す。ＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体及びＡＦ抗ＦｋｐＡ抗体の結果として生じる標準曲線を、図２８Ａ及び２８Ｂに示す。図２８Ａ、２８Ｂ、ならびに表１９及び２０に示されるように、親和性精製抗体は、０．７８ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬの動的範囲を有し、改善された線形性を有し、より少ないＨＲＰ検出抗体を必要とした。

表１９。ＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体及びＡＦ抗ＦｋｐＡ抗体の比較において使用されるパラメータ

パラメータ	ＡＳＰ－ＦｋｐＡ	ＡＦ－ＦｋｐＡ
コーティング	４ｕｇ／ｍＬ	４ｕｇ／ｍＬ
コンジュゲート希釈	１／９０	１／６０００
ブランクＯＤ	０．０９２	０．０５４
０．１５６または０．７８ｎｇ／ｍＬでのＯＤ	０．１３７	０．０８７
標準曲線範囲	０．１５６～２０ｎｇ／ｍＬ	０．７８～１００ｎｇ／ｍＬ
最大ＯＤ	１．５３７	１．７５３

表２０。ＡＳＰ抗ＦｋｐＡ抗体及びＡＦ抗ＦｋｐＡ抗体の結果

	未加工の結果（ｎｇ／ｍＬ）		希釈補正結果（ｎｇ／ｍＬ）	
希釈	ＡＦ－ＦｋｐＡ	ＡＳ－ＦｋｐＡ	ＡＦ－ＦｋｐＡ	ＡＳ－ＦｋｐＡ
１／２０	４８．０１４	２０．０１６	９６０	４００
１／４０	２２．７９８	１１．３４４	９１２	４５４
１／８０	１１．１８０	６．３５７	８９４	５０９
１／１６０	５．４４４	３．５２８	８７１	５６４
１／３２０	２．５６２	１．８６４	８２０	５９６
１／６４０	１．２３４	０．９３７	７９０	６００
平均			８７５	５２１
標準偏差			６２	８１
ＣＶ			７	１６
ＦｋｐＡ／ａＩＬ１３／ａＩＬ１７（ｎｇ／ｍｇ）			１６５	９８

【０５０６】

残りのＡＳＰ抗体の親和性精製

上述の並行比較に基づいて、親和性クロマトグラフィーに続いてサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、残りのＡＳＰ抗体を精製した。画分３３～４６は、約９８％の単量体を含有する（図２９）。濃度を、ＵＶ分光光度法によって０．３８６ｍｇ／ｍＬであると決定した。Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００運転２の画分３３～４６を組み合わせ、前述のようにＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ１０ｋＤａユニットを使用して濃縮した。濃度を、ＵＶ分光光度法によって１．２ｍｇ／ｍＬであると決定し、試料をＡＦコーティングストックＩＩと表記した。

【０５０７】

ＡＦ抗体の凍結融解安定性

凍結融解安定性試験の背後にある目的は、試薬が、活性を損失することも、電気泳動またはＳＥＣプロファイルを変化させることもなく、最大３回の凍結融解に好適であることを確実にすることである。１００μＬの一定分量のＡＦコーティングストックＩＩを、この実験に使用した。１つの一定分量を冷室に保持し、残りの３つを－６０℃以下の冷凍庫内に置いた。１時間後、３つの凍結した一定分量を融解し、緩徐に混合した。１つの一定分量（「１回の凍結融解」）を冷室に置き、他の２つを冷凍庫に戻した。残り２つの試料についてプロセスを繰り返し、第２の凍結融解試料を試料に移行させ、第３の凍結融解試料を－６０℃以下の冷凍庫内で一晩保持した。第３の試料を翌日融解した。

【０５０８】

１０μｇの一定分量の凍結融解試料の各々を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した。ゲル結果を図３０に示す。凍結融解試料は、ゲルの両側において凍結融解間で同等であるようである。還元された側は、試料の各々において、いくつかの非常に高い分子量のバンドを示す。これらのバンドは、還元ステップに関連するゲルの人為的結果であり得る。

【０５０９】

４つの凍結融解試料を、ＨＰＬＣ－ＳＥＣによって分析した。５０μｇの一定分量を、試料の各々に使用した。アッセイ結果は、図３１Ａ及び３１Ｂならびに表２１にある。プロファイルはかなり同様であるが、凍結融解の増加とともにより高い分子量種の増加に向かうわずかな傾向を示す。これらの試料の機能試験は、より高い分子量種の増加が試薬の使用に対する影響をほとんど有しないことを明らかにした（図３２）。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びＨＰＬＣ－ＳＥＣ分析に基づいて、最大３回の凍結融解では、タンパク質純度及び／または組成物には有意な差異は存在しない。

表２１。ＡＦ精製抗体の凍結融解アッセイのＨＰＬＣ－ＳＥＣ分析

凍結融解数	ピーク数	分	ｍＡＵ*分	ｍＡＵ	％
0	1	１１．０５０	０．３１３４	１．１９９	０．２６
	2	１３．９６３	２．６２４２	２．２７８	２．１８
	3	１６．１６０	１１７．２７６４	１３２．１８１	９７．５６
	合計：		１２０．２１４０	１３５．６５８	１００．００
1	1	１１．０５０	０．３１０２	１．１７８	０．２６
	2	１３．９７３	２．６６８３	２．２９５	２．２２
	3	１６．１６３	１１７．１７８３	１３１．６７０	９７．５２
	合計：		１２０．１５６７	１３５．１４３	１００．００
2	1	１１．０４７	０．３１４０	１．２０８	０．２６
	2	１３．９６０	２．７０４１	２．２８７	２．２６
	3	１６．１６３	１１６．６０６６	１３１．５１３	９７．４８
	合計：		１１９．６２４８	１３５．００８	１００．００
3	1	１１．０５０	０．３５８３	１．２４３	０．３０
	2	１３．９６７	３．０９２８	２．３３８	２．５９
	3	１６．１６３	１１６．０７０７	１３１．４５５	９７．１１
	合計：		１１９．５２１７	１３５．０３６	１００．００

【０５１０】

ＡＦコーティングストックＩＩを一定分量に分け、複数の凍結／融解事象にわたってＡＦ抗ＦｋｐＡ抗体の安定性を評価した。

【０５１１】

ＡＦコーティングストックＩとＩＩとのサンドイッチＥＬＩＳＡ比較

ＡＦコーティングストックＩ及びＩＩを、炭酸塩緩衝液（ｐＨ９．６）中３μｇ／ｍＬに希釈し、Ｃｏｓｔａｒ９６ウェルプレート（カタログ番号９０１８）上に直接コーティングし、２～８℃で一晩インキュベートした。プレートをＥＬＩＳＡ洗浄緩衝液（リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）／０．０５％のＰｏｌｙｓｏｒｂａｔｅ２０）で洗浄し、アッセイ希釈剤（０．１５Ｍの塩化ナトリウム［ＮａＣｌ］／０．１Ｍのリン酸ナトリウム［ＮａＰＯ４］／０．１％の魚ゼラチン／０．０５％のＰｏｌｙｓｏｒｂａｔｅ２０／０．０５％のＰｒｏｃｌｉｎ３００）で、撹拌しながら室温で１～２時間遮断し、その後、再度ＥＬＩＳＡ洗浄緩衝液で洗浄した。標準曲線（１００～１．５６ｎｇ／ｍＬ）及びブランクをプレートに追加し、撹拌しながら室温で２時間インキュベートした。プレートをＥＬＩＳＡ洗浄緩衝液で洗浄し、ＡＦ　ＨＲＰコンジュゲートストックＩを、アッセイ希釈剤

との１：６０００の希釈でプレートに添加し、撹拌しながら室温で２時間インキュベートした。プレートをＥＬＩＳＡ洗浄緩衝液で洗浄し、ＳｕｒｅＢｌｕｅ　Ｒｅｓｅｒｖｅ（商標）ＴＭＢ　Ｍｉｃｒｏｗｅｌｌ　Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ＆Ｐｅｒｒｙ　Ｌａｂｓ［ＫＰＬ］、カタログ番号５３－００－００）をプレートに添加、室温でおよそ２０分間色を発現させた。０．６Ｎの硫酸で反応を停止させた。４５０ｎｍの波長でＯＤを読み取り、Ｓｏｆｔｍａｘ　Ｐｒｏデータ整理ソフトウェアを使用してデータを分析した。ＡＦコーティングストックＩ及びＩＩから生成された標準曲線は、ほぼ重ね合わせることができた。コーティング濃度、検出抗体希釈、及びインキュベーション時間をスクリーニングして、最適化した。３ｕｇ／ｍＬのコーティング濃度及び１／６０００のＡＦ　ＨＲＰコンジュゲート希釈を、正確かつ頑強であると決定した。コーティングインキュベーション時間は、最大３日間頑強であった。

【０５１２】

その後の採血からの抗体の精製及び分析

ウサギＡ、Ｂ、及びＣのその後の採血を、溶解材料及び非溶解材料を別個に精製して、赤血球溶血が生じたかどうかに基づいてプールした。両方のプールを、６０％のＡＳＰに続いて、前述の親和性クロマトグラフィー及びＳＥＣによって精製した。ＳＥＣ－ＨＰＬＣデータに基づいて、溶解プール（ロットＢと表記）と非溶解プール（ロットＣと表記）との間には有意な差異は存在しない。画分３５～３８は、ＡＦコーティングストックＩＩ（ロットＡと表記）材料に最も密接に似ているため、ロットＢ画分３５～３８をともにプールした（表２２）。

表２２。ロットＡとロットＢとのＨＰＬＣ－ＳＥＣ比較

画分	ピーク数	分	ｍＡＵ*分	ｍＡＵ	％
ロットＢ画分３４～３８	１	１１．０８０	１．７２９７	２．４５８	０．６９
	２	１４．７６７	７．０６４１	４．５３８	２．８２
	３	１６．２７７	２４２．０９５１	２４６．１８３	９６．４９
	合計：		２５０．８８８９	２５３．１７８	１００．００

画分	ピーク数	分	ｍＡＵ*分	ｍＡＵ	％
ロットＢ画分３５～３８	１	１１．０８０	１．３９０４	１．８９６	０．５０
	２	１４．８６７	５．２０６８	３．５００	１．８９
	３	１６．２８０	２６９．３８６３	２７５．８１１	９７．６１
	合計：		２７５．９８３６	２８１．２０６	１００．００

画分	ピーク数	分	ｍＡＵ*分	ｍＡＵ	％
ロットＡ	１	１１．０５０	０．３１３４	１．１９９	０．２６
	２	１３．９６３	２．６２４２	２．２７８	２．１８
	３	１６．１６０	１１７．２７６４	１３４．１８１	９７．５６
	合計：		１２０．２１４０	１３５．６５８	１００．００

【０５１３】
ロットＡ、Ｂ、及びＣを、サンドイッチＥＬＩＳＡにおいてコート抗体として比較した。コート抗体を、３μｇ／ｍＬに希釈した。ＡＦ　ＨＲＰコンジュゲートストックＩを、１：６０００の希釈で、検出抗体として使用した。３つの抗体の結果は、同等であった（図３３）。ロットＢの濃度を、ＵＶ分光光度法によって２．１３ｍｇ／ｍＬであると決定した。
【０５１４】
製造業者の指示に従ってＰｉｅｒｃｅ　Ｋｉｔ　ＥＺ－Ｌｉｎｋ　Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ（カタログ番号３１４８９）を使用して、１ｍｇのロットＢ抗体をＨＲＰにコンジュゲートした。ロットＢのＨＲＰコンジュゲート抗体を１／１０に更に希釈し、ロットＢのＨＲＰコンジュゲートストックＩと表記した。ロットＢを一定下位分量に分け、ロットＢコーティングストックＩと表記した。
【０５１５】
アッセイ頑強性
実験計画を行って、アッセイ条件をスクリーニングし、頑強性を実証した。濃度、コンジュゲートされた希釈物、及びＴＭＢ基質インキュベーション時間等のアッセイパラメータは、異なっていた。これらのパラメータのわずかな変動は、アッセイ結果には影響を及ぼさなかった。最適な条件を表２３に示す。
表２３。

Ｙ１５４パラメータ	
標準曲線範囲	１．５６～１００ｎｇ／ｍＬ
ＡＦコーティングストックＩＩ	３ｕｇ／ｍＬ
コンジュゲートストックＩ	１／２０，０００
基質インキュベーション時間	２０分

【０５１６】
実施例４。超高純度ＦｋｐＡの安定性
－７０℃で保管した超高純度ＦｋｐＡの安定性
アッセイ対照としての超高純度ＦｋｐＡの安定性を試験するために、実施例２に記載の標準ストックＩをアッセイ希釈剤中で３（低）、１５（中）、７５（高）ｎｇ／ｍＬに希釈し、一定分量に分け、－７０℃で保管した。凍結前に、標準曲線を使用して、１つの低、中、及び高の一定分量の濃度をＥＬＩＳＡによって測定した。低、中、及び高の超高純度ＦｋｐＡ対照の一定分量の安定性を、一定分量を融解し、ＦｋｐＡの濃度を決定することによって、合計１８日間監視した。－７０℃での保管時、低対照は不安定であった。中対照は同様の不安定性を示したが、－７０℃での保管時、高対照は安定しているようであった。
【０５１７】
－７０℃に対して、２～８℃で保管した超高純度ＦｋｐＡの安定性
半分を－７０℃及び他の半分を２～８℃で合計８日間保管した新たな組の低及び中対照に対して、第２の試験を行った。凍結前に、濃度は測定しなかった。先の実験と同様に、凍結した対照の濃度は、１日目の時点で、標的濃度の計算値から３０％低下し始めた。２～８℃で保管した対照の濃度は、－７０℃で保管した対照よりも緩徐な速度で低下したが、低下は依然として許容範囲外であると見なされた（図３４）。
【０５１８】
様々な量のポリソルベート中で調製した超高純度ＦｋｐＡの安定性
標準ストックＩを、アッセイ対照において使用するためのアッセイ希釈剤中の様々な量のポリソルベート中、３（低）、１５（中）、または７５（高）ｎｇ／ｍＬに希釈した。アッセイ希釈剤は０．０５％のポリソルベートを含有するため、０．１、０．２５、０．５

、及び１％のポリソルベート濃度を試験して、それが－７０℃で凍結された対照の安定性を改善したかどうかを確認した。凍結前（Ｔ＝０）に、ＦｋｐＡの様々な溶液を試験し、上述のように合計１５日間監視した。３ｎｇ／ｍＬに希釈した全ての試料では、０．５％のポリソルベートを含有する試料のみが、１５日間全てにわたって、Ｔ＝０と比較して、濃度の２０％未満の低下を有するようである。他の３ｎｇ／ｍＬ条件では、より大きな可変性が観察された（表２４）。１５ｎｇ／ｍＬの溶液では、どの条件も、標的濃度の３０％未満を超える濃度を有しなかった。０．５％または０．２５％のポリソルベートを含有するものの濃度は、１５日間全てにわたって、標的の２０％以内のままであった（表２４）。０．５％のポリソルベートは、試験した全ての対照うちで最良の回収を産出した。標的濃度及び０日目の両方からの差異パーセント（％Ｄｉｆｆ）は１～１３％であり、％ＣＶは１～１０％である。０．１０％のポリソルベート中で希釈した対照は、２０％未満の％Ｄｉｆｆを有したが、低対照では、２０％が％ＣＶで、より大きな可変性が存在した。全体として、増加した量のポリソルベートは、超高純度ＦｋｐＡの不安定性を阻止するのに適切であるとは見なされなかった。

表２４。異なる濃度のポリソルベートの比較

	０．０５％のポリソルベート			０．１０％のポリソルベート			０．２５％のポリソルベート		
	低	中	高	低	中	高	低	中	高
平均	２．３３４	１２．４８２	６９．３２７	２．６２５	１２．４９９	７０．２７２	２．４０３	１３．２５６	７０．１２６
標準	０．２００	０．７２５	４．４１８	０．５１８	０．５４２	６．００９	０．４４３	０．６５０	４．７２３
％ＣＶ	９％	６％	６％	２０％	４％	９％	１８％	５％	７％
Ｔ＝０（新鮮）からの％Ｄｉｆｆ	－７％	１％	－１％	－８％	－４％	－１０％	－１５％	２％	－８％
標的からの％Ｄｉｆｆ	－２２％	－１７％	－８％	－１２％	－１７％	－６％	－２０％	－１２％	－６％

	０．５％のポリソルベート			１．０％のポリソルベート		
	低	中	高	低	中	高
平均	２．７０９	１２．９９１	７０．３０１	２．３９４	１２．５１８	６７．７８０
標準	０．０８２	０．７３０	５．６６５	０．３４３	０．３９９	８．４１２
％ＣＶ	３％	６％	８％	１４％	３％	１２％
Ｔ＝０（新鮮）からの％Ｄｉｆｆ	－２％	－１％	－１０％	－１１％	－１％	－９％
標的からの％Ｄｉｆｆ	－１０％	－１３％	－６％	－２０％	－１７％	－１０％

【０５１９】

魚ゼラチン、ＡｐｏＭａｂ、及び緩衝液Ｃ中で調製した超高純度ＦｋｐＡの安定性

０．２％の魚ゼラチン、１ｍｇ／ｍＬのＡｐｏＭａｂ（Ａｓｈｋｅｎａｚｉ，Ａ，２００８，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ，７：１００１－１０１２）、または緩衝液Ｃ（２０ｍＭの酢酸ヒスチジン、２４０ｍＭのスクロース、０．０２％のＰｏｌｙｓｏｒｂａｔｅ２０（ｐＨ５．５））中で３（低）、１５（中）、７５（高）ｎｇ／ｍＬに希釈した時の、－７０℃での超高純度ＦｋｐＡの安定性を決定した。（図３５Ａ及び３５Ｂ）。結果は、いくつかの異なる組成物中でのＦｋｐＡの安定性、及び全ての場合で、緩衝液Ｃ中での保管時に、－７０℃で対照が安定したままであることを示

す。一例として、緩衝液Ｃ中の対照回収の頑強性を、このアッセイを１６回繰り返すことによって実証した（表２５）。可変性は、許容範囲内であった。

表２５。ＦｋｐＡの検出のためのＥＬＩＳＡ

	低対照回収（ｎｇ／ｍＬ）	中対照回収（ｎｇ／ｍＬ）	高対照回収（ｎｇ／ｍＬ）
平均	２．８９７	１３．５８４	７４．５３５
標準偏差	０．２２４	０．４４１	３．１３１
ＣＶ	８％	３％	４％
Ｎ	１６	１６	１６

【０５２０】

実施例５。超高純度ＦｋｐＡと市販のＦｋｐＡ試薬との比較

実施例３に記載のサンドイッチＥＬＩＳＡアッセイが、異なるＦｋｐＡ標準物を検出する能力を決定した。様々な標準物は、標準ストックＩ（実施例２に記載）、ＢｉｏＳｏｕｒｃｅ ＦｋｐＡ標準物カタログ番号ＭＢＳ１０３７４０２、及びＢｉｏＳｏｕｒｃｅ ＦｋｐＡ標準物カタログ番号ＭＢＳ１１８２１２０を含んだ。使用した標準物は、１．５６～１００ｎｇ／ｍＬであった。ＢｉｏＳｏｕｒｃｅ ＦｋｐＡ標準物カタログ番号ＭＢＳ１０３７４０２及びＭＢＳ１１８２１２０は、標準ストックＩよりも低いシグナル伝達を有する標準曲線を産生した（図３６）。

【０５２１】

実施例６。抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７ＩｇＧ４二重特異性抗体の生成

Ｅ．ｃｏｌｉ内に、２つの異なる軽鎖を有するヒトＩｇＧ１二重特異性抗体を生成するための技法（Ｙｕ ｅｔ ａｌ．，２０１１，Ｓｃｉ Ｔｒａｎｓｌ Ｍｅｄ３，８４ｒａ４４）。この方法は、ノブ・イン・ホール技法（Ｒｉｄｇｗａｙ ｅｔ ａｌ．，１９９６，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．９，６１７－６２１、Ａｔｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，１９９７，Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ２７０，２６－３５）を利用して、免疫グロブリン重鎖のヘテロ二量体化を促進する。軽鎖が誤対合することなく、２つの異なる軽鎖の使用を可能にするために、各アームを、別個のＥ．ｃｏｌｉ細胞内でヘミマーまたは半抗体として培養した。このアプローチを使用して、抗ＩＬ１７及び抗ＩＬ１３の親抗体をベクターにサブクローニングし、抗ＩＬ１７アームのヒトＩｇＧ４ホールとしての発現、及び抗ＩＬ１３アームのヒトＩｇＧ４ノブとしての発現を可能にすることによって、抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７二重特異性抗体を生成した。ＩｇＧ４ノブ重鎖定常領域の配列を配列番号１５または１６に示し、ＩｇＧ４ホール重鎖定常領域の配列を配列番号２６または２７に示す。

【０５２２】

初期抗体発現では、内因性ＦｋｐＡのみを発現するＥ．ｃｏｌｉ株６４Ｂ４を使用した。初期評価中、我々は、抗ＩＬ－１７半抗体が７よりも高いｐＨで沈降物を形成したことを見出した。半抗体を捕捉し、その後、低ｐＨでタンパク質Ａカラムから溶出させ、溶出物をｐＨ８．５に調整して、酸化還元反応において二重特異性抗体の組み立てを行った。ｐＨ調整後、抗ＩＬ－１７半抗体溶出物のうちの約２０％が沈降して失われた。抗ＩＬ－１３半抗体との対合に利用可能な抗ＩＬ－１７半抗体の減少は、２つの半抗体の比率間に不平衡をもたらし、抗ＩＬ－１３／ＩＬ－１７二重特異性の収率を低減した。その後、外因性ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、及びＤｓｂＣを過剰発現する異なるＥ．ｃｏｌｉ株内で半抗体を産生させた。Ｅ．ｃｏｌｉ株６７Ａ６（遺伝子型：Ｗ３１１０ΔｆｈｕＡ ΔｐｈｏＡ ｉｌｖＧ２０９６（ＩｌｖＧ＋；Ｖａｌｒ）Δｐｒｃ ｓｐｒ４３Ｈ１ ΔｍａｎＡ ｌａｃＩＱ ΔｏｍｐＴ ΔｍｅｎＥ７４２ ｄｅｇＰＳ２１０Ａ）を、抗ＩＬ１３または抗ＩＬ１７半ＡｂのＬＣ及びＨＣ、ならびにシャペロンＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、及びＤｓｂＣをコードするＴＩＲ（翻訳開始領域）２，２単一プラスミドで形質転換した。両方のプラスミ

ドで、ＦｋｐＡの発現はｐｈｏＡプロモーターの制御下にあり、ＤｓｂＡ及びＤｓｂＣの発現は多シストロン性の様式でｔａｃＩＩプロモーターの制御下にあった。両方のＬＣ及びＨＣは、独立したｐｈｏＡプロモーターの制御下にあった。プラスミドを使用して、６７Ａ６を形質転換した。発現されたＦｋｐＡは、その天然シグナル伝達ペプチドを含有する。

【０５２３】

各々が上述の６７Ａ６Ｅ．ｃｏｌｉ細胞の培養物内で成長した、半抗体、抗ＩＬ１３．ノブ及び抗ＩＬ１７．ホール。抗ＩＬ１３．ノブの大規模培養物をｐＨ６．７±０．２に維持し、抗ＩＬ１７．ホールの大規模培養物をｐＨ７．０±０．２に維持した。培養物のＯＤが１５０に到達するまで、培養物を３４℃、２２０ｒｐｍで成長させた。その後、培養物を２５℃、１６０ｒｐｍに転換した。合計発酵は、７２時間であった。

【０５２４】

各半抗体の全ブロスを、微少流体技術によって別個にホモジナイズした。その後、各ホモジネートプールを水で希釈し、ＰＥＩで調整し、室温でインキュベートした。その後、この調整したホモジネートプールを遠心分離して固体を分離し、続いて、一連のフィルターを通して遠心分離物を含有する半抗体を濾過した。

【０５２５】

各半抗体の力価は、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、及びＤｓｂＣの外因性発現を有しないＥ．ｃｏｌｉ株６４Ｂ４によって産生された力価よりも約１０～２０倍高かった（データ示さず）。したがって、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、及びＤｓｂＣの外因性発現を採用して、抗ＩＬ１３／ＩＬ１７抗体を調製した。

【０５２６】

その後、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（商標）樹脂（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して、各半抗体を親和性クロマトグラフィーカラム上に別個に捕捉した。カラム平衡化後、遠心分離物をカラムに装填し、平衡化緩衝液及び第２の洗浄緩衝液で洗浄した。酸性条件（ｐＨ２．８）下、カラムから半抗体を溶出させた。

【０５２７】

抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７抗体の組み立て

親和性精製した抗ＩＬ１３及び抗ＩＬ１７半抗体を１：１の質量比で組み合わせた後、ｐＨ８．５に滴定した。組み立てプロセスから期待される二重特異性抗体の理論最大量に対して還元した、１００倍の過剰モル比のＬ－グルタチオン（ＧＳＨ）を混合物に添加し、温度を室温から３５℃に調整した。２つの半抗体を酸化還元反応においてインビトロで組み立てて、抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７二重特異性抗体を形成した。酸化還元反応を３５℃で１２～２４時間続けた。ｐＨを６．５に調整することによって、組み立て反応を停止させ、プールを水で希釈してから、以下に記載される精製プロセスに供した。

【０５２８】

ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（商標）精製及び組み立て後、二重特異性抗体のいくつかの逐次的精製ステップを行った。組み立てられた抗体をまず、ＣＡＰＴＯ（商標）ＡＤＨＥＲＥ樹脂（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して、結合及び溶出モードで作動した混合モード陰イオン交換クロマトグラフィーステップで精製した。カラム平衡化（５０ｍＭの酢酸塩（ｐＨ６．５））後、調整した組み立てプールをカラムに装填し、平衡化緩衝液で洗浄し、その後、第２の洗浄緩衝液（２００ｍＭの酢酸塩（ｐＨ６．５））で洗浄した。緩衝液のｐＨを低下させる（２５ｍＭの酢酸塩（ｐＨ５．２））ことによって、二重特異性抗体を溶出させた。

【０５２９】

ＣＡＰＴＯ（商標）ＡＤＨＥＲＥクロマトグラフィー後、二重特異性抗体産物の濃度は約８０～８５％から９２％以上へと増加し、ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって測定される高分子量種濃度は約１２～１５％から約４％以下へと減少した。加えて、調製物中のＥＣＰは約２ログだけ低減し、ＤｓｂＡは約１ログだけ減少し、ＦｋｐＡは０．７５ログだけ減少した。

【０５３０】

Ｑ ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（登録商標）Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ樹脂（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して、結合及び溶出モードで作動した陰イオン交換クロマトグラフィーステップをかけて、プールを更に精製した。ｐＨ８．５に調整したＣａｐｔｏ（商標）ａｄｈｅｒｅ溶出物プールを、平衡化したＱ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗカラムに装填し、平衡化緩衝液（５０ｍＭのＴｒｉｓ（ｐＨ８．５））で洗浄した。緩衝液（５０ｍＭのＴｒｉｓ、１００ｍＭの酢酸ナトリウム（ｐＨ８．５））の伝導度を増加させることによって、カラムから二重特異性抗体を溶出させた。

【０５３１】

ＱＳＦＦクロマトグラフィー後、二重特異性抗体産物の濃度は約９２％以上から９４％以上へと増加し、高分子量種濃度は４％以下から約２．５％以下へと減少し、ＳＥＣ－ＨＰＬＣによって測定される超高分子量種の量は検出することができなかった。加えて、調製物中のＤｓｂＣは約４倍だけ減少し、ＦｋｐＡは４～５倍だけ減少した。

【０５３２】

ＱＳＦＦ溶出物プールをｐＨ５．５に調整し、Ｐｈｅｎｙｌ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（高置換）樹脂（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用し、貫流モードで作動した疎水性相互作用クロマトグラフィーカラムで更に精製した。カラムを平衡化し（１７０ｍＭの酢酸塩（ｐＨ５．５））、調整したＱＳＦＦプールをカラムに装填した。抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７二重特異性抗体を貫流させ、その後、カラムを平衡化緩衝液で洗浄した。産物プール収集を開始し、ＯＤ２８０に基づいて終結させた（プールは０．５～１ＯＤの間または最大１０ＣＶのカラム洗浄体積で生じた）。その後、プールを濃縮し、限外濾過／透析濾過（ＵＦ／ＤＦ）を使用して緩衝液交換した。

【０５３３】

第２の運転を行い、結果は同様であった。

【０５３４】

実施例７。抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７抗体の調製物中の不純物の検出

非対合半抗体、ホモ二量体、低分子量種（ＬＭＷＳ）、高分子量種（ＨＭＷＳ）、超高分子量種（ｖＨＭＷＳ）、酸性変異形、塩基性変異形、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、ＤｓｂＣ、ＥＣＰ、浸出タンパク質Ａ、Ｅ．ｃｏｌｉ ＤＮＡ、及び内毒素を含む不純物の存在について、２つのロットの抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７二重特異性抗体を分析した。産物品質を表２６に提示する。

表２６。産物品質

産物品質の特質	アッセイ	産物品質の標的	運転１	運転２
二重特異性（％）	ＨＩＣ－ＨＰＬＣ	９０％以上	９７．２	９７．３
ａＩＬ１７種（％）		５％以下	１．３	１．０
ａＩＬ１３１／２ｍＡｂ（％）		５％以下	１．１	１．２
ａＩＬ１３ホモ二量体（％）		５％以下	０．５	０．５
主要（％）	ＮＲ　ＣＥ－ＳＤＳ	８５％以上	９４．０	９５．５
ＬＭＷ（％）			３．８	３．７
ＬＭＷ（％）	ＳＥＣ－ＨＰＬＣ		定量下限未満	定量下限未満
主要（％）		９５％以上	９８．５	９８．８
ＨＭＷＳ（％）		５％以下	１．５	１．２
ｖＨＭＷＳ（％）		定量下限未満	定量下限未満	定量下限未満
酸性（％）	ｉｃＩＥＦ		２１．０	２１．０
主要（％）			７５．８	７６．４
塩基性（％）			３．２	２．６
ＥＣＰ（ｐｐｍ）	ＥＬＩＳＡ	１００ｐｐｍ未満	１９	２０
Ｅ．ｃｏｌｉシャペロン（ｐｐｍ）	ＥＬＩＳＡまたはＬＣ－Ｍ／ＭＳ	１０ｐｐｍ以下（各々）	ＤｓｂＡ＝０．５ ＤｓｂＣ＝０．７ ＦｋｐＡ＝１１（ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）	ＤｓｂＡ＝０．４ ＤｓｂＣ＝０．２ ＦｋｐＡ＝１０（ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）
浸出タンパク質Ａ（ｐｐｍ）	ＥＬＩＳＡ	５０以下	２ｐｐｍ未満	２ｐｐｍ未満
Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤＮＡ（ｐｐｂ）	ｑＰＣＲ	８．３以下	０．１ｐｐｂ未満	０．１ｐｐｂ未満
内毒素（ＥＵ／ｍＬ）	ＬＡＬ	４以下	０．３	０．２

【０５３５】

精製された抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７二重特異性抗体におけるＦｋｐＡの検出

超高純度ＦｋｐＡに対する抗体ならびに標準及び対照の超高純度ＦｋｐＡを使用するＥＬＩＳＡによって、ＦｋｐＡの濃度を決定した。抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７二重特異性抗体の各産生段階後、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ（液体クロマトグラフィー－タンデム質量分析法）によって、ＦｋｐＡの存在についても試料を分析した。

【０５３６】

ＥＬＩＳＡ及びＬＣ－ＭＳ／ＭＳによる検出ＦｋｐＡが、以下に記載される。結果を表２７に示す。

表２７　抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７試料中のＦｋｐＡ濃度

プロセスステップ	運転１			運転２		
	ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ（ｐｐｍ）	ＥＬＩＳＡ（ｐｐｍ）	タンパク質濃度（ｍｇ／ｍＬ）	ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ（ｐｐｍ）	ＥＬＩＳＡ（ｐｐｍ）	タンパク質濃度（ｍｇ／ｍＬ）
αＩＬ１３遠心分離物	試験せず	１４４９４１９	１．７１	試験せず	１２０２３４４	１．９０
αＩＬ１７遠心分離物	試験せず	２５８８２７８	０．９６	試験せず	２４８３８７６	０．９７
αＩＬ１３ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（商標）	３３８０	２８５９	１６．７	３８４０	２６７７	１４．９
αＩＬ１７ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（商標）	２３３０	１９９０	１９．６	２５１０	１８７０	１９．３
組み立て	３０７０	２４４７	１３．６	３２６０	２２９４	１３．０
Ｃａｐｔｏ（商標）ａｄｈｅｒｅ	８２０	４４７	５．１	７４４	５９３	７．３
ＱＳＦＦ	２４３	１１６	９．９	１６０	１１７	９．６
フェニルＨＳ（高置換）	１３	６	６．２	１０	７	６．０
ＵＦ／ＤＦ	１１	６	１９１．７	１１	６	１７８．７

【０５３７】

ＥＬＩＳＡによるＦｋｐＡの検出

超高純度ＦｋｐＡに対して指向されたポリクローナル血清を、炭酸塩緩衝液（ｐＨ９．６）中３μｇ／ｍＬに希釈し、Ｃｏｓｔａｒ９６ウェルプレート（カタログ番号９０１８）上に直接コーティングし、２～８℃で一晩インキュベートした。プレートをＥＬＩＳＡ洗浄緩衝液（リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）／０．０５％のＰｏｌｙｓｏｒｂａｔｅ２０）で洗浄し、アッセイ希釈剤（０．１５Ｍの塩化ナトリウム／０．１Ｍのリン酸ナトリウム／０．１％の魚ゼラチン／０．０５％のＰｏｌｙｓｏｒｂａｔｅ２０／０．０５％のＰ

ｒｏｃｌｉｎ３００）で、撹拌しながら室温で１～２時間遮断し、その後、再度ＥＬＩＳＡ洗浄緩衝液で洗浄した。超高純度ＦｋｐＡの標準曲線（１００～１．５６ｎｇ／ｍＬ）及びブランクをプレートに追加し、撹拌しながら室温で２時間インキュベートした。プレートをＥＬＩＳＡ洗浄緩衝液で洗浄し、親和性精製抗ＦｋｐＡ ＨＲＰコンジュゲートストックを、アッセイ希釈剤との１：６０００の希釈でプレートに添加し、撹拌しながら室温で２時間インキュベートした。プレートをＥＬＩＳＡ洗浄緩衝液で洗浄し、ＳｕｒｅＢｌｕｅ Ｒｅｓｅｒｖｅ（商標）ＴＭＢ Ｍｉｃｒｏｗｅｌｌ Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ＆Ｐｅｒｒｙ Ｌａｂｓ、カタログ番号５３－００－００）をプレートに添加、室温でおよそ２０分間色を発現させた。０．６Ｎの硫酸で反応を停止させた。４５０ｎｍの波長でＯＤを読み取り、Ｓｏｆｔｍａｘ Ｐｒｏデータ整理ソフトウェアを使用してデータを分析した。

【０５３８】

ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによるＦｋｐＡの検出

０．５ｍｇのＡｐｏｍａｂ中、１、５、１０、２５、及び５０ｐｐｍのＦｋｐＡのＦｋｐＡ標準物。０．５ｍｇの各抗体試料及び標準物を、５ｍｇ／ｍＬの最終濃度になるまで精製水で希釈した。４００μＬの変性緩衝液（７．２Ｍの塩酸グアニジン、０．３Ｍの酢酸ナトリウム（ｐＨ５．０））及び１０μＬの０．５ＭのＢｏｎｄ－Ｂｒｅａｋｅｒ Ｔｒｉｓ（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）、中性ｐＨ（Ｐｉｅｒｃｅ）を、１００μＬの希釈した試料に添加し、試料を３７℃で１５分間インキュベートした。

【０５３９】

ＮＡＰ－５脱塩カラムを、約１０ｍＬの脱塩緩衝液（１ｍＭの酢酸ナトリウム、０．５ｍＭのＴＣＥＰ（ｐＨ５．０））で平衡化した。試料を装填し、８００μＬの脱塩緩衝液で溶出させた。１００μＬの０．５ＭのＭＯＰＳ（３－（Ｎ－モルホリノ）プロパンスルホン酸、４－モルホリンプロパン－スルホン酸）を、各試料に添加した。

【０５４０】

２０μＬの０．５ｍｇ／ｍＬのトリプシンを各試料に添加し、試料を３７℃で６０分間インキュベートした。３０μＬの１０％のトリフロウロ（ｔｒｉｆｌｏｕｒｏ）酢酸（ＴＦＡ）を添加することによって、トリプシンを不活性化した。

【０５４１】

１００μＬの消化された各試料を、多重反応監視（ＭＲＭ）によってＬＣ－ＭＳ／ＭＳ分析のために注入した。２．１ｍｍ×１５０ｍｍ、１．７μｍのＷａｔｅｒｓ ＣＳＨ Ｃ１８ＵＰＬＣカラムを有するＷａｔｅｒｓ Ａｃｑｕｉｔｙ Ｈ－Ｃｌａｓｓ Ｂｉｏ ＵＰＬＣで、ＬＣを行った。カラム温度は６０℃であり、流量は０．３ｍＬ／分であり、緩衝液Ａ（０．１％のギ酸を有する水）及び緩衝液Ｂ（０．１％のギ酸を有するアセトニトリル）を０～４０％のＢの勾配として４５分間使用した。

【０５４２】

Ｓｃｉｅｘ６５００Ｑｔｒａｐ質量分析計でＭＳ／ＭＳを行った。ＭＲＭは、ＦｋｐＡペプチドＳＡＹＡＬＧＡＳＬＧＲ（配列番号４５）ペプチドの＋２前駆体イオンの、ｙ６断片イオンへの推移を監視する。衝突エネルギーは２８．１Ｖであり、脱クラスター化電位＝７０Ｖであり、滞留時間は１００ミリ秒であった。前駆体のＱ１質量＝５３３．３、ｙ６断片イオンのＱ３質量＝５６０．３。ＦｋｐＡ標準曲線を使用して、抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７試料中のＦｋｐＡ濃度を決定した。

【０５４３】

実施例８。抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７二重特異性抗体の５－カラム精製

抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７抗体におけるＦｋｐＡの濃度を更に低減するために、上述の４カラム手順に追加の精製ステップを追加した。ＰＯＲＯＳ（登録商標）５０ＨＳ陽イオン交換クロマトグラフィーを評価した。ｐＨ５．０に調整したＰｈｅｎｙｌ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（高置換）溶出物プールの試料を、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（商標））陽イオン交換カラムに適用し、結合及び溶出モードで精製した。線形塩勾配（２２ＣＶにわたって、０～

５００ｍＭの酢酸塩（ｐＨ５．８））を使用して、二重特異性抗体を溶出させた。その後、不純物の除去について試料をアッセイした。結果を表２８に提示する。

表２８。予備ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０の第５のクロマトグラフィーステップの結果

装填材料	プール	装填密度（ｇ／Ｌ）	回収（％）	ＥＬＩＳＡ				ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ
				ＦｋｐＡ（ｐｐｍ）	ＥＣＰ（ｐｐｍ）	ＤｓｂＡ（ｐｐｍ）	ＤｓｂＣ（ｐｐｍ）	ＦｋｐＡ（ｐｐｍ）
運転１	装填	２０	７５	７	２４	定量下限未満	定量下限未満	１３
	ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０			１	９	ｎ．ｔ．	ｎ．ｔ．	１
運転２	装填	２０	７９	６	２２	定量下限未満	定量下限未満	１０
	ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０			２	１５	ｎ．ｔ．	ｎ．ｔ．	３

装填材料	プール	プール体積（ＣＶ）	ＳＥＣ		ＲＰＬＣ	ＨＩＣ－ＨＰＬＣ	ＮＲＣＥ－ＳＤＳ	ｉｃＩＥＦ		
			ＨＭＷＳ（％）	主要ピーク（％）	ＢｓＡｂ（％）	ＢｓＡｂ（％）	純度（％）	酸性（％）	主要（％）	塩基性（％）
運転１	装填	２．５	１．６	９６．６	９５．８	９７．０	９５．０	２１．４	７４．９	３．８
	ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０		０．４	９８．６	９８．０	９８．４	９７．６	２０．５	７７．１	２．４
運転２	装填	２．５	０．８	９８．２	９６．７	９７．６	９５．５	２１．３	７６．０	２．７
	ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０		０．７	９８．１	９７．１	ｎ．ｔ．	ｎ．ｔ．	ｎ．ｔ．	ｎ．ｔ．	ｎ．ｔ．

ｎ．ｔ．：試験せず
ＢｓＡｂ＝二重特異性抗体

【０５４４】
これらの結果に基づいて、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０カラムを抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７の精製スキームに組み込んだ。半抗体を、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（商標）カラムのタンパク質Ａ親和性クロマトグラフィーによって精製し、実施例６に記載されるように組み立てた。組み立てられた抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７抗体を、実施例６に記載のＣＡＰＴＯ（商標）ＡＤＨＥＲＥ、Ｑ　ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ、及びＰｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（高置換）クロマトグラフィーステップによって更に精製した。

【０５４５】
ＵＦ／ＤＦステップの前に、Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６ＦａｓｔＦｌｏｗカラムからの抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７二重特異性抗体プールを、結合及び溶出モードで作動したＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０カラムで精製した。カラムを平衡化（５０ｍＭの酢酸塩（ｐＨ５．５））し、希釈されたＰｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（高置換）貫流物プールをカラムに装填した。カラムを平衡化緩衝液で洗浄し、その後、第２の洗浄緩衝液（５０ｍＭの酢酸塩（ｐＨ５．８））で

洗浄した。２２ＣＶにわたって、１０～１００％のＢ（Ａ：水、Ｂ：５００ｍＭの酢酸塩（ｐＨ５．８））の線形塩勾配を使用して、二重特異性抗体をカラムから溶出させた。溶出物収集を開始し、ＯＤ２８０に基づいて終結させた（プールは０．５～１ＯＤの間で生じた）。

【０５４６】

その後、限外濾過／透析濾過（ＵＦ／ＤＦ）を使用して、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０プールの濃縮及び緩衝液交換を行った。

【０５４７】

αＩＬ１３及びαＩＬ１７の４つの異なる発酵で、プロセスを繰り返した。

【０５４８】

最終産物の試料及び精製プロセスの異なるステップ後の試料を、産物特異的不純物について分析した。試料中の高分子量種（ＨＭＷＳ）の分析結果を表２９に提示する。簡潔には、組み立てられた二重特異性抗体の出発材料は、約９１～９４％の産物及び約６．０～７．５％のＨＭＷＳを含有した。Ｃａｐｔｏ（商標）ａｄｈｅｒｅ混合モードクロマトグラフィー後、試料は約９５～９８％の産物及び約２．２％のＨＭＷＳを含有し、これは試料中のＨＭＷＳ不純物の量の低減を示した。陰イオン交換、ＨＩＣ、及び陽イオン交換後、試料は、９８～９９．６％の産物及び０．２～１．５％のＨＭＷＳを含有した。

表２９。分析ＳＥＣ－ＨＰＬＣ結果

プロセスステップ	運転１		運転２		運転３		運転４	
	主要ピーク（％）	ＨＭＷＳ（％）	主要ピーク（％）	ＨＭＷＳ（％）	主要ピーク（％）	ＨＭＷＳ（％）	主要ピーク（％）	ＨＭＷＳ（％）
組み立て	９１．８	７．５	９３．２	６．１	９３．６	５．８	９３．３	３．４
Ｃａｐｔｏ（商標）ａｄｈｅｒｅ	９７．６	２．２	９６．１	２．２	９５．４	２．１	９５．２	２．３
ＱＳＦＦ	９８．７	１．１	９７．２	１．４	９６．６	１．５	９６．４	１．９
フェニルＨＳ	９９．３	０．５	９９．２	０．７	９７．７	０．８	９７．３	１．７
ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０	９９．６	０．２	９９．６	０．３	９８．４	０．３	９８．０	１．５

【０５４９】

超高純度ＦｋｐＡに対する抗体を使用する、実施例４に提示したＥＬＩＳＡを使用して、ＦｋｐＡの存在について５－カラムプロセスプールの試料を分析した。表３０及び３１に示されるように、５－カラムプロセスは、二重特異性抗体製剤からＦｋｐＡを除去するのに有効であった。

【０５５０】
したがって、本明細書に記載の精製プロセスは、外因性ＦｋｐＡを過剰発現するＥ．ｃｏｌｉ細胞によって産生された半抗体から組み立てられた例示的な二重特異性抗体、すなわち、抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７二重特異性抗体の試料において、ＦｋｐＡレベルを、ＥＬＩＳＡアッセイによって分析される６ｐｐｍ以下まで、実質的に除去または低減した。比較として、内因性ＦｋｐＡのみを発現するＥ．ｃｏｌｉ細胞（外因性ＦｋｐＡまたは他のシャペロンタンパク質を発現するプラスミドを持たない株６４Ｂ４等）によって産生され、ＰｒｏＰａｃ（商標）ＨＩＣ－１０カラムによって精製された抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７二重特異性抗体の試料において、ＦｋｐＡのレベルは、同じＥＬＩＳＡアッセイによって分析される７ｐｐｍのままである（データ示さず）。

表３０。ＥＬＩＳＡによって決定される抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７試料中のＦｋｐＡ濃度

プロセスステップ	運転１	運転２	運転３	運転４
αＩＬ１３遠心分離物	１２４８２５５	５３２３９３	１７８２２５０	１６２１１１５
αＩＬ１７遠心分離物	１９２３１８３	７８６９１０	２５１１４０９	２３８１０３９
αＩＬ１３ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（商標）	２１３８	２０６４	２４１１	２２１４
αＩＬ１７ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（商標）	１４２５	１６０８	２００３	１７８０
組み立て	２１７３	２０７３	２３７６	２１３１
Ｃａｐｔｏ（商標）Ａｄｈｅｒｅ	２７７	２８３	４０４	３５４
ＱＳＦＦ	１０９	１００	１６６	１０９
フェニルＨＳ	２	３	６	４
ＰＯＲＯＳ（登録商標）５０ＨＳ	０．２	０．４	０．７	０．５
ＵＦ／ＤＦ	＜０．３	０．６	０．９	０．５

表３１　抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７試料中のタンパク質濃度（ｍｇ／ｍＬ）

プロセスステップ	運転１	運転２	運転３	運転４
αＩＬ１３遠心分離物	１．２６９２	１．２２００	１．２１２４	１．３０１３
αＩＬ１７遠心分離物	０．８３９４	０．８４８５	０．８１４３	０．８０９９
αＩＬ１３ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（商標）	１３．８３	１３．７８	１４．０４	１３．４９
αＩＬ１７ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（商標）	１８．３３	１６．８８	１７．１３	１６．６３
組み立て	１２．３０	１０．５２	１０．８９	１１．７８
Ｃａｐｔｏ（商標）ａｄｈｅｒｅ	５．７７	８．４４	６．２７	６．２９
ＱＳＦＦ	５．８６	１１．２５	１１．６４	１１．９７
フェニルＨＳ	２．７８	５．６４	５．８６	６．０１
ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０	４．３６	４．６４	５．６４	５．６８
ＵＦ／ＤＦ	１５９．０５	１７６．３８	１７４．７３	１７９．７０

【０５５１】
実施例９。ＦｋｐＡを外因的に発現するＥ．ｃｏｌｉ内で産生されたポリペプチドを精製するための混合モード陰イオン交換クロマトグラフィーの評価
ハイスループットスクリーニングは、従来の陰イオン交換クロマトグラフィー（例えば、ＱＳＦＦクロマトグラフィー）と比較して、混合モード陰イオン－交換クロマトグラフィーでの産物関連不純物の解像度の増強を示した（図３７）。抗ＩＬ１７単量体は、ＱＳＦＦクロマトグラフィーによってほとんどまたは全く分離されなかったが、混合モードクロマトグラフィーでは、抗ＩＬ１３単量体種及び抗ＩＬ１７二量体種の分離の改善が観察された。
【０５５２】
二重特異性抗体の精製における混合モードクロマトグラフィーの使用を評価した。評価の一群において、ＩＬ１３またはＩＬ１７に結合する半抗体を細菌培養物内で別個に調製した。その後、ＩＬ１３またはＩＬ１７に結合する半抗体を、タンパク質Ａクロマトグラフィー（ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（商標）クロマトグラフィー）を使用する親和性クロマトグラフィーに供した。その後、部分的に精製された抗体を組み立てて、上述のＩＬ１３及びＩＬ１７に結合する二重特異性抗体を形成した。組み立てられた二重特異性抗体を、ＱＳＦＦ陰イオン交換クロマトグラフィー、その後、Ｃａｐｔｏ（商標）Ａｄｈｅｒｅ混合モード陰イオン交換クロマトグラフィーに供する（トレーン１）か、またはＣａｐｔｏ（商標）Ａｄｈｅｒｅ混合モード陰イオン交換クロマトグラフィー、その後、ＱＳＦＦ陰イオン交換クロマトグラフィーに供した（トレーン２）。結果を表３２に提示する。

表３２。産物品質

ステップ	Ａ２８０収率（％）		ＢｓＡｂ収率（％）		ＳＥＣ－合計ＨＭＷＳ（％）		ＲＰＬＣ－ＢｓＡｂ純度（％）	
	トレーン１	トレーン２	トレーン１	トレーン２	トレーン１	トレーン２	トレーン１	トレーン２
αＩＬ１３ＭＳＳ	９０		３．６		－－		－－	
αＩＬ１７ＭＳＳ	８０		９．１				－－	
組み立て	１００		８６		７．８		８５．６	
カラム２	７１	７２	７６	８０	１．４	１．６	９２．８	９４．６
カラム３	７７	９７	８０	９８	０．６	０．７	９６．７	９６．２
全体	３９	５０	５３	６７				
ステップ	ＣＥ－ＳＤＳＢｓＡｂ純度（％）		ｉＣＩＥＦ－酸性（％）		ｉＣＩＥＦ－主要（％）		ｉＣＩＥＦ－塩基性（％）	
	トレーン１	トレーン２	トレーン１	トレーン２	トレーン１	トレーン２	トレーン１	トレーン２
αＩＬ１３ＭＳＳ	－－		－－		－－		－－	
αＩＬ１７ＭＳＳ	－－		－－		－－		－－	
組み立て	８４．２		３６．６		６０．５		２．９	
カラム２	９２．０	９４．２	３８．１	２８．９	５８．３	６７．３	３．６	３．８
カラム３	９６．３	９５．９	２８．５	３１．３	６８．５	６５．２	３．１	３．５

【０５５３】
一般に、組み立てられた二重特異性抗体を、陰イオン交換クロマトグラフィー前に混合モード陰イオンクロマトグラフィーに供すると、産物変異形除去の改善がもたらされた。
【０５５４】
プロセス関連不純物のクリアランスを表３３に提示する。
表３３。プロセス関連不純物

ステップ	ＥＣＰ（％）		ＤｓｂＡ（ｐｐｍ）		ＤｓｂＣ（ｐｐｍ）	
	トレーン１	トレーン２	トレーン１	トレーン２	トレーン１	トレーン２
αＩＬ１３ＭＳＳ	１４５１		３９		１４４	
αＩＬ１７ＭＳＳ	３０６０		６４		３５０	
組み立て	９７２		３８		１５６	
カラム２	２３９	５６	４９	３	１４９	３９
カラム３	８７	８	２	２	３７	２６

【０５５５】
トレーン２を使用して精製される材料中のより少ない量の不純物によって示されるように、混合モードが陰イオン交換クロマトグラフィーに先行するとき、改善された不純物クリアランスが観察された。
【０５５６】
結合及び溶出ＱＳＦＦ陰イオン交換条件は、以下の通りであった。カラムを５０ｍＭのＴｒｉｓ（ｐＨ８．５）で平衡化した。ｐＨ８．５かつ１．８ｍＳ／ｃｍ以下に調整した、組み立てプール（トレーン１）またはＣａｐｔｏ（商標）Ａｄｈｅｒｅ溶出物プール（トレーン２）を、１Ｌの装填樹脂当たり２０ｇ以下のタンパク質の装填密度になるまで、カラムに装填し、平衡化緩衝液で洗浄し、その後、第２の洗浄緩衝液（５ｍＭの酢酸ナトリウムを有する５０ｍＭのＴｒｉｓ（ｐＨ８．５））で洗浄した。緩衝液（１３９ｍＭの酢酸ナトリウムを有する５０ｍＭのＴｒｉｓ（ｐＨ８．５））の伝導度を増加させることによって、二重特異性抗体を溶出させた。プールを開始し、２８０ｎｍでの吸光度に基づいて終結させた。
【０５５７】
結合及び溶出Ｃａｐｔｏ（商標）Ａｄｈｅｒｅ混合モード陰イオン交換条件は、以下の通りであった。カラムを５０ｍＭの酢酸塩（ｐＨ６．５）で平衡化した。ｐＨ６．５かつ７．０ｍＳ／ｃｍ以下に調整したＱＳＦＦ溶出物プール（トレーン１）または組み立てプール（トレーン２）を、１Ｌの装填樹脂当たり２４ｇ以下のタンパク質の装填密度になるまで、カラムに装填し、平衡化緩衝液で洗浄し、その後、第２の洗浄緩衝液（２００ｍＭの酢酸塩（ｐＨ６．５））で洗浄した。緩衝液のｐＨを低下させる（２５ｍＭの酢酸塩（ｐＨ５．２））ことによって、二重特異性抗体を溶出させた。プールを開始し、２８０ｎｍでの吸光度に基づいて終結させた。
【０５５８】
実施例１０。ＦｋｐＡ低減についてのＨＩＣ樹脂のスクリーニング
二重特異性抗体産物等のポリペプチド産物中のＦｋｐＡの低減について、いくつかのＨＩＣ樹脂をスクリーニングした。樹脂としては、Ｂａｋｅｒｂｏｎｄ（商標）ＷＰ　Ｈｉ－Ｐｒｏｐｙｌ、Ｃａｐｔｏ（商標）Ｏｃｔｙｌ、Ｃａｐｔｏ（商標）Ｂｕｔｙｌ、Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ（登録商標）Ｈｅｘｙｌ－６５０Ｃ、Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ（登録商標）ＰＰＧ－６００Ｍ、Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ（登録商標）Ｐｈｅｎｙｌ－６５０Ｍ、Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ（登録商標）Ｂｕｔｙｌ－６５０Ｍ、及びＴｏｙｏｐｅａｒｌ（登録商標）Ｅｔｈｅｒ－６５０Ｍが挙げられる。Ｈｅｘｙｌ６５０Ｃは、貫流モードで最低のＦｋｐＡレベルを産生し、Ｃａｐｔｏ（登録商標）Ｂｕｔｙｌが続いた（図３８及び３９）。ロボット工学ハイスループットスクリーニングを行って、様々な塩の種類ならびに濃度及びｐＨ条件下、これらの樹脂に対する産物及びＦｋｐＡのバッチ結合を評価した。３つの異なるコスモトロピック塩を検査して、選択性に対する塩の種類の影響を決定した。試験した塩及

び濃度範囲は、以下の通りであった。１００～８００ｍＭの酢酸ナトリウム、１００～４００ｍＭの硫酸ナトリウム、５００～２０００ｍＭの塩化ナトリウム。加えて、５．０～７．０のｐＨ範囲を評価した。９６ウェルの底膜プレートを、各ウェルおよそ５０μＬの樹脂で充填し、各実験にとって適切な結合条件（塩の種類、塩濃度、ｐＨ）で平衡化した。対応する結合条件に調整した、ＦｋｐＡを含有する部分的に精製された産物プール（すなわち、装填出発材料／供給ストック）を各ウェルに適用して、１μＬの樹脂当たり５０μｇの産物の装填密度を標的とした。混合及びインキュベーションを行って、平衡を達成した後、上清を収集し、相対的産物及びＦｋｐＡ含有量について分析して、装填出発材料／供給ストックに対する、得られた産物の濃縮を評価した。Ｈｅｘｙｌ６５０Ｃは、貫流モードで最低のＦｋｐＡレベルを産生し、Ｃａｐｔｏ（商標）Ｂｕｔｙｌが続いた。

【０５５９】

実施例１１。プロセスバージョン

いくつかのプロセスバージョンを評価した。プロセスの第１の例において、Ｅ．ｃｏｌｉ内で半抗体を産生した。図４０Ａを参照されたい。各半抗体のＥ．ｃｏｌｉ全細胞ブロスを、微少流体技術によってホモジナイズした。各ホモジネートプールを水で希釈し、ＰＥＩで調整し、室温でインキュベートした。その後、この調整したホモジネートプールを遠心分離して固体を分離し、続いて、一連のフィルターを通して遠心分離物を含有する半抗体を濾過した。その後、半抗体を、タンパク質Ａクロマトグラフィーカラム（ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（商標））を使用する親和性精製に供した。その後、上述の親和性精製された半抗体を組み合わせることによって、二重特異性抗体を組み立てた。この第１のプロセス（プロセス１）について、組み立てられた二重特異性抗体を、結合及び溶出モードで混合モード陰イオン交換クロマトグラフィー（Ｃａｐｔｏ（商標）Ａｄｈｅｒｅ）に供し、その後、結合及び溶出モードで陰イオン交換クロマトグラフィー（Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ）に供した。その後、回収された画分を、貫流モードでＨＩＣ（Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ、高置換）に供した。最後に、二重特異性抗体を限外濾過及び透析濾過に供して、二重特異性抗体を製剤化した。あるプロセスであるプロセス２（図４０Ｂ）の別の例において、組み立てられた二重特異性抗体を上述のように調製し、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィー（Ｃａｐｔｏ（商標）Ａｄｈｅｒｅ）に供し、その後、結合及び溶出モードで陰イオン交換クロマトグラフィー（Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ）に供した。その後、回収された画分を、貫流モードでＨＩＣ（Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ、高置換）及び結合及び溶出モードで陽イオン交換クロマトグラフィー（ＰＯＲＯＳ（登録商標）５０ＨＳ）に供した。最後に、二重特異性抗体を限外濾過及び透析濾過に供して、二重特異性抗体を製剤化した。

【０５６０】

第３のプロセス（プロセス３、図４０Ｃ）において、二重特異性抗体を上述のように組み立て、その後、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィー（Ｃａｐｔｏ（商標）Ａｄｈｅｒｅ）に供し、その後、結合及び溶出モードで陰イオン交換クロマトグラフィー（Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ）及び貫流モードでＨＩＣ（Ｈｅｘｙｌ６５０Ｃ）に供した。最後に、二重特異性抗体を限外濾過及び透析濾過に供して、二重特異性抗体を製剤化した。

【０５６１】

第４のプロセス（プロセス４、図４０Ｄ）において、二重特異性抗体を上述の組み立て、その後、結合及び溶出モードで混合モード陰イオン交換クロマトグラフィー（Ｃａｐｔｏ（商標）Ａｄｈｅｒｅ）に供し、その後、結合及び溶出モードで陰イオン交換クロマトグラフィー（Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ）及び結合及び溶出モードでセラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー（ＣＨＴ　Ｉ型、８０μｍ）に供した。

【０５６２】

最後に、プロセス１～３について、二重特異性抗体を限外濾過及び透析濾過に供して、二

重特異性抗体を製剤化した。
【０５６３】
その後、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（商標）樹脂（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して、各半抗体を親和性クロマトグラフィーカラム上に別個に捕捉した。カラム平衡化後、遠心分離物をカラムに装填し、平衡化緩衝液及び第２の洗浄緩衝液で洗浄した。酸性条件（ｐＨ２．８）下、カラムから半抗体を溶出させた。
【０５６４】
Ｃａｐｔｏ（商標）Ａｄｈｅｒｅプロセス：
結合及び溶出Ｃａｐｔｏ（商標）Ａｄｈｅｒｅ混合モード陰イオン交換条件は、以下の通りであった。カラムを５０ｍＭの酢酸塩（ｐＨ６．５）で平衡化した。ｐＨ６．５かつ６．５ｍＳ／ｃｍに調整した組み立てプールを、１Ｌの装填樹脂当たり２０ｇ以下のタンパク質の装填密度になるまで、カラムに装填し、平衡化緩衝液で洗浄し、その後、第２の洗浄緩衝液（２００ｍＭの酢酸塩（ｐＨ６．５））で洗浄した。緩衝液のｐＨを低下させる（２５ｍＭの酢酸塩（ｐＨ５．２））ことによって、二重特異性抗体を溶出させた。プールを開始し、２８０ｎｍでの吸光度に基づいて終結させた。
【０５６５】
Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＦＦプロセス：
結合及び溶出ＱＳＦＦ陰イオン交換条件は、以下の通りであった。カラムを５０ｍＭのＴｒｉｓ（ｐＨ８．５）で平衡化した。ｐＨ８．５に調整したＣａｐｔｏ（商標）Ａｄｈｅｒｅ溶出物プールを、１Ｌの装填樹脂当たり５０ｇ以下のタンパク質の装填密度になるまで、カラムに装填し、平衡化緩衝液で洗浄した。緩衝液（１００ｍＭの酢酸ナトリウムを有する５０ｍＭのＴｒｉｓ（ｐＨ８．５））の伝導度を増加させることによって、二重特異性抗体を溶出させた。プールを開始し、２８０ｎｍでの吸光度に基づいて終結させた。
【０５６６】
Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）プロセス：
貫流Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（高置換）ＨＩＣ条件は、以下の通りであった。カラムを１７０ｍＭの酢酸塩（ｐＨ５．５）で平衡化した。調整したＱＳＦＦ溶出物プール（ｐＨ５．５）をカラムに装填した。抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７二重特異性抗体を貫流させ、その後、カラムを平衡化緩衝液で洗浄した。産物プール収集を開始し、２８０ｎｍでの吸光度に基づいて終結させた。
【０５６７】
ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０プロセス：
結合及び溶出ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０陽イオン交換条件は、以下の通りであった。カラムを５０ｍＭの酢酸塩（ｐＨ５．５）で平衡化した。５．０ｍＳ／ｃｍに調整したＰｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）貫流プールを、１Ｌの装填樹脂当たり２０ｇ以下のタンパク質の装填密度になるまで、カラムに装填し、平衡化緩衝液で洗浄し、その後、第２の洗浄緩衝液（５０ｍＭの酢酸塩（ｐＨ５．８））で洗浄した。伝導度を、２２カラム体積（ＣＶ）にわたって、１０～１００％のＢ（Ａ：ＷＦＩ、Ｂ：５００ｍＭの酢酸塩（ｐＨ５．８））まで線形勾配で増加させることによって、二重特異性抗体を溶出させた。プールを開始し、２８０ｎｍでの吸光度に基づいて終結させた。
【０５６８】
Ｈｅｘｙｌ－６５０Ｃプロセス：
貫流Ｈｅｘｙｌ－６５０Ｃ　ＨＩＣ条件は、以下の通りであった。カラムを、１２５ｍＭの酢酸ナトリウムを有する５０ｍＭのＭＯＰＳ（ｐＨ７．０）で平衡化した。調整したＱＳＦＦ溶出物プール（ｐＨ７．０）をカラムに装填した。抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７二重特異性抗体を貫流させ、その後、カラムを平衡化緩衝液で洗浄した。産物プール収集を開始し、２８０ｎｍでの吸光度に基づいて終結させた。
【０５６９】
ＣＨＴ　Ｉ型プロセス：
結合及び溶出ＣＨＴ　Ｉ型セラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー条件は、

以下の通りであった。カラムを１０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）で平衡化した。１０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）を含有するようにＱＳＦＦ溶出物プールを、１Ｌの装填樹脂当たり２５ｇ以下のタンパク質の装填密度になるまで、カラムに装填し、平衡化緩衝液で洗浄した。伝導度を、２０カラム体積（ＣＶ）において、０～１００％のＢ（Ａ：平衡化緩衝液、Ｂ：１Ｍの塩化ナトリウムを含有する１０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８））まで線形勾配で増加させることによって、二重特異性抗体を溶出させた。プールを開始し、２８０ｎｍでの吸光度に基づいて終結させた。

【０５７０】

これらの例示的なプロセス（プロセス１～４）の各々の最終カラムプールにおける全体的な収率及び産物品質データを、以下の表３４に示す。

表３４。産物品質

特質	アッセイ	プロセス１（Ｎ＝２）	プロセス２（Ｎ＝４）	プロセス３（Ｎ＝２）	プロセス４（Ｎ＝２）
全体的収率	－－	４４～４５	３１～３４	４４～４６	４４～４８
ＨＭＷＳ（％）	ＳＥＣ	０．６～０．８	０．２～０．４	０．６、０．６	０．４～０．５
主要（％）		９９．０～９９．３	９９．５～９９．６	９９．４～９９．５	９９．０～９９．２
酸性（％）	ｉＣＩＥＦ	２１．３～２１．４	１７．０～２３．０	２４．２*	ｎ．ａ．
主要（％）		７４．９～７６．０	７４．１～８０．５	７２．１*	ｎ．ａ．
塩基性（％）		２．７～３．８	２．５～２．９	３．７*	ｎ．ａ．
純度－１５０ｋＤａ種（％）	ＣＥ－ＳＤＳ（ＮＲ）	９５．０～９５．５	９７．２～９７．６	９５．２～９５．３	ｎ．ａ．
純度－ＢｓＡｂ（％）	ＲＰＬＣ	９５．３～９５．６	９６．７～９７．８	９６．５～９６．９	９５．７～９６．１
純度－ＢｓＡｂ（％）	ＨＩＣ－ＨＰＬＣ	９７．０～９７．６	９７．３～９７．９	９７．５*	ｎ．ａ．
ＥＣＰ（ｐｐｍ）	ＥＬＩＳＡ	２０～２１	７～１７	１８～２０	６、６
ＦｋｐＡ（ｐｐｍ）		６～８	０．２～０．７	１、１	１、１
ＤｓｂＡ（ｐｐｍ）		０．４	＜０．６	０．４～０．５	＜０．７
ＤｓｂＣ（ｐｐｍ）		＜０．４～０．４	＜０．６	０．４～０．７	＜１．０～１．４

*：Ｎ＝１分析した運転

ｎ．ａ．：データ入手不可能

【０５７１】

実施例１２。αＡ／αＢの精製
２つの抗原Ａ及びＢに結合する二重特異性抗体を組み立て、精製した。抗ＩＬ１３／抗ＩＬ１７二重特異性抗体について上述の、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、及びＤｓｂＣを過剰発現するＥ．ｃｏｌｉ内で、抗Ａ及び抗Ｂ半抗体を産生した（実施例６を参照されたい）。抗Ａ半抗体はＦｃ領域に「ノブ」アミノ酸置換を含み、抗Ｂ半抗体は「ホール」アミノ酸置換を含んだ。
【０５７２】
各半抗体の全ブロスを、微少流体技術によって別個にホモジナイズした。その後、各ホモジネートプールを水で希釈し、ＰＥＩで調整し、室温でインキュベートした。その後、この調整したホモジネートプールを遠心分離して固体を分離し、続いて、一連のフィルターを通して遠心分離物を含有する半抗体を濾過した。
【０５７３】
その後、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ ＳｕＲｅ（商標）樹脂（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して、各半抗体を親和性クロマトグラフィーカラム上に別個に捕捉した。カラム平衡化後、遠心分離物をカラムに装填し、平衡化緩衝液及び第２の洗浄緩衝液で洗浄した。酸性条件（ｐＨ２．８＜３）下、カラムから半抗体を溶出させた。
【０５７４】
等しい質量の各半抗体を組み合わせることによって、二重特異性抗体を組み立てた。試料を最大ｐＨ８．４に滴定した。組み立てプロセスから期待される二重特異性抗体の理論最大量に対して還元した、１００倍の過剰モル比のＬ－グルタチオン（ＧＳＨ）を混合物に添加し、温度を室温から３５℃に調整した。２つの半抗体を酸化還元反応においてインビトロで組み立てて、二重特異性抗体を形成した。酸化還元反応を３５℃で２０時間続けた。ｐＨを６．５に調整することによって、組み立て反応を停止させ、プールを水で希釈してから、以下に記載される精製プロセスに供した。
【０５７５】
その後、組み立てられた二重特異性抗体を、Ｃａｐｔｏ（商標）Ａｄｈｅｒｅ混合モード陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。結合及び溶出Ｃａｐｔｏ（商標）Ａｄｈｅｒｅ混合モード陰イオン交換条件は、以下の通りであった。カラムを、５０ｍＭの酢酸ナトリウムを含有する２ｍＭのＭＥＳ（ｐＨ６．５）で平衡化した。ｐＨ６．５かつ６．５ｍＳ／ｃｍに調整した組み立てプールを、１Ｌの装填樹脂当たり２０ｇ以下のタンパク質の装填密度になるまで、カラムに装填し、平衡化緩衝液で洗浄し、その後、第２の洗浄緩衝液（１５０ｍＭの酢酸塩を含有する６ｍＭのＭＥＳ（ｐＨ６．５））で洗浄した。緩衝液のｐＨを低下させる（２５ｍＭの酢酸塩（ｐＨ５．０））ことによって、二重特異性抗体を溶出させた。プールを開始し、２８０ｎｍでの吸光度に基づいて終結させた。
【０５７６】
プールされたＣａｐｔｏ（商標）Ａｄｈｅｒｅ溶出物をｐＨ８．５に調整し、結合及び溶出モードでＱＳＦＦ陰イオン交換クロマトグラフィーカラムで精製した。結合及び溶出ＱＳＦＦ陰イオン交換条件は、以下の通りであった。カラムを５０ｍＭのＴｒｉｓ（ｐＨ８．５）で平衡化した。調整したＣａｐｔｏ（商標）Ａｄｈｅｒｅ溶出物プールを、１Ｌの装填樹脂当たり４１ｇのタンパク質の装填密度になるまで、カラムに装填し、平衡化緩衝液で洗浄した。緩衝液（１００ｍＭの酢酸ナトリウムを有する５０ｍＭのＴｒｉｓ（ｐＨ８．５））の伝導度を増加させることによって、二重特異性抗体を溶出させた。プールを開始し、２８０ｎｍでの吸光度に基づいて終結させた。
【０５７７】
その後、ｐＨ５．５に調整したＱＳＦＦ溶出物を、貫流モードでＰｈｅｎｙｌ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＨＳクロマトグラフィーに供した。貫流Ｐｈｅｎｙｌ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）６Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（高置換）ＨＩＣ条件は、以下の通りであった。カラムを１７０ｍＭの酢酸塩（ｐＨ５．５）で平衡化した。調整したＱＳＦＦ溶出物プールをカラムに装填した。二重特異性抗体を貫流させ、その後、カラムを平衡化緩衝

液で洗浄した。産物プール収集を開始し、２８０ｎｍでの吸光度に基づいて終結させた。その後、Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）プールを濃縮し、限外濾過／透析濾過（ＵＦ／ＤＦ）を使用して緩衝液交換した。非対合半抗体、ホモ二量体、低分子量種（ＬＭＷＳ）、高分子量種（ＨＭＷＳ）、超高分子量種（ｖＨＭＷＳ）、酸性変異形、塩基性変異形、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、ＤｓｂＣ、ＥＣＰ、浸出タンパク質Ａ、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤＮＡ、及び内毒素を含む不純物の存在について、抗Ａ／抗Ｂ二重特異性抗体を分析した。産物品質及び（収率％によって示される）プロセス性能を表３５に詳述する。

表３５。抗Ａ／抗Ｂ産物品質及びプロセス性能

ステップ	αＡＭＳＳ	αＢＭＳＳ	組み立て	Ｃａｐｔｏ（商標）Ａｄｈｅｒｅ	ＱＳＦＦ	Ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）	ＵＦＤＦ
収率（％）	７７	７５	８５	７７	８５	８４	８０
ＥＣＰ（ｐｐｍ）	１１８１７	１０９９６	３４４７	９４	４４	２６	１６
ＦｋｐＡ（ｐｐｍ）	３３３１	２７５１	１８４１	１２６５	２１６	８	８
ＤｓｂＡ（ｐｐｍ）	５９	２９	２８	５	１	１	０．３
ＤｓｂＣ（ｐｐｍ）	９４	１４４	１２２	４	９	２	０．１
ＳＥＣ－合計ＨＭＷＳ（％）	４．２	１２．０	１４．４	７．４	１．４	０．２	０．７
ＳＥＣ－主要（％）	１８．１	２９．４	８５．１	９２．６	９８．５	９９．８	９９．３
ＳＥＣ－ＬＭＷＳ（％）	７７．３	５８．５	０．５	０	０．０９	０	０
純度、ＮＲ－ＣＥ－ＳＤＳ（％）	８３．５	７１．１	８６．９	９２．６	９６．４	９７	９７

配列

別途表記されない限り、アミノ酸配列はＮ末端からＣ末端で提示され、核酸配列は５’から３’で提示される。

Ｅ．ｃｏｌｉ　ＦｋｐＡ

アミノ酸配列－リーダー配列なし

ＡＦＡＤＫＳＫＬＳＤＱＥＩＥＱＴＬＱＡＦＥＡＲＶＫＳＳＡＱＡＫＭＥＫＤＡＡＤＮＥ
ＡＫＧＫＥＹＲＥＫＦＡＫＥＫＧＶＫＴＳＳＴＧＬＶＹＱＶＶＥＡＧＫＧＥＡＰＫＤＳＤ
ＴＶＶＶＮＹＫＧＴＬＩＤＧＫＥＦＤＮＳＹＴＲＧＥＰＬＳＦＲＬＤＧＶＩＰＧＷＴＥＧ
ＬＫＮＩＫＫＧＧＫＩＫＬＶＩＰＰＥＬＡＹＧＫＡＧＶＰＧＩＰＰＮＳＴＬＶＦＤＶＥＬ
ＬＤＶＫＰＡＰＫＡＤＡＫＰＥＡＤＡＫＡＡＤＳＡＫＫ

（配列番号１）

アミノ酸配列－全配列

ＭＫＳＬＦＫＶＴＬＬＡＴＴＭＡＶＡＬＨＡＰＩＴＦＡＡＥＡＡＫＰＡＴＴＡＤＳＫＡＡ
ＦＫＮＤＤＱＫＳＡＹＡＬＧＡＳＬＧＲＹＭＥＮＳＬＫＥＱＥＫＬＧＩＫＬＤＫＤＱＬＩ
ＡＧＶＱＤＡＦＡＤＫＳＫＬＳＤＱＥＩＥＱＴＬＱＡＦＥＡＲＶＫＳＳＡＱＡＫＭＥＫＤ
ＡＡＤＮＥＡＫＧＫＥＹＲＥＫＦＡＫＥＫＧＶＫＴＳＳＴＧＬＶＹＱＶＶＥＡＧＫＧＥＡ
ＰＫＤＳＤＴＶＶＶＮＹＫＧＴＬＩＤＧＫＥＦＤＮＳＹＴＲＧＥＰＬＳＦＲＬＤＧＶＩＰ
ＧＷＴＥＧＬＫＮＩＫＫＧＧＫＩＫＬＶＩＰＰＥＬＡＹＧＫＡＧＶＰＧＩＰＰＮＳＴＸＶ
ＦＤＶＥＬＬＤＶＫＰＡＰＫＡＤＡＫＰＥＡＤＡＫＡＡＤＳＡＫＫ

（配列番号２）

核酸配列

ａｔｇａａａｔｃａｃｔｇｔｔｔａａａｇｔａａｃｇｃｔｇｃｔｇｇｃｇａｃｃａｃａａ
ｔｇｇｃｃｇｔｔｇｃｃｃｔｇｃａｔｇｃａｃｃａａｔｃａｃｔｔｔｔｇｃｔｇｃｔｇａ
ａｇｃｔｇｃａａａａｃｃｔｇｃｔａｃａｇｃｔｇｃｔｇａｃａｇｃａａａｇｃａｇｃｇ
ｔｔｃａａａａａｔｇａｃｇａｔｃａｇａａａｔｃａｇｃｔｔａｔｇｃａｃｔｇｇｇｔｇ
ｃｃｔｃｇｃｔｇｇｇｔｃｇｔｔａｃａｔｇｇａａａａｃｔｃｔｃｔａａａａｇａａｃａ
ａｇａａａａａｃｔｇｇｇｃａｔｃａａａｃｔｇｇａｔａａａｇａｔｃａｇｃｔｇａｔｃ
ｇｃｔｇｇｔｇｔｔｃａｇｇａｔｇｃａｔｔｔｇｃｔｇａｔａａｇａｇｃａａａｃｔｃｔ
ｃｃｇａｃｃａａｇａｇａｔｃｇａａｃａｇａｃｔｃｔａｃａａｇｃａｔｔｃｇａａｇｃ
ｔｃｇｃｇｔｇａａｇｔｃｔｔｃｔｇｃｔｃａｇｇｃｇａａｇａｔｇｇａａａａａｇａｃ
ｇｃｇｇｃｔｇａｔａａｃｇａａｇｃａａａａｇｇｔａａａｇａｇｔａｃｃｇｃｇａｇａ
ａａｔｔｔｇｃｃａａａｇａｇａａａｇｇｔｇｔｇａａａａｃｃｔｃｔｔｃａａｃｔｇｇ
ｔｃｔｇｇｔｔｔａｔｃａｇｇｔａｇｔａｇａａｇｃｃｇｇｔａａａｇｇｃｇａａｇｃａ
ｃｃｇａａａｇａｃａｇｃｇａｔａｃｔｇｔｔｇｔａｇｔｇａａｃｔａｃａａａｇｇｔａ
ｃｇｃｔｇａｔｃｇａｃｇｇｔａａａｇａｇｔｔｃｇａｃａａｃｔｃｔｔａｃａｃｃｃｇ
ｔｇｇｔｇａａｃｃｇｃｔｔｔｃｔｔｔｃｃｇｔｃｔｇｇａｃｇｇｔｇｔｔａｔｃｃｃｇ
ｇｇｔｔｇｇａｃａｇａａｇｇｔｃｔｇａａｇａａｃａｔｃａａｇａａａｇｇｃｇｇｔａ
ａｇａｔｃａａａｃｔｇｇｔｔａｔｔｃｃａｃｃａｇａａｃｔｇｇｃｔｔａｃｇｇｃａａ
ａｇｃｇｇｇｔｇｔｔｃｃｇｇｇｇａｔｃｃｃａｃｃｇａａｔｔｃｔａｃｃｃｔｇｇｔｇ
ｔｔｔｇａｃｇｔａｇａｇｃｔｇｃｔｇｇａｔｇｔｇａａａｃｃａｇｃｇｃｃｇａａｇｇ
ｃｔｇａｔｇｃａａａｇｃｃｇｇａａｇｃｔｇａｔｇｃｇａａａｇｃｃｇｃａｇａｔｔｃ
ｔｇｃｔａａａａａａｔａａ

（配列番号３）

＜本発明の更なる実施態様＞

［実施態様１］

ＦｋｐＡポリペプチドを含む細胞溶解物からの前記ＦｋｐＡポリペプチドの精製方法であって、

ａ）遠心分離により前記細胞溶解物を浄化することと、

ｂ）前記ＦｋｐＡポリペプチドを含む前記浄化された細胞溶解物を陽イオン交換クロマトグラフィー材料に適用することと、

ｃ）前記陽イオン交換クロマトグラフィー材料から前記ＦｋｐＡポリペプチドを溶出さ

せて、前記ＦｋｐＡポリペプチドを含む陽イオン交換溶出物を生成することと、
ｄ）前記ＦｋｐＡポリペプチドを含む前記陽イオン交換溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）材料に適用することと、
ｅ）前記ＨＩＣ材料から前記ＦｋｐＡポリペプチドを溶出させて、ＨＩＣ溶出物を生成することと、
ｆ）前記ＦｋｐＡポリペプチドを含む前記ＨＩＣ溶出物をサイズ排除クロマトグラフィーに適用することと、
ｇ）前記サイズ排除クロマトグラフィーから前記ＦｋｐＡポリペプチドを溶出させることと、を含む、前記方法。
［実施態様２］
前記ＦｋｐＡポリペプチドを含む前記溶解物が、約ｐＨ６．０である、実施態様１に記載の方法。
［実施態様３］
前記陽イオン交換クロマトグラフィー材料が、強陽イオン交換体である、実施態様１または２に記載の方法。
［実施態様４］
前記強陽イオン交換体が、スルホプロピル基を含む、実施態様３に記載の方法。
［実施態様５］
前記スルホプロピル基が、架橋アガロースに結合している、実施態様４に記載の方法。
［実施態様６］
前記陽イオン交換材料が、溶出前に２５ｍＭの２－（Ｎ－モルフィリノ（ｍｏｒｐｈｉｌｉｎｏ））エタンスルホン酸（ＭＥＳ）中で洗浄される、実施態様１～５のいずれかーに記載の方法。
［実施態様７］
前記ＦｋｐＡが、塩勾配を使用して前記陽イオンクロマトグラフィー材料から溶出される、実施態様１～６のいずれかーに記載の方法。
［実施態様８］
前記塩勾配が、線形勾配である、実施態様７に記載の方法。
［実施態様９］
前記塩勾配が、９カラム体積にわたって、２５ｍＭのＭＥＳ、３００ｍＭのＮａＣｌから２５ｍＭのＭＥＳ、３００ｍＭのＮａＣｌまでの０～３０％の勾配である、実施態様８に記載の方法。
［実施態様１０］
前記陽イオン交換溶出物が、画分で収集される、実施態様１～９のいずれかーに記載の方法。
［実施態様１１］
前記画分が、疎水性相互作用クロマトグラフィー前にサイズ排除クロマトグラフィーによって分析される、実施態様１０に記載の方法。
［実施態様１２］
少なくとも約２５％のＦｋｐＡを含む画分が、更なる精製のために選択される、実施態様１１に記載の方法。
［実施態様１３］
前記ＨＩＣ材料が、ブチル部分を含む、実施態様１～１２のいずれかーに記載の方法。
［実施態様１４］
前記ブチル部分が、架橋アガロースに結合している、実施態様１３に記載の方法。
［実施態様１５］
前記陽イオン交換溶出物が、ＨＩＣ前に約０．６Ｍの硫酸ナトリウム及び約５０ｍＭのPO_4（約ｐＨ７）を含有するように調整される、実施態様１～１４のいずれかーに記載の方法。
［実施態様１６］

前記ＦｋｐＡ結合ＨＩＣ材料が、溶出前に４０ｍＭのリン酸塩、３００ｍＭの硫酸ナトリウム（ｐＨ７．０）で洗浄される、実施態様１～１５のいずれかーに記載の方法。

［実施態様１７］

前記ＦｋｐＡが、水を使用して前記ＨＩＣ材料から溶出される、実施態様１～１６のいずれかーに記載の方法。

［実施態様１８］

前記ＨＩＣ溶出物が、画分で収集される、実施態様１～１６のいずれかーに記載の方法。

［実施態様１９］

ＦｋｐＡを含む画分が、プールされる、実施態様１８に記載の方法。

［実施態様２０］

少なくとも約２５％のＦｋｐＡを含む画分が、プールされる、実施態様１９に記載の方法。

［実施態様２１］

前記サイズ排除クロマトグラフィー材料が、架橋アガロースとデキストランとの球状複合体を含む、実施態様１～２０のいずれかーに記載の方法。

［実施態様２２］

前記サイズ排除貫流物が、画分で収集される、実施態様１～２１のいずれかーに記載の方法。

［実施態様２３］

前記ＨＩＣ溶出物が、サイズ排除クロマトグラフィー前に濃縮される、実施態様１～２２のいずれかーに記載の方法。

［実施態様２４］

前記ＨＩＣ溶出物が、サイズ排除クロマトグラフィー前に約６倍～約１０倍に濃縮される、実施態様２３に記載の方法。

［実施態様２５］

ＦｋｐＡを含むサイズ排除画分が、プールされる、実施態様２２～２４のいずれかーに記載の方法。

［実施態様２６］

前記ＦｋｐＡポリペプチドが、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＦｋｐＡポリペプチドである、実施態様１～２５のいずれかーに記載の方法。

［実施態様２７］

前記ＦｋｐＡポリペプチドが、配列番号１のアミノ酸配列を含む、実施態様２６に記載の方法。

［実施態様２８］

前記ＦｋｐＡポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号１のアミノ酸配列に対して少なくとも約８０％の同一性を含む、実施態様２７に記載の方法。

［実施態様２９］

前記ＦｋｐＡが、細胞で発現される、実施態様１～２８のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３０］

前記細胞が、原核生物細胞である、実施態様２９に記載の方法。

［実施態様３１］

前記細胞が、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞である、実施態様２９または３０に記載の方法。

［実施態様３２］

前記細胞が、ＦｋｐＡの内因性発現を超えるレベルでＦｋｐＡを発現するように操作される、実施態様２９～３１のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３３］

前記細胞が、微小流動化剤を使用して溶解される、実施態様１～３２のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３４］

実施態様１～３３のいずれかーに記載の方法によって精製されたＦｋｐＡポリペプチド

を含む組成物。
［実施態様３５］
精製されたＦｋｐＡポリペプチドを含む組成物であって、少なくとも約９８％の単量体ＦｋｐＡポリペプチドを含む、前記組成物。
［実施態様３６］
前記組成物が、約２％未満の低分子量種を含む、実施態様３５に記載の組成物。
［実施態様３７］
前記組成物が、約５％以下の高分子量種を含む、実施態様３５または３６に記載の組成物。
［実施態様３８］
単量体ＦｋｐＡポリペプチドの割合が、サイズ排除クロマトグラフィーによって検出される、実施態様３５～３７のいずれかーに記載の組成物。
［実施態様３９］
前記組成物が、約５％、約４％、約３％、約２％、または約１％未満の不純物を含む、実施態様３８に記載の組成物。
［実施態様４０］
前記不純物が、ＦｋｐＡに対して高分子量及び／または低分子量のポリペプチド種である、実施態様３９に記載の組成物。
［実施態様４１］
前記不純物が、Ｅ．ｃｏｌｉタンパク質（ＥＣＰ）、ＦｋｐＡ凝集体、ＦｋｐＡ断片、核酸、または細胞培養培地成分のうちの１つ以上である、実施態様３９または４０に記載の組成物。
［実施態様４２］
前記ＦｋｐＡが、１回以上の凍結融解サイクルに対して安定している、実施態様３４～４１のいずれかーに記載の組成物。
［実施態様４３］
前記ＦｋｐＡが、３回の凍結融解サイクルに対して安定している、実施態様４２に記載の組成物。
［実施態様４４］
前記組成物中の前記ＦｋｐＡポリペプチドの純度が、クロマトグラフィー、ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはウエスタンブロット分析のうちの１つ以上によって測定される、実施態様３４～４３のいずれかーに記載の組成物。
［実施態様４５］
前記組成物中の前記ＦｋｐＡポリペプチドの純度が、高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）によって測定される、実施態様３４～４４のいずれかーに記載の組成物。
［実施態様４６］
前記組成物中の前記ＦｋｐＡポリペプチドの純度が、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）によって測定される、実施態様３４～４５のいずれかーに記載の組成物。
［実施態様４７］
前記組成物中の前記ＦｋｐＡポリペプチドの純度が、蛍光画像化または銀染色を使用してＳＤＳゲル電気泳動によって測定される、実施態様３４～４４のいずれかーに記載の組成物。
［実施態様４８］
前記組成物中の非ＦｋｐＡポリペプチドの存在が、ウエスタンブロット分析により示される抗ＦｋｐＡ抗体と免疫反応しないゲル電気泳動によって特定される種の存在によって特定される、実施態様４７に記載の組成物。
［実施態様４９］
前記組成物中の前記ＦｋｐＡポリペプチドの凝集体の存在が、ウエスタンブロット分析により、前記天然ＦｋｐＡを超える分子量を有する種の存在によって特定される、実施態様４８に記載の組成物。

［実施態様５０］
ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体の生成方法であって、動物を、実施態様１～３３のいずれか一に記載の方法によって精製されたＦｋｐＡを含む組成物に曝露または免疫化することを含む、前記方法。
［実施態様５１］
ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体の生成方法であって、動物を実施態様３４～４９のいずれか一に記載の組成物に曝露または免疫化することを含む、前記方法。
［実施態様５２］
前記動物から血清を収集することを更に含み、前記血清がＦｋｐＡに特異的に結合する抗体を含む、実施態様５０または５１に記載の方法。
［実施態様５３］
前記血清が、ＦｋｐＡに特異的に結合するポリクローナル抗体を含む、実施態様５２に記載の方法。
［実施態様５４］
１つ以上のモノクローナル抗体が、前記血清から単離される、実施態様５２または５３に記載の方法。
［実施態様５５］
前記動物が、ヤギ、ウサギ、マウス、モルモット、ハムスター、ラット、ロバ、またはニワトリである、実施態様５０～５４のいずれか一に記載の方法。
［実施態様５６］
ＦｋｐＡに特異的に結合するポリクローナル抗体を含む組成物であって、前記ポリクローナル抗体が、動物を、実施態様１～３３のいずれか一に記載の方法によって精製されたＦｋｐＡを含む組成物に免疫化することによって生成される、前記組成物。
［実施態様５７］
ＦｋｐＡに特異的に結合するポリクローナル抗体を含む組成物であって、前記ポリクローナル抗体が、動物を、実施態様３４～４９のいずれか一に記載の組成物に免疫化することによって生成される、前記組成物。
［実施態様５８］
前記ポリクローナル抗体が、前記動物の血清から収集される、実施態様５６または５７に記載の組成物。
［実施態様５９］
ＦｋｐＡに特異的に結合するモノクローナル抗体を含む組成物であって、前記モノクローナル抗体が、動物を、実施態様１～３３のいずれか一に記載の方法によって精製されたＦｋｐＡを含む組成物に免疫化することによって生成される、前記組成物。
［実施態様６０］
ＦｋｐＡに特異的に結合するモノクローナル抗体を含む組成物であって、前記モノクローナル抗体が、動物を、実施態様３４～４９のいずれか一に記載の組成物に免疫化することによって生成される、前記組成物。
［実施態様６１］
前記動物が、ヤギ、ウサギ、マウス、モルモット、ハムスター、ラット、ロバ、またはニワトリである、実施態様５６～６０のいずれか一に記載の組成物。
［実施態様６２］
ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体の精製方法であって、抗ＦｋｐＡ抗体を含む、実施態様５６～６１のいずれか一に記載の組成物を、約６０％の最終濃度の硫酸アンモニウムになるまで、硫酸アンモニウムと接触させることと、前記溶液を遠心分離することと、前記上清を除去することと、前記ペレットをリン酸緩衝液中に溶解することと、を含む、前記方法。
［実施態様６３］
前記リン酸緩衝液が、約５０ｍＭのリン酸ナトリウム（約ｐＨ７．０）を含む、実施態様６２に記載の方法。

［実施態様６４］
ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体の精製方法であって、
ａ）抗ＦｋｐＡ抗体を含む、実施態様５６～６１のいずれか一に記載の組成物を、約６０％の最終濃度の硫酸アンモニウムになるまで、硫酸アンモニウムと接触させることと、前記溶液を遠心分離することと、前記上清を除去することと、前記ペレットをリン酸緩衝液中に溶解して、抗ＦｋｐＡ抗体溶液を生成することと、
ｂ）前記抗ＦｋｐＡ抗体溶液を親和性クロマトグラフィー材料に適用することと、
ｃ）前記親和性材料から前記抗体を溶出させて、前記抗ＦｋｐＡ抗体を含む親和性溶出物を生成することと、
ｄ）前記硫酸アンモニウム上清をサイズ排除クロマトグラフィーに供することと、ｅ）前記サイズ排除クロマトグラフィーから、前記精製された抗体を含む画分を収集することと、を含む、前記方法。
［実施態様６５］
前記リン酸緩衝液が、約５０ｍＭのリン酸ナトリウム（約ｐＨ７．０）を含む、実施態様６４に記載の方法。
［実施態様６６］
前記親和性クロマトグラフィー材料が、クロマトグラフィー培地に結合しているＦｋｐＡを含む、実施態様６４または６５に記載の方法。
［実施態様６７］
前記クロマトグラフィー培地が、架橋デキストランである、実施態様６６に記載の方法。
［実施態様６８］
前記ＦｋｐＡが、実施態様１～３３のいずれか一に記載の方法によって精製される、実施態様６６または６７に記載の方法。
［実施態様６９］
前記ＦｋｐＡが、実施態様３４～４９のいずれか一に記載の組成物に由来する、実施態様６６または６７に記載の方法。
［実施態様７０］
前記ＦｋｐＡが、前記クロマトグラフィー培地に共有結合している、実施態様６６～６９のいずれか一に記載の方法。
［実施態様７１］
前記ＦｋｐＡが、グリセリル－制御孔ガラスカラム（グリセリル－ＣＰＧ）を使用して前記クロマトグラフィー培地に結合している、実施態様６６～７０のいずれか一に記載の方法。
［実施態様７２］
前記抗ＦｋｐＡ抗体が、前記親和性カラムから溶出される、実施態様６４～７１のいずれか一に記載の方法。
［実施態様７３］
前記サイズ排除クロマトグラフィー材料が、架橋アガロースとデキストランとの球状複合体を含む、実施態様６４～７２のいずれか一に記載の方法。
［実施態様７４］
架橋アガロースとデキストランとの前記球状複合体が、１０，０００ダルトン～６００，０００ダルトンの分子量を有する分子の分離範囲を有する、実施態様７３に記載の方法。
［実施態様７５］
前記サイズ排除貫流物が、画分で収集される、実施態様６４～７４のいずれか一に記載の方法。
［実施態様７６］
抗ＦｋｐＡ抗体を含むサイズ排除画分が、プールされる、実施態様７５に記載の方法。
［実施態様７７］
前記抗体が、ポリクローナル抗体である、実施態様６４～７６のいずれか一に記載の方法。

［実施態様７８］
前記抗体が、実施態様５０～５５のいずれか一に記載の方法に従って調製される、実施態様６４～７７のいずれか一に記載の方法。
［実施態様７９］
前記抗体の約１％未満が、非ＦｋｐＡ化合物に特異的に結合する、実施態様６４～７８のいずれか一に記載の方法。
［実施態様８０］
実施態様６２～７９のいずれか一に記載の方法によって精製された、単離された抗ＦｋｐＡ抗体。
［実施態様８１］
試料中のＦｋｐＡの定量化方法であって、検出システムを使用して前記試料中のＦｋｐＡを検出することと、前記試料中で検出されたＦｋｐＡの量を１つ以上の濃度の超高純度ＦｋｐＡ参照標準物の検出と比較することと、を含む、前記方法。
［実施態様８２］
前記超高純度ＦｋｐＡ参照標準物が、少なくとも約９５％、約９６％、約９７％、または約９８％の単量体ＦｋｐＡポリペプチドを含む、実施態様８１に記載の方法。
［実施態様８３］
前記超高純度ＦｋｐＡ参照標準物が実施態様１～３３のいずれか一に記載の方法によって調製され、実施態様３４～４９のいずれか一に記載のＦｋｐＡ組成物を含む、実施態様８１または８２に記載の方法。
［実施態様８４］
前記検出システムが、免疫アッセイである、実施態様８１～８３のいずれか一に記載の方法。
［実施態様８５］
前記免疫アッセイが、超高純度ＦｋｐＡ参照標準物に特異的に結合する抗体を含む、実施態様８４に記載の方法。
［実施態様８６］
ＦｋｐＡの存在及び／または分量についての組換えポリペプチド試料の分析方法であって、免疫アッセイを使用して前記試料中のＦｋｐＡを検出することと、前記試料中で検出されたＦｋｐＡの量を１つ以上の濃度の超高純度ＦｋｐＡ参照標準物の検出と比較することと、を含む、前記方法。
［実施態様８７］
前記超高純度ＦｋｐＡ参照標準物が、少なくとも約９８％の単量体ＦｋｐＡポリペプチドを含む、実施態様８６に記載の方法。
［実施態様８８］
前記超高純度ＦｋｐＡ参照標準物が、実施態様１～３３のいずれか一に記載の方法によって調製される、実施態様８６または８７に記載の方法。
［実施態様８９］
前記免疫アッセイが、超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合する抗体を含む、実施態様８４～８８のいずれか一に記載の方法。
［実施態様９０］
前記超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合する前記抗体が、ポリクローナル抗体である、実施態様８９に記載の方法。
［実施態様９１］
前記超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合する前記抗体が、前記免疫アッセイにおいて捕捉抗体として使用される、実施態様８９または９０に記載の方法。
［実施態様９２］
超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合する前記抗体が、検出抗体として使用される、実施態様８９～９１のいずれか一に記載の方法。
［実施態様９３］

前記検出抗体が、検出剤にコンジュゲートされる、実施態様９２に記載の方法。
［実施態様９４］
検出剤が、西洋ワサビペルオキシダーゼである、実施態様８９～９３のいずれかーに記載の方法。
［実施態様９５］
ＦｋｐＡに特異的に結合する前記抗体が、実施態様５６～６１のいずれかーに記載の組成物中に含まれるか、または実施態様５０～５５のいずれかーに記載の方法に従って調製される、実施態様８９～９４のいずれかーに記載の方法。
［実施態様９６］
前記ＦｋｐＡが、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＦｋｐＡである、実施態様８１～９５のいずれかーに記載の方法。
［実施態様９７］
前記試料が、宿主細胞内で調製される組換えポリペプチドを含む、実施態様８１～９６のいずれかーに記載の方法。
［実施態様９８］
前記宿主細胞が、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞である、実施態様９７に記載の方法。
［実施態様９９］
前記宿主細胞が、ＦｋｐＡを過剰発現する、実施態様９７または９８に記載の方法。
［実施態様１００］
前記試料が、細胞溶解物である、実施態様８１～９９のいずれかーに記載の方法。
［実施態様１０１］
前記試料が、組換えポリペプチド調製物から得られ、前記組換えポリペプチド調製物が、１つ以上のクロマトグラフィー精製ステップに供されている、実施態様８１～１００のいずれかーに記載の方法。
［実施態様１０２］
前記組換えポリペプチド調製物が、最終精製産物である、実施態様１０１に記載の方法。
［実施態様１０３］
前記組換えポリペプチド試料中に含有される前記組換えポリペプチドが、抗体またはイムノアドヘシンである、実施態様８１～１０２のいずれかーに記載の方法。
［実施態様１０４］
前記抗体が、多重特異性抗体、二重特異性抗体、半抗体、または抗体断片である、実施態様１０３に記載の方法。
［実施態様１０５］
前記組換えポリペプチドが、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４である、実施態様１０３または１０４に記載の方法。
［実施態様１０６］
試料中のＦｋｐＡの検出のための免疫アッセイ方法であって、前記試料が、宿主細胞株に由来する組換えポリペプチド調製物から得られ、前記方法が、
（ａ）ＦｋｐＡに結合する捕捉抗体を前記試料と接触させて、それにより試料－捕捉抗体組み合わせ材料を生成することと、
（ｂ）ＦｋｐＡに結合する検出抗体を前記試料－捕捉抗体組み合わせ材料と接触させることと、
（ｃ）前記試料－捕捉抗体組み合わせ材料に結合している前記抗体を検出することと、
を含む、前記方法。
［実施態様１０７］
標準滴定曲線を使用して結合している前記検出抗体のレベルを定量化することを更に含む、実施態様１０６に記載の方法。
［実施態様１０８］
結合している前記検出抗体のレベルに基づいて、前記試料中に存在するＦｋｐＡの量を計算することを更に含む、実施態様１０７に記載の方法。

［実施態様１０９］
前記試料中に存在するＦｋｐＡの前記量が、前記標準滴定曲線を超高純度ＦｋｐＡ組成物で生成された標準滴定曲線と比較することによって決定される、実施態様１０８に記載の方法。
［実施態様１１０］
前記超高純度ＦｋｐＡ組成物が、少なくとも約９８％の単量体ＦｋｐＡポリペプチドを含む、実施態様１０９に記載の方法。
［実施態様１１１］
前記組成物中の前記超高純度ＦｋｐＡが、実施態様１～３３のいずれか一に記載の方法によって調製される、実施態様１０９または１１０に記載の方法。
［実施態様１１２］
前記捕捉抗体が、前記超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合する、実施態様１０６～１１１のいずれか一に記載の方法。
［実施態様１１３］
前記検出抗体が、前記超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合する、実施態様１０６～１１２のいずれか一に記載の方法。
［実施態様１１４］
前記超高純度ＦｋｐＡに特異的に結合する前記抗体が、ポリクローナル抗体である、実施態様１１２または１１３に記載の方法。
［実施態様１１５］
ＦｋｐＡに結合する前記第２の検出抗体が西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートされる、実施態様１０６～１１４のいずれか一に記載の方法。
［実施態様１１６］
前記ポリクローナル抗体が、実施態様５０～５５のいずれか一に記載の方法に従って生成される、実施態様１０６～１１５のいずれか一に記載の方法。
［実施態様１１７］
前記免疫アッセイが、サンドイッチアッセイである、実施態様１０６～１１６のいずれか一に記載の方法。
［実施態様１１８］
前記サンドイッチアッセイが、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）である、実施態様１１７に記載の方法。
［実施態様１１９］
前記ＦｋｐＡが、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＦｋｐＡである、実施態様１０６～１１８のいずれか一に記載の方法。
［実施態様１２０］
前記宿主細胞株に由来する前記組換えポリペプチド調製物が、Ｅ．ｃｏｌｉから得られる、実施態様１０６～１１９のいずれか一に記載の方法。
［実施態様１２１］
前記宿主細胞株が、外因性ＦｋｐＡを過剰発現する、実施態様１２０に記載の方法。
［実施態様１２２］
前記試料が、細胞溶解物である、実施態様１０６～１２１のいずれか一に記載の方法。
［実施態様１２３］
前記試料が、前記組換えポリペプチド調製物から得られ、前記組換えポリペプチド調製物が、１つ以上のクロマトグラフィー精製ステップに供されている、実施態様１０６～１２２のいずれか一に記載の方法。
［実施態様１２４］
前記組換えポリペプチド調製物が、最終精製産物である、実施態様１２３に記載の方法。
［実施態様１２５］
前記組換えポリペプチド調製物中に含有される前記組換えポリペプチドが、抗体またはイムノアドヘシンである、実施態様１０６～１２４のいずれか一に記載の方法。

［実施態様１２６］
前記抗体が、多重特異性抗体、二重特異性抗体、半抗体、または抗体断片である、実施態様１２５に記載の方法。
［実施態様１２７］
前記組換えポリペプチドが、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４である、実施態様１２５または１２６に記載の方法。
［実施態様１２８］
前記組換えポリペプチドが、ＩＬ１３に結合する第１の結合ドメイン、及びＩＬ１７に結合する第２の結合ドメインを含む二重特異性抗体である、実施態様１２５に記載の方法。
［実施態様１２９］
前記ＩＬ１３が、配列番号４または配列番号５のアミノ酸配列を含む、実施態様１２８に記載の方法。
［実施態様１３０］
前記二重特異性抗体の前記第１の結合ドメインが、配列番号１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号１３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、実施態様１２８または１２９に記載の方法。
［実施態様１３１］
前記二重特異性抗体の前記第１の結合ドメインが、配列番号１０のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号１１のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む、実施態様１２８～１３０のいずれかーに記載の方法。
［実施態様１３２］
前記二重特異性抗体の前記第１の結合ドメインが、配列番号１８のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施態様１２８～１３１のいずれかーに記載の方法。
［実施態様１３３］
前記二重特異性抗体の前記第１の結合ドメインが、配列番号１９のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施態様１２８～１３２のいずれかーに記載の方法。
［実施態様１３４］
前記二重特異性抗体の前記第１の結合ドメインが、配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、実施態様１２８～１３３のいずれかーに記載の方法。
［実施態様１３５］
前記ＩＬ１７が、ヒトＩＬ１７である、実施態様１２８～１３４のいずれかーに記載の方法。
［実施態様１３６］
第２の結合ドメインが、ヒトＩＬ１７ＡＡ、ＩＬ１７ＦＦ、及びＩＬ１７ＡＦに結合する、実施態様１２８～１３５のいずれかーに記載の方法。
［実施態様１３７］
前記ＩＬ１７Ａが、配列番号６または配列番号７のアミノ酸配列を含み、前記ＩＬ１７Ｆが、配列番号８または配列番号９のアミノ酸配列を含む、実施態様１２８～１３６のいずれかーに記載の方法。
［実施態様１３８］
前記二重特異性抗体の前記第２の結合ドメインが、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号２４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号２５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号２６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、実施態様１２８～１３７のいずれかーに記載の方法。
［実施態様１３９］
前記二重特異性抗体の前記第２の結合ドメインが、配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号２２のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む、実施態様１２８～１

３８のいずれかーに記載の方法。
［実施態様１４０］
前記二重特異性抗体の前記第２の結合ドメインが、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施態様１２８～１３９のいずれかーに記載の方法。
［実施態様１４１］
前記二重特異性抗体の前記第２の結合ドメインが、配列番号３０のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施態様１２８～１４０のいずれかーに記載の方法。
［実施態様１４２］
前記二重特異性抗体の前記第２の結合ドメインが、配列番号３１のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、実施態様１２８～１４１のいずれかーに記載の方法。
［実施態様１４３］
細菌細胞から調製された組換えポリペプチドを含む薬学的組成物の品質アッセイであって、前記薬学的組成物の試料を実施態様１０６～１４２のいずれかーに記載の免疫アッセイ方法に供して、前記薬学的組成物中のＦｋｐＡの存在または量を検出することを含む、前記品質アッセイ。
［実施態様１４４］
約３０ｐｐｍ、約２５ｐｐｍ、約２０ｐｐｍ、約１５ｐｐｍ、約１４ｐｐｍ、約１３ｐｐｍ、約１２ｐｐｍ、約１１ｐｐｍ、約１０ｐｐｍ、約９ｐｐｍ、約８ｐｐｍ、約７ｐｐｍ、約６ｐｐｍ、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍ以下の前記薬学的組成物中のＦｋｐＡの量である、実施態様１４３に記載の品質アッセイ。
［実施態様１４５］
前記細菌細胞が、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞である、実施態様１４３または１４４に記載の品質アッセイ。
［実施態様１４６］
前記細菌細胞が、外因性ＦｋｐＡを過剰発現する、実施態様１４３～１４５のいずれかーに記載の品質アッセイ。
［実施態様１４７］
前記試料が、細胞溶解物である、実施態様１４３～１４６のいずれかーに記載の品質アッセイ。
［実施態様１４８］
前記試料が、前記組換えポリペプチド調製物から得られ、前記組換えポリペプチド調製物が、１つ以上のクロマトグラフィー精製ステップに供されている、実施態様１４３～１４７のいずれかーに記載の品質アッセイ。
［実施態様１４９］
前記組換えポリペプチド調製物が、最終精製産物である、実施態様１４８に記載の品質アッセイ。
［実施態様１５０］
前記組換えポリペプチドが、抗体またはイムノアドヘシンである、実施態様１４３～１４９のいずれかーに記載の品質アッセイ。
［実施態様１５１］
前記抗体が、多重特異性抗体、二重特異性抗体、半抗体、または抗体断片である、実施態様１５０に記載の品質アッセイ。
［実施態様１５２］
前記組換えポリペプチドが、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４である、実施態様１５１に記載の品質アッセイ。
［実施態様１５３］
前記組換えポリペプチドが、ＩＬ１３に結合する第１の結合ドメイン、及びＩＬ１７に結合する第２の結合ドメインを含む二重特異性抗体である、実施態様１５１に記載の品質

アッセイ。
［実施態様１５４］
前記ＩＬ１３が、配列番号４または配列番号５のアミノ酸配列を含む、実施態様１５３に記載の品質アッセイ。
［実施態様１５５］
前記二重特異性抗体の前記第１の結合ドメインが、配列番号１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号１３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、実施態様１５３または１５４に記載の品質アッセイ。
［実施態様１５６］
前記二重特異性抗体の前記第１の結合ドメインが、配列番号１０のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号１１のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む、実施態様１５３～１５５のいずれか一に記載の品質アッセイ。
［実施態様１５７］
前記二重特異性抗体の前記第１の結合ドメインが、配列番号１８のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施態様１５３～１５６のいずれか一に記載の品質アッセイ。
［実施態様１５８］
前記二重特異性抗体の前記第１の結合ドメインが、配列番号１９のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施態様１５３～１５７のいずれか一に記載の品質アッセイ。
［実施態様１５９］
前記二重特異性抗体の前記第１の結合ドメインが、配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、実施態様１５３～１５８のいずれか一に記載の品質アッセイ。
［実施態様１６０］
前記ＩＬ１７が、ヒトＩＬ１７である、実施態様１５３～１５９のいずれか一に記載の品質アッセイ。
［実施態様１６１］
第２の結合ドメインが、ヒトＩＬ１７ＡＡ、ＩＬ１７ＦＦ、及びＩＬ１７ＡＦに結合する、実施態様１５３～１５９のいずれか一に記載の品質アッセイ。
［実施態様１６２］
前記ＩＬ１７Ａが、配列番号６または配列番号７のアミノ酸配列を含み、前記ＩＬ１７Ｆが、配列番号８または配列番号９のアミノ酸配列を含む、実施態様１５３～１６１のいずれか一に記載の品質アッセイ。
［実施態様１６３］
前記二重特異性抗体の前記第２の結合ドメインが、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号２４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号２５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号２６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、実施態様１５３～１６２のいずれか一に記載の品質アッセイ。
［実施態様１６４］
前記二重特異性抗体の前記第２の結合ドメインが、配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号２２のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む、実施態様１５３～１６３のいずれか一に記載の品質アッセイ。
［実施態様１６５］
前記二重特異性抗体の前記第２の結合ドメインが、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施態様１５３～１６４のいずれか一に記載の品質アッセイ。
［実施態様１６６］
前記二重特異性抗体の前記第２の結合ドメインが、配列番号３０のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施態様１５３～１６５のいずれか一に記載の品質アッセイ。
［実施態様１６７］

前記二重特異性抗体の前記第２の結合ドメインが、配列番号３１のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、実施態様１５３～１６６のいずれかーに記載の品質アッセイ。

［実施態様１６８］

前記薬学的組成物中のＤｓｂＡ及び／またはＤｓｂＣの量を検出するステップを更に含む、実施態様１５３～１６７のいずれかーに記載の品質アッセイ。

［実施態様１６９］

ＤｓｂＡの量が、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍ以下である、実施態様１６８に記載の品質アッセイ。

［実施態様１７０］

ＤｓｂＣの量が、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍ以下である、実施態様１６８または１６９に記載の品質アッセイ。

［実施態様１７１］

ＤｓｂＡ及び／またはＤｓｂＣの量が、免疫アッセイによって測定される、実施態様１６８～１７０のいずれかーに記載の品質アッセイ。

［実施態様１７２］

細菌細胞から調製された組換えポリペプチドを含む薬学的組成物中のＦｋｐＡの検出のためのキットであって、実施態様５０～５５のいずれかーに記載の方法によって調製された抗ＦｋｐＡ抗体、または実施態様５６～６１のいずれかーに記載の抗ＦｋｐＡ抗体の組成物を含む、前記キット。

［実施態様１７３］

前記キットが、試料中のＦｋｐＡを定量するための標準曲線を生成する際の参照標準物として使用するための、かつ／または陽性対照として使用するための超高純度ＦｋｐＡを更に含む、実施態様１７２に記載のキット。

［実施態様１７４］

前記超高純度ＦｋｐＡが、実施態様１～３３のいずれかーに記載の方法に従って調製される、実施態様１７２に記載のキット。

［実施態様１７５］

組換えポリペプチドを含む組成物であって、前記組換えポリペプチドが、内因性ＦｋｐＡを発現する宿主細胞内で産生され、前記組成物が、約６ｐｐｍ、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍ以下の濃度のＦｋｐＡを含む、前記組成物。

［実施態様１７６］

前記組成物中のＦｋｐＡの量が、免疫アッセイによって決定される、実施態様１７５に記載の組成物。

［実施態様１７７］

前記組成物中のＦｋｐＡの量が、実施態様１０６～１２４のいずれかーに記載の免疫アッセイによって決定される、実施態様１７５に記載の組成物。

［実施態様１７８］

組換えポリペプチドを含む組成物であって、前記組換えポリペプチドが、外因性ＦｋｐＡを発現するように操作されている宿主細胞内で産生され、前記組成物が、約１５ｐｐｍ、約１４ｐｐｍ、約１３ｐｐｍ、約１２ｐｐｍ、約１１ｐｐｍ、約１０ｐｐｍ、約９ｐｐｍ、約８ｐｐｍ、約７ｐｐｍ、約６ｐｐｍ、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍ以下の濃度のＦｋｐＡを含む、前記組成物。

［実施態様１７９］
前記組換えポリペプチドが、抗体である、実施態様１７５～１７８のいずれか一に記載の組成物。
［実施態様１８０］
前記抗体が、二重特異性抗体である、実施態様１７９に記載の抗体。
［実施態様１８１］
前記組成物が、少なくとも約０．２ｐｐｍのＦｋｐＡを含む、実施態様１７５～１８０のいずれか一に記載の組成物。
［実施態様１８２］
前記宿主細胞が、外因性ＦｋｐＡを発現し、前記組成物が、約１３ｐｐｍ以下を含む、実施態様１７５～１８１のいずれか一に記載の組成物。
［実施態様１８３］
前記宿主細胞が、外因性ＦｋｐＡを発現し、前記組成物が、約０．７ｐｐｍ以下を含む、実施態様１７５～１８２のいずれか一に記載の組成物。
［実施態様１８４］
前記宿主細胞が、外因性ＦｋｐＡを発現し、前記組成物が、約６ｐｐｍ以下を含む、実施態様１７５～１８３のいずれか一に記載の組成物。
［実施態様１８５］
前記組換えポリペプチドが、二重特異性抗体であり、前記二重特異性抗体が、ＩＬ１３に結合する第１の結合ドメイン、及びＩＬ１７に結合する第２の結合ドメインを含む、実施態様１７５～１８４のいずれか一に記載の組成物。
［実施態様１８６］
前記ＩＬ１３が、配列番号４または配列番号５のアミノ酸配列を含む、実施態様１８５に記載の組成物。
［実施態様１８７］
前記二重特異性抗体の前記第１の結合ドメインが、配列番号１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号１３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、実施態様１８５または１８６に記載の組成物。
［実施態様１８８］
前記二重特異性抗体の前記第１の結合ドメインが、配列番号１０のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号１１のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む、実施態様１８５～１８７のいずれか一に記載の組成物。
［実施態様１８９］
前記二重特異性抗体の前記第１の結合ドメインが、配列番号１８のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施態様１８５～１８８のいずれか一に記載の組成物。
［実施態様１９０］
前記二重特異性抗体の前記第１の結合ドメインが、配列番号１９のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施態様１８５～１８９のいずれか一に記載の組成物。
［実施態様１９１］
前記二重特異性抗体の前記第１の結合ドメインが、配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、実施態様１８５～１９０のいずれか一に記載の組成物。
［実施態様１９２］
前記ＩＬ１７が、ヒトＩＬ１７である、実施態様１８５～１９１のいずれか一に記載の組成物。
［実施態様１９３］
前記第２の結合ドメインが、ヒトＩＬ１７ＡＡ、ＩＬ１７ＦＦ、及びＩＬ１７ＡＦに結合する、実施態様１８５～１９２のいずれか一に記載の方法。
［実施態様１９４］

前記ＩＬ１７Ａが、配列番号６または配列番号７のアミノ酸配列を含み、前記ＩＬ１７Ｆが、配列番号８または配列番号９のアミノ酸配列を含む、実施態様１９３に記載の組成物。

［実施態様１９５］

前記二重特異性抗体の前記第２の結合ドメインが、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号２４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号２５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号２６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、実施態様１８５～１９４のいずれかーに記載の組成物。

［実施態様１９６］

前記二重特異性抗体の前記第２の結合ドメインが、配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号２２のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む、実施態様１８５～１９５のいずれかーに記載の組成物。

［実施態様１９７］

前記二重特異性抗体の前記第２の結合ドメインが、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施態様１８５～１９６のいずれかーに記載の組成物。

［実施態様１９８］

前記二重特異性抗体の前記第２の結合ドメインが、配列番号３０のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施態様１８５～１９６のいずれかーに記載の組成物。

［実施態様１９９］

前記二重特異性抗体の前記第２の結合ドメインが、配列番号３１のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、実施態様１８５～１９８のいずれかーに記載の組成物。

［実施態様２００］

前記組成物が、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍ以下の濃度のＤｓｂＡを含む、実施態様１８５～１９９のいずれかーに記載の組成物。

［実施態様２０１］

前記組成物中のＤｓｂＡの濃度が、免疫アッセイによって決定される、実施態様２００に記載の組成物。

［実施態様２０２］

前記組成物が、約５ｐｐｍ、約４ｐｐｍ、約３ｐｐｍ、約２ｐｐｍ、約１ｐｐｍ、約０．９ｐｐｍ、約０．８ｐｐｍ、約０．７ｐｐｍ、約０．６ｐｐｍ、約０．５ｐｐｍ、約０．４ｐｐｍ、約０．３ｐｐｍ、約０．２ｐｐｍ、または約０．１ｐｐｍ以下の濃度のＤｓｂＣを含む、実施態様１８５～２０１のいずれかーに記載の組成物。

［実施態様２０３］

前記組成物中のＤｓｂＣの濃度が、免疫アッセイによって決定される、実施態様２０２に記載の組成物。

［実施態様２０４］

二重特異性抗体を含む組成物であって、前記組換えポリペプチドが、

ａ）宿主細胞に、

ｉ）第１の重鎖及び第１の軽鎖をコードする核酸であって、前記第１の重鎖及び前記第１の軽鎖が、第１の抗原結合ドメインを形成する、核酸と、

ｉｉ）第２の重鎖及び第２の軽鎖をコードする核酸であって、前記第２の重鎖及び前記第２の軽鎖が、第１の抗原結合ドメインを形成する、核酸と、

ｉｉｉ）ＦｋｐＡポリペプチドをコードする核酸と、を導入することであって、

前記第１の重鎖及び前記第２の重鎖が、Ｆｃドメインを形成する、導入することと、

ｂ）前記抗体を精製することと、

を含む方法によって産生され、前記組成物が、約５ｐｐｍ未満のＦｋｐＡを含む、前記組成物。

［実施態様２０５］
前記組成物が、約１ｐｐｍ未満のＦｋｐＡを含む、実施態様２０４に記載の組成物。
［実施態様２０６］
前記宿主細胞が、原核生物宿主細胞である、実施態様１７５～２０５のいずれかーに記載の組成物。
［実施態様２０７］
前記宿主細胞が、グラム陰性菌である、実施態様２０６に記載の組成物。
［実施態様２０８］
前記グラム陰性菌が、Ｅ．ｃｏｌｉである、実施態様２０７に記載の方法。
［実施態様２０９］
前記ＦｋｐＡが、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＦｋｐＡである、実施態様１７５～２０８のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２１０］
前記二重特異性抗体が、精製される、実施態様１７５～２０９のいずれかーに記載の組成物。
［実施態様２１１］
前記二重特異性抗体が、ＩＬ１３に結合する第１の結合ドメインを含む、実施態様１７５～２１０のいずれかーに記載の組成物。
［実施態様２１２］
前記二重特異性抗体が、ＩＬ１７に結合する第２の結合ドメインを含む、実施態様１７５～２１１のいずれかーに記載の組成物。
［実施態様２１３］
前記ＩＬ１３が、配列番号４または配列番号５のアミノ酸配列を含む、実施態様２１１または２１２に記載の組成物。
［実施態様２１４］
前記二重特異性抗体の前記第１の結合ドメインが、配列番号１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号１３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、実施態様２１１～２１３のいずれかーに記載の組成物。
［実施態様２１５］
前記二重特異性抗体の前記第１の結合ドメインが、配列番号１０のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号１１のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む、実施態様２１１のいずれかーに記載の組成物。
［実施態様２１６］
前記二重特異性抗体の前記第１の結合ドメインが、配列番号１８のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施態様２１１～２１５のいずれかーに記載の組成物。
［実施態様２１７］
前記二重特異性抗体の前記第１の結合ドメインが、配列番号１９のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施態様２１１～２１５のいずれかーに記載の組成物。
［実施態様２１８］
前記二重特異性抗体の前記第１の結合ドメインが、配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、実施態様２１１～２１７のいずれかーに記載の組成物。
［実施態様２１９］
前記ＩＬ１７が、ヒトＩＬ１７である、実施態様２１１～２１８のいずれかーに記載の組成物。
［実施態様２２０］
前記第２の結合ドメインが、ヒトＩＬ１７ＡＡ、ＩＬ１７ＦＦ、及びＩＬ１７ＡＦに結合する、実施態様２１１～２１９のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２２１］

前記ＩＬ１７Ａが、配列番号６または配列番号７のアミノ酸配列を含み、前記ＩＬ１７Ｆが、配列番号８または配列番号９のアミノ酸配列を含む、実施態様２２０に記載の組成物。

［実施態様２２２］

前記二重特異性抗体の前記第２の結合ドメインが、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号２４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号２５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号２６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、実施態様２１９～２２１のいずれかーに記載の組成物。

［実施態様２２３］

前記二重特異性抗体の前記第２の結合ドメインが、配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号２２のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む、実施態様２１９～２２２のいずれかーに記載の組成物。

［実施態様２２４］

前記二重特異性抗体の前記第２の結合ドメインが、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施態様２１９～２２３のいずれかーに記載の組成物。

［実施態様２２５］

前記二重特異性抗体の前記第２の結合ドメインが、配列番号３０のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施態様２１９～２２３のいずれかーに記載の組成物。

［実施態様２２６］

前記二重特異性抗体の前記第２の結合ドメインが、配列番号３１のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、実施態様２１９～２２５のいずれかーに記載の組成物。

［実施態様２２７］

前記組成物が、約１５ｐｐｍ以下のＤｓｂＡを含む、実施態様１７５～２２６のいずれかーに記載の組成物。

［実施態様２２８］

前記組成物が、約５ｐｐｍ以下のＤｓｂＡを含む、実施態様１７５～２２７のいずれかーに記載の組成物。

［実施態様２２９］

前記組成物が、約１５ｐｐｍ以下のＤｓｂＣを含む、実施態様１７５～２２８のいずれかーに記載の組成物。

［実施態様２３０］

前記組成物が、約５ｐｐｍ以下のＤｓｂＣを含む、実施態様１７５～２２９のいずれかーに記載の組成物。

［実施態様２３１］

ポリペプチド及び１つ以上の不純物を含む組成物からの前記ポリペプチドの精製方法であって、

ａ）前記組成物を親和性クロマトグラフィーに供して、親和性溶出物を産生することと、

ｂ）前記親和性溶出物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成することと、

ｃ）前記混合モード溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し、前記ポリペプチドを含む画分を収集することと、

前記組成物からの産物特異的不純物の量を低減する、前記方法。

［実施態様２３２］

多重特異性抗体及び１つ以上の不純物を含む組成物からの前記多重特異性抗体の精製方法であって、前記多重特異性抗体が、複数のアームを含み、各アームが、ＶＨ／ＶＬ単位を含み、前記方法が、逐次的に、

ａ）前記組成物をタンパク質Ａクロマトグラフィーに供して、タンパク質Ａ溶出物を産生するステップと、

ｂ）前記タンパク質Ａ溶出物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶

出物を生成するステップと、
ｃ）前記混合モード溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し、前記多重特異性抗体を含む画分を収集するステップと、を含み、
前記組成物からの産物特異的不純物の量を低減する、前記方法。
［実施態様２３３］
前記混合モードクロマトグラフィーが、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィーである、実施態様２３１または２３２に記載の方法。
［実施態様２３４］
前記親和性クロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２３１に記載の方法。
［実施態様２３５］
前記タンパク質Ａクロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２３２または２３３に記載の方法。
［実施態様２３６］
前記混合モードクロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２３１～２３５のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２３７］
前記ＨＩＣが、貫流モードで行われる、実施態様２３１～２３６のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２３８］
多重特異性抗体及び１つ以上の不純物を含む組成物からの前記多重特異性抗体の精製方法であって、前記多重特異性抗体が、複数のアームを含み、各アームが、ＶＨ／ＶＬ単位を含み、前記多重特異性抗体の各アームが、別個に産生され、前記方法が、逐次的に、
ａ）前記多重特異性抗体の各アームをタンパク質Ａクロマトグラフィーに供して、前記多重特異性抗体の各アームのタンパク質Ａ溶出物を産生するステップと、
ｂ）前記多重特異性抗体を含む組成物を産生するのに十分な条件下で、前記多重特異性抗体の各アームのタンパク質Ａ溶出物を含む混合物を形成するステップと、
ｃ）前記多重特異性抗体を含む前記組成物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成するステップと、
ｄ）前記混合モード溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）に供し、前記多重特異性抗体を含む画分を収集するステップと、を含み、
前記組成物からの産物特異的不純物の量を低減する、前記方法。
［実施態様２３９］
前記混合モードクロマトグラフィーが、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィーである、実施態様２３８に記載の方法。
［実施態様２４０］
前記タンパク質Ａクロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２３８または２３９に記載の方法。
［実施態様２４１］
前記混合モードクロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２３８～２４０のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２４２］
前記疎水性相互作用クロマトグラフィーが、貫流モードで行われる、実施態様２３８～２４１のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２４３］
前記混合モード溶出物が、疎水性相互作用クロマトグラフィー前に陰イオン交換クロマトグラフィーに供される、実施態様２３１～２４２のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２４４］
前記陰イオン交換クロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２４３に記載の方法。

［実施態様２４５］
前記ポリペプチドまたは多重特異性抗体を含む前記疎水性相互作用クロマトグラフィー画分を陽イオン交換クロマトグラフィーに供し、前記ポリペプチドまたは多重特異性抗体を含む画分を収集するステップを更に含む、実施態様２３１～２４４のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２４６］
前記陽イオン交換クロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２４５に記載の方法。
［実施態様２４７］
ポリペプチド及び１つ以上の不純物を含む組成物からの前記ポリペプチドの精製方法であって、
ａ）前記組成物を親和性クロマトグラフィーに供して、親和性溶出物を産生することと、
ｂ）前記親和性溶出物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成することと、
ｃ）前記混合モード溶出物を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、陰イオン交換溶出物を生成することと、
ｄ）前記陰イオン交換溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し、前記ポリペプチドを含む画分を収集することと、
前記組成物からの産物特異的不純物の量を低減する、前記方法。
［実施態様２４８］
多重特異性抗体及び１つ以上の不純物を含む組成物からの前記多重特異性抗体の精製方法であって、前記多重特異性抗体が、複数のアームを含み、各アームが、ＶＨ／ＶＬ単位を含み、前記方法が、逐次的に、
ａ）前記組成物をタンパク質Ａクロマトグラフィーに供して、タンパク質Ａ溶出物を産生するステップと、
ｂ）前記タンパク質Ａ溶出物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成するステップと、
ｃ）前記混合モード溶出物を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、陰イオン交換溶出物を生成するステップと、
ｄ）前記陰イオン交換溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し、前記多重特異性抗体を含む画分を収集するステップと、を含み、
前記組成物からの産物特異的不純物の量を低減する、前記方法。
［実施態様２４９］
多重特異性抗体及び１つ以上の不純物を含む組成物からの前記多重特異性抗体の精製方法であって、前記多重特異性抗体が、複数のアームを含み、各アームが、ＶＨ／ＶＬ単位を含み、前記多重特異性抗体の各アームが、別個に産生され、前記方法が、逐次的に、
ａ）前記多重特異性抗体の各アームをタンパク質Ａクロマトグラフィーに供して、前記多重特異性抗体の各アームのタンパク質Ａ溶出物を産生するステップと、
ｂ）前記多重特異性抗体を含む組成物を産生するのに十分な条件下で、前記多重特異性抗体の各アームのタンパク質Ａ溶出物を含む混合物を形成するステップと、
ｃ）前記多重特異性抗体を含む前記組成物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成するステップと、
ｄ）前記混合モード溶出物を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、陰イオン交換溶出物を生成するステップと、
ｅ）前記陰イオン交換溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し、前記多重特異性抗体を含む画分を収集し、前記多重特異性抗体を含む画分を収集するステップと、を含み、
前記組成物からの産物特異的不純物の量を低減する、前記方法。
［実施態様２５０］
前記混合モードクロマトグラフィーが、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィーで

ある、実施態様２４７～２４９のいずれか一に記載の方法。
［実施態様２５１］
前記親和性クロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２４７に記載の方法。
［実施態様２５２］
前記タンパク質Ａクロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２４８～２５０のいずれか一に記載の方法。
［実施態様２５３］
前記混合モードクロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２４７～２５２のいずれか一に記載の方法。
［実施態様２５４］
前記陰イオン交換クロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２４７～２５３のいずれか一に記載の方法。
［実施態様２５５］
前記疎水性相互作用クロマトグラフィーが、貫流モードで行われる、実施態様２４７～２５４のいずれか一に記載の方法。
［実施態様２５６］
前記ポリペプチドまたは多重特異性抗体を含む前記疎水性相互作用クロマトグラフィー画分を陽イオン交換クロマトグラフィーに供するステップを更に含む、実施態様２４７～２５５のいずれか一に記載の方法。
［実施態様２５７］
前記陽イオン交換クロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２４７～２５６のいずれか一に記載の方法。
［実施態様２５８］
ポリペプチド及び１つ以上の不純物を含む組成物からの前記ポリペプチドの精製方法であって、
ａ）前記組成物を親和性クロマトグラフィーに供して、親和性溶出物を産生することと、
ｂ）前記親和性溶出物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成することと、
ｃ）前記混合モード溶出物を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、陰イオン交換溶出物を生成することと、
ｄ）前記陰イオン交換溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し、前記ポリペプチドを含む画分を収集することと、
ｅ）前記疎水性相互作用溶出物を陽イオン交換クロマトグラフィーに供し、前記ポリペプチドを含む画分を収集することと、
前記組成物からの産物特異的不純物の量を低減する、前記方法。
［実施態様２５９］
多重特異性抗体及び１つ以上の不純物を含む組成物からの前記多重特異性抗体の精製方法であって、前記多重特異性抗体が、複数のアームを含み、各アームが、ＶＨ／ＶＬ単位を含み、前記方法が、逐次的に、
ａ）前記組成物をタンパク質Ａクロマトグラフィーに供して、タンパク質Ａ溶出物を産生するステップと、
ｂ）前記タンパク質Ａ溶出物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成するステップと、
ｃ）前記混合モード溶出物を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、陰イオン交換溶出物を生成するステップと、
ｄ）前記陰イオン交換溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し、前記多重特異性抗体を含む画分を収集するステップと、
ｅ）前記疎水性相互作用溶出物を陽イオン交換クロマトグラフィーに供し、前記ポリペプチドを含む画分を収集するステップと、を含み、

前記組成物からの産物特異的不純物の量を低減する、前記方法。
［実施態様２６０］
多重特異性抗体及び１つ以上の不純物を含む組成物からの前記多重特異性抗体の精製方法であって、前記多重特異性抗体が、複数のアームを含み、各アームが、ＶＨ／ＶＬ単位を含み、前記多重特異性抗体の各アームが、別個に産生され、前記方法が、逐次的に、
ａ）前記多重特異性抗体の各アームをタンパク質Ａクロマトグラフィーに供して、前記多重特異性抗体の各アームのタンパク質Ａ溶出物を産生するステップと、
ｂ）前記多重特異性抗体を含む組成物を産生するのに十分な条件下で、前記多重特異性抗体の各アームのタンパク質Ａ溶出物を含む混合物を形成するステップと、
ｃ）前記多重特異性抗体を含む前記組成物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成するステップと、
ｄ）前記混合モード溶出物を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、陰イオン交換溶出物を生成するステップと、
ｅ）前記陰イオン交換溶出物を疎水性相互作用クロマトグラフィーに供し、前記多重特異性抗体を含む画分を収集し、前記多重特異性抗体を含む画分を収集するステップと、
ｆ）前記疎水性相互作用溶出物を陽イオン交換クロマトグラフィーに供し、前記ポリペプチドを含む画分を収集するステップと、を含み、
前記組成物からの産物特異的不純物の量を低減する、前記方法。
［実施態様２６１］
前記混合モードクロマトグラフィーが、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィーである、実施態様２５８～２６０のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２６２］
前記親和性クロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２５８に記載の方法。
［実施態様２６３］
前記タンパク質Ａクロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２５９～２６１のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２６４］
前記混合モードクロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２５８～２６３のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２６５］
前記陰イオン交換クロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２５８～２６４のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２６６］
前記疎水性相互作用クロマトグラフィーが、貫流モードで行われる、実施態様２５８～２６５のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２６７］
前記陽イオン交換クロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２５８～２６６のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２６８］
ポリペプチド及び１つ以上の不純物を含む組成物からの前記ポリペプチドの精製方法であって、逐次的に、
ａ）前記組成物を親和性クロマトグラフィーに供して、親和性溶出物を産生するステップと、
ｂ）前記親和性溶出物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成するステップと、
ｃ）前記混合モード溶出物を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、陰イオン交換溶出物を生成するステップと、
ｄ）前記陰イオン交換溶出物をヒドロキシアパタイト（ｈｙｄｒｏｘｙａｐａｔｉｔｅ）クロマトグラフィーに供し、前記ポリペプチドを含む画分を収集するステップと

、を含み、
前記組成物からの産物特異的不純物の量を低減する、前記方法。
［実施態様２６９］
多重特異性抗体及び１つ以上の不純物を含む組成物からの前記多重特異性抗体の精製方法であって、前記多重特異性抗体が、複数のアームを含み、各アームが、ＶＨ／ＶＬ単位を含み、前記方法が、逐次的に、
ａ）前記組成物をタンパク質Ａクロマトグラフィーに供して、タンパク質Ａ溶出物を産生するステップと、
ｂ）前記タンパク質Ａ溶出物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成するステップと、
ｃ）前記混合モード溶出物を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、陰イオン交換溶出物を生成するステップと、
ｄ）前記陰イオン交換溶出物をヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーに供し、前記多重特異性抗体を含む画分を収集するステップと、を含み、
前記組成物からの産物特異的不純物の量を低減する、前記方法。
［実施態様２７０］
多重特異性抗体及び１つ以上の不純物を含む組成物からの前記多重特異性抗体の精製方法であって、前記多重特異性抗体が、複数のアームを含み、各アームが、ＶＨ／ＶＬ単位を含み、前記多重特異性抗体の各アームが、別個に産生され、前記方法が、逐次的に、
ａ）前記多重特異性抗体の各アームをタンパク質Ａクロマトグラフィーに供して、前記多重特異性抗体の各アームのタンパク質Ａ溶出物を産生するステップと、
ｂ）前記多重特異性抗体を含む組成物を産生するのに十分な条件下で、前記多重特異性抗体の各アームのタンパク質Ａ溶出物を含む混合物を形成するステップと、
ｃ）前記多重特異性抗体を含む前記組成物を混合モードクロマトグラフィーに供して、混合モード溶出物を生成するステップと、
ｄ）前記混合モード溶出物を陰イオン交換クロマトグラフィーに供して、陰イオン交換溶出物を生成するステップと、
ｅ）前記陰イオン交換溶出物をヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーに供し、前記多重特異性抗体を含む画分を収集し、前記多重特異性抗体を含む画分を収集するステップと、を含み、
前記組成物からの産物特異的不純物の量を低減する、前記方法。
［実施態様２７１］
前記混合モードクロマトグラフィーが、混合モード陰イオン交換クロマトグラフィーである、実施態様２６８～２７０のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２７２］
前記親和性クロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２７１に記載の方法。
［実施態様２７３］
前記タンパク質Ａクロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２６９～２７２のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２７４］
前記混合モードクロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２６８～２７３のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２７５］
前記陰イオン交換クロマトグラフィーが、結合及び溶出モードで行われる、実施態様２６８～２７４のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２７６］
前記ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーが、貫流モードで行われる、実施態様２６８～２７５のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２７７］

前記ポリペプチドまたは多重特異性抗体を含む前記ヒドロキシアパタイト相互作用クロマトグラフィー画分を限外濾過に供するステップを更に含む、実施態様２３１～２４５または２５６～２６７のいずれかーに記載の方法。

［実施態様２７８］

前記ポリペプチドまたは多重特異性抗体を含む前記陽イオン交換画分を限外濾過に供するステップを更に含む、実施態様２４５～２４６または２５６～２６７のいずれかーに記載の方法。

［実施態様２７９］

前記ポリペプチドまたは多重特異性抗体を含む前記ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー画分を限外濾過に供するステップを更に含む、実施態様２６７～２７６のいずれかーに記載の方法。

［実施態様２８０］

前記限外濾過が、第１の限外濾過、透析濾過、及び第２の限外濾過を逐次的に含む、実施態様２７７～２７９のいずれかーに記載の方法。

［実施態様２８１］

前記タンパク質Ａクロマトグラフィーが、アガロースに結合しているタンパク質Ａを含む、実施態様２３２～２３３、２３５～２４６、２４８～２５０、２５２～２５７、２５９～２６１、２６３～２７０、または２６９～２７６のいずれかーに記載の方法。

［実施態様２８２］

前記タンパク質Ａクロマトグラフィーが、ＭＡｂＳｅｌｅｃｔ（商標）、ＭＡｂＳｅｌｅｃｔ（商標）ＳｕＲｅ、及びＭＡｂＳｅｌｅｃｔ（商標）ＳｕＲｅ ＬＸ、Ｐｒｏｓｅｐ－ＶＡ、Ｐｒｏｓｅｐ－ＶＡ Ｕｌｔｒａ Ｐｌｕｓ、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ｆａｓｔ ｆｌｏｗ、またはＴｙｏｐｅａｒｌ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａクロマトグラフィーである、実施態様２８１に記載の方法。

［実施態様２８３］

前記タンパク質Ａクロマトグラフィーが、タンパク質Ａ平衡化緩衝液、タンパク質Ａ装填緩衝液、またはタンパク質Ａ洗浄緩衝液のうちの１つ以上を使用し、前記平衡化緩衝液、装填緩衝液、及び／または洗浄緩衝液が、約ｐＨ７～約ｐＨ８である、実施態様２８１または２８２に記載の方法。

［実施態様２８４］

前記タンパク質Ａ平衡化緩衝液が、約ｐＨ７．７である、実施態様２８３に記載の方法。

［実施態様２８５］

前記タンパク質Ａ平衡化緩衝液が、約２５ｍＭのＴｒｉｓ及び約２５ｍＭのＮａＣｌを含む、実施態様２８３または２８４に記載の方法。

［実施態様２８６］

前記タンパク質Ａクロマトグラフィーが、装填後に平衡化緩衝液で洗浄される、実施態様２８３～２８５のいずれかーに記載の方法。

［実施態様２８７］

第２の洗浄及び第３の洗浄を更に含み、前記第２の洗浄が、１Ｍのアルギニンであり、前記第３の洗浄が、平衡化緩衝液である、実施態様２８６に記載の方法。

［実施態様２８８］

前記多重特異性抗体が、ｐＨ勾配によって前記タンパク質Ａクロマトグラフィーから溶出される、実施態様２８３～２８７のいずれかーに記載の方法。

［実施態様２８９］

前記多重特異性抗体が、低ｐＨを有するタンパク質Ａ溶出緩衝液を前記タンパク質Ａクロマトグラフィーに適用することによって、タンパク質Ａから溶出される、実施態様２８３～２８８のいずれかーに記載の方法。

［実施態様２９０］

前記タンパク質Ａ溶出緩衝液が、約１５０ｍＭの酢酸（約ｐＨ２．８または約ｐＨ２．９）を含む、実施態様２８９に記載の方法。

［実施態様２９１］
前記タンパク質Ａ溶出物が、プールされ、前記溶出物のＯＤ２８０が、約０．５を超える、実施態様２８３～２９０のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２９２］
前記混合モードクロマトグラフィーが、四級アミン及び疎水性部分を含む、実施態様２３１～２９１のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２９３］
前記混合モードクロマトグラフィーが、四級アミン及び高架橋アガロースに結合している疎水性部分を含む、実施態様２３１～２９２のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２９４］
前記混合モードクロマトグラフィーが、Ｎ－ベンジル－ｎ－メチルエタノールアミンを含む、実施態様２３１～２９３のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２９５］
前記混合モードクロマトグラフィーが、Ｃａｐｔｏ（商標）ａｄｈｅｒｅクロマトグラフィーである、実施態様２９４に記載の方法。
［実施態様２９６］
前記混合モードクロマトグラフィーが、混合モード事前平衡化緩衝液、混合モード平衡化緩衝液、混合モード装填緩衝液、または混合モード洗浄緩衝液のうちの１つ以上を使用し、前記混合モード事前平衡化緩衝液、前記混合モード平衡化緩衝液、及び／または混合モード洗浄緩衝液が、約ｐＨ６～約ｐＨ７である、実施態様２３１～２９５のいずれかーに記載の方法。
［実施態様２９７］
前記混合モード事前平衡化緩衝液、前記混合モード平衡化緩衝液、及び／または混合モード洗浄緩衝液が、約ｐＨ６．５である、実施態様２９６に記載の方法。
［実施態様２９８］
前記混合モード事前平衡化緩衝液が、約２００ｍＭの酢酸塩または約５００ｍＭの酢酸塩を含む、実施態様２９６または２９７に記載の方法。
［実施態様２９９］
前記混合モード平衡化緩衝液が、約５０ｍＭの酢酸塩を含む、実施態様２９６～２９８のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３００］
前記混合モードクロマトグラフィーが、装填後に洗浄緩衝液で洗浄される、実施態様２９６～２９９のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３０１］
前記洗浄緩衝液が、約５０ｍＭの酢酸塩（約ｐＨ６．５）または約２００ｍＭの酢酸塩（約ｐＨ６．５）である、実施態様３００に記載の方法。
［実施態様３０２］
前記ポリペプチドまたは多重特異性抗体が、ｐＨ勾配によって前記混合モードクロマトグラフィーから溶出される、実施態様２３１～３０１のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３０３］
前記ポリペプチドまたは多重特異性抗体が、低ｐＨを有する混合モード溶出緩衝液を前記混合モード陰イオン交換クロマトグラフィーに適用することによって、前記混合モードクロマトグラフィーから溶出される、実施態様２３１～３０２のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３０４］
前記混合モード溶出緩衝液が、約２５ｍＭの酢酸塩（約ｐＨ５．２または約ｐＨ５．０）を含む、実施態様３０３に記載の方法。
［実施態様３０５］
前記混合モード溶出物が、プールされ、前記溶出物のＯＤ２８０が、約０．５超～約１．０である、実施態様２３１～３０４のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３０６］

前記疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）が、疎水性部分を含む、実施態様２３１～２６７のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３０７］

前記疎水性相互作用クロマトグラフィーが、フェニル部分を含む、実施態様３０６に記載の方法。

［実施態様３０８］

前記疎水性相互作用クロマトグラフィーが、架橋アガロースに結合している疎水性部分を含む、実施態様３０６または３０７に記載の方法。

［実施態様３０９］

前記疎水性相互作用クロマトグラフィーが、架橋アガロースに結合しているフェニル部分またはブチル部分を含む、実施態様３０６～３０８のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３１０］

前記疎水性相互作用クロマトグラフィーが、ｐｈｅｎｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）クロマトグラフィーまたはＢｕｔｙｌ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）クロマトグラフィーである、実施態様３０９に記載の方法。

［実施態様３１１］

前記疎水性相互作用交換クロマトグラフィーが、ＨＩＣ平衡化緩衝液、ＨＩＣ装填緩衝液、またはＨＩＣ洗浄緩衝液のうちの１つ以上を使用し、前記ＨＩＣ平衡化緩衝液、前記装填緩衝液、及び／または前記ＨＩＣ洗浄緩衝液が、約ｐＨ５～約ｐＨ６である、実施態様３０６～３１０のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３１２］

前記ＨＩＣ平衡化緩衝液、前記装填緩衝液、及び／または前記洗浄緩衝液が、約ｐＨ５．５である、実施態様３１１に記載の方法。

［実施態様３１３］

前記ＨＩＣ平衡化緩衝液及び前記洗浄緩衝液が、約１７０ｍＭの酢酸塩を含む、実施態様３１１または３１２に記載の方法。

［実施態様３１４］

前記ＨＩＣ装填緩衝液が、５０ｍＭのＴｒｉｓ、１００ｍＭの酢酸ナトリウム（ｐＨ約５．５）である、実施態様３１１～３１３のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３１５］

前記疎水性相互作用クロマトグラフィーが、装填後にＨＩＣ洗浄緩衝液で洗浄される、実施態様３１１～３１４のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３１６］

前記疎水性相互作用クロマトグラフィーが、ヘキシル部分を含む、実施態様３０６～３１５のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３１７］

前記疎水性相互作用クロマトグラフィーが、ヒドロキシル化メタクリルポリマーに結合している疎水性部分を含む、実施態様３０６に記載の方法。

［実施態様３１８］

前記疎水性相互作用クロマトグラフィーが、ヒドロキシル化メタクリルポリマーに結合しているヘキシル部分を含む、実施態様３１６または３１７に記載の方法。

［実施態様３１９］

前記疎水性相互作用クロマトグラフィーが、ＴＯＹＯＰＥＡＲＬ（登録商標）Ｈｅｘｙｌ６５０Ｃである、実施態様３１８に記載の方法。

［実施態様３２０］

前記疎水性相互作用交換クロマトグラフィーが、ＨＩＣ平衡化緩衝液、ＨＩＣ装填緩衝液、またはＨＩＣ洗浄緩衝液のうちの１つ以上を使用し、前記ＨＩＣ平衡化緩衝液、前記ＨＩＣ装填緩衝液、及び／または前記ＨＩＣ洗浄緩衝液が、約ｐＨ６～約ｐＨ８である、実施態様３１６～３１９のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３２１］

前記ＨＩＣ平衡化緩衝液、前記装填緩衝液、及び／または前記洗浄緩衝液が、約ｐＨ７．０である、実施態様３２０に記載の方法。

［実施態様３２２］

前記ＨＩＣ平衡化緩衝液及び前記洗浄緩衝液が、約５０ｍＭの３－（Ｎ－モルホリノ）プロパンスルホン酸（ＭＯＰＳ）及び１２５ｍＭの酢酸塩を含む、実施態様３２０または３２１に記載の方法。

［実施態様３２３］

前記疎水性相互作用クロマトグラフィーが、装填後にＨＩＣ洗浄緩衝液で洗浄される、実施態様３１６～３２２のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３２４］

前記疎水性相互作用溶出物が、プールされ、前記溶出物のＯＤ$_{２８０}$が、約０．５超～約１．０である、実施態様３０６～３２３のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３２５］

陰イオン交換クロマトグラフィーが、四級アミンを含む、実施態様２４３、２４４、または２４７～３２４のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３２６］

前記陰イオン交換クロマトグラフィーが、架橋アガロースに結合している四級アミンを含む、実施態様３２５に記載の方法。

［実施態様３２７］

前記混合モード陰イオン交換クロマトグラフィーが、ＱＳＦＦクロマトグラフィーである、実施態様３２６に記載の方法。

［実施態様３２８］

前記陰イオン交換クロマトグラフィーが、陰イオン交換事前平衡化緩衝液、陰イオン交換平衡化緩衝液、または陰イオン交換装填緩衝液のうちの１つ以上を使用し、前記陰イオン交換事前平衡化緩衝液、前記陰イオン交換平衡化緩衝液、及び／または陰イオン交換前記装填緩衝液が、約ｐＨ８～約ｐＨ９である、実施態様３２５～３２７のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３２９］

前記陰イオン交換事前平衡化緩衝液、前記陰イオン交換平衡化緩衝液、及び／または前記陰イオン交換装填緩衝液が、約ｐＨ８．５である、実施態様３２８に記載の方法。

［実施態様３３０］

前記陰イオン交換事前平衡化緩衝液が、約５０ｍＭのＴｒｉｓ及び約５００ｍＭの酢酸ナトリウムまたは約１００ｍＭの酢酸ナトリウムを含む、実施態様３２８または３２９に記載の方法。

［実施態様３３１］

前記陰イオン交換平衡化緩衝液が、約５０ｍＭのＴｒｉｓを含む、実施態様３２８～３３０のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３３２］

前記陰イオン交換クロマトグラフィーが、装填後に陰イオン交換平衡化緩衝液で洗浄される、実施態様３２８～３３１のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３３３］

前記ポリペプチドまたは多重特異性抗体が、塩勾配によって前記陰イオン交換クロマトグラフィーから溶出される、実施態様３２８～３３２のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３３４］

前記ポリペプチドまたは多重特異性抗体が、増加した塩濃度を有する陰イオン交換溶出緩衝液を前記陰イオン交換クロマトグラフィーに適用することによって、前記陰イオン交換クロマトグラフィーから溶出される、実施態様３２８～３３３のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３３５］

前記陰イオン交換溶出緩衝液が、約５０ｍＭのＴｒｉｓ及び約１００ｍＭの酢酸ナトリ

ウム（約ｐＨ８．５）を含む、実施態様３３４に記載の方法。
［実施態様３３６］
前記陰イオン交換溶出物が、プールされ、前記溶出物のＯＤ$_{２８０}$が、約０．５超～約１．０である、実施態様３２８～３３５のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３３７］
前記ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーが、セラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーである、実施態様２６７～２８０のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３３８］
前記ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーが、ＣＨＴ　Ｉ型セラミックヒドロキシアパプタイト（ｈｙｄｒｏｘｙａｐａｐｔｉｔｅ）クロマトグラフィーである、実施態様３３７に記載の方法。
［実施態様３３９］
前記ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーが、ヒドロキシアパタイト緩衝液Ａまたはヒドロキシアパタイト緩衝液Ｂのうちの１つ以上を使用し、前記ヒドロキシアパタイト緩衝液Ｂが、ヒドロキシアパタイト緩衝液Ａと比較してより高い伝導度を有する、実施態様３３７または３３８に記載の方法。
［実施態様３４０］
前記ヒドロキシアパタイト緩衝液Ａが、約１０ｍＭのリン酸ナトリウム（約ｐＨ６．８）を含む平衡化緩衝液である、実施態様３３９に記載の方法。
［実施態様３４１］
前記ヒドロキシアパタイト緩衝液Ｂが、約１０ｍＭのリン酸ナトリウム及び約１Ｍ塩化ナトリウム（約ｐＨ６．８）を含む、実施態様３３９または３４０に記載の方法。
［実施態様３４２］
前記ポリペプチドまたは多重特異性抗体が、ヒドロキシアパタイト緩衝液Ａ中のヒドロキシアパタイト緩衝液Ｂの勾配を使用して、ヒドロキシアパタイド（ｈｙｄｒｏｘｙａｐａｐｔｉｄｅ）クロマトグラフィーから溶出される、実施態様３３９～３４１のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３４３］
前記勾配が、線形勾配である、実施態様３４２に記載の方法。
［実施態様３４４］
前記勾配が、０％のヒドロキシアパプタイト緩衝液Ｂから１００％のヒドロキシアパプタイト緩衝液Ｂへと増加する、実施態様３４２または３４３に記載の方法。
［実施態様３４５］
前記勾配が、約２０カラム体積中、０％のヒドロキシアパプタイト緩衝液Ｂから１００％のヒドロキシアパプタイト緩衝液Ｂへと増加する、実施態様３４２～３４４のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３４６］
前記ヒドロキシアパタイト溶出物が、プールされ、前記溶出物のＯＤ$_{２８０}$が、約０．５超～約１．０である、実施態様３３７～３４５のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３４７］
陽イオン交換クロマトグラフィーが、カルボン酸部分またはスルホン酸部分を含む、実施態様２４５～２４６または２５６～３２６のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３４８］
前記カルボン酸部分または前記スルホン酸部分が、スルホプロピル、スルホエチル、スルホイソブチル、またはカルボキシル部分である、実施態様３４７に記載の方法。
［実施態様３４９］
前記陽イオン交換クロマトグラフィーが、架橋アガロースに結合しているカルボン酸部分またはスルホン酸部分を含む、実施態様３４７または３４８のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３５０］
前記陽イオン交換材料が、ＰＯＲＯＳ（登録商標）ＨＳ５０、ＰＯＲＯＳ（登録商標）

ＨＳ２０、ＳＯ３ Ｍｏｎｏｌｉｔｈ、Ｓ Ｃｅｒａｍｉｃ ＨｙｐｅｒＤ、スルホプロピル－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ（ＳＰＳＦＦ）、ＳＰ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）ＸＬ（ＳＰＸＬ）、ＣＭ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗ、Ｃａｐｔｏ（商標）Ｓ、Ｆｒａｃｔｏｇｅｌ Ｓｅ ＨｉＣａｐ、Ｆｒａｃｔｏｇｅｌ ＳＯ３、またはＦｒａｃｔｏｇｅｌ ＣＯＯである、実施態様３４８または３４９に記載の方法。

［実施態様３５１］

前記陽イオン交換装填密度が、約２０ｇ／Ｌ未満である、実施態様３４７～３５０のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３５２］

前記陽イオン交換クロマトグラフィーが、陽イオン交換事前平衡化緩衝液、陽イオン交換平衡化緩衝液、陽イオン交換装填緩衝液、または陽イオン交換洗浄緩衝液のうちの１つ以上を使用し、前記陽イオン交換事前平衡化緩衝液、前記陽イオン交換平衡化緩衝液、前記陽イオン交換装填緩衝液、及び／または陽イオン交換洗浄緩衝液が、約ｐＨ５．０～約ｐＨ６．０である、実施態様３４７～３５１のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３５３］

前記陽イオン交換陽イオン交換、前記平衡化緩衝液、前記陽イオン交換装填緩衝液、及び／または陽イオン交換洗浄緩衝液が、約ｐＨ５．５または約ｐＨ５．８である、実施態様３５２に記載の方法。

［実施態様３５４］

前記陽イオン交換平衡化緩衝液が、５０ｍＭの酢酸ナトリウムを含む、実施態様３５２または３５３に記載の方法。

［実施態様３５５］

前記陽イオン交換洗浄緩衝液が、５０ｍＭの酢酸ナトリウムを含む、実施態様３５２～３５４のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３５６］

前記陽イオン交換クロマトグラフィーが、装填後に平衡化緩衝液で洗浄される、実施態様３５２～３５５のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３５７］

前記ポリペプチドまたは多重特異性抗体が、塩勾配によって前記陽イオン交換クロマトグラフィーから溶出される、実施態様３５２～３５６のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３５８］

前記ポリペプチドまたは多重特異性抗体が、増加した塩濃度を有する陽イオン交換溶出緩衝液を前記陽イオン交換クロマトグラフィーに適用することによって、前記陽イオン交換クロマトグラフィーから溶出される、実施態様３５２～３５７のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３５９］

前記陽イオン交換溶出緩衝液が、５００ｍＭの酢酸ナトリウム（約ｐＨ５．８）を含む、実施態様３５８に記載の方法。

［実施態様３６０］

前記溶出が、１０％～１００％の陽イオン交換溶出緩衝液の勾配溶出である、実施態様３５９に記載の方法。

［実施態様３６１］

前記陽イオン交換溶出物が、プールされ、前記溶出物のＯＤ$_{２８０}$が、約０．５超～約１．０である、実施態様３５２～３６０のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３６２］

前記ポリペプチドまたは前記多重特異性抗体が、細胞内で産生される、実施態様２５１～３６１のいずれかーに記載の方法。

［実施態様３６３］

前記多重特異性抗体の前記アームが、細胞内で産生される、実施態様３６１に記載の方

法。
［実施態様３６４］
前記細胞が、原核生物細胞である、実施態様３６２または３６３に記載の方法。
［実施態様３６５］
前記原核生物細胞が、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞である、実施態様３６４に記載の方法。
［実施態様３６６］
前記細胞が、１つ以上のシャペロンを発現するように操作される、実施態様３６４または３６５に記載の方法。
［実施態様３６７］
前記シャペロンが、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、またはＤｓｂＣのうちの１つ以上である、実施態様３６６に記載の方法。
［実施態様３６８］
前記シャペロンが、Ｅ．ｃｏｌｉシャペロンである、実施態様３６６または３６７に記載の方法。
［実施態様３６９］
前記細胞が溶解されて、前記ポリペプチドまたは前記多重特異性抗体を含む細胞溶解物を生成する、実施態様３６２～３６８のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３７０］
前記細胞が溶解されて、タンパク質Ａクロマトグラフィー前に前記多重特異性抗体または前記多重特異性抗体のアームを含む細胞溶解物を生成する、実施態様３６９に記載の方法。
［実施態様３７１］
前記細胞が、微小流動化剤を使用して溶解される、実施態様３６９または３７０に記載の方法。
［実施態様３７２］
ポリエスリエンイミン（ｐｏｌｙｅｔｈｌｙｅｎｅｉｍｉｎｅ）（ＰＥＩ）が、クロマトグラフィー前に前記細胞溶解物に添加される、実施態様３６９～３７１のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３７３］
前記ＰＥＩが、約０．４％の最終濃度になるまで前記溶解物に添加される、実施態様３７２に記載の方法。
［実施態様３７４］
前記細胞溶解物が、遠心分離によって浄化される、実施態様３６９～３７３のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３７５］
前記産物特異的不純物が、非対合抗体アーム、抗体ホモ二量体、凝集体、高分子量種（ＨＭＷ）、低分子量種（ＬＭＷ）、酸性変異形、または塩基性変異形のうちの１つ以上である、実施態様２５１～３７３のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３７６］
前記方法が、前記組成物中のＥ．ｃｏｌｉタンパク質（ＥＣＰ）、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、ＤｓｂＣ、浸出タンパク質Ａ、核酸、細胞培養培地成分、またはウイルス不純物のうちのいずれか１つの量を低減する、実施態様２５１～３７５のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３７７］
前記多重特異性抗体が、二重特異性抗体である、実施態様２３２～２４５、２４７～２５７、２５９～２６７、または２６９～３７６のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３７８］
前記多重特異性抗体の第１のアームが、ＩＬ１３に結合する、実施態様３７７に記載の方法。
［実施態様３７９］
前記ＩＬ１３が、ヒトＩＬ１３である、実施態様３７８に記載の方法。

［実施態様３８０］
前記ＩＬ１３が、配列番号１または配列番号２のアミノ酸配列を含む、実施態様３７８または３７９に記載の方法。
［実施態様３８１］
前記多重特異性抗体の前記第１のアームが、配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号１０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、実施態様３７８～３８０のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３８２］
前記多重特異性抗体の前記第１のアームが、配列番号１３のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号１４のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む、実施態様３７８～３８１のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３８３］
前記多重特異性抗体の前記第１のアームが、配列番号１５のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施態様３７８～３８２のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３８４］
前記多重特異性抗体の前記第１のアームが、配列番号１６のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施態様３７８～３８３のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３８５］
前記多重特異性抗体の前記第１のアームが、配列番号１７のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、実施態様３７８～３８４のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３８６］
前記抗体の第２のアームが、ＩＬ１７に結合する、実施態様３７８～３８５のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３８７］
前記ＩＬ１７が、ヒトＩＬ１７である、実施態様３８６に記載の方法。
［実施態様３８８］
前記ＩＬ１７が、配列番号３、配列番号４、配列番号５、または配列番号６のアミノ酸配列を含む、実施態様３８６または３８７に記載の方法。
［実施態様３８９］
前記多重特異性抗体の第２のアームが、配列番号１８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号１９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号２０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、配列番号２１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、実施態様３８６～３８８のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３９０］
前記多重特異性抗体の前記第２のアームが、配列番号２５のアミノ酸配列を含むＶＨ配列、及び配列番号２６のアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含む、実施態様３８６～３８９のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３９１］
前記多重特異性抗体の前記第２のアームが、配列番号２７のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施態様３８６～３９０のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３９２］
前記多重特異性抗体の前記第２のアームが、配列番号２８のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施態様３８６～３９１のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３９３］
前記多重特異性抗体の前記第２のアームが、配列番号２９のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、実施態様３８６～３９３のいずれかーに記載の方法。
［実施態様３９４］

実施態様２３１～３９３のいずれか一に記載の方法によって精製されたポリペプチドまたは多重特異性抗体を含む、組成物であって、約５％、４％、３％、２％、または１％以下の産物特異的不純物を含む、前記組成物。

［実施態様３９５］

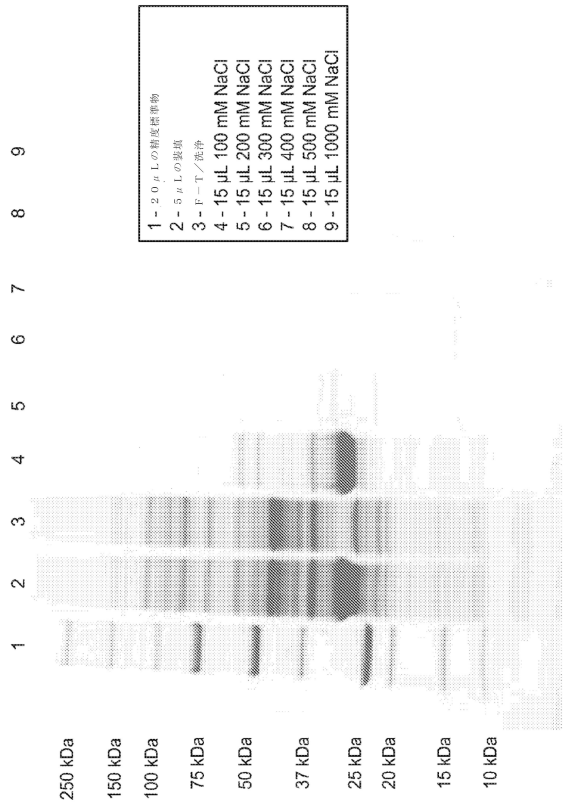
前記産物特異的不純物が、非対合抗体アーム、抗体ホモ二量体、凝集体、高分子量種（ＨＭＷ）、低分子量種（ＬＭＷ）、酸性変異形、または塩基性変異形のうちの１つ以上である、実施態様３９４に記載の組成物。

［実施態様３９６］

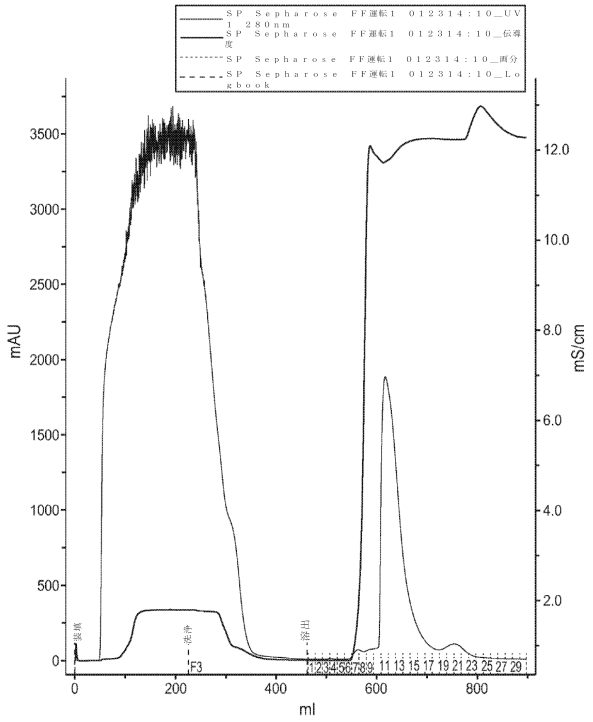
前記組成物が、約未満を含み、組成物が、前記組成物中、約５％、４％、３％、２％、または１％以下のＥ．ｃｏｌｉタンパク質（ＥＣＰ）、ＦｋｐＡ、ＤｓｂＡ、ＤｓｂＣ、浸出タンパク質Ａ、核酸、細胞培養培地成分、またはウイルス不純物のうちのいずれか１つを含む、実施態様３９４または３９５に記載の組成物。

【図面】

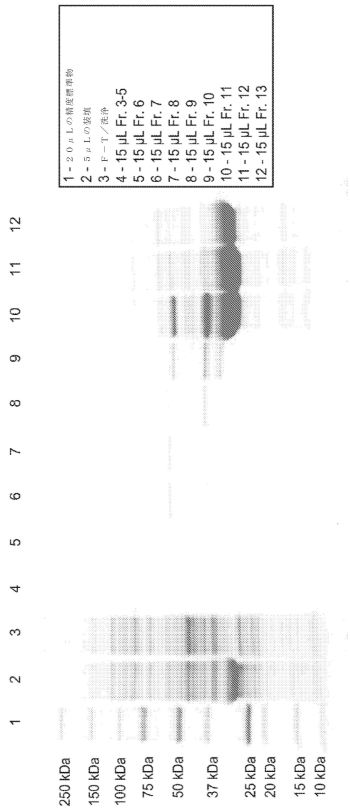
【図１】



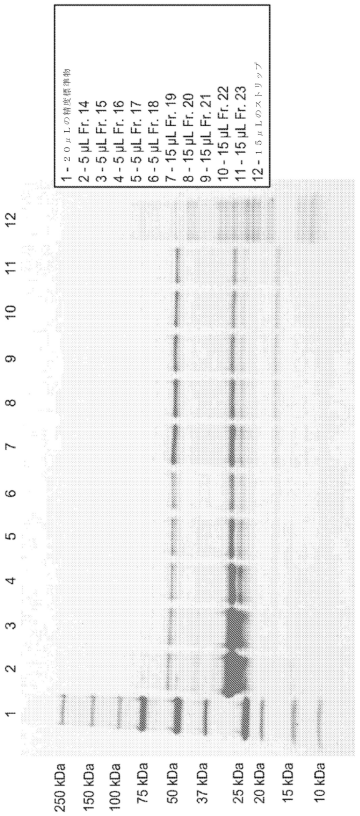
【図２】



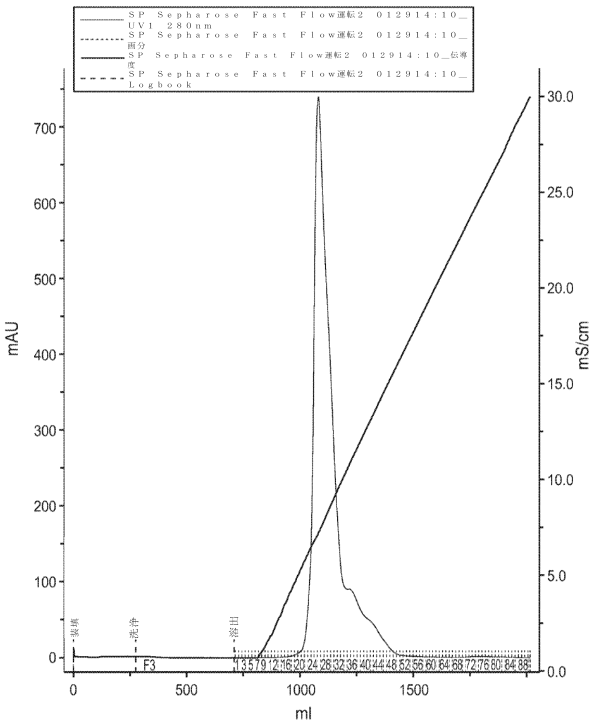
【図３Ａ】


1 - 20μLの精度標準物
2 - 5μLの装填
3 - F－T／洗浄
4 - 15 μL Fr. 3-5
5 - 15 μL Fr. 6
6 - 15 μL Fr. 7
7 - 15 μL Fr. 8
8 - 15 μL Fr. 9
9 - 15 μL Fr. 10
10 - 15 μL Fr. 11
11 - 15 μL Fr. 12
12 - 15 μL Fr. 13
250 kDa
150 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa
20 kDa
15 kDa
10 kDa

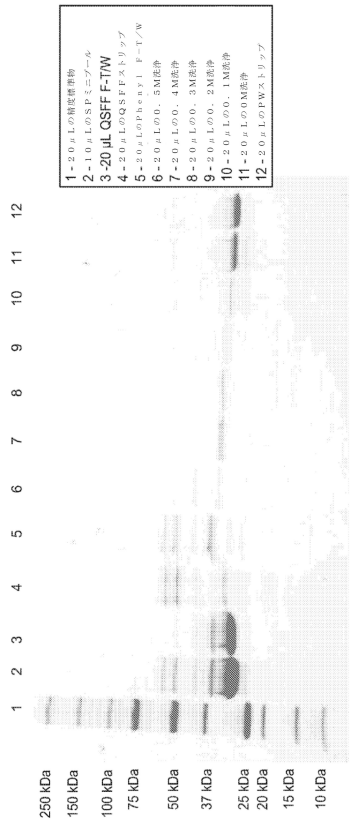
【図３Ｂ】


1 - 20μLの精度標準物
2 - 5 μL Fr. 14
3 - 5 μL Fr. 15
4 - 5 μL Fr. 16
5 - 5 μL Fr. 17
6 - 5 μL Fr. 18
7 - 15 μL Fr. 19
8 - 15 μL Fr. 20
9 - 15 μL Fr. 21
10 - 15 μL Fr. 22
11 - 15 μL Fr. 23
12 - 15μLのストリップ
250 kDa
150 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa
20 kDa
15 kDa
10 kDa

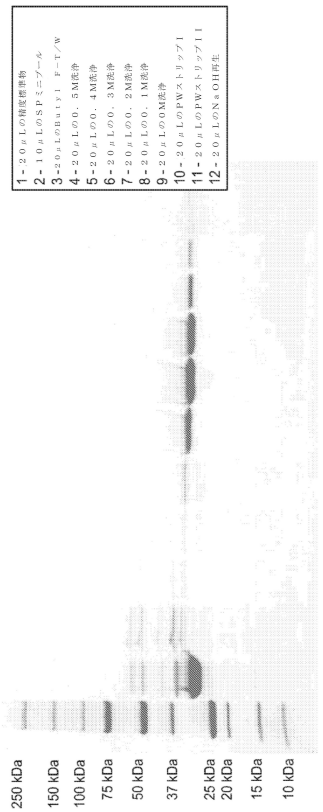
【図４】


SP Sepharose Fast Flow運転2 012914:10_ UV1 280nm
SP Sepharose Fast Flow運転2 012914:10_ 画分
SP Sepharose Fast Flow運転2 012914:10_伝導
SP Sepharose Fast Flow運転2 012914:10_ Logbook
mAU
mS/cm
ml
装填
洗浄
溶出
F3

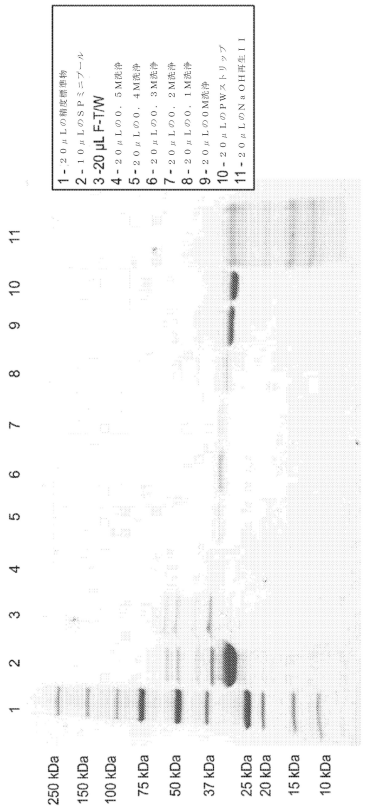
【図５】


1 - 20μLの精度標準物
2 - 10μLのSPミニプール
3 -20 μL QSFF F-T/W
4 - 20μLのQSFFストリップ
5 - 20μLのPhenyl F－T／W
6 - 20μLの0．5M洗浄
7 - 20μLの0．4M洗浄
8 - 20μLの0．3M洗浄
9 - 20μLの0．2M洗浄
10 - 20μLの0．1M洗浄
11 - 20μLの0M洗浄
12 - 20μLのPWストリップ
250 kDa
150 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa
20 kDa
15 kDa
10 kDa

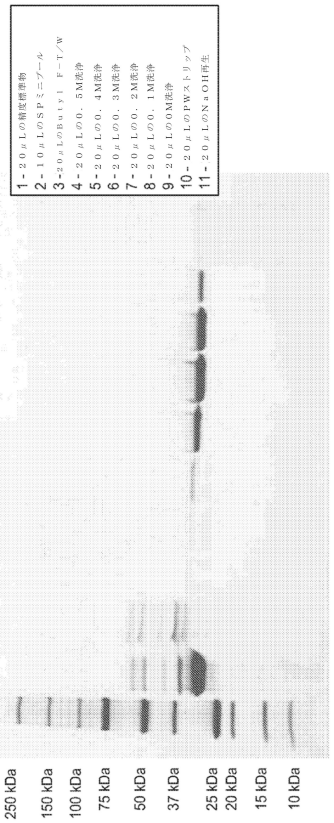
【図６】


1 - 20μLの精度標準物
2 - 10μLのSPミニプール
3 -20μLのButyl F-T/W
4 - 20μLの0．5M洗浄
5 - 20μLの0．4M洗浄
6 - 20μLの0．3M洗浄
7 - 20μLの0．2M洗浄
8 - 20μLの0．1M洗浄
9 - 20μLの0M洗浄
10 - 20μLのPWストリップ1
11 - 20μLのPWストリップ11
12 - 20μLのNaOH再生
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
250 kDa
150 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa
20 kDa
15 kDa
10 kDa

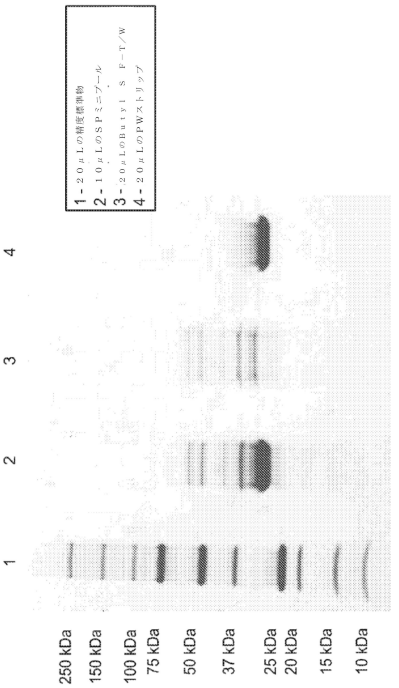
【図７Ａ】


1 - 20μLの精度標準物
2 - 10μLのSPミニプール
3 -20 μL F-T/W
4 - 20μLの0．5M洗浄
5 - 20μLの0．4M洗浄
6 - 20μLの0．3M洗浄
7 - 20μLの0．2M洗浄
8 - 20μLの0．1M洗浄
9 - 20μLの0M洗浄
10 - 20μLのPWストリップ
11 - 20μLのNaOH再生11
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
250 kDa
150 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa
20 kDa
15 kDa
10 kDa

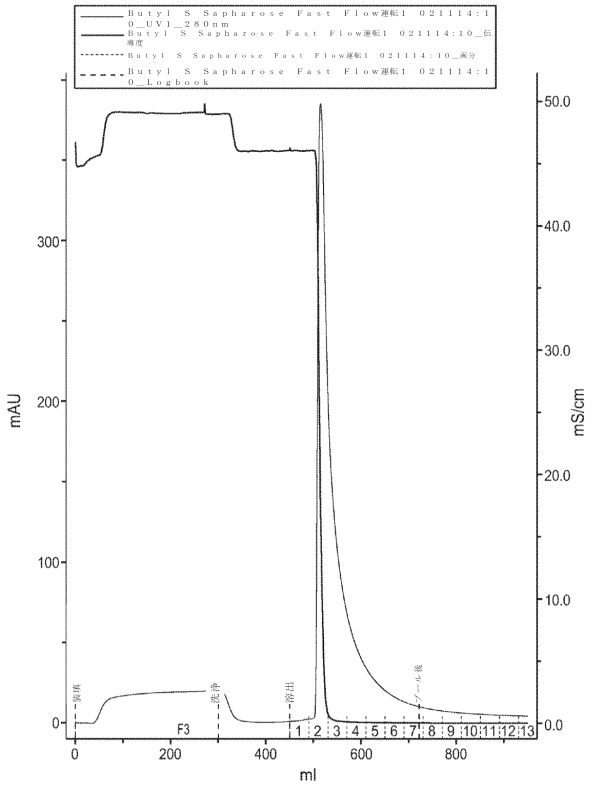
【図７Ｂ】


1 - 20μLの精度標準物
2 - 10μLのSPミニプール
3 -20μLのButyl F-T/W
4 - 20μLの0．5M洗浄
5 - 20μLの0．4M洗浄
6 - 20μLの0．3M洗浄
7 - 20μLの0．2M洗浄
8 - 20μLの0．1M洗浄
9 - 20μLの0M洗浄
10 - 20μLのPWストリップ
11 - 20μLのNaOH再生
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
250 kDa
150 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa
20 kDa
15 kDa
10 kDa

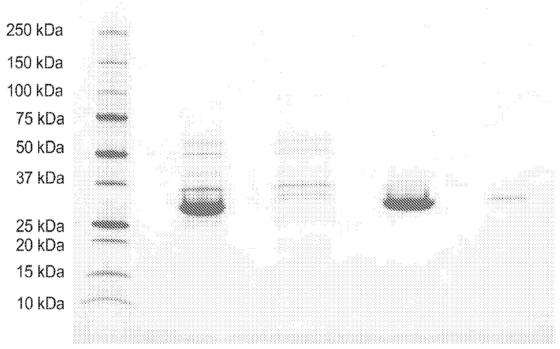
【図８】


1 - 20μLの精度標準物
2 - 10μLのSPミニプール
3 - 20μLのButyl S F-T/W
4 - 20μLのPWストリップ
1 2 3 4
250 kDa
150 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa
20 kDa
15 kDa
10 kDa

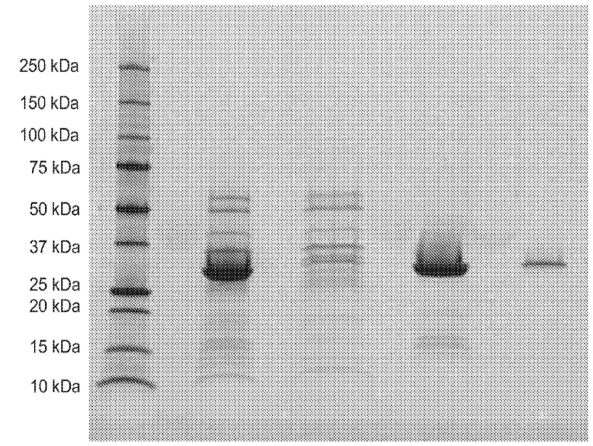
【図９】



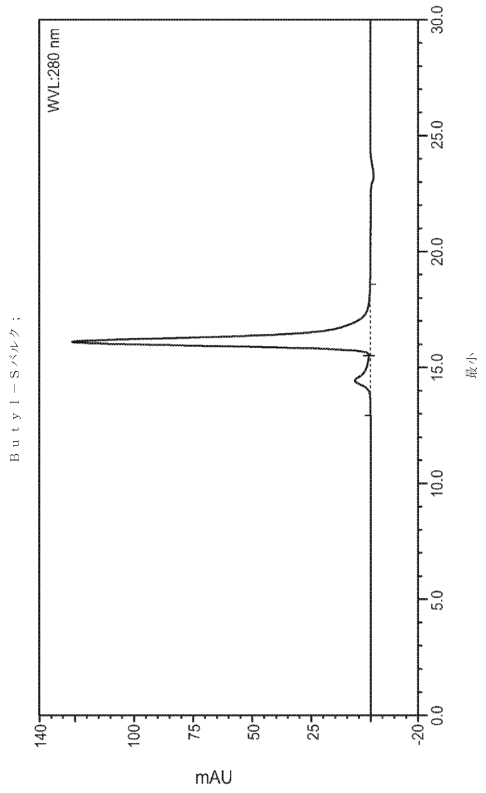
【図１０Ａ】



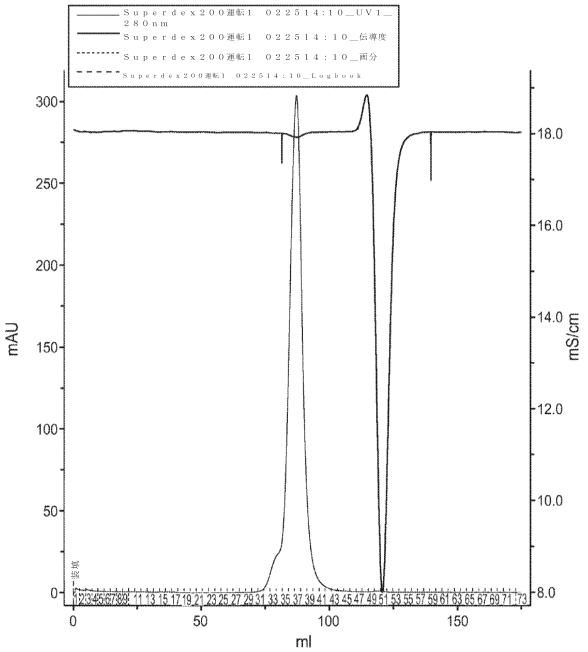
【図１０Ｂ】



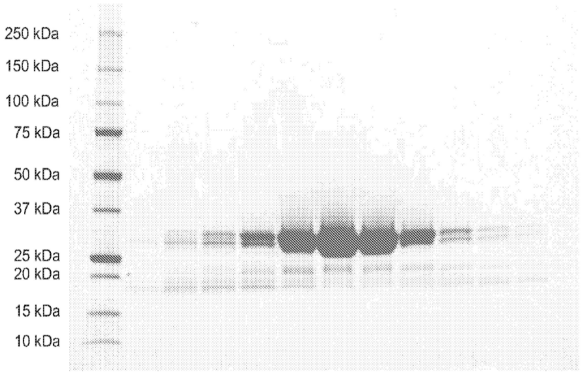
【図１１】



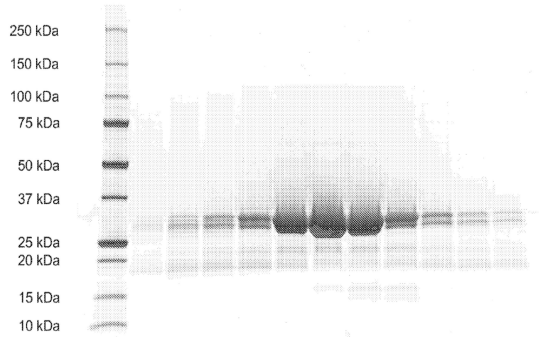
【図１２】



【図１３Ａ】

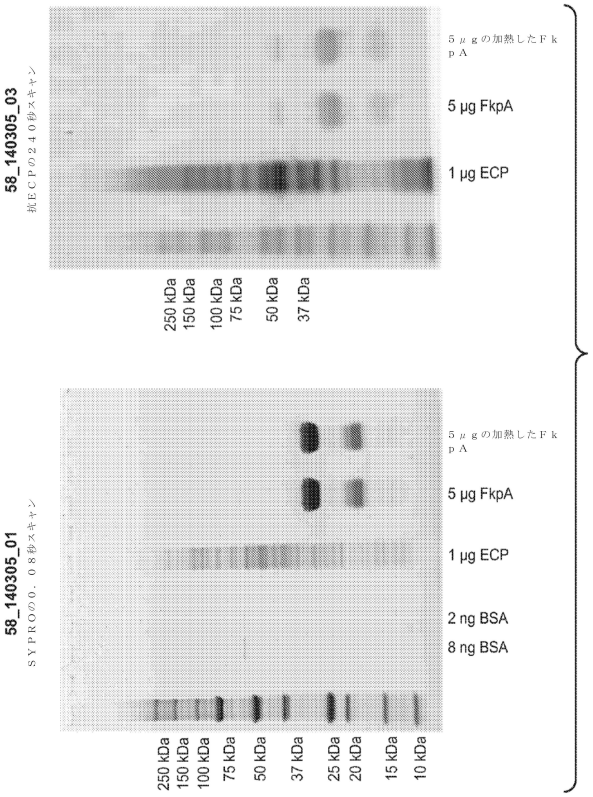


【図１３Ｂ】

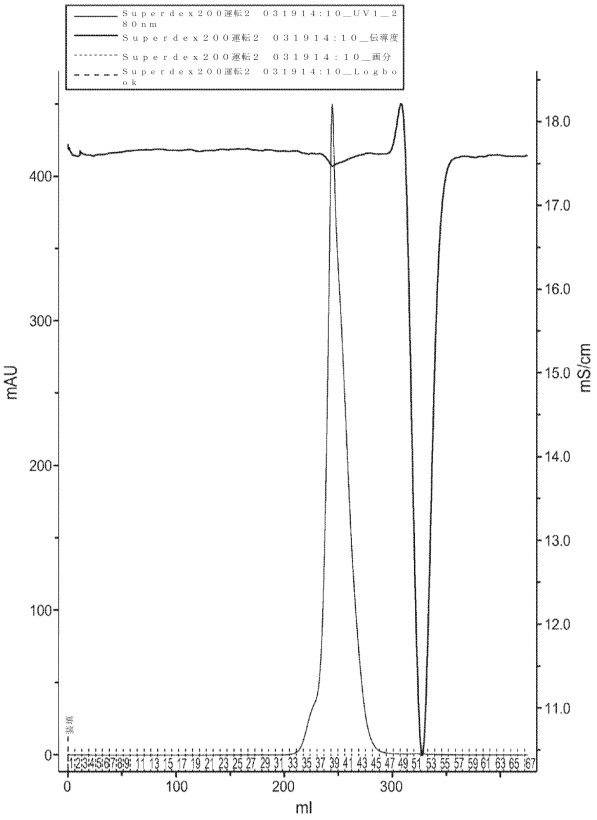


レーン	試料説明	試料μL	μL 4x SB	参照物	レーン	試料説明	試料μL	μL 4x SB	参照物
1					8	Fr. 37	20	10	加熱なし
2	精度標準物	20		Bio-Rad	9	Fr. 38	20	10	加熱なし
3	Fr. 32	20	10	加熱なし	10	Fr. 39	20	10	加熱なし
4	Fr. 33	20	10	加熱なし	11	Fr. 40	20	10	加熱なし
5	Fr. 34	20	10	加熱なし	12	Fr. 41	20	10	加熱なし
6	Fr. 35	20	10	加熱なし	13	Fr. 42	20	10	加熱なし
7	Fr. 36	20	10	加熱なし	14				
						低減：なし			
	無染色Bio-Rad	4-20%	12+2						

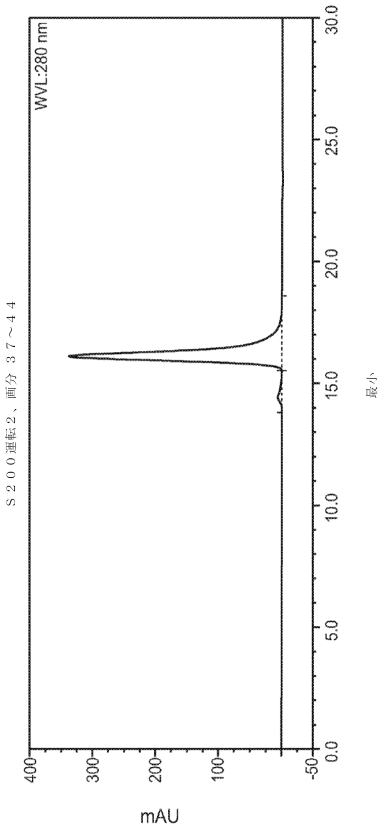
【図１４】



【図１５】

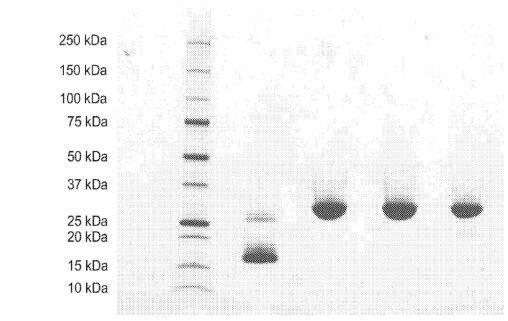


【図１６】

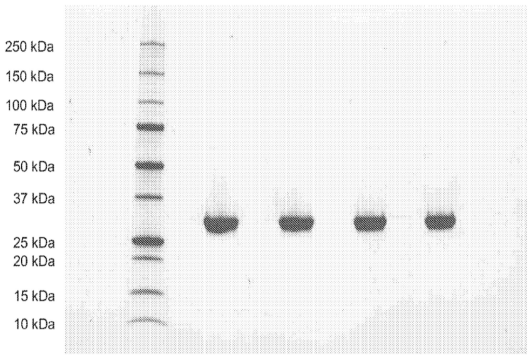


【図１７】

レーン	試料説明	試料μL	μL 4x SB	参照物	レーン	試料説明	試料μL	μL 4x SB	参照物
1					8				
2					9	運転3、画分 37～44	15	5	加熱なし
3	精度標準物	20		Bio-Rad	10				
4					11	運転4、画分 37～44	15	5	加熱なし
5	運転1、画分 35～40	15	5	加熱なし	12				
6					13				
7	運転2、画分 37～44	15	5	加熱なし	14				
	032514					低減：なし			
	無染色Bio-Rad	4-20%	12+2						

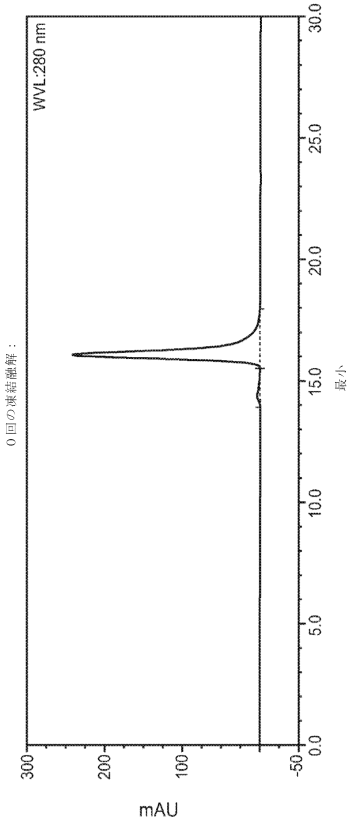


【図１８】

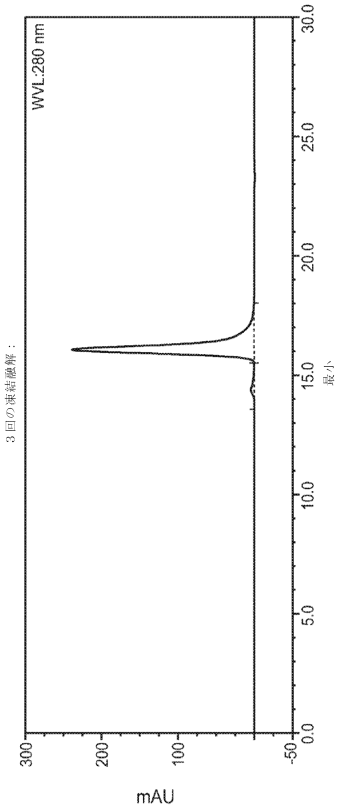


レーン	試料説明	試料μL	μL 4x SB	参照物	レーン	試料説明	試料μL	μL 4x SB	参照物
1					8	1回の凍結融解	5	5	加熱なし
2					9				
3					10	2回の凍結融解	5	5	加熱なし
4	精度標準物	20		Bio-Rad	11				
5					12	3回の凍結融解	5	5	加熱なし
6	0回の凍結融解	5	5	加熱なし	13				
7					14				
						低減：なし			
	無染色Bio-Rad	4-20%	12+2						

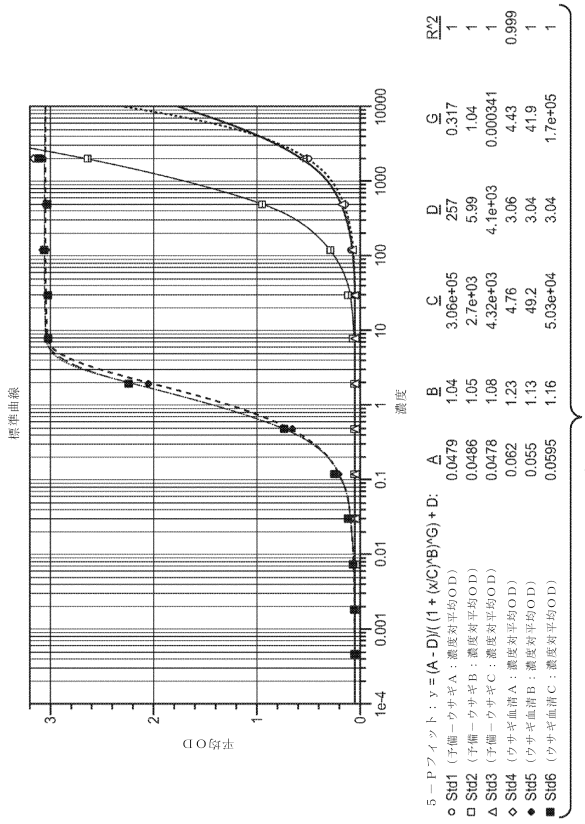
【図１９Ａ】



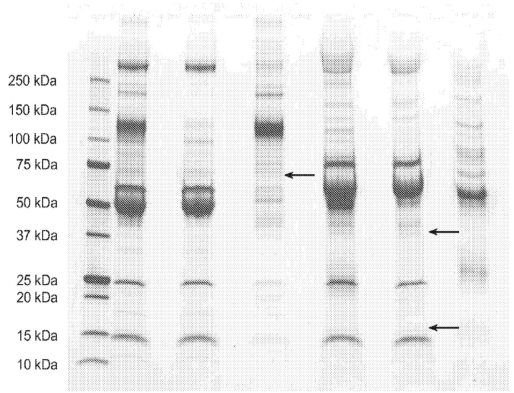
【図１９Ｂ】



【図２０】

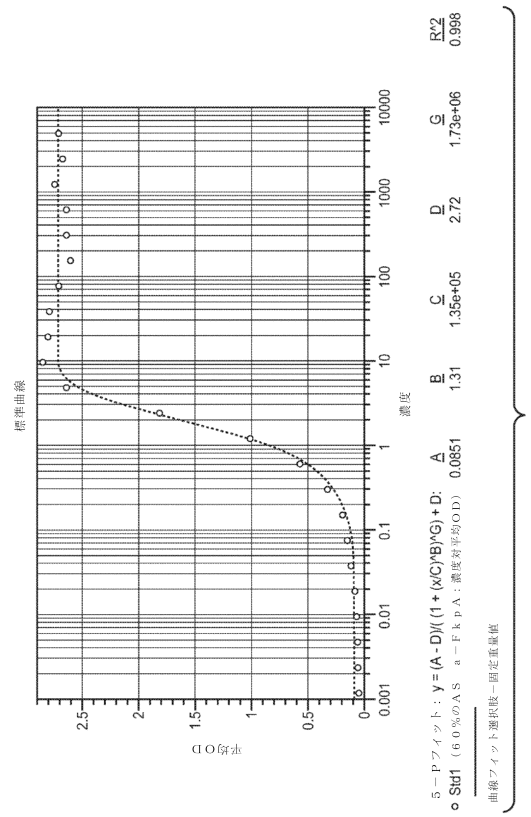


【図２１】

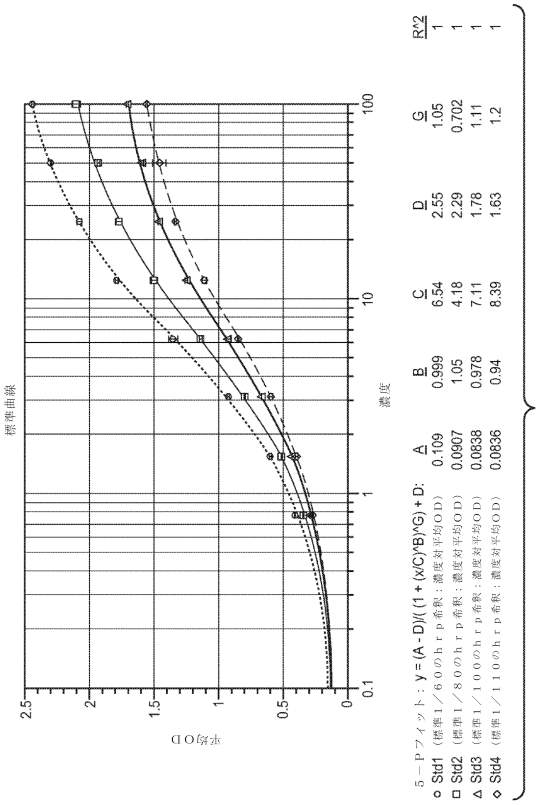


レーン	試料説明	試料μL	μL 4x SB	参照物	レーン	試料説明	試料μL	μL 4x SB	参照物
1					8				
2	精度標準物	20		Bio-Rad	9	６０％の全ＡＳ	10	10	１：１０希釈
3	６０％の全ＡＳ	10	10	１：１０希釈	10				
4					11	６０％のＡＳ上清	10	10	１：１０希釈
5	６０％のＡＳ上清	10	10	１：１０希釈	12				
6					13	６０％のＡＳペレット	10	10	１：１０希釈
7	６０％のＡＳペレット	10	10	１：１０希釈	14				
						拡減：９～１１			
	無染色Ｂｉｏ－Ｒａｄ	4-20%	12+2						

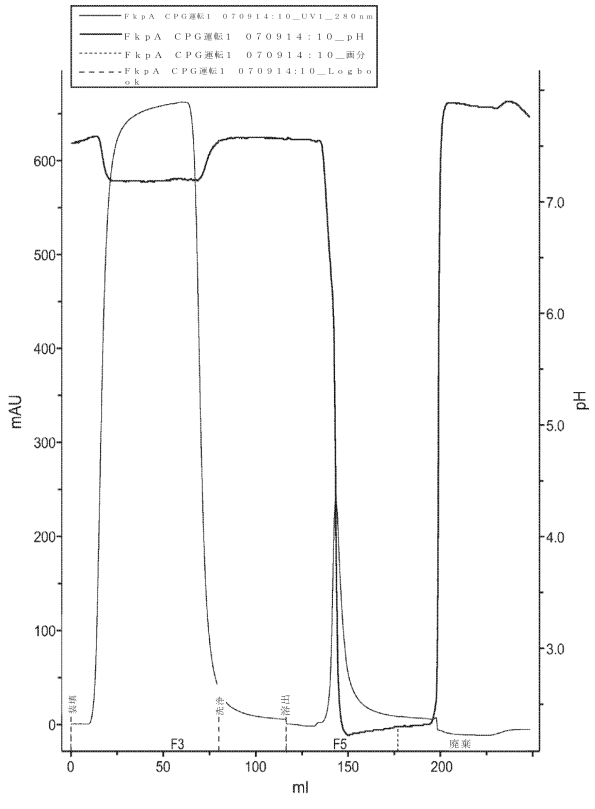
【図２２】



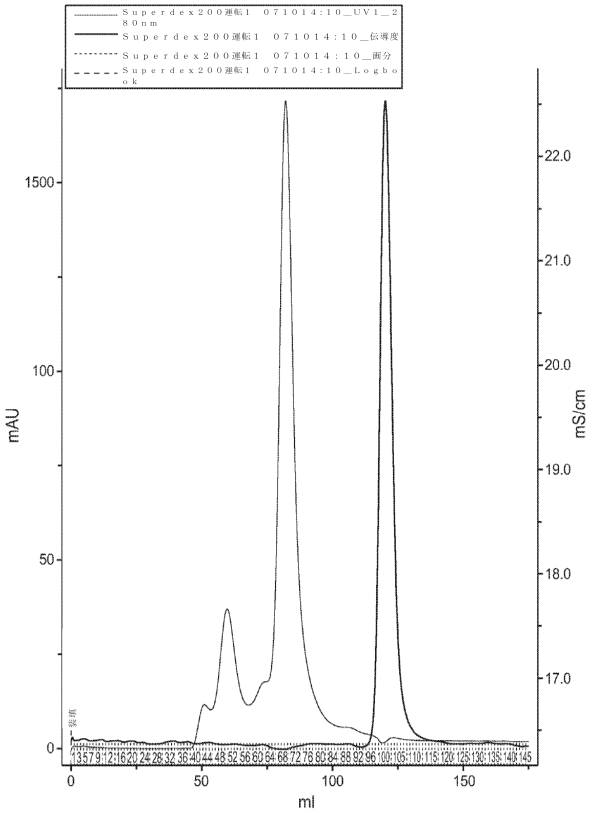
【図２３】



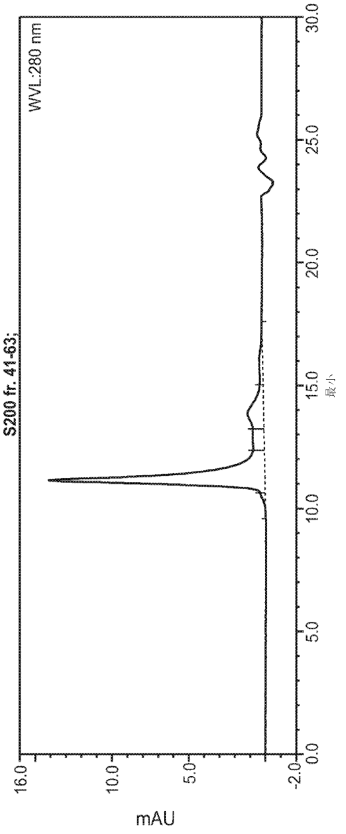
【図２４】



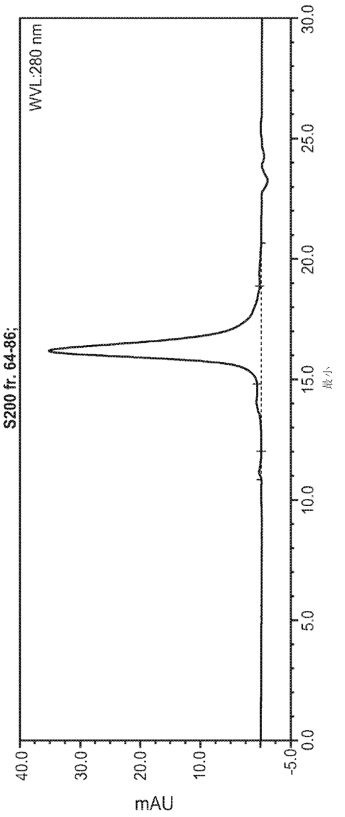
【図２５】



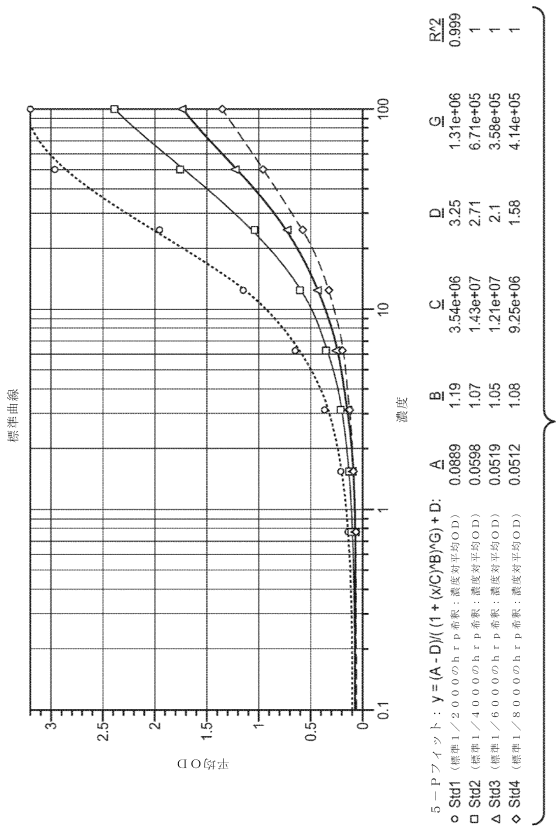
【図２６Ａ】



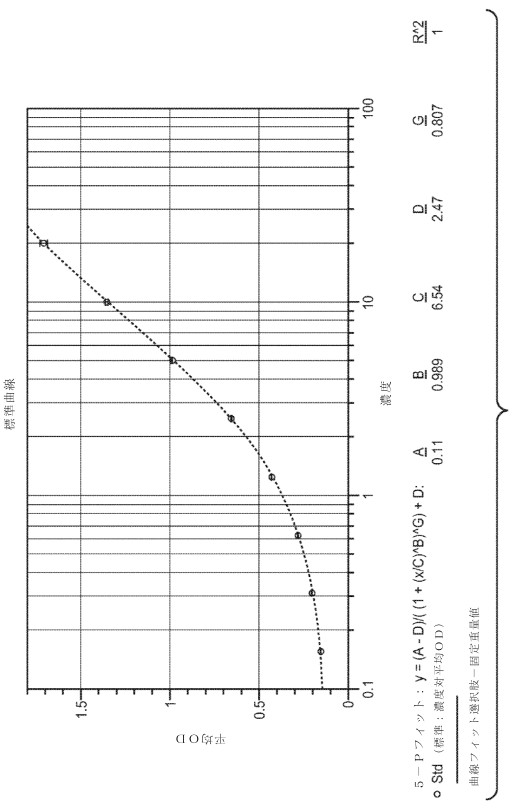
【図２６Ｂ】



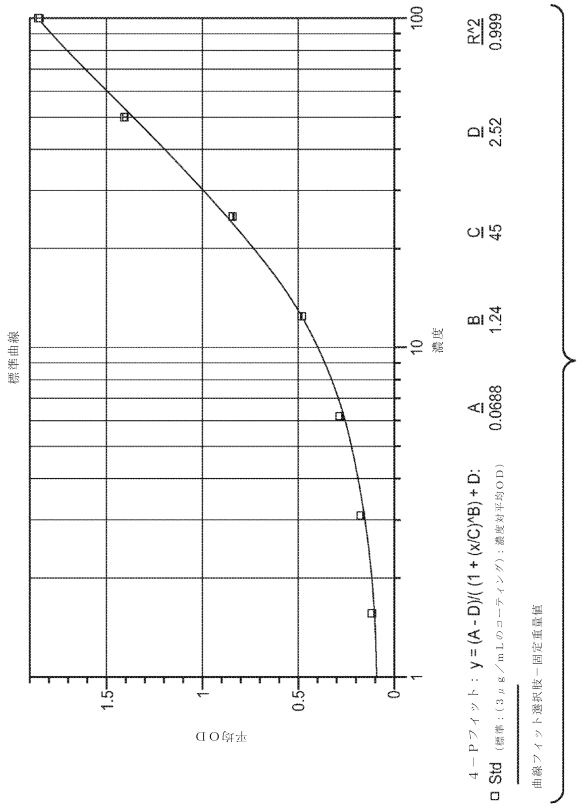
【図２７】



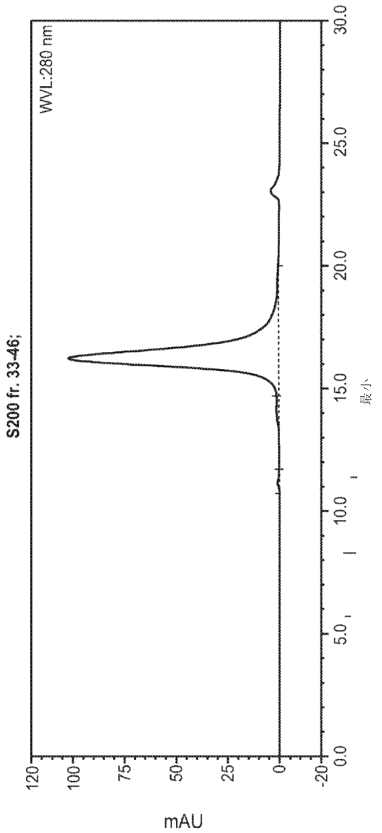
【図２８Ａ】



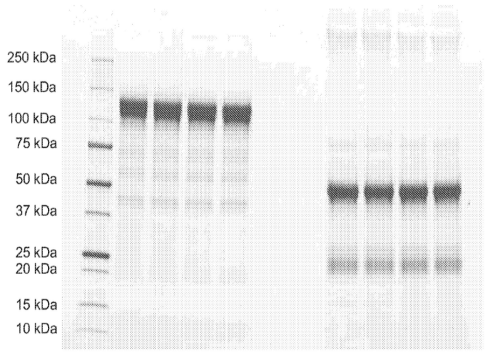
【図２８Ｂ】



【図２９】

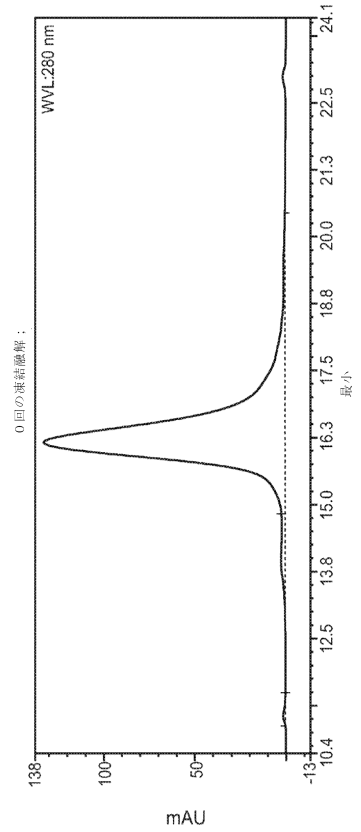


【図３０】

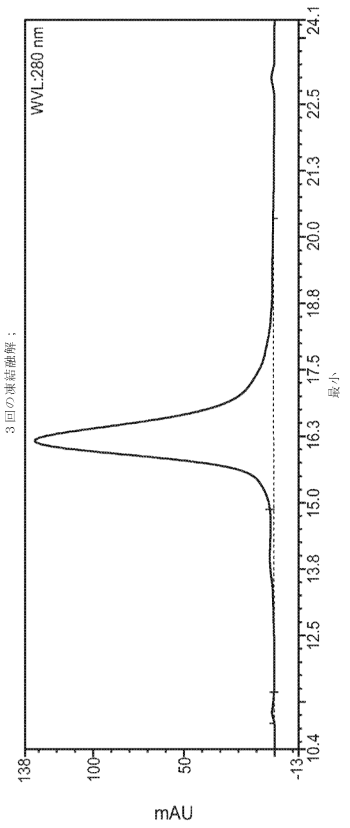


レーン	試料説明	試料μL	μL 4x SB	参照物	レーン	試料説明	試料μL	μL 4x SB	参照物
1					8				
2	精度標準物	20		Ｂｉｏ－Ｒａｄ	9	０回の凍結融解	8.3	7	
3	０回の凍結融解	8.3	7		10	１回の凍結融解	8.3	7	
4	１回の凍結融解	8.3	7		11	２回の凍結融解	8.3	7	
5	２回の凍結融解	8.3	7		12	３回の凍結融解	8.3	7	
6	３回の凍結融解	8.3	7		13				
7					14				
						低減：９～１２			
	事前色Ｂｉｏ－Ｒａｄ	4-20%	12+2						

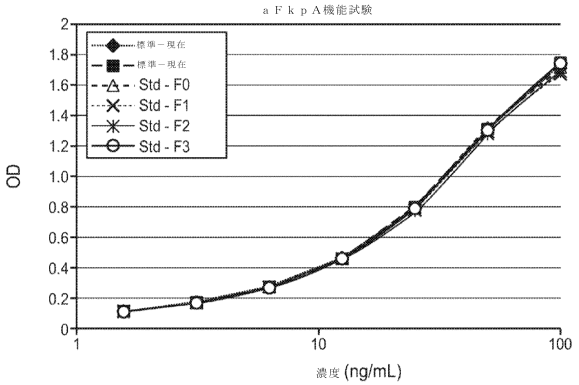
【図３１Ａ】



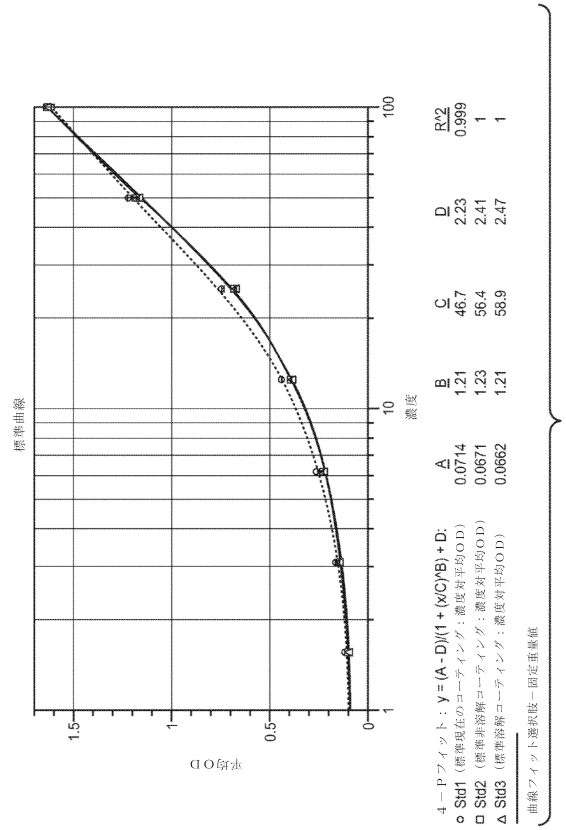
【図３１Ｂ】



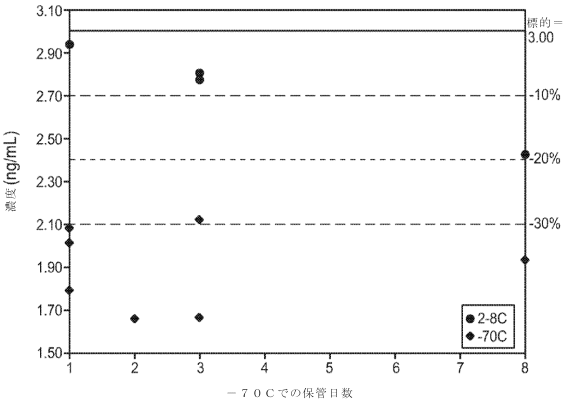
【図３２】



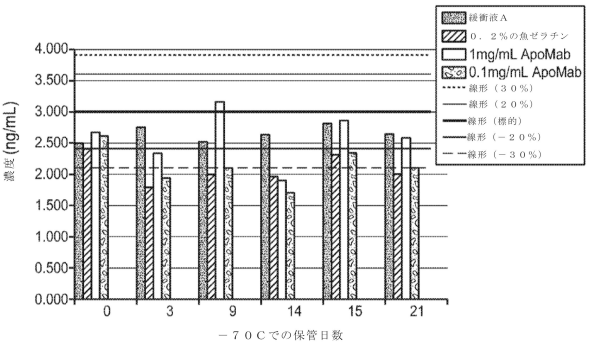
【図３３】



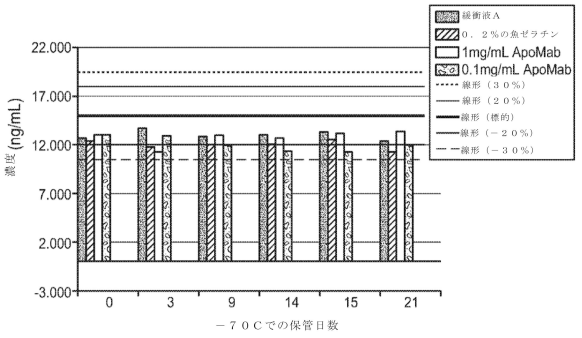
【図３４】



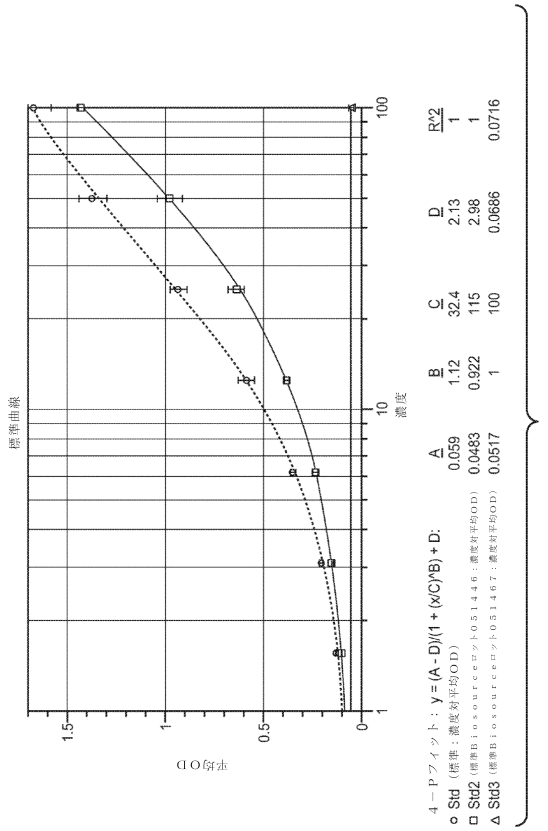
【図３５Ａ】



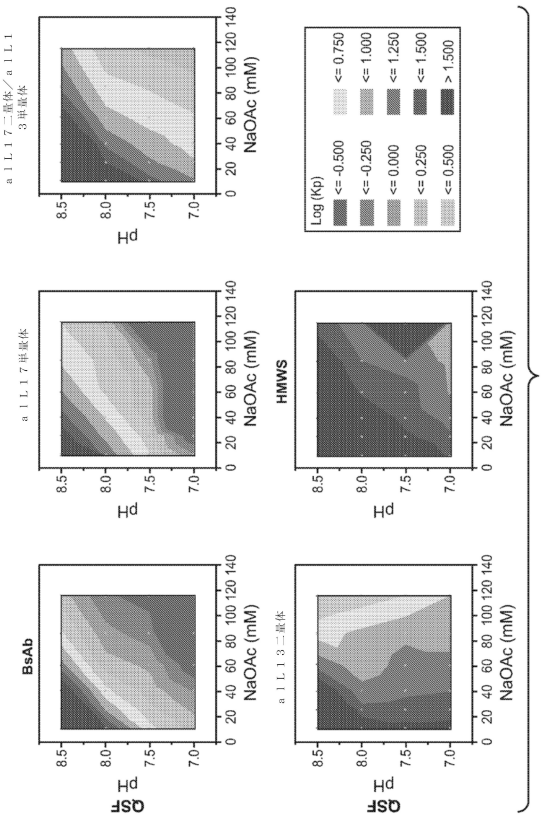
【図３５Ｂ】



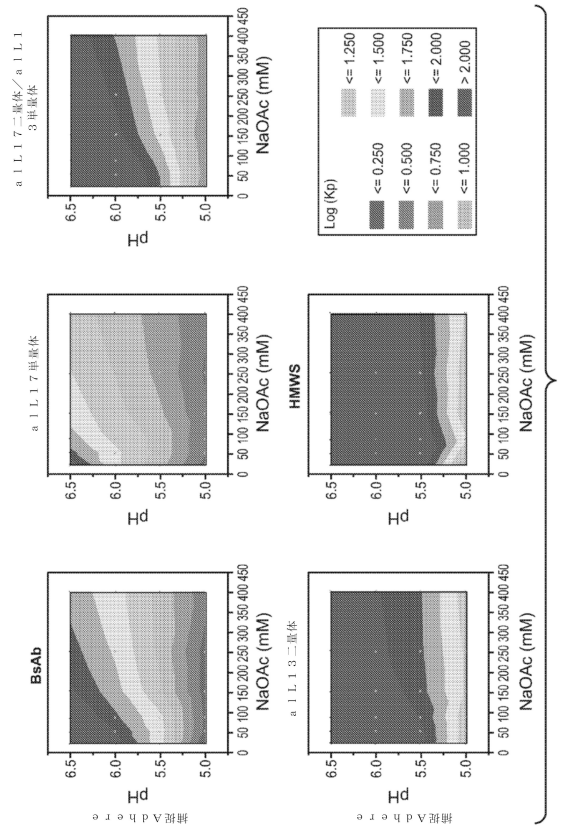
【図３６】



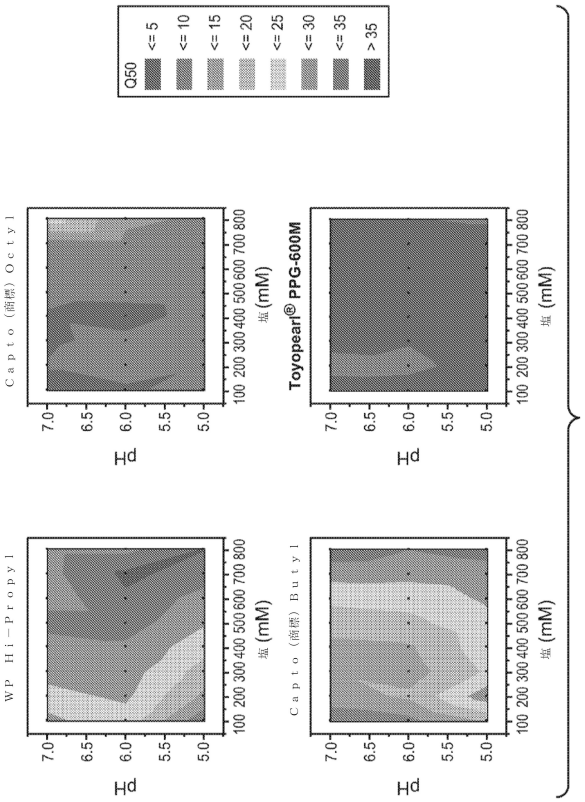
【図３７Ａ】



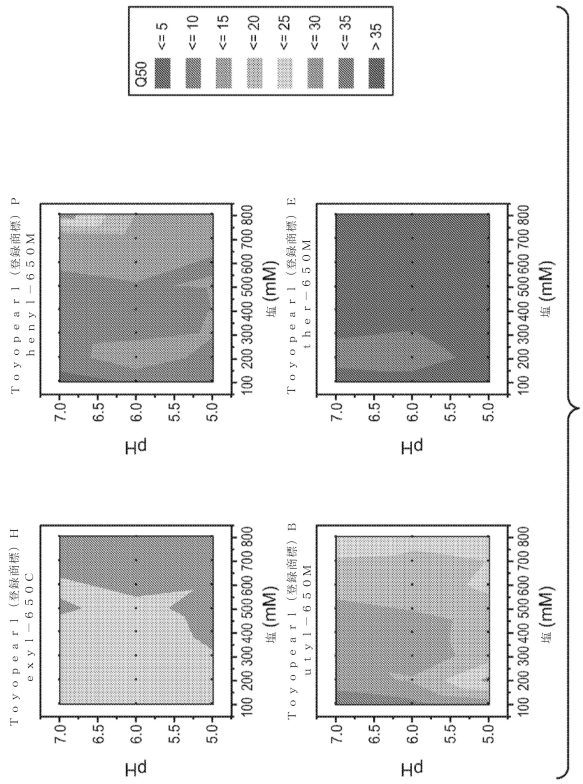
【図３７Ｂ】



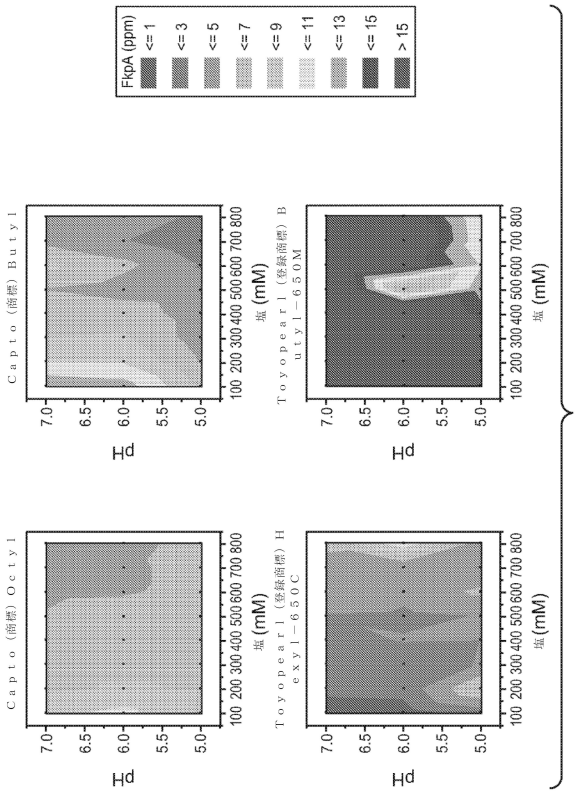
【図３８Ａ】



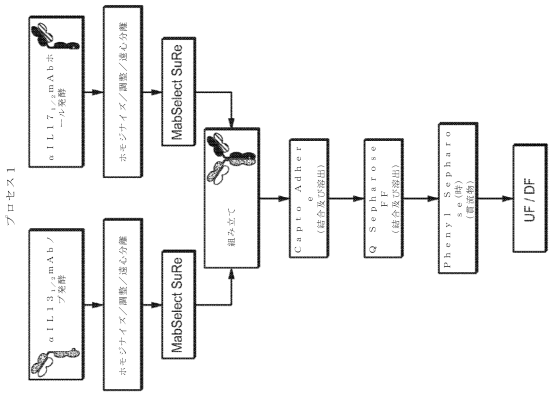
【図３８Ｂ】



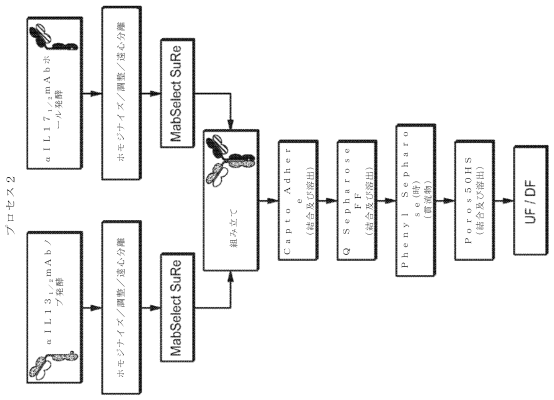
【図３９】



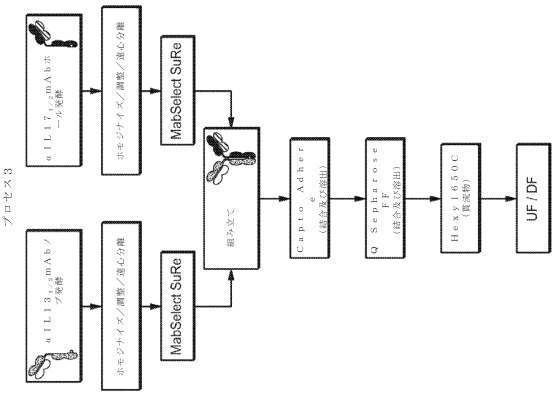
【図４０Ａ】



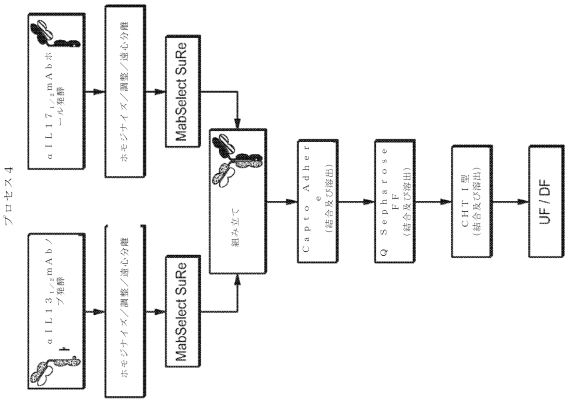
【図４０Ｂ】



【図４０Ｃ】



【図４０Ｄ】



【配列表】

0007091238000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		
C07K	*1/22*	*(2006.01)*	C07K	1/22	
C07K	*1/36*	*(2006.01)*	C07K	1/36	
C07K	*1/34*	*(2006.01)*	C07K	1/34	
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/13	
C12N	*15/62*	*(2006.01)*	C12N	15/62	Z
C12P	*21/08*	*(2006.01)*	C12P	21/08	

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/207,908
(32)優先日 平成27年8月20日(2015.8.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 ディーエヌエー ウェイ １， シー／オー ジェネンテック， インコーポレイテッド
(72)発明者 マッケイ， パトリック エー．
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０８０， サウス サンフランシスコ， ディーエヌエー ウェイ １， シー／オー ジェネンテック， インコーポレイテッド

審査官 坂崎 恵美子

(56)参考文献
国際公開第２０１５／０７００６８（WO，Ａ１）
特開２０１５－０７１６２９（ＪＰ，Ａ）
特開２０１５－０４２６４５（ＪＰ，Ａ）
特表２０１５－５０１８３６（ＪＰ，Ａ）
特表２０１３－５０８３８７（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１４／１１０２４６（WO，Ａ１）
Journal of Chromatography A，2004年，Vo.1024, No.1-2，p.79-85
mAbs，2010年，Vol.2, No.5，p.480-499
Journal of Chromatography A，2012年，Vol.1221，p.57-70

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ １／１６
Ｃ０７Ｋ １６／４６
Ｃ１２Ｎ １５／１３
Ｃ１２Ｐ ２１／０８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）