(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-522902
(P2024-522902A)
(43)公表日　令和6年6月21日(2024.6.21)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C07K	*1/22 (2006.01)*	C07K	1/22	4H045
C07K	*16/46 (2006.01)*	C07K	16/46	
C07K	*16/28 (2006.01)*	C07K	16/28	
C07K	*1/36 (2006.01)*	C07K	1/36	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全19頁）

(21)出願番号　特願2023-579839(P2023-579839)
(86)(22)出願日　令和4年6月22日(2022.6.22)
(85)翻訳文提出日　令和5年12月26日(2023.12.26)
(86)国際出願番号　PCT/EP2022/067013
(87)国際公開番号　WO2023/274809
(87)国際公開日　令和5年1月5日(2023.1.5)
(31)優先権主張番号　2109246.5
(32)優先日　令和3年6月28日(2021.6.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　516105833
サイティバ・バイオプロセス・アールアンドディ・アクチボラグ
スウェーデン国 エスイー－７５１８４
ウプサラ ブヨルクガタン ３０
(74)代理人　100188558
弁理士　飯田 雅人
(74)代理人　100154922
弁理士　崔 允辰
(74)代理人　100207158
弁理士　田中 研二
(72)発明者　ベングト・ヴェステルンド
スウェーデン・７５１・８４・ウプサラ・ビヨルクガタン・３０・サイティバ・スウェーデン・アクチボラグ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　二重特異性抗体を分離する方法

(57)【要約】
本発明は、二重特異性抗体又は二重特異性抗体断片を分離する方法に関する。本方法は、ａ）二重特異性抗体又は二重特異性抗体断片を含むフィードを準備する工程と；ｂ）フィードを、支持体にカップリングされた親和性リガンドを有する分離基材と接触させる工程と；ｃ）任意選択で、分離樹脂を洗浄液で洗浄する工程と；ｄ）溶出緩衝液を分離樹脂にアプライして、親和性リガンドに結合している抗体又は抗体断片を溶出する工程とを含み、工程ｄ）において、ｐＨ勾配が溶出緩衝液に対して適用され、前記ｐＨ勾配は、約６～約２である。

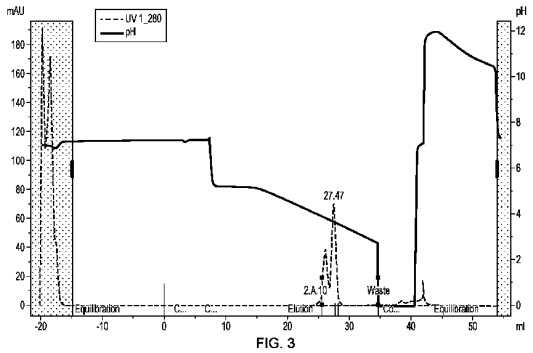


FIG. 3

【特許請求の範囲】
【請求項１】
二重特異性抗体又は二重特異性抗体断片を分離する方法であって、前記方法が：
ａ）二重特異性抗体又は二重特異性抗体断片を含むフィードを準備する工程と；
ｂ）前記フィードを、支持体にカップリングされた親和性リガンドを有する分離基材と接触させる工程と；
ｃ）任意選択で、分離樹脂を洗浄液で洗浄する工程と；
ｄ）溶出緩衝液を前記分離樹脂にアプライして、前記親和性リガンドに結合している抗体又は抗体断片を溶出する工程と
を含み、
工程ｄ）において、ｐＨ勾配が前記溶出緩衝液に対して適用され、前記ｐＨ勾配が、約６～約２である、方法。
【請求項２】
前記ｐＨ勾配が、約５．５から、又は約５．２から、又は約５．０から、約２．０まで又は約２．５までである、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記親和性リガンドが、プロテインＡリガンドである、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
前記プロテインＡリガンドが、Ｚドメイン、Ａドメイン、Ｂドメイン、Ｃドメイン、Ｄドメイン及びＥドメインを含む群から選択される天然の又は突然変異したドメインを含む、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記プロテインＡリガンドが、天然の若しくは突然変異したＺドメイン又は天然の若しくは突然変異したＣドメインを含む、請求項３又は４に記載の方法。
【請求項６】
前記支持体が、架橋されたアガロースビーズを含む、請求項１から５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記支持体が、断面直径２００～８００ｎｍ、２００～４００ｎｍ又は３００～４００ｎｍ等、１０～１０００ｎｍの繊維を含む、請求項１から５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記フィードが、清澄化された細胞培養上清である、請求項１から７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記抗体断片が、一方のＶＨ鎖がＶＨ３である異なる２本のＶＨ鎖を含む任意の抗体断片である、請求項１から８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記抗体断片が、ダイアボディ、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、ｓｃＦｖ－ＣＨ、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ－Ｆｃ又はｓｃＦｖ－ジッパーから選択される、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記抗体が、一方のＶＨ鎖がＶＨ３である異なる２本のＶＨ鎖を含む任意の抗体である、請求項１から８のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、生物工学の分野並びに抗体及び抗体断片を分離する、特に二重特異性抗体と二重特異性抗体断片の分離の新規の方法に関する。
【背景技術】
【０００２】

免疫グロブリンは、世界中で製造又は開発のいずれかで最も一般的な生物薬剤産物を表す。抗体に対する商業的需要、それ故治療市場の価値の高さにより、製薬会社は、関連費用を抑制しながらそれぞれのモノクローナル抗体（ｍＡｂ）製造工程の生産性を最大化することに重点を置くようになった。

【０００３】

親和性クロマトグラフィーは、モノクローナル又はポリクローナル抗体等の免疫グロブリン分子の精製に重要な工程の１つとして、ほとんどの場合使用される。親和性試薬の特に興味深いクラスは、免疫グロブリン分子の不変部分に対して特異的結合能力があるタンパク質であり、そのような相互作用は、抗体の抗原結合特異性から独立している。そのような試薬は、血清若しくは血漿調製物又は細胞培養由来フィードストック等があるがこれに限定されない異なる試料からの免疫グロブリンの親和性クロマトグラフィー回収に広く使用されうる。そのようなタンパク質の例は、異なる種由来のＩｇＧ免疫グロブリンのＦｃ及びＦａｂ部分に結合する能力があるドメインを含有するブドウ球菌プロテインＡである。これらドメインは、Ｅ、Ｄ、Ａ、Ｂ及びＣドメインと一般に示される。

【０００４】

ブドウ球菌プロテインＡ（ＳｐＡ）に基づく試薬は、その高い親和性及び選択性のため、生物工学の分野、例えば抗体の捕捉及び精製並びに検出又は定量化のための親和性クロマトグラフィーにおける広範な使用を見出してきた。現時点で、ＳｐＡに基づく親和性媒体は、おそらく、産業的細胞培養上清を含めた異なる試料からのモノクローナル抗体及びその断片の単離用として最も広く使用されている親和性クロマトグラフィー樹脂である。従って、プロテインＡリガンドを含む様々な基材は、例えば、天然のプロテインＡの形態で市販されており［例えばＰｒｏｔｅｉｎ Ａ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（商標）、Ｃｙｔｉｖａ、ウプサラ、スウェーデン］、更に組換えプロテインＡ［例えばｒＰｒｏｔｅｉｎ Ａ Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（商標）、Ｃｙｔｉｖａ］から構成される。より具体的には、市販の組換えプロテインＡ製品において実行される遺伝子操作は、支持体へのその配向的結合を容易にし、リガンドの生産性を増大させることが意図される。

【０００５】

モノクローナル抗体（ｍＡｂ）は、単一特異性抗体であり、１つの型の抗原を結合することを意味する。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞により産生され、１つのハイブリドーマ細胞株によって産生される全てのｍＡｂは、同一である。

【０００６】

二重特異性抗体（ｂｓＡｂ）は、生物工学内のツールとしてより大規模に使用される操作された抗体である。それらは、治療的潜在性も有しており、多数の臨床試験が進行中である。二重特異性抗体は、異なる２つの抗原結合部位を含む抗体であり、例えば同じ抗原又は異なる抗原上の２つのエピトープを結合することができる。それ故、二重特異性抗体は、異なる２つの抗原に潜在的に結合することができる。特異性が定義された二重特異性抗体は人工的分子であり、それ自体は天然には見られない。二重特異性抗体の範囲は、Ｕ．Ｂｒｉｎｋｍａｎｎらにより詳細に更に記述される（Ｂｒｉｎｋｍａｎｎ．Ｕ．、Ｋｏｎｔｅｒｍａｎｎ，Ｒ．Ｅ．、ＭＡｂ、２０１７年２月～３月；９（２）：１８２～２１２頁）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００７】

【特許文献１】米国特許出願公開第２００６／０１９４９５０号
【特許文献２】米国特許第６６０２９９０号
【特許文献３】米国特許第７３９６４６７号

【非特許文献】

【０００８】

【非特許文献１】Ｂｒｉｎｋｍａｎｎ．Ｕ．、Ｋｏｎｔｅｒｍａｎｎ，Ｒ．Ｅ．、ＭＡｂ、２０１７年２月～３月；９（２）：１８２～２１２頁

【非特許文献２】Ｇｏｏｄら（１９６６年） Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ５：４６７頁
【非特許文献３】Ｇｏｏｄ及びＩｚａｗａ （１９７２年） Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ． ２４：６２頁
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
二重特異性ＩｇＧ分子の生成は、軽鎖と重鎖の対合、結果的にその中の可変ドメイン（ＶＬ； ＶＨ）が、無差別になりうるので困難である。異なる２本の軽鎖と異なる２本の重鎖の対合は、特定の非対称の組合せは通常１つしか求められないので、多数の誤対合をもたらす可能性があり、達成される組合せの多くは、例えば単一特異性ホモ二量体等、非機能的又は望ましくない分子になる。従って、単一特異性抗体から二重特異性抗体を分離し、正しくマッチした二重特異性抗体からミスマッチ二重特異性抗体を分離するための改良されたツール及び方法の必要性が増大している。従って、本発明者らの目的は、二重特異性抗体の分離を可能にする改善された方法を見出すことであった。
【００１０】
可変重鎖クラス３（ＶＨ３）は、他の重鎖サブクラスよりも発現及び安定性を改善することが実証されているので、生物工学において一層開発されてきた可変重（ＶＨ）鎖のサブクラスである。
【課題を解決するための手段】
【００１１】
上述の目的を解決するために、本発明者らは、ＶＨ３鎖の存在に基づいて単一特異性抗体又はミスマッチ抗体から二重特異性抗体を分離することを可能にする方法を開発した。モノクローナル抗体は、同一のＶＨ鎖を２本有する。二重特異性抗体は、異なる２本のＶＨ鎖を含むように設計されうる。分離のこの方法は、ＶＨ３相互作用が維持されている任意の市販のプロテインＡリガンドを使用して実行されうる。プロテインＡリガンドクロマトグラフィー基材から二重特異性抗体を溶出する場合、分離はｐＨ勾配を使用して実行される。
【００１２】
従って、上の目的は、二重特異性抗体又は二重特異性抗体断片を分離する方法であって、前記方法が：
ａ）二重特異性抗体又は二重特異性抗体断片を含むフィードを準備する工程と；
ｂ）フィードを、支持体にカップリングされた親和性リガンドを有する分離基材と接触させる工程と；
ｃ）任意選択で、分離樹脂を洗浄液で洗浄する工程と；
ｄ）溶出緩衝液を分離樹脂にアプライして、親和性リガンドに結合している抗体又は抗体断片を溶出する工程と
を含む、方法によって達成される。
【００１３】
工程ｄ）において、ｐＨ勾配が溶出緩衝液に対して適用される。前記ｐＨ勾配は、約６～約２である。
【００１４】
ｐＨ勾配は、約５．５から、又は約５．２から、又は約５．０から、約２．０まで又は約２．５までであり得る。
【００１５】
親和性リガンドは、プロテインＡリガンドであり得る。プロテインＡリガンドは、Ｚドメイン、Ａドメイン、Ｂドメイン、Ｃドメイン、Ｄドメイン及びＥドメインを含む群から選択される天然の又は突然変異したドメインを含むことができる。好ましくは、プロテインＡリガンドは、天然の若しくは突然変異したＺドメイン又は天然の若しくは突然変異したＣドメインを含むことができる。
【００１６】

支持体は、架橋されたアガロースビーズを含むことができる。別法として、支持体は、断面直径２００～８００ｎｍ、２００～４００ｎｍ又は３００～４００ｎｍ等、１０～１０００ｎｍの繊維を含むことができる。

【００１７】

上の方法に使用されるフィードは、清澄化された細胞培養上清でありうる。

【００１８】

抗体断片は、一方のＶＨ鎖がＶＨ３である異なる２本のＶＨ鎖を含む任意の抗体断片でありうる。抗体断片は、ダイアボディ、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、ｓｃＦｖ－ＣＨ、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ－Ｆｃ又はｓｃＦｖ－ジッパーから選択されうる。

【００１９】

抗体は、一方のＶＨ鎖がＶＨ３である異なる２本のＶＨ鎖を含む任意の抗体でありうる。

【図面の簡単な説明】

【００２０】

【図１】ＩｇＧ等の抗体の概略図である。

【図２】Ｃｙｔｉｖａ製の市販品ＭａｂＳｅｌｅｃｔ（商標）ＳｕＲｅを使用した、ＶＨ３領域を１つ持つ抗体とＶＨ３領域を２つ持つ抗体との分離の欠如を示すクロマトグラムである。

【図３】Ｃｙｔｉｖａ製の市販品ＭａｂＳｅｌｅｃｔ（商標）ＰｒｉｓｍＡを使用した、ＶＨ３領域を１つ持つ抗体とＶＨ３領域を２つ持つ抗体との分離を示すクロマトグラムである。

【図４】ＪＳＲ製の市販品Ａｍｓｐｈｅｒｅ（商標）Ａ３を使用した、ＶＨ３領域を１つ持つ抗体とＶＨ３領域を２つ持つ抗体との分離を示すクロマトグラムである。

【図５】Ｐｕｒｏｌｉｔｅ製の市販品Ｐｒａｅｓｔｏ（登録商標）Ｊｅｔｔｅｄ　Ａ５０を使用した、ＶＨ３領域を１つ持つ抗体とＶＨ３領域を２つ持つ抗体との分離を示すクロマトグラムである。

【発明を実施するための形態】

【００２１】

定義

用語「抗体」及び「免疫グロブリン」は、本明細書において互換的に使用されえ、２本の重（Ｈ）鎖及び２本の軽（Ｌ）鎖からなる基本的な４ポリペプチド鎖構造を有する抗原結合タンパク質のことを指し、前記鎖は、鎖間ジスルフィド結合により安定化されている。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書においてＨＣＶＲ又はＶＨと略記される）及び重鎖定常領域（ＣＨ）から構成される。重鎖定常領域は、３つのドメイン、ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（ＶＬ）及び軽鎖定常領域から構成される。軽鎖定常領域は、１つのドメイン、ＣＬから構成される。用語は、抗体の断片、抗体又は抗体断片を含む融合タンパク質及び抗体又は抗体断片を含むコンジュゲートも含むと理解されるべきである。

【００２２】

用語「断片」は、無傷の又は完全な抗体若しくは抗体鎖より少ないアミノ酸残基を含む抗体若しくは抗体鎖の一部若しくは部分のことを指す。断片は、無傷の若しくは完全な抗体若しくは抗体鎖の化学又は酵素的処置によって入手することができる。断片は、組換え手段により入手することもできる。典型的な断片には、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆａｂ及び／又はＦｖ断片がある。用語「抗原結合性断片」とは、抗原を結合する、又は特定の抗原結合について抗原結合性断片が得られた無傷の抗体と競合する免疫グロブリン若しくは抗体のポリペプチド断片のことを指す。

【００２３】

用語「Ｆｃ結合ポリペプチド」、「Ｆｃ結合剤」及び「Ｆｃ結合タンパク質」は、抗体のＦｃ領域である結晶性部分に結合する能力があるポリペプチド、分子又はタンパク質をそれぞれ意味し、例えばプロテインＡ及びプロテインＧ、若しくは前記結合特性を維持し

たその任意の断片若しくは融合タンパク質があるが、これに限定されない。
【００２４】
用語「Ｆｃ領域」とは、ｌｇＧ抗体のＣ末端領域、特に前記ＩｇＧ抗体の重鎖のＣ末端領域のことを指す。
【００２５】
用語「Ｆｖ断片」とは、断片可変領域のことを指し、２つの可変ドメイン、ＶＨ及びＶＬのみを含有する。ＶＨ及びＶＬは、非共有結合相互作用によりＦｖ断片中に一緒に保持される。用語「Ｆａｂ断片」とは、断片抗原結合領域のことを指し、重鎖と軽鎖両方の定常ドメインと可変ドメインの両方を含む。用語「Ｆ（ａｂ）断片」とは、抗原結合部位を１つ有する断片のことを指す。用語「（Ｆａｂ’）２断片」とは、ジスルフィド結合によって連結された２つの抗原結合領域を有する二価の断片のことを指す。Ｆ（ａｂ’）２断片の還元により、２つの一価のＦａｂ’断片が生成され、そのＦａｂ’断片は、他の分子へのコンジュゲーションに有用な遊離スルフヒドリル基を有する。
【００２６】
重鎖上の「可変」ドメインは、「重鎖可変領域」、「重鎖可変ドメイン」、「ＶＨ」領域、「ＶＨ」ドメイン又は「ＶＨ」鎖として互換的に称される場合がある。
【００２７】
用語「ドメイン」及び「領域」は、本開示において互換的に使用される。
【００２８】
本明細書では用語「フィード」とは、同様に存在する他の物質から精製されようとする標的物質を少なくとも１つ含有する液体のことを指す。フィードは、例えば、水性溶液、有機溶媒系又は水性／有機溶媒混合物若しくは溶液であることができる。供給源液は、多くの生体分子（タンパク質、抗体、ホルモン及びウイルス等）、小分子（塩、糖、脂質、等など）、更に粒状物体を含有するしばしば複雑な混合物又は溶液である。生物起源の典型的な供給源液は、水性溶液又は懸濁液として始まりうるが、溶媒沈殿、抽出、等などの初期の分離工程に使用される有機溶媒を含有することもできる。本発明の様々な実施形態による精製に適する有益な生体物質を含有しうるフィードの例には、バイオリアクタの培養上清、均質化細胞懸濁液、血漿、血漿画分及び乳汁があるが、これに限定されない。
【００２９】
本明細書では、用語「固体支持体」とは、精製の間に標的物質と相互作用する又はＦｅ結合剤が接着できる非水性基材のことを指す。適切な固相材料には、ガラス、シリカ（例えば、シリカゲル）、アガロース及びセルロース等の多糖（例えば、多糖基材）、ポリアクリルアミド、メチルメタクリラート並びにポリスチレンジビニルベンゼンコポリマー等の有機ポリマーがあるが、これに限定されない。固相は、多孔又は無孔性の特質のものでありえ、圧縮性又は非圧縮性でありうる。様々な実施形態において、固相は、ポリマー性基材又はアガロース粒子若しくはビーズである。好ましい固体支持体材料は、ポンピング及びクロスフロー濾過、並びに利用される液体の温度、ｐＨ及び他の態様を含めた精製工程に利用される条件に対して物理及び化学的に回復力があることになる。
【００３０】
「親和性リガンド」とは、供給源液の成分の結合部位との特異的相互作用により成分に選択又は優先的に結合する部分のことを指す。本発明において、親和性リガンドは、樹脂等の固相に一般に固定化される。本発明の工程に有用なクロマトグラフィー樹脂を得るために樹脂支持体に結合させうる親和性リガンドの例には、タンパク質Ｆｃ領域に選択的に結合するプロテインＡ、プロテインＧ及びその類似体があるが、これに限定されない。固体支持体材料に親和性リガンドを結合させる方法は、精製技術者に周知である。
【００３１】
「緩衝液」は、溶液中に存在することにより、ｐＨに単位変化を起こすのに添加しなければならない酸又はアルカリの量を増大させる物質である。緩衝溶液は、その酸－塩基共役成分の作用によりｐＨの変化に抵抗する。生物学的試薬とともに使用するための緩衝溶液は、溶液のｐＨが生理的範囲内にあるように一定濃度の水素イオンを維持する能力が一

般にある。用語「生理的ｐＨ」とは、哺乳動物の血液のｐＨ（即ち、７．３８又は約７．４）のことを指す。従って、生理的ｐＨ範囲は、約７．２～７．６である。従来の緩衝成分には、有機並びに無機塩、酸及び塩基があるが、これに限定されない。生体分子（例えば、タンパク質分子）の精製に使用する典型的な緩衝液には、双性イオン又は「グッド」バッファーがある。例えば、Ｇｏｏｄら（１９６６年） Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ５：４６７頁及びＧｏｏｄ及びＩｚａｗａ （１９７２年） Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ． ２４：６２頁を参照のこと。

【００３２】

本明細書において「平衡緩衝液」は、標的タンパク質を含有する供給源液をロードするために結合試薬、固相、又は両方を調製するのに使用される緩衝液である。平衡緩衝液は、好ましくは等張性であり、ｐＨ約６～約８を一般に有する。「ローディング緩衝液」は、結合領域含有タンパク質及び不純物を含有する供給源液を結合剤が固定化される固相上へロードするのに使用される緩衝液である。多くの場合、平衡及びローディング緩衝液は同一である。「溶出緩衝液」は、固定化した結合剤から結合領域含有タンパク質を溶出するのに使用される。好ましくは、溶出緩衝液は低ｐＨを有し、それによりＦｃ結合剤と対象となるタンパク質の間の相互作用を破壊する。好ましくは、低ｐＨ溶出緩衝液は、ｐＨ約２～約５の範囲、最も好ましくは約３～約４の範囲を有する。この範囲内にｐＨを制御することになる緩衝液の例には、グリシン、リン酸、酢酸、クエン酸及びアンモニウム緩衝液、並びにこれらの組合せがある。好ましいそのような緩衝液は、クエン酸及び酢酸緩衝液、最も好ましくはクエン酸ナトリウム又は酢酸ナトリウム緩衝液である。対象となるタンパク質を溶出するための高ｐＨ緩衝液（例えば９又はより高いｐＨを有する）又は$MgCl_2$（２ｍＭ）等の化合物若しくは組成物を含む緩衝液を含めた他の溶出緩衝液が考えられる。

【００３３】

本明細書では「洗浄液」又は「洗浄緩衝液」は全て、標的物質を結合しているクロマトグラフィー樹脂から不純物を取り除くために使用される液体のことを本明細書において指す。２種以上の洗浄液が連続して利用されえ、例えば、連続した洗浄液は、クロマトグラフィー樹脂と非特異的に会合する様々な型の不純物を解離し、除去するように設計された、ｐＨ、伝導率、溶媒濃度、等などの様々な特性を有する。

【００３４】

「溶出液」又は「溶出緩衝液」とは、１つ又は複数の洗浄液で洗浄した後に、クロマトグラフィー樹脂から標的物質を解離させるために使用される液体のことを本明細書において指す。溶出液は、標的物質を不可逆的に変性させることなくそれを分離するように作用する。典型的な溶出液は、クロマトグラフィー技術者に周知であり、より高濃度の塩、遊離親和性リガンド若しくは類似体、又はクロマトグラフィー樹脂からの標的物質の解離を促進する他の物質を有することができる。「溶出条件」とは、標的物質を結合しているクロマトグラフィー樹脂を溶出液又は溶出緩衝液と接触させて解離を生じる工程等、クロマトグラフィー樹脂から標的物質を解離させる、標的物質が結合しているクロマトグラフィー樹脂に与えられる工程条件のことを指す。

【００３５】

本明細書では、用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」「含有する（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）」、「有する（ｈａｖｉｎｇ）」等は、米国特許法に帰する意味を有することができ、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」等を意味することができ；「本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ ｏｆ）」又は「本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｓ ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ）」は、同様に米国特許法に帰する意味を有し、用語は無制限であり、列挙されるものの基本的又は新規の特徴が、列挙されるより多くのものの存在によって変更されない限り、列挙されるものより多くの存在を考慮するが、先行技術の実施形態を除外する。

【００３６】

ヒトにより産生される最も一般的な抗体は、免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）である。ＩｇＧは、４本の異なるポリペプチド鎖、２本の同一の重鎖（ＨＣ）及び２本の同一の軽鎖（ＬＣ）からなる。図１は、ＩｇＧを模式的に図示し、以下の説明で参照される。ＨＣは両方とも、ＶＨ　２と示される１つの可変ドメイン並びにＣＨ１　３、ＣＨ２　４及びＣＨ３　５と示される３つの定常ドメインからそれぞれなる。重鎖のＣ末端は、ＣＨ３ドメイン５の末端である。重鎖は、２本の鎖間の共有結合に関与するヒンジ領域で一緒に保持される。２本の軽鎖は、ジスルフィド結合によって重鎖に共有結合している。これら軽鎖は、ＶＬ　６と示される１つの可変ドメイン及びＣＬ　７と示される１つの定常ドメインからなる。軽鎖は、ＶＨ及びＣＨ１と一緒に単一の抗原を結合することができる抗原結合断片（Ｆａｂ）を形成する。モノクローナル抗体は、通常２つの同一のＨＣ及びＬＣを有する。特に、モノクローナル抗体は、単一特異性なので、同一のＶＨドメイン２を通常２つ有する。二重特異性抗体は、異なる２種の可変領域（Ｆｖ）　８、９を有し、従って２つの異なるＶＨドメイン２を含むことができ、図１において２種のＶＨドメイン２について異なるパターンで例示される。

【００３７】

２本の重鎖が共有結合で連結されている抗体の部分は、結晶化部位（Ｆｃ）と呼ばれ、従って両方の重鎖のＣＨ３　５及びＣＨ２　４ドメインからなる。Ｆｃは様々なＦｃ受容体（ＦｃＲ）に結合することができ、それにより免疫系内のエフェクター機能に関与又は仲介している。全ての抗体がＦｃ領域を有するわけではなく、例えば、ＩｇＭはＦｃ領域を欠いている。

【００３８】

プロテインＡリガンドは、免疫グロブリンのＦｃ領域に選択的に結合し、従って非常に効率的な捕捉工程が可能になる。天然のプロテインＡは、免疫グロブリンのＶＨ３領域にも結合するので、なお有用でありうる。しかしながら、天然のプロテインＡは、バイオ処理に使用されるアルカリ性浄化条件下で安定ではなく、アルカリ安定化プロテインＡバリアントの一部は、ＶＨ３相互作用を阻害する突然変異を有する、例えば米国特許出願公開第２００６／０１９４９５０号を参照のこと。この文献は、市販品ＭａｂＳｅｌｅｃｔ（商標）ＳｕＲｅに使用されるＺドメインを生じるプロテインＡ　Ｆｃ結合Ｂドメイン中のＧ２９Ａ突然変異によるＶＨ３相互作用の阻害について検討している。

【００３９】

本発明者らは、ＶＨ３相互作用が維持されている任意の市販のプロテインＡリガンドを使用して、ＶＨ３鎖に基づいて単一特異性抗体又はミスマッチ抗体から二重特異性抗体を分離することを可能にする方法を開発した。別の言葉では、本明細書に開示される方法に使用される親和性リガンドは、ＶＨ３結合プロテインＡリガンドである。前記ＶＨ３結合プロテインＡリガンドを含むプロテインＡリガンドクロマトグラフィー樹脂から抗体を溶出する場合、分離はｐＨ勾配を使用して実行される。

【００４０】

本発明による二重特異性抗体又は二重特異性抗体断片を分離する方法は：

ａ）二重特異性抗体又は二重特異性抗体断片を含むフィードを準備する工程と；

ｂ）フィードを、固体支持体にカップリングされた親和性リガンドを有する分離基材と接触させる工程と；

ｃ）任意選択で、分離樹脂を洗浄液で洗浄する工程と；

ｄ）溶出緩衝液を分離樹脂にアプライして、親和性リガンドに結合している抗体又は抗体断片を溶出する工程とを含む。

【００４１】

工程ｄ）において、ｐＨ勾配が溶出緩衝液に対して適用され、前記ｐＨ勾配は、約６～約２である。例２～例４及び図３～図５で分かるように、本方法は、ＶＨ３鎖を１本含む抗体とＶＨ３鎖を２本含む抗体の分離を可能にする。

【００４２】

一実施形態によれば、ｐＨ勾配は、約５．５から約２．０まで、又は約２．５までであ

る。別の実施形態において、ｐＨ勾配は、約５．２から約２．０まで、又は約２．５までである。更に別の実施形態において、ｐＨ勾配は、約５．０から約２．０まで、又は約２．５までである。

【００４３】

本方法のｐＨ範囲において、親和性リガンドに対する抗体のどんなＦｃ結合も、より高いｐＨでＦｃ結合が消滅するので、最初に遊離されることになる。ｐＨを低下させることによりＦｃ結合が中和された場合、ＶＨ相互作用は、なお活性であり、分離基材内にｍＡｂを保持することになる。Ｆｃ結合の親和性は、ＶＨ結合よりなお強くなりうるが、本方法において選択した条件、特にｐＨに関しては、ＶＨ相互作用は、より低いｐＨにとどまることになる。結果として、少なくとも１つのＶＨ３領域を持たないどんな抗体も、分離のためのｐＨ勾配範囲に達する前に溶出されることになる。それ故、本分離の方法は、一方のＨＣ又は両方のＨＣ上にＦｃ結合ノックアウトを持つ抗体に使用される場合もある。

【００４４】

実施例に示すように、本方法は、親和性リガンド上でＦｃ結合がなお存在し（例２～４）、既存のＶＨ相互作用があるリガンドでよく機能する。ＶＨ３相互作用が阻害されたリガンドの場合、分離は観察されなかった（参照例１）。

【００４５】

本発明の方法の優位性の１つは、既に市販されている親和性リガンドが使用されうることである。本発明者らは、通常無視される既に存在するＶＨ３結合を使用し、このＶＨ３結合に基づく分離方法を開発した。

【００４６】

本方法による分離に適した抗体は、それが１つ又は２つの結合ＶＨ３鎖を有するという意味で二重特異的である抗体である。従ってそれは、ＶＨ３鎖を２本持つ抗体からのＶＨ３鎖を１本しか持たない抗体の分離に関しうる。ＶＨ３鎖を欠く抗体も、溶出工程において前述の２つのバージョンから分離されることになるので、分離されうる。

【００４７】

本方法による分離は、指定されたｐＨ勾配溶出においてＶＨ３鎖を１本有する抗体が、ＶＨ３鎖を２本有する抗体の前に溶出することになる。おそらくＶＨ３鎖のない抗体は、Ｆｃ部分を介して親和性リガンドを結合し、その結果Ｆｃ結合が消滅すると溶出することになるので、ＶＨ３鎖を１本持つ抗体の前に溶出することになる。

【００４８】

本発明の方法に使用される親和性リガンドは、好ましくはプロテインＡリガンドである。プロテインＡリガンドは、Ｚドメイン、Ａドメイン、Ｂドメイン、Ｃドメイン、Ｄドメイン及びＥドメインを含む群から選択される天然の又は突然変異したドメインを含むことができる。好ましい一実施形態において、リガンドは、天然の又は突然変異したＺドメインを含む。別の好ましい実施形態において、リガンドは、天然の又は突然変異したＣドメインを含む。本方法に使用されうる親和性リガンドを含む分離基材は、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ（商標）（Ｃｙｔｉｖａ）、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ（商標） Ｘｔｒａ（Ｃｙｔｉｖａ）、ＰｒｏＳｅｐ（商標） Ａ（Ｍｅｒｃｋ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）、ＰｒｏＳｅｐ（商標）Ｕｌｔｒａ Ｐｌｕｓ（Ｍｅｒｃｋ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）、ＡｂＳｏｌｕｔｅ（商標）、ＣａｐｔｉｖＡ（商標）（Ｒｅｐｌｉｇｅｎ）、ＰｒｉＭａｂ（商標）（Ｒｅｐｌｉｇｅｎ）及びＰｒｏｔｅｉｎ Ａ Ｄｉａｍｏｎｄ（Ｂｅｓｔｃｈｒｏｍ）、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ（商標） ＰｒｉｓｍＡ（Ｃｙｔｉｖａ）、Ｅｓｈｍｕｎｏ（商標） Ａ（Ｍｅｒｃｋ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）、Ｔｏｙｏｐｅａｒｌ（商標） ＡＦ ｒＰｒｏｔｅｉｎ Ａ（Ｔｏｓｏｈ）、Ａｍｓｐｈｅｒｅ（商標） Ａ３（ＪＳＲ）及びＰｒａｅｓｔｏ（登録商標） Ｊｅｔｔｅｄ Ａ５０（Ｐｕｒｏｌｉｔｅ）からなる群から選択されうる。

【００４９】

分離基材の固体支持体は、多孔性支持体でありうる。分離基材の多孔性支持体は、任意の適切な周知の種類でありうる。従来通りの親和性分離基材は、多くの場合有機性のものであり、使用される水性媒体へ親水性表面を露出している、即ちその外部、存在する場合

には、内部表面にヒドロキシ（－ＯＨ）、カルボキシ（ＣＯＯＨ）、カルボキサミド（－ＣＯＮＨ$_2$、場合によりＮ置換形態）、アミノ（－ＮＨ$_2$、場合により置換形態）、オリゴ又はポリエチレンオキシ基を露出しているポリマーに基づく。

【００５０】

特定の実施形態において、支持体は、多糖等のポリヒドロキシポリマーを含む。多糖の例には、例えばデキストラン、デンプン、セルロース、プルラン、寒天、アガロース、等がある。多糖は、本質的に親水性であり、非特異的相互作用の程度が低く、反応性（活性化可能な）ヒドロキシ基の含有量が高く、バイオ処理に使用されるアルカリ性浄化溶液に対して一般に安定である。

【００５１】

一部の実施形態において、支持体は、寒天又はアガロースを含む。支持体は、Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（商標）　ＦＦ（Ｃｙｔｉｖａ）の名称で販売されている架橋されたアガロースビーズ等、市販の製品でありうる。大規模な分離に特に有利な実施形態において、支持体は、米国特許第６６０２９９０号又は第７３９６４６７号に記述される方法を使用して剛性を増大させるように構成され、それ故、基材を高流速に一層適するようにする。

【００５２】

特定の実施形態において、ポリマー、多糖又はアガロース支持体等の支持体は、架橋される。架橋は、支持体の剛性に有益であり、化学的安定性を改善する。好ましい実施形態において、支持体は、架橋されたアガロースビーズを含む。

【００５３】

分離基材の固体支持体は、対流に基づくクロマトグラフィー基材でありうる。前記対流に基づくクロマトグラフィー基材は、繊維性の基質でありうる。前記繊維性基質は、電気スピンされたポリマー繊維又はセルロース繊維、任意選択で不織繊維に基づきうる。従って繊維性基質は、繊維性不織布ポリマー基材でありうる。繊維は、好ましくは架橋される。前記繊維性基質に含まれる繊維は、２００～８００ｎｍ、２００～４００ｎｍ又は３００～４００ｎｍ等１０～１０００ｎｍの断面直径を有する。そのような繊維性基質は、Ｃｙｔｉｖａ製ＨｉＴｒａｐ　Ｆｉｂｒｏユニットに見られうる。

【００５４】

分離基材に適用されるフィードは、細胞培養上清でありうる。細胞培養上清は細胞を含有してもよく、又は細胞が除去されてもよく、及び／若しくは清澄化されてもよい。

【００５５】

フィードに含まれる抗体は、一方のＶＨ鎖がＶＨ３である異なる２本のＶＨ鎖を含む任意の抗体である。Ｋｎｏｂ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅ（Ｋｉｈ）は、二重特異性である抗体を作製するためによく検証されている一技術である。本方法に適切な二重特異性抗体は、いわゆる共通軽鎖抗体でありうる。共通軽鎖抗体は、同一の軽鎖を２本有し、従って二重特異性は、異なるＶＨ鎖のみに関係する。適切な二重特異性抗体は、異なるＶＨ鎖に加えて異なる軽鎖を有してもよい。最近では、ＶＨ鎖を４本含む、テトラＶＨ　ＩｇＧも操作された。これら四価のＩｇＧも、本方法で分離されうる。デュオボディは、異なる２本のＶＨ鎖を含むＦｃ修飾されたＩｇＧの別の例である。

【００５６】

一方がＶＨ３鎖であるＶＨ鎖を２本含む抗体断片も、本方法により分離されうる。結果として、フィードに含まれる抗体断片は、一方のＶＨ鎖がＶＨ３である異なる２本のＶＨ鎖を含む任意の抗体断片でありうる。前記抗体断片は、ダイアボディ、ｓｃＦｖ－Ｆｃ、ｓｃＦｖ－ＣＨ、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ－Ｆｃ又はｓｃＦｖ－ジッパーから選択されうる。１本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）は、約１０～２５アミノ酸の短いリンカーペプチドで接続された免疫グロブリンの重鎖（ＶＨ）及び軽鎖（ＶＬ）可変領域の融合タンパク質である。このタンパク質は、定常領域を除去し、リンカーを導入したにもかかわらず、元の免疫グロブリンの特異性を保持している。ダイアボディは、リンカーペプチドで接続された２本のｓｃＦｖであり、そのリンカーペプチドは２つの可変領域を互いに折り畳むには短すぎ（約５アミノ酸）、ｓｃＦｖを二量体化させる。ダイアボディは、対応するｓｃＦｖより最

大４０倍低い解離定数を有することが示され、そのことは、標的に対して非常に高い親和性を有することを意味する。２本のｓｃＦｖがより長いリンカーで接続されて、ｓｃＦｖ二量体を形成することもありうる。それらは、例えばｓｃＦｖ－Ｆｃ若しくはｓｃＦｖ－ＣＨ、又はｓｃＦｖ－ジッパーでありうる。

【００５７】

上の二重特異性抗体断片及び二重特異性抗体のリストは、単なる例であり、網羅的でない。当業者は、ＶＨ鎖を少なくとも２本含む任意の抗体断片であって、一方のＶＨ鎖がＶＨ３鎖である抗体断片が、本発明による方法に適用可能であると理解することになる。

【００５８】

本発明の方法は、以下の非限定的な例において例示される。これら例から、特許請求の範囲に記載の方法により、親和性リガンド及び分離基材の範囲にわたって、単一特異性抗体から二重特異性抗体を分離することが可能になることは明らかである。それ故、本発明の方法の概念上の原則が、様々な親和性リガンド及び分離基材に適用可能であることが証明される。

【実施例】

【００５９】

２つのｍＡｂを、本実験に使用した。Ｈｅｍｌｉｂｒａ（登録商標）（抗体エミシズマブ、Ｒｏｃｈｅ製）は、ＨＣヘテロ二量体であり、一方のＨＣがＶＨ３領域を有し、一方のＨＣがＶＨ１領域を有する。ハーセプチン（登録商標）（抗体トラスツズマブ、Ｒｏｃｈｅ製）は、各ＨＣ上に１つずつ２つのＶＨ３ドメインを含むホモ二量体である。以下の例において、２つのｍＡｂを、各例で指定する分離基材を含むクロマトグラフィーカラムに適用する前に混合した。

【００６０】

（例１）（参照）

本実験は、Ｃｙｔｉｖａ製ＭａｂＳｅｌｅｃｔ（商標）　ＳｕＲｅ分離基材を使用して、上述の抗体混合物で実行された。

【００６１】

実行条件：

試料：ハーセプチン（登録商標）及びヘムライブラ（登録商標）、濃度ＰＢＳ中にそれぞれ１．２及び０．６ｍｇ／ｍＬ

カラム：　Ｔｒｉｃｏｒｎ　５／１００、Ｂｈ＝１０ｃｍ、Ｖｔ＝２ｍＬ

樹脂：　ＭａｂＳｅｌｅｃｔ（商標）　ＳｕＲｅ

緩衝液Ａ１：　ＰＢＳ

緩衝液Ａ２：　５０ｍＭクエン酸ナトリウムｐＨ＝６．５

緩衝液Ａ３：　２５ｍＭ　ＮａＯＨ

緩衝液Ｂ１：　５０ｍＭクエン酸ナトリウムｐＨ＝２．５

システム：　ＡＫＴＡ（商標）　ｐｕｒｅ

流速：　０．５ｍＬ／分

平衡化：　２ＣＶ緩衝液Ａ１

試料アプライ：　２００μＬ

洗浄１：　２ＣＶ緩衝液Ａ１

洗浄２：　３ＣＶ緩衝液Ａ２

溶出：　１０ＣＶの３０から１００％緩衝液Ｂ１

【００６２】

結果を、図２に示す。２つのｍＡｂ間に分離は観察されない。これは、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ（商標）　ＳｕＲｅが、前述のようにＶＨ３相互作用が阻害されており、リガンドに対してＦｃ結合のみ利用可能であるという事実のためである。結果として、樹脂への結合が抗体のＦｃ領域に基づくので、ＶＨ３鎖の数が異なる、単一特異性抗体からの二重特異性抗体の分離は得られない。

【００６３】

（例２）
本実験は、ＰｒｉｓｍＡ分離基材を使用して、上記と同じ抗体の混合物で実施された。
【００６４】
実行条件：
試料：ハーセプチン（登録商標）とヘムライブラ（登録商標）の混合物、濃度ＰＢＳ中にそれぞれ１．２及び０．６ｍｇ／ｍＬ
カラム：　Ｔｒｉｃｏｒｎ　５／１００、Ｂｈ＝１０ｃｍ、Ｖｔ＝２ｍＬ
樹脂：　Ｍａｂｓｅｌｅｃｔ（商標）　ＰｒｉｓｍＡ
緩衝液Ａ１：　ＰＢＳ
緩衝液Ａ２：　５０ｍＭクエン酸ナトリウムｐＨ＝６．５
緩衝液Ａ３：　２５ｍＭ　ＮａＯＨ
緩衝液Ｂ１：　５０ｍＭクエン酸ナトリウムｐＨ＝２．５
システム：　ＡＫＴＡ（商標）　ｐｕｒｅ
流速：　０．５ｍＬ／分
平衡化：　２ＣＶ緩衝液Ａ１
試料アプライ：　２００μＬ
洗浄１：　２ＣＶ緩衝液Ａ１
洗浄２：　３ＣＶ緩衝液Ａ２
溶出：　１０ＣＶの３０から１００％緩衝液Ｂ１
【００６５】
結果を、図３に示す。ｐＨ勾配５．２～２．５において、２つのｍＡｂ間の分離が観察される。２６ｍＬあたりの第１の溶出ピークは、ヘムライブラ（登録商標）に対応し、２７ｍＬあたりの第２の溶出ピークは、ハーセプチン（登録商標）に対応する。
【００６６】
従って、ＶＨ３相互作用が、ＶＨ１及びＶＨ３を含有する重鎖の分離に関与するようである。
【００６７】
（例３）
本実験は、ＪＳＲ製Ａｍｓｐｈｅｒｅ（商標）　Ａ３分離基材を使用して、上記と同じ抗体の混合物で実施された。
【００６８】
実行条件：
試料：ハーセプチン（登録商標）とヘムライブラ（登録商標）の混合物、濃度ＰＢＳ中にそれぞれ１．２及び０．６ｍｇ／ｍＬ
カラム：　Ｔｒｉｃｏｒｎ　５／１００、Ｂｈ＝１０ｃｍ、Ｖｔ＝２ｍＬ
樹脂：　ＪＳＲ　Ａｍｓｐｈｅｒｅ（商標）　Ａ３
緩衝液Ａ１：　ＰＢＳ
緩衝液Ａ２：　２５ｍＭクエン酸ナトリウムｐＨ＝５．５
緩衝液Ａ３：１００ｍＭ　ＮａＯＨ
緩衝液Ｂ１：　４４ｍＭクエン酸ナトリウムｐＨ＝２．５
システム：　ＡＫＴＡ（商標）　ｐｕｒｅ
流速：　０．５ｍＬ／分
平衡化：　２ＣＶ緩衝液Ａ１
試料アプライ：　１００μＬ
洗浄１：　２ＣＶ緩衝液Ａ１
洗浄２：　３ＣＶ緩衝液Ａ２
溶出：　１０ＣＶの０から１００％緩衝液Ｂ１
【００６９】
結果を、図４に示す。ｐＨ勾配５．２～２．５において、２つのｍＡｂ間の分離が観察される。３７ｍＬあたりの第１の溶出ピークは、ヘムライブラ（登録商標）に対応し、４

０ｍＬあたりの第２の溶出ピークは、ハーセプチンに対応する。
【００７０】
　また、ＶＨ３相互作用が、ＶＨ１及びＶＨ３を含有する重鎖の分離に関与するようである。
【００７１】
（例４）
　本実験は、Ｐｕｒｏｌｉｔｅ製Ｐｒａｅｓｔｏ（登録商標）　Ｊｅｔｔｅｄ　Ａ５０分離基材を使用して、上記と同じ抗体の混合物で実施された。
【００７２】
実行条件：
試料：ハーセプチン（登録商標）とヘムライブラ（登録商標）の混合物、濃度ＰＢＳ中にそれぞれ１．２及び０．６ｍｇ／ｍＬ
カラム：　Ｔｒｉｃｏｒｎ　５／１００、Ｂｈ＝１０ｃｍ、Ｖｔ＝２ｍＬ
樹脂：　Ｐｕｒｏｌｉｔｅ　Ｐｒａｅｓｔｏ（登録商標）　Ｊｅｔｔｅｄ　Ａ５０
緩衝液Ａ１：　ＰＢＳ
緩衝液Ａ２：　２５ｍＭクエン酸ナトリウムｐＨ＝５．５
緩衝液Ａ３：１００ｍＭ　ＮａＯＨ
緩衝液Ｂ１：　４４ｍＭクエン酸ナトリウムｐＨ＝２．５
システム：　ＡＫＴＡ（商標）　ｐｕｒｅ
流速：　０．５ｍＬ／分
平衡化：　２ＣＶ緩衝液Ａ１
試料アプライ：　１００μＬ
洗浄１：　２ＣＶ緩衝液Ａ１
洗浄２：　３ＣＶ緩衝液Ａ２
溶出：　１０ＣＶの０から１００％緩衝液Ｂ１
【００７３】
　結果を、図５に示す。ｐＨ勾配５．２～２．５において、２つのｍＡｂ間の分離が観察される。３７ｍＬあたりの第１の溶出ピークは、ヘムライブラ（登録商標）に対応し、４０ｍＬあたりの第２の溶出ピークは、ハーセプチン（登録商標）に対応する。
【００７４】
　再び、ＶＨ３相互作用が、ＶＨ１及びＶＨ３を含有する重鎖の分離に関与するようである。
【００７５】
　本明細書は、例を使用して、最良の様式を含めて本発明を開示しており、更に任意の当業者が、任意のデバイス又はシステムを製作及び使用し、組み込まれた任意の方法を実行することを含めて、本発明を実施することを可能にする。本発明の特許性のある範囲は、特許請求の範囲により定義され、当業技術者が思いつく他の例を含むことができる。そのような他の例は、それが特許請求の範囲の文字通りの文言と異ならない構造的要素を有する場合、又はそれが特許請求の範囲の文字通りの文言と実質的差異がない同等の構造的要素を含む場合、特許請求の範囲の範囲内にあるものとする。本文に記載の任意の特許又は特許出願は、あたかも個々に組み込まれるかのように、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【符号の説明】
【００７６】
２　ＶＨ
３　ＣＨ１
４　ＣＨ２
５　ＣＨ３
６　ＶＬ
７　ＣＬ

８　可変領域（Ｆｖ）
９　可変領域（Ｆｖ）

【図面】

【図１】

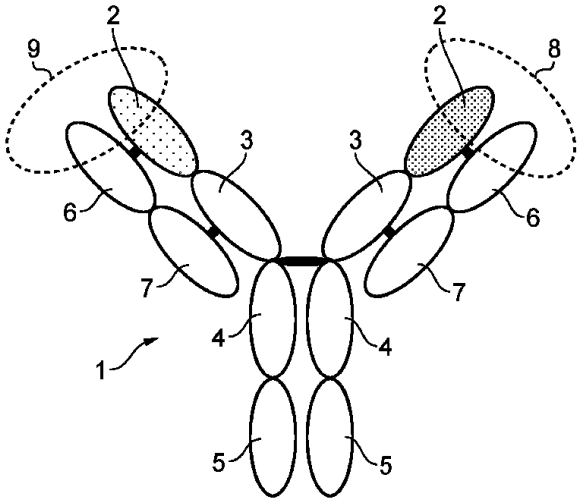


FIG. 1

【図２】

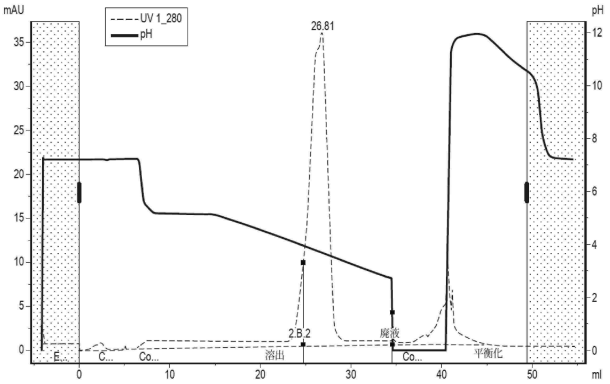


FIG. 2

【図３】

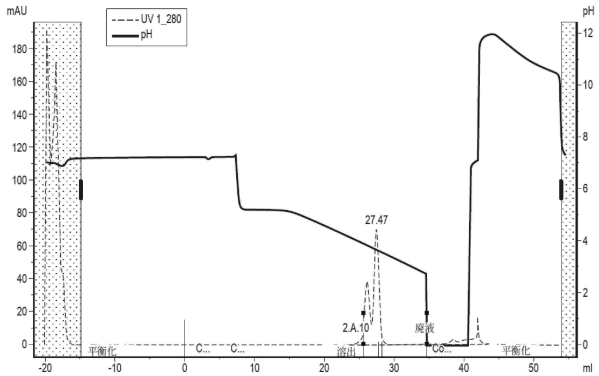


FIG. 3

【図４】

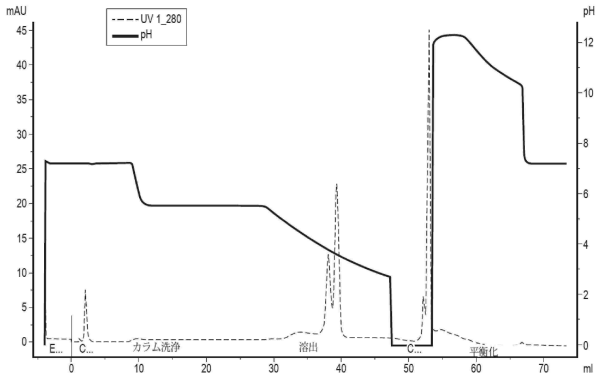
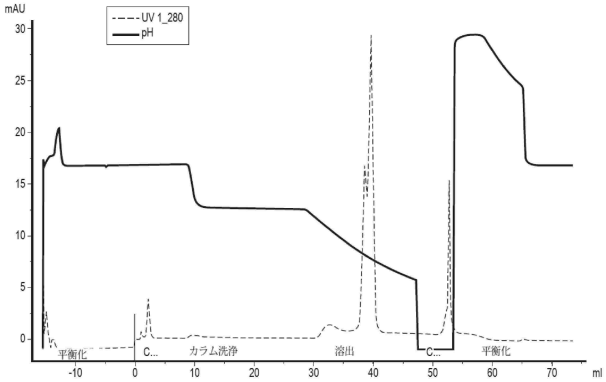


FIG. 4

【図５】


mAU
UV 1_280
pH
30
25
20
15
10
5
0
平衡化
C...
カラム洗浄
溶出
C...
平衡化
-10
0
10
20
30
40
50
60
70
ml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/067013

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K1/00 C07K1/22 C07K16/36 C07K16/32 C07K16/06
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 2016/024147 A1 (TUSTIAN ANDREW [US] ET AL) 28 January 2016 (2016-01-28) paragraphs 0009,0020; claims 1,4,5,6,8,9,13,15,23 -----	1-8 9-11
X	ZHANG TING ET AL: "Removing a single-arm species by Fibro PrismA in purifying an asymmetric IgG-like bispecific antibody", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, vol. 182, 1 June 2021 (2021-06-01), page 105847, XP055964748, SAN DIEGO, CA. ISSN: 1046-5928, DOI: 10.1016/j.pep.2021.105847 pages 1,2,3,5,6,7; figure 2; tables 1,2 ----- -/--	1-11

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 September 2022	11/10/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Mattugini, Nicola

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/067013

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/169992 A1 (UCB BIOPHARMA SPRL [BE]) 27 October 2016 (2016-10-27) page 17; claim 1; figure 9; examples 1,3	1-11
X Y	WO 2020/221781 A1 (CYTIVA BIOPROCESS R & D AB [SE]) 5 November 2020 (2020-11-05) claims 1,9,10,11,13,18	1-8 9-11
A	CHEN SERENE W ET AL: "Current trends and challenges in the downstream purification of bispecific antibodies", DOWNSTREAM PROCESSING GROUP, BIOPROCESSING TECHNOLOGY INSTITUTE, AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH , SINGAPORE 138668, SINGAPORE, vol. 4, no. 2, 1 April 2021 (2021-04-01), pages 73-88, XP055964942, DOI: 10.1093/abt/tbab007 Retrieved from the Internet: URL:https://academic.oup.com/abt/article-pdf/4/2/73/45248935/tbab007.pdf> page 76; table 1	1-11
A	LI YIFENG ET AL: "Chapter 8 - A roadmap for IgG-like bispecific antibody purification", APPROACHES TO THE PURIFICATION, ANALYSIS AND CHARACTERIZATION OF ANTIBODY-BASED THERAPEUTICS, 1 January 2020 (2020-01-01), pages 167-179, XP055859168, DOI: 10.1016/B978-0-08-103019-6.00008-4 page 171	1-11

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/067013

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2016024147 A1	28-01-2016	AR 101262 A1	07-12-2016
		AU 2015298156 A1	23-02-2017
		BR 112017001443 A2	05-12-2017
		CA 2955618 A1	04-02-2016
		CN 107074906 A	18-08-2017
		DK 3172221 T3	09-08-2021
		EP 3172221 A2	31-05-2017
		EP 3912987 A1	24-11-2021
		ES 2881026 T3	26-11-2021
		JP 6702967 B2	03-06-2020
		JP 2017524740 A	31-08-2017
		KR 20170035941 A	31-03-2017
		MY 187051 A	27-08-2021
		PL 3172221 T3	27-12-2021
		SG 10201900661Y A	27-02-2019
		SG 11201700157V A	27-02-2017
		TW 201617359 A	16-05-2016
		US 2016024147 A1	28-01-2016
		WO 2016018740 A2	04-02-2016
		ZA 201700622 B	27-05-2020
WO 2016169992 A1	27-10-2016	AR 104358 A1	12-07-2017
		AU 2016251223 A1	26-10-2017
		BR 112017022073 A2	14-08-2018
		CA 2983057 A1	27-10-2016
		CL 2017002614 A1	27-04-2018
		CN 107636012 A	26-01-2018
		CO 2017010631 A2	05-01-2018
		EA 201792328 A1	31-05-2018
		EP 3286205 A1	28-02-2018
		JP 6866300 B2	28-04-2021
		JP 2018520089 A	26-07-2018
		JP 2021066734 A	30-04-2021
		KR 20170139131 A	18-12-2017
		MA 41941 A	28-02-2018
		MY 189854 A	14-03-2022
		SG 11201708256Y A	29-11-2017
		US 2018100007 A1	12-04-2018
		US 2021171609 A1	10-06-2021
		WO 2016169992 A1	27-10-2016
WO 2020221781 A1	05-11-2020	CN 113748128 A	03-12-2021
		EP 3962923 A1	09-03-2022
		JP 2022533017 A	21-07-2022
		KR 20220002325 A	06-01-2022
		WO 2020221781 A1	05-11-2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

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

(72)発明者　マッツ・アンデル
スウェーデン・７５１・８４・ウプサラ・ビヨルクガタン・３０・サイティバ・スウェーデン・アクチボラグ

Ｆターム（参考）　4H045　AA11 AA30 AA50 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74 GA26