

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-505696
(P2025-505696A)

(43)公表日 令和7年2月28日(2025.2.28)

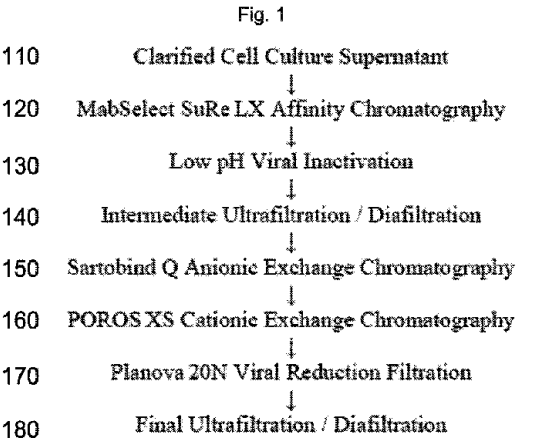
(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 1/22 (2006.01)	C 0 7 K 1/22	Z N A 4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C 4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全181頁)			
(21)出願番号	特願2024-547315(P2024-547315)	(71)出願人	512159960
(86)(22)出願日	令和5年2月9日(2023.2.9)		コディアック サイエンシーズ インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和6年10月8日(2024.10.8)		K o d i a k S c i e n c e s I n c .
(86)国際出願番号	PCT/US2023/062322		アメリカ合衆国, 9 4 3 0 4 カリフォルニア州, パロアルト, ページ ミル ロード 1 2 0 0
(87)国際公開番号	WO2023/154822	(74)代理人	110002860
(87)国際公開日	令和5年8月17日(2023.8.17)		弁理士法人秀和特許事務所
(31)優先権主張番号	63/267,810	(72)発明者	ツルブリッゲン, アンドレアス セバスチャン
(32)優先日	令和4年2月10日(2022.2.10)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 4 パロアルト ページ ミル ロード 1 2 0 0 コディアック サイエンシーズ インコーポレイテッド内
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		最終頁に続く
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,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		

(54)【発明の名称】 生産物の精製方法

(57)【要約】

本明細書では、H C P（宿主細胞タンパク質）を含む汚染物質種を所望の分子種及び化学種からアフィニティークロマトグラフィー精製及び分離することに関する実施形態が提供される。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

アフィニティークロマトグラフィーを用いた生産物の精製方法であって、溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは目的のタンパク質に結合すること、及びカオトロピック剤を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、を含む、方法。

【請求項 2】

タンパク質及び 1 又は複数の不純物を含むロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスに通し、続いてカオトロピック塩を含む少なくとも 1 つの洗浄溶液を通して、溶出溶液を使用して前記タンパク質を収集することによって、前記ロード液から生産物を精製して不純物を減らす方法。

【請求項 3】

目的のタンパク質を含む溶出液中の不純物を分離するための方法であって、目的のタンパク質を含む溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすること、及びマグネシウム又はマグネシウム塩を含む 1 又は複数の緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、を含む方法。

【請求項 4】

アフィニティークロマトグラフィーを用いた生産物の製造方法であって、目的のタンパク質を含む溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすること、リン酸ナトリウム及び塩を含む第一の緩衝液を用いて前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスの第一の洗浄を行うこと、並びにカオトロピック剤を含む第二の緩衝液を使用して、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスの第二の洗浄を行うこと、を含む方法。

【請求項 5】

アフィニティークロマトグラフィーを用いた生産物の製造方法であって、目的のタンパク質を含む溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすること、トリス及び塩を含む第一の緩衝液で第一の洗浄を行うこと、並びにトリス及びカオトロピック剤を含む第二の緩衝液で第二の洗浄を行うこと、を含み、前記第二の緩衝液のカオトロピック剤は、前記第一の緩衝液に含まれる塩と同一ではない、方法。

【請求項 6】

生産物の製造方法であって、
(i) ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、
(i i) 前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、
(i i i) カオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、
(i v) 前記結合した目的のタンパク質を溶出させること、及び
(v) 溶出液を収集することであって、前記溶出液は前記目的のタンパク質を含有すること、を含む方法。

【請求項 7】

生産物の製造方法であって、ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、

10

20

30

40

50

カオトロピック塩を含む緩衝溶液を前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスに供給すること、
前記結合した目的のタンパク質を溶出させること、及び
溶出液を収集することであって、前記溶出液は前記目的のタンパク質を含有すること、を含む方法。

【請求項 8】

生産物の製造方法であって、
複合体タンパク質を収集することであって、前記複合体タンパク質は、複合体ポリマーに結合した抗体を含むこと、
前記複合体タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記複合体タンパク質に結合すること、
カオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、
前記複合体タンパク質を溶出させること、及び
溶出液を収集することであって、前記溶出液は前記複合体タンパク質を含有すること、を含む、方法。

10

【請求項 9】

生産物の製造方法であって、
目的の標的タンパク質に結合したアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを、カオトロピック塩を含む緩衝液で洗浄すること、
溶出させて溶出液を収集することであって、
前記溶出液は、前記目的の標的タンパク質を含有すること、及び
前記溶出液からウイルス汚染物質を除去すること、を含む、方法。

20

【請求項 10】

前記溶出液からウイルス汚染物質を除去することが、
低 pH 不活性化、界面活性剤不活性化、ポリッシングクロマトグラフィー工程、ウイルスろ過 (VF)、限外ろ過 (UF)、及び／又は透析ろ過 (DF) のうち 1 又は複数を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

30

生産物の製造方法であって、
目的の標的タンパク質に結合したアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを、カオトロピック塩を含む緩衝液で洗浄すること、
前記カオトロピック塩を除去すること、及び溶出させて溶出液を収集することであって、
前記溶出液が前記目的の標的タンパク質を含有すること、を含む、方法。

【請求項 12】

前記溶出液が許容される医薬賦形剤とさらに組み合わせられて医薬組成物を形成する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

緩衝溶液が前記医薬組成物に添加される、請求項 12 に記載の方法。

40

【請求項 14】

保存剤溶液が前記医薬組成物に添加される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記医薬組成物が硝子体内注射用にさらに精製される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

生産物の製造方法であって、
ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、

50

カオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、
溶出させて溶出液を収集することであって、前記溶出液は前記目的の標的タンパク質を含むこと、及び
前記溶出液からウイルス汚染物質を除去すること、を含む、方法。

【請求項 17】

生産物の製造方法であって、
溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすること、
第一の洗浄緩衝液で洗浄すること、
カオトロピック塩を含む第二の洗浄緩衝液で洗浄すること、
第三の洗浄緩衝液で洗浄することであって、前記第三の洗浄緩衝液で、前記カオトロピック塩を除去すること、及び
溶出緩衝液で溶出させることであって、溶出液を収集し、前記溶出液はタンパク質産物を含むこと、を含む、方法。

【請求項 18】

前記第一の洗浄緩衝液が 50 mM リン酸ナトリウムを含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記第一の洗浄緩衝液が 250 mM 塩化ナトリウムをさらに含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

前記第一の洗浄緩衝液がトリス及び塩を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 21】

前記溶出液からウイルス汚染物質を除去することをさらに含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 22】

ウイルス汚染物質を除去することが、低 pH 不活性化、界面活性剤不活性化、ポリッシングクロマトグラフィー工程、ウイルスろ過（VF）、限外ろ過（UF）、及び透析ろ過（DF）のうち 1 又は複数を含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記溶離液が目的のタンパク質を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 24】

前記目的のタンパク質が抗体である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記抗体がさらにポリマーに結合されて抗体複合体を形成する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記抗体複合体が下記式（I）の構造を有する、請求項 24 に記載の方法：

10

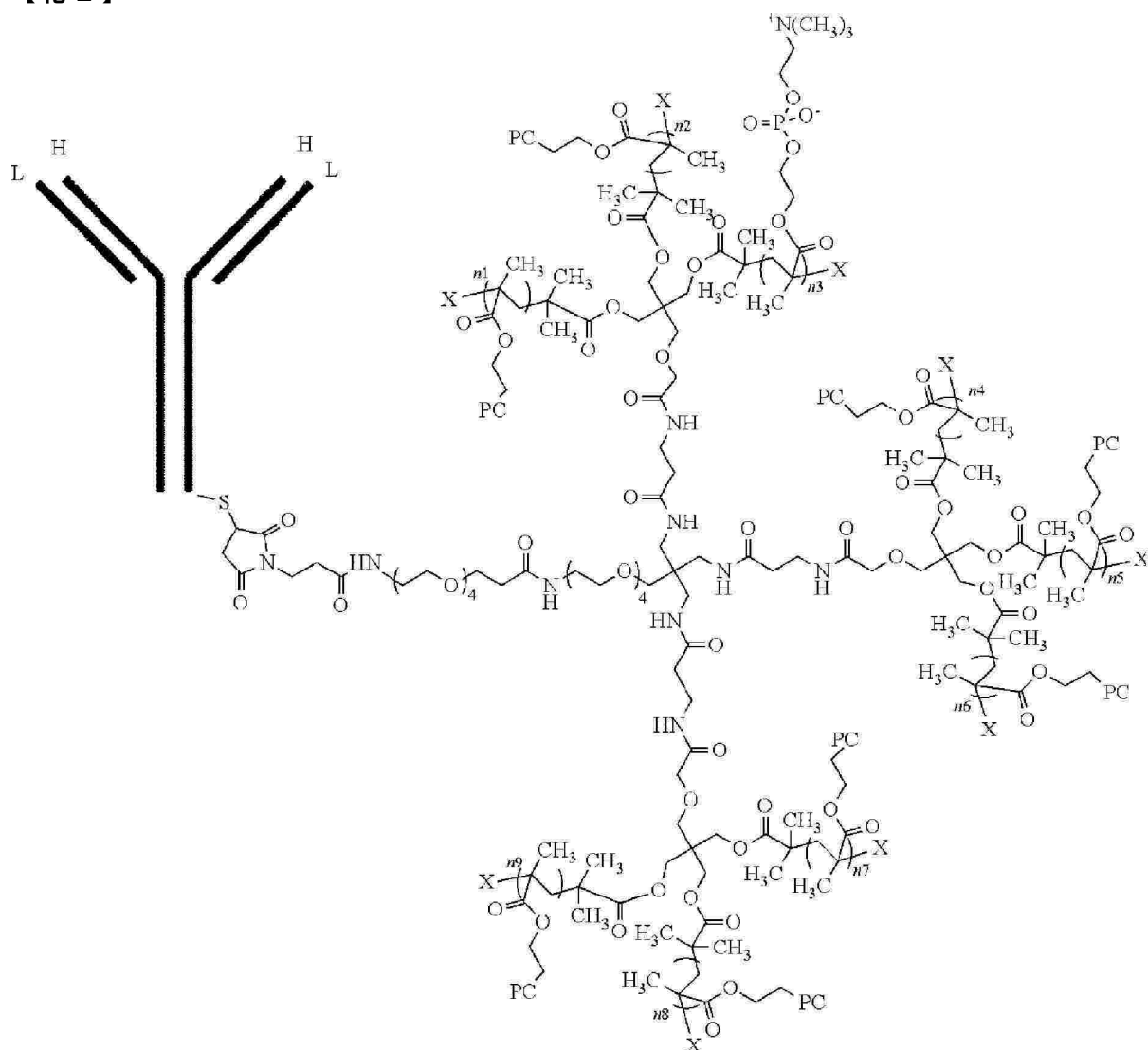
20

30

40

50

【化 1】

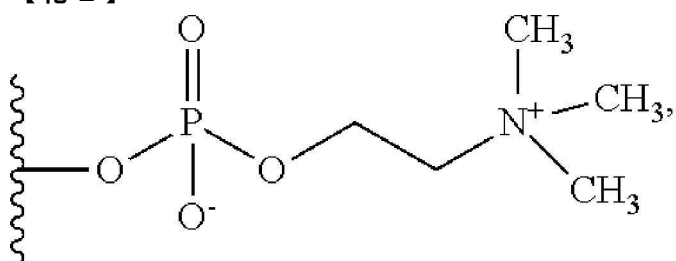


式中、抗 V E G F - A 抗体 の 各 重 鎖 は 文 字 H で 示 さ れ る と 共 に、前 記 抗 V E G F - A 抗体 の 各 軽 鎖 は 文 字 L で 示 さ れ、

前 記 ポ リ マ ー は、C 4 4 3 (E U 番 号 付 け) の ス ル フ ヒ ド リ ル を 介 し て 前 記 抗 V E G F - A 抗体 に 結 合 し、こ の 結 合 は 重 鎖 の 1 つ に 示 さ れ て お り、

P C は

【化 2】



(式 中、波 線 は 前 記 ポ リ マ ー の 残 り の 部 分 へ の 接 続 点 を 示 す) で あり、X は、a) - O R (R は - H、メ チ ル、エ チ ル、プ ロ ピ ル、又 は イ ソ プ ロ ピ ル)、b) - H、c) - B r、- C l、若 し く は - I を 含 む 任 意 の ハ ロ ゲ ン、d) - S C N、又 は e) - N C S で あり、並 び に

i) n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 、 n_8 、及 び n_9 は 同 じ か 異 な り、0 ~ 3 0 0 0 ま で の 整 数 で あり、又 は ii) n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 、

n 8、及び n 9 の合計が $2500 \pm 15\%$ であるように、n 1、n 2、n 3、n 4、n 5、n 6、n 7、n 8、及び n 9 は同じか異なる。

【請求項 27】

前記抗体複合体が二重特異性抗体を含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

前記二重特異性抗体が抗 VEGF 結合部分及び抗 IL-6 結合部分を含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 29】

生産物の製造方法であって、
細胞培養上清を回収することであって、前記細胞培養上清は、目的のタンパク質を含むこと、

前記細胞培養上清を溶離液で処理することであって、前記溶離液は、前記目的のタンパク質を含むこと、

前記溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすること、

トリス又はリン酸ナトリウムを含む第一の洗浄緩衝液で洗浄すること、

カオトロピック塩を含む第二の洗浄緩衝液で洗浄すること、

溶出緩衝液で溶出させることであって、溶出液を収集し、前記溶出液はタンパク質産物を含むこと、

前記溶出液中に存在するウイルス汚染物質を低 pH ウイルス緩衝液で不活性化し、ウイルス不活性化溶出液を生じさせること、

前記ウイルス不活性化溶出液をろ過すること、

前記ウイルス不活性化溶出液に対して少なくとも 1 回のイオン交換クロマトグラフィーを行うこと、及び

前記ウイルス不活性化溶出液をろ過して保持液を得ることであって、前記保持液は前記目的のタンパク質を含むこと、を含む方法が本明細書において提供される。

【請求項 30】

前記細胞培養上清が動物成分不含細胞培養物を用いてバイオリアクターで生産されたものである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記細胞培養上清を処理することが細胞培養物から細胞産物を採取することを含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

前記細胞培養物を清澄化して細胞及び細胞片を除去する、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記溶離液が前記清澄化細胞培養上清を含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 34】

アフィニティークロマトグラフィーを用いたタンパク質の精製方法であって、

ロード液を媒体と接触させることであって、前記媒体は、目的のタンパク質を結合するアフィニティークロマトグラフィーマトリックスであること、カオトロピック剤を含む緩衝溶液で前記媒体を洗浄することであって、前記カオトロピック剤は塩であること、及び前記目的のタンパク質を溶出させるのに適した条件下で、洗浄した媒体を溶出溶液と接触させること、を含む方法。

【請求項 35】

生産物の製造方法であって、

目的のタンパク質を含む溶液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスに適用すること、

前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを第一の緩衝液で洗浄すること、

カオトロピック剤を含む第二の緩衝液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、

前記カオトロピック剤を除去するために第三の緩衝液で前記アフィニティークロマトグラ

10

20

30

40

50

フィーマトリックスを洗浄すること、及び
溶出緩衝液で溶出させることであって、溶出液を収集し、前記溶出液はタンパク質産物を含むこと、を含む、方法。

【請求項 36】

タンパク質精製のためのシステムであって、
第一の抗原結合タンパク質が結合したカラム、
リン酸ナトリウム及び塩を含むリン酸洗浄緩衝液、
トリスを含む中間洗浄緩衝液、
塩化マグネシウムを含む第二の洗浄緩衝液、並びに
ギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液、を含む、システム。

10

【請求項 37】

タンパク質精製のためのシステムであって、
第一の抗原結合タンパク質が結合したカラム、
トリス及び塩を含む第一のトリス洗浄緩衝液、
中間トリス洗浄緩衝液、
塩化マグネシウムを含む第二の洗浄緩衝液、並びに
ギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液、を含む、システム。

【請求項 38】

前記カラムがアフィニティークロマトグラフィー用のリガンドを含む、請求項 36 に記載のシステム。

20

【請求項 39】

前記リガンドがプロテイン A 又はプロテイン G を含む、請求項 36 に記載のシステム。

【請求項 40】

リン酸ナトリウム及び塩を含む前記第一の洗浄緩衝液の pH が 5.5 ～ 9.5 である、請求項 36 に記載のシステム。

【請求項 41】

リン酸ナトリウム及び塩を含む前記リン酸洗浄緩衝液が約 50 mM のリン酸ナトリウムを含む、請求項 36 に記載のシステム。

【請求項 42】

リン酸ナトリウム及び塩を含む前記リン酸洗浄緩衝液が約 250 mM 塩化ナトリウムを含む、請求項 36 に記載のシステム。

30

【請求項 43】

前記第一のトリス洗浄緩衝液が約 50 mM のトリスを含む、請求項 36 に記載のシステム。

【請求項 44】

前記第一のトリス洗浄緩衝液がさらに約 250 mM 塩化ナトリウムを含む、請求項 43 に記載のシステム。

【請求項 45】

前記中間トリス洗浄緩衝液が約 50 mM トリスを含む、請求項 36 に記載のシステム。

【請求項 46】

前記第一のトリス洗浄緩衝液の pH が約 7.2 である、請求項 36 に記載のシステム。

40

【請求項 47】

前記第二の洗浄緩衝液の pH が約 7.8 である、請求項 36 に記載のシステム。

【請求項 48】

前記第二の洗浄緩衝液中の塩化マグネシウムの濃度が約 2.8 M である、請求項 36 に記載のシステム。

【請求項 49】

前記溶出緩衝液中のギ酸ナトリウムの濃度が 10 mM である、請求項 36 に記載のシステム。

【請求項 50】

50

抗体精製のためのシステムであって、
抗体に結合したプロテイン A 樹脂を有するカラムであって、
前記抗体は、それぞれ配列番号 91～93 及び 28～30 のうち少なくとも 1 つ並びに配列番号 7～13、19～27、89、90、及び 256～262 のうち少なくとも 1 つである軽鎖及び重鎖を含むカラムと、
カオトロピック塩を含むカオトロピック洗浄緩衝液と、ギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液と、を含む、システム。

【請求項 51】

前記目的のタンパク質が二重特異性抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 52】

前記二重特異性抗体が VEGF 及び IL-6 に対して特異的である、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

前記二重特異性抗体が OG2072 である、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 54】

前記目的のタンパク質が抗体複合体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 55】

前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスがプロテイン A クロマトグラフィーマトリックスである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 56】

前記緩衝溶液中の前記カオトロピック剤は、リチウム、リチウム塩、マグネシウム、マグネシウム塩、カルシウム、カルシウム塩、グアニジニウム、及び／又はグアニジニウム塩のうち 1 又は複数を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 57】

リチウム、リチウム塩、マグネシウム、マグネシウム塩、カルシウム、カルシウム塩、グアニジニウム、及び／又はグアニジニウム塩のうち 1 又は複数の濃度が、それぞれ 0.05～3.5 M である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

前記緩衝溶液がさらにトリスを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 59】

前記緩衝溶液中のトリスの濃度が少なくとも 5 mM である、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

前記緩衝溶液の pH が 5.5 より大きい、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 61】

前記溶出液がさらにウイルス不純物を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 62】

前記ウイルス不純物を除去することをさらに含む、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

前記ウイルス不純物を不活性化することをさらに含む、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 64】

前記緩衝溶液で洗浄する前に、前記ロード液がロードされたアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを予洗浄緩衝溶液で洗浄する工程をさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 65】

前記緩衝溶液で洗浄した後、前記溶離液がロードされた前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを後洗浄緩衝溶液で洗浄する工程をさらに含む、請求項 64 に記載の方法。

【請求項 66】

前記予洗浄緩衝溶液がリン酸ナトリウムを含む、請求項 64 に記載の方法。

【請求項 67】

10

20

30

40

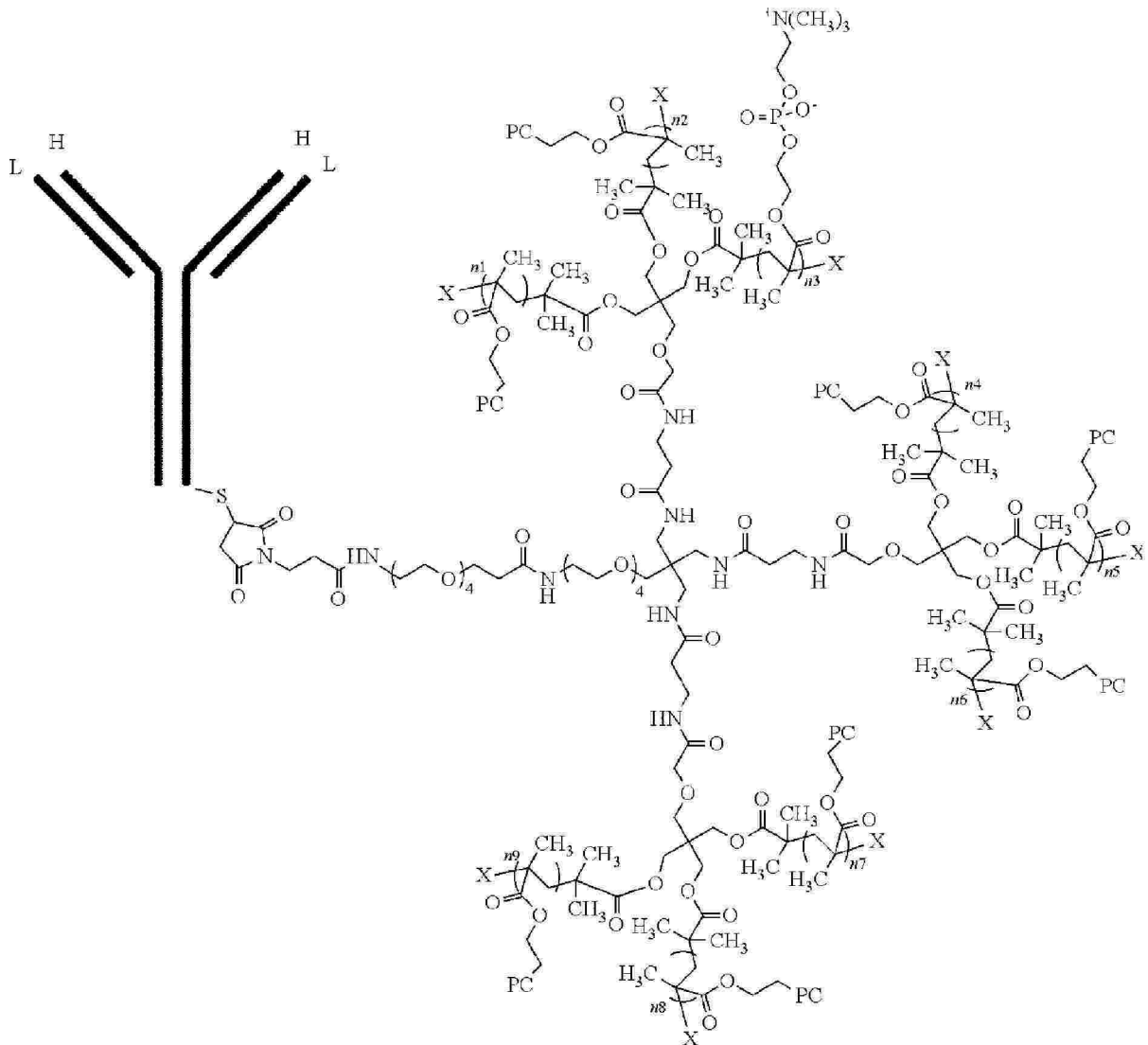
50

前記予洗浄緩衝溶液がトリス及び塩を含む、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記抗体複合体が下記式（Ⅰ）の構造を有する、請求項 2 5 に記載の方法：

【化 3】



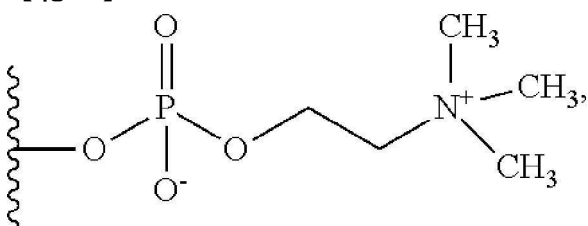
式中、

前記抗 V E G F - A 抗体の各重鎖は文字 H で示されると共に、前記抗 V E G F - A 抗体の各軽鎖は文字 L で示され、

前記ポリマーは、C 4 4 3（E U 番号付け）のスルフヒドリルを介して前記抗 V E G F - A 抗体に結合し、この結合は重鎖の 1 つに示されており、

PC は

【化 4】



（式中、波線は前記ポリマーの残りの部分への接続点を示す）であり、X は、a）-OR（R は -H、メチル、エチル、プロピル、又はイソプロピル）、b）-H、c）-Br、-Cl、若しくは -I を含む任意のハロゲン、d）-SCN、又は e）-NCS であり、

並びに

n 1、n 2、n 3、n 4、n 5、n 6、n 7、n 8、及び n 9 は同じか異なり、0 ～ 3 0 0 までの整数である。

【請求項 6 9】

前記抗体複合体が抗 V E G F - A 軽鎖及び抗 V E G F - A 重鎖を含む抗 V E G F 抗体複合体を含み、前記抗 V E G F - A 抗体重鎖が、配列番号 1 7 2 の C D R H 1 である C D R H 1、配列番号 1 7 3 の C D R H 2 である C D R H 2、及び配列番号 1 7 4 の C D R H 3 である C D R H 3 を含み、並びに前記抗 V E G F - A 抗体軽鎖が、配列番号 1 9 9 の C D R L 1 である C D R L 1、配列番号 2 0 0 の C D R L 2 である C D R L 2、及び配列番号 2 0 1 の C D R L 3 である C D R L 3 を含む、請求項 6 8 に記載の方法。

10

【請求項 7 0】

前記抗 V E G F 抗体複合体が、M P C モノマーを含むポリマーに結合した抗 V E G F - A 免疫グロブリン G (I g G) を含む抗体複合体を含み、前記抗 V E G F - A 抗体重鎖の配列は、配列番号 7 ～ 1 3、1 9 ～ 2 7、8 9、9 0、及び 2 5 6 ～ 2 6 2 のうちの少なくとも 1 つであり、前記抗 V E G F - A 抗体軽鎖の配列は、配列番号 9 1 ～ 9 3、及び 2 8 ～ 3 0 のうちの少なくとも 1 つであり、並びに前記抗体が C 4 4 9 で前記ポリマーに結合している、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記目的の標的タンパク質が細胞培養物によって生産される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7 2】

20

前記細胞培養物が C H O 細胞を含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記緩衝溶液で洗浄した後、前記溶離液がロードされた前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを後洗浄緩衝溶液で洗浄する工程をさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを前記緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質以外の核酸、エンドトキシン、消泡剤、又はその他の小分子が除去される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

30

前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを前記緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質を前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスに結合したまま不純物を除去する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを前記緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質以外の宿主細胞タンパク質が除去される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記緩衝溶液へのカオトロピック剤の添加によって、前記目的の標的タンパク質が溶出されない、請求項 4 に記載の方法。

40

【請求項 7 8】

ウイルス不活性化、タンジェンシャルフローろ過、透析ろ過、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、又はウイルス低減ろ過のうち 1 又は複数をさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記溶離液が動物成分不含細胞培養物を使用してバイオリアクターで生産されたものである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記生産物が目的のタンパク質である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 8 1】

50

不純物が宿主細胞タンパク質不純物を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記第一の洗浄緩衝液が 10 mM リン酸ナトリウムを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記第一の洗浄緩衝液がリン酸ベースの種を含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記第一の洗浄緩衝液が 50 mM 塩化ナトリウムをさらに含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 8 5】

生産物を処理するための方法であって、

10

溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすること、及びカオトロピック塩を含む洗浄緩衝液で洗浄して溶出液を収集することを含み、前記カオトロピック塩の濃度は、第一濃度から第二濃度に増加され、前記溶出液は少なくとも 1 つの画分に収集され、並びに前記少なくとも 1 つの画分には目的の生産物が含まれる、方法。

【請求項 8 6】

前記第一濃度における前記カオトロピック塩の濃度が 0 M であり、前記第二濃度における前記カオトロピック塩の濃度が 4.0 M である、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記カオトロピック塩がリチウム、リチウム塩、マグネシウム、マグネシウム塩、カルシウム、カルシウム塩、グアニジニウム、及び／又はグアニジニウム塩のうち 1 又は複数を含む、請求項 8 5 に記載の方法。

20

【請求項 8 8】

前記カオトロピック塩が塩化マグネシウム、塩化カルシウム、塩化リチウム、及び塩酸グアニジニウムから選択される、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記緩衝溶液が、酢酸塩、クエン酸塩、ACES、BES、ピシン、HEPES、MES、MOPS、MOPSO、TAPS、トリシン、ビスートリス、ビスートリスプロパン、カコジル酸塩、CAPS、CAPSO、CHES、グリシン、グリシルグリシン、イミダゾール、PIPES、TEA、及びTESのうち 1 又は複数をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

本出願は、電子形式の配列表とともに提出される。前記配列表は、2023年2月8日に作成された、サイズが843,266バイトのKDI A K. 141WO. xml というファイルとして提供される。配列表の電子形式の情報は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0002】

優先出願の参照による援用

40

本出願は、2022年2月10日に提出された米国仮出願第63／267810号に対する優先権を主張する。

【0003】

本出願とともに提出された出願データシートにおいて外国又は国内の優先権主張が特定されている全ての出願は、アメリカ合衆国特許規則：連邦規則法典第37巻§1.57(37 CFR 1.57)に基づいて参照により本明細書に援用される。

【0004】

本開示は、抗体及びその他の細胞生産物を精製する方法に関する。

【背景技術】

【0005】

50

細胞培養由来の分子種の処理及び精製に関わる単位操作には、望ましい分子種と望ましくない分子種との優先的な分離が含まれる。特に、クロマトグラフィー及びプロテインAクロマトグラフィーでは、任意の洗浄液又はフロースルー緩衝溶液と比較して、様々な分子結合の相互作用に基づいて特定の種を優先的に分離できる。この工程での単位操作の最適化により、不純物を減らしながら、望ましい分子種の全体的な純度及びパーセント収率を高めることができる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本明細書では、カオトロピック剤の投与によって生産物を精製する方法が提供される。

10

【0007】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態は、生産物の精製に係る処理工程で使用するための新規精製方法を提供することにより、生産物の純度及び組成を改善することを可能にする。いくつかの実施形態では、前記生産物はタンパク質産物であり得る。いくつかの実施形態では、前記精製はクロマトグラフィーを含む。いくつかの実施形態では、クロマトグラフィーはプロテインA又はプロテインGであり得る。いくつかの実施形態では、前記カオトロピック剤は、リチウム及びリチウム塩、マグネシウム及びマグネシウム塩、カルシウム及びカルシウム塩、並びにグアニジニウム及びグアニジニウム塩のうち1又は複数を含み得る。

【0008】

20

本明細書では、アフィニティークロマトグラフィーを使用してタンパク質産物を精製する方法が提供される。本明細書で提供されるいくつかの実施形態は、細胞培養物を採取した後にタンパク質産物を精製するための新規の方法を提供することにより、従来技術の特定の制限を克服することを可能にする。いくつかの実施形態では、前記タンパク質産物が抗体である。いくつかの実施形態では、前記タンパク質産物が抗VEGF抗体である。いくつかの実施形態では、本開示の抗VEGF抗体は、対象に投与された場合に抗体又はタンパク質の半減期（例えば、眼の半減期など）を延長するポリマー部分を含む抗VEGF抗体複合体（コンジュゲート（conjugate））（例えば、KSI-301、KSI-501）又は抗VEGFタンパク質複合体であり得る。いくつかの実施形態では、タンパク質産物を精製するために使用され得る緩衝液試薬の組成物が、本明細書において提供される。

30

【0009】

いくつかの実施形態では、タンパク質及び1又は複数の不純物を含むロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスに通し、続いてカオトロピック塩を含む少なくとも1つの洗浄溶液を通し、溶出溶液を使用して前記タンパク質を収集することによって、前記ロード液から生産物を精製して不純物を減らす方法が、本明細書において提供される。

【0010】

いくつかの実施形態では、目的のタンパク質を含む溶出液中の不純物を分離する方法であって、目的のタンパク質を含む溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすること、及びリチウム及びリチウム塩、マグネシウム及びマグネシウム塩、カルシウム及びカルシウム塩、並びにグアニジニウム及びグアニジニウム塩のうち1又は複数を含み1又は複数の緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、を含む方法が、本明細書において提供される。

40

【0011】

いくつかの実施形態では、アフィニティークロマトグラフィーを使用して生産物を製造する方法が、本明細書において提供される。前記方法は、目的のタンパク質を含有する溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすること、次に前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスの第一の洗浄をリン酸ナトリウム及び塩を含む第一の緩衝液で行うこと、並びに次に前記アフィニティークロマトグラフィーマトリ

50

ックスの第二の洗浄をカオトロピック剤を含む第二の緩衝液で行うこと、を含む。

【0012】

いくつかの実施形態では、アフィニティークロマトグラフィーを使用して生産物を製造する方法が、本明細書において提供される。前記方法は、目的のタンパク質を含む溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすること、トリス及び塩を含む第一の緩衝液で第一の洗浄を行うこと、及びトリス及びカオトロピック剤を含む第二の緩衝液で第二の洗浄を行うこと、を含み、前記第二の緩衝液のカオトロピック剤は、前記第一の緩衝液に含まれる塩と同一ではない。

【0013】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法が、本明細書において提供される。前記方法は、ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、カオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、結合した前記目的のタンパク質を溶出させること、及び溶出液を収集することであって、前記溶出液は前記目的のタンパク質を含有すること、を含む。

10

【0014】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法が、本明細書において提供される。前記方法は、ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、カオトロピック塩を含む緩衝溶液を前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスに供給すること、結合した前記目的のタンパク質を溶出させること、及び溶出液を収集することであって、前記溶出液は前記目的のタンパク質を含有すること、を含む。

20

【0015】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法であって、複合体タンパク質を収集することであって、前記複合体タンパク質は、複合体ポリマーに結合した抗体を含むこと、前記複合体タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記複合体タンパク質に結合すること、カオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、前記複合体タンパク質を溶出させること、及び溶出液を収集することであって、前記溶出液は前記複合体タンパク質を含むこと、を含む方法が本明細書において提供される。

30

【0016】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法であって、目的の標的タンパク質に結合したアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを、カオトロピック塩を含む緩衝液で洗浄すること、次に溶出させて溶出液を収集することであって、前記溶出液は、前記目的の標的タンパク質を含有すること、及び前記溶出液からウイルス汚染物質を除去すること、を含む方法が本明細書において提供される。本明細書において提供される方法のいくつかの実施形態では、前記溶出液からウイルス汚染物質を除去することが、低pH不活性化、界面活性剤不活性化、ポリッシングクロマトグラフィー工程、ウイルスろ過(VF)、限外ろ過(UF)、及び／又は透析ろ過(DF)のうち1又は複数を含む。

40

【0017】

本明細書において提供される方法のいくつかの実施形態では、生産物を製造する方法であって、目的の標的タンパク質に結合したアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを、カオトロピック塩を含む緩衝液で洗浄すること、前記カオトロピック塩を除去すること、及び溶出させて溶出液を収集することであって、前記溶出液が前記目的の標的タンパク質を含有すること、を含む方法が提供される。本明細書において提供される方法のい

50

くつかの実施形態では、前記溶出液が許容される医薬賦形剤とさらに組み合わせられて医薬組成物を形成する。本明細書において提供される方法のいくつかの実施形態では、緩衝溶液が前記医薬組成物に添加される。本明細書において提供される方法のいくつかの実施形態では、保存剤溶液が前記医薬組成物に添加される。本明細書において提供される方法のいくつかの実施形態では、前記医薬組成物が硝子体内注射用にさらに精製される。

【0018】

いくつかの実施形態では、生産物を処理するための方法が本明細書において提供される。前記方法は、溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすることを含む。前記方法は、カオトロピック塩を含む洗浄緩衝液で洗浄して溶出液を収集することをさらに含み、前記カオトロピック塩の濃度は、第一濃度から第二濃度に増加され、前記溶出液は少なくとも1つの画分に収集され、並びに前記少なくとも1つの画分には目的の生産物が含まれる。

10

【0019】

いくつかの実施形態では、生産物の製造方法であって、ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、カオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、溶出させて溶出液を収集することであって、前記溶出液は目的の標的タンパク質を含むこと、及び前記溶出液からウイルス汚染物質を除去すること、を含む方法が本明細書において提供される。

20

【0020】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法であって、溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすること、第一の洗浄緩衝液で洗浄すること、カオトロピック塩を含む第二の洗浄緩衝液で洗浄すること、第三の洗浄緩衝液で洗浄することであって、前記第三の洗浄緩衝液で、前記カオトロピック塩を除去すること、及び、溶出緩衝液で溶出させることであって、溶出液を収集し、前記溶出液はタンパク質産物を含むこと、を含む方法が本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、前記第一の洗浄緩衝液が50mMリン酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、前記第一の洗浄緩衝液が250mM塩化ナトリウムをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記第一の洗浄緩衝液がトリス及び塩を含む方法が本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、前記溶出液からウイルス汚染物質を除去することをさらに含む方法が本明細書において提供される。

30

【0021】

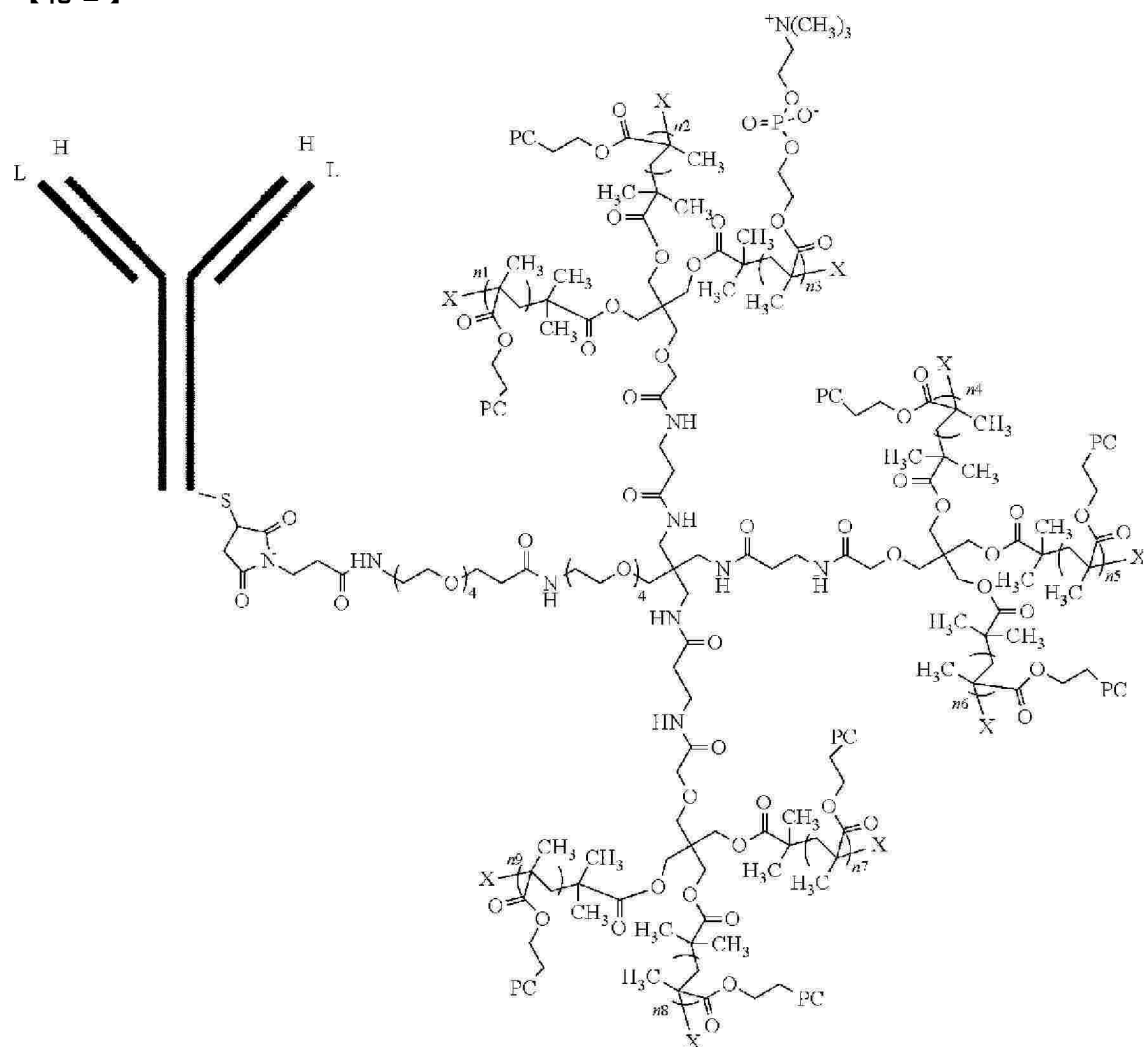
いくつかの実施形態では、ウイルス汚染物質を除去することが、低pH不活性化、界面活性剤不活性化、ポリッシングクロマトグラフィー工程、ウイルスろ過(VF)、限外ろ過(UF)、及び透析ろ過(DF)のうち1又は複数を含む方法が本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、前記溶離液が目的のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、前記目的のタンパク質が抗体である。いくつかの実施形態では、前記抗体がさらにポリマーに結合されて抗体複合体を形成する。いくつかの実施形態では、前記抗体複合体が二重特異性抗体を含む。いくつかの実施形態では、前記二重特異性抗体が抗VEGF結合部分及び抗IL-6結合部分を含む。

40

【0022】

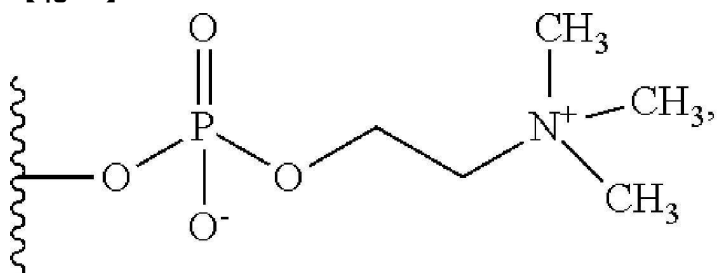
いくつかの実施形態では、前記抗体複合体が下記式(I)の構造を有する：

【化 1】



式中、抗 V E G F - A 抗体 の 各 重 鎖 は 文 字 H で 示 さ れ る と 共 に、抗 V E G F - A 抗体 の 各 軽 鎖 は 文 字 L で 示 さ れ、並 び に 前 記 ポ リ マー は、C 4 4 3 (E U 番 号 付 け) の ス ル フ ヒ ド リ ル を 介 し て 前 記 抗 V E G F - A 抗体 に 結 合 し、こ の 結 合 は 重 鎖 の 1 つ に 示 さ れ て い る。上 記 の 構 造 に お い て、P C は 以 下 の 構 造 を 指 す：

【化 2】



式中、波 線 は ポ リ マー の 残 り の 部 分 へ の 接 続 点 を 示 し、X は、a) - O R (R は - H、メ チ ル、エ チ ル、プ ロ ピ ル、又 は イ ソ プ ロ ピ ル)、b) - H、c) - B r、- C l、若 し く は - I を 含 む 任 意 の ハ ロ ゲ ン、d) - S C N、又 は e) - N C S で あ り、並 び に i) n 1、n 2、n 3、n 4、n 5、n 6、n 7、n 8、及 び n 9 は 同 じ か 異 な り、0 ~ 3 0 0 0 ま で の 整 数 で あ る か、又 は i i) n 1、n 2、n 3、n 4、n 5、n 6、n 7、n 8、及 び n 9 の 合 計 が 2 5 0 0 ± 1 5 % で あ る よ う に、n 1、n 2、n 3、n 4、n 5、n 6、n 7、n 8、及 び n 9 は 同 じ か 異 な る。

【0 0 2 3】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法であって、細胞培養上清を回収することであって、前記細胞培養上清は、目的のタンパク質を含むこと、次に前記細胞培養上清を溶離液で処理することであって、前記溶離液は、前記目的のタンパク質を含むこと、次に溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすること、及びトリス又はリン酸ナトリウムを含む第一の洗浄緩衝液で洗浄すること、次にカオトロピック塩を含む第二の洗浄緩衝液で洗浄すること、溶出緩衝液で溶出させることであって、溶出液を収集し、前記溶出液はタンパク質産物を含むこと、次に前記溶出液中に存在するウイルス汚染物質を低pHウイルス緩衝液で不活性化し、ウイルス不活性化溶出液を生じさせること、前記ウイルス不活性化溶出液をろ過すること、前記ウイルス不活性化溶出液に対して少なくとも1回のイオン交換クロマトグラフィーを行うこと、及び前記ウイルス不活性化溶出液をろ過して保持液を得ることであって、前記保持液は目的のタンパク質を含むこと、を含む方法が本明細書において提供される。

10

【0024】

いくつかの実施形態では、前記細胞培養上清が動物成分不含細胞培養物を用いてバイオリアクターで生産されたものである。いくつかの実施形態では、前記細胞培養上清を処理することが細胞培養物から細胞産物を採取することを含む。いくつかの実施形態では、前記細胞培養物を清澄化して細胞及び細胞片を除去する。いくつかの実施形態では、前記溶離液が前記清澄化細胞培養上清を含む。

【0025】

いくつかの実施形態では、アフィニティークロマトグラフィーを用いたタンパク質の精製方法であって、ロード液を媒体と接触させることであって、前記媒体は、目的のタンパク質を結合するアフィニティークロマトグラフィーマトリックスであること、次にカオトロピック剤を含む緩衝溶液で前記媒体を洗浄することであって、前記カオトロピック剤は塩であること、及び前記目的のタンパク質を溶出させるのに適した条件下で、洗浄した媒体を溶出溶液と接触させること、を含む方法が本明細書において提供される。

20

【0026】

いくつかの実施形態では、生産物の製造方法であって、目的のタンパク質を含む溶液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスに適用すること、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを第一の緩衝液で洗浄すること、次にカオトロピック剤を含む第二の緩衝液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、次にカオトロピック剤を除去するために第三の緩衝液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、次に溶出緩衝液で溶出させることであって、溶出液を収集し、前記溶出液はタンパク質産物を含むこと、を含む方法が本明細書において提供される。

30

【0027】

いくつかの実施形態では、タンパク質精製のためのシステムであって、第一の抗原結合タンパク質が結合したカラム、リン酸ナトリウム及び塩を含むリン酸洗浄緩衝液、トリスを含む中間洗浄緩衝液、塩化マグネシウムを含む第二の洗浄緩衝液、並びにギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液を含む、システムが本明細書において提供される。

【0028】

いくつかの実施形態では、タンパク質精製のためのシステムであって、第一の抗原結合タンパク質が結合したカラム、トリス及び塩を含む第一のトリス洗浄緩衝液、中間トリス洗浄緩衝液、塩化マグネシウムを含む第二の洗浄緩衝液、並びにギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液を含む、システムが本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、前記カラムがアフィニティークロマトグラフィー用のリガンドを含む。いくつかの実施形態では、前記リガンドがプロテインA又はプロテインGを含む。いくつかの実施形態では、リン酸ナトリウム及び塩を含む前記第一の洗浄緩衝液のpHが5.5～9.5である。いくつかの実施形態では、リン酸ナトリウム及び塩を含む前記リン酸洗浄緩衝液が約50mMのリン酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、リン酸ナトリウム及び塩を含む前記リン酸洗浄緩衝液が約250mM塩化ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、

40

50

前記第一のトリス洗浄緩衝液が約 50 mM のトリスを含む。いくつかの実施形態では、前記第一のトリス洗浄緩衝液がさらに約 250 mM 塩化ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、前記中間トリス洗浄緩衝液が約 50 mM トリスを含む。いくつかの実施形態では、前記第一のトリス洗浄緩衝液の pH が約 7.2 である。いくつかの実施形態では、前記第二の洗浄緩衝液の pH が約 7.8 である。いくつかの実施形態では、前記第二の洗浄緩衝液中の塩化マグネシウムの濃度が約 2.8 M である。いくつかの実施形態では、前記溶出緩衝液中のギ酸ナトリウムの濃度が 10 mM である。

【0029】

いくつかの実施形態では、抗体精製のためのシステムであって、抗体に結合したプロテイン A 樹脂を有するカラムであって、前記抗体は、それぞれ配列番号 91～93 及び 28～30 のうちの少なくとも 1 つ並びに配列番号 7～13、19～27、89、90、及び 256～262 のうちの少なくとも 1 つである軽鎖及び重鎖を含む、カラムと、カオトロピック塩を含むカオトロピック洗浄緩衝液と、ギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液と、を含む、システムが本明細書に記載されている。

10

【0030】

いくつかの実施形態では、前記目的のタンパク質が二重特異性抗体である。いくつかの実施形態では、前記二重特異性抗体が VEGF 及び IL-6 に対して特異的である。いくつかの実施形態では、前記目的のタンパク質が抗体複合体である。いくつかの実施形態では、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスがプロテイン A クロマトグラフィーマトリックスである。いくつかの実施形態では、前記緩衝溶液中の前記カオトロピック剤は、リチウム及びリチウム塩、マグネシウム及びマグネシウム塩、カルシウム及びカルシウム塩、並びにグアニジニウム及びグアニジニウム塩のうち 1 又は複数を含む。いくつかの実施形態では、リチウム及びリチウム塩、マグネシウム及びマグネシウム塩、カルシウム及びカルシウム塩、並びにグアニジニウム及びグアニジニウム塩のうち 1 又は複数の濃度が、0.05～3.5 M である。いくつかの実施形態では、前記緩衝溶液はさらにトリスを含む。いくつかの実施形態では、前記緩衝溶液中のトリスの濃度は、少なくとも 5 mM である。いくつかの実施形態では、前記緩衝溶液の pH が 5.5 より大きい。いくつかの実施形態では、前記溶出液がさらにウイルス不純物を含む。

20

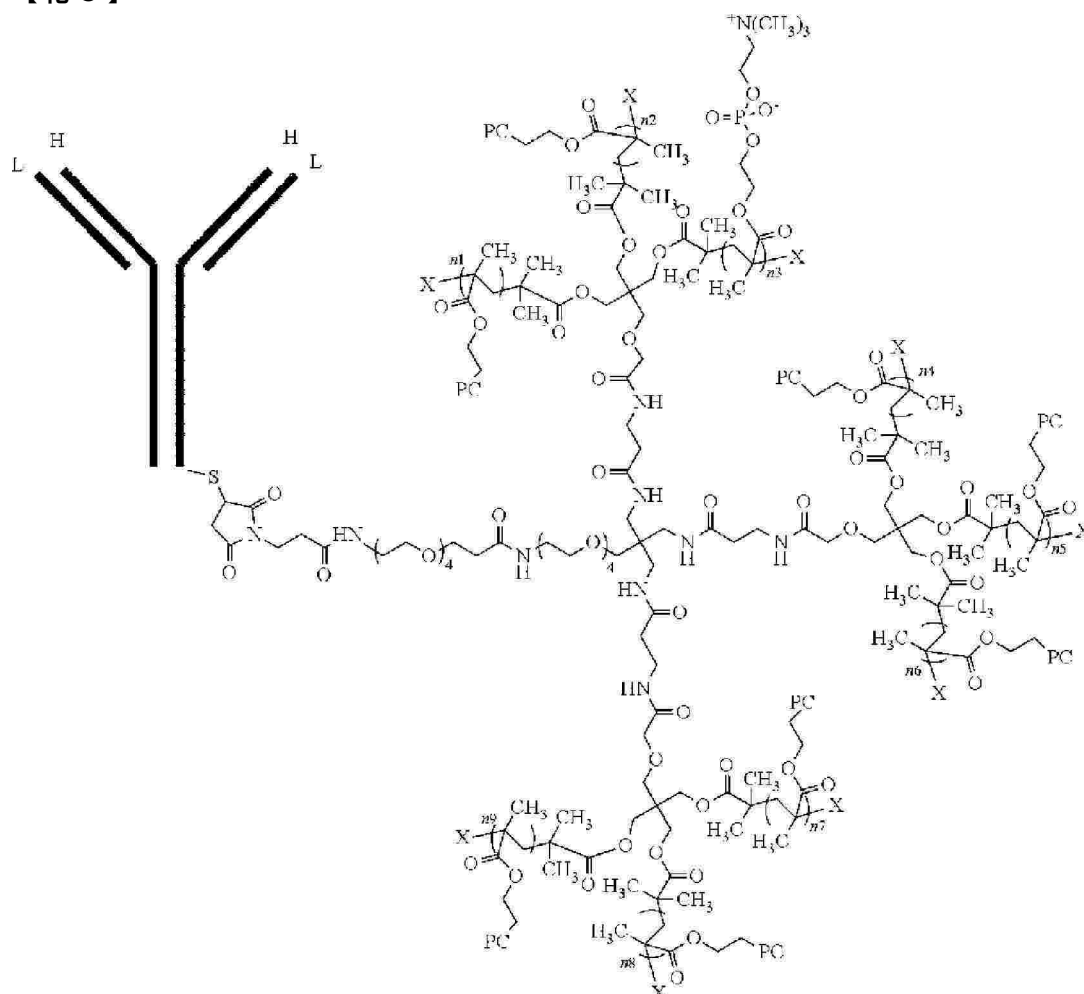
【0031】

本明細書に記載されている方法のいくつかの実施形態では、前記方法はウイルス不純物を除去することをさらに含む。本明細書に記載されている方法のいくつかの実施形態では、前記方法は前記ウイルス不純物を不活性化することをさらに含む。本明細書に記載されている方法のいくつかの実施形態では、前記方法は、前記緩衝溶液で洗浄する前に、前記ロード液がロードされたアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを予洗浄緩衝溶液で洗浄する工程をさらに含む。本明細書に記載されている方法のいくつかの実施形態では、前記方法は、前記緩衝溶液で洗浄した後、前記溶離液がロードされた前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを後洗浄緩衝溶液で洗浄する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記予洗浄緩衝溶液がリン酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、前記抗体複合体が下記式 (I) の構造を有する：

30

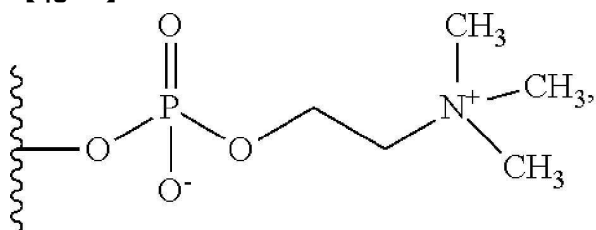
40

【化 3】



式中、抗 V E G F - A 抗体 of 各重鎖は文字 H で示されると共に、抗 V E G F - A 抗体 of 各軽鎖は文字 L で示され、前記ポリマーは、C 4 4 3 (E U 番号付け) のスルフヒドリルを介して前記抗 V E G F - A 抗体に結合し、この結合は重鎖の 1 つに示されており、P C は下記構造を有する：

【化 4】



式中、波線はポリマーの残りの部分への接続点を示し、X は、a) - O R (R は - H 、メチル、エチル、プロピル、又はイソプロピル)、b) - H 、c) - B r 、- C l 、若しくは - I を含む任意のハロゲン、d) - S C N 、又は e) - N C S であり、並びに i) n 1 、n 2 、n 3 、n 4 、n 5 、n 6 、n 7 、n 8 、及び n 9 は同じか異なり、0 ~ 3 0 0 0 までの整数であるか、又は i i) n 1 、n 2 、n 3 、n 4 、n 5 、n 6 、n 7 、n 8 、及び n 9 の合計が 2 5 0 0 ± 1 5 % であるように、n 1 、n 2 、n 3 、n 4 、n 5 、n 6 、n 7 、n 8 、及び n 9 は同じか異なる。

【0 0 3 2】

いくつかの実施形態では、前記抗体複合体が抗 V E G F - A 軽鎖及び抗 V E G F - A 重鎖を含む抗 V E G F 抗体複合体を含み、前記抗 V E G F - A 抗体重鎖が、配列番号 1 7 2 の C D R H 1 である C D R H 1 、配列番号 1 7 3 の C D R H 2 である C D R H 2 、及び配

列番号 174 の CDRH3 である CDRH3 を含み、並びに前記抗 VEGF-A 抗体軽鎖が、配列番号 199 の CDR L1 である CDR L1、配列番号 200 の CDR L2 である CDR L2、及び配列番号 201 の CDR L3 である CDR L3 を含む。

【0033】

いくつかの実施形態では、前記抗 VEGF 抗体複合体が、MPC モノマーを含むポリマーに結合した抗 VEGF-A 免疫グロブリン G (IgG) を含む抗体複合体を含み、前記抗 VEGF-A 抗体重鎖の配列は、配列番号 7~13、19~27、89、90、及び 256~262 のうちの少なくとも 1 つであり、抗 VEGF-A 抗体軽鎖の配列は、配列番号 91~93、及び 28~30 のうちの少なくとも 1 つであり、並びに前記抗体が C449 で前記ポリマーに結合している。

【0034】

いくつかの実施形態では、前記目的の標的タンパク質が細胞培養物によって生産される。いくつかの実施形態では、前記細胞培養物が CHO 細胞を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液で洗浄した後、前記溶離液がロードされた前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを後洗浄緩衝溶液で洗浄する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質以外の核酸、エンドトキシン、消泡剤、又はその他の小分子が除去される。いくつかの実施形態では、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを前記緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質を前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスに結合したまま不純物を除去する。いくつかの実施形態では、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを前記緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質以外の宿主細胞タンパク質を除去する。いくつかの実施形態では、前記緩衝溶液へのカオトロピック剤の添加によって、前記目的の標的タンパク質が溶出されない。本明細書に記載されている方法のいくつかの実施形態では、前記方法が、ウイルス不活性化、タンジェンシャルフローろ過、透析ろ過、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、又はウイルス低減ろ過のうち 1 又は複数をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記溶離液が動物成分不含細胞培養物を用いてバイオリアクターで生産されたものである。いくつかの実施形態では、前記生産物が目的のタンパク質である。いくつかの実施形態では、不純物が宿主細胞タンパク質不純物を含む。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図 1】図 1 は、目的のタンパク質の収集及び精製のいくつかの実施形態の通常のプロトコルを示した図である。

【図 2】図 2 は、目的のタンパク質の収集及び精製のための通常のプロトコルを示した図である。

【図 3】図 3 は、本開示の実施形態に係るカラムクロマトグラフィーの通常のプロトコルを示した図である。

【図 4】図 4 は、異なる洗浄緩衝溶液で実行された一連のクロマトグラフィープロファイルを示した図である。

【図 5】図 5 は、異なる洗浄緩衝溶液で実行された一連のクロマトグラフィープロファイルを示した図である。

【図 6】図 6 は、異なる洗浄緩衝溶液で実行された一連のクロマトグラフィープロファイルを示した図である。

【図 7】図 7 は、異なる洗浄緩衝溶液で実行された一連のクロマトグラフィープロファイルを示した図である。

【図 8】図 8 は、抗 VEGF 抗体のいくつかの実施形態のアミノ酸配列を示した図である。

【図 9】図 9 は、IL-6-VEGF Trap (トラップ) 融合タンパク質のいくつかの実施形態を示した図である。VEGF Trap ドメインは、可変ドメインの直前の N

10

20

30

40

50

末端（左）又は抗体の Fab 領域とヒンジ領域との間に配置される（右）。

【図 10】図 10 は、VEGF__trap__バリエーション__1、VEGF__trap__バリエーション__2、及び VEGF__trap__バリエーション__3 の配列表を示した図である。

【図 11】図 11 は、抗 IL-6 重鎖可変領域配列の実施形態を示した図である。CDR に下線を付した。

【図 12】図 12 は、VEGF Trap 配列の様々な実施形態を示した図である。配列間で異なるセクションは太字で下線を付した。図 12 に、リンカー（GS）配列の実施形態のいくつかの実施形態をさらに示す。二重反復 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser リンカー（GS）として存在する場合がある。

【図 13】図 13 は、抗 IL-6 分子の重鎖配列のいくつかの実施形態を示した図である。CDR に下線を付した。

【図 14】図 14 は、抗 IL-6 分子の重鎖配列のいくつかの実施形態を示した図である。CDR に下線を付した。

【図 15】図 15 は、抗 IL-6 分子の軽鎖配列のいくつかの実施形態を示した図である。CDR に下線を付した。

【図 16-1】図 16 は、抗 IL-6 分子の重鎖配列のいくつかの実施形態を示した図である。CDR に下線を付した。

【図 16-2】図 16 は、抗 IL-6 分子の重鎖配列のいくつかの実施形態を示した図である。CDR に下線を付した。

【図 17A】図 17A は、CDR の組み合わせのいくつかの実施形態を示した図である。

【図 17B】図 17B は、CDR の組み合わせのいくつかの実施形態を示した図である。

【図 18】図 18 は、VEGFR-Fc 配列バリエーションのいくつかの実施形態を示した図である。配列間で異なるセクションは太字で下線を付した。

【発明を実施するための形態】

【0036】

いくつかの実施形態では、クロマトグラフィーを使用して望ましい分子種と望ましくない分子種とを優先的に分離することにより、不純物を低減する方法及びシステムを本明細書において提供する。

【0037】

いくつかの実施形態では、アフィニティークロマトグラフィーを使用して生産物を精製する方法である。いくつかの実施形態では、前記方法は、溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすること、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは目的のタンパク質に結合すること、及びカオトロピック剤を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、を含む。

【0038】

いくつかの実施形態では、タンパク質及び 1 又は複数の不純物を含むロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスに通し、続いてカオトロピック塩を含む少なくとも 1 つの洗浄溶液を通し、溶出溶液を使用して前記タンパク質を収集することによって、前記ロード液から生産物を精製して不純物を減らす方法である。

【0039】

いくつかの実施形態では、目的のタンパク質を含む溶出液中の不純物を分離する方法である。いくつかの実施形態では、前記方法は、目的のタンパク質を含む溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすること、及びマグネシウム又はマグネシウム塩を含む 1 又は複数の緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、を含む。

【0040】

いくつかの実施形態では、アフィニティークロマトグラフィーを使用して生産物を製造する方法である。いくつかの実施形態では、前記方法は、目的のタンパク質を含有する溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすること、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスの第一の洗浄をリン酸ナトリウム及び塩を含む

10

20

30

40

50

第一の緩衝液で行うこと、並びに前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスの第二の洗浄をカオトロピック剤を含む第二の緩衝液で行うこと、を含む。

【0041】

いくつかの実施形態では、アフィニティークロマトグラフィーを使用して生産物を製造する方法である。いくつかの実施形態では、前記方法は、目的のタンパク質を含む溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすること、トリス及び塩を含む第一の緩衝液で第一の洗浄を行うこと、及びトリス及びカオトロピック剤を含む第二の緩衝液で第二の洗浄を行うこと、を含み、前記第二の緩衝液のカオトロピック剤は、前記第一の緩衝液に含まれる塩と同一ではない。

【0042】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法である。いくつかの実施形態では、前記方法は、(i) ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、(ii) 前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、(iii) カオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、(iv) 前記結合した目的のタンパク質を溶出させること、及び(v) 溶出液を収集することであって、前記溶出液は前記目的のタンパク質を含有すること、を含む。

【0043】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法である。いくつかの実施形態では、前記方法は、ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、カオトロピック塩を含む緩衝溶液を前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスに供給すること、結合した前記目的のタンパク質を溶出させること、及び溶出液を収集することであって、前記溶出液は前記目的のタンパク質を含有すること、を含む。

【0044】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法である。いくつかの実施形態では、前記方法は、複合体タンパク質を収集することであって、前記複合体タンパク質は、複合体ポリマーに結合した抗体を含むこと、前記複合体タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記複合体タンパク質に結合すること、カオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、前記複合体タンパク質を溶出させること、及び溶出液を収集することであって、前記溶出液は前記複合体タンパク質を含むこと、を含む方法が本明細書において提供される。

【0045】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法である。いくつかの実施形態では、前記方法は、目的の標的タンパク質に結合したアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを、カオトロピック塩を含む緩衝液で洗浄すること、溶出させて溶出液を収集することであって、前記溶出液は、前記目的の標的タンパク質を含有すること、及び前記溶出液からウイルス汚染物質を除去すること、を含む。いくつかの実施形態では、前記溶出液からウイルス汚染物質を除去することが、低pH不活性化、界面活性剤不活性化、ポリッシングクロマトグラフィー工程、ウイルスろ過(VF)、限外ろ過(UF)、及び／又は透析ろ過(DF)のうち1又は複数を含む。

【0046】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法である。いくつかの実施形態では、前記方法は、目的の標的タンパク質に結合したアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを、カオトロピック塩を含む緩衝液で洗浄すること、前記カオトロピック塩を除去すること、及び溶出させて溶出液を収集することであって、前記溶出液が前記目的の標的タ

10

20

30

40

50

ンパク質を含有すること、を含む。いくつかの実施形態では、前記溶出液が許容される医薬賦形剤とさらに組み合わせられて医薬組成物を形成する。いくつかの実施形態では、緩衝溶液が前記医薬組成物に添加される。いくつかの実施形態では、保存剤溶液が前記医薬組成物に添加される。いくつかの実施形態では、前記医薬組成物が硝子体内注射用にさらに精製される。

【0047】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法である。いくつかの実施形態では、前記方法は、ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、カオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、溶出させて溶出液を収集することであって、前記溶出液は目的の標的タンパク質を含むこと、及び前記溶出液からウイルス汚染物質を除去すること、を含む。

【0048】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法である。いくつかの実施形態では、前記方法は、溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすること、第一の洗浄緩衝液で洗浄すること、カオトロピック塩を含む第二の洗浄緩衝液で洗浄すること、第三の洗浄緩衝液で洗浄することであって、前記第三の洗浄緩衝液で、前記カオトロピック塩を除去すること、及び、溶出緩衝液で溶出させることであって、溶出液を収集し、前記溶出液はタンパク質産物を含むこと、を含む。いくつかの実施形態では、前記第一の洗浄緩衝液が50 mMリン酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、前記第一の洗浄緩衝液が250 mM塩化ナトリウムをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記第一の洗浄緩衝液がトリス及び塩を含む。いくつかの実施形態では、前記方法は、前記溶出液からウイルス汚染物質を除去することをさらに含む。いくつかの実施形態では、ウイルス汚染物質を除去することが、低pH不活性化、界面活性剤不活性化、ポリッシングクロマトグラフィー工程、ウイルスろ過(VF)、限外ろ過(UF)、及び透析ろ過(DF)のうち1又は複数を含む。いくつかの実施形態では、前記溶離液が目的のタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、前記目的のタンパク質が抗体である。いくつかの実施形態では、前記抗体がさらにポリマーに結合されて抗体複合体を形成する。いくつかの実施形態では、前記抗体複合体が下記式(I)の構造を有する：

10

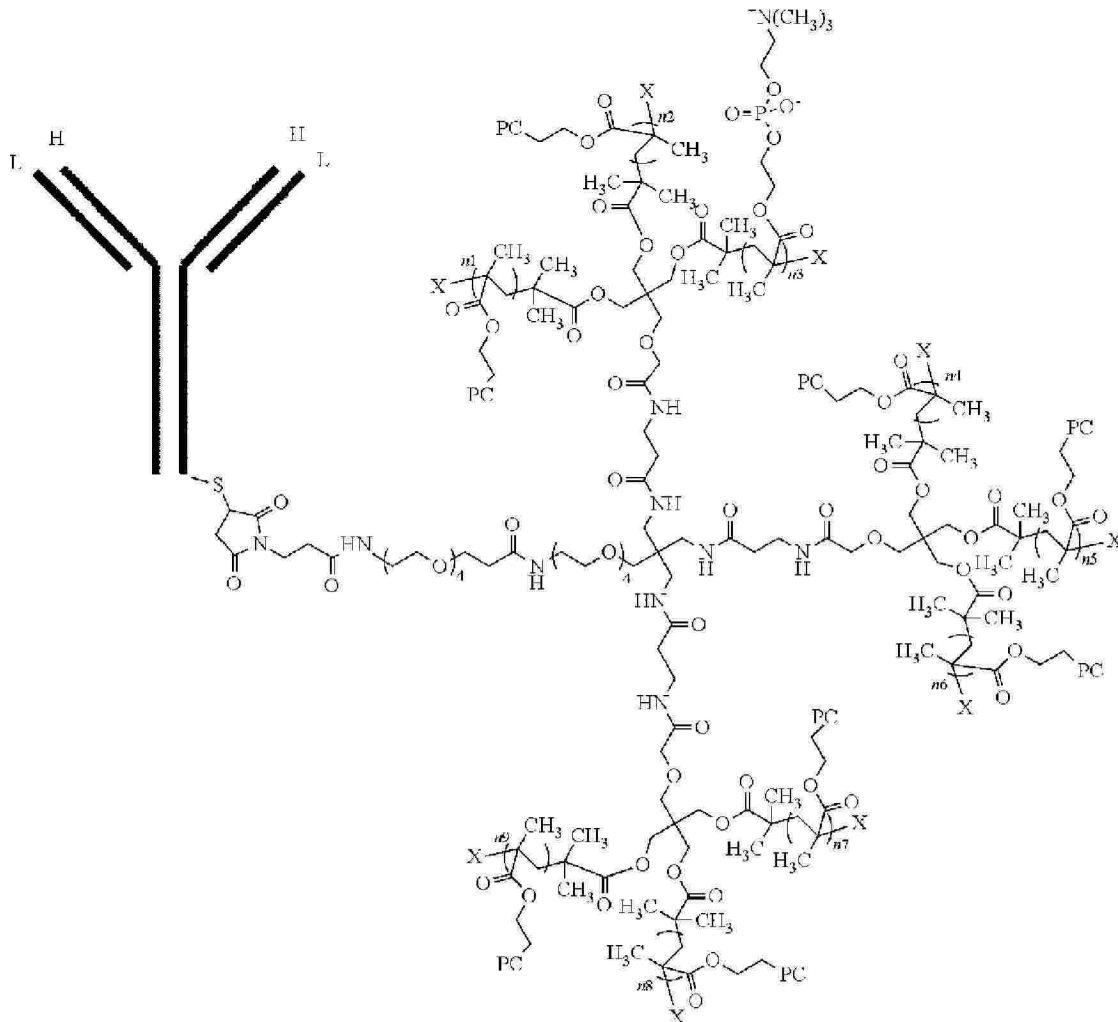
20

30

40

50

【化 5】



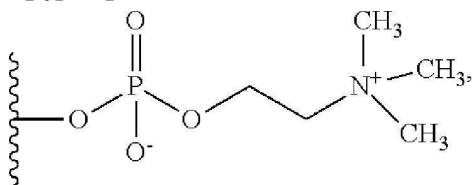
10

20

30

式中、抗 V E G F - A 抗体の各重鎖は文字 H で示されると共に、抗 V E G F - A 抗体の各軽鎖は文字 L で示され、前記ポリマーは、C 4 4 3 (E U 番号付け) のスルフヒドリルを介して前記抗 V E G F - A 抗体に結合し、この結合は重鎖の 1 つに示されており、P C は

【化 6】



40

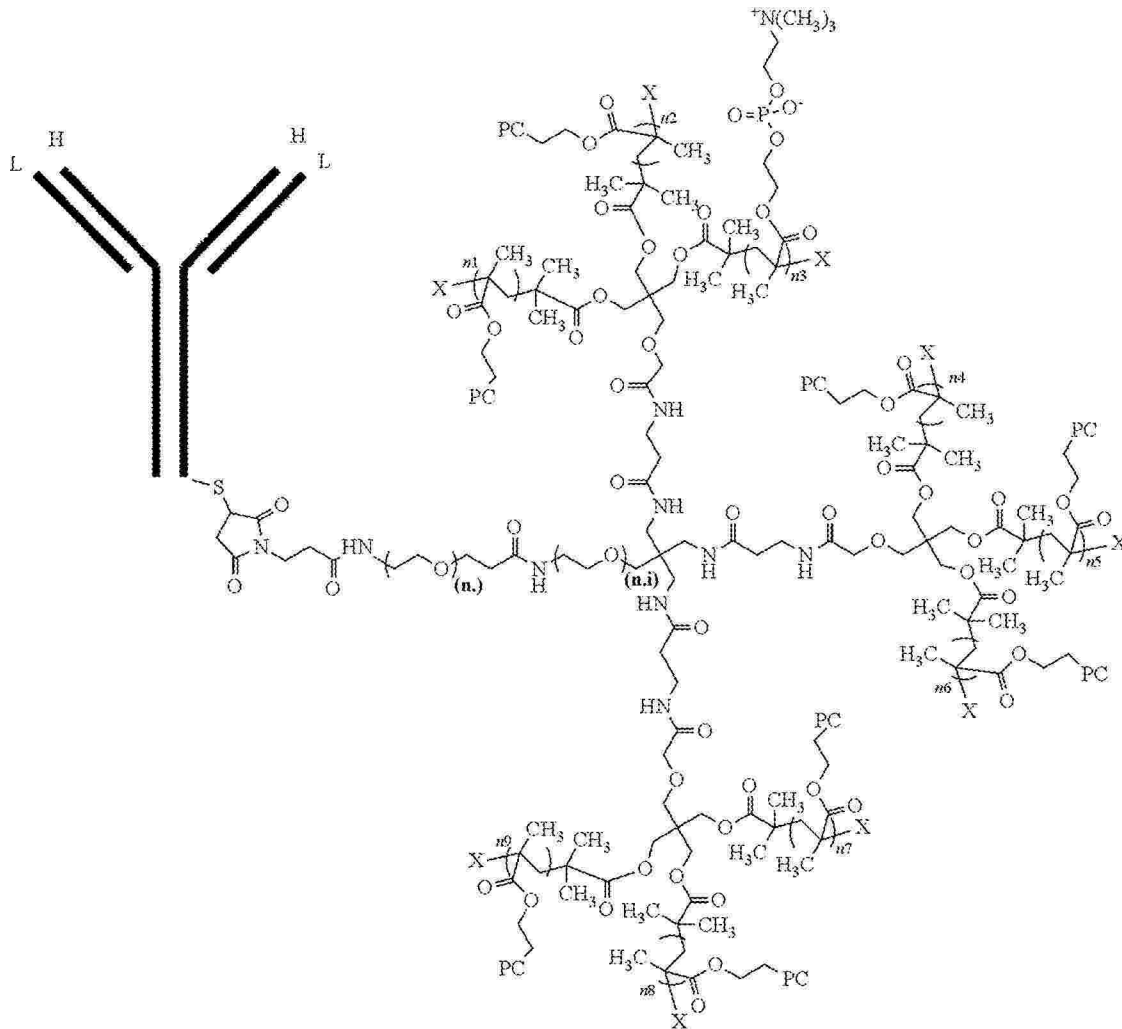
(式中、波線はポリマーの残りの部分への接続点を示す) であり、X は、a) - O R (R は - H 、メチル、エチル、プロピル、又はイソプロピル)、b) - H 、c) - B r 、- C l 、若しくは - I を含む任意のハロゲン、d) - S C N 、又は e) - N C S であり、並びに i) n 1 、n 2 、n 3 、n 4 、n 5 、n 6 、n 7 、n 8 、及び n 9 は同じか異なり、0 ~ 3 0 0 0 までの整数であるか、又は i i) n 1 、n 2 、n 3 、n 4 、n 5 、n 6 、n 7 、n 8 、及び n 9 の合計が 2 5 0 0 ± 1 5 % であるように、n 1 、n 2 、n 3 、n 4 、n 5 、n 6 、n 7 、n 8 、及び n 9 は同じか異なる。いくつかの実施形態では、前記抗体複合体が二重特異性抗体を含む。いくつかの実施形態では、前記二重特異性抗体が抗 V E G F 結合部分及び抗 I L - 6 結合部分を含む。

【0 0 4 9】

いくつかの実施形態では、前記抗体複合体が下記式 (I I) の構造を有する：

50

【化 7】



10

20

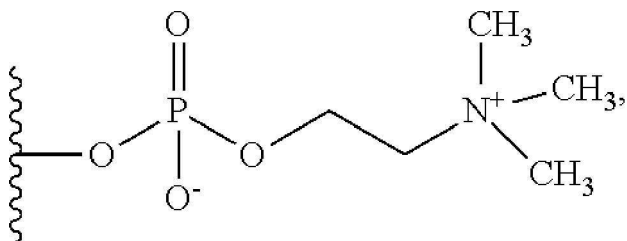
30

40

50

式中、「 n 」は1～50の整数であり、「 $n.i$ 」は1～50の整数であり；抗VEGF-A抗体の各重鎖は文字Hで示されると共に、抗VEGF-A抗体の各軽鎖は文字Lで示され、前記ポリマーは、C443（EU番号付け）のスルフィドを介して前記抗VEGF-A抗体に結合し、この結合は重鎖の1つに示されており、PCは

【化 8】



（式中、波線はポリマーの残りの部分への接続点を示す）であり、Xは、a) -OR（Rは-H、メチル、エチル、プロピル、又はイソプロピル）、b) -H、c) -Br、-Cl、若しくは-Iを含む任意のハロゲン、d) -SCN、又はe) -NCSであり、並びにi) n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 、 n_8 、及び n_9 は同じか異なり、0～3000までの整数であるか、又はii) n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 、 n_8 、及び n_9 の合計が $2500 \pm 15\%$ であるように、 n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 、 n_8 、及び n_9 は同じか異なる。いくつかの実施形態では、前記抗体複合体が二重特異性抗体を含む。いくつかの実施形態では、前記二重特異性抗体が抗VEGF結合部分及び抗IL-6結合部分を含む。

【0050】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法である。いくつかの実施形態では、前記方法は、細胞培養上清を回収することであって、前記細胞培養上清は、目的のタンパク質を含むこと、前記細胞培養上清を溶離液で処理することであって、前記溶離液は、前記目的のタンパク質を含むこと、前記溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすること、トリス又はリン酸ナトリウムを含む第一の洗浄緩衝液で洗浄すること、カオトロピック塩を含む第二の洗浄緩衝液で洗浄すること、溶出緩衝液で溶出させることであって、溶出液を収集し、前記溶出液はタンパク質産物を含むこと、前記溶出液中に存在するウイルス汚染物質を低pHウイルス緩衝液で不活性化し、ウイルス不活性化溶出液を生じさせること、前記ウイルス不活性化溶出液をろ過すること、前記ウイルス不活性化溶出液に対して少なくとも1回のイオン交換クロマトグラフィーを行うこと、及び前記ウイルス不活性化溶出液をろ過して保持液を得ることであって、前記保持液は目的のタンパク質を含むこと、を含む方法が本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、前記細胞培養上清が動物成分不含細胞培養物を用いてバイオリアクターで生産されたものである。いくつかの実施形態では、前記細胞培養上清を処理することが細胞培養物から細胞産物を採取することを含む。いくつかの実施形態では、前記細胞培養物を清澄化して細胞及び細胞片を除去する。いくつかの実施形態では、前記溶離液が前記清澄化細胞培養上清を含む。

10

【0051】

いくつかの実施形態では、アフィニティークロマトグラフィーを使用してタンパク質を精製する方法である。いくつかの実施形態では、前記方法は、ロード液を媒体と接触させることであって、前記媒体は、目的のタンパク質を結合するアフィニティークロマトグラフィーマトリックスであること、カオトロピック剤を含む緩衝溶液で前記媒体を洗浄することであって、前記カオトロピック剤は塩であること、及び前記目的のタンパク質を溶出させるのに適した条件下で、洗浄した媒体を溶出溶液と接触させること、を含む。

20

【0052】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法である。いくつかの実施形態では、前記方法は、目的のタンパク質を含む溶液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスに適用すること、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを第一の緩衝液で洗浄すること、カオトロピック剤を含む第二の緩衝液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、カオトロピック剤を除去するために第三の緩衝液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、及び溶出緩衝液で溶出させることであって、溶出液を収集し、前記溶出液はタンパク質産物を含むこと、を含む。

30

【0053】

いくつかの実施形態では、タンパク質精製のためのシステムである。いくつかの実施形態では、前記システムは、第一の抗原結合タンパク質が結合したカラム、リン酸ナトリウム及び塩を含むリン酸洗浄緩衝液、トリスを含む中間洗浄緩衝液、塩化マグネシウムを含む第二の洗浄緩衝液、並びにギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液を含む。

【0054】

いくつかの実施形態では、タンパク質精製のためのシステムである。いくつかの実施形態では、前記システムは、第一の抗原結合タンパク質が結合したカラム、トリス及び塩を含む第一のトリス洗浄緩衝液、中間トリス洗浄緩衝液、塩化マグネシウムを含む第二の洗浄緩衝液、並びにギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、前記カラムがアフィニティークロマトグラフィー用のリガンドを含む。いくつかの実施形態では、前記リガンドがプロテインA又はプロテインGを含む。いくつかの実施形態では、リン酸ナトリウム及び塩を含む前記第一の洗浄緩衝液のpHが5.5～9.5である。いくつかの実施形態では、リン酸ナトリウム及び塩を含む前記リン酸洗浄緩衝液が約50mMのリン酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、リン酸ナトリウム及び塩を含む前記リン酸洗浄緩衝液が約250mM塩化ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、前記第一のトリス洗浄緩衝液が約50mMのトリスを含む。いくつかの実施形態では、前

40

50

記第一のトリス洗浄緩衝液がさらに約 250 mM 塩化ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、前記中間トリス洗浄緩衝液が約 50 mM トリスを含む。いくつかの実施形態では、前記第一のトリス洗浄緩衝液の pH が約 7.2 である。いくつかの実施形態では、前記第二の洗浄緩衝液の pH が約 7.8 である。いくつかの実施形態では、前記第二の洗浄緩衝液中の塩化マグネシウムの濃度が約 2.8 M である。いくつかの実施形態では、前記溶出緩衝液中のギ酸ナトリウムの濃度が 10 mM である。

【0055】

いくつかの実施形態は、抗体精製のためのシステムである。いくつかの実施形態では、前記システムは、抗体に結合したプロテイン A 樹脂を有するカラムを含み、前記抗体は、それぞれ配列番号 91~93 及び 28~30 のうちの少なくとも 1 つ並びに配列番号 7~13、19~27、89、90、及び 256~262 のうちの少なくとも 1 つである軽鎖及び重鎖を含む、カラムと、カオトロピック塩を含むカオトロピック洗浄緩衝液と、ギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液と、を含む。いくつかの実施形態では、前記目的のタンパク質が二重特異性抗体である。いくつかの実施形態では、前記二重特異性抗体が VEGF 及び IL-6 に対して特異的である。いくつかの実施形態では、前記二重特異性抗体が OG2072 である。いくつかの実施形態では、前記目的のタンパク質が抗体複合体である。いくつかの実施形態では、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスがプロテイン A クロマトグラフィーマトリックスである。いくつかの実施形態では、前記緩衝溶液中の前記カオトロピック剤は、リチウム、リチウム塩、マグネシウム、マグネシウム塩、カルシウム、カルシウム塩、グアニジニウム、及び／又はグアニジニウム塩のうち 1 又は複数を含む。いくつかの実施形態では、リチウム、リチウム塩、マグネシウム、マグネシウム塩、カルシウム、カルシウム塩、グアニジニウム、及び／又はグアニジニウム塩のうち 1 又は複数の濃度が、それぞれ 0.05~3.5 M である。いくつかの実施形態では、前記緩衝溶液はさらにトリスを含む。いくつかの実施形態では、前記緩衝溶液中のトリスの濃度は、少なくとも 5 mM である。いくつかの実施形態では、前記緩衝溶液の pH が 5.5 より大きい。いくつかの実施形態では、前記溶出液がさらにウイルス不純物を含む。いくつかの実施形態では、前記方法は、前記ウイルス不純物を除去することをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記方法は、前記ウイルス不純物を不活性化することをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記方法は、前記緩衝溶液で洗浄する前に、前記ロード液がロードされたアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを予洗浄緩衝溶液で洗浄する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記方法は、前記緩衝溶液で洗浄した後、前記溶離液がロードされた前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを後洗浄緩衝溶液で洗浄する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記予洗浄緩衝溶液がリン酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、前記予洗浄緩衝溶液がトリス及び塩を含む。いくつかの実施形態では、前記抗体複合体が下記式 (I) の構造を有する：

10

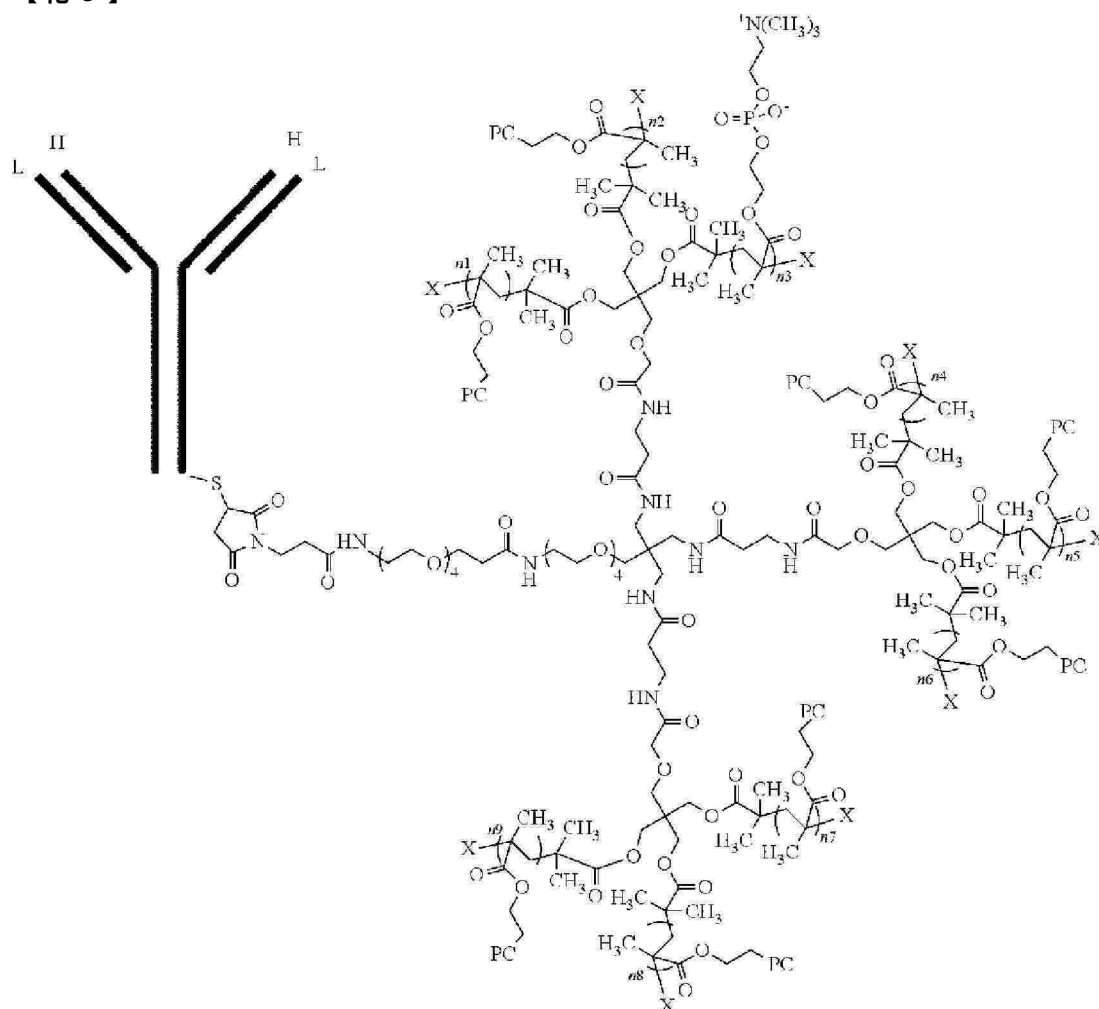
20

30

40

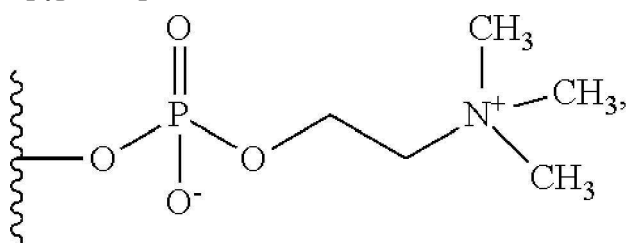
50

【化 9】



式中、抗 V E G F - A 抗体の各重鎖は文字 H で示されると共に、抗 V E G F - A 抗体の各軽鎖は文字 L で示され、前記ポリマーは、C 4 4 3 (E U 番号付け) のスルフヒドリルを介して前記抗 V E G F - A 抗体に結合し、この結合は重鎖の 1 つに示されており、P C は

【化 1 0】



(式中、波線はポリマーの残りの部分への接続点を示す) であり、X は、a) - O R (R は - H、メチル、エチル、プロピル、又はイソプロピル)、b) - H、c) - B r、- C l、若しくは - I を含む任意のハロゲン、d) - S C N、又は e) - N C S であり、並びに i) n 1、n 2、n 3、n 4、n 5、n 6、n 7、n 8、及び n 9 は同じか異なり、0 ~ 3 0 0 0 までの整数であるか、又は i i) n 1、n 2、n 3、n 4、n 5、n 6、n 7、n 8、及び n 9 の合計が 2 5 0 0 ± 1 5 % であるように、n 1、n 2、n 3、n 4、n 5、n 6、n 7、n 8、及び n 9 は同じか異なる。いくつかの実施形態では、前記抗体複合体が抗 V E G F - A 軽鎖及び抗 V E G F - A 重鎖を含む抗 V E G F 抗体複合体を含み、前記抗 V E G F - A 抗体重鎖が、配列番号 1 7 2 の C D R H 1 である C D R H 1、配列番号 1 7 3 の C D R H 2 である C D R H 2、及び配列番号 1 7 4 の C D R H 3 である C D R H 3 を含み、並びに前記抗 V E G F - A 抗体軽鎖が、配列番号 1 9 9 の C D R L 1 である

C D R L 1、配列番号 2 0 0 の C D R L 2 である C D R L 2、及び配列番号 2 0 1 の C D R L 3 である C D R L 3 を含む。いくつかの実施形態では、前記抗 V E G F 抗体複合体が、M P C モノマーを含むポリマーに結合した抗 V E G F - A 免疫グロブリン G (I g G) を含む抗体複合体を含み、前記抗 V E G F - A 抗体重鎖の配列は、配列番号 7 ~ 1 3、1 9 ~ 2 7、8 9、9 0、及び 2 5 6 ~ 2 6 2 のうちの少なくとも 1 つであり、抗 V E G F - A 抗体軽鎖の配列は、配列番号 9 1 ~ 9 3、及び 2 8 ~ 3 0 のうちの少なくとも 1 つであり、並びに前記抗体が C 4 4 9 で前記ポリマーに結合している。

【 0 0 5 6 】

いくつかの実施形態では、前記目的の標的タンパク質が細胞培養物によって生産される。いくつかの実施形態では、前記細胞培養物が C H O 細胞を含む。いくつかの実施形態では、前記方法は、前記緩衝溶液で洗浄した後、前記溶離液がロードされた前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを後洗浄緩衝溶液で洗浄する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質以外の核酸、エンドトキシン、消泡剤、又はその他の小分子が除去される。いくつかの実施形態では、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを前記緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質を前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスに結合したまま不純物を除去する。いくつかの実施形態では、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを前記緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質以外の宿主細胞タンパク質を除去する。いくつかの実施形態では、前記緩衝溶液へのカオトロピック剤の添加によって、前記目的の標的タンパク質が溶出されない。いくつかの実施形態では、前記方法が、ウイルス不活性化、タンジェンシャルフローろ過、透析ろ過、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、又はウイルス低減ろ過のうち 1 又は複数をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記溶離液が動物成分不含細胞培養物を用いてバイオリアクターで生産されたものである。いくつかの実施形態では、前記生産物が目的のタンパク質である。いくつかの実施形態では、不純物が宿主細胞タンパク質不純物を含む。いくつかの実施形態では、前記第一の洗浄緩衝液が 1 0 m M リン酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、前記第一の洗浄緩衝液がリン酸ベースの種を含む。いくつかの実施形態では、前記第一の洗浄緩衝液が 5 0 m M 塩化ナトリウムをさらに含む。

【 0 0 5 7 】

いくつかの実施形態では、生産物を処理するための方法である。いくつかの実施形態では、前記方法は、溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすること、及びカオトロピック塩を含む洗浄緩衝液で洗浄して溶出液を収集することをさらに含み、前記カオトロピック塩の濃度は、第一濃度から第二濃度に増加され、前記溶出液は少なくとも 1 つの画分に収集され、並びに前記少なくとも 1 つの画分には目的の生産物が含まれる。いくつかの実施形態では、前記第一濃度における前記カオトロピック塩の濃度が 0 M であり、前記第二濃度における前記カオトロピック塩の濃度が 4 . 0 M である。いくつかの実施形態では、前記カオトロピック塩がリチウム、リチウム塩、マグネシウム、マグネシウム塩、カルシウム、カルシウム塩、グアニジニウム、及び／又はグアニジニウム塩のうち 1 又は複数を含む。いくつかの実施形態では、前記カオトロピック塩が塩化マグネシウム、塩化カルシウム、塩化リチウム、及び塩酸グアニジニウムから選択される。

【 0 0 5 8 】

いくつかの実施形態では、前記緩衝溶液が、酢酸塩、クエン酸塩、A C E S、B E S、ピシン、H E P E S、M E S、M O P S、M O P S O、T A P S、トリシン、ビスートリス、ビスートリスプロパン、カコジル酸塩、C A P S、C A P S O、C H E S、グリシン、グリシルグリシン、イミダゾール、P I P E S、T E A、及び T E S のうち 1 又は複数をさらに含む。

【 0 0 5 9 】

いくつかの実施形態では、不要な分子が、非特異的な相互作用を解消するためのカオトロピック剤を含む方法を使用して前記溶液から除去される。いくつかの実施形態では、カ

10

20

30

40

50

オトロピック剤が、アフィニティークロマトグラフィー工程の一部として使用される。いくつかの実施形態では、カオトロピック剤が、イオン交換クロマトグラフィー工程の一部として使用される。いくつかの実施形態では、イオン交換クロマトグラフィーの一部として使用される前記カオトロピック剤は、尿素、アルコール、及び界面活性剤のように導電率が低い。いくつかの実施形態では、不要な分子が、疎水性相互作用樹脂を含む方法を使用して前記溶液から除去され、前記目的のタンパク質はコスモトロピック剤とともに前記樹脂に結合し、カオトロピック塩への勾配を適用しながら溶出される。

【0060】

細胞培養物から収集する場合、望ましい分子種がかなりの濃度で存在する場合がある一方で、宿主細胞タンパク質、細胞片、核酸、エンドトキシン、又は前記望ましい分子種の純度を損なう可能性のあるその他の分子など、望ましくない分子種も存在する場合がある。結合、形状、サイズ、電荷、及びその他の物理的特性に関連する差異に基づいて、様々な上清組成を分類及び精製することが可能になる。いくつかの実施形態では、前記望ましい分子種の精製により、望ましい分子種の投与の結果として、患者の転帰がより良くなり、合併症がより少なくなり得る。いくつかの実施形態では、本発明の方法により、有効性の向上、又は望ましい分子種の投与量の低減が可能になり得る。

【0061】

いくつかの実施形態では、前記望ましい分子種が血液から収集される。いくつかの実施形態では、前記望ましい分子種が血漿から収集される。いくつかの実施形態では、前記望ましい分子種が細胞培養物から収集される。いくつかの実施形態では、前記望ましい分子種が動物成分不含細胞培養物から収集される。いくつかの実施形態では、前記望ましい分子種が清澄化細胞培養液（CCC F）から収集される。いくつかの実施形態では、前記望ましい分子種が細胞上清から収集される。

【0062】

いくつかの実施形態では、前記細胞培養物は細菌である。いくつかの実施形態では、前記細胞培養物は大腸菌である。いくつかの実施形態では、前記細胞培養物は真核生物である。いくつかの実施形態では、前記細胞培養物はサッカロマイセス・セレビシエ（*S. cerevisiae*）である。いくつかの実施形態では、前記細胞培養物は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、前記細胞培養物はヒト細胞由来である。いくつかの実施形態では、前記細胞培養物は一次組織である。いくつかの実施形態では、前記細胞培養物は樹立された細胞株である。樹立された細胞株の非限定的な例としては、CHO細胞、HeLa細胞、マウス3T3線維芽細胞、HEK293細胞、及びKT-3細胞が挙げられる。いくつかの実施形態では、前記細胞培養物は、細胞型の混合物を含む。いくつかの実施形態では、前記細胞培養物は、単一の細胞型を含む。いくつかの実施形態では、前記細胞培養物が免疫細胞である。いくつかの実施形態では、前記細胞培養物がリンパ球である。いくつかの実施形態では、前記細胞培養物がT細胞である。

【0063】

いくつかの実施形態では、前記望ましい分子種は、対象に投与された場合に抗体の半減期を延長するポリマー部分を含む抗VEGF抗体複合体（例えば、KSI-301、KSI-501）を含み得る。いくつかの実施形態では、前記望ましくない分子種は、宿主細胞タンパク質（HCP（Host Cell Protein））を含み得る。いくつかの実施形態では、クロマトグラフィーはプロテインA基質を使用して達成することができ、特定のカオトロピック剤の投与により、望ましくない分子種を効率的に溶出させながら、望ましい分子種を基質に結合させたままにできる。したがって、いくつかの実施形態では、本開示の方法及びシステムは、細胞培養物から採取された細胞産物の精製方法を提供することができる。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、細胞処理が進むにつれて損失率を低くしながら、所望の分子種のより高い純度を達成することができる。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、最終医薬品を投与する際の患者の合併症を軽減するために、HCPのレベルを低減することができる。いくつかの実施形態では、本発明の方法により、細胞産物の精製に関連するコストや時間を削減可能となり得る。

【0064】

細胞培養物の採取及び処理には、全細胞抽出物に望ましい分子種だけでなく望ましくない不純物も含まれていることが多いため、かなりの精製及び収集の作業が必要になる場合がある。収集された細胞培養物を多段階処理することで、宿主細胞タンパク質（HCP）、高分子量（HMW）種、及び低分子量（LMW）種などの生産物関連不純物を含む不純物を効率的に除去できる。目的のタンパク質（例えば、抗体）の多段階精製プロセスの第1段階では、一部のプロセスではアフィニティークロマトグラフィーが使用され、結果として得られる目的のタンパク質の効率及び純度が、下流の全ての精製手順に影響する。さらに、下流処理中のアフィニティークロマトグラフィーは、生産物を濃縮するのに役立ち、後の処理工程で比例してより小さな装置を使用できるようになるため、処理中に費やされるコスト及び時間の削減に有用となり得る。したがって、後続の処理工程の濃縮収率を失ったり損なったりすることなく、アフィニティークロマトグラフィー中の不純物の除去を最適化することには利点がある。

10

【0065】

いくつかの実施形態では、前記方法は、抗体及び／又はタンパク質を精製することを含む。いくつかの実施形態では、前記方法は、最適化した洗浄緩衝液を使用する。いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、pH 6.0、pH 6.5、pH 7.0、pH 7.5、pH 8.0、pH 8.5、pH 9.0、又は任意の整数であるpH 6.0～pH 9.0である。いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、pH 7.0である。いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、pH 7.2である。いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、pH 6.0である。

20

【0066】

いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、5 mM、10 mM、25 mM、50 mM、100 mM、150 mM、200 mM、又は任意の整数である5 mM～200 mMのリン酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、5 mMリン酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、50 mMリン酸ナトリウムを含む。

【0067】

いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、5 mM、10 mM、25 mM、50 mM、100 mM、150 mM、200 mM、又は任意の整数である5 mM～200 mMのトリスを含む。いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、5 mMトリスを含む。いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、50 mMトリスを含む。

30

【0068】

いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、5 mM、10 mM、25 mM、50 mM、100 mM、150 mM、200 mM、又は任意の整数である5 mM～200 mMのピストリスを含む。いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、5 mMピストリスを含む。いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、50 mMピストリスを含む。

【0069】

いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、50 mM、100 mM、250 mM、500 mM、750 mM、1 M、1.5 M、2 M、3 M、又は任意の整数である50 mM～3 Mの塩化ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、2 M塩化ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、50 mM塩化ナトリウムを含む。

40

【0070】

いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、1 M、1.5 M、1.65 M、2 M、2.8 M、3 M、4 M、5 M、又は任意の整数である1 M～5 Mの塩化マグネシウムを含む。いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、2.8 M塩化マグネシウムを含む。いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、2 M塩化マグ

50

ネシウムを含む。

【0071】

いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、カオトロープを含む。いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、カオトロープ塩を含む。いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、カオトロピック陽イオンを含む。いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、カオトロピック陰イオンを含む。カオトロピック陽イオンの非限定的な例としては、グアニジニウム、マグネシウム、カルシウム、ナトリウム、及びリチウムが挙げられる。カオトロピック陰イオンの非限定的な例としては、塩化物、硫酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、硝酸塩、及び亜硝酸塩が挙げられる。いくつかの実施形態では、カオトロープ塩は、塩化カルシウム、塩化グアニジニウム、酢酸リチウム、塩化リチウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、硝酸ナトリウム、又は塩化ナトリウムである。いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液は、2つ以上のカオトロープ塩を含む。いくつかの実施形態では、前記カオトロープは、前記最適化した洗浄緩衝液中に、0.05 M、0.1 M、0.2 M、0.5 M、1 M、1.5 M、1.65 M、2 M、2.8 M、3 M、4 M、5 M、6 M、7 M、10 M、又は任意の整数である0.05 M～10 Mで存在する。いくつかの実施形態では、前記カオトロープは、前記最適化した洗浄緩衝液中に1 Mで存在する。いくつかの実施形態では、前記カオトロープは、前記最適化した洗浄緩衝液中に2.8 Mで存在する。いくつかの実施形態では、前記最適化した洗浄緩衝液中に存在する前記カオトロープの濃度は、精製されるタンパク質及び／又は抗体に対して最適化される。

10

20

【0072】

関連性

本明細書に記載のように、アフィニティークロマトグラフィー工程の溶出液中のHCPレベルを軽減する洗浄手順が確立された。緩衝液の強度、導電率、及び緩衝液内のpHの範囲も定義された。前記溶出液中のHCPレベルを低下させることができる塩が特定された。HCPレベルを低下させる塩の効率は、ホフマイスター系列(Hofmeister series)に従ってカオトロピック強度と相関していることがわかった。また、このアプローチは異なる抗体タイプ及び異なるFc融合タンパク質に対して機能することがわかったため、本明細書に開示された本発明の概念は、あらゆる抗体及び／又はタンパク質に全般的に適用できる。この技術は、2種類の異なるプロテインAアフィニティークロマトグラフィー樹脂でも機能することが示された。

30

【0073】

本明細書において説明する研究では、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞から得られた様々な抗体及び抗体様コンストラクトを使用した。CHO発現システムは、ヒトで生成されるものと同様の翻訳後修飾を有する複雑なタンパク質を生成できるため、バイオ医薬品の製造に業界で最も一般的に使用されているシステムである。これまでに、6,000以上のCHOのHCPが特定されている。

【0074】

現在、哺乳動物細胞培養物によるバイオ医薬品製剤の下流処理は、総生産コストの大部分を占めている。下流処理における大きな課題は、宿主細胞タンパク質(HCP)の除去である。HCPは、バイオ医薬品製剤と同時に精製される可能性のあるプロセス関連の不純物である。下流処理には通常、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーの工程が含まれ、その後凝集体、生産物バリエーション、HCP、及び宿主細胞DNAを除去するための追加のポリッシング工程が続く。同じHCPの多くは、バイオ医薬品業界全体で、プロテインAクロマトグラフィー工程の後に見出される。これは、業界では抗体及び抗体様コンストラクトの製造にCHO細胞がほぼ普遍的に使用されており、また非常に類似した条件でプロテインAアフィニティークロマトグラフィー工程が使用されていることの結果である。後者の場合、バイオ医薬品は生理学的条件(中性pH及び生理学的塩条件)で樹脂に適用され、生理学的条件及び高塩化ナトリウム濃度緩衝液で樹脂を洗浄した後、溶出工程で生産物を収集する。このプラットフォームアプローチの結果として、アフィニテ

40

50

イークロマトグラフィー溶出液には多くの同じHCPが同程度含まれる。バイオ医薬品製造品の種類によって少し差異はあるがわずかである。調査では、69%の企業が医薬品製造中に個々のHCPに関する問題を経験したことがあると回答しており、これはバイオ製造における最大の課題の1つと考えられている。一部のHCPは高リスクであり、免疫原性、生物活性、又は酵素活性を有し、製剤に使用される製品分子又は賦形剤を分解する可能性があるものが含まれる。プロセス開発では、HCPを除去する必要性は容易に認識できるが、HCPレベルを可能な限り軽減することは困難であるが重要である。これらの高リスクHCPの一部は、脂肪及び脂質を分解する酵素であるリパーゼ類である。リパーゼ類は製剤によく使用されるポリソルベートを分解することも可能であり、治療薬の安定性に影響を与える。同様に、加水分解酵素がポリソルベートの分解の根本的な原因であることが判明した。このようなHCPは、医薬品の安定性を損ない、保存期間を短縮する場合がある。ポリソルベートの分解により製剤中に粒子が形成される場合があり、安全性の懸念が生じる。次に、セリンプロテアーゼ、カテプシン、及びメタロプロテアーゼなどのプロテアーゼが抗体、抗体様コンストラクト、及びその他のタンパク質を分解する。結論として、様々なHCP種が生物学的製剤の有効成分及び賦形剤の両方に影響を及ぼす場合がある。重要なのは、HCPは人間に対して免疫原性を有する可能性もあるということである。望ましくない免疫反応は、HCPによって引き起こされる最も深刻な害であり、致命的となる場合もある。レブリキズマブ (lebrizumab) にはホスホリパーゼB様2タンパク質が含まれており、臨床試験のデータに基づいて被験者の約90%で免疫反応を引き起こすことが示された。高リスクHCP及びその潜在的な影響の概要を表5Aに示す。これらすべての理由から、HCPレベルを可能な限り軽減することが重要である。一部のHCPは生産物に非特異的に結合し、その後共精製される。これらのHCPを除去するのが最も困難である。この研究では、生産物とHCPとの非特異的な相互作用を分解し、それによってHCPレベルを軽減することに焦点を当てた。このアプローチによって除去されたHCPタイプの特性評価は、この研究の範囲外であった。本発明者らは、カオトロピック塩を含む洗浄工程を適用することにより、HCPのレベルを大幅に軽減できることを示している。どのようなタイプのHCPが除去されるかはまだわかっていない。

10

20

【0075】

定義

「細胞」という用語には、原核生物及び真核生物の細胞が含まれ、さらに細菌細胞、結核菌細胞、真菌細胞、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞、非ヒト動物細胞、ヒト細胞、又は例えばハイブリドーマなどの細胞融合体も含まれる場合がある。いくつかの実施形態では、前記細胞は、哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、前記細胞は、ヒト、サル、類人猿、ハムスター、ラット、又はマウスの細胞に由来する。いくつかの実施形態では、前記細胞は真核細胞であり、以下の細胞から選択される：CHO (例えば、CHO K1、DXB-11 CHO、Veggie-CHO)、COS (例えば、COS-7)、網膜細胞、Vero、CV1、腎臓 (例えば、HEK293、293 EBNA、MSR293、MDCK、HaK、BHK)、HeLa、HepG2、WI38、MRC5、Colo205、HB8065、HL-60、(例えば、BHK21)、Jurkat、Daudi、A431 (表皮)、CV-1、U937、3T3、L細胞、C127細胞、SP2/0、NS-0、MMT060562、セルトリ細胞、BRL3A細胞、HT1080細胞、骨髄腫細胞、腫瘍細胞、及び前記細胞から誘導された細胞株。いくつかの実施形態では、前記細胞は、1又は複数のウイルス遺伝子を含む。

30

40

【0076】

本明細書において、「アフィニティークロマトグラフィー」とは、生体分子間の特異的かつ可逆的な相互作用を利用してクロマトグラフィー分離を行う方法である。

【0077】

本明細書において、「プロテインAクロマトグラフィー」とは、プロテインAのIgG結合ドメインと免疫グロブリン分子のFc部分との親和性に依存する特定のアフィニティークロマトグラフィー法を指す。免疫グロブリンにおいて、Fc部分は、免疫グロブリン

50

定常ドメインであるCH₂及びCH₃、又はこれらと実質的に類似した免疫グロブリンドメインを含む。プロテインAは黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の細胞壁の天然タンパク質から派生したもので、組換え又は合成法で製造されたプロテインA並びにプロテインAのバリエーションはFc領域に結合する能力を保持できる。プロテインAクロマトグラフィーは、プロテインAカラム内のものと同様に、固体支持体に固定化されることがよくある。プロテインG及びプロテインLも同様の方法で使用できる。いくつかの実施形態では、前記固体支持体はプロテインAに付着したマトリックスである。

【0078】

ここで使用される「アフィニティークロマトグラフィーマトリックス」又は「ACマトリックス」という用語は、受容体とリガンドとの間、酵素と基質との間、又は抗原と抗体との間など、対象のタンパク質とACマトリックスとの間の非常に特異的な結合相互作用に基づいて生化学混合物の分離を可能にする固相媒体（通常はゲル又は樹脂）を指すことを意図している。したがって、固相媒体は、緩衝液条件に応じて、目的のタンパク質が可逆的に付着することができる標的を含む。ACマトリックスを含み得る固定化又は固相媒体の非限定的な例としては、アガロースビーズ（市販のSephroseマトリックスなど）などのゲルマトリックス、及び多孔質ガラスビーズ（市販のProSepマトリックスなど）などのガラスマトリックスなどが挙げられる。

【0079】

いくつかの実施形態では、前記目的のタンパク質を分離する方法には、カラムクロマトグラフィーが含まれる。このプロセスでは、ACマトリックスがカラムに形成され、目的のタンパク質を含む生化学混合物がカラムに流される。前記目的のタンパク質はACマトリックスに結合する。次に、カラムに洗浄溶液を流してカラムを洗浄し、続いてカラムに溶出緩衝液を流して前記目的のタンパク質をカラムから溶出させる。

【0080】

いくつかの実施形態では、前記目的のタンパク質を単離する方法は膜クロマトグラフィーを含む。膜クロマトグラフィー法は、膜シートに適合するようにフォーマットされた、ACマトリックスに依存しており、前記目的のタンパク質を含む生化学混合物が前記膜を通過する。膜クロマトグラフィーの非限定的な例としては、Sartorius社のSartobind Rapid Aが挙げられる。いくつかの実施形態では、前記目的のタンパク質が少なくとも約500kDaである場合、膜クロマトグラフィーが好ましいクロマトグラフィー法である。

【0081】

本発明で利用できるさらなるアフィニティークロマトグラフィーシステムには、例えば、プロテインG、プロテインA/G、及びプロテインLカラムが挙げられ、これらもそれぞれ、当技術分野で確立された結合特性を有する免疫グロブリン結合細菌タンパク質である。したがって、プロテインGマトリックス、プロテインA/Gマトリックス、又はプロテインLマトリックスであるACマトリックスは、抗体、抗体断片、又はFc領域を含むタンパク質（例えば、Fc融合タンパク質）を精製するために使用できる。

【0082】

本開示は、特にプロテインAを使用した抗体の精製に関して説明されるが、任意のタンパク質（融合タンパク質を含む）が特定のACマトリックスに選択的に結合する技術が公知である限り、当該タンパク質は、本明細書に記載される洗浄方法を使用した精製に適している。

【0083】

本明細書において、「カオトロピック剤」とは、非共有結合力を弱めるか又は他の方法で干渉し、生体分子系内のエントロピーを増加させる分子である。いくつかの実施形態では、塩化リチウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、及び／又は塩化グアニジニウムがカオトロピック剤である。カオトロピック剤の非限定的な例としては、ブタノール、塩化カルシウム、エタノール、塩化グアニジニウム、過塩素酸リチウム、酢酸リチウム、塩

10

20

30

40

50

化マグネシウム、フェノール、プロパノール、ドデシル硫酸ナトリウム、チオ尿素、及び尿素が挙げられる。カオトロピック剤として、タンパク質の溶解性に影響を与える塩が挙げられる。よりカオトロピックな陰イオンとしては、塩化物、硝酸塩、臭化物、塩素酸塩、ヨウ化物、過塩素酸塩、及びチオシアン酸塩が挙げられる。よりカオトロピックな陽イオンとしては、リチウム、マグネシウム、カルシウム、及びグアニジニウムが挙げられる。

【0084】

本明細書において、「溶離液」又は「溶離剤」とは、クロマトグラフィーにおける移動相のキャリア部分を指す。液体クロマトグラフィーでは、溶離液はカラムに入る液体溶媒であるが、ガスクロマトグラフィーではキャリアガスである。いくつかの実施形態では、溶離液は、抗体、宿主細胞タンパク質（HCP）、及びその他の対象分子を含むキャリア液体溶媒を指す。

10

【0085】

本明細書において、「溶出液」とは、クロマトグラフィー工程から出てくる分析対象物質を指し、固相を通過する分析対象物質及び溶質の両方が含まれる。いくつかの実施形態では、溶出液は、さらなる処理のために収集される分析対象物質を具体的に指す。いくつかの実施形態では、溶出液は、採取された細胞から収集された抗体を指し、「生産物溶出液」としても公知である。いくつかの実施形態では、溶出液は、採取された細胞から収集されたHCPを指し、「洗浄溶出液」としても公知である。

【0086】

「新生血管障害」とは、血管新生が変化したり、調節不全になったり、又は調節不能になったりすることを特徴とする障害又は疾患である。新生血管疾患の例には、腫瘍性変化（例えば、がん）、並びに糖尿病網膜症、加齢黄斑変性、及び網膜静脈閉塞症などの眼新生血管疾患が挙げられる。

20

【0087】

「眼新生血管」障害は、患者の眼における血管新生の変化、調節不全、又は調節不能を特徴とする障害である。このような障害には、網膜静脈閉塞症、視神経乳頭新生血管、虹彩新生血管、網膜新生血管、脈絡膜新生血管、角膜新生血管、硝子体新生血管、緑内障、パンヌス、翼状片、黄斑浮腫、糖尿病網膜症、糖尿病黄斑浮腫、血管網膜症、網膜変性、ぶどう膜炎、網膜の炎症性疾患、及び増殖性硝子体網膜症が挙げられる。

30

【0088】

抗体という用語には、インタクトな抗体及びその結合断片が含まれる。結合断片とは、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部を含む、インタクトな抗体以外の分子を指す。結合断片の例には、Fv、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、ダイアボディ、直鎖状抗体、単鎖抗体分子（例えば、scFv）、及び抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる。scFv抗体は、Houston JS. 1991. Methods in Enzymol. 203: 46-96に記載されている。さらに、抗体断片は、VHドメインの特性、すなわちVLドメインと共に機能的な抗原結合部位にアセンブル可能な特性、又はVLドメインの特性、すなわちVHドメインと共に機能的な抗原結合部位にアセンブル可能な特性を有し、それによって全長抗体の抗原結合特性を提示する、単鎖ポリペプチドを含む。

40

【0089】

抗体がその標的抗原に特異的に結合するということは、少なくとも 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、又は 10^{10} M^{-1} の親和性を意味する。特異的結合は検出可能であるほど強くなり、少なくとも1つの無関係な標的に生じる非特異的結合と区別可能である。特異的結合は、特定の官能基間の結合の形成又は特定の空間適合（例えば、鍵と鍵穴タイプ）の結果であり得るが、非特異的結合は通常、ファンデルワールス力の結果である。但し、特異的結合は、必ずしも抗体又は融合タンパク質が1つの標的のみに結合することを意味するわけではない。

【0090】

50

基本的な抗体の構造単位はサブユニットの四量体である。各四量体には2つの同一のポリペプチド鎖の対が含まれており、各対は1つの「軽」鎖（約25 kDa）及び1つの「重」鎖（約50～70 kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部分には、主に抗原認識を担う約100～110個以上のアミノ酸の可変領域が含まれている。この可変領域は、切断可能なシグナルペプチドに連結されて最初に発現される。シグナルペプチドのない可変領域は、成熟した可変領域と称される場合がある。したがって、例えば、軽鎖成熟可変領域は、軽鎖シグナルペプチドのない軽鎖可変領域を意味する。但し、可変領域への言及は、シグナル配列が必ず存在することを意味するわけではなく、実際には、抗体又は融合タンパク質が発現され分泌されると、シグナル配列は切断される。重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の対が抗体の結合領域を定義する。軽鎖及び重鎖のカルボキシ末端部分は、それぞれ軽鎖定常領域及び重鎖定常領域を定義する。重鎖定常領域は主にエフェクター機能を担う。IgG抗体では、重鎖定常領域はCH1、ヒンジ、CH2、及びCH3領域に分かれている。CH1領域は、ジスルフィド結合及び非共有結合によって軽鎖定常領域に結合する。ヒンジ領域は、抗体の結合領域とエフェクター領域との間に可動性を付与し、また、四量体サブユニット内の2つの重鎖定常領域間の分子間ジスルフィド結合のための部位も提供する。CH2領域及びCH3領域は、エフェクター機能及びFcR結合の主な部位である。

10

【0091】

軽鎖は、 κ 又は λ のいずれかに分類される。重鎖は、 γ 、 μ 、 α 、 δ 、又は ϵ に分類され、抗体のアイソタイプをそれぞれ、IgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEとして定義する。軽鎖及び重鎖内では、可変領域及び定常領域が約12個以上のアミノ酸からなる「J」セグメントによって結合されており、重鎖には約10個以上のアミノ酸からなる「D」セグメントも含まれている（通常、Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y., 1989), Ch. 7を参照）（あらゆる目的のために参照により援用される）。

20

【0092】

各軽鎖／重鎖対の成熟した可変領域が抗体結合部位を形成する。したがって、インタクトな抗体には2つの結合部位があり、すなわち二価である。天然抗体では、結合部位は同じである。一方、2つの結合部位が異なる二重特異性抗体を作製することもできる（例えば、Songsivilai S, Lachmann PC. 1990. Bisppecific antibody: a tool for diagnosis and treatment of disease. Clin Exp Immunol. 79:315-321; Kostelny SA, Cole MS, Tso JY. 1992. Formation of bispecific antibody by the use of leucine zippers. J Immunol. 148: 1547-1553を参照）。可変領域は全て、相補性決定領域又はCDRとも呼ばれる3つの超可変領域によって結合された、比較的保存されたフレームワーク領域（FR）の同じ全体構造を示す。各対の2つの鎖のCDRはフレームワーク領域によって整列され、特定のエピトープへの結合を可能にする。N末端からC末端にかけて、軽鎖及び重鎖の両方が、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及びFR4ドメインを含む。便宜上、可変重鎖CDRをCDRH1、CDRH2、及びCDRH3と称し、可変軽鎖CDRをCDRL1、CDRL2、及びCDRL3と称してもよい。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては以下に従う：Kabat EA, et al. 1987 and 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD) 又は Chothia C, Lesk AM. 1987. Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins. J Mol Biol 196:901-917; Chothia C, et a

30

40

50

l. 1989. Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions. Nature 342:877-883. Kabatは、異なる重鎖可変領域間又は異なる軽鎖可変領域間の対応する残基に同じ番号を割り当てる、広く使用されている番号付け規則（Kabat番号付け）も提供する。抗体定常領域にはKabat番号付けを使用できるが、本出願の場合のように、EU番号付けの方がより広く使用される。本明細書に開示された例示的な抗体には特定の配列が提供されているが、タンパク質鎖の発現後に、軽鎖及び／若しくは重鎖のアミノ末端又はカルボキシ末端の1～数個のアミノ酸、特に重鎖のC末端リジン残基が、分子の一部又は全部で欠落しているか、又は誘導体化されている場合があることが理解されるであろう。

10

【0093】

「エピトープ」という用語は、抗体又は細胞外トラップセグメントが結合する抗原上の部位を指す。タンパク質上のエピトープは、連続したアミノ酸、又は1又は複数のタンパク質の三次折り畳みによって並置された非連続アミノ酸から形成される。連続したアミノ酸から形成されたエピトープ（直鎖状エピトープとしても公知）は、通常、変性溶媒に曝露されても保持されるが、三次折り畳みによって形成されたエピトープ（立体配座エピトープとしても公知）は、通常、変性溶媒で処理すると失われる。エピトープには通常、少なくとも3個、通常は少なくとも5個又は8～10個のアミノ酸が固有の空間構成で含まれている。エピトープの空間的立体配座を決定する方法には、例えば、X線結晶構造解析及び2次元核磁気共鳴法が挙げられる。例えば、Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996)を参照。

20

【0094】

同じ又は重複するエピトープを認識する抗体は、ある抗体が別の抗体の標的抗原への結合と競合する能力を示す簡単な免疫アッセイで識別できる。抗体のエピトープは、抗原に結合した抗体（又はFab断片）のX線結晶構造解析によって接触残基を特定することによっても定義できる。

【0095】

あるいは、一方の抗体の結合を減少又は排除する抗原内の全てのアミノ酸変異が、他方の抗体の結合も減少又は排除する場合、2つの抗体は同じエピトープを有する。一方の抗体の結合を減少又は排除するアミノ酸変異が、他方の抗体の結合を減少又は排除する場合、2つの抗体は重複するエピトープを有する。

30

【0096】

抗体間の競合は、試験対象の抗体が共通抗原への参照抗体の特異的結合を阻害するアッセイによって決定される（例えば、Jungmans et al., Cancer Res. 50: 1495, 1990を参照）。試験抗体の過剰量（例えば、少なくとも2倍、5倍、10倍、20倍、又は100倍）が参照抗体の結合を少なくとも50%阻害する場合、試験抗体は参照抗体と競合する。いくつかの実施形態では、競合結合アッセイで測定した場合、試験抗体は参照抗体の結合を75%、90%、又は99%阻害する。競合アッセイによって同定された抗体（競合抗体）には、参照抗体と同じエピトープに結合する抗体と、参照抗体が結合したエピトープに充分近接して立体障害が発生する隣接エピトープに結合する抗体とが含まれる。

40

【0097】

「患者」という用語には、予防的又は治療的処置を受けるヒト及びその他の哺乳動物の対象が含まれる。

【0098】

アミノ酸置換を保存的又は非保存的として分類するために、アミノ酸を以下のようにグループ分けする：グループI（疎水性側鎖）：met、ala、val、leu、ile；グループII（中性親水性側鎖）：cys、ser、thr；グループIII（酸性側鎖）：asp、glu；グループIV（塩基性側鎖）：asn、gln、his、lys

50

、arg；グループV（鎖配向性に影響する残基）：gly、pro；及びグループVI（芳香族側鎖）：trp、tyr、phe。保存的置換では、同じクラスのアミノ酸間での置換が行われる。非保守的な置換は、これらのクラスのいずれかのメンバーを別のクラスのメンバーと交換することを意味する。

【0099】

パーセンテージ配列同一性は、可変領域の場合はKabat番号付け規則、定常領域の場合はEU番号付けによって最大限にアラインメントされた抗体配列で決定される。アラインメント後、対象抗体領域（例えば、重鎖又は軽鎖の成熟可変領域全体）が参照抗体の同じ領域と比較される場合、対象抗体領域と参照抗体領域との間の配列同一性のパーセンテージは、対象抗体領域及び参照抗体領域の両方で同じアミノ酸が占める位置の数を、ギャップを数えずに2つの領域のアラインメントされた位置の合計数で除し、100を乗じてパーセンテージに変換する。他の配列の配列同一性は、Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0（Genetics Computer Group社、575 Science Dr. ウィスコンシン州マディソン）におけるBESTFIT、FASTA、及びTFASTAなどのアルゴリズムを使用して、デフォルトのギャップパラメータを使用して配列をアラインメントするか、検査及び最適なアラインメント（すなわち、比較ウィンドウ全体で配列類似性のパーセンテージが最も高くなるもの）をするかによって決定できる。配列同一性のパーセンテージは、比較ウィンドウにわたって最適に整列された2つの配列を比較し、両方の配列で同一の残基が発生する位置の数を決定して一致する位置の数を算出し、一致する位置の数を比較ウィンドウ内の位置の合計数（すなわち、ウィンドウサイズ）で除し、その結果に100を乗じて配列同一性のパーセンテージを算出する。

10

20

【0100】

1又は複数の記載された要素を「含む」（comprising）組成物又は方法には、具体的に記載されていない他の要素が含まれてもよい。例えば、抗体を含む組成物には、抗体が単独で含まれていてもよく、又は他の成分と組み合わせて含まれていてもよい。

【0101】

「抗体依存性細胞傷害」（又はADCC）という用語は、抗体で被覆された標的細胞（すなわち、抗体が結合した細胞）と溶解活性を有する免疫細胞（エフェクター細胞とも称される）との相互作用に依存して細胞死を誘導するメカニズムである。このようなエフェクター細胞には、ナチュラルキラー細胞、単球／マクロファージ、及び好中球が挙げられる。ADCCは、細胞に結合した抗体のFc領域と、好中球、マクロファージ、及びナチュラルキラー細胞などの免疫エフェクター細胞上のFcγRI及びFcγRIIIとの相互作用によって引き起こされる。標的細胞は、媒介するエフェクター細胞の種類に応じて、貪食又は溶解によって除去される。抗体で被覆された標的細胞の死は、エフェクター細胞の活性の結果として起こる。

30

【0102】

「抗体依存性細胞貪食」（又はADCP）としても公知であるオプソニン化という用語は、抗体で被覆された細胞が、免疫グロブリンFc領域に結合する貪食免疫細胞（例えば、マクロファージ、好中球、及び樹状細胞）によって全体的又は部分的に内部化されるプロセスを指す。

40

【0103】

「補体依存性細胞傷害」（又はCDC）という用語は、標的に結合した抗体のFcエフェクタードメインが一連の酵素反応を活性化し、最終的に標的細胞膜に穴を形成することで細胞死を誘導するメカニズムを指す。通常、抗体で被覆された標的細胞上にあるような抗原抗体複合体は、補体成分C1qに結合して活性化し、次に補体カスケードを活性化して標的細胞の死に至る。補体の活性化により、標的細胞表面に補体成分が沈着し、白血球上の補体受容体（CR3など）に結合してADCCが促進されることもある。

【0104】

ヒト化抗体は、非ヒトの「ドナー」抗体のCDRをヒトの「アクセプター」抗体配列に

50

移植した遺伝子組み換え抗体である（例えば、Queenによる米国特許第5,530,101号及び第5,585,089号、Winterによる米国特許第5,225,539号、Carterによる米国特許第6,407,213号、Adairによる米国特許第5,859,205号及び第6,881,557号、Footteによる米国特許第6,881,557号）。アクセプター抗体配列は、例えば、成熟ヒト抗体配列、そのような配列の混合物、ヒト抗体配列のコンセンサス配列、又は生殖細胞系領域配列であり得る。したがって、ヒト化抗体とは、ドナー抗体由来のCDRの一部又は全部と、存在する場合は、完全に又は実質的にヒト抗体配列に由来する可変領域フレームワーク配列及び定常領域とを有する抗体である。同様に、ヒト化重鎖は、完全に又は実質的にドナー抗体重鎖に由来する少なくとも1つ、2つ、通常は3つ全てのCDRと、存在する場合は、実質的にヒト重鎖可変領域フレームワーク配列及び定常領域配列に由来する重鎖可変領域フレームワーク配列及び重鎖定常領域とを有する。同様に、ヒト化軽鎖は、完全に又は実質的にドナー抗体軽鎖に由来する少なくとも1つ、2つ、通常は3つ全てのCDRと、存在する場合は、実質的にヒト軽鎖可変領域フレームワーク配列及び定常領域配列に由来する軽鎖可変領域フレームワーク配列及び軽鎖定常領域とを有する。ナノボディ及びdAb以外で、ヒト化抗体はヒト化重鎖及びヒト化軽鎖を含む。ヒト化抗体のCDRは、対応する残基の少なくとも85%、90%、95%、又は100%（Kabatsの定義による）がそれぞれのCDR間で同一である場合、非ヒト抗体の対応するCDRと実質的に同じである。抗体鎖の可変領域フレームワーク配列又は抗体鎖の定常領域は、Kabatsによって定義された対応する残基の少なくとも85%、90%、95%、又は100%が同一である場合、それぞれヒト可変領域フレームワーク配列又はヒト定常領域から実質的に由来する。

10

20

【0105】

ヒト化抗体は、マウス抗体由来の6つのCDR（Kabatsの定義による）を全て組み込むことが多いが、全てのCDRよりも少ないCDR（例えば、マウス抗体の少なくとも3、4、又は5つのCDR）で作製されてもよい（例えば、De Pascalis R, Iwahashi M, Tamura M, et al. 2002. Grafting “Abbreviated” Complementary-Determining Regions Containing Specificity-Determining Residues Essential for Ligand Contact to Engineer a Less Immunogenic Humanized Monoclonal Antibody. J Immunol. 169:3076-3084; Vajdos FF, Adams CW, Breece TN, Presta LG, de Vos AM, Sidhu, SS. 2002. Comprehensive functional maps of the antigen-binding site of an anti-ErbB2 antibody obtained with shotgun scanning mutagenesis. J Mol Biol. 320: 415-428; Iwahashi M, Milenic DE, Padlan EA, et al. 1999. CDR substitutions of a humanized monoclonal antibody (CC49): Contributions of individual CDRs to antigen binding and immunogenicity. Mol Immunol. 36:1079-1091; Tamura M, Milenic DE, Iwahashi M, et al. 2000. Structural correlates of an anticarcinoma antibody: Identification of specificity-determining regions (SDRs) and development of a minimally immunogenic antibody variant by retention of SDRs only. J Immunol. 164:1432-1441)。

30

40

【0106】

50

キメラ抗体は、非ヒト抗体（例えば、マウス）の軽鎖及び重鎖の成熟可変領域が、ヒトの軽鎖及び重鎖の定常領域と組み合わされた抗体である。このような抗体は、マウス抗体の結合特異性を実質的に又は完全に保持し、約3分の2がヒト配列である。

【0107】

ベニア（veneered）抗体は、非ヒト抗体のCDRの一部（通常は全て）と非ヒト可変領域フレームワーク残基の一部とを保持するが、B細胞又はT細胞エピトープに寄与する可能性のあるその他の可変領域フレームワーク残基、例えば、露出した残基（Padlan EA. 1991. A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. Mol Immunol. 28:489-98）を、ヒト抗体配列の対応する位置の残基に置換したタイプのヒト化抗体である。その結果、CDRが完全に又は実質的に非ヒト抗体由来であり、非ヒト抗体の可変領域フレームワークが置換によってよりヒト様になった抗体が得られる。ヒト抗体はヒトから単離されるか、そうでない場合はヒト免疫グロブリン遺伝子の発現（例えば、トランスジェニックマウス、インビトロ、又はファージディスプレイによる）から得られる。ヒト抗体の製造方法としては、トリオーマ法（Ostberg L, Pursch

10

E. 1983. Human x (mouse x human) hybridomas stably producing human antibodies. Hybridoma 2:361-367、Ostbergによる米国特許第4,634,664号、及びEngleman et al. による米国特許第4,634,666号）、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むトランスジェニックマウスの使用（例えば、Lomborg et al. による国際公開第93/12227号（1993）；米国特許第5,877,397号、第5,874,299号、第5,814,318号、第5,789,650号、第5,770,429号、第5,661,016号、第5,633,425号、第5,625,126号、第5,569,825号、及び第5,545,806号、Nature 148, 1547-1553（1994）、並びにNature Biotechnology 14, 826（1996）、Kucherlapati による国際公開第91/10741号（1991））、並びにファージディスプレイ法（例えば、Dower et al. による国際公開第91/17271号及びMcCafferty et al. による国際公開第92/01047号、米国特許第5,877,218号、第5,871,907号、第5,858,657号、第5,837,242号、第5,733,743号、及び第5,565,332号を参照）が挙げられる。

20

30

【0108】

「ポリマー」とは、ひと続きのモノマー基が連結したものを指す。ポリマーは、単一のモノマー（ホモポリマー）又は異なるモノマー（ヘテロポリマー）の複数の単位で構成される。高分子量（MW）ポリマーは、アクリレート、メタクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、スチレン、ビニルピリジン、ビニルピロリドン、及びビニルアセテートなどのビニルエステルを含むがこれらに限定されないモノマーから調製される。付加的モノマーは高MWポリマーに役立つ。2つの異なるモノマーが使用される場合、その2つのモノマーは「コモノマー」と呼ばれ、異なるモノマーが共重合されて単一のポリマーが形成されることを意味する。ポリマーは直鎖状でも分岐状でもよい。ポリマーが分岐している場合、各ポリマー鎖は「ポリマーアーム」と称される。開始剤部分に連結したポリマーアームの末端は近位端であり、ポリマーアームの成長鎖末端は遠位端である。ポリマーアームの成長鎖末端では、ポリマーアーム末端基はラジカル捕捉剤であっても、別の基であってもよい。

40

【0109】

「開始剤」とは、モノマー又はコモノマーを使用して重合を開始することができる化合物を指す。重合は、従来のフリーラジカル重合又は原子移動ラジカル重合（ATRP）、可逆的付加開裂停止（RAFT）重合、若しくはニトロキシド媒介重合（NMP）などの

50

制御された／「リビング」ラジカル重合である。重合は、変性転移などの「疑似」制御重合であってもよい。開始剤が A T R P に適している場合、開始剤には、ホモリシ的に切断されてラジカル重合を開始できるラジカルである開始剤断片 I と、成長するポリマー鎖のラジカルと反応して重合を可逆的に終了させるラジカル捕捉剤 I' を形成できる不安定な結合が含まれる。ラジカル捕捉剤 I' は典型的にはハロゲンであるが、ニトリルなどの有機部分である場合もある。いくつかの実施形態では、開始剤には、A T R P による重合の部位として 1 又は複数の 2-ブロモイソ酪酸基が含まれる。

【0110】

「化学リンカー」とは、半減期延長部分及びタンパク質など、2つの基を結合する化学部分を指す。リンカーは切断可能でも切断不可能でもよい。切断可能なリンカーには、加水分解性、酵素切断性、pH感受性、光不安定性、又はジスルフィドリンカーやその他のリンカーであり得る。その他のリンカーには、ホモ二官能性リンカー及びヘテロ二官能性リンカーが挙げられる。「連結基」とは、生物活性剤と 1 又は複数の結合からなる共有結合を形成できる官能基である。非限定的な例としては、国際公開第 2013059137 号（参照により援用される）の表 1 に示されているものが挙げられる。

10

【0111】

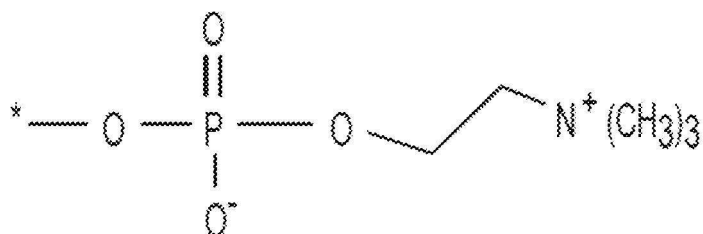
「反応性基」という用語は、別の化学基と反応して共有結合を形成できる基、すなわち適切な反応条件下で共有結合的に反応し、通常別の物質の接続点を表す基を指す。反応性基は、マレイミド又はスクシンイミジルエステルなどの部分であり、異なる部分の官能基と化学的に反応して共有結合を形成できる。反応性基には通常、求核剤、求電子剤、及び光活性化基が挙げられる。

20

【0112】

「ホスホリルコリン」は「PC」とも称され、下記を指す：

【化11】



30

式中、*は接続点を示す。ホスホリルコリンは両性イオン基であり、塩（内部塩など）並びにそのプロトン化形態及び脱プロトン化形態が含まれる。

【0113】

「ホスホリルコリン含有ポリマー」とは、ホスホリルコリンを含むポリマーである。「両性イオン含有ポリマー」とは、両性イオンを含むポリマーを指す。

【0114】

ポリ（アクリロイルオキシエチルホスホリルコリン）含有ポリマーとは、2-（アクリロイルオキシ）エチル-2-（トリメチルアンモニウム）エチルホスフェート（下記実施例 6 に示す H E A - P C）をモノマーとして含むポリマーを指す。

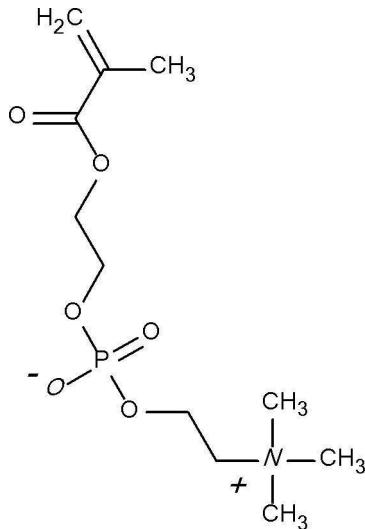
40

【0115】

ポリ（メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン）含有ポリマーとは、2-（メタクリロイルオキシ）エチル-2-（トリメチルアンモニウム）エチルホスフェート（H E M A - P C 又は M P C）をモノマーとして含むポリマーを指す（以下を参照）。

50

【化 1 2】



10

【0 1 1 6】

本書では、「MPC」及び「HEMA-P C」は互換性がある。

【0 1 1 7】

ポリマーの文脈における「分子量」は、数平均分子量、重量平均分子量、又はピーク分子量のいずれかとして表現できる。特に明記しない限り、本明細書における分子量に関する全ての言及はピーク分子量を指す。これらの分子量の測定、数平均（Mn）、重量平均（Mw）、及びピーク（Mp）は、サイズ排除クロマトグラフィー又はその他の液体クロマトグラフィー技術を使用して測定できる。分子量値を測定する他の方法も使用できる。末端基分析の使用又は凝集特性の測定（例えば、凝固点降下、沸点上昇、又は浸透圧）を使用して数平均分子量を決定したり、光散乱技術、超遠心分離、又は粘度測定を使用して重量平均分子量を決定したりすることができる。いくつかの実施形態では、分子量はSEC-MALS（サイズ排除クロマトグラフィー－多角度光散乱）によって測定される。いくつかの実施形態では、ポリマー試薬は、典型的には多分散性（すなわち、ポリマーの数平均分子量と重量平均分子量とは等しくない）であり、例えば、SEC-MALS測定から得られるPDI値によって判断されるように、例えば約1.5未満の低い多分散性値を有することができる。いくつかの実施形態では、多分散度（PDI）は約1.4～約1.2の範囲内である。いくつかの実施形態では、PDIは約1.15、1.10、1.05、又は1.03未満である。

20

30

【0 1 1 8】

「1つの（a/an）」という語句は、その全体の1又は複数（one or more）を指す。例えば、1つの化合物は、1又は複数の化合物、又は少なくとも1つ（at least one）の化合物を指す。したがって、ここでは「1つの（a/an）」、「1又は複数（one or more）」、及び「少なくとも1つ（at least one）」という用語は互換的に使用できる。

40

【0 1 1 9】

「約」とは、様々な機器、試料、及び試料調製の間で測定された測定値に見られる変動を意味する。

【0 1 2 0】

「保護された（protected）」、「保護された形態（protected form）」、「保護基（protecting group）」、及び「保護基（protective group）」は、特定の反応条件下で分子内の特定の化学的に反応性のある官能基の反応を防止又は阻害する基（すなわち、保護基）の存在を指す。保護基は、保護される化学的に反応性のある基の種類、使用される反応条件、及び分子内の追加の反応性基又は保護基の存在（存在する場合）に応じて異なる。適切な保護基としては、G

50

reene et al., "Protective Groups In Organic Synthesis," 3rd Edition, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1999に記載されているものなどがある。

【0121】

「アルキル」とは、示された数の炭素原子を有する直鎖状又は分岐状飽和脂肪族ラジカルを指す。例えば、 $C_1 \sim C_6$ アルキルには、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ヘキシルなどが挙げられるが、これらに限定されない。その他のアルキル基には、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシルなどが含まれるが、これらに限定されない。アルキルには、1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、2～3、2～4、2～5、2～6、3～4、3～5、3～6、4～5、4～6、5～6など、任意の数の炭素を含めることができる。アルキル基は通常一価であるが、アルキル基が2つの部分を結合する場合など二価になることもある。

10

【0122】

上記及び下記で有機ラジカル又は化合物に関連して言及される「低級」という用語は、それぞれ、7個以下又は4個以下の炭素原子及び（非分岐の場合）1個又は2個の炭素原子を有する分岐又は非分岐の化合物又はラジカルを定義する。

【0123】

「アルキレン」とは、上記で定義したように、少なくとも2つの他の基に連結しているアルキル基、すなわち二価の炭化水素ラジカルを指す。アルキレンに連結した2つの部分は、アルキレンの同じ原子又は異なる原子に連結され得る。例えば、直鎖アルキレンは、 $-(CH_2)_n$ の二価ラジカルであり、 n は1、2、3、4、5、又は6である。アルキレン基には、メチレン、エチレン、プロピレン、イソプロピレン、ブチレン、イソブチレン、sec-ブチレン、ペンチレン、及びヘキシレンが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0124】

アルキルラジカル及びヘテロアルキルラジカル（アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニル、及びヘテロシクロアルケニルとしばしば称される基を含む）の置換基は、以下から選択される様々な基であり得る： $-OR'$ 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、ハロゲン、 $-SiR'R''R'''$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)RCO_2R'$ 、 $CONR'R''$ 、 $OC(O)NR'R''$ 、 $NR'R''C(O)R'$ 、 $NR'R''C(O)R'R''R'''$ 、 $NR'R''_2CR'(Q)NHC(NH_2)=NH$ 、 $NR'R''C(NH_2)=NH$ 、 $NHC(NH_2)=NR'$ 、 $S(O)R'$ 、 $S(O)_2R'$ 、 $S(O)_2NR'R''$ 、 CN 、及び NO_2 （ $0 \sim (2m' + 1)$ の範囲内の数であり、 m' はそのようなラジカル中の炭素原子の総数である）。 R' 、 R'' 、及び R''' はそれぞれ独立して、水素、非置換（ $\neq$ ）アルキル及びヘテロアルキル基、非置換アリール基、1～3個のハロゲンで置換されたアリール基、非置換アルキル基、アルコキシ又はチオアルコキシ基、又はアリール- $(C_1 \sim C_4)$ アルキル基を指す。 R' 及び R'' が同じ窒素原子に結合している場合、それらは40窒素原子と結合して5員環、6員環、又は7員環を形成できる。例えば、「 $-NR'R''$ 」には、1-ピロリジニル及び4-モルホリニルが挙げられる。「アルキル」という用語には、ハロアルキル（例えば、 $-CF_3$ 、 $-CH_2CF_3$ ）及びアシル（例えば、 $-C(O)CH_3$ 、 $-C(O)CF_3$ 、 $-C(O)CH_2OCH_3$ など）などの基が含まれる。いくつかの実施形態では、置換アルキル及びヘテロアルキル基は1～4個の置換基を有する。いくつかの実施形態では、置換アルキル及びヘテロアルキル基は、1、2、又は3個の置換基を有する。例外は、ペルハロアルキル基（例えば、ペンタフルオロエチルなど）である。

30

40

【0125】

アルキルラジカル及びヘテロアルキルラジカル（アルキレン、アルケニル、ヘテロアル

50

キレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニル、及びヘテロシクロアルケニルとしばしば称される基を含む)の置換基は、以下から選択される様々な基の1又は複数あり得るが、これらに限定されない： OR' 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=NOR'$ 、 $NR'R''$ 、 SR' 、ハロゲン、 $SiR'R''R'''$ 、 $OC(R'R''C(O)R')$ 、 $C(O)R'$ 、 C_2OR' 、 $CONR'R''$ 、 $OC(O)NR'R''$ 、 $NR'R''C(O)R'$ 、 $NR'C(O)NR'R''$ 、 NR'_2R'' 、 $ONRC(NR'R''R''')$ 、 $NR'R''$ 、 $NRC(NR'R'')$ 、 $NR'R''$ 、 $S(O)R'$ 、 $SR'(Q)S(O)_2NR'R''$ 、 $NR'SO_2R'$ 、 CN 、及び $-NO_2$ ($0 \sim (2m' + 1)$ の範囲内の数であり、 m' はそのようなラジカル中の炭素原子の総数である)。 R' 、 R'' 、 R''' 、及び R'''' はそれぞれ独立して、水素、置換又は非置換ヘテロアルキル基、置換又は非置換アリール基（例えば、1～3個のハロゲンで置換されたアリール基）、置換又は非置換アルキル基、アルコキシ又はチオアルコキシ基、又はアリールアルキル基を指す。例えば、化合物が複数のR基を含む場合、各R基は独立して選択され、これらの基が複数存在する場合は、各 R' 、 R'' 、 R''' 、及び R'''' 基も独立して選択される。 R' 及び R'' が同じ窒素原子に結合している場合、それらは窒素原子と結合して5員環、6員環、又は7員環を形成できる。例えば、「 $-NR'R$ 」には、1-ピロリジニル及び4-モルホリニルが挙げられるが、これらに限定されない。上記の置換基の考察から、当業者は、「アルキル」という用語が、水素基以外の基に結合した炭素原子を含む基を含むことを意味することを理解するであろう。ハロアルキル（例えば、 $-CF_3$ 、 $-CH_2CF_3$ ）及びアシル（例えば、 $-C(O)CH_3$ 、 $-C(O)CF_3$ 、 $-C(O)CH_2OCH_3$ など）などの基が挙げられる。

10

20

【0126】

「アルコキシ」とは、アルコキシ基を接続点に接続するか、又はアルコキシ基の2つの炭素に連結している酸素原子を有するアルキル基を指す。アルコキシ基には、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、2-ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシ、ペントキシ、ヘキソキシなどが挙げられる。アルコキシ基は、本明細書中に記載される様々な置換基でさらに置換され得る。例えば、アルコキシ基はハロゲンで置換されて「ハロアルコキシ」基を形成する。

【0127】

「カルボキシアルキル」とは、カルボキシ基で置換されたアルキル基（本明細書で定義）を意味する。「カルボキシシクロアルキル」という用語は、カルボキシ基で置換されたシクロアルキル基（本明細書で定義）を意味する。アルコキシアルキルという用語は、アルコキシ基で置換されたアルキル基（本明細書で定義）を意味する。本明細書で使用される用語「カルボキシ」は、カルボン酸及びそのエステルを指す。

30

【0128】

「ハロアルキル」とは、上記で定義したアルキルのうち、水素原子の一部又は全部がハロゲン原子で置換されたものを指す。ハロゲン（ハロ）はクロロ又はフルオロを表すが、ブromo又はヨードを表す場合もある。例えば、ハロアルキルには、トリフルオロメチル、フルオロメチル、1, 2, 3, 4, 5-ペンタフルオロフェニルなどが挙げられる。「パーフルオロ」という用語は、利用可能な全ての水素がフッ素に置換された化合物又はラジカルを定義する。例えば、パーフルオロフェニルは、1, 2, 3, 4, 5-ペンタフルオロフェニルを指し、パーフルオロメチルは、1, 1, 1-トリフルオロメチルを指し、パーフルオロメトキシは、1, 1, 1-トリフルオロメトキシを指す。

40

【0129】

「フッ素置換アルキル」とは、1個、一部、又は全ての水素原子がフッ素で置換されたアルキル基を指す。

【0130】

「サイトカイン」は、免疫反応や炎症反応における細胞間コミュニケーションに関与する可能性のあるタンパク質シグナル伝達分子のグループに属する。サイトカインは、通常、質量が約8～35 kDaの小さな水溶性糖タンパク質である。

【0131】

50

「シクロアルキル」とは、約 3 ～ 12 個、3 ～ 10 個、又は 3 ～ 7 個の環内炭素原子を含む環状炭化水素基を指す。シクロアルキル基には、縮合環、架橋環、及びスピロ環構造であるものが挙げられる。

【0132】

「環内」とは、環状の環構造の一部を構成する原子又は原子群を指す。

【0133】

「環外」とは、結合しているが環構造を定義しない原子又は原子群を指す。

【0134】

「環状アルキルエーテル」とは、3 個又は 4 個の環内炭素原子及び 1 個の環内酸素原子又は硫黄原子を有する 4 員又は 5 員環アルキル基（例えば、オキセタン、チエタン、テトラヒドロフラン、テトラヒドロチオフェン）、又は 1 個若しくは 2 個の環内酸素原子又は硫黄原子を有する 6 員～7 員環アルキル基（例えば、テトラヒドロピラン、1, 3-ジオキサン、1, 4-ジオキサン、テトラヒドロチオピラン、1, 3-ジチアン、1, 4-ジチアン、1, 4-オキサチアン）を指す。

10

【0135】

「アルケニル」とは、少なくとも 1 つの二重結合を有する 2 ～ 6 個の炭素原子からなる直鎖状又は分岐状炭化水素を指す。アルケニル基の例には、ビニル、プロペニル、イソプロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、イソブテニル、ブタジエニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、イソペンテニル、1, 3-ペンタジエニル、1, 4-ペンタジエニル、1-ヘキセニル、2-ヘキセニル、3-ヘキセニル、1, 3-ヘキサジエニル、1, 4-ヘキサジエニル、1, 5-ヘキサジエニル、2, 4-ヘキサジエニル、及び 1, 3, 5-ヘキサトリエニルが挙げられるが、これらに限定されない。アルケニル基は、2 ～ 3、2 ～ 4、2 ～ 5、3 ～ 4、3 ～ 5、3 ～ 6、4 ～ 5、4 ～ 6、5 ～ 6 の炭素数を有していてもよい。アルケニル基は通常一価であるが、アルケニル基が 2 つの部分相结合する場合など二価になることもある。

20

【0136】

「アルケニレン」とは、上記で定義したように、少なくとも 2 つの他の基に連結しているアルケニル基、すなわち二価の炭化水素ラジカルを指す。アルケニレンに連結した 2 つの部分は、アルケニレンの同じ原子又は異なる原子に連結され得る。アルケニレン基には、エテニレン、プロペニレン、イソプロペニレン、ブテニレン、イソブテニレン、sec-ブテニレン、ペンテニレン、及びヘキセニレンなどが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0137】

「アルキニル」とは、少なくとも 1 つの三重結合を有する 2 ～ 6 個の炭素原子からなる直鎖状又は分岐状炭化水素を指す。アルキニル基の例には、アセチレニル、プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、イソブチニル、sec-ブチニル、ブタジイニル、1-ペンチニル、2-ペンチニル、イソペンチニル、1, 3-ペンタジイニル、1, 4-ペンタジイニル、1-ヘキシニル、2-ヘキシニル、3-ヘキシニル、1, 3-ヘキサジイニル、1, 4-ヘキサジイニル、1, 5-ヘキサジイニル、2, 4-ヘキサジイニル、及び 1, 3, 5-ヘキサトリイニルが挙げられるが、これらに限定されない。アルキニル基は、2 ～ 3、2 ～ 4、2 ～ 5、3 ～ 4、3 ～ 5、3 ～ 6、4 ～ 5、4 ～ 6、又は 5 ～ 6 個の炭素数を有していてもよい。アルキニル基は通常一価であるが、アルキニル基が 2 つの部分相结合する場合など二価になることもある。

40

【0138】

「アルキニレン」とは、上記で定義したように、少なくとも 2 つの他の基に連結しているアルキニル基、すなわち二価の炭化水素ラジカルを指す。アルキニレンに連結した 2 つの部分は、アルキニレンの同じ原子又は異なる原子に連結され得る。アルキニレン基には、エチニレン、プロピニレン、ブチニレン、sec-ブチニレン、ペンチニレン、及びヘキシニレンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0139】

50

「シクロアルキル」とは、3～12個の環原子、又は示された数の原子を含む、飽和又は部分的に不飽和の単環式、縮合二環式、又は架橋多環式の環アセンブリを指す。単環式環としては、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、及びシクロオクチルが挙げられる。二環式環及び多環式環としては、例えば、ノルボルナン、デカヒドロナフタレン、及びアダマンタンが挙げられる。例えば、 $C_3 \sim C_8$ シクロアルキルには、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロオクチル、及びノルボルナンが挙げられる。

【0140】

「シクロアルキレン」とは、上記で定義したように、少なくとも2つの他の基に連結しているシクロアルキル基、すなわち二価の炭化水素ラジカルを指す。シクロアルキレンに連結した2つの部分は、シクロアルキレンの同じ原子又は異なる原子に連結され得る。シクロアルキレン基には、シクロプロピレン、シクロブチレン、シクロペンチレン、シクロヘキシレン、及びシクロオクチレンが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0141】

「ヘテロシクロアルキル」とは、3～約20環員並びにN、O、及びSなどの1～約5個のヘテロ原子を含む環系を指す。追加のヘテロ原子も有用であり、これにはB、Al、Si、及びPが挙げられるが、これらに限定されない。ヘテロ原子は、 $-S(O)-$ 及び $-S(O)_2-$ など、これらに限定されないが、酸化されていてもよい。例えば、複素環としては、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフエニル、モルホリノ、ピロリジニル、ピロリニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ペラジニル、ピペリジニル、インドリニル、キヌクリジニル、及び1,4-ジオキサ-8-アザースピロ[4.5]デカ-8-イルが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0142】

「ヘテロシクロアルキレン」とは、上記で定義したように、少なくとも2つの他の基に連結しているヘテロシクロアルキル基を指す。ヘテロシクロアルキレンに連結した2つの部分は、ヘテロシクロアルキレンの同じ原子又は異なる原子に連結され得る。

【0143】

「アリール」とは、6～16個の環炭素原子を含む単環式又は縮合二環式、三環式、又はそれ以上の芳香族環アセンブリを指す。例えば、アリールは、フェニル、ベンジル、又はナフチルであってもよい。「アリーレン」とは、アリール基から誘導された二価のラジカルを意味する。アリール基は、アルキル、アルコキシ、アリール、ヒドロキシ、ハロゲン、シアノ、アミノ、アミノアルキル、トリフルオロメチル、アルキレンジオキシ、及びオキシ- C_2-C_3 -アルキレンから選択される1、2、又は3個のラジカルでモノ、ジ、又はトリ置換されて得る。これらは全て、例えば上記で定義したように、所望によりさらに置換されていてもよく、又は1-若しくは2-ナフチル、又は1-若しくは2-フェナントレニルである。アルキレンジオキシは、フェニルの隣接する2つの炭素原子に結合した2価の置換基である（例えば、メチレンジオキシ、エチレンジオキシ）。オキシ- C_2-C_3 -アルキレンは、フェニルの隣接する2つの炭素原子に結合した二価の置換基でもあり、例えば、オキシエチレン又はオキシプロピレンである。オキシ- C_2-C_3 -アルキレン-フェニルの例としては、2,3-ジヒドロベンゾフラン-5-イルが挙げられる。

30

40

【0144】

いくつかの実施形態では、前記アリールは、ナフチル、フェニル、又はアルコキシ、フェニル、ハロゲン、アルキル、若しくはトリフルオロメチルでモノ又はジ置換されたフェニルであり、特にフェニル、又はアルコキシ、ハロゲン、若しくはトリフルオロメチルでモノ又はジ置換されたフェニルであり、特にフェニルである。

【0145】

Rとして置換されたフェニル基の例は、4-クロロフェン-1-イル、3,4-ジクロロフェン-1-イル、4-メトキシフェン-1-イル、4-メチルフェン-1-イル、4-アミノメチルフェン-1-イル、4-メトキシエチルアミノメチルフェン-1-イル、

50

4-ヒドロキシエチルアミノメチルフェン-1-イル、4-ヒドロキシエチル-(メチル)-アミノメチルフェン-1-イル、3-アミノメチルフェン-1-イル、4-N-アセチルアミノメチルフェン-1-イル、4-アミノフェン-1-イル、3-アミノフェン-1-イル、2-アミノフェン-1-イル、4-フェニルフェン-1-イル、4-(イミダゾール-1-イル)-フェニル、4-(イミダゾール-1-イルメチル)-フェン-1-イル、4-(モルホリン-1-イル)-フェン-1-イル、4-(モルホリン-1-イルメチル)-フェン-1-イル、4-(2-メトキシエチルアミノメチル)-フェン-1-イル及び4-(ピロリジン-1-イルメチル)-フェン-1-イル、4-(チオフェニル)-フェン-1-イル、4-(3-チオフェニル)-フェン-1-イル、4-(4-メチルピペラジン-1-イル)-フェン-1-イル、並びに複素環において任意に置換された4-(ピペリジニル)-フェニル及び4-(ピリジニル)-フェニルである。

10

【0146】

「アリーレン」とは、上記で定義したように、少なくとも2つの他の基に連結しているアリール基を指す。アリーレンに連結した2つの部分は、アリーレンの異なる原子に連結されている。アリーレン基にはフェニレンが挙げられるが、これに限定されない。

【0147】

「アリーレンオキシ」とは、上記で定義したアリーレン基を指し、アリーレンに連結した部分の1つが酸素原子を介して連結されている。アリーレンオキシ基にはフェニレンオキシ基が挙げられるが、これに限定されない。

【0148】

同様に、アリール基及びヘテロアリール基の置換基は多様であり、-ハロゲン、-OR'、-OC(O)R'、-NR'R''、-SR'、-R'、-CN₂、-NCOO₂R'、-CONR'R''、-C(O)R'、-OC(O)NR'R''、-NR'R''C(O)R'、-NR'C(O)₂R'、-NR'-C(O)NR'R''、-NH-~~2~~C(=NH)H、-NR'C(NH₂)=NH、-NH-C(NH₂)=NR'、-S(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)₂NR'R''、₃N-CH(Ph)₂、パーフルオロ(C₁~C₄)アルコキシ、及びパーフルオロ(C₁~C₄)アルキルから選択され、その数は0~芳香族環系上の開いた原子価の総数の範囲内であり、式中、R'、R''、及びR'''は、水素~C₈アルキル及びヘテロアルキル、非置換アリール及びヘテロアリール、(非置換アリール)-(C₁~C₄)アルキル、並びに(非置換アリール)オキシ-(C₁~C₄)アルキルから独立して選択される。

20

30

【0149】

アリール又はヘテロアリール環の隣接原子上の置換基のうちの2つは、式-T-C(O)-(CH₂)_q-U-の置換基で所望により置換されていてもよく、式中、T及びUは独立して-NH-、-O-、-CH₂-、又は単結合であり、qは0~2の整数である。あるいは、アリール又はヘテロアリール環の隣接原子上の置換基のうちの2つは、式-A-(CH₂)_r-B-の置換基で所望により置換されていてもよく、式中、A及びBは独立して-CH₂-、-O-、-NH-、-S-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂NR'-、又は単結合であり、rは1~3の整数である。このようにして形成された新しい環の単結合の1つは、所望により二重結合に置換されていてもよい。あるいは、アリール又はヘテロアリール環の隣接原子上の置換基のうちの2つは、式-(CH₂)_s-X-(CH₂)_t-の置換基で所望により置換されていてもよく、式中、s及びtは独立して0~3の整数であり、Xは-O-、-NR'-、-S-、-S(O)-、-S(O)₂-、又は-S(O)₂NR'-である。NR'及びS(O)₂NR'の置換基R'は、水素又は非置換(C₁~C₆)アルキルから選択される。

40

【0150】

「ヘテロアリール」とは、5~16個の環原子を含む単環式、縮合二環式、又は三環式の芳香族環アセンブリを指し、環原子の1~4個はそれぞれN、O、又はSのヘテロ原子である。例えば、ヘテロアリールには、ピリジル、インドリル、インダゾリル、キノキサリニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンゾチエニル、ベンゾフラニル、フラニル、ピ

50

ロリル、チアゾリル、ベンゾチアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、ピラゾリル、イミダゾリル、チエニル、又は、例えば、アルキル、ニトロ、若しくはハロゲンで置換された、特に一置換若しくは二置換された他のラジカルが挙げられる。ピリジルは、2-、3-、又は4-ピリジルを表し、2-又は3-ピリジルが有利である。チエニルは、2-又は3-チエニルを表す。いくつかの実施形態では、キノリニルは、2-、3-、又は4-キノリニルを表す。いくつかの実施形態では、イソキノリニルは、1-、3-、又は4-イソキノリニルを表す。いくつかの実施形態では、ベンゾピラニル及びベンゾチオピラニルは、それぞれ3-ベンゾピラニル及び3-ベンゾチオピラニルを表し得る。いくつかの実施形態では、チアゾリルは、2-又は4-チアゾリルを表し得る。いくつかの実施形態では、トリアゾリルは、1-、2-、又は5-（1，2，4-トリアゾリル）であり得る。いくつかの実施形態では、テトラゾリルは、5-テトラゾリルであり得る。

10

【0151】

いくつかの実施形態では、ヘテロアリールは、ピリジル、インドリル、キノリニル、ピロリル、チアゾリル、イソオキサゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、ピラゾリル、イミダゾリル、チエニル、フラニル、ベンゾチアゾリル、ベンゾフラニル、イソキノリニル、ベンゾチエニル、オキサゾリル、インダゾリル、又は置換された、特に一置換若しくは二置換された任意のラジカルである。

【0152】

「ヘテロアルキル」という用語は、N、O、及びSなどの1～3個のヘテロ原子を有するアルキル基を指す。追加のヘテロ原子も有用であり、これにはB、Al、Si、及びPが挙げられるが、これらに限定されない。ヘテロ原子は、 $-S(O)-$ 及び $-S(O)_2-$ など、これらに限定されないが、酸化されていてもよい。例えば、ヘテロアルキルには、エーテル、チオエーテル、アルキルアミン、及びアルキルチオールが挙げられる。

20

【0153】

「ヘテロアルキレン」という用語は、上記で定義したように、少なくとも2つの他の基に連結しているヘテロアルキル基を指す。ヘテロアルキレンに連結した2つの部分は、ヘテロアルキレンの同じ原子又は異なる原子に連結され得る。

【0154】

「求電子剤」とは、イオン性であってもよい、求電子中心、すなわち電子を求め、求核剤と反応できる中心を有するイオン、原子、又は原子の集合を指す。求電子剤（又は求電子試薬）は、反応相手（求核剤）から両方の結合電子を受け取ることによって、反応相手との結合を形成する試薬である。

30

【0155】

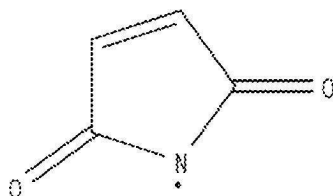
「求核剤」とは、イオン性であってもよい、求核中心、すなわち求電子中心を求めるか又は求電子剤と反応することができる中心を有するイオン、原子、又は原子の集合を指す。求核剤（又は求核試薬）は、両方の結合電子を供与することによって反応相手（求電子剤）との結合を形成する試薬である。「求核基」とは、反応性基と反応した後の求核剤を指す。非限定的な例としては、アミノ、ヒドロキシル、アルコキシ、及びハロアルコキシが挙げられる。

40

【0156】

「マレイミド」とは、以下の構造を有するピロール-2，5-ジオン-1-イル基を指す：

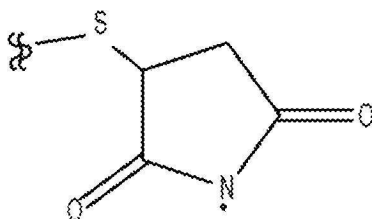
【化13】



50

(スルフヒドリル (例えば、チオアルキル) と反応して、以下の構造を有する -S- マレイミド基を形成する)

【化 1 4】



10

(式中、「・」はマレイミド基の接続点を示し、

【化 1 5】



は、チオールの硫黄原子が元のスルフヒドリル基の残りの部分に結合する点を示す)。

【0 1 5 7】

本開示の目的上、タンパク質及びポリペプチドに含まれる「天然アミノ酸」とは、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-グルタミン、L-グルタミン酸、L-グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、及び／又はL-バリンである。タンパク質に含まれる「非天然アミノ酸」とは、天然アミノ酸として言及されるアミノ酸以外のアミノ酸を指す。非天然アミノ酸には、天然アミノ酸のD異性体、及び天然アミノ酸のD異性体とL異性体との混合物などが挙げられるが、これらに限定されない。N-αメチルアミノ酸 (例えば、サルコシン)、4-ヒドロキシプロリン、デスモシン、イソデスモシン、5-ヒドロキシリジン、ε-N-メチルリジン、3-メチルヒスチジンなどの他のアミノ酸は、天然タンパク質中に存在するが、mRNAのリボソーム翻訳以外の手段によって通常導入されるため、本開示の目的ではタンパク質中に見出される非天然アミノ酸とみなされる。

20

30

【0 1 5 8】

ポリマーの形状、構造、又は全体的な構造に関する「直鎖状」とは、単一のポリマーアームを有するポリマーを指す。

【0 1 5 9】

「分岐状」とは、ポリマーの形状、構築、又は全体的な構造に関して、開始剤内に含まれるコア構造から伸びる2つ以上のポリマー「アーム」を有するポリマーを指す。開始剤は、原子移動ラジカル重合 (ATRP) 反応に使用されてもよい。分岐状ポリマーは、2本のポリマー鎖 (アーム)、3本のポリマーアーム、4本のポリマーアーム、5本のポリマーアーム、6本のポリマーアーム、7本のポリマーアーム、8本のポリマーアーム、9本のポリマーアーム、又はそれ以上を有し得る。各ポリマーアームはポリマー開始部位から伸びている。各ポリマー開始部位は、モノマーの添加によってポリマー鎖の成長部位となることができる。例えば、限定するものではないが、ATRPを使用する場合、開始剤上のポリマー開始部位は、通常、ハロゲン化銅などの遷移金属化合物によって触媒される可逆的な酸化還元プロセスを受ける有機ハロゲン化物である。いくつかの実施形態では、前記ハロゲン化物は臭素である。

40

【0 1 6 0】

「薬学的に許容される賦形剤」とは、組成物に含めることができ、患者に重大な有害な毒性作用を引き起こさず、特にヒトの治療用途でFDAによって承認されているか、承認される可能性のある賦形剤を指す。薬学的に許容される賦形剤の非限定的な例としては、

50

水、塩化ナトリウム、生理食塩水、乳酸リンゲル液、通常のショ糖、通常のブドウ糖などが挙げられる。

【0161】

治療用タンパク質は、発症を遅らせ、重症度を軽減し、さらなる悪化を抑制し、及び／又は障害の少なくとも1つの兆候又は症状を改善する投与量、投与経路、及び投与頻度を意味する効果的なレジメンで投与される。患者がすでに何らかの障害を患っている場合、前記レジメンは治療効果のあるレジメンと言える。患者が一般集団と比較して疾患のリスクが高いものの、まだ症状が現れていない場合、そのレジメンは予防的に有効なレジメンであると言える。場合によっては、過去の対照又は同じ患者の過去の経験と比較して、個々の患者で治療効果又は予防効果が観察される場合がある。他の場合には、治療を受けた患者集団と治療を受けていない患者の対照集団とを比較した前臨床試験又は臨床試験で、治療効果又は予防効果が実証されることがある。

10

【0162】

物質の「生物学的半減期」とは、物質の導入後に組織又は生物から物質の半分が除去されるまでに必要な時間を指定する薬物動態パラメーターである。

【0163】

「OG1786」はポリマー合成に使用される9アーム開始剤であり、OG1786と共にトリフルオロ酢酸の塩形態を表す。OG1786は、他の塩として使用することも、遊離塩基として使用することもできる。

【0164】

「OG1801」は、モノマーHEMA-PCを使用したATRP合成の開始剤としてOG1786を使用して作製された、約(±15%)750kDaのポリマー(Mn又はMpによる)である。

【0165】

「OG1802」は、マレイミド官能基が付加されたOG1801であり、 n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 、 n_8 、及び n_9 のそれぞれは整数(正)(0~約3000)であり、ポリマーの全分子量は(Mw)750,000±15%ダルトンである。

【0166】

多角度光散乱(MALS)は、レーザー光が分子に当たると光の振動電場が分子内に振動双極子を誘導し、高分子を分析する技術である。この振動双極子は光を再放射し、Wyatt社のminiDawn(登録商標)TREOS(登録商標)などのMALS検出器を使用して測定できる。放射光の強度は高分子に誘起される双極子の大きさに依存し、これは高分子の分極率に比例し、誘起される双極子が大きいくほど、散乱光の強度も大きくなる。したがって、このような高分子の溶液からの散乱を分析するには、周囲の媒体(例えば、溶媒)に対する分極率を知る必要がある。これは、Wyatt社のOptilab(登録商標)T-rEX示差屈折計を使用して dn/dc (= $\Delta n/\Delta c$)値を測定することにより、分子濃度の変化 Δc による溶液の屈折率 n の変化 Δn の測定から決定してもよい。MALS測定で使用される2つのモル重量パラメーターは、数平均分子量(Mn)及び重量平均分子量(Mw)である。多分散指数(PDI)はMwをMnで割った値に等しくなる。SECでは、SECでの最高ピークの分子量として定義されるピーク分子量Mpの平均分子量も測定できる。

30

40

【0167】

PDIは、個別のタンパク質(例えば、OG1950)と多分散バイオポリマー(例えば、OG1802)との結合に由来するポリマー及びバイオコンジュゲート(bioconjugate)の分子量分布の広さの尺度として使用される。タンパク質試料の場合、溶液中の全てのタンパク質分子の長さと同質質量がほぼ同じであると予想される翻訳産物であるため、その多分散性は1.0に近くなる。対照的に、重合プロセス中に様々な長さのポリマー鎖が合成されるバイオポリマーの多分散性のため、分子量の狭い分布の品質特性の1つとして試料のPDIを決定することが非常に重要である。

【0168】

50

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）は、溶液中の分子をサイズによって分離するクロマトグラフィー技術である。通常、様々な孔サイズの樹脂が詰められたカラムに試料を通すために水溶液が適用される。樹脂はカラムを通過する際に分析対象物に対して不活性であることが期待され、分析対象物はそれぞれの固有のサイズ及び選択されたカラムの孔サイズ特性に基づいて互いに分離される。

【0169】

SECをMALS又はSEC/MALSと組み合わせると、SEC校正標準セットに頼る場合とは対照的に、モル質量及びサイズ（二乗平均平方根半径）の正確な分布が得られる。このタイプの配置には、これまでのカラムキャリブレーション方法に比べて多くの利点がある。光散乱及び濃度は溶出画分ごとに測定されるため、溶出位置に関係なくモル質量及びサイズを決定できる。これは、バイオポリマー（OG1802）又はバイオコンジュゲート（例えば、KSI-301、KSI-501）などの非球形高分子を有する種に特に当てはまる。このような種は通常、カラム校正標準セットで説明できるような方法では溶出しない。

10

【0170】

いくつかの実施形態では、SEC/MALS分析には、Alliance 2695 溶媒送達モジュールを備えたWaters社のHPLCシステム及びShodex SEC-HPLCカラム（7.8×300mm）を備えたWaters社の2996フォトダイオードアレイ検出器が含まれる。これは、Wyatt社のminiDawn（登録商標）TREOS（登録商標）及びOptilab（登録商標）T-REX示差屈折計とオンラインで接続されている。Waters社のEmpower（商標）ソフトウェアを使用してWaters社HPLCシステムを制御することができ、Wyatt社のASTRA V 6.1.7.16ソフトウェアを使用してminiDawn（登録商標）TREOS（登録商標）からMALSデータ、T-REX検出器から dn/dc データ、及びWaters社の2996フォトダイオードアレイ検出器からのA280吸光度信号を使用した質量回収データを取得できる。SECは1×PBS pH 7.4で1mL/分で実行でき、試料を注入すると、MALS及びRIシグナルがASTRAソフトウェアによって分析され、絶対モル質量（Mp、Mw、Mn）及び多分散指数（PDI）を決定できる。さらに、計算にはポリマー及びタンパク質の入力 dn/dc 値（それぞれ0.142及び0.183）も含まれる。KSI-301の dn/dc 値の場合、 dn/dc はポリマー及びタンパク質の加重MWに基づいて以下の式で約0.148と計算される：

20

複合体 $dn/dc = 0.142 \times [\text{ポリマー}Mw / (\text{ポリマー}Mw + \text{タンパク質}Mw)] + 0.183 \times [\text{タンパク質}Mw / (\text{ポリマー}Mw + \text{タンパク質}Mw)]$

30

（式中、OG1802のポリマーMwは800kDa、OG1950のタンパク質Mwは146kDaである）。

【0171】

「KSI-301」は、分岐状の高分子量のホスホリルコリンベースのバイオポリマーに共有結合した、組換え哺乳類細胞発現全長ヒト化抗VEGFモノクローナル抗体のバイオコンジュゲートである。いくつかの実施形態では、KSI-301は、保存剤不含滅菌水溶液として、50mg/mL（抗体質量に基づく）の濃度で使い捨てのガラスバイアルに供給される。図8は、KSI-301の抗体部分のアミノ酸配列を示す。KSI-301は、眼球内半減期が長い抗血管内皮増殖因子（VEGF）バイオ医薬品である。KSI-301は、2つの中間体（（1）OG1950抗体中間体、組み換え型全長ヒト化抗huVEGFAモノクローナル抗体、（2）OG1802バイオポリマー中間体、ホスホリルコリンバイオポリマー）のバイオコンジュゲートである。不活性バイオポリマーであるOG1802を追加することで、生物学的製剤のサイズが大きくなり、KSI-301の眼薬物動態（PK）が現在承認されている抗huVEGFA治療薬のPKを超えて拡張される。KSI-301の非臨床試験では、KSI-301が、huVEGFR1及び受容体2（huVEGFR）への結合が阻害されることが示されている。これにより、huVEGFR-Aを介した機能が無効に

40

50

なる。

【0172】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法のいずれか1又は複数で投与される分子は、米国特許公開第2017/0190766号に開示されている分子のいずれか1つであり、その全文が参照により本明細書に援用される。

【0173】

図8は、末端リジンを除去したKSI-301の抗体部分のアミノ酸配列を示す。末端リジンの除去は抗体における翻訳後修飾である。組換えIgGの重鎖C末端のリジン残基は、細胞培養中にCHO宿主細胞に内因性のカルボキシペプチダーゼによって（多くの場合、大部分が）除去される。本明細書に記載された全ての抗体配列について、本明細書に開示された例示的な抗体については特定の配列（より長い場合もある）が提供されるが、タンパク質鎖の発現後に、軽鎖及び／若しくは重鎖のアミノ末端又はカルボキシ末端の1～数個のアミノ酸、特に重鎖のC末端リジン残基が、分子の一部又は全部で欠落しているか、又は誘導体化されている場合があることが理解されるであろう。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体配列のいずれかは、このリジンをクリップによって改変される場合があり、これには、図8に示される改変バージョン（下線付きの残基の1又は複数が除去されている）が含まれる場合がある。いくつかの実施形態では、図8の重鎖中のリジンが除去される。いくつかの実施形態では、GKが除去される。いくつかの実施形態では、PGKが除去される。いくつかの実施形態では、SPGKが除去される。当業者には理解されるように、分子の集団全体にわたって、リジンをクリップは変化し、完全ではない場合がある。したがって、たとえば、分子の90%、95%、98%、99%、又は100%が1又は複数のクリップバージョンを有する一方で、10%、5%、2%、1%、又は0%までが完全長である場合がある（前述の値の任意の2つの間に定義された範囲を含む）。したがって、本明細書で使用されるKSI-301には、図8に概説されている重鎖バリエーションのいずれか1つと全てのオプションが含まれる。

【0174】

本明細書において、「抗VEGF抗体」又は「抗VEGF抗体複合体」が参照される場合はいつでも、抗VEGFタンパク質、例えば抗VEGF融合タンパク質、例えばアフリベルセプト（Aflibercept）も考慮される。したがって、本明細書に開示されているように、「抗VEGF抗体複合体」が参照される場合はいつでも、本明細書に開示されているホスホリルコリン含有バイオポリマー（例えば、OG1802）に共有結合した抗VEGFタンパク質（例えば、アフリベルセプト）も考慮される。本明細書に開示される様々な実施形態において、抗VEGF抗体複合体療法への言及は、抗VEGFタンパク質、例えばアフリベルセプト複合体療法も考慮する。本明細書に開示される眼疾患の治療方法の様々な実施形態において、抗VEGF抗体複合体への言及は、アフリベルセプトバイオポリマー複合体も考慮する。

【0175】

精製方法

いくつかの実施形態では、生産物を精製する方法が提供される。前記方法は、結合したタンパク質産物をカオトロピック剤で洗浄し、その後結合したタンパク質を収集することを含む。前記方法は、追加の上流及び下流の精製プロセスをさらに含むことができる。

【0176】

いくつかの実施形態では、アフィニティークロマトグラフィーを使用して生産物を精製する方法が提供される。前記方法は、溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは目的のタンパク質に結合すること、及びカオトロピック剤を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、を含む。

【0177】

いくつかの実施形態では、前記目的の標的タンパク質が細胞培養物によって生産される。いくつかの実施形態では、前記細胞培養物はCHO細胞である。いくつかの実施形態で

は、前記目的のタンパク質が二重特異性抗体である。いくつかの実施形態では、前記二重特異性抗体が V E G F 及び I L - 6 に対して特異的である。いくつかの実施形態では、前記二重特異性抗体が O G 2 0 7 2 である。いくつかの実施形態では、前記目的のタンパク質が抗体複合体である。いくつかの実施形態では、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスがプロテイン A クロマトグラフィーマトリックスである。

【0178】

いくつかの実施形態では、前記緩衝溶液中の前記カオトロピック剤は、リチウム及びリチウム塩、マグネシウム及びマグネシウム塩、カルシウム及びカルシウム塩、並びにグアニジニウム及びグアニジニウム塩のうち 1 又は複数を含む。

【0179】

いくつかの実施形態では、マグネシウム塩の濃度は 2 ~ 3 . 5 M である。いくつかの実施形態では、塩化マグネシウムの濃度は約 2 . 8 M である。

【0180】

いくつかの実施形態では、マグネシウム塩の濃度は、2、2 . 1、2 . 2、2 . 3、2 . 4、2 . 5、2 . 6、2 . 7、2 . 8、2 . 9、3、3 . 1、3 . 2、3 . 3、3 . 4、若しくは 3 . 5 M、又は前述の範囲内の任意の値である。

【0181】

いくつかの実施形態では、カルシウム塩の濃度は 1 ~ 3 M である。いくつかの実施形態では、塩化カルシウムの濃度は約 2 . 0 M である。

【0182】

いくつかの実施形態では、カルシウム塩の濃度は、1、1 . 5、1 . 8、1 . 9、2、2 . 1、2 . 2、2 . 3、2 . 4、2 . 5、2 . 7、若しくは 3 M、又は前述の範囲内の任意の値である。

【0183】

いくつかの実施形態では、グアニジニウム塩の濃度は 0 . 0 5 ~ 3 M である。いくつかの実施形態では、グアニジニウム塩酸塩の濃度は約 1 . 0 M である。

【0184】

いくつかの実施形態では、グアニジニウム塩の濃度は、0 . 0 5、0 . 0 7 5、0 . 1、0 . 2、0 . 2 5、0 . 5、0 . 7 5、1、1 . 5、1 . 7 5、2、2 . 5、2 . 7 5、若しくは 3 M、又は前述の範囲内の任意の値である。

【0185】

いくつかの実施形態では、前記緩衝溶液はさらにトリスを含む。

【0186】

いくつかの実施形態では、前記緩衝溶液中のトリスの濃度は、少なくとも 5 m M である。

【0187】

いくつかの実施形態では、前記緩衝溶液中のトリスの濃度は、少なくとも 1 0 m M である。

【0188】

いくつかの実施形態では、緩衝溶液中のトリスの濃度は、少なくとも 2 5 m M、3 0 m M、3 5 m M、4 0 m M、5 0 m M、又は 5 0 m M を超える値である。

【0189】

いくつかの実施形態では、前記緩衝溶液の p H が 5 . 5 より大きい。

【0190】

いくつかの実施形態では、タンパク質及び 1 又は複数の不純物を含むロード液から生産物を精製して不純物を低減する方法が、本明細書において提供される。前記方法は、前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスに通し、続いてカオトロピック塩を含む少なくとも 1 つの洗浄溶液を通し、溶出溶液を使用して前記タンパク質を収集することを含む。

【0191】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、目的のタンパク質を含む溶出液中の不純物を分離する方法が、本明細書において提供される。目的のタンパク質を含む溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすること、及びリチウム及びリチウム塩、マグネシウム及びマグネシウム塩、カルシウム及びカルシウム塩、並びにグアニジニウム及びグアニジニウム塩のうち1又は複数を含む1又は複数の緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、を含む方法。

【0192】

いくつかの実施形態では、目的のタンパク質を含む溶出液中の不純物を分離する方法が本明細書で提供される。目的のタンパク質を含む溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすること、及びリチウム及びリチウム塩、マグネシウム及びマグネシウム塩、カルシウム及びカルシウム塩、並びにグアニジニウム及びグアニジニウム塩のうち1又は複数を含む1又は複数の緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、を含む方法。いくつかの実施形態では、前記方法は、前記緩衝溶液で洗浄した後、前記溶離液がロードされた前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを後洗浄緩衝溶液で洗浄する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質以外の核酸、エンドトキシン、消泡剤、その他の分子、又はその他の小分子が除去される。いくつかの実施形態では、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを前記緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質を前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスに結合したまま不純物を除去する。いくつかの実施形態では、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを前記緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質以外の宿主細胞タンパク質を除去する。いくつかの実施形態では、前記緩衝溶液へのカオトロピック剤の添加によって、前記目的の標的タンパク質が溶出されない。いくつかの実施形態では、前記方法が、ウイルス不活性化、タンジェンシャルフローろ過、透析ろ過、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、又はウイルス低減ろ過のうち1又は複数をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記溶離液が動物成分不含細胞培養物を用いてバイオリアクターで生産されたものである。いくつかの実施形態では、前記生産物が目的の精製タンパク質である。いくつかの実施形態では、前記不純物が宿主細胞タンパク質（HCP）不純物を含む。いくつかの実施形態では、前記溶出液がさらにウイルス不純物を含む。いくつかの実施形態では、前記方法は、ウイルス不純物を除去することをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記方法は、前記緩衝溶液で洗浄する前に、前記ロード液がロードされたアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを予洗浄緩衝溶液で洗浄する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記方法は、前記緩衝溶液で洗浄した後、前記溶離液がロードされた前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを後洗浄緩衝溶液で洗浄することをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記予洗浄緩衝溶液がリン酸ナトリウムを含む。いくつかの実施形態では、前記予洗浄緩衝溶液がトリス及び塩を含む。前記方法のいくつかの実施形態では、前記抗体複合体が抗VEGF-A軽鎖及び抗VEGF-A重鎖を含む抗VEGF抗体複合体を含み、前記抗VEGF-A抗体重鎖が、配列番号172のCDRH1であるCDRH1、配列番号173のCDRH2であるCDRH2、及び配列番号174のCDRH3であるCDRH3を含み、並びに前記抗VEGF-A抗体軽鎖が、配列番号199のCDRL1であるCDRL1、配列番号200のCDRL2であるCDRL2、及び配列番号201のCDRL3であるCDRL3を含む。本明細書において提供される方法のいくつかの実施形態では、前記抗VEGF抗体複合体が、MPCモノマーを含むポリマーに結合した抗VEGF-A免疫グロブリンG（IgG）を含む抗体複合体を含み、前記抗VEGF-A抗体重鎖の配列は、配列番号7～13、19～27、89、90、及び256～262のうちの少なくとも1つであり、抗VEGF-A抗体軽鎖の配列は、配列番号91～93、及び28～30のうちの少なくとも1つであり、並びに前記抗体がC449で前記ポリマーに結合している。

【0193】

いくつかの実施形態では、アフィニティークロマトグラフィーを使用して生産物を製造する方法が提供される。前記方法が、目的のタンパク質を含む溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすること、及びリチウム及びリチウム塩、マグネシウム及びマグネシウム塩、カルシウム及びカルシウム塩、並びにグアニジニウム及びグアニジニウム塩のうち1又は複数を含む1又は複数の緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、を含む。

【0194】

いくつかの実施形態では、生産物を処理するための方法が提供される。前記方法は、溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすることを含む。いくつかの実施形態では、前記方法は、カオトロピック塩を含む洗浄緩衝液で洗浄して溶出液を収集することをさらに含み、前記カオトロピック塩の濃度は、第一濃度から第二濃度に増加され、前記溶出液は少なくとも1つの画分に収集され、並びに前記少なくとも1つの画分には目的の生産物が含まれる。いくつかの実施形態では、前記方法は、前記第一濃度における前記カオトロピック塩の濃度が0 Mであり、前記第二濃度における前記カオトロピック塩の濃度が4.0 Mであることを含む。いくつかの実施形態では、前記カオトロピック塩はマグネシウムベースである。いくつかの実施形態では、前記カオトロピック塩は塩化マグネシウムである。

【0195】

いくつかの実施形態では、アフィニティークロマトグラフィーを使用して生産物を製造する方法が提供される。前記方法は、目的のタンパク質を含有する溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすること、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスの第一の洗浄をリン酸ナトリウム及び塩を含む第一の緩衝液で行うこと、並びに前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスの第二の洗浄をカオトロピック剤を含む第二の緩衝液で行うこと、を含む。

【0196】

いくつかの実施形態では、アフィニティークロマトグラフィーを使用して生産物を製造する方法が提供される。前記方法は、目的のタンパク質を含む溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすること、トリス及び塩を含む第一の緩衝液で第一の洗浄を行うこと、及びトリス及びカオトロピック剤を含む第二の緩衝液で第二の洗浄を行うこと、を含み、前記第二の緩衝液のカオトロピック剤は、前記第一の緩衝液に含まれる塩と同一ではない。

【0197】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法が提供される。前記方法は、ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、次にカオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、結合した前記目的のタンパク質を溶出させること、及び溶出液を収集することであって、前記溶出液は前記目的のタンパク質を含有すること、を含む。

【0198】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法が提供される。前記方法は、ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、カオトロピック塩を含む緩衝溶液を前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスに供給すること、前記結合した目的のタンパク質を溶出させること、及び溶出液を収集することであって、前記溶出液は前記目的のタンパク質を含有すること、を含む。

【0199】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法が提供される。前記方法は、複合体タンパク質を収集することであって、前記複合体タンパク質は、複合体ポリマーに結合した

10

20

30

40

50

抗体を含むこと、前記複合体タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記複合体タンパク質に結合すること、カオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、前記複合体タンパク質を溶出させること、及び溶出液を収集することであって、前記溶出液は前記複合体タンパク質を含むこと、を含む。

【0200】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法が提供される。前記方法は、目的の標的タンパク質に結合したアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを、カオトロピック塩を含む緩衝液で洗浄すること、溶出させて溶出液を収集することであって、前記溶出液は、前記目的の標的タンパク質を含有すること、前記溶出液からウイルス汚染物質を除去すること、を含む。

10

【0201】

いくつかの実施形態では、前記溶出液からウイルス汚染物質を除去することが、低pH不活性化、界面活性剤不活性化、ポリッシングクロマトグラフィー工程、ウイルスろ過、限外ろ過、及び／又は透析ろ過のうち1又は複数を含む。

【0202】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法が提供される。前記方法は、目的の標的タンパク質に結合したアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを、カオトロピック塩を含む緩衝液で洗浄すること、前記カオトロピック塩を除去すること、及び溶出させて溶出液を収集することであって、前記溶出液が前記目的の標的タンパク質を含有すること、を含む。

20

【0203】

いくつかの実施形態では、前記溶出液が許容される医薬賦形剤とさらに組み合わせられて医薬組成物を形成する。いくつかの実施形態では、緩衝溶液が前記医薬組成物に添加される。いくつかの実施形態では、保存剤溶液が前記医薬組成物に添加される。いくつかの実施形態では、前記医薬組成物が硝子体内注射用にさらに精製される。

【0204】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法が提供される。前記方法は、ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、カオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、溶出させて溶出液を収集することであって、前記溶出液は目的の標的タンパク質を含むこと、及び前記溶出液からウイルス汚染物質を除去すること、を含む。

30

【0205】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法が提供される。前記方法は、ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、カオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、結合した前記目的のタンパク質を溶出させること、及び溶出液を収集することであって、前記溶出液は前記目的のタンパク質を含有すること、を含む。

40

【0206】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法が提供される。前記方法は、ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、カオトロピック塩を含む緩衝溶液を前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスに供給すること、前記結合した目的のタンパク質を溶出させること、及び溶出液を収集する

50

ことであって、前記溶出液は前記目的のタンパク質を含有すること、を含む。

【0207】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法が提供される。前記方法は、複合体タンパク質を収集することであって、前記複合体タンパク質は、複合体ポリマーに結合した抗体を含むこと、前記複合体タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記複合体タンパク質に結合すること、カオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、前記複合体タンパク質を溶出させること、及び溶出液を収集することであって、前記溶出液は前記複合体タンパク質を含むこと、を含む。

10

【0208】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法が提供される。前記方法は、目的の標的タンパク質に結合したアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを、カオトロピック塩を含む緩衝液で洗浄すること、溶出させて溶出液を収集することであって、前記溶出液は、前記目的の標的タンパク質を含有すること、前記溶出液からウイルス汚染物質を除去すること、を含む。

【0209】

前記方法は、前記溶出液からウイルス汚染物質を除去することが、低pH不活性化、界面活性剤不活性化、ポリッシングクロマトグラフィー工程、ウイルスろ過(VF)、限外ろ過(UF)、及び／又は透析ろ過(DF)のうち1又は複数を含むこと、をさらに含んでいてもよい。前記方法は、前記溶出液が許容される医薬賦形剤とさらに組み合わせられて医薬組成物を形成すること、をさらに含んでいてもよい。前記方法は、緩衝溶液が前記医薬組成物に添加されること、をさらに含んでいてもよい。前記方法は、保存剤溶液が前記医薬組成物に添加されること、をさらに含んでいてもよい。前記方法は、前記医薬組成物が硝子体内注射用にさらに精製されること、をさらに含んでいてもよい。

20

【0210】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法が提供される。前記方法は、目的の標的タンパク質に結合したアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを、カオトロピック塩を含む緩衝液で洗浄すること、前記カオトロピック塩を除去すること、及び溶出させて溶出液を収集することであって、前記溶出液が前記目的の標的タンパク質を含有すること、を含む。

30

【0211】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法が提供される。前記方法は、ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、カオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、溶出させて溶出液を収集することであって、前記溶出液は目的の標的タンパク質を含むこと、及び前記溶出液からウイルス汚染物質を除去すること、を含む。

【0212】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法が提供される。前記方法は、溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすること、第一の洗浄緩衝液で洗浄すること、カオトロピック塩を含む第二の洗浄緩衝液で洗浄すること、第三の洗浄緩衝液で洗浄することであって、前記第三の洗浄緩衝液で、前記カオトロピック塩を除去すること、及び、溶出緩衝液で溶出させることであって、溶出液を収集し、前記溶出液はタンパク質産物を含むこと、を含む。

40

【0213】

前記方法は、前記第一の洗浄緩衝液が50mMリン酸ナトリウムを含むこと、をさらに含んでいてもよい。前記方法は、前記第一の洗浄緩衝液がさらに約250mM塩化ナトリウムを含むこと、をさらに含んでいてもよい。前記方法は、前記第一の洗浄緩衝液がトリ

50

ス及び塩を含むこと、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記溶出液からウイルス汚染物質を除去すること、をさらに含んでもよい。前記方法は、ウイルス汚染物質を除去することが、低pH不活性化、界面活性剤不活性化、ポリッシングクロマトグラフィー工程、ウイルスろ過（VF）、限外ろ過（UF）、及び透析ろ過（DF）のうち1又は複数を含むこと、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記溶離液が目的のタンパク質を含むこと、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記目的のタンパク質が抗体であること、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記抗体がさらにポリマーに結合されて抗体複合体を形成すること、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記抗体複合体が二重特異性抗体を含むこと、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記二重特異性抗体が抗VEGF結合部分及び抗IL-6結合部分を含むこと、をさらに含んでもよい。

10

【0214】

前記方法は、前記第一の洗浄緩衝液が、10mM、50mM、100mM、150mM、200mM、又は任意の整数である10～200mMのリン酸ナトリウムを含むこと、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記第一の洗浄緩衝液がリン酸ベースの種を含むこと、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記第一の洗浄緩衝液がさらに25mM、50mM、100mM、150mM、200mM、又は任意の整数である25～200mM塩化ナトリウムを含むこと、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記第一濃度における前記カオトロピック塩の濃度が0Mであり、前記第二濃度における前記カオトロピック塩の濃度が4.0Mであること、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記カオトロピック塩がマグネシウムベースであること、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記カオトロピック塩が塩化マグネシウムであること、をさらに含んでもよい。

20

【0215】

いくつかの実施形態では、前記抗体複合体は、VEGF Trapに融合したアンタゴニストIL-6抗体を含むタンパク質コンストラクトを含み、前記抗体が単離された拮抗性IL-6抗体又はその断片を含む。いくつかの実施形態では、前記二重特異性抗体はVEGF-抗IL-6二重阻害剤を含み、前記VEGFR-抗IL-6二重阻害剤は、抗IL-6抗体又はその断片と抗VEGF Trap（VEGFR1/2）とのトラップ抗体融合体を含み、前記二重阻害剤は、VEGFRタンパク質の切断を減らすために、VEGFR配列内に少なくとも1つの点変異を含み、前記抗体は、断片抗原結合（Fab）領域、ヒンジ領域、及び断片結晶化可能（Fc）領域を含み、前記抗VEGF Trapは、前記抗体の重鎖（前記重鎖はIL-6 VHを含む）のN末端に位置するか、Fab領域とヒンジ領域との間に位置する。いくつかの実施形態では、前記抗体複合体は、（1）抗VEGF-A抗体及び（2）ホスホリルコリン含有ポリマーを含む抗体複合体を含み、前記ポリマーは前記抗体の可変領域の外側のシステインで前記抗体に共有結合し、前記システインは組換えDNA技術によって付加されている。いくつかの実施形態では、前記抗体複合体、補体因子D（CFD）に特異的に結合し、CFDのタンパク質分解活性を直接阻害する単離されたアンタゴニスト抗体を含む。

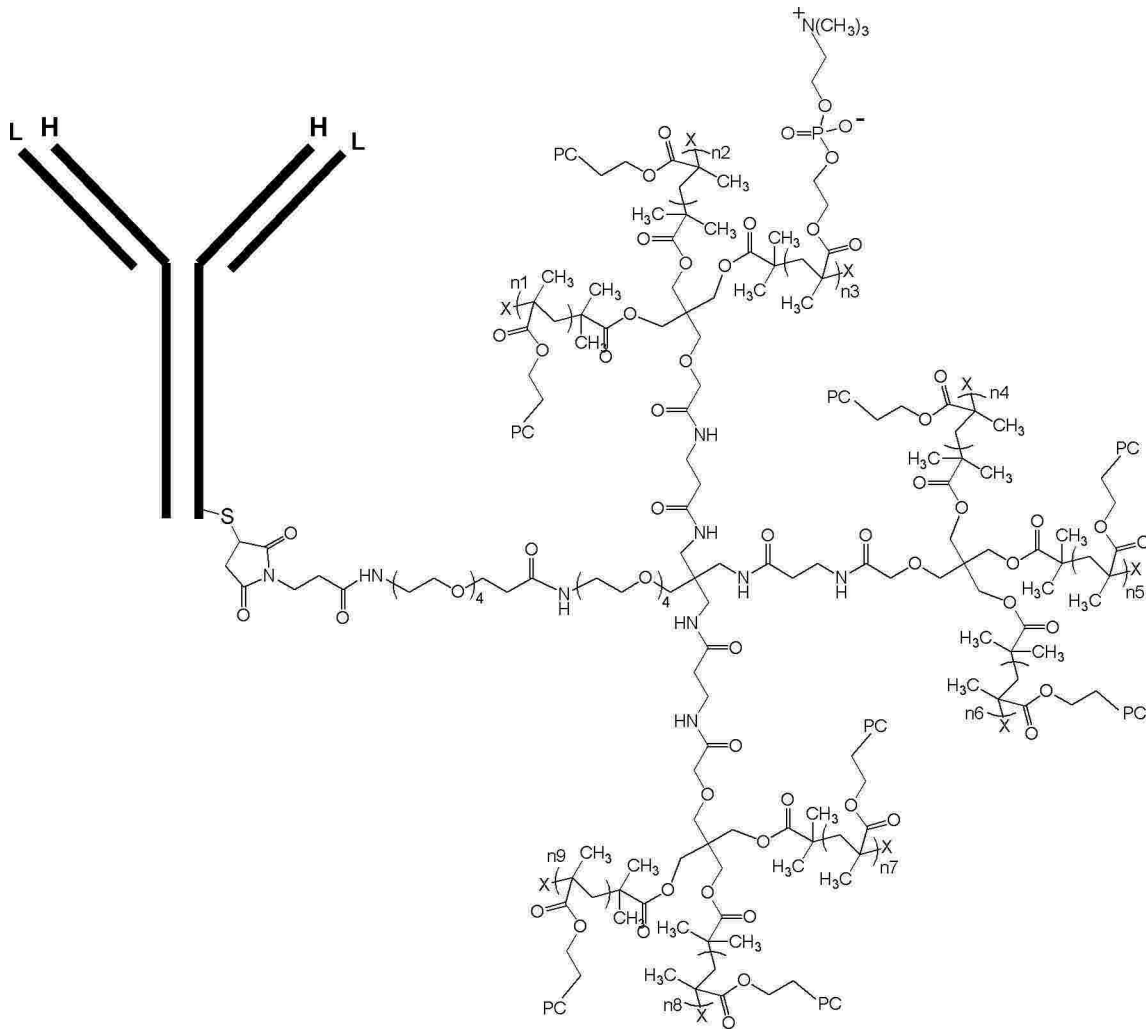
30

【0216】

いくつかの実施形態では、前記抗体複合体が下記式（I）の構造を有する：

40

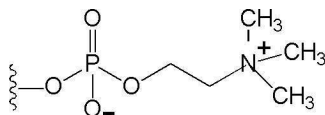
【化 1 6】



式中、前記抗体の各重鎖は文字Hで示されると共に、抗CFD抗体の各軽鎖は文字Lで示され、前記ポリマーは、C443（EU番号付け）のスルフィドリルを介して前記抗体に結合し、この結合は重鎖の1つに示されており、

PCは

【化 1 7】



（式中、波線はポリマーの残りの部分への接続点を示す）であり、X=a) OR（R=H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル）、b) H、又はc) Brを含む任意のハロゲン化物であり、並びにi) n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8、及びn9は同じか異なり、0～3000までの整数であるか、又はii) n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8、及びn9の合計が2500±15%であるように、n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8、及びn9は同じか異なる。いくつかの実施形態では、n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8、及びn9の合計は、約1500～約3500±約10%～約20%である。

【0217】

いくつかの実施形態は、表1A、表1B、表1C、表1D、及び／又は表1Eに見られる部分的な軽鎖配列及び部分的な重鎖配列を有する抗CFD抗体又はそのバリエーションを含む、以下のいずれか、又は組成物（医薬組成物を含む）を提供する。表1Aにおいて、下線付きの配列は、本明細書で提供されるCDR配列のいくつかの実施形態である。いくつ

かの実施形態では、本明細書に開示される組成物は、表 1 A、表 1 B、表 1 C、表 1 D、及び／又は表 1 E に提供されるオプションのいずれかからの部分的又は完全な軽鎖配列及び部分的若しくは完全な重鎖配列又はそれらのバリエーションを有する抗体を含む。いくつかの実施形態では、前記抗体（又はその結合断片）には、表 1 A、表 1 B、表 1 C、表 1 D、及び／又は表 1 E に示される C D R のうちの 1 又は複数が含まれ得る。いくつかの実施形態では、前記抗体（又はその結合断片）には、表 1 A、表 1 B、表 1 C、表 1 D、及び／又は表 1 E に示される C D R のうち 3 つ以上が含まれ得る。いくつかの実施形態では、前記抗体（又はその結合断片）には、表 1 A、表 1 B、表 1 C、表 1 D、及び／又は表 1 E に示される 6 つの C D R のうちの任意のもの全てが含まれ得る。様々なコンストラクトの C D R 配列も表 1 A、表 1 B、表 1 C、表 1 D、及び／又は表 1 E に記載されている。

10

【表 1 - 1】

表 1 A：抗 C F D アンタゴニストモノクローナル抗体の可変領域配列（C D R は下線付き）

mAb	重鎖	軽鎖
KCD002	EVKLVESEGGVLVQPGSSMKLSCTASG FTFSDYYMAWVRQVPEKGLEWVGNL <u>NYDGSSYYLDSLKSRFIISRDSAKNI</u> <u>LYLQMSSLSKSEDTATYFCARGEDFYLY</u> <u>YAMDYWGQGTSTVTVSS</u> (配列番号276)	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASE NIHSYLAWYQQKQKQSPQLIVYNTKT LAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLOP EDFGSYVCQHGYGIPPTFGGGTKLEIK (配列番号309)
KCD003	EVQLQSSRPPELVKPGASVKIFCKASG YTFDYYMNWVRQRHGETLEWIGDI NPNGGDSYNQKFKDKATLTVDKSSS TASMEIRSLTSDSAVYYCAREGPFSE <u>AYWGQGTLLTVSA</u> (配列番号277)	DVLTMTQTPPLSLPVSLGEQASISCRSSQ TIVHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLI YKYSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYCFQGSHPVPTFGGG TKLEIK (配列番号310)
KCD005	EVQLQSSGPPELVKPGASVKISCKASG YTFDYYMNWVKQSHGKSLEWIGDI NPNGGDSYNQKFKDKATLTVDKSSS TAYMELRSLTSGDSAVYYCTREGASE <u>AEFWGQGTLLTVSA</u> (配列番号278)	DVLTMTQTPPLSLPVSLGDAQASISCRSSQ SIVHSNGDTYLEWYLQKPGQSPKLLI YKYSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYCFQGSHPVPTFGAG TKLEIK (配列番号311)
KCD009	QIQLVQSGPELVKPGASVKISCKASGY IFRNYGMNWVKQGPQKGLKWMGWI <u>NTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSAS</u> <u>TAYLQISNLKNEDTATYFCVRDGPGE</u> <u>AYWGQGTLLTVSA</u> (配列番号279)	DVLTMTQTPPLSLPVSLGDAQASISCRSSL IEHSDGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIY KYSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEADDLGVIYCFQGSHPVPTFGAGT NLEIK (配列番号312)
KCD010	EVLLQSSGPPELVKPGASVKIPCKASG YTFDYYMDWVKQSHGKSLEWIGHI NPNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSS TAYMELRSLTSEDNAVYYCGTGDFAY <u>WGHGTLTVSA</u> (配列番号280)	QIVLTQSPAISMSVSPGEKVTLTCSASS SVSSSYLYWYQKPGSSPKLWIYSTS NLASGVPAARFSGSGSGTSYSLTISME AEDAASYFCHQWSSYPPTFGAGTKLE LK (配列番号313)
KCD023	EVLLQSSGPPELVKPGASVKIPCKASG YTFDYYNIDWVKQSHGKSLEWIGDIN PNNGGINYNQKFKGKATLTVDKSSST AYMELRSLTSEDNAVYYCGTGDIYAY <u>WGQGTLLTVSA</u> (配列番号281)	QIVLTQSPAFMSASPGEKVTLTCSASS SVSSSYLYWYQKPGSSPKLWIYSTS NLASGVPAARFSGSGSGTSYSLTISME AEDAASYFCHQWTSYPPTFGAGTKLE LK (配列番号314)
KCD036	EVQLQSSGPPELVKPGASVKISCKASG YSFTGYTMTWVKQSHGKNLEWIGLIN PYNGGTNYNQKFKGKATFTVDKSSST AYMELSLTSEDNAVYYCARHGYGSS <u>WDYWGQGTLLTVSS</u> (配列番号282)	DIKLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQ DINTYLSWFQKPGKSPKTLIYRANR LVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISLEY EEMGIYYCLQYDEFPYTFGGGKLEIK (配列番号315)
KCD040	EVQLQSSGAELVKPGASVKLSCTASD FNIKDTYMHWVVMQRPEQGLEWIGKID <u>PANGNTEFDPKFGKATITADTSSNT</u> <u>AYLQLTSLTSEDNAVYYCTRAMDYW</u> <u>GQGTSTVTVSS</u> (配列番号283)	QIVLTQSPAISMSASPGEKVTMTCSAGS SVSYMYWYQKPGSSPRVLIYDTSNL ASGVVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEA DAATYYCQQWSNYPYTFGGGKLEIK (配列番号316)
KCD042	EVQLQSSGAELVKPGASVRLSCTASG FNIKHTYIHWVSQRPEQGLEWIGKIDP <u>ANGNTKYDPKFGKATITADTSSNTA</u> <u>YLQLSSLTSEDNAVYYCVNAMEYW</u> <u>GQGTSTVTVSS</u> (配列番号284)	QSVLTQSPAISMSASPGEKVTMTCSAN SSVSDMYWYQQRPGSSPRLLIYDTSN LASGVVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEA EDAATYYCQQWSTYPTWTFGGGKLEIK (配列番号317)
KCD044	EVQLQSSGAELVKPGASVRLSCTASG FNIKHTYMHWVSQRPERGLEWIGKID <u>PANGNTKYDPKFGKATITADTSSNT</u> <u>VYLQLSSLTSEDNAVYYCLNAMEYW</u> <u>GQGTSTVTVSS</u> (配列番号285)	QSVLTQSPAISMSASPGEKVTMTCSAN SSVSDMYWYQQRPGSSPRLLIYDTSN LASGVVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEA EDAATYYCQQWSTYPTWTFGGGKLEIK (配列番号318)
KCD047	EVQLQSSGAELVKPGASVRLSCTASG FNIKDTYMHWVKQRPEQGLEWIGRID <u>PANGYTKDDPKFGKATITADTSSNT</u> <u>AYLQLSSLTSEDNAVYYCASAMDYW</u> <u>GQGTSTVTVSS</u> (配列番号286)	QIVLTQSPAIVMSASPGEKVAMTCSAS SSVTYMYWYQKPGSSPRLLIYDTSN LASGVVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEA EDAATYYCQQWSTYPTWTFGGGKLEIK (配列番号319)

20

30

40

50

【表 1 - 2】

KCD048	EVQLQQSGADLVKPGASVKLSCTASG FNIKATYMHVWRQRPEKGLEWIGRID PANGHTIYDPQFQGKATITSDTSSNTA YQLNSLTSEDNAVYYCAEAMDYWG QGTSTVTSS (配列番号287)	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTLTCSATS SVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNL ASGVPRFSGSGSGTSYSLTISRMEAE DDATYYCQQWSNYPFTFGGGTKLEIK (配列番号320)
KCD070	EIQLQQTGPPELVKPGASVKISCKASGY SFTDYIILWVKQSHGKSLEWIGNINPY YDYTSYNLKFKGKATLTVDKSSSTAY MQLNSLTSEDNAVYYCARSDGYG DYWGQGTSTVTSS (配列番号288)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKAS QDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWA STRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTINN QSEDLADYFCQQYSSYPWTFGGGTTL EIK (配列番号321)
KCD101	QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASG YFTTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGVI DPSDSYTNYNQKFKGKATLTVDTSST TAYMQLSSLTSEDNAVYYCGRNGYD GSMDDYWGQGTSTVTSS (配列番号289)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQ DISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYPSR LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQ EDFATYFCQQGNTLPYTFGGGTLEIK (配列番号322)
KCD102	QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASG YFTTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGVI DPSDSYTNYNQKFKGKATLTVDTSST TAYMQLSSLTSEDNAVYYCARNGYD GSMDDYWGQGTSTVTSS (配列番号290)	EIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQ DISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYPSR LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQ EDFATYFCQQGNTLPYTFGGGTLEIK (配列番号323)
KCD103	QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASG YFTTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGVI DPSDSYTKYNQKFKDKATLTVETSSS TAYMQLSSLTSEDNAVYYCAGNGYD GSMDDYWGQGTSTVTSS (配列番号291)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQ DISNSLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSR LHSRVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLDQ EDIAITYFCQQANTLPYTFGGGTLEIK (配列番号324)
KCD104	QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASG YFTTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGVI DPSDSYTYYNQKFKGKATLTVDTSST TAYMQLSSLTSEDNAVYYCARNGYD GAMDDYWGQGTSTVTSS (配列番号292)	EIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQ DISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYPSR LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQ EDFATYFCQQGNTLPYTFGGGTLEIK (配列番号325)
KCD118	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAFG YFTFDYYKNWMRQRHGESLEWIGDI NPNSGDANYNQKFKGKATLTVDKSSS TAYMELRSLTSEDNAVYYCAREGPSF AYWGHGTLVTVA (配列番号293)	DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQ TIVHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLI YKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGIIYCFQGSHPVPTFGGG TKLEIK (配列番号326)
KCD119	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASG YFTFDYYTNWMRQRHGESLEWIGDIN PNTGDTSYNQKFRVKATLTVDKSSGT AYMGLRSLTSEDNAVYYCTREGPSFA YWGQGTTLVTVA (配列番号294)	DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQ TIVHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLI YKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYCFQGSHPVPTFGGG TTLEIK (配列番号327)
KCD121	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASG YFTFDYYKNWMRQRHGESLEWIGDI NPNGDTSYNQKFKGKATLTVDKSSS TAFMELRSLTSEDNAVYYCAREGPSF AYWGQGTTLVTVA (配列番号295)	DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQ TIVHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLI YKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLRI SRVEAEDLGVIYCFQGSHPVPTFGGG TKLEIK (配列番号328)
KCD122	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASG YFTFDYYKNWMRQRHGESLEWIGDIN NPNGDANYNQKFKGKATLTVDKSS STAYMELRSLTSEDNAVYYFCAREGPS FAYWGHGTLVTVA (配列番号296)	DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQ TIVHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLI YKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYCFQGSHPVPTFGGG TKLEIK (配列番号329)
KCD123	EVHLQQSGPELVKPGASVKISCKASG YFTTDFYKNWMRQRHGESLEWIGDIN PNNGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSST AYMELRSLTSEDNAVYYCAREGPSFA YWGQGTTLVTVA (配列番号297)	DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQ TIVHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLI YKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYCFQGSHPVPTFGGG TKLEIK (配列番号330)
KCD124	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASG YFTTDHYMNWVKQSHGKSLEWIGDI NPNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSS TAYMELRSLTSGDSNAVYYCTREGASF AFWGQGTTLVTVA (配列番号298)	DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQ SIVHSNGDTYLEWYLQKPGQSPKLLI YKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVIYCFQGSHPVPLTFGAG TKLELK (配列番号331)

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

KCD131	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASA YTFTDYYINWVKQRPGQGPEWIGWIF PGSNSTYSNEKFVKATLTVDESSSTA YMLLSSLTSEDSAVYFCARLG YFGSS YHALDYWGQGTSTVTSS (配列番号 299)	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASE NIYSHLAWFQQKQKSPRLLVYSATN LPDGVPSRFSGSGSGTQYSLKINILQS EDFGSYYCQHFHWGTPWTFGGGKLEI K (配列番号332)
KCD136	EVQLQQSVAELVRPGASVKLSCSASG FNIKNTYMHWVNQRPEQGLEWIGRID PANGITKYAPNFQGKATITADTSSNTA YLQLSNLTSEDTAIYYCTRAMDYWGQ GTSVTVSS (配列番号300)	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASS SVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDISNL ASGVPVRFSGSGSGTSSYSLTISRMEAE DAATYYCQQWDTYPWTFGGGKLEI K (配列番号333)
KCD200	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASG YTFTSYKYNWVRQRHGESLEWIGDIN PNSGDTAYNQKFKGKATLTVDRSSST AYMELRSLTSEDSAVYYCAREGPSFA YWGQGTLLTVSA (配列番号301)	DVLMTQTPLSLPVSLGDQVSISCRSSQ TIVHSNGDTYLEWYLQKPGQSPNLLI YKVSNRFSGVPRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLG VYYCFQGSHPPTFGGG TKLEIK (配列番号334)
KCD208	EVQLQQSVAELVRPGASVKLSCTVSG FNIKNTYMHWVKQRPEQGLEWIGRID PANGDTTYAPKFQGKATITADTSSNS AYLHLSRLTSEDTAIYYCSLYDYDGY WGQGTLLTVSS (配列番号302)	EIVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSS SISSSSLHWYRQKSGTSPKPIYGTSH LASGVPVRFSGSGSGTSSYSLTISSMEA EDAATYYCQQWDTYPWTFGGGKLEI K (配列番号335)
KCD214	EVQLQQSVAEFVRPGASVKLSCTASG FNIKNTYMHWVKQRPEQGLEWIGRID PANGNTEYAPKFQGKATITADTSSNT AYLQLSSLTSEDTAIYYCALYDYDGY WGQGTLLTVSS (配列番号303)	EIVLTQSPALMAASPGEKVTITCRVSS SISSSSLHWYQQKSGTSPKPIYGTSN LASGVPVRFSGSGSGTSSYSLTISSMEA EDAATYYCQQWSDYPWTFGGGKLEI K (配列番号336)
KCD220	QVQLQQSGAELMEPGASVKLSCKATG YTFTGYWIEWVKQRPGHGLEWIGETL PGSDSNYNEKFKGKATFTADTSSNT AYMQLSSLTTEDSAIYYCARDYSNYW YFDVWGTGTTVTVSS (配列番号304)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQ DISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSN LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQ EDIATYFCQQDSKHRTFGGGKLEIK (配 列番号337)
KCD224	QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGF SLTSYGVWDWIRQSPGKGLEWLGVIWG VGSTNYNSALKSRLSISKDNSKSQVFL KMNSLQTDDTAMYYCARSYDGSYWY EDVWGTGTTVTVSS (配列番号305)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQ VISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSR LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEP EDIATYYCQQYSKLPYTFGSGTKLEIK (配列番号338)
119_TA F	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG YTFTDYIMNWVRQAPGKGLEWIGDI NPNTGDTSYNADFKRRFTFSLDTSKS TAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSF AYWGQGTLLTVSS (配列番号306)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQ TIVHSNGDTYLEWYQQKPGKAPNLLI YKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCFQGSHPPTFGQG TKVEIK (配列番号339)
119_TA F Germ	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG YTFTDYIMSWVRQAPGKGLEWIGDI NPNTGDTSYNADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPS FAYWGQGTLLTVSS (配列番号307)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQ TIVHSNGDTYLEWYQQKPGKAPNLLI YKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCFQGSHPPTFGQG TKVEIK (配列番号340)
119_Hu man Germ	EVKKPGASVKVSKASGYTFTDYIM HWVRQAPGQGLEWIGDINPNTGDTSY NQKFQGRVTSTRDTSISTAYMELSR RSDDTVVYYCTREGPSFAYWGQGT LTVSS (配列番号308)	DVVMQTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQ TIVHSNGDTYLEWFQQRPGQSPNLLI YKVSNRFSGVPRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVG VYYCFQGSHPPTFGGG TKVEIK (配列番号341)

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 1 B : 広義の C D R 定義に基づく抗 C F D アンタゴニストモノクローナル抗体の C D R

	H1	H2	H3	L1	L2	L3
KCD 002	GFTFSDYY MA (配列番 号342)	INYDGSSTY YLDCLKS (配 列番号372)	ARGEDFY LYAMDY (配 列番号402)	RASENIHSY LA (配列番号 432)	NTKTLA E (配列番号 462)	QHHYGIPP T (配列番号 492)
KCD 003	GYTFTDY YMN (配列番 号343)	INPNNGDPS YNQKFKD (配 列番号373)	AREGPSFA Y (配列番号 403)	RSSQTIVHS NGDTYLE (配 列番号433)	KVSNRF S (配列番号 463)	FQGSHPVP T (配列番号 493)
KCD 005	GYTFTDH YMN (配列番 号344)	INPNNGGTS CNQKFKG (配 列番号374)	TREGASFA F (配列番号 404)	RSSQSIVHS NGDTYLE (配 列番号434)	KVSNRF S (配列番号 464)	FQGSHPVP T (配列番号 494)
KCD 009	GYIFRNYG MN (配列番 号345)	INTYTGEPT YADDFKG (配 列番号375)	VRDGPGE AY (配列番号 405)	RSSLIEHSD GNTYLE (配 列番号435)	KVSNRF S (配列番号 465)	FQGSHPVP T (配列番号 495)
KCD 010	GYTFTDY DMD (配列番 号346)	INPNNGGTI YNQKFKG (配 列番号376)	GTGDFAY (配列番号 406)	SASSSVSS YLY (配列番号 436)	STSNLA S (配列番号 466)	HQWSSYP PT (配列番号 496)
KCD 023	GYTFTDY NID (配列番 号347)	INPNNGGIN YNQKFKG (配 列番号377)	GTGDYAY (配列番号 407)	SASSSVSS YLY (配列番号 437)	STSNLA S (配列番号 467)	HQWTSYP PT (配列番号 497)
KCD 036	GYSFTGYT MT (配列番 号348)	INPYNGGTN YNQKFKG (配 列番号378)	ARRHYGS SWDY (配列番 号408)	KASQDINTY LS (配列番号 438)	RANRL VD (配列番号 468)	LQYDEFPPY T (配列番号 498)
KCD 040	DFNIKDTY MH (配列番 号349)	IDPANGNTE FDPKFQG (配 列番号379)	TRAMDY (配 列番号409)	SAGSSVS MY (配列番号 439)	DTSNLA S (配列番号 469)	QQWSNYP YT (配列番号 499)
KCD 042	GFNIKHTY IH (配列番号 350)	IDPANGNTK YDPKFQG (配 列番号380)	VNAMEY (配 列番号410)	SANSSVSD MY (配列番号 440)	DTSNLA S (配列番号 470)	QQWSTYP WT (配列番号 500)
KCD 044	GFNIKHTY MH (配列番号 351)	IDPANGNTK YDPKFQG (配 列番号381)	LNAMEY (配 列番号411)	SANSSVSD MY (配列番号 441)	DTSNLA S (配列番号 471)	QQWSTYP WT (配列番号 501)
KCD 047	GFNIKDTY MH (配列番号 352)	IDPANGYTK DDPKFQG (配 列番号382)	ASAMDY (配 列番号412)	SASSSVTY Y (配列番号 442)	DTSNLA S (配列番号 472)	QQWSNYP FT (配列番号 502)
KCD 048	GFNIKATY MH (配列番号 353)	IDPANGHTI YDPQFQG (配 列番号383)	AEAMDY (配 列番号413)	SATSSVS Y (配列番号 443)	DTSNLA S (配列番号 473)	QQWSNYP FT (配列番号 503)
KCD 070	GYSFTDYI IL (配列番号 354)	INPYDYDTS YNLKFQG (配 列番号384)	ARSDGYY GGDY (配列番 号414)	KASQDVGT AVA (配列番号 444)	WASTR HT (配列番号 474)	QQYSSYP WT (配列番号 504)
KCD 101	GYTFTSY WMH (配列番 号355)	IDPSDSYTN YNQKFKG (配 列番号385)	GRNGYDG SMDY (配列番 号415)	RASQDISNY LN (配列番号 445)	YPSRLH S (配列番号 475)	QQGNTLP YT (配列番号 505)
KCD 102	GYTFTSY WMH (配列番 号356)	IDPSDSYTN YNQKFKG (配 列番号386)	ARNGYDG SMDY (配列番 号416)	RASQDISNY LN (配列番号 446)	YPSRLH S (配列番号 476)	QQGNTLP YT (配列番号 506)
KCD 103	GYTFTSY WMH (配列番 号357)	IDPSDSYTK YNQKFKD (配 列番号387)	AGNGYDG SMDY (配列番 号417)	RASQDISNS LN (配列番号 447)	YTSRLH S (配列番号 477)	QQANTLP YT (配列番号 507)
KCD 104	GYTFTSY WMH (配列番 号358)	IDPSDSYTY YNQKFKG (配 列番号388)	ARNGYDG AMDY (配列番 号418)	RASQDISNY LN (配列番号 448)	YPSRLH S (配列番号 478)	QQGNTLP YT (配列番号 508)

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

KCD 118	GYTFTDY YKN (配列 番号359)	INPNSGDAN YNQKFKG (配列番号389)	AREGPSFA Y (配列番号 419)	RSSQTIVHS NGDTYLE (配列番号449)	KVSNRF S (配列番号479)	FQGSHVPP T (配列番号509)
KCD 119	GYTFTDY YTN (配列 番号360)	INPNTGDT YNQKFRV (配列番号390)	TREGPSFA Y (配列番号 420)	RSSQTIVHS NGDTYLE (配列番号450)	KVSNRF S (配列番号480)	FQGSHVPP T (配列番号510)
KCD 121	GYTFTDY YKN (配列 番号361)	INPNNGDTS YNQKFRG (配列番号391)	AREGPSFA Y (配列番号 421)	RSNQTIVHS NGDTYLE (配列番号451)	KVSNRF S (配列番号481)	FQGSHVPP T (配列番号511)
KCD 122	GYTFTDY YKN (配列 番号362)	INPNNGDA NYNQKFKG (配列番号392)	AREGPSFA Y (配列番号 422)	RSSQTIVHS NGDTYLE (配列番号452)	KVSNRF S (配列番号482)	FQGSHVPP T (配列番号512)
KCD 123	GYTFTDFY KN (配列 番号363)	INPNNGGTN YNQKFKG (配列番号393)	AREGPSFA Y (配列番号 423)	RSSQTIVHS NGDTYLE (配列番号453)	KVSNRF S (配列番号483)	FQGSHVPP T (配列番号513)
KCD 124	GYTFTDH YMN (配列 番号364)	INPNNGGTS YNQKFKG (配列番号394)	TREGASFA F (配列番号 424)	RSSQSIVHS NGDTYLE (配列番号454)	KVSNRF S (配列番号484)	FQGSHVPL T (配列番号514)
KCD 131	AYTFTDY YIN (配列 番号365)	IFPGSNSTY SNEKFEV (配列番号395)	ARLG YFGS SYHALDY (配列番号425)	RASENIYSH LA (配列番号455)	SATNLP D (配列番号485)	QHFWDTP WT (配列番号515)
KCD 136	GFNIKNTY MH (配列 番号366)	RIDPANGIT KYAPNFQG (配列番号396)	TRAMDY (配列番号426)	SASSSVSYM Y (配列番号456)	DISNLA S (配列番号486)	QQWDTP WT (配列番号516)
KCD 200	GYTFTSYY KN (配列 番号367)	INPNSGDTA YNQKFKG (配列番号397)	AREGPSFA Y (配列番号 427)	RSSQTIVHS NGDTYLE (配列番号457)	KVSNRF S (配列番号487)	FQGSHVPP T (配列番号517)
KCD 208	GFNIKNTY MH (配列 番号368)	RIDPANGDT TYAPKFQG (配列番号398)	SLYDYDG Y (配列番号 428)	SVSSSISSSS LH (配列番号458)	GTSHLA S (配列番号488)	QQWDTP WT (配列番号518)
KCD 214	GFNIKNTY MH (配列 番号369)	RIDPANGDT TYAPKFQG (配列番号399)	ALYDYDG Y (配列番号 429)	RVSSSISSSS LH (配列番号459)	GTSNLA S (配列番号489)	QQWSDYP WT (配列番号519)
KCD 220	GYTFTGY WIE (配列 番号370)	ETLPGSDSN NYNEKFKG (配列番号400)	ARDYSNY WYFDV (配列番号430)	RASQDISNY LN (配列番号460)	YTSNLH S (配列番号490)	QQDSKHR T (配列番号520)
KCD 224	GFSLTSYG VD (配列 番号371)	VIWGVGST NYNSALKS (配列番号401)	ARSYDGS YWYFDV (配列番号431)	RASQVISNY LN (配列番号461)	YTSRLH S (配列番号491)	QQYSKLP YT (配列番号521)

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 1 C : 88 個のマウス抗 C F D 抗体の重鎖可変配列及び軽鎖可変配列 (C D R は下線付き)

ID	重鎖可変領域AA配列	ID	軽鎖可変領域AA配列
FKC D001	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKA SDNSFTGYMHWVKQSHGNILD WIGYIDPYNGVSSYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMEIRSLTSEDSAV YYCASYYGSSPYWYFDVWGTGTT TVSS (配列番号522)	KCD 001	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCR ASSSVSYMHWYQQKPGSSPKPWI YATSNLASGVPARFSGSGSGTSH FLTISRLEAEDAATYFCQQWSSN PYTFGGGGTKLEIK (配列番号610)
KCD 002	EVKLVESEGGLVQPGSSMKLSCT ASGFTFSDYYMAWVRQVPEKGLE WVGNIYDGSSTYYLDSLKSRFII SRDSAKNILYLQMSSLKSEDTATY FCARGEDFYLYAMDYWGQGTSTV TVSS (配列番号523)	KCD 002	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCR ASENIHSYLAWYQQKQKGKSPQLI VYNTKTLAEGVPSRFSGSGSGTQ FSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYGI PPTFGGGGTKLEIK (配列番号611)
KCD 003	EVQLQQSRPELVKPGASVKIFCKA SGYTFTDYMNWVRQRHGETLE WIGDINPNNGDPSYNQKFKDKAT LTVDKSSSTASMEIRSLTSDSAV YYCAREGPSFAYWGQGTSLTVSA (配列番号524)	KCD 003	DVLMTQTPLSLPVSLGEQASISCR SSQTIVHSNGDTYPEWYLQKPGQ SPNLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGS SGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCF QGSHVPPTFGGGGTKLEIK (配列番 号612)
KCD 004	EVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCK TSGKFTTSHGINWVKRPGQGLE WIGYIYIGNGYNEYNEKFKGKAT LTSDTSSSTAYMQLSSLTFEDSAI YFCVRKAYGNYGFDDWGQGTTT TVSS (配列番号525)	KCD 004	DIQMTQSPTSLASLGESVSLTCR ASQEISGYLNLWQQKPDGSIKRLI YAASTLDSGVPKRFSGSRSGSDY SLTSSLESEDFADYYCLQYANYP FTFGSGGTKLEVK (配列番号613)
KCD 005	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKA SGYTFTDHYMNWVKQSHGKSLE WIGDINPNNGGTSCNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMELRSLTSGDSAV YYCTREGASFAFWGQGTSLTVSA (配列番号526)	KCD 005	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC RSSQSIHVHSDGTYPEWYLQKPG QSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQGSHPVPTFGAGTKLELK (配列 番号614)
KCD 006	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCT ASGFKIKDTYMHVVKERPEQGLE WIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATI TADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVY YCANAMDYWGQGTSTVTVSS (配列 番号527)	KCD 006	QIILTQSPAIMASASPGEKVTMTCS ARSSVSNMYWYQQKPGSSPRLLI YDTSNLAGSVVPRFSGSGSGTSY SLTISRMEAEDAATYYCQQWSSY PWTFGGGGTKLEIK (配列番号615)
KCD 007	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCT ASGFNIKDTYMHVVKERPEQGLE WIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATI TADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVY YCANAMDYWGQGTSTVTVSS (配列 番号528)	KCD 007	QIILTQSPAIMASASPGERVMTTCS ASSSVSNMYWYQQKPGSSPRLLI YDTSNLAGSVPLRFSGSGSGTSY SLTISRMEAEDAATYYCQQWSSY PWTFGGGGTKLEIK (配列番号616)
KCD 008	EVQLQQSGPELVKAGASVKMSCT ASGFNIKDTYMHVVKRPEQGLA WIGRIDPANGNIKYDPKFQGKATI TADTSSNTAYLQLSSLTSDDTAVY YCTSAMDYWGQGTSTVTVSS (配列 番号529)	KCD 008	QIVLTQSPEIMASASPGEKVTMTCS ARSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLI YDTSNLAGSVVPRFSGSGSGTSY SLTISRMETEDAATYYCQQWSTY PFTFGSGGTKLEIK (配列番号617)
KCD 009	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKA SGYIFRNYGMNWKQGPQGLK WMGWINTYTGEPTYADDFKGRFA FSLETASTAYLQISNLKNEDTAT YFCVRDGPGFAYWGQGTSLTVSA (配列番号530)	KCD 009	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC RSSLIIEHSDGNTYPEWYLQKPG QSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEADDLGVYYC FQGSHPVPTFGAGTNLELK (配列 番号618)

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

KCD 010	EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKA SGYTFTDYDMDWVKQSHGKSLE WIGHINPNNGGTIYNQKFKGKATL TVDKSSSTAYMELRSLTSEDNAV YYCGTGDFAYWGHGTLVTVSA (配 列番号531)	KCD 010	QIVLTQSPAIVMSVSPGEKVTLTCS ASSSVSSSYLYWYQKPKGSSPKL WIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTS YSLTISSMEAEDAASYFCHQWSS YPPTFGAGTKLELK (配列番号 619)
KCD 011	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSA ASGFTFSSNTMSWVRQTPEKRLE WVAYITNNGGSTIYPDTVKGRFT ISRDNARNTLYLQMSSLKSEDTA MYYCARRHDYYTMDYWGQGTSTV VSS (配列番号532)	KCD 011	DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCK ASQDINKYIAWYQHKPGKGRLL IHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDT SFSISNLEPEDIATYYCLQYDNLL YTFGGGKLEIK (配列番号620)
KCD 013	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCT ASGFKIKDTYMHVVKERPDQGLE WIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATI TADTSSNTAYLQLSSLTSEDNAVY YCANAMDYWGQGTSTVTVSS (配 列番号533)	KCD 013	QIILTQSPAIVMSASPGEKVTMTCS ASSSVSNMYWYQKPKGSSPRLLI YDTSNLAGVPPVRFSGSGSGASY SLTISRMEAEDAATYYCQQWSSY PWTFFGGGKLEIK (配列番号621)
KCD 014	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSA ASGFTFSSYIMSWVRQTPEKRLE WVAYITNNGGNTIYPDTIKGRFTI SRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAM YYCARHGTGYAMDYWGQGTSTV VSS (配列番号534)	KCD 014	EIVLTQSPPTMAASPGEKITITCS ASSSISSNYLHWYQKPKGFSPKL LIYRTSNLAGVPPARFSGSGSGTS YSLTIGTMEAEDVATYYCQQGSS IPLTFGAGTKLELK (配列番号622)
KCD 015	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCT ASGFNIKDTYMHVVKRPEQGLE WIGRIDPANGYTEYDPKFQGKATI TADTSSNTAYLQLSSLTSEDSAA YCTSAMEFWGQGTSTVTVSS (配 列番号535)	KCD 015	QIVLTQSPAILASASPGEKVTMTCS ASSSVSYIYWYQKPKRSSPRLLIY DTSNLAGVPPVRFSGSGSGTSYS LTISRMEAEDAATYYCQQWSSYP FTFFGGGKLEVK (配列番号623)
KCD 016	QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCK ASGYTFITNFMHWVKRPGQGL EWIGFENPSTAYTEYNQKFKDKA TLTADKSSSTAYLHLSSLTSEDSA VYYCARRDYGSYGYFDVWGA GTTVTVSS (配列番号536)	KCD 016	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCR ASGNIHNYLAWYQKQKQKSPQL LVYNAKTLADGVPSRFSGSGSGT QYSLKINSLQPEDFGYYCYQHFW STPTFFGGGKLEIK (配列番号624)
KCD 017	DVQLQESGPDLVKPSQSLTCTV TDYSITSGYSWHWIRQFPGNKLE WLGVIHSSGNTNYPNPSLKSRFSIT RDTSKNQFFLQLNSVTSEDATYY CALHYGSSFGWYFDVWGAGTT VTVSS (配列番号537)	KCD 017	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVYITC KASQDVGTAVAWYQQTSQGSPK LLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSG TDFTLTLSNVQSEDLADYFCQQY TSYPLTFGAGTKLELK (配列番号 625)
KCD 018	QVQLQQSAAELARPGASVKMSCK ASGYTFTSYTVHWVKRPGQGLE WIGYINPSSGFTDYNQKFKDKTTL TADISSSTAYLIQLSSLTSEDSAVY CARRGVNWSWFAIYWGQGTLLTV SA (配列番号538)	KCD 018	NIMMTQSPSSLAIVSAGEKVTMSC KSSQSVLYSSNQKNYLAWYQK PGQSPQLLIYWASTRESGVPERFT GSGSGTDFTLTISVQAEDLAVY YCHQYLSSWTFGGGKLEIK (配 列番号626)
KCD 019	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCK ASGYTFATYTIHWVKRPGQGLE WIGYLNLRNDYTHYNQKFRDKAA LTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV YNCAFRLGNDROGWYFDVWGAG TTVTVSS (配列番号539)	KCD 019	DIVMTQAHRFMSTSVGDRVIISC KASQDVGTAVAWYQQTPGQSPK ILYWTSTRHTGVPDRFTGSRSGT DFTLTISNVQSEDLADYFCQQYT TYPLTFGGGKLEIK (配列番号 627)
KCD 022	DVQLQESGPDLVKPSQSLTCTV TGYSITSGYSWHWIRQFPGNTLE WMGYIHYSGSTNYPNPSLESRSFT RDTSKNQFFLQLNSVTTEDATY YCALHFYGYNLGWYFDVWGAGT TVTVSS (配列番号540)	KCD 022	DIVMTQSHKFMSTSIGDRVIITCK ASQDVGTAVAWYQKPGQSPKL LIYWASTRHTAVPDRFTGSGSGT DFTLTISNVQSEDLADYFCQQYT SYPLTFGAGTQLELK (配列番号 628)

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

KCD 023	EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKA SGYTFTDYNIDWVKQSHGKSLEW IGDINPNNGGINYNQKFKGKATLT VDKSSSTAYMELRSLTSED ~~TAVY~~ YCGTGDYAYWGQGTLLTVSA (配 列番号541)	KCD 023	QIVLTQSPAFMSASPGEKVTLTCS ASSSVSSSYLYWYQQKPGSSPKL WIYSTSNLASGVPGRFSGSGSGTS YSLTISSMEAEDAASYFCHQWTS YPPTFGAGTKLELK (配列番号 629)
KCD 030	QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCK ASGYTFTN ~~YWMHWVKQRPGQGL~~ EWIGYINPSIGYTEYNQKFKDKAT LTADKSSSTAYMQLSSLTSED ~~SAV~~ FYCATFIYYAMDYWGQGTSTVTS S (配列番号542)	KCD 030	DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCH ASQNINVWLSWYQQKPGNIPKLL IYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTG FTLTISLQPEDIAITYCQQGQSY YTFGGGTKLEIK (配列番号630)
KCD 033	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCTA SGYSFTGYTMTWVKQSHGKNLE WIGLINPYNGGTN ~~YNQKFKGKAT~~ LTVDKSSSIAYMELLSLTSED ~~SAV~~ YYCARRHYGSNWDYWGQGTTLT VSS (配列番号543)	KCD 033	DIKLTQSPSSIYTS ~~LG~~ ERVITICK ASQDINTYLSWFQQRPGKSPKTLI YRADRLVDGVPSRV ~~RGSGSGQD~~ YSLTISSLEYEDMGIYYCLO ~~YDEF~~ PYTFGGGTKLEIK (配列番号631)
KCD 036	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCK ASGYSFTGYTMTWVKQSHGKNLE WIGLINPYNGGTN ~~YNQKFKGKAT~~ FTVDKSSSTAYMELLSLTSED ~~SAV~~ YYCARRHYGSSWDYWGQGTTLT VSS (配列番号544)	KCD 036	DIKLTQSPSSMYASLG ~~ER~~ VTITCK ASQDINTYLSWFQQRPGKSPKTL IYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQD YSLTISSLEYEEMGIYYCLO ~~YDEF~~ PYTFGGGTKLEIK (配列番号632)
KCD 038	EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKA SGYSFADYTMNWVKQSHGKSLE WIGLINPYNGGT ~~SYNQKFMGKAT~~ LTVDKSSSTAYMELLSLTSED ~~SAV~~ YYCARWGTYS ~~HN~~ YDYAMDYWG QGTSVTVSS (配列番号545)	KCD 038	DVVMQTQPLSLPVSLGDQASISC RSSQSLVHSNGNTYL ~~YWYFQKPG~~ QSPKFLIYK ~~VSNR~~ FGISDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDLG ~~VYFC~~ SQSTHVPPFTFGSGTKLEIK (配 列番号633)
KCD 039	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCK ASGYSFADYTLNWVKQSHGKSLE WIGLINPYNGGT ~~SYNQKFMGKAT~~ LTVDKSSSTAYMELLSLTSED ~~SAV~~ YYCTR ~~WGTYS~~ HN ~~YDY~~ AMDYWGQ GTSVTVSS (配列番号546)	KCD 039	DVVMQTQPLSLSVSLGDQASISC RSSQSLVHSNGNTYL ~~YWYLQKP~~ GQSPKLLIYK ~~VSNR~~ FGITDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDLG ~~VYF~~ CSQSTHVPPFTFGSGTKLEIK (配 列番号634)
KCD 040	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCT ASDFNIKDTYMH ~~WVMQRPEQGLE~~ WIGKIDPANGNTEFD ~~PKFQGKATI~~ TADTSSNTAYLQLTSLTSED ~~TAVY~~ YCTRAMDYWGQGTSTVTVSS (配 列番号547)	KCD 040	QIVLTQSPA ~~IMS~~ ASPGEKVTMTCS AGSSVS ~~YMYWY~~ QQKPGSSPRVLI YDTSN ~~LASGVPVR~~ FGSGSGTSY SLTISRMEAEDAATYYCQ ~~QWSNY~~ PYTFGGGTKLEIK (配列番号635)
KCD 042	EVQLQQSGAELVKPGASVRLSCT ASGFNIKHTYIHWVSQRPEQGLE WIGKIDPANGNTKYDPK ~~FQGKATI~~ TADTSSNTAYLQLSSLTSED ~~TAVY~~ YCVNAMEYWGQGTSTVTVSS (配 列番号548)	KCD 042	QSVLTQSPA ~~IMS~~ ASPGEKVTMTCS SANSSVSDMYWFQQRPGSSPRLL IYDTSN ~~LASGVPVR~~ FGSGSGTSY SLTISRMEAEDAATYYCQ ~~QWSTY~~ PWTFGGGTKLEIK (配列番号636)
KCD 044	EVQLQQSGAELVKPGASVRLSCT ASGFNIKHTYMH ~~WVSQRPERGLE~~ WIGKIDPANGNTKYDPK ~~FQGKATI~~ TADTSSNTVYLQLSSLTSED ~~TAVY~~ YCLNAMEYWGQGTSTVTVSS (配 列番号549)	KCD 044	QSVLTQSPA ~~IMS~~ ASPGEKVTMTCS SANSSVSDMYWYQQRPGSSPRLL IYDTSN ~~LASGVPVR~~ FGSGSGTSY SLTISRMEAEDAATYYCQ ~~QWSTY~~ PWTFGGGTKLEIK (配列番号637)
KCD 047	EVQLQQSGAEFVKPGASVRLSCT ASGFNIKDTYMH ~~WVKQRPEQGLE~~ WIGRIDPANGYTKDDPK ~~FQGKATI~~ TADTSSNTAYLQLSSLTSED ~~TAVY~~ YCASAMDYWGQGTSTVTVSS (配 列番号550)	KCD 047	QIVLTQSPA ~~VMS~~ ASPGEKVAMTC SASSSVTYMYWYQQKPGSSPRLL IYDTSN ~~LASGVPVR~~ FGSGSGTSY SLTISRMEAEDAATYYCQ ~~QWSTY~~ PFTPGSGTKLEIK (配列番号638)

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

KCD 048	EVQLQQSGADLVKPGASVKLSCT ASGFNIKATYMHWRQRPEKGLE WIGRIDPANGHTIYDPQFQGKATI TSDTSSNTAYLQLNSLTSEDYAVY YCAEAMDYWGQGTSTVTVSS (配列 番号551)	KCD 048	QIVLTQSPAIMASASPGEKVTLTCS ATSSVSVMYWYQQKPGSSPRLLI YDTSNLAGVPPVRFSGSGSGTSY SLTISRMEAEDDATYYCQQWSNY PFTFGGGTKLEIK (配列番号639)
KCD 049	QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTV SGFSLSSYGQVWRQPPGQGLEW LVVIWRDGSITYNSALKSRISIK DNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMY CGRTSHYGNYYVMDYWGQGT AVTVSS (配列番号552)	KCD 049	DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCR ASESVDKYGISFLNWFQQKPGQP PKLLIYAASNQGSQVPAFSGSGS SGTDFSLNIHPMEEDDPAMYFCQ QGKEVPWTFGGGKLEIK (配列番 号640)
KCD 050	QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTV SGFSLNSYGQVWRQPPGQGLEW LVVIWRDGSITYNSALKSRISIK DNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMY CGRTSHYGNFYVMDYWGQGT AVTVSS (配列番号553)	KCD 050	DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCR ASESVDKYGISFLNWFQQKPGQP PRLLIYAASNQGSQVPAFSGSGS GTDFSLNIHPMEEDDPAMYFCQ GKEFPWTFGGGKLEIK (配列番 号641)
KCD 052	QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTV SGFSLNSYGQVWRQPPGQGLEW LGVIWRDGSITYNSALKSRISIK DNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMY CGRTSHYGNFYVMDYWGQGT AVTVSS (配列番号554)	KCD 052	DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCR ASESVDKYGISFLNWFQQKPGQP PKLLIYAASNQGSQVPAFSGSGS SGTDFSLNIHPMEEDDPAMYFCQ GKEVPWTFGGGKLEIK (配列番 号642)
KCD 056	EVKLVESGGGLVQPGGSLKVS ASGFTFSTYIMSWVRQTPEKRL WVAYITNGGGSTIYPDTTEKGRFTI SRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAM YYCYRHDYYAMDYWGQGTSTV SS (配列番号555)	KCD 056	DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCK ASQDINKYIAWYQHKPGKGRLL IHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGR DY SFSISNLEPEDIATYYCLQYDNLL YTFGGGKLEIK (配列番号643)
KCD 057	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLS ASGFTFSNYIMSWVRQTPEKRL WVAYITNGGGATYYPDTVKGQFT ISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAI YYCARHDFYALDFWGQGTSTV SS (配列番号556)	KCD 057	DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCK ASQDINKYIAWYQHKPGKGRLL IHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGR DY SFSISNLEPEDIATYYCLQYDNLL YTFGGGKLEIK (配列番号644)
KCD 058	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLS ASGFTFSRYIMSWVRQTPEKRL WVAFITNGGGNTYHPDTVKGRFT ISRDNANNTLYLQMSSLKSEDTAI YYCARHDDYALDYWGQGTSTV SS (配列番号557)	KCD 058	DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCK ASQDINKYIAWYQHKPGKGRLL IHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGR DY SFSISNLEPEDIATYYCLQYDNLL YTFGGGKLEIK (配列番号645)
KCD 062	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLS ASGFTFSTYIMSWVRQTPEKRL WVAYITSGGSSYYPDTVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAM YYCARHAHFYAMDYWGQGTSTV VSS (配列番号558)	KCD 062	DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCK ASQDINKYIAWYQHKPGKGRLL IHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGR DY SFSISNLEPEDIATYYCLQYDNLL YTFGGGKLEIK (配列番号646)
KCD 063	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLS ASGFIFSSYIMSWVRQTPEKRL VAYITNGGGSTIYPDTVKGRFTI RDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAM YCVRHAYHYAMDYWGQGTSTV SS (配列番号559)	KCD 063	DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCK ASQDINKYITWYQHKPGKGRLL IHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGR DY SFSISNLEPEDIATYYCLQYDNLL YTFGGGKLEIK (配列番号647)
KCD 064	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLS ASGFTFSSYIMSWVRQTPEKRL WVAYITSGGSSYYPDTVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAM YYCARHGTGYAMDYWGQGTSTV VSS (配列番号560)	KCD 064	DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCK ASQDINKYIAWYQHKPGKGRLL IHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGR DY SFSISNLEPEDIATYYCLQYDNLL YTFGGGTELEIK (配列番号648)

10

20

30

40

50

【表 3 - 5】

KCD 065	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCK ASGYTFTTYTIHWVKQRPQGGL WIGYINPSSDETNYNQNFADKATL TADRSSSTAYMQLSSLTSEESAVY YCAIRLG YDRQGWYFDVWGAGT TVTVSS (配列番号561)	KCD 065	DIVMTQSHKFLSTSLGDRVSITCK ASQDVGSAVAWYQQKPGQSPDL LIYWTETRHTGVPDRFTGSRSGT DFTLTISNVQSGDLADYFCQQYS NYPLTFGGGTKLEIK (配列番号 649)
KCD 066	QVQLQQSAAELARPGASVKMSCK ASGYTFTDYTMHWVKQRPQGGL WIGYINPSSGGYTDYNQKFKDKTA LTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV YYCARRRDYWFAYWGQGTLVTV SA (配列番号562)	KCD 066	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSC KSSQSLLYSGNQKNYLAWYQQK PGQSPKLLIYWASTRESGVPDRF TSGSGGTDFTLTISSVKAEDLAV YYCHQYYSYLTFGAGTKLELK (配 列番号650)
KCD 070	EIQLQQTGPPELVKPGASVKISCKA SGYSFTDYIILWVKQSHGKSLEWI GNINPYDYDTSYNLKFQKATLT VDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVY YCARSDGYGGDYWGQGTSTVTV SS (配列番号563)	KCD 070	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC KASQDVGTAVAWYQQKPGQSPK LLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSG TDFTLTINNVSQEDLADYFCQQY SSYPWTFGGGTTLEIK (配列番号 651)
KCD 075	QVQLLQPGAELVRPGTSVKLSCK ASGYTFESNYWINWVKQRPQGGL WIGNIYPSDSSINYNQKFKDKATL TVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVY YCTGTDWYFDVWGAGTTTVTVSS (配 列番号564)	KCD 075	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCS GGQGISNYLNWYQQKPDGTFKL LIYYTSTLHSGVPSRFSGSGSGTD YSLTISNLEPEDVATYYCQQYSK LPYTFGGGTKLEIK (配列番号652)
KCD 077	EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCK ASGFNIKDYMHVVKQRPEQGLE WIGWIDPENGTIYDPRFQGKATI TADTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVY YCSRGLLGFAIWGQGTLVTVSA (配 列番号565)	KCD 077	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC KASQNVGTNVAWYQQKPGQSPK ALIYTASYRYSVGPDRFTGSGSG TDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQY NSYPHMYTFGGGTKLEIK (配列番 号653)
KCD 101	QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCK ASGYTFSTSYWMHWVKQRPQGGL EWIGVIDPSDSYTNYNQKFKGKA TLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSA VYYCGRNGYDGSMDYWGQGTSTV TVSS (配列番号566)	KCD 101	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCR ASQDISNYLNWYQQKPDGTVKL LIYYPSRLHSGVPSRFSGSGSGTD YSLTISNLEQEDFATYFCQQGNT LPYTFGGGTKLEIK (配列番号654)
KCD 102	QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCK ASGYTFSTSYWMHWVKQRPQGGL EWIGVIDPSDSYTNYNQKFKGKA TLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSA VYYCARNGYDGSMDYWGQGTSTV TVSS (配列番号567)	KCD 102	EIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCR ASQDISNYLNWYQQKPDGTVKL LIYYPSRLHSGVPSRFSGSGSGTD YSLTISNLEQEDFATYFCQQGNT LPYTFGGGTKLEIK (配列番号655)
KCD 103	QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCK ASGYTFSTSYWMHWVKQRPQGGL EWIGVIDPSDSYTKYNQKFKDKA TLTVETSSSTAYMQLSSLTSEDSA VYYCAGNGYDGSMDYWGQGTSTV TVSS (配列番号568)	KCD 103	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCR ASQDISNSLNWYQQKPDGTVKLL IYYTSRLHRSRVPFRFSGSGSGTDY SLTISNLDQEDIATYFCQQANTLP YTFGGGTKLEIK (配列番号656)
KCD 104	QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCK ASGYTFSTSYWMHWVKQRPQGGL EWIGVIDPSDSYTYYNQKFKGKA TLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSA VYYCARNGYDGAMDYWGQGTSTV TVSS (配列番号569)	KCD 104	EIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCR ASQDISNYLNWYQQKPDGTVKL LIYYPSRLHSGVPSRFSGSGSGTD YSLTISNLEQEDFATYFCQQGNT LPYTFGGGTKLEIK (配列番号657)
KCD 110	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKA SGYSFTGYMHVVKQSHGNIL WIGYIDPDNGVSSKNQKFTGKAT VTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAV YYCAGYYGSSWYWFYFDVWGTT TVTVSS (配列番号570)	KCD 110	QIVLSQSPAILASPGKVTMTCR ASSSVSYMHVYQQKPGSSPKPWI YATSNLASGVPARFSGSGSGTSY SLTISRVEAEDAATYYCQQWSSN PYTFGGGTKLEIK (配列番号658)

10

20

30

40

50

【表 3 - 6】

KCD 111	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKA SGYSFTDYYMHVVKQSHGNILD WIGYIDPYNGVSSYNQKFKGKAT LSVDQSSSTAYMELRSLTSEDSAV YYCSSYYGSSPYWYFDVWGTGTR VTVSS (配列番号571)	KCD 111	QIVLSQSPAILASAPGEKVTMTCR ASSSVSYMHWYQQKPGSSPKPWI YATSNLASGVPTRFSGSGSGTSY SLTISKLEAEDAATYYCQQWSSN PYTFGGGGTKLEIK (配列番号659)
KCD 112	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKA SGYSFTAYYMNWVKHSPEKSLEW IGDINPSTGGTTYNQKFKARATLT VDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVY YCATTYYSGNSYVGFAFWGQGT LTVSA (配列番号572)	KCD 112	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC KASQDVSTAVAWYQQKPGQSPK LLIFWTSTRHTGVPDRFTGSGSGT DYTLTISSVQAEDLALYYCQQHY TTPWTFGGGGTKLEIK (配列番号 660)
KCD 114	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKA SGYSFTAYYMNWVKHSPEKSLEW IGDINPSTGGTTYNQNFKAATLT VDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVY YCATTYYSGNSYVGFAFWGQGT LTVSA (配列番号573)	KCD 114	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC KASQDVSTAVAWYQQKPGQSPK LLIFWASTRHTGVPDRFTGSGSG TDYTLTISSVQAEDLALYYCQQH YSTPWTFGGGGTKLEIK (配列番号 661)
KCD 115	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKA SGYSFTGYVMNWVKQSPEKSLEW IGDINPSTGGTTYNQKFKAKATLT VDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVY YCATPYYYGSSYVGFAFWGQGT LTVSA (配列番号574)	KCD 115	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC KASQDVSTAVDWYQQKPGQSPK LLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSG TDYTLTISSVQAEDLALYYCQQH YSTPWTFGGGGTKLEIK (配列番号 662)
KCD 118	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKA FGYTFDYYKNWMRQRHGESLE WIGDINPNSGDANYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAV YYCAREGPSFAFWGHGTLTVSA (配列番号575)	KCD 118	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC RSSQTIVHSNGDTYLEWYLQKPG QSPNLLIYKVSNNRFSGVDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCF QGSHVPPTFGGGGTKLEIK (配列番 号663)
KCD 119	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKA SGYTFDYYTNWMRQRHGESLE WIGDINPNTGDTSYNQKFRVKAT LTVDKSSGTAYMGLRSLTSEDSA VYYCTREGPSFAFWGQGT LTVSA (配列番号576)	KCD 119	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC RSSQTIVHSNGDTYLEWYLQKPG QSPNLLIYKVSNNRFSGVDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYYC FQGSHPPTFGGGGTTLEIK (配列 番号664)
KCD 121	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKA SGYTFDYYKNWMRQRHGESLE WIGDINPNNGDTSYNQKFRGKAT LTVDKSSSTAFMELRSLTSEDSAV YYCAREGPSFAFWGQGT LTVSA (配列番号577)	KCD 121	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC RSNQTIVHSNGDTYLEWYLQKPG QSPNLLIYKVSNNRFSGVDRFSGS GSGTDFTLRISRVEAEDLGVIYYC FQGSHPPTFGGGGTKLEIK (配列 番号665)
KCD 122	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKA SGYTFDYYKNWMRQRHGESLE WIGDINPNNGDANYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAV YFCAREGPSFAFWGHGTLTVSA (配列番号578)	KCD 122	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC RSSQTIVHSNGDTYLEWYLQKPG QSPNLLIYKVSNNRFSGVDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYYC FQGSHPPTFGGGGTKLEIK (配列 番号666)
KCD 123	EVHLQQSGPELVKPGASVKISCKA SGYTFDIFYKNWMRQRHGESLEW IGDINPNNGGTNYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVY YCAREGPSFAFWGQGT LTVSA (配列番号579)	KCD 123	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC RSSQTIVHSNGDTYLEWYLQKPG QSPNLLIYKVSNNRFSGVDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYYC FQGSHPPTFGGGGTKLEIK (配列 番号667)
KCD 124	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKA SGYTFDHYMNWVKQSHGKSLE WIGDINPNNGGTSYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYMELRSLTSGDSAV YYCTREGASFAFWGQGT LTVSA (配列番号580)	KCD 124	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC RSSQSIVHSNGDTYLEWYLQKPG QSPKLLIYKVSNNRFSGVDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYYC FQGSHPPLTFGAGTKLEIK (配列 番号668)

10

20

30

40

50

【表 3 - 7】

KCD 125	EVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCK TSGNTFTSYGINWVKQRPQGGL WIGYIYIGTGYTEYNEKFKGKATL TSDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAIY FCVRKAYGNYGFDYWGQGTTLT VSS (配列番号581)	KCD 125	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCR ASQEISGYLSWLQKQPDGTIKRLI YAASTLD SGV PKR FSGSRSGSDY SLTISSLESEDFADYYCLOQYASYP FTFGSGTKLEIK (配列番号669)
KCD 126	EVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCK TSGKTFTSHGINWVKQRPQGGL WIGYIYIGNGYNEYNEKFKGKAT LTSDTSSSTAYMQLSSLTFEDSAI YFCVRKAYGNYGFDDWGQGTTLT TVSS (配列番号582)	KCD 126	DIQMTQSPTSLASLGESVSLTCR ASQEISGNLNLWLQKQPDGSIKRLI YAASTLD SGV PKR FSGSRSGSDY SLTISSLESEDFADYYCLOQYANYP FTFGSGTKLEVK (配列番号670)
KCD 127	QVQLQQPGAELVRPESSVKLSCK ASGYTFTNFWMDWVKQRPQGGL EWIGNIYPSGSETHYNQKFKDKAT LTVDKSSTTAYMQLSSLTSEDSAV YYCARSGYYGSRYLYYFDYWGQ GTTLTVSS (配列番号583)	KCD 127	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC KASQDVSTAVAWYQKQPGQSPK LLIYSASYSRSTGVDPDRFTGSGSGT DFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHY STPYTFGGGGTKLEIR (配列番号 671)
KCD 128	QVQLQQPGAELVRPESSVKLSCK ASGYTFTSYWMDWVMQRPQGGL EWIGNIYPSGSETHYNQKFKDKAT LTVDKSSTTAYMQLSSLTFEDSAV YYCARSGFIGSRYYLYYFDYWGQ GTTLTVSS (配列番号584)	KCD 128	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVITIC KASQDVSNVAVAWYQLKPGQSPK LLIYSASYSRYTGVPDRFTGSGSGT DFTFTISSVQAADLAVYYCQQHY ITPYTFGGGGTKLEIK (配列番号 672)
KCD 129	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCA ASGFSENTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKSNNYATYYADSVKDR FTISRDDSESMVYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGYYWYFDVWGTGT TVTSS (配列番号585)	KCD 129	DVLMQTPLSLPVSLGDQASISC RSSQSIVHSDGNTYLEWYLQKPG QSPKLLIYRVSNRFSGVDPDRFSGS GSGTDFTLKISRMEAEDLGYYC FQGSHPVYTFGGGGTKLEIK (配列 番号673)
KCD 131	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCK ASAYTFTDYINWVKQRPQGQPE WIGWIFPGSNSTYSNEKFEVKATL TVDESSSTAYMLLSSLTSEDSAVY FCARLG YFGSSYHALDYWGQGT S TVSS (配列番号586)	KCD 131	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCR ASENIYSHLAWFQKQKQKSPRL VYSATNLPDGVPSRFSGSGSGTQ YSLKINILQSEDFGSYYCQHF WGTPTWTFGGGGTKLEIK (配列 番号674)
KCD 132	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCK ASGYSTFDYINWVKQRPQGQGLE WIGWIFPGSGSTYNEKFKGKAT LTVDKSSTTAYMLLSSLTSEDSAV YFCARTGYYSNLYAVDYWGQGT S TVSS (配列番号587)	KCD 132	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCR ASENIYSNLAWYQKQKQKSPQLL VYVATNLADGVPSRFSGSGSGTQ YSLKINSLQSEDFGNYCQHF WGTTPYTFGGGGTKLEMR (配列 番号675)
KCD 133	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCA ASGETENTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKSSNYATYYADSVKDR FTISRDDSQSMFYLEMNNLTEDT AMYYCVRDRGYYYVMDYWGQ GTS TVSS (配列番号588)	KCD 133	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCR ASESVEYYGTSLMQWYQKQKPGQ PPKLLINAAASNVESGVPARFSGSG SGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFCQ QSRKVPWTFGGGGTKLEIK (配列 番号676)
KCD 134	EVQLQQSGPEMVKPGASVKMSCQ ASGYTFTDYIMNWVKQSHGETLE WIGDIYPHNGYTAYNQKFKGKAT LTVDKSSTTAYMELRSLTSEDSAV YYCARGGQLRLPAWFAYWGQGT L TVSA (配列番号589)	KCD 134	ETTVTQSPASLSMAIGKVTIRCI TSTDIDDDMNWYQKQKPEPPKLL ISEGNSLRPGVPSRFSSSGYGTDF VFTIEDMFSEDVADYHCLQSDNL PYTFGGGGTKLEIK (配列番号677)
KCD 135	EVQLQQSGPELVKPGASVRMSCK ASGYFTDYSIHVKQSHGKSLE WIGYINPNNGGTSYNQKFKGKAT LTVNKSSTTAYMELRSLTSEDSAV YFCARDTTIVGDYWGQGTTLT VS (配列番号590)	KCD 135	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC KASQHVGTNVWYQKQKPGQSPK ALIYSASYSRYSGVPDRFSGSGSGT DFTLTISNVQSEDLAEYFCQQFNS YPLTFGGGGTKLEIK (配列番号678)

10

20

30

40

50

【表 3 - 8】

KCD 136	EVQLQQSVAELVRPGASVKLSCS ASGFNIKNTYMHVWVNRPEQGLE WIGRIDPANGITKYAPNFQGKATI TADTSSNTAYLQLSLTSEDTAIY YCTRAMDYWGQGTSTVTVSS (配列 番号591)	KCD 136	QIVLTQSPAISASPGKEKVTMTCS ASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLI YDISNLASGVVPRFSGSGSGTSYS LTISRMEAEDAATYYCQQWDTY PWTFGGGTKLEIK (配列番号679)
KCD 137	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSA ASGFTFSGYGMWVRQIPDKRLE WVAISSRDNSFTIYPDSVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAL YFCRHPYLPYLGYYVMDYWGQG TSVTVSS (配列番号592)	KCD 137	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC KASQDVGTA VAWYQQRPGQSPK LLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSG TDFTLTVSNVQSEDLADYFCQQY TSYPLTFGAGTKLELK (配列番号 680)
KCD 139	EVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCK TSGYTFTSYGINVWKQRPQGQGLE WIGYIYIANGYITENNEKFKGKAK LTSDISSSTAYMQLSSLTSEDSAIY FCARRFDYAGALDYWGQGTSTVTV SS (配列番号593)	KCD 139	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCR ASESVDSYGNSEFMHWYQQKPGQ PPKLLIHRASNLSEGI PARFSGSG SRDFTLTINPVEADDVAIYYCQ QTNDPPYTFGGGTNLEIK (配列番 号681)
KCD 200	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKA SGYTFTSYKKNWVRQRHGESLEW IGDINPNSGDTAYNQKFKGKATLT VDRSSSTAYMELRSLTSEDSAVY YCAREGPSFAYWGQGTSLTVTVSA (配 列番号594)	KCD 200	DVLMQTPLSLPVSLGQVSISSC RSSQTIVHSNGDTYLEWYLQKPG QSPNLLIYKVSNRFSGVPRDFSGS SGSDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQGSHPVPTFGGGTKLEIK (配列 番号682)
KCD 205	EVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCK TSGNTFTSHGINVWKQRPQGQGLE WIGYIYIGNGYNEYNKFKGKAT LTSDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAI YFCVRKAYGNYGFDWVGQGTTL TVSS (配列番号595)	KCD 205	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCR ASQEISGYLSWLQKQPDGTIKRLI YAASTLDSGVPRKFSGSSSGSDY SLTISSLESDDFADYYCLQYASYP FTFGSGTKLEIK (配列番号683)
KCD 207	AVQLVESGGGLVQPKGSLKLSA ASGFSNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKSNNTYATYYADSVKDR FTLSRDDSESMYQLQMNLTED TAMYYCVRQGFYFYFDVWGTGT TVTVSS (配列番号596)	KCD 207	DVLMQTPLSLPVSLGDAQSISC RSSQTIVHSNGNTYLEWYLQKSG QSPKLLIYNVSNRFSGVPRDFRGS SGSDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQGSHPVPTFGSGTKLEIK (配列番 号684)
KCD 208	EVQLQQSVAELVRPGASVKLSCT VSGFNKNTYMHVWVNRPEQGLE WIGRIDPANGDTTYAPKFGKATI TADTSSNSAYLHLRLTSEDTAIY YCSLYDYDGYWGQGTTLTVSS (配 列番号597)	KCD 208	EIVLTQSPALMAASPGEKVTITCS VSSSISSSLHWYRQKSGTSPKPV IYGTSHLASGVVPRFSGSGSGTSY SLTISSMEAEDAATYYCQQWDTY PWTFGGGTKLEIK (配列番号685)
KCD 210	EVQLQQSGPVLVKPGASVTMSCK ASGYTFTEYYMNWVKQSHGKSLD WIGVINPYSGGTSYKQKFKDKAT LTVDKSSSTAYMELNGLTSEDSA VYFCYRGGGLRRNYFDYWGQGTTL TVSS (配列番号598)	KCD 210	EIVLTQSPALMTASPGEKVTITCS VSSSISSSTNLHWYQQKSGTSPKP WIFGTSNLASGVVPRFSGSGSGTS YSLTISNMEAEDAATYYCQQWN SYPTFTGTGKLEIK (配列番号 686)
KCD 212	EVHLVESGGDLVKPGGSLKLSA ASGFTFSRYGMSWVRQTPDKRLE WVATISSAGSYTYYPDSVKGRFTI SRDNAKNTLFLQMSSLKSEDTAM YYCARPLNYYGTSSFDYWGQGT LTVSS (配列番号599)	KCD 212	QIVLTQSPAISASPGKEKVTMTC RASSSVSSTY LHWYQQKPGSSPK LWIYSTNLASGVPPRFSGSGSGT SYSLTISSVEAEDAATYYCQQYD SSPNTFGAGTKLELK (配列番号 687)
KCD 214	EVQLQQSVAEFVRPGASVKLSCT ASGFNIKNTYMHVWVNRPEQGLE WIGRIDPANGNTEYAPKFGKATI TADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAIY YCALYDYDGYWGQGTTLTVSS (配 列番号600)	KCD 214	EIVLTQSPALMAASPGEKVTITCR VSSSISSSLHWYQQKSGTSPKP WIYGTSNLASGVVPRFSGSRSGT SYSLTISSMEAEDAATYYCQQWS DYPWTFGGGTGKLEIK (配列番号 688)
KCD 216	QVHLQQSGPELVKPGASVKISCK ASGYTFIDYYINWVKQRPQGQGLE WIGWIFPGSDSTYYNEKFKGKAT LTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV YFCARYGYGSSFYAMDYWGQG TSVTVSS (配列番号601)	KCD 216	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCR ASENIYSNLAWYQQKQKSPQLL VYAAATNLADGVPSRFSGSGSGTQ YSLKINSLQSEDFGSYYCQHFWG TPPTFGGGSKLEIK (配列番号689)

10

20

30

40

50

【表 3 - 9】

KCD 217	QVQVQQPGA ~~E~~ FVKTGASVKLSCK TSGYT ~~F~~ IDYWIHWVKQRP ~~G~~ HGLE WIGRID ~~P~~ NTGGSKYYEKFKRKAT LTVDKPSRTVYMQ ~~L~~ SSLTSEDSAV YYCTREYDYGW ~~F~~ GYW ~~G~~ QGTLVT VSE (配列番号602)	KCD 217	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCG ASENIYGALN ~~W~~ YQRKQ ~~G~~ KSPQLL IYGATNLADGMSSRFSGSGSGRQ YSLKISSLHPDDVATYYCQ ~~N~~ VLS TPWTFGGG ~~T~~ KLEIK (配列番号 690)
KCD 219	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCK ASGYTFTDY ~~I~~ INWVKQRP ~~G~~ QGLE WIGWIFPGSGSTYYNEKFKGKAT LTVDKSSSTAYMLLSSLPS ~~E~~ DSAV YFCARYGY ~~Y~~ GSSFYAMDYWGQG TSVTVSS (配列番号603)	KCD 219	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCR ASENIYSNLAWYQ ~~Q~~ KQ ~~G~~ KSPQLL VYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQ YSLKINSLQSEDFGSYYCQHFWG SPPTFGGG ~~T~~ KLEIK (配列番号691)
KCD 220	QVQLQQSGAELMEPGASVKLSCK ATGYTFTGYWIEWVKQRP ~~G~~ HGLE WIGETLPGSDSN ~~N~~ YNEKFKGKAT FTADTSSNTAYMQ ~~L~~ SSLTTEDSAI YYCARDYSN ~~Y~~ WYFDVWGTGTTV TVSS (配列番号604)	KCD 220	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCR ASQDISNYLN ~~W~~ YQ ~~Q~~ KPDGTVKL LIYYTSNLHSGVPSRFSGSGSGTD YSLTISNLEQEDIATYFCQ ~~Q~~ DSKH RTFGGG ~~T~~ KLEIK (配列番号692)
KCD 224	QVQLKESGPGLVAPSQSL ~~S~~ ITCTV SGFSLTSYGVDWIRQSPGKGLEW LGVIWGVGSTN ~~Y~~ NSALKSRLSISK DNSKSQVFLKMNSLQTD ~~D~~ TAMYY CARSYDGSYWYFDVWGTGTTVT VSS (配列番号605)	KCD 224	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCR ASQVISNYLN ~~W~~ YQ ~~Q~~ KPDGTVKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTD YSLTISNLEPEDIATYYCQ ~~Q~~ YSKL PYTFGSG ~~T~~ KLEIK (配列番号693)
KCD 225	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCK ASGYTFTDY ~~I~~ INWMKQRP ~~G~~ QGLE WIGWIFPGSDSTYYNEKFKGKAT LTVDKSSSTAYMLLSSLTSEDSAV YFCARLGYYSHSY ~~Y~~ AMDYWGQG TSVTVSS (配列番号606)	KCD 225	DIQMTQSPASLSVSTGETVTITCR ASENIYSNLAWFQ ~~Q~~ KQ ~~G~~ KSPQLL VYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQ YSLKITSLSQSEDFGSYYCQHFWG TPLTFGAGTKLDL ~~K~~ (配列番号 694)
KCD 229	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCA ASGFSENTYAMNWRQAPGKGLE WVARIRSKSN ~~N~~ YATYYADSVKDR FTIFRDDSESM ~~L~~ YLQMNNLKTEDT AMYYCVRHGYWYFDVWGTGTT VTVSS (配列番号607)	KCD 229	DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISC RSSQSIVHSDGNTYLEWYLQKPG QSPNLLIYNVFNRFSGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQGSHPYPTFGSGTKLEIK (配列 番号695)
KCD 230	QVQLQPGTELVKPGASVKLPCK ASGYTFTSYWMQWVKQRP ~~G~~ QGL EWIGEIDPSDTYINYNQKFKGKAT LTVDTSSTTAYMQ ~~L~~ SSLTSEDSAV YYCARYTTIMASD ~~Y~~ WGQGTTLTV SS (配列番号608)	KCD 230	DIQMTQTTSSLSVSLGDRVTISCR ASQDITNYLN ~~W~~ YQ ~~Q~~ KPDGTVKL LIYFTSRLHSGVPSRFSGSGSGTD YSLTISNLEPEDIATYYCQ ~~Q~~ YSKL PWTFGGG ~~T~~ KLEIK (配列番号696)
KCD 232	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCA ASGFSENTYAMNWRQAPGKGLE WVARIRSKSN ~~N~~ YATYYADSVKDR FTISRDDSESMVYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGYWYFDVWGTGT TVTVSS (配列番号609)	KCD 232	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISC RSSQSIVHSDGNTYLEWYLQKPG QSPKLLIYRVSNRFSGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRMEAEDLGVYYC FQGSHPYPTFGGGTKLEIK (配列 番号697)

10

20

30

40

50

【表 4】

表 1 D : CDR 定義に基づく変異型ヒト化 C F D アンタゴニスト抗体の可変領域配列

	CDR1	CDR2	CDR3
軽鎖	QX ₁ X ₂ X ₃ HX ₄ NX ₅ X ₆ X ₇ YX ₈ E (式中、X ₁ は、T、D、G、H、I、N、Q、R、V、又はW；X ₂ は、I、A、又はV；X ₃ はV、A、D、E、F、I、K、L、Q、R、S、W、又はY；X ₄ は、S、A、D、F、G、I、R、T、V、又はW；X ₅ は、G、E、F、又はS；X ₆ は、D、又はE；X ₇ は、T、S、又はV；X ₈ は、L又はI)	X ₁ X ₂ LX ₃ X ₄ KX ₅ X ₆ X ₇ RX ₈ (式中、X ₁ は、N、D、E、R、S、V、又はY；X ₂ は、L又はI；X ₃ は、I又はT；X ₄ は、Y、D、E、F、G、L、R、S、T、又はV；X ₅ は、V、A、又はI；X ₆ は、S、A、F、G、K、L、Q、R、T、又はY；X ₇ は、N、E、G、H、I、L、Q、R、T、又はY；X ₈ は、F、E、G、I、L、R、又はW)	X ₁ QGSX ₂ X ₃ PX ₄ T (式中、X ₁ は、F又はM；X ₂ は、H、A、E、F、G、L、N、Q、T、V、W、又はY；X ₃ は、V、W、Q、又はN；及びX ₄ は、P又はV)
重鎖	GYX ₁ FTX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ (式中、X ₁ は、T、D、E、F、H、I、K、P、R、S、W、又はY；X ₂ は、D、A、F、G、S、V、又はY；X ₃ は、Y又はF；X ₄ は、Y又はP；X ₅ は、M、H、又はI)	WIGDX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ (式中、X ₁ は、I、L、又はV；X ₂ は、N、A、又はG；X ₃ は、P、又はT；X ₄ は、N、A、D、G、H、I、L、R、T、V、W、又はY；X ₅ は、T、I、K、L、Q、R、S、又はV；X ₆ は、G、又はV；X ₇ は、任意のアミノ酸；X ₈ は、I以外の任意のアミノ酸；X ₉ は、K又はR以外の任意のアミノ酸；X ₁₀ は、I又はW以外の任意のアミノ酸)	X ₁ REGPX ₂ FX ₃ X ₄ (式中、X ₁ は、T、A、又はQ；X ₂ は、S、I又はA；X ₃ は、A又はR；及びX ₄ は、Y、A、H、F、V、Y、又はL)

10

20

【表 5】

表 1 D (続き) : CDR (簡素化された CDR 定義配列)

	CDR1	CDR2	CDR3
軽鎖	QX ₁ X ₂ X ₃ HX ₄ NX ₅ X ₆ X ₇ Y (式中、X ₁ は、T、D、G、H、I、N、Q、R、V、又はW；X ₂ は、I、A、又はV；X ₃ は、V、A、D、E、F、I、K、L、Q、R、S、W、又はY；X ₄ は、S、A、D、F、G、I、R、T、V、又はW；X ₅ は、G、E、F、又はS；X ₆ は、D又はE；X ₇ は、T、S、又はV)	KX ₁ X ₂ (式中、X ₁ は、V、A、又はI；X ₂ は、S、A、F、G、K、L、Q、R、T、又はY)	X ₁ QGSX ₂ X ₃ PX ₄ T (式中、X ₁ は、F又はM；X ₂ は、H、A、E、F、G、L、N、Q、T、V、W、又はY；X ₃ は、V、W、Q又はN；及びX ₄ は、P又はV)
重鎖	X ₁ X ₂ X ₃ (式中、X ₁ は、D、A、F、G、S、V、又はY；X ₂ は、Y又はF；X ₃ は、Y又はP)	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ (式中、X ₁ は、I、L、又はV；X ₂ は、N、A、又はG；X ₃ は、P、又はT；X ₄ は、N、A、D、G、H、I、L、R、T、V、W、又はY；X ₅ は、T、I、K、L、Q、R、S、又はV；X ₆ は、G又はV；X ₇ は、任意のアミノ酸；X ₈ は、I以外の任意のアミノ酸)	EGPX ₁ FX ₂ X ₃ (式中、X ₁ は、S又はA；X ₂ は、A又はR；及びX ₃ は、Y、A、H、F、V、Y、又はL)

30

40

【表 6】

表 1 E : 最終的な重鎖候補及び軽鎖候補並びにそれらのバリエーションのアミノ酸配列 (KCD119 バリエーション配列、CDR の実施形態に下線を付した。)

重鎖	
KCD119 TAF	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWIGDINPNT GDTSYNADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGT LVTVSS (配列番号698)
54V	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWIGDINPVT GDTSYNADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGT LVTVSS (配列番号699)
54I	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWIGDINPIT GDTSYNADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGT LVTVSS (配列番号700)
54V59D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWIGDINPVT GDTSYNADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGT LVTVSS (配列番号701)
54I59D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWIGDINPIT GDTSYNADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGT LVTVSS (配列番号702)
34I54I59D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYINWVRQAPGKGLEWIGDINPITG DIDYNADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGT LVTVSS (配列番号703)
31S34I54I59D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYINWVRQAPGKGLEWIGDINPITG DIDYNADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGT LVTVSS (配列番号704)
34I54I59D84S	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYYINWVRQAPGKGLEWIGDINPITG DIDYNADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGT LVTVSS (配列番号705)
31S34I54I59D84S	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYINWVRQAPGKGLEWIGDINPITG DIDYNADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTREGPSFAYWGQGT LVTVSS (配列番号706)
軽鎖	
KCD119 TAF	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSQTIVHSNGDYLEWYQQKPGKAPNLLIYKVS NRFSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSHPVPTFGQGTKVEIK (配 列番号707)
54R	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSQTIVHSNGDYLEWYQQKPGKAPNLLIRKVS NRFSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSHPVPTFGQGTKVEIK (配 列番号708)
101V	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSQTIVHSNGDYLEWYQQKPGKAPNLLIYKVS NRFSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSHPVPTFGQGTKVEIK (配 列番号709)
54R101V	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSQTIVHSNGDYLEWYQQKPGKAPNLLIRKVS NRFSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSHPVPTFGQGTKVEIK (配 列番号710)
54G101V	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSQTIVHSNGDYLEWYQQKPGKAPNLLIGKVS NRFSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSHPVPTFGQGTKVEIK (配 列番号711)

10

20

30

【0218】

本明細書に記載されている方法は、抗VEGF-A抗体複合体が下記構造を有すること、をさらに含んでもよい。

40

50

The chemical structure shows a dendritic polymer with a central core consisting of two amide groups linked by a sulfur atom. The core is substituted with two phenyl groups (labeled L and H). The polymer chain is composed of repeating units of polyether (PC) and polyether amide (PEA) segments. The structure includes several branching points, with the number of branches indicated by subscripts n1 through n9. The terminal groups are labeled L and H, and the repeating units are labeled PC and PEA. The structure is highly branched and complex, with multiple ester and amide linkages.

式中、抗 V E G F - A 抗体 の 各 重 鎖 は 文 字 H で 示 さ れ る と 共 に、抗 V E G F - A 抗体 の 各 軽 鎖 は 文 字 L で 示 さ れ、前 記 ポ リ マ ー は、C 4 4 3 (E U 番 号 付 け) の ス ル フ ヒ ド リ ル を 介 し て 前 記 抗 V E G F - A 抗 体 に 結 合 し、こ の 結 合 は 重 鎖 の 1 つ に 示 さ れ て お り、P C は

CC[N+](C)(C)CCOP(=O)([O-])O*

(式中、波線はポリマーの残りの部分への接続点を示す)であり、X = a) O R (R = H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル)、b) H、又はc) B rを含む任意のハロゲン化物であり、並びにi) n₁、n₂、n₃、n₄、n₅、n₆、n₇、n₈、及びn₉は同じか異なり、0～3000までの整数であるか、又はii) n₁、n₂、n₃、n₄、n₅、n₆、n₇、n₈、及びn₉の合計が2500±15%であるように、n₁、n₂、n₃、n₄、n₅、n₆、n₇、n₈、及びn₉は同じか異なる。

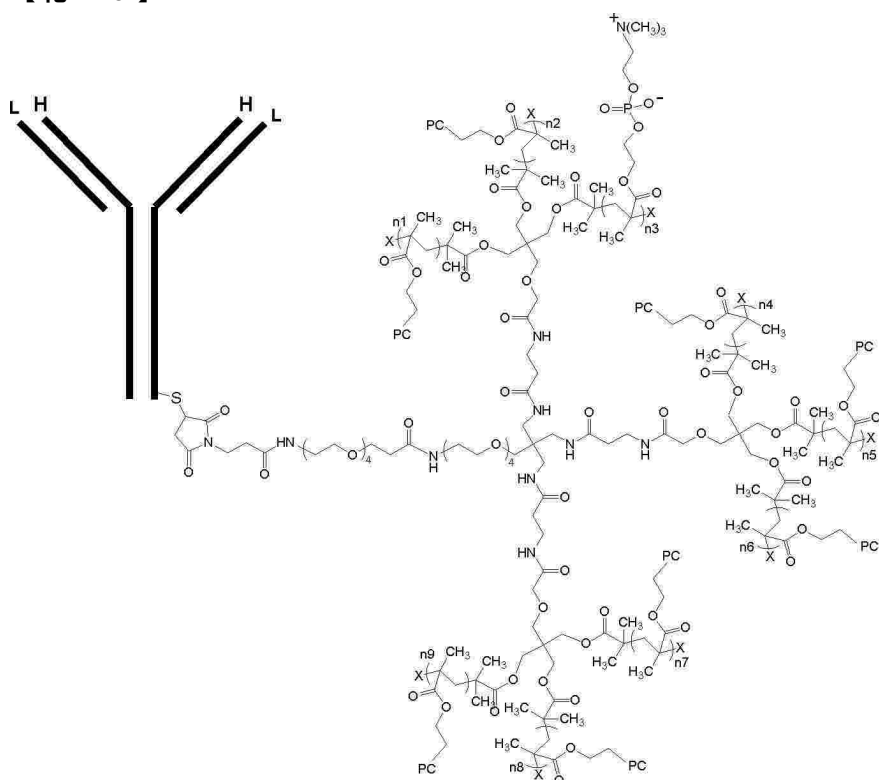
いくつかの実施形態では、前記抗 VEGF-A 重鎖が、配列番号 172 の CDRH1 である CDRH1、配列番号 173 の CDRH2 である CDRH2、配列番号 174 の CDRH3 である CDRH3、及び 221 位の T を含み、前記抗 VEGF-A 軽鎖が、配列番

10

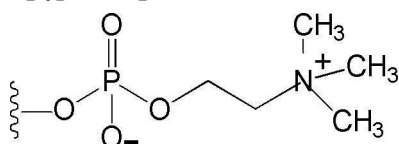
20

30

40



50



(式中、波線はポリマーの残りの部分への接続点を示す) であり、 $X = a) \text{OR} (R = \text{H}$ 、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル)、 $b) \text{H}$ 、又は $c) \text{Br}$ を含む任意のハロ

ゲン化物であり、並びに n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 、 n_8 、及び n_9 の合計が $2500 \pm 15\%$ であるように、 n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 、 n_8 、及び n_9 は同じか異なる。いくつかの実施形態では、 n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 、 n_8 、及び n_9 は同じか異なり、 $0 \sim 3000$ までの整数である。いくつかの実施形態では、 n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 、 n_8 、及び n_9 は同じか異なり、 $0 \sim 500$ までの整数である。いくつかの実施形態では、 $X = OR$ であって、 R は糖、アミノアルキル、又は以下の残基の一置換、多置換、若しくは非置換のバリエーションであり：飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_2 \sim C_{24}$ アルケニル若しくは $C_2 \sim C_{24}$ アルキニル、アシル、アシルオキシ、アルキルオキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、ヘテロアリール、アリールアルコキシカルボニル、アルコキシカルボニルアシル、アミノ、アミノカルボニル、アミノカルボイルオキシ、ニトロ、アジド、フェニル、ヒドロキシ、アルキルチオ、アリールチオ、オキシスルホニル、カルボキシ、シアノ、及びポリハロゲン化アルキルを含むハロゲン化アルキル、 $-CO-O-R_7$ 、カルボニル- $CCO-R_7$ 、 $-CO-NR_8R_9$ 、 $-(CH_2)_n-COOR_7$ 、 $-CO-(CH_2)_n-COOR_7$ 、 $-(CH_2)_n-NR_8R_9$ 、エステル、アルコキシカルボニル、又はアリールオキシカルボニル、 n は $1 \sim 6$ の整数であり、 R_7 、 R_8 、及び R_9 はそれぞれ、水素原子、ハロゲン原子、及び以下の残基の一置換、多置換、若しくは非置換の変異体からなる群から別々に選択される：飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_2 \sim C_{24}$ アルケニル又は $C_2 \sim C_{24}$ アルキニル、アシル、アシルオキシ、アルキルオキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、ヘテロアリール、アリールアルコキシカルボニル、アルコキシカルボニルアシル、アミノ、アミノカルボニル、アミノカルボイルオキシ、ニトロ、アジド、フェニル、ヒドロキシ、アルキルチオ、アリールチオ、オキシスルホニル、カルボキシ、シアノ、並びにポリハロゲン化アルキル、5員環、及び6員環を含むハロゲン化アルキル。

【0222】

いくつかの実施形態では、抗 $IL-6$ 抗体、又は本明細書で別途使用される場合、「 $IL-6$ 抗体- $VEGF$ Trap 融合」、「 $IL-6$ 抗体- $VEGF$ Trap」、「 Ab $IL-6-VEGF$ Trap」、「抗 $IL-6-VEGF$ Trap」、「 $VEGFR$ -抗 $IL-6$ 」、「 $VEGFR$ -抗 $IL-6$ 」、「 $VEGF$ Trap-抗 $IL-6$ 抗体融合 (TAF)」、「 $VEGF$ Trap- $IL-6$ 」、「 $VEGFR$ $IL-6$ 」、「 $IL-6-VEGFR$ 」、又は同意語若しくは反意語（例えば、「 $VEGF$ Trap- $IL-6$ Ab 」、「 $VEGF$ Trap- $IL-6$ 抗体融合」）は、 $IL-6$ 抗体と $VEGF$ Trap との融合を示す。実施形態を図9に示す。通常使用される場合、2つの用語の順序は入れ替わる場合がある。具体的に使用する場合、2つの用語の順序は、コンストラクトにおける構成要素の相対的な位置を示す。「 Ab -Trap」、「 $IL-6$ Ab - $VEGF$ Trap」、「 Ab $IL-6$ $VEGF$ Trap」若しくは「 Ab $IL-6$ -Trap」若しくは「抗 $IL-6$ $VEGF$ Trap」、「Trap- Ab 」、抗 $IL-6-VEGFR$ 、抗 $IL-6-VEGFR$ 、又はその他の同意語若しくは反意語（例えば、「 $VEGF$ Trap- $IL-6$ Ab 」、「 $VEGF$ Trap- $IL-6$ 抗体融合」）は、 $VEGF$ Trap を提供するために、 $VEGF$ 結合タンパク質の関連ドメインに融合された Ab の配置を示す。上述したように、 $VEGF$ 結合タンパク質のこのセクションは、 $VEGF$ が $VEGF$ 受容体に結合するのを防ぐものである。本明細書で説明するように、トラップセクション及び抗体セクションの配置（順序）は変更可能である。したがって、明示的に又は文脈によって別途示されない限り、 Ab -Trap（又は $IL-6/VEGF$ Trap など）融合に関して本明細書で使用する語句は、抗体及びトラップの配置に関する全ての開示された実施形態を示す。したがって、特に説明がない限り、 Ab -Trap（又は $IL-6/VEGF$ Trap など）という語句は、図9の左側の実施形態、図9の右側の実施形態、及び図9の両方の実施形態を示す。したがっ

て、便宜上、一般言語では3つのオプションすべてを開示するものとして示されている。配向性が具体的に示される場合、例えば、「配置」が Trap-Ab、Trap IL-6 Ab、VEGF Trap Ab IL-6、VEGF Trap Ab IL6のいずれかであり得ると提示することによって示することができる。同様に、本発明の実施例のいくつかの内容は、実施例の内容によって示される分子の特定の配向性又は配置を示すことが理解されるであろう。両方の配置（代替的及び組み合わせ）は、本明細書で提供される融合タンパク質の全ての説明において明示的に考慮されている。また、順序により、融合タンパク質の文脈で使用される場合の IL-6 Ab という語句には、抗体が連続しているオプション（図9の左側）及び TRAP が Ab 「内」に配置されているオプション（図9の右側）の両方が含まれることがわかる。「Ab」又は「抗体」という用語が融合タンパク質の文脈で使用される場合（又は他の同意語）、特に明記しない限り、3つのオプション全て（図9の左側、図9の右側、及び両方のオプション）が包含される。いくつかの実施形態では、VEGF Trap は、以下のいずれかにおいて IL-6 に融合される：IL-6 VH を含む重鎖の N 末端又は IL-6 VH を含む重鎖のヒンジ領域と CH1 ドメインとの間。抗体又はその断片を指定するための呼称で 사용되는場合、Ab、抗体、「抗」、又はその他の同意語の指定に違いはない。「IL-6」と「IL6」と「IL-6」との呼称に違いはない。本明細書において、IL-6 との融合コンストラクトを参照する場合、「VEGF」、「VEGFR」、「VEGF Trap」、「VEGFR Trap」という用語は互換的に使用される。これらの用語は、IL-6 融合配列とは別々に使用される場合、異なる意味を有する場合があり、その意味は当該用語の文脈によって異なる。

10

20

【0223】

いくつかの実施形態では、抗体は VEGF Trap 配列に連結又は融合され得る。いくつかの実施形態では、このトラップ配列は表 2 A に示すようになる。いくつかの実施形態では、前記配列は表 2 A に示されるものと少なくとも 80 % 同一であり、例えば、2 A に示されるものと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 同一である。いくつかの実施形態では、米国特許公開第 2015 / 037627 1 号の VEGF Trap 分子のいずれかをここで使用することができる。いくつかの実施形態では、VEGF Trap 配列は、以下のいずれかにおいて IL-6 に融合される：IL-6 VH を含む重鎖の N 末端（図9左側）又は IL-6 VH を含む重鎖のヒンジ領域と CH1 ドメインとの間（図9右側）。別途指定がない限り、Ab-Trap 融合が議論される本明細書で提供される実施形態では、両方のオプションが交互に、また同時に考慮される。いくつかの実施形態では、「トラップ (Trap)」という用語は、全長の細胞外領域若しくはその任意の部分、又は少なくとも1つの VEGF と VEGFR との間のシグナル伝達を拮抗させることができる異なる VEGF 受容体の部分の組み合わせを指す。好ましくは、細胞外トラップセグメントには、VEGFR-1、-2、又は-3のいずれか1つからの少なくとも1つのドメインが含まれ、さらに好ましくは、D2 及び D3 などの少なくとも2つの連続したドメインが含まれる。所望により、細胞外ドメインには、少なくとも2つの異なる VEGFR からの少なくとも1つのドメインが含まれる。好ましい細胞外ドメインは、VEGFR-1 の D2 及び VEGFR-2 の D3 を含むか、又は本質的にそれらからなる。

30

40

【表 7】

表 2 A : VEGFR 1、ドメイン 2、及び VEGFR 2、ドメイン 3 融合配列

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWD RKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEK LVLNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVT RSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK (配列番号114)

【0224】

いくつかの実施形態では、前記 IL-6 Ab VEGF Trap コンストラクトは、表 2 B 又は表 2 B-1 に示されている配列のいずれかを有し得る。いくつかの実施形態

50

では、前記コンストラクトは、表 2 B 又は表 2 B - 1 の配列（例えば、8 0、8 5、9 0、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9 以上）と少なくとも同一であり得る。いくつかの実施形態では、抗体の I L - 6 ドメインに表 1 E の C D R が 1 又は複数含まれていないことを除いて、融合タンパク質はこれらのパーセンテージと一致する場合がある。いくつかの実施形態では、前記融合タンパク質は、図 5 で特定された配列の 1 又は複数、例えば、C D R の 1 又は複数（2、3、4、5、又は 6 個の四角で囲まれた C D R を含む）並びに／又は重鎖可変領域及び軽鎖可変領域全体を V E G F T r a p 配列（例えば、表 2 C）と共に含むものである。いくつかの実施形態では、前記配列は互いに直接融合することができる。いくつかの実施形態では、1 又は複数の可動性連結配列又は部分を使用できる。連結配列は、A b 配列と V E G F T r a p 配列との間に配置できる。これらの配列の長さは 5 ~ 3 0 アミノ酸であり得る。いくつかの実施形態では、連結配列には、G と S が約 4 : 1 の比率で含まれる場合がある。いくつかの実施形態では、リンカーには以下の配列が含まれる：G G G G S G G G G S（配列番号 7 4 8）。いくつかの実施形態では、任意の可動性リンカーを使用できる。いくつかの実施形態では、I L - 6 A b の F c 部分は I g G 1 である。

10

20

30

40

50

【表 8 - 1】

表 2 B : 二重阻害剤分子の重鎖配列及び軽鎖配列。前記重鎖及び軽鎖では C D R が下線で示され、V E G F T r a p 配列は黒の太字で示され、G l y - S e r リンカーは斜体で示されている。

ID	重鎖	軽鎖
A	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSNITVT LKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFISNATYKEIGLLTCE ATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGE KLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKL VNRDL KTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMT KKNSTFVRVHEKGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSPFAISWVRQAPGKGLEWVAKISP GGSWTIYYSDTVTDRTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCARQLWGYYALDVWGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK (配列番号712)	DIQLTQSPSSLSASVG DRVITITCSASISVSYL YWYQQKPGKAPKLLI YDDSSLASGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQWSGYPY TFGGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (配列 番号730)
B	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSNITVT LKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFISNATYKEIGLLTCE ATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGE KLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKL VNRDL KTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMT KKNSTFVRVHEKGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSPFAISWVRQAPGKGLEWVAKISP GGSWTIYYSDTVTDRTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCARQLWGYYALDVWGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK (配列番号713)	DIQLTQSPSSLSASVG DRVITITCSASISVSYL YWYQQKPGKAPKLLI YDASSLASGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQWSGYPY TFGGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (配列 番号731)
C	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSNITVT LKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFISNATYKEIGLLTCE ATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGE KLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKL VNRDL KTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMT KKNSTFVRVHEKGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSPFAISWVRQAPGKGLEWVAKISP GGSWTIYYSDTVTDRTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAED TAVYYCARQLWGYYALDVWGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSCSPGK (配列番号714)	DIQLTQSPSSLSASVG DRVITITCSASISVSYL YWYQQKPGKAPKLLI YDDSNLASGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQWSGYPY TFGGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (配列 番号732)

10

20

30

40

【表 8 - 2】

D	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVT LKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCE ATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGE KLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKL VNRDL KTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMT KKNSTFVRVHEKGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSPFAWSWVRQAPGKGLEW VAKIS PGGSWTYYSDT VTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAE DTAVYYCARQLWGYALD VWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGA PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号715)	DIQLTQSPSSLSASVG DRVITITCSASISVSYL YWYQQKPGKAPKLLI YDDSSLASGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQWSGYPY TFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (配列 番号733)	10
E	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVT LKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCE ATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGE KLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKL VNRDL KTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMT KKNSTFVRVHEKGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSPFAWSWVRQAPGKGLEW VAKIS PGGSWTYYSDT VTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAE DTAVYYCARQLWGYALD VWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGA PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号716)	DIQLTQSPSSLSASVG DRVITITCSASISVSYL YWYQQKPGKAPKLLI YDASSLASGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQWSGYPY TFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (配列 番号734)	20
F	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVT LKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCE ATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGE KLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKL VNRDL KTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMT KKNSTFVRVHEKGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSPFAWSWVRQAPGKGLEW VAKIS PGGSWTYYSDT VTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAE DTAVYYCARQLWGYALD VWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGA PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号717)	DIQLTQSPSSLSASVG DRVITITCSASISVSYL YWYQQKPGKAPKLLI YDDSNLASGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQWSGYPY TFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (配列 番号735)	30
			40

10

20

30

40

10

20

30

40

10

20

10

20

【表 9】

表 2 B - 1

配列番号	配列
1	VPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRKETCNKSNMCES SKEALAENNLNLPKMAEKDGCQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQ NRFESSEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQ AQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM
2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAISWVRQAPGKGLEWVA KISPGGSWTYYSDTVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR QLWGYALDVWGQGTLVTVSS
3	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYWYQQKPGKAPKLLIYDDSD SLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQGT KVEIK

10

【表 10】

表 2 C : 抗 I L - 6 重鎖可変領域配列。C D R に下線を付した。

ID	配列
I	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAISWVRQAPGKGLEWVAKISPGGS WTYYSDTVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWGYALDVWG QGTLVTVSS (配列番号89)
II	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAWSWVRQAPGKGLEWVAKISPGGS WTYYSDTVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLWGYALDVWG QGTLVTVSS (配列番号90)
IIa	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGG SWTYYSDDTVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQAWGYALDIWG QGTLVTVSS (配列番号256)
IIb	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGG SWTYYSDDTVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQSWGYALDIWG QGTLVTVSS (配列番号257)
IIc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGG SWTYYSDDTVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGWGYALDIWG QGTLVTVSS (配列番号258)
IId	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGG SWTYYSDDTVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQITWGYALDIWG QGTLVTVSS (配列番号259)
IIe	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGG SWTYYSDDTVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQVWGYALDIWG QGTLVTVSS (配列番号260)
IIIf	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGG SWTYYSDDTVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQQWGYALDIWG QGTLVTVSS (配列番号261)
IIg	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWVAKISPGG SWTYYSDDTVTDRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARQKWGYALDIWG QGTLVTVSS (配列番号262)

20

30

【表 11】

表 2 D : 抗 I L - 6 軽鎖可変領域配列。C D R に下線を付した。

ID	配列
III	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYWYQQKPGKAPKLLIYDDSSLASGV SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQGTKEIK (配列番号91)
IV	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYWYQQKPGKAPKLLIYDASSLASGV SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQGTKEIK (配列番号92)
V	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASISVSYLYWYQQKPGKAPKLLIYDDSNLASGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSGYPYTFGQGTKEIK (配列番号 93)

40

【0225】

いくつかの実施形態では、前記抗体は、表 2 E (表 2 E 1、表 2 E 2、及び／又は表 2 E 3を含む) の C D R を 1 又は複数 (又はいずれか) 有する。

50

【表 1 2】

表 2 E 1

配列		
重鎖	CDR1	GFTFSPFAMS (配列番号94)
	CDR2	KISPGGSWTYYSDTVTG (配列番号95)
	CDR3	QLWGYYALDI (配列番号171)
軽鎖	CDR1	SASISVSYMY (配列番号96)
	CDR2	DMSNLAS (配列番号97)
	CDR3	MQWSGYPYT (配列番号98)

10

【表 1 3】

表 2 E 2

配列		
重鎖	CDR1	PFAMS (配列番号244)
	CDR2	KISPGGSWTYYSDTVTG (配列番号245)
	CDR3	QLWGYYALDI (配列番号246)
軽鎖	CDR1	SASISVSYMY (配列番号247)
	CDR2	DMSNLAS (配列番号248)
	CDR3	MQWSGYPYT (配列番号249)

20

【表 1 4】

表 2 E 3

配列		
重鎖	CDR1	GFTFSPFAMS (配列番号250)
	CDR2	WVAKISPGGSWTYYSDTVTG (配列番号251)
	CDR3	ARQLWGYYALDI (配列番号252)
軽鎖	CDR1	SASISVSYMY (配列番号253)
	CDR2	LLIYDMSNLAS (配列番号254)
	CDR3	MQWSGYPYT (配列番号255)

30

【0 2 2 6】

いくつかの実施形態では、I L - 6 アンタゴニスト抗体は、表 2 C、2 D、2 E 1、2 E 2、及び／又は 2 E 3 に示される重鎖可変領域のいずれか 1 つにおける 3 つの C D R を含む。いくつかの実施形態では、前記抗体は、表 2 C、2 D、2 E 1、2 E 2、及び／又は 2 E 3 に示される軽鎖可変領域のいずれか 1 つにおける 3 つの C D R を含む。いくつかの実施形態では、前記抗体は、表 2 C に示される重鎖可変領域のいずれか 1 つにおける 3 つの C D R と、表 2 D に示される軽鎖可変領域のいずれか 1 つにおける 3 つの C D R とを含む。いくつかの実施形態では、前記 C D R は、以下の表 3 (表 3 A 及び／又は表 3 B を含む) 又は表 4 (表 4 A 及び／又は表 4 B を含む) で指定された 1 又は複数である。

40

【表 1 5】

表 3 A：抗 I L－6 重鎖 C D R 配列

ID	CDR1	CDR2	CDR3
I	GFTFSPFAIS (配列番号 99)	VAKISPGGSWTYYSDTVT D (配列番号100)	ARQLWGYYALDV (配列番号101)
II	GFTFSPFAWS (配列番号102)	VAKISPGGSWTYYSDTVT D (配列番号103)	ARQLWGYYALDV (配列番号104)
IIa	GFTFSPFAMH (配列番号49)	VAKISPGGSWTYYSDTVT D (配列番号50)	ARQAWGYYALDI (配列番号51)
IIb	GFTFSPFAMH (SEQ ID NO:52)	VAKISPGGSWTYYSDTVT D (SEQ ID NO:53)	ARQSWGYYALDI (SEQ ID NO:54)
IIc	GFTFSPFAMH (SEQ ID NO:55)	VAKISPGGSWTYYSDTVT D (配列番号56)	ARQGWGYYALDI (配列番号57)
IId	GFTFSPFAMH (配列番号58)	VAKISPGGSWTYYSDTVT D (配列番号59)	ARQTWGYYALDI (配列番号60)
IIe	GFTFSPFAMH (配列番号61)	VAKISPGGSWTYYSDTVT D (配列番号62)	ARQVWGYYALDI (配列番号63)
IIf	GFTFSPFAMH (配列番号64)	VAKISPGGSWTYYSDTVT D (配列番号65)	ARQQWGYYALDI (配列番号66)
IIg	GFTFSPFAMH (配列番号67)	VAKISPGGSWTYYSDTVT D (配列番号68)	ARQKWGYYALDI (配列番号69)

10

【表 1 6】

表 3 B：抗 I L－6 重鎖 C D R 配列

CDR1	CDR2	CDR3
PFAMH (配列番号172)	KISPGGSWTYYSDTVTD (配列番号173)	QAWGYYALDI (配列番号174)
PFAMH (配列番号175)	KISPGGSWTYYSDTVTD (配列番号176)	QSWGYYALDI (配列番号177)
PFAMH (配列番号178)	KISPGGSWTYYSDTVTD (配列番号179)	QGWGYYALDI (配列番号180)
PFAMH (配列番号181)	KISPGGSWTYYSDTVTD (配列番号182)	QTWGYYALDI (配列番号183)
PFAMH (配列番号184)	KISPGGSWTYYSDTVTD (配列番号185)	QVWGYYALDI (配列番号186)
PFAMH (配列番号187)	KISPGGSWTYYSDTVTD (配列番号188)	QQWGYYALDI (配列番号189)
PFAMH (配列番号190)	KISPGGSWTYYSDTVTD (配列番号191)	QKWGYYALDI (配列番号192)
PFAIS (配列番号193)	KISPGGSWTYYSDTVTD (配列番号194)	QLWGYYALDV (配列番号195)
PFAWS (配列番号196)	KISPGGSWTYYSDTVTD (配列番号197)	QLWGYYALDV (配列番号198)

20

30

【表 1 7】

表 4 A：抗 I L－6 軽鎖 C D R 配列

ID	CDR1	CDR2	CDR3
III	SASISVSYLY (配列番号 105)	LLIYDDSSLAS (配列番号106)	QQWSGYPYT (配列番号 107)
IV	SASISVSYLY (配列番号 108)	LLIYDASSLAS (配列番号109)	QQWSGYPYT (配列番号 110)
V	SASISVSYLY (配列番号 111)	LLIYDDSNLAS (配列番号112)	QQWSGYPYT (配列番号 113)

40

50

【表 18】

表 4 B : 抗 I L - 6 軽鎖 C D R 配列

CDR1	CDR2	CDR3
SASISVSYLY 配列番号 199)	DDSSLAS 配列番号200)	QQWSGYPYT 配列番号 201)
SASISVSYLY 配列番号 202)	DASSLAS 配列番号203)	QQWSGYPYT 配列番号 204)
SASISVSYLY 配列番号 205)	DDSNLAS 配列番号206)	QQWSGYPYT 配列番号 207)

【0227】

いくつかの実施形態では、I L - 6 に結合するために使用される抗体は、表 2 C、2 D、2 E 1、2 E 2、2 E 3、3 A、3 B、4 A、及び／又は 4 B の配列の 1 又は複数を含む抗体であり得る。いくつかの実施形態では、I L - 6 に結合するために使用される抗体は、表 2 C、2 D、2 E 1、2 E 2、2 E 3、3 A、3 B、4 A、及び／又は 4 B の配列の 3 つ以上を含む抗体であり得る。いくつかの実施形態では、I L - 6 に結合するために使用される抗体は、表 2 C、2 D、2 E 1、2 E 2、2 E 3、3 A、3 B、4 A、及び／又は 4 B のいずれか 1 つの配列のうち 6 つを含む抗体であり得る。いくつかの実施形態では、I L - 6 に結合する抗体は、表 2 C、2 D、2 E 1、2 E 2、2 E 3、3 A、3 B、4 A、及び／又は 4 B のいずれか 1 つに指定された C D R のうち 6 つを含む抗体と結合を競合するものであり得る。

【0228】

本明細書に記載されている方法は、前記抗体複合体が下記式 (I) の構造を有すること、をさらに含んでいてもよい。

10

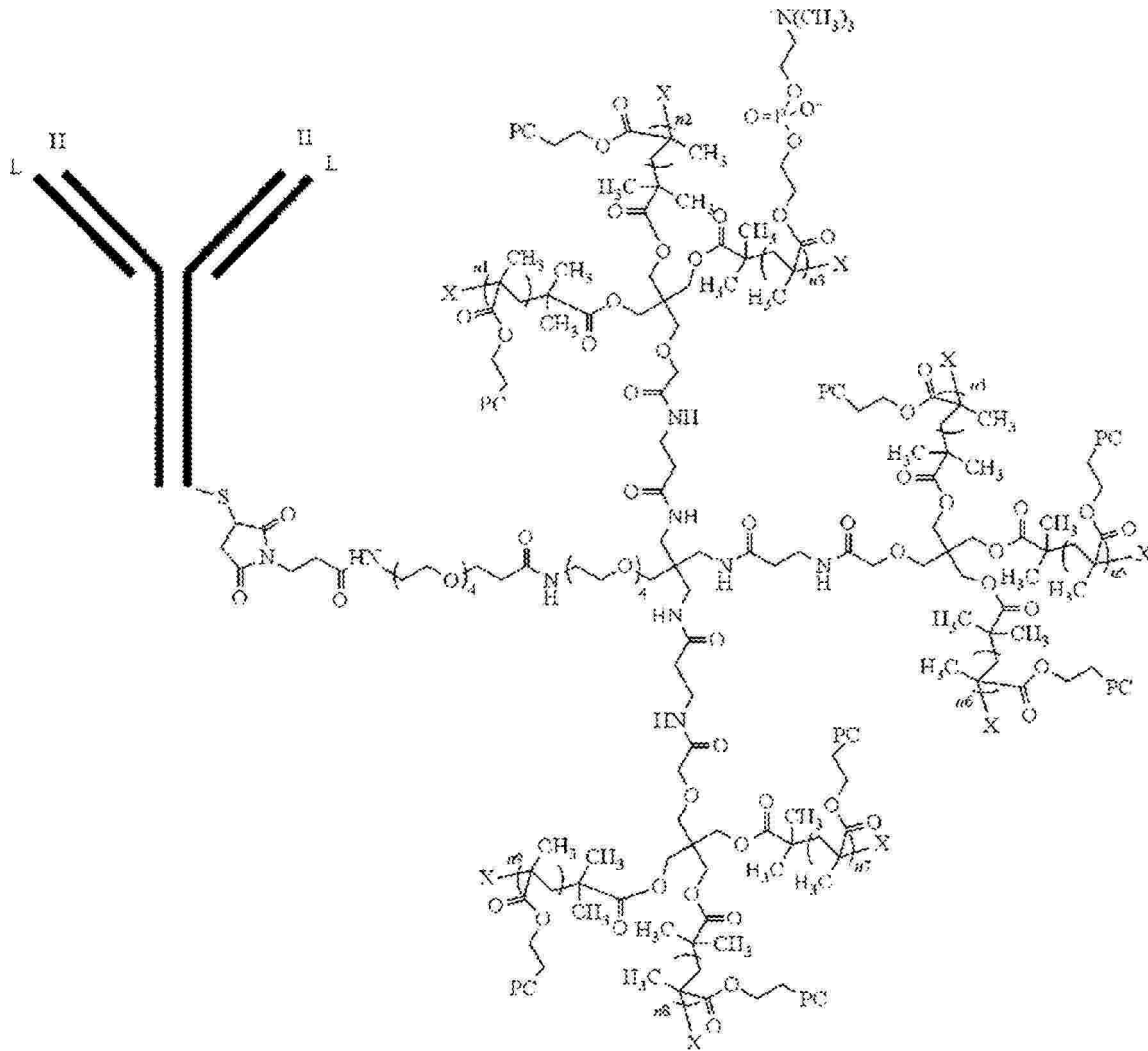
20

30

40

50

【化 2 2】



10

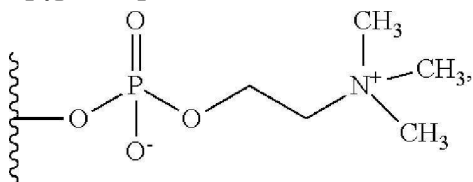
20

式中、抗 V E G F - A 抗体 の 各 重 鎖 は 文 字 H で 示 さ れ る と 共 に、抗 V E G F - A 抗体 の 各 軽 鎖 は 文 字 L で 示 さ れ、

前 記 ポ リ マ ー は、C 4 4 3 (E U 番 号 付 け) の ス ル フ ヒ ド リ ル を 介 し て 前 記 抗 V E G F - A 抗体 に 結 合 し、こ の 結 合 は 重 鎖 の 1 つ に 示 さ れ て お り、

P C は

【化 2 3】



(式 中、波 線 は ポ リ マ ー の 残 り の 部 分 へ の 接 続 点 を 示 す) で あ り、X は、a) - O R (R は - H、メ チ ル、エ チ ル、プ ロ ビ ル、又 は イ ソ プ ロ ビ ル)、b) - H、c) - B r、- C l、若 し く は - I を 含 む 任 意 の ハ ロ ゲ ン、d) - S C N、又 は e) - N C S で あ り、並 び に i) n 1、n 2、n 3、n 4、n 5、n 6、n 7、n 8、及 び n 9 は 同 じ か 異 な り、0 ~ 3 0 0 0 ま で の 整 数 で あ る か、又 は i i) n 1、n 2、n 3、n 4、n 5、n 6、n 7、n 8、及 び n 9 の 合 計 が 2 5 0 0 ± 1 5 % で あ る よ う に、n 1、n 2、n 3、n 4、n 5、n 6、n 7、n 8、及 び n 9 は 同 じ か 異 な る。

【0 2 2 9】

い く つ か の 実 施 形 態 で は、生 産 物 を 製 造 す る 方 法 が 提 供 さ れ る。前 記 方 法 は、細 胞 培 養

30

40

50

上清を回収することであって、前記細胞培養上清は、目的のタンパク質を含むこと、前記細胞培養上清を溶離液で処理することであって、前記溶離液は、前記目的のタンパク質を含むこと、前記溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすること、トリス又はリン酸ナトリウムを含む第一の洗浄緩衝液で洗浄すること、カオトロピック塩を含む第二の洗浄緩衝液で洗浄すること、溶出緩衝液で溶出させることであって、溶出液を収集し、前記溶出液はタンパク質産物を含むこと、前記溶出液中に存在するウイルス汚染物質を低pHウイルス緩衝液で不活性化し、ウイルス不活性化溶出液を生じさせること、前記ウイルス不活性化溶出液をろ過すること、前記ウイルス不活性化溶出液に対して少なくとも1回のイオン交換クロマトグラフィーを行うこと、及び前記ウイルス不活性化溶出液をろ過して保持液を得ることであって、前記保持液は目的のタンパク質を含むこと、を含む方法が本明細書において提供される。

10

【0230】

いくつかの実施形態では、前記方法は、前記細胞培養上清が動物成分不含細胞培養物を用いてバイオリアクターで生産されたものであること、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記細胞培養上清を処理することが細胞培養物から細胞産物を採取すること、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記細胞培養物を清澄化して細胞及び細胞片を除去すること、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記溶離液が前記清澄化細胞培養上清を含むこと、をさらに含んでもよい。アフィニティークロマトグラフィーを用いたタンパク質の精製方法であって、ロード液を媒体と接触させることであって、前記媒体は、目的のタンパク質を結合するアフィニティークロマトグラフィーマトリックスであること、カオトロピック剤を含む緩衝溶液で前記媒体を洗浄することであって、前記カオトロピック剤は塩であること、及び前記目的のタンパク質を溶出させるのに適した条件下で、洗浄した媒体を溶出溶液と接触させること、を含む方法。

20

【0231】

いくつかの実施形態では、生産物を製造する方法が提供される。前記方法は、目的のタンパク質を含む溶液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスに適用すること、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを第一の緩衝液で洗浄すること、カオトロピック剤を含む第二の緩衝液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、カオトロピック剤を除去するために第三の緩衝液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、及び溶出緩衝液で溶出させることであって、溶出液を収集し、前記溶出液はタンパク質産物を含むこと、を含む。

30

【0232】

いくつかの実施形態では、タンパク質精製のためのシステムが提供される。前記システムは、第一の抗原結合タンパク質が結合したカラム、リン酸ナトリウム及び塩を含むリン酸洗浄緩衝液、トリスを含む中間洗浄緩衝液、塩化マグネシウムを含む第二の洗浄緩衝液、並びにギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液を含む。

【0233】

いくつかの実施形態では、タンパク質精製のためのシステムが提供される。前記システムは、第一の抗原結合タンパク質が結合したカラム、トリス及び塩を含む第一のトリス洗浄緩衝液、中間トリス洗浄緩衝液、塩化マグネシウムを含む第二の洗浄緩衝液、並びにギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液を含む。

40

【0234】

いくつかの実施形態では、前記システムは、前記カラムがアフィニティークロマトグラフィー用のリガンドを含むこと、をさらに含んでもよい。前記システムは、前記リガンドがプロテインA又はプロテインGを含むこと、をさらに含んでもよい。前記システムは、リン酸ナトリウム及び塩を含む前記第一の洗浄緩衝液のpHが5.5～9.5であること、をさらに含んでもよい。前記システムは、リン酸ナトリウム及び塩を含む前記リン酸洗浄緩衝液が約50mMのリン酸ナトリウムを含むこと、をさらに含んでもよい。前記システムは、リン酸ナトリウム及び塩を含む前記リン酸洗浄緩衝液が約250mM塩化ナトリウムを含むこと、をさらに含んでもよい。前記システムは、前記第

50

一のトリス洗浄緩衝液が約50 mMのトリスを含むこと、をさらに含んでもよい。前記システムは、前記第一のトリス洗浄緩衝液がさらに約250 mM塩化ナトリウムを含むこと、をさらに含んでもよい。前記システムは、前記中間トリス洗浄緩衝液が約50 mMトリスを含むこと、をさらに含んでもよい。前記システムは、前記第一のトリス洗浄緩衝液のpHが約7.2であること、をさらに含んでもよい。前記システムは、前記第二の洗浄緩衝液のpHが約7.8であること、をさらに含んでもよい。前記システムは、前記第二の洗浄緩衝液中の塩化マグネシウムの濃度が約2.8 Mであること、をさらに含んでもよい。前記システムは、前記溶出緩衝液中のギ酸ナトリウムの濃度が10 mMであること、をさらに含んでもよい。

【0235】

10

いくつかの実施形態では、タンパク質精製のためのシステムが提供される。前記システムは、抗体に結合したプロテインA樹脂を有するカラムであって、前記抗体がそれぞれ配列番号2及び配列番号1の軽鎖及び重鎖を含むカラムと、カオトロピック塩を含むカオトロピック洗浄緩衝液、並びにギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液とを含む。

【0236】

本明細書に記載されている方法は、前記目的のタンパク質が二重特異性抗体であること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記二重特異性抗体がVEGF及びIL-6に対して特異的であること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記目的のタンパク質が抗体複合体であること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスがプロテインAクロマトグラフィーマトリックスであること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液中の前記カオトロピック剤がマグネシウム塩を含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記マグネシウム塩の濃度が1.5～3.5 Mであること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液中の前記カオトロピック剤がカルシウム塩を含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記カルシウム塩の濃度が1～3 Mであること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液中の前記カオトロピック剤がグアニジニウム塩を含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、グアニジニウム塩の濃度が0.05～3 Mであること、をさらに含んでもよい。

20

30

【0237】

本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液がさらにトリスを含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液中のトリスの濃度が少なくとも5 mMであること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液のpHが5.5より大きいこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記溶出液がさらにウイルス不純物を含有すること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記ウイルス不純物を除去すること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記ウイルス不純物を不活性化すること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液で洗浄する前に、前記ロード液がロードされたアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを予洗浄緩衝溶液で洗浄すること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液で洗浄した後、前記溶離液がロードされた前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを後洗浄緩衝溶液で洗浄する工程をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記予洗浄緩衝溶液がリン酸ナトリウムを含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記予洗浄緩衝溶液がトリス及び塩を含むこと、をさらに含んでもよい。

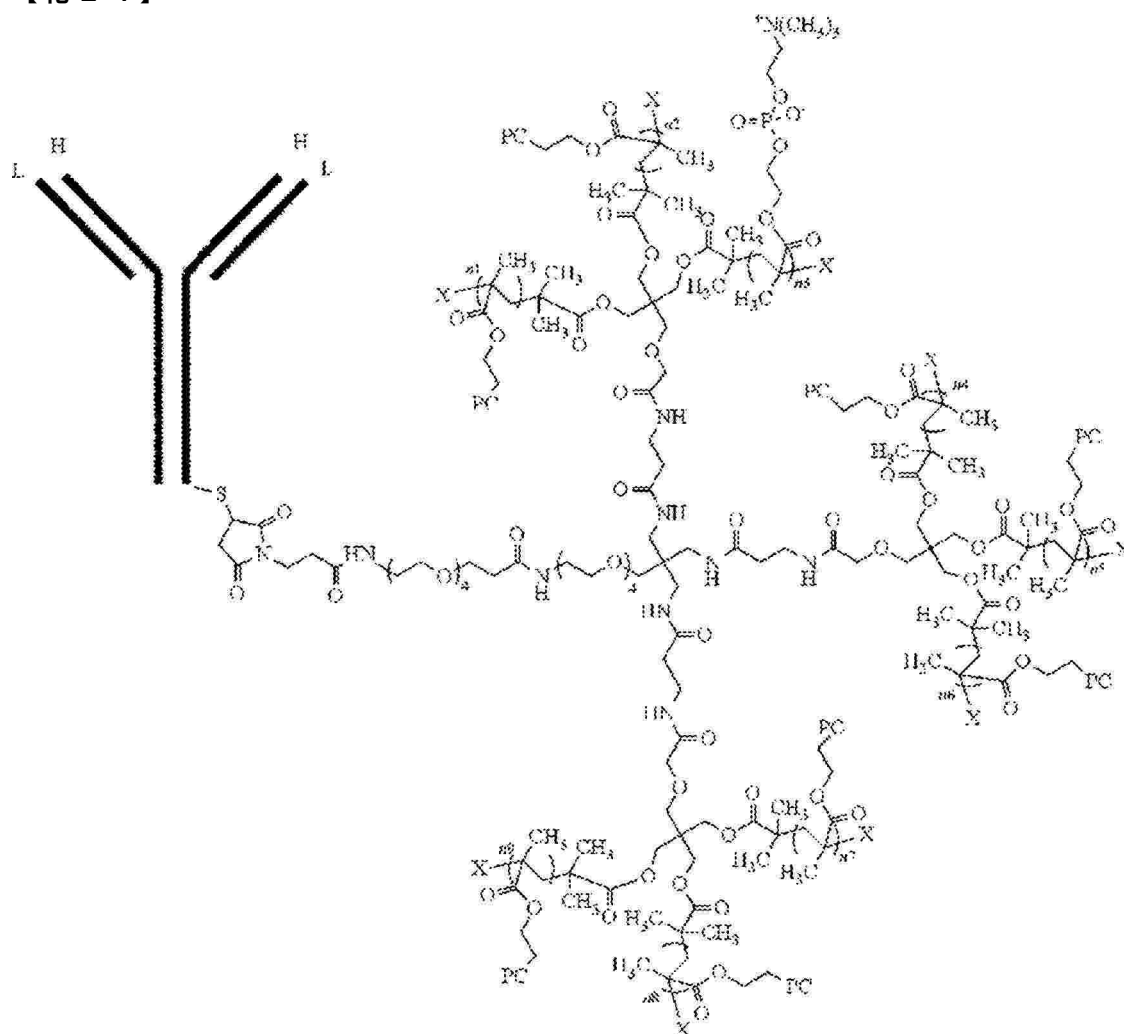
40

【0238】

本明細書に記載されている方法は、前記抗体複合体が下記式(I)の構造を有すること、をさらに含んでもよい。

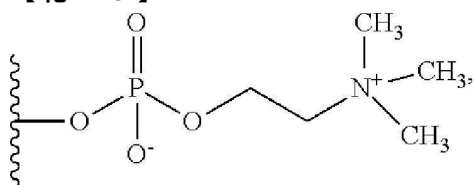
50

【化 2 4】



式中、抗 V E G F - A 抗体各重鎖は文字 H で示されると共に、抗 V E G F - A 抗体各軽鎖は文字 L で示され、前記ポリマーは、C 4 4 3 (E U 番号付け) のスルフヒドリルを介して前記抗 V E G F - A 抗体に結合し、この結合は重鎖の 1 つに示されており、P C は

【化 2 5】



(式中、波線はポリマーの残りの部分への接続点を示す) であり、X は、a) - O R (R は - H 、メチル、エチル、プロピル、又はイソプロピル)、b) - H 、c) - B r 、- C l 、若しくは - I を含む任意のハロゲン、d) - S C N 、又は e) - N C S であり、並びに i) n 1 、n 2 、n 3 、n 4 、n 5 、n 6 、n 7 、n 8 、及び n 9 は同じか異なり、0 ~ 3 0 0 0 までの整数であるか、又は i i) n 1 、n 2 、n 3 、n 4 、n 5 、n 6 、n 7 、n 8 、及び n 9 の合計が 2 5 0 0 ± 1 5 % であるように、n 1 、n 2 、n 3 、n 4 、n 5 、n 6 、n 7 、n 8 、及び n 9 は同じか異なる。

【0 2 3 9】

本明細書に記載されている方法は、前記抗体複合体が抗 V E G F - A 軽鎖及び抗 V E G F - A 重鎖を含む抗 V E G F 抗体複合体を含むこと、前記抗 V E G F - A 抗体重鎖が、配列番号 1 7 2 の C D R H 1 である C D R H 1 、配列番号 1 7 3 の C D R H 2 である C D R H 2 、及び配列番号 1 7 4 の C D R H 3 である C D R H 3 を含むこと、並びに前記抗 V E

G F - A 抗体軽鎖が、配列番号 199 の C D R L 1 である C D R L 1、配列番号 200 の C D R L 2 である C D R L 2、及び配列番号 201 の C D R L 3 である C D R L 3 を含むこと、をさらに含んでいてもよい。本明細書に記載されている方法は、抗 V E G F 抗体複合体が、M P C モノマーを含むポリマーに結合した抗 V E G F - A 免疫グロブリン G (I g G) を含む抗体複合体を含み、前記抗 V E G F - A 抗体重鎖の配列は、配列番号 7 ~ 13、19 ~ 27、89、90、及び 256 ~ 262 のうちの少なくとも 1 つであり、抗 V E G F - A 抗体軽鎖の配列は、配列番号 91 ~ 93、及び 28 ~ 30 のうちの少なくとも 1 つであり、並びに前記抗体が C 449 で前記ポリマーに結合していること、をさらに含んでいてもよい。本明細書に記載されている方法は、前記目的の標的タンパク質が細胞培養物によって生産されること、をさらに含んでいてもよい。本明細書に記載されている方法は、前記細胞培養物が C H O 細胞を含むこと、をさらに含んでいてもよい。本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液で洗浄した後、前記溶離液がロードされた前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを後洗浄緩衝溶液で洗浄する工程をさらに含んでいてもよい。本明細書に記載されている方法は、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質以外の核酸、エンドトキシン、消泡剤、又はその他の小分子が除去されること、をさらに含んでいてもよい。本明細書に記載されている方法は、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを前記緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質を前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスに結合したまま不純物を除去すること、をさらに含んでいてもよい。本明細書に記載されている方法は、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを前記緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質以外の宿主細胞タンパク質が除去されること、をさらに含んでいてもよい。本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液へのカオトロピック剤の添加によって、前記目的の標的タンパク質が溶出されないこと、をさらに含んでいてもよい。本明細書に記載されている方法は、ウイルス不活性化、タンジェンシャルフローろ過、透析ろ過、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、又はウイルス低減ろ過のうち 1 又は複数をさらに含んでいてもよい。本明細書に記載されている方法は、前記溶離液が動物成分不含細胞培養物を用いてバイオリアクターで生産されたものであること、をさらに含んでいてもよい。本明細書に記載されている方法は、前記生産物が目的のタンパク質であること、をさらに含んでいてもよい。本明細書に記載されている方法は、不純物が宿主細胞タンパク質不純物を含むこと、をさらに含んでいてもよい。

10

20

30

【0240】

本明細書に開示されるように、本開示の精製方法は、宿主細胞タンパク質 (H C P) のような不純物を除去するのに効果的である。実施例で詳細に説明されているように、前記方法は、洗浄溶出液中の H C P を減らすのに効果的であり、同時に、目的のタンパク質の高パーセント収率及び目的のタンパク質の高濃度を達成する。例えば、様々な実施形態では、本明細書に記載されている方法は、目的のタンパク質のパーセント収率が、80%超、81%超、82%超、83%超、84%超、85%超、86%超、87%超、88%超、89%超、90%超、91%超、92%超、93%超、94%超、95%超、96%超、97%超、98%超、又は99%超となる結果をもたらす。

40

【0241】

本明細書に開示されるように、本開示の精製方法は、アフィニティークロマトグラフィーに基づく精製方法から不純物を除去するのに効果的である。いくつかの実施形態では、クロマトグラフィーに基づく精製方法には、移動相中の分析物と固定相中のリガンドとの間の特定の高分子結合相互作用に基づく方法が含まれる。いくつかの実施形態では、前記方法は、洗浄溶出液中の不純物を減らすのに効果的であり、同時に、目的の種の高パーセント収率を達成する。いくつかの実施形態では、前記方法は、洗浄溶出液中の不純物を減らしながら、目的の種の高濃度を達成するのに効果的である。例えば、様々な実施形態では、本明細書に記載されている方法は、目的の種のパーセント収率が、80%超、81%超、82%超、83%超、84%超、85%超、86%超、87%超、88%超、89%

50

超、90%超、91%超、92%超、93%超、94%超、95%超、96%超、97%超、98%超、又は99%超となる結果をもたらす。

【0242】

本明細書に開示されるように、本開示の精製方法は、モノクローナル抗体 (mAbs) を含む試料から不純物を除去するのに効果的である。いくつかの実施形態では、mAb を含む残基は、抗体の全体的な形態又は構造を変化させるために変更又は改変されてもよい。いくつかの実施形態では、mAb を含む残基は、結合パートナーへの結合効率を調節するために変更又は改変されてもよい。いくつかの実施形態では、mAb を含む残基は、抗原結合部位における結合効率を調節するために変更又は改変されてもよい。いくつかの実施形態では、mAb を構成する残基は、結合効率を調節するために変更又は改変されてもよい。いくつかの実施形態では、前記変更された残基は改変されたシステインであってもよい。いくつかの実施形態では、前記モノクローナル抗体は、VEGF に特異的なドメインを含む特定の結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、前記特異的結合ドメインは、1又は複数のVEGF受容体の1又は複数の細胞外成分を含む。いくつかの実施形態では、前記結合ドメインはさらにFc部分を含む。

10

【0243】

表5に、存在する可能性があり、現在の方法で除去され得る高リスクHCPの一般的な種を示す。前記表にはさらに、調合された医薬品への下流の影響の可能性も含まれている。現在の技術がなければ、一部のHCP種は、他の望ましい分子種に近づく物理化学的特性のために除去が困難になる。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される実施形態のいずれか1又は複数は、表5の種のいずれか1又は複数除去するために使用することができる。いくつかの実施形態では、前記目的の生産物は、表5の種の1又は複数から選択される。いくつかの実施形態では、前記目的のタンパク質は、表5の種の1又は複数から選択される。除去が困難なHCPは、分子量が15kDa超又はpIが7.3~9.3のタンパク質として分類できる。

20

30

40

50

【表 19-1】

表 5 : H C P の一般的な種 A

タンパク質名前	MW (Da)	pI	機能	影響	影響のタイプ	参照
78 kDa グルコース調節タンパク質 (GRP78; BiP)	72,379	5.07	小胞体内のタンパク質の折り畳みと品質管理	薬剤の品質	薬剤の凝集	Farrell et al., 2015; Liu et al., 2019; Valente et al., 2015
α-エノラーゼ	47,141	6.37	2-ホスホグリセリン酸からホスホエノールピルビン酸への脱水反応を触媒する	薬剤の品質	薬剤の改変	Valente et al., 2015; Zhang et al., 2014
Annexin A5 (ANXA5)	35,752	4.82	リン脂質に高い親和性で結合し、アポトーシスのマーカーとして機能する	免疫原性	免疫原性反応	Fukuda et al., 2019; Gilgunn & Bones, 2018
C-X-Cモチーフケモカイン 3 (CXCL3)	10,686	8.74	発がん性の可能性のあるサイトカイン	生物学的機能	免疫原性反応	Gilgunn & Bones, 2018; Gilgunn et al., 2019
カルボキシエステラーゼ (CEB) a	60,175	5.51	エステル又はアミドを含む基質をアルコールとカルボン酸に分解する触媒作用を及ぼす	製剤化	ポリソルベートの分解	McShan et al., 2016; Zhang et al., 2020
カルボキシペプチダーゼ D (Cpd)	152,406	5.77	C末端アミノ酸を放出するセリンエキソペプチダーゼ	薬剤の品質	薬剤の改変	Hu et al., 2016; Dick et al., 2008; Park, et al., 2017
カテプシン (B, L, Z) a	37,280	5.57	細胞内タンパク質分解を司るシステインプロテアーゼ	薬剤の品質	薬剤の断片化	Luo et al., 2019; Migani et al., 2017; Park, et al., 2017; Vanderlaan et al., 2018
カテプシン (D, E) a	43,021	4.67	酸性及び中性の両方の pH で活性を有するアスパルチルプロテアーゼ	薬剤の品質	薬剤の断片化	Bee et al., 2017; Lima et al., 2018; Robert et al., 2009; Yang et al., 2019
クラステリン (CLU)	51,656	5.45	細胞残骸の除去及びアポトーシスに関連する多機能ジスルフィド結合ヘテロ二量体糖タンパク質	免疫原性	免疫原性反応	Aboulaich et al., 2014; Gilgunn & Bones, 2018; Goey et al., 2018
グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) a	25,608	9.04	還元型グルタチオンを外因性及び内因性の疎水性求電子剤と結合させる	免疫原性	免疫原性反応	Goey et al., 2018; Jawa et al., 2016
リボタンパク質リパーゼ (LPL)	53,109	7.95	LDL のトリアシルグリセロールの加水分解を触媒し、トリグリセリドと HDL の血漿濃度を調節する	製剤化	ポリソルベートの分解	Chiu et al., 2017; Levy et al., 2014; Park et al., 2017
リソソーム酸性リパーゼ (LAL)	45,325	8.15	コレステロールエステル及びトリグリセリドを加水分解する	製剤化	分解	Levy et al., 2014; McShan et al., 2016
リソソームホスホリパーゼ A2 (LPLA2)	47,307	6.02	グリセロリン脂質のアシルエステル結合を切断して遊離脂肪酸を生成する	製剤化	ポリソルベートの分解	Hall et al., 2016; McShan et al., 2016; Shayman et al., 2011

10

20

30

40

50

【表 19-2】

マトリックスメ タロプロテアー ゼ (MMP) a	70,46 0	9.25	細胞外マトリックス タンパク質の分解を 担うエンドペプチダ ーゼ	薬 剤 の 品 質	薬 剤 の 分 解	Gilgunn & Bones, 2018; Gilgunn et al., 2019
単球走化性タン パク質 1 (MC P-1)	16,32 6	9.81	C-Cケモカイン受 容体のリガンドとし て作用する	ヒト での 生物 学的 機能	サイ トカ イン 放出	Leister et al., 2019; Vanderlaan et al., 2018; Yoshimura & Leonard, 1989
ペプチジルプロ リルシストラン スイソメラーゼ A (PPIA)	18,01 2	7.68	ペプチド結合のN末 端からプロリン残基 へのシストランス 異性化を触媒する	薬 剤 の 品 質	薬 剤 の 凝 集	Jawa et al., 2013; Zhang et al., 2016
ペルオキシレド キシン (PRD X) a	22,26 3	8.22	細胞内の過酸化水素 濃度を調節する	免 疫 原 性	免 疫 原 性 反 応	Albrecht et al., 2018; Jawa et al., 2016; Joucla et al., 2013; Park et al., 2017
ホスホリパーゼ B-類似体 2 (P L B L 2)	66,28 9	5.76	リン脂質を脂肪酸に 加水分解する触媒作 用がある可能性がある	免 疫 原 性	免 疫 原 性 反 応	Fischer et al., 2017; Jawa et al., 2016; Tran et al., 2016; Zhang et al., 2020
プロコラーゲン- リジン2-オキシ グルタル酸5-デ オキシゲナーゼ — 1 (P L O D 1)	83,59 5	6.08	コラーゲンα鎖のリジ ン残基の水酸化を触 媒する	免 疫 原 性	免 疫 原 性 反 応	Hogwood et al., 2016; Jawa et al., 2016
タンパク質ジス ルフィドイソメ ラーゼ (P D I)	57,01 0	4.78	ジスルフィド結合の 形成と切断を触媒す る	薬 剤 の 品 質	薬 剤 の 凝 集	Aboulaich et al., 2014; Gilgunn & Bones, 2018; Goey et al., 2018; Maeda et al., 2007
タンパク質 S 1 O O a	11,24 1	5.28	カルシウムバランス 、細胞のアポトーシ ス、移動、増殖、分 化、エネルギー代謝 、炎症を調節する	免 疫 原 性	免 疫 原 性 反 応	Gilgunn & Bones, 2018; Gilgunn et al., 2019
ピルビン酸キナ ーゼ (PK)	62089 .32 58628 .38	6.19 6.07	ホスホエノールピル ビン酸からピルビン 酸への変換を触媒し 、細胞代謝の調節に 役割を果たす	免 疫 原 性	免 疫 原 性 反 応	Goey et al., 2018; Jawa et al., 2016; Park et al., 2017
セリンプロテア ーゼ (H T R A 1)	51,21 4	7.82	プロテオグリカン を分解し、N末端を切 り取る可能性がある	薬 剤 の 品 質	薬 剤 の 改 変	Dorai et al., 2011; Gilgunn & Bones, 2018; Goey et al., 2018
シアル酸 O-ア セチルエステラー ゼ (S I A E)	60,77 5	6.32	カルボン酸エステル 結合を加水分解する	製 剤 化	ポリ ソル ベート の分解	Schauer et al., 1988
トランスフォー ミング増殖因子β 1 (T G F -β 1)	44,31 0	8.90	免疫恒常性及び免疫 抑制を維持する	ヒト での 生物 学的 機能	サイ トカ イン 放出	Beatson et al., 2011; Vanderlaan et al., 2018

【0244】

図1に関して、動物成分不含細胞培養プロセスからOG2072抗体を精製するためのプロセス100を開示する。このプロセスには、3つのクロマトグラフィー工程及び2つのTFF（タンジェンシャルフロー過）工程、並びに低pHウイルス不活性化が含まれる。まず、110において清澄化細胞上清を採取する。次に、清澄化細胞上清に対してアフィニティークロマトグラフィー120を実施する。低pHウイルス不活性化130に続いて中間ろ過140を、アフィニティークロマトグラフィー中に収集された出力（output）溶出液に対して行う。陰イオン交換クロマトグラフィー150とそれに続く陽イオン交換クロマトグラフィー160を含むクロマトグラフィーをさらに行う。ウイルス低

減ろ過 170 を行い、その後最終的な限ろ過／透析ろ過 180 を行う。

【0245】

低 pH ウイルス不活性化には、溶液を pH 3.5 で 240 分間保持し、その後 pH 7 に中和することが含まれてもよい。低 pH ウイルス不活性化には、代わりに pH 3.5 で 60 分間保持し、その後 pH 5.5、6、又は 6.5 まで段階的に中和することが含まれてもよい。Mab Select Sure LX アフィニティークロマトグラフィー (MSLX) の後に、ウイルス不活性化／中和工程を行い、その後、最初の TFF (TFF 1) を実施して、抗体を Sartobind Q 陰イオン交換クロマトグラフィー (AEX クロマトグラフィー) 用に調整できる。次に、POROS XS 陽イオン交換クロマトグラフィー (CEX クロマトグラフィー) 及びウイルス低減ろ過 (Planova 20N) を行う。POROS XS は、10 mM リン酸ナトリウム (pH 5)、40 mM 塩化ナトリウム、添加物として酢酸 ($<15 \text{ mS/cm}$) を用いた結合と、それに続く、50 mM 酢酸ナトリウム、pH 6、10 mM 塩化ナトリウム～50 mM 酢酸ナトリウム、pH 6、300 mM 塩化ナトリウムでの 10 CV における勾配溶出とを含む。POROS XS クロマトグラフィー中に、50 mM 酢酸ナトリウム (pH 5) 及び 150 mM 塩化ナトリウムを含む追加の洗浄を行い、その後塩化ナトリウムを 165、180、195、又は 210 mM まで徐々に増加させることができる。POROS XS カラム工程に勾配を適用してもよく、10 CV で 30 cm のベッド高で pH 5 の 150 mM 塩化ナトリウム～400 mM 塩化ナトリウムの勾配、又は 12 CV で 30 cm のベッド高で pH 6 の 50 mM 塩化ナトリウム～350 mM 塩化ナトリウムの勾配が提供される。勾配溶出の前に、洗浄工程を行うことができる。洗浄工程は、2 CV の 50 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.0、10 mM 塩化ナトリウム、続いて 5 CV の 18.8 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0、22.5 mM 塩化ナトリウム、続いて 3 CV の 50 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.0、10 mM 塩化ナトリウム、続いて 2 CV の 50 mM 酢酸ナトリウム、pH 6.0、10 mM 塩化ナトリウムを含む。最後に、2 回目の TFF (TFF 2) を行って抗体を配合し、抗体中間体を得る。

【0246】

図 2 に、生体分子の精製プロセス 200 を示す。まず、細胞培養物を増殖させ、発酵プロセス 210 を使用して培養する。その後、細胞培養物を採取 220 で収集し、清澄化細胞濃縮物を得る。次いで、清澄化細胞濃縮物を、アフィニティークロマトグラフィー及びウイルス不活性化／中和 230 を使用して精製する。プロセスの出力は生産物の保持液である。次に、収集した生産物保持液に対してタンジェンシャルフローろ過 240 を行い、その後、陰イオン交換クロマトグラフィー 250 及び陽イオン交換クロマトグラフィー 260 を順に行う。次に、処理した生産物の保持液を、ウイルス低減ろ過 270 に供し、第 2 のタンジェンシャルフローろ過 280 を行い、精製生産物が生じさせる。

【0247】

図 3 に関して、望ましい分子種の収量及び純度を評価するために、測定可能な HCP 種の減少率を評価するプロトコルを開発した。動物成分不含細胞培養プロセスから OG 2072 抗体をカラム精製するためのプロセス 300 を開示する。このプロセスは、平衡化 310 と、それに続く、清澄化細胞培養液 (CCCF) をカラムにロードする 320 とを含む。次に、カラムを、洗浄 1 の 330、続いて洗浄 2 の 340、洗浄 3 の 350、及び洗浄 4 の 360 を含む一連の洗浄で処理する。洗浄 2 の 340 は、サブ洗浄 340 A、340 B、及び 340 C を含んでいてもよい。洗浄 4 の 360 に続いて、溶出 370 を行い、それにより溶出後緩衝液 380 をカラムに流して樹脂を再生させる。このプロセスには、pH 7 の 50 mM リン酸ナトリウム及び 250 mM 塩化ナトリウムによるプロテイン A カラムの平衡化 310、次にロード 320 工程が含まれ、カラムに清澄化細胞培養液 (CCCF) がロードされ、続いて、pH 7 の 50 mM リン酸ナトリウム及び 250 mM 塩化ナトリウムによる第一の洗浄 330 を含む一連の洗浄 330～360 が続く。洗浄 2 の 340 は、表 6 C に記載されているように、様々な洗浄緩衝液及び条件を含む。洗浄 3 の 350 は、pH 7 での 50 mM リン酸ナトリウム及び 2 M 塩化ナトリウムによる洗浄を含み、

洗浄４の３６０は、pH 7での50mMリン酸ナトリウム及び250mM塩化ナトリウムによる洗浄を含む。溶出３７０はpH 3.5の10mMギ酸ナトリウムで行い、溶出後処理はpH 2.1の100mMクエン酸で前記カラムを通過させた。

【0248】

いくつかの実施形態では、図８の１１～１６の任意の１又は複数における指定されたアミノ酸配列の任意の１又は複数の配列は、本明細書で提供される他の実施形態のいずれかの対応する構造と入れ替えることも、本明細書で提供される他の配列のいずれかと交換することもできる。いくつかの実施形態では、このコンストラクトは、VEGFR-抗IL-6構成であり、配列１Ａ～配列１Ｄ（図１２）のいずれか１つ、リンカーに連結されたもの（例えば、図１２、配列２Ａ）、重鎖IL-6配列に連結されたもの（例えば、図１３、配列３Ａ又は配列３Ｂ）、軽鎖配列に連結されたもの（例えば、図１５、配列４Ａ）の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、配列１Ａ～配列１Ｄ（図１２）のいずれか１つを、リンカー（図１２）と組み合わせることができ、重鎖抗IL-6配列（図１３～１４、配列３Ａ～配列３Ｉ）及び軽鎖抗IL-6配列（図１５、配列４Ａ～配列４Ｃ）と組み合わせることができる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるコンストラクトの特定の単位に対応する他の任意の配列は、これらの単位のいずれかに入れ替える又は交換することができる。

10

【0249】

いくつかの実施形態では、抗IL-6抗体コンストラクトのいずれかは、例えば、本明細書で提供される実施形態の表２Ｃ、表２Ｄ、表２Ｅ、表０.３及び／又は表０.４、並びに図８、１１～１６に含まれるものを含め、組成物、成分、又は治療薬として使用することが想定されている。

20

【0250】

いくつかの実施形態では、前記融合タンパク質は、VEGF Trap配列の９４位、VEGF Trap配列の９５位、又はVEGF Trap配列のＴ９４Ｉ及びＨ９５Ｉの変異を含む。

【0251】

いくつかの実施形態では、VEGFR-抗IL-6二重阻害剤が提供される。前記VEGFR-抗IL-6二重阻害剤は、抗IL-6抗体とVEGF (VEGFR1/2) Trapとのトラップ抗体融合体を含み、前記二重阻害剤は、VEGFR配列の切断を減らすために、VEGFR配列内に少なくとも１つの点変異を含む。いくつかの実施形態では、前記VEGFR-抗IL-6二重阻害剤の分子量は1.0MDaである。

30

【0252】

いくつかの実施形態では、前記VEGR-抗IL-6二重阻害剤は炎症性網膜疾患の治療に使用される。

【0253】

いくつかの実施形態では、前記VEGFR-抗IL-6二重阻害剤は、定常重鎖、定常軽鎖、抗原結合断片、結晶化可能断片(Fc)、血管内皮増殖因子受容体(VEGFR)、可変重鎖、可変軽鎖、及びCDR領域を含む。

【0254】

いくつかの実施形態では、前記抗IL-6重鎖可変領域配列は、図１１の配列番号７、８、９、１０、１１、１２、又は１３から選択することができる。

40

【0255】

いくつかの実施形態では、前記VEGF Trap配列は、図１２の配列番号１４、１５、１６、又は１７の少なくとも１つから選択することができる。

【0256】

いくつかの実施形態では、VEGR-抗IL-6二重阻害剤の場合、抗IL-6分子の重鎖配列は、図１３～図１４の配列番号１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、又は２７の少なくとも１つから選択することができる。

【0257】

50

いくつかの実施形態では、VEGFR-抗IL-6二重阻害剤の場合、抗IL-6分子の軽鎖配列は、図15の配列番号28、29、又は30の少なくとも1つからの少なくとも1、2、又は3つの軽鎖CDRを含む。

【0258】

いくつかの実施形態では、VEGFR-抗IL-6二重阻害剤の場合、抗IL-6分子の重鎖配列は、図16のオプション5A、5B、5C、5D、5E、5F、5G、5H、又は5Iの少なくとも1つからの少なくとも1、2、又は3つの重鎖CDRを含む。

【0259】

いくつかの実施形態では、VEGFR-抗IL-6二重阻害剤は、図18の配列番号85、86、87、又は88のうち少なくとも1つからのVEGFR-Fc配列を含む。

10

【0260】

いくつかの実施形態では、VEGFR-抗IL-6二重阻害剤は、図11～図18の配列の1又は複数を含む。

【0261】

いくつかの実施形態では、VEGFR-抗IL-6二重阻害剤は、IL-6 VH、IL-6 VL、IL-6 Fc、VEGF Trap、及びリンカーを含む。いくつかの実施形態では、IL-6 VHは、図16又は図13～図14のIL6VH配列からの配列を含む。いくつかの実施形態では、IL-6 VLは、図15のIL6VL配列からの配列を含む。いくつかの実施形態では、Fcは、図16のFc配列からの配列を含む。いくつかの実施形態では、VEGF Trapは、VEGF Trap配列からの配列を含む。

20

【0262】

いくつかの実施形態では、少なくとも3つの重鎖CDR、少なくとも3つの軽鎖CDR、VEGF Trap配列、及びリンカー配列を含むタンパク質コンストラクトが提供され、各配列は、図11～図18内の配列から選択される。

【0263】

いくつかの実施形態では、IL-6 VH、IL-6 VL、IL-6 Fc、及びVEGF Trapを含む融合タンパク質が提供され、融合タンパク質はHUVECの増殖を変化させる。いくつかの実施形態では、各配列は、図11～図18内の配列から選択される。

30

【0264】

他の実施形態では、本発明の方法により、溶出液中のHCP汚染物質のパーセント削減が、少なくとも約2倍、少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約6倍、少なくとも約7倍、少なくとも約8倍、少なくとも約9倍、少なくとも約10倍、少なくとも約15倍、又は少なくとも約20倍削減される。

【0265】

したがって、一態様において、本開示は、目的のタンパク質が結合したアフィニティークロマトグラフィー（AC）マトリックスを使用して、精製されたタンパク質（例えば、抗体、抗体断片、又はFc領域を含むタンパク質（例えば、Fc融合タンパク質））を製造する方法であって、塩化マグネシウム又は同等のカオトロピック剤を含む洗浄溶液でACマトリックスを洗浄することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、前記塩化マグネシウムを含む洗浄溶液は、ACマトリックスから目的のタンパク質を溶出する前のpHが約7.8、約6、約6.1、約6.2、約6.3、約6.4、約6.5、約6.6、約6.7、約6.8、約6.9、約7、約7.1、約7.2、約7.3、約7.4、約7.5、約7.6、約7.7、約7.9、約8、約8.1、約8.2、約8.3、約8.4、約8.5、約8.6、約8.7、約8.8、約8.9、又は約9である。いくつかの実施形態では、前記洗浄溶液は、約1M、約1.1M、約1.2M、約1.3M、約1.4M、約1.5M、約1.6M、約1.7M、約1.8M、約1.9M、約2M、約2.1M、約2.2M、約2.3M、約2.4M、約2.5M、約2.6M、約2.7M、約2.8M、約2.9M、約3M、約3.1M、約3.2M、約3.3M、約3.4M

40

50

、約 3.5 M、約 3.6 M、約 3.7 M、約 3.8 M、約 3.9 M、約 4 M、約 4.1 M、約 4.2 M、又は 4.2 M 超の塩化マグネシウムを含む。

【0266】

抗体複合体

本明細書では、抗 VEGF 抗体（抗 VEGF タンパク質、例えばアフリベルセプトを含む）及びその複合体が提供される。いくつかの実施形態では、前記抗体自体は他の抗 VEGF 剤とは異なり、他の抗 VEGF 剤よりも優れた結果をもたらす。いくつかの実施形態では、抗 VEGF 抗体複合体は、他の抗体及び／又は他の抗体複合体の活性に対する驚くべき優位性を示す。

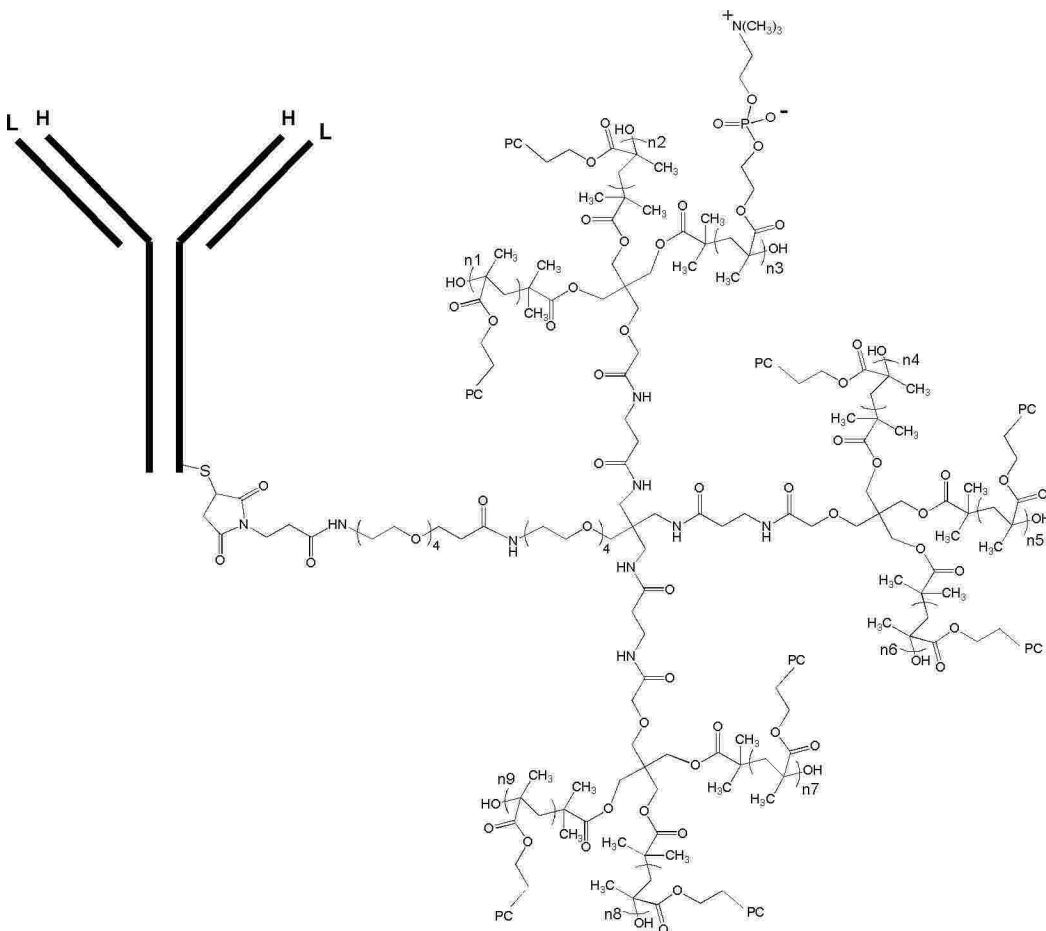
【0267】

いくつかの実施形態では、抗 VEGF 抗体複合体は KSI-301 であり、

（１）抗 VEGF-A 抗体並びに

（２）ホスホリルコリン含有ポリマーであって、抗 VEGF-A 抗体の可変領域外のシステインにおいて抗 VEGF-A 抗体に共有結合しており、前記システインが配列中の同じ位置に存在する非システインアミノ酸を置換しており、前記抗 VEGF-A 抗体が軽鎖及び重鎖を含み、前記重鎖が Fc 領域を含み、前記システインは重鎖の Fc 領域内にあり、重鎖の配列が配列番号 270 の少なくとも 1 つであり、及び軽鎖の配列が配列番号 275 の少なくとも 1 つを含む、（又は図 8 のそのバリエーションのいずれか）を含み、前記抗体複合体は下記式（I）の構造を有し：

【化 26】



式中、抗 VEGF-A 抗体の各重鎖は文字 H で示されると共に、抗 VEGF-A 抗体の各軽鎖は文字 L で示され、前記ポリマーは、EU 番号付け C443 のスルフヒドリルを介して前記抗 VEGF-A 抗体に結合し、この結合は上記重鎖の 1 つに示されており、PC は

10

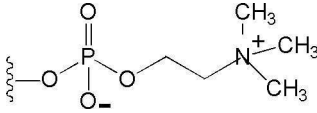
20

30

40

50

【化 27】



(式中、波線はポリマーの残りの部分への接続点を示す)であり、並びに i) n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 、 n_8 、及び n_9 は同じか異なり、0～3000までの整数であるか、又は ii) n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 、 n_8 、及び n_9 の合計が $2500 \pm 15\%$ であるように、 n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 、 n_8 、及び n_9 は同じか異なる。

10

【0268】

歴史的に、分子をタンパク質に結合させると、タンパク質と意図した標的との結合相互作用が減少する結果になることがしばしば見られた。いくつかの実施形態では、活性部位の外側の場所に結合した場合、予想されたのと同じレベルの減少が必ずしも観察されるわけではない。本明細書で提示されるエビデンスは、予想されていたものとは逆の効果を示している。いくつかの実施形態では、理論に限定されるものではないが、複合体は抗体単独よりも優れている可能性がある。例えば、リガンドとその特定の受容体との相互作用は、リガンド上の親水性アミノ酸と受容体上の親水性アミノ酸との相互作用によって指示される、リガンドと受容体の立体特異的相互作用によって駆動されることが多く、水分子がそれらの相互作用の中心となる。同時に、この親水性立体特異性は、通常疎水性アミノ酸同士によって媒介／生成される非特異的な疎水性相互作用を重視しない及び／又は抑制することによってさらに強化される。

20

【0269】

いくつかの実施形態では、VEGFリガンド(「VEGFL」)とVEGF受容体(「VEGFR」)との間の相互作用を少なくとも90%阻害することができる抗VEGF抗体複合体が提供される。例えば、VEGFRとVEGFLとの間の相互作用の少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、又は実質的に全てを阻害できる。いくつかの実施形態では、注目される阻害は飽和濃度で生じる。いくつかの実施形態では、VEGFリガンドとVEGF受容体との間の相互作用を少なくとも95%阻害する抗VEGF抗体複合体が提供される。このような阻害の優位性の一例としては、抗VEGF抗体バイオコンジュゲート(本明細書で提供される抗体複合体、例えばKSI-301)が、ルセンチス(LUCENTIS(登録商標))(ラニビズマブ(Ranibizumab))若しくはアバスチン(AVASTIN(登録商標))(ベバシズマブ(Bevacizumab))又は抗体OG1950(非複合体型)よりも高い程度に阻害する能力が挙げられる。実際、この結果は予想外のものである。抗体にポリマーを添加すると(抗体複合体を形成するため)、抗体の結合／活性に何らかの悪影響があるか、または全くないと考えられる一方で、このようにして抗体の阻害能力が実際に向上するとは予想外である。

30

【0270】

いくつかの実施形態では、前記抗体又はその複合体は、VEGFRとVEGFLとの間の活性及び／又は相互作用の少なくとも70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%を阻害する。いくつかの実施形態では、IC50値は、0.1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、100 nM、又は前述の値の1つ以上より小さい値になる。いくつかの実施形態では、KDは 2×10^{-13} 、 1×10^{-13} 、 1×10^{-12} 、 1×10^{-11} 、若しくは 1×10^{-10} M又は前述の値のいずれかより小さくなる。いくつかの実施形態では、IC50値は、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、又は前述の値のいずれかより小さい値になる。

40

50

【0271】

いくつかの実施形態では、VEGFリガンドとVEGF受容体との間の相互作用を少なくとも90%阻害する抗VEGF抗体が提供される。例えば、VEGFRとVEGFLとの間の相互作用の少なくとも91、92、93、94、95、96、97、98、99、又は実質的に全てを阻害できる。このような阻害の優位性の一例として、OG1950（及び本明細書で提供される抗体）は、ルセンチス（LUCENTIS（登録商標））（ラニズマブ（Ranibizumab））又はアバスチン（AVASTIN（登録商標））（ベバシズマブ（Bevacizumab））よりも高い程度に阻害する能力がある。

【0272】

いくつかの実施形態では、ルセンチス（登録商標）（ラニズマブ）又はアバスチン（登録商標）（ベバシズマブ）などの他の抗体は、本明細書に記載されている1又は複数のプロセスによって、本明細書に記載されている1又は複数のポリマーに結合させることができる。いくつかの実施形態では、任意の抗体又はその断片は、本明細書に記載されている1又は複数のプロセスによって、本明細書に記載されている1又は複数のポリマーに結合させることができる。

【0273】

いくつかの実施形態では、前記抗体は、配列番号7～13、19～27、89、90、及び256～262のうち少なくとも1つを含む重鎖アミノ酸可変領域と、配列番号91～93及び28～30のうち少なくとも1つを含む軽鎖アミノ酸可変領域とを含む。いくつかの実施形態では、前記抗体は、本明細書で提供されるポリマーの1又は複数に結合される。いくつかの実施形態では、前記複合体抗体は、配列番号7～13、19～27、89、90、及び256～262の少なくとも1つ並びに／又は配列番号91～93及び28～30の少なくとも1つと少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態では、前記抗体には、配列番号7～13、19～27、89、90、及び256～262の少なくとも1つと配列番号91～93及び28～30の少なくとも1つとに含まれる6つのCDR、並びにL443C（又は449C、EU番号付け）の点変異が含まれる。いくつかの実施形態では、前記複合体抗体は、配列番号7～13、19～27、89、90、及び256～262の少なくとも1つ並びに／又は配列番号91～93及び28～30の少なくとも1つと少なくとも90%同一であり、以下の変異：L234A、L235A、及びG237A（EU番号付け）、並びに以下の変異の少なくとも1つ：Q347C（EU番号付け）又はL443C（EU番号付け）を含む。

【0274】

いくつかの実施形態では、VEGF-Aに結合する抗体が提供される。前記抗体は、配列番号172のCDRH1であるCDRH1、配列番号173のCDRH2であるCDRH2、配列番号174のCDRH3であるCDRH3、配列番号199のCDRL1であるCDRL1、配列番号200のCDRL2であるCDRL2、配列番号201のCDRL3であるCDRL3、以下の変異（EU番号付け）のうち少なくとも1つ：L234A、L235A、及びG237A、並びに以下の変異（EU番号付け）のうち少なくとも1つ：Q347C又はL443Cを含む。

【0275】

当業者であれば理解できるように、本明細書に照らして、本明細書で提供される抗体のいずれかは、本明細書で提供されるポリマーのいずれかに結合させることができ、及び／又は本明細書で提供される抗体のいずれかには、ポリマーへの部位特異的結合を可能にするためにシステイン付加を有し得る。

【0276】

「VEGF」又は「血管内皮増殖因子」は、血管新生又は血管形成プロセスに影響を与えるヒト血管内皮増殖因子である。特に、VEGFという用語は、（i）VEGFR-1（Flt-1）、VEGFR-2（KDR／Flk-1）、又はVEGFR-3（Flt-4）などのVEGF受容体に結合し、（ii）VEGF受容体に関連するチロシンキナ

10

20

30

40

50

ーゼ活性を活性化し、(iii) それによって血管新生又は血管新生プロセスに影響を及ぼす増殖因子のクラスの任意のメンバーを意味する。

【0277】

VEGF因子ファミリーは、5つの関連糖タンパク質、VEGF-A (VPEとしても公知)、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、及びPGF (胎盤増殖因子) で構成されている。これらのうち、VEGF-Aは最もよく研究されており、抗血管新生療法の標的となっている (Ferrara et al., (2003) Nat. Med.

9:669-676)。VEGF-Aは、選択的スプライシング及びタンパク質分解の両方によって生成される、VEGF-A₂₀₆、VEGF-A₁₈₉、VEGF-A₁₆₅、及びVEGF-A₁₂₁といった様々なアイソタイプとして存在する。アイソフォームは、ヘパリンとニューロピリンと呼ばれる非シグナル伝達結合タンパク質に結合する能力が異なる。アイソフォームは全て二量体として生物学的に活性である。

【0278】

VEGFの様々な効果は、VEGF、例えばVEGF-A (P15692)、VEGF-B (P49766)、VEGF-C (P49767)、及びVEGF-D (Q43915) が受容体チロシンキナーゼ (RTK) に結合することによって媒介される。VEGFファミリー受容体はクラスVRTKに属し、それぞれ細胞外ドメイン (ECD) に7つのIg様ドメインを有する。ヒトでは、VEGFは3種類のRTKに結合する: VEGFR-1 (Flt-1) (P17948)、VEGFR-2 (KDR、Flk-1) (P935968)、及びVEGFR-3 (Flt-4) (P35916)。文脈から特に断りのない限り、VEGFとは、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、及びPGFのいずれか、又は天然型と少なくとも90%、95%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する天然アイソフォーム、天然バリエーション、若しくは誘導バリエーションのいずれかを意味する。いくつかの実施形態では、このようなVEGFはヒトVEGFである。同様に、VEGFRへの言及は、VEGR-1、VEGR-2、又はVEGR-3のいずれかを意味し、これには、あらゆる天然アイソフォーム若しくは天然バリエーション、又は天然配列に対して少なくとも90%、95%、98%、99%、若しくは100%の配列同一性を有する誘導バリエーションが含まれる。

【0279】

VEGFアンタゴニスト療法は、特定のがん及び滲出性AMDの治療に承認されている。ベバシズマブ (AVASTIN、Genentech/Roche社) は、ヒトVEGF、特にVEGF-Aの全てのアイソフォーム及びVEGF-Aの生物活性タンパク質分解断片に結合して中和するヒト化マウスモノクローナル抗体である。例えば、Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. 2004. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. Nat Rev Drug Discov. 3(5):391-400を参照。ベバシズマブは特定のがんの治療薬として承認されている。

【0280】

ベバシズマブ可変軽鎖CDRは、CDRL1: SASQDISNYLN (配列番号749)、CDRL2: FTSSLHS (配列番号750)、及びCDRL3: QQYSTVPWT (配列番号751) である。ベバシズマブ可変重鎖CDRは、CDRH1: GYTF TNYGMN (配列番号752)、CDRH2: WINTYTGEPTYAADFKR (配列番号753)、及びCDRH3: YPHYYGSSHWYFDV (配列番号755) である。CDRはKabatt (カバット) によって定義されるが、CDRH1ではKabatt/Chothia (コチア) を合わせた定義が使用される。いくつかの実施形態では、システインをベバシズマブ配列に付加することができ、抗体 (及び/又はベバシズマブの6つのCDRを含むバリエーション) を本明細書に記載されているポリマーのいずれか1又は複数に結合させることができる。いくつかの実施形態では、ベバシズマブ又はラニズマブのCDRは、本明細書で提供される組成物及び方法において使用され得る。

【0281】

ベバシズマブと同じマウスモノクローナル抗体から派生した別の抗VEGF分子であるラニビズマブ（LUCENTIS（登録商標）、Genentech／Roche社）が、湿性AMDの治療薬として承認されている。ラニビズマブは抗体断片又はFabである。ラニビズマブは、ベバシズマブの可変重鎖と軽鎖との親和性成熟によって生成された。いくつかの実施形態では、システインをラニビズマブ配列に付加することができ、抗体（及び／又はラニビズマブの6つのCDRを含むバリエーション）を本明細書に記載されているポリマーのいずれか1又は複数に結合させることができる。

【0282】

ラニビズマブのCDRは、親和性成熟後に改良が加えられた点を除いて、ベバシズマブと同じである。ラニビズマブ可変軽鎖CDRは、CDRL1：SASQDISNYLN（配列番号749）、CDRL2：FTSSLHS（配列番号750）、及びCDRL3：QQYSTVPWT（配列番号751）である。ラニビズマブ可変重鎖CDRは、CDRH1：GYDFTHYGMN（配列番号754）、CDRH2：WINTYTGEPTYAADFKR（配列番号753）、及びCDRH3：YPYYYGTSHWYFDV（配列番号756）である。

【0283】

いくつかの実施形態では、抗VEGF-A抗体を抗体の可変領域の外側のシステインでホスホリルコリン含有ポリマーに結合させた抗体複合体が提示され、システインは組換えDNA技術によって付加されている。いくつかの実施形態では、前記ポリマーは単一のシステインに結合している。いくつかの実施形態では、「組換えDNA技術によって付加される」とは、システイン残基が、公知又は既存の抗体若しくはコンセンサス抗体配列内の同じ位置に存在する非システインアミノ酸を置換することを意味する。したがって、例えば、前記抗体がIgG1であり、重鎖のEU位置443にロイシンがある場合、ロイシンは組換えDNA技術によってシステイン（L443C、EU番号付け、又は449C）に置換される。同様に、EU番号付け347位の天然IgG1配列はQ（グルタミン）であり、Qは組換えDNA技術によってシステインに置換され、Q347Cが生成される。

【0284】

いくつかの実施形態では、抗VEGF-A抗体は軽鎖及び重鎖を含み、前記重鎖はFc領域を有する。いくつかの実施形態では、前記システインはFc領域にあり、抗VEGF-A抗体は免疫グロブリンG（IgG）である。いくつかの実施形態では、前記抗VEGF-A重鎖はCDRH1：GYDFTHYGMN（配列番号754）、CDRH2：WINTYTGEPTYAADFKR（配列番号753）、及びCDRH3：YPYYYGTSHWYFDV（配列番号756）を有し、221位はTであり、抗VEGF-A軽鎖はCDRL1：SASQDISNYLN（配列番号749）、CDRL2：FTSSLHS（配列番号750）、及びCDRL3：QQYSTVPWT（配列番号751）を有し、Kabattの4位はLである。

【0285】

いくつかの実施形態では、前記抗VEGF-A重鎖アイソタイプはIgG1である。いくつかの実施形態では、前記IgG1定常ドメインには、エフェクター機能を調節するためのIgG1定常ドメインに対する1又は複数の変異を有する。いくつかの実施形態では、エフェクター機能変異は、以下の1又は複数である：E233X、L234X、L235X、G236X、G237X、A327X、A330X、及びP331X（EU番号付け）（Xは任意の天然又は非天然アミノ酸である）。いくつかの実施形態では、変異は、E233P、L234V、L234A、L235A、G237A、A327G、A330S、及びP331S（EU番号付け）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、前記抗体複合体は、以下の変異を有する：

L234A、L235A、及びG237A（EU番号付け）。

【0286】

いくつかの実施形態では、前記システイン残基は抗VEGF-A重鎖にあり、Q347

10

20

30

40

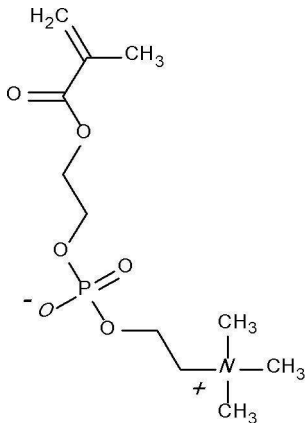
50

C (EU 番号付け) 又は L 4 4 3 C (EU 番号付け) である。いくつかの実施形態では、前記システイン残基は L 4 4 3 C (又は 4 4 9 C、EU 番号付け) である。いくつかの実施形態では、抗 V E G F - A 重鎖の配列は配列番号 7 ~ 1 3、1 9 ~ 2 7、8 9、9 0、及び 2 5 6 ~ 2 6 2 であり、軽鎖配列は配列番号 9 1 ~ 9 3 及び 2 8 ~ 3 0 の少なくとも 1 つを含む。

【0287】

いくつかの実施形態では、前記ホスホリルコリン含有ポリマーは、以下に示す 2 - (メタクリロイルオキシエチル) - 2' - (トリメチルアンモニウム) エチルホスフェート (MPC) モノマーを含む：

【化28】

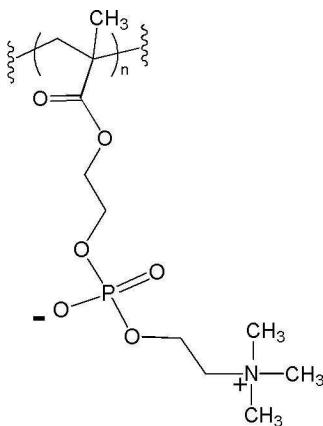


10

20

(ポリマーは以下の繰り返し単位を含む)：

【化29】



30

；(n は 1 ~ 3 0 0 0 までの整数であり、波線はポリマー内のモノマー単位間の接続点を示す)。

【0288】

いくつかの実施形態では、前記ポリマーは 3 本以上のアームを有するか、又は 3 個以上のポリマー開始部位を含む開始剤を用いて合成される。いくつかの実施形態では、前記ポリマーは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、若しくは 12 本のアームを有するか、又は 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、若しくは 12 個のポリマー開始部位を含む開始剤を用いて合成される。より好ましくは、前記ポリマーは 3、6、若しくは 9 本のアームを有し、又は 3、6、若しくは 9 個のポリマー開始部位を含む開始剤を使用して合成される。いくつかの実施形態では、前記ポリマーは 9 本のアームを有し、又は 9 個のポリマー開始部位を含む開始剤を使用して合成される。

40

【0289】

いくつかの実施形態では、添加されるポリマーの分子量は約 3 0 0 , 0 0 0 ~ 約 1 , 7 5 0 , 0 0 0 D a (S E C - M A L) である。いくつかの実施形態では、前記ポリマーの

50

分子量は約 500,000～約 1,000,000 Da である。いくつかの実施形態では、前記ポリマーの分子量は約 600,000～約 900,000 Da である。いくつかの実施形態では、前記ポリマーの分子量は約 750,000～約 850,000 Da である。いくつかの実施形態では、前記ポリマーの分子量は約 800,000～約 850,000 Da である。いくつかの実施形態では、前記ポリマーの分子量は約 750,000～約 800,000 Da である。

【0290】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている抗体はいずれも、さらにポリマーと結合してバイオコンジュゲートを形成することができる。バイオコンジュゲート（SEC-MAL 全体）の分子量は、約 350,000～2,000,000 ダルトンの範囲内であり、例えば、約 450,000～1,900,000 ダルトン、約 550,000～1,800,000 ダルトン、約 650,000～1,700,000 ダルトン、約 750,000～1,600,000 ダルトン、約 850,000～1,500,000 ダルトン、約 900,000～1,400,000 ダルトン、約 950,000～1,300,000 ダルトン、約 900,000～1,000,000 ダルトン、約 1,000,000～1,300,000 ダルトン、約 850,000～1,300,000 ダルトン、約 850,000～1,000,000 ダルトン、約 1,000,000～1,200,000 ダルトンである。

【0291】

いくつかの実施形態では、前記抗体複合体は精製されている。いくつかの実施形態では、前記ポリマーは抗体複合体の側面が多分散である、すなわち、ポリマー PDI は 1.0 ではない。いくつかの実施形態では、前記 PDI は 1.5 未満である。いくつかの実施形態では、前記 PDI は 1.4 未満である。いくつかの実施形態では、前記 PDI は 1.3 未満である。いくつかの実施形態では、前記 PDI は 1.2 未満である。いくつかの実施形態では、前記 PDI は 1.1 未満である。

【0292】

いくつかの実施形態では、前記抗体複合体は、MPC モノマーを含むポリマーに結合した抗 VEGF-A 免疫グロブリン G (IgG) を含み、抗 VEGF-A 重鎖の配列は配列番号 7～13、19～27、89、90、及び 256～262 であり、軽鎖配列は配列番号 91～93 及び 28～30 の少なくとも 1 つを含み、並びに前記抗体が C449 のみで前記ポリマーに結合している。いくつかの実施形態では、前記ポリマーは 9 本のアームを有し、分子量は約 600,000～約 1,000,000 Da である。

【0293】

いくつかの実施形態では、前記抗体複合体は、MPC モノマーを含むポリマーに結合した抗 VEGF-A 免疫グロブリン G (IgG) を含み、前記抗 VEGF-A 抗体重鎖の配列は、配列番号 7～13、19～27、89、90、及び 256～262 であり、抗 VEGF-A 抗体軽鎖の配列は、配列番号 91～93 及び 28～30 であり、並びに前記抗体が C443（又は 449C、EU 番号付け）のみで前記ポリマーに結合している。いくつかの実施形態では、前記ポリマーは 9 本のアームを有し、分子量は約 600,000～約 1,000,000 Da である。

【0294】

いくつかの実施形態では、前記抗体複合体が下記式（I）の構造を有する：

10

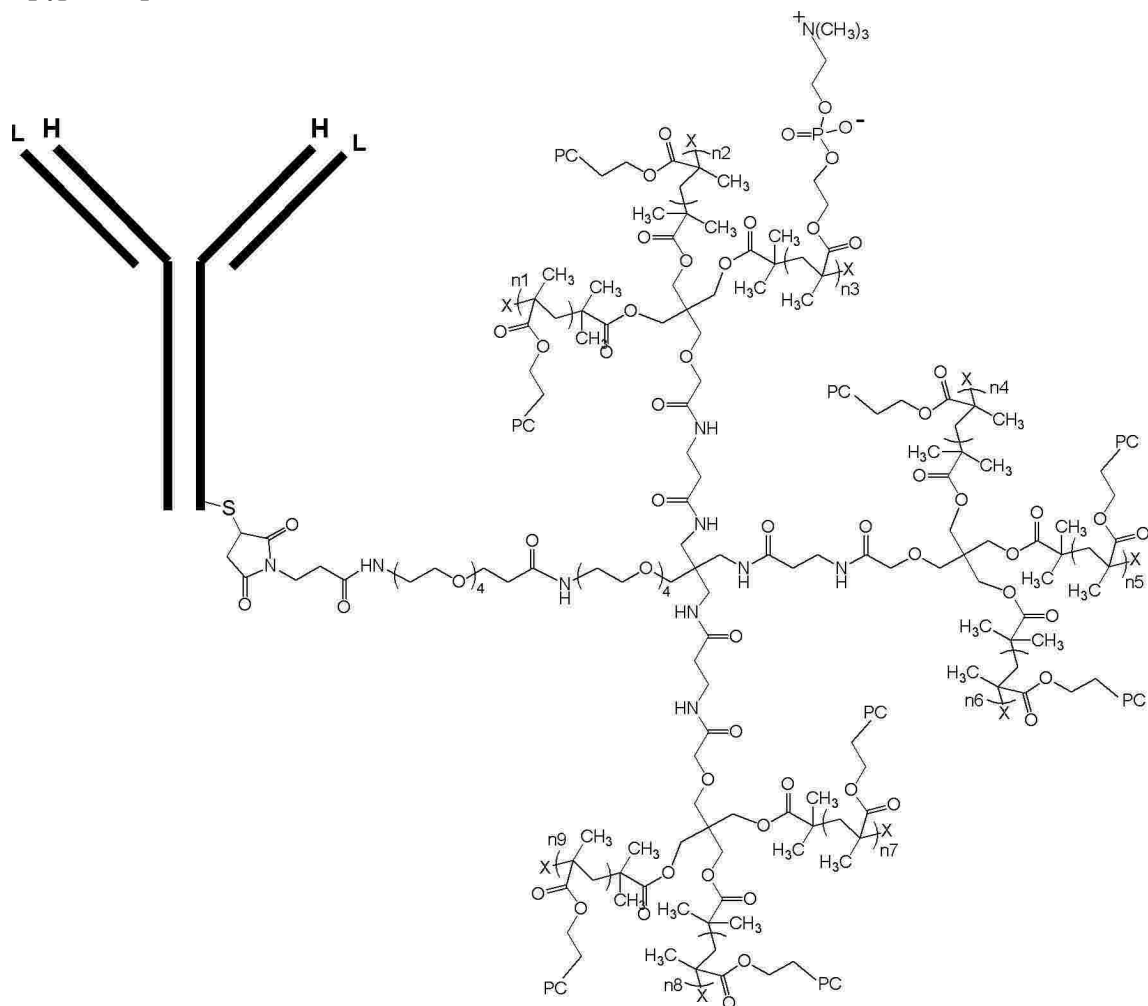
20

30

40

50

【化 3 0】



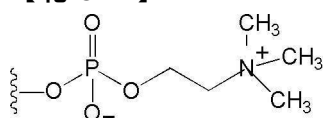
10

20

式中、抗 V E G F - A 抗体の各重鎖は文字 H で示されると共に、抗 V E G F - A 抗体の各軽鎖は文字 L で示され、前記ポリマーは、C 4 4 9 のスルフヒドリルを介して前記抗 V E G F - A 抗体に結合し、この結合は重鎖の 1 つに示されており、P C は

30

【化 3 1】



(式中、波線はポリマーの残りの部分への接続点を示す) であり、X は、a) -O R (R は -H、メチル、エチル、プロピル、又はイソプロピル)、b) -H、c) -B r、-C l、若しくは -I を含む任意のハロゲン、d) -S C N、又は e) -N C S であり、並びに n 1、n 2、n 3、n 4、n 5、n 6、n 7、n 8、及び n 9 の合計が 2 5 0 0 ± 1 5 % であるように、n 1、n 2、n 3、n 4、n 5、n 6、n 7、n 8、及び n 9 は同じか異なる。いくつかの実施形態では、n 1、n 2、n 3、n 4、n 5、n 6、n 7、n 8、及び n 9 は同じか異なり、0 ~ 3 0 0 0 までの整数である。いくつかの実施形態では、n 1、n 2、n 3、n 4、n 5、n 6、n 7、n 8、及び n 9 は同じか異なり、0 ~ 5 0 0 までの整数である。いくつかの実施形態では、X は -O R であり、R は糖、アミノアルキル、又は以下の残基の一置換、多置換、若しくは非置換のバリエーションであり：飽和 C₁ ~ C₂₄ アルキル、不飽和 C₂ ~ C₂₄ アルケニル若しくは C₂ ~ C₂₄ アルキニル、アシル、アシルオキシ、アルキルオキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、ヘテロアリール、アリールアルコキシカルボニル、アルコキシカルボニルアシル、アミノ、アミ

40

50

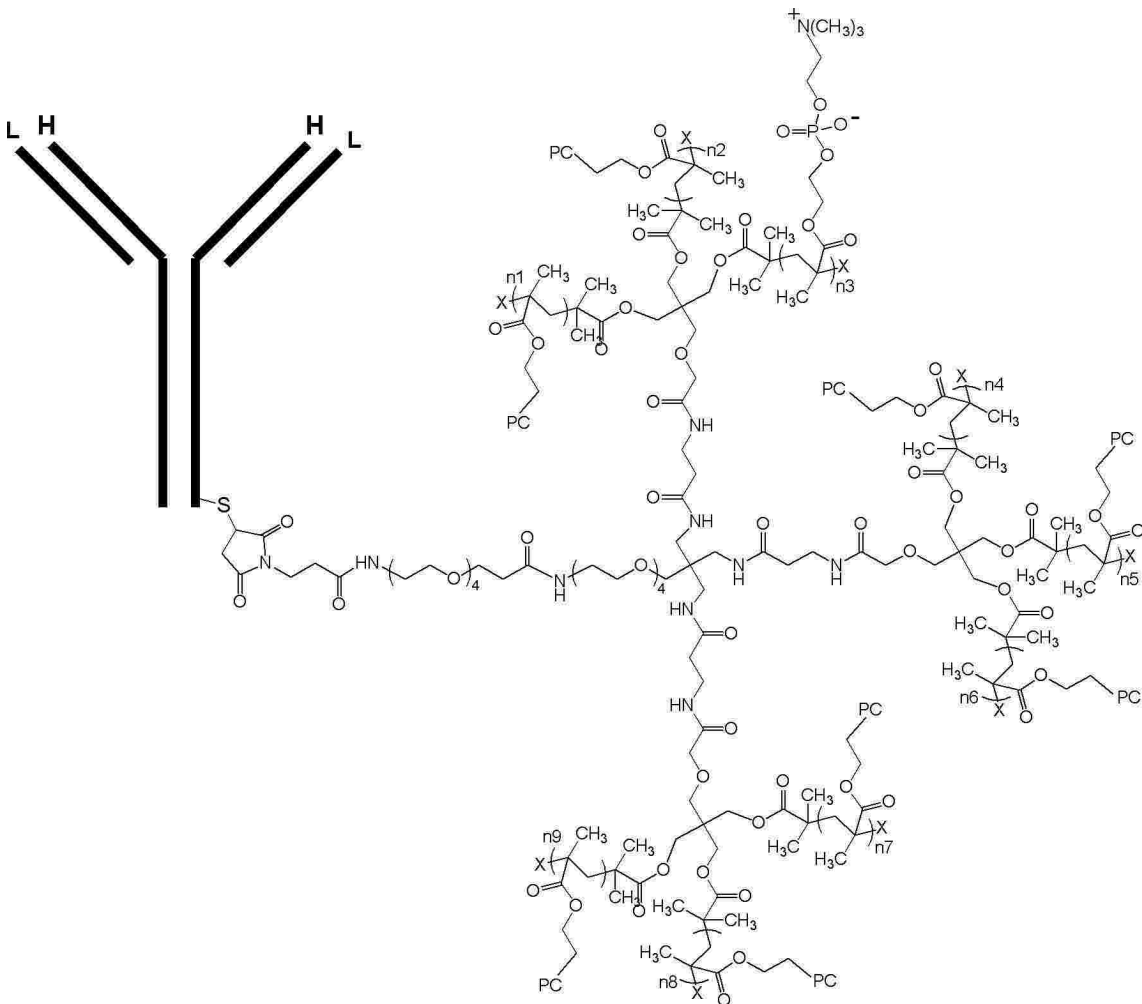
ノカルボニル、アミノカルボイルオキシ、ニトロ、アジド、フェニル、ヒドロキシ、アルキルチオ、アリールチオ、オキシスルホニル、カルボキシ、シアノ、及びポリハロゲン化アルキルを含むハロゲン化アルキル、 $-\text{CO}-\text{O}-\text{R}_7$ 、カルボニル $-\text{C}(\text{O})-\text{R}_7$ 、 $-\text{CO}-\text{NR}_8\text{R}_9$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{COOR}_7$ 、 $-\text{CO}-(\text{CH})_n-\text{COOR}_7$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{NR}_8\text{R}_9$ 、エステル、アルコキシカルボニル、又はアリールオキシカルボニル、 n は1～6の整数であり、 R_7 、 R_8 、及び R_9 はそれぞれ、水素原子、ハロゲン原子、及び以下の残基の一置換、多置換、若しくは非置換のバリエーションから別々に選択される：飽和 $\text{C}_{1\sim 24}$ アルキル、不飽和 $\text{C}_{2\sim 24}$ アルケニル又は $\text{C}_{2\sim 24}$ アルキニル、アシル、アシルオキシ、アルキルオキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、ヘテロアリール、アリールアルコキシカルボニル、アルコキシカルボニルアシル、アミノ、アミノカルボニル、アミノカルボイルオキシ、ニトロ、アジド、フェニル、ヒドロキシ、アルキルチオ、アリールチオ、オキシスルホニル、カルボキシ、シアノ、並びにポリハロゲン化アルキル、5員環、及び6員環を含むハロゲン化アルキル。

10

【0295】

いくつかの実施形態では、前記抗体複合体が式(I)の構造を有する：

【化32】



20

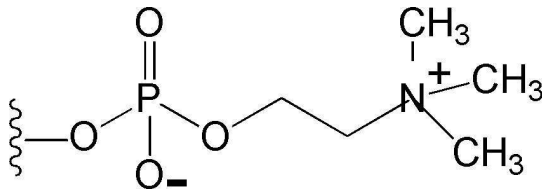
30

40

式中、抗VEGF-A抗体の各重鎖は文字Hで示されると共に、抗VEGF-A抗体の各軽鎖は文字Lで示され、前記ポリマーは、C443（又は449C、EU番号付け）のスルフィドヒドリルを介して前記抗VEGF-A抗体に結合し、この結合は重鎖の1つに示されており、PCは

50

【化 3 3】



(式中、波線はポリマーの残りの部分への接続点を示す)であり、Xは、a) $-OR$ (R は $-H$ 、メチル、エチル、プロピル、又はイソプロピル)、b) $-H$ 、c) $-Br$ 、 $-Cl$ 、若しくは $-I$ を含む任意のハロゲン、d) $-SCN$ 、又はe) $-NCS$ であり、並びに n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 、 n_8 、及び n_9 の合計が $2500 \pm 15\%$ であるように、 n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 、 n_8 、及び n_9 は同じか異なる。いくつかの実施形態では、 n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 、 n_8 、及び n_9 は同じか異なり、 $0 \sim 3000$ までの整数である。いくつかの実施形態では、 n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 、 n_8 、及び n_9 は同じか異なり、 $0 \sim 500$ までの整数である。いくつかの実施形態では、XはORであって、Rは糖、アミノアルキル、又は以下の残基の一置換、多置換、若しくは非置換のバリエーションであり：飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_2 \sim C_{24}$ アルケニル若しくは $C_2 \sim C_{24}$ アルキニル、アシル、アシルオキシ、アルキルオキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、ヘテロアリール、アリールアルコキシカルボニル、アルコキシカルボニルアシル、アミノ、アミノカルボニル、アミノカルボイルオキシ、ニトロ、アジド、フェニル、ヒドロキシ、アルキルチオ、アリールチオ、オキシスルホニル、カルボキシ、シアノ、及びポリハロゲン化アルキルを含むハロゲン化アルキル、 $-CO-O-R_7$ 、カルボニル $-CCO-R_7$ 、 $-CO-NR_8R_9$ 、 $-(CH_2)_n-COOR_7$ 、 $-CO-(CH)_n-COOR_7$ 、 $-(CH_2)_n-NR_8R_9$ 、エステル、アルコキシカルボニル、又はアリールオキシカルボニル、 n は $1 \sim 6$ の整数であり、 R_7 、 R_8 、及び R_9 はそれぞれ、水素原子、ハロゲン原子、及び以下の残基の一置換、多置換、若しくは非置換のバリエーションからなる群から別々に選択される：飽和 $C_1 \sim C_{24}$ アルキル、不飽和 $C_2 \sim C_{24}$ アルケニル又は $C_2 \sim C_{24}$ アルキニル、アシル、アシルオキシ、アルキルオキシカルボニルオキシ、アリールオキシカルボニルオキシ、シクロアルキル、シクロアルケニル、アルコキシ、シクロアルコキシ、アリール、ヘテロアリール、アリールアルコキシカルボニル、アルコキシカルボニルアシル、アミノ、アミノカルボニル、アミノカルボイルオキシ、ニトロ、アジド、フェニル、ヒドロキシ、アルキルチオ、アリールチオ、オキシスルホニル、カルボキシ、シアノ、並びにポリハロゲン化アルキル、5員環、及び6員環を含むハロゲン化アルキル。いくつかの実施形態では、このコンストラクトはKSI-301と命名されている。

【0296】

いくつかの実施形態では、前記抗体複合体は液体製剤として存在する。いくつかの実施形態では、前記抗体複合体は、薬学的に許容される担体と組み合わせられる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法のいずれかは、以下の薬物製剤を使用することができる：a) 0.025% (w/w) ポリソルベート20を含む 12.5 mM リン酸ナトリウム緩衝液、 $pH 6.5$ 、濃度 50 mg/mL (抗体質量に基づく)、抗体-バイオポリマー複合体の総質量 324 mg/mL に相当、 50 mg/mL OG1950抗体中間体及び 274 mg/mL OG1802バイオポリマー中間体を含む；b) $0.01 \sim 0.5\%$ (w/w) ポリソルベート20を含む $10 \sim 15\text{ mM}$ リン酸ナトリウム緩衝液、 $pH 6.5$ 、濃度約 50 mg/mL (抗体質量に基づく)、抗体-バイオポリマー複合体の総質量の約 324 mg/mL に相当する；c) 12.5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (所望により 0.025% (w/w) ポリソルベート20、 $pH 6.5$ 、濃度 50 mg/mL (抗体質量に基づく)、抗体-バイオポリマー複合体の総質量 324 mg/mL に相当、 50 mg/mL OG1950抗体中間体及び 274 mg/mL OG1802バイオポリマー

中間体を含む；d）ポリソルベート20を含むリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.5、濃度50mg/mL（抗体質量に基づく）、抗体-バイオポリマー複合体の総質量の約324mg/mLに相当、約50mg/mLのOG1950抗体中間体及び約274mg/mLのOG1802バイオポリマー中間体を含む；e）0.01~0.5%（w/w）ポリソルベート20を含む10~15mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.5、濃度約40~55mg/mL（抗体質量に基づく）、抗体-バイオポリマー複合体の総質量の約259~356mg/mLに相当；f）0.01~0.5%（w/w）ポリソルベート20を含む10~15mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.5、濃度約45~52.5mg/mL（抗体質量に基づく）、抗体-バイオポリマー複合体の総質量の約292~340mg/mLに相当；又はg）0.01~0.5%（w/w）ポリソルベート20を含む10~15mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.5、濃度約40~55mg/mL（抗体質量に基づく）、抗体-バイオポリマー複合体の総質量の約259~356mg/mLに相当。これらのいずれの製剤においても、前記抗体は、図8のVH及びVL（又はこれらのVH及び／若しくはVL配列内の1、2、3、4、5、若しくは6つのCDR全て）、例えばOG1950（例えば、配列番号1、15-18、及び2）を使用することができる。

10

【0297】

いくつかの実施形態では、抗VEGF-A抗体が提示されている。前記抗VEGF-A抗体重鎖は、少なくとも以下のCDR配列を有する：

CDRH1：配列番号172のCDRH1、CDRH2：配列番号173のCDRH2、及びCDRH3：配列番号174のCDRH3。いくつかの実施形態では、抗VEGF-A重鎖にはこれらのCDRがあり、さらに221位にトレオニン（T）がある。いくつかの実施形態では、抗VEGF-A軽鎖は、少なくとも以下のCDRを有する：CDRL1：配列番号199のCDRL1、CDRL2：配列番号200のCDRL2、及びCDRL3：配列番号201のCDRL3。いくつかの実施形態では、前記抗VEGF-A抗体にはこれらのCDRがあり、さらにKababの4位にロイシン（L）がある。いくつかの実施形態では、前記抗VEGF-A抗体重鎖のアイソタイプはIgG1であり、CH1、ヒンジ、CH2、及びCH3ドメインを有する。いくつかの実施形態では、軽鎖アイソタイプはκである。いくつかの実施形態では、前記抗VEGF抗体複合体（例えば、KSI-301）コンストラクトには、これらのCDRが1又は複数含まれる。

20

30

【0298】

いくつかの実施形態では、前記抗VEGF-A抗体のIgG1ドメインは、ADCC、ADCP、CDCなどのエフェクター機能を調節する1又は複数の変異を有する。いくつかの実施形態では、IgG1変異はエフェクター機能を低下させる。いくつかの実施形態では、エフェクター機能の変異に使用するアミノ酸には、E233X、L234X、L235X、G236X、G237X、G236X、D270X、K322X、A327X、P329X、A330X、A330X、P331X、及びP331X（EU番号付け）が含まれ、Xは任意の天然又は非天然アミノ酸である。いくつかの実施形態では、変異には、E233P、L234V、L234A、L235A、G237A、A327G、A330S、及びP331S（EU番号付け）のうち1又は複数が含まれる。いくつかの実施形態では、抗VEGF-A重鎖は、以下の変異を有する：L234A、L235A、及びG237A（EU番号付け）。いくつかの実施形態では、天然のヒトIgG1配列に対するエフェクター機能変異の数は10以下である。いくつかの実施形態では、天然のヒトIgG1配列に対するエフェクター機能変異の数は、5、4、3、2、又は1以下である。いくつかの実施形態では、前記抗体のFcγ結合及び／又は補体C1q結合が減少しているため、抗体のエフェクター機能をもたらす能力が低下している。これは、眼科の適応症／疾患に特に有利である。

40

【0299】

いくつかの実施形態では、前記抗VEGF-A抗体は、L234A、L235A、G237A（EU番号付け）、及びL443C（又は449C、EU番号付け）の1又は複数

50

のアミノ酸変異を含む。

【0300】

いくつかの実施形態では、前記抗VEGF-A抗体は、ヒト免疫グロブリンG (IgG1) であるか、又はその一部である。

【0301】

いくつかの実施形態では、前記VEGF-A抗体は、免疫介在性エフェクター機能を低下させる1又は複数の変異を含む重鎖定常ドメインを含む。

【0302】

いくつかの実施形態では、抗VEGF-A抗体が提供される。抗VEGF抗体は、配列番号172のCDRH1である配列を含むCDRH1、配列番号173のCDRH2である配列を含むCDRH2、配列番号174のCDRH3である配列を含むCDRH3、配列番号199のCDRL1である配列を含むCDRL1、配列番号200のCDRL2である配列を含むCDRL2、及び配列番号201のCDRL3である配列を含むCDRL3を含む重鎖を含む。

【0303】

あるいは、IgGドメインは、IgG2、IgG3、又はIgG4であるか、定常領域がこれらのアイソタイプのうちの1つ以上から形成された混合物（例えば、IgG2又はIgG4からのCH1領域、IgG1からのヒンジ、CH2、及びCH3領域）であり得る。このようなドメインには、IgG1について言及されているEU位置の1又は複数のエフェクター機能を低下及び／又は調節する変異が含まれる場合がある。ヒトIgG2及びIgG4は、ヒトIgG1及びIgG3に比べてエフェクター機能が低下している。

【0304】

抗VEGF-A重鎖には、組換えDNA技術によって変異として付加されたシステイン残基があり、これを使用して半減期を延長する部分を結合することができる。いくつかの実施形態では、変異は、Q347C (EU番号付け) 及び／又はL443C (又は449C、EU番号付け) である。いくつかの実施形態では、変異はL443C (又は449C、EU番号付け) である。いくつかの実施形態では、ポリマーに対する抗体の化学量論は1:1である。換言すれば、複合体は1分子の抗体と1分子のポリマーとが結合したものである。

【0305】

抗VEGF-A抗体の半減期は、「半減期（「半減期」）延長部分」又は「半減期（「半減期」）延長基」を付加することによって延長することができる。半減期延長成分には、当該生物学的薬剤とフレーム内で発現できる（又は状況に応じて化学的に結合できる）ペプチド及びタンパク質、並びに-SH、-OH、-COOH、-CONH₂、-NH₂などの1又は複数のアミノ酸側鎖若しくは末端官能基、又は1又は複数のN-及び／又はO-グリカン構造に付着又は結合できる様々なポリマーが含まれる。半減期延長部分は、通常生物学的薬剤のインビボでの循環半減期を延長する働きをする。

【0306】

ペプチド／タンパク質の半減期を延長する部分としては、Fc融合体 (Capon DJ, Chamow SM, Mordenti J, et al. Designing CD4 immunoadhesions for AIDS therapy. Nature. 1989. 337:525-31)、ヒト血清アルブミン (HAS)

融合体 (Yeh P, Landais D, Lemaitre M, et al. Design of yeast-secreted albumin derivatives for human therapy: biological and antiviral properties of a serum albumin-CD4 genetic conjugate. Proc Natl Acad Sci USA. 1992. 89:1904-08)、カルボキシ末端ペプチド (CTP) 融合体 (Fares FA, Suganuma N, Nishimori K, et al. Design of a long-acting follitropin

10

20

30

40

50

agonist by fusing the C-terminal sequence of the chorionic gonadotropin beta subunit to the follitropin beta subunit. Proc Natl Acad Sci USA. 1992. 89:4304-08)、非正確な反復ペプチド配列の遺伝子融合(XTEN)融合体(Schellenberger V, Wang CW, Geething NC, et al. A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner. Nat Biotechnol. 2009. 27:1186-90)、エラスチン様ペプチド(ELPylation)(McPherson DT, Morrow C, Minehan DS, et al. Production and purification of a recombinant elastomeric polypeptide, G(VPGVG19-VPGV, from Escherichia coli. Biotechnol Prog. 1992. 8:347-52)、ヒトトランスフェリン融合体(Prior CP, Lai C-H, Sadehghi H et al. Modified transferrin fusion proteins. 国際公開第2004/020405号(2004))、プロリン-アラニン-セリン(PASylation)(Skerra A, Theobald I, Schlapsky M. Biological active proteins having increased in vivo and/or vitro stability. 国際公開第2008/155134号(2008))、ホモアミノ酸ポリマー(HAPylation)(Schlapsch y M, Theobald I, Mack H, et al. Fusion of a recombinant antibody fragment with a homo-amino acid polymer: effects on biophysical properties and prolonged plasma half-life. Protein Eng Des Sel. 2007. 20:273-84)、及びゼラチン様タンパク質(GLK)融合(Huang Y-S, Wen X-F, Zaro JL, et al. Engineering a pharmacologically superior form of granulocyte-colony-stimulating-factor by fusion with gelatin-like protein polymer. Eur J . Pharm Biopharm. 2010. 72:435-41)が挙げられる。
【0307】

ポリマーの半減期延長部分としては、ポリエチレングリコール(PEG)、分岐PEG、ポリPEG(登録商標)(Warwick Effect Polymers社、英国コベントリー)、ポリシアル酸(PSA)、デンプン、ヒドロキシエチルデンプン(HES)、ヒドロキシアルキルデンプン(HAS)、炭水化物、多糖類、プルラン、キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、ポリアルキレンオキシド(PAO)、ポリアルキレングリコール(PAG)、ポリプロピレングリコール(PPG)、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリエチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリスチレン-コ-マレイン酸無水物、ポリ(1-ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール)(PHF)、両性イオンポリマー、ホスホリルコリン含有ポリマー、並びにMPC、ポリ(Glyx-Sery)、ヒアルロン酸(HA)、ヘパロサンポリマー(HEP)、フレキシマー、デキストラン、及びポリシアル酸を含むポリマーが挙げられる。

【0308】

一実施形態では、半減期延長部分は、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステ

ルを使用して、タンパク質の遊離アミノ基を介して抗体に結合させることができる。アミノ基への結合を標的とする試薬は、リジンの ϵ -アミノ基、N末端アミノ酸の α -アミノ基、及びヒスチジンの δ -アミノ基にランダムに反応し得る。

【0309】

しかしながら、本明細書に開示される抗VEGF-A抗体は、ポリマー結合に利用可能なアミノ基を多数有する。したがって、ポリマーを遊離アミノ基に結合すると、抗体タンパク質がVEGFに結合する能力に悪影響を与えるおそれがある。

【0310】

いくつかの実施形態では、半減期延長部分は、マレイミド化学、又は事前の酸化後の抗体の炭水化物部分へのポリマーヒドラジド若しくはポリマーアミンの結合を含むがこれに限定されない、任意の適切なチオール反応性化学を使用して、1又は複数の遊離SH基に結合される。いくつかの実施形態では、マレイミドカップリングが使用される。いくつかの実施形態では、このカップリングは、天然に存在するシステイン、又は遺伝子工学によって導入されたシステインで起こる。

【0311】

いくつかの実施形態では、ポリマーは、部位特異的変異誘発によって抗VEGF-A抗体に導入されたシステイン残基に共有結合する。いくつかの実施形態では、前記システイン残基は抗体のFc部分に使用される。いくつかの実施形態では、Fc領域にシステイン残基を導入する部位は、国際公開第2013/093809号、米国特許第7,521,541号、国際公開第2008/020827号、米国特許第8,008,453号、米国特許第8,455,622号、及び米国特許出願公開第2012/0213705号に記載されており、これらの文献は、あらゆる目的で参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、システイン変異は、EU番号付けによるヒトIgG重鎖を指すQ347C(EU番号付け)及びL443Cである。

【0312】

いくつかの実施形態では、半減期延長剤として機能する抗体と高分子量ポリマーとの複合体が提供される。いくつかの実施形態では、複合体は、両性イオンポリマーに結合された抗体を含み、前記ポリマーは1又は複数のモノマー単位から形成され、少なくとも1つのモノマー単位は両性イオン基を有する。いくつかの実施形態では、前記両性イオン基はホスホリルコリンである。

【0313】

いくつかの実施形態では、前記モノマー単位の1つはHEMA-PCである。いくつかの実施形態では、ポリマーは、HEMA-PCという単一のモノマーから合成される。

【0314】

いくつかの実施形態では、いくつかの抗体複合体は、モノマーがHEMA-PCである2本、3本、又はそれ以上のポリマーアームを有する。いくつかの実施形態では、前記複合体は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12本のポリマーアームを有し、モノマーはHEMA-PCである。いくつかの実施形態では、前記複合体は、3、6、又は9本のアームを有する。いくつかの実施形態では、前記複合体は、9本のアームを有する。

【0315】

いくつかの実施形態では、ポリマー/抗体複合体には、分子量が100,000~1,500,000Daのポリマー部分がある。いくつかの実施形態では、前記複合体には、分子量が500,000~1,000,000Daのポリマー部分が含まれている。いくつかの実施形態では、前記複合体には、分子量が600,000~800,000Daのポリマー部分が含まれている。いくつかの実施形態では、前記複合体には、分子量が600,000~850,000Daのポリマー部分があり、9本のアームがある。ポリマーに結合した抗体が所定の分子量を有する場合、その分子量は、それに関連する炭水化物部分を含むタンパク質の分子量にポリマーの分子量を加えたものになる。

【0316】

いくつかの実施形態では、Mwで測定された分子量が約100kDa～1650kDaであるHEMA-PCポリマーを有する抗VEGF-A抗体が提供される。いくつかの実施形態では、Mwで測定されるポリマーの分子量は約500kDa～1000kDaである。いくつかの実施形態では、Mwで測定されるポリマーの分子量は、約600kDa～約900kDaである。いくつかの実施形態では、Mwで測定されたポリマーの分子量は750kDa±15%である。

【0317】

いくつかの実施形態では、前記ポリマーは、1又は複数のポリマー開始部位を有するATRPに適した開始剤から製造される。いくつかの実施形態では、前記ポリマー開始部位には2-ブロモイソ酪酸部位がある。いくつかの実施形態では、前記開始剤には3個以上のポリマー開始部位がある。いくつかの実施形態では、前記開始剤には3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12個のポリマー開始部位がある。いくつかの実施形態では、前記開始剤には3、6、又は9個のポリマー開始部位がある。いくつかの実施形態では、前記開始剤には9個のポリマー開始部位がある。いくつかの実施形態では、前記開始剤はOG1786である。

【0318】

前記抗VEGF-A抗体は、以下を含む組換え発現によって製造することができる：(i) 遺伝子工学による組み換えDNAの生産、(ii) 組換えDNAを、例えばトランスフェクション、エレクトロポレーション、又はマイクロインジェクションなどにより、原核細胞又は真核細胞に導入すること、(iii) 形質転換された細胞を培養すること、(iv) 抗体を発現する(例えば、恒常的又は誘導的に)こと、並びに(v) 前記抗体を、例えば、培養培地から又は形質転換された細胞を採取することによって単離することによって、(vi) 精製された抗体を得ること。

【0319】

抗VEGF-A抗体は、薬理学的に許容される抗体分子を産生することの特徴とする、適切な原核生物又は真核生物の宿主系での発現によって産生することができる。真核細胞としては、CHO、COS、HEK293、BHK、SK-Hip、及びHepG2などの哺乳類細胞が挙げられる。その他の適切な発現系としては、原核生物(例えば、pET/BL21発現系を使用した大腸菌)、酵母(サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)系及び/又はピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)系)、及び昆虫細胞がある。

【0320】

本明細書に開示される抗体の調製には、多種多様なベクターを使用することができ、真核生物及び原核生物の発現ベクターから選択される。原核生物発現用ベクターには、preset、pet、及びpadなどのプラスミドが含まれるが、これらに限定されるものではなく、原核生物発現ベクターで使用されるプロモーターには、lac、trc、trp、recA、及びaraBADの1又は複数が含まれるが、これらに限定されるものではない。真核生物発現用ベクターには、以下のものが挙げられる：(i) 酵母での発現には、AOX1、GAP、GAL1、又はAUG1などのプロモーターを使用するpAO、pPIC、pYES、又はpMETなどのベクター(これらに限定されない)；(ii) 昆虫細胞での発現には、PH、p10、MT、Ac5、OpIE2、gp64、又はpolhなどのプロモーター(これらに限定されない)を使用するpMT、pAc5、pIB、pMIB、又はpBACなどのベクター(これらに限定されない)；並びに(iii) 哺乳動物細胞での発現には、pSVL、pCMV、pRc/RSV、pcDNA3、又はpBPVなどのベクター、並びに一態様では、CMV、SV40、EF-1、UbC、RSV、ADV、BPV、及びベータアクチンなどのプロモーターを使用する、ワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、又はレトロウイルスなどのウイルス系に由来するベクター(これらに限定されない)。

【0321】

タンパク質をポリマーに結合する方法

いくつかの実施形態では、組換えDNA技術によってシステイン残基が付加された治療用タンパク質を、マレイミド、ビニルスルホン類、オルトピリジルジスルフィド類、及びγ-アセトアミド類からなる群から選択されるスルフヒドリル特異的反応基を有する半減期延長部分に結合させて治療用タンパク質半減期延長部分複合体を得る工程を含む、治療用タンパク質半減期延長部分複合体を調製する方法が提示される。

【0322】

いくつかの実施形態では、OG1950から抗VEGF抗体複合体、例えばKSI-301を調製する方法が提供される。前記方法は、OG1950タンパク質を30倍モル過剰のTCEP還元剤で還元することを含む。還元後、前記抗体は酸化され、前記抗体に天然に存在する軽鎖及び重鎖間（及び内部）にジスルフィド結合が形成される、脱キャップ（decapped）OG1950抗体が産生される。次に、賦形剤を加え、3～10倍モル過剰のマレイミドバイオポリマーを加えることで、OG1950を結合させる。前記バイオポリマーは共有チオールエーテル結合を介してOG1950抗体に連結する。結合後、抗VEGF抗体複合体（例えば、KSI-301）は、結合していない抗体及びポリマーの両方が除去されて精製される。

【0323】

上記で説明したタンパク質及びプロセスは変化させてもよい。したがって、いくつかの実施形態では、結合タンパク質（抗体又は抗VEGF抗体である必要はない）を調製するためのプロセスが提供される。前記プロセスには、タンパク質内の1又は複数のシステインを還元して、溶液中に脱キャップタンパク質を形成することが含まれる。1又は複数のシステインを還元した後、脱キャップタンパク質は再酸化され、還元されたタンパク質内の少なくとも1つのジスルフィド結合が復元されると同時に、タンパク質内の改変されたシステイン残基が遊離チオールの形態で残り、溶液中に再酸化された脱キャップタンパク質が確実に形成される。次に、少なくとも1つの賦形剤を溶液に添加する。前記賦形剤はポリマーによるタンパク質の沈殿を軽減する。前記賦形剤を添加した後、溶液にポリマーを添加し、改変されたシステイン残基で再酸化された脱キャップタンパク質に結合して結合タンパク質を形成する。

【0324】

いくつかの実施形態では、前記還元剤のモル過剰量は、機能する任意の量に変更することができる。いくつかの実施形態では、前記還元剤（全ての実施形態においてTCEPである必要はない）の10、20、30、40、50、60、70、80、又は90倍のモル過剰を使用することができる。いくつかの実施形態では、あらゆる抗体（治療用又はその他の抗体）を使用することができる。いくつかの実施形態では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15倍モル過剰のマレイミドバイオポリマーを使用することができる。いくつかの実施形態では、ポリマーに対して脱キャップタンパク質が過剰に存在する。いくつかの実施形態では、再酸化された脱キャップタンパク質、又は脱キャップタンパク質の量は、ポリマーの量よりも少ない。いくつかの実施形態では、再酸化された脱キャップタンパク質、又は脱キャップタンパク質の量は、ポリマーの量の90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、又は1%である。いくつかの実施形態では、モル過剰で測定すると、タンパク質の2.5～4.5倍のポリマーが使用される。いくつかの実施形態では、質量で測定すると、タンパク質の10～20倍のポリマーが使用される。いくつかの実施形態では、還元抗体の量はポリマーの量よりも多い。いくつかの実施形態では、ポリマーの量は還元抗体の量よりも多い。

【0325】

いくつかの実施形態では、精製工程は所望による。

【0326】

いくつかの実施形態では、抗体複合体の製造方法は、抗VEGF-A抗体をホスホリルコリン含有ポリマーに結合することを含む。いくつかの実施形態では、前記方法は、抗VEGF-A抗体をホスホリルコリン含有ポリマーに結合させる工程を含む。前記抗VEGF

F-A抗体は、組換えDNA技術によって付加されたアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、前記付加されたアミノ酸残基はシステイン残基である。いくつかの実施形態では、前記システイン残基は抗体の可変領域の外側に付加される。システイン残基は抗体の重鎖又は軽鎖のいずれかに付加できる。

【0327】

いくつかの実施形態では、前記ポリマーはホスホリルコリン含有ポリマーを含む又はホスホリルコリン含有ポリマーからなる。いくつかの実施形態では、前記ホスホリルコリン含有ポリマーは、マレイミド、ビニルスルホン、オルトピリジルジスルフィド、及びヨードアセトアミドからなる群から選択されるスルフヒドリル特異的反応基を含む。いくつかの実施形態では、ホスホリルコリン含有ポリマー上のスルフヒドリル特異的反応基が抗VEGF-A抗体上のシステイン残基と反応して抗体複合体を形成する。

10

【0328】

いくつかの実施形態では、前記結合されるタンパク質は、抗体、抗体タンパク質融合物、又はその結合断片であり得る。いくつかの実施形態では、前記タンパク質は抗体ではなく、酵素、リガンド、受容体、若しくはその他のタンパク質、又はそれらの変異体若しくはバリエーションである。いくつかの実施形態では、前記天然タンパク質には、少なくとも1つのジスルフィド結合及び少なくとも1つの非天然システインが含まれている。

【0329】

いくつかの実施形態では、前記賦形剤は酸又は塩基であり得る。いくつかの実施形態では、前記賦形剤は界面活性剤、糖、又は荷電アミノ酸である。いくつかの実施形態では、前記賦形剤は、ポリマーへの結合中にタンパク質を溶液中に維持するのに役立つ。いくつかの実施形態では、前記タンパク質を含む溶液にポリマーを添加する前に、前記タンパク質を含む溶液に賦形剤を添加する。

20

【0330】

いくつかの実施形態では、前記反応は、pH約5～pH約9の間の水性条件下で起こる。いくつかの実施形態では、前記反応は、pH6.0～pH8.5、pH6.5～pH8.0、又はpH7.0～pH7.5で起こる。いくつかの実施形態では、前記反応は、pH8～pH9で起こる。

【0331】

いくつかの実施形態では、前記ポリマーは2℃～37℃でタンパク質に結合される。いくつかの実施形態では、前記結合は、0℃～40℃、5℃～35℃、10℃～30℃、及び15℃～25℃で起こる。いくつかの実施形態では、前記ポリマーは5℃～10℃で結合する。

30

【0332】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている結合タンパク質は、精製（複合体のタンパク質を非複合体型タンパク質から除去するため）のためにイオン交換媒体又は疎水性相互作用クロマトグラフィー又はアフィニティークロマトグラフィー媒体に接触させることができる。いくつかの実施形態では、イオン交換媒体、疎水性相互作用クロマトグラフィー、及び／又はアフィニティークロマトグラフィー媒体は、結合タンパク質を遊離ポリマー及び再酸化された脱キャップタンパク質から分離する。

40

【0333】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるポリマーは、両性イオン、ホスホリルコリン、又はポリマー分岐点の中心をマレイミド官能基に架橋するPEGリンカーのうちの1又は複数を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるポリマーのいずれかは、本明細書で提供される方法を介してタンパク質に添加することができる。

【0334】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるタンパク質のいずれかは、本明細書で提供される方法の1又は複数を経由して、本明細書で提供されるポリマーのいずれかに結合させることができる。

【0335】

50

いくつかの実施形態では、前記本明細書で提供されるプロセスにより、タンパク質及び／又は抗体複合体を作製及び精製するためのより大規模な処理が可能になる。いくつかの実施形態では、使用される容積は少なくとも１リットル、例えば、１、１０、１００、１，０００、５，０００、若しくは１０，０００リットル又はそれ以上である。いくつかの実施形態では、製造及び／又は精製された抗体複合体の量は、０．１、１、１０、１００、１０００、２０００、２５００、若しくは３０００グラム又はそれ以上であり得る。

【０３３６】

いくつかの実施形態では、治療用タンパク質は、組換えＤＮＡ技術によってシステイン残基が付加された本明細書に記載されている抗ＶＥＧＦ－Ａ抗体のいずれかであってもよい。いくつかの実施形態では、前記抗ＶＥＧＦ－Ａ抗体重鎖は、以下のＣＤＲ配列を有する：ＣＤＲ_H１：配列番号１７２のＣＤＲ_H１、ＣＤＲ_H２：配列番号１７３のＣＤＲ_H２、及びＣＤＲ_H３：配列番号１７４のＣＤＲ_H３。重鎖には、２２１位にスレオニン（Ｔ）が存在する場合もある。いくつかの実施形態では、抗ＶＥＧＦ－Ａ軽鎖は、以下のＣＤＲを有する：ＣＤＲ_L１：配列番号１９９のＣＤＲ_L１、ＣＤＲ_L２：配列番号２００のＣＤＲ_L２、及びＣＤＲ_L３：配列番号２０１のＣＤＲ_L３。抗ＶＥＧＦ－Ａ軽鎖には、Ｋａｂａｔの４位にロイシン（Ｌ）が存在する場合もある。

【０３３７】

いくつかの実施形態では、前記抗ＶＥＧＦ－Ａ抗体は、ＩｇＧ１である。いくつかの実施形態では、前記重鎖は、エフェクター機能を調節するための１又は複数の変異を有する。いくつかの実施形態では、前記変異は、以下のアミノ酸位置（ＥＵ番号付け）の１又は複数に生じる：Ｅ２３３、Ｌ２３４、Ｌ２３５、Ｇ２３６、Ｇ２３７、Ａ３２７、Ａ３３０、及びＰ３３１。いくつかの実施形態では、前記変異は、Ｅ２３３Ｐ、Ｌ２３４Ｖ、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｇ２３７Ａ、Ａ３２７Ｇ、Ａ３３０Ｓ、及びＰ３３１Ｓ（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、前記変異は、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＧ２３７Ａ（ＥＵ番号付け）である。

【０３３８】

いくつかの実施形態では、前記組換えＤＮＡ技術によって治療用タンパク質に付加されたシステイン残基は、Ｃｙｓ－Ｃｙｓジスルフィド結合の対形成に関与しないこととなる。この点において、治療用タンパク質は二量体であってもよい。例えば、インタクトな抗ＶＥＧＦ－Ａ抗体は、２つの軽鎖及び２つの重鎖を有する。例えば、重鎖にＣｙｓ残基が導入されると、インタクトな抗体には、同じ位置に２つのシステインが導入されることになり、これらのシステイン残基が鎖内ジスルフィド結合を形成する。導入されたシステイン残基がＣｙｓ－Ｃｙｓジスルフィド結合を形成するか、又はその傾向がある場合、導入されたＣｙｓ残基は結合に役立つことはない。重鎖及び軽鎖において鎖内ジスルフィド対合を生じる位置を回避する方法は、当該技術分野において公知である。例えば、米国特許出願番号２０１５／０１５８９５２を参照。

【０３３９】

いくつかの実施形態では、組換えＤＮＡ技術により導入されたシステイン残基は、Ｑ３４７Ｃ及びＬ４４３Ｃ（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、前記システイン残基はＬ４４３Ｃ（又は４４９Ｃ、ＥＵ番号付け）である。いくつかの実施形態では、前記抗体の重鎖は、配列番号７～１３、１９～２７、８９、９０、及び２５６～２６２のうちの少なくとも１つに記載のアミノ酸配列を有し、軽鎖は、配列番号９１～９３及び２８～３０のうちの少なくとも１つのアミノ酸配列を有する。

【０３４０】

いくつかの実施形態では、前記スルフヒドリル特異的反応基はマレイミドである。

【０３４１】

いくつかの実施形態では、半減期延長部分は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、分岐ＰＥＧ、ポリＰＥＧ（登録商標）（Ｗａｒｗｉｃｋ　Ｅｆｆｅｃｔ　Ｐｏｌｙｍｅｒｓ　社、英国コベントリー）、ポリシアル酸（ＰＳＡ）、デンプン、ヒドロキシエチルデンプン（ＨＥＳ）、ヒドロキシアルキルデンプン（ＨＡＳ）、炭水化物、多糖類、プルラン、

10

20

30

40

50

キトサン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、ポリアルキレンオキシド（P A O）、ポリアルキレングリコール（P A G）、ポリプロピレングリコール（P P G）、ポリオキサゾリン、ポリアクリロイルモルホリン、ポリビニルアルコール（P V A）、ポリカルボキシレート、ポリビニルピロリドン、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン、ポリエチレンーコマーレイン酸無水物、ポリスチレンーコマーレイン酸無水物、ポリ（１－ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール）（P H F）、両性イオンポリマー、ホスホリルコリン含有ポリマー、並びにリン酸２－メタクリロイルオキシ－２’－エチルトリメチルアンモニウム（M P C）を含むポリマーからなる群から選択される。

【 0 3 4 2 】

いくつかの実施形態では、前記半減期延長部分は両性イオンポリマーである。いくつかの実施形態では、前記両性イオンはホスホリルコリン、すなわち、ホスホリルコリン含有ポリマーである。いくつかの実施形態では、前記ポリマーはM P C単位で構成されている。

【 0 3 4 3 】

いくつかの実施形態では、前記M P Cポリマーは、３本以上のアームを有する。いくつかの実施形態では、前記M P Cポリマーは、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、又は１２本のアームを有する。いくつかの実施形態では、前記M P Cポリマーは、３、６、又は９本のアームを有する。いくつかの実施形態では、前記M P Cポリマーは、９本のアームを有する。いくつかの実施形態では、前記ポリマーは、２、３、４、５、６、

【 0 3 4 4 】

いくつかの実施形態では、前記M P Cポリマーの分子量は、約３００，０００～１，７５０，０００Daである。いくつかの実施形態では、前記M P Cポリマーの分子量は、約５００，０００～１，０００，０００Da又は約６００，０００～９００，０００Daである。

【 0 3 4 5 】

いくつかの実施形態では、治療用タンパク質と半減期延長部分との複合体を調製する方法には、還元されたシステインスルフィド基を生成する条件下で治療用タンパク質をチオール還元剤と接触させる追加の工程が含まれる。上述したように、組換えDNA技術によって付加されたシステイン残基は、対になっていない、すなわち、C y s－C y s鎖内ジスルフィド結合に関与していないか、又はそのような結合に実質的に関与していないことが好ましい。しかし、このようなC y s－C y sジスルフィド結合に関与せず、結合が自由なC y s残基は、培養培地中の遊離システインと反応してジスルフィド付加物を形成することが知られている。例えば、国際公開第２００９／０５２２４９号を参照。このように誘導体化されたシステインは結合に利用できない。新たに付加されたシステインをジスルフィド付加物から解放するために、精製後のタンパク質は還元剤、例えば、ジチオトレイトールで処理される。しかし、還元剤によるこのような処理は、治療用タンパク質中のシステイン残基のすべてを還元する。これには、鎖間及び鎖内のC y s－C y sジスルフィド結合に関与する天然システインも含まれる。前記天然C y s－C y sジスルフィドは、通常タンパク質の安定性及び活性にとって非常に重要なので、再形成される必要がある。いくつかの実施形態では、全ての天然（例えば、鎖間及び鎖内）C y s－C y sジスルフィドが再形成される。

【 0 3 4 6 】

天然な鎖間及び鎖内ジスルフィド残基を再形成するために、システインジスルフィド付加物を除去して還元した後、治療用タンパク質を酸化条件及び／又は酸化剤に所定時間、例えば一晩曝露する。いくつかの実施形態では、一晩の大気曝露により、天然ジスルフィド結合の再形成を達成することができる。いくつかの実施形態では、天然ジスルフィドを還元するために酸化剤が使用される。いくつかの実施形態では、前記酸化剤は、水性C u

10

20

30

40

50

SO_4 及びデヒドロアスコルビン酸 (DHA) からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、前記酸化剤は DHA である。いくつかの実施形態では、使用される DHA の範囲は 5 ~ 30 当量の範囲内である。いくつかの実施形態では、前記範囲は 10 ~ 20 当量である。いくつかの実施形態では、前記範囲は 15 当量である。

【0347】

いくつかの実施形態では、チオール還元剤が、トリス [2-カルボキシエチル] ホスフィン塩酸塩 (TCEP)、ジチオトレイトール (DTT)、ジチオエリスリトール (DTE)、水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4)、シアノ水素化ホウ素ナトリウム (NaCNBH_3)、 β -メルカプトエタノール (BME)、システイン塩酸塩、及びシステインからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、前記チオール還元剤は TCEP である。

10

【0348】

いくつかの実施形態では、前記チオール還元剤の濃度は、治療用タンパク質の濃度に対して 1 倍 ~ 100 倍のモル過剰である。いくつかの実施形態では、前記チオール還元剤の濃度は、治療用タンパク質の濃度に対して 20 倍 ~ 50 倍のモル過剰である。いくつかの実施形態では、前記チオール還元剤は、治療用タンパク質とのインキュベーション後に、治療用タンパク質の酸化前に除去される。

【0349】

いくつかの実施形態では、治療用タンパク質を半減期延長部分に結合させる方法は、結合後に治療用タンパク質複合体を精製するさらなる工程を有する。いくつかの実施形態では、前記治療用タンパク質複合体は、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、及びアフィニティークロマトグラフィー、又はそれらの組み合わせからなる群から選択される技術を使用して精製される。

20

【0350】

いくつかの実施形態では、前記治療用タンパク質複合体は、非複合体型治療用タンパク質と比較して少なくとも 20 % の生物学的活性を保持する。いくつかの実施形態では、前記治療用タンパク質複合体は、非複合体型治療用タンパク質と比較して少なくとも 50 % の生物学的活性を保持する。いくつかの実施形態では、前記治療用タンパク質複合体は、天然な治療用タンパク質と比較して少なくとも 90 % の生物学的活性を保持する。

【0351】

いくつかの実施形態では、前記治療用タンパク質複合体は、非複合体型治療用タンパク質に比べて半減期が長くなる。いくつかの実施形態では、前記治療用タンパク質複合体は、非複合体型治療用タンパク質に比べて半減期が少なくとも 1.5 倍長くなる。いくつかの実施形態では、前記治療用タンパク質複合体は、非複合体型治療用タンパク質に比べて半減期が少なくとも 5 倍長くなる。

30

【0352】

いくつかの実施形態では、治療用タンパク質を半減期延長部分に結合させる方法の両性イオンポリマーは、両性イオン基を有するラジカル重合性モノマーである。前記方法は、フリーラジカル重合性両性イオンモノマーを重合媒体中で重合してポリマーを得るさらなる工程を有し、前記媒体は、ラジカル重合性両性イオンモノマー、遷移金属触媒 $\text{M}_t^{(q-1)+}$ (式中、 M_t は遷移金属であり、 q は金属のより高い酸化状態であり、 $q-1$ は金属のより低い酸化状態であり、前記金属触媒は $\text{M}_t^{(q-1)+} \text{X}'_{(q-1)}$ の形態の塩として供給され、 X' は対イオン若しくは基であるか、又は前記遷移金属触媒は、より高い酸化状態 $\text{M}_t^{q+} \text{X}'_q$ の不活性金属塩を、遷移金属を酸化不活性状態から還元活性状態に還元することができる還元剤とともに提供することにより、インサイチュで供給される)、リガンド、及び開始剤を含む。

40

【0353】

ATRP 遷移金属触媒として機能するには、前記遷移金属は、1 つの電子で分離された、容易にアクセスできる少なくとも 2 つの酸化状態、すなわち、より高い酸化状態及びより低い酸化状態を有する必要がある。ATRP では、可逆的な酸化還元反応により、遷移

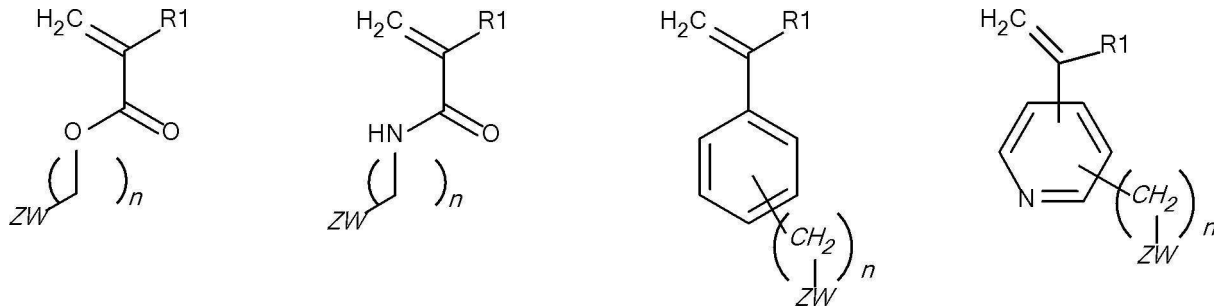
50

金属触媒はより高い酸化状態及びより低い酸化状態の間を循環し、ポリマー鎖は伝播鎖末端及び休止鎖末端の間を循環する。例えば、米国特許第 7, 893, 173 号を参照。

【0354】

いくつかの実施形態では、前記ラジカル重合性両性イオンモノマーは、以下からなる群から選択される：

【化 3 4】



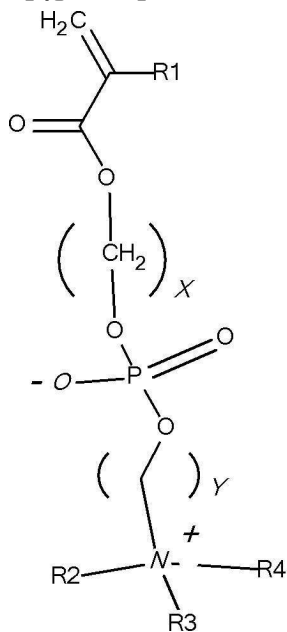
10

式中、R1 は H 又は C₁～6 アルキルであり、ZW は両性イオンであり、及び n は 1～6 の整数である。

【0355】

いくつかの実施形態では、前記ラジカル重合性モノマーは、

【化 3 5】



20

30

であり、

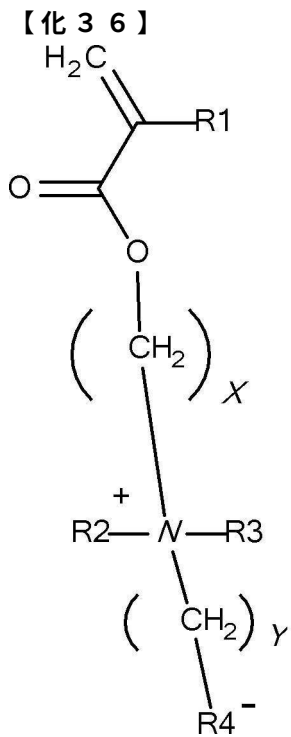
式中、R1 は H 又は C₁～6 アルキルであり、R2、R3、R4 は同じか異なっていて H 又は C₁～4 アルキルであり、並びに X 及び Y は同じか異なっていて 1～6 の整数である。いくつかの実施形態では、R1、R2、R3、及び R4 はそれぞれメチルであり、並びに X 及び Y はそれぞれ 2 である。

40

【0356】

いくつかの実施形態では、前記ラジカル重合性モノマーは、

50



10

20

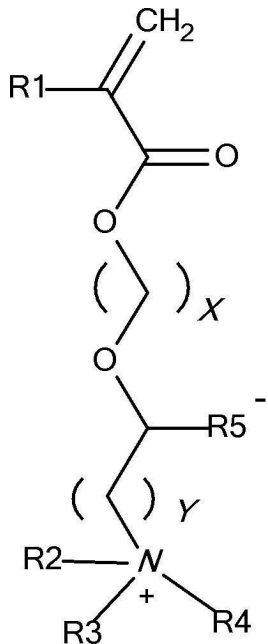
であり、

式中、R₁はH又はC₁～6アルキルであり、R₂及びR₃は同じか異なっていてH又はC₁～4アルキルであり、R₄はPO₄⁻、SO₃⁻、又はCO₂⁻であり、並びにX及びYは同じか異なっていて1～6の整数である。いくつかの実施形態では、R₁、R₂、及びR₃はメチルであり、R₄はPO₄⁻であり、並びにX及びYはそれぞれ2である。

【0 3 5 7】

いくつかの実施形態では、前記モノマーは、

【化 3 7】



30

40

であり、

式中、R₁はH又はC₁～6アルキルであり、R₂、R₃、及びR₄は同じか異なっていてH又はC₁～4アルキルであり、R₅はPO₄⁻、SO₃⁻、又はCO₂⁻であり、並びにX及びYは同じか異なっていて1～6の整数である。いくつかの実施形態では、R₁、R₂、R₃、及びR₄はメチルであり、R₅はPO₄⁻であり、並びにX及びYは2で

50

ある。

【0358】

いくつかの実施形態では、遷移金属 M_t は、 Cu 、 Fe 、 Ru 、 Cr 、 Mo 、 W 、 Mn 、 Rh 、 Re 、 Co 、 V 、 Zn 、 Au 、及び Ag からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、前記金属触媒は $M_t^{(q-1)+} X'_{(q-1)}$ の形態の塩として供給される。 $M_t^{(q-1)+}$ は、 Cu^{1+} 、 Fe^{2+} 、 Ru^{2+} 、 Cr^{2+} 、 Mo^{2+} 、 W^{2+} 、 Mn^{3+} 、 Rh^{3+} 、 Re^{2+} 、 Co^{+} 、 V^{2+} 、 Zn^{+} 、 Au^{+} 、及び Ag^{+} からなる群から選択され、並びに X' は、ハロゲン、 $G_1 \sim 6$ アルコキシ、 $(SO_4)_{1/2}$ 、 $(PO_4)_{1/3}$ 、 $(R_7PO_4)_{1/2}$ 、 $(R_7_2PO_4)$ 、トリフラート、ヘキサフルオロホスフェート、メタンスルホネート、アリールスルホネート、 CN 、及び R_7CO_2 からなる群から選択される

10

(式中、 R_7 は、 H 又はハロゲンで 1～5 回置換されていてもよい直鎖若しくは分岐 $C_{1 \sim 6}$ アルキル基である)。いくつかの実施形態では、 $M_t^{(q-1)+}$ は Cu^{1+} であり、 X' は Br である。

【0359】

いくつかの実施形態では、 $M_t^{(q-1)+}$ はインサイチュで供給される。いくつかの実施形態では、 $M_t^{q+} X_q$ は $CuBr_2$ である。いくつかの実施形態では、前記還元剤は無機化合物である。いくつかの実施形態では、前記還元剤は、低酸化レベルの硫黄化合物、亜硫酸水素ナトリウム、金属イオンを含む無機塩、金属、ヒドラジン水和物、及びそのような化合物の誘導体からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、前記還元剤は金属である。いくつかの実施形態では、前記還元剤は Cu^0 である。

20

【0360】

いくつかの実施形態では、前記還元剤は有機化合物である。いくつかの実施形態では、前記有機化合物は、容易にエノール化され得るアルキルチオール、メルカプトエタノール、又はカルボニル化合物、アスコルビン酸、アセチルアセトネート、カンフォースルホン酸、ヒドロキシアセトン、還元糖、単糖類、グルコース、アルデヒド、及びそのような有機化合物の誘導体からなる群から選択される。

【0361】

いくつかの実施形態では、前記リガンドは、2, 2'-ビピリジン、4, 4'-ジ-5-ノニル-2, 2'-ビピリジン、4, 4'-ジノニル-2, 2'-ジピリジル、4, 4', 4'-トリ-5-ノニル-2, 2':6', 2''-テルピリジン、 N, N, N', N', N'' -ペンタメチルジエチレントリアミン、1, 1, 4, 7, 10, 10-ヘキサメチルトリエチレンテトラミン、トリス(2-ジメチルアミノエチル)アミン、 N, N -ビス(2-ピリジルメチル)オクタデシルアミン、 N, N, N', N' -テトラ[(2-ピリダール)メチル]エチレンジアミン、トリス[(2-ピリジル)メチル]アミン、トリス(2-アミノエチル)アミン、トリス(2-ビス(3-ブトキシ-3-オキソプロピル)アミノエチル)アミン、及びトリス(2-ビス(3-(2-エチルヘキソキシ)-3-オキソプロピル)アミノエチル)アミンからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、前記リガンドは、2, 2'-ビピリジンである。

40

【0362】

いくつかの実施形態では、前記開始剤は下記構造を有する：

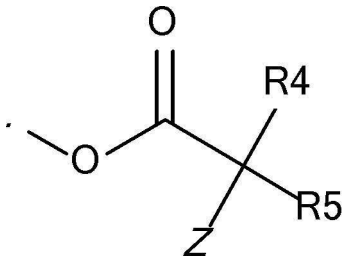
【化38】



(式中、 R_1 は求核反応基であり、 R_2 はリンカーを含み、並びに R_3 は構造を有するポリマー合成開始剤部分を含む)

50

【化 3 9】



(式中、R 4 及び R 5 は、同じか異なり、アルキル、置換アルキル、アルキレン、アルコキシ、カルボキシアリル、ハロアルキル、シクロアルキル、環状アルキルエーテル、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、アルキニレン、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルキレン、アリール、アリーレン、アリーレンオキシ、ヘテロアリール、アミノ、アミド、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択され、Z は、ハロゲン、 $-OR$ (式中、R は $-H$ 、メチル、エチル、プロピル、又はイソプロピル)、 $-SCN$ 、又は $-NCS$ であり、s は 1 ~ 20 の整数である)。

10

【0 3 6 3】

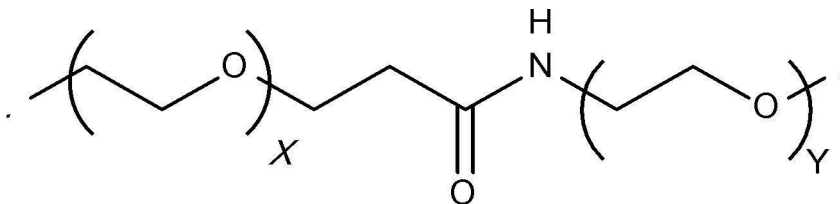
いくつかの実施形態では、Z は Br であり、R 4 及び R 5 はそれぞれメチルである。いくつかの実施形態では、R 1 は、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、及び $-SH$ からなる群から選択される。

20

【0 3 6 4】

いくつかの実施形態では、R 2 は、アルキル、置換アルキル、アルキレン、アルコキシ、カルボキシアリル、ハロアルキル、シクロアルキル、環状アルキルエーテル、アルケニル、アルケニレン、アルキニル、アルキニレン、シクロアルキレン、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルキレン、アリール、アリーレン、アリーレンオキシ、ヘテロアリール、アミノ、アミド、又はそれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態では、R 2 は

【化 4 0】



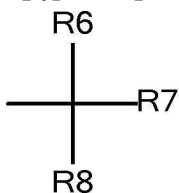
30

(式中、X 及び Y は同じか異なり、1 ~ 20 までの整数である) である。いくつかの実施形態では、X 及び Y はそれぞれ 4 である。

【0 3 6 5】

いくつかの実施形態では、R 3 は

【化 4 1】



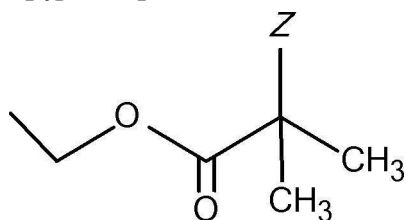
40

であり、

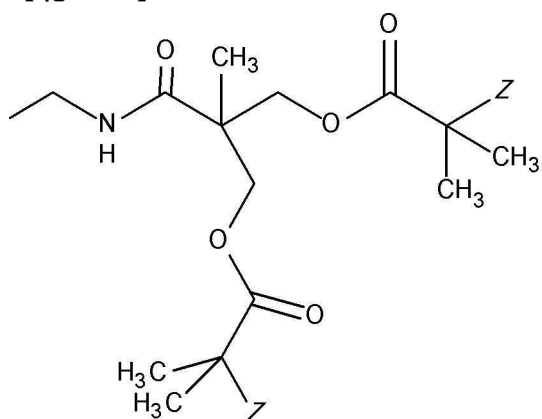
式中、R 6、R 7、及び R 8 は、同じかまたは異なり、以下からなる群から選択される：

50

【化 4 2】



【化 4 3】

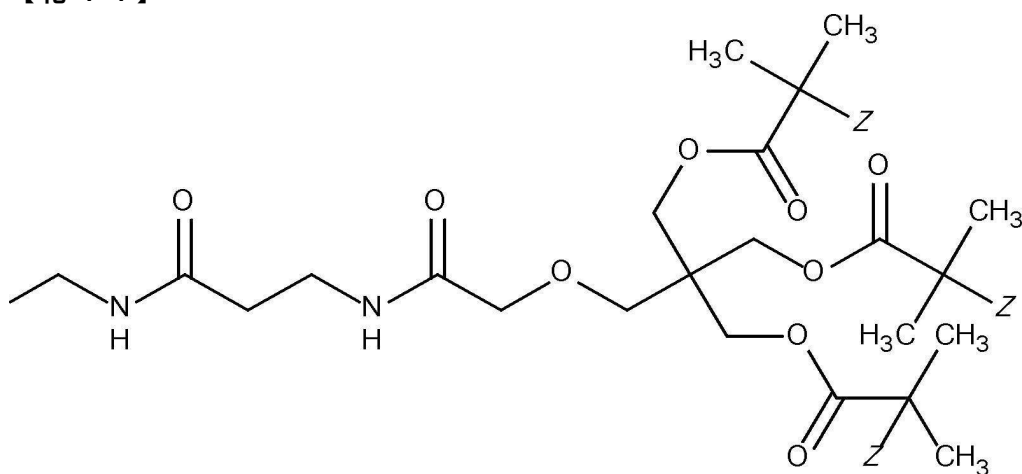


10

20

、及び

【化 4 4】



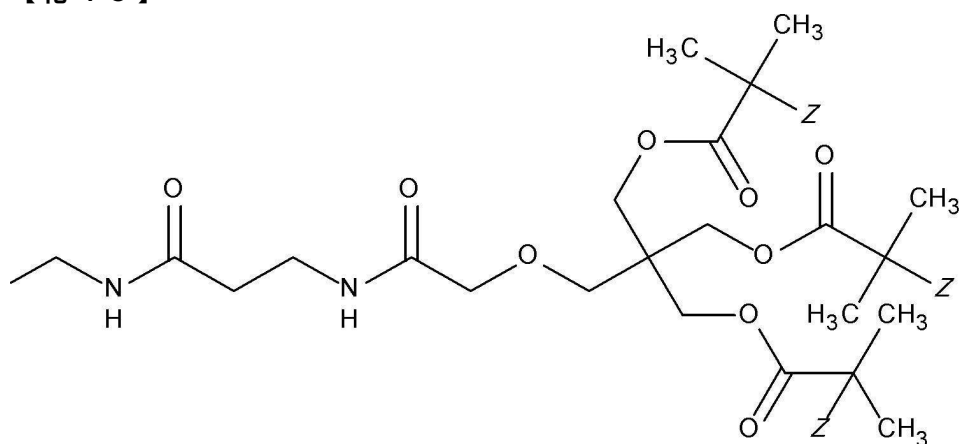
30

（式中、Zは $-OR$ （Rは $-H$ 、メチル、エチル、プロピル、又はイソプロピル）、 $-SCN$ 、 $-NCS$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、又は $-I$ である）。いくつかの実施形態では、Zは $-Br$ であり、R6、R7、及びR8はそれぞれ

40

50

【化 4 5】



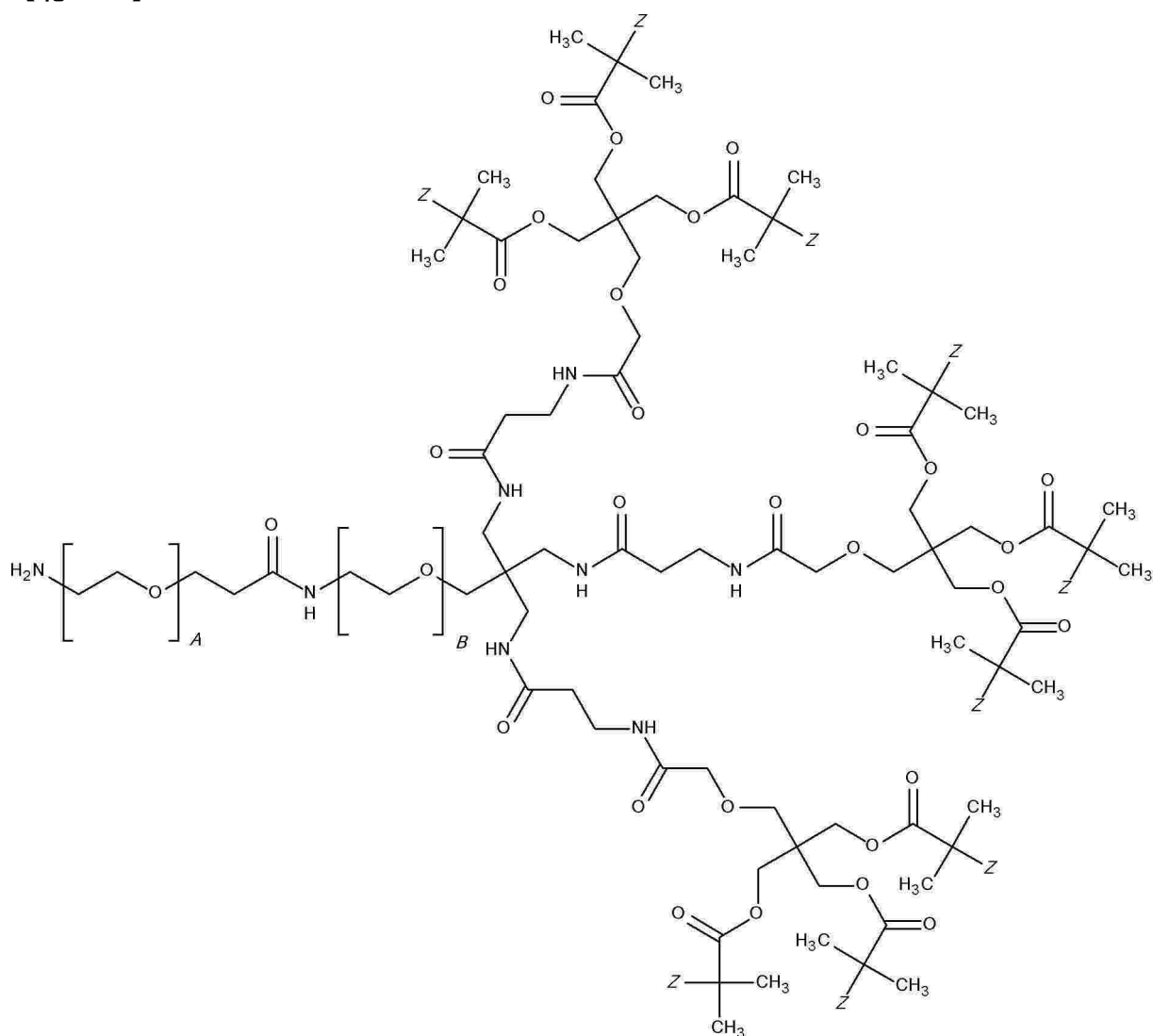
10

である。

【 0 3 6 6】

いくつかの実施形態では、前記開始剤は下記構造を有する：

【化 4 6】



20

30

40

式中、AとBは同じでも異なってもよく、2～12の整数であり、ZはBrなどの任意のハロゲン化物である。いくつかの実施形態では、A及びBはそれぞれ4である。

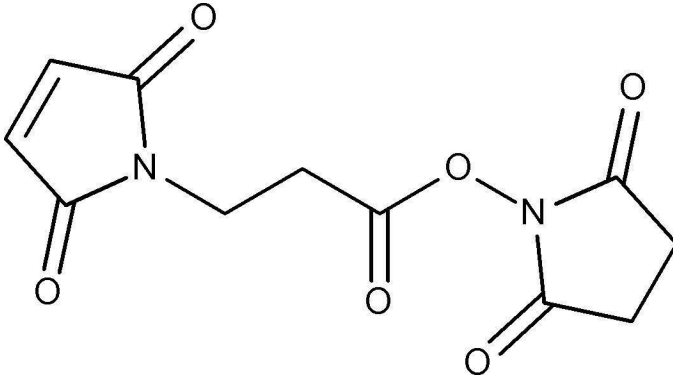
【 0 3 6 7】

いくつかの実施形態では、前記方法は、ポリマーをマレイミド試薬と反応させて末端マ

50

レイミドを有するポリマーを提供する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記マレイミド化合物は

【化 4 7】



である。

【0368】

医薬組成物

治療用タンパク質は、薬学的に許容される賦形剤と共に医薬組成物に組み込むことができる。経口投与に適した医薬組成物は、カプセル、溶液、シロップ、又は懸濁液（水性若しくは非水性液体、又は食用の泡状若しくはホイップ状、又は乳剤）などの個別の単位として提供されてもよい。錠剤又は硬質ゼラチンカプセルに適した賦形剤には、ラクトース、トウモロコシデンプン又はその誘導体、ステアリン酸又はその塩が含まれる。ソフトゼラチンカプセルに適した賦形剤には、例えば植物油、ワックス、脂肪、半固体又は液体ポリオールが含まれる。溶液及びシロップの調製には、例えば、水、ポリオール、及び糖の賦形剤が使用されてもよい。懸濁液の調製には、油（例えば、植物油）を使用して水中油型又は油中水型の懸濁液を提供してもよい。

【0369】

医薬組成物は、鼻腔投与に適合させることができ、前記賦形剤は、例えば、20～500ミクロンの範囲内の粒子サイズを有する粗い粉末を含む固体であり、鼻から吸入する方法、すなわち、鼻の近くに保持された粉末の容器から鼻腔を通して急速に吸入することによって投与される。鼻スプレー又は点鼻薬として投与するための、賦形剤が液体である適切な組成物には、有効成分の水溶液又は油溶液が含まれる。吸入投与に適した医薬組成物には、様々なタイプの定量加圧エアロゾル、ネブライザー、又は吸入器によって生成される微粒子の粉塵又はミストが含まれる。

【0370】

非経口投与に適した医薬組成物には、抗酸化剤、緩衝剤、殺菌剤、及び製剤を対象者の血液と実質的に等張にする溶質を含む水性及び非水性の滅菌注射液、並びに懸濁剤及び増粘剤を含んでもよい水性及び非水性の滅菌懸濁液が含まれる。注射液に使用できる賦形剤には、例えば、水、アルコール、ポリオール、グリセリン、及び植物油がある。前記組成物は、例えば、密封されたアンプル及びバイアルの単位用量又は複数用量の容器で提供され、使用直前に、例えば、注射用水の滅菌液体を添加するだけでフリーズドライ（凍結乾燥）状態で保存されてもよい。即時注射液及び懸濁液は、滅菌粉末、顆粒、及び錠剤から調製できる。医薬組成物は実質的に等張性であり、浸透圧は約250～400mOsm/kg水となる。

【0371】

前記医薬組成物には、保存剤、可溶化剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、甘味料、着色剤、着臭剤、塩（物質自体が医薬として許容される塩の形態で提供される場合もある）、緩衝剤、コーティング剤、又は抗酸化剤が含まれ得る。前記物質に加えて治療効果のある薬剤が含まれる場合もある。前記医薬組成物は、1又は複数の医薬的に許容される賦形剤と組み合わせて使用されてもよい。このような賦形剤には、生理食塩水、緩衝生理食塩水（リ

ン酸緩衝生理食塩水など)、デキストロース、リポソーム、水、グリセロール、エタノール、及びそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【0372】

前記抗体及びそれらを含む医薬組成物は、例えば経口、硝子体内、静脈内、皮下、筋肉内、骨内、鼻腔内、局所、腹腔内、及び病巣内投与による投与を含む、患者の疾患の治療又は予防に有効な方法で投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与若しくは経路が含まれる。治療又は予防として、活性剤は、例えば滅菌水性分散液などの注射用組成物として個人に投与され得る。いくつかの実施形態では、前記薬剤は等張性又は実質的に等張性である。

【0373】

哺乳動物、特にヒトへの投与の場合、有効成分の投与量は体重1kgあたり0.01mg、通常は1mg/kg程度になると予想される。医師は、個人の年齢、体重、性別、及び反応、治療対象の疾患又は障害、並びに治療対象の個人の年齢と状態などの要因に応じて、個人に最も適した実際の投与量を決定できる。上記の投与量は平均的な場合の例である。言うまでもなく、より高い投与量又はより低い投与量が有効な場合もある。いくつかの実施形態では、前記投与量は、0.5~20mg/眼、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、又は19mgであり得る。

【0374】

この投与量は、適切な頻度(例:毎週、隔週、毎月、2か月に1回、四半期に1回、年に2回、毎年)で繰り返してもよい。副作用が発生した場合は、通常の臨床診療に従って、投与量及び/又は投与頻度を減らすことができる。一実施形態では、前記医薬組成物は1日~30日ごとに1回投与され得る。一実施形態では、前記医薬組成物は30日ごとに2回投与され得る。一実施形態では、前記医薬組成物は週に1回投与され得る。

【0375】

前記抗体及び医薬組成物は、単独で使用することも、抗炎症薬、鎮痛剤、又は抗生物質などの治療化合物若しくは分子などの他の化合物と組み合わせて使用することもできる。他の化合物との投与は、同時、別々、又は順次に行われ得る。前記成分は、必要に応じて説明書を含むキットの形で準備されてもよい。

【0376】

本明細書に開示される抗体及び医薬組成物は、疾患、特に本明細書に記載される眼疾患若しくは状態の治療又は予防に使用することができる。

【0377】

抗VEGF抗体複合体又は抗VEGFタンパク質複合体及びそれらを含む医薬組成物は、製剤化され、点眼薬及び/又は軟膏の形態で、眼、眼内、及び/又は硝子体内注射、並びに/又は強膜近傍注射、並びに/又は網膜下注射、並びに/又はテノン嚢下注射、並びに/又は脈絡膜上注射、並びに/又は結膜下及び/又は局所投与により投与され得る。このような抗体および組成物は、Intraocular Drug Delivery, Jaffe, Ashton, and Pearson, editors, Taylor & Francis (March 2006)などの参考文献に記載されているものを含む、硝子体内への化合物の徐放を可能にするデバイス及び/又はデポーとして、例えば硝子体内に送達することができる。一例では、前記デバイスは、ミニポンプ、マトリックス、受動拡散システム、又は長期間にわたって化合物を放出するカプセル化されたセルの形態であってもよい(Intraocular Drug Delivery, Jaffe, Ashton, and Pearson, editors, Taylor & Francis (March 2006))。

【0378】

眼球、眼球内、又は硝子体内投与用の製剤は、当該技術分野で公知の方法及び成分を使用して調製することができる。効果的な治療を行うための主な要件は、眼への適切な浸透である。薬剤を局所的に投与できる眼の前部の疾患とは異なり、網膜疾患ではより部位に

10

20

30

40

50

特化したアプローチが必要である。点眼薬及び軟膏が眼の奥まで浸透することはほとんどなく、血液眼関門により全身投与された薬剤が眼組織に浸透するのを妨げられる。したがって、通常、AMD及びCNVなどの網膜疾患を治療するための薬剤投与方法として選択されるのは、直接硝子体内注射である。硝子体内注射は通常、患者の状態、投与される薬剤の特性及び半減期に応じて一定の間隔で繰り返される。

【0379】

治療用抗体及び関連する複合体は、通常、滅菌アクセスポートを備えた容器、例えば、皮下注射針で穿刺可能なストッパーを備えた静脈内溶液バッグ又はバイアルに入れられている。このような組成物は、予め充填された注射器の形態で供給されてもよい。

【0380】

「安定した」製剤とは、タンパク質又は他の半減期延長部分のポリマーに結合したタンパク質が、保存時に物理的安定性及び／又は化学的安定性及び／又は生物学的活性を本質的に保持する製剤である。「安定」とは、凝集及び／又は脱アミド化を含む不安定性の兆候がほとんど又は全く示されない製剤も意味する。例えば、提供される製剤は、5～8℃の温度で指定されたとおりに保存した場合、少なくとも2年間は安定した状態を保つことができる。本開示の抗VEGF抗体複合体に適した製剤は、例えば国際公開第2017/117464号（PCT公開番号）に記載されており、その全文が本明細書に参照により援用される。

【0381】

タンパク質の安定性を測定するための様々な分析技術が当技術分野で利用可能であり、例えば、Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301 (Vincent Lee ed., New York, N.Y., 1991) and Jones, 1993 Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90に概説されている。安定性は、選択した温度で選択した期間にわたって測定できる。いくつかの実施形態では、製剤の保存は少なくとも6か月、12か月、12～18か月、又は2年以上安定する。

【0382】

抗体又はその断片などのタンパク質は、色及び／若しくは透明度の目視検査、又は紫外線散乱若しくはサイズ排除クロマトグラフィーによる測定で、凝集、沈殿、脱アミド化、及び／又は変性の兆候が見られない場合、医薬製剤において「物理的安定性を保持している」とみなされる。

【0383】

特定の時点での化学的安定性が、タンパク質が依然としてその生物学的活性を保持しているとみなされるほどである場合、タンパク質は医薬製剤において「化学的安定性を保持している」ことになる。化学的安定性は、化学的に変化したタンパク質を検出し、定量化することによって評価できる。化学的な変化には、サイズの変更（例えば、クリッピング）が含まれる場合があり、これは、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、SDS-PAGE、及び／又はマトリックス支援レーザー脱離イオン化／飛行時間型質量分析（MALDI/TOF MS）などを使用して評価できる。その他の種類の化学変化には電荷変化（例えば、脱アミド化の結果として生じる）が含まれ、これは、例えば、イオン交換クロマトグラフィーによって評価できる。抗体は、例えば、抗原結合アッセイで測定されるように、特定の時点における抗体の生物学的活性が、医薬製剤が調製された時点で示された生物学的活性の約10%以内（アッセイの誤差内）である場合、医薬製剤中で「生物学的活性を保持している」とみなされる。

【0384】

タンパク質-ポリマー複合体は「化学的安定性を保持」し、タンパク質とポリマーとの化学結合はそのまま維持され、例えば、加水分解されたり破壊されたりすることはない。前記複合体のタンパク質部分は、上記のように化学的安定性を維持する。

【0385】

「等張性」とは、目的の製剤が、本質的にヒトの血液又は硝子体内注射の硝子体と同じ

10

20

30

40

50

浸透圧を持つことを意味する。等張製剤の浸透圧は、通常約 250～400 mOsm になる。等張性は、例えば、蒸気圧法浸透圧計又は氷点降下法浸透圧計などを用いて測定することができる。

【0386】

本明細書において、「緩衝液」とは、酸塩基複合体成分の作用によって pH の変化に抵抗する緩衝溶液を指す。いくつかの実施形態では、前記緩衝液の pH は、約 3.0～約 8.0、例えば、約 4.5～8、又は約 pH 6～約 7.5、又は約 6.0～約 7.0、又は約 6.5～7.0、又は約 pH 7.0～約 7.5、又は約 7.1～約 7.4 である。上記範囲内の任意の点の pH も考慮される。

【0387】

いくつかの実施形態では、「PBS」リン酸緩衝生理食塩水、トリスベースの緩衝液、及びヒスチジンベースの緩衝液が使用される。いくつかの実施形態では、酢酸緩衝液が使用される。

【0388】

いくつかの実施形態では、PBS 緩衝液は、適切な pH を提供するように調整された少なくともリン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、及び塩化ナトリウムで構成されている。いくつかの実施形態では、前記緩衝液緩衝液は、安定した保存溶液を提供するために、塩化カリウム及びその他の塩、界面活性剤、並びに／又は保存剤などの他の医薬品賦形剤を含有し得る。

【0389】

「保存剤」とは、製剤中に含めることで本質的に細菌の作用を減少させ、例えば、多用途製剤の製造を容易にすることができる化合物である。可能性のある保存剤の例としては、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム塩化物、ヘキサメトニウム塩化物、ベンザルコニウム塩化物（アルキル基が長鎖化合物であるアルキルベンジルジメチルアンモニウム塩化物の混合物）、及びベンゼトニウム塩化物が挙げられる。その他の種類の保存剤には、フェノール、ブチルアルコール、及びベンジルアルコールなどの芳香族アルコール、メチルパラベン又はプロピルパラベンなど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、並びに m-クレゾールが挙げられる。

【0390】

いくつかの実施形態では、製剤がヒトにおける使用や動物実験において安全であるためには、エンドトキシンのレベルが十分に低くなければならない。「エンドトキシン」はグラム陰性細菌の細胞膜に由来するリポ多糖類 (LPS) である。エンドトキシンは、疎水性脂質部分 (脂質 A) に共有結合した親水性多糖部分で構成されている (Raetz C R, Ulevitch R J, Wright S D, Sibley C H, Ding A, Nathan C F. 1991. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. FASEB J. 5 (12): 2652-2660)。脂質 A は、エンドトキシンの生物学的活性、すなわちその毒性の大部分を担っている。エンドトキシン類は、細菌細胞死の際だけでなく、細胞の増殖及び分裂の際にも大量に放出される。それらは熱安定性が非常に高く、通常の滅菌条件下では破壊されない。180～250℃及び 0.1 M を超える酸又は塩基などの、極端な熱又は pH による処理を使用する必要がある (Petsch D, Anspach F. 2000. Endotoxin removal from protein solutions. J Biotechnol. 76: 97-119)。勿論、このような状態は生物学的製剤にとって非常に有害となると考えられる。

【0391】

バイオテクノロジー業界及び製薬業界では、製造プロセス中と最終製品における両方でエンドトキシンが検出される可能性がある。細菌は、水、生理食塩水、及び緩衝液などの栄養分の少ない培地で増殖する可能性があるため、予防措置を講じないとエンドトキシン

10

20

30

40

50

が蔓延する。動物やヒトにエンドトキシンを注入すると、エンドトキシンショック、組織損傷、さらには死亡など、様々な病態生理学的影響を引き起こす (Ogikubo Y, Ogikubo Y, Norimatsu M, Noda K, Takahashi J, Inotsume M, Tsuchiya M, Tamura Y. 2004. Evaluation of the bacterial endotoxin test for quantifications of endotoxin contamination of porcine vaccines. *Biologics* 32:88-93)。

【0392】

低濃度 (1 ng/mL) のエンドトキシンを哺乳動物に静脈内注射すると、発熱反応及びショックが誘発される (Fiske JM, Ross A, VanDerMeid RK, McMichael JC, Arumugham. 2001. Method for reducing endotoxin in *Moraxella catarrhalis* UspA2 protein preparations. *J Chrom B*. 753:269-278)。医薬品及び生物学的製剤の静脈内投与におけるエンドトキシンの最大レベルは、全ての薬局方によって体重1 kgあたり1時間あたり5エンドトキシン単位 (EU) に設定されている (Daneshian M, Guenther A, Wendel A, Hartung T, Von Aulock S. 2006. In vitro pyrogen test for toxic or immunomodulatory drugs. *J Immunol Method* 313:169-175)。EUはエンドトキシンの生物学的活性の測定値である。例えば、標準エンドトキシンEC-5の100 pgと大腸菌O111:B4由来のエンドトキシンの120 pgとは、1 EUの活性を有する (Hirayama C, Sakata M. 2002. Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles. *J Chrom B* 781:419-432)。この閾値レベルを満たすことは、生物学的研究及び製薬業界において常に課題となってきた (Berthold W, Walter J. 1994. Protein Purification: Aspects of Processes for Pharmaceutical Products. *Biologicals* 22:135-150; Petsch D, Anspach FB. 2000. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotech* 76:97-119)。

【0393】

硝子体内注射により投与される薬剤にエンドトキシンが存在することは特に懸念される。薬剤 (ペニシリン) の硝子体内注射は1945年にRycroftによって初めて実施された (Rycroft BW. 1945. Penicillin and the control of deep intra-ocular infection. *British J Ophthalmol* 29 (2): 57-87)。硝子体は、高濃度の薬剤を導入し、比較的長期間維持できるチャンバーである。硝子体内注射によって達成できる薬物の濃度は、局所投与又は全身投与 (例えば、静脈内) によって生成できる濃度をはるかに超える。

【0394】

硝子体内注射によって発生する可能性のある最も危険な合併症の1つは眼内炎である。眼内炎は感染性と無菌性の2つの種類に分類される。感染性眼内炎は、一般的に細菌、真菌、又は寄生虫によって引き起こされる。感染性眼内炎の症状には、激しい痛み、視力喪失、及び結膜とその下の強膜の赤みなどがある。感染性眼内炎は緊急の診断及び治療を要する。可能な治療法としては、抗生物質の硝子体内注射や、場合によっては硝子体切除術などがある。失明して痛みのある眼を取り除くために眼球摘出術が必要になる場合がある。例えば、Christy NE, Sommer A. 1979. Antibio

tic prophylaxis of postoperative endophthalmitis. Ann Ophthalmol 11 (8) : 1261-1265 を参照。

【0395】

対照的に、無菌性眼内炎は感染性因子を伴わず、硝子体内抗生物質及び／又は硝子体網膜手術を必要とせずに治癒する硝子体腔の急性眼内炎症として定義できる。硝子体の微生物学的検査が行われた場合、無菌性眼内炎の診断を裏付けるには培養検査が陰性であることが証明される必要がある (Marticorena J, Romano V, Gomez-Ulla F. 2012 “Sterile Endophthalmitis after Intravitreal Injections” Med Inflamm. 928123)。

10

【0396】

エンドトキシンに汚染された生物学的薬剤を硝子体内に注射すると、無菌性眼内炎を引き起こす可能性があることが観察されている。Marticorena, et al. によれば、ベバシズマブ (Bevacizumab) (アバスチン (Avastin)) は、膠芽腫、転移性大腸がん、進行性非扁平上皮非小細胞肺癌、及び転移性腎臓がんの治療薬として米国食品医薬品局により承認されている。ベバシズマブは滲出性AMDの治療薬としても適応外処方で広く使用されている。ベバシズマブは製造元から100mg / 4mLとして出荷される。この溶液は硝子体内注射に直接使用することはできず、薬剤師が調剤する必要がある。無菌性眼内炎のクラスターが観察されており、これは調剤薬剤師によるエンドトキシンによるベバシズマブの不注意な汚染によって引き起こされたと理論づけられている。

20

【0397】

エンドトキシンの硝子体内注射の深刻な臨床結果を考慮すると、硝子体内投与によって患者に投与できるエンドトキシンの総量は非常に限られている。いくつかの実施形態では、エンドトキシン濃度が5.0 EU / mLを超えない抗体又は抗体複合体を含む溶液が提供される。いくつかの実施形態では、前記エンドトキシン濃度は1.0 EU / mLを超えない。いくつかの実施形態では、前記エンドトキシン濃度は0.5 EU / mLを超えない。いくつかの実施形態では、前記エンドトキシン濃度は0.2 EU / mLを超えない。いくつかの実施形態では、前記エンドトキシン濃度は、2、1、0.5、0.2、0.1、0.09、0.08、0.07、0.06、0.05、0.04、0.03、0.02、又は0.01 EU / mLを超えない。

30

【0398】

エンドトキシンの存在を調べるために広く使用されているFDA承認の2つの検査は、ウサギ発熱物質検査及びリムルスアマーバ細胞ライセート (LAL) 検査である (Hoffman S, et al. 2005. International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells J. Immunol. Methods 298:161-173; Ding JL, Ho BA. 2001. New era in pyrogen testing. Biotech. 19:277-281)。ウサギ発熱物質試験は1920年代に開発され、試験溶液を注射されたウサギの体温上昇をモニタリングするものである。しかし、ウサギ発熱物質検査は、費用及び長い所要時間を理由に、長年にわたって使用が大幅に減少している。LAL試験がより一般的である。LALはカプトガニの血液から抽出され、エンドトキシンにさらされると凝固する。

40

【0399】

最も単純なLALアッセイの1つは、LALゲル凝固アッセイである。基本的に、LAL凝固アッセイは、当該試料の連続希釈と組み合わせられる。ゲルの形成は試料中のエンドトキシンの量に比例する。試料から連続希釈液を調製し、各希釈液のLALゲル形成性を検査する。ある時点で否定的な反応が抑制される。元の試料中のエンドトキシンの量は

50

希釈アッセイから推定できる。

【0400】

濁度測定LALアッセイ (Ong KG, Lelan JM, Zeng KF, Barrett G, Aourob M, Grimes CA. 2006. A rapid highly-sensitive endotoxin detection system. Biosensors and Bioelectronics 21:2270-2274) 及びクロモジェニックLALアッセイ (Haishima Y, Hasegawa C, Yagami T, Tsuchiya T, Matsuda R, Hayashi Y. 2003. Estimation of uncertainty in kinetic-colorimetric assay of bacterial endotoxins. J Pharm Biomed Analysis. 32:495-503) を含む他のLAL試験も開発されている。濁度測定アッセイ及びクロモジェニックアッセイは、単純なゲル凝固希釈法よりもはるかに感度が高く、定量性も優れている。

10

【0401】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗体を有する組成物中のエンドトキシンの量を低減する方法が提供される。前記方法は、前記組成物を、前記抗体に結合するアフィニティークロマトグラフィー樹脂と接触させる工程、前記アフィニティークロマトグラフィー樹脂から前記抗体を溶出して、アンタゴニストを含むアフィニティークロマトグラフィー溶離液を形成する工程、前記アフィニティークロマトグラフィー溶離液を、前記抗体に結合するイオン交換樹脂と接触させる工程、及び前記イオン交換樹脂から前記抗体を溶出することであって、前記イオン交換樹脂から溶出された抗体にはエンドトキシンが実質的に含まれない工程、を有する。

20

【0402】

エンドトキシンの量を低減するための上記方法、又は本明細書で述べた他の方法若しくはプロセスは、上記の工程で説明した順序で実施することも、工程の順序を変更したり、1又は複数の工程を繰り返したりして、任意に実施することもできる。一実施形態では、前記組成物中のエンドトキシンの量を低減する方法は、記載された工程の順序で実行される。いくつかの実施形態では、前記アフィニティークロマトグラフィー樹脂の接触、洗浄、及び溶出の工程は、前記アフィニティークロマトグラフィー溶離液を前記イオン交換樹脂と接触させる前に、同じ順序で複数回繰り返される。前記方法には、例えば、0.1ミクロン、0.20ミクロン、又は0.45ミクロンのフィルターを使用したろ過工程も含まれ、このろ過工程は、各樹脂結合工程後に除去された1又は複数の溶離液に対して実施できる。

30

【0403】

特定の例では、前記組成物をアフィニティークロマトグラフィー樹脂と接触させ、洗浄し、前記アフィニティークロマトグラフィー樹脂から前記抗体を溶出させる工程は、第一の溶離液をイオン交換樹脂と接触させる前に複数回繰り返すことができる。一実施形態では、前記アフィニティークロマトグラフィー樹脂は、組換えプロテインA (「rProteinA」) 樹脂を含む。適切な組換えプロテインA樹脂の一例としては、MabSelect Sure及びMabselect Sure LX (Cytiva) がある。別の実施形態では、適切なアフィニティークロマトグラフィー樹脂は、プロテインGクロマトグラフィー樹脂を含む。他の実施形態では、適切なアフィニティークロマトグラフィー樹脂は、プロテインA／プロテインG混合樹脂を含む。いくつかの実施形態では、適切なアフィニティークロマトグラフィー樹脂は、プロテインL樹脂を含む。他の実施形態では、適切なアフィニティークロマトグラフィー樹脂は、MEP HyperCell (登録商標) 樹脂などの4-メルカプトエチルピリジンリガンドを含む疎水性電荷誘導樹脂を含む (BioSeptra社、セルジ・サン・クリストフ、サンクリストフ、フランス)。

40

【0404】

いくつかの実施形態では、前記イオン交換樹脂は、陰イオン交換樹脂を含む。当業者に

50

は周知のように、イオン交換体は、マトリックス及び付着した荷電基に関して、様々な材料に基づき得る。例えば、以下のマトリックスを使用できるが、これらのマトリックスでは、言及されている材料が多かれ少なかれ架橋されている場合がある：POROS XS (ThermoFisher)、POROS XQ (ThermoFisher社)、MacroCap Q (Cytiva社、ニュージャージー州ピスカタウェイ)、アガロースベース (Sephacrose CL-6B (登録商標)、Sephacrose Fast Flow (登録商標)、Sephacrose High Performance (登録商標) など)、セルロースベース (DEAE Sephacel (登録商標) など)、デキストランベース (Sephadex (登録商標) など)、シリカベース、合成ポリマーベース。陰イオン交換樹脂の場合、マトリックスに共有結合している荷電基は、例えば、ジエチルアミノエチル、第四級アミノエチル、及び／又は第四級アンモニウムであってもよい。いくつかの実施形態では、前記陰イオン交換樹脂は、第四級アミン基を含む。抗M-CSF抗体に結合するための第四級アミン基を有する例示的な陰イオン交換樹脂は、Qセファロース (登録商標) 樹脂である (Amersham社、ニュージャージー州ピスカタウェイ)。

10

20

30

40

50

【0405】

他の態様では、前記組成物を前述の陰イオン交換クロマトグラフィー工程に供した後にエンドトキシンレベルが所望よりも高い場合、前記組成物を代わりに陽イオン交換樹脂に供してもよい。いくつかの実施形態では、前記組成物中のエンドトキシンは、エンドトキシンからタンパク質を精製できるように、イオン交換樹脂に対して当該タンパク質とは異なる結合を示す必要がある。この点では、エンドトキシンは負に帯電しており、通常は陰イオン交換樹脂に結合する。タンパク質及びエンドトキシンの両方が陰イオン交換樹脂に結合する場合、塩勾配を使用して2つを異なる画分に溶出させることにより、一方を他方から精製することができる。特定の樹脂に対するタンパク質の相対的な結合は、タンパク質のpIに対する緩衝液のpHを変更することによっても変更され得る。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が、唯一使用されるイオン交換クロマトグラフィーである。

【0406】

いくつかの実施形態では、前記陰イオン交換樹脂後のエンドトキシン濃度が高すぎる場合、前記組成物をさらに第二のイオン交換工程に供してもよく、例えば、前記組成物を陽イオン交換樹脂と接触させ、続いて洗浄工程を行い、その後イオン交換樹脂から溶出させる。いくつかの実施形態では、前記陽イオン交換樹脂は結合のためのスルホン酸基を含む。代表的な陽イオン交換樹脂としては、SP Sephacrose (登録商標) 樹脂FF (Amersham社、ニュージャージー州ピスカタウェイ) 及びPOROS XS (CEX) (ThermoFisher社) がある。いくつかの実施形態では、エンドトキシンの除去は疎水性相互作用クロマトグラフィーを使用して行われる。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、エンドトキシン及びmAbの両方が同じ又は類似の電荷を有する場合に使用される。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、Sartobind Phenyl (Sartorius社、ゲッティンゲン、ドイツ) などの代表的なシステムによって実施できる。

【0407】

いくつかの実施形態では、特定レベルのエンドトキシンを含む抗体タンパク質の溶液が生成された後、タンパク質の最終的な製剤化の前にいくつかの工程がある。いくつかの実施形態では、半減期延長部分がタンパク質に結合される。その後、複合体は最終製剤に調合され、患者に注射される。いくつかの実施形態では、前記複合体は、陽イオン交換樹脂であってもよいイオン交換樹脂上で再度精製される。他の実施形態では、タンパク質が製剤化される。いずれの場合も、タンパク質試料又はタンパク質-ポリマー複合体へのエンドトキシン汚染物質の混入を防ぐために、通常の実験室手順を採用する必要がある。

【0408】

いくつかの実施形態では、本明細書では、以下のいずれかの構成が想定されている。

【0409】

アフィニティークロマトグラフィーを用いた生産物の精製方法であって、溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは目的のタンパク質に結合すること、及びカオトロピック剤を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、を含む方法。

【0410】

タンパク質及び1又は複数の不純物を含むロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスに通し、続いてカオトロピック塩を含む少なくとも1つの洗浄溶液を通し、溶出溶液を使用して前記タンパク質を収集することによって、前記ロード液から生産物を精製して不純物を減らす方法。

10

【0411】

目的のタンパク質を含む溶出液中の不純物を分離するための方法であって、目的のタンパク質を含む溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすること、及びリチウム及びリチウム塩、マグネシウム及びマグネシウム塩、カルシウム及びカルシウム塩、並びにグアニジニウム及びグアニジニウム塩のうち1又は複数を含む1又は複数の緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、を含む方法。

【0412】

アフィニティークロマトグラフィーを用いた生産物の製造方法であって、目的のタンパク質を含有する溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすること、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスの第一の洗浄をリン酸ナトリウム及び塩を含む第一の緩衝液で行うこと、並びに前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスの第二の洗浄をカオトロピック剤を含む第二の緩衝液で行うこと、を含む方法。

20

【0413】

アフィニティークロマトグラフィーを用いた生産物の製造方法であって、目的のタンパク質を含む溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすること、トリス及び塩を含む第一の緩衝液で第一の洗浄を行うこと、及びトリス及びカオトロピック剤を含む第二の緩衝液で第二の洗浄を行うこと、を含み、前記第二の緩衝液のカオトロピック剤は、前記第一の緩衝液に含まれる塩と同一ではない、方法。

30

【0414】

生産物の製造方法であって、ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、カオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、結合した前記目的のタンパク質を溶出させること、及び溶出液を収集することであって、前記溶出液は前記目的のタンパク質を含有すること、を含む方法。

【0415】

生産物の製造方法であって、ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、カオトロピック塩を含む緩衝溶液を前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスに供給すること、前記結合した目的のタンパク質を溶出させること、及び溶出液を収集することであって、前記溶出液は前記目的のタンパク質を含有すること、を含む方法。

40

【0416】

生産物の製造方法であって、複合体タンパク質を収集することであって、前記複合体タンパク質は、複合体ポリマーに結合した抗体を含むこと、前記複合体タンパク質をアフィ

50

ニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記複合体タンパク質に結合すること、カオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、前記複合体タンパク質を溶出させること、及び溶出液を収集することであって、前記溶出液は前記複合体タンパク質を含有すること、を含む方法。

【0417】

生産物の製造方法であって、目的の標的タンパク質に結合したアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを、カオトロピック塩を含む緩衝液で洗浄すること、溶出させて溶出液を収集することであって、前記溶出液は、前記目的の標的タンパク質を含有すること、及び前記溶出液からウイルス汚染物質を除去すること、を含む方法。前記方法は、前記溶出液からウイルス汚染物質を除去することが、低pH不活性化、界面活性剤不活性化、ポリッシングクロマトグラフィー工程、ウイルスろ過（VF）、限外ろ過（UF）、及び／又は透析ろ過（DF）のうち1又は複数を含むこと、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記溶出液が許容される医薬賦形剤とさらに組み合わせられて医薬組成物を形成すること、をさらに含んでもよい。前記方法は、緩衝溶液が前記医薬組成物に添加されること、をさらに含んでもよい。前記方法は、保存剤溶液が前記医薬組成物に添加されること、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記医薬組成物が硝子体内注射用にさらに精製されること、をさらに含んでもよい。

【0418】

生産物の製造方法であって、目的の標的タンパク質に結合したアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを、カオトロピック塩を含む緩衝液で洗浄すること、前記カオトロピック塩を除去すること、及び溶出させて溶出液を収集することであって、前記溶出液が前記目的の標的タンパク質を含有すること、を含む方法。

【0419】

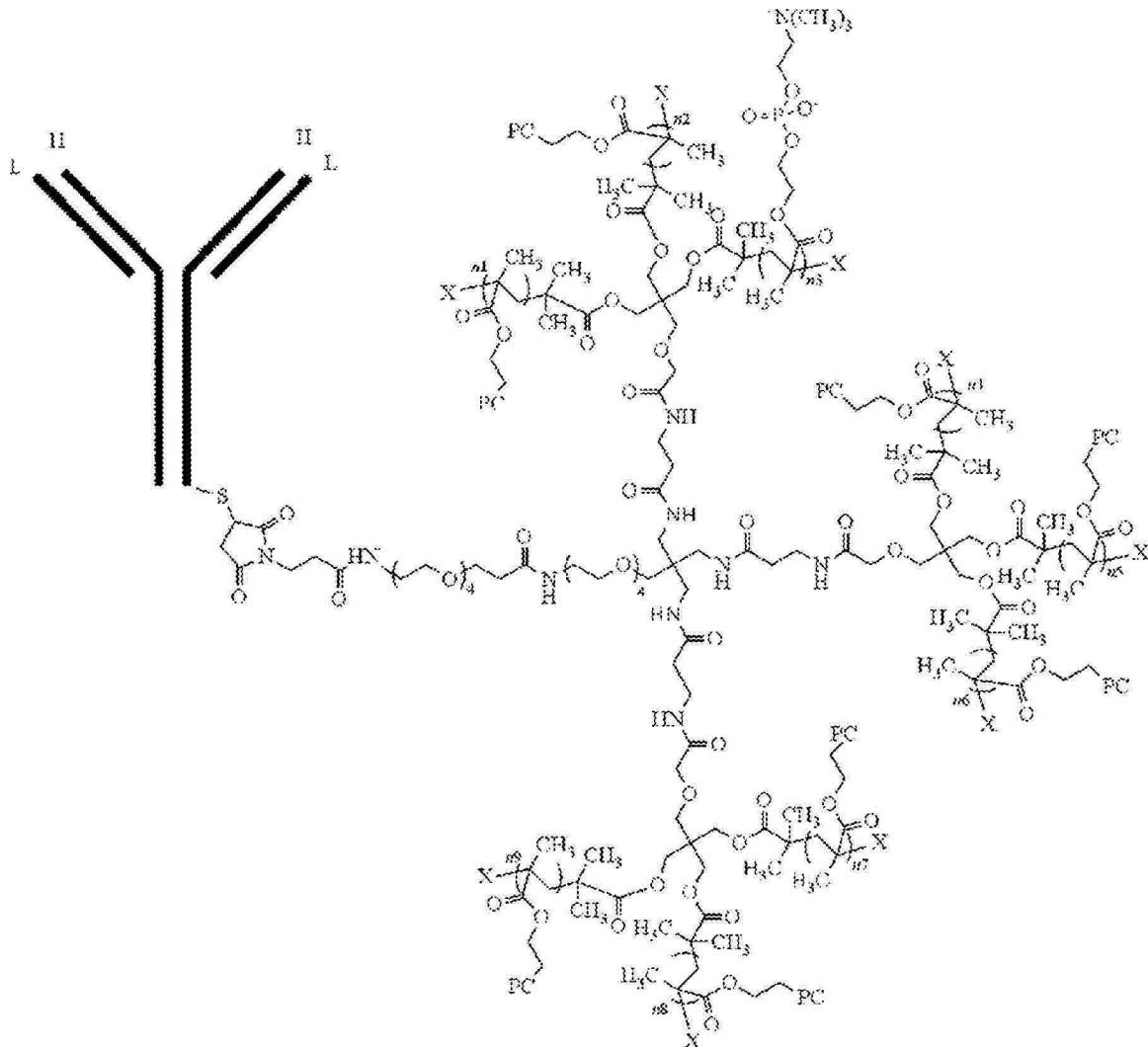
生産物の製造方法であって、ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、カオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、溶出させて溶出液を収集することであって、前記溶出液は目的の標的タンパク質を含むこと、及び前記溶出液からウイルス汚染物質を除去すること、を含む方法。

【0420】

生産物の製造方法であって、溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすること、第一の洗浄緩衝液で洗浄すること、カオトロピック塩を含む第二の洗浄緩衝液で洗浄すること、第三の洗浄緩衝液で洗浄することであって、前記第三の洗浄緩衝液で、前記カオトロピック塩を除去すること、及び、溶出緩衝液で溶出させることであって、溶出液を収集し、前記溶出液はタンパク質産物を含むこと、を含む方法。前記方法は、前記第一の洗浄緩衝液が50mMリン酸ナトリウムを含むこと、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記第一の洗浄緩衝液がさらに約250mM塩化ナトリウムを含むこと、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記第一の洗浄緩衝液がトリス及び塩を含むこと、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記溶出液からウイルス汚染物質を除去すること、をさらに含んでもよい。前記方法は、ウイルス汚染物質を除去することが、低pH不活性化、界面活性剤不活性化、ポリッシングクロマトグラフィー工程、ウイルスろ過（VF）、限外ろ過（UF）、及び透析ろ過（DF）のうち1又は複数を含むこと、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記溶離液が目的のタンパク質を含むこと、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記目的のタンパク質が抗体であること、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記抗体がさらにポリマーに結合されて抗体複合体を形成すること、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記抗体複合体が二重特異性抗体を含むこと、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記二重特異性抗体が抗VEGF結合部分及び抗IL-6結合部分を含むこと、をさらに含んでもよい。前記

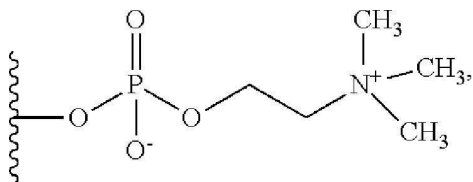
方法は、前記抗体複合体が下記構造を有することをさらに含んでいてもよい：

【化 4 8】



式中、抗 VEGF-A 抗体の各重鎖は文字 H で示されると共に、抗 VEGF-A 抗体の各軽鎖は文字 L で示され、前記ポリマーは、C443 (EU 番号付け) のスルフヒドリルを介して前記抗 VEGF-A 抗体に結合し、この結合は重鎖の 1 つに示されており、PC は

【化 4 9】



(式中、波線はポリマーの残りの部分への接続点を示す) であり、X は、a) -OR (R は -H、メチル、エチル、プロピル、又はイソプロピル)、b) -H、c) -Br、-Cl、若しくは -I を含む任意のハロゲン、d) -SCN、又は e) -NCS であり、並びに i) n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 、 n_8 、及び n_9 は同じか異なり、0 ~ 3000 までの整数であるか、又は ii) n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 、 n_8 、及び n_9 の合計が $2500 \pm 15\%$ であるように、 n_1 、 n_2 、 n_3 、 n_4 、 n_5 、 n_6 、 n_7 、 n_8 、及び n_9 は同じか異なる。

【0421】

生産物の製造方法であって、細胞培養上清を回収することであって、前記細胞培養上清は、目的のタンパク質を含むこと、前記細胞培養上清を溶離液で処理することであって、

前記溶離液は、前記目的のタンパク質を含むこと、前記溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすること、トリス又はリン酸ナトリウムを含む第一の洗浄緩衝液で洗浄すること、カオトロピック塩を含む第二の洗浄緩衝液で洗浄すること、溶出緩衝液で溶出させることであって、溶出液を収集し、前記溶出液はタンパク質産物を含むこと、前記溶出液中に存在するウイルス汚染物質を低pHウイルス緩衝液で不活性化し、ウイルス不活性化溶出液を生じさせること、前記ウイルス不活性化溶出液をろ過すること、前記ウイルス不活性化溶出液に対して少なくとも1回のイオン交換クロマトグラフィーを行うこと、及び前記ウイルス不活性化溶出液をろ過して保持液を得ることであって、前記保持液は目的のタンパク質を含むこと、を含む方法が本明細書において提供される。前記方法は、前記細胞培養上清が動物成分不含細胞培養物を用いてバイオリアクターで生産されたものであること、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記細胞培養上清を処理することが細胞培養物から細胞産物を採取すること、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記細胞培養物を清澄化して細胞及び細胞片を除去すること、をさらに含んでもよい。前記方法は、前記溶離液が前記清澄化細胞培養上清を含むこと、をさらに含んでもよい。アフィニティークロマトグラフィーを用いたタンパク質の精製方法であって、ロード液を媒体と接触させることであって、前記媒体は、目的のタンパク質を結合するアフィニティークロマトグラフィーマトリックスであること、カオトロピック剤を含む緩衝溶液で前記媒体を洗浄することであって、前記カオトロピック剤は塩であること、及び前記目的のタンパク質を溶出させるのに適した条件下で、洗浄した媒体を溶出溶液と接触させること、を含む方法。

10

20

【0422】

生産物の製造方法であって、目的のタンパク質を含む溶液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスに適用すること、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを第一の緩衝液で洗浄すること、カオトロピック剤を含む第二の緩衝液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、カオトロピック剤を除去するために第三の緩衝液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、及び溶出緩衝液で溶出させることであって、溶出液を収集し、前記溶出液はタンパク質産物を含むこと、を含む方法。

【0423】

タンパク質精製のためのシステムであって、第一の抗原結合タンパク質が結合したカラム、リン酸ナトリウム及び塩を含むリン酸洗浄緩衝液、トリスを含む中間洗浄緩衝液、塩化マグネシウムを含む第二の洗浄緩衝液、並びにギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液を含む、システム。

30

【0424】

タンパク質精製のためのシステムであって、第一の抗原結合タンパク質が結合したカラム、トリス及び塩を含む第一のトリス洗浄緩衝液、中間トリス洗浄緩衝液、塩化マグネシウムを含む第二の洗浄緩衝液、並びにギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液を含む、システム。前記システムは、前記カラムがアフィニティークロマトグラフィー用のリガンドを含むこと、をさらに含んでもよい。前記システムは、前記リガンドがプロテインA又はプロテインGを含むこと、をさらに含んでもよい。前記システムは、リン酸ナトリウム及び塩を含む前記第一の洗浄緩衝液のpHが5.5～9.5であること、をさらに含んでもよい。前記システムは、リン酸ナトリウム及び塩を含む前記リン酸洗浄緩衝液が約50mMのリン酸ナトリウムを含むこと、をさらに含んでもよい。前記システムは、リン酸ナトリウム及び塩を含む前記リン酸洗浄緩衝液が約250mM塩化ナトリウムを含むこと、をさらに含んでもよい。前記システムは、前記第一のトリス洗浄緩衝液が約50mMのトリスを含むこと、をさらに含んでもよい。前記システムは、前記第一のトリス洗浄緩衝液がさらに約250mM塩化ナトリウムを含むこと、をさらに含んでもよい。前記システムは、前記中間トリス洗浄緩衝液が約50mMトリスを含むこと、をさらに含んでもよい。前記システムは、前記第一のトリス洗浄緩衝液のpHが約7.2であること、をさらに含んでもよい。前記システムは、前記第二の洗浄緩衝液のp

40

50

Hが約7.8であること、をさらに含んでもよい。前記システムは、前記第二の洗浄緩衝液中の塩化マグネシウムの濃度が約2.8Mであること、をさらに含んでもよい。前記システムは、前記溶出緩衝液中のギ酸ナトリウムの濃度が10mMであること、をさらに含んでもよい。

【0425】

抗体精製のためのシステムであって、抗体に結合したプロテインA樹脂を有するカラムであって、前記抗体は、それぞれ配列番号91～93及び28～30のうちの少なくとも1つ並びに配列番号7～13、19～27、89、90、及び256～262のうちの少なくとも1つである軽鎖及び重鎖を含む、カラムと、カオトロピック塩を含むカオトロピック洗浄緩衝液と、ギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液と、を含む、システム。

10

【0426】

本明細書に記載されている方法は、前記目的のタンパク質が二重特異性抗体であること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記二重特異性抗体がVEGF及びIL-6に対して特異的であること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記二重特異性抗体がVEGF及びIL-6に対して特異的であること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記目的のタンパク質が抗体複合体であること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスがプロテインAクロマトグラフィーマトリックスであること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液中の前記カオトロピック剤がマグネシウム塩を含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記マグネシウム塩の濃度が1.5～3.5Mであること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液中の前記カオトロピック剤がカルシウム塩を含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記カルシウム塩の濃度が1～3Mであること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液中の前記カオトロピック剤がグアニジニウム塩を含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、グアニジニウム塩の濃度が0.05～3Mであること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液がさらにトリスを含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液中のトリスの濃度が少なくとも5mMであること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液のpHが5.5より大きいこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記溶出液がさらにウイルス不純物を含有すること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記ウイルス不純物を除去すること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記ウイルス不純物を不活性化すること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液で洗浄する前に、前記ロード液がロードされたアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを予洗浄緩衝溶液で洗浄すること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液で洗浄した後、前記溶離液がロードされた前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを後洗浄緩衝溶液で洗浄する工程をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記予洗浄緩衝溶液がリン酸ナトリウムを含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記予洗浄緩衝溶液がトリス及び塩を含むこと、をさらに含んでもよい。

20

30

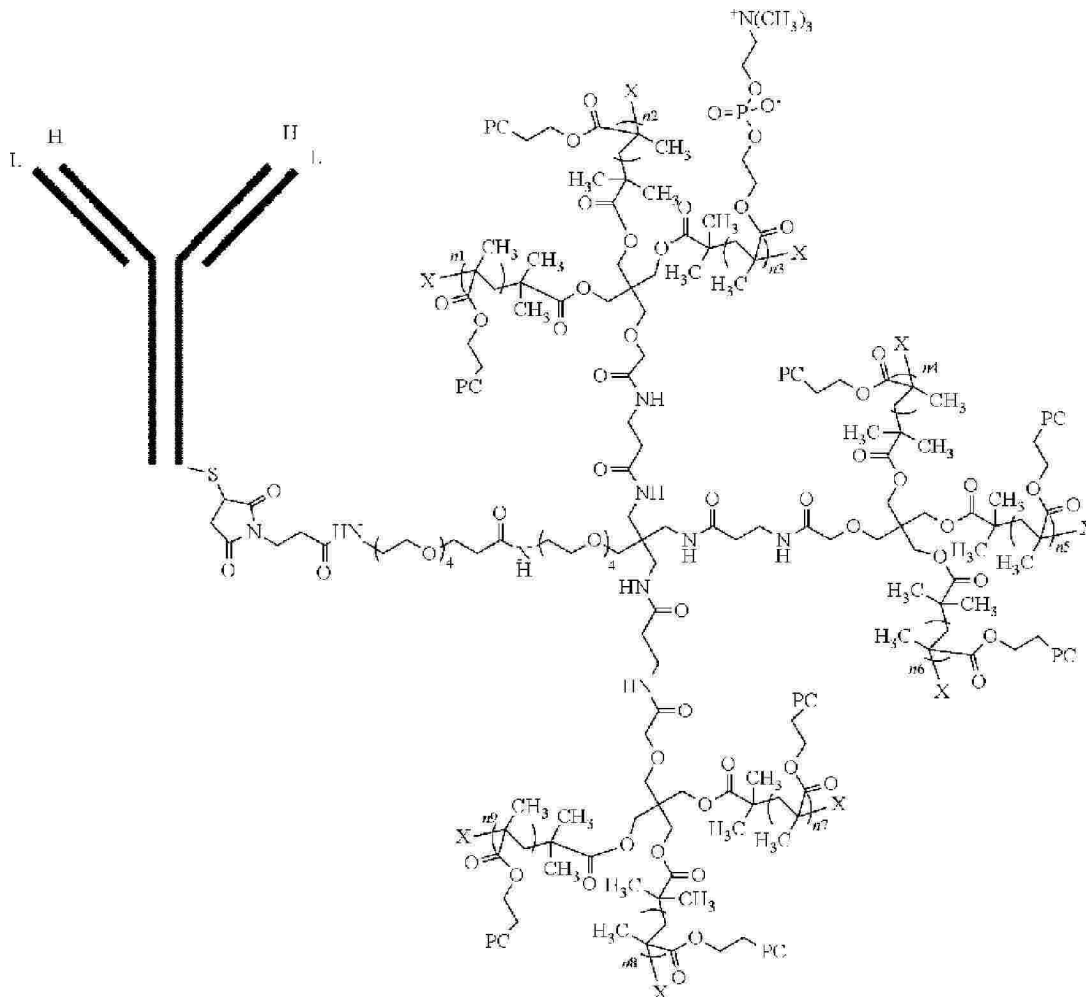
40

【0427】

本明細書に記載されている方法は、前記抗体複合体が下記構造を有すること、をさらに含んでもよい。

50

【化 5 0】



10

20

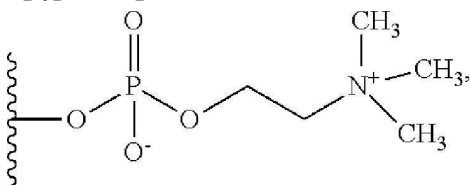
30

40

50

式中、抗 V E G F - A 抗体各重鎖は文字 H で示されると共に、抗 V E G F - A 抗体各軽鎖は文字 L で示され、前記ポリマーは、C 4 4 3 (E U 番号付け) のスルフィドリルを介して前記抗 V E G F - A 抗体に結合し、この結合は重鎖の 1 つに示されており、P C は

【化 5 1】



(式中、波線はポリマーの残りの部分への接続点を示す) であり、X は、a) - O R (R は - H 、メチル、エチル、プロピル、又はイソプロピル) 、b) - H 、c) - B r 、- C l 、若しくは - I を含む任意のハロゲン、d) - S C N 、又は e) - N C S であり、並びに i) n 1 、n 2 、n 3 、n 4 、n 5 、n 6 、n 7 、n 8 、及び n 9 は同じか異なり、0 ~ 3 0 0 0 までの整数であるか、又は i i) n 1 、n 2 、n 3 、n 4 、n 5 、n 6 、n 7 、n 8 、及び n 9 の合計が 2 5 0 0 ± 1 5 % であるように、n 1 、n 2 、n 3 、n 4 、n 5 、n 6 、n 7 、n 8 、及び n 9 は同じか異なる。

【 0 4 2 8 】

本明細書に記載されている方法は、前記抗体複合体が抗 V E G F - A 軽鎖及び抗 V E G F - A 重鎖を含む抗 V E G F 抗体複合体を含むこと、前記抗 V E G F - A 抗体重鎖が、配列番号 1 7 2 の C D R H 1 である C D R H 1 、配列番号 1 7 3 の C D R H 2 である C D R H 2 、及び配列番号 1 7 4 の C D R H 3 である C D R H 3 を含むこと、並びに前記抗 V E

G F - A 抗体軽鎖が、配列番号 199 の C D R L 1 である C D R L 1、配列番号 200 の C D R L 2 である C D R L 2、及び配列番号 201 の C D R L 3 である C D R L 3 を含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記抗 V E G F 抗体複合体が、M P C モノマーを含むポリマーに結合した抗 V E G F - A 免疫グロブリン G (I g G) を含む抗体複合体を含み、前記抗 V E G F - A 抗体重鎖の配列は、配列番号 7 ~ 13、19 ~ 27、89、90、及び 256 ~ 262 のうちの少なくとも 1 つであり、抗 V E G F - A 抗体軽鎖の配列は、配列番号 91 ~ 93、及び 28 ~ 30 のうちの少なくとも 1 つであり、並びに前記抗体が C 449 で前記ポリマーに結合していること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記目的の標的タンパク質が細胞培養物によって生産されること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記細胞培養物が C H O 細胞を含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液で洗浄した後、前記溶離液がロードされた前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを後洗浄緩衝溶液で洗浄する工程をさらに含み得る。本明細書に記載されている方法は、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質以外の核酸、エンドトキシン、消泡剤、又はその他の小分子が除去されること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを前記緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質を前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスに結合したまま不純物を除去すること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを前記緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質以外の宿主細胞タンパク質が除去されること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記緩衝溶液へのカオトロピック剤の添加によって、前記目的の標的タンパク質が溶出されないこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、ウイルス不活性化、タンジェンシャルフローろ過、透析ろ過、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、又はウイルス低減ろ過のうち 1 又は複数をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記溶離液が動物成分不含細胞培養物を用いてバイオリアクターで生産されたものであること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記生産物が目的のタンパク質であること、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、不純物が宿主細胞タンパク質不純物を含むこと、をさらに含んでもよい。

10

20

30

【0429】

本明細書に記載されている方法は、前記第一の洗浄緩衝液が塩を含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記第一の洗浄緩衝液がリン酸ベースの種を含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記第一の洗浄緩衝液がリン酸ナトリウムを含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記第一の洗浄緩衝液が、約 0.1 mM、約 1 mM、約 5 mM、約 10 mM、約 15 mM、約 20 mM、約 25 mM、約 30 mM、約 35 mM、約 40 mM、約 45 mM、約 50 mM、約 55 mM、約 60 mM、約 65 mM、約 70 mM、約 75 mM、約 80 mM、約 85 mM、約 90 mM、約 95 mM、約 100 mM、約 150 mM、約 200 mM、約 250 mM、又は任意の整数である 0.1 ~ 250 mM など、約 0.1 ~ 約 250 mM のリン酸塩を含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記第一の洗浄緩衝液が 10 mM リン酸ナトリウムを含むこと、をさらに含んでもよい。

40

【0430】

本明細書に記載されている方法は、前記第二の洗浄緩衝液が塩を含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記第二の洗浄緩衝液がリン酸ベースの種を含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記第二の洗浄緩衝液がリン酸ナトリウムを含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記第二の洗浄緩衝液が、約 0.1 mM、約 1 mM、約 5 mM

50

、約 10 mM、約 15 mM、約 20 mM、約 25 mM、約 30 mM、約 35 mM、約 40 mM、約 45 mM、約 50 mM、約 55 mM、約 60 mM、約 65 mM、約 70 mM、約 75 mM、約 80 mM、約 85 mM、約 90 mM、約 95 mM、約 100 mM、約 150 mM、約 200 mM、約 250 mM、又は任意の整数である 0.1～250 mM など、約 0.1～約 2500 mM のリン酸塩を含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記第二の洗浄緩衝液が 10 mM リン酸ナトリウムを含むこと、をさらに含んでもよい。

【0431】

本明細書に記載されている方法は、前記洗浄緩衝液が塩を含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記洗浄緩衝液がリン酸ベースの種を含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記洗浄緩衝液がリン酸ナトリウムを含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記洗浄緩衝液が、約 0.1 mM、約 1 mM、約 5 mM、約 10 mM、約 15 mM、約 20 mM、約 25 mM、約 30 mM、約 35 mM、約 40 mM、約 45 mM、約 50 mM、約 55 mM、約 60 mM、約 65 mM、約 70 mM、約 75 mM、約 80 mM、約 85 mM、約 90 mM、約 95 mM、約 100 mM、約 150 mM、約 200 mM、約 250 mM、又は任意の整数である 0.1～250 mM など、約 0.1～約 250 mM のリン酸塩を含むこと、をさらに含んでもよい。本明細書に記載されている方法は、前記洗浄緩衝液が 10 mM リン酸ナトリウムを含むこと、をさらに含んでもよい。

【0432】

いくつかの実施形態では、前記緩衝システムは、トリス以外のシステムを採用し得る。いくつかの実施形態では、前記緩衝システムは、リン酸ナトリウム以外のシステムを採用し得る。いくつかの実施形態では、前記緩衝溶液は、酢酸塩、クエン酸塩、ACES、BES、ピシン、HEPES、MES、MOPS、MOPSO、TAPS、トリシン、ピストリス、ピストリスプロパン、カコジル酸塩、CAPS、CAPSO、CHES、グリシン、グリシルグリシン、イミダゾール、PIPES、TEA、及びTESのうち1又は複数あり得る。いくつかの実施形態では、前記緩衝システムは、提示されるもの以外のpH値を使用し得る。いくつかの実施形態では、前記緩衝システムは、2～13のpH値を採用し得る。いくつかの実施形態では、使用される溶出緩衝液は、ギ酸ナトリウムではない。いくつかの実施形態では、前記溶出緩衝液は、塩基性である。いくつかの実施形態では、前記溶出緩衝液は、酸性である。

【0433】

構成

いくつかの実施形態では、以下のいずれかの構成が本明細書で考慮される。

1. アフィニティークロマトグラフィーを用いた生産物の精製方法であって、溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは目的のタンパク質に結合すること、及びカオトロピック剤を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、を含む、方法。
2. タンパク質及び1又は複数の不純物を含むロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスに通し、続いてカオトロピック塩を含む少なくとも1つの洗浄溶液を通し、溶出溶液を使用して前記タンパク質を収集することによって、前記ロード液から生産物を精製して不純物を減らす方法。
3. 目的のタンパク質を含む溶出液中の不純物を分離するための方法であって、目的のタンパク質を含む溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすること、及びリチウム及びリチウム塩、マグネシウム及びマグネシウム塩、カルシウム及びカルシウム塩、並びにグアニジニウム及びグアニジニウム塩のうち1又は複数を含む1又は複数の緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、を含む方法。
4. アフィニティークロマトグラフィーを用いた生産物の製造方法であって、

目的のタンパク質を含む溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすること、

リン酸ナトリウム及び塩を含む第一の緩衝液を用いて前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスの第一の洗浄を行うこと、並びに

カオトロピック剤を含む第二の緩衝液を使用して、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスの第二の洗浄を行うこと、を含む、方法。

5. アフィニティークロマトグラフィーを用いた生産物の製造方法であって、

目的のタンパク質を含む溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすること、

トリス及び塩を含む第一の緩衝液で第一の洗浄を行うこと、並びに

トリス及びカオトロピック剤を含む第二の緩衝液で第二の洗浄を行うこと、を含み、前記第二の緩衝液のカオトロピック剤は、前記第一の緩衝液に含まれる塩と同一ではない、方法。

6. 生産物の製造方法であって、

ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、

前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることであって、

前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、

カオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、

前記結合した目的のタンパク質を溶出させること、及び溶出液を収集することであって、

前記溶出液は前記目的のタンパク質を含有すること、を含む、方法。

7. 生産物の製造方法であって、

ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、

前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることであって、

前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、

カオトロピック塩を含む緩衝溶液を前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスに供給すること、

前記結合した目的のタンパク質を溶出させること、及び

溶出液を収集することであって、前記溶出液は前記目的のタンパク質を含有すること、を含む、方法。

8. 生産物の製造方法であって、

複合体タンパク質を収集することであって、前記複合体タンパク質は、複合体ポリマーに結合した抗体を含むこと、前記複合体タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記複合体タンパク質に結合すること、

カオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、

前記複合体タンパク質を溶出させること、及び

溶出液を収集することであって、前記溶出液は前記複合体タンパク質を含有すること、を含む、方法。

9. 生産物の製造方法であって、

目的の標的タンパク質に結合したアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを、カオトロピック塩を含む緩衝液で洗浄すること、溶出させて溶出液を収集することであって、

前記溶出液は、前記目的の標的タンパク質を含有すること、及び

前記溶出液からウイルス汚染物質を除去すること、を含む、方法。

10

20

30

40

50

10. 前記溶出液からウイルス汚染物質を除去することが、低pH不活性化、界面活性剤不活性化、ポリッシングクロマトグラフィー工程、ウイルスろ過(VF)、限外ろ過(UF)、及び／又は透析ろ過(DF)のうち1又は複数を含むこと、をさらに含んでもよい、構成9の方法。

11. 生産物の製造方法であって、目的の標的タンパク質に結合したアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを、カオトロピック塩を含む緩衝液で洗浄すること、前記カオトロピック塩を除去すること、及び溶出させて溶出液を収集することであって、前記溶出液が前記目的の標的タンパク質を含有すること、を含む、方法。

12. 前記溶出液が許容される医薬賦形剤とともに組み合わせられて医薬組成物を形成する、構成11の方法。

13. 緩衝溶液が前記医薬組成物に添加される、構成12の方法。

14. 保存剤溶液が前記医薬組成物に添加される、構成12の方法。

15. 前記医薬組成物が硝子体内注射用にさらに精製される、構成12の方法。

16. 生産物の製造方法であって、ロード液を収集することであって、前記ロード液は目的のタンパク質を含むこと、前記ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすることであって、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合すること、

カオトロピック塩を含む緩衝溶液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、

溶出させて溶出液を収集することであって、前記溶出液は目的の標的タンパク質を含むこと、及び

前記溶出液からウイルス汚染物質を除去すること、を含む、方法。

17. 生産物の製造方法であって、

溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすること、

第一の洗浄緩衝液で洗浄すること、

カオトロピック塩を含む第二の洗浄緩衝液で洗浄すること、

第三の洗浄緩衝液で洗浄することであって、前記第三の洗浄緩衝液で、前記カオトロピック塩を除去すること、及び、

溶出緩衝液で溶出させることであって、溶出液を収集し、前記溶出液はタンパク質産物を含むこと、を含む、方法。

18. 前記第一の洗浄緩衝液が50mMリン酸ナトリウムを含む、構成17の方法。

19. 前記第一の洗浄緩衝液が250mM塩化ナトリウムをさらに含む、構成17の方法。

20. 前記第一の洗浄緩衝液がトリス及び塩を含む、構成17の方法。

21. 前記溶出液からウイルス汚染物質を除去することをさらに含む、構成17の方法。

22. ウイルス汚染物質を除去することが、低pH不活性化、界面活性剤不活性化、ポリッシングクロマトグラフィー工程、ウイルスろ過(VF)、限外ろ過(UF)、及び透析ろ過(DF)のうち1又は複数を含む、構成21の方法。

23. 前記溶離液が目的のタンパク質を含む、構成17の方法。

24. 前記目的のタンパク質が抗体である、構成23の方法。

25. 前記抗体がさらにポリマーに結合されて抗体複合体を形成する、構成24の方法。

26. 前記抗体複合体が下記式(I)の構造を有する、構成24の方法：

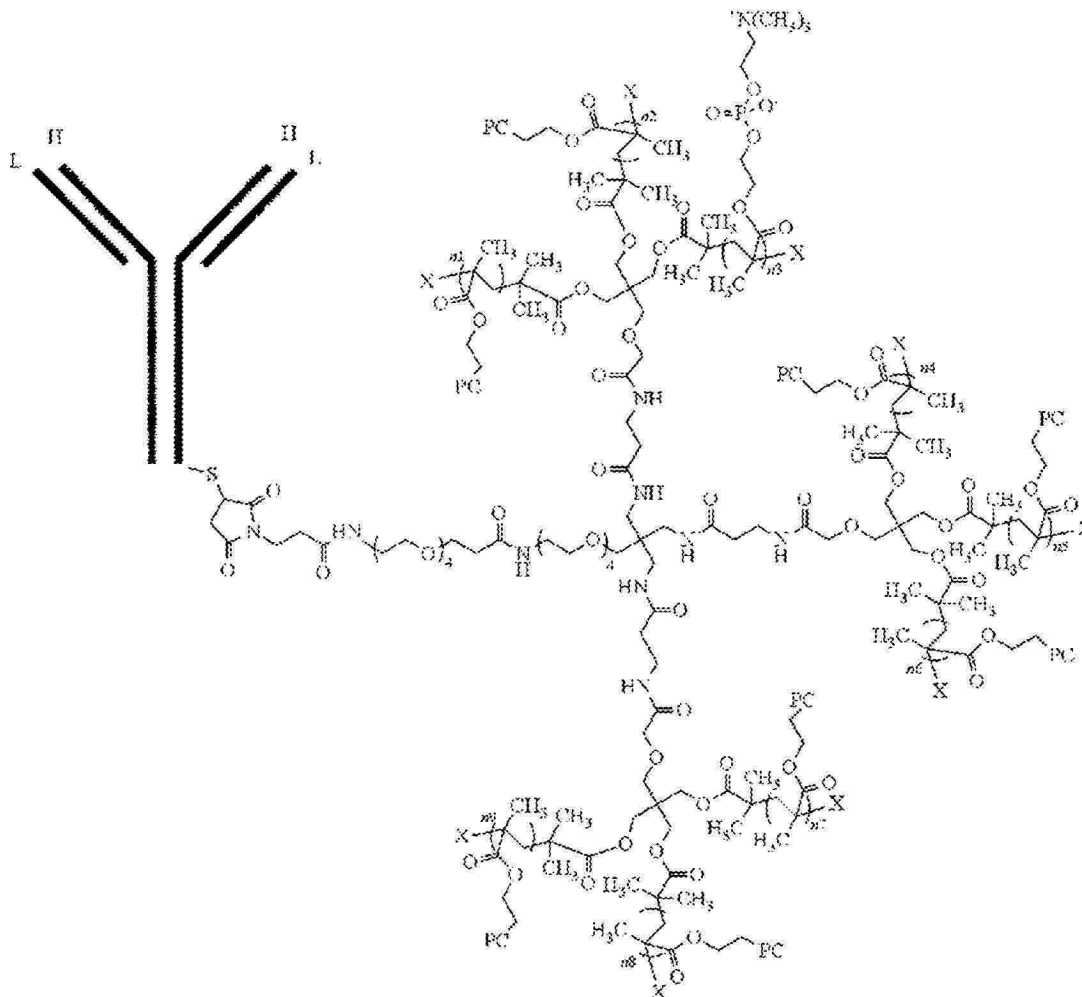
10

20

30

40

【化 5 2】

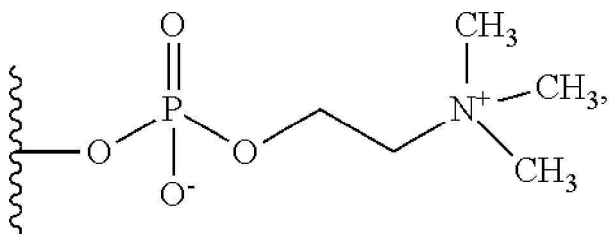


式中、抗 V E G F - A 抗体 of 各重鎖は文字 H で示されると共に、抗 V E G F - A 抗体 of 各軽鎖は文字 L で示され、

前記ポリマーは、C 4 4 3 (E U 番号付け) のスルフヒドリルを介して前記抗 V E G F - A 抗体に結合し、この結合は重鎖の 1 つに示されており、

P C は

【化 5 3】



(式中、波線はポリマーの残りの部分への接続点を示す) であり、X は、a) -O R (R は -H、メチル、エチル、プロピル、又はイソプロピル)、b) -H、c) -B r、-C l、若しくは -I を含む任意のハロゲン、d) -S C N、又は e) -N C S であり、並びに i) n 1、n 2、n 3、n 4、n 5、n 6、n 7、n 8、及び n 9 は同じか異なり、0 ~ 3 0 0 0 までの整数であるか、又は i i) n 1、n 2、n 3、n 4、n 5、n 6、n 7、n 8、及び n 9 の合計が $2500 \pm 15\%$ であるように、n 1、n 2、n 3、n 4、n 5、n 6、n 7、n 8、及び n 9 は同じか異なる。

2 7. 前記抗体複合体が二重特異性抗体を含む、構成 2 5 の方法。

2 8. 前記二重特異性抗体が抗 V E G F 結合部分及び抗 I L - 6 結合部分を含む、構成

24の方法。

29. 生産物の製造方法であって、

細胞培養上清を回収することであって、前記細胞培養上清は、目的のタンパク質を含むこと、

前記細胞培養上清を溶離液で処理することであって、前記溶離液は、前記目的のタンパク質を含むこと、

前記溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすること、

トリス又はリン酸ナトリウムを含む第一の洗浄緩衝液で洗浄すること、

カオトロピック塩を含む第二の洗浄緩衝液で洗浄すること、

溶出緩衝液で溶出させることであって、溶出液を収集し、前記溶出液はタンパク質産物を含むこと、

前記溶出液中に存在するウイルス汚染物質を低pHウイルス緩衝液で不活性化し、ウイルス不活性化溶出液を生じさせること、

前記ウイルス不活性化溶出液をろ過すること、

前記ウイルス不活性化溶出液に対して少なくとも1回のイオン交換クロマトグラフィーを行うこと、及び

前記ウイルス不活性化溶出液をろ過して保持液を得ることであって、前記保持液は目的のタンパク質を含むこと、を含む、方法。

30. 前記細胞培養上清が動物成分不含細胞培養物を用いてバイオリアクターで生産されたものである、構成29の方法。

31. 前記細胞培養上清を処理することが細胞培養物から細胞産物を採取することを含む、構成29の方法。

32. 前記細胞培養物を清澄化して細胞及び細胞片を除去する、構成31の方法。

33. 前記溶離液が前記清澄化細胞培養上清を含む、構成29の方法。

34. アフィニティークロマトグラフィーを用いたタンパク質の精製方法であって、ロード液を媒体と接触させることであって、前記媒体は、目的のタンパク質を結合するアフィニティークロマトグラフィーマトリックスであること、カオトロピック剤を含む緩衝溶液で前記媒体を洗浄することであって、前記カオトロピック剤は塩であること、及び前記目的のタンパク質を溶出させるのに適した条件下で、洗浄した媒体を溶出溶液と接触させること、を含む、方法。

35. 生産物の製造方法であって、

目的のタンパク質を含む溶液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスに適用すること、

前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを第一の緩衝液で洗浄すること、

カオトロピック剤を含む第二の緩衝液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、

カオトロピック剤を除去するために第三の緩衝液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄すること、及び

溶出緩衝液で溶出させることであって、溶出液を収集し、前記溶出液はタンパク質産物を含むこと、を含む、方法。

36. タンパク質精製のためのシステムであって、

第一の抗原結合タンパク質が結合したカラム、

リン酸ナトリウム及び塩を含むリン酸洗浄緩衝液、

トリスを含む中間洗浄緩衝液、

塩化マグネシウムを含む第二の洗浄緩衝液、並びに

ギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液、を含む、システム。

37. タンパク質精製のためのシステムであって、

第一の抗原結合タンパク質が結合したカラム、

トリス及び塩を含む第一のトリス洗浄緩衝液、

中間トリス洗浄緩衝液、

10

20

30

40

50

塩化マグネシウムを含む第二の洗浄緩衝液、並びに

ギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液、を含む、システム。

38. 前記カラムがアフィニティークロマトグラフィー用のリガンドを含む、構成36のシステム。

39. 前記リガンドがプロテインA又はプロテインGを含む、構成36のシステム。

40. リン酸ナトリウム及び塩を含む前記第一の洗浄緩衝液のpHが5.5~9.5である、構成36のシステム。

41. リン酸ナトリウム及び塩を含む前記リン酸洗浄緩衝液が約50mMのリン酸ナトリウムを含む、構成36のシステム。

42. リン酸ナトリウム及び塩を含む前記リン酸洗浄緩衝液が約250mM塩化ナトリウムを含む、構成36のシステム。

43. 前記第一のトリス洗浄緩衝液が約50mMのトリスを含む、構成36のシステム。

44. 前記第一のトリス洗浄緩衝液がさらに約250mM塩化ナトリウムを含む、構成43のシステム。

45. 前記中間トリス洗浄緩衝液が約50mMトリスを含む、構成36のシステム。

46. 前記第一のトリス洗浄緩衝液のpHが約7.2である、構成36のシステム。

47. 前記第二の洗浄緩衝液のpHが約7.8である、構成36のシステム。

48. 前記第二の洗浄緩衝液中の塩化マグネシウムの濃度が約2.8Mである、構成36のシステム。

49. 前記溶出緩衝液中のギ酸ナトリウムの濃度が10mMである、構成36のシステム。

50. 抗体精製のためのシステムであって、

抗体に結合したプロテインA樹脂を有するカラムであって、前記抗体は、それぞれ配列番号91~93及び28~30のうち少なくとも1つ並びに配列番号7~13、19~27、89、90、及び256~262のうち少なくとも1つである軽鎖及び重鎖を含むカラムと、

カオトロピック塩を含むカオトロピック洗浄緩衝液と、ギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液と、を含む、システム。

51. 前記目的のタンパク質が二重特異性抗体である、構成1の方法。

52. 前記二重特異性抗体がVEGF及びIL-6に対して特異的である、構成51の方法。

53. 前記二重特異性抗体がOG2072である、構成51の方法。

54. 前記目的のタンパク質が抗体複合体である、構成1の方法。

55. 前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスがプロテインAクロマトグラフィーマトリックスである、構成1の方法。

56. 前記緩衝液中の前記カオトロピック剤が、マグネシウム塩、カルシウム塩、及びグアニジニウム塩からなる群から選択される塩から構成される、構成1の方法。

57. 前記塩の濃度が0.05~3.5Mである、構成56の方法。

58. 前記緩衝溶液がさらにトリスを含む、構成1の方法。

59. 前記緩衝溶液中のトリスの濃度が少なくとも5mMである、構成58の方法。

60. 前記緩衝溶液のpHが5.5より大きい、構成1の方法。

61. 前記溶出液がさらにウイルス不純物を含む、構成3の方法。

62. 前記ウイルス不純物を除去することをさらに含む、構成61の方法。

63. 前記ウイルス不純物を不活性化することをさらに含む、構成62の方法。

64. 前記緩衝溶液で洗浄する前に、前記ロード液がロードされたアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを予洗浄緩衝溶液で洗浄する工程をさらに含む、構成3の方法。

65. 前記緩衝溶液で洗浄した後、前記溶離液がロードされた前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを後洗浄緩衝溶液で洗浄する工程をさらに含む、構成64の方法。

10

20

30

40

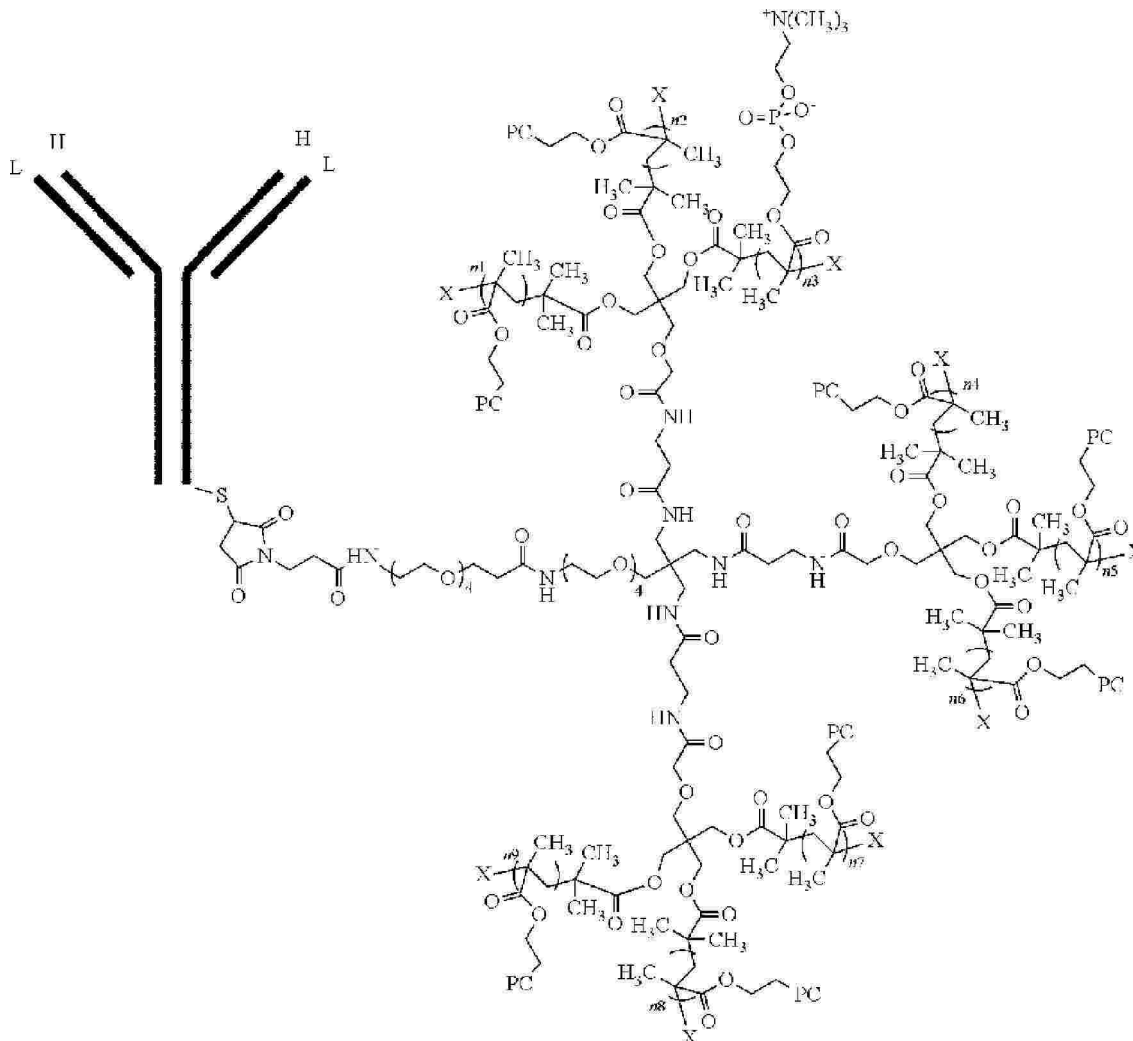
50

66. 前記予洗浄緩衝溶液がリン酸ナトリウムを含む、構成64の方法。

67. 前記予洗浄緩衝溶液がトリス及び塩を含む、構成64の方法。

68. 前記抗体複合体が下記式(I)の構造を有する、構成25の方法：

【化54】



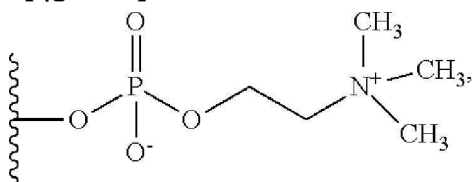
式中、

抗VEGF-A抗体の各重鎖は文字Hで示されると共に、抗VEGF-A抗体の各軽鎖は文字Lで示され、

前記ポリマーは、C443（EU番号付け）のスルフヒドリルを介して前記抗VEGF-A抗体に結合し、この結合は重鎖の1つに示されており、

PCは

【化55】



(式中、波線はポリマーの残りの部分への接続点を示す)であり、Xは、a) -OR (Rは-H、メチル、エチル、プロピル、又はイソプロピル)、b) -H、c) -Br、-Cl、若しくは-Iを含む任意のハロゲン、d) -SCN、又はe) -NCSであり、並びにi) n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7、n8、及びn9は同じか異なり、0～3000までの整数であるか、又はii) n1、n2、n3、n4、n5、n6、n7

、n 8、及びn 9の合計が2500±15%であるように、n 1、n 2、n 3、n 4、n 5、n 6、n 7、n 8、及びn 9は同じか異なる。

69. 前記抗体複合体が抗VEGF-A軽鎖及び抗VEGF-A重鎖を含む抗VEGF抗体複合体を含み、前記抗VEGF-A抗体重鎖が、配列番号172のCDRH1であるCDRH1、配列番号173のCDRH2であるCDRH2、及び配列番号174のCDRH3であるCDRH3を含み、並びに前記抗VEGF-A抗体軽鎖が、配列番号199のCDRL1であるCDRL1、配列番号200のCDRL2であるCDRL2、及び配列番号201のCDRL3であるCDRL3を含む、構成68の方法。

70. 前記抗VEGF抗体複合体が、MPCモノマーを含むポリマーに結合した抗VEGF-A免疫グロブリンG(IgG)を含む抗体複合体を含み、前記抗VEGF-A抗体重鎖の配列は、配列番号7～13、19～27、89、90、及び256～262のうちの少なくとも1つであり、抗VEGF-A抗体軽鎖の配列は、配列番号91～93、及び28～30のうちの少なくとも1つであり、並びに前記抗体がC449でポリマーに結合している、構成69の方法。

71. 前記目的の標的タンパク質が細胞培養物によって生産される、構成1の方法。

72. 前記細胞培養物がCHO細胞を含む、構成71の方法。

73. 前記緩衝溶液で洗浄した後、前記溶離液がロードされた前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを後洗浄緩衝溶液で洗浄する工程をさらに含む、構成3の方法。

74. 前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質以外の核酸、エンドトキシン、消泡剤、又はその他の小分子が除去される、構成3の方法。

75. 前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを前記緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質を前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスに結合したまま不純物を除去する、構成3の方法。

76. 前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを前記緩衝溶液で洗浄することにより、前記目的の標的タンパク質以外の宿主細胞タンパク質が除去される、構成3の方法。

77. 前記緩衝溶液へのカオトロピック剤の添加によって、前記目的の標的タンパク質が溶出されない、構成4の方法。

78. ウイルス不活性化、タンジェンシャルフローろ過、透析ろ過、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、又はウイルス低減ろ過のうち1又は複数をさらに含む、構成3の方法。

79. 前記溶離液が動物成分不含細胞培養物を用いてバイオリアクターで生産されたものである、構成3の方法。

80. 前記生産物が目的のタンパク質である、構成3の方法。

81. 不純物が宿主細胞タンパク質不純物を含む、構成3の方法。

82. 前記第一の洗浄緩衝液が10mMリン酸ナトリウムを含む、構成17の方法。

83. 前記第一の洗浄緩衝液がリン酸ベースの種を含む、構成17の方法。

84. 前記第一の洗浄緩衝液が50mM塩化ナトリウムをさらに含む、構成17の方法。

85. 生産物を処理するための方法であって、

溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードすること、及びカオトロピック塩を含む洗浄緩衝液で洗浄して溶出液を収集することを含み、前記カオトロピック塩の濃度は、第一濃度から第二濃度に増加され、前記溶出液は少なくとも1つの画分に収集され、並びに前記少なくとも1つの画分には目的の生産物が含まれる、方法。

86. 前記第一濃度における前記カオトロピック塩の濃度が0Mであり、前記第二濃度における前記カオトロピック塩の濃度が4.0Mである、構成85の方法。

87. 前記カオトロピック塩がマグネシウムベースである、構成85の方法。

88. 前記カオトロピック塩が塩化マグネシウムである、構成86の方法。

89. 前記緩衝溶液が、酢酸塩、クエン酸塩、ACES、BES、ピシン、HEPES

10

20

30

40

50

、MES、MOPS、MOPSO、TAPS、トリシン、ビスートリス、ビスートリスプロパン、カコジル酸塩、CAPS、CAPSO、CHES、グリシン、グリシルグリシン、イミダゾール、PIPES、TEA、及びTESのうち1又は複数をさらに含む、構成1の方法。

90. 前記目的の分子がタンパク質である、構成1の方法。

91. 前記タンパク質が抗体又は抗体様コンストラクト、例えばFc融合タンパク質である、構成90の方法。

【実施例】

【0434】

実施例1：OG2072の精製プロトコルの全容

動物成分不含細胞培養プロセスからOG2072抗体を精製するためのプロセス100を開示する(図1)。このプロセスには、3つのクロマトグラフィー工程及び2つのTFF(タンジェンシャルフローろ過)工程、並びに低pHウイルス不活性化が含まれる。まず、CHO細胞株110から清澄化細胞上清を採取した。次に、清澄化細胞上清に対してアフィニティークロマトグラフィー120を実施した。低pHウイルス不活性化130に続いて中間ろ過140を、アフィニティークロマトグラフィー中に収集された出力溶出液に対して行った。陰イオン交換クロマトグラフィー150とそれに続く陽イオン交換クロマトグラフィー160を含むクロマトグラフィーをさらに行った。ウイルス低減ろ過170を行い、その後最終的な限外ろ過／透析ろ過180を行った。

【0435】

低pHウイルス不活性化には、溶液をpH3.5で240分間保持し、その後pH7に中和することが含まれる。MabSelect SuRe LXアフィニティークロマトグラフィー(MSSLX)の後に、ウイルス不活性化／中和工程を行い、その後、最初のTFF(TFF1)を実施して、抗体をSartobind Q陰イオン交換クロマトグラフィー(AEXクロマトグラフィー)用に調整した。次に、POROS XS陽イオン交換クロマトグラフィー(CEXクロマトグラフィー)及びウイルス低減ろ過(Planova 20N)を行った。POROS XSは、10mMリン酸ナトリウム(pH5)、40mM塩化ナトリウム、添加物として酢酸(<15mS/cm)を用いた結合と、それに続く、50mM酢酸ナトリウム、pH6、10mM塩化ナトリウム、~50mM酢酸ナトリウム、pH6、300mM塩化ナトリウムでの10CVにおける勾配溶出とを含む。POROS XSクロマトグラフィー中に、2CVの50mM酢酸ナトリウム、pH5.0、10mM塩化ナトリウム、次に5CVの18.8mMリン酸ナトリウム、pH7.0、22.5mM塩化ナトリウム、次に3CVの50mM酢酸ナトリウム、pH5.0、10mM塩化ナトリウム、続いて2CVの50mM酢酸ナトリウム、pH6.0、10mM塩化ナトリウムで追加の洗浄を行った。最後に、2回目のTFF(TFF2)を行って抗体を製剤化し、抗体中間体を得た。しかしながら、HCPレベルは27ng/mgと、眼科用途には高すぎることが指摘されている。

【0436】

図2も同様に、生体分子の精製プロセス200を示す。まず、細胞培養物を増殖させ、発酵プロセス210を使用して培養した。その後、細胞培養物を採取220で収集し、清澄化細胞濃縮物を得た。次いで、清澄化細胞濃縮物を、アフィニティークロマトグラフィー及びウイルス不活性化／中和230を使用して精製した。プロセスの出力は生産物の保持液である。次に、収集した生産物保持液に対してタンジェンシャルフローろ過240を行い、その後、陰イオン交換クロマトグラフィー250工程及び陽イオン交換クロマトグラフィー260工程を順に行った。次に、処理した生産物の保持液を、ウイルス低減ろ過270に供し、第2のタンジェンシャルフローろ過280を行い、精製生産物が生じた。

【0437】

実施例2：カラムクロマトグラフィー中のOG2072の精製プロトコル、通常のリン酸ナトリウムプロトコル

望ましい分子種の収量及び純度を評価するために、測定可能なHCP種の減少率を評価

10

20

30

40

50

するプロトコルを開発した。動物成分不含細胞培養プロセスからOG2072抗体をカラム精製するためのプロセス300を開示する（図3）（表6A）。このプロセスは、平衡化310と、それに続く、清澄化細胞培養液（CCCF）をカラムにロードする320を含む。次に、カラムを、洗浄1の330、続いて洗浄2の340、洗浄3の350、及び洗浄4の360を含む一連の洗浄で処理する。洗浄2の340は、サブ洗浄340A、340B、及び340Cを含んでいてもよい。洗浄4の360に続いて、溶出370を行い、それにより溶出後処理380がカラム上で行われる。このプロセスには、pH7の50mMリン酸ナトリウム及び250mM塩化ナトリウムによるプロテインAカラムの平衡化310、次にロード320工程が含まれ、カラムに清澄化細胞培養液（CCCF）がロードされ、続いて、pH7の50mMリン酸ナトリウム及び250mM塩化ナトリウムによる第一の洗浄330を含む一連の洗浄330～360が続く。洗浄2の340は、表6Cに記載されているように、様々な洗浄緩衝液及び条件を含む。洗浄3の350は、pH7での50mMリン酸ナトリウム及び2M塩化ナトリウムによる洗浄を含み、洗浄4の360は、pH7での50mMリン酸ナトリウム及び250mM塩化ナトリウムによる洗浄を含む。溶出370はpH3.5の10mMギ酸ナトリウムで行い、溶出後処理はpH2.1の100mMクエン酸で前記カラムを通過させた。様々な溶液の流量及びカラム容量（CV）を、表6Aの右側に示す。緩衝液の組成を表6Aに記載した。

10

20

30

40

50

【表20】

表6A：通常のクロマトグラフィー精製

工程	緩衝液	CV	流量 (cm/h)
平衡化	50mMリン酸ナトリウム、250mM塩化ナトリウム、pH7	5	400
ロード			200
洗浄1	50mMリン酸ナトリウム、250mM塩化ナトリウム、pH7	2	200
洗浄2－添加剤濃度1	異なる。表6Cに記載。	3	400
洗浄2－添加剤濃度2		3	400
洗浄2－添加剤濃度3		3	400
洗浄3	50mMリン酸ナトリウム、2M塩化ナトリウム、pH7	3	400
洗浄4	50mMリン酸ナトリウム、250mM塩化ナトリウム、pH7	3	400
溶出	10mMギ酸ナトリウム、pH3.5	4	400
溶出後	100mMクエン酸、pH2.1	2	400
CIP	0.1水酸化ナトリウム（2CV後15分保持）	3	400

【0438】

実施例2.5：カラムクロマトグラフィーによるOG2072の精製

カラムクロマトグラフィーの工程は、表6Aに記載されているように行われる。カラムは、pH7の50mMリン酸ナトリウム及び250mM塩化ナトリウムを含む緩衝液で平衡化した。平衡時のカラム容積（CV）は5であり、流量400cm/hで供給される。続いて、200cm/hの速度で前記カラムにロードする。表6Aに記載されているように一連の洗浄を行った。次に、前記カラムからpH3.5の10mMギ酸ナトリウムを使用して溶出させた。溶出は、CV4、流速400cm/hを含む。

【0439】

実施例3：細胞抽出物由来の宿主細胞タンパク質レベルを低減するためのプロトコル

アフィニティークロマトグラフィーを用いた抗体の精製方法を開示する（表6B）。カラム精製に先立ち、OG2072は、動物成分不含細胞培養プロセス及び発酵を使用して10Lバイオリアクターで製造した。バイオリアクターから採取した清澄化細胞培養液（CCCF；上清SG01174/A1）は、プロテインA-HPLCによって4.118mg/mLと測定された。前記材料を280mLずつ分注し、プロテインAカラムで樹脂仕込み量18g/Lで5回行った。タンパク質溶液のpHは7.4、導電率は13.9m

S / c mであった。

【表 2 1】

表 6 B : カオトロピッククロマトグラフィー精製 (塩化マグネシウム)

工程	緩衝液	CV	流量 (cm/h)
平衡化	5 0 m M リン酸ナトリウム、2 5 0 m M 塩化ナトリウム、p H 7	5	300
ロード			200
洗浄 1	5 0 m M リン酸ナトリウム、2 5 0 m M 塩化ナトリウム、p H 7	2	200
洗浄 2 - 添加剤濃度 1	5 0 m M トリス、p H 8 . 8	4	300
洗浄 2 - 添加剤濃度 2	1 0 0 m M トリス、2 . 8 M 塩化マグネシウム	4	100
洗浄 2 - 添加剤濃度 3	5 0 m M トリス、p H 8 . 8	1.2	100
洗浄 3	5 0 m M トリス、p H 8 . 8	2.8	300
洗浄 4	5 0 m M リン酸ナトリウム、2 5 0 m M 塩化ナトリウム、p H 7	2	300
溶出	1 0 m M ギ酸ナトリウム、p H 3 . 5	5	300
溶出後	1 0 0 m M クエン酸、p H 2 . 1	2	300
CIP	0 . 1 水酸化ナトリウム (2 C V 後 1 5 分 保持)	3	300

10

20

【0 4 4 0】

カラムクロマトグラフィーの工程は、表 6 B に記載されているように行われる。カラムは、p H 7 の 5 0 m M リン酸ナトリウム及び 2 5 0 m M 塩化ナトリウムを含む緩衝液で平衡化した。平衡時のカラム容積 (C V) は 5 であり、流量 4 0 0 c m / h で供給した。続いて、2 0 0 c m / h の速度で前記カラムにロードした。表 6 B に記載されているように一連の洗浄を行った。1 0 0 m M トリス (T r i s) 及び 2 . 8 M 塩化マグネシウムを含む洗浄について説明する。1 0 0 m M トリス及び 2 . 8 M 塩化マグネシウムを含む洗浄は、さらに C V 4 及び流速 1 0 0 c m / h を含んでいた。次に、前記カラムから p H 3 . 5 の 1 0 m M ギ酸ナトリウムを使用して溶出させた。溶出は C V 5、流速 3 0 0 c m / h を含んでいた。

30

【0 4 4 1】

5 0 m M リン酸ナトリウム、2 5 0 m M 塩化ナトリウム、p H 7 を使用して平衡化を行い、その後 C C C F を前記カラム上にロードした。一回目の洗浄は 5 0 m M リン酸ナトリウム、2 5 0 m M 塩化ナトリウムで行い、続いて二回目の洗浄は p H 8 . 8 の 5 0 m M トリスで行った。続いて、1 0 0 m M トリス及び 2 . 8 M 塩化マグネシウムで三回目の洗浄を行った。次に、p H 8 . 8 の 5 0 m M トリスを含む洗浄 4 及び洗浄 5 を様々な流速で行った (図 4 を参照)。その後、最終洗浄 6 を 5 0 m M リン酸ナトリウム、2 5 0 m M 塩化ナトリウム、p H 7 で行った。洗浄後、目的のタンパク質を、p H 3 . 5 の 1 0 m M ギ酸ナトリウムを使用して溶出させ、その後、溶出後溶液として 1 0 0 m M クエン酸 (p H 2 . 1) を流した。各種液体の流量を表 6 B の右側に示す。結果は、参照実行と比較して H C P レベルが 8 分の 1 に減少したことを示している。説明した洗浄工程は、H C P のレベルを低下させるだけでなく、他の不純物 (例えば、エンドトキシン及び核酸) のレベルも低下させるのに役立つと考えられる。

40

【0 4 4 2】

実施例 4 : 宿主細胞タンパク質レベルを低下させる実験的バリエーション

以下の研究設計及び方法は、特に明記しない限り、実施例 2 に記載されているプロトコルに従う。洗浄手順の変更により、宿主細胞タンパク質 (H C P) レベルが低下した。表 6 C に、本開示のいくつかの実施形態による洗浄 2 のバリエーションを示す。表 6 C に、洗浄 2 工程なしで実施例 2 に開示されたプロトコルに従った参照実行の結果をさらに開示する。工程収率 8 9 . 3 %、H C P 濃度 1 8 4 2 . 7 1 n g / m g を示した参照値と比較すると、トリス + 2 . 8 M 塩化マグネシウムの実行では、工程収率が 8 7 . 9 % となり、

50

HCP濃度が8分の1の226.27 ng/mgに減少した。

【表22】

表6C：クロマトグラフィー精製結果

実行	試料ID	工程 収率 (%)	GP－ HPLC (% HMW2)	GP－ HPLC (% HMW1)	GP－ HPLC (% 純度)	HCP (ng/mg)	抗 VEGF RP (%)	抗 IL6 RP (%)	pH
洗浄2：トリス＋1.2M尿素	KV00080	90.8	0.78	4.71	94.52	1086.7	98.7	97.9	6.76
洗浄2：リン酸ナトリウム＋3.0M尿素＋IPA	KV00097	87.7	1.86	6.15	92	438.9	99.6	96.9	6.71
洗浄2：クエン酸Na＋0.3M尿素	KV00082	88.3	1.14	3.34	95.53	1198.3	93.5	95.2	4.81
洗浄2：トリス＋アルギニン	KV00083	81.1	0.67	4.48	94.86	531.4	96.1	101.8	7.07
参照実行	KV00084	89.3	1.07	4.52	94.42	1842.7	100	100	6.28
エシユムノ (E s h m u n o) A－参照実行	KV00087	82.9	0.24	1.51	98.26	2427.3	102.3	99	4.121
エシユムノA－洗浄2＋トリス＋3M塩化マグネシウム	KV00088	85.3	0.34	2.19	97.47	488.0	97.5	101.9	4.194
エシユムノA－洗浄2＋トリス＋3M塩化マグネシウム、溶出：4M塩化マグネシウム	KV00101D	107.3	7.24	15.48	77.29	230.9	97.2	88	6.92
洗浄2：トリス＋2.8M塩化マグネシウム	KV00103	87.9	1.14	4.58	94.3	226.3	105.3	100.6	6.15
洗浄2：トリス＋塩化マグネシウム、塩化マグネシウム勾配溶出	KV00105D	81	1	6.1	92.9	696.1	111.9	113	7.189
洗浄2：トリス＋塩化マグネシウム、塩化マグネシウム勾配溶出	KV00106D		0.92	5.88	93.2	670.0	110.2	111.9	

【0443】

実施例5：様々な洗浄緩衝液を使用した実験的実行

精製条件及び緩衝液の組成を評価するために、様々な洗浄条件を試験した。表6Dに様々な洗浄緩衝液を示す。実行1は、洗浄工程で可能な最低pH値を決定するための調査的実行であった。図3に示すように、洗浄1工程後にpH6からpH3へのpH溶出勾配を実施した。表6Fに各洗浄緩衝液による溶出後のHCPと収量レベルを示す。各洗浄緩衝液は、表6Dで説明した実行に対応している。結果は、様々な洗浄とカラムとの組み合わせによって、異なる生産物純度及びHCP濃度が得られることを示した。

【表 2 3】

表 6 D : クロマトグラフィー精製実行

実行	実験	緩衝液
1	0001	MSS L X : pH 6. 0 ~ pH 3. 0 の溶出勾配 (50 mM クエン酸ナトリウム)
2	0002	MSS L X : 50 mM トリス、pH 8. 8、続いて尿素を徐々に増加 (1 M、2 M、3 M)
3	0003	MSS L X : 50 mM トリス、pH 8. 8、1. 2 M 尿素
4	0004	MSS L X : 50 mM リン酸ナトリウム、pH 7 で洗浄し、続いて尿素を徐々に増やし (1 M、2 M、3 M)、50 mM リン酸ナトリウム、pH 6. 5、3 M 尿素、10% IPA で洗浄
5	0005	フォローアップ実行は行わず
6	0006	MSS L X : 50 mM クエン酸、pH 4. 7 で洗浄し、続いて尿素を徐々に増やし (1 M、2 M、3 M)、50 mM クエン酸ナトリウム、pH 4. 6、3 M 尿素、10% IPA で洗浄
7	0007	MSS L X : 50 mM クエン酸、pH 4. 7、0. 3 尿素
8	0008	MSS L X : 50 mM トリス、pH 8. 8 で洗浄し、その後アルギニン を段階的に増加 (0. 25 M、0. 5 M、0. 75 M)。フォローアップ 実行は行わず。
9	0009	MSS L X : 参照実行 (表 6 B に記載されているが、洗浄 2 工程なし)
10	0010	MSS L X : 50 mM トリス、pH 8. 8 で洗浄し、続いて塩化マグネ シウムを段階的に増やし (1 M、2 M、3 M、4 M)、100 mM トリス 塩基、4. 0 M 塩化マグネシウム、pH 6. 6 を適用。
11	0011	MSS L X : 50 mM トリス塩基、3 M 塩化マグネシウムを試みたが、 カラム詰まりが生じた。クロマトグラフィー負荷物質を室温で 3 日間放置 したところ沈殿物を形成した。容器は不透明で、沈殿は確認されなかった。 また、前回の実行 (0010) では、50 mM トリス塩基、4 M 塩化マ グネシウムから 50 mM リン酸ナトリウム、2. 0 M 塩化ナトリウム、p H 7 に変更したが、リン酸マグネシウムは容易に結晶化するため、カラム 上で沈殿が発生する可能性がある。新たなカラムをオーダーした。エシユ ムノ A 樹脂のスクリーニングを継続した。
12	0012	エシユムノ A : 参照条件 (表 6 B に記載、但し洗浄 2 工程なし)
13	0013	エシユムノ A : 50 mM トリス塩基、続いて塩化マグネシウム (1 M、2 M、3 M、3. 6 M、0 M) を段階的に増加させ、100 mM トリス塩基 、4. 0 M 塩化マグネシウム、pH 6. 6 を適用
14	0014	エシユムノ A : 50 mM トリス、pH 8. 8、続いて 50 mM トリス塩基 、3 M 塩化マグネシウム、50 mM トリス、pH 8. 8
15	0014b	エシユムノ A : 50 mM トリス、pH 8. 8、続いて 50 mM トリス塩基 、3 M 塩化マグネシウム、100 mM トリス塩基、4 M 塩化マグネシウム 、pH 6. 6 で溶出
16	0014c	エシユムノ A : 50 mM クエン酸ナトリウム、pH 4. 7、続いて塩化マ グネシウムを段階的に増加 (1 M、2 M、3 M、0 M)
17	0014d	エシユムノ A : 樹脂容量
18	0015	MSS L X : 50 mM トリス、pH 8. 8、続いて 50 mM トリス塩基 、2. 8 M 塩化マグネシウム、50 mM トリス、pH 8. 8
19	0016	MSS L X : 50 mM トリス、pH 8. 8、続いて 50 mM トリス塩基 、2. 8 M 塩化マグネシウム、50 mM トリス、pH 8. 8 (デュプリケ ート実行)
20	0017	MSS L X : 50 mM トリス、pH 8. 8、続いて 50 mM トリス塩基 、2. 8 M 塩化マグネシウム、2. 8 M ~ 4 M の塩化マグネシウムでの勾 配溶出

10

20

30

40

50

【表 2 4】

表 6 F : クロマトグラフィー精製結果

#	実行の説明	収 率 (%)	GP HPLC (HMW2) %	GP HPLC (HMW1) %	GP HPLC (純 度) %	HCP (ng/ mg)	抗 VEGF R P (%)	抗 IL6 R P (%)	pH
3	M S S L X - 洗 浄 2 : トリス + 1 . 2 M 尿 素	90.8	0.78	4.71	94.52	1086 .7	98.7	97.9	6.7 6
4	M S S L X - 洗 浄 2 : リン酸ナ トリウム + 3 . 0 M 尿 素 + I P A	87.7	1.86	6.15	92	438. 9	99.6	96.9	6.7 1
7	M S S L X - 洗 浄 2 : クエン酸 ナトリウム + 0 . 3 M 尿素	88.3	1.14	3.34	95.53	1198 .3	93.5	95.2	4.8 1
8	M S S L X - 洗 浄 2 : トリス + アルギニン	81.1	0.67	4.48	94.86	531. 4	96.1	101. 8	7.0 7
9	M S S L X - 参照実 行	89.3	1.07	4.52	94.42	1842 .7	100	100	6.2 8
1 2	エシユムノ A - 参照実 行	82.9	0.24	1.51	98.26	2427 .3	102.3	99	4.1 2
1 4	エシユムノ A - 洗 浄 2 + トリス + 3 M 塩化マ グネシウム	85.3	0.34	2.19	97.47	488. 0	97.5	101. 9	4.1 9
1 5	エシユムノ A - 洗 浄 2 + トリス + 3 M 塩化マ グネシウム 、溶出 : 4 M 塩化マ グネシウム	107. 3	7.24	15.48	77.29	230. 9	97.2	88	6.9 2
1 8	M S S L X - 洗 浄 2 : トリス + 2 . 8 M 塩 化マグネシ ウム	87.9	1.14	4.58	94.3	226. 3	105.3	100. 6	6.1 5
2 0	M S S L X - 洗 浄 2 : トリス + 塩化マグネ シウム 塩化マグネ シウム 勾配溶出	81	1	6.1	92.9	696. 1	111.9	113	7.1 9

【 0 4 4 4】

実施例 6 : 様々な洗浄緩衝液を使用した実験的実行

図 4 に表 6 D に記載された実行 6 のクロマトグラフィープロファイルを示す。M a b S e l e c t S u r e L X の尿素洗浄条件は、工程 2 では 5 0 m M クエン酸ナトリウム、p H 4 . 7 で、続いて尿素（1 M、2 M、及び 3 M）を徐々に増加し、5 0 m M クエン酸ナトリウム、p H 4 . 6、3 M 尿素、1 0 % I P A である。尿素及び I P A は、5 0 m M リン酸ナトリウム、p H 7、2 . 0 M 塩化ナトリウムで除去した。グラフによると、洗浄終了時に尿素は A 2 8 0 活性を少し示している。p H 4 . 7 では、2 M 以上の尿素により O G 2 0 7 2 が著しく溶出される。p H 7 及び p H 8 . 8 では、3 M 尿素は O G 2 0 7 2 の早期溶出を引き起こさない。図に示すように、各線は以下のように識別され、矢印で示されている：四角（■）：A 2 8 0；プラス（+）：ポンプ B 活性（%）；星（★）：p H

。したがって、本実施例では、様々な尿素洗浄条件を使用して実行したクロマトグラフィーの結果を示す。

【0445】

実施例7：様々な洗浄緩衝液を使用した実験的実行

図5に表6Dに記載された実行7のクロマトグラフィープロファイルを示す。Mab Select Sure LXに50mMクエン酸ナトリウム（pH4.7）、0.3M尿素洗浄液を添加。尿素及びIPAは、50mMリン酸ナトリウム、pH7、2.0M塩化ナトリウムで除去した。グラフによると、洗浄液にA280活性はあまり見られなかった。図に示すように、各線は以下のように識別され、矢印で示されている：四角（■）：A280；プラス（+）：ポンプB活性（%）；星（★）：pH。したがって、本実施例では、様々な尿素洗浄条件を使用して実行したクロマトグラフィーの結果を示す。

10

【0446】

実施例8：様々な洗浄緩衝液を使用した実験的実行

図6に表6Dに記載された実行10のクロマトグラフィープロファイルを示す。具体的には、図6は、塩化マグネシウムの濃度を徐々に増加させて適用し、カオトロープを使用して目的のタンパク質を溶出できるクロマトグラフィープロファイルを示している。Mab Select Sure LXを50mMトリス（pH8.8）で希釈し、続いて50mMトリスで塩化マグネシウムを段階的に増加させる（1M、2M、3M、4M）。塩化マグネシウムは、50mMリン酸ナトリウム、pH7、2.0M塩化ナトリウムで除去した。溶出前に、カラムを50mMリン酸ナトリウム、pH7、250mM塩化ナトリウムで平衡化した。50mMトリス塩基から4.0M塩化マグネシウム及び50mMリン酸ナトリウムへの移行中に結晶形成が起こった。リン酸イオン及びマグネシウムイオンは同時に存在できない。同時に存在するとリン酸マグネシウムの結晶が形成され、カラムが目詰まりを起こす。このプロファイルは、3M塩化マグネシウムが目的の生産物の溶出を伴わないカオトロープ濃度の上限を表し、少なくとも4M塩化マグネシウムが存在すると目的の生産物が定量的に溶出されることを示している。図に示すように、各線は以下のように識別され、矢印で示されている：四角（■）：A280；プラス（+）：ポンプB活性（%）；星（★）：pH。したがって、本実施例では、様々な塩化マグネシウム濃度を使用して実行したクロマトグラフィーの結果を示す。

20

【0447】

実施例9：様々な洗浄緩衝液を使用した実験的実行

図7に図6に記載された実行18のクロマトグラフィープロファイルを示す。Mab Select Sure LXを50mMトリス（pH8.8）で希釈し、続いて2.8M塩化マグネシウムを含む50mMトリスを添加。50mMトリス、pH8.8で塩化マグネシウムを除去した後、50mMリン酸ナトリウム、pH7、2M塩化ナトリウムを適用した。溶出前に、カラムを50mMリン酸ナトリウム、pH7、250mM塩化ナトリウムで平衡化した。図に示すように、各線は以下のように識別され、矢印で示されている：四角（■）：A280；プラス（+）：ポンプB活性（%）；星（★）：pH。したがって、本実施例では、塩化マグネシウム濃度のセットを使用して実行したクロマトグラフィーの結果を示す。

30

40

【0448】

実施例10：トリスベースの緩衝液を使用したカラム精製プロトコル

代替の緩衝液組成を検討し、カラム精製時に分析した。表6Gは、動物成分不含細胞培養プロセスからのOG2072抗体のカラム精製プロセスの実施形態を示している。平衡化及び洗浄工程用の緩衝液は、トリス単独又は塩化ナトリウムと塩化マグネシウムとの組み合わせからなる。平衡化は、50mMトリス、pH7.2、及び250mM塩化ナトリウムで行われる。洗浄1には50mMトリス、pH7.2、250mM塩化ナトリウムが含まれ、洗浄2には50mMトリス、pH7.8、2.8M塩化マグネシウムが含まれ、洗浄3は50mMトリス、pH8.8で行われる。洗浄4は、50mMトリス、pH7.2、250mM塩化ナトリウムで進められる。結果は、代替緩衝液を使用してカラムプロ

50

トコルの実施形態を達成できることを示している。いくつかの実施形態では、代替緩衝液は主にトリスからなる。したがって、本実施例ではトリスベースの緩衝液の使用方法を示す。

【表 25】

表 6 G：代替緩衝液を使用したカオトロピッククロマトグラフィー精製

工程	緩衝液	CV	流量 (cm/h)
平衡化	50 mM トリス、250 mM 塩化ナトリウム、pH 7.2	5	300
ロード			200
洗浄 1	50 mM トリス、250 mM 塩化ナトリウム、pH 7.2	2	200
洗浄 2	50 mM トリス、pH 7.8、2.8 M 塩化マグネシウム	3	100
洗浄 3	50 mM トリス、pH 8.8	3	100
洗浄 4	50 mM トリス、250 mM 塩化ナトリウム、pH 7.2	3	300
溶出	100 mM ギ酸ナトリウム、pH 3.5	4	300
溶出後	100 mM クエン酸、pH 2.1	2	300
CIP	0.1 水酸化ナトリウム	3	300

10

【0449】

実施例 11

本実施例では、アフィニティークロマトグラフィーを使用して生産物を精製する方法を示す。まず、溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードする。アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは目的のタンパク質に結合する。次に、カオトロピック剤を含む緩衝溶液でアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄する。洗浄から収集された液体には HCP 種が含まれる。その後、溶出溶液を使用して前記タンパク質を収集する。したがって、本実施例は、生産物を精製する方法を示している。

20

【0450】

実施例 12

本実施例では、ロード液から生産物を精製して不純物を低減させる方法を示す。ロード液はタンパク質及び 1 又は複数の不純物を含み、ロード液はアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを通過する。次に、カオトロピック塩を含む少なくとも 1 つの洗浄溶液をマトリックスに適用する。その後、溶出溶液を使用して前記タンパク質を収集する。したがって、本実施例は、生産物を精製する方法を示している。

30

【0451】

実施例 13

本実施例では、目的のタンパク質を含む溶出液中の不純物を分離する方法を示す。この方法は、目的のタンパク質を含む溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードすることを含む。次に、マグネシウム又はマグネシウム塩を含む 1 又は複数の緩衝溶液でアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄する。洗浄から収集された液体には HCP 種が含まれる。その後、溶出溶液を使用して前記タンパク質を収集する。よって、本実施例では、目的のタンパク質を含む溶出液中の不純物を分離する方法を示す。

40

【0452】

実施例 14

本実施例では、アフィニティークロマトグラフィーを使用して生産物を製造する方法を示す。まず、目的のタンパク質を含む溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードする。次に、リン酸ナトリウム及び塩を含む第一の緩衝液を用いてアフィニティークロマトグラフィーマトリックスの第一の洗浄を行う。次に、カオトロピック剤を含む第二の緩衝液を使用して、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスの第二の洗浄を行う。洗浄から収集された液体には HCP 種が含まれる。その後、溶出溶液を使用して前記タンパク質を収集する。よって、本実施例では、アフィニティークロマトグラフィーを使用して生産物を製造する方法を示す。

50

【 0 4 5 3 】

実施例 1 5

本実施例では、アフィニティークロマトグラフィーを使用して生産物を製造する方法を示す。まず、目的のタンパク質を含む溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードする。次に、トリス及び塩を含む第一の緩衝液で第一の洗浄を行う。次に、トリス及びカオトロピック剤を含む第二の緩衝液で第二の洗浄を行う。前記第二の緩衝液のカオトロピック剤は、前記第一の緩衝液に含まれる塩と同一ではない。洗浄から収集された液体にはH C P種が含まれる。その後、溶出溶液を使用して前記タンパク質を収集する。よって、本実施例では、アフィニティークロマトグラフィーを使用して生産物を製造する方法を示す。

10

【 0 4 5 4 】

実施例 1 6

本実施例では、生産物を製造する方法を示す。まず、ロード液を収集する。ロード液には、目的のタンパク質が含まれている。次に、ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードする。アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合する。次に、カオトロピック塩を含む緩衝溶液でアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄する。次に、前記結合した目的のタンパク質を溶出させて、溶出液を収集する。この溶出液は、目的の標的タンパク質を含有する。したがって、本実施例は、生産物を製造する方法を示している。

20

【 0 4 5 5 】

実施例 1 7

本実施例では、生産物を製造する方法を示す。まず、ロード液を収集する。ロード液には、目的のタンパク質が含まれている。次に、ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードする。アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合する。次に、カオトロピック塩を含む緩衝溶液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスに供給する。次に、前記結合した目的のタンパク質を溶出させて、目的のタンパク質を含む溶出液を収集する。したがって、本実施例は、生産物を製造する方法を示している。

【 0 4 5 6 】

実施例 1 8

本実施例では、生産物を製造する方法を示す。まず、複合体タンパク質を収集する。この複合体タンパク質は、複合体ポリマーに結合した抗体を含む。次に、複合体タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーマトリックス上にロードし、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスが複合体タンパク質に結合した後、カオトロピック塩を含む緩衝溶液でアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄する。次に、複合体タンパク質を溶出させて、溶出液を収集する。前記溶出液は前記複合体タンパク質を含む。したがって、本実施例は、生産物を製造する方法を示している。

30

【 0 4 5 7 】

実施例 1 9

本実施例では、生産物を製造する方法を示す。まず、目的の標的タンパク質に結合したアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを、カオトロピック塩を含む緩衝液で洗浄する。次に、溶出させて溶出液を収集する。この溶出液は、目的の標的タンパク質を含有する。次に、前記溶出液からウイルス汚染物質を除去する。したがって、本実施例は、生産物を製造する方法を示している。

40

【 0 4 5 8 】

実施例 2 0

本実施例では、生産物を製造する方法を示す。まず、目的の標的タンパク質に結合したアフィニティークロマトグラフィーマトリックスを、カオトロピック塩を含む緩衝液で洗浄する。次に、カオトロピック塩を除去し、カラムから溶出させて、目的の標的タンパク質を含む溶出液を収集する。したがって、本実施例は、生産物を製造する方法を示してい

50

る。

【0459】

実施例 2 1

本実施例では、生産物を製造する方法を示す。まず、ロード液を収集する。このロード液には、目的のタンパク質が含まれている。次に、ロード液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードする。アフィニティークロマトグラフィーマトリックスは前記目的のタンパク質に結合する。次に、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを、カオトロピック塩を含む緩衝溶液で洗浄する。次に、溶出させて溶出液を収集する。この溶出液は、目的の標的タンパク質を含有する。次に、前記溶出液からウイルス汚染物質を除去する。したがって、本実施例は、生産物を製造する方法を示している。

10

【0460】

実施例 2 2

本実施例では、生産物を製造する方法を示す。まず、溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードする。次に、第一の洗浄緩衝液で洗浄する。次に、カオトロピック塩を含む第二の洗浄緩衝液で洗浄する。次に、第三の洗浄緩衝液で洗浄する。前記第三の洗浄緩衝液で、前記カオトロピック塩を除去する。次に、溶出緩衝液で溶出させて、溶出液を収集する。この溶出液はタンパク質産物を含む。したがって、本実施例は、生産物を製造する方法を示している。

【0461】

実施例 2 3

本実施例では、生産物を製造する方法を示す。まず、細胞培養上清を回収する。この細胞培養上清には、目的のタンパク質が含まれている。次に、細胞培養上清を溶離液で処理する。この溶離液は、前記目的のタンパク質を含む。次に、前記溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードする。次に、トリス又はリン酸ナトリウムを含む第一の洗浄緩衝液で洗浄する。次に、カオトロピック塩を含む第二の洗浄緩衝液で洗浄する。次に、溶出緩衝液で溶出させて、溶出液を収集する。この溶出液はタンパク質産物を含む。次に、前記溶出液中に存在するウイルス汚染物質を低 pH ウイルス緩衝液で不活性化し、ウイルス不活性化溶出液を生じさせる。次に、ウイルス不活性化溶出液をろ過し、ウイルス不活性化溶出液に対して少なくとも 1 回のイオン交換クロマトグラフィーを行い、ウイルス不活性化溶出液をろ過して、目的のタンパク質を含む保持液を生じさせる。したがって、本実施例は、生産物を製造する方法を示している。

20

30

【0462】

実施例 2 4

本実施例では、アフィニティークロマトグラフィーを使用してタンパク質を精製する方法を示す。まず、ロード液を媒体と接触させる。この媒体は、目的のタンパク質を結合するアフィニティークロマトグラフィーマトリックスである。次に、カオトロピック剤を含む緩衝溶液で前記媒体を洗浄する。カオトロピック剤は塩である。次に、目的のタンパク質を溶出させるのに適した条件下で、洗浄した媒体を溶出溶液と接触させる。したがって、本実施例は、タンパク質を精製する方法を示している。

【0463】

実施例 2 5

本実施例では、生産物を製造する方法を示す。まず、目的のタンパク質を含む溶液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスに適用する。次に、前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを第一の緩衝液で洗浄する。次に、カオトロピック剤を含む第二の緩衝液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄する。次に、カオトロピック剤を除去するために第三の緩衝液で前記アフィニティークロマトグラフィーマトリックスを洗浄する。次に、溶出緩衝液で溶出させて、溶出液を収集する。この溶出液はタンパク質産物を含む。したがって、本実施例は、生産物を製造する方法を示している。

40

【0464】

50

実施例 26

本実施例では、タンパク質精製のためのシステムを示す。前記システムは、第一の抗原結合タンパク質が結合したカラム、リン酸ナトリウム及び塩を含むリン酸洗浄緩衝液、トリスを含む中間洗浄緩衝液、塩化マグネシウムを含む第二の洗浄緩衝液、並びにギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液を含み、HCP種を低減させ、タンパク質を精製するように構成されている。前記システムの使用後にHCP種が低減されたタンパク質が収集される。したがって、本実施例はタンパク質精製のシステムを示している。

【0465】

実施例 27

本実施例では、タンパク質精製のためのシステムを示す。前記システムは、第一の抗原結合タンパク質が結合したカラム、トリス及び塩を含む第一のトリス洗浄緩衝液、中間トリス洗浄緩衝液、塩化マグネシウムを含む第二の洗浄緩衝液、並びにギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液を含み、HCP種を低減させ、タンパク質を精製するように構成されている。前記システムの使用後にHCP種が低減されたタンパク質が収集される。したがって、本実施例はタンパク質精製のシステムを示している。

【0466】

実施例 28

本実施例では、抗体精製のためのシステムを示す。前記システムは、抗体に結合したブロテインA樹脂を有するカラムであって、前記抗体は、それぞれ配列番号91～93及び28～30のうち少なくとも1つ並びに配列番号7～13、19～27、89、90、及び256～262のうち少なくとも1つである軽鎖及び重鎖を含むカラムと、カオトロピック塩を含むカオトロピック洗浄緩衝液と、ギ酸ナトリウムを含む溶出緩衝液と、を含む。前記システムは、HCP種を低減させ、タンパク質を精製するように構成されている。前記システムの使用後にHCP種が低減されたタンパク質が収集される。したがって、本実施例は抗体精製のシステムを示している。

【0467】

実施例 29

本実施例では、生産物を処理するための方法を示す。まず、溶離液をアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにロードする。次に、カオトロピック塩を含む洗浄緩衝液で洗浄して溶出液を収集する。カオトロピック塩の濃度は、第一濃度から第二濃度に増加され、前記溶出液は少なくとも1つの画分に収集され、及び前記少なくとも1つの画分には目的の生産物が含まれる。したがって、本実施例では、溶出液の一部から目的の生産物を溶出させて収集するための方法を示す。

【0468】

実施例 30

OG1950及びウイルス不活性化OG1950の両方を精製するための参照実行は、表6Hに示す工程に従って実行し、OG1950及びウイルス不活性化OG1950の両方を精製するための一連の実験実行は、表6Iに示す工程に従って実行した。

【0469】

参照実行では、100mM水酸化ナトリウム(NaOH)を使用して洗浄工程を実行し、続いてpH7で50mMリン酸ナトリウム、250mM塩化ナトリウムを使用して平衡化を実行した。次に、タンパク質試料をカラムにロードした。次に、表6Hに従って洗浄1～3を順番に行った。続いて、pH3.5の10mMギ酸ナトリウムを使用して溶出を行い、その後、ストリップ及び洗浄のプロセスを行った。CV及び流量条件は表6Hに記載されている。100mM水酸化ナトリウムを使用して洗浄工程を実行し、続いてpH7で50mMリン酸ナトリウム、250mM塩化ナトリウムを使用して平衡化を実行した。次に、タンパク質試料をカラムにロードした。次に、表6Iに従って洗浄1～6を順番に行った。続いて、pH3.5の10mMギ酸ナトリウムを使用して溶出を行い、その後、ストリップ及び洗浄のプロセスを行った。

【0470】

表 6 J は H C P 減少率及び回収されたタンパク質濃度（O G 1 9 5 0 濃度 [m g / m L]）を示している。塩化マグネシウムベースの洗浄緩衝液を使用した実験では、参照実行条件と比較して H C P 含有量が約 5 倍減少した。

【表 2 6】

表 6 H：参照実行

工程	緩衝液	CV	流量 [cm/h]
CIP 1	1 0 0 m M 水酸化ナトリウム（2 C V 後 1 5 分保持）	3	400
平衡化	5 0 m M リン酸ナトリウム、2 5 0 m M 塩化ナトリウム、p H 7 . 0	5	400
ロード		該 当 せず	400
洗浄 1	5 0 m M リン酸ナトリウム、2 5 0 m M 塩化ナトリウム、p H 7 . 0	2	400
洗浄 2	5 0 m M リン酸ナトリウム、2 M 塩化ナトリウム、p H 7 . 0	4	400
洗浄 3	5 0 m M リン酸ナトリウム、2 5 0 m M 塩化ナトリウム、p H 7 . 0	2	400
溶出	1 0 m M ギ酸ナトリウム、p H 3 . 5	5	400
ストリップ	1 0 0 m M クエン酸、p H 2 . 1	2	400
CIP 2	1 0 0 m M 水酸化ナトリウム（2 C V 後 1 5 分保持）	3	400

10

【表 2 7】

表 6 I：実験実行

工程	緩衝液	CV	流量 [cm/h]
CIP 1	1 0 0 m M 水酸化ナトリウム（2 C V 後 1 5 分保持）	3	400
平衡化	5 0 m M リン酸ナトリウム、2 5 0 m M 塩化ナトリウム、p H 7 . 0	5	400
ロード		該 当 せず	400
洗浄 1	5 0 m M リン酸ナトリウム、2 5 0 m M 塩化ナトリウム、p H 7 . 0	2	400
洗浄 2	5 0 m M トリス、p H 8 . 8	4	400
洗浄 3	1 0 0 m M トリス塩基、2 . 8 M 塩化マグネシウム	4	100
洗浄 4	5 0 m M トリス、p H 8 . 8	1.2	100
洗浄 5	5 0 m M トリス、p H 8 . 8	2.8	400
洗浄 6	5 0 m M リン酸ナトリウム、2 5 0 m M 塩化ナトリウム、p H 7 . 0	2	400
溶出	1 0 m M ギ酸ナトリウム、p H 3 . 5	5	400
ストリップ	1 0 0 m M クエン酸、p H 2 . 1	2	400
CIP 2	1 0 0 m M 水酸化ナトリウム（2 C V 後 1 5 分保持）	3	400

30

【表 2 8】

表 6 J：H C P 及びタンパク質濃度の結果

試料の説明	O G 1 9 5 0 濃度 [m g / m L]	H C P [n g / m g]
M a b S e l e c t S u R e 溶出液－参照実行	13.42	>1001
ウイルス不活性化－参照実行	11.76	1023
M a b S e l e c t S u R e 溶出液－塩化マグネシウム洗浄	13.24	266
ウイルス不活性化－塩化マグネシウム洗浄	11.57	215

40

50

【 0 4 7 1 】

実施例 3 1

これまで使用されていたプラットフォームプロセスは表 7 A に示される通りである。本開示のさらなる実施形態は表 7 B に示される通りである。

【表 2 9】

表 7 A：プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーのプラットフォームプロセス

工程	入口	緩衝液	ポンプ B [%]	CV	流 量 [cm/h]	出口
リンス 1	B4	Milli Q H2O	100%	2	200	W
CIP 1	A3	0.1 M 水酸化ナトリウム (2 CV 後 15 分保持)	0%	3	300	W
平衡化	A1	50 mM リン酸ナトリウム、250 mM 塩化ナトリウム、pH 7.0	0%	5	300	W
ロード	S3		186.2	mL (IV)	200	W
洗浄 1	A1	50 mM リン酸ナトリウム、250 mM 塩化ナトリウム、pH 7.0	0%	2	200	W
洗浄 2	A4	50 mM リン酸ナトリウム、2.0 M 塩化ナトリウム、pH 7.0	0%	4	300	W
洗浄 6	A1	50 mM リン酸ナトリウム、250 mM 塩化ナトリウム、pH 7.0	0%	2	300	W
溶出	B1	10 mM ギ酸ナトリウム、pH 3.5	100%	5	300	O1
溶出後	B3	100 mM クエン酸、pH 2.1	100%	2	300	W
CIP 2	A3	0.1 M 水酸化ナトリウム (2 CV 後 15 分保持)	0%	3	300	W

10

20

30

40

50

【表 30】

表 7 B : プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーのプラットフォームプロセス

2

工程	入口	緩衝液	ポンプ B [%]	CV	流量 [cm/h]	出口
リンス 1	B4	Milli Q H2O	100%	2	200	W
CIP 1	A3	0.1 M 水酸化ナトリウム (2 CV 後 15 分保持)	0%	3	300	W
平衡化	A1	50 mM リン酸ナトリウム、250 mM 塩化ナトリウム、pH 7.0	0%	5	300	W
ロード	S3		186.2	ml (LV)	200	W
洗浄 1	A1	50 mM リン酸ナトリウム、250 mM 塩化ナトリウム、pH 7.0	0%	2	200	W
洗浄 2	A4	50 mM トリス、pH 8.8	0%	4	300	W
洗浄 3	A2	100 mM トリス塩基、pH 7.7 ; 2.8 M 塩化マグネシウム	0%	4	100	W
洗浄 4	A4	50 mM トリス、pH 8.8	0%	1.2	100	W
洗浄 5	A4	50 mM トリス、pH 8.8	0%	2.8	300	W
洗浄 6	A1	50 mM リン酸ナトリウム、250 mM 塩化ナトリウム、pH 7.0	0%	2	300	W
溶出	B1	10 mM ギ酸ナトリウム、pH 3.5	100%	5	300	O1
溶出後	B3	100 mM クエン酸、pH 2.1	100%	2	300	W
CIP 2	A3	0.1 M 水酸化ナトリウム (2 CV 後 15 分保持)	0%	3	300	W

10

20

30

【0472】

表 7 B に概説したプロセスは、ここで説明するようにさらに改良した。結晶化が問題となる溶液の場合、表 7 B に概説したプロセスが推奨されるプロセスとなる。例えば、溶液に塩化マグネシウムを使用する場合、リン酸緩衝液とマグネシウム塩との相互作用による急速な結晶化を防ぐために、洗浄工程数が多くなる。カルシウム塩を使用する場合は、リン酸緩衝液とカルシウム塩との相互作用を防ぐために、洗浄工程数も多くなる。但し、グアニジニウム塩の場合、結晶化は重大な問題ではないことが観察されるため、表 7 A に示すようなプロセスを利用することができ、このプロセスでは、第二の洗浄工程において 1 M 塩化グアニジニウム (GuHCl) に置換される。

40

【0473】

平衡化及び洗浄緩衝液パラメーターの範囲の確立

表 8 A に示すように、抗体コンストラクトを生理学的条件下でプロテイン A 親和性樹脂に適用することにより、プラットフォームプロセスを行った。

50

【表 3 1】

表 8 A

実行	タンパク質	樹脂	精製戦略	クロマトグラフィー溶出液		ウイルス不活性化タンパク質溶液			
				SEC-HPLC 純度 (%)	HCP (ng/mg)	SEC-HPLC 純度 (%)	HCP (ng/mg)	効力 (pM)	相対効力 (%)
1b	OG2072	MSSLX	平衡化+洗浄1: 50 mMリン酸ナトリウム、pH 7.0、250 mM塩化ナトリウム 洗浄3: 100 mMトリス塩基、2.8 M塩化マグネシウム	98.4	241	98.3	193	304	121
2	OG2072	MSSLX	平衡化+洗浄1: 5 mMリン酸ナトリウム、pH 7.0、50 mM塩化ナトリウム 洗浄3: 100 mMトリス塩基、2.8 M塩化マグネシウム	98.1	386	98.1	355	該当せず	該当せず
3	OG2072	MSSLX	平衡化+洗浄1: 200 mMリン酸ナトリウム、pH 7.0、2000 mM塩化ナトリウム 洗浄3: 100 mMトリス塩基、2.8 M塩化マグネシウム	98.2	410	98.1	279	該当せず	該当せず
4	OG2072	MSSLX	平衡化+洗浄1: 50 mMリン酸ナトリウム、pH 6.0、250 mM塩化ナトリウム 洗浄3: 100 mMトリス塩基、2.8 M塩化マグネシウム	98.2	259	98.2	254	該当せず	該当せず
5	OG2072	MSSLX	平衡化+洗浄1: 50 mMリン酸ナトリウム、pH 9.0、250 mM塩化ナトリウム 洗浄3: 100 mMトリス塩基、2.8 M塩化マグネシウム	97.9	327	98.2	311	該当せず	該当せず
6	OG2072	MSSLX	平衡化+洗浄（トリスのみ）: 50 mMトリス、pH 7.2、250 mM塩化ナトリウム 洗浄3: 100 mMトリス塩基、2.8 M塩化マグネシウム	97.9	340	97.8	296	336	110
22 b	OG2072	MSSLX	プラットフォームプロセス: 50 mMリン酸ナトリウム、pH 7.0、2.0 M塩化ナトリウムで洗浄（洗浄緩衝液には塩化マグネシウムは含まれない）	98.4	1285	98.5	562	330	114

【0474】

平衡化及び洗浄1緩衝液は、50 mMリン酸ナトリウム、250 mM塩化ナトリウム、pH 7.0を含んでいた。次に、高塩洗浄緩衝液2（50 mMリン酸ナトリウム、2.0 M塩化ナトリウム、pH 7.0）を適用して樹脂を洗浄し、抗体を溶出させる前に前記第一の緩衝液（10 mMギ酸ナトリウム、pH 3.5）で樹脂を再平衡化した。このプラットフォームプロセスの溶出液中のHCPレベルを軽減することを試みた。塩化マグネシウムはHCPをさらに除去するのに効果的であることが示された。マグネシウムはリン酸の存在下で結晶を形成するため、マグネシウム含有緩衝液を適用する前にリン酸を除去する洗浄液（50 mMトリス、pH 8.8）を導入した。マグネシウム含有緩衝液による洗浄が完了した後、リン酸ナトリウム緩衝液を適用する前に、同じ洗浄を再度適用してカラムからマグネシウムを除去した。この対策は、既存のプラットフォームプロセスにマグネシウム洗浄を導入できるようにするために必要であった。2.8 M塩化マグネシウムの濃度がこの目的に適していることがわかった（実行1b）。最初の一連の実験では、緩衝液濃

度及び塩濃度を試験して、緩衝液システム及び塩濃度の適切な操作範囲を定義した。

【0475】

実行2及び実行3では、5 mMリン酸ナトリウム、50 mM塩化ナトリウム、pH 7.0、並びに200 mMリン酸ナトリウム、2.0 M塩化ナトリウム、pH 7.0を、平衡化及びロード後の洗浄のために試験し、洗浄3工程では100 mMトリス塩基、2.8 M塩化マグネシウムを維持した。より高い緩衝液濃度及びより低い緩衝液濃度並びに塩化ナトリウム濃度では、アフィニティークロマトグラフィー段階の溶出液のHCPレベルは同等であり、HCP除去の効率には影響がなかった。これは、緩衝液システムの場合は、5 mM～200 mMの範囲が機能し、塩化ナトリウムの場合は、50 mM～2.0 Mの範囲が機能することを示している。

10

【0476】

実行4及び実行5では、50 mMリン酸ナトリウム、250 mM塩化ナトリウム、pH 6.0、並びに50 mMリン酸ナトリウム、250 mM塩化ナトリウム、pH 9.0を、平衡化及びロード後の洗浄のために試験し、洗浄3工程では100 mMトリス塩基、2.8 M塩化マグネシウムを維持した。平衡化と洗浄のためにより高いpH値及びより低いpH値を適用した実行の溶出液は、同等のHCPレベルを示した。HCPの効率には影響がなく、緩衝液システムのpH範囲が6.0～9.0であれば適切に機能することを示す。

【0477】

現行のプラットフォームでは、平衡化及びロード後の洗浄工程に50 mMリン酸ナトリウム、250 mM塩化ナトリウム、pH 7.0を使用する。トリス緩衝液のみを使用したクロマトグラフィー工程の実現可能性を試験するために、実験（実行6）を行った。この実験では、平衡化と洗浄に50 mMトリス、250 mM塩化ナトリウム、pH 7.2を使用した（50 mMリン酸ナトリウム、250 mM塩化ナトリウム、pH 7.0に代えて）。結果は同等であり、アフィニティークロマトグラフィーの工程をトリス緩衝液のみ行うと、マグネシウムイオンを適用する前にリン酸イオンを除去するための追加の洗浄（50 mMトリス、pH 8.8）を回避できることを示している。これにより、クロマトグラフィーのレイアウトが簡素化され、緩衝液の容量が低減される。

20

【0478】

要約すると、平衡化及び洗浄工程における緩衝液濃度及び塩化ナトリウム濃度の高低並びにpH値の高低によって、HCP除去効率は同等であることが示された。これにより、（1）緩衝液の濃度が5 mM～200 mM、（2）塩化ナトリウムの濃度が50 mM～2.0 M、（3）pHが6.0～9.0、（4）トリス緩衝液及びリン酸緩衝液が使用可能、という操作範囲が確立される。洗浄3：0.1 Mビストリス、pH 6.0、2.8 M塩化マグネシウムを使用した追加実験を行い、工程収率は低かったものの、良好に機能した。この緩衝液システムでは、より低濃度の塩化マグネシウムを確立する必要があると考えられる。

30

【0479】

塩化マグネシウム濃度範囲の設定

次に、発明者らは、表8Bに示すように、洗浄3工程における塩化マグネシウム濃度が溶出液のHCP含有量に与える影響を試験した。

40

【表 3 2】

表 8 B

実行	タンパク質	樹脂	精製戦略	クロマトグラフィー溶出液		ウイルス不活性化タンパク質溶液			
				S E C ー H P L C 純 度 (%)	HCP (ng/ mg)	S E C ー H P L C 純 度 (%)	HCP (ng/ mg)	効 力 (pM)	相 対 効 力 (%)
7	OG207 2	MSS LX	洗浄 3 : 0 . 1 M トリス塩基、1 . 5 M 塩化マグネシウム	97.8	415	97.8	368	該 当 せ ず	該 当 せ ず
9	OG207 2	MSS LX	洗浄 3 : 0 . 1 M トリス塩基、2 . 0 M 塩化マグネシウム	98.2	255	98.1	230	該 当 せ ず	該 当 せ ず
10	OG207 2	MSS LX	洗浄 3 : 0 . 1 M トリス塩基、2 . 5 M 塩化マグネシウム	98.3	276	98.2	221	該 当 せ ず	該 当 せ ず
1b	OG207 2	MSS LX	洗浄 3 : 1 0 0 m M トリス塩基、2 . 8 M 塩化マグネシウム	98.4	241	98.3	193	304	121
11	OG207 2	MSS LX	洗浄 3 : 0 . 1 M トリス塩基、3 . 0 M 塩化マグネシウム	98.5	158	98.3	136	314	117
22 b	OG207 2	MSS LX	プラットフォームプロセス : 5 0 m M リン酸ナトリウム、p H 7 . 0、 2 . 0 M 塩化ナトリウムで洗浄	98.4	1285	98.5	562	330	114

10

20

【0 4 8 0】

実行 7 ～実行 1 1 では、洗浄工程の塩化マグネシウム濃度と溶出液中の H C P 含有量との間に逆相関があることが示された。実行 1 1 を除く全ての実行で収率は良好であるが、3 . 0 M 塩化マグネシウムはやや過度に高く、アフィニティークロマトグラフィー工程の収率は 6 6 % である。その他の全ての実行では、収率は 8 5 % を超えた。S E C ー H P L C 純度は全ての実行で同等である。3 . 5 M 塩化マグネシウムが過度に高く、O G 2 0 7 2 が洗浄画分に溶出されたため、実行 1 2 のデータは表示されない。塩化マグネシウムを用いたこれらの実験及び濃度の影響から、発明者らは、濃度は影響があるが、濃度よりもマグネシウムの存在（ナトリウムに代えて）の方が重要であることを観察した。1 . 5 M 塩化マグネシウムでは 2 . 0 M 塩化ナトリウムよりも溶出液中の H C P が少ないことが示されたため、発明者らはこの結論に達した。

30

【0 4 8 1】

実行 1 3 は、p H 6 . 0 のビストリス洗浄緩衝液に 2 . 8 M 塩化マグネシウムを添加して行った。H C P 含有量は、溶出液プール及び V I 後でそれぞれ 9 4 n g / m g 及び n g / m g である。これは、プラットフォーム条件と比較すると 1 2 倍及び 5 倍少ない。しかし、洗浄工程で大量の O G 2 0 7 2 が溶出されたため、収率は 4 8 . 4 % と低くなった。したがって、これは経済的に実行可能な洗浄工程ではない。マグネシウム含有洗浄緩衝液の p H が 6 . 0 の場合、塩化マグネシウム含有量を下げて微調整する必要がある。なお、実行 8 を、p H 7 . 0 の 1 0 0 m M トリス緩衝液に 2 . 8 M 塩化マグネシウムを添加して行い、良好な工程収率が観察された。

40

【0 4 8 2】

洗浄 3 緩衝液の塩化マグネシウム濃度及び溶出液中の H C P 含有量には逆相関関係があった。塩化マグネシウム濃度（2 . 0 M 塩化マグネシウムを超える）を増加させることによる H C P 除去の追加効率は、少し低めであった。洗浄 3 緩衝液で 3 . 0 M 塩化マグネシウムを使用した実行を除き、全ての実行で収率は良好であり、抗体の一部が洗浄緩衝液に溶出されていた。S E C ー H P L C 純度は全ての実行で同等であった。塩化マグネシウムを用いたこれらの実験及び濃度の影響から、発明者らは、濃度は影響があるが、濃度よりもマグネシウムの存在（ナトリウムに代えて）の方が重要であったことを観察した。発明者らは、1 . 5 M 塩化マグネシウムを含む緩衝液では、2 . 0 M 塩化ナトリウムよりも溶出液中の H C P が少ないと結論付けた。

50

【 0 4 8 3 】

実施例 3 2 : 異なるカオトロピック強度の塩のスクリーニング

次に、H C P の除去がホフマイスター系列に従ったカオトロープの強度と相関するかどうかを判断するための試験を実行した。

【 0 4 8 4 】

カオトロピック陽イオンのスクリーニング

実験条件は表 9 A に示される通りであった。

【表 3 3】

表 9 A

実行	タンパク質	樹脂	精製戦略	クロマトグラフ イー溶出液		ウイルス不活性化タンパク質溶液			
				S E C ー H P L C 純 度 (%)	HCP (ng/mg)	S E C ー H P L C 純 度 (%)	HCP (ng/mg)	効 力 (pM)	相 対 効 力 (%)
19	OG207 2	MSS LX	洗浄 3 : 0 . 1 M トリス塩基、2 . 8 M 酢酸リチウム	98.1	444	98.1	390	321	117
14	OG207 2	MSS LX	洗浄 3 : 0 . 1 M トリス塩基、2 . 8 M 塩化リチウム	98.1	408	97.8	353	該 当 せず	該 当 せず
1b	OG207 2	MSS LX	洗浄 3 : 1 0 0 m M トリス塩基、2 . 8 M 塩化マグネシウム	98.4	241	98.3	193	304	121
23	OG207 2	MSS LX	洗浄 3 : 0 . 1 M トリス塩基、2 . 0 M 塩化カルシウム	97.6	157	98.1	147	299	126
29	OG207 2	MSS LX	洗浄液 3 : 0 . 1 M トリス塩基、1 . 0 M グアニジニウム塩化物*	98.9	86	98.7	86	該 当 せず	該 当 せず
22 b	OG207 2	MSS LX	プラットフォームプロセス : 5 0 m M リン酸ナトリウム、p H 7 . 0、 2 . 0 M 塩化ナトリウムで洗浄	98.4	1285	98.5	562	330	114

【 0 4 8 5 】

このため、トリス塩基に添加した 5 . 0 M 塩化カルシウムによる洗浄工程を実行したが（データは示さず）、O G 2 0 7 2 が洗浄画分に溶出されたため収量が低く、5 . 0 M ではカオトロピック効果が強すぎることを示された。洗浄緩衝液に 2 . 0 M 塩化カルシウムを添加してフォローアップの実行を行った。この実行では、アフィニティークロマトグラフィーの工程で良好な収率が示された。2 . 0 M 塩化カルシウムの存在により凝集のエビデンスは見られなかった。洗浄工程で 2 . 0 M 塩化ナトリウムを使用するプラットフォームプロセスと比較すると、H C P 含有量は大幅に低くなった。これは、塩化カルシウム洗浄の利点がカルシウム成分から得られることを示している。カルシウムはナトリウムよりもカオトロピックな陽イオンである。重要なのは、洗浄工程で 2 . 0 M 塩化カルシウムを使用した実行の溶出液の H C P 含有量が、2 . 8 M 塩化マグネシウムを使用した実行の溶出液よりも低かったということである。これは、ホフマイスター系列によればカルシウムはマグネシウムよりも強いカオトロープであるため、より強いカオトロープが H C P 除去に対してより有益な効果を有するという仮説を裏付けている。

【 0 4 8 6 】

産業において使用される最も強力なカオトロピック陽イオンはグアニジニウムである。実行 1 6 では、3 . 0 M 塩化グアニジニウムは、洗浄工程においては過度に高いことが示された。収量が低く、凝集レベルが上昇した。実行 2 4 では、S E C ー H P L C に影響を与えずプラットフォームプロセスと同等の条件での約 9 8 % と比較して、S E C ー H P L C 純度が 9 5 . 8 % であることから、1 . 6 5 M では塩化グアニジニウムの濃度がまだわずかに高すぎることを示された。実行 2 9 では、S E C ー H P L C で測定された良好な収率及び純度が示されたため、1 . 0 M 塩化グアニジニウムが適切であることが示された。溶出液中の H C P 含有量は 8 6 n g / m g で、プラットフォームプロセスの約 1 5 分の 1

であった。

【0487】

洗浄緩衝液中の塩の一部としてのカオトロピック陽イオンとしてナトリウムを使用した結果、HCP含有量は1285 ng/mgとなった。洗浄緩衝液中の塩の一部としてのカオトロピック陽イオンとしてリチウムを使用した結果、HCP含有量は408 ng/mgとなった。洗浄緩衝液中の塩の一部としてのカオトロピック陽イオンとしてマグネシウムを使用した結果、HCP含有量は241 ng/mgとなった。洗浄緩衝液中の塩の一部としてのカオトロピック陽イオンとしてカルシウムを使用した結果、HCP含有量は157 ng/mgとなった。洗浄緩衝液中の塩の一部としてのカオトロピック陽イオンとしてグアニジニウムを使用した結果、HCP含有量は86 ng/mgとなった。これは、ホフマイスター系列で説明されているカオトロピック強度に従い、HCPの除去は、洗浄緩衝液で使用される塩の一部としてのカオトロピック陽イオンの強度の関数であることを示唆している。すなわち、より強力なカオトロピック剤は、より高いHCP除去効率を有する（ $\text{Na}^+ < \text{Li}^+ < \text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{グアニジニウム}^+$ ）。注目すべきは、酢酸リチウム及び塩化リチウムはHCP除去において同等の効率を示し、塩化物の方がわずかに優れた性能を示したが、陰イオンの影響はそれほど顕著ではなかったことである。

10

【0488】

カオトロピック陰イオンのスクリーニング

実験条件は表9Bに示される通りであった。

20

【表34】

表9B

実行	タンパク質	樹脂	精製戦略	クロマトグラフィー溶出液		ウイルス不活性化タンパク質溶液			
				SEC-HPLC純度 (%)	HCP (ng/mg)	SEC-HPLC純度 (%)	HCP (ng/mg)	効力 (pM)	相対効力 (%)
19	OG2072	MSSLX	洗浄3:0.1Mトリス塩基、2.8M酢酸リチウム	98.1	444	98.1	390	321	117
14	OG2072	MSSLX	洗浄3:0.1Mトリス塩基、2.8M塩化リチウム	98.1	408	97.8	353	該当せず	該当せず
22b	OG2072	MSSLX	プラットフォームプロセス: 50mMリン酸ナトリウム、pH7.0、2.0M塩化ナトリウムで洗浄	98.4	1285	98.5	562	330	114
18	OG2072	MSSLX	洗浄3勾配: 0.1Mトリス塩基、7.0M硝酸ナトリウム	98.0	471	98.0	306	283	130
17b	OG2072	MSSLX	洗浄3:0.1Mトリス塩基、2.8M硫酸マグネシウム	98.1	412	97.9	319	325	113
1b	OG2072	MSSLX	洗浄3:100mMトリス塩基、2.8M塩化マグネシウム	98.4	241	98.3	193	304	121

30

【0489】

次に、陰イオンがHCPの除去に与える影響を調べる試験を実行した。HCP含有量に対する有益な効果がマグネシウムによるものか塩化物によるものかを明らかにするために、塩として硫酸マグネシウムを試験した。硫酸塩は強力なコスモトロピック陰イオンであり、タンパク質の沈殿又は結晶化など、高次のオリゴマー構造を誘発するために硫酸アンモニウム又は硫酸ナトリウムとしてよく使用される。対照的に、カオトロブは分子を溶液中に保持し、好ましくない相互作用又は非特異的な相互作用を防ぐために使用できる。実行17bでは、2.8M硫酸マグネシウムによる洗浄工程を適用した。溶出液にはプラットフォームプロセスよりも低いHCP含有量のOG2072が含まれ、2.8M塩化マグネシウムを使用した参照実行と同等のHCP含有量であった。この実行では、SEC-HPLCで測定したところ、良好な収率及び純度も示された。これは、塩化マグネシウム

40

50

洗浄の主な利点が塩化物成分ではなくマグネシウム成分から得られることを示唆している。マグネシウムはナトリウムよりも強いカオトロピック陽イオンであり、この洗浄戦略がプラットフォーム戦略よりも優れている理由であると考えられる。主な利点は陰イオンではなく陽イオンから得られることが示されていることが重要である。硫酸アニオンのコスモトロピック特性はマグネシウムのカオトロピック効果を元に戻すことはできない。

【0490】

実行18では、洗浄工程に塩として7.0M硝酸ナトリウムが含まれており、プラットフォームプロセスでは硝酸塩の方が塩化物よりもカオトロピックである。溶出液は、プラットフォームプロセスよりもHCP含有量が低いOG2072を含有していたが、適用された7.0M硝酸ナトリウムというはるかに高い濃度にもかかわらず、2.8M塩化マグネシウムを使用した参照実行と比較するとHCP含有量が高くなった。これは、HCP除去において、陰イオンと比較して陽イオンの方がより強力なパラメーターであるという仮説をさらに裏付けている。この仮説をさらに検証するために、実行19では2.8M酢酸リチウムを含む洗浄緩衝液を準備した。リチウムはナトリウムに比べてカオトロピックな陽イオンであるが、酢酸は塩化物よりもカオトロピック性が低くなる。溶出液は、塩化ナトリウムを使用したプラットフォームプロセスよりもHCP含有量が低いOG2072を含有していた。これは、よりコスモトロピックな陰イオンが存在することによって逆転されない陽イオンの有益な効果を示している。

【0491】

要約すると、洗浄緩衝液添加物として2.8M硫酸マグネシウムを使用した結果、プラットフォームプロセスよりもHCP含有量が低い溶出液が得られ、洗浄緩衝液添加物として2.8M塩化マグネシウムを使用した実行と比較するとHCP含有量が少し高くなった。これは、HCP除去における主な利点が陰イオンではなく陽イオンから得られることを示している。硫酸アニオンのコスモトロピック特性はマグネシウムのカオトロピック効果を元に戻すことはできない。酢酸リチウムと塩化リチウムとを比較した場合にも同様の結果が得られた。さらに、洗浄緩衝液の添加物として7.0M硝酸ナトリウムを使用した場合（硝酸塩は塩化物よりもカオトロピック性が高い）、溶出液のHCP含有量はプラットフォームプロセスよりも低くなるが、適用された7.0M硝酸ナトリウムというはるかに高い濃度にもかかわらず、2.8M塩化マグネシウムを使用した参照実行と比較するとHCP含有量が高くなった。これは、HCP除去において、陰イオンと比較して陽イオンの方がより強力なパラメーターであるという仮説をさらに裏付けている。

【0492】

アフィニティークロマトグラフィー工程にカオトロピック塩を含めることにより、HCPレベルが低下し、その効果は主に陽イオンの性質によって決まると結論付けられた。発明者らは、この観察結果が他の分子及び樹脂にも適用できるかどうかを評価したいと考えた。

【0493】

実行25及び実行26ではOG1950を使用し、それをMabSelect Sureに適用した（但し上記の他の全ての実験はMabSelect Sure LXを使用して行った）。OG1950はより古典的な一価抗体であるが、OG2072は二価融合抗体である。実行26では、プラットフォームプロセスに2.0M塩化ナトリウムを含む洗浄工程を適用したが、実行25では、2.8M塩化マグネシウムを含む洗浄緩衝液を適用した。2.8M塩化マグネシウムを使用した実行の溶出液（100ng/mg）は、洗浄緩衝液に2.0M塩化ナトリウムを使用した実行（423ng/mg）と比較して4倍低いHCPを示した。両方の実行で同等のSEC-HPLC純度及び効力が示され、塩化マグネシウムがOG1950抗体の構造及び機能に悪影響を及ぼさないことが実証された。比較のために、高pH洗浄（50mMリン酸ナトリウム、2.0M塩化ナトリウム、pH9.0で実行）を実行したが、2.8M塩化マグネシウムを含む洗浄緩衝液と比較して、HCP除去（341ng/mg）に同等の効果は観察されなかった。これは、HCP除去の効果はカオトロピック塩の性質に関連しており、高いpHによって代償され得ないこ

とを示している。実行 25 では、洗浄工程で一部の OG1950 が溶出されており、2.8 M 塩化マグネシウムは少し高すぎることが示唆されている。実行 28 では、2.0 M 塩化マグネシウムが適用され、2.0 M 塩化マグネシウムは OG1950 に適した濃度であり、2.0 M 塩化マグネシウム洗浄工程では A280 は認められなかったことが示された。これは、塩化マグネシウムを分子ごとに最適化する必要があることを示唆している。塩化マグネシウム濃度の低下は、溶出液中の HCP レベル (138 ng/mg) に大きな影響を与えなかった。この実行では、2.8 M 塩化マグネシウムを含む洗浄緩衝液を使用した実行と比較して、SEC-HPLC 純度が低くなる。この結果は想定外であった。

【0494】

実行 31 及び実行 32 では、アフリベルセプト (Aflibercept) を Mab Select Sure LX 樹脂に適用した。アフリベルセプトは、VEGF 受容体のリガンド結合要素を IgG の Fc 部分に融合させた可溶性融合タンパク質である。実行 31 では、プラットフォームプロセスに 2.0 M 塩化ナトリウムを含む洗浄工程を適用したが、実行 32 では、洗浄緩衝液に 2.8 M 塩化マグネシウムを添加した。塩化マグネシウムを使用した実行の溶出液は、洗浄緩衝液に塩化ナトリウムを使用した実行と比較して、少なくとも 3 倍低い HCP を示した。両方の実行で同等の SEC-HPLC 純度が示され、塩化マグネシウムがアフリベルセプトの構造に悪影響を及ぼさなかったことが実証された。2.8 M 塩化マグネシウム洗浄工程では、A280 活性は観察されず、この分子には 2.8 M 塩化マグネシウムが適切であった。

【0495】

実行 33 及び実行 34 では、OG2127 を Mab Select Sure LX 樹脂に適用した。OG2127 も、VEGF 受容体のリガンド結合要素を Fc 部分に融合させた可溶性融合タンパク質である。実行 33 では、プラットフォームプロセスに 2.0 M 塩化ナトリウムを含む洗浄工程を適用したが、実行 34 では、洗浄緩衝液に 2.8 M 塩化マグネシウムを添加した。塩化マグネシウムを使用した実行の溶出液は、洗浄緩衝液に塩化ナトリウムを使用した実行と比較して、少なくとも 5 倍低い HCP を示した。両方の実行で同等の SEC-HPLC 純度が示され、塩化マグネシウムが OG2127 の構造に悪影響を及ぼさなかったことが実証された。2.8 M 塩化マグネシウム洗浄工程では、やはり A280 活性は観察されず、この分子には 2.8 M 塩化マグネシウムが適切であった。

【0496】

これらの実験により、この概念が、一価及び二価抗体コンストラクト及び Fc 融合タンパク質などの様々な抗体タイプ及びコンストラクトに機能することが示された。また、2 種類の異なるアフィニティー樹脂も試験した。これは、その概念が OG2072 だけでなく一般的に適用できることを示している。

【0497】

実施例 33：様々なタンパク質及び樹脂のスクリーニング

次に、表 10 に示すように、2 つの異なるアフィニティー樹脂並びに様々な抗体及びタンパク質を使用して、本明細書に開示されているアフィニティークロマトグラフィープロセスを決定するための試験を実施した。

【表 3 5】

表 1 0

実行	タンパク質	樹脂	精製戦略	クロマトグラフィー溶出液		ウイルス不活性化タンパク質溶液			
				SEC-HPLC純度 (%)	HCP (ng/mg)	SEC-HPLC純度 (%)	HCP (ng/mg)	効力 (pM)	相対効力 (%)
22b	OG2072	MSSLX	プラットフォームプロセス：50 mMリン酸ナトリウム、pH 7.0、2.0 M塩化ナトリウムで洗浄	98.4	1285	98.5	562	330	114
1b	OG2072	MSSLX	洗浄3：100 mMトリス塩基、2.8 M塩化マグネシウム	98.4	241	98.3	193	304	121
26	OG1950	MSS	プラットフォームプロセス：50 mMリン酸ナトリウム、pH 7.0、2.0 M塩化ナトリウムで洗浄	96.2	423	96.5	281	1607	96
25	OG1950	MSS	洗浄3：100 mMトリス塩基、2.8 M塩化マグネシウム	96.3	100	96.3	63	1755	88
28	OG1950	MSS	洗浄3：100 mMトリス塩基、2.0 M塩化マグネシウム	93.9	138	93.9	94	1610	96
31	アフリベルセプト	MSSLX	プラットフォームプロセス：50 mMリン酸ナトリウム、pH 7.0、2.0 M塩化ナトリウムで洗浄	98.8	該当せず	98.7	>21,538°	該当せず	該当せず
32	アフリベルセプト	MSSLX	洗浄3：100 mMトリス塩基、2.8 M塩化マグネシウム	98.2	該当せず	98.1	7,611°	該当せず	該当せず
33	OG2127I	MSSLX	プラットフォームプロセス：50 mMリン酸ナトリウム、pH 7.0、2.0 M塩化ナトリウムで洗浄	100.0	該当せず	99	>66,667°	該当せず	該当せず
34	OG2127	MSSLX	洗浄3：100 mMトリス塩基、2.8 M塩化マグネシウム	98.8	該当せず	98.8	12,482°	該当せず	該当せず

10

20

【0498】

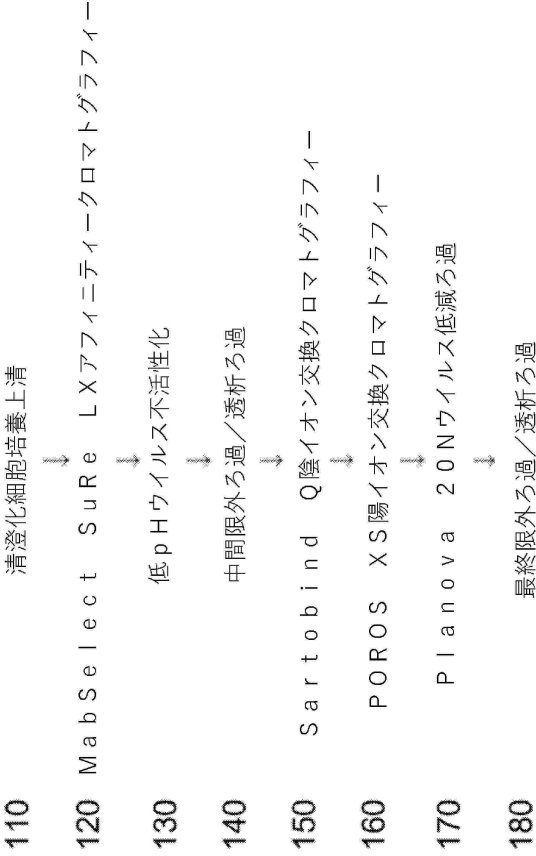
上記の表10に示されているように、本明細書で開示された方法論は、様々な抗体及びタンパク質にわたって広く有効であった。改良された洗浄戦略は、一価及び二価の抗体コンストラクトだけでなく、様々なFc融合タンパク質にも有効であった。したがって、本発明者らは、洗浄戦略があらゆる種類の抗体及び／又はタンパク質に一般的に適用可能であると想定している。

30

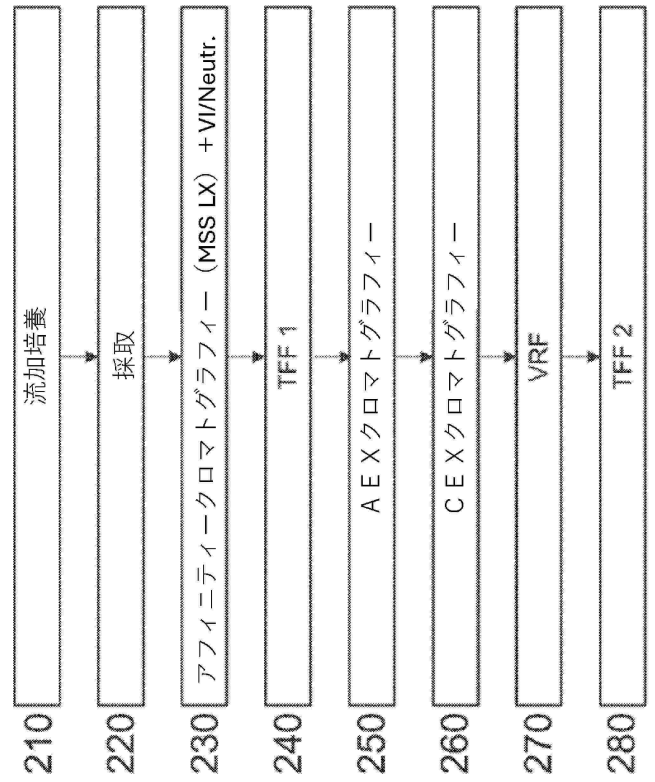
40

50

【図面】
【図 1】



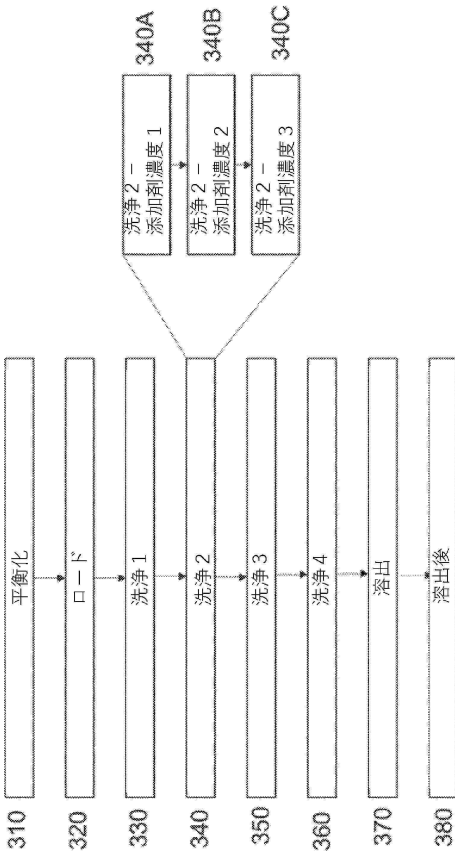
【図 2】



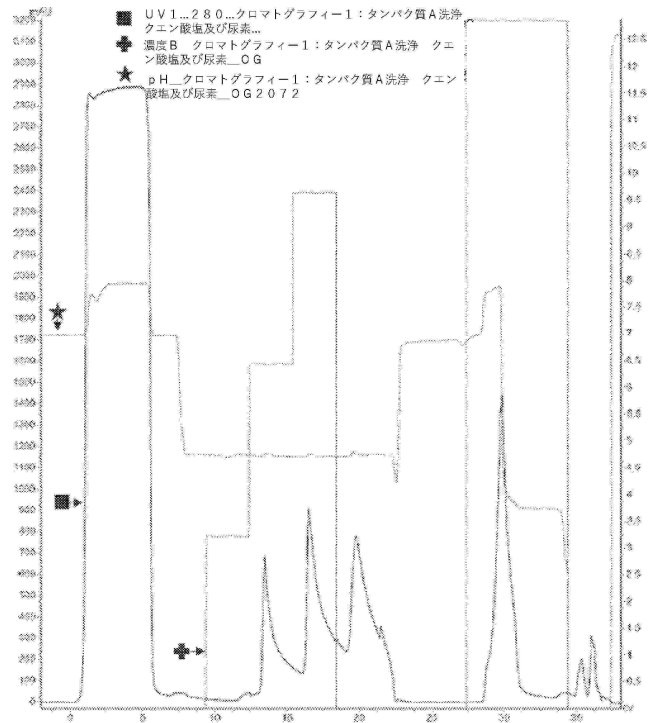
10

20

【図 3】



【図 4】

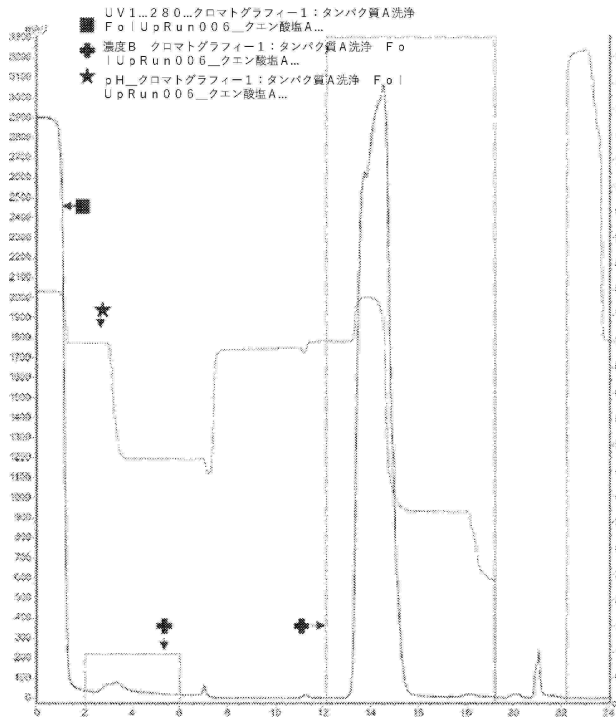


30

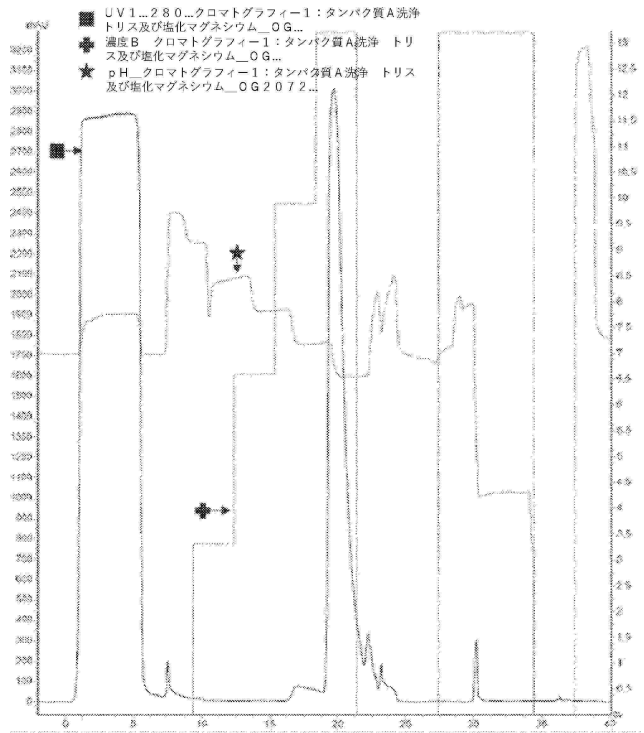
40

50

【図 5】



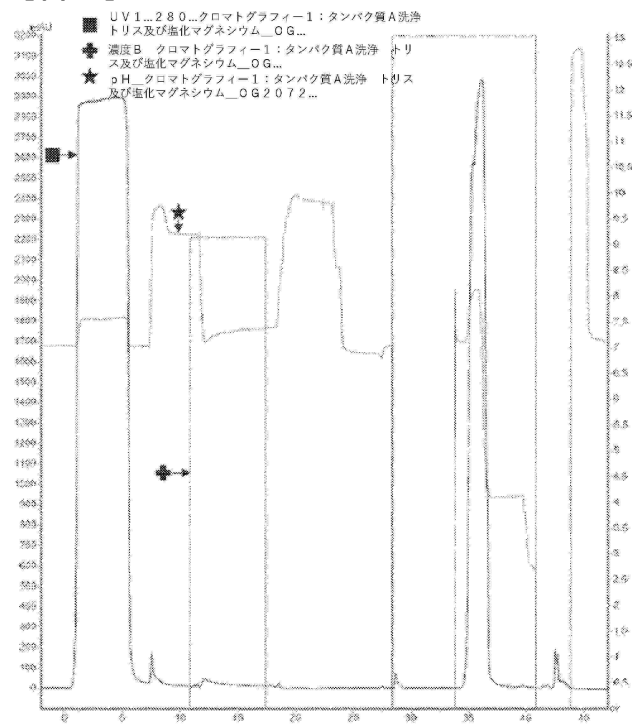
【図 6】



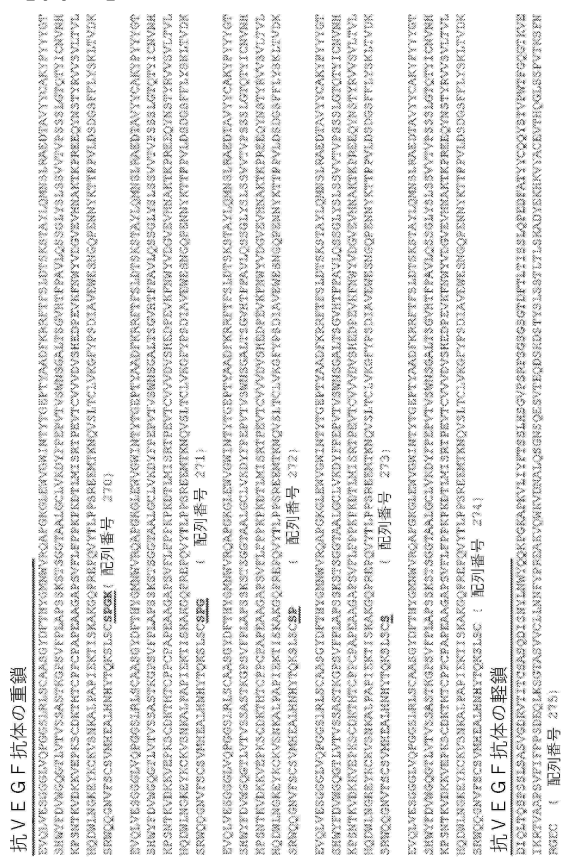
10

20

【図 7】



【図 8】



30

40

50

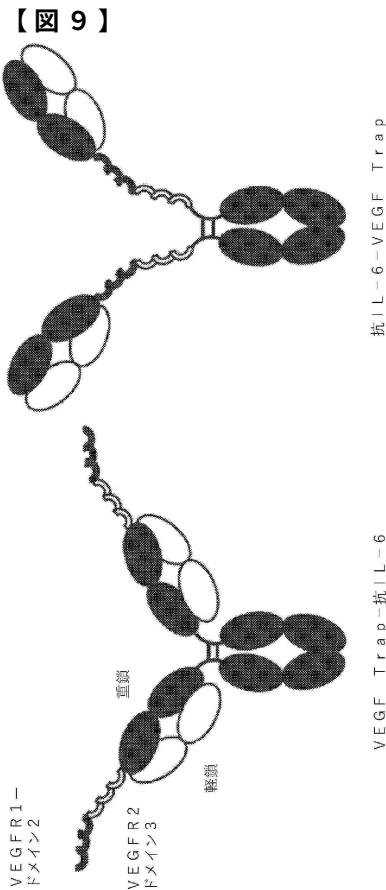
10

20

30

40

50



【図 10】

> VEGF Trap_バリアント_1 (配列番号4)
SDTGRPFVEMYSEIPEIHHMTEGRELVIPCRVTSNITVTLKKFPPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFHISN
ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLIRQNTIHDVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELNVGI
DNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKNKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKN
TFVRVHEK

> VEGF Trap_バリアント_2 (配列番号5)
SDTGRPFVEMYSEIPEIHHMTEGRELVIPCRVTSNITVTLKKFPPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFHISN
ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLIRQNTIHDVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELNVGI
DNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKNKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKN
TFVRVHEK

> VEGF Trap_バリアント_3 (配列番号6)
SDTGRPFVEMYSEIPEIHHMTEGRELVIPCRVTSNITVTLKKFPPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFHISN
ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLIRQNTIHDVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELNVGI
DNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKNKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKN
TFVRVHEK

【図 11】

配列番号	配列
7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWAKISPGGSWYYSD TVTDRTFSLDTSKSTAYLQMSLRADDTAVYICARQMGYALDINGQGTLVTVSS
8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWAKISPGGSWYYSD TVTDRTFSLDTSKSTAYLQMSLRADDTAVYICARQMGYALDINGQGTLVTVSS
9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWAKISPGGSWYYSD TVTDRTFSLDTSKSTAYLQMSLRADDTAVYICARQMGYALDINGQGTLVTVSS
10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWAKISPGGSWYYSD TVTDRTFSLDTSKSTAYLQMSLRADDTAVYICARQMGYALDINGQGTLVTVSS
11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWAKISPGGSWYYSD TVTDRTFSLDTSKSTAYLQMSLRADDTAVYICARQMGYALDINGQGTLVTVSS
12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWAKISPGGSWYYSD TVTDRTFSLDTSKSTAYLQMSLRADDTAVYICARQMGYALDINGQGTLVTVSS
13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFSPFAMHWVRQAPGKGLEWAKISPGGSWYYSD TVTDRTFSLDTSKSTAYLQMSLRADDTAVYICARQMGYALDINGQGTLVTVSS

【図 12】

配列番号	VEGF Trap配列
14	SDTGRPFVEMYSEIPEIHHMTEGRELVIPCRVTSNITVTLKKFPPLDTLIPDGKRIIWDNRK GFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLIRQNTIHDVLSPSHGIELSVGEKLVNCT ARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKNKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCA ASSGLMTKKNSTFVRVHEK
15	SDTGRPFVEMYSEIPEIHHMTEGRELVIPCRVTSNITVTLKKFPPLDTLIPDGKRIIWDNRK GFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLIRQNTIHDVLSPSHGIELSVGEKLVNCT ARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKNKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCA ASSGLMTKKNSTFVRVHEK
16	SDTGRPFVEMYSEIPEIHHMTEGRELVIPCRVTSNITVTLKKFPPLDTLIPDGKRIIWDNRK GFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLIRQNTIHDVLSPSHGIELSVGEKLVNCT ARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKNKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCA ASSGLMTKKNSTFVRVHEK
17	SDTGRPFVEMYSEIPEIHHMTEGRELVIPCRVTSNITVTLKKFPPLDTLIPDGKRIIWDNRK GFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLIRQNTIHDVLSPSHGIELSVGEKLVNCT ARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKNKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCA ASSGLMTKKNSTFVRVHEK

配列番号	VEGF Trap配列
18	GGGGGGGGG

【圖 13】

配列 番号	VEGF Trap配列
19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSPFAMHWVRQAPGKGLNWAKISPGGSWTFYSD TVYDRFTESLDSKSTAYLQMSLRADDTAVYCAQRWGYYALDINWGQGTLVTVSSASTKPG PSYFPLAPSSKSTSGYTAALGLCLVYDFPEFVTVSNWSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTPVPSSELGTQYICNVNHNKPSNTVDKDKVPSKCDKHTCCPCFAPEAAGAPSVLPFPFK PKDTLMSIRTPETCVVVDVSHDEPEVKENWVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LQPDWLNKGEYKCKVSNKALPAPIETKIISKAGQGPREPQVTVLPSPREEMTKHQVSLTCLVK GFPSPDIAVEWESNQGPENNYKTFPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRNQGNVFCSCVMHEAL HNHYTQKELSCSPGK
20	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSPFAMHWVRQAPGKGLNWAKISPGGSWTFYSD TVYDRFTESLDSKSTAYLQMSLRADDTAVYCAQRWGYYALDINWGQGTLVTVSSASTKPG PSYFPLAPSSKSTSGYTAALGLCLVYDFPEFVTVSNWSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTPVPSSELGTQYICNVNHNKPSNTVDKDKVPSKCDKHTCCPCFAPEAAGAPSVLPFPFK PKDTLMSIRTPETCVVVDVSHDEPEVKENWVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LQPDWLNKGEYKCKVSNKALPAPIETKIISKAGQGPREPQVTVLPSPREEMTKHQVSLTCLVK GFPSPDIAVEWESNQGPENNYKTFPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRNQGNVFCSCVMHEAL HNHYTQKELSCSPGK
21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSPFAMHWVRQAPGKGLNWAKISPGGSWTFYSD TVYDRFTESLDSKSTAYLQMSLRADDTAVYCAQRWGYYALDINWGQGTLVTVSSASTKPG PSYFPLAPSSKSTSGYTAALGLCLVYDFPEFVTVSNWSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTPVPSSELGTQYICNVNHNKPSNTVDKDKVPSKCDKHTCCPCFAPEAAGAPSVLPFPFK PKDTLMSIRTPETCVVVDVSHDEPEVKENWVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LQPDWLNKGEYKCKVSNKALPAPIETKIISKAGQGPREPQVTVLPSPREEMTKHQVSLTCLVK GFPSPDIAVEWESNQGPENNYKTFPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRNQGNVFCSCVMHEAL HNHYTQKELSCSPGK
22	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSPFAMHWVRQAPGKGLNWAKISPGGSWTFYSD TVYDRFTESLDSKSTAYLQMSLRADDTAVYCAQRWGYYALDINWGQGTLVTVSSASTKPG PSYFPLAPSSKSTSGYTAALGLCLVYDFPEFVTVSNWSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTPVPSSELGTQYICNVNHNKPSNTVDKDKVPSKCDKHTCCPCFAPEAAGAPSVLPFPFK PKDTLMSIRTPETCVVVDVSHDEPEVKENWVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LQPDWLNKGEYKCKVSNKALPAPIETKIISKAGQGPREPQVTVLPSPREEMTKHQVSLTCLVK GFPSPDIAVEWESNQGPENNYKTFPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRNQGNVFCSCVMHEAL HNHYTQKELSCSPGK
23	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSPFAMHWVRQAPGKGLNWAKISPGGSWTFYSD TVYDRFTESLDSKSTAYLQMSLRADDTAVYCAQRWGYYALDINWGQGTLVTVSSASTKPG PSYFPLAPSSKSTSGYTAALGLCLVYDFPEFVTVSNWSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTPVPSSELGTQYICNVNHNKPSNTVDKDKVPSKCDKHTCCPCFAPEAAGAPSVLPFPFK PKDTLMSIRTPETCVVVDVSHDEPEVKENWVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LQPDWLNKGEYKCKVSNKALPAPIETKIISKAGQGPREPQVTVLPSPREEMTKHQVSLTCLVK GFPSPDIAVEWESNQGPENNYKTFPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRNQGNVFCSCVMHEAL HNHYTQKELSCSPGK

【図 14】

VEGF TrapTM

10

20

【圖 15】

堅鎖配列	配列番号
DIOLTSFSSLSASVGDRAVITIC SASISVSXLYWYQKQKPGKAPKLLIYDSSLSASGVPSRFS GSGSGDFTLTISSLOPEDFATYYCQWMSGYPIYFGQGTKVBIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSTGTASVVCCLINNFYPRKAVQMKVINALSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPYTKSFNRGEC	28
DIOLTSFSSLSASVGDRAVITIC SASISVSXLYWYQKQKPGKAPKLLIYDASLSAEGVPSRFS GSGSGDFTLTISSLOPEDFATYYCQWMSGYPIYFGQGTKVBIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSTGTASVVCCLINNFYPRKAVQMKVINALSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPYTKSFNRGEC	29
DIOLTSFSSLSASVGDRAVITIC SASISVSXLYWYQKQKPGKAPKLLIYDGNLASGVPSRFS GSGSGDFTLTISSLOPEDFATYYCQWMSGYPIYFGQGTKVBIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSTGTASVVCCLINNFYPRKAVQMKVINALSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPYTKSFNRGEC	30

【図 16-1】

行番	面番	F a b	面番	F c
01A	01	WVA1VESGGLVVOGSGRISLCAASGFTSPFAMHVRQAPKQLE WVA1SFGSGMYSIDTIDRTSLDTSKSTALQANSIAEDTA VYCARQAGXVALIDWQGTVALVSSATGSPFVALPSRSTG GTFALACGLVADIPPTVYSSNAGLGGTHFPAVLASGLSL SSVTVFSSSLAGTQITONNHKSNITKYDKVYEPKSC (配列番号 31)	01	WYTHCTPFAEALAGASVTLFPFKKOTLMISNTPVTVVYH SHDEHKYKMYGVNHNATKEKTSIAKQOPKPVTLFPBREM WNGKXGKCKVNSALPAETKTSIAKQOPKPVTLFPBREM TKNQVSLCLVNGTIPDIALVWNSQOPKPVTLFPBREM FLYSLSLTVLDSHWQGNVFCSSWHEALHNHYTKQSLCSQPK (配列番号 40)
01B	02	WVA1VESGGLVVOGSGRISLCAASGFTSPFAMHVRQAPKQLE WVA1SFGSGMYSIDTIDRTSLDTSKSTALQANSIAEDTA VYCARQAGXVALIDWQGTVALVSSATGSPFVALPSRSTG GTFALACGLVADIPPTVYSSNAGLGGTHFPAVLASGLSL SSVTVFSSSLAGTQITONNHKSNITKYDKVYEPKSC (配列番号 32)	02	SHDEHKYKMYGVNHNATKEKTSIAKQOPKPVTLFPBREM WNGKXGKCKVNSALPAETKTSIAKQOPKPVTLFPBREM TKNQVSLCLVNGTIPDIALVWNSQOPKPVTLFPBREM FLYSLSLTVLDSHWQGNVFCSSWHEALHNHYTKQSLCSQPK (配列番号 41)
01C	03	WVA1VESGGLVVOGSGRISLCAASGFTSPFAMHVRQAPKQLE WVA1SFGSGMYSIDTIDRTSLDTSKSTALQANSIAEDTA VYCARQAGXVALIDWQGTVALVSSATGSPFVALPSRSTG GTFALACGLVADIPPTVYSSNAGLGGTHFPAVLASGLSL SSVTVFSSSLAGTQITONNHKSNITKYDKVYEPKSC (配列番号 33)	03	SHDEHKYKMYGVNHNATKEKTSIAKQOPKPVTLFPBREM WNGKXGKCKVNSALPAETKTSIAKQOPKPVTLFPBREM TKNQVSLCLVNGTIPDIALVWNSQOPKPVTLFPBREM FLYSLSLTVLDSHWQGNVFCSSWHEALHNHYTKQSLCSQPK (配列番号 42)
01D	04	WVA1VESGGLVVOGSGRISLCAASGFTSPFAMHVRQAPKQLE WVA1SFGSGMYSIDTIDRTSLDTSKSTALQANSIAEDTA VYCARQAGXVALIDWQGTVALVSSATGSPFVALPSRSTG GTFALACGLVADIPPTVYSSNAGLGGTHFPAVLASGLSL SSVTVFSSSLAGTQITONNHKSNITKYDKVYEPKSC (配列番号 34)	04	SHDEHKYKMYGVNHNATKEKTSIAKQOPKPVTLFPBREM WNGKXGKCKVNSALPAETKTSIAKQOPKPVTLFPBREM TKNQVSLCLVNGTIPDIALVWNSQOPKPVTLFPBREM FLYSLSLTVLDSHWQGNVFCSSWHEALHNHYTKQSLCSQPK (配列番号 43)
01E	05	WVA1VESGGLVVOGSGRISLCAASGFTSPFAMHVRQAPKQLE WVA1SFGSGMYSIDTIDRTSLDTSKSTALQANSIAEDTA VYCARQAGXVALIDWQGTVALVSSATGSPFVALPSRSTG GTFALACGLVADIPPTVYSSNAGLGGTHFPAVLASGLSL SSVTVFSSSLAGTQITONNHKSNITKYDKVYEPKSC (配列番号 35)	05	SHDEHKYKMYGVNHNATKEKTSIAKQOPKPVTLFPBREM WNGKXGKCKVNSALPAETKTSIAKQOPKPVTLFPBREM TKNQVSLCLVNGTIPDIALVWNSQOPKPVTLFPBREM FLYSLSLTVLDSHWQGNVFCSSWHEALHNHYTKQSLCSQPK (配列番号 44)

30

40

【配列表】

2025505696000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/62322

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC -	INV. C07K 1/22; A61K 47/34; A61K 47/59; A61K 47/60; B01D 15/38; C07K 16/22; C07K 16/24 (2023.01)	
	ADD.	
CPC -	INV. B01D 15/3809; A61K 47/34; A61K 47/595; A61K 47/60; C07K 1/22; C07K 16/22; C07K 16/248	
	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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y — A	WO 2010/147686 A2 (WYETH LLC) 23 December 2010; paragraphs [0006], [0009]-[0010], [0015], [0047], [0068], [0080], [0093]-[0096], [0120], [0123], [0134]-[0136], [0139], [0141]-[0143], [0148], [0150], [0163]-[0165], [0167]	1-3, 11-14, 17-24, 29-35, 55-67, 71-76, 78-84, 89 — 8, 15, 25-26, 36-47, 49-53, 54, 68-69 — 48, 70
X	US 2006/0216789 A1 (BLAKE, MS et al.) 28 September 2006; paragraph [0050]	85-88
X — Y	WO 2013/063155 A2 (HALOZYME, INC.) 2 May 2013; page 209, lines 15-20; page 212, lines 5-30; page 239, lines 20-30	1-2, 4, 6-7, 9-10, 16, 34, 56, 60, 71-72, 77 — 5
A —	(KANDORI, K et al.) Synthesis of positively charged calcium hydroxyapatite nano-crystals and their adsorption behavior of proteins. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol. 73, No. 1, 1 October 2009, published online 19 May 2009, doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.05.011, pages 140-145, abstract and introduction only; page 2, first paragraph	1-2, 4-7, 9-10, 16, 34, 56, 60, 71-72, 77
Y	WO 2017/117464 A1 (KODIAK SCIENCES INC.) 6 July 2017; paragraphs [0091], [0209], [0247], [0289], [0332]	8, 15, 26-27, 64, 68
Y —	US 2019/0100581 A1 (GENENTECH, Inc.) 4 April 2019; paragraphs [0045], [0161], [0303], [0373]	25, 27-28, 51-52 —
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 16 May 2023 (16.05.2023)		Date of mailing of the international search report JUL 20 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/62322

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/62322

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A		70
Y	US 2019/0270806 A1 (KODIAK SCIENCES INC.) 5 September 2019; paragraphs [0233], [0252], [0309], [0334]-[0339], [0379], [0566], [0679]; SEQ ID NO 91-92, 256-257	25, 50-51, 53, 68-69
A		70
Y	(LUND, LN et al.) Novel peptide ligand with high binding capacity for antibody purification. Journal of Chromatography A, Vol. 1225, 17 February 2012, published online 29 December 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2011.12.074, pages 158-167; abstract; page 160, first column, second paragraph	38-47, 49-50
A	US 2019/0127457 A1 (HOFFMANN-LA ROCHE INC.) 2 May 2019; paragraphs [0642]-[0650]	48
A	WO 2015/101586 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, et al.) 9 July 2015; page 174, lines 1-20	48
A	US 2019/0382733 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICAL INSERM, et al.) 19 December 2019; abstract; paragraphs [0015], [0106], [0161], [0168], [0379]-[0381]	1
A	US 2021/0254073 A1 (CORNELL UNIVERSITY) 19 August 2021; paragraph [0009]	1

フロントページの続き

,MC,ME,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,C
O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I
R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX
,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,
SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 インーアルボン, キャロル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94304 パロアルト ページ ミル ロード 1200 コディ
アック サイエンシーズ インコーポレイテッド内

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA20 FA74 GA26