

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6462681号  
(P6462681)

(45) 発行日 平成31年1月30日(2019.1.30)

(24) 登録日 平成31年1月11日(2019.1.11)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N 30/88	(2006.01)	GO 1 N 30/88	J
GO 1 N 30/26	(2006.01)	GO 1 N 30/26	A
GO 1 N 30/02	(2006.01)	GO 1 N 30/88	H
CO 7 K 1/18	(2006.01)	GO 1 N 30/02	B
CO 7 K 16/00	(2006.01)	CO 7 K 1/18	

請求項の数 43 (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-525805 (P2016-525805)
(86) (22) 出願日	平成26年7月11日 (2014.7.11)
(65) 公表番号	特表2016-529489 (P2016-529489A)
(43) 公表日	平成28年9月23日 (2016.9.23)
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/046338
(87) 國際公開番号	W02015/006686
(87) 國際公開日	平成27年1月15日 (2015.1.15)
審査請求日	平成29年7月7日 (2017.7.7)
(31) 優先権主張番号	61/845,890
(32) 優先日	平成25年7月12日 (2013.7.12)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	509012625 ジェネンテック, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
(74) 代理人	110002077 園田・小林特許業務法人
(72) 発明者	マクドナルド, ダニエル アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080-4990, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】イオン交換クロマトグラフィーのインプットの最適化の解説

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

複数の組成物を分析するために最適なイオン交換クロマトグラフィーの分離条件を同定するための方法であって、各組成物がポリペプチド及び一以上の混入物を含み、該方法が、

a) 二以上の組成物のポリペプチドのアミノ酸組成に基づいて、選択された温度での正味電荷対 pH の曲線をプロットすること、及び

b) 工程 a) のプロットの二次導関数を決定することにより中性 pH で又はその近傍での正味電荷対 pH の曲線の変曲点を決定することを含み、

最適なイオン交換クロマトグラフィーの分離条件が、一以上の組成物のポリペプチドについてほぼ共通の変曲点での pH である、方法。

## 【請求項 2】

ポリペプチド及び一以上の混入物を含む組成物を分析するために最適なイオン交換クロマトグラフィーの分離条件を同定するための方法であって、該方法は、

a) ポリペプチドのアミノ酸組成に基づいて、選択された温度での正味電荷対 pH の曲線をプロットすること、及び

b) 工程 a) のプロットの二次導関数を決定することにより中性 pH で又はその近傍での正味電荷対 pH の曲線の変曲点を決定することを含み、

最適なイオン交換クロマトグラフィーの分離条件が、ポリペプチドについてほぼ変曲点での pH である、方法。

10

20

**【請求項 3】**

変曲点での正味電荷が正である場合、陽イオン交換材料がイオン交換クロマトグラフィーのために使用される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

陽イオン交換クロマトグラフィー材料が、スルホン化クロマトグラフィー材料又はカルボキシル化クロマトグラフィー材料である、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 5】**

変曲点での正味電荷が負である場合、陰イオン交換材料がイオン交換クロマトグラフィーのために使用される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

**【請求項 6】**

陰イオン交換クロマトグラフィー材料が、第四級アミンのクロマトグラフィー材料又は第三級アミンクロマトグラフィー材料である、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

混合モードクロマトグラフィー材料が、クロマトグラフィーのために使用される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

**【請求項 8】**

混合モードイオン交換材料が、スルホン化クロマトグラフィー材料又はカルボキシル化クロマトグラフィー材料及び第四級アミンのクロマトグラフィー材料又は第三級アミンクロマトグラフィー材料を順次充填した混合物である、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

c ) 二以上の組成物のポリペプチドについて温度変化による正味電荷対 pH 曲線の変曲点の pH の変化 ( d I P / d T ) を決定すること、

d ) 温度変化によるバッファーの酸解離定数の変化 ( d p K a / d T ) がポリペプチドの d I P / d T と本質的に同じである、クロマトグラフィーに使用のためのバッファーを選択することを更に含む、請求項 1 及び 3 から 8 の何れか一項に記載の方法。

**【請求項 10】**

c ) ポリペプチドについて温度変化による正味電荷対 pH 曲線の変曲点の pH の変化 ( d I P / d T ) を決定すること、

d ) 温度変化によるバッファーの酸解離定数の変化 ( d p K a / d T ) がポリペプチドの d I P / d T と本質的に同じである、クロマトグラフィーに使用のためのバッファーを選択することを更に含む、請求項 2 から 8 の何れか一項に記載の方法。

**【請求項 11】**

バッファーが、変曲点の pH で効果的な緩衝能を提供する、請求項 9 又は 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

一以上の組成物のポリペプチドの d I P / d T が、約 - 0 . 0 2 pH 単位である、請求項 1 から 11 の何れか一項に記載の方法。

**【請求項 13】**

温度変化が、a ) 約 2 0 から約 7 0 であるか、及び / 又は b ) 約 2 0 から約 5 0 である、請求項 1 から 12 の何れか一項に記載の方法。

**【請求項 14】**

$d p K a / d T = d I P / d T \pm 5 0 \%$  である、請求項 9 から 13 の何れか一項に記載の方法。

**【請求項 15】**

工程 d ) で選択されたバッファー中のポリペプチドの正味電荷が、3 0 を超えて 0 . 5 未満変化する、請求項 9 から 14 の何れか一項に記載の方法。

**【請求項 16】**

工程 d ) で選択されたバッファーが、約 5 mM から約 2 5 0 mM の範囲の濃度でクロマトグラフィーに使用される、請求項 9 から 15 の何れか一項に記載の方法。

**【請求項 17】**

10

20

30

40

50

バッファー組成物が更に塩を含む、請求項 1 から 16 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 18】

塩が、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{KCl}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、又は $\text{Na}_2\text{SO}_4$ である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

塩の濃度が、約 1 mM から約 1 M の範囲である、請求項 17 又は 18 に記載の方法。

【請求項 20】

組成物がポリペプチド及び一以上の混入物を含む組成物を分析するための方法であって、ここで、該方法は混入物からポリペプチドを効果的に分離し、該方法が、

a ) 請求項 1 の方法に従って、各組成物が標的ポリペプチド及び一以上の混入物を含有する複数の組成物についての最適 pH 及び温度のイオン交換分離条件を決定すること、

b ) ローディングバッファーが請求項 9 から 16 の何れか一項に記載の方法によって同定されるバッファーを含むローディングバッファーを用いて、イオン交換クロマトグラフィー材料へ組成物からのポリペプチド及び一以上の混入物を結合させること；

c ) 溶出バッファーがバッファー及び塩を含み、塩の濃度が経時的に勾配で増加し、ポリペプチド及び一以上の混入物がその勾配によって分離される溶出バッファーの勾配を用いてイオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチド及び一以上の混入物を溶出させること；及び

d ) ポリペプチド及び一以上の混入物を検出することを含む、方法。

【請求項 21】

ポリペプチド及び一以上の混入物を含む組成物を分析するための方法であって、該方法は混入物からポリペプチドを効果的に分離し、該方法が、

a ) ローディングバッファーがバッファーを含み、クロマトグラフィーの pH 及び温度が、i ) 曲線が二以上の標的ポリペプチドのポリペプチドのアミノ酸組成に基づいている、選択された温度での正味電荷対 pH の曲線をプロットし、ii ) 工程 i ) のプロットの二次導関数を決定することによって正味電荷対 pH の曲線の変曲点を決定すること（ここで最適なイオン交換クロマトグラフィーの条件は、二以上の標的ポリペプチドについての共通の変曲点での pH である）によって、複数の標的ポリペプチドに対して最適化され、ローディングバッファーを使用してイオン交換クロマトグラフィー材料にポリペプチド及び一以上の混入物を結合させること；

b ) 溶出バッファーがバッファー及び塩を含み、ポリペプチド及び一以上の混入物が勾配により分離される溶出バッファーの勾配を用いてイオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチド及び一以上の混入物を溶出させること；及び

c ) ポリペプチド及び一以上の混入物を検出することを含む、方法。

【請求項 22】

選択される温度が大気温度である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

バッファーが、

a ) 二以上の標的ポリペプチドについて温度変化による正味電荷対 pH 曲線の変曲点の pH の変化 (dIP/dT) を決定すること、

b ) 温度変化によるバッファーの酸解離定数の変化 (dPKa/dT) が共通の変曲点を有する二以上の標的ポリペプチドの dIP/dT と本質的に同じであるバッファーを選択することによって同定される、請求項 21 又は 22 に記載の方法。

【請求項 24】

バッファーが、変曲点の pH で効果的な緩衝能を提供する、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

バッファーが、N - (2 - アセトアミド) - 2 - アミノエタンスルホン酸 (ACES) 又は 4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸 (HEPES) である、請求項 20 又は 21 に記載の方法。

【請求項 26】

10

20

30

40

50

バッファーの濃度が、約 5 mM から約 20 mM の範囲である、請求項 20 から 25 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 27】

バッファーの pH が、a) 約 2.0 から約 7.0 の温度範囲で約 6.5 から約 8.5 の範囲であるか、及び / 又は b) 約 2.0 から約 5.0 の温度範囲で約 6.5 から約 8.5 の範囲である、請求項 20 から 26 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 28】

変曲点でのバッファー及びポリペプチドの pH が、約 2.2 で約 7.8、約 3.7 で約 7.5、約 5.0 で約 7.2 である、請求項 20 から 27 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 29】

塩勾配が、直線勾配である、請求項 20 から 28 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 30】

塩勾配が、段階勾配である、請求項 20 から 28 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 31】

塩勾配が、NaCl 勾配、KCl 勾配、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 勾配又はNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 勾配である、請求項 20 から 30 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 32】

塩濃度が、a) 約 0 mM から約 1 M までの勾配で増加するか、又は b) 約 100 分で約 0 mM から約 100 mM までの勾配で増加するか、又は c) 約 40 分で約 0 mM から約 80 mM までの勾配で増加する、請求項 20 から 31 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 33】

ポリペプチドが、抗体若しくはイムノアドヘシン又はその断片である、請求項 1 から 3 2 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 34】

ポリペプチドが、モノクローナル抗体又はその断片である、請求項 1 から 3 3 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 35】

抗体が、ヒト抗体であるか、ヒト化抗体であるか、又はキメラ抗体である、請求項 3 3 又は 3 4 に記載の方法。

【請求項 36】

抗体が、抗体断片である、請求項 3 3 から 3 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 37】

混入物が、a) ポリペプチドの変異体であるか、及び / 又は b) ポリペプチドの分解生成物であるか、及び / 又は c) ポリペプチドの電荷変異体である、請求項 1 から 3 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 38】

クロマトグラフィー材料が、陽イオン交換クロマトグラフィー材料である、請求項 20 から 3 7 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 39】

陽イオン交換クロマトグラフィー材料が、スルホン化クロマトグラフィー材料又はカルボキシル化クロマトグラフィー材料である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 40】

複数のポリペプチド組成物を分析するための方法であって、各ポリペプチド組成物がポリペプチド及びポリペプチドの一以上の電荷変異体を含み、該方法はポリペプチドをその電荷変異体から効果的に分離し；

各ポリペプチド組成物に対して、

a) ローディングバッファーが約 4.0 で pH が約 7.6 で 10 mM の HEPES バッファーを含み、ローディングバッファーを約 1 mL / 分の流速で使用してイオン交換クロマトグラフィー材料にポリペプチド及び一以上の電荷変異体を結合させること；

b) 溶出バッファーが pH が約 7.6 で約 10 mM の HEPES バッファー及び NaC 50

1を含み、NaClの濃度が約40分で約0mMから約80mMまで勾配で増加し、ポリペプチド及びその電荷変異体が勾配により分離される溶出バッファーの勾配を用いてイオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチド及び電荷変異体混入物を溶出させること；及び

c) ポリペプチド及び一以上の電荷変異体を検出することを含む、方法。

【請求項41】

複数のポリペプチド組成物が異なるポリペプチドを含む、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

複数のポリペプチド組成物が異なるpIを有するポリペプチドを含む、請求項40又は41に記載の方法。

10

【請求項43】

ポリペプチド組成物が抗体組成物である、請求項40から42の何れか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は2013年7月12日に出願された米国仮特許出願第61/845,890号の優先権を主張し、その開示は、その全体が参照により本明細書に包含される。

【0002】

20

発明の分野

本発明は、タンパク質の荷電変異体について、イオン強度勾配、イオン交換クロマトグラフィーを使用してポリペプチドの調製物を分析するための方法を提供する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

モノクローナル抗体(mAb)のようなタンパク質は、水性環境下で、大抵は電荷で極性のアミノ酸を表面に有する(Barlow, DJ and Thornton, JM (1986) *Biopolymers* 25:17-17)。溶液成分との分子間相互作用により、表面残留物は、多数の化学的及び酵素的修飾を受ける可能性があり、これは、その静電表面上で僅かに異なるタンパク質変異体の不均一混合物をもたらす(Dick, LW et al., (2009) *J. Chromatogr. B* 877:3841; Liu, HW et al., (2008) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22:4081; Miller, AK, et al., (2011) *J. Pharm. Sci.* 100:2543; Wang, WR et al., (2011) *Mol. Immunol.* 48:860)。陽イオン交換クロマトグラフィー(CEC)は、Vlasak, J and Ionescu, R (2008 *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9:468)による最近の総説により、タンパク質治療の電荷不均一性をプロファイルする代表的な基準であると考えられている。電荷敏感分離方法は、製造中の生産整合性を保証するため及びタンパク質治療の分解レベルをモニターするために、規制当局により典型的に必要とされる(Miller, AK, et al., (2011) *J. Pharm. Sci.* 100:2543; He, X PZ (2009) *Electrophoresis* 30:714; Sosic, Z et al., (2008) *Electrophoresis* 29:4368; Kim, J et al., (2010) *J. Chromatogr.* 8781973 Teshima, G et al., (2010) *J. Chromatogr.* 1218:2091)。

30

【0004】

イオン交換クロマトグラフィー(IEC)は、典型的には、結合及び溶出モードで実行される。一般に、タンパク質サンプル、例えば、mAbは、カラムへのタンパク質の結合を促進する条件下で(すなわち、100%バッファーA中で)固定相に導入される。塩又はpH勾配(すなわち、バッファーBの割合(%)を増加させる)が、異なる電荷タンパク質を順番に溶出させるために適用される。IEC法は、典型的には生成物に特異的である。両方とも堅牢である、すなわち、温度及びpHの変動に耐えることができ、かつ十分に充電不均一性を解決することができる方法の開発は資源集約的である。複数のポリペプチド生成物中の混入物の存在を決定するための堅牢なアッセイの開発を可能にする最適な

40

50

緩衝系を開発する方法が望まれる。本発明は、ポリペプチド及び緩衝系の両方の数学的モデルに基づく、イオン交換のための最適な条件を予測するための方法を提供する。

【0005】

本明細書に引用される全ての参考文献は、特許出願及び刊行物を含み、その全体が参考により援用される。

【発明の概要】

【0006】

簡潔な要旨

幾つかの態様において、本発明は、複数の組成物を分析するために最適なイオン交換クロマトグラフィーの分離条件を同定するための方法を提供し、ここで各組成物は一以上の混入物を有するポリペプチドを含み、該方法は、a)組成物の二以上のポリペプチドのアミノ酸組成に基づいて、選択された温度での正味電荷対pHの曲線をプロットすること、b)工程a)のプロットの二次導関数を決定することにより中性pHで又はその近傍での正味電荷対pHの曲線の変曲点を決定することを含み；ここで最適なイオン交換クロマトグラフィーの分離条件は、一以上の組成物のポリペプチドについてほぼ共通の変曲点でのpHである。幾つかの実施態様において、本方法は更に、c)組成物の二以上のポリペプチドについて温度変化による正味電荷対pH曲線の変曲点のpHの変化(dIP/dT)を決定し、d)温度変化によるバッファーの酸解離定数の変化(dPKa/dT)がポリペプチドのdIP/dTと本質的に同じである、クロマトグラフィーに使用のためのバッファーを選択することを含む。

10

【0007】

他の態様において、本発明は、一以上の混入物と共にポリペプチドを含む組成物を分析するために最適なイオン交換クロマトグラフィーの分離条件を同定するための方法を提供し、該方法は、a)ポリペプチドのアミノ酸組成に基づいて、選択された温度での正味電荷対pHの曲線をプロットすること、b)工程a)のプロットの二次導関数を決定することにより中性pHで又はその近傍での正味電荷対pHの曲線の変曲点を決定することを含み；ここで最適なイオン交換クロマトグラフィーの分離条件は、ポリペプチドについてほぼ変曲点でのpHである。

20

【0008】

幾つかの実施態様において、変曲点での正味電荷が正である場合、陽イオン交換材料がイオン交換クロマトグラフィーのために使用される。幾つかの実施態様において、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は、スルホン化クロマトグラフィー材料又はカルボキシル化クロマトグラフィー材料である。他の実施態様において、変曲点での正味電荷が負である場合、陰イオン交換材料がクロマトグラフィーのために使用される。幾つかの実施態様において、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は、第四級アミンのクロマトグラフィー材料又は第三級アミンクロマトグラフィー材料である。更に他の実施態様において、混合モードクロマトグラフィー材料が、クロマトグラフィーのために使用される。幾つかの実施態様において、混合モードクロマトグラフィー材料は、スルホン化クロマトグラフィー材料又はカルボキシル化クロマトグラフィー材料及び第四級アミンのクロマトグラフィー材料又は第三級アミンクロマトグラフィー材料を順次充填した混合物である。

30

【0009】

幾つかの実施態様において、バッファーは、変曲点のpHで効果的な緩衝能を提供する。幾つかの実施態様において、一以上の組成物のポリペプチドのdIP/dTは、約-0.02pH単位である。幾つかの実施態様において、温度変化は、約20から約70である。更なる実施態様において、温度変化は、約20から約50である。幾つかの実施態様において、dPKa/dT = dIP/dT ± 50%。幾つかの実施態様において、工程d)で選択されたバッファー中のポリペプチドの正味電荷は、30を超えて0.5未満変化する。幾つかの実施態様において、工程d)で選択されたバッファーが、約5mMから約250mMの範囲の濃度でクロマトグラフィーに使用される。

40

【0010】

50

上記実施態様の幾つかの実施態様において、バッファー組成物は更に塩を含む。更なる実施態様において、塩は、NaCl、KCl、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、又はNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>である。幾つかの実施態様において、塩の濃度は、約1mMから約1Mの範囲である。

【0011】

本発明の方法の幾つかの実施態様において、ポリペプチドは、抗体若しくはイムノアドヘシン又はその断片である。幾つかの実施態様において、ポリペプチドはモノクローナル抗体又はその断片である。幾つかの実施態様において、抗体はヒト抗体である。他の実施態様において、抗体はヒト化抗体である。更に他の実施態様において、抗体はキメラ抗体である。幾つかの実施態様において、抗体は抗体断片である。

【0012】

本発明の方法の幾つかの実施態様において、混入物は、ポリペプチドの変異体である。幾つかの実施態様において、混入物は、ポリペプチドの分解生成物である。幾つかの実施態様において、混入物は、ポリペプチドの荷電変異体である。

【0013】

幾つかの態様において、本発明は、組成物がポリペプチド及び一以上の混入物を含む組成物を分析するための方法を提供し、ここで、a)各組成物が本発明の方法に従って、標的ポリペプチド及び一以上の混入物を含有する複数の組成物についての最適pH及び温度のイオン交換分離条件を決定し、b)ローディングバッファーが本発明の方法によって同定されるバッファーを含むローディングバッファーを用いてイオン交換クロマトグラフィー材料へ、組成物からのポリペプチド及び一以上の混入物を結合させ、c)溶出バッファーがバッファー及び塩を含み、塩の濃度が経時的に勾配で増加し、ポリペプチド及び一以上の混入物がその勾配によって分離される溶出バッファーの勾配を用いてイオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチド及び一以上の混入物を溶出させること、及びd)ポリペプチド及び一以上の混入物を検出すること含む本方法は混入物からポリペプチドを効果的に分離する。

【0014】

幾つかの態様において、本発明は、ポリペプチド及び一以上の混入物を含む組成物を分析するための方法を提供し、ここで、

a)ローディングバッファーがバッファーを含み、クロマトグラフィーのpH及び温度が、i)曲線が二以上の標的ポリペプチドのポリペプチドのアミノ酸組成に基づいている、選択された温度での正味電荷対pHの曲線をプロットし、ii)工程i)のプロットの二次導関数を決定することによって正味電荷対pHの曲線の変曲点を決定すること(ここで最適なイオン交換クロマトグラフィーの条件は、二以上の標的ポリペプチドについての共通の変曲点でのpHである)によって、複数の標的ポリペプチドに対して最適化される、ローディングバッファーを使用してイオン交換クロマトグラフィー材料にポリペプチド及び一以上の混入物を結合させること；b)溶出バッファーがバッファー及び塩を含み、ポリペプチド及び一以上の混入物が勾配により分離される溶出バッファーの勾配を用いてイオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチド及び一以上の混入物を溶出させること、及びc)ポリペプチド及び一以上の混入物を検出することを含む方法は、効果的に混入物からポリペプチドを分離する。幾つかの実施態様において、選択される温度は大気温度である。幾つかの実施態様において、バッファーが、a)二以上の標的ポリペプチドについて温度変化による正味電荷対pH曲線の変曲点のpHの変化(dIP/dT)を決定し、b)温度変化によるバッファーの酸解離定数の変化(dPKa/dT)が共通の変曲点を有する二以上の標的ポリペプチドのdIP/dTと本質的に同じであるバッファーを選択することによって同定される。幾つかの実施態様において、バッファーは、変曲点のpHで効果的な緩衝能を提供する。

【0015】

幾つかの態様において、本発明は、ポリペプチド及び一以上の混入物を含む組成物を分析するための方法を提供し、ここで、a)ローディングバッファーがバッファーを含み、かつクロマトグラフィーのpH及び温度は複数の標的ポリペプチドに対して最適化されて

10

20

30

40

50

いる、ローディングバッファーを用いてイオン交換クロマトグラフィー材料にポリペプチド及び一以上の混入物を結合させること；b) 溶出バッファーがバッファー及び塩を含み、ポリペプチド及び一以上の混入物が勾配により分離される溶出バッファーの勾配を用いてイオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチド及び一以上の混入物を溶出させること、及びc) ポリペプチド及び一以上の混入物を検出することを含む方法は、効果的に混入物からポリペプチドを分離する。幾つかの実施態様において、バッファーは、N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸(ACES)又は4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸(HEPES)である。幾つかの実施態様において、バッファーの濃度は、約5mMから約20mMの範囲である。幾つかの実施態様において、温度変化は、約20から約70である。更なる実施態様において、温度変化は、約20から約50である。幾つかの実施態様において、 $d \text{pKa} / dT = d \text{pI} / dT \pm 50\%$ 。幾つかの実施態様において、バッファー中のポリペプチドの正味電荷は、3.0を超えて0.5未満変化する。幾つかの実施態様において、バッファーは、約5mMから約250mMの範囲の濃度でクロマトグラフィーに使用される。

#### 【0016】

上記実施態様の幾つかの実施態様において、バッファー組成物は更に塩を含む。更なる実施態様において、塩は、NaCl、KCl、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、又はNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>である。幾つかの実施態様において、塩の濃度は、約1mMから約1Mの範囲である。幾つかの実施態様において、塩濃度は、約100分で約0mMから約100mMまで増加する。幾つかの実施態様において、塩濃度は、約40分で約0mMから約80mMまで増加する。

#### 【0017】

本発明の方法の幾つかの実施態様において、ポリペプチドは、抗体若しくはイムノアドヘシン又はその断片である。幾つかの実施態様において、ポリペプチドはモノクローナル抗体又はその断片である。幾つかの実施態様において、抗体はヒト抗体である。他の実施態様において、抗体はヒト化抗体である。更に他の実施態様において、抗体はキメラ抗体である。幾つかの実施態様において、抗体は抗体断片である。

#### 【0018】

本発明の方法の幾つかの実施態様において、混入物は、ポリペプチドの変異体である。幾つかの実施態様において、混入物は、ポリペプチドの分解生成物である。幾つかの実施態様において、混入物は、ポリペプチドの荷電変異体である。

#### 【0019】

幾つかの実施態様において、クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィー材料である。更なる実施態様において、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は、スルホン化クロマトグラフィー材料又はカルボキシル化クロマトグラフィー材料である。

#### 【0020】

幾つかの態様において、本発明は、各ポリペプチド組成物がポリペプチド及びそのポリペプチドの一以上の荷電変異体を含む、複数のポリペプチド組成物を効果的に分析するための方法を提供し、ここで、各ポリペプチド組成物に対して、方法は、a) ローディングバッファーが約4.0で約7.6のpHで10mMのHEPESバッファーを含む、ローディングバッファーを用いて、約1mL/分の流速でイオン交換クロマトグラフィー材料にポリペプチド及び一以上の荷電変異体を結合させ；b) 溶出バッファーが約7.6のpHで約10mMのHEPESバッファー及びNaClを含み、NaClの濃度が約4.0分で約0mMから約80mMまで勾配で増加し、ポリペプチド及びその荷電変異体が勾配により分離される溶出バッファーの勾配を用いてイオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチド及び荷電変異体混入物を溶出し；及びc) ポリペプチド及び一以上の荷電変異体を検出することを含む方法はポリペプチドをその荷電変異体から効果的に分離する。幾つかの実施態様において、複数のポリペプチド組成物が異なるポリペプチドを含む。幾つかの実施態様において、複数のポリペプチド組成物が異なるpIを有するポリペプチドを含む。幾つかの実施態様において、ポリペプチド組成物は抗体組成物である。

10

20

30

40

50

## 【図面の簡単な説明】

## 【0021】

【図1】図1は、モノクローナル抗体mAb1（実線の黒い行）及びその2つの荷電変異体について、計算された正味電荷対pHをプロットしたグラフである。示されるように、破線は2つの負電荷を有する酸性変異体と2つの正電荷を有する塩基性変異体を表す。曲線はmAb1及びその変異体のアミノ酸配列の組成物を使用して作成された。星は、曲線の変曲点を表す。変曲点のpHで実行されるプラットフォームIEC法は、pHに関して最適な分解能及び堅牢性を提供する。

【図2A】図2Aは、pHスケールに対して集団（例えば、ポリペプチド溶液）内のプロトン化されたヒスチジン（正に帯電した）の割合のグラフを示す。

10

【図2B】図2Bは、pH6.5及びpH7.5で10個のヒスチジン残基を含むポリペプチド中で脱プロトン化ヒスチジン（電荷頻度）の数を示す。これは、変曲点（pH7.5）では、ヒスチジン残基の大部分が脱プロトン化し、荷電していないことを示している。

【図2C】図2Cは、各々が2個のヒスチジン残基を有する4つのポリペプチド分子の例を示す。HisのpKa（pH6.0）で、His残基の50%がプロトン化され、50%が脱プロトン化されている。これらの4つの分子におけるHis残基の電荷状態の組み合わせはpKaで二項分布である：1つは両方のHisがプロトン化され；2つは片方のHisがプロトン化され他方のHisが脱プロトン化され；1つは両方のHisが脱プロトン化されている。

20

【図3】図3は、pHの関数としての極性アミノ酸の電荷頻度に関連した典型的なモノクローナル抗体を示すグラフである。37での電荷計算に寄与する6つのアミノ酸について異なるpHで最も豊富な電荷状態の確率が実線としてプロットされ、mAb1についてこれらのアミノ酸残基の加重組み合わせが破線としてプロットされている。

【図4】図4は、22での異なるpHでのmAb1のシャノンエントロピーを示している。アミノ酸残基のタイプ及び数は、表3に記載されている正味電荷の算出に寄与している。

【図5】図5は、37での異なるpHでのmAb1の集団における電荷分布の3次元表示及び電荷分布の頻度を示す。正味電荷対pHの曲線の変曲点において、電荷分布は約0.7の頻度で最も均質であるが；一方変曲点から離れたpHでは、電荷分布は0.15の頻度でより広範である。IEC分離は電荷に基づいているので、電荷分布頻度が高いほど、ピークはより狭くかつ分解能がより高い。

30

【図6】図6は、図5の2次元表示、mAb1の正味電荷対pH曲線である。温度が37である場合、変曲点はpH7.5においてである。

【図7】図7は、37でのmAb生成物のpHの関数として正味電荷を示すグラフである。各mAbの計算された正味電荷はmAbのアミノ酸配列に基づいて計算された。一部のmAbは異なるフレームワークのアミノ酸配列を有していた。全ての曲線の変曲点は37で約pH7.5である。

【図8】図8は、22（菱形）、37（三角形）及び50（四角）での多数のmAb生成物について計算された変曲点を示すグラフである。

40

【図9】図9は、22から50の範囲の温度での、mAbについてpHに対する正味電荷の関係を示すグラフである。

【図10A】図10Aは、変曲点の変化率を示す。

【図10B】図10Bは、選択されたmAbについて温度の関数としてのdIPの変化を示す。変化率はほぼ同一である。

【図11】図11は、指定されたバッファー（リン酸塩、HEPES、ACES、及びトリス）中の温度の関数としてのmAbの正味電荷を示すグラフである。

【図12】図12は、同じクロマトグラフィーの手順を使用して、異なるpIを有する多数のmAbの重ね合わされたクロマトグラムを示す。バッファーAは、37で5mMのACES（pH7.5）であった。バッファーBはバッファーA中に180mMのNaC

50

1 であった。塩勾配は 37 度で 100 分間又は 1 mM / 分で 0 mM の NaCl から 100 mM の NaCl であった。流速は 0.8 mL / 分であった。カラムは MabPac SCX - 10 カラム (4 × 250 mm) であった。

【図 13】図 13 は、pH の関数として mAb 4 の IEC の堅牢性を示している。クロマトグラフィーの条件は、勾配が 1.5 mM の NaCl / 分であったことを除き、図 12 の通りである。

【図 14】図 14 は、温度の関数として 3 つの mAb について IEC の堅牢性を示している。クロマトグラフィーの条件は、図 13 で説明したように 3 つ全ての抗体において同じであった。

【図 15】図 15 は、温度の関数として 3 つの mAb について IEC の堅牢性を示している。クロマトグラフィーの条件は 3 つ全ての抗体について同じであった。クロマトグラフィーの条件は、バッファーが 10 mM の HEPES であったことを除き、図 13 の通りである。

【図 16】図 16 は、多生成物の手順を使用しあつ各 mAb に対して開発された手順を使用して、3 つの mAb の IEX クロマトグラフィーを比較したグラフを示す。多生成物法は、50 分間で 0 mM の NaCl から 75 mM の NaCl の勾配 (1.5 mM / 分) 及び流速 0.8 mL / 分を用いた 37 度で 5 mM の ACES (pH 7.5) であった。生成物特異的な方法に対するバッファー及び温度は異なっていた。mAb 8 については 30 度で 20 mM の MES (pH 6.5) : mAb 25 については 42 度で 20 mM の HEPES (pH 7.6) : 及び mAb 26 については 40 度で 20 mM の ACES (pH 7.1) 20 であった。カラムは MabPac SCX - 10 カラム (4 × 250 mm) であった。

【図 17】図 17 は、4 つの異なるクロマトグラフィーカラム ; ProPac WCX - 10 (10 μm, 4 × 250 mm)、YMC (5 μm, 4 × 100 mm)、Antibody (5 μm, 4 × 250 mm)、及び MabPac SCX - 10 (10 μm, 4 × 250 mm) における mAb 8 を用いた多生成物クロマトグラフィーの条件の使用を示す。クロマトグラフィーの条件は図 13 で説明された通りであった。挿入は変異体ピークの拡大を示す。

【図 18】図 18 は、異なるサイズ ; 4 × 250 mm、4 × 100 mm、4 × 50 mm の ProPac WCX - 10 クロマトグラフィーカラムにおける mAb 8 を用いた多生成物クロマトグラフィーの条件の使用を示す。実行時間はカラムが短いほど短かった。クロマトグラムは主ピークに対して正規化される。クロマトグラフィーの条件は、勾配時間を除いて図 15 に対して説明された通りであった。

【図 19】図 19 は、GMP ロバストネスト DOE 試験の主ピークの相対的な割合のグラフを示す。

【図 20】図 20 は、GMP ロバストネスト DOE 試験の主ピークの相対的な割合のグラフを示す。

【図 21】図 21 は、GMP ロバストネスト DOE 試験の主ピークの相対的な割合のグラフを示す。

#### 【0022】

#### 発明の詳細な説明

本発明は、一以上の混入物と共にポリペプチドを含む組成物を分析するために最適なイオン交換クロマトグラフィーの分離条件を同定するための方法を提供し、該方法は、a) ポリペプチドのアミノ酸組成に基づいて、選択された温度での正味電荷対 pH の曲線をプロットすること、b) 工程 a) のプロットの二次導関数を決定することにより中性 pH で又はその近傍での正味電荷対 pH の曲線の変曲点 (IP) を決定することを含み；ここで最適なイオン交換クロマトグラフィーの分離条件は、ポリペプチドについてほぼ変曲点での pH である。幾つかの実施態様において、電荷頻度の分布は、所定の温度において異なる pH 値でのポリペプチドのシャノンエントロピーを計算することによって決定される。シャノンエントロピーが減少するにつれて、組成物中のポリペプチドの電荷分布がより均一になる。その結果、ポリペプチド及びその荷電変異体との間で分離する能力が向上する

10

20

30

40

50

。

## 【0023】

幾つかの実施態様において、本発明は、一以上の混入物と共にポリペプチドを含む組成物を分析するための最適なイオン交換クロマトグラフィーの分離条件で使用のためのバッファーを同定する方法を提供する。幾つかの実施態様において、温度による酸解離定数の変化 ( $d p K_a / d T$ ) が、上述されるように温度による変曲点の変化 ( $d I_p / d T$ ) にほぼ等しいバッファーが選択される。

## 【0024】

幾つかの態様において、本発明は、複数の組成物を分析するために最適なイオン交換クロマトグラフィーの分離条件を同定するための方法を提供し、ここで各組成物は一以上の混入物を有するポリペプチドを含み、該方法は、a) 組成物の二以上のポリペプチドのアミノ酸組成に基づいて、選択された温度での正味電荷対  $pH$  の曲線をプロットすること、b) 工程 a) のプロットの二次導関数を決定することにより中性  $pH$  で又はその近傍での正味電荷対  $pH$  の曲線の変曲点を決定することを含み；ここで最適なイオン交換クロマトグラフィーの分離条件は、一以上の組成物のポリペプチドについてほぼ共通の変曲点での  $pH$  である。このように、本方法は、各生成物について特異的なプロトコルの開発を必要とせずに複数の生成物を分析するために使用され得る。

## 【0025】

## I. 定義

用語「ポリペプチド」又は「タンパク質」は、本明細書においては、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指すために互換的に使用される。ポリマーは、直鎖状でも分枝状でもよく、改変されたアミノ酸を含んでもよく、非アミノ酸が割り込んでいてもよい。この用語はまた、自然に又は介入により改変されているアミノ酸ポリマーを包含しており；その例として、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、又は任意の他の操作若しくは改変、例えば、標識化成分又は毒素とのコンジュゲーションが挙げられる。この定義には、例えば、アミノ酸（例えば、非天然アミノ酸等を含む）の一又は複数の類似体を含むポリペプチド、並びに、当該技術分野において公知の他の改変体も含まれる。用語「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、本明細書において使用される場合、特に抗体を包含する。

## 【0026】

用語「ポリペプチド荷電変異体」は、本明細書において使用される場合、ポリペプチドの電荷が変更されるように、自然の状態から改変されているポリペプチドを指す。幾つかの例において、荷電変異体は、親ポリペプチドよりも酸性である；即ち、親ペプチドよりも低い  $pI$  を有する。その他の例において、荷電変異体は、親ポリペプチドよりも塩基性である；即ち、親ペプチドよりも高い  $pI$  を有する。このような改変は操作されてもよく、又は、酸化、脱アミド化、リジン残基の C 末端プロセシング、N 末端ピログルタミン酸形成及び糖化等の天然のプロセスの結果であってもよい。幾つかの例において、ポリペプチド荷電変異体は、タンパク質に結合するグリカンが、親糖タンパク質と比較して、例えば、シアル酸又はその誘導体の付加により、糖タンパク質の電荷が変更されるように改変されている、糖タンパク質である。「抗体荷電変異体」とは、本明細書において使用される場合、抗体又はその断片が、抗体又はその断片の電荷が変更されるように、その自然な状態から改変されている、抗体又はその断片である。

## 【0027】

「精製された」ポリペプチド（例えば、抗体又はイムノアドヘシン）とは、ポリペプチドの純度が増加し、その天然環境に存在するよりも、及び / 又は実験室条件下で最初に合成及び / 又は増幅された時よりも純粋な形態で存在することを意味する。純度は相対用語であり、必ずしも絶対純度を意味するのではない。

## 【0028】

用語「アンタゴニスト」は最も広い意味で使用され、天然ポリペプチドの生物学的活性を部分的に又は完全に阻止、阻害、又は中和する任意の分子を含む。同様に用語「アゴニ

10

20

30

40

50

スト」は最も広い意味で使用され、天然ポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子を含む。好適なアゴニスト又はアンタゴニスト分子は特に、アゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、天然ポリペプチドの断片又はアミノ酸配列変異体等を含む。ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定するための方法は、ポリペプチドを候補アゴニスト又はアンタゴニスト分子に接触させること及びポリペプチドに通常関連する一又は複数の生物学的活性における検出可能な変化を測定することを含む。

【0029】

目的とする抗原、例えば、腫瘍関連ポリペプチド抗原標的と「結合する」ポリペプチドとは、十分な親和性で抗原と結合することから、その抗原を発現する細胞又は組織の標的化における診断剤及び/又は治療剤として有用であり、他のポリペプチドとはそれほど交差反応しないような、ポリペプチドである。そのような実施態様において、ポリペプチドと「非標的」ポリペプチドとの結合度は、蛍光活性化細胞選別 (FACS) 分析又は放射性免疫沈降法 (RIA) により決定した場合、ポリペプチドとその特定の標的ポリペプチドとの結合の約10%未満であろう。

10

【0030】

ポリペプチドと標的分子との結合に関しては、特定のポリペプチド、又は特定のポリペプチド標的上のエピトープについて、その「特異的結合」、又はそれと「特異的に結合する」、又はそれに対して「特異的である」という用語は、非特異的相互作用とは測定可能な程度に異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、分子の結合を対照分子の結合との比較で決定することにより測定でき、対照分子は、一般に、結合活性を有さない類似構造の分子である。例えば、特異的結合は、標的と類似している対照分子、例えば過剰な非標識標的との競合により決定され得る。この場合、プローブに対する標識した標的の結合が、標識していない過剰な量の標的により競合的に阻害された場合、特異的結合が示される。

20

【0031】

用語「抗体」とは、本明細書では最も広い意味で使用され、具体的には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも二つのインタクトな抗体から形成される多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び、所望の生物学的活性を示す限り、抗体断片を含む。用語「免疫グロブリン」(Ig)は、本明細書では抗体と互換的に使用される。

【0032】

30

抗体は、全て免疫グロブリンフォールドに基づく、様々な構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子である。例えば、IgG抗体は、ジスルフィド結合されて機能的抗体を形成する、二つの「重」鎖及び二つの「軽」鎖を有する。各重鎖及び軽鎖自体は、「定常」(C)及び「可変」(V)領域を含む。V領域は抗体の抗原結合特異性を決定し、一方、C領域は、構造的な支持をもたらし、免疫エフェクターとの非抗原特異的相互作用において機能する。抗体又は抗体の抗原結合断片の抗原結合特異性とは、抗体が特定の抗原と特異的に結合する能力のことである。

【0033】

抗体の抗原結合特異性は、V領域の構造的特徴により決定される。可変性は、可変ドメインの110個のアミノ酸全長にわたり一様に分布してはいない。その代わりに、V領域は、それぞれ9~12アミノ酸長である「超可変領域」(HV R)と呼ばれる極度の可変性のより短い領域で分割されている、15~30個のアミノ酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれる比較的不变のストレッチから成る。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、それぞれ四つのFRを含み、大部分がシート立体配置をとり、三つの超可変領域により繋がっており、この三つの超可変領域はシート構造と繋がり、場合によってはシート構造の一部を形成している、ループを形成する。各鎖における超可変領域は、FRにより互いに極めて近接した状態で保持され、他の鎖由来の超可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md, (1991)を参照のこと)。定常ドメインは、抗原との抗体の結合には直接関わっていない

40

50

いが、抗体依存性細胞性細胞傷害（A D C C）における抗体の関与など、多様なエフェクター機能を呈する。

【 0 0 3 4 】

各 V 領域は典型的には三つの H V R、例えば相補性決定領域（それぞれが「高頻度可変ループ」を含む「 C D R 」）と四つのフレームワーク領域を含む。特定の所望の抗原に対して実質的な親和性で結合するのに必要とされる最少の構造単位である抗原結合部位は、したがって三つの C D R と、適切な高次構造で C D R を保持し提示するためにそれらの間に散在した少なくとも三つ、好ましくは四つのフレームワーク領域を含むであろう。古典的な四本鎖抗体は、 V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメインが協働して定める抗原結合部位を有している。ある種の抗体、例えばラクダ及びサメ抗体は、軽鎖を欠き、重鎖のみによって形成される結合部位に依存する。結合部位が重鎖又は軽鎖のみによって形成され、 V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> の間に協働がない単一ドメイン操作型免疫グロブリンを調製することができる。

【 0 0 3 5 】

「可変」なる用語は、可変ドメインのある部分が、抗体間で配列が広範囲に相違しているという事実を指し、それぞれの特定の抗体のその特定の抗原への結合及び特異性に使用される。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。それは、軽鎖及び重鎖可変ドメインの双方において、高頻度可変領域と称される三つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存されている部分は、フレームワーク領域（ F R ）と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、それぞれ四つの F R を含み、大部分が シート立体配置をとり、三つの超可変領域により繋がっており、この三つの超可変領域は シート構造と繋がり、場合によっては シート構造の一部を形成している、ループを形成する。各鎖における超可変領域は、 F R により互いに極めて近接した状態で保持され、他の鎖由来の超可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（ Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md, (1991) を参照のこと）。定常ドメインは、抗原との抗体の結合には直接関わっていないが、抗体依存性細胞性細胞傷害（A D C C）における抗体の関与など、多様なエフェクター機能を呈する。

【 0 0 3 6 】

「超可変領域」（ H V R ）なる用語は、本明細書において使用される場合、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を意味する。超可変領域は「相補性決定領域」又は「 C D R 」からのアミノ酸残基（例えば、 V<sub>L</sub> の残基 24 - 34 ( L 1 ) 、 50 - 56 ( L 2 ) 及び 89 - 97 ( L 3 ) 、並びに V<sub>H</sub> の 31 - 35 B ( H 1 ) 、 50 - 65 ( H 2 ) 及び 95 - 102 ( H 3 ) ）（ Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) ）及び / 又は「超可変ループ」からの残基（例えば、 V<sub>L</sub> の残基 26 - 32 ( L 1 ) 、 50 - 52 ( L 2 ) 及び 91 - 96 ( L 3 ) 、並びに V<sub>H</sub> の残基 26 - 32 ( H 1 ) 、 52 A - 55 ( H 2 ) 及び 96 - 101 ( H 3 ) ）（ Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987) ）を含み得る。

【 0 0 3 7 】

「フレームワーク」又は「 F R 」残基は、本明細書で定義している高頻度可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【 0 0 3 8 】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部、好ましくはその抗原結合領域を含む。抗体断片の例としては、 F a b 、 F a b' 、 F ( a b' ) 及び F v 断片；ダイアボディ；タンデムダイアボディ（ t a D b ）、線状抗体（例えば、米国特許第 5 6 4 1 8 7 0 号、実施例 2 ； Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995) ）； 1 アーム抗体、単一可変ドメイン抗体、ミニボディ、単鎖抗体分子；抗体断片（例えば、限定されるものではないが、 D b - F c 、 t a D b - F c 、 t a D b - C H 3 、 ( s c F V ) 4 - F c 、ジ - s c F v 、バイ - s c F v 、又はタンデム（ジ、トリ） - s c F v が挙げられる）から形成

10

20

30

40

50

される多特異性抗体；及び二重特異性T細胞エンゲージャー（B i T E）が挙げられる。

【0039】

抗体のパパイン消化は、「F a b」断片と呼ばれる二つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「F c」断片と命名される。パパイン処置は、2つの抗原結合部位を有し、なお抗原を架橋することが可能なF ( a b ' )<sub>2</sub>断片を产生する。

【0040】

「F v」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、密接に非共有結合した一本の重鎖と一本の軽鎖の可変領域の二量体からなる。この配置において、各可変ドメインの三つの超可変領域は相互作用し、V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub>二量体の表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、6つの超可変領域が抗体に抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン（又は抗原に対して特異的な3つの超可変領域のみを含むF vの半分）でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有する。

10

【0041】

F a b 断片はまた、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域（C H 1）を含む。F a b ' 断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖C H 1ドメインのカルボキシ末端に数個の残基が付加されている点でF a b 断片とは異なる。F a b ' - S Hは、本明細書において、F a b ' の一般名称であり、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を持つ。F ( a b ' )<sub>2</sub>抗体断片は、それらの間にヒンジシステインを有するF a b ' 断片の対として生産された。抗体断片の他の化学結合も知られている。

20

【0042】

任意の脊椎動物種からの抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）及びラムダ（λ）と呼ばれる二つの明確に区別される型の一つが割り当てられる。

【0043】

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、抗体は異なるクラスが割り当てられる。インタクトな抗体には5つの主要なクラス：I g A、I g D、I g E、I g G及びI g Mがあり、これらのいくつかは、更にサブクラス（アイソタイプ）、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I G A 1、及びI g A 2に分けられる。抗体の異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、γ、δ、ε、及ぼμと呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配位はよく知られている。

30

【0044】

「単鎖F v」又は「s c F v」抗体断片は、抗体のV<sub>H</sub>ドメイン及びV<sub>L</sub>ドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖に存在する。幾つかの実施態様において、s c F vポリペプチドはV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメイン間にポリペプチドリンクーを更に含み、それはs c F vが抗原結合に所望の構造を形成することを可能にする。s c F vの総説については、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照のこと。

40

【0045】

用語「ダイアボディ」は、二つの抗原結合部位を持つ抗体断片を指し、その断片は、同一ポリペプチド鎖（V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub>）の軽鎖可変ドメイン（V<sub>L</sub>）に連結した重鎖可変ドメイン（V<sub>H</sub>）を含む。非常に短いために同一鎖上で2つのドメインの対形成ができないリンクーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、2つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディは、例えば、E P 4 0 4 0 9 7；国際公開第93/11161号；及びHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)においてより詳しく説明される。

【0046】

50

用語「多特異性抗体」は、最も広い意味で使用され、ポリエピトープ特異性を有する抗体を特に網羅する。そのような多特異性抗体としては、限定されるものではないが、重鎖可変ドメイン ( $V_H$ ) 及び軽鎖可変ドメイン ( $V_L$ ) を含み  $V_H V_L$  単位がポリエピトープ特異性を有する抗体、2つ以上の  $V_L$  及び  $V_H$  ドメインを有し各  $V_H V_L$  単位が異なるエピトープと結合する抗体、2つ以上の单一可変ドメインを有し各单一可変ドメインが異なるエピトープと結合する抗体、完全長抗体、抗体断片、例えば  $Fab$ 、 $Fv$ 、 $dsFv$ 、 $scFv$ 、ダイアボディ、二重特異性を有するダイアボディ、トリアボディ、三重機能性抗体、共有結合的又は非共有結合的に連結している抗体断片が挙げられる。「ポリエピトープ特異性」とは、同じ又は異なる標的(複数可)上で2つ以上の異なるエピトープと特異的に結合する能力を指す。「单一特異性の」とは、1つのエピトープのみと結合できることを指す。一実施態様によれば、多特異性抗体は、親和性が  $5 \mu M$  から  $0.001 \mu M$ 、 $3 \mu M$  から  $0.001 \mu M$ 、 $1 \mu M$  から  $0.001 \mu M$ 、 $0.5 \mu M$  から  $0.001 \mu M$ 、又は  $0.1 \mu M$  から  $0.001 \mu M$  である各エピトープと結合する  $IgG$  抗体である。10

#### 【0047】

「單一ドメイン抗体」( $sdAb$ )又は「单一可変ドメイン(SVD)抗体」という表現は、一般的に、单一可変ドメイン( $VH$ 又は $VL$ )が抗原結合をもたらし得る抗体を指す。言い換えれば、单一可変ドメインは、標的抗原を認識するために別の可変ドメインと相互作用する必要がない。單一ドメイン抗体の例としては、ラクダ科の動物(ラマ及びラクダ)並びに軟骨魚(例えば、テンジクザメ)に由来するもの、並びに、ヒト及びマウス抗体からの組換法に由来するものが挙げられる(Nature (1989) 341:544-546; Dev Comp Immunol (2006) 30:43-56; Trend Biochem Sci (2001) 26:230-235; Trends Biotechnol (2003) 21:484-490; 国際公開第2005/035572号; 国際公開第03/035694号; Febs Lett (1994) 339:285-290; 国際公開第00/29004号; 国際公開第02/051870号)。20

#### 【0048】

本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味し、すなわち、モノクローナル抗体の產生中に生じ得る変異体(通常少量で存在する変異体など)を除き、集団を構成する個々の抗体は同一であり、及び/又は同じエピトープに結合する。異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を通常含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の单一の決定基に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンで汚染されていないという点で有利である。修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体集団から得られているという抗体の特徴を示し、抗体を何か特定の方法で作製しなければならないことを意味するものではない。例えば、本明細書において提供される方法により使用されることになるモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法により作製されてもよく、又は、組換えDNA法により作製されてもよい(例えば、米国特許第4816567号を参照のこと)。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991)及びMarks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)に記載されている手法を用いてファージ抗体ライブラリーから単離されてもよい。30

#### 【0049】

本明細書においては、モノクローナル抗体は、「キメラ」抗体(免疫グロブリン)、即ち、重鎖及び/又は軽鎖の一部分は特定の種に由来する抗体又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一若しくは相同であるが、鎖(複数可)の残りの部分は別の種に由来する抗体又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一若しくは相同である、「キメラ」抗体(免疫グロブリン)、並びに、所望の生物学的活性を呈するものである限りそのような抗体の断片を、特に含む(米国特許第4816567号; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984))。本明細書における目的のキメラ抗体は、非ヒト靈長動物(例:40

旧世界サル、例えばヒヒ、アカゲザル、又はカニクイザル)に由来する可変ドメイン抗原結合配列及びヒト定常領域配列を含む「靈長類化」抗体を含む(米国特許第5693780号)。

【0050】

非ヒト(例えばマウス)抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。大抵の場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が、非ヒト種、例えば、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、ウサギ、又は非ヒト靈長動物の超可変領域(ドナー抗体)由来の残基により置き換えられているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。幾つかの例においては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)の残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられている。更に、ヒト化抗体はレシピエント抗体又はドナー抗体において見い出されない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体性能を更に改良するためになされる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインの全てを実質的に含み、超可変ループの全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、上記のFR置換基(複数可)を除く、FRの全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のものである。また、ヒト化抗体は、場合によっては、免疫グロブリン、通常はヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。更なる詳細については、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); 及び Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)を参照のこと。

【0051】

本明細書での目的に関して、「インタクトな抗体」は、重及び軽可変ドメイン並びにFc領域を含むものである。定常ドメインは、天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)又はそのアミノ酸配列変異体であり得る。好ましくは、インタクトな抗体は、一又は複数のエフェクター機能を有する。

【0052】

「天然抗体」は、通常、二つの同一の軽(L)鎖及び二つの同一の重(H)鎖からなる、約150000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は一つの共有ジスルフィド結合により重鎖に結合しており、ジスルフィド結合の数は、異なった免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で変化する。また各重鎖と軽鎖は、規則的に離間した鎖内ジスルフィド架橋を有している。各重鎖は、多くの定常ドメインが続く可変ドメイン(V<sub>H</sub>)を一端に有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン(V<sub>L</sub>)を、他端に定常ドメインを有する; 軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基は、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられる。

【0053】

「ネイキッド抗体」は、細胞傷害性部分又は放射性標識などの異種分子とコンジュゲートされない、(本明細書において定義する)抗体である。

【0054】

幾つかの実施態様において、抗体「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域(天然配列Fc領域又はアミノ酸配列変異体Fc領域)に起因しうる生物学的活性を指し、抗体のアイソタイプにより変化する。抗体のエフェクター機能の例は: C1q結合及び補体依存性細胞障害; Fc受容体結合性; 抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADC C); 貪食作用; 細胞表面受容体のダウンレギュレーションを含む。

【0055】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」及び「ADC C」は、Fc受容体(FcR)を発現する非特異的な細胞傷害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、及びマクロファージ)が、標的細胞上の結合された抗体を認識し、引き続き標的細胞を溶解させる、細胞媒介性の反応を指す。ADC Cを媒介する主要な細胞NK細胞はFcR I I Iのみを発現するのに対し、単球はFcR I、FcR I I 及びFcR I I Iを発現する。造血細胞におけるFcRの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:45

10

20

30

40

50

7-92 (1991) の 464 ページの表 3 に要約されている。目的の分子の A D C C 活性を評価するために、米国特許第 5500362 号又は同第 5821337 号に記載されているようなインビトロ A D C C アッセイを実施してもよい。このようなアッセイにおいて有用なエフェクター細胞は、末梢血液単核細胞 (P B M C) 及びナチュラルキラー (N K) 細胞を含む。代替的又は追加的に、目的の分子の A D C C 活性は、例えば、Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656 (1998) において開示されているような動物モデルにおいて、インビボで評価され得る。

#### 【 0 0 5 6 】

「ヒトエフェクター細胞」とは、一又は複数の F c R を発現し、エフェクター機能を実行する白血球である。幾つかの実施態様において、その細胞が少なくとも F c R I I I を発現し、A D C C エフェクター機能を実行する。A D C C を媒介するヒト白血球の例は、末梢血液単核細胞 (P B M C)、ナチュラルキラー (N K) 細胞、単球、細胞障害性 T 細胞及び好中球を含むが、P B M C と N K 細胞が好適である。

#### 【 0 0 5 7 】

「補体依存性細胞傷害」又は「C D C」は、分子が補体の存在下で標的を溶解する能力を指す。補体活性化経路は、補体系の第 1 成分 (C 1 q) が、同種抗原と複合体化された分子 (例えばポリペプチド (例: 抗体)) と結合することにより引き起こされる。補体活性化を検討評価するために、C D C アッセイ、例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996) に記載されているような C D C アッセイを実施してもよい。

#### 【 0 0 5 8 】

用語「F c 受容体」又は「F c R」は、抗体の F c 領域と結合する受容体を説明するために使用される。幾つかの実施態様において、F c R は、天然配列ヒト F c R である。更に、好ましい F c R は、I g G 抗体 (ガンマ受容体) と結合するものであり、F c R I 、F c R I I 、及び F c R I I I サブクラスの受容体を含み、これらの受容体の対立遺伝子変異体及び代替的にスプライスされた形態も含む。F c R I I I 受容体は、F c R I I I A (「活性化型受容体」) 及び F c R I I I B (「抑制型受容体」) を含み、これらは、その細胞質ドメインが主に異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化型受容体 F c R I I I A は、その細胞質ドメイン中に免疫受容活性化チロシンモチーフ (I T A M) を含む。抑制型受容体 F c R I I I B は、その細胞質ドメイン中に免疫受容体抑制性チロシンモチーフ (I T I M) を含む (Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997) を参照のこと)。F c R は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); 及び de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995) において総説されている。将来的に同定されることになるものを含め、他の F c R は、本明細書においては用語「F c R」に包含される。この用語には、胎児への母親の I g G の移行に関与している新生児の受容体 F c R n も含まれる (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) 及び Kim et al., J. Immunol. 249 (1994))。

#### 【 0 0 5 9 】

「混入物」とは、所望のポリペプチド生成物とは異なる物質を指す。本発明の幾つかの実施態様において、混入物はポリペプチドの荷電変異体を含む。本発明の幾つかの実施態様において、混入物は抗体又は抗体断片の荷電変異体を含む。本発明の他の実施態様において、混入物は、限定するものではないが:宿主細胞物質、例えば C H O P; 浸出されたタンパク質 A; 核酸; 所望のポリペプチドの変異体、断片、凝集体又は誘導体; 別のポリペプチド; エンドトキシン; ウイルス性混入物; 細胞培養培地成分等を含む。幾つかの例において、混入物は、例えば限定されるものではないが、細菌細胞 (大腸菌細胞など)、昆虫細胞、原核細胞、真核細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、鳥類細胞、真菌細胞に由来する宿主細胞タンパク質 (H C P) であってよい。

#### 【 0 0 6 0 】

本明細書において使用される場合、用語「イムノアドヘシン」は、異種ポリペプチドの結合特異性を免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能と組み合わせた抗体様の分

10

20

30

40

50

子を指している。構造的に、イムノアドヘシンは、抗原認識以外の所望の結合特異性を有するアミノ酸配列と、抗体の結合部位との融合（すなわち、「異種の」である）、及び免疫グロブリン定常ドメイン配列を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部は、典型的には、少なくとも受容体又はリガンドの結合部位を含む近接するアミノ酸配列である。イムノアドヘシンにおける免疫グロブリン定常ドメイン配列は、任意の免疫グロブリン、例えば Ig G - 1、Ig G - 2、Ig G - 3 若しくは Ig G - 4 サブタイプ、Ig A ( Ig A - 1 及び Ig A - 2 を含む)、Ig E、Ig D、又は Ig M から得てもよい。

#### 【 0 0 6 1 】

本明細書において使用される場合、「基本的に同一」とは、値又はパラメータが有意な影響により変更されていないことを示す。例えば、カラム出口のクロマトグラフィー移動相は、イオン強度が有意に変化していない場合、移動相の初期イオン強度と基本的に同一である。例えば、初期イオン強度の 10 %、5 % 又は 1 % 内のカラム出口のイオン強度は、初期イオン強度と基本的に同一である。

10

#### 【 0 0 6 2 】

本明細書中の「約」の値又はパラメーターへの言及は、その値又はパラメーター自体に対するバリエーションを含む（記載する）。例えば、「約 X」との記載には「X」の記載が含まれる。

#### 【 0 0 6 3 】

本明細書において使用される場合、単数形「a」、「or」、及び「the」は、文脈が明らかに他を指さない限り複数系を含む。本明細書に記載の本発明の態様及び変形形態は、態様及び変形形態「からなる」及び / 又は「基本的にからなる」を含む。

20

#### 【 0 0 6 4 】

##### I I . クロマトグラフィーの方法

###### A . 最適なイオン交換クロマトグラフィーの分離条件を決定する

本発明は、分解能の損失が pH 及び温度の変化により最小化されるように、ポリペプチドにおいて IEC を実行するために最適なイオン交換条件を予測するための方法を提供する。幾つかの実施態様において、イオン交換クロマトグラフィーは、ポリペプチドを含む組成物中の混入物を検出するために使用される。幾つかの実施態様において、ポリペプチドは抗体又はその抗原結合性断片である。幾つかの実施態様において、混入物は荷電変異体；例えば、抗体又は抗体断片の塩基性荷電変異体及び / 又は酸性荷電変異体を含む、ポリペプチドの塩基性荷電変異体及び / 又は酸性荷電変異体である。

30

#### 【 0 0 6 5 】

本発明の幾つかの実施態様において、ポリペプチドが電荷平衡である条件が同定される。ポリペプチドの正味電荷状態 (z) 対 pH をグラフ化すると、この平衡を実証する。曲線は、ポリペプチドのアミノ酸配列を使用して作成される。ゼロに最も近い勾配を有する曲線の領域は、電荷平衡を表している。平衡状態で、ポリペプチドの正味の電荷状態は、曲線上の平坦領域としてグラフで示される（図 1）pH の変化に起因する変化に抵抗する。ポリペプチドの電荷状態の安定性は、堅牢性をアッセイするために寄与する。ポリペプチドが平衡状態である条件は、pH に対する z の直線の方程式の二次導関数を 0 に等しく設定することによって解くことができる。これは、曲線が凹から凸へ又はその逆へと遷移する曲線の変曲点にある。この曲線上には複数の変曲点 (IP) があるが（図 1 には図示せず）、目的の変曲点は、傾きの絶対値がもはや減少していない生物学的領域内にある。この IP は、pH に関する電荷状態の安定性に起因して著しく堅牢な方法を生成する。

40

#### 【 0 0 6 6 】

標的ポリペプチドと比較して正味電荷に僅かな違いを有する混入物を pH 値の範囲にわたって検出することができるため、ポリペプチドの電荷平衡は IEC の分解能において理想的な最適電荷である。これはポリペプチドを含むアミノ酸の構造及び特性によるためである。6 つのアミノ酸が、それらがタンパク質の pH 依存性の特性を定義する上で重要な役割を果たしているので正味荷電状態 (z) を計算するために使用される（表 1）。酸解離定数、( - log<sub>10</sub> K<sub>a</sub> ) として定義され、一定の比率 [A - ] / [HA] に基づい

50

た  $pK_a$  が、アミノ酸の電荷状態を計算するために使用される。その結果は実際の値ではなく、その電荷状態の確率、  $P$  である。

表1. 選択アミノ酸の酸解離定数。

アミノ酸	$pK_{a_3}$
アスパラギン;D	3.65
グルタミン酸;E	4.25
ヒスチジン;H	6.02
チロシン;Y	10.1
リジン;K	10.53
アルギニン;R	12.48

10

$$P = \left( \frac{10^{(pH - pK_a)}}{10^{(pH - pK_a)} + 1} \right)$$

20

式1

#### 【0067】

例えば、  $pH 6.5$  でヒスチジンについて式1を用いると、  $P = 10^{(6.5 - 6)} / (10^{(6.5 - 6)} + 1) = 0.76$ 。これは、  $pH 6.5$  において、 10 個のヒスチジン残基を含むポリペプチド内の各ヒスチジン残基は、 +0.24 の電荷よりもむしろ脱プロトン化されている可能性 76 % を有するであろうことを示している。言い換えると、  $pH 6.5$  で、ポリペプチド内の 4 個全てのヒスチジン残基のうちおよそ 3 つが非プロトン化されているであろう。これは、ほぼ全てのヒスチジン残基が脱プロトン化されている  $pH 7.5$  でのポリペプチドについての計算と比較することができる（図2B）。  $pH$  がアミノ酸の側鎖の  $pK_a$  に近づくと、最も優勢な電荷状態の頻度が減少する。

30

#### 【0068】

重要なアミノ酸にこの式を適用すると、平衡状態で動作させると最適な分解能を提供する理由を実証する。  $pH$  の範囲にわたって 6 つの電荷決定アミノ酸の確率を重み付けすると、最も均質な電荷状態を解くことができる（図3）。プロトン化された種の推定分布に起因する異なる電荷状態の存在は、その結果を曖昧にし、かつ対象ポリペプチドと比較して正味電荷分布のわずかな変化を有する混入物を検出する能力を妨害するであろう。幾つかの実施態様において、正味電荷分布対  $pH$  の 3D グラフがプロットされる。正味電荷のピーク対  $pH$  対頻度が最もシャープである場合に、より高い分解能が達成される（図5）。従って、堅牢性のために  $pH$  及び温度の同一条件が最適な分解能を創成する。

40

#### 【0069】

本発明の幾つかの実施態様において、電荷頻度の分布は、確率変数における不確実性の尺度であるシャノンエントロピー（式2）を介して決定される。ポリペプチド中に存在する各 6 つのアミノ酸（リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、チロシン及びアルギニン）の残基の数に基づいて、ポリペプチドの所定の  $pH$  でのシャノンエントロピーは、所定の温度で  $pH$  の関数としてプロットされる（図4）。シャノンエントロピーが低いほど、電荷分布はより均一である。本発明の幾つかの実施態様において、クロマトグラフィーは、シャノンエントロピーがおよそ最小である  $pH$  及び温度で行われる。

式2

$$H(X) = - \sum_{i=1}^n p(x_i) \log_b p(x_i)$$

ここで：

n = 結果の可能性 (n = 2、プロトン化又は非プロトン化の何れか)

p = 結果又は事象 ( $x_i$ ) の確率 (式1を参照)

b = #トライアル (荷電アミノ酸残基の#)

【0070】

10

本発明の幾つかの実施態様において、共通のクロマトグラフィー手順が複数のポリペプチド生成物；例えば複数の抗体生成物を分析するために使用されるように、最適なイオン交換クロマトグラフィーの分離条件が複数の異なるポリペプチドについて決定される。幾つかの実施態様において、複数のポリペプチド生成物（例えば、複数の抗体生成物）が、本明細書に記載の方法によって同定される共通のクロマトグラフィー手順を使用して荷電変異体などの混入物の存在について分析される。本発明の重要な利点は、多数のmAbを含む多数のポリペプチドのIPが、同じpHで生じ（図7）、その点での電荷の数によって異なるだけであることである。従って、これらのポリペプチドの全てのIECの最適条件は同じになる；すなわち、ポリペプチドが電荷平衡であるpH及び温度においてである。

20

【0071】

IPからの逸脱を生じないであろう条件の変化を確実にするために、用語dIP/dT値が使用される。タンパク質のdIP/dTは、温度の変化に関する正味電荷対pHの曲線におけるポリペプチドの変曲点の変化である。所与のポリペプチドの変曲点は、正味電荷対pHのプロットが決定される温度に基づいて変動することとなる。しかし、変曲点のpHは温度の上昇とともに減少するが（例えば、図8及び9を参照）、正味の電荷は一定のままである。従って、変曲点に対してクロマトグラフィーを最適化することは、温度変動に対するイオン交換法の堅牢性をも提供する。

【0072】

幾つかの実施態様において、本発明は、複数のポリペプチドの所定のポリペプチドに使用するイオン交換クロマトグラフィーのタイプを決定するための手段を提供する。例えば、変曲点での正味の電荷が正である場合、陽イオン交換クロマトグラフィー材料が用いられる。陽イオン交換クロマトグラフィー材料の非限定的な例を以下に提供する。幾つかの実施態様において、複数のポリペプチドが共通の変曲点での正味の正電荷を有する共通の陽イオン交換クロマトグラフィーの手順が、複数のポリペプチド（例えば、抗体）を分析するために使用される。変曲点での正味の電荷が負である場合、陰イオン交換クロマトグラフィー材料が用いられる。陰イオン交換クロマトグラフィー材料の非限定的な例を以下に提供する。幾つかの実施態様において、複数のポリペプチドが共通の変曲点での正味の負電荷を有する共通の陰イオン交換クロマトグラフィーの手順が、複数のポリペプチド（例えば、抗体）を分析するために使用される。

30

【0073】

B. 最適な緩衝系を決定する

幾つかの実施態様において、本発明は、クロマトグラフィー法において使用するために最適なバッファーを選択するための方法を提供する。幾つかの実施態様において、温度変化による変曲点の変化と同様の酸解離定数（pKa）変化率を有する緩衝系がクロマトグラフィーの手順で使用される。タンパク質のdIP/dTにほぼ等しい温度の変化によるpKaの変化（すなわちd pKa/dT）を用いてバッファーを選択することは、温度のいかなる変化もタンパク質をそのIPでとどまらせることを確実にし、それによって分析クロマトグラフィーの堅牢性に貢献することとなる。幾つかの実施態様において、(dIP/dT)ポリペプチド（複数）= (d pKa/dT)バッファー。幾つかの実施態様に

40

50

おいて、バッファーはACESバッファー又はHEPESバッファーである。例えば、バッファーのACES又はHEPESを用いて、変曲点での例示的なmAbの電荷状態は30を超えて0.5未満変化する(図11)。

$$\text{式3} \quad d\text{IP}/dT \approx dp\text{Ka}/dT$$

#### 【0074】

幾つかの実施態様において、バッファーは、変曲点のpHで効果的な緩衝能を提供する。幾つかの実施態様において、ポリペプチドのdIP/dTは、約-0.02である。幾つかの実施態様において、温度変化は、約20から約50である。幾つかの実施態様において、 $d\text{IP}/dT = dp\text{Ka}/dT \pm 1\%$ 、 $d\text{IP}/dT = dp\text{Ka}/dT \pm 2\%$ 、 $d\text{IP}/dT = dp\text{Ka}/dT \pm 3\%$ 、 $d\text{IP}/dT = dp\text{Ka}/dT \pm 4\%$ 、 $d\text{IP}/dT = dp\text{Ka}/dT \pm 5\%$ 、 $d\text{IP}/dT = dp\text{Ka}/dT \pm 6\%$ 、 $d\text{IP}/dT = dp\text{Ka}/dT \pm 7\%$ 、 $d\text{IP}/dT = dp\text{Ka}/dT \pm 8\%$ 、 $d\text{IP}/dT = dp\text{Ka}/dT \pm 9\%$ 、 $d\text{IP}/dT = dp\text{Ka}/dT \pm 10\%$ 、 $d\text{IP}/dT = dp\text{Ka}/dT \pm 20\%$ 、 $d\text{IP}/dT = dp\text{Ka}/dT \pm 30\%$ 、 $d\text{IP}/dT = dp\text{Ka}/dT \pm 40\%$ 、又は $d\text{IP}/dT = dp\text{Ka}/dT \pm 50\%$ 。幾つかの実施態様において、選択されたバッファー中のポリペプチドの正味電荷は、約5、10、15、20、25、又は30以上にわたって1未満だけ変化する。

#### 【0075】

幾つかの実施態様において、本発明は、荷電変異体などの混入物を検出する高解像度で堅牢な多生成物ポリペプチドのIECを開発するための方法を提供する。条件は、ポリペプチド(例えば、mAb)が親ポリペプチドからの荷電変異体の分離を向上させる電荷平衡にあるように設計される。電荷平衡は、計算される正味電荷状態(z)対pHをグラフ化することにより、多数のポリペプチド生成物(例えば、mAb生成物)について決定される。ポリペプチドが平衡状態である条件は、pHに対するzの直線の方程式の二次導関数を0に等しく設定することによって解かれる。

#### 【0076】

与えられたpHでのポリペプチドの正味の電荷は、それらの側鎖によってタンパク質のpH依存性の特性を定義する際に重要な役割を果たしているmAbの6つのアミノ酸の含有量に基づいて決定される。6つのアミノ酸は、アスパラギン、グルタミン酸、ヒスチジン、チロシン、リジン及びアルギニンである。6つのアミノ酸の酸解離定数(-log<sub>10</sub>Ka)として定義されるpKaが、正味荷電状態(z)を計算するために使用される(表1)。例えば、6.02以下のpH値では、平均してヒスチジンはプロトン化されておりと正の電荷を帯びているが、一方6.02を超えるpH値では平均してヒスチジンは脱プロトン化され、電荷を帯びていない。与えられたpH値における最も豊富な荷電状態の確率が6つのアミノ酸のそれぞれについて決定され、与えられたpHでのmAbの電荷の重み付き確率が、抗体中に存在するこれらの6つのアミノ酸のそれぞれの残基数に基づいて決定された。電荷頻度の分布もまた、確率変数における不確実性の尺度であるシャノンエントロピー(式3)を介して決定することができる。ポリペプチド中に存在するこれらの6つのアミノ酸のそれぞれの残基数に基づいて、ポリペプチドに対する所与のpHにおけるシャノンエントロピーをpHの関数としてプロットすることができる。シャノンエントロピーが低いほど、電荷分布はより均一である。このデータから、pHの関数としてのポリペプチドの正味の電荷の分布をプロットし、中性pHに最も近い変曲点(IP)が決定される。これは、最も均質な電荷状態であるpHであり、IECの分離において最もシャープなピークを生じることとなる。多生成物IECプロトコルを開発するために、異なるpIを有する多数の標的ポリペプチド(例えば、標的のMAb)についての変曲点が決定される。IPを標的にすると、IECのpH堅牢性を向上させることができる。

#### 【0077】

用語dIP/dTは、温度の変化による分子のIPの変化を表している。これらの結果

10

20

30

40

50

から、温度の影響を最小にし、アッセイの堅牢性を向上させるために、温度の関数としてのバッファーの酸解離定数の変化が  $d \text{ I P} / d \text{ T}$  に近づいた場合に（すなわち、 $d \text{ I P} / d \text{ T} = d \text{ p K}_a / d \text{ T}$ ）最適なバッファーを選択することができる。多数のバッファーについて温度の関数（ $d \text{ p K}_a / d \text{ T}$ ）としての  $\text{p K}_a$  の変化の公表値は以下のとおりである：リン酸塩：-0.0028、HEPES：-0.014、ACES：-0.02、トリス：-0.028、ビシン：-0.018、トリシン：-0.021、TAPS：-0.02、及びCHES：-0.018 (Benyon, RJ & Easterby, JS, Buffer Solutions The Basics, IRL Press, 1996)。

#### 【0078】

幾つかの態様において、本発明は、各抗体組成物が抗体及びその抗体の一以上の電荷変異体を含む、複数の抗体組成物を分析するための方法を提供し、ここで、各抗体組成物に対して、方法は、a) ローディングバッファーが約40で約7.6のpHで10mMのHEPESバッファーを含む、ローディングバッファーを用いて、約1mL/分の流速でイオン交換クロマトグラフィー材料に抗体及び一以上の電荷変異体を結合させ；b) 溶出バッファーが約7.6のpHで約10mMのHEPESバッファー及びNaClを含み、NaClの濃度が約40分で約0mMから約80mMまで勾配で増加し、抗体及びその電荷変異体が勾配により分離される溶出バッファーの勾配を用いてイオン交換クロマトグラフィー材料から抗体及び電荷変異体混入物を溶出し；及びc) 抗体及び一以上の電荷変異体を検出することを含む方法は抗体をその電荷変異体から効果的に分離する。幾つかの実施態様において、複数の抗体組成物が異なる抗体を含む。幾つかの実施態様において、複数の抗体組成物が異なるpIを有する抗体を含む。

10

#### 【0079】

##### C. クロマトグラフィー

幾つかの態様において、本発明は、初期イオン強度を有するローディングバッファーを用いてポリペプチド及び一以上の混入物をイオン交換クロマトグラフィー材料に結合させ、ポリペプチド及び一以上の混入物が別個の独立した実体としてクロマトグラフィー材料から溶出するように溶出バッファーのイオン強度がイオン強度勾配によって変更される溶出バッファーを用いてイオン交換カラムからポリペプチド及び一以上の混入物を溶出させることを含む、ポリペプチド及び一以上の混入物、例えば、ポリペプチド変異体を含む組成物の分析方法を提供する。幾つかの実施態様において、クロマトグラフィー法は、様々なpIを有する複数のポリペプチド（例えば、ポリペプチド生成物）に適している。例えば、方法は、pIが6.0から9.5までの範囲を有する多数の異なる抗体生成物のために使用することができる。他の実施態様において、クロマトグラフィー法は、本明細書に記載の方法によって同定される最適なバッファーの使用を含む。

20

#### 【0080】

本明細書に記載される方法の何れかの幾つかの実施態様において、クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換材料である。幾つかの実施態様において、ポリペプチドが本明細書に記載される変曲点で正に荷電される場合、陽イオン交換材料が使用される。幾つかの実施態様において、陽イオン交換材料は、負に荷電され、固相を通過し又は通じて水溶液中の陽イオンとの交換のための遊離の陽イオンを有する固相である。本明細書に記載される方法の何れかの幾つかの実施態様において、陽イオン交換材料は、膜、モノリス、又は樹脂であってもよい。幾つかの実施態様において、陽イオン交換材料は、樹脂であってもよい。陽イオン交換材料は、限定されないが、スルホン酸、カルボン酸、カルボキシメチルスルホン酸、スルホイソブチル、スルホエチル、カルボキシル、スルホプロピル、スルホニル、スルホキシエチル（sulphoxyethyl）、又はオルトリン酸塩などのカルボン酸官能基又はスルホン酸官能基を含んでいてもよい。上記の幾つかの実施態様において、陽イオン交換クロマトグラフィー材料は、陽イオン交換クロマトグラフィーカラムである。幾つかの実施態様において、陽イオン交換クロマトグラフィー材料が、異なるポリペプチド、例えば、pIが約7.0から約9.5までの範囲である異なる抗体又はその断片に対して使用される。幾つかの実施態様において、陽イオン交換クロマトグラフィー

30

40

50

材料は、本明細書に記載の方法によって同定される最適なバッファーを用いてクロマトグラフィー法において使用される。

【0081】

陽イオン交換材料の例は、当該技術分野で知られており、限定されないが、Mustang S, Sartobind S, SOS Monolith, S Ceramic HyperD, Poros XS, Poros HS50, Poros HS20, SPSFF, SP-Sepharose XL (SPXL), CM Sepharose Fast Flow, Capto S, Fractogel Se HiCap, Fractogel S03, 又はFractogel COOを含む。本明細書に記載される方法の何れかの幾つかの実施態様において、陽イオン交換材料はPoros HS50である。幾つかの実施態様において、Poros HS50樹脂は、Poros HS50  $\mu\text{m}$ 又はPoros HS20  $\mu\text{m}$ 粒子であって良い。本発明の方法で使用するための陽イオン交換クロマトグラフィーカラムの例としては、限定されるものではないが、Propac WCX-10、Propac WCX-10HT、MabPac SCX-10 5  $\mu\text{m}$ 、及びMabPac SCX-10 10  $\mu\text{m}$ を含む。

10

【0082】

本明細書に記載される方法の何れかの幾つかの実施態様において、クロマトグラフィー材料は陽イオン交換材料である。幾つかの実施態様において、ポリペプチドが本明細書に記載される変曲点で負に荷電される場合、陰イオン交換材料が使用される。幾つかの実施態様において、陰イオン交換材料は、正に荷電され、固相を通過し又は通じて水溶液中の陰イオンとの交換のための遊離の陰イオンを有する固相である。本明細書に記載される方法の何れかの幾つかの実施態様において、陰イオン交換材料は、膜、モノリス、又は樹脂であってもよい。幾つかの実施態様において、陰イオン交換材料は、一級アミン、二級アミン、三級アミン又は第四級アンモニウムイオン官能基、ポリアミン官能基、又はジエチルアミノエチル官能基を含んでいてもよい。上記の幾つかの実施態様において、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は、陰イオン交換クロマトグラフィーカラムである。幾つかの実施態様において、陰イオン交換クロマトグラフィー材料が、ポリペプチド、例えば、pIが約7未満である抗体又はその断片に対して使用される。幾つかの実施態様において、陰イオン交換クロマトグラフィー材料が、異なるポリペプチド、例えば、pIが約4.5から約7.0までの範囲である異なる抗体又はその断片に対して使用される。幾つかの実施態様において、陰イオン交換クロマトグラフィー材料は、本明細書に記載の方法によって同定される最適なバッファーを用いてクロマトグラフィー法において使用される。

20

【0083】

陰イオン交換材料の例は、当該技術分野で公知であり、限定されないが、Poros HQ 50、Poros PI 50、Poros D、Mustang Q、Q Sepharose FF、及びDEAE Sepharoseを含む。本発明の方法で使用するための陰イオン交換クロマトグラフィーカラムの例としては、限定されるものではないが、Dionex Propac 10 SAX及びTosoh GSkgel Q STAT 7  $\mu\text{m}$  WAXを含む。

30

【0084】

本明細書に記載される方法の何れかの幾つかの実施態様において、クロマトグラフィー材料は、以下の機能：陰イオン交換、陽イオン交換、水素結合、及び疎水性相互作用のうちの一又は複数が可能な官能基を含む混合モード材料である。幾つかの実施態様において、混合モード材料は、陰イオン交換及び疎水性相互作用が可能な官能基を含む。混合モード材料は、リガンドとしてN-ベンジル-N-メチルエタノールアミン、4-メルカプト-エチル-ピリジン、ヘキシルアミン、又はフェニルプロピルアミンを含むか、又は架橋ポリアリルアミンを含む。混合モード材料の例は、Capto Adhere樹脂、QM A樹脂、Capto MMC樹脂、MEP HyperCel樹脂、HEA HyperCel樹脂、PPA HyperCel樹脂、又はChromasorb膜又はSarto

40

50

bind STICを含む。幾つかの実施態様において、混合モード材料は、Capto Adhere樹脂である。上記の幾つかの実施態様において、混合モード材料は、混合モードクロマトグラフィーカラムである。

【0085】

本明細書に記載される方法の何れかの幾つかの実施態様において、イオン交換材料は、従来のクロマトグラフィー材料又は対流性クロマトグラフィー材料を利用することができる。従来のクロマトグラフィー材料は、例えば、灌流性材料（例えば、ポリ（スチレン-ジビニルベンゼン）樹脂）及び拡散性材料（例えば、架橋されたアガロース樹脂）を含む。幾つかの実施態様において、ポリ（スチレン-ジビニルベンゼン）樹脂は、Poros樹脂であり得る。幾つかの実施態様において、架橋アガロース樹脂は、スルホプロピル-Sepharose Fast Flow（「SPSF」）樹脂であってもよい。対流性クロマトグラフィー材料は、膜（例えば、ポリエーテルスルホン）、又はモノリス材料（例えば、架橋ポリマー）であってもよい。ポリエーテルスルホン膜は、Mustangであって良い。架橋ポリマー-モノリス材料は、架橋ポリ（グリシジルメタクリレート-コ-エチレンジメタクリレート）であっても良い。

【0086】

本発明の方法の何れかの幾つかの実施態様において、クロマトグラフィー材料は、クロマトグラフィーカラム；例えば、陽イオン交換クロマトグラフィーカラム又は陰イオン交換クロマトグラフィーカラムの中にある。幾つかの実施態様において、クロマトグラフィーカラムは、液体クロマトグラフィーに使用される。幾つかの実施態様において、クロマトグラフィーカラムは、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）のために使用される。幾つかの実施態様において、クロマトグラフィーカラムは、HPLCクロマトグラフィーカラム；例えば、陽イオン交換HPLCカラム又は陰イオン交換HPLCカラムである。

【0087】

本発明の多生成物クロマトグラフィー法のために使用することができる例示的なHPLCの手順は以下の通りである；しかしながら、本発明の方法は、これらの手順に拘束されるとは解釈されない。サンプルをオートサンプラーに付加し、冷蔵する（5±3）。カラムをカラムコンパートメントに置き、分析中、コンパートメントの温度を設定点から狭い範囲内（±1）に維持するために温度調節機能を用いてもよい。カラム溶出物を280nmでモニターする。

【0088】

サンプルを移動相でおよそ1~2mg/mLの目標ポリペプチド濃度に希釈する。幾つかの実施態様において、ポリペプチドはカルボキシペプチダーゼB（CpB）で消化され、1:100（w/w）の比率で付加され、37で20分間インキュベートされてもよい。サンプルは分析するまで5で保管されてもよい。

【0089】

機器は、低圧四元勾配ポンプ、温度調節能力を有する高速分離オートサンプラー、熱制御カラムコンパートメント及びダイオードアレイUV検出器を含んでもよい。PCM-3000pH及び導電率モニターは、検出器の出口で、リアルタイムでpH及び導電率データを収集するように接続されてもよい。機器制御、データ習得及びデータ分析は、例えば、Thermo Scientific Dionex Chromelionソフトウェア、バージョン6.8を使用して実施され得る。

【0090】

サンプルは、脱イオン水で2mg/mLに希釈され、オートサンプラーに5±3で保持され得る。MabPac SCX-10、4×250mmカラムは、温度設定37±1でカラムコンパートメントに配置される。各クロマトグラフィーの実行のために、タンパク質（20μg）の10μLが注入される。バッファーAは、37で5mMのACES（pH7.5）である。バッファーBはバッファーA中に180mMのNaClである。勾配はバッファーBをバッファーA中に混合することにより、100分間、1mM/分で0~100mMのNaClである。流速は0.8mL/分である。タンパク質は28

10

20

30

40

50

0 nmでの吸光度によって検出される。幾つかの実施態様において、バッファーAは、40で10 mMのHEPESバッファー(pH 7.6)、バッファーBは100 mMのNaClである。

【0091】

溶出とは、本明細書において使用される場合、クロマトグラフィー材料から生成物、例えばポリペプチド及び/又は混入物を除去することである。溶出バッファーは、クロマトグラフィー材料からポリペプチド又は目的とするその他の生成物を溶出するために使用されるバッファーである。幾つかの実施態様において、溶出バッファーは、クロマトグラフィーの移動相の一部である。幾つかの実施態様において、ポリペプチド及び混入物を含む組成物は、移動相の一部としてクロマトグラフィー材料に適用される。次いで、ポリペプチド及び混入物がクロマトグラフィー材料から溶出する際、移動相は、混入物からのポリペプチドの分離が可能になるように変更される。多くの場合、溶出バッファーは、ロードバッファーとは異なる物理的特性を有する。幾つかの実施態様において、溶出バッファーのpH及び溶出バッファーのイオン強度は、ロードバッファーと比較して、溶出中に増加する。幾つかの実施態様において、クロマトグラフィーは、多生成物のクロマトグラフィーの手順である。幾つかの実施態様において、溶出バッファーは、本明細書に記載の方法によって同定される最適なバッファーを含む。

【0092】

幾つかの実施態様において、イオン強度勾配は、塩勾配である。幾つかの実施態様において、塩勾配は、約0 mM塩から約200 mM塩までの勾配である。幾つかの実施態様において、塩勾配は、約0 mMから約100 mMまで、0 mMから約60 mMまで、0 mMから約50 mMまで、0 mMから約40 mMまで、0 mMから約30 mMまで、0 mMから約20 mMまで、0 mMから約10 mMまで、10 mMから約200 mMまで、10 mMから約100 mMまで、10 mMから約50 mMまで、10 mMから約40 mMまで、10 mMから約30 mMまで、10 mMから約20 mMまで、20 mMから約200 mMまで、20 mMから約100 mMまで、20 mMから約50 mMまで、20 mMから約30 mMまで、30 mMから約200 mMまで、30 mMから約100 mMまで、及び30 mMから約50 mMまでの何れかである。

【0093】

本発明の幾つかの実施態様において、移動相、例えば溶出バッファーのイオン強度は、移動相の導電率により測定される。導電率とは、二つの電極間の電流を導電する水溶液の能力を指す。溶液中では、電流はイオン輸送により流れる。したがって、水溶液中のイオン量が増加すると、溶液はより高い導電率を有することになる。導電率の基本測定単位は、Siemens(又はmho)、mho(mS/cm)であり、Orion導電率計の様々なモデル等の導電率計を使用して測定され得る。電解導電率は溶液中のイオンの電流を流す能力であるため、溶液の導電率は、その中のイオンの濃度を変化させることにより変更されてもよい。例えば、溶液中のバッファー剤の濃度及び/又は塩(例えば塩化ナトリウム、酢酸ナトリウム及び塩化カリウム)の濃度は、所望の導電率を達成するために変更されてもよい。好ましくは、様々なバッファーの塩濃度は、所望の導電率を達成するために変更される。

【0094】

幾つかの実施態様において、クロマトグラフィーの移動相は、約0.0 mS/cm、0.5 mS/cm、1.0 mS/cm、1.5 mS/cm、2.0 mS/cm、2.5 mS/cm、3.0 mS/cm、3.5 mS/cm、4.0 mS/cm、4.5 mS/cm、5.0 mS/cm、5.5 mS/cm、6.0 mS/cm、6.5 mS/cm、7.0 mS/cm、7.5 mS/cm、8.0 mS/cm、8.5 mS/cm、9.0 mS/cm、9.5 mS/cm、10 mS/cm、11 mS/cm、12 mS/cm、13 mS/cm、14 mS/cm、15 mS/cm、16 mS/cm、17.0 mS/cm、18.0 mS/cm、19.0 mS/cm、又は20.0 mS/cmの何れかより大きい初期導電率を有する。幾つかの実施態様において、移動相の導電率は、例えばイオン強度勾配によ

り、クロマトグラフィー中に増加する。幾つかの実施態様において、溶出完了時の移動相の導電率は、約 1.0 mS/cm、1.5 mS/cm、2.0 mS/cm、2.5 mS/cm、3.0 mS/cm、3.5 mS/cm、4.0 mS/cm、4.5 mS/cm、5.0 mS/cm、5.5 mS/cm、6.0 mS/cm、6.5 mS/cm、7.0 mS/cm、7.5 mS/cm、8.0 mS/cm、8.5 mS/cm、9.0 mS/cm、9.5 mS/cm、10 mS/cm、11 mS/cm、12 mS/cm、13 mS/cm、14 mS/cm、15 mS/cm、16 mS/cm、17.0 mS/cm、18.0 mS/cm、19.0 mS/cm、又は20.0 mS/cm の何れかより大きい。幾つかの実施態様において、移動相の導電率は、直線勾配により増加する。幾つかの実施態様において、移動相の導電率は、一又は複数の工程を含む段階勾配により増加する。

10

#### 【0095】

本明細書に記載される方法の何れかの幾つかの実施態様において、例えば、本明細書に記載される方法により同定される多生成物クロマトグラフィー手順又はクロマトグラフィー手順において、ポリペプチド及び一以上の混入物を含む組成物は、約 1 μg、2 μg、3 μg、4 μg、5 μg、6 μg、7 μg、8 μg、9 μg、10 μg、15 μg、20 μg、25 μg、又は 50 μg の何れかより大きい量でクロマトグラフィー材料にロードされる。幾つかの実施態様において、組成物は、約 0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、1.5 mg/mL、2.0 mg/mL、2.5 mg/mL、及び 5.0 mg/mL の何れかより大きい濃度でクロマトグラフィー材料にロードされる。幾つかの実施態様において、組成物は、クロマトグラフィー材料にロードされる前に希釈される；例えば、1:1、1:2、1:5、1:10 又は 1:10 超で希釈される。幾つかの実施態様において、組成物はクロマトグラフィーの移動相中に希釈される。幾つかの実施態様において、組成物はローディングバッファー中に希釈される。

20

#### 【0096】

本明細書に記載の方法の何れかの幾つかの実施態様において、流量は、約 0.5 mL/分、0.6 mL/分、0.7 mL/分、0.8 mL/分、0.9 mL/分、1.0 mL/分、1.1 mL/分、1.2 mL/分、1.3 mL/分、1.4 mL/分、1.5 mL/分、1.75 mL/分及び 2.0 mL/分の何れかより大きい。

#### 【0097】

本明細書に記載の方法の何れかの幾つかの実施態様において、クロマトグラフィー材料はカラムである。幾つかの実施態様において、カラムは HPLC カラムである。幾つかの実施態様において、カラムは以下の寸法の何れか一つを有する：4 × 50 mm、4 × 100 mm、4 × 150 mm、4 × 200 mm、4 × 250 mm、又は 2 × 250 mm。

30

#### 【0098】

##### D. 電荷変異体の検出

幾つかの態様において、本発明は、ポリペプチド（例えば、抗体）の組成物中にポリペプチド及び一又は複数の変異体を含む組成物中のポリペプチドの変異体を検出する方法を提供する。幾つかの実施態様において、ポリペプチドの変異体は、上記のように最適化されたイオン交換クロマトグラフィーの分離条件を用いて分析される。幾つかの実施態様において、ポリペプチドの変異体は、バッファーが上記のように最適化されたイオン交換クロマトグラフィーを用いて分析される。幾つかの実施態様において、ポリペプチドの変異体は、分離条件及びバッファーが上記のように最適化されるイオン交換クロマトグラフィーを用いて分析される。幾つかの実施態様において、イオン交換クロマトグラフィーの分離条件及びバッファーは、複数のポリペプチドに対して、例えば、一以上の標的ポリペプチド（例えば、一以上の抗体）に対して共通の dIP/dT を同定することにより最適化される。方法は、初期イオン強度を有するローディングバッファーを用いてポリペプチド及び一以上の変異体をイオン交換クロマトグラフィー材料に結合させ、ポリペプチド及び一以上の混入物が別個の独立した実体としてクロマトグラフィー材料から溶出するように溶出バッファーのイオン強度がイオン強度勾配によって変更される溶出バッファーを用いてイオン交換カラムからポリペプチド及び一以上の混入物を溶出させることを含む

40

50

。次いで、クロマトグラフィーの溶出物は、親ポリペプチドに関して、及び変異体の有無に関して分析される。ポリペプチドの変異体は、ポリペプチドの酸性変異体及び親ポリペプチドの塩基性変異体を含んでもよい。酸性変異体、即ち親ポリペプチドのpIより小さいpIを有する変異体の例は、一若しくは複数のグルタミン及び/又はアスパラギン残基が脱アミド化されているポリペプチドを含むが、これらに限定されない。塩基性変異体、即ち親ポリペプチドのpIより大きいpIを有する変異体の例は、アスパラギン残基がスクシンイミド部分に修飾を受けている変異体を含むが、これらに限定されない。幾つかの実施態様において、ポリペプチドは、約6.0から約9.5の範囲のpIを有する。幾つかの実施態様において、ポリペプチドは、約6.0から約9.5の範囲のpIを有する抗体である。

10

#### 【0099】

##### E. 組成物中のポリペプチドの純度を決定する

幾つかの態様において、本発明は、ポリペプチドを含む組成物中のポリペプチドの純度を決定する方法を提供する。幾つかの実施態様において、組成物中のポリペプチドの純度は、上記のように最適化されたイオン交換クロマトグラフィーの分離条件を用いて分析される。幾つかの実施態様において、組成物中のポリペプチドの純度は、バッファーが上記のように最適化されているイオン交換クロマトグラフィーを用いて分析される。幾つかの実施態様において、組成物中のポリペプチドの純度は、分離条件及びバッファーが上記のように最適化されるイオン交換クロマトグラフィーを用いて分析される。幾つかの実施態様において、イオン交換クロマトグラフィーの分離条件及び/又はバッファーは、複数のポリペプチドに対して、例えば、一以上の標的ポリペプチド（例えば、一以上の抗体）に対して共通のdIP/dTを同定することにより最適化される。方法は、初期イオン強度を有するローディングバッファーを用いてポリペプチド及び一以上の混入物をイオン交換クロマトグラフィー材料に結合させ、ポリペプチド及び一以上の混入物が別個の独立した実体としてクロマトグラフィー材料から溶出するよう溶出バッファーのイオン強度がイオン強度勾配によって変更される溶出バッファーを用いてイオン交換カラムからポリペプチド及び一以上の混入物を溶出させることを含む。ポリペプチドの純度は、クロマトグラフィー材料から溶出するポリペプチドの量の、クロマトグラフィー材料から溶出する混入物、例えば電荷変異体の総量に対する比率を決定することによって評価することができる。幾つかの実施態様において、ポリペプチドは、約6.0から約9.5の範囲のpIを有する。幾つかの実施態様において、ポリペプチドは、約6.0から約9.5の範囲のpIを有する抗体である。

20

#### 【0100】

##### F. 組成物中のポリペプチドの安定性を決定する

幾つかの態様において、本発明は、ポリペプチドを含む組成物中のポリペプチドの安定性を決定するための方法を提供する。幾つかの実施態様において、組成物中のポリペプチドの安定性は、分離条件が上記のように最適化されるイオン交換クロマトグラフィーを用いて決定される。幾つかの実施態様において、組成物中のポリペプチドの安定性は、バッファーが上記のように最適化されているイオン交換クロマトグラフィーを用いて決定される。幾つかの実施態様において、組成物中のポリペプチドの安定性は、分離条件及びバッファーが上記のように最適化されるイオン交換クロマトグラフィーを用いて決定される。幾つかの実施態様において、イオン交換クロマトグラフィーの分離条件及び/又はバッファーは、複数のポリペプチドに対して、例えば、一以上の標的ポリペプチド（例えば、一以上の抗体）に対して共通のdIP/dTを同定することにより最適化される。幾つかの実施態様において、ポリペプチドを含む組成物のサンプルは経時的に分析される。幾つかの実施態様において、組成物は、分析の前に様々な時点でインキュベートされる。幾つかの実施態様において、組成物は、分析前に約0、20、37又は40の何れか一つよりも高温でインキュベートされる。幾つかの実施態様において、組成物は、分析前に1日間、2日間、3日間、5日間、1週間、2週間、3週間、4週間、6週間、2か月間、3か月間、6か月間、1年間の—又は複数でインキュベートされる。次いで組成物は、

40

50

初期イオン強度を有するローディングバッファーを用いてポリペプチド及び一以上の混入物をイオン交換クロマトグラフィー材料に結合させ、ポリペプチド及び一以上の混入物が別個の独立した実体としてクロマトグラフィー材料から溶出するように溶出バッファーのイオン強度がイオン強度勾配によって変更される溶出バッファーを用いてイオン交換カラムからポリペプチド及び一以上の混入物を溶出させることにより分析される。ポリペプチド対混入物の比率における変化は、組成物中のポリペプチドの安定性を示す。例えば、ポリペプチド対混入物の比率が経時的に変化しない場合、ポリペプチドは安定していると考えられてもよいのに対し、組成物中のポリペプチドの量における混入物減少を有する混入物の高速蓄積は、組成物中のポリペプチドはより不安定であることを示す。幾つかの実施態様において、組成物中のポリペプチドの安定性は、分離条件が上記のように最適化されるイオン交換クロマトグラフィーを用いて分析される。幾つかの実施態様において、組成物中のポリペプチドの安定性は、バッファーが上記のように最適化されているイオン交換クロマトグラフィーを用いて分析される。幾つかの実施態様において、組成物中のポリペプチドの安定性は、分離条件及びバッファーが上記のように最適化されるイオン交換クロマトグラフィーを用いて分析される。幾つかの実施態様において、イオン交換クロマトグラフィーの分離条件及び/又はバッファーは、複数のポリペプチドに対して、例えば、一以上の標的ポリペプチド（例えば、一以上の抗体）に対して共通の  $d I P / d T$  を同定することにより最適化される。幾つかの実施態様において、ポリペプチドは、約 6.0 から約 9.5 の範囲の  $p I$  を有する。幾つかの実施態様において、ポリペプチドは、約 6.0 から約 9.5 の範囲の  $p I$  を有する抗体である。ポリペプチドの例としては、限定されないが、抗体及び抗体断片を含む。

#### 【0101】

##### G. ポリペプチドの精製

幾つかの実施態様において、本発明は、ポリペプチド及び一以上の混入物を含有する組成物から抗体などのポリペプチドを精製する方法を提供する。方法は、クロマトグラフィーの分離条件を最適化することを含む。幾つかの実施態様において、ポリペプチドは、バッファーが上記のように最適化されたクロマトグラフィーを用いて精製される。幾つかの実施態様において、ポリペプチドは、分離条件及びバッファーが上記のように最適化されるクロマトグラフィーを用いて精製される。幾つかの実施態様において、クロマトグラフィーの分離条件及び/又はバッファーは、複数のポリペプチドに対して、例えば、一以上の標的ポリペプチド（例えば、一以上の抗体）に対して共通の  $d I P / d T$  を同定することにより最適化される。幾つかの実施態様において、クロマトグラフィーは、イオン交換クロマトグラフィー；例えば陽イオン交換クロマトグラフィー又は陰イオン交換クロマトグラフィーである。幾つかの実施態様において、クロマトグラフィーは混合モードクロマトグラフィーである。

#### 【0102】

幾つかの実施態様において、クロマトグラフィー温度におけるポリペプチドの変曲点での  $p H$  のローディングバッファーを用いて、イオン交換クロマトグラフィー材料又は混合モードクロマトグラフィー材料にポリペプチド及び混入物を結合させる。ローディングバッファーは初期イオン強度を有する。ポリペプチドは、次いで、ポリペプチド及び一以上の混入物が別個の独立した実体としてクロマトグラフィー材料から溶出するように、溶出バッファーのイオン強度がイオン強度勾配によって変更される溶出バッファーを使用してイオン交換クロマトグラフィー媒体又は混合モードクロマトグラフィー媒体から溶出される。画分がクロマトグラフィーの溶出段階の間に収集され、混入物が含まれないか又は最小であるポリペプチドを含む画分が、更なる処理のために、又は医薬製剤のためにプールされる。ポリペプチドの例としては、限定されないが、抗体及び抗体断片を含む。

#### 【0103】

##### I II I. ポリペプチド

ポリペプチドが、本明細書に記載されるように分離条件が最適化されたイオン交換クロマトグラフィーの方法の何れかで使用のために提供される。本発明の幾つかの実施態様に

10

20

30

40

50

おいて、ポリペプチドの組成物は、イオン交換クロマトグラフィーにより分析される。かかる方法は、組成物中のポリペプチドの電荷変異体を同定するのに有用である。幾つかの実施態様において、ポリペプチドは抗体又はその断片である。幾つかの実施態様において、ポリペプチドは、約6.0から約9.5の範囲のpIを有する。幾つかの実施態様において、ポリペプチドは、約6.0から約9.5の範囲のpIを有する抗体である。幾つかの実施態様において、ポリペプチドの電荷対pHの曲線における変曲点(IP)が、本発明の方法により提供される。幾つかの実施態様において、温度の変化によるIPの変化(dIP/dT)が本発明の方法により提供される。

#### 【0104】

幾つかの実施態様において、ポリペプチドは、治療用ポリペプチドである。幾つかの実施態様において、ポリペプチドは抗体である。幾つかの実施態様において、ポリペプチドはイムノアドヘシンである。

#### 【0105】

幾つかの実施態様において、ポリペプチドは、約5000ダルトン、10000ダルトン、15000ダルトン、25000ダルトン、50000ダルトン、75000ダルトン、100000ダルトン、125000ダルトン、又は150000ダルトンの何れかより大きい分子量を有する。ポリペプチドは、約50000ダルトンから200000ダルトン又は100000ダルトンから200000ダルトンの何れかの分子量を有してもよい。あるいは、本明細書における使用のためのポリペプチドは、約120000ダルトン又は約25000ダルトンの分子量を有してもよい。

#### 【0106】

pIは、等電点であり、特定の分子又は表面が正味電荷を持たないpHのことである。幾つかの実施態様において、本発明の方法は、組成物中のポリペプチド、例えば抗体のpIが約6.0から約9.5の範囲であるポリペプチドを含む複数の組成物に対して使用することができる。幾つかの実施態様において、ポリペプチドは約9.5より大きい；例えば約9.5から約12のpIを有する。本明細書に記載される方法の何れかの幾つかの実施態様において、ポリペプチド、例えば抗体のpIは、約7未満；例えば約4から約7であり得る。

#### 【0107】

本明細書に記載の方法の何れかの実施態様において、ポリペプチド及び一又は複数の混入物を含む組成物中の一又は複数の混入物は、ポリペプチド電荷変異体である。幾つかの実施態様において、ポリペプチド電荷変異体は、ポリペプチドの電荷が変更されるよう、自然の状態から変更されているポリペプチドである。幾つかの実施態様において、電荷変異体は、親ポリペプチドよりも酸性である；即ち、親ペプチドよりも低いpIを有する。その他の実施態様において、電荷変異体は、親ポリペプチドよりも塩基性である；即ち、親ペプチドよりも高いpIを有する。幾つかの実施態様において、ポリペプチド電荷変異体は操作される。幾つかの実施態様において、ポリペプチド電荷変異体は、例えば、酸化、脱アミド化、リジン残基のC末端プロセシング、N末端ピログルタミン酸形成及び糖化等の天然のプロセスの結果であってもよい。幾つかの実施態様において、ポリペプチド電荷変異体は、タンパク質に結合するグリカンが、親糖タンパク質と比較して、例えば、シアル酸又はその誘導体の付加により、糖タンパク質の電荷が変更されるよう変更されている、糖タンパク質である。幾つかの実施態様において、ポリペプチド電荷変異体は、抗体電荷変異体である。

#### 【0108】

本明細書に記載の方法を使用して分析されることになるポリペプチドは、一般に、組換え技術を使用して産生される。組換えタンパク質を産生するための方法は、例えば、参照により本明細書に具体的に援用されている米国特許第5534615号及び第4816567号に記載されている。幾つかの実施態様において、目的のタンパク質は、CHO細胞において産生される（例えば、国際公開第94/11026号を参照のこと）。幾つかの実施態様において、目的のポリペプチドは大腸菌細胞中で産生される。発現及び分泌を最

10

20

30

40

50

適化するための翻訳開始領域 (TIR) 及びシグナル配列を記載している、例えば米国特許第5,648,237号；米国特許第5,789,199号及び米国特許第5,840,523号を参照のこと。また、大腸菌中における抗体断片の発現について記載している、Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254を参照されたい。組換え技術を使用した場合、ポリペプチドは細胞周辺腔内で細胞内に生成されるか又は培地中に直接分泌されうる。

#### 【0109】

ポリペプチドは、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。ポリペプチドの発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。ポリペプチドが細胞内に生成される場合、最初の工程として、宿主細胞か又は溶解断片の何れかである微粒子状破片は、例えば遠心分離又は限外濾過により除去されうる。Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)は、大腸菌 (E. coli) の細胞周辺腔に分泌されるポリペプチドを単離するための手順を記載する。簡潔には、細胞ペーストは、酢酸ナトリウム (pH 3.5)、EDTA及びフッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) の存在下で、約30分間にわたって融解される。細胞破片は遠心分離により除去することができる。ポリペプチドが培地中に分泌される場合、一般的に、そのような発現系からの上清はまず、市販のポリペプチド濃縮フィルター、例えばAmicon又はMillipore Pellecicon限外濾過ユニットを使用して濃縮される。PMSF等のプロテアーゼ阻害剤は、タンパク質分解を阻害するように前述の工程の何れかに含まれてよく、抗生物質は、偶発性混入物の成長を防止するために含まれてよい。

#### 【0110】

幾つかの実施態様において、ポリペプチド及び一又は複数の混入物を含む組成物中のポリペプチドは、本発明の方法により、分析前に精製されているか又は部分的に精製されている。例えば、該方法のポリペプチドは、アフィニティクロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、混合モードクロマトグラフィー及び疎水性相互作用クロマトグラフィーからの溶出物中にある。幾つかの実施態様において、ポリペプチドは、プロテインAクロマトグラフィーからの溶出物である。

#### 【0111】

本発明の方法により分析されてもよいポリペプチドの例は、限定するものではないが、免疫グロブリン、イムノアドヘシン、抗体、酵素、ホルモン、融合タンパク質、Fc含有タンパク質、免疫抱合体、サイトカイン及びインターロイキンを含む。(A)抗体

#### 【0112】

本明細書に記載の方法の何れかの幾つかの実施態様において、ポリペプチド及び本明細書に記載の方法によるポリペプチドを含む製剤を分析する方法の何れかにおける使用のためのポリペプチドは、抗体である。

#### 【0113】

抗体の分子標的は、CDタンパク質及びそのリガンド、例えば限定するものではないが以下を含む：(i) CD3、CD4、CD8、CD19、CD11a、CD20、CD22、CD34、CD40、CD79 (CD79a)、及びCD79 (CD79b)；(ii) ErbB受容体ファミリーのメンバー、例えば、EGF受容体、HER2受容体、HER3受容体又はHER4受容体；(iii) 細胞接着分子、例えば、LFA-1、Mac1、p150, 95、VLA-4、ICAM-1、VCAM及びv/3インテグリン(そのアルファ又はベータサブユニットの何れかを含む)等(例：抗CD11a、抗CD18又は抗CD11b抗体)；(iv) 成長因子、例えばVEGF；IgE；血液型抗原；f1k2/f1t3受容体；肥満(OB)受容体；mp1受容体；CTL4；タンパク質C、BR3、c-met、組織因子、7等；並びに(v)細胞表面及び膜貫通腫瘍関連抗原(TAA)、例えば米国特許第7521541号に記載されるもの。

#### 【0114】

その他の例示的な抗体は、限定するものではないが、抗エストロゲン受容体抗体、抗ブ

10

20

30

40

50

ロゲステロン受容体抗体、抗 p 5 3 抗体、抗 H E R - 2 / neu 抗体、抗 E G F R 抗体、抗カテプシン D 抗体、抗 B c 1 - 2 抗体、抗 E - カドヘリン抗体、抗 C A 1 2 5 抗体、抗 C A 1 5 - 3 抗体、抗 C A 1 9 - 9 抗体、抗 c - erb B - 2 抗体、抗 P - 糖タンパク質抗体、抗 C E A 抗体、抗網膜芽細胞腫タンパク抗体、抗 r a s がんタンパク抗体、抗 L e w i s X 抗体、抗 K i - 6 7 抗体、抗 P C N A 抗体、抗 C D 3 抗体、抗 C D 4 抗体、抗 C D 5 抗体、抗 C D 7 抗体、抗 C D 8 抗体、抗 C D 9 / p 2 4 抗体、抗 C D 1 0 抗体、抗 C D 1 1 a 抗体、抗 C D 1 1 c 抗体、抗 C D 1 3 抗体、抗 C D 1 4 抗体、抗 C D 1 5 抗体、抗 C D 1 9 抗体、抗 C D 2 0 抗体、抗 C D 2 2 抗体、抗 C D 2 3 抗体、抗 C D 3 0 抗体、抗 C D 3 1 抗体、抗 C D 3 3 抗体、抗 C D 3 4 抗体、抗 C D 3 5 抗体、抗 C D 3 8 抗体、抗 C D 4 1 抗体、抗 L C A / C D 4 5 抗体、抗 C D 4 5 R O 抗体、抗 C D 4 5 R A 抗体、抗 C D 3 9 抗体、抗 C D 1 0 0 抗体、抗 C D 9 5 / F a s 抗体、抗 C D 9 9 抗体、抗 C D 1 0 6 抗体、抗ユビキチン抗体、抗 C D 7 1 抗体、抗 c - m y c 抗体、抗サイトケラチン抗体、抗ビメンチン抗体、抗 H P V タンパク抗体、抗カッパ軽鎖抗体、抗ラムダ軽鎖抗体、抗メラノソーム抗体、抗前立腺特異抗原抗体、抗 S - 1 0 0 抗体、抗タウ抗原抗体、抗フィブリン抗体、抗ケラチン抗体及び抗 T n - 抗原抗体から選択されるものを含む。  
10

#### 【 0 1 1 5 】

##### ( i ) モノクローナル抗体

幾つかの実施態様において、抗体はモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、実質的に均一な抗体の集団から得られ、即ち、モノクローナル抗体の產生中に生じ得る変異体（通常少量で存在する変異体など）を除き、集団を構成する個々の抗体は同一であり、及び／又は同じエピトープに結合する。したがって、修飾語「モノクローナル」は、個別抗体又はポリクローナル抗体の混合物ではないという抗体の性質を示す。  
20

#### 【 0 1 1 6 】

例えば、モノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature 256:495 (1975) により最初に記載されたハイブリドーマ法により作製されてもよく、又は、組換え D N A 法により作製されてもよい（米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号）。

#### 【 0 1 1 7 】

ハイブリドーマ法において、マウス又はハムスター等のその他適切な宿主動物は、免疫付与に使用されるポリペプチドと特異的に結合することになる抗体を產生するか又は產生する能力があるリンパ球を引き起こすように、本明細書に記載されるように免疫を与えられる。あるいは、リンパ球はインビトロで免疫を与えられてもよい。次いで、リンパ球は、ポリエチレングリコール等の好適な融合剤を使用して骨髄腫細胞と融合され、ハイブリドーマ細胞を形成する (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。  
30

#### 【 0 1 1 8 】

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髄腫細胞の増殖又は生存を阻害する一又は複数の物質を好ましくは含む適當な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親の骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ ( H G P R T 又は H P R T ) を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、 H G P R T - 欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノブテリン、及びチミジンを含有するであろう ( H A T 培地 )。  
40

#### 【 0 1 1 9 】

幾つかの実施態様において、骨髄腫細胞は、効率的に融合するものであり、選択された抗体產生細胞による抗体の安定した高レベルの產生をサポートし、 H A T 培地等の培地に対して感受性がある。幾つかの実施態様において、これらの中で、骨髄腫細胞株は、マウス骨髄種株、例えば、 S a l k I n s t i t u t e C e l l D i s t r i b u t i o n C e n t e r , S a n D i e g o , C a l i f o r n i a U S A から入手可能な M O P C - 2 1 及び M P C - 1 1 マウス腫瘍から誘導されるもの及び A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n , R o c k v i l l e , M a r y l a n d U S A から入手可能な S P - 2 又は X 6 3 - A g 8 - 6 5 3 細胞である。ヒトモノクロ  
50

ーナル抗体の産生のためのヒト骨髓腫及びマウス - ヒトヘテロ骨髓腫細胞株もまた記載されている (Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

【0120】

ハイブリドーマ細胞が成長する培養培地は、抗原に対するモノクローナル抗体の産生のためにアッセイされる。幾つかの実施態様において、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降により又はインビトロ結合アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ (RIA) 又は酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) により決定される。

10

【0121】

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Scatchard analysis of Munson et al., Anal. Biochem. 107:220 (1980) により決定され得る。

【0122】

ハイブリドーマ細胞が所望の特異性、親和性及び / 又は活性の抗体を産生するとして同定された後、クローンは、限定希釈手順によりサブクローンされ、標準的な方法により培養されてもよい (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。この目的のための好適な培養培地は、例えば、D-MEM 又は RPMI - 1640 培地である。また、このハイブリドーマ細胞は、動物の腹水症腫瘍として、インビボで増殖させることができる。

20

【0123】

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、従来の免疫グロブリン精製手順、例えば、ポリペプチド A - セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析又はアフィニティークロマトグラフィー等により、培養培地、腹水又は血清から適切に分離される。

【0124】

モノクローナル抗体をコードした DNA は、容易に単離され、従来の手順を用いて (例えば、マウス抗体の重鎖と軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって) 配列決定される。幾つかの実施態様において、ハイブリドーマ細胞はそのような DNA のソースとして機能する。DNA は、単離されると、発現ベクター中に配置され、次いで、これは、他の形では免疫グロブリンポリペプチドを産生しない宿主細胞中、例えば、大腸菌細胞、サル COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、又は骨髓腫細胞中にトランスフェクトされ、組換え宿主細胞中のモノクローナル抗体の合成を得てもよい。抗体をコードする DNA の最近における組換え発現に関する総説は、Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262 (1993) 及び Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992) を含む。

30

【0125】

更なる実施態様において、抗体又は抗体断片は、McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990) に記載される技術を使用して生成される抗体ファージライブラリーから単離され得る。Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) 及び Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) は、ファージライブラリーを使用した、それぞれ、マウス及びヒト抗体の単離を記載する。後の出版物は、鎖シャッフリングによる高親和性 (nM レンジ) ヒト抗体の産生 (Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992))、並びに、非常に大きなファージライブラリーを構成するための戦略としてのコンビナトリアル感染及びインビボ組換え (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res. 21:2265-2266 (1993)) を記載する。したがって、これらの技術は、モノクローナル抗体を単離するための従来のモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術の実行可能な代替手段である。

40

【0126】

DNA は、例えば相同マウス配列の代わりにヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより (米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号; Morrison et al., Proc. Natl

50

Acad. Sci. USA 81:6851 (1984) )、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部若しくは一部を共有結合することにより改変され得る。

#### 【0127】

典型的には、このような非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常ドメインに置換され、あるいは抗体の一の抗原結合部位の可変ドメインに置換されて、抗原に対して特異性を有する一の抗原結合部位と異なる抗原に対して特異性を有する別の抗原部位とを含むキメラ二価抗体が創出される。

#### 【0128】

本明細書に記載の任意の方法の幾つかの実施態様において、抗体は Ig A、Ig D、Ig E、Ig G 又は Ig M である。幾つかの実施態様において、抗体は Ig G モノクローナル抗体である。

10

#### 【0129】

##### (i) ヒト化抗体

幾つかの実施態様において、抗体はヒト化抗体である。非ヒト抗体をヒト化する方法は、当該技術分野で記載されている。幾つかの実施態様において、ヒト化抗体は、非ヒトであるソースから導入された一又は複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「インポート」残基と呼ばれ、典型的には「インポート」可変ドメインから取得される。ヒト化は、基本的には、Winter and co-workers (Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988) ) の方法に従って、超可変領域の配列をヒト抗体の対応する配列と置換することにより、実施され得る。したがって、そのような「ヒト化」抗体は、インタクトなヒト可変ドメインより実質的に少ないドメインが、非ヒト種由来の対応する配列により置換されている、キメラ抗体（米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号）である。実際には、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかの超可変領域残基及び可能であればいくつかの FR 残基が齧歯動物抗体における相似部位由来の残基により置換されているヒト抗体である。

20

#### 【0130】

ヒト化抗体を作製する際に使用することになるヒト可変ドメイン（軽鎖と重鎖の両方）の選定は、抗原性を低下させることが非常に重要である。いわゆる「最も適した」方法によれば、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメインの配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。次いで、その齧歯動物の配列と最も近いヒト配列を、ヒト化抗体のためのヒトフレームワーク領域 (FR) として採択する (Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901 (1987) )。別 の方法は、軽鎖又は重鎖可変領域の特定のサブグループである、全てのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークを、いくつかの異なるヒト化抗体について使用してもよい (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993) )。

30

#### 【0131】

抗体が、抗原に対する高親和性及び他の望ましい生物学的特性を保持した状態でヒト化されることは、更に重要である。この目標を達成するために、本方法の幾つかの実施態様において、ヒト化抗体は、親配列及びヒト化配列の三次元モデルを使用した、親配列及び多様な概念的ヒト化産物の分析のプロセスにより調製される。三次元の免疫グロブリンモデルは、一般に入手可能であり、当業者にはなじみがある。選択された候補免疫グロブリン配列の推定される三次元立体配座構造を図示及び表示するコンピュータープログラムは、入手可能である。これらの表示を精査することにより、候補免疫グロブリン配列が機能する際に残基が果たすと考えられる役割の分析、即ち、候補免疫グロブリンがその抗原と結合する能力に影響する残基の分析が可能になる。この方式では、FR 残基は、レシピエント配列及びインポート配列から選択され、組み合わされることで、所望の抗体特徴（例えば、標的抗原（複数可）に対する親和性の向上）が達成されるようにすることができる。一般に、超可変領域残基は、抗原結合への影響を及ぼすことに直接かつ最も実質的に関

40

50

わっている。

#### 【0132】

##### (i i i) ヒト抗体

幾つかの実施態様において、抗体はヒト抗体である。ヒト化の代替策として、ヒト抗体が生成され得る。例えば、免疫化の際に、内因性の免疫グロブリンが產生されなくてもヒト抗体の完全なレパートリーを產生する能力があるトランスジェニック動物（例えばマウス）を作製することが、現在可能である。例えば、キメラマウス及び生殖細胞系突然変異マウスにおいて、抗体の重鎖接合領域（JH）遺伝子のホモ接合性が欠失していると、内因性抗体產生は完全に阻害されることが記載されている。そのような生殖細胞系突然変異マウスにおいてヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイを移入することにより、抗原による攻撃を行った際にヒト抗体が產生されるであろう。例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362:255-258 (1993); Brugermann et al., Year in Immuno. 7:33 (1993); 並びに米国特許第5591669号；第5589369号；及び第5545807号を参照のこと。

#### 【0133】

あるいは、ファージディスプレイ技術（McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)）が使用され、免疫化されていないドナー由来の免疫グロブリン可変（V）ドメインの遺伝子レパートリーからインビトロでヒト抗体及び抗体断片が產生され得る。この技術によれば、抗体のVドメインの遺伝子は、インフレームでクローニングされて、纖維状バクテリオファージ、例えばM13又はfdの主要又は微働何れかのコートポリペプチド遺伝子となり、ファージ粒子の表面上で機能的抗体断片としてディスプレイされる。纖維状粒子はファージゲノムの一本鎖DNAのコピーを含んでいるため、抗体の機能特性に基づいて選択すれば、それらの特性を呈する抗体をコードする遺伝子を選択したことにもなる。したがって、ファージは、B細胞の特性の一部を模倣する。ファージディスプレイは、さまざまなフォーマットで実施され得、それらの総説については、例えば、Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)を参照のこと。複数のソースのV遺伝子セグメントが、ファージディスプレイに使用され得る。Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991)は、免疫化されたマウスの脾臓に由来するV遺伝子の小規模なランダムコンビナトリアルライブラリーから、抗オキサゾロン抗体の多種多様なアレイを単離した。免疫化されていないヒトドナー由来のV遺伝子のレパートリーが構築され、抗原の多種多様なアレイに対する抗体（自己抗原を含む）は、Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)、又はGriffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993)により記載された技術に基本的に従って、単離され得る。米国特許第5565332号及び第5573905号も参照のこと。

#### 【0134】

ヒト抗体は、また、インビトロ活性化されたB細胞により生成されてもよい（米国特許第5567610号及び第5229275号を参照のこと）。

#### 【0135】

##### (i v) 抗体断片

幾つかの実施態様において、抗体は抗体断片である。様々な技術が抗体断片の產生のために開発されてきた。従来、これらの断片は、インタクトな抗体のタンパク分解性消化を介して誘導された（例えば、Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)及びBrennan et al., Science 229:81 (1985)を参照のこと）。しかしながら、これらの断片は、今では組換え宿主細胞により直接產生され得る。例えば、抗体断片は、前述の抗体ファージライブラリーから単離され得る。あるいは、Fab' - SH断片は、大腸菌から直接回収され、化学的に結合してFab(ab')2断片を形成し得る（Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)）。Fab(ab')2断片は、別の方法によって、組換え宿主細胞培養物から直接単離され得る。抗体断片の產生のためのその他の技術は、当業者にとって明らかであろう。その他の実施態様において、抗体の選定は、一本鎖Fv断片（scFv）である。国際公開第93/16185号；米国特

10

20

30

40

50

許第5571894号；及び米国特許第5587458号を参照のこと。抗体断片はまた、例えば、米国特許第5641870号に記載されるように「直線抗体」であってもよい。そのような直線抗体断片は、単一特異的であってよく、又は二重特異的であってもよい。

【0136】

幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗体の断片が提供される。幾つかの実施態様において、抗体断片は抗原結合断片である。幾つかの実施態様において、抗原結合断片は、F<sub>a</sub>b断片、F<sub>a</sub>b'断片、F(a b')<sub>2</sub>断片、s c F<sub>v</sub>、F<sub>v</sub>及びダイアボデイからなる群より選択される。

【0137】

(v) 二重特異的抗体

幾つかの実施態様において、抗体は二重特異的抗体である。二重特異性抗体は、少なくとも二つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、二つの異なるエピトープに結合してもよい。あるいは、二重特異性抗体の結合アームは、白血球上のトリガー分子、例えばT細胞受容体分子（例えば、CD2若しくはCD3）、又は、IgGのFc受容体（FcR）、例えばFc<sub>α</sub>R<sub>I</sub>（CD64）、Fc<sub>α</sub>R<sub>II</sub>（CD32）及びFc<sub>α</sub>R<sub>III</sub>（CD16）と結合するアームと組み合わせて、細胞防御機構を細胞に集中させるようにしてもよい。二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体断片（例えばF(a b')<sub>2</sub>二重特性抗体）として調製され得る。

【0138】

二重特異性抗体を作製するための方法は、当該技術分野において公知である。完全長の二重特異性抗体の従来の产生は、二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の共発現に基づいており、この場合の二本の鎖は、異なる特異性を有する（Millstein et al., Nature 305:537-539 (1983)）。免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖はランダムに取り合わされるため、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、10個の異なる抗体分子の潜在的な混合物を产生し、1個のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、通常はアフィニティーコロマトグラフィー工程により行われるが、相当に面倒であり、産物の収率は低い。類似の手順は、国際公開第93/08829号、及びTraunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)に開示されている。

【0139】

異なるアプローチによれば、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン（抗体-抗原結合部位）は、免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合される。幾つかの実施態様において、融合は、ヒンジ領域、CH2領域及びCH3領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖の定常ドメインとの間で行われる。幾つかの実施態様において、軽鎖結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域（CH1）が、融合体のうち少なくとも一に存在する。免疫グロブリン重鎖融合体と、所望により免疫グロブリン軽鎖とをコードしているDNAを別々の発現ベクター中に挿入し、好適な宿主生物の中に共にトランスフェクトする。これは、不均等な比率の三本のポリペプチド鎖が構造中で使用された場合に最適な収率が得られる実施態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合を調節する際に大きな柔軟性を提供する。ただし、少なくとも二本のポリペプチド鎖が等しい比率で発現することで収率が高くなるとき、又はその比率が特に重要性をもたないときは、一つの発現ベクター中の二本又は全三本のポリペプチド鎖のコード配列を挿入することが可能である。

【0140】

このアプローチの幾つかの実施態様において、二重特異性抗体は、第1の結合特異性を一方のアームに、複合免疫グロブリン重鎖-軽鎖対（第2の結合特異性を提供する）を他方のアームに有する、複合免疫グロブリン重鎖から構成される。この非対称構造は、望ましくない免疫グロブリン鎖の組合せからの所望の二重特異性化合物の分離を容易にすることが見出されたが、これは、二重特異性分子の半分のみに免疫グロブリン軽鎖が存在することが容易な分離方式を提供するからである。このアプローチは、国際公開第94/04690号に開示されている。二重特異性抗体の生成の更なる詳細については、例えば、Su

10

20

30

40

50

resh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986)を参照のこと。

【0141】

米国特許第5731168号に記載されている別のアプローチによれば、抗体分子対の間の接点は工学操作され、組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体の比率(%)が最大化され得る。幾つかの実施態様において、接点は、抗体定常ドメインのCH3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法において、第1の抗体分子の接点由来の一又は複数の小さいアミノ酸側鎖は、より大きい側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)で置き換えられる。大きい側鎖(複数可)と同一又は類似のサイズの代償的な「空洞」は、大きいアミノ酸側鎖をより小さい側鎖(例えばアラニン又はトレオニン)で置き換えることにより、第2の抗体分子の接点上に創出される。これは、ヘテロ二量体の収率をホモ二量体等の他の望ましくない最終産物より高くするメカニズムを提供する。

10

【0142】

二重特異性抗体は、架橋抗体又は「ヘテロコンジュゲート」抗体を含む。例えば、ヘテロコンジュゲートにおける抗体のうち一方はアビシンと、他方はビオチンと、カップリングされ得る。そのような抗体は、例えば、望ましくない細胞に対して免疫系細胞を標的化すること(米国特許第4676980号)、及びHIV感染症の治療に用いること(国際公開第91/00360号、国際公開第92/200373号及び欧州特許第03089号)が提案されている。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の簡便な架橋方法を使用して作製され得る。好適な架橋剤は当該技術分野において公知であり、米国特許第4676980号において、いくつかの架橋手法と共に開示されている。

20

【0143】

抗体断片から二重特異性抗体を生成させるための技術も、文献に記載されている。例えば、二重特異性抗体は、化学的連結を使用して調製され得る。Brennan et al., Science 229: 81 (1985)は、インタクト抗体をタンパク質分解的に開裂してFab(ab')2断片を生成させる手順が記載されている。これらの断片は、ジチオール錯化剤である亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元され、隣接するジチオールを安定化させ、分子間のジスルフィド形成を防止する。次いで、生成されたFab(ab')2断片をチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に変換させる。次いで、Fab(ab')2-TNB誘導体のうち一方を、メルカプトエチルアミンを用いた還元によりFab(ab')2-チオールに再変換させ、等モル量の他方のFab(ab')2-TNB誘導体と混合させて二重特異性抗体を形成させる。產生された二重特異性抗体は、酵素の選択的な固定化のための作用剤として使用され得る。

30

【0144】

組換え細胞培養物から直接、二重特異性抗体断片を作製し単離するための様々な技術も記載されている。例えば、ロイシンジッパーを使用して二重特異性抗体が產生されている(Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992))。Fab(s)及びJunタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合により、二つの異なる抗体のFab部分と連結された。抗体ホモ二量体は、ヒンジ領域で還元されて单量体を形成し、次いで、再酸化されて抗体ヘテロ二量体を形成した。この方法は、抗体ホモ二量体の产生にも利用することができる。Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)により記載された「ダイアボディ」技術は、二重特異性抗体断片を作製するための代替的メカニズムを提供した。この断片は、きわめて短いために同一鎖上の二つのドメイン間の対形成を可能にするリンカーにより軽鎖可変ドメイン(VL)と繋がっている重鎖可変ドメイン(VH)を含む。したがって、一つの断片のVH及びVLドメインは、もう一つの断片の相補的なVL及びVHドメインとの対形成を強いられ、それにより、二つの抗原結合部位を形成する。单鎖Fv(sFv)二量体の使用により二重特異性抗体断片を作製するための別の戦略も報告されている。Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994)を参照のこと。

40

【0145】

3価以上の抗体が企図される。例えば、三重特異性抗体が調製され得る(Tutt et al., J. Immunol. 147: 60 (1991))。

50

## 【0146】

## (v) 多価抗体

幾つかの実施態様において、抗体は多価抗体である。多価抗体は、抗体が結合する対象である抗原を発現する細胞により、二価抗体より速く内部移行（及び／又は異化）してもよい。本明細書において提供される抗体は、三つ以上の抗原結合部位を有する多価抗体（IgMクラスの抗体以外である）であってもよく（例えば四価抗体）、そのような抗体は、抗体のポリペプチド鎖をコードしている核酸の組換え発現により、容易に産生され得る。多価抗体は、二量体化ドメイン及び三つ以上の抗原結合部位を含み得る。好ましい二量体化ドメインは、Fc領域又はヒンジ領域を含む（又は、それらからなる）。この場合、抗体は、一つのFc領域と、Fc領域のアミノ末端に三つ以上の抗原結合部位を含むであろう。本明細書における好ましい多価抗体は、三つから約八つ、ただし好ましくは四つの抗原結合部位を含む（又は、それらからなる）。多価抗体は、少なくとも一本のポリペプチド鎖（好ましくは二本のポリペプチド鎖）を含み、そのポリペプチド鎖（複数可）は、二つ以上の可変ドメインを含む。例えば、ポリペプチド鎖（複数可）は、VD1 - (X1)n - VD2 - (X2)n - Fc（ここで、VD1は、第1の可変ドメインであり、VD2は、第2の可変ドメインであり、Fcは、Fc領域の一方のポリペプチド鎖であり、X1及びX2は、アミノ酸又はポリペプチドを表し、nは、0又は1である）を含んでもよい。例えば、ポリペプチド鎖（複数可）は、VH - CH1 - 柔軟なリンカー - VH - CH1 - Fc領域鎖、又はVH - CH1 - VH - CH1 - Fc領域鎖を含んでもよい。本明細書における多価抗体は、好ましくは、少なくとも二つ（好ましくは四つ）の軽鎖可変ドメインポリペプチドを更に含む。本明細書における多価抗体は、例えば、約二つから約八つの軽鎖可変ドメインポリペプチドを含んでもよい。ここで企図される軽鎖可変ドメインポリペプチドは、軽鎖可変ドメインを含み、場合により、CLドメインを更に含む。

## 【0147】

幾つかの実施態様において、抗体は多重特異性抗体である。特異性抗体の例としては、限定されるものではないが、重鎖可変ドメイン（VH）及び軽鎖可変ドメイン（VL）を含みVHVL単位がポリエピトープ特異性を有する抗体、2つ以上のVL及びVHドメインを有し、各VHVL単位が異なるエピトープと結合する抗体、2つ以上の单一可変ドメインを有し、各单一可変ドメインが異なるエピトープと結合する抗体、完全長抗体、抗体断片、例えばFab、Fv、dsFv、scFv、ダイアボディ、二重特異性を有するダイアボディ、トリアボディ、三重機能性抗体、共有結合的又は非共有結合的に連結している抗体断片が挙げられる。幾つかの実施態様において、当該抗体は、ポリエピトープ特異性、例えば、同じ又は異なる標的（複数可）に対して二つ以上の異なるエピトープと特異的に結合する能力を有する。幾つかの実施態様において、抗体は、单一特異性の抗体、例えば、一つのエピトープのみと結合する抗体である。一実施態様によれば、多特異性抗体は、親和性が5μMから0.001pM、3μMから0.001pM、1μMから0.001pM、0.5μMから0.001pM、又は0.1μMから0.001pMである各エピトープと結合するIgG抗体である。

## 【0148】

## (v) その他の抗体改変体

本明細書において提供される抗体を改変することは、エフェクター機能、例えば、抗体の抗原依存性細胞媒介性細胞傷害性（ADCC）及び／又は補体依存性細胞傷害（CDC）を強化するためのエフェクター機能に関して、望ましい場合がある。これは、抗体のFc領域において一又は複数のアミノ酸置換基を導入することにより達成してもよい。代替的又は追加的に、システイン残基（複数可）をFc領域に導入して、それにより、この領域における鎖間ジスルフィド結合形成が可能になるようにしてもよい。このようにして生成されたホモ二量体型抗体は、内部移行の可能性が向上してもよく、及び／又は、補体媒介性細胞殺傷及び抗体依存性細胞性細胞毒性（ADCC）が増加していくてもよい。Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992)及びShopes, B. J., Immunol. 148:2918-2922 (1992)を参照のこと。抗腫瘍活性が強化されているホモ二量体型抗体は、Wolff et al.

10

20

30

40

50

, Cancer Research 53:2560-2565 (1993)に記載されているように、ヘテロ二官能性の架橋剤を使用して調製されてもよい。あるいは、二つのF c領域を有しており、それにより補体媒介性溶解及びADCの能力が強化されていてもよい抗体は工学操作され得る。St evenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)を参照のこと。

【0149】

抗体の血清中半減期を長期化するために、アミノ酸の変性は、米国特許公開第2006/0067930号に記載されているように抗体中で行うことができ、同文献は、出典明示によりその全体が本明細書に援用される。

【0150】

(B) ポリペプチドの変異体及び改変体

10

本明細書に記載されているポリペプチド(抗体を含む)のアミノ酸配列改変体(複数可)は、本明細書に記載されているポリペプチド(例えば、抗体)を精製する方法において使用してもよい。

【0151】

(i) 変異体ポリペプチド

「ポリペプチド変異体」は、本明細書において定義するポリペプチド、好ましくは活性のあるポリペプチドであり、完全長天然配列のポリペプチド、シグナルペプチドが欠如しているポリペプチド配列、ポリペプチドの細胞外ドメイン(シグナルペプチドの有無を問わない)と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有するものを意味する。のようなポリペプチド変異体は、例えば、完全長天然アミノ酸配列のN又はC末端で一又は複数のアミノ酸残基が付加され又は欠失しているポリペプチドを含む。通常、TATポリペプチド変異体は、完全長天然配列ポリペプチドの配列、シグナルペプチドが欠如しているポリペプチド配列、ポリペプチドの細胞外ドメイン(シグナルペプチドの有無を問わない)と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%の何れかのアミノ酸配列同一性を有するであろう。場合により、変異体ポリペプチドは、天然ポリペプチド配列と比較して一以下の保存的なアミノ酸置換、あるいは、天然ポリペプチド配列と比較して、約2、3、4、5、6、7、8、9、又は10の何れか以下の保存的なアミノ酸置換を有するであろう。

20

【0152】

変異体ポリペプチドは、N末端又はC末端で切断されてもよく、又は、例えば、完全長天然ポリペプチドと比較して内部残基が欠如していてもよい。特定の変異体ポリペプチドは、所望の生物活性に必須ではないアミノ酸残基が欠如していてもよい。切断、欠失、及び挿入がみられるこれらの変異体ポリペプチドは、いくつかの従来の技術のうちのあらゆるものにより調製してもよい。所望の変異体ポリペプチドは、化学合成されてもよい。別の好適な技術は、所望の変異体ポリペプチドをコードしている核酸断片を、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により単離及び增幅することを含んでいる。核酸断片の所望の末端を規定するオリゴヌクレオチドは、PCRにおいて5'及び3'プライマーの位置で用いられる。好ましくは、変異体ポリペプチドは、本明細書において開示する天然ポリペプチドと、少なくとも一の生物学的及び/又は免疫学的活性を共有する。

30

【0153】

アミノ酸配列挿入は、一残基から百以上の残基を含有するポリペプチド長にわたるアミノ及び/又はカルボキシル末端融合、並びに单一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例としては、N末端メチオニン残基を有する抗体又は細胞傷害性ポリペプチドと融合した抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体は、酵素に対する抗体のN末端又はC末端への融合、又は抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドへの融合を含む。

40

【0154】

例えば、ポリペプチドの結合親和性及び/又は他の生物学的特性を改善することが望まれ得る。ポリペプチドのアミノ配列変異体は、適切なヌクレオチド変化を抗体核酸に導入することにより、又はペプチド合成により調整される。このような改変は、例えば、ポリ

50

ペプチドのアミノ酸配列内における、残基の欠失、及び／又は挿入及び／又は置換を含む。最終コンストラクトが所望の特性、例えば、抗原結合を有していることを条件として、欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせが、最終構築物に到達させるために作製され得る。アミノ酸の変更により、グリコシル化部位の数又は位置が変更されるなど、ポリペプチド（例えば抗体）の翻訳後プロセスが変化することもある。

#### 【0155】

所望の活性に悪影響を及ぼすことなくどのアミノ酸残基を挿入、置換、又は欠失させ得るかを決定する際の指標は、ポリペプチドの配列を相同の既知のポリペプチド分子の配列と比較して、相同性の高い領域においてなされるアミノ酸配列変更の数を最小限にすることにより見出してもよい。

10

#### 【0156】

突然変異誘発にとって好ましい場所である、ポリペプチド（例えば抗体）の一定の残基又は領域の同定のための有用な方法は、Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085 (1989)により記載されるように、「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。ここでは、標的残基の残基又は基が同定され（例：荷電残基、例えば、Arg、Asp、His、Lys、及びGlu）、中性の又は負に帯電したアミノ酸（最も好ましくはアラニン又はポリアラニン）により置き換えられ、抗原とのアミノ酸の相互作用に影響を及ぼされる。次いで、置換に対する機能的感受性を示している当該アミノ酸の場所を、更なる又は他の変異体を置換部位に、又は置換部位の代わりに導入することにより精密化される。したがって、アミノ酸配列バリエーションを導入するための部位は予め決めておくが、突然変異の性質 자체は、予め決まっている必要はない。例えば、所与の部位での突然変異の成果を分析するために、alphaスキャニング又はランダム突然変異誘発が標的コドン又は領域で行われ、発現された抗体変異体が所望の活性についてスクリーニングされる。

20

#### 【0157】

別のタイプの変異体は、アミノ酸置換変異体である。この変異体では、抗体分子中の少なくとも一のアミノ酸残基が、異なる残基により置き換えられている。置換による突然変異誘発のための最も関心の高い部位としては、超可変領域が挙げられるが、FRの変性も企図される。保存的置換は、表1の「好ましい置換基」の見出しの下に示されている。そのような置換により生物活性が変わる場合は、より実質的な変更（表1で「例示的な置換基」と名付けられている変更、又はアミノ酸クラスに関連して更に後述するような変更）を導入してから産物をスクリーニングしてもよい。

30

表 2.

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

## 【0158】

ポリペプチドの生物学的特性の実質的な改変は、(a)置換エリアにおけるポリペプチド骨格の構造(例えば、シート若しくは螺旋の立体配座として)の維持、(b)標的部位での分子の電荷若しくは疎水性の維持、又は(c)側鎖の嵩高さの維持に及ぶ効果が有意に異なる置換基を選択することにより達成される。アミノ酸は、側鎖の特性の類似性によってグルーピングしてもよい(A. L. Lehninger, Biochemistry second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)中) :

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

(2) 非電荷極性: Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q)

(3) 酸性: Asp (D)、Glu (E)

(4) 塩基性: Lys (K)、Arg (R)、His (H)

## 【0159】

10

20

30

40

50

あるいは、天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて、以下の群に分けてよい：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile
- (2) 中性の親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg
- (5) 鎖配向に影響する残基：Gly、Pro
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe

【0160】

非保存的置換は、これらのクラスの一つのメンバーを他のクラスと交換することを必要とするであろう。 10

【0161】

また、抗体の正確な立体配座の維持に関わっていない一切のシステイン残基は、一般にはセリンで置き換えられ、分子の酸化的安定性を改善し異常な架橋を防止してもよい。逆に、システイン結合（複数可）がポリペプチドに付加され、その安定性を改善してもよい（特に、抗体が、Fv断片等の抗体断片である場合）。

【0162】

特に好ましいタイプの置換型変異体には、親抗体（例えばヒト化抗体）の一又は複数の超可変領域残基の置換が関わっている。一般に、その結果得られる、更なる開発のために選択される変異体（複数可）は、その変異体が生成された元である親抗体と比較して生物学的特性が改善されることになる。そのような置換型変異体を生成するための簡便な方法は、ファージディスプレイを使用した親和性成熟を含んでいる。簡潔に言えば、いくつかの超可変領域部位（例えば、6～7部位）を突然変異させて、各部位で、可能なアミノ置換を全て生成させる。このようにして生成された抗体変異体は、各粒子内にパッケージされたM13の遺伝子III産物との融合物として、纖維状ファージ粒子から一価の様式でディスプレイされる。次いで、ファージディスプレイされた変異体は、本明細書において開示するように、その生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。改変について候補となる超可変領域部位を同定するために、アラニンスキャニング突然変異誘発が実施され、抗原結合に有意に寄与する超可変領域残基が同定され得る。代替的又は追加的に、抗原抗体複合体の結晶構造が分析され、抗体と標的との間の接点が同定されることが有益である場合がある。そのような接触残基及び隣接残基は、本明細書において詳述した技術による置換のための候補である。そのような変異体が生成されると、本明細書に記載されているように、変異体のパネルはスクリーニングにかけられ、一又は複数の関連するアッセイにおいて優れた特性を示した抗体が、さらなる開発のために選択されてもよい。 20

【0163】

ポリペプチドの別のタイプのアミノ酸変異体は、抗体の元のグリコシル化パターンを変性させる。ポリペプチドは、非アミノ酸部分を含んでもよい。例えば、ポリペプチドは、グリコシル化されてもよい。そのようなグリコシル化は、宿主細胞又は宿主生物におけるポリペプチドの発現の間に自然に起きててもよく、又は、ヒトの介入により生じる計画的な改変であってもよい。変性とは、ポリペプチドにおいて見出される一又は複数の炭水化物部分を欠失させること、及び/又は、そのポリペプチドに存在しない一又は複数のグリコシル化部位を加えることを意味する。 40

【0164】

ポリペプチドのグリコシル化は、典型的には、N-連結型又はO-連結型の何れかである。N-連結型は、炭水化物部分がアスパラギン残基の側鎖に付着していることを指す。トリペプチド配列のアスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-トレオニン（ここで、Xは、プロリン以外の任意のアミノ酸である）は、炭水化物部分をアスパラギン側鎖に酵素的に付着させるための認識配列である。したがって、これらのトリペプチド配列の何れかがポリペプチド中に存在していると、潜在的なグリコシル化部位が創出される。O 50

- 連結型グリコシル化は、糖である N - アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースのうち一つを、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はトレオニンに付着させることを指すが、5 - ヒドロキシプロリン又は5 - ヒドロキシリジンも使用されてもよい。

【 0 1 6 5 】

ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を改変させて前述のトリペプチド配列のうち一又は複数を含むようにすることにより、簡便に達成される ( N - 連結型グリコシル化部位の場合 )。この改変は、一又は複数のセリン又はトレオニン残基を元の抗体の配列に付加する、又は該残基により置換することによってもなされ得る ( O - 連結型グリコシル化部位の場合 )。

10

【 0 1 6 6 】

ポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的若しくは酵素的に、又は、グリコシル化のための標的として役立つアミノ酸残基をコードするコドンの突然変異置換により、達成され得る。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的開裂は、様々なエンドグリコシダーゼ及びエキソグリコシダーゼの使用により達成され得る。

【 0 1 6 7 】

他の改変は、グルタミニル残基及びアスパラギニル残基の、それぞれ対応するグルタミル残基及びアスパルチル残基への脱アミド化、プロリン及びリジンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の - アミノ基のメチル化、N 末端アミンのアセチル化、並びに、任意の C 末端カルボキシル基のアミド化を含む。

20

【 0 1 6 8 】

( i i ) キメラポリペプチド

本明細書に記載されているポリペプチドは、別の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列と融合されるポリペプチドを含むキメラ分子を形成する方式で改変されてもよい。幾つかの実施態様において、キメラ分子は、ポリペプチドと、抗タグ抗体が選択的に結合することができるエピトープをもたらすタグポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般に、ポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端に配置される。そのようなエピトープタグが付加された形態のポリペプチドの存在は、タグポリペプチドに対する抗体を使用して検出され得る。また、エピトープタグがもたらされることで、抗タグ抗体、又は、エピトープタグと結合する別のタイプの親和性マトリックスを使用したアフィニティー精製により、ポリペプチドを容易に精製することができるようになる。

30

【 0 1 6 9 】

代替的な一実施態様において、キメラ分子は、ポリペプチドと免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合を含んでもよい。二価の形態のキメラ分子は、「イムノアドヘシン」と称される。

【 0 1 7 0 】

本明細書において使用される場合、用語「イムノアドヘシン」は、異種ポリペプチドの結合特異性を免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能と組み合わせた抗体様の分子を指している。構造的に、イムノアドヘシンは、抗原認識以外の所望の結合特異性を有するアミノ酸配列と、抗体の結合部位との融合 ( すなわち、「異種の」である )、及び免疫グロブリン定常ドメイン配列を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部は、典型的には、少なくとも受容体又はリガンドの結合部位を含む近接するアミノ酸配列である。イムノアドヘシンにおける免疫グロブリン定常ドメイン配列は、任意の免疫グロブリン、例えば Ig G - 1、Ig G - 2、Ig G - 3 若しくは Ig G - 4 サブタイプ、Ig A ( Ig A - 1 及び Ig A - 2 を含む )、Ig E、Ig D、又は Ig M から得てもよい。

40

【 0 1 7 1 】

Ig 融合は、好ましくは、Ig 分子内の少なくとも一の可変領域の代わりに、可溶性の ( 膜貫通ドメインが欠失又は不活性化されている ) 形態のポリペプチドを置換することを含む。特に好ましい一実施態様において、免疫グロブリン融合体は、ヒンジ、CH2、及

50

び C H 3 領域、又は、I g G 1 分子の、ヒンジ、C H 1、C H 2、及びC H 3 領域を含む。

【 0 1 7 2 】

( i i i ) ポリペプチドコンジュゲート

ポリペプチド製剤において使用するためのポリペプチドは、細胞傷害剤、例えば化学療法剤、成長阻害剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物、若しくは動物起源の酵素活性毒素、又はそれらの断片）、又は放射性同位元素（即ち、ラジオコンジュゲート）とコンジュゲートしてもよい。

【 0 1 7 3 】

そのようなコンジュゲートの生成に有用な化学療法剤が使用され得る。加えて、酵素的に活性な毒素及び使用され得るその断片は、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、（綠膿菌からの）外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシンA鎖、アルファ - サルシン、アレウリテス・フォーディタンパク質、ジアンチンタンパク質、フィトラカ・アメリカーナタンパク質（P A P I、P A P I I、及びP A P - S）、モモルディカ・チャランチアインヒビター、クルシン、クロチン、サパオナリア・オフィシナリスインヒビター、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコテセンを含む。様々な放射性核種は、ラジオコンジュゲートされたポリペプチドの產生のために入手可能である。その例は、<sup>2</sup><sup>1</sup><sup>2</sup> B i 、<sup>1</sup><sup>3</sup><sup>1</sup> I 、<sup>1</sup><sup>3</sup><sup>1</sup> I n 、<sup>9</sup><sup>0</sup> Y 、及び<sup>1</sup><sup>8</sup><sup>6</sup> R e を含む。ポリペプチドと細胞障害剤のコンジュゲートは、様々な二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN - スクシンイミジル - 3 - ( 2 - ピリジルジチオール ) プロピオナート ( S P D P ) 、イミノチオラン ( I T ) 、イミドエステル類の二官能性誘導体（例えばジメチルアジピミダート H C L ）、活性エステル類（例えば、スペリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド類（例えば、グルタルアルデヒド）、ビスアジド化合物（例えば、ビス ( p - アジドベンゾイル ) ヘキサンジアミン）、ビス - ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス - ( p - ジアゾニウムベンゾイル ) エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トリエン - 2 , 6 - ジイソシアネート）、及び二活性フッ素化合物（例えば、1 , 5 - ジフルオロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼン）を使用して作製され得る。例えば、リシンイムノトキシンは、Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987) に記載されるように調製され得る。カーボン - 1 4 - 標識 1 - イソチオシアナトベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミン五酢酸 ( M X - D T P A ) は、放射性ヌクレオチドのポリペプチドへの抱合のためのキレート剤の例である。

【 0 1 7 4 】

ポリペプチドと一又は複数の小分子毒素（例えば、カリケアマイシン、マイタンシノイド、トリコテセン、及びC C 1 0 6 5 、並びに、毒素活性を有する、これらの毒素の誘導体）とのコンジュゲートもまた、本明細書において企図される。

【 0 1 7 5 】

マイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害することにより作用する有糸分裂阻害剤である。マイタンシンは、東アフリカの低木マイテヌス・セルラタから最初に単離された。続いて、ある微生物も、マイタンシノイド、例えばマイタンシノール及びC - 3 マイタンシノールエステル等のマイタンシノイドを產生することが発見された。合成のマイタンシノール並びにその誘導体及び類似体も企図される。ポリペプチド - マイタンシノイドコンジュゲートを作製するための、当該技術分野において公知の多くの連結基（例えば、米国特許第5 2 0 8 0 2 0 号において開示されているものを含む）がある。そのような連結基は、上で同定した特許において開示されている、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸解離性基、光解離性基、ペプチダーゼ解離性基、又はエステラーゼ解離性基を含み、ジスルフィド基及びチオエーテル基が好ましい。

【 0 1 7 6 】

リンカーは、連結のタイプに応じて、多様な位置でマイタンシノイド分子と付着させてもよい。例えば、エステル連結は、従来のカップリング技術を使用してヒドロキシル基と反応させることにより形成されてもよい。この反応は、ヒドロキシル基を有するC - 3 位

10

20

30

40

50

、ヒドロキシメチルで修飾されたC-14位、ヒドロキシル基で修飾されたC-15位、及びヒドロキシル基を有するC-20位で起きることがある。好ましい一実施態様において、連結は、マイタンシノール又はマイタンシノール類似体のC-3位で形成される。

【0177】

別の目的コンジュゲートは、一又は複数のカリケアマイシン分子とコンジュゲートされたポリペプチドを含む。カリケアマイシンファミリーの抗生物質は、ピコモル濃度未満で二本鎖DNA切断を生じさせる能力がある。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、例えば、米国特許第5712374号を参照のこと。使用してもよいカリケアマイシンの構造類似体は、限定されるものではないが、<sup>1</sup>I、<sup>2</sup>I、<sup>3</sup>I、N-アセチル-<sup>1</sup>I、PSAG及び<sup>1</sup>Iを含む。抗体をコンジュゲートすることができる別の抗腫瘍薬は、抗葉酸薬であるQFAである。カリケアマイシンとQFAはどちらも、細胞内作用部位を有しており、原形質膜を容易に越えない。したがって、細胞がポリペプチド（例えば、抗体）媒介性の内部移行を通じてこれらの薬剤を取り込むと、その細胞傷害効果は大きく強化される。

【0178】

本明細書に記載されているポリペプチドとコンジュゲートすることができる他の抗腫瘍剤は、BCNU、ストレプトゾイシン、ピンクリスチン及び5-フルオロウラシル、総称的にLL-E33288複合体として公知の薬剤ファミリー、並びにエスペラマイシンを含む。

【0179】

幾つかの実施態様において、ポリペプチドは、ポリペプチドと、核酸分解活性を有する化合物（例：リボヌクレアーゼ又はDNAエンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ；DNase）との間のコンジュゲートであってもよい。

【0180】

また別の実施態様において、ポリペプチド（例えば、抗体）は、腫瘍の事前標的化において利用するための「受容体」（例えばストレプトアビジン）とコンジュゲートしてもよく、この場合、ポリペプチド受容体コンジュゲートが患者に投与され、続いて、洗浄剤を使用して、結合されていないコンジュゲートの循環からの除去、次いで、細胞傷害剤（例えば、放射性ヌクレオチド）とコンジュゲートされている「リガンド」（例えば、アビジン）の投与が行われる

【0181】

幾つかの実施態様において、ポリペプチドは、プロドラッグ（例えば、ペプチジル化学療法剤）を活性のある抗癌薬に変換させるプロドラッグ活性化酵素とコンジュゲートしてもよい。免疫コンジュゲートの酵素成分は、プロドラッグに対して、それをより活性のある細胞傷害性の形態に変換させるような方式で作用する能力がある任意の酵素を含む。

【0182】

有用である酵素としては、限定されるものではないが、以下を含む：リン酸塩含有プロドラッグを遊離薬剤に変換させるのに有用なアルカリホスファターゼ；スルフェート含有プロドラッグを遊離薬剤に変換させるのに有用なアリールスルファターゼ；非毒性の5-フルオロシトシンを抗癌薬の5-フルオロウラシルに変換させるのに有用なシトシンデアミナーゼ；ペプチド含有プロドラッグを遊離薬剤に変換させるのに有用なプロテアーゼ、例えば、セラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ、及びカテプシン（例えばカテプシンB及びL）；D-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグを変換させるのに有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；グリコシル化されたプロドラッグを遊離薬剤に変換させるのに有用な炭水化物開裂酵素、例えば-D-ガラクトシダーゼ及びノイラミニダーゼ；-ラクタムで誘導体化されている薬剤を遊離薬剤に変換させるのに有用な-L-ラクタマーゼ；並びに、アミン窒素の位置にてそれぞれフェノキシアセチル基又はフェニルアセチル基で誘導体化されている薬剤を遊離薬剤に変換させるのに有用なペニシリニアミダーゼ、例えばペニシリンVアミダーゼ又はペニシリンGアミダーゼ。あるいは、酵素活性を有する抗体は、当該技術分野においては「アブザイム」

10

20

30

40

50

としても公知であるが、これを使用してプロドラッグを遊離活性薬物に変換させることができる。

【0183】

(i v) その他

ポリペプチドの、別のタイプの共有結合性改変は、ポリペプチドを、様々な非タンパク質ポリマーの一つ、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、又は、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとのコポリマーと連結させることを含む。ポリペプチドは、例えば、コアセルベーション技術又は界面重合法によって、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メチルメタシレート)マイクロカプセル)、コロイド薬物送達系(10 例えはリボソーム、アルブミンミクロスフィア、ミクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)又はマクロ・エマルジョンなどの調製されたマイクロカプセルに封入されてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Gennaro, A.R., Ed., (1990)に開示される。

【0184】

I V . 製剤及び方法において使用するためのポリペプチドの入手

本明細書に記載されている精製方法において使用されるポリペプチドは、組換え法を含め、当該技術分野において公知の方法を使用して入手し得る。次の項では、これらの方法に関する手引きを提供する。

【0185】

(A) ポリヌクレオチド

「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、本明細書においては互換的に使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、その例としてはDNA及びRNAが挙げられる。

【0186】

ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、任意の供給源から入手されてもよく、そのような供給源としては、限定されるものではないが、ポリペプチドmRNAが備わっており検出可能なレベルでそれを発現すると考えられる組織から調製されたcDNAライブラリーを含む。したがって、ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドは、ヒト組織から調製されたcDNAライブラリーから簡便に入手され得る。ポリペプチドをコードしている遺伝子はまた、ゲノムライブラリーから、又は、公知の合成手順(例えは、自動化された核酸合成)により、入手されてもよい。

【0187】

例えは、ポリヌクレオチドは、免疫グロブリン分子鎖全体、例えは軽鎖又は重鎖をコードしていてもよい。完全な重鎖は、重鎖可変領域(VH)だけでなく重鎖定常領域(CH)を含み、CHは、典型的には、三つの定常ドメイン: CH1、CH2及びCH3;並びに「ヒンジ」領域を含むであろう。状況状況によっては、定常領域が存在することが望ましい。

【0188】

ポリヌクレオチドによりコードされ得る他のポリペプチドは、抗原結合抗体断片、例えは単一ドメイン抗体(「dAb」)、Fv、scFv、Fab'及びF(ab')<sub>2</sub>、並びに「ミニボディ」が挙げられる。ミニボディは、そこからCH1及びCH<sub>κ</sub>又はCLドメインが切り取られる、(典型的には)二価の抗体断片である。ミニボディは従来の抗体より小さいため、臨床的/診断的用途において、より良好な組織浸透を達成するはずであるが、二価であることから、dAb等の一価抗体断片より高い結合親和性を保持するはずである。したがって、文脈でそうでないことが指示されない限り、用語「抗体」は、本明細書において使用される場合、全抗体分子だけでなく、上述のタイプの抗原結合抗体断片を包含する。好ましくは、コードされているポリペプチド中に存在する各フレームワーク領域は、対応するヒトアクセプターフレームワークに関連する少なくとも一のアミノ酸置換を含むであろう。したがって、例えは、フレームワーク領域は、アクセプターフレームワーク領域に関して合計で3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、

10

20

30

40

50

又は 15 のアミノ酸置換基を含んでもよい。

【0189】

VI. 例示的な実施態様

【0190】

1 複数の組成物を分析するために最適なイオン交換クロマトグラフィーの分離条件を同定するための方法であって、ここで各組成物は一以上の混入物を有するポリペプチドを含み、該方法は、a) 組成物の二以上のポリペプチドのアミノ酸組成に基づいて、選択された温度での正味電荷対 pH の曲線をプロットすること、b) 工程 a) のプロットの二次導関数を決定することにより中性 pH で又はその近傍での正味電荷対 pH の曲線の変曲点を決定することを含み；ここで最適なイオン交換クロマトグラフィーの分離条件が、一以上の組成物のポリペプチドについてほぼ共通の変曲点での pH である、方法。

【0191】

2 変曲点での正味電荷が正である場合、陽イオン交換材料がイオン交換クロマトグラフィーのために使用される、実施態様 1 に記載の方法。

【0192】

3 陽イオン交換クロマトグラフィー材料が、スルホン化クロマトグラフィー材料又はカルボキシル化クロマトグラフィー材料である、実施態様 2 に記載の方法。

【0193】

4 変曲点での正味電荷が負である場合、陰イオン交換材料がイオン交換クロマトグラフィーのために使用される、実施態様 1 に記載の方法。

【0194】

5 陰イオン交換クロマトグラフィー材料が、第四級アミンのクロマトグラフィー材料又は第三級アミンクロマトグラフィー材料である、実施態様 4 に記載の方法。

【0195】

6 混合モードクロマトグラフィー材料が、クロマトグラフィーのために使用される、実施態様 1 に記載の方法。

【0196】

7 混合モードイオン交換材料が、スルホン化クロマトグラフィー材料又はカルボキシル化クロマトグラフィー材料及び第四級アミンのクロマトグラフィー材料又は第三級アミンクロマトグラフィー材料を順次充填した混合物である、実施態様 6 に記載の方法。

【0197】

8 c) 組成物の二以上のポリペプチドについて温度変化による正味電荷対 pH 曲線の変曲点の pH の変化 (d I P / d T) を決定すること、d) 温度変化によるバッファーの酸解離定数の変化 (d p K a / d T) がポリペプチドの d I P / d T と本質的に同じである、クロマトグラフィーに使用のためのバッファーを選択することを更に含む、実施態様 1 から 7 の何れか一に記載の方法。

【0198】

9 バッファーが、変曲点の pH で効果的な緩衝能を提供する、実施態様 8 に記載の方法。

【0199】

10 一以上の組成物のポリペプチドの d I P / d T が、約 -0.02 pH 単位である、実施態様 1 から 9 の何れか一に記載の方法。

【0200】

11 温度変化が、約 20 から約 70 である、実施態様 1 から 10 の何れか一に記載の方法。

【0201】

12 温度変化が、約 20 から約 50 である、実施態様 1 から 11 の何れか一に記載の方法。

【0202】

13  $d p K a / d T = d I P / d T \pm 50\%$  である、実施態様 8 から 12 の何れか一

10

20

30

40

50

に記載の方法。

【0203】

14 工程d)で選択されたバッファー中のポリペプチドの正味電荷が、30を超えて0.5未満変化する、実施態様8から13の何れか一に記載の方法。

【0204】

15 工程d)で選択されたバッファーが、約5mMから約250mMの範囲の濃度でクロマトグラフィーに使用される、実施態様8から14の何れか一に記載の方法。

【0205】

16 バッファー組成物が更に塩を含む、実施態様1から15の何れか一に記載の方法。

10

【0206】

17 塩が、NaCl、KCl、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、又はNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>である、実施態様16に記載の方法。

【0207】

18 塩の濃度が、約1mMから約1Mの範囲である、実施態様16又は17に記載の方法。

【0208】

19 ポリペプチドが、抗体若しくはイムノアドヘシン又はその断片である、実施態様1から18の何れか一に記載の方法。

20

【0209】

20 ポリペプチドが、モノクローナル抗体又はその断片である、実施態様1から19の何れか一に記載の方法。

【0210】

21 抗体が、ヒト抗体である、実施態様19又は20に記載の方法。

【0211】

22 抗体が、ヒト化抗体である、実施態様19又は20に記載の方法。

【0212】

23 抗体が、キメラ抗体である、実施態様19又は20に記載の方法。

【0213】

24 抗体が、抗体断片である、実施態様19から23の何れか一に記載の方法。

30

【0214】

25 混入物が、ポリペプチドの変異体である、実施態様1から14の何れか一に記載の方法。

【0215】

26 混入物が、ポリペプチドの分解生成物である、実施態様1から25の何れか一に記載の方法。

【0216】

27 混入物が、ポリペプチドの電荷変異体である、実施態様1から26の何れか一に記載の方法。

【0217】

28 一以上の混入物と共にポリペプチドを含む組成物を分析するために最適なイオン交換クロマトグラフィーの分離条件を同定するための方法であって、該方法は、a)ポリペプチドのアミノ酸組成に基づいて、選択された温度での正味電荷対pHの曲線をプロットすること、b)工程a)のプロットの二次導関数を決定することにより中性pHで又はその近傍での正味電荷対pHの曲線の変曲点を決定することを含み；ここで最適なイオン交換クロマトグラフィーの分離条件が、ポリペプチドについてほぼ変曲点でのpHである、方法。

40

【0218】

29 変曲点での正味電荷が正である場合、陽イオン交換材料がイオン交換クロマトグラフィーのために使用される、実施態様28に記載の方法。

50

## 【0219】

30 陽イオン交換クロマトグラフィー材料が、スルホン化クロマトグラフィー材料又はカルボキシル化クロマトグラフィー材料である、実施態様29に記載の方法。

## 【0220】

31 変曲点での正味電荷が負である場合、陰イオン交換材料がクロマトグラフィーのために使用される、実施態様28に記載の方法。

## 【0221】

32 陰イオン交換クロマトグラフィー材料が、第四級アミンのクロマトグラフィー材料又は第三級アミンクロマトグラフィー材料である、実施態様31に記載の方法。

## 【0222】

33 混合モードクロマトグラフィー材料が、クロマトグラフィーのために使用される、実施態様28に記載の方法。

## 【0223】

34 混合モードイオン交換材料が、スルホン化クロマトグラフィー材料又はカルボキシル化クロマトグラフィー材料及び第四級アミンのクロマトグラフィー材料又は第三級アミンクロマトグラフィー材料を順次充填した混合物である、実施態様33に記載の方法。

## 【0224】

35 c) ポリペプチドについて温度変化による正味電荷対pH曲線の変曲点のpHの変化( $d\text{IP}/dT$ )を決定し、d) 温度変化によるバッファーの酸解離定数の変化( $d\text{pKa}/dT$ )がポリペプチドの $d\text{IP}/dT$ と本質的に同じである、クロマトグラフィーに使用のためのバッファーを選択することを更に含む、実施態様28から34の何れか一に記載の方法。

## 【0225】

36 バッファーが、変曲点のpHで効果的な緩衝能を提供する、実施態様35に記載の方法。

## 【0226】

37 一以上の組成物のポリペプチドの $d\text{IP}/dT$ が、約-0.02pH単位である、実施態様28から36の何れか一に記載の方法。

## 【0227】

38 温度変化が、約20から約70である、実施態様28から37の何れか一に記載の方法。

## 【0228】

39 温度変化が、約20から約50である、実施態様28から38の何れか一に記載の方法。

## 【0229】

40  $d\text{IP}/dT = d\text{pKa}/dT \pm 50\%$ である、実施態様28から39の何れか一に記載の方法。

## 【0230】

41 工程d)で選択されたバッファー中のポリペプチドの正味電荷が、30を超えて0.5未満変化する、実施態様28から40の何れか一に記載の方法。

## 【0231】

42 工程d)で選択されたバッファーが、約5mMから約50mMの範囲の濃度でクロマトグラフィーに使用される、実施態様28から41の何れか一に記載の方法。

## 【0232】

43 バッファー組成物が更に塩を含む、実施態様28から42の何れか一に記載の方法。

## 【0233】

44 塩が、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{KCl}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、又は $\text{Na}_2\text{SO}_4$ である、実施態様43に記載の方法。

## 【0234】

10

20

30

40

50

45 塩の濃度が、約10 mMから約1Mの範囲である、実施態様43又は44に記載の方法。

【0235】

46 ポリペプチドが、抗体若しくはイムノアドヘシン又はその断片である、実施態様28から45の何れか一に記載の方法。

【0236】

47 ポリペプチドが、モノクローナル抗体又はその断片である、実施態様28から46の何れか一に記載の方法。

【0237】

48 抗体が、ヒト抗体である、実施態様46又は47に記載の方法。

10

【0238】

49 抗体が、ヒト化抗体である、実施態様46又は47に記載の方法。

【0239】

50 抗体が、キメラ抗体である、実施態様46又は47に記載の方法。

【0240】

51 抗体が、抗体断片である、実施態様38から50の何れか一に記載の方法。

【0241】

52 混入物が、ポリペプチドの変異体である、実施態様28から51の何れか一に記載の方法。

【0242】

20

53 混入物が、ポリペプチドの分解生成物である、実施態様28から52の何れか一に記載の方法。

【0243】

54 混入物が、ポリペプチドの電荷変異体である、実施態様28から53の何れか一に記載の方法。

【0244】

55 組成物がポリペプチド及び一以上の混入物を含む組成物を分析するための方法であって、ここで、該方法は混入物からポリペプチドを効果的に分離し、該方法は、a)実施態様1の方法に従って、各組成物が標的ポリペプチド及び一以上の混入物を含有する複数の組成物についての最適pH及び温度のイオン交換分離条件を決定すること、b)ローディングバッファーが実施態様8から15の何れか一項に記載の方法によって同定されるバッファーを含むローディングバッファーを用いて、イオン交換クロマトグラフィー材料へ組成物からのポリペプチド及び一以上の混入物を結合させること、c)溶出バッファーがバッファー及び塩を含み、塩の濃度が経時的に勾配で増加し、ポリペプチド及び一以上の混入物がその勾配によって分離される溶出バッファーの勾配を用いてイオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチド及び一以上の混入物を溶出させること、及びd)ポリペプチド及び一以上の混入物を検出すること含む、方法。

30

【0245】

56 ポリペプチド及び一以上の混入物を含む組成物を分析するための方法であって、該方法は混入物からポリペプチドを効果的に分離し、該方法は、a)ローディングバッファーがバッファーを含み、クロマトグラフィーのpH及び温度が、i)曲線が二以上の標的ポリペプチドのポリペプチドのアミノ酸組成に基づいている、選択された温度での正味電荷対pHの曲線をプロットし、ii)工程i)のプロットの二次導関数を決定することによって正味電荷対pHの曲線の変曲点を決定すること（ここで最適なイオン交換クロマトグラフィーの条件は、二以上の標的ポリペプチドについての共通の変曲点でのpHである）によって、複数の標的ポリペプチドに対して最適化される、ローディングバッファーを使用してイオン交換クロマトグラフィー材料にポリペプチド及び一以上の混入物を結合させること；b)溶出バッファーがバッファー及び塩を含み、ポリペプチド及び一以上の混入物が勾配により分離される溶出バッファーの勾配を用いてイオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチド及び一以上の混入物を溶出させること；及びc)ポリペプチド

40

50

及び一以上の混入物を検出することを含む、方法。

【0246】

57 選択される温度が大気温度である、実施態様56に記載の方法。

【0247】

58 バッファーが、a) 二以上の標的ポリペプチドについて温度変化による正味電荷対pH曲線の変曲点のpHの変化( $d\text{IP}/dT$ )を決定し、b) 温度変化によるバッファーの酸解離定数の変化( $d\text{pKa}/dT$ )が共通の変曲点を有する二以上の標的ポリペプチドの $d\text{IP}/dT$ と本質的に同じであるバッファーを選択することによって同定される、方法。

【0248】

59 バッファーが、変曲点のpHで効果的な緩衝能を提供する、実施態様58に記載の方法。

【0249】

60 ポリペプチド及び一以上の混入物を含む組成物を分析するための方法であって、該方法は混入物からポリペプチドを効果的に分離し、該方法が、a) ローディングバッファーがバッファーを含み、かつクロマトグラフィーのpH及び温度が複数の標的ポリペプチドに対して最適化されている、ローディングバッファーを使用してイオン交換クロマトグラフィー材料にポリペプチド及び一以上の混入物を結合させること；b) 溶出バッファーがバッファー及び塩を含み、ポリペプチド及び一以上の混入物が勾配により分離される溶出バッファーの勾配を使用してイオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチド及び一以上の混入物を溶出させること；及びc) ポリペプチド及び一以上の混入物を検出することを含む、方法。

【0250】

61 バッファーが、N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸(ACES)又は4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸(HEPE)である、実施態様60に記載の方法。

【0251】

62 バッファーの濃度が、約5mMから約20mMの範囲である、実施態様55から61の何れか一に記載の方法。

【0252】

63 バッファーのpHが、約2.0から約7.0の温度範囲で約6.5から約8.5の範囲である、実施態様55から62の何れか一に記載の方法。

【0253】

64 バッファーのpHが、約2.0から約5.0の温度範囲で約6.5から約8.5の範囲である、実施態様55から63の何れか一に記載の方法。

【0254】

65 変曲点でのバッファー及びポリペプチドのpHが、約2.2で約7.8、約3.7で約7.5、約5.0で約7.2である、実施態様55から64の何れか一に記載の方法。

【0255】

66 塩勾配が、直線勾配である、実施態様55から65の何れか一に記載の方法。

【0256】

67 塩勾配が、段階勾配である、実施態様55から66の何れか一に記載の方法。

【0257】

68 塩勾配が、 $\text{NaCl}$ 勾配、 $\text{KCl}$ 勾配、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 又は $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 勾配である、実施態様55から67の何れか一に記載の方法。

【0258】

69 塩濃度が、約0mMから約1Mまで勾配で増加する、実施態様55から68の何れか一に記載の方法。

【0259】

10

20

30

40

50

70 塩濃度が、約100分で約0mMから約100mMまで増加する、実施態様69に記載の方法。

【0260】

71 塩濃度が、約40分で約0mMから約80mMまで増加する、実施態様69に記載の方法。

【0261】

72 ポリペプチドが、抗体若しくはイムノアドヘシン又はその断片である、実施態様55から71の何れか一に記載の方法。

【0262】

73 ポリペプチドが、モノクローナル抗体又はその断片である、実施態様55から72の何れか一に記載の方法。 10

【0263】

74 抗体が、ヒト抗体である、実施態様72又は73に記載の方法。

【0264】

75 抗体が、ヒト化抗体である、実施態様72又は73に記載の方法。

【0265】

76 抗体が、キメラ抗体である、実施態様72又は73に記載の方法。

【0266】

77 抗体が、抗体断片である、実施態様72から76の何れか一に記載の方法。

【0267】

78 混入物が、ポリペプチドの変異体である、実施態様55から77の何れか一に記載の方法。 20

【0268】

79 混入物が、ポリペプチドの分解生成物である、実施態様55から78の何れか一に記載の方法。

【0269】

80 混入物が、ポリペプチドの電荷変異体である、実施態様55から79の何れか一に記載の方法。

【0270】

81 クロマトグラフィー材料が、陽イオン交換クロマトグラフィー材料である、実施態様55から80の何れか一に記載の方法。 30

【0271】

82 陽イオン交換クロマトグラフィー材料が、スルホン化クロマトグラフィー材料又はカルボキシル化クロマトグラフィー材料である、実施態様81に記載の方法。

【0272】

83 複数のポリペプチド組成物を分析するための方法であって、各ポリペプチド組成物がポリペプチド及びポリペプチドの一以上の電荷変異体を含み、該方法は、ポリペプチドをその電荷変異体から効果的に分離し；

各ポリペプチド組成物に対して、該方法が、a) ローディングバッファーが約40でpHが約7.6で10mMのHEPESバッファーを含み、ローディングバッファーを約1mL/分の流速で使用してイオン交換クロマトグラフィー材料にポリペプチド及び一以上の荷電変異体を結合させること；b) 溶出バッファーがpHが約7.6で約10mMのHEPESバッファー及びNaClを含み、NaClの濃度が約40分で約0mMから約80mMまで勾配で増加し、ポリペプチド及びその荷電変異体が勾配により分離される溶出バッファーの勾配を用いてイオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチド及び荷電変異体混入物を溶出させること；及びc) ポリペプチド及び一以上の荷電変異体を検出することを含む、方法。 40

【0273】

84 複数のポリペプチド組成物が異なるポリペプチドを含む、実施態様83に記載の方法。 50

**【0274】**

85 複数のポリペプチド組成物が異なるpIを有するポリペプチドを含む、実施態様  
83又は84に記載の方法。

**【0275】**

86 ポリペプチド組成物は抗体組成物である、実施態様83から85の何れか一に記載の方法。

**【0276】**

本明細書に開示される特徴の全ては、任意の組合せで組み合わされてもよい。本明細書に開示される各特徴は、同一の、等価な、又は類似の目的を果たす代替的な特徴により置き換えられてもよい。したがって、別段の明示的な指定のない限り、開示される各特徴は、一般的な一連の同等物又は類似の特徴の一例に過ぎない。

10

**【0277】**

本発明の更なる詳細は、以下の非限定的な実施例により説明される。本明細書中の全ての参考文献の開示内容は、参照により本明細書中に明示的に援用される。

**【実施例】****【0278】**

以下の実施例は、単に本発明の例示であると意図されており、したがって、決して本発明を限定するものと考えられるべきではない。以下の実施例及び詳細な記述は、説明のために提供されるものであり、限定のために提供されるものではない。

**【0279】**

20

**実施例のための材料及び方法**

別段の注記がない限り、以下の物質及び方法が実施例で使用された。

**材料**

安定したチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株又は大腸菌細胞を使用して、全てのmAbを製造した。

**【0280】**

MabPac SCS-10及びPropac WCX-10カラムはThermo Fisherから購入した。AntibodyカラムはSepaxからであった。YMCカラムはYMCから購入した。Triisma（トリス）をMallinckrodt Baker Inc.又はSigma（St. Louis, MO）から入手し、HEPES、ACES、Trizma塩基及びCAPSをSigmaから入手した。塩化ナトリウム、水酸化ナトリウム（10N）及び塩化水素酸（12N）をMallinckrodt Baker Inc.から入手した。リン酸（85%）をEMD Milliporeから入手した。

30

**【0281】****HPLC設定**

陽イオン交換クロマトグラフィー実験を、主にWaters 2796 BioAliance液体クロマトグラフィー機器、Agilent 1200SL HPLCシステム又はUltimate 3000 Quaternary Rapid Separation LC（Thermo Scientific Dionex）上で実施した。機器には、低圧四元勾配ポンプ又はバイナリポンプ、温度調節能力を有するオートサンプラー、正確な温度調節のための熱カラムコンパートメント、及び二波長ダイオードアレイUV検出器が含まれた。Dionex Chromelionソフトウェア、バージョン6.8を用いて、機器制御、データ収集及びデータ分析を実施した。

40

**【0282】****実施例1. 多生成物分析イオン交換クロマトグラフィーの最適化。**

電荷変異型などの混入物を検出するために、高分解能かつ堅牢な多生成物IECを開発するため、mAbが電荷平衡であるような条件を設計した。電荷平衡は、正味電荷状態（z）対pHをグラフ化することにより、多数のmAbについて決定された。mAbが平衡である条件は、pHに対するzの直線の方程式の二次導関数を0に等しく設定することに

50

よって解かれた。

【0283】

与えられた pH での mA b の正味の電荷は、それらの側鎖によってタンパク質の pH 依存性の特性を定義する際に重要な役割を果たしている mA b の 6 つのアミノ酸の含有量に基づいて決定された。6 つのアミノ酸は、アスパラギン、グルタミン酸、ヒスチジン、チロシン、リジン及びアルギニンである。6 つのアミノ酸の酸解離定数 ( -10g10Ka ) として定義される pKa が、正味荷電状態 ( z ) を計算するために使用された。例えば、mA b 1 は 10 のヒスチジン残基を有する。図 2 は、pH の関数としてヒスチジンのプロトン化を示している。ヒスチジンの pKa の 6.02 未満の pH で、ヒスチジンは、プロトン化され、正の電荷を有する ( 図 2A )。6.02 を超える pH で、ヒスチジンは脱プロトン化され、電荷を帯びていない。式 1 を使用して、特定の pH でのヒスチジンの特定の荷電状態の確率を決定した。図 2B は、pH 6.5 において及び pH 7.5 においての mA b 1 における脱プロトン化ヒスチジンの推定分布を示す。pH は 6.5 では、mA b 1 は 8 つの脱プロトン化ヒスチジン残基の中央値を有していたが、一方 pH 7.5 では、ほぼ全てヒスチジン残基が脱プロトン化された。図 2C は、各々が 2 個のヒスチジン残基を有する 4 つのポリペプチド分子による例を示す。pKa ( pH 6.02 ) で、His 残基の 50 % がプロトン化され、50 % が脱プロトン化されている。これらの 4 つの分子におけるヒスチジン残基の電荷状態の組み合わせは pKa で二項分布である：1 つは両方のヒスチジンがプロトン化され；2 つは片方のヒスチジンがプロトン化され他方のヒスチジンが脱プロトン化され；1 つは両方のヒスチジンが脱プロトン化されている。

【0284】

与えられた pH 値における最も豊富な荷電状態の確率が 6 つのアミノ酸のそれぞれについて決定され、与えられた pH での mA b 1 の電荷の重み付き確率が、抗体中に存在するこれらの 6 つのアミノ酸のそれぞれの残基数に基づいて決定された ( 図 3 )。電荷頻度の分布もまた、確率変数における不確実性の尺度であるシャノンエントロピー ( 式 3 ) を介して決定することができる。mA b 1 中に存在するこれらの 6 つのアミノ酸のそれぞれの残基数に基づいて ( 表 3 ) 、mA b 1 に対する所与の pH におけるシャノンエントロピーが図 4 にプロットされる。シャノンエントロピーが低いほど、電荷分布はより均一である。

表3. mA b 1 の選択されたアミノ酸残基の数

pH	リジン	ヒスチジン	アスパラギン酸塩	グルタミン酸塩	チロシン	アルギニン
残基数	90	28	52	64	66	32

【0285】

このデータから、pH の関数として mA b 1 の正味の電荷の分布がプロットされ ( 図 5 ) 、変曲点は 3.7 で pH 7.5 であると決定された ( 図 5 の上面図である図 6 )。これが図 5 において最も高くかつ最もシャープなピークとして示される、最も均質な電荷状態を有する pH であることに留意のこと。最も均質な電荷状態はまた、IEC の分離において最もシャープなピークを生じることとなる。

【0286】

上述される方法を使用して、7.6 から 9.4 の範囲の pI を有する多数の mA b について変曲点が決定された ( 図 7 )。驚くべきことに、ほぼ全ての mA b において、変曲点は 3.7 で pH 7.5 で同じであった。IP を標的にすると、IEC の pH 堅牢性を向上させることができる。図 7 に示されるように、全ての抗体において、pH 7 と pH 8 の間で正味電荷はほとんど変わらない。

【0287】

mA b の変曲点は、2.2 、 3.7 及び 5.0 のときに決定された。図 8 に示されるように、変曲点は、温度に依存していたが、試験した全ての抗体について、変曲点は所定の

10

20

30

40

50

温度で同様であった。

【0288】

mAb2についての変曲点は、22から50の範囲の温度に対して決定された。図9に見られるように、温度の上昇とともに変曲点のpHは低下するが、正味電荷は一定のままである。従って、変曲点に対してクロマトグラフィーを最適化することは、温度変動に対するIEC法の堅牢性をも提供する。用語dIP/dTは、温度の変化による分子のIPの変化を表している。これらの結果から、温度の影響を最小にし、アッセイの堅牢性を向上させるために、温度の関数としてのバッファーの酸解離定数の変化がdIP/dTに近づいた場合に（すなわち、dIP/dT = dpKa/dT）最適なバッファーを選択することができる。

10

【0289】

変曲点のpHと温度との関係がプロットされ、線形回帰の傾き、dIP/dT値、が異なるpI値を有する多数のmAbについて計算された（図10及び表4）。これら6つのmAbについてのdIP/dTの値が本質的に同じ（-0.0177から-0.0183）であることが見いだされた。このように、約-0.018のdpKa/dTの値を有するバッファーが、図10に提示されるmAbの全てのIEC分析のために最適であり、従って多生成物IECについて最適となるであろう。

表4. 変曲点 (pH)

温度°C	MAb27	MAb1	MAb2	MAb4	MAb5	MAb6	MAb8
25	7.69	7.73	7.72	7.72	7.75	7.72	7.72
30	7.60	7.64	7.63	7.62	7.66	7.62	7.62
35	7.50	7.54	7.54	7.53	7.56	7.53	7.53
37	7.47	7.51	7.50	7.49	7.53	7.49	7.49
40	7.42	7.45	7.45	7.44	7.47	7.44	7.44
45	7.33	7.37	7.36	7.35	7.39	7.35	7.35
50	7.25	7.28	7.27	7.26	7.30	7.27	7.27
dIP/dT	-0.0177	-0.018	-0.018	-0.0183	-0.018	-0.018	-0.018

20

【0290】

多数のバッファーについて温度の関数 (dpKa/dT) としてのpKaの変化の公表値は以下のとおりである：

リン酸塩：-0.0028

HEPES：-0.014

ACES：-0.02

トリス：-0.028

ビシン：-0.018

トリシン：-0.021

TAPS：-0.02

CHEs：-0.018

30

Benyon, RJ & Easterby, JS, Buffer Solutions The Basics, IRL Press, 1996を参照。

【0291】

図11は、温度の関数として、リン酸バッファー、HEPESバッファー、ACES緩衝、及びトリスバッファー中におけるmAb2の変曲点での正味電荷のグラフを示す。ACESバッファー又はHEPESバッファーにおけるmAb2の正味電荷のグラフは、30を超える範囲で0.5未満のほぼ平坦な変化であった。一方、トリス及びリン酸塩のグラフは平坦ではなく、温度変化による正味電荷のより大きな変化を示していた。ACES又はHEPESが、多生成物クロマトグラフィーのために最適なバッファーであると結論された。

40

50

## 【0292】

## 実施例2. 多生成物IECプロトコルの開発

変曲点並びにACES及びHEPESについての $d\text{pKa}/dT$ の値と多数のmAbに対して決定された $d\text{IP}/dT$ の値との関係を考慮して、多生成物IECプロトコルが開発された。19のmAbが試験された。mAbサンプルは、バッファーAで1mg/mLに希釈され、オートサンプラーに $5\pm3$ で保持された。MabPac SCX-10、 $4\times250\text{mm}$ カラムが、温度設定 $37\pm1$ でカラムコンパートメントに配置された。各クロマトグラフィーの実行のために、タンパク質( $20\mu\text{g}$ )の $10\mu\text{L}$ が注入された。バッファーAは、 $37$ で $5\text{mM}$ のACES( $\text{pH }7.5$ )であった。バッファーBはバッファーA中に $180\text{mM}$ のNaClである。勾配はバッファーBをバッファーA中に混合することにより、100分間、 $1\text{mM}/\text{分}$ で $0\sim100\text{mM}$ のNaClであった。流速は $0.8\text{mL}/\text{分}$ であった。タンパク質は $280\text{nm}$ での吸光度によって検出された。図12に示されるように、多生成物IECは、広範囲のmAb生成物に対して良好な分解能を与えた。

## 【0293】

## 実施例3. 多生成物IECのpH堅牢性

多生成物IECのpH堅牢性は、勾配が $1.5\text{mM}/\text{分}$ であり、かつ3つの異なるpH値、 $\text{pH }7.3$ 、 $\text{pH }7.5$ 及び $\text{pH }7.7$ であることを除いて、実施例2に記載の方法を用いて調べられた。mAb4が、この研究のための非限定的な例示的抗体として用いられた。

## 【0294】

図13に示すように、抗体の主ピークとその電荷変異体との間の良好な分解能が試験した全てのpH値で見られた。ピーク面積の定量化は、pHに関して分析に有意な変化がないことを明らかにした(表5)。

表5. 多生成物IECのpH堅牢性

						分解能 <sup>a</sup>	
pH	%酸性	%主 ピーク	%塩基性1	%塩基性2	合計 塩基性	主/BV1	BV1/BV2
7.7	8.4	52.1	21.1	18.4	39.5	2.3	2.2
7.5	8.4	53.3	21.0	18.3	39.3	2.3	2.3
7.3	8.6	52.4	21.3	17.7	39.0	3.0	2.7

<sup>a</sup>式4により定義される分解能

$$\text{式4} \quad R = \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{1/2(w_1 + w_2)},$$

ここでRは分解能であり

$t_{r1}$ 及び $t_{r2}$ は、二つの直接隣接するピークの保持時間であり  
 $w_1$ 及び $w_2$ は、2つの直接隣接するピークのピーク幅がある。

## 【0295】

## 実施例4. 温度堅牢性

多生成物IECの温度堅牢性は、勾配が $1.5\text{mM}/\text{分}$ であり、かつ3つの異なる温度、 $32$ 、 $37$ 、及び $42$ であることを除いて、実施例2に記載の方法を用いて調べられた。mAb2、mAb6及びmAb10が、この研究のための非限定的な例示的抗体として用いられた。

## 【0296】

10

20

30

40

50

図14に示されるように、抗体及びそれらの電荷変異体の間で良好な分解能が、抗体ごとに試験された全ての温度で見られた。ほぼ同一のクロマトグラムが、各抗体について、各温度で見られた。

【0297】

第2の実験では、mAb19、7及び8が、10 mMのHEPESバッファー中で温度堅牢性について試験された。図15に見られるように、抗体及びそれらの電荷変異体の間で良好な分解能が、抗体ごとに試験された全ての温度で見られた。ピーク面積の定量化は、pHに関して分析に有意な変化がないことを明らかにした。

表6. 多生成物IECの温度堅牢性

10

mAb	温度	%酸性	%主ピーク	%塩基性1	分解能酸性	分解能塩基性
mAb19	42°C	16.46	75.62	7.92	1.51	3.20
	37°C	16.69	74.65	8.56	1.53	3.26
	32°C	15.97	76.17	7.86	1.62	3.30
mAb7	42°C	18.95	67.30	13.75	1.31	na
	37°C	19.80	67.28	12.92	1.36	na
	32°C	18.53	68.80	12.66	1.45	na
mAb8	42°C	22.20	68.78	9.03	2.21	1.72
	37°C	22.44	67.67	9.89	2.25	1.45
	32°C	22.60	67.25	10.15	2.33	1.35

20

【0298】

実施例5. 多生成物IECの生成物特異的IECとの比較

30

多生成物IECが、mAb8、mAb25及びmAb26に対して開発された生成物特異的IECと比較された。mAb8、mAb28及びmAb26のIECが、勾配が1.5 mMのNaCl/分であるのを除き実施例2に記載される多生成物IEC法を使用して実施された[Geneentech-確認して下さい]。生成物特異的な方法に対するバッファー及び温度は異なっていた。mAb8については30で20 mMのMES(pH 6.5)；mAb25については42で20 mMのHEPES(pH 7.6)；及びmAb26については40で20 mMのACES(pH 7.1)であった。図16に見られるように、多生成物IEC(左のパネル)が、同様に又は生成物特異的IEC法(右のパネル)よりも良好な分解能で実施された。

【0299】

40

実施例6. 異なるカラムを用いた多生成物IECの使用

多生成物IECがクロマトグラフィーカラムの選択のために使用された。mAb8が、勾配が1.5 mMのNaCl/分であるのを除き実施例2に記載される方法を使用して4つの異なる陽イオン交換カラムで試験された。試験されたカラムは、ProPac WC X-10、4×250、10 μm；YMC、4.6×100、5 μm；Antibody NP5、4.6×250、5 μm；及びMabPac SCX-10、4×250、10 μmであった(実施例2で使用)。図17で見ることができるように、4つ全てのカラムは十分な分解能を生じた。ピーク面積の定量化及び主ピークとの酸性ピーク及び塩基性ピーク間の分解能が表7に示される。

50

表7. mAb 8についてのカラムスクリーニング

カラム	%酸性	%主 ピーク	%塩基性 1	分解能 酸性	分解能 塩基性
ProPac WCX-10	19.80	66.98	13.22	2.06	1.42
YMC	25.21	64.86	9.93	1.78	0.93
AntiBodix NP5	23.23	66.10	10.67	0.99	0.22
MabPac SCX-10	14.80	73.38	11.83	2.81	2.54

10

## 【0300】

## 実施例7. 拡張性

異なるサイズの陽イオン交換クロマトグラフィーカラムの使用が、多生成物 IEC における使用のために評価された。カラムの長さを減らすと実行時間が短くなることとなる。mAb 8 は、実施例 2 に記載される多生成物 IEC 法を使用して、3 つの異なるサイズの ProPac WCX-10 カラム上でクロマトグラフィー処理された。カラムは異なるサイズであったので、クロマトグラフィーの実行は異なる時間に対してであった。カラムのサイズ及び各実行時間が以下の通りであった：63 分に対して  $4 \times 250$  mm、19 分に対して  $4 \times 100$  mm、15 分に対して  $4 \times 50$  mm。結果は図 18 に提示される。一部の分解能は短いカラムで失われるものの、一貫性のある定量的結果を伴う適切な分離が、ハイスループットアプリケーション用の短いカラムを用いて得られる。ピーク面積の定量化は一貫性があり、表 8 に示される。

20

表8. 多生成物 IEC の拡張性

カラム サイズ	実行 時間	%酸性	%主 ピーク	%塩基性 1	分解能 酸性	分解能 塩基性
$4 \times 250$	63分	22.44	67.67	9.89	2.25	1.45
$4 \times 100$	19分	24.72	65.85	9.42	1.66	0.85
$4 \times 50$	15分	23.22	67.03	9.75	1.51	0.65

30

## 実施例8. アッセイの堅牢性

試験手順の検証は適切に堅牢である方法が必要である。堅牢性を評価するための実験の設計 (DOE) アプローチが、相互作用的な効果を含むアッセイ条件下における小さな変動の効果を総合的に評価する。各実験の特異的多変量条件は、相互作用の可能性のある因子を結び付けるために選択された。連続的に変化させることはできなかったが、効果を有することが知られている因子、すなわち、カラム（例えば、ロット間の変動性、年齢）及び装置（例えば、2つのモデルタイプ）は一時一事法により検討された。効果は、標的条件での応答の変動性を、要因計画に従って変動される条件での応答の変動性に対して比較することによって決定された。

40

## 【0301】

## 実験計画

以下は、プラットフォームメソッドコントロールアプローチのための組換えモノクローナル抗体タンパク質の電荷不均一性を監視するために使用されるイオン交換条件を説明している。本研究の目的は、実験の 6 要因プラケット・バーマン計画を用いたアッセイの堅牢性を調査することであった（表 9 及び 10）。検討される因子は、溶媒の pH、終了の塩濃度、カラム温度、流速、注入量、及びバッファーのモル濃度であった。この研究のた

50

めの応答変数は、主ピーク、酸性及び塩基性変異体の相対的な割合を含んでいた。合計 21 回の実行が、12 回の実行が要因条件で、9 回の実行が標的で行われた。

表 13

可変パラメーター							
注入#	パターン	pH	バッファー モル濃度(mM)	注入量 ( $\mu$ L)	温度(℃)	流速 (mL/分)	勾配終末 NaCl(mM)
1	標的	7.50	5.0	25	40	1.50	90
2	(+---+ -)	7.65	4.7	22	37	1.53	85
3	(+- +++) -	7.65	4.7	28	43	1.53	85
4	標的	7.50	5.0	25	40	1.50	90
5	(- - + - +)	7.35	4.7	28	37	1.47	95
6	標的	7.50	5.0	25	40	1.50	90
7	(+ + + - -)	7.65	5.3	28	37	1.47	85
8	標的	7.50	5.0	25	40	1.50	90
9	(- + + - -)	7.35	5.3	28	43	1.47	85
10	(- + - + -)	7.35	5.3	22	37	1.47	85
11	標的	7.50	5.0	25	40	1.50	90
12	(- + - + +)	7.35	5.3	22	43	1.53	95
13	標的	7.50	5.0	25	40	1.50	90
14	(+ + + - +)	7.65	5.3	22	37	1.47	95
15	標的	7.50	5.0	25	40	1.50	90
16	(+ - + - +)	7.65	4.7	22	43	1.47	95
17	標的	7.50	5.0	25	40	1.50	90
18	(- - + - +)	7.35	4.7	28	37	1.53	95
19	(- - + - -)	7.35	4.7	22	43	1.47	85
20	標的	7.50	5.0	25	40	1.50	90
21	(+ + + + + +)	7.65	5.3	28	43	1.53	95

表10

結果			
パターン	%酸性	%主	%塩基性
標的	16.72	58.38	24.89
(+---+-)	16.37	57.79	25.84
(++-++-)	16.44	57.84	25.72
標的	16.54	58.34	25.12
(--+--+)	16.22	59.20	24.58
標的	16.58	58.44	24.98
(++-+--)	16.60	58.58	24.81
標的	16.57	58.86	24.57
(-+---+)	16.29	59.37	24.33
(-+---+)	16.12	59.36	24.52
標的	16.34	58.45	25.20
(-+---++)	15.97	58.82	25.21
標的	16.70	58.16	25.14
(++-+--+)	16.62	57.94	25.44
標的	16.63	58.79	24.58
(+---++-+)	16.34	58.71	24.95
標的	16.54	59.05	24.41
(--+---+)	16.29	59.47	24.24
(---+--+)	16.21	59.32	24.48
標的	16.46	58.32	25.22
(++-+---+)	16.40	58.64	24.96

10

20

表11. 堅牢性の概要表

試験	条件	結果
多変量パラメーター： 溶媒A&BのpH, バッファーのモル濃度 (mM), カラム温度(℃), 流速 (mL/分), 注入量 (μL), 塩濃度 (mM)	評価する多変量計画 溶媒A&BのpH 7.5 ± 0.15 バッファー モル濃度 5 ± 0.3 mM カラム温度 40° ± 3°C 流速 1.50 ± 0.03 mL/分 注入量 25 ± 3 μg 塩濃度 90 ± 3 mM	有意な効果無し 主ピーク、酸性及び塩基性領域のピーク面積の割合について、全IECパラメーターにわたり、それぞれ1.2%、0.9%及び1.8%のRSD値
機器間及びカラムロットの変動性	2つの機器 (1 HPLC & 1 UPLC), 異なる樹脂ロットの2つのカラム、单一分析者	有意な効果無し。 主ピーク、酸性及び塩基性領域のピーク面積の割合について、2つ機器及び5つのカートリッジからそれぞれ、0.9%、1.0%及び2.3%のRSD値

30

40

## 【 0 3 0 2 】

## 統計解析

標的応答値のサンプルは、全ての可変因子が、標的条件においてである場合に生じる変動性を示す。要因応答値のサンプルは、多因子が組み合わせて可変される場合に生じる変動性を示す。

表.12

標的条件; (n=9)				要因条件; (n=11)		
	%酸性	%主ピーク	%塩基性	%酸性	%主ピーク	%塩基性
平均	16.5	58.5	24.9	16.3	58.6	24.8
SD	0.1	0.3	0.3	0.2	0.6	0.5
%RSD	0.70%	0.50%	1.23%	1.13%	1.06%	2.16%

## 【0303】

10

平均、標準偏差 (SD) 及び相対的標準偏差 (RSD) は、全ての標的及びD o E 要因応答値に対して計算された。僅かな違いが、標的条件と要因条件のアイソフォームのSDとRSDとの間で見られているが、それらは前例のないほどに低い。結果は図19～21に示される。

## 【0304】

I ECの検証のために典型的には、許容可能な%RSDの限界は次のとおりである：主ピークに対して<5%、酸性及び塩基性変異体に対して<10%。

## 【0305】

要因条件の全てが、標的条件の結果から算出される95/99許容差内にある%主ピークと%塩基性についての結果を生成する。

20

## 【0306】

2つの要因条件 #10 (- + - + -) 及び #12 (- + - + + +) が、標的条件の結果から計算される低い95/99TIの要求値以下の%酸性変異体値を生成した。その他全ての要因条件は、区間に内に値を生成した。

## 【0307】

標的条件の95/99TIを外れる値を生成した条件は、アッセイの高レベルの精度の結果であり、D o E 試験の範囲内の無制限の変動性（機器 & カラム）を制限した。

## 【0308】

I ECの正常な95/99TIは、主ピーク、酸性及び塩基性変異体に対して3～5%の範囲内とすることができる。

30

## 【0309】

## 材料と方法

タンパク質又は抗体の薬物物質の荷電変異体を定量するために、臨床製品の製剤又は毒性物質はプラットフォームメソッドコントロール (PMC) アプローチを用いる。プラットフォームメソッドコントロールアプローチは、この多生成物陽イオン交換クロマトグラフィー法におけるシステム適合性の決定のためのメソッドコントロールとして代表的な抗体を利用する。多生成物の試験手順は、正の正味電荷を有するタンパク質分子に適用できる（およそpI > 7.2で）。

## 【0310】

## 装置及び材料

40

1.1 HPLCシステム：調節可能なUV (TUV) を用いるWaters UPLC H-Class Bio; Waters 2487検出器を有するWaters Alliance 2695、及びWaters 2489 UV/VIS検出器又は装置を有するWaters Alliance e2695。

1.2 280nmでのモニタリングが可能なインラインUV検出器

1.3 HPLCは、セットポイント±2で温度を維持することができるカラムコンパートメントが含まれている必要がある。

1.4 電子積分器及びピーク面積積分が可能なコンピュータシステム。

1.5 2-8に冷却することが可能なオートサンプラー。

1.6 カラム：Thermo Fisher MabPac R SCX-10、10 μm

50

、4 250 mm (Thermo、製品番号074625)。

1.7 溫度補償付きpHメーター。

1.8 37 ± 2 で加熱が可能な水槽。

1.9 水槽中への部分的な浸漬での使用のために指定された、1分割で較正された温度計

【0311】

試薬

記：レシピは、試薬の名目上の量のためのもので、アッセイの要件に応じて比例的に調整することができる。

2.1 HPLC分析に適した精製水 (Super-Q又は同等物) 10

2.2 溶媒A：5 mM HEPESバッファー、pH 7.5 ± 0.1

HEPES Free Acid、試薬グレード (FW 238.3, Corning Cell Gro; 製品番号61-034-RO)、1.87 g

HEPES Sodium Salt、試薬グレード (FW 260.3, Sigma Aldrich; 製品番号H3784)、1.87 g

精製水 3 L にメスアップ

メスシリンダー中で約2900 mLの精製水により記載されている化学物質を混合する。溶解するまで攪拌する。精製水で3 LまでメスアップしpHを測定する。周囲温度でpHが7.5 ± 0.1であることを確認する。pH値が指定された範囲外にある場合、破棄し、調製を繰り返す。0.2 - μmの膜を通してろ過する。 20

2.3 溶媒B：溶媒A中100 mMの塩化ナトリウム

塩化ナトリウム (FW 58.44 J.T. Baker カタログ番号3624-01又は同等物)、5.844 g

溶媒A (工程2.2) 1 L にメスアップ

メスシリンダー中で約450 mLの溶媒Aにより塩化ナトリウムを混合させて、溶解するまで攪拌する。溶媒Aで1 L にメスアップし、0.2 - mの膜を通してろ過する。

2.4 溶媒C：溶媒A中1 Mの塩化ナトリウム

塩化ナトリウム (FW 58.44 J.T. Baker カタログ番号3624-01)、29.22 g

溶媒A (工程2.2)、500 mL にメスアップ

メスシリンダー中で約450 mLの溶媒Aにより塩化ナトリウムを混合させて、溶解するまで攪拌する。溶媒Aで500 mL にメスアップし、0.2 - mの膜を通してろ過する。 30

2.5 カラムストレージソリューション：溶媒B中0.05%アジ化ナトリウム、pH 7.5 ± 0.1

注意：アジ化ナトリウムは非常に毒性でかつ変異原性である。粉塵の吸入を避け、皮膚との接触を避ける（それは容易に皮膚から吸収される）。

アジ化ナトリウム (FW 65.01, EM Science 0066884 R又は同等物)、2.25 g；溶媒B (工程2.2)、500 mL にメスアップ

メスシリンダー中で約450 mLの溶媒Bによりアジ化ナトリウムを混合させて、溶解するまで攪拌する。溶媒Bで500 mL にメスアップし、0.22 - mの膜を通してろ過する。 40

2.6 カラム及びシステムクリーニング液：0.1 N 水酸化ナトリウム (JT Baker 5636-02)、以下の手順ごとに調製する：

1 N NaOH 100 μL

精製水 900 μL

記載されている化学物質を混合し、よく混ぜる。

2.7 サンプル及び標準品の処方バッファー

2.8 10%ポリソルベート20ストック (w/v)

ポリソルベート20 (ポリソルベート<sup>TM</sup> 20, Sigma Cat. P79

49又は同等物) 10 g、精製水、100 mL にメスアップ。

ポリソルベート 20 を釣り合い重りメスシリンダー中に計量する。界面活性剤とシリンダーの首との接触を避ける。気泡の形成を回避しながら、注意深く精製水で 100 mL にメスアップする。シリンダー内に磁気攪拌棒を穩やかに下げる。全ての界面活性剤が溶解するまで 15 ~ 20 分間溶液を攪拌する。

## 2.9 メソッドコントロール処方バッファー

MAb8 処方バッファー： 20 mM ヒスチジン HC1、120 mM スクロース、0.02 % ポリソルベート 20 、 pH 6.0 ± 0.3

L - ヒスチジン HC1、一水和物 (FW 209.6) 2.31 g

L - ヒスチジン、遊離塩基 (FW 155.2) 1.40 g

スクロース (FW 342.3) 41.08 g

10

ポリソルベート 20 0.20 g

又は 10 % ポリソルベート 20 (w/v) ストック溶液 2.0 mL

精製水 1.0 L にメスアップ

約 800 mL の精製水に記載されている化学物質を混合させて、溶解するまで攪拌する。pH が 6.0 ± 0.3 であることを確認する。pH 値が指定された範囲外にある場合、破棄し、調製を繰り返す。溶液を精製水で 1.0 L にメスアップする。0.45-mm p 膜を通してろ過する。

2.10 5 mg / mL カルボキシペプチダーゼ B、DFP 処理型 (Rochelle 103233) 又は同等物、およそ 150 U / mg の活性

2.11 1 mg / mL C p B

20

5 mg / mL カルボキシペプチダーゼ B、DFP 処理型 20 μL

精製水 80 μL

精製水中に 5 mg / mL のカルボキシペプチダーゼ B を正確に追加する。5 mg / mL 以外の購入されたカルボキシペプチダーゼ B の濃度について、容積への調整は 1 mg / mL の最終濃度を確保するようになされ得る。新しく調製する。

## 【0312】

メソッドコントロール、サンプル、リファレンス及び処方バッファーのプランクの調製

3.1 メソッドコントロール (MAb8)、名目濃度： 50 mg / mL

メソッドコントロールを溶媒 A (工程 2.2) で最終濃度がおよそ 2.0 mg / mL まで希釈する (例えば、50 mg / mL のメソッドコントロールに対して、40 μL のサンプル及び 960 μL の溶媒 A を混合する)。

30

## 3.2 メソッドコントロールプランク

メソッドコントロール処方バッファーを工程 3.1 に記載されるのと同一の希釈スキームを使用して溶媒 A で希釈する。

## 3.3 サンプル及び標準品の調製

サンプル及び標準品を溶媒 A で 2 mg / mL に希釈する。

## 3.3 サンプル及び標準品プランクの調製

3.4.1 工程 3.4 と同一の希釈スキームを使用して生成物用の処方バッファーを希釈する。

## 3.5 データシート上に希釈を記録する。

40

3.6 C p B 消化によるサンプル調製は、C p B 消化の必要性について、生成物特異的情報及び指示を言及する。

3.6.1 希釈されたメソッドコントロール、サンプル、標準品及び処方バッファー プランクへの 1 mg / mL の C p B (工程 2.12) の 1 % (w/w) 添加を行う (例えば、2.0 mg / mL のサンプルの 1000 L へ 1 mg / mL の C p B の 20 L を添加する)。

3.6.2 C p B 処理されたメソッドコントロール、サンプル、標準品及び処方バッファー プランクを 37 ± 2 で 20 ± 2 分間穩やかに攪拌しインキュベートする。

3.6.3 データシート上に調製を記録する。

3.7 希釈されたメソッドコントロール、標準品、サンプル及び処方バッファーブラ

50

ンクを分析用に適當なバイアルに移す。

3.8 HPLC 分析は、サンプル調製の48時間以内に完了しなければならない。サンプルは、分析前に2~8で保管されなければならない。

【0313】

クロマトグラフィー条件

4.1 両方のWatersのHPLC装置に共通のクロマトグラフィー条件：

4.1.1 流速：1.5 mL/分

4.1.2 オートサンプラー温度：5±3

4.1.3 カラム温度：40±2°C

4.1.4 UV検出波長：280 nm

4.1.5 注入量：25 L (~50 g)

4.2 WatersのAcuity H-class UPLC及び多波長又はダイオードアレイ検出器のための機器の設定

4.2.1 原点オフセットアナログアウトプット：5%

4.2.2 減衰アナログ出力：500 mA U

4.2.3 洗浄設定：ニードル洗浄による注入(10%のIPA)

注入前 10 s

注入後 20 s

4.2.4 吸引及び分注速度：100 μL/分

4.2.5 加速 2.0 mL/分/0.02分(100 mL/分/分)

4.2.6 検出器設定：

4.2.6.1 サンプリングレート：1 pt/秒

4.2.6.2 フィルター：ハミング

4.2.6.3 時定数 1.0

4.2.6.4 比率最小 最小比率 0.00 最大比率 2.00

4.2.6.5 オートゼロ チャンネルA：(時間0及び時間50)

4.2.6.6 感度：2.000 AUFS

4.3 Waters 2487を備えたWaters Alliance(e) 26

9.5 HPLCの機器設定

4.3.1 行程容積：100 μL

30

4.3.2 ニードル洗浄時間：延長される(10% IPA)

4.3.3 溶媒脱気：「on」モードに設定

4.3.4 加速 10.0 mL/分/0.1分(100 mL/分/分)

4.3.5 吸引及び分注速度：低(50 μL/分)

4.3.6 検出器設定：

4.3.6.1 サンプリングレート：1 pt/秒

4.3.6.2 フィルター：ハミング

4.3.6.3 時定数 1.0

4.3.6.4 比率の最小 0.1000

4.3.6.5 オートゼロ 時間0及び時間50でチャンネルA

40

4.3.6.6 感度：2.000 AU

4.4 勾配：

表. 13

時間 (分)	% A	%B	%C	流速 (mL/分)
0.0	100	0.0	0.0	1.5
3.0	100	0.0	0.0	1.5
37.0	10.0	90.0	0.0	1.5
37.1	0.0	0.0	100	1.5
40.0	0.0	0.0	100	1.5
40.1	100	0.0	0.0	1.5
50.0	100	0.0	0.0	1.5

10

## 【0314】

## 機器の調整

5.1 HPLC を使用するための適切なプロトコルに従う

5.2 10%IPA によるニードル洗浄線を含む、適切な溶媒の ~ 20mL によるプライムライン 20

## 【0315】

## カラムの洗浄及び調整

6.1 以下の均一濃度プログラムを使用して、システム及びカラム洗浄を行う。  
0.1NのNaOH 100 μLを注入する。

表. 14

時間 (分)	流速 (mL/分)	%溶媒B	%溶媒B
0	1.5	50	50
3	1.5	50	50

30

6.2 工程 6.1 を少なくとも 5 回繰り返す。

6.3 工程 6.1 で均一濃度プログラムを使用して、溶媒 A の 100 μL の単回注入を行う。

6.4 工程 4.4 における勾配プログラムの初期条件で ~ 20 分間、又は安定したベースラインが観察されるまでカラムを平衡化する (1.5 mL / 分で 100% 溶媒 A)。

## 【0316】

40

## 注入プロトコル

7.1 調整：一貫性のあるクロマトグラムが最低 2 回の注入に対して観察されるまで C p B 消化せずにメソッドコントロールを注入する。酸性領域、メインピーク及び塩基性領域の分解能は、典型的なクロマトグラムと目視で一致していかなければならない。

7.2 C p B 消化をしないプラットフォームメソッドコントロール ( 単回注入 )

7.3 メソッドコントロールのための処方バッファーブランク

7.4 標準品 \* ( 単回注入 )

7.5 サンプル ( 複数 ) \* ( 重複注入 )

7.6 標準品 \* ( 単回注入 )

50

7.7 標準品(複数)のための処方バッファーブランク(複数)(単回注入)

7.8 CpB消化をしないプラットフォームメソッドコントロール(単回注入)

)

\*生成物が保証される場合、CpBの有無にかかわらない。

記：1) 処方バッファーが標準品によって異なる場合、標準品とサンプル用に別のブランクを注入する。

2) メソッドコントロールが必要とされている間に、15以上の注入の場合(標準品と各生成物処方バッファーブランク製剤バッファーブランクを含む)、メソッドコントロール注入による15回の注入ごとにひとまとめにする。試験データシートのシステム適合性セクションでは、報告されているサンプルをひとまとめにするメソッドコントロール注入のみ報告する。

3) 標準品はサンプルとみなされ、試験セッションのシステム適合性を評価するためには使用されない。

#### 【0317】

##### カラムのシャットダウン及びストレージ

カラムストレージソリューション(工程2.4)の少なくとも30mLでカラムを洗浄することにより、カラムを格納する。

#### 【0318】

##### システム適合性

記：メソッドコントロールのため、メソッドコントロール処方バッファーをブランクとメソッドコントロールプロファイルを重ねることによって、積分エンドポイントを決定する。重ねプロファイルを展開し、メソッドコントロールプロファイルにブランクを比較することにより、積分エンドポイントを同定する。

9.1 タンパク質に起因する全てのピークを積分する。メソッドコントロール処方バッファーブランククロマトグラム中に存在する任意のピークは、ブランクにおける対応するピークが、PMCにおけるピークの<1%である場合を除き、含めない。

9.2 ひとまとめにするメソッドコントロール注入のクロマトグラムプロファイルの、お互いに及び典型的なクロマトグラフィープロファイルとの整合性を視覚的に確認する。典型的なクロマトグラムにおける全ての命名されたピークが存在している必要がある。

記：命名されたピークのプロファイルは、カラム及び機器の変動性に起因して、例のプロファイルからピーク形状が多少異なる場合がある。

9.3 各ひとまとめにするメソッドコントロール注入について主ピーク、酸性領域及び塩基性領域の割合を計算する。

#### 9.4 システム適合性の範囲

表15. 非CpB処理型メソッドコントロールの許容されるシステム適合性の範囲

	酸性領域	主ピーク	塩基性領域
%ピーク面積の許容される範囲	15.5及び17.7	55.5及び61.4	21.3及び28.6

20

30

40

9.5 システム適合性データシートに結果を記録する。

#### 【0319】

##### データ分析

10.1 サンプル及び標準品のクロマトグラムの両方においてピークを同定するためにプロファイルを視覚的に比較する。

10.2 タンパク質に起因する全てのピークを積分する。生成物処方バッファーブランククロマトグラム中に存在する任意のピークは、ブランクにおける対応するピークが、PMCにおけるピークの<1%である場合を除き、含めない。

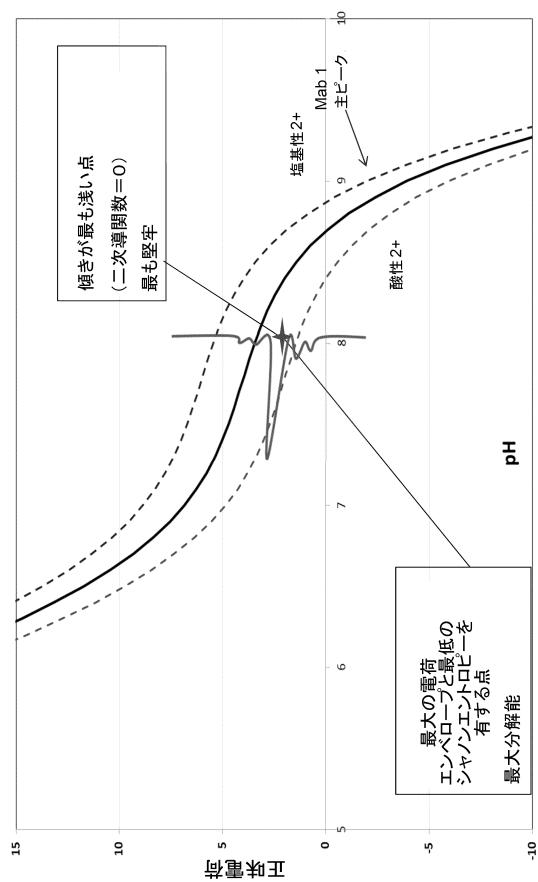
記：積分エンドポイントを決定するために、サンプル及び標準品プロファイルを生成物処

50

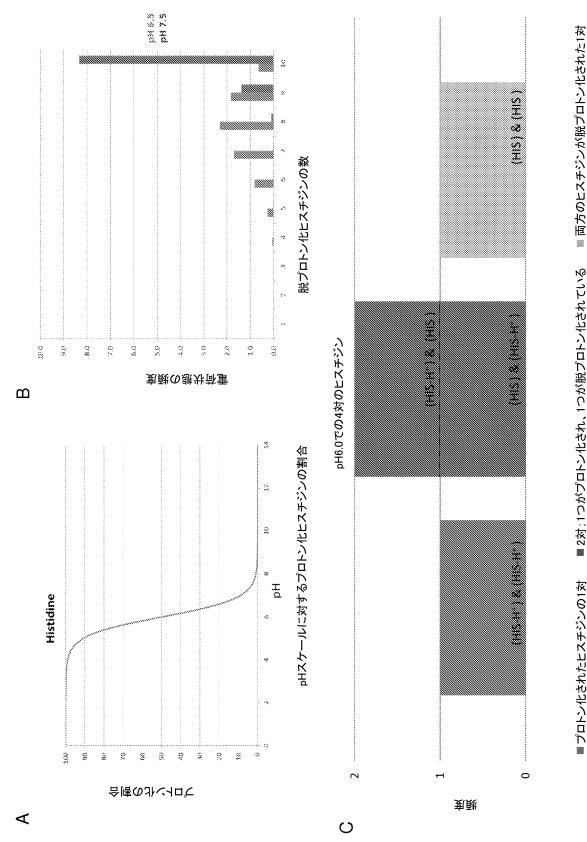
方バッファーブランクと重ね合わせる。重ねプロファイルを展開し、生成物処方バッファーブランクをサンプル及び標準品プロファイルと比較することにより、積分エンドポイントを同定する。

10.3 主ピークのピーク面積、酸性領域及び塩基性領域の割合を計算するために各サンプル及び標準品注入を分析する。

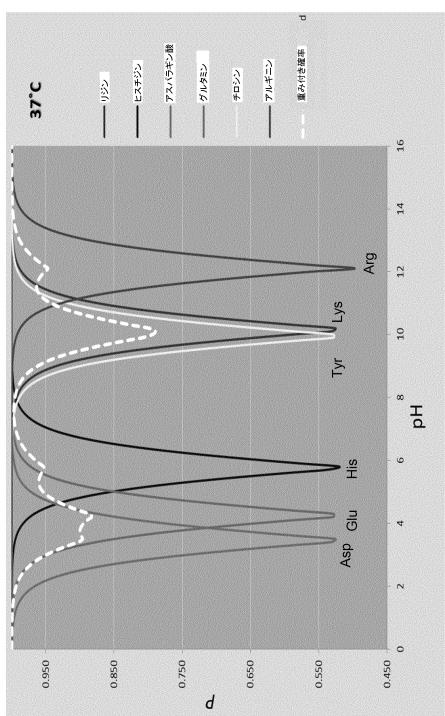
【図1】



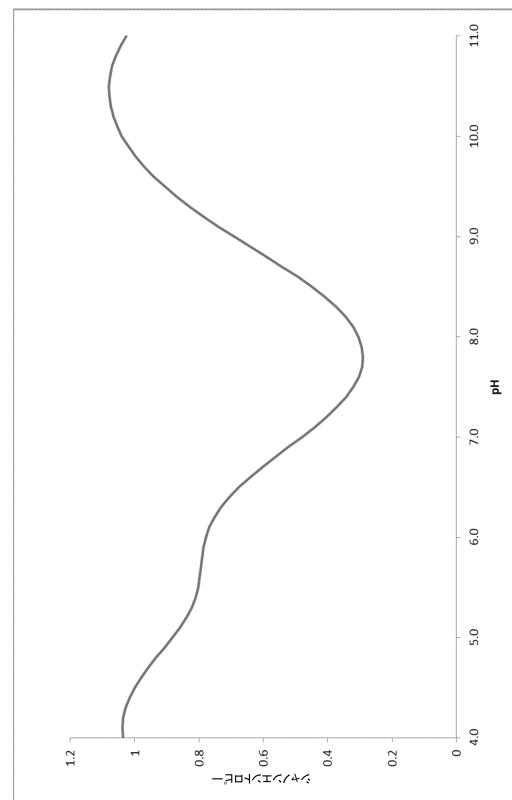
【図2】



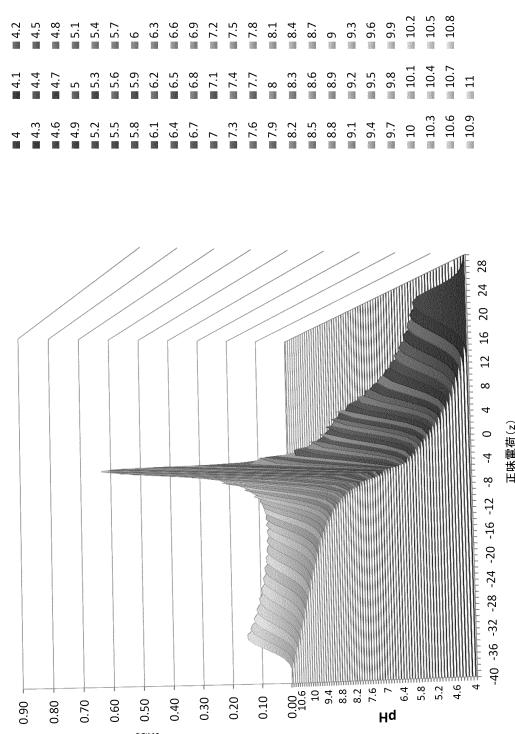
【図3】



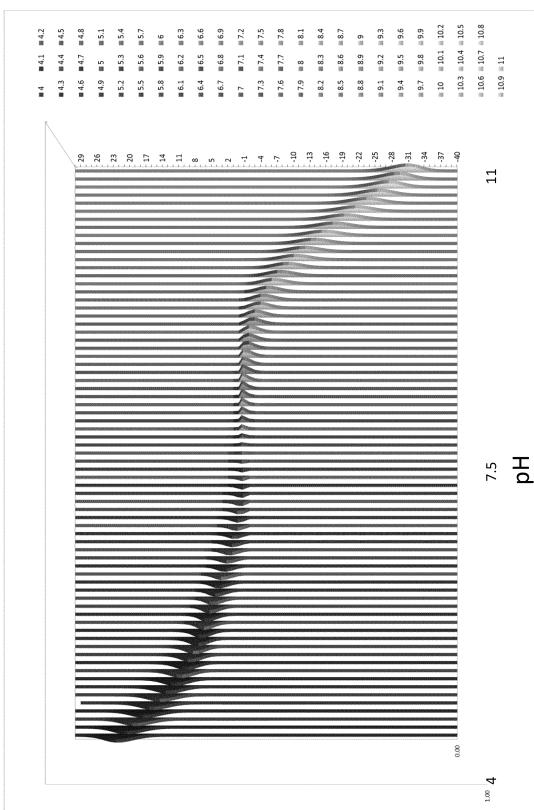
【図4】



【図5】

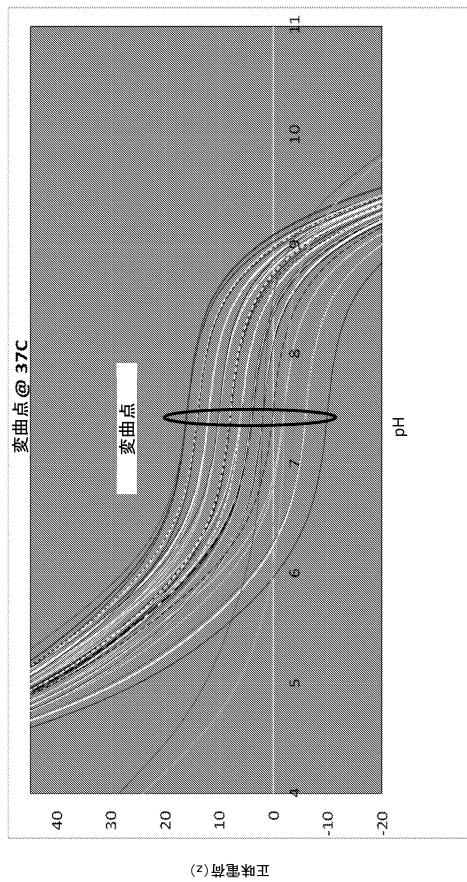


【図6】

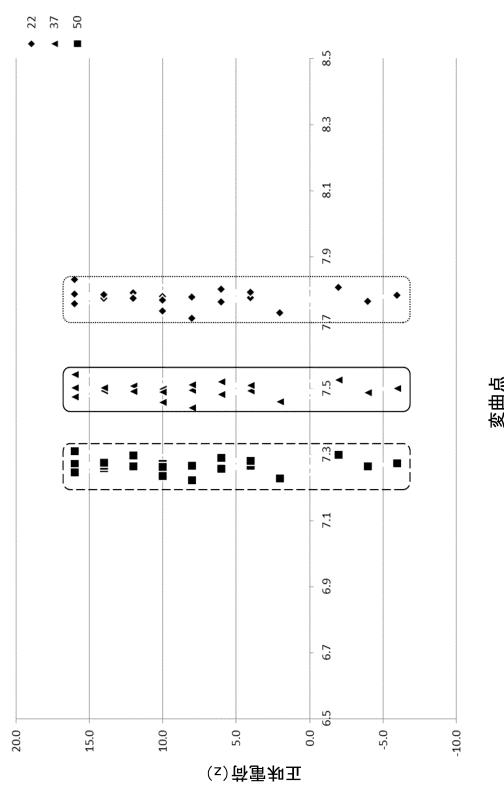


正味電荷(z)

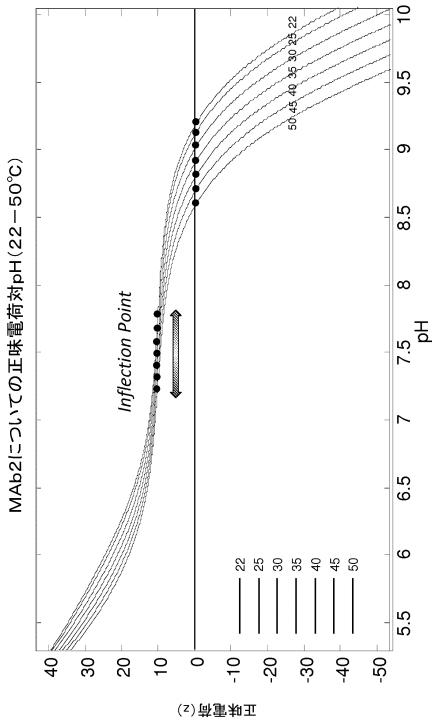
【図7】



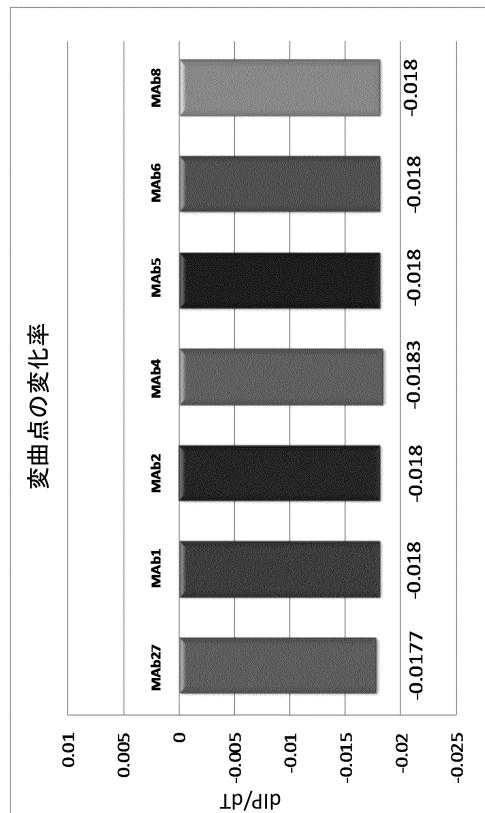
【図8】



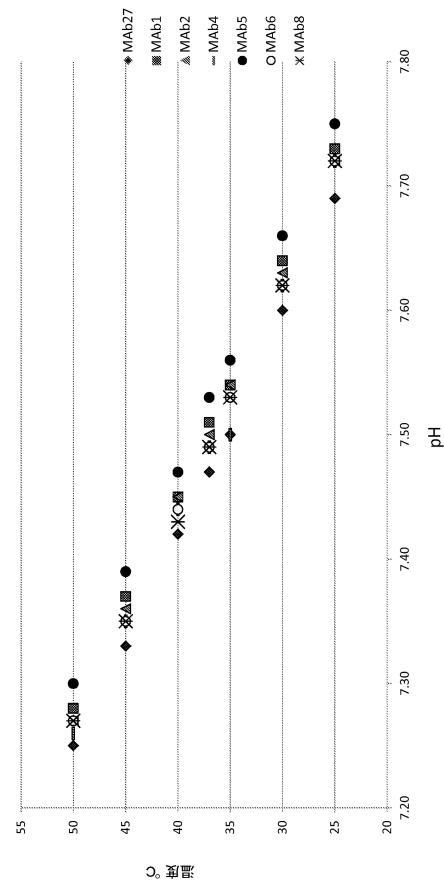
【図9】



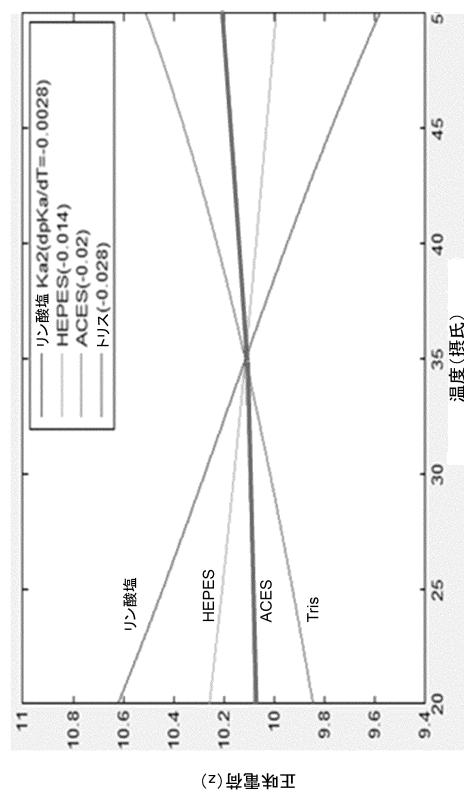
【図10A】



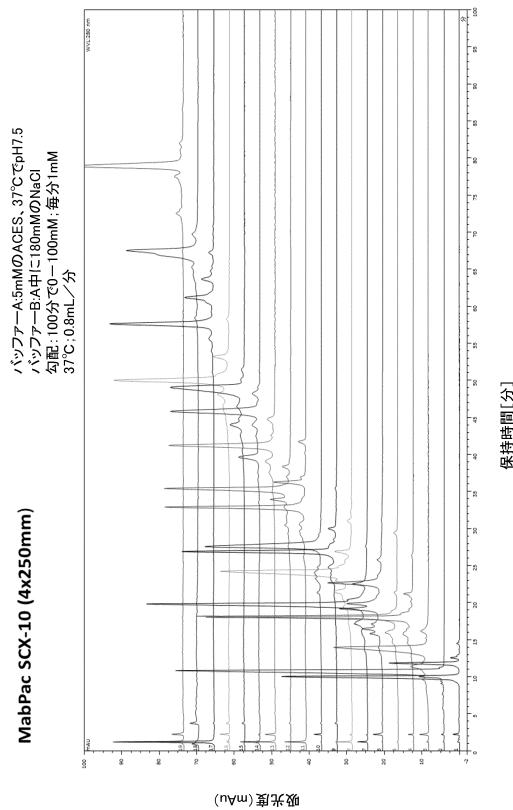
【図10B】



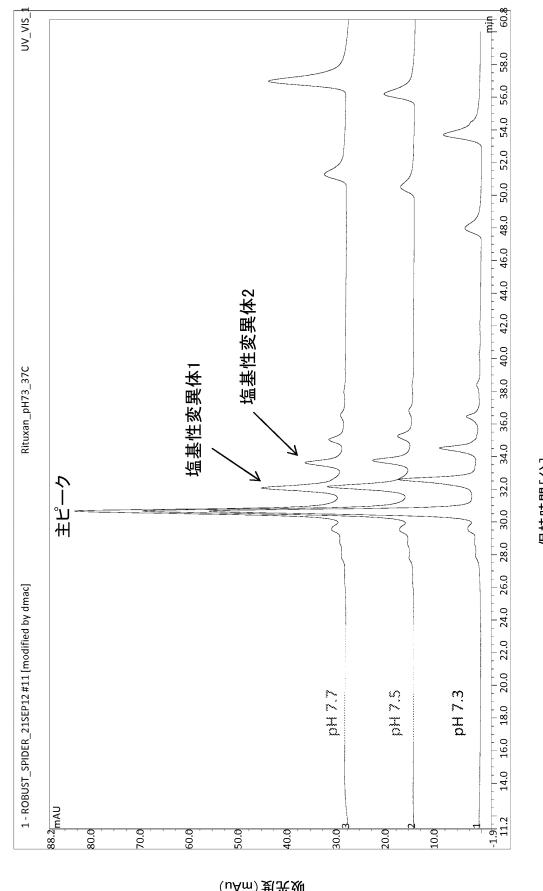
【図11】



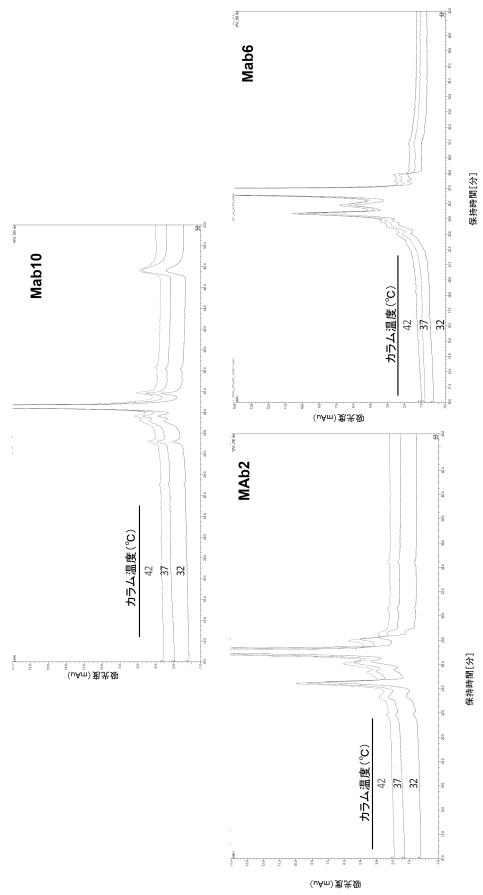
【図12】



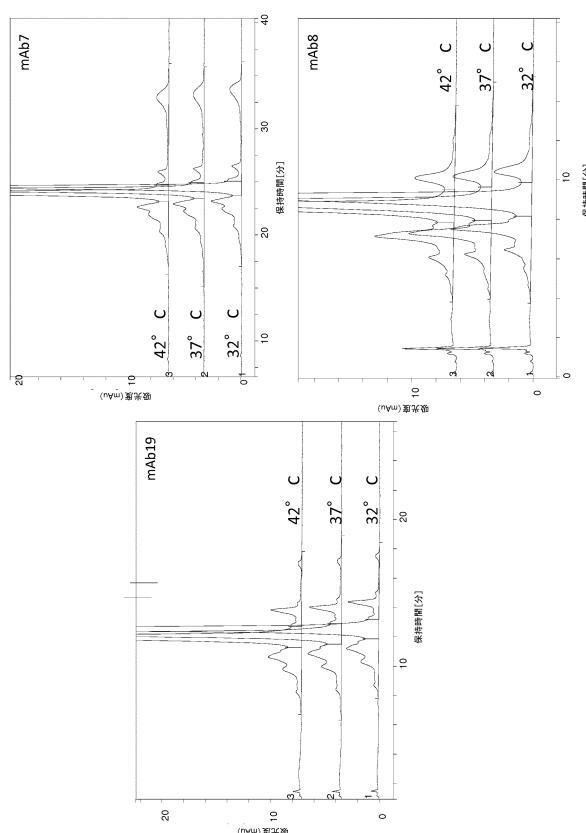
【図13】



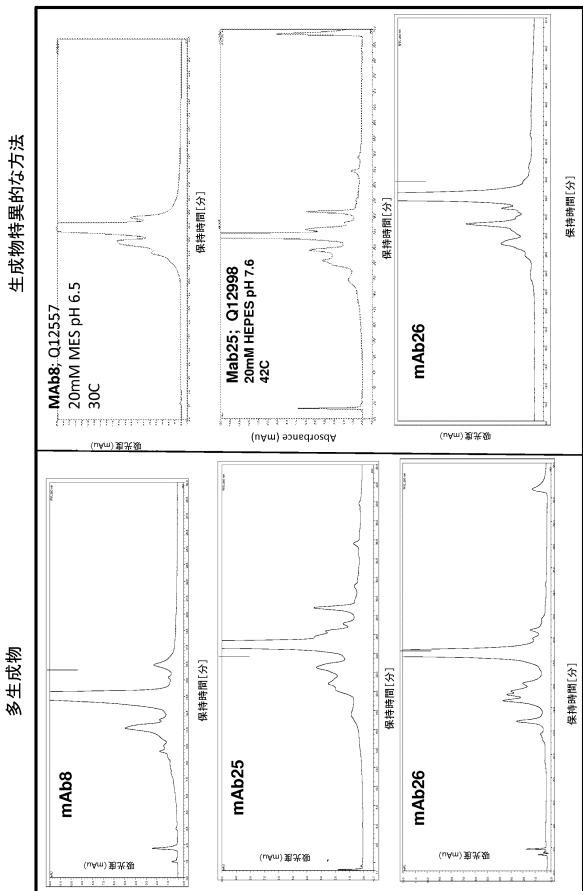
【図14】



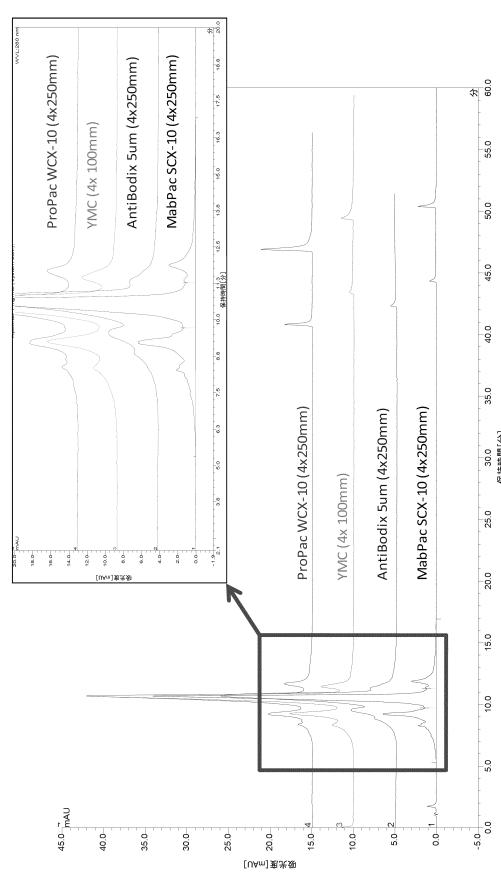
【図15】



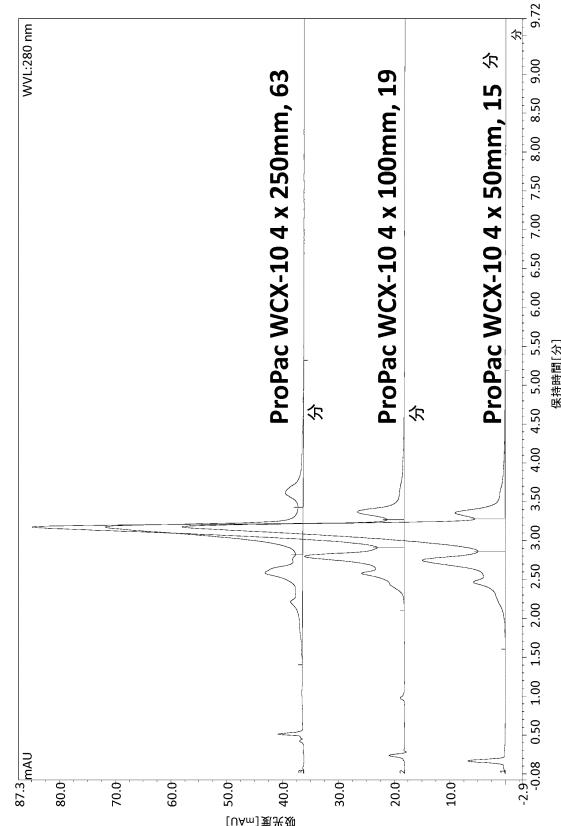
【図16】



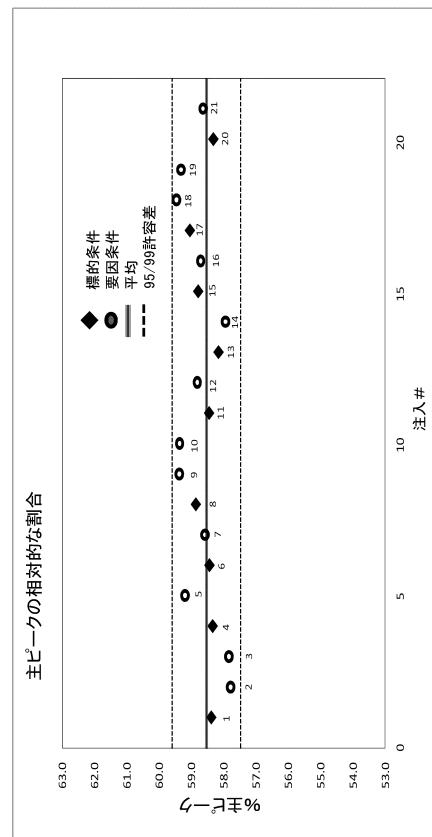
【図17】



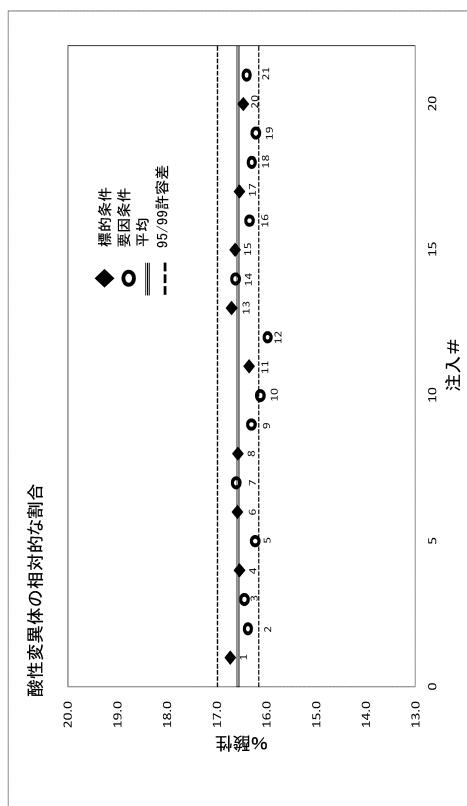
【図 1 8】



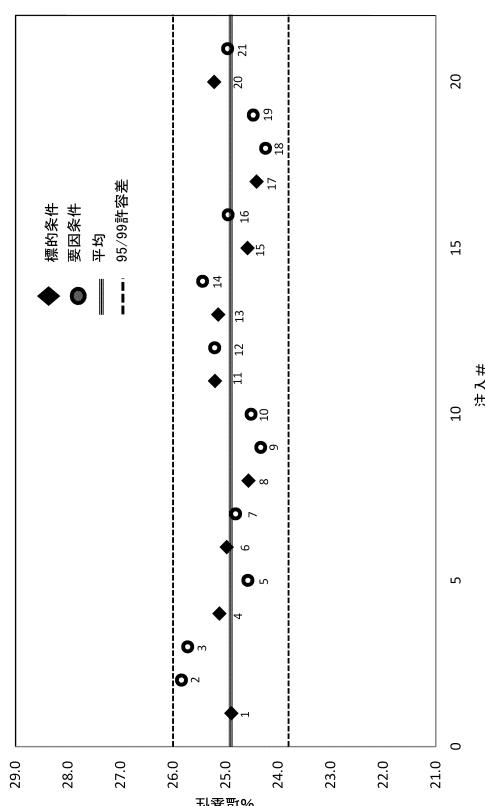
【図 1 9】



【図 2 0】



【図 2 1】



塩基性変異体の相対的な割合

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 C 07K 16/46 (2006.01) C 07K 16/00  
 C 07K 16/46

(72)発明者 パタボフ, トーマス  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080-4990, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド  
 (72)発明者 ワン, ヤーチュン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080-4990, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

審査官 高田 亜希

(56)参考文献 特表2008-503725 (JP, A)  
 特開2006-087394 (JP, A)  
 特表2012-519706 (JP, A)  
 特開2005-068161 (JP, A)  
 国際公開第2012/129680 (WO, A1)  
 特表2007-500852 (JP, A)  
 特表2010-504080 (JP, A)  
 特表2007-538260 (JP, A)  
 特表2002-529714 (JP, A)  
 特開昭63-263457 (JP, A)  
 特表2007-536218 (JP, A)  
 国際公開第2012/102104 (WO, A1)  
 特表2013-500244 (JP, A)  
 国際公開第2011/009623 (WO, A1)  
 AHAMED; NFOR T; VERHAERT B K; VAN DEDEM P D E M; VAN DER WIELEN G W K; EPPINK L A M E T AL, PH-GRADIENT ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY: AN ANALYTICAL TOOL FOR DESIGN AND OPTIMIZATION OF PROTEIN SEPARATIONS, JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V, 2007年 8月23日, VOL:1164 NR:1-2, PAGE(S):181 - 188, U R L, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.07.010>  
 GE HEALTHCARE, ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY & CHROMATOFOCUSING PRINCIPLES AND METHODS I ON EXCHANGE CHROMATOGRAPHY & CHROMATOFOCUSING - PRINCIPLES AND METHODS IMAGINATION AT WORK, [ONLINE], 2010年, U R L, <http://www.biocompare.com/10200-Biochemistry-Books/133287-Ion-Exchange-Chromatography-Chromatofocusing-Principles-and-Methods/>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 G 01 N 30/00 - 30/93  
 C 07 K 1/00 - 19/00  
 B 01 D 15/00 - 15/42  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )