

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-19805

(P2017-19805A)

(43) 公開日 平成29年1月26日(2017.1.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 1/18 (2006.01)	C O 7 K 1/18	4 H O 4 5
C O 7 K 16/00 (2006.01)	C O 7 K 16/00	

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 65 頁)

(21) 出願番号	特願2016-151624 (P2016-151624)	(71) 出願人	591003013
(22) 出願日	平成28年8月2日 (2016.8.2)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(62) 分割の表示	特願2013-558420 (P2013-558420)		F. HOFFMANN-LA ROCH
	の分割		E AKTIENGESSELLSCHAF
原出願日	平成24年3月14日 (2012.3.14)		T
(31) 優先権主張番号	11158523.8		スイス・シーエイチー4070バーゼル・
(32) 優先日	平成23年3月16日 (2011.3.16)		グレンツアーヘルストラツセ124
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100102978
			弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 移動相の調整によって、ポリペプチド単量体、凝集物およびフラグメントを分離するための選択性を向上させた、イオン交換クロマトグラフィー

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 イオン交換クロマトグラフィーを用いてポリペプチド単量体、凝集物およびフラグメントを分離するための方法の提供。

【解決手段】 ポリ(エチレングリコール)と、ソルビトール、キシリトール、グリセロール、グリシン、ベタイン、プロリン、フルクトース、グルコース又はスクロースより選択される1種又はそれ以上の添加剤とを含む溶液を、IgGクラスの抗体が吸着されたカチオン交換クロマトグラフィー材料にアプライする工程であって、単量体形態の前記IgGクラスの抗体が前記カチオン交換クロマトグラフィー材料に吸着されたままである工程、並びに前記ポリ(エチレングリコール)と前記1種またはそれ以上の前記添加剤とを含む溶液をアプライすることによって回収する工程を含む、前記単量体形態のIgGクラスの抗体を産生するための方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- ポリ(エチレングリコール)と、ソルビトール、キシリトール、グリセロール、グリシン、ベタイン、プロリン、フルクトース、グルコース、およびスクロースを含む群より選択される1種またはそれ以上の添加剤とを含む溶液を、IgGクラスの抗体が吸着されたカチオン交換クロマトグラフィー材料にアプライする工程であって、単量体形態のIgGクラスの抗体がカチオン交換クロマトグラフィー材料に吸着されたままである、工程、ならびに

- ポリ(エチレングリコール)と前記1種またはそれ以上の添加剤とを含む溶液をアプライすることによって、カチオン交換クロマトグラフィー材料から単量体形態のIgGクラスの抗体を回収する工程

を含む、単量体形態のIgGクラスの抗体を産生するための方法であって、ポリ(エチレングリコール)ポリマーが、約5～15重量%の濃度を有し、かつ/または前記添加剤が、3～25重量%の濃度を有する、方法。

10

【請求項 2】

- ポリ(エチレングリコール)と、ソルビトール、キシリトール、グリセロール、グリシン、ベタイン、プロリン、フルクトース、グルコース、およびスクロースを含む群より選択される1種またはそれ以上の添加剤とを含む溶液を、IgGクラスの抗体が吸着されたカチオン交換クロマトグラフィー材料にアプライする工程であって、単量体形態のIgGクラスの抗体がカチオン交換クロマトグラフィー材料に吸着されたままである、工程、ならびに

- ポリ(エチレングリコール)と、ソルビトール、キシリトール、グリセロール、グリシン、ベタイン、プロリン、フルクトース、グルコース、およびスクロースを含む群より選択される1種またはそれ以上の添加剤と、溶出化合物とを含む溶液をアプライすることによって、カチオン交換クロマトグラフィー材料から単量体形態のIgGクラスの抗体を回収し、それによって、宿主細胞タンパク質含量を低減させたIgGクラスの抗体調製物を産生する工程

を含む、宿主細胞タンパク質含量を低減させたIgGクラスの抗体調製物を産生するための方法であって、ポリ(エチレングリコール)が、約5～15重量%の濃度を有し、かつ/または前記添加剤が、3～25重量%の濃度を有する、方法。

20

【請求項 3】

ポリ(エチレングリコール)が約7～13重量%の濃度を有し、かつ/または前記添加剤が3～25重量%の濃度を有することを特徴とする、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 4】

ポリ(エチレングリコール)が約7～13重量%の濃度を有し、かつ/または前記添加剤が12～25重量%の濃度を有することを特徴とする、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

ポリ(エチレングリコール)が約7～13重量%の濃度を有し、かつ/または前記添加剤が12～20重量%の濃度を有することを特徴とする、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

ポリ(エチレングリコール)が約3,500 Da±20%の分子量を有することを特徴とする、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 7】

前記添加剤がソルビトールであることを特徴とする、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

単量体形態の抗体が100 kDa～200 kDaの分子量を有することを特徴とする、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

- ポリ(エチレングリコール)と、ソルビトール、キシリトール、グリセロール、グリシン、ベタイン、プロリン、フルクトース、グルコース、およびスクロースを含む群より選

50

択される1種またはそれ以上の添加剤とを任意で含む第1の溶液を、カチオン交換クロマトグラフィー材料にアプライし、それによって該材料を平衡化する工程、

- 平衡化した該クロマトグラフィー材料にIgGクラスの抗体を含む溶液をアプライし、それによって該クロマトグラフィー材料にロードする工程、

- ポリ(エチレングリコール)と、ソルビトール、キシリトール、グリセロール、グリシン、ベタイン、プロリン、フルクトース、グルコース、およびスクロースを含む群より選択される1種またはそれ以上の添加剤とを含む溶液を、該クロマトグラフィー材料にアプライし、それによって、単量体形態のIgGクラスの抗体を該クロマトグラフィー材料から脱着/溶出することにより、単量体形態のIgGクラスの抗体を産生する工程

をさらに含むことを特徴とする、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書には、イオン交換クロマトグラフィーを用いてポリペプチド単量体、凝集物およびフラグメントを分離するための方法であって、回収工程において非イオン性ポリマーと添加剤とが移動相に添加される方法が、報告される。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

タンパク質、特に免疫グロブリンは、今日の医療ポートフォリオにおいて重要な役割を果たしている。医薬用途で使用するためのポリペプチドは主に、CHO細胞、NS0細胞、Sp2/O細胞、COS細胞、HEK細胞、BHK細胞、PER.C6(登録商標)細胞などの哺乳動物細胞において産生されている。

20

【0003】

それらの化学的および物理的性質、例えば分子量および二次修飾を含むドメイン構造に起因して、免疫グロブリンの下流処理は非常に複雑である。例えば、製剤化される薬物についてだけでなく、下流処理(DSP)での中間体についても、濃縮溶液は経済的取扱いおよび適用貯蔵のために低容量を達成することが必要とされる。バイオテクノロジーにより産生された免疫グロブリンの下流処理は通常、次の3つのクロマトグラフィー工程を含む：免疫グロブリン以外の分子を取り除くための、例えばプロテインAを用いる、最初のアフィニティクロマトグラフィー工程と、これに続く2つのイオン交換クロマトグラフィー工程。精製された免疫グロブリンは低濃度の溶液として得られ、抗体を薬学的製剤に製剤化する前に濃縮工程を必要とする。IgGをはじめとする多くのタンパク質は二量体、オリゴマー、またはより高次の凝集物を形成する。必要な純度の治療用タンパク質製品を提供するためには、これらの分子種は精製プロセスによって除去されなければならない。

30

【0004】

さまざまな方法がタンパク質の精製のために十分に確立されて、広く使用されている(Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102 (非特許文献1))。Zhou, J.X.ら(J. Chrom. A 1175 (2007) 69-80) (非特許文献2)は、プロセススケールのモノクローナル抗体精製のためのpH-導電率ハイブリッド勾配カチオン交換クロマトグラフィーを報告している。イオン交換クロマトグラフィーの使用による抗体単量体のその多量体からの分離は、EP 1 084 136 (特許文献1)に報告されている。US 5,429,746 (特許文献2)は、疎水性相互作用クロマトグラフィーの組合せクロマトグラフィーを抗体分子タンパク質の精製に適用することに関する。

40

【0005】

カラムクロマトグラフィーの溶媒調整は、Arakawa, T.らによってProt. Pep. Lett. 15 (2008) 544-555 (非特許文献3)中に報告されている。EP 1 729 867 (特許文献3)には、クロマトグラフィー精製のための方法が報告されている。ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる抗体凝集物の除去は、Gagnon, P.とBeam, K.によってCurr. Pharm. Biotechnol. 10 (2009) 440-446 (非特許文献4)中に報告されている。J. Immunol. Meth.

50

(336 (2008) 222-228) (非特許文献5) 中で、Gagnon, P. は、ポリエチレングリコールの存在下でのヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる改善された抗体凝集物除去を報告している。WO 2004/013162 (特許文献4) には、ポリエチレングリコールの添加によるイオン交換クロマトグラフィーの動的結合能力の増加が報告されている。WO 2005/094960 (特許文献5) には、クロマトグラフィー精製のための方法が報告されている。水溶性の非イオン性有機ポリマーの存在下での混合モードクロマトグラフィーによる抗体の結合能力および精製の向上は、WO 2008/086335 (特許文献6) に報告されている。WO 2009/149067 (特許文献7) には、抗体の精製方法が報告されている。

【0006】

Milby, K.H. らは、タンパク質のイオン交換クロマトグラフィーならびに移動相中の中性ポリマーの効果を報告している(J. Chrom. 482 (1989) 133-144 (非特許文献6))。Biotechnology Techniques (12 (1998) 289-293) (非特許文献7) 中で、Feng, X-L. らは、ポリエチレングリコールがイオン交換クロマトグラフィーにおいて組換えヒト腫瘍壊死因子の精製を向上させることを報告している。移動相に有機ポリマーを添加することによってイオン交換クロマトグラフィーの優れた選択性を得るための方法は、Gagnon, P. ら(J. Chrom. 743 (1996) 51-55) (非特許文献8) によって報告されている。Gagnon, P. は、validated.com (<http://www.validated.com/revalbio/pdf/files/ionslect.pdf>) (非特許文献9) 上のインターネット記事中でイオン交換体に対する選択性の微調整を報告している。WO 2009/149067 (特許文献7) には、抗体を精製するための方法が報告されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】EP 1 084 136

【特許文献2】US 5,429,746

【特許文献3】EP 1 729 867

【特許文献4】WO 2004/013162

【特許文献5】WO 2005/094960

【特許文献6】WO 2008/086335

【特許文献7】WO 2009/149067

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102

【非特許文献2】Zhou, J.X. et.al., J. Chrom. A 1175 (2007) 69-80

【非特許文献3】Arakawa, T. et al., Prot. Pep. Lett. 15 (2008) 544-555

【非特許文献4】Gagnon, P. and Beam, K., Curr. Pharm. Biotechnol. 10 (2009) 440-446

【非特許文献5】Gagnon, P., J. Immunol. Meth. (336 (2008) 222-228)

【非特許文献6】Milby, K.H. et.al., J. Chrom. 482 (1989) 133-144

【非特許文献7】Feng, X-L. et.al., Biotechnology Techniques (12 (1998) 289-293)

【非特許文献8】Gagnon, P. et.al., J. Chrom. 743 (1996) 51-55

【非特許文献9】validated.com (<http://www.validated.com/revalbio/pdf/files/ionslect.pdf>)

【発明の概要】

【0009】

カチオン交換クロマトグラフィーにおいて、高いPEG濃度を特定の添加剤(溶解促進剤)の存在下で使用すると、例えばPEGのみを用いる方法に比べて、選択性を調整し、かつ抗体の単量体種と凝集物種の分離度を向上させることができることが見出された。

【0010】

本明細書には、単量体形態の関心対象ポリペプチドを、凝集形態の関心対象ポリペプチドなどの他の成分から単離する、または取得する、または取り出すための、少なくとも1

10

20

30

40

50

つのクロマトグラフィー工程を含む方法が報告される。一態様において、方法は、関心対象のポリペプチドを含む溶液をカチオン交換クロマトグラフィー材料と接触させる工程を含み、ここで、クロマトグラフィー材料との接触工程は非イオン性ポリマーおよび添加剤の非存在下で行われ、かつ回収工程は非イオン性ポリマーおよび添加剤の存在下で行われる。

【0011】

本明細書に報告される方法では、追加の添加剤を使用することによって、非イオン性ポリマーの効果を向上させることができることが見出された。

【0012】

本明細書に報告される一局面は、

- 非イオン性ポリマーと添加剤とを含む溶液を、抗体が吸着されたクロマトグラフィー材料にアプライする工程であって、単量体形態の抗体がイオン交換クロマトグラフィー材料に吸着されたままである、工程、ならびに、

- 非イオン性ポリマーと添加剤と溶出化合物とを含む溶液をアプライすることによって、イオン交換クロマトグラフィー材料から単量体形態の抗体を回収し、それによって単量体形態の抗体を産生する工程

を含む、単量体形態の抗体を産生するための方法である。

【0013】

本明細書に報告される別の局面は、

- 非イオン性ポリマーと添加剤とを含む溶液を、ポリペプチドが吸着されたクロマトグラフィー材料にアプライする工程であって、単量体形態のポリペプチドがイオン交換クロマトグラフィー材料に吸着されたままである、工程、および

- 非イオン性ポリマーと添加剤と溶出化合物とを含む溶液をアプライすることによって、イオン交換クロマトグラフィー材料から単量体形態のポリペプチドを回収し、それによって宿主細胞タンパク質含量を低減させたポリペプチド調製物を産生する工程

を含む、宿主細胞タンパク質含量を低減させたポリペプチド調製物を産生するための方法であって、

該調製物は、哺乳動物細胞の培養上清、特にCHO細胞の培養上清から得られるものである。

【0014】

本明細書に報告される一局面は、

- 添加剤が存在しない溶液中で、ポリペプチドの50%未満が溶液中に溶解して残存する非イオン性ポリマーの濃度を決定する工程、および

- 前工程で決定された濃度の非イオン性ポリマーが存在する溶液中で、ポリペプチドの95%超が溶液中に溶解して残存する添加剤の濃度を決定する工程

を含む、ポリペプチドのイオン交換クロマトグラフィーで使用するための非イオン性ポリマーおよび添加剤の濃度を決定するための方法であって、

それによって非イオン性ポリマーおよび添加剤の濃度を決定する。

【0015】

本明細書に報告される一局面は、

- 非イオン性ポリマーと添加剤と溶出化合物とを含む溶液をアプライすることによって、イオン交換クロマトグラフィー材料から単量体形態の抗体を回収し、それによって単量体形態の抗体を産生する工程

を含む、単量体形態の抗体を産生するための方法であって、

ここで、クロマトグラフィーの分離効率(分離度)は、非イオン性ポリマーの非存在下でのクロマトグラフィーに比べて向上し、かつ

非イオン性ポリマーの採用された濃度により、添加剤の非存在下において、抗体の部分的または完全な沈殿がもたらされる。

【0016】

一態様において、イオン交換クロマトグラフィー材料はカチオン交換クロマトグラフィー

10

20

30

40

50

ー材料である。

【0017】

一態様において、非イオン性ポリマーは、ポリ(エチレングリコール)(PEG)、ポリ(プロピレングリコール)(PPG)、PEG-PPGコポリマー、およびポリ(オキシエチレン)(ポリ(エチレンオキシド))で挟まれたポリ(オキシプロピレン)(ポリ(プロピレンオキシド))から構成されるトリブロックコポリマーを含む群より選択される。さらなる態様では、非イオン性ポリマーはポリ(エチレングリコール)である。

【0018】

一態様において、添加剤は、両性イオン、アミノ酸、尿素、尿素誘導体、両性電解質、CHAPSO、天然物、糖類、およびポリオールを含む群より選択される。さらなる態様では、添加剤はソルビトールである。

10

【0019】

一態様において、非イオン性ポリマーは約5~15重量%の濃度を有し、かつ/または添加剤は3~25重量%の濃度を有する。

【0020】

一態様において、ポリペプチドはIgG、IgD、IgE、またはIgAクラスの抗体である。別の態様では、ポリペプチドはIgGクラスのIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4サブクラスの抗体である。

【0021】

一態様において、方法は、

20

- 非イオン性ポリマーと添加剤とを任意で含む第1の溶液をイオン交換クロマトグラフィー材料にアプライし、それによってイオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化する工程、

- 平衡化したクロマトグラフィー材料にポリペプチドを含む緩衝溶液をアプライし、それによってポリペプチドをクロマトグラフィー材料に吸着させる工程であって、該溶液が非イオン性ポリマーおよび添加剤を本質的に含まない、工程、

- 非イオン性ポリマーと添加剤とを含む緩衝溶液をクロマトグラフィー材料にアプライする工程であって、単量体形態のポリペプチドがイオン交換クロマトグラフィー材料に吸着されたままである、工程、および

- 非イオン性ポリマーと添加剤と溶出化合物とを含む溶液をアプライすることによって、イオン交換クロマトグラフィー材料から単量体形態のポリペプチドを回収する工程を含む。

30

【0022】

一態様において、ポリペプチドは抗体である。

【0023】

一態様では、クロマトグラフィー材料1リットルあたり約40gのポリペプチド(抗体)がアプライされる。一態様では、クロマトグラフィー材料1リットルあたり約30gのポリペプチド(抗体)がアプライされる。一態様では、クロマトグラフィー材料1リットルあたり約20gのポリペプチド(抗体)がアプライされる。

[本発明1001]

40

- ポリ(エチレングリコール)と、ソルビトール、キシリトール、グリセロール、グリシン、ベタイン、プロリン、フルクトース、グルコース、およびスクロースを含む群より選択される1種またはそれ以上の添加剤とを含む溶液を、IgGクラスの抗体が吸着されたカチオン交換クロマトグラフィー材料にアプライする工程であって、単量体形態のIgGクラスの抗体がカチオン交換クロマトグラフィー材料に吸着されたままである、工程、ならびに

- ポリ(エチレングリコール)と前記1種またはそれ以上の添加剤とを含む溶液をアプライすることによって、カチオン交換クロマトグラフィー材料から単量体形態のIgGクラスの抗体を回収する工程

を含む、単量体形態のIgGクラスの抗体を産生するための方法であって、

ポリ(エチレングリコール)ポリマーが、約5~15重量%の濃度を有し、かつ/または前記添

50

加剤が、3～25重量%の濃度を有する、方法。

[本発明1002]

- ポリ(エチレングリコール)と、ソルビトール、キシリトール、グリセロール、グリシン、ベタイン、プロリン、フルクトース、グルコース、およびスクロースを含む群より選択される1種またはそれ以上の添加剤とを含む溶液を、IgGクラスの抗体が吸着されたカチオン交換クロマトグラフィー材料にアプライする工程であって、単量体形態のIgGクラスの抗体がカチオン交換クロマトグラフィー材料に吸着されたままである、工程、ならびに

- ポリ(エチレングリコール)と、ソルビトール、キシリトール、グリセロール、グリシン、ベタイン、プロリン、フルクトース、グルコース、およびスクロースを含む群より選択される1種またはそれ以上の添加剤と、溶出化合物とを含む溶液をアプライすることによって、カチオン交換クロマトグラフィー材料から単量体形態のIgGクラスの抗体を回収し、それによって、宿主細胞タンパク質含量を低減させたIgGクラスの抗体調製物を産生する工程

を含む、宿主細胞タンパク質含量を低減させたIgGクラスの抗体調製物を産生するための方法であって、

ポリ(エチレングリコール)が、約5～15重量%の濃度を有し、かつ/または前記添加剤が、3～25重量%の濃度を有する、方法。

[本発明1003]

ポリ(エチレングリコール)が約7～13重量%の濃度を有し、かつ/または前記添加剤が3～25重量%の濃度を有することを特徴とする、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1004]

ポリ(エチレングリコール)が約7～13重量%の濃度を有し、かつ/または前記添加剤が12～25重量%の濃度を有することを特徴とする、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1005]

ポリ(エチレングリコール)が約7～13重量%の濃度を有し、かつ/または前記添加剤が12～20重量%の濃度を有することを特徴とする、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1006]

ポリ(エチレングリコール)が約3,500 Da $\pm$ 20%の分子量を有することを特徴とする、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1007]

前記添加剤がソルビトールであることを特徴とする、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1008]

単量体形態の抗体が100 kDa～200 kDaの分子量を有することを特徴とする、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1009]

- ポリ(エチレングリコール)と、ソルビトール、キシリトール、グリセロール、グリシン、ベタイン、プロリン、フルクトース、グルコース、およびスクロースを含む群より選択される1種またはそれ以上の添加剤とを任意で含む第1の溶液を、カチオン交換クロマトグラフィー材料にアプライし、それによって該材料を平衡化する工程、

- 平衡化した該クロマトグラフィー材料にIgGクラスの抗体を含む溶液をアプライし、それによって該クロマトグラフィー材料にロードする工程、

- ポリ(エチレングリコール)と、ソルビトール、キシリトール、グリセロール、グリシン、ベタイン、プロリン、フルクトース、グルコース、およびスクロースを含む群より選択される1種またはそれ以上の添加剤とを含む溶液を、該クロマトグラフィー材料にアプライし、それによって、単量体形態のIgGクラスの抗体を該クロマトグラフィー材料から脱着/溶出することにより、単量体形態のIgGクラスの抗体を産生する工程

をさらに含むことを特徴とする、前記本発明のいずれかの方法。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】 カチオン交換クロマトグラフィー材料上の抗IL17抗体のカチオン交換クロマトグ

10

20

30

40

50

ラフィーの溶出クロマトグラム。

【図2】集められた画分についての、単量体形態の抗体および凝集形態の抗体の分布。

【図3】非イオン性ポリマーの例として10重量%濃度のポリ(エチレングリコール)4000および添加剤としてさまざまな濃度の異なるポリオールを含む溶液中の、抗IL17抗体および抗CSF-1R抗体の溶解性。

【図4】非イオン性ポリマーの例として10重量%濃度のポリ(エチレングリコール)4000および添加剤としてさまざまな濃度の異なるアミノ酸を含む溶液中の、抗IL17抗体および抗CSF-1R抗体の溶解性。

【図5】非イオン性ポリマーの例として10重量%濃度のポリ(エチレングリコール)および添加剤としてさまざまな濃度の異なる糖を含む溶液中の、抗IL17抗体および抗CSF-1R抗体の溶解性。

【図6】実施例25および26に関して集められた画分についての、単量体形態の抗体、3/4抗体フラグメントおよび凝集形態の抗体の分布。

【発明を実施するための形態】

【0025】

発明の詳細な説明

本明細書には、単量体形態の関心対象ポリペプチドを、凝集形態の関心対象ポリペプチドなどの他の成分から分離することによって、単量体形態の関心対象ポリペプチドを産生するための、少なくとも1つのクロマトグラフィー工程を含む方法が報告される。一態様において、方法は、関心対象のポリペプチドを含む溶液とカチオン交換クロマトグラフィー材料とを接触させる工程を含み、その際、クロマトグラフィー材料との接触工程は非イオン性ポリマーおよび添加剤の非存在下で行われ、かつ回収工程は非イオン性ポリマーおよび添加剤の存在下で行われる。

【0026】

非イオン性ポリマーおよび添加剤の存在は、カチオン交換クロマトグラフィー材料上での、凝集形態のポリペプチドに対する単量体形態のポリペプチドの滞留時間差(分離度)を増大させ、それによって単量体形態のポリペプチドからの凝集形態のポリペプチドの改善された除去のための新規な選択性を可能にすることが見出された。

【0027】

特に、カチオン交換クロマトグラフィーにおいて、高いPEG濃度を特定の添加剤(溶解促進剤)の存在下で使用すると、例えばPEGのみを用いる方法に比べて、選択性を調整し、かつ抗体の単量体種と凝集物種の分離度を向上させることができることが見出された。

【0028】

ポリ(エチレングリコール)は粘着性であり、クロマトグラフィーを適用する際のランニング緩衝液の高粘度は、クロマトグラフィーの適用中のいくつかの実際的な制限につながる。

【0029】

クロマトグラフィー分離プロセスは、溶出クロマトグラムにおける個々のピークの実験度によって特徴づけることができる。分離度の値は、Kaltenbrunner, O., et al., Biotechnol. Bioeng. 98 (2007) 201-210、またはGrushka, E., Anal. Chem. 44 (1972) 1733-1738に従って計算することができる。

【0030】

一般的なクロマトグラフィー法およびそれらの使用は当業者に公知である。例えば、Heftmann, E. (編), Chromatography, 第5版, Part A: Fundamentals and Techniques, Elsevier Science Publishing Company, New York, (1992); Deyl, Z. (編), Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences, Vol. 60, Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, (1998); Poole, C.F., and Poole, S.K., Chromatography Today, Elsevier Science Publishing Company, New York (1991); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer Verlag (1982); Sambrook, J. et al. (編), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); または Ausubel, F.M. et al. (編), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York (1998) を参照されたい。

【0031】

「ポリペプチド」は、天然で産生されようと合成的に産生されようと、ペプチド結合で連結されたアミノ酸残基のポリマーである。約20アミノ酸残基未満のポリペプチドは「ペプチド」と呼ばれる。「タンパク質」は、1つもしくは複数のポリペプチド鎖を含む巨大分子、または100アミノ酸残基を超える少なくとも1つのポリペプチド鎖を含む巨大分子である。ポリペプチドはまた、糖鎖基のような非ペプチド性成分を含んでもよい。糖鎖基および他の非ペプチド性置換基は、ポリペプチドが産生される細胞によってそのポリペプチドに付加されることがあり、細胞の種類によって異なる。ポリペプチドは本明細書ではそのアミノ酸骨格構造の観点から定義される；糖鎖基のような置換基は一般的に明記されないが、それにもかかわらず存在してよい。

10

【0032】

「にアプライする」という用語は、溶液をクロマトグラフィー材料に接触させる精製の部分的工程を意味する。これは、a)クロマトグラフィー材料の入ったクロマトグラフ装置に溶液を添加すること、またはb)ポリペプチドを含む溶液にクロマトグラフィー材料を添加すること、のいずれかを意味する。ケースa)では、溶液が該装置を通過して、溶液中に含まれる物質のクロマトグラフィー材料への吸着を可能にする。例えばpH、導電率、塩濃度、温度、および/または流速などの条件に応じて、溶液中のある物質はクロマトグラフィー材料に吸着され、他の物質はフロースルーから回収することができる。「フロースルー」は、該装置を通過した後に得られる溶液を意味し、それはアプライされた溶液であるか、カラムを洗浄するために、またはクロマトグラフィー材料に吸着された物質の溶出を起こさせるために用いられる、緩衝溶液であり得る。一態様では、該装置はカラムまたはカセットである。ケースb)では、クロマトグラフィー材料は、例えば固体として、溶液(例えば、精製しようとする関心対象の物質を含有する)に添加されて、クロマトグラフィー材料と溶液中の物質との相互作用を可能にする。相互作用の後に、クロマトグラフィー材料は、例えば濾過によって、取り出され、クロマトグラフィー材料に結合された物質もそれと一緒に溶液から取り出されるが、クロマトグラフィー材料に結合されなかった物質は溶液中に残存する。一態様では、クロマトグラフィー材料1リットルあたり約40gのポリペプチド(抗体)が吸着される。一態様では、クロマトグラフィー材料1リットルあたり約30gのポリペプチド(抗体)が吸着される。一態様では、クロマトグラフィー材料1リットルあたり約20gのポリペプチド(抗体)が吸着される。

20

30

【0033】

用語「結合/溶出モード」は、クロマトグラフィー工程の操作モードを意味し、このモードでは、精製しようとする関心対象の物質を含有する溶液がクロマトグラフィー材料にアプライされ、それによって関心対象の物質がクロマトグラフィー材料に結合する。したがって、関心対象の物質はクロマトグラフィー材料上に滞留するのに対し、関心対象でない物質はフロースルーまたは上清と一緒に取り除かれる。関心対象の物質はその後、溶出液を用いる第2の工程においてクロマトグラフィー材料から回収される。一態様では、本明細書に報告される方法は結合/溶出モードで操作される。

40

【0034】

本明細書に報告される方法で用いられる溶液は粗製の溶液または緩衝溶液である。用語「緩衝溶液」は、酸性またはアルカリ性物質の添加または除去によるpHの変化が、溶解した緩衝物質によって平準化されている溶液を意味する。このような特性を有する緩衝物質はどれも使用することができる。一般的には、薬学的に許容される緩衝物質が使用される。一態様では、緩衝溶液は以下から選択される：リン酸および/またはその塩からなるリン酸緩衝溶液、酢酸およびその塩からなる酢酸緩衝溶液、クエン酸および/またはその塩からなるクエン酸緩衝溶液、モルホリン緩衝溶液、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸緩衝溶液、ヒスチジン緩衝溶液、グリシン緩衝溶液、またはトリス(ヒドロキシメチル)アミ

50

ノメタン(TRIS)緩衝溶液。別の態様では、緩衝溶液は以下から選択される：リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、クエン酸緩衝溶液、またはヒスチジン緩衝溶液。必要に応じて、緩衝溶液は追加の塩、例えば、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化カリウム、硫酸カリウム、クエン酸ナトリウム、またはクエン酸カリウムなどを含むことができる。

【0035】

用語「連続溶出」および「連続溶出法」は、溶出、すなわちクロマトグラフィー材料からの結合した化合物の回収、を生じさせる溶液の導電率を連続的に変化させる、すなわち上昇または下降させる方法、すなわち、一連の小さいステップごとにその濃度を変化させる方法(各ステップで溶出を生じさせる物質の濃度変化は2%または1%を超えない)を意味する。この「連続溶出」では、1つ以上の条件、例えば、pH、イオン強度、塩濃度、およ

10

【0036】

用語「ステップ溶出」は、例えば、溶出、すなわちクロマトグラフィー材料からの結合した物質の回収、を生じさせる物質の濃度を一度に(すなわち、1つの値/レベルから次の値/レベルに直接)上昇または下降させる方法を意味する。この「ステップ溶出」では、1つ以上の条件、例えば、pH、イオン強度、塩濃度、および/またはクロマトグラフィーの流れを、第1の(例えば、初期)値から第2の(例えば、最終)値に一気に変化させることができる。したがって、条件は、線形変化とは対照的に、漸増的に(すなわち、段階的に)変更される。

20

【0037】

用語「イオン交換クロマトグラフィー材料」は、イオン交換クロマトグラフィーの固定相として使用される、共有結合した荷電置換基を有する固定された高分子量マトリックスを意味する。全体的な電荷中性のために、共有結合していない対イオンがそこに結合される。「イオン交換クロマトグラフィー材料」は、その共有結合していない対イオンを、周囲の溶液の同様に荷電したイオンと交換する能力がある。その交換可能な対イオンの電荷に応じて、「イオン交換樹脂」はカチオン交換樹脂またはアニオン交換樹脂と呼ばれる。荷電した基(置換基)の種類に応じて、「イオン交換樹脂」は、例えばカチオン交換樹脂の場合には、スルホン酸樹脂(S)、スルホプロピル樹脂(SP)、またはカルボキシメチル樹脂(CM)と呼ばれる。

30

【0038】

さまざまなタイプのイオン交換材料(すなわち、固定相)が、異なる名称のもとに、多数の会社から入手可能である：例えば、カチオン交換材料Bio-Rex(登録商標)(例：タイプ70)、Chelex(登録商標)(例：タイプ100)、Macro-Prep(登録商標)(例：タイプCM、High S、25 S)、AG(登録商標)(例：タイプ50W、MP)、すべてBioRad Laboratories社から入手可能；WCX 2、Ciphergen社から入手可能；Dowex(登録商標)MAC-3、Dow chemical社から入手可能；Mustang CおよびMustang S、Pall Corporationから入手可能；Cellulose CM (例：タイプ23、52)、hyper-D、パーティスフィア、Whatman plcから入手可能；Amberlite(登録商標)IRC(例：タイプ76、747、748)、Amberlite(登録商標)GT 73、Toyopearl(登録商標)(例：タイプSP、CM、650M)、すべてTosoh Bioscience GmbHから入手可能；CM 1500およびCM 3000、BioChrom Labs社から入手可能；SP-Sepharose(商標)、CM-Sepharose(商標)、GE Healthcare社から入手可能；Applied Biosystems社またはPerSeptive Biosystems社から入手可能な多孔性樹脂；Asahipak ES(例：タイプ502C)、CXpak P、IEC CM(例：タイプ825、2825、5025、LG)、IEC SP(例：タイプ420N、825)、IEC QA(例：タイプLG、825)、Shoko America Inc.から入手可能；50Wカチオン交換樹脂、Eichrom Technologies Inc.から入手可能。一態様では、カチオン交換材料は、強カチオン交換材料、例えば、Macro-Prep(登録商標)High Sもしくは25S、MacroCap SP、Toyopearl(登録商標)SP 650M、Source S、SP Sepharose、POLYCAT A、Mono S、またはHighscreen SPである。

40

【0039】

用語「結合に適した条件下で」およびその文法的等価物は、関心対象の物質(例えば、

50

単量体形態の抗体)が、固定相(例えば、イオン交換材料)と接触させたときに、その固定相に結合することを意味する。このことは、関心対象物質の100%が固定相に結合されることを必ずしも意味しないが、関心対象の物質の本質的に100%が結合される、すなわち、関心対象の物質の少なくとも50%が結合される、一態様では関心対象の物質の少なくとも75%が結合される、別の態様では関心対象の物質の少なくとも85%が結合される、さらなる態様では関心対象の物質の95%超が固定相に結合されることを意味する。

【0040】

一態様において、抗体は治療用抗体である。用語「治療用抗体」は、ヒトの治療薬としての承認のために臨床試験で検査されかつ疾患の治療のために個体に投与され得る抗体を意味する。別の態様では、治療用抗体はモノクローナル抗体である。さらなる態様では、治療用抗体は、ヒト抗体遺伝子座で形質転換された類人猿もしくは動物から得られ、つまりヒトモノクローナル抗体またはヒト化モノクローナル抗体である。一態様では、治療用抗体はヒトモノクローナル抗体である。さらなる態様では、治療用抗体はヒト化モノクローナル抗体である。治療用抗体は、腫瘍性疾患(例えば、非ホジキンリンパ腫、乳癌、結腸直腸癌を含む血液および固形の悪性腫瘍)、免疫疾患、中枢神経系疾患、血管疾患、または感染症などの、さまざまな疾患の治療のために広く使用されている。そうした抗体は、一態様では、以下に対する抗体である：ALK、接着関連キナーゼ(adhesion related kinase)受容体(例：Ax1)、ERBB受容体(例：EGFR、ERBB2、ERBB3、ERBB4)、エリスロポエチン産生肝細胞(EPH)受容体(例：EphA1、EphA2、EphA3、EphA4、EphA5、EphA6、EphA7、EphA8、EphB1、EphB2、EphB3、EphB4、EphB5、EphB6)、線維芽細胞増殖因子(FGF)受容体(例：FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FGFR5)、Fgr、IGF-1R、インスリン受容体、LTK、M-CSFR、MUSK、血小板由来増殖因子(PDGF)受容体(例：PDGFR-A、PDGFR-B)、RET、ROR1、ROR2、ROS、RYK、血管内皮増殖因子(VEGF)受容体(例：VEGF-R1/FLT1、VEGF-R2/FLK1、VEGF3)、免疫グロブリン様ドメインとEGF様ドメインをもつチロシンキナーゼ(TIE)受容体(例：TIE-1、TIE-2/TEK)、Tec、TYRO 10、インスリン様増殖因子(IGF)受容体(例：INS-R、IGF-IR、IR-R)、ジスコイジンドメイン(DD)受容体(例：DDR1、DDR2)、c-Metの受容体(MET)、recepteur d'origine nantaïs (RON、別名をマクロファージ刺激1受容体ともいう)、FLT3(fms関連チロシンキナーゼ3)、コロニー刺激因子1(CSF1)受容体、c-kitの受容体(KIT、またはSCF-R)、インスリン受容体関連(IRR)受容体、CD19、CD20、HLA-DR、CD33、CD52、G250、GD3、PSMA、CD56、CEA、Lewis Y抗原、またはIL-6受容体。

【0041】

用語「抗体」は、全抗体を含めて、抗体構造のさまざまな形態を包含する。抗体は、一態様では、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、またはT細胞抗原枯渇抗体である。

【0042】

抗体の遺伝子工学は、例えば、Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5,202,238; US 5,204,244; Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270; Lonberg, N., Nat. Biotechnol. 23 (2005) 1117-1125に記載されている。重鎖の定常領域のアミノ酸配列に応じて、抗体は次のクラスに分けられる：IgA、IgD、IgE、およびIgG。これらのクラスの一部はサブクラス(アイソタイプ)にさらに分けられ、すなわち、IgGはIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4に、IgAはIgA1およびIgA2に分けられる。抗体が属するクラスによって、抗体の重鎖定常領域は、それぞれ α (IgA)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE)、および γ (IgG)と表記される。例えば、用語「ヒトIgG1クラスの抗体」は、定常ドメインのアミノ酸配列がヒトIgG1のアミノ酸配列から誘導された抗体を意味する。この用語には、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、および抗体コンジュゲートが含まれる。

【0043】

用語「完全抗体」は、2本の軽鎖ポリペプチド(軽鎖)と2本の重鎖ポリペプチド(重鎖)を含む抗体を意味する。重鎖および軽鎖ポリペプチドの各々は、抗原と相互作用することができる結合領域を含む可変ドメイン(可変領域、一般にはアミノ末端部分)を含む。重鎖および軽鎖ポリペプチドの各々は、定常領域(一般にはカルボキシル末端部分)を含む。軽鎖

または重鎖の可変ドメインは、異なるセグメント、すなわち4つのフレームワーク領域(FR)と3つの超可変領域(CDR)を順に含む。

【0044】

用語「抗体コンジュゲート」は、別のポリペプチドにペプチド結合を介してコンジュゲート化された、抗体の重鎖または軽鎖の少なくとも1つのドメインを含むポリペプチドを意味する。別のポリペプチドは、非抗体ペプチド、例えば、ホルモン、毒素、増殖受容体、抗融合性ペプチド、または補体因子などとすることができる。

【0045】

組換えにより産生された抗体の精製のために、異なるカラムクロマトグラフィー工程の組み合わせを用いることができる。一般的には、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーの後に1回または2回の追加の分離工程が続く。最終精製工程は、凝集した抗体、残留HCP(宿主細胞タンパク質)、DNA(宿主細胞核酸)、ウイルス、または内毒素のような微量の不純物および汚染物質を除去するための、いわゆる「ポリッシング工程」(polishing step)である。

【0046】

用語「単量体形態の抗体」は、第2の抗体分子と会合していない、すなわち別の抗体分子に共有結合でも非共有結合でも結合していない、抗体分子を意味する。用語「凝集形態の抗体」は、少なくとも1つの追加の抗体分子と、共有結合または非共有結合のいずれかで会合しており、かつサイズ排除クロマトグラフィーカラムから単一のピークとして溶出される抗体分子を意味する。本明細書中で用いる用語「単量体形態」は、抗体分子の100%が単量体形態で存在することを必ずしも意味しない。この用語は、抗体が本質的に単量体形態である、すなわち、サイズ排除クロマトグラムのピーク面積として測定して、抗体の少なくとも90%が単量体形態である、一態様では抗体の少なくとも95%が単量体形態である、別の態様では抗体の少なくとも99%が単量体形態である、さらなる態様では抗体の少なくとも99.5%が単量体形態である、さらに別の態様では抗体の99.8%超が単量体形態であることを意味する。用語「高分子量(HMW)形態」は、ポリマー性の、すなわち凝集した抗体を意味し、この凝集物は水性緩衝溶液中に依然として可溶である。

【0047】

本明細書中で用いる用語「100%」は、指定された成分以外の成分の量が、特定の条件下で関連分析方法の検出限界を下回ることを意味する。

【0048】

本出願内で用いる用語「90%」、「95%」、「99%」、「99.5%」、および「99.8%」は、正確な値ではなく、特定の条件下で関連分析方法の精度の範囲内の値を意味する。

【0049】

用語「溶出化合物」は、結合したポリペプチドをイオン交換材料から回収するために用いられる塩を意味し、ここで、該化合物は緩衝液/溶液の導電率を上昇させる。これは、緩衝液の塩濃度を増加させるか、または緩衝溶液に他の塩類(いわゆる溶出塩)を加えるか、のいずれかによって達成することができる。好ましい溶出塩は、クエン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、塩化カリウム、硫酸カリウム、リン酸カリウム、ならびにクエン酸とリン酸の他の塩、およびこれらの成分の任意の混合物である。一態様では、溶出化合物はクエン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、およびこれらの混合物から選択される。

【0050】

非ヒト(例えば、げっ歯類)抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト抗体およびヒト抗体に由来する部分配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体はヒト抗体(レシピエント抗体)から誘導され、その際、ヒト抗体の超可変領域からの残基は、所望の特異性および親和性を有する、例えばマウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、モルモット、または非ヒト霊長類などの非ヒト種(ドナー抗体)の超可変領域からの残基によって置き換えられる。場合によっては、ヒト抗体のフレームワーク領域(FR)残基が対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化抗体はさらなる改変を含んでもよく、例えば、レシピ

エント抗体中またはドナー抗体中に見出されないアミノ酸残基を含むことができる。そのような改変は、対応する親配列に相同であるが同一ではない、レシピエントまたはドナー抗体の変異体をもたらす。こうした改変は、抗体の性能をさらに高めるために行われる。

【0051】

一般的に、ヒト化抗体は、超可変ループのすべてまたは実質上すべてが非ヒトドナー抗体のものに対応し、かつFRのすべてまたは実質上すべてがヒトレシピエント抗体のものである、少なくとも1つの、通常は2つの、可変ドメインの実質上すべてを含むものである。ヒト化抗体はまた、必要に応じて、抗体の定常領域(通常はヒト抗体のもの)の少なくとも一部を含んでもよい。

【0052】

実際には、ヒト化抗体は一般に、一部の超可変領域残基とおそらくは一部のフレームワーク領域残基がげっ歯類または非ヒト霊長類抗体の類似部位からの残基で置換されたヒト抗体である。

【0053】

本明細書中で用いる用語「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た抗体を意味し、すなわち、該集団の個々の抗体は、わずかに存在し得る突然変異(自然界で発生する可能性がある)を除いて、同一である。モノクローナル抗体は、単一の抗原部位に向けられたもので、高度に特異的である。さらに、異なる抗原部位(抗原決定基またはエピトープ)に向けられたさまざまな抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の抗原部位に向けられたものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、それが他の抗体によって汚染されずに合成され得る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の集団から得られるという抗体の性質を示しており、任意の特定の方法による抗体の作製を必要とすると解釈されるべきでない。

【0054】

用語「キメラ抗体」は、第1の種に由来する可変ドメイン(すなわち、結合領域)と異なる第2の種に由来する定常領域の少なくとも一部を含む抗体を意味する。

【0055】

抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体鎖をコードするヌクレオチド配列に適切な改変を導入することによって、またはペプチドの合成によって、調製することができる。そうした改変には、例えば、抗体のアミノ酸配列からの残基の欠失、および/または抗体のアミノ酸配列への残基の挿入、および/または抗体のアミノ酸配列内の残基の置換が含まれる。欠失、挿入および置換の任意の組み合わせを行って最終構築物に到達することができるが、その最終構築物は親抗体と同じ抗原結合特性をもつことを条件とする。

【0056】

保存的アミノ酸置換は表1の「好ましい置換」の見出しの下に示される。より実質的な変更は、表1の「例示的な置換」の見出しの下に、そして後述されるようにアミノ酸側鎖クラスに関連して、提供される。アミノ酸置換を抗体鎖に導入して、その産物を親抗体の生物学的活性の保持についてスクリーニングすることができる。

【0057】

(表)

10

20

30

40

もとの 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

10

20

【 0 0 5 8 】

アミノ酸は共通の側鎖特性に応じてグループ分けすることができる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン, Met, Ala, Val, Leu, Ile；
- (2) 中性親水性：Cys, Ser, Thr, Asn, Gln；
- (3) 酸性：Asp, Glu；
- (4) 塩基性：His, Lys, Arg；
- (5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：Gly, Pro；
- (6) 芳香族：Trp, Tyr, Phe。

【 0 0 5 9 】

30

非保存的置換は、これらのクラスのいずれか1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴う。

【 0 0 6 0 】

用語「移動相」は、クロマトグラフィーカラムからポリペプチドを回収するのに適した水および/または水性緩衝液および/または有機溶媒の任意の混合物を意味する。本明細書において用語「溶出する」または「溶出」はそれぞれ、当業者に公知のように用いられ、流体を含浸させた固体または吸着剤(すなわち、物質が吸着されているカラム材料)からの吸着物質の溶解、場合により置換、を意味する。

【 0 0 6 1 】

用語「吸着」は、液相と固相との間に形成された境界相での、液体(例えば、移動相)からの物質の蓄積を意味し、ここで、固相はその表面に関心対象の物質を吸着することができる。この吸着は吸着された物質の蓄積につながる。その表面に関心対象の物質を蓄積することができる物質は吸着剤と呼ばれ、吸着された物質は吸着質と呼ばれる。通常、用語「吸着」は用語「吸収」と区別されており、用語「吸収」は、表面での蓄積を越えて、蓄積された物質が吸着性固体または流体の内部に浸透することをも意味する。一般的に、吸着は、物質(通常は分子)が吸着剤の表面に付着し、したがって、それぞれの表面に蓄積される、物理的プロセスである。この付着に関与している力は、化学的結合よりもむしろ物理的な力であると考えられ、したがって、吸着は当技術分野では物理的吸着(physical absorption)または物理吸着(physisorption)としても知られており、これは表面への物質の化学的結合を必ずしも排除するものではない。表面への物質の吸着に関与する物理的な力

40

50

は、ほとんどの場合、ファンデルワールス力、ロンドン力、または双極子/双極子相互作用、例えば水素結合、または双極子誘起双極子相互作用であり、ここで、これらの用語は、本明細書中で説明されるように、または吸着との関連において通常用いられるように、使用される。

【0062】

(カラム)クロマトグラフィーでは、通常、溶媒は溶離液(すなわち、溶出される物質が少なくとも十分に可溶である溶離剤)として用いられる。

【0063】

一態様において、非イオン性ポリマーは親水性の非イオン性ポリマーである。さらなる態様では、非イオン性ポリマーは、非イオン性ポリエーテル、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)(PPG)、PEG-PPGブロックコポリマー、PEG-PPGコポリマー、ポリ(オキシプロピレン)(ポリ(プロピレンオキシド))と2つのポリ(オキシエチレン)(ポリ(エチレンオキシド))ポリマーから構成されるトリブロックコポリマー(Poloxamer、Pluronic(商標))、およびその他のPEG-PPG-PEGトリブロックポリマーから選択される。

【0064】

用いる非イオン性ポリマーは、その単量体構成単位のほかに、ダルトン(Da)で示されるその分子量によっても特徴づけることができる。用語「分子量」は、ポリマーに関して、そのポリマーの平均分子量を表す。というのは、ポリマー化合物は規定された分子量で得られず、実際にそれらは分子量分布を有するからである。ポリマーの分子量は「約X Da」の形で示され、ここで「X」はポリマーの分子量の平均値を表す。用語「約」は、ポリマー調製物において、一部の分子が示された平均分子量より高い分子量を有し、一部の分子がそれより低い分子量を有することを示し、すなわち、用語「約」は、ポリマー分子の95%が示された分子量の±30%の範囲内の分子量を有する分子量分布を指す。例えば、3,500 Daの分子量は2450 Daから4,550 Daまでの範囲を表す。一態様では、ポリマー分子は示された分子量の±20%の範囲内の分子量を有する。一態様では、ポリマー分子は示された分子量の±10%の範囲内の分子量を有する。

【0065】

非イオン性ポリマーは、塩含有緩衝溶液などの緩衝溶液中に存在させることができる。関心対象のポリペプチドを含む溶液は、そのポリペプチドをコードする核酸を含む細胞の培養上清から直接得ることができる。その上清は、清澄化されたまたは清澄化されていない培養上清であり得る。

【0066】

一態様では、1種またはそれ以上の非イオン性ポリマーは、ポリペプチド、特に抗体を回収するためのクロマトグラフィー材料にアプライされる溶液中に存在する。一態様では、単量体形態の抗体を回収するためのクロマトグラフィー材料にアプライされる溶液は、1、2、3、4または5種の異なる非イオン性ポリマーを含む。2種以上の非イオン性ポリマーが溶液中に存在する場合、その溶液中に存在するすべての非イオン性ポリマーの濃度の合計は、本明細書に示された範囲内であることが好ましい。

【0067】

一態様では、1種またはそれ以上の添加剤は、ポリペプチド、特に抗体を回収するためのクロマトグラフィー材料にアプライされる溶液中に存在する。一態様では、単量体形態の抗体を回収するためのクロマトグラフィー材料にアプライされる溶液は、1、2、3、4または5種の異なる添加剤を含む。2種以上の添加剤が溶液中に存在する場合、その溶液中に存在するすべての添加剤の濃度の合計は、本明細書に示された範囲内であることが好ましい。

【0068】

あるいは、関心対象のポリペプチドを含む溶液は、先行するクロマトグラフィー工程からの溶出液とすることができる。

【0069】

10

20

30

40

50

関心対象のポリペプチドとイオン交換クロマトグラフィー材料との間の相互作用は、吸着、すなわちポリペプチドの結合、または溶液中にやはり存在する他の成分に対する該ポリペプチドの遅延であり得る。

【0070】

イオン交換クロマトグラフィー材料から単量体形態のポリペプチドを回収するために、吸着の後に、イオン交換クロマトグラフィー材料から吸着された単量体形態のポリペプチドを溶出する工程が続く。吸着されたポリペプチドの溶出は、吸着工程と比べたときの塩条件、すなわち導電率、および/またはpH値の変更によって行うことができる。

【0071】

イオン交換クロマトグラフィー材料から関心対象のポリペプチドを回収または溶出する間、移動相に非イオン性ポリマーと添加剤とを加えることを除いて、本明細書に報告される方法のクロマトグラフィー工程は、従来の一般的な操作条件および当分野で周知の原理に従って実施される。従来のクロマトグラフィーカラムが便利に用いられ、そのサイズは個々の場合に合わせて適合され、出発物質、緩衝液、マトリックス(リガンドの官能基を含む)なども同様である。

【0072】

ポリペプチドの電荷は、周囲の溶液のpH値を変えることによって変更することができる。よく知られているように、イオン交換材料は強イオン交換材料(すべてのpH値で荷電されることを意味する)、または弱イオン交換材料(pHをシフトすることによって荷電可能であることを意味する)とすることができる。

【0073】

本明細書に報告されるイオン交換クロマトグラフィー回収工程で移動相に非イオン性ポリマーと添加剤とを加えることは、予想外にも、単量体形態のポリペプチドの収率を、従来のイオン交換クロマトグラフィーと比較して、高めることが示された。一態様では、イオン交換クロマトグラフィーはカチオン交換クロマトグラフィーである。一態様では、非イオン性ポリマーの濃度は少なくとも約5重量%であり、かつ添加剤の濃度は少なくとも3重量%である。

【0074】

一般的に、本明細書に報告される方法で用いられる非イオン性ポリマーの分子量排除は存在しない。非イオン性ポリマーの分子量は、非イオン性ポリマー単独の使用と比較して、添加剤と組み合わせることで、単量体形態のポリペプチドの増大した収率をもたらしながら、可能な限り低くなるように選択される。当業者にとって、任意の物質の添加、すなわち非イオン性ポリマーと添加剤の添加が、得られる溶液の粘度に影響を及ぼす(粘度を増加させる)ことは公知である。したがって、当業者であれば、非イオン性ポリマーと添加剤の物理化学的特性のため、これらの化合物の添加には上限があることが理解されよう。

【0075】

本明細書に報告される方法で用いられる非イオン性ポリマーは、酸素原子が豊富である基を含む。一態様では、非イオン性ポリマーは、水溶性の、荷電していない、直鎖状または分岐状ポリマーである。そのような非イオン性ポリマーは、一態様では、ポリエーテル、例えば、ポリ(エチレングリコール)(PEG)、ポリ(プロピレングリコール)(PPG)、PEG-PPGブロックコポリマー、PEG-PPGコポリマー、ポリ(オキシエチレン)(ポリ(エチレンオキシド))の2本の親水性鎖によって挟まれたポリ(オキシプロピレン)(ポリ(プロピレンオキシド))の中央の疎水性鎖から構成されるトリブロックコポリマー(Poloxamer、Pluronic(商標))、およびその他のPEG-PPG-PEGトリブロックポリマー、エチルヒドロキシエチルセルロース(EHEC)および同様のポリマー、重合アリルグリシジルエーテル、重合フェニルグリシジルエーテル、デキストラン、デンプン、セルロース、ポリビニルピロリドン、各種の界面活性剤およびこれらの構成単位を含む他の化合物である。一態様では、非イオン性ポリマーはポリ(エチレングリコール)(PEG)である。用語ポリ(エチレングリコール)はまた、改変されたポリ(エチレングリコール)をも含む。

【0076】

本明細書に報告される方法では、任意の分子量の非イオン性ポリマーを用いることができる。しかし、非イオン性ポリマーと添加剤の最適な濃度および比はタンパク質ごとに変換することがあり、ほとんどの場合、非イオン性ポリマーの好ましい分子量および非イオン性ポリマーと添加剤の好ましい比が存在する。

【0077】

一態様において、非イオン性ポリマーはポリ(エチレングリコール)である。

【0078】

ポリ(エチレングリコール)は、本明細書に報告される方法の範囲内で、非イオン性ポリマーの挙動のための一般的なモデルとして使用することができる。したがって、ポリ(エチレングリコール)は本明細書では1つの例として使用されるが、提供された情報は、上で具体的に挙げたものを含めて、他の非イオン性ポリマーにも当てはまることに留意すべきである。

【0079】

ポリ(エチレングリコール)は多くの商業的供給源から入手可能である。一態様では、ポリ(エチレングリコール)は約100 Da～約40,000 Daの分子量を有する。一態様では、ポリ(エチレングリコール)は約400 Da～約10,000 Daの分子量を有する。一態様では、ポリ(エチレングリコール)は約1,000 Da～約8,000 Daの分子量を有する。他の態様では、異なる大きさのポリ(エチレングリコール)類の混合物が利用される。

【0080】

一態様では、ポリ(エチレングリコール)は約2,450 Da～約4,550 Daの分子量を有する。一態様では、ポリ(エチレングリコール)は約2,625 Da～約4,375 Daの分子量を有する。一態様では、ポリ(エチレングリコール)は約2,800 Da～約4,200 Daの分子量を有する。一態様では、ポリ(エチレングリコール)は約3,150 Da～約3,850 Daの分子量を有する。

【0081】

一態様において、ポリ(エチレングリコール)は直鎖状または分岐状のポリ(エチレングリコール)である。

【0082】

より低分子量のポリ(エチレングリコール)は、より高分子量のポリ(エチレングリコール)と比較して同様の効果を与えるために、より高い質量濃度を用いる必要がある場合がある。

【0083】

同様に、抗体および融合タンパク質といった、単量体形態のより大きなポリペプチドを産生するために、より小さいポリペプチドの同じ純度を達成するのに必要とされる濃度と比較して、より低い濃度の特定の分子量のポリ(エチレングリコール)を採用することができる。例えば、主に二量体として存在して、約320 kDaの分子量をもつIgAクラスの抗体は、約150 kDaの分子量をもつIgGクラスの抗体と比較して、ポリ(エチレングリコール)のより低い濃度が必要になる。凝集物、複合体、および他の大きな分子の滞留は一般的に、単量体ポリペプチドの滞留に比べて、増加させることができる。また、カチオン交換クロマトグラフィー材料に強く吸着される/相互作用するポリペプチドの滞留を増加させるためには、カチオン交換クロマトグラフィー材料に通常は弱く吸着されるポリペプチドの吸着を増加させるために必要とされるポリ(エチレングリコール)の濃度に比べて、より低い濃度のポリ(エチレングリコール)が必要とされ得る。

【0084】

添加剤は、非イオン性ポリマーの存在によって誘導される沈殿を低減することができるまたは防止することさえできる物質である。

【0085】

一態様において、添加剤は、カチオン交換クロマトグラフィーを妨害しないように十分低い導電性を有する。別の態様では、添加剤は検出可能な緩衝能力を有していない。

【0086】

一態様において、添加剤は両性イオン、アミノ酸(例えば、グリシン、ピシン、トリシン、アラニン、プロリン、ベタインなど)、尿素または尿素誘導体(例えば、アルキル尿素(メチル尿素、エチル尿素など))、アルキレングリコール(例えば、エチレングリコールまたはプロピレングリコールなど)、両性電解質(例えば、アミノスルホン酸系緩衝剤MES、MOPS、HEPES、PIPESおよびCAPS緩衝液など)、CHAPSO、天然産物(例えば、特定のアルカロイドおよびベタイン)、糖(例えば、グルコース、スクロース、ラフィノースなど)、またはポリオール(例えば、グリセロール、キシリトール、ソルビトールなど)である。

【0087】

一態様において、添加剤は両性イオンである。

10

【0088】

一態様において、添加剤はアミノ酸である。さらなる態様では、アミノ酸はグリシン、ピシン、トリシン、アラニン、プロリン、またはベタインである。

【0089】

一態様において、添加剤は尿素または尿素誘導体である。さらなる態様では、添加剤はメチル尿素またはエチル尿素である。

【0090】

一態様において、添加剤はアルキレングリコールである。さらなる態様では、アルキレングリコールはエチレングリコールまたはプロピレングリコールである。

【0091】

一態様において、添加剤は両性電解質である。さらなる態様では、両性電解質はMES、MOPS、HEPES、PIPESまたはCAPSである。

20

【0092】

一態様において、添加剤は天然産物である。さらなる態様では、天然産物はアルカロイドまたはベタインである。

【0093】

一態様において、添加剤は糖である。さらなる態様では、糖はグルコース、スクロース、ラフィノース、またはフルクトースである。

【0094】

一態様において、添加剤はポリオールである。さらなる態様では、ポリオールはグリセロール、キシリトール、またはソルビトールである。

30

【0095】

どの添加剤についても、それぞれの使用量または濃度を決定する際には、個々の溶解限度を考慮しなければならないことに留意すべきである。

【0096】

アミノ酸を添加剤として用いる場合には、荷電した側鎖は、溶液のpH値を調整するために、追加の酸または塩基の使用を必要とすることに留意しなければならない。余剰の酸または塩基の添加によって、移動相のイオン強度が変化し、ひいてはクロマトグラフィーの結果に影響を及ぼす可能性がある。

【0097】

例えば、本明細書に報告される方法ではグリシンを添加剤として用いることができる。グリシンは両性イオン化合物であり、より正確にはグリシンはアミノ酸である。カチオン交換クロマトグラフィー法で一般に採用されるpH値で、グリシンは全体的な導電性に寄せず、したがって、カチオン交換クロマトグラフィー法において干渉しないはずである。さらに、グリシンは水溶液中で緩衝効果を示さず、また、それは移動相のpH値に影響を及ぼさない。グリシンは本明細書に報告される方法において添加剤として約50mM~5Mの濃度でを使用することができる。一態様では、グリシンは約100mM~約4Mの濃度を有する。別の態様では、グリシンは約250mM~約3Mの濃度を有する。さらなる態様では、グリシンは約500mM~約2Mの濃度を有する。さらに別の態様では、グリシンは約1Mの濃度を有する。2種以上の添加剤を用いる場合、個々の添加剤の濃度は、上の段落で例示的に示した濃度より

40

50

低くすることができる。

【0098】

どのような添加剤も、意図した効果を達成するのに必要な濃度より高い濃度で使用できるということを指摘しておく必要がある。特に、当業者は、本明細書に報告される方法において許容され得る添加剤の濃度範囲(その範囲内で効果が存在する)を決定することができる。

【0099】

一態様において、添加剤が尿素または尿素誘導体であるとき、その添加剤は最大6モルまでの濃度で存在する。一態様では、その添加剤は2モル以下の濃度で存在する。

【0100】

上で概説したように、回収溶液中の非イオン性ポリマーおよび添加剤の濃度はさまざまである。一般的には、任意の濃度のポリ(エチレングリコール)が用いられる。一態様では、ポリ(エチレングリコール)の濃度は少なくとも約0.5重量%である。一態様では、ポリ(エチレングリコール)の濃度は少なくとも約0.5重量%で、多くとも約20重量%である。さらなる態様では、ポリ(エチレングリコール)の濃度は少なくとも約5重量%で、多くとも約15重量%である。別の態様では、ポリ(エチレングリコール)の濃度は少なくとも約7重量%で、多くとも約13重量%である。

【0101】

非イオン性ポリマーの濃度は、クロマトグラフィーの経過中、一定に保持することも、変更することも可能である。この変更には、次第に上昇または下降する濃度の勾配、または濃度の段階的变化が含まれるが、これらに限定されない。

【0102】

一態様において、非イオン性ポリマーは約0.5~20重量%の濃度を有し、かつ/または添加剤は約0.5~40重量%の濃度を有する。

【0103】

一態様において、非イオン性ポリマーは約5~15重量%の濃度を有し、かつ/または添加剤は約0.5~40重量%の濃度を有する。

【0104】

一態様において、非イオン性ポリマーは約5~15重量%の濃度を有し、かつ/または添加剤は約3~25重量%の濃度を有する。

【0105】

一態様において、非イオン性ポリマーは約7~13重量%の濃度を有し、かつ/または添加剤は約3~25重量%の濃度を有する。

【0106】

一態様において、非イオン性ポリマーは約7~13重量%の濃度を有し、かつ/または添加剤は約12~25重量%の濃度を有する。

【0107】

一態様において、非イオン性ポリマーは約7~13重量%の濃度を有し、かつ/または添加剤は約12~20重量%の濃度を有する。

【0108】

非イオン性ポリマーの使用または添加は、この溶液中に同時に存在するポリペプチド、特に抗体、の溶解性の低下をもたらす。下記の表には、例示的なポリペプチドとしての抗IL17抗体(5mg/ml)の室温(RT)および4℃での溶解性が、添加されたポリ(エチレングリコール)3,500 Daの濃度に依存することが示される(50mMマロン酸ナトリウム、90mM NaCl、pH6.5)。

【0109】

(表)

10

20

30

40

PEG 濃度	RT: タンパク質 濃度 (UV280) [mg/ml]	RT: タンパク質 濃度 [初期濃度に 対する割合]	4°C: タンパク質 濃度 (UV280) [mg/ml]	4°C: タンパク質 濃度 [初期濃度に 対する割合]
0%	5.0	100%	5.1	100%
1%	5.1	100%	5.1	100%
2.5%	5.1	100%	5.1	100%
5.0%	5.1	100%	5.8	100%
7.5%	5.0	100%	2.1	42%
10%	2.5	50%	0.5	10%

10

【0110】

下記の表には、例示的なポリペプチドとしての抗IL17抗体(5mg/ml)の室温および4°Cでの溶解性が、添加された塩化ナトリウムの濃度に依存することが示される(50mMマロン酸ナトリウム、7.5重量%の分子量3,500 Daのポリ(エチレングリコール)、pH6.5)。

20

【0111】

(表)

NaCl 濃度	RT: タンパク質 濃度 (UV280) [mg/ml]	RT: タンパク質 濃度 [初期濃度 に対する 割合]	4°C: タンパク質 濃度 (UV280) [mg/ml]	4°C: タンパク質 濃度 [初期濃度 に対する 割合]
0 mM	2.9	61%	0.7	14%
45 mM	3.3	67%	0.8	17%
90 mM	3.6	75%	0.9	19%
135 mM	4.0	83%	1.0	20%
180 mM	4.6	95%	1.6	33%

30

【0112】

一態様において、非イオン性ポリマーはポリ(エチレングリコール)であり、かつ添加剤はポリオールである。図3には、非イオン性ポリマーの例として10重量%の濃度の分子量約3,500 Daのポリ(エチレングリコール)および添加剤としてさまざまな濃度の異なるポリオールを含む溶液中の抗体の溶解性が示される。

40

【0113】

一態様において、非イオン性ポリマーは約3,500 Daの分子量を有するポリ(エチレングリコール)であり、かつ添加剤はアミノ酸である。図4には、非イオン性ポリマーの例として10重量%の濃度の分子量約3,500 Daのポリ(エチレングリコール)および添加剤としてさまざまな濃度の異なるアミノ酸を含む溶液中の抗体の溶解性が示される。

【0114】

50

一態様において、非イオン性ポリマーは約3,500 Daの分子量を有するポリ(エチレングリコール)であり、かつ添加剤は糖である。図5には、非イオン性ポリマーの例として10重量%の濃度の分子量約3,500 Daのポリ(エチレングリコール)および添加剤としてさまざまな濃度の異なる糖を含む溶液中の抗体の溶解性が示される。

【0115】

下記の表から分かるように、添加剤のみの存在下での分離は、分離度の値の改善を与えない。

【0116】

(表)

分離度の値	抗IL17 抗体	抗CSF-1R 抗体
なし	0.46	0.64
グリシン	0.52	0.61
グルタミン酸	0.49	0.68
アルギニン	0.53	0.73
グリセリン	0.49	0.68
尿素	0.46	0.66
マンニトール	0.46	0.69
スクロース	0.46	0.39
トレハロース	0.45	0.60

【0117】

一態様において、用語「ポリオール」は、少なくとも3個のヒドロキシル基をもつ化合物を表す。したがって、一態様では、ポリオールは、3個の遊離ヒドロキシル基をもつトリオール、4個の遊離ヒドロキシル基をもつテトラオール、5個の遊離ヒドロキシル基をもつペンタオール、6個の遊離ヒドロキシル基をもつヘキサオール、7個の遊離ヒドロキシル基をもつヘプタオール、または8個の遊離ヒドロキシル基をもつオクタオールから選択される。

【0118】

非イオン性ポリマー、例えばポリ(エチレングリコール)の添加による溶解性の低下は、添加剤、例えばソルビトールの添加によって防止することができる。

【0119】

このように、本明細書に報告される一局面は、ポリペプチドのイオン交換クロマトグラフィーで使用するための非イオン性ポリマーおよび添加剤の濃度を決定する方法であり、この方法は、

- 添加剤が存在しない溶液中で、ポリペプチドの50%未満が溶液中に残存する非イオン性ポリマーの濃度を決定する工程、
 - 前工程で決定された濃度の非イオン性ポリマーが存在する溶液中で、ポリペプチドの95%超が溶液中に残存する添加剤の濃度を決定する工程、
- を含み、それによって、非イオン性ポリマーおよび添加剤の濃度を決定する。

【0120】

下記の表には、例示的なポリペプチドとしての抗IL17抗体(10mg/ml)の室温での溶解性が、異なる塩化ナトリウム濃度で、添加剤の一例として添加されたソルビトールの濃度に依存することが示される(10mMクエン酸ナトリウム、分子量3,500 Daのポリ(エチレングリ

コール)、pH5.0)。

【0121】

(表)

添加剤 (ソルビトール) [重量%]	塩化 ナトリウム [mM]	PEG 3,500 [重量%]	c(UV280) [mg/ml]	タンパク質濃度 [初期濃度に 対する割合]
0	0	0	10.7	~ 100 %
0	0	5	10.6	~ 100 %
0	0	10	1.96	19.6 %
0	250	0	10.3	~ 100 %
0	250	5	10.6	~ 100 %
0	250	10	1.77	17.7 %
0	500	0	10.5	~ 100 %
0	500	5	10.6	~ 100 %
0	500	10	1.57	15.7 %
7.5	0	0	11.1	~ 100 %
7.5	0	5	10.6	~ 100 %
7.5	0	10	5.26	52.6 %
7.5	250	0	10.7	~ 100 %
7.5	250	5	10.6	~ 100 %
7.5	250	10	5.83	58.3 %
7.5	500	0	10.7	~ 100 %
7.5	500	5	10.6	~ 100 %
7.5	500	10	4.66	46.6 %
15	0	0	10.7	~ 100 %
15	0	5	10.8	~ 100 %
15	0	10	11.0	~ 100 %
15	250	0	10.8	~ 100 %
15	250	5	10.7	~ 100 %
15	250	10	10.4	~ 100 %
15	500	0	10.7	~ 100 %
15	500	5	10.6	~ 100 %
15	500	10	10.5	~ 100 %

10

20

30

【0122】

下記の表には、例示的なポリペプチドとしての抗IL17抗体(10mg/ml)および抗CSF-1R抗体(10mg/ml)の室温での溶解性が、添加剤の一例として添加されたグリセロールの濃度に依存することが示される(10mMクエン酸ナトリウム、分子量3,500 Daのポリ(エチレングリコール)、pH5.0)。

40

【0123】

(表)

添加剤 (グリセロール) [重量%]	PEG- 3,500 [重量%]	c(UV280) 抗IL17 抗体 [mg/ml]	タンパク質濃度 抗IL17 抗体 [初期濃度に 対する割合]	c(UV280) 抗CSF-1R 抗体 [mg/ml]	タンパク質濃度 抗CSF-1R 抗体 [初期濃度に 対する割合]
0	0	9.65	96.5%	9.82	98.2%
0	5	10.0	100%	10.0	100%
0	10	2.13	21.3%	0.59	5.9%
7.5	0	9.76	97.6%	9.96	99.6%
7.5	5	9.88	98.8%	10.2	~ 100%
7.5	10	3.28	32.8%	1.56	15.6%
15	0	9.82	98.2%	9.88	98.8%
15	5	9.92	99.2%	10.2	~ 100%
15	10	6.70	67.0%	3.04	30.4%
20	0	9.95	99.5%	10.2	~ 100%
20	5	9.89	98.9%	10.2	~ 100%
20	10	8.46	84.6%	5.54	55.4%
25	0	10.3	~ 100%	9.87	98.7%
25	5	10.0	100%	9.86	98.6%
25	10	9.92	99.2%	8.94	89.4%
30	0	10.1	~ 100%	9.77	97.7%
30	5	9.92	99.2%	10.1	~ 100%
30	10	9.85	98.5%	10.0	100%

10

20

【0124】

下記の表には、例示的なポリペプチドとしての抗IL17抗体(10mg/ml)および抗CSF-1R抗体(10mg/ml)の室温での溶解性が、添加剤の一例として添加されたキシリトールの濃度に依存することが示される(10mMクエン酸ナトリウム、分子量3,500 Daのポリ(エチレングリコール)、pH5.0)。

30

【0125】

(表)

添加剤 (キシリトール) [重量%]	PEG- 3,500 [重量%]	c(UV280) 抗IL17 抗体 [mg/ml]	タンパク質濃度 抗IL17 抗体 [初期濃度に 対する割合]	c(UV280) 抗CSF-1R 抗体 [mg/ml]	タンパク質濃度 抗CSF-1R 抗体 [初期濃度に 対する割合]
15	0	10.1	~ 100%	10.2	~ 100%
15	10	9.01	90.1%	5.15	51.5%
20	0	10.2	~ 100%	10.1	~ 100%
20	10	10.3	~ 100%	10.1	~ 100%

40

【0126】

下記の表には、例示的なポリペプチドとしての抗IL17抗体(10mg/ml)および抗CSF-1R抗体(10mg/ml)の室温での溶解性が、添加剤の一例として添加されたグリシンの濃度に依存することが示される(10mMクエン酸ナトリウム、分子量3,500 Daのポリ(エチレングリコール)、pH5.0)。

【0127】

(表)

50

添加剤 (グリシン) [重量%]	PEG- 3,500 [重量%]	c(UV280) 抗IL17 抗体 [mg/ml]	タンパク質濃度 抗IL17 抗体 [初期濃度に 対する割合]	c(UV280) 抗CSF-1R 抗体 [mg/ml]	タンパク質濃度 抗CSF-1R 抗体 [初期濃度に 対する割合]
0	0	9.82	98.2%	9.94	99.4%
0	5	10.0	100%	10.0	100%
0	10	1.60	16.0%	0.53	5.3%
1	0	9.85	98.5%	9.72	97.2%
1	10	3.80	38.0%	1.49	14.9%
2	0	9.73	97.3%	9.83	98.3%
2	10	7.18	71.8%	3.19	31.9%
4	0	9.84	98.4%	9.77	97.7%
4	5	9.96	99.6%	10.1	~ 100%
4	10	10.5	~ 100%	9.71	97.1%
8	0	9.89	98.9%	9.95	99.5%
8	5	9.87	98.7%	9.94	99.4%
8	10	9.90	99.0%	11.3	~ 100%

10

20

【0128】

下記の表には、例示的なポリペプチドとしての抗IL17抗体(10mg/ml)および抗CSF-1R抗体(10mg/ml)の室温での溶解性が、添加剤の一例として添加されたプロリンの濃度に依存することが示される(10mMクエン酸ナトリウム、分子量3,500 Daのポリ(エチレングリコール)、pH5.0)。

【0129】

(表)

添加剤 (プロリン) [重量%]	PEG- 3,500 [重量%]	c(UV280) 抗IL17 抗体 [mg/ml]	タンパク質濃度 抗IL17 抗体 [初期濃度に 対する割合]	c(UV280) 抗CSF-1R 抗体 [mg/ml]	タンパク質濃度 抗CSF-1R 抗体 [初期濃度に 対する割合]
1	0	9.74	97.4%	9.75	97.5%
1	10	3.86	38.6%	1.63	16.3%
2	0	9.78	97.8%	9.99	99.9%
2	10	8.38	83.8%	3.61	36.1%
4	0	9.93	99.3%	10.0	100%
4	10	9.85	98.5%	10.1	> 100%
8	0	9.98	99.8%	10.1	> 100%
8	10	10.1	> 100%	10.2	> 100%

30

40

【0130】

下記の表には、例示的なポリペプチドとしての抗IL17抗体(10mg/ml)および抗CSF-1R抗体(10mg/ml)の室温での溶解性が、添加剤の一例として添加されたベタインの濃度に依存することが示される(10mMクエン酸ナトリウム、分子量3,500 Daのポリ(エチレングリコール)、pH5.0)。

【0131】

(表)

添加剤 (ベタイン) [重量%]	PEG- 3,500 [重量%]	c(UV280) 抗IL17 抗体 [mg/ml]	タンパク質濃度 抗IL17 抗体 [初期濃度に 対する割合]	c(UV280) 抗CSF-1R 抗体 [mg/ml]	タンパク質濃度 抗CSF-1R 抗体 [初期濃度に 対する割合]
0	0	9.66	96.6%	9.82	98.2%
0	5	9.81	98.1%	9.97	99.7%
0	10	1.53	15.3%	0.43	4.3%
1	0	9.57	95.7%	9.83	98.3%
1	10	7.11	71.1%	2.28	22.8%
2.5	0	9.60	96.0%	9.60	96.0%
2.5	10	9.68	96.8%	9.89	98.9%
5	0	9.73	97.3%	9.81	98.1%
5	10	9.57	95.7%	10.0	100%
7.5	0	9.65	96.5%	9.86	98.6%
7.5	5	9.98	99.8%	9.99	99.9%
7.5	10	10.5	~ 100%	10.2	~ 100%
15	0	9.75	97.5%	9.87	98.7%
15	5	10.1	~ 100%	10.1	~ 100%
15	10	10.3	~ 100%	10.7	~ 100%

10

20

【0132】

下記の表には、例示的なポリペプチドとしての抗IL17抗体(10mg/ml)および抗CSF-1R抗体(10mg/ml)の室温での溶解性が、添加剤の一例として添加されたスクロースの濃度に依存することが示される(10mMクエン酸ナトリウム、分子量3,500 Daのポリ(エチレングリコール)、pH5.0)。

【0133】

(表)

添加剤 (スクロース) [重量%]	PEG- 3,500 [重量%]	c(UV280) 抗IL17 抗体 [mg/ml]	タンパク質濃度 抗IL17 抗体 [初期濃度に 対する割合]	c(UV280) 抗CSF-1R 抗体 [mg/ml]	タンパク質濃度 抗CSF-1R 抗体 [初期濃度に 対する割合]
0	0	9.64	96.4%	9.74	97.4%
0	5	10.0	100%	10.0	100%
0	10	1.63	16.3%	0.66	6.6%
7.5	0	9.56	95.6%	9.76	97.6%
7.5	5	10.2	~ 100%	10.3	~ 100%
7.5	10	4.49	44.9%	1.58	15.8%
15	0	9.82	98.2%	9.90	99.0%
15	5	10.4	~ 100%	10.4	~ 100%
15	10	7.80	78.0%	3.33	33.3%
20	0	9.71	97.1%	9.80	98.0%
20	10	9.96	99.6%	10.2	~ 100%
25	0	9.65	96.5%	10.0	100%
25	10	9.73	97.3%	9.95	99.5%

30

40

【0134】

50

下記の表には、例示的なポリペプチドとしての抗IL17抗体(10mg/ml)および抗CSF-1R抗体(10mg/ml)の室温での溶解性が、添加剤の一例として添加されたフルクトースの濃度に依存することが示される(10mMクエン酸ナトリウム、分子量3,500 Daのポリ(エチレングリコール)、pH5.0)。

【0135】

(表)

添加剤 (フルクトース) [重量%]	PEG- 3,500 [重量%]	c(UV280) 抗IL17 抗体 [mg/ml]	タンパク質濃度 抗IL17 抗体 [初期濃度に対する割合]	c(UV280) 抗CSF-1R 抗体 [mg/ml]	タンパク質濃度 抗CSF-1R 抗体 [初期濃度に対する割合]
0	0	9.79	97.9%	9.56	95.6%
0	5	9.93	99.3%	9.85	98.5%
0	10	0.98	9.8%	0.42	4.2%
7.5	0	9.76	97.6%	9.78	97.8%
7.5	5	9.97	99.7%	10.1	> 100%
7.5	10	3.85	38.5%	1.42	14.2%
15	0	10.0	100%	9.49	94.9%
15	5	10.1	> 100%	10.0	100%
15	10	8.23	82.3%	3.76	37.6%
20	0	9.65	96.5%	9.91	99.1%
20	10	9.92	99.2%	10.3	> 100%
25	0	10.0	100%	9.61	96.1%
25	10	9.99	99.9%	10.3	> 100%

【0136】

下記の表には、例示的なポリペプチドとしての抗IL17抗体(10mg/ml)および抗CSF-1R抗体(10mg/ml)の室温での溶解性が、添加剤の一例として添加されたグルコースの濃度に依存することが示される(10mMクエン酸ナトリウム、分子量3,500 Daのポリ(エチレングリコール)、pH5.0)。

【0137】

(表)

添加剤 (グルコース) [重量%]	PEG- 3,500 [重量%]	c(UV280) 抗IL17 抗体 [mg/ml]	タンパク質濃度 抗IL17 抗体 [初期濃度に対する割合]	c(UV280) 抗CSF-1R 抗体 [mg/ml]	タンパク質濃度 抗CSF-1R 抗体 [初期濃度に対する割合]
7.5	0	9.84	98.4%	97.8	97.8%
7.5	10	5.35	53.5%	2.39	23.9%
15	0	9.98	99.8%	9.92	99.2%
15	10	9.63	96.3%	5.84	58.4%
20	0	10.1	~ 100%	10.1	~ 100%
20	10	10.0	100%	8.08	80.8%
25	0	10.5	~ 100%	10.4	~ 100%
25	10	10.4	~ 100%	10.3	~ 100%

【0138】

本明細書に報告される方法において非イオン性ポリマーを添加剤と組み合わせた場合に

は、改善された分離度値を達成することができる。下記の表には、抗IL17抗体のクロマトグラフ分離における、非イオン性ポリマーの一例としての10重量%濃度のポリ(エチレングリコール)3,500と表示濃度の添加剤との組み合わせにより得られた分離度の値が示される。

【0139】

(表)

分離度の値	抗 IL17 抗体	抗 CSF-1R 抗体
5% PEG, 3,500 Da MW	0.75	0.66
D-ソルビトール、15重量%	0.85	0.86
グリシン、8重量%	0.85	0.80
L-プロリン、8重量%	0.83	0.97
ベタイン、8重量%	0.86	0.86
サッカロース、25重量%	0.73	0.84
D-フルクトース、25重量%	0.79	0.91
D-グルコース、25重量%	0.81	0.97
キシリトール、20重量%	0.76	0.94
グリセロール、30重量%	0.77	0.90

10

20

【0140】

10重量%のポリ(エチレングリコール)を添加剤なしで用いると、抗体が沈殿する。したがって、上記表の基準値は5重量%の非イオン性ポリマーの存在下で測定された。

30

【0141】

下記の表には、本明細書に報告される方法に供したサンプルの宿主細胞タンパク質含量と宿主細胞DNA含量の変化が示される。宿主細胞タンパク質含量と宿主細胞DNA含量を測定するために、分離度値の低下をもたらした画分サイズを増加しなければならなかったことを指摘しておく必要がある。提示されたすべての例では、移動相中の塩化ナトリウム濃度を増加させることによって溶出が実施される。

【0142】

(表)

抗IL17抗体			
溶出条件	分離度の値	HCP減少 [%]	宿主細胞DNA減少 [%]
非イオン性ポリマーなし 添加剤なし	0.44	85.5	61.8
5重量% PEG-3,500	0.70	94.5	増加
10重量% PEG-3,500 15重量% D-ソルビトール	0.78	98.4	増加
抗CSF-1R抗体			
溶出条件	分離度の値	HCP減少 [%]	宿主細胞DNA減少 [%]
非イオン性ポリマーなし 添加剤なし	0.56	98.6	80.9
5重量% PEG-3,500	0.66	99.5	77.7
10重量% PEG-3,500 15重量% D-ソルビトール	0.88	99.7	17.0

10

20

【0143】

上記の表から分かるように、回収溶液中に非イオン性ポリマーと添加剤とを含むクロマトグラフィー法では、この組み合わせを用いないで行った方法と比べて、回収された抗体調製物中のHCP(宿主細胞タンパク質)含量を低減させることができる。

【0144】

したがって、本明細書に報告される一局面は、宿主細胞タンパク質含量を低減させた抗体調製物を産生するための方法であり、ここで、該調製物は、哺乳動物細胞の培養上清、特にCHO細胞の培養上清から得られるものであり、この方法は、

30

- 非イオン性ポリマーと添加剤とを含む溶液を、抗体が吸着されたクロマトグラフィー材料にアプライする工程であって、単量体形態の抗体がイオン交換クロマトグラフィー材料に吸着されたままである、工程、および

- 非イオン性ポリマーと添加剤と溶出化合物とを含む溶液をアプライすることによって、イオン交換クロマトグラフィー材料から単量体形態の抗体を回収し、それによって宿主細胞タンパク質含量を低減させた抗体調製物を産生する工程を含む。

【0145】

本明細書に報告される別の局面は、抗体を産生するための方法であり、この方法は、

- a) 抗体をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養し、該細胞または培養培地から抗体を回収する工程、

40

- b) 以下の工程：

- 非イオン性ポリマーと添加剤とを含む溶液を、抗体が吸着されたクロマトグラフィー材料にアプライする工程であって、単量体形態の抗体がイオン交換クロマトグラフィー材料に吸着されたままである、工程、および

- 非イオン性ポリマーと添加剤と溶出化合物とを含む溶液をアプライすることによって、イオン交換クロマトグラフィー材料から単量体形態の抗体を回収し、それによって抗体を産生する工程

を含むカチオン交換クロマトグラフィー法で抗体を精製する工程を含む。

50

【0146】

下記の表には、抗IL17抗体に対して異なるカチオン交換クロマトグラフィー材料を用いて得られた分離度の値が示される。提示されたすべての例では、移動相中の塩化ナトリウム濃度を増加させることによって溶出が実施される。

【0147】

(表)

溶出条件	クロマトグラフィー材料	分離度の値
非イオン性ポリマーなし 添加剤なし	SP Sepharose FF	0.29
非イオン性ポリマーなし 添加剤なし	Toyopearl CM-650M	0.53
非イオン性ポリマーなし 添加剤なし	CM Sepharose FF	0.29
5重量% PEG-3,500	SP Sepharose FF	0.45
5重量% PEG-3,500	Toyopearl CM-650M	0.67
5重量% PEG-3,500	CM Sepharose FF	0.44
10重量% PEG-3,500 15重量% D-ソルビトール	SP Sepharose FF	0.51
10重量% PEG-3,500 15重量% D-ソルビトール	Toyopearl CM-650M	0.76
10重量% PEG-3,500 15重量% D-ソルビトール	CM Sepharose FF	0.51

10

20

【0148】

下記の表には、異なる分子量を有する非イオン性ポリマーとしてポリ(エチレングリコール)400 Da MWおよび10,000 Da MWならびに添加剤としてポリオールのソルビトールを用いて、本明細書に記載の方法により得られた分離度の値が、抗IL17抗体に関して示される。

30

【0149】

(表)

溶出条件	分離度の値
10重量% PEG-400; 15重量% D-ソルビトール	0.52
10重量% PEG-400; 15% D-ソルビトール	0.56
10重量% PEG-400; 15% D-ソルビトール	0.57
平均:	0.55
10重量% PEG-10,000; 15% D-ソルビトール	0.58
10重量% PEG-10,000; 15% D-ソルビトール	0.70
10重量% PEG-10,000; 15% D-ソルビトール	0.65
平均:	0.64

40

【0150】

本明細書に報告される方法を実施した後の予想された純度に応じて、単量体ポリペプチドの回収率は、非イオン性ポリマーおよび添加剤の濃度の組み合わせに依存して変化する。

【0151】

50

以下では、この相互関係が、非イオン性ポリマーとしてポリ(エチレングリコール)、添加剤としてソルビトール、そしてポリペプチドとして抗IL17抗体を用いて例示される。

【0152】

下記の表には、ポリ(エチレングリコール)とソルビトールの濃度に依存する、プールされた(組み合わされた)溶出画分中の少なくとも99%の純度を有する単量体抗IL17抗体の回収率および最終純度が示される。

【0153】

(表)

単量体 回収率 [%]	ソルビトール[重量%] →								
		0	3	5	10	15	20	30	40
PEG- 3,500 [重量%] ↓	0	82.3				77.9			
	5	87.0				84.5			
	6	89.0							
	8	82.7							
	9	86.1	92.6						
	10	86.1		88.5	89.2	88.6	90.0	84.9	88.1
	15						87.1		
単量体 純度 [%]	ソルビトール[重量%] →								
		0	3	5	10	15	20	30	40
PEG- 3,500 [重量%] ↓	0	99.5				99.5			
	5	99.3				99.3			
	6	99.3							
	8	98.9							
	9	99.0	99.1						
	10	99.1		98.8	98.9	99.3	99.2	99.1	99.0
	15						99.2		

空白セルの値は測定されなかった。

【0154】

下記の表には、ポリ(エチレングリコール)とソルビトールの濃度に依存する、プールされた(組み合わされた)溶出画分中の少なくとも99.5%の純度を有する単量体抗IL17抗体の回収率および最終純度が示される。

【0155】

(表)

単量体 回収率 [%]	ソルビトール[重量%] →								
PEG- 3,500 [重量%] ↓		0	3	5	10	15	20	30	40
	0	82.3				77.9			
	5	81.3				78.7			
	6	83.3							
	8	81.1							
	9	84.3	92.0						
	10	84.9		85.3	88.2	87.1	87.0	81.5	82.8
	15						86.0		
単量体 純度 [%]	ソルビトール[重量%] →								
PEG- 3,500 [重量%] ↓		0	3	5	10	15	20	30	40
	0	99.5				99.5			
	5	99.8				99.9			
	6	99.8							
	8	99.8							
	9	99.5	99.5						
	10	99.5		100.0	99.5	99.7	99.7	99.8	99.6
	15						99.5		

空白セルの値は測定されなかった。

【0156】

下記の表には、ポリ(エチレングリコール)とソルビトールの濃度に依存する、プールされた(組み合わせられた)溶出画分中の少なくとも99.9%の純度を有する単量体抗IL17抗体の回収率および最終純度が示される。

【0157】

(表)

10

20

単量体 回収率 [%]	ソルビトール[重量%] →								
PEG- 3,500 [重量%] ↓		0	3	5	10	15	20	30	40
	0	66.3				63.9			
	5	67.9				78.7			
	6	66.0							
	8	75.1							
	9	76.9	89.1						
	10	80.4		85.3	83.1	84.5	81.3	76.0	64.6
	15						80.9		
単量体 純度 [%]	ソルビトール[重量%] →								
PEG- 3,500 [重量%] ↓		0	3	5	10	15	20	30	40
	0	99.9				100.0			
	5	100.0				99.9			
	6	100.0							
	8	100.0							
	9	99.9	99.9						
	10	99.9		100.0	100.0	99.9	99.9	100.0	100.0
	15						99.9		

空白セルの値は測定されなかった。

【0158】

下記の表には、ポリ(エチレングリコール)とソルビトールの濃度に依存する、プールされた(組み合わせられた)溶出画分中の100%の純度を有する単量体抗IL17抗体の回収率および最終純度が示される。

【0159】

(表)

10

20

単量体 回収率 [%]	ソルビトール[重量%] →								
PEG- 3,500 [重量%] ↓		0	3	5	10	15	20	30	40
	0	41.1				63.9			
	5	67.9				67.1			
	6	66.0							
	8	75.1							
	9	67.0	84.7						
	10	75.8		85.3	83.1	68.7	70.5	76.0	64.6
	15						75.5		
単量体 純度 [%]	ソルビトール[重量%] →								
PEG- 3,500 [重量%] ↓		0	3	5	10	15	20	30	40
	0	100.0				100.0			
	5	100.0				100.0			
	6	100.0							
	8	100.0							
	9	100.0	100.0						
	10	100.0		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	15						100.0		

空白セルの値は測定されなかった。

【0160】

一般的に、クロマトグラフ分離工程はいくつかのサブ工程を含む：

- クロマトグラフィーカラムに充填されたクロマトグラフィー材料を平衡化するサブ工程、

- 平衡化したクロマトグラフィー材料に、関心対象のポリペプチドを含む溶液を、クロマトグラフィー材料への該ポリペプチドの吸着/結合に適した条件下でアプライし、それによってクロマトグラフィーカラムにロードするサブ工程、

- 必要に応じて、クロマトグラフィー材料から該ポリペプチドを脱着/溶出することなく、クロマトグラフィー材料を洗浄するサブ工程、

- 回収溶液をクロマトグラフィー材料にアプライし、それによってクロマトグラフィー材料から該ポリペプチドを脱着/溶出することによって、関心対象のポリペプチドを回収するサブ工程。

【0161】

一態様では、カラム内のカチオン交換クロマトグラフィー材料は、ポリペプチドを含む溶液をカラムにアプライする前に平衡化される。これは、カラムに平衡化緩衝液をアプライして、カチオン交換クロマトグラフィー材料上またはその内部に適切なpH値、および/または導電率、および/または塩濃度を確立することによって、達成することができる。

【0162】

一態様では、ポリペプチドを含む溶液は、カチオン交換クロマトグラフィーカラムを平衡化するのに匹敵する条件に調整される。

【0163】

関心対象のポリペプチドをクロマトグラフィーカラムにロードするためのさまざまな方法が可能である。一態様では、関心対象のポリペプチドを溶液に添加して、カラムにロードする。別の態様では、カラムを平衡化および/または洗浄した後で、関心対象のポリペプチドを添加する。一態様では、平衡化する工程は、クロマトグラフィー材料に該溶液をロードする前に、結合緩衝液をアプライすることを含む。

【0164】

10

20

30

40

50

上で概説したように、本明細書に報告される方法は結合/溶出モードで実施される。

【0165】

本明細書に報告される方法では、単量体形態のポリペプチドの回収は、線形勾配、段階的勾配、または線形勾配と段階的勾配の組み合わせを用いて行うことができる。線形勾配は、例えば、凝集形態のポリペプチドからのおよび/または宿主細胞タンパク質などの他の汚染物質からの単量体形態のポリペプチドの分離をさらに改善するために使用することができる。段階的勾配は、回収されたポリペプチド溶液の量を減らすために使用することができる。カチオン交換クロマトグラフィー材料からポリペプチドを回収する際の任意の勾配の選択および使用は、当業者であれば容易に行うことができる。

【0166】

一態様では、ポリペプチドを含む溶液をアプライした後に、多くの場合は平衡化緩衝液と同じ組成の緩衝洗浄液がクロマトグラフィー材料にアプライされる。

【0167】

一態様では、非イオン性ポリマーの濃度は溶出中に一定に保持され、その間pH値が変更され、かつ/または溶出を生じさせる塩の濃度が上げられる。

【0168】

一態様では、非イオン性ポリマーの濃度は溶出中に上げられ、その間pH値が変更され、かつ/または溶出を生じさせる塩の濃度が上げられる。

【0169】

一態様では、非イオン性ポリマーの濃度は溶出中に下げられ、その間pH値および/または塩濃度が一定に保持される。

【0170】

使用後は、カチオン交換クロマトグラフィー材料を洗浄し、殺菌し、そして適切な剤中に保存することができる。

【0171】

本明細書に報告される方法は、例えば、限定するものではないが、プロテインAアフィニティクロマトグラフィーおよび他の種類のアフィニティクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、または他の混合モードクロマトグラフィーなどの、1つまたはそれ以上の他のクロマトグラフィー工程または方法と組み合わせて実施することができる。

【0172】

本明細書に報告される方法は、充填床カラム、カチオン交換クロマトグラフィー材料を含む流動床/膨潤床カラム、および/またはカチオン交換クロマトグラフィー材料がポリペプチド調製物と一定時間混合されるバッチ操作で実施することができる。

【0173】

本明細書に報告される方法は、単量体形態の生物学的に活性なポリペプチドを産生するのに有用である。そのような生物学的に活性なポリペプチドは、一態様では、抗体、抗体変異体、抗体コンジュゲートから選択される。別の態様では、関心対象のポリペプチドは抗体、特にモノクローナル抗体である。抗体は、任意の哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ウシ、またはヒト免疫グロブリン遺伝子座を有するトランスジェニック動物に由来するものであってよく、あるいはそれはそのヒト化変異体、再表面形成(resurfaced)変異体、またはT細胞エピトープ枯渇変異体であってもよい。

【0174】

当業者は、本明細書に報告される方法を実施して、任意のポリペプチドを産生することができることを理解すべきである。したがって、本明細書中で用いられる抗体は、ポリペプチドの一例として扱われねばならない。

【0175】

本明細書に報告される方法では、さまざまな抗体調製物、例えば、天然、合成または組換え供給源からの未精製(粗製)もしくは部分精製抗体を使用することができる。粗製の抗体調製物は、実験動物の血漿、血清、腹水、もしくは乳、植物抽出物、細菌細胞溶解液、

10

20

30

40

50

酵母溶解液、または馴化動物細胞培養培地を含むがこれらに限定されない、さまざまな供給源から得ることができる。部分精製調製物は、少なくとも1回のクロマトグラフィー、沈殿、他の分画工程、またはそれらの任意の組み合わせを施された粗製の調製物から得ることができる。沈殿工程は、例えば塩またはポリ(エチレングリコール)沈殿などの、任意の方法を含むことができる。結晶化または膜濾過といった他の分画工程を使用してもよい。一態様では、抗体は非PEG化抗体である。

【0176】

本明細書に報告される方法を用いると、凝集物を実質的に含まないポリペプチドを得ることができる。一態様では、サイズ排除クロマトグラフィーで測定された凝集形態のポリペプチドの含量は、全ピーク面積に基づいて約5%未満である。別の態様では、凝集形態のポリペプチドの含量は約1%未満である。さらなる態様では、凝集形態のポリペプチドの量は約0.5%未満である。さらに別の態様では、凝集形態のポリペプチドの量は約0.1%未満である。

10

【0177】

最近、新しい二重特異性二価抗体フォーマット、いわゆる「CrossMab」が発表された(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108 (2011) 11187-11192)。この二重特異性抗体は4本の異なる抗体鎖、すなわち2本の異なる軽鎖と2本の異なる重鎖を含む。発現の間に、種々の産物関連不純物が形成されることがある。これらの産物関連不純物の一つがいわゆる「3/4抗体」であり、この抗体は1本の軽鎖を失っており、完全な4本鎖抗体が約150kDaの分子量であるのに対して、約125kDaの分子量を示す。こうした種類の抗体フラグメントは一般に、抗体の発現中に形成される可能性がある。

20

【0178】

したがって、本明細書に報告される一局面は、完全長4本鎖抗体を産生するための方法であり、この方法は、

a) 該抗体をコードする核酸を含む哺乳動物細胞を培養し、該細胞または培養培地から該抗体を回収する工程、

b) 以下の工程：

- 非イオン性ポリマーと添加剤とを含む溶液を、該抗体が吸着されたクロマトグラフィー材料にアプライする工程であって、単量体形態の4本鎖完全長抗体がイオン交換クロマトグラフィー材料に吸着されたままである、工程、および

30

- 非イオン性ポリマーと添加剤と溶出化合物とを含む溶液をアプライすることによって、イオン交換クロマトグラフィー材料から単量体形態の4本鎖完全長抗体を回収し、それによって該抗体を産生する工程

を含むカチオン交換クロマトグラフィー法で該抗体を精製する工程を含む。

【0179】

先に概説したすべての局面の一態様において、イオン交換クロマトグラフィー材料はカチオン交換クロマトグラフィー材料である。

【0180】

先に概説したすべての局面の一態様において、非イオン性ポリマーは、ポリ(エチレングリコール)(PEG)、ポリ(プロピレングリコール)(PPG)、PEG-PPGコポリマー、およびポリ(オキシエチレン)(ポリ(エチレンオキシド))で挟まれたポリ(オキシプロピレン)(ポリ(プロピレンオキシド))から構成されるトリブロックコポリマーを含む群より選択される。一態様では、非イオン性ポリマーはポリ(エチレングリコール)である。

40

【0181】

先に概説したすべての局面の一態様において、添加剤は、両性イオン、アミノ酸、尿素、尿素誘導体、両性電解質、CHAPSO、天然物、糖類、およびポリオールを含む群より選択される。さらなる態様では、添加剤はソルビトールである。

【0182】

先に概説したすべての局面の一態様において、非イオン性ポリマーは約5~15重量%の

50

濃度を有し、かつ/または添加剤は3～25重量%の濃度を有する。

【0183】

先に概説したすべての局面の一態様において、ポリペプチドはクラスIgG、IgD、IgE、またはIgAの抗体である。別の態様では、ポリペプチドはクラスIgGのサブクラスIgG1、サブクラスIgG2、サブクラスIgG3、またはサブクラスIgG4の抗体である。

【0184】

先に概説したすべての局面の一態様において、方法は、

- 非イオン性ポリマーと添加剤とを任意で含む第1の溶液をイオン交換クロマトグラフィー材料にアプライし、それによってイオン交換クロマトグラフィー材料を平衡化する工程、

- 平衡化したクロマトグラフィー材料にポリペプチドを含む緩衝溶液をアプライし、それによってポリペプチドをクロマトグラフィー材料に吸着させる工程であって、該溶液が非イオン性ポリマーおよび添加剤を本質的に含まない、工程、

- 非イオン性ポリマーと添加剤とを含む緩衝溶液をクロマトグラフィー材料にアプライする工程であって、単量体形態のポリペプチドがイオン交換クロマトグラフィー材料に吸着されたままである、工程、ならびに

- 非イオン性ポリマーと添加剤と溶出化合物とを含む溶液をアプライすることによって、イオン交換クロマトグラフィー材料から単量体形態のポリペプチドを回収する工程を含む。一態様では、回収する工程は勾配溶出により行う。

【0185】

以下の実施例および図面は、本発明の理解を助けるために提供されるものであり、本発明の真の範囲は添付の特許請求の範囲に記載される。記載された手順には、本発明の精神から逸脱することなく、変更がなされ得ることが理解されよう。

【実施例】

【0186】

材料：

各抗体(抗IL17抗体：配列についてはWO 2010/034443参照；抗CSF-1R抗体：配列についてはPCT/EP2010/069090参照；抗Ang2/VEGF抗体：配列についてはWO 2010/040508参照)は第1段階においてプロテインAアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。プロテインAカラムからの溶出は酸性条件下で実施した。その後サンプルを1Mクエン酸で約pH3.5に調整し、約1時間インキュベートした。続いて、1M TRIS/HCl, pH8～9または1M TRIS溶液(TRIS：トリス-ヒドロキシメチル-アミノ-メタン)を加えることによってpHを5.0または5.5に調整した。4℃で12～18時間インキュベートした後、サンプルを深層濾過した。このサンプルは5mg/ml～20 mg/mlのタンパク質濃度を有する溶液である。この物質は以下では調整済みプロテインA溶出液と呼ばれ、カチオン交換クロマトグラフィー材料にロードするために調製された溶出液である。

【0187】

抗Ang2/VEGF抗体はさらに、アニオン交換クロマトグラフィーで精製した：調整済みプロテインA溶出液のpH値を1M TRIS緩衝溶液の添加により7.5に調整した。続いて、サンプルをアニオン交換クロマトグラフィーによりpH7.5でフロースルーモードにて処理した。

【0188】

最初の実施例では、本明細書に報告される方法が実施された。したがって、実施例1には本方法のすべての条件が示される。その後続く実施例では、差異のみが記載される。記載されていないパラメータはすべて同一である。

【0189】

実施例1

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗IL17抗体

交換材料： Poros 50HS

カラム： 内径8mm、長さ100mm、体積5.03ml

流速： 90cm/h(=0.75ml/分)

平衡化溶液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、pH5.0に調整、4カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液1： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、pH5.0に調整、1カラム体積

洗浄液2： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10%(w/w)ポリ(エチレングリコール)(MW 3,500 Da)、15%(w/w) D-ソルビトール、pH5.0に調整

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10%(w/w)ポリ(エチレングリコール)(MW 3,500 Da)、15%(w/w) D-ソルビトール、pH5.0に調整

溶出法： 0%(v/v)から100%(v/v)溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

【0190】

10

イオン交換クロマトグラフィー材料を含むクロマトグラフィーカラムに調整済みプロテインA溶出液をアプライした。90cm/hの流速でロードした後、カラムを洗浄液1(1カラム体積)と洗浄液2(3カラム体積)で洗浄した。単量体形態の抗体は線形勾配溶出法で回収したが、その際、pH値を一定に維持して、導電率を塩化ナトリウムの添加により変化(増加)させた。

【0191】

図1には、カチオン交換クロマトグラフィー材料上の抗IL17抗体のカチオン交換クロマトグラフィーの溶出クロマトグラムが示される。単量体形態の抗体と凝集形態の抗体が分離される。

【0192】

20

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量ならびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果を以下の表に示す。

【0193】

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.45	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	8.93	10.7	95.67	93.35	6.65
フロースルー	0.00	~ 90	0.00	0	0
画分 1	0.45	3.0	1.35	100	0
画分 2	2.92	3.0	8.76	100	0
画分 3	6.30	3.0	18.90	100	0
画分 4	8.45	3.0	25.35	100	0
画分 5	6.50	3.0	19.50	99.61	0.39
画分 6	2.21	3.0	6.63	89.70	10.30
画分 7	1.28	3.0	3.84	53.47	46.53
画分 8	1.41	3.0	4.23	36.58	63.42
画分 9	0.97	3.0	2.91	30.93	69.07
画分 10	0.45	3.0	1.35	18.96	81.04
画分 11	0.20	3.0	0.60	20.38	79.62
サンプル	抗体の量に 基づく CHO HCP の量 [ng/mg]	CHO HCP の量 [ng]	抗体の量に 基づく CHO HCDNA の量 [pg/mg]	CHO HCDNA の量 [pg]	
調整済み プロテインA 溶出液	471	45,061	0.80	76.54	
フロースルー	<5 ng/ml	<15	<0.4 pg/ml	<1.2	
画分 1	<18	<24	<9	<12.15	
画分 2	<2.74	<24	<1	<8.76	
画分 3	<1.27	<24	<0.63	<11.91	
画分 4	0.991	25	<0.96	<24.34	
画分 5	1.394	27	1	19.50	
画分 6	7.923	53	6	39.78	
画分 7	19	73	10	38.40	
画分 8	14	59	10	42.30	
画分 9	30	87	15	43.65	
画分 10	91	123	26	35.10	
画分 11	316	190	53	31.80	

【0194】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.78であると決定された。

【0195】

実施例2

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗CSF-1R抗体

【0196】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量について分析した。分析の結果を以下の表に示す。

【0197】

10

20

30

40

50

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.47	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	12.9	7.71	99.48	99.19	0.81
フロースルー	0.00	~60	0.00	-	-
画分 1	0.99	3.00	2.97	100	0
画分 2	5.84	3.00	17.52	100	0
画分 3	8.30	3.00	24.90	100	0
画分 4	7.87	3.00	23.61	100	0
画分 5	5.67	3.00	17.01	100	0
画分 6	1.94	3.00	5.82	100	0
画分 7	0.58	3.00	1.74	94.21	5.79
画分 8	0.41	3.00	1.23	87.79	12.21
画分 9	0.23	1.50	0.35	84.58	15.42
サンプル	抗体の量に 基づく CHO HCP の量 [ng/mg]	CHO HCP の量 [ng]	抗体の量に 基づく CHO HCDNA の量 [pg/mg]	CHO HCDNA の量 [pg]	
調整済み プロテインA 溶出液	1,260	125,345	2	198.96	
フロースルー	<5 ng/ml	<15	<0.4 pg/ml	<1.2	
画分 1	<8.081	<24	<4	11.88	
画分 2	1.579	28	<0.68	70.08	
画分 3	<0.602	<15	<0.48	16.93	
画分 4	<1.017	<24	1	11.33	
画分 5	2.797	48	1	17.01	
画分 6	14	81	5	5.82	
画分 7	50	87	19	8.70	
画分 8	99	122	28	23.37	
画分 9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	

【0198】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.88であると決定された。

【0199】

実施例3

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗IL17抗体

平衡化溶液： 35mM酢酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、15% (w/w) D-ソルビトール、pH5.0に調整、4カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液： 35mM酢酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、15% (w/w) D-ソルビトール、pH5.0に調整、1カラム体積

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、35mM酢酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、15% (w/w) D-ソルビトール、pH5.0に調整、

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

【0200】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量ならびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果を以下の表に示す。

【0201】

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.45	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	9.36	11.0	102.98	92.76	7.24
フロースルー	0.00	~ 50	0.00	0	0
画分 1	0.43	2.0	0.86	100	0
画分 2	2.77	2.0	5.54	100	0
画分 3	6.10	2.0	12.20	100	0
画分 4	8.02	2.0	16.04	100	0
画分 5	8.56	2.0	17.12	100	0
画分 6	7.86	2.0	15.72	100	0
画分 7	5.59	2.0	11.18	99.77	0.23
画分 8	2.74	2.0	5.48	97.75	2.25
画分 9	1.34	2.0	2.68	85.98	14.02
画分 10	1.13	2.0	2.26	55.26	44.74
画分 11	1.31	2.0	2.62	35.5	64.5
画分 12	1.41	2.0	2.82	24.86	75.14
画分 13	1.18	2.0	2.36	22.22	77.78
画分 14	0.79	2.0	1.58	15.47	84.53
画分 15	0.48	2.0	0.96	13.63	86.37
画分 16	0.29	2.0	0.58	13.73	86.27
画分 17	0.18	2.0	0.36	16.03	83.97

【0202】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社) を用いて0.86であると決定された。

【0203】

実施例4

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗IL17抗体

平衡化溶液： 25mM MES緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、15% (w/w) D-ソルビトール、pH5.5に調整、4カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液： 35mM MES緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、15% (w/w) D-ソルビトール、pH5.5に調整、4カラム体積

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、35mM MES緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、15% (w/w) D-ソルビトール、pH5.5に調整、

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

【0204】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量ならびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果

果を以下の表に示す。

【0205】

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.45	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	9.36	10.99	102.87	92.85	7.15
フロースルー	0.00	~50	0.00	0	0
画分 1	0.28	2.0	0.56	100	0
画分 2	1.45	2.0	2.90	100	0
画分 3	4.43	2.0	8.86	100	0
画分 4	7.17	2.0	14.34	100	0
画分 5	8.90	2.0	17.80	100	0
画分 6	8.85	2.0	17.70	100	0
画分 7	6.64	2.0	13.28	99.65	0.35
画分 8	2.97	2.0	5.94	93.13	6.87
画分 9	1.61	2.0	3.22	67.63	32.37
画分 10	1.50	2.0	3.00	34.08	65.92
画分 11	1.51	2.0	3.02	25.22	74.78
画分 12	1.19	2.0	2.38	22.68	77.32
画分 13	0.72	2.0	1.44	20.45	79.55
画分 14	0.43	2.0	0.86	17.36	82.64
画分 15	0.25	2.0	0.50	16.24	83.76
画分 16	0.15	2.0	0.30	18.61	81.39

10

20

【0206】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.77であると決定された。

30

【0207】

実施例5

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗IL17抗体

交換材料： SP Sepharose FF

平衡化溶液： 30mMクエン酸ナトリウム緩衝液、pH5.0に調整、4カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液1： 30mMクエン酸ナトリウム緩衝液、pH5.0に調整、1カラム体積

洗浄液2： 30mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、15% (w/w) D-ソルビトール、pH5.0に調整

40

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、30mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、15% (w/w) D-ソルビトール、pH5.0に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

【0208】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量ならびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果を以下の表に示す。

【0209】

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.45	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	9.36	10.7	100.07	92.90	7.10
フロースルー	0.00	~50	0.00	-	-
画分 1	0.18	2.00	0.36	100	0
画分 2	0.74	2.00	1.48	100	0
画分 3	1.97	2.00	3.94	100	0
画分 4	3.62	2.00	7.24	100	0
画分 5	5.15	2.00	10.30	100	0
画分 6	6.17	2.00	12.34	99.65	0.35
画分 7	6.25	2.00	12.50	99.23	0.77
画分 8	5.64	2.00	11.28	98.11	1.89
画分 9	4.53	2.00	9.06	96.18	3.82
画分 10	3.34	2.00	6.68	92.74	7.26
画分 11	2.37	2.00	4.74	85.49	14.51
画分 12	1.63	2.00	3.26	77.02	22.98
画分 13	1.15	2.00	2.30	63.27	36.73
画分 14	0.83	2.00	1.66	48.97	51.03
画分 15	0.60	2.00	1.20	36.01	63.99
画分 16	0.44	2.00	0.88	25.04	74.96
画分 17	0.32	2.00	0.64	19.77	80.23
画分 18	0.23	2.00	0.46	17.00	83.00
画分 19	0.16	2.00	0.32	16.62	83.38

【0210】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.51であると決定された。

【0211】

実施例6

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗IL17抗体

交換材料： Toyopearl CM-650 M

平衡化溶液： 30mMクエン酸ナトリウム緩衝液、pH5.0に調整、4カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液1： 30mMクエン酸ナトリウム緩衝液、pH5.0に調整、1カラム体積

洗浄液2： 30mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、15% (w/w) D-ソルビトール、pH5.0に調整

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、30mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、15% (w/w) D-ソルビトール、pH5.0に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

【0212】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量ならびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果を以下の表に示す。

【0213】

(表)

10

20

30

40

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.45	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	9.38	10.7	100.32	93.05	6.95
フロースルー	0.00	~50	0.00	0	0
画分 1	0.58	2.00	1.16	100	0
画分 2	1.63	2.00	3.26	100	0
画分 3	2.89	2.00	5.78	100	0
画分 4	4.13	2.00	8.26	100	0
画分 5	5.01	2.00	10.02	100	0
画分 6	5.49	2.00	10.98	100	0
画分 7	5.58	2.00	11.16	100	0
画分 8	5.24	2.00	10.48	100	0
画分 9	4.52	2.00	9.04	100	0
画分 10	3.48	2.00	6.96	99.29	0.71
画分 11	2.41	2.00	4.82	97.27	2.73
画分 12	1.58	2.00	3.16	91.13	8.87
画分 13	1.15	2.00	2.30	75.73	24.27
画分 14	0.99	2.00	1.98	44.16	55.84
画分 15	0.94	2.00	1.88	17.21	82.79
画分 16	0.88	2.00	1.76	16.96	83.04
画分 17	0.75	2.00	1.50	10.07	89.93
画分 18	0.58	2.00	1.16	8.64	91.36
画分 19	0.43	2.00	0.86	0.85	99.15
画分 20	0.31	2.00	0.62	0	100
画分 21	0.21	2.00	0.42	0	100
画分 22	0.15	2.00	0.30	0	100

10

20

30

【0214】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.76であると決定された。

【0215】

実施例7

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗IL17抗体

交換材料： CM Sepharose FF

平衡化溶液： 30mMクエン酸ナトリウム緩衝液、pH5.0に調整、4カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液1： 30mMクエン酸ナトリウム緩衝液、pH5.0に調整、1カラム体積

洗浄液2： 30mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、15% (w/w) D-ソルビトール、pH5.0に調整

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、30mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、15% (w/w) D-ソルビトール、pH5.0に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

40

【0216】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量ならびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果を以下の表に示す。

50

【0217】

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.45	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	9.55	10.7	102.02	93.04	6.96
フロースルー	0.00	~50	0.00	-	-
画分 1	0.14	2.00	0.28	98.77	1.23
画分 2	0.47	2.00	0.94	100	0
画分 3	1.16	2.00	2.32	100	0
画分 4	2.19	2.00	4.38	100	0
画分 5	3.32	2.00	6.64	100	0
画分 6	4.38	2.00	8.76	100	0
画分 7	4.98	2.00	9.96	99.79	0.21
画分 8	5.37	2.00	10.74	99.48	0.52
画分 9	5.18	2.00	10.36	98.65	1.35
画分 10	4.61	2.00	9.22	98.21	1.79
画分 11	3.89	2.00	7.78	96.20	3.80
画分 12	3.01	2.00	6.02	93.77	6.23
画分 13	2.35	2.00	4.70	89.37	10.63
画分 14	1.76	2.00	3.52	83.97	16.03
画分 15	1.30	2.00	2.60	75.39	24.61
画分 16	0.98	2.00	1.96	63.61	36.39
画分 17	0.74	2.00	1.48	51.68	48.32
画分 18	0.57	2.00	1.14	37.62	62.38
画分 19	0.44	2.00	0.88	30.42	69.58
画分 20	0.33	2.00	0.66	22.95	77.05
画分 21	0.23	2.00	0.46	21.01	78.99
画分 22	0.19	2.00	0.38	16.76	83.24
画分 23	0.15	2.00	0.30	15.29	84.71

【0218】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.51であると決定された。

【0219】

実施例8

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗IL17抗体

平衡化溶液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、20% (w/w) キシリトール、pH5.0に調整、2カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、20% (w/w) キシリトール、pH5.0に調整、4カラム体積

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、20% (w/w) キシリトール、pH5.0に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

【0220】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量な

らびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果を以下の表に示す。

【0221】

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.45	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]	抗体 フラグメント (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	9.36	10.77	100.24	94.23	5.77	0
フロースルー	0.00	~80	0.00	-	-	0
画分 1	0.62	1.5	0.93	82.66	0	17.34
画分 2	2.85	1.5	4.28	100	0	0
画分 3	5.59	1.5	8.39	100	0	0
画分 4	7.15	1.5	10.73	100	0	0
画分 5	7.89	1.5	11.84	100	0	0
画分 6	7.81	1.5	11.72	100	0	0
画分 7	7.31	1.5	10.97	100	0	0
画分 8	6.21	1.5	9.32	100	0	0
画分 9	4.48	1.5	6.72	99.78	0.22	0
画分 10	2.74	1.5	4.11	98.36	1.64	0
画分 11	1.65	1.5	2.48	94.44	5.56	0
画分 12	1.24	1.5	1.86	77.49	22.51	0
画分 13	1.23	1.5	1.85	57.48	42.52	0
画分 14	1.39	1.5	2.09	43.27	56.73	0
画分 15	1.43	1.5	2.15	36.42	63.58	0
画分 16	1.30	1.5	1.95	34.12	65.88	0
画分 17	1.01	1.5	1.52	29.98	70.02	0
画分 18	0.72	1.5	1.08	23.98	76.02	0
画分 19	0.48	1.5	0.72	26.01	73.99	0
画分 20	0.32	1.5	0.48	20.98	79.02	0
画分 21	0.22	1.5	0.33	20.23	79.77	0
画分 22	0.15	1.5	0.23	21.64	78.36	0

【0222】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.76であると決定された。

【0223】

実施例9

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗CSF-1R抗体

平衡化溶液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、20% (w/w) キシリトール、pH5.0に調整、2カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、20% (w/w) キシリトール、pH5.0に調整、4カラム体積

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、20% (w/w) キシリトール、pH5.0に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

【0224】

10

20

30

40

50

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量ならびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果を以下の表に示す。

【0225】

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.47	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]	抗体 フラグメント (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	13.3	7.41	98.58	99.19	0.81	0
フロースルー	0.00	~80	0.00	0	0	0
画分 1	1.74	1.5	2.61	100	0	0
画分 2	4.90	1.5	7.35	100	0	0
画分 3	6.98	1.5	10.47	100	0	0
画分 4	7.83	1.5	11.75	100	0	0
画分 5	7.96	1.5	11.94	100	0	0
画分 6	7.69	1.5	11.54	100	0	0
画分 7	7.20	1.5	10.80	100	0	0
画分 8	6.37	1.5	9.56	100	0	0
画分 9	4.73	1.5	7.10	100	0	0
画分 10	3.14	1.5	4.71	100	0	0
画分 11	1.78	1.5	2.67	99.57	0.43	0
画分 12	0.89	1.5	1.34	98.06	1.94	0
画分 13	0.64	1.5	0.96	91.40	8.60	0
画分 14	0.57	1.5	0.86	70.19	21.01	8.80
画分 15	0.55	1.5	0.83	63.04	28.85	8.11
画分 16	0.43	1.5	0.65	58.67	31.48	9.85
画分 17	0.28	1.5	0.42	57.19	34.17	8.64

【0226】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.93であると決定された。

【0227】

実施例10

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗IL17抗体

平衡化溶液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、30% (w/w) グリセロール、pH5.0に調整、2カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、30% (w/w) グリセロール、pH5.0に調整、4カラム体積

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、30% (w/w) グリセロール、pH5.0に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

【0228】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量ならびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果を以下の表に示す。

【0229】

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.45	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]	抗体 フラグメント (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	9.36	10.69	100.04	93.93	6.07	0
フロースルー	0.00	~80	0.00	0	0	0
画分 1	0.92	1.5	1.38	66.77	0	33.23
画分 2	2.90	1.5	4.35	100	0	0
画分 3	5.06	1.5	7.59	100	0	0
画分 4	6.36	1.5	9.54	100	0	0
画分 5	6.71	1.5	10.07	100	0	0
画分 6	6.74	1.5	10.11	100	0	0
画分 7	6.45	1.5	9.68	100	0	0
画分 8	5.71	1.5	8.57	100	0	0
画分 9	4.70	1.5	7.05	99.84	0.16	0
画分 10	3.50	1.5	5.25	99.54	0.46	0
画分 11	2.40	1.5	3.60	98.34	1.66	0
画分 12	1.61	1.5	2.42	94.80	5.20	0
画分 13	1.23	1.5	1.85	86.37	13.63	0
画分 14	1.16	1.5	1.74	66.30	33.70	0
画分 15	1.28	1.5	1.92	48.88	51.12	0
画分 16	1.38	1.5	2.07	30.96	69.04	0
画分 17	1.34	1.5	2.01	29.30	70.70	0
画分 18	0.88	1.5	1.32	30.99	69.01	0
画分 19	0.89	1.5	1.34	27.69	72.33	0
画分 20	0.64	1.5	0.96	31.36	68.64	0
画分 21	0.56	1.5	0.84	30.76	69.24	0
画分 22	0.35	1.5	0.53	29.23	70.77	0
画分 23	0.25	1.5	0.38	27.83	72.17	0
画分 24	0.18	1.5	0.27	27.50	72.50	0

10

20

30

【0230】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.77であると決定された。

【0231】

実施例11

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗CSF-1R抗体

40

平衡化溶液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、30% (w/w) グリセロール、pH5.0に調整、2カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、30% (w/w) グリセロール、pH5.0に調整、4カラム体積

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w)

ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、30% (w/w) グリセロール、pH5.0に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

【0232】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量な

50

らびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果を以下の表に示す。

【0233】

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.47	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]	抗体 フラグメント (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	13.3	7.55	100.64	99.13	0.87	0
フロースルー	0.00	~80	0.00	0	0	0
画分 1	1.27	1.5	1.91	81.59	0	18.41
画分 2	3.61	1.5	5.42	100	0	0
画分 3	5.45	1.5	8.18	100	0	0
画分 4	6.36	1.5	9.54	100	0	0
画分 5	6.48	1.5	9.72	100	0	0
画分 6	6.50	1.5	9.75	100	0	0
画分 7	6.28	1.5	9.42	100	0	0
画分 8	5.79	1.5	8.69	100	0	0
画分 9	5.17	1.5	7.76	100	0	0
画分 10	4.25	1.5	6.38	100	0	0
画分 11	3.26	1.5	4.89	100	0	0
画分 12	2.27	1.5	3.41	99.85	0.15	0
画分 13	1.43	1.5	2.15	93.21	0.35	6.45
画分 14	0.86	1.5	1.29	69.58	1.24	29.18
画分 15	0.60	1.5	0.90	58.01	5.92	36.07
画分 16	0.51	1.5	0.77	51.57	15.49	32.94
画分 17	0.50	1.5	0.75	46.54	26.33	27.14
画分 18	0.45	1.5	0.68	43.00	31.02	25.97
画分 19	0.43	1.5	0.65	36.82	38.46	24.72
画分 20	0.27	1.5	0.41	37.11	38.01	24.87

【0234】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.90であると決定された。

【0235】

実施例12

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗IL17抗体

平衡化溶液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、25% (w/w) サッカロース、pH5.0に調整、2カラム体積 40

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、25% (w/w) サッカロース、pH5.0に調整、4カラム体積

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、25% (w/w) サッカロース、pH5.0に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

【0236】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量ならびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果

10

20

30

50

果を以下の表に示す。

【0237】

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.45	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]	抗体 フラグメント (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	9.36	10.71	96.91	94.97	5.03	0
フロースルー	0.00	~90	0.00	0	0	0
画分 1	1.12	1.5	1.68	93.40	0	6.60
画分 2	3.57	1.5	5.36	100	0	0
画分 3	6.05	1.5	9.08	100	0	0
画分 4	7.44	1.5	11.16	100	0	0
画分 5	7.8	1.5	11.70	100	0	0
画分 6	7.64	1.5	11.46	100	0	0
画分 7	6.96	1.5	10.44	100	0	0
画分 8	5.89	1.5	8.84	100	0	0
画分 9	4.35	1.5	6.53	99.82	0.18	0
画分 10	2.85	1.5	4.28	98.95	1.05	0
画分 11	1.81	1.5	2.72	95.18	4.82	0
画分 12	1.33	1.5	2.00	85.83	14.17	0
画分 13	1.23	1.5	1.85	70.44	29.56	0
画分 14	1.26	1.5	1.89	59.07	40.93	0
画分 15	1.2	1.5	1.80	50.95	49.05	0
画分 16	1.01	1.5	1.52	43.67	56.33	0
画分 17	0.77	1.5	1.16	42.33	57.67	0
画分 18	0.53	1.5	0.80	36.74	63.26	0
画分 19	0.36	1.5	0.54	37.68	62.32	0
画分 20	0.25	1.5	0.38	36.00	64.00	0
画分 21	0.18	1.5	0.27	34.41	65.59	0

【0238】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.73であると決定された。

【0239】

実施例13

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗CSF-1R抗体

平衡化溶液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、25% (w/w) サッカロース、pH5.0に調整、2カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、25% (w/w) サッカロース、pH5.0に調整、4カラム体積

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、25% (w/w) サッカロース、pH5.0に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

【0240】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量ならびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果

果を以下の表に示す。

【0241】

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.47	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]	抗体 フラグメント (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	13.8	7.55	100.44	99.23	0.77	0
フロースルー	0.00	~90	0.00	0	0	0
画分 1	1.78	1.5	2.67	100	0	0
画分 2	4.54	1.5	6.81	100	0	0
画分 3	6.45	1.5	9.68	100	0	0
画分 4	7.46	1.5	11.19	100	0	0
画分 5	7.50	1.5	11.25	100	0	0
画分 6	7.35	1.5	11.03	100	0	0
画分 7	6.79	1.5	10.19	100	0	0
画分 8	6.01	1.5	9.02	100	0	0
画分 9	4.87	1.5	7.31	100	0	0
画分 10	3.63	1.5	5.45	100	0	0
画分 11	2.38	1.5	3.57	100	0	0
画分 12	1.41	1.5	2.12	99.73	0.27	0
画分 13	0.84	1.5	1.26	98.71	1.29	0
画分 14	0.60	1.5	0.90	83.46	5.09	11.45
画分 15	0.52	1.5	0.78	74.12	9.89	15.99
画分 16	0.44	1.5	0.66	71.45	11.73	16.82
画分 17	0.33	1.5	0.50	70.55	13.67	15.77
画分 18	0.22	1.5	0.33	61.41	14.38	24.21

【0242】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.84であると決定された。

【0243】

実施例14

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗IL17抗体

平衡化溶液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、25% (w/w) D-フルクトース、pH5.0に調整、2カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、25% (w/w) D-フルクトース、pH5.0に調整、4カラム体積

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、25% (w/w) D-フルクトース、pH5.0に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

【0244】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量ならびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果を以下の表に示す。

【0245】

(表)

10

20

30

40

50

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.45	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]	抗体 フラグメント (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	9.36	10.7	100.18	95.11	4.89	0
フロースルー	0.00	~80	0.00	0	0	0
画分 1	0.93	1.5	1.40	79.49	0	20.51
画分 2	3.94	1.5	5.91	100	0	0
画分 3	6.68	1.5	10.02	100	0	0
画分 4	7.86	1.5	11.79	100	0	0
画分 5	7.98	1.5	11.97	100	0	0
画分 6	7.52	1.5	11.28	100	0	0
画分 7	6.83	1.5	10.25	100	0	0
画分 8	5.75	1.5	8.63	100	0	0
画分 9	4.45	1.5	6.68	99.78	0.22	0
画分 10	3.08	1.5	4.62	99.45	0.55	0
画分 11	1.97	1.5	2.96	97.64	2.36	0
画分 12	1.39	1.5	2.09	92.02	7.98	0
画分 13	1.06	1.5	1.59	78.43	21.57	0
画分 14	1.13	1.5	1.70	59.36	40.64	0
画分 15	1.24	1.5	1.86	44.05	55.95	0
画分 16	1.18	1.5	1.77	37.20	62.80	0
画分 17	1.08	1.5	1.62	32.47	67.53	0
画分 18	0.76	1.5	1.14	29.88	70.12	0
画分 19	0.67	1.5	1.01	35.55	64.45	0
画分 20	0.41	1.5	0.62	28.90	71.10	0
画分 21	0.29	1.5	0.44	25.31	74.69	0
画分 22	0.21	1.5	0.32	23.60	76.40	0
画分 23	0.20	1.5	0.30	46.16	53.84	0

10

20

30

【0246】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.79であると決定された。

【0247】

実施例15

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗CSF-1R抗体

平衡化溶液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、25% (w/w) D-フルクトース、pH5.0に調整、2カラム体積

40

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、25% (w/w) D-フルクトース、pH5.0に調整、4カラム体積

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、25% (w/w) D-フルクトース、pH5.0に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

【0248】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量ならびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果を以下の表に示す。

50

【0249】

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.47	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]	抗体 フラグメント (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	13.3	7.55	100.43	99.22	0.78	0
フロースルー	0.00	~80	0.00	0	0	0
画分 1	0.54	1.5	0.81	77.09	0.22	22.69
画分 2	2.58	1.5	3.87	100	0	0
画分 3	5.32	1.5	7.98	100	0	0
画分 4	7.29	1.5	10.94	100	0	0
画分 5	7.78	1.5	11.67	100	0	0
画分 6	7.96	1.5	11.94	100	0	0
画分 7	7.72	1.5	11.58	100	0	0
画分 8	6.87	1.5	10.31	100	0	0
画分 9	6.10	1.5	9.15	100	0	0
画分 10	4.87	1.5	7.31	100	0	0
画分 11	3.61	1.5	5.42	100	0	0
画分 12	2.17	1.5	3.26	99.89	0.11	0
画分 13	1.27	1.5	1.91	99.24	0.76	0
画分 14	0.81	1.5	1.22	89.35	4.06	6.58
画分 15	0.63	1.5	0.95	80.84	11.62	7.54
画分 16	0.59	1.5	0.89	72.37	20.76	6.86
画分 17	0.50	1.5	0.75	66.31	25.98	7.71
画分 18	0.40	1.5	0.60	64.08	29.11	6.81
画分 19	0.26	1.5	0.39	61.91	31.23	6.86
画分 20	0.17	1.5	0.26	58.82	32.78	8.41

10

20

30

【0250】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.90であると決定された。

【0251】

実施例16

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗IL17抗体

平衡化溶液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、8% (w/w) グリシン、pH5.0に調整、2カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、8% (w/w) グリシン、pH5.0に調整、4カラム体積

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、8% (w/w) グリシン、pH5.0に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

【0252】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量ならびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果を以下の表に示す。

【0253】

40

50

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.45	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]	抗体 フラグメント (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	8.82	10.76	94.87	94.88	5.12	0
フロースルー	0.00	~90	0.00	0	0	0
画分 1	0.31	1.5	0.47	53.77	0	46.73
画分 2	1.57	1.5	2.36	100	0	0
画分 3	4.68	1.5	7.02	100	0	0
画分 4	7.51	1.5	11.27	100	0	0
画分 5	9.34	1.5	14.01	100	0	0
画分 6	9.92	1.5	14.88	100	0	0
画分 7	9.60	1.5	14.40	100	0	0
画分 8	7.02	1.5	10.53	99.64	0.36	0
画分 9	3.08	1.5	4.62	97.59	2.41	0
画分 10	1.50	1.5	2.25	88.29	11.71	0
画分 11	1.33	1.5	2.00	70.61	29.39	0
画分 12	1.45	1.5	2.18	58.23	41.77	0
画分 13	1.32	1.5	1.98	50.02	49.98	0
画分 14	0.86	1.5	1.29	43.85	56.15	0
画分 15	0.47	1.5	0.71	42.73	57.27	0
画分 16	0.25	1.5	0.38	38.54	61.46	0

10

20

【0254】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.85であると決定された。

【0255】

実施例17

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗CSF-1R抗体

平衡化溶液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、8% (w/w) グリシン、pH5.0に調整、2カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、8% (w/w) グリシン、pH5.0に調整、4カラム体積

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、8% (w/w) グリシン、pH5.0に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

30

40

【0256】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量ならびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果を以下の表に示す。

【0257】

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.47	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]	抗体 フラグメント (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	13.3	6.87	99.16	99.28	0.72	0
フロースルー	0.00	~90	0.00	0	0	0
画分 1	0.28	1.5	0.42	66.36	0.41	33.23
画分 2	1.82	1.5	2.73	100	0	0
画分 3	5.02	1.5	7.53	100	0	0
画分 4	7.74	1.5	11.61	100	0	0
画分 5	9.05	1.5	13.58	100	0	0
画分 6	9.19	1.5	13.79	100	0	0
画分 7	8.67	1.5	13.01	100	0	0
画分 8	7.04	1.5	10.56	100	0	0
画分 9	3.82	1.5	5.73	99.90	0.10	0
画分 10	1.46	1.5	2.19	99.00	1.00	0
画分 11	0.70	1.5	1.05	95.61	4.39	0
画分 12	0.56	1.5	0.84	84.11	6.96	8.92
画分 13	0.42	1.5	0.63	79.56	8.46	11.99
画分 14	0.25	1.5	0.38	72.00	12.71	15.29

10

20

【0258】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.90であると決定された。

【0259】

実施例18

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗IL17抗体

平衡化溶液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、8% (w/w) L-プロリン、pH5.0に調整、2カラム体積 30

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、8% (w/w) L-プロリン、pH5.0に調整、4カラム体積

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、8% (w/w) L-プロリン、pH5.0に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

【0260】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量ならびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果を以下の表に示す。

40

【0261】

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.45	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]	抗体 フラグメント (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	9.36	10.6	93.51	94.97	5.03	0
フロースルー	0.00	~90	0.00	0	0	0
画分 1	0.26	1.5	0.39	58.65	0	41.35
画分 2	0.95	1.5	1.43	100	0	0
画分 3	2.58	1.5	3.87	100	0	0
画分 4	4.75	1.5	7.13	100	0	0
画分 5	6.24	1.5	9.36	100	0	0
画分 6	7.22	1.5	10.83	100	0	0
画分 7	7.96	1.5	11.94	100	0	0
画分 8	7.97	1.5	11.96	100	0	0
画分 9	7.35	1.5	11.03	100	0	0
画分 10	5.76	1.5	8.64	100	0	0
画分 11	2.89	1.5	4.34	98.95	1.05	0
画分 12	1.18	1.5	1.77	94.31	5.69	0
画分 13	0.68	1.5	1.02	80.42	19.58	0
画分 14	0.63	1.5	0.95	68.26	31.74	0
画分 15	0.72	1.5	1.08	50.87	49.13	0
画分 16	0.84	1.5	1.26	60.95	39.05	0
画分 17	0.90	1.5	1.35	75.25	24.75	0
画分 18	0.81	1.5	1.22	78.25	21.75	0
画分 19	0.59	1.5	0.89	79.58	20.42	0
画分 20	0.38	1.5	0.57	73.76	26.24	0
画分 21	0.24	1.5	0.36	75.45	24.55	0
画分 22	0.16	1.5	0.24	76.72	23.28	0

10

20

30

【0262】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.83であると決定された。

【0263】

実施例19

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗CSF-1R抗体

平衡化溶液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、8% (w/w) L-プロリン、pH5.0に調整、2カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

40

洗浄液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、8% (w/w) L-プロリン、pH5.0に調整、4カラム体積

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、8% (w/w) L-プロリン、pH5.0に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

【0264】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量ならびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果を以下の表に示す。

【0265】

50

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.47	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]	抗体 フラグメント (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	13.3	7.31	97.20	99.33	0.67	0
フロースルー	0.00	~90	0.00	0	0	0
画分 1	0.51	1.5	0.77	67.91	0.38	31.71
画分 2	2.31	1.5	3.47	100	0	0
画分 3	4.90	1.5	7.35	100	0	0
画分 4	6.60	1.5	9.90	100	0	0
画分 5	7.41	1.5	11.12	100	0	0
画分 6	7.70	1.5	11.55	100	0	0
画分 7	7.87	1.5	11.81	100	0	0
画分 8	7.21	1.5	10.82	100	0	0
画分 9	6.14	1.5	9.21	100	0	0
画分 10	4.35	1.5	6.53	100	0	0
画分 11	2.13	1.5	3.20	99.89	0.11	0
画分 12	0.83	1.5	1.25	99.16	0.84	0
画分 13	0.38	1.5	0.57	79.11	5.30	15.59
画分 14	0.27	1.5	0.41	63.62	16.62	19.76
画分 15	0.24	1.5	0.36	46.29	27.44	26.27
画分 16	0.18	1.5	0.27	68.51	31.49	20.66

10

20

【0266】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.97であると決定された。

【0267】

実施例20

30

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗IL17抗体

平衡化溶液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、8% (w/w) ベタイン、pH5.0に調整、2カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、8% (w/w) ベタイン、pH5.0に調整、4カラム体積

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、8% (w/w) ベタイン、pH5.0に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

40

【0268】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量ならびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果を以下の表に示す。

【0269】

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.45	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]	抗体 フラグメント (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	9.24	10.81	99.86	94.16	5.84	0
フロースルー	0.00	~90	0.00	0	0	0
画分 1	0.21	1.5	0.32	51.88	0	48.12
画分 2	0.61	1.5	0.92	57.58	0	42.46
画分 3	1.59	1.5	2.39	100	0	0
画分 4	3.25	1.5	4.88	100	0	0
画分 5	5.11	1.5	7.67	100	0	0
画分 6	6.63	1.5	9.95	100	0	0
画分 7	7.69	1.5	11.54	100	0	0
画分 8	8.26	1.5	12.39	100	0	0
画分 9	8.15	1.5	12.23	100	0	0
画分 10	7.88	1.5	11.82	100	0	0
画分 11	5.02	1.5	7.53	100	0	0
画分 12	1.91	1.5	2.87	95.64	4.36	0
画分 13	0.84	1.5	1.26	85.39	14.61	0
画分 14	0.72	1.5	1.08	68.77	31.23	0
画分 15	0.81	1.5	1.22	66.73	33.27	0
画分 16	0.89	1.5	1.34	64.45	35.55	0
画分 17	0.88	1.5	1.32	49.18	50.82	0
画分 18	0.77	1.5	1.16	46.31	53.69	0
画分 19	0.53	1.5	0.80	44.49	55.51	0
画分 20	0.34	1.5	0.51	35.48	64.52	0
画分 21	0.22	1.5	0.33	33.50	66.5	0
画分 22	0.15	1.5	0.23	32.72	67.28	0

10

20

30

【0270】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.86であると決定された。

【0271】

実施例21

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗CSF-1R抗体

平衡化溶液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、8% (w/w) ベタイン、pH5.0に調整、2カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、8% (w/w) ベタイン、pH5.0に調整、4カラム体積

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 3,500 Da)、8% (w/w) ベタイン、pH5.0に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

【0272】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量ならびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果を以下の表に示す。

【0273】

40

50

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.47	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]	抗体 フラグメント (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	13.8	7.55	99.16	99.22	0.78	0
フロースルー	0.00	~90	0.00	0	0	0
画分 1	0.33	1.5	0.50	71.12	0.40	28.48
画分 2	1.61	1.5	2.42	100	0	0
画分 3	4.31	1.5	6.47	100	0	0
画分 4	6.58	1.5	9.87	100	0	0
画分 5	7.75	1.5	11.63	100	0	0
画分 6	8.30	1.5	12.45	100	0	0
画分 7	8.40	1.5	12.60	100	0	0
画分 8	8.13	1.5	12.20	100	0	0
画分 9	7.34	1.5	11.01	100	0	0
画分 10	5.40	1.5	8.10	100	0	0
画分 11	2.61	1.5	3.92	99.82	0.18	0
画分 12	0.92	1.5	1.38	98.56	1.44	0
画分 13	0.42	1.5	0.63	92.33	7.67	0
画分 14	0.34	1.5	0.51	88.25	11.75	0
画分 15	0.32	1.5	0.48	85.93	14.07	0
画分 16	0.24	1.5	0.36	82.38	17.62	0
画分 17	0.17	1.5	0.26	77.09	22.91	0

10

20

【0274】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.86であると決定された。

【0275】

30

実施例22

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗IL17抗体

平衡化溶液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、pH5.0に調整、2カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 400 Da)、15% (w/w) ソルビトール、pH5.0に調整、4カラム体積

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 400 Da)、15% (w/w) ソルビトール、pH5.0に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、22.5カラム体積

40

【0276】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量ならびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果を以下の表に示す。

【0277】

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.47	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	9.76	10.8	105.00	93.34	6.66
フロースルー	0.00	~60	0.00	-	-
画分 1	3.19	2.0	6.38	100	0
画分 2	11.2	2.0	22.40	100	0
画分 3	12.2	2.0	24.40	100	0
画分 4	8.89	2.0	17.78	99.64	0.36
画分 5	5.22	2.0	10.44	94.65	5.35
画分 6	3.45	2.0	6.90	72.24	27.76
画分 7	2.33	2.0	4.66	44.63	55.37
画分 8	1.46	2.0	2.92	33.75	66.25
画分 9	0.86	2.0	1.72	24.38	75.62
画分 10	0.46	2.0	0.92	30.67	69.33
画分 11	0.27	2.0	0.54	51.34	48.66
画分 12	0.20	2.0	0.40	64.8	35.2
画分 13	0.17	2.0	0.34	71.58	28.42
画分 14	0.15	2.0	0.30	75.35	24.65

10

20

【0278】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社)を用いて0.57であると決定された。

【0279】

実施例23

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗IL17抗体

平衡化溶液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、pH5.0に調整、2カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液： 10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 10,000 Da)、15% (w/w) ソルビトール、pH5.0に調整、4カラム体積

溶出液： 750mM塩化ナトリウムを含有する、10mMクエン酸ナトリウム緩衝液、10% (w/w) ポリ(エチレングリコール) (MW 10,000 Da)、15% (w/w) ソルビトール、pH5.0に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、30カラム体積

30

【0280】

抗体を含有するピークを3ml画分で集め、それらの画分を単量体および凝集物の含量ならびにCHO宿主細胞タンパク質およびCHO宿主細胞DNAの含量について分析した。分析の結果を以下の表に示す。

40

【0281】

(表)

サンプル	濃度 (UV280) [mg/ml] E=1.47	画分 体積 [ml]	抗体量 [mg]	抗体 単量体 (SEC) [%]	抗体 凝集物 (SEC) [%]
調整済み プロテインA 溶出液	9.06	10.5	95.13	93.30	6.70
フロースルー	0.00	~100	0.00	-	-
画分 1	0.27	2.0	0.54	100	0
画分 2	0.56	2.0	1.12	100	0
画分 3	1.04	2.0	2.08	100	0
画分 4	1.59	2.0	3.18	100	0
画分 5	2.09	2.0	4.18	100	0
画分 6	2.46	2.0	4.92	100	0
画分 7	2.78	2.0	5.56	100	0
画分 8	3.03	2.0	6.06	100	0
画分 9	3.06	2.0	6.12	100	0
画分 10	3.15	2.0	6.30	100	0
画分 11	3.06	2.0	6.12	100	0
画分 12	3.04	2.0	6.08	100	0
画分 13	3.21	2.0	6.42	100	0
画分 14	2.85	2.0	5.70	100	0
画分 15	2.52	2.0	5.04	99.46	0.54
画分 16	1.07	2.0	2.14	92.89	7.11
画分 17	0.48	2.0	0.96	74.81	25.19
画分 18	0.33	2.0	0.66	49.32	50.68
画分 19	0.30	2.0	0.60	22.75	77.25
画分 20	0.28	2.0	0.56	25.32	74.68
画分 21	0.27	2.0	0.54	17.5	82.5
画分 22	0.28	2.0	0.56	17.29	82.71
画分 23	0.28	2.0	0.56	13.47	86.53
画分 24	0.28	2.0	0.56	17.42	82.58
画分 25	0.27	2.0	0.54	14.09	85.91
画分 26	0.27	2.0	0.54	15.36	84.64
画分 27	0.24	2.0	0.48	11.57	88.43
画分 28	0.23	2.0	0.46	13.01	86.99
画分 29	0.19	2.0	0.38	12.61	87.39
画分 30	0.14	2.0	0.28	13.29	86.71

【0282】

単量体ピークと凝集物ピークの分離度は、プログラムPeakFit (Seasolve Software社) を用いて0.70であると決定された。

【0283】

実施例24

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗Ang2/VEGF抗体

交換材料： Poros 50HS

カラム： 内径11mm、長さ250mm、体積23ml

流速： 90cm/h

平衡化溶液： 40mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH5.0に調整、3カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液： 40mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH5.0に調整、3カラム体積
溶出液： 40mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.5に調整
溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、12カラム体積

【0284】

カチオン交換クロマトグラフィー材料を含むクロマトグラフィーカラムに調整済みアニオン交換溶出液をアプライした。90cm/hの流速でロードした後、カラムを洗浄液(3カラム体積)で洗浄した。抗体は線形勾配溶出法で回収したが、その際、pH値を5.0から7.5に変化(増加)させた。

【0285】

3/4抗体が抗体単量体と「共溶出」され、2つの3/4抗体ピークが検出される。

10

【0286】

実施例25

クロマトグラフィー条件

ポリペプチド： 抗Ang2/VEGF抗体

交換材料： Poros 50HS

カラム： 内径11mm、長さ250mm、体積23ml

流速： 90cm/h

平衡化溶液： 40mMリン酸ナトリウム緩衝液、5%PEG 4000、pH5.0に調整、3カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液： 40mMリン酸ナトリウム緩衝液、5%PEG 4000、pH5.0に調整、3カラム体積

20

溶出液： 40mMリン酸ナトリウム緩衝液、5%PEG 4000、pH7.5に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、12カラム体積

【0287】

カチオン交換クロマトグラフィー材料を含むクロマトグラフィーカラムに調整済みアニオン交換溶出液をアプライした。90cm/hの流速でロードした後、カラムを洗浄液(3カラム体積)で洗浄した。抗体は線形勾配溶出法で回収したが、その際、pH値を5.0から7.5に変化(増加)させた。

【0288】

実施例26

クロマトグラフィー条件

30

ポリペプチド： 抗Ang2/VEGF抗体

交換材料： Poros 50HS

カラム： 内径11mm、長さ250mm、体積23ml

流速： 90cm/h

平衡化溶液： 40mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH5.0に調整、3カラム体積

ローディング： クロマトグラフィー材料1リットルあたり20gのタンパク質

洗浄液： 40mMリン酸ナトリウム緩衝液、10%PEG 4000、8%グリシン、pH5.0に調整、3カラム体積

溶出液： 40mMリン酸ナトリウム緩衝液、10%PEG 4000、8%グリシン、pH7.5に調整

溶出法： 0% (v/v) から100% (v/v) 溶出液までの線形勾配、12カラム体積

40

【0289】

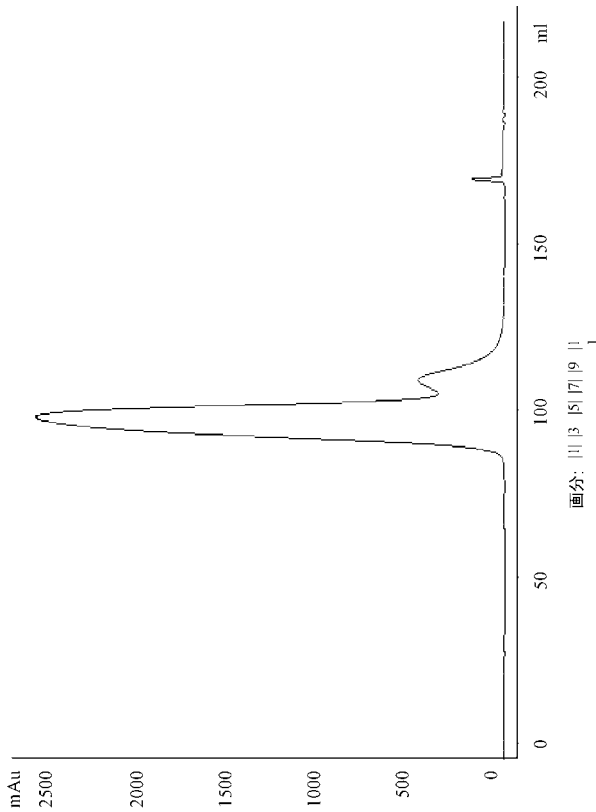
カチオン交換クロマトグラフィー材料を含むクロマトグラフィーカラムに調整済みアニオン交換溶出液をアプライした。90cm/hの流速でロードした後、カラムを洗浄液(3カラム体積)で洗浄した。抗体は線形勾配溶出法で回収したが、その際、pH値を5.0から7.5に変化(増加)させた。

【0290】

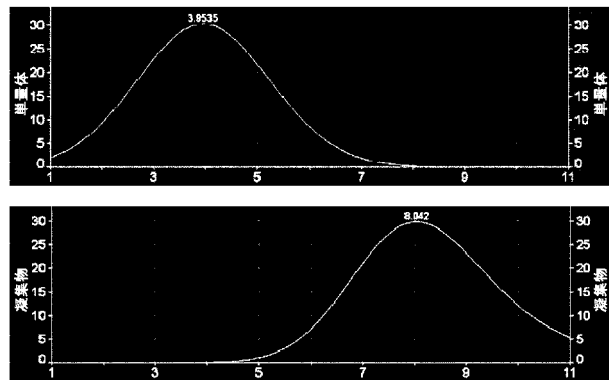
図6には、カチオン交換クロマトグラフィー材料上の抗Ang2/VEGF抗体のカチオン交換クロマトグラフィーの集められた画分についての、単量体形態の抗体、3/4抗体フラグメントおよび凝集形態の抗体の分布が示される。単量体形態の抗体と凝集形態の抗体と3/4抗体フラグメントが分離される。

50

【図 1】

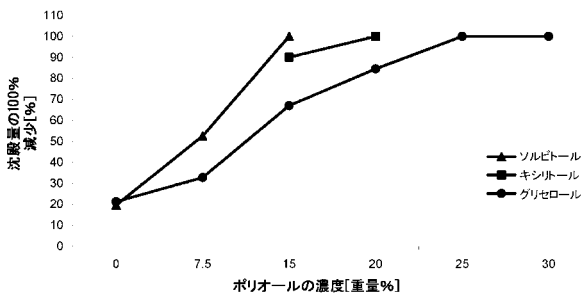


【図 2】



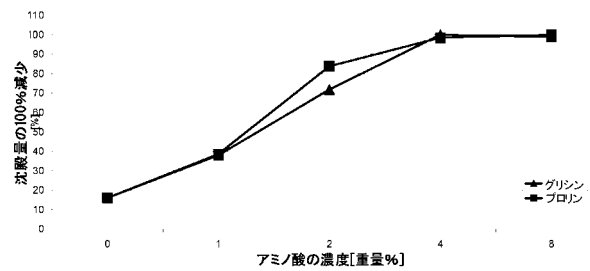
【図 3】

10重量%の分子量3,500 Daのポリ(エチレン)グリコールを含む
溶液中の抗IL17抗体の溶解性

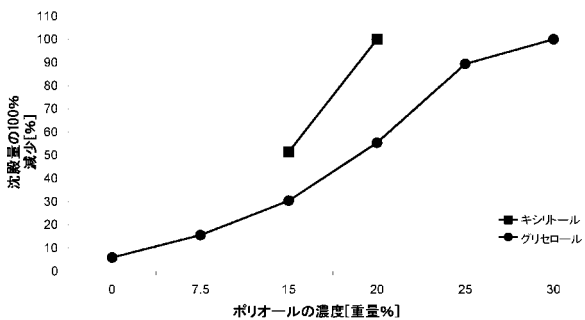


【図 4】

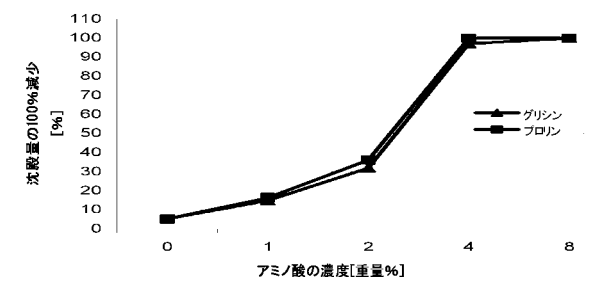
10重量%の分子量3,500 Daのポリ(エチレン)グリコールを含む
溶液中の抗IL17抗体の溶解性



10重量%の分子量3,500 Daのポリ(エチレン)グリコールを含む
溶液中の抗CSF-1R抗体の溶解性

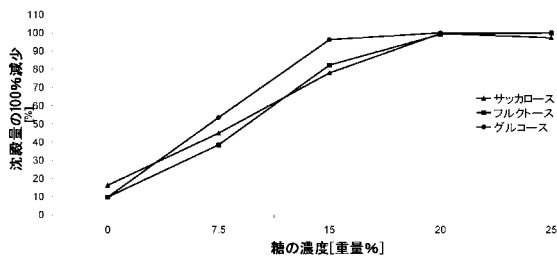


10重量%の分子量3,500 Daのポリ(エチレン)グリコールを含む
溶液中の抗CSF-1R抗体の溶解性

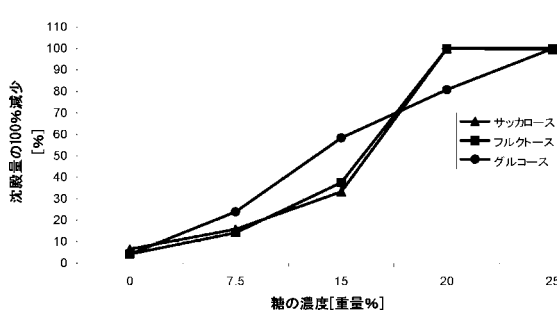


【図 5】

10重量%の分子量3,500 Daのポリ(エチレン)グリコールを含む
溶液中の抗IL17抗体の溶解性

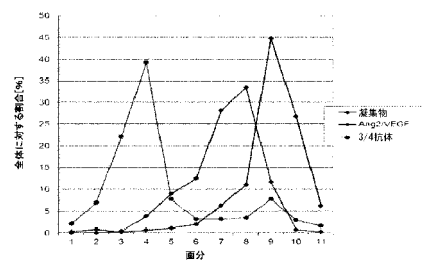


10重量%の分子量3,500 Daのポリ(エチレン)グリコールを含む
溶液中の抗CSF-1R抗体の溶解性

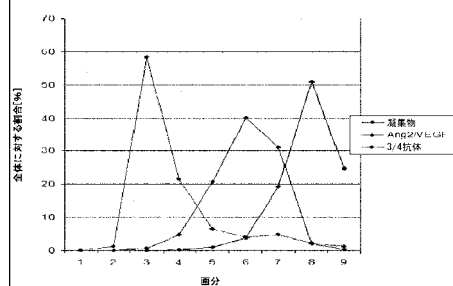


【図 6】

20mlのSuperdex 200による分析



20mlのSuperdex 200による分析



【手続補正書】

【提出日】平成28年8月30日(2016.8.30)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- ポリ(エチレングリコール)とグリシンとを任意で含む第1の溶液を、カチオン交換クロマトグラフィー材料にアプライし、それによって該材料を平衡化する工程、
 - 平衡化した該クロマトグラフィー材料にIgGクラスの抗体を含む溶液をアプライし、それによって該クロマトグラフィー材料にロードする工程、および
 - ポリ(エチレングリコール)とグリシンとを含む溶液を、該クロマトグラフィー材料にアプライし、それによって、単量体形態のIgGクラスの抗体を該クロマトグラフィー材料から脱着/溶出することにより、単量体形態のIgGクラスの抗体を産生する工程を含む、単量体形態のIgGクラスの抗体を産生するための方法であって、ポリ(エチレングリコール)が、5～15重量%の濃度を有し、かつグリシンが、4～8重量%の濃度を有する、前記方法。

【請求項 2】

- ポリ(エチレングリコール)とグリシンとを任意で含む第1の溶液を、カチオン交換クロマトグラフィー材料にアプライし、それによって該材料を平衡化する工程、
 - 平衡化した該クロマトグラフィー材料にIgGクラスの抗体を含む溶液をアプライし、それによって該クロマトグラフィー材料にロードする工程、および
 - ポリ(エチレングリコール)とグリシンとを含む溶液を、該クロマトグラフィー材料に

アプライし、それによって、単量体形態のIgGクラスの抗体を該クロマトグラフィー材料から脱着/溶出することにより、単量体形態のIgGクラスの抗体を産生する工程を含む、宿主細胞タンパク質含量を低減させたIgGクラスの抗体調製物を産生するための方法であって、

ポリ(エチレングリコール)が、5～15重量%の濃度を有し、かつグリシンが、3～25重量%の濃度を有する、前記方法。

【請求項3】

ポリ(エチレングリコール)が、約7～13重量%の濃度を有し、および/またはグリシンが3～25重量%の濃度を有する、請求項1から2のいずれか一項記載の方法。

【請求項4】

ポリ(エチレングリコール)が、約7～13重量%の濃度を有し、および/またはグリシンが12～25重量%の濃度を有する、請求項1から2のいずれか一項記載の方法。

【請求項5】

ポリ(エチレングリコール)が、約7～13重量%の濃度を有し、および/またはグリシンが12～20重量%の濃度を有する、請求項1から2のいずれか一項記載の方法。

【請求項6】

ポリ(エチレングリコール)が約3,500 Da $\pm$ 20%の分子量を有することを特徴とする、請求項1から5のいずれか一項記載の方法。

【請求項7】

単量体形態の抗体が100 kDa～200 kDaの分子量を有することを特徴とする、請求項1から6のいずれか一項記載の方法。

フロントページの続き

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ニューマン セバスチャン

ドイツ連邦共和国 ワイルハイム オーデルディンガー シュトラーセ 19エイ

Fターム(参考) 4H045 AA20 BA10 CA40 DA76 EA20 GA23 GA26