(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7021950号
(P7021950)

(45)発行日　令和4年2月17日(2022.2.17)

(24)登録日　令和4年2月8日(2022.2.8)

(51)国際特許分類

			FI		
C07K	*16/24*	*(2006.01)*	C07K	16/24	ZNA
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/13	
C12P	*21/08*	*(2006.01)*	C12P	21/08	

請求項の数　23　（全94頁）

(21)出願番号　特願2017-551390(P2017-551390)
(86)(22)出願日　平成27年12月21日(2015.12.21)
(65)公表番号　特表2018-507250(P2018-507250A)
(43)公表日　平成30年3月15日(2018.3.15)
(86)国際出願番号　PCT/IB2015/059824
(87)国際公開番号　WO2016/103146
(87)国際公開日　平成28年6月30日(2016.6.30)
審査請求日　平成30年12月21日(2018.12.21)
(31)優先権主張番号　62/095,361
(32)優先日　平成26年12月22日(2014.12.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　504389991
ノバルティス アーゲー
スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ３５
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100095360
弁理士　片山 英二
(74)代理人　100120134
弁理士　大森 規雄
(74)代理人　100181168
弁理士　丸山 智裕
(74)代理人　100104282
弁理士　鈴木 康仁
(72)発明者　ハイツマン，マークス

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＩＬ－１７抗体中のシステイン残基の選択的還元

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
哺乳動物細胞によって組換え産生された、セクキヌマブ抗体を含む組成物中の、配列番号6として記載するL-CDR3のアミノ酸8において酸化されたシステイン残基を、
非還元ドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動(CE-SDS)によって測定した場合に、16個すべての保存ジスルフィド架橋を有するインタクト抗体が理論最大値に対して少なくとも80％となるように選択的に還元する方法であって、
ａ）容器内で前記組成物を少なくとも１つの還元剤と接触させて還元性混合物を形成するステップであって、前記少なくとも１つの還元剤が、チオール－ジスルフィド交換によって測定した場合、ｐＨ７．０で－０．２０Ｖ～－０．２３Ｖの標準酸化還元電位E^0を有するチオール含有還元剤であり、前記還元性混合物中の還元剤：抗体のモル比が、４６：１～１１８：１の間である、ステップ、および
ｂ）溶存酸素曲線を飽和曲線に当てはめることによって計算される≦０．３７h^{-1}の酸素物質移動容量係数（k_La^*）を容器内で維持しながら前記還元性混合物をインキュベートするステップ
を含み、
ステップａ）の前、前記容器において、前記組成物の初期酸素飽和度パーセントが、２５℃で較正した酸素プローブを使用して測定した場合、少なくとも６０％に調整されている、方法。
【請求項２】

哺乳動物細胞によって組換え産生されたセクキヌマブ抗体を含む組成物中の、配列番号6として記載するL-CDR3のアミノ酸8において酸化されたシステイン残基を、非還元ドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動(CE-SDS)によって測定した場合に、16個すべての保存ジスルフィド架橋を有するインタクト抗体が理論最大値に対して少なくとも80%となるように選択的に還元する方法であって、
ａ）容器内で前記組成物をシステインと接触させて還元性混合物を形成するステップであって、前記還元性混合物中のシステイン：抗体のモル比が４６：１～１１８：１の間であるステップ、および
ｂ）溶存酸素曲線を飽和曲線に当てはめることによって計算される≦０．３７ｈ$^{-1}$の酸素物質移動容量係数（k_La^*）を容器内で維持しながら前記還元性混合物をインキュベートするステップ
を含み、
ステップａ）の前、前記組成物の初期酸素飽和度パーセントが、２５℃で較正した酸素プローブを使用して測定した場合、少なくとも６０％である、
方法。
【請求項３】
ステップｂ）中の前記容器内のk_La^*が、
ａ．≦０．３７ｈ$^{-1}$であり、前記還元性混合物中のシステイン：セクキヌマブ抗体のモル比が、５６：１～１１８：１の間であり、前記還元性混合物が、ステップｂ）に従って最大２４０分までインキュベートされるか、
ｂ．≦０．３７ｈ$^{-1}$であり、前記還元性混合物中のシステイン：セクキヌマブ抗体のモル比が、７７：１～１１８：１の間であり、前記還元性混合物が、ステップｂ）に従って最大３００分までインキュベートされるか、
ｃ．＜０．３７ｈ$^{-1}$であり、前記還元性混合物中のシステイン：セクキヌマブ抗体のモル比が、４６：１～１１８：１の間であるか、
ｄ．＜０．３７ｈ$^{-1}$であり、前記還元性混合物中のシステイン：セクキヌマブ抗体のモル比が、５４：１～８２：１の間であるか、または、
ｅ．≦０．２７ｈ$^{-1}$である、
請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記還元性混合物中のシステイン：セクキヌマブ抗体のモル比が、６６：１である、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記還元性混合物中のシステインの濃度が、４．０ｍＭ～８．０ｍＭである、請求項２に記載の方法。
【請求項６】
ステップａ）とステップｂ）の間に、前記還元性混合物が、４５～９０分間、３２℃～４２℃の間の温度に加熱され、加熱中の前記容器内のk_La^*が、≦０．６９ｈ$^{-1}$であり、前記k_La^*が、飽和曲線を溶存酸素曲線に当てはめることによって計算される、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記還元性混合物が、ステップｂ）に従って、２１０～４２０分間、２０℃～４２℃の間の温度でインキュベートされる、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記還元剤の酸化型が前記還元性混合物に添加されない、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
変性剤が前記還元性混合物に添加されない、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
哺乳動物細胞によって組換え産生されたセクキヌマブ抗体を含む組成物中の配列番号6と

して記載するL-CDR3のアミノ酸8において酸化されたシステイン残基を、非還元ドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動(CE-SDS)によって測定した場合に、16個すべての保存ジスルフィド架橋を有するインタクト抗体が理論最大値に対して少なくとも80%となるように選択的に還元する方法であって、
ａ）容器内で前記組成物を、４．０ｍＭ～８．０ｍＭのシステインと接触させて、還元性混合物を形成するステップ、
ｂ）前記還元性混合物を、４５～９０分間、３２℃～４２℃の間の温度に加熱するステップであって、加熱中の前記容器内の酸素物質移動容量係数（ｋ$_{L}$ａ＊）が≦０．６９ｈ$^{-1}$であるステップ、および
ｃ）前記還元性混合物を２０℃～４２℃の間の温度でインキュベートし、この間、前記容器内のｋ$_{L}$ａ＊を、
ｉ．≦０．３７ｈ$^{-1}$に維持するステップであって、前記還元性混合物中のシステイン：セクキヌマブ抗体のモル比が５６：１～１１８：１の間であり、前記還元性混合物が最大２４０分までインキュベートされる、ステップ、
ｉｉ．≦０．３７ｈ$^{-1}$に維持するステップであって、前記還元性混合物中のシステイン：セクキヌマブ抗体のモル比が７７：１～１１８：１の間であり、前記還元性混合物が最大３００分までインキュベートされる、ステップ、
ｉｉｉ．＜０．３７ｈ$^{-1}$に維持するステップであって、前記還元性混合物中のシステイン：セクキヌマブ抗体のモル比が４６：１～１１８：１の間であるステップ、
ｉｖ．＜０．３７ｈ$^{-1}$に維持するステップであって、前記還元性混合物中のシステイン：セクキヌマブ抗体のモル比が５４：１～８２：１の間であるステップ、または、
ｖ．≦０．２７ｈ$^{-1}$に維持するステップ
を含み、
前記ｋ$_{L}$ａ＊が、飽和曲線を溶存酸素曲線に当てはめることによって計算され、
ステップａ）の前、前記組成物の初期酸素飽和度パーセントが、２５℃で較正した酸素プローブを使用して測定した場合、少なくとも６０％である、方法。
【請求項１１】
哺乳動物細胞によって組換え産生されたセクキヌマブ抗体を含む組成物中の配列番号6として記載するL-CDR3のアミノ酸8において酸化されたシステイン残基を、非還元ドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動(CE-SDS)によって測定した場合に、16個すべての保存ジスルフィド架橋を有するインタクト抗体が理論最大値に対して少なくとも80%となるように選択的に還元する方法であって、
ａ）前記組成物を、システイン／シスチンおよびシステイン／シスタミンから選択される酸化／還元試薬のセットと接触させて、還元性混合物を形成するステップであって、前記還元性混合物中の酸化試薬：還元試薬のモル比が、４：１～８０：１の間であり、前記還元性混合物中のシステイン：セクキヌマブ抗体のモル比が、２１：１～２９６：１の間である、ステップ、および
ｂ）前記還元性混合物を
ｉ．３７℃の温度で嫌気条件下、少なくとも４時間インキュベートするか、または
ｉｉ．１８～２４℃の温度で１６～２４時間インキュベートする
ステップを含む、方法。
【請求項１２】
酸化／還元試薬の前記セットがシステイン／シスチンであり、前記還元性混合物中の酸化試薬：還元試薬のモル比が、２６：１～８０：１の間である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記組成物中の前記セクキヌマブ抗体の活性レベルが、シスタミン－ＣＥＸによって測定した場合、ステップｂ）後６０分以内に少なくとも１０パーセントポイント増加する、請求項１～１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
哺乳動物細胞によって組換え産生されたセクキヌマブ抗体を含む組成物中の配列番号6と

して記載するL-CDR3のアミノ酸8において酸化されたシステイン残基を、非還元ドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動(CE-SDS)によって測定した場合に、16個すべての保存ジスルフィド架橋を有するインタクト抗体が理論最大値に対して少なくとも80%となるように選択的に還元する方法であって、
ａ）前記組成物中のセクキヌマブ抗体の濃度を４ｍｇ／ｍｌ～１９．４ｍｇ／ｍｌの間に調整するステップ、
ｂ）前記組成物の酸素飽和度パーセントを少なくとも６０％に調整するステップ　ｃ）前記組成物のｐＨを、７．４～８．５に調整するステップ、
ｄ）前記組成物を容器内でシステインと接触させて還元性混合物を形成するステップであり、前記還元性混合物中のシステインの濃度が４．０ｍＭ～８．０ｍＭである、ステップ；
ｅ）前記還元性混合物を３２℃～４２℃の間の温度に加熱するステップ、
ｆ）ステップｅ）からの前記還元性混合物を２０℃～４２℃の間の温度でインキュベートするステップであり、前記インキュベートを２１０～４２０分間行い、この間、容器内で≦０．３７ｈ$^{-1}$の酸素物質移動容量係数（k_La^*）を維持し、前記k_La^*は飽和曲線を溶存酸素曲線に当てはめることによって計算される、ステップ、
ｇ）ステップｆ）から結果として得られる混合物を１６℃～２８℃の温度に冷却するステップであって、前記冷却を４５～９０分間行うステップ、および
ｈ）ステップｇ）から結果として得られる混合物のｐＨを５．１～５．３の間に調整するステップ
を含む方法。

【請求項１５】
請求項１～１４のいずれか一項に記載の方法を含む、精製されたセクキヌマブ抗体を含む組成物を製造する方法。

【請求項１６】
非還元ドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動(CE-SDS)によって測定した場合に、16個すべての保存ジスルフィド架橋を有するインタクト抗体が理論最大値に対して少なくとも90%となるように、配列番号6として記載するL-CDR3のアミノ酸8において酸化されたシステイン残基が還元されている、セクキヌマブ抗体を含有する組成物であって、前記組成物中のインタクトセクキヌマブのレベルが、ドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動（ＣＥ－ＳＤＳ）によって測定された場合、少なくとも９０％であり、前記組成物中のセクキヌマブの活性レベルが、シスタミン－ＣＥＸによって測定された場合、少なくとも９０％である、精製された組成物。

【請求項１７】
非還元ドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動(CE-SDS)によって測定した場合に、16個すべての保存ジスルフィド架橋を有するインタクト抗体が理論最大値に対して少なくとも90%となるように、配列番号6として記載するL-CDR3のアミノ酸8において酸化されたシステイン残基が還元されている、セクキヌマブ抗体を含有する組成物であって、前記組成物は、カラム溶出液、濾過溶出液または透析緩衝液中に、セクキヌマブ抗体を含み、前記組成物中のインタクトセクキヌマブのレベルが、ドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動（ＣＥ－ＳＤＳ）によって測定された場合、少なくとも９０％であり、前記組成物中のセクキヌマブの活性レベルが、シスタミン－ＣＥＸによって測定された場合、少なくとも９０％である、精製された組成物。

【請求項１８】
前記組成物中のセクキヌマブの活性レベルが、シスタミン－ＣＥＸによって測定された場合、少なくとも９２％である、請求項１６または１７に記載の精製された組成物。

【請求項１９】
前記組成物中のセクキヌマブの活性レベルが、シスタミン－ＣＥＸによって測定された場合、少なくとも９３％である、請求項１６または１７に記載の精製された組成物。

【請求項２０】
前記組成物中のセクキヌマブの活性レベルが、シスタミン－ＣＥＸによって測定された場

合、少なくとも９６％である、請求項１６または１７に記載の精製された組成物。
【請求項２１】
前記組成物中のインタクトセクキヌマブのレベルが、ドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動（ＣＥ－ＳＤＳ）によって測定された場合、少なくとも９２％である、請求項１６または１７に記載の精製された組成物。
【請求項２２】
前記組成物中のインタクトセクキヌマブのレベルが、ドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動（ＣＥ－ＳＤＳ）によって測定された場合、少なくとも９３％である、請求項１６または１７に記載の精製された組成物。
【請求項２３】
前記組成物中のインタクトセクキヌマブのレベルが、ドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動（ＣＥ－ＳＤＳ）によって測定された場合、少なくとも９６％である、請求項１６または１７に記載の精製された組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる２０１４年１２月２２日に出願した米国仮出願第６２／０９５，３６１号の優先権を主張する。
【０００２】
本開示は、哺乳動物細胞によって組換え産生されたＩＬ－１７抗体またはそれらの抗原結合断片の調製物、例えばセクキヌマブの調製物、中のＣｙｓＬ９７を選択的に還元する方法に関する。
【背景技術】
【０００３】
古典的抗体は、各々約２５ｋＤの分子量を有する２本の軽鎖（Ｌ）および各々約５０ｋＤの分子量を有する２本の重鎖（Ｈ）で構成されている。軽鎖および重鎖はジスルフィド結合（Ｌ－Ｓ－Ｓ－Ｈ）によって接続されており、さらに、２つのＬＨユニットが重鎖間で２つのジスルフィド結合によって連結されている。古典的抗体の一般式は、Ｌ－ＳＳ－Ｈ（－ＳＳ－）$_2$Ｈ－ＳＳ－Ｌまたは単純にＨ$_2$Ｌ$_2$（ＨＨＬＬ）である。これらの保存鎖間ジスルフィド結合に加えて、保存鎖内ジスルフィド結合もある。両方のタイプのジスルフィド結合が抗体の安定性および挙動（例えば、親和性）にとって重要である。一般に、ジスルフィド結合は、抗体鎖内の保存部位にある２つのシステイン残基（Ｃｙｓ－ＳＨ）によって生成され、これらの残基は、自発的にジスルフィド結合（Ｃｙｓ－Ｓ－Ｓ－Ｃｙｓ）を形成する。ジスルフィド結合形成は、環境のレドックス電位によって、およびチオール－ジスルフィド交換に特化した酵素の存在によって決まる。内部ジスルフィド結合（Ｃｙｓ－Ｓ－Ｓ－Ｃｙｓ）は、抗体の三次元構造を安定させる。
【０００４】
抗原認識および結合に関与するさらなる遊離システイン（すなわち、不対システイン）を含有する異常な抗体がある。これらの抗体についての遊離システインの修飾は、分子の活性および安定性にマイナス影響を及ぼすことがあり、免疫原性増加につながることもある。結果として、これらの抗体の処理は、最終製品が不活性な、誤って折り畳まれた、使い物にならない抗体物質を相当な量含有する可能性があるので、困難でありうる。その全体が参照によって本明細書に組み入れられている米国特許出願公開第２００９／０２８０１３１号明細書には、ＩＬ－１７抗体、例えば、軽鎖相補性決定領域（ＣＤＲ）３ループ（Ｌ－ＣＤＲ３）内のｃｉｓ－プロリンの後に遊離システイン残基（すなわち、配列番号１０として記載する軽鎖可変領域のアミノ酸９７（以降「ＣｙｓＬ９７」と呼ぶ）に対応する、配列番号６として記載するＬ－ＣＤＲ３のアミノ酸８）を有するセクキヌマブ（すなわち、ＡＩＮ４５）が提供されている。完全活性を維持するために、他のシステイン残基との酸化的ジスルフィド対合によっても、外因性化合物での酸化（例えば、他のタンパク質との混合ジスルフィドの形成、細胞代謝産物［例えば、システインもしくはグルタチオ

ン］での誘導体化、および酸素によるスルホキシドの形成）によっても、セクキヌマブの不対システイン残基をマスクすることはできない。残念なことに、セクキヌマブは、哺乳動物細胞を使用して製造されるので、細胞に基づく望ましくないＣｙｓＬ９７修飾が起こる。

【０００５】

文献には、混合ジスルフィドを有する、折り畳まれていない不溶性凝集物（封入体）として哺乳動物タンパク質を産生する細菌細胞において発現された哺乳動物細胞の再折り畳みが記載されている。細菌から哺乳動物タンパク質を得るために、封入体タンパク質が単離され、可溶化され、強いカオトロピック試薬および還元剤で変性される。変性剤、還元剤、ジスルフィド付加体形成剤、および弱酸化／還元環境（ｐＨ７～９）を使用するジスルフィド結合の完全変性および還元も、商業的供給源から得られるまたは酵母によって組換え産生される植物タンパク質を再び正しく折り畳むために使用されている（米国特許第４，７６６，２０５明細書）。タンパク質の完全変性および再折り畳みを用いるこれらのプロセスは、費用がかかり、腐食性であり、時間がかかり、哺乳動物細胞において産生されるタンパク質には不必要である。

【０００６】

天然に存在しないＦｃ融合タンパク質の誤った折り畳みを修正するための還元／酸化カップリング試薬の使用は公知である（国際公開第０２／６８４５５号パンフレット）。国際公開第０２／６８４５５号パンフレットのＦｃ融合タンパク質は、開示されているプロセスによって還元され再び酸化される鎖間ジスルフィドをＦｃ領域内におそらく含有するが、選択的に還元されたシステイン残基を有する分子をどのようにして生成するかについての教示がそのパンフレットにはない。さらに、Ｆｃ融合タンパク質は、単なる抗体ではなく、構造および活性が非常に多数の正しく連結された鎖間および鎖内ジスルフィド結合に依存する非常に複雑な免疫グロブリンである。

【０００７】

米国特許出願公開第２００５／０１２３５３２号明細書には、抗体を還元剤で活性化することによって、またはＬ－システインを補足した無血清培地で抗体産生細胞を培養することによって、遊離システインを有する抗体を産生させる方法が提供されている。この細胞培養法を使用した場合、後の処理ステップ、例えば、濾過、ウイルス不活化およびクロマトグラフィーは、細胞培養法によって生成される遊離システインの酸化につながることがあった。そのような場合、遊離システインは、理想的には、遊離チオール基を酸化剤で修飾することによって後のステップの間、保護され、酸化剤自体は、後に様々な技法、例えば濾過、を使用して除去される（米国特許出願公開第２００６／０２５７３９３号明細書）。商業生産については、そのような方法は、元の培地中に大量の還元剤を必要とし、後の処理中に大量の酸化剤を必要とし、その酸化剤を除去するためのさらなる濾過方法を必要とするので、時間がさらにかかり、生産コストの支出がさらにかさむ。

【０００８】

米国特許第７，９２８，２０５号明細書には、哺乳動物細胞培養物から得られるＩｇＧ２抗体の再折り畳みにレドックスペアを使用することの選好、ならびに１４６Ｂ７（ＩｇＧ１）抗体の可変領域内の遊離システインの脱システイニル化（decysteinylation）方法が教示されている。対応する研究出版物、Banks et al.(2008) J. Pharmaceutical Sci.97:764-779には、組換えモノクローナルＩｇＧ１抗体（ＭＡＢ００７）の可変領域内の不対スルフヒドリルの脱システイニル化が教示されている。Ｂａｎｋｓらは、ＭＡＢ００７の脱システイニル化には強い変性剤（ＧｄｎＨＣＬ）および還元剤（システイン）の使用が必要であるのかどうか、または選択的還元がシステインのみの存在下で起こりうるのかどうかを研究した。著者らは、システイニル化が変性剤の存在および不在下でＭＡＢ００７から有効に除去されると断定した。

【０００９】

上記のどの参考文献にも、セクキヌマブのＣｙｓＬ９７の選択的還元が可能であるのかどうかは教示されていない。上記のどの参考文献にも、特に、セクキヌマブの一次、二次お

よび三次構造；セクキヌマブ中の酸化ＣｙｓＬ９７の位置および場所（例えば、溶媒に露出しているまたは露出していない）；ならびに抗体中の保存ジスルフィド結合の相対強度（例えば、ＣｙｓＬ９７が所与の還元剤と最初に反応するのか、または保存システインが還元された後にしか反応しないのか）に依存する、セクキヌマブのＣｙｓＬ９７の選択的還元に必要な試薬および条件は教示されていない。さらに、これらのどの参考文献にも、セクキヌマブ中の酸化ＣｙｓＬ９７の選択的還元が、抗体構造（例えば、折り畳み）、化学組成（例えば、脱アミド化）、または特性（結合活性、凝集もしくは分解傾向）の変化をもたらすのかどうか記載されておらず、これら変化はすべて、商業規模でのセクキヌマブの選択的還元を実現不能／実現困難にしうる。

【発明の概要】

【００１０】

最大セクキヌマブ抗原結合活性を維持するために、本発明者らは、セクキヌマブの処理中に、保存ジスルフィド結合を有意に低減させることなくＣｙｓＬ９７をマスクされた形態（１）を遊離形態（２）に変換すること（下記Ｉを参照されたい）が必要であると断定した。そうしなければ、より低い活性および不活性のより低い分子量のバリアントが鎖の連結解除によって形成されることになる（H_2L_2→H_2L、HL_2、ＨＬ、ＨおよびＬ）。

（Ｉ）H_2L_2－Ｃｙｓ－ＳＸ＋試薬→H_2L_2－Ｃｙｓ－ＳＨ＋Ｘ－試薬

（１）　　（２）

【００１１】

商業規模の抗体調製における還元条件の導入は、常識では考えられない（例えば、抗体の細胞培養製造中の抗体ジスルフィド結合還元を防止するために様々な試薬および方法を用いる、Trexler-Schmidt et al. 2010 Biotech and Bioengineering 106:452-61を参照されたい）。それにもかかわらず、本発明者らは、哺乳動物細胞における大規模商業生産中にセクキヌマブのＣｙｓＬ９７を選択的に還元することが、この抗体を有意に変性させることなく、可能であると断定した。米国特許出願公開第２００９／０２８０１３１号明細書に開示されているＩＬ－１７抗体（およびそれらの断片）、特にセクキヌマブ、の抗原結合部位におけるＣｙｓＬ９７を選択的に還元する方法を本明細書に開示する。これらの方法は、これらの抗体の結合活性の回復を助長し、したがって、それらの調製物の生物学的活性を増加させる。さらに、これらの方法は、インタクト抗体レベルの増加、およびこれらの抗体の調製物の均一性の向上を助長する。開示するプロセスは、インキュベーション中のシステム内の特定の抗体：還元剤比と制御された酸素移動速度の複合効果に依存する。

【００１２】

したがって、哺乳動物細胞によって組換え産生されたＩＬ－１７抗体の調製物中のＣｙｓＬ９７を選択的に還元する方法であって、

ａ）システム内で調製物を少なくとも１つの還元剤と接触させて還元性混合物を形成するステップ、および

ｂ）システム内で≦約０．３７h^{-1}の酸素物質移動容量係数（k_La^*）を維持しながら還元性混合物をインキュベートするステップ

を含み、前記k_La^*が、溶存酸素曲線を飽和曲線に当てはめることによって計算され；ＩＬ－１７抗体各々が、配列番号８に記載のV_Hの３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（V_H）と、配列番号１０に記載のV_Lの３つのＣＤＲを含む免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（V_L）とを含み；ならびにさらに、

ステップａ）の前に、調製物の初期酸素飽和度パーセントが、２５℃で較正した酸素プローブを使用して測定した場合、少なくとも約６０％である、方法を本明細書に開示する。

【００１３】

哺乳動物細胞によって組換え産生されたＩＬ－１７抗体の調製物中のＣｙｓＬ９７を選択的に還元する方法であって、

ａ）調製物を、システイン／シスチンおよびシステイン／シスタミンから選択される酸化／還元試薬のセットと接触させて、還元性混合物を形成するステップ、および

ｂ）還元性混合物を約３７℃の温度で嫌気条件下、少なくとも４時間インキュベートするか、または還元性混合物を約１８～２４℃の温度で約１６～２４時間インキュベートするステップ
を含み、
ＩＬ－１７抗体各々が、配列番号８に記載のＶ$_H$の３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（Ｖ$_H$）と、配列番号１０に記載のＶ$_L$の３つのＣＤＲを含む免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（Ｖ$_L$）とを含む、方法も本明細書に開示する。
【００１４】
また、セクキヌマブの精製された調製物であって、調製物中のインタクトセクキヌマブのレベルが、ドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動（ＣＥ－ＳＤＳ）によって測定した場合、少なくとも約９０％であり、調製物中のセクキヌマブの活性レベルが、システミン－ＣＥＸによって測定した場合、少なくとも約９０％である、精製された調製物も本明細書に開示する。
【図面の簡単な説明】
【００１５】
【図１】異なる還元剤を受けた後のインタクト抗体（ＬＨＨＬ）のパーセンテージを経時的に示す図である。
【図２－１】図２Ａは、嫌気条件下で８ｍＭシステインでの選択的還元を受けた後の室温でのインタクト抗体（ＬＨＨＬ）のパーセンテージを経時的に示す図である。図２Ｂは、好気条件下で８ｍＭシステインでの選択的還元を受けた後の室温でのインタクト抗体（ＬＨＨＬ）のパーセンテージを経時的に示す図である。
【図２－２】図２Ｃは、嫌気条件下で８ｍＭシステインでの選択的還元を受けた後の３７℃でのインタクト抗体（ＬＨＨＬ）のパーセンテージを経時的に示す図である。図２Ｄは、好気条件下で８ｍＭシステインでの選択的還元を受けた後の３７℃でのインタクト抗体（ＬＨＨＬ）のパーセンテージを経時的に示す図である。
【図３】様々な溶存酸素濃度で８ｍＭシステインでの選択的還元を受けた後の３７℃でのインタクト抗体のパーセンテージを経時的に示す図である。
【図４】図４Ａは、ＣＥＸによる活性の４Ｄコンタープロットを示す図である。図４Ｂは、ＣＥ－ＳＤＳについての純度の４Ｄコンタープロットを示す図である。図４のプロットは、出力パラメータであるＣＥＸによる活性およびＣＥ－ＳＤＳによる純度に対するシステイン濃度、タンパク質含有量およびシステイン／シスチン比の影響、ならびにシステイン濃度とタンパク質含有量とシステイン／シスチン比の交互作用を分析するものである。
【図５】図５Ａは、ＣＥＸによる活性の４Ｄコンタープロットを示す図である。図５Ｂは、ＣＥ－ＳＤＳについての純度の４Ｄコンタープロットを示す図である。図５のプロットは、出力パラメータであるＣＥＸによる活性およびＣＥ－ＳＤＳによる純度に対するシステイン濃度、タンパク質含有量およびシスチン濃度の影響、ならびにシステイン濃度とタンパク質含有量とシスチン濃度の交互作用を分析するものである。
【図６】ｐＨ、時間、温度およびシステイン濃度の影響および交互作用を見る、ＣＥＸによる活性の４Ｄコンタープロットを示す図である。
【図７】ｐＨ、時間、温度およびシステイン濃度の影響および交互作用を見る、ＣＥ－ＳＤＳによる純度の４Ｄコンタープロットを示す図である。
【図８】確認試行１のシステイン処理の溶存酸素チャートを示す図である。
【図９】確認試行２のシステイン処理の溶存酸素チャートを示す図である。
【図１０】確認試行３のシステイン処理の溶存酸素チャートを示す図である。
【図１１】確認試行４のシステイン処理の溶存酸素チャートを示す図である。
【図１２】ＣＥＸによる活性およびＣＥ－ＳＤＳによる純度に関して確認試行３と確認試行４の反応動態を比較する図である。
【図１３】図１３Ａは、ＲＥＡＣＴ．ＰのＣＥＸによる活性のスケーリングおよびセンタリングを施した係数プロットを示す図である。図１３Ｂは、ＲＥＡＣＴ．ＰのＣＥＸによる活性の４Ｄコンタープロットを示す図である。図１３のプロットは、出力パラメータで

あるＣＥＸによる活性およびＣＥ－ＳＤＳによる純度に対するシステイン濃度、タンパク質含有量および撹拌機速度の影響、ならびにシステイン濃度とタンパク質含有量と撹拌機速度の交互作用を分析するものである。
【図１４Ａ】０ｒｐｍでのプロセス特性解析試行の溶存酸素プロファイルを示す図である（説明文中の数字は、試行番号、撹拌機速度ならびにシステインおよび抗体濃度を示す）。
【図１４Ｂ】５０ｒｐｍでのプロセス特性解析試行の溶存酸素プロファイルを示す図である（説明文中の数字は、試行番号、撹拌機速度ならびにシステインおよび抗体濃度を示す）。
【図１４Ｃ】１００ｒｐｍでのプロセス特性解析試行の溶存酸素プロファイルを示す図である（説明文中の数字は、試行番号、撹拌機速度ならびにシステインおよび抗体濃度を示す）。
【図１４Ｄ】一方は抗体なしで、もう一方は１２．７ｇ／Ｌの抗体を用いて、５０ｍＬ規模で、５０ｒｐｍおよび６．０ｍＭで行った２つの試行の溶存酸素プロファイルを比較する図である。
【図１５】異なるインキュベーション温度でのＣＥＸによる活性の選択的還元の動態を示す図である。
【図１６】プロセスの様々なステップ（システイン添加、加熱、インキュベーション、冷却およびｐＨ調整）のタイミングの表示を伴う、縮小モデル適格性確認試行からの溶存酸素チャートのオーバーレイを示す図である。
【図１７】選択的還元中の製造規模試行および縮小モデル試行のＣＥＸによる活性についての動態を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００１６】
本開示の目的は、セクキヌマブなどの、ある特定のＩＬ－１７抗体またはそれらの抗原結合断片の抗原結合部位におけるＣｙｓＬ９７を選択的に還元する方法を提供することである。「選択的に還元すること」とは、開示するＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片中のＣｙｓＬ９７が、これらの抗体の保存システイン残基を還元することなく、酸化型へ還元されることを意味する。保存システイン残基は、古典的ＩｇＧ１抗体の場合、ヒンジ領域における２つのジスルフィド架橋、２つの鎖間ジスルフィド架橋（各Ｆａｂに１つ）、Ｆｃ領域における４つの鎖内ジスルフィド結合、および抗体のＦａｂ部分における８つの鎖内ジスルフィド架橋として存在する。選択的還元プロセス中に、特定の調製物中の一部の抗体の保存システインの一時的還元が起こることもある。しかし、反応完了時には、一時的に還元された保存システインの圧倒的多数が再び酸化されて典型的抗体に見られる保存的ジスルフィド結合を形成しており、その結果、抗体の選択的に還元された調製物（すなわち、精製された調製物）の純度および活性は高くなる。選択的還元反応の完了時、選択的に還元された調製物（すなわち、精製された調製物）は、インタクト抗体を１００％含有するとは期待されないが、その代わり、選択的に還元された調製物は、ＣＥ－ＳＤＳによって測定した場合、インタクト抗体を（理論最大値に対して）理想的には少なくとも約８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９または約１００％含有すると予想される。
【００１７】
用語「含む（comprising）」は、「含む（including）」に加えて「からなる」も含み、例えば、Ｘ「を含む」組成物は、排他的にＸからなっていてもよいし、または何か追加のもの、例えばＸ＋Ｙを含んでいてもよい。
【００１８】
数値ｘに関しての用語「約」は、例えば、＋／－１０％を意味する。数値範囲または数のリストの前に使用されている場合、用語「約」は一連の数の各々に当てはまり、例えば、「約１～５」という句は、「約１～約５」と解釈すべきであり、または例えば、「約１、２、３、４」という句は、「約１、約２、約３、約４など」と解釈すべきである。
【００１９】

翻訳後アミノ酸配列に基づくセクキヌマブの相対分子量は、１４７，９４４ダルトンである。この分子量（すなわち、１４７，９４４ダルトン）を本開示を通してセクキヌマブモルモル濃度値およびモル比の計算に使用する。しかし、ＣＨＯ細胞における産生中に、一般に、Ｃ末端リシンは各重鎖から除去される。各重鎖からのＣ末端リシンを欠くセクキヌマブの相対分子量は、１４７，６８８ダルトンである。セクキヌマブの調製物は、重鎖にＣ末端リシン残基がある分子とない分子の混合物を含有する。したがって、本開示において使用するセクキヌマブモル濃度値（およびこれらのモル濃度値を用いる比）は推定値であり、これらの数値に関しての用語「約」、「おおよそ」などは、少なくとも、相対分子量およびそれらを用いて行う結果として生じる計算のこのばらつきを包含する。

【００２０】

「実質的に」という語は、「完全に」を除外せず、例えば、Ｙが「実質的にない」は、Ｙが完全にないこともある。必要に応じて、「実質的に」という語は、本開示の定義から削除されることもある。

【００２１】

用語「抗体」は、本明細書において述べる場合、全抗体および任意の抗原結合部分またはそれらの一本鎖を含む。天然に存在する「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互接続されている少なくとも２本の重（Ｈ）鎖と２本の軽（Ｌ）鎖を含む糖タンパク質である。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではV_Hと略記する）および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、３つのドメイン、ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３、からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではV_Lと略記する）および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、１つのドメイン、ＣＬ、からなる。V_HおよびV_L領域は、フレームワーク領域（ＦＲ）と称する、より保存される領域が散在する、超可変領域または相補性決定領域（ＣＤＲ）と称する超可変性の領域にさらに細分することができる。各V_HおよびV_Lは、３つのＣＤＲおよび４つのＦＲからなり、これらは、アミノ末端からカルボキシ末端へ次の順序で配置されている：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４。重鎖および軽鎖可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第１の成分（Ｃ１ｑ）を含む、宿主組織または因子との、免疫グロブリンの結合を媒介することができる。

【００２２】

抗体の「抗原結合断片」という用語は、本明細書で使用する場合、抗原（例えば、ＩＬ－１７）と特異的に結合する能力を保持する抗体の断片を指す。抗体の抗原結合機能を完全長抗体の断片が果すことができることは証明されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例としては、V_L、V_H、ＣＬおよびＣＨ１ドメインからなる一価断片であるＦａｂ断片；ヒンジ領域においてジスルフィド結合によって連結されている２つのＦａｂ断片を含む二価断片であるＦ（ａｂ）２断片；V_HおよびＣＨ１ドメインからなるＦｄ断片；抗体の単一アームのV_LおよびV_HドメインからなるＦｖ断片；V_HドメインからなるｄＡｂ断片（Ward et al., 1989 Nature 341:544-546）；および単離されたＣＤＲが挙げられる。例示的抗原結合部位は、配列番号１～６および１１～１３（表１）に記載のセクキヌマブのＣＤＲ、好ましくは重鎖ＣＤＲ３を含む。さらに、Ｆｖ断片の２つのドメインであるV_LおよびV_Hは、別々の遺伝子によってコードされているが、それらを単一タンパク質鎖とすることを可能にする合成リンカーによって、組換え法を使用して、連結させることができ、この場合、V_LおよびV_H領域が対合して一価分子（一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）として公知）を形成する（例えば、Bird et al., 1988 Science 242:423-426、およびHuston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883を参照されたい）。そのような、一本鎖抗体も、用語「抗体」に包含されることを意図している。一本鎖抗体および抗原結合部分は、当業者に公知の従来の技術を使用して得られる。

【００２３】

「単離された抗体」は、本明細書で使用する場合、異なる抗原特異性を有する他の抗体を

実質的に含まない抗体を指す（例えば、ＩＬ－１７に特異的に結合する単離された抗体が、ＩＬ－１７以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、本明細書で使用する場合、単一分子組成の抗体分子の調製物を指す。用語「ヒト抗体」は、本明細書で使用する場合、フレームワーク領域とＣＤＲ領域の両方がヒト由来の配列に由来する可変領域を有する抗体を含むことを意図したものである。「ヒト抗体」は、ヒト、ヒト組織またはヒト細胞によって産生される必要はない。本開示のヒト抗体は、ヒト配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでランダムもしくは部位特異的変異誘発によって、抗体遺伝子の組み換え中のｉｎ　ｖｉｖｏでの接合部へのＮ－ヌクレオチド付加によって、またはｉｎ　ｖｉｖｏで体細胞変異によって導入される変異）を含むこともある。開示するプロセスおよび組成物の一部の実施形態において、ＩＬ－１７抗体は、ヒト抗体、単離された抗体、および／またはモノクローナル抗体である。

【００２４】

用語「ＩＬ－１７」は、以前はＣＴＬＡ８として知られていたＩＬ－１７Ａを指し、様々な種（例えば、ヒト、マウスおよびサル）からの野生型ＩＬ－１７Ａ、ＩＬ－１７Ａの多型バリアント、およびＩＬ－１７Ａの機能的等価物を含む。本開示によるＩＬ－１７Ａの機能的等価物は、好ましくは、野生型ＩＬ－１７Ａ（例えば、ヒトＩＬ－１７Ａ）と少なくとも約６５％、７５％、８５％、９５％、９６％、９７％、９８％、またはさらには９９％の全配列同一性を有し、ヒト皮膚線維芽細胞によるＩＬ－６産生を誘導する能力を実質的に保持する。

【００２５】

用語「K_D」は、特定の抗体－抗原相互作用の解離速度を指すことを意図したものである。用語「K_D」は、本明細書で使用する場合、K_dのK_aに対する比（すなわち、K_d／K_a）から得られる、モル濃度（Ｍ）として表される、解離定数を指すことを意図したものである。抗体のK_D値は、当技術分野において確立されている方法を使用して決定することができる。抗体のK_Dを決定する方法は、表面プラズモン共鳴を使用することによる、またはＢｉａｃｏｒｅ（登録商標）システムなどのバイオセンサーシステムを使用することによる。一部の実施形態において、ＩＬ－１７抗体または抗原結合断片、例えばセクキヌマブは、ヒトＬ－１７に対して約１００～２５０ｐＭのK_Dを有する。

【００２６】

用語「親和性」は、単一抗原部位における抗体と抗原間の相互作用の強度を指す。各抗体部位内では抗体「アーム」の可変領域が弱い非共有結合力によって非常に多数の部位の抗原と相互作用しており、相互作用が大きいほど、親和性が強い。様々な種のＩＬ－１７に対する抗体の結合親和性を評価するための標準的アッセイは、例えばＥＬＩＳＡ、ウェスタンブロットおよびＲＩＡを含めて、当技術分野において公知である。抗体の結合動態（例えば、結合親和性）も、当技術分野において公知の標準的アッセイによって、例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ分析によって評価することができる。

【００２７】

当分野に公知の本明細書に記載の方法論に従って判定してこれらのＩＬ－１７機能的特性（例えば、生化学的活性、免疫化学的活性、細胞活性、生理的活性または他の生物学的活性など）の１つまたは複数を「阻害する」抗体は、その抗体の不在下で（または無関係な特異性の対照抗体が存在するときに）見られるものと比較して特定の活性の統計的に有意な減少に関係すると解されることになる。ＩＬ－１７活性を阻害する抗体は、統計的に有意な減少、例えば、測定パラメータの少なくとも約１０％の減少、少なくとも５０％、８０％または９０％の減少をもたらし、開示する方法および組成物のある特定の実施形態において、使用するＩＬ－１７抗体は、ＩＬ－１７機能活性の９５％、９８％または９９％超を阻害することもある。

【００２８】

「ＩＬ－６を阻害する」は、本明細書で使用する場合、初代ヒト皮膚線維芽細胞からのＩＬ－６産生を減少させるＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片（例えば、セクキヌマブ

）の能力を指す。初代ヒト（皮膚）線維芽細胞におけるＩＬ－６の産生は、ＩＬ－１７に依存する（Hwang et al., (2004) Arthritis Res Ther; 6:R120-128）。要するに、Ｆｃ部を有する様々な濃度のＩＬ－１７結合分子またはヒトＩＬ－１７受容体の存在下でヒト皮膚線維芽細胞を組換えＩＬ－１７で刺激する。キメラ抗ＣＤ２５抗体Ｓｉｍｕｌｅｃｔ（登録商標）（バシリキシマブ）を陰性対照として使用してもよい。１６時間刺激後に上清を採取し、ＥＬＩＳＡによってＩＬ－６をアッセイする。ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片、例えばセクキヌマブは、上記のように試験したとき、すなわち、前記阻害活性をヒト皮膚線維芽細胞においてｈｕ－ＩＬ－１７によって誘導されるＩＬ－６産生に基づいて測定したとき（１ｎＭヒトＩＬ－１７の存在下で）ＩＬ－６産生の阻害について約５０ｎＭ以下（例えば、約０．０１～約５０ｎＭ）のＩＣ５０を概して有する。開示する方法および組成物の一部の実施形態において、ＩＬ－１７抗体またはそれらの抗原結合断片、例えばセクキヌマブ、およびそれらの機能的誘導体は、上で定義したようなＩＬ－６産生の阻害について、約２０ｎＭ以下、より好ましくは約１０ｎＭ以下、より好ましくは約５ｎＭ以下、より好ましくは約２ｎＭ以下、より好ましくは約１ｎＭ以下のＩＣ５０を有する。

【００２９】

用語「誘導体」は、別段の指示がない限り、アミノ酸配列バリアント、および本開示によるＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片、例えばセクキヌマブの、例えば、特定の配列（例えば可変ドメイン）の、共有結合性修飾（例えばＰＥＧ化、脱アミド化、ヒドロキシル化、リン酸化、メチル化など）を定義するために使用している。「機能的誘導体」は、開示するＩＬ－１７抗体と同様に、同等の生物学的活性を有する分子を含む。機能的誘導体は、本明細書に開示のＩＬ－１７抗体の断片およびペプチド類似体を含む。断片は、本開示による、例えば指定配列の、ポリペプチドの配列内の領域を含む。本明細書に開示するＩＬ－１７抗体の機能的誘導体（例えば、セクキヌマブの機能的誘導体）は、本明細書に開示するＩＬ－１７抗体およびそれらの抗原結合断片のV_Hおよび／またはV_L配列（例えば、表１のV_Hおよび／またはV_L配列）と少なくとも約６５％、７５％、８５％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％の全配列同一性を有するV_Hおよび／またはV_Lドメインを好ましくは含み、ヒトＩＬ－１７に結合する能力、例えば、ＩＬ－１７誘導ヒト皮膚線維芽細胞のＩＬ－６産生を阻害する能力を実質的に保持する。

【００３０】

「実質的に同一の」という句は、関連アミノ酸またはヌクレオチド配列（例えば、V_HまたはV_Lドメイン）が、特定の参照配列と比較して同一であるであろうまたは（例えば保存アミノ酸置換によって）非実質的相違を有すると予想されるということを意味する。非実質的相違は、小さなアミノ酸変化、例えば、指定領域（例えば、V_HまたはV_Lドメイン）の５アミノ酸配列内の１つまたは２つの置換を含む。抗体の場合、二次抗体は、同じ特異性を有し、その親和性の少なくとも５０％を有する。本明細書に開示する配列と実質的に同一の配列（例えば、少なくとも約８５％配列同一性）も本出願の一部である。一部の実施形態において、誘導体ＩＬ－１７抗体（例えば、セクキヌマブの誘導体、例えばセクキヌマブバイオシミラー抗体）の配列同一性は、開示する配列と比較して約９０％以上、例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％以上でありうる。

【００３１】

ネイティブポリペプチドおよびその機能的誘導体に対する「同一性」は、配列をアラインし、必要に応じて、最大同一性パーセントを達成するためにギャップを導入した後の、いかなる保存的置換も配列同一性の一部と見なさない、対応するネイティブポリペプチドの残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと本明細書では定義する。Ｎ末端伸長も、Ｃ末端伸長も、挿入も、同一性を低下させると見なさないものとする。アラインメントのための方法およびコンピュータプログラムは周知である。同一性パーセントは、標準的アラインメントアルゴリズム、例えば、Ａｌｔｓｈｕｌら（(1990) J. Mol. Biol., 215: 403 410）によって記載された基礎局所的アラインメント検索ツール（ＢＬ

ＡＳＴ：Basic Local Alignment Search Tool）、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎら（(1970) J. Mol.Biol., 48: 444 453）のアルゴリズム、またはＭｅｙｅｒｓら（(1988) Comput.Appl.Biosci., 4: 11 17）のアルゴリズムによって決定することができる。パラメータセットは、ギャップペナルティが１２であり、ギャップ伸長ペナルティが４であり、フレームシフトギャップペナルティが５である、Ｂｌｏｓｕｍ ６２スコア行列であってもよい。２アミノ酸またはヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、ＰＡＭ１２０残基質量表、１２のギャップ長ペナルティおよび４のギャップペナルティを使用してＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に組み込まれたＥ．ＭｅｙｅｒｓおよびＷ．Ｍｉｌｌｅｒ（(1989) CABIOS, 4:11-17）のアルゴリズムを使用して決定することもできる。

【００３２】

「アミノ酸」は、例えば、すべての天然に存在するＬ－α－アミノ酸を指し、Ｄ－アミノ酸を含む。「アミノ酸配列バリアント」という句は、それらのアミノ酸配列に本開示の配列と比較して多少の差がある分子を指す。本開示による、例えば指定配列の、抗体のアミノ酸配列バリアントは、ヒトＩＬ－１７に結合する能力を有するものとし、例えば、ＩＬ－１７誘導ヒト皮膚線維芽細胞のＩＬ－６産生を阻害するものとする。アミノ酸配列バリアントは、置換バリアント（少なくとも１つのアミノ酸残基が除去され、本開示によるポリペプチドの同じ位置のその場所に異なるアミノ酸が挿入されたもの）、挿入バリアント（１つまたは複数のアミノ酸が本開示によるポリペプチドの特定の位置のアミノ酸に直接隣接して挿入されたもの）、および欠失バリアント（本開示によるポリペプチドの１つまたは複数のアミノ酸が除去されたもの）を含む。

【００３３】

「遊離システイン」、「非伝統的システイン」および「不対システイン」という句は同義語として、保存抗体ジスルフィド結合に関与しないシステインを指す。遊離システインは、抗体フレームワーク領域に存在することもあり、または可変領域に（例えばＣＤＲ内に）存在することもある。セクキヌマブの場合、配列番号１０として記載する軽鎖可変領域のアミノ酸９７に対応する、配列番号６として記載するＬ－ＣＤＲ３のアミノ酸８（本明細書では以降ＣｙｓＬ９７と呼ぶ）は、遊離システインである。セクキヌマブの各分子は、２つのそのような遊離システイン残基－各V_Lドメインに１つ－を含む。開示するプロセスは、セクキヌマブの両方の遊離システイン残基を選択的に還元することができる。一部の実施形態では、開示するＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片の軽鎖における欠失および／または置換のため、遊離システインはＣｙｓＬ９７位に存在しないことになる。そのような場合、対応する遊離システインは、選択的還元反応の標的であり、用語「ＣｙｓＬ９７」に含まれる。

【００３４】

ＩＬ－１７抗体およびそれらの抗原結合断片

開示する様々なプロセスは、ある特定のＩＬ－１７抗体またはそれらの抗原結合断片（例えば、セクキヌマブ）の選択的還元に関係する。一実施形態において、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片は、超可変領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含む、少なくとも１つの免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（V_H）を含み、前記ＣＤＲ１は、アミノ酸配列配列番号１を有し、前記ＣＤＲ２は、アミノ酸配列配列番号２を有し、前記ＣＤＲ３は、アミノ酸配列配列番号３を有する。一実施形態において、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片は、超可変領域ＣＤＲ１’、ＣＤＲ２’およびＣＤＲ３’を含む、少なくとも１つの免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（V_L）を含み、前記ＣＤＲ１’は、アミノ酸配列配列番号４を有し、前記ＣＤＲ２’は、アミノ酸配列配列番号５を有し、前記ＣＤＲ３’は、アミノ酸配列配列番号６を有する。一実施形態において、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片は、超可変領域ＣＤＲ１－ｘ、ＣＤＲ２－ｘおよびＣＤＲ３－ｘを含む、少なくとも１つの免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（V_H）を含み、前記ＣＤＲ１－ｘは、アミノ酸配列配列番号１１を有し、前記ＣＤＲ２－ｘは、アミノ酸配列配列番号１２を有し、前記ＣＤＲ３－ｘは、アミノ酸配列配列番号１３を有する。

【００３５】

一実施形態において、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片は、少なくとも１つの免疫グロブリンV_Hドメインおよび少なくとも１つの免疫グロブリンV_Lドメインを含み、ａ）V_Hドメインは、（例えば、順番に）、ｉ）超可変領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３（前記ＣＤＲ１は、アミノ酸配列配列番号１を有し、前記ＣＤＲ２は、アミノ酸配列配列番号２を有し、前記ＣＤＲ３は、アミノ酸配列配列番号３を有する）またはｉｉ）超可変領域ＣＤＲ１－ｘ、ＣＤＲ２－ｘおよびＣＤＲ３－ｘ（前記ＣＤＲ１－ｘは、アミノ酸配列配列番号１１を有し、前記ＣＤＲ２－ｘは、アミノ酸配列配列番号１２を有し、前記ＣＤＲ３－ｘは、アミノ酸配列配列番号１３を有する）を含み、およびｂ）V_Lドメインは、（例えば、順番に）、超可変領域ＣＤＲ１’、ＣＤＲ２’およびＣＤＲ３’（前記ＣＤＲ１’は、アミノ酸配列配列番号４を有し、前記ＣＤＲ２’は、アミノ酸配列配列番号５を有し、前記ＣＤＲ３’は、アミノ酸配列配列番号６を有する）を含む。

【００３６】

一実施形態において、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片は、ａ）配列番号８に記載のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（V_H）；ｂ）配列番号１０に記載のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（V_L）；ｃ）配列番号８に記載のアミノ酸配列を含む免疫グロブリンV_Hドメインと配列番号１０に記載のアミノ酸配列を含む免疫グロブリンV_Lドメイン；ｄ）配列番号１、配列番号２および配列番号３に記載の超可変領域を含む免疫グロブリンV_Hドメイン；ｅ）配列番号４、配列番号５および配列番号６に記載の超可変領域を含む免疫グロブリンV_Lドメイン；ｆ）配列番号１１、配列番号１２および配列番号１３として記載する超可変領域を含む免疫グロブリンV_Hドメイン；ｇ） 配列番号１、配列番号２および配列番号３に記載の超可変領域を含む免疫グロブリンV_Hドメインと配列番号４、配列番号５および配列番号６に記載の超可変領域を含む免疫グロブリンV_Lドメイン；またはｈ）配列番号１１、配列番号１２および配列番号１３として記載する超可変領域を含む免疫グロブリンV_Hドメインと配列番号４、配列番号５および配列番号６に記載の超可変領域を含む免疫グロブリンV_Lドメインを含む。

【００３７】

言及を容易にするために、カバット定義に基づく、およびＸ線分析によってならびにコチアおよび共同研究者のアプローチを使用して決定した、セクキヌマブモノクローナル抗体の超可変領域のアミノ酸配列を、下の表１に提供する。

【００３８】

【表１】

軽鎖		
CDR1'	カバット	R-A-S-Q-S-V-S-S-S-Y-L-A (配列番号 4)
	コチア	R-A-S-Q-S-V-S-S-S-Y-L-A (配列番号 4)
CDR2'	カバット	G-A-S-S-R-A-T (配列番号 5)
	コチア	G-A-S-S-R-A-T (配列番号 5)
CDR3'	カバット	Q-Q-Y-G-S-S-P-C-T (配列番号 6)
	コチア	Q-Q-Y-G-S-S-P-C-T (配列番号 6)
重鎖		
CDR1	カバット	N-Y-W-M-N (配列番号 1)
CDR1-x	コチア	G-F-T-F-S-N-Y-W-M-N (配列番号 11)
CDR2	カバット	A-I-N-Q-D-G-S-E-K-Y-Y-V-G-S-V-K-G (配列番号 2)
CDR2-x	コチア	A-I-N-Q-D-G-S-E-K-Y-Y (配列番号 12)
CDR3	カバット	D-Y-Y-D-I-L-T-D-Y-Y-I-H-Y-W-Y-F-D-L (配列番号 3)
CDR3-x	コチア	C-V-R-D-Y-Y-D-I-L-T-D-Y-Y-I-H-Y-W-Y-F-D-L-W-G (配列番号 13)

表 1:セクキヌマブモノクローナル抗体の超可変領域のアミノ酸配列。

【００３９】
好ましい実施形態において、定常領域ドメインは、好適なヒト定常領域、例えば、"Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat E.A. et al, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Healthに記載のものも好ましくは含む。セクキヌマブのＶＬをコードするＤＮＡを配列番号９に記載する。セクキヌマブのV_HをコードするＤＮＡを配列番号７に記載する。
【００４０】
一部の実施形態において、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片（例えば、セクキヌマブ）は、配列番号１０の３つのＣＤＲを含む。他の実施形態において、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片は、配列番号８の３つのＣＤＲを含む。他の実施形態において、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片は、配列番号１０の３つのＣＤＲ、および配列番号８の３つのＣＤＲを含む。配列番号８および配列番号１０のＣＤＲは、表１において見つけることができる。軽鎖内の遊離システイン（ＣｙｓＬ９７）は、配列番号６で見ることができる。
【００４１】
一部の実施形態において、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片は、配列番号１４の軽鎖を含む。他の実施形態において、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片は、（Ｃ末端リシンを有するまたは有さない）配列番号１５の重鎖を含む。他の実施形態において、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片は、配列番号１４の軽鎖および（Ｃ末端リシンを有するまたは有さない）配列番号１５の重鎖を含む。一部の実施形態において、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片は、配列番号１４の３つのＣＤＲを含む。他の実施形態において、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片は、配列番号１５の３つのＣＤＲを含む。他の実施形態において、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片は、配列番号１４の３つのＣＤＲ、および配列番号１５の３つのＣＤＲを含む。配列番号１４および配列番号１５のＣＤＲは、表１において見つけることができる。
【００４２】
超可変領域は、好ましくはヒト由来のものであるが、いずれの種類のフレームワーク領域と会合していてもよい。好適なフレームワーク領域は、Kabat E.A. et al, ibidに記載されている。好ましい重鎖フレームワークは、ヒト重鎖フレームワーク、例えば、セクキヌマブ抗体のものである。それは、順番に、例えばＦＲ１（配列番号８のアミノ酸１～３０）、ＦＲ２（配列番号８のアミノ酸３６～４９）、ＦＲ３（配列番号８のアミノ酸６７～９８）およびＦＲ４（配列番号８のアミノ酸１１７～１２７）領域からなる。セクキヌマブのＸ線分析によって決定された超可変領域を考慮に入れて、別の好ましい重鎖フレームワークは、順番に、ＦＲ１－ｘ（配列番号８のアミノ酸１～２５）、ＦＲ２－ｘ（配列番号８のアミノ酸３６～４９）、ＦＲ３－ｘ（配列番号８のアミノ酸６１～９５）およびＦＲ４（配列番号８のアミノ酸１１９～１２７）領域からなる。同様の方法で、軽鎖フレームワークは、順番に、ＦＲ１’（配列番号１０のアミノ酸１～２３）、ＦＲ２’（配列番号１０のアミノ酸３６～５０）、ＦＲ３’（配列番号１０のアミノ酸５８～８９）およびＦＲ４’（配列番号１０のアミノ酸９９～１０９）領域からなる。
【００４３】
一実施形態において、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片（例えば、セクキヌマブ）は、ａ）ヒト重鎖の超可変領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を順番に含む可変ドメインと定常部分またはその断片とを含む、免疫グロブリン重鎖またはその断片（前記ＣＤＲ１は、アミノ酸配列配列番号１を有し、前記ＣＤＲ２は、アミノ酸配列配列番号２を有し、前記ＣＤＲ３は、アミノ酸配列配列番号３を有する）、およびｂ）ヒト軽鎖の超可変領域ＣＤＲ１’、ＣＤＲ２’およびＣＤＲ３’を順番に含む可変ドメインと定常部分またはその断片とを含む、免疫グロブリン軽鎖またはその断片（前記ＣＤＲ１’は、アミノ酸配列配列番号４を有し、前記ＣＤＲ２’は、アミノ酸配列配列番号５を有し、前記ＣＤＲ３’は、アミノ酸配列配列番号６を有する）を少なくとも含む、ヒトＩＬ－１７抗体から選択される。

【００４４】
一実施形態において、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片は、抗原結合部位を含む、一本鎖抗体またはその抗原結合断片から選択され、抗原結合部位は、ａ）順番に超可変領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３を含む第１のドメイン（前記ＣＤＲ１は、アミノ酸配列配列番号１を有し、前記ＣＤＲ２は、アミノ酸配列配列番号２を有し、前記ＣＤＲ３は、アミノ酸配列配列番号３を有する）；ｂ）順番に超可変領域ＣＤＲ１’、ＣＤＲ２’およびＣＤＲ３’を順番に含む第２のドメイン（前記ＣＤＲ１’は、アミノ酸配列配列番号４を有し、前記ＣＤＲ２’は、アミノ酸配列配列番号５を有し、前記ＣＤＲ３’は、アミノ酸配列配列番号６を有する）；ｃ）第１のドメインのＮ末端先端および第２のドメインのＣ末端先端と結合されている、または第１のドメインのＣ末端先端および第２のドメインのＮ末端先端と結合されているペプチドリンカーを含む。
【００４５】
あるいは、開示する方法で使用される場合のＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片は、本明細書に記載のＩＬ－１７抗体の配列による誘導体（例えば、セクキヌマブのＰＥＧ化バージョン）を含むことがある。あるいは、本開示の方法で使用されるＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片のV_HまたはV_Lドメインは、本明細書に記載のV_HまたはV_Lドメイン（例えば、配列番号８および１０に記載するもの）と実質的に同一であるV_HまたはV_Lドメインを有することがある。本明細書に開示するヒトＩＬ－１７抗体は、（Ｃ末端リシンを有するもしくは有さない）配列番号１５に記載のものと実質的に同一である重鎖、および／または配列番号１４に記載のものと実質的に同一である軽鎖を含むことがある。本明細書に開示するヒトＩＬ－１７抗体は、（Ｃ末端リシンを有するもしくは有さない）配列番号１５を含む重鎖、および配列番号１４を含む軽鎖を含むことがある。本明細書に開示するヒトＩＬ－１７抗体は、ａ）配列番号８に示すものと実質的に同一のアミノ酸配列を有する可変ドメインとヒト重鎖の定常部とを含む１本の重鎖、およびｂ）配列番号１０に示すものと実質的に同一のアミノ酸配列を有する可変ドメインとヒト軽鎖の定常部とを含む１本の軽鎖を含むことがある。
【００４６】
あるいは、開示する方法で使用されるＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片は、本明細書に記載する参照ＩＬ－１７抗体のアミノ酸配列バリアントであってもよいが、それがＣｙｓＬ９７を含有することを条件とする。本開示は、セクキヌマブのＶＨまたはＶＬドメインのアミノ酸残基（しかしＣｙｓＬ９７ではない）の１つまたは複数、通常はほんの少数（例えば１～１０）が、例えば、変異、例えば、対応するＤＮＡ配列の部位特異的変異誘発によって変更されている、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片（例えば、セクキヌマブ）も含む。誘導体およびバリアントのすべてのそのような場合、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片は、前記分子の約５０ｎＭ以下、約２０ｎＭ以下、約１０ｎＭ以下、約５ｎＭ以下、約２ｎＭ以下、またはより好ましくは約１ｎＭ以下の濃度で、約１ｎＭ（＝３０ｇｎ／ｍｌ）ヒトＩＬ－１７の活性を５０％阻害することができ、前記阻害活性は、国際公開第２００６／０１３１０７号パンフレットの実施例１に記載されているようにヒト皮膚線維芽細胞においてｈｕ－ＩＬ－１７によって誘発されるＩＬ－６産生に基づいて測定される。
【００４７】
一部の実施形態において、ＩＬ－１７抗体またはそれらの抗原結合断片、例えばセクキヌマブは、Ｌｅｕ７４、Ｔｙｒ８５、Ｈｉｓ８６、Ｍｅｔ８７、Ａｓｎ８８、Ｖａｌ１２４、Ｔｈｒ１２５、Ｐｒｏ１２６、Ｉｌｅ１２７、Ｖａｌ１２８、Ｈｉｓ１２９を含む、成熟ヒトＩＬ－１７のエピトープと結合する。一部の実施形態において、ＩＬ－１７抗体、例えばセクキヌマブは、Ｔｙｒ４３、Ｔｙｒ４４、Ａｒｇ４６、Ａｌａ７９、Ａｓｐ８０を含む、成熟ヒトＩＬ－１７のエピトープと結合する。一部の実施形態において、ＩＬ－１７抗体、例えばセクキヌマブは、２本の成熟ヒトＩＬ－１７鎖を有するＩＬ－１７ホモ二量体のエピトープと結合し、前記エピトープは、一方の鎖にＬｅｕ７４、Ｔｙｒ８５、Ｈｉｓ８６、Ｍｅｔ８７、Ａｓｎ８８、Ｖａｌ１２４、Ｔｈｒ１２５、Ｐｒｏ１２６、Ｉ

ｌｅ１２７、Ｖａｌ１２８、Ｈｉｓ１２９を、他方の鎖にＴｙｒ４３、Ｔｙｒ４４、Ａｒｇ４６、Ａｌａ７９、Ａｓｐ８０を含む。これらのエピトープを定義するために使用した残基ナンバリングスキームは、成熟タンパク質の第１のアミノ酸である残基（すなわち、２３アミノ酸Ｎ末端シグナルペプチドを欠き、グリシンで始まる、ＩＬ－１７Ａ）のものに基づく。未成熟ＩＬ－１７の配列は、Ｓｗｉｓｓ－ＰｒｏｔエントリーＱ１６５５２に記載されている。一部の実施形態において、ＩＬ－１７抗体は、約１００～２００ｐＭのＫＤを有する。一部の実施形態において、ＩＬ－１７抗体は、約０．６７ｎＭ ヒトＩＬ－１７Ａの生物学的活性のｉｎ ｖｉｔｒｏ中和について約０．４ｎＭのＩＣ５０を有する。一部の実施形態において、皮下（ｓ．ｃ．）投与されるＩＬ－１７抗体の絶対バイオアベイラビリティは、約６０～約８０％の範囲、例えば約７６％、を有する。一部の実施形態において、ＩＬ－１７抗体、セクキヌマブは、約４週間（例えば、約２３～約３５日、約２３～約３０日、例えば３０日）の排出半減期を有する。一部の実施形態において、ＩＬ－１７抗体（例えば、セクキヌマブ）は、約７～８日のＴｍａｘを有する。

【００４８】

開示する方法で使用される特に好ましいＩＬ－１７抗体またはそれらの抗原結合断片は、ヒト抗体、特に、国際公開第２００６／０１３１０７号パンフレットの実施例１および２に記載のセクキヌマブである。セクキヌマブは、免疫媒介炎症状態の処置について現在臨床試験中である、ＩｇＧ１／カッパアイソタイプの組換え高親和性、完全ヒトモノクローナル抗ヒトインターロイキン－１７Ａ（ＩＬ－１７Ａ、ＩＬ－１７）抗体である。セクキヌマブ（例えば国際公開第２００６／０１３１０７号および同第２００７／１１７７４９号パンフレットを参照されたい）は、ＩＬ－１７に対する非常に高い親和性、すなわち、約１００～２００ｐＭのＫＤ、および約０．６７ｎＭ ヒトＩＬ－１７Ａの生物学的活性のｉｎ ｖｉｔｒｏ中和について約０．４ｎＭのＩＣ５０を有する。したがって、セクキヌマブは、約１：１のモル比で抗原を阻害する。この高い結合親和性のため、セクキヌマブは治療への応用に特に好適なのである。さらに、セクキヌマブ抗体は、非常に長い半減期、すなわち約４週間の半減期を有し、このことによって投与間の期間延長が可能であり、これは、関節リウマチなどの一生続く慢性障害を処置するときの並外れた特性である。

【００４９】

上述のＩＬ－１７抗体およびそれらの抗原結合断片（例えば、セクキヌマブ）の調製物中のＣｙｓＬ９７を選択的に還元するプロセスを本明細書において開示する。開示する方法を抗体（例えば、ＩＬ－１７抗体、例えばセクキヌマブ）の調製物に対して適便に行ってコストを削減することができる。抗体の「調製物」は、複数の抗体分子を有する組成物（例えば、溶液）を指す。「調製物」は、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片を含むあらゆる液体組成物を含む。したがって、調製物は、例えば、水または緩衝液中、カラム溶出液中、透析緩衝液中などの、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片、例えばセクキヌマブ、を含むことがある。一部の実施形態において、抗体の初期調製物は、緩衝液（例えば、Ｔｒｉｓ、例えば、１ｍＭ～１Ｍ Ｔｒｉｓ、ｐＨ６．０～８．０）またはＷＦＩ中のＩＬ－１７抗体およびそれらの抗原結合断片、例えばセクキヌマブ、のプールを含む。抗体への還元剤の添加前に、溶存酸素レベル、溶液ｐＨ、抗体濃度などを変更することによって調製物を調整することもある。一部の実施形態では、還元剤の添加前に、調製物中の抗体（例えば、セクキヌマブ）の濃度を、約４ｍｇ／ｍｌ～約１９．４ｍｇ／ｍｌ、例えば、約１０ｍｇ／ｍｌ～約１９．４ｍｇ／ｍｌ、約１０ｍｇ／ｍｌ～約１５．４ｍｇ／ｍｌ、約１２ｍｇ／ｍｌ～約１５ｍｇ／ｍｌ、または約１３．５ｍｇ／ｍｌに調整する。一部の実施形態では、還元剤の添加前に、調製物中の酸素飽和度パーセントを、少なくとも約６０％（２５℃で較正した酸素プローブを使用して測定した場合）、例えば、少なくとも８０％に調整する。一部の実施形態では、還元剤の添加前に、調製物のｐＨを、約７．３～約８．５、例えば、約７．８～約８．２、例えば、約７．９～約８．１、例えば、約８．０に調整する。抗体の濃度、ｐＨおよび酸素レベルを還元剤の添加直後（またはさらには添加中）に調整することもでき、したがって、等価と解釈すべきである。

【００５０】

開示するプロセスで使用するためのＩＬ－１７抗体またはそれらの抗原結合断片の調製物は、任意の哺乳動物細胞株、例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）細胞、マウス骨髄腫ＮＳ０細胞、ベビーハムスター腎臓（ＢＨＫ）細胞、ヒト胎児由来腎臓細胞株ＨＥＫ－２９３、ヒト網膜細胞株Ｐｅｒ．Ｃ６（Ｃｒｕｃｅｌｌ、ＮＬ）、ＨＫＢ１１細胞クローン（ＨＥＫ２９３Ｓとバーキットリンパ腫株２Ｂ８のハイブリッド細胞融合から得られるもの）などを使用して、任意の哺乳動物細胞によって組換え産生させることができるだろう。「哺乳動物細胞によって組換え産生された」とは、哺乳動物細胞における抗体の産生が、組換えＤＮＡ技術を使用して果されたことを意味する。選択的還元に晒されたＩＬ－１７抗体調製物は、（後の精澄化を伴うまたは伴わない）遠心分離によって哺乳動物細胞から収集された抗体のプールであってもよい。あるいは、選択的還元に晒されたＩＬ－１７抗体調製物は、さらなる下流のクロマトグラフィーステップからの抗体のプール、例えば、アフィニティーカラム（例えば、プロテインＡカラム）、陽イオン交換カラム、陰イオン交換カラムなどからの溶出物であってもよい。あるいは、選択的還元に晒されたＩＬ－１７抗体調製物は、下流の濾過ステップ、例えば、深層濾過、ナノフィルトレーション、限外濾過などからの抗体のプールであってもよい。あるいは、選択的還元に晒されたＩＬ－１７抗体調製物は、宿主細胞タンパク質を除去するようにおよび／またはウイルス不活化するように処理された、下流のステップからの抗体のプールであってもよい。一実施形態において、選択的還元に晒されたＩＬ－１７抗体調製物は、抗体のプロテインＡ溶出物プールである。

【００５１】

選択されるプロセス条件（例えば、温度、還元時間の長さ、ｐＨなど）に依存して、元の調製物中の抗体濃度は変わることになる。一部の実施形態において、元の調製物に使用されるＩＬ－１７抗体の濃度は、ＩＬ－１７抗体またはそれらの抗原結合断片約２ｍｇ／ｍｌ～約２０ｍｇ／ｍｌの間、約３．８ｍｇ／ｍｌ～約１９．５ｍｇ／ｍｌの間、約４ｍｇ／ｍｌ～約１９．５ｍｇ／ｍｌの間、約１０ｍｇ／ｍｌ～約１９．４ｍｇ／ｍｌの間、例えば、約１０ｍｇ／ｍｌ～約１５．４ｍｇ／ｍｌの間、例えば、約１２ｍｇ／ｍｌ～約１５ｍｇ／ｍｌの間、例えば、約１３．５ｍｇ／ｍｌである。選択的還元の前に、注射用水（ＷＦＩ）または最適な緩衝液を使用して初期抗体調製物中の抗体濃度を所望通りに調整することができるだろう。

【００５２】

本明細書に記載する選択的還元プロセスをいずれのサイズの容器で行ってもよい。一部の実施形態において、容器は、実験室規模（例えば１Ｌ～２Ｌ）である。他の実施形態において、容器は、パイロット規模（例えば１２Ｌ～２０Ｌ）である。さらなる実施形態において、容器は、商業規模（例えば、１０，０００Ｌ超、例えば、１４，０００Ｌ、１５，０００Ｌ、１６，０００Ｌなど）である。

【００５３】

還元剤

還元剤は、レドックス（還元－酸化）反応において電子供与できる物質である。具体的には、そのような薬剤は、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片（例えば、セクキヌマブ抗体）中に存在するマスクされた（遮断された）システインへの水素の供給に有用である。本明細書に開示するプロセスは、ＩＬ－１７抗体の選択的還元に還元剤を使用する。本明細書において言及する各還元剤は、それらの誘導体（例えば、塩、エステルおよびアミド）を含む。したがって、例えば、「システイン」への言及は、システインおよびシステイン－ＨＣＬを含み、「ＴＣＥＰ」への言及は、ＴＣＥＰおよびＴＣＥＰ－ＨＣＬを含み、チオグリコール酸ナトリウムへの言及は、チオグリコール酸エステルなどを含む。開示する方法において使用するための還元剤としては、亜硫酸水素ナトリウム、アンモニア、トリエチルシラン、グリシルシステイン、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、チオグリコール酸アンモニウム、チオグリコール酸カルシウム、チオグリコール酸ナトリウム、アスコルビン酸、ヒドロキノン、アミノメタンスルホン酸、システイン酸、システインスルフィン酸、エタンジスルホン酸、エタンスルホン酸、ホモタウリン、ヒポタウリン、イセチオ

ン酸、メルカプトエタンスルホン酸、Ｎ－メチルタウリン（ＭＴＡＵ）、ＴＣＥＰ（トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩）、Ｎ－Ｎ－ジメチル－Ｎ－Ｎビス（メルカプトアセチル）ヒドラジン（ＤＭＨ）、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）、２－メルカプトエタノール（ベーターメルカプトエタノール）、２－メルカプト酢酸（チオグリコール酸、ＴＧＡ）、システイン（Ｌ－システイン）、システアミン（ベーターメルカプトエチルアミン、またはＭＥＡ）、グルタチオン、およびこれらの組合せが挙げられる。一部の実施形態において、開示するプロセスで使用するための還元剤は、チオール含有還元剤（すなわち、Ｒ－ＳＨ基を有する化合物）、例えば、有機硫黄化合物である。一部の実施形態において、開示するプロセスで使用するための還元剤は、例えば、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）、２－メルカプトエタノール、２－メルカプト酢酸、システイン、システアミン、グルタチオンおよび組合せである。

【００５４】

還元剤の強度は、その酸化還元電位（レドックス電位）E^0によって示され、酸化還元電位は、ボルト（Ｖ）で与えられ、伝統的にｐＨ７、２５℃で判定される。例えば、ＣＳＨ／ＣＳＳＣについての標準酸化還元電位E^0は、約－０．２０Ｖ～約－０．２３Ｖ（ｐＨ７、２５℃）とされている（P. C. Jocelyn (1967) Eu.J. Biochem 2:327-31、Liu “The role of Sulfur in Proteins,” in The Proteins, 3rd Ed.(ed. Neurath) p. 250-252 Academic Press 1977）。ＤＴＴの標準酸化還元電位E^0は、約－０．３３Ｖ（ｐＨ７、２５℃）とされている（M.J.O'Neil, ed. by (2001).Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, & biologicals: 13th ed. (13. ed. ed.) United States: MERCK & CO INC.、Liu, supra）。グルタチオンの標準酸化還元電位E^0は、約－０．２４Ｖまたは約－０．２６Ｖ（ｐＨ７、２５℃）とされている（Rost and Rapoport (1964) Nature 201:185; Gilbert (1990) Adv.Enzymol.Relat.Areas Mol.Biol.63:69-172、Giles (2002) Gen.Physiol Biophys 21:65-72、Liu, supra）。２－メルカプトエタノールの標準酸化還元電位E^0は、約－０．２６Ｖとされている（Lee and Whitesides (1990) J. Org.Chem 58:642-647）。一部の実施形態において、還元剤は、システインと同様の標準酸化還元電位E^0（例えば、約－０．２０Ｖ～約－０．２３Ｖ、約－０．２０Ｖ～約－０．２２Ｖ、約－０．２０Ｖ～約－０．２１Ｖ、約－０．２１Ｖ～約－０．２３Ｖ、約－０．２１Ｖ～－０．２２Ｖ、約－０．２２Ｖ～約－０．２３Ｖ、約－０．２０Ｖ、約－０．２１Ｖ、約－０．２２Ｖ、約－０．２３Ｖ）を有する。

【００５５】

チオール含有化合物の標準酸化還元電位E^0は、熱分析、ＮＡＤ＋の還元、ポーラログラフィー、Ｆｅ＋＋との反応、またはチオール－ジスルフィド交換研究によって測定されうる（Jocelyn, supra、Borsook et al.(1937) J. Biol.Chem 117:281、Ghosh et al.(1932) J. Indian Chem.Soc.9:43、Kolthoff et al.(1955) J. Am. Chem.Soc.77:4739、Tanaka et al.(1955) J. Am. Chem.Soc.77:2004、Kolthoff et al.(1955) J. Am. Chem.Soc.77:4733、Eldjarn (1957) J. Am. Chem.Soc.79:4589）。一部の実施形態では、標準酸化還元電位E^0を、熱分析、ポーラログラフィー、Ｆｅ＋＋との反応、またはチオール－ジスルフィド交換研究によって、例えば、好ましくはチオール－ジスルフィド交換研究によって判定する。一部の実施形態では、標準酸化還元電位E^0を、ｐＨ７、２５℃で判定する。

【００５６】

還元剤は、抗体調製物と併せると、「還元性混合物」になる。還元性混合物は、還元剤およびＩＬ－１７抗体に加えて賦形剤を含有することもある。例えば、ある特定の実施形態では、小モル比の還元剤の酸化型（例えば、システイン、シスタミン）を、還元性混合物に、還元剤と同時に添加してもよく、または逐次的に、例えば、インキュベーション開始の１０～３０分以上後に添加してもよい。例えば、システインが還元剤である場合には、少量のシステインを還元性混合物に、例えば、システインと同時に添加してもよく、または例えば、システインをＩＬ－１７抗体もしくはその抗原結合断片と併せた１５、２０、３０分後に添加してもよい。したがって、一部の実施形態において、還元性混合物は、酸

化剤／還元剤のセットを含む。「酸化剤／還元剤のセット」とは、レドックスペアまたはレドックス対、すなわち、半反応式の両側に出現する酸化剤および還元剤（例えば、還元種およびその対応する酸化型、例えば、Ｆｅ２＋／Ｆｅ３＋、システイン／シスチン、システアミン／シスタミン）を意味する。

【００５７】

反応条件（温度、反応時間の長さ、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片の量、ｐＨなど）に依存して、特定の還元性混合物および選択的還元反応に使用される還元剤の濃度は変わることになる。一部の実施形態において、還元性混合物に使用される還元剤の量は、約１から約２０ｍＭまで様々である。一部の実施形態において、還元性混合物に用いられる還元剤の濃度は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５または１６ｍＭである。一実施形態において、還元剤（例えば、システイン）の量は、約４ｍＭ～約８ｍＭの間、例えば、５．９ｍＭ、６ｍＭ、７．７ｍＭ、７．９ｍＭ、８ｍＭである。

【００５８】

一実施形態において、還元剤は、ベーターメルカプトエタノールである。ある特定の実施形態では、ベーターメルカプトエタノールを約２．０ｍＭ～約８．０ｍＭの濃度で用いる。

【００５９】

一実施形態において、還元剤は、グルタチオンである。ある特定の実施形態では、グルタチオンを約２．０ｍＭ～約５．０ｍＭの濃度で用いる。

【００６０】

一実施形態において、還元剤は、システアミンである。ある特定の実施形態では、システアミンを約１．０ｍＭ～２０ｍＭ、約４．０ｍＭ～約１９ｍＭ、約２．０ｍＭ～約８．０ｍＭ、約４．０ｍＭ～約８．０ｍＭ、約４．８ｍＭ～約８．０ｍＭ、約５．５ｍＭ～約６．７ｍＭ、または約６．０ｍＭの濃度で用いる。

【００６１】

一実施形態において、還元剤は、システインである。ある特定の実施形態では、システインを約１．０ｍＭ～２０ｍＭ、約４．０ｍＭ～約１９ｍＭ、約２．０ｍＭ～約８．０ｍＭ、約４．０ｍＭ～約８．０ｍＭ、約４．８ｍＭ～約８．０ｍＭ、約５．５ｍＭ～約６．７ｍＭ、または約６．０ｍＭの濃度で用いる。例えば１２０ｍＭ　システインＨＣＬのストック溶液を使用して、システイン濃度を調整することができる。

【００６２】

各ＩＬ－１７抗体は、選択的還元を必要とする２つのＣｙｓＬ９７残基を有する。したがって、用いられる還元剤の量は、伝統的ジスルフィド結合を不可逆的に還元することによって抗体を同時に過剰還元することなく、抗体の調製物中のかなりの部分のＩＬ－１７抗体の両方のＣｙｓＬ９７残基を選択的に還元するために十分な量であるべきである。反応条件（酸化剤の存在、温度、反応時間の長さ、ｐＨなど）に依存して、特定の還元性混合物および選択的還元反応に使用される還元剤：ＩＬ－１７抗体のモル比は変わることになる。本発明者らは、還元剤（例えば、システイン）：抗体（例えば、セクキヌマブ）のモル比が、約１１：１（実施例５．２）から約５４６：１（実施例６．２）まで多岐にわたりうることを発見した。開示する方法の一部の実施形態において、還元剤（例えば、システイン）：抗体（例えば、セクキヌマブ）のモル比は、約１１：１～約４６２：１の間（例えば、約２１：１）、約３１：１～約５４５：１（例えば、約３１：１～約１５６：１）の間、約２１：１～約２９６：１の間、または約４６：１～約９１：１の間である。他の実施形態において、還元剤（例えば、システイン）：抗体（例えば、セクキヌマブ）のモル比は、約２３：１～約９１：１（例えば、約２３：１～約５７：１）の間、約４４：１～約２７５：１の間（例えば、約４４：１）、約４４：１～約６６：１（例えば、約４４：１～約６６：１）の間、好ましくは、約４６：１～約１１８：１（例えば、約５６：１～約１１８：１）の間、より好ましくは、約５４：１～約８２：１の間である。一実施形態において、還元剤（例えば、システイン）：抗体（例えば、セクキヌマブ）のモル比は、約６６：１である。

【００６３】
還元剤（例えば、システイン）：抗体（例えば、セクキヌマブ）のより高いモル比を使用する（抗体と比較して過剰な還元剤を意味する）場合には、少量の対応する酸化剤（例えば、シスチンまたはシスタミン）の添加は、還元剤（例えば、システインまたはシステアミン）の還元力を弱めるのに有用でありうる。これは、嫌気環境において特に有益である。したがって、一部の実施形態では、酸化剤／還元剤のセットを使用して（例えば、好気または嫌気環境、好ましくは嫌気環境で）選択的還元を行う。一部の実施形態では、還元性混合物中、約２：１～約８０：１、約４：１～約８０：１、約２６：１～約８０：１、約２：１～約１０：１（例えば、約６：１～約１０：１）、約４：１～約２８：１（約４：１～約１８：１）、約２７：１～約５３：１（例えば、約２７：１）の還元剤（例えば、システイン）：酸化剤（例えば、シスチン）のモル比を使用して、選択的還元を行う。ある特定の実施形態では、還元性混合物に酸化剤シスチンまたはシスタミン（好ましくは、シスチン）とシステインを併用する。一部の実施形態では、約４ｍＭ～１４ｍＭシステイン（例えば、約７．７ｍＭ～約８．０ｍＭシステイン）および約０．１～約１ｍＭシスチン（例えば、約０．１～約０．３ｍＭシスチン）を還元性混合物に使用する条件で、選択的還元を行う。ある特定の実施形態において、還元性混合物は、約８．０ｍＭシステインおよび約０．１ｍＭシスチン、約７．９ｍＭシステインおよび約０．１ｍＭシスチン、または約７．７ｍＭシステインおよび約０．３ｍＭシスチンを含有する。開示するプロセスで酸化剤、例えばシスチンを還元剤、例えばシステインを併用する場合、還元剤、例えばシステインをＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片と併せた後の時点で酸化剤、例えばシスチンを添加してもよいことは、理解されるであろう。例えば、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片をシステインと併せて還元性混合物にし、次いで、例えば１５～３０分間インキュベートし、その後、シスチンをその反応に加えてもよい。
【００６４】
溶存酸素
本明細書で使用する場合、「溶存酸素」、「ｄＯ２」および「ＤＯ」は、所与の媒体に溶解または担持されている酸素の量を指す。それを液体媒体中の酸素センサーまたはオプトードなどの酸素プローブで測定することができる。ＤＯは、濃度（ミリグラム毎リットル（ｍｇ／Ｌ））または「飽和度パーセント」のいずれかとして報告される。ミリグラム毎リットルは、溶媒１リットル中の酸素の量であり、百万分率＝ｐｐｍにも等しい。酸素飽和度パーセントは、溶液が特定の温度で保持できる酸素の総量に対する溶液中の酸素の量である。
【００６５】
本明細書で使用する場合、「初期酸素飽和度パーセント」は、ＩＬ－１７抗体（例えば、セクキヌマブ）の調製物中の溶存酸素の量であって、調製物を容器内で還元剤と接触させて還元性混合物を形成する前の量を指す。初期酸素飽和度パーセントを選択的還元プロセス開始前に直接（例えば、スパージングによって）または間接的に（例えば、撹拌によって）調整して所望の酸素レベルを達成することができる。例えば、一部の実施形態では、ＩＬ－１７抗体調製物中の初期酸素飽和度パーセントを、還元剤との接触前に少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％に、またはさらには１００％までにも調整する。還元剤をＩＬ－１７抗体調製物に添加して還元性混合物を形成し次第、最初にその還元剤の力を弱めるためにこの調整を行うことができ、それによって、そうしなければ活性および純度の低下をもたらすことになる抗体の伝統的ジスルフィドの部分的または完全還元を避けられる。好ましい実施形態では、ＩＬ－１７抗体調製物の初期酸素飽和度パーセントを（２５℃で較正した酸素プローブを使用して測定した場合）少なくとも６０％に調整する。好ましい実施形態では、ＩＬ－１７抗体調製物の初期酸素飽和度パーセントを（２５℃で較正した酸素プローブを使用して測定した場合）少なくとも８０％に調整する。
【００６６】
本発明者らは、システイン処理ステップ中の酸素レベル上昇は、システインの還元力を抑

制してセクキヌマブのＣ９７の不十分な還元をもたらすその酸素に起因する可能性が高い有害な作用を抗体活性に及ぼしうると断定した。大気からのこの酸素取り込みの問題は、特に生産規模で作業する場合、還元剤の量を変えること、還元剤：抗体のモル比を変えること、被定義核酸速度を使用すること、またはさらには撹拌中断を用いることによってうまく対処することができる。還元剤（例えばシステイン）の量が多いほど、処理できる還元性混合物中の酸素レベルが高いことは理解されるであろう。一部の実施形態では、選択的還元プロセスのインキュベーションステップ中、還元性混合物中の酸素飽和度を一般に低いパーセンテージ（例えば、約４０％未満、約３０％未満、約２０％未満、約１５％未満、約１０％未満、約５％未満）に維持する。

【００６７】

還元剤（例えば、システイン）の還元力の低下は、インキュベーションステップ中のより早い時点でのＣｙｓＬ９７－ＳＨの不完全な脱遮断につながる可能性が高く、インキュベーションステップのより後の部分に（または冷却ステップ中に）残留還元剤（例えば、システイン）がない場合には、脱遮断されたＣｙｓ９７Ｌ－ＳＨの再酸化が起こりうる。したがって、理想的には、低い酸素飽和度パーセンテージを少なくとも約６０分～約３３０分、例えば、少なくとも約６０分、少なくとも約９０分、少なくとも約１２０分、少なくとも約１５０分、少なくとも約１８０分、少なくとも約２１０分、少なくとも約２４０分、少なくとも約２７０分、少なくとも約３００分、または少なくとも約３３０分維持することになる。一部の実施形態では、この低い酸素飽和度パーセンテージを全インキュベーションステップはもちろん、冷却ステップの一部にも維持することになる。

【００６８】

還元性混合物のインキュベーション中、酸素飽和度パーセントを直接（例えば、スパージングによって）または間接的に（例えば、撹拌によって）調整して所望の酸素レベルを達成することができる。好気環境の場合、還元溶液の（連続的ではなく）間欠混合、例えば、＜１５分／時、例えば２分／時を使用することによって、または低い回転速度での連続撹拌によって、低い酸素飽和度パーセントを達成することができる。嫌気環境の場合、還元剤の消費につながることになる酸素は、全く（または殆ど）存在しない。

【００６９】

酸素物質移動容量（ｋＬａ＊）

選択的還元を好気条件下で行う場合、反応における酸素レベルを直接制御せず、他のプロセスパラメータ、例えば、撹拌速度によって制御する。各反応の物理的設定も反応混合物中に存在する酸素レベルに影響を与える。したがって、溶液中に移動する酸素を、物理的設定間で、特定の抗体処理ステップ中に比較するために使用することができる変数を特定することは重要である－その変数が「ｋＬａ＊」である（例えば、Garcia-Ochoa and Gomez (2009) Biotechnology Advances 27:153-176、Bandino et al. (2001) Biochem.Engineering J. 8:111-119、Juarez and Orejas (2001) Latin Am. Appl.Res. 31:433-439、Yange and Wang (1992) Biotechnol.Prog.8:244-61を参照されたい）。ｋＬａ＊は、スパージングなしでヘッドスペースによって経時的に溶液中に移動する酸素の量を表す。この値は、各設定および規模に特異的であり、撹拌機タイプ、撹拌機速度、充填容量、およびヘッドスペースと接触している溶液の表面積（これは各容器の個々の幾何形状による影響を受ける）に依存する。各物理的設定のｋＬａ＊は異なるが、選択的還元プロセス中の溶液中の酸素レベルはセクキヌマブの活性および完全性に影響を与えるので、本発明者らは、選択的還元プロセスは、同様のｋＬａ＊範囲を示すシステムで行うと、同様の品質を有するセクキヌマブの調製物をもたらすことになると予想する。

【００７０】

本明細書で使用する場合、用語「システム」は、スパージングなしでヘッドスペースによって経時的に溶液に移動する酸素に影響を及ぼす物理的設定（容器、撹拌タイプなど）とプロセス条件（充填容量、回転速度など）の両方、すなわち、規模、撹拌機速度、充填容量、ヘッドスペースと接触している溶液の表面積（これは各容器の個々の幾何形状による影響を受ける）などを包含する。

【００７１】
本明細書で使用する場合、用語「容器」は、選択的還元反応を行う任意の容器を意味する。容器は、限定ではないが、パイロット規模および商業規模抗体生産に使用されるバイオリアクター（例えば、鋼製、撹拌タンク、使い捨てまたは非使い捨てなど）、ならびに一般的な実験用容器、例えば、フラスコ、試験管などを含む。一部の実施形態において、容器は、少なくとも約２リットル、少なくとも約１００リットル、少なくとも約５００リットル、少なくとも約１０００リットル、少なくとも約２０００リットル、少なくとも約５０００リットル、少なくとも約１０，０００リットル、少なくとも約１５，０００リットル以上の容量を保持することができるバイオリアクターである。
【００７２】
ｋＬａ＊を酸素移動実験で直接決定することはできない。その代わり、試験溶液中のｄＯ２を窒素によって置換し、較正ｄＯ２プローブを使用して経時的なｄＯ２の増加をモニターし、それによって実験ｄＯ２曲線を作成することができる。その後、この実験ｄＯ２曲線を下に示す方程式に従って（例えば、Ｍａｔｈｃａｄ（登録商標）を使用して）飽和曲線に当てはめることによって、本明細書で使用するｋＬａ＊値を特定のシステムについて計算する：
【００７３】
【化１】

$$DO = C \times (1 - e^{-kLa^* \times (t - t0)})$$

（式中、ＤＯ＝溶存酸素の測定値、Ｃは酸素の飽和値（無限に撹拌し飽和に達したとき１００％を意味する）であり、オイラー数ｅ＝２．７１８２８１・・・、ｔ＝ＤＯ値に対応する時点、およびｔ０＝開始時点）。この方程式は、溶液への酸素移動（ｋＬａ＊値）の決定のために確立された積分形の実験式を表す。この式は、様々な実験で異なる著者によって確認された（Doran, P. M. 1995.Bioprocess Engineering Principles, Academic Press, San Diego, California）。
【００７４】
本発明者らは、選択的還元プロセスの加熱および冷却ステップのほうが、一般に、インキュベーションステップより高いｋＬａ＊に対する許容可能性が高いと断定した。これは、インキュベーションステップ中の酸素レベル上昇が抗体活性に対して有害な作用を及ぼしうるからであり、その原因は、還元剤（例えば、システイン）の還元力を抑制してセクキヌマブのＣ９７の不十分な還元をもたらす酸素移動増加である可能性が高い。好気環境では、選択的還元プロセス中の還元性混合物に関する撹拌速度（または撹拌時間）の増加は、ｋＬａ＊を増加させる。より高いｋＬａ＊値をもたらす還元性混合物の連続撹拌を、加熱および冷却ステップ中、許容できる。一部の実施形態において、加熱および冷却ステップ中のｋＬａ＊は（別々に）、約０．１２ｈ－１～約１．６９ｈ－１、約０．０８ｈ－１～約０．６９ｈ－１、約０．２４ｈ－１～約０．４４ｈ－１、約０．３９ｈ－１～約０．６９ｈ－１である。一部の実施形態において、加熱および冷却ステップ中のシステム内のｋＬａ＊は、≦約０．６９ｈ－１であり、前記ｋＬａ＊は、飽和曲線を溶存酸素曲線に当てはめることによって計算する。
【００７５】
インキュベーションステップ中は、例えば、低い回転速度での連続撹拌または好ましくは間欠撹拌を使用して、ｋＬａ＊をより低く保つほうが好ましい。一部の実施形態では、≦約０．３７ｈ－１、≦約０．２７ｈ－１、または≦約０．１８ｈ－１の酸素物質移動容量係数（ｋＬａ＊）をシステム内で維持しながら還元性混合物をインキュベートし、前記ｋＬａ＊は、飽和曲線を溶存酸素曲線に当てはめることによって計算する。選択的還元反応のインキュベーションステップ中のシステム内のｋＬａ＊が０．３７ｈ－１未満（＜０．３７ｈ－１）である場合には、還元剤（例えば、システイン）：抗体のモル比は、（より短いインキュベーション時間およびより長いインキュベーション時間両方、例えば、約２

１０～約３３０分について）４６．１１：１（約４６：１）～１１８．３６：１（約１１８：１）間で変動しうる。選択的還元反応のインキュベーションステップ中のシステム内のk_La^*は、還元剤（例えば、システイン）：タンパク質のモル比が、（より短いインキュベーション時間、例えば、最大約２４０分までのインキュベーションについて）６９．８９：１（約７０：１）～１１８．３６：１（約１１８：１）の間、または（より長いインキュベーション時間、例えば、最大約３００分までのインキュベーションについて）７６．８５（約７７：１）～１１８．３６：１（約１１８：１）の間である場合、$0.37h^{-1}$ほども高い（$\leqq 0.37h^{-1}$）ことがある。

【００７６】

全選択的還元プロセス（すなわち、加熱ステップ、インキュベーションステップおよび冷却ステップ）は、還元剤（例えば、システイン）：抗体のモル比が約４６：１～約１１８：１の間である場合、約２１０～約３３０分のインキュベーション時間（例えば、約２４０分～３００分のインキュベーション時間）を含む、$<0.37h^{-1}$のk_La^*を使用して、一般に行うことができる。全選択的還元プロセス（すなわち、加熱ステップ、インキュベーションステップおよび冷却ステップ）は、還元剤（例えば、システイン）：抗体のモル比が約７０：１～約１１８：１の間であり、インキュベーションが最大約２４０分までである場合、または還元剤（例えば、システイン）：抗体のモル比が約７７：１～約１１８：１の間であり、インキュベーションが最大約３００分までである場合、$k_La^* \leqq 0.37h^{-1}$を使用して、一般に行うことができる。

【００７７】

さらなるプロセス成分

本開示は、ある特定のＩＬ－１７抗体、例えばセクキヌマブ、中のＣｙｓＬ９７の選択的還元の方法であって、抗体を還元剤と接触させて還元性混合物を形成するステップを含む方法を提供する。還元製混合物が、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片および還元剤の他にも成分を含むことがあることは理解されるであろう。還元性混合物は、水性成分（例えば、緩衝液、例えばＴｒｉｓ緩衝液）を含有することがあり、還元性混合物、塩、ＥＤＴＡなどのｐＨを増加または減少させるために使用される試薬も含有することがある。したがって、還元性混合物は、ＩＬ－１７抗体（例えば、セクキヌマブ）および還元剤を必然的に含有することになるが、還元性混合物は、追加の成分を含有することもあり、またはしないこともある。一部の実施形態において、還元性混合物は、金属キレート剤（例えば、ＥＤＴＡ、ＤＭＳＡ、ＤＭＰＳ）を含有する。一部の実施形態において、還元性混合物は、１．３ｍＭ～約０．８ｍＭ、約１．１～約０．９ｍＭ、または約１．０ｍＭ　ＥＤＴＡ（例えば、ＥＤＴＡ二ナトリウム）を含有する。

【００７８】

反応条件（温度、反応時間の長さ、ＩＬ－１７抗体の量、還元剤の濃度、還元剤：抗体比など）に依存して、特定の抗体調製物のｐＨは変わりうる。しかし、本明細書に記載する反応条件に基づいて、そのような条件を変えて所望の選択的還元を達成することができる。一部の実施形態において、還元剤と接触させる前の抗体調製物のｐＨは、約６．５から約９．５まで様々である、例えば、約７から約９まで様々である。他の実施形態において、抗体調製物のｐＨは、約７．４～約８．５、約７．８～約８．２、約７．９～約８．１、または約８．０である。一部の実施形態において、抗体調製物のｐＨは、（例えば、初期酸素飽和度パーセントを調整するためのガッシング後に）緩衝液、例えば、１Ｍ　Ｔｒｉｓ緩衝液（例えば、１Ｍ　Ｔｒｉｓ緩衝液　ｐＨ１０．８）を使用して調整することがある。

【００７９】

ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片（例えば、セクキヌマブ）を含有する調製物を還元剤と接触させた後、インタクトＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片（ＨＬＬＨ）のレベルで初期還元があることもある。用語「インタクト」は、すべての保存ジスルフィド架橋（例えば、古典的IgG_1抗体の場合、１６の保存ジスルフィド架橋）を有する抗体を指す。様々なＩＬ－１７抗体断片、すなわち、H_2L、HL_2、ＨＬ、ＨおよびＬバン

ド、ならびにインタクトＨ２Ｌ２（ＨＨＬＬ）バンドの形成は、当技術分野において公知の様々な分析ツール（例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、陽イオン交換ＨＰＬＣ）を使用して判定することができる。好ましくは、混合物中のインタクトＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片のレベルをドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動（ＣＥ－ＳＤＳ）によって測定する。ＣＥ－ＳＤＳは、タンパク質をそれらの分子量に従って電場で分離する。非還元ＣＥ－ＳＤＳを使用して、抗体の調製物中のサイズバリアントを評価することができる。一部の実施形態において、混合物中のインタクトＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片のレベルは、抗体調製物への還元剤の添加から約１～３０分（例えば、約１５分）以内に、ＣＥ－ＳＤＳによって測定した場合、少なくとも約８０％に減少する。一部の実施形態において、混合物中のインタクトＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片のレベルは、ＣＥ－ＳＤＳによって測定した場合、少なくとも約８３％に減少する。一部の実施形態において、混合物中のインタクトＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片のレベルは、約７５％～約８７％の間に減少する。一部の実施形態において、混合物中のインタクトＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片のレベルは、ＣＥ－ＳＤＳによって測定した場合、少なくとも約３８、３９、４０、４１、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６または８７％に減少する。

【００８０】

ＣＥ－ＳＤＳ分析は、Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ　ＰＡ－８００キャピラリー電気泳動システムを使用して行うことができる。内径５０μｍおよび長さ３０ｃｍ（還元ＣＥ－ＳＤＳおよび非還元ＣＥ－ＳＤＳ分析についての分離範囲、それぞれ、２０ｃｍおよび１０ｃｍ）を有する非被覆溶融シリカキャピラリーを分析に使用する。分離をＵＶ検出器で、２１４ｎｍでモニターする。非還元ＣＥ－ＳＤＳ分析については、抗体を水で６．０ｍｇ／ｍＬに希釈し、非還元ＣＥ－ＳＤＳ試料用緩衝液（０．１Ｍ　Ｔｒｉｓ／１．０％ＳＤＳ、ｐＨ７．０）および２５０ｍＭヨードアセトアミドと２０／７５／５（ｖ／ｖ／ｖ）比で十分に混合し、７０℃で１０分間加熱して、ジスルフィド架橋シャッフリングを防止する。キャピラリー温度を分離のために２５℃に設定する。電気泳動を１５ｋＶの定電圧で、通常の正極性モードで２０分間行う。

【００８１】

一部の実施形態では、還元性混合物を加熱する。一部の実施形態では、インキュベーションステップの前に加熱を行う。一部の実施形態では、還元性混合物を約３２℃～約４２℃の間の温度に、約３５℃～約３９℃の間に、約３７℃に加熱する。一部の実施形態では、加熱を約３０分～約１２０分間、約４５分～約９０分間、約４５分～約７５分間、約６０分間行う。加熱中、撹拌用の任意の手段を使用して、例えば連続的にまたは間欠的に、還元性混合物を撹拌してもよい。撹拌は、軸流式であってもよく（例えば、傾斜翼インペラを使用）、または半径流式であってもよい（例えば、ラシュトンタービンを使用）。一部の実施形態では、加熱中、還元性混合物を６５～２００ｒｐｍ（例えば、５０ｒｐｍ、６５ｒｐｍ、７５ｒｐｍ、８５ｒｐｍ、１００ｒｐｍまたは２００ｒｐｍ）で絶えず撹拌する。

【００８２】

インキュベーションステップ中、還元性混合物は、概して、遊離システイン（例えば、セクキヌマブの遊離システイン）の選択的還元を可能にする所定の時間、インキュベートされることになる。一部の実施形態では、インキュベーションを還元性混合物の加熱後に行う。反応条件（還元剤、温度、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片の量、ｐＨなど）に依存して、還元性混合物の所定のインキュベーション時間は変わることになる。一部の実施形態において、この時間は、約１～約２４時間の間で様々であるであろう（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１６、１８、２０または２４時間）。一部の実施形態では、インキュベーションを約２００分～約５００分間、約２１０分～約４２０分間、約２１０分～約３３０分間、約２４０～約３００分間、約２５０分間行う。

【００８３】
インキュベーションステップ中、標的遊離システイン（例えば、セクキヌマブの抗原結合部位のＣｙｓＬ９７）の選択的還元を可能にする所定の温度でインキュベーションを行うことになる。反応条件（還元剤、時間、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片の量、ｐＨなど）に依存して、インキュベーション温度は変わることになる。一部の実施形態において、所定の温度は、約２０～約４２℃の間で様々であるであろう。一部の実施形態では、所定の温度は、約３２℃～約４２℃、約３５℃～約３９℃の間、または約３７℃であるであろう。
【００８４】
インキュベーションステップ中、還元剤をＩＬ－１７抗体調製物、例えば、セクキヌマブとインキュベートしている間、還元性混合物を撹拌して生成物の均一性を確実なものにすることができる。しかし、選択的還元反応のこの部分の間は、還元剤によるＩＬ－１７抗体中のＣｙｓＬ９７の選択的還元を可能にするために容器内の酸素レベルを低く保つべきである。好気条件下では、連続撹拌を回避することによって、例えば、間欠撹拌、例えば、≦１５分／時、例えば、≦２分／時を使用することによって、低酸素を達成することができる。嫌気条件下では、酸素の移動が制限されるため、撹拌をより長い期間、続行することがあり、または撹拌が連続的であることもある。さらに、嫌気条件下では、酸素移動の（例えば、調節スパージングによる）厳密な制御によっても、より長い撹拌期間（連続撹拌を含む）の適用が可能になる。
【００８５】
一部の実施形態では、混合物をインキュベーションステップ後に冷却する。一部の実施形態では、混合物を室温（例えば、約１６℃～約２８℃の間の温度）に冷却する。一部の実施形態では、冷却を約３０分～約１２０分間、約４５分～約９０分間、約４５分～約７５分間、約６０分間行う。冷却中、撹拌用の任意の手段を使用して、例えばコンスタントにまたは間欠的に、還元性混合物を撹拌してもよい。撹拌は、軸流式であってもよく（例えば、傾斜翼インペラを使用）、または半径流式であってもよい（例えば、ラシュトンタービンを使用）。一部の実施形態では、冷却中、還元性混合物を６５～２００ｒｐｍ（例えば、５０ｒｐｍ、６５ｒｐｍ、７５ｒｐｍ、８５ｒｐｍ、１００ｒｐｍまたは２００ｒｐｍ）で絶えず撹拌する。
【００８６】
選択的還元反応は、例えば、ヨードアセトアミドまたはｏ－リン酸を使用して（例えば、０．３Ｍ　ｏ－リン酸のストック溶液を使用して）停止させることができるだろう。一部の実施形態では、反応停止を冷却ステップ後に行う。一部の実施形態では、混合物のｐＨを約５．０～約５．５の間、約５．１～約５．３、約５．２に調整することによって選択的還元を停止させる。ｏ－リン酸を使用してｐＨ調整を達成することができる。
【００８７】
「精製された調製物」という句は、選択的還元を受けたＩＬ－１７抗体またはそれらの抗原結合断片を指す。選択的還元の完了後、精製された調製物中のインタクトＩＬ－１７抗体のレベルは増加されているであろう。選択的還元後の精製された調製物中のインタクト抗体のレベルは、様々な周知の技法（例えば、非還元ＳＤＳ　ＰＡＧＥ、ＣＥ－ＳＤＳ　ＰＡＧＥ、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）、ＨＰＬＣ）によって測定することができる。一部の実施形態では、インタクト抗体のレベルをＣＥ－ＳＤＳによって測定する。一部の実施形態では、選択的還元の完了後（例えば、冷却ステップ後）、精製された調製物中のインタクトＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片のレベルは、ＣＥ－ＳＤＳによって測定した場合、少なくとも約８０％である。一部の実施形態において、選択的還元後、精製された調製物中のインタクトＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片のレベルは、ＣＥ－ＳＤＳによって測定した場合、少なくとも約８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または約１００％である。一部の実施形態において、精製された調製物中のインタクトＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片のレベルは、選択的還元後、ＣＥ－ＳＤＳ

によって測定した場合、少なくとも約９０％である。
【００８８】
選択的還元前の調製物中、選択的還元中の調製物中、または選択的還元後の調製物中（すなわち精製された調製物中）の抗体の活性（例えば、生物学的活性など）を、様々な周知の技法（例えば、国際公開第２００６／０１３１０７号パンフレット、国際公開第２００７／１１７７４９号パンフレット、Shen and Gaffen (2008) Cytokine.41(2): 92-104を参照されたい）によって測定することができる。ある特定の実施形態では、ＥＬＩＳＡベースのアッセイまたは細胞ベースのアッセイ（例えば、ＩＬ－６またはＧＲＯａｌｐｈａの、例えばＣ－２０／Ａ４軟骨細胞またはＢＪ細胞株からの、ＩＬ－１７依存性放出の阻害）を使用して、活性を測定する。一部の実施形態では、システミン－ＣＥＸ（陽イオン交換クロマトグラフィー）法によって活性を測定する。システミン－ＣＥＸ法は、システミン（２，２’－ジチオビス（エチルアミン））での抗体の誘導体化、続いての陽イオン交換クロマトグラフィー（ＣＥＸ）を使用する分析的分離を含む。本明細書に開示する抗体（例えば、セクキヌマブ）の活性は、ＣｙｓＬ９７が酸化型である場合、減少するので、システミンでのＣｙｓＬ９７の誘導体化は、抗体活性を測定するためのプロキシとして役立つ。すなわち、選択的還元が成功した場合には還元されたＣｙｓＬ９７をシステミンで誘導体化できるが、選択的還元が失敗した場合には酸化されたＣｙｓＬ９７をシステミンで誘導体化できない。システミンの誘導体化は、遊離Ｃｙｓ９７残基１つにつき１つの正電荷の付加をもたらす。結果として得られる誘導体化された形態のセクキヌマブ（例えば、＋２、＋１電荷）を、その後、誘導体化されていない形態から分離し、ＣＥＸによって定量することができる。両方の軽鎖上にある不対Ｃｙｓ９７に結合している２つのシステミンを有する、システミン誘導体化セクキヌマブ分子は、理論上、１００％生物学的活性と考えることができる。一方の軽鎖上にある不対Ｃｙｓ９７に結合している１つのシステミンが付加された、システミン誘導体化セクキヌマブ分子は、５０％生物学的活性と考えることができる。分子に結合しているシステミンが一切ない、システミン誘導体化セクキヌマブは、生物学的不活性と考えることができる。したがって、抗体の調製物（例えば、セクキヌマブ抗体の調製物）中のシステミン誘導体のレベルを、この調製物のシステミン誘導体化の理論上の最大レベル（例えば、理論上の最大パーセンテージとして表される）と比較して、この調製物の活性の尺度として使用することができる。
【００８９】
簡単に言うと、システミン－ＣＥＸを次のように行うことができる：抗体試料（５０μｇ）を先ずカルボキシペプチダーゼＢ（１：４０　ｗ：ｗ）で処理して重鎖内のＣ末端リシンを除去し、次いで酢酸ナトリウム５ｍＭ、０．５ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ４．７中、４ｍＭシステミンで、室温で２時間、誘導体化する。２μＬの１Ｍリン酸の添加によって誘導体化を停止させる。ＰｒｏＰａｃ（商標）ＷＣＸ－１０分析カラム（４ｍｍ×２５０ｍｍ、Ｄｉｏｎｅｘ）を使用してシステミン誘導体化抗体試料でＣＥＸを行う。１．０ｍｌ／分の流量での、２５ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ６．０中、１２．５ｍＭ～９２．５ｍＭの塩化ナトリウム勾配を、分離に使用する。２２０ｎｍでの吸収をＵＶ検出器（Ａｇｉｌｅｎｔ　ＨＰＬＣ　１２００）によって記録する。
【００９０】
酸化された遊離システインを有するＩＬ－１７抗体の一部の初期調製物は、４５％ほどもの低さの活性レベルを有する。一部の実施形態では、選択的還元プロセスの開始前、調製物中のＩＬ－１７抗体またはそれらの抗原結合断片の活性レベルは、（例えば、システミン－ＣＥＸ法によって測定した場合）約８０％未満、約７５％未満、約７０％未満、約６５％未満、約６０％未満、約５５％未満、約５０％未満、または約４５％未満ある。選択的還元中に、精製された調製物中のＩＬ－１７抗体の活性レベルは増加することになる。一部の実施形態において、抗体調製物中のＩＬ－１７抗体またはそれらの抗原結合断片の活性レベルは、還元性混合物を形成するために抗体調製物を還元剤と接触させた後約６０分以内に（例えば、システミン－ＣＥＸ法によって測定した場合）少なくとも約１５パーセントポイント（例えば、約６０％から少なくとも約７５％に）、少なくとも約２０パー

セントポイント（例えば、約６０％から少なくとも約８０％に）、少なくとも約２５パーセントポイント（例えば、約６０％から少なくとも約８５％に）または少なくとも約３０パーセントポイント（例えば、約６０％から少なくとも約９０％に）増加する。

【００９１】

選択的還元後、精製された調製物は、ＣｙｓＬ９７の還元型を有するＩＬ－１７抗体について富化されることになり、初期調製物と比較して増加した活性レベルを示すことになる。一部の実施形態では、選択的還元の完了後、精製された調製物中のＩＬ－１７抗体またはそれらの抗原結合断片の活性レベルは、シスタミン－ＣＥＸ、ＥＬＩＳＡ、または細胞ベースの結合アッセイ（例えば、シスタミン－ＣＥＸアッセイ）によって測定した場合、（理論上の最大値と比較して）少なくとも約８０％である。一部の実施形態では、選択的還元の完了後、精製された調製物中のＩＬ－１７抗体またはそれらの抗原結合断片の活性レベルは、ＣＥＸ、ＥＬＩＳＡ、または細胞ベースの結合アッセイ（例えば、シスタミン－ＣＥＸアッセイ）によって測定した場合、少なくとも約８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９または約１００％である。一部の実施形態では、選択的還元の完了後、精製された調製物中のＩＬ－１７抗体またはそれらの抗原結合断片の活性レベルは、シスタミン－ＣＥＸ、ＥＬＩＳＡ、または細胞ベースの結合アッセイ（例えば、シスタミン－ＣＥＸアッセイ）によって測定した場合、少なくとも約９３％である。

【００９２】

したがって、哺乳動物細胞によって組換え産生されたＩＬ－１７抗体の調製物中のＣｙｓＬ９７を選択的に還元する方法であって、

ａ）システム内で調製物を少なくとも１つの還元剤と接触させて還元性混合物を形成するステップ、および

ｂ）溶存酸素曲線を飽和曲線に当てはめることによって計算される≦約０．３７ｈ$^{-1}$の酸素物質移動容量係数（k_La^*）をシステム内で維持しながら還元性混合物をインキュベートするステップ

を含み、

ＩＬ－１７抗体各々が、配列番号８に記載のV_Hの３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（V_H）と、配列番号１０に記載のV_Lの３つのＣＤＲを含む免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（V_L）とを含み、

ステップａ）の前、調製物の初期酸素飽和度パーセントが、２５℃で較正した酸素プローブを使用して測定した場合、少なくとも約６０％である、方法を本明細書に開示する。

【００９３】

したがって、哺乳動物細胞によって組換え産生されたＩＬ－１７抗体の調製物中のＣｙｓＬ９７を選択的に還元する方法であって、

ａ）調製物を、システイン／シスチンおよびシステイン／シスタミンから選択される酸化／還元試薬のセットと接触させて、還元性混合物を形成するステップ、および

ｂ）還元性混合物を約３７℃の温度で嫌気条件下、少なくとも４時間インキュベートするか、または還元性混合物を約１８～２４℃の温度で約１６～２４時間インキュベートするステップ

を含み、

ＩＬ－１７抗体各々が、配列番号８に記載のV_Hの３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（V_H）と、配列番号１０に記載のV_Lの３つのＣＤＲを含む免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（V_L）とを含む、方法も本明細書に開示する。

【００９４】

したがって、哺乳動物細胞によって組換え産生されたセクキヌマブ抗体の調製物中のＣｙｓＬ９７を選択的に還元する方法であって、

ａ）調製物中のセクキヌマブの濃度を約４ｍｇ／ｍｌ～約１９．４ｍｇ／ｍｌの間、例えば、約１０ｍｇ／ｍｌ～約１９．４ｍｇ／ｍｌ、例えば、約１０～約１５．４、例えば、約１２ｍｇ／ｍｌ～約１５ｍｇ／ｍｌ、例えば、約１３．５ｍｇ／ｍｌに調整するステッ

プ、
ｂ）調製物の酸素飽和度パーセントを少なくとも約６０％、例えば、少なくとも約８０％に調整するステップ、
ｃ）調製物のｐＨを、約７．４～約８．５、例えば、約７．８～約８．２、例えば、約７．９～約８．１、例えば、約８．０に調整するステップ、
ｄ）調製物を容器内でシステインと接触させて還元性混合物を形成するステップであり、還元性混合物中のシステインの濃度が約４．０ｍＭ～約８．０ｍＭ、例えば、約４．８ｍＭ～約８．０ｍＭ、例えば、約５．５ｍＭ～約６．７ｍＭ、例えば、約６．０ｍＭである、ステップ、
ｅ）還元性混合物を約３２℃～約４２℃の間の温度に、例えば、約３５℃～約３９℃の間に、例えば、約３７℃に加熱し、前記加熱を約４５～約９０分、例えば、約４５～約７５分、例えば約６０分間行うステップ、
ｆ）ステップｅ）からの還元性混合物を約２０℃～約４２℃の間、例えば約３２℃～約４２℃の温度で、例えば、約３５℃～約３９℃に、例えば、約３７℃にインキュベートするステップであり、前記インキュベーションが、約２１０～約４２０分、例えば、約２１０～約３３０分、例えば、約２４０～約３００分、例えば、約２５０分間行われ、この間、容器内で≦０．３７ｈ$^{-1}$の酸素物質移動容量係数（K_La^*）が維持され、前記K_La^*が飽和曲線を溶存酸素曲線に当てはめることによって計算される、ステップ、
ｇ）ステップｆ）からの結果として得られる混合物を約１６℃～約２８℃の温度に冷却し、前記冷却を約４５～約９０分、例えば、約４５～約７５分、例えば、約６０分間行うステップ、および
ｈ）ステップｇ）から結果として得られる混合物のｐＨを約５．１～約５．３の間に、例えば約５．２に調整するステップ
を含む方法も、本明細書に開示する。

【００９５】

セクキヌマブの精製された調製物であって、調製物中のインタクトセクキヌマブのレベルが、ドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動（ＣＥ－ＳＤＳ）によって測定した場合、少なくとも約９０％であり、調製物中のセクキヌマブの活性レベルが、シスタミン－ＣＥＸによって測定した場合、少なくとも約９０％である、精製された調製物も本明細書に開示する。

【００９６】

通則

上記方法の一部の実施形態において、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片は、ｉ）配列番号８に記載のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（ＶＨ）；ｉｉ）配列番号１０に記載のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）；ｉｉｉ）配列番号８に記載のアミノ酸配列を含む免疫グロブリンＶＨドメインと配列番号１０に記載のアミノ酸配列を含む免疫グロブリンＶＬドメイン；ｉｖ）配列番号１、配列番号２および配列番号３に記載の超可変領域を順番に含む免疫グロブリンＶＨドメイン；ｖ）配列番号４、配列番号５および配列番号６に記載の超可変領域を順番に含む免疫グロブリンＶＬドメイン；ｖｉ）配列番号１１、配列番号１２および配列番号１３として記載する超可変領域を順番に含む免疫グロブリンＶＨドメイン；ｖｉｉ） 配列番号１、配列番号２および配列番号３に記載の超可変領域を順番に含む免疫グロブリンＶＨドメインと配列番号４、配列番号５および配列番号６に記載の超可変領域を順番に含む免疫グロブリンＶＬドメイン；およびｖｉｉｉ）配列番号１１、配列番号１２および配列番号１３として記載する超可変領域を順番に含む免疫グロブリンＶＨドメインと配列番号４、配列番号５および配列番号６に記載の超可変領域を順番に含む免疫グロブリンＶＬドメインを含む。開示する方法の一部の実施形態において、ＩＬ－１７抗体またはその抗原結合断片は、ＩｇＧ$_1$アイソタイプのヒト抗体である。開示する方法の一部の実施形態において、抗体はセクキヌマブである。

【００９７】

本開示の１つまたは複数の実施形態の詳細は、上の付随する説明の中に記載している。本明細書に記載のものと同様または等価の任意の方法および材料を本開示の実施または試験の際に使用することができるが、好ましい方法および材料を次に説明する。本開示の他の特徴、目的および利点は、この説明からおよび特許請求の範囲から明らかになる。本明細書および添付の特許請求の範囲において、単数形は、文脈による別段の明白な指示がない限り、複数の言及対象も含む。別段の定義がない限り、本明細書において使用するすべての専門および科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般に理解されているのと同じ意味を有する。本明細書に引用するすべての特許および出版物は、参照によって組み入れられている。以下の実施例は、本開示の好ましい実施形態をより十分に例証するために提供するものである。これらの実施例は、いかなる点においても、添付の特許請求の範囲によって定義する通りの本開示特許事項の範囲を限定するものと見なしてはならない。

［実施例］

【実施例１】

【００９８】

異なるスルフヒドリル剤によるセクキヌマブプロテインＡ中間体の還元

実施例１．１

様々なスルフヒドリル基含有還元剤（例えば、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）、２－メルカプトエタノール、２－メルカプト酢酸、システイン、システアミン、グルタチオン）を、セクキヌマブの軽鎖の酸化Ｃｙｓ９７の選択的還元におけるそれらの使用についてスクリーニングした。第１の実験セットでは、プロテインＡ捕捉ステップ後の初期発酵プロセスから得た不活性出発物質の１ｍＬ分を、様々な濃度のβ－メルカプトエタノール、システインおよびグルタチオンとともに、３７℃で、様々なｐＨでインキュベートした。ある特定の時点後、試料を２０ｍＭ酢酸ｐＨ６緩衝液へのゲル濾過によって脱塩し、活性の回復をＥＬＩＳＡによって判定した。また、遊離スルフヒドリル基の含有量をエルマン試験によって決定した（スルフヒドリル基の脱遮断は抗体１ｍｏｌにつき２ｍｏｌの遊離ＳＨ値を与えると予想される）。結果を下の表２に収載する。

【００９９】

【表２】

2-ME°		活性 % *	遊離 SH Mol/Mol	システィン	活性 % *	遊離 SH Mol/Mol	グルタチオン	活性 % *	遊離 SH Mol/Mol
pH 7									
37℃	5mM/1h	59	1.3						
	/4h	85	1.6						
	/8h	85	1.6						
pH8									
37℃									
				1mM/2h	61	1.4			
				/8h	90	1.8			
	2mM/1h	64	1.4	2mM/2h	80	1.8	2mM/2h	45	1.4
	/4h	82	1.9	/4h	98	1.9	/8h	65	2.0
	/8h	88	n.p.						
	4mM/1h	88	1.3	4mM/1h	77	0.9	4mM/2h	59	1.6
	/4h	91	1.8	/4h	105	1.9	/4h	94	1.8
	/8h	106	2.0						
							8mM/1h	58	1.4
							/4h	75	1.7
pH 9									
37℃									
				1mM/2h	48	1.2			
				/8h	71	1.5			
	2mM/1h	82	n.p.	2mM/2h	78	1.6	2mM/2h	73	1.6
	/4h	97	0.9	/4h	89	1.8	/8h	81	2.1
	/8h	93	1.1						
	4mM/1h	85	0.7	4mM/1h	74	1.5	4mM/2h	54	2.0
	/4h	102	2.0	/4h	100	2.1	/4h	73	2.1
							8mM/1h	68	1.7
							/4h	81	2.1

表 2:所与の条件での反応後の試料の活性および遊離 SH。

°:2-メルカプトエタノール(2-ME)

*:基準に対する%

【０１００】

これらの研究の結果として、ｐＨ範囲７～９で、１～２０ｍＭの濃度で、２０～４０℃の温度のメルカプトエタノールおよびシステインが最も好適であると判明した。

【０１０１】

さらなる調査の過程で、抗体は、還元剤への曝露中に過剰還元されて、鎖間ジスルフィド架橋が部分的に還元された抗体が形成されることに気がついた。この過剰還元は、例えば、上記のダイアフィルトレーションによってまたはクロマトグラフィーによって、抗体を反応混合物から単離すると、大気条件下で可逆である。なぜなら、緩衝液中に存在する溶存酸素が自発的再酸化をもたらし、インタクト抗体が再形成されるからである。

Ｌ－ＳＳ－ＨＨ－ＳＳ－Ｌ→Ｌ－ＳＨ＋ＨＳ－ＨＨ－ＳＳ－Ｌ→Ｌ－ＳＳ－ＨＨ－ＳＳ－Ｌ

（インタクト抗体）　（還元された鎖間ジスルフィド架橋）　（インタクト抗体）

【０１０２】

実施例１．２（嫌気条件）
第２の実験セットでは、プロテインＡ捕捉ステップ後に得たセクキヌマブ抗体の処理を、脱気溶液およびアルゴンまたは窒素雰囲気の使用により嫌気条件下で行って、還元結果に対する溶存酸素の影響を排除した。簡単に言うと、プロテインＡ捕捉ステップからのセクキヌマブ溶液をＴｒｉｓ塩基ストック溶液の添加によってｐＨ８．０に調整した。次いで、その溶液を、システイン／ＥＤＴＡストック溶液（例えば、ｐＨ８で、２００ｍＭ／１２．５ｍＭ　ＥＤＴＡ）の添加によって８ｍＭのシステイン濃度システインおよび１ｍＭのＥＤＴＡ濃度に調整した。還元性溶液中のセクキヌマブの濃度は、４ｍｇ／ｍＬ（約２９６：１のシステイン：抗体のモル比）であった。その混合物を室温でさらに２４時間インキュベートした。異なる時点で、試料を抜き取り、過剰なヨードアセトアミドでスパイクした。このヨードアミドが、還元剤および抗体のスルフヒドリル基を失活させることによって反応を停止させる。
【０１０３】
同じ設定を２－メルカプトエタノール、２－メルカプト酢酸、システイン、システアミンおよびグルタチオンでの実験にも使用した。ＤＴＴについては、１ｍＭの濃度を使用した。
【０１０４】
反応を停止させた試料を非還元モードでのＳＤＳによるキャピラリー電気泳動（ＣＥ－ＳＤＳ）によって分析した。この分析法は、抗体の異なる反応生成物（ＨＨＬ、ＨＨ、ＨＬ、ＨおよびＬ種）をインタクト抗体（ＬＨＨＬ）から分離し、それらを、オンラインＵＶ検出および得られたシグナルの面積積分によって定量する。
【０１０５】
図１中の、０、３、１５分、１時間、２時間、４時間および２０～２４時間還元処理からのインタクト抗体（ＬＨＨＬ）のデータは、ＤＴＴおよびβ－メルカプト酢酸が、インタクト抗体との再平衡化なしに、抗体を完全に還元することを示す。グルタチオンおよびβ－メルカプトエタノールもまた顕著な還元を示すが、インタクト抗体（ＬＨＨＬ）との再平衡を誘導することができた。システインは、抗体を約５０％還元し、その後、インタクト抗体と簡単に再平衡化される。システアミンのデータは、この試薬が、殆ど還元をもたらさない、または極めて急速に（３分未満の時間内に）再平衡化に至ることを示す。
【０１０６】
判明した還元の順番（すなわち、ＤＴＴ＞β－メルカプト酢酸＞β－メルカプトエタノール＞グルタチオン）は、レドックス電位またはジスルフィド相互交換についての発表データと相関する。T. Liu in “ The Proteins, 3rd Edition, Volume 3 (1977) p. 239を参照されたく、この参考文献には下記のコメントおよびデータが与えられている：
レドックス電位Ｅ＝Ｅ$_0$＋０．０５９×ｌｏｇ［Ｒ－ＳＳ－Ｒ］／［Ｒ－ＳＨ］
電極が硫黄によって被毒するので直接測定できない標準レドックス電位（ボルトでのＥ$_0$）。したがって、レドックス電位を間接的測定から演繹した：
ジチオトレイトール　ＤＴＴ／ＤＴＴｏｘ：　Ｅ$_0$約－０．３３Ｖ（ｐＨ７、２５℃）
グルタチオン　ＧＳＨ／ＧＳＳＧ：　Ｅ$_0$約－０．２４Ｖ（ｐＨ７、２５℃）
システイン　ＣＳＨ／ＣＳＳＣ：　Ｅ$_0$約－０．２２Ｖ（ｐＨ７、２５℃）
【実施例２】
【０１０７】
システインは好気および嫌気条件下でセクキヌマブを選択的に還元する。
８ｍＭシステイン、４ｍｇ／ｍｌセクキヌマブ、ｐＨ８（システイン：抗体のモル比約２９５．８８：１）を使用して室温（ＲＴ）（約２５℃）または３７℃でさらなる実験を行った。反応を好気下で行った（すなわち、溶液の調製および処理を通常の空気のもとで行った）または嫌気下で行った（すなわち、溶液の調製および処理を、脱気およびその後のアルゴンまたは窒素雰囲気下での作業によって、酸素排除または低減下で行った）。
【０１０８】
嫌気条件（例えば、溶存酸素０％である窒素またはアルゴン雰囲気）下では、処理の初期段階に、抗体断片の形成－過剰還元の兆候－を伴う抗体の実質的分解がある。約４０％へ

のインタクト抗体（ＬＨＨＬ）の最大の減少は、室温（図２Ａ）または３７℃（図２Ｃ）どちらかで行った実験についてはおよそ１５分間で起こる。２０時間時点でのインタクト抗体との再平衡化は、室温試料に残存する約１７．１％過剰還元バリアント、および３７℃試料に残存する１２．１％過剰還元バリアントを示す。

【０１０９】

好気条件下、すなわち、溶存酸素の存在下では、より穏やかな反応がある。室温で行った実験（図２Ｂ）についてはインタクト抗体（ＬＨＨＬ）の約８０％残留レベルへの最大減少および３７℃で行った実験（図２Ｄ）については約７３％への最大減少がおよそ１５分で起こる。インタクト抗体との再平衡化は、２０時間後の室温試料に残存するたった５．８％過剰還元バリアント、および８時間後に３７℃試料に残存するたった９．３％過剰還元バリアントを示す。

【０１１０】

したがって、嫌気条件下では、初期還元がより大きく、インタクト抗体との再平衡化が好気条件下ほど完全でない。

【実施例３】

【０１１１】

選択的還元に対する溶存酸素およびシスチンの影響

システイン（Ｃｙｓ－ＳＨ）は空気の存在下でシスチン（Ｃｙｓ－ＳＳ－Ｃｙｓ）に酸化するため、好気条件下と嫌気条件下で観察される差は、好気条件下でシステイン溶液の調製中およびまたセクキヌマブのシステインでの実際の処理中に形成される少量のシスチンによって起こりえた。セクキヌマブの選択的還元に対するdO_2およびシスチン（またはシスタミン）レベルの影響を評価するために、本発明者らは、抗体の単離を伴う、いくつかのさらなる調製実験を行った。

【０１１２】

一部の試料について、４ｍｇ／ｍｌ　セクキヌマブの選択的還元は、ｐＨ８．０を有する溶液中、８ｍＭシステイン（システイン：抗体のモル比２９５．８８：１）で、３７℃で、好気条件下、１００％dO_2（窒素による燻蒸なし）、５０％、および２０％dO_2（溶存酸素が実験を通して目標レベルにとどまるように窒素で燻蒸しながら周囲雰囲気で撹拌）で、ならびにシスチンなしの嫌気（０％dO_2）条件（脱気溶液、完全窒素雰囲気）下で、ならびに１００％dO_2下、約０．１ｍＭシスチンの存在下［システイン：シスチン比＝８０：１］で、行った。一実施形態では、０．３ｍＭシステインを添加し、その後、８ｍＭシステインとともに嫌気条件下で最初の３０分のインキュベーションを行った。別の実験では、選択的還元を嫌気条件下で、７．７ｍＭシステインおよび０．３ｍＭシスチン［システイン：シスチン比＝２５．６６：１］を使用して行った。別の試料には、０．１ｍＭシスタミンをシスチンの代わりに添加した。

【０１１３】

これらの実施例すべてに関して、試料を異なる時点で抜き取った。処理（３７℃で２４０分）の終了時に、バルク溶液のｐＨを５．０に調整し、抗体に結合する陽イオン交換カラムに負荷することによって、抗体を単離した。洗浄して還元剤を除去した後、抗体を塩および／またはｐＨ勾配によって溶出し、ＣＥ－ＳＤＳ、ＳＥ－ＨＰＬＣおよびＣＥＸによって分析した。

【０１１４】

図３は、異なる処理時点で抜き取った、ヨードアセトアミドで反応停止させた試料のＣＥ－ＳＤＳ分析を示す。dO_2が少ないほど、選択的還元の初期段階での還元が多く、より後の段階での平衡が遅かった。インタクト抗体のレベルは、完全嫌気条件（０％dO_2）でのレベルのほうが処理終了時に実施的に低かった（７０％）。インタクト抗体のレベルは、反応を溶存酸素５０％以上の条件下で行うと、９０％より上に向上した。少量のシスチン（またはシステアミン）の添加は、抗体の初期還元を減少させた。

【０１１５】

表３は、異なる再活性化処理（嫌気および好気条件）からの試料を、ＳＰ－セファロース

ＦＦでのその後のクロマトグラフィーを使用して精製した後に得た、抗体の活性および純度を示す。

【０１１６】

【表３】

処理条件 (37℃/pH 8.0/4h)	SP ステップ後			
	CE-SDS 純度	SEC 純度	CEX 活性	生物活性
	%	%	%	%
出発原料	96.4	98.4	61.2	45
8mM システイン/ 0% 酸素 (嫌気性)	82.3	98.1	92.8	92
8mM システイン/0% 酸素 /30 分: + 0.3mM シスチン	92.6	98.4	92.3	95
8mM システイン/ 20% 酸素	96.9	98.0	88.6	99
8mM システイン/ 50% 酸素	96.1	98.2	87.0	90
8mM システイン/100% 酸素 (好気性)	95.8	98.1	90.6	96
7.7mM システイン/0.3mM シスチン/嫌気性	97.1	98.9	91.8	104
8mM システイン/0.1mM シスチン 100% 酸素 (好気性)	94.5	98.0	82.4	108
8mM システイン/0.1mM シスタミン 100% 酸素 (好気性)	94.8	98.6	86.1	86

表 3:異なる再活性化処理後の抗体の活性および純度。

【０１１７】

生物学的活性に関しては、すべての場合、４５％の活性しか有さない非選択的還元を受けたセクキヌマブ出発物質に対して完全活性物質（理論上の最大値の８６～１０８％）を得た。ＣＥ－ＳＤＳ純度に関しては、シスチンを欠く完全嫌気性処理下で得た抗体において純度低下（８２．３％）が認められ、この原因は、高い確実性で、これらの条件下での過剰還元であった（注記：嫌気性反応へのシスチンの添加は、ＣＥ－ＳＤＳによって測定して、試料の純度を増加させた。その理由は、還元電位がより小さいためであり、この過剰還元による可能性は低い）。しかし、すべての他の選択的還元処理は、より小さい、および高い、抗体の質および活性をもたらした。本発明者らは、ＳＰ－セファロースクロマトグラフィーステップ前の一部のＣＥ－ＳＤＳ純度値が、このクロマトグラフィーステップ後に得た値よりわずかに低かった（例えば、処理後の８２％に対して処理前の６５％）（データを示さない）ことにも注目した。このことは、さらなる再酸化がクロマトグラフィーステップ中に起こりうることを示唆している。ＣＥＸ活性は、一般に、様々な好気条件下でのほうが、システインの還元力を弱める酸素がより多かったので低かった。酸化剤であるシスチンおよびシスタミンの好気条件下での添加は、ＣＥＸ活性をさらに減少させた。

【０１１８】

実施例１～３から引き出された要約および結論

本発明者らは、セクキヌマブのＣｙｓＬ９７が、例えばグアニジンＨＣｌを使用して、完全抗体構造の折り畳み構造を部分的にほどく必要なく、溶解状態で還元に利用可能であると断定した。さらに、セクキヌマブは、総体的には選択的還元を受けやすく、制御された条件下では、実質的な分解なしに抗体の活性化を可能にすると予想される。

【０１１９】

システインは、迅速な平衡に加えてほんのわずかな過剰活性化しか示さないので、セクキヌマブの選択的還元にとって特に理想的であると判明した。システインを使用する選択的還元が始まって１時間のうちに、抗体は、部分的に還元する、例えば、嫌気条件下では最大６０％まで、および完全好気条件下では最大約３０％まで還元する。その後、セクキヌマブは、ゆっくりとインタクト抗体へと再酸化する。システインでの選択的還元に晒された試料の再酸化は、３７℃で行った反応より室温でのほうがはるかにゆっくりと進行した（３７℃での平衡化のための８時間に対して室温での再平衡化のための２１時間を比較されたい）。室温試料は、一般に、３７℃で行った選択的還元反応と比較してインタクト抗

体のより小さい最大減少も示した。
【０１２０】
嫌気条件下で、本発明者らは、抗体の初期還元がより大きく、インタクトセクキヌマブとの再平衡化が好気条件下ほど完全でないことに注目した。しかし、少量のシスチンの嫌気性反応への添加は、シスチン不在下で行った嫌気性反応と比較して向上した純度および活性をもたらした。したがって、好気性反応過程を、小モル比の還元剤の酸化型（例えば、還元剤としてのシステインの場合のシスチン）が存在する嫌気条件下でシミュレートすることができる。さらに、本発明者らは、シスチンの添加が－シスチンがインキュベーションの最初の３０分間に存在しないときでさえ－インタクト抗体の平衡を加速したことに注目した。したがって、選択的還元を空気の存在下で行うことができ、不活性ガス雰囲気（例えば、窒素またはアルゴン）を使用することによって溶存酸素の不在下でも行うことができる。完全嫌気条件下で行う場合、小モル比の還元剤の酸化型の添加は有用である。
【実施例４】
【０１２１】
システイン選択的還元ステップ開発研究：概念実証（ＤｏＥ１）
実施例４．１－研究計画および方法
システイン処理ステップの主な目的は、細胞培養、回収および／またはプロテインＡクロマトグラフィー中に行うことができる、軽鎖の９７位におけるシステインの－ＳＨ基のマスキングによるセクキヌマブ抗体の完全生物学的活性の回復である。以下の実施例では、抗体完全性をモニターする非還元ＣＥ－ＳＤＳ法によって抗体の純度（「ＣＥ－ＳＤＳによる純度」と呼ぶ）を分析し、シスタミン－ＣＥＸクロマトグラフィー法によって抗体の生物学的活性（「ＣＥＸによる活性」と呼ぶ）を分析する。シスタミン－ＣＥＸクロマトグラフィーでは、シスタミンを抗体試料に添加し、そのままセクキヌマブ中のすべての遊離システインを誘導体化させる。次いで、シスタミン誘導体化抗体種が追加の正電荷を有するので非誘導体化抗体種の後に溶出する陽イオン交換クロマトグラフィーによる分析的分離に試料を付した。次いで、そのクロマトグラムを未処理試料のクロマトグラムと比較した。溶出位置がシフトした処理試料のクロマトグラムにおける種の部分は、元の試料における遊離ＣｙｓＬ９７－ＳＨの存在量の直接的尺度であり、活性の代替マーカーとして使用することができる。
【０１２２】
概念実証研究（ＤｏＥ１）の主な目的は、システイン処理ステップを向上させるためにパラメータ範囲の第１のセットを試験して主な影響因子を特定し、操作範囲の定義を裏づけるための実験研究計画の適用性を確認することであった。加えて、ＤｏＥ１は、実験設定が出力パラメータに対する入力パラメータの影響を検出することに適用可能であるかどうかを評価するために行った。Ｍｏｄｄｅ　９．０（Ｕｍｅｔｒｉｃｓ）ソフトウェアを使用して、この概念研究を分析した。
【０１２３】
入力パラメータを表４に示す。レドックス電位は、還元型／酸化型比、この場合はシステイン／シスチン比、による影響を受けるので、シスチン（酸化型）の添加を追加の入力パラメータとして試験した。システイン／シスチン比およびシステイン濃度を３つのレベル各々に関して調査し、抗体濃度（「ＡＬＣによる含有量」）を２つのレベルに関して調査した。製品品質出力パラメータ、ＣＥＣによる活性およびＣＥ－ＳＤＳによる純度を判定した。
【０１２４】

【表４】

名称	単位	低方レベル	中レベル	上方レベル
システイン/シスチン比	[-]	2.00	6.00	10.0
システイン濃度	[mM]	0.50	5.25	10.0
ALC による含有量	[mg/mL]	3.25	該当なし	6.5

表 4:入力パラメータ。

【０１２５】

この計画は、中心点試行を伴わない３２×２マルチレベル要因計画である。システイン処理ステップの向上のためのデータおよびプロセス理解を得るために、この計画を選択した。このタイプの計画は、入力パラメータシステイン／シスチン比およびシステイン濃度についての線形項、交互作用項および２次の項を有する数理モデルの計算を支援する。この実験計画プランを表５に与える。

【０１２６】

【表５】

試行	システインのシスチンに対する比[M/M]	システイン濃度 [mM]	ALC によるタンパク質含有量 [mg/mL]	システインのタンパク質に対する近似的モル比[M/M]
React007_1	2	0.50	6.50	11.38
React007_2	6	10.00	6.50	227.61
React007_3	2	10.00	6.50	227.61
React007_4	10	10.00	6.50	227.61
React007_6	6	0.50	6.50	11.38
React007_7	10	10.00	3.25	455.21
React007_8	10	5.25	6.50	119.49
React007_9	6	10.00	3.25	455.21
React007_10	6	5.25	6.50	119.49
React007_11	2	10.00	3.25	455.21
React007_12	10	0.50	3.25	22.76
React007_13	6	5.25	3.25	238.99
React007_14	6	0.50	3.25	22.76
React007_15	10	5.25	3.25	238.99
React007_16	2	5.25	3.25	238.99
React007_17	2	0.50	3.25	22.76
React007_18	10	0.50	6.50	11.38

表 5:実験計画プラン。アミノ酸配列に基づくセクキヌマブの相対分子量は 147,944 ダルトンであり、これを使用してシステインのタンパク質に対するモル比を計算する。

【０１２７】

水浴に入れ、３７℃に加温した１５ｍＬ密閉式ポリエチレン製試験管で、選択的還元反応を行った。タンパク質溶液をＷＦＩで目標濃度に希釈し、１Ｍ　Ｔｒｉｓでｐ Ｈ８．０に調整した。システインおよびシスチン溶液の添加後、試験管を調節し、水浴内で４時間インキュベートした。次いで、ＡＬＣによる含有量の判定のための試料を抜き取った。インキュベーション後に直接抜き取り、１０倍過剰（システイン濃度に関して）のヨードアセトアミドの添加によって反応を停止させた試料を用いて、ＣＥ－ＳＤＳを行った。残りの溶液を周囲温度の冷却し、そのｐＨをｐＨ５．０～５．５に調整し、ＣＥＸおよびＳＥＣ

分析用の試料を抜き取った。

【０１２８】

この計画は、表６の実際の実験計画に従って行った。

【０１２９】

【表６】

試行	システインのシスチンに対するモル比[M/M]	システイン濃度 [mM]	ALC によるタンパク質含有量 [mg/mL]	システインのタンパク質に対する近似的モル比[M/M]
React007_1	2	0.50	6.9	10.72
React007_2	6	10.00	6.3	234.83
React007_3	2	10.00	6.3	234.83
React007_4	10	10.00	6.3	234.83
React007_5	2	5.25	6.5	119.49
React007_6	6	0.50	6.8	10.88
React007_7	10	10.00	3.2	462.33
React007_8	10	5.25	6.5	119.49
React007_9	6	10.00	3.2	462.33
React007_10	6	5.25	6.6	117.68
React007_11	2	10.00	3.2	462.33
React007_12	10	0.50	3.5	21.13
React007_13	6	5.25	3.4	228.44
React007_14	6	0.50	3.5	21.13
React007_15	10	5.25	3.3	235.37
React007_16	2	5.25	3.4	228.44
React007_17	2	0.50	3.5	21.13
React007_18	10	0.50	6.6	11.21

表 6:実際の実験計画。アミノ酸配列に基づくセクキヌマブの相対分子量は 147,944Da であり、これを使用してシステインのタンパク質に対するモル比を計算する。

【０１３０】

実施例４．２－概念実証研究の結果

出力パラメータの値を入力パラメータとともに表７に収載する。試行をＣＥＸによる活性の値の上昇に伴って収載する。０．５ｍＭ濃度のシステインでのすべての試行が、より低い活性を有することが分かる－この理由は、高い確実性で、このシステイン濃度が低すぎてＣｙｓ９７の完全なアンマスキングを果せないためである。このセットでは、システイン：抗体比が約１１：１から約２１：１に増加したとき、ＣＥＸによる活性のわずかな向上が認められた（ＲＥＡＣＴ００＿１７、＿１４および＿１２）。これらの３試行のうち、わずかに高いシステイン：シスチン比（ＲＥＡＣＴ００７＿１４および＿１２）（高い確実性で、システインの還元力のわずかな減弱を表す）を有したものは、ＣＥ－ＳＤＳパラメータによる良好な純度も有した。したがって、一連の試行は、活性出力パラメータの差が小さく（９２．４～９３．１％）、高い確実性で分析精度の範囲内であり、そのためこの群間の解釈が難しくなる。最後に、４試行の１セットは、活性が最も高かった（９３．７～９５．１％）。注目に値することとして、これらの試行は、最高システイン／タンパク質比（４６２．３３）を有さなかった。

【０１３１】

【表７】

試行	システインのシスチンに対するモル比[M/M]	システイン濃度[mM]	ALCによるタンパク質含有量[mg/mL]	システインのタンパク質に対する近似的モル比[M/M]	CEXによる活性[%]	CE-SDSによる純度[%]
React007_1	2	0.50	6.9	10.72	87.2	97.0
React007_6	6	0.50	6.8	10.88	88.8	95.0
React007_18	10	0.50	6.6	11.21	88.8	94.0
React007_17	2	0.50	3.5	21.13	89.3	78.0
React007_14	6	0.50	3.5	21.13	90.4	93.0
React007_12	10	0.50	3.5	21.13	90.9	95.0
React007_16	2	5.25	3.4	228.44	92.4	85.0
React007_3	2	10.00	6.3	234.83	92.8	83.0
React007_13	6	5.25	3.4	228.44	92.8	85.0
React007_9	6	10.00	3.2	462.33	92.9	68.0
React007_7	10	10.00	3.2	462.33	93.0	56.0
React007_8	10	5.25	6.5	119.49	93.0	88.0
React007_11	2	10.00	3.2	462.33	93.0	70.0
React007_4	10	10.00	6.3	234.83	93.1	77.0
React007_2	6	10.00	6.3	234.83	93.7	76.0
React007_15	10	5.25	3.3	235.37	94.0	78.0
React007_10	6	5.25	6.6	117.68	94.2	84.0
React007_5	2	5.25	6.5	119.49	95.2	87.0

表 7:CEX による活性の値上昇に伴って収載した入力および出力パラメータ値

【０１３２】

良好なモデル適合度のため、システムの主要影響パラメータを理解するためにコンタープロットを使用することが可能であった。モデルの品質を４つのツール、すなわち、Ｒ２、Ｑ２、モデル有効性および反復の標準偏差（ＳＤ）によって表す。データと十分一致しているモデルは、１．０に近いＲ２およびＱ２、ならびに０．２５より上のモデル有効性を有することになる。統計的有意性がより低いモデルは、より低いＲ２およびＱ２値を有する。品質出力パラメータについてのモデル診断は、ＣＥＸによる活性およびＣＥ－ＳＤＳによる純度のモデルが、高い統計的有意性（ＣＥＸによる活性についてはＲ２＝０．８８およびＱ２＝０．７３、ならびにＣＥ－ＳＤＳによる純度についてはＲ２＝０．８４およびＱ２＝０．６３）を有することを示す。ＣＥＸによる活性についてのコンタープロット（図４Ａ）は、入力パラメータシステイン濃度が４．０ｍＭ～０．９ｍＭの間である場合、９３．０％以上のＣＥＸによる活性値が達成されることを教示している。さらに、入力因子であるＡＬＣによる含有量は、入力因子であるシステイン／シスチン比を６のその中心点に設定したとき、低レベル（３．２５ｍｇ／ｍＬ）から高レベル（６．５ｍｇ／ｍＬ）まで様々でありうる。ＣＥＸによる活性を向上させるために、モデルは、入力パラメータＡＬＣによる含有量が６．５ｍｇ／ｍＬの調査された上方レベルより高くあるべきであることを示す。

【０１３３】

表８に、試行をＣＥ－ＳＤＳ純度の増加に従って収載する。４６２モル／モルの高いモル比を有する試行が属する、低純度（＜／＝７０％）を有する試行；中純度（７０～８３％）を有する試行；および高純度（＞８３％）を有する試行という３群を見ることができる。良好なモデル適合度のため、入力パラメータが表８に示すＣＥ－ＳＤＳによる純度値にどのように影響を及ぼすかを理解するためにコンタープロットを使用することも可能である。図４ＢのＣＥ－ＳＤＳのコンタープロットによると、理論上最適に最も近くなる区域は右下側に位置する。これは、システイン／シスチン比をより高レベルに設定すべきであ

り、システイン濃度をより低レベルに設定すべきであることを含意する。加えて、ＡＬＣによるより高い含有量を使用して、ＣＥ－ＳＤＳによる純度を増加させることができよう。

【０１３４】

【表８】

試行	システインのシスチンに対するモル比 [M/M]	システイン濃度 [mM]	ALC によるタンパク質含有量 [mg/mL]	システインのタンパク質に対する近似的モル比 [M/M]	CEX による活性 [%]	CE-SDS による純度 [%]
React007_7	10	10.00	3.2	462.33	93.0	56
React007_9	6	10.00	3.2	462.33	92.9	68
React007_11	2	10.00	3.2	462.33	93.0	70
React007_2	6	10.00	6.3	234.83	93.7	76
React007_4	10	10.00	6.3	234.83	93.1	77
React007_15	10	5.25	3.3	235.37	94.0	78
React007_3	2	10.00	6.3	234.83	92.8	83
React007_10	6	5.25	6.6	117.68	94.2	84
React007_16	2	5.25	3.4	228.44	92.4	85
React007_13	6	5.25	3.4	228.44	92.8	85
React007_5	2	5.25	6.5	119.49	95.2	87
React007_8	10	5.25	6.5	119.49	93.0	88
React007_14	6	0.50	3.5	21.13	90.4	93
React007_18	10	0.50	6.6	11.21	88.8	94
React007_6	6	0.50	6.8	10.88	88.8	95
React007_12	10	0.50	3.5	21.13	90.9	95
React007_1	2	0.50	6.9	10.72	87.2	97

表 8:CE-SDS 純度漸増に従って収載した入力および出力パラメータ。

【０１３５】

実施例４．３－概念実証研究の要約

概念実証研究によって、システイン処理ステップの入力パラメータの評価および精密化への実験設定の適用性を確認した。本発明者らは、システインのタンパク質に対する高いモル比がＣＥ－ＳＤＳによる低い純度値につながりうることに注目した。モデルは、タンパク質およびシステイン濃度を増加させることでＣＥ－ＳＤＳによる純度およびＣＥＸによる活性を向上させることができるだろうということも示唆した。したがって、システイン濃度、ならびにＡＬＣによる含有量についてのパラメータ範囲増加の製品品質特性であるＣＥＸによる活性およびＣＥ－ＳＤＳによる純度に対する影響を、以下の研究（応答局面計画１）でより詳細に評価した。

【実施例５】

【０１３６】

システイン選択的還元ステップ開発研究：応答局面計画１

実施例５．１－研究計画および方法

実施例４からのデータに基づいて、選択的還元ステップの入力パラメータを調整した。Ｍｏｄｄｅ　９．０（Ｕｍｅｔｒｉｃｓ）ソフトウェアを使用して、この開発研究を分析した。入力パラメータを表９に収載する。因子を各々３レベルで調査した。この計画は、入力パラメータＡＬＣによる含有量およびシステイン濃度のレベルを調整した、概念実証研究の調整バージョンであった。入力パラメータ「システイン／シスチン比」をパラメータ「シスチンの濃度」によって置き換えて、実験設定およびさらにデータの評価を単純化した。

【０１３７】
【表９】

名称	単位	低方レベル	中レベル	上方レベル
シスチン濃度	[mM]	0.0	0.5	1.0
システイン濃度	[mM]	4.0	9.0	14.0
ALC による含有量	[mg/mL]	3.8	11.6	19.5

表 9:入力パラメータ。

【０１３８】
この計画は、中心点条件での４つの中心試行を伴う２３中心複合面（Center Composite Face）（ＣＣＦ）計画である。このタイプの計画は、線形項、交互作用項および２次の項を有する数理モデルの計算を支援する。この実験計画プランを表１０に与える。
【０１３９】
【表１０】

試行	ALC によるタンパク質含有量 (mg/mL)	システイン濃度(mM)	シスチン濃度 (mM)	システインのシスチンに対するモル比 (M/M)	システインのタンパク質に対する近似的モル比(M/M)
React016_1	19.5	14	0.0	該当なし	106.22
React016_2[1]	11.6	9	0.5	18	114.78
React016_3	3.8	9	0.5	18	350.39
React016_4	11.6	9	1.0	9	114.78
React016_5	19.5	9	0.5	18	68.28
React016_6	19.5	4	0.0	該当なし	30.35
React016_7	3.8	4	1.0	4	155.73
React016_8[1]	11.6	9	0.5	18	114.78
React016_9	11.6	14	0.5	28	178.55
React016_10	3.8	4	0.0	該当なし	155.73
React016_11	11.6	4	0.5	8	51.02
React016_12	3.8	14	0.0	該当なし	545.06
React016_13	19.5	4	1.0	4	30.35
React016_14[1]	11.6	9	0.5	18	114.78
React016_15[1]	11.6	9	0.5	18	114.78
React016_16	19.5	14	1.0	14	106.22
React016_17	11.6	9	0.0	該当なし	114.78
React016_18	3.8	14	1.0	14	545.06

表 10:実験計画プラン。1)中心点。アミノ酸配列に基づくセクキヌマブの相対分子量は 147,944Da であり、これを使用してシステインのタンパク質に対するモル比を計算する。

【０１４０】
水浴に入れ、３７℃に加温した１５ｍＬ密閉式ポリエチレン製試験管で、選択的還元反応を行った。この計画は、表１１の実際の実験計画に従って行った。
【０１４１】

【表１１】

試行	ALC によるタンパク質含有量 (mg/mL)	システイン濃度(mM)	シスチン濃度 (mM)	システインのシスチンに対するモル比 (M/M)	システインのタンパク質に対する近似的モル比(M/M)
React016_1	19.5	14	0.0	該当なし	106.22
React016_2[1]	11.9	9	0.5	18	111.89
React016_3	4.0	9	0.5	18	332.87
React016_4	11.5	9	1.0	9	115.78
React016_5	19.4	9	0.5	18	68.63
React016_6	19.4	4	0.0	該当なし	30.50
React016_7	3.8	4	1.0	4	155.73
React016_8[1]	11.6	9	0.5	18	114.78
React016_9	11.5	14	0.5	28	180.11
React016_10	3.7	4	0.0	該当なし	159.94
React016_11	11.6	4	0.5	8	51.02
React016_12	3.8	14	0.0	該当なし	545.06
React016_13	19.3	4	1.0	4	30.66
React016_14[1]	11.7	9	0.5	18	113.80
React016_15[1,2]	11.1	9	0.5	18	119.95
React016_16	17.8	14	1.0	14	116.36
React016_17	10.9	9	0.0	該当なし	122.16
React016_18	3.8	14	1.0	14	545.06

表 11:実際の実験計画。1)中心点;2)タンパク質濃度の当初計画した中心点との 10%を超える偏差のため、この実験を使用 DoE ソフトウェアの中心点と見なさない。アミノ酸配列に基づくセクキヌマブの相対分子量は 147,944Da であり、これを使用してシステインのタンパク質に対するモル比を計算する。

【０１４２】

実施例５．２－応答局面計画１の結果

入力パラメータ、および出力パラメータの値を表１２に収載する。試行をＣＥＸによる活性の増加に従って収載する。高いＣＥＸ活性を有する試行は、より高いシステイン濃度を使用したことが分かる。より低い活性を有する単一の試行（Ｒｅａｃｔ０１６＿１３）は、高いタンパク質濃度、低いシステイン濃度、および高いシスチン濃度を有した。

【０１４３】

製品品質出力パラメータのモデル診断は、ＣＥＸによる活性についてはＲ^2＝０．９５、Ｑ^2＝０．７６、ＳＤ＝０．２０、およびモデル有効性＝０．７８であり、ＣＥ－ＳＤＳによる純度についてはＲ^2＝０．７９、Ｑ^2＝０．５３、ＳＤ＝２．９１、およびモデル有効性＝０．８３であった。これは、両方の出力パラメータについての有意なモデルを示す。入力パラメータ設定の影響およびＣＥＸによる活性に対する影響を見抜くために、コンタープロットを計算した（図５）。

【０１４４】

【表１２】

試行	ALC によるタンパク質含有量 (mg/mL)	システイン濃度 (mM)	シスチン濃度 (mM)	システインのシスチンに対するモル比 (M/M)	システインのタンパク質に対する近似的モル比 (M/M)	CEX による活性 [%]	CE-SDS による純度 [%]
React016_13	19.3	4	1	4	30.66	91.6	93
React016_7	3.8	4	1.0	4	155.73	93.3	92
React016_6	19.4	4	0.0	該当なし	30.50	93.5	94
React016_11	11.6	4	0.5	8	51.02	93.5	93
React016_5	19.4	9	0.5	18	68.63	94.1	85
React016_10	3.7	4	0.0	該当なし	159.94	94.2	79
React016_2[1]	11.9	9	0.5	18	111.89	94.3	86
React016_3	4.0	9	0.5	18	332.87	94.3	85
React016_4	11.5	9	1.0	9	115.78	94.5	87
React016_8[1]	11.6	9	0.5	18	114.78	94.5	91
React016_15[1, 2]	11.1	9	0.5	18	119.95	94.5	86
React016_14[1]	11.7	9	0.5	18	113.80	94.7	86
React016_17	10.9	9	0.0	該当なし	122.16	94.7	85
React016_1	19.5	14	0.0	該当なし	106.22	94.9	76
React016_9	11.5	14	0.5	28	180.11	95.1	85
React016_12	3.8	14	0.0	該当なし	545.06	95.1	74
React016_16	17.8	14	1.0	14	116.36	95.1	78
React016_18	3.8	14	1.0	14	545.06	95.1	77

表 12:CEX による活性の漸増に従って収載した入力および出力パラメータ。1)中心点; 2)タンパク質濃度の当初計画した中心点との 10%を超える偏差のため、この実験を使用 DoE ソフトウェアの中心点と見なさない。

【０１４５】

図５のコンタープロットに示すように、ＣＥＸによる高い活性を達成するために最も影響の大きい入力パラメータはシステイン濃度であり、このパラメータをその高レベルに設定すべきである。しかし、低レベルのシステイン濃度であっても、ＡＬＣによる含有量およびシスチン濃度が上限でない場合、高いＣＥＸ活性（＞９３％）をかなえる。入力パラメータＡＬＣによる含有量およびシスチン濃度は、出力パラメータＣＥＸによる活性にも、より小さい程度にではあるが、影響を及ぼす。

【０１４６】

表１３に、試行をＣＥ－ＳＤＳ純度の上昇に従って収載する。これらの試行を３群に分けることができる。低純度（＜８０％）を有する一連の６つの試行（主として１４ｍＭ試行）と、中純度（８５～９１％）を有する一連の試行と、より高い純度（＞９１％）を有する一連の試行とがあり、後述ものはすべて４ｍＭシステイン試行であった。

【０１４７】

【表１３】

試行	ALCによるタンパク質含有量 (mg/mL)	システイン濃度 (mM)	シスチン濃度 (mM)	システインのシスチンに対するモル比 (M/M)	システインのタンパク質に対する近似的モル比(M/M)	CEXによる活性 [%]	CE-SDSによる純度 [%]
React016_12	3.8	14	0.0	該当なし	545.06	95.1	74
React016_1	19.5	14	0.0	該当なし	106.22	94.9	76
React016_18	3.8	14	1.0	14	545.06	95.1	77
React016_16	17.8	14	1.0	14	116.36	95.1	78
React016_10	3.7	4	0.0	該当なし	159.94	94.2	79
React016_5	19.4	9	0.5	18	68.63	94.1	85
React016_3	4.0	9	0.5	18	332.87	94.3	85
React016_17	10.9	9	0.0	該当なし	122.16	94.7	85
React016_9	11.5	14	0.5	28	180.11	95.1	85
React016_2[1]	11.9	9	0.5	18	111.89	94.3	86
React016_15[1, 2]	11.1	9	0.5	18	119.95	94.5	86
React016_14[1]	11.7	9	0.5	18	113.80	94.7	86
React016_4	11.5	9	1.0	9	115.78	94.5	87
React016_8[1]	11.6	9	0.5	18	114.78	94.5	91
React016_7	3.8	4	1.0	4	155.73	93.3	92
React016_13	19.3	4	1.0	4	30.66	91.6	93
React016_11	11.6	4	0.5	8	51.02	93.5	93
React016_6	19.4	4	0.0	該当なし	30.50	93.5	94

表 13:CE-SDS 純度上昇に従って収載した入力および出力パラメータ。1)中心点; 2)タンパク質濃度の当初計画した中心点との 10%を超える偏差のため、この実験を使用 DoE ソフトウェアの中心点と見なさない。

【０１４８】
結果に基づいて、ＣＥ－ＳＤＳによるより高い純度値を達成するためには、システイン濃度は低くあるべきであり、ＡＬＣによる含有量およびシスチン濃度を高く設定すべきである。

【０１４９】
実験Ｒｅａｃｔ０１６＿６、Ｒｅａｃｔ０１６＿７、Ｒｅａｃｔ０１６＿８およびＲｅａｃｔ０１６＿１１は、２つの品質出力パラメータ両方について高い値を有する。このＤｏＥによって確立したモデルに基づいてシステイン処理ステップの失敗リスクを推定するために、モンテカルロシミュレーションを使用して計画空間推定器を実行した。この計画空間推定器によって、因子が変動できる範囲であって、しかも出力パラメータが製品品質およびプロセス性能出力パラメータの目標範囲を超えない範囲が得られる。これは、ＡＬＣによる含有量を理想通りの１２ｍｇ／ｍＬに設定すべきであることを示唆する。システイン濃度は、この特定の実験では４．０ｍＭが理想である。シスチン濃度については、理想は０．３２ｍＭである。

【０１５０】
この研究の結果によると、システイン処理ステップは、主として、システイン濃度による影響を受ける。高いシステイン濃度は、ＣＥＸによる高い活性を促進するが、同時に、ＣＥ－ＳＤＳによる低い純度をもたらす。この計画空間推定器によると、システイン濃度を４ｍＭに保つべきであり、ＡＬＣによる含有量を１２ｍｇ／ｍＬ（約４９のシステイン対タンパク質比）に設定すべきである。

【０１５１】
この統計学的計画の結果の検証のために、空気オーバーレイおよび開放ヘッドスペースを

有する撹拌式２Ｌバイオリアクターで標的試行を行った。インキュベーション中に撹拌を適用しなかった。プロセスパラメータを表１４に収載し、分析結果を表１５に示す。

【０１５２】

【表１４】

プロセスパラメータ	単位	標的試行 1 (REACT019)	標的試行 2 (REACT020)	標的試行 3 (REACT021)
タンパク質濃度	[mg/mL]	12.90	13.00	12.60
システイン濃度	[mM]	4.00	8.00	4.00
シスチン濃度	[mM]	0.15	0.15	0.00
温度	[℃]	37.00	37.00	37.00
pH	[-]	8.00	8.00	8.00
インキュベーション時間	[h]	4.00	4.00	4.00
システイン/シスチンモル比	M/M	26.67	53.33	n.a.
システインのタンパク質に対する近似的モル比	M/M	45.87	91.04	46.97

表 14:標的試行のプロセスパラメータ。アミノ酸配列に基づくセクキヌマブの相対分子量は 147,944Da であり、これを使用してシステインのタンパク質に対するモル比を計算する。

【０１５３】

【表１５】

プロセスパラメータ	単位	標的試行 1 (REACT019)	標的試行 2 (REACT020)	標的試行 3 (REACT021)
CEX による活性	[%]	94.8	94.3	95.4
CE-SDS による純度	[%]	94.0	89.0	95.0

表 15:標的試行の分析結果。

【０１５４】

３試行すべてが、ＣＥＸによる活性に関して同様の結果をもたらす。これは、４．０ｍＭシステインが抗体の活性を回復させるのに十分なものであることを示す以前のＤｏＥ研究の結果に対応する。第３の標的試行（ＲＥＡＣＴ０２１）にはシスチンを含めず、その結果、ＣＥ－ＳＤＳによる純度について試行１（ＲＥＡＣＴ０１９）と匹敵する結果となり、これは、試験した条件下ではシスチンがシステイン処理ステップに対してほんのわずかな影響しか与えないことを示唆していた。８．０ｍＭ（システインのタンパク質に対する比　約９１）へのシステイン濃度の増加は、ＣＥＸによるより高い活性値につながるばかりでなく、そのプールにおけるＣＥ－ＳＤＳによるより低い純度にもつながり、その結果、９０％の開発目標を下回った。シスチンはこの統計学的計画において有意性を示したが、プラスの効果は標的試行では検出できなかった。加えて、この統計学的計画においてＣＥＸによる活性に対する影響は小さく（図５を参照されたい）、シスチン含有緩衝液の調製は、非塩基性緩衝液へのシスチンの低い溶解度のため困難である。それ故、シスチンをシステイン処理用緩衝液に含めないことができる。

【実施例６】

【０１５５】

システイン選択的還元ステップ開発研究：応答局面計画２

実施例６．１－研究計画および方法

応答局面計画２（ＤｏＥ３）の主な目的は、システイン濃度に加えて、システイン処理ステップにおけるプロセスパラメータ温度、時間およびｐＨの調査であった。これらのデー

タを、操作範囲の定義を裏づけることおよび主要影響因子を特定することにも使用した。Ｍｏｄｄｅ　９．０（Ｕｍｅｔｒｉｃｓ）ソフトウェアを使用して、この開発研究を分析した。入力パラメータは、表１６に見出される。

【０１５６】

【表１６】

名称	単位	低方レベル	中レベル	上方レベル
温度	[℃]	32.0	37.0	42.0
時間	[h]	1.0	4.0	7.0
pH	[-]	7.5	8.0	8.5
システイン濃度	[mM]	2.0	5.0	8.0

表 16:入力パラメータ。

【０１５７】

この計画は、３つの中心点試行を伴う中心複合面（ＣＣＦ）計画である。この実験計画プランを表１７に与える。システイン処理溶液を前の実験で向上させので、さらなるプロセスパラメータの影響を評価するためにこの計画を選択した。システイン濃度は、システイン処理ステップの最も影響の大きい入力パラメータであり、入力パラメータとの交互作用が予想されたので、システイン濃度を再び分析した。このタイプの計画は、線形項、交互作用項および２次の項を有する数理モデルの計算を支援する。

【０１５８】

【表１７】

試行	温度 [℃]	時間 (h)	pH [-]	システイン濃度 [mM]	ALC によるタンパク質含有量 [mg/mL]	システインのタンパク質に対する近似的モル比 (M/M)
React027_1	42	7	8.5	8	13	91.04
React027_2	37	4	8.0	8	13	91.04
React027_3	32	1	7.5	8	13	91.04
React027_4	32	1	8.5	2	13	22.76
React027_5[1]	37	4	8.0	5	13	56.90
React027_6	42	1	8.5	8	13	91.04
React027_7	32	1	8.5	8	13	91.04
React027_8	32	1	7.5	2	13	22.76
React027_9[1]	37	4	8.0	5	13	56.90
React027_10	37	7	8.0	5	13	56.90
React027_11	42	7	7.5	2	13	22.76
React027_12	42	4	8.0	5	13	56.90
React027_13	32	7	7.5	8	13	91.04
React027_14	37	4	8.0	2	13	22.76
React027_15	37	4	7.5	5	13	56.90
React027_16	32	4	8.0	5	13	56.90
React027_17	42	1	8.5	2	13	22.76
React027_18	32	7	7.5	2	13	22.76
React027_19	37	1	8.0	5	13	56.90
React027_20	42	7	7.5	8	13	91.04
React027_21	42	1	7.5	8	13	91.04
React027_22[1]	37	4	8.0	5	13	56.90
React027_23	42	7	8.5	2	13	22.76
React027_24	32	7	8.5	2	13	22.76
React027_25	37	4	8.5	5	13	56.90
React027_26	32	7	8.5	8	13	91.04
React027_27	42	1	7.5	2	13	22.76

表 17:実験計画プラン。1)中心点。アミノ酸配列に基づくセクキヌマブの相対分子量は 147,944Da であり、これを使用してシステインのタンパク質に対するモル比を計算する。

【０１５９】

水浴に入れ、３７℃に加温した１５ｍＬ密閉式ポリプロピレン製試験管で、選択的還元反応を行った。

【０１６０】

実施例６．２－応答局面計画２の結果

この計画は、表１８の実際の実験計画に従って行った。

【０１６１】

【表１８】

試行	温度 [℃]	時間 (h)	pH [-]	システイン濃度 [mM]	ALC によるタンパク質含有量 [mg/mL]	システインのタンパク質に対する近似的モル比 [M/M]
React027_1	42	7	8.5	8	13	91.04
React027_2	37	4	8.0	8	13	91.04
React027_3	32	1	7.5	8	13	91.04
React027_4	32	1	8.4	2	13	22.76
React027_5[1,2]	37	4	7.9	5	13	56.90
React027_6	42	1	8.5	8	13	91.04
React027_7	32	1	8.5	8	13	91.04
React027_8	32	1	7.3	2	13	22.76
React027_9[1]	37	4	8.0	5	13	56.90
React027_10	37	7	8.0	5	13	56.90
React027_11	42	7	7.4	2	13	22.76
React027_12	42	4	8.0	5	13	56.90
React027_13	32	7	7.6	8	13	91.04
React027_14	37	4	7.9	2	13	22.76
React027_15	37	4	7.5	5	13	56.90
React027_16	32	4	8.0	5	13	56.90
React027_17	42	1	8.5	2	13	22.76
React027_18	32	7	7.4	2	13	22.76
React027_19	37	1	8.0	5	13	56.90
React027_20	42	7	7.6	8	13	91.04
React027_21	42	1	7.6	8	13	91.04
React027_22[1]	37	4	8.0	5	13	56.90
React027_23	42	7	8.5	2	13	22.76
React027_24	32	7	8.5	2	13	22.76
React027_25	37	4	8.5	5	13	56.90
React027_26	32	7	8.5	8	13	91.04
React027_27	42	1	7.5	2	13	22.76

表 18:実際の実験計画プラン。1)中心点。2)使用ソフトウェアの中心点を考慮しない。アミノ酸配列に基づくセクキヌマブの相対分子量は 147,944Da であり、これを使用してシステインのタンパク質に対するモル比を計算する。

【０１６２】

製品品質出力パラメータについての値を、ＣＥＸ活性結果についての昇順で表１９に収載する。製品品質出力パラメータのモデル診断は、ＣＥＸによる活性についてはＲ^2＝０．９３、Ｑ^2＝０．８０、モデル有効性＝０．７９、およびＳＤ＝０．４２であり、ＣＥ－ＳＤＳによる純度についてはＲ^2＝０．９６、Ｑ^2＝０．８９、モデル有効性＝０．６７およびＳＤ＝０．００である。

【０１６３】

【表１９】

試行	温度 [℃]	時間 (h)	pH [-]	システイン濃度 [mM]	ALCによるタンパク質含有量 (mg/mL)	システインのタンパク質に対する近似的モル比 (M/M)	CEXによる活性 [%]	CE-SDSによる純度 [%]
React027_8	32	1	7.3	2	13	22.76	89.1	91
React027_27	42	1	7.5	2	13	22.76	90.1	91
React027_3	32	1	7.5	8	13	91.04	90.3	61
React027_4	32	1	8.4	2	13	22.76	91.1	92
React027_7	32	1	8.5	8	13	91.04	91.7	65
React027_17	42	1	8.5	2	13	22.76	91.8	89
React027_18	32	7	7.4	2	13	22.76	92.5	93
React027_14	37	4	7.9	2	13	22.76	93.3	94
React027_21	42	1	7.6	8	13	91.04	93.3	77
React027_19	37	1	8.0	5	13	56.90	93.4	79
React027_23	42	7	8.5	2	13	22.76	93.6	93
React027_24	32	7	8.5	2	13	22.76	94.1	93
React027_11	42	7	7.4	2	13	22.76	94.2	95
React027_6	42	1	8.5	8	13	91.04	94.3	74
React027_16	32	4	8.0	5	13	56.90	94.4	86
React027_13	32	7	7.6	8	13	91.04	94.5	82
React027_9[1]	37	4	8.0.	5	13	56.90	95.0	89
React027_5[1,2]	37	4	7.9	5	13	56.90	95.2	89
React027_10	37	7	8.0	5	13	56.90	95.3	90
React027_22[1]	37	4	8.0	5	13	56.90	95.6	88
React027_25	37	4	8.5	5	13	56.90	95.7	87
React027_20	42	7	7.6	8	13	91.04	95.8	85
React027_12	42	4	8.0	5	13	56.90	95.9	90
React027_1	42	7	8.5	8	13	91.04	96.0	85
React027_15	37	4	7.5	5	13	56.90	96.1	88
React027_2	37	4	8.0	8	13	91.04	97.1	82
React027_26	32	7	8.5	8	13	91.04	97.1	82

表 19:CEXによる活性上昇に従って収載した入力および出力パラメータ値。1)中心点。2)使用ソフトウェアの中心点を考慮しない。

【０１６４】

表１９は、試行を主に３群：低活性（＜９３％）、中活性（９３～９５％）および高活性（＞９５％）に分けることができることを示す。良好なモデル適合度のため、システムの主要影響パラメータを特定するためにコンタープロットを使用することが可能である（図６）。図６は、中～高インキュベーション時間（例えば４～７時間）および高システイン濃度がＣＥＸによる活性を増加させるのに有益であることを示す。インキュベーション温度およびプロセスｐＨは、出力パラメータＣＥＸによる活性に殆ど影響を与えない。それにもかかわらず、９５％以上の純度についての面積は、３７℃でｐＨ８．０および８．５のプロットでは最大であり、このことは、これが最適操作範囲であることを示唆している。

【０１６５】

表２０に、試行をＣＥ－ＳＤＳ純度の増加に応じて収載する。試行を３群：低純度（＜８２％）を有する試行、中純度を有する試行、および高純度（＞９０％）を有する試行に分けることができる。ＣＤ－ＳＤＳによる高い純度を有するすべての試行は、２ｍＭシステインを用いた。

【０１６６】
【表２０】

試行	温度 [℃]	時間 (h)	pH [-]	システイン濃度 [mM]	ALCによるタンパク質含有量 (mg/mL)	システインのタンパク質に対する近似的モル比 (M/M)	CEXによる活性 [%]	CE-SDSによる純度 [%]
React027_3	32	1	7.5	8	13	91.04	90.3	61
React027_7	32	1	8.5	8	13	91.04	91.7	65
React027_6	42	1	8.5	8	13	91.04	94.3	74
React027_21	42	1	7.6	8	13	91.04	93.3	77
React027_19	37	1	8.0	5	13	56.90	93.4	79
React027_13	32	7	7.6	8	13	91.04	94.5	82
React027_2	37	4	8.0	8	13	91.04	97.1	82
React027_26	32	7	8.5	8	13	91.04	97.1	82
React027_20	42	7	7.6	8	13	91.04	95.8	85
React027_1	42	7	8.5	8	13	91.04	96.0	85
React027_16	32	4	8.0	5	13	56.90	94.4	86
React027_25	37	4	8.5	5	13	56.90	95.7	87
React027_22[1]	37	4	8.0	5	13	56.90	95.6	88
React027_15	37	4	7.5	5	13	56.90	96.1	88
React027_17	42	1	8.5	2	13	22.76	91.8	89
React027_9[1]	37	4	8.0	5	13	56.90	95.0	89
React027_5[1,2]	37	4	7.9	5	13	56.90	95.2	89
React027_10	37	7	8.0	5	13	56.90	95.3	90
React027_12	42	4	8.0	5	13	56.90	95.9	90
React027_8	32	1	7.3	2	13	22.76	89.1	91
React027_27	42	1	7.5	2	13	22.76	90.1	91
React027_4	32	1	8.4	2	13	22.76	91.1	92
React027_18	32	7	7.4	2	13	22.76	92.5	93
React027_23	42	7	8.5	2	13	22.76	93.6	93
React027_24	32	7	8.5	2	13	22.76	94.1	93
React027_14	37	4	7.9	2	13	22.76	93.3	94
React027_11	42	7	7.4	2	13	22.76	94.2	95

表 20:CE-SDSによる純度漸増に伴って収載した入力および出力パラメータ。1)中心点。2)使用ソフトウェアの中心点を考慮しない。

【０１６７】
良好なモデル適合度のため、プロセスおよび主要影響入力パラメータを理解するためにコンタープロットを使用することができる（図７）。図７は、中～高インキュベーション時間および低いシステイン濃度がＣＥ－ＳＤＳによる純度を増加させることを示す。入力パラメータインキュベーション温度およびプロセスｐＨは、ＣＥ－ＳＤＳによる純度に対してわずかな影響しか与えなかった。
【０１６８】
実施例６から引き出された要約および結論
温度は中心から高まで様々であってよく、ｐＨは中心から高まで様々であってよく、時間は中心から高まで様々であってよいが、システイン濃度を低レベルで保持したとき、開発目標は達成される。高い製品品質につながる入力パラメータ範囲の推定を助長するために、モンテカルロシミュレーションを使用する計画空間推定器を実行した。このシミュレー

ションのために、ＣＥＸ活性については＞９３％およびＣＥ－ＳＤＳ純度については＞９０％の目標を設定した。モンテカルロシミュレーションにより、温度は３８．６℃～３９．７℃の間で様々であってもよいが、理想的には３９．１℃であるとき、これらの品質目標が達成されると予測された。インキュベーション時間は、４．０時間～６．０時間の間の様々であってもよいが、５．０時間が理想である。ｐＨについては、理想は８．２であり、８．１５～８．２５まで様々であってよい。最後の入力パラメータシステイン濃度については、予測される理想は２．４ｍＭであり、２．２ｍＭから２．５ｍＭまで様々であってもよい。これらの範囲内で、計画空間推定器により、製品品質出力パラメータＣＥＸによる活性についての予測ＤＰＭＯ（１００万回の操作当りの欠陥数）値は１１０となり、ＣＥ－ＳＤＳによる純度についてのＤＰＭＯ値は２０となることが判明した。これは、ＣＥＸによる活性についての目標限界である１００万のうち１１０回が達成されず、ＣＥ－ＳＤＳによる純度についての目標限界である１００万のうち２０回が達成されないことを意味する。

【０１６９】

コンタープロットの結果に従って、および前の開発研究（ＤｏＥ１およびＤｏＥ２）の結果を考慮に入れて、インキュベーション温度の目標を３７℃に設定した。インキュベーション時間目標を４時間（２４０分）に設定し、本実験の設定と同様に、製造規模の応用については考慮されることになる加熱および冷却時間を含まなかった。加熱および冷却時間と併せて、おおよそ６時間の全プロセス時間が適用されることになる。ｐＨのＣＥ－ＳＤＳによる純度に対する影響は検出できず、ＣＥＸによる活性に対する影響は小さい。それ故、目標を８．０に設定した。これは十分に試験範囲内であり、ＣＥＸによる活性についての開発目標を安全に達成することができ、ＣＥＸによる（塩基性条件によって増進される）酸性バリアント形成のリスクを減少させることになるからである。入力パラメータシステイン濃度の結果は、２．４ｍＭの低い最適レベルを示すが、２ｍＭシステインを用いる殆どの実験は、ＣＥＸによる活性が所望したものより低い結果となった。これは、標的試行の結果と併せて、システイン濃度の目標が、確認試行中、より高い、すなわち４ｍＭであるべきであることを示唆している。

【実施例７】

【０１７０】

プロセス比較および連続撹拌の分析

実施例７．１－プロセスＢ２とプロセスＣの比較

実施例６で説明した考慮事項は、選択的還元を今まで製造規模で行われていたもの（本明細書におけるプロセスＢ２）より高いタンパク質濃度および低いシステイン濃度（４～６ｍＭ）で好ましく行うことができることを示唆した。表２１は、以前のプロセスＢ２と提案プロセスＣについて入力パラメータを比較するものである。水浴に入れ、３７℃に加温したポリプロピレン製試験管の中で、５０ｍＬ規模で、比較試行を２回ずつ行った。結果を表２２に示す。

【０１７１】

【表２１】

	単位	プロセス B2	提案プロセス C
システイン濃度	[mM]	8.00	4.00
タンパク質濃度 1)	[mg/mL]	4.30	13.50
システインのタンパク質に対する近似的モル比	[M/M]	275.24	43.84
pH	[-]	8.00	8.00
インキュベーション時間	[h]	4.00	4.00
温度	[℃]	37.00	37.00

表 21:プロセス B2 と提案プロセス C の入力パラメータ。1)pH 調節およびシステイン添加前。アミノ酸配列に基づくセクキヌマブの相対分子量は 147,944Da であり、これを使用してシステインのタンパク質に対するモル比を計算する。

【０１７２】
【表２２】

試行	ステップ実行	単位	CEX による活性	CE-SDS による純度
REACT030	提案プロセス C	[%]	95.5	95
REACT031	提案プロセス C	[%]	95.0	95
REACT032	プロセス B2	[%]	96.7	79
REACT033	プロセス B2	[%]	97.0	79

表 22:プロセス B2 および提案プロセス C の出力パラメータ。

【０１７３】
表２２は、プロセスＣの改良システイン処理が、ＣＥ－ＳＤＳ純度の有意な増加とともにＣＥＸによる活性の非常にわずかな減少をもたらすことを示す。選択的還元ステップ中のタンパク質濃度増加およびシステイン濃度減少（すなわち、システインのタンパク質に対するより小さいモル比）によって、ＣＥ－ＳＤＳによるより高い純度値が得られる。これは、より低い還元力につながるにもかかわらず、この還元力は、セクキヌマブの適切活性を確保するのになお十分なものである。
【０１７４】
実施例７．２－インキュベーション中の連続撹拌についての試験
プロセスＢ２による臨床製造の間、３７℃でのインキュベーション段階中の不均一性を回避するために間欠混合（１時間につき２分）を適用した。インキュベーションを通して均一性を保証するために連続撹拌を使用することの実行可能性を２Ｌバイオリアクター（試行ＲＥＡＣＴ０２９）で試験した。この実験設定およびプロセス条件を表２３に示す。
【０１７５】

【表２３】

	単位	REACT029
システイン濃度	[mM]	4.00
タンパク質濃度 1)	[mg/mL]	13.50
システインのタンパク質に対する近似的モル比	[M/M]	43.84
インキュベーション中の攪拌機速度	[rpm]	200.00
充填容量	[L]	1.20
インキュベーション時間	[h]	4.00

表 23:反応中の連続撹拌を試験するための入力パラメータ。1)pH 調整およびシステイン添加前。アミノ酸配列に基づくセクキヌマブの相対分子量は 147,944Da であり、これを使用してシステインのタンパク質に対するモル比を計算する。

【０１７６】
ＲＥＡＣＴ０２９について、ＣＥ－ＳＤＳによる純度は９６％であり、ＣＥＸによる活性は９２．７％であった。この活性は、撹拌せずに小規模で行った試行ＲＥＡＣＴ０３０およびＲＥＡＣＴ０３１（提案プロセスＣ）によって示されたものより低いＣＥＸ活性である。したがって、連続混合に起因するシステイン処理溶液への酸素移動増加は、システインの還元力を抑制した。それにもかかわらず、システイン処理プールにおけるＣＥＸによる活性は品質目標に近かった。酸素移動および表面／容量比は製造規模への拡大に伴って減少するので、この実験を高い酸素移動に関する最悪ケースと考えた。それ故、プロセス溶液の均一性を確保するためにパイロット規模の試行（「プロセスＣ」）には連続混合を使用した。
【０１７７】
実施例５～７から引き出された要約および結論
本発明者らは、システイン処理中のタンパク質濃度を３倍増加でき、このことがプロセス容積を有意に減少させるということを断定した。本発明者らは、より低いシステイン濃度によって、システイン処理後に同様の製品活性およびＣＥ－ＳＤＳによる製品純度増加が得られるということも立証した。したがって、より低いシステイン：タンパク質比によって高品質の製品を確保することができる。
【０１７８】
データは、温度およびｐＨがシステイン処理ステップに対して小さい影響しか及ぼさないこと、ならびに高品質の製品を得るためにシステインの酸化型－シスチン－の添加が必要でないことも示す。インキュベーション時間は５時間で理想を示したが、本発明者らは、目標を４時間に設定し、本実験の設定と同様に、製造規模の応用中に考慮しなければならない加熱および冷却時間を含まなかった。能動的曝気を伴わない開放条件下での連続撹拌を選択的還元法で使用することは実行可能であるようであったが、本発明者らが後の実施例で示すように、溶液への酸素移動を（例えば、低／緩速撹拌を使用して）制限すべきである。
【実施例８】
【０１７９】
パイロット規模でのプロセス確認
プロセス向上後の提案精製条件を７Ｌパイロット規模でのプロセス確認によって試験して、第１の拡大を行い、プロセスの再現性および堅牢性に対する第一印象を得た。プロセスＣによる選択的還元ステップ（表２１）をパイロット規模実験（ＲＥＡＣＴ０３５）で使用した。連続撹拌を適用した。溶存酸素濃度をpO_2プローブによって測定した。
【０１８０】
確認試行１による選択的還元ステップ後のＲＥＡＣＴ０３５のＣＥＸによる活性化は、９０．４％に過ぎなかった。溶存酸素曲線（図８を参照されたい）の分析によって処理の最

初の３時間にｐＯ２の着実な減少があることが明らかになった。これは、撹拌によって誘発される溶液への酸素移動より速い酸素消費が溶液中で起こることを示す。本発明者らは、酸素消費がシステイン試薬（Ｃｙｓ－ＳＨ）のシスチンへまたはシステイン酸（Ｃｙｓ－ＳＯ３）への酸化に起因すると推測する。したがって、最後の反応時間における酸素レベルの増加は、システイン試薬が消費されてしまったこと、そして撹拌に起因する溶液による酸素取り込みが可視化することを示す。これは、システインの還元力がこの処理の最後の期間に有効でないことを含意し、このことによって、この試行から得られる活性減少が説明できよう。

【０１８１】

実施例８．１－確認試行１中のシステインステップの調査

第１のパイロット規模試行ＲＥＡＣＴ０３５においてＣＥＸによって判定された低い活性（９０．４％）の根本原因を調査するために、可能性のある影響因子を評価した。上で述べたように、低いシステイン濃度、反応中の長時間の撹拌による酸素の導入、および規模変化（反応容量増加）は、不十分な還元力をもたらしうる。それ故、インキュベーション中の撹拌機速度およびシステイン濃度を評価した。

【０１８２】

実験プラン、および出力パラメータＣＥＸによる活性を表２４に示す。この実験では、溶存酸素濃度をｐＯ２プローブによって測定した。

【０１８３】

【表２４】

試行	システイン濃度 [mM]	システインのタンパク質に対する近似的モル比 [M/M]	インキュベーション中の撹拌 [rpm]	CEX による活性 [%]
REACT035 [1)]	4	43.84	100	90.4
REACT038 [2)]	4	43.84	0 [3)]	92.5
REACT039 [2)]	4	43.84	50	93.7
REACT040 [2)]	6	65.75	50	91.9

表 24:システイン処理ステップに関する撹拌およびシステイン濃度の調査。1)7L 充填容量で 20L バイオリアクターにおいて行った確認試行 1。2)1.7L 充填容量で 2L バイオリアクターにおいて行った実験。3)1 時間ごとに 2 分間、50rpm で混合。アミノ酸配列に基づくセクキヌマブの相対分子量は 147,944Da であり、これを使用してシステインのタンパク質に対するモル比を計算する。

【０１８４】

３つのより小規模の反応（ＲＥＡＣＴ０３８、ＲＥＡＣＴ０３９およびＲＥＡＣＴ０４０）すべてが、確認試行１（ＲＥＡＣＴ０３５）と比較してＣＥＸによる活性の向上を示した（表２４）。しかし、ＣＥＸによる対応する活性は、システイン濃度を上昇させた実験（ＲＥＡＣＴ０４０）においても、インキュベーション時間中に連続混合しなかった実験（ＲＥＡＣＴ０３８）においても、ＲＥＡＣＴ０３９と比較して増加されなかった。それ故、システイン濃度もインキュベーション中の撹拌もこの時点では主要影響因子として特定することができなかった。それにもかかわらず、パイロット規模確認試行１（ＲＥＡＣＴ０３５）の溶存酸素（ｄＯ２）プロファイル（図８）は、おおよそ３時間のインキュベーション後にｄＯ２の増加を示した。これは、システインの還元力が消耗されたことを示す。連続撹拌を行わなかった２つのより小規模の実験ＲＥＡＣＴ０３９およびＲＥＡＣＴ０４０のｄＯ２チャートは、処理の最後に向かってｄＯ２の増加を示さず（データを示さない）、これは、システインの還元力がこれらのより小規模の実験では消耗されなかったことを示す。

【０１８５】
実施例８．２－確認試行２中のシステインステップの調査
充填容量は、確認試行１の場合のような７Ｌではなく１４Ｌであり、２台の撹拌機（底部で半径流撹拌機、加えて、上部で軸流撹拌機）を撹拌に使用した。システイン濃度（４ｍＭ）および撹拌機速度（１００ｒｐｍ）は、確認試行１、ＲＥＡＣＴ０３５と同じであった。選択的還元後、抗体溶液の活性は、ＣＥＸによって測定して８５．５％に過ぎなかった。図９に示すｄＯ２チャートによると、システインの還元力は、確認試行１中のより早期でさえ消耗された（図８）。これは、連続撹拌による溶液への酸素移動がこの試行でのほうが顕著であったことを示唆している。
【０１８６】
（図８～９）でのｄＯ２曲線の傾向は、連続撹拌によるヘッドスペース全体にわたっての酸素移動が、確認試行１および２中の選択的還元後のより低い活性の主な根本原因であることを示唆している。確認試行１での７Ｌ充填容量に関しては、１台だけの撹拌機（底部の半径流撹拌機）をシステイン処理ステップのプロセス溶液に沈めた。確認試行２での１４Ｌ充填容量に関しては、２台の撹拌機（底部に半径流撹拌機および上部に軸流撹拌機）をプロセス溶液に沈め、その結果、溶液への酸素移動がさらにいっそう増加した。それ故、確認試行２のよりいっそう不良な結果は、プロセス溶液への酸素移動上昇にほぼ確実に起因し、このことをｄＯ２曲線によって見ることができる（図９）。確認試行２についての溶液へのより高い酸素移動に起因して、システインの還元力はより早期に消耗され、その結果、ＣＥＸによる活性がより低くなる。それ故、プロセス中間体への酸素移動を、例えばインキュベーション中の混合（速度、継続期間および頻度）の調整によって、制限すべきである。
【０１８７】
実施例８．３－確認試行３中のシステインステップの調査
充填容量は、確認試行２の場合のような１４Ｌではなく１６Ｌであり、撹拌プロファイルを適応させた。システイン処理中に連続撹拌ではなく、以前のプロセスＢ２に対応する１時間に２分間の混合のみを適用した。選択的還元ステップ後にＣＥＸによって測定した抗体溶液の活性は、９２．５％であった。
【０１８８】
システイン処理ステップに連続混合を含めないことから酸素移動が制限され、その結果、十分な還元力が確保され、ＣＥＸによる活性が高くなった。図１０に示すｄＯ２チャートは、処理を始めた頃に酸素レベルの－ほぼゼロ％への－急激な減少を示す。この実験は、システイン処理中に導入された酸素量の調整によって適切な反応条件が確保され、そしてその結果としてＣＥＸによる高い活性が確保されることを立証する。
【０１８９】
実施例８．４－確認試行４中のシステインステップの調査
確認試行３の結果に基づいて、第４のパイロット規模確認試行（ＲＥＡＣＴ０４０）を、確認試行３のものと同一の設定およびプロセス条件で行った。しかし、確認試行４のプロセスが溶液へのより高い酸素移動を取り扱うことができるように、このプールにおけるシステイン処理を４ｍＭから６ｍＭに増加させた。この増加した還元力と起こりうる抗体過剰還元とのバランスをとらなければならない。それにもかかわらず、ＲＥＡＣＴ０４０の結果（表２４を参照されたい）に基づいて、この適応は、失敗のリスクが低い変更を表す。選択的還元ステップ後のＲＥＡＣＴ０４０のＣＥＸによる活性化は、９１．９％であった。
【０１９０】
図１１に、確認試行４のｄＯ２チャートを示す。確認試行３と同様に、ｄＯ２は、システイン添加後に減少し、低レベルのままであった。これは、この実験ではシステインの還元力が消耗されず、その上、ＣＥ－ＳＤＳによって判定される製品純度要求を満たすことを示す。
【０１９１】

図１２では、ＣＥＸによる活性およびＣＥ－ＳＤＳによる純度に関して確認試行３と確認試行４の反応動態を比較する。ＣＥＸによる活性の動態は、両方の実験で同等であり、おおよそ２時間後にプラトーに達し、その後、後続の２時間の処置における活性の増加は小さかった。ＣＥ－ＳＤＳによる純度の曲線は、反応の初期段階で、より高いシステイン濃度（６ｍＭ）での試行におけるほうが純度の降下が顕著である点で、わずかに異なった。しかし、両方の手順がシステイン処理終了時に同等の製品品質をもたらしたので、両方が適切な製品品質の確保に適している。それにもかかわらず、プロセス溶液中の酸素レベル上昇の効果を考えると、確認試行４に適用した、システイン濃度を増加させたプロセスのほうが、システイン処理中のプロセス溶液への酸素移動の変動に対してより堅牢であると予想される。最終的に、６ｍＭのシステイン濃度（１３．５ｍｇ抗体＝６５．７５：１のシステイン：抗体のモル比［すなわち、約６６：１］を有する）を、確認試行４の条件と同一の製造スケールでのシステイン処理ステップに選択した。本発明者らは、約２７５：１（システイン：タンパク質）のモル比で行った試行でのＣＥＸ活性について（１時間中にプラトーに達する）より速い動態にも注目した（データを示さない）。

【０１９２】

実施例８から引き出された要約および結論

本発明者らは、システイン処理ステップ中の酸素レベル上昇は、システインの還元力を抑制してセクキヌマブのＣ９７の不十分な還元をもたらすその酸素に起因する可能性が高い有害な作用をＣＥＸによる活性に及ぼしうると断定した。大気からのこの酸素取り込みは、生産規模で作業する場合、システイン／タンパク質比を変えること、被定義撹拌速度を使用すること、またはさらには撹拌中断を用いることによってうまく対処することができる。

【０１９３】

確認試行の結果に基づいて、システイン濃度を４ｍＭ（システインのタンパク質に対するモル比４３．８４）から、反応溶液中に存在する酸素を相殺すると予想される６ｍＭ（システインのタンパク質に対するモル比６５．７５）へと増加させた。さらに、選択的還元反応のインキュベーション段階中に存在する溶存酸素のレベルを低下させるために、連続混合をインキュベーション中、１時間につき２分の混合に置き換えた。選択的還元手順をプロセス確認中に変更するが、明らかな根本原因（選択的還元中に溶液に移動した酸素のレベル）を同定して、その調整したシステイン処理ステップによって原薬におけるＣＥＸによる適切な活性を確実なものにした。

【実施例９】

【０１９４】

選択的還元ステップの特性解析

選択的還元ステップに対する入力パラメータタンパク質濃度、システイン濃度および撹拌機速度の影響を統計学的計画で評価した。出力パラメータＣＥＸによる活性およびＣＥ－ＳＤＳによる純度を使用して、選択的還元ステップ後の製品品質を評価し、入力パラメータの立証された許容範囲を定義した。出力パラメータ範囲は、以前の計画プロセスに従って定義した。これらの制約を用いて、入力パラメータ範囲を定義した。

【０１９５】

加えて、３つの縮小モデル適格性確認試行の結果、および製造規模で行った７つの選択的還元サイクルの結果を使用して、還元力に関する最悪／最良ケース研究のために選択的還元後の製品品質を評価し、インキュベーション時間およびインキュベーション温度についての専用試行を評価した。

【０１９６】

実施例９．１－プロセス特性解析応答局面計画

実施例９．１．１－実験計画および方法

タンパク質含有量、システイン濃度、およびインキュベーション中の撹拌モード（撹拌なし、５０または１００ｒｐｍでの連続撹拌）を応答局面計画の入力パラメータとして選択した。表２５を参照されたい。

【０１９７】
【表２５】

名称	単位	低方レベル	中レベル	上方レベル
ALC によるタンパク質含有量	**[mg/mL]**	10	12.7	15.4
TITR3 添加による希釈係数 [1)]	**[-]**	15 (4.8 mM システイン、0.8 mM EDTA)	20 (6.0 M システイン)	25 (8 mM システイン; 1.3 mM EDTA)
インキュベーション中の撹拌機速度	**[rpm]**	0	50	100

表 25:入力パラメータ。1)選択的還元中の被定義システイン濃度に対応する。「ALCによる含有量」は、抗体の濃度を指す。

【０１９８】
「ＴＩＴＲ３添加による希釈係数」と表現する、様々なシステイン濃度を用いた。これは、プロセス条件および潜在的変動を反映し、潜在的変動は、例えば、計量の不正確さ、溶液添加の不正確さなどによって誘導される。抗体濃度はシステインのタンパク質に対する比に寄与するため、潜在的交互作用を検出するために抗体濃度も本研究の中で試験した。加えて、インキュベーション中の撹拌機速度を入力パラメータとして試験した。なぜなら、実施例８に示すようにヘッドスペースから溶液への酸素移動は選択的還元ステップに影響を及ぼすからである。
【０１９９】
３つの中心点試行を用いる中心複合面計画（Central Composite Face Design）を使用した。このタイプの計画は、線形項、交互作用項および２次の項を有する数理モデルの計算を支援する。製造規模試行Ｂ０１２３０７に由来するセクキヌマブ、ＩＮＡＫＴ．Ｆ（－６０℃未満で保存したもの）を使用した。プロセス特性解析に使用した緩衝液は、Ｔｉｔｒａｔｉｏｎ Ｂｕｆｆｅｒ ＡＩＮ４５７－ＴＩＴＲ１（１Ｍ Ｔｒｉｓ塩基、ｐＨ１０．８［ｐＨ範囲≧１０．０；導電率０．１０～０．３０ｍＳ／ｃｍ］）、Ｔｉｔｒａｔｉｏｎ ｂｕｆｆｅｒ ＡＩＮ４５７－ＴＩＴＲ２（０．３Ｍ ｏ－リン酸、ｐＨ１．４［ｐＨ範囲≦２．０；導電率範囲１９．５～２２．７ｍＳ／ｃｍ］）、Ｔｉｔｒａｔｉｏｎ ｂｕｆｆｅｒ ＡＩＮ４５７－ＴＩＴＲ３（１２０ｍＭシステイン－ＨＣＬ＋２０ｍＭ ＥＤＴＡ二ナトリウム、ｐＨ８．０［ｐＨ範囲７．８～８．２；導電率範囲１４．７～１８．３ｍＳ／ｃｍ］）であった。
【０２００】
適格な縮小モデル（実施例１０で詳細に説明する）を用いて、撹拌式バイオリアクター（最大容量２Ｌ）で、周囲雰囲気で、自由空気交換で、ｐＨ、溶存酸素、撹拌機速度および温度をモニターしながら、実験を行った。この実験計画プランを表２６に示す。個々の研究の一部でない入力パラメータはすべて、表２７に従ってそれぞれの目標値で一定に保った。
【０２０１】

【表２６】

試行	ALC によるタンパク質含有量	TITR3 添加による希釈係数	インキュベーション中の撹拌機速度	システイン	システインのタンパク質に対する近似的モル比
	[mg/mL]	[-]	[rpm]	[mM]	[M/M]
REACT069[1]	12.7	20	50	6.0	69.89
REACT070	12.7	20	0	6.0	69.89
REACT072	12.7	25	50	4.8	55.92
REACT073[1]	12.7	20	50	6.0	69.89
REACT075	12.7	20	100	6.0	69.89
REACT077	15.4	15	0	8.0	76.85
REACT079	15.4	20	50	6.0	57.64
REACT080	10.0	15	0	8.0	118.36
REACT082	15.4	25	0	8.0	76.85
REACT084	10.0	25	100	4.8	71.01
REACT085	15.4	25	100	4.8	46.11
REACT086	10.0	20	50	6.0	88.77
REACT087	12.7	15	50	8.0	93.19
REACT088[1]	12.7	20	50	6.0	69.89
REACT089	15.4	15	100	8.0	76.85
REACT090	10.0	25	0	4.8	71.01
REACT091	10.0	15	100	8.0	118.36

表 26:実験計画プラン。1)中心点。

【０２０２】

【表２７】

プロセスパラメータ	単位	目標
負荷時 pH	-	8
負荷時温度	℃	そのまま
pH 調整および TITR3 添加前のタンパク質濃度	mg/mL	13.5
インキュベーション温度	℃	37
冷却後の温度	℃	22
加熱および冷却中の撹拌機速度	rpm	50
インキュベーション中の撹拌機速度 1)	rpm	0
加熱時間	分	60
インキュベーション時間	分	REACT.PT300 については 240、および REACT.P については 300
冷却時間	分	60
REACT.P の pH	-	5.2
溶存酸素	%	そのまま
TITR3 での希釈比	-	1:20 (6 mM)

表 27:選択的還元ステップのプロセスパラメータ。1)1 時間ごとに 2 分間、50rpm の速度で撹拌。

【０２０３】

ＩＮＡＫＴ．Ｆをハンド温水浴（hand warm water bath）で解凍し、ＷＦＩで目標濃度に希釈した。ｐＨ調整後、ｄＯ２プローブと撹拌機とを装備した適格な２Ｌバイオリアクターに１Ｌの溶液を移入した。表２８に収載するシステイン目標濃度を達成するように算定した容量のシステインストック溶液（ＴＩＴＲ３緩衝液）を添加することによって、選択的還元を開始した。溶液を５０ｒｐｍの撹拌下で６０分以内に３７℃のインキュベーション温度に加熱した。次いで、実験計画プランに従って５０もしくは１００ｒｐｍで連続撹拌しながら、または撹拌せずに（０ｒｐｍ）、３００分間、３７℃で溶液をインキュベートした。３００分の反応時間（６０分加熱および２４０分インキュベーション）後、試料を抜き取った（ＲＥＡＣＴ．ＰＴ３００）。３７℃でのさらなる６０分のインキュベーション（６０分加熱および３００分インキュベーション）の後、溶液を５０ｒｐｍの撹拌機速度で６０分以内に周囲温度に冷却し、別の試料を抜き取った（ＲＥＡＣＴ．Ｐ、全反応時間４２０分）。この手順が２時点で計画（「ＲＥＡＣＴ．ＰＴ３００」および「ＲＥＡＣＴ．Ｐ」と呼ぶ）の評価およびインキュベーション時間の潜在的影響の評価を可能にする。

【０２０４】

実施例９．１．２－応答局面計画の出力パラメータ

試料ＲＥＡＣＴ．ＰＴ３００およびＲＥＡＣＴ．Ｐについての製品品質出力パラメータの値を表２８（ＲＥＡＣＴ．ＰＴ３００試料におけるＣＥＸ活性の昇順）および表２９（ＲＥＡＣＴ．Ｐ試料におけるＣＥＸ活性の昇順）に収載する。一般に、データは、ＣＥ－ＳＤＳによる純度がすべての試行において高かった（＞９０％）が、一部の試行がＣＥＸによるより低い活性（＜９０％）を有したことを示す。ＲＥＡＣＴ．ＰＴ３００試料におけるＣＥＸ活性（表２８）に関しては、低い活性（８９．４％）を有する試行が１つあった。この試行（ＲＥＡＣＴ０８５）において、システイン濃度は下限であり、抗体濃度は高

く（したがってシステイン対タンパク質のモル比は最低であり）、撹拌速度は最高（最高酸素移動速度）であった。また、撹拌を行わなかったすべての試行を含む、高い活性（９６％超）を有する８試行の１群があることが分かる。

【０２０５】

【表２８】

	ALC による抗体含有量	インキュベーション中の撹拌機速度	システイン濃度	システインのタンパク質に対する近似的モル比	React. PT300 CEX による活性	React.P CEX による活性	React.PT300 CE-SDS による純度	React.P CE-SDS による純度
試行	[mg/mL]	[rpm]	[mM]	[M/M]	[%]	[%]	[%]	[%]
REACT085	15.4	100	4.8	46.11	89.4	84.0	95	94
REACT091	10.0	100	8.0	118.36	92.4	91.3	93	94
REACT084	10.0	100	4.8	71.01	94.3	88.9	95	95
REACT072	12.7	50	4.8	55.92	94.5	90.2	96	95
REACT089	15.4	100	8.0	76.85	95.2	93.7	95	94
REACT069[1]	12.7	50	6.0	69.89	95.3	94.1	95	95
REACT075	12.7	100	6.0	69.89	95.7	88.9	95	95
REACT088[1]	12.7	50	6.0	69.89	95.7	95.1	95	95
REACT079	15.4	50	6.0	57.64	96.0	94.4	95	95
REACT073[1]	12.7	50	6.0	69.89	96.1	94.7	95	95
REACT082	15.4	0	8.0	76.85	96.1	96.2	95	96
REACT070	12.7	0	6.0	69.89	96.1	96.5	94	92
REACT087	12.7	50	8.0	93.19	96.5	96.0	94	94
REACT090	10.0	0	4.8	71.01	96.6	97.3	94	95
REACT086	10.0	50	6.0	88.77	96.7	95.4	94	94
REACT077	15.4	0	8.0	76.85	97.0	97.4	92	92
REACT080	10.0	0	8.0	118.36	97.8	97.5	90	91

表 28:REACT.PT300 試料についての CEX の昇順に並べ替えた入力パラメータおよび品質出力パラメータ値
REACT.PT300 および REACT.P。1)中心点。

【０２０６】

表２９に示すように、ＲＥＡＣＴ．Ｐ試料におけるＣＥＸ活性に関しては、より低い活性（＜９４％）をもたらす６試行の１群があった。この群は、高い撹拌機速度を有するすべての試行を含む。注目に値することとして、撹拌を伴わないすべての試行は、最高ＣＥＸ活性（９６％超）をもたらした。ＣＥＸ活性がＲＥＡＣＴ．Ｐ試料において１００ｒｐｍ

で行った試行で（ＲＥＡＣＴ．ＰＴ３００試料におけるＣＥＸ活性と比較して）低下し、および５０ｒｐｍで行った試行で（然程顕著でないが）低下したことも、表２９から分かる。これらの試行での最高の低下は、システインのモル比が下端であったときに見られる（例えば、モル比が約４６：１であったＲＥＡＣＴ０８５における８９．４から８４．０％への低下、ならびにＲＥＡＣＴ０７５、ＲＥＡＣＴ０８４およびＲＥＡＣＴ０７２における同様の低下）。

【０２０７】

【表２９】

	ALC による抗体含有量	インキュベーション中の撹拌機速度	システイン濃度	システインのタンパク質に対する近似的モル比	React. PT300 CEX による活性	React.P CEX による活性	React.PT300 CE-SDS による純度	React.P CE-SDS による純度
試行	[mg/mL]	[rpm]	[mM]	[M/M]	[%]	[%]	[%]	[%]
REACT085	15.4	100	4.8	46.11	89.4	84.0	95	94
REACT075	12.7	100	6.0	69.89	95.7	88.9	95	95
REACT084	10.0	100	4.8	71.01	94.3	88.9	95	95
REACT072	12.7	50	4.8	55.92	94.5	90.2	96	95
REACT091	10.0	100	8.0	118.36	92.4	91.3	93	94
REACT089	15.4	100	8.0	76.85	95.2	93.7	95	94
REACT069[1]	12.7	50	6.0	69.89	95.3	94.1	95	95
REACT079	15.4	50	6.0	57.64	96.0	94.4	95	95
REACT073[1]	12.7	50	6.0	69.89	96.1	94.7	95	95
REACT088[1]	12.7	50	6.0	69.89	95.7	95.1	95	95
REACT086	10.0	50	6.0	88.77	96.7	95.4	94	94
REACT087	12.7	50	8.0	93.19	96.5	96.0	94	94
REACT082	15.4	0	8.0	76.85	96.1	96.2	95	96
REACT070	12.7	0	6.0	69.89	96.1	96.5	94	92
REACT090	10.0	0	4.8	71.01	96.6	97.3	94	95
REACT077	15.4	0	8.0	76.85	97.0	97.4	92	92
REACT080	10.0	0	8.0	118.36	97.8	97.5	90	91

表 29:REACT.P 試料についての CEX の昇順に並べ替えた入力パラメータおよび品質出力パラメータ値 REACT.PT300 および REACT.P。1)中心点。

【０２０８】

この統計的診断（表３０）は、両方の時点のＣＥ－ＳＤＳによる純度についてのおよび選

択的還元終了時のＲＥＡＣＴ．ＰのＣＥＸによる活性についての統計的に有意なモデルを示す。ＲＥＡＣＴ．ＰＴ３００のＣＥＸによる活性についてのモデルは、より低い統計的有意性（０．１５のＱ２）を示す。

【０２０９】

【表３０】

出力	R^2	Q^2	モデル有効性	反復実験の SD
REACT.PT300				
CEX による活性	0.75	0.15	0.4	0.4
CE-SDS による純度	0.98	0.89	-0.2	0.0
REACT.P				
CEX による活性	0.92	0.75	0.48	0.5
CE-SDS による純度	0.87	0.59	-0.2	0.0

表 30:REACT.PT300 および REACT.P の製品品質出力パラメータについてのモデル診断。データと十分一致しているモデルは、1.0 に近い R^2 および Q^2、ならびに 0.25 より上のモデル有効性を有することになる。統計的有意性が低いモデルは、低い R^2 および Q^2 値を有する。

【０２１０】

実施例９．１．２．１－時点１（ＲＥＡＣＴ．ＰＴ３００）での製品品質出力パラメータのモデリング評価

時点ＲＥＡＣＴ．ＰＴ３００でのＣＥＸ活性についての係数プロットおよびコンタープロットは、入力パラメータインキュベーション中の撹拌機速度（ｓｔｉｒ）がＣＥＸによる活性に影響を及ぼすことを明示する（データを示さない）。パラメータタンパク質濃度（ｃｏｎｔＡ）およびシステイン濃度（ｄｉｌ－ｃ）は、調査範囲内でＣＥＸによる活性に対する統計的に有意な影響を示さない。ＣＥＸによる高い活性を達成するために、インキュベーション中の撹拌機速度は低くあるべきである。

【０２１１】

表２９に示すように、時点ＲＥＡＣＴ．ＰＴ３００でのすべての実験は、ＣＥ－ＳＤＳによる少なくとも９０％の純度を有した。係数プロット（データを示さない）は、３つの入力パラメータすべてがＣＥ－ＳＤＳによる純度に影響を及ぼすことを明示する。ＡＬＣによる含有量（ｃｏｎｔＡ）および撹拌機速度（ｓｔｉｒ）についての２次の項もある。ＴＩＴＲ３添加による希釈係数（システイン濃度を表すｄｉｌ－ｃ）と撹拌機速度の交互作用項があり、ＴＩＴＲ３添加による希釈係数とＡＬＣによる含有量の交互作用項もある。このコンタープロット（データを示さない）において可視化したときのモデル係数は、高い撹拌機速度、ＴＩＴＲ３添加による高い希釈係数（それぞれ、低いシステイン濃度）、およびＡＬＣによる中～高含有量が、ＣＥ－ＳＤＳによる純度に良い影響を与えることを示す。これらの設定すべてが、システインの還元力を低下させ、抗体完全性に良い影響を与える。それにもかかわらず、すべての試行はＣＥ－ＳＤＳによる高い純度を有するので、調査した全入力パラメータ範囲が、選択的還元後のＣＥ－ＳＤＳによる適切な純度の確保に適している。

【０２１２】

実施例９．１．２．２－時点２（ＲＥＡＣＴ．Ｐ）での製品品質出力パラメータのモデリング

時点ＲＥＡＣＴ．ＰでのＣＥＸ活性についての図１３Ａの係数プロットおよび図１３Ｂのコンタープロットは、特に入力パラメータ撹拌機速度（ｓｔｉｒ）がＣＥＸによる活性に対して影響を及ぼすことを確認するものである。したがって、ＣＥＸによる高い活性を達成するために、インキュベーション中に行う撹拌を最小限にして、溶液への酸素移動を制限すべきである。また、ＴＩＴＲ３添加による低い希釈係数（ｄｉｌ－ｃ、それぞれ高い

システイン濃度）は、選択的還元後のＣＥＸによる活性に有益である。加えて、撹拌機速度とＴＩＴＲ３添加による希釈の交互作用は、ＣＥＸによる活性に対して－小さいが－有意な影響を及ぼすが、ＡＬＣによる含有量とＴＩＴＲ３添加による希釈係数の交互作用は不明確である。ＡＬＣによる含有量に対する影響は有意でない。これらの結果は、還元力を増加させる条件、例えば、最小撹拌速度による限られた酸素移動、およびより低い希釈によるより高いシステイン濃度が、ＣＥＸによるより高い活性をもたらすことを明確に示す。

【０２１３】

表２９に示すように、時点ＲＥＡＣＴ．Ｐでのすべての実験は、ＣＥ－ＳＤＳによる少なくとも９０％の純度を有した。ＣＥ－ＳＤＳ純度についての係数プロットおよびコンタープロット（データを示さない）は、入力パラメータＡＬＣによる含有量（タンパク質濃度を表す）、ＴＩＴＲ３添加による希釈係数（システイン濃度を表す、ｄｉｌ－ｃ）、および撹拌機速度（酸素移動を表す、ｓｔｉｒ）が、ＣＥ－ＳＤＳによる純度に対して小さい影響しか与えないことを明示する。撹拌機速度は二次効果を示し、ＴＩＴＲ３による希釈係数と撹拌機速度の交互作用は、統計的に有意である。ＣＥ－ＳＤＳによる純度は、中～高撹拌機速度およびＴＩＴＲ３添加による高い希釈係数によって向上する。これらの設定は、システインの還元力を低下させ、抗体完全性に良い影響を与える。それにもかかわらず、すべての試行はＣＥ－ＳＤＳによる純度の指定範囲を満たすので、調査した全入力パラメータ範囲が、選択的還元ステップ後のＣＥ－ＳＤＳによる適切な純度の確保に適している。

【０２１４】

実施例９．１．２．１－溶存酸素レベルと出力パラメータの関係

表２６に示す反応の酸素プロファイルを分析して、入力パラメータ撹拌速度、抗体含有量およびシステイン濃度の酸素レベルに対する影響を判定した。これらの酸素プロファイルのグラフを図１４に提供する（注記：ｘ軸の０～１．００は、撹拌がすべての試行において５０ｒｐｍであった１時間加熱段階に対応し、１．００～６．００は、撹拌が０ｒｐｍ［すなわち、撹拌なし］、５０または１００ｒｐｍいずれかであった５時間インキュベーション段階に対応し、６．００～７．００は、撹拌がすべての試行において５０ｒｐｍであった１時間冷却段階に対応する。すべての試行は、溶存酸素の初期段階での低レベルへの減少を示す。注目に値することとして、この減少は、低い抗体含有量を有する試行では然程顕著ではなく（０ｒｐｍシリーズの試行ＲＥＡＣＴ０９０およびＲＥＡＣＴ０８０（図１４Ａ）、５０ｒｐｍシリーズのＲＥＡＣＴ０８６（図１４Ｂ）ならびに１００ｒｐｍシリーズのＲＥＡＣＴ０８４およびＲＥＡＣＴ０９１（図１４Ｃ）を参照されたい）、高い抗体含有量を有する試行で最も顕著であった（図１４の１５．４ｍｇ／ｍＬでの試行のグラフのプロファイルを参照されたい）。

【０２１５】

インキュベーション中に撹拌のないすべての試行（図１４Ａ）において、ｄＯ$_2$レベルは、インキュベーション段階中も冷却段階中も約２０％未満のままであった。また、ＲＥＡＣＴ０８６を除いて、インキュベーション中に５０ｒｐｍ撹拌を使用した試行（図１４Ｂ）では、５０ｒｐｍ撹拌によって可能になったインキュベーション段階での酸素移動にもかかわらず、インキュベーション段階中も冷却段階中もｄＯ$_2$レベルは約２０％未満にとどまった。しかし、システイン濃度が低かった（４．８ｍＭ）、試行ＲＥＡＣＴ０７２では、最終冷却段階で酸素レベルのわずかな増加を見ることができる。インキュベーション中に１００ｒｐｍ撹拌を用いる試行（図１４Ｃ）は、非常に異なるプロファイルを示した。第一に、上で述べたように、低い抗体含有量（１０ｍｇ／ｍＬ）を有する試行（ＲＥＡＣＴ０８４およびＲＥＡＣＴ０９１）は、より遅いｄＯ$_2$減少を示し、インキュベーション段階の間その減少が継続した。しかし、システイン濃度が低かった（４．８ｍＭ）、試行ＲＥＡＣＴ０８４では、インキュベーションの最後の時間である時間５．００および６．００中にｄＯ$_2$レベルがほぼ飽和レベルまで増加した。そのような増加が試行ＲＥＡＣＴ０８５ではより早い時点（時間４．００）でも観察された。ＲＥＡＣＴ０８５はまた、

高抗体含有量（１５．４ｍｇ／ｍＬ）だが低レベルのシステインを使用した。ｄＯ２レベルの増加は、試行ＲＥＡＣＴ０７５では冷却段階（時間６．００～７．００）中にも観察された。試行ＲＥＡＣＴ０７５でのシステイン濃度は中レベル（６．０ｍＭ）であった。

【０２１６】

これらのプロファイルは、酸素が反応混合物においてその混合物からヘッドスペースに移動するより速い速度で消費されること、およびより高い抗体濃度を有する試行では酸素消費がより速いことを示す。そしてまたこれは、抗体自体がｄＯ２消費を誘発しうることを示唆する。低いシステインレベルを有する試行での選択的還元のより後の段階における酸素の増加は、酸素消費がシステイン（Ｃｙｓ－ＳＨ）との反応に、高い確実性で次のように、関連づけられることを示す：４Ｃｙｓ－ＳＨ＋Ｏ２→２Ｃｙｓ－ＳＳ－Ｃｙｓ＋２Ｈ２Ｏ および／または２Ｃｙ－ＳＨ＋３Ｏ２→２Ｃｙｓ－ＳＯ３Ｈ。実際、速度は、試行ＲＥＡＣＴ０８５ではおおよそ４時間後、および試行ＲＥＡＣＴ０８４では５時間後にすべてのシステインを消費するほど速かった（図１４Ｃ）。システインの消費後には、ｄＯ２レベルが飽和レベル（１００％Ｏ２）に回復した。

【０２１７】

酸素消費に対する抗体の影響を研究するために、本発明者らは、６ｍＭシステインおよび５０ｒｐｍの撹拌機速度を使用して５０ｍＬ規模で２つのさらなる試行を行った。一方の試行では、抗体濃度は１２．７ｍｇ／ｍｌ（システイン：抗体のモル比＝６９．８９：１、すなわち約７０：１）であり、他方の試行では、抗体濃度はゼロであった。図１４Ｄに示すように、抗体なしの試行では、最初の１時間のうちにｄＯ２のおよそ７５％への減少があり、この時間の間に反応温度は２０℃から３７℃に上昇された。ｄＯ２のこの７５％減少は、報告されている２０℃での８．９ｍｇ／Ｌから３７℃での６．６ｍｇ／ＬへのｄＯ２飽和濃度減少（U.S. Geological Survey TWRI Book 9, April, 98）とよく適合する。ｄＯ２レベルは、インキュベーション段階の残りの時間の間、一定のままである。冷却段階が（６時間後に）始まると、３７℃から２０℃への温度の低下に起因してｄＯ２レベルの増加がある。したがって、抗体不在下では、溶液における酸素消費はなく、システインによる酸素の消費が緩速で起こり、したがって、撹拌に起因するヘッドスペースからの酸素移動が直ちにその消費を代償する。対照的に、抗体がある試行では、最大でおおよそ５．５時間までｄＯ２レベルの着実な減少がある。インキュベーション段階の最後の０．５時間に、ｄＯ２レベルのわずかな増加があり、その後、冷却層中（すなわち、時間６～７）にｄＯ２レベルのより強い増加がある。したがって、この抗体含有試行では、すべてではないがほぼ確実に、５．５時間後にはシステインが消費された。実際、この試行のアミノ酸分析（データを示さない）は、システインのほぼ完全な消費に対応する、シスチンレベルの上昇を示した。

【０２１８】

この情報を用いて、一部の試行において認められたＣＥＸによる低い活性をｄＯ２プロファイルと相関させることが可能である。試行ＲＥＡＣＴ０８５（図１４Ｃ）（システイン：抗体のモル比約４６：１）は、システインが４．００時点後には消費されて、抗体の完全還元に至ったので、ＲＥＡＣＴ．ＰＴ３００（５．００時間時点からの試料）でＣＥＸによる８９．４％活性を有した（表２８を参照されたい）。より遅い時点ＲＥＡＣＴ．Ｐ（終点７．００時間からの試料）でのＲＥＡＣＴ０８５（図１４Ｃ）は、システイン不在下での反応の最終段階における高い酸素レベルが抗体の酸化的分解ともたらしたので、ＣＥＸによるよりいっそう低い活性（８４．０％、図２９を参照されたい）を有した。試行ＲＥＡＣＴ０８４（図１４Ｃ）（システイン：抗体のモル比約７１：１）およびＲＥＡＣＴ０７５（図１４Ｃ）（システイン：抗体のモル比約７１：１）は、より遅い時点ＲＥＡＣＴ．Ｐで相対的に低い活性を有する２つの別の試行であったが、活性は、より早いＲＥＡＣＴ．ＰＴ３００時点では高かった。これらの試行では、抗体の還元は、時点５．００時間（ＲＥＡＣＴ．ＰＴ３００時点）で完了するようであったが、増加したｄＯ２レベルおよびシステイン不在のため、より遅い時点ＲＥＡＣＴ．Ｐまでに分解が起こった。同様に、試行ＲＥＡＣＴ０７２についてより遅い時点ＲＥＡＣＴ．Ｐで認められる相対的に低

い活性（９０．２％）（システイン：抗体のモル比約５６：１）は、反応の冷却段階中の酸素レベルの増加によって説明される。０ｒｐｍでの試行で（抗体含有量が高く、システイン濃度が低い［システイン：抗体のモル比約４６：１］、試行ＲＥＡＣＴ０８２でも）得られる高い活性は、酸素移動速度が低く、したがってシステイン消費がほんのわずかであり、その結果、還元のより遅い冷却段階中の酸化的分解に対する完全還元（およびまた保護）が保証されるため、起こった。

【０２１９】

要するに、酸素が還元剤（システイン）を消費し、その消費が抗体自体によって媒介される（または加速される）ので、還元システム内での酸素移動を少なく保つべきである。したがって、このシステイン消費には二重の影響がある：１）システインの還元力の低下は、より早い時点ＲＥＡＣＴ．ＰＴ３００でのＣｙｓＬ９７－ＳＨの不完全な脱遮断につながり、２）脱遮断されたＣｙｓ９７ＬをＲＥＡＣＴ．Ｐ３００～ＲＥＡＣＴ．Ｐの時間の間、保護するのに利用できる残留システインがない場合には、脱遮断されたＣｙｓ９７Ｌ－ＳＨの再酸化が起こりうる。

【０２２０】

実施例９．２－プロセス特性解析：最悪／最良ケースのシナリオ

最悪／最良ケースの研究の主な目的は、実験計画（ＤＯＥ）研究中に試験しなかったが、プロセスリスク分析において重要である可能性があると評価された、選択的還元ステップの入力因子の特性解析であった。このデータは、立証された許容範囲を定義することおよび入力パラメータの製品特性に対するそれらの影響に基づく分類を支援することにも使用した。

【０２２１】

実施例９．２．１－実験計画および方法

加熱時間増加を有意である可能性があると評価した。加熱時間増加は、長時間の撹拌継続時間のため選択的還元溶液への酸素移動を増加させ、その結果、システインのシスチンへの変換によって、およびしたがって抗体のより少ない選択的還元によって、還元力が低下されることになりうるからである。同じ理由で、初期dO_2レベルの向上を有意である可能性のある入力パラメータとして評価した。

【０２２２】

システインのスルフヒドリル基の酸化は、ｐＨ依存性である。それ故、ｐＨの影響を有意である可能性がある入力パラメータとして評価した。

【０２２３】

高い還元力は、抗体の過剰還元をもたらすことがあり、長時間の冷却時間は、抗体再構築を促進することもあった。したがって、長時間の冷却時間も、有意である可能性がある入力パラメータとして評価した。

【０２２４】

温度は、前のプロセス開発中に既に試験した（３２～４２℃）が、有意である可能性があると評価した。典型的に、化学反応速度は、より低い温度で減少する。したがって、専用試行において上限と下限の動態を決定した。

【０２２５】

インキュベーション時間も調査した。少ないインキュベーション時間は、選択的還元プール中の過剰還元製品のより高いレベルをもたらすことがあった。逆に言うと、長時間のインキュベーション時間は、応答局面計画結果で示されるように、ＣＥＸによるより低い活性につながることもあった（表２９を参照されたく、ＲＥＡＣＴ．ＰＴ３００およびＲＥＡＣＴ．Ｐ試料のＣＥＸ活性を比較されたい）。

【０２２６】

３つの最悪／最良ケースシーケンスを定義して、上で説明したパラメータの選択的還元ステップに対する影響を評価した。最悪／最良ケースシーケンスでの還元力を評価するための入力パラメータを表３０に示す。第２の最悪／最良ケースシーケンスを作成して、選択的還元ステップに対する温度の影響を評価した（表３１）。インキュベーション時間の影

響を表３２に収載する入力パラメータに従って第３の最悪／最良ケーススタディで評価した。これらの最悪／最良ケーススタディの結果を評価するために使用した製品品質出力パラメータは、ＣＥＸによる活性およびＣＥ－ＳＤＳによる純度である。

【０２２７】

【表３１】

名称	単位	下限	上限
撹拌を含む加熱時間	[分]	45	90
撹拌を含む冷却時間	[分]	45	90
開始時の溶存酸素	[%]	60	100
プロセス pH	[-]	7.8	8.2

表 30:還元力の影響を評価するための入力パラメータ。

【０２２８】

【表３２】

名称	単位	下限 1	下限 2 [1)]	上限
インキュベーション温度	[℃]	18	32	42

表 31:インキュベーション温度の影響を評価するための入力パラメータ。1)18℃での選択的還元の反応速度は十分でなく、その結果、不十分な再活性化となったので、32℃を試験した。

【０２２９】

【表３３】

名称	単位	下限	上限
インキュベーション時間	[分]	210	330

表 32:インキュベーション時間の影響を評価するための入力パラメータ。

【０２３０】

専用試行を行って、重要である可能性のあるさらなるパラメータの影響を評価した。製造規模試行Ｂ００８５３０に由来するセクキヌマブ、ＩＮＡＫＴ．Ｆ（－６０℃未満で保存したもの）を使用した。緩衝液ＡＩＮ４５７－ＴＩＴＲ１、ＡＩＮ４５７－ＴＩＴＲ２およびＡＩＮ４５７－ＴＩＴＲ３は、実施例１０において説明する通りである。実験は、開放型撹拌式バイオリアクター（最大２Ｌ容積）の適格な縮小モデル（実施例１０において詳細に説明する）を用いて、ｐＨ、溶存酸素、撹拌機速度および温度をモニターしながら行った。すべての試行に、表２７からのプロセスパラメータを適用した。個々の研究の一部でない入力パラメータはすべて、標準シーケンスの操作範囲内の表２７中の目標値で一定に保った。

【０２３１】

実施例９．２．２－最悪／最良シナリオの結果

加熱時間、冷却時間、開始時dO_2およびプロセスｐＨの影響を調査するための実験計画プランおよび出力パラメータ（ＣＥ－ＳＤＳによる純度およびＣＥＸによる活性）を表３３に示す。インキュベーション温度の影響を調査するための実験計画プランおよび出力パラメータ（ＣＥ－ＳＤＳによる純度およびＣＥＸによる活性）を表３４に示す。インキュベーション時間を調査するための実験計画プランおよび出力パラメータ（ＣＥ－ＳＤＳに

よる純度およびＣＥＸによる活性）を表３５に示す。

【０２３２】

表３３に示すように、高い還元力を有する二重反復試行はもちろん、低い還元力を有する二重反復試行も、ＣＥＸによる高い活性、およびＣＥ－ＳＤＳによる高い純度を生じさせた。したがって、このプロセスは、試験範囲内の入力パラメータ加熱時間および冷却時間（撹拌を含む）、開始時ｄＯ２レベル、およびプロセスｐＨの変動を対象にすることができる。

【０２３３】

【表３４】

試行	加熱時間 [分]	冷却時間 [分]	開始時の溶存酸素 [%]	プロセス pH [-]	CEX による活性 [%]	CE-SDS による純度 [%]
REACT076 1)	90	90	100	7.8	96.4	94
REACT078 2)	45	45	60	8.2	97.4	93
REACT098 1)	90	90	100	7.8	95.8	95
REACT100 2)	45	45	60	8.2	94.1	94

表 33:加熱時間、冷却時間、開始時 dO_2 およびプロセス pH の影響を調査するための実験計画プランおよび出力パラメータ。1)より低い pH、より高い dO_2 開始レベルならびにより長い加熱および冷却時間のため、二重反復試行がより低い還元力で進む。2)より高い pH、より低い dO_2 開始レベルならびにより短い加熱および冷却時間のため、より高い還元力を有する二重反復試行。

【０２３４】

インキュベーション温度の影響を評価するための実験の結果を、表３４に示す。ＣＥ－ＳＤＳによる純度は常に高いが、ＣＥＸよる高い活性が３２℃以上の試行でのみ得られたことが分かる。

【０２３５】

【表３５】

試行	インキュベーション温度 [℃]	CEX による活性 [%]	CE-SDS による純度 [%]
REACT093	42	94.9	94
REACT095	42	95.2	94
REACT107	32	95.9	95
REACT109	32	97.3	95
REACT092	18	91.2	93
REACT099	18	90.4	95
REACT106 1)	37	95.6	96

表 34:インキュベーション温度の影響を調査するための実験設計プランおよび出力パラメータ。1)追加の中心点試行。

加えて、ＣＥＸによる活性の動態を異なるインキュベーション温度で判定した。これらの結果を図１５に示す。４２℃での動態が３２℃より速いことが、特に、より後（６０分以上）の段階で分かる。しかし、両方の温度で、２４０分およびＲＥＡＣＴ．Ｐにおいて同じプラトーに達する。１８℃で、反応速度はより遅く、その結果、試験したステップ継続時間内でＣＥＸによる活性の増加がより低くなる。

【０２３６】

インキュベーション時間の影響を評価するための実験の結果を、表３５に示す。すべてのケースで高い活性および純度が得られた。

【０２３７】

【表３６】

試行	インキュベーション時間 [分]	CEX による活性 [%]	CE-SDS による純度 [%]
REACT081[1)]	210	96.7	95
REACT083[2)]	330	96.3	95
REACT094[1)]	210	95.2	93
REACT096[2)]	330	96.2	94

表 35:インキュベーション時間の影響を調査するための実験設計プランおよび出力パラメータ。1)短いインキュベーション時間。2)長いインキュベーション時間。

【０２３８】

実施例９．３－プロセスパラメータの分類および正当化

実施例９．３．１－応答局面計画研究：許容範囲

ＣＥ－ＳＤＳによる純度は、すべての実験において、時点１（ＲＥＡＣＴ．ＰＴ３００）および選択的還元終了時（ＲＥＡＣＴ．Ｐ）に少なくとも９０％であった。ＣＥ－ＳＤＳによる高レベルの純度を達成するために、入力パラメータＴＩＴＲ３添加による希釈係数を高く設定すべきであり、撹拌機速度を中心から高速に設定すべきである。これらの条件は、より低いシステイン濃度およびヘッドスペース全体にわたっての酸素移動増加に起因して、低い還元力に対応する。入力パラメータＡＬＣによる含有量、すなわち抗体濃度には、選択的還元ステップ中の時間点１（ＲＥＡＣＴ．ＰＴ３００）において有意な影響力があり、理想は中心点付近である。ＣＥ－ＳＤＳによる純度の絶対値に対する抗体濃度（ＡＬＣによる含有量）の影響は、調査した範囲内では小さい。それにもかかわらず、すべての実験で指定純度値を満たし、パラメータＡＬＣによる含有量（抗体濃度）、ＴＩＴＲ３添加による希釈係数（システイン濃度）および撹拌機速度（酸素移動）について調査した全範囲が、選択的還元後のＣＥ－ＳＤＳによる適切な純度の確保に適している。

【０２３９】

ＣＥＸによる活性は、時点１（ＲＥＡＣＴ．ＰＴ３００）にＲＥＡＣＴ０８５を除くすべてについて少なくとも９０％であった（表２８を参照されたい）。この実験は、より高い酸素移動を表す、その高レベルの撹拌機速度で行った。期待に反して、さらなる２つの実験（ＲＥＡＣＴ０７５およびＲＥＡＣＴ０８４、表２９を参照されたい）が９３％未満のＣＥＸによる活性を示したので、より長いインキュベーション時間（すなわち、さらなる６０分、時点ＲＥＡＣＴ．Ｐ）は、出力パラメータＣＥＸによる活性に対して特に有益ではなかった。これらの実験は、低いシステイン濃度、およびヘッドスペース全体にわたっての酸素移動増加を表す、高い撹拌機速度、またはＴＩＴＲ３添加による高レベルの希釈係数のどちらかを有する。これらの結果は、ＣＥＸによる最高活性を達成するために、入力パラメータ撹拌機速度を低レベルに設定すべきであり（低い酸素移動を含意する）、ＴＩＴＲ３添加による希釈係数を中心点または低レベルに設定すべきである（より高いシステイン濃度を含意する）ことを示唆している。抗体濃度を表す、入力パラメータＡＬＣによる含有量は、これらの実験におけるＣＥＸによる活性に有意な影響を与えなかった。

【０２４０】

ヘッドスペースから溶液への酸素移動を媒介する入力パラメータ撹拌機速度は、選択的還元ステップに重要であり、ＣＥＸによる適切な活性を確保するために撹拌速度をそのより低いレベルに設定すべきである。さらなる製造規模試行（Ｂ０１８８３８、データを示さない）に従って１時間につき最大１５分の撹拌を試験し、その結果、選択的還元ステップ後に許容可能な製品品質を得た。しかし、実施例８の結果は、撹拌による酸素移動が規模

および設定各々に特有であり、間接的に制御されることを明示する。したがって、例えば、プロセス変更または拡大の場合、インキュベーション中の撹拌条件を評価すべきである。反応溶液へのｄＯ２移動レベルを間接的に表す、インキュベーション中の撹拌を、プロセスの視点から有意な入力パラメータとして分類する。

【０２４１】

入力パラメータＡＬＣによる含有量、すなわち抗体濃度、およびＴＩＴＲ３添加による希釈係数、すなわちシステイン濃度は、統計的に有意な効果を示すが、十分に制御され、選択的還元ステップに与える影響が小さい。したがって、それらをプロセスの観点から重要でないものとして分類する。インキュベーション中の混合時間が許容範囲内である限り、調査したシステイン濃度および抗体濃度範囲内の変動は、選択的還元ステップ後に適切なプロセス性能および製品品質をもたらすであろう。これらの入力パラメータの立証された許容範囲を伴うリストを表３６に示す。

【０２４２】

【表３７】

名称	単位	下限	上限
インキュベーション中の混合時間	[分/h]	0	15[1)]
ALC による含有量	[mg/mL]	10	15.4
TITR3 添加による希釈係数	[-]	15 (8 mM システイン、1.3 mM EDTA)	25 (4.8 mM システイン、0.8 mM EDTA)

表 36:インキュベーション中の撹拌機速度、ALC による含有量および TITR3 添加による希釈係数(システイン濃度)についての許容範囲。1)インキュベーション時間 4 時間で、製造規模での特性解析試行、バッチ B018838、SITE A によるもの。

【０２４３】

実施例９．３．２－最悪／最良ケーススタディ：許容範囲

入力パラメータ加熱時間および冷却時間（撹拌を含む）、開始時ｄＯ２レベルおよびプロセスｐＨには、表３７に示した調査範囲内の製品品質特性ＣＥＸによる活性およびＣＥ－ＳＤＳによる純度に関して有意な影響力がない。しかし、応答局面計画の経験のために、選択的還元溶液への過度に高い酸素移動は、還元力を低下させるので、避けるべきである。酸素移動は、規模および設定各々に特異的であるが、好気プロセスでは、他のプロセス条件、例えば、撹拌、ヘッドスペースへの気流量によって間接的に制御される。したがって、酸素移動に影響を与える加熱および冷却中の撹拌は、特に、例えばプロセス変更、プロセス移動または拡大の場合、慎重に評価しなければならない。したがって、加熱および冷却時間（撹拌を含む）をプロセスの観点から有意なパラメータとして分類する。加熱および冷却時間（撹拌を含む）について４５～９０分の範囲を試験したが、許容範囲を≦９０分に設定した。これは、９０分の加熱および冷却時間（撹拌を含む）は、ＣＥＸによる適切な活性およびＣＥ－ＳＤＳによる適切な純度をもたらす酸素移動に関する最悪ケースを反映しているためである。

【０２４４】

【表３８】

名称	単位	下限	上限
撹拌を含む加熱時間	[分]	45	90
撹拌を含む冷却時間	[分]	45	90
開始時の溶存酸素	[%]	60	100
プロセス pH	[-]	7.8	8.2

表 37:加熱時間、冷却時間、開始時溶存酸素およびプロセス pH の試験範囲。

【０２４５】
入力パラメータインキュベーション温度を調査する実験の結果は、１８℃のインキュベーション温度が遅い反応動態をもたらし、その結果、不十分な再活性化となることを明示する。この低い温度は、２４０分のインキュベーション時間内にＣＥＸによる活性を９３．０％より高いレベルに増加させるのに十分でなかった。それ故、製品品質特性ＣＥ－ＳＤＳによる純度を１８～４２℃のインキュベーション温度範囲内で達成することはできるが、選択的還元ステップ後にＣＥＸによる適切な活性を確保するために１８～４２℃の試験範囲を３２～４２℃に狭めた。したがって、インキュベーション温度の許容範囲は、下限３２℃および上限４２℃である。
【０２４６】
最後に、２１０～３３０分インキュベーション時間の試験範囲によって、選択的還元ステップ後のＣＥＸによる適切な活性およびＣＥ－ＳＤＳによる適切な純度は確保される。
【０２４７】
実施例９から引き出された要約および結論
プロセス特性解析研究の結果に基づいて、調査したプロセス入力パラメータの許容範囲を定義した。選択的還元ステップを２つの製品品質出力パラメータＣＥ－ＳＤＳによる純度およびＣＥＸによる活性によって特性解析する。パラメータ分類および許容範囲を表３８に要約する。ＰＡＲのシステイン：抗体比は、約４６：１～約１１８：１である。ＳＯＲのシステイン：抗体比は、約５４：１～約８３：１である。
【０２４８】

【表３９】

入力パラメータ	単位	推奨操作範囲(SOR)	立証された許容範囲(PAR)
ALC による含有量 [1)]	[mg/mL]	12.0- 15.0	10.0 - 15.4
TITR3 添加による希釈係数(システイン濃度) [5)]	[-]	1:18 - 1:22 (5.5 - 6.7 mM システイン、1.1 -0.9 mM EDTA)	1:15 - 1:25 (4.8 - 8.0 mM システイン、1.3 - 0.8 mM EDTA)
開始時の溶存酸素	[%]	≧80	≧60
撹拌を含む加熱時間	[分]	≦75	≦90
インキュベーション中の混合時間	[分/時]	0 - 5	0 - 15 [4)]
インキュベーション時間	[分]	240 - 300	210 - 330
撹拌を含む冷却時間	[分]	≦75	≦90
プロセス pH [2)]	[pH]	7.9 - 8.1	7.8 - 8.2
プロセス温度 [3)]	[℃]	35 - 39	32 - 42

表 38:分類を含む選択的還元ステップの入力パラメータ。1)WFI での希釈後、pH 調節および TITR3 添加前、2)加熱前。3)インキュベーション中。4)インキュベーション時間 4 時間で、製造規模での特性解析試行、バッチ B018838 によるもの。5)WFI の添加および TITR1 での pH 調整後の中間体容量に関する。

【０２４９】

選択的還元ステップの開始時、酸素は、システインの還元力を弱めるが、溶液への酸素の連続移動の結果、酸素レベルは上昇し、ＣＥＸによる抗体活性は低くなる。しかし、選択的還元ステップの終了時、酸素の導入は、還元力が高い反応開始時に解離した抗体のジスルフィド結合の形成を増進させることができるだろう。したがって、酸素は、非還元ＣＥ－ＳＤＳによる適切な純度を確保するのに重要である。抗体活性にとっての酸素移動の重要性は、酸素移動、したがってＣＥＸによる製品活性、に対する撹拌機速度の有意な影響が観察された、応答局面計画研究の結果によって立証される（表２８および２９を参照されたい）。しかし、撹拌機速度は、容器のサイズ、撹拌機のサイズ、撹拌機のタイプなどに依存してdO_2レベルに異なる影響を与える。したがって、溶液に移動した酸素を物理的設定間で比較するために使用することができる変数を特定することは重要である。

【実施例１０】

【０２５０】

縮小モデルの酸素移動速度（k_La^*）

前の実施例において、本発明者らは、とりわけ、選択的還元中、特に、インキュベーションステップ中に存在するdO_2の量が、セクキヌマブの量および活性に強い影響を与えることを示した。選択的還元を好気条件下で行う場合、反応における酸素レベルを直接制御せず、他の操作条件、例えば、撹拌速度、およびヘッドスペースへの気流量によって制御する。各反応の物理的設定も反応混合物中に存在する酸素レベルに影響を与える（装置および操作条件が一緒に「システム」を形成する）。「k_La^*」は、溶液中に移動する酸素を、物理的設定間で、特定の抗体処理ステップ中に比較するために使用することができる（例えば、Garcia-Ochoa and Gomez (2009) Biotechnology Advances 27:153-176、Bandino et al.(2001) Biochem.Engineering J. 8:111-119、Juarez and Orejas (2001) Latin Am. Appl.Res.31:433-439、Yange and Wang (1992) Biotechnol.Prog.8:244-61を参照されたい）。k_La^*は、スパージングなしでヘッドスペースによって経時的に溶液中に移動する酸素の量を表す。この値は、各設定および規模に特異的であり、撹拌機タイプ、撹拌機速度、充填容量、およびヘッドスペースと接触している溶液の表面積（これは各容器の個々の幾何形状による影響を受ける）に依存する。各物理

的設定のｋＬａ＊は異なるが、選択的還元ステップ中の溶液中の酸素レベルはセクキヌマブの活性および完全性に有意な影響を与えるので、本発明者らは、選択的還元ステップは、同様のｋＬａ＊範囲を示すシステムで行うと、同様の品質を有するセクキヌマブの調製物をもたらすことになると予想する。

【０２５１】

ｋＬａ＊を酸素移動実験で直接決定することはできない。その代わり、試験溶液中のｄＯ２を窒素によって置換し、較正ｄＯ２プローブを使用して経時的なｄＯ２の増加をモニターし、それによって実験ｄＯ２曲線を作成することができる。その後、この実験ｄＯ２曲線を下に示す方程式に従って（例えば、Ｍａｔｈｃａｄ（登録商標）を使用して）飽和曲線に当てはめることによって、ｋＬａ＊値を特定のシステムについて計算する：

【０２５２】

【化２】

$$DO = C \times (1 - e^{-kLa^* \times (t - t0)})$$

（式中、ＤＯ＝溶存酸素の測定値、Ｃは酸素の飽和値（無限に撹拌し飽和に達したとき１００％を意味する）であり、ｅ＝２．７１８２８１・・・、ｔ＝ＤＯ値に対応する時点、およびｔ０＝開始時点）。

この方程式は、溶液への酸素移動（ｋＬａ＊値）の決定のために確立された積分形の実験式を表す。この式は、様々な実験で異なる著者によって確認された（Doran, P. M. 1995.Bioprocess Engineering Principles, Academic Press, San Diego, California, chapter 9.10.2, p. 210-213）。

【０２５３】

実施例１０．１－実験および統計学的計画方法

溶存酸素レベルはレドックス反応にとって重要な影響因子であるため、縮小モデルの適格性確認のために、および製造規模との比較のために酸素移動を評価した。

【０２５４】

統計学的計画を使用して、容量、ヘッドスペースへの気流量、撹拌機速度および撹拌機タイプの入力パラメータとｋＬａ＊の依存性を判定した。入力パラメータを表３９に収載する。各々が統計学的計画プランに従う３レベルで因子を調査した。出力パラメータは、ｋＬａ＊値である。

【０２５５】

【表４０】

名称	略語	単位	下限	上限
容量	Vol	[L]	0.7	1.7
気流量(ヘッドスペース)	Air	[L/分]	0	0.5
撹拌機速度	Stir	[rpm]	50	200

表 39-縮小モードの k_La^* 値決定のための入力パラメータ。

【０２５６】

各試料のｋＬａ＊値を決定するために、２Ｌバイオリアクターに水を充填し、３７℃に加熱した。気流量を質量流量計によって制御し、ヘッドスペースに適用した。その後、溶液を窒素ガスでスパージして水からｄＯ２を除去した。次いで、ラシュトンタービン（半径流式）を使用して定常撹拌を適用した。酸素プローブ（室温、約１８～２５℃で較正したもの）を使用して、ｄＯ２が９０％に達するまで、水中のｄＯ２のレベルを経時的に記録した。その後、上で説明したように実験ｄＯ２曲線を飽和曲線に当てはめることによってｋＬａ＊値を計算した。

【０２５７】

３つの中心点試行を用いる面心中心複合計画（ＣＣＦ）を使用した。最も重要なプロセス

パラメータ間の相関関係、およびk_La^*に対するそれらの影響を判定するために、この計画を選択した。このタイプの計画は、線形項、交互作用項および２次の項を有する数理モデルの計算を支援する。

【０２５８】

実施例１０．３－出力パラメータ（k_La^*）値

実験条件およびプロセス性能出力パラメータk_La^*の値を表４０に収載する。

【０２５９】

【表４１】

試行	気流量	容量	撹拌機速度	測定 k_La^*
[-]	[L/分]	[L]	[rpm]	[1/h]
1	0.50	0.7	50	0.83
2	0.10	0.7	200	0.70
3	0.50	0.7	200	3.58
4	0.10	0.7	50	0.41
5	0.25	0.7	125	1.97
6	0.25	1.2	125	0.97
7	0.25	1.2	125	0.86
8	0.25	1.2	125	0.98
9	0.25	1.2	200	1.36
10	0.25	1.2	125	0.77
11	0.50	1.2	125	1.07
12	0.25	1.2	125	1.05
13	0.10	1.2	125	0.73
14	0.25	1.2	50	0.54
15	0.25	1.2	125	0.86
16	0.50	1.7	200	0.73
17	0.50	1.7	50	0.22
18	0.00	1.7	200	0.48
19	0.25	1.7	125	0.62
20	0.00	1.7	50	0.24

表 40-統計学的計画-実行したシーケンスおよび実験条件。

【０２６０】

実施例１０．４－出力パラメータk_La^*の統計的診断

モデルの品質を４つのツール、すなわち、R^2、Q^2、モデル有効性および反復の標準偏差（ＳＤ）によって表す。データをよく説明するモデルは、１．０に近いR^2およびQ^2、ならびに０．２５より上のモデル有効性を有することになる。モデル分析では、k_La^*結果の評価は、変換しなければ、残差が正規分布の要件を満たさないモデルに至ることが確認された。これは、バイオリアクターに関する一般的k_La^*測定に見られることがあるk_La^*値の変換が適切な方法で結果を記述するために必要であることを示す。プロセス性能出力パラメータについてのモデル診断は、R^2＝０．９８、Q^2＝０．９１（－０．５の累乗による変換に従って）、モデル有効性＝０．５６、および反復の標準偏差＝０．０６であり、これは、統計的有意性が高いモデルを示す。

【０２６１】

実施例１０．５－数理モデルの説明

残差のＮプロットでは、標準化残差（標準偏差で割った応答の残差）を横軸にプロットし

、正規確立を縦軸にプロットする。異常値は、±４標準化残差から外れているとき、グラフで特定することができる。また、非線形プロットは、出力パラメータ変換を必要とするモデルを示すことができる（“Design of Experiments - Principles and Applications,”(1999-2008) MKS Umetrics AB, ed. Eriksson et al.）。プロセス出力パラメータｋＬａ＊についての残差のＮプロット（データを示さない）は、実験結果とモデルの良好な適合性を示す。値は回帰直線にうまく当てはまり、これは、そのモデル変換が適切である（標準化残差が正規分布の要件を満たす）ことを意味する。加えて、すべての実験値は、±３標準化残差の範囲内であり、これは、測定値がいかなる異常値も含まないことを示す。

【０２６２】

プロセス出力パラメータの係数プロット（データを示さない）は、入力パラメータである気流量、容量および撹拌機速度がプロセスパラメータｋＬａ＊に有意な影響を与えることを示す。コンタープロット（データを示さない）は、気流量、容量および撹拌機速度のｋＬａ＊に対する影響を図示するものである－気流量が多いほど、容量が小さいほど（すなわち、ヘッドスペースが大きいほど）、および撹拌速度が高いほど、ｋＬａ＊として表されるヘッドスペース全体にわたっての酸素移動は多い。

【０２６３】

コンタープロットおよび係数プロットを使用して、実験条件の対応するｋＬａ＊値を統計モデルの使用によりＭＯＤＤＥ　８．０２で予測した。結果を表４１に示す。これは、縮小モデルを使用してプロセス特性解析（実施例９を参照されたい）中に試験したｋＬａ＊範囲を実証するものである。

【０２６４】

【表４２】

	気流量 [L/分]	容量 [L]	撹拌機速度 [rpm]	予測 k_La^* [1/h]
低い撹拌機速度	0	1.2	0	0.18
中心点	0	1.2	50	0.27
高い撹拌機速度	0	1.2	100	0.37
最悪/最良ケース実験	0	1.0	50	0.28

表 41-パラメータ設定、およびプロセス特性解析研究中に使用した対応する k_La^* 値。

【実施例１１】

【０２６５】

製造規模での酸素移動速度（ｋＬａ＊）

製造規模（１８００Ｌ容器）での定常撹拌（すなわち、選択的還元プロセスの加熱および冷却段階中に使用した撹拌のタイプ）中のｋＬａ＊を決定した。

【０２６６】

実施例１１．１－ＳＩＴＥ　Ａでの製造規模でのｋＬａ＊値の決定

実施例１１．１．１－実験および統計学的計画方法

統計学的計画を使用して、試験入力パラメータ範囲内のｋＬａ＊の依存性を判定した。入力パラメータを下の表４２に収載する。各々が統計学的計画プランに従う３レベルで因子を調査する。出力パラメータは、ｋＬａ＊値である。

【０２６７】

【表４３】

名称	略語	単位	下限	上限
容量	Vol	[L]	400	800
撹拌機速度	Stir	[rpm]	100	300
温度	Temp	[℃]	16	48

表 42:製造規模 SITE A での k_La^*値決定のための入力パラメータ。

【０２６８】
ＳＩＴＥ　Ａでのこれらの実験は、最大作業容量１８００Ｌ、高さ２．７ｍ、直径１．０ｍを有するステンレス鋼容器で行った。各試料のｋＬａ＊値を決定するために、容器に水を充填し、指示温度に加熱した。その後、窒素ガスをヘッドスペースに適用して水からｄＯ２を除去した。次いで、定常撹拌を（底部からプロペラ撹拌機を使用して）適用した。酸素プローブ（室温、例えば１８～２５℃で較正したもの）を使用して、ｄＯ２が９０％に達するまで、水中のｄＯ２のレベルを経時的に記録した。その後、上で説明したように実験ｄＯ２曲線を飽和曲線に当てはめることによってｋＬａ＊値を計算した。入力パラメータおよび対応する結果を表４３に示す。
【０２６９】
４つの中心点を用いる面心中心複合（ＣＣＦ）計画を使用した。最も重要な入力パラメータ間の相関関係、および酸素移動に対するそれらの影響を判定するために、この計画を選択した。このタイプの計画は、線形項、交互作用項および２次の項を有する数理モデルの計算を支援する。
【０２７０】
実施例１１．１．２－出力パラメータ（ｋＬａ＊）値
実験条件およびプロセス性能出力パラメータｋＬａ＊の値を表４３に収載する。
【０２７１】

【表４４】

試行 [-]	容量 [L]	撹拌機速度 [rpm]	温度 [℃]	測定 k_La^* [1/h]
1	602	99	33	0.20
2	410	99	16	0.47
3	605	200	33	0.29
4	596	201	16	0.22
5	419	300	49	1.69
6	804	100	49	0.12
7	388	201	32	1.01
8	808	300	16	0.22
9	637	201	33	0.27
10	803	201	33	0.20
11	600	300	33	0.37
12	808	100	16	0.09
13	400	300	16	1.24
14	815	300	49	0.39
15	612	201	49	0.29
16	616	201	33	0.30
17	608	200	33	0.23
18	396	100	49	0.97

表 43:統計学的計画-実行したシーケンスおよび実験条件。

【０２７２】

実施例１１．１．３－出力パラメータｋＬａ＊の統計的診断

モデルの品質を４つのツール、すなわち、Ｒ２、Ｑ２、モデル有効性および反復の標準偏差（ＳＤ）によって表す。データをよく説明するモデルは、１．０に近いＲ２およびＱ２、ならびに０．２５より上のモデル有効性を有することになる。統計的有意性が低いモデルは、低いＲ２およびＱ２値を有する。ｋＬａ＊結果の評価は、変換しなければ、残差が正規分布の要件を満たさないモデルに至ることが確認された。これは、適切な方法で結果を記述するためにｋＬａ＊の変換が必要であることを示す。堅牢なモデルを得るために、出力パラメータを－０．５の累乗によって変換した。プロセス性能のモデル診断は、Ｒ２＝０．９５、Ｑ２＝０．８８、モデル有効性＝０．８２、ＳＤ＝０．１５であった。これは、統計的有意性が高いモデルを示す。

【０２７３】

実施例１１．１．４－数理モデルの説明

プロセス出力パラメータｋＬａ＊値についての残差のＮプロット（データを示さない）は、実験結果とモデルの良好な適合性を示す。値は回帰直線にうまく当てはまり、これは、そのモデル変換が適切である（標準化残差が正規分布の要件を満たす）ことを意味する。加えて、すべての実験値は、±３標準化残差の範囲内であり、これは、測定値が異常値を含まないことを示す。

【０２７４】

係数プロット（データを示さない）は、エラーバーがｘ軸を切らないので、すべての入力パラメータ、すなわち、撹拌速度、容量および温度、がプロセスパラメータｋＬａ＊値に

有意な影響を与えることを示す。加えて、撹拌機速度と容量の交互作用は有意である。ｋＬａ＊値のコンタープロット（データを示さない）は、温度、容量および撹拌機速度のｋＬａ＊に対する影響を図示するものであり、すなわち、温度が高いほど、容量が小さいほど、および撹拌機速度が高いほど、ｋＬａ＊として表されるヘッドスペース全体にわたっての酸素移動は多い。

【０２７５】

実施例１１．１．５－製造規模での専用試行の結果

ｋＬａ＊値を専用実験で決定し、ＭＯＤＤＥ　８．０２によって算出するモデルの予測と比較した。予測および専用試行の結果を表４４に示す。これらの結果によると、この数理モデルは、適切な方法でｋＬａ＊値を予測することができた。

【０２７６】

【表４５】

バッチ [-]	容量 [L]	撹拌機速度 [rpm]	温度 [℃]	k_La^* [1/h]
モデル予測	606	200	38	0.32
専用試行の結果	606	200	38	0.25

表 44:製造規模(SITE A)での標準プロセス条件の(予測および測定)k_La^*値。

【０２７７】

実施例１１．１．６－ＳＩＴＥ　Ａでのプロセス条件についての予測ｋＬａ＊

ＳＩＴＥ　Ａでのキャンペーン ＡＴ４９３０２１中に使用したプロセス条件についてのｋＬａ＊をＭＯＤＤＥ　８．０２によって算出するモデルで予想した。結果を表４５に示す。定常撹拌を適用するときの予測ｋＬａ＊値は０．０５ｈ－１～０．６９ｈ－１である。これらの値は、このプロセスステップが、異なるプロセス容量に起因する広いｋＬａ＊値範囲にわたって堅牢であることを示す。ｋＬａ＊（およびしたがって酸素移動）に影響を与えるパラメータをプロセス頑強性の最終評価に考慮すべきである。例えば、全撹拌時間が酸素移動に有意な影響を与える。

【０２７８】

【表４６】

バッチ [-]	サイクル [-]	容量 [L]	撹拌機速度 [rpm]	温度 [℃]	予測 k_La^* [h^{-1}]
B010231	1	443	200	37	0.69
B010231	2	466	200	37	0.60
B010655	1	542	200	37	0.41
B010655	2	569	200	37	0.37
B010655	3	557	200	37	0.39
B012307	1	1348[1)]	200	37	0.05
B013981	1	1142[1)]	200	37	0.08

表 45:製造規模(SITE A)でのプロセス条件の k_La^*値。1)容量が評価範囲を超える。外挿は不正確な値に至ることがある。

【実施例１２】

【０２７９】

縮小モデルの適格性確認試行およびＳｉｔｅ　Ａでの製造規模との比較

実施例１２．１－方法

標準条件下で行った縮小モデル適格性確認試行（ＲＥＡＣＴ０６５、ＲＥＡＣＴ０６６およびＲＥＡＣＴ０６７）を製造規模での７つの代表試行と比較した。縮小モデル適格性確認試行のために、製造規模試行Ｂ００８５３０（キャンペーンＡＴ４９３０２１、ＳＩＴＥ　Ａ）に由来するＩＮＡＫＴ．Ｆ（－６０℃未満で保存されたもの）であるセクキヌマブを使用した。負荷量（ＩＮＡＫＴ．Ｆ）を使用前にハンド温水浴（１５～３５℃）で解凍した。全選択的還元手順のステップを表４６に示す。

【０２８０】

【表４７】

ステップ	緩衝液	目標 pH	コメント
濃度調整	WFI	該当なし	タンパク質濃度を 12.0 - 15.0 (13.5) mg/mL に調整 *
溶存酸素(DO)レベルの確認および調整	該当なし	該当なし	DO > 80%、pH 調整 1 を開始
pH 調整 1	AIN457-TITR1 (1 M Tris)	7.9 - 8.1	おおよそ 5%の容量増加
撹拌しながらシステイン含有溶液添加	AIN457-TITR3 (120 mM システイン HCl、20 mM Na-EDTA、pH 8.0±0.2)	該当なし	DO > 80%、システイン処理を開始;撹拌下でシステイン溶液添加**
撹拌しながら反応温度に加熱する時間	該当なし	該当なし	最大 1 時間(75 分)、撹拌しながら室温(18-25℃)から 37℃に加熱。撹拌機速度
インキュベーション	該当なし	該当なし	インキュベーション時間: 1 時間につき 2 分の撹拌で 250 分
反応後に撹拌しながら室温に冷却する時間	該当なし	該当なし	最大 1 時間(75 分)、撹拌しながら 37℃から室温(18-25℃)に冷却
pH 調整 2	AIN457-TITR2 (0.3 M H_3PO_4)	5.1 - 5.3	おおよそ 15%の容量増加

表 46:選択的還元手順の説明。*WFI の添加についての計算:Vol(WFI)=(Vol(INAKT.F)×c(INACT.F)/ 13.5mg/mL)-Vol(INAKT.F);**TITR3 の添加についての計算:Vol(TITR3)=(Vol(INAKT.F)+Vol(WFI)+Vol(TITR1))×係数(TITR3)(式中、係数(TITR3)=0.05/0.95=0.05263(再活性化溶液中の 6mM システイン)。

【０２８１】

表４７に収載するプロセスパラメータを縮小モデル適格性確認試行に適用した。これらのパラメータは、製造規模（ＳＩＴＥ　Ａ）でのプロセス条件に対応するものであり、適切に縮小したものである。

【０２８２】

【表４８】

プロセスパラメータ	単位	目標	操作範囲
負荷時 pH	-	8.0	7.9 - 8.1
負荷時温度	℃	そのまま	18 - 25
pH 調整および TITR3 添加前のタンパク質濃度	mg/mL	13.5	12 - 15
インキュベーション温度	℃	37	35 - 39
冷却後の温度	℃	22	18 - 25
加熱および冷却中の撹拌機速度	rpm	50	40 - 60
インキュベーション中の撹拌機速度[1]	rpm	0	該当せず
加熱時間	分	60	≦60
インキュベーション時間	分	250	240 - 300
冷却時間	分	60	≦60
REACT.P の pH	-	5.2	5.1 - 5.3
溶存酸素	%	そのまま	> 80
TITR3 での希釈比	-	1:20 (6 mM システイン)	1:20 (6 mM システイン)

表 47-選択的還元ステップのプロセスパラメータ。[1]1 時間ごとに 2 分間の 50rpm での撹拌。

【０２８３】
試料を抜き取り、５分以内にｐＨを０．３Ｍリン酸でｐＨ１．４（ＡＩＮ４５７－ＴＩＴＲ２）から５．２（許容範囲５．０～５．４）に調整し、次いで試料を分析実験室に移動させた。すべての保持試料を解凍し、≦－６０℃で保存した。前に説明した通りの製品品質特性ＣＥＸによる活性およびＣＥ－ＳＤＳによる純度の比較によって、縮小モデルの適格性確認を評価した。次の時間間隔を試験した：０、１０、２０、３０、４５、６０、１２０、２４０分。

【０２８４】
実施例１２．２－結果
３つの代表製造規模試行からの溶存酸素チャート（データを示さない）および縮小モデル適格性確認試行からの溶存酸素チャート（図１６）は、選択的還元ステップの特徴的形状を示す。これらの曲線は、溶存酸素がシステインの酸化によってシステムから除去されることを示す。開発経験によると、長時間の撹拌は、より高度な酸素移動をもたらし、ＣＥＸによる不十分な活性につながる。それ故、選択的還元溶液をインキュベーション中に１時間につき２～１５分間しか撹拌しないことによって、溶液への酸素移動を制限し、選択的還元を停止させるまで溶存酸素レベルを低く保つ。冷却段階中、酸素レベルは、連続混合による溶液への酸素移動に起因してわずかに増加し、それと同時にある一定の量のシステインが酸化され、その結果、そのシステインを溶存酸素の還元剤として利用できなくなる。

【０２８５】
ＳＩＴＥ　Ａでのキャンペーン ＡＴ４９３０２１の製造規模試行３～６については、ＣＥＸによる活性は、標準偏差０．８％で平均９６．３％であった一方で、ＣＥ－ＳＤＳによる純度は、標準偏差１％で平均９２％であった。各試行の結果を、表４５から得た予測 k_La^* 値とともに、表４８に示す。

【０２８６】

【表４９】

試行	CEX による活性 [%]	CE-SDS による純度 [%]	予測 k_La* [1/h]
B010231; サイクル番号 1	94.5	92	0.69
B010231; サイクル番号 2	96.7	93	0.60
B010655; サイクル番号 1	96.3	90	0.41
B010655; サイクル番号 2	96.4	90	0.37
B010655; サイクル番号 3	96.3	93	0.39
B012307; サイクル番号 1	96.8	92	0.05
B013981; サイクル番号 1	96.9	93	0.08
標準偏差	0.8	1	
平均±3×標準偏差	96.3±2.5	92±4	

表 48:製造規模試行の実験結果。

【０２８７】

縮小モデル適格性確認試行については、ＣＥＸによる活性は、標準偏差１．６％で平均値９５．０％であった一方で、ＣＥ－ＳＤＳによる純度は、標準偏差１％で平均９４％であった（表４９）。

【０２８８】

【表５０】

試行	CEX による活性 [%]	CE-SDS による純度 [%]
適格性確認試行番号 1; REACT065	95.9	93.0
適格性確認試行番号 2; REACT066	96.0	94.0
適格性確認試行番号 3; REACT067	93.1	95.0
標準偏差	1.6	1.0
平均±3×標準偏差	95.0±4.9	94±3

表 49:縮小モデル適格性確認試行の実験結果。

【０２８９】

選択的還元ステップ終了時の製品品質の評価に加えて、ＣＥＸによる活性についての動態もモニターし、縮小モデル試行の結果（ＲＥＡＣＴ０６５、６６および６７の平均）とＳＩＴＥ　Ａでの製造規模の結果を比較した。結果を図１７に示す。縮小モデルから得たデータは、製造規模の変動の範囲内であり、これは、大規模（Ｓｉｔｅ　Ａ）での動態と小規模での動態が同等であることを実証する。

【実施例１３】

【０２９０】

実施例９～１２からのｋＬａ＊値の複合解析

選択的還元反応中の溶液中の溶存酸素レベルの重要性のため、ヘッドスペースから容器への制御された酸素移動は、選択的還元ステップにとって重要である。各システムについて、これらの変数をｋＬａ＊値として捕捉することができる。ｋＬａ＊は、撹拌機速度、撹拌機タイプ、充填容量、温度、およびヘッドスペースと接触している溶液の表面積（これは、各容器の個々の幾何形状による影響を受ける）に依存する。ｋＬａ＊は各設定に依存して変化することになるが、上記実験から、ｋＬａ＊値の範囲は、選択的還元プロセス中のセクキヌマブの品質および活性を保証するために許容されうることが分かる。

【０２９１】

縮小研究の実験条件についての予測ｋＬａ＊範囲０．１８ｈ－１～０．３７ｈ－１は、統計モデルの使用により決定した（表４１）。ｋＬａ＊値は、固定容量を前提として、撹拌速度が低下するにつれて減少した。実施例９における応答局面計画実験条件および設定は実施例１０における縮小モデルに関して使用したものと同じであるため、表４１の予測ｋＬａ＊値を表２８中の条件および結果と相関させることができる。この解析を表５０に提示する。

【０２９２】

【表５１】

試行	タンパク質 (mg/ml)	システイン (mM)	システインのタンパク質に対する近似的モル比(M/M)	kLa* (h^{-1})	回転 (RPM)	CEX による活性 (%) REACT.PT300 (240 分インキュベーション)	CE-SDS による純度(%) REACT.PT300 (240 分インキュベーション)	CEX による活性(%) REACT.P (300 分インキュベーション)	CE-SDS による純度(%) REACT.P (300 分インキュベーション)
REACT082	15.4	4.8	46.11	0.18	0	96.1	95	96.2	96
REACT070	12.7	6.0	69.89	0.18	0	96.1	94	96.5	92
REACT090	10.0	4.8	71.01	0.18	0	96.6	94	97.3	95
REACT077	15.4	8.0	76.85	0.18	0	97.0	92	97.4	92
REACT080	10.0	8.0	118.36	0.18	0	97.8	90	97.5	91
REACT072	12.7	4.8	55.92	0.27	50	94.5	96	90.2	95
REACT079	15.4	6.0	57.64	0.27	50	96.0	95	94.4	95
REACT069	12.7	6.0	69.89	0.27	50	95.3	95	94.1	95
REACT073	12.7	6.0	69.89	0.27	50	96.1	95	94.7	95
REACT088	12.7	6.0	69.89	0.27	50	95.7	95	95.1	95
REACT086	10.0	6.0	88.77	0.27	50	96.7	94	95.4	94
REACT087	12.7	8.0	93.19	0.27	50	96.5	94	96.0	94
REACT085	15.4	4.8	46.11	0.37	100	89.4	95	84.0	94
REACT075	12.7	6.0	69.89	0.37	100	95.7	95	88.9	95
REACT084	10.0	4.8	71.01	0.37	100	94.3	95	88.9	95
REACT089	15.4	8.0	76.85	0.37	100	95.2	95	93.7	94
REACT091	10.0	8.0	118.36	0.37	100	92.4	93	91.3	94

表 50-出力パラメータ値 REACT.PT300 および REACT.P についての kla*解析。モル比を小数点第 1 位で四捨五入して整数にする。アミノ酸配列に基づくセクキヌマブの相対分子量は 147,944 ダルトンであり、これを使用して第 4 列のシステインのタンパク質に対するモル比を計算する。

【０２９３】

２４０分インキュベーション期間（ＲＥＡＣＴ．ＰＴ３００）を有する実験については、

ＲＥＡＣＴ０８５を除くすべての反応が、ＣＥＸおよびＣＥ－ＳＤＳによって測定して適切な製品品質を伴う非常に高い選択的還元性能をもたらした（表５０）。ＲＥＡＣＴ０８５は、１００ｒｐｍの撹拌速度、インキュベーション中の０．３７ｈ$^{-1}$のｋ$_{L}$ａ＊、およびシステインの抗体に対する非常に低いモル比（約４６：１）を有した。容器への多い酸素移動（高いｋ$_{L}$ａ＊値によって表される）と併せて、システインの抗体に対する低いモル比は、不十分な再活性化をもたらす可能性が高かった。

【０２９４】

３００分インキュベーション期間（ＲＥＡＣＴ．Ｐ）を有する実験については、ＲＥＡＣＴ０８５、ＲＥＡＣＴ０７５およびＲＥＡＣＴ０８４を除くすべての反応が、ＣＥＸおよびＣＥ－ＳＤＳによって測定して適切な製品品質を伴う非常に高い選択的還元性能をもたらした（表５０）。ＲＥＡＣＴ０８５、ＲＥＡＣＴ０７５およびＴＲＡＣＴ０８４は、１００ｒｐｍの撹拌速度、インキュベーション中の０．３７ｈ$^{-1}$のｋ$_{L}$ａ＊、およびシステインの抗体に対する低い～中等度のモル比（約４６：１および約７１：１）を有した。容器への多い酸素移動（高いｋ$_{L}$ａ＊値によって表される）と併せて、システインの抗体に対する低い～中等度のモル比は、不十分な再活性化をもたらす可能性が高かった。インキュベーション時間の（ＲＥＡＣＴ．ＰＴ３００試料に対する）増加は、一部のＲＥＡＣＴ．Ｐ施行ではより不良なＣＥＸ値の一因となるように見えた。

【０２９５】

表５０から分かるように、９０％より大きいＣＥＸ活性を有する反応は、選択的還元反応のインキュベーション部分の間にシステムのｋ$_{L}$ａ＊に関して次の特性を有する：

１）選択的還元反応のインキュベーションステップ中のシステム内のｋ$_{L}$ａ＊が、＜０．３７ｈ$^{-1}$である場合には、システイン：抗体のモル比は、（より短いインキュベーション時間およびより長いインキュベーション時間両方、例えば、約２１０～約３３０分、例えば、約２４０～約３００分について）約４６：１～約１１８：１間で変動しうる；および

２）選択的還元反応のインキュベーションステップ中のシステム内のｋ$_{L}$ａ＊は、システイン：タンパク質のモル比が、（より短いインキュベーション時間、例えば、最大約２４０分までのインキュベーションについて）約５６：１～約１１８：１の間、または（より長いインキュベーション時間、例えば、最大約３００分までのインキュベーションについて）約７７：１～約１１８：１の間である場合、０．３７ｈ$^{-1}$ほども高いことがある。

もちろん、加熱および冷却段階中のｋ$_{L}$ａ＊は、インキュベーション段階中のｋ$_{L}$ａ＊よりはるかに高いことがあり、例えば、表５４は、０．６９ｈ$^{-1}$ほども高いｋ$_{L}$ａ＊が加熱／冷却段階中に適用され、高品質の製品をなお生成できることを示す。

【０２９６】

実施例９（プロセス特性解析研究）では、インキュベーション段階中に定常撹拌を適用する縮小モデルを使用して出力パラメータＣＥＸによる活性およびＣＥ－ＳＤＳによる純度を検査した。実施例１０では、同じく定常撹拌を適用する縮小モデルのｋ$_{L}$ａ＊値を検査した。実施例１１では、製造規模で連続撹拌を使用する場合のｋ$_{L}$ａ＊値を検査した。実際の製造中、連続撹拌は、選択的還元反応の加熱および冷却段階中にしか適用されず、間欠撹拌（例えば、１時間につき２～１５分）が選択的還元反応のインキュベーション段階中に適用される。したがって、製造中、選択的還元反応ステップのインキュベーション段階中のシステムのｋ$_{L}$ａ＊は、実施例１０および１１で観察されたｋ$_{L}$ａ＊値よりはるかに低いことになる。それにもかかわらず、実施例９～１１を組み合わせた結果から、システイン：抗体のモル比が約４６：１～約１１８：１の間である場合には約２４０～約３００分のインキュベーション段階を含む全選択的還元ステップ（すなわち、加熱段階、インキュベーション段階、および冷却段階）を、一般に、＜０．３７ｈ$^{-1}$のｋ$_{L}$ａ＊を使用して行うことができることが分かる。

【０２９７】

実施例９の最悪／最良実験は、同じ適格な縮小モデルを使用して、約６６：１のシステイン：抗体のモル比を使用して、インキュベーション段階（＜０．１８ｈ$^{-1}$のｋ$_{L}$ａ＊）中に極わずかな撹拌（すなわち、１時間につき２分）で行った。実施例９の最悪／最良ケ

ース実験における２１０～３３０分間インキュベートした反応すべてが高品質の製品を生成したので、k_La^*が低く、システイン：抗体のモル比が中等度（約６６：１）である場合、インキュベーション時間を約２１０～約３３０分に拡大することができると予想される。

【実施例１４】

【０２９８】

好ましい選択的還元プロセスパラメータおよび手順

選択的還元ステップの好ましいプロセスパラメータを表５１に収載する。設定点についてのシステイン：抗体のモル比は約６６：１であり、推奨操作範囲は約５４：１～約８３：１であり、立証された許容範囲は約４６：１～約１１８：１である。

【０２９９】

【表５２】

パラメータ	設定点/目標	推奨操作範囲	立証された許容範囲(PAR)
インキュベーション温度[℃]	37	35 - 39	32 - 42
pH 調整および TITR3 緩衝液添加前のタンパク質濃度[g/L]	13.5	12 - 15	10.0 - 15.4
プロセス pH [-]	8	7.9 - 8.1	7.8 - 8.2
再活性化開始時の溶存酸素(DO) [%]	そのまま	≧80	≧60
AIN457-TITR3 添加による希釈係数	1:20 (6.0 mM システイン、1.0 mM EDTA)	1:18 - 1:22 (5.5 - 6.7 mM システイン、0.9 - 1.1 mM EDTA)	1:15 - 1:25 (4.8 - 8.0 mM システイン、1.3 - 0.8 mM EDTA)
近似的システイン:抗体モル比 [M/M]	65.75:1 (約 66:1)	54.24:1 - 82.60:1 (約 54:1 から約 83:1)	46.11:1 - 118.36:1 (約 46:1 から約 118:1)
撹拌を含むインキュベーション時間[分]	250	240 - 300	210 - 330
温度低下後の pH 調整[-]	5.2	5.1 - 5.3	
撹拌を含む加熱時間[分]	60	≦75	≦90
インキュベーション中の撹拌時間[分/時]	2	≦5	≦15
インキュベーション中の撹拌速度[rpm]	75	65-85	65-85
撹拌を含む冷却時間[分]	60	≦75	≦90

表 LLLLL:選択的還元-プロセスパラメータのリスト。

【０３００】

選択的還元手順の個々のステップを表５２に示す。先ず、出発物質のタンパク質濃度をＷＦＩの添加によって１３．５ｍｇ／ｍＬの目標濃度に調整する。次に、１Ｍ　Ｔｒｉｓの添加によってｐＨを８．０に調整する。dO_2を確認し、操作範囲に対応しない場合は、例えばさらなる混合、水中曝気などによって、（例えば、≧６０％に）調整する。システインを６ｍＭまで添加することによって反応を開始させ、その後、溶液を（約１時間にわたって）インキュベーション温度（約３７℃）に加熱する。その溶液を１時間につき約２分の撹拌で約２５０分間インキュベートして、インキュベーション時間中のヘッドスペースから溶液への酸素移動を制限する。最後に、溶液を（約１時間にわたって）室温に冷却し、ｐＨを、例えば０．３Ｍオルトーリン酸で、約５．２に調整して反応を停止させる。

【０３０１】

【表５３】

ステップ	緩衝液	目標 pH	コメント
濃度調整	WFI	該当なし	タンパク質濃度を 12.0 - 15.0 (13.5) mg/mL に調整*
溶存酸素(DO)レベルの確認および調整	該当なし	該当なし	DO > 80%、pH 調整 1 を開始
pH 調整 1	AIN457-TITR1 (1 M Tris)	7.9 - 8.1	おおよそ 5%の容量増加
撹拌しながらシステイン含有溶液添加	AIN457-TITR3 (120 mM システイン HCl、20 mM Na-EDTA、pH 8.0 ±0.2)	該当なし	DO > 80%、システイン処理を開始;撹拌下でシステイン溶液添加**
撹拌しながら反応温度に加熱する時間	該当なし	該当なし	最大 1 時間(75 分)、撹拌しながら室温(18-25℃)から 37℃に加熱。撹拌機速度
インキュベーション	該当なし	該当なし	インキュベーション時間: 1 時間につき 2 分の撹拌で 250 分
反応後に撹拌しながら室温に冷却する時間	該当なし	該当なし	最大 1 時間(75 分)、撹拌しながら 37℃から室温(18-25℃)に冷却
pH 調整 2	AIN457-TITR2 (0.3 M H_3PO_4)	5.1 - 5.3	おおよそ 15%の容量増加

表 52:選択的還元手順の説明。*WFI の添加についての計算:Vol(WFI)=(Vol(INAKT.F)×c(INACT.F)/ 13.5mg/mL)-Vol(INAKT.F);**TITR3 の添加についての計算:Vol(TITR3)=(Vol(INAKT.F)+Vol(WFI)+Vol(TITR1))×係数(TITR3)(式中、係数(TITR3)=0.05/0.95=0.05263(再活性化溶液中の 6mM システイン)。

本願は以下の態様にも関する。

（１） 哺乳動物細胞によって組換え産生されたＩＬ－１７抗体の調製物中のＣｙｓＬ９７を選択的に還元する方法であって、

ｃ）システム内で前記調製物を少なくとも１つの還元剤と接触させて還元性混合物を形成するステップ、および

ｄ）溶存酸素曲線を飽和曲線に当てはめることによって計算される≦約０．３７ｈ－１の酸素物質移動容量係数（ｋＬａ＊）をシステム内で維持しながら前記還元性混合物をインキュベートするステップ

を含み、

前記ＩＬ－１７抗体各々が、配列番号８に記載のＶＨの３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、配列番号１０に記載のＶＬの３つのＣＤＲを含む免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含み、

ステップａ）の前、前記調製物の初期酸素飽和度パーセントが、２５℃で較正した酸素プローブを使用して測定した場合、少なくとも約６０％である、方法。

（２） 前記少なくとも１つの還元剤が、システアミン、システインおよびこれらの組合せからなる群から選択される、前記（１）に記載の方法。

（３） 前記少なくとも１つの還元剤が、チオール－ジスルフィド交換によって測定した場合、ｐＨ７．０で約－０．２０Ｖ～約－０．２３Ｖの標準酸化還元電位Ｅ０を有するチ

オール含有還元剤である、前記（１）に記載の方法。
（４）　前記少なくとも１つの還元剤がシステインである、前記（２）に記載の方法。
（５）　ステップｂ）中の前記システム内のｋＬａ＊が、≦約０．３７ｈ－１であり、前記還元性混合物中のシステイン：ＩＬ－１７抗体のモル比が、約５６：１～約１１８：１の間であり、前記還元性混合物が、ステップｂ）に従って最大約２４０分までインキュベートされる、前記（４）に記載の方法。
（６）　ステップｂ）中の前記システム内のｋＬａ＊が、≦約０．３７ｈ－１であり、前記還元性混合物中のシステイン：ＩＬ－１７抗体のモル比が、約７７：１～約１１８：１の間であり、前記還元性混合物が、ステップｂ）に従って最大約３００分までインキュベートされる、前記（４）に記載の方法。
（７）　ステップｂ）中の前記システム内のｋＬａ＊が、＜約０．３７ｈ－１であり、前記還元性混合物中のシステイン：ＩＬ－１７抗体のモル比が、約４６：１～約１１８：１の間である、前記（４）に記載の方法。
（８）　ステップｂ）中の前記システム内のｋＬａ＊が、＜約０．３７ｈ－１であり、前記還元性混合物中のシステイン：ＩＬ－１７抗体のモル比が、約５４：１～約８２：１の間である、前記（４）に記載の方法。
（９）　システイン：ＩＬ－１７抗体のまたは前記還元性混合物中のモル比が、約６６：１である、前記（４）に記載の方法。
（１０）　ステップｂ）中の前記システム内のｋＬａ＊が、≦約０．２７ｈ－１、好ましくは、≦約０．１８ｈ－１である、前記（１）～（９）のいずれかに記載の方法。
（１１）　ステップａ）の前に、前記調製物が、約４ｍｇ／ｍｌ～約１９．４ｍｇ／ｍｌ、例えば、約１０ｍｇ／ｍｌ～約１９．４ｍｇ／ｍｌ、例えば、約１０ｍｇ／ｍｌ～約１５．４ｍｇ／ｍｌ、例えば、約１２ｍｇ／ｍｌ～約１５ｍｇ／ｍｌ、例えば、約１３．５ｍｇ／ｍｌのＩＬ－１７抗体を含む、前記（１）～（１０）のいずれかに記載の方法。
（１２）　前記還元性混合物中のシステインの濃度が、約４．０ｍＭ～約８．０ｍＭ、例えば、約４．８ｍＭ～約８．０ｍＭ、例えば、約５．５ｍＭ～約６．７ｍＭ、例えば、約６．０ｍＭである、前記（４）に記載の方法。
（１３）　ステップａ）の前に、前記調製物のｐＨが、約７．３～約８．５、例えば、約７．８～約８．２、例えば、約７．９～約８．１、例えば、約８．０である、前記（１）～（１２）のいずれかに記載の方法。
（１４）　ステップａ）の前に、前記調製物の初期酸素飽和度パーセントが、２５℃で較正された酸素プローブを使用して測定した場合、少なくとも約８０％または少なくとも約６０％である、前記（１）～（１３）のいずれかに記載の方法。
（１５）　前記還元性混合物が、ＥＤＴＡをさらに含み、前記還元性混合物中のＥＤＴＡの濃度が、約１．３ｍＭ～約０．８ｍＭ、例えば、約１．１～約０．９ｍＭ、例えば、約１．０ｍＭである、前記（１）～（１４）のいずれかに記載の方法。
（１６）　ステップａ）とステップｂ）の間に、前記還元性混合物が約３２℃～約４２℃の間の温度に、例えば、約３５℃～約３９℃の間に、例えば、約３７℃に加熱される、前記（１）～（１５）のいずれかに記載の方法。
（１７）　前記還元性混合物が、約４５～約９０分間、例えば約４５～約７５分間、例えば、約６０分間加熱される、前記（１６）に記載の方法。
（１８）　加熱中の前記システム内のｋＬａ＊が、≦約０．６９ｈ－１であり、前記ｋＬａ＊が、飽和曲線を溶存酸素曲線に当てはめることによって計算される、前記（１６）に記載の方法。
（１９）　前記還元性混合物が、ステップｂ）に従って、約２０℃～約４２℃の間の温度、例えば、約３２℃～約４２℃、例えば、約３５℃～約３９℃、例えば、約３７℃でインキュベートされる、前記（１）～（１８）のいずれかに記載の方法。
（２０）　前記還元性混合物が、ステップｂ）に従って、約２１０～約４２０分間、例えば約２１０～約３３０分間、例えば、約２４０分～約３００分間、例えば、約２５０分間インキュベートされる、前記（７）に記載の方法。

（２１）　ステップｂ）中、前記還元性混合物が、１時間につき≦約１５分間、例えば、１時間につき≦約５分間、例えば、１時間につき≦約２分間撹拌される、前記（１）～（２０）のいずれかに記載の方法。
（２２）　ステップａ）後の前記還元性混合物中のインタクトＩＬ－１７抗体のレベルが、ドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動（ＣＥ－ＳＤＳ）によって測定した場合、少なくとも約８０％に減少する、前記（１）～（２１）のいずれかに記載の方法。
（２３）　ｃ）ステップｂ）から結果として得られる混合物を室温、例えば、約１６℃～約２８℃の間に冷却するステップ
をさらに含む、前記（１）～（２２）のいずれかに記載の方法。
（２４）　前記混合物が、ステップｃ）に従って、約４５～約９０分間、例えば約４５～約７５分間、例えば、約６０分間冷却される、前記（２３）に記載の方法。
（２５）　ステップｃ）中の前記システム内のｋＬａ＊が、≦約０．６９ｈ－１であり、前記ｋＬａ＊が、飽和曲線を溶存酸素曲線に当てはめることによって計算される、前記（２３）に記載の方法。
（２６）　ｄ）ステップｃ）から結果として得られる混合物のｐＨを約５．１～約５．３の間に、例えば５．２に調整するステップ
をさらに含む、前記（２３）に記載の方法。
（２７）　調整ステップｄ）が、ｏ－リン酸を、ステップｃ）から結果として得られる混合物に添加することを含む、前記（２６）に記載の方法。
（２８）　ステップｄ）から結果として得られる混合物中のインタクトＩＬ－１７抗体のレベルが、ＣＥ－ＳＤＳによって測定した場合、少なくとも約９０％である、前記（２６）に記載の方法。
（２９）　ステップｄ）から結果として得られる混合物中のＩＬ－１７抗体の活性レベルが、シスタミン陽イオン交換クロマトグラフィー（シスタミン－ＣＥＸ）によって測定した場合、少なくとも約９０％である、前記（２６）に記載の方法。
（３０）　前記還元剤の酸化型、例えば、シスチンまたはシスタミンが前記還元性混合物に添加される、前記（１）～（２９）のいずれかに記載の方法。
（３１）　変性剤、例えば、グアニジン塩酸塩が前記還元性混合物に添加されない、前記（１）～（３０）のいずれかに記載の方法。
（３２）　哺乳動物細胞によって組換え産生されたＩＬ－１７抗体の調製物中のＣｙｓＬ９７を選択的に還元する方法であって、
ａ）前記調製物を、システイン／シスチンおよびシステイン／シスタミンから選択される酸化／還元試薬のセットと接触させて、還元性混合物を形成するステップ、および
ｂ）前記還元性混合物を約３７℃の温度で嫌気条件下、少なくとも４時間インキュベートするか、または前記還元性混合物を約１８～２４度の温度で約１６～２４時間インキュベートするステップ
を含み、
前記ＩＬ－１７抗体各々が、配列番号８に記載のＶＨの３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と、配列番号１０に記載のＶＬの３つのＣＤＲを含む免疫グロブリン軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）とを含む、方法。
（３３）　前記還元性混合物中の酸化／還元試薬のモル比が、約４：１～約８０：１の間である、前記（３２）に記載の方法。
（３４）　前記還元性混合物中の酸化／還元試薬のモル比が、約２６：１～約８０：１の間である、前記（３３）に記載の方法。
（３５）　酸化剤／還元試薬の前記セットがシステイン／シスチンである、前記（３３）に記載の方法。
（３６）　酸化剤／還元試薬の前記セットがシステイン／シスタミンである、前記（３３）に記載の方法。
（３７）　前記還元性混合物中のシステイン／ＩＬ－１７抗体のモル比が、約２１：１～約２９６：１の間である、前記（３２）に記載の方法。

（３８）　配列番号８に記載の前記ＶＨの３つのＣＤＲが、順番に、配列番号１、２および３に記載のアミノ酸配列、または配列番号１１、１２および１３に記載のアミノ酸配列であり、
配列番号１０に記載の前記ＶＬの３つのＣＤＲが、順番に、配列番号４、５および６に記載のアミノ酸配列である、前記（１）～（３７）のいずれかに記載の方法。
（３９）　前記ＩＬ－１７抗体各々が、
ｉ）配列番号１０に記載のＶＬセットおよび配列番号８に記載のＶＨセット、またはｉｉ）Ｃ末端リシンを有するもしくは有さない、配列番号１４に記載の完全長軽鎖および配列番号１５に記載の完全長重鎖
を含む、前記（１）～（３８）のいずれかに記載の方法。
（４０）　前記ＩＬ－１７抗体が、ＩｇＧ１アイソタイプのヒト抗体である、前記（１）～（３９）のいずれかに記載の方法。
（４１）　前記ＩＬ－１７抗体が、セクキヌマブ抗体である、前記（１）～（４０）のいずれかに記載の方法。
（４２）　前記調製物中の前記ＩＬ－１７抗体の活性レベルが、システミン－ＣＥＸによって測定した場合、ステップｂ）後約６０分以内に少なくとも約１０パーセントポイント、少なくとも約１５パーセントポイント、少なくとも約２０パーセントポイント、少なくとも約２５パーセントポイント、または少なくとも約３０パーセントポイント増加する、前記（１）～（４１）のいずれかに記載の方法。
（４３）　哺乳動物細胞によって組換え産生されたセクキヌマブ抗体の調製物中のＣｙｓＬ９７を選択的に還元する方法であって、
ｇ）前記調製物中のセクキヌマブの濃度を約４ｍｇ／ｍｌ～約１９．４ｍｇ／ｍｌの間、例えば、約１０ｍｇ／ｍｌ～約１９．４ｍｇ／ｍｌ、例えば、約１０～約１５．４、例えば、約１２ｍｇ／ｍｌ～約１５ｍｇ／ｍｌ、例えば、約１３．５ｍｇ／ｍｌに調整するステップ、
ｈ）前記調製物の酸素飽和度パーセントを少なくとも約６０％、例えば、少なくとも約８０％に調整するステップ
ｉ）前記調製物のｐＨを、約７．４～約８．５、例えば、約７．８～約８．２、例えば、約７．９～約８．１、例えば、約８．０に調整するステップ、
ｊ）前記調製物を容器内でシステインと接触させて還元性混合物を形成するステップであり、前記還元性混合物中のシステインの濃度が約４．０ｍＭ～約８．０ｍＭ、例えば、約４．８ｍＭ～約８．０ｍＭ、例えば、約５．５ｍＭ～約６．７ｍＭ、例えば、約６．０ｍＭである、ステップ；
ｋ）前記還元性混合物を約３２℃～約４２℃の間の温度に、例えば、約３５℃～約３９℃の間に、例えば、約３７℃に加熱し、前記加熱を約４５～約９０分、例えば、約４５～約７５分、例えば約６０分間行うステップ、
ｌ）ステップｅ）からの前記還元性混合物を約２０℃～約４２℃の間、例えば約３２℃～約４２℃の温度で、例えば、約３５℃～約３９℃に、例えば、約３７℃にインキュベートするステップであり、前記インキュベーションが、約２１０～約４２０分、例えば、約２１０～約３３０分、例えば、約２４０～約３００分、例えば、２５０分間行われ、この間、容器内で≦０．３７ｈ－１の酸素物質移動容量係数（ＫＬａ＊）が維持され、前記ＫＬａ＊が飽和曲線を溶存酸素曲線に当てはめることによって計算される、ステップ、
ｇ）ステップｆからの結果として得られる混合物を約１６℃～約２８℃の温度に冷却し、前記冷却を約４５～約９０分、例えば、約４５～約７５分、例えば、約６０分間行うステップ、および
ｈ）ステップｇ）から結果として得られる混合物のｐＨを約５．１～約５．３の間に、例えば５．２に調整するステップ
を含む方法。
（４４）　前記（１）～（４３）のいずれかによって作製されるＩＬ－１７抗体の精製された調製物。

（４５） 前記ＩＬ－１７抗体が、セクキヌマブ抗体である、前記（４４）に記載の精製された調製物。

（４６） セクキヌマブの精製された調製物であって、前記調製物中のインタクトセクキヌマブのレベルが、ドデシル硫酸ナトリウムキャピラリー電気泳動（ＣＥ－ＳＤＳ）によって測定した場合、少なくとも約９０％であり、前記調製物中のセクキヌマブの活性レベルが、シスタミン－ＣＥＸによって測定した場合、少なくとも約９０％である、精製された調製物。

【図面】

【図１】

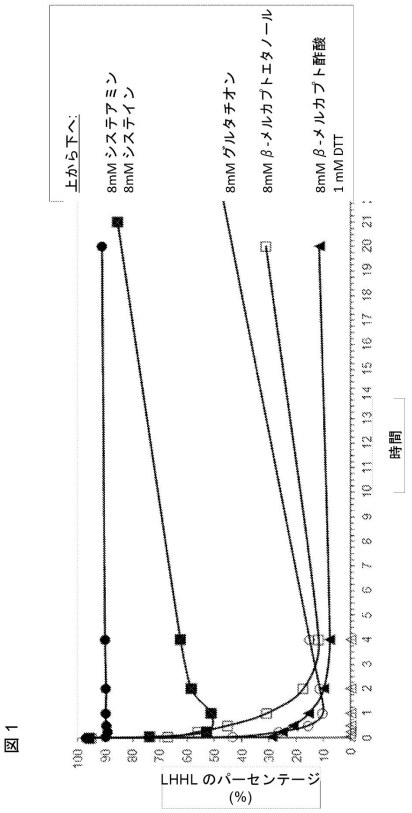


図１

【図２－１】

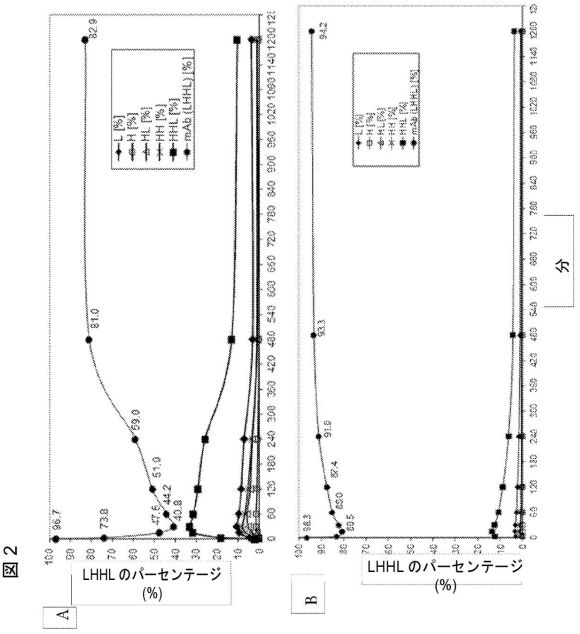


図２

【図２－２】

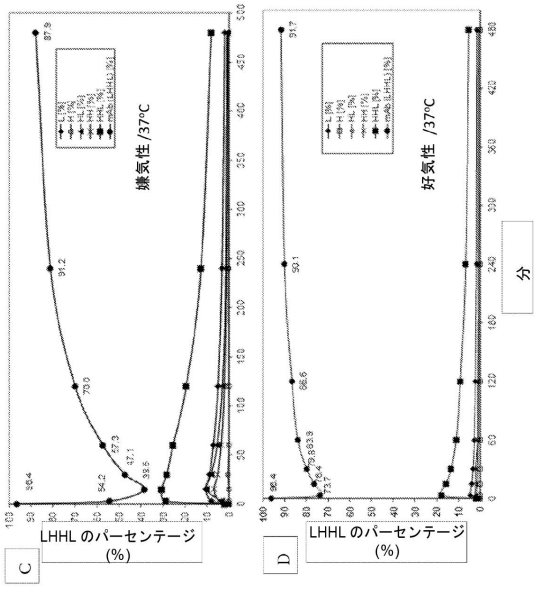


図２

【図３】

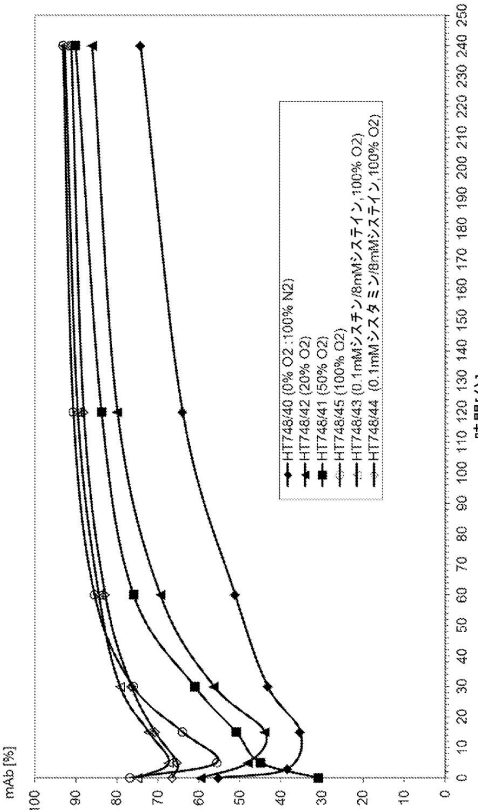


図３

【図４】

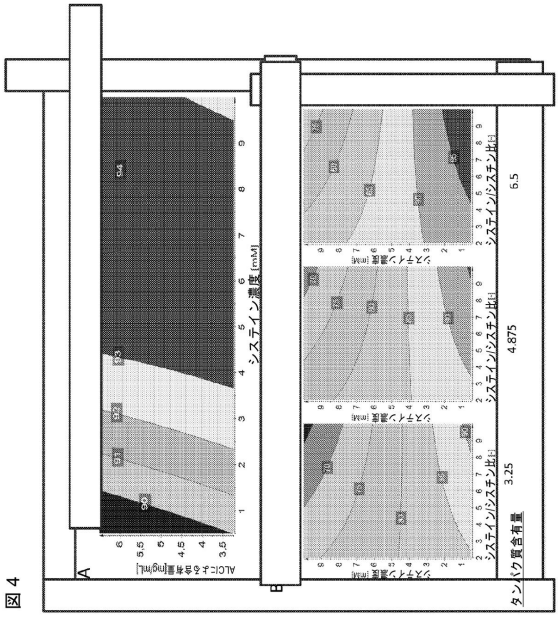


図４

【図５】

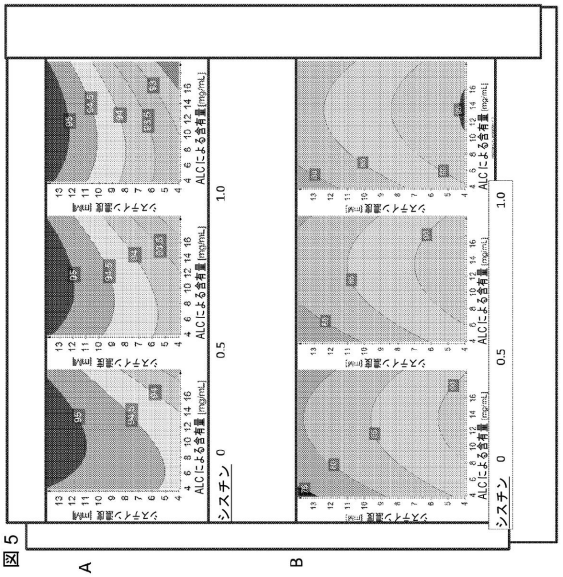


図５

【図６】

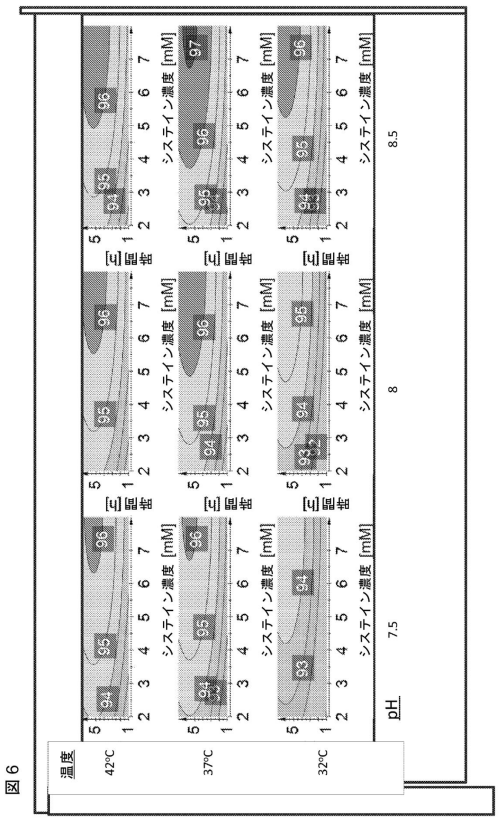


図６

【図７】

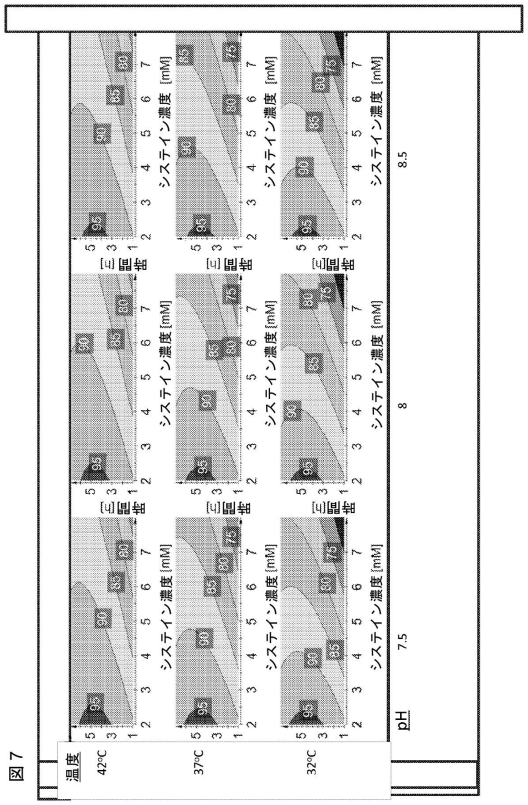


図７

【図８】



図８

【図９】

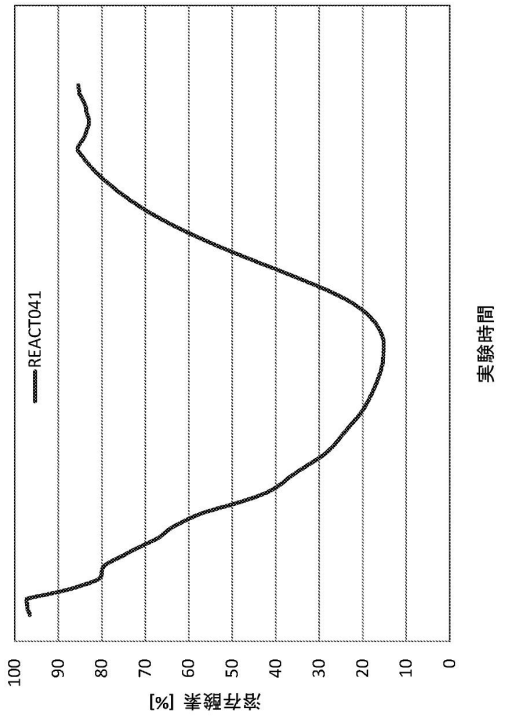


図９

【図１０】

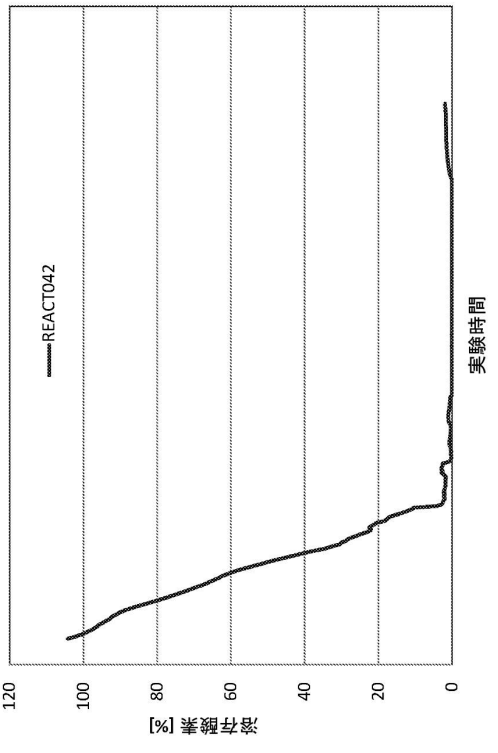


図 10

【図１１】

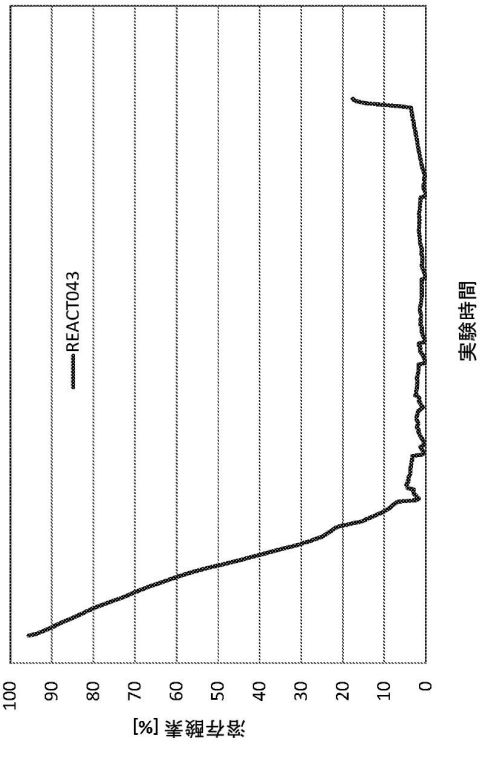


図 11

【図１２】

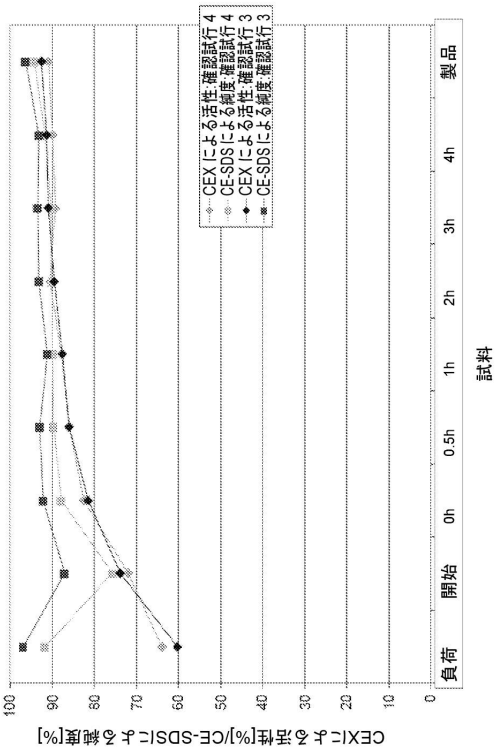


図 12

【図１３】

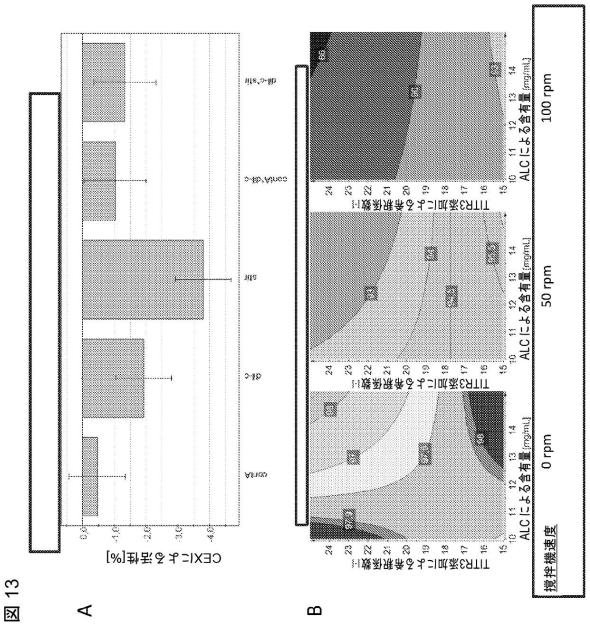


図 13

【図１４Ａ】

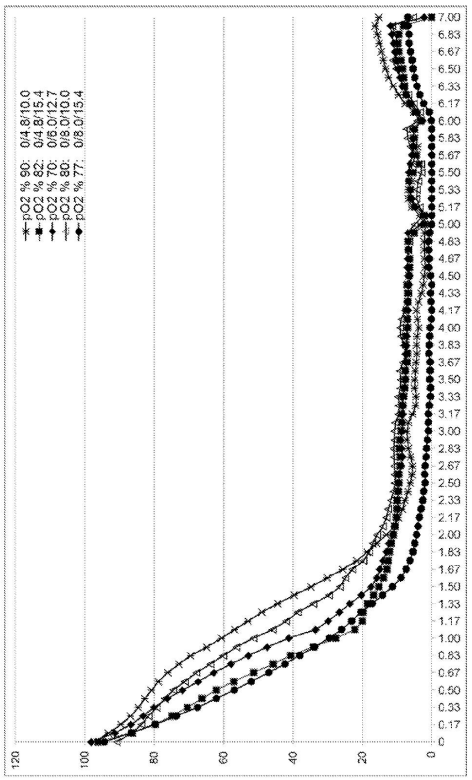


図 14

【図１４Ｂ】

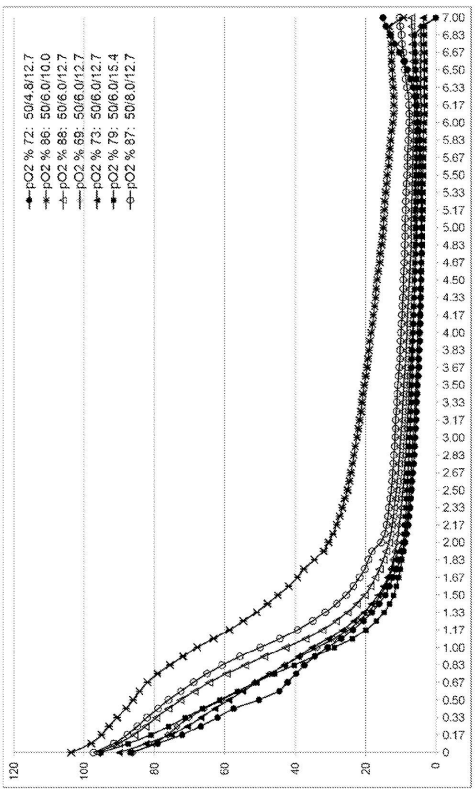


図 14

【図１４Ｃ】

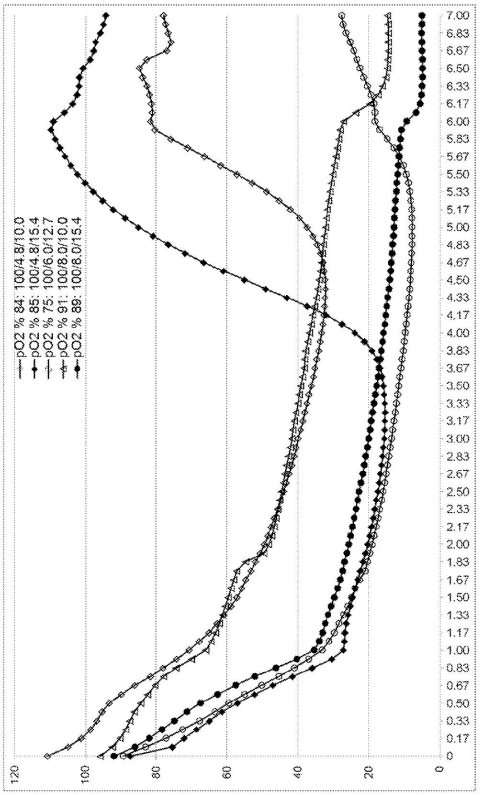


図 14

【図１４Ｄ】

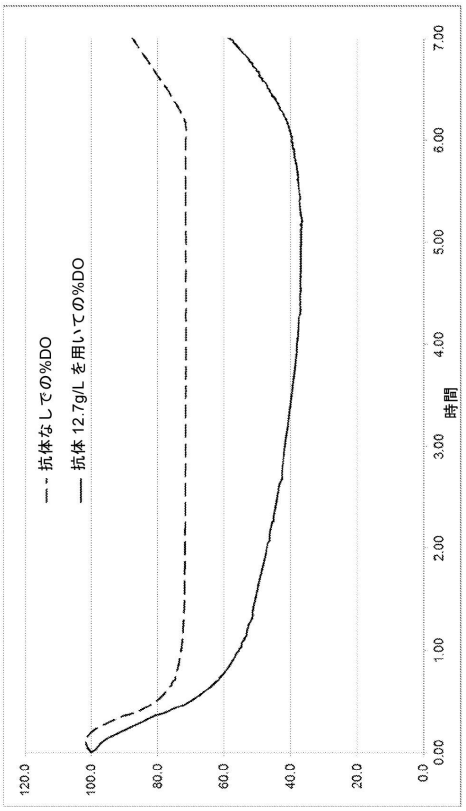


図 14

【図１５】

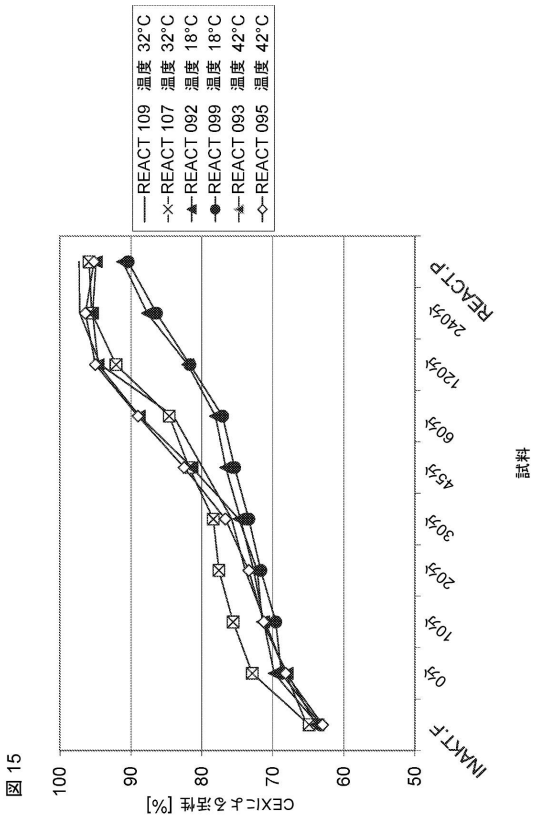


図 15

【図１６】

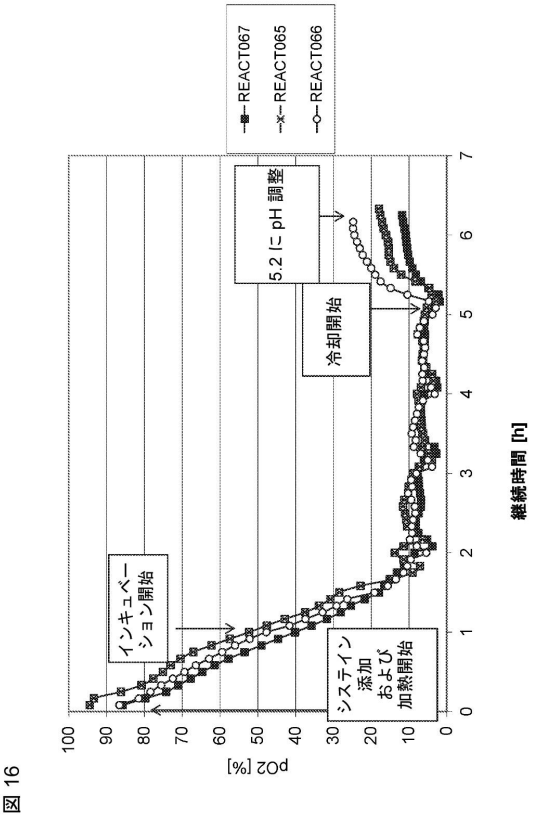


図 16

【図１７】

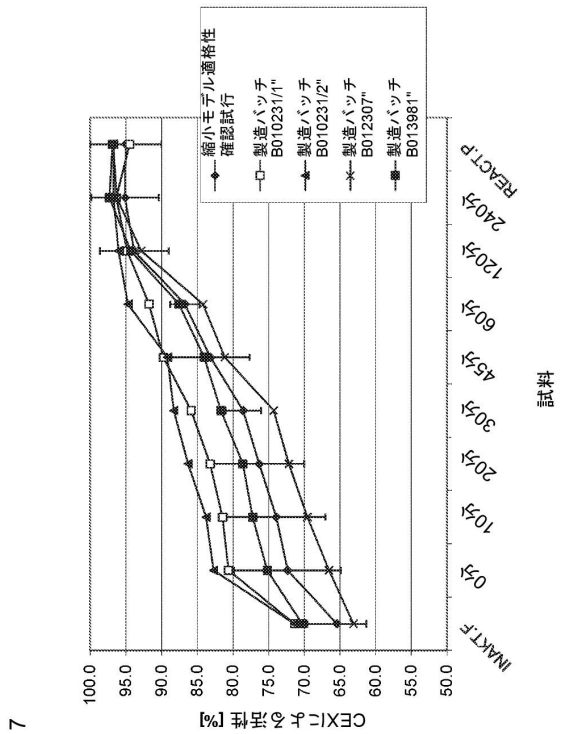


図 17

【配列表】
0007021950000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 スイス国 ツェーハー－４００２ バーゼル，ポストファッハ，ノバルティス ファーマ アーゲー内
ウィンクラー，ヨハン
オーストリア国 クント ６２５０，ビオッヘミーシュトラーセ １０，サンド ゲーエムベーハー内

審査官 佐久 敬

(56)参考文献
特表２００８－５０７９８８（ＪＰ，Ａ）
特表２００８－５２０１９０（ＪＰ，Ａ）
特表２０１４－５３０８９１（ＪＰ，Ａ）
特開平０６－１９２２９７（ＪＰ，Ａ）
特表２００５－５０５４９４（ＪＰ，Ａ）
特開平０１－１３１１９５（ＪＰ，Ａ）
特表２０１０－５３３１９２（ＪＰ，Ａ）
特表２００９－５２６０８０（ＪＰ，Ａ）
特表２０１８－５０２９１０（ＪＰ，Ａ）
審議結果報告書，医薬食品局審査管理課，2014年12月03日，表紙, pp.1-90
LANGLEY, R.G. et al.，N. Engl. J. Med.，2014年07月24日，Vol.371, No.4，pp.326-338
ClinicalTrials.gov, NCT01365455，2021年01月22日，pp.1-10，https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01365455，[retrieved on 2021-01-22], Retrieved from the Internet
ClinicalTrials.gov, NCT01358578，2021年01月22日，pp.1-8，https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01358578，[retrieved on 2021-01-22], Retrieved from the Internet
WHO Drug Information，2010年，Vol.24, No.3，pp.259-260,278-279
HUEBER, W. et al.，Sci. Transl. Med.，2010年，Vol.2, No.52，Article No.52ra72(pp.1-9)
LIU, H. et al.，mAbs，2014年10月，Vol.6, No.5，pp.1145-1154
MULLAN, B. et al.，BMC Proceedings，2011年，Vol.5, No.Suppl.8，Article. No.P110(pp.1-3)
GADGIL, H.S. et al.，Anal. Biochem.，2006年，Vol.355，pp.165-174
BUCHANAN, A. et al.，mAbs，2013年，Vol.5, No.2，pp.255-262
GOMEZ, N. et al.，Biotechnol. Prog.，2010年，Vol.26, No.5，pp.1438-1445
BANKS, D.D. et al.，J. Pharm. Sci.，2008年，Vol.97, No.2，pp.764-779
ヒト型抗ヒトIL-17Aモノクローナル抗体製剤 コセンティクス(商標)，医薬品インタビューフォーム，第1版，2015年01月，第1版，表紙, 目次, pp.1-8,67-73, 奥付
ヒト型抗ヒトIL-17Aモノクローナル抗体製剤，コセンティクス(商標)，第3版，2015年12月，表紙, 目次, pp.1-8,70-77, 奥付

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ
Ｃ１２Ｎ
Ｃ１２Ｐ
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）