

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2020年10月15日(15.10.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/209318 A1

- (51) 国際特許分類:  
C07K 1/22 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2020/015904
- (22) 国際出願日: 2020年4月9日(09.04.2020)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2019-074738 2019年4月10日(10.04.2019) JP
- (71) 出願人: 中外製薬株式会社(CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP). プロテノバ株式会社(PROTENOVA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒7692604 香川県東かがわ市西村1488番地1 Kagawa (JP).
- (72) 発明者: 若林 哲也(WAKABAYASHI, Tetsuya); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 清水 祐一郎(SHIMIZU, Yuichiro); 138623 パイオポリスドライブ3 シナプス #07-11/16 中外ファーマボディ・リサーチ・ピーティーイー・リミテッド内 Singapore (SG). 福永 匡宏(FUKUNAGA, Masahiro); 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP). 真島 英司(MAJIMA, Eiji); 〒7692604 香川県東かがわ市西村1488番地1 プロテノバ株式会社内 Kagawa (JP).
- (74) 代理人: 春名 雅夫, 外(HARUNA, Masao et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 規則4.17に規定する申立て:  
一 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則4.17(ii))
- 添付公開書類:  
一 国際調査報告 (条約第21条(3))  
一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR PURIFYING FC REGION-MODIFIED ANTIBODY

(54) 発明の名称: Fc領域改変抗体の精製方法

(57) Abstract: In the present invention, an affinity purified resin having sufficient binding affinity for a modified Fc region having reduced bindability with protein A was found. Specifically, immunoglobulin containing a modified Fc region having reduced bindability with protein A was successfully purified, where a protein A-modified ligand including a structure in which an amino acid of the C domain has been substituted serves as the Fc ligand.

(57) 要約: プロテインAとの結合性が低下したFc領域改変体に対し、十分な結合親和性を備えたアフィニティ精製樹脂を見出した。具体的には、Cドメインのアミノ酸を置換した構造を含むプロテインA改変リガンドをFcリガンドとして、プロテインAとの結合性が低下したFc領域改変体を含むイムノグロブリンを精製することができた。



WO 2020/209318 A1

## 明 細 書

発明の名称：Fc領域改変抗体の精製方法

### 技術分野

[0001] 本発明は抗体の精製方法に関し、特定のアミノ酸変異を有するFc領域改変抗体のための精製方法に関する。

### 背景技術

[0002] 遺伝子組換え技術の発達によって、種々のタンパク質製剤が安定した供給量で提供されるようになり、様々な抗体医薬品の開発が進んでいる。

[0003] 遺伝子組換え技術により哺乳動物細胞を宿主として抗体の製造をする場合、プロテインAやプロテインGがIgGのFc鎖に結合する性質を利用して、プロテインAもしくはプロテインGのアフィニティカラムクロマトグラフィーによる処理を行った後に種々のクロマトグラフィーで精製している。特に、プロテインAアフィニティカラムクロマトグラフィーによる抗体の精製は、抗体を培養液から回収するために、もっとも一般的に、抗体医薬の製造に用いられている工程である。

[0004] 例えば、特表平5-504579号（特許文献1）では、哺乳動物細胞培養から得られた抗体含有水性培地をプロテインAもしくはプロテインGカラムクロマトグラフィーに適用して抗体をカラムに吸着させ、次いで酸性溶液（濃度約0.1Mのクエン酸、pH3.0-3.5）を用いて抗体を溶出させ、得られる酸性溶出液をイオン交換カラムクロマトグラフィー、サイズ排除カラムクロマトグラフィーに順次適用して精製している。

[0005] 一方、血中滞留性あるいは体内動態の向上を目的として、抗体の等電点（pI）を制御するためのアミノ酸置換技術、具体的には抗体の表面に露出しているアミノ酸残基を改変することにより抗体のpIを制御する技術が知られている（WO 07/114319（特許文献2）、WO2017/104783（特許文献3））。特許文献2には抗体のアミノ酸残基を改変してpIを制御することによって、抗体の血漿中滞留性や半減期の改善が期待でき、医薬としての抗体の投与量の低減

や投与間隔の延長に繋がることが開示されている。また、特許文献3には抗体のCH2領域やCH3領域にアミノ酸置換Q311R及びP343Rを入れ、pIを上昇させるように改変することにより該抗体がインビボにおいて投与される場合に血漿からの抗原の消失が促進され得ることが開示されている。

[0006] 抗体の精製に用いられるプロテインAはStaphylococcus aureus（黄色ブドウ球菌）の細胞壁に存在するタンパク質であり、免疫グロブリン、特にIgGのFc領域に結合する。一般にスタフィロコッカスに由来するプロテインAタンパク質には、Eドメイン、Dドメイン、Aドメイン、BドメインおよびCドメインと呼ばれる相同性を有する5つのイムノグロブリン結合ドメインの繰り返し構造が存在し、各結合ドメインは1個だけでイムノグロブリンに結合が可能である。天然型のプロテインAと並んで、アミノ酸が部分的に改変されたイムノグロブリン結合ドメインのみからなる組み換えタンパク質もアフィニティクロマトグラフィ用の親和性リガンドとして利用されている。たとえば、スタフィロコッカスプロテインAのCドメインのアミノ酸配列の29位のグリシンをアラニンに置換したCドメイン改変体またはBドメインのアミノ酸配列の29位のグリシンをアラニンに置換したZドメインの4、7、35位のいずれか1以上の元からあるリジンのリジン以外のアミノ酸へ置換する改変を加えることにより、抗体精製効率の向上を図ったプロテインAカラムの開発も行われている（特許文献4、5）。

## 先行技術文献

## 特許文献

- [0007] 特許文献1：特表平5-504579号公報  
特許文献2：WO07/114319号公報  
特許文献3：WO2017/104783号公報  
特許文献4：特開2007-252368号公報  
特許文献5：WO2015/034000号公報

## 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

[0008] プロテインAは、抗体精製用のリガンドとして従来から活用されてきた。しかしこれまで、pI改変のためのアミノ酸改変を有する抗体（以下、pI改変抗体）に適した精製法の検討や、精製工程における問題について、詳細には検討されていない。したがって、たとえば、通常用いられるプロテインAカラムでは精製できない抗体が存在することについても知られていなかった。

[0009] 本発明者らは、通常用いられるプロテインAカラムにおいては効率よく精製できないpI改変抗体が存在することを見出した。そして、そのような抗体に適した、効率のよい精製方法が必要である。すなわち、通常のプロテインAカラムにおいては効率よく精製できないpI改変抗体であっても工業的規模で製造することを可能とする、高い効率性と経済性を有する精製方法を提供することが本発明の課題である。

## 課題を解決するための手段

[0010] 上記目的を達成するために鋭意研究した結果、本発明者らは通常用いられるプロテインAカラムにおいては効率よく精製できないpI改変抗体であっても、特定の改変プロテインAリガンドを有する樹脂を用いることにより効率よく精製が可能となることを見出した。

[0011] すなわち、本発明は以下〔1〕～〔20〕を提供するものである。

〔1〕 Q311R及びP343Rのアミノ酸残基の置換を含むIgG抗体を含有する組成物から当該抗体を精製する方法であって、

(a) 配列番号1で規定されるスタフィロコッカス (Staphylococcus) プロテインAのCドメイン改変体または配列番号2で規定されるZドメインの、4、7、35位のいずれか1以上の元からあるリジン残基をリジン以外のアミノ酸残基へ置換する改変を含む改変イムノグロブリン結合ドメインまたはそれらの改変イムノグロブリン結合ドメインの多量体を含むプロテインA改変リガンドが固定化された担体を含むアフィニティカラムを準備する工程、

(b) 前記IgG抗体を含有する組成物を工程(a)のアフィニティカラムにロードする工程、及び

(c)工程(b)のアフィニティカラムからIgG抗体を溶出して回収する工程、を含む方法。

〔2〕上記改変イムノグロブリン結合ドメインの多量体が、2～10量体であり、且つ、N末端又はC末端側から1番目および／または2番目に、Cドメイン改変体（配列番号1）、またはZドメイン（配列番号2）において、40、43、46、53、54、56位の元からあるアミノ酸残基の内、少なくとも1個が、リジン残基に置換されているイムノグロブリン結合ドメインが配されている、〔1〕に記載の方法。

〔3〕前記置換が、プロテインAのCドメイン改変体またはZドメインの、4、7、35位のいずれか1以上の元からあるリジン残基を、アラニン残基（A）、グルタミン残基（Q）、アスパラギン残基（D）、バリン残基（V）、セリン残基（S）、スレオニン残基（T）、ヒスチジン残基（H）、チロシン残基（Y）、アルギニン残基（R）、グルタミン酸残基（E）、フェニルアラニン残基（F）、ロイシン残基（L）、イソロイシン残基（I）、およびプロリン残基（P）からなる群から選択されるいずれかのアミノ酸残基に置換する改変である、〔1〕または〔2〕に記載の方法。

〔4〕前記改変イムノグロブリン結合ドメインが、(i)配列番号3又は5に示すアミノ酸配列を有する改変イムノグロブリン結合ドメイン、又は(ii)配列番号3又は5に示すアミノ酸配列において、4、7、及び35位以外のアミノ酸残基の内1又は数個のアミノ酸残基が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列を含む改変イムノグロブリン結合ドメインである、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の方法。

〔5〕前記改変イムノグロブリン結合ドメインが、Q311R及びP343Rのアミノ残基の置換を含むIgG抗体に対する結合能を有する、〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の方法。

〔6〕前記プロテインA改変リガンドが、配列番号3、4、および5からなる群から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列からなる改変イムノグロブリン結合ドメインを含む改変リガンドである、〔1〕～〔3〕のいずれか一

つに記載の方法。

〔7〕 上記プロテインA改変リガンドが、以下の(1)-(5)からなる群から選択されるいずれかの手段で前記担体に固定化されている、〔1〕～〔6〕のいずれか一つに記載の方法；

(1) プロテインAのCドメインまたはZドメインにおいて、さらに付加的に、40位、43位、46位、53位、54位および56位のアミノ酸残基のうちの1個ないし6個をリジン残基に置換した改変イムノグロブリン結合ドメインを介して担体に固定化する方法、

(2) プロテインAのC末端にシステインを導入し、担体とジスルフィド結合またはチオエーテル結合により固定化する方法、

(3) チオール基をシアノ化することによるアミノ基含有固体化担体へ固定化する方法、

(4) 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)を架橋剤として利用してシステイン残基を有する改変イムノグロブリン結合ドメインの多量体をアミノ基含有担体へ固定化する方法、および

(5) プロテインAのCドメイン改変体の42位、49位、50位、58位のリジン残基をリジン残基以外のアミノ酸に置換した改変イムノグロブリン結合ドメイン、またはZドメインの49位、50位、58位のリジン残基をリジン以外のアミノ酸に置換した改変イムノグロブリン結合ドメインのC末端に付加した複数個のリジン残基を介して担体に固定化する方法。

〔8〕 前記IgG抗体が、さらに付加的にIgG抗体のCH3領域においてM428L, N434A, Y436T, Q438R, 及びS440Eの中から選択される1以上のアミノ酸残基の置換を含むIgG抗体である、〔1〕～〔7〕のいずれか一つに記載の方法。

〔9〕 IgG抗体のCH3領域が、配列番号6～11からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むIgG抗体である、〔1〕～〔8〕のいずれか一つに記載の方法。

〔10〕 IgG抗体の重鎖定常領域が、配列番号12～57からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むIgG抗体である、〔1〕～〔9〕のいずれか一つに

記載の方法。

〔11〕 IgG抗体のpI値が4.0～10.0である、〔1〕～〔10〕のいずれか一つに記載の方法。

〔12〕 前記プロテインA改変リガンドの前記IgG抗体のFc領域との結合量が、改変されていないプロテインAとの結合能に比して5倍以上である、〔1〕～〔11〕のいずれか一つに記載の方法。

〔13〕 工程(c)の前に、洗浄溶液でアフィニティカラムを洗浄する工程を付加的に含む、〔1〕～〔12〕のいずれか一つに記載の方法。

〔14〕 洗浄溶液が、緩衝剤と塩の組み合わせであって、緩衝剤としてはリン酸、酢酸、クエン酸、グリシン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンからなる群より選択される少なくとも1つを含み、塩としてはアルギニン、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウムからなる群より選択される少なくとも一つを含む溶液である、〔13〕に記載の方法。

〔15〕 工程(c)の後、さらに付加的に、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、マルチモードクロマトグラフィー及びヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーからなる群から選択される少なくとも一つのクロマトグラフィーによるIgG抗体の精製工程を含む、〔1〕～〔14〕のいずれか一つに記載の方法。

〔16〕 工程(c)が、塩酸、酢酸、クエン酸、アルギニン、グリシンまたはリン酸からなる群より選択される少なくとも1つを含む溶出溶液でアフィニティカラムからIgG抗体を溶出する工程を含む、〔1〕～〔15〕のいずれか一つに記載の方法。

〔17〕 抗体がヒト化抗体またはヒト抗体である、〔1〕～〔16〕のいずれか一つに記載の方法。

〔18〕 抗体が、抗ミオスタチン抗体、抗IL-6レセプター抗体、抗IL-6抗体、抗IL-8抗体、または抗IL-31レセプター抗体である、〔1〕～〔17〕のいずれか一つに記載の方法。

〔19〕 プロテインA改変リガンドが固定化された担体を含むアフィニティカ

ラムの、Q311R及びP343Rのアミノ酸残基の置換を含むIgG抗体の精製における使用であって、前記プロテインA改変リガンドが、アミノ酸が置換されたプロテインAのCドメイン改変体およびZドメインのいずれか、または両方を含み、前記置換が、Cドメイン改変体またはZドメインの4、7、35位のいずれか1以上の元からあるリジン残基をリジン以外のアミノ酸残基に改変する置換であり、且つ前記IgG抗体との結合能を有する改変リガンドである使用。

〔20〕次の工程を含む、Q311R及びP343Rのアミノ酸残基の置換を有するIgG抗体の製造方法：

- (i) Q311R及びP343Rのアミノ酸残基の置換を含むIgG抗体を含有する組成物を提供する工程、
- (ii) 配列番号1で規定されるスタフィロコッカス (Staphylococcus) プロテインAのCドメイン改変体または配列番号2で規定されるZドメインの、4、7、35位のいずれか1以上の元からあるリジン残基をリジン以外のアミノ酸残基へ置換する改変を含む改変イムノグロブリン結合ドメインまたはそれらの改変イムノグロブリン結合ドメインの多量体を含むプロテインA改変リガンドが固定化された担体を含むアフィニティカラムを準備する工程、
- (iii) 前記IgG抗体を含有する組成物を工程(ii)のアフィニティカラムにロードする工程、及び
- (iv) 工程(iii)でIgG抗体を含有する組成物をロードしたアフィニティカラムからIgG抗体を溶出して回収する工程。

あるいは本発明は、

〔1'〕 Q311R及びP343Rのアミノ酸残基の置換を含むIgG抗体を含有する組成物から当該抗体を精製する方法であって、

- (a) プロテインA改変リガンドが固定化された担体を含むアフィニティカラムを準備する工程、
- (b) 前記IgG抗体を含有する組成物を工程(a)のアフィニティカラムにロードする工程、及び

(c)工程(b)のアフィニティカラムからIgG抗体を溶出して回収する工程、を含み、前記プロテインA改変リガンドが、アミノ酸が置換されたプロテインAのCドメイン改変体およびZドメインのいずれか、または両方を含み、前記置換が、Cドメイン改変体またはZドメインの4、7、35位のいずれか1以上の元からあるリジン残基をリジン以外のアミノ酸残基に改変する置換を含み、且つ前記IgG抗体との結合能を有するプロテインA改変リガンドである方法を提供する。

### 発明の効果

[0012] 本発明により、通常のプロテインAカラムではうまく精製できないpI改変抗体であっても、簡便で効率的に精製することができる。

### 図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、Fc領域に改変を含まない抗体の各プロテインA固定化樹脂における動的結合容量(DBC)の測定結果を示す。図中、縦軸はDBC (g/L resin)、横軸は滞留時間 (residence time;分) を示す。

[図2-1]AF-rProtein A HC-650Fのリガンド (式 (1')) に示す構造) と抗体との結合親和性をBLItz (登録商標) (ForteBio社) の評価システムによって評価した結果 (リアルタイム結合曲線) を示す。

[図2-2]MabSelect SuReのリガンドと抗体との結合親和性をBLItz (登録商標) (ForteBio社) の評価システムによって評価した結果 (リアルタイム結合曲線) を示す。

### 発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、等電点 (pI) を上昇させたpI改変抗体を含有する組成物の精製方法に関する。具体的には本発明は、Q311R及びP343Rのアミノ酸残基の置換を含むIgG抗体を含有する組成物から当該抗体を精製するための方法であって、

(a) 配列番号1で規定されるスタフィロコッカス (Staphylococcus) プロテインAのCドメイン改変体または配列番号2で規定されるZドメインの、4

、 7、 35位のいずれか1以上の元からあるリジン残基をリジン以外のアミノ酸残基へ置換する改変を含む改変イムノグロブリン結合ドメインまたはそれらの改変イムノグロブリン結合ドメインの多量体を含むプロテインA改変リガンドが固定化された担体を含むアフィニティカラムを準備する工程、

(b)前記IgG抗体を含有する組成物を工程(a)のアフィニティカラムにロードする工程、及び

(c)工程(b)でロードしたIgG抗体を溶出して回収する工程、を含む方法に関する。

[0015] 本発明におけるCH2領域やCH3領域に関するQ311R及びP343Rのアミノ酸残基の置換を含むIgG抗体は、親Fc領域におけるCH2領域やCH3領域のEUナンバリングにより表される位置311のグルタミン(Q)をアルギニン(R)に、位置343のプロリン(P)をアルギニン(R)に改変したものである。一般的に、CH2領域は、ヒンジ領域中、EUナンバリング231番目から340番目に、またCH3領域はEUナンバリング341番目から447番目に当たる。本願における「親Fc領域」とは、本明細書に記載のアミノ酸改変の導入前のFc領域を指す。親Fc領域の好ましい例には、天然型抗体に由来するFc領域が含まれる。抗体は、ヒトまたはサル(例えば、カニクイザル、アカゲザル、マーモセット、チンパンジー、またはヒヒ)に由来しうる。天然型抗体は、天然に存在する変異を含んでいてもよい。遺伝子多型によるIgGの複数のアロタイプ配列が、「Sequences of proteins of immunological interest」、NIH Publication No. 91-3242に記載されているが、そのいずれも、本発明において使用されうる。特に、ヒトIgG1については、位置356~358(EUナンバリング)のアミノ酸配列はDELまたはEEMのいずれかであり得る。親Fc領域の好ましい例には、ヒトIgG1(配列番号:58)、ヒトIgG2(配列番号:59)、ヒトIgG3(配列番号:60)およびヒトIgG4(配列番号:61)の重鎖定常領域に由来するFc領域が含まれる。親Fc領域の別の好ましい例は、重鎖定常領域SG1(配列番号:62)に由来するFc領域である。さらに、親Fc領域は、本明細書に記載されるアミノ酸改変以外のアミノ酸改変を天然型抗体由来のFc領域に加えることに

よって作製されるFc領域であってもよい。

[0016] さらに、本発明における抗体については他の目的のために実施されるアミノ酸改変が、本発明に用いられる抗体に組み合わせられていてもよい。例えば、FcRn結合活性を増強させるアミノ酸置換 (Hinton et al., J. Immunol. 176(1):346-356 (2006); Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281(33):23514-23524 (2006); Petkova et al., Intl. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006); Zalevsky et al., Nat. Biotechnol. 28(2):157-159 (2010); W02006/019447; W02006/053301; およびW02009/086320)、および、抗体のヘテロジェニティーまたは安定性を改善するためのアミノ酸置換 (W02009/041613) を加えてもよい。あるいは、W02011/122011、W02012/132067、W02013/046704、またはW02013/180201に記載される抗原クリアランスを促進する特性を有するポリペプチド、W02013/180200に記載される標的組織への特異的結合特性を有するポリペプチド、W02009/125825、W02012/073992、またはW02013/047752に記載される複数の抗原分子に対して繰り返し結合する特性を有するポリペプチドに適用されているアミノ酸改変が、本発明に用いられる抗体と組み合わせられていてもよい。あるいは、他の抗原に対する結合能を付与する目的で、EP1752471およびEP1772465に開示されたアミノ酸改変が、本発明に用いられる抗体において組み合わせられていてもよい。あるいは、血漿中滞留性を増大させる目的で、定常領域のpIを低下させるアミノ酸改変 (W02012/016227) が本発明に用いられる抗体に組み合わせられていてもよい。あるいは、細胞への取り込みを促進する目的で、定常領域のpIを上昇させるアミノ酸改変 (W02014/145159) が組み合わせられていてもよい。あるいは、標的分子の血漿からの消失を促進する目的で、定常領域のpIを上昇させるアミノ酸改変 (特願2015-021371および特願2015-185254) が組み合わせられていてもよい。

[0017] 本発明において、アミノ酸改変とは、任意の置換、欠失、付加、挿入、および修飾、またはそれらの組み合わせを意味する。本発明において、アミノ酸改変は、アミノ酸変異と言い換えることができる。

[0018] 本発明に用いられる抗体についてはより好ましくはCH3領域にさらにM428L,

N434A, Y436T, Q438R, 及びS440Eの中から選択される1以上のアミノ酸残基の置換を含むIgG抗体であり、より好ましくはCH3領域にM428L, N434A, Y436T, Q438R, 及びS440Eの中から選択される2以上のアミノ酸残基の置換を含むIgG抗体である。さらに好ましくはCH3領域が、配列番号6～11からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むIgG抗体、重鎖定常領域が配列番号12～57からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むIgG抗体が挙げられる。

[0019] 本発明に用いられる抗体は通常、所望の抗原と結合する限り特に制限はなく、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。

[0020] 本発明で使用されるモノクローナル抗体としては、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ラクダ、サル等の動物由来のモノクローナル抗体だけでなく、キメラ抗体、ヒト化抗体、bispecific抗体など人為的に改変した遺伝子組み換え型抗体も含まれる。さらに、血中滞留性や体内動態の改善を目的とした抗体分子の物性の改変（具体的には、等電点（pI）改変、Fc受容体の親和性改変等）を行うために抗体の定常領域等を人為的に改変した遺伝子組み換え型抗体も含まれる。

[0021] また、本発明で使用される抗体の免疫グロブリンクラスは特に限定されるものではなく、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4などのIgGでもよい。本発明における好ましいIgGは、特にFc領域がヒト由来の場合は、IgG1、IgG2、およびIgG4である。

[0022] 本発明で使用される抗体は、医薬組成物として用いられることもでき、非経口投与、肺内投与、および経鼻投与、また局所的処置のために望まれる場合は病巣内投与を含む、任意の公的な手段によって投与され得る。非経口注入は、筋肉内、静脈内、腹腔内、または皮下投与を含む。

[0023] 本発明で使用される抗体が医薬組成物として用いられる場合には、医薬組成物とともに治療、予防、および/または診断に有用な器材を含んだ製品が、提供される。製品は、容器、および当該容器上のラベルまたは当該容器に付属する添付文書を含む。好ましい容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、IV溶液バックなどが含まれる。容器類は、ガラスやプラスチック

クなどのさまざまな材料から形成されていてよく、シリコンフリーシリンジなども利用できる。

[0024] 上述した本発明で使用される抗体は、当業者に周知の方法により作製することができる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、所望の抗原や所望の抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞（ハイブリドーマ）をスクリーニングすることによって作製することができる。ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルステインらの方法（Kohler, G. and Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73: 3-46）等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。

[0025] また、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた遺伝子組換え型抗体を用いることができる（例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, *THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES*, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。具体的には、ハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域（V領域）のcDNAを合成する。目的とする抗体のV領域をコードするDNAを得たら、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでよい。発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

[0026] 本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒ

ト化 (Humanized) 抗体などを使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

[0027] ヒト化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region; FR) を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる (EP 239400、WO 96/02576 参照)。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856)。

[0028] 抗体の活性、物性、薬物動態、安全性等を改善するために抗体のアミノ酸を置換する技術としては、例えば以下に述べる技術も知られており、本発明で使用される抗体には、このようなアミノ酸の置換 (欠損や付加も含む) を施された抗体も含まれる。

[0029] IgG抗体の可変領域にアミノ酸置換を施す技術は、ヒト化 (Tsurushita N, Hinton PR, Kumar S., *Design of humanized antibodies: from anti-Tac to Zenapax.*, *Methods.* 2005 May;36(1):69-83.) をはじめとして、結合活性を増強させるための相補性決定領域 (CDR) のアミノ酸置換による affinity matur

ation (Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R., A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries., Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 14;102(24):8466-71.)、フレームワーク(FR)のアミノ酸置換による物理化学的安定性の向上 (Ewert S, Honegger A, Pluckthun A., Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering., Methods. 2004 Oct;34(2):184-99. Review) が報告されている。また、IgG抗体のFc領域のアミノ酸置換を施す技術として、抗体依存性細胞障害活性(ADCC)活性や補体依存性細胞障害活性(CDC)活性を増強させる技術が知られている (Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies., Mol Cells. 2005 Aug 31;20(1):17-29. Review.)。さらに、このようなエフェクター機能を増強させるだけでなく、抗体の血中半減期を向上させるFc領域のアミノ酸置換の技術が報告されている (Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N., An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life., J Immunol. 2006 Jan 1;176(1):346-56., Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES., Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis., Nat Biotechnol. 1997 Jul;15(7):637-40.)。さらには抗体の物性改善を目的とした定常領域の種々のアミノ酸置換技術も知られている (WO 09/41613)。

[0030] また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球を *in vitro* で所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる (特公平1-59878 参照)。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる (WO 93/12227, WO 92/03

918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照)。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体 (scFv) としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を含む適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に周知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388を参考にすることができる。本発明で使用される抗体には、このようなヒト抗体も含まれる。

[0031] 抗体遺伝子を一旦単離し、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いることができる。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO, COS, ミエローマ、BHK (baby hamster kidney), HeLa, Vero, (2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9, sf21, Tn5などが知られている。植物細胞としては、ニコティアナ (Nicotiana) 属、例えばニコティアナ・タバカム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (Aspergillus) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) などが知られている。原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli)、枯草菌が知られている。これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。

[0032] 抗体修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) や細胞障害性薬剤等の

各種分子と結合した抗体を使用することもできる (Farmaco, 1999 Aug 30;54 (8):497-516., Cancer J. 2008 May-Jun;14(3):154-69.)。本発明で使用される抗体にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物は、抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

[0033] 本発明で使用される抗体としては、抗組織因子抗体、抗IL-6レセプター抗体、抗IL-6抗体、抗HM1.24抗原モノクローナル抗体、抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体 (抗PTHrP抗体)、抗グリピカン-3 抗体、抗ガングリオシドGM3抗体、抗TP0受容体アゴニスト抗体、凝固第VIII因子機能代替抗体、抗IL31レセプター抗体、抗HLA抗体、抗AXL抗体、抗CXCR4抗体、抗NR10抗体、ファクターIX(a)とファクターXを認識する二重特異性抗体などを挙げることができるが、これらに限定されない。

[0034] また、本発明で使用される抗体のpI値が4.0~10.0であることが好ましく、さらに好ましくはpI値が5.0~9.5、より好ましくは6.0~9.0である。これらのpI値は、アミノ酸の改変前のIgG抗体のpI値と比較して、上昇している。なおIgG抗体等の等電点は、等電点電気泳動等の公知の解析方法によって評価することができる。

[0035] 本発明におけるプロテインA改変リガンドと本発明において精製すべきIgG抗体のFc領域との結合量が、改変されていないプロテインAとの結合量に比して5倍以上であることが好ましく、より好ましくは10倍以上のIgG抗体を結合する改変体である。ここでいう結合量は特に測定方法を限定するものではないが、例えば本願の実施例で記載されている動的結合容量の測定方法などが挙げられる。

[0036] 通常用いられるプロテインAカラムとして、例えば具体的にはHiTrap MabSelect SuRe (GEヘルスケア製、商品名)、Amsphere A3 (JSRライフサイエンス製、登録商標)、MiniChrom Column Eshmuno A (メルクミリポア製、登録商標)、MabSpeed rP202 (三菱ケミカル製、登録商標)、KanCap Pre-packaged Column (カネカ製、商品名)が挙げられる。

[0037] 本発明に用いられるプロテインAアフィニティカラムとしてはCドメイン改変体またはZドメインの、4、7、35位のいずれか1以上の元からあるリジン残基をリジン以外のアミノ酸残基へ置換する改変を有し、且つQ311R及びR343Rのアミノ酸残基の置換を含むIgG抗体に対する結合能を有する改変イムノグロブリン結合ドメインまたはそれらの改変イムノグロブリン結合ドメインの多量体を含むプロテインA改変リガンドが固定化された担体を含むアフィニティカラムが用いられる。本プロテインA改変リガンドはプロテインAのCドメインのアミノ酸配列の29位のグリシン残基をアラニン残基に置換したCドメイン改変体（配列番号1）、またはZドメイン（配列番号2）の、4、7、35位のいずれか1以上のリジン残基を他のアミノ酸残基に置換する改変を行うことにより、自らのアミノ基を介して不溶性担体に固定化する際に、イムノグロブリンに対する親和性を保持するための配向性が改変前の分子に比べて向上していることを特徴とする。

[0038] 本発明において、「イムノグロブリン結合ドメイン」とは、単独でイムノグロブリン結合活性を有するポリペプチドの機能単位を指し、「改変イムノグロブリン結合ドメイン」とは、元となるイムノグロブリン結合ドメインに改変を加えたものをいう。「リガンド」とは、特異的親和力により特定の分子と結合する性質をもつ分子のことをいい、本発明においては、イムノグロブリンと選択的に結合できるイムノグロブリン結合タンパク質を指す。「プロテインA改変リガンド」とは、プロテインAの結合ドメインに改変を加えた改変イムノグロブリン結合ドメインを含むイムノグロブリン結合タンパク質をいう。ここで、本明細書においては「改変イムノグロブリン結合ドメイン」と「プロテインA改変リガンド」を総称して「改変タンパク質」という。

[0039] 本発明に用いられる改変イムノグロブリン結合ドメインは、Cドメイン改変体（配列番号1）においてさらに付加的に、またはZドメイン（配列番号2）の、4、7、35位のいずれか1以上のリジン残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むことができる。たとえば、4、7、35位の内、2以上のリジン残基、好ましくは3つのリジン残基が他のアミノ酸残

基に置換されていることが望ましい。

- [0040] Cドメイン改変体（配列番号1）、またはZドメイン（配列番号2）の、4、7、35位のいずれか1個以上における置換後のアミノ酸の種類については、特に限定されないが、アラニン、グルタミン、アスパラギン、バリン、セリン、スレオニン、ヒスチジン、チロシン、またはアルギニンが好ましく、アラニン、スレオニン、またはアルギニンがより好ましい。
- [0041] より具体的には、Cドメイン改変体（配列番号1）、またはZドメイン（配列番号2）の4位における置換後のアミノ酸の種類としては、グルタミン酸、イソロイシン、アルギニン、アラニン、バリン、セリン、スレオニン、またはヒスチジンが好ましく、アラニンがより好ましい。
- [0042] また、Cドメイン改変体（配列番号1）、またはZドメイン（配列番号2）の7位における置換後のアミノ酸の種類としては、チロシン、フェニルアラニン、グルタミン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、スレオニン、アラニン、バリン、セリン、アルギニン、またはヒスチジンが好ましく、スレオニンがより好ましい。
- [0043] また、Cドメイン改変体（配列番号1）、またはZドメイン（配列番号2）の35位における置換後のアミノ酸の種類としては、アルギニン、グルタミン、アスパラギン、またはチロシンが好ましく、アルギニンがより好ましい。
- [0044] また、Cドメイン改変体（配列番号1）、またはZドメイン（配列番号2）は、Q311R及びR343Rのアミノ酸残基の置換を含むIgG抗体に対する結合能を有することを限度として、上記改変に加えて、1または数個のアミノ酸が置換されていてもよい。特に、Cドメイン改変体（配列番号1）、またはZドメイン（配列番号2）において、構成アミノ酸として含まれるリジンの数が少ないことが好ましく、上記改変に加えて、42、49、50、58位の元からあるリジン残基のうち1～4個、好ましくは3又は4個、より好ましくは4個、リジン以外のアミノ酸残基に置換されていることが望ましい。
- [0045] Cドメイン改変体（配列番号1）、またはZドメイン（配列番号2）の、

42、49、50、58位のいずれか1個以上における置換後のアミノ酸の種類については、特に限定されないが、アラニン、グルタミン、アスパラギン、バリン、セリン、スレオニン、ヒスチジン、チロシン、またはアルギニンが好ましく、アラニン、またはアルギニンがより好ましい。

[0046] より具体的には、Cドメイン改変体（配列番号1）、またはZドメイン（配列番号2）の42位の元からあるリジン残基を他のアミノ酸残基に置換する場合であれば、置換後のアミノ酸の種類としては、アラニン、バリン、セリン、スレオニン、またはヒスチジンが好ましく、アラニンがより好ましい。

[0047] また、Cドメイン改変体（配列番号1）、またはZドメイン（配列番号2）の49位の元からあるリジン残基を他のアミノ酸残基に置換する場合であれば、置換後のアミノ酸の種類としては、アルギニン、グルタミン、アスパラギン、またはチロシンが好ましく、アルギニンがより好ましい。

[0048] また、Cドメイン改変体（配列番号1）、またはZドメイン（配列番号2）の50位の元からあるリジン残基を他のアミノ酸残基に置換する場合であれば、置換後のアミノ酸の種類としては、アルギニン、グルタミン、アスパラギン、またはチロシンが好ましく、アルギニンがより好ましい。

[0049] また、Cドメイン改変体（配列番号1）、またはZドメイン（配列番号2）の58位の元からあるリジン残基を他のアミノ酸残基に置換する場合であれば、置換後のアミノ酸の種類としては、アルギニン、グルタミン、アスパラギン、またはチロシンが好ましく、アルギニンがより好ましい。

[0050] また、本発明における改変イムノグロブリン結合ドメインは、上記改変に加えて、Cドメイン改変体（配列番号1）、またはZドメイン（配列番号2）の37位のアスパラギン酸残基がアスパラギン酸以外のアミノ酸残基に置換されていてもよい。この改変により、酸性pH条件における化学的安定性が改変前の分子に比べて向上する。

[0051] Cドメイン改変体（配列番号1）、またはZドメイン（配列番号2）の37位の元からあるアスパラギン酸残基を他のアミノ酸残基に置換する場合で

あれば、置換後のアミノ酸の種類としては、特に限定されないが、アラニン、グルタミン酸、セリン、スレオニン、ロイシン、またはイソロイシンが好ましい。

[0052] 本発明に用いられる改変イムノグロブリン結合ドメインのアミノ酸配列の好適な例として、配列番号3または5に示すアミノ酸配列が挙げられる。配列番号3に示すアミノ酸配列は、配列番号1に示すアミノ酸配列における4位がアラニン残基、7位がスレオニン残基、35位がアルギニン残基に置換されたアミノ酸配列である。また、配列番号5に示すアミノ酸配列は、配列番号1に示すアミノ酸配列における4位がアラニン残基、7位がスレオニン残基、35位がアルギニン残基、42位がアラニン残基、49位がアルギニン残基、50位がアルギニン残基、および58位がアルギニン残基に置換されたアミノ酸配列である。

あるいは、上記に加えて、以下のアミノ酸配列も、本発明における改変イムノグロブリン結合ドメインのアミノ酸配列の好適な例として挙げることができる：

[1] 配列番号1で規定されるCドメイン改変体において、35位のリジンをグルタミンまたはアルギニンに置換；

[2] 配列番号1で規定されるCドメイン改変体において、40、43、46、および53位のアミノ酸残基をリジンに置換し、かつ35位のリジンをアルギニンまたはバリンに置換

[3] [2]のアミノ酸配列において更に付加的に、7位のリジンを、チロシン、フェニルアラニン、スレオニン、アルギニン、グルタミン、バリン、ロイシン、イソロイシン、ヒスチジン、アラニン、またはプロリンに置換；

[4] [2]または[3]のアミノ酸配列において更に付加的に、4位のリジンをアラニンに置換；

[5] 配列番号1で規定されるCドメイン改変体において、40、43、46、および53位のアミノ酸残基をリジンに置換し、かつ4位のリジンをバリン、イソロイシン、グルタミン酸またはアルギニンに置換；

[6] 配列番号1で規定されるCドメイン改変体において、42位のリジンをアラニンに置換し、かつ49、50、および58位のリジンをアルギニンに置換し、更に4位のリジンをバリン、イソロイシン、グルタミン酸またはアルギニンに置換；

[7] [5]または[6]のアミノ酸配列において、更に付加的に7位と35位のリジンをアルギニンに置換

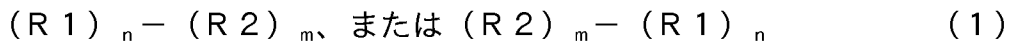
[0053] プロテインA改変リガンドが、イムノグロブリン結合ドメインを構成単位とする多量体である場合、上記改変を含むイムノグロブリン結合ドメインが1個以上含まれていればよい。当該多量体に含まれるイムノグロブリン結合ドメインの単位数は、例えば、2～10個、好ましくは2～8個、より好ましくは4～7個、更に好ましくは6個である。当該多量体には、上記改変を含むイムノグロブリン結合ドメインが1個以上含まれていることを限度として、上記改変を含まないイムノグロブリン結合ドメインが含まれていてもよい。当該多量体において、構成単位として含まれるイムノグロブリン結合ドメインの総数に対して、上記改変を含むイムノグロブリン結合ドメインが占める割合としては、50%以上が好ましく、100%（即ち、構成単位として含まれるイムノグロブリン結合ドメインの全てが上記改変を有していること）がより好ましい。

[0054] プロテインA改変リガンドが、イムノグロブリン結合ドメインを構成単位とする多量体である場合、当該多量体のN末端又はC末端側から1番目および／または2番目に配されるイムノグロブリン結合ドメインには、担体に対して固定化し易くするために、担体に共有結合可能なアミノ酸残基（例えば、リジン残基）が置換されていてもよい。例えば、当該多量体のN末端又はC末端側から1番目および／または2番目に配されるCドメイン改変体（配列番号1）、またはZドメイン（配列番号2）において、40、43、46、53、54、56位の元からあるアミノ酸残基の内、少なくとも1個、好ましくは2～6個、より好ましくは3又は4個、更に好ましくは4個が、リジン残基に置換されていることにより、担体に対して固定化し易くすることが

できる。

[0055] また、当該多量体のN末端又はC末端側から1番目および／または2番目に配されるイムノグロブリン結合ドメインは、Cドメイン改変体（配列番号1）、またはZドメイン（配列番号2）の、4、7、35位のいずれか1以上のリジン残基が他のアミノ酸残基に置換されていなくてもよいが、これらのリジン残基の1以上が他のアミノ酸残基に置換されていてもよい。当該多量体のN末端又はC末端側から1番目および／または2番目に配されるイムノグロブリン結合ドメインの一例として、配列番号4に示すアミノ酸配列が挙げられる。配列番号4に示すアミノ酸配列は、配列番号1に示すアミノ酸配列における4位がアラニン残基、7位がスレオニン残基、35位がアルギニン残基、40位がリジン残基、43位がリジン残基、46位がリジン残基、および53位がリジン残基に置換されたアミノ酸配列である。

[0056] 上記多量体の一例として、下記式（1）で表される改変プロテインAリガンドが挙げられる。



[0057] 式（1）において、左端がN末端であり、右端がC末端である。

[0058] 式（1）において、nは1以上9以下の整数、好ましくは1以上7以下の整数、より好ましくは3以上6以下の整数、さらに好ましくは5である。mは1又は2の整数であり、好ましくは1である。ドメイン総数n+mは、2～10個、好ましくは2～8個、より好ましくは4～7個、更に好ましくは6個である。

[0059] 式（1）において、（R1）は、Cドメイン改変体（配列番号1）、またはZドメイン（配列番号2）の、4、7、35位のいずれか1以上（好ましくは全て）がリジン残基以外のアミノ酸残基に置換されている改変イムノグロブリン結合ドメインである。（R1）は、前記4、7、35位の置換に加えて、42、49、50、58位のいずれか1以上（好ましくは全て）が、リジン以外のアミノ酸残基に置換されていることが好ましい。n個の（R1）は、全て同一のアミノ酸配列であってもよいが、互いに異なるアミノ酸配列

であってもよい。

[0060] 式(1)において、(R2)は、Cドメイン改変体(配列番号1)、またはZドメイン(配列番号2)の、40、43、46、53、54、56位のいずれか1以上(好ましくは全て)がリジン残基に置換されているイムノグロブリン結合ドメインである。(R2)は、前記40、43、46、53、54、56位のいずれか1以上の置換に加えて、4、7、35位のいずれか1以上(好ましくは全て)がリジン以外のアミノ酸残基に置換されていることが好ましい。mが2である場合、2個の(R2)は、全て同一のアミノ酸配列であってもよいが、互いに異なる配列であってもよい。

[0061] 前記式(1)で表される改変プロテインAリガンドの好適な一例として、nが5；mが1；(R1)が、配列番号5に示すアミノ酸配列(配列番号1における4位がアラニン残基、7位がスレオニン残基、35位がアルギニン残基、42位がアラニン残基、49位がアルギニン残基、50位がアルギニン残基、および58位がアルギニン残基に置換されているアミノ酸配列)からなる改変イムノグロブリン結合ドメイン；(R2)が、配列番号4に示すアミノ酸配列(配列番号1における4位がアラニン残基、7位がスレオニン残基、35位がアルギニン残基、40位がリジン残基、43位がリジン残基、46位がリジン残基、および53位がリジン残基に置換されているアミノ酸配列)からなる改変イムノグロブリン結合ドメイン、が挙げられる。

[0062] 本発明のプロテインA改変タンパク質は、例えばFrederick M. AusbelらによるCurrent Protocols In Molecular Biologyなどに記載されている公知の遺伝子組換え技術を利用して製造することができる。すなわち、目的の改変タンパク質をコードする核酸配列を含有させた発現ベクターを大腸菌などの宿主に形質転換し、該細胞を適切な液体培地で培養することにより、培養後の細胞より大量かつ経済的に取得することができる。具体的には、プロテインAの1個のイムノグロブリン結合ドメインは約60個のアミノ酸からなる小さなタンパク質であるので、例えば所望のアミノ酸配列をコードするDNAを数十塩基からなる合成オリゴヌクレオチドに分割して合成し、それらを

DNAリガーゼによるライゲーション反応によって繋げてプラスミドベクターに挿入することで、目的の発現ベクターを取得することができる。

[0063] その際に、該タンパク質を大腸菌で効率よく発現させる目的で、大腸菌の至適コドンを用いた核酸配列を採用することは、当業者によって一般的に行われている。また改変前のイムノグロブリン結合ドメインのアミノ酸配列としては、プロテインAのいずれのドメインのものを採用しても良いが、元から存在する5つのドメインのうち39位以降にリジン残基が多いCドメインを用いるのが好ましい。あるいは、イムノグロブリンに対する親和性リガンドとしての使用実績の多いZドメインの配列を用いてもよいが、化学的安定性が増すことが既に知られている29位のグリシン残基のアラニン残基への置換 (Nilsson B. et. Al, Protein Engineering, 1(2), pp.107-113) を施したCドメイン改変体の配列 (配列表の配列番号1に表示) を採用するのが最も好ましい。目的のアミノ酸置換を実現するためのDNA配列の変異は、改変前のクローンDNAを鋳型として、ミスマッチ塩基対を組み込む合成オリゴDNAをポリメラーゼチェーンリアクションのプライマーとして利用するオーバーラップ伸長法や、カセット変異法等を用いて意図した部位に容易に導入することができる。さらに、プロテインA由来のイムノグロブリン結合タンパク質をイムノグロブリンのアフィニティクロマトグラフィ用のリガンドとして利用する際には、従来より2個以上、望ましくは4個程度のイムノグロブリン結合ドメインを連結した多量体タンパク質が製造され、使用されている。本発明により得られるイムノグロブリン結合タンパク質についても、イムノグロブリン結合ドメインを2個以上、好ましくは2~10個、より好ましくは4~7個、更に好ましくは6個を連結した多量体タンパク質として製造され、利用されることが好ましい。このような多量体タンパク質をコードするcDNAは、一個のイムノグロブリン結合ドメインをコードするcDNAを意図する数だけ直列に連結することにより、容易に作成することができる。こうして作成したcDNAを適切な発現プラスミド上に挿入して利用することで、イムノグロブリン結合ドメインの単位が2個またはそれ以上

連結された多量体タンパク質を容易に製造することが可能である。

- [0064] 本発明の改変タンパク質をコードする核酸配列が挿入される発現ベクターとしては、宿主細胞において複製可能であるプラスミド、ファージ、ウイルス等いかなるベクターをも用いることができる。例えば、商業的に入手可能な発現ベクターとしては、pQE系ベクター（株式会社キアゲン）、pDR540、pRIT2T（GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社）、pET系ベクター（メルク株式会社）等が挙げられる。発現ベクターは宿主細胞との適切な組み合わせを選んで使用するのがよい。例えば大腸菌を宿主細胞とする場合には、pET系ベクターとBL21（DE3）大腸菌株の組み合わせまたはpDR540ベクターとJM109大腸菌株の組み合わせ等が好ましく挙げられる。
- [0065] 本発明の改変タンパク質は、培養された細胞を遠心分離等により集め、これを超音波やフレンチプレスなどを用いた処理にて破砕することで、可溶性画分中に回収することができる。該改変タンパク質の精製は、公知の分離、精製技術を適切に組み合わせて行なうことができる。具体的には、塩析法、透析法、限外濾過法等の分離技術に加え、疎水クロマトグラフィ、ゲル濾過クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、アフィニティークロマトグラフィ、逆相クロマトグラフィ等の精製方法が挙げられる。
- [0066] 本発明の改変タンパク質をイムノグロブリンの親和性リガンドとして結合させる不溶性担体としては、例えば、キトサン、デキストランなどの天然の高分子材料、ビニルポリマー、高度架橋アガロース、ポリイミドなどの合成ポリマー類などが挙げられる。また別の形態ではシリカなどの無機担体でもよい。通常、リガンドタンパク質は、シアノゲンブロミド、エピクロロヒドリン、N-ヒドロキシスクシンイミド、トシル／トレシルクロリド、カルボジイミド、グルタルアルデヒド、ヒドラジンのようなカップリング剤やカルボキシルまたはチオール活性化担体等によって、担体上に固定される。このようなカップリング反応は、当該技術分野において周知であり、文献に広く記載されている（例えば、Jansson, J.C.およびRyden, L., 「Protein puri

fication]、第2版、375-442頁、ISBN 0-471-18626-0)。本発明のリガンドタンパク質は、空間的にリガンドの配向性を制御できるように配置された複数のアミノ基を介して担体に結合させることを特徴とするものであり、該タンパク質の固定化にはトレシル基、エポキシ基、カルボキシル基、ホルミル基など、タンパク質のアミノ基と反応して共有結合を形成できる活性基を有する担体を用いることができる。市販の担体としては、トヨパールAF-トレシル-650、トヨパールAF-エポキシ-650、トヨパールAF-カルボキシ-650、トヨパールAF-ホルミル-650（以上、東ソー株式会社）、NHS活性化セファロース、臭化シアン活性化セファロース、エポキシ活性化セファロース（以上、GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社）などが挙げられる。

[0067] 本発明に用いられるプロテインAアフィニティカラムとしては上記プロテインA改変リガンドが、どのような手段で固定されていてもよいが、例えば以下の手段で固定することができる。

(1) プロテインAのCドメイン改変体またはZドメインにおいて、さらに付加的に、40位、43位、46位、53位、54位および56位のアミノ酸残基のうちの1個ないし6個をリジン残基に置換し、置換されたリジン残基を介して担体に固定化する方法、

(2) プロテインAのC末端にシステインを導入し、担体とジスルフィド結合またはチオエーテル結合により担体に固定化する方法、

(3) チオール基をシアノ化することによるアミノ基含有固体化担体へ固定化する方法、

(4) 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)を架橋剤として利用してシステイン残基を有する改変イムノグロブリン結合ドメインの多量体をアミノ基含有担体へ固定化する方法、および

(5) プロテインAのCドメイン改変体の42位、49位、50位、58位のリジン残基をリジン残基以外のアミノ酸に置換した改変イムノグロブリン結合ドメイン、またはZドメインの49位、50位、58位のリジン残基をリ

ジン以外のアミノ酸に置換した改変イムノグロブリン結合ドメインのC末端に付加した複数個（たとえば5個）のリジン残基を介して担体に固定化する方法。

上記固定化する方法については、通常行われる方法により固定化できる。

[0068] 好ましくはプロテインAのCドメイン改変体またはZドメインにおいて、さらに付加的に、40位、43位、46位、53位、54位および56位のアミノ酸残基のうちの1個ないし6個をリジン残基に置換し、置換されたりリジン残基を介して担体に固定化する方法である。

[0069] 本発明に用いられるプロテインAアフィニティカラムは具体的にはFc結合性リガンド（改変プロテインAの組み換え体）を合成ポリマー担体T O Y O P E A R L HW-56に結合させたアフィニティ樹脂であるAF-rProtein A HC-650F（東ソー製）が挙げられる。

[0070] 以上のようにして調製されたプロテインA改変リガンドを固定化した担体をカラムに充填してアフィニティカラムとすることができる（工程a）。次いで、準備されたアフィニティカラムには、CH2領域やCH3領域に改変されたアミノ酸配列を有するIgG抗体を含む組成物がロードされる（工程b）。本発明において、IgG抗体を含む組成物とは、例えば、IgG抗体発現細胞の培養物やその上澄を言う。一般に、培養物は、培養に必要な各種の栄養素のみならず、細胞の代謝産物等の多様な成分で構成された複雑な組成物を構成する。その中から目的とするIgG抗体を医薬品原料に求められる純度にまで高度に精製するには、目的とするIgG抗体に適した精製条件を決定する必要がある。本発明によって、CH2領域やCH3領域にQ311R及びP343Rのアミノ酸残基の置換を含むIgG抗体の精製には、プロテインAのCドメインまたはZドメインの、4、7、35位のいずれか1以上の元からあるリジン残基をリジン以外のアミノ酸残基へ置換する改変を有し、且つ前記IgG抗体との結合能を有する改変体が好適な精製ツールであることが明らかにされた。

[0071] IgG抗体を含む組成物は、アフィニティカラムにロードする前に、ろ過や遠心分離などによって予め処理することもできる。IgG抗体を含む組成物は、一

一般的な液体クロマトグラフィーシステムによって、カラムのサイズや容量、あるいは担体のサイズ等に応じて、適当な圧力と流速でアフィニティカラムにロードすることができる。IgG抗体組成物をアフィニティカラムにロードする量は、アフィニティカラムのIgG抗体結合容量と同程度とするのが望ましい。たとえば、組成物をロードしたアフィニティカラムから流出するIgG抗体の濃度をモニタリングすることによって、IgG抗体の結合容量を知ることができる。すなわち、アフィニティカラムから流出するIgG抗体のレベルが、ロードした組成物におけるIgG抗体濃度と同じレベルになった時に、アフィニティカラムのIgG抗体結合容量に近づいたと判定できる。その後、アフィニティカラムからIgG抗体を溶出（工程c）すれば、IgG抗体の効率的な精製が期待できる。

[0072] 本発明の精製方法において、工程(c)の前に、洗浄溶液でアフィニティカラムを洗浄する工程を付加的に含むこともできる。

[0073] 洗浄溶液は特に限定されるものではないが、緩衝剤と塩の組み合わせであって、緩衝剤としてはリン酸、酢酸、クエン酸、グリシン、トリスヒドロキシメチルアミノメタンからなる群より選択される少なくとも1つを含み、塩としてはアルギニン、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウムからなる群より選択される少なくとも一つを含む溶液を用いることができる。

[0074] 必要に応じてアフィニティカラムを洗浄後、アフィニティカラムに吸着されたIgG抗体を溶出することによって精製されたIgG抗体を回収することができる（工程c）。プロテインA改変リガンドに吸着したIgG抗体を溶出する方法は、公知の条件の中から適宜選択することができる。たとえば、塩酸、酢酸、クエン酸、アルギニン、グリシンまたはリン酸からなる群より選択される少なくとも1つを含む溶液を利用することができる。IgG抗体をアフィニティカラムから溶出するための溶液の濃度は、適宜目的によって調整可能であり、例えば酢酸であれば20 ~ 500 mM、通常50~200 mM、塩酸であれば1~5 mMとすることができる。アフィニティカラムからのIgG抗体の溶出時にも、溶出液のタンパク質濃度をモニタリングすることによってIgG抗体の溶出を追跡

することができる。

[0075] 工程(c)の後、回収されたIgG抗体は、必要に応じて更に精製することができる。たとえば、本発明の精製方法は、さらに付加的に、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、マルチモードクロマトグラフィー及びハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーからなる群から選択される少なくとも一つのクロマトグラフィーによるIgG抗体の精製工程を含んでいてもよい。

以上のような工程を経て、本発明は、その好ましい態様において、IgG抗体を宿主細胞内または細胞外（培地など）から単離し、実質的に純粋で均一なIgG抗体として精製することができる。すなわち本発明は、以下の工程を含む、精製されたIgG抗体の製造方法を提供する：

(i) Q311R及びP343Rのアミノ酸残基の置換を含むIgG抗体を含有する組成物を提供する工程、

(ii) 配列番号1で規定されるスタフィロコッカス (Staphylococcus) プロテインAのCドメイン改変体または配列番号2で規定されるZドメインの、4、7、35位のいずれか1以上の元からあるリジン残基をリジン以外のアミノ酸残基へ置換する改変を含む改変イムノグロブリン結合ドメインまたはそれらの改変イムノグロブリン結合ドメインの多量体を含むプロテインA改変リガンドが固定化された担体を含むアフィニティカラムを準備する工程、

(iii) 前記IgG抗体を含有する組成物を工程(ii)のアフィニティカラムにロードする工程、及び

(iv) 工程(iii)でIgG抗体を含有する組成物をロードしたアフィニティカラムからIgG抗体を溶出して回収する工程。

本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製されたIgG抗体も包含する。

[0076] 以下に本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

### 実施例 1

[0077] 抗体Aは薬物動態を改善するために、抗体工学的な手法により、等電点 (pI

)の上昇と、Fc受容体IIb (FcRIIb)や新生児型Fc受容体 (FcRn)に対する親和性が増強されており、CH2領域やCH3領域におけるQ311R及びP343Rのアミノ酸残基が置換され、配列番号10のFc領域を持つ抗体である一方で、その結果として、抗体Aは、プロテインAに対する結合親和性が弱まっていた。つまり、抗体Aは、薬物動態を改善したことで、医薬品としての有用性が高められたものの、一方で新たに製造上の問題を抱えることになっている。

[0078] 抗体のプロテインAとの結合親和性は、その精製工程（アフィニティ精製）にしばしば利用されている。具体的には、プロテインAを固定したカラムに抗体を吸着させ、洗浄後に抗体を溶出して回収する工程は、抗体の精製方法として広く利用されている。プロテインAは、抗体のFc領域に結合するので、抗体の抗原特異性とは無関係に幅広い抗体の精製に利用されている。そして、プロテインAの固定化方法や、樹脂、あるいはプロテインAそのものを改変した種々のプロテインAカラムが市販されている。

[0079] 抗体Aのアフィニティ精製に応用できるプロテインA固定化樹脂を見出すために、以下の市販のプロテインA固定化樹脂に対する抗体の親和性を比較した：

HiTrap MabSelect SuRe (GE ヘルスケア製、商品名) ;  
ToyoScreen AF-rProtein A HC-650F (東ソー製、商品名) ;  
Amsphere A3 (JSRライフサイエンス製、登録商標) ;  
MiniChrom Column Eshmuno A (メルクミリポア製、登録商標) ;  
MabSpeed rP202 (三菱ケミカル製、登録商標) ;  
KanCap Pre-packaged Column (カネカ製、商品名) 。

[0080] (1) 抗体Aの各カラムにおける動的結合容量 (dynamic binding capacity ;DBC)

精製された抗体Aを平衡化緩衝液 (Equilibration Buffer)に溶解し、各プロテインA固定化樹脂を充てんしたカラムにロードした。カラムから溶出してくる緩衝液のタンパク質濃度を紫外線で追跡し、5%溶出点 (5% breakthrough point)を同定し、以下の式により樹脂1L当たりのDBCを決定した。5%溶出点

とは、溶出液のタンパク質濃度が、カラムにロードした抗体溶液のタンパク濃度の5%を越えた時点で、カラムにロードされたタンパク質量を意味する：

$$\text{抗体A濃度(g/L)} \times \text{ロードした液量(5\% breakthrough point)(L)}$$

$$\text{DBC} = \frac{\text{抗体A濃度(g/L)} \times \text{ロードした液量(5\% breakthrough point)(L)}}{\text{Column容量 (L)}}$$

同様にして、比較のために、ヒトIgG1のFc領域に改変を含まないヒト化抗体についても、各カラムのDBCを決定した。

[0081] (2) 動的結合容量 ; DBC

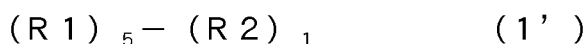
[表1]

各プロテイン A 固定化樹脂における抗体 A の DBC (g/L resin)

樹脂	DBC
AF-rProtein A HC-650F	49.1
Amsphere A3	13.6
MabSpeed rP202	6.4
KanCap A	2.5
Eshmuno A	2.3
MabSelect SuRe	1.9
MabSelect SuRe LX	1.6

[0082] 抗体Aの結合量が多かったAF-rProtein A HC-650Fは、製造ロットの異なる2つの樹脂で評価した場合にも46.6および45.2と、高いDBCを示した。AF-rProtein A HC-650Fに次ぐDBCを示したのはAmsphere A3で、13.6だった。その他の樹脂のDBCは1.6-6.4とかなり低い数値となった。一方、Fc領域が改変されていない抗体では、図1に示すように各樹脂のDBCは20-70で、抗体の精製に十分な値となった。

[0083] AF-rProtein A HC-650F (東ソー製) は、Fc結合性リガンド (改変プロテインAの組み換え体) を合成ポリマー担体TOYOPEARL HW-65に結合させたアフィニティ樹脂である。AF-rProtein A HC-650Fに結合されたリガンドは、以下の式(1')に示す構造を持っている：



上記式（1'）において、左端がN末端、右端がC末端である。上記式（1'）中、（R2）は、スタフィロコッカスアウレウス(Staphylococcus aureus)由来のプロテインAを構成するイムノグロブリン結合ドメインのCドメインのアミノ酸配列の一部を置換（G29A）したCドメイン改変体（配列番号：1）のアミノ酸配列の4位がアラニン残基、7位がスレオニン残基、35位がアルギニン残基、40位がリジン残基、43位がリジン残基、46位がリジン残基、および53位がリジン残基に置換された改変イムノグロブリン結合ドメイン（配列番号4）である。そのN末端側に配置された5つの（R1）は、Cドメイン改変体のアミノ酸配列の4位がアラニン残基、7位がスレオニン残基、35位がアルギニン残基に置換された配列に加えて、42位がアラニン残基、49位がアルギニン残基、50位がアルギニン残基、および58位がアルギニン残基に置換されているアミノ酸配列からなる改変イムノグロブリン結合ドメイン（配列番号5）である。即ち、式（1'）は、N末端側から、配列番号5に示すアミノ酸配列が5個及び配列番号4に示すアミノ酸配列が1個連結されているアミノ酸配列からなるリガンドである。

上記改変体においては、改変イムノグロブリン結合ドメインを6量体とすることで、Fc領域との結合は更に強化されている。AF-rProtein A HC-650Fは、上記構造の改変体の利用によってそのFc結合性が大きく改善されるとともに、アルカリ耐性を備えたアフィニティ樹脂である。

今回の比較試験に用いたアフィニティ樹脂は、いずれもプロテインA自体の構造やその担体との結合様式を最適化し、Fc領域との結合性やアルカリ耐性などを強化した製品である。Fc領域に改変を含まない場合には、いずれも抗体との優れた結合性を示すが、Fc領域が改変された場合には、アフィニティ樹脂によって抗体との結合性に大きな違いをもたらすことが明らかとなった。

## 実施例 2

[0084] Q311R及びP343Rのアミノ酸残基の置換を含むpI改変抗体に対するリガンドの結合性能の評価のため、実施例1で用いたAF-rProtein A HC-650FおよびMa

bSelect SuRe について、BLItz（登録商標）（ForteBio社）の評価システムによるKD値の測定を行った。

AF-rProtein A HC-650Fのリガンド（式（1'）に示す構造）、MabSelect SuReのリガンドのそれぞれをBiotin（Lys:Biotin = 1:1）で標識化後、センサーチップ表面に固定した。PBS溶液で平衡化処理を行った後に、抗体を含有する溶液をPBS（+0.1%のBSA）バッファーで希釈して添加し、さらにPBS（+BSA）を添加して解離反応の測定を行った。

抗体には、抗体Aのほか、ヒト化抗インターロイキン6（IL-6）レセプター抗体であるトシリズマブ（hPM-1あるいはMRA：国際特許出願公開番号WO92-19759を参照）を比較例として用いた。トシリズマブは抗体Aと異なり、pI改変のためのQ311R及びP343Rのアミノ酸残基の置換を含まない（非pI改変抗体）。

試験結果を図2および表2にまとめる。AF-rProtein A HC-650Fのリガンドについて、トシリズマブは $K_D$  値が $1.55 \times 10^{-9}$  Mで結合した。また、抗体Aは $K_D$  値が $184 \times 10^{-9}$  Mと、トシリズマブよりも親和性が弱いものの、結合が認められた。一方、MabSelect SuReのリガンドについては、トシリズマブは $K_D$  値が $8.11 \times 10^{-9}$  Mで結合したが、抗体Aの結合は認められなかった。

[0085] [表2]

リガンド	抗体	
	トシリズマブ親和性 $K_D$ ( $\times 10^{-9}$ M)	抗体A親和性 $K_D$ ( $\times 10^{-9}$ M)
AF-rProtein A HC-650	1.55	184
MabSelect SuRe	8.11	n. d.

### 実施例 3

[0086] リガンドのアミノ酸残基の置換と、pI改変抗体への結合力との関係性を評価するため、Cドメイン改変体（配列番号1）に対し4位、7位、35位の変異を導入したリガンド単量体について、実施例2と同様の方法（ただしLys:Biotin = 12:1に変更）で抗体AのKD値を測定した。

表3の結果から、Cドメイン改変体の35位のリジン残基（K）を、グル

タミン残基（Q）またはアルギニン残基（R）に置換することにより、抗体Aへの親和性の増加が認められた。

[0087] [表3]

リガンド	抗体A親和性 K <sub>d</sub> (×10 <sup>-4</sup> M)	Cドメイン改変体（配列番号1） に対する置換		
		4位	7位	35位
Cドメイン 改変体	n. d.	—*	—	—
PN61	1.62	A	T	R
PN34	1.99	—	—	Q
PN23	1.16	—	—	R
PN43	n. d.	R	—	—
PN44	n. d.	—	R	—

\* Cドメイン改変体(4位: K、7位:K、35位:K)に対する置換がないことを意味する。

[0088] また、Cドメイン改変体に対し40、43、46、53位のアミノ酸残基をリジン残基（K）に置換したりリガンド単量体（以下、「R2'構造のリガンド単量体」）について、4位、7位、35位に異なる変異を導入し、実施例2と同様の方法（ただしLys:Biotin = 12:1に変更）で抗体AのKD値を測定した。

表4の結果から、R2'構造のリガンド単量体のうち、35位のリジン残基（K）を、アルギニン残基（R）またはバリン残基（V）、特にアルギニン残基（R）に置換することにより、抗体Aへの親和性の増加が認められた。また、35位の置換に加え、7位のリジン残基（K）を、チロシン残基（Y）、フェニルアラニン残基（F）、トレオニン残基（T）、アルギニン残基（R）、グルタミン残基（Q）、バリン残基（V）、ロイシン残基（L）、イソロイシン残基（I）、ヒスチジン残基（H）、アラニン残基（A）、プロリン残基（P）のいずれか、特にチロシン残基（Y）またはフェニルアラニン残基（F）に置換することにより、抗体Aへの親和性の増加が認められた。

[0089]

[表4]

リガンド	抗体 A 親和性 K <sub>D</sub> (× 10 <sup>-9</sup> M)	C ドメイン 改変体 (配列番号 1) に対する置換						
		4 位	7 位	35 位	40 位	43 位	46 位	53 位
C ドメイン 改変体	n. d.	-*	-	-	-	-	-	-
R2	539	A	T	R	K	K	K	K
PN30	42400	A	-	R	K	K	K	K
PN133	80100	A	T	H	K	K	K	K
PN190	91300	A	T	A	K	K	K	K
PN12	39900	-	-	-	K	K	K	K
PN93	322	A	R	R	K	K	K	K
PN127	265	A	Q	R	K	K	K	K
PN128	176000	A	E	R	K	K	K	K
PN132	309	A	V	R	K	K	K	K
PN194	257000	A	T	E	K	K	K	K
PN195	171000	A	T	T	K	K	K	K
PN196	1100	A	T	V	K	K	K	K
PN198	n. d.	A	T	Y	K	K	K	K
PN197	120000	A	T	L	K	K	K	K
PN129	359	A	L	R	K	K	K	K
PN130	310	A	I	R	K	K	K	K
PN131	314	A	H	R	K	K	K	K
PN2011	102	A	Y	R	K	K	K	K
PN2012	152	A	F	R	K	K	K	K
PN2078	258	A	A	R	K	K	K	K
PN2082	1630	A	P	R	K	K	K	K

\*C ドメイン 改変体 (4 位: K、7 位: K、35 位: K、40 位: V、43 位: E、46 位: A、53 位: D、) に対する置換がないことを意味する。

#### 実施例 4

[0090] リガンドのアミノ酸残基の置換と、pI 改変抗体への結合力との関係性を評価するため、複数のリガンド 2 量体について、実施例 2 と同様の方法 (ただし Ly s: Biotin = 12:1 に変更) で抗体 A の K D 値を測定した。

試験対象のリガンド 2 量体は、C ドメイン 改変体に対し、40、43、46、53 位のアミノ酸残基をリジン残基 (K) に置換した R 2' 構造のリガンド単量体と、C ドメイン 改変体に対し、42 位をアラニン残基 (A)、49 位、50 位、58 位をアルギニン残基 (R) に置換したリガンド単量体 (以下、「R 1' 構造のリガンド単量体」) との 2 量体構造を有し、さらに 4 位、7 位、35 位に変異を有する。

表5の結果から、4位のリジン残基（K）を、バリン残基（V）、イソロイシン残基（I）、グルタミン酸残基（E）、アルギニン残基（R）のいずれかに置換した2量体について、いずれも抗体Aへの親和性の増強が認められた。

[0091] [表5]

リガ ンド	抗体A 親和性 K <sub>D</sub> (× 10 <sup>-9</sup> M)		Cドメイン改変体（配列番号1）に対する置換											
			4 位	7 位	35 位	40 位	43 位	46 位	53 位	42 位	49 位	50 位	58 位	
PN226	306	R1'	V	R	R	-*	-	-	-	-	A	R	R	R
		R2'	V	R	R	K	K	K	K	-	-	-	-	-
PN229	379	R1'	I	R	R	-	-	-	-	A	R	R	R	R
		R2'	I	R	R	K	K	K	K	-	-	-	-	-
PN231	314	R1'	E	R	R	-	-	-	-	A	R	R	R	R
		R2'	E	R	R	K	K	K	K	-	-	-	-	-
PN232	258	R1'	R	R	R	-	-	-	-	A	R	R	R	R
		R2'	R	R	R	K	K	K	K	-	-	-	-	-

\*Cドメイン改変体(40位:V、43位:E、46位:A、53位:D、42位:K、49位:K、50位:K、58位:K)に対する置換がないことを意味する。

## 実施例 5

[0092] リガンド単量体へのpolyリジン残基（K）の付加と、pI改変抗体への結合力との関係の評価するため、実施例2と同様の方法（ただしLys:Biotin = 12:1に変更）で抗体AのK<sub>D</sub>値を測定した。

試験対象のリガンド単量体は、42位、49位、50位および58位の元からあるリジン残基をリジン以外のアミノ酸に置換したR1'構造のリガンド単量体のC末端に担体への固定化のために5個のリジン残基（K）を付加した構造を有する。

表6の結果から、42位、49位、50位および58位の元からあるリジン残基をリジン以外のアラニン残基（A）とアルギニン残基（R）に置換し、C末端にリジン残基（K）を複数付加したリガンド単量体で、35位をアルギニン残基に置換することにより、抗体Aへの親和性の増強が認められた。

[0093]

[表6]

リガンド	抗体 A 親和性 K <sub>D</sub> (× 10 <sup>-9</sup> M)	C ドメイン 改変体 (配列番号 1) に対する置換							C 末端への 付加
		4 位	7 位	35 位	42 位	49 位	50 位	58 位	
PN100AH	335	V	R	R	A	R	R	R	Poly Lys (K)

### 産業上の利用可能性

[0094] 通常工業的製法において用いられているプロテインAカラムでは精製できないpI改変抗体を、本発明に基づいて特定のプロテインAアフィニティカラムを用いることにより、効率的かつ簡便な精製を行うことができる。本発明は、安定的かつ効率的な抗体医薬品の工業製法に有用である。

## 請求の範囲

- [請求項1] Q311R及びP343Rのアミノ酸残基の置換を含むIgG抗体を含有する組成物から当該抗体を精製する方法であって、
- (a) 配列番号1で規定されるスタフィロコッカス (Staphylococcus) プロテインAのCドメイン改変体または配列番号2で規定されるZドメインの、4、7、35位のいずれか1以上の元からあるリジン残基をリジン以外のアミノ酸残基へ置換する改変を含む改変イムノグロブリン結合ドメインまたはそれらの改変イムノグロブリン結合ドメインの多量体を含むプロテインA改変リガンドが固定化された担体を含むアフィニティカラムを準備する工程、
- (b) 前記IgG抗体を含有する組成物を工程(a)のアフィニティカラムにロードする工程、及び
- (c) 工程(b)のアフィニティカラムからIgG抗体を溶出して回収する工程、を含む方法。
- [請求項2] 上記改変イムノグロブリン結合ドメインの多量体が、2～10量体であり、且つ、N末端又はC末端側から1番目および／または2番目に、Cドメイン改変体（配列番号1）、またはZドメイン（配列番号2）において、40、43、46、53、54、56位の元からあるアミノ酸残基の内、少なくとも1個が、リジン残基に置換されているイムノグロブリン結合ドメインが配されている、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記置換が、プロテインAのCドメイン改変体またはZドメインの、4、7、35位のいずれか1以上の元からあるリジン残基を、アラニン残基、グルタミン残基、アスパラギン残基、バリン残基、セリン残基、スレオニン残基、ヒスチジン残基、チロシン残基、アルギニン残基、グルタミン酸残基、フェニルアラニン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、およびプロリン残基からなる群から選択されるいずれかのアミノ酸残基に置換する改変である、請求項1または2に記載

の方法。

[請求項4] 前記改変イムノグロブリン結合ドメインが、(i)配列番号3又は5に示すアミノ酸配列を有する改変イムノグロブリン結合ドメイン、又は(ii)配列番号3又は5に示すアミノ酸配列において、4、7、及び35位以外のアミノ酸残基の内1又は数個のアミノ酸残基が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列を含む改変イムノグロブリン結合ドメインである、請求項1～3のいずれかに記載の方法。

[請求項5] 前記改変イムノグロブリン結合ドメインが、Q311R及びP343Rのアミノ残基の置換を含むIgG抗体に対する結合能を有する、請求項1～4のいずれかに記載の方法。

[請求項6] 前記プロテインA改変リガンドが、配列番号3、4、および5からなる群から選択される少なくとも一つのアミノ酸配列からなる改変イムノグロブリン結合ドメインを含む改変リガンドである、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

[請求項7] 前記プロテインA改変リガンドが、以下の(1)-(5)からなる群から選択されるいずれかの手段で前記担体に固定化されている、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法；

(1) プロテインAのCドメイン改変体またはZドメインにおいて、さらに付加的に、40位、43位、46位、53位、54位および56位のアミノ酸残基のうちの1個ないし6個をリジン残基に置換した改変イムノグロブリン結合ドメインを介して担体に固定化する方法、

(2) プロテインAのC末端にシステインを導入し、担体とジスルフィド結合またはチオエーテル結合により固定化する方法、

(3) チオール基をシアノ化することによるアミノ基含有固体化担体へ固定化する方法、および

(4) 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)を架橋剤として利用してシステイン残基を有する改変イ

ムノグロブリン結合ドメインの多量体をアミノ基含有担体へ固定化する方法、

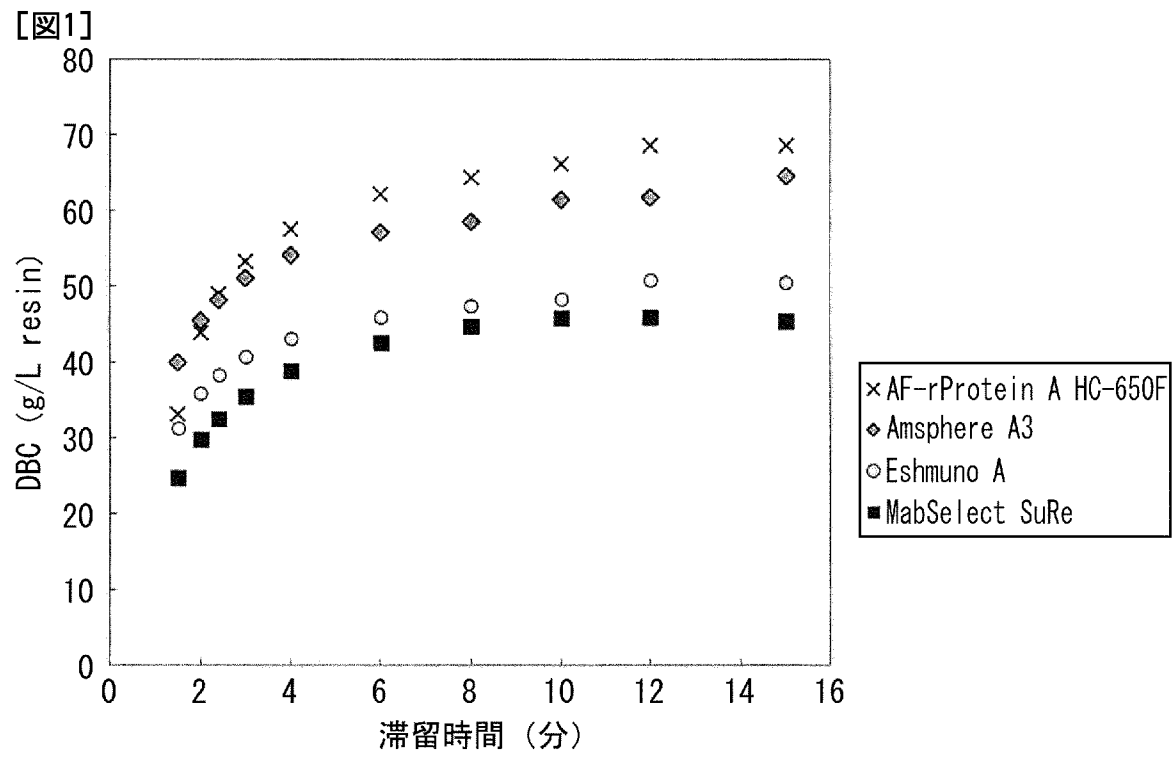
(5) プロテインAのCドメイン改変体の42位、49位、50位、58位のリジン残基をリジン残基以外のアミノ酸に置換した改変イムノグロブリン結合ドメイン、またはZドメインの49位、50位、58位のリジン残基をリジン以外のアミノ酸に置換した改変イムノグロブリン結合ドメインのC末端に付加した複数個のリジン残基を介して担体に固定化する方法。

[請求項8] 前記IgG抗体が、さらに付加的にIgG抗体のCH3領域においてM428L, N434A, Y436T, Q438R, 及びS440Eの中から選択される1以上のアミノ酸残基の置換を含むIgG抗体である、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

[請求項9] IgG抗体のCH3領域が、配列番号6～11からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むIgG抗体である、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

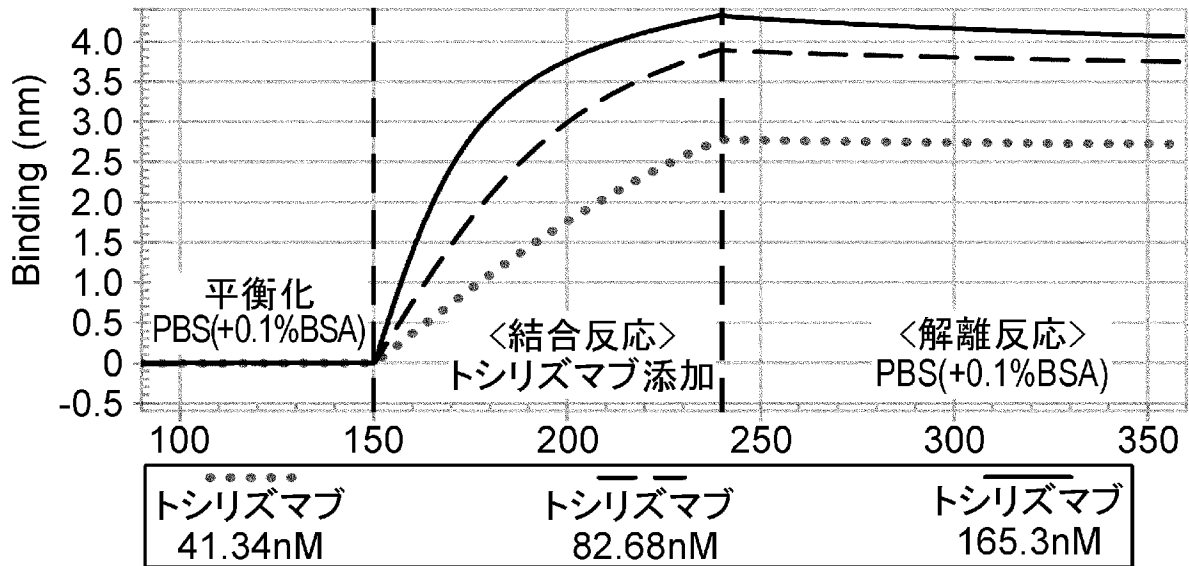
[請求項10] IgG抗体の重鎖定常領域が、配列番号12～57からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むIgG抗体である、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

[請求項11] 抗体のpI値が4.0～10.0である、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。



[図2-1]

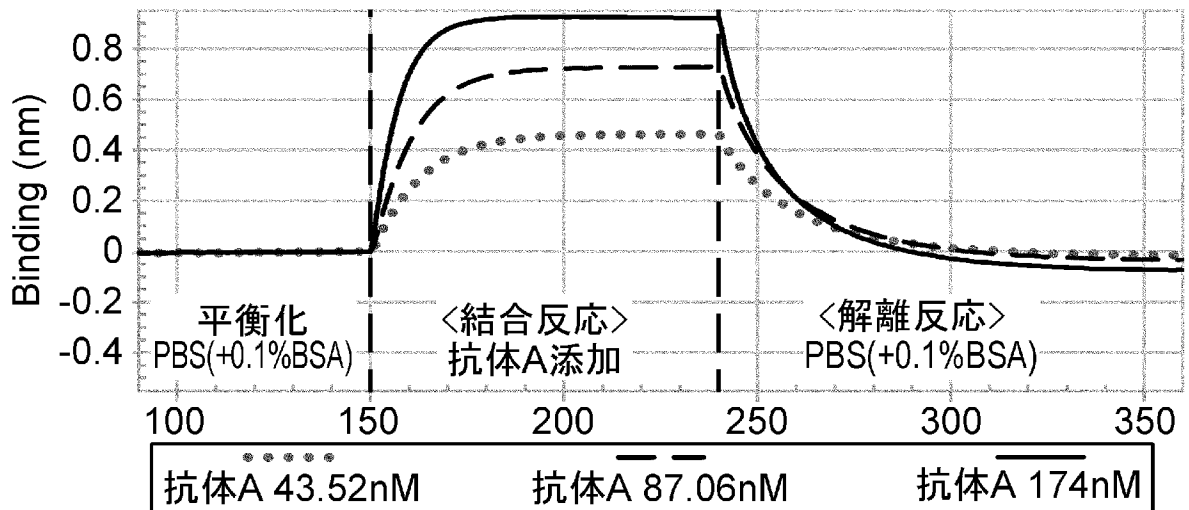
(A) AF-rProtein A HC-650Fのリガンドを固定化したチップ  
+ トシリズマブ含有溶液



$KD = 1.55 \times 10^{-9}M$

Sample ID	Conc. (nM)	KD (M)	ka (1/Ms)	ka Error	kd (1/s)	kd Error	Rmax	Rmax Error	R equilibrium
Tocilizumab	41.34	1.55E-09	2.33E+05	9.93E+02	3.60E-04	1.09E-05	4.874	0.03668	4.699
Tocilizumab	82.68	1.55E-09	2.33E+05	9.93E+02	3.60E-04	1.09E-05	4.8	0.01928	4.711
Tocilizumab	165.3	1.55E-09	2.33E+05	9.93E+02	3.60E-04	1.09E-05	4.448	0.007023	4.406

(B) AF-rProtein A HC-650Fのリガンドを固定化したチップ  
+ 抗体A含有溶液



$KD = 184 \times 10^{-9}M$

Sample ID	Conc. (nM)	KD (M)	ka (1/Ms)	ka Error	kd (1/s)	kd Error	Rmax	Rmax Error	R equilibrium
Antibody A	43.52	1.84E-07	3.70E+05	1.34E+04	6.81E-02	6.28E-04	2.432	0.08423	0.4654
Antibody A	87.06	1.84E-07	3.70E+05	1.34E+04	6.81E-02	6.28E-04	2.262	0.06648	0.7268
Antibody A	174	1.84E-07	3.70E+05	1.34E+04	6.81E-02	6.28E-04	1.899	0.04305	0.9233



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2020/015904

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

Int. Cl. C07K1/22 (2006.01) i, C07K16/00 (2006.01) i  
 FI: C07K16/00 ZNA, C07K1/22

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. C07K1/22, C07K16/00

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996  
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2020  
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2020  
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2020

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

JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII),  
 CAPplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2017/104783 A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 22 June 2017, paragraphs [0345], [0347], [0507], [0601], [0645]	1-11
Y	JP 2007-252368 A (PROTENOVA CO., LTD.) 04 October 2007, claims 1-4, example 7	1-11
Y	WO 2015/034000 A1 (PROTENOVA CO., LTD.) 12 March 2015, claims 1-10, paragraphs [0023]-[0034], example 3	1-11
A	JP 2010-81866 A (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 15 April 2010, abstract	1-11

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
 09.06.2020

Date of mailing of the international search report  
 23.06.2020

Name and mailing address of the ISA/  
 Japan Patent Office  
 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
 Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer  
  
 Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/JP2020/015904

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZWOLAK, Adam et al., Rapid Purification of Human Bispecific Antibodies via Selective Modulation of Protein A Binding, Scientific Reports, 14 November 2017, vol. 7, no. 15521, pp. 1-11, abstract	1-11

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/JP2020/015904

Patent Documents referred to in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2017/104783 A1	22.06.2017	JP 2017-112997 A JP 2017-148069 A KR 10-2017-0085028 A CA 3002422 A AU 2016372934 A KR 10-2018-0085711 A CN 108473562 A MX 2018007145 A BR 112018011073 A EA 201891420 A SG 11201610812W A TW 201726718 A AR 107078 A TW 201808992 A SG 102017072678 A	
JP 2007-252368 A	04.10.2007	JP 2008-214350 A US 2010/0286373 A1 claims 1-4, example 7 WO 2007/097361 A1 EP 1992692 A1	
WO 2015/034000 A1	12.03.2015	US 2016/0215027 A1 claims 1-10, paragraphs [0059]- [0073], example 3 EP 3042912 A1	
JP 2010-81866 A	15.04.2010	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07K 1/22(2006.01)i; C07K 16/00(2006.01)i FI: C07K16/00 ZNA; C07K1/22		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C07K1/22; C07K16/00 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2017/104783 A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 22.06.2017 (2017-06-22) [0345]、[0347]、[0507]、[0601]、[0645]	1-11
Y	JP 2007-252368 A (プロテノバ株式会社) 04.10.2007 (2007-10-04) 請求項1-4、実施例7	1-11
Y	WO 2015/034000 A1 (プロテノバ株式会社) 12.03.2015 (2015-03-12) 請求項1-10、[0023]-[0034]、実施例3	1-11
A	JP 2010-81866 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 15.04.2010 (2010-04-15) 要約	1-11
A	ZWOLAK, Adam et al., Rapid Purification of Human Bispecific Antibodies via Selective Modulation of Protein A Binding, Scientific Reports, 2017.11.14, Vol.7, No.15521, p.1-11 要約	1-11
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 09.06.2020	国際調査報告の発送日 23.06.2020	
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 松浦 安紀子 4B 3336 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

## 第 I 欄      ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b.  国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c.  国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/015904

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2017/104783	A1	22.06.2017	JP	2017-112997	A	
				JP	2017-148069	A	
				KR	10-2017-0085028	A	
				CA	3002422	A	
				AU	2016372934	A	
				KR	10-2018-0085711	A	
				CN	108473562	A	
				MX	2018007145	A	
				BR	112018011073	A	
				EA	201891420	A	
				SG	11201610812W	A	
				TW	201726718	A	
				AR	107078	A	
				TW	201808992	A	
				SG	10201707267R	A	
JP	2007-252368	A	04.10.2007	JP	2008-214350	A	
				US	2010/0286373	A1	
				請求項 1 - 4、実施例 7			
				WO	2007/097361	A1	
				EP	1992692	A1	
WO	2015/034000	A1	12.03.2015	US	2016/0215027	A1	
				請求項 1 - 10、[0059]- [0073]、実施例 3			
				EP	3042912	A1	
JP	2010-81866	A	15.04.2010	(ファミリーなし)			