

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5974343号
(P5974343)

(45) 発行日 平成28年8月23日 (2016. 8. 23)

(24) 登録日 平成28年7月29日 (2016. 7. 29)

(51) Int. Cl.		F I	
C 0 7 K 1/22	(2006. 01)	C 0 7 K	1/22 Z N A
C 0 7 K 16/00	(2006. 01)	C 0 7 K	16/00
C 0 7 K 14/31	(2006. 01)	C 0 7 K	14/31
C 1 2 N 15/09	(2006. 01)	C 1 2 N	15/00 A

請求項の数 10 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2013-546072 (P2013-546072)	(73) 特許権者	516105833
(86) (22) 出願日	平成23年12月19日 (2011. 12. 19)		ジーイー・ヘルスケア・バイオプロセス・
(65) 公表番号	特表2014-500311 (P2014-500311A)		アールアンドディ・アクチボラダ
(43) 公表日	平成26年1月9日 (2014. 1. 9)		スウェーデン国 エスイー-75184
(86) 国際出願番号	PCT/SE2011/051537		ウプサラ ビヨルクガタン 30
(87) 国際公開番号	W02012/087231	(74) 代理人	100137545
(87) 国際公開日	平成24年6月28日 (2012. 6. 28)		弁理士 荒川 聡志
審査請求日	平成26年12月11日 (2014. 12. 11)	(72) 発明者	ビヨルクマン, トーマス
(31) 優先権主張番号	61/424, 698		スウェーデン国、エス-751 84 ウ
(32) 優先日	平成22年12月20日 (2010. 12. 20)		プサラ ビヨルクガタン 30、ジーイー
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ノーレン, ビヨーン
			スウェーデン国、エス-751 84 ウ
			プサラ ビヨルクガタン 30、ジーイー
			・ヘルスケア
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アフィニティークロマトグラフィーマトリックス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 種以上の免疫グロブリン含有タンパク質を液体から分離する方法であって、
 (a) 前記液体を、担体に固定化されたリガンドを含む分離マトリックスと接触させる段階と、
 (b) 前記免疫グロブリン含有タンパク質を、前記リガンドとの相互作用によってマトリックスに吸着させる段階と、
 (c) 免疫グロブリン含有タンパク質を吸着したマトリックスを洗浄する任意選択の段階と、
 (d) 前記タンパク質を放出する溶出剤とマトリックスを接触させることによって前記免疫グロブリン含有タンパク質を回収する段階と
 を含み、前記リガンドのそれぞれがブドウ球菌プロテイン A (S p A) (E、D、A、B、C) 若しくはプロテイン Z の 1 以上のドメイン (単量体) を含む点で改良されており、1 以上の単量体の 1 以上において、プロテイン A の B ドメイン又はプロテイン Z の H 1 8 に相当する位置のアスパラギン又はヒスチジンがセリンで置換されており、前記リガンドが、非置換のリガンドと比較して溶出 pH の上昇をもたらすと共に、動的結合能及び収率が本質的に不変であるか又は改良されている、方法。

【請求項 2】

プロテイン A 又はプロテイン Z の前記 1 以上のドメインが、同一のドメイン E、D、A、B、C 又はプロテイン Z の 2 以上のコピーであるか、或いはプロテイン A 又はプロテ

ンZの前記1以上のドメインが、ドメインE、D、A、B、C又はプロテインZから選択される2以上のドメインであるか、或いはプロテインA又はプロテインZの前記1以上のドメインが、ドメインB、ドメインC又はプロテインZから選択される、請求項1記載の方法。

【請求項3】

プロテインAのBドメイン又はプロテインZのH18に相当する位置のアスパラギン又はヒスチジンが、多量体リガンド中の単量体の1以上においてセリンで置換されている、請求項1又は請求項2記載の方法。

【請求項4】

前記リガンドが、免疫グロブリンのFc部に対する親和性を有するが、免疫グロブリンのFab部に対する親和性を欠いている、請求項1乃至請求項3のいずれか1項記載の方法。

10

【請求項5】

プロテインAのBドメインの29位に相当するグリシン残基がアラニンに変更されている、請求項1乃至請求項4のいずれか1項記載の方法。

【請求項6】

前記リガンドが、1個以上のアスパラギン残基をグルタミン以外のアミノ酸に突然変異させることによってアルカリ安定性となっている、請求項1乃至請求項5のいずれか1項記載の方法。

【請求項7】

前記リガンドが、少なくとも23位のアスパラギン残基をグルタミン以外のアミノ酸に突然変異させることによってアルカリ安定性が達成されているプロテインZである、請求項1乃至請求項6のいずれか1項記載の方法。

20

【請求項8】

ブドウ球菌プロテインA(SpA)(E、D、A、B、C)若しくはプロテインZの1以上のドメイン(単量体)を含むリガンドであって、単量体の1以上において、プロテインAのBドメイン又はプロテインZのH18に相当する位置のアスパラギン又はヒスチジンがセリンで置換されている、リガンド。

【請求項9】

固体担体にカップリングされている、請求項8記載のリガンドを含むアフィニティー分離のためのマトリックス。

30

【請求項10】

前記リガンドが、チオエーテル結合によってカップリングされている、請求項9記載のマトリックス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アフィニティークロマトグラフィーの分野に関し、より詳細には、プロテインAドメイン(E、D、A、B、C)又はプロテインZの1以上を含有するリガンドを含有する分離マトリックスであって、ドメイン(単量体)の1以上において、プロテインAのBドメイン又はプロテインZのH18に相当する位置のアスパラギン又はヒスチジンが別のアミノ酸で置換されている分離マトリックスに関する。本発明はまた、前記マトリックスによって対象のタンパク質を分離する方法であって、上昇した溶出pHという利点を有する方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

免疫グロブリンは、世界中で製造及び開発されている最も普及している生物薬剤製品である。特にこの治療薬市場の商業ニーズ、したがって商業価値が高いため、製薬会社は、関連コストを抑えながら、それぞれのmAb製造プロセスの生産性を最大にすることに重

50

きを置いてきた。

【0003】

ほとんどの場合、これらの免疫グロブリン分子、例えば、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体の精製において重要な段階の1つとして、アフィニティークロマトグラフィーが使用されている。特に興味深い種類の親和性試薬は、免疫グロブリン分子の不変部に特異的に結合可能なタンパク質であり、このような相互作用は抗体の抗原結合特異性とは無関係である。このような試薬は、種々の試料、例えば、これらに限定するものではないが血清製剤若しくは血漿製剤又は細胞培養物に由来する供給原料から免疫グロブリンをアフィニティークロマトグラフィーによって回収するのに広く使用することができる。このようなタンパク質の一例は、種々の種に由来するIgG免疫グロブリンのFc部分及びFab部分に結合可能なドメインを含有するブドウ球菌プロテインAである。

10

【0004】

ブドウ球菌プロテインA(SpA)をベースとする試薬は、親和性及び選択性が高いため、バイオテクノロジーの分野において、例えば、抗体の捕捉及び精製並びに検出のためのアフィニティークロマトグラフィーに広範に用いられてきた。現時点で、SpAをベースとする親和性媒体が、細胞培養物に由来する工業的供給原料を含む種々の試料からモノクローナル抗体及びそれらの断片を単離するために最も広く使用されている親和性媒体であると思われる。したがって、プロテインAリガンドを含む種々のマトリックスが市販されており、例えば、天然プロテインAの形態のもの(例えば、Protein A SEPHAROSE(商標)(GE Healthcare社(スウェーデン、ウプサラ))及びまた、組換えプロテインAからなるもの(例えば、rProtein A SEPHAROSE(商標)(GE Healthcare社))などがある。より詳細には、市販の組換えプロテインA製品において実施されている遺伝子操作は、担体へのその付着を容易にすることを目的としたものである。

20

【0005】

これらの用途では、他のアフィニティークロマトグラフィー用途と同様に、夾雑物を確実に除去することに包括的な注意を払う必要がある。このような夾雑物は、例えば、クロマトグラフィー手順において固定相又はマトリックスに吸着される非溶出性の分子であり、例えばタンパク質、炭水化物、脂質、細菌及びウイルスを含む望ましくない生体分子又は微生物などであり得る。マトリックスからのこのような夾雑物の除去は、マトリックスを再生してから引き続いて使用するために、所望の生成物の最初の溶出後に実施するのが普通である。このような除去には通常、定置清浄(cleaning-in-place; CIP)として知られる手順が関与し、固定相から夾雑物を溶出可能である薬剤が使用される。よく使用されるこのような種類の薬剤の1つは、前記固定相上を流れるアルカリ溶液である。現時点で、最も広範に使用されている清浄消毒剤はNaOHであり、その濃度は、夾雑の程度及び性質に応じて、0.1Mから例えば1Mまでの範囲であり得る。この戦略は、13を超えるpH値へのマトリックスの曝露を伴う。タンパク性の親和性リガンドを含有する多くのアフィニティークロマトグラフィーマトリックスにとって、このようなアルカリ性環境は非常に過酷な条件であり、関与する高いpHに対してリガンドが不安定性であるため、結果として能力が低下する。

30

40

【0006】

そこで、アルカリ性のpH値に耐える改善された能力を示す改変タンパク質リガンドの開発に集中して、多数の研究が行われてきた。例えば、Gulich et al(Journal of Biotechnology 80(2000), 169-178)は、アルカリ性環境中における連鎖球菌アルブミン結合ドメイン(streptococcal albumin-binding domain; ABD)の安定性特性を改善するために、タンパク質工学を提案した。Gulich et alは、4つのアスパラギン残基全てがロイシン(1残基)、アスパラギン酸(2残基)及びリシン(1残基)で置き換えられているABDの突然変異体を作製した。さらに、Gulich et alは、それらの突然変異体が、天然タンパク質と類似した標的タンパク質結合挙動を示すこと、及び改変リガンドを含有するア

50

フィニティーカラムが、アルカリ性条件に繰り返し曝露した後に、親の非改変リガンドを用いて調製されたカラムよりも高い結合能を示すことを報告している。よって、この文献では、4つのアスパラギン残基全てが、構造及び機能に著しい影響を及ぼさずに置き換え可能であると結論づけられている。

【0007】

最近の研究は、プロテインA (SpA) にさらに変更を加えることによって、類似の特性をもたらし得ることを示している。米国特許出願公開第2005/0143566号は、1以上のアスパラギン残基をグルタミン又はアスパラギン酸以外のアミノ酸に突然変異させた場合に、このような突然変異は、親のSpA、例えばSpAのB-ドメイン、又はSpAのBドメインに由来する合成構築物であるプロテインZ (米国特許第5143844号) と比較して、約13~14までのpH値における化学的安定性を増大させることを開示している。著者らは、これらの突然変異タンパク質を親和性リガンドとして使用した場合、分離媒体は予想通りに、アルカリ剤を使用する清浄手順によりよく耐え得ることを示している。米国特許出願公開第2006/0194955号は、突然変異リガンドがプロテアーゼによりよく耐え、したがって分離プロセスにおけるリガンド漏出を低減し得ることを示している。別の特許出願である米国特許出願公開第2006/0194950号は、リガンドがFabに対する親和性を欠くがFc親和性を保持するように、アルカリ安定性SpAドメインを例えばG29A突然変異によってさらに修飾できることを示している。

10

【0008】

歴史的には、5つのIgG結合ドメインを含有する天然のプロテインAが、全てのプロテインA親和性媒体の製造に使用された。組換え技術を用いて多くのプロテインA構築物が製造されてきたが、これらは全て、4つ又は5つのIgG結合ドメインを含有していた。最近の研究は、二量体リガンドが、四量体リガンドと比較して類似した又は増大された結合能を有することを示している (国際公開第2010/080065号)。

20

【0009】

一部の抗体が、低pHにおいて凝集する傾向があるか又は感受性である (例えば、活性を失う可能性がある) ことはよく知られている。抗体又は関連標的に対して上昇した溶出pHを有するタンパク質リガンドを含有する分離マトリックスを得ることが、この分野において依然として必要とされている。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】国際公開第2010/080065号

【発明の概要】

【0011】

本発明の1つの目的は、IgG、IgA及び/又はIgMなどの免疫グロブリンを、好ましくはそれらのFc断片を介して結合可能なタンパク質リガンドを含むアフィニティー分離マトリックスを提供することである。これらのリガンドは、プロテインA (E、D、A、B、C) 又はプロテインZの単量体ドメインの1以上において、プロテインAのBドメイン又はプロテインZのH18に相当する位置のアスパラギン又はヒスチジンの置換を有し、したがって、置換のないリガンドと比較して高い溶出pHを有する。好ましくは、リガンドは多量体である、即ち、プロテインA (E、D、A、B、C) 及びプロテインZから選択される2以上の単量体ドメインを含有する。

40

【0012】

本発明の別の目的は、現在の親和性マトリックスを用いる、1種以上の免疫グロブリン含有タンパク質の分離方法を提供することである。置換のある親和性リガンドを使用することによって、この方法は意外にも、標的分子に対する上昇した溶出pHを達成する。

【0013】

したがって、本発明は、純粋な免疫グロブリン画分若しくは代替として免疫グロブリン

50

が除去された液体などの精製物を製造するための方法、又は試料中の免疫グロブリンの存在を検出するための方法を提供する。本発明によるリガンドは、上昇した溶出 pH を示すので、コスト効率の良い大規模操作の魅力的な候補となる。

【0014】

前記目的の1以上は、添付した特許請求の範囲に記載されたようにして達成できる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】プロテインZのアミノ酸配列（配列番号2）を示す図である。18位のヒスチジンが太字で示され、セリン置換も示されている。

【図2】プロテインAの5つのドメインのそれぞれのアミノ酸配列の配列比較を示す図である。プロテインAのBドメインのH18に相当する位置のアスパラギン又はヒスチジンが太字で示されている。3つのヘリックスの位置も示されている（Graille et al, PNAS 2000, 97(10): 5399-5404; Deisenhofer, Biochemistry 1981, 20(9): 2361-2370）。

10

【図3】それぞれがH18S置換を有するプロテインZの4つのコピーを有する、実験的研究で使用した四量体リガンドのアミノ酸配列（配列番号9）を示す図である。

【図4】それぞれがH18S置換を有するプロテインZの2つのコピーを有する、実験的研究で使用された二量体リガンドのアミノ酸配列（配列番号3）を示す図である。

【図5】動的結合能アッセイの代表的なクロマトグラムの結果のオーバーレイを示すグラフである。

20

【図6】図5に記載したZ(H18S)₂に関する実験の画分についてのサイズ排除クロマトグラフィーの結果を示す、代表的なクロマトグラムのオーバーレイを示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0016】

定義

「タンパク質」という用語は、本明細書中において、タンパク質及びその断片を記載するのに使用する。よって、三次元構造を示すアミノ酸のあらゆる鎖が用語「タンパク質」に含まれ、したがってタンパク質断片も包含される。

30

【0017】

タンパク質の「機能的変異体」という用語は、本明細書中において、本発明との関連で親和性及び安定性と定義される機能が本質的に保持されている変異体タンパク質を意味する。したがって、前記機能に関連しない1種以上のアミノ酸が、交換されていてもよい。

【0018】

「親分子」という用語は、本明細書中において、本発明による突然変異が導入される前の形態である、対応するタンパク質に使用する。

【0019】

「構造安定性」という用語は分子の3次元形態の完全性を指し、「化学的安定性」は化学分解に耐える能力を指す。

40

【0020】

「Fc断片結合」タンパク質という用語は、タンパク質が免疫グロブリンのFc断片に結合可能であることを意味する。ただし、Fc断片結合タンパク質が他の領域、例えば、免疫グロブリンのFab領域にさらに結合できることを除外しない。

【0021】

本明細書中において、アミノ酸は、それらのフルネームで言及しない場合、従来の1文字又は3文字の記号で示される。

【0022】

突然変異は、本明細書中において、野生型又は非突然変異アミノ酸の後に交換位置番号を付し、その後に突然変異アミノ酸を付すことによって定義する。したがって、例えば、

50

23位のアスパラギンのスレオニンへの突然変異は、N23Tと示す。

【0023】

本発明は一態様において、1種以上の免疫グロブリン含有タンパク質を液体から分離する方法であって、(a)前記液体を、担体に固定化されたリガンドを含む分離マトリックスと接触させる段階と、(b)前記免疫グロブリン含有タンパク質を、リガンドとの相互作用によってマトリックスに吸着させる段階と、(c)免疫グロブリン含有タンパク質を吸着したマトリックスを洗浄する任意選択の段階と、(d)タンパク質を放出する溶出剤とマトリックスを接触させることによって前記免疫グロブリン含有タンパク質を回収する段階とを含む方法に関する。この方法は、ブドウ球菌プロテインA(SpA)(E、D、A、B、C)若しくはプロテインZ又はそれらの機能的変異体の1以上のドメイン(即ち、単量体)をそれぞれ含むリガンドを使用することによって免疫グロブリン分子の溶出pHの上昇をもたらす、プロテインAのBドメイン又はプロテインZのH18に相当する位置のアスパラギン又はヒスチジンは任意の他のアミノ酸で置換されている。

10

【0024】

免疫グロブリン結合タンパク質(即ち、リガンド)は、天然免疫グロブリン結合能を有する任意のタンパク質、例えば、ブドウ球菌プロテインA(SpA)若しくは連鎖球菌プロテインG(SpG)又はこれらのタンパク質のIgG結合ドメインを含有する組換えタンパク質とすることができる。他のこのようなタンパク質の総説に関しては、例えば、Kronvall, G., Jonsson, K. Receptins: a novel term for an expanding spectrum of natural and engineered microbial proteins with binding properties for mammalian proteins, J. Mol. Recognit. 1999 Jan-Feb; 12(1): 38-44を参照されたい。リガンドは、SpAのE、D、A、B及びCDドメインの1以上を含むことができる。より好ましくは、リガンドは、プロテインAのドメインB、プロテインAのドメインC又は改変プロテインZを含む。

20

【0025】

いずれのプロテインZ又はプロテインAドメインも、プロテインAのBドメイン又はプロテインZのH18に相当する位置にアスパラギン又はヒスチジンを含有する(例えば、図1、図2、及び配列番号1~8参照)。

30

【0026】

図2に示されるように、プロテインAの5つのドメイン間の配列は、関連性が高い。欠失又は挿入はなく、置換の多くは保存的变化であり、タンパク質の構造又は機能の予測される変化は最小である。例えば、BドメインとCドメインの間には、58アミノ酸ポリペプチド全体にわたって4つの変化しかない。したがって、これらのドメインのそれぞれにおける、プロテインAのBドメイン又はプロテインZのH18に相当する位置のアスパラギン又はヒスチジンは、プロテインA又はそのドメインを含有するリガンドと同様な構造的/機能的寄与を有する。同様に、アスパラギン又はヒスチジンの変化は、このような変化を含有するリガンドの構造/機能に同様な効果をもたらす。

40

【0027】

ある特定の実施形態では、アスパラギン又はヒスチジンは、IgGへの結合能を保持しながら、溶出pHを増加させるアミノ酸で置換されている。好ましくは、置換はセリンに対するものである。

【0028】

ある特定の好ましい実施形態では、親の分子配列は、配列番号1~2、4~8又はそれらの任意の機能的変異体によって定義される配列を含む。

【0029】

ある特定の実施形態では、多量体リガンド中の単量体ドメインの1以上における、プロテインAのBドメイン又はプロテインZのH18に相当する位置のアスパラギン又はヒスチジンが、置換されている。他の実施形態では、多量体リガンド中の全ての単量体ドメイ

50

ンにおけるアスパラギン又はヒスチジン残基が、置換されている。

【0030】

プロテインAのBドメイン又はプロテインZのH18に相当する位置のアスパラギン又はヒスチジン残基の置換は、意外にも、免疫グロブリン、例えば、IgG、IgA及び/若しくはIgM又はFc断片を含有する融合タンパク質の、pH勾配における溶出pHを上昇させる。好ましくは、溶出pHは、pH0.2からpH1.0超上昇する。より好ましくは、溶出pHは、pH0.3以上上昇し、最も好ましくは、溶出pHは、pH0.4以上上昇する。あるいは、溶出pHは4.0超、好ましくはpH4.2超まで上昇し、その一方で標的分子の収率は80%以上又は好ましくは95%超である。溶出pHのこのような上昇の利点は、免疫グロブリンが凝集体を形成する傾向が大きく低減し得ることである。抗体凝集体は、免疫原性である可能性があり、免疫グロブリンを医薬として使用する前に除去する必要がある。これは、処理コストをかなり増加させる。

10

【0031】

一実施形態では、リガンドはまた、例えば、SpAドメインB又はプロテインZの単量体ドメインの1以上の1以上のアスパラギン残基をグルタミン以外のアミノ酸に突然変異させることによってアルカリ安定性にする。前述のように、米国特許出願公開第2005/0143566号は、1以上のアスパラギン残基をグルタミン又はアスパラギン酸以外のアミノ酸に突然変異させた場合に、このような突然変異が高pHにおけるリガンドの化学安定性を増大させる(例えば、N23T)ことを開示している。さらに、これらのリガンドを含む親和性媒体は、アルカリ剤を使用する洗浄手順によりよく耐え得る。米国特許出願公開第2006/0194955号は、突然変異リガンドがプロテアーゼによりよく耐え、したがって分離プロセスにおけるリガンド漏出を低減し得ることも示している。これらの出願の開示全体を、参照によって本明細書中に組み込む。

20

【0032】

別の実施形態では、こうして調製されたリガンド(複数可)は抗体のFab部に対する実質的な親和性を欠いているが、Fc部に対する親和性を有する。したがって、ある特定の実施形態では、リガンドの1以上のグリシンは、アラニンによって置き換えられている。米国特許出願公開第2006/0194950号は、リガンドがFabに対する親和性を欠くがFc親和性を保持するように、アルカリ安定性ドメインを例えばG29A突然変異によってさらに修飾できることを示している。この出願の開示全体を、参照によって本明細書中に組み込む。本明細書中で使用する、アミノ酸の番号付けは、当技術分野で通常使用されているものであり、プロテインAのドメインB上の位置によって例示され、当業者ならば、E、D、A、B、Cの各ドメインに関して突然変異させる位置が容易にわかる。

30

【0033】

有利な一実施形態では、リガンドはドメインBの多量体コピーからなり、ドメインBのアルカリ安定性が、1以上のアスパラギン残基をグルタミン以外のアミノ酸に突然変異させる(例えば、N23T)ことによって達成されており、リガンドは、アルカリ安定性ドメインBの29位のアミノ酸残基の突然変異、例えば、G29A突然変異を含む。

【0034】

有利な一実施形態では、リガンドは、H18のヒスチジン(Histidine)残基が突然変異しているドメインC又はその機能的変異体の多量体コピーからなる。任意選択で、リガンドはまた、29位にアミノ酸残基の突然変異、例えば、G29A突然変異を含む。

40

【0035】

別の実施形態では、リガンドは、1以上のアスパラギン残基をグルタミン以外のアミノ酸に突然変異させることによってアルカリ安定性が達成されているプロテインZの多量体コピーからなる。有利な一実施形態では、アルカリ安定性は、少なくとも23位のアスパラギン残基をグルタミン以外のアミノ酸に突然変異させることによって達成されている。

【0036】

当業者ならば、18位のアスパラギン又はヒスチジンの置換、突然変異によるアルカリ

50

安定性の付与、及びG - A突然変異を、従来の分子生物学技術を使用して任意の配列順序で実施できることが容易にわかるであろう。さらに、リガンドは、突然変異タンパク質リガンドをコードしている核酸配列を含有するベクターによって発現できる。別法として、リガンドは、タンパク質合成技術によっても作製することができる。所定の配列のペプチド及びタンパク質を合成するための方法は、当技術分野において周知であり、一般に入手可能である。

【0037】

したがって、本発明において、「ブドウ球菌プロテインAのアルカリ安定性ドメインB」という用語は、SpAのドメインBをベースとするアルカリ安定化タンパク質、例えば、米国特許出願公開第2005/0143566号及び米国特許出願公開第2006/0194950号に記載されている突然変異体タンパク質、並びに他の起源を有するが機能的に同等のアミノ酸配列を有する他のアルカリ安定性タンパク質を意味する。

10

【0038】

当業者にはわかるように、発現されたタンパク質は、担体に固定化する前に適切な程度まで精製すべきである。このような精製方法は当分野でよく知られており、タンパク質をベースとするリガンドの担体への固定化は、標準的な方法を用いて容易に実施される。好適な方法及び担体について、以下により詳細に記載する。

【0039】

したがって、一実施形態では、本発明による突然変異タンパク質は、配列番号1又は2で定義される配列の約75%以上、例えば約80%以上又は好ましくは約95%以上を含むが、ただし、アスパラギン突然変異は21位にない。

20

【0040】

本明細書中において、配列番号1

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln
 Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
 Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln
 Arg Asn Gly Phe Ile Gln
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala
 Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

30

は、SpAのB - ドメインのアミノ酸配列を定義し、配列番号2

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln
 Asn Ala Phe Tyr Glu Ile
 Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln
 Arg Asn Ala Phe Ile Gln
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala
 Asn Leu Leu Ala Glu Ala
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys

は、プロテインZとして知られているタンパク質を定義する。

【0041】

40

プロテインZは、29位のグリシンがアラニンと交換されている、SpAのB - ドメインに由来する合成構築物である(例えば、Stahl et al, 1999: Affinity fusions in biotechnology: focus on protein A and protein G, in The Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation. M.C. Fleckinger and S.W. Drew, editors. John Wiley and Sons Inc., New York, 8-22参照)。

【0042】

50

一実施形態では、前記突然変異体タンパク質は、プロテイン A の B ドメイン又はプロテイン Z の H 1 8 に相当する位置のヒスチジンが置換されている、配列番号 1、2 若しくは 8 において定義されるアミノ酸配列から構成されるか又はその機能的変異体である。別の実施形態では、前記突然変異体タンパク質は、プロテイン A の B ドメインの H 1 8 に相当する位置のアスパラギンが置換されている、配列番号 4 ~ 6 において定義されるアミノ酸配列から構成されるか又はその機能的変異体である。これに関連して使用する「機能的変異体」という用語は、免疫グロブリンに対する突然変異体タンパク質の親和性に影響を及ぼさない、又は pH 値が上昇した環境における化学安定性を改善するアミノ酸位置の 1 以上のさらなるバリエーションを含む任意の同様な配列を包含する。

【0043】

10

有利な一実施形態では、本発明のアスパラギン又はヒスチジンの置換は、アミノ酸、例えば、アルギニン、アスパラギン酸、イソロイシン、リシン、スレオニン、アラニン又はセリンからなる群から選択され、親分子は配列番号 1 ~ 2 及び 4 ~ 8、又はそれらの任意の機能的変異体によって定義される配列を含む。より好ましくは、置換はセリンに対してである。前述のように、アルカリ条件下において長期間にわたって高い結合能を有する、リガンドとして有用な突然変異体タンパク質を獲得するために、21 位のアスパラギン残基の突然変異を回避する。一実施形態では、3 位のアスパラギン残基は、突然変異していない。

【0044】

プロテイン A の B ドメイン又はプロテイン Z の H 1 8 に相当する位置のアスパラギン又はヒスチジン残基の置換は、意外なことに、免疫グロブリン、例えば、Ig G、Ig A 及び/若しくは Ig M 又は Fc 断片を含有する融合タンパク質の溶出 pH を上昇させる。好ましくは、溶出 pH は、pH 0.2 から pH 1.0 超上昇する。より好ましくは、溶出 pH は、pH 0.3 以上上昇し、最も好ましくは、溶出 pH は、pH 0.4 以上上昇する。あるいは、溶出 pH は 4.0 超、好ましくは pH 4.2 超まで上昇し、その一方で標的分子の収率は、80% 以上又は好ましくは 95% 超である。

20

【0045】

ある特定の実施形態では、多量体リガンド中の 1 以上の単量体のアスパラギン又はヒスチジン残基が置換されている。他の実施形態では、多量体リガンド中の全ての単量体のアスパラギン又はヒスチジン残基が置換されている。

30

【0046】

有利な一実施形態では、ロイシン残基とグルタミン残基の間に位置するアスパラギン残基もまた、例えば、スレオニン残基に突然変異している。したがって、一実施形態では、配列番号 2 で定義される配列の 23 位のアスパラギン残基は、例えばスレオニン残基に突然変異している。特定の一実施形態では、配列番号 2 で定義される配列の 43 位のアスパラギン残基もまた、例えばグルタミン酸に突然変異している。アミノ酸番号 43 が突然変異している実施形態では、それは最も有利には、1 以上のさらなる突然変異、例えば N 23 T と組み合わせられるようである。

【0047】

したがって、本発明は、前述の単量体突然変異体タンパク質を包含する。ただし、このようなタンパク質単量体は、多量体リガンド、例えば、二量体、三量体、四量体、五量体、六量体などに組み合わせ得る。したがって、本発明の別の態様は、本発明による 1 種以上の突然変異タンパク質と 2 以上のさらなる単位とから構成される多量体であり、好ましくはこれもまた本発明による突然変異体タンパク質である。したがって、本発明は、例えば、2 つの反復単位から構成される二量体、又は 4 つの反復単位から構成される四量体である。

40

【0048】

ある特定の実施形態では、多量体リガンドは、プロテイン A のドメイン E、D、A、B、C 若しくはプロテイン Z 又は任意の機能的変異体の同一の単量体ドメインの 2 以上のコピーを含有する。

50

【0049】

他の実施形態では、多量体リガンドは、プロテインAのドメインE、D、A、B、C若しくはプロテインZ又は任意の機能的変異体から選択される2以上の異なる単量体ドメインを含有する。

【0050】

一実施形態では、本発明による多量体は、好ましくは0~15個、例えば、0~10個又は5~10個の範囲の長さのアミノ酸によって連結された単量体単位を含む。このような連結の性質は、好ましくは、タンパク質単位の空間的コンフォメーションを不安定化すべきでない。さらに、前記連結は好ましくは、アルカリ性環境において、突然変異タンパク質単位の特性を損なわないように十分に安定でもあるべきである。

10

【0051】

別の実施形態では、本発明の二量体リガンドは、配列番号3

```

Ala  Gln  Val  Asp  Ala  Lys  Phe  Asp  Lys  Glu
Gln  Gln  Asn  Ala  Phe  Tyr  Glu  Ile  Leu
Ser  Leu  Pro  Asn  Leu  Thr  Glu  Glu  Gln  Arg
Asn  Ala  Phe  Ile  Gln  Ser  Leu  Lys  Asp
Asp  Pro  Ser  Gln  Ser  Ala  Asn  Leu  Leu  Ala
Glu  Ala  Lys  Lys  Leu  Asn  Asp  Ala  Gln
Ala  Pro  Lys  Val  Asp  Ala  Lys  Phe  Asp  Lys
Glu  Gln  Gln  Asn  Ala  Phe  Tyr  Glu  Ile
Leu  Ser  Leu  Pro  Asn  Leu  Thr  Glu  Glu  Gln
Arg  Asn  Ala  Phe  Ile  Gln  Ser  Leu  Lys
Asp  Asp  Pro  Ser  Gln  Ser  Ala  Asn  Leu  Leu
Ala  Glu  Ala  Lys  Lys  Leu  Asn  Asp  Ala
Gln  Ala  Pro  Lys  Cys

```

20

の配列を含む。

【0052】

さらなる一実施形態では、本発明の四量体リガンドは、配列番号9

```

Ala  Gln  Val  Asp  Ala  Lys  Phe  Asp  Lys  Glu
Gln  Gln  Asn  Ala  Phe  Tyr  Glu  Ile  Leu  Ser
Leu  Pro  Asn  Leu  Thr  Glu  Glu  Gln  Arg  Asn
Ala  Phe  Ile  Gln  Ser  Leu  Lys  Asp  Asp  Pro
Ser  Gln  Ser  Ala  Asn  Leu  Leu  Ala  Glu  Ala
Lys  Lys  Leu  Asn  Asp  Ala  Gln  Ala  Pro  Lys  Val
Ala  Asp  Ala  Lys  Phe  Asp  Lys  Glu  Gln  Gln  Asn
Asn  Ala  Phe  Tyr  Glu  Ile  Leu  Ser  Leu  Pro  Asn
n  Leu  Thr  Glu  Glu  Gln  Arg  Asn  Ala  Phe  Ile
e  Gln  Ser  Leu  Lys  Asp  Asp  Pro  Ser  Gln  Ser
Ala  Asn  Leu  Leu  Ala  Glu  Ala  Lys  Lys  Leu
Asn  Asp  Ala  Gln  Ala  Pro  Lys  Val  Asp  Ala
Lys  Phe  Asp  Lys  Glu  Gln  Gln  Asn  Ala  Phe
Tyr  Glu  Ile  Leu  Ser  Leu  Pro  Asn  Leu  Thr
Glu  Glu  Gln  Arg  Asn  Ala  Phe  Ile  Gln  Ser
Leu  Lys  Asp  Asp  Pro  Ser  Gln  Ser  Ala  Asn
Leu  Leu  Ala  Glu  Ala  Lys  Lys  Leu  Asn  Asp
Ala  Gln  Ala  Pro  Lys  Val  Asp  Ala  Lys  Phe
Asp  Lys  Glu  Gln  Gln  Asn  Ala  Phe  Tyr  Glu
Ile  Leu  Ser  Leu  Pro  Asn  Leu  Thr  Glu  Glu
Gln  Arg  Asn  Ala  Phe  Ile  Gln  Ser  Leu  Lys
Asp  Asp  Pro  Ser  Gln  Ser  Ala  Asn  Leu  Leu

```

30

40

50

Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala
 la Pro Lys Cys

の配列を含む。

【0053】

別の実施形態では、本発明の二量体リガンドは、配列番号10

Ala Gln Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu
 Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Ser L
 eu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn G
 ly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro S
 er Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala L
 ys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys V
 al Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln A
 sn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Ser Leu Pro As
 n Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Il
 e Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Se
 r Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Le
 u Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Cys

の配列を含む。

【0054】

本発明は、意外にも、リガンドの溶出pHを比較すると、リガンドの単量体ドメインの
 1以上における、プロテインAのBドメイン又はプロテインZのH18に相当する位置の
 アスパラギン又はヒスチジンの置換が、非置換リガンドと比較して高い溶出pHをもた
 らすことを見出した。

【0055】

一実施形態では、本発明は、固体担体にカップリングされた免疫グロブリン結合タンパ
 ク質を含むリガンドを含む、アフィニティー分離のためのマトリックスに関する。好まし
 くは、プロテインA(ドメインE、D、A、B、C)又はプロテインZの単量体ドメイン
 の1以上における、プロテインAのBドメイン又はプロテインZのH18に相当する位置
 のアスパラギン又はヒスチジンが、別のアミノ酸に置換されている。好ましくは、リガ
 ンドは多量体である、即ち、プロテインA(ドメインE、D、A、B、C)及びプロテイン
 Zから選択される2以上の単量体ドメインを含有している。本発明のマトリックスは、置
 換のないマトリックスと比較して、上昇した溶出pHを示す。突然変異タンパク質リガ
 ンドは好ましくは、Fc断片結合タンパク質であり、IgG、IgA及び/又はIgM、好
 ましくはIgGの選択的結合に使用できる。

【0056】

本発明によるマトリックスは、その任意の実施形態では前述した突然変異体タンパク質
 をリガンドとして含むことができる。最も好ましい実施形態では、固体担体上に存在する
 リガンドは、前述のような置換を含む。

【0057】

本発明によるマトリックスの固体担体は、よく知られている任意の好適な種類のもので
 あり得る。従来のアフィニティー分離マトリックスは多くの場合、有機性のものであり、
 使用される水性媒体に親水性表面を曝露する、即ち、外表面及び存在する場合にはさら
 に内表面のヒドロキシ(-OH)、カルボキシ(-COOH)、カルボキサミド(-CONH
 2、場合によりN-置換された形態の)、アミノ(-NH2、場合により置換された形
 態の)、オリゴ-又はポリエチレンオキシ基を曝露するポリマーをベースとする。一実施
 形態では、ポリマーは例えば、有利には架橋されて、例えばビスエポキシド、エピハロ
 ヒドリン、1,2,3-トリハロ置換されている低級炭化水素で架橋されて好適な多孔度及
 び剛直性を提供する多糖、例えば、デキストラン、澱粉、セルロース、プルラン、寒天、
 アガロースなどをベースとすることができる。最も好ましい実施形態では、固体担体は多
 孔質アガロースビーズである。本発明において使用する担体は、逆懸濁ゲル化(inverse

10

20

30

40

50

suspension gelation) などの標準的方法に従って容易に調製できる (S H j e r t e n : B i o c h i m B i o p h y s A c t a 79(2), 393-398 (1964))。あるいは、ベースマトリックスは、市販製品、例えば、SEPHAROSE (商標) FF (GE Health care 社) である。大規模な分離に特に有利な一実施形態では、担体は、その剛直性を増加させるように、したがってマトリックスが高流速により好適になるように構成されている。

【0058】

あるいは、固体担体は、ポリビニルアルコール、ポリヒドロキシアルキルアクリレート、ポリヒドロキシアルキルメタクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミドなどのような合成ポリマーをベースとする。疎水性ポリマー、例えば、ジビニル及びモノビニル置換ベンゼンをベースとするマトリックスの場合、マトリックスの表面は、前記で定義した親水基を周囲の水性液体に曝露するように親水化されることが多い。このようなポリマーは、標準的な方法に従って容易に製造される (例えば、"Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization" (R Arshady: Chimica e L'Industria 70(9), 70-75 (1988)) 参照)。あるいは、市販製品、例えば、SOURCE (商標) (GE Health care 社) を使用する。

10

【0059】

別の選択肢において、本発明による固体担体は、無機性の担体、例えば、シリカ、酸化ジルコニウムなどを含む。

20

【0060】

さらに別の実施形態では、固体担体は、表面、チップ、毛细管又はフィルターなどの別の形態である。

【0061】

本発明によるマトリックスの形状に関しては、一実施形態では、マトリックスは、多孔質モノリスの形態である。代替的实施形態では、マトリックスは、ビーズ又は粒子の形態であり、多孔質又は非孔質のいずれであってもよい。ビーズ又は粒子の形態のマトリックスは、充填層として又は懸濁された形態で使用できる。懸濁された形態には、膨張層として知られるもの及び純粋な懸濁液が含まれ、それらにおいて粒子又はビーズは自由に移動できる。モノリス、充填層及び膨張層の場合、一般に、濃度勾配による従来のクロマトグラフィーの後に分離手順を行う。純粋な懸濁液の場合には、回分式方法を使用する。

30

【0062】

リガンドは、リガンド中に存在する例えばアミノ基及び/又はカルボキシ基を利用する従来のカップリング技術によって担体に付着させ得る。ビスエポキシド、エピクロロヒドリン、CNBr、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) などが、よく知られているカップリング試薬である。リガンドの利用能を改善し且つ担体へのリガンドの化学カップリングを容易にする、スペーサーとして知られる分子を、担体とリガンドの間に導入し得る。あるいは、リガンドは、物理的吸着又は生物特異的吸着などの非共有結合的結合によって、担体に付着させることができる。マトリックスのリガンド含量は、例えば、5 ~ 15 mg/ml (マトリックス)、有利には 5 ~ 10 mg/ml とすることができる。

40

【0063】

有利な一実施形態では、本発明のリガンドは、チオエーテル結合によって担体にカップリングされている。このようなカップリングを実施するための方法は、当分野で周知であり、当業者によって、標準的な技術及び装置を用いて容易に実施される。有利な一実施形態では、カップリングにおけるその後の使用のために、最初にリガンドに末端システイン残基を提供する。当業者ならばまた、適切な精製段階を容易に実施する。

【0064】

本発明のある特定の实施形態では、吸着段階の条件は、任意の通常使用されている条件を、標的抗体の特性、例えば、その pI に応じて適切に適合させたものであり得る。任意

50

選択の洗浄段階を、PBS緩衝液などの一般に使用されている緩衝液を使用して実施し得る。

【0065】

溶出は、プロテインA媒体からの溶出に使用される任意の好適な溶液を使用して実施し得る。

【0066】

本発明の方法は、標的抗体を捕捉するために、例えば、治療的使用又は診断的使用のための抗体の精製プロトコールにおける第1の段階において有用である。一実施形態では、75%以上の抗体が回収される。有利な一実施形態では、80%以上、例えば90%以上、好ましくは95%以上の抗体を、個々のリガンド系に好適なpHを有する溶出剤を使用して回収する。本発明の方法の後に、1以上の追加段階、例えば、他のクロマトグラフィー段階を実施し得る。したがって、特定の一実施形態では、約98%を超える抗体が回収される。

10

【0067】

SpA(ドメインE、D、A、B、C)又はプロテインZリガンドに関して前述したように、1以上のアスパラギン残基をグルタミン又はアスパラギン酸以外のアミノ酸に突然変異させた場合、これらの突然変異体リガンドを含む親和性媒体は、アルカリ剤を使用する洗浄手順によりよく耐え得る(米国特許出願公開第2005/0143566号)。この増大された安定性は、免疫グロブリンに対する突然変異タンパク質の初期親和性が、長期間にわたって本質的に保持されることを意味する。したがって、その結合能は、アルカリ性環境において、親分子よりゆっくり低下する。この環境はアルカリ性と定義でき、pH値の上昇した環境を意味する。これは、例えば、約10を超える、例えば約13又は14までの、即ち、10~13又は10~14のpHであり、これは一般にアルカリ条件と表される。あるいは、これらの条件は、NaOHの濃度によって定義でき、その濃度は約1.0M以下、例えば、0.7M又は詳細には約0.5M、したがって0.7~1.0Mの範囲とすることができる。

20

【0068】

よって、前述のアスパラギン突然変異の存在下における免疫グロブリンに対する親和性、即ち、リガンドの結合特性、したがってマトリックスの能力は、アルカリ剤での処理によって経時的に本質的に変化しない。従来、アフィニティー分離マトリックスの定置洗浄処理に使用されるアルカリ剤はNaOHであり、その濃度は0.75M以下、例えば0.5Mである。したがって、その結合能は、0.5M NaOHで7.5時間処理した後に、約70%未満に、好ましくは約50%未満に、より好ましくは約30%未満に、例えば、約28%に低下するであろう。

30

【0069】

さらなる態様において、本発明は、本発明によるリガンド又はマトリックスを使用する、IgG、IgA及び/又はIgMなどの免疫グロブリンを単離するための方法に関する。したがって、本発明は、1種以上の標的化合物を、前述のリガンド又はマトリックスに吸着させることによって液体から分離するクロマトグラフィーの方法を包含する。目的生成物は、分離される化合物又は液体であり得る。したがって、本発明のこの態様は、広範囲に使用されている周知の分離技術であるアフィニティークロマトグラフィーに関する。簡潔に述べると、第1の段階において、標的化合物、好ましくは前述の抗体を含む溶液を、分離マトリックス上に存在するリガンドに標的化合物を吸着させる条件下で分離マトリックス上に流す。このような条件は、例えば、溶液のpH及び/又は塩濃度、即ち、イオン強度によって制御する。マトリックスの能力を超えないように注意すべきである。即ち、フローは、満足できる吸着を行えるように十分に遅くすべきである。この段階において、溶液の他の成分は、原則的に妨げられずに通過する。任意選択で、マトリックスは次に、例えば水溶液によって洗浄することによって、保持されている及び/又は緩く結合している物質を除去する。本発明のマトリックスは最も有利には、溶媒、塩若しくは洗浄剤又はそれらの混合物などの添加剤を用いて中間洗浄段階に使用される。

40

50

【0070】

次の段階において、溶出剤と称する第2の溶液を、標的化合物を脱着させる、即ち、放出させる条件下でマトリックス上に流す。このような条件は一般に、pH、塩濃度、即ち、イオン強度、疎水性などの変化によってもたらされる。勾配溶出及び段階的溶出などの種々の溶出スキームが知られている。溶出はまた、マトリックス上で目的とする抗体と置き換わる競合物質を含む第2の溶液によって実現できる。天然又は組換えプロテインAをベースとする普通のプロテインA媒体（例えば、MABSELECT（商標）及びnProtein A SEPHAROSE（商標）4 Fast Flow）は通常、主はそのVH3結合に応じてpH3.1~4.0（ピーク頂点において測定）において溶出する（例えば、Ghose, S. et al. *Biotechnology and Bioengineering* 92 665-673 [2005]参照）。プロテインAのB-ドメインに由来するアルカリ安定化製品MABSELECT SURE（商標）は、VH3結合を本質的に欠いており、3.7~4.0のより高い溶出pHを生じる。アフィニティークロマトグラフィーの原理の一般的な総説に関しては、例えば、Wilchek, M., and Chaiken, I. 2000. *An overview of affinity chromatography. Methods Mol. Biol.* 147: 1-6を参照されたい。

10

【0071】

プロテインAのBドメイン又はプロテインZのH18に相当する位置のアスパラギン又はヒスチジン残基の置換は、意外なことに、免疫グロブリン又はFc断片を含有する融合タンパク質の溶出pHを上昇させる。したがって、この置換は、標的分子の収率が80%以上又は好ましくは95%超でありながら、pH4.0超、好ましくはpH4.2超での溶出を可能にするリガンドを生じる。これにより、標的分子の凝集又は不活性化のリスクを最小限に抑える、より穏やかな溶出条件が得られる。

20

【0072】

単量体からの凝集体分離は、抗体精製、特により高い分解能での抗体精製において課題となっている。本発明のリガンドは、単量体と凝集体との改良された分離を示し、これは、大規模であっても、捕捉段階における凝集体の除去の実行可能なアプローチとなる（図5及び図6参照）。

【実施例】

30

【0073】

以下に、本発明を例によって説明する。これらの例は、単に例示を目的として記載するのであり、したがって添付した特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を限定するものと解してはならない。以下及び本明細書中の他の場所に示した参考文献は全て、参照によって本明細書中に組み入れる。

【0074】

タンパク質の突然変異誘発

部位特異的突然変異誘発を、ヒスチジンの置き換えをコードするオリゴヌクレオチドを用いて2段階PCRによって実施した。鋳型として、Z又はCの単ドメインを含有するプラスミドを使用した。PCR断片を、大腸菌発現ベクター（pGO）にライゲーションさせた。DNA配列決定を用いて、挿入断片の正確な配列を検証した。

40

【0075】

Z（H18S）及びC（H18S）の多量体を形成するために、アミノ酸VDに対応する、C又はZドメインの開始コドンに位置するAccI部位（GTAGAC）を使用した。pGO Z（H18S）1及びpGO C（H18S）1を、AccIを用いて切断し、CIP処理した。各変異体に特異的なAccI粘着末端プライマーを設計し、2つのオーバーラップPCR産物を各鋳型から作製した。PCR産物を精製し、2%アガロースゲル上でPCR産物を比較することによって濃度を推定した。等量の1対のPCR産物をライゲーション緩衝液中でハイブリダイズした（90 - > 25、45分間）。得られた産物は、約1/4までが、AccI部位にライゲーションされる可能性がある断片からな

50

る（正確なPCR断片及び/又は消化されたベクター）。ライゲーション及び形質変換の後、コロニーは、PCRによりスクリーニングして、Z(H18S)2、Z(H18S)4、C(H18S)2及びC(H18S)4を含有する構築物を同定した。陽性クローンを、DNA塩基配列決定によって検証した。

【0076】

構築物の発現及び精製

構築物を、標準培地中で大腸菌K12を培養することによって細菌ペリプラズム内で発現させた。培養後、細胞を熱処理して、培地中にペリプラズムの内容物を放出させた。培地中に放出された構築物を、細孔径0.2µmのメンブランを用いて精密濾過によって回収した。

10

【0077】

その時点で濾過段階からの透過液中に存在する各構築物を、親和性によって精製した。透過液を、固定化IgGを含有するクロマトグラフィー媒体にロードした。ロードした産物を、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、pHを低下させることによって溶出させた。

【0078】

溶出プールを中性のpHに調整し、ジチオスレイトールを添加することによって還元した。次いで、試料を陰イオン交換体にロードした。洗浄段階の後、構築物をNaCl勾配中で溶出させて、あらゆる夾雑物から構築物を分離した。溶出プールを、限外濾過によって40~50mg/mlに濃縮した。

【0079】

精製されたリガンドを、LC-MSによって分析して純度を求め、分子量が予想される値に一致する（アミノ酸配列に基づいて）ことを確認した。

20

【0080】

活性化

使用したベースマトリックスは、US6602990の方法に従って調製された、平均直径85ミクロンの硬質な架橋アガロースビーズであり、細孔サイズは、Gel Filtration Principles and Methods, Pharmacia LKB Biotechnology 1991, pp 6-13に記載された方法により、Mw110kDaのデキストランに対する逆相ゲル濾過クロマトグラフィーKav値0.70に相当する。

30

【0081】

固形物ベースマトリックス25mL(g)、蒸留水10.0mL及びNaOH2.02gを、100mLフラスコ中で25において10分間機械的に攪拌しながら混合した。エピクロロヒドリン4.0mLを添加した。反応は2時間進行した。活性化されたゲルを、10ゲル沈降体積(gel sediment volume)(GV)の水で洗浄した。

【0082】

カップリング

50mlファルコンチューブ内のリガンド溶液(50mg/mL)20mLに、NaHCO₃ 169mg、Na₂CO₃ 21mg、NaCl 175mg及びEDTA 7mgを添加した。ファルコンチューブを、5~10分間、ローラーテーブル上に置き、次いでDTE 77mgを添加した。還元が45分間超にわたって進行した。次いで、リガンド溶液を、セファデックスG-25を充填したPD10カラム上で脱塩した。脱塩された溶液中のリガンド含有量を、276nmのUV吸収を測定することによって求めた。

40

【0083】

活性化されたゲルを3~5GVの{0.1Mリン酸塩/1mM EDTA pH8.6}で洗浄し、次いで、リガンドを、US6399750に記載された方法に従ってカップリングさせた。実験で使用した緩衝液は全て、窒素ガスによって少なくとも5~10分間脱泡してある。

【0084】

50

固定化後、ゲルは、3 × G Vの蒸留水で洗浄した。ゲル + 1 G Vの { 0 . 1 Mリン酸塩 / 1 m M E D T A / 1 0 %チオグリセロール p H 8 . 6 } を混合し、チューブを振盪テーブル内に室温で終夜放置した。次いで、ゲルを 3 × G Vの { 0 . 1 M T R I S / 0 . 1 5 M N a C l p H 8 . 6 } 及び 0 . 5 M H A c で交互に洗浄してから、8 ~ 1 0 × G Vの蒸留水で洗浄した。ゲル試料を、アミノ酸分析のために外部研究機関に送り、総アミノ酸含有量からリガンド含有量 (m g / m l ゲル) を算出した。

【 0 0 8 5 】

実施例 1

プロトタイプ

突然変異体 Z (H 1 8 S) 2 (配列番号 3) : それぞれ H 1 8 S 置換を有するプロテイン Z の 2 つのコピーを含有するリガンド二量体 (Z (H 1 8 S) 2) (リガンド密度 6 . 1 m g / m l)。 10

【 0 0 8 6 】

Z 2 (H 1 8 が S に置換されていない以外は配列番号 3 と同様) : プロテイン Z の 2 つのコピーを含有するリガンド二量体 (Z 2) (リガンド密度 5 . 9 m g / m l)。

【 0 0 8 7 】

突然変異体 Z (H 1 8 S) 4 (配列番号 9) : それぞれ H 1 8 S 置換を含有するプロテイン Z の 4 つのコピーを含有するリガンド四量体 (Z (H 1 8 S) 4) (リガンド密度 9 . 6 m g / m l)。 20

【 0 0 8 8 】

Z 4 (H 1 8 が S に置換されない以外は配列番号 9 と同様) : プロテイン Z の 4 つのコピーを含有するリガンド四量体 (Z 4) (リガンド密度 6 m g / m l)。

【 0 0 8 9 】

樹脂 2 m l を T r i c o r n 5 1 0 0 カラムに充填。

【 0 0 9 0 】

突然変異体 C (H 1 8 S) 2 (配列番号 1 0) : それぞれ H 1 8 S 置換を含有する C ドメインの 2 つのコピーを含有するリガンド二量体 (C (H 1 8 S) 2) (リガンド密度 6 . 5 m g / m l)。

【 0 0 9 1 】

C 2 (H 1 8 が S に置換されていない以外は、配列番号 1 0 と同様) : ドメイン C の 2 つのコピーを含有するリガンド二量体 (C 2) (リガンド密度 6 . 9 m g / m l)。 30

【 0 0 9 2 】

タンパク質

G a m m a n o r m 1 6 5 m g / m l (O c t a p h a r m a) を、平衡化緩衝液中で 1 m g / m l に希釈。

【 0 0 9 3 】

平衡化緩衝液

A P B リン酸緩衝液 2 0 m M + 0 . 1 5 M N a C l 、 p H 7 . 4 (E l s i c h r o m A B)

溶出緩衝液

クエン酸緩衝液 0 . 1 M 、 p H 6 。 40

【 0 0 9 4 】

クエン酸緩衝液 0 . 1 M 、 p H 3 。

【 0 0 9 5 】

C I P

0 . 1 M N a O H 。

【 0 0 9 6 】

実験の詳細及び結果

ブレイクスルー容量 (破過容量) を、A K T A E x p l o r e r 1 0 システムを用いて滞留時間 2 . 4 分で決定した。安定なベースラインが得られるまで、平衡化緩衝液をバ 50

イパスカラムに流した。これは、自動ゼロ目盛り調整の前に行った。100%のUVシグナルが得られるまで、試料をバイパスから適用した。次いで、安定なベースラインが得られるまで、平衡化緩衝液を再びカラムに適用した。最大吸光度の85%のUVシグナルに達するまで、試料をカラムにロードした。次に、流速0.5ml/分において最大吸光度の20%のUVシグナルまで、カラムを平衡化緩衝液で洗浄した。タンパク質を10カラム容量にわたって流速0.5ml/分で、pH6.0で開始しpH3.0で終了する直線勾配で溶出させた。次いで、カラムを、0.1M NaOHで流速0.5ml/分で洗浄にし、平衡化緩衝液で再平衡化してから、20%エタノールを添加した。最後の段階は、試料濃度を調べることであり、100%のUVシグナルが得られるまでバイパスカラムから試料をロードすることによって行った。

10

【0097】

10%におけるブレイクスルー容量を算出するために、下記式を使用した。これは、即ち、カラム流出液中のIgGの濃度が供給材料中のIgG濃度の10%となるまで、カラムにロードされるIgGの量である。

【0098】

【数1】

$$q_{10\%} = \frac{C_0}{V_c} \left[V_{app} - V_{sys} - \int_{V_{sys}}^{V_{app}} \frac{A(V) - A_{sub}}{A_{100\%} - A_{sub}} * dv \right]$$

20

$A_{100\%}$ = 100% UV 信号;

A_{sub} = 非結合 IgG サブクラスによる吸光度への寄与;

$A(V)$ = 所定の添加体積での吸光度;

V_c = カラム体積;

V_{app} = 10%ブレイクスルーまでに添加した体積;

30

V_{sys} = システムデッドボリューム;

C_0 = 供給濃度

10%ブレイクスルーでの動的結合能(DBC)を算出し、曲線の形を研究した。曲線は、結合、溶出及びCIPピークに関して研究した。動的結合能(DBC)は、5%、10%及び80%のブレイクスルーに関して算出した。一部の結果を表1に示す。H18S置換を有するリガンドについても、親のH18リガンド(Z2又はZ4)と比較して、同様な能力が観察された。

【0099】

40

ヒトポリクローナルIgG及び異なるmAbに関するIgGの能力及び溶出の研究を、Z(H18S)2、Z(H18S)4、Z2及びZ4について行った。能力値は、Z(H18S)2とZ2では異ならなかった。いくつかの例を表1に示す。

【0100】

【表 1】

表 1. 20mM PBS+0.15M NaCl 緩衝液 (pH 7.4) に溶解した 1mg/ml IgG を用いたときの Z(H18S)2、Z(H18S)4、Z2 及び Z4 の容量データ

プロトタイプ	Qb10 (mg/ml 樹脂)	Qb80 (mg/ml 樹脂)	滞留時間 (min)	リガンド密度 (mg/ml)
Z(H18S)2	32.0	46.4	2.4	6.1
Z(H18S)4	36.4	65.0	2.4	9.6
Z2	31.4	43.8	2.4	5.9
Z4	33.6	58.0	2.4	6
C(H18S)2	36.5	55.1	2.4	6.5
C2	38.3	59.9	2.4	6.9

10

溶出研究は、リン酸緩衝液中の異なる細胞培養物上清 (mAb C、mAb D) 又はヒトポリクローナル IgG について行った。溶出 pH は、Z(H18S)2 及び Z(H18S)4 の場合、Z2 及び Z4 と比較して、0.4 pH 単位から 1 pH 単位超まで上昇している。最大の差はポリクローナル IgG (Gammanorm) の場合に示され、mAb D は最小の差を示している。これらの溶出研究においては、約 10 mg の細胞培養物上清 (異なる細胞培養物上清を使用した、表 2 参照) をカラムにロードした。0.1 M クエン酸緩衝液を使用して、pH 6 から pH 3 までの勾配溶出を行った。ピーク頂点の pH を記録した (表 2 参照)。

【 0 1 0 1 】

20

【表 2】

表 2. ヒトポリクローナル IgG 及び 2 種類の mAbs での溶出 pH

プロトタイプ	pH hIgG (最初のピーク)	pH hIgG (第 2 のピーク)	pH mAb C	pH mAb D
Z(H18S)2	4.95	4.36	4.54	4.37
Z(H18S)4	5.11	4.61	ND	ND
Z2	3.99	3.59	3.81	3.93
Z4	3.89	3.53	3.77	3.81
C(H18S)2	4.66	4.07		
C2	3.74	3.45		

30

注: pH hIgG (最初のピーク) 及び pH hIgG (第 2 のピーク) はポリクローナル IgG (Gammanorm) である。

Z(H18S)2 及び Z(H18S)4 に関するより高い溶出 pH を除いて、それらはまた、Z2 及び Z4 よりも良好な分離特性を有するように思われる。図 5 において、例えば、3 つの異なるプロトタイプ全てにおいてテーリングが見られるが、Z(H18S)2 の場合には 2 つのピークが実際に分離している。平衡化緩衝液並びに流速 0.2 ml / 分及び 215 nm での UV 検出 (図 6) を使用する、直列に連結された 2 つの 3 ml TRI CORN (商標) 5 / 150 SUPERDEX (商標) 200 カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより、主ピーク (B7) は検出可能な量の凝集体を含まないが、第 2 のピーク (B2) は主に凝集体を含むことが明らかであった。

40

【 0 1 0 2 】

上記の例は、本発明の特定の態様を例示するのであって、いかなる点においても本発明の範囲を限定するものではなく、そのように解釈すべきでない。上記のような本発明の教示の恩恵を受ける当業者ならば、本発明に多数の修正を行い得る。これらの修正は、添付した特許請求の範囲に記載した本発明の範囲内に包含されるものと解釈すべきである。

【 1 】

```

          S
V D A K F D K E Q Q N A F Y E I L H L P
N L T E E Q R N A F I Q S L K D D P S Q
S A N L L A E A K K L N D A Q A P K

```

Figure 1

【 3 】

```

AQVDAKFDKE QQNAFYEILS LPNLTEEQRN AFIQSLKDDP SQSANLLAEA
KKLNDAQAPK VDAKFDKEQQ NAFYEILSLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ
SANLLAEAKK LNDAPKVD AKFDKEQQNA FYEILSLPNL TEEQRNAFIQ
SLKDDPSQSA NLLAEAKKLN DAQAPKVDK FDKQQNAFY EILSLPNL
EQRNAFIQSL KDDPSQSANL LAEAKKLND A QAPK

```

Figure 3

【 2 】

Protein A (five domains, EDABC)

```

(N-terminus) < Helix 1 > < Helix 2 > < Helix 3 >
QQNAFYQVIMFENLNADQRNGFIQSLKDDPSQSANVLEAACKLNDSQAPK (E) SEQ ID No: 4
ADAQQNNFNDQQSAFYEILSLPNLEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNDSQAPK (D) SEQ ID No: 5
ADNKFNEQQNAFYEILSLPNLEAQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDSQAPK (A) SEQ ID No: 6
ADNKFNEQQNAFYEILSLPNLEAQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDSQAPK (B) SEQ ID No: 7
ADNKFNEQQNAFYEILSLPNLEAQRNGFIQSLKDDPSVSKELAEAKKLNDSQAPK (C) SEQ ID No: 8
(C-terminus)

```

Figure 2

【 4 】

```

AQVDAKFDKE QQNAFYEILS LPNLTEEQRN AFIQSLKDDP SQSANLLAEA
KKLNDAQAPK VDAKFDKEQQ NAFYEILSLP NLTEEQRNAF IQSLKDDPSQ
SANLLAEAKK LNDAPKPC

```

Figure 4

【 5 】

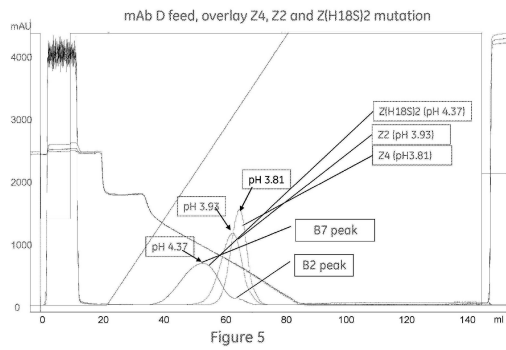


Figure 5

【 6 】

SEC (Superdex 200) showing aggregates removal on Z(H18S)2 mutation (absorbance measured at 215nm)

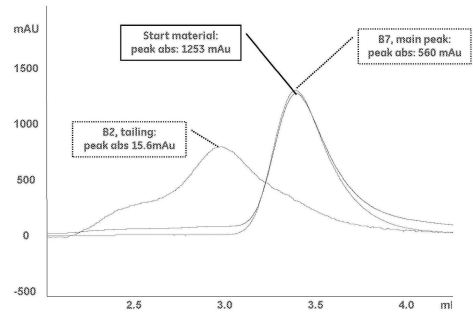


Figure 6

【配列表】

0005974343000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ロドリゴ, グスタブ
スウェーデン国、エス - 7 5 1 8 4 ウブサラ ビヨルクガタン 3 0、ジーイー・ヘルスケア
- (72)発明者 ヴェイシック, ジェレナ
スウェーデン国、エス - 7 5 1 8 4 ウブサラ ビヨルクガタン 3 0、ジーイー・ヘルスケア
- (72)発明者 アーベルグ, パー - ミカエル
スウェーデン国、エス - 7 5 1 8 4 ウブサラ ビヨルクガタン 3 0、ジーイー・ヘルスケア

審査官 松原 寛子

- (56)参考文献 特開2010-081866(JP, A)
米国特許出願公開第2005/0143566(US, A1)
米国特許出願公開第2006/0194950(US, A1)
国際公開第2005/075507(WO, A1)
Review : Protein A chromatography for antibody purification, Journal of Chromatography
B, 2007年, Vol.848, p.40-47
Journal of immunological methods, 1995年, Vol.182, p.185-192

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/22
C07K 16/00
C07K 14/31
C12N 15/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/REGISTRY(STN)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)