明　細　書

発明の名称 ：

生物活性が低下した抗体バリアントおよびアイソフォーム

技術分野

[0001] 本発明は、生物活性が低下した抗体バリアントおよびアイソフォームに関する。例えば、本発明は、血液凝固第VIII因子（FVIII）様活性が低下した、エミシズマブの抗体バリアントおよびアイソフォームに関する。本発明はまた、そのような抗体バリアントおよびアイソフォームの含有率が低い医薬組成物にも関する。本発明はさらに、当該抗体バリアントおよびアイソフォームの検出方法および分析方法に関する。

背景技術

[0002] 抗体は血漿中での安定性が高く、副作用も少ないことから医薬品として注目されている。中でもIgG型の抗体医薬は多数上市されており、現在も数多くの抗体医薬が開発されている（非特許文献１、２、３）。

[0003] 血友病Aは、先天性のFVIIIの機能低下または欠損による出血異常症である。血友病A患者の出血に対しては、FVIII製剤が通常投与される（on-demand投与）。また、近年は、出血イベントを防ぐために、予防的に、FVIII製剤が投与される（非特許文献１、２）（予防投与）。FVIII製剤の血中半減期は、約12～16時間程度である。それ故、継続的な予防のためには、週に3回、FVIII製剤が、患者に投与される（非特許文献３、４）。また、on-demand投与においては、再出血を防ぐため、FVIII製剤を、必要に応じ、一定間隔で追加投与する。また、FVIII製剤の投与は静脈内に実施される。従って、FVIII製剤と比べて投与の負担が少ない薬剤が、強く求められていた。

[0004] 時折、FVIIIに対する抗体（インヒビター）が、血友病患者に発生する。インヒビターは、FVIII製剤の効果を打ち消す。インヒビターが発生した患者（インヒビター患者）の出血に対しては、バイパス製剤が投与される。それらの作用機序は、FVIIIの機能、すなわち活性化血液凝固第IX因子（FIXa）によ

る血液凝固第X因子（FX）の活性化を触媒する機能に非依存である。そのため、バイパス製剤が、出血を十分止められないケースがある。従って、インヒビターの存在に左右されず、且つFVIIIの機能を代替する薬剤が、強く求められていた。

[0005] これらの課題を解決する手段として、FVIIIの機能を代替する二重特異性抗体及びその使用が報告されている（特許文献１、２、３および４）。FIXaとFXに対する二重特異性抗体は、両因子を近傍に位置付けることによって、FVIII様の活性を発揮し、FVIIIの機能を代替することが可能である（非特許文献５）。該抗体のFVIII様活性はFIXaとFXに対する親和性を最適化することにより向上できることが報告されている（非特許文献６）。該抗体の一つであり、高いFVIII様活性を有するエミシズマブ（Emicizumab：ACE910）は、サル血友病モデルで止血効果を発揮することが報告されており（非特許文献７、８）、血友病A患者を対象とした臨床試験が行われている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：WO 2005/035754

特許文献2：WO 2005/035756

特許文献3：WO 2006/109592

特許文献4：WO 2012/067176

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Blood 58, 1-13 (1981)

非特許文献2：Nature 312, 330-337(1984)

非特許文献3：Nature 312, 337-342(1984)

非特許文献4：Biochim.Biophys.Acta 871, 268-278(1986)

非特許文献5：Nat Med. 2012 Oct;18(10):1570-4.

非特許文献6：PLoS One. 2013;8(2):e57479.

非特許文献7：J Thromb Haemost. 2014 Feb;12(2):206-213.

非特許文献8：Blood. 2014 Nov 13;124(20):3165-71.

非特許文献9：J. Appl. Cryst. 13, 577-584 (1980)

非特許文献10：IUCrJ. 2, 9-18 (2015)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は上記のような状況に鑑みてなされたものであり、FVIII様活性が低い抗体バリアントまたはアイソフォームを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 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、エミシズマブを有効成分として含む医薬組成物に含まれる抗体バリアントおよびアイソフォームを同定することに成功した。また、これらの抗体バリアントおよびアイソフォームのFVIII様活性がエミシズマブと比べて極めて低いことを見出した。

[0010] 本発明はこのような知見に基づくものであり、具体的には下記〔１〕～〔２１〕を提供するものである。

〔１〕アミノ酸配列SISPSGQSTYYRREVKG（配列番号2）を含む可変領域を有する抗体のバリアントであって、

（a）前記配列のN末端側から12番目の位置（エミシズマブQ鎖のN末端側から61番目の位置：Kabatナンバリング60位）におけるアミノ酸残基R；または

（b）前記配列のN末端側から10～12番目の位置（エミシズマブQ鎖のN末端側から59～61番目の位置：Kabatナンバリング58～60位）におけるアミノ酸残基YYR

が欠損して当該可変領域が当該欠損部位で切断されている、抗体バリアント。

〔２〕前記配列がCDR配列である、〔１〕の抗体バリアント。

〔３〕前記配列がCDR2配列である、〔１〕の抗体バリアント。

〔４〕前記配列が重鎖に含まれる配列である、〔１〕の抗体バリアント。

〔５〕二重特異性（Bi-specific）抗体のバリアントである、〔１〕の抗体バリアント

〔６〕エミシズマブのバリアントである、〔１〕の抗体バリアント。

〔７〕アミノ酸配列SISPSGQSTYYRREVKG（配列番号2）を含む可変領域を有する抗体を含む試料を、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）、電荷に基づく分離、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）、またはそれらの組み合わせによって分離する工程を含む、〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の抗体バリアントの検出方法。

〔８〕〔１〕～〔６〕のいずれかの抗体バリアントを標準品として使用する、〔７〕の検出方法。

〔８－２〕定量分析、定性分析、および構造解析からなる群より選択される１つまたは複数の分析を行う工程を含む、〔８〕の検出方法。

〔９〕〔１〕～〔６〕のいずれかの抗体バリアントを含む医薬組成物であって、該医薬組成物中の全抗体分子における該抗体バリアントの割合が５％以下である、医薬組成物。

〔１０〕抗体がエミシズマブである、〔９〕の医薬組成物。

〔１１〕陽イオン交換クロマトグラフィー（CEX）による精製を含む精製工程により得られる、〔９〕の医薬組成物。

〔１２〕抗体産生細胞をpH7.1以上かつ/または培養温度36℃以下で培養する工程を含む、〔１〕～〔６〕のいずれかの抗体バリアントの生成を抑制する方法。

〔１２－２〕抗体産生細胞の培養条件を、培養の途中で、pH7.1以上かつ/または培養温度36℃以下での培養に変更する、〔１２〕の方法。

〔１３〕第一の重鎖（Q鎖：配列番号10）および第二の重鎖（J鎖：配列番号11）を含む二重特異性抗体のアイソフォームであって、

（1a）第一の重鎖におけるEUナンバリング144位（配列番号10のN末端側から150番目の位置）のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング200位（

配列番号11のN末端側から202番目の位置）のシステインとの間；および
（1b）第一の重鎖におけるEUナンバリング200位（配列番号10のN末端側から206番目の位置）のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング144位（配列番号11のN末端側から146番目の位置）のシステインとの間；
においてジスルフィド結合を形成しているか、あるいは
（2a）第一の重鎖におけるEUナンバリング226位（配列番号10のN末端側から229番目の位置）のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング229位（配列番号11のN末端側から228番目の位置）のシステインとの間；および
（2b）第一の重鎖におけるEUナンバリング229位（配列番号10のN末端側から232番目の位置）のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング226位（配列番号11のN末端側から225番目の位置）のシステインとの間
においてジスルフィド結合を形成している、二重特異性抗体アイソフォーム。

〔１４〕前記（1a）および（1b）においてジスルフィド結合を形成している、〔１３〕の二重特異性抗体アイソフォーム。

〔１５〕第一の重鎖（Q鎖：配列番号10）および第二の重鎖（J鎖：配列番号11）を含む二重特異性抗体のアイソフォームであって、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて分離した場合に前記二重特異性抗体よりもアルカリ性側の領域で溶出されることを特徴とする、二重特異性抗体アイソフォーム。

〔１６〕エミシズマブのアイソフォームである、〔１３〕～〔１５〕のいずれかの二重特異性抗体アイソフォーム。

〔１７〕二重特異性抗体含む試料を、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）、電荷に基づく分離、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）、またはそれらの組み合わせによって分離する工程を含む、〔１３〕～〔１６〕のいずれか一項に記載の抗体アイソフォームの検出方法。

〔１８〕〔１３〕～〔１６〕のいずれかの二重特異性抗体アイソフォームを標準品として使用する、〔１７〕の検出方法。

〔１８－２〕定量分析、定性分析、および構造解析からなる群より選択される１つまたは複数の分析を行う工程を含む、〔１８〕の検出方法。

〔１９〕〔１３〕～〔１６〕のいずれかの二重特異性抗体アイソフォームを含む医薬組成物であって、該医薬組成物中の全抗体分子における該抗体アイソフォームの割合が２％以下である、医薬組成物。

〔２０〕陽イオン交換クロマトグラフィーによって精製する工程を含む、〔１３〕～〔１６〕のいずれかの二重特異性抗体アイソフォームの含有率を低減する方法。

〔２１〕抗体の生物活性が著しく低下している、〔1〕、〔１３〕、または〔１５〕の抗体アイソフォーム又はバリアント。

〔２２〕それぞれ異なるエピトープを認識する２つの可変領域を有する抗体またはその誘導体のアイソフォームであって、当該抗体またはその誘導体に対し、Rgの平均値が3%以上、好ましくは4%以上、より好ましくは5%以上、より好ましくは６％以上小さく、および／またはDmaxの平均値が5%以上、好ましくは6%以上、より好ましくは7%以上、より好ましくは７．５％以上小さいアイソフォーム。

〔２３〕それぞれ異なるエピトープを認識する２つの可変領域を有する抗体またはその誘導体のアイソフォームであって、当該抗体またはその誘導体に対し、Rgの平均値が0.15nm以上、好ましくは 0.2nm以上、より好ましくは0.25nm以上、より好ましくは0.3nm以上小さく、および／またはDmaxの平均値が0.5nm以上、好ましくは1.0nm以上、より好ましくは1.2nm以上、より好ましくは1.4nm以上小さいアイソフォーム。

〔２４〕当該抗体またはその誘導体と異なるジスルフィド結合を有する〔２２〕または〔２３〕のアイソフォーム。

〔２５〕当該抗体またはその誘導体がエミシズマブ（第一の重鎖（Q鎖：配列番号10）、第二の重鎖（J鎖：配列番号11）、および第一の重鎖、第二の重鎖

のそれぞれと対を形成する共通軽鎖（配列番号12）を含む二重特異性抗体）である〔２２〕～〔２４〕のいずれかのアイソフォーム。

〔２６〕エミシズマブのアイソフォームであって、Rgの平均値が4.9nm以下、好ましくは4.8nm以下であり、および／またはDmaxの平均値が17.0nm以下、好ましくは16.5nm以下であるアイソフォーム。

〔２７〕第一の重鎖におけるEUナンバリング144位（配列番号10のN末端側から150番目の位置）のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング200位（配列番号11のN末端側から202番目の位置）のシステインとの間および第一の重鎖におけるEUナンバリング200位（配列番号10のN末端側から206番目の位置）のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング144位（配列番号11のN末端側から146番目の位置）のシステインとの間でジスルフィド結合を有する〔２５〕または〔２６〕のアイソフォーム。

〔２８〕エミシズマブおよび〔２２〕～〔２７〕のいずれかのアイソフォームを含む医薬組成物であって、該医薬組成物中の全抗体分子における該アイソフォームの割合が２％以下である、医薬組成物。

〔２９〕第一の重鎖（Q鎖：配列番号10）、第二の重鎖（J鎖：配列番号11）、および第一の重鎖、第二の重鎖のそれぞれと対を形成する共通軽鎖（配列番号12）を含む二重特異性抗体（Q499-z121/J327-z119/L404-k; エミシズマブ）のアイソフォームであって、Q鎖におけるEUナンバリング146位から174位（配列番号１０のＮ末端側から152番目から180番目）のアミノ酸残基およびJ鎖におけるEUナンバリング146位から174位（配列番号１１のＮ末端側から148番目から176番目）のアミノ酸残基においてエミシズマブと分子構造上の差異を有するアイソフォーム。

〔３０〕当該分子構造上の差異が、HDX-MS測定における重水素交換率(%D)の差として測定される〔２９〕に記載のアイソフォーム。

〔３１〕エミシズマブおよび〔２９〕または〔３０〕のアイソフォームを含む医薬組成物であって、該医薬組成物中の全抗体分子における該アイソフォームの割合が２％以下である、医薬組成物。

[0011] また本発明は、下記〔Ａ１〕～〔Ａ９〕も提供する。

〔Ａ１〕抗体および/または抗体バリアントもしくはアイソフォームを含む試料を、還元反応、加水分解反応（消化反応）、タンパク質変性反応、またはそれらの組み合わせに供する工程を含む、〔７〕または〔１７〕の検出方法。

〔Ａ２〕前記還元反応が、温和な還元条件下（例えば、Tris緩衝液（pH7.0）中のDTTによる37℃での還元）で実施される、〔Ａ１〕の検出方法。

〔Ａ３〕前記加水分解反応が、部位特異的切断酵素（例えば、IdeSプロテアーゼ、Lys-C、パパイン等の配列特異的プロテアーゼ）を用いて実施される、〔Ａ１〕の検出方法。

〔Ａ４〕抗体、抗体バリアントもしくはアイソフォーム、それらの反応産物、またはそれらの組み合わせを含む試料を、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）、電荷に基づく分離、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）、またはそれらの組み合わせによって分離する工程を含む、〔７〕、〔１７〕または〔Ａ１〕～〔Ａ３〕のいずれかの検出方法。

〔Ａ５〕SE-HPLC分析、動的光散乱法（DLS）、SAXS測定、電子顕微鏡測定、3D modeling、SPR評価、HDX MS分析、またはそれらの組み合わせによって分析する工程を含む、〔８〕、〔１８〕または〔Ａ１〕～〔Ａ４〕のいずれかの検出方法。

〔Ａ６〕〔７〕、〔８〕、〔１７〕、〔１８〕または〔Ａ１〕～〔Ａ５〕、またはそれらの方法を組み合わせる工程を含む、エミシズマブを含有する医薬組成物の品質管理方法。

〔Ａ７〕〔Ａ６〕の方法の工程を含む、エミシズマブを含有する医薬組成物の製造方法。

〔Ａ８〕陽イオン交換クロマトグラフィー（CEX）のBind & Elute modeの工

程を含むことを特徴とする、エミシズマブを含む組成物の精製方法。

〔Ａ９〕〔Ａ８〕の精製方法の工程を含む、エミシズマブを含有する医薬組成物の製造方法。

発明の効果

[0012] 本発明者等は、エミシズマブを有効成分として含む医薬組成物に含まれる抗体バリアントおよびアイソフォームを同定することに成功した。また、本発明者等は、これらの抗体バリアントおよびアイソフォームのFVIII様活性がエミシズマブと比べて極めて低いことも見出した。したがって、エミシズマブを含むが、これらの抗体バリアントおよびアイソフォームの含有率が低い医薬組成物は、血友病の治療手段として有用である。

図面の簡単な説明

[0013] [図1-1]図１Ａは、CE-HPLCによるエミシズマブ原薬の分離結果を示す図である。太枠で示したピークはQ-CDR-Clipped Variantを示す。

[図1-2]図１Ｂは、Q-CDR-Clipped Variantの分子構造を表す模式図である。図中の数字およびその下のアルファベットは、それぞれ、エミシズマブのQ鎖のN末端側から数えたアミノ酸残基の位置および当該位置におけるアミノ酸残基（一文字表記）を表す。

[図2-1]図２Ａは、CE-HPLCによるエミシズマブ原薬の分離結果を示す図である。太枠で示したピークはProtected disulfide isoformを示す。

[図2-2]図２Ｂは、Protected disulfide isoformの分子構造を表す模式図である。図中の数字およびその左のアルファベットCは、それぞれ、エミシズマブのQ鎖のN末端側から数えたアミノ酸残基の位置および当該位置におけるシステイン残基を表す。図２Ｃは、エミシズマブ原薬におけるProtected disulfide isoformの含有率を示す図である。種々の条件（抗体産生細胞の培養条件）における当該含有率を、図２Ａが示すCE-HPLC分離結果におけるProtected disulfide isoformのピークの面積％（area ％）の平均値（Mean）および標準偏差（Std Dev）にて示している。

[図3]図３は、IdeS消化および還元処理後のエミシズマブおよびProtected di

sulfide isoformを逆相高速液体クロマトグラフィーにより分離した結果を示す図である。図３Ａ～Ｄは、IdeS消化後に、変性剤を含む条件（ＡおよびＣ：完全還元条件）または含まない条件（ＢおよびＤ：部分還元条件）下でエミシズマブ（ＡおよびＢ）またはProtected disulfide isoform（ＣおよびＤ）を還元したサンプルの分離結果を示している。完全還元条件（図３ＡおよびＣ）においては、エミシズマブとProtected disulfide isoformのいずれについても、Q鎖Fd（Q-Fd）、J鎖Fd（J-Fd）、Q鎖Fc（Q-Fc）、J鎖Fc（J-Fc）、およびL鎖（LC）を示すピークが検出され、エミシズマブとProtected disulfide isoformとの間に還元パターンの違いは検出されなかった。一方、部分還元条件（図３ＢおよびＤ）においては、完全還元条件の場合と同様のQ鎖Fd、J鎖Fd、Q鎖Fc、J鎖Fc、およびL鎖を示すピークに加えて、Protected Disulfide Isoformについてのみ、互いにジスルフィド結合しているQ鎖FdとJ鎖Fdのヘテロ二量体（J-Fd-Q-Fd）を示す特異なピークが検出された。

[図4]図４は、IdeS消化（および変性処理）後のエミシズマブおよびProtected disulfide isoformを逆相高速液体クロマトグラフィーにより分離した結果を示す図である。図４ＡおよびＢは、IdeS消化後のProtected disulfide isoform（Ａ）またはエミシズマブ（Ｂ）の分離結果を示している。図４ＣおよびＤは、IdeS消化後に変性処理したProtected disulfide isoform（Ｃ）またはエミシズマブ（Ｄ）の分離結果を示している。変性処理の有無にかかわらず、Protected Disulfide IsoformのF(ab')2部分（LC-J Fab-Q Fab-LC）はエミシズマブの主成分よりも保持時間が長く分離された。

[図5]図５は、種々の培養条件でエミシズマブ産生CHO細胞を培養した場合の培養上清に含まれるQ-CDR-Clipped Variant含有率を示す図である。培養上清をProtein Aを用いて精製した試料をQ-CDR-Clipped Variant含有率の測定に用いた。縦軸はQ-CDR-Clipped Variant含有率（ピーク面積%）を表し、横軸は種々の培養条件を表す。

[図6]図６は、種々の培養条件でエミシズマブ産生CHO細胞を培養した場合の培養上清に含まれるQ-CDR-Clipped Variant含有率を示す図である。培養上清

をProtein Aを用いて精製した試料をQ-CDR-Clipped Variant含有率の測定に用いた。縦軸はQ-CDR-Clipped Variant含有率（ピーク面積%）を表し、横軸は種々の培養条件を表す。

[図7]図７は、Q-CDR Clipped Variantを含むエミシズマブ抗体溶液の、陽イオン交換クロマトグラフィー（CEX）のBind & Elute mode工程を含む精製工程における各画分をCE-HPLC分析した結果を示す図である。「負荷画分」は、陽イオン交換カラムに負荷した抗体溶液のCE-HPLC分析結果を示す。「洗浄画分」は、pH 7.2に調整した、25 mmol/Lの塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液をカラムに通液した後（洗浄後）のカラム吸着画分のCE-HPLC分析結果を示す。「溶出画分」は、洗浄後、pH 6.5に調整した、100 mmol/Lの塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液をカラムに通液した後のカラム吸着画分のCE-HPLC分析結果を示す。負荷画分および洗浄画分と比べて、溶出画分においては、エミシズマブ抗体のピークより酸性側のQ-CDR Clipped Variantのピークが消失していた。

[図8]図８Ａ～ＤはSAXS装置によるエミシズマブ（Main）およびProtected Disulfide Isoform（BiAb3）の分子構造の分析結果を示す図である。Pair-distance distribution function [p(r)]、Rg（nm）、Dmax（nm)はそれぞれ分子の二体間距離分布関数、慣性半径、最大長を表す。

[図9-1]図９ＡはHDX-MS測定における重水素交換率(%D)のエミシズマブ（カチオン交換高速液体クロマトグラフィーの主成分）およびProtected Disulfide IsoformのResidual Plot（重水素交換時間30 s,60 s, 120 s, 240 s, 480 s, 960 s, 1920 sおよび3840 s）を示す。棒グラフはＱ鎖、Ｊ鎖、及びＬ鎖における各重水素交換時間の結果の差の総和を示す。図９ＢはHDX-MS測定によるエミシズマブおよびProtected Disulfide Isoformの間で分子構造の違いが示唆された部分を示す。両者の分子構造上の差異はQ鎖におけるEUナンバリング146位から174位（配列番号１０のＮ末端側から152番目から180番目）およびJ鎖におけるEUナンバリング146位から174位（配列番号１１のＮ末端側から148番目から176番目）のアミノ酸残基を含むペプチドで顕著であった（星印

で表示）。

[図9-2]図９－１の続きを示す。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明の一つの実施態様は、生物活性（例えばFVIII様活性）が低下した抗体バリアントおよびアイソフォームに関する。これらの抗体バリアントおよびアイソフォームは、本発明者らによるエミシズマブ原薬の分析において、２種類の構造変化体（Q-CDR-Clipped Variant およびProtected disulfide isoform）として同定された。本明細書において、「抗体バリアント」および「抗体アイソフォーム」は、抗体分子の変異体、または異性体と称されることもある。

[0015] エミシズマブは、FVIII補因子機能代替活性を示す抗FIX（a）および抗FXからなる二重特異性ヒト化IgG4抗体であり、FIX(a)およびFXそれぞれを認識する2種類の重鎖（Q499およびJ327）と共通L鎖（L404）から構成される。

[0016] 具体的には、エミシズマブは、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドが配列番号：1、2、3（Q499のH鎖CDR）に記載のH鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含むH鎖、第二のポリペプチドが配列番号：4、5、6（J327のH鎖CDR）に記載のH鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含むH鎖、第三のポリペプチドと第四のポリペプチドが配列番号：7、8、9（L404のL鎖CDR）に記載のL鎖CDR1、2、3のアミノ酸配列を含む共通L鎖からなる二重特異性抗体（Q499-z121/J327-z119/L404-k）である。

[0017] より具体的には、エミシズマブは、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドが配列番号：13に記載のH鎖可変領域のアミノ酸配列を含むH鎖、第二のポリペプチドが配列番号：14に記載のH鎖可変領域のアミノ酸配列を含むH鎖、および第三のポリペプチドと第四のポリペプチドが配列番号：15に記載のL鎖可変領域のアミノ酸配列を含む共通L鎖からなる二重特異性抗体である。

[0018] さらに具体的には、エミシズマブは、第一のポリペプチドと第三のポリペプチドが対を形成し、第二のポリペプチドと第四のポリペプチドが対を形成する二重特異性抗体であって、第一のポリペプチドが配列番号：10に記載のアミノ酸配列からなるH鎖、第二のポリペプチドが配列番号：11に記載のアミノ酸配列からなるH鎖、および第三のポリペプチドと第四のポリペプチドが配列番号：12に記載の共通L鎖からなる二重特異性抗体（Q499-z121/J327-z119/L404-k）である。

このような抗体は、例えばWO2005/035756、WO2006/109592、WO2012/067176などに記載の方法に従って取得することができる。

[0019] 本発明で使用される抗体は、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く、均質な抗体を安定に生産できる点でモノクローナル抗体が好ましい。

[0020] なお、本発明で記載されているアミノ酸配列に含まれるアミノ酸は翻訳後に修飾（例えば、N末端のグルタミンのピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾は当業者によく知られた修飾である）を受ける場合もあるが、そのようにアミノ酸が翻訳後修飾された場合であっても当然のことながら本発明で使用される抗体に含まれる。

[0021] 本発明において、抗体または抗体バリアントまたは抗体アイソフォームの生物活性は、好ましくはFVIII様活性である。本発明において「FVIII様活性」とは、FVIIIの機能を代替する活性（FVIII補因子機能代替活性）を意味する。本発明において「FVIIIの機能を代替する」とは、FIXまたはFIXa、および、FXを認識し、FIXaによるFXの活性化を促進する（FIXaによるFXa産生を促進する）ことを意味する。FXa産生促進活性は、例えば、FIXa、FX、合成基質S-2222（FXaの合成基質）、リン脂質から成る測定系で評価することができる。このような測定系は、血友病A症例における疾患の重症度および臨床症状と相関性を示す(Rosen S, Andersson M, Blomba¨ck M et al. Clinical applications of a chromogenic substrate method for determination of FVIII activity. Thromb Haemost 1985; 54: 811-23)。

エミシズマブ等の抗体および抗体バリアントおよび抗体アイソフォームのFVIII様活性は、例えば、WO2005/035756、WO2006/109592、WO2012/067176等に記載の方法に従って評価することができる。

[0022] 本発明において抗体または抗体バリアントまたは抗体アイソフォームの生物活性が低下しているとは、当該生物活性が、比較対象とする抗体の生物活性と比べて低下していればよく、統計学的に有意に低下していることが好ましい。本発明において抗体または抗体バリアントまたは抗体アイソフォームの生物活性が著しく（または極めて）低下しているとは、当該生物活性が、比較対象とする抗体の生物活性と比べて、10%以上、例えば、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、または90%以上低下していることを意味する。

[0023] 本発明において「Q鎖（Q Chain）」および「J鎖（J chain）」とは、それぞれFIX(a)およびFXに対して結合能を示し得る可変領域を含むH鎖（重鎖）を意味する。

[0024] 本発明において「共通L鎖」とは、異なる2種以上のH鎖とそれぞれ対を形成し、それぞれの抗原に対して結合能を示し得るL鎖である。ここで、「異なるH鎖」とは、好ましくは異なる抗原に対する抗体のH鎖を指すが、それに限定されず、アミノ酸配列が互いに異なっているH鎖を意味する。共通L鎖は、例えばWO2006/109592に記載の方法に従って取得することができる。

[0025] 「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、所望の生物学的活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、二量体、多量体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、抗体誘導体および抗体修飾物であってもよい（Miller K et al. J Immunol. 2003, 170(9), 4854-61）。抗体は、マウス、ヒト、ヒト化、キメラであってもよく、または他の種由来であっても、人工的に合成したものであってもよい。本明細書中に開示される抗体は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgDおよびIgA）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）またはサブクラスであり得る。免疫グロブリンは、任意の種（例えば、ヒト

、マウスまたはウサギ）由来であり得る。尚、「抗体」、「免疫グロブリン」および「イムノグロブリン」なる用語は互換性をもって広義な意味で使われる。

[0026] 「二重特異性」抗体は、それぞれ異なるエピトープを認識する２つの可変領域を同一の抗体分子内に有する抗体をいう。二重特異性抗体は2つ以上の異なる抗原を認識する抗体であってもよいし、同一抗原上の異なる2つ以上のエピトープを認識する抗体であってもよい。二重特異性抗体には、wholeの抗体だけでなく抗体誘導体が含まれていてもよい。

[0027] 抗体としては、遺伝子組換え技術を用いて産生した組換え型抗体を用いることができる。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ、または抗体を産生する感作リンパ球等の抗体産生細胞からクローニングし、ベクターに組み込んで、これを宿主（宿主細胞）に導入し産生させることにより得ることができる。

[0028] 二重特異性抗体はIgGタイプのものに限られないが、例えばIgGタイプ二重特異性抗体はIgG抗体を産生するハイブリドーマ二種を融合することによって生じるhybrid hybridoma(quadroma)によって分泌させることが出来る（Milstein C et al. Nature 1983, 305: 537-540）。また目的の二種のIgGを構成するL鎖およびH鎖の遺伝子、合計4種の遺伝子を細胞に導入することによって共発現させることによって分泌させることが出来る。

[0029] 本発明の抗体は当業者に公知の方法により製造することができる。具体的には、目的とする抗体をコードするDNAを発現ベクターへ組み込む。その際、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。その際には、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。

[0030] これにより得られた本発明の抗体は、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抗体として精製することができる。抗体の分離、精製は、通常の抗体の精製で使用されている分離、精製方法を使

用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、IgG2ジスルフィドアイソフォームの分離については、WO2013/086448に記載の方法が知られている。本発明の抗体および抗体バリアントまたは抗体アイソフォームの分離、精製については、例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれば抗体および抗体バリアントまたは抗体アイソフォームを分離、精製することができる。例えば、クロマトグラフィーカラムを用いた分離、精製においては、強陽イオン交換マトリックス、弱陽イオン交換マトリックス、抗ヒトIgG親和性マトリックス、およびプロテインLマトリックス等の種々のマトリックスを用いることができる。

[0031] 一局面において、本発明は、以下の特徴を有する抗体バリアント（本明細書において、Q-CDR-Clipped Variantと称することがある）に関する：

・エミシズマブに比べて、生物活性（FVIII様活性）が極めて低い；

・欠損しているアミノ酸残基のN末端側の断片とC末端側の断片とがジスルフィド結合によって結合している（図１Ｂ）。

・抗体産生細胞の培養時間、培養温度、および培養pHによって生成量が異なる。

[0032] 一態様において、Q-CDR-Clipped Variantは、アミノ酸配列SISPSGQSTYYRREVKG（配列番号2）を含む可変領域を有する抗体のバリアントであって、

（a）配列番号2のアミノ酸配列のN末端側から12番目の位置（エミシズマブのQ鎖のN末端側から61番目の位置、すなわちKabatナンバリング60位）におけるアミノ酸残基R；または

（b）配列番号2のアミノ酸配列のN末端側から10～12番目の位置（エミシズマブのQ鎖のN末端側から59～61番目の位置：Kabatナンバリング58～60位）におけるアミノ酸残基YYR

が欠損して当該可変領域が当該欠損部位で切断されている、抗体バリアントである。

Q-CDR-Clipped Variantは、好ましくは二重特異性（Bi-specific）抗体のバリアントであり、特に好ましくはエミシズマブのバリアントである。

[0033] 別の局面において、本発明は、Q-CDR-Clipped Variantの検出方法および分析方法にも関する。一態様において、Q-CDR-Clipped Variantの検出方法は、アミノ酸配列SISPSGQSTYYRREVKG（配列番号2）を含む可変領域を有する抗体を含む試料を、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）、電荷に基づく分離、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）、またはそれらの組み合わせによって分離する工程を含む。また、一態様において、Q-CDR-Clipped Variantの分析方法は、Q-CDR-Clipped Variantを標準品として使用し、定量分析、定性分析、および構造解析からなる群より選択される１つまたは複数の分析を行う工程を含む。

そのような検出方法および分析方法においては、配列番号2のアミノ酸配列を有するFab（Q鎖Fab）における欠損部位の有無を指標にして検出および分析することができる。当該欠損部位は、例えば、LCMS分析における、当該欠損に起因する分子量のシフトを指標として検出することができる。また、Q-CDR-Clipped Variantにおいて、欠損しているアミノ酸残基のN末端側の断片とC末端側の断片とはジスルフィド結合によって結合しているため、ジスルフィド結合の還元反応に供した後の試料をCE-HPLC、LCMS、LC-UV等の種々の分析技術を利用して分析することによって、欠損部位の有無に起因する還元パターンの違いを検出することができる。また、NMR測定等による構造解析を利用することもできる。

あるいは、イオン交換クロマトグラフィーによる分離度の違いを指標とすることもでき、例えば陽イオン交換クロマトグラフィーにより分離した場合、Q-CDR-Clipped Variantは、エミシズマブの主要ピークと比べて酸性側の領域にて分離される。

別の局面において、本発明は、上記のような検出方法および分析方法のう

ちの１つまたはそれらの組み合わせを実施することによって、エミシズマブを含有する医薬組成物の製造および品質管理を行うことができる。したがって、本発明は、上記のような検出方法および分析方法の実施、またはそれらの方法を組み合わせる工程を含む、エミシズマブを含有する医薬組成物の品質管理方法に関する。また、本発明は、そのような品質管理方法を実施する工程を含む、エミシズマブを含有する医薬組成物の製造にも関する。

[0034] 別の局面において、本発明は、エミシズマブおよびQ-CDR-Clipped Variantを含む医薬組成物であって、該医薬組成物中の抗体分子におけるQ-CDR-Clipped Variantの割合が低く抑えられている、医薬組成物に関する。当該医薬組成物は、陽イオン交換クロマトグラフィー（CEX）による精製を含む精製工程により得られる。例えば、エミシズマブおよびQ-CDR-Clipped Variantを含む抗体溶液を陽イオン交換カラムに吸着させた後、Q-CDR Clipped Variant含む酸性側のバリアントのみを特異的に溶出させ、除去することができる、当該医薬組成物中の全抗体分子におけるQ-CDR-Clipped Variantの割合は、上記のQ-CDR-Clipped Variant検出/分析方法を含む種々の方法によって評価することができ、例えば、当該医薬組成物を陽イオン交換クロマトグラフィー（CEX）やCE-HPLCで分析した際のQ-CDR-Clipped Variantのピーク面積の割合（ピークエリア比）によって表すことができる。当該医薬組成物中の全抗体分子におけるQ-CDR-Clipped Variantの割合（例えば、CEXのピークエリア比）は、好ましくは5%以下であり、例えば、5.0%以下、4.0%以下、3.0%以下、2.0%以下、または1.0%以下である。

また、本発明は、Q-CDR-Clipped Variantの含有率が低く抑えられた医薬組成物の製造方法、およびQ-CDR-Clipped Variantの生成を抑制する方法にも関する。Q-CDR-Clipped Variantの生成量は、抗体産生細胞の培養時間を短くする（例えば15日以内、好ましくは13日以内とする）ことによって、あるいは培養温度を低くする（例えば38℃以下、好ましくは37℃以下、さらに好ましくは36℃以下とする）ことによって、および/または、培養pHを高くする（例えば6.7以上、好ましくは6.9以上、さらに好ましくは7.1以上とする）ことに

よって、低減することができる（図４）。したがって、上記方法は、抗体（例えばエミシズマブ）産生細胞を、従来よりも低い培養温度（例えば約36℃以下）、高いpH（例えば約7.1以上）で一定時間（例えば約15日以内）培養する工程を含むことを特徴とする。一態様において、上記方法は、抗体産生細胞をpH7.1以上かつ/または培養温度36℃以下で培養する工程を含む。特定の態様において、上記方法は、抗体産生細胞の培養条件を、培養の途中（たとえば培養２日目以降）で、pH7.1以上かつ/または培養温度36℃以下での培養条件にシフトすることを特徴とする。

別の局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー（CEX）のBind & Elute modeの工程を含むことを特徴とする、エミシズマブを含む組成物の精製方法に関する。また、本発明は、当該精製方法を実施する工程を含む、エミシズマブを含有する医薬組成物の製造方法にも関する。

[0035] 別の局面において、本発明は、以下の特徴を有する抗体アイソフォーム（本明細書において、Protected disulfide isoformと称することがある）に関する：

・エミシズマブに比べて、生物活性（FVIII様活性）が極めて低い；

・エミシズマブに比べて、疎水性が強い；

・エミシズマブに比べて、温和な還元条件（部分還元条件）下で重鎖間のジスルフィド結合（図２Ｂ）が還元されにくい；

・抗体産生細胞の培養液中の溶存酸素濃度および初期pH、ならびにMTX（methotrexate）添加前の培養時間等の条件（製造パラメータ）に関係なく生成される。

一態様において、Protected disulfide isoformは、抗原であるFIX(a)およびFXと結合することはできるが、生物活性（FVIII様活性）は示さないことを特徴とする。

特定の態様において、Protected disulfide isoformは、エミシズマブと同じ（正常な）ジスルフィド結合を有しているが、Fab部分の構造変化によって通常よりも強い疎水性を有し、重鎖間のジスルフィド結合が通常より還元さ

れにくくなった構造異性体である。

[0036] 別の態様において、Protected disulfide isoformは、第一の重鎖（Q鎖：配列番号10）および第二の重鎖（J鎖：配列番号11）を含む二重特異性抗体のアイソフォームであって、

（1a）第一の重鎖におけるEUナンバリング144位（配列番号10のN末端側から150番目の位置）のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング200位（配列番号11のN末端側から202番目の位置）のシステインとの間；および

（1b）第一の重鎖におけるEUナンバリング200位（配列番号10のN末端側から206番目の位置）のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング144位（配列番号11のN末端側から146番目の位置）のシステインとの間；

においてジスルフィド結合を形成しているか、あるいは

（2a）第一の重鎖におけるEUナンバリング226位（配列番号10のN末端側から229番目の位置）のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング229位（配列番号11のN末端側から228番目の位置）のシステインとの間；および

（2b）第一の重鎖におけるEUナンバリング229位（配列番号10のN末端側から232番目の位置）のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング226位（配列番号11のN末端側から225番目の位置）のシステインとの間；

においてジスルフィド結合を形成している、二重特異性抗体アイソフォームである。

[0037] 特定の態様において、Protected disulfide isoformは、

（1a）第一の重鎖におけるEUナンバリング144位（配列番号10のN末端側から150番目の位置）のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング200位（配列番号11のN末端側から202番目の位置）のシステインとの間；

（1b）第一の重鎖におけるEUナンバリング200位（配列番号10のN末端側から206番目の位置）のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング144位（配列番号11のN末端側から146番目の位置）のシステインとの間；

（1c）第一の重鎖におけるEUナンバリング226位（配列番号10のN末端側から229番目の位置）のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング226位（

配列番号11のN末端側から225番目の位置）のシステインとの間；および

（1d）第一の重鎖におけるEUナンバリング229位（配列番号10のN末端側から232番目の位置）のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング229位（配列番号11のN末端側から228番目の位置）のシステインとの間

においてジスルフィド結合を形成しているか、あるいは

（2a）第一の重鎖におけるEUナンバリング226位（配列番号10のN末端側から229番目の位置）のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング229位（配列番号11のN末端側から228番目の位置）のシステインとの間；

（2b）第一の重鎖におけるEUナンバリング229位（配列番号10のN末端側から232番目の位置）のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング226位（配列番号11のN末端側から225番目の位置）のシステインとの間；

（2c）第一の重鎖におけるEUナンバリング144位（配列番号10のN末端側から150番目の位置）のシステインと、第一の重鎖におけるEUナンバリング200位（配列番号10のN末端側から206番目の位置）のシステインとの間；および

（2d）第二の重鎖におけるEUナンバリング144位（配列番号11のN末端側から146番目の位置）のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング200位（配列番号11のN末端側から202番目の位置）のシステインとの間；

においてジスルフィド結合を形成している、二重特異性抗体アイソフォームであり、特に好ましくはエミシズマブのアイソフォームである。

[0038] 別の局面において、本発明は、Protected disulfide isoformの検出方法および分析方法にも関する。一態様において、Protected disulfide isoformの検出方法は、二重特異性抗体含む試料を、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）、電荷に基づく分離、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）、またはそれらの組み合わせによって分離する工程を含む。また、一態様において、Protected disulfide isoformの分析方法は、Protected disulfide isoformを標準品として

使用し、定量分析、定性分析、および構造解析からなる群より選択される1つまたは複数の分析を行う工程を含む。

そのような検出方法および分析方法においては、重鎖間ジスルフィド結合領域および/またはFab領域の構造における、Protected disulfide isoformとエミシズマブとの違いを利用して分析することができる。この構造面の違いは、例えば以下に示すような種々の分析手法によって検出することができる。

[0039] 例えば、 非還元条件下でIdeSプロテアーゼによる消化反応（IgGのヒンジ領域の下の単一部位を切断し、F(ab')2とFc断片を生じさせる）を行った後の試料を、逆相カラム（例えばC4カラム）を用いて分析することによって、エミシズマブとProtected disulfide isoformの立体構造の違いまたは疎水性の強さを反映したピークを検出することができる。

また、IdeS消化後に、温和な還元条件下（例えばTris緩衝液（pH7.0）中のDTTによる37℃での還元）で還元反応を行った後の試料を逆相カラムにより分析することによって、エミシズマブとProtected disulfide isoformにおけるジスルフィド結合の還元されやすさの違いを反映したピークを検出することができる。

エミシズマブとProtected disulfide isoformは、全てのジスルフィド結合が還元される条件下で還元反応を行った場合は逆相カラムによる分析結果に違いが検出されないが、上記の温和な還元条件下で還元反応を行った場合は逆相カラムによる分析結果において、還元パターンの違いが検出される。特定の理論により限定されることを意図するものではないが、上記の温和な還元条件下では、エミシズマブは、重鎖-軽鎖間のジスルフィド結合も重鎖間のジスルフィド結合も還元されるのに対し、Protected disulfide isoformは、重鎖-軽鎖間のジスルフィド結合のみ還元されて重鎖間のジスルフィド結合は還元されないと考えられる。

[0040] また、非変性条件下（例えばTris緩衝液中）で（例えばLys-C消化反応を途中で止めることによって）限定的Lys-C消化を行った場合の試料を、逆相カラ

ム（例えばC4カラム）を用いて分析することによって、エミシズマブとProtected disulfide isoformの立体構造の違いに起因するLys-C消化パターンの違いを反映したピークを検出することができる。特定の理論により限定されることを意図するものではないが、非変性条件におけるLys-C消化のため、立体構造を保持した状態でLys-Cがアクセスしやすい部位が優先的に切断された結果、立体構造の違いが反映されたLys-C消化パターンが検出されると考えられる。

[0041] あるいは、変性処理（例えば、5Mグアニジン、37℃、30分処理）後の非還元試料（すなわちSS結合は保持している）に対して限定にLys-C消化を行った上で逆相カラムを用いて分析することによって、エミシズマブとProtected disulfide isoformの立体構造の違いに起因するLys-C消化パターンの違いを反映したピークを検出することができる。特定の理論により限定されることを意図するものではないが、変性後の非還元試料のLys-C消化のため、立体構造は保持していないがSS結合（ジスルフィド結合）は保持している状態でLys-Cがアクセスしやすい部位が優先的に切断された結果、SS結合の違いが反映されたLys-C消化パターンが検出されると考えられる。

上記のような、非変性条件または変性条件における、還元反応、IdeS消化、限定的Lys-C消化の他に、パパイン消化等の種々の分解反応を利用することができる。また、C4カラム等を利用した逆相クロマトグラフィーの他に、SE-HPLC分析、動的光散乱法（DLS）、SAXS測定、電子顕微鏡測定、3D modeling、SPR評価、HDX MS分析等の種々の分析技術を利用することができる。

別の局面において、本発明は、上記のような検出方法および分析方法のうちの１つまたはそれらの組み合わせを実施することによって、エミシズマブを含有する医薬組成物の製造および品質管理を行うことができる。したがって、本発明は、上記のような検出方法および分析方法の実施、またはそれらの方法を組み合わせる工程を含む、エミシズマブを含有する医薬組成物の品質管理方法に関する。また、本発明は、そのような品質管理方法を実施する工程を含む、エミシズマブを含有する医薬組成物の製造にも関する。

[0042] 別の局面において、本発明は、エミシズマブおよびProtected disulfide isoformを含む医薬組成物であって、該医薬組成物中の抗体分子におけるProtected disulfide isoformの割合が低く抑えられている、医薬組成物に関する。当該医薬組成物中の全抗体分子におけるProtected disulfide isoformの割合は、上記のProtected disulfide isoform検出/分析方法を含む種々の方法によって評価することができ、例えば、当該医薬組成物を陽イオン交換クロマトグラフィー（CEX）やCE-HPLCで分析した際のProtected disulfide isoformのピーク面積の割合（ピークエリア比）によって表すことができる。当該医薬組成物中の全抗体分子におけるProtected disulfide isoformの割合（例えば、CEXのピークエリア比）は、好ましくは2%以下であり、例えば、2.0%以下、1.5%以下、1.0%以下、または0.5%以下である。

別の局面において、本発明は、陽イオン交換クロマトグラフィー（CEX）のBind & Elute modeの工程を含むことを特徴とする、エミシズマブを含む組成物の精製方法に関する。また、本発明は、当該精製方法を実施する工程を含む、エミシズマブを含有する医薬組成物の製造方法にも関する。

[0043] 別の局面において、本発明は、エミシズマブのアイソフォーム（Protected disulfide isoform）であって、エミシズマブと同一の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列を有するが、エミシズマブよりもRg(nm)および／またはDmax(nm)の値の小さい分子構造を有するアイソフォームを開示する。このようなアイソフォームは、エミシズマブよりもJ鎖-Q鎖のN末端間の距離が短い分子構造を有し、具体的にはSAXS装置で測定したRgの平均値がエミシズマブに対し3%以上、好ましくは4%以上、より好ましくは5%以上、より好ましくは6%以上小さく、および／またはDmaxの平均値が5%以上、好ましくは6%以上、より好ましくは7%以上、より好ましくは7.5%以上小さい。また、Rgの平均値がエミシズマブに対し0.15nm以上、好ましくは 0.2nm以上、より好ましくは0.25nm以上、より好ましくは0.3nm以上小さく、および／またはDmaxの平均値が0.5nm以上、好ましくは1.0nm以上、より好ましくは1.2nm以上、より好ましくは1.4nm以上小さい。またこのようなアイソフォームは、Rgの平均値が4.9nm

以下、好ましくは4.8nm以下であり、および／またはDmaxの平均値が17.0nm以下、好ましくは16.5nm以下である。

このようなRg, Dmaxの値は以下の条件下で測定される。

(1)抗体濃度：抗体濃度7.54 mg/mL

(2)溶媒条件：150 mmol/L arginine, 20 mmol/L histidine-aspartic acid, pH6.0

(3)温度：25℃

ここで、Rgの平均値はGuinier plotからRgを測定ごとに計算し、それらを平均することにより算出することが出来る。Dmaxの平均値はp(r)のx切片からDmaxを測定ごとに計算し、それらを平均することにより算出することが出来る。なお、Guinier plot及びp(r)に関する解析方法は、実施例９に記載の通りである。

別の局面において、本発明は、エミシズマブのアイソフォーム（Protected disulfide isoform）であって、エミシズマブと同一の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列を有するが、エミシズマブと比べ、Q鎖におけるEUナンバリング146位から174位（配列番号１０のＮ末端側から152番目から180番目）のアミノ酸残基およびJ鎖におけるEUナンバリング146位から174位（配列番号１１のＮ末端側から148番目から176番目）のアミノ酸残基において分子構造上の差異を有するアイソフォームを開示する。このような構造上の違いは、HDX-MS測定における重水素交換率(%D)の差として測定することが可能であり、具体的に、図９Ａに示すように、この領域のアミノ酸残基を含むペプチドの重水素交換時間の差として確認することが出来る。

別の局面において、本発明は、エミシズマブおよび該アイソフォームを含む医薬組成物であって、該医薬組成物中の全抗体分子における該アイソフォームの割合が２％以下である、医薬組成物を開示する。

前記、抗体分子、抗体バリアント、抗体アイソフォーム、抗体バリアントまたはアイソフォームを含む医薬組成物、抗体バリアントまたはアイソフォームの分析方法、および抗体バリアントまたはアイソフォームの生成を抑制

する方法においては、抗体は好ましくは二重特異性抗体であり、さらに好ましくはエミシズマブ（ACE910）である。

[0044] 本明細書において用いる場合、「・・・を含む（comprising）」との表現により表される態様は、「本質的に・・・からなる（essentially consisting of）」との表現により表される態様、ならびに「・・・からなる（consisting of）」との表現により表される態様を包含する。

[0045] 本明細書に記載の数値は、例えば機器、測定条件、当業者の手技に起因して、一定の範囲内で変動し得るものであり、本発明の目的を達成できる範囲内であれば、例えば10%程度変動することはあり得る。

[0046] 本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て本明細書に参照として取り込まれる。

本発明は、以下の実施例によってさらに例示されるが、下記の実施例に限定されるものではない。

実施例

[0047] 〔実施例１〕遺伝子組換えヒト化二重特異性モノクローナル抗体（エミシズマブ抗体）の製造

エミシズマブの異性体（抗体バリアントおよびアイソフォーム）の構造解析のために、大量のエミシズマブ抗体を次のような方法で製造した。エミシズマブをコードする遺伝子を組み込んだＣＨＯ細胞をエミシズマブ産生細胞として市販の基礎培地（動物細胞培養用基礎培地）で培養した。培養条件は、一般にＣＨＯ細胞の培養に適した環境で行った。

発現された抗体の精製は、一般的なカラムクロマトグラフィー、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーなどの組み合わせによって行った。

[0048] 〔実施例２〕Q-CDR Clipped Variant及びProtected Disulfide Isoformの分離（カチオン交換高速液体クロマトグラフィー法）

分析検体を移動相A液（組成後記）にて希釈した試料溶液をカチオン交換カラム（ProPac WCX-10, 粒子径10 マイクロメートル、内径4.0 mm, 長さ250 m

m）に注入し、酸性の移動相（9.6 mmol/L Tris、6.0 mmol/Lピペラジン、11.0 mmol/Lイミダゾール緩衝液を含むpH6.0の移動相A液）及びアルカリ性の移動相（9.6 mmol/L Tris, 6.0 mmol/Lピペラジン、11.0 mmol/Lイミダゾール及び150 mmol/L塩化ナトリウムを含むpH9.9の移動相B液）を用いて液体クロマトグラフィーにより分離を行った（カラム温度：30±5℃、測定波長：280 nm、流量：1.0 mL/min）。その結果、エミシズマブに対応するMainピークに比べてQ-CDR Clipped Variantは酸性側、Protected Disulfide Isoformはアルカリ性側の領域で分離されることが確認された（図１Ａ、図２Ａ）。

[0049] 〔実施例３〕Protected Disulfide Isoformの分離（IdeS消化、部分還元、逆相高速液体クロマトグラフィー法）

検体をリン酸緩衝液で希釈し、IdeS protease及びPNGase-Fにより消化した後、変性剤を含まないTris緩衝液中でDTTにより部分還元を行った後、TFA溶液で希釈したサンプルを逆相高速液体クロマトグラフィーに注入し分離を行った。その結果、エミシズマブの主成分は重鎖及び軽鎖間のジスルフィド結合が還元された状態でクロマトグラフ上にて分離されるが、Protected Disulfide Isoformは重鎖間が還元されない状態の特異なピークとして検出されることがわかった（図３ＢおよびＤ）。

[0050] 〔実施例４〕Protected Disulfide Isoformの分離（IdeS消化、変性、逆相高速液体クロマトグラフィー法）

検体を緩衝液で希釈し、IdeS protease及びPNGase-Fにより消化した後、変性緩衝液にてタンパク質の変性を行った。その後、TFA溶液で希釈したサンプルを逆相高速液体クロマトグラフィーに注入し分離を行った。その結果、Protected Disulfide IsoformのF(ab')2部分はエミシズマブの主成分よりも保持時間が長く分離されることが分かった（図４ＣおよびＤ）。

[0051] 〔実施例５〕Protected Disulfide Isoformの分離（IdeS消化、逆相高速液体クロマトグラフィー法）

検体を緩衝液で希釈し、IdeS protease及びPNGase-Fにより消化した後、TFA溶液で希釈したサンプルを逆相高速液体クロマトグラフィーにより分離した

。その結果、Protected Disulfide IsoformのF(ab')2部分はエミシズマブの主成分よりも保持時間が長く分離されることが分かった（図４ＡおよびＢ）。

[0052] 〔実施例６〕Q-CDR Clipped Variant及びProtected Disulfide Isoformの生物活性の評価

Chromogenic assay

リン脂質を反応の場において，FIXaとFX存在下でエミシズマブを反応させることにより生成する活性化血液凝固第X因子（FXa）の生成量を特異的発色基質にて定量測定した。具体的には、サンプルにトリスヒドロキシメチルアミノメタン，塩化ナトリウム，BSAを含む溶液（TBSB）を加えて各種濃度のエミシズマブ希釈液を調製した。希釈液を96穴マイクロプレートの各ウェルにそれぞれ添加し，各ウェルにFIXa，FX,塩化カルシウム、塩化マグネシウム、リン脂質及びTBSBを含む凝固因子溶液を加えて振とう後，30分間放置した。その後，各ウェルにエチレンジアミン四酢酸溶液を加えて振とう、更に各ウェルにChromogenic 基質溶液（N-benzoyl-L-isoleucyl-L-glutamyl-glycyl-L-arginine-p-nitroaniline hydrochloride and its methyl ester）を加えて振とう後，35分間放置した。1～2分間振とうした後，プレートリーダーを用いて各ウェルの405 nm における吸光度(Abs)を測定した。各濃度の試料溶液及び標準溶液より得られた吸光度から，4-パラメーター平行線ロジスティック解析プログラムを使用して回帰曲線から標準溶液に対する試料の比活性を求めた。結果、エミシズマブの標準溶液に対して、Q-CDR Clipped Variantは18±1%、Protected Disulfide Isoformは8±0%の生物活性を示した。

[0053] Clotting assay

本試験では，ヒト第VIII因子欠乏血漿を用いて，内因系凝固活性化機序を反映した系で，フィブリン生成による凝固までの時間を，濁度変化を指標に測定した。具体的には、サンプルにトリスヒドロキシメチルアミノメタン，塩化ナトリウム，BSAを含む溶液を加えて各種濃度のエミシズマブ希釈液を調製した。全自動血液凝固測定装置により第VIII因子欠乏血漿を希釈液に加えイ

ンキュベートし、次にAPTT試薬を添加しインキュベート、最後に塩化カルシウム液を添加し凝固時間を測定した。標準物質に対する試料の比活性の算出は，平行線検定法により行った。結果、エミシズマブの標準溶液に対して、Q-CDR Clipped Variantは18±1%、Protected Disulfide Isoformは16±1%の生物活性を示した。

[0054] 〔実施例７〕培養パラメーターのQ-CDR Clipped Variant比率への影響評価

〔初発培地〕

市販の基礎培地に植物由来の加水分解物・アミノ酸等を添加し、溶解後に濾過滅菌した。

〔流加培地〕

市販の基礎培地にグルコース・アミノ酸等を添加し、溶解後に濾過滅菌した。

〔細胞〕

エミシズマブをコードする遺伝子を組み込んだエミシズマブ産生CHO細胞（DXB-11株）を用いた。

[0055] 〔培養法〕

１Ｌスケールの細胞培養装置に生産培地（標準濃度の-10～10%）を加え、これに上記CHO細胞株を2～6×10^5 cells/mLとなるよう播種し、温度36～38℃、溶存酸素濃度40%、初期pH 7.20で培養を開始した。培養開始後1-3日目より流加培地（標準濃度の-10～10%）を一定流速で添加し、培養開始後3日目よりpHを6.70-7.10にシフトし、13～15日間培養した。

12個の中心点を含む中心複合計画（6因子：生産培地濃度、流加培地濃度、初発生細胞密度、温度、流加開始のタイミング、シフト後pH）に基づきデザインされた実験計画に従い、全56条件にて培養した。全ての条件に対して、培養13日目、14日目、及び15日目の培養液をサンプリングし（計168サンプル）、遠心（3000 rpm、5分間）上清をProtein A精製後にQ-CDR Clipped Variant比率の測定に使用した。

[0056] 〔分析方法〕

生細胞数・生存率測定はトリパンブルー染色法により測定した。Q-CDR Clipped Variantは、陽イオンカラム（ProPac WCX-10）を用いたカチオン交換高速液体クロマトグラフィー法により、ピークとして検出した。

[0057]〔結果〕

結果を図５及び図６に示す。Q-CDR Clipped Variant比率は温度とシフト後pHの影響を受け、試験した範囲（温度36-38℃、シフト後pH 6.70-7.10）では、36℃培養の方がQ-CDR Clipped Variant比率を低減することができ、シフト後pH 7.10で培養した方がQ-CDR Clipped Variant比率を低減することができた。また、温度とシフト後pHには交互作用が見られ、38℃培養条件下でもシフト後pHを6.70と低くすることで、Q-CDR Clipped Variant比率を低減することができた。

培養温度を36-38℃、培養開始後3日目からのpHを6.70-7.10で制御することで、Q-CDR Clipped Variantを4%以下に制御することができた。

[0058]〔実施例８〕陽イオン交換クロマトグラフィーによるQ-CDR Clipped Variantの除去

Q-CDR Clipped Variantとエミシズマブ抗体との静電的性質の違いを利用し、これらを分離する方法を確立した。以下に実施例を示す。

陽イオン交換樹脂としてGE社製Capto SP ImpResまたは相当品をカラムに充てんし，平衡化後，Q-CDR Clipped Variantを含むエミシズマブ抗体溶液を負荷し，いったんどちらも吸着させた。負荷後，塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液で洗浄し，Q-CDR Clipped Variant含む酸性側のバリアントのみを特異的に溶出させ，エミシズマブ抗体と分離、除去した。除去状況を示すため，この洗浄画分と溶出画分，及び分離前の負荷画分をCE-HPLC分析した（図７）。

負荷，洗浄，及び溶出の条件を以下に示した。

負荷：pH 5.0に調整した，エミシズマブ抗体を含むトリス－塩酸緩衝液を，樹脂1 Lあたり33 gエミシズマブ抗体の条件で負荷した。

洗浄：pH 7.2に調整した，25 mmol/Lの塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液を

，室温で3.5 CVカラムに通液した。

溶出：pH 6.5に調整した，100 mmol/Lの塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液を，室温で6.5 CVカラムに通液した。

[0059] 〔実施例９〕Protected Disulfide Isoformの分子構造の分析

エミシズマブおよびProtected Disulfide Isoformのそれぞれについて抗体製剤（抗体濃度7.54 mg/mL、150 mmol/L arginine, 20 mmol/L histidine-aspartic acid, pH6.0）を調製した。SAXS測定には、SAXSess mc2 system (Anton Paar, Graz, Austria)のラインコリメーションされたX線（Cu Kα，λ= 0.1542nm）を用いた。測定温度は25°Cとした。検出には2次元イメージングプレートを用いた。X線照射時間は30分とした。2次元の散乱強度はSAXSQuant software (Anton Paar)を用いて1次元の散乱強度I(q)に変換した。ここで、qは散乱ベクトルであり、q=(4π/λ)sin(θ/2)で定義される。θは散乱角である。散乱曲線は、ビームストッパーを透過したq=0における散乱強度で規格化したのち、ブランク（キャピラリーとBuffer）補正と光学系（デスメア）補正を行った。補正後の散乱曲線に対して、q×Rg<1.3を満たす条件下でGuinier plotを行い、慣性半径Rg (nm)を求めた。ただし、小角側で散乱強度の低下が見られる場合は、粒子間反発の寄与を避けるために、そのようなqの領域を除いてGuinier plotを行った。粒子間相互作用がないと仮定する系（構造因子S(q)=1）では、散乱強度I(q)は二体距離分布関数p(r)のフーリエ変換として与えられる。補正後の散乱曲線に対して間接フーリエ変換法（非特許文献９）を適用し、粒子のp(r)を得た。p(r)のx軸切片から最大長Dmax (nm)を得た。なお、測定はエミシズマブ抗体製剤（Main）とProtected Disulfide Isoform抗体製剤（BiAb3）でそれぞれ3回行った。

その結果、Protected Disulfide IsoformのRgの平均値は4.8nm以下（エミシズマブより0.3nm以上小さい値）、Dmaxの平均値は16.5nm以下（エミシズマブよりも1.4nm以上小さい値）であり、エミシズマブに比べ、Rgの平均値で6%以上小さく、Dmaxの平均値で7.5%以上小さい値を示した。エミシズマブと同じサブクラスのIgG4抗体分子のDmaxは、2つのFabドメインの先端の距離に

相当することが報告されていることから（非特許文献１０）、Protected Disulfide Isoform においては2つのFabドメインの先端の距離が短くなっており、これにより、分子の重心からの広がりを意味するRgも小さい値を示したものと考えられる。以上より、Protected Disulfide Isoform はエミシズマブよりもJ鎖-Q鎖のN末端間の距離が短い分子構造を取ることが確認された（図８）。2種類の抗原間の相互作用を仲介するような二重特異性抗体においては、立体構造上、Fabドメイン間の距離が抗原同士の相互作用に決定的に重要な役割を果たすと想像される。したがって、医薬組成物中の該アイソフォームの割合を制御することは、エミシズマブだけでなく、二重特異性抗体医薬一般において重要である。

[0060] 〔実施例１０〕HDX-MS（Hydrogen. Deuterium eXchange Mass Spectrometry）の分子構造の分析

エミシズマブおよびProtected Disulfide Isoformのそれぞれについて抗体製剤（抗体濃度1 mg/mL、150 mmol/L arginine, 20 mmol/L histidine-aspartic acid, pH6.0）を調製し、HDX-MS装置（Orbitrap Fusion Lumos（Thermo Fisher Scientific), UltiMate30000RSLCnano(Thermo Fisher Scientific) with HDX-PAL（LEAP Technologies））によるHDX-MS測定(重水素交換時間30 s, 60 s, 120 s, 240 s, 480 s, 960 s, 1920 sおよび3840 sの測定)を行った。

その結果、Q鎖におけるEUナンバリング146位から174位（配列番号１０のＮ末端側から152番目から180番目）のアミノ酸残基およびJ鎖におけるEUナンバリング146位から174位（配列番号１１のＮ末端側から148番目から176番目）のアミノ酸残基を含むペプチドにて，HDX-MS測定における重水交換率(D%)の差が顕著であった。この結果から、Protected Disulfide Isoformはエミシズマブと比較して，当該領域の構造が変化していることが確認された（図９）。

産業上の利用可能性

[0061] 本発明の抗体バリアントおよびアイソフォームは、エミシズマブと比べてFVIII様活性が極めて低く、エミシズマブを含み且つそれらの抗体バリアント

およびアイソフォームの含有率が低く抑えられた本発明の医薬組成物は、血友病の治療手段として有用である。また、本発明の抗体バリアントおよびアイソフォームの分析方法は、エミシズマブ製剤の品質評価に有用である他、抗体バリアントおよびアイソフォームの含有率が抑えられたエミシズマブ製剤の開発や、抗体バリアントおよびアイソフォームの生成を抑制する方法の開発においても有用である。

請求の範囲

[請求項1] アミノ酸配列SISPSGQSTYYRREVKG（配列番号2）を含む可変領域を有する抗体のバリアントであって、

（a）前記配列のN末端側から12番目の位置におけるアミノ酸残基R；または

（b）前記配列のN末端側から10～12番目の位置におけるアミノ酸残基YYR

が欠損して当該可変領域が当該欠損部位で切断されている、抗体バリアント。

[請求項2] 前記配列がCDR配列である、請求項１に記載の抗体バリアント。

[請求項3] 前記配列がCDR2配列である、請求項１に記載の抗体バリアント。

[請求項4] 前記配列が重鎖に含まれる配列である、請求項１に記載の抗体バリアント。

[請求項5] 二重特異性（Bi-specific）抗体のバリアントである、請求項１に記載の抗体バリアント

[請求項6] エミシズマブのバリアントである、請求項１に記載の抗体バリアント。

[請求項7] アミノ酸配列SISPSGQSTYYRREVKG（配列番号2）を含む可変領域を有する抗体を含む試料を、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）、電荷に基づく分離、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）、またはそれらの組み合わせによって分離する工程を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の抗体バリアントの検出方法。

[請求項8] 請求項１～６のいずれか一項に記載の抗体バリアントを標準品として使用する、請求項７に記載の検出方法。

[請求項9] 請求項１～６のいずれか一項に記載の抗体バリアントを含む医薬組

成物であって、該医薬組成物中の全抗体分子における該抗体バリアントの割合が５％以下である、医薬組成物。

[請求項10] 抗体がエミシズマブである、請求項９に記載の医薬組成物。

[請求項11] 陽イオン交換クロマトグラフィー（CEX）による精製を含む精製工程により得られる、請求項９記載の医薬組成物。

[請求項12] 抗体産生細胞をpH7.1以上かつ/または培養温度36℃以下で培養する工程を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の抗体バリアントの生成を抑制する方法。

[請求項13] 第一の重鎖および第二の重鎖を含む二重特異性抗体のアイソフォームであって、

（1a）第一の重鎖におけるEUナンバリング144位のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング200位のシステインとの間；および

（1b）第一の重鎖におけるEUナンバリング200位のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング144位のシステインとの間；

においてジスルフィド結合を形成しているか、あるいは

（2a）第一の重鎖におけるEUナンバリング226位のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング229位のシステインとの間；および

（2b）第一の重鎖におけるEUナンバリング229位のシステインと、第二の重鎖におけるEUナンバリング226位のシステインとの間

においてジスルフィド結合を形成している、二重特異性抗体アイソフォーム。

[請求項14] 前記（1a）および（1b）においてジスルフィド結合を形成している、請求項１３に記載の二重特異性抗体アイソフォーム。

[請求項15] 第一の重鎖および第二の重鎖を含む二重特異性抗体のアイソフォームであって、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて分離した場合に前記二重特異性抗体よりもアルカリ性側の領域で溶出されることを特徴とする、二重特異性抗体アイソフォーム。

[請求項16] エミシズマブのアイソフォームである、請求項１３～１５のいずれ

か一項に記載の二重特異性抗体アイソフォーム。

[請求項17] 二重特異性抗体含む試料を、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）、電荷に基づく分離、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）、またはそれらの組み合わせによって分離する工程を含む、請求項１３～１６のいずれか一項に記載の抗体アイソフォームの検出方法。

[請求項18] 請求項１３～１６のいずれか一項に記載の抗体アイソフォームを標準品として使用する、請求項１７に記載の検出方法。

[請求項19] 請求項１３～１６のいずれか一項に記載の二重特異性抗体アイソフォームを含む医薬組成物であって、該医薬組成物中の全抗体分子における該抗体アイソフォームの割合が２％以下である、医薬組成物。

[請求項20] 陽イオン交換クロマトグラフィーによって精製する工程を含む、請求項１３～１６のいずれか一項に記載の二重特異性抗体アイソフォームの含有率を低減する方法。

[請求項21] 抗体の生物活性が著しく低下している、請求項１、１３、または１５に記載の抗体アイソフォーム又はバリアント。