明　細　書

発明の名称 ：

免疫グロブリンに特異的に結合するタンパク質および免疫グロブリン結合性アフィニティーリガンド

技術分野

[0001] 本発明は、抗体に特異的に結合するタンパク質、および、該タンパク質を免疫グロブリン結合性アフィニティーリガンドとするアフィニティー分離マトリックス、および、該マトリックスを用いて抗体を分離精製または吸着除去する方法に関する。

背景技術

[0002] 抗体は、抗原と呼ばれる物質に特異的に結合する機能、および、他の生体分子や細胞と協同して抗原を有する因子を無毒化・除去する機能を有する。抗体という名は、このような抗原に結合するという機能を重視した名前であり、物質としては「免疫グロブリン（Ｉｇ）」と呼ばれる。

[0003] 近年、遺伝子工学、タンパク質工学、および、細胞工学の発展に伴い、抗体医薬と呼ばれる、抗体の有する機能を利用した医薬品の開発が盛んに行われている。抗体医薬は、従来の医薬と比べて、標的分子に対してより特異的に働くために、副作用をより軽減させ、かつ、高い治療効果が得られることが期待されており、実際に様々な病態の改善に寄与している。

[0004] 一方、抗体医薬は、生体に大量に投与されることから、他の組み換えタンパク質医薬品と比べた場合に、その純度が品質に与える影響は大きいと言われている。よって、純度の高い抗体を製造するために、抗体に対して特異的に結合する分子をリガンドとする吸着材料を利用する、アフィニティークロマトグラフィー等の手法が一般的に用いられている。

[0005] 抗体医薬として開発されているのは、基本的にモノクローナル抗体であり、組み換え培養細胞技術等を用いて大量に生産されている。「モノクローナル抗体」とは、単一の抗体産生細胞に由来するクローンから得られた抗体を指

す。現在上市されている抗体医薬のほとんどは、分子構造的には免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）サブクラスである。ＩｇＧ抗体にアフィニティーを有する免疫グロブリン結合性タンパク質として、プロテインＡがよく知られている。プロテインＡは、グラム陽性細菌スタフィロコッカス・アウレウス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）によって生産される細胞壁タンパク質の１種であり、シグナル配列Ｓ、５つの免疫グロブリン結合性ドメイン（Ｅドメイン、Ｄドメイン、Ａドメイン、Ｂドメイン、Ｃドメイン）、および、細胞壁結合ドメインであるＸＭ領域から構成されている（非特許文献１）。抗体医薬製造工程における初期精製工程（キャプチャー工程）には、プロテインＡがリガンドとして水不溶性担体に固定化された、アフィニティークロマトグラフィー用カラム（以下、プロテインＡカラム）が一般的に利用されている（非特許文献１、非特許文献２、非特許文献３）。

[0006] プロテインＡカラムの性能を改良するために、様々な技術開発がなされてきた。リガンドの側面からの技術開発も進んでいる。最初は天然型のプロテインＡがリガンドとして利用されてきたが、タンパク質工学的に改変を加えた組み換えプロテインＡをリガンドとして、カラムの性能を改良する技術も多数見られるようになった。

[0007] 代表的な組み換えプロテインＡとしては、免疫グロブリン結合活性がないＸＭ領域を除去した組み換えプロテインＡが挙げられる（ｒＰｒｏｔｅｉｎ　Ａ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）、ＧＥヘルスケア・ジャパン（株）製）。ＸＭ領域を除去した組み換えプロテインＡをリガンドとしたカラムは、従来品よりもタンパク質の非特異吸着が抑えられるという利点があり、現在、工業的にも広く使用されている。

[0008] その他に、プロテインＡに１個のＣｙｓを変異導入した組み換えプロテインＡ（特許文献１）、または、複数のＬｙｓを変異導入した組み換えプロテインＡ（特許文献２）をリガンドとして利用する発明がある。これらの技術は、水不溶性担体への固定化において効果を示し、抗体のカラムへの結合容量や固定化リガンドのリーク低減で利点を有する。

[0009] 改変を加えた組み換えプロテインＡとして、Ｂドメインに変異を導入した改変ドメイン（Ｚドメインと呼ばれる）をリガンドに利用する技術もよく知られている（非特許文献１、非特許文献４、特許文献３）。Ｚドメインは、Ｂドメインに対して、２９位のＧｌｙをＡｌａに置換する変異を導入した改変ドメインである。なお、Ｚドメインでは、Ｂドメイン１位のＡｌａをＶａｌに置換する変異も同時に導入されているが、これは、遺伝子工学的に複数のドメインを連結したコード遺伝子を作製し易くすることを目的とした変異で、ドメインの機能に対して影響は及ぼさない（例えば、特許文献４には、Ｚドメイン１位のＶａｌをＡｌａに置換した変異体を用いた実施例がある）。

[0010] Ｚドメインは、Ｂドメインよりもアルカリ耐性が高いことが知られており、殺菌・洗浄効果の高いアルカリ溶液を用いた洗浄による、カラムの繰返し使用に利点を有する。Ｚドメインをベースとして、Ａｓｎを他のアミノ酸に置換することによって更なるアルカリ耐性を付与したリガンドが発明され（特許文献５、特許文献６）、工業的使用も開始されている。

[0011] このように、プロテインＡの免疫グロブリン結合性ドメイン（Ｅ、Ｄ、Ａ、Ｂ、および、Ｃドメイン）に対して、２９位のＧｌｙをＡｌａに置換する変異を導入することの有用性は広く認知されている。実際に、１９８７年にこの「Ｇ２９Ａ」の変異が公開されてから、後に開発された改変プロテインＡに関する先行技術においても、この「Ｇ２９Ａ」の変異が導入されている（特許文献２、特許文献４、特許文献６）。

[0012] Ｚドメインのもう１つの特徴としては、免疫グロブリンのＦａｂ領域への結合能が弱くなっていることが挙げられる（非特許文献５）。この特徴によって、結合した抗体を酸で解離する工程において、抗体が解離され易いという利点がある（非特許文献１、特許文献７）。抗体が解離され易いと、より少ない容量の溶出液でより高濃度の抗体含有溶出液を回収可能とすることができる。近年、抗体医薬製造において、１バッチあたりの細胞培養液量が１０，０００リットルを超えるようになり、抗体発現レベルはこの数年で１０ｇ／Ｌまでの向上が実現しつつある（非特許文献６）。下流となる精製工程も

、必然的にその処理スケールの増大への対応が求められており、少ない容量の溶出液でより高濃度の抗体含有溶出液を回収可能とする技術改良への期待は非常に大きい。

[0013] ＺドメインのほかにＣ、改変プロテインＡ・リガンドとして、プロテインＡのＣドメインをベースとした研究が進められている（特許文献４）。これらのリガンドは、野生型Ｃドメインが本来有しているアルカリ耐性の高さを生かすことを特徴としており、Ｂドメインをベースとして作成されたＺドメインに代わる、新しいベース・ドメインとして注目されている。しかし、Ｃドメインに関して検証した結果、Ｃドメインに結合した抗体を酸で解離する工程において、抗体が解離されにくいという欠点があることが判明した。非特許文献２や特許文献４において、Ｃドメインが免疫グロブリンのＦａｂ領域への結合能が強いことが示されており、この特徴が、抗体が酸で解離されにくい原因となっていると推測された。この欠点を改善するために、２９位のＧｌｙをＡｌａに置換する変異を導入したＣドメインを用いて、抗体酸解離特性を検証したところ、野生型のＣドメインに比べれば抗体が解離され易くなる傾向が見られたが、まだ不十分であった。

[0014] このように、現在、プロテインＡの免疫グロブリン結合性ドメインから抗体が解離され易くなる変異というのは、「Ｇ２９Ａ」のみが公知である。先述の通り、「Ｇ２９Ａ」は、抗体が解離され易いという点以外にも利点を有しており、２９位以外への変異による技術改良が期待されている。しかしながら、２９位以外への変異によって、さらに抗体が解離され易くなったという報告はなされていない。

先行技術文献

特許文献

[0015] 特許文献1：米国特許第６３９９７５０号公報

特許文献2：特開２００７－２５２３６８号公報

特許文献3：米国特許第５１４３８４４号公報

特許文献4：特開２００６－３０４６３３号公報

特許文献5：欧州特許第１１２３３８９号公報

特許文献6：国際公開第０３／０８０６５５号公報

特許文献7：米国公開第２００６／０１９４９５０号公報

非特許文献

[0016] 非特許文献1：Ｈｏｂｅｒ　Ｓ．他　著、「Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．Ｂ」２００７年、８４８巻、４０－４７頁

非特許文献2：Ｌｏｗ　Ｄ．他　著、「Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．Ｂ」、２００７年、８４８巻、４８－６３頁

非特許文献3：Ｒｏｑｕｅ　Ａ．Ｃ．Ａ．他　著、「Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．Ａ」、２００７年、１１６０巻、４４－５５頁

非特許文献4：Ｎｉｌｓｓｏｎ　Ｂ．他　著、「Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ」、１９８７年、１巻、１０７－１１３頁

非特許文献5：Ｊａｎｓｓｏｎ　Ｂ．他　著、「ＦＥＭＳ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ」、１９９８年、２０巻、６９－７８頁

非特許文献6：稲川　淳一　他　著、「分離技術」、２００８年、３８巻、２０１－２０７頁

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0017] ２９位以外のアミノ酸への変異導入によって、既存の改変型プロテインＡリガンドよりも優れた抗体酸解離特性を有する新規改変プロテインＡリガンドを創出することが、本発明が解決しようとする課題である。

課題を解決するための手段

[0018] 本発明者らは、２９位以外の位置へのアミノ酸置換変異を有する数多くの組み換えプロテインＡ変異体を分子設計し、タンパク質工学的手法および遺伝子工学的手法を用いて該変異体を形質転換細胞から取得し、該変異体の活性を比較検討することにより、本発明を完成させるに至った。

[0019] すなわち、本発明は、配列番号１～５に記載のプロテインＡのＥ、Ｄ、Ａ、Ｂ及びＣドメインから選ばれる少なくとも１つのドメインに由来するアミノ酸配列において、Ａ、Ｂ、および、Ｃドメインの３１～３７位のアミノ酸残基、Ｅドメインの２９～３５位のアミノ酸残基、又はＤドメインの３４～４０位のアミノ酸残基に、少なくとも１つのアミノ酸置換変異を導入したアミノ酸配列を有するタンパク質であって、変異導入前のタンパク質と比較して、免疫グロブリンのＦａｂ領域に対する親和性が低下していることを特徴とする、免疫グロブリンに親和性を有するタンパク質に関する。

[0020] 変異導入前のドメインに由来するアミノ酸配列が、配列番号１～５に記載のプロテインＡのＥ、Ｄ、Ａ、Ｂ及びＣドメインのアミノ酸配列、又は配列番号６～１０に記載のプロテインＡのＥ、Ｄ、Ａ、Ｂ及びＣドメインに由来するアミノ酸配列であることが好ましい。

[0021] 変異導入前のドメインに由来するアミノ酸配列が、配列番号５に記載のプロテインＡのＣドメインのアミノ酸配列、又は配列番号１０に記載のプロテインＡのＣドメインに由来するアミノ酸配列であることが好ましい。

[0022] 変異導入前のアミノ酸残基において、各ドメインにおけるＣドメインの３３位に対応するアミノ酸残基がＳｅｒ、各ドメインにおけるＣドメインの３５位に対応するアミノ酸残基がＬｙｓ、各ドメインにおけるＣドメインの３６位に対応するアミノ酸残基がＡｓｐ、又は各ドメインにおけるＣドメインの３７位に対応するアミノ酸残基がＡｓｐであることが好ましい。

[0023] 導入するアミノ酸置換変異が、Ｃドメインの３３位に対応するＳｅｒをＧｌｕ、Ｌｅｕ又はＴｈｒに置換する変異、Ｃドメインの３５位に対応するＬｙｓをＡｒｇに置換する変異、Ｃドメインの３６位に対応するＡｓｐをＡｒｇ又はＩｌｅに置換する変異、又はＣドメインの３７位に対応するＡｓｐをＧｌｕに置換する変異であることが好ましい。

[0024] 導入するアミノ酸置換変異が、Ｃドメインの３３位に対応するＳｅｒをＧｌｕに置換する変異であることが好ましい。

[0025] また、本発明は、前記タンパク質を２個以上連結した複数ドメインからなる

タンパク質に関する。

[0026] 連結するタンパク質が、種類の異なるタンパク質であり、連結するタンパク質の数が２～５個であることが好ましい。

[0027] また、本発明は、前記タンパク質をコードするＤＮＡに関する。

[0028] 前記ＤＮＡにおいて、連結されているドメインを構成する塩基配列の配列同一性が９０％以下であることが好ましい。

[0029] また、本発明は、前記ＤＮＡを含むベクターに関する。

[0030] また、本発明は、前記ベクターで宿主を形質転換して得られる形質転換体に関する。

[0031] 前記形質転換体において、宿主がグラム陽性菌であることが好ましい。

[0032] グラム陽性菌がブレビバチルス属細菌であることが好ましく、ブレビバチルス属細菌がブレビバチルス・チョウシネンシスであることがより好ましい。

[0033] また、本発明は、前記形質転換体、または、前記ＤＮＡを用いた無細胞タンパク質合成系を用いる、前記タンパク質の製造方法に関する。

[0034] 前記製造方法において、形質転換体の細胞内及び／又はペリプラズム領域内にタンパク質を蓄積すること、及び／又は、形質転換体の細胞外にタンパク質を分泌することが好ましい。

[0035] また、本発明は、前記タンパク質をアフィニティーリガンドとして、水不溶性基材からなる担体に固定化したことを特徴とする、アフィニティー分離マトリックスに関する。

[0036] 水不溶性基材は合成高分子又は多糖類からなることが好ましく、多糖類はセルロースであることが好ましい。

[0037] 前記アフィニティー分離マトリックスは、免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質に結合することが好ましく、免疫グロブリンＧ、または、免疫グロブリンＧ誘導体に結合することがより好ましい。

[0038] また、本発明は、免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質の分離における、前記アフィニティー分離マトリックスの使用に関する。免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質の分離は、免疫グロブリンのＦａｂ領域のみを

含むタンパク質の分離回収を目的とすることが好ましい。

発明の効果

[0039] 本発明のタンパク質は、優れた抗体酸解離特性を示す。該タンパク質を担体に固定化したアフィニティー分離マトリックスを用いることにより、抗体の分離精製を改善することが可能となる。本発明のタンパク質は、全てのドメインで保存されているアミノ酸部位に変異が導入されるので、本発明のタンパク質およびアフィニティー分離マトリックスは、Ｅ、Ｄ、Ａ、Ｂ、および、Ｃドメインのうちいずれのドメインを使用した場合であっても、共通して上述の効果を有する。

図面の簡単な説明

[0040] [図1]スタフィロコッカス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）のプロテインＡのＥ、Ｄ、Ａ、Ｂ、および、Ｃドメインの配列比較表である。

[図2]本発明の実施例１０および比較例３に係る、Ｂｉａｃｏｒｅ測定における、各種ＧＳＴ融合Ｃドメイン変異体のモノクローナルＩｇＧ－Ｆａｂ（ＶＨ３型）への結合センサーグラムである。

[図3]本発明の実施例１２に係る、アフィニティー分離マトリックス（４）の抗体に対する５％ｄＢＣに関するグラフである。

[図4]本発明の実施例１３および比較例１に係る、アフィニティー分離マトリックス（１）を用いた抗体精製クロマトグラフィーの溶出ピーク・プロファイルを示した図である。

[図5]本発明の実施例１３および比較例２に係る、アフィニティー分離マトリックス（２）を用いた抗体精製クロマトグラフィーの溶出ピーク・プロファイルを示した図である。

[図6]本発明の実施例１３および比較例１に係る、アフィニティー分離マトリックス（３）を用いた抗体精製クロマトグラフィーの溶出ピーク・プロファイルを示した図である。

[図7]本発明の実施例１３に係る、アフィニティー分離マトリックス（４）を用いた抗体精製クロマトグラフィーの溶出ピーク・プロファイルを示した図

である。

発明を実施するための形態

[0041] 本発明のタンパク質は、配列番号１～５に記載のプロテインＡのＥ、Ｄ、Ａ、ＢおよびＣドメインから選ばれる少なくとも１つのドメインに由来するアミノ酸配列において、全てのドメインで保存されている、Ａ、Ｂ、および、ＣドメインのＳ１～Ｓ７位のアミノ酸、ＥドメインのＱ２９～Ｑ３５位のアミノ酸、またはＤドメインのＱ３４～Ｑ４０位のアミノ酸に対して、少なくとも１つのアミノ酸置換変異を導入したアミノ酸配列を有し、かつ、該変異を導入する前のアミノ酸配列を有するタンパク質に比べて、免疫グロブリンのＦａｂ領域に対する親和性が低下しており、免疫グロブリンに親和性を有することを特徴とする。

[0042] プロテインＡは、免疫グロブリン結合性ドメイン、つまり、免疫グロブリン結合性タンパク質が、５個つながった形で構成されるタンパク質である。プロテインＡのＥ、Ｄ、Ａ、Ｂ、および、Ｃドメインは、免疫グロブリンの相補性決定領域（ＣＤＲ）以外の領域に結合することができる免疫グロブリン結合性ドメインであり、いずれのドメインも、免疫グロブリンのＦｃ領域、Ｆａｂ領域、および、Ｆａｂ領域中の特にＦｖ領域の、各々の領域に対して結合する活性を有する。なお、本発明においてプロテインＡの由来は特に限定されないが、スタフィロコッカス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ）に由来するプロテインＡであることが好ましい。

[0043] 「タンパク質」という用語は、ポリペプチド構造を有するあらゆる分子を含むものであって、断片化された、または、ペプチド結合によって連結されたポリペプチド鎖も、「タンパク質」という用語に包含される。また、「ドメイン」とは、タンパク質の高次構造上の単位であり、数十から数百のアミノ酸残基配列から構成され、なんらかの物理化学的または生物化学的な機能を発現するに十分なタンパク質の単位をいう。

[0044] ドメインに由来するアミノ酸配列は、変異を導入する前のアミノ酸配列のことを指し、プロテインＡのＥ、Ｄ、Ａ、Ｂ、および、Ｃドメインのいずれか

の野生型アミノ酸配列のみに限定されるものではなく、アミノ酸の置換、挿入、欠失、および、化学修飾により部分的に改変されたアミノ酸配列であっても、Ｆｃ領域への結合能を有しているタンパク質である限りこれに含まれる。ドメインに由来したアミノ酸配列として、例えば、配列番号１～５に記載のスタフィロコッカスのプロテインＡのＥ、Ｄ、Ａ、Ｂ、および、Ｃドメインを構成するアミノ酸配列が挙げられ、さらに、配列番号６～１０に記載のプロテインＡのＥ、Ｄ、Ａ、Ｂ、および、Ｃドメインを構成するアミノ酸配列が挙げられる。なお、配列番号６～１０に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質は、プロテインＡのＥ、Ｄ、Ａ、Ｂ、および、Ｃドメイン（配列番号１～５）に対して、Ｃドメインの２９位に対応するＧｌｙをＡｌａに置換する変異を導入したアミノ酸配列からなるタンパク質である。また、ＢドメインにＡ１ＶとＧ２９Ａという変異を導入したＺドメインもＦｃ領域への結合能を有しているので、ドメインに由来するアミノ酸配列に該当する。例えば、変異を導入する前のアミノ酸配列は、化学安定性が高いドメイン、または、その変異体であることが好ましい。

[0045] アミノ酸置換変異を導入するタンパク質は、プロテインＡのＥ、Ｄ、Ａ、Ｂ、および、Ｃドメインのいずれかの野生型アミノ酸配列と、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上のアミノ酸の配列同一性を有し、Ｆｃ領域への結合能を有する。

[0046] 全てのドメインで保存されているアミノ酸残基は、Ｅ、Ｄ、Ａ、Ｂ、および、Ｃドメインのアミノ酸配列を比較した時に、同じ位置に存在する同じアミノ酸残基を意味する。図１の配列比較表に示すように、Ａ、Ｂ、および、Ｃドメインの２６～３９位、Ｅドメインの２４～３７位、Ｄドメインの２９～４２位のアミノ酸残基は、全てのドメインにおいて保存されている。全てのドメインで保存されている具体的なアミノ酸残基としては、例えば、Ａ、Ｂ、および、Ｃドメインの３１～３７位のアミノ酸、Ｅドメインの２９～３５位のアミノ酸、またはＤドメインの３４～４０位のアミノ酸が挙げられる。さらに、Ｃドメインの３３位に対応するＳｅｒ、Ｃドメインの３５位に対応

するＬｙｓ、Ｃドメインの３６位に対応するＡｓｐ、およびＣドメインの３７位に対応するＡｓｐであることが好ましい。特に、Ｃドメインの３３位に対応するＳｅｒであることがより好ましいが、これらに限定されるものではない。なお、「対応する」とは、図１に示すようにプロテインＡのＥ、Ｄ、Ａ、Ｂ、および、Ｃドメインをアラインした時に、縦列に同じ位置となることをいう。

[0047] 一般に、アミノ酸配列が高度に保存されている領域はタンパク質の機能に重要な領域であることが多く、そのような領域に変異を導入するとタンパク質の機能が失われることが多い。しかし、前記の領域においてはアミノ酸配列が高度に保存されているにもかかわらず、変異を導入しても、免疫グロブリンのＦｃ領域への結合能に多大な影響を及ぼさずに、免疫グロブリンのＦａｂ領域への結合能のみを大幅に低下させることができる。

[0048] また、変異を導入する前のアミノ酸配列が、化学安定性が高いドメイン、または、その変異体である場合、ドメインを構成するアミノ酸が６０アミノ酸程度と少ないために、新たに変異を導入することで、化学安定性が低下することが多いことは、公知の事実である。例えば、Ｃドメインの３０位に対するＰｈｅをＡｌａに置換した変異体は、アルカリに対する化学安定性が大きく低下する（Ｌｉｎｈｕｌｔ　Ｍ. 他、ＰＲＯＴＥＩＮＳ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，Ｆｕｎｃｔｉｏｎ，ａｎｄ　Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ、２００４年、５５巻、４０７－４１６）。しかし、本発明におけるアミノ酸変異は、本来有する化学安定性を維持したままで、上述の効果を発揮することが可能である。

[0049] アミノ酸置換変異は、元のアミノ酸を削除し、その位置に、種類の異なる別のアミノ酸を追加する変異のことを意味する。追加される別のアミノ酸は特に限定されるものではなく、例えば、天然のタンパク質構成アミノ酸、タンパク質非構成アミノ酸、非天然アミノ酸が挙げられる。この中でも、遺伝子工学的生産の観点から、天然アミノ酸を好適に用いることができる。天然アミノ酸としては、例えば、Ａｌａ、Ｐｈｅ、Ｖａｌ、Ｔｒｐ、Ｌｅｕ、Ｐｒ

ｏ、Ｉｌｅ、Ｍｅｔ、Ｇｌｙ、Ａｓｎ、Ｓｅｒ、Ｇｌｎ、Ｔｈｒ、Ｔｙｒ、Ｃｙｓ、Ｌｙｓ、Ｈｉｓ、Ａｓｐ、ＧｌｕおよびＡｒｇが挙げられ、特にＧｌｕまたはＡｒｇであることが好ましい。アミノ酸置換変異の数は、変異を含むタンパク質の、免疫グロブリンのＦａｂ領域に対する親和性が低下し、免疫グロブリン全体に対する親和性が維持されていれば特に限定されないが、変異導入前のタンパク質の立体構造の維持という観点からは、４個以下であることが好ましく、２個以下であることがより好ましい。

[0050] なお、アミノ酸を置換する変異の表記について、置換位置の番号の前に、野生型、または、非変異型のアミノ酸を付し、置換位置の番号の後に、変異したアミノ酸を付して表記する。例えば、２９位のＧｌｙをＡｌａに置換する変異は、Ｇ２９Ａと記載する。

[0051] アミノ酸置換変異を、上述の全てのドメインで保存されているアミノ酸部位に導入する場合、導入例としては、例えば、Ｃドメインの３３位に対応するＳｅｒをＧｌｕ、Ｌｅｕ又はＴｈｒに置換する変異、Ｃドメインの３５位に対応するＬｙｓをＡｒｇに置換する変異、Ｃドメインの３６位に対応するＡｓｐをＡｒｇ又はＩｌｅに置換する変異、および、Ｃドメインの３７位に対応するＡｓｐをＧｌｕに置換する変異が挙げられる。特に、Ｃドメインの３３位に対応するＳｅｒをＧｌｕに置換する変異であることが好ましいが、これらに限定されるものではない。

[0052] アミノ酸置換変異を導入して得られるタンパク質は、プロテインＡのＥ、Ｄ、Ａ、Ｂ、および、Ｃドメインのいずれかの野生型アミノ酸配列と、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上のアミノ酸の配列同一性を有し、Ｆｃ領域への結合能を有する。

[0053] 本発明のタンパク質は、アミノ酸置換変異が導入された単一のドメインのみからなるタンパク質であってもよいが、前記のタンパク質を２個以上連結して、複数ドメインからなるタンパク質とすることもできる。

[0054] 複数ドメインからなるタンパク質である場合、連結するタンパク質は、同種のドメインに由来するタンパク質（ホモダイマー、ホモトリマー等のホモポ

リマー）であってもよいし、種類の異なるドメインに由来するタンパク質（ヘテロダイマー、ヘテロトリマー等のヘテロポリマー）であってもよい。連結するタンパク質の数は、２個以上であることが好ましく、２～１０個であることがより好ましく、２～５個であることがさらに好ましい。

[0055] 複数ドメインからなるタンパク質において、単量体タンパク質同士、単ドメイン同士の連結のされ方としては、リンカーとなるアミノ酸残基を介さずに連結する方法、または、１または複数のアミノ酸残基で連結する方法が挙げられるが、これらに限定されるものではない。連結するアミノ酸残基数に特に制限は無い。連結様式および連結数は、単量体タンパク質の３次元立体構造を不安定化しないものであれば、特に限定されない。

[0056] また、前記タンパク質、または前記複数ドメインからなるタンパク質を１つの構成成分として、機能の異なる他のタンパク質と融合されている融合タンパク質も、本発明のタンパク質に含まれる。融合タンパク質の例としては、アルブミンやＧＳＴ（グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ）、ＭＢＰ（マルトース結合タンパク質）が融合したタンパク質を例として挙げることができるが、これに限定されるものではない。ＧＳＴ、ＭＢＰとの融合タンパク質として発現することにより、タンパク質の精製を容易にすることができる。また、ＤＮＡアプタマーなどの核酸、抗生物質などの薬物、ＰＥＧ（ポリエチレングリコール）などの高分子が融合されている場合も、本発明と同じ効果を奏するものであれば、本発明のタンパク質に含まれる。

[0057] 本発明は、上述のタンパク質をコードするＤＮＡにも関する。ＤＮＡは、それを構成する塩基配列を翻訳したアミノ酸配列が、本発明のタンパク質を構成するものであればよい。そのような塩基配列は、通常用いられる公知の方法、例えば、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション（以下、ＰＣＲと略す）法を利用して取得できる。また、公知の化学合成法で合成することも可能であり、さらに、ＤＮＡライブラリーから得ることもできる。当該塩基配列は、コドンが縮重コドンで置換されていても良く、翻訳されたときに同一のアミノ酸をコードしている限り、本来の塩基配列と同一である必要性は無い

。

[0058] 本発明のＤＮＡは、野生型または変異型のプロテインＡのドメインをコードする従来公知のＤＮＡに対して、部位特異的に変異を導入することにより得られる。部位特異的な変異の導入は、以下のように、組み換えＤＮＡ技術、ＰＣＲ法等を用いて行うことができる。

[0059] 組み換えＤＮＡ技術による変異の導入は、例えば、本発明のタンパク質をコードする遺伝子中において、変異導入を希望する目的の部位の両側に適当な制限酵素認識配列が存在する場合に、それら制限酵素認識配列部分を前記制限酵素で切断し、変異導入を希望する部位を含む領域を除去した後、化学合成等によって目的の部位のみに変異導入したＤＮＡ断片を挿入するカセット変異法によって行うことができる。

[0060] また、ＰＣＲによる部位特異的変異の導入は、例えば、タンパク質をコードする二本鎖プラスミドを鋳型として、＋および－鎖に相補的な変異を含む２種の合成オリゴプライマーを用いてＰＣＲを行うダブルプライマー法により、行うことができる。

[0061] また、複数ドメインからなるタンパク質をコードするＤＮＡは、本発明の単量体タンパク質（１つのドメイン）をコードするＤＮＡを、意図する数だけ直列に連結することにより作製することができる。例えば、複数ドメインからなるタンパク質をコードするＤＮＡの連結方法は、ＤＮＡ配列に適当な制限酵素部位を導入し、制限酵素で断片化した２本鎖ＤＮＡをＤＮＡリガーゼで連結することができる。制限酵素部位は１種類でもよいが、複数の異なる種類の制限酵素部位を導入することもできる。或いは、複数ドメインからなるタンパク質をコードするＤＮＡは、プロテインＡをコードするＤＮＡ（例えば、国際公開第０６／００４０６７号公報）に上記の変異導入法を適用することで作製することも可能である。ここで、複数ドメインからなるタンパク質をコードするＤＮＡにおいて、各々の単量体タンパク質をコードする塩基配列が同一の場合には宿主にて相同組み換えを誘発する可能性があるので、連結されている単量体タンパク質をコードするＤＮＡの塩基配列間の配列

同一性が９０％以下、より好ましくは８５％以下であることが好ましい。

[0062] 本発明のベクターは、前述したタンパク質または複数ドメインからなるタンパク質をコードする塩基配列、およびその塩基配列に作動可能に連結された宿主で機能しうるプロモーターを含む。通常は、前述したタンパク質をコードするＤＮＡを、ベクターに連結もしくは挿入することにより得ることができる。

[0063] 遺伝子を挿入するためのベクターは、宿主中で自律複製可能なものであれば特に限定されず、プラスミドＤＮＡやファージＤＮＡをベクターとして用いることができる。遺伝子を挿入するためのベクターは、例えば、大腸菌を宿主として用いる場合には、ｐＱＥ系ベクター（キアゲン社製）、ｐＥＴ系ベクター（メルク社製）、および、ｐＧＥＸ系ベクター（ＧＥヘルスケア・ジャパン（株）製）のベクターなどが挙げられる。ブレビバチルス属細菌を宿主として用いる場合には、例えば、枯草菌ベクターとして公知であるｐＵＢ１１０、または、ｐＨＹ５００（特開平２－３１６８２号公報）、ｐＮＹ７００（特開平４－２７８０９１号公報）、ｐＮＵ２１１Ｒ２Ｌ５（特開平７－１７０９８４号公報）、ｐＨＴ２１０（特開平６－１３３７８２号公報）、または、大腸菌とブレビバチルス属細菌とのシャトルベクターであるｐＮＣＭＯ２（特開２００２－２３８５６９号公報）などを使用することができる。

[0064] ベクターで宿主を形質転換することにより、形質転換体を得ることができる。宿主としては、特に限定されるものではないが、安価に大量生産する上では、大腸菌、枯草菌、ブレビバチルス属、スタフィロコッカス属、ストレプトコッカス属、ストレプトマイセス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）、コリネバクテリウム属（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）等のバクテリア（真正細菌）を好適に使用しうる。より好ましくは、枯草菌、ブレビバチルス属、スタフィロコッカス属、ストレプトコッカス属、ストレプトマイセス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）、コリネバクテリウム属（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）等のグラム陽性菌がよい。さらに好ましくは、プロテインＡ

の大量生産への適応例（国際公開第０６／００４０６７号公報）が公知である、ブレビバチルス属細菌がよい。

[0065] ブレビバチルス属細菌としては、特に限定されないが、例えば、Ｂｒｅｖｉｂａｃｉｌｌｕｓ ａｇｒｉ、Ｂ．ｂｏｒｓｔｅｌｅｎｓｉｓ、Ｂ．ｂｒｅｖｉｓ、Ｂ．ｃｅｎｔｒｏｓｐｏｒｕｓ、Ｂ．ｃｈｏｓｈｉｎｅｎｓｉｓ、Ｂ．ｆｏｒｍｏｓｕｓ、Ｂ．ｉｎｖｏｃａｔｕｓ、Ｂ．ｌａｔｅｒｏｓｐｏｒｕｓ、Ｂ．ｌｉｍｎｏｐｈｉｌｕｓ、Ｂ．ｐａｒａｂｒｅｖｉｓ、Ｂ．ｒｅｕｓｚｅｒｉ、Ｂ．ｔｈｅｒｍｏｒｕｂｅｒが挙げられる。好ましくは、ブレビバチルス・ブレビス４７株（ＪＣＭ６２８５）、ブレビバチルス・ブレビス４７Ｋ株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－２３０８）、ブレビバチルス・ブレビス４７－５Ｑ株（ＪＣＭ８９７０）、ブレビバチルス・チョウシネンシスＨＰＤ３１株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－１０８７）およびブレビバチルス・チョウシネンシスＨＰＤ３１－ＯＫ株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－４５７３）が挙げられる。生産量の向上などの目的に応じて、上記ブレビバチルス属細菌のプロテアーゼ欠損株、高発現株、または、芽胞形成能欠失株のような変異株（または、誘導株）を使用しても良い。具体的に挙げれば、ブレビバチルス・チョウシネンシスＨＰＤ３１由来のプロテアーゼ変異株であるブレビバチルス・チョウシネンシスＨＰＤ３１－ＯＫ（特開平６－２９６４８５号公報）や、芽胞形成能を有しないブレビバチルス・チョウシネンシスＨＰＤ３１－ＳＰ３（国際公開第０５／０４５００５号公報）が使用できる。

[0066] 宿主細胞へのベクターの導入方法としては、例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、アグロバクテリウム感染法、パーティクルガン法、または、ポリエチレングリコール法などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、得られた遺伝子の機能を宿主で発現する方法としては、本発明で得られた遺伝子をゲノム（染色体）に組み込む方法なども挙げられる。

[0067] 上記の形質転換体、またはＤＮＡを用いた無細胞タンパク質合成系により、タンパク質を製造することができる。

[0068] 形質転換体を用いてタンパク質を製造する場合、形質転換細胞を培地で培養し、培養菌体中（菌体ペリプラズム領域中も含む）、または、培養液中（菌体外）に本発明のタンパク質を生成蓄積させることにより製造することができ、該培養物から所望のタンパク質を採取することができる。

[0069] 形質転換細胞を用いてタンパク質を製造する場合には、形質転換体の細胞内および／またはペリプラズム領域内にタンパク質を蓄積することも可能である。この場合、細胞内に蓄積すると、発現タンパク質の酸化を防ぐことができ、培地成分との副反応もない点で有利であり、ペリプラズム領域内に蓄積すると、細胞内プロテアーゼによる分解を抑えることができる点で有利である。一方、タンパク質を製造する場合に、形質転換体の細胞外にタンパク質を分泌することも可能である。この場合、菌体破砕や抽出の工程が不要となるため、製造コストが抑えられる点で有利である。

[0070] 本発明の形質転換細胞を培地で培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。得られた形質転換体の培養に用いる培地は、該タンパク質を高効率、高収量で生産できるものであれば特に制限は無い。具体的には、グルコース、蔗糖、グリセロール、ポリペプトン、肉エキス、酵母エキス、カザミノ酸などの炭素源や窒素源を使用することが出来る。その他、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マグネシウム塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩等の無機塩類が必要に応じて添加される。栄養要求性の宿主細胞を用いる場合は、生育に要求される栄養物質を添加すればよい。また、必要であればペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、ネオマイシンなどの抗生物質が添加されても良い。

[0071] さらに、菌体内外に存在する宿主由来のプロテアーゼによる当該目的タンパク質の分解、低分子化を抑えるために、公知の各種プロテアーゼ阻害剤、すなわち、Ｐｈｅｎｙｌｍｅｔｈａｎｅ ｓｕｌｆｏｎｙｌ ｆｌｕｏｒｉｄｅ（ＰＭＳＦ）、Ｂｅｎｚａｍｉｄｉｎｅ、４－（２－ａｍｉｎｏｅｔｈｙｌ）－ｂｅｎｚｅｎｅｓｕｌｆｏｎｙｌ ｆｌｕｏｒｉｄｅ（ＡＥＢＳＦ）、Ａｎｔｉｐａｉｎ、Ｃｈｙｍｏｓｔａｔｉｎ、Ｌｅｕｐｅｐｔｉｎ、Ｐｅ

ｐｓｔａｔｉｎ Ａ、Ｐｈｏｓｐｈｏｒａｍｉｄｏｎ、Ａｐｒｏｔｉｎｉｎ、Ｅｔｈｙｌｅｎｅｄｉａｍｉｎｅ ｔｅｔｒａ ａｃｅｔｉｃ ａｃｉｄ（ＥＤＴＡ）、および／または、その他市販されているプロテアーゼ阻害剤を適当な濃度で添加しても良い。

[0072] さらに、本発明のタンパク質を正しくフォールディングさせるために、例えば、ＧｒｏＥＬ／ＥＳ、Ｈｓｐ７０／ＤｎａＫ、Ｈｓｐ９０、Ｈｓｐ１０４／ＣｌｐＢなどの分子シャペロンを利用しても良い。この場合、例えば、共発現、または、融合タンパク質化などの手法で、本発明のタンパク質と共存させることができる。なお、本発明のタンパク質の正しいフォールディングを目的とする場合には、正しいフォールディングを助長する添加剤を培地中に加える、および、低温にて培養するなどの手法もあるが、これらに限定されるものではない。

[0073] 大腸菌を宿主として得られた形質転換細胞を培養する培地としては、ＬＢ培地（トリプトン　１％、酵母エキス　０．５％、ＮａＣｌ　１％）、または、２ｘＹＴ培地（トリプトン　１．６％、酵母エキス　１．０％、ＮａＣｌ　０．５％）等が挙げられる。

[0074] ブレビバチルス属細菌を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、ＴＭ培地（ペプトン　１％、肉エキス　０．５％、酵母エキス　０．２％、グルコース　１％、ｐＨ７．０）、または、２ＳＬ培地（ペプトン　４％、酵母エキス　０．５％　、グルコース　２％、ｐＨ７．２）等が挙げられる。

[0075] また、培養温度は、１５～４２℃、好ましくは２０～３７℃で、通気攪拌条件で好気的に数時間～数日培養することにより本発明のタンパク質を、培養細胞内（ペリプラズム領域内を含む）、または、培養溶液（細胞外）に蓄積させて回収する。場合によっては、通気を遮断し嫌気的に培養してもよい。

[0076] 組み換えタンパク質が分泌生産される場合には、培養終了後に、遠心分離、ろ過などの一般的な分離方法で、培養細胞と分泌生産されたタンパク質を含む上清を分離することにより生産された組み換えタンパク質を回収すること

ができる。

[0077] また、培養細胞内（ペリプラズム領域内を含む）に蓄積される場合にも、例えば、培養液から遠心分離、ろ過などの方法により菌体を採取し、次いで、この菌体を超音波破砕法、フレンチプレス法などにより破砕し、および／または、界面活性剤等を添加して可溶化することにより、細胞内に蓄積生産されたタンパク質を回収することができる。

[0078] 本発明のタンパク質を無細胞タンパク質合成系により製造する場合、無細胞タンパク質合成系としては、特に限定されず、例えば、原核細胞由来、植物細胞由来、高等動物細胞由来の合成系などを使用することができる。

[0079] 本発明のタンパク質の精製はアフィニティークロマトグラフィー、陽イオンまたは陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等を単独でまたは適宜組み合わせることによって行うことができる。

[0080] 得られた精製物質が目的のタンパク質であることの確認は、通常の方法、例えばＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動、Ｎ末端アミノ酸配列分析、ウエスタンブロッティング等により行うことができる。

[0081] 上記の方法により生産したタンパク質を、水不溶性の基材からなる担体にアフィニティーリガンドとして固定化して、アフィニティー分離マトリックスを製造することができる。ここで、「アフィニティーリガンド」とは、抗原と抗体の結合に代表される、特異的な分子間の親和力に基づいて、ある分子の集合から目的の分子を選択的に捕集（結合）する物質（官能基）を指す用語であり、本発明においては、免疫グロブリンに対して特異的に結合するタンパク質を指す。本明細書においては、単に「リガンド」と表記した場合も、「アフィニティーリガンド」と同意である。

[0082] 本発明に用いる水不溶性の基材からなる担体としては、ガラスビーズ、シリカゲルなどの無機担体、架橋ポリビニルアルコール、架橋ポリアクリレート、架橋ポリアクリルアミド、架橋ポリスチレンなどの合成高分子や、結晶性セルロース、架橋セルロース、架橋アガロース、架橋デキストランなどの多糖類からなる有機担体、さらにはこれらの組み合わせによって得られる有機

ー有機、有機ー無機などの複合担体などが挙げられる。

市販品としては、多孔質セルロースゲルであるＧＣＬ２０００、アリルデキストランとメチレンビスアクリルアミドを共有結合で架橋したＳｅｐｈａｃｒｙｌ　Ｓ－１０００、メタクリレート系の担体であるＴｏｙｏｐｅａｒｌ、アガロース系の架橋担体であるＳｅｐｈａｒｏｓｅ　ＣＬ４Ｂ、および、セルロース系の架橋担体であるＣｅｌｌｕｆｉｎｅなどを例示することができる。ただし、本発明における水不溶性担体は、例示したこれらの担体のみに限定されるものではない。

[0083] また、本発明に用いる水不溶性担体は、本アフィニティー分離マトリックスの使用目的および方法からみて、表面積が大きいことが望ましく、適当な大きさの細孔を多数有する多孔質であることが好ましい。担体の形態としては、ビーズ状、モノリス状、繊維状、膜状（中空糸を含む）などいずれも可能であり、任意の形態を選ぶことができる。

[0084] リガンドの固定化方法については、例えば、リガンドに存在するアミノ基、カルボキシル基、または、チオール基を利用した、従来のカップリング法で担体に結合して良い。カップリング法としては、担体を臭化シアン、エピクロロヒドリン、ジグリシジルエーテル、トシルクロライド、トレシルクロライド、ヒドラジン、および、過ヨウ素酸ナトリウムなどと反応させて担体を活性化し（あるいは担体表面に反応性官能基を導入し）、リガンドとして固定化する化合物とカップリング反応を行い固定化する方法、また、担体とリガンドとして固定化する化合物が存在する系にカルボジイミドのような縮合試薬、または、グルタルアルデヒドのように分子中に複数の官能基を持つ試薬を加えて縮合、架橋することによる固定化方法が挙げられる。

[0085] また、リガンドと担体の間に複数の原子からなるスペーサー分子を導入しても良いし、担体にリガンドを直接固定化しても良い。したがって、固定化のために、本発明のタンパク質に対して、化学修飾しても良いし、固定化に有用なアミノ酸残基を加えても良い。固定化に有用なアミノ酸としては、側鎖に固定化の化学反応に有用な官能基を有しているアミノ酸が挙げられ、例え

ば、側鎖にアミノ基を含むＬｙｓや、側鎖にチオール基を含むＣｙｓが挙げられる。本発明の本質は、本発明においてタンパク質に付与した効果が、該タンパク質をリガンドとして固定化したマトリックスにおいても同様に付与されることにあり、固定化のためにいかように修飾・改変しても、本発明の範囲に含まれる。

[0086] アフィニティー分離マトリックスは、本発明のタンパク質を固定化して得られるので、本発明のタンパク質自体の活性に基づき、免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質に結合することができる。よって、本発明のタンパク質およびアフィニティー分離マトリックスを利用して、免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質をアフィニティーカラム・クロマトグラフィ精製法により分離精製することが可能となる。「免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質」とは、プロテインＡが結合するＦｃ領域側の部位を含むタンパク質のことである。ただし、プロテインＡが結合できれば、Ｆｃ領域を完全に含むタンパク質である必要はない。

[0087] 免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質としては、免疫グロブリンＧ、または、免疫グロブリンＧ誘導体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質の具体例として、ＶＨ３サブファミリーに属するＩｇＧが挙げられ、特に、ＶＨ３サブファミリーに属するヒトＩｇＧ（モノクローナル抗体）が挙げられる。本発明のタンパク質およびアフィニティー分離マトリックスは、ＶＨ３サブファミリーに属するＩｇＧのＦａｂ領域に対する親和性が、変異を導入する前のタンパク質に比べて低下していることが好ましく、同時に、サブタイプが１、２、および、４であるＩｇＧのＦｃ領域に親和性を有することが好ましい。ヒトのＶＨ生殖細胞遺伝子のほぼ半分がＶＨ３サブファミリーに属し、実際にＶＨ３サブファミリーに属するＩｇＧ抗体からなる医薬が市販中・開発中である。さらに、抗体精製においてアフィニティー分離マトリックスに使用されるリガンドにＶＨ３サブファミリーに属する免疫グロブリンのＦａｂ領域への結合能が残っていることが、抗体の酸解離特性に悪影響を与えることは、す

でに文献等によって公知の情報と言える（Ｇｈｏｓｅ　Ｓ．他、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、２００５年、９２巻、６号）。したがって、本発明のタンパク質およびアフィニティー分離マトリックスは、ＶＨ３サブファミリーに属するヒトＩｇＧのＦａｂ領域への結合能が低減していることが好ましい。

[0088] 前記「免疫グロブリンＧ誘導体」とは、例えば、ヒト免疫グロブリンＧの一部のドメインを他生物種の免疫グロブリンＧのドメインに置き換えて融合させたキメラ型免疫グロブリンＧや、ヒト免疫グロブリンＧのＣＤＲ（Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ　Ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｇ　Ｒｅｇｉｏｎｓ）部分を他生物種抗体のＣＤＲ部分に置き換えて融合させたヒト型化免疫グロブリンＧ、Ｆｃ領域の糖鎖に分子改変を加えた免疫グロブリンＧ、ヒト免疫グロブリンＧのＦｖ領域とＦｃ領域とを融合させた人工免疫グロブリンＧなどの、プロテインＡが結合し得る改変型人工タンパク質を総称する名称である。

[0089] また、結合する領域をＦａｂ領域（特にＦｖ領域）、および、Ｆｃ領域、というように広く定義したが、抗体の立体構造はすでに既知であるので、本発明のタンパク質およびアフィニティー分離マトリックスが結合する対象となるタンパク質は、タンパク質工学的にプロテインＡが結合する領域の立体構造を保持した上で、Ｆａｂ領域やＦｃ領域にさらなる改変（断片化など）が施されたものであってもよい。

[0090] 本発明のアフィニティー分離マトリックスを充填したアフィニティーカラムを使用して免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質を精製する方法は、すでに市販品として存在するプロテインＡカラムを用いたアフィニティーカラム・クロマトグラフィ精製法に準じる（非特許文献３）。すなわち、免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質を含有する緩衝液を中性となるように調整した後、該溶液を本発明のアフィニティー分離マトリックスを充填したアフィニティーカラムに通過させ、免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質を吸着させる。次いで、アフィニティーカラムに純粋な緩衝液を適量通過させ、カラム内部を洗浄する。この時点では所望の免疫グロブリンのＦ

ｃ領域を含むタンパク質はカラム内の本発明のアフィニティー分離マトリックスに吸着されている。次いで、適切なｐＨに調整した酸性緩衝液（該マトリックスからの解離を促進する物質を含む場合もある）をカラムに通液し、所望の免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質を溶出することにより、高純度な精製が達成される。

[0091] 本発明のアフィニティー分離マトリックスは、リガンド化合物や担体の基材が完全に機能を損なわない程度の、適当な強酸性、または、強アルカリ性の純粋な緩衝液（適当な変性剤、または、有機溶剤を含む溶液の場合もある）を通過させて洗浄することにより、再利用が可能である。

[0092] 本発明のタンパク質およびそれを使用したアフィニティー分離マトリックスは、免疫グロブリンに対する親和性を有し、免疫グロブリンのＦａｂ領域に対する親和性は低下するという効果を奏する。一般的には、プロテインＡの各々のドメインは、Ｆａｂ（Ｆｖ）領域よりもＦｃ領域に対してより強く結合する（非特許文献３）。したがって、プロテインＡ、および、各々のドメインの「免疫グロブリンに対する親和性」は、本質的にはＦｃ領域に対する親和性を指す表現であり、Ｆａｂ領域に対する結合力のみが変化しても、免疫グロブリンに対する親和性の強さは大きく変化しない。本発明のタンパク質は、プロテインＡの免疫グロブリン結合ドメインが有する、Ｆａｂ領域への２次的な親和性が低下しており、免疫グロブリンとの相互作用における２次的な結合の影響を排除できるという効果を奏する。一方で、Ｆｃ領域への親和性は維持されているので、免疫グロブリン全体に対する親和性は維持されている。本発明のタンパク質が有する免疫グロブリンに対する親和性は、ヒト免疫グロブリンＧ製剤に対する親和性を後述のＢｉａｃｏｒｅシステムにより測定した時に、親和定数（ＫＡ）が10^6（M^{-1}）以上であることが好ましく、10^7（M^{-1}）以上であることがより好ましい。

[0093] 本発明のタンパク質およびアフィニティー分離マトリックスの、免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質に対する親和性は、例えば、表面プラズモン共鳴原理を用いたＢｉａｃｏｒｅシステム（ＧＥヘルスケア・ジャパン（

株）製）などのバイオセンサーによって試験することができるが、これに限定されるものではない。

[0094] 測定条件としては、プロテインＡが免疫グロブリンのＦｃ領域に結合した時の結合シグナルが検出できる条件であれば良く、温度２０～４０℃（一定温度）にて、ｐＨ６～８の中性条件にて測定することで簡単に評価することができる。

[0095] 結合相手の免疫グロブリン分子は、Ｆａｂ領域への結合が検出できれば特に限定はされないが、Ｆｃ領域を含む免疫グロブリン分子を用いるとＦｃ領域への結合も検出されるので、Ｆｃ領域を除くようにＦａｂ領域を断片化した免疫グロブリン分子（Ｆａｂフラグメント、Ｆｖフラグメント）を用いることが好ましい。さらには、Ｆａｂ領域へのプロテインＡの結合がすでに確認されている、ＶＨ３サブファミリーに属する免疫グロブリンのＦａｂフラグメントがより好ましい。

[0096] 親和性の違いは、同じ測定条件にて、同じ免疫グロブリン分子に対する結合反応曲線を得て、解析した時に得られる結合パラメータにて、変異を導入する前のタンパク質と変異を導入した後のタンパク質とを比較することで当業者が容易に検証することができる。ここで、親和性の違いを比較する両者の配列は、変異部位以外の配列は同一である必要があり、例えば、変異Ｄ３６Ｒの効果を評価する場合に、変異を導入する前のタンパク質のアミノ酸配列がＢドメインで、変異を導入した後のタンパク質のアミノ酸配列がＣドメインに変異Ｄ３６Ｒを導入した配列であれば、その比較は不適切である。

[0097] 結合パラメータとしては、例えば、親和定数（ＫＡ）や解離定数（ＫＤ）を用いることができる（永田他　著、「生体物質相互作用のリアルタイム解析実験法」、シュプリンガー・フェアラーク東京、１９９８年、４１頁）。本発明の各ドメインの変異体とＦａｂの親和定数は、Ｂｉａｃｏｒｅシステムを利用して、センサーチップにＶＨ３サブファミリーに属する免疫グロブリンのＦａｂフラグメントを固定化して、温度２５℃、ｐＨ７．４の条件下にて、各ドメイン変異体を流路添加する実験系で求めることができる。本発明

に係る変異を導入した配列を有するタンパク質について、該タンパク質の親和定数（ＫＡ）が、該変異を導入する前の配列を有するタンパク質に比べて、１／２以下に低下したタンパク質を好適に用いることができ、より好ましくは１／５以下、さらにより好ましくは１／１０以下に低下したタンパク質を好適に用いることができる。なお、文献によっては親和定数は結合定数と表記されることもあるが、基本的に両者の定義は同じである。

[0098] ２９位のＧｌｙをＡｌａに置換したＣドメイン変異体のＦａｂに対するＫＡが、通常１×１０^{4}～１×１０^{5}（Ｍ$^{-1}$）であるところ、２９位のＧｌｙをＡｌａに置換した変異、および、本発明に係る変異を導入したＣドメイン変異体について、ＫＡが１×１０^{4}（Ｍ$^{-1}$）未満に低下した該変異体を本発明に好適に用いることができ、ＫＡが０．５×１０^{4}（Ｍ$^{-1}$）以下の該変異体をより好適に用いることができる。なお、上記のＫＡの測定においては、免疫グロブリンＧをパパインによってＦａｂフラグメントとＦｃフラグメントに断片化して得たＦａｂ、または、遺伝子工学的な手法によって得られた、免疫グロブリンＧのＦａｂ領域のみを発現する生産系を用いて調製したＦａｂを使用することができる。

[0099] 本発明のアフィニティー分離マトリックスは、免疫グロブリンのＦａｂ領域への結合能が低下しているという性質を有するため、抗体を酸性溶液で溶出する工程において、抗体を解離する特性に優れる。具体的には、より中性側の酸性溶出条件による溶出を可能とすることで、酸性条件下での抗体へのダメージを抑制する効果が得られる。より中性側の酸性溶出条件とは、具体的には、通常の酸性溶出条件であるｐＨ２．０～３．５程度に対し、ｐＨ３．０～５．０程度のより中性側の酸性溶出条件のことであり、この条件下で溶出すると、抗体へのダメージが小さい（Ｇｈｏｓｅ　Ｓ．他、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、２００５年、９２巻、６号）。優れた抗体酸解離特性とは、より中性側の酸性溶出条件で解離される、抗体を酸性条件下で溶出させたときの溶出ピーク・プロファイルがよりシャープである、といった特性を指す。クロマトグラフィーの溶出ピ

一ク・プロファイルがよりシャープになることで、より少ない容量の溶出液でより高濃度の抗体含有溶出液を回収可能とすることができる。

また、本発明のアフィニティー分離マトリックスを用いることにより、Ｆｃ領域を含む分子とＦａｂ領域のみを含む分子からなる混合物から、Ｆａｂ領域を素通り画分として容易に分離回収することが可能となる。

実施例

[0100] 以下に実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0101] 実施例で取得した各種タンパク質について、「ドメインを示すアルファベットー導入した変異（野生型ではｗｉｌｄ）」の形で表記する。例えば、プロテインＡの野生型Ｃドメインは「Ｃ－ｗｉｌｄ」、変異Ｇ２９Ａを導入したＣドメイン変異体は「Ｃ－Ｇ２９Ａ」という形で表記する。２種類の変異を同時に導入した変異体の表記については、スラッシュを用いて併記する。例えば、変異Ｇ２９Ａ、および、変異Ｓ３３Ｅを導入したＣドメイン変異体については、「Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ」という形で表記する。また、単ドメインを複数連結したタンパク質については、ピリオドをつけて、連結した数に「ｄ」をつけて併記する。例えば、変異Ｇ２９Ａ、および、変異Ｓ３３Ｅを導入したＣドメイン変異体を５連結したタンパク質は、「Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄ」と表記する。

[0102] ［実施例１］Ｃ－Ｇ２９Ａ．５ｄをコードするＤＮＡの調製

Ｃ－Ｇ２９Ｖを５連結したタンパク質のアミノ酸配列（Ｃ－Ｇ２９Ｖ．５ｄ、配列番号１１）から逆翻訳を行い、該タンパク質をコードする塩基配列を設計した。該タンパク質のコドン使用頻度が、ブレビバチルス・チョウシネンシスＨＰＤ３１株で大量に発現している細胞表層タンパク質であるＨＷＰ（Ｅｂｉｓｕ　Ｓ．著、「Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．」、１９９０年、１７２号、１３１２－１３２０頁）のコドン使用頻度に近くなるように、かつ、５個の各ドメイン間での塩基配列の配列同一性が低くなるように考慮して、コドンを分配した。また、５連結ドメインをコードする配列の５’側にＰｓ

ｔＩ、および、３’側にＸｂａＩの制限酵素認識部位を作製した。ＤＮＡ断片の作製はタカラバイオ社に依頼した。作製したＤＮＡ断片の配列を配列番号１２に記した。

[0103] 作製したＣ－Ｇ２９Ｖ．５ｄをコードするＤＮＡ断片をＰｓｔＩおよびＸｂａＩ（ともにタカラバイオ社製）で消化し、アガロースゲル電気泳動で分画、精製した。一方、ブレビバチルス属細菌用のプラスミドベクターであるｐＮＫ３２６２を、ＰｓｔＩおよびＸｂａＩにより消化後、精製回収し、さらに、アルカリフォスファターゼ（タカラバイオ社製）処理により脱リン酸化処理を行った。両者を混合後、Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｈｉｇｈ（東洋紡績社製）を用いて連結して、Ｃ－Ｇ２９Ｖ．５ｄ発現プラスミドベクターｐＮＫ３２６２－Ｃ－Ｇ２９Ｖ．５ｄを構築した。前記操作により得られたプラスミドベクターを用いて、ブレビバチルス・チョウシネンシスＦＹ－１株の形質転換を行った。形質転換は、公知の方法による電気導入法にて実施した（「Ｂｉｏｓｃｉ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．」、１９９７年、６１号、２０２－２０３頁）。なお、ブレビバチルス・チョウシネンシスＦＹ－１株は、ブレビバチルス・チョウシネンシスＨＰＤ３１－ＯＫ株（特開平６－２９６４８５号公報）に変異処理をして得られたＰｈｅ・Ｔｙｒ要求性株である。

[0104] 作製したプラスミドｐＮＫ３２６２－Ｃ－Ｇ２９Ｖ．５ｄから、Ｃ－Ｇ２９Ｖ．５ｄをコードする遺伝子を５分割し、各ドメインのＶａｌ－２９を含むようにＤＮＡ断片を調製した。各ドメインについてＮ末端側から順に１～５の番号を付与する。ドメイン１はＰｓｔＩとＮａｒＩ、ドメイン２はＮａｒＩとＨｉｎｄＩＩＩ、ドメイン３はＨｉｎｄＩＩＩとＭｌｕＩ、ドメイン４はＭｌｕＩとＢｇｌＩＩ、ドメイン５はＢｇｌＩＩＩとＸｂａＩ（ＮａｒＩのみ東洋紡績社製、他はタカラバイオ社製）でそれぞれ消化し、アガロースゲルで分画精製して、各々のＤＮＡ断片を取得した。

[0105] ２種のクローニングベクター、ｐＳＬ３０１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）、および、ｐＵＣ１９（タカラバイオ社製）を、各々のドメインをコードす

るＤＮＡ断片に使用したものと同じ２種類の制限酵素で消化し、上記のＤＮＡ断片と混合後、Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｈｉｇｈで連結して、５分割したＤＮＡ断片を有するプラスミドを構築した。各々のプラスミドについて、ドメインにつけた番号に対応させ、ｐＵＣ１９－Ｖ２９－ｄ１、ｐＵＣ１９－Ｖ２９－ｄ２、ｐＳＬ３０１－Ｖ２９－ｄ３、ｐＳＬ３０１－Ｖ２９－ｄ４、ｐＳＬ３０１－Ｖ２９－ｄ５と表記する。各々のＣ－Ｇ２９Ｖ．５ｄコード領域のＤＮＡ断片の配列（制限酵素認識部位含む）を、配列番号１３～１７に示した。

[0106] ｐＵＣ１９－Ｖ２９－ｄ１、ｐＵＣ１９－Ｖ２９－ｄ２、ｐＳＬ３０１－Ｖ２９－ｄ３、ｐＳＬ３０１－Ｖ２９－ｄ４、ｐＳＬ３０１－Ｖ２９－ｄ５を鋳型として、配列番号１８～２７のオリゴヌクレオチドプライマーを用いてクイックチェンジ法を実施し、各ドメインのＶａｌ－２９がＡｌａに置換されたＣ－Ｇ２９ＡのＤＮＡ断片を含むプラスミドｐＵＣ１９－Ａ２９－ｄ１、ｐＵＣ１９－Ａ２９－ｄ２、ｐＳＬ３０１－Ａ２９－ｄ３、ｐＳＬ３０１－Ａ２９－ｄ４、ｐＳＬ３０１－Ａ２９－ｄ５を作製し、５個の断片を順次Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｈｉｇｈにより連結して、Ｃ－Ｇ２９Ａ．５ｄ（配列番号２８）をコードするＤＮＡ断片（配列番号２９）を有する発現プラスミドｐＮＫ３２６２－Ｃ－Ｇ２９Ａ．５ｄを調製し、ＦＹ－１組み換え菌の形質転換を実施した。クイックチェンジ法は、ＤＮＡポリメラーゼのＰｆｕ　Ｔｕｒｂｏ、および、メチル化ＤＮＡ（鋳型ＤＮＡ）切断酵素ＤｐｎＩ（ともにＳｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）を用い、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社のプロトコルに従い実施した。例えば、配列番号１３のＤＮＡ断片を含むプラスミドｐＵＣ１９－Ｖ２９－ｄ１に対して、配列番号１８、および、配列番号１９の２本の合成ＤＮＡプライマーを用いて、クイックチェンジ法を実施し、ドメイン１のＶａｌ－２９がＡｌａに置換されたＤＮＡ断片を含むプラスミドｐＵＣ１９－Ａ２９－ｄ１を作製した。

[0107] ［実施例２］Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄ、Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｄ３６Ｒ．５ｄ、および、Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｋ３５Ｒ／Ｄ３７Ｅ．５ｄをコードするＤＮＡ

の調製

実施例１で作製した、Ｃ－Ｇ２９Ａをコードするｄｎａ断片を含む５種のプラスミド、ｐＵＣ１９－Ａ２９－ｄ１、ｐＵＣ１９－Ａ２９－ｄ２、ｐＳＬ３０１－Ａ２９－ｄ３、ｐＳＬ３０１－Ａ２９－ｄ４、ｐＳＬ３０１－Ａ２９－ｄ５を鋳型として、配列番号３０～５９のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、実施例１と同様に、クイックチェンジ法を利用した手法にて、Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ、Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｄ３６Ｒ、および、Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｋ３５Ｒ／Ｄ３７ＥのＤＮＡ断片を含むプラスミドを作製した。

[0108] そして、各種ＤＮＡ断片を実施例１に記載の手法で連結し、Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄ（配列番号６０）をコードするＤＮＡ断片（配列番号６１）を有する発現プラスミドｐＮＫ３２６２－Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄ、Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｄ３６Ｒ．５ｄ（配列番号６２）をコードするＤＮＡ断片（配列番号６３）を有する発現プラスミドｐＮＫ３２６２－Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｄ３６Ｒ．５ｄ、および、Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｋ３５Ｒ／Ｄ３７Ｅ．５ｄ（配列番号６４）をコードするＤＮＡ断片（配列番号６５）を有する発現プラスミドｐＮＫ３２６２－Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｋ３５Ｒ／Ｄ３７Ｅ．５ｄを、それぞれ調製し、ＦＹ－１組み換え菌の形質転換を実施した。なお、Ｃ－Ｇ２９Ａをコードするｄｎａ断片の連結の際に、制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩを利用するが、ＨｉｎｄＩＩＩの認識配列と変異導入部位が近接しているので、変異未導入のドメイン２をコードするＤＮＡ断片と、変異を導入したドメイン３をコードするＤＮＡ断片を、ＨｉｎｄＩＩＩ部位で連結したプラスミドを調製した後で、ドメイン２をコードする領域に該当する変異を導入した。また、ｐＮＫ３２６２－Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄを鋳型プラスミドとして、配列番号６６～６７のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．４ｄ（配列番号６８）をコードするＤＮＡ断片（配列番号６９）をＰＣＲにより増幅した。このＤＮＡ断片をＰｓｔＩとＸｂａＩで消化し、同じ酵素で消化したベクターｐＮＫ３２６２に挿入して、発現プラスミドｐＮＫ３２６２－Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．４ｄを調製し、ＦＹ－１組み換え

菌の形質転換を実施した。

[0109] ［実施例３］ＤＮＡの配列確認

実施例１～２で得られた、各々の発現プラスミドＤＮＡ塩基配列の確認は、ＤＮＡシークエンサー３１３０ｘｌ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ａｎａｌｙｚｅｒ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）を用いて行った。ＢｉｇＤｙｅ Ｔｅｒｍｉｎａｔｏｒ ｖ．１．１ Ｃｙｃｌｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ Ｋｉｔ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社製）を用いて、付属のプロトコルに従い、各々のプラスミドＤＮＡのシークエンシングＰＣＲ反応を行い、そのシークエンシング産物を精製し、配列解析に用いた。シークエンシングに用いたオリゴヌクレオチドプライマーの配列については省略する。

[0110] ［実施例４］発現組み換え菌の目的タンパク質発現

実施例１～２により得られた、各種ブレビバチルス・チョウシネンシスＦＹ－１組み換え菌を、６０μｇ／ｍＬのネオマイシンを含む５ｍＬの３ＹＣ培地（ポリペプトン ３％、酵母エキス ０．２％、グルコース ３％、硫酸マグネシウム ０．０１％、硫酸鉄 ０．００１％、塩化マンガン ０．００１％、塩化亜鉛 ０．０００１％）にて、３０℃で３日間の振盪培養を行った。

[0111] 培養物を遠心処理して菌体を分離し、得られた培養上清から、ＳＰ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗカラム（ＧＥヘルスケア・ジャパン（株）製）を利用した陽イオン交換クロマトグラフィーにて、目的のタンパク質を精製（粗精製）した。具体的には、酢酸ナトリウムを終濃度５０ｍＭになるように添加し、さらに塩酸でｐＨ４．０に調整した培養上清を、陽イオン交換用緩衝液Ａ（５０ｍＭ $CH_3COOH-CH_3COONa$，ｐＨ４．０）にて平衡化したＳＰ Ｆａｓｔ Ｆｌｏｗカラムに添加し、陽イオン交換用緩衝液Ａで洗浄後、陽イオン交換緩衝液Ａと陽イオン交換緩衝液Ｂ（５０ｍＭ $CH_3COOH-CH_3COONa$，１Ｍ ＮａＣｌ，ｐＨ４．０）を利用した塩濃度勾配にて、途中に溶出される目的タンパク質を分取した。

[0112] 次に、ＤＥＡＥ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗカラム（ＧＥヘルスケア・ジャパン（株）製）を利用した陰イオン交換クロマトグラフィーにて、目的のタンパク質を精製した。具体的には、分取した目的タンパク質溶液を、超純水に透析し、陰イオン交換用緩衝液Ａ（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ８．０）にて平衡化したＤＥＡＥ　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗカラムに添加し、陰イオン交換用緩衝液Ａで洗浄後、陰イオン交換緩衝液Ａと陰イオン交換緩衝液Ｂ（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，０．３Ｍ　ＮａＣｌ，ｐＨ８．０）を利用した塩濃度勾配にて、途中に溶出される目的タンパク質を分取した。分取した目的タンパク質溶液を、再び超純水に透析し、目的タンパク質のみを含む水溶液を最終精製サンプルとした。

[0113] なお、上記のカラムを用いたクロマトグラフィーによるタンパク質精製は、ＡＫＴＡｐｒｉｍｅ　ｐｌｕｓシステム（ＧＥヘルスケア・ジャパン（株）製）を利用して実施した。

[0114] ［実施例５］取得したタンパク質とヒト免疫グロブリンＧ（ヒトＩｇＧ）との親和性の解析表面プラズモン共鳴を利用したバイオセンサーＢｉａｃｏｒｅ　３０００（ＧＥヘルスケア・ジャパン（株）製）を用いて、実施例４で取得した各種タンパク質の免疫グロブリンとの親和性を解析した。本実施例では、ヒト血漿から分画したヒト免疫グロブリンＧ製剤（以後は、ヒトＩｇＧと記する）を利用した。ヒトＩｇＧをセンサーチップに固定化し、各種タンパク質をチップ上に流して、両者の相互作用を検出した。ヒトＩｇＧのセンサーチップＣＭ５への固定化は、Ｎ－ｈｙｄｒｏｘｙｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ（ＮＨＳ）、および、Ｎ－ｅｔｈｙｌ－Ｎ’－（３－ｄｉｍｅｔｈｙｌａｍｉｎｏｐｒｏｐｙｌ）ｃａｒｂｏｄｉｉｍｉｄｅ　ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ（ＥＤＣ）を用いたアミンカップリング法にて行い、ブロッキングにはＥｔｈａｎｏｌａｍｉｎｅを用いた（センサーチップや固定化用試薬は、全てＧＥヘルスケア・ジャパン（株）製）。ヒトＩｇＧ溶液は、ガンマガード（バクスター社製）を標準緩衝液（２０ｍＭ　NaH_2PO_4－Na_2HPO_4、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）に１．０ｍｇ／ｍＬになるよう溶

解して調製した。ヒトＩｇＧ溶液を、固定化用緩衝液（１０ｍＭ　CH_3COOH－CH_3COONa、ｐＨ４．５）で１００倍に希釈し、Ｂｉａｃｏｒｅ　３０００付属のプロトコルに従い、ヒトＩｇＧをセンサーチップへ固定した。また、チップ上の別のフローセルに対して、ＥＤＣ／ＮＨＳにより活性化した後にＥｔｈａｎｏｌａｍｉｎｅを固定化する処理を行うことで、ネガティブ・コントロールとなるリファレンスセルも用意した。各種タンパク質は、ランニング緩衝液（２０ｍＭ　NaH_2PO_4－Na_2HPO_4、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．００５％　Ｐ－２０、ｐＨ７．４）を用いて、１０～１０００ｎＭの範囲で適宜調製し（各々について、異なるタンパク質濃度の溶液を３種類調製）、各々のタンパク質溶液を、流速２０μＬ／ｍｉｎで３０秒間センサーチップに添加した。測定温度２５℃にて、添加時（結合相、３０秒間）、および、添加終了後（解離相、６０秒間）の結合反応曲線を順次観測した。各々の観測終了後に、５０ｍＭ　ＮａＯＨ（１５秒間）を添加してセンサーチップを再生した（センサーチップ上に残った添加タンパク質の除去が目的であり、固定化したヒトＩｇＧの結合活性がほぼ完全に戻ることを確認した）。得られた結合反応曲線（リファレンスセルの結合反応曲線を差し引いた結合反応曲線）に対して、システム付属ソフトＢＩＡ　ｅｖａｌｕａｔｉｏｎを用いた１：１の結合モデルによるフィッティング解析を行い、結合速度定数（k_{on}）、解離速度定数（k_{off}）、親和定数（$K_A=k_{on}/k_{off}$）、および、解離定数（$K_D=k_{off}/k_{on}$）を算出した。

[0115] 表１に示すように、各種タンパク質のヒトＩｇＧに対する結合パラメータは、Ｃ－Ｇ２９Ａ．５ｄ（比較例１）と同程度であった。具体的には、ヒトＩｇＧに対する親和定数（ＫＡ）は、いずれのタンパク質に関しても、５．０×10^7M^{-1}～５．０×10^8M^{-1}の範囲に収まった。

[0116]

[表1]

	K_{on}($\times 10^5$ $M^{-1}s$)	K_{off} (10^{-3} s^{-1})	K_A($\times 10^8$ M^{-1})
C-G29A.5d	4.1	0.88	4.7
C-G29A/S33E.5d	3.0	1.3	2.3
C-G29A/D36R.5d	4.6	1.5	3.0
C-G29A/K35R/D37E.5d	0.86	1.3	0.65

[0117] ［実施例６］ヒト化モノクローナル抗体由来Ｆａｂフラグメントの調製

本発明における「Ｆａｂ領域への親和性」については、免疫グロブリンのＦｃ領域を含まないＦａｂフラグメントを用いて調べた。

[0118] ヒト化モノクローナルＩｇＧ製剤を原料として、これをパパインによって、ＦａｂフラグメントとＦｃフラグメントに断片化し、Ｆａｂフラグメントのみを分離精製することで調製した。

[0119] ヒト化モノクローナルＩｇＧ製剤のハーセプチン（中外製薬社製）を、パパイン消化用緩衝液（０．１Ｍ　ＡｃＯＨ－ＡｃＯＮａ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、１ｍＭ　システイン、ｐＨ５．５）に溶解し、Ｐａｐａｉｎ　Ａｇａｒｏｓｅ　ｆｒｏｍ　ｐａｐａｙａ　ｌａｔｅｘパパイン固定化アガロース、ＳＩＧＭＡ社製）を添加し、ローテーターで混和させながら、３７℃で約８時間インキュベートした。パパイン固定化アガロースから分離した反応溶液（ＦａｂフラグメントとＦｃフラグメントが混在）から、Ｒｅｓｏｕｒｃｅ　Ｓカラム（ＧＥヘルスケア・ジャパン（株）製）を利用したイオン交換クロマトグラフィーにより、Ｆａｂフラグメント（以後、モノクローナルＩｇＧ－Ｆａｂと表記する）を分離精製した。具体的には、イオン交換用緩衝液Ａ（５０ｍＭ　CH_3COOH－CH_3COONa，ｐＨ４．５）で、ｐＨ４．５になるよう希釈した反応溶液を、イオン交換用緩衝液Ａにて平衡化したＲｅｓｏｕｒｃｅ　Ｓカラムに添加し、イオン交換用緩衝液Ａで洗浄後、イオン交換緩衝液Ａとイオン交換緩衝液Ｂ（５０ｍＭ　CH_3COOH－CH_3COONa，１Ｍ　ＮａＣｌ，ｐＨ４．５）を利用した塩濃度勾配（カラムに１０カラムボリューム分の緩衝液を通液する際に、緩衝液Ｂの濃度を０％から５０％に直線的に上げていく）にて、途中に溶出されるモノクローナルＩｇ

Ｇ－Ｆａｂを分取した。

[0120] 分取したモノクローナルＩｇＧ－Ｆａｂ溶液を、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　７５　１０／３００ＧＬカラム（平衡化および分離には標準緩衝液を使用）を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにて精製し、モノクローナルＩｇＧ－Ｆａｂ溶液を得た。

[0121] なお、実施例４と同様に、クロマトグラフィーによるタンパク質精製は、ＡＫＴＡｐｒｉｍｅ　ｐｌｕｓシステムを利用して実施した。

[0122] ［実施例７］取得した各種タンパク質のモノクローナルＩｇＧ－Ｆａｂとの親和性の解析

実施例４で取得した各種タンパク質のＩｇＧ－Ｆａｂとの親和性の解析に関しても、実施例５と同様に、Ｂｉａｃｏｒｅ　３０００を用いて実施した。

[0123] 実施例６で得たモノクローナルＩｇＧ－Ｆａｂを、センサーチップＣＭ５に固定化し、実施例４で得た各種タンパク質を、チップ上に流して相互作用を検出した。リファレンスセルには、ヒト血清アルブミン（シグマ　アルドリッチ社製）を固定化した。モノクローナルＩｇＧ－Ｆａｂ、および、ヒト血清アルブミンの固定化方法は、実施例５と同様である。

[0124] 測定する各種タンパク質は、ランニング緩衝液（２０ｍＭ　NaH_2PO_4－Na_2HPO_4、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．００５％　Ｐ－２０、ｐＨ７．４）を用いて、各々について、４μＭ、８μＭ、１６μＭ、３２μＭ（場合によって３２μＭは未調製）の異なるタンパク質濃度の溶液を調製し、各々のタンパク質溶液を、流速２０μＬ／ｍｉｎで３０秒間センサーチップに添加した。測定温度２５℃にて、添加時（結合相、３０秒間）、および、添加終了後（解離相、６０秒間）の結合反応曲線を順次観測した。各々の観測終了後に、１０ｍＭ　ＮａＯＨを３０秒間添加して、センサーチップを再生した。解析の方法は、実施例６と同様である。ただし、解析時に結合パラメータの１種であるR_{max}値は、定数としてフィッティングを行った。R_{max}値は、固定化した分子の全てに添加した分子が結合した時のシグナル量であり、同一の分子（モノクローナルＩｇＧ－Ｆａｂ）を固定化した本実験系では、

この値が大きく変わることはあり得ない。しかし、結合シグナルが非常に弱い場合には、R_{max}が極端に小さな値になるような間違ったフィッティングがなされるために、R_{max}値を定数としたフィッティングを行った。表２に示すように、各種タンパク質のモノクローナルＩｇＧ－Ｆａｂに対する結合パラメータは、Ｃ－Ｇ２９Ａ．５ｄ（比較例１）に比べて有意に低かった。具体的には、モノクローナルＩｇＧ－Ｆａｂに対する親和定数（ＫＡ）は、いずれのタンパク質に関しても、Ｃ－Ｇ２９Ａ．５ｄに比べて１／１０未満の値を示した。

[0125] [表2]

	k_{on} ($\times 10^4$ $M^{-1}s$)	k_{off} (s^{-1})	K_A($\times 10^5$ M^{-1})
C-G29A.5d	5.8	0.13	4.4
C-G29A/S33E.5d	0.056	0.40	0.014
C-G29A/D36R.5d	0.22	0.39	0.057
C-G29A/K35R/D37E.5d	0.23	0.41	0.059

[0126] ［実施例８］単ドメイン型各種変異体発現用形質転換細胞の調製

実施例７で評価した変異に加え、この発明によって見出されたその他の変異について効率的に評価することを目的に、単ドメインレベルで各種変異体を調製した。

変異を導入するタンパク質配列として、プロテインＡのＣドメインに由来するアミノ酸配列（配列番号１０、Ｃ－Ｇ２９Ａ．１ｄ）を選んだ。配列番号７０に示したＣ－Ｇ２９Ａ．１ｄをコードするＤＮＡ配列を含む、ＧＳＴ融合タンパク質発現ベクターｐＧＥＸ－６Ｐ－１（ＧＥヘルスケア・ジャパン（株）製）を変異導入の鋳型プラスミドとした。鋳型プラスミドの調製方法は、公開特許文献（国際公開第２０１０／１１０２８８号公報）の記載に準ずる。

[0127] 上記２種類のプラスミドを鋳型として、配列番号７１～８０のオリゴヌクレオチドプライマーを用い、クイックチェンジ法にて、配列番号８１～８５に示す各種Ｃドメイン変異体（Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｌ．１ｄ、Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｔ．１ｄ、Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｄ３６Ｉ．１ｄ、Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｄ３６

Ｒ．１ｄ、Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｄ３７Ｅ．１ｄ）をコードする各種発現プラスミドを得た。例えば、配列番号７０のＤＮＡ配列を含む発現プラスミド（ｐＧＥＸ－６Ｐ－１－Ｃ－Ｇ２９Ａ．１ｄ）を鋳型とし、配列番号７１～７２のオリゴヌクレオチドプライマーを用いたクイックチェンジ法によって、配列番号８１に示すＣドメイン変異体（Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｌ．１ｄ）が得られる。得られた発現プラスミドについては、実施例３と同様の手法にて、ＤＮＡ配列を確認した。また、得られた各種発現プラスミドを用いて、実施例１と同様の手法にて、大腸菌ＨＢ１０１株（タカラバイオ社製）の形質転換を実施した。

[0128] ［実施例９］単ドメイン型各種変異体の発現・精製

実施例８で得られた各々の形質転換細胞は、各種変異体をＧＳＴ融合タンパク質として発現する。これらの形質転換細胞を、アンピシリンを含むＬＢ培地にて、３７℃で終夜培養した。これらの培養液を、２×ＹＴ培地（アンピシリン含有）に接種し、３７℃で約１時間培養した。終濃度０．１ｍＭになるようＩＰＴＧ（イソプロピル１－チオ－β－Ｄ－ガラクシド）を添加し、さらに、３７℃にて１８時間培養した。培養終了後、遠心にて集菌し、ＥＤＴＡ（０．５ｍＭ）を含むＰＢＳ緩衝液に再懸濁した。超音波破砕にて細胞を破砕し、遠心分離して上清画分（無細胞抽出液）と不溶性画分に分画した。ＧＳＴ融合タンパク質を含む各々の無細胞抽出液から、ＧＳＴに対して親和性のあるＧＳＴｒａｐ　ＦＦカラム（ＧＥヘルスケア・ジャパン（株）製）を用いたアフィニティークロマトグラフィーにて、ＧＳＴ融合タンパク質を精製（粗精製）した。各々の無細胞抽出液をＧＳＴｒａｐ　ＦＦカラムに添加し、標準緩衝液（２０ｍＭ　NaH_2PO_4－Na_2HPO_4，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ，ｐＨ７．４）にてカラムを洗浄、続いて溶出用緩衝液（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、２０ｍＭ　Ｇｌｕｔａｔｈｉｏｎｅ、ｐＨ８．０）にて目的のＧＳＴ融合タンパク質を溶出した。溶出画分を限外ろ過によって標準緩衝液に置換した溶液を、最終精製サンプルとした。

[0129] ［実施例１０］単ドメイン型各種変異体のモノクローナルＩｇＧ－Ｆａｂと

の親和性の解析

実施例９で得られた各種単ドメイン型変異体について、実施例７に記載の方法と同様に、モノクローナルＩｇＧ－Ｆａｂとの親和性をＢｉａｃｏｒｅにて測定し、各種変異を導入することによるＩｇＧ－Ｆａｂ結合能の変化について解析した。ただし、タンパク質濃度を４μＭ（２８０ｎｍで同じ吸光度を示す濃度）とした各種単ドメイン型変異体のセンサーグラムのみ測定した。

[0130] 得られたＩｇＧ－Ｆａｂ結合センサーグラムを、図２に示した。各種タンパク質のモノクローナルＩｇＧ－Ｆａｂに対する結合レスポンスは、Ｃ－Ｇ２９Ａ．１ｄ（比較例３）に比べて、有意に低く、検出できないレベルにまで低下していた。本発明によって得られた変異によって、Ｆａｂ結合力が低下することを確認できた。なお、結合が検出できないレベルまで低下したので、親和定数の算出は行わなかった。

[0131] ［実施例１１］Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄのアルカリ耐性評価

実施例４で取得したＣ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄのアルカリ耐性について、アルカリ性条件下で一定時間インキュベートする処理を行った後の、ヒトＩｇＧに対する結合量の低下度合い（ヒトＩｇＧに対する残存結合活性）を比較することで評価した。

[0132] Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄについて、アルカリ処理の前後におけるヒトＩｇＧに対する結合量を、Ｂｉａｃｏｒｅ　３０００を用いて測定した。アルカリ処理に関しては、２６．２μＭの各種タンパク質（１０μＬ）に対して、最終濃度が０．５Ｍとなるように０．６２５Ｍ　ＮａＯＨを一定量加えて、３０℃にて８時間インキュベートした。その後、０．５Ｍ　ＨＣｌ（あらかじめｐＨが中性に戻ることを確認した一定容量）を各種処理溶液に対して添加することで中和し、ランニング緩衝液（２０ｍＭ　NaH_2PO_4－Na_2HPO_4、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．００５％　Ｐ－２０、ｐＨ７．４）により２倍希釈して、アルカリ処理後のＣ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄ溶液を調製した。

アルカリ処理前のＣ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄ溶液は、タンパク質濃度、溶液の組成が同じになるように、アルカリ処理時に加えるＮａＯＨ溶液、および、中和処理時に加えるＨＣｌ溶液を、あらかじめ混合させた溶液を、２６．２μＭのＣ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄ（１０μＬ）に対して加えることで、調製した。センサーチップの準備（ヒトＩｇＧの固定化など）、測定時のランニング緩衝液、測定温度、チップの再生処理に関しては、実施例７と同じである。アルカリ処理前、および、処理後のＣ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄ溶液を、流速２０μＬ／ｍｉｎで１５０秒間センサーチップに添加した。添加時（結合相、１５０秒間）、および、添加終了後（解離相、２１０秒間）の結合反応曲線を順次観測した。

[0133] 解析方法は、実施例５と同様であるが、得られた結合パラメータの解釈について補足する。今回の解析方法では、アルカリ処理の前後でタンパク質濃度は同じであるが、ヒトＩｇＧに対して結合活性があるタンパク質濃度は変わる。しかし、濃度を変数としてフィッティングすることは難しいので、濃度は処理前後で一定としてフィッティングを行った。このとき、ＩｇＧに対して結合活性があるタンパク質濃度の変化は、最大結合容量を示すパラメータR_{max}に反映されるので、Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄのアルカリ処理前のR_{max}に対するアルカリ処理後のR_{max}の相対値（残存ＩｇＧ結合活性［％］）を算出し、比較することで、アルカリ耐性の評価を行った。

[0134] アルカリ処理後の残存ＩｇＧ結合活性について、Ｃ－Ｇ２９Ａ．５ｄ（比較例１）が８５．４％であったのに対し、Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄが８５．５％であった。本発明の変異は、Ｃ－Ｇ２９Ａの優れたアルカリ耐性を損なうことなく効果を発揮することが可能であることを確認した。

[0135] ［実施例１２］取得した各種タンパク質（リガンド）が固定化されたアフィニティー分離マトリックスの調製

アフィニティー分離マトリックス（１）：メタクリレート系ポリマー・ベース

水不溶性基材として、市販の活性化型アフィニティークロマトグラフィー用

充填剤「ＴＯＹＯＰＥＡＲＬ　ＡＦ－Ｆｏｒｍｙｌ－６５０Ｍ」（東ソー（株）製）を使用した。この充填剤は、メタクリレート系ポリマーをベースとし、タンパク性リガンド固定化用のホルミル基が導入済みである。実施例４で取得したＣ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄの最終精製サンプルをリガンドとして固定化し、アフィニティー分離マトリックス（１）を調製した。

[0136] 具体的には、充填剤５ｍＬをグラスフィルター上で、クエン酸緩衝液（０．２５Ｍクエン酸三ナトリウム二水和物、ｐＨ　９．０、ＮａＯＨを用いて調整）で置換後、遠沈管内で全量を７．５ｍＬとした。これにＣ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄ含有溶液（６４．６ｍｇ／ｍＬ）を０．６４ｍＬ加え、ミックスローター（ＡＺＯＮＥ製ミックスローターＭＲ－３　１－３３６－０５）にて、６℃で４時間振とうした。その後、２．４Ｍクエン酸水溶液でｐＨ３とし、６℃で４時間振とうを継続した。続けて、５．５重量%濃度のジメチルアミンボラン水溶液（和光純薬工業社製）を２．８ｍＬ加えて、２５℃、１８時間振とうした。この担体をグラスフィルター上、ＲＯ水を用いて、洗浄濾液の電気伝導度が５μＳ／ｃｍ以下になるまで洗浄し、アフィニティー分離マトリックスを調製した。

[0137] <u>アフィニティー分離マトリックス（２）：架橋アガロース・ベース</u>

水不溶性基材として、市販の活性化型プレパックカラム「Ｈｉｔｒａｐ　ＮＨＳ　ａｃｔｉｖａｔｅｄ　ＨＰ」１ｍＬ（ＧＥヘルスケア・ジャパン（株）製）を使用した。このカラムは、架橋アガロースをベースとし、タンパク性リガンド固定化用のＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）基が導入済みである。概ね製品マニュアルに従う形で、実施例４で取得したＣ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．４ｄの最終精製サンプルをリガンドとして固定化し、アフィニティー分離マトリックス（２）を調製した。

[0138] 具体的には、最終精製サンプルをカップリング緩衝液（０．２Ｍ　炭酸ナトリウム、０．５Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ８．３）で終濃度約６ｍｇ／ｍＬに希釈した溶液を１ｍＬ調製した。氷浴で冷やした１ｍＭ　ＨＣｌを、流速１ｍＬ／ｍｉｎで２ｍＬ分流す操作を３回行い、カラム中のイソプロパノールを除

去した。その後すぐに、先に調製したサンプル希釈溶液を同じ流速で１ｍＬ添加し、カラムの上下に栓をして２５℃で３０分間静置することで、取得したタンパク質をカラムに固定化した。その後開栓し、カップリング緩衝液を同じ流速で３ｍＬ流して、未反応タンパク質を回収した。その後、ブロッキング用緩衝液（０．５Ｍ　エタノールアミン、０．５Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ８．３）を２ｍＬ流す操作を３回実施し、洗浄用緩衝液（０．１Ｍ　酢酸、０．５Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ４．０）を２ｍＬ流す操作を３回実施し、最後に標準緩衝液（２０ｍＭ　NaH_2PO_4－Na_2HPO_4、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を２ｍＬ流してアフィニティー分離カラムの作製を完了した。

[0139] アフィニティー分離マトリックス（３）：セルロース・ベース

水不溶性基材として、市販のゲル濾過用充填剤「セルロファインＧＣＬ－２０００－ｍ」（チッソ（株）製）を使用した。この充填剤は、架橋された多孔性セルロースをベースとする。実施例４で取得したＣ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄの最終精製サンプルをリガンドとして固定化し、アフィニティー分離マトリックス（３）を調製した。

[0140] 具体的には、充填剤１２ｍＬをグラスフィルター（ＴＯＰ社製１７Ｇ－２）上にて、クエン酸緩衝液（０．０１Ｍ　クエン酸三ナトリウム二水和物－クエン酸一水和物、ｐＨ３）で置換後、遠沈管内で液量を１８ｍＬとした。これに０．０８ｇの過ヨウ素酸ナトリウム（和光純薬工業社製）をＲＯ水に溶解させた水溶液６ｍＬを加え、ミックスローター（ＡＺＯＮＥ製ミックスローターＭＲ－３　１－３３６－０５）にて、６℃で約３０分間振とうした。グラスフィルター上で、十分量のＲＯ水で洗浄し、ホルミル基含有担体を得た。

[0141] このホルミル基含有担体５ｍＬをグラスフィルター上で、クエン酸緩衝液（０．２５Ｍクエン酸三ナトリウム二水和物、ｐＨ８．０、ＮａＯＨを用いて調整）で置換後、遠沈管内で全量を８．５ｍＬとした。Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄ含有溶液（６４．６ｍｇ／ｍＬ）を０．６４ｍＬ加え、０．４Ｍ

ＮａＯＨでｐＨ１２とした後、ミックスローターにて、６℃で４時間振とうした。その後、２．４Ｍクエン酸水溶液（クエン酸１水和物）でｐＨ３とし、６℃で４時間振とうを継続した。続けて、５．５重量%濃度のジメチルアミンボラン水溶液を２．８ｍＬ加えて、２５℃、１８時間振とうした。この担体をグラスフィルター上、ＲＯ水を用いて、洗浄濾液の電気伝導度が５μＳ／ｃｍ以下になるまで洗浄し、アフィニティー分離マトリックスを得た。

[0142] アフィニティー分離マトリックス（４）：セルロース・ベース－２

水不溶性基材として、結晶性高架橋セルロース（チッソ（株）製、米国公開第００６２１１８号（特開２００９－２４２７７０）により得られるゲル）を使用した。実施例４で取得したＣ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄの最終精製サンプルをリガンドとして固定化し、アフィニティー分離マトリックス（４）を調製した。

具体的には、ゲル１２ｍＬを、グラスフィルター上にて、クエン酸緩衝液（０．０１Ｍ　クエン酸三ナトリウム二水和物－クエン酸一水和物、ｐＨ３）で置換後、遠沈管内で液量を１８ｍＬとした。これに０．０８ｇの過ヨウ素酸ナトリウムをＲＯ水に溶解させた水溶液６ｍＬを加え、ミックスローターにて、６℃で約３０分間振とうした。

[0143] このホルミル基含有担体５ｍＬをグラスフィルター上で、クエン酸緩衝液（０．２５Ｍクエン酸三ナトリウム二水和物、ｐＨ８．０、ＮａＯＨを用いて調整）で置換後、遠沈管内で全量を８．５ｍＬとした。これに実施例４で取得したＣ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄ含有溶液（６４．６ｍｇ／ｍＬ）を０．９６ｍＬ加え、０．４Ｍ　ＮａＯＨでｐＨ１２とした後、ミックスローターにて、６℃で４時間振とうした。

その後、２．４Ｍクエン酸水溶液（クエン酸１水和物）でｐＨ５とし、６℃で４時間振とうを継続した。続けて、５．５重量%濃度のジメチルアミンボラン水溶液を０．４６ｍＬ加えて、２５℃、１８時間振とうした。反応後、反応液の２７５ｎｍ付近の吸収極大の吸光度を測定した結果、Ｃ－Ｇ２９Ａ

／Ｓ３３Ｅ．５ｄの導入量は１１ｍｇ／ｍＬ－ｇｅｌであり、リガンドの担体への固定化収率は９０％であった。

[0144] この担体をグラスフィルター上、ＲＯ水を用いて、洗浄濾液の電気伝導度が５μＳ／ｃｍ以下になるまで洗浄し、更に、０．１Ｍクエン酸水溶液（クエン酸一水和物）、水酸化ナトリウム・硫酸ナトリウム混合水溶液（０．０５Ｍ　ＮａＯＨ、０．５Ｍ　硫酸ナトリウム）、クエン酸緩衝液（０．５Ｍクエン酸三ナトリウム二水和物－クエン酸一水和物、ｐＨ６）にて順次洗浄した。最終的に、ＲＯ水を用いて、洗浄濾液の電気伝導度が５μＳ／ｃｍ以下になるまで洗浄し、アフィニティー分離マトリックスを得た。

[0145] なお、本アフィニティー分離マトリックス（４）については、国際公開第２０１０／０６４４３７号に記載の測定に付し、抗体に対する吸着容量、及びリガンド漏出量を測定した。接触時間１．８分、３分の５％ｄＢＣがそれぞれ３３、４１ｍｇ／ｍＬであり、リガンド漏出量は、溶出ＩｇＧに対して３０ｐｐｍであった。なお、同条件で測定した市販の高架橋アガロース担体「ＭａｂＳｅｌｅｃｔ」（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社製）の５％ｄＢＣは、それぞれ２８、３７ｍｇ／ｍＬであった。図３に、５％ｄＢＣをグラフにして比較した図を示した。また、リガンド漏出量については、市販のアフィニティー分離マトリックスについて調査した公知文献が存在する（Ｈａｈｎ　Ｒ．他著、「Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．Ａ．」、２００６年、１１０２巻、２２４－２３１頁）。このように、本実施例にて得られたアフィニティー分離マトリックス（４）が、抗体医薬精製プロセスにおいて重要な性能を示すパラメータに関し、充分実用に供するレベルであることが分かった。

[0146] ［実施例１３］各種アフィニティー分離マトリックスの抗体酸溶出特性の評価

実施例１２で調製したアフィニティー分離マトリックス（１）～（４）を、エンプティーカラムＴｒｉｃｏｒｎ™　５／５０　Ｃｏｌｕｍｎ（ＧＥヘルスケア・ジャパン（株）製）に充填し、クロマトシステムＡＫＴＡ　ｐｒｉ

ｍｅ　ｐｌｕｓ（ＧＥヘルスケア・ジャパン（株）製）に接続して、抗体精製クロマトグラフィーによる抗体酸溶出特性評価を行った。ただし、アフィニティー分離マトリックス（２）はプレパックカラムなので、そのまま接続可能である。全ての場合において、カラム容量は約１ｍＬとなる。このアフィニティー分離カラムを標準緩衝液（２０ｍＭ　NaH_2PO_4－Na_2HPO_4、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）で平衡化した後に、ＶＨ３サブファミリーに属するヒト化モノクローナルＩｇＧ製剤のハーセプチンを標準緩衝液で１ｍｇ／ｍＬに調製した溶液５００μＬを、流速２ｍＬ／ｍｉｎにて添加した。その後、標準緩衝液を同じ流速で５ｍＬ流して洗浄した後に、溶出緩衝液（３５ｍＭ　CH_3COOH－CH_3COONa、ｐＨ３．５）を同じ流速で５ｍＬ流して、２８０ｎｍの吸光度をモニタリングして得られたＩｇＧ溶出ピークのクロマトグラフィー・プロファイルを確認した。さらに連続して、５ｍＬの標準緩衝液を同じ流速で流した後、強洗浄液（０．５Ｍ　CH_3COOH、０．１Ｍ　Na_2SO_4、ｐＨ２．５）を同じ流速で３ｍＬ流し、２８０ｎｍの吸光度をモニタリングして、強制的に分離されたカラム残存ＩｇＧのピークを確認した。なお、アフィニティー分離マトリックス（２）についてのみ、強洗浄液の組成は、２０ｍＭ　CH_3COONa－CH_3COOH、１Ｍ　ＮａＣｌ（ｐＨ３．２）とした。

アフィニティー分離マトリックス（１）～（３）については、ｐＨ３．７５に調整した溶出緩衝液を用いた、同様の抗体精製クロマトグラフィーによる抗体酸溶出特性評価を行った。

[0147] アフィニティー分離マトリックス（１）の抗体酸溶出特性

Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄ、および、Ｃ－Ｇ２９Ａ．５ｄ（比較例１）を固定化した各々のアフィニティー分離マトリックス（１）を用いた、抗体精製クロマトグラフィーの溶出ピーク・プロファイルを重ねた図を、図４に示した。上の図が溶出ｐＨ３．５のときの、下の図が溶出ｐＨ３．７５のときの、溶出ピーク・プロファイルである。図４に示す通り、Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄを固定化したマトリックスの溶出ピーク・プロファイルは、

Ｃ－Ｇ２９Ａ．５ｄの場合に比べて、明確にシャープであることが確認できた。溶出ｐＨ３．７５のときの溶出ピーク・プロファイルより、変異導入前のＣ－Ｇ２９Ａ．５ｄは吸着したＩｇＧの回収が困難であったものが、変異導入後のＣ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄでは吸着したＩｇＧを全て回収できることを確認した。本発明がより中性に近い酸性溶液での抗体回収率を劇的に向上することが可能であることを示した一例と考えられる。

[0148] アフィニティー分離マトリックス（２）の抗体酸溶出特性

Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．４ｄ、および、Ｃ－Ｇ２９Ａ．４ｄ（比較例２）を固定化した各々のアフィニティー分離マトリックス（２）を用いた、抗体精製クロマトグラフィーの溶出ピーク・プロファイルを重ねた図を、図５に示した。アフィニティー分離マトリックス（１）の場合と同様に、Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．４ｄを固定化したマトリックスの溶出ピーク・プロファイルは、Ｃ－Ｇ２９Ａ．４ｄの場合に比べて、明確にシャープであることが確認できた。本データにより、本発明のタンパク質は、ベースとなる水不溶性基材の種類、基材へのリガンド固定化方法、および、リガンドとなるタンパク質のドメイン数に依らず、効果を奏することが示された。

[0149] アフィニティー分離マトリックス（３）の抗体酸溶出特性

Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄ、および、Ｃ－Ｇ２９Ａ．５ｄ（比較例１）を固定化した各々のアフィニティー分離マトリックス（３）を用いた、抗体精製クロマトグラフィーの溶出ピーク・プロファイルを重ねた図を、図６に示した。Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄを固定化したマトリックスの溶出ピーク・プロファイルは、Ｃ－Ｇ２９Ａ．５ｄの場合に比べて、明確にシャープであることが確認できた。本データにより、本発明のタンパク質は、基材として抗体溶出特性（溶出の切れ）に優れた基材と組み合わせることによっても、さらに優れた効果が発揮されることが示された。

[0150] アフィニティー分離マトリックス（４）の抗体酸溶出特性

Ｃ－Ｇ２９Ａ／Ｓ３３Ｅ．５ｄを固定化したアフィニティー分離マトリックス（４）を用いた、抗体精製クロマトグラフィーの溶出ピーク・プロファイ

ル（溶出ｐＨ３．５）を図７に示した。産業的には、高い抗体結合容量を示すマトリックスへのニーズが高く、リガンド固定化量の増加は、抗体結合容量の向上に有効である。本データにより、本発明は、タンパク質固定化量が高い場合においても、問題なくその効果を奏することが確認された。

[0151] ［比較例１］Ｃ－Ｇ２９Ａ．５ｄの調製・利用

実施例１で得られた組み換え菌を用いて、実施例３～５に記載の方法と同様の方法にてＣ－Ｇ２９Ａ．５ｄ（配列番号２８）を調製した。ヒトＩｇＧ、および、モノクローナルＩｇＧ－Ｆａｂとの親和性の解析方法についても、実施例５、および、実施例７に記載の方法と同様であり、解析結果については、表１～２に併せて表記した。

[0152] また、アルカリ耐性についても、実施例１１に記載の手法で評価した。加えて、実施例１２のアフィニティー分離マトリックス（１）、（３）の調製にも、Ｃ－Ｇ２９Ａ．５ｄを用い、実施例１３と同様の手法にて抗体酸溶出特性を評価し、その結果を図４および図６に併せて表記した。なお、アフィニティー分離マトリックス（１）、（３）の調製において、用いた溶液のタンパク質濃度は５８．２ｍｇ／ｍＬであり、用いた量は０．７９ｍＬであった。

[0153] ［比較例２］Ｃ－Ｇ２９Ａ．４ｄの調製・利用

実施例１で得られた発現プラスミドｐＮＫ３２６２－Ｃ－Ｇ２９Ａ．５ｄを鋳型とし、配列番号６６～６７のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、実施例２と同様の手法にて、Ｃ－Ｇ２９Ａ．４ｄの発現プラスミド、および、その形質転換細胞を得た。実施例３～５に記載の方法と同様の方法にて、Ｃ－Ｇ２９Ａ．４ｄを調製した。加えて、実施例１２のアフィニティー分離マトリックス（２）の調製にも、Ｃ－Ｇ２９Ａ．４ｄを用い、実施例１３と同様の手法にて抗体酸溶出特性を評価し、その結果を図５に併せて表記した。

[0154] ［比較例３］Ｃ－Ｇ２９Ａ．１ｄの調製

実施例８で用いた鋳型プラスミドを含む形質転換細胞（ＨＢ１０１）を用い

て、実施例９と同様の手法にて、Ｃ－Ｇ２９Ａ．１ｄを調製し、実施例１０と同様の手法にて、モノクローナルＩｇＧ－Ｆａｂとの親和性を解析した。解析結果については、図２に併せて表記した。

請求の範囲

[請求項1] 配列番号１～５に記載のプロテインＡのＥ、Ｄ、Ａ、Ｂ及びＣドメインから選ばれる少なくとも１つのドメインに由来するアミノ酸配列において、

Ａ、Ｂ、および、Ｃドメインの３１～３７位のアミノ酸残基、

Ｅドメインの２９～３５位のアミノ酸残基、又は

Ｄドメインの３４～４０位のアミノ酸残基に

少なくとも１つのアミノ酸置換変異を導入したアミノ酸配列を有するタンパク質であって、

変異導入前のタンパク質と比較して、免疫グロブリンのＦａｂ領域に対する親和性が低下していることを特徴とする、免疫グロブリンに親和性を有するタンパク質。

[請求項2] 変異導入前のドメインに由来するアミノ酸配列が、

配列番号１～５に記載のプロテインＡのＥ、Ｄ、Ａ、Ｂ及びＣドメインのアミノ酸配列、又は

配列番号６～１０に記載のプロテインＡのＥ、Ｄ、Ａ、Ｂ及びＣドメインに由来するアミノ酸配列

である、請求項１に記載のタンパク質。

[請求項3] 変異導入前のドメインに由来するアミノ酸配列が、

配列番号５に記載のプロテインＡのＣドメインのアミノ酸配列、又は

配列番号１０に記載のプロテインＡのＣドメインに由来するアミノ酸配列

である、請求項１又は２に記載のタンパク質。

[請求項4] 変異導入前のアミノ酸残基において、

各ドメインにおけるＣドメインの３３位に対応するアミノ酸残基がＳｅｒ、

各ドメインにおけるＣドメインの３５位に対応するアミノ酸残基がＬｙｓ、

各ドメインにおけるＣドメインの３６位に対応するアミノ酸残基がＡｓｐ、又は
各ドメインにおけるＣドメインの３７位に対応するアミノ酸残基がＡｓｐ
である、請求項１～３のいずれか１項に記載のタンパク質。

[請求項5] 導入するアミノ酸置換変異が、
Ｃドメインの３３位に対応するＳｅｒをＧｌｕ、Ｌｅｕ又はＴｈｒに置換する変異、
Ｃドメインの３５位に対応するＬｙｓをＡｒｇに置換する変異、
Ｃドメインの３６位に対応するＡｓｐをＡｒｇ又はＩｌｅに置換する変異、又は
Ｃドメインの３７位に対応するＡｓｐをＧｌｕに置換する変異
である、請求項１～４のいずれか１項に記載のタンパク質。

[請求項6] 導入するアミノ酸置換変異が、
Ｃドメインの３３位に対応するＳｅｒをＧｌｕに置換する変異
である、請求項５に記載のタンパク質。

[請求項7] 請求項１～６のいずれか１項に記載のタンパク質を２個以上連結した複数ドメインからなるタンパク質。

[請求項8] 連結するタンパク質が、種類の異なるタンパク質である請求項７に記載のタンパク質。

[請求項9] 連結するタンパク質の数が２～５個である、請求項７または８に記載の複数ドメインからなるタンパク質。

[請求項10] 請求項１～９のいずれか１項に記載のタンパク質をコードするＤＮＡ。

[請求項11] 連結されているドメインを構成する塩基配列の配列同一性が９０％以下であることを特徴とする、請求項１０に記載のＤＮＡ。

[請求項12] 請求項１０または１１に記載のＤＮＡを含むベクター。

[請求項13] 請求項１２に記載のベクターで宿主を形質転換して得られる形質転換

体。

[請求項14] 宿主がグラム陽性菌であることを特徴とする、請求項１３に記載の形質転換体。

[請求項15] グラム陽性菌がブレビバチルス属細菌であることを特徴とする、請求項１４に記載の形質転換体。

[請求項16] ブレビバチルス属細菌がブレビバチルス・チョウシネンシスであることを特徴とする、請求項１５に記載の形質転換体。

[請求項17] 請求項１３～１６のいずれか１項に記載の形質転換体、または、請求項１０又は１１に記載のＤＮＡを用いた無細胞タンパク質合成系を用いる、請求項１～９のいずれか１項に記載のタンパク質の製造方法。

[請求項18] 形質転換体の細胞内及び／又はペリプラズム領域内にタンパク質を蓄積すること、及び／又は、形質転換体の細胞外にタンパク質を分泌することを特徴とする、請求項１７に記載の製造方法。

[請求項19] 請求項１～９のいずれか１項に記載のタンパク質をアフィニティーリガンドとして、水不溶性基材からなる担体に固定化したことを特徴とする、アフィニティー分離マトリックス。

[請求項20] 水不溶性基材が、合成高分子又は多糖類からなる請求項１９に記載のアフィニティー分離マトリックス。

[請求項21] 多糖類がセルロースである、請求項２０に記載のアフィニティー分離マトリックス。

[請求項22] 免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質に結合することを特徴とする、請求項１９～２１のいずれか１項に記載のアフィニティー分離マトリックス。

[請求項23] 免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質が免疫グロブリンＧ、または、免疫グロブリンＧ誘導体のいずれかであることを特徴とする、請求項２２に記載のアフィニティー分離マトリックス。

[請求項24] 免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質の分離における、請求項１９～２３のいずれか１項に記載のアフィニティー分離マトリックス

の使用。

[請求項25] 免疫グロブリンのＦｃ領域を含むタンパク質の分離が、免疫グロブリンのＦａｂ領域のみを含むタンパク質の分離回収を目的とする、請求項２４に記載のアフィニティー分離マトリックスの使用。