明　細　書

発明の名称 ： Ｆｃ領域改変抗体の精製方法

技術分野

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

背景技術

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

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

[0004] 例えば、特表平５－５０４５７９号（特許文献１）では、哺乳動物細胞培養から得られた抗体含有水性培地をプロテインＡもしくはプロテインＧカラムクロマトグラフィーに適用して抗体をカラムに吸着させ、次いで酸性溶液（濃度約０．１Ｍのクエン酸、ｐＨ３．０－３．５）を用いて抗体を溶出させ、得られる酸性溶出液をイオン交換カラムクロマトグラフィー、サイズ排除カラムクロマトグラフィーに順次適用して精製している。

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

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

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

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特表平５－５０４５７９号公報

特許文献2：ＷＯ０７／１１４３１９号公報

特許文献3：ＷＯ２０１７／１０４７８３号公報

特許文献4：特開２００７－２５２３６８号公報

特許文献5：ＷＯ２０１５／０３４０００号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

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

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

課題を解決するための手段

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

[0011] すなわち、本発明は以下〔１〕～〔２０〕を提供するものである。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

つに記載の方法。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

記載の方法。

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

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

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

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

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

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

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

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

〔１９〕プロテインA改変リガンドが固定化された担体を含むアフィニティカ

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

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

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

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

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

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

あるいは本発明は、

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

(a)プロテインA改変リガンドが固定化された担体を含むアフィニティカラムを準備する工程、

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

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

発明の効果

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

図面の簡単な説明

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

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

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

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明を詳細に説明する。

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

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

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

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

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

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

よって作製されるFc領域であってもよい。

[0016] さらに、本発明における抗体については他の目的のために実施されるアミノ酸改変が、本発明に用いられる抗体に組み合わされていてもよい。例えば、FcRn結合活性を増強させるアミノ酸置換（Hinton et al., J. Immunol. 176(1):346-356 (2006)；Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281(33):23514-23524 (2006)；Petkova et al., Intl. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)；Zalevsky et al., Nat. Biotechnol. 28(2):157-159 (2010)；WO2006/019447; WO2006/053301；およびWO2009/086320）、および、抗体のヘテロジェニティーまたは安定性を改善するためのアミノ酸置換（WO2009/041613）を加えてもよい。あるいは、WO2011/122011、WO2012/132067、WO2013/046704、またはWO2013/180201に記載される抗原クリアランスを促進する特性を有するポリペプチド、WO2013/180200に記載される標的組織への特異的結合特性を有するポリペプチド、WO2009/125825、WO2012/073992、またはWO2013/047752に記載される複数の抗原分子に対して繰り返し結合する特性を有するポリペプチドに適用されているアミノ酸改変が、本発明に用いられる抗体と組み合わされていてもよい。あるいは、他の抗原に対する結合能を付与する目的で、EP1752471およびEP1772465に開示されたアミノ酸改変が、本発明に用いられる抗体において組み合わせられていてもよい。あるいは、血漿中滞留性を増大させる目的で、定常領域のpIを低下させるアミノ酸改変（WO2012/016227）が本発明に用いられる抗体に組み合わせられていてもよい。あるいは、細胞への取り込みを促進する目的で、定常領域のpIを上昇させるアミノ酸改変（WO2014/145159）が組み合わせられていてもよい。あるいは、標的分子の血漿からの消失を促進する目的で、定常領域のpIを上昇させるアミノ酸改変（特願2015-021371および特願2015-185254）が組み合わせられていてもよい。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

基に置換されていることが望ましい。

[0040] Ｃドメイン改変体（配列番号１）、またはＺドメイン（配列番号２）の、４、７、３５位のいずれか１個以上における置換後のアミノ酸の種類については、特に限定されないが、アラニン、グルタミン、アスパラギン、バリン、セリン、スレオニン、ヒスチジン、チロシン、またはアルギニンが好ましく、アラニン、スレオニン、またはアルギニンがより好ましい。

[0041] より具体的には、Ｃドメイン改変体（配列番号１）、またはＺドメイン（配列番号２）の４位における置換後のアミノ酸の種類としては、グルタミン酸、イソロイシン、アルギニン、アラニン、バリン、セリン、スレオニン、またはヒスチジンが好ましく、アラニンがより好ましい。

[0042] また、Ｃドメイン改変体（配列番号１）、またはＺドメイン（配列番号２）の７位における置換後のアミノ酸の種類としては、チロシン、フェニルアラニン、グルタミン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、スレオニン、アラニン、バリン、セリン、アルギニン、またはヒスチジンが好ましく、スレオニンがより好ましい。

[0043] また、Ｃドメイン改変体（配列番号１）、またはＺドメイン（配列番号２）の３５位における置換後のアミノ酸の種類としては、アルギニン、グルタミン、アスパラギン、またはチロシンが好ましく、アルギニンがより好ましい。

[0044] また、Ｃドメイン改変体（配列番号１）、またはＺドメイン（配列番号２）は、Q311R及びR343Rのアミノ酸残基の置換を含むIgG抗体に対する結合能を有することを限度として、上記改変に加えて、１または数個のアミノ酸が置換されていてもよい。特に、Ｃドメイン改変体（配列番号１）、またはＺドメイン（配列番号２）において、構成アミノ酸として含まれるリジンの数が少ないことが好ましく、上記改変に加えて、４２、４９、５０、５８位の元からあるリジン残基のうち１～４個、好ましくは３又は４個、より好ましくは４個、リジン以外のアミノ酸残基に置換されていることが望ましい。

[0045] Ｃドメイン改変体（配列番号１）、またはＺドメイン（配列番号２）の、

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

できる。

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

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

$(R1)_n-(R2)_m$、または$(R2)_m-(R1)_n$ （１）

[0057] 式（１）において、左端がＮ末端であり、右端がＣ末端である。

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

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

であってもよい。

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

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

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

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

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

連結された多量体タンパク質を容易に製造することが可能である。

[0064] 本発明の改変タンパク質をコードする核酸配列が挿入される発現ベクターとしては、宿主細胞において複製可能であるプラスミド、ファージ、ウイルス等いかなるベクターをも用いることができる。例えば、商業的に入手可能な発現ベクターとしては、ｐＱＥ系ベクター（株式会社キアゲン）、ｐＤＲ５４０、ｐＲＩＴ２Ｔ（ＧＥ ヘルスケアバイオサイエンス株式会社）、ｐＥＴ系ベクター（メルク株式会社）等が挙げられる。発現ベクターは宿主細胞との適切な組み合わせを選んで使用するのがよい。例えば大腸菌を宿主細胞とする場合には、ｐＥＴ系ベクターとＢＬ２１（ＤＥ３）大腸菌株の組み合わせまたはｐＤＲ５４０ベクターとＪＭ１０９大腸菌株の組み合わせ等が好ましく挙げられる。

[0065] 本発明の改変タンパク質は、培養された細胞を遠心分離等により集め、これを超音波やフレンチプレスなどを用いた処理にて破砕することで、可溶性画分中に回収することができる。該改変タンパク質の精製は、公知の分離、精製技術を適切に組み合わせて行なうことができる。具体的には、塩析法、透析法、限外濾過法等の分離技術に加え、疎水クロマトグラフィ、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等の精製方法が挙げられる。

[0066] 本発明の改変タンパク質をイムノグロブリンの親和性リガンドとして結合させる不溶性担体としては、例えば、キトサン、デキストランなどの天然の高分子材料、ビニルポリマー、高度架橋アガロース、ポリイミドなどの合成ポリマー類などが挙げられる。また別の形態ではシリカなどの無機担体でもよい。通常、リガンドタンパク質は、シアノゲンブロミド、エピクロロヒドリン、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド、トシル／トレシルクロリド、カルボジイミド、グルタールアルデヒド、ヒドラジンのようなカップリング剤やカルボキシルまたはチオール活性化担体等によって、担体上に固定される。このようなカップリング反応は、当該技術分野において周知であり、文献に広く記載されている（例えば、Jansson, J.C.およびRyden, L.,「Protein puri

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

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

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

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

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

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

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

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

上記固定化する方法については、通常行われる方法により固定化できる。

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

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

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

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

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

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

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

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

することができる。

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

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

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

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

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

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

本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製されたIgG抗体も包含する。

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

実施例 1

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

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

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

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

HiTrap MabSelect SuRe（GE ヘルスケア製、商品名）；

ToyoScreen AF-rProtein A HC-650F（東ソー製、商品名）；

Amsphere A3（JSRライフサイエンス製、登録商標）；

MiniChrom Column Eshmuno A（メルクミリポア製、登録商標）；

MabSpeed rP202（三菱ケミカル製、登録商標）；

KanCap Pre-packaged Column（カネカ製、商品名）。

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

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

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

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

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

[0081] （２）動的結合容量 ；DBC

[表1]

各プロテインA固定化樹脂における抗体AのDBC (g/L resin)

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

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

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

$$(R1)_5-(R2)_1 \qquad (1')$$

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

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

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

実施例 2

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

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

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

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

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

[0085] [表2]

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

実施例 3

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

表３の結果から、Ｃドメイン改変体の３５位のリジン残基（Ｋ）を、グル

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

[0087] [表3]

リガンド	抗体A親和性 K_D（$\times 10^{-4}$ M）	Cドメイン改変体（配列番号１）に対する置換		
		4位	7位	35位
Cドメイン改変体	n.d.	−*	−	−
PN61	1.62	A	T	R
PN34	1.99	−	−	Q
PN23	1.16	−	−	R
PN43	n.d.	R	−	−
PN44	n.d.	−	R	−

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

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

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

[0089]

[表4]

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

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

実施例 4

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

試験対象のリガンド２量体は、Ｃドメイン改変体に対し、４０、４３、４６、５３位のアミノ酸残基をリジン残基（Ｋ）に置換したＲ２’構造のリガンド単量体と、Ｃドメイン改変体に対し、４２位をアラニン残基（Ａ）、４９位、５０位、５８位をアルギニン残基（Ｒ）に置換したリガンド単量体（以下、「Ｒ１’構造のリガンド単量体」）との２量体構造を有し、さらに４位、７位、３５位に変異を有する。

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

[0091] [表5]

リガンド	抗体A親和性 K_D（$\times 10^{-9}$ M）		Cドメイン改変体（配列番号１）に対する置換										
			4位	7位	35位	40位	43位	46位	53位	42位	49位	50位	58位
PN226	306	R1’	V	R	R	-*	-	-	-	A	R	R	R
		R2’	V	R	R	K	K	K	K	-	-	-	-
PN229	379	R1’	I	R	R	-	-	-	-	A	R	R	R
		R2’	I	R	R	K	K	K	K	-	-	-	-
PN231	314	R1’	E	R	R	-	-	-	-	A	R	R	R
		R2’	E	R	R	K	K	K	K	-	-	-	-
PN232	258	R1’	R	R	R	-	-	-	-	A	R	R	R
		R2’	R	R	R	K	K	K	K	-	-	-	-

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

実施例 5

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

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

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

[0093]

[表6]

リガンド	抗体A親和性 K_D（$\times 10^{-9}$ M）	Cドメイン改変体（配列番号１）に対する置換							C末端への付加
		4位	7位	35位	42位	49位	50位	58位	
PN100AH	335	V	R	R	A	R	R	R	Poly Lys(K)

産業上の利用可能性

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

請求の範囲

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

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

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

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

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

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

の方法。

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

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

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

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

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

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

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

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

ムノグロブリン結合ドメインの多量体をアミノ基含有担体へ固定化する方法、

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

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

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

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

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