

明 細 書

発明の名称：抗体組成物の精製方法

技術分野

[0001] 本発明は抗体組成物の製造方法に関する。より詳しくは、Fc領域糖鎖結合コンセンサス領域以外に糖鎖が付加した異性体が低減された抗体組成物の精製方法に関する。

背景技術

[0002] モノクローナル抗体を有効成分とする抗体医薬品は、抗体分子の持つ抗原への高い結合親和性と結合特異性を活かした分子標的薬の1つとして期待され、研究開発が進展してきた。抗体医薬品は、がんや自己免疫疾患をはじめとする様々な疾患の治療に不可欠なものとなっており、現在、100品目近くの製品が世界で承認され使用される状況に至っている（非特許文献1、非特許文献2）。アンメットメディカルニーズを満たす新規抗体医薬品開発への期待は依然として高く、今後も数多くの新たな抗体医薬品が研究され、開発されることが期待されている。

[0003] 抗体（IgG）は、重鎖のFc部分に存在する糖鎖付加コンセンサス領域（Asn297-X-Ser/Thr、XはPro以外のアミノ酸）中の297残基目のAsn残基（Asn297）にN-結合型糖鎖を有している。この糖鎖付加コンセンサス領域に存在する糖鎖は抗体分子としての生物活性や血中動態、安全性等に寄与することが知られている（非特許文献3、非特許文献4）。たとえば、Asn297のN-結合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミン（GlcNAc）残基に付加しているFuc残基（コアフコース）を除去すると抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性が増強されることが知られている。同様に、Fc部分に結合する糖鎖の非還元末端部分のガラクトース（Gal）残基の数が多いほど補体第一成分（C1q）への結合が増強され、結果として補体依存性細胞傷害（CDC）活性が増強されることが分かっている（非特許文献5）。

- [0004] 一方、抗体のF c領域の糖鎖付加コンセンサス領域以外に糖鎖が結合した抗体（糖鎖付加異性体）の事例もよく知られている。たとえば、SP2/O細胞で産生された抗悪性腫瘍剤であるCetuximabは、Fab部分にN-結合型糖鎖が結合していることが確認された（非特許文献3）。これ以外にも糖鎖付加異性体についての様々な報告がなされている（非特許文献6、非特許文献7、非特許文献8）。
- [0005] 糖鎖付加異性体は、生物活性（非特許文献10、非特許文献11）、免疫原性（非特許文献8、非特許文献10）、血中半減期（非特許文献9）など、様々な抗体の特性に影響を及ぼす可能性があることが知られている。特に、Fab領域又はCDR領域付近に糖鎖が結合した場合、生物活性が低下する可能性が懸念される。同様に、糖鎖付加コンセンサス領域以外に糖鎖が結合した抗体の糖鎖付加異性体は免疫原性等の安全性の懸念もある。
- [0006] 糖鎖付加コンセンサス領域以外の糖鎖の付加により、生物活性が大幅に低下したり、免疫原性が大幅に増加したりする場合、抗体医薬品の成分としては望ましくないマイナスの影響が生じることになるため、これらの糖鎖付加異性体は目的物質由来不純物とみなされる。このような目的物質由来不純物は、医薬品の成分として含有されることは望ましくなく、規制上の観点からも可能な限り除去することが望ましい（非特許文献12）。
- [0007] 抗体のF c領域の糖鎖付加コンセンサス領域以外に糖鎖が付加する可能性のあるコンセンサス配列を含む抗体が、医薬品の開発候補の分子として見出された場合は、その部位に糖鎖が結合しないようにコンセンサス配列を別のアミノ酸配列へ変更するなどが一般的に行われる。その際、元の抗体の性能に比較して結合活性等の低下を生じることもあり、目的の治療効果を有する抗体を取得できない可能性がある。
- [0008] 抗体の糖鎖付加コンセンサス領域以外のFab又はCDR等の領域に糖鎖が結合した糖鎖付加異性体は、少量かつ高性能の分析レベルでの糖鎖付加異性体の分離を行うことで評価し、見分けることが可能である。高速液体クロマトグラフィと質量分析を組み合わせるペプチド断片を評価する方法や、抗

体から切り出した糖鎖そのものを評価する方法が知られている（非特許文献 6、非特許文献 9）。また、抗体の F a b 領域に糖鎖が結合した抗体を疎水性相互作用クロマトグラフィ（H I C）により分析した事例が知られている（非特許文献 1 3）。しかし、これらの事例では、いずれも分析を目的としてごく少量の抗体を用いて分離性能の極めて高い分析レベルの方法を用いており、分離された組成物を抗体医薬品として利用することはできない。また、H I C 分析の総説（非特許文献 1 4）により、数多くの抗体の分離性能の有用性が公開されているが、H I C による精製法で糖鎖付加異性体を分離できることは一切示唆されていない。

[0009] このように、こうした糖鎖付加異性体を分離・除去し、糖鎖付加コンセンサス領域以外に糖鎖が付加した異性体を含まない、あるいは十分低減された抗体組成物の調製方法は知られていなかった。すなわち、従来の技術では、糖鎖付加異性体は、分析レベルで糖鎖の付加状況进行评估できるとどまり、抗体の糖鎖付加異性体を分離・除去し、医薬品として提供できる量の抗体組成物を製造する方法は存在せず、そのような抗体組成物も知られていなかった。

[0010] よって、通常、抗体の F c 領域に存在する糖鎖付加コンセンサス領域以外に糖鎖が付加し、そのような糖鎖付加異性体が含まれてしまう場合、それらの成分は分離されずに抗体医薬品の一部として含有されている。前述した C e t u x i m a b も、F c 部分の糖鎖付加コンセンサス領域及び F a b 内の非コンセンサス領域の両方に糖鎖が付加した混合物の組成で開発が行われている（非特許文献 3）。仮に糖鎖付加異性体が生物活性を有しない場合、目的物質由来不純物が医薬品の成分として含まれることになり望ましくない。

[0011] なお、所定の糖鎖に特異的に結合するレクチンを用いたアフィニティクロマトグラフィによる糖鎖付加異性体の分離は報告がある（非特許文献 1 5、非特許文献 1 6）。C o n c a n a v a l i n A をリガンドとして用いるものであり、分離特性も高いことが分かっているが、アフィニティによる分離であり、天然物を使用することから、医薬品の製造には適しておらず、抗

体医薬品の製造に適用された事例は存在しない。

[0012] 抗体以外で糖鎖成分の分離を実現した技術としては、遺伝子組換えアンチトロンبینを糖鎖本数の違いによりクロマトグラフィで分離した事例が知られている（特許文献1）。また、遺伝子組換えエリスロポエチン及びその誘導体はシアル酸の付加数の違いでクロマトグラフィによる分離が行われている（特許文献2）。同様に、等電点クロマトグラフィを用いて卵白アルブミンやトランスフェリンを分離した事例がある（特許文献3）。しかし、これらの技術をそのまま抗体に適用することはできず、抗体組成物において、糖鎖付加異性体を分離除去する製造法は一切報告が無い。

[0013] 前記以外の技術としては、酵素処理することで糖鎖を除去する方法が知られている（非特許文献17）。しかし、安全性の観点から、酵素の分離・除去や由来なども問題になるため、医薬品の製造技術として利用することは難しい。酵素で抗体の糖鎖を除去する場合、糖鎖付加コンセンサス領域と非コンセンサス領域の糖鎖を区別して除去することも不可能である。

[0014] 特許文献4に記載される抗hDLK-1抗体は、その抗腫瘍活性が期待されている抗体である。

先行技術文献

特許文献

[0015] 特許文献1：国際公開第2008/120801号

特許文献2：特開2001-064300号公報

特許文献3：国際公開第2005/100379号

特許文献4：国際公開第2014/054820号

非特許文献

[0016] 非特許文献1：YAKUGAKU ZASSHI 137(7), 815-816 (2017)

非特許文献2：Bull. Natl. Inst. Health Sci., 132, 36-46 (2014)

非特許文献3：CHROMATOGRAPHY, 34(2), 83-88

(2013)

非特許文献4: Protein Cell, 9, 63-73 (2018)

非特許文献5: Front. Immunol., 8 (646), 1-8 (2017)

非特許文献6: J. Biol. Chem., 284 (47), 32493-32506 (2009)

非特許文献7: Embo J., 10, 2717-2723 (1991)

非特許文献8: J. Immunol., 196, 1435-1441 (2016)

非特許文献9: Anal. Biochem., 349, 197-207 (2006)

非特許文献10: Nature Review | Immunology, published online, 04 Feb, (2019)

非特許文献11: Biochem. J., 338 (2), 529-538 (1999)

非特許文献12: ICH Q6 B Guideline

非特許文献13: mAbs, 6 (4), 852-858 (2014)

非特許文献14: J. Pharm. Biomed. Anal., 130, 3-18 (2016)

非特許文献15: J. Biol. Chem., 285 (21), 16012-22 (2010)

非特許文献16: Oncotarget, 7 (21), 31166-76 (2016)

非特許文献17: J. Immunol. Methods, 467, 58-62 (2019)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0017] 抗体の糖鎖付加コンセンサス領域以外に結合した糖鎖は生物活性や安全性の観点からも望ましくなく、抗体医薬品が含有する糖鎖付加異性体を十分なレベルまで除去することができ、簡便に均一な精製抗体組成物を調製可能な技術の開発が求められている。よって、本発明は、抗体医薬品の糖鎖付加異性体を除去する方法の提供を課題とする。

[0018] 別の態様において、本発明は、より有効かつより安全な抗hDLK-1抗体の精製組成物を得ることを課題とする。

課題を解決するための手段

[0019] 前述した従来の技術が示すように、分析評価の目的で糖鎖付加異性体を精密かつ高度な分離能を有するクロマトグラフィで分離した報告はあるものの、抗体医薬品の糖鎖付加異性体をクロマトグラフィで分離し除去可能な製造技術又は調製技術は報告が無かった。本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究した結果、驚くべきことに、コンベンショナルな疎水性相互作用クロマトグラフィ担体を使用することで、特には、糖鎖付加異性体及び目的物質の吸着及び分離条件を最適化することで、糖鎖付加異性体が低減された精製抗体組成物を調製可能であることを見出した。

[0020] また、本発明者らは新たに見出した糖鎖付加異性体の低減方法を用いて特許文献4に記載される抗hDLK-1抗体について糖鎖付加異性体の分離、非糖鎖付加異性体の精製を行った。抗体のCDR付近に糖鎖を有する糖鎖付加異性体は抗体の結合活性に影響を及ぼすかも知れないが、その活性の低下の程度は糖鎖の大きさや結合位置にも関係するため、活性に影響しない可能性も考えられる。驚くべきことに特許文献4に記載される抗hDLK-1抗体においては、糖鎖付加異性体は完全に活性が消失し、そのため医薬品における「不純物」となることを見出した。これにより、本発明者らは、抗hDLK-1抗体粗精製物中の新たな不純物として糖鎖付加異性体を特定することに成功し、その除去を可能とすることで、より有効かつより安全な抗hDLK-1抗体の精製組成物の提供を達成した。

[0021] すなわち、本発明は以下の（１）～（２７）に関する。

（１） 重鎖が配列番号２、４、６、８、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、及び３６から選択されるアミノ酸配列を有し、かつ軽鎖が配列番号１０又は配列番号１２に記載のアミノ酸配列を有する、抗hDLK-1抗体組成物の精製方法であって、

抗体粗精製物をコンベンショナルクロマトグラフィに負荷して、Fc領域糖鎖付加コンセンサス領域以外の部位に糖鎖が付加していない抗体を前記クロマトグラフィの担体に吸着させること、及び

前記担体を溶出液で溶出させることにより、前記担体に吸着した前記抗体を溶出させて精製抗体組成物を得ることを含み、

ここで、得られた前記精製抗体組成物における、Fc領域糖鎖付加コンセンサス領域以外の部位に糖鎖が付加した糖鎖付加異性体の含有量が、前記抗体粗精製物と比較して減少している、

前記方法。

（２） 前記コンベンショナルクロマトグラフィの担体が、疎水性相互作用クロマトグラフィ担体、又は、ミックスモードクロマトグラフィ担体である、（１）に記載の精製方法。

（３） 前記コンベンショナルクロマトグラフィの担体の平均粒子径が $15\mu\text{m}$ 以上である、（１）又は（２）に記載の精製方法。

（４） 前記コンベンショナルクロマトグラフィの担体の平均粒子径が $20\sim 100\mu\text{m}$ である、（１）又は（２）に記載の精製方法。

（５） 前記コンベンショナルクロマトグラフィの担体が、ベンジル基又はブチル基を有する、（１）～（４）のいずれか１項に記載の精製方法。

（６） 前記コンベンショナルクロマトグラフィの担体の単位量あたりのタンパク質負荷量が、 20mg/mL 以上である、（１）～（５）のいずれか１項に記載の精製方法。

（７） 前記コンベンショナルクロマトグラフィの担体が疎水性相互作用クロマトグラフィ担体であり、かつ、前記抗体粗精製物を前記担体に負荷した

後、溶出前に当該担体を洗浄液で洗浄することを含む、(1)～(6)のいずれか1項に記載の精製方法。

(8) 前記洗浄液の塩濃度が、前記溶出液の塩濃度より10 mM以上高いことを特徴とする、(7)に記載の精製方法。

(9) 前記洗浄液の塩濃度が、0.5 M以上であることを特徴とする、(7)又は(8)に記載の精製方法。

(10) 前記洗浄液の塩濃度が、1.0 M以上であることを特徴とする、(7)又は(8)に記載の精製方法。

(11) 前記洗浄液のpHが、前記溶出液のpHより0.2ユニット以上低いpHであり、かつ、pH4～8の範囲内である、(7)～(10)のいずれか1項に記載の精製方法。

(12) 前記洗浄が、2担体容量以上の洗浄液を流すことにより行われる、(7)～(11)のいずれか1項に記載の精製方法。

(13) 段階的又は直線的にpH又は／及び塩濃度が変化する移動相を使用することにより、洗浄及び溶出を行うことを特徴とする、(7)～(12)のいずれか1項に記載の精製方法。

(14) 前記溶出液が0.5 M以下の塩濃度であるか又は塩を含まず、かつ、pH5～7である、(7)～(13)のいずれか1項に記載の精製方法。

(15) 収率が20%以上である、(1)～(14)のいずれか1項に記載の精製方法。

(16) 前記精製抗体組成物中の全抗体に対する糖鎖付加異性体の割合が5%以下である、(1)～(15)のいずれか1項に記載の精製方法。

(17) 前記抗体粗精製物中の全抗体に対する糖鎖付加異性体の割合が5%より大きい、(16)に記載の精製方法。

(18) (1)に記載の抗hDLK-1抗体組成物の精製方法であって、抗体粗精製物を、ベンジル基若しくはブチル基を有する粒子径20～100 μmの担体を用いたコンベンショナルクロマトグラフィに負荷すること、

前記担体に、Fc領域糖鎖付加コンセンサス領域以外の部位に糖鎖が付加していない抗体を吸着させること、

pH 4～6の洗浄液で前記担体を1回以上洗浄することにより糖鎖付加異性体を除去すること、及び、

0.5 M以下の塩濃度又は塩を含まないpH 5～7の溶出液で前記担体に吸着した前記抗体を溶出させて精製抗体組成物を得ることを含み、

ここで、前記精製抗体組成物における、全抗体に対する糖鎖付加異性体の割合が、前記抗体粗精製物と比較して低減している、
前記方法。

(19) (1)に記載の抗体組成物の精製方法であって、

0.5 M以上の塩濃度に調整された前記抗体粗精製物を、ベンジル基若しくはブチル基を有する粒子径20～100 μm の担体を用いたコンベンショナルクロマトグラフィに負荷して糖鎖付加異性体を素通り画分に除去すること、

前記担体を洗浄液で洗浄すること、及び、

0.5 M以下の塩濃度又は塩を含まない、pH 5～7の溶出液で前記担体に吸着した前記抗体を溶出させて精製抗体組成物を得ることを含み、

ここで、前記精製抗体組成物における、全抗体に対する糖鎖付加異性体の割合が、前記抗体粗精製物と比較して低減している、
前記方法。

(20) (1)に記載の抗体組成物の精製方法であって、

pH 4～6に調整された前記抗体粗精製物を、ベンジル基若しくはブチル基を有する粒子径20～100 μm の担体を用いたコンベンショナルクロマトグラフィに負荷して糖鎖付加異性体を素通り画分に除去すること、

前記担体を洗浄液で洗浄すること、及び、

0.5 M以下の塩濃度又は塩を含まない、pH 5～7の溶出液で前記担体に吸着した前記抗体を溶出させて精製抗体組成物を得ることを含み

ここで、前記精製抗体組成物における、全抗体に対する糖鎖付加異性体の

割合が、前記抗体粗精製物と比較して低減している、
前記方法。

(21) 前記コンベンショナルクロマトグラフィの担体の単位量あたりのタンパク質負荷量が20 g/L以上であり、かつ、前記洗浄が、5担体容量以上の洗浄液を流すことにより行われる、(1)～(20)のいずれか1項に記載の方法。

(22) (1)～(21)のいずれか1項に記載の精製方法を含む、Fc領域糖鎖付加コンセンサス領域以外の部位に糖鎖が付加していない抗体の、全抗体に対する割合が95%以上である抗体組成物の製造方法。

(23) 重鎖が配列番号2、4、6、8、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、及び36から選択されるアミノ酸配列を有し、かつ軽鎖が配列番号10又は配列番号12に記載のアミノ酸配列を有する、抗hDLK-1抗体精製組成物の製造方法であって、

抗体粗精製物を、ベンジル基若しくはブチル基を有する粒子径20～100 μmの担体を用いたコンベンショナルクロマトグラフィに負荷すること、
前記担体に、Fc領域糖鎖付加コンセンサス領域以外の部位に糖鎖が付加していない抗体を吸着させること、

0.5 M以上の塩を含む洗浄液で前記担体を1回以上洗浄することにより糖鎖付加異性体を除去すること、及び

0.5 M以下の塩濃度又は塩を含まないpH 5～7の溶出液で前記担体に吸着した前記抗体を溶出させて精製抗体組成物を得ることを含み、

ここで、前記精製抗体組成物における、全抗体に対する糖鎖付加異性体の割合が、前記抗体粗精製物と比較して低減している、
前記方法。

(24) (22)又は(23)に記載の製造方法により製造された抗体組成物。

(25) 重鎖が配列番号2、4、6、8、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、及び36から選択されるアミノ酸

配列を有し、かつ軽鎖が配列番号 10 又は配列番号 12 に記載のアミノ酸配列を有する抗 h D L K - 1 抗体粗精製物から、F c 領域糖鎖付加コンセンサス領域以外の部位に糖鎖が付加した糖鎖付加異性体を除去する方法であって、

抗体粗精製物を疎水性相互作用クロマトグラフィ担体に負荷して、F c 領域糖鎖付加コンセンサス領域以外の部位に糖鎖が付加していない抗体を前記担体に吸着させること、

前記担体を洗浄液で洗浄すること、及び、

前記担体から溶出液で溶出させることにより、前記担体に吸着した前記抗体を溶出させて精製抗体組成物を得ることを含む、

前記方法。

(26) 重鎖が配列番号 2、4、6、8、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、及び 36 から選択されるアミノ酸配列を有し、かつ軽鎖が配列番号 10 又は配列番号 12 に記載のアミノ酸配列を有する、抗 h D L K - 1 抗体組成物であって、F c 領域糖鎖付加コンセンサス領域以外の部位に糖鎖が付加していない抗体を、全抗体の 95% 以上含有する、前記抗体組成物。

(27) 重鎖が配列番号 2、4、6、8、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、及び 36 から選択されるアミノ酸配列を有し、かつ軽鎖が配列番号 10 又は配列番号 12 に記載のアミノ酸配列を有する、抗 h D L K - 1 抗体であって、F c 領域糖鎖付加コンセンサス領域以外の部位に糖鎖が付加していない、前記抗体。

発明の効果

[0022] 本発明は、抗体の糖鎖付加コンセンサス領域以外に糖鎖が付加した糖鎖付加異性体を低減・除去することが可能である。

[0023] 本願発明の第一の効果としては、糖鎖付加異性体の割合が減少した医療用抗体組成物の提供を行うことができる。これにより当該方法により精製され糖鎖付加異性体が低減された高純度の抗体組成物は、より純度の高い医薬品

製剤とすることができる。

[0024] 本願発明の第二の効果としては、糖鎖付加異性体を除去した医療用抗体組成物の提供を行うことができる。これにより活性本体の純度の非常に高い組成物、すなわち有効性と安全性において優れる医薬組成物として提供することができる。

特に、本発明において精製された抗hDLK-1抗体の精製組成物は、活性を持たない不純物である糖鎖付加異性体が除去されていることから、有効性と安全性において優れる医薬組成物として提供することができる。

図面の簡単な説明

[0025] [図1]ヒト化抗hDLK-1モノクローナル抗体を産生する細胞の培養液から取得した粗精製物のHIC-HPLC分析パターンを示すグラフである。

[図2]ヒト化抗hDLK-1モノクローナル抗体を一過性発現したCHO細胞による培養上清のProtein A精製後のSDS-PAGE分析の結果を示す写真である。

[図3]Capto Butyl疎水性相互作用クロマトグラフィ担体による抗体組成物の分離プロファイルを示すグラフである。

[図4]Capto Butyl担体で分離した精製抗体組成物のHIC-HPLCによる純度分析試験の結果を表すグラフ及び表である。表中のPeak 1及びPeak 2は糖鎖付加異性体抗体（Peak 1は4本のポリペプチド鎖の1か所のCDRに糖鎖が結合、Peak 2は2か所のCDRに糖鎖が結合）、Peak 3は糖鎖付加コンセンサス領域のみに糖鎖が結合した抗体の割合（%）を示す。

[図5A]Capto Butyl担体による抗体組成物の分離プロファイルを示すグラフである。

[図5B]Poros Benzyl Ultra担体による抗体組成物の分離プロファイルを示すグラフである。

[図6]POROS Benzyl Ultra担体を用いたクロマトグラフィ条件の最適化による糖鎖付加異性体含量の制御を実験計画法により解析した

結果を表すグラフである。

[図7]抗体組成物の精製プロセスにおけるクロマトグラフィステップのシーケンスを表す図である。

[図8]疎水性相互作用クロマトグラフィにおける洗浄液量を変化させたときの溶出パターン及び収率と純度を示すグラフである（上図：洗浄液1が6 CVで洗浄液2が5 CVの条件、中図：洗浄液1が8 CVで洗浄液2が5 CVの条件、下図：洗浄液1が15 CVで洗浄液2が5 CVの条件）。

[図9]HIC-HPLC分析を用いた抗体粗精製物の精密分取による単離成分の分析データを示す。（a）単離前の抗体粗精製物のHIC-HPLC分析の結果を示す。（b）（a）のHIC-HPLCにおいてメインピークとして分取された画分のHIC-HPLC分析の結果を示す。（c）（a）のHIC-HPLCにおいて前ピークとして分取された画分のHIC-HPLC分析の結果を示す。

[図10]糖鎖付加異性体のADCC活性を評価した結果を表すグラフである。縦軸がADCC活性を示す蛍光強度、横軸は抗体濃度を示す。丸は図9（b）のメインピークとして分取された画分（糖鎖付加異性体を含まない成分）、四角は図9（c）の前ピークとして分取された画分（糖鎖付加異性体）、三角は図9（a）の単離前の抗体粗精製物の結果を示す。

[図11]HuBA-1-3D-1のH鎖（ γ 1鎖）のコーディング領域の塩基配列（配列番号37）とアミノ酸配列（配列番号38）を示す。アミノ酸は一文字表記で表し、ターミネーションコドンの位置は“.”で示している。

[図12]HuBA-1-3D-2のH鎖（ γ 1鎖）のコーディング領域の塩基配列（配列番号41）とアミノ酸配列（配列番号42）を示す。アミノ酸は一文字表記で表し、ターミネーションコドンの位置は“.”で示している。

[図13]L鎖（ κ 鎖）のコーディング領域の塩基配列（配列番号69）とアミノ酸配列（配列番号70）を示す。図中、アミノ酸は一文字表記で表し、ターミネーションコドンの位置は“.”で示している。

[図14]HuBA-1-3D-1 T73KのH鎖（ γ 1鎖）のコーディング

領域の塩基配列（配列番号53）とアミノ酸配列（配列番号54）を示す。アミノ酸は一文字表記で表し、ターミネーションコドンの位置は“・”で示している。上記HuBA-1-3D-1 T73KのVHの推定アミノ酸配列（配列番号18）中、N末端から19アミノ酸からなるペプチドはシグナルペプチドである。HuBA-1-3D-1 T73KのVHの成熟ペプチドのcDNA塩基配列は配列番号19に示し、その推定アミノ酸配列は配列番号20に示す。

[図15]HuBA-1-3D-1 A24G/T73KのH鎖（ γ 1鎖）のコーディング領域の塩基配列（配列番号61）とアミノ酸配列（配列番号62）を示す。アミノ酸は一文字表記で表し、ターミネーションコドンの位置は“・”で示している。上記HuBA-1-3D-1 A24G/T73KのVHの推定アミノ酸配列（配列番号22）中、N末端から19アミノ酸からなるペプチドはシグナルペプチドである。HuBA-1-3D-1 A24G/T73KのVHの成熟ペプチドのcDNA塩基配列は配列番号23に示し、その推定アミノ酸配列は配列番号24に示す。

[図16]HuBA-1-3D-VH1、HuBA-1-3D-VH1 A24G、HuBA-1-3D-VH1 T73K、HuBA-1-3D-VH1 A24G/T73K、HuBA-1-3D-VH2、HuBA-1-3D-VH2 A24G、HuBA-1-3D-VH2 T73K、及びHuBA-1-3D-VH2 A24G/T73Kのアミノ酸配列アラインメントを示す図である。カッコ内は配列表における配列番号を示す。

発明を実施するための形態

[0026] 以下、本発明を詳細に説明する。本発明の範囲はこれらの説明に拘束されることはなく、以下の例示以外についても、本発明の趣旨を損なわない範囲で適宜変更し実施することができる。なお、本明細書は、本願優先権主張の基礎となる特願2021-079977号明細書（令和3年（2021年）5月10日付け出願）の全体を包含する。本明細書において引用された全ての刊行物、例えば先行技術文献、及び公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細

書に組み込まれる。

本明細書において、「糖鎖付加コンセンサス配列」又は「糖鎖結合コンセンサス配列」とは、 $Asn-X-Ser/Thr$ (XはPro以外のアミノ酸) で示されるアミノ酸配列を意味し、抗体中におけるこの配列の位置、及びAsnの存在する位置は問わない。本明細書において、「Fc領域糖鎖付加コンセンサス領域」、「糖鎖付加コンセンサス領域」又は「糖鎖結合コンセンサス領域」とは、抗体のFc部分に存在する通常 Asn_{297} を含む糖鎖付加コンセンサス配列(代表的には、 $Asn_{297}-X-Ser/Thr$ (XはPro以外のアミノ酸))をいう。糖鎖付加コンセンサス配列、及び糖鎖付加コンセンサス領域をコードする塩基配列は、当該アミノ酸配列をコードする配列であれば如何なるものも含まれる。

[0027] 本明細書において「糖鎖付加異性体」とは、糖鎖付加コンセンサス領域以外のアミノ酸に糖鎖が付加している抗体を意味する。糖鎖付加コンセンサス領域以外のアミノ酸に付加している糖鎖を「非コンセンサス糖鎖」という。糖鎖付加異性体において非コンセンサス糖鎖が結合している領域としては、Fab領域、抗原との結合領域であるFv(可変)領域、complementarity determining region(CDR)領域、糖鎖付加コンセンサス領域以外のFc領域、及び融合抗体における融合配列部分が含まれ、代表的には、CDR領域である。非コンセンサス糖鎖の糖鎖付加コンセンサス領域以外のアミノ酸への糖鎖結合様式としては、糖鎖付加コンセンサス配列である $Asn-X-Ser/Thr$ (XはPro以外のアミノ酸) へのN型糖鎖でも良いし、Ser又はThrへのO型糖鎖でも良い。

[0028] 抗体分子の構造は、通常、ヘテロテトラマーであり、2種類の同一ポリペプチド鎖が2個ずつ結合して形成されているため、非コンセンサス糖鎖の結合部位としては理論的に抗体1分子中に2の倍数か所ずつ存在することになる。本発明の精製対象となる抗体粗精製物は、1個以上の非コンセンサス糖鎖を有する抗体を含んでいればよい。抗体1分子当たりの非コンセンサス糖

鎖の結合数は、1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、又は10個以上であってもよい。また、抗体は4本（通常は重鎖2本及び軽鎖2本）のポリペプチド鎖からなるところ、いずれか1本に結合している非コンセンサス糖鎖の結合数が、1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、又は10個以上であってもよい。抗体粗精製物中の非コンセンサス糖鎖の結合可能領域への糖鎖の結合割合率、すなわち、糖鎖付加異性体の存在割合としては、抗体1分子中の片方の「重鎖と軽鎖の組み合わせ」又はそれに該当する構造への非コンセンサス糖鎖が完全に結合している場合を100%とした場合、抗体1分子あたり、0.1%以上200%以下であってもよく、通常、本発明の方法を適用する必要がある場合は、1%以上50%以下である。ここで、200%とは、1分子の抗体において、対となる「重鎖と軽鎖の組み合わせ」の両方（2か所）に非コンセンサス糖鎖が結合していることを意味する。

[0029] 本明細書において「抗体」は、全長抗体の他、抗体断片、全長抗体又は抗体断片と他の物質との融合物を含み、例えば、マウス抗体、マウスーヒトキメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、及び、これらのアミノ酸改変体、付加体、欠失体、置換体、糖鎖改変体などを含む。抗体のイムノグロブリンクラスは特に限定されるものではなく、IgG、IgM、IgA、IgE、IgD、又はIgYのいずれのイムノグロブリンクラス（アイソタイプ）であってもよく、好ましくはIgGである。また、本発明の抗体がIgGの場合、いずれのサブクラス（IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4）であってもよい。抗体断片は、好ましくは抗原結合性断片であり、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fab₃、一本鎖Fv（以下、「scFv」という）、（タンデム）バイスペシフィック一本鎖Fv（sc(Fv)₂）、一本鎖トリプルボディ、ナノボディ、ダイバレントVHH、ペンタバレントVHH、ミニボディ、（二本鎖）ダイアボディ、タンデムダイアボディ、バイスペシフィックトリボディ、バイスペシフィックバイボディ、デュアルアフィニティリ

ターゲティング分子（DART）、トリアボディ（又はトリボディ）、テトラボディ（又は $[sc(Fv)_2]_2$ 、若しくは $(scFv-SA)_4$ ）、ジスルフィド結合Fv（以下、「dsFv」という）、コンパクトIgG、重鎖抗体、又はそれらの重合体を含む。抗体断片と他の物質との融合物としては、融合タンパク質、特にはFc融合タンパク質などが挙げられる。

[0030] 特には、本明細書における抗体としては、重鎖が配列番号2、4、6、8、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、及び36から選択されるアミノ酸配列を有し、かつ軽鎖が配列番号10又は12に記載のアミノ酸配列を有する、抗hDLK-1抗体を意味する。好ましくは、重鎖が配列番号4、8、16、20、24、28、32及び36から選択されるアミノ酸配列を有し、かつ軽鎖が配列番号12に記載のアミノ酸配列を有する、抗hDLK-1抗体である。

[0031] 本明細書において、精製対象となる糖鎖付加異性体を含む抗体組成物は、「抗体粗精製物」という。抗体粗精製物は、糖鎖付加異性体を含む限り、如何なるものでも利用することができる。例えば、抗体粗精製物として、血漿など生体由来組成物又はその処理物、及び抗体遺伝子が組み込まれた形質転換細胞の培養液（培養上清であってもよい、以下同様）又はその処理物があげられる。生体由来組成物としては、トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物などから得られた抗体を含む組成物などがあげられる。形質転換細胞としては、糖鎖を結合できる細胞であれば何れでも良く、具体的には、動物細胞、植物細胞あるいは酵母細胞などの糖鎖を結合できる性質を有する細胞株、さらに具体的には、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、マウスミエローマ細胞であるNS0細胞、SP2/O細胞、ラットミエローマ細胞であるYB2/O細胞、IR93F細胞、シリアンハムスター腎臓由来であるBHK細胞、ヒト胎児腎由来である293細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞、胚性幹細胞、又は、受精卵細胞などに抗体遺伝子を導入した細胞があげられる。前述の細胞株としては、初代不死化細胞株から派生した種々の亜種を利用することも可能である。例えば、CHO細胞で

あれば、CHO K1株、CHO DG44株、CHO S株及びこれらの派生株などを利用できる（Palssonら、Nature Biotechnology 31(8), 759-765, 2013）。これらの細胞を、タンパク質の生産に適した培地で培養することで、培養液として抗体粗精製物が得られる。用いられる培地としては、例えば、血清含有培地、血清アルブミンあるいは血清分画物などの動物由来成分を含まない培地、無血清培地又は無タンパク質培地など、いずれの培地も用いられるが、好ましくは無血清培地、動物由来原料不含培地、無タンパク質培地、完全化学合成培地が用いられる。

[0032] 更に、上記抗体粗精製物としては、ろ過、塩析、1種類以上のクロマトグラフィ、pH調整、緩衝液置換、濃縮、希釈などの処理を行った生体由来組成物や培養液や、生体由来組成物や培養液に対して精製等の操作を行った中間体組成物などの組成物を利用することもできる。精製操作を行った中間体組成物としては、抗体医薬品の製造プロセスを構築するための何れの単位操作の後の溶液であっても利用できる。たとえば、Protein Aアフィニティクロマトグラフィ後、陽イオン交換クロマトグラフィ後、陰イオン交換クロマトグラフィ後、緩衝液交換後、低pH処理後、ろ過後の組成物などが望まれる。

[0033] N型糖鎖の場合、糖鎖付加異性体の存在する可能性については当該抗体のアミノ酸配列又は遺伝子配列から推定することができる。また、糖鎖の型によらず、抗体のペプチドマッピング及び質量分析により、糖鎖結合位置を推定することができる。より簡便な方法としては、ペプチド-N-グリコシダーゼ（PNGase）処理した抗体と当該処理を行わない抗体をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）して比較することにより、タンパク質の泳動帯の変化として糖鎖の結合を観察することができる。

[0034] 抗体の種類としては、前記に示した通りであるが、本方法は、治療用、診断用又は予防用抗体を含む抗体医薬品としての抗体の生産における精製方法として適している。抗体医薬品は、含まれる抗体の異性体の含量に恒常性が

あることが必要とされ、目的物質由来不純物は可能な限り低減されることが必要であるためである（ICH Q6Bガイドライン）。治療用又は予防用抗体の例としては、リガンドに結合しリガンドの活性を中和する抗体、細胞表面の受容体に結合してリガンドの結合を中和する抗体、細胞表面に結合して細胞自身へ傷害活性を示す抗体があげられる。診断用抗体の例としては、リガンド又は細胞表面の受容体に結合する抗体があげられる。細胞への傷害活性としては、抗体依存性細胞傷害活性（Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity）、補体依存性細胞傷害活性（Complement-Dependent Cytotoxicity）、抗体依存性細胞貪食（Antibody dependent cellular phagocytosis）活性などが挙げられる。また、抗体-薬物複合体（Antibody Drug Conjugate）、放射性標識抗体（Radioisotope-labelled Antibody）などの化学修飾抗体、サイトカイン等との融合抗体、多重特異性抗体（Multi-specific Antibody）（Nature, 580（16）, 330-338（2020））など、糖鎖を有する抗体誘導体であれば本発明の技術を利用できる。

[0035] 更に具体的には、CD3、EGF受容体、CD20、RSウイルス、TNF α 、CD25、IL-6受容体、CD33、VEGF、IgE、補体C5、IL-12、IL-23、IL-1 β 、RANKL、CCR4、HER2、CD30、IL-5、IL-5受容体、 α 4インテグリン、 α 4 β 7インテグリン、PD-1、CD52、IL-17、IL-17A、IL-17受容体、CTLA-4、PCSK9、SLAMF7、BlyS、CD38、PD-L1、IL-4 α 受容体、CD22、CD23、第IXa因子、X因子、CD19、スクレロスチン、DLK-1などのタンパク質抗原（好ましくは、ヒトに由来のタンパク質抗原）に対する抗体の精製に本方法を利用することが可能である。融合タンパク質としては、可溶性TNF受容体Fc融合タンパク質、CTLA4改変Fc融合タンパク質、Fc-TPORアゴニス

トペプチド融合タンパク質、VEGF受容体-Fc融合タンパク質などがあげられる。これらの如何なる抗体あるいは融合タンパク質等の精製に本方法を利用することが可能である。

[0036] 最も望ましい事例の一つは、抗DLK-1抗体の精製である。具体的には、前掲の特許文献4（WO2014/054820）に記載されているヒト化抗ヒトDLK-1抗体であり、例えば、配列番号2、4、6、8、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、及び36から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖（特にはこれらのアミノ酸配列を可変領域として有する重鎖、本段落において以下同様）、及び配列番号10又は12に記載されたアミノ酸配列を有する軽鎖（特にはこれらのアミノ酸配列を可変領域として有する軽鎖、本段落において以下同様）を含む抗体を挙げることができ、好ましくは、配列番号4、8、16、20、24、28、32及び36から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖、及び配列番号12に記載されたアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体である。このようなヒト化抗ヒトDLK-1モノクローナル抗体は、その軽鎖の可変領域に糖鎖結合コンセンサス配列を有する。

[0037] 以下の表1及び2は、前掲の特許文献4（WO2014/054820）に記載されている抗ヒトDLK-1抗体の全長配列を含むものである（下線はシグナル配列を示す。成熟タンパク質においては下線部の配列を含まない。）が、例えば当該抗体においては、四角い枠で囲まれたNSS配列のNが糖鎖結合コンセンサス配列となる。そのため、動物細胞等にこの遺伝子を発現させた場合、糖鎖付加異性体を含む糖鎖組成物が生成する可能性がある。同様に、当該抗DLK-1抗体の配列に類似する配列を有するDLK-1抗体も同様の可能性を有する。こうした糖鎖付加異性体を含む抗体粗精製物から糖鎖付加異性体を除去又は低減する方法として本方法は有用である。なお、以下の表に記載された、HuBA-1-3D-1のH鎖、HuBA-1-3D-2のH鎖、HuBA-1-3D-1 A24GのH鎖、HuBA-1-3D-2 A24GのH鎖、HuBA-1-3D-1 T73KのH鎖、

HuBA-1-3D-2 T73KのH鎖、HuBA-1-3D-1 A24G/T73KのH鎖、HuBA-1-3D-2 A24G/T73KのH鎖、及びHuBA-1-3DのL鎖のアミノ酸配列は、それぞれ順に、配列番号38, 42, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 及び70に記載されている。また、これらの配列からシグナル配列を除いた成熟タンパク質のアミノ酸配列は、それぞれ順に、配列番号40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 及び72に記載されている。本願明細書等において、「H鎖」は重鎖、「L鎖」は軽鎖を意味する。

[0038] HuBA-1-3D VH1及びHuBA-1-3D VH2のCDR1のアミノ酸配列は「DYAMH」（配列番号73）、CDR2のアミノ酸配列は「VISTYYGNTNYNQKFKG」（配列番号74）、及びCDR3のアミノ酸配列は「GGLREYYAMDY」（配列番号75）である。また、HuBA-1-3D VLのCDR1のアミノ酸配列は「KSSQSLLNSSNQKNYLA」（配列番号76）、CDR2のアミノ酸配列は「FASTRES」（配列番号77）、及びCDR3のアミノ酸配列は「QQHYSTPPT」（配列番号78）である。本発明の抗体は、これらのCDRの全部又は一部を有する抗体であってもよい。なお、これらCDR配列は、Kabatら（Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991）の定義に従った。本願明細書等において、「VH」は重鎖可変領域、「VL」は軽鎖可変領域を意味する。

[0039]

[表1]

HuBA-1-3D-1 Heavy chain

MGWSCIIFFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAP
GQGLEWIGVISTYYGNTNYNQKFKGKATMTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGL
REYYYAMDYWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HuBA-1-3D-1 A24G Heavy chain

MGWSCIIFFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGYTFTDYAMHWVRQAP
GQGLEWIGVISTYYGNTNYNQKFKGKATMTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGL
REYYYAMDYWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HuBA-1-3D-1 T73K Heavy chain

MGWSCIIFFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAP
GQGLEWIGVISTYYGNTNYNQKFKGKATMTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGL
REYYYAMDYWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HuBA-1-3D-1 A24G/T73K Heavy chain

MGWSCIIFFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGYTFTDYAMHWVRQAP
GQGLEWIGVISTYYGNTNYNQKFKGKATMTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGL
REYYYAMDYWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0040]

[表2]

HuBA-1-3D-2 Heavy chain

MGWSCIIFFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAP
GQGLEWIGVISTYYGNTNYNQFKGRATMTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGL
REYYYAMDYWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKHTCPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HuBA-1-3D-2 A24G Heavy chain

MGWSCIIFFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGYTFTDYAMHWVRQAP
GQGLEWIGVISTYYGNTNYNQFKGRATMTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGL
REYYYAMDYWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKHTCPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HuBA-1-3D-2 T73K Heavy chain

MGWSCIIFFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAP
GQGLEWIGVISTYYGNTNYNQFKGRATMTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGL
REYYYAMDYWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKHTCPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HuBA-1-3D-2 A24G/T73K Heavy chain

MGWSCIIFFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGYTFTDYAMHWVRQAP
GQGLEWIGVISTYYGNTNYNQFKGRATMTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGL
REYYYAMDYWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKHTCPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

HuBA-VH1-3D LC Light chain

MESQTQVLMFLLLWVSGACADIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLINSSN
QKNYLA
WYQQKPGQPPKLLVYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYST
PPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0041] 抗体粗精製物と比較して糖鎖付加異性体の含有量が減少した抗体組成物（

本明細書において、「精製抗体組成物」という)は、糖鎖付加異性体を含む抗体粗精製物を出発原料として、コンベンショナルクロマトグラフィに供することで得られる。よって、本発明は、抗体粗精製物の精製方法であって、前記抗体粗精製物をコンベンショナルクロマトグラフィに負荷して、Fc領域糖鎖付加コンセンサス領域以外の部位に糖鎖が付加していない抗体を前記担体に吸着させること、及び前記担体を溶出液で溶出させることにより、前記担体に吸着した前記抗体を溶出させて精製抗体組成物を得ることを含み、得られた精製抗体組成物における、Fc領域糖鎖付加コンセンサス領域以外の部位に糖鎖が付加した糖鎖付加異性体の含有量が、精製前の抗体粗精製物と比較して減少している方法に関する。

[0042] コンベンショナルクロマトグラフィで使用する担体としては、疎水性相互作用クロマトグラフィ担体、疎水クロマトグラフィ担体、若しくは、ミックスモードクロマトグラフィ担体（マルチモードクロマトグラフィ担体ともいう、好ましくは疎水クロマトグラフィの性質をもつミックスモードクロマトグラフィ担体）を利用することができる。疎水性相互作用クロマトグラフィ担体としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、オクチル基、ヘキシル基、プロピレングリコール基、フェニル基、アルキルフェニル基、ベンジル基、アルキルベンジル基などの疎水性官能基をベース基材に結合したものをを用いることができる。ミックスモードクロマトグラフィ担体としては、前記の疎水性官能基とイオン交換性の官能基を任意の割合で混合したものが挙げられる。例えば、N-ベンジル-N-メチルエタノールアミンなどを官能基として利用することができる。陽イオン交換性の官能基の代表的なものにはCM (Carboxymethyl、 $-O-CH_2-COOH$)、SP (Sulphopropyl、 $-O-C_3H_6-SO_3H$) などが挙げられ、陰イオン交換性の代表的なものにはDEAE (Diethylaminoethyl、 $-O-C_2H_4-N-(C_2H_5)_2$)、QAE (Quaternized aminoethyl又はDiethyl-(2-hydroxypropyl)-aminoethyl、 $-O-C_2H_4-N-(C_2H_5)_2(CH_2$

—CH(OH)—CH₂)) などが挙げられ、これらを利用できる。担体の基材としてはセルロース、セファデックス、架橋アガロース、ポリアクリドアミド、メタクリレート及び各種合成ポリマーが挙げられる。担体は細孔があってもなくても、何れでも利用できる。ミックスモードクロマトグラフィ担体の別の形態としては、ハイドロキシアパタイト (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) やフルオロアパタイト (Ca₁₀(PO₄)₆F₂) のようにリン酸カルシウム等の官能基を持つものが挙げられる。

[0043] クロマトグラフィ担体は市販品として入手して利用することができる。具体的には、Butyl-Sepharose (登録商標) 4 Fast Flow (平均粒子径90 μm)、Butyl-Sepharose 6 Fast Flow (平均粒子径90 μm)、Octyl-Sepharose (登録商標) 4 Fast Flow (平均粒子径90 μm)、Phenyl-Sepharose (登録商標) 6 Fast Flow (high sub) (平均粒子径90 μm)、Phenyl-Sepharose (登録商標) 6 Fast Flow (low sub) (平均粒子径90 μm)、Butyl-Sepharose (登録商標) High Performance (平均粒子径90 μm)、Phenyl-Sepharose High Performance (平均粒子径90 μm)、SOURCE 15 ETH (平均粒子径15 μm)、SOURCE 15 ISO (平均粒子径15 μm)、SOURCE 15 PHE (平均粒子径15 μm)、Capto Phenyl (High Sub) (平均粒子径90 μm)、Capto Butyl (平均粒子径90 μm)、Capto Octyl (平均粒子径90 μm)、Capto Phenyl ImpRes (平均粒子径36–44 μm)、Capto Butyl ImpRes (平均粒子径36–44 μm)、Capto adhere (平均粒子径90 μm)、Capto adhere ImpRes (平均粒子径36–44 μm)、Capto MMC (平均粒子径90 μm)、Capto MMC ImpRes (平均粒子径36–44 μm)、Capto Co

re 700 (平均粒子径 $90\mu\text{m}$)、ReadyToProcess Adsorber Phenyl (以上、Cytiva社、英国)、TOYOPEARL (登録商標) Butyl-600 (平均粒子径 $40-90\mu\text{m}$)、TOYOPEARL (登録商標) Phenyl-600 (平均粒子径 $40-90\mu\text{m}$)、TOYOPEARL (登録商標) PPG-600 (平均粒子径 $40-90\mu\text{m}$)、TOYOPEARL (登録商標) Butyl-650 (平均粒子径 $40-90\mu\text{m}$)、TOYOPEARL (登録商標) Phenyl-650 (平均粒子径 $40-90\mu\text{m}$)、TOYOPEARL (登録商標) SuperButyl-550 (平均粒子径 $40-90\mu\text{m}$)、TOYOPEARL (登録商標) Hexyl-650 (平均粒子径 $50-150\mu\text{m}$)、TOYOPEARL (登録商標) Ether-650 (平均粒子径 $40-90\mu\text{m}$) (以上、東ソー社製)、POROS Ethyl (平均粒子径 $50\mu\text{m}$)、POROS Benzyl (平均粒子径 $50\mu\text{m}$)、POROS Benzyl Ultra (平均粒子径 $50\mu\text{m}$) (以上、Thermo Fisher社製)、Macro-Prep t-Butyl HIC (平均粒子径 $50\mu\text{m}$)、Macro-Prep Methyl HIC (平均粒子径 $50\mu\text{m}$)、セラミックハイドロキシアパタイト (平均粒子径 $20-80\mu\text{m}$)、セラミックフルオロアパタイト (平均粒子径 $20-80\mu\text{m}$)、バイオゲルHT (平均粒子径 $20-80\mu\text{m}$) (以上、バイオ・ラッド社製)、QMA Spherosil (平均粒子径 $50\mu\text{m}$)、Methyl Ceramic Hyper D (平均粒子径 $50\mu\text{m}$) (以上、ポール社製)、Fractogel EMD Phenyl (S) (平均粒子径 $20-90\mu\text{m}$)、Fractogel EMD Propyl (S) (平均粒子径 $20-90\mu\text{m}$) (以上、メルク社製)、Cellufine MAX Phenyl (平均粒子径 $40-130\mu\text{m}$)、Cellufine MAX Phenyl LS (平均粒子径 $40-130\mu\text{m}$)、Cellufine MAX Butyl (平均粒子径 $40-130\mu\text{m}$) (以上、JNC社製)、ブチル化キトパール、フェニル化

キトパール（以上、富士紡ホールディングズ社製）等の担体が挙げられ、これらの担体からより適切な担体を選択され、使用される。より好ましくは、Capto Butyl、POROS Benzyl Ultra、POROS Butyl Ultraなどの担体である。

[0044] 本発明の精製目的で使用されるクロマトグラフィ担体の平均粒子径は、 $15\mu\text{m}$ 以上、 $20\mu\text{m}$ 以上、 $30\mu\text{m}$ 以上、又は $40\mu\text{m}$ 以上とすることができる。また、クロマトグラフィ担体が処理できる抗体粗精製物の液量としては、 100mL 以上、 1L 以上、 10L 以上、又は 100L 以上とすることができる。この担体を充填したクロマトグラフィ用カラムは 100mL ～ $1,000\text{L}$ 程度（直径 5cm ～ 2m 程度）までの容量のものが使用できる。クロマトグラフィ精製に供される抗体粗精製物の量は、少なくとも 1L 以上であり、望ましくは 10L 以上、より望ましくは 100L 以上、更に望ましくは 500L 以上、最大 $20,000\text{L}$ 程度までである。このような大量の抗体粗精製物を処理することが必要となるため、クロマトグラフィにおける線流速は $1,000\text{cm/hr}$ 以下、望ましくは 500cm/hr 以下である。精製に供される抗体の量としてはタンパク質量として 10g 以上であり、望ましくは 100g 以上、より望ましくは 1kg 以上、更に望ましくは 10kg 以上である。本技術で除去又は低減すべき糖鎖付加異性体は、クロマトグラフィで溶出される抗体のうち前半の画分に含まれ、目的とする所望の抗体を後半の画分に溶出することで、糖鎖付加異性体を分別・除去するものである。

[0045] 糖鎖付加異性体を含む抗体粗精製物をコンベンショナルクロマトグラフィに負荷する条件としては、少なくとも目的の成分である糖鎖付加コンセンサス領域のみに糖鎖が付加した抗体（非糖鎖付加異性体抗体）をクロマトグラフィ担体に吸着できる条件が必要である。抗体の吸着は抗体及びクロマトグラフィ担体の疎水性・親水性の程度からなる相互作用により生じる。緩衝液としては、疎水性相互作用クロマトグラフィ、疎水クロマトグラフィ、ミックスモードクロマトグラフィに通常使用する緩衝液を利用できる。抗体がク

ロマトグラフィの条件において安定であれば何れでも良く、たとえば、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、ホウ酸緩衝液、酒石酸緩衝液、MES緩衝液、HEPES緩衝液、MOPS緩衝液、アミノ酸緩衝液、及び、これらの混合緩衝液があげられる。これらの緩衝液の濃度は、0.1 mM～300 mM程度の一般的に使用される範囲で任意に選択可能である。緩衝液のpHは、pH4～8の範囲で任意に選択できるが、pH4～6が望ましい。

[0046] これらの緩衝液に、硫酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウムなどの塩類を、抗体が沈殿を生成しない程度に必要な応じて適量加え、前記のクロマトグラフィ担体との相互作用を増強させることで、クロマトグラフィ担体への吸着を行うことができる。前記の塩類は任意に1種類以上から選択することができ、塩濃度としては、300 mM～2 Mの範囲で抗体が安定に存在し、クロマトグラフィ担体に抗体が十分吸着できる濃度が使用される。1 M程度の塩濃度が好ましく、抗体を吸着可能な低い塩濃度が好まれる。単位量あたりのクロマトグラフィ担体に吸着できる抗体の量は、クロマトグラフィ担体の種類や緩衝液の条件により様々であるが、担体1 mgあたり10 mg以上の抗体、好ましくは担体1 mgあたり20 mg以上の抗体を吸着させることができる。クロマトグラフィの操作は0℃～40℃の任意の温度で実施可能である。室温での操作が望ましく、温度が管理された条件での操作がより望ましい。

[0047] 前述の条件において、糖鎖付加異性体を含む抗体粗精製物がクロマトグラフィに負荷された後、溶出により分離精製が行われる。クロマトグラフィによる糖鎖付加異性体の分離は、抗体をクロマトグラフィ担体に吸着させた後、段階的、連続的、又はそれらを組合せて、カラムに流す緩衝液の塩濃度を低下させるか、pHを上げるか、導電率を低下させるか、又はこれらの組合せで行うことができる。クロマトグラフィ担体に抗体を吸着させた後、まず糖鎖付加異性体を主に溶出させ、次いで、糖鎖付加コンセンサス領域のみに糖鎖が付加した抗体（非糖鎖付加異性体抗体）を溶出させることで、目的と

する精製抗体組成物を調製することができる。「溶出」とはクロマトグラフィ担体に疎水性相互作用等で結合した抗体成分の担体への結合を弱め、クロマトグラフィ担体から当該抗体成分を排出することをいう。糖鎖付加異性体を溶出させる条件としては、糖鎖付加異性体とクロマトグラフィ担体との相互作用が、非糖鎖付加異性体抗体とクロマトグラフィ担体との相互作用と比較して十分弱い緩衝液の条件である。当該条件の当該緩衝液を十分量用いてクロマトグラフィ担体を洗浄することで、目的の抗体である非糖鎖付加異性体抗体のみをクロマトグラフィ担体に吸着させたまま糖鎖付加異性体のみを溶出除去することができる。

[0048] 糖鎖付加異性体を溶出除去する（洗浄する）ための緩衝液は、非糖鎖付加異性体抗体を溶出する緩衝液との間で、10 mM以上の塩濃度の違い、及び／又は、0.2ユニット以上のpHの違いがあれば何れの緩衝液も利用できる。非糖鎖付加異性体抗体をクロマトグラフィ担体に高塩濃度（通常300 mM～2 Mの範囲となる）で吸着させた後、クロマトグラフィ担体を洗浄する洗浄液の塩濃度は、溶出させる塩濃度に対して同等以上の範囲とすることができる。例えば、抗体を溶出させる際の塩濃度に対して、同等又は同等から1 M高い塩濃度までの範囲、若しくは、同等から0.5 M高い塩濃度までの範囲、又は、抗体を溶出させる際の塩濃度よりも10 mM以上高い塩濃度とすることができ、例えば、0.5 M以上又は1.0 M以上とすることができる。洗浄液のpHは、抗体を吸着させる際のpHに対して、同等又は最大2ユニット高いpHまでの範囲、あるいは、溶出時のpHに対して、同等又は最大2ユニットまでの低い範囲とすることができる。例えば、洗浄液のpHは、溶出液のpHより0.2ユニット低いpHであってよい。洗浄液のpHは、pH4～8の範囲内であってよい。また、糖鎖付加異性体を溶出除去するための緩衝液（洗浄液）の通液量としては、クロマトグラフィ担体容量に対して2担体容量（CV）以上、3 CV以上、4 CV以上、5 CV以上、10 CV以上、15 CV以上、又は20 CV以上、あるいは5～20 CV、5～15 CV、5～10 CV、又は10～20 CVとすることができる。

- [0049] 抗体粗精製物の負荷から洗浄までのpH及び／又は塩濃度の変化は段階的（一段階若しくはそれ以上、二段階若しくはそれ以上、三段階若しくはそれ以上、数段階など）であってもよいし、連続的であってもよい。抗体粗精製物の負荷から洗浄までのpHの範囲は通常4～6の範囲内である。
- [0050] 上記塩濃度、pH、及び／又は洗浄液量の条件は原料として用いる抗体粗精製物中の糖鎖付加異性体の含量、及び、抗体の等電点やアミノ酸配列などの抗体そのものの特性などに応じて適宜設定することができる。
- [0051] 本明細書における、クロマトグラフィによる糖鎖付加異性体の分離方法は、糖鎖付加異性体をクロマトグラフィ担体から素通り（フロースルー）させること、次いで、糖鎖付加コンセンサス領域のみに糖鎖が付加した抗体を溶出させることを含んでもよく、これにより、非糖鎖付加異性体抗体の純度の高い精製抗体組成物を調製することも可能である。素通り（フロースルー）とは、クロマトグラフィ担体を充填したカラムに抗体粗精製物を負荷した際に、糖鎖付加異性体をクロマトグラフィ担体に吸着させずにそのままカラム外へ溶出させることをいう。この場合、抗体粗精製物中の糖鎖付加異性体はクロマトグラフィ担体との弱い相互作用を有する場合があるが、平衡化緩衝液（望ましくは1カラム容量以上）を連続あるいは断続的に通液することで、不要な糖鎖付加異性体を含む成分をカラム外に排除することができる。糖鎖付加異性体を特異的に素通りさせるための緩衝液としては、糖鎖付加異性体とクロマトグラフィ担体との相互作用が、糖鎖付加コンセンサス領域のみに糖鎖が結合した抗体とクロマトグラフィ担体との相互作用と比較して十分弱い条件の緩衝液を選択する。十分量の当該緩衝液を用いてクロマトグラフィ担体から糖鎖付加異性体のみを素通りさせることで、目的の抗体のみをクロマトグラフィ担体に吸着させることができる。次いで、前記緩衝液とは塩濃度等の条件の異なる緩衝液を使用し、結合した抗体をクロマトグラフィ担体から溶出して所望の精製抗体組成物を調製する。
- [0052] 糖鎖付加異性体のみを素通りさせる緩衝液としては、糖鎖付加コンセンサス領域のみに糖鎖が結合した抗体を溶出する溶出液と比較して、10mM以

上の塩濃度の違い（10 mM以上高い塩濃度）、及び／又は、0.2ユニット以上のpHの違い（0.2以上低いpH）があれば何れの緩衝液も素通り用洗浄液として利用できる。緩衝液の塩濃度は、非糖鎖付加異性体抗体を担体から溶出させる塩濃度に対して、同等又は1 M高い塩濃度までの範囲（好ましくは0.5 M高い塩濃度までの範囲）とすることができる。この際の塩濃度は、通常、抗体を溶出させる塩濃度に対して100%以上の範囲となる。あるいは、抗体の吸着時のpHに対して同等又は最大2ユニットまでの高いpHの範囲での洗浄液、若しくは、溶出時のpHに対して同等又は最大2ユニットまでの低いpHの範囲の洗浄液で洗浄する。pH又は／及び塩濃度の変化は一段階でも数段階でもよく、連続的でもよい。また、通常、当該緩衝液の塩濃度やpHは、原料となる抗体粗精製物をクロマトグラフィ担体にかける前に適切な範囲に調製される。糖鎖付加異性体を素通りさせるための緩衝液（洗浄液）の通液量としては、クロマトグラフィ担体量の2倍以上、望ましくは5倍以上の条件を選択する。洗浄液の通液量として更に望ましくは10～20倍以上である。上記塩濃度、pH、又は／及び、洗浄液量は原料に用いる抗体粗精製物中の糖鎖付加異性体の含量に応じて適宜設定する。

[0053] クロマトグラフィ担体への抗体粗精製物中の抗体の負荷量、すなわち、タンパク質の負荷量は、糖鎖付加異性体の分離能に影響するため、得られる精製抗体組成物が所望の収率及び純度（糖鎖付加異性体の含有量）になるように、クロマトグラフィ担体あたりのタンパク質負荷量を決定する。通常、クロマトグラフィ操作において、タンパク質を担体に吸着できる量には限界があり、最大動的吸着容量（DBC: Dynamic Binding Capacity）などのパラメータを指標にしてクロマトグラフィ操作が管理される。一般的に、最大動的吸着容量以下のタンパク質負荷量とすることで、タンパク質の回収率及び分離能が良好となり所望のクロマトグラフィの分離効果が期待できる。また、本発明の方法では、不要な糖鎖付加異性体が吸着しないように、一定量以上の負荷量とすることが好ましく、少なくともクロマトグラフィ担体1 gの単位量あたり又はクロマトグラフィ担体1 mLの

単位量あたり、20 mg 以上、25 mg 以上、30 mg 以上、又は35 mg 以上、かつ最大動的吸着容量以下のタンパク質の負荷を行うことで糖鎖付加異性体の分離・除去を行う。タンパク質の負荷量は、精製しようとする抗体粗精製物中の糖鎖付加異性体の含量に応じて決定することができる。すなわち、クロマトグラフィ精製前の抗体粗精製物における糖鎖付加異性体の含量が多い場合には、最大動的吸着容量に近い負荷量とすることができる。

[0054] 一態様において本発明の方法は、使用するコンベンショナルクロマトグラフィ担体を分離に供する抗体の性質に応じて選択するステップ、選択したクロマトグラフィ担体による糖鎖付加異性体の分離除去を最適化するステップを含む。

[0055] クロマトグラフィ担体を選択するステップは、まず、前述した塩濃度及び pH 条件下で、任意の2種類以上のクロマトグラフィ担体に精製対象となる抗体粗精製物を負荷し、糖鎖付加コンセンサス領域のみに糖鎖が付加した抗体が吸着した量が多いクロマトグラフィ担体を選択することができる。更に、必要に応じて、塩濃度を段階的又は連続的に低下させた溶出液で溶出して、担体を通じた溶出液中の糖鎖付加異性体及び／又は糖鎖付加コンセンサス領域のみに糖鎖が付加した抗体の量を測定し、糖鎖付加異性体の量が少なく、かつ糖鎖付加コンセンサス領域のみに糖鎖が付加した抗体の量の多い溶出液が得られるクロマトグラフィ担体を、糖鎖付加異性体の分離がより優れたクロマトグラフィ担体として選択することができる。

[0056] 選択したクロマトグラフィ担体による糖鎖付加異性体の分離除去の最適化ステップは、負荷時に使用する緩衝液の組成、濃度、及び pH、添加する塩の種類及び濃度、クロマトグラフィ担体への抗体粗精製物の負荷量、洗浄時の緩衝液の組成、濃度、pH、洗浄回数及び洗浄液量、溶出時の緩衝液の組成、濃度、及び pH、添加する塩の種類及び塩濃度、並びにそれらの変更方法、糖鎖付加異性体の吸着又は素通りによる除去などの条件の検討と選択を行う。これらの最適化のステップは、各々のパラメータについて1つずつ最適化していくこともできるし、実験計画法等の統計解析手法を用いて複数の

パラメータの相互作用を含めて最適条件を選定することもできる。

[0057] 抗体の精製方法には様々なステップがある。多くの抗体の精製プロセスは2ステップ以上の異なるクロマトグラフィのモードで行われているが、通常、3ステップのクロマトグラフィを利用して精製プロセスが構築されることが多い。例えば、プロテインAアフィニティークロマトグラフィ、陽イオン交換クロマトグラフィ、陰イオン交換クロマトグラフィ、ミックスモードクロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィなどのうち、2種類以上が組合せて利用されている。本発明の方法は、これらの抗体の精製プロセス中のコンベンショナルクロマトグラフィを利用した抗体のクロマトグラフィの何れのステップにも組み込むことができる。具体的には、第1ステップにプロテインAアフィニティークロマトグラフィ、第2ステップに陽イオン交換クロマトグラフィ、第3ステップに疎水性相互作用クロマトグラフィを利用した精製プロセスにおいて、第3ステップの疎水性相互作用クロマトグラフィを本発明の方法とすることができる。また、第1ステップにプロテインAアフィニティークロマトグラフィ、第2ステップにミックスモードクロマトグラフィ、第3ステップに疎水性相互作用クロマトグラフィを利用した精製プロセスの場合、第3ステップの疎水性相互作用クロマトグラフィを本発明の方法とすることができる。また、第1ステップにプロテインAアフィニティークロマトグラフィ、第2ステップに疎水性相互作用クロマトグラフィ、第3ステップにミックスモードクロマトグラフィを利用した精製プロセスの場合、第2ステップの疎水性相互作用クロマトグラフィを本発明の方法とすることができる。更に、第1ステップにプロテインAアフィニティークロマトグラフィ、第2ステップに陰イオン交換クロマトグラフィ、第3ステップに疎水性相互作用クロマトグラフィを利用した精製プロセスであれば、第3ステップの疎水性相互作用クロマトグラフィを本発明の方法とすることができる。また、これらのクロマトグラフィのシーケンスにおいて、疎水性相互作用クロマトグラフィと共に、又は疎水性相互作用クロマトグラフィではなく、ミックスモードクロマトグラフィのステップを本発明の方法としてもよい。

[0058] 本発明の方法により、糖鎖付加異性体は効率的に除去され、所望の含量にまで低減された量の糖鎖付加異性体を含む精製抗体組成物を提供可能である。本発明の方法により精製後の精製抗体組成物における糖鎖付加異性体の量の全抗体量に対する割合は、10%以下とすることができ、より望ましくは5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下、0.5%以下、又は0.2%以下とすることができる。また、精製前の抗体粗精製物が含有する糖鎖付加異性体の量の全抗体量に対する割合は、50%以上、20%以上、10%以上、又は5%以上であってもよい。本発明の方法は、糖鎖付加異性体量が低減された抗体を20%以上、40%以上、又は50%以上のステップ収率で得る方法であってもよい。

[0059] 最終精製抗体組成物又は精製後の抗体組成物における、糖鎖付加異性体の含有量及び含有割合、及び精製収率は、前述したクロマトグラフィのパラメータを調整することにより達成することができ、好ましくは、糖鎖付加異性体が任意の量まで低減され、抗体の生産に許容可能な精製収率が得られるように最適化される。

[0060] 糖鎖付加異性体の除去状況の確認は、分析評価用の高速液体クロマトグラフィ (HPLC: High Performance Liquid Chromatography) 又は超高速液体クロマトグラフィ (UHPLC: Ultra High Performance Liquid Chromatography) により行うことができる。これらの分析には、平均粒子径が15 μm 以下の担体を使用され、超高流速かつ超高压でのクロマトグラフィにより糖鎖付加異性体の分離が可能である。例えば、TSK gel Butyl-NPRカラム (平均粒子径2.5 μm 、東ソー社)、TSK gel Phenyl-5PRカラム (平均粒子径10又は13 μm 、東ソー社)、TSK gel Ether-5PWカラム (平均粒子径10 μm 、東ソー社)、TSK gel BioAssist Phenylカラム (平均粒子径10 μm 、東ソー社)、Protein-Pak Hi Res HICカラム (Waters社)、BioPro HICカラム (平

均粒子径2.3又は4 μ m、ワイエムシー社)、Proteomix HICカラム(平均粒子径1.7又は5 μ m、エムエス機器社)、AdvanceBio HICカラム(平均粒子径3.5 μ m、Agilent社)、MAbPac HIC-10LCカラム(平均粒子径5 μ m、ThermoFisher社)、MAbPac HIC-20LCカラム(平均粒子径5 μ m、ThermoFisher社)、MAbPac HIC-Butyl LCカラム(平均粒子径5 μ m、ThermoFisher社)、Shim-pack Bio-HICカラム(平均粒子径4 μ m、島津製作所社)、Shodex HIC PH-814(平均粒子径10 μ m、昭光通商社)、COSMOSIL HIC(平均粒子径5 μ m、nacalaitesque社)などが適している。

[0061] 本発明の方法により精製された精製抗体組成物は、抗体医薬品の活性成分として、ヒト及び動物における種々の疾患の治療薬、予防薬又は診断薬として用いることができる。

[0062] 以下に実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、これは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例 1

[0063] 抗体の糖鎖付加コンセンサス領域以外に糖鎖が結合した抗体粗精製物(培養上清)の調製と組成比の評価

糖鎖付加抗体として、国際公開第2014/054820号に記載された、H鎖、及びL鎖(本願におけるH鎖:配列番号64、L鎖:配列番号72)を有するヒト化抗ヒトDLK-1モノクローナル抗体(以下、「抗hDLK-1抗体」という)を使用した。この抗体は、その軽鎖の可変領域に糖鎖付加コンセンサス配列を有するため、動物細胞等にこの遺伝子を発現させた場合、糖鎖付加異性体を含む糖鎖組成物が生成・混入する可能性がある。

[0064] 抗hDLK-1抗体のアミノ酸配列をコードする遺伝子を有する発現ベクターでCHO細胞DG44株を形質転換し、安定発現細胞株プールDGC8-R-T11-14.2dを調製した。この細胞株プールを用いて、1Lス

ケールのDASGIP（登録商標）Parallel Bioreactor System（Eppendorf社製）バイオリアクタで培養を行った。培養は無血清の完全化学合成培地を用い、13日間のフェドバッチ法によりpH7、34℃～37℃の条件で実施した。この培養上清をProtein Aクロマトグラフィ（MabSelect SuRe担体（Cytiva社））で精製し、抗体組成物を得た。

[0065] <抗体組成物のHIC-HPLC分析>

得られた抗体組成物を以下の条件でHIC-HPLC分析を行った。

HPLC装置：Prominence HPLC System（島津製作所）

分析カラム：TSKgel Butyl-NPRカラム（東ソー、0014947；4.6mm×3.5cm、平均粒子径2.5μm）

移動相A：2.3M硫酸アンモニウムを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）

移動相B：0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）

分析条件：タンパク質濃度2mg/mL×10μL注入、グラジエント0～3分；0%

B、3～15分；0～100% B、15～20分；100% B、流速0.5mL/min、検出波長220nm又は280nm

[0066] 図1に示す通り、三つのピークが分離され、13分付近の溶出時間にメインピーク（ピーク3）、12.5分及び12.0分付近の溶出時間にそれぞれピーク2及びピーク1が検出された。ピーク3は糖鎖付加コンセンサス領域のみに糖鎖が結合した抗体、ピーク2はピーク3の抗体に糖鎖がもう1か所結合した糖鎖付加異性体、ピーク1はピーク3の抗体に糖鎖がもう2か所結合した糖鎖付加異性体と考えられた（実施例2参照）。この分析結果より、上記プール株細胞を培養して得られた抗体粗精製物には、糖鎖付加異性体が約10%含まれていることが確認された。

実施例 2

[0067] 抗体の糖鎖付加コンセンサス領域以外に糖鎖が結合した抗体粗精製物の調製（培養上清）と糖鎖付加状況の確認

抗hDLK-1抗体の重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を有する発現ベクター（pFUSE）、並びに、同抗体の軽鎖の糖鎖結合コンセンサス配列（Asn-Ser-Ser）の三つ目のアミノ酸に点変異に入れた変異配列（Asn-Ser-Ala）及び重鎖のアミノ酸配列をコードする発現ベクター（pFUSE）を用いて、それぞれExp CHO細胞を形質転換し抗体タンパク質の一過性発現を行った。その培養上清をProtein Aアフィニティクロマトグラフィで精製し、得られた抗体粗精製物をペプチド-N-グリコシダーゼF（PNGase F）処理、又は、PNGase F非処理後、還元SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）（銀染色）で分析した。変異前の抗hDLK-1抗体をNSS抗体、及び軽鎖の糖鎖結合コンセンサス配列変異後の抗hDLK-1抗体をNSA抗体と表す。

[0068] その結果、図2に示すように、NSS抗体において、PNGase Fで処理しない条件では25 kDaの軽鎖バンドの上に25 kDaより大きい分子量を持つバンドが見られたが、PNGase Fの処理によりそのバンドが消失した。このことから、NSS抗体には抗体の糖鎖付加コンセンサス領域以外のコンセンサス配列を有する軽鎖に糖鎖が結合していることが確認された。一方、NSAにおいてPNGase Fの処理の有無にかかわらずそのバンドが見られなかった。これらの結果から、一過性発現由来のヒト化抗DLK-1モノクローナル抗体（NSS抗体）の粗精製物には軽鎖にも糖鎖が付加した糖鎖付加異性体が含まれることが分かった。

実施例 3

[0069] 疎水性相互作用クロマトグラフィ担体による糖鎖付加異性体の分離 1

実施例1と同様にして、調製した抗hDLK-1抗体を含む培養上清をProtein Aアフィニティクロマトグラフィで精製し、糖鎖付加異性体を約10%含む同抗体の粗精製物を得た。この抗体粗精製物に終濃度1.0

Mとなるように塩化ナトリウムを添加した後、pH 5.0に調整しクロマトグラフィ担体への負荷用試料とした。

[0070] 当該抗体粗精製物を用い、C a p t o B u t y l（平均粒子径90 μ m、C y t i v a社製）を充填した疎水性相互作用クロマトグラフィカラム（担体容量5 mL）への吸着特性を吸-脱着モードで評価した。カラムへの試料の負荷量は担体あたりのタンパク質量として15 mg/mLとし、流速は300 cm/hとした。以下の移動相の条件でクロマトグラフィを実施した。

移動相A：1 M塩化ナトリウムを含む20 mMクエン酸ナトリウム-15 mM T r i s緩衝液（pH 5.0）

移動相B：20 mMクエン酸ナトリウム-15 mM T r i s緩衝液（pH 5.0）

1. 平衡化：100%移動相A；10カラム容量（CV）
2. 負荷：抗体粗精製物の試料
3. 洗浄：100%移動相A；10 CV
4. 線型グラジエント溶出：40 CVで0%移動相Bから100%移動相Bまで
5. カラム洗浄：1 M水酸化ナトリウム；5 CV

[0071] 図3に溶出クロマトグラム（H I C 3 8 9）を示す。この結果から、C a p t o B u t y l担体を用いた線形グラジエントの条件で担体への抗体成分の吸着が認められた。カラムへの負荷試料、C a p t o B u t y lカラムからの素通り画分、及び、同カラムへの吸着画分について、実施例1のH I C-H P L C分析法で評価した結果を図4に示す。負荷試料中に2.1%（P e a k 1）及び12.1%（P e a k 2）含まれる糖鎖付加異性体は素通り画分（H I C 3 8 9 F l o w - t h r o u g h）に除去され、カラムの吸着画分（H I C 3 8 9 E l u t e）には糖鎖付加異性体が除去された純度100%の抗体（糖鎖付加コンセンサス領域以外に糖鎖が付加していない抗体）（P e a k 3）組成物が得られた。

[0072] 以上の結果から、疎水性相互作用クロマトグラフィ担体（C a p t o B u t y l）を使用することで、糖鎖付加異性体を分離可能であることが分かった。選定されたクロマトグラフィ担体を用いると、糖鎖付加異性体が効率的に素通り画分に除去され、吸着画分に高純度の精製抗体組成物を得られることが分かった。

実施例 4

[0073] 疎水性相互作用クロマトグラフィ担体による糖鎖付加異性体の分離 2

実施例 1 と同様にして、調製したヒト化抗ヒトDLK-1モノクローナル抗体を含む培養上清をP r o t e i n Aアフィニティクロマトグラフィで精製し、糖鎖付加異性体を約10%含む同抗体の粗精製物を得た。この抗体粗精製物に終濃度1.0Mとなるように塩化ナトリウムを添加した後、pHを4.5、4.7、又は5.0に、導電率を70mS/cm以下とし、クロマトグラフィ担体への負荷用試料とした。

[0074] 当該抗体粗精製物を用い、C a p t o B u t y l（平均粒子径90 μ m、C y t i v a社製）、及び、P O R O S B e n z y l U l t r a（平均粒子径50 μ m、T h e r m o F i s h e r社製）の各々の疎水性相互作用クロマトグラフィカラム（担体容量5mL）への吸着特性を吸-脱着モードで評価した。各カラムへのタンパク質試料の負荷量は担体あたりのタンパク質量として20mg/mLで実施し、流速は300cm/hとした。以下の移動相の条件でクロマトグラフィを実施した。

移動相A：1M塩化ナトリウムを含む20mMクエン酸ナトリウム緩衝液（pH4.5、4.7、又は5.0）

移動相B：20mMクエン酸ナトリウム緩衝液（pH4.5、4.7、又は5.0）

1. 平衡化：100%移動相A；5CV
2. 負荷：試料溶液
3. 洗浄：100%移動相A；8CV
4. 洗浄1：100%移動相A；5CV

5. 洗浄2 : 100%移動相B + 0.8 M塩化ナトリウム ; 5 CV

6. 溶出 : 100%移動相B ; 10 CV

7. カラム洗浄 : 水 (適量)

8. カラム洗浄 : 1 M水酸化ナトリウム (適量)

[0075] C a p t o B u t y l と P O R O S B e n z y l U l t r a の溶出クロマトグラムを、それぞれ図5 A及び図5 Bに示す。いずれのpH条件においても、抗体組成物はC a p t o B u t y l 担体に吸着し、その後溶出可能であった。P O R O S B e n z y l U l t r a についても良好な吸着と溶出が認められた。具体的には、図5 A及び図5 Bのグラフにおいて、横軸0～50 mL 付近のピークは吸着されずにカラムから素通りして溶出された抗体 (糖鎖付加異性体) であり、50～300 mL のピークとして溶出された抗体は糖鎖付加コンセンサス領域以外に糖鎖が付加していない抗体がカラムから徐々に溶出されていることを示す。C a p t o B u t y l では、pHにかかわらず洗浄／溶出の全域にわたって抗体が溶出しており、溶出の中間層を回収することにより糖鎖付加コンセンサス領域以外に糖鎖が付加していない抗体を純度高く得られることが示された。また、P o r o s B e n z y l U l t r a では、pHに応じてピークが変動する (pH4.5では抗体が良く吸着して溶出後半にカラムから溶出されるが、pH5.0では80%程度が吸着せず洗浄中に抗体が溶出することから、pHに応じて溶出成分をコントロール可能であることが示された。以上の結果から、C a p t o B u t y l 及びP O R O S B e n z y l U l t r a のいずれを用いても糖鎖付加異性体を分離可能であることから、疎水性相互作用クロマトグラフィ担体を用いた糖鎖付加異性体の分離が可能であることが示された。また、この結果から、疎水性相互作用クロマトグラフィにおいて、洗浄／溶出液のpH、塩濃度、及び、液量を最適化することで、抗体組成物を吸着でき、糖鎖付加異性体の除去を達成できることが示された。

実施例 5

[0076] 疎水性相互作用クロマトグラフィ担体における、負荷時の塩濃度、洗浄時の

塩濃度及びpH、溶出緩衝液の種類による、糖鎖付加異性体の除去効率（純度及び収率）の検討

C a p t o B u t y l と P O R O S B e n z y l U l t r a クロマトグラフィ担体について、段階的溶出により糖鎖付加異性体が除去可能であるか否かを検討した。負荷液としてはP r o t e i n A アフィニティクロマトグラフィで精製した実施例1の抗体粗精製物を0.5M T r i s でpH4.5又はpH5.0に調整したものを使用した。パラメータとして、試料負荷液の塩濃度、洗浄液（洗浄液I、洗浄液II）のpH及び塩濃度、並びに、溶出緩衝液の種類及びpHを検討し、抗体の収率及び精製画分の非糖鎖付加異性体抗体純度（糖鎖付加コンセンサス領域以外に糖鎖が付加していない抗体の純度）（H I C - H P L C 分析法による糖鎖付加異性体の含量）を測定した。試験結果を表3に示す。

[0077]

[表3]

Evaluation design and buffers for the hydrophobic interaction chromatography scouting

Column	Load [M NaCl]	Load [pH]	Wash I [M NaCl]	Wash I [pH]	Wash II [M NaCl]	Wash II [pH]	Wash II [pH]	Wash II [buffer]	Elution [pH]	Elution [buffer]	Yield [%]	Purity Analytical HIC [%]
Capto Butyl	1	4.5	1	4.5	1	4.5	Na-citrate	Na-citrate	5	Na-citrate	73	97.1
	1	4.5	1	5	0.8	5	Histidine	Histidine	5	Histidine	68	98.9
	1	4.5	1	4.5	1	4.5	Na-citrate	Na-citrate	5	Na-citrate	63	99.1
	1	4.5	1	5	1	5	Na-citrate	Na-citrate	6	Na-citrate	60	99.1
	1	4.5	1	4.5	0.8	5	Na-citrate	Na-citrate	5	Na-citrate	59	98.9
	1	4.5	1	5	0.8	5	Na-citrate	Na-citrate	5	Na-citrate	56	99.3
	1	4.5	1	4.5	1	5	Na-citrate	Na-citrate	6	Histidine	41	95.1
	1	4.5	1	6	1	6	Na-citrate	Na-citrate	6	Na-citrate	36	99.2
	1	4.5	1	4.5	1	4.5	Na-citrate	Na-citrate	5	Histidine	23	100
	0.8	5	0.8	5	0.8	5	Na-citrate	Na-citrate	5	Na-citrate	67	100
Parex Benzyl Ultra	0.8	5	0.6	5	0.6	5	Na-citrate	Na-citrate	5	Na-citrate	59	100
	0.6	5	0.6	5	0.6	5	Na-citrate	Na-citrate	5	Napp	54	100
	0.6	5	0.6	5	0.6	5	Na-citrate	Na-citrate	5	Histidine	48	100
	0.8	5	0.8	5	0.55	5	Na-citrate	Na-citrate	5	Na-citrate	47	100
	0.6	5	0.6	5	0.55	5	Na-citrate	Na-citrate	5	Na-citrate	46	100
	0.7	5	0.7	5	0.6	5	Na-citrate	Na-citrate	5	Na-citrate	40	100
	0.6	5	0.6	5	0.6	5	Na-citrate	Na-citrate	6	Na-citrate	39	100
	0.55	5	0.55	5	0.55	5	Na-citrate	Na-citrate	7	Histidine	33	100
	0.9	5	0.9	5	0.8	5	Na-citrate	Na-citrate	6	Na-citrate	39	n/a
	0.6	5	0.6	5	0.6	5	Na-citrate	Na-citrate	5	Na-citrate	39	100

[0078] 各条件で実施したC a p t o B u t y l担体による精製収率は23%～73%であり、H I C－H P L C分析による精製抗体組成物の純度（糖鎖付加異性体を含まない抗体成分）は97.1%～99.3%であった。一方、P O R O S B e n z y l U l t r a担体の精製収率はやや低いものの（33%～67%）、H I C－H P L C分析による精製抗体組成物の純度はすべて100%であった。特に、P O R O S B e n z y l U l t r a担体を使用した条件において、0.8M塩化ナトリウムを含む試料を負荷し、0.8M塩化ナトリウムを含む洗浄液Ⅰ、0.6M塩化ナトリウムを含む洗浄液Ⅱの順で洗浄し、pH6のクエン酸ナトリウム緩衝液で溶出する条件が、純度及び収率の観点で最適であった。

[0079] また、一連の試験の結果、以下のことが明らかとなった。

（i）洗浄液（洗浄液Ⅰ及び／又は洗浄液Ⅱ）のpHを上げると純度が向上する。

（ii）洗浄液（洗浄液Ⅰ及び／又は洗浄液Ⅱ）のpHを上げると収率が低下する。

（iii）溶出液のpHを上げると純度が向上する。

（iv）溶出液のpHを上げると収率が低下する。

（v）負荷液及び／又は洗浄液の塩濃度を下げると収率が低下する。

（vi）抗体組成物の純度として95%以上、理想的には99%以上を達成可能な条件を設定できる。

[0080] 以上の結果が示す通り、疎水性相互作用クロマトグラフィ担体（例えば、C a p t o B u t y lとP O R O S B e n z y l U l t r a）において、負荷液の塩濃度及びpH、洗浄液の塩濃度及びpH、洗浄液量、洗浄回数、溶出時のpH及び緩衝液の種類を最適化することにより、収率及び糖鎖付加異性体の混入量を最適化できることが分かった。

実施例 6

[0081] 糖鎖付加異性体の混入率及び目的物質の純度及び収率を制御するための洗浄条件の最適化

実施例 1 と同様にして調製した抗 h D L K - 1 抗体を含む培養上清を P r o t e i n A アフィニティクロマトグラフィで精製し、糖鎖付加異性体を約 10 % 含む同抗体の粗精製物を得た。この抗体粗精製物に終濃度 1 . 0 M となるように塩化ナトリウムを添加した後、p H 及び導電率を適宜調整し、クロマトグラフィ担体への負荷用試料とした。当該抗体粗精製物を用い、P O R O S B e n z y l U l t r a 担体を用いて、試料の負荷量、洗浄液 I 及び洗浄液 II の液量をインプットパラメータとして、アウトプットパラメータである収率及び H I C - H P L C 分析による純度を評価した。

[0082] その結果、クロマトグラフィ担体単位量あたりのタンパク質負荷量を 25 g / L 以上、洗浄液 I 及び洗浄液 II を 5 ~ 15 カラム容量 (C V) に調整することで、97 ~ 100 % の純度で収率を 40 ~ 80 % に制御できることが分かった (表 4)。特に、タンパク質の負荷量は 25 g / L よりも 30 g / L 又は 35 g / L のほうが得られる精製抗体組成物の純度は高い傾向があった。また、洗浄液量を増大させることで、得られる精製抗体組成物の収率は低下するが純度が向上する傾向があった。この結果は、タンパク質の負荷量が低い条件では、洗浄液量を増やすことで、精製抗体組成物の純度を高められることを示した。

すなわち、この結果から、クロマトグラフィにおけるタンパク質負荷量を一定以上にすること、及び / 又は、洗浄液量を適切に管理することにより、糖鎖付加異性体の含有量を約 10 % から 3 ~ 0 % の範囲へ低減し管理できることが明らかとなった。実験計画法 (D o E : D e s i g n o f E x p e r i m e n t) により当該結果を解析した結果を図 6 に示す。洗浄液 I 及び洗浄液 II の液量と収率及び純度への影響が等高線図として現わされ、任意の収率及び純度を洗浄液量で管理できることが明らかとなった。

[0083]

[表4]

Evaluation design and buffers for the hydrophobic interaction chromatography scouting with Poros Benzyl Ultra.

Run	Run ID	Load Mass [g/L]	Flow rate [cm/h]	Wash I [CV]	Wash II [CV]	Yield [%]	Purity [analytical HIC]
1	HIC 464 001	25	300	10	7.5	73.0	98.4
2	HIC 464 002	30	300	10	5	64.0	99.6
3	HIC 464 003	25	300	15	10	65.4	99.6
4	HIC 464 004	35	300	15	5	50.0	100
5	HIC 464 005	35	300	10	7.5	49.4	100
6	HIC 464 006	25	300	15	5	69.4	99.1
7	HIC 464 007	30	300	5	7.5	62.7	99.6
8	HIC 464 008*	30	300	10	7.5	59.5	100
9	HIC 464 009*	30	300	10	7.5	58.5	100
10	HIC 464 010	30	300	15	7.5	54.8	100
11	HIC 464 011	35	300	5	5	57.1	100
12	HIC 464 012	35	300	15	10	44.4	100
13	HIC 464 013	30	300	10	10	56.1	100
14	HIC 464 014*	30	300	10	7.5	58.2	100
15	HIC 464 015	35	300	5	10	48.7	100
16	HIC 464 016	25	300	5	5	74.0	97.1
17	HIC 464 017	25	300	5	10	66.1	99.0
18	HIC 467 001	40	200	15	5	40.4	n/a
19	HIC 467 002	35	200	15	5	46.2	n/a

* triplicate run

実施例 7

[0084] 精製プロセス内の糖鎖付加異性体の除去ステップの位置、及び、洗浄液量の純度への影響

実施例 1 と同様にして調製した抗 hDLK-1 抗体を含む培養上清を Protein A アフィニティクロマトグラフィーで精製し、糖鎖付加異性体を約 10% 含む同抗体の粗精製物を得た。この抗体粗精製物を pH 3~4 に一定時間保持し、中和したものをクロマトグラフィー担体への負荷用試料とした。

[0085] この抗体粗精製物について、図 7 に示す 2 種類のフローで疎水性相互作用

クロマトグラフィの後にミックスモードクロマトグラフィ、又は、ミックスモードクロマトグラフィの後に疎水性相互作用クロマトグラフィの順で精製した。疎水性相互作用クロマトグラフィ担体はPOROS Benzyl Ultra、ミックスモードクロマトグラフィ担体はCaptor MMCを用いた。疎水性相互作用クロマトグラフィの条件は以下の通りとした。ID No. HIC446、HIC457、及びHIC463は、疎水クロマトグラフィ後にミックスモードクロマトグラフィを行い、ID No. HIC447はミックスモードクロマトグラフィ後に疎水クロマトグラフィを行った。

[0086] <疎水性相互作用クロマトグラフィの条件>

担体：POROS Benzyl Ultra

カラムサイズ：260 mL、ベッド高13.3 cm

流速：300 cm/h

担体当たりのタンパク質負荷量：30 g/L

クロマトグラフィ条件：

1. 平衡化：0.8 M塩化ナトリウムを含む20 mMクエン酸ナトリウム (pH 5.0) ; 5 CV

2. 負荷：抗体粗精製物の試料

3. 洗浄1：0.8 M塩化ナトリウムを含む20 mMクエン酸ナトリウム (pH 5.0) ; 6 CV (HIC446/HIC447)、8 CV (HIC457)、又は、15 CV (HIC463)

4. 洗浄2：0.6 M塩化ナトリウムを含む20 mMクエン酸ナトリウム (pH 5.0) ; 5 CV

5. 溶出：20 mMクエン酸ナトリウム (pH 6.0) ; 6.3 CV

6. カラム洗浄：1 M水酸化ナトリウム水溶液 ; 3 CV

[0087] 疎水性相互作用クロマトグラフィのステップで得られた精製抗体組成物の収率及び純度を表5及び図8に示す。何れの精製フローにおいても、収率は60%以上であり、HIC-HPLC分析による純度（糖鎖付加異性体の混

入量を示す)は99%以上が得られた。また、洗浄1の液量(6~15CV)に応じて、収率及び純度を制御できることが明らかになった。すなわち、抗体の純度約90%の組成物は5CVの洗浄では98%程度、8CVの洗浄では99%程度、15CVの洗浄では99.5%程度に向上することが分かった。

[0088] [表5]

Results of the scale-up run of the HIC chromatography.

Run	Load amount		Yield		Monomer content	Purity analytical HIC
ID no.	[g/L Resin] acc. UV280	[g] acc. UV280	[g] acc. UV280	[%] acc. UV280	[%] acc. SEC-HPLC	[%] acc. HIC
HIC 446	30	7800	6113	78	99.7	97.6
HIC 447	30	7917	5671	72	99.8	98.3
HIC 457	30	7834	5650	72	99.7	98.7
HIC 463	30	7834	4923	63	99.8	99.6

実施例 8

[0089] 糖鎖付加異性体の除去ステップを含む精製プロセス (POROS Benzyl Ultra)

実施例1と同様にして調製した抗hDLK-1抗体を含む培養上清を約200L得た。糖鎖付加異性体が抗体粗精製物中に約10%含まれることを確認した。

[0090] 培養上清をろ過し、Protein Aアフィニティクロマトグラフィ (MabSelect SuRe 10L; Cytiva社)、低pHウイルス不活化、POROS Benzyl Ultra担体 (Thermo Fisher社、10L) を用いた疎水性相互作用クロマトグラフィ、Capto adhere担体 (Cytiva社、10L) を用いたミックスモードクロマトグラフィ、ウイルスろ過、タンジェンシャルフローろ過 (TFF) による処方緩衝液への置換、滅菌ろ過等の工程を経て高純度の精製抗体組成物を得た。

[0091] POROS Benzyl Ultraクロマトグラフィは担体単位量あ

たりのタンパク質負荷量を35 g/L、30 g/L、16 g/Lに調整し、3回のクロマトグラフィを実施した。POROS Benzyl Ultraクロマトグラフィステップの条件、及びPOROS Benzyl Ultraクロマトグラフィステップの結果を、各々表6、及び表7に示す。

[0092] [表6]

パラメータ	条件
カラム	担体量：10 L、ベッド高：20 cm
平衡化	0.8 M塩化ナトリウム含有20 mMクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）、4 CV
負荷液	タンパク質濃度6.71 mg/mL（合計液量約125 kg、合計タンパク質量841 g）
担体あたりの負荷量	負荷量：35 g/L-resin（負荷液量約52 L）、30 g/L-resin（負荷液量約45 L）、16 g/L-resin（負荷液量約24 L）
洗浄1	0.8 M塩化ナトリウム含有20 mMクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）、15 CV
洗浄2	0.6 M塩化ナトリウム含有20 mMクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）、5 CV
溶出	20 mMクエン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）、10 CV
洗浄3	1 M水酸化ナトリウム水溶液

[0093] [表7]

	Run 1	Run 2	Run 3
負荷量	35 g/L	30 g/L	16 g/L
収率	54%	58%	77%
純度	100%	100%	89.74%

[0094] Run 1 及び Run 2 の負荷量は規定量以上の適切な範囲内であったが、Run 3 の負荷量は16 g/Lと低い条件であった。その結果、収率は77%となったものの糖鎖付加異性体混入量を示すHIC-HPLC純度は89.74%と低い値が得られた。そのため、Run 1 及び Run 2 の分画液のみを統合し、次のクロマトグラフィステップへ供した。

[0095] 全ステップを経て最終的に得られた精製抗体組成物は46%の総収率であった。また、HIC-HPLC分析による精製抗体組成物の純度は100%

であり、糖鎖付加異性体は含まれていなかった。このように、抗体のクロマトグラフィ条件下においても、糖鎖付加異性体を十分に低減した精製抗体組成物を得ることが可能であった。また、クロマトグラフィ担体へのタンパク質負荷量が糖鎖付加異性体の除去率に重要であることも示された。

実施例 9

[0096] 糖鎖付加異性体の除去ステップを含む精製プロセス (C a p t o B u t y l)

実施例 1 と同様にして調製した抗 h D L K - 1 抗体を含む培養上清を得た。糖鎖付加異性体が抗体粗精製物中に約 1 0 % 含まれることを確認した。

[0097] この培養液を用いて P r o t e i n A アフィニティクロマトグラフィステップ (担体 : M a b S e l e c t S u R e)、低 p H ウィスル不活化ステップ、疎水性相互作用クロマトグラフィステップ (C a p t o B u t y l 担体)、ミックスモードクロマトグラフィステップ (C a p t o a d h e r e) の順に精製した。

[0098] 表 8 に示す結果の通り、疎水性クロマトグラフィステップにより糖鎖付加異性体の非含有率を純度 9 9 . 8 % まで向上させ、精製抗体組成物を総収率 2 5 % で取得することができた。

この結果に示すように、P O R O S B e n z y l U l t r a 担体以外の疎水性相互作用クロマトグラフィ担体を用いても高純度の精製抗体組成物を得られることが分かった。

[0099]

[表8]

精製ステップ	収率	純度	条件など
培養上清	100%	90%	—
Protein Aアフィニティクロマトグラフィ	>90%	89.9%	—
低pH	100%	89.9%	—
疎水性相互作用クロマトグラフィ (Capto Butyl担体)	37%	99.8%	負荷量20 mg/mL、0.8 M塩化ナトリウムを含む20 mMクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) で30 CV洗浄後、50 mM塩化ナトリウム及び75 mMアルギニン塩酸塩を含む20 mMクエン酸ナトリウム (pH 4.5) で10 CV溶出。
ミックスモードクロマトグラフィ (Capto adhere担体)	>90%	99.8%	—
精製プロセス全体	25%	99.8%	—

実施例 10

[0100] 糖鎖付加異性体の分取と生物活性の測定

実施例 1 と同様にして取得した糖鎖付加異性体を約 10% 含む抗 hDLK-1 抗体粗精製物について、実施例 1 に記載した HIC-HPLC 分析系を用いて各ピークを精密に分取した。分取は約 10 回に分けて実施し、各ピークを統合した後、等張リン酸緩衝液に緩衝液交換した。なお、分取に使用した HIC-HPLC の移動相の条件は以下に変更した。

移動相 A : 2.3 M 硫酸アンモニウムを含む 50 mM リン酸緩衝液、pH 7

移動相 B : 50 mM リン酸緩衝液、pH 7

[0101] 分取前の抗体粗精製物 (a)、分取後の精製抗体組成物 (b、c) について、実施例 1 に示した HIC-HPLC を用いて分析した結果を図 9 に示す。

[0102] これらの試料について、10 µg/mL から 3 倍公比で希釈し、ADCC Reporter Bioassay キット (Promega、G7010) で E:T 比率 6:1 (ターゲット細胞は DLK1 を高発現する HEK293 細胞株)、反応時間 6 時間の条件で ADCC 活性を測った。その結果を

図10に示す。分取前の抗体粗精製物及び分取後のメインピーク（図9における（b））はほぼ同様のシグモイド曲線が得られ、同等の生物活性を有することが確認された。一方、分取により単離された糖鎖付加異性体（図9における（c））は、何れの濃度においてもシグナルが殆ど得られず、生物活性が無いことが分かった。この結果から、糖鎖付加異性体は不純物であり、バイオ医薬品の成分として可能な限り除去する必要のある成分であることが確認された。

産業上の利用可能性

[0103] 本発明により、Fc領域糖鎖結合コンセンサス領域以外の糖鎖付加異性体が低減された精製抗体組成物を調製し利用することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 重鎖が配列番号 2、4、6、8、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、及び36から選択されるアミノ酸配列を有し、かつ軽鎖が配列番号10又は配列番号12に記載のアミノ酸配列を有する、抗hDLK-1抗体組成物の精製方法であって、
- 抗体粗精製物をコンベンショナルクロマトグラフィに負荷して、Fc領域糖鎖付加コンセンサス領域以外の部位に糖鎖が付加していない抗体を前記クロマトグラフィの担体に吸着させること、及び
- 前記担体を溶出液で溶出させることにより、前記担体に吸着した前記抗体を溶出させて精製抗体組成物を得ることを含み、
- ここで、得られた前記精製抗体組成物における、Fc領域糖鎖付加コンセンサス領域以外の部位に糖鎖が付加した糖鎖付加異性体の含有量が、前記抗体粗精製物と比較して減少している、
- 前記方法。
- [請求項2] 前記コンベンショナルクロマトグラフィの担体が、疎水性相互作用クロマトグラフィ担体、又は、ミックスモードクロマトグラフィ担体である、請求項1に記載の精製方法。
- [請求項3] 前記コンベンショナルクロマトグラフィの担体の平均粒子径が15 μm 以上である、請求項1又は2に記載の精製方法。
- [請求項4] 前記コンベンショナルクロマトグラフィの担体の平均粒子径が20～100 μm である、請求項1又は2に記載の精製方法。
- [請求項5] 前記コンベンショナルクロマトグラフィの担体が、ベンジル基又はブチル基を有する、請求項1～4のいずれか1項に記載の精製方法。
- [請求項6] 前記コンベンショナルクロマトグラフィの担体の単位量あたりのタンパク質負荷量が、20 mg/mL以上である、請求項1～5のいずれか1項に記載の精製方法。
- [請求項7] 前記コンベンショナルクロマトグラフィの担体が疎水性相互作用ク

ロマトグラフィ担体であり、かつ、前記抗体粗精製物を前記担体に負荷した後、溶出前に当該担体を洗浄液で洗浄することを含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の精製方法。

[請求項8] 前記洗浄液の塩濃度が、前記溶出液の塩濃度より10mM以上高いことを特徴とする、請求項7に記載の精製方法。

[請求項9] 前記洗浄液の塩濃度が、0.5M以上であることを特徴とする、請求項7又は8に記載の精製方法。

[請求項10] 前記洗浄液の塩濃度が、1.0M以上であることを特徴とする、請求項7又は8に記載の精製方法。

[請求項11] 前記洗浄液のpHが、前記溶出液のpHより0.2ユニット以上低いpHであり、かつ、pH4～8の範囲内である、請求項7～10のいずれか1項に記載の精製方法。

[請求項12] 前記洗浄が、2担体容量以上の洗浄液を流すことにより行われる、請求項7～11のいずれか1項に記載の精製方法。

[請求項13] 段階的又は直線的にpH又は／及び塩濃度が変化する移動相を使用することにより、洗浄及び溶出を行うことを特徴とする、請求項7～12のいずれか1項に記載の精製方法。

[請求項14] 前記溶出液が0.5M以下の塩濃度であるか又は塩を含まず、かつ、pH5～7である、請求項7～13のいずれか1項に記載の精製方法。

[請求項15] 収率が20%以上である、請求項1～14のいずれか1項に記載の精製方法。

[請求項16] 前記精製抗体組成物中の全抗体に対する糖鎖付加異性体の割合が5%以下である、請求項1～15のいずれか1項に記載の精製方法。

[請求項17] 前記抗体粗精製物中の全抗体に対する糖鎖付加異性体の割合が5%より大きい、請求項16に記載の精製方法。

[請求項18] 請求項1に記載の抗hDLK-1抗体組成物の精製方法であって、抗体粗精製物を、ベンジル基若しくはブチル基を有する粒子径20

～100 μmの担体を用いたコンベンショナルクロマトグラフィに負荷すること、

前記担体に、Fc領域糖鎖付加コンセンサス領域以外の部位に糖鎖が付加していない抗体を吸着させること、

pH4～6の洗浄液で前記担体を1回以上洗浄することにより糖鎖付加異性体を除去すること、及び、

0.5 M以下の塩濃度又は塩を含まないpH5～7の溶出液で前記担体に吸着した前記抗体を溶出させて精製抗体組成物を得ることを含み、

ここで、前記精製抗体組成物における、全抗体に対する糖鎖付加異性体の割合が、前記抗体粗精製物と比較して低減している、
前記方法。

[請求項19]

請求項1に記載の抗体組成物の精製方法であって、

0.5 M以上の塩濃度に調整された前記抗体粗精製物を、ベンジル基若しくはブチル基を有する粒子径20～100 μmの担体を用いたコンベンショナルクロマトグラフィに負荷して糖鎖付加異性体を素通り画分に除去すること、

前記担体を洗浄液で洗浄すること、及び、

0.5 M以下の塩濃度又は塩を含まない、pH5～7の溶出液で前記担体に吸着した前記抗体を溶出させて精製抗体組成物を得ることを含み、

ここで、前記精製抗体組成物における、全抗体に対する糖鎖付加異性体の割合が、前記抗体粗精製物と比較して低減している、
前記方法。

[請求項20]

請求項1に記載の抗体組成物の精製方法であって、

pH4～6に調整された前記抗体粗精製物を、ベンジル基若しくはブチル基を有する粒子径20～100 μmの担体を用いたコンベンショナルクロマトグラフィに負荷して糖鎖付加異性体を素通り画分に除

去すること、

前記担体を洗浄液で洗浄すること、及び、

0.5 M以下の塩濃度又は塩を含まない、pH 5～7の溶出液で前記担体に吸着した前記抗体を溶出させて精製抗体組成物を得ることを含み

ここで、前記精製抗体組成物における、全抗体に対する糖鎖付加異性体の割合が、前記抗体粗精製物と比較して低減している、
前記方法。

[請求項21] 前記コンベンショナルクロマトグラフィの担体の単位量あたりのタンパク質負荷量が20 g/L以上であり、かつ、前記洗浄が、5担体容量以上の洗浄液を流すことにより行われる、請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

[請求項22] 請求項1～21のいずれか1項に記載の精製方法を含む、Fc領域糖鎖付加コンセンサス領域以外の部位に糖鎖が付加していない抗体の、全抗体に対する割合が95%以上である抗体組成物の製造方法。

[請求項23] 重鎖が配列番号2、4、6、8、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、及び36から選択されるアミノ酸配列を有し、かつ軽鎖が配列番号10又は配列番号12に記載のアミノ酸配列を有する、抗hDLK-1抗体精製組成物の製造方法であって、

抗体粗精製物を、ベンジル基若しくはブチル基を有する粒子径20～100 μmの担体を用いたコンベンショナルクロマトグラフィに負荷すること、

前記担体に、Fc領域糖鎖付加コンセンサス領域以外の部位に糖鎖が付加していない抗体を吸着させること、

0.5 M以上の塩を含む洗浄液で前記担体を1回以上洗浄することにより糖鎖付加異性体を除去すること、及び

0.5 M以下の塩濃度又は塩を含まないpH 5～7の溶出液で前記

担体に吸着した前記抗体を溶出させて精製抗体組成物を得ることを含み、

ここで、前記精製抗体組成物における、全抗体に対する糖鎖付加異性体の割合が、前記抗体粗精製物と比較して低減している、
前記方法。

[請求項24] 請求項22又は23に記載の製造方法により製造された抗体組成物。

[請求項25] 重鎖が配列番号2、4、6、8、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、及び36から選択されるアミノ酸配列を有し、かつ軽鎖が配列番号10又は配列番号12に記載のアミノ酸配列を有する抗hDLK-1抗体粗精製物から、Fc領域糖鎖付加コンセンサス領域以外の部位に糖鎖が付加した糖鎖付加異性体を除去する方法であって、

抗体粗精製物を疎水性相互作用クロマトグラフィ担体に負荷して、Fc領域糖鎖付加コンセンサス領域以外の部位に糖鎖が付加していない抗体を前記担体に吸着させること、

前記担体を洗浄液で洗浄すること、及び、

前記担体から溶出液で溶出させることにより、前記担体に吸着した前記抗体を溶出させて精製抗体組成物を得ることを含む、
前記方法。

[請求項26] 重鎖が配列番号2、4、6、8、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、及び36から選択されるアミノ酸配列を有し、かつ軽鎖が配列番号10又は配列番号12に記載のアミノ酸配列を有する、抗hDLK-1抗体組成物であって、Fc領域糖鎖付加コンセンサス領域以外の部位に糖鎖が付加していない抗体を、全抗体の95%以上含有する、前記抗体組成物。

[請求項27] 重鎖が配列番号2、4、6、8、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、及び36から選択されるアミ

ノ酸配列を有し、かつ軽鎖が配列番号 10 又は配列番号 12 に記載の
アミノ酸配列を有する、抗 hDLK-1 抗体であって、Fc 領域糖鎖
付加コンセンサス領域以外の部位に糖鎖が付加していない、前記抗体
。