

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年3月3日(03.03.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/031932 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 1/22 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
C07K 1/113 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/074286
- (22) 国際出願日: 2015年8月27日(27.08.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-173253 2014年8月27日(27.08.2014) JP
- (71) 出願人: 田辺三菱製薬株式会社(MITSUBISHI TANABE PHARMA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5418505 大阪府大阪市中央区道修町三丁目2番10号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 山之内 昌也(YAMANOUCHI, Masaya); 〒5418505 大阪府大阪市中央区道修町三丁目2番10号 田辺三菱製薬株式会社内 Osaka (JP). 井村 雄一(IMURA, Yuichi); 〒5418505 大阪府大

阪市中央区道修町三丁目2番10号 田辺三菱製薬株式会社内 Osaka (JP). 田川 俊明(TAGAWA, Toshiaki); 〒5418505 大阪府大阪市中央区道修町三丁目2番10号 田辺三菱製薬株式会社内 Osaka (JP). 野々山 聡(NONOYAMA, Satoshi); 〒5418505 大阪府大阪市中央区道修町三丁目2番10号 田辺三菱製薬株式会社内 Osaka (JP). 藤野 泰寛(FUJINO, Yasuhiro); 〒5418505 大阪府大阪市中央区道修町三丁目2番10号 田辺三菱製薬株式会社内 Osaka (JP).

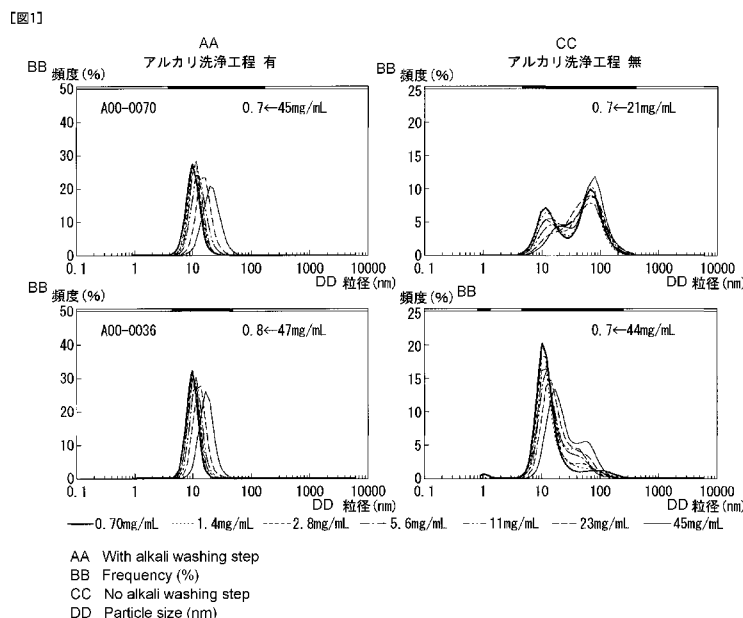
(74) 代理人: 青木 篤, 外(AOKI, Atsushi et al.); 〒1058423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING PROTEIN HAVING Fc REGION BY ALKALI WASHING

(54) 発明の名称: アルカリ洗浄によるFc領域を有するタンパク質の製造方法



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a method for purifying a protein having an Fc region having reduced problems with properties when purifying a protein having an Fc region having problems with properties such as free thiol content, self-association, and cohesiveness. The free thiol content is decreased and self-association and cohesiveness are also decreased by conducting a step for washing by an alkali wash solution in a state in which a protein having an Fc region is bonded on a carrier for affinity chromatography and refining the protein having an Fc region.

(57) 要約: フリーチオール含量、自己会合性、凝集性等の物性の問題を有するFc領域を有するタンパク質を精製するにあたり、物性の問題を低減化したFc領域を有するタンパク質の精製方法の提供を課題とする。Fc領域を有するタンパク質をアフィニティークロマトグラフィー用担体上に結合させた状態において、アルカリ洗浄液で洗浄する工程を行い、Fc領域を有するタンパク質を精製することにより、フリーチオール含量が低下し、自己会合性や凝集性も低下した。



WO 2016/031932 A1

PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

アルカリ洗浄によるFc領域を有するタンパク質の製造方法

技術分野

[0001] 本願の発明は、Fc領域を有するタンパク質の精製方法、及び当該精製方法を含むFc領域を有するタンパク質の製造方法に関する。また、本発明はFc領域を有するタンパク質のフリーチオール含量、自己会合性及び凝集性を低減する方法、並びに保存安定性を高める方法に関する。さらに、本発明はヒト抗IL-33モノクローナル抗体の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 抗体などのFc領域を有するタンパク質は治療用医薬品、診断薬、研究用試薬など広く一般的に用いられている。これらのタンパク質は、Fc領域を有するタンパク質の遺伝子を導入した遺伝子組換え細胞や、抗体を産生するハイブリドーマを培養すること等により、製造される。Fc領域を有するタンパク質は、主にこれらの細胞を培養して得られる培養上清から精製される。

[0003] Fc領域を有するタンパク質を精製する方法には、アフィニティークロマトグラフィーがある。特に、Protein A、Protein G、またはこれらの改変体を固定化したアフィニティークロマトグラフィー用担体は、Fc領域と結合するため汎用されている。

[0004] 抗体などのFc領域を有するタンパク質を、Protein A等を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製する場合には、高い頻度で凝集や沈殿などの問題が生じる（非特許文献1：Shukla et al., J. Chromatography, 2007, Vol. 848, p28）。凝集や沈殿はFc領域を有するタンパク質の精製収率を低下させるとともに、不純物の混入を高める。抗体の凝集物は医薬組成物として生体内に投与した時に炎症の原因となり得、抗体自身の抗原性を高め得る。また、抗体の凝集物は、診断薬や研究用試薬として用いる場合にも、抗原との特異的な結合によらない

非特異的な結合により、誤った結果をもたらし得る。抗体の凝集や沈殿の原因の1つとして、抗体の分子内でシステイン残基同士が適切にジスルフィド結合を形成できないことにより生じるフリーチオール残基が関与していることが考えられている。

[0005] 抗体の凝集体である高分子量の不純物（HMW）を取り除くために、アフィニティクロマトグラフィーにおける洗浄工程においてアルギニンを含む洗浄液で洗浄する方法があるが、依然としてHMWが混入し、HMWの除去は十分とはいえない（特許文献1）。また、Fc領域を有するタンパク質のジスルフィド結合の形成が不十分なアンダージスルフィド結合種（UDB）を洗浄除去するために、アフィニティクロマトグラフィーにおける洗浄工程において二価カチオン塩を含有する洗浄液が用いられるが、UDBの除去は十分とはいえない（特許文献2）。UDBは、フリーチオール残基を有するため、凝集をもたらす。したがって、Fc領域を有するタンパク質を精製する際の凝集性などの問題は依然として極めて不都合なものとなっている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2012/164046号

特許文献2：国際公開第2006/138553号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Shukla et al., J. Chromatography, 2007, Vol. 848, p28

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] Fc領域を有するタンパク質には、フリーチオール含量、自己会合性、凝集性等の物性の問題が存在する。このような物性の問題は、Fc領域を有するタンパク質の保存安定性に影響を与える。さらに、凝集等の物性の問題は、Fc領域を有するタンパク質の沈殿等による損失や、またFc領域を有するタンパ

ク質の凝集体等に結合した不純物の混入により、精製工程における収率や純度にも影響する。近年開発されている抗体医薬は高濃度皮下注製剤が主流になりつつあり、自己会合性や凝集性などの物性の問題が重要視されている。従って、物性の問題を低減化したFc領域を有するタンパク質の精製方法が必要とされている。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意検討した結果、Fc領域を有するタンパク質をアフィニティークロマトグラフィー担体上に結合した状態においてアルカリ洗浄液で洗浄する工程を含む、Fc領域を有するタンパク質の精製方法を見出し、本発明を完成するに至った。そこで本発明は以下の発明に関する：

- [0010] [1] Fc領域を有するタンパク質を精製する方法であって、
- (a) Fc領域を有するタンパク質を含む溶液をアフィニティークロマトグラフィー用担体に接触させ、Fc領域を有するタンパク質をアフィニティークロマトグラフィー用担体に結合させる工程、
 - (b) 10.1から12の範囲内のpH値を有するアルカリ洗浄液で洗浄する工程、および
 - (c) Fc領域を有するタンパク質を溶出する工程、
- を含む、Fc領域を有するタンパク質を精製する方法。
- [2] アルカリ洗浄液が10.5から11.5のpH値を有する、項目1に記載の方法。
- [3] アルカリ洗浄液が0.2M以上の塩化ナトリウムを含まない、項目1または項目2に記載の方法。
- [4] アルカリ洗浄液がアルギニンを含まない、項目1から3のいずれかに記載の方法。
- [5] アフィニティークロマトグラフィー用担体がProtein A、Protein G、またはこれらの改変体を有する担体である、項目1から4のいずれかに記載の方法。

[6] Fc領域を有するタンパク質が抗体である、項目1から5のいずれかに記載の方法。

[7] Fc領域を有するタンパク質がヒトモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体である、項目1から6のいずれかに記載の方法。

[8] Fc領域を有するタンパク質が入鎖を有する抗体である、項目1から7のいずれかに記載の方法。

[9] 項目1から8のいずれかに記載の方法を含む、Fc領域を有するタンパク質の製造方法。

[10] 項目9に記載の方法により製造されたFc領域を有するタンパク質。

[11] ヒトモノクローナル抗体を製造する方法であって、

(i)ヒトモノクローナル抗体を含む溶液をアフィニティークロマトグラフィー用担体に接触させ、ヒトモノクローナル抗体をアフィニティークロマトグラフィー用担体に結合させる工程、

(ii)9から12の範囲内のpH値を有するアルカリ洗浄液で洗浄する工程、および

(iii)ヒトモノクローナル抗体を溶出する工程、

を含み、ここでヒトモノクローナル抗体の軽鎖の相補性決定領域1 (LCDR1)、軽鎖の相補性決定領域2 (LCDR2)、軽鎖の相補性決定領域3 (LCDR3)、重鎖の相補性決定領域1 (HCDR1)、重鎖の相補性決定領域2 (HCDR2) 及び重鎖の相補性決定領域3 (HCDR3) のそれぞれのアミノ酸配列の組み合わせが、

(a) LCDR1: TGSSSNIGAVYDVH (配列表の配列番号1)、LCDR2: RNNQRPS (配列表の配列番号2)、LCDR3: QTYDSSRWV (配列表の配列番号3)

、HCDR1: DYYMN (配列表の配列番号4)、HCDR2: SISRYSSYIYADSVKG (配列表の配列番号5)、及びHCDR3: DIGGMDV (配列表の配列番号6)

(b) LCDR1: SGSSSNIGNNAVS (配列表の配列番号7)、LCDR2: ASNMRVI (配列表の配列番号8)、LCDR3: GAWDDSQKALV (配列表の配列番号9)

、HCDR1: NYMH (配列表の配列番号10)、HCDR2: SISARSRYHYA

DSVKG (配列表の配列番号 11)、及び HCDR3:LATRHNAFDI (配列表の配列番号 12)

(c) LCDR1:SGSSSNIGRNAVN (配列表の配列番号13)、LCDR2:ASNM RVS (配列表の配列番号 14)、LCDR3:WAWDDSQKVG (配列表の配列番号 15)、HCDR1:NYYMH (配列表の配列番号 10)、HCDR2:SISARSSY IYYADSVKG (配列表の配列番号 16)、及び HCDR3:LATRNNAFDI (配列表の配列番号 17)

(d) LCDR1:SGSSSNIGRNAVN (配列表の配列番号13)、LCDR2:ASNM RRS (配列表の配列番号 18)、LCDR3:SAWDDSQKVVV (配列表の配列番号 19)、HCDR1:RYYMH (配列表の配列番号 20)、HCDR2:SISAQSSH IYYADSVKG (配列表の配列番号 21)、及び HCDR3:LATRQNAFDI (配列表の配列番号 22) または、

(e) LCDR1:SGSSSNIGNNAVN (配列表の配列番号 23)、LCDR2:ASN MRRP (配列表の配列番号 24)、LCDR3:EAWDDSQKAVV (配列表の配列番号 25)、HCDR1:NYYMH (配列表の配列番号 10)、HCDR2:SISARS SYLYYADSVKG (配列表の配列番号 26)、及び HCDR3:LATRHVAFDI (配列表の配列番号 27)

であるヒトモノクローナル抗体である、ヒトモノクローナル抗体の製造方法。

[12] ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域(VL)及び重鎖可変領域(VH)のそれぞれのアミノ酸配列の組み合わせが、

(a) VL:QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAVYDVHWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQTYDSSRWVFGGGTKLTVL (配列表の配列番号 28) 及び VH:EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMNWVRQAPGKLEWVSSIS RYSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIGGMDVWGQGLTVTVSS (配列表の配列番号 29)

(b) VL:QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNAVSWYQQLPGTAPKLLIYASNM RVI GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGAWDDSQKALVFGGGTKLTVL (配列表の配列番号 30)

号 30) 及び V H :EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMHWRQAPGKGLEWVSSIS
ARSRYYHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLATRHNAFDIWGQGLTVTVSS (配列表の配列番号 31)

(c) V L :QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGRNAVNWYQQLPGTAPKLLIYASNMRRS
GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCWAWDDSQKVGVFVGGGKLTVL (配列表の配列番号 32) 及び V H :EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMHWRQAPGKGLEWVSSIS
ARSSYYHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLATRNNAFDIWGQGLTVTVSS (配列表の配列番号 33)

(d) V L :QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGRNAVNWYQQLPGTAPKLLIYASNMRRS
GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCSAWDDSQKVVVFVGGGKLTVL (配列表の配列番号 34) 及び V H :EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYMHWRQAPGKGLEWVSSIS
AQSSHYHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLATRQNAFDIWGQGLTVTVSS (配列表の配列番号 35)、または

(e) V L :QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGRNAVNWYQQLPGTAPKLLIYASNMRRP
GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCEAWDDSQKAVVFVGGGKLTVL (配列表の配列番号 36) 及び V H :EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMHWRQAPGKGLEWVSSIS
ARSSYLYHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLATRHVAFDIWGQGLTVTVSS (配列表の配列番号 37)、

である項目 11 に記載の製造方法。

[13] アルカリ洗浄液が 10.5 から 11.5 の pH 値を有する、項目 11 又は項目 12 に記載の製造方法。

[14] アルカリ洗浄液が 0.2M 以上の塩化ナトリウムを含まない、項目 11 から 13 のいずれかに記載の製造方法。

[15] アルカリ洗浄液がアルギニンを含まない、項目 11 から 14 のいずれかに記載の製造方法。

[16] アフィニティークロマトグラフィー用担体が Protein A、Protein G、またはこれらの改変体を有する担体である、項目 11 から 15 のいずれかに記載の製造方法。

[17] 項目11から16のいずれか1項に記載の方法により製造されたヒトモノクローナル抗体。

[18] 溶液中に含まれるFc領域を有するタンパク質の物性を改善する方法であって、

(a) Fc領域を有するタンパク質を含む溶液をアフィニティークロマトグラフィー用担体に接触させ、Fc領域を有するタンパク質をアフィニティークロマトグラフィー用担体に結合させる工程、

(b) 9.1から12の範囲内のpH値を有するアルカリ溶液に接触する工程、および

(c) Fc領域を有するタンパク質を溶出する工程、を含む、方法。

[19] Fc領域を有するタンパク質の物性を改善する方法が、Fc領域を有するタンパク質のフリーチオール含量を低減する方法である項目18に記載の方法。

[20] Fc領域を有するタンパク質の物性を改善する方法が、Fc領域を有するタンパク質の自己会合性を低減する方法である項目18に記載の方法。

[21] Fc領域を有するタンパク質の物性を改善する方法が、Fc領域を有するタンパク質の凝集性を低減する方法である項目18に記載の方法。

[22] Fc領域を有するタンパク質の物性を改善する方法が、さらにFc領域を有するタンパク質の保存安定性を高める方法である項目18に記載の方法。

[23] アルカリ溶液が10.6から11.5のpH値を有する、項目18から22のいずれかに記載の方法。

[24] アルカリ溶液が0.2M以上の塩化ナトリウムを含まない、項目18から23のいずれかに記載の方法。

[25] アルカリ溶液がアルギニンを含まない、項目18から24のいずれかに記載の方法。

[26] アフィニティークロマトグラフィー用担体がProtein A、Protein G

、またはこれらの改変体を有する担体である、項目18から25のいずれかに記載の方法。

[27] Fc領域を有するタンパク質が抗体である、項目18から26のいずれかに記載の方法。

[28] Fc領域を有するタンパク質がヒトモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体である、項目18から27のいずれかに記載の方法。

[29] Fc領域を有するタンパク質が入鎖を有する抗体である、項目18から28のいずれかに記載の方法。

発明の効果

[0011] 本発明の、Fc領域を有するタンパク質の精製方法は、Fc領域を有するタンパク質のフリーチオール含量、自己会合性、及び凝集性のうちの少なくとも1以上を低減することができる。また、本発明により精製されたFc領域を有するタンパク質は保存安定性に優れている。さらに、本発明の精製方法は、Fc領域を有するタンパク質の純度、収率を高めることができる。従って、本発明により物性の優れたFc領域を有するタンパク質を、高純度で、安価に製造することができる。

[0012] また、本発明で製造されるヒト抗IL-33モノクローナル抗体は、フリーチオール含量、自己会合性、及び凝集性が低減されていること、さらには不純物の混入が低減されていることにより、安全性に優れている。したがって、本発明により製造されるヒト抗IL-33モノクローナル抗体は、IL-33に関連する疾患に対して新たな診断、予防、治療または軽減薬として利用できる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]Fc領域を有するタンパク質のアルカリ処理による凝集性の低減を評価したグラフである。

[図2]Fc領域を有するタンパク質のアルカリ処理による自己会合性の低減を評価したグラフである。

[図3]Fc領域を有するタンパク質のアルカリ処理による保存安定性の向上を評

価したグラフである。

[図4]培養上清から各種pHの洗浄液を用いてA10-1C04抗体を精製した時の抗体収量を示したグラフである。

[図5]各種pHの洗浄液を用いてA23-1A05抗体を捕捉したProtein Aカラムを洗浄して得られた洗浄画分をSDS-PAGEにより分析した結果を示した写真である。

[図6]各種pHの洗浄液を用いてA23-1A05抗体を捕捉したProtein Aカラムを洗浄して得られたカラムを通過した洗浄液の吸光度の経時的变化を示したグラフである。

[図7]培養上清から各種pHの洗浄液を用いてA23-1A05抗体を精製した時のフリーチオール含量を示したグラフである。

[図8]Fc領域を有するタンパク質ST2-Fcを、Protein Aカラムでアルカリ洗浄工程を加えて精製した場合と、アルカリ洗浄工程を行わずに精製した場合における、精製後のST2-Fcの凝集性を動的光散乱法により測定したグラフである。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明の理解を容易にするため、以下に本発明に用いられる用語を説明する。本明細書で示される用語の説明は、特に限定を目的とするものではない。

[0015] [Fc領域を有するタンパク質]

本発明においてFc領域を有するタンパク質とは、免疫グロブリンのFc領域、その改変体、またはそのフラグメントを有するタンパク質を示す。免疫グロブリンのFc領域とは、免疫グロブリンをパパインで分解した場合の重鎖の定常部位側のフラグメントの領域を指し、通常、重鎖のC_H2及びC_H3領域からなる領域である。Fc領域の改変体としては、Fc領域の一部が、置換、欠失及び/又は付加されたものを含んでもよい。Fc領域を有するタンパク質は、IgG、IgM、IgD、IgE、IgAなどの免疫グロブリン、バイスペシフィック抗体などのマルチスペシフィック抗体だけではなく、免疫グロブリンのFc領域（その

改変体及びそのフラグメントを含む)を別のタンパク質やペプチドに結合した融合タンパク質 (Fc融合タンパク質)を含む。さらに、免疫グロブリン、マルチスペシフィック抗体、またはFc融合タンパク質に低分子薬物、放射性物質もしくは蛍光色素などのイメージング化合物、またはPEGなどのポリマーを結合させたものも本用語には含まれる。

[0016] [精製]

本発明において精製とは、目的タンパク質であるFc領域を有するタンパク質を含む種々の混合物溶液 (例えば、動物細胞由来培養上清、微生物由来培養上清、微生物破砕物、無細胞発現系溶液、遺伝子組換え動物・植物由来サンプル)を分離工程に供することにより、目的タンパク質とそれ以外の不純物とを分離する技術をいう。不純物には、培地由来成分 (例えば、糖類、脂質、成長因子などのタンパク質及びそのペプチド)、宿主細胞由来成分 (例えば、宿主細胞由来タンパク質、ペプチド、核酸、脂質及び糖類)、並びに目的物由来不純物(切断体、化学修飾体及び凝集体)等が挙げられる。

[0017] [アフィニティークロマトグラフィー]

目的タンパク質に対して親和性を有する物質、例えばリガンドを有する担体を用いたクロマトグラフィーを指す。Fc領域に対して親和性を有する担体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行うことで、Fc領域を有するタンパク質を精製及び/又は製造することができる。Fc領域を有するタンパク質に対して結合性を有するアフィニティークロマトグラフィー用担体として、抗体精製に慣用される担体を用いることができる。抗体精製に用いられる担体としては、Fc領域に結合するリガンドを結合させた担体を用いることができる。本発明では、Fc領域に結合するリガンドとして、例えば、ProteinA、ProteinG、またはこれらの改変体を使用することができる。

[0018] [アルカリ洗浄液]

本発明においてアルカリ洗浄液とは、アフィニティークロマトグラフィー用担体に結合した目的タンパク質から不純物を分離するのに用いられる塩基性溶液を示す。アルカリ洗浄液は、不純物の除去だけではなく、目的タンパ

ク質のフリーチオール含量、自己会合性、及び/又は凝集性を低減する効果も奏する。さらにアルカリ洗浄液による洗浄工程を経ることにより、Fc領域を有するタンパク質の回収率が改善する。その理由は定かではないが、Fc領域を有するタンパク質に含まれるフリーチオール基が、カラム上でのアルカリ洗浄液暴露により適切な分子内ジスルフィド結合を形成する結果、Fc領域を有するタンパク質の凝集や沈殿等による損失がないためと考えられる。しかしながら、その理論に限定されることを意図するものではない。

[0019] [Protein A]

Protein A は黄色ブドウ球菌の細胞壁に存在し、免疫グロブリンのFc領域に高親和性を有するタンパク質である。Protein A改変体とはProtein Aのアミノ酸配列の一部を改変し、Fc領域との結合特異性や安定性を改変したProtein Aである。Protein A改変体は、市販されており、例えば、MabSelect SuRe (GE Healthcare社)、TOYOPEARL AF-rProtein A HC-650F (東ソー社)、KAN EKA KanCap (カネカ社) などを用いることもできる。本発明で使用するProtein A及びその改変体は、黄色ブドウ球菌由来の天然タンパク質であってもよく、また遺伝子組み換え技術により製造されたものでもよい。アルカリ洗浄工程を行う観点から、アルカリ耐久性の改変体を使用することが好ましい。

[0020] [Protein G]

Protein GはグループG連鎖球菌の細胞壁に存在し、免疫グロブリンのFc領域に高親和性を有する蛋白質である。Protein G改変体とはProtein Gのアミノ酸配列の一部を改変し、Fc領域との結合特異性や安定性を改変したProtein Gである。本発明で使用するProtein G及びその改変体は、グループG連鎖球菌由来の天然タンパク質であってもよく、また遺伝子組み換え技術により製造されたものでもよい。アルカリ洗浄工程を行う観点から、アルカリ耐久性の改変体を使用することが好ましい。

[0021] [抗体]

本発明において抗体とは、特定の抗原に結合することができる糖タンパク質である免疫グロブリン、またはそのフラグメントであって、Fc領域を有す

るものを示す。また、本用語には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、マルチスペシフィック抗体も含まれる。

[0022] [ヒトモノクローナル抗体]

ヒトモノクローナル抗体は、ヒトの生殖系列の免疫グロブリンの配列に由来する可変領域及び定常領域を有するモノクローナル抗体をいい、軽鎖、重鎖ともにヒト由来の抗体をいう。重鎖の定常領域の違いにより、 γ 鎖の重鎖を有するIgG (IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4を含む)、 μ 鎖の重鎖を有するIgM、 α 鎖の重鎖を有するIgA (IgA1、IgA2を含む)、 δ 鎖の重鎖を有するIgD、または ϵ 鎖の重鎖を有するIgEを含む。また原則として軽鎖は、 κ 鎖と λ 鎖のどちらか一方を含む。

[0023] [ヒト化モノクローナル抗体]

ヒト化抗体は、非ヒト哺乳動物由来抗体の相補性決定領域と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域とからなる可変領域、並びにヒト抗体由来の定常領域からなるモノクローナル抗体をいう。

[0024] [キメラモノクローナル抗体]

キメラ抗体とは、軽鎖、重鎖、またはその両方が、非ヒト由来の可変領域とヒト由来の定常領域からなるモノクローナル抗体をいう。

[0025] [λ 鎖]

λ 鎖とは免疫グロブリンの軽鎖の一つの種類を指す。 λ 鎖の可変領域のアミノ酸配列は多様であり、 λ 鎖の軽鎖を含む免疫グロブリンは多様な抗原に結合することができる。免疫グロブリンの軽鎖の種類としては、他に κ 鎖がある。

[0026] [相補性決定領域]

相補性決定領域とは免疫グロブリン分子の可変領域のうち、抗原結合部位を形成する領域をいい、超可変領域とも呼ばれ、免疫グロブリン分子ごとに特にアミノ酸配列の変化が大きい部分をいう。相補性決定領域には軽鎖、重鎖それぞれに3つの相補性決定領域（相補性決定領域1、相補性決定領域2及び相補性決定領域3）がある。本願では、免疫グロブリン分子の相補性決

定領域はカバット (Kabat) の番号付けシステム (Kabatら、1987、Sequences of Proteins of Immunological Interest、US Department of Health and Human Services、NIH、USA) に従って決定される。

[0027] [可変領域]

抗体の可変領域とは、軽鎖及び重鎖のN末側に位置し、抗体の抗原結合性を決定する部分をいう。可変領域は、3つの相補性決定領域と、それを取り囲む4つのフレームワーク領域から構成される。

[0028] [自己会合性]

本発明において自己会合とは、同種のタンパク質分子間での一時的で可逆な相互作用や一時的で可逆な多量体形成を示す。このような多量体形成は希釈などの操作で簡単に単量体に戻る。自己会合性とは自己会合のしやすさを示すものである。少量の不純物が、任意のタンパク質の自己会合性に影響を与えることも考えられるが、そのような不純物存在下での任意のタンパク質の会合性も自己会合性という用語に含まれる。自己会合性を示すパラメータとしては、第2ビリアル係数や相互作用パラメータなどが挙げられる。相互作用パラメータは実験的手法で得られた拡散係数の濃度依存性を用いて算出される自己会合性の指標であり、その値が -12.4 g/mL 以上であれば分子間には斥力的な働き、それ以下であれば引力的 (自己会合的) な相互作用となると報告されている (Saito et al., Pharm. Res., 2013, Vol. 30 p1263)。拡散係数とは溶液中の分子の拡散しやすさの指標であり、動的光散乱法などで測定が可能である。

[0029] [フリーチオール]

本発明においてフリーチオールとは、Fc領域を有するタンパク質中のシステイン残基に含まれる遊離チオール基を示す。Fc領域を有するタンパク質において、本来抗体の軽鎖と重鎖間、あるいは重鎖内の2個のシステイン残基が架橋して生じるはずのジスルフィド結合が形成されないことがあり、フリー

チオールとして存在する。フリーチオール含量とは、Fc領域を有するタンパク質1モルあたりのフリーチオール基のモル数（モル比）をいう。

[0030] [凝集性]

本発明において凝集とは、複数のタンパク質分子の分子間で起きる不可逆な相互作用を指し、希釈などの操作によっても解離しない多量体形成を示す。凝集体は物理化学的な相互作用や化学反応によって形成されるが、形成経路によって限定されるものではない。凝集体は動的光散乱法により、希釈によって解離しないモノマー（非凝集体）よりも粒子径の大きなピークとして確認することができる。

[0031] [保存安定性]

保存安定性とは、特定の保存条件下、保存期間における安定性をいう。この保存期間内に生じる変化に関する任意の指標により、保存安定性を評価することができる。本発明においてFc領域を有するタンパク質の保存安定性を評価する任意の指標には、外観、抗原結合性、分解性、自己会合性、フリーチオール含量、凝集性、生物活性など様々なものが挙げられるが、これらによって限定されるものではない。

[0032] [収率]

本発明において収率とは、精製工程前の混合溶液中に含まれる目的タンパク質の量に対する、精製工程後に得られた目的タンパク質の量の割合を示す。

[0033] [IL-33]

IL-33はIL-1ファミリーに属するサイトカインであり、N末端側にクロマチン結合ドメインを有し、C末端側に12個の β ストランドを持つ分子量18 kDaのIL-1様サイトカインドメインを有している。IL-33は、細胞がネクローシスを起こす過程で、エステラーゼ、カテプシンG、またはプロテイナーゼ3などの酵素により切断されて、C末端側断片のみからなる成熟型IL-33になり、サイトカインとして機能すると考えられている。IL-33は、サイトカインとして細胞外に放出されると、IL-33受容体（ST2及びIL-1RAcP）と結合し

、当該IL-33受容体を発現する細胞において、細胞内シグナル伝達を開始させるという機能を有する。IL-33により誘導されるシグナル伝達には、非限定的に、NF- κ B経路と、MAPKs経路とがあり、最終的に各種のサイトカインやケモカイン、炎症性メディエータの産生を惹起する。IL-33により誘導されるサイトカインの例として、TNF- α 、IL-1 β 、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-13などが挙げられ、特にIL-5、IL-6、及びIL-13が誘導される。IL-33により誘導されるケモカインの例としてCXCL2、CCL2、CCL3、CCL6、CCL17、CCL24などが挙げられる。IL-33により誘導される炎症性メディエータの例としてPGD2、LTB4などが挙げられる。IL-33により誘導されるサイトカインやケモカイン、炎症性メディエータは、免疫系細胞の遊走、サイトカイン産生、脱顆粒に関与し炎症を惹起する。本発明では、IL-33は、IL-33受容体に結合して作用するものであれば、全長IL-33または成熟型IL-33のいずれかを指してもよいし、それらの誘導體若しくは変異体であってもよい。また、ヒトIL-33でも他の生物由来のIL-33でもよい。

[0034] 以下、本発明の実施の形態について説明する。なお、以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明はその実施の形態のみに限定されない。

[0035] 本発明の一形態においては、Fc領域を有するタンパク質の精製方法が提供される。本方法は、Fc領域を有するタンパク質をアフィニティークロマトグラフィー用担体に結合した後、アルカリ洗浄液で洗浄することを特徴とする。アルカリ洗浄液により不純物を除去するとともに、アフィニティークロマトグラフィー用担体に結合したFc領域を含むタンパク質のフリーチオール含量、自己会合性、凝集性を低減化する。次いで溶出液を用いてFc領域を有するタンパク質を溶出することにより、Fc領域を有するタンパク質を精製する。洗浄液での洗浄は1回であってもよいし、同一又は異なる洗浄液を用いて複数回行われてもよい。

[0036] 本発明における、Fc領域を有するタンパク質を含む溶液としては、非限定的に、血液、腹水及びミルクなどのFc領域を有するタンパク質を含む体液、F

c領域を有するタンパク質を産生するように該タンパク質をコードする遺伝子を形質転換した遺伝子組換え大腸菌、遺伝子組換え酵母、及び遺伝子組換え植物等の細胞破碎溶液、並びにFc領域を有するタンパク質を産生するハイブリドーマ、Epstein-Barrvirus(EBV)等で不死化したB細胞、及び遺伝子組換え動物細胞を培養して得られる培養上清が挙げられるが、Fc領域を有するタンパク質を含む培養上清が好ましい。本発明における、Fc領域を有するタンパク質を含む溶液としては、前記溶液をさらに沈殿後再溶解した溶液、濃縮した溶液、希釈した溶液、透析した溶液、及びクロマトグラフィー等により粗精製処理を行った溶液等であってもよい。

[0037] 本発明における、Fc領域を有するタンパク質を含む溶液には目的のFc領域を有するタンパク質以外の不純物が含まれていてもよい。不純物としては、体液及び宿主細胞由来の成分（タンパク質、核酸、脂質及び糖鎖など）、混入したウィルス・細菌・真菌及びこれらを構成する成分、培地由来の成分、Fc領域を有するタンパク質の分解物、凝集体、並びにサブミクロメートルスケールの粒子などが挙げられる。

[0038] 様々な実施形態では、本発明は、Fc領域を含むタンパク質をアフィニティークロマトグラフィー用担体に接触させ、Fc領域を有するタンパク質をアフィニティークロマトグラフィー用担体に結合させる工程を含む。アフィニティークロマトグラフィー用担体としては、Protein A、Protein G、Protein A/G、Protein L、抗免疫グロブリン抗体、Fc受容体の細胞外ドメイン及びこれらの断片、並びにこれらの改変体を固定化した担体が挙げられるが、所望のFc領域を有するタンパク質を結合することができ、アルカリ洗浄液による洗浄工程でもFc領域を有するタンパク質を保持することができ、かつ溶出液でFc領域を有するタンパク質を溶出することができるものであれば特に限定されない。本発明のアフィニティークロマトグラフィー用担体の好ましい態様としては、Protein A、Protein Gまたはこれらの改変体を有する担体である。

[0039] 本発明における精製方法は、アフィニティークロマトグラフィー用担体を充填したカラムを用いて行うことができる。また、カラムを用いずにバッチ

処理で行うこともできる。本発明の好ましい実施形態は、カラムを用いた精製方法である。カラムを用いた場合、アフィニティークロマトグラフィー用担体を充填したカラムに、Fc領域を有するタンパク質を含む溶液を通し、次いでアルカリ洗浄液を通し、最後に溶出液を通すことにより、接触工程、洗浄工程、および溶出工程が行われる。各工程は、連続して行ってもよいし、時間をあけて行ってもよい。また、アルカリ洗浄液以外の洗浄液での洗浄工程、カラムの平衡化工程や再生工程等がさらに付加されてもよい。

[0040] アフィニティークロマトグラフィー用担体に結合したFc領域を含むタンパク質を不純物から分離するために、1ないしは複数の洗浄液で上記担体を充填したカラムを洗浄することができる。一般的な洗浄液として生理的食塩水やPhosphate buffered saline (PBS) が挙げられるが、さらにこれらの洗浄液に界面活性剤が添加されていてもよい。界面活性剤の一例としては、ポリソルベート (Tween 20、Tween 40、Tween 60、Tween 80 (以上商品名) 等) やTriton X-100 (商品名) が挙げられる。界面活性剤の添加量は臨界ミセル濃度以上であればよく、好ましくは0.01%(V/V)から1%(V/V)の範囲である。

[0041] 様々な実施形態では、本発明は、Fc領域を有するタンパク質が結合したアフィニティークロマトグラフィー用担体をアルカリ溶液で洗浄する工程を含む。アルカリ洗浄液のpHは9から12の範囲であり、好ましくは9.5から12、より好ましくは10から12であり、さらにより好ましくは10.1から12、10.5から12、10.6から12、10.5から11.5であり、最も好ましくは10.6から11.5である。アルカリ洗浄液のpHの下限值としては例えば9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、10.1、10.2、10.3、10.4、10.5、10.6、10.7、10.8、10.9、11が挙げられ、アルカリ洗浄液のpHの上限值としては、11、11.1、11.2、11.3、11.4、11.5、11.6、11.7、11.8、11.9、12が挙げられる。洗浄液のpHを維持するために、緩衝剤を添加することができる。緩衝剤は、使用するpHに応じて当業者が通常用いる緩衝剤の中から適宜選択すればよく、リン酸塩、クエン酸塩、グリシン、トリスヒドロキシアミノメタン (Tris)、ホウ酸塩、炭酸塩、重炭酸塩及びCHESやCAPS、Bicine、TAP

Sといったグッドバッファー系緩衝剤が挙げられる。本発明のアルカリ洗浄液の好ましい態様としては、炭酸ナトリウムまたはリン酸ナトリウムを含むアルカリ洗浄液であり、これらの緩衝剤の濃度は、好ましくは10mMから1000mM、より好ましくは50mMから500mM、最も好ましくは100mMから250mMである。

[0042] 本発明におけるアルカリ洗浄液に、アミノ酸（例えば、アルギニン、ヒスチジン、ロイシン、イソロイシン、バリン）、二価カチオン（例えば、マンガン、ニッケル、銅、マグネシウム、カルシウム、バリウムの二価カチオン）、界面活性剤（例えば、ポリソルベート、Triton X-100など）、蛋白質変性剤（例えば、尿素、塩酸グアニジン）、酸化還元剤（例えば、ジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール、TCEP、硫酸銅、シスタミン、シスチン、グルタチオン）などを添加することができる。本発明における好ましいアルカリ洗浄液は、これらを添加しないアルカリ洗浄液である。

[0043] アフィニティークロマトグラフィーでのアルカリ洗浄液には緩衝剤でない塩（例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム）が添加されていてもよい。緩衝剤でない塩はアフィニティークロマトグラフィー用担体にイオン結合により結合した不純物を洗浄するのに効果があり、0.05M未満、0.1M未満、0.15M未満、0.2M未満、0.5M未満、1M未満、2M未満の濃度で、本発明のアルカリ洗浄液に添加することができる。本発明における好ましいアルカリ洗浄液は、塩化ナトリウム等の、緩衝剤でない塩を含まないアルカリ洗浄液である。

[0044] 様々な実施形態では、本発明は、Fc領域を有するタンパク質をアフィニティークロマトグラフィー用担体から溶出する工程を含む。溶出する工程は適切な溶出液を用いて行われる。結合したアフィニティークロマトグラフィー用担体からFc領域を有するタンパク質を溶出させることができれば、任意の溶出液であってよく、例えば低いpH、好ましくは2から6.5、より好ましくは2.5から4.0の範囲内のpHを有する溶出液を用いることができる。本発明の好ましい溶出液は100mMの酢酸緩衝液やグリシン塩酸溶液である。

[0045] アルカリ洗浄工程を経て溶出液により回収されたFc領域を有するタンパク質は、フリーチオール含量、自己会合性、及び凝集性が低減しており、保存

安定性に優れている。さらに混入している不純物を除去するために、追加の精製ステップを行なってもよい。通常行われる精製ステップとしては、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム沈殿、エタノール沈殿、逆相HPLC、クロマトフォーカシング、ミックスモードクロマトグラフィー、デプスフィルター、限外濾過及び透析濾過が挙げられる。

[0046] 本発明の精製方法の好ましい実施形態としては、Fc領域を有するタンパク質は抗体である。特に好ましい実施形態としては、ヒトモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体である。これらの抗体は、ヒトに対する抗原性が低く、ヒトに投与できる点で治療用医薬品として有用である。最も好ましい実施形態としてはヒト抗体である。

[0047] 本発明の精製方法の別の好ましい実施形態としては、Fc領域を有するタンパク質は λ 鎖を有する抗体である。 λ 鎖を有する抗体は、一般に κ 鎖を有する抗体と比べて、凝集性が高く取扱いが困難であった。そこで、凝集性を低下させることができるアルカリ洗浄工程を含む本発明の精製方法は、 λ 鎖を有する抗体の精製に極めて有用である。

[0048] 別の態様では、本発明は、Fc領域を有するタンパク質の製造方法に関する。Fc領域を有するタンパク質をアフィニティークロマトグラフィー用担体上でアルカリ洗浄液を用いて洗浄することにより、凝集性、自己会合性、フリーチオール含量を低減し、保存安定性に優れたFc領域を有するタンパク質を、安価で、容易に、また高収率で製造することができる。

[0049] 別の態様では、本発明は、本発明の製造方法によって製造される、Fc領域を有するタンパク質に関する。本発明の製造方法によって製造されたFc領域を有するタンパク質は、所定の自己会合性、フリーチオール含量、及び凝集性を有する点で特徴づけられる。かかるタンパク質は、 -12.4 mL/g 以上の相互作用パラメータ、タンパク質1モルあたり0.1モル以下のフリーチオール含量、及び50nmを超える粒径を有さないことにより特徴づけ

られる優れた非凝集性のうちの1以上、好ましくは2、さらに好ましくは3の性質により特徴づけられる。

[0050] 本発明の好ましい実施形態は、IL-33に結合することができるヒトモノクローナル抗体の製造方法である。ヒト抗IL-33モノクローナル抗体をアフィニティークロマトグラフィー用担体上でアルカリ洗浄液を用いて洗浄することにより、凝集性、自己会合性、フリーチオール含量を低減し、保存安定性に優れたヒト抗IL-33モノクローナル抗体を、安価で、容易に、また高収率で製造することができる。

[0051] 別の好ましい実施形態では、本発明は、本発明の製造方法によって製造される、ヒト抗IL-33モノクローナル抗体に関する。本発明の製造方法によって製造されたヒト抗IL-33モノクローナル抗体は、所定の自己会合性、フリーチオール含量、及び凝集性を有する点で特徴づけられる。かかるタンパク質は、 -12.4 mL/g 以上の相互作用パラメータ、抗体1モルあたり0.1モル以下のフリーチオール含量、及び50nmを超える粒径を有さないことにより特徴づけられる優れた非凝集性のうちの1以上、好ましくは2、さらに好ましくは3の性質により特徴づけられる。このような性質を有するヒト抗IL-33モノクローナル抗体は、保存安定性に優れており、医薬品として有用である。

[0052] 別の態様では、本発明は、溶液中に含まれるFc領域を有するタンパク質の自己会合性を低減する方法に関する。自己会合性は本願実施例に記載するように、動的光散乱を解析し、相互作用パラメータを算出することにより評価することができる。相互作用パラメータが高ければ自己会合性が低く、相互作用パラメータは -12.4 mL/g 以上であることが好ましい。本発明の好ましい態様としては、アルカリ溶液処理をしないFc領域を有するタンパク質と比較して、アルカリ溶液処理を行なうFc領域を有するタンパク質の溶液中での相互作用パラメータが 1 mL/g 以上増加、より好ましい態様として 5 mL/g 以上増加、さらにより好ましい態様として 10 mL/g 以上増加して、自己会合性が低減することである。

[0053] さらに別の態様では、本発明は、溶液中に含まれるFc領域を有するタンパク質のフリーチオール含量を低減する方法に関する。フリーチオールは反応性が高く、Fc領域を有するタンパク質の分子間でジスルフィド結合やチオエーテル結合を形成することにより、Fc領域を有するタンパク質は非可逆的に凝集する。フリーチオール含量は本願実施例に記載するように、化学的な方法により測定することができる。本発明の好ましい態様としては、アルカリ溶液処理をしないFc領域を有するタンパク質と比較して、アルカリ溶液処理を行なうFc領域を有するタンパク質の溶液中でのフリーチオール含量が、0.01以上低下、より好ましい態様として0.05以上低下、さらにより好ましい態様として0.1以上低下することである。

[0054] さらに別の態様では、本発明は、溶液中に含まれるFc領域を有するタンパク質の凝集性を低減する方法に関する。本願実施例に記載するように、動的光散乱などを測定することにより、Fc領域を有するタンパク質のモノマーの粒子径のピークよりも大きな粒子径を示す凝集体のピークを確認することができる。本発明の好ましい態様としては、一定濃度（例えば、1 mg/mL、10 mg/mL、50mg/mL）溶液を測定した場合、アルカリ溶液処理をしないFc領域を有するタンパク質と比較して、アルカリ溶液処理を行なうFc領域を有するタンパク質の凝集体のピーク面積（動的光散乱、光強度分布）が65%以上低下、より好ましい態様として80%以上低下、さらにより好ましい態様として90%以上低下、最も好ましい態様として95%以上低下することである。

[0055] さらに別の態様では、本発明は、溶液中に含まれるFc領域を有するタンパク質の保存安定性を高める方法に関する。本願実施例に記載するように、Fc領域を有するタンパク質を一定期間一定温度で保存することにより、評価することができる。例えば、Fc領域を有するタンパク質を4℃で1月間、2月間、6月間、1年間、2年間、3年間、または40℃で3日間、4週間、8週間保存することができ、それぞれのFc領域を有するタンパク質の保存安定性は、前記した自己会合性、フリーチオール含量、凝集性を測定することにより評価することができる。また、当業者が一般的に行うサイズ排除クロマトグラ

フィー、SDSポリアクリルアミド電気泳動や、マスペクトル解析によりFc領域を有するタンパク質の分解物の有無を調べることもできる。本発明の好ましい態様としては、アルカリ溶液処理をしないFc領域を有するタンパク質と比較して、アルカリ溶液処理を行なう場合のFc領域を有するタンパク質を一定期間、一定温度で保存した場合の凝集体のピーク面積(動的光散乱、光強度分布)が80%以上低下、より好ましい態様として90%以上低下、さらにより好ましい態様として95%以上低下することである。

[0056] 別の態様では、本発明は、Fcを有するタンパク質が含まれる溶液中に含まれるウイルスの不活化を同時に実施できる精製方法に関する。レトロウイルス等のウイルスはアルカリ条件で速やかに不活化することが知られている (Biotechnol Prog, 2003, 19 : 538-43.)。通常、ウイルス不活化はアフィニティカラムでの精製後に別工程として行うが、本発明では精製と同時に実施することで、工程時間及びコストを低減できる。アフィニティカラム精製時にアルカリ洗浄溶液を用いることでレトロウイルス等のウイルスを不活化することができる。

[0057] 別の態様では、本発明は、クロマトグラフィー担体の定置洗浄の工程 (Cleaning-in-place, CIP) の低減化に関する。バイオ医薬品製造において、クロマトグラフィーを用いた精製過程で様々な不純物がクロマトグラフィー担体に吸着してしまい、次の精製サイクルにキャリアオーバーする。精製によって得られる目的タンパク質の品質を保つには、クロマトグラフィー担体を一定のサイクル毎に定置洗浄する必要がある。定置洗浄には水酸化ナトリウム溶液や水酸化ナトリウムと高濃度の塩の組み合わせといった過酷な条件で行われることが多い (Journal of Chromatography A, 1308 (2013) 86- 95)。本発明では、各サイクル毎に温和なアルカリ条件で洗浄を行うことでクロマトグラフィー担体に吸着した不純物を除去することができる。その為、本発明を用いることで、過酷な条件の定置洗浄を除くこと、あるいは定置洗浄の頻度を低減することができる。

[0058] 本発明におけるアルカリ溶液のpHは9から12の範囲であり、好ましくは9.5

から12、より好ましくは10から12であり、さらにより好ましくは10.1から12、10.5から12、10.6から12、10.5から11.5であり、最も好ましくは10.6から11.5である。アルカリ溶液のpHの下限值としては例えば9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、10.1、10.2、10.3、10.4、10.5、10.6、10.7、10.8、10.9、11が挙げられ、アルカリ溶液のpHの上限値としては、11、11.1、11.2、11.3、11.4、11.5、11.6、11.7、11.8、11.9、12が挙げられる。アルカリ溶液のpHを維持するために、緩衝剤を添加することができる。緩衝剤は、使用するpHに応じて当業者が通常用いる緩衝剤の中から適宜選択すればよく、リン酸塩、クエン酸塩、グリシン、トリスヒドロキシアミノメタン (Tris)、ホウ酸塩、炭酸塩、重炭酸塩及びCHESやCAPS、Bicine、TAPSといったグッドバッファー系緩衝剤が挙げられる。本発明のアルカリ溶液に用いる緩衝剤としては、非アミノ酸系緩衝剤が好ましい。本発明のアルカリ溶液の好ましい態様としては、炭酸ナトリウムまたはリン酸ナトリウムを含むアルカリ溶液であり、これらの緩衝剤の濃度は、好ましくは10mMから1000mM、より好ましくは50mMから500mM、最も好ましくは100mMから250mMである。

[0059] 本発明におけるアルカリ溶液に、アミノ酸（例えば、アルギニン、ヒスチジン、ロイシン、イソロイシン、バリン）、二価カチオン（例えば、マンガン、ニッケル、銅、マグネシウム、カルシウム、バリウム）、界面活性剤（例えば、ポリソルベート、Triton X-100など）、蛋白質変性剤（例えば、尿素、塩酸グアニジン）、酸化還元剤（例えば、ジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール、TCEP、硫酸銅、シスタミン、シスチン、グルタチオン）などを添加することができる。本発明における好ましいアルカリ溶液は、これらを添加しないアルカリ溶液である。本発明におけるアルカリ溶液は、特にアルギニン及びその誘導体を含まないことが好ましい。

[0060] 本発明におけるアルカリ溶液に、緩衝剤でない塩（例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム）を、0.05M未満、0.1M未満、0.15M未満、0.2M未満、0.5M未満、1M未満、2M未満の濃度で添加することができる。本発明における好まし

いアルカリ溶液は、塩化ナトリウム等の、緩衝剤でない塩を含まないアルカリ溶液である。

[0061] 本発明における一実施形態において、Fc領域を有するタンパク質は抗体である。本発明における抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体であってもよく、マウス抗体、ヒト抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヤギ抗体、ラクダ抗体など、任意の動物由来の抗体であってもよい。さらに、本発明における抗体はこれらの動物由来の抗体を組み合わせたキメラ抗体やヒト化抗体であってもよい。

[0062] 本発明のFc領域を有するタンパク質の別の実施形態としては、Fc融合タンパク質が含まれる。Fc領域と融合するタンパク質としては非限定的に、TNF受容体やCTLA-4などの膜結合タンパク質の細胞外ドメインであってもよく、サイトカイン、ケモカイン、酵素、増殖因子、凝固因子、ホルモン及びこれらの機能を改変したアゴニスト、アンタゴニストであってもよい。また、ヒトファイブロネクチンの細胞外ドメインやセリンプロテアーゼ阻害剤のKunitzドメインなどを利用した、人工的な抗原結合蛋白質であってもよい (Clifford Mintz et.al BioProcess International, 2013, Vol.11(2), pp40-48)。

[0063] 本発明のFc領域を有するタンパク質のFc領域は、IgG抗体のC末端領域であるが、好ましくはヒト由来のIgG1、IgG2、IgG3、IgG4のFc領域であり、より好ましくはヒトIgG1のFc領域である。なお、Fc領域に結合する糖鎖は改変されていてもよく、特にフコース含量を調節することにより、抗体の抗体依存性細胞傷害活性を調節することができる (国際公開第2005/035586号、国際公開第2002/31140号、国際公開第00/61739号)。また、Fc領域のアミノ酸配列はアフィニティークロマトグラフィー用担体に結合できる範囲で改変されていてもよく、例えばヒトIgG1とヒトIgG3のキメラFc領域、Fc受容体 (FcRn) への結合性を高めたFc領域があげられる (橋口周平ら、生化学、2010、Vol.82(8), p710)。

[0064] 本発明における一実施形態において、Fc領域を有するタンパク質はλ鎖を有する抗体である。抗体の軽鎖はλ鎖またはκ鎖からなるが、λ鎖を有する

抗体も κ 鎖を有する抗体と同様に多様性を有し、さまざまな抗原に結合し得るので有用である。

[0065] 好ましい実施形態では、本発明によって精製されるべきFc領域を有するタンパク質はヒト抗IL-33モノクローナル抗体である。ヒト抗IL-33モノクローナル抗体は2014年4月4日出願の特願2014-078223号明細書に記載されている。

[0066] 以下に、本発明のFc領域を有するタンパク質の製造方法について説明する。遺伝子工学的手法を用いれば、所望のFc領域を有するタンパク質をコードするDNA配列を含むDNAを発現ベクターに組み込み、これを宿主細胞に形質転換して、該宿主細胞を培養することにより本発明のFc領域を有するタンパク質を製造することができる（例えば、Borrebaeck C. A. K. and Larrick J. W. THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。Fc領域を有するタンパク質が、Fc融合タンパク質である場合、Fc領域と融合するタンパク質をコードするDNAの下流に、Fc領域をコードするDNAを連結することにより、Fc領域を有するタンパク質の全長をコードするDNA配列を作製することができる。

[0067] 本発明の好ましい実施形態であるキメラ抗体は非ヒト由来の抗体可変領域をコードするDNAを、ヒト抗体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細胞に形質転換し産生させることにより得られる（欧州公開第125023号、国際公開92/19759号参照）。

[0068] 本発明の好ましい実施形態であるヒト化抗体は非ヒト哺乳動物由来抗体の相補性決定領域と、その他の部分のヒト抗体領域をコードするDNAを連結し、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られる。

[0069] 本発明の好ましい実施形態であるヒト抗体は、例えば、ヒト抗体ファージライブラリーをスクリーニングして得られるヒト抗体の軽鎖及び重鎖可変領域をコードするDNAを利用して取得することができる。またヒト抗体は、トリオーマ技術、ヒトB-細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら, 1983 Immunol Today 4: p72)及びヒトモノクローナル抗体を生成するためのEBVハイブリドーマ技術(Coleら, 1985, MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., p. 77)等を使用し、調製することもできる。さらに、ヒト抗体遺伝子を導入したトランスジェニックマウスに抗原蛋白質を免疫し、ハイブリドーマを作製することにより、ヒト抗体を生成することもできる。トランスジェニックマウスとしては、HuMab（登録商標）マウス(Medarex, Princeton NJ)、KMTMマウス(Kirin Pharma Company, Japan)、KM(FcγRIIb-KO)マウス等が挙げられる。

[0070] 本発明において好ましいヒト抗IL-33モノクローナル抗体の重鎖全長及び軽鎖全長をコードするDNA配列は、例えば軽鎖としてλ鎖を有するIgG1であり、以下の表1に表される：

[表1]

表1. 以下の配列番号は配列表の配列番号を示す。

抗体名	軽鎖DNA配列	重鎖DNA配列
A10-1C04	配列番号38	配列番号39
A23-1A05	配列番号40	配列番号41
A25-2C02	配列番号42	配列番号43
A25-3H04	配列番号44	配列番号45
A26-1F02	配列番号46	配列番号47
A00-0070	配列番号48	配列番号49
A00-0036	配列番号50	配列番号51

[0071] Fc領域を有するタンパク質の製造のための産生系は、*in vitro*の産生系を利用することができる。*in vitro*の産生系としては、真核細胞、例えば動物細胞、植物細胞または真菌細胞を使用する産生系や原核細胞、例えば大腸菌、枯草菌などの細菌細胞を使用する産生系等が挙げられる。使用される動物細胞としては、哺乳動物細胞、例えばCHO、COS、ミ

エローマ、BHK、HeLa、Vero、293、NSO、Namalwa、YB2/Oといった一般に使用される細胞、昆虫細胞などが用いられてもよいが、293細胞やCHO細胞が好ましい。

[0072] 上述のように *in vitro* の産生系にてFc領域を有するタンパク質を産生する場合、Fc領域を有するタンパク質をコードするDNAを発現ベクターに組み込んで宿主を形質転換させる。動物細胞で使用され得るベクターとしては、例えばpConPlus、pcDM8、pcDNA1/Amp、pcDNA3.1、pREP4などが好ましいが、これらに限定されるものではない。

[0073] Fc領域を有するタンパク質の製造のための *in vitro* の産生系として、ハイブリドーマを用いることができる。ハイブリドーマは一般的な方法に従って、リンパ球とミエローマ細胞株を融合することにより取得できる（例えば、Kohler et al. Nature 256, 495(1975)、Gelfre et al. Nature 266, 55052(1977)。ミエローマ細胞株としては、例えばP3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653およびSp2/0-Ag14が挙げられる。

[0074] 本発明の別の態様では、本発明の製造方法により製造されたヒト抗IL-33モノクローナル抗体を含む医薬組成物に存する。この医薬組成物は、IL-33関連疾患の診断、治療、予防、又は軽減のために使用することができる。また、本発明のヒト抗IL-33モノクローナル抗体を投与することを含むIL-33関連疾患の診断、治療、予防または軽減方法、並びに、IL-33関連疾患の診断、治療、予防または軽減用医薬の製造のための本発明のモノクローナル抗体の使用に関する。

[0075] IL-33関連疾患の例として、非限定的に、喘息、アトピー性皮膚炎、じんま疹、花粉症、アナフィラキシーショック、好酸球性副鼻腔炎、好酸球増多症候群、チャージ・ストラウス症候群、アレルギー性脳脊髄炎、リウマチ性多発筋痛、リウマチ性心疾患、多発性硬化症、関節炎（例えば、関節リウマチ、若年性関節炎、乾癬性関節炎、変形性関節症、ライター症候群等）、全身性エリトマトーデス（円板状狼蒼を含む）、乾癬、強直性脊椎炎、肝炎（例

例えば、自己免疫性肝炎、慢性活動性肝炎等）、炎症性腸疾患（例えば、潰瘍性大腸炎、クローン病、グルテン感受性腸疾患等）、全身性エリトマトーデス、シェーグレン症候群、ベーチェット病、天疱瘡、類天疱瘡、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性炎症性眼疾患、自己免疫性新生児血小板減少症、自己免疫性好中球減少、自己免疫性卵巣炎及び睾丸炎、自己免疫性血小板減少症、自己免疫性甲状腺炎、多発性筋炎、皮膚筋炎、重症筋無力症、アドレナリン作動薬耐性、円形脱毛症（*alopecia areata*）、抗リン脂質症候群、副腎の自己免疫疾患（例えば、自己免疫性アジソン病等）、セリアックスプルー皮膚炎、慢性疲労免疫機能障害症候群（*CFIDS*）、寒冷凝集素病、本態性混合クリオグロブリン血症、線維筋痛－線維筋炎、糸球体腎炎（例えば、*IgA*腎症（*nephropathy*）等）、グレーブス病、甲状腺機能亢進症（すなわち、橋本甲状腺炎）、特発性血小板減少性紫斑病（*ITP*）、混合結合組織病、1型または免疫介在性糖尿病、悪性貧血、多発性軟骨炎（*polychondritis*）、多腺症候群、スティッフマン症候群、白斑、サルコイドーシス、多腺性内分泌障害、他の内分泌腺不全、動脈硬化症、肝線維症（例えば、原発性胆汁性肝硬変等）、肺線維症（例えば、突発性肺線維症等）、慢性閉塞性肺疾患、強皮症（*CREST*症候群、レイノー現象等を含む）、尿細管間質性腎炎、デンスデポジット病、急性腎障害、心筋炎、心筋症、神経炎（例えば、ギラン・バレー症候群等）、結節性多発性動脈炎、心臓切開症候群（*cardiotomy syndrome*）、慢性炎症性脱髄性多発神経障害、*IgA*神経障害、扁平苔癬、メニエール病、ポスト心筋梗塞（*post-MI*）、ブドウ膜炎、ブドウ膜炎眼炎（*Uveitis Ophthalmia*）、血管炎、原発性無ガンマグロブリン血症、癌（例えば、脳腫瘍、喉頭癌、口唇口腔癌、下咽頭癌、甲状腺癌、食道癌、乳癌、肺癌、胃癌、副腎皮質癌、胆管癌、胆嚢癌、肝臓癌、膵臓癌、膀胱癌、大腸癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、睾丸癌、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、ユーイング腫瘍、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、黒色腫、中皮腫、多発性骨髄腫等）、免疫系による排除

に抵抗を示す感染（例えば、重症急性呼吸器症候群（SARS））、強毒性インフルエンザ感染症に伴う致死的サイトカインストーム、並びに、敗血症が挙げられ、好ましくは、喘息、アトピー性皮膚炎、花粉症、アナフィラキシーショック、強皮症、クローン病、潰瘍性大腸炎、関節炎、全身性エリトマトーデス、強直性脊椎炎、肝線維症、肺線維症、急性腎障害、血管炎及び癌などが挙げられる。

[0076] 他の好ましいFc領域を有するタンパク質としては、ヒトにおける治療用途として認められているFc領域を有するタンパク質が挙げられる。かかるFc領域を有するタンパク質としては、腫瘍細胞抗原、サイトカイン、サイトカイン受容体または接着タンパク質などに結合する抗体やFc融合タンパク質が挙げられる。したがって、様々な実施形態では、Fc領域を有するタンパク質は、以下からなる群から選択される抗原に結合する抗体またはFc融合タンパク質であってもよい：CD3（例えば、OKT3）、CD52（例えば、アレムツズマブ；Campath（登録商標））、VEGF（例えば、ベバシズマブ；Avastin（登録商標））、EGFR（例えばセツキシマブ；Erbix（登録商標））、CD33（例えば、ゲムツズマブ；Mylotarg（登録商標））、CD20（例えば、リツキシマブ；Rituxan（登録商標））、トシツモマブ；Bexxar（登録商標）、イブリツモマブ；Zevalin（登録商標））、HER-2（例えば、トラスツズマブ；Herceptin（登録商標））、TNF α （例えば、インフリキシマブ；Remicade（登録商標）、アダリムマブ；Humira（登録商標）、エタネルセプト；Embrel（登録商標）、ゴリムマブ；Simponi（登録商標））、CD25（例えば、ダクリズマブ；Zenapax（登録商標）、バシリキシマブ；Simulect（登録商標））、RSV（例えば、パリビズマブ；Synagis（登録商標））、IgE（例えば、オマリズマブ；Xolair（登録商標））、gpIIb/IIIa（例えば、アブシキシマブ；Reopro（登録商標））、CD11a（例えば、エファリズマブ；Raptiva（登録商標））、 $\alpha 4$ インテグリン（例えば、ナタリツマブ；Tysabri（登録商標））、IL-6受容体（例えば、トシリズマブ；Actemra（登録商標））、CD80/86（例えば、アバタセプト；Orencia（登録商標））、CTLA-4（例えば、イピリムマブ；YERVO

Y（登録商標））、BLys（例えば、ベリムマブ；Benlysta（登録商標））、IL-17A（例えば、セクキヌマブ；Cosentyx（登録商標））、PD-1（例えば、ニボルマブ；Opdivo（登録商標）、ペンブロリズマブ；KEYTRUDA（登録商標））。

[0077] 以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、特に言及しない限り、本発明は以下に限定されるものではない。

実施例

[0078] 実施例は7つの異なるヒト抗IL-33モノクローナル抗体（A10-1C04、A23-1A05、A25-2C02、A25-3H04、A26-1F02、A00-0070、A00-0036）を用いている。各抗体の軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列をコードするDNAをCMVプロモータの下流に挿入することにより、IgGを発現する哺乳細胞用発現ベクターを構築した。ヒト抗IL-33モノクローナル抗体の軽鎖のDNA配列はそれぞれ、配列表の配列番号38、40、42、44、46、48及び50を用い、重鎖のDNA配列はそれぞれ、配列表の配列番号39、41、43、45、47、49及び51を用いた。遺伝子導入試薬 NeoFectin-293-1（Astec）を使用して、上記発現ベクターをFreeStyle 293-F細胞（Life Technologies）に導入した。遺伝子導入後5日間培養した後に培養上清を取得した。CHO細胞による安定発現株はpConPlusベクターとCHO K1SV細胞を用いたGSシステム（Lonza社）にて樹立した。CHO細胞安定発現株はWAVE Bioreactor SYSTEM 20/50 EHT（GE Healthcare社）を用いて 0.3×10^6 cells/mLから培養を開始し、分泌されたIgGを含む培養上清を回収した。これらの培養上清を用いて以下の実施例を行なった。

[0079] 実施例1：ProteinAクロマトグラフィーによる抗体精製

精製1（アルカリ洗浄工程なし）：

ProteinAカラム（HiTrap MabSelect SuRe, GE Healthcare）をAKTA explorer 100（GE Healthcare）に接続した。HiTrap MabSelect SuReにPBS（pH7.

2)を送液しカラムを平衡化後、前記の各培養上清を添加した。カラムにPBS (pH7.2)を6 Column Volume (CV) (6 min) 送液しカラムを洗浄後、100 mMグリシン塩酸バッファー (pH3.2) を10CV (10 min) 送液し、カラム内に結合した抗体を溶出しクロマトグラムより目的のフラクションを回収した。尚、回収チューブにはpHが中性付近となるように予め1.0 Mのトリス塩酸バッファー (pH8.8) を添加しておいた。

[0080] 精製2 (アルカリ洗浄工程あり) :

ProteinAカラム (HiTrap MabSelect SuRe) をAKTA explorer 100に接続した。HiTrap MabSelect SuReにPBS (pH7.2)を送液しカラムを平衡化後、前記の各培養上清を添加した。カラムにPBS (pH7.2)を6CV (6 min) 送液しカラムを洗浄後、100 mM 炭酸ナトリウムバッファー (pH11.0) を6CV (6 min) 送液した。カラムにPBS(pH7.2)を8CV (8 min) 送液しカラムを洗浄後、100 mMグリシン塩酸バッファー (pH3.2) を10CV (10 min) 送液し、カラム内に結合した抗体を溶出しクロマトグラムより目的のフラクションを回収した。尚、回収チューブにはpHが中性付近となるように予め1.0 Mのトリス塩酸バッファー (pH8.8) を添加しておいた。

[0081] 透析 :

前記の精製1または精製2により得られた抗体溶液を遠心分離しその上清を回収後、Slide-A-Lyzer G2 10,000 MWCO (Thermo Scientific) にて透析を行った。透析外液にはPBS (pH7.2) を用い、途中で透析外液を交換して2回実施した。透析後のサンプルを回収後、0.45 μ m PES filter GD/X (GE Healthcare) にてろ過を行い、精製抗体を調製した。

[0082] 濃度測定 :

培養上清中に含まれるヒト抗体濃度はBLI(Bio-Layer Interferometry)法にてBLItz (Pall forteBIO社製) を用いて測定した。

精製抗体の濃度はNanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)にて測定した。その時の吸光係数は $E^{1\%}_{280} = 13.7$ を使用し濃度値を算出した。

[0083] 精製抗体の濃度測定結果及び、培養上清中の抗体濃度測定結果から5種類

の各抗体のアルカリ洗浄工程の有無の精製条件での回収率を算出した。また、本回収率を用いてアルカリ洗浄工程の有無による回収率比（アルカリ洗浄工程ありの回収率 / アルカリ洗浄工程なしの回収率）も算出した。その結果、5抗体のうち4抗体においてProtein A精製工程でのアルカリ洗浄工程による回収率の改善効果が示された。特にA25-2C02においては回収率が約20倍に向上した。20抗体(22精製バッチ)の内、17抗体(19精製バッチ)で収率改善効果が認められ、さらに軽鎖としてκ鎖を有するtrastuzumabにおいても回収率が向上した。20抗体(22精製バッチ)の平均の回収率比は2.7倍であった。

[表2]

表2. アルカリ洗浄工程の有無による回収率の変化

精製No.	抗体名	アルカリ 洗浄工程	回収率 (%)	アルカリ洗浄 による回収率比 %(+) / %(-)
1	A10-1C04	-	91	1.29
		+	117	
2	A23-1A05	-	89	0.94
		+	84	
3	A25-3H04	-	40	1.48
		+	59	
4	A26-1F02	-	63	2.00
		+	126	
5	A25-2C02	-	4	20.8
		+	83	

[0084] 実施例2：フリーチオール含量の測定

還元型グルタチオンを1 M EDTA を含む0.1 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) で順次希釈し標準溶液を作製した。標準溶液950 μLあたり10 mM 4,4' Dithiodipyridine (4DTP) を50 μL添加し室温で10分間静置した後、分光光度計で324 nmの吸光度を測定し検量線を作成した。

精製抗体を1 mM EDTA を含む0.1 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) で10倍希釈し測定用サンプルとした。標準溶液と同様に4DTPで発色し、検量線からフリーチオール量を算出した。得られたフリーチオール量と別途280 nmの吸光度を測定して算出した抗体濃度から、抗体1 モルあたりのフリーチ

オール含量（モル比）を算出した。

[0085] その結果、アルカリ洗浄工程を経ない前記精製1による精製方法で得られた抗体のフリーチオール含量は、アルカリ洗浄工程を経た前記精製2による精製方法で得られた抗体のフリーチオール含量より高いことが示された（表3）。試験に供された抗体の可変領域にはシステイン残基を含まないことから、検出されたフリーチオールは定常領域に存在するシステイン残基のチオール基であると考えられる。このようなフリーチオール基は反応性が高く分子間でジスルフィド結合を形成することにより凝集等を生じる恐れがあることから、アルカリ洗浄工程を加えることで凝集性などのリスクの低い抗体を得ることができた。アルカリ洗浄工程を行うことにより、フリーチオール含量が低くなる理由としては、抗体分子内で適切なジスルフィド結合を形成できなかったシステイン残基内のフリーチオール基が、アルカリ条件下で適切な分子内ジスルフィド結合を形成するためと考えられるが、この理論に束縛されることを意図するものではない。

[0086] [表3]

表3. アルカリ洗浄工程の有無と抗体のフリーチオール含量

抗体名	アルカリ洗浄工程	
	無	有
A00-0070	1.31	0.04
A00-0036	0.30	0.04
A10-1C04	0.15	0.08
A23-1A05	0.16	0.09
A25-3H04	0.16	0.03
A26-1F02	0.16	0.07

フリーチオール含量は抗体1モルあたりのフリーチオールモル量を示す。

[0087] 実施例3:凝集性の測定

PBS (pH 7.2)に溶解した前記の精製抗体溶液を限外ろ過膜(Vivaspin turbo 50000 MWC0 15 mL, ザルトリウス)を用いて数10 mg/mLになるように濃縮した。抗体の濃度は、アルカリ洗浄工程を行なった前記精製2によるA00-0070では45mg/mL、アルカリ洗浄処理を行なわなかった前記精製1によるA00-0070では21mg/mL、アルカリ洗浄工程を行なった前記精製2によるA00-0036では47

mg/mL、アルカリ洗浄工程を行なわなかった前記精製1によるA00-0036では44 mg/mLとなった。その濃縮溶液を動的光散乱測定装置(Nanotracs UPA UT151 日機装)を用いて粒子径測定を実施した。また、その凝集体形成が可逆的なものかどうかを確かめるため、PBS (pH 7.2)で順次2倍希釈したサンプルの粒子径を測定した。図1に示すように、アルカリ洗浄工程を経ないA00-0070、A00-0036は凝集体が見られ、希釈しても戻らない不可逆な凝集体を形成することが分かった。一方、アルカリ洗浄工程を経たA00-0070、A00-0036は凝集体の形成がほとんどみられないことが示された。このことから、凝集体を形成する抗体でもアルカリ洗浄工程を用いることで、凝集しない抗体を得ることが可能であった。

[0088] 実施例4: 自己会合性の測定

拡散係数(粒子径と反比例)の濃度依存性を表す相互作用パラメータは、抗体などのタンパク質高濃度製剤の処方設計にも利用される重要な指標である。相互作用パラメータの値は -12.4 mL/g より高い値であれば斥力的な相互作用でコロイド安定性に優れ、自己会合性が低いものであると報告されている(Saito et al., Pharm. Res., 2013, Vol. 30 p 1263)。

[0089] PBS (pH 7.2)に溶解した前記精製抗体溶液を限外ろ過膜で数10 mg/mLになるように濃縮し、同溶媒で順次2倍希釈したサンプルの粒子径測定を動的光散乱測定装置(Nanotracs UPA UT151 日機装)を用いて行った。得られた粒子径から拡散係数を以下のStokes-Einsteinの式で算出した。

[数1]

$$D = \frac{K_B T}{3\pi\eta d}$$

{式中、Dは拡散係数 (cm²/sec)、K_Bはボルツマン定数、Tは熱力学温度 (°C)、πは円周率、ηは希釈粘度P (poise)、dは粒径 (cm) である。}

拡散係数の濃度依存性をプロットし、以下の計算式でフィッティングする

ことで相互作用パラメータを求めた。

[数2]

$$D = D_0(1 + k_D c)$$

{式中、DはStokes-Einsteinの式で得られた拡散係数で、 D_0 は無限希釈時の拡散係数、 c は測定時の濃度である。}

この式からフィッティング直線の傾きである相互作用パラメータ k_D を得た。

[0090] 図2に示すように、アルカリ洗浄工程を経ない前記精製1によるA23-1A05、A26-1F02、A25-3H04の相互作用パラメータは低く、引力的（自己会合的）な相互作用をしている。一方で、アルカリ洗浄工程を経た前記精製2によるA23-1A05、A26-1F02、A25-3H04の相互作用パラメータは高く、自己会合性が低減されていた。アルカリ洗浄処理工程を用いることで、自己会合性が低減された抗体を得ることが可能であった。

[0091] 実施例5: 保存安定性の向上

pH 6.3クエン酸バッファー(50 mM クエン酸, 150 mM NaCl)に溶解している約10 mg/mLのA10-1C04抗体を4°Cもしくは40°Cで3日間保存した。図3に示すように、動的光散乱法(Zetasizer μ V, マルバーン)で粒子径測定を行ったところ、アルカリ洗浄工程を経ない前記精製1によるA10-1C04抗体では40°Cで3日間保存した際、凝集体が見られたのに対し、アルカリ洗浄工程を経た前記精製2によるA10-1C04抗体では凝集形成は見られなかった。アルカリ洗浄工程により、保存安定性を改善することが可能であった。

[0092] 実施例6: 収率のpH依存性

アルカリ洗浄工程による収率改善効果のpH依存性を確認するために、7種のpHの異なる洗浄液を用いて精製を実施した。ProteinAカラム (ToyoScreen AF-rProtein A HC-650F) をAKTA explorer 100に接続した。ProteinAカラムに100 mM KH_2PO_4 150 mM NaCl (pH 7.2) 溶液を送液しカラムを平衡化後、A10-1C04抗体を発現させた培養上清を添加した。カラムに100 mM KH_2PO_4 150 mM NaCl (pH 7.2) 溶液を6CV (6 min) 送液しカラムを洗浄後、100 mM KH_2PO_4 15

0 mM NaCl (pH 7.2) の中性洗浄液又は各種アルカリ洗浄液を6CV (6 min) 送液した。用いたアルカリ洗浄液は100 mM TrisHCl (pH9.1)、100 mM Gly-NaOH (pH9.5)、100 mM Na₂CO₃ (pH10.1)、100 mM Na₂CO₃ (pH10.6)、100 mM Na₂CO₃ (pH11.0)、100 mM Na₂HPO₄ (pH11.5) の溶液である。その後、カラムに100 mM KH₂PO₄ 150 mM NaCl(pH 7.2)溶液を6CV (6 min) 送液しカラムを洗浄後、100 mMグリシン塩酸バッファー (pH3.2) を8CV (8 min) 送液し、カラム内に結合した抗体を溶出しクロマトグラムより目的のフラクションを回収した。尚、回収チューブにはpHが中性付近となるように予め1.0 Mのトリス塩酸バッファー (pH8.8) を添加しておいた。精製抗体の濃度はNanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)にて測定した。

[0093] 培養上清から前記のpHの異なる各種洗浄液を用いてA10-1C04抗体を精製した時の抗体収量を図4に示した。その結果、pH10.1以上の洗浄液を用いた場合に収率改善効果が認められた。

[0094] 実施例7: 不純物除去効果のpH依存性

ProteinAカラム (MabSelect SuRe) をAKTA explorer 100に接続した。ProteinAカラムにPBS (pH 7.2) を送液しカラムを平衡化後、A23-1A05抗体を発現させた培養上清を添加し、A23-1A05抗体を捕捉した。カラムにPBS (pH 7.2) を8CV (8 min) 送液しカラムを洗浄後、100 mM KH₂PO₄ 150 mM NaCl (pH 7.2) の中性洗浄液又は6種のアルカリ洗浄液を6CV (6 min) 送液した。用いたアルカリ洗浄液は100 mM TrisHCl (pH 9.0)、100 mM Na₂CO₃ (pH 9.5)、100 mM Na₂CO₃ (pH 10.0)、100 mM Na₂CO₃ (pH 10.6)、100 mM Na₂CO₃ (pH 11.0)、100 mM K₂HPO₄ (pH 11.5) の溶液である。その後、カラムにPBS (pH 7.2) を8CV (8 min) 送液しカラムを洗浄後、100 mMグリシン塩酸バッファー (pH3.2) を10CV (10 min) 送液し、カラム内に結合した抗体を溶出しクロマトグラムより目的のフラクションを回収した。尚、回収チューブにはpHが中性付近となるように予め1.0 Mのトリス塩酸バッファー (pH8.8) を添加しておいた。

[0095] 中性洗浄液又はアルカリ溶液で洗浄した画分についてSDS-PAGE (Nupage 4

-12% Bis-Tris gels(Life Technologies社)) をメーカーの添付文書に準じて泳動した結果を図5に示した。その結果、pH9.5以上で不純物が見られた。pH11.5では目的タンパク質である抗体分子も洗浄されることが分かった。各種pHの洗浄液で洗浄した際のカラムを通過した洗浄液の吸光度の経時的变化を図6に示した。pH 7.2及び9の洗浄液では吸光度の上昇がみられず、洗浄効果が見られなかったが、pH9.5の洗浄液では不純物と思われる吸光度のピークが認められ、pH 10以上の洗浄液においては、より高い吸光度のピークが見られ、洗浄効果が確認された。

[0096] 上記のとおり各洗浄液で洗浄後、溶出された目的タンパク質である抗体のフリーチオール含量を実施例2と同様にして測定した。その結果、pH 9以上のアルカリ洗浄液による洗浄工程を行うことでフリーチオール含量が低減することが示された(図7)。

[0097] 実施例8: アルカリ溶液での洗浄時間の影響

アルカリ洗浄工程による収率改善効果に及ぼす洗浄時間の影響を調べるため、複数の送液時間の条件で精製を実施した。ProteinAカラム (ToyoScreen AF-rProtein A HC-650F) をAKTA explorer 100に接続した。ProteinAカラムに100 mM KH_2PO_4 150 mM NaCl (pH 7.2) 溶液を送液しカラムを平衡化後、A25-3H04抗体を発現させた培養上清を添加した。カラムに100 mM KH_2PO_4 150 mM NaCl (pH 7.2) 溶液を6CV (6 min) 送液しカラムを洗浄後、各種アルカリ洗浄液で洗浄を行った。用いた洗浄液は100 mM TrisHCl (pH 8.0)、100 mM TrisHCl (pH 9.0)、100 mM Na_2CO_3 (pH 10.0)、100 mM Na_2CO_3 (pH 11.0) の4種類であり、1, 3, 6, 12, 18, 24, 48CVの条件でアルカリ洗浄液による洗浄工程を実施した。その後、カラムに100 mM KH_2PO_4 150 mM NaCl (pH 7.2) 溶液を6CV (6 min) 送液しカラムを洗浄した。次に、100 mMグリシン塩酸バッファー (pH3.2) を8CV (8 min) 送液し、カラム内に結合した抗体を溶出しクロマトグラムより目的のフラクションを回収した。尚、回収チューブにはpHが中性付近となるように予め1.0 Mのトリス塩酸バッファー (pH8.8) を添加しておいた。精製抗体の濃度はNanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)にて

測定した。

[0098] アルカリ洗浄の処理時間の影響を調べるために、1CV(1 min)、3CV(3 min)、6CV(6 min)、12CV(12 min)、18CV(18 min)、24CV(24 min)、48CV(48 min)の上記アルカリ洗浄液 (pH11) で洗浄後にA25-3H04抗体を溶出した。抗体の収率を計算した結果、1CV(1 min)でもアルカリ洗浄工程を組み込むことによる収率改善効果が認められた。

[0099] 実施例9: 宿主細胞由来タンパク質

精製3 (アルカリ洗浄工程なし) :

ProteinAカラム (ToyoScreen AF-rProtein A -650F, TOSOH) をAKTA explorer 100 (GE Healthcare) に接続した。ProteinAカラムに20mM リン酸、20mM クエン酸、20mM Trisバッファー (PCTバッファー) (pH7.0) を送液しカラムを平衡化後、A10-1C04抗体の培養上清を添加した。カラムにPCTバッファー (pH7.0) を2CV送液しカラムを洗浄後、PCTバッファー (pH8.5) を6CV送液して洗浄を行った。続いて、PCTバッファー (pH5.8) を9CV送液した。最後に、PCTバッファー (pH2.7) を10CV (10 min) 送液し、カラム内に結合した抗体を溶出しクロマトグラムより目的のフラクションを回収した。

[0100] 精製4 (アルカリ洗浄工程あり) :

ProteinAカラム (ToyoScreen AF-rProtein A -650F, TOSOH) をAKTA explorer 100 (GE Healthcare) に接続した。ProteinAカラムにPCTバッファー (pH7.0) を送液しカラムを平衡化後、A10-1C04抗体の培養上清を添加した。カラムにPCTバッファー (pH7.0) を2CV送液しカラムを洗浄後、アルカリ洗浄液100 mM Na₂CO₃バッファー (pH11) を6CV送液して洗浄を行った。続いて、PCTバッファー (pH5.8) を9CV送液した。最後に、PCTバッファー (pH2.7) を10CV (10 min) 送液し、カラム内に結合した抗体を溶出しクロマトグラムより目的のフラクションを回収した。

[0101] 精製3及び精製4の方法で精製されたA10-1C04抗体溶液中に含まれる宿主細胞由来タンパク質を、Immunoenzymetric Assay for the Measurement of CHO Host Cell Proteinsキット (CYGNUS TECHNOLOGIES社) を用いて添付文書

に従い測定した。出発材料中には373443 ppm含まれていた宿主セルプロテインは、精製3（アルカリ洗浄工程なし）で精製したサンプル中には6978 ppmに減少したのに対し、精製4（アルカリ洗浄工程あり）で精製したサンプル中には1691 ppmであり、アルカリ洗浄工程を用いることで宿主細胞由来タンパク質の除去効果が確認された。

[0102] 実施例10:Fc融合タンパク質

Fc融合タンパク質ST2-Fcは、ヒトST2タンパク質の細胞外領域とヒト抗体定常領域(Fc)の融合タンパク質である。当該融合タンパク質のアミノ酸配列をコードするDNA（配列表の配列番号52）をpXC-17.4ベクター(Lonza社)に挿入し、CHO K1 SVGS-KO細胞を用いたGS XceedTM Gene Expression System(Lonza社)を添付文書に従い用いることで、目的のCHO安定発現株を樹立した。CHO安定発現株を、三角フラスコを用いて 0.3×10^6 cells/mLから培養を開始し、分泌されたST2-Fcを含む培養上清を回収した。得られたST2-Fcを含む培養上清125 mLをそれぞれ実施例1の精製1（アルカリ洗浄工程なし）、精製2（アルカリ洗浄工程あり）の方法で精製を実施した。この精製1または精製2により得られたST2-Fc溶液を回収後、Slide-A-Lyzer G2 10,000 MWCO (Thermo Scientific)にて透析を行った。透析外液にはPBS (pH7.2)を用い、途中で透析外液を交換して3回実施した。その後、濃度測定を行ったところ、収量は精製1（アルカリ洗浄工程なし）では46.1 mg、精製2（アルカリ洗浄工程あり）では48.4 mgであり、約5%の収量改善が見られた。

[0103] 精製したST2-Fc溶液（1.5 mg/mL）の粒子径測定を動的光散乱測定装置(Nanotracs UPA UT151 日機装)を用いて実施した。図8に示すように、精製2（アルカリ洗浄工程あり）で取得したサンプルは精製1（アルカリ洗浄工程なし）で得られたサンプルよりも含まれる凝集体の量が少なかった。

[0104] 実施例11:アルカリ洗浄がタンパク質に及ぼす影響

タンパク質をアルカリ条件で洗浄することで、活性の失活や化学的な変化などの懸念が考えられる。そこで、抗体の生物活性、Fc γ 受容体への結合、

ペプチドマップについて、アルカリ洗浄工程を含むプロセスで精製されたサンプルとアルカリ洗浄工程を含まないプロセスで精製されたサンプルを比較した。

[0105] 実施例11-1:抗体の生物活性

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) をEGM-2培地 (LONZA社) に懸濁させ、96ウェルコラーゲンコートマイクロプレート (AGCテクノグラス, 4860-010) に播種した (1×10^4 細胞/100 μ L/ウェル)。約24時間後、培地を吸引除去し、polymyxin B (終濃度10 μ g/mL) とhIL-33 (ATGen社) (終濃度0~100 ng/mL) を添加した抗IL-33抗体 (終濃度0~100 μ g/mL) を添加し (150 μ L/ウェル)、37°Cにて約24時間インキュベートした。培養上清を採取し、培地中のサイトカインレベルをHuman IL-6 ELISA Kitキット (R&D systems) を用いて測定した。実施例1の精製1 (アルカリ洗浄工程なし) 及び精製2 (アルカリ洗浄工程あり) の方法で精製された複数の抗体 (A10-1C04、A23-1A05、A25-3H04を含む8抗体) について、IL-6産生阻害作用の違いを検討したが、両者の中和能に差はなく、アルカリ洗浄の実施による機能喪失は見られなかった。

[0106] 実施例11-2: Fc γ 受容体への結合

実施例1の精製1 (アルカリ洗浄工程なし) 及び精製2 (アルカリ洗浄工程あり) の方法で精製された抗IL-33抗体 (A23-1A05、A10-1C04、A26-1F02、A25-3H04) とFc受容体との相互作用をBiacore T200 (GE healthcare社) を用いて解析した。Fc受容体Recombinant Human Fc γ R1IIIA (R&D Systems, 4325-FC-050) を、抗His抗体を用いてセンサーチップに固定化した。抗His抗体はHis capture kit (GE healthcare, BR-1003-51) のマニュアルに準じて固定化した。HBS-EP+ (pH 7.4) 溶液 (GE healthcare社) を用いて0.5 μ g/mLに調製したRecombinant Human Fc γ R1IIIA溶液を5 μ L/minにて30 sec添加した。次に、各種抗体溶液を低濃度サンプルから順に30 μ L/minにて60 sec添加した (Single-cycle法)。その後、HBS-EP+ (pH 7.4) 溶液を30 μ L/minにて600 sec添加してアナライトを解離させた。付属ソフトBIAevaluation softwareでTw

o state reactionモデルを用いて解析した。解離定数 (KD)、結合パラメータを算出したところ、アルカリ洗浄処理の有無によるHuman Fc γ R111Aに対する解離定数 K_D 及び結合パラメータの違いは見られず、アルカリ洗浄実施によるFc領域のFc γ 受容体への結合する機能の喪失は認められなかった。

[0107] 実施例11-3: ペプチドマップ

実施例1の精製1（アルカリ洗浄工程なし）及び精製2（アルカリ洗浄工程あり）の方法で精製された抗体(A23-1A05、A10-1C04、A26-1F02、A25-3H04)をそれぞれDTTで還元し、ヨードアセトアミドでアルキル化した後に、トリプシンで酵素消化した。液体クロマトグラフィー装置Acuity(Waters社)にC18カラムACQUITY UPLC Peptide BEH C18 Column, 300 Å, 1.7 μ m, 2.1 mm X 150 mm(Waters社)を接続した。移動相A:0.1%ギ酸/水、移動相B:0.1%ギ酸/アセトニトリルでグラジエントは移動相B濃度 1→40%/60minとなるように流量0.2 mL/minで送液し、トリプシン消化されたペプチド断片をC18カラムで分析した。得られたUVクロマトグラムを比較した結果、精製1（アルカリ洗浄工程なし）及び精製2（アルカリ洗浄工程あり）で精製されたサンプルのペプチドマップパターンは同等であり、アルカリ洗浄に伴う化学的変化は認められなかった。

産業上の利用可能性

[0108] 本発明のFc領域を有するタンパク質の精製方法は、従来の方法と比較してFc領域を有するタンパク質のフリーチオール含量、自己会合性、凝集性を低減することができ、収率や保存安定性を向上することができる。本発明により、物性の優れたFc領域を有するタンパク質を、高純度で、安価に製造することができる。また、本発明により製造されるヒト抗IL-33モノクローナル抗体は、IL-33関連疾患の診断、治療、予防または軽減用の医薬組成物として用いることができる。

請求の範囲

- [請求項1] Fc領域を有するタンパク質を精製する方法であって、
(a)Fc領域を有するタンパク質を含む溶液をアフィニティークロマトグラフィー用担体に接触させ、Fc領域を有するタンパク質をアフィニティークロマトグラフィー用担体に結合させる工程、
(b)10.1から12の範囲内のpH値を有するアルカリ洗浄液で洗浄する工程、および
(c)Fc領域を有するタンパク質を溶出する工程、
を含む、Fc領域を有するタンパク質を精製する方法。
- [請求項2] アルカリ洗浄液が10.5から11.5のpH値を有する、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] アルカリ洗浄液が0.2M以上の塩化ナトリウムを含まない、請求項1または請求項2に記載の方法。
- [請求項4] アルカリ洗浄液がアルギニンを含まない、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項5] アフィニティークロマトグラフィー用担体がProtein A、Protein G、またはこれらの改変体を有する担体である、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6] Fc領域を有するタンパク質が抗体である、請求項1から5のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項7] Fc領域を有するタンパク質がヒトモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体である、請求項1から6のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項8] Fc領域を有するタンパク質がλ鎖を有する抗体である、請求項1から7のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項9] 請求項1から8のいずれか1項に記載の方法を含む、Fc領域を有するタンパク質の製造方法。
- [請求項10] 請求項9に記載の方法により製造されたFc領域を有するタンパク質

[請求項11]

。

ヒトモノクローナル抗体を製造する方法であって、

(i)ヒトモノクローナル抗体を含む溶液をアフィニティークロマトグラフィー用担体に接触させ、ヒトモノクローナル抗体をアフィニティークロマトグラフィー用担体に結合させる工程、

(ii)9から12の範囲内のpH値を有するアルカリ洗浄液で洗浄する工程、および

(iii)ヒトモノクローナル抗体を溶出する工程、

を含み、ヒトモノクローナル抗体の軽鎖の相補性決定領域1 (LCDR1)、軽鎖の相補性決定領域2 (LCDR2)、軽鎖の相補性決定領域3 (LCDR3)、重鎖の相補性決定領域1 (HCDR1)、重鎖の相補性決定領域2 (HCDR2) 及び重鎖の相補性決定領域3 (HCDR3) のそれぞれのアミノ酸配列の組み合わせが、

(a) LCDR1: TGSSSNIGAVYDVH (配列表の配列番号1)、LCDR2: RNNQRPS (配列表の配列番号2)、LCDR3: QTYDSSRWV (配列表の配列番号3)、HCDR1: DYYMN (配列表の配列番号4)、HCDR2: SISRYSSYIYYADSVKG (配列表の配列番号5)、及びHCDR3: DIGGMDV (配列表の配列番号6)

(b) LCDR1: SGSSSNIGNNAVS (配列表の配列番号7)、LCDR2: ASNMRVI (配列表の配列番号8)、LCDR3: GAWDDSQKALV (配列表の配列番号9)、HCDR1: NYMH (配列表の配列番号10)、HCDR2: SISARSRHYIYYADSVKG (配列表の配列番号11)、及びHCDR3: LATRHNAFDI (配列表の配列番号12)

(c) LCDR1: SGSSSNIGRNAVN (配列表の配列番号13)、LCDR2: ASNMRVS (配列表の配列番号14)、LCDR3: WAWDDSQKGV (配列表の配列番号15)、HCDR1: NYMH (配列表の配列番号10)、HCDR2: SISARSSYIYYADSVKG (配列表の配列番号16)、及びHCDR3: LATRNNAFDI (配列表の配列番号17)

(d) L C D R 1 :SGSSSNIGRNAVN (配列表の配列番号13)、L C D R 2 :ASNMRRS (配列表の配列番号18)、L C D R 3 :SAWDDSQKVVV (配列表の配列番号19)、H C D R 1 :RYYMH (配列表の配列番号20)、H C D R 2 :SISAQSSHIYYADSVEG (配列表の配列番号21)、及びH C D R 3 :LATRQNAFDI (配列表の配列番号22)または、

(e) L C D R 1 :SGSSSNIGNNAVN (配列表の配列番号23)、L C D R 2 :ASNMRRP (配列表の配列番号24)、L C D R 3 :EAWDDSQKAVV (配列表の配列番号25)、H C D R 1 :NYMH (配列表の配列番号10)、H C D R 2 :SISARSSYLYYADSVKG (配列表の配列番号26)、及びH C D R 3 :LATRHVAFDI (配列表の配列番号27)

であるヒトモノクローナル抗体である、ヒトモノクローナル抗体の製造方法。

[請求項12]

ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域(VL)及び重鎖可変領域(VH)のそれぞれのアミノ酸配列の組み合わせが、

(a) V L :QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAVYDVHWYQQLPGTAPKLLIYRNN QRPSPVDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQTYDSSRWVFGGGTKLTVL (配列表の配列番号28) 及びV H :EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMM WVRQAPGKGLEWVSSISRYSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DIGGMDVWGQGLVTVSS (配列表の配列番号29)

(b) V L :QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNAVSWYQQLPGTAPKLLIYASNM RVIGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGAWDDSQKALVFGGGTKLTVL (配列表の配列番号30) 及びV H :EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYMH WVRQAPGKGLEWVSSISARSRYHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR LTRHNAFDIWGQGLVTVSS (配列表の配列番号31)

(c) V L :QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGRNAVNWYQQLPGTAPKLLIYASNM RVSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCWAWDDSQKVGVFVFGGGTKLTVL (配列表の配列番号32) 及びV H :EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYMH WVRQAPGKGLEWVSSISARSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

RLATRNNAFDIWGQGLVTVSS (配列表の配列番号 33)

(d) VL:QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGRNAVNWYQQLPGTAPKLLIYASNM
RRSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYCYSAWDDSQKVVVFGGKTLTVL (配列

表の配列番号 34) 及び VH:EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYMH
WVRQAPGKGLEWVSSISAQSSHIYYADSVGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RLATRQNAFDIWGQGLVTVSS (配列表の配列番号 35)、または

(e) VL:QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGTAPKLLIYASNM
RRPGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYCEAWDDSQKAVVFGGKTLTVL (配列

表の配列番号 36) 及び VH:EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYMH
WVRQAPGKGLEWVSSISARSSYLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA

RLATRHVAFDIWGQGLVTVSS (配列表の配列番号 37)、

である請求項 11 に記載の製造方法。

[請求項13] アルカリ洗浄液が10.5から11.5のpH値を有する、請求項 11 又は請求項 12 に記載の製造方法。

[請求項14] アルカリ洗浄液が0.2M以上の塩化ナトリウムを含まない、請求項 11 から 13 のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項15] アルカリ洗浄液がアルギニンを含まない、請求項 11 から 14 のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項16] アフィニティークロマトグラフィー用担体がProtein A、Protein G、またはこれらの改変体を有する担体である、請求項 11 から 15 のいずれか1項に記載の製造方法。

[請求項17] 請求項 11 から 16 のいずれか1項に記載の方法により製造されたヒトモノクローナル抗体。

[請求項18] 溶液中に含まれるFc領域を有するタンパク質の物性を改善する方法であって、

(a)Fc領域を有するタンパク質を含む溶液をアフィニティークロマトグラフィー用担体に接触させ、Fc領域を有するタンパク質をアフィニティークロマトグラフィー用担体に結合させる工程、

(b)9.1から12の範囲内のpH値を有するアルカリ溶液に接触する工程、
および

(c)Fc領域を有するタンパク質を溶出する工程、
を含む、方法。

[請求項19] Fc領域を有するタンパク質の物性を改善する方法が、Fc領域を有するタンパク質のフリーチオール含量を低減する方法である請求項18に記載の方法。

[請求項20] Fc領域を有するタンパク質の物性を改善する方法が、Fc領域を有するタンパク質の自己会合性を低減する方法である請求項18に記載の方法。

[請求項21] Fc領域を有するタンパク質の物性を改善する方法が、Fc領域を有するタンパク質の凝集性を低減する方法である請求項18に記載の方法。

[請求項22] Fc領域を有するタンパク質の物性を改善する方法が、さらにFc領域を有するタンパク質の保存安定性を高める方法である請求項18に記載の方法。

[請求項23] アルカリ溶液が10.6から11.5のpH値を有する、請求項18から22のいずれか1項に記載の方法。

[請求項24] アルカリ溶液が0.2M以上の塩化ナトリウムを含まない、請求項18から23のいずれか1項に記載の方法。

[請求項25] アルカリ溶液がアルギニンを含まない、請求項18から24のいずれか1項に記載の方法。

[請求項26] アフィニティークロマトグラフィー用担体がProtein A、Protein G、またはこれらの改変体を有する担体である、請求項18から25のいずれか1項に記載の方法。

[請求項27] Fc領域を有するタンパク質が抗体である、請求項18から26のいずれか1項に記載の方法。

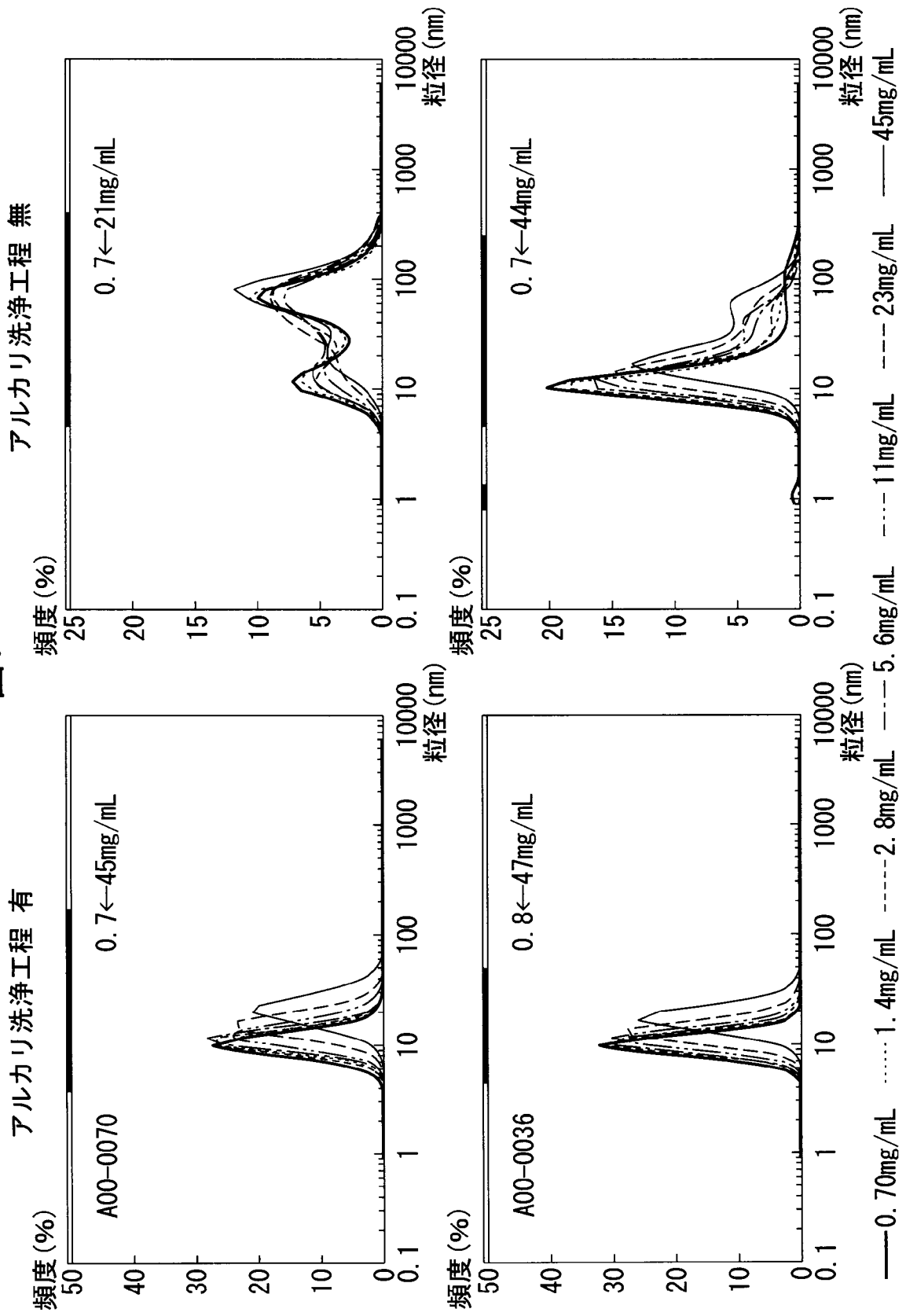
[請求項28] Fc領域を有するタンパク質がヒトモノクローナル抗体、ヒト化モノ

クローナル抗体、キメラモノクローナル抗体である、請求項 18 から 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

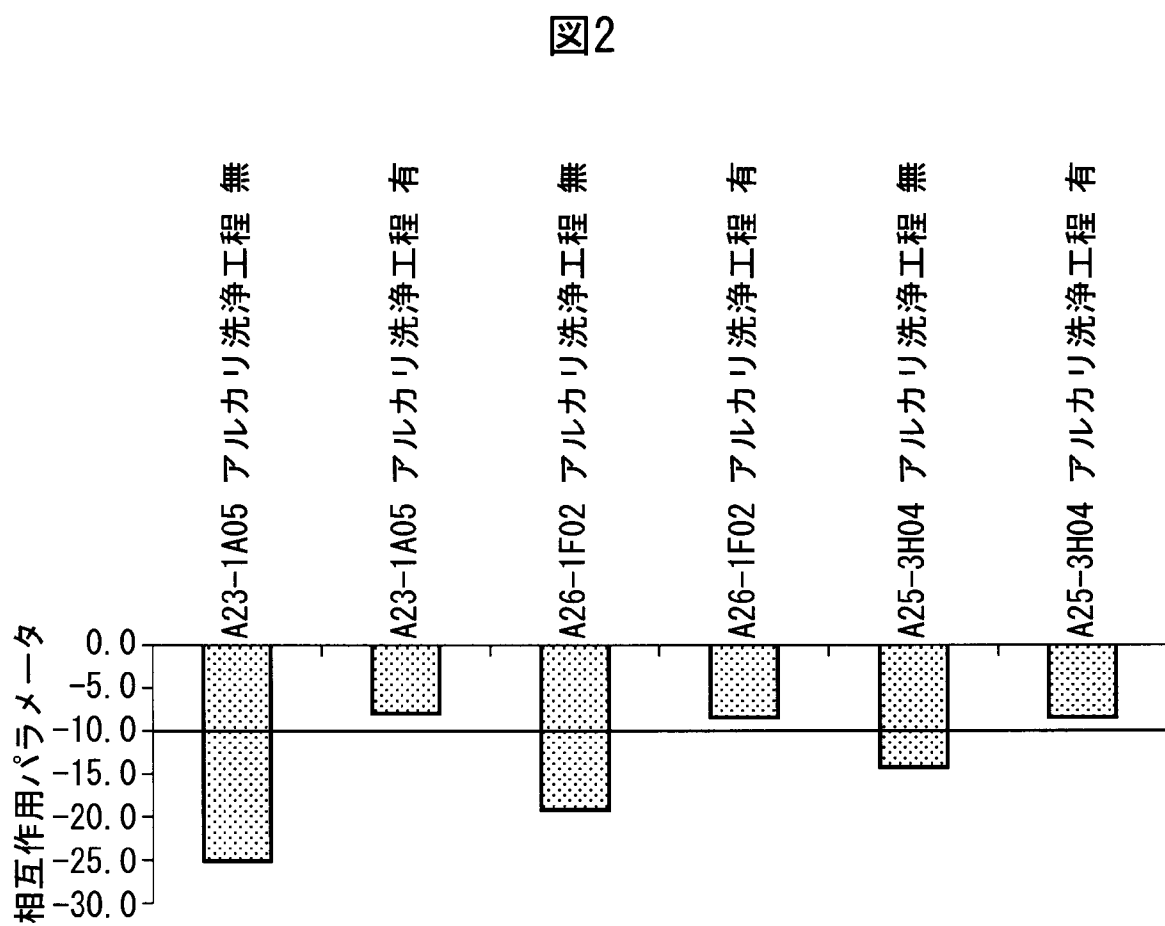
[請求項29] Fc領域を有するタンパク質が鎖を有する抗体である、請求項 18 から 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

[図1]

図1



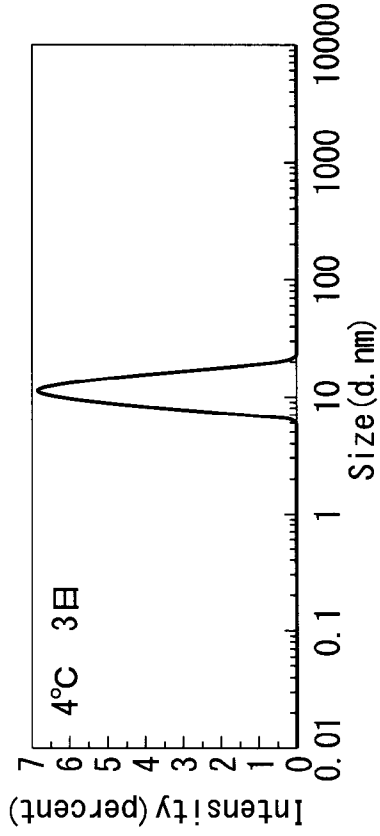
[図2]



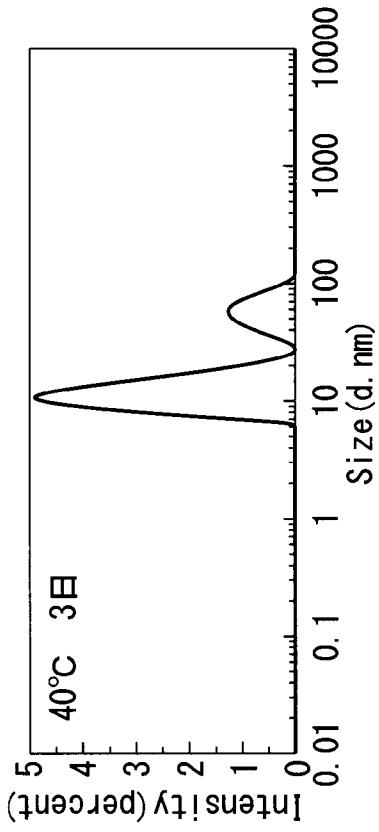
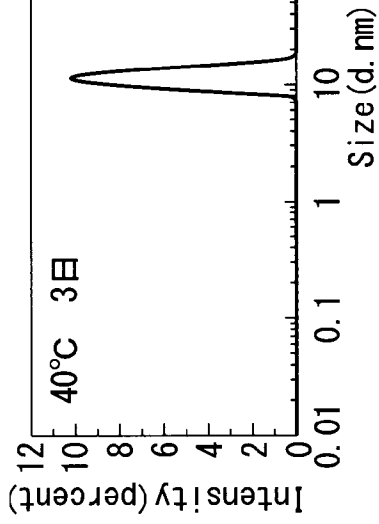
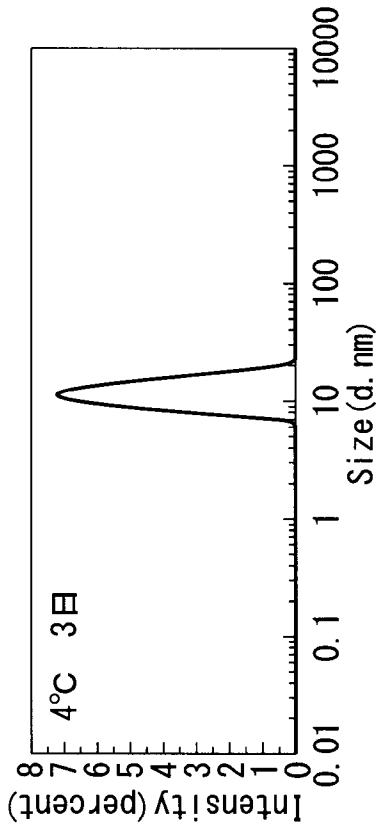
[図3]

図3

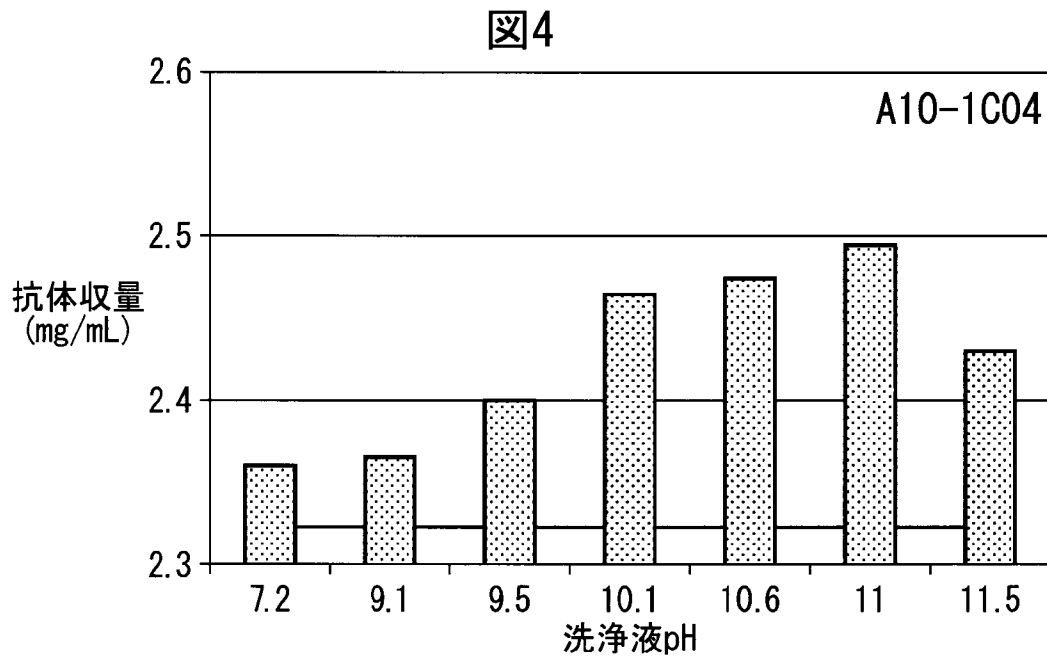
アルカリ洗浄工程 有



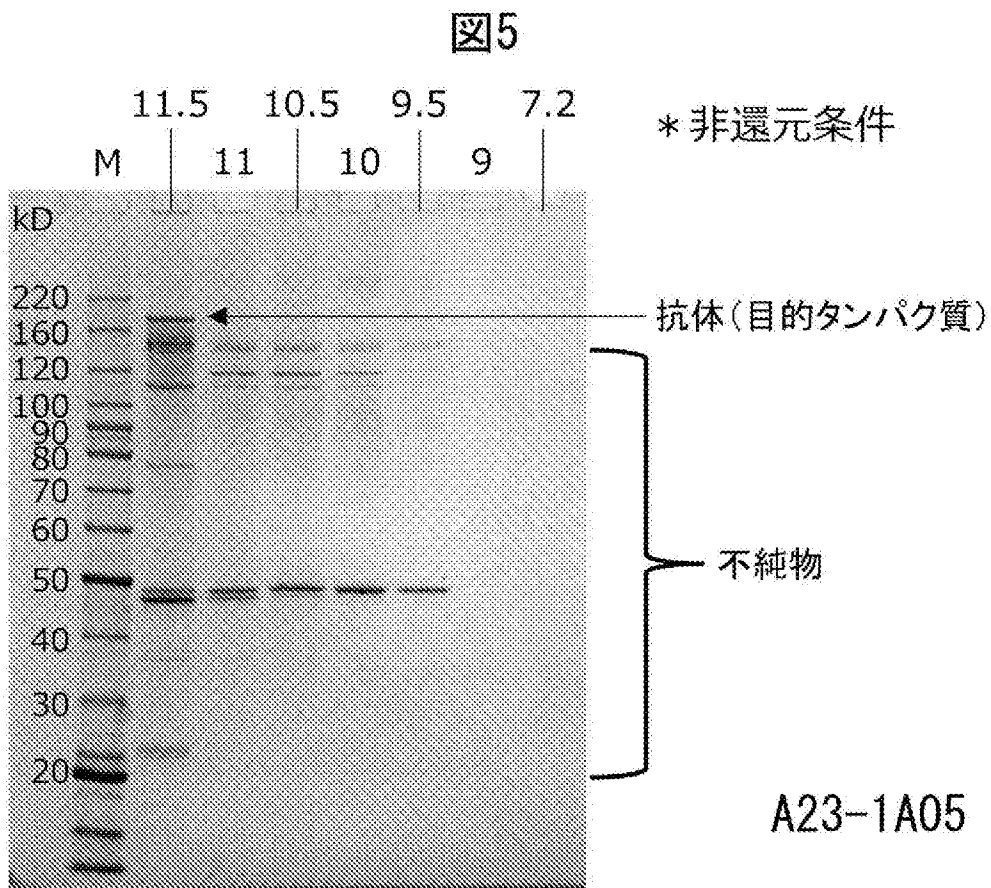
アルカリ洗浄工程 無



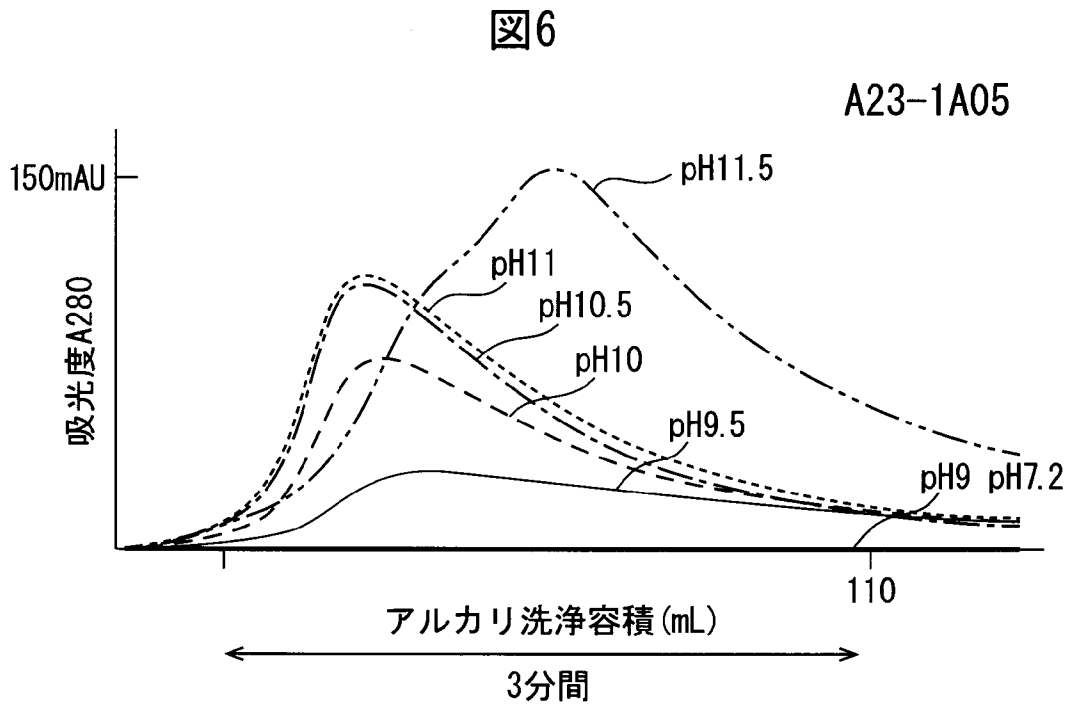
[図4]



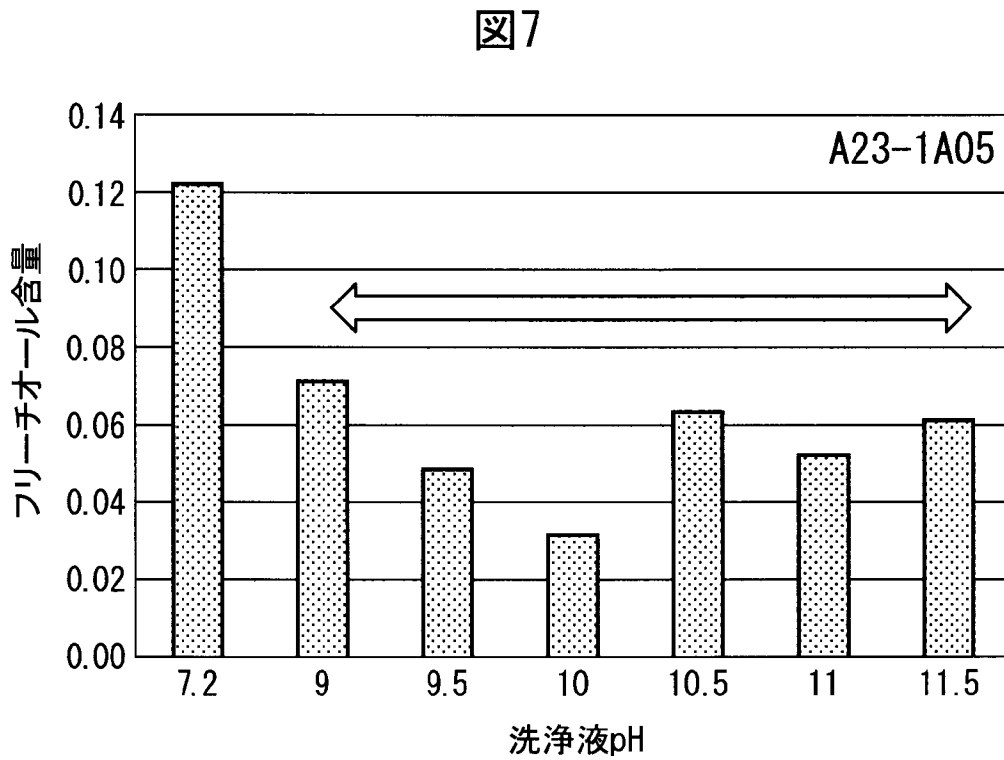
[図5]



[図6]



[図7]



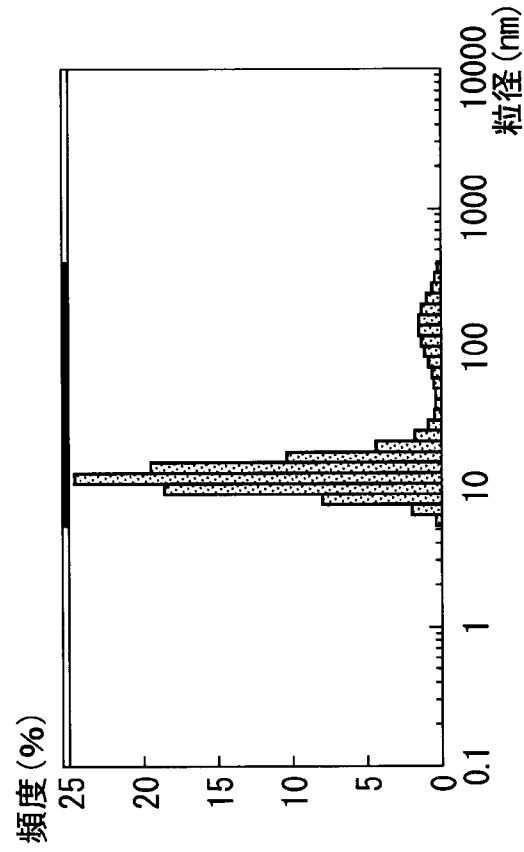
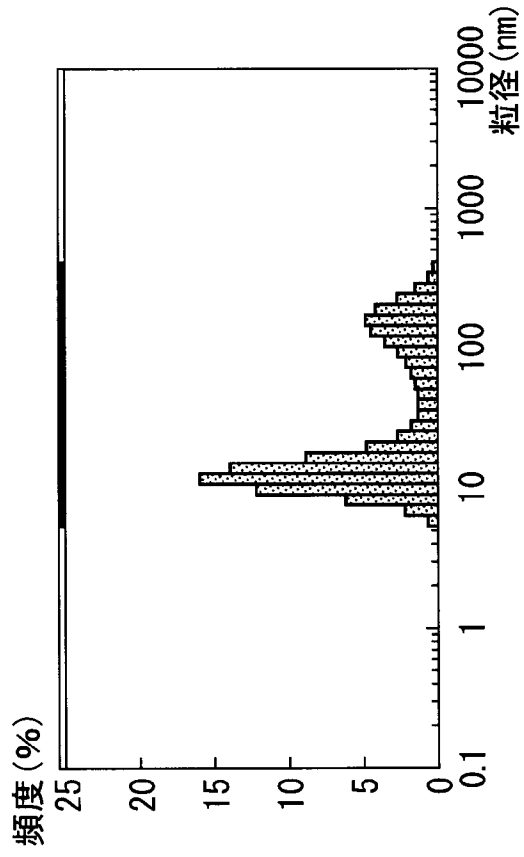
[図8]

図8

ST2-Fc

アルカリ洗浄工程 無

アルカリ洗浄工程 有



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/074286

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K1/22(2006.01)i, C07K1/113(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K1/00-1/36, C07K16/00-16/46, C12P21/08, C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2013-504621 A (Althea Technologies, Inc.), 07 February 2013 (07.02.2013), claims 19, 24 & WO 2011/034822 A1 claims 19, 24 & EP 2478005 A1 & US 2013/0053548 A1	1-29
X	JP 01-135798 A (Becton, Dickinson and Co.), 29 May 1989 (29.05.1989), claims; examples & EP 0310719 A1 claims; examples	1-29

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 17 November 2015 (17.11.15)	Date of mailing of the international search report 24 November 2015 (24.11.15)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/074286

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 02-290900 A (Bioprobe International, Inc.), 30 November 1990 (30.11.1990), claims & EP 0391526 A2 claims & US 4933435 A	1-29
<u>X</u> A	JP 2014-515389 A (Novartis AG.), 30 June 2014 (30.06.2014), claims & WO 2012/164046 A1 claims & EP 2714714 A1 & US 2014/0094593 A1	1-3, 5-14, <u>16-24, 26-29</u> 4, 15, 25
P, X	WO 2015/099175 A1 (Mitsubishi Tanabe Pharma Corp.), 02 July 2015 (02.07.2015), example 8 & TW 201529601 A	1-29

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C07K1/22(2006.01)i, C07K1/113(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C07K1/00-1/36, C07K16/00-16/46, C12P21/08, C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2015年
 日本国実用新案登録公報 1996-2015年
 日本国登録実用新案公報 1994-2015年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2013-504621 A (アルシア テクノロジーズ, インコーポレイテッド) 2013.02.07, (請求項19、24) & WO 2011/034822 A1 (Claim 19, 24) & EP 2478005 A1 & US 2013/0053548 A1	1-29
X	JP 01-135798 A (ベクトン・ドイツキンソン・アンド・カンパニー) 1989.05.29, (請求項、実施例) & EP 0310719 A1 (Claims, Examples)	1-29

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 17.11.2015	国際調査報告の発送日 24.11.2015
--------------------------	--------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 戸来 幸男 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B	3964
---	--	----	------

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 02-290900 A (バイオプルーブ・インターナショナル・インコーポレーテッド) 1990. 11. 30, (請求項) & EP 0391526 A2 (Claims) & US 4933435 A	1-29
<u>X</u> A	JP 2014-515389 A (ノバルティス アーゲー) 2014. 06. 30, (請求項) & WO 2012/164046 A1 (Claims) & EP 2714714 A1 & US 2014/0094593 A1	1-3, 5-14, <u>16-24, 26-29</u> 4, 15, 25
P, X	WO 2015/099175 A1 (田辺三菱製薬株式会社) 2015. 07. 02, (実施例 8) & TW 201529601 A	1-29