

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-502272
(P2014-502272A)

(43) 公表日 平成26年1月30日(2014.1.30)

(51) Int.Cl. F 1
C07K 1/16 (2006.01) C07K 1/16
C07K 1/22 (2006.01) C07K 1/22
A61K 39/395 (2006.01) A61K 39/395

テーマコード (参考)
4C085
4H045

審查請求 未請求 予備審查請求 未請求 (全 28 頁)

| | |
|---------------|------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2013-541958 (P2013-541958) |
| (86) (22) 出願日 | 平成23年11月28日 (2011.11.28) |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成25年7月10日 (2013.7.10) |
| (86) 國際出願番号 | PCT/SE2011/051432 |
| (87) 國際公開番号 | W02012/074463 |
| (87) 國際公開日 | 平成24年6月7日 (2012.6.7) |
| (31) 優先権主張番号 | 61/417, 494 |
| (32) 優先日 | 平成22年11月29日 (2010.11.29) |
| (33) 優先権主張國 | 米国 (US) |

(71) 出願人 597064713
ジーイー・ヘルスケア・バイオサイエンス
・アクチボラグ
スウェーデン国エスエー 751 84
ウプサラ ビヨルクガタン 30
(74) 代理人 100137545
弁理士 荒川 智志
(74) 代理人 100105588
弁理士 小倉 博
(74) 代理人 100129779
弁理士 黒川 俊久
(72) 発明者 ビヨルクマン, トーマス
スウェーデン国、エス 751 84 ウ
プサラ ビヨルクガタン 30、ジーイー
・ヘルスケア

(54) 【発明の名称】アフィニティークロマトグラフィーマトリックス

(57)【要約】

本発明は、1種以上の免疫グロブリン含有タンパク質を液体から分離する方法に関する。本方法は、先ず液体を、担体に固定化されたリガンドを含む分離マトリックスに接触させる段階、免疫グロブリン含有タンパク質をリガンドとの相互作用によってマトリックスに吸着させる段階、続いて吸着した免疫グロブリン含有タンパク質を洗浄する任意段階、及びタンパク質を遊離させる溶離剤にマトリックスを接触させることで前記免疫グロブリン含有タンパク質を回収する段階を含んでいる。本方法は、従前の分離方法に比べて、各々のリガンドが1以上のプロテインAドメイン(E、D、A、B、C)又はプロテインZ或いはその機能的変異体を含み、1以上の単量体が第3のヘリックスの後方にある最もC末端のプロリン残基の置換を有する点で改良されている。

【選択図】図 2(d)



Figure 2(a)



Figure 2(b)



Figure 2(c)

Protein A (five domains, EDABC)

Figure 2(d)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1種以上の免疫グロブリン含有タンパク質を液体から分離する方法であって、
 (a) 該液体を、担体に固定化されたリガンドを含む分離マトリックスに接触させる段階
 、
 (b) 前記免疫グロブリン含有タンパク質をリガンドとの相互作用によってマトリックスに吸着させる段階、
 (c) 吸着した免疫グロブリン含有タンパク質を洗浄する任意段階、及び
 (d) タンパク質を遊離させる溶離剤にマトリックスを接触させることで前記免疫グロブリン含有タンパク質を回収する段階
 を含んでなる方法において、前記リガンドの各々がブドウ球菌プロテインA (S p A) の
 1以上のドメイン (単量体) (E、D、A、B、C) 又はプロテインZ或いはその機能的
 変異体を含み、1以上のドメインにおける最もC末端のプロリンが任意の他のアミノ酸で
 置換されている点で改良された方法。
 10

【請求項 2】

前記プロテインAの1以上のドメイン又はプロテインZが同じドメインE、D、A、B、
 C又はプロテインZの2以上のコピーである、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記プロテインAの1以上のドメイン又はプロテインZがドメインE、D、A、B、C
 及びプロテインZから選択される2以上のドメインである、請求項1記載の方法。
 20

【請求項 4】

前記プロテインAの1以上のドメイン又はプロテインZがドメインB、ドメインC及び
 プロテインZから選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

多量体リガンド中の1以上の単量体における最もC末端のプロリンが別のアミノ酸で置
 換されている、請求項1乃至請求項4のいずれか1項記載の方法。

【請求項 6】

多量体リガンド中のすべての単量体における最もC末端のプロリンが別のアミノ酸で置
 換されている、請求項1乃至請求項5のいずれか1項記載の方法。

【請求項 7】

1以上の単量体における最もC末端のプロリンがY、W、F、M、I、V、Tから選択
 されたアミノ酸で置換されている、請求項1乃至請求項6のいずれか1項記載の方法。
 30

【請求項 8】

1以上の単量体における最もC末端のプロリンがイソロイシンで置換されている、請求
 項1乃至請求項7のいずれか1項記載の方法。

【請求項 9】

1以上の単量体における最もC末端のプロリンがE、A、L、H、M、Q、Kから選択
 されたアミノ酸で置換されている、請求項1乃至請求項8のいずれか1項記載の方法。

【請求項 10】

リガンドが、1以上のアスパラギン残基をグルタミン以外のアミノ酸に変異させること
 でアルカリ安定性を有する、請求項1乃至請求項9のいずれか1項記載の方法。
 40

【請求項 11】

リガンドが免疫グロブリンのFc部分に対して親和性を有するが、免疫グロブリンのFa
 b部分に対する親和性を欠いている、請求項1乃至請求項10のいずれか1項記載の
 方法。

【請求項 12】

前記リガンドの1以上のグリシンがアラニンで置換されている、請求項1乃至請求項1
 1のいずれか1項記載の方法。

【請求項 13】

プロテインAのBドメインの29位に対応するグリシン残基がアラニンに変えられてい
 50

る、請求項 1 1 又は請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 1 4】

リガンドがプロテイン Z であり、そのアルカリ安定性が 1 以上のアスパラギン残基をグルタミン以外のアミノ酸に変異させることで達成されている、請求項 1 乃至請求項 1 3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 5】

プロテイン Z のアルカリ安定性が、少なくとも 2 3 位のアスパラギン残基をグルタミン以外のアミノ酸に変異させることで達成されている、請求項 1 4 記載の方法。

【請求項 1 6】

前記多量体が二量体である、請求項 1 乃至請求項 1 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 7】

前記多量体が四量体である、請求項 1 乃至請求項 1 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 8】

免疫グロブリン含有タンパク質がモノクローナル抗体である、請求項 1 乃至請求項 1 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 9】

免疫グロブリン含有タンパク質がポリクローナル抗体である、請求項 1 乃至請求項 1 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 2 0】

免疫グロブリン含有タンパク質が別のタンパク質と融合した免疫グロブリンの Fc 部分を含む融合タンパク質である、請求項 1 乃至請求項 1 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 2 1】

免疫グロブリン含有タンパク質を分離するためのリガンドであって、当該リガンドがブドウ球菌プロテイン A (SpA) の 1 以上のドメイン (单量体) (E、D、A、B、C) 又はプロテイン Z 或いはその機能的変異体を含み、1 以上のドメインにおける最も C 末端のプロリンが任意の他のアミノ酸で置換されている、リガンド。

【請求項 2 2】

前記プロテイン A の 1 以上のドメイン又はプロテイン Z が同じドメイン E、D、A、B、C 又はプロテイン Z の 2 以上のコピーである、請求項 2 1 記載のリガンド。

【請求項 2 3】

前記プロテイン A の 1 以上のドメイン又はプロテイン Z がドメイン E、D、A、B、C 及びプロテイン Z から選択される 2 以上のドメインである、請求項 2 1 記載のリガンド。

【請求項 2 4】

前記プロテイン A の 1 以上のドメイン又はプロテイン Z がドメイン B、ドメイン C 及びプロテイン Z から選択される、請求項 2 1 記載のリガンド。

【請求項 2 5】

多量体リガンド中の 1 以上の单量体における最も C 末端のプロリンが別のアミノ酸で置換されている、請求項 2 1 乃至請求項 2 4 のいずれか 1 項記載のリガンド。

【請求項 2 6】

多量体リガンド中のすべての单量体における最も C 末端のプロリンが別のアミノ酸で置換されている、請求項 2 1 乃至請求項 2 5 のいずれか 1 項記載のリガンド。

【請求項 2 7】

1 以上の单量体における最も C 末端のプロリンが Y、W、F、M、I、V、T から選択されたアミノ酸で置換されている、請求項 2 1 乃至請求項 2 6 のいずれか 1 項記載のリガンド。

【請求項 2 8】

1 以上の单量体における最も C 末端のプロリンがイソロイシンで置換されている、請求項 2 1 乃至請求項 2 7 のいずれか 1 項記載のリガンド。

【請求項 2 9】

1 以上の单量体における最も C 末端のプロリンが E、A、L、H、M、K から選択

10

20

30

40

50

されたアミノ酸で置換されている、請求項 21 乃至請求項 28 のいずれか 1 項記載のリガンド。

【請求項 30】

1 以上のアスパラギン残基をグルタミン以外のアミノ酸に変異させることでリガンドがアルカリ安定性である、請求項 21 乃至請求項 29 のいずれか 1 項記載のリガンド。

【請求項 31】

リガンドが免疫グロブリンの Fc 部分に対して親和性を有するが、免疫グロブリンの Fa b 部分に対する親和性を欠いている、請求項 21 乃至請求項 30 のいずれか 1 項記載のリガンド。

【請求項 32】

当該リガンドの 1 以上のグリシンがアラニンで置換されている、請求項 21 乃至請求項 31 のいずれか 1 項記載のリガンド。

【請求項 33】

プロテイン A の B ドメインの 29 位に対応するグリシン残基がアラニンに変えられている、請求項 31 又は請求項 32 記載のリガンド。

【請求項 34】

リガンドがプロテイン Z であり、そのアルカリ安定性が 1 以上のアスパラギン残基をグルタミン以外のアミノ酸に変異させることで達成されている、請求項 21 乃至請求項 33 のいずれか 1 項記載のリガンド。

【請求項 35】

プロテイン Z のアルカリ安定性が、少なくとも 23 位のアスパラギン残基をグルタミン以外のアミノ酸に変異させることで達成されている、請求項 34 記載のリガンド。

【請求項 36】

前記多量体が二量体又は四量体である、請求項 21 乃至請求項 35 のいずれか 1 項記載のリガンド。

【請求項 37】

固体担体にカップリングされた、請求項 21 乃至請求項 36 のいずれか 1 項記載のリガンドの 1 以上を含んでなる分離マトリックス。

【請求項 38】

固体担体が寒天又はアガロースのような多糖類を含む、請求項 37 記載の分離マトリックス。

【請求項 39】

固体担体が架橋されている、請求項 37 乃至請求項 38 のいずれか 1 項記載の分離マトリックス。

【請求項 40】

リガンドがチオエーテル結合を介してカップリングされている、請求項 37 乃至請求項 39 のいずれか 1 項記載の分離マトリックス。

【請求項 41】

マトリックスのリガンド含有量が 5 ~ 15 mg / ml 、例えば 5 ~ 10 mg / ml である、請求項 37 乃至請求項 40 のいずれか 1 項記載の分離マトリックス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はアフィニティーコロマトグラフィーの分野に関し、さらに具体的には、1 以上のプロテイン A ドメイン (E、D、A、B、C) 又はプロテイン Z を含むリガンドであって、1 以上の単量体における最も C 末端のプロリン残基がアミノ酸置換を受けているリガンドを含む分離マトリックスに関する。本発明はまた、前述のマトリックスを用いて興味あるタンパク質を分離する方法であって、容量が増加するという利点を有する方法にも関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0002】

免疫グロブリンは、世界中で製造又は開発されている最も普及したバイオ医薬製品を代表している。それに対する高い商業的需要、したがってこの特定の治療薬市場の高い価値のため、製薬会社は関連するコストを抑制しながらそれぞれのmAb製造プロセスの生産性を最大化することに重きを置いてきた。

【0003】

大抵の場合、これらの免疫グロブリン分子（例えば、モノクローナル又はポリクローナル抗体）の精製における基本段階の1つとしてアフィニティークロマトグラフィーが使用される。特に興味深い部類の親和性試薬は免疫グロブリン分子の不变部に特異的に結合できるタンパク質であり、かかる相互作用は抗体の抗原結合特異性とは無関係である。かかる試薬は、特に限定されないが血清又は血漿製剤或いは細胞培養物由来の供給原料のような様々な試料からアフィニティークロマトグラフィーで免疫グロブリンを回収するのに広く使用できる。かかるタンパク質の一例は、様々な種のIgG免疫グロブリンのFc及びFab部分に結合できるドメインを含んだブドウ球菌プロテインAである。

10

【0004】

ブドウ球菌プロテインA(SpA)系試薬は、その高い親和性及び選択性のため、バイオテクノロジー分野で（例えば、抗体の捕捉及び精製並びに検出のためのアフィニティークロマトグラフィーで）広く用いられてきた。現在、SpA系アフィニティー媒体は恐らく細胞培養物由来の工業用供給原料を始めとする様々な試料からモノクローナル抗体及びそのフラグメントを単離するために最も広く使用されているアフィニティー媒体である。したがって、プロテインAリガンドを含む各種のマトリックスが市販されており、例えば、天然プロテインAの形態のもの（例えば、Protein A SEPHAROSE（商標）、GE Healthcare社（ウプサラ、スウェーデン））、組換えプロテインAからなるもの（例えば、r Protein A - SEPHAROSE（商標）、GE Healthcare社）などがある。さらに具体的には、市販の組換えプロテインA製品で行われている遺伝子操作は、担体に対するその結合を容易にすることを目的としたものである。

20

【0005】

これらの用途では、他のアフィニティークロマトグラフィー用途と同じく、夾雑物を確実に除去することに包括的な注意を払う必要がある。かかる夾雫物とは、例えばタンパク質、炭水化物、脂質、細菌及びウィルスを始めとする所望されない生体分子や微生物のように、クロマトグラフィー操作で固定相又はマトリックスに吸着された非溶出性の分子であり得る。かかる夾雫物のマトリックスからの除去は、マトリックスを再生してから引き続いて使用するため、所望生成物の最初の溶出の後に行われるが普通である。かかる除去では、通常クリーニング・イン・プレイス(CIP)として知られる操作が行われ、その際には固定相から夾雫物を溶出することのできる薬剤が使用される。かかる薬剤として多用されるものには、前記固定相に流されるアルカリ溶液がある。現時点で最も多用されている洗浄消毒剤はNaOHであり、その濃度は汚染の程度及び性質に応じて0.1Mから例えば1Mの範囲にわたり得る。この方法では、マトリックスが13を超えるpH値に暴露されることを伴う。タンパク質系の親和性リガンドを含む多くのアフィニティークロマトグラフィーマトリックスに関しては、かかるアルカリ性環境は極めて過酷な条件であり、そのために関連する高pHに対するリガンドの不安定性によって容量低下を生じる。

30

【0006】

そこで、アルカリ性pH値に耐える能力の向上した人工タンパク質リガンドの開発に集中して多大の研究が行われてきた。例えば、Gulich et al (Susanne Gulich, Martin Linhult, Per-Ake Nygren, Matthias Uhlen, Sophia Hober, Journal of Biotechnology 80 (2000), 169-178)は、アルカリ性環境における連鎖球菌のアルブミン結合ドメイン(ABD)の安定性を改善するためのタンパク質工学を提唱した。Gulich et alは、4つのアスパラギン残基のすべてをロイシン

40

50

(1残基)、アスパラギン酸(2残基)及びリシン(1残基)で置換したA B Dの変異体を作製した。さらに、Gulich et alは、この変異体が天然タンパク質と同様の標的タンパク結合挙動を示すこと、及び人工リガンドを含むアフィニティーカラムがアルカリ性条件に繰返し暴露した後でも非人工親リガンドを用いて調製したカラムより高い結合容量を示すことを報告している。かくして、構造及び機能に顕著な影響を与えることなしに4つのアスパラギン残基のすべてを置換できると結論づけている。

【0007】

最近の研究は、プロテインA(SpA)に変更を加えることで同様な性質に影響を及ぼし得ることを示している。米国特許出願公開第2005/0143566号には、1以上のアスパラギン残基をグルタミン又はアスパラギン酸以外のアミノ酸に変異させた場合、かかる変異は、SpAのBドメイン又はプロテインZ(SpAのBドメイン由来の合成構築物(米国特許第5143844号))のような親SpAに比べて、最大約13~14までのpH値における向上した化学的安定性を付与することが開示されている。著者らは、これらの変異タンパク質を親和性リガンドとして使用した場合、分離媒体は予想される通りアルカリ剤を用いるクリーニング操作に一層よく耐え得ることを示している。米国特許出願公開第2006/0194955号は、変異したリガンドがプロテアーゼに一層よく耐え、したがって分離プロセスでのリガンドの漏出を低減させ得ることを示している。別の出願公開文献である米国特許出願公開第2006/0194950号は、アルカリ安定性のSpAドメインをさらに、例えばG29A変異により、リガンドがFabに対する親和性を欠くがFc親和性は保持するように改変し得ることを示している。

10

20

30

【0008】

歴史的には、5つのIgG結合ドメインを含む天然プロテインAが、すべてのプロテインAアフィニティーメディアの製造に使用されていた。組換え技術を用いて多数のプロテインA構築物が製造されてきたが、これらはいずれも4つ又は5つのIgG結合ドメインを含んでいた。最近の研究では、二量体リガンドが四量体リガンドに比べて同様な結合容量又は増加した結合容量を有することが示された(国際公開第2010/080065号)。

【0009】

当技術分野では、増加した結合容量を有するタンパク質リガンドを含む分離マトリックスを得ることが今なお要望されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

米国特許第5362859号明細書

【発明の概要】

【0011】

本発明の目的の1つは、IgG、IgA及び/又はIgMのような免疫グロブリンを好ましくはそのFcフラグメントを介して結合し得るタンパク質リガンドを提供することである。これらのリガンドは、プロテインAの1以上の単量体ドメイン(E、D、A、B、C)又はプロテインZにおいて第3のヘリックスの後方にある最もC末端のプロリン残基の置換を担持し、かくしてかかる置換を持たないリガンドに比べて高い結合容量を有している。好ましくは、かかるリガンドは多量体、即ちプロテインA(E、D、A、B、C)及びプロテインZから選択された2以上の単量体ドメインを含むものである。

40

【0012】

本発明の別の目的は、上述したように、IgG、IgA及び/又はIgMのような免疫グロブリンを好ましくはそのFcフラグメントを介して結合し得るリガンドを含むアフィニティーマトリックスを提供することである。

【0013】

本発明のさらに別の目的は、本発明のアフィニティーマトリックスを用いて1種以上の免疫グロブリン含有タンパク質を分離する方法を提供することである。上記の置換を有する親和性リガンドを使用することで、本方法は意外にも標的分子に対する結合容量の増加

50

を達成する。

【0014】

かくして本発明は、純粋な免疫グロブリン画分のような精製生成物又は別法として免疫グロブリンを除去した後の液体を製造する方法、或いは試料中における免疫グロブリンの存在を検出する方法を提供する。本発明に係るリガンドは容量の増加を示し、したがってかかるリガンドはコスト効率の良い大規模操作のための魅力的な候補品となる。

【0015】

上述した目的の1以上は、添付の特許請求の範囲中に記載したようにして達成することができる。

【図面の簡単な説明】

10

【0016】

【図1】図1はプロテインZのアミノ酸配列を示し、57位のプロリンが太字で示されている(配列番号2)。

【図2(a)】図2(a)は仮説的な四量体リガンド構造を示し、各単量体はプロテインA(E、D、A、B、C)及びプロテインZから選択されたドメインであって、これは各単量体における最もC末端のプロリンの存在のためドメイン間に60°の屈曲を含んでいる。

【図2(b)】図2(b)はリガンドとIgGとの間の仮説的な結合を示し、ここでは単一のIgGが2つの単量体ドメインに結合している(両方のFc鎖は円によって表され、各々が1つの単量体ドメインに結合している)。

20

【図2(c)】図2(c)は、各ドメインにおける最もC末端のプロリンが別のアミノ酸残基で置換されたため、単量体ドメイン間が一層直線的で柔軟である仮説的な多量体リガンド構造を示している。

【図2(d)】図2(d)は、プロテインAの5つのドメインの各々からのアミノ酸配列の整列状態を示している。

【図3】図3は、動的結合容量アッセイに関する代表的なクロマトグラム結果を示している。

【発明を実施するための形態】

【0017】

30

定義

本明細書中で「タンパク質」という用語は、タンパク質並びにそのフラグメントを記述するために使用される。即ち、三次元構造を示すアミノ酸の連鎖が「タンパク質」という用語に包含され、したがってタンパク質フラグメントも包含される。

【0018】

本明細書中では、タンパク質の「機能的変異体」という用語は、機能(本発明に関しては親和性及び安定性と定義される)が本質的に保持されている変異タンパク質を意味する。そこで、前記機能とは無関係の1以上のアミノ酸が置換されていてもよい。

【0019】

本明細書中で「親分子」という用語は、本発明の変異が導入される前の形態の対応タンパク質に関して使用される。

【0020】

40

「構造的安定性」という用語は分子の三次元形態の健全性をいい、「化学的安定性」という用語は化学的分解に耐える能力をいう。

【0021】

「Fcフラグメント結合」タンパク質という用語は、当該タンパク質が免疫グロブリンのFcフラグメントに結合できることを意味する。ただし、Fcフラグメント結合タンパク質が免疫グロブリンのFab領域のような他の領域にも結合できることを排除するものではない。

【0022】

本明細書中では、アミノ酸について、その正式名称で記載しない場合には慣用の一文字

50

略号で表す。

【0023】

本明細書中では、変異は置換位置の番号の前に野生型又は非変異型アミノ酸を付し、その後に変異したアミノ酸を付して定義する。例えば、23位のアスパラギンのトレオニンへの変異はN23Tと記載される。

【0024】

一様様では、本発明は、1種以上の免疫グロブリン含有タンパク質を液体から分離する方法であって、(a)該液体を、担体に固定化されたリガンドを含む分離マトリックスに接触させる段階、(b)免疫グロブリン含有タンパク質をリガンドとの相互作用によってマトリックスに吸着させる段階、(c)吸着した免疫グロブリン含有タンパク質を洗浄する任意段階、及び(d)タンパク質を遊離させる溶離剤にマトリックスを接触させることで前記免疫グロブリン含有タンパク質を回収する段階を含んでなる方法に関する。この方法では、リガンドの各々がブドウ球菌プロテインA(SpA)の1以上のドメイン(即ち、単量体)(E、D、A、B、C)又はプロテインZ或いはその機能的変異体を含み、1以上のドメインにおける最もC末端のプロリンが任意の他のアミノ酸で置換されているようなリガンドを使用することで免疫グロブリン分子に対するリガンドの結合容量の増加が得られる。

10

【0025】

免疫グロブリン結合タンパク質(即ち、リガンド)は、ブドウ球菌プロテインA(SpA)又は連鎖球菌プロテインG(SpG)或いはこれらのタンパク質のIgG結合ドメインを含む組換えタンパク質のような、天然の免疫グロブリン結合能力を有する任意のタンパク質であり得る。他のかかるタンパク質の総説に関しては、例えば、Kronval1, G., Jonsson, K. Receptions: a novel term for an expanding spectrum of natural and engineered microbial proteins with binding properties for mammalian proteins, J. Mol. Recognit. 1999 Jan-Feb; 12(1):38-44を参照されたい。リガンドは、SpAのE、D、A、B及びCドメインの1以上を含み得る。さらに好ましくは、リガンドはプロテインAのドメインB又は人工的に作製されたプロテインZを含んでいる。

20

【0026】

プロリンZ又はプロテインAドメインはいずれも、C末端の近くにプロリン(P57)を含んでいる(例えば、図1、図2(d)及び配列番号1~8を参照されたい)。プロリンは、その構造(即ち、側鎖が-窒素に結合していること)のため、タンパク質中に屈曲を生じることが知られている。この結合は=約60°の結合角に限定され、そのためタンパク質中に屈曲を生じる。古典的な例はIgGのヒンジに見られ、そこにはプロリンが見出される。このように、C末端にプロリンが存在する場合、プロテインA又はプロテインZのすべてのドメインは結合中に60°の角を成して終わり、ドメイン間に屈曲を生じる(図2(a)~2(c))。最もC末端のプロリンは、Fc結合にも関与せず(Graile et al., PNAS 2000, 97(10):5399-5404; Deisenhofer, Biochemistry 1981, 20(9):2361-2370)、また-ヘリックスの一部でもない(プロリンに関しては不可能である)。

30

【0027】

このように、プロテインA/プロテインZリガンドにおける単量体ドメインの不良な使用(トータルオーバローディングで2つの内の1つが使用されること)は、各ドメインにおけるC末端プロリンの存在によって引き起こされる構造的制限(即ち、立体障害)に原因することがあり得る。2つのドメインが1つのIgG分子に結合し、したがっていずれか他方のドメインに対するIgGのアクセスが妨害される可能性がある(図2(b))。かかる結合はまた、リガンドに対するIgGのより強い結合を意味し得る。本発明の若干の実施形態では、各ドメインの一層高度の使用を達成するため、各ドメインにおける最もC

40

50

末端のプロリン（配列番号 1 又は配列番号 2 の P 5 7 ）が置換され、かくして、恐らくは单量体ドメイン間が一層直線的かつ / 又は柔軟な多量体リガンド構造（図 2 (c)）のため、リガンドの容量の増加が得られる。

【0028】

図 2 (d) に示されるように、プロテイン A のつのドメイン間の配列は高度に関連している。欠失や挿入は存在せず、置換の多くは保存的変化であって、タンパク質の構造又は機能に対して起こり得る変化はごくわずかである。例えば、B ドメインと C ドメインとの間の変化は、58 アミノ酸のポリペプチド全体にわたってわずか 4 つである。したがって、これらのドメインの各々における C 末端のプロリンは、プロテイン A 又は該ドメインを含むリガンドに対して同様な構造的 / 機能的寄与をもたらす。同様に、プロリンの変化は、かかる変化を含むリガンドの構造 / 機能に対して同様な効果を引き起こす。

10

【0029】

若干の実施形態では、プロリンは、好ましくは - シートを形成するアミノ酸で置換される。好ましくは、プロリンは、バルキーなアミノ酸又は「スチフネス」を与えるアミノ酸（例えば、Y、W、F、M、I、V、T）で置換される。さらに好ましくは、かかる置換は P 5 7 I である。

【0030】

他の実施形態では、プロリンは - ヘリックスの形成を生じやすいアミノ酸（例えば、E、A、L、H、M、Q、K）で置換される。

20

【0031】

若干の実施形態では、親分子は配列番号 1 乃至配列番号 8 で規定される配列又はその任意の機能的変異体を含んでいる。

【0032】

若干の実施形態では、多量体リガンド中の 1 以上の单量体ドメインにおける最も C 末端のプロリン残基が置換されている。他の実施形態では、多量体リガンド中のすべての单量体ドメインにおける最も C 末端のプロリン残基が置換されている。

30

【0033】

一実施形態では、リガンドはまた、例えば S p A ドメイン B 又はプロテイン Z の 1 以上の单量体ドメインの 1 以上のアスパラギン残基をグルタミン以外のアミノ酸に変異させることでアルカリ安定化される。前述の通り、米国特許出願公開第 2005 / 0143566 号は、1 以上のアスパラギン残基をグルタミン又はアスパラギン酸以外のアミノ酸に変異させた場合、かかる変異（例えば、N 23 T）はリガンドに高 pH での向上した化学的安定性を付与することを開示している。さらに、これらのリガンドを含むアフィニティ媒体は、アルカリ剤を用いるクリーニング操作に一層よく耐えることができる。米国特許出願公開第 2006 / 0194955 号は、変異したリガンドがプロテアーゼにも一層よく耐え、したがって分離プロセスでのリガンドの漏れを低減させ得ることを示している。これらの出願の開示内容は、援用によって本明細書の内容の一部をなしている。

【0034】

別の実施形態では、こうして製造されたリガンドは、抗体の F c 部分に対して親和性を有するものの、抗体の F a b 部分に対する実質的な親和性を欠いている。したがって、若干の実施形態では、リガンドの 1 以上のグリシンがアラニンで置換されている。米国特許出願公開第 2006 / 0194950 号は、アルカリ安定性ドメインをさらに、例えば G 29 A 変異により、リガンドが F a b に対する親和性を欠くが F c 親和性は保持するように改変し得ることを示している。この出願の開示内容は援用によって本明細書の内容の一部をなしている。本明細書中で使用されるアミノ酸の番号付けは当技術分野で通常使用されているものであり、プロテイン A のドメイン B 上での位置によって例示されており、当業者は E、D、A、B、C の各ドメイン又はプロテイン Z に関して変異させるべき位置を容易に認識できよう。

40

【0035】

有利な実施形態では、リガンドはドメイン B の多量体コピーから構成されており、ドメ

50

インBのアルカリ安定性は1以上のアスパラギン残基をグルタミン以外のアミノ酸に変異させること（例えば、N23T）で達成されていると共に、アルカリ安定性ドメインBの29位のアミノ酸残基の変異（例えば、G29A変異）が含まれている。

【0036】

別の実施形態では、リガンドは、1以上のアスパラギン残基をグルタミン以外のアミノ酸に変異させることでアルカリ安定性が達成されたプロテインZの多量体コピーから構成されている。有利な実施形態では、アルカリ安定性は少なくとも23位のアスパラギン残基をグルタミン以外のアミノ酸に変異させることで達成されている。

【0037】

当業者には容易に理解されるように、P57の置換、アルカリ安定性を与えるための変異、及びG-A変異は、通常の分子生物学的技法を用いて任意の順序で実施できる。さらに、かかるリガンドは、変異したタンパク質リガンドをエンコードする核酸配列を含むベクターによって発現させることができる。別法として、かかるリガンドはタンパク質合成技法によっても製造できる。所定配列のペプチド及びタンパク質を合成する方法は、当技術分野で公知であって一般に利用できる。

10

【0038】

かくして、本発明では、「ブドウ球菌プロテインAのアルカリ安定性ドメインB」という用語は、米国特許出願公開第2005/0143566号及び同第2006/0194950号に記載されている変異タンパク質のような、SpAのドメインBに基づくアルカリ安定化タンパク質、並びに他の起源を有するが機能的に同等なアミノ酸配列を有する他のアルカリ安定性タンパク質を意味する。

20

【0039】

当業者には理解される通り、発現されたタンパク質は、担体に固定化する前に適当な程度まで精製すべきである。かかる精製方法は当技術分野で公知であり、担体へのタンパク質系リガンドの固定化は標準的な方法を用いて容易に実施される。好適な方法及び担体は以下に一層詳しく記載される。

【0040】

したがって一実施形態では、本発明に係る変異タンパク質は、アスパラギン変異が21位にないことを条件として、配列番号1又は配列番号2で規定される配列の約75%以上、例えば約80%以上、好ましくは95%以上を含んでいる。

30

【0041】

本明細書中では、次の配列番号1はSpAのBドメインのアミノ酸配列を規定する。

A1a A s p A s n L y s P h e A s n L y s G l u G l n G l n
 A s n
 A1a P h e T y r G l u I l e L e u H i s L e u P r o A s n
 L e u
 A s n G l u G l u G l n A r g A s n G l y P h e I l e G l n
 S e r
 L e u L y s A s p A s p P r o S e r G l n S e r A l a A s n
 L e u
 L e u A l a G l u A l a L y s L y s L e u A s n A s p A l a
 G l n
 A l a P r o L y s.

40

次の配列番号2はプロテインZとして知られるタンパク質を規定する。

V a l A s p A s n L y s P h e A s n L y s G l u G l n G l n
 A s n
 A l a P h e T y r G l u I l e L e u H i s L e u P r o A s n
 L e u
 A s n G l u G l u G l n A r g A s n A l a P h e I l e G l n
 S e r

50

Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn
 Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 Gln
 Ala Pro Lys.

【0042】

プロテインZは、29位のグリシンがアラニンに置換されたS p AのBドメイン由来の合成構築物である。例えば、The Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation, M. C. Fleckinger and S. W. Drew, editors, John Wiley and Sons Inc., New York, 8-22のStahl et al., 1999: Affinity fusions in biotechnology: focus on protein A and protein Gを参照されたい。
 10

【0043】

一実施形態では、上述の変異タンパク質は、P57の置換を含む、配列番号1又は配列番号2で規定されるアミノ酸配列或いはその機能的変異体から構成されている。別の実施形態では、上述の変異タンパク質は、P57の置換を含む、配列番号4乃至配列番号8で規定されるアミノ酸配列或いはその機能的変異体から構成されている。本文脈中で使用される「機能的変異体」という用語は、免疫グロブリンに対する変異タンパク質の親和性又はpH値の上昇した環境におけるその向上した化学的安定性に影響を及ぼさないアミノ酸位置における1以上の追加変異を含む任意の類似配列を包含する。
 20

【0044】

有利な実施形態では、本発明のP57置換は、バルキーなアミノ酸又は「スチフネス」を与えるアミノ酸（例えば、Y、W、F、M、I、V、T）からなる群から選択され、かつ親分子は配列番号1乃至配列番号8で規定される配列又はその任意の機能的変異体を含んでいる。他の実施形態では、P57は-ヘリックスの形成を生じやすいアミノ酸（例えば、E、A、L、H、M、Q、K）で置換され、かつ親分子は配列番号1乃至配列番号8で規定される配列又はその任意の機能的変異体を含んでいる。さらに好ましくは、かかる置換はP57Iである。
 30

上述の通り、アルカリ性条件下で長期にわたって高い結合容量を有するリガンドとして有用な変異タンパク質を得るためにには、21位のアスパラギン残基の変異は回避される。一実施形態では、3位のアスパラギン残基は変異されない。

【0045】

若干の実施形態では、多量体リガンド中の1以上の単量体における最もC末端のプロリン残基が置換されている。他の実施形態では、多量体リガンド中のすべての単量体における最もC末端のプロリン残基が置換されている。

【0046】

有利な一実施形態では、ロイシン残基とグルタミン残基との間に位置するアスパラギン残基が例えばトレオニン残基に変異されている。かくして、一実施形態では、配列番号2で規定される配列の23位のアスパラギン残基が、例えばトレオニン残基に変異されている。特定の実施形態では、配列番号2で規定される配列の43位のアスパラギン残基も例えばグルタミン酸に変異されている。アミノ酸番号43が変異された実施形態では、当該変異を1以上の追加変異（例えば、N23T）と組み合わせるのが最も有利であるように思われる。
 40

【0047】

かくして、本発明は上述した単量体型変異タンパク質を包含する。ただし、かかるタンパク質単量体を合体させて二量体、三量体、四量体、五量体などの多量体リガンドとすることもできる。したがって、本発明の別の態様は、本発明に係る1以上の変異タンパク質を1以上の追加単位（好ましくはやはり本発明に係る変異タンパク質）と共に含んでなる
 50

多量体である。かくして、本発明は例えば2つの反復単位からなる二量体又は4つの反復単位からなる四量体である。

【0048】

若干の実施形態では、多量体リガンドは、プロリンAのドメインE、D、A、B、C又はプロテインZ或いは任意の機能的変異体から選択された同一単量体ドメインの2以上(例えば、2~4)のコピーを含んでいる。

【0049】

他の実施形態では、多量体リガンドは、プロリンAのドメインE、D、A、B、C又はプロテインZ或いは任意の機能的変異体から選択された2以上(例えば、2~4)の異なる単量体ドメインを含んでいる。

10

【0050】

一実施形態では、本発明に係る多量体は、好ましくは0~15のアミノ酸(例えば、0~10又は5~10のアミノ酸)からなるアミノ酸ストレッチで連結された単量体単位を含んでいる。かかる連結の性質は、好ましくはタンパク質単位の空間的コンホメーションを不安定にすべきでない。さらに、前記連結は好ましくはアルカリ性環境中で変異タンパク質単位の特性を損なわないように十分安定であるべきである。

【0051】

別の実施形態では、本発明の二量体リガンドは次の配列番号3の配列を含んでいる。

A1aG1nValAspA1aLysPheAspLysGluG1nG1nAsn
 AlaPheTyrGluIleLeuHisLeuProAsnLeuThrGlu
 GluG1nArgAsnAlaPheIleG1nSerLeuLysAspAsp
 ProSerG1nSerAlaAsnLeuLeuAlaGluAlaLysLys
 LeuAsnAspAlaG1nAlaIleLysValAspAlaLysPhe
 AspLysGluG1nG1nAsnAlaPheTyrGluIleLeuHis
 LeuProAsnLeuThrGluGluG1nArgAsnAlaPheIle
 G1nSerLeuLysAspAspProSerG1nSerAlaAsnLeu
 LeuAlaGluAlaLysLysLeuAsnAspAlaG1nAlaIle
 LysCys。

20

【0052】

さらに別の実施形態では、二量体リガンドは次の配列番号9の配列を含んでいる。

A1aG1nValAspAsnLysPheAsnLysGluG1nG1nAsn
 AlaPheTyrGluIleLeuHisLeuProAsnLeuThrGlu
 GluG1nArgAsnG1yPheIleG1nSerLeuLysAspAsp
 ProSerValSerLysGluIleLeuAlaGluAlaLysLys
 LeuAsnAspAlaG1nAlaIleLysValAspAsnLysPhe
 AsnLysGluG1nG1nAsnAlaPheTyrGluIleLeuHis
 LeuProAsnLeuThrGluGluG1nArgAsnG1yPheIle
 G1nSerLeuLysAspAspProSerValSerLysGluIle
 LeuAlaGluAlaLysLysLeuAsnAspAlaG1nAlaIle
 LysCys。

30

【0053】

別の実施形態では、四量体リガンドは次の配列番号10の配列を含んでいる。

A1aG1nValAspA1aLysPheAspLysGluG1nG1nAsn
 AlaPheTyrGluIleLeuHisLeuProAsnLeuThrGlu
 GluG1nArgAsnAlaPheIleG1nSerLeuLysAspAsp
 ProSerG1nSerAlaAsnLeuLeuAlaGluAlaLysLys
 LeuAsnAspAlaG1nAlaIleLysValAspAlaLysPhe
 AspLysGluG1nG1nAsnAlaPheTyrGluIleLeuHis
 LeuProAsnLeuThrGluGluG1nArgAsnAlaPheIle
 G1nSerLeuLysAspAspProSerG1nSerAlaAsnLeu

40

50

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Glu Ala Ile Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Glu Glu Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Glu Asn Arg Asn Ala Phe Ile Glu Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Glu Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Glu Ala Ile Lys Val Asp Ala Lys Phe Asp Lys Glu Glu Glu Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Glu Asn Arg Asn Ala Phe Ile Glu Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Glu Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Glu Ala Ile Lys Cys. 10

【0054】

本発明では意外にも、リガンドの容量を比較した場合、リガンドの1以上の単量体ドメインにおけるC末端プロリン(P57)の置換が非置換リガンドに比べてより高い容量を与えることが見出された。

【0055】

本発明の一態様は、免疫グロブリン含有タンパク質を分離するためのリガンドに関する。かかるリガンドはブドウ球菌プロテインA(SpA)の1以上のドメイン(E、D、A、B、C)又はプロテインZ或いはその機能的変異体を含み、1以上のドメインにおける最もC末端のプロリンが別のアミノ酸で置換されている。かかるリガンドは、固体担体材料上に固定化した場合、この置換を有しないリガンドに比べて増加した免疫グロブリン容量を与える。かかるリガンドは、上記に記載した任意の実施形態に従って構築できる。 20

【0056】

一態様では、本発明は、アフィニティー分離用のマトリックスであって、免疫グロブリン結合タンパク質を含むリガンドが固体担体にカップリングされてなるマトリックスに関する。好ましくは、プロテインAの1以上の単量体ドメイン(E、D、A、B、C)又はプロテインZにおいて第3のヘリックスの後方にある最もC末端のプロリン残基(P57残基)が別のアミノ酸に置換されている。好ましくは、かかるリガンドは多量体、即ちプロテインA(E、D、A、B、C)及びプロテインZから選択された2以上の単量体ドメインを含むものである。本発明のマトリックスは、この置換を有しないマトリックスと比較した場合、増加した結合容量を示す。変異タンパク質リガンドは好ましくはFcフラグメント結合タンパク質であり、IgG、IgA及び/又はIgM(好ましくはIgG)の選択的結合のために使用できる。 30

【0057】

本発明に係るマトリックスは、任意の実施形態に関して上記に記載したような変異タンパク質をリガンドとして含むことができる。最も好ましい実施形態では、固体担体上に存在するリガンドは上記に記載したような置換を含んでいる。

【0058】

本発明に係るマトリックスの固体担体は、任意適宜の公知タイプのものであり得る。通常のアフィニティー分離マトリックスは大抵は有機質のものであり、使用する水性媒体に親水性表面が露出されたポリマー、即ちその外面に(及び存在する場合には内面にも)ヒドロキシ(-OH)、カルボキシ(-COOH)、カルボキサミド(-CONH₂或いはN置換型)、アミノ(-NH₂或いは置換型)、オリゴ又はポリエチレンオキシ基が露出されたポリマーを基材としている。一実施形態では、ポリマーは例えばデキストラン、デンプン、セルロース、フルラン、寒天、アガロースなどの多糖類系のものであり得る。かかるポリマーは、有利には適当な多孔性及び剛性を与えるため、例えばビスエポキシド、エピハロヒドリン、1,2,3-トリハロ置換低級炭化水素で架橋され、或いは米国特許第6602990号に記載された方法に従って架橋されている。最も好ましい実施形態では、固体担体は多孔質の寒天又はアガロースビーズである。本発明で使用される担体は逆濁濁ゲル化(S.Hjerten: Biochim Biophys Acta 79 40

(2), 393-398 (1964)のような標準的方法に従って容易に製造できる。別法として、ベースマトリックスは Sepharose (商標) FF 又は Sepharose HP (GE Healthcare 社) のような市販品である。大規模分離のために特に有利な実施形態では、担体は、その剛性が増大し、したがってマトリックスが高い流量に対して一層適するように改変されている。

【0059】

別法として、固体担体は、ポリビニルアルコール、ポリヒドロキシアルキルアクリレート、ポリヒドロキシアルキルメタクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミドなどの合成ポリマーを基材としている。ジビニル及びモノビニル置換ベンゼン系マトリックスのように疎水性ポリマーの場合には、上述のような親水性基が周囲の水性液体に露出されるようにマトリックスの表面を親水化処理することが多い。かかるポリマーは標準的方法に従って容易に製造されるが、例えば "Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization" (R. Arshady: Chimica L'Industria 70(9), 70-75 (1988)) を参照されたい。別法として、SOURCE (商標) (GE Healthcare 社) のような市販品が使用される。

10

【0060】

別の代替法では、本発明に係る固体担体は、例えばシリカ、酸化ジルコニウムなどの無機質の担体を含んでいる。

20

【0061】

さらに別の実施形態では、固体担体は表面、チップ、毛管又はフィルターのような別の形態を取る。

【0062】

本発明に係るマトリックスの形状に関しては、一実施形態では、マトリックスは多孔質モノリスの形態である。別の実施形態では、マトリックスはビーズ又は粒子形態であり、これは多孔質でも非多孔質でもよい。ビーズ又は粒子形態のマトリックスは充填ベッドとして使用することもできるし、或いは懸濁形態で使用することもできる。懸濁形態には膨張ベッドとして知られるもの及び純然たる懸濁物が包含され、そこでは粒子又はビーズが自由に運動できる。モノリス、充填ベッド及び膨張ベッドの場合、分離手順は一般に濃度勾配を用いる通常のクロマトグラフィーに従う。純然たる懸濁物の場合には、回分方式が使用される。

30

【0063】

リガンドは、例えばリガンド中に存在するアミノ基及び / 又はカルボキシ基を利用した通常のカップリング技法で担体に結合できる。ビスエポキシド、エピクロロヒドリン、CNBr、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) などがよく知られたカップリング試薬である。担体とリガンドとの間には、スペーサーとして知られる分子を導入することができ、これはリガンドの利用可能性を向上させ、担体へのリガンドの化学的カップリングを容易にする。別法として、リガンドは物理的吸着又は生物特異的吸着のような非共有結合によって担体に結合することもできる。マトリックスのリガンド含有量は 5 ~ 15 mg / ml マトリックスであり、有利には 5 ~ 10 mg / ml であり得る。

40

【0064】

有利な実施形態では、本発明のリガンドはチオエステル結合で担体にカップリングされている。かかるカップリングの実施方法は当技術分野で公知であり、標準的な技法及び機器を用いて当業者が容易に実施できる。有利な実施形態では、最初に、後にカップリングで使用するための末端システィン残基をリガンドに設ける。当業者は適切な精製段階も容易に実施できる。

【0065】

本発明の若干の実施形態では、吸着段階のための条件は常用されている任意のものであってよく、標的抗体の性質 (例えば、その pI) に応じて適切に改変することができる。任意の洗浄段階は、PBS 緩衝液のような常用緩衝液を用いて実施できる。

50

【0066】

溶出は、任意の常用緩衝液を用いて実施できる。

【0067】

本発明の方法は、例えば治療用又は診断用の抗体の精製プロトコルの第1段階として、標的抗体を捕捉するために有用である。一実施形態では、75%以上の抗体が回収される。有利な実施形態では、80%以上、例えば90%以上、好ましくは95%以上の抗体が、個々のリガンド系に関して適当なpHを有する溶離剤を用いて回収される。本発明の方法に統いて、他のクロマトグラフィー段階のような1以上の追加段階を実施することができる。かくして、特定の実施形態では、約98%を超える抗体が回収される。

【0068】

S p A (ドメインE、D、A、B、C)又はプロテインZリガンドに関して前述した通り、1以上のアスパラギン残基をグルタミン又はアスパラギン酸以外のアミノ酸に変異させた場合、これらの変異リガンドを含むアフィニティー媒体は、アルカリ剤を用いる洗浄操作に一層よく耐えることができる(米国特許出願公開第2005/0143566号)。向上した安定性は、免疫グロブリンに対する変異タンパク質の初期親和性が長期にわたって本質的に保持されることを意味する。したがって、その結合容量はアルカリ性環境中では親分子の結合容量よりゆっくりと減少する。かかる環境はアルカリ性と定義することができ、pH値の上昇した環境を意味する。上昇したpH値とは、例えば約10超から約13又は14まで(即ち、10~13又は10~14)のpH値であり、これは一般にアルカリ性条件と表される。別法として、かかる条件はNaOH濃度で定義することもでき、その濃度は約1.0M以下(例えば、0.7M、特に約0.5M)、したがって0.7~1.0Mの範囲内であり得る。

10

20

30

【0069】

このように、免疫グロブリンに対する親和性(即ち、上述したようなアスパラギン変異の存在下における本発明のリガンドの結合性)、したがってマトリックスの容量は、アルカリ剤での処理によって本質的に経時的な変化を示さない。通常、アフィニティー分離マトリックスのクリーニング・イン・プレイス処理に使用されるアルカリ剤はNaOHであり、その濃度は0.75M以下(例えば、0.5M)である。したがって、0.5M NaOHで7.5時間処理した後の結合容量の低下は約70%未満、好ましくは約50%未満、さらに好ましくは約30%未満(例えば約28%)である。

30

【0070】

さらに別の態様では、本発明は、本発明に係るリガンド又はマトリックスを使用してIgG、IgA及び/又はIgMのような免疫グロブリンを単離する方法に関する。かくして本発明は、上述のリガンド又はマトリックスへの吸着によって1種以上の標的化合物を液体から分離するクロマトグラフィープロセスを包含する。所望の生成物は分離された化合物又は液体であり得る。かくして本発明のこの態様は、広く用いられている公知の分離技法であるアフィニティークロマトグラフィーに関する。簡単に述べれば、最初の工程では、標的化合物(好ましくは上述したような抗体)を含む溶液を、分離マトリックス上に存在するリガンドへの標的化合物の吸着を可能にする条件下で分離マトリックスに流す。かかる条件は、例えばpH及び/又は塩濃度(即ち、溶液中のイオン強度)によって制御される。マトリックスの容量を超えないように注意すべきであり、換言すれば、流量は満足すべき吸着が起こるように十分遅くすべきである。この段階では、溶液の他の成分は原則として妨害されずに通過する。任意には、保持された物質及び/又は緩く結合した物質を除去するため、次いでマトリックスが例えば水溶液で洗浄される。本発明のマトリックスは、溶剤、塩又は洗浄剤或いはこれらの混合物を用いる中間洗浄段階と共に使用するのが最も有利である。次の段階では、溶離剤といわれる第2の溶液を、標的化合物の脱着(即ち、遊離)が起こる条件下でマトリックスに流す。かかる条件は、通常はpH、塩濃度(即ち、イオン強度)、疎水性などの変化によってもたらされる。勾配溶出及び段階的溶出のような様々な溶出スキームが知られている。溶出はまた、マトリックス上の所望抗体に置き換わる競合物質を含む第2の溶液で達成することもできる。アフィニティークロマ

40

50

トグラフィーの原理に関する一般的な総説としては、例えば、Wilchek, M., and Chaiken, I. 2000. An Overview of affinity chromatography. Methods Mol. Biol. 147: 1-6を参照されたい。

【実施例】

【0071】

以下、本発明を実施例によって説明する。これらの実施例は例示を目的としたものにすぎず、したがって添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の技術的範囲を限定するものと解すべきでない。本明細書で引用したすべての参考文献の開示内容は、援用によって本明細書の内容の一部をなす。

【0072】

実施例1

プロトタイプ

変異体Z(P57I)2：各々がP57I置換を含んだプロテインZの2つのコピーを含むリガンド二量体(Z(P57I)2)（配列番号3）であって、5.8mg/mlのリガンド密度を有する。

【0073】

変異体Z(P57I)4：各々がP57I置換を含んだプロテインZの4つのコピーを含むリガンド四量体(Z(P57I)4)（配列番号10）であって、9.7mg/mlのリガンド密度を有する。

【0074】

変異体C(P57I)2：各々がP57I置換を含んだプロテインA-Cドメインの2つのコピーを含むリガンド二量体(C(P57I)2)（配列番号9）であって、7.2mg/mlのリガンド密度を有する。

【0075】

正常Z2：プロテインZの2つのコピーを含むリガンド二量体(Z2reg)(P57I置換を含まない配列番号3)であって、6.1mg/mlのリガンド密度を有する。

【0076】

タンパク質

Gamma norm 165mg/ml (Octapharma社)、平衡化緩衝液で1mg/mlに希釈。

【0077】

平衡化緩衝液

APBリン酸緩衝液20mM+0.15M NaCl、pH7.4 (Elsichrom AB)。

【0078】

吸着緩衝液

APBリン酸緩衝液20mM+0.15M NaCl、pH7.4 (Elsichrom AB)。

【0079】

溶出緩衝液

APBクエン酸緩衝液0.1mM、pH3 (Elsichrom AB)。

【0080】

CIP

0.1M NaOH。

【0081】

実験の詳細及び結果：

タンパク質の変異誘発

プロリン置換をコードするオリゴヌクレオチドを用いるPCRによって部位指向変異誘発を実施した。鋳型として、Z又はCの單ドメインを含むプラスミドを使用した。PCR

10

20

30

40

50

R フラグメントを E . c o l i の発現ベクター (p G O) 中に連結した。D N A 配列決定を用いて、挿入されたフラグメントの正しい配列を確認した。Z (P 5 7 I) 及び C (P 5 7 I) の多量体を形成するため、C 又は Z ドメインの開始コドン (G T A G A C) 中に位置する、アミノ酸 V D に対応する A c e I 部位を使用した。p G O Z (P 5 7 I) 1 及び p G O C (P 5 7 I) 1 を A c e I で消化し、C I P 处理した。各変異体に対して特異的な A c e I 付着末端プライマーを消化し、各鑄型から 2 種のオーバーラップ P C R 生成物を生成した。P C R 生成物を精製し、2 % アガロースゲル上で P C R 生成物を比較することで濃度を推定した。等量のペアワイズ P C R 生成物を連結緩衝液中でハイブリダイズした (4 5 分で 9 0 2 5)。得られた生成物では、約 1 / 4 のフラグメントが A c e I 部位に連結されていると思われる (正しい P C R フラグメント及び / 又は消化ベクター)。連結及び形質転換後、コロニーを P C R スクリーニングすることで、Z (P 5 7 I) 2 , Z (P 5 7 I) 4 , C (P 5 7 I) 2 及び C (P 5 7 I) 4 を含む構築物を同定した。陽性クローンを D N A 配列決定によって確認した。

10

【 0 0 8 2 】

構築物の発現及び精製

標準培地中の E . c o l i K 1 2 の発酵により、構築物を細菌ペリプラズム中で発現させた。発酵後、細胞を熱処理することで、ペリプラズム内部物を培地中に放出させた。培地中に放出された内容物を、0 . 2 μ m の孔径を有する膜を用いるミクロ濾過によって回収した。

20

【 0 0 8 3 】

今では濾過段階からの透過液中にある各構築物を親和性によって精製した。透過液を、固定化 I g G を含むクロマトグラフィー媒体上に装填した。装填生成物をリン酸緩衝食塩水で洗浄し、p H を低下させることで溶出した。

【 0 0 8 4 】

溶出プールを中性 p H に調整し、ジチオトレイトルの添加によって還元した。次いで、試料を陰イオン交換体上に装填した。洗浄段階後、構築物を N a C l 勾配中で溶出することで、それを夾雑物から分離した。溶出プールを限外濾過によって 4 0 ~ 5 0 m g / m l に濃縮した。

【 0 0 8 5 】

精製リガンドを L C - M S で分析することで、純度を決定すると共に、分子量が (アミノ酸配列に基づいて) 予想される値に一致することを確認した。

30

【 0 0 8 6 】

活性化

使用したベースマトリックスは、米国特許第 6 6 0 2 9 9 0 号の方法に従って製造された、平均直径 8 5 ミクロンの硬質架橋アガロースビーズであった。これはまた、 G e l f i l t r a t i o n P r i n c i p l e s a n d M e t h o d s , P h a r m a c i a L K B B i o t e c h n o l o g y 1 9 9 1 , p p 6 - 1 3 に記載された方法に従えば、 M w 1 1 0 k D a のデキストランに対して 0 . 7 0 の逆ゲル濾過クロマトグラフィー K a v 値に相当する孔径を有していた。

40

【 0 0 8 7 】

1 0 0 m L フラスコ内において、2 5 m L (g) の排水ベースマトリックス、1 0 m L の蒸留水及び 2 . 0 2 g の N a O H (s) を機械的攪拌により 2 5 で 1 0 分間混合した。4 . 0 m L のエピクロロヒドリンを添加し、反応を 2 時間進行させた。活性化ゲルを 1 0 ゲル沈降体積 (G V) の水で洗浄した。

【 0 0 8 8 】

カップリング

5 0 m l ファルコン管に入れた 2 0 m L の連結溶液 (5 0 m g / m L) に、1 6 9 m g の N a H C O 3 、2 1 m g の N a 2 H C O 3 、1 7 5 m g の N a C l 及び 7 m g の E D T A を添加した。ファルコン管をローラーテーブル上に 5 ~ 1 0 分間置き、次いで 7 7 m g の D T E を添加した。還元を > 4 5 分間進行させた。次いで、 S e p h a d e x G - 2 5

50

を充填した P D 1 0 カラム上でリガンド溶液を脱塩した。脱塩溶液中のリガンド含有量を、279 nm の UV 吸収を測定することで求めた。

【 0 0 8 9 】

活性化ゲルを 3 ~ 5 GV の { 0 . 1 M リン酸塩 / 1 mM EDTA pH 8 . 6 } で洗浄し、次いでリガンドを米国特許第 6 3 9 9 7 5 0 号に記載された方法に従ってカップリングした。本実験で使用したすべての緩衝液は、窒素ガスによって 5 ~ 10 分間以上脱気した。

【 0 0 9 0 】

固定化後、ゲルを 3 × GV の蒸留水で洗浄した。ゲル + 1 GV の { 0 . 1 M リン酸塩 / 1 mM EDTA / 10 % チオグリセロール pH 8 . 6 } を混合し、管を振盪テーブル上に室温で一晩放置した。次いで、ゲルを 3 × GV の { 0 . 1 M TRIS / 0 . 15 M NaCl pH 8 . 6 } 及び 0 . 5 M HAc で交互に洗浄し、次いで 8 ~ 10 × GV の蒸留水で洗浄した。ゲル試料を外の部実験室に送ってアミノ酸分析を行い、総アミノ酸含有量からリガンド含有量 (mg / ml ゲル) を算出した。

【 0 0 9 1 】

容量の測定

AKTA Explorer 100、AL E 100。

AKTA Explorer 10 システムを用いて、2 . 4 分及び 6 分の滞留時間での漏出容量を標準として測定した。安定な基線が得られるまで、吸着緩衝液をバイパスカラムに流した。これはオートゼロイングに先立って行った。100 % UV 信号が得られるまで、試料をカラムに適用した。次いで、安定な基線が得られるまで、吸着緩衝液を再び適用した。

【 0 0 9 2 】

カラムを吸着緩衝液で平衡化した後、最大吸光度の 85 % の UV 信号に達するまで試料を装填した。次いで、0 . 5 ml / 分の流量で最大吸光度の 20 % の UV 信号に達するまで、カラムを吸着緩衝液で洗浄した。10 CV の溶出緩衝液を 0 . 5 ml / 分の流量で用いてタンパク質を溶出した。次いで、0 . 1 M NaOH を 0 . 5 ml / 分の流量で用いてカラムをクリーニングし、吸着緩衝液で再平衡化した後、20 % エタノールでクリーニングした。最後の段階は、100 % UV 信号が得られるまでバイパスカラムを通して試料を装填することにより、試料濃度をチェックするためのものであった。

【 0 0 9 3 】

10 % での漏出容量を算出するためには、下記の式を使用した。それは、カラム流出液中の IgG の濃度が供給液中の IgG 濃度の 10 % になるまでカラム上に装填される IgG の量である。

【 0 0 9 4 】

【 数 1 】

$$q_{10\%} = \frac{C_0}{V_C} \left[V_{app} - V_{sys} - \int_{V_{sys}}^{V_{app}} \frac{A(V) - A_{sub}}{A_{100\%} - A_{sub}} * dV \right]$$

【 0 0 9 5 】

$A_{100\%}$ = 100 % UV 信号、

A_{sub} = 非結合 IgG サブクラスからの吸光度寄与、

$A(V)$ = 所定適用体積での吸光度、

V_C = カラム容積、

V_{app} = 10 % 漏出点までの適用体積、

V_{sys} = システムの死容積、

C_0 = 供給液濃度。

【 0 0 9 6 】

動的結合容量に関する典型的な試験例を図 3 に示す。10 % 漏出点での動的結合容量 (

10

20

30

40

50

D B C) を算出し、曲線の外観を調べた。また、結合、溶出及び C I P ピークに関しても曲線を調べた。

【 0 0 9 7 】

5 %、10 % 及び 80 % 漏出点に関して動的結合容量 (D B C) を算出した。結果を表 1 に示す。P 57 I 置換を有するリガンドに関しては、親の P 57 リガンドに比べて高い容量が認められた。

【 0 0 9 8 】

【 表 1 】

表 1. 結果の要約

10

| プロトタイプ (2 本のカラム に充填して試 験) | リガンド密 度 (mg/ml 樹脂) | Qb5 (mg/ml 樹脂) | Qb10 (mg/ml 樹脂) | Qb80 (mg/ml 樹脂) | 滞留時間 (分) |
|------------------------------------|--------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------|
| Z(P57I)2#1 | 5.8 | 31.5 | 34.3 | 51 | 2.4 |
| Z(P57I)2#2 | 5.8 | 33.5 | 35.7 | 51.8 | 2.4 |
| Z(P57I)2#2 | 5.8 | 32.4 | 34.6 | 50.3 | 2.4 |
| Z(P57I)2#2 | 5.8 | 34.0 | 36.2 | 53.4 | 2.4 |
| Z(P57I)2#1 | 5.8 | 44.1 | 45.6 | 53.5 | 6.0 |
| Z(P57I)2#2 | 5.8 | 43.9 | 45.6 | 53.6 | 6.0 |
| Z(P57I)2#2 | 5.8 | 42.6 | 44.6 | na | 6.0 |
| Z(P57I)2#2 | 5.8 | 45.4 | 46.6 | 54.5 | 6.0 |
| | | | | | |
| Z2reg#1 | 6.1 | 28.5 | 31.4 | 43.8 | 2.4 |
| Z2reg#2 | 6.1 | 29.9 | 32.2 | 46.1 | 2.4 |
| Z2reg#1 | 6.1 | 38.1 | 40.6 | 46.7 | 6.0 |
| Z2reg#2 | 6.1 | 38.5 | 40.4 | 47.1 | 6.0 |
| | | | | | |
| C(P57I)2 | 7.2 | 36.9 | 40.2 | 63.7 | 2.4 |
| C(P57I)2 | 7.2 | 52.6 | 55.2 | 66.9 | 6.0 |
| | | | | | |
| Z(P57I)4 | 9.7 | 35.2 | 39.0 | 68.0 | 2.4 |
| Z(P57I)4 | 9.7 | 54.7 | 57.1 | 72.4 | 6.0 |

20

30

40

【 0 0 9 9 】

上記の実施例は本発明の特定の態様を例示するものであり、いかなる点でもその技術的範囲を限定することではなく、そのように解すべきでない。上記に示した本発明の教示の恩恵を受ける当業者は、それに対して多数の修正を施すことができる。これらの修正は、添付の特許請求の範囲に示す本発明の技術的範囲内に包含されると解すべきである。さらに、様々な実施形態の特徴を組み合わせ得ることはもちろんである。

【図 1】

10 20 30 40 50
| | | | |
VDAKFDKEQQ NAFYEILHLP NLNEEQRNGF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK LNDAQAPK
< ヘリックス 1 > < ヘリックス 2 > < ヘリックス 3 >

Figure 1

【図 2 (a)】

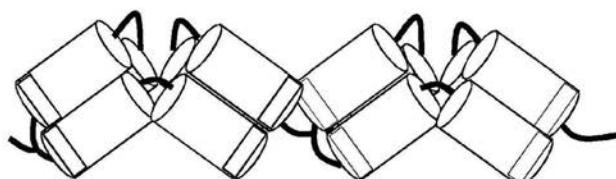


Figure 2(a)

【図 2 (b)】

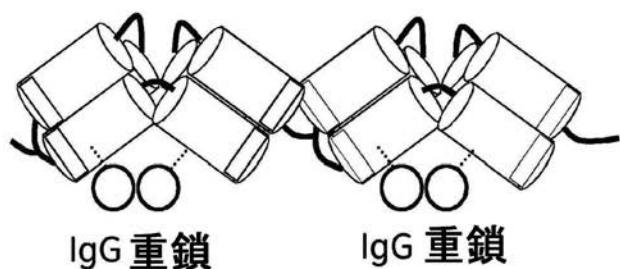


Figure 2(b)

【図 2 (c)】

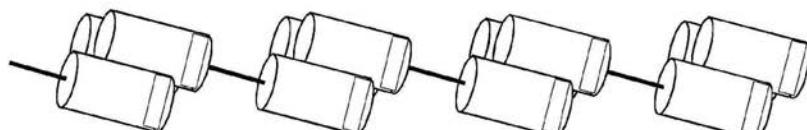


Figure 2(c)

【図2(d)】

プロテインA(5つのドメイン, EDABC)

(N末端)

QQNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKDDPSQSANVLGEAQKLND**QAPK**
 ADAQQNNFNKD**QQ**SAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQS**ST**NVLGEAKKLNES**QAPK**
 ADNNFNKEQQNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQS**AN**LLSEAKKLNES**QAPK**
 ADNKF**N**KEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQS**AN**LLAEAKKLND**QAPK**
 ADNKF**N**KEQQNAFYEILHLPNL**TE**EQRNGFIQSLKDDPSVS**KE**ILAEAKKLND**QAPK**

(C末端)

(E) SEQ IN No: 4
 (D) SEQ IN No: 5
 (A) SEQ IN No: 6
 (B) SEQ IN No: 7
 (C) SEQ IN No: 8

Figure 2(d)

【図3】

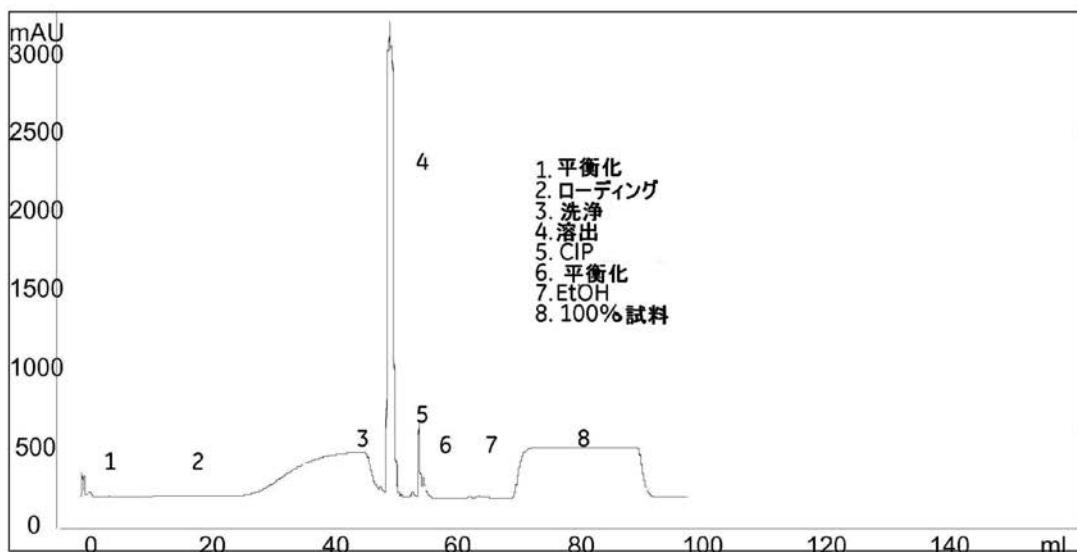


Figure 3

【配列表】

2014502272000001.xml

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/SE2011/051432 |
|---|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| IPC: see extra sheet 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) IPC: B01D, B01J, C07K, C12N | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched SE, DK, FI, NO classes as above | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI data, BIOSIS, CHEM ABS Data, COMPENDEX, EMBASE, INSPEC, MEDLINE, XPESP2, XPSRNG | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | GHOSE S. et al., "Binding capacity differences for antibodies and Fc-fusion proteins on protein A chromatographic materials", Biotechnology Engineering, 2006, Vol. 96, pages 768-779; whole document -- | 1-41 |
| A | US 5362859 A (ZALE STEPHEN E), 8 November 1994 (1994-11-08); whole document -- | 1-41 |
| A | WO 2010080065 A1 (GE HEALTHCARE BIO SCIENCES AB ET AL), 15 July 2010 (2010-07-15); page 1, line 1 - line 8; page 2, line 30 - page 3, line 30; page 6, line 9 - page 6, line 17; page 7, line 27 - line 32; claims 3-6 -- | 1-41 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. | | <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. |
| <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> | | |
| Date of the actual completion of the international search 24-02-2012 | Date of mailing of the international search report 06-03-2012 | |
| Name and mailing address of the ISA/SE Patent- och registreringsverket Box 5055 S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. + 46 8 666 02 86 | Authorized officer Liza Nilsson Telephone No. + 46 8 782 25 00 | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|--|
| International application No. PCT/SE2011/051432 |
|--|

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 11 (partially) and 31 (partially)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Present claims 11 and 31 relate to a ligand as well as a method using ligand
.../...
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- | | |
|--------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> | The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. |
| <input type="checkbox"/> | The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. |
| <input type="checkbox"/> | No protest accompanied the payment of additional search fees. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2011/051432**Continuation of:** Box No. II

which is defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that they have affinity for the Fc part of an immunoglobulin but lack affinity for the Fab part. Claim 11 covers all methods according to claim 1 with ligands having this characteristic or property and claim 31 covers all ligands according to claim 21 having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such ligands. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the ligand by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to ligands where at least one glycine of said ligands has been replaced by an alanine have been searched e.g. those parts mentioned in the claims 12-13 and 32-33.

Thence it follows that a reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability only can be established for those parts which have been searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|--|
| International application No. PCT/SE2011/051432 |
|--|

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | WO 2008039141 A1 (GE HEALTHCARE BIO SCIENCES AB ET AL), 3 April 2008 (2008-04-03); whole document -- | 1-41 |
| A | US 20060194955 A1 (HOBER SOPHIA ET AL), 31 August 2006 (2006-08-31); Abstract; paragraphs: [0003] - [0005], [0007], [0008], [0014], [0015], [0018], [0045]-[0049], [0051], [0057], [0058], [0065], [0070]; claims 1-4 -- | 1-41 |
| A | US 20060194950 A1 (HOBER SOPHIA ET AL), 31 August 2006 (2006-08-31); Abstract; [0002]-[0004], [0008]-[009], [0011], [0042]-[0054], [0060]-[0067], [0070], [0075]-[0076], [0078]-[0082]; claims 7-11 ----- | 1-41 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2011/051432**Continuation of:** second sheet
International Patent Classification (IPC)

B01D 15/38 (2006.01)
B01J 20/281 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)
C07K 14/31 (2006.01)
C12N 15/03 (2006.01)

Download your patent documents at www.prv.se

The cited patent documents can be downloaded:

- From "Cited documents" found under our online services at www.prv.se
(English version)
- From "Anförla dokument" found under "e-tjänster" at www.prv.se
(Swedish version)

Use the application number as username. The password is **FTBFMPWFKB**.

Paper copies can be ordered at a cost of 50 SEK per copy from PRV InterPat (telephone number 08-782 28 85).

Cited literature, if any, will be enclosed in paper form.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/SE2011/051432

| | | | | | | | |
|----|-------------|----|------------|------|-------------|----|------------|
| US | 5362859 | A | 08/11/1994 | NONE | | | |
| WO | 2010080065 | A1 | 15/07/2010 | CN | 102272145 | A | 07/12/2011 |
| | | | | EP | 2389386 | A1 | 30/11/2011 |
| WO | 2008039141 | A1 | 03/04/2008 | AU | 2007300751 | A1 | 03/04/2008 |
| | | | | CA | 2664530 | A1 | 03/04/2008 |
| | | | | CN | 101522278 | A | 02/09/2009 |
| | | | | EP | 2066419 | A1 | 10/06/2009 |
| | | | | JP | 2010504754 | A | 18/02/2010 |
| | | | | US | 20100048876 | A1 | 25/02/2010 |
| US | 20060194955 | A1 | 31/08/2006 | US | 7709209 | B2 | 04/05/2010 |
| US | 20060194950 | A1 | 31/08/2006 | AT | 431360 | T | 15/05/2009 |
| | | | | AU | 2003217119 | A1 | 08/10/2003 |
| | | | | CA | 2479896 | A1 | 02/10/2003 |
| | | | | CN | 1642976 | A | 20/07/2005 |
| | | | | DE | 60327606 | D1 | 25/06/2009 |
| | | | | EP | 1485407 | B1 | 13/05/2009 |
| | | | | EP | 1972689 | A2 | 24/09/2008 |
| | | | | ES | 2325362 | T3 | 02/09/2009 |
| | | | | JP | 4391830 | B2 | 24/12/2009 |
| | | | | JP | 2005538693 | A | 22/12/2005 |
| | | | | KR | 20110004456 | A | 13/01/2011 |
| | | | | US | 7834158 | B2 | 16/11/2010 |
| | | | | US | 20110112276 | A1 | 12/05/2011 |
| | | | | US | 20050143566 | A1 | 30/06/2005 |
| | | | | US | 20100022760 | A1 | 28/01/2010 |
| | | | | WO | 03080655 | A1 | 02/10/2003 |

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,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,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN

(72)発明者 ロドリゴ, グスタブ

スウェーデン国、エス - 7 5 1 8 4 ウプサラ ビヨルクガタン 3 0、ジーイー・ヘルスケア

F ターム(参考) 4C085 AA14 CC23 DD33 EE01

4H045 AA11 AA20 CA11 CA40 DA75 GA26