

(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
2014年12月4日(04.12.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/192877 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 1/22 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
C07C 211/63 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/064284
- (22) 国際出願日: 2014年5月29日(29.05.2014)
- (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 2013-113357 2013年5月29日(29.05.2013) JP
特願 2013-140411 2013年7月4日(04.07.2013) JP
特願 2013-140412 2013年7月4日(04.07.2013) JP
- (71) 出願人: J S R 株式会社 (JSR CORPORATION) [JP/JP]; 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 Tokyo (JP). JSRライフサイエンス株式会社 (JSR LIFE SCIENCES CORPORATION) [JP/JP]; 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 塩谷 知範 (SHIOTANI, Tomonori); 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 JSRライフサイエンス株式会社内 Tokyo (JP). 河田 優子 (KAWADA, Yuko); 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 JSRライフサイエンス株式会社内 Tokyo (JP). 岡野 友亮 (OKANO, Yusuke); 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 JSRライフサイエンス株式会社内 Tokyo (JP). 平井 佑紀 (HIRAI, Yuki); 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 JSRライフサイエンス株式会社内 Tokyo (JP). 大谷 勇 (OTANI, Yu); 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 JSRライフサイエンス株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番8号 沢の鶴人形町ビル 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, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, 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.
- (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, 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, 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).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: WASHING COMPOSITION, PROTEIN PURIFICATION METHOD, AND PROTEIN

(54) 発明の名称: 洗浄用組成物、タンパク質精製方法、及びタンパク質

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a washing composition with excellent impurity-removing capacity to be used in processes for separating and purifying a target protein. A washing composition to be used in processes for separating and purifying a target protein from a mixed solution containing the target protein and impurities, the washing composition being characterized in containing at least one selected from the following component (A), component (B) and component (C). (A) A cationic surfactant selected from quaternary ammonium salt cationic surfactants having an organic group of at least five carbons and amine salt cationic surfactants having an organic group of at least five carbons (B) A hydroxyl acid ester (C) An amide solvent

(57) 要約: 目的タンパク質を分離精製するプロセスに用いる不純物除去性能に優れた洗浄用組成物を提供すること。目的タンパク質及び不純物を含む混合液から目的タンパク質を分離精製するプロセスに用いる洗浄用組成物であって、以下の成分(A)、成分(B)及び成分(C)から選ばれる1種又は2種以上を含むことを特徴とする、洗浄用組成物。(A)炭素数5以上の有機基を有する第4級アンモニウム塩型カチオン性界面活性剤、及び炭素数5以上の有機基を有するアミン塩型カチオン性界面活性剤から選ばれるカチオン性界面活性剤 (B)ヒドロキシ酸エステル (C)アミド系溶媒



WO 2014/192877 A1

明 細 書

発明の名称：

洗浄用組成物、タンパク質精製方法、及びタンパク質

技術分野

[0001] 本発明は、洗浄用組成物、タンパク質精製方法、及びタンパク質に関する。

背景技術

[0002] 抗体は、多くの動物、特にヒトの免疫系にとって重要な要素である。最近の組換え技術の進歩により、癌細胞、細菌、及びウイルスに対する抗体の産生が可能になっている。例えば、抗体は、高レベルに発現するように設計されている細胞株を用いて産生される。また、設計された細胞株は、糖類、アミノ酸、成長因子の複合混合物、血清タンパク質などを含む様々なタンパク質を含む培養物中で培養される。

[0003] 抗体をはじめとするタンパク質を細胞副産物や培養物成分から分離して、研究用途にまたは治療薬・診断薬として使用するためには、十分な純度に高めることが必要となる。抗体がヒトへの投与用の薬剤として用いられるものである場合、抗体分子の精製は特に重要である。従来、抗体精製方法として、特許文献1～4に記載の方法が知られている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：米国特許第6870034号明細書

特許文献2：特許第4031049号公報

特許文献3：特許第4460302号公報

特許文献4：特許第5150488号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の課題は、目的タンパク質を分離精製するプロセスに用いる不純物

除去性能に優れた洗浄用組成物を提供することである。

課題を解決するための手段

[0006] 上記の課題は下記的手段により解決された。

<1>目的タンパク質及び不純物を含む混合液から目的タンパク質を分離精製するプロセスに用いる洗浄用組成物であって、以下の成分(A)、成分(B)及び成分(C)から選ばれる1種又は2種以上を含むことを特徴とする、洗浄用組成物。

(A) 炭素数5以上の有機基を有する第4級アンモニウム塩型カチオン性界面活性剤、及び炭素数5以上の有機基を有するアミン塩型カチオン性界面活性剤から選ばれるカチオン性界面活性剤

(B) ヒドロキシ酸エステル

(C) アミド系溶媒

[0007] <2>固相上に固定されたりガンドと、目的タンパク質及び不純物を含む混合液とを接触させ、前記リガンドと前記混合液中のタンパク質とを結合させる結合工程、

上記<1>の洗浄用組成物で、前記タンパク質が結合したりガンドが固定された固相を洗浄して不純物を除去する洗浄工程、並びに

溶出バッファーを用いて、前記洗浄工程で洗浄した固相から目的タンパク質を回収する回収工程、

を含むことを特徴とするタンパク質精製方法。

[0008] <3>上記<2>の精製方法により精製されたことを特徴とする、目的タンパク質。

発明の効果

[0009] 本発明の洗浄用組成物は、目的タンパク質を分離精製するプロセスに用いた場合に優れた不純物除去性能を示す。

したがって、本発明のタンパク質精製方法によれば、不純物を効率的に除去することができる。また、当該精製方法により精製された目的タンパク質は不純物が少ない。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明について詳細に説明する。なお、数値範囲等を表す「a～b」等の表記は、特に断りのない限り a 及び b をその数値範囲に含むものであり、「a 以上、b 以下」と同義である。

[0011] [洗浄用組成物]

本発明の洗浄用組成物は、目的タンパク質及び不純物を含む混合液から目的タンパク質を分離精製するプロセスに用いる洗浄用組成物であって、以下の成分 (A)、成分 (B) 及び成分 (C) から選ばれる 1 種又は 2 種以上を含むことを特徴とするものである。

(A) 炭素数 5 以上の有機基を有する第 4 級アンモニウム塩型カチオン性界面活性剤、及び炭素数 5 以上の有機基を有するアミン塩型カチオン性界面活性剤から選ばれるカチオン性界面活性剤

(B) ヒドロキシ酸エステル

(C) アミド系溶媒

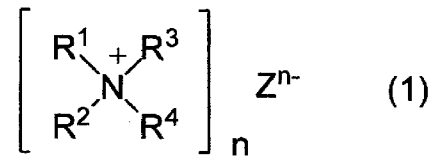
[0012] (成分 (A) : カチオン性界面活性剤)

成分 (A) のカチオン性界面活性剤は、炭素数 5 以上の有機基を有する第 4 級アンモニウム塩型カチオン性界面活性剤、及び炭素数 5 以上の有機基を有するアミン塩型カチオン性界面活性剤から選ばれるものである。上記アミン塩型カチオン性界面活性剤は、第 1 級～第 3 級アミン塩型のいずれでもよい。

[0013] 上記カチオン性界面活性剤としては、殺菌性、保存安定性、不純物除去性能の観点や、目的タンパク質を効率よく回収する観点から、炭素数 5 以上の有機基を有する第 4 級アンモニウム塩型カチオン性界面活性剤が好ましく、下記式 (1) で表される第 4 級アンモニウム塩型カチオン性界面活性剤 (以下、カチオン性界面活性剤 (1) とも称する) がより好ましい。

[0014]

[化1]



[0015] [式(1)中、

R¹は、炭素数5以上の有機基を示し、

R²、R³及びR⁴は、それぞれ独立して、有機基を示し、

nは1以上の整数を示し、

Zⁿ⁻はn価のアニオンを示す。]

[0016] 式(1)中、R¹は、炭素数5以上の有機基を示す。ここで、R¹で示される有機基が、2種以上の炭素数の有機基である場合、その炭素数は平均炭素数を意味とするものとする。平均炭素数は、カチオン性界面活性剤(1)に該当する全分子のR¹の炭素数の総和を求めて、炭素数を1分子あたりに換算することで算出できる(全分子のR¹の炭素数の総和/分子の数)。

[0017] 上記R¹で示される有機基としては、炭素数5~30の炭化水素基、炭素数5~30のヒドロキシアルキル基、ヒドロキシアルキル基の水素原子の一部が炭化水素基で置換された総炭素数5~30の基、平均付加モル数が10以下であり炭素数が5以上であるポリオキシアルキレン基、平均付加モル数10以下のポリオキシアルキレン基の水素原子の一部が炭化水素基で置換された総炭素数5~30の基が好ましい。

[0018] R¹における炭素数5~30の炭化水素基の炭素数としては、不純物除去性能の観点や、本発明の洗浄用組成物で洗浄された固相の再利用を容易にする観点から、好ましくは6~24、より好ましくは8~22、更に好ましくは9~20、更に好ましくは10~18、特に好ましくは10~16である。

[0019] 上記炭化水素基としては、アルキル基、アルケニル基、アラルキル基が挙げられる。

上記アルキル基は直鎖状でも分岐鎖状でもよい。例えば、オクチル基、ノ

ニル基、デシル基、ウンデシル基、1-メチルデシル基、ドデシル基、1-メチルウンデシル基、1-エチルデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、オクタデシル基等が挙げられる。

上記アルケニル基は直鎖状でも分岐鎖状でもよい。例えば、デセニル基、ウンデセニル基、ドデセニル基、テトラデセニル基、ヘキサデセニル基等が挙げられる。

上記アラルキル基としては、ベンジル基、フェネチル基等が挙げられる。

[0020] R¹におけるヒドロキシアルキル基の炭素数は5~30であるが、不純物除去性能の観点や、本発明の洗浄用組成物で洗浄された固相の再利用を容易にする観点、回収した目的タンパク質への洗浄用組成物の混入を低レベルに抑える観点から、好ましくは6~24、より好ましくは8~22、更に好ましくは9~20、更に好ましくは10~18、特に好ましくは10~16である。ヒドロキシアルキル基に含まれるアルキル基としては、上記アルキル基と同様のものが挙げられる。

[0021] R¹における平均付加モル数が10以下であり炭素数が5以上であるポリオキシアルキレン基としては、 $-(CH_2CH_2O)_pH$ (pは3~10の整数を示すが、不純物除去性能の観点や、本発明の洗浄用組成物で洗浄された固相の再利用を容易にする観点、回収した目的タンパク質への洗浄用組成物の混入を低レベルに抑える観点から、好ましくは5~8の整数である) で表されるポリオキシエチレン基が好ましい。

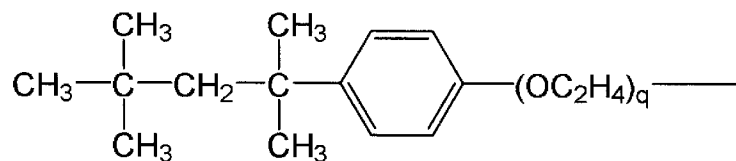
[0022] R¹におけるヒドロキシアルキル基の水素原子の一部が炭化水素基で置換された基、及び平均付加モル数10以下のポリオキシアルキレン基の水素原子の一部が炭化水素基で置換された基の総炭素数は、5~30であるが、不純物除去性能の観点や、本発明の洗浄用組成物で洗浄された固相の再利用を容易にする観点、回収した目的タンパク質への洗浄用組成物の混入を低レベルに抑える観点から、好ましくは8~26、より好ましくは9~25、更に好ましくは12~24、更に好ましくは14~22、特に好ましくは16~20である。また、上記ポリオキシアルキレン基としては、 $-(CH_2CH_2O$

)_qH (qは1～10の整数を示すが、好ましくは1～7の整数、より好ましくは1～4の整数、更に好ましくは1又は2である)で表されるポリオキシエチレン基が好ましい。

[0023] また、ヒドロキシアルキル基及びポリオキシアルキレン基に置換された炭化水素基の置換位置としては、ヒドロキシアルキル基又はポリオキシエチレン基に含まれる水酸基中の水素原子が好ましい。また、上記炭化水素基としては、炭素数1～10のアルキル基、炭素数6～20のアリール基、アルキルアリール基が好ましく、アルキルアリール基がより好ましい。当該アルキルアリール基としては、炭素数7～20のアルキルアリール基が好ましく、炭素数10～18のアルキルフェニル基がより好ましく、炭素数12～16のアルキルフェニル基が更に好ましい。例えば、(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェニル基等が挙げられる。

平均付加モル数10以下のポリオキシアルキレン基の水素原子の一部が炭化水素基で置換された基としては、下記式で示されるものが挙げられる。なお、式中のqは前記と同義である。

[0024] [化2]



[0025] また、式(1)中、R²、R³及びR⁴は、それぞれ独立して、有機基を示す。

R²、R³及びR⁴としては、炭素数1～30の炭化水素基、炭素数1～30のヒドロキシアルキル基、ヒドロキシアルキル基の水素原子の一部が炭化水素基で置換された総炭素数2以上の基、平均付加モル数が10以下であるポリオキシアルキレン基、平均付加モル数10以下のポリオキシアルキレン基の水素原子の一部が炭化水素基で置換された総炭素数2以上の基が好ましい。

[0026] R²における炭素数1～30の炭化水素基としては、アルキル基、アルケニル基、アラルキル基が挙げられる。

[0027] R²におけるアルキル基の炭素数としては、回収した目的タンパク質への洗浄用組成物の混入を低レベルに抑える観点から、1～12が好ましく、1～8がより好ましく、1～4が更に好ましく、1～3が更に好ましく、1又は2が特に好ましい。また、上記アルキル基は直鎖状でも分岐鎖状でもよい。例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基等が挙げられる。

[0028] R²におけるアルケニル基の炭素数としては、回収した目的タンパク質への洗浄用組成物の混入を低レベルに抑える観点から、2～12が好ましく、2～8がより好ましく、2～4が更に好ましく、2又は3が更に好ましい。また、上記アルケニル基は直鎖状でも分岐鎖状でもよい。例えば、エテニル基、1-プロペニル基、2-プロペニル基、1-ブテニル基等が挙げられる。

[0029] R²におけるアラルキル基の炭素数としては、7～20が好ましく、7～10がより好ましく、7又は8が更に好ましい。アラルキル基としては、ベンジル基、フェネチル基等が挙げられる。

[0030] R²におけるヒドロキシアルキル基の炭素数は1～30であるが、回収した目的タンパク質への洗浄用組成物の混入を低レベルに抑える観点から、1～12が好ましく、1～8がより好ましく、1～4が更に好ましく、1～3が更に好ましく、1又は2が特に好ましい。ヒドロキシアルキル基に含まれるアルキル基としては、上記R²で示されるアルキル基と同様のものが挙げられる。

また、ヒドロキシアルキル基の水素原子の一部が炭化水素基で置換された基に含まれるヒドロキシアルキル基としては、上記ヒドロキシアルキル基と同様のものが挙げられる。

[0031] R²における平均付加モル数が10以下であるポリオキシアルキレン基としては、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{H}$ (rは1～10の整数を示すが、好ましくは1～7の整数、より好ましくは1～4の整数、更に好ましくは1又は2である

) で表されるポリオキシエチレン基が好ましい。

また、平均付加モル数10以下のポリオキシアルキレン基の水素原子の一部が炭化水素基で置換された基に含まれるポリオキシアルキレン基としては、上記ポリオキシアルキレン基と同様のものが挙げられる。

[0032] また、 R^2 において、ヒドロキシアルキル基及びポリオキシアルキレン基に置換された炭化水素基の置換位置としては、ヒドロキシアルキル基又はポリオキシエチレン基に含まれる水酸基中の水素原子が好ましい。また、上記炭化水素基としては、炭素数1~10のアルキル基、炭素数6~20のアリール基、アルキルアリール基が好ましく、アルキルアリール基がより好ましい。当該アルキルアリール基としては、炭素数7~20のアルキルアリール基が好ましく、炭素数10~18のアルキルフェニル基がより好ましく、炭素数12~16のアルキルフェニル基が更に好ましい。例えば、(1, 1, 3, 3-テトラメチルブチル)フェニル基が挙げられる。

[0033] 上記 R^2 の中でも、回収した目的タンパク質への洗浄用組成物の混入を低レベルに抑える観点、不純物除去性能の観点や、本発明の洗浄用組成物で洗浄された固相の再利用を容易にする観点から、炭素数1~30の炭化水素基、炭素数1~30のヒドロキシアルキル基、平均付加モル数が10以下であるポリオキシアルキレン基が好ましく、炭素数1~30の炭化水素基がより好ましく、アルキル基、アラルキル基が特に好ましい。

[0034] また、 R^3 及び R^4 としては、炭素数1~30の炭化水素基が好ましい。 R^3 及び R^4 における炭化水素基の炭素数としては、回収した目的タンパク質への洗浄用組成物の混入を低レベルに抑える観点から、1~12が好ましく、1~8がより好ましく、1~4が更に好ましく、1~3が更に好ましく、1又は2が特に好ましい。

また、 R^3 及び R^4 における炭化水素基としては、アルキル基が好ましい。また、アルキル基は直鎖状でも分岐鎖状でもよい。例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基等が挙げられる。

[0035] また、 $R^1 \sim R^4$ の炭素数の関係は、不純物除去性能の観点や、本発明の洗浄用組成物で洗浄された固相の再利用を容易にする観点、回収した目的タンパク質への洗浄用組成物の混入を低レベルに抑える観点からは、 R^2 の炭素数 $\geq R^3$ の炭素数、且つ R^2 の炭素数 $\geq R^4$ の炭素数であり、 R^1 と R^2 との炭素数の合計が10以上であるのが好ましい。当該 R^1 と R^2 との炭素数の合計は、上記と同様の観点から、好ましくは10～26であり、より好ましくは12～24であり、特に好ましくは12～22である。

[0036] また、式(1)中、 n は、対アニオンとなる原子又は原子団の価数を意味し、1以上の整数を示す。 n は好ましくは1である。

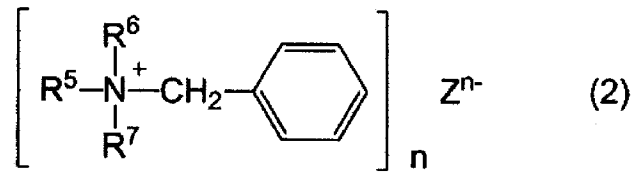
[0037] また、式(1)中、 Z (原子又は原子団)としては、具体的には、ハロゲン原子、 CH_3SO_4 、 $CH_3CH_2SO_4$ 、 OH の他、アミノ酸に由来する原子団、脂肪酸に由来する原子団、炭素数1～30の直鎖若しくは分岐鎖のアルキル基又はアルケニル基を有するリン酸エステルに由来する原子団、ホスホン酸エステルに由来する原子団、スルホン酸エステルに由来する原子団、硫酸エステルに由来する原子団、重合度3以上のスチレンスルホン酸を有するか又は置換基として炭化水素基を有することがある多環式芳香族化合物のスルホン化物のホルマリン縮合物を含有するアニオン性オリゴマー又はポリマーに由来する原子団が挙げられる。

これらの中でも、 Z としては、ハロゲン原子が好ましく、塩素原子、臭素原子がより好ましく、塩素原子が特に好ましい。

[0038] 上記カチオン性界面活性剤(1)の中でも、不純物除去性能の観点から、下記式(2)又は(3)で表されるものが好ましい。このうち、本発明の洗浄用組成物で洗浄された固相の再利用を容易にする観点、回収した目的タンパク質への洗浄用組成物の混入を低レベルに抑える観点や安全性の観点からは、式(2)で表されるものがより好ましい。

[0039]

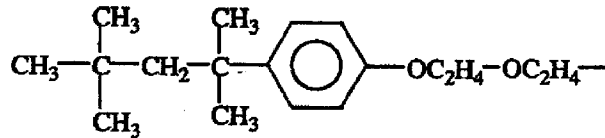
[化3]



[0040] [式(2)中、

R⁵は、炭素数5～30の炭化水素基又は

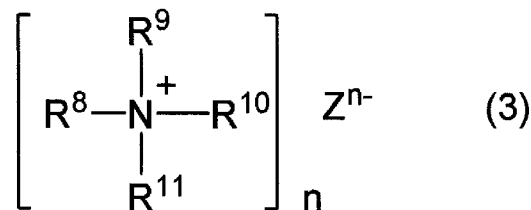
[0041] [化4]



[0042] で表わされる基を示し、

R⁶及びR⁷は、それぞれ独立して、炭素数1～4の炭化水素基を示し、
n及びZⁿ⁻は前記と同義である。]

[0043] [化5]



[0044] [式(3)中、

R⁸は、炭素数9～30のアルキル基を示し、

R⁹～R¹¹は、それぞれ独立して、炭素数1～4の炭化水素基を示し、
n及びZⁿ⁻は前記と同義である。]

[0045] 式(2)中、R⁵としては、不純物除去性能の観点から、炭素数5～30の炭化水素基が好ましい。ここで、R⁵で示される炭化水素基が、2種以上の炭素数の炭化水素基である場合、その炭素数は平均炭素数を意味とするものとする。平均炭素数は、カチオン性界面活性剤(2)に該当する全分子のR⁵の

炭素数の総和を求めて、炭素数を1分子あたりに換算することで算出できる（全分子の R^5 の炭素数の総和／分子の数）。

上記 R^5 で示される炭化水素基の炭素数は、不純物除去性能の観点や、本発明の洗浄用組成物で洗浄された固相の再利用を容易にする観点、回収した目的タンパク質への洗浄用組成物の混入を低レベルに抑える観点から、好ましくは6～24、より好ましくは8～22、更に好ましくは9～20、更に好ましくは10～18、特に好ましくは10～16である。

また、上記炭化水素基としては、アルキル基が好ましい。当該アルキル基は直鎖状でも分岐鎖状でもよい。例えば、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、1-メチルデシル基、ドデシル基、1-メチルウンデシル基、1-エチルデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、オクタデシル基等が挙げられる。

[0046] 式(2)中、 R^6 及び R^7 は、それぞれ独立して、炭素数1～4の炭化水素基を示す。当該炭化水素基の炭素数としては、回収した目的タンパク質への洗浄用組成物の混入を低レベルに抑える観点から、1～3が好ましく、1又は2が特に好ましい。

また、 R^6 及び R^7 で示される炭化水素基としては、アルキル基が好ましい。当該アルキル基は直鎖状でも分岐鎖状でもよい。例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基等が挙げられる。

[0047] 式(3)中、 R^8 は、炭素数9～30のアルキル基を示す。当該アルキル基の炭素数は、不純物除去性能の観点や、本発明の洗浄用組成物で洗浄された固相の再利用を容易にする観点、回収した目的タンパク質への洗浄用組成物の混入を低レベルに抑える観点から、好ましくは6～24、より好ましくは8～22、更に好ましくは9～20、更に好ましくは10～18、更に好ましくは10～16であり、更に好ましくは10～14であり、特に好ましくは11～13である。

また、 R^8 で示されるアルキル基は直鎖状でも分岐鎖状でもよい。例えば、

オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、1-メチルデシル基、ドデシル基、1-メチルウンデシル基、1-エチルデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、オクタデシル基等が挙げられる。

[0048] 式(3)中、 $R^9 \sim R^{11}$ は、それぞれ独立して、炭素数1~4の炭化水素基を示す。当該炭化水素基としては、式(2)中の R^6 と同様のものが挙げられる。

[0049] 上記カチオン性界面活性剤の具体例としては、塩化オクチルトリメチルアンモニウム、塩化デシルトリメチルアンモニウム、塩化ジデシルジメチルアンモニウム、塩化ドデシルトリメチルアンモニウム、塩化ドデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化テトラデシルトリメチルアンモニウム、塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム、塩化ステアリルトリメチルアンモニウム、塩化ジステアリルジメチルアンモニウム、塩化ベンジルトリメチルアンモニウム、塩化ベンジルトリエチルアンモニウム、塩化ベンザルコニウム、臭化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム等が挙げられる。

これら中でも、静脈又は筋肉内投与が可能な医薬品添加物であり、ヒトに対する安全性が担保されているという観点からは、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウムが好ましい。この中でも、安全性と不純物除去性能との両立の観点から、塩化ベンザルコニウムが特に好ましい。

なお、塩化ベンザルコニウムは、式(1)において、 R^1 =平均炭素数が10~15の範囲内のアルキル基、 R^2 =ベンジル基、 $R^3=R^4$ =メチル基、 $Z^{n-}=Cl^-$ の化合物である。

[0050] また、上記カチオン性界面活性剤は、1種を単独で又は2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0051] 上記カチオン性界面活性剤を用いる場合、その濃度としては、不純物除去性能の観点から、本発明の洗浄用組成物中、好ましくは0.01% (w/v)以上、より好ましくは0.05% (w/v)以上、更に好ましくは0.1

% (w/v) 以上、更に好ましくは0.5% (w/v) 以上、特に好ましくは1% (w/v) 以上であり、また、分離精製する際の圧力上昇を抑える観点から、本発明の洗浄用組成物中、好ましくは20% (w/v) 以下、より好ましくは10% (w/v) 以下、更に好ましくは8% (w/v) 以下、更に好ましくは6.5% (w/v) 以下、更に好ましくは5% (w/v) 以下、更に好ましくは3.5% (w/v) 以下、特に好ましくは2% (w/v) 以下である。

カチオン性界面活性剤の濃度を上記のような範囲とすることにより、分離精製する際の圧力上昇が大幅に抑えられ、且つ優れた不純物除去性能が得られる。

[0052] (成分(B) : ヒドロキシ酸エステル)

ヒドロキシ酸エステルとしては、1~3個のヒドロキシ基及び1~3個のエステル結合を分子内に有するヒドロキシ酸エステルが好ましく、1又は2個のヒドロキシ基及び1又は2個のエステル結合を分子内に有するヒドロキシ酸エステルが好ましい。

また、ヒドロキシ酸エステルとしては、1~3個のヒドロキシ基及び1~3個のカルボキシ基を分子内に有するヒドロキシ酸に由来するヒドロキシ酸エステルが好ましく、1又は2個のヒドロキシ基及び1又は2個のカルボキシ基を分子内に有するヒドロキシ酸に由来するヒドロキシ酸エステルがより好ましい。

[0053] また、上記ヒドロキシ酸エステルとしては、グリコール酸エステル、乳酸エステル、タルトロン酸エステル、グリセリン酸エステル、ヒドロキシ酪酸エステル、リンゴ酸エステル、酒石酸エステル、クエン酸エステル等が挙げられる。

ヒドロキシ酸エステルの中でも、 α -ヒドロキシ酸エステルが好ましく、グリコール酸、乳酸エステルがより好ましく、乳酸エステルがさらに好ましい。

[0054] また、ヒドロキシ酸エステルは、ヒドロキシ酸アルキルエステルであるこ

には、互いに結合して環構造を形成していてもよい。]

[0061] R^{21} としては、炭素数1～4のアルキル基が好ましい。また、 R^{22} 及び R^{23} としては、炭素数1～4のアルキル基、アリール基が好ましい。

また、 R^{21} 、 R^{22} 及び R^{23} で示される炭素数1～4のアルキル基は直鎖状でも分岐鎖状でもよく、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基が挙げられる。

R^{22} 及び R^{23} で示されるアリール基としては、炭素数6～12のアリール基が好ましい。具体的にはフェニル基、ナフチル基等が挙げられる。

R^{21} 及び R^{22} で示される炭素数1～4のアルキル基が互いに結合して形成する環としては、2-ピロリドン環、2-ピペリドン環、2-カプロラクタム (ϵ -カプロラクタム) 環等が挙げられる。

[0062] 上記アミド系溶媒としては、例えば、*N,N*-ジメチルアセトアミド、*N,N*-ジエチルアセトアミド、*N,N*-ジプロピルアセトアミド、*N*-メチル-*N*-エチルアセトアミド、*N*-ブチル-*N*-フェニルアセトアミド、*N,N*-ジメチルプロパンアミド、*N,N*-ジエチルプロパンアミド、*N*-メチル-*N*-エチルプロパンアミド、*N*-メチル-2-ピロリドン、*N*-メチル-2-カプロラクタム、*N*-エチル-2-カプロラクタム等が挙げられる。

これらの中でも、静脈内投与又は筋肉内投与が可能な医薬品添加物であり、ヒトに対する安全性が担保されていることから、*N,N*-ジメチルアセトアミドが特に好ましい。

[0063] なお、上記アミド系溶媒は、1種を単独で又は2種以上を組み合わせる用いてよい。

[0064] 上記アミド系溶媒を用いる場合、その濃度としては、不純物除去性能の観点から、本発明の洗浄用組成物中、好ましくは1% (v/v) 以上、より好ましくは5% (v/v) 以上、更に好ましくは10% (v/v) 以上、特に好ましくは15% (v/v) 以上であり、また、好ましくは40% (v/v)

) 以下、より好ましくは30% (v/v) 以下、更に好ましくは20% (v/v) 以下である。具体的には1~40% (v/v) が好ましく、5~30% (v/v) がより好ましく、10~20% (v/v) がさらに好ましく、15~20% (v/v) が特に好ましい。

[0065] 本発明の洗浄用組成物において、上記成分(A)、成分(B)、成分(C)は、これらの成分のうち1種を単独で用いてもよく、2種以上を組み合わせ用いてもよいが、2種以上を組み合わせた場合、不純物除去性能が更に向上する。

これら成分の組み合わせとしては、成分(A)と成分(B)の組み合わせ、成分(A)と成分(C)の組み合わせ、成分(B)と成分(C)の組み合わせ、成分(A)と成分(B)と成分(C)の組み合わせが挙げられる。斯様な組み合わせを含有する洗浄用組成物の中でも、不純物除去性能の観点から、成分(A)を少なくとも含み、更に成分(B)及び成分(C)から選ばれる1種以上を含有する洗浄用組成物が好ましい。

[0066] また、上記各成分のうち成分(A)と成分(B)をともに用いる場合、成分(A)と成分(B)との含有割合[(A)/(B)]は、0.01~10 (w/v) が好ましく、0.05~1 (w/v) がより好ましく、0.05~0.5 (w/v) がさらに好ましい。

[0067] また、上記各成分のうち成分(A)と成分(C)をともに用いる場合、成分(A)と成分(C)との含有割合[(A)/(C)]は、0.01~10 (w/v) が好ましく、0.05~1 (w/v) がより好ましく、0.05~0.5 (w/v) がさらに好ましい。

[0068] (その他の成分)

本発明の洗浄用組成物中には、上記成分の他に、水；リン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム等の無機塩；アミノ酸；糖等を含んでもよい。なお、これらその他の成分は、1種を単独で用いても2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0069] また、上記無機塩の濃度としては、不純物除去性能の観点からは、洗浄用

組成物中、1～1500mMが好ましく、5～1000mMがより好ましく、10～750mMが更に好ましく、200～750mMが特に好ましい。

[0070] 本発明の洗浄用組成物の23℃におけるpHは、目的タンパク質の安定性の観点から、好ましくは5以上、より好ましくは6以上、更に好ましくは7以上であり、また、好ましくは9以下、より好ましくは8以下である。

また、本発明の洗浄用組成物の23℃における粘度としては、0.8～2.0mPa・sが好ましく、0.8～1.6mPa・sがより好ましい。

また、本発明の洗浄用組成物は、洗浄用液状組成物であるのが好ましい。

[0071] 本発明の洗浄用組成物は、目的タンパク質及び不純物を含む混合液から目的タンパク質を分離精製するプロセスに用いられるものである。例えば、目的タンパク質が結合したリガンドが固定された固相をカラム容器に充填し、洗浄用組成物を通液する等して使用される。

(分離精製プロセス)

分離精製プロセスとしては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどが挙げられ、選択性に優れ、高純度な目的タンパク質が得られることから、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい。

特に、本発明の洗浄用組成物は、プロテインAをリガンドとして用いたアフィニティークロマトグラフィーによる抗体精製に適し、当該抗体精製における中間洗浄用の組成物として特に有用である。斯様な洗浄に本発明の洗浄用組成物を用いた場合、不純物が非常に効果的に除去され、且つ、プロテインAから抗体が解離しにくいいため、抗体を極めて効率よく回収することができる。

中間洗浄とは、抗体などの目的タンパク質の分離精製プロセスにおいて、不純物を洗浄除去するために、リガンドに目的タンパク質を保持させた状態で固相を洗浄することをいう。

[0072] (目的タンパク質)

目的タンパク質としては、抗体が好ましく、Fc領域(CH2/CH3領

域（C H 2 領域及びC H 3 領域）を含む I g G 型の抗体がより好ましい。また、F c 融合タンパク質、組換えタンパク質を用いてもよい。なお、抗体には、動物細胞で産生された抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体が含まれる。

[0073] [タンパク質精製方法]

本発明のタンパク質精製方法は、

固相上に固定されたりガンドと、目的タンパク質及び不純物を含む混合液とを接触させ、前記リガンドと前記混合液中のタンパク質とを結合させる結合工程、

本発明の洗浄用組成物で、前記タンパク質が結合したりガンドが固定された固相を洗浄して不純物を除去する洗浄工程、並びに

溶出バッファーを用いて、前記洗浄工程で洗浄した固相から目的タンパク質を回収する回収工程、

を含むことを特徴とするものである。

以下、各工程について説明する。

[0074] (結合工程)

本発明における結合工程とは、固相上に固定されたりガンドと、目的タンパク質及び不純物を含む混合液とを接触させ、前記リガンドと前記混合液中のタンパク質とを結合させる工程である。

[0075] 固相の材質は、本発明の洗浄用組成物は種々の材質の固相を用いた精製に利用できるため特に限定されるものではなく、合成高分子、天然高分子の他、シリカ、ガラスなどが挙げられる。

これらの中でも、合成高分子、天然高分子が好ましい。合成高分子としては、ポリスチレン樹脂、メタクリレート樹脂が挙げられ、天然高分子としては、アガロース、デキストラン、セルロース等の多糖類で構成されるものが挙げられる。この中でも、アガロース、メタクリレート樹脂が好ましく、カラムへの充填やスケールアップが容易であることから、メタクリレート樹脂がより好ましい。

[0076] 固相の形状としては、粒子、中空繊維、不織布、フィルター、モノリスが

挙げられるが、粒子が好ましい。

[0077] リガンドは、目的タンパク質との親和性を考慮して選択すればよい。例えば、プロテインA、プロテインG、アビジン、Hisタグ、GSTタグ等のタンパク質が挙げられる。

これらの中でも、抗体医薬の製造において用いることが可能であることから、プロテインAが特に好ましい。本発明の洗浄用組成物は、プロテインAから抗体を解離させにくいため、本発明の洗浄用組成物を用いてプロテインAをリガンドとする固相の洗浄をした場合、抗体を極めて効率よく回収することができる。

[0078] 目的タンパク質及び不純物を含む混合液としては、例えば、不純物を含むCHO細胞（チャイニーズハムスター卵巣タンパク質）の培養液、不純物を含むハイブリドーマの培養液、遺伝子組換え大腸菌の細胞破碎液が挙げられる。CHO細胞の培養液には、不純物の他に、CHO細胞が産生したFc領域を含むIgG型の抗体が含まれる。

[0079] リガンドと混合液中の目的タンパク質とを結合させる方法は特に限定されないが、例えば、リガンドが固定化された粒子状の担体をカラム容器に充填し、混合液をカラムに添加し、目的タンパク質とリガンドとを接触させることで結合させる方法が挙げられる。

[0080] (洗浄工程)

本発明における洗浄工程とは、本発明の洗浄用組成物で、前記タンパク質が結合したリガンドが固定された固相を洗浄して不純物を除去する工程である。

洗浄工程は、本発明の洗浄用組成物を用いること以外は常法の間接洗浄と同様に行えばよく、例えば、リガンドに抗体が保持された状態のまま本発明の洗浄用組成物をカラムに通液させることで固相を洗浄して不純物を除去すればよい。

[0081] 不純物としては、HCP (Host Cell Protein)、DNA、脂質、培地由来成分などが挙げられる。HCPには、CHO細胞等の抗

体産生細胞の細胞片由来のタンパク質が含まれる。

[0082] 本発明の洗浄用組成物の使用量は、カラムを用いる場合は、通常1～10カラム容量であるが、3～5カラム容量が好ましい。

洗浄温度は、通常0～50℃であるが、5～35℃が好ましく、常温がより好ましい。

[0083] なお、本洗浄工程の前後に、リン酸ナトリウムやトリス塩酸緩衝液などの中性緩衝液に塩化ナトリウムや硫酸ナトリウムなどの無機塩を添加した洗浄液などを用いて、更に固相を洗浄してもよい。

[0084] (回収工程)

本発明における回収工程とは、溶出バッファーを用いて、前記洗浄工程で洗浄した固相から目的タンパク質を回収する工程である。例えば、溶出バッファーで目的タンパク質を溶出させ、クロマトグラフィーシステムのフラクションコレクターを用いて目的タンパク質を回収する方法が挙げられる。

[0085] 溶出バッファーとしては、リガンドがプロテインA等の場合は酸性緩衝液、リガンドがHisタグ等の場合はイミダゾール含有緩衝液、リガンドがGSTタグ等の場合はグルタチオン含有緩衝液などが挙げられる。

[0086] 目的タンパク質は上記と同様に、抗体が好ましく、Fc領域(CH₂/CH₃領域(CH₂領域及びCH₃領域))を含むIgG型の抗体がより好ましい。また、Fc融合タンパク質、組換えタンパク質を用いてもよい。

[0087] なお、分離精製した目的タンパク質を含む溶液中に成分(A)～(C)が含まれる場合、回収工程の後、成分(A)～(C)を除去してもよい。除去方法としては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー用担体、疎水性相互作用クロマトグラフィー用担体又はマルチモーダルクロマトグラフィー用担体を用いて、吸着挙動の差異により目的タンパク質から成分(A)～(C)を分離除去する方法が挙げられる。

実施例

[0088] 以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0089] (参考例1)

カラム容器 (GE Healthcare社製 Tricorn 10/50 column) に、国際公開第2012/086660号の実施例に記載のタンパク質リガンド (プロテインA) を固定化させたメタクリレート樹脂を主成分とするアフィニティークロマトグラフィー担体 JX02-PB2 を充填高さ約5cmで充填してカラムを作製した。得られたカラムをGE Healthcare社製 AKTA Prime Plus に接続し、20mMリン酸ナトリウムバッファー (pH7.5) を5カラム容量 (カラム容積の5倍)、流速1mL/分にて通液し、平衡化させた。

次いで、モノクローナル抗体 Trastuzumab のバイオシミラーを含有するCHO細胞培養上清を、約24g抗体/mL担体の負荷量で、流速1mL/分にてカラムに通液した。

次いで、洗浄液1として、20mMリン酸ナトリウムバッファー (pH7.5) を5カラム容量、流速1mL/分にてカラムに通液した。

次いで、洗浄液2として、20mMリン酸ナトリウム/1M塩化ナトリウムバッファー (pH7.5) を5カラム容量、流速1mL/分にてカラムに通液した。

次いで、洗浄液3として、20mMリン酸ナトリウムバッファー (pH7.5) を5カラム容量、流速1mL/分にてカラムに通液した。

その後、100mMグリシン塩酸緩衝液 (pH3.0) を5カラム容量、流速1mL/分にてカラムに通液し、カラム内に捕捉されていたモノクローナル抗体を溶出させ、Abs. 280 > 100mAuの溶出フラクションを回収した。

そして、Cygnus Technologies社製 CHO HCP ELISA kit, 3Gを用い、回収したフラクション中に含有される Host Cell Protein (HCP) 濃度を測定した。結果を表2に示した。

また、分光光度計 (Bio-Rad Laboratories製 Sma

rt Spec Plus) を用い、回収したフラクション中に含有される抗体濃度を測定し、回収液量を乗ずることで抗体回収量を算出し、さらに添加抗体量で除することにより、抗体回収率を測定した。結果を表 2 に示した。

[0090] (参考例 2)

メタクリレート樹脂担体 (JX02-PB2) を、アガロース担体 (Mab Select Sure (商標)) に変更する以外は参考例 1 と同様の処理を行い、HCP 濃度と抗体回収率の評価を実施した。結果を表 2 に示した。

[0091] (実施例 1 ~ 10 及び比較例 1 ~ 2)

参考例 1 における洗浄液 1 を、表 1 に記載の各洗浄液にそれぞれ変更した以外は、参考例 1 と同様の処理を行い、HCP 濃度と抗体回収率の評価を実施した。結果を表 2 に示した。

[0092] (実施例 11)

参考例 2 における洗浄液 1 を、表 1 に記載の洗浄液 A-2 に変更した以外は、参考例 2 と同様の処理を行い、HCP 濃度と抗体回収率の評価を実施した。結果を表 2 に示した。

[0093]

[表1]

		洗淨液			23°CにおけるpH
		組成			
		無機塩	界面活性剤		
洗淨液1	リン酸ナトリウム(20mM)			精製水(残量)	7.5
洗淨液A-1	リン酸ナトリウム(20mM)		塩化ベンザルコニウム(0.5%(w/v))	精製水(残量)	7.5
洗淨液A-2	リン酸ナトリウム(20mM)		塩化ベンザルコニウム(2%(w/v))	精製水(残量)	7.5
洗淨液A-3	リン酸ナトリウム(20mM)		塩化ベンザルコニウム(10%(w/v))	精製水(残量)	7.5
洗淨液A-4	リン酸ナトリウム(20mM)		塩化デシルトリメチルアンモニウム(2%(w/v))	精製水(残量)	7.5
洗淨液A-5	リン酸ナトリウム(20mM)		塩化ドデシルトリメチルアンモニウム(2%(w/v))	精製水(残量)	7.5
洗淨液A-6	リン酸ナトリウム(20mM)		塩化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(2%(w/v))	精製水(残量)	7.5
洗淨液A-7	リン酸ナトリウム(20mM)		塩化ベンゼトニウム(2%(w/v))	精製水(残量)	7.5
洗淨液A-8	リン酸ナトリウム(20mM)		塩化n-オクチルトリメチルアンモニウム(2%(w/v))	精製水(残量)	7.5
洗淨液A-9	リン酸ナトリウム(20mM)		塩化ペンジルトリメチルアンモニウム(2%(w/v))	精製水(残量)	7.5
洗淨液A-10	リン酸ナトリウム(20mM)		塩化ペンジルトリエチルアンモニウム(2%(w/v))	精製水(残量)	7.5
洗淨液B-1	リン酸ナトリウム(20mM)		塩化テトラメチルアンモニウム(2%(w/v))	精製水(残量)	7.5
洗淨液B-2	リン酸ナトリウム(20mM)		塩化テトラエチルアンモニウム(2%(w/v))	精製水(残量)	7.5

[0094]

[表2]

	添加試料	担体	洗浄液	HCP (ppm)	抗体回収率 (%)
参考例1	Trastuzumab/バイオシミラー	JX02-PB2	洗浄液1	18789	96
実施例1		JX02-PB2	洗浄液A-1	1460	93
実施例2		JX02-PB2	洗浄液A-2	780	92
実施例3		JX02-PB2	洗浄液A-3	668	94
実施例4		JX02-PB2	洗浄液A-4	816	91
実施例5		JX02-PB2	洗浄液A-5	498	92
実施例6		JX02-PB2	洗浄液A-6	931	92
実施例7		JX02-PB2	洗浄液A-7	1584	78
実施例8		JX02-PB2	洗浄液A-8	8109	90
実施例9		JX02-PB2	洗浄液A-9	11775	93
実施例10	JX02-PB2	洗浄液A-10	11299	94	
比較例1		JX02-PB2	洗浄液B-1	14884	96
比較例2		JX02-PB2	洗浄液B-2	14440	95
参考例2	Trastuzumab/バイオシミラー	MabSelect SuRe	洗浄液1	5098	91
実施例11		MabSelect SuRe	洗浄液A-2	762	87

[0095] (参考例3)

モノクローナル抗体 *Trastuzumab* のバイオシミラーを含有する CHO 細胞培養上清（約 2.4 g 抗体 / mL 担体の負荷量）を、モノクローナル抗体 *Etanercept* のバイオシミラーを含有する CHO 細胞培養上清（約 6.5 g 抗体 / mL 担体の負荷量）に変更する以外は参考例 1 と同様の処理を行い、HCP 濃度と抗体回収率の評価を実施した。結果を表 3 に示した。

[0096]（実施例 12～13 及び比較例 3）

参考例 3 における洗浄液 1 を、表 1 に記載の洗浄液 A-2（実施例 12）、洗浄液 A-4（実施例 13）、洗浄液 B-1（比較例 3）にそれぞれ変更した以外は、参考例 3 と同様の処理を行い、HCP 濃度と抗体回収率の評価を実施した。結果を表 3 に示した。

[0097]

[表3]

	添加試料	担体	洗浄液	HCP (ppm)	抗体回収率 (%)
参考例3	Etanercept/ハインミラー	JX02-PB2	洗浄液1	78314	103
実施例12		JX02-PB2	洗浄液A-2	2441	100
実施例13		JX02-PB2	洗浄液A-4	3107	94
比較例3		JX02-PB2	洗浄液B-1	42751	106

[0098] 上記表2及び3に示すように、洗浄液A-1～A-10を用いることによ

って、HCPを効率的に洗浄除去できた。

[0099] (参考例4)

カラム容器 (GE Healthcare社製 Tricorn 5/200 column) に、国際公開第2012/086660号の実施例に記載のタンパク質リガンド (プロテインA) を固定化させたメタクリレート樹脂を主成分とするアフィニティークロマトグラフィー担体 JX02-PB2 を充填高さ約20cmで充填してカラムを作製した。得られたカラムを GE Healthcare社製 AKTA Prime Plus に接続し、20mMリン酸ナトリウムバッファー (pH7.5) を5カラム容量 (カラム容積の5倍)、流速1mL/分にて通液し、平衡化させた。その後、GE Healthcare社製 AKTA Prime Plus からカラムを取り外した。

次いで、20mMリン酸ナトリウム/500mM塩化ナトリウムバッファー (pH7.5) (以下、測定液11とも称する) を5カラム容量、流速1mL/分にて AKTA Prime Plus に通液し、カラム未接続時の圧力値を測定した。

次にカラムを接続し、再度、測定液11を5カラム容量、流速1mL/分にて AKTA Prime Plus に通液し、カラム接続時の圧力値を測定した。当該カラム接続時の圧力値からカラム未接続時の圧力値を差し引き、測定液11を通液した際の圧力損失値とした。結果を表5に示した。

なお、カラム未接続時の圧力値とカラム接続時の圧力値は、AKTA Prime Plus に付属の圧力計により測定した。

[0100] (実施例14~16及び比較例4~5)

参考例4における測定液11を、表4に記載の各測定液にそれぞれ変更した以外は、参考例4と同様の処理を行い、圧力損失値の評価を実施した。結果を表5に示した。

[0101]

[表4]

	測定液					23°CにおけるpH
	組成					
	無機塩	界面活性剤	アルキレングリコール	精製水(残量)		
測定液11	リン酸ナトリウム (20mM)	塩化ナトリウム (500mM)	—	—	精製水(残量)	7.5
測定液A-11	リン酸ナトリウム (20mM)	リン酸ナトリウム (500mM)	塩化ベンザルコニウム (2% (w/v))	—	精製水(残量)	7.5
測定液A-12	リン酸ナトリウム (20mM)	リン酸ナトリウム (500mM)	塩化ベンザルコニウム (5% (w/v))	—	精製水(残量)	7.5
測定液A-13	リン酸ナトリウム (20mM)	リン酸ナトリウム (500mM)	塩化ベンザルコニウム (10% (w/v))	—	精製水(残量)	7.5
測定液B-11	リン酸ナトリウム (20mM)	リン酸ナトリウム (500mM)	—	プロピレングリコール (20% (w/v))	精製水(残量)	7.5
測定液B-12	リン酸ナトリウム (20mM)	リン酸ナトリウム (500mM)	—	ヘキシレングリコール (20% (w/v))	精製水(残量)	7.5

[0102]

[表5]

	測定液	圧力値 (MPa)		
		カラム未接続時	カラム接続時	圧力損失
参考例4	測定液11	0.233	0.316	0.083
実施例14	測定液A-11	0.246	0.336	0.090
実施例15	測定液A-12	0.234	0.359	0.125
実施例16	測定液A-13	0.245	0.464	0.219
比較例4	測定液B-11	0.247	0.423	0.176
比較例5	測定液B-12	0.240	0.393	0.153

[0103] (実施例17～22)

参考例1における洗浄液1を、表6に記載の洗浄液A-21～A23、A31～A33にそれぞれ変更した以外は、参考例1と同様の処理を行い、HCP濃度と抗体回収率の評価を実施した。結果を表7に示した。

[0104]

[表6]

	洗浄液					23°CにおけるpH
	組成					
	無機塩	ヒドロキシ酸エステル	アミド系溶媒	精製水(残量)		
洗浄液1	リン酸ナトリウム (20mM)	-	-	精製水(残量)	7.5	
洗浄液A-21	リン酸ナトリウム (20mM)	乳酸エチル (10%(v/v))	-	精製水(残量)	7.5	
洗浄液A-22	リン酸ナトリウム (20mM)	乳酸エチル (20%(v/v))	-	精製水(残量)	7.5	
洗浄液A-23	リン酸ナトリウム (20mM)	乳酸エチル (20%(v/v))	-	精製水(残量)	7.5	
洗浄液A-31	リン酸ナトリウム (20mM)	-	N, N-ジメチルアセトアミド (10%(v/v))	精製水(残量)	7.5	
洗浄液A-32	リン酸ナトリウム (20mM)	-	N, N-ジメチルアセトアミド (20%(v/v))	精製水(残量)	7.5	
洗浄液A-33	リン酸ナトリウム (20mM)	-	N, N-ジメチルアセトアミド (20%(v/v))	精製水(残量)	7.5	

[0105]

[表7]

	添加試料	担体	洗浄液	HCP (ppm)	抗体回収率 (%)
参考例1	Trastuzumab/バイオシミラー	JX02-PB2	洗浄液1	18789	96
実施例17		JX02-PB2	洗浄液A-21	3237	96
実施例18		JX02-PB2	洗浄液A-22	4938	93
実施例19		JX02-PB2	洗浄液A-23	1470	93
実施例20		JX02-PB2	洗浄液A-31	4197	93
実施例21		JX02-PB2	洗浄液A-32	6411	93
実施例22		JX02-PB2	洗浄液A-33	2749	93

[0106] (実施例23及び24)

参考例 1 における洗浄液 1 を、表 8 に記載の洗浄液 A-4 1、A-4 2 にそれぞれ変更した以外は、参考例 1 と同様の処理を行い、HCP 濃度と抗体回収率の評価を実施した。結果を表 9 に示した。

[0107]

[表8]

洗淨液						23°CにおけるpH
	組成					
	無機塩	界面活性剤	ヒドロキシ酸エステル	アミド系溶媒	精製水(残量)	
洗淨液1	リン酸ナトリウム (20mM)	—	—	—	精製水(残量)	7.5
洗淨液A-2	リン酸ナトリウム (20mM)	塩化ベンザルコニウム (2% (w/v))	—	—	精製水(残量)	7.5
洗淨液A-41	リン酸ナトリウム (20mM)	塩化ベンザルコニウム (2% (w/v))	乳酸エチル (20% (v/v))	—	精製水(残量)	7.5
洗淨液A-42	リン酸ナトリウム (20mM)	塩化ベンザルコニウム (2% (w/v))	—	N,N-ジメチルアセトアミド (20% (v/v))	精製水(残量)	7.5

[0108]

[表9]

	添加試料	担体	洗浄液	HCP (ppm)	抗体回収率 (%)
参考例1	Trastuzumab/バイオシミラー	JX02-PB2	洗浄液1	18789	96
実施例2		JX02-PB2	洗浄液A-2	780	92
実施例23		JX02-PB2	洗浄液A-41	494	89
実施例24		JX02-PB2	洗浄液A-42	524	90

請求の範囲

[請求項1] 目的タンパク質及び不純物を含む混合液から目的タンパク質を分離精製するプロセスに用いる洗浄用組成物であって、以下の成分（A）、成分（B）及び成分（C）から選ばれる1種又は2種以上を含むことを特徴とする、洗浄用組成物。

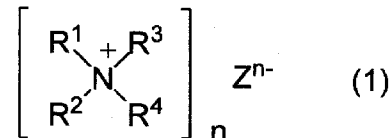
（A）炭素数5以上の有機基を有する第4級アンモニウム塩型カチオン性界面活性剤、及び炭素数5以上の有機基を有するアミン塩型カチオン性界面活性剤から選ばれるカチオン性界面活性剤

（B）ヒドロキシ酸エステル

（C）アミド系溶媒

[請求項2] 前記カチオン性界面活性剤が、下記式（1）で表されるものである、
請求項1に記載の洗浄用組成物。

[化1]



[式（1）中、

R¹は、炭素数5以上の有機基を示し、

R²、R³及びR⁴は、それぞれ独立して、有機基を示し、

nは1以上の整数を示し、

Zⁿ⁻はn価のアニオンを示す。]

[請求項3]

R¹が、

炭素数5～30の炭化水素基、

炭素数5～30のヒドロキシアルキル基、

ヒドロキシアルキル基の水素原子の一部が炭化水素基で置換された総

炭素数 5 ～ 30 の基、

平均付加モル数が 10 以下であり炭素数が 5 以上であるポリオキシアルキレン基、

又は平均付加モル数 10 以下のポリオキシアルキレン基の水素原子の一部が炭化水素基で置換された総炭素数 5 ～ 30 の基である、

請求項 2 に記載の洗浄用組成物。

[請求項 4]

R^2 、 R^3 及び R^4 が、それぞれ独立して、

炭素数 1 ～ 30 の炭化水素基、

炭素数 1 ～ 30 のヒドロキシアルキル基、

ヒドロキシアルキル基の水素原子の一部が炭化水素基で置換された総炭素数 2 以上の基、

平均付加モル数が 10 以下であるポリオキシアルキレン基、

又は平均付加モル数 10 以下のポリオキシアルキレン基の水素原子の一部が炭化水素基で置換された総炭素数 2 以上の基である、

請求項 2 又は 3 のいずれか 1 項に記載の洗浄用組成物。

[請求項 5]

R^2 の炭素数 $\geq R^3$ の炭素数、且つ R^2 の炭素数 $\geq R^4$ の炭素数であり、

R^1 と R^2 との炭素数の合計が 10 以上である、

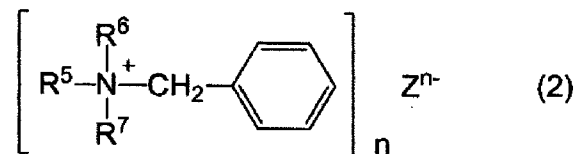
請求項 2 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の洗浄用組成物。

[請求項 6]

前記カチオン性界面活性剤が、下記式 (2) 又は (3) で表されるものである、

請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の洗浄用組成物。

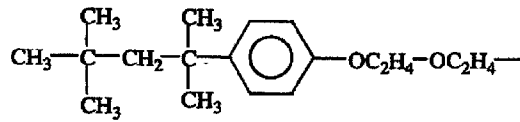
[化 2]



[式 (2) 中、

R^5 は、炭素数 5 ～ 30 の炭化水素基又は

[化3]



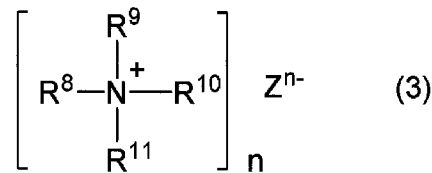
で表わされる基を示し、

R^6 及び R^7 は、それぞれ独立して、炭素数1～4の炭化水素基を示し、

n は1以上の整数を示し、

Z^{n-} は n 価のアニオンを示す。]

[化4]



[式(3)中、

R^8 は、炭素数9～30のアルキル基を示し、

$R^9 \sim R^{11}$ は、それぞれ独立して、炭素数1～4の炭化水素基を示し、

n 及び Z^{n-} は前記と同義である。]

[請求項7] 前記カチオン性界面活性剤が、塩化ベンザルコニウム又は塩化ベンゼトニウムである、

請求項1～6のいずれか1項に記載の洗浄用組成物。

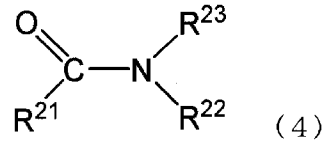
[請求項8] 前記カチオン性界面活性剤の濃度が、0.01～20% (w/v)である、

請求項1～7のいずれか1項に記載の洗浄用組成物。

[請求項9] 前記ヒドロキシ酸エステルが、1～3個のヒドロキシ基及び1～3個のエステル結合を分子内に有するヒドロキシ酸エステルである、
請求項1～8のいずれか1項に記載の洗浄用組成物。

[請求項10] 前記アミド系溶媒が、下記式(4)で表される溶媒である、
請求項1～9のいずれか1項に記載の洗浄用組成物。

[化5]



[式(4)中、

R^{21} は、水素原子又は炭素数1～4のアルキル基を示し、

R^{22} 及び R^{23} は、それぞれ独立して、水素原子、炭素数1～4のアルキル基、又はアリアル基を示し、

R^{21} と R^{22} がともに炭素数1～4のアルキル基の場合には、互いに結合して環構造を形成していてもよい。]

[請求項11] 前記カチオン性界面活性剤を少なくとも含み、更に前記ヒドロキシ酸エステル及び前記アミド系溶媒から選ばれる1種以上を含有する、
請求項1～10のいずれか1項に記載の洗浄用組成物。

[請求項12] 前記目的タンパク質を分離精製するプロセスが、アフィニティークロマトグラフィーである、
請求項1～11のいずれか1項に記載の洗浄用組成物。

[請求項13] 前記目的タンパク質が抗体である、
請求項1～12のいずれか1項に記載の洗浄用組成物。

[請求項14] 前記目的タンパク質の分離精製が、合成高分子又は天然高分子を固相とするアフィニティークロマトグラフィーによる分離精製である、
請求項1～13のいずれか1項に記載の洗浄用組成物。

[請求項15] 前記目的タンパク質の分離精製が、アガロース又はメタクリレート樹脂を固相とするアフィニティークロマトグラフィーによる分離精製である、
請求項1～14のいずれか1項に記載の洗浄用組成物。

[請求項16] 固相上に固定されたリガンドと、目的タンパク質及び不純物を含む

混合液とを接触させ、前記リガンドと前記混合液中のタンパク質とを結合させる結合工程、

請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の洗浄用組成物で、前記タンパク質が結合したリガンドが固定された固相を洗浄して不純物を除去する洗浄工程、並びに

溶出バッファーを用いて、前記洗浄工程で洗浄した固相から目的タンパク質を回収する回収工程、

を含むことを特徴とするタンパク質精製方法。

[請求項17] 請求項 16 に記載の精製方法により精製されたことを特徴とする、目的タンパク質。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/064284

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K1/22(2006.01)i, C07C211/63(2006.01)i, C07K14/00(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i

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)
C07K1/22, C07C211/63, C07K14/00, C07K16/00, C07K19/00

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Thomson Innovation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2012-1462 A (Kaneka Corp.), 05 January 2012 (05.01.2012), claims; paragraphs [0062] to [0069]; example 4, table 2 (Family: none)	<u>1, 8-17</u> 1-7, 11-16

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 26 August, 2014 (26.08.14)	Date of mailing of the international search report 02 September, 2014 (02.09.14)
-----------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/064284

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	EP 0226448 A2 (Bunge (Australia) Proprietary Ltd.), 24 June 1987 (24.06.1987), claims; examples 1, 2 & JP 62-223192 A & EP 226448 A2 & DE 3685562 A & DE 3685562 T & AT 76878 T & NO 864990 A & NZ 218586 A & AU 6687486 A & CA 1281849 A & DK 592186 A & ES 2032194 T & GR 3004903 T & CN 86108729 A & AU 597924 B & DK 592186 A0	1-6, 8, 17 1-6, 11-16
X Y	US 5883256 A (Behringwerke AG), 16 March 1999 (16.03.1999), claims 1 to 15 & JP 9-183795 A & EP 776668 A3 & DE 19544297 A & DE 59610731 D & AU 7199796 A & CA 2191406 A & AT 250430 T & ES 2204985 T & AU 706030 B & CA 2191406 A1	1-6, 8, 17 1-6, 11-16
X Y	US 5565338 A (La Jolla Institute for Allergy and Immunology), 15 October 1996 (15.10.1996), example 4 & JP 6-508829 A & EP 591320 A & WO 1992/021240 A1 & NO 934382 A & AU 6573196 A & FI 934989 A & HU 67010 A & AU 2161792 A & CA 2103046 A & AU 707739 B & CA 2103046 A1	1-6, 8, 17 1-6, 11-16
X Y	WO 2008/101667 A1 (Baxter International Inc.), 28 August 2008 (28.08.2008), claims 1 to 10 & JP 2010-518836 A & US 2008/0249014 A1 & EP 2129684 A & DE 602008004747 D & CN 101616930 A & AU 2008217189 A & HK 1138290 A & CA 2677023 A & AT 496935 T	1-8, 17 1-7, 11-16
X Y	Zhao and Sun, Journal of Chromatography A, Vol.1165, p.109-115(2007)	<u>1-8, 17</u> 1-7, 11-16
A	Maciuk et al., Journal of liquid Chromatography & Related Technologies, Vol.28, p.1947-1957 (2005)	1-8, 17
A	JP 4-68088 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 03 March 1992 (03.03.1992), entire text (Family: none)	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/064284

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-504838 A (Genentech, Inc.), 10 April 2001 (10.04.2001), claims; example 1 & US 6127526 A & EP 950067 A & WO 1998/023645 A1	1-8,11-17
A	Andres et al., Protein Expression and Purification, Vol. 2, p266-269(1991)	1-8,11-17
A	Reifsnnyder et al., Journal of Chromatography A, Vol. 753, p73-80(1996)	1-8,11-17
A	JP 2013-504621 A (Althea Technologies, Inc.), 07 February 2013 (07.02.2013), claims; paragraph [0056] & US 2013/0053548 A1 & EP 2478005 A & WO 2011/034822 A1 & CA 2774212 A & CN 102753570 A & EA 201270425 A & KR 10-2014-0002459 A	1-8,11-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/064284

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.:
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:

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:
See extra sheet.

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

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- 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.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/064284

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The inventions of claims 1-17 are classified into the following three invention groups.

(Invention group 1) claims 1-8 and 11-17 (parts)

A cleaning composition which contains, as a component, "a cationic surfactant that is selected from among quaternary ammonium salt type cationic surfactants having an organic group with 5 or more carbon atoms and amine salt type cationic surfactants having an organic group with 5 or more carbon atoms".

(Invention group 2) claims 1, 11-17(parts) and claim 9

A cleaning composition which contains, as a component, "a hydroxy acid ester".

(Invention group 3) claims 1, 11-17(parts) and claim 10

A cleaning composition which contains, as a component, "an amide solvent".

Although the technical feature common to claims 1-17 is to provide a cleaning composition which is used in a process for separating and refining a desired protein and exhibits excellent impurity removal performance, this technical feature has been publicly known and is not novel.

Meanwhile, since the inventions of claims 1-17 have different active ingredients for a cleaning composition as described above, the inventions of claims 1-17 cannot be considered to have a common special technical feature.

The inventions of claims 1, 11-17(parts), 9 and 10 are not relevant to inventions which involve all of the matters to define the inventions in claims 1-8 and 11-17 (parts), and which have a same category.

Further, as a result of the search which has been carried out with respect to claims classified into Invention 1, claims 1, 11-17, 9 and 10 are not relevant to inventions on which it is substantially possible to carry out a search without an additional prior-art search and judgment, and there is no other reason for that it can be considered that it is efficient to carry out a search on these claims together with Invention 1, and consequently, it is impossible to classify these claims into Invention 1 or 2.

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, C07C211/63(2006.01)i, C07K14/00(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i

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. C07K1/22, C07C211/63, C07K14/00, C07K16/00, C07K19/00

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 1971-2014年
 日本国実用新案登録公報 1996-2014年
 日本国登録実用新案公報 1994-2014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/BIOSIS/WPIDS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)
 Thomson Innovation

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 Y	JP 2012-1462 A (株式会社カネカ) 2012.01.05, 特許請求の範囲, 【0062】～【0069】, 実施例4【表2】(ファミリーなし)	1, 8-17 1-7, 11-16
X	EP 0226448 A2 (Bunge (Australia) Proprietary Limited) 1987.06.24, Claims, Example1, 2 & JP 62-223192 A & EP 226448 A2	1-6, 8, 17
Y	& DE 3685562 A & DE 3685562 T & AT 76878 T & NO 864990 A & NZ 218586 A & AU 6687486 A & CA 1281849 A & DK 592186 A & ES 2032194 T & GR 3004903 T & CN 86108729 A & AU 597924 B & DK 592186 A0	1-6, 11-16

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 26.08.2014	国際調査報告の発送日 02.09.2014
--------------------------	--------------------------

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) 梶引 明佳 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N	3 2 3 1
-------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------	-----	---------

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	US 5883256 A (Behringwerke Aktiengesellschaft) 1999. 03. 16, Claim1-15 & JP 9-183795 A & EP 776668 A3 & DE 19544297 A & DE	1-6, 8, 17
Y	59610731 D & AU 7199796 A & CA 2191406 A & AT 250430 T & ES 2204985 T & AU 706030 B & CA 2191406 A1	1-6, 11-16
X	US 5565338 A (La Jolla Institute for Allergy and Immunology) 1996. 10. 15, Example4 & JP 6-508829 A & EP 591320 A & WO	1-6, 8, 17
Y	1992/021240 A1 & NO 934382 A & AU 6573196 A & FI 934989 A & HU 67010 A & AU 2161792 A & CA 2103046 A & AU 707739 B & CA 2103046 A1	1-6, 11-16
X	WO 2008/101667 A1 (Baxter International Inc.) 2008. 08. 28, Claim1-10 & JP 2010-518836 A & US 2008/0249014 A1 & EP 2129684	1-8, 17
Y	A & DE 602008004747 D & CN 101616930 A & AU 2008217189 A & HK 1138290 A & CA 2677023 A & AT 496935 T	1-7, 11-16
X	Zhao and Sun, Journal of Chromatography A, Vol. 1165, p. 109-115(2007)	1-8, 17
Y		1-7, 11-16
A	Maciuk et al., Journal of liquid Chromatography & Related Technologies, Vol. 28, p. 1947-1957(2005)	1-8, 17
A	JP 4-68088 A (旭化成工業株式会社) 1992. 03. 03, 全文 (ファミリ ーなし)	1-17
A	JP 2001-504838 A (ジェネンテック, インコーポレーテッド) 2001. 04. 10, 特許請求の範囲, 実施例 1 & US 6127526 A & EP 950067 A & WO 1998/023645 A1	1-8, 11-17
A	Andres et al., Protein Expression and Purification, Vol. 2, p266-269(1991)	1-8, 11-17
A	Reifsnyder et al., Journal of Chromatography A, Vol. 753, p73-80 (1996)	1-8, 11-17
A	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, 特許請求の範囲, 【0056】 & US 2013/0053548 A1 & EP 2478005 A & WO 2011/034822 A1 & CA 2774212 A & CN 102753570 A & EA 201270425 A & KR 10-2014-0002459 A	1-8, 11-17

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求項 1-17 に係る発明は、以下の 3 つの発明群に区分される。

(発明 1) 請求項 1-8, 11-17 (部分)

洗浄用組成物の成分として「炭素数 5 以上の有機基を有する第 4 級アンモニウム塩型カチオン性界面活性剤、及び炭素数 5 以上の有機基を有するアミン塩型カチオン性界面活性剤から選ばれるカチオン性界面活性剤」を含むもの。

(発明 2) 請求項 1, 11-17 (部分)、請求項 9

洗浄用組成物の成分として「ヒドロキシ酸エステル」を含むもの。

(発明 3) 請求項 1, 11-17 (部分)、請求項 10

洗浄用組成物の成分として「アミド系溶媒」を含むもの。

請求項 1-17 に共通する技術的事項は、目的タンパク質を分離精製するプロセスに用いる不純物除去性能に優れた洗浄用組成物を提供することであるが、そのような技術は公知であって新規なものではない。

そして、請求項 1-17 に係る発明は、上述のように洗浄性組成物としての有効成分が異なるものであるから、それが共通する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

請求項 1, 11-17 (部分), 9 及び 10 に係る発明は請求項 1-8, 11-17 (部分) に係る発明の発明特定事項を全て含む同一カテゴリーの発明ではない。

そして、上記請求項 1, 11-17, 9 及び 10 は、発明 1 に区分された請求項について調査した結果、実質的に追加的な先行技術調査や判断を必要とすることなく調査を行うことが可能である発明ではなく、発明 1 とまとめて調査を行うことが効率的であるといえる他の事情もないから、発明 1 又は 2 に区分することはできない。