

(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
2022年12月15日(15.12.2022)



(10) 国際公開番号
WO 2022/260091 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 1/22 (2006.01) B01J 20/28 (2006.01)
B01D 15/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/023149

(22) 国際出願日: 2022年6月8日(08.06.2022)

(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 2021-097149 2021年6月10日(10.06.2021) JP

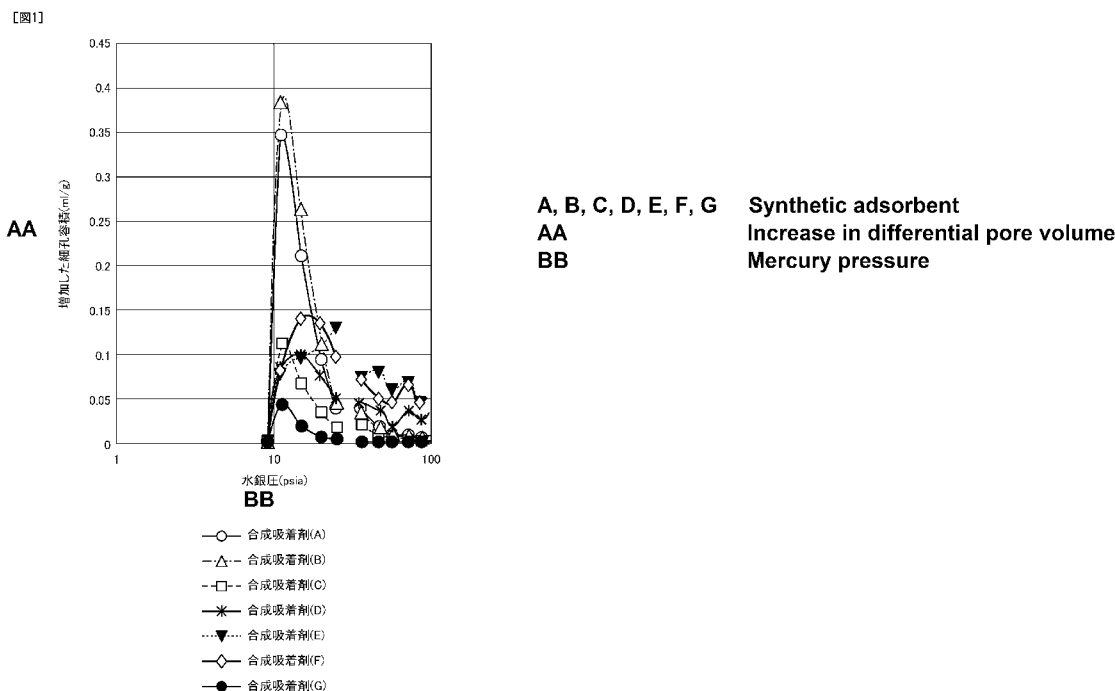
(71) 出願人: 三菱ケミカル株式会社(MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION)
[JP/JP]; 〒1008251 東京都千代田区丸の内一丁目1番1号 Tokyo (JP). 協和キリン株式会社

(KYOWA KIRIN CO., LTD.); 〒1000004 東京都千代田区大手町一丁目9番2号 Tokyo (JP).

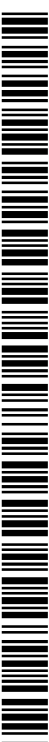
(72) 発明者: 田代 佳也 (TASHIRO, Yoshiya); 〒1008251 東京都千代田区丸の内一丁目1番1号 三菱ケミカル株式会社内 Tokyo (JP). 小原 祥平(OHARA, Shouhei); 〒1008251 東京都千代田区丸の内一丁目1番1号 三菱ケミカル株式会社内 Tokyo (JP). 竹原 潤(TAKEHARA, Jun); 〒1008251 東京都千代田区丸の内一丁目1番1号 三菱ケミカル株式会社内 Tokyo (JP). 石原 尚(ISHIHARA, Takashi); 〒1000004 東京都千代田区大手町一丁目9番2号 協和キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP). 菊池 信介(KIKUCHI, Shinsuke); 〒1000004 東京都

(54) Title: SYNTHETIC ADSORBENT, ANTIBODY PURIFICATION METHOD, AND ANTIBODY PRODUCTION METHOD

(54) 発明の名称: 合成吸着剤、抗体の精製方法及び抗体の製造方法



(57) Abstract: In this synthetic adsorbent, the maximum value of a differential pore volume (mL/g) determined under pressure conditions from 0.5 psia to 30.0 psia as measured by the following method exceeds 0.05 mL/g. <Differential pore volume (mL/g) measuring method> 1. The pressure in a sample container including the synthetic adsorbent being dried is reduced to 10 Pa or lower, and mercury as prescribed in JIS K8572 is degassed by reducing pressure thereof to 10 Pa or lower and is loaded in the sample container at a pressure of 0.5 psia. 2. The mercury intrusion amount is measured



WO 2022/260091 A1

千代田区大手町一丁目9番2号 協和キリン株式会社 本社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 重野 剛, 外(SHIGENO, Tsuyoshi et al.);
〒1600022 東京都新宿区新宿二丁目5番10号日伸ビル9階 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, 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, 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:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

while the pressure in the sample container loaded with the mercury is incrementally raised from 0.5 psia to 30.0 psia. 3. The differential pore volume (mL/g) is determined by dividing, by a measured synthetic adsorbent amount, the increase amount of the mercury intrusion amount when the pressure is increased by a one-step pressure calculated on the basis of the mercury intrusion amount measured in 2 above.

(57) 要約: 以下の方法で測定される0.5 psiaから30.0 psiaの圧力条件下での差分細孔容積 (mL/g) の最大値が0.05 mL/gを超える合成吸着剤。 <差分細孔容積 (mL/g) の測定方法> 1. 乾燥した該合成吸着剤を入れた試料容器を10 Pa以下まで減圧し、該試料容器に、JIS K 8572に規定する水銀を10 Pa以下まで減圧して脱泡後、0.5 psiaの圧力で充填する。 2. 該水銀が充填された試料容器を0.5 psiaから30.0 psiaまで段階的に圧力を上昇させたときの水銀圧入量を測定する。 3. 前記2で測定された水銀圧入量に基づき算出した1段階圧力を上昇させたときの水銀圧入量の増加量を、測定合成吸着剤量で割った差分細孔容積 (mL/g) を求める。

明 細 書

発明の名称：合成吸着剤、抗体の精製方法及び抗体の製造方法 技術分野

[0001] 本発明は、合成吸着剤、抗体の精製方法及び抗体の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、バイオ医薬品は、遺伝子組換え技術の発達によって、急速に進展している。中でも、抗体医薬品は、生産量が年々増加している医薬品である。抗体医薬品は、他の低分子医薬品と比べて非常に高価な医薬品である。抗体医薬品が高価である理由の一つとして、抗体の精製コストが莫大であることが挙げられる。

[0003] 抗体のようなタンパク質は、一般に、目的とするタンパク質をコードする遺伝子を含むベクターが挿入された組換え細胞を培養することによって産生される。培養液には、目的とするタンパク質の他に、多種多様の培地由来成分、宿主細胞由来成分、タンパク質由来の副生成物等の不純物が含まれている。このため、医薬品として要求される純度まで不純物を分離して除去し、目的のタンパク質を精製する必要がある。

[0004] 抗体をタンパク質分解酵素パパインにて分解すると、抗体の特定の場所が切断され、F a b領域とF c領域と呼ばれる部分に分けられる。F c領域に特異的に結合することができるタンパク質としてプロテインAが挙げられる。このタンパク質の特異性を利用して抗体のみを吸着させて抗体と不純物とを分離する方法が、プロテインAを用いたアフィニティークロマトグラフィーである。この分離方法は、多種多様な不純物を含む培養液から、目的とする抗体のみを選択的に捕捉することが可能である。このため、ほとんどの抗体医薬品の精製に利用されている。

[0005] 特許文献1には、アフィニティークロマトグラフィーを用いた抗体の精製方法が開示されている。一方、特許文献2には、アフィニティークロマトグラフィーを用いず、活性炭を利用した精製方法が開示されている。

[0006] 特許文献1：特表平5－504579号公報

特許文献2：国際公開第2014／024514号

[0007] 特許文献1に開示されている、プロテインA等を用いたアフィニティークロマトグラフィーのアフィニティ分離剤は、一般的なイオン交換作用や疎水性相互作用を利用した分離剤に比べ、非常に高価なものである。そのため、アフィニティ分離剤を大量に使用して生産される抗体医薬品も高価となる。

[0008] 特許文献2に開示されているように、アフィニティークロマトグラフィーを用いず、活性炭を利用した精製方法とすることで抗体の製造コストを低減することもできる。しかし、この方法では、目的とする抗体の回収率がアフィニティークロマトグラフィーと比較して大幅に低い。

[0009] 上記の通り、従来の抗体の精製方法では、低コストかつ高生産を実現することが困難であった。

発明の概要

[0010] 本発明の目的は、抗体の製造コストを低減し、かつ、工業スケールでも効率的に抗体の生産を可能とする合成吸着剤を提供することにある。また、本発明の目的は、抗体の製造コストを低減し、かつ、工業スケールでも効率的に抗体の生産を可能とする抗体の精製方法及び抗体の製造方法を提供することにある。

[0011] 本発明者らは、差分細孔容積（mL／g）の最大値が所定値を超える合成吸着剤を抗体の精製に用いることで、低コストかつ高生産の抗体の精製方法を実現できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0012] 即ち、本発明の要旨は、以下の通りである。

[0013] [1] 以下の方法で測定される0.5psiaから30.0psiaの圧力条件下での差分細孔容積（mL／g）の最大値が0.05mL／gを超える合成吸着剤。

<差分細孔容積（mL／g）の測定方法>

1. 乾燥した該合成吸着剤を入れた試料容器を10Pa以下まで減圧し、該試料容器に、JIS K8572に規定する水銀を10Pa以下まで減圧し

て脱泡後、0.5 psiaの圧力で充填する。

2. 該水銀が充填された試料容器を0.5 psiaから30.0 psiaまで段階的に圧力を上昇させたときの水銀圧入量を測定する。

3. 前記2で測定された水銀圧入量に基づき算出した1段階圧力を上昇させたときの水銀圧入量の増加量を、測定合成吸着剤量で割った差分細孔容積 (mL/g) を求める。

[2] 抗体精製用の合成吸着剤である、[1]に記載の合成吸着剤。

[3] 細孔を有する、[1]又は[2]に記載の合成吸着剤。

[4] 前記細孔の半径が、3 nm~15 nmである、[3]に記載の合成吸着剤。

[5] 疎水性である、[1]~[4]のいずれかに記載の合成吸着剤。

[6] スチレン系樹脂及びアクリル系樹脂から選ばれる少なくとも1種を含む、[1]~[5]のいずれかに記載の合成吸着剤。

[7] 体積平均粒子径が、1 μm~500 μmである、[1]~[6]のいずれかに記載の合成吸着剤。

[8] 以下の方法で求められる補正真円度の値が、0.10を超える、[1]~[7]のいずれかに記載の合成吸着剤。

<補正真円度の値の測定・算出方法>

1. 光学顕微鏡を用いて、合成吸着剤を撮影する。

2. 画像解析ソフトWinROOF2018を用いて、撮影した合成吸着剤の近似円を作成する。

3. JIS B0621に従って、当該近似円と同心である、二つの同心の幾何学的円(同心二円)で挟む。

4. 前記3の同心二円の間隔が最小となる場合の当該同心二円のうちの外周側の円の半径と内周側の円の半径の差を真円度として求める。

5. 求めた真円度を、当該近似円の半径で除す。

6. 100点以上、前記1~5の測定・算出を行い、その平均値を補正真円度とする。

[9] 押し潰し強度が、100gf／粒～2000gf／粒である、[1] ～ [8] のいずれかに記載の合成吸着剤。

[10] 前記抗体が、モノクローナル抗体である、[2] ～ [9] のいずれかに記載の合成吸着剤。

[11] 前記モノクローナル抗体の分子量が、100,000以上である、[10] に記載の合成吸着剤。

[12] 前記モノクローナル抗体が、免疫グロブリンGである、[10] 又は [11] に記載の合成吸着剤。

[13] 抗体及び不純物を含む混合物と、[1] ～ [12] のいずれかに記載の合成吸着剤とを混合した後に、ろ過を行う抗体の精製方法。

[14] [1] ～ [12] のいずれかに記載の合成吸着剤に、抗体と不純物とを含む混合物を通過させ、合成吸着剤に吸着されなかった、抗体を含む非吸着画分を回収する工程を含む、抗体の精製方法。

[15] 下記工程 (i) 及び (i i) を有する抗体の精製方法。

工程 (i) : 抗体及び不純物を含む混合溶液と、[1] ～ [12] のいずれかに記載の合成吸着剤とを接触させる接触工程

工程 (i i) : 前記工程 (i) の後に、前記混合溶液と前記合成吸着剤とを分離する分離工程

[16] 前記工程 (i) の前段に下記工程 (A) を有する、[15] に記載の抗体の精製方法。

工程 (A) : 抗体及び不純物を含む混合溶液と、陰イオン交換樹脂及び／又は陽イオン交換樹脂とを接触させるイオン交換樹脂接触工程

[17] 前記不純物が、分子量50,000以下の物質を含む、[13] ～ [16] のいずれかに記載の抗体の精製方法。

[18] 前記不純物が、宿主細胞由来タンパク質、抗体由来の重合体、抗体由来の分解物及び核酸からなる群より選ばれる少なくとも1種を含む、[13] ～ [17] のいずれかに記載の抗体の精製方法。

[19] 前記混合物と合成吸着剤との混合、前記合成吸着剤への前記混合

物の通過、又は前記混合溶液と合成吸着剤との接触を、pH 3～8の液体中
で行う、[13]～[18]のいずれかに記載の抗体の精製方法。

[20] [13]～[19]のいずれかに記載の抗体の精製方法を含む抗
体の製造方法。

[0014] また、本発明の第二の要旨は、以下の通りである。

<1> 抗体精製用の破碎した合成吸着剤。

<2> 細孔を有する、<1>に記載の合成吸着剤。

<3> 前記細孔の半径が、3 nm～15 nmである、<2>に記載の合成
吸着剤。

<4> 疎水性である、<1>～<3>のいずれかに記載の合成吸着剤。

<5> スチレン系樹脂及びアクリル系樹脂から選ばれる少なくとも1種を
含む、<1>～<4>のいずれかに記載の合成吸着剤。

<6> 体積平均粒子径が、1 μm～500 μmである、<1>～<5>の
いずれかに記載の合成吸着剤。

<7> 前記抗体が、モノクローナル抗体である、<1>～<6>のいずれ
かに記載の合成吸着剤。

<8> 前記モノクローナル抗体の分子量が、100,000以上である、
<7>に記載の合成吸着剤。

<9> 前記モノクローナル抗体が、免疫グロブリンGである、<7>又は
<8>に記載の合成吸着剤。

<10> 抗体及び不純物を含む混合物と、<1>～<9>のいずれかに記
載の合成吸着剤とを混合した後に、ろ過を行う抗体の精製方法。

<11> <1>～<9>のいずれかに記載の合成吸着剤に、抗体と不純物
とを含む混合物を通過させ、合成吸着剤に吸着されなかった、抗体を含む非
吸着画分を回収する工程を含む、抗体の精製方法。

<12> 前記不純物が、分子量50,000以下の物質を含む、<10>
又は<11>に記載の抗体の精製方法。

<13> 前記不純物が、宿主細胞由来タンパク質、抗体由来の重合体、抗

体由来の分解物及び核酸からなる群より選ばれる少なくとも1種を含む、<10>~<12>のいずれかに記載の抗体の精製方法。

<14> 前記混合物と合成吸着剤との混合を、pH3~8の液体中で行う、<10>~<13>のいずれかに記載の抗体の精製方法。

<15> <10>~<14>のいずれかに記載の抗体の精製方法を含む抗体の製造方法。

発明の効果

[0015] 本発明の合成吸着剤は、抗体の精製、製造コストを低減し、かつ、工業スケールでも効率的な抗体の生産を可能とする。

[0016] 本発明の抗体の精製方法及び抗体の製造方法は、抗体の精製、製造コストを低減し、かつ、工業スケールでも効率的な抗体の生産を可能とする。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]図1は、実施例及び比較例における合成吸着剤(A)~(G)の差分細孔容積(mL/g)の測定値を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0018] 以下に本発明について詳述する。本発明は、以下の実施の形態に限定されるものではなく、その要旨の範囲内で種々に変更して実施することができる。

本明細書において「~」という表現を用いる場合、その前後の数値又は物性値を含む表現として用いるものとする。

本明細書において、「(メタ)アクリル」とは、「アクリル」、「メタクリル」又はその両者をいう。「(メタ)アクリレート」とは、「アクリレート」、「メタクリレート」又はその両者をいう。「(メタ)アクリロ」についても同様である。

[0019] (合成吸着剤)

本発明の合成吸着剤は、以下の方法で測定される0.5psiaから30.0psiaの圧力条件下での差分細孔容積(mL/g)の最大値が0.05mL/gを超えることを特徴とする。

<差分細孔容積 (mL/g) の測定方法>

1. 乾燥した該合成吸着剤を入れた試料容器を10Pa以下まで減圧し、該試料容器に、JIS K8572に規定する水銀を10Pa以下まで減圧して脱泡後、0.5psiaの圧力で充填する。
2. 該水銀が充填された試料容器を0.5psiaから30.0psiaまで段階的に圧力を上昇させたときの水銀圧入量を測定する。
3. 前記2で測定された水銀圧入量に基づき算出した1段階圧力を上昇させたときの水銀圧入量の増加量を、測定合成吸着剤量で割った差分細孔容積 (mL/g) を求める。

[0020] 水銀圧入法とは、水銀の表面張力が大きいため、大気圧のみの力では空隙または細孔に入っていないことを利用し、圧力で水銀を押し込むことにより測定される、空隙または細孔容積の測定方法である。測定は、段階的に圧力を上昇させ、注入された水銀の量を静電容量式などの検出器で検出し、増加した水銀の注入量を用いて細孔容積を算出する。

段階的に圧力を上昇させて水銀圧入量を測定し、測定された水銀圧入量に基づいて算出した1段階圧力を上昇させたときの水銀圧入量の増加量を、測定合成吸着剤量で割ったものを差分細孔容積 (mL/g) という。

[0021] 差分細孔容積 (mL/g) の測定において、段階的に圧力を上昇させる際の測定毎の圧力の上昇幅は、用いる細孔容積測定装置の仕様にもよるが、本発明に係る差分細孔容積 (mL/g) を正確に把握することができることから、2psia~10psia、特に2psia~5psiaの範囲であることが好ましい。

[0022] 本発明において、差分細孔容積 (mL/g) は、具体的には後掲の実施例の項に記載の通り、細孔分布測定装置 (機種名「オートポアIV 9520」、Micromeritics Instruments Corporation社製) を用いて、水銀圧入法により、段階的に測定圧力を上昇させたときの水銀圧入量の増加分から差分細孔容積 (mL/g) を求めた。一例としての水銀圧入量の測定圧力値は、以下の圧力とすることが好ましい。

第1の測定圧力値：9.0±0.5 psia

第2の測定圧力値：11.0±0.5 psia

第3の測定圧力値：15.0±0.5 psia

第4の測定圧力値：20.0±0.5 psia

第5の測定圧力値：25.0±0.5 psia

[0023] 本発明の合成吸着剤は、0.5 psiaから30.0 psiaの範囲の測定圧力下での差分細孔容積 (mL/g) の最大値が、0.05 mL/gを超えることを特徴とする。差分細孔容積 (mL/g) の最大値が0.05 mL/gを超える合成吸着剤は、合成吸着剤粒子表面に不純物の除去性に優れた細孔を有するものであり、不純物の除去性、抗体の精製効率に優れる。不純物の除去性に優れることから、本発明の合成吸着剤の差分細孔容積 (mL/g) の最大値は、0.05 mL/gを超え、好ましくは0.1 mL/g以上であり、より好ましくは0.2 mL/g以上であり、更に好ましくは0.3 mL/g以上である。一方、差分細孔容積 (mL/g) の最大値の上限については特に制限はないが、測定の正確性や合成吸着剤の物理的強度の観点から通常1.0 mL/g以下である。

[0024] 差分細孔容積 (mL/g) の最大値が0.05 mL/gを超える合成吸着剤は、例えば、後述の通り、市販の合成吸着剤 (合成樹脂) 粒子又は製造された合成吸着剤 (合成樹脂) 粒子を、このような差分細孔容積 (mL/g) の最大値を満たす合成吸着剤が得られるように破砕することにより得ることができる。

[0025] 合成吸着剤とは、母体の構造、細孔の構造、表面積、表面の極性等を好適化した、物理的相互作用や化学的相互作用により、溶液中から特定の有機化合物を吸着する合成物質をいう。

[0026] 本発明において、合成吸着剤は有機系合成吸着剤を意味する。

合成吸着剤の材料としては、例えば、スチレン系樹脂、アクリル系樹脂、フェノール系樹脂、アミド系樹脂等が挙げられる。これらの合成吸着剤の材料は、1種を単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。これらの合

成吸着剤の材料の中でも、低コストであり、疎水性に優れることから、スチレン系樹脂、アクリル系樹脂が好ましく、スチレン系樹脂がより好ましい。

[0027] 疎水性とは、水分子に対して親和性の小さい非極性基が水溶液中で互いに集まろうとする性質のことである。この引力を利用した相互作用を、疎水性相互作用という。

疎水性の官能基としては、例えば、アルキル基、フェニル基、ベンジル基等の炭化水素の官能基等が挙げられる。

[0028] 本明細書において、スチレン系樹脂は、スチレン系樹脂を構成する全単量体単位100質量%中、芳香族ビニル単量体由来の構成単位が50質量%以上であるものである。不純物の合成吸着剤への吸着量、合成吸着剤の物理的強度、細孔の形成性に優れることから、この割合は80質量%以上が好ましい。スチレン系樹脂は、芳香族ビニル単量体由来以外の構成単位を含んでもよい。

[0029] 芳香族ビニル単量体としては、例えば、スチレン、メチルスチレン、エチルスチレン、 α -メチルスチレン、クロロスチレン、クロロメチルスチレン、ブロモブチルスチレン等の芳香族モノビニル単量体；ジビニルベンゼン、ビス（ビニルフェニル）エタン、ジビニルナフタレン、2, 4, 6-トリビニルエチルベンゼン等の架橋性芳香族ビニル単量体等が挙げられる。これらの芳香族ビニル単量体は、1種を単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

これらの芳香族ビニル単量体の中でも、不純物の合成吸着剤への吸着量、合成吸着剤の物理的強度、細孔の形成性に優れることから、架橋性芳香族ビニル単量体を含むことが好ましく、芳香族モノビニル単量体と架橋性芳香族ビニル単量体との併用がより好ましく、スチレンとジビニルベンゼンとの併用が更に好ましい。

[0030] スチレン系樹脂中の芳香族モノビニル単量体由来の構成単位の含有率は、スチレン系樹脂を構成する全単量体単位100質量%中、0質量%~99質量%が好ましく、20質量%~80質量%がより好ましい。芳香族モノビニ

ル単量体由来の構成単位の含有率が上記下限値以上であると、合成吸着剤の柔軟性に優れる。芳香族モノビニル単量体由来の構成単位の含有率が上記上限値以下であると、合成吸着剤の溶媒への溶解や膨潤・収縮を抑制することができる。

[0031] スチレン系樹脂中の架橋性芳香族ビニル単量体由来の構成単位の含有率は、スチレン系樹脂を構成する全単量体単位100質量%中、1質量%~100質量%が好ましく、20質量%~80質量%がより好ましい。架橋性芳香族ビニル単量体由来の構成単位の含有率が上記下限値以上であると、合成吸着剤の溶媒への溶解や膨潤・収縮を抑制することができる。架橋性芳香族ビニル単量体由来の構成単位の含有率が上記上限値以下であると、合成吸着剤の柔軟性に優れる。

[0032] スチレン系樹脂中の芳香族モノビニル単量体単位及び架橋性芳香族ビニル単量体単位以外の他の単量体由来の構成単位の含有率は、合成吸着剤の疎水性に優れることから、スチレン系樹脂を構成する全単量体単位100質量%中、10質量%以下が好ましく、1質量%以下がより好ましく、0質量%が更に好ましい。

[0033] 本明細書において、アクリル系樹脂は、アクリル系樹脂を構成する全単量体単位100質量%中、(メタ)アクリレート由来の構成単位が50質量%以上であるものである。抗体の回収率に優れることから、この割合は80質量%以上が好ましい。アクリル系樹脂は、(メタ)アクリレート由来以外の構成単位を含んでもよい。

[0034] (メタ)アクリレートとしては、例えば、メチル(メタ)アクリレート、エチル(メタ)アクリレート、ブチル(メタ)アクリレート、ステアリル(メタ)アクリレート、2-エチルヘキシル(メタ)アクリレート、シクロヘキシル(メタ)アクリレート等のアルキル(メタ)アクリレート；ヒドロキシエチル(メタ)アクリレート、ヒドロキシプロピル(メタ)アクリレート、グリセリンモノ(メタ)アクリレート等のヒドロキシル基含有(メタ)アクリレート；グリシジル(メタ)アクリレート、4,5-エポキシブチル(

メタ) アクリレート、9, 10-エポキシステアリル (メタ) アクリレート等のエポキシ基含有 (メタ) アクリレート; (メタ) アクリルアミド、ジメチル (メタ) アクリルアミド、ヒドロキシエチル (メタ) アクリルアミド等の (メタ) アクリルアミド類; (メタ) アクリロニトリル等のシアノ基含有 (メタ) アクリレート; エチレングリコールジ (メタ) アクリレート等のアルキレンジ (メタ) アクリレート; ポリエチレングリコールジ (メタ) アクリレート等のポリアルキレングリコールジ (メタ) アクリレート; N, N'-アルキレンビス (メタ) アクリルアミド、グリセロールジ (メタ) アクリレート、トリメチロールプロパントリ (メタ) アクリレート等の架橋性 (メタ) アクリレート等が挙げられる。これらの (メタ) アクリレートは、1種を単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

これらの (メタ) アクリレートの中でも、合成吸着剤の官能基化が容易で、合成吸着剤の物理的強度に優れることから、架橋性 (メタ) アクリレートを含むことが好ましく、エチレングリコールジ (メタ) アクリレートを含むことがより好ましい。

[0035] アクリル系樹脂中の架橋性 (メタ) アクリレート単位の含有率は、アクリル系樹脂を構成する全単量体単位 100 質量%中、1 質量%~100 質量%が好ましく、20 質量%~80 質量%がより好ましい。架橋性 (メタ) アクリレート単位の含有率が上記下限以上であると、合成吸着剤の溶媒への溶解や膨潤・収縮を抑制することができる。架橋性 (メタ) アクリレート単位の含有率が上記上限以下であると、合成吸着剤の柔軟性に優れる。

[0036] 本発明の合成吸着剤は、懸濁重合や乳化重合等の公知の重合方法で製造した合成樹脂粒子や市販品を破碎することで得られる。

[0037] 破碎とは、物理的な力によって合成吸着剤を細かくすることをいう。

破碎に用いる器具としては、物理的な力によって合成吸着剤を細かくできれば特に限定されないが、例えば、すり鉢、ミキサー、ボールミル、ハンマーミル、ピンミル等が挙げられる。これらの破碎に用いる器具の中でも、合成吸着剤を細かく粉碎することができ、粒子径分布を制御しやすいことから

、ボールミルが好ましい。

[0038] 本発明の合成吸着剤は、比表面積を効率よく増やし、不純物の除去性に優れることから、細孔を有することが好ましい。

[0039] 合成吸着剤の細孔の形成は、合成樹脂を得る際の重合時に多孔化剤を用いればよい。

[0040] 合成吸着剤の細孔の半径は、3 nm～15 nmが好ましく、5 nm～10 nmがより好ましい。合成吸着剤の細孔の半径が上記下限値以上であると、不純物の合成吸着剤内部への拡散性に優れ、不純物の除去性に優れる。合成吸着剤の細孔の半径が上記上限値以下であると、不純物の合成吸着剤への吸着量に優れ、抗体の合成吸着剤内部への拡散による収率の低下を抑制することができる。即ち、抗体精製時の抗体の回収率、抗体の生産性に優れる。

[0041] 合成吸着剤の細孔の半径は、窒素ガスを利用し、細孔分布測定装置を用いて測定した細孔の最頻度半径とする。

[0042] 合成吸着剤の細孔の半径は、多孔化剤の種類や添加量、合成樹脂を得る際の重合の速度を制御することによって調整することができる。

[0043] 合成吸着剤の体積平均粒子径は、1 μm～500 μmが好ましく、10 μm～200 μmがより好ましい。合成吸着剤の体積平均粒子径が上記下限値以上であると、抗体精製時のろ過性に優れ、抗体の回収率、抗体の生産性に優れる。合成吸着剤の体積平均粒子径が上記上限値以下であると、合成吸着剤の表面積を増やすことができ、不純物の除去性能に優れる。

[0044] 合成吸着剤の体積平均粒子径は、レーザー回折・散乱式粒度分析計を用いて測定した値とする。

測定サンプルとして、合成吸着剤を20体積%エタノール水溶液に浸漬させ、付着水分をろ過にて除去したものをを用いる。

[0045] 本発明の合成吸着剤の補正真円度の値は、0.10より大きいことが好ましく、0.40以上がより好ましい。補正真円度の値が0.10より大きいと、合成吸着剤の細孔内部への拡散性が高く、不純物の除去性能に優れる。補正真円度の上限には特に制限はないが、通常1.00以下である。

[0046] ここで、「真円度」とは、JIS B0621に定義されており、「円形形体の幾何学的に正しい円からの狂いの大きさ」をいう。真円度は、「対象物（円形形体）を二つの同心の幾何学的円で挟んだとき、同心二円の間隔が最小となる場合の二円の半径の差」である。

本発明に係る「補正真円度」は、この真円度を、真円度を求める際に撮影した合成吸着剤の近似円の半径で除したものであり、粒径による真円度の値の変化を補正した値に該当する。補正真円度が0に近いほど幾何学的円に近く、補正真円度が大きいほど幾何学的円からずれていることを表す。

[0047] 本発明に係る補正真円度は、以下の方法で求められる。なお、以下における真円度と近似円の半径の値の長さの単位は同一とする。

＜補正真円度の値の測定・算出方法＞

1. 光学顕微鏡を用いて、合成吸着剤を撮影する。
2. 画像解析ソフトWinROOF2018を用いて、撮影した合成吸着剤の近似円を作成する。
3. JIS B0621に従って、当該近似円と同心である、二つの同心の幾何学的円（同心二円）で挟む。
4. 前記3の同心二円の間隔が最小となる場合の当該同心二円のうちの外周側の円の半径と内周側の円の半径の差を真円度として求める。
5. 求めた真円度を、当該近似円の半径で除す。
6. 100点以上、前記1～5の測定・算出を行い、その平均値を補正真円度とする。

[0048] 合成吸着剤の押し潰し強度（物理的強度）は、100gf／粒～2000gf／粒が好ましく、300gf／粒～1000gf／粒がより好ましい。一般的に、押し潰し強度は、高い方が使用中に破砕しにくくなるので好ましい。しかし、押し潰し強度が高すぎる合成吸着剤は、通液する溶媒組成の変化による膨潤・収縮に耐えられなくなり、破砕してしまう。合成吸着剤粒子の積層による荷重や攪拌による衝突など物理的衝撃に強く、溶媒の組成変化による膨潤・収縮に耐えるバランスから、上記押し潰し強度の範囲であるこ

とが好ましい。

[0049] ここで押し潰し強度とは、ある物体が押し潰し(圧縮)の力を受けた際に、原形を保てなくなる(破壊される)力の平均値である。押し潰し強度は、具体的には、後掲の実施例の項に記載の方法で測定される。

後掲の実施例において、押し潰し強度は破砕前の合成吸着剤について測定を行っている。これは、破砕後の合成吸着剤では粒子が小さくて、測定結果が得られないためである。押し潰し強度は、材料としての強度であるため、一般的に同じ組成物であれば、小さい方が高い。そのため、破砕の後で値が小さくなることはないと考えられ、破砕前の合成吸着剤の押し潰し強度の測定値は、破砕後の合成吸着剤の測定値以上となる。

[0050] (抗体)

本発明の合成吸着剤は、好ましくは抗体の精製に用いられる。

[0051] 抗体とは、抗原刺激の結果として免疫反応によって生体内に生産されるタンパク質であり、抗原に特異的に結合する活性をもつものをいう。

[0052] 抗体としては、例えば、マウス抗体、ラマ抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、それらのFc領域等を改変した抗体、これらの抗体を多価化した抗体、これらの抗体の一部を改変した抗体等が挙げられる。抗体の分子型としては、例えば、免疫グロブリンG(IgG)、免疫グロブリンM(IgM)、免疫グロブリンA(IgA)、免疫グロブリンD(IgD)、免疫グロブリンE(IgE)、Fab、Fc、Fc-融合タンパク、VH、VL、VHH、Fab'2、scFv、scFab、scDb、scDbFc等が挙げられる。これらの抗体の中でも、単一性に優れることから、同一細胞由来の抗体、同一クラスの抗体が好ましく、モノクローナル抗体がより好ましい。

[0053] モノクローナル抗体とは、単一クローンの抗体生産細胞が生産する抗体であり、一次構造、即ち、アミノ酸配列が均一である。したがって、クラス、サブクラス、アロタイプ、L鎖の型等も均一である。

[0054] モノクローナル抗体としては、例えば、免疫グロブリンG(IgG)、免

疫グロブリンM (I g M)、免疫グロブリンA (I g A)、免疫グロブリンD (I g D)、免疫グロブリンE (I g E) 等が挙げられる。これらのモノクローナル抗体の中でも、合成吸着剤に吸着しにくいことから、I g G、I g D、I g Eが好ましく、I g Gがより好ましい。

[0055] モノクローナル抗体の分子量は、100,000~9,000,000が好ましく、300,000~2,000,000がより好ましい。モノクローナル抗体の分子量が上記下限値以上であると、抗体の合成吸着剤内部への拡散による収率の低下を抑制することができる。また、モノクローナル抗体の分子量が上記上限値以下であると、モノクローナル抗体が水中で沈殿しにくく、溶解しやすい。

[0056] モノクローナル抗体の分子量は、分子篩効果を利用したサイズ排除クロマトグラフィーにより測定した値とする。

[0057] (抗体の精製方法)

本発明の合成吸着剤を用いて抗体を精製する方法には特に制限はないが例えば以下の(1)~(3)の方法が挙げられる。

[0058] (1) 抗体と不純物とを含む混合物と、本発明の合成吸着剤とを混合した後に、ろ過を行う抗体の精製方法。即ち、不純物が吸着した合成吸着剤と、液体に溶解した抗体とを、ろ過により分離する。

[0059] (2) 本発明の合成吸着剤に、抗体と不純物とを含む混合物を通過させ、吸着剤に吸着されなかった、抗体を含む非吸着画分を回収する工程を含む、いわゆる、フロースルー様式の精製方法。

[0060] (3) 下記工程(i)及び(ii)の前段に下記工程(A)を有する抗体の精製方法。

工程(i) : 抗体及び不純物を含む混合溶液と、本発明の合成吸着剤とを接触させる接触工程

工程(ii) : 前記工程(i)の後に、混合溶液と合成吸着剤とを分離する分離工程

工程(A) : 抗体及び不純物を含む混合溶液と、陰イオン交換樹脂及び/又

は陽イオン交換樹脂とを接触させるイオン交換樹脂接触工程

前記工程（A）による脱塩処理で、本発明の合成吸着剤による不純物除去効率、抗体精製効率、抗体回収効率を高めることができる。なお、前記工程（i）で用いる合成吸着剤に前記工程（A）で用いる陰イオン交換樹脂及び／又は陽イオン交換樹脂の混合物を混ぜても良い。前記工程（i）は、バッチ方式でも良いし、フロースルー方式でも良いが、フロースルー方式の場合は、前記工程（ii）を省略することもできる。

[0061] 不純物とは、抗体を医薬品として用いるために除去する必要があるものであり、例えば、組換え細胞を培養するために必要な培地成分、細胞由来の抗体を除くタンパク質及び代謝物、核酸等が挙げられる。

具体的には、不純物は、宿主細胞由来タンパク質、抗体由来の重合体、抗体由来の分解物及び核酸からなる群より選ばれる少なくとも1種を含む。

[0062] 宿主細胞由来タンパク質とは、抗体を生産する細胞を培養したときの生育する過程で生み出されたタンパク質、死細胞の細胞片等であり、例えば、糖鎖成分の除去、酸化、脱アミド等を受けたタンパク質由来の修飾体、宿主細胞から溶出した酵素類等が挙げられる。

[0063] 宿主細胞から溶出した酵素類としては、例えば、糖除去酵素、タンパク質加水分解酵素、酸化還元酵素、アミノ酸異性化酵素等が挙げられる。

糖除去酵素としては、例えば、ノイラミニダーゼ（シアリダーゼ）、ガラクトシダーゼ、グリカナーゼ等が挙げられる。

タンパク質分解酵素としては、例えば、セリンプロテアーゼ、エステラーゼ、システインプロテアーゼ、トリプシン様プロテアーゼ、アミノペプチダーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、カテプシン等が挙げられる。

酸化還元酵素としては、例えば、チオレドキシソレダクターゼ等のチオレドキシソ関連酵素等が挙げられる。

[0064] 抗体由来の重合体とは、抗体が熱、触媒、pH条件等により重合したものであり、例えば、ヒトγグロブリンの熱変性重合体、酸化により生じた重合体等が挙げられる。

- [0065] 抗体由来の分解物とは、抗体がタンパク質分解酵素、熱、pH条件等により、抗体のペプチド結合又はジスルフィド結合が切断され、分解した断片物である。
- [0066] 核酸とは、プリン、ピリミジン塩基、ペントース及びリン酸からなるヌクレオチドを基本単位とし、リン酸が各ヌクレオチド間で糖の3'位と5'位の炭素の間にジエステル結合によって重合した長鎖のポリヌクレオチドであり、例えば、DNA、RNA、それらの分解物等が挙げられる。
- [0067] 不純物の分子量は、1,000~50,000が好ましく、5,000~25,000がより好ましい。不純物の分子量が上記下限値以上であると、不純物が疎水部を有し、合成吸着剤に吸着しやすい。また、不純物の分子量が上記上限値以下であると、不純物の合成吸着剤内部への拡散性に優れる。
- [0068] 不純物の分子量は、分子篩効果を利用したサイズ排除クロマトグラフィーにより測定した値とする。
- [0069] 前記(1)の方法におけるろ過は、ろ材を用いて、固体と液体とを分離することで行う。
- [0070] ろ材としては、例えば、親水性スルホン系高分子膜、親水性芳香族エーテル系高分子膜、親水性フッ素系高分子膜、親水性オレフィン系高分子膜、セルロース系膜、(メタ)アクリル系高分子膜、(メタ)アクリロニトリル系高分子膜、ビニルアルコール系高分子膜等が挙げられる。これらのろ材の中でも、親水性に優れることから、親水性フッ素系高分子膜、親水性スルホン系高分子膜、セルロース系膜が好ましく、親水性フッ素系高分子膜がより好ましい。
- [0071] ろ材の孔径は、0.1 μm ~30 μm が好ましく、0.2 μm ~10 μm がより好ましい。ろ材の孔径が上記下限値以上であると、ろ過の通液性に優れる。また、ろ材の孔径が上記上限値以下であると、固体と液体との分離性に優れる。
- [0072] ろ材の孔径は、走査型電子顕微鏡(SEM)を用い、得られた画像により計測する。

[0073] 前記（３）の方法において、前記工程（i）で、抗体及び不純物を含む混合溶液と本発明の合成吸着剤とを接触させる方法としては、抗体及び不純物を含む混合溶液と本発明の合成吸着剤とを混合する方法が挙げられる。また、前記（２）の方法のように、本発明の合成吸着剤を充填したカラムに混合溶液を通液するフロースルー様式としてもよい。

[0074] 前記（３）の方法において、前記工程（A）において、用いる陰イオン交換樹脂としては、モノビニル芳香族モノマーと架橋性芳香族モノマーから成る架橋ポリマーに四級アンモニウム（トリメチルアンモニウムあるいはジメチルエタノールアミン）基などの交換基を有し、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどの強アルカリと同様に解離して塩基性を示す塩基性陰イオン交換樹脂が挙げられる。特に、全pH範囲（0～14）においてイオン交換性を示すものが好ましく、強塩基性陰イオン交換樹脂が好ましい。市販の塩基性陰イオン交換樹脂としては、例えば、三菱ケミカル株式会社製ダイヤイオン（登録商標）のSAシリーズ、PAシリーズ、UBAシリーズが挙げられる。塩基性陰イオン交換樹脂の具体的なものとしては、交換基として、四級アンモニウム（トリメチルアンモニウムあるいはジメチルエタノールアミン）基を有し、塩形が、OH型、Cl型などが挙げられ、これらの中でもOH型が脱塩効率に優れ、好ましい。

[0075] 一方、陽イオン交換樹脂としては、モノビニル芳香族モノマーと架橋性芳香族モノマーから成る架橋ポリマーにスルホン酸基（ $-SO_3H$ ）などの交換基を持つイオン交換樹脂であり、塩酸、硫酸などの鉱酸と同様に解離して酸性を示す酸性陽イオン交換樹脂が挙げられる。特に、全てのpH領域（0～14）でイオン交換性を有するものが好ましく、強酸性陽イオン交換樹脂が好ましい。市販の酸性陽イオン交換樹脂としては、例えば、三菱ケミカル株式会社製ダイヤイオン（登録商標）のSKシリーズ、PKシリーズ、UBKシリーズが挙げられる。酸性陽イオン交換樹脂の具体的なものとしてはスルホン酸基を交換基として有し、また、その塩形は、通常、H形またはLi形であり、脱塩効率の点でH形であることが好ましい。

[0076] また、イオン交換樹脂は、その構造的性質で大別すると、「ゲル型」「ポラス（多孔性）型」に分けられるが、本発明で用いる酸性陽イオン交換樹脂および塩基性陰イオン交換樹脂はともにゲル型であることが好ましい。

即ち、ゲル型のイオン交換樹脂は、ポラス型のイオン交換樹脂に比べて、体積当たりのイオン交換容量が大きく、物理強度（押し潰し強度）が高いため、長期間使用することができる。

[0077] 前記工程（A）の脱塩処理には、陰イオン交換樹脂及び陽イオン交換樹脂のうち的一方のみを用いてもよいが、陽イオン性不純物と陰イオン性不純物の両方を除去できることから、陰イオン交換樹脂と陽イオン交換樹脂とを混合して、或いは組み合わせて用いることが好ましい。

[0078] 前記工程（A）の脱塩処理は、抗体及び不純物を含む混合溶液と陰イオン交換樹脂及び／又は陽イオン交換樹脂とを混合することにより、或いは、陰イオン交換樹脂床及び／又は陽イオン交換樹脂床、好ましくは陰イオン交換樹脂と陽イオン交換樹脂の混床に抗体及び不純物を含む混合溶液を通液することにより行うことができる。

[0079] いずれの場合においても、前記工程（A）の脱塩処理で得られる処理液は、イオン性不純物の除去で、導電率が 10 mS/cm 以下、特に 5 mS/cm 以下の低導電率を示すものであることが、脱塩処理による不純物除去効率、抗体精製効率、抗体回収効率の向上の観点から好ましい。

[0080] 前記（1）～（3）の方法において、混合物と合成吸着剤との混合、合成吸着剤への混合物の通過、又は混合溶液と合成吸着剤との接触は、 $\text{pH} 3\sim 8$ の液体中で行うことが好ましく、 $\text{pH} 4\sim 6$ の液体中に行うことがより好ましい。 pH が上記下限値以上であると、抗体の安定性を保持することができる。また、 pH が上記上限値以下であると、抗体の合成吸着剤への吸着を抑制することができる。

従って、抗体と不純物を含む混合物又は混合溶液には、必要に応じて、 pH 調整のために酸、アルカリ等を添加してもよい。

[0081] （抗体の製造方法）

本発明の抗体の製造方法は、前述した抗体の精製方法を含む。

[0082] 本発明の抗体の製造方法は、前述した抗体の精製工程以外にも、細胞の培養工程、イオン交換樹脂による精製工程、サイズ排除クロマトグラフィーによる精製工程、膜分離による精製工程を含んでもよい。

[0083] (用途)

本発明の合成吸着剤は、抗体の製造コストを低減し、かつ、工業スケールでも効率的な抗体の生産を可能とする。また、本発明の抗体の精製方法及び抗体の製造方法は、抗体の製造コストを低減し、かつ、工業スケールでも効率的な抗体の生産を可能とする。

実施例

[0084] 以下、実施例を用いて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は、その要旨を逸脱しない限り、以下の実施例の記載に限定されるものではない。

[0085] (体積平均粒子径・粒度分布の測定)

合成吸着剤(A)～(G)について、レーザー回折・散乱式粒度分析計(機種名「MLS-2000e」、株式会社セイシン企業製)を用いて、体積平均粒子径・粒度分布を測定した。

[0086] (差分細孔容積の測定)

合成吸着剤(A)～(G)について、水銀圧入法により、細孔分布測定装置(機種名「オートポアIV 9520」、Micromeritics Instruments Corporation社製)を用いて、0.5 psiaから30.0 psiaまで段階的に圧力を上昇させたときの差分細孔容積を測定し、その最大値を求めた。

一例として、合成吸着剤(A)～(G)の実際の測定圧力と差分細孔容積の測定値を下記表1に示す。

[0087]

[表1]

<表1>

合成吸着剤(A)		合成吸着剤(B)		合成吸着剤(C)		合成吸着剤(D)		合成吸着剤(E)		合成吸着剤(F)		合成吸着剤(G)	
圧力 (psia)	差分細孔容積 (mL/g)	圧力 (psia)	差分細孔容積 (mL/g)	圧力 (psia)	差分細孔容積 (mL/g)	圧力 (psia)	差分細孔容積 (mL/g)	圧力 (psia)	差分細孔容積 (mL/g)	圧力 (psia)	差分細孔容積 (mL/g)	圧力 (psia)	差分細孔容積 (mL/g)
8.94995	0	8.94995	0	8.94995	0	8.94995	0	8.94995	0	8.94995	0	8.94995	0
8.9742	0.00521	8.9742	0.00495	8.9742	0.00156	8.9728	0.00113	8.9728	0.000996	8.9728	0.000888	8.97447	0.00052
11.1633	0.34807	11.1633	0.38265	11.1633	0.11198	11.1613	0.08695	11.1613	0.07989	11.1613	0.08337	11.1622	0.04394
14.8842	0.21187	14.8842	0.26188	14.8842	0.06854	14.8764	0.10011	14.8764	0.09784	14.8764	0.14054	14.8829	0.02075
19.8646	0.09594	19.8646	0.10969	19.8646	0.0357	19.8642	0.07694	19.8642	0.1093	19.8642	0.13576	19.8654	0.00749
24.8525	0.04183	24.8525	0.04355	24.8525	0.01821	24.8574	0.05143	24.8574	0.1310	24.8574	0.09784	24.8658	0.00576

[0088] (細孔の半径の測定)

合成吸着剤 (D) ~ (G) について、窒素ガスを利用し、細孔分布測定装

置（機種名「ASAP2024」、Micromeritics Instruments Corporation社製）を用いて、細孔の最頻度半径を測定した。尚、粉碎前後で細孔の半径が大きく変化しなかった。

[0089] （補正真円度の測定・算出）

合成吸着剤（A）～（G）について、NiconSMZ18（株式会社ニコンソリューションズ社製）を使用して顕微写真を撮影した。同心二円の各半径と近似円の半径の測定は、画像解析ソフト WinROOF2018（三谷商事株式会社製）を使用して行い、前述の方法で真円度と、近似円の半径で真円度を除した補正真円度を算出した。

[0090] （押し潰し強度の測定）

合成吸着剤（A）～（F）の製造に用いた破砕前の合成吸着剤（合成吸着剤（A）～（C）、（E）は同一のものを用いている）の粒子を脱塩水に浸し、測定直前まで脱塩水中に保管した。次いで、破砕前の合成吸着剤粒子をランダムに最低30粒選び、Charillon force measurement CS225（AMETEK TEST & CALIBRATION INSTRUMENTS）にて強度測定を行い、全ての粒子についての強度の平均値を算出した。なお、合成吸着剤（G）は、体積粒子径（ μm ）が小さく、押し潰し強度の測定が困難であった。

[0091] （不純物の濃度と抗体の回収率の測定）

モノクローナル抗体（免疫グロブリンG，分子量：150,000）の培養液として、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞（CHO細胞）に抗体を生産させた後、CHO細胞を除去して清澄化した培養液を用いた。5mol/Lの酢酸水溶液を用いて、pH7.4の培養液をpH4.5に調整した。

次いで、合成吸着剤（A）～（G）をそれぞれ0.2gずつ15mLの容器に量り取り、調製した培養液をそれぞれ4mLずつ添加した。添加後、8時間振盪し、混合した。その後、メンブレンフィルター（Merck社製、孔径0.22 μm 、PVDF膜）を用いてろ過を行って合成吸着剤を除去し、合成吸着剤処理液を得た。

宿主細胞由来タンパク質濃度（HCP濃度）[ng/mL]については、キット（キット名「ELISA Kit F550 (CHO Host Cell Protein, 3Rd Generation)」を用い、ELISA法により測定した。

HCP濃度の対数減少値（LRV）については、処理前後のHCP濃度から算出した。

抗体の回収率 [%] については、アフィニティークロマトグラフィーカラム（商品名「POROS A20 μ m Column」、Thermo Fisher Scientific社製）を用いて高速液体クロマトグラフィーHPLCにより測定した。溶媒はリン酸緩衝生理食塩水（pH7.4）、溶離液は20mmol/Lのリン酸緩衝液（pH2.8、食塩濃度150mmol/L）を使用した。

[0092] （導電率の測定）

培養液上清又は培養液上清の脱塩処理液の導電率は、HORIBA社の卓上型pHメータ F-74 導電率（電気伝導率）電極：3552-10Dにより測定した。

[0093] [実施例1]

市販の合成吸着剤（商品名「セパビーズ825L」、三菱ケミカル株式会社製、多孔化処理をしたスチレン-ジビニルベンゼン共重合体）をすり鉢にて粉碎し、ろ過膜（Merck社製、孔径5 μ m）を用いて20体積%エタノール水溶液で洗浄し、ろ過にて付着水分を除去して、合成吸着剤（A）を得た。

得られた合成吸着剤（A）の評価結果を、表2に示す。

[0094] [実施例2]

市販の合成吸着剤（商品名「セパビーズ825L」、三菱ケミカル株式会社製、多孔化処理をしたスチレン-ジビニルベンゼン共重合体）をすり鉢にて粉碎し、20 μ mの篩にて整粒し、ろ過膜（Merck社製、孔径5 μ m）を用いて20体積%エタノール水溶液で洗浄し、ろ過にて付着水分を除去

して、合成吸着剤（B）を得た。

得られた合成吸着剤（B）の評価結果を、表2に示す。

[0095] [実施例3]

市販の合成吸着剤（商品名「セパビーズ825L」、三菱ケミカル株式会社製、多孔化処理をしたスチレン-ジビニルベンゼン共重合体）をすり鉢にて粉碎し、63 μmの篩にて整粒し、ろ過膜（Merck社製、孔径5 μm）を用いて20体積%エタノール水溶液で洗浄し、ろ過にて付着水分を除去して、合成吸着剤（C）を得た。

得られた合成吸着剤（C）の評価結果を、表2に示す。

[0096] [比較例1]

多孔化処理をしたスチレン-ジビニルベンゼン共重合体を粉碎せず、ろ過膜（Merck社製、孔径5 μm）を用いて20体積%エタノール水溶液で洗浄し、ろ過にて付着水分を除去して、粉碎していない合成吸着剤（G）を得た。

得られた合成吸着剤（G）の評価結果を、表2及び表3に示す。

[0097] [表2]

<表2>

	合成吸着剤種類	粒度分布[μm]			差分細孔容積 [mL/g]	補正真円度	押し潰し強度 [gf/粒]	HCP濃度 [ng/mL]	LRV	抗体回収率 [%]
		d (0.1)	d (0.5)	d (0.9)						
培養液	—	—	—	—	—	—	512000	—	—	
実施例1	合成吸着剤 (A)	4	27	101	0.348	0.722	316	3950	2.5	78
実施例2	合成吸着剤 (B)	38	99	256	0.383	0.764	316	5770	2.2	88
実施例3	合成吸着剤 (C)	87	139	221	0.112	0.675	316	32700	1.3	93
比較例1	合成吸着剤 (G)	86	118	162	0.044	0.052	—	374000	0.2	100

[0098] 表2からも分かるように、比較例1で製造した差分細孔容積が0.05 mL/g以下の合成吸着剤（G）と比較し、実施例1～3で製造した差分細孔容積が0.05 mL/gを超える合成吸着剤（A）～（C）は、HCP濃度、LRV、抗体回収率に優れた。特に、体積平均粒子径の小さい実施例1の

合成吸着剤（A）は、HCP濃度が低く、不純物の除去性能に優れた。また、体積平均粒子径の大きい実施例3の合成吸着剤（C）は、抗体の回収率が高く、効率的な抗体の生産を可能とする。

なお、合成吸着剤（A）、合成吸着剤（B）、合成吸着剤（C）及び合成吸着剤（G）の差分細孔容積の測定値の測定圧力と差分細孔容積（増加した細孔容積）との関係を図1に示す。図1より、合成吸着剤（A）、合成吸着剤（B）及び合成吸着剤（C）は、合成吸着剤（G）よりも差分細孔容積の最大値が格段に大きいことが分かる。

[0099] [実施例4]

市販の合成吸着剤（商品名「セパビーズ850」、三菱ケミカル株式会社製、多孔化処理をしたスチレンージビニルベンゼン共重合体、細孔の半径5nm）をすり鉢にて粉碎し、ろ過膜（Merck社製、孔径5 μ m）を用いて20体積%エタノール水溶液で洗浄し、ろ過にて付着水分を除去して、合成吸着剤（D）を得た。

得られた合成吸着剤（D）の評価結果を、表3に示す。

[0100] [実施例5]

市販の合成吸着剤（商品名「セパビーズ825L」、三菱ケミカル株式会社製、多孔化処理をしたスチレンージビニルベンゼン共重合体、細孔の半径7nm）をすり鉢にて粉碎し、ろ過膜（Merck社製、孔径5 μ m）を用いて20体積%エタノール水溶液で洗浄し、ろ過にて付着水分を除去して、合成吸着剤（E）を得た。

得られた合成吸着剤（E）の評価結果を、表3に示す。

[0101] [実施例6]

市販の合成吸着剤（商品名「セパビーズHP21」、三菱ケミカル株式会社製、多孔化処理をしたスチレンージビニルベンゼン共重合体、細孔の半径11nm）をすり鉢にて粉碎し、ろ過膜（Merck社製、孔径5 μ m）を用いて20体積%エタノール水溶液で洗浄し、ろ過にて付着水分を除去して、合成吸着剤（F）を得た。

得られた合成吸着剤（F）の評価結果を、表3に示す。

[0102] [表3]

<表3>

	合成吸着剤 種類	体積平均 粒子径 [μm]	細孔 半径 [nm]	差分 細孔容積 [mL/g]	補正 真円度	押し潰し 強度 [gf/粒]	HCP 濃度 [ng/mL]	LRV	抗体 回収率 [%]
培養液	—	—	—	—	—	—	512000	—	—
実施例4	合成吸着剤 (D)	72	5	0.100	0.635	546	63500	0.8	96
実施例5	合成吸着剤 (E)	55	7	0.131	0.619	316	4100	2.0	91
実施例6	合成吸着剤 (F)	112	11	0.141	0.627	391	1700	2.5	62
比較例1	合成吸着剤 (G)	118	7	0.044	0.052	—	374000	0.2	100

[0103] 表3からも分かるように、比較例1で製造した粉碎していない合成吸着剤（G）と比較し、実施例4～6で製造した合成吸着剤（D）～（F）は、HCP濃度、LRV、抗体回収率に優れた。特に、細孔の半径が大きい実施例6の合成吸着剤（F）は、HCP濃度が低く、不純物の除去性能に優れた。また、細孔の半径が小さい実施例4の合成吸着剤（D）は、抗体の回収率が高く、効率的な抗体の生産を可能とする。

[0104] [実施例7]

市販の合成吸着剤（商品名「セパピーズ825L」、三菱ケミカル株式会社製、多孔化処理をしたスチレンージビニルベンゼン共重合体）をすり鉢にて粉碎し、20体積%エタノール水溶液に浸漬した後、ろ過膜（Merck社製、孔径 $5\mu\text{m}$ ）を用いて吸引ろ過し、合成吸着剤（H）を得た。合成吸着剤（H）について測定した差分細孔容積の最大値は 0.131mL/g であった。

モノクローナル抗体（免疫グロブリンG、分子量：150,000）の培養液として、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞（CHO細胞）に抗体を生産させた後、CHO細胞を除去して清澄化した培養液上清を用いた。5mL/Lの酢酸水溶液を用いて、pH7.4の培養液をpH4.5に調整した。

次いで、合成吸着剤（H）1.5gと調製した培養液30mLとを容器に量り取り、25℃で8時間振盪し、混合した。その後、遠心分離及びろ過膜（Merck社製、孔径0.22μm）にて合成吸着剤を除去し、合成吸着剤のバッチの処理液を得た。

得られた合成吸着剤のバッチの処理液を1mol/Lの塩酸でpH3.5に調整し、25℃で2時間静置した。その後、1mol/LのTris溶液でpH5.0に調整し、ろ過をして、ウイルス不活化液を得た。

得られたウイルス不活化液をMilliQ水にて4倍に希釈し、20mmol/Lのトリス-塩酸緩衝液（pH8.5）の平衡化緩衝液で平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラム（商品名「ChromSpeedQ103」、三菱ケミカル株式会社製）に、希釈したウイルス不活化液を添加した。添加終了後、5カラム体積の平衡化緩衝液をカラムに通液した。カラム非吸着画分をChromSpeedQ103溶出液とした。

得られたChromSpeedQ103溶出液を5mol/Lの酢酸にてpH4.5に調整し、20mmol/Lの酢酸緩衝液（pH4.5）で平衡化した陽イオン交換クロマトグラフィーカラム（商品名「ChromSpeedS103」、三菱ケミカル社製）に、調製した溶出液を添加した。添加終了後、吸着画分を溶離液（500mmol/Lの食塩を溶解させた20mmol/Lの酢酸緩衝液、pH4.5）に溶出し、溶出液を3段階精製サンプルとした。

[0105] 培養液上清と得られた合成吸着剤処理液、3段階精製処理液は下記の方法でHCPと抗体濃度を測定した。

宿主細胞由来タンパク質濃度（HCP濃度）[ng/mL]については、キット（キット名「ELISA Kit F550 (CHO Host Cell Protein, 3Rd Generation)」を用い、ELISA法により測定した。

抗体純度 [HCP/Mab ppm] については、アフィニティークロマトグラフィーカラム（商品名「POROS A20μm Column」、

Thermo Fisher Scientific社製)を用いて高速液体クロマトグラフィーHPLCにより測定した。

抗体の回収率 [%] については、アフィニティークロマトグラフィーカラム (商品名「POROS A20 μ m Column」、Thermo Fisher Scientific社製)を用いて高速液体クロマトグラフィーHPLCにより測定した。溶媒はリン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4)、溶離液は20mmol/Lのリン酸緩衝液 (pH2.8、食塩濃度150mmol/L)を使用した。

[0106] [比較例2]

モノクローナル抗体 (免疫グロブリンG, 分子量: 150,000) の培養液として、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO細胞) に抗体を生産させた後、CHO細胞を除去して清澄化した培養液上清を用いた。5mol/Lの酢酸水溶液を用いて、pH7.4の培養液をpH4.5に調整した。

調製した培養液30mLをアフィニティークロマトグラフィー (商品名「MabSelect SuRetm LX」、GE Healthcare Life Sciences社製、アフィニティ吸着剤である吸着剤 (I) を含むカラム) に添加し、吸着させた状態で20mmol/Lのリン酸緩衝食塩水にて洗浄した。150mmol/Lの食塩を溶解させた100mmol/Lの酢酸にて脱着させ、吸着剤のバッチの処理液を得た。

得られた吸着剤のバッチの処理液をMilliQ水にて10倍に希釈した後、1mol/Lの塩酸でpH3.5に調整し、25°Cで2時間静置した。その後、1mol/LのTris溶液でpH5.0に調整し、ろ過をして、ウイルス不活化液を得た。

得られたウイルス不活化液を20mmol/Lのトリス-塩酸緩衝液 (pH8.5) の平衡化緩衝液で平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラム (商品名「ChromSpeedQ103」、三菱ケミカル株式会社製) に添加した。添加終了後、5カラム体積の平衡化緩衝液をカラムに通液し

た。カラム非吸着画分をChromSpeed Q103溶出液とした。

得られたChromSpeed Q103溶出液から、実施例7におけると同様の操作で陽イオン交換クロマトグラフィーカラムで得られた溶出液を3段階精製サンプルとし、実施例7と同様に、培養液上清、合成吸着剤処理液、及び3段階精製処理液について各々分析を行った。

[0107] 上記実施例7及び比較例2の結果を表4に示す。

[0108] [表4]

<表4>

	合成吸着剤種類	液体種類	HCP濃度 [ng/mL]	抗体純度 [HCP/Mab ppm]	累積抗体回収率 [%]
実施例7	合成吸着剤(H)	培養液上清	624732	277137	100
		処理液	927	523	82
		3段階精製	34	8	70
比較例2	合成吸着剤(I)	培養液上清	505852	249895	100
		処理液	340	177	84
		3段階精製	30	9	70

[0109] 表4からも分かるように、比較例2で用いたアフィニティ吸着剤である吸着剤(I)と比較し、実施例7で製造した合成吸着剤(H)は、1段階目の吸着剤処理では、吸着剤(I)のように抗体の吸脱着・洗浄工程がないものの、抗体純度が3桁ppmレベルまで粗精製することができ、回収率も80%以上であった。3段階精製の最終サンプルにおいては、アフィニティ吸着剤である吸着剤(I)を使用した工程と同等のHCP除去率、抗体回収率を示した。

[0110] [実施例8]

(培養液上清の調製)

モノクローナル抗体(免疫グロブリンG, 分子量: 150,000)の培養液として、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞(CHO細胞)に抗体を生産させた後、CHO細胞を除去して清澄化した培養液上清1(抗体濃度2.4mg/mL、導電率20mS/cm)を用いた。

(脱塩処理)

前記培養液上清1の4 mLに、陰イオン交換樹脂(ダイヤイオン(登録商標)「UBA1200H」、三菱ケミカル株式会社製)0.4 g、及び、陽イオン交換樹脂(ダイヤイオン(登録商標)「UBK10H」、三菱ケミカル株式会社製)0.4 gを各々添加した。その後、0.1 mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を用いて、pH7.4の前記培養液上清1をpH4.5に調整した。

その後、ろ過膜(Merck社製、孔径0.22 μm)にて陰イオン交換樹脂及び陽イオン交換樹脂を除去し、脱塩処理液(導電率3 mS/cm)を得た。

(合成吸着剤による精製)

次いで、合成吸着剤(B)0.3 gと調製した脱塩処理液4 mLとを容器に量り取り、25℃で8時間振盪した。その後、遠心分離及びろ過膜(Merck社製、孔径0.22 μm)にて合成吸着剤(B)を除去し、合成吸着剤(B)による処理液を得た。処理液の評価結果を表5に示す。

[0111] [実施例9]

培養液上清1の代わりに、モノクローナル抗体の抗体濃度を15 mg/mLに調整した培養液上清2を用いた以外は、実施例8と同じ工程で処理した処理液の評価結果を表5に示す。

[0112] [実施例10]

脱塩処理を行わなかったこと以外は、実施例8と同じ工程で処理した処理液の評価結果を表5に示す。

[0113] [実施例11]

脱塩処理を行わなかったこと以外は、実施例9と同じ工程で処理した処理液の評価結果を表5に示す。

[0114]

[表5]

<表5>

	合成吸着剤 種類	pH	抗体 濃度 [mg/mL]	導電率 [mS/cm]	HCP 濃度 [ng/mL]	LRV	抗体 回収率 [%]
培養液上清1	—	7.4	2.4	20	508417	—	—
培養液上清2	—	7.4	15	20	394195	—	—
実施例8	合成吸着剤 (B)	4.5	2.4	3	3412	2.4	89
実施例9		4.5	15	3	995	2.9	94
実施例10		4.5	2.4	20	5352	2.2	86
実施例11		4.5	15	20	12009	1.9	88

[0115] 表5からも分かるように、実施例10及び11で実施した脱塩処理なしのプロセスに対し、脱塩処理を行った実施例8及び9は、HCP濃度、LRV、抗体回収率に優れた。特に、培養液中の抗体濃度が高いとき、HCP濃度、LRV、抗体回収率に著しく優れた。

[0116] [実施例12]

培養液上清に対して実施例8に記載の脱塩処理を行ったこと、合成吸着剤(H)の代わりに合成吸着剤(B)を用いたこと、ウイルス不活化液を希釈しなかったこと以外は、実施例7と同じ処理を行った。

評価結果を、実施例7及び比較例2の結果と共に、表6に示す。

[0117]

[表6]

<表6>

	合成吸着剤 種類	液体種類	HCP 濃度 [ng/mL]	抗体純度 [HCP/Mab ppm]	累積抗体 回収率 [%]
実施例7	合成吸着剤 (H)	培養液上清	624732	277137	100
		処理液	927	523	82
		3段階精製	34	8	70
実施例12	合成吸着剤 (B)	培養液上清	1031731	416021	100
		脱塩処理液	733652	380926	93
		処理液	1043	727	90
		3段階精製	81	23	81
比較例2	合成吸着剤 (I)	培養液上清	505852	249895	100
		処理液	340	177	84
		3段階精製	30	9	70

[0118] 表6からも分かるように、実施例7と比較し、実施例12では脱塩工程（工程（A））をプロセスに組み込むことにより、陰イオン交換クロマトグラフィー前のMilliQ水による4倍希釈を省略することができ、3段階精製後の抗体回収率も81%と比較的高い値であった。また、3段階精製の最終サンプルにおいては、アフィニティ吸着剤である吸着剤（I）を使用した工程と同等のHCP除去率を示した。

[0119] 本開示を特定の態様を用いて詳細に説明したが、本開示の意図と範囲を離れることなく様々な変更が可能であることは当業者に明らかである。

本出願は、2021年6月10日付で出願された日本特許出願2021-097149に基づいており、その全体が引用により援用される。

請求の範囲

[請求項1] 以下の方法で測定される0.5 p s i aから30.0 p s i aの圧力条件下での差分細孔容積 (m L / g) の最大値が0.05 m L / g を超える合成吸着剤。

<差分細孔容積 (m L / g) の測定方法>

1. 乾燥した該合成吸着剤を入れた試料容器を10 P a以下まで減圧し、該試料容器に、J I S K 8 5 7 2に規定する水銀を10 P a以下まで減圧して脱泡後、0.5 p s i aの圧力で充填する。
2. 該水銀が充填された試料容器を0.5 p s i aから30.0 p s i aまで段階的に圧力を上昇させたときの水銀圧入量を測定する。
3. 前記2で測定された水銀圧入量に基づき算出した1段階圧力を上昇させたときの水銀圧入量の増加量を、測定合成吸着剤量で割った差分細孔容積 (m L / g) を求める。

[請求項2] 抗体精製用の合成吸着剤である、請求項1に記載の合成吸着剤。

[請求項3] 細孔を有する、請求項1又は2に記載の合成吸着剤。

[請求項4] 前記細孔の半径が、3 n m ~ 15 n mである、請求項3に記載の合成吸着剤。

[請求項5] 疎水性である、請求項1又は2に記載の合成吸着剤。

[請求項6] スチレン系樹脂及びアクリル系樹脂から選ばれる少なくとも1種を含む、請求項1又は2に記載の合成吸着剤。

[請求項7] 体積平均粒子径が、1 μ m ~ 500 μ mである、請求項1又は2に記載の合成吸着剤。

[請求項8] 以下の方法で求められる補正真円度の値が、0.10を超える、請求項1又は2に記載の合成吸着剤。

<補正真円度の値の測定・算出方法>

1. 光学顕微鏡を用いて、合成吸着剤を撮影する。
2. 画像解析ソフトW i n R O O F 2 0 1 8を用いて、撮影した合成吸着剤の近似円を作成する。

3. J I S B 0 6 2 1 に従って、当該近似円と同心である、二つの同心の幾何学的円（同心二円）で挟む。

4. 前記3の同心二円の間隔が最小となる場合の当該同心二円のうちの外周側の円の半径と内周側の円の半径の差を真円度として求める。

5. 求めた真円度を、当該近似円の半径で除す。

6. 100点以上、前記1～5の測定・算出を行い、その平均値を補正真円度とする。

[請求項9] 押し潰し強度が、100gf／粒～2000gf／粒である、請求項1又は2に記載の合成吸着剤。

[請求項10] 前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項2に記載の合成吸着剤。

[請求項11] 前記モノクローナル抗体の分子量が、100,000以上である、請求項10に記載の合成吸着剤。

[請求項12] 前記モノクローナル抗体が、免疫グロブリンGである、請求項10又は11に記載の合成吸着剤。

[請求項13] 抗体及び不純物を含む混合物と、請求項1に記載の合成吸着剤とを混合した後に、ろ過を行う抗体の精製方法。

[請求項14] 請求項1に記載の合成吸着剤に、抗体と不純物とを含む混合物を通過させ、吸着剤に吸着されなかった、抗体を含む非吸着画分を回収する工程を含む抗体の精製方法。

[請求項15] 下記工程(i)及び(ii)を有する抗体の精製方法。

工程(i)：抗体及び不純物を含む混合溶液と、請求項1に記載の合成吸着剤とを接触させる接触工程

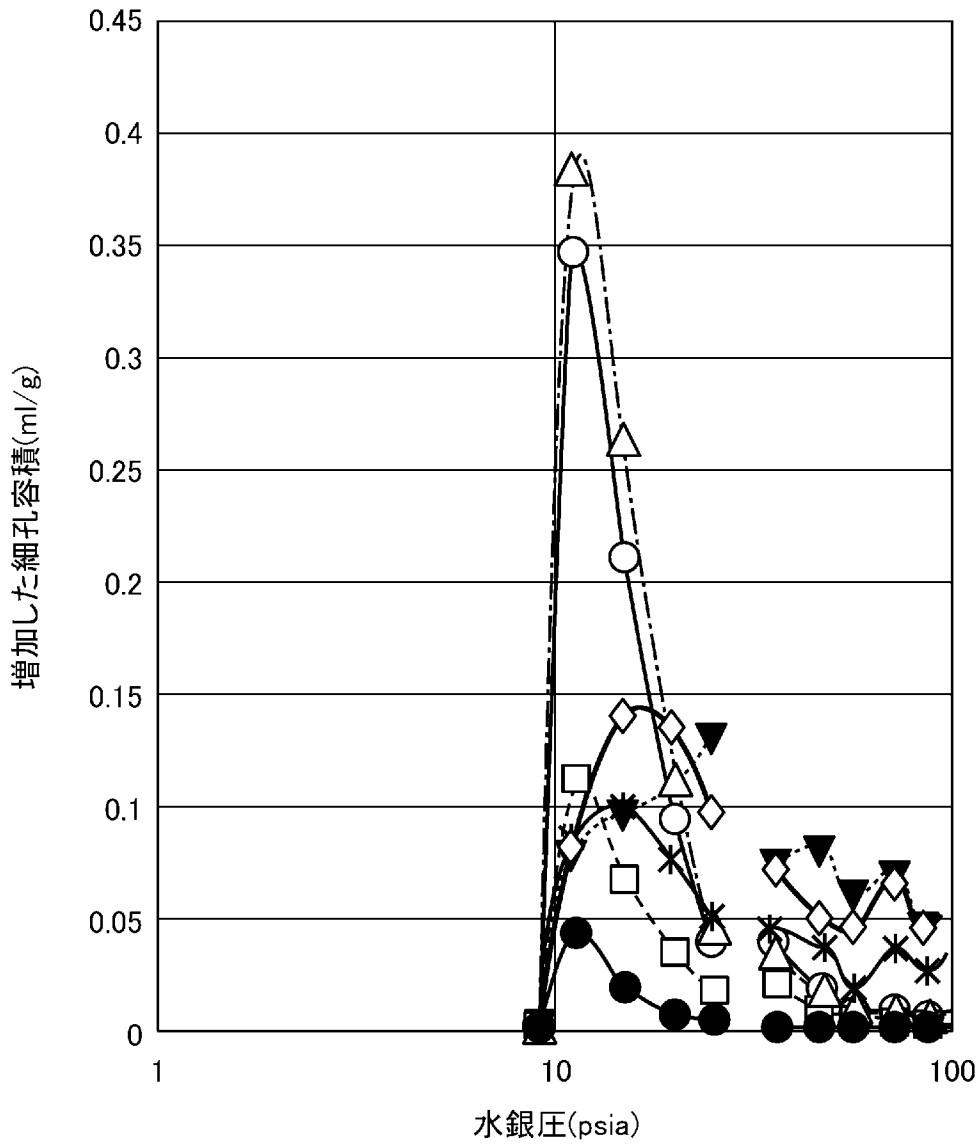
工程(ii)：前記工程(i)の後に、前記混合溶液と前記合成吸着剤とを分離する分離工程

[請求項16] 前記工程(i)の前段に下記工程(A)を有する、請求項15に記載の抗体の精製方法。

工程(A)：抗体及び不純物を含む混合溶液と、陰イオン交換樹脂及

- び／又は陽イオン交換樹脂とを接触させるイオン交換樹脂接触工程
- [請求項17] 前記不純物が、分子量50,000以下の物質を含む、請求項13～16のいずれか1項に記載の抗体の精製方法。
- [請求項18] 前記不純物が、宿主細胞由来タンパク質、抗体由来の重合体、抗体由来の分解物及び核酸からなる群より選ばれる少なくとも1種を含む、請求項13～16のいずれか1項に記載の抗体の精製方法。
- [請求項19] 前記混合物と合成吸着剤との混合、前記合成吸着剤への前記混合物の通過、又は前記混合溶液と合成吸着剤との接触を、pH3～8の液体中で行う、請求項13～16のいずれか1項に記載の抗体の精製方法。
- [請求項20] 請求項13～16のいずれか1項に記載の抗体の精製方法を含む抗体の製造方法。

[図1]



- 合成吸着剤(A)
- △-- 合成吸着剤(B)
- 合成吸着剤(C)
- *— 合成吸着剤(D)
- ...▼... 合成吸着剤(E)
- ◇— 合成吸着剤(F)
- 合成吸着剤(G)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/023149

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C07K 1/22</i> (2006.01)i; <i>B01D 15/00</i> (2006.01)i; <i>B01J 20/28</i> (2006.01)i FI: B01J20/28 Z; C07K1/22; B01D15/00 K		
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; B01D15/00; B01J20/28		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2016-531128 A (BOEHRINGER INGELHEIM RCV GMBH & CO KG) 06 October 2016 (2016-10-06) claim 1, paragraphs [0025], [0026], [0056], [0057], [0072], [0077], [0087]-[0108], example 4	1-20
X	CN 112237905 A (XI'AN LANSHEN ENVIRONMENTAL PROTECTION TECHNOLOGY CO., LTD.) 19 January 2021 (2021-01-19) claims 1-2, 8	1, 3-9
X	JP 2002-365273 A (NIPPON SODA CO., LTD.) 18 December 2002 (2002-12-18) claims 1, 4-6, paragraphs [0039], [0043]	1, 3-9
Y		1-20
Y	JP 2020-128373 A (MERCK PATENT GMBH) 27 August 2020 (2020-08-27) claims 1-2, 6, paragraphs [0049], [0055]	1-20
A	JP 7-188249 A (EISAI CO., LTD.) 25 July 1995 (1995-07-25) entire text	1-20
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "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 "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 June 2022		Date of mailing of the international search report 19 July 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/023149

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2016-531128	A	06 October 2016	US 2016/0193598 A1 claim 1, paragraphs [0025], [0026], [0122], [0123], [0140], [0147], [0158]-[0206], example 4	
				WO 2015/025062 A1	
				EP 3036250 A1	
				KR 10-2016-0065092 A	
				CN 105764914 A	

CN	112237905	A	19 January 2021	(Family: none)	

JP	2002-365273	A	18 December 2002	(Family: none)	

JP	2020-128373	A	27 August 2020	US 2017/0073394 A1 claims 1-2, 6, paragraphs [0049], [0055]	
				WO 2015/131978 A1	
				EP 3114455 A1	
				CN 106103477 A	
				KR 10-2016-0128411 A	

JP	7-188249	A	25 July 1995	(Family: none)	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07K 1/22(2006.01)i; B01D 15/00(2006.01)i; B01J 20/28(2006.01)i FI: B01J20/28 Z; C07K1/22; B01D15/00 K</p>																							
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C07K1/22; B01D15/00; B01J20/28</p> <p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2022年</td> </tr> </table> <p>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）</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年													
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																						
日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年																						
日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年																						
日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年																						
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP 2016-531128 A（ベーリンガー インゲルハイム エルツウェーファウ ゲゼルシャフト ミット ベシユレンクテル ハフツング ウント コンパニー コマンディトゲゼルシャフト） 06.10.2016（2016 - 10 - 06） 請求項1, [0025]-[0026], [0056]-[0057], [0072], [0077], [0087]-[0108], 実施例4</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 112237905 A（XI'AN LANSHEN ENVIRONMENTAL PROTECTION TECHNOLOGY CO., LTD.） 19.01.2021（2021 - 01 - 19） 請求項1-2, 8</td> <td>1, 3-9</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 2002-365273 A（日本曹達株式会社） 18.12.2002（2002 - 12 - 18） 請求項1, 4-6, [0039], [0043]</td> <td>1, 3-9</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2020-128373 A（メルク パテント ゲゼルシャフト ミット ベシユレンクテル ハフツング） 27.08.2020（2020 - 08 - 27） 請求項1-2, 6, [0049], [0055]</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 7-188249 A（エーザイ化学株式会社） 25.07.1995（1995 - 07 - 25） 全文</td> <td>1-20</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p> <p>* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な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の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抵触するものではなく、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</p>			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 2016-531128 A（ベーリンガー インゲルハイム エルツウェーファウ ゲゼルシャフト ミット ベシユレンクテル ハフツング ウント コンパニー コマンディトゲゼルシャフト） 06.10.2016（2016 - 10 - 06） 請求項1, [0025]-[0026], [0056]-[0057], [0072], [0077], [0087]-[0108], 実施例4	1-20	X	CN 112237905 A（XI'AN LANSHEN ENVIRONMENTAL PROTECTION TECHNOLOGY CO., LTD.） 19.01.2021（2021 - 01 - 19） 請求項1-2, 8	1, 3-9	X	JP 2002-365273 A（日本曹達株式会社） 18.12.2002（2002 - 12 - 18） 請求項1, 4-6, [0039], [0043]	1, 3-9	Y		1-20	Y	JP 2020-128373 A（メルク パテント ゲゼルシャフト ミット ベシユレンクテル ハフツング） 27.08.2020（2020 - 08 - 27） 請求項1-2, 6, [0049], [0055]	1-20	A	JP 7-188249 A（エーザイ化学株式会社） 25.07.1995（1995 - 07 - 25） 全文	1-20
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 2016-531128 A（ベーリンガー インゲルハイム エルツウェーファウ ゲゼルシャフト ミット ベシユレンクテル ハフツング ウント コンパニー コマンディトゲゼルシャフト） 06.10.2016（2016 - 10 - 06） 請求項1, [0025]-[0026], [0056]-[0057], [0072], [0077], [0087]-[0108], 実施例4	1-20																					
X	CN 112237905 A（XI'AN LANSHEN ENVIRONMENTAL PROTECTION TECHNOLOGY CO., LTD.） 19.01.2021（2021 - 01 - 19） 請求項1-2, 8	1, 3-9																					
X	JP 2002-365273 A（日本曹達株式会社） 18.12.2002（2002 - 12 - 18） 請求項1, 4-6, [0039], [0043]	1, 3-9																					
Y		1-20																					
Y	JP 2020-128373 A（メルク パテント ゲゼルシャフト ミット ベシユレンクテル ハフツング） 27.08.2020（2020 - 08 - 27） 請求項1-2, 6, [0049], [0055]	1-20																					
A	JP 7-188249 A（エーザイ化学株式会社） 25.07.1995（1995 - 07 - 25） 全文	1-20																					
<p>国際調査を完了した日</p> <p>29.06.2022</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>19.07.2022</p>																						
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>寺▲崎▼ 遥 4Q 1586</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3468</p>																						

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/023149

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2016-531128 A	06.10.2016	US 2016/0193598 A1 請求項1, [0025]-[0026], [0122]-[0123], [0140], [0147], [0158]-[0206], 実 施例4 WO 2015/025062 A1 EP 3036250 A1 KR 10-2016-0065092 A CN 105764914 A	
CN 112237905 A	19.01.2021	(ファミリーなし)	
JP 2002-365273 A	18.12.2002	(ファミリーなし)	
JP 2020-128373 A	27.08.2020	US 2017/0073394 A1 請求項1-2, 6, [0049], [0055] WO 2015/131978 A1 EP 3114455 A1 CN 106103477 A KR 10-2016-0128411 A	
JP 7-188249 A	25.07.1995	(ファミリーなし)	