

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5881744号
(P5881744)

(45) 発行日 平成28年3月9日(2016.3.9)

(24) 登録日 平成28年2月12日(2016.2.12)

(51) Int.Cl.

F 1

C01B 25/32 (2006.01)

C01B 25/32

Z

C01B 25/455 (2006.01)

C01B 25/455

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 1/16

請求項の数 13 (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2013-552605 (P2013-552605)
 (86) (22) 出願日 平成24年2月1日 (2012.2.1)
 (65) 公表番号 特表2014-507368 (P2014-507368A)
 (43) 公表日 平成26年3月27日 (2014.3.27)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2012/023512
 (87) 國際公開番号 WO2012/106449
 (87) 國際公開日 平成24年8月9日 (2012.8.9)
 審査請求日 平成26年12月5日 (2014.12.5)
 (31) 優先権主張番号 61/438,729
 (32) 優先日 平成23年2月2日 (2011.2.2)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 507190880
 バイオーラッド ラボラトリーズ インコ
 ーポレーティッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ハー
 キュリーズ アルフレッド ノーベル ド
 ライブ 1000
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アルカリ溶液でのアパタイトの表面中和方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 標的分子を含む試料をアパタイト固体表面に接触させる工程であって、それによつてアパタイト固体表面を通して標的分子を流す、工程；

(b) アパタイト固体表面を十分な濃度及び体積の水酸化アルカリと接触させることにより、アパタイト固体表面を中和する工程；及び

(c) 水酸化アルカリで中和する工程の後でアパタイト固体表面を洗浄する工程であつて、それによつて吸着された生物学的化合物を溶出し、ここで、該洗浄する工程が、アパタイト固体表面をリン酸塩溶液に接触させることを含む、工程を含む、非吸着性フロースループロセスによる標的分子の精製に続いてアパタイト固体表面を洗浄するための方法。

【請求項2】

水酸化アルカリが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム及び水酸化リチウムからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項3】

水酸化アルカリの濃度が0.01～2Mである、請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

水酸化アルカリの濃度が0.1～1Mである、請求項1または2記載の方法。

【請求項5】

リン酸塩溶液のpHが、6.5あるいは10.0であるかまたは6.5～10.0である、請求項1記載

10

20

の方法。

【請求項 6】

リン酸塩溶液のリン酸塩濃度が、0.1Mあるいは1.0Mであるかまたは0.1～1.0Mである、請求項1または5記載の方法。

【請求項 7】

アパタイトが、ヒドロキシアパタイト及びフルオロアパタイトからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

アパタイトが、セラミックヒドロキシアパタイトまたはセラミックフルオロアパタイトである、請求項1記載の方法。

10

【請求項 9】

アパタイトが非セラミックアパタイトである、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

標的分子がタンパク質である、請求項1記載の方法。

【請求項 11】

タンパク質が、抗体、抗体断片、及び組換えタンパク質から選択される、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

接触させる工程が、固体表面をpH5.0～7.5の溶液に接触させることを含む、請求項1記載の方法。

20

【請求項 13】

アパタイト固体支持体が、カラムの形態である、請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連特許出願の相互参照

本出願は、2011年2月2日に出願された米国仮特許出願第61/438,729に基づいて優先権の恩典を主張するものであり、これは参照によって組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

30

発明の背景

ヒドロキシアパタイト及びフルオロアパタイトは、他のアパタイト固体支持体とともに、タンパク質、炭水化物、ポリヌクレオチド、及びウイルス粒子を含む、広い範囲の生体分子の精製に使用される。

【発明の概要】

【0003】

本発明は、非吸着性のフロースループロセスによって標的分子を精製した後、アパタイト固体表面を洗浄するための方法を提供する。いくつかの態様において、本方法は以下を含む。

(a)標的分子を含む試料をアパタイト固体表面に接触させる工程であって、それによってアパタイト固体表面を通して標的分子を流す、工程；

40

(b)アパタイト固体表面を十分な濃度及び容量の水酸化アルカリと接触させることにより、アパタイト固体表面を中和する工程；及び

(c)アパタイト固体表面を洗浄する工程。

【0004】

いくつかの態様において、水酸化アルカリは、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、及び水酸化リチウムからなる群より選択される。

【0005】

いくつかの態様において、水酸化アルカリの濃度は0.1～1Mである。いくつかの態様においては、水酸化アルカリの濃度は0.3～0.7Mである。

50

【0006】

いくつかの態様において、洗浄する工程は、固体表面をリン酸塩溶液と接触させることを含む。いくつかの態様において、リン酸塩溶液は、pHが6.5あるいは10.0であるかまたは6.5~10.0である。いくつかの態様においては、リン酸塩溶液のリン酸塩濃度は、0.1あるいは1.0であるかまたは0.1~1.0である。

【0007】

いくつかの態様において、アパタイトは、ヒドロキシアパタイト及びフルオロアパタイトからなる群より選択される。いくつかの態様において、アパタイトは、セラミックヒドロキシアパタイトまたはセラミックフルオロアパタイトである。

【0008】

いくつかの態様において、アパタイトは、非セラミックアパタイトである。

10

【0009】

いくつかの態様において、標的分子はタンパク質である。いくつかの態様において、タンパク質は抗体である。

【0010】

いくつかの態様において、接触させる工程は、固体表面をpH5.0~7.5の溶液と接触させることを含む。

【0011】

いくつかの態様において、アパタイト固体支持体はカラムの形態である。

【0012】

20

定義

「アパタイト固体表面の中和」とは、アパタイト表面の表面を処理し、固体表面が、それに続く洗浄バッファーのpHに大きく影響（すなわち、0.2より大きい酸性方向へのpHシフトを起こさせる）を与えるほど十分なヒドロニウムイオンを含まないようにすることを指す。

【0013】

「抗体」とは、免疫グロブリン、その複合体、またはその断片形態を指す。この用語は、これに限られないが、ヒト化抗体、ヒト抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、合成抗体、組換え型抗体、ハイブリッド抗体、変異抗体、移植抗体、及びインビトロで作成された抗体のような、天然のまたは遺伝子改変された形態を含み、ヒトまたは他の哺乳動物の株化細胞に由来する、クラスIgA、IgD、IgE、IgG、IgMのポリクローナルまたはモノクローナル抗体を含みうる。「抗体」はまた、これに限られないが、免疫グロブリン部分を含む融合タンパク質を含む複合体の形態も含みうる。「抗体」はまた、抗原結合機能を維持しているがいまいが、Fab、F(ab')2、Fv、scFv、Fd、dAb、Fc及び他の組成要素等の抗体断片を含み得る。

30

【0014】

「アパタイト固体表面」とは、融解ナノ結晶（セラミックアパタイト）、微結晶、または合成微結晶を指す。セラミックアパタイトは、これに限られないが、セラミックヒドロキシアパタイト（例えば、CHT（登録商標））またはセラミックフルオロアパタイトを含む。セラミックアパタイトは、ナノ結晶が凝集して粒子になり、かつ高温で融解して、クロマトグラフィー適用に好適な安定したセラミック微粒子となった、アパタイトミネラルの形態である。合成微結晶は、これに限られないが、HA Ultragel（登録商標）（Pall Corp.）を含む。微結晶はこれに限られないが、Bio-Gel HTP、Bio-Gel（登録商標）HT、DNA-Grade HT（Bio-Rad）及びHypatite C（Clarkson Chromatography）を含む。

40

【0015】

「ヒドロキシアパタイト」は、構造式 $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ のリン酸カルシウムの不溶性ヒドロキシル化ミネラルを含む、混合モード固体支持体を指す。その相互作用の基本モードは、ホスホリルカチオン交換及びカルシウム金属親和性である。ヒドロキシアパタイトは、これに限られないが、セラミック、結晶及び複合体の形態を含むいくつかの形態で、商業的に入手可能である。複合体の形態は、アガロースまたは他のビーズの孔内に封入され

50

たヒドロキシアパタイト微結晶を含む。

【0016】

「フルオロアパタイト」は、構造式 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ のリン酸カルシウムの不溶性フッ素化ミネラルを含む混合モード支持体を指す。その相互作用の基本モードは、ホスホリルカチオン交換とカルシウム金属親和性である。フルオロアパタイトは、これに限られないが、セラミック、結晶複合体の形態を含む幾つかの形態で商業的に入手可能である。

【0017】

「試料」とは、標的分子または関心対象の粒子を有する任意の組成物を指す。試料は、未精製または、部分精製されたものであります。試料は、これに限られないが、血液、または血液の一部（これに限られないが、血清を含む）、尿、唾液、糞便、ならびに組織を含む、生物由来の試料を含みうる。

10

【0018】

「水酸化アルカリ」とは、例えば、リチウム(Li)、ナトリウム(Na)、カリウム(K)、ルビジウム(Rb)、セシウム(Cs)、及びフランシウム(Fr)を含む、周期律表のI族の任意のカチオン要素を含むアルカリ金属の水酸化物を指す。すなわち、代表的な水酸化アルカリは、例えば、NaOH、LiOH、及びKOHを含む。

【0019】

「フロースルーモード」とは、適用に際して、精製されるべき（試料由来の）標的分子がクロマトグラフィー支持体を通って流れ、一方、試料中の少なくともいくつかの他の成分が選択的に保持され、それによって試料中の少なくともいくつかの非標的成分が取り除かれるようにクロマトグラフィーの条件が確立されているクロマトグラフィーの操作上のアプローチを指す。

20

[本発明1001]

(a) 標的分子を含む試料をアパタイト固体表面に接触させる工程であって、それによつてアパタイト固体表面を通して標的分子を流す、工程；
 (b) アパタイト固体表面を十分な濃度及び体積の水酸化アルカリと接触させることにより、アパタイト固体表面を中和する工程；及び
 (c) アパタイト固体表面を洗浄する工程

を含む、非吸着性フロースループロセスによる標的分子の精製に続いてアパタイト固体表面を洗浄するための方法。

30

[本発明1002]

水酸化アルカリが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム及び水酸化リチウムからなる群より選択される、本発明1001の方法。

[本発明1003]

水酸化アルカリの濃度が0.01～2Mである、本発明1001または1002の方法。

[本発明1004]

水酸化アルカリの濃度が0.1～1Mである、本発明1001または1002の方法。

[本発明1005]

洗浄する工程が、アパタイト固体表面をリン酸溶液に接触させることを含む、本発明1001の方法。

40

[本発明1006]

リン酸溶液のpHが、6.5あるいは10.0であるかまたは6.5～10.0である、本発明1005の方法。

[本発明1007]

リン酸溶液のリン酸濃度が、0.1あるいは1.0であるかまたは0.1～1.0である、本発明1005または1006の方法。

[本発明1008]

アパタイトが、ヒドロキシアパタイト及びフルオロアパタイトからなる群より選択される、本発明1001の方法。

[本発明1009]

50

アパタイトが、セラミックヒドロキシアパタイトまたはセラミックフルオロアパタイトである、本発明1001の方法。

[本発明1010]

アパタイトが非セラミックアパタイトである、本発明1001の方法。

[本発明1011]

標的分子がタンパク質である、本発明1001の方法。

[本発明1012]

タンパク質が、抗体、抗体断片、及び組換えタンパク質から選択される、本発明1011の方法。

[本発明1013]

接触させる工程が、固体表面をpH5.0～7.5の溶液に接触させることを含む、本発明1001の方法。

[本発明1014]

アパタイト固体支持体が、カラムの形態である、本発明1001の方法。

【発明を実施するための形態】

【0020】

発明の詳細な説明

I. 概説

本発明は、一部、標的分子のフロースルーフルーティング精製の後、洗浄工程の前に、水酸化アルカリ溶液（例えばNaOH）が、アパタイト固体支持体の表面を中和するのに有効であるという驚くべき発見に基づいている。水素（またはヒドロニウム）イオンは、標的分子のフロースルーフルーティング精製の後、アパタイト固体表面上で累積しうる。驚くべきことに、最初のカラムの中和を行わずに次の洗浄工程を（例えば、0.1～1.0Mリン酸塩溶液で）行うと、アパタイト支持体のカルシウムイオンの置換により、カラムの劣化が起こりうる。洗浄工程の前に、水酸化アルカリ溶液で固体支持体を中和することにより、アパタイト固体表面にさもなくば起こりうる、重大な劣化を避けることができる。

【0021】

最初に、標的分子を含む試料を、クロマトグラフィー技術で公知のフロースルーモードでアパタイト表面に接触させる。いくつかの態様において、フロースルーモードは、pH5.0あるいは7.5であるかまたは5.0～7.5の溶液を含む。典型的なバッファーは、例えば、リン酸塩バッファーを含み、任意で、ナトリウム（例えば、NaCl）を含む。フロースルーモードは、300～600cm/hrのような高い線流速で行われる。しかし、50～200cm/hrの比較的遅い線流速でも適用可能である。

【0022】

任意で、アパタイト表面は、表面への標的分子の吸着に先立って、あらかじめ、殺菌及び/または平衡化される。標的分子が固体支持体（例えば、カラム）を通った後は、固体支持体は洗浄の前に中和される。

【0023】

本明細書中で発明に関連する「フロースルーモード」とは、精製される無処置の非凝集標的分子をクロマトグラフィー支持体を通じて流れ、他の分子（例えば、いくつかの態様では、凝集物及び他の大きい分子（ウイルスを含む））は選択的に保持され、それによってこれらが取り除かれるようにバッファー条件が確立されているクロマトグラフィーの操作上のアプローチをいう。フロースルーモードの条件は、望まれる特定の標的分子によって開発される。本発明の範囲を限定する意図ではないが、以下の説明は、特定のタンパク質のために望ましいフロースルーモードの開発のための案内として提供される。典型的なフロースルーモードの条件は、例えば以下のようなものである：フロースルーモードのカラム条件は、0.5～1.0M NaOHで殺菌、0.2MのpH6.5～7.5のリン酸ナトリウムで洗浄、カラムをフロースルーバッファー（5～20mMリン酸ナトリウムpH5.0～7.5）で平衡化、試料を適用して標的分子を含むフロースルーモードを回収、0.3～1倍のカラム容量の1M NaOHでカラムを洗浄、そしてカラムを0.1～1Mリン酸塩で洗浄する。しかしながら、任意のフロースルーモードが本発明の

10

20

30

40

50

ために企図される。

【0024】

標的がフロースルーし、任意で回収された後に、中和が行われる。中和は、アパタイト表面を、十分な濃度の水酸化アルカリを含む十分な量の溶液と接触させることを含む。典型的な水酸化アルカリは、例えば、NaOH、LiOH、及びKOHを含むが、他の水酸化アルカリも所望により使用できる。いくつかの態様では、アパタイト固体表面を中和する水酸化アルカリは、例えば、1~100mM、1~20mM、10~2000mM、10~1000mM、10~500mM、10~200mM、または10~100mM等である。

【0025】

水酸化アルカリの代わりにアミノ官能基塩基及び炭酸アルカリを、水酸化アルカリとして本明細書に記載したように、アパタイト表面の中和に使用しうる。例えば、任意のアミノ官能基塩基（トリエチルアミン、トリス、アンモニア等）で中和を達成しうると考えられる。しかし、アミノ化合物は、洗浄バッファーとガスを形成し、アンモニアのような臭いを発生させる可能性がある。炭酸アルカリ（例えば、炭酸リチウム、炭酸ナトリウム、または炭酸カリウム）もまた、アパタイト表面を中和するであろうと考えられる。しかし、CO₂ガスがカラム内で発生し得、背圧を起こしうる。

【0026】

アパタイト表面の中和は、容易に測定されうる。例えば、水酸化アルカリの処理に続きクロマトグラフィー流出液のpHを測定することができる。中性なアパタイト表面は、インプットと中和後の流出液の間で、pH変化が0.1~0.2を越えない結果になるであろう。例えば、洗浄バッファーのpHがインプットで7.0であった場合、もし表面が中和されたならば、洗浄の間、流出液は6.8を下回らないであろう。また、表面が中和されたかどうかを確定するのに、流出液のカルシウムイオンを測定することができる。放出された遊離ヒドロニウムイオンの存在下では、アパタイトはカルシウムを放出する。したがって、インプットされたバッファーよりも流出液に、より多くのカルシウムが存在すれば、それは表面が中和されていなかったことを示す。

【0027】

典型的な洗浄溶液は、pHが約6.5~10.0の、約0.1~1.0Mのリン酸塩バッファーである。しかし、任意の洗浄条件が本発明のために企図される。バッファーは、任意に他の塩（例えば、KCl、NaCl）もまた含みうるが、塩は、いったん表面が中和されれば一般的には必要がない。

【0028】

II. アパタイト

当業者は、数々のタイプのアパタイト固体表面が本発明に使用され得ることを認識するであろう。セラミックヒドロキシアパタイトの商業的な例は、これに限られないが、CHTタイプI及びCHTタイプIIを含む。セラミックフルオロアパタイトの商業的な例は、これに限定されないが、CFT(登録商標)タイプI及びCFTタイプIIを含む。特定しなければ、セラミックヒドロキシアパタイト及びセラミックフルオロアパタイトは、おおよそ球の、多孔性の任意の平均直径の粒子を指し、平均直径は、これに限定されないが、約10、20、40、80 μmを含む。ヒドロキシアパタイトまたはフルオロアパタイトの選択、タイプ、及び平均粒子直径は、当業者によって決定されうる。他の非セラミックタイプのアパタイト固体表面（「ゲル」として販売されているものを含む）もまた、本発明に従って使用されうる。非セラミック固体表面の例は、これに限定されないが、合成されたミクロ結晶（例えば、HA Ultragel(登録商標)(Pall Corp.)）及び、ミクロ結晶（例えば、Bio-Gel HTP、Bio-Gel(登録商標)HT、DNA-Grade HT(Bio-Rad)及びHypatite C(Clarkson Chromatography)）を含む。

【0029】

試料をアパタイト支持体に接触させるための準備において、カラム中の化学的環境は、典型的には平衡化される。これは、例えば、平衡バッファーをカラムに流し、好適なpH、伝導率、同一性、分子量、及び他の関連する変数を確立することによって達成されうる。

10

20

30

40

50

【0030】

いくつかの態様において、調製された試料もまた、カラム平衡バッファーと両立できる条件に平衡化される。いくつかの態様において、これは、ロードに先立って、調製された試料のpHを調整することを含む。

【0031】

いくつかの態様において、カラム及び調製された試料が平衡化された後、調製された試料を、カラムと接触させる。調製された試料は、例えば、約50～600cm/hrの範囲の線流速で適用されうる。好適な流速は、当業者によって決定されうる。

【0032】

いくつかの態様において、本発明は、充填層カラム、流動層カラム／膨張層カラムで、及び／または、支持体と調製された試料とがある程度の時間混合されるバッチ操作で行われる。いくつかの態様において、アパタイト支持体は、カラムに充填される。いくつかの態様において、アパタイト支持体は、少なくとも5mmの内径及び少なくとも25mmの高さのカラムに充填される。

【0033】

別の態様は、アパタイト支持体を、調製用の適用を支持する任意の寸法のカラムに充填して使用する。カラムの直径は、特定の適用の必要性に応じて、1cm未満から1mを超えるまでの範囲であり得、カラムの高さは、1cm未満から30cmを超えるまでの範囲であり得る。好適なカラムの寸法は、当業者によって決定されうる。

【0034】

使用した後は、混合モードのカラムについて、任意で洗浄、殺菌、及び充填が好適な薬剤で行われ、任意で再使用されうる。実際、本発明の中和溶液の一つの利点は、アパタイトカラムの劣化を、避けうる、あるいは遅らせうることである。したがって、幾つかの態様においては、カラムは、10回以上、例えば、20回を超える、30回を超える、40回を超える、または50回を超える精製サイクルで、使用されうる。

【0035】

III. 使用

本発明の方法は、本質的に、複合試料のいかなる標的分子を精製するのにも使用され得る。いくつかの態様では、精製される標的分子は、生物学的試料の成分である。そのような成分の例は、これに限定されないが、タンパク質、脂質、糖、炭水化物、ウイルス粒子、アミノ酸、核酸を含み、例えば、脂質付加タンパク質またはグリコシル化されたタンパク質、またはそれらの混合物等の、上記の組み合わせをも含みうる。いくつかの態様では、本発明の方法が適用される試料は、天然、合成、または組換え型の供給源由来の、非精製または部分精製の生物分子を含む。非精製試料は、例えば、血漿、血清、腹水液、牛乳、植物抽出液、バクテリア溶菌液、イースト溶菌液、または条件細胞培養液に由来し得る。いくつかの態様では、部分精製された試料は、少なくとも一つの、クロマトグラフィー、限外濾過、沈殿、他の分離工程、またはそれらの任意の組み合わせが行われた非精製調製物に由来する。典型的な標的分子は、抗体(これに限定されないが、モノクローナル抗体及び／または抗体断片を含む)、または他のペプチドもしくはポリペプチドである。クロマトグラフィー工程は、これに限定されないが、分子ふるいクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、プロテインAアフィニティ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、固定化金属アフィニティクロマトグラフィー、または混合モードクロマトグラフィーを含む、任意の方法を使用できる。一つまたは複数の沈殿工程は、例えば、塩析もしくはペグ沈、または有機酸、有機塩基、もしくは他の薬剤での沈殿を含み得る。他の分画工程は、これに限定されないが、再結晶、液液分離、または膜ろ過を含み得る。限外濾過は、試料の直接濃縮、及び／またはダイアフィルトレーションを含みうる。

【実施例】

【0036】

下記の実施例は、特許請求の範囲に記載された発明を説明するために提供されるが、こ

10

20

30

40

50

れに限定されるものではない。

【0037】

アパタイトのクロマトグラフィーカラムは、pH6.5の5mMリン酸ナトリウムバッファーで平衡化される。試料の平衡バッファー中溶液、または標的分子を含む試料バッファーがアパタイトカラムに適用され、標的分子の精製は、それをアパタイトに通して流すことによって達成される。吸着された水素イオンは、カラムを十分な量の強塩基、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、または水酸化リチウムで溶出することによって中和される。最後に、アパタイトは、十分な濃度のリン酸塩バッファーで洗浄され、吸着された生物学的化合物、例えばDNA、塩基性タンパク質、及びエンドトキシン等が溶出する。

【0038】

本明細書に述べられた実施例及び態様は、説明のみを目的とするものであり、それに照らした種々の改良または変形が当業者に示唆され、この出願及び添付の特許請求の範囲の精神及び趣旨のうちに含まれるものであると理解される。本明細書に引用されたすべての出版物、特許、及び特許出願は、すべての目的のためにその全体において、参照により本明細書に組み入れられる。

フロントページの続き

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 カミングス ラリー ジェイ。
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 プレザント ヒル バンブリッジ プレイス 68

審査官 佐藤 哲

(56)参考文献 特表2005-538686 (JP, A)
米国特許出願公開第2009/0186396 (US, A1)
特表平11-507033 (JP, A)
特表2011-510303 (JP, A)
特表2007-532477 (JP, A)
特表平08-509605 (JP, A)
特開平08-071412 (JP, A)
特表2011-517462 (JP, A)
特開昭52-023596 (JP, A)
特表2012-525407 (JP, A)
特表2013-517284 (JP, A)
米国特許出願公開第2009/0318674 (US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C01B 25/00 - 25/46
C07K 1/16