

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再 公 表 特 許(A1)

(11) 国際公開番号

W02002/030954

発行日 平成16年2月19日(2004.2.19)

(43) 国際公開日 平成14年4月18日(2002.4.18)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

**C07K 16/18**  
**A61K 39/395**  
**A61P 9/00**  
**A61P 31/12**  
**A61P 35/00**

F I

C O 7 K 16/18  
 A 6 1 K 39/395 V  
 A 6 1 K 39/395 X  
 A 6 1 P 9/00  
 A 6 1 P 31/12

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 27 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2002-534339 (P2002-534339)	(71) 出願人	000001029
(21) 国際出願番号	PCT/JP2001/008715		協和醗酵工業株式会社
(22) 国際出願日	平成13年10月3日(2001.10.3)		東京都千代田区大手町1丁目6番1号
(31) 優先権主張番号	特願2000-308254 (P2000-308254)	(74) 代理人	100105647
(32) 優先日	平成12年10月6日(2000.10.6)		弁理士 小栗 昌平
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100105474
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, C N, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, R O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW	(74) 代理人	100105474
			弁理士 本多 弘徳
		(74) 代理人	100108589
			弁理士 市川 利光
		(74) 代理人	100115107
			弁理士 高松 猛
		(74) 代理人	100090343
			弁理士 栗宇 百合子
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体を精製する方法

## (57) 【要約】

本発明は、抗体に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を用いて所望の性質を有する抗体、該方法で精製された抗体を有効成分とする医薬、および抗体に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を用いる各種疾患の診断または予防方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

抗体に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を用いることを特徴とする、所望の性質を有する抗体を精製する方法。

## 【請求項 2】

糖鎖が、N - グリコシド結合糖鎖である、請求の範囲 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

N - グリコシド結合糖鎖が、バイセクティング N - アセチルグルコサミン、フコースまたはガラクトースが結合した糖鎖である、請求の範囲 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

糖鎖に対し親和性を有する物質が、レクチンであることを特徴とする、請求の範囲 1 記載の方法。

## 【請求項 5】

レクチンが、コンカナバリン A、小麦胚芽レクチン、レンズマメレクチンおよびインゲンマメレクチン E<sub>4</sub> からなる群から選ばれる少なくとも 1 種類のレクチンである、請求の範囲 4 記載の方法。

## 【請求項 6】

糖鎖に対し親和性を有する物質が、担体と結合していることを特徴とする、請求の範囲 1 記載の方法。

## 【請求項 7】

担体が、合成樹脂のポリマーであることを特徴とする、請求の範囲 6 記載の方法。

## 【請求項 8】

小麦胚芽レクチンまたはインゲンマメレクチン E<sub>4</sub> が固定化されたカラムを用いることを特徴とする、バイセクティング N - アセチルグルコサミンが結合した糖鎖構造を有する抗体を精製する方法。

## 【請求項 9】

小麦胚芽レクチンまたはインゲンマメレクチン E<sub>4</sub> が固定化されたカラムを用いることを特徴とする、抗体依存性細胞障害活性の高い抗体を精製する方法。

## 【請求項 10】

レンズマメレクチンが固定化されたカラムを用いることを特徴とする、フコースが結合した糖鎖構造を有する抗体を精製する方法。

## 【請求項 11】

レンズマメレクチンが固定化されたカラムを用いることを特徴とする、抗体依存性細胞障害活性の高い抗体を精製する方法。

## 【請求項 12】

疎水性クロマト用担体を用いることを特徴とする、ガラクトースが結合した糖鎖構造を有する抗体を精製する方法。

## 【請求項 13】

疎水性クロマト用担体を用いることを特徴とする、補体依存性細胞障害活性または抗体依存性細胞障害活性の高い抗体を精製する方法。

## 【請求項 14】

疎水性クロマト用担体に、フェニル基が結合している、請求の範囲 13 記載の方法。

## 【請求項 15】

請求の範囲 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法を組み合わせ、所望の性質を有する抗体を精製する方法。

## 【請求項 16】

抗体がヒト Ig G である、請求の範囲 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 17】

ヒト Ig G のサブクラスが Ig G 1 である、請求の範囲 16 記載の方法。

## 【請求項 18】

10

20

30

40

50

請求の範囲 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法で精製された抗体を有効成分とする医薬。

【請求項 19】

抗体がヒト Ig G である、請求の範囲 18 記載の医薬。

【請求項 20】

ヒト Ig G のサブクラスが Ig G 1 である、請求の範囲 19 記載の医薬。

【請求項 21】

抗体に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を用いることを特徴とする、各種疾患の診断方法。

【発明の詳細な説明】

10

技術分野

本発明は、所望の性質を有する抗体を精製する方法に関する。また、本発明の精製方法により得られた抗体を有効成分とする医薬、および、抗体に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質により得られた抗体を用いた、各種疾患の治療方法に関する。

背景技術

糖蛋白質のうち、糖鎖構造が一般には蛋白質の外側に向かって配位している糖蛋白質については、糖鎖に結合するレクチンを固定化したカラムを用いて精製することが出来る。レクチンは、特定の糖鎖構造に対して特異的に結合する性質を有する。レクチンの例としては、小麦胚芽レクチン、レンズマメレクチンなどがあげられる。

小麦胚芽レクチンと、糖鎖または糖ペプチドとの結合活性を調べたところ、小麦胚芽レクチンは、N - グリコシド結合糖鎖のうち、ハイブリッド型糖鎖あるいはシアル酸を有する糖鎖または糖ペプチドとの結合性が高いことが示唆された [ バイオケミストリー ( Biochemistry ) , 16 , 4426 , 1977、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー ( The Journal of Biological Chemistry ) , 254 , 4000 , 1979 ]。また、小麦胚芽レクチンは、バイセクティング N - アセチルグルコサミンを有する糖鎖構造を有する糖ペプチドに対し、より強い結合活性を有することが示唆された [ バイオケミストリー ( Biochemistry ) , 20 , 5894 , 1981 ]。

20

レンズマメレクチン ( 以下、LCA と表記する ) は、単糖である - D - マンノース、- D - グルコースを認識することが知られている [ ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー ( The Journal of Biological Chemistry ) , 268 , 7668 , 1993 ]。また、LCA が、N - グリコシド結合糖鎖のアスパラギンに最も近い N - アセチルグルコサミン残基に L - フコースが 1 , 6 - 結合した糖鎖構造を有する糖ペプチドに対して、強い結合性を示すことが知られている [ カーボハイドレート・リサーチ ( Carbohydrate Research ) , 40 , 111 , 1975、カーボハイドレート・リサーチ ( Carbohydrate Research ) , 110 , 283 , 1982 ]。

30

しかしながら、これらは、糖鎖または糖鎖構造を含んだペプチドとレクチンとが結合することを示しているにすぎない。

抗体は、その Fc 領域 ( 抗体重鎖のヒンジ領域以降の領域 ) に結合した糖鎖構造を有しており、その糖鎖構造は Fc 領域に埋もれた形、すなわち抗体の立体構造において糖鎖構造が抗体の内側に向いた形で存在する [ ネイチャー ( Nature ) , 264 , 415 - 420 , 1976 ]。

40

ノセ ( Nose ) らは、セファロース ( Sepharose ) 担体に LCA を固定化したカラムを用いたが、マウス Ig G 2a を分離することができなかった。この結果より、彼らはハイブリドーマ細胞 ( 12 - 6 細胞 ) で生産させた通常のマウス Ig G 2a の糖鎖が Fc 領域に埋もれているためであると考察した。また、彼らは培地中に N 型糖鎖の成熟化を阻害する薬剤であるスワインソニンを添加させた後にハイブリドーマ 12 - 6 細胞を培養し、Ig G 2a タイプのモノクローナル抗体を生産させ、該培養物を LCA 固定化セファロースカラムに通塔したところ、モノクローナル抗体をカラムに結合させることができ

50

た。しかしながら、これはマウス IgG2a の Fc 領域に存在する糖鎖がスワインソニンの影響によりコンプレックス型糖鎖からハイブリッド型糖鎖に変換した結果、糖鎖が抗体の Fc 領域より外に露出したためと考察されている [ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー (The Journal of Immunology), 145, 910-914, 1990]。

以上のように糖鎖構造を人為的に変化させることにより抗体を精製した方法は知られているが、糖鎖構造を変化させることなく、糖鎖構造に着目して抗体を精製する方法はこれまでのところ知られていない。

ところで、抗体の Fc 領域に存在する糖鎖構造は、抗体の有する活性、具体的には抗体依存性細胞障害活性 (以下、ADCC 活性とも表記する)、補体依存性細胞障害活性 (以下、CDC 活性とも表記する) または生体内の安定性などに関与している。

糖鎖構造の非還元末端にガラクトース残基が付加されると、抗体の CDC 活性が上昇すること [モレキュラー・イムノロジー (Molecular Immunol.), 32, 1311, 1995; WO98/58964]、抗体の Fc 領域のバイセクティング N - アセチルグルコサミン結合糖鎖含量を増加させることにより、抗体の ADCC 活性が上昇すること (WO99/54342)、シアル酸の含量を増加させると体内での安定性が高まること [ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotechnology), 17, 1116, 1999] などが知られている。しかしながら、これらの活性に相関する糖鎖構造に着目し、ADCC 活性や CDC 活性などのエフェクター活性、または体内における安定性などの所望の性質を有する抗体の精製方法はこれまでのところ知られていない。

また、自己免疫疾患であるリウマチでは、患者の血中 IgG のガラクトース量が減少することが知られている [グライココンジュゲート・ジャーナル (Glycoconjugate Journal), 15, 929-934, 1998]。これまでのリウマチの診断方法としては、レクチンによるレクチンプロット法が用いられているが、生体内の抗体を変性させる工程などを含めて、操作が複雑である。

#### 発明の開示

本発明の目的は、抗体を Fc 領域に結合する糖鎖構造の相違により精製し、所望の性質を有する抗体を高純度で得ることにある。また、このような手法により、生体内の抗体を精製し、各種疾患の診断に用いることが期待される。さらに、動物細胞等で生産した抗体から、所望の性質を有する抗体を精製することができる。特に本発明の方法により精製された ADCC 活性が高い抗体は、生体内の免疫系をより活性化できることが期待され、抗腫瘍効果をはじめとする、ヒトの各種疾患の治療上の有用性が期待される。

本発明は以下の (1) から (21) に関する。

(1) 抗体に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を用いることを特徴とする、所望の性質を有する抗体を精製する方法。

(2) 糖鎖が、N - グリコシド結合糖鎖である、上記 (1) 記載の方法。

(3) N - グリコシド結合糖鎖が、バイセクティング N - アセチルグルコサミン、フコースまたはガラクトースが結合した糖鎖である、上記 (2) 記載の方法。

(4) 糖鎖に対し親和性を有する物質が、レクチンであることを特徴とする、上記 (1) 記載の方法。

(5) レクチンが、コンカナバリン A、小麦胚芽レクチン、レンズマメレクチンおよびインゲンマメレクチン E<sub>4</sub> からなる群から選ばれる少なくとも 1 種類のレクチンである、上記 (4) 記載の方法。

(6) 糖鎖に対し親和性を有する物質が、担体と結合していることを特徴とする、上記 (1) 記載の方法。

(7) 担体が、合成樹脂のポリマーであることを特徴とする、上記 (6) 記載の方法。

(8) 小麦胚芽レクチンまたはインゲンマメレクチン E<sub>4</sub> が固定化されたカラムを用いることを特徴とする、バイセクティング N - アセチルグルコサミンが結合した糖鎖構造を有する抗体を精製する方法。

10

20

30

40

50

( 9 ) 小麦胚芽レクチンまたはインゲンマメレクチン E<sub>4</sub> が固定化されたカラムを用いることを特徴とする、抗体依存性細胞障害活性の高い抗体を精製する方法。

( 10 ) レンズマメレクチンが固定化されたカラムを用いることを特徴とする、フコースが結合した糖鎖構造を有する抗体を精製する方法。

( 11 ) レンズマメレクチンが固定化されたカラムを用いることを特徴とする、抗体依存性細胞障害活性の高い抗体を精製する方法。

( 12 ) 疎水性クロマト用担体を用いることを特徴とする、ガラクトースが結合した糖鎖構造を有する抗体を精製する方法。

( 13 ) 疎水性クロマト用担体を用いることを特徴とする、補体依存性細胞障害活性または抗体依存性細胞障害活性の高い抗体を精製する方法。

( 14 ) 疎水性クロマト用担体に、フェニル基が結合している、上記 ( 13 ) 記載の方法。

( 15 ) 上記 ( 1 ) ~ ( 14 ) のいずれか 1 項に記載の方法を組み合わせ、所望の性質を有する抗体を精製する方法。

( 16 ) 抗体がヒト Ig G である、上記 ( 1 ) ~ ( 15 ) のいずれか 1 項に記載の方法。

( 17 ) ヒト Ig G のサブクラスが Ig G 1 である、上記 ( 16 ) 記載の方法。

( 18 ) 上記 ( 1 ) ~ ( 17 ) のいずれか 1 項に記載の方法で精製された抗体を有効成分とする医薬。

( 19 ) 抗体がヒト Ig G である、上記 ( 18 ) 記載の医薬。

( 20 ) ヒト Ig G のサブクラスが Ig G 1 である、上記 ( 19 ) 記載の医薬。

( 21 ) 抗体に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を用いることを特徴とする、各種疾患の診断方法。

ここで、抗体の補体依存性細胞障害活性または抗体依存性細胞障害活性が高いとは、精製後の抗体が、カラムに通塔する前の抗体や抗体組成物よりも、高い CDC 活性または ADC 活性を有することを意味する。

抗体は、外来抗原刺激の結果、免疫反応によって生体内に生産される糖蛋白質であり、抗原と特異的に結合する活性を有する。

本発明で精製される抗体としては、動物に抗原を免疫することにより得られた抗血清、動物に抗原を免疫し、免疫動物の脾臓細胞より作製したハイブリドーマ細胞が分泌するモノクローナル抗体、遺伝子組換え技術により作製された抗体、すなわち、抗体遺伝子を挿入した抗体発現ベクターを、宿主細胞へ導入することにより取得された抗体などいかなるものでもよい。また、抗体の Fc 領域を融合させた融合タンパク質なども本発明では抗体として含まれる。

具体的には、マウスに免疫したのち脾臓細胞から得られるマウス抗体、マウス抗体とヒト抗体の遺伝子を任意に組込んだ宿主細胞を用いて生産されるヒト型キメラ抗体 (Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 81, 6851, 1984) またはヒト型相補性決定領域 (以下、CDR と表記する) 移植抗体 (Nature, 321, 522, 1986) などがあげられる。

抗体としては、好ましくはヒト Ig G (イムノグロブリン) があげられる。さらに好ましくはサブクラスが Ig G 1 であるヒト Ig G である。

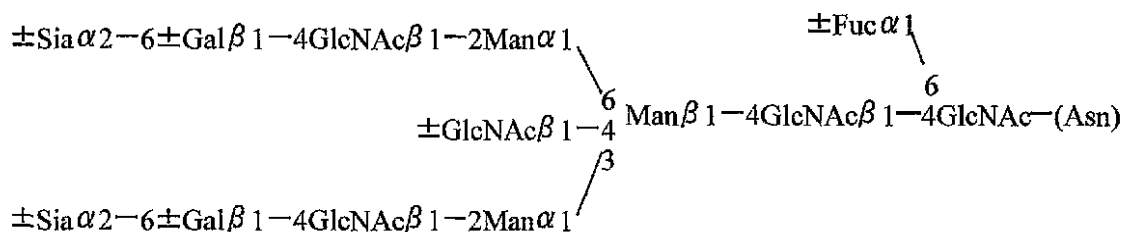
抗体の Fc 領域には、後述する N - グリコシド結合糖鎖がそれぞれの重鎖に 1 か所ずつ結合する領域を有しているので、抗体 1 分子あたり 2 本の糖鎖が結合している。抗体に結合する N - グリコシド結合糖鎖としては、化合物 (I) で示されるいかなる糖鎖も包含されるので、抗体に結合する 2 本の N - グリコシド結合糖鎖には多数の糖鎖の組み合わせが存在することになる。したがって、これまでの精製抗体とは、アミノ酸配列の観点からは同一抗体分子であるが、それらの精製抗体の Fc 領域に結合した糖鎖構造には種々の糖鎖がみられる点で抗体組成物といえる。

10

20

30

40

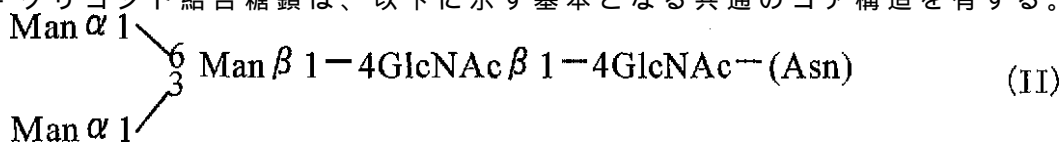


(I)

糖鎖としては、直鎖または分岐したオリゴ糖または多糖であればいずれも包含されるが、例えば蛋白質との結合様式により、アスパラギンと結合するN-グリコシド結合糖鎖、セリン、スレオニンなどと結合するO-グリコシド結合糖鎖に大別される。N-グリコシド結合糖鎖としては、ハイマンノース型、コンプレックス型、ハイブリッド型の3つの種類があげられる。

オリゴ糖は、単糖または単糖の置換誘導体が2～10個脱水結合して生じたものをいう。さらに多数の単糖が結合している糖質を多糖という。多糖は、構成糖の種類によって異なるが、ウロン酸やエステル硫酸を多く含む糖質を酸性多糖、中性糖のみのものを中性多糖という。多糖のうち、ムコ多糖とよばれる一群の多糖は、ほとんどが蛋白質と結合しており、プロテオグリカンという。

単糖とは、糖鎖の構成単位となるもので、加水分解によってそれ以上簡単な分子にならない基本的物質である。単糖は、カルボキシル基などの酸性側鎖を有する酸性糖、ヒドロキシル基がアミノ基で置換されたアミノ糖、それ以外の中性糖の3つに大別される。生体内に存在する単糖としては、酸性糖はN - アセチルノイラミン酸やN - グリコリルノイラミン酸（以下、Neu5Gcと略記する）などのシアル酸や、ウロン酸など、アミノ糖はN - アセチルグルコサミン（以下、GlcNAcと略記する）やN - アセチルガラクトサミンなど、中性糖はグルコース、マンノース、ガラクトース、フコースなどがあげられる。抗体に結合する糖鎖としては、N - グリコシド結合糖鎖の3つの型のいずれも包含する。N - グリコシド結合糖鎖は、以下に示す基本となる共通のコア構造を有する。



上記の構造において、アスパラギンと結合する糖鎖の末端を還元末端、反対側を非還元末端という。

本発明における糖鎖に親和性を示す物質としては、糖鎖と結合する性質を有する物質であればいかなるものでもよい。具体的には、蛋白質、抗体、低分子化合物などがあげられる。

糖鎖に親和性を示す蛋白質としては、マンノース結合タンパク質、繊維芽細胞増殖因子、上皮細胞増殖因子などの糖結合蛋白質、レクチン、レクチン様物質などがあげられる。レクチンとは、動植物をはじめとして微生物などあらゆる生物中に存在する、糖質に親和性を有する蛋白質の総称である。レクチンは、以下 1 ~ 3 のように定義されている。

- 1 糖質に結合し、細胞を凝集あるいは複合糖質を沈降させる。
- 2 非免疫学的な産物である。
- 3 細胞や複合糖質との結合は、単糖またはオリゴ糖により阻止される。

複合糖質は、糖質を含む生体分子の総称で、糖蛋白質、プロテオグリカン、糖脂質を意味する。

レクチンとしては、ナタ豆（英名 Jack bean、学名 *Conavalia ensiformis*）由来のコンカナバリン A（*Concanavarin A*：以下 Con A と表記する）、小麦胚芽（英名 Wheat germ、学名 *Triticum vulgare*）由来の小麦胚芽レクチン（以下 WGA と表記する）、レンズマメ（学名 *Lentil*）由来のレンズマメレクチン（以下 LGA と表記する）が用いられる。

ns culinarius)由来のLCA、インゲンマメ(学名Phaseolus vulgaris)由来のインゲンマメレクチンE<sub>4</sub>(以下、PHA-E<sub>4</sub>と表記する)、ヒマ豆(英名Caster bean、学名Ricinus communis)由来のヒマ豆レクチン(以下RCAと表記する)などがあげられる。

ConAは、-D-マンノース、-D-グルコースを認識する。N-グリコシド結合糖鎖に強く結合するため、最も汎用されているレクチンである。

WGAは、ハイブリッド型糖鎖やシアル酸をもつ糖蛋白質との結合性が高く、バイセクティングGlcNAcの存在により強く結合する。

バイセクティングGlcNAcとは、上記の式(I)において、1,4結合でマンノース残基に結合しているGlcNAcを指す。

LCAは、-D-マンノース、-D-グルコースを認識する。N-グリコシド結合糖鎖のアスパラギンに最も近いGlcNAc残基にL-フコースが1,6結合した構造に強い結合性を示す。

PHA-E<sub>4</sub>は、2本鎖、3本鎖のアスパラギン結合型糖鎖に結合し、バイセクティングGlcNAcの存在により強く結合する。

RCAは、-D-ガラクトースを認識し、非還元末端に-ガラクトースを有するO-グリコシド結合糖鎖またはN-グリコシド結合糖鎖に結合する。特に、ガラクトース1-4GLCNAc構造を有するコンプレックス型糖鎖には強い親和性を有する。

糖鎖に親和性を示す抗体としては、動物に糖鎖を免疫し、免疫動物の脾臓細胞より作製したハイブリドーマ細胞が分泌する糖鎖に対するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体から抗体遺伝子を取得し、該抗体遺伝子を挿入した抗体発現ベクターを宿主細胞へ導入し、該宿主細胞から生産することにより取得された、糖鎖に親和性を示す遺伝子組換え体抗体などがあげられる。

具体的には、マウスに免疫したのち脾臓細胞から得られるマウス抗体、マウス抗体とヒト抗体の遺伝子を任意に組込んだ宿主細胞を用いて生産されるヒト型キメラ抗体あるいはヒト型CDR移植抗体、およびそれらの抗体フラグメントであるFab、Fab'、F(ab)<sub>2</sub>、一本鎖抗体(Science, 242, 423, 1988)、2量体化可変領域断片(Nature Biotechnol., 15, 629, 1997)、ジスルフィド抗体断片(ジスルフィド安定化可変領域断片)(Molecular Immunol., 32, 249, 1995)、CDRを含むペプチド(J. Biol. Chem., 271, 2966, 1996)などがあげられる。

さらに、ファージディスプレイなどの手法によって得られる、糖鎖に親和性を示すペプチド、蛋白質も包含される。

糖鎖に親和性を示す低分子化合物としては、セロトニン、フェニルホウ酸等があげられる。また、糖鎖に親和性を有する官能基を結合させた担体なども包含される。セロトニンは、シアル酸に親和性を有する低分子化合物である。

長い糖鎖を有している抗体は、水酸基数が多くなるために疎水性が低くなり、短い糖鎖を有している抗体は、水酸基数が少なくなるために疎水性が高くなる。糖鎖に親和性を有する官能基としては、フェニル基、ブチル基、オクチル基など疎水性官能基があげられる。これらの官能基を結合させた担体を用いることにより、上記の式(I)で示された非還元末端側の糖の付加が少ない糖鎖構造を有する抗体を精製し、取得することができる。

糖鎖に対し親和性を有する物質を、樹脂、膜等の担体に直接または間接的に結合させた器材を用いて、クロマトグラフィー等を行うことにより所望の性質を有する抗体を精製することができる。

担体としては、合成樹脂ポリマー、好ましくはアクリル系合成樹脂ポリマーまたはビニル系合成樹脂ポリマー、より好ましくはアクリル酸エステルがあげられる。

本発明における所望の性質としては、CDC活性、ADCC活性など抗体のエフェクター活性または体内における安定性などがあげられる。

CDC活性とは、抗原に結合した抗体に補体が結合して膜障害性蛋白複合体を形成し、微生物などの膜に穴をあけたり、マクロファージや好中球に捕食されるように働く活性を意

10

20

30

40

50

味する。A D C C 活性とは、腫瘍細胞等に結合した抗体が、抗体の F c 領域とキラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ等のエフェクター細胞表面上に存在する F c レセプターの結合を介してエフェクター細胞を活性化し、腫瘍細胞等を障害する活性を意味する。

また、所望の性質には、抗体の有する糖鎖構造の均一性なども含まれる。

以上にあげた所望の性質は、抗体の有する糖鎖構造に起因する。抗体の F c 領域に結合する糖鎖構造が、還元末端の G l c N A c へ 1, 6 結合するフコースを持たない糖鎖構造、バイセクティング G l c N A c を有する糖鎖構造である割合が高いほど抗体の A D C C 活性が高い。また、抗体の F c 領域に結合する糖鎖構造が、ガラクトースを有する糖鎖構造である割合が高いほど、抗体の C D C 活性および A D C C 活性が高い。シアル酸の含量を増加させた糖鎖構造を有する割合が高いほど、抗体の体内での安定性がよい。また、シアル酸うち、N e u 5 G c を持たない糖鎖構造を有する割合が高いほど、抗体の免疫原性が低い。

10

したがって、これらの糖鎖構造を特異的に認識する物質を用いて精製を行うことにより、所望の性質を有する抗体を精製することができる。

また、本発明の精製方法を組み合わせることによって、所望の性質を有する抗体をさらに精製することができる。

本発明の精製方法では、血清などの体液、抗体を生産する細胞を培養した培養液などから抗体を精製することができる。該培養液はあらかじめ細胞を除去して得られる溶液が好ましく、他の糖蛋白質が共存しない溶液がより好ましい。具体的には、従来の抗体の精製方法、例えばプロテイン A などによる精製で予め粗精製された溶液などがあげられる。さらに、抗体を生産する細胞を培養した培養液としては、無血清または無蛋白質の培地で培養した培養液が好ましい。

20

以下、本発明の精製、評価および使用方法について具体的に例示する。

#### 1. 抗体の精製

##### (1) レクチンクロマトグラフィーによる精製

レクチンクロマトグラフィーは、レクチンが糖鎖と特異的に結合する性質を利用した、アフィニティークロマトグラフィーである。

所望の性質を有する抗体を精製するために用いるレクチンの種類としては、抗体の糖鎖構造により選択することができる。

30

所望の性質が C D C 活性の場合には、ガラクトースに親和性を有するレクチンを用いることができる。ガラクトースに親和性を有するレクチンとしては、R C A があげられ、好ましくは R C A 1 2 0 があげられる。

所望の性質が A D C C 活性の場合には、フコースまたはバイセクティング G l c N A c に親和性を有するレクチンを用いることができる。フコースに親和性を有するレクチンとしては、L C A があげられ、好ましくは L A - L C A 4 (ホーネンコーポレーション社製) があげられる。バイセクティング G l c N A c に親和性を有するレクチンとしては、W G A、P H A - E<sub>4</sub> などがあげられ、好ましくは L A - W C A 4、L A - P H A - E<sub>4</sub> (ともにホーネンコーポレーション社製) があげられる。

所望の性質を有する抗体の糖質構造が明らかな場合には、上述したレクチンの特異性を参考にしてレクチンを選択する。

40

所望の性質を有する抗体の糖質構造が不明な場合は、ピオチン、フルオレセインイソチオシアネート ( f l u o r e s c e i n i s o t h i o c y a n a t e )、西洋ワサビペルオキシダーゼ ( h o r s e r a d i s h p e r o x i d a s e ) 等で標識されたレクチンを用いて、ドットプロット法 [ アナリティカル・バイオケミストリー ( A n a l y t i c a l B i o c h e m i s t r y ) , 2 0 4 ( 1 ) , 1 9 8 , 1 9 9 2 ] やウエスタンプロット法 [ 法医学の実際と研究 , 3 7 , 1 5 5 , 1 9 9 4 ] 等を行うことにより、結合性のあるレクチンを選択することができる。

1 分子に複数本の糖鎖が存在する糖蛋白質では、レクチンとの結合がより強固になり、カラムから溶出しにくい場合がある。その場合、溶出液の糖濃度を高くすることにより溶出

50



されやすくなるが、糖蛋白質との結合の弱い別のレクチンを選択する方が好ましい。  
レクチンクロマトグラフィーに用いるカラムとしては、具体的には、HiTrap ConA、HiTrap Lentil Lectin (LCA)、HiTrap Wheat Germ Lectin (WGA)、(以上、Pharmacia社製)などがあげられる。また、微生物、植物、動物等の生体試料から単離したレクチンを、担体に固定化したカラムを用いてもよい。担体としては、アガロース、アクリル系合成樹脂のポリマー等があげられ、好ましくはアクリル酸エステルポリマーがあげられる。高速液体クロマトグラフィー(以下、HPLCと表記する)システムを使用する場合は、一般に市販されているHPLCシステムであればいかなるものでもよい。例えば、LC-6A (Shimadzu社製)などがあげられる。

10

HPLCシステムを使用した精製方法の一例を示す。溶離液は、10~100 mmol/l トリス-硫酸緩衝液、10~100 mmol/l 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液などを用いる。pHは7~8程度の間が好ましい。まず、10~100 mmol/l トリス-硫酸緩衝液または10~100 mmol/l 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液などの初期緩衝液でカラムを十分に平衡化する。HPLCシステムにより試料を通塔し、溶出糖を含む10~100 mmol/l トリス-硫酸緩衝液または10~100 mmol/l 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液を用いて溶出させる。溶出糖はレクチンによって異なる。例えば、ConAカラムの場合は、溶出糖として0.02~0.5 mol/l メチル-D-グルコシドや0.02~0.5 mol/l メチル-D-マンノシドを用いる。溶出はステップワイズ法またはグラジエント法により溶出する。蛋白質は、例えば紫外線吸収、電気泳動などの方法により検出することができる。

20

## (2) 疎水性クロマトグラフィーによる精製

疎水性クロマトグラフィーは、蛋白質の疎水性の違いにより分離する手法である。一般的には、目的蛋白質と夾雑蛋白質との疎水性の違いを利用して、目的蛋白質を分離する場合に用いられている。

同一蛋白質の疎水性クロマトグラフィーを行う場合、溶出時間の違いによって蛋白質の有する糖鎖構造の違いや、二量体含量の相違が見られる場合がある。これは、蛋白質の立体構造が変化することにより、疎水性に差異が生じるためである。

疎水性クロマトグラフィーに使用するカラムとしては、一般には市販されている疎水性クロマトグラフィーのカラムであればいかなるものでもよい。例えば、HiTrap 16 / 10 Phenyl (Pharmacia社製)、TSK-gel Phenyl-5 PW (TOSOH社製)などがあげられる。

30

HPLCシステムを使用する場合は、一般に市販されているHPLCシステムであればいかなるものでもよい。例えば、LC-6A (Shimadzu社製)などがあげられる。

HPLCシステムを使用した精製方法の一例を示す。溶離液には、10~100 mmol/l クエン酸-グリシン緩衝液または10~100 mmol/l リン酸ナトリウム緩衝液などを用いる。pHは5~8程度の間、好ましくはpH7前後とする。まず、硫酸アンモニウム(以下、硫酸と表記する)0.5~1 mol/l程度を含む10~100 mmol/l クエン酸-グリシン緩衝液または10~100 mmol/l リン酸ナトリウム緩衝液などの初期溶離液で充分カラムを平衡化する。HPLCシステムにより試料を通塔し、10~100 mmol/l クエン酸-グリシン緩衝液または10~100 mmol/l リン酸ナトリウム緩衝液などの溶出緩衝液で溶出させる。溶出はステップワイズ法またはグラジエント法により溶出する。蛋白質は、例えば紫外線吸収、電気泳動などの方法により検出することができる。

40

## 2. 抗体の評価方法

上記1の方法により得られた抗体の活性測定、また抗体に結合する糖鎖の分析については下記の方法を用いることができる。

### (1) 抗体の活性評価

上記1で精製された抗体と抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性はELISA法及び蛍光抗体法[キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー(Cancer

50

Immunol. Immunother.), 36, 373, 1993] 等により測定できる。抗原陽性培養細胞株に対する細胞障害活性は、CDC 活性、ADCC 活性等を測定し、評価することができる [ Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373, 1993]。更にヒトでの安全性、治療効果は、カニクイザル等のヒトに比較的近い動物種の適当なモデルを用いて評価することができる。

## (2) 抗体の糖鎖の分析方法

抗体の糖鎖構造の解析方法としては、2次元糖鎖マップ法 [ アナリティカル・バイオケミストリー ( Anal. Biochem.), 171, 73, 1988、生物化学実験法 23 - 糖蛋白質糖鎖研究法 ( 学会出版センター) 高橋禮子編 ( 1989 ) ] があげられる。2次元糖鎖マップ法は、例えば、X 軸には逆相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y 軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖の結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

具体的には、抗体をヒドラジン分解して、抗体から糖鎖を遊離し、2 - アミノピリジン ( 以下、PA と略記する ) による糖鎖の蛍光標識 [ ジャーナル・オブ・バイオケミストリー ( J. of Biochem.), 95, 197, 1984 ] を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰の PA 化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。さらに、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、2次元糖鎖マップ [ アナリティカル・バイオケミストリー ( Anal. Biochem.), 171, 73, 1988 ] 上にプロットし、糖鎖構造を推定することができる。

さらに各糖鎖の MALDI - TOF - MS などの質量分析を行い、2次元糖鎖マップ法により推定される糖鎖構造を確認することができる。

## 3. 抗体の使用法

### (1) 本発明の精製方法で取得された抗体を有効成分として含有する医薬

上記 1 の方法で精製された抗体を、上記 2 の評価方法により抗体の性質を確認する。

LCA は GlcNAc 残基に L - フコースが 1, 6 結合した構造に親和性を有する。そこで、LCA を用いた抗体の精製により、抗体の Fc 領域に結合する糖鎖構造が、還元末端側の GlcNAc に 1, 6 結合するフコースを有するか、または有しない抗体を分離し、精製することができる。

また、WGA および PHA - E<sub>4</sub> はバイセクティング GlcNAc に対し親和性を有する。そこで、WGA または PHA - E<sub>4</sub> を用いた抗体の精製により、抗体の Fc 領域に結合する糖鎖構造が、非還元末端側にバイセクティング GlcNAc を有するか、または有しない抗体を分離し、精製することができる。

LCA による精製で得られる還元末端側の GlcNAc にフコースが結合していない糖鎖構造を有する抗体、WGA または PHA - E<sub>4</sub> による精製で得られる非還元末端側にバイセクティング GlcNAc を持つ糖鎖構造を有する抗体は、ADCC 活性が高い。

このような性質を有する抗体は、癌、アレルギー、循環器疾患、またはウイルスあるいは細胞感染をはじめとする各種疾患の予防および治療において有用である。

通常の抗癌剤は癌細胞の増殖を抑制することを特徴とする。しかし、高い ADCC 活性を有していれば癌細胞を傷害することにより癌を治療することができるので、通常の抗癌剤よりも有用である。

アレルギー反応は、免疫細胞によるメディエータ分子の放出により惹起されるため、高い ADCC 活性を有する抗体を用いて免疫細胞を除去することにより、アレルギー反応をおさえることができる。

循環器疾患としては、動脈硬化などがあげられる。動脈硬化の治療方法の一つにバルーンカテーテルがあるが、これにより動脈細胞が増殖し、再狭窄が発生することがある。高い ADCC 活性を有する抗体を用いて動脈細胞の増殖を抑制することにより、循環器疾患を予防および治療することができる。

高い ADCC 活性を有する抗体を用いてウイルスまたは細菌に感染した細胞の増殖を抑制

10

20

30

40

50

することにより、ウイルスまたは細菌感染をはじめとする各種疾患の予防および治療することができる。

上記１（１）のＬＣＡを用いて精製される抗体のうち、還元末端のＧ１ｃＮＡｃへ１，６結合するフコースを有する糖鎖構造を有する抗体は、上述した抗体よりもＡＤＣＣ活性が低くなる。このように、ＡＤＣＣ活性が抑制された抗体は、自己免疫疾患において亢進された免疫反応を押さえるという観点から、自己免疫疾患の予防および治療において有用である。

上記１（２）の疎水クロマトグラフィーによって精製される抗体のうち、ガラクトースを有する糖鎖構造を多くを有する抗体は、ＣＤＣ活性およびＡＤＣＣ活性が高い。したがって、このような性質を有する抗体は、癌、アレルギー、循環器疾患、またはウイルスあるいは細胞感染をはじめとする各種疾患の予防および治療において有用である。

上記１（２）の疎水クロマトグラフィーによって精製される抗体のうち、ガラクトースを有する糖鎖構造が少ない抗体は、精製する前の抗体よりもＣＤＣ活性およびＡＤＣＣ活性が低くなる。このように、ＣＤＣ活性、ＡＤＣＣ活性が抑制された抗体は、自己免疫疾患において亢進された免疫反応を押さえるという観点から、自己免疫疾患の予防および治療において有用である。

また、これらの糖鎖構造、ならびに糖鎖構造に起因する抗体の性質は、混合されていてもよい。そのような抗体を精製する手法としては、具体的には、糖鎖に親和性を示す物質を固定化したカラムを組み合わせたか、糖鎖への結合特異性が異なる物質を同一カラム内に混合して作製したカラムを用いる方法があげられる。

上記の精製された抗体は、単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内などの非経口投与をあげることができる、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤などがあげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤などがあげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖などの糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミントなどのフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトールなどの賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤などがあげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸などの担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は本発明の抗体そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体または抗体断片を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリンなどが例示される。本発明の抗体および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダーなどの製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等によ

10

20

30

40

50

り異なるが、通常成人1日当たり0.01mg/kg～20mg/kgである。

(2) 抗体に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を用いた診断方法

糖鎖に親和性を示す物質を用いて、ヒト体内から生体試料を抽出し、該生体試料中の抗体の検出または定量を行うことにより、各種疾患の診断を行うことができる。また、ヒト体内の抗体の検出または定量を行うことにより、ヒトの生理機能の変化、疾患の進行状況等を診断することができる。

方法としては、本発明における抗体に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を結合させた担体をカラムに充填する。該カラムにヒト体内から採取した生体試料を通塔させ、抗体に結合する種々の糖鎖構造の割合を検出または定量する。抗体に結合する糖鎖に対し親和性を有する物質を結合させた担体を充填したカラムに、抗体を特異的に吸着させる性質を有するプロテインAを充填したカラムを組み合わせることにより、リウマチ等の疾患などを、より特異的に、かつ簡便に診断することができる。

具体的には、自己免疫疾患であるリウマチの診断があげられる。

以下に、本発明の実施例を示すが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

発明を実施するための最良の形態

実施例1：フコース結合糖鎖を多く含む抗体の分画

(1) レクチンクロマトグラフィーによる抗体の分画

フコースを有する糖鎖に結合するレクチンを用いて、抗hIL-5R CDR移植抗体を精製した。

まず、WO97/10354記載の方法に従って作製された抗hIL-5R CDR移植抗体発現ベクターを、ラットミエローマYB2/0細胞へ導入して抗hIL-5R CDR移植抗体を生産する細胞を取得した。該細胞を培地中に培養した後、培養培地より抗hIL-5R CDR移植抗体をWO97/10354記載の方法に従って精製した。

次に、上記で精製された抗hIL-5R CDR移植抗体を含む溶液を、レクチンカラム(LA-LCA、4.6×150mm、ホーネンコーポレーション社製)に通塔した。HPLCシステムとしてはShimadzu社製LC-6Aを用いて、流速0.5ml/分、カラム温度は室温でカラムへ溶液を通塔した。カラムを50mMトリス-硫酸緩衝液(pH7.3)で平衡化し、精製された抗hIL-5R CDR移植抗体を注入後、50mMトリス-硫酸緩衝液(pH7.3)中0Mから0.2Mの-Nメチルマンノシド(ナカライテスク社製)によるリニアグラジエント(60分間)にて溶出した。抗hIL-5R CDR移植抗体を非吸着画分と吸着画分とに分画した(第1図)。

(2) 結合活性測定(ELISA法)

第1図中に示した非吸着画分、吸着画分の一部をとり、hIL-5Rに対する結合活性を、ELISA法により測定した。WO97/10354に記載の抗hIL-5R マウス抗体KM1257をPBSで10μg/mlの濃度に希釈した溶液の50μlを96ウェルのELISA用のプレート(Greiner社製)の各ウェルにそれぞれ分注し、4で20時間反応させた。反応後、1%BSA-PBSを100μl/ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBSを捨て、WO97/10354に記載の可溶性hIL-5Rを1%BSA-PBSで0.5μg/mlの濃度に希釈した溶液を50μl/ウェルで加え、4で20時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄後、形質転換株の培養上清或いは精製したヒト型CDR移植抗体の各種希釈溶液を50μl/ウェルで加え、室温で2時間反応させた。反応後、各ウェルをTween-PBSで洗浄後、1%BSA-PBSで3000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(H&L)抗体溶液(American Qualex社製)を二次抗体溶液として、50μl/ウェルで加え、室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液(2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウム)の0.55gを1Lの0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)に溶解し、使用直前に過酸化水素を1μl/mlで添加した溶液)を50μl/ウェルで加えて発色させ、415nmでの吸光度(OD415)を測定した。

10

20

30

40

50

測定の結果、非吸着画分と吸着画分の一部は、分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体と同様の結合活性を示した（第 2 図）。

### (3) i n v i t r o 細胞障害活性 (A D C C 活性)

非吸着画分と吸着画分の一部の A D C C 活性を測定した。まず、標的細胞溶液の調製を行った。W O 9 7 / 1 0 3 5 4 に記載の h I L - 5 R 鎖及び 鎖を発現しているマウス T 細胞株 C T L L - 2 ( h 5 R ) を R P M I 1 6 4 0 - F B S ( 1 0 ) 培地で培養し、 $1 \times 10^6$  細胞 / 0 . 5 m l となる様に調製し、放射性物質である  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  を 3 . 7 M B q 当量加えて 3 7 で 1 . 5 時間反応させ、細胞を放射標識した。反応後、R P M I 1 6 4 0 - F B S ( 1 0 ) 培地で懸濁及び遠心分離操作より 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、4 で 3 0 分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、R P M I 1 6 4 0 - F B S ( 1 0 ) 培地を 5 m l 加え、 $2 \times 10^5$  細胞 / m l に調製し、標的細胞溶液とした。

10

次に、エフェクター細胞溶液の調製を行った。健常人静脈血 5 0 m l を採取し、ヘパリンナトリウム（武田薬品社製）0 . 5 m l を加え穏やかに混ぜた。これを P o l y m o r p h p r e p ( N y c o m e d P h a r m a A S 社製 ) を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。R P M I 1 6 4 0 - F B S ( 1 0 ) 培地で 3 回遠心分離して洗浄後、培地を用いて  $9 \times 10^6$  細胞 / m l の濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

9 6 ウェル U 字底プレート（F a l c o n 社製）の各ウェルに、調製した標的細胞溶液の 5 0  $\mu$  l (  $1 \times 10^4$  細胞 / ウェル ) を分注した。次いで調製したエフェクター細胞溶液を 1 0 0  $\mu$  l (  $9 \times 10^5$  細胞 / ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 9 0 : 1 となる ) 添加した。更に、各種抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体を各最終濃度 0 . 0 0 1 ~ 0 . 1  $\mu$  g / m l となる様に加え、3 7 で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を - カウンターにて測定した。自然解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。全解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに 1 規定塩酸を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。A D C C 活性は下式により求めた。

20

検体上清中の  $^{51}\text{Cr}$  量—自然解離  $^{51}\text{Cr}$  量

$$\text{ADCC 活性 (\%)} = \frac{\text{全解離 } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}}{\text{全解離 } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}} \times 100$$

30

全解離  $^{51}\text{Cr}$  量—自然解離  $^{51}\text{Cr}$  量

その結果を第 3 図に示した。非吸着画分は分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体より A D C C 活性が高く、吸着画分の一部は分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体よりも低い A D C C 活性を示した。

### (4) 糖鎖分析

非吸着画分および吸着画分の一部をヒドラジン分解により糖鎖を蛋白質から切断した [ メソッド・イン・エンザイモロジー ( M e t h o d i n E n z y m o l o g y ) , 8 3 , 2 6 3 , 1 9 8 2 ] 。ヒドラジンを除去した後、酢酸アンモニウム水溶液と無水酢酸加えて N - アセチル化を行った。凍結乾燥後、P A による蛍光標識を行った [ ジャーナル・オブ・バイオケミストリー ( J . o f B i o c h e m . , 9 5 , 1 9 7 , 1 9 8 4 ) ] 。蛍光標識した糖鎖群 ( P A 化糖鎖群 ) を、S u r p e r d e x P e p t i d e H R 1 0 / 3 0 カラム ( P h a r m a c i a 社製 ) を用いて過剰な試薬と分離した。糖鎖画分を遠心濃縮機にて乾固させ、精製 P A 化糖鎖群とした。次に、C L C - O D S カラム ( S h i m a d z u 社製 ) を用いて、精製 P A 化糖鎖群の逆相 H P L C 分析を行った ( 第 4 図 ) 。P A 化糖鎖群は、3 9 分から 7 5 分の範囲に溶出した。ピーク面積から計算すると、非吸着画分はフコースのない糖鎖が 1 0 0 % 、吸着画分の一部はフコースのない糖鎖が 1 8 % であった。分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体ではフコースのない糖鎖が 3 7 % であった。このことから、フコースを有する糖鎖に結合するレクチンカラムを用いて、分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体よりもフコースのない糖鎖の含量が多い抗体とフコースのない糖鎖の含量が少ない抗体とを分離・精製することができた。

40

50

**実施例 2 : バイセクティング G l c N A c 結合糖鎖を多く含む抗体の分画****( 1 ) レクチンクロマトグラフィーによる抗体の分画**

バイセクティング G l c N A c を有する糖鎖に結合するレクチンを用いて、抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体を精製した。

まず、W O 9 7 / 1 0 3 5 4 記載の方法に従って作製された抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体発現ベクターを、ラットミエロマ Y B 2 / 0 細胞へ導入して抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体を生産する細胞を取得した。該細胞を培地中に培養した後、培養培地より抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体を W O 9 7 / 1 0 3 5 4 記載の方法に従って精製した。

次に、上記で精製された抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体を含む溶液をレクチンカラム ( L A - W G A 、 4 . 6 x 1 5 0 m m 、 ホーネンコーポレーション社製 ) に通塔した。H P L C システムとしては S h i m a d z u 社製 L C - 6 A を用いて、流速 0 . 5 m l / 分、カラム温度は室温でカラムへ溶液を通塔した。5 0 m M トリス - 硫酸緩衝液 ( p H 7 . 3 ) で平衡化し、精製された抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体を注入後、5 0 m M トリス - 硫酸緩衝液 ( p H 7 . 3 ) 中 0 M から 0 . 2 M への G l c N A c ( 純正化学社製 ) によるリニアグラジエント ( 6 0 分間 ) にて溶出した。抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体を、2 ~ 5 分間に溶出された画分と 8 ~ 1 2 分間に溶出された画分に分離した。

**( 2 ) 糖鎖分析**

早く溶出された画分および遅く溶出された画分の抗体の糖鎖分析を、実施例 1 の ( 4 ) 項に示す方法で行った。P A 化糖鎖群は、2 0 分から 5 0 分の範囲に溶出した。その結果、遅く溶出された画分の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体は、精製・分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体と比較して、バイセクティング G l c N A c を持つ糖鎖の含量が、6 % から 1 2 % に増加した ( 第 5 図 ) 。

**実施例 3 : フコースを有する糖鎖が少なく、バイセクティング G l c N A c 結合糖鎖を多く含む抗体の分画****( 1 ) レクチンクロマトグラフィーによる抗体の分画**

実施例 2 で得られた、バイセクティング G l c N A c 結合糖鎖を多く含む抗体組成物を、実施例 1 の ( 1 ) 項と同様の方法を用いて、非吸着画分と吸着画分の一部に分離した。

**( 2 ) 糖鎖分析**

非吸着画分と、吸着画分の一部の糖鎖分析を、実施例 1 の ( 4 ) 項に示す方法で行った。P A 化糖鎖群は、1 8 分から 4 5 分の範囲に溶出した。その結果、吸着画分の一部は、分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体と比較して、フコースのない糖鎖の含量が 2 9 % から 1 5 % に減少し、バイセクティング G l c N A c 結合糖鎖が 5 % から 1 8 % に増加した ( 第 6 図 ) 。

**実施例 4 : ガラクトース結合糖鎖を多く含む抗体の分画****( 1 ) 疎水性クロマトグラフィーによる抗体の分画**

疎水性クロマトグラフィーを用いて、抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体を精製した。

まず、W O 9 7 / 1 0 3 5 4 記載の方法に従って作製された抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体発現ベクターを、ラットミエロマ Y B 2 / 0 細胞へ導入して抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体を生産する細胞を取得した。該細胞を培地中に培養した後、培養培地より抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体を W O 9 7 / 1 0 3 5 4 記載の方法に従って精製した。

次に、上記で精製された抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体を含む溶液を、疎水性カラムである P h e n y l - 5 P W ( 東ソー社製 ) に通塔した。H P L C システムは S h i m a d z u 社製 L C - 6 A を用い、流速は 1 m l / 分、カラム温度は室温で行った。1 M 硫酸を含む 2 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液 ( p H 6 . 0 ) で平衡化し、精製された抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体を注入後、2 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液 ( p H 6 . 0 ) へのリニアグラジエント ( 6 0 分間 ) にて溶出した。抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体を、早く ( 4 ~ 6 分間 ) 溶出された画分と遅く ( 2 0 ~ 2 5 分間 ) 溶出された画分とに分離した。

**( 2 ) 糖鎖分析**

早く溶出された画分および遅く溶出された画分の糖鎖解析を、実施例 1 の ( 4 ) 項に示す方法で行った。P A 化糖鎖群は、3 3 分から 7 0 分の範囲に溶出した。その結果、早く溶

出された画分はガラクトース結合糖鎖の含量が53%、遅く溶出された画分は、ガラクトース結合糖鎖の含量44%であった(第7図)。

実施例5: フコース結合糖鎖を多く含む抗体の分画

(1) レクチンクロマトグラフィーによる抗体の分画

フコースを有する糖鎖に結合するレクチンを用いて、抗hIL-5R CDR移植抗体を精製した。

まず、WO97/10354記載の方法に従って作製された抗hIL-5R CDR移植抗体発現ベクターを、マウスミエロマンS O細胞へ導入して抗hIL-5R CDR移植抗体を生産する細胞を取得した。該細胞を培地中に培養した後、培養培地より抗hIL-5R CDR移植抗体をWO97/10354記載の方法に従って精製した。

10

精製された抗hIL-5R CDR移植抗体を含む溶液を、実施例1の(1)項と同様の方法を用いて、抗hIL-5R CDR移植抗体を非吸着画分と吸着画分とに分画した。

(2) 結合活性測定(ELISA法)

非吸着画分、吸着画分の一部をとり、hIL-5R に対する結合活性を、実施例1の(2)項と同様の方法で測定した。非吸着画分と吸着画分の一部は、分離前の抗hIL-5R CDR移植抗体と同様の結合活性を示した(第8図)。

(3) in vitro細胞障害活性(ADCC活性)

非吸着画分と吸着画分の一部のADCC活性を、実施例1の(3)項と同様の方法で測定した。非吸着画分は分離前の抗hIL-5R CDR移植抗体よりADCC活性が高く、吸着画分の一部は分離前の抗hIL-5R CDR移植抗体よりも低いADCC活性を示した(第9図)。

20

(4) 糖鎖分析

非吸着画分、吸着画分の一部の糖鎖分析を、実施例1の(4)項と同様の方法で行った(第10図)。PA化糖鎖群は、15分から55分の範囲に溶出した。ピーク面積から計算すると、非吸着画分はハイマンノース型糖鎖が84%、フコースのないコンプレックス型糖鎖が16%であった。吸着画分の一部は、ハイマンノース型糖鎖が5%、フコースのないコンプレックス型糖鎖が7%であった。分離前の抗hIL-5R CDR移植抗体では、ハイマンノース型糖鎖が7%、フコースのないコンプレックス型糖鎖が8%であった。このことから、フコースを有する糖鎖に結合するレクチンカラムを用いることによって、ハイマンノース型、コンプレックス型糖鎖にかかわらず、分離前の抗hIL-5R CDR移植抗体よりもフコースのない糖鎖の含量が多い抗体と、フコースのない糖鎖の含量が少ない抗体とを分離・精製することができた。

30

実施例6: バイセクティングGlcNAc結合糖鎖を多く含む抗体の分画

(1) レクチンクロマトグラフィーによる抗体の分画

バイセクティングGlcNAcを有する糖鎖に結合するレクチンを用いて、抗hIL-5R CDR移植抗体を精製した。

まず、WO97/10354記載の方法に従って作製された抗hIL-5R CDR移植抗体発現ベクターを、マウスミエロマンS O細胞へ導入して抗hIL-5R CDR移植抗体を生産する細胞を取得した。該細胞を培地中に培養した後、培養培地より抗hIL-5R CDR移植抗体をWO97/10354記載の方法に従って精製した。

40

次に、上記で精製された抗hIL-5R CDR移植抗体を含む溶液をレクチンカラム(LA-PHA-E<sub>4</sub>、4.6×150mm、ホーネンコーポレーション社製)に通塔した。HPLCシステムとしてはShimadzu社製LC-6Aを用いて、流速0.5ml/分、カラム温度は室温でカラムへ溶液を通塔した。50mMトリス-硫酸緩衝液(pH8.0)で平衡化し、精製された抗hIL-5R CDR移植抗体を注入後、50mMトリス-硫酸緩衝液(pH8.0)中0Mから0.1MへのK<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>(ナカラ社製)によるリニアグラジエント(60分間)にて溶出した。抗hIL-5R CDR移植抗体を、早く(5~8分)溶出された画分と遅く(18~30分)溶出された画分に分画した。

(2) 糖鎖分析

50

遅く溶出された画分と、分離前の抗体の糖鎖分析を、実施例 1 の ( 4 ) 項に示す方法で行った。P A 化糖鎖群は、2 6 分から 5 5 分の範囲に溶出した。その結果、遅く溶出された画分の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体は、精製・分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体と比較して、バイセクティング G l c N A c を持つ糖鎖の含量が、4 % から 2 1 % に増加した ( 第 1 1 図 )。

実施例 7 : フコースを有する糖鎖が少なく、バイセクティング G l c N A c 結合糖鎖を多く含む抗体の分画

( 1 ) レクチンクロマトグラフィーによる抗体の分画

実施例 6 ( 1 ) で得られた、バイセクティング G l c N A c 結合糖鎖を多く含む抗体を、実施例 1 の ( 1 ) 項と同様の方法を用いて、非吸着画分と吸着画分の一部に分離した。

10

( 2 ) 糖鎖分析

非吸着画分と、吸着画分の一部の糖鎖分析を、実施例 1 の ( 4 ) 項に示す方法で行った。P A 化糖鎖群は、2 5 分から 5 5 分の範囲に溶出した。その結果、吸着画分の一部は、分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体と比較して、フコースのない糖鎖の含量が 2 7 % から 1 0 % に減少し、かつバイセクティング G l c N A c 結合糖鎖が 4 % から 3 1 % に増加した ( 第 1 2 図 )。

産業上の利用可能性

本発明により、所望の性質を有する抗体を精製することができる。また、本発明の精製方法により得られた抗体を有効成分とする医薬は、所望の活性を有するため、ヒトの各種疾患の診断に有用である。また、生体試料から抗体を精製する方法と同様の方法を用いることにより、各種疾患を診断することができる。

20

【図面の簡単な説明】

第 1 図は、抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体を、フコースを持つ糖鎖に結合するレクチンが固定化されたカラムによって分離した溶離図を示したものである。縦軸に U V 2 8 0 n m における吸光度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 2 図は、フコースを持つ糖鎖に結合するレクチンによって分画した非吸着画分、吸着画分の一部と、分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体の h I L - 5 R との結合活性を、抗体濃度を变化させて測定した図である。縦軸は h I L - 5 R との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。 が非吸着画分、 が吸着画分の一部、 が分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体をそれぞれ示す。

30

第 3 図は、フコースを持つ糖鎖に結合するレクチンによって分画した非吸着画分、吸着画分の一部と、分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体の、h I L - 5 R 発現マウス T 細胞株 C T L L - 2 ( h 5 R ) に対する A D C C 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。 が非吸着画分、 が吸着画分の一部、 が分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体をそれぞれ示す。

第 4 図は、フコースを持つ糖鎖に結合するレクチンによって分画した非吸着画分、吸着画分の一部と、分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体から調製した P A 化糖鎖を、それぞれ逆相 H P L C で分析して得た溶離図を示したものである。上図に非吸着画分の溶離図、中央図に吸着画分の一部、下図に分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。図中「 - F u c 」はフコースを持たない糖鎖群、「 + F u c 」はフコースが結合した糖鎖群を示す。

40

第 5 図は、分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体と、バイセクティング G l c N A c を持つ糖鎖に結合するレクチンを用いたクロマトグラフィーにおいて、遅く溶出される画分から調製した P A 化糖鎖を、それぞれ逆相 H P L C で分析して得た溶離図を示したものである。上図に分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体、下図に遅く溶出される画分の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。図中の「バイセクティング」はバイセクティング G l c N A c が結合した糖鎖群を示す。

第 6 図は、分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体と、バイセクティング G l c N A c を持つ糖鎖に結合するレクチンを用いたクロマトグラフィーにおいて遅く溶出され、さらにフコースを持つ糖鎖に結合するレクチンを用いたクロマトグラフィーを行って分画した

50



抗体のうち、吸着画分の一部から調製した P A 化糖鎖を、それぞれ逆相 H P L C で分析して得た溶離図を示したものである。上図に分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体、下図に遅く溶出される画分の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。図中「- F u c」はフコースを持たない糖鎖群、「バイセクティング」はバイセクティング G l c N A c が結合した糖鎖群を示す。

第 7 図は、早く溶出される画分、遅く溶出される画分から調製した P A 化糖鎖を、それぞれ逆相 H P L C で分析して得た溶離図を示したものである。左図に早く溶出される画分、右図に遅く溶出される画分をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。図中斜線で示すピークはガラクトースを持たない糖鎖群、黒塗りで示すピークはガラクトースが結合した糖鎖群を示す。

10

第 8 図は、フコースを持つ糖鎖に結合するレクチンによって分画した非吸着画分、ならびに吸着画分の一部と、分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体の h I L - 5 R との結合活性を、抗体濃度を变化させて測定した図である。縦軸は h I L - 5 R との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。が非吸着画分、が吸着画分の一部、が分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体をそれぞれ示す。

第 9 図は、フコースを持つ糖鎖に結合するレクチンによって分画した非吸着画分、ならびに吸着画分の一部と、分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体の、h I L - 5 R 発現マウス T 細胞株 C T L L - 2 ( h 5 R ) に対する A D C C 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。が非吸着画分、が吸着画分の一部、が分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体をそれぞれ示す。

20

第 10 図は、フコースを持つ糖鎖に結合するレクチンによって分画した非吸着画分、吸着画分の一部と、分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体から調製した P A 化糖鎖を、それぞれ逆相 H P L C で分析して得た溶離図を示したものである。上図に非吸着画分の溶離図、中央図に吸着画分の一部、下図に分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。図中「- F u c」はフコースを持たない糖鎖群、「+ F u c」はフコースが結合した糖鎖群、「ハイマンノース」はハイマンノース型糖鎖群を示す。

第 11 図は、P H A - E<sub>4</sub> レクチンを用いたクロマトグラフィーにおいて、遅く溶出される画分、ならびに分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体から調製した P A 化糖鎖を、それぞれ逆相 H P L C で分析して得た溶離図を示したものである。上図に分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体、下図に遅く溶出される画分の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。図中の「バイセクティング」はバイセクティング G l c N A c が結合した糖鎖群を示す。

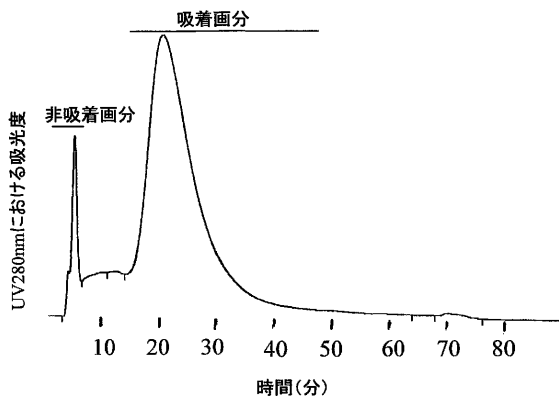
30

第 12 図は、P H A - E<sub>4</sub> レクチンを用いたクロマトグラフィーにおいて 18 ~ 30 分に溶出された画分を、さらに L C A レクチンを用いたクロマトグラフィーを行って分画した抗体のうち、吸着画分の一部から調製した P A 化糖鎖と、分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体から調製した P A 化糖鎖を、それぞれ逆相 H P L C で分析して得た溶離図を示したものである。上図に分離前の抗 h I L - 5 R C D R 移植抗体、下図に 2 種類のレクチンクロマトグラフィーで分離した画分の溶離図をそれぞれ示す。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。図中「- F u c」はフコースを持たない糖鎖群、「バイセクティング」はバイセクティング G l e N A c が結合した糖鎖群を示す。

40

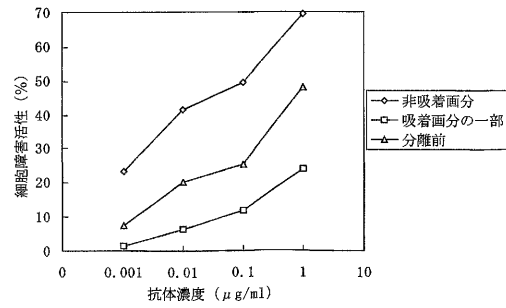
【図 1】

第 1 図



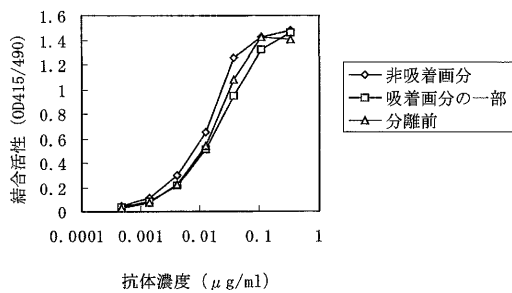
【図 3】

第 3 図



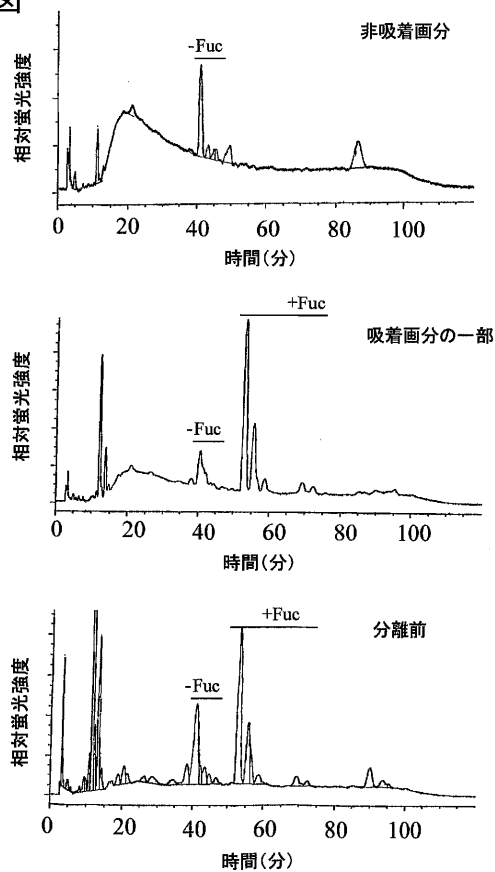
【図 2】

第 2 図



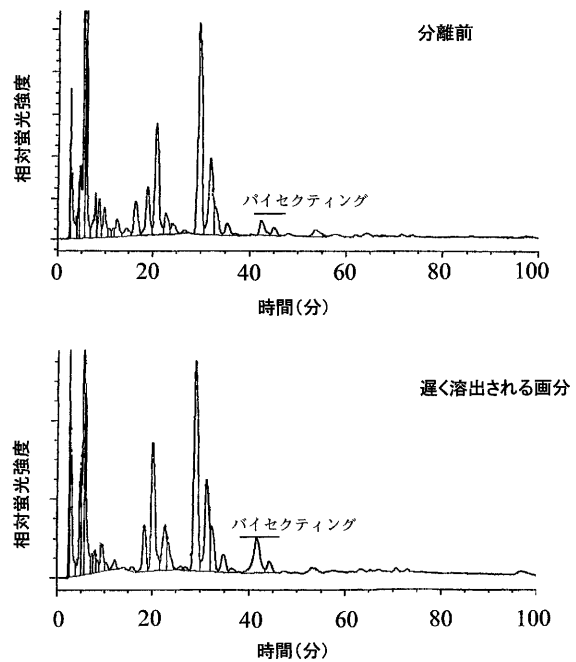
【図 4】

第 4 図



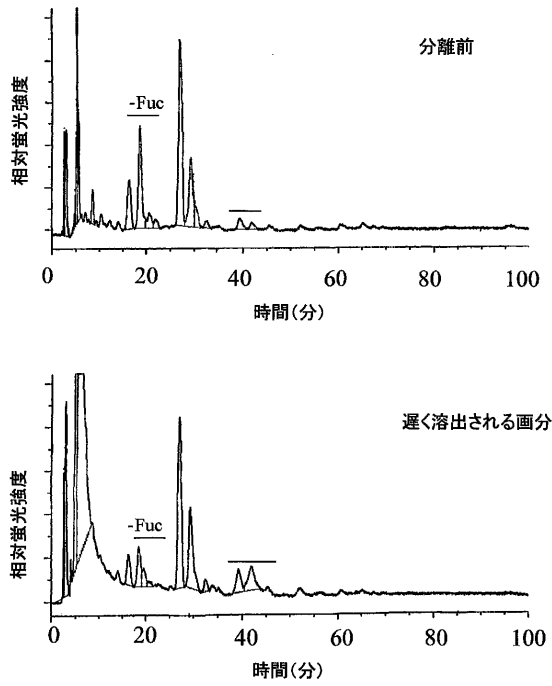
【図 5】

第 5 図



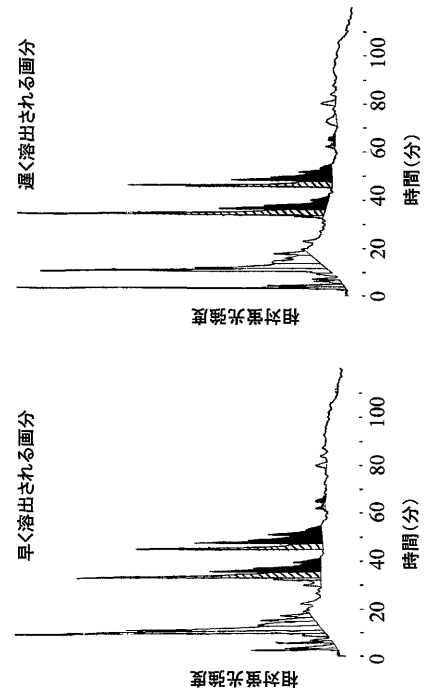
【図 6】

第 6 図



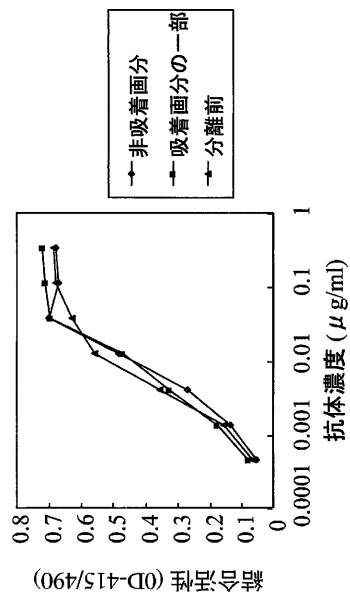
【図 7】

第 7 図



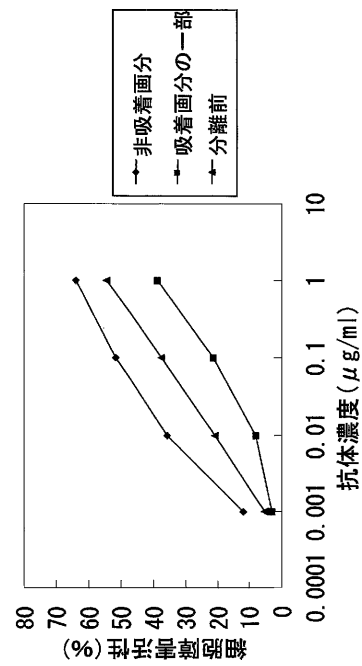
【図 8】

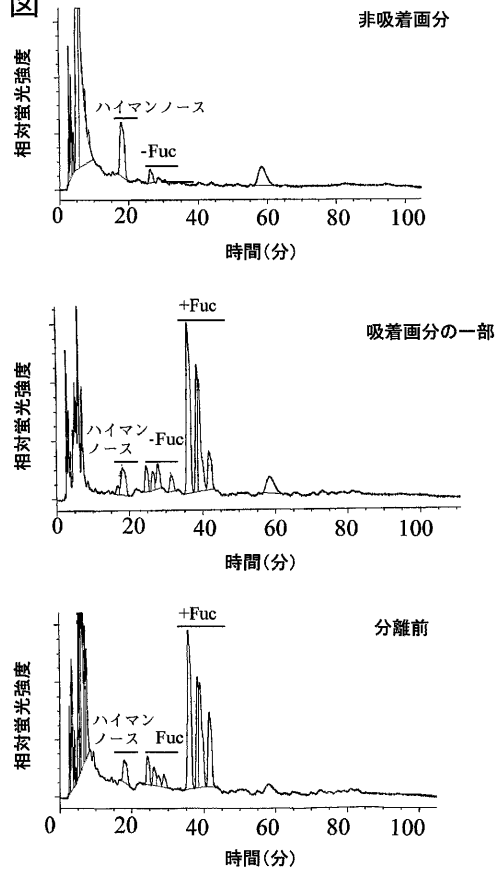
第 8 図



【図 9】

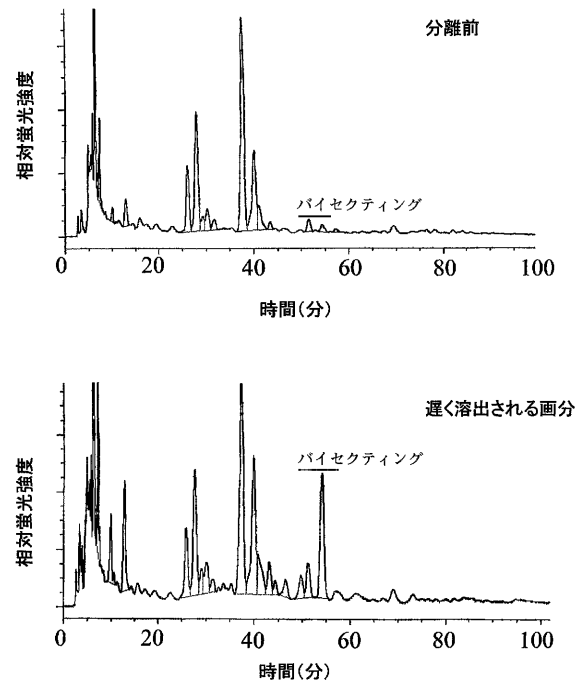
第 9 図



【図 10】  
第 10 図

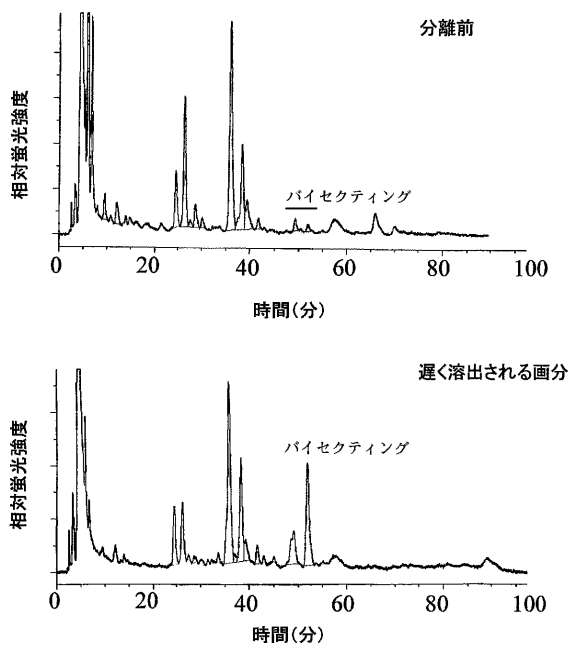
【図 11】

第 11 図



【図 12】

第 12 図



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP01/08715
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. <sup>7</sup> C07K 1/22, C07K 16/28, A61K 39/395, A61K 45/00, G01N 33/531		
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) Int. Cl. <sup>7</sup> C07K 1/22, C07K 16/28, A61K 39/395, A61K 45/00, G01N 33/531		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/10494 A2 (GENENTECH INC.), 04 March, 1999 (04.03.99), & JP 2001-513999 A & BP 1009831 A2 & AU 9888312 A	1-20
X Y	WO 97/10354 A2 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.), 20 March, 1997 (20.03.97), & EP 811691 A1 & US 6018032 A & KR 9770716 A & AU 9669438 A	18-20 1-17
Y	WO 99/54342 A1 (UMANA, P.), 28 October, 1999 (28.10.98), & EP 1071700 A1 & AU 9936578 A	1-20
Y	WO 98/58964 A1 (GENENTECH INC.), 30 December, 1998 (30.12.98), & EP 994903 A1 & AU 9881634 A	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 document 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 "I" 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 16 January, 2002 (16.01.02)		Date of mailing of the international search report 29 January, 2002 (29.01.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08715

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NOSE, M. et al. Inhibition of processing of asparagine-linked carbohydrate chains on IgG2a by using swainsonine has no influence upon antibody effector functions in vitro. J.Immunol. 1990, Vol.145, No.3, pp.910-4	1-7, 18-20
X	DOBRE, M. A. et al. Isolation of a rabbit IgG fraction with cytophilic properties. J.Immunol.Methods 1983, Vol.59, No.3, pp.339-48	1-7
X	PENG, Z. et al. Binding of dog immunoglobulins G,A,M, and E to concanavalin A. Vet.Immunol.Immunopathol. 1993, Vol.36, No.1, pp.83-88	1-7
X	HIKI, Y. et al. Underglycosylation of IgA1 hinge plays a certain role for its glomerular deposition in IgA nephropathy. J.Am.Soc.Nephrol. 1999, Vol.10, No.4, pp.760-9	1-4, 6-7
X	KIM, H. et al. O-glycosylation in hinge region of mouse immunoglobulin G2b. J.Biol.Chem. 1994, Vol.269, No.16, pp.12345-50	1-4, 6-7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08715

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.: 21  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 21 pertains to diagnostic methods to be practiced on the human body.
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

A method of purifying an antibody having desired properties with the use of a substance having an affinity for a sugar chain binding to the antibody cannot be regarded as novel. Thus, it is recognized that the inventions as set forth in claims 1 to 20 are divided into five groups of inventions including: a group of inventions relating to a method of purifying an antibody by using concanavalin A (parts of claims 1 to 7 and 15 to 20); a group of inventions relating to a method of purifying an antibody by using wheat germ lectin (parts of claims 1 to 9 and 15 to 20); a group of inventions relating to a method of purifying an antibody by using lens bean lectin (parts of claims 1 to 7 and 15 to 20, and claims 10 and 11); a group of inventions relating to a method of purifying an antibody by using kidney bean lectin E<sub>4</sub> (parts of claims 1 to 9 and 15 to 20); and a method of purifying an antibody by using a hydrophobic chromatographic carrier (parts of claims 1 to 7 and 15 to 20, and claims 12 to 14).

Namely, the inventions as set forth in claims 1 to 20 are divided into the five groups as described above and these groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP01/08715	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl. C07K 1/22, C07K 16/28, A61K 39/395, A61K 45/00, G01N 33/531			
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. C07K 1/22, C07K 16/28, A61K 39/395, A61K 45/00, G01N 33/531			
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			
国際調査で利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)			
CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST7744 (JOIS)			
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 請求の範囲の番号	
X	WO 99/10494 A2 (GENENTECH INC.) 1999. 3. 4 & JP 2001-513999 A & EP 1009831 A2 & AU 9888312 A	1-20	
X Y	WO 97/10354 A2 (協和醗酵工業株式会社) 1997. 3. 20 & EP 811691 A1 & US 6018032 A & KR 9770716 A & AU 9669438 A	18-20 1-17	
Y	WO 99/54342 A1 (UMANA, P.) 1999. 10. 28 & EP 1071700 A1 & AU 9936578 A	1-20	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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、一般の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」 優先権主張に原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		国際調査報告の発送日	
16. 01. 02		29.01.02	
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) 高瀬 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	



国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO1/08715
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 請求の範囲の番号
Y	WO 98/58964 A1 (GENENTECH INC.) 1998.12.30 & EP 994903 A1 & AU 9881634 A	1-20
X	NOSE, M. et al. Inhibition of processing of asparagine-linked carbohydrate chains on IgG2a by using swainsonine has no influence upon antibody effector functions in vitro. J. Immunol. 1990, Vol. 145, No. 3, p. 910-4	1-7, 18-20
X	DOBRE, M. A. et al. Isolation of a rabbit IgG fraction with cytophilic properties. J. Immunol. Methods 1983, Vol. 59, No. 3, p. 339-48	1-7
X	PENG, Z. et al. Binding of dog immunoglobulins G, A, M, and E to concanavalin A. Vet. Immunol. Immunopathol. 1993, Vol. 36, No. 1, p. 83-8	1-7
X	HIKI, Y. et al. Underglycosylation of IgA1 hinge plays a certain role for its glomerular deposition in IgA nephropathy. J. Am. Soc. Nephrol. 1999, Vol. 10, No. 4, p. 760-9	1-4, 6-7
X	KIM, H. et al. O-glycosylation in hinge region of mouse immunoglobulin G2b. J. Biol. Chem. 1994, Vol. 269, No. 16, p. 12345-50	1-4, 6-7

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JPO1/08715
<p>第I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)</p> <p>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。</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲 21 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、</p> <p style="padding-left: 40px;">請求の範囲21は、人の身体の診断方法に関するものである。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 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、</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 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。</p>	
<p>第II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)</p> <p>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の国際調査機関は認めた。</p> <p>抗体に結合する雄鎖に対し親和性を有する物質を用いて所望の性質を有する抗体を精製する方法は、新規であるとは認められないので、請求の範囲1-20に記載された発明は、コンカナバリンAを用いた抗体の精製方法に係る発明群 (請求の範囲1-7、15-20の一部)、小麦胚芽レクチンを用いた抗体の精製方法に係る発明群 (請求の範囲1-9、15-20の一部)、レンズマメレクチンを用いた抗体の精製方法に係る発明群 (請求の範囲1-7、15-20の一部、請求の範囲10-11)、インゲンマメレクチンEを用いた抗体の精製方法に係る発明群 (請求の範囲1-9、15-20の一部)、疎水性クロマト用担体を用いた抗体の精製方法に係る発明群 (請求の範囲1-7、15-20の一部、請求の範囲12-14)の5つの発明群に区分されると認められる。</p> <p>したがって、請求の範囲1-20に記載された発明は、上記5つの発明群に区分され、当該発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> 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の範囲について作成した。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 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の範囲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。</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 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の範囲のみについて作成した。</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 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の範囲について作成した。</p> <p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意</p> <p><input type="checkbox"/> 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。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。</p>	
様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉 (1)) (1998年7月)	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

A 6 1 P 37/08

C 0 7 K 1/22

F I

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 37/08

C 0 7 K 1/22

(72)発明者 新川 豊英

東京都町田市旭町三丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内

(72)発明者 内田 和久

東京都町田市旭町三丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内

(72)発明者 山 崎 基生

東京都町田市旭町三丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内

(72)発明者 保坂 絵美

東京都町田市旭町三丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内

(72)発明者 設楽 研也

東京都町田市旭町三丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。