

(43) 国際公開日
2007 年 11 月 1 日 (01.11.2007)

PCT

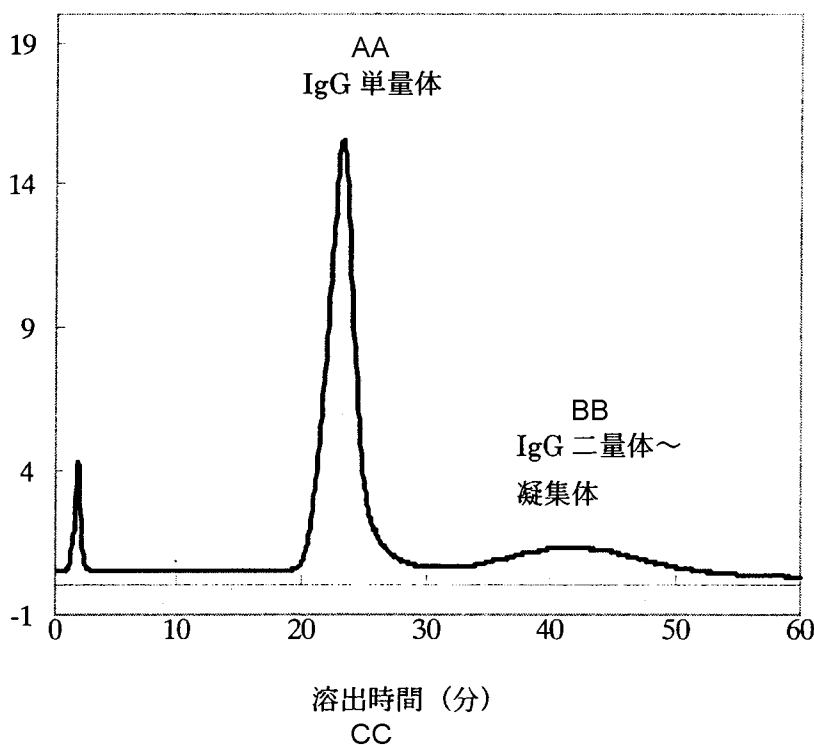
(10) 国際公開番号
WO 2007/123242 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 30/88 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
B01J 20/26 (2006.01) G01N 30/34 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/058879
- (22) 国際出願日: 2007 年 4 月 24 日 (24.04.2007)
- (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2006-120626 2006 年 4 月 25 日 (25.04.2006) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東ソー株式会社 (TOSOH CORPORATION) [JP/JP]; 〒7468501 山口県周南市開成町 4 5 6 0 番地 Yamaguchi (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中村 孝司 (NAKA-MURA, Koji) [JP/JP]; 〒7460034 山口県周南市大字富田 3 0 7 9 - 3 Yamaguchi (JP).
- (74) 代理人: 泉名 謙治, 外 (SENMYO, Kenji et al.); 〒1010035 東京都千代田区神田紺屋町 1 7 番地 S I A 神田スクエア 4 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,

[続葉有]

(54) Title: SEPARATOR FOR IgG PURIFICATION, AND METHOD FOR PURIFICATION OF IgG MONOMER USING THE SAME

(54) 発明の名称: I g G 精製用分離剤、及びそれを用いた I g G 単量体の精製方法



AA MONOMERIC IgG
BB DIMERIC IgG - AGGREGATE
CC ELUTION TIME (MIN)

(57) Abstract: Disclosed is a separator for use in the purification of IgG, which can separate and purify IgG with high efficiency and at a high purity. Also disclosed is a method for purification of a monomeric IgG using the separator. The separator comprises a porous carrier and polyacrylic acid and/or polymethacrylic acid immobilized on the porous carrier. The method comprises contacting the separator with a mixture containing both a monomeric IgG and impurities including a polymeric IgG and eluting the monomeric IgG from the separator.

(57) 要約: I g G を効率よく高純度に分離精製し得る I g G 精製用分離剤、及びそれを用いた I g G 単量体の精製方法を提供する。ポリアクリル酸及び/又はポリメタクリル酸が多孔性の担体に固定化されていることを特徴とする I g G 精製用分離剤、及び該分離剤に I g G の単量体と I g G の重合体を含む不純物を含む混合物を接触させ、次いで溶出させる I g G 単量体の精製方法。



IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明 細 書

IgG精製用分離剤、及びそれを用いたIgG単量体の精製方法

技術分野

[0001] 本発明は、IgG精製用分離剤、その製造方法及びそれを用いたIgG単量体の精製方法に関する。より具体的には、プロテインAアフィニティークロマトグラフィー等により精製されたIgG溶出画分中に存在するIgGの二量体～多量体及び／又は凝集体（以下、これらをIgGの重合体と称する。）を含む不純物を、イオン交換クロマトグラフィーにより、IgGの単量体から除去する際に用いられる分離剤、及びそれを用いたIgG単量体の精製方法に関するものである。

背景技術

[0002] IgG（免疫グロブリンG）は治療薬、体外診断薬として有用であり、今後も益々需要が高まることが予測されている。このような用途に使用するためにはIgGを高純度で精製できる技術の開発が必要である。IgGの精製には一般にプロテインAを用いたアフィニティークロマトグラフィーが用いられている。プロテインAはIgGに結合特性を示す、*Staphyrococal aureus*の菌体膜より分離されたタンパク質である。プロテインAは、種々の動物由来のIgGと特異的に結合する性質があり、かつ単位タンパク質あたりのIgGの結合量が多いため、このプロテインAを固定化した担体を用いるアフィニティークロマトグラフィーが工業スケールの抗体精製プロセスに使用されている。しかしながら、このプロテインAを用いるアフィニティークロマトグラフィーは、吸着したIgGを溶出する方法としてpH4以下の酸性溶液を使用するため、抗体の高次構造が変化し、さらに会合、凝集へと進行することが起こる。また、細胞培養の段階で凝集体も発現しており、これらIgGの重合体を含む不純物をプロテインAを用いたアフィニティークロマトグラフィーで除去するのは困難であった。

[0003] 上記の問題を解決するため、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精製した後、イオン交換クロマトグラフィーや疎水性相互作用クロマトグラフィーを組み合わせた方法が通常用いられている。しかしながら、従来のイオン交換クロマトグラフィーではIgGの単量体と、IgGの重合体を含む不純物との分離が不十分なた

め、高純度のIgG(すなわち、IgGの単量体)を得るためにはIgGの収量を犠牲にする必要があった。また疎水性相互作用クロマトグラフィーではIgGの回収率が低く、また長時間を要するためコスト高となるという問題があった。

[0004] 一方、ポリアニオンを担体に固定化した分離剤が種々提案されており、例えば、低比重リポ蛋白質吸着材として、表面に分子量が25000以上である高分子ポリアニオン部を有する吸着材が知られている(例えば、特許文献1参照)。また、免疫複合体の吸着体として、水不溶性多孔質担体にアニオン性官能基を有する化合物が固定化されてなる吸着体が知られている(例えば、特許文献2参照)。しかしながら、これらの文献には、IgGの単量体とIgGの重合体を含む混合物からIgGの単量体のみを分離精製することについては何ら開示されていない。

[0005] また、バイオポリマー(生体高分子)の分離材料として、ヒドロキシ基を含有する支持体粒子の表面が共有結合した重合体で被覆されている分離材料が知られている(例えば、特許文献3参照)。同文献、例Eによれば、人間血清中の免疫グロブリン(IgG)の分別が行なわれているが、IgGの単量体のみを高純度で分離精製することについては何ら開示されていない。また、当該分離材料では、表面特性と深く関わるグラフト鎖の分子量、分子量分布およびグラフト密度(グラフト鎖の表面密度)を制御することが困難であり、担体上に存在する重合体の分子量も小さくなるため、IgGの単量体とIgGの重合体との分離が不十分になることが予想される。

[0006] 以上のとおり、IgGを診断薬、治療薬として広く使用するためには、IgG単量体を高純度でかつ安価に大量生産することが必要であるが、従来技術には解決しなければならない多くの問題があり、それらの問題を解決できる新規な分離剤、及びIgG単量体の精製方法の開発が望まれていた。

[0007] 特許文献1:特開昭59-206045号公報(特許請求の範囲第1項)

特許文献2:特開平1-68272号公報(特許請求の範囲第1項)

特許文献3:特開平1-310744号公報(特許請求の範囲第1項、第9頁右上欄15行～19行、第12頁左下欄13行～20行)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は上記の課題に鑑みてなされたものであり、その目的は、IgGを効率よく高純度に分離精製し得るIgG精製用分離剤、及びそれを用いたIgG単量体の精製方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者は、上記の課題を解決するため、鋭意検討を重ねた結果、担体にポリアクリル酸及び／又はポリメタクリル酸を固定化した分離剤が、IgGの単量体とIgGの重合体との分離を温和な条件下で実施できるとともに、上記した課題を一挙に解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、以下に示すとおりIgG精製用分離剤、及びそれを用いたIgGの精製方法である。

[0010] [1]ポリアクリル酸及び／又はポリメタクリル酸が担体に固定化されていることを特徴とするIgG精製用分離剤。

[2]ポリアクリル酸及び／又はポリメタクリル酸が、担体の表面上に分散して多点で固定化されていることを特徴とする上記[1]に記載の分離剤。

[3]ポリアクリル酸及び／又はポリメタクリル酸の粘度平均分子量が、5000以上であることを特徴とする上記[1]又は[2]に記載の分離剤。

[4]担体が多孔性の担体であることを特徴とする上記[1]乃至[3]のいずれかに記載の分離剤。

[5]多孔性の担体が、無機多孔質材料、多糖類、及び合成高分子からなる群より選ばれることを特徴とする上記[4]に記載の分離剤。

[6]担体の形状が、球状粒子、非球状粒子、膜、又はモノリス(連続体)であることを特徴とする上記[1]乃至[5]のいずれかに記載の分離剤。

[7]IgG単量体と不純物を含む混合物を上記[1]乃至[6]のいずれかに記載の分離剤と接触させ、溶出させることを特徴とするIgG単量体の精製方法。

[8]不純物がIgGの二量体～多量体及び／又は凝集体(すなわち、IgGの重合体)を含有することを特徴とする上記[7]に記載の精製方法。

[9]溶出させる方法が、溶離液塩濃度若しくは溶離液pHを直線的に増加させ、前記分離剤に吸着したIgGを溶出させる方法;溶離液塩濃度若しくは溶離液pHを段階

的に増加させ、前記分離剤に吸着したIgGを溶出させる方法；又はIgGの単量体を前記分離剤に吸着させず、IgGの重合体のみを吸着させる方法、であることを特徴とする上記[7]又は[8]に記載の精製方法。

発明の効果

- [0011] 本発明のIgG精製用分離剤を使用すると、プロテインAアフィニティークロマトグラフィー等で精製された、IgGの単量体とIgGの重合体を含む不純物とを含む混合物から、当該不純物を効率良く分離することが可能となり、目的のIgG単量体のみを高純度に精製することが可能となる。

図面の簡単な説明

- [0012] [図1]実施例5に記載のヒト化モノクローナル抗体の分離結果を示すクロマトグラムである。
- [図2]実施例6に記載のヒト化モノクローナル抗体の分離結果を示すクロマトグラムである。
- [図3]比較例1に記載のヒト化モノクローナル抗体の分離結果を示すクロマトグラムである。
- [図4]比較例2に記載のヒト化モノクローナル抗体の分離結果を示すクロマトグラムである。

発明を実施するための最良の形態

- [0013] 本発明のIgG精製用分離剤は、ポリアクリル酸及び／又はポリメタクリル酸が担体に固定化されていることを特徴とする分離剤である。

本発明の分離剤によるIgGの単量体の精製は、主として、IgGと分離剤との間の静電的相互作用に基づくものである。上記したとおり、高分子ポリアニオン部を有する吸着材により血液中のリポ蛋白質を除去する方法が提案されているが、この方法はリポ蛋白質と吸着材との間の生物学的親和性に基づくものであり、本発明とは分離機構が異なるものである。本発明の分離剤はポリアクリル酸及び／又はポリメタクリル酸がIgG吸着の担い手として機能するものであり、そのためにはIgGと接触する分離剤の表面にポリアクリル酸及び／又はポリメタクリル酸が固定化されていることが必要である。なお、分離能力を考慮すると、本発明の分離剤としては、ポリアクリル酸及び／

又はポリメタクリル酸が担体表面上に分散して多点で固定化されているものが好ましい。

- [0014] 本発明の分離剤において、担体に結合させるポリアクリル酸及び／又はポリメタクリル酸の粘度平均分子量は好ましくは5,000～100万の範囲であり、特に高分子量になるにつれて、IgGの単量体とIgGの重合体との分離度が向上する。

本発明の分離剤においては、IgGと接触しない分離剤内部の材質及び多孔性は、本発明の静電氣的相互作用による分離機構とは直接には関係しないため、担体として無孔質の材料と多孔質の材料のいずれも使用することができる。実用面からは、時間的にもコスト的にも一回の操作で処理できるIgGの量が多いほうが望ましいため、多孔性の担体から分離剤を調製して分離剤の表面積を大きくするのが好ましく、 $1\text{m}^2/\text{g}$ 以上の比表面積を有する分離剤が更に好ましい。

- [0015] 本発明の分離剤において使用される多孔性の担体としては、カラムクロマトグラフィー用の充填剤として使用される公知の担体を特に制限なく使用することができ、特に限定するものではないが、例えば、多孔質ガラス、多孔質シリカゲル等の無機多孔質材料、アガロース、デキストラン、セルロース等の多糖類、ポリアクリルアミド、ポリメチルメタクリレート、ポリビニルアルコール、スチレンージビニルベンゼン共重合体等の合成高分子等が好適なものとして挙げられる。本発明の分離剤を工業スケールで使用する場合には、精製操作の後に分離剤のアルカリ洗浄が実施されるため、これらのうち、アルカリに対して耐性のある多糖類、合成高分子等からなる担体が好ましい。また、担体の形状としては、特に限定するものではないが、例えば、球状粒子、非球状粒子、膜、モノリス(連続体)等が挙げられる。

- [0016] 本発明の分離剤の形状としては、その使用形態により異なるため、特に限定するものではないが、例えば、カラムクロマトグラフィー用の充填剤として用いる場合には、粒子状の分離剤とすることが好ましく、カラム中に均一な充填を行うためには球状粒子とすることがさらに好ましい。また、連続した一体型の円柱状の多孔質体をカラムに装着したものでもよい。さらには、膜状の分離剤を用いたクロマトグラフィーも可能である。

分離剤の形状を粒子状にして使用する場合、分離剤粒子の大きさは、その使用条

件によって適当な大きさを選択することが好ましく、特に限定するものではないが、例えば、HPLC用の充填剤として用いる場合は、平均粒子径が通常5～15 μm 、少量の分取を目的とする場合には15～50 μm 、工業プロセスで使用する目的では50～300 μm 程度の粒子径を用いるのが好ましい。

[0017] 本発明において、担体にポリアクリル酸及び／又はポリメタクリル酸を固定化する方法としては特に限定するものではなく、公知の方法を用いることができる。例えば、担体表面にエピクロルヒドリンや多官能エポキシ化合物等を用いて、担体表面にエポキシ基を導入した後、ポリアクリル酸及び／又はポリメタクリル酸を反応させる方法や、エポキシ基導入後、アンモニア等を用いてアミノ化し、アミノ基とアクリル酸及び／又はポリメタクリル酸のカルボキシル基とをカルボジイミド試薬で結合させる方法等が可能である。

[0018] 本発明のIgG単量体の精製方法は、プロテインAアフィニティークロマトグラフィー等で精製された、IgGの重合体を含む不純物とIgGの単量体とを含む混合物を本発明の分離剤と接触させ、溶出させることをその特徴とする。

本発明の精製方法におけるIgGの種類はポリクロナール抗体、モノクロナール抗体のいずれであってもよい。

[0019] 本発明の精製方法において、IgGの重合体を含む不純物とIgGの単量体とを含む混合物を本発明の分離剤と接触させる方法としては、特に限定するものではないが、例えば、公知のイオン交換クロマトグラフィーによる方法を使用することができる。すなわち、当該混合物を緩衝液中で本発明の分離剤に吸着させ、その後、溶出させることにより、IgGの重合体を含む不純物からIgGの単量体が分離される。

[0020] 本発明の精製方法において、本発明の分離剤に吸着したIgGを溶出させる方法としては、特に限定するものではないが、例えば、溶離液塩濃度若しくは溶離液pHを直線的に増加させ、吸着したIgGを溶出させる方法(リニアグラジエント溶出)、溶離液塩濃度若しくは溶離液pHを段階的に増加させ、吸着したIgGを溶出させる方法(ステップワイズグラジエント溶出)を使用することができる。また、溶離液の塩濃度を高めておき、IgGの単量体を分離剤に吸着させず、IgGの重合体のみを吸着させる方法を使用することもできる。

実施例

[0021] 以下に、本発明の実施例を挙げ、本発明を具体的に説明する。ただし、本発明は下記の実施例に限定されるものではない。

[0022] 実施例1

親水性ビニル系ポリマーを基材としたゲル濾過クロマトグラフィー用充填剤TOYO PEARL HW-65C(商品名、東ソー株式会社製、タンパク質排除限界分子量 5×10^6 、粒子径 $50 \sim 100 \mu\text{m}$)100mlにエピクロルヒドリン100g、NaOH水溶液(NaOH;40g、 H_2O ;180g)を加え、 40°C で4時間反応しエポキシ化ゲルを得た。このゲルに濃アンモニア水100mlを加え、 50°C で2時間攪拌し、アミノ基が導入されたアミノ基含有ゲルを得た。

次にポリアクリル酸(粘度平均分子量;5,000)2gを100mlの水に溶解し、上記アミノ基含有ゲル100mlを加えた。この溶液に、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド2gをpH4.5に保ちながら 4°C で添加し、同温度で24時間攪拌した。反応終了後、0.5モル食塩水、次いで水で洗浄し、本発明のポリアクリル酸固定化ゲルを得た。固定化されたポリアクリル酸の量は $4\text{mg}/\text{ml}$ ゲルであった。

[0023] 実施例2

ポリアクリル酸(粘度平均分子量;250,000)を用い、実施例1と同様の反応を実施し、本発明の分離剤を得た。ポリアクリル酸の導入量は $5\text{mg}/\text{ml}$ ゲルであった。

[0024] 実施例3

ポリアクリル酸(粘度平均;5,000)2gを100mlの水に溶解し、次いでアガロースゲルに予めアミノ基が導入されたEAH-セファローズ4B(商品名、GE社製、粒子径 $45 \sim 165 \mu\text{m}$)100mlを加えた。この溶液に、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド2gをpH4.5に保ちながら 4°C で添加し、同温度で24時間攪拌した。反応終了後、0.5モル食塩水、次に水で洗浄し、本発明の分離剤であるポリアクリル酸固定化ゲルを得た。固定化されたポリアクリル酸の量は $6\text{mg}/\text{ml}$ ゲルであった。

[0025] 実施例4

実施例1で得られたエポキシ化ゲル100mlに、ポリメタクリル酸2gを100mlの水に

溶解した水溶液を加え、40℃で16時間反応した。反応終了後、0.5モル食塩水、次いで水で洗浄し、本発明の分離剤であるポリアクリル酸固定化ゲルを得た。固定化されたポリメタクリル酸の量は4mg/mlゲルであった。

[0026] 実施例5

実施例1で得られた本発明の分離剤を内径6mm、長さ4cmのカラムに充填し、該カラムにヒト化モノクローナル抗体を注入した後、IgGの重合体(二量体～凝集体)を含む不純物とIgGの単量体との混合物の分離を溶離液塩濃度を直線的に増加させる方法(リニアグラジエント)で実施した。得られたクロマトグラムを図1に示す。

実施例1で得られた本発明の分離剤によるIgGの単量体と重合体の分離は、具体的には、以下の方法で実施した。すなわち、カラム(6mm内径、長さ4cm)に実施例1で得られた分離剤を充填した後、FPLC装置(Akta Prime、GE社製)に接続した。流速0.5ml/分でカラム容量10倍量の50mMりん酸緩衝液(pH6.0)で平衡化した後、ヒト化モノクローナル抗体(100 μ g)を注入した。溶出は1M NaClを含む50mMりん酸緩衝液を用い、60分の直線塩濃度勾配溶出法で分離した。図1において横軸は保持時間(分)を示し、22分付近に溶出しているピークがIgGの単量体で、38分付近に溶出しているピークがIgGの重合体である。

[0027] 実施例6

実施例2で得られた本発明の分離剤を用いる以外は、実施例5と同様の分離条件でIgGの単量体とIgGの重合体との混合物の分離を行なった。得られたクロマトグラムを図2に示す。図2において、23分付近に溶出しているピークがIgGの単量体で、42分付近に溶出しているピークがIgGの重合体である。

[0028] 比較例1

分離剤として、TOYOPEARL HW-65Cにカルボキシメチル基が導入されたTOYOPEARL CM-650(商品名、東ソー株式会社製)を用いた以外は、実施例5と同様の分離条件でIgGの単量体とIgGの重合体との混合物の分離を行なった。得られたクロマトグラムを図3に示す。図3において、22分付近に溶出しているピークがIgGの単量体で、30分付近に溶出しているピークがIgGの重合体である。

図1、図2と図3の比較から明らかなとおり、本発明の分離剤を使用すると、従来の

カチオン交換体(TOYOPEARL CM-650)を使用した場合に比べ、IgGの単量体とIgGの重合体との分離度が格段に向上し、高純度のIgG単量体が得られている。

[0029] 比較例2

分離剤として、アクリル酸を担体にグラフト重合させた分離剤であるFractogel EMD COO⁻ (商品名、メルク社製)を用いた以外は、実施例5に記載と同一条件でIgGの単量体とIgGの重合体との混合物の分離を行なった。得られたクロマトグラムを図4に示す。図4において、20分付近に溶出しているピークがIgG単量体で、33分付近に溶出しているピークがIgG重合体である。

図1、図2と図4の比較から明らかなように、本発明の分離剤を使用すると、特許文献3に開示されたような分離材料(Fractogel EMD COO⁻)を使用した場合に比べ、IgG単量体が効率良く分離・精製されている。

産業上の利用可能性

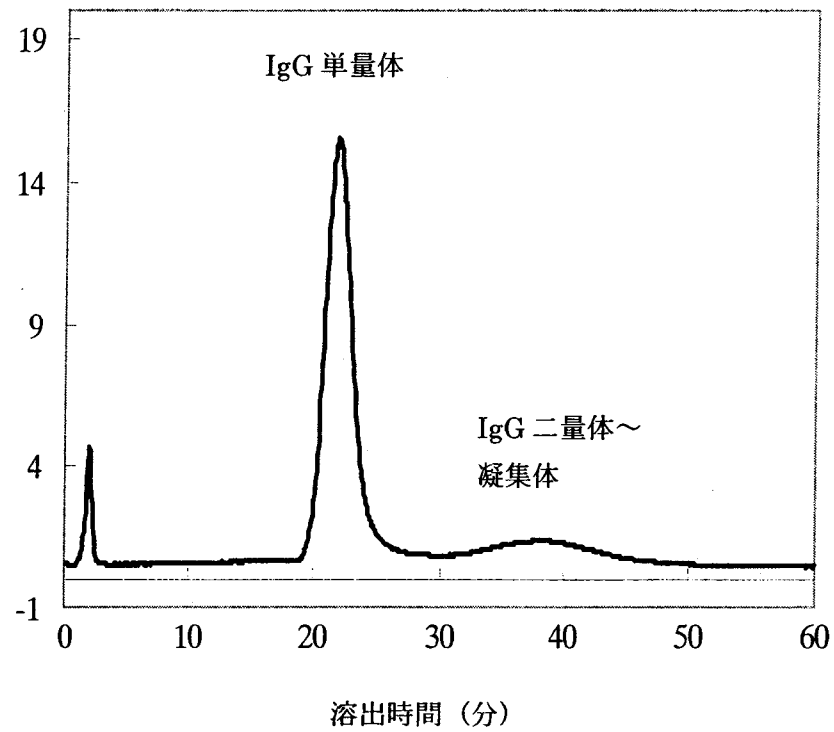
[0030] プロテインAアフィニティークロマトグラフィー精製後の、更なる精製に通常用いられているイオン交換クロマトグラフィーによる方法が持つ、IgGの単量体と、IgGの重合体を含む不純物との分離が不十分、IgGの回収率が低い、また長時間を要するためコスト高、等の問題点が解消されるため、IgG精製用分離剤として利用可能性は高い。

なお、2006年4月25日に出願された日本特許出願2006-120626号の明細書、特許請求の範囲、図面及び要約書の全内容をここに引用し、本発明の明細書の開示として取り入れるものである。

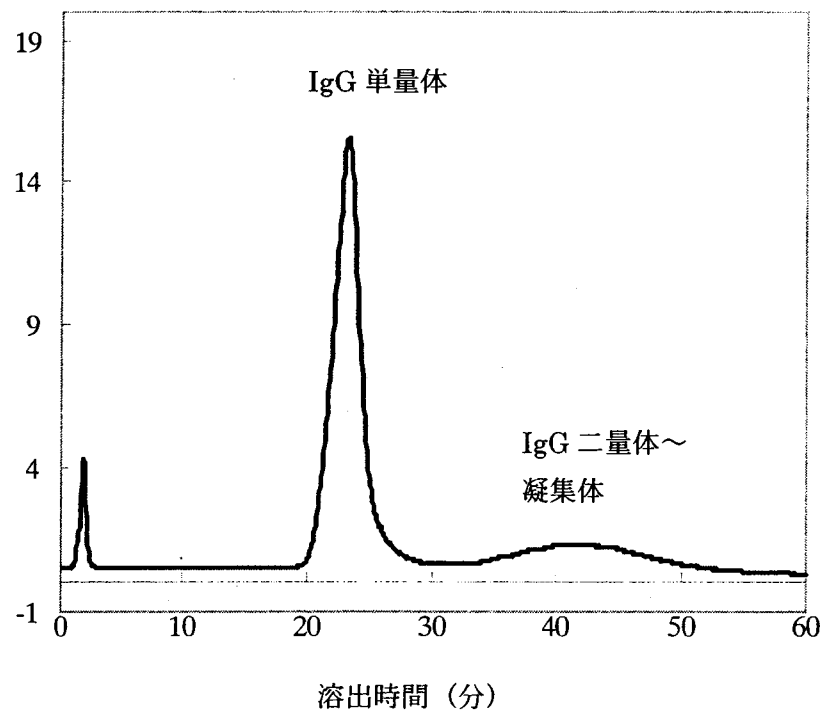
請求の範囲

- [1] ポリアクリル酸及び／又はポリメタクリル酸が担体に固定化されていることを特徴とするIgG精製用分離剤。
- [2] ポリアクリル酸及び／又はポリメタクリル酸が、担体の表面上に分散して多点で固定化されていることを特徴とする請求項1に記載の分離剤。
- [3] ポリアクリル酸及び／又はポリメタクリル酸の粘度平均分子量が5,000以上であることを特徴とする請求項1又は請求項2に記載の分離剤。
- [4] 担体が多孔性の担体であることを特徴とする請求項1乃至請求項3のいずれかに記載の分離剤。
- [5] 多孔性の担体が、無機多孔質材料、多糖類及び合成高分子からなる群より選ばれ、ることを特徴とする請求項4に記載の分離剤。
- [6] 担体の形状が、球状粒子、非球状粒子、膜、又はモノリス(連続体)であることを特徴とする請求項1乃至請求項5のいずれかに記載の分離剤。
- [7] IgG単量体と不純物を含む混合物を請求項1乃至請求項6のいずれかに記載の分離剤と接触させ、溶出させることを特徴とするIgG単量体の精製方法。
- [8] 不純物がIgGの二量体乃至多量体及び／又は凝集体を含有することを特徴とする請求項7に記載の精製方法。
- [9] 溶出させる方法が、溶離液塩濃度若しくは溶離液pHを直線的に増加させ、前記分離剤に吸着したIgGを溶出させる方法;溶離液塩濃度若しくは溶離液pHを段階的に増加させ、前記分離剤に吸着したIgGを溶出させる方法;又はIgGの単量体を前記分離剤に吸着させず、IgGの重合体のみを吸着させる方法、であることを特徴とする請求項7又は請求項8に記載の精製方法。

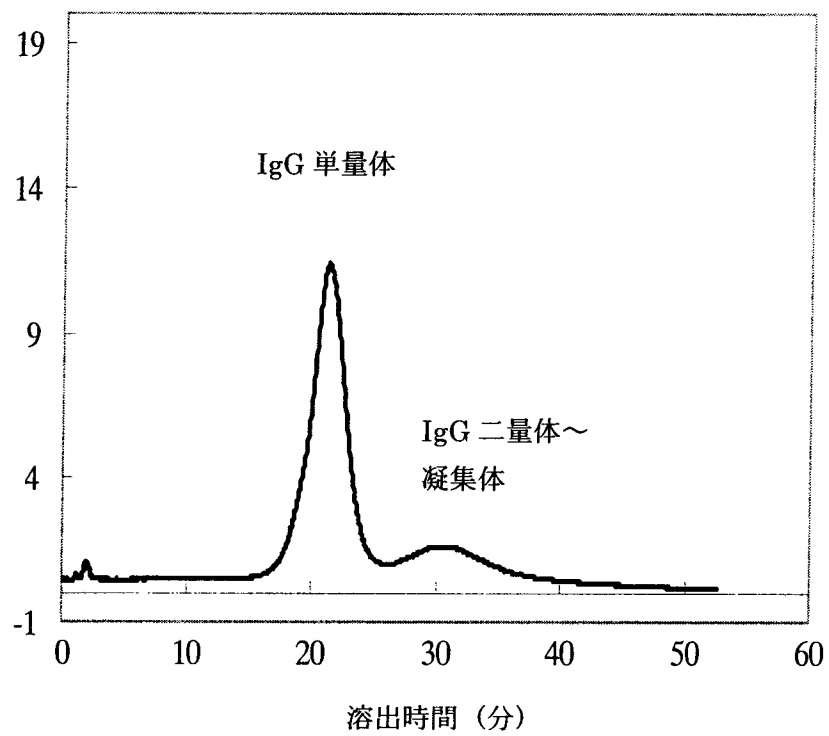
[図1]



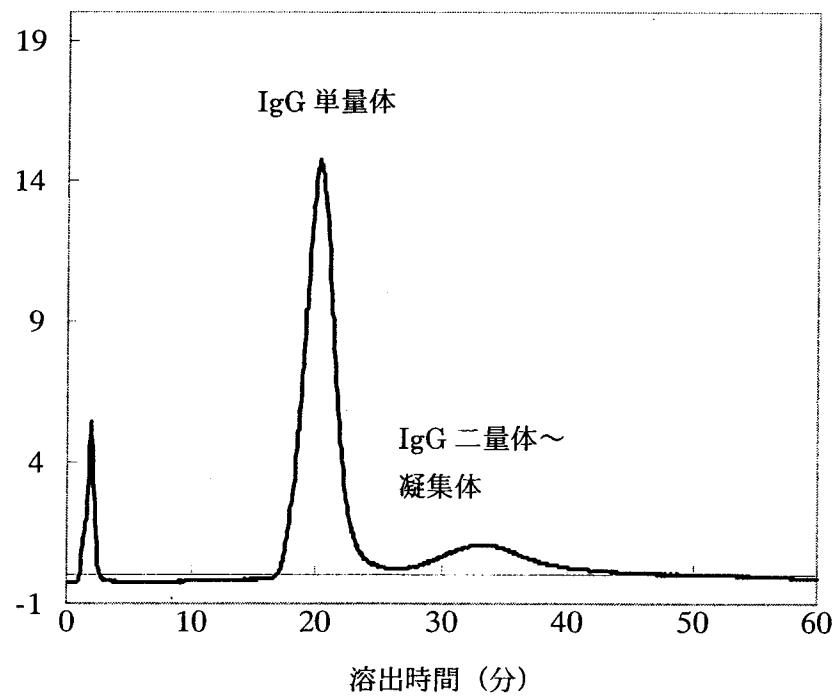
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/058879

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N30/88(2006.01)i, B01J20/26(2006.01)i, C07K1/22(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)i, G01N30/34(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N30/88, B01J20/26, C07K1/22, C07K16/00, G01N30/34

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2007	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2007

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus (JDream2 IgG, TANRYOTAI+NIRYOTAI+TARYOTAI+KUROMATO) (in Japanese)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 1-119264 A (Kaneka Corp.), 11 May, 1989 (11.05.89), Particularly, examples 10, 11 (Family: none)	1-7, 9/ 8
A	JOHN K.LEE, DETERMINATION OF THE MOLECULAR SIZE DISTRIBUTION OF IMMUNOGLOBULIN G (IgG) IN INTRAVENOUS IgG-ALBUMIN FORMULATIONS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, Journal of Chromatography, vol.444, p.141-152, 1988	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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
24 May, 2007 (24.05.07)

Date of mailing of the international search report
05 June, 2007 (05.06.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/058879

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Timothy K., Rapid automated two-dimensional high-performance liquid chromatographic analysis of immunoglobulin G and its multimers, Journal of Chromatography A, Vol.676, p.331-335, 1994	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N30/88(2006.01)i, B01J20/26(2006.01)i, C07K1/22(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)i,
G01N30/34(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N30/88, B01J20/26, C07K1/22, C07K16/00, G01N30/34

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 7 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 7 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 7 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus(JDream2 IgG, 単量体+二量体+多量体+クロマト)

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/ A	JP 1-119264 A (鐘淵化学工業株式会社) 1989.05.11 特に実施例 10, 11 (ファミリーなし)	1-7, 9/ 8
A	JOHN K. LEE, DETERMINATION OF THE MOLECULAR SIZE DISTRIBUTION OF IMMUNOGLOBULIN G (IgG) IN INTRAVENOUS IgG-ALBUMIN FORMULATIONS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, Journal of Chromatography, vol.444, p.141-152, 1988	1-9

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

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

2 4 . 0 5 . 2 0 0 7

国際調査報告の発送日

0 5 . 0 6 . 2 0 0 7

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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)

宮澤 浩

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

2 J

9 4 0 7

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
A	Timothy K., Rapid automated two-dimensional high-performance liquid chromatographic analysis of immunoglobulin G and its multimers, Journal of Chromatography A, vol. 676, p. 331-335, 1994	1-9