

(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
2018年11月8日(08.11.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/203541 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 1/14 (2006.01) G01N 30/88 (2006.01)
B01D 15/00 (2006.01) B01J 20/24 (2006.01)
B01D 15/12 (2006.01) C07K 14/00 (2006.01)
B01D 15/38 (2006.01) C07K 16/00 (2006.01)
B01J 20/281 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/017326

(22) 国際出願日: 2018年4月27日(27.04.2018)

(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 2017-091607 2017年5月2日(02.05.2017) JP

(71) 出願人: 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島二丁目3番18号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 唐 杉 慶一 (KARASUGI, Keiichi); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 船木 正

大(FUNAKI, Masahiro); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 西八條 正克(NISHIHACHIGO, Masakatsu); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 中野 喜之(NAKANO, Yoshiyuki); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 水口 和信(MINAKUCHI, Kazunobu); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 植木 久一, 外 (UEKI, Kyuichi et al.); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番16号 フジタ東洋紡ビル9階 Osaka (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, IR, IS, 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,

(54) Title: METHOD OF RECOVERING AND PURIFYING POLYPEPTIDES HAVING IMMUNOGLOBULIN BINDING ACTIVITY

(54) 発明の名称: 免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドの回収精製法

(57) Abstract: The present invention is characterized by providing a treatment method for recovering and purifying polypeptides having immunoglobulin binding activity using a genetically modified organism, wherein, rather than relying on differences in polypeptide host or amino acid sequence, impurities comprising host-originating cell components, contaminant proteins, and nucleic acids are precipitated at high efficiency to a larger particle size, thereby allowing for improved filterability and improved productivity in chromatography processes. This purifying method for polypeptides having immunoglobulin binding activity is characterized by comprising: (1) a step for culturing a genetically modified organism that produces polypeptides having immunoglobulin binding activity; (2) a step for performing an acidic heat treatment upon one or more of culture liquid obtained in step (1), supernatant therefrom, a liquid suspension of microbes in the culture liquid, crushed microbe liquid obtained by crushing the microbes in the liquid microbe suspension, and crushed microbe supernatant obtained by removing the microbes from the crushed microbe liquid; and (3) a step for separating the precipitate.

(57) 要約: 本発明は、遺伝子組換え体より免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを回収精製する方法として、ポリペプチドの宿主やアミノ酸配列の違いによらず、宿主由来の細胞成分、夾雑タンパク、核酸からなる不純物を、より大きな粒子サイズで高効率に沈殿化することで、ろ過性を向上させ、クロマトグラフィー工程における生産性を向上せしめる処理法を提供することを特徴とする。本発明に係る免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドの精製方法は、(1) 免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを生産する遺伝子組換え体を培養する工程、(2) 前記工程(1)にて得られた培養液、その培養上清、前記培養液中の菌体の懸濁液、前記菌体懸濁液を菌体破碎することで得られる菌体破碎後液および前記破碎後液から菌体を除去した菌体破碎後上清のいずれか一つ以上を酸性加熱処理する工程、(3) 沈殿を分離する工程を有することを特徴とする。

NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドの回収精製法

技術分野

[0001] 本発明は、遺伝子組み換え体を培養することによって生産された免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドの回収精製法に関するものである。

背景技術

[0002] 近年、遺伝子工学、タンパク質工学、および、細胞工学の発展に伴い、抗体医薬と呼ばれる、免疫グロブリンの有する機能を利用した医薬品の開発が盛んに行われている。抗体医薬は、従来の医薬と比べて、標的分子に対してより特異的に働くために、副作用をより軽減させ、かつ、高い治療効果が得られることが期待されており、実際に様々な病態の改善に寄与している。

[0003] 抗体医薬として開発されているのは基本的にモノクローナル抗体であり、組換え培養細胞技術等を用いて大量に生産されている。「モノクローナル抗体」とは、単一の抗体産生細胞に由来するクローンから得られた抗体を指す。現在上市されている抗体医薬のほとんどは、分子構造的には免疫グロブリンG（以下、「IgG」と略記する場合がある）サブクラスに分類される。また、免疫グロブリンを断片化した分子構造を有する抗体誘導体（断片抗体）からなる抗体医薬も盛んに臨床開発されており、IgGのFab断片からなる抗体医薬が複数上市された（非特許文献1）。

[0004] これら抗体医薬品の調製における初期精製工程ではプロテインA（PA）、プロテインG（PG）、プロテインL（PL）といった免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを、多糖類、合成ポリマー、シリカ等からなる不溶性の多孔質基材に結合させたアフィニティー担体が用いられる。

[0005] これら免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドをリガンドとしたアフィニティー担体は、培養液から完全長抗体や断片化抗体を1回の処理で高純度に精製することができる。これを利用し、例えばプロテインAアフィニ

ティー担体（P A担体）やプロテインGアフィニティー担体（P G担体）は I g Gを基本構造とした抗体医薬品の製造プロセスにおける初期精製工程に用いられている。

[0006] また、プロテインLアフィニティー担体（P L担体）は、断片化抗体を基本構造とした抗体医薬品や診断薬の研究開発段階における精製に用いられている。

[0007] 一方、これらアフィニティー担体は、医薬品製造用資材として高い品質が求められ、タンパク質からなるリガンド自体も抗体医薬品と同レベルの品質を要求されるため、生産コストが高くなり、アフィニティー担体を安価に提供することが難しくなっている。これにより、抗体医薬品製造コストのうち、アフィニティー担体が占める割合は大きく、抗体医薬品製造コスト増加の一因となっている。そのため、これら免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを安価に大量調製する方法として、従来法よりも簡便で、効果的で、定型化された手法が望まれていた。

[0008] 免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを調製する方法としてこれまでに種々の方法が検討されている。例えばH j e l mらは、スタフィロコッカス・アウレウスの培養により生産された野生型のプロテインAを回収精製する方法について報告している（非特許文献2）。当該文献では、野生型のプロテインAを含むスタフィロコッカス・アウレウスの培養液をL y s o s t a p h i nにより処理し、遠心分離により宿主由来の細胞成分を除去後、得られた培養上清のpHを3.5とすることにより夾雑タンパク質を沈殿させており、さらにこの上清を回収し、中和後にフィルターろ過したものをI g Gを固定化したs e p h a r o s e^(R) 4 B（P h a r m a c i a）にて精製している。

[0009] またL e eらは、形質転換された大腸菌を培養することにより生産された野生型プロテインGの免疫グロブリン結合ドメインの回収精製方法について報告している（非特許文献3）。当該文献では、野生型プロテインGを含む大腸菌培養液を80℃で10分間処理することにより培養上清中にプロテ

ンGを抽出し、これをクロスフロー過することで、細胞成分を分離しており、さらに、得られた上清をIgG Sepharose^(R) 6 Fast Flow (Pharmacia) にて精製している。

[0010] また、Richardらは、形質転換された大腸菌を培養することにより生産された野生型プロテインAの回収精製法について記載している（特許文献1）。当該文献では、野生型プロテインAを含む大腸菌培養液をビーズミルにて菌体破碎したのち、得られた菌体破碎後上清を80℃で30分加熱し、大腸菌由来の夾雑タンパク質を沈殿させて取り除いており、さらに、加熱処理後の培養上清のpHを調整した後に陰イオン交換クロマトグラフィーあるいは陽イオン交換クロマトグラフィーにて精製している。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：特開昭63-275600

非特許文献

[0012] 非特許文献1：Nelsonら、Nat. Biotechnol., 2009, 27: 331-337

非特許文献2：Hjelmら、FEBS. LETT., 1972, 28: 73-76

非特許文献3：Leeら、J. Biotechnol., 1992, 26: 213-229

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 前記のいずれの精製法も、クロマトグラフィーによる処理の前に、免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを含む培養液または培養上清に対し、酸性処理または加熱処理のいずれかの処理を行なっているが、前記のいずれかの方法による処理のみでは以下に述べるように宿主由来の菌体成分、夾雑タンパク、核酸といった不純物から形成される沈殿の粒子サイズが小さい

ことや、前記不純物を十分に除去できないことから、後段の精製プロセスにおける生産性が低下するといった課題があった。

[0014] 前記の生産性低下の影響を受ける後段の精製プロセスとは、前記酸性処理または加熱処理によって生じた沈殿を除去するろ過工程と免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを回収、精製するクロマトグラフィー工程が挙げられる。以下に前記の従来法にて酸性処理または加熱処理のみを行なう場合の個々のプロセスにおける問題点を具体的に述べる。

[0015] 前記の酸性処理または加熱処理のいずれかの方法による処理のみの場合、宿主由来の菌体成分、夾雑タンパク、核酸といった不純物からなる沈殿の粒子サイズが小さいために、精密ろ過フィルターや限外ろ過フィルターによるろ過速度が低下し、ろ過工程における生産性が低下するといった課題があった。さらに、前記のいずれかの方法による処理のみでは前記不純物を十分に除去できず、後段のクロマトグラフィー精製における一回当たりの処理量が低下するといった課題があった。

[0016] これらを解決する方法として、例えば該ポリペプチドを含む該培養液または培養上清に対し、クロマトグラフィーによる処理の前に、酸性処理および加熱処理を組み合わせることで、酸性処理または加熱処理を単独で実施する場合に比べ、より多くの不純物を沈殿化するとともに沈殿の粒子サイズを大きくすることでより高効率に前記不純物を沈殿化する処理法が考えられうるが、以下のような理由から、それらを組み合わせることは該ポリペプチドの構造を不可逆的に変化させ、免疫グロブリン結合活性を失わせるリスクが高まることが推察されるため、実施は避けられていた。

[0017] 一般にタンパク質は、それが含まれる溶液のpH、温度、塩、重金属、変性剤の影響により立体構造の不可逆的变化を起こし失活してしまう場合がある。例えば、タンパク質溶液のpHを酸性あるいはアルカリ性条件とすることにより、アミノ酸残基の側鎖のイオン化状態が変化したり、修飾反応が促進される（新生化学実験講座1「タンパク質Ⅰ分離・精製・性質」日本生化学会編）。これにより、タンパク質本来の立体構造を安定に保つ上で重要な

役割を担っているイオン性の引力や反発力が失われ、タンパク質の立体構造を不安定化する。さらに、タンパク質溶液の温度を高温とすることにより、タンパク質の立体構造を安定化している非共有結合が壊され、折りたたみ構造をほどけやすくする。また、これら酸性やアルカリ性条件と高温条件を組み合わせると、タンパク質の立体構造の不安定化はそれらを単独で行なう場合よりもさらに促進されうる。さらに、特開昭63-275600には、大腸菌含有プロテアーゼが低pH（pH 3.0～pH 3.5）でプロテインAを破壊することが記載されており、低pHでの処理と加熱処理を組み合わせで行なうことは、プロテインAの破壊を促進することは容易に想像できる。つまり、前記免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを含む該溶液に対し、酸性処理および加熱処理を組み合わせで行なうことは、これらを単独で実施する場合に比べて、該ポリペプチドの立体構造を不可逆的に不安定化させたり、ポリペプチドを破壊させてしまうリスクが高まる（新生化学実験講座1「タンパク質Ⅰ分離・精製・性質」日本生化学会編）。また、免疫グロブリン結合活性は、ポリペプチドの立体構造やそのアミノ酸配列が少し変化しただけでも劇的に変化しうるため、免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを精製する際に、酸性処理および加熱処理を組み合わせで行なうことは、免疫グロブリン結合活性の低下という問題が発生すると考えられ、これまで避けられてきた。

[0018] また、複数種類のタンパク質を工業的に精製する際、それらの精製プロセスを共通化できると、プロセス開発期間の短縮や精製資材や設備の共通化によるコスト削減が可能となる。このような精製プロセスの共通化は「精製プラットフォーム技術」と呼ばれ、抗体医薬品では、製薬会社各社が独自のプラットフォームを構築している。製造コストの高い免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドに関しても、精製プラットフォーム技術を確立できれば、産業上有用である。

[0019] 上記の理由から、遺伝子組換え体より免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを回収精製する方法として、前記ポリペプチドの宿主やアミノ酸

配列の違いによらず、宿主由来の細胞成分、夾雑タンパク、核酸からなる不純物をより多く且つより大きな粒子サイズで高効率に沈殿化することにより、ろ過性を向上させ、クロマトグラフィー工程における生産性を向上させる処理法が求められていた。

課題を解決するための手段

[0020] 本発明者らは、遺伝子組換え体より免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを回収精製する方法として、前記ポリペプチドの宿主やアミノ酸配列の違いによらず、宿主由来の細胞成分、夾雑タンパク、核酸からなる不純物を、より多く且つより大きな粒子サイズで高効率に沈殿化することで、ろ過性を向上させ、クロマトグラフィー工程における生産性を向上させる処理法について鋭意検討を行なった。その結果、驚くべきことに遺伝子組換え体を培養することによって得られた培養液、その培養上清、前記培養液中の菌体の懸濁液、その菌体破碎後液およびその菌体破碎後上清のいずれか一つ以上を酸性条件で加熱処理することにより、該ポリペプチドの活性を保ちつつ、前記の従来法に比べて宿主由来の菌体、夾雑タンパク質やDNAを、より多く且つより大きな粒子サイズで高効率に沈殿化することで、凝集沈殿画分のろ過性が向上するだけでなく、後段のクロマトグラフィー工程における生産性を向上させられるということを発見した。さらに、前記記載の調製法は由来となる宿主やアミノ酸配列の異なる複数の免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドに適用可能なことを発見し、該ポリペプチドの精製プラットフォーム技術の確立に至った。すなわち本発明は、下記の[1]～[7]に関する。

[0021] [1]

下記工程(1)～(3)を含む免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドの精製方法。

(1) 免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを生産する遺伝子組換え体を培養する工程

(2) 下記(a)～(e)のいずれか一つ以上を酸性で加熱処理する工程

- (a) 前記工程 (1) にて得られた培養液
- (b) 前記 (a) の培養液から菌体を除去して得られた培養上清
- (c) 前記 (a) の培養液から培養上清を除去して得られた菌体の懸濁液
- (d) 前記 (c) の菌体を破碎することで得られる菌体破碎後液
- (e) 前記 (d) の菌体破碎後液から菌体を除去した菌体破碎後上清

(3) 沈殿を分離する工程

[0022] [2]

前記工程 (3) の後に沈殿分離後の上清をクロマトグラフィーにより処理する工程を有することを特徴とする前記 [1] に記載の精製方法。

[0023] [3]

前記ポリペプチドが、微生物由来である前記 [1] または [2] に記載の精製方法。

[0024] [4]

前記ポリペプチドが免疫グロブリンの Fc 領域、CH 領域、VH 領域、CL 領域および VL 領域のいずれか一つ以上に結合するポリペプチドである前記 [1] ~ [3] のいずれかに記載の精製方法。

[0025] [5]

前記ポリペプチドが以下の (x) および (y) からなる群より選択されるいずれかのポリペプチドを含有している前記 [1] ~ [4] のいずれかに記載の精製方法。

(x) 配列番号 1 ~ 19 のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(y) 配列番号 1 ~ 19 のいずれかで示されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド。

[0026] [6]

前記遺伝子組換え体が微生物である、前記 [1] ~ [5] のいずれかに記載の精製方法。

[0027] [7]

免疫グロブリンのF c領域、C H領域、V H領域、C L領域およびV L領域のいずれか一つ以上を含むタンパク質の製造方法であって、

前記〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の方法にて免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを製造する工程、

前記ポリペプチドをリガンドとして水不溶性担体に固定化してアフィニティー分離マトリックスを製造する工程、

前記アフィニティー分離マトリックスと、免疫グロブリンのF c領域、C H領域、V H領域、C L領域およびV L領域のいずれか一つ以上を含むタンパク質を含む液体試料とを接触させる工程、および、

アフィニティー分離マトリックスに結合した前記タンパク質を、アフィニティー分離マトリックスから分離する工程を含むことを特徴とする方法。

発明の効果

[0028] 免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを生産する遺伝子組換え体を培養することによって得られた培養液、その培養上清、前記培養液中の菌体の懸濁液、その菌体破碎後液およびその菌体破碎後上清のいずれか1つ以上を酸性条件で加熱処理することにより、従来法に比べてより多くの宿主由来の菌体、夾雑タンパク質やDNAを、より大きな粒子サイズで高効率に沈殿化することで、凝集沈殿画分のろ過性が向上するだけでなく、後段のクロマトグラフィー工程における生産性を向上させられる。

図面の簡単な説明

[0029] [図1]本発明の実施例1に係る、大腸菌由来のSPG・2d菌体破碎後上清の酸性加熱処理後の各サンプルのSDS-PAGEの結果である。

[図2]本発明の実施例1に係る、大腸菌由来のSPG・2d菌体破碎後上清の酸性加熱処理後の各サンプルにおけるSPG・2dの純度である。

[図3]本発明の実施例2に係る、ブレビバチルス由来のSPA・5d培養上清の酸性加熱処理後の各サンプルのSDS-PAGEの結果である。

[図4]本発明の実施例2に係る、ブレビバチルス由来のSPA・5d培養上清の酸性加熱処理後の各サンプルにおけるSPA・5dの純度である。

[図5]本発明の実施例3に係る、ブレビバチルス由来のP P L・5 d培養上清の酸性加熱処理後の各サンプルにおけるP P L・5 dの純度である。

[図6]本発明の実施例4に係る、大腸菌由来のP P L・4 d培養上清の酸性加熱処理後の各サンプルにおけるP P L・4 dの純度である。

[図7]本発明の実施例5に係る、ブレビバチルス由来のS P A・5 d培養上清の酸性加熱処理後の各サンプルの同一条件下でのろ過量である。

[図8]本発明の実施例6に係る、ブレビバチルス由来のS P A・5 d培養上清の酸性加熱処理後液をクロマトグラフィーにて精製した場合のクロマトグラムである。

[図9]本発明の実施例6に係る、ブレビバチルス由来のS P A・5 d培養上清の酸性加熱処理後のサンプルのクロマトグラフィーによる溶出液のS D S - P A G Eの結果である。

発明を実施するための形態

[0030] 本発明は免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを含有する遺伝子組換え体を、下記工程により処理することで、該ポリペプチドの活性を保ちつつ、培養物中に共存する宿主由来の菌体成分、夾雑タンパク質および核酸等から該ポリペプチドを回収精製する方法に関するものである。

[0031] さらに、前記記載の方法は由来となる宿主やアミノ酸配列の異なる複数の免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドに適用可能であるため、複数種類の該ポリペプチドを製造する場合、プロセス開発期間の短縮や精製資材や設備の共通化によるコスト削減が可能となる。

[0032] すなわち本発明を実施するには、該培養物について、(1)～(3)の工程にしたがって処理すれば良い。

[0033] (1) 免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを生産する遺伝子組換え体を培養する工程

(2) 下記(a)～(e)のいずれか一つ以上を酸性条件で加熱処理する工程

(a) 前記工程(1)にて得られた培養液

(b) 前記 (a) の培養液から菌体を除去して得られた培養上清

(c) 前記 (a) の培養液から培養上清を除去して得られた菌体の懸濁液

(d) 前記 (c) の菌体を破碎することで得られる菌体破碎後液

(e) 前記 (d) の菌体破碎後液から菌体を除去した菌体破碎後上清

(3) 沈殿を分離する工程

[0034] 本発明における「免疫グロブリン」は、リンパ球のB細胞が産生する糖タンパク質であり、特定のタンパク質などの分子を認識して結合する働きを持つ。免疫グロブリンは、かかる特定の分子（抗原）に特異的に結合する機能に加えて、他の生体分子や細胞と協同して抗原を含む因子を無毒化・除去する機能も有する。免疫グロブリンは、一般的に「抗体」と呼ばれるが、それはこのような機能に着目した名称である。全ての免疫グロブリンは、基本的には同じ分子構造を有し、軽鎖および重鎖のポリペプチド鎖それぞれ2本ずつからなる“Y”字型の4本鎖構造を基本構造としている。軽鎖（L鎖）には λ 鎖と κ 鎖の2種類があり、すべての免疫グロブリンはこのどちらかを持つ。重鎖（H鎖）には、 γ 鎖、 μ 鎖、 α 鎖、 δ 鎖、 ϵ 鎖という構造の異なる5種類があり、この重鎖の違いによって免疫グロブリンの種類（アイソタイプ）が変わる。免疫グロブリンG（IgG）は、単量体型の免疫グロブリンで、2本の重鎖（ γ 鎖）と2本の軽鎖から構成され、2箇所の抗原結合部位を持っている。

[0035] 免疫グロブリンの“Y”字の下半分の縦棒部分にあたる場所をFc領域と呼び、上半分の“V”字の部分をFab領域と呼ぶ。Fc領域は抗体が抗原に結合した後の反応を惹起するエフェクター機能を有し、Fab領域は抗原と結合する機能を有する。重鎖のFab領域とFc領域はヒンジ部でつながっており、パパイヤに含まれるタンパク分解酵素パパインは、このヒンジ部を分解して2つのFab領域と1つのFc領域に切断する。Fab領域のうち“Y”字の先端に近い部分は、多様な抗原に結合できるようアミノ酸配列に多彩な変化が見られるため可変領域（V領域）と呼ばれている。軽鎖の可

変領域をV L領域、重鎖の可変領域をV H領域と呼ぶ。V領域以外のF a b領域とF c領域は、比較的变化の少ない領域であり定常領域（C領域）と呼ばれる。軽鎖の定常領域をC L領域と呼び、重鎖の定常領域をC H領域と呼ぶが、C H領域はさらにC H 1～C H 3の3つに分けられる。重鎖のF a b領域はV H領域とC H 1からなり、重鎖のF c領域はC H 2とC H 3からなる。ヒンジ部はC H 1とC H 2の間に位置する。

[0036] 本発明方法で精製すべきポリペプチドとは、前記免疫グロブリンのF c領域、C H領域、V H領域、C L領域、V L領域のいずれか一つ以上に結合するポリペプチドであれば特に限定はされない。このようなポリペプチドとして、例えば配列番号1～5のアミノ酸配列を有する、プロテインAの免疫グロブリン結合ドメインであるE、D、A、BおよびCドメイン、配列番号6～10のアミノ酸配列を有する、プロテインGの免疫グロブリン結合ドメインであるB 1、B 2ドメインおよびC 1～C 3ドメイン、配列番号11～19のアミノ酸配列を有する、プロテインLの免疫グロブリン結合ドメインであるB 1～B 5ドメインおよびC 1～C 4ドメイン、ならびにそれらの変異体や連結体が挙げられる（Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1983, 80: 697-701; J. Biol. Chem., 1987, 262: 13388-13391; J. Biol. Chem., 1992, 267: 12820-12825; Mol. Microbiol., 1994, 12(6): 911-920）。「変異体」とは、野生型のポリペプチドの配列に対し、アミノ酸レベルで、少なくとも1つ以上の変異が導入されたポリペプチドを言う。変異は、置換、付加、欠失から選択される1以上の変異をいう。変異するアミノ酸の数としては、10以下が好ましく、5以下がより好ましく、4以下、3以下または2以下がより更に好ましい。また、「連結体」とは、免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドあるいはその変異体を直列に連結して得られるポリペプチドである。同じポリペプチドを連結しても良く、異なるポリペプチドを連結しても良い。連結されるポリペプチドの数としては、例えば2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個

、 9 個、 1 0 個が挙げられる。

[0037] 本発明方法で精製すべきポリペプチドは配列番号 1 ～ 1 9 のいずれかで示されるアミノ酸配列を必須的に有するポリペプチドが好ましい。

[0038] 本発明のポリペプチドとは配列番号 1 ～ 1 9 のいずれかで示されるアミノ酸配列との配列同一性が好ましくは 8 0 % 以上、より好ましくは 8 5 % 以上、より好ましくは 9 0 % 以上、より好ましくは 9 5 % 以上、さらに好ましくは 9 8 % 以上であればよい。

[0039] プロテイン A はグラム陽性細菌 *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus*) によって生産される細胞壁タンパク質の 1 種であり、その免疫グロブリン結合ドメイン (E ドメイン、 D ドメイン、 A ドメイン、 B ドメイン、 C ドメイン) は抗体の相補性決定領域 (C D R) 以外の領域に結合することができる。いずれのドメインも、抗体の F c 領域、 F a b 領域、および、 F a b 領域中の特に F v 領域に結合する活性を有する。なお、本発明においてプロテイン A の由来は特に限定されないが、微生物である *Staphylococcus* (*Staphylococcus*) に由来するプロテイン A であることが好ましい。

[0040] プロテイン G は、*Streptococcus* (*Streptococcus*) によって生産される細胞壁タンパク質の 1 種であり、その免疫グロブリン結合ドメイン (B 1、 B 2 ドメインおよび C 1 – C 3 ドメイン) はほとんどの哺乳動物の I g G の F c 領域と結合活性を示し、抗体の F a b 領域にも弱く結合する活性を有する。なお、本発明においてプロテイン G の由来は特に限定されないが、微生物である *Streptococcus* (*Streptococcus* sp.) に由来するプロテイン G であることが好ましい。

[0041] プロテイン L は *Peptostreptococcus magnus* (*Peptostreptococcus magnus*) によって生産されるタンパク質の 1 種であり、その免疫グロブリン結合ドメイン (B 1 – B 5 ドメインおよび C 1 – C 4 ドメイン) は、免疫グロブリンの k 軽鎖 (k 1、 k 3、 k 4) との結合活性を示し、種々の動物種の抗体に結合する。また、一本鎖抗体 (S c

F v) や F a b とともに結合することができる。なお本発明においてプロテイン L の由来は特に限定されないが、微生物であるペプトストレプトコッカス・マグニウス (*Peptostreptococcus magnus*) に由来するプロテイン L であることが好ましい。

[0042] 本発明において「ポリペプチド」とは、ポリペプチド構造を有するあらゆる分子を含むものであって、いわゆる「タンパク質」のみならず、断片化されたものや、ペプチド結合によって他のペプチドが連結されたものも包含されるものとする。また、「ドメイン」とは、タンパク質の高次構造上の単位であり、数十から数百のアミノ酸残基配列から構成され、なんらかの物理化学的または生物化学的な機能を発現するに十分なタンパク質の単位をいう。

[0043] 本発明における遺伝子組換え体とは、免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列をコードする塩基配列、およびその塩基配列に作動可能に連結された宿主で機能しうるプロモーターを含む発現ベクターを宿主となる細胞へ導入した形質転換細胞である。

[0044] 前記宿主とは免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドをコードする DNA を含む発現ベクターにより形質転換され、導入された DNA を発現してポリペプチドを生産することができる微生物であれば、特に制限するものではない。利用可能な微生物としては、例えば、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、バシラス (*Bacillus*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ブレヴィバチルス (*Brevibacillus*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、及びラクトバシラス (*Lactobacillus*) 属など宿主ベクター系の開発されている細菌；ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属及びストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属など宿主ベクター系の開発されている放線菌；サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、クライベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属、シゾサッカロマイセ

ス (*Schizosaccharomyces*) 属、チゴサッカロマイセス (*Zygosaccharomyces*) 属、ヤロウイア (*Yarrowia*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、ロドスポリジウム (*Rhodospiridium*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、及びキャンディダ (*Candida*) 属など宿主ベクター系の開発されている酵母；ノイロスポラ (*Neurospora*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、セファロスポリウム (*Cephalosporium*) 属、及びトリコデルマ (*Trichoderma*) 属など宿主ベクター系の開発されているカビなどが挙げられる。また、微生物以外でも、植物、動物において様々な宿主・ベクター系が開発されており、特にCHO (*Chinese Hamster Ovary*) 細胞、蚕などの昆虫 (*Nature*, 315, 592-594 (1985))、菜種、トウモロコシ、ジャガイモなどの植物中に大量に異種タンパク質を発現させる系が開発されており、好適に利用できる。これらのうち、導入及び発現効率から細菌および酵母が好ましく、エシェリヒア (*Escherichia*) 属またはブレヴィバチルス (*Brevibacillus*) 属細菌またはピキア (*Pichia*) 属酵母が特に好ましい。

[0045] 遺伝子を挿入するための発現ベクターは、宿主中で自律複製可能なものであれば特に限定されず、プラスミドDNAやファージDNAをベクターとして用いることができる。遺伝子を挿入するためのベクターは、例えば、大腸菌を宿主として用いる場合には、pQE系ベクター（キアゲン社製）、pET系ベクター（メルク社製）、および、pGEX系ベクター（GEヘルスケア・ジャパン（株）製）のベクターなどが挙げられる。ブレヴィバチルス属細菌を宿主として用いる場合には、例えば、枯草菌ベクターとして公知であるpUB110、または、pHY500（特開平2-31682号公報）、pNY700（特開平4-278091号公報）、pNU211R2L5（特開平7-170984号公報）、pHT210（特開平6-133782号公報）、または、大腸菌とブレヴィバチルス属細菌とのシャトルベクターであ

る pNCMO2（特開2002-238569号公報）などを使用することができる。ピキア属酵母を宿主として用いる場合には pPICHOLI、pHIP、pHRP、pHARSなどが挙げられるが、特にこれらに限定されるものではない。

[0046] 宿主細胞へのベクターの導入方法としては、例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、アグロバクテリウム感染法、パーティクルガン法、または、ポリエチレングリコール法などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、得られた遺伝子の機能を宿主で発現する方法としては、本発明で得られた遺伝子をゲノム（染色体）に組み込む方法なども挙げられる。

[0047] 前記遺伝子組換え体を用いて目的のポリペプチドを製造する場合、遺伝子組換え体を培地で培養し、培養菌体中（菌体ペリプラズム領域中も含む）、または、培養液中（菌体外）に目的のポリペプチドを生成蓄積させることにより製造することができ、該培養物から所望のポリペプチドを採取することができる。

[0048] 遺伝子組換え体を用いてポリペプチドを製造する場合には、遺伝子組換え体の細胞内および／またはペリプラズム領域内にポリペプチドを蓄積することも可能である。この場合、細胞内に蓄積すると、ポリペプチドの酸化を防ぐことができ、培地成分との副反応もない点で有利であり、ペリプラズム領域内に蓄積すると、細胞内プロテアーゼによる分解を抑えることができる点で有利である。一方、ポリペプチドを製造する場合に、形質転換体の細胞外にポリペプチドを分泌することも可能である。この場合、菌体破碎や抽出の工程が不要となるため、製造コストが抑えられる点で有利である。

[0049] 前記工程（1）の遺伝子組換え体を培地で培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。得られた形質転換体の培養に用いる培地は、目的のポリペプチドを高効率、高収量で生産できるものであれば特に制限は無い。具体的には、グルコース、蔗糖、グリセロール、ポリペプトン、肉エキス、酵母エキス、カザミノ酸などの炭素源や窒素源を含む培地

を使用することが出来る。その他、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マグネシウム塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩等の無機塩類が必要に応じて添加される。栄養要求性の宿主細胞を用いる場合は、生育に要求される栄養物質を添加すればよい。また、必要であればペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、ネオマイシンなどの抗生物質が添加されてもよい。

[0050] さらに、菌体内外に存在する宿主由来のプロテアーゼによる当該目的ポリペプチドの分解、低分子化を抑えるために、公知の各種プロテアーゼ阻害剤、すなわち、Phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF)、Benzamidine、4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride (AEBSF)、Antipain、Chymostatin、Leupeptin、Pepstatin A、Phosphoramidon、Aprotinin、Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)、および／または、その他市販されているプロテアーゼ阻害剤を適当な濃度で添加してもよい。

[0051] さらに、本発明の目的ポリペプチドを正しくフォールディングさせるために、例えば、GroEL/ES、Hsp70/DnaK、Hsp90、Hsp104/CipBなどの分子シャペロンを利用してもよい。この場合、例えば、共発現、または、融合タンパク質化などの手法で、本発明の目的ポリペプチドと共存させることができる。なお、本発明の目的ポリペプチドの正しいフォールディングを目的とする場合には、正しいフォールディングを助長する添加剤を培地中に加える、および、低温にて培養するなどの手法もあるが、これらに限定されるものではない。

[0052] 大腸菌を宿主として得られた形質転換細胞を培養する培地としては、例えば、LB培地（トリプトン 1%、酵母エキス 0.5%、NaCl 1%）、または、2×YT培地（トリプトン 1.6%、酵母エキス 1.0%、NaCl 0.5%）等が挙げられる。

[0053] ブレヴィバチルス属細菌を宿主として得られた形質転換体を培養する培地と

しては、例えば、TM培地（ペプトン 1%、肉エキス 0.5%、酵母エキス 0.2%、グルコース 1%、pH 7.0）、または、2SL培地（ペプトン 4%、酵母エキス 0.5%、グルコース 2%、pH 7.2）等が挙げられる。

[0054] ピキア属酵母を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えば、YPD培地（1% yeast extract bacto (Difco社製)、2% tryptone bacto (Difco社製)、2% glucose）等が挙げられる。

[0055] また、培養温度は、15～42℃、好ましくは20～37℃で、通気攪拌条件で好氣的に数時間～数日培養することにより本発明の目的ポリペプチドを、培養細胞内（ペリプラズム領域内を含む）、または、培養溶液（細胞外）に蓄積させて回収する。場合によっては、通気を遮断し嫌氣的に培養してもよい。

[0056] 前記工程（2）－（a）における「培養液」とは、前記工程（1）にて得られた培養液をそのまま用いても良いし、リゾスタフィンまたはリゾチームあるいはリチケースといった酵素や、非イオン性、陰イオン性、陽イオン性、両イオン性の界面活性剤を添加しても良いが、この方法に限定されるものではない。

[0057] 前記工程（2）－（b）における「培養上清」は、目的ポリペプチドが培養溶液（細胞外）に蓄積している場合に用いる。前記工程（2）－（c）における「菌体の懸濁液」は、目的ポリペプチドが培養細胞内（ペリプラズム領域内を含む）に蓄積している場合に用いる。前記工程（2）－（b）または（2）－（c）において、前記工程（1）にて得られた培養液から菌体または培養上清を分離除去する方法としては、以下の方法に限られるものではないが、培養終了後に、培養液を静置または遠心分離したのちに培養上清を回収することで菌体と分離することができる。また、該培養液をデッドエンドろ過またはクロスフローろ過のいずれかのろ過方式にて処理することによっても分離することができる。また、該培養液をアコースティックウェーブ

セパレーションによって処理することで、分離することもできる。さらに、前記デッドエンドろ過、クロスフローろ過、アコースティックウェーブセパレーションによる処理は該培養液を遠心分離した後に行なっても良いし、該培養液をそのまま用いても良い。

[0058] 前記デッドエンドろ過とはフィード溶液がメンブレンに対して垂直に移動するろ過方式であり、ろ液はメンブレンを通過する。デッドエンドろ過により、前記菌体と培養上清を分離する方法としては、ボトルトップフィルターや遠心式フィルターユニットを用いた該培養液の精密ろ過または限外ろ過が挙げられるが、この方法に限定されるものではない。

[0059] 前記クロスフローろ過とは、フィード溶液が膜表面に平行に移動するろ過方式であり、ろ液はメンブレンを通過する。クロスフローろ過により、前記菌体と培養上清を分離する方法としては、カセットメンブレンあるいは中空子を用いた該培養液の精密ろ過または限外ろ過が挙げられるが、この方法に限定されるものではない。

[0060] 前記、アコースティックウェーブセパレーションによる処理とは、フィード溶液に定在波を照射することにより、定在波の節の位置に不溶物を集め、沈降させることで、フィード溶液中の不溶物と上清を分離する方法である。アコースティックウェーブセパレーションにより、前記菌体と培養上清を分離する方法としては、アコースティックウェーブセパレーターによって該培養液を処理する方法が挙げられるが、この方法に限定されるものではない。

[0061] 前記デッドエンドろ過を行なう場合のボトルトップフィルターとしては、Nalgene Rapid-Flow PES 膜付き滅菌ディスポーザブルボトルトップフィルター 0.45 μm (Thermo Scientific 社)

Nalgene Rapid-Flow PES 膜付き滅菌ディスポーザブルボトルトップフィルター 0.2 μm (Thermo Scientific 社)

IWAKI ボトルトップフィルター500mL PES 0.22 μm

33口径 (AGCテクノグラス・IWAKI社)

Bottle top vacuum filter 0.22 μ m (Corning社)

Bottle top vacuum filter 0.45 μ m (Corning社)

が挙げられるが、これらに限定されない。

[0062] 前記デッドエンドろ過を行なう場合の遠心式フィルターユニットとしては

、

Vivaspin 20-3K (GE Healthcare Life Sciences社)

Vivaspin 20-5K (GE Healthcare Life Sciences社)

Vivaspin 20-10K (GE Healthcare Life Sciences社)

Vivaspin 20-30K (GE Healthcare Life Sciences社)

Vivaspin 20-50K (GE Healthcare Life Sciences社)

Vivaspin 20-100K (GE Healthcare Life Sciences社)

Amicon Ultra-15 3kDa (MERK MILLIPORE社)

Amicon Ultra-15 10kDa (MERK MILLIPORE社)

Amicon Ultra-15 30kDa (MERK MILLIPORE社)

Amicon Ultra-15 50kDa (MERK MILLIPORE社)

Amicon Ultra-15 100kDa (MERK MILLIPORE社)

が挙げられるが、これらに限定されない。

[0063] 前記クロスフローろ過を行なう場合のカセットメンブレンとしては、

PelliconXL 50 精密ろ過モジュール 0.65 μm (MERK MILLIPORE社)

PelliconXL 50 精密ろ過モジュール 0.22 μm (MERK MILLIPORE社)

PelliconXL 50 精密ろ過モジュール 0.45 μm (MERK MILLIPORE社)

PelliconXL 50 精密ろ過モジュール 0.10 μm (MERK MILLIPORE社)

Kvick Start 50 cm^2 , 5 KD, PES (GE Healthcare Life Sciences社)

Kvick Start 50 cm^2 , 10 KD, PES (GE Healthcare Life Sciences社)

Kvick Start 50 cm^2 , 30 KD, PES (GE Healthcare Life Sciences社)

Kvick Start 50 cm^2 , 50 KD, PES (GE Healthcare Life Sciences社)

Kvick Start 50 cm^2 , 100 KD, PES (GE Healthcare Life Sciences社)

Pellicon2 Cassette-Biomax^(R) Hydrophilic Polyethersulfone Membrane・A Screen 5kDa (MERK MILLIPORE社)

Pellicon2 Cassette-Biomax^(R) Hydrophilic Polyethersulfone Membrane・A Screen 8kDa (MERK MILLIPORE社)

Pellicon2 Cassette-Biomax^(R) Hydrophilic Polyethersulfone Membrane・A Screen 10kDa (MERK MILLIPORE社)

Pellicon2 Cassette-Biomax^(R) Hydrophilic Polyethersulfone Membrane・A Screen 30kDa (MERK MILLIPORE社)

Pellicon2 Cassette-Biomax^(R) Hydrophilic Polyethersulfone Membrane・A Screen 50kDa (MERK MILLIPORE社)

Pellicon2 Cassette-Biomax^(R) Hydrophilic Polyethersulfone Membrane・A Screen 100kDa (MERK MILLIPORE社)

が挙げられるが、これらに限定されない。

[0064] 前記クロスフローろ過を行なう場合のホロファイバーとしては、

MidGee Cartridge, 0.1 micron (GE Healthcare Life Sciences社)

MidGee Cartridge, 0.2 micron (GE Healthcare Life Sciences社)

MidGee Cartridge, 0.45 micron (GE Healthcare Life Sciences社)

MidGee Cartridge, 0.65 micron (GE Healthcare Life Sciences社)

MidGee Cartridge, 1 kD (GE Healthcare Life Sciences社)

MidGee Cartridge, 3 kD (GE Healthcare Life Sciences社)

MidGee Cartridge, 10 kD (GE Healthcare Life Sciences社)

MidGee Cartridge, 30 kD (GE Healthcare Life Sciences社)

MidGee Cartridge, 50 kD (GE Healthcare Life Sciences社)

MidGee Cartridge, 100 kD (GE Healthcare Life Sciences社)

が挙げられるが、これらに限定されない。

[0065] 前記、アコースティックウェーブセパレーターとしては、
ケイデンス Acoustic Separator (PALL社)

が挙げられるが、これに限定されない。

[0066] 前記工程(2)－(b)における培養上清とは、宿主より分泌生産された免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを含む溶液である。前記工程(1)にて得られた培養液から菌体を取り除いた培養上清をそのまま用いても良いし、酸、アルカリ等で中性にpH調整しても良いし、中性バッファーで希釈しても良い。この時に用いる酸としては、ギ酸、酢酸、リン酸、塩酸、硝酸、硫酸などが挙げられ、アルカリとしては、水酸化ナトリウム、アンモニア、酢酸Na等が挙げられるが、該ポリペプチドの免疫結合活性を失わせることなくpH調整できるものであればこれらに限定されるものではない。また、中性バッファーとしては該ポリペプチドが免疫グロブリン結合活性を失うことの無い緩衝液であれば特に限定されないが、例えば酢酸－酢酸Na緩衝液やリン酸Na緩衝液、リン酸K緩衝液、トリス－塩酸緩衝液、HEPES緩衝液、MES緩衝液、MOPS緩衝液等を用いればよい。

[0067] 前記工程(2)－(c)における菌体の懸濁液は、培養細胞内（ペリプラズム領域内を含む）に蓄積された免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを含む懸濁液であり、前記工程(1)にて得られた培養液から培養上清を取り除いた菌体を中性バッファーで懸濁したものであっても良いし水で希釈後、酸やアルカリで中性にpH調整しても良い。この時に用いる酸としては、ギ酸、酢酸、リン酸、塩酸、硝酸、硫酸などが挙げられ、アルカリとし

ては、水酸化ナトリウム、アンモニア、酢酸Na等が挙げられるが、該ポリペプチドの免疫結合活性を失わせることなくpH調整できるものであればこれらに限定されるものではない。また、中性バッファーとしては該ポリペプチドが免疫グロブリン結合活性を失うことの無い緩衝液であれば特に限定されないが、例えば酢酸-酢酸Na緩衝液やリン酸Na緩衝液、リン酸K緩衝液、トリス緩衝液、HEPES緩衝液、MES緩衝液、MOPS緩衝液等を用いればよい。

[0068] 前記工程(2)-(d)における菌体破碎後液とは、前記工程(2)-(c)の菌体の懸濁液中の菌体を破碎することで得られた懸濁液のことである。菌体は完全に破碎されている必要はなく、例えば、ペリプラズム領域に該ポリペプチドが蓄積している場合は、外膜を部分的に破壊して得られた懸濁液も菌体破碎後液に含まれる。ここで、菌体破碎の方法としては特に限定されないが、懸濁液中の菌体が十分に破碎されるものであれば良く、例えば浸透圧ショック法、凍結融解法、界面活性剤による破碎法、酵素消化法、超音波処理法、フレンチプレス法、乳鉢による粉碎法、ホモジナイザーによる破碎法、ガラスビーズによる破碎法、サンプル破碎キットによる破碎法等が挙げられ、より好ましくは超音波処理法、ホモジナイザーによる破碎法であれば懸濁液中の菌体を十分に破碎できる。

[0069] 前記工程(2)-(e)における菌体破碎後上清とは、前記工程(2)-(d)の菌体破碎後液から不溶性沈殿物を除去した上清のことである。不溶性沈殿の除去方法としては前記工程(1)にて得られた培養液から培養上清あるいは菌体を分離する方法と同様の方法を用いることができるが、これに限定されない。

[0070] 前記工程(2)における酸性条件は宿主となる微生物の菌体成分および細胞質内またはペリプラズムまたは細胞外に生産された宿主由来の夾雑タンパク質および核酸が特異的に沈殿する範囲であればよく、好ましくはpH3.0~6.0、より好ましくはpH3.2~5.9、より好ましくはpH3.4~5.8、より好ましくはpH3.6~5.7、より好ましくはpH3.

8～5.6であれば良い。

[0071] 前記工程（２）において前記工程（１）にて得られた免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを含む培養液、その培養上清、前記培養液中の菌体の懸濁液、その菌体破碎後液およびその菌体破碎後上清のいずれか一つ以上のpHを調整するための酸やアルカリとしては該ポリペプチドの免疫結合活性を失わせることなくpH調整できるものであればこれらに限定されるものではないが、酸としては、ギ酸、酢酸、リン酸、塩酸、硝酸、硫酸などが挙げられ、アルカリとしては、水酸化ナトリウム、アンモニア、酢酸Na等が挙げられる。また、pH調整する方法としては、前記培養液、前記培養上清、前記菌体の懸濁液、前記菌体破碎後液または前記菌体破碎後上清をプラスチックボトル中で均一に攪拌しながらpHメーターやpH試験紙でpHをモニタリングし、水で5Mに希釈した酢酸溶液をピペットを用いて滴下する方法が挙げられるが、これに限定されるものではない。また前記pH調整は安全上の観点から温度調節を行う前に行なうことが好ましいが、温度調節中または温度調節後に行うこともできる。

[0072] 前記工程（２）における温度は宿主となる微生物の細胞質内またはペリプラズムまたは細胞外に生産された宿主由来の夾雑タンパク質が特異的に沈殿する範囲であればよく、温度は好ましくは50℃～70℃、より好ましくは51℃～69℃、より好ましくは52℃～68℃、より好ましくは53℃～67℃、より好ましくは54℃～66℃、さらに好ましくは55℃～65℃の範囲であれば良い。また、温度調節の方法としては以下の方法に限られるものではないが、温度調節機器によって前記温度範囲内に保った水浴に前記pH調整後の免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを含む培養液または培養上清、菌体の懸濁液またはその菌体破碎後液もしくはその菌体破碎後上清を含んだプラスチックボトルを入れ、均一に攪拌しながら温度計で該溶液内の温度が前記温度範囲内に達するまでモニタリングする方法が挙げられる。また温度調節は安全上の観点からpH調整後に行なうことが好ましいが、pH調整前またはpH調整中に行なうこともできる。

- [0073] 前記工程（２）において酸性で加熱処理する方法としては、温度調節機器によって前記温度範囲内に保った水浴により前記ｐＨおよび温度調整後の免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを含む培養液、その培養上清、前記培養液中の菌体の懸濁液、その菌体破碎後液およびその菌体破碎後上清のいずれか一つ以上を均一に攪拌しながら３０分から１時間処理し、その後、水浴の温度を２５℃とすることで、該溶液の温度を２５℃まで低下させる方法が挙げられるが、これに限定されない。
- [0074] 前記工程（３）における沈殿を分離する工程とは、前記工程（２）の酸性加熱処理により生じた夾雑タンパク質などの沈殿を分離する工程であり、宿主由来の細胞成分、夾雑タンパク質および核酸からなる沈殿と免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを含む上清を分離できる方法であれば、特に限定されないが、前記工程（１）にて得られた培養液から培養上清あるいは菌体を分離する方法と同様の方法にて分離することができる。
- [0075] 前記工程（３）の後に、クロマトグラフィーにより、目的ポリペプチドを含む上清から目的ポリペプチドを精製しても良い。使用するクロマトグラフィー担体としては、前記（１）～（３）の工程後の上清から免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを回収精製できる方法であれば特に限定されないが、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、疎水クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ミックスモードクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーといったクロマトグラフィー担体が挙げられ、これらを単独で使用しても良いし、組み合わせて使用しても良い。また、酸性加熱処理後の該ポリペプチドを含む溶液をｐＨ調整等することなくそのまま負荷できるという利点から、特に陽イオン交換クロマトグラフィー、ミックスモードクロマトグラフィーが好ましく、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いるとさらに良い。
- [0076] 前記陰イオン交換クロマトグラフィーに用いられる陰イオン交換樹脂は、陰イオン交換作用を示すものであれば限定されない。陰イオン交換樹脂としては、

Capt Q (GE Healthcare Life Sciences社)

Capt DEAE (GE Healthcare Life Sciences社) Capt Q ImpRes (GE Healthcare Life Sciences社)

Q Sepharose High Performance (GE Healthcare Life Sciences社)

RESOURCE Q (GE Healthcare Life Sciences社)

SOURCE 30Q (GE Healthcare Life Sciences社)

YMC BioPro Q (YMC社)

YMC BioPro DA (YMC社)

TOYOPEARL SuperQ-650 (TOSOH社)

TOYOPEARL GigaCapQ-650 (TOSOH社)

TOYOPEARL DEAE-650 (TOSOH社)

TOYOPEARL GigaCap DEAE-650 (TOSOH社)

Cellufine MAX Q-r (JNC社)

Cellufine MAX Q-h (JNC社)

Cellufine MAX DEAE (JNC社)

などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0077] 前記陽イオン交換クロマトグラフィーに用いられる陽イオン交換樹脂は、陽イオン交換作用を示すものであれば限定されない。陽イオン交換樹脂としては、

Capt S (GE Healthcare Life Sciences社)

Capt SP ImpRes (GE Healthcare Life

Sciences社)
SP Sepharose High Performance (GE Healthcare Life Sciences社)
RESOURCE S (GE Healthcare Life Sciences社)
SOURCE 30S (GE Healthcare Life Sciences社)
YMC BioPro S (YMC社)
YMC BioPro CM (YMC社)
TOYOPEARL SP-650 (TOSOH社)
TOYOPEARL GigaCap S-650 (TOSOH社)
TOYOPEARL CM-650 (TOSOH社)
TOYOPEARL GigaCap CM-650 (TOSOH社)
Cellufine MAX S-r (JNC社)
Cellufine MAX S-h (JNC社)
Cellufine MAX CM (JNC社)

などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0078] 前記疎水クロマトグラフィーに用いられる疎水クロマトグラフィー樹脂は、疎水相互作用を示すものであれば限定されない。疎水クロマトグラフィー樹脂としては、

Phenyl Sepharose High Performance (GE Healthcare Life Sciences社)
Butyl Sepharose High Performance (GE Healthcare Life Sciences社)
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences社)
Butyl Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences社)

Octyl Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences社)

Buthyl Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences社)

Macro-Prep HIC (Bio-Rad Laboratories 社)

TOYOPEARL Ethyl-650 (TOSOH社)

TOYOPEARL PPG-650 (TOSOH社)

TOYOPEARL Phenyl-650 (TOSOH社)

TOYOPEARL Butyl-650 (TOSOH社)

Cellufine MAX Phenyl (JNC社)

Cellufine MAX Butyl (JNC社)

Cellufine MAX Phenyl LS (JNC社)

などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0079] また、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー樹脂としては、

Ceramic Hydroxyapatite (Bio-Rad Laboratories 社)

Ceramic Fluoroapatite (Bio-Rad Laboratories 社)

MPC Ceramic HydroxyFluoroapatite (Bio-Rad Laboratories 社)

HA Ultrogel (PALL社)

などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0080] また、ミックスモードクロマトグラフィー樹脂としては、

Capt MMC (GE Healthcare Life Sciences社)

Capt Adhere (GE Healthcare Life Sciences社)

Eshumuno HCX (Merck Millipore社)

などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0081] また、アフィニティークロマトグラフィー樹脂としては、

IgG Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences社)

などが挙げられるが、これに限定されない。

[0082] 本発明の精製方法により精製した免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドは、免疫グロブリンのFc領域、CH領域、VH領域、CL領域およびVL領域のいずれか一つ以上に結合親和性を有することを特徴とするアフィニティリガンドとして利用することができる。即ち、当該ポリペプチドをリガンドとして水不溶性担体に固定化したアフィニティ分離マトリックスを利用して、免疫グロブリンをアフィニティカラムクロマトグラフィー精製法により分離精製することが可能となる。

[0083] 前記ポリペプチドを、水不溶性の基材からなる担体にアフィニティリガンドとして固定化して、アフィニティ分離マトリックスを製造することができる。ここで、「アフィニティリガンド」とは、抗原と抗体の結合に代表される、特異的な分子間の親和力に基づいて、ある分子の集合から目的の分子を選択的に捕集（結合）する物質（官能基）を指す用語であり、本発明においては、免疫グロブリンに対して特異的に結合するタンパク質を指す。本明細書においては、単に「リガンド」と表記した場合も、「アフィニティリガンド」と同意である。

[0084] 本発明に用いる水不溶性の基材からなる担体としては、ガラスビーズ、シリカゲルなどの無機担体、架橋ポリビニルアルコール、架橋ポリアクリレート、架橋ポリアクリルアミド、架橋ポリスチレンなどの合成高分子や、結晶性セルロース、架橋セルロース、架橋アガロース、架橋デキストランなどの多糖類からなる有機担体、さらにはこれらの組み合わせによって得られる有機-有機、有機-無機などの複合担体などが挙げられる。市販品としては、多孔質セルロースゲルであるGCL2000、アリルデキストランとメチレ

ンビスアクリルアミドを共有結合で架橋した *Sephacryl S-100*、メタクリレート系の担体である *Toyopearl*、アガロース系の架橋担体である *Sephacrose CL4B*、および、セルロース系の架橋担体である *Cellufine* などを例示することができる。ただし、本発明における水不溶性担体は、例示したこれらの担体のみに限定されるものではない。

[0085] また、本発明に用いる水不溶性担体は、本アフィニティー分離マトリックスの使用目的および方法からみて、表面積が大きいことが望ましく、適当な大きさの細孔を多数有する多孔質であることが好ましい。担体の形態としては、ビーズ状、モノリス状、繊維状、膜状（中空糸を含む）などいずれも可能であり、任意の形態を選ぶことができる。

[0086] リガンドの固定化方法については、例えば、リガンドに存在するアミノ基、カルボキシル基、または、チオール基を利用した、従来のカップリング法で担体に結合してよい。カップリング法としては、担体を臭化シアン、エピクロロヒドリン、ジグリシジルエーテル、トシルクロライド、トレシルクロライド、ヒドラジン、および、過ヨウ素酸ナトリウムなどと反応させて担体を活性化し（あるいは担体表面に反応性官能基を導入し）、リガンドとして固定化する化合物とカップリング反応を行い固定化する方法、また、担体とリガンドとして固定化する化合物が存在する系にカルボジイミドのような縮合試薬、または、グルタルアルデヒドのように分子中に複数の官能基を持つ試薬を加えて縮合、架橋することによる固定化方法が挙げられる。

[0087] また、リガンドと担体の間に複数の原子からなるスペーサー分子を導入してもよいし、担体にリガンドを直接固定化してもよい。したがって、固定化のために、本発明の精製方法により精製した免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドに対して、化学修飾してもよいし、固定化に有用なアミノ酸残基を加えてもよい。固定化に有用なアミノ酸としては、側鎖に固定化の化学反応に有用な官能基を有しているアミノ酸が挙げられ、例えば、側鎖にアミノ基を含む *Lys* や、側鎖にチオール基を含む *Cys* が挙げられる。

- [0088] アフィニティー分離マトリックスは、本発明の精製方法により精製した、免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを固定化して得られるので、前記ポリペプチド自体の活性に基づき、免疫グロブリンのF c領域、C H領域、V H領域、C L領域およびV L領域のいずれか一つ以上に結合することができる。よって、本発明の精製方法により精製したポリペプチドおよびアフィニティー分離マトリックスを利用して、免疫グロブリンのF c領域、C H領域、V H領域、C L領域およびV L領域のいずれか一つ以上を含むタンパク質をアフィニティーカラム・クロマトグラフィ精製法により分離精製することが可能となる。「免疫グロブリンのF c領域、C H領域、V H領域、C L領域およびV L領域のいずれか一つ以上を含むタンパク質」とは、前記ポリペプチドが結合するタンパク質のことである。ただし、前記ポリペプチドが結合できれば、F c領域、C H領域、V H領域、C L領域およびV L領域を完全に含むポリペプチドである必要はない。
- [0089] 免疫グロブリンのF c領域、C H領域、V H領域、C L領域およびV L領域のいずれか一つ以上を含むタンパク質としては、免疫グロブリンG、または、免疫グロブリンG誘導体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。
- [0090] 前記「免疫グロブリンG誘導体」とは、例えば、ヒト免疫グロブリンGの一部のドメインを他生物種の免疫グロブリンGのドメインに置き換えて融合させたキメラ型免疫グロブリンGや、ヒト免疫グロブリンGのCDR (Complementarity Determining Regions) 部分を他生物種抗体のCDR部分に置き換えて融合させたヒト型化免疫グロブリンG、F c領域の糖鎖に分子改変を加えた免疫グロブリンG、ヒト免疫グロブリンGのF v領域とF c領域とを融合させた人工免疫グロブリンGなどの、本発明の精製方法にて精製した免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドが結合し得る改変型人工タンパク質を総称する名称である。
- [0091] また、結合する領域をF c領域、C H領域、V H領域、C L領域およびV L領域というように広く定義したが、抗体の立体構造はすでに既知であるの

で、本発明の精製方法により精製した免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドおよびアフィニティー分離マトリックスが結合する対象となるタンパク質は、タンパク質工学的に該ポリペプチドが結合する領域の立体構造を保持した上で、Fc領域、CH領域、VH領域、CL領域およびVL領域にさらなる改変（断片化など）が施されたものであってもよい。

[0092] 免疫グロブリンのFc領域、CH領域、VH領域、CL領域およびVL領域のいずれか一つ以上を含むタンパク質を含む液体試料を、担体に固定化されたリガンドを含むアフィニティー分離マトリックスと接触させ、前記タンパク質をアフィニティー分離マトリックスに吸着させる工程（吸着工程）、および、アフィニティー分離マトリックスに結合した前記タンパク質を、アフィニティー分離マトリックスから分離する工程（溶出工程）により、前記タンパク質を高純度に回収精製できる。

[0093] 免疫グロブリンのFc領域、CH領域、VH領域、CL領域およびVL領域のいずれか一つ以上を含むタンパク質の精製方法の吸着工程では、前記タンパク質を、担体に固定化されたリガンドを含むアフィニティー分離マトリックスと接触させることにより吸着させる。具体的には、前記タンパク質を含有する液体試料を中性となるように調整した後、該液体試料をアフィニティー分離マトリックスを充填したアフィニティーカラムに通過させ、前記タンパク質を吸着させる。液体試料の溶媒としては、緩衝液が好ましい。緩衝液としては、例えば、クエン酸、2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)、Bis-Tris、N-(2-Acetamido)iminodiacetic acid (ADA)、Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES)、N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid (ACES)、3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropanesulfonic acid (MOPSO)、N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid

(BES)、3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS)、N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid (TES)、4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)、Triethanolamine、3-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] propanesulfonic acid (EPPS)、Tricine、Tris、Glycylglycine、もしくはBicine、NTris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acid (TAPS)を含む緩衝液、およびダルベッコリン酸緩衝生理食塩水などの緩衝液が挙げられる。前記タンパク質をアフィニティー分離マトリックスに吸着させる際のpHは、pH6.5～8.5であることが好ましく、pH7～8であることがより好ましい。前記タンパク質をアフィニティー分離マトリックスに吸着させる際の温度は、1～40℃であることが好ましく、4～25℃であることがより好ましい。

[0094] 吸着工程に次いで、アフィニティーカラムに純粋な緩衝液を適量通過させ、カラム内部を洗浄してもよい。この時点では免疫グロブリンのFc領域、CH領域、VH領域、CL領域およびVL領域のいずれか一つ以上を含むタンパク質はカラム内のアフィニティー分離マトリックスに吸着されている。洗浄のために使用する緩衝液は、吸着工程で使用する緩衝液と同じものを使用できる。

[0095] 免疫グロブリンのFc領域、CH領域、VH領域、CL領域およびVL領域のいずれか一つ以上を含むタンパク質の精製方法の溶出工程では、pH2.7以上の溶出液をアフィニティー分離マトリックスと接触させ、前記タンパク質を溶出させる。溶出液としては、例えば、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、ギ酸緩衝液、プロピオン酸緩衝液、γ-アミノ酪酸緩衝液、乳酸緩衝液が挙げられる。

- [0096] 溶出液のpHは、pH 2.7以上であれば抗体を回収することが可能であるが、より高いpHの溶出液を用いれば抗体の凝集や活性低下を回避できるため好適である。具体的には、pH 3.0以上がより好ましく、pH 3.5、pH 3.75、pH 3.8、pH 3.9以上がさらに好ましく、pH 4.0以上が最も好ましい。溶出液のpHの上限はpH 6.0であることが好ましい。
- [0097] アフィニティー分離マトリックスからの免疫グロブリンのFc領域、CH領域、VH領域、CL領域およびVL領域のいずれか一つ以上を含むタンパク質の溶出には複数のpHの溶出液を用いて段階的に溶出することも可能である。また、pHの異なる2種類以上の溶出液（例えばpH 6とpH 3）を用いたグラジエント溶出でpHに勾配をつけて溶出すれば、より高度に精製できるため、好適である。吸着時、洗浄時、溶出時の緩衝液には界面活性剤（例えば、Tween 20やTriton-X 100）やカオトロップ剤（例えば、尿素やグアニジン）、アミノ酸（例えば、アルギニン）を添加することも可能である。
- [0098] 同様に、免疫グロブリンのFc領域、CH領域、VH領域、CL領域およびVL領域のいずれか一つ以上を含むタンパク質を溶出させる際の、アフィニティー分離マトリックスを充填したアフィニティーカラム内のpHは、pH 2.7以上であることが好ましく、pH 3.0以上であることがより好ましく、pH 3.6、pH 3.75、pH 3.8、pH 3.9以上であることがさらに好ましく、pH 4.0以上であることが最も好ましい。pH 3.0以上の条件で溶出すると、前記タンパク質へのダメージを低減できる（*Biotechnology and bioengineering.*, 2005, 92(6): 665-673）。また、前記タンパク質を溶出させる際の、アフィニティー分離マトリックスを充填したアフィニティーカラム内のpHの上限はpH 6.0であることが好ましい。
- [0099] 免疫グロブリンのFc領域、CH領域、VH領域、CL領域およびVL領域のいずれか一つ以上を含むタンパク質を溶出する際の温度は、1～40℃

であることが好ましく、4～25℃であることがより好ましい。

[0100] 本発明の精製方法により回収される免疫グロブリンのFc領域、CH領域、VH領域、CL領域およびVL領域のいずれか一つ以上を含むタンパク質の回収率は、90%以上であることが好ましく、95%以上であることがより好ましい。回収率は、例えば、下記式により算出される。

$$\text{回収率 (\%)} = \left[\frac{\{ (\text{溶出した免疫グロブリンのFc領域、CH領域、VH領域、CL領域およびVL領域のいずれか一つ以上を含むタンパク質の濃度 (mg/mL)}) \times (\text{溶出した液量 (mL)}) \}}{\{ (\text{負荷した免疫グロブリンのFc領域、CH領域、VH領域、CL領域およびVL領域のいずれか一つ以上を含むタンパク質の濃度 (mg/mL)}) \times (\text{負荷した液量 (mL)}) \}} \right] \times 100$$

[0101] 本発明の精製方法では、免疫グロブリンのFc領域、CH領域、VH領域、CL領域およびVL領域のいずれか一つ以上を含むタンパク質を発現させるための宿主に由来するタンパク質の混入を低減できる。これらのタンパク質の混入により、抗体の製造における精製工程の負荷増大（工数の増加や収率の低減）や不純物タンパク質が医薬品として重大な副作用をもたらす可能性があるが、本発明の精製方法ではこれらの問題を回避できる。

[0102] 本発明のアフィニティー分離マトリックスは免疫グロブリンのFc領域、CH領域、VH領域、CL領域およびVL領域のいずれか一つ以上を含むタンパク質と宿主由来タンパク質を分離するのに効果的である。宿主細胞タンパク質の由来となる宿主細胞は前記タンパク質を発現できる細胞であり、特に遺伝子組換え技術が確立されているCHO細胞や大腸菌が例として挙げられる。これらの宿主由来タンパク質は、市販のイムノアッセイキットによって定量することが可能である。例えば、CHO HCP ELISAキット（Cygнус社）を用いれば、CHO細胞由来のタンパク質を定量できる。

[0103] 本発明のアフィニティー分離マトリックスは、リガンド化合物や担体の基材が完全に機能を損なわない程度の、適当な強酸性、または、強アルカリ性

の純粋な緩衝液（適当な変性剤、または、有機溶剤を含む溶液の場合もある）を通過させて洗浄することにより、再利用が可能である。

[0104] 本発明の精製方法により精製した免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドおよびアフィニティー分離マトリックスの、免疫グロブリンのFc領域、CH領域、VH領域、CL領域およびVL領域のいずれか一つ以上を含むタンパク質に対する親和性は、例えば、表面プラズモン共鳴原理を用いたBiacoreシステム（GEヘルスケア・ジャパン（株）製）などのバイオセンサーによって試験することができる。本発明のタンパク質が有する免疫グロブリンに対する親和性は、ヒト免疫グロブリンG製剤に対する親和性を後述のBiacoreシステムにより測定した時に、結合定数（ K_A ）が 10^6 （ M^{-1} ）以上であることが好ましく、 10^7 （ M^{-1} ）以上であることがより好ましい。

[0105] 上記親和性の測定条件としては、本発明の精製法にて精製された免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドが免疫グロブリンのFc領域、CH領域、VH領域、CL領域およびVL領域のいずれかに結合した時の結合シグナルが検出できる条件であればよく、温度20～40℃（一定温度）にて、pH6～8の中性条件にて測定することで簡単に評価することができる。

[0106] 結合相手の免疫グロブリン分子としては、例えば、ポリクローナル抗体であるガンマグロブリン・ニチャク（ヒト免疫グロブリンG）（日本製薬）や市販医薬品のモノクローナル抗体が挙げられる。

[0107] 親和性の違いは、同じ測定条件にて、同じ免疫グロブリン分子に対する結合反応曲線を得て、解析した時に得られる結合パラメータにて、変異を導入する前のタンパク質と変異を導入した後のタンパク質とを比較することで当業者が容易に検証することができる。

[0108] 結合パラメータとしては、例えば、結合定数（ K_A ）や解離定数（ K_D ）を用いることができる（永田ら、「生体物質相互作用のリアルタイム解析実験法」、シュプリンガー・フェアラーク東京、1998年、41頁）。本発明で得られたポリペプチドとFabの結合定数は、Biacoreシステムを利

用して、センサーチップにVH3サブファミリーに属する免疫グロブリンのFabフラグメントを固定化して、温度25℃、pH7.4の条件下にて、ポリペプチドを流路添加する実験系で求めることができる。なお、文献によっては結合定数は親和定数と表記されることもあるが、基本的に両者の定義は同じである。

[0109] 本願は、2017年5月2日に出願された日本国特許出願第2017-91607号に基づく優先権の利益を主張するものである。2017年5月2日に出願された日本国特許出願第2017-91607号の明細書の全内容が、本願に参考のため援用される。

実施例

[0110] 以下に実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

本実施では、組換えDNAの作製や操作などは特に断わらない限り下記の実験書に従って実施した。

- ・ T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook 著、「モレキュラー・クローニング／ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning／A Laboratory Manual)」、第2版(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory 刊(米国)

- ・ 村松正實編著「ラボマニュアル遺伝子工学」、第3版(1996)、丸善株式会社刊。

また、本実施例で用いる試薬、制限酵素等については特に明記しない限り、市販品を用いた。

[0111] 参考例1： プロテインGを含む菌体破碎上清の調製

Streptococcus sp. GX7809株が生産する野生型プロテインGの免疫グロブリン結合領域を含むポリペプチドSPG・2d(配列番号20)をコードするDNAの5'末端にNdeI認識サイト、3'末端にXbaI認識サイトを付与したDNA(配列番号21)の人工合成遺

伝子を、外注によって全合成した（ユーロフィンジェノミクス社）。このサブクローニング後の発現プラスミドを、制限酵素NdeIおよびXbaI（タカラバイオ社）で消化し、取得したDNA断片を、同じ制限酵素で消化したベクターpUCSNT（国際特許公報WO94/03613）へライゲーションし、SPG・2dのアミノ酸配列をコードするDNAがベクターpUCSNTに挿入された発現プラスミドを調製した。

Escherichia coli HB101株（タカラバイオ社）を得られたプラスミドで形質転換し、SPG・2dを生産する遺伝子組換え体を育種した。この遺伝子組換え体を100μg/mLのアンピシリンを含む50mLの2YT培地（ポリペプトン 1.6%、酵母エキス 1.0%、塩化ナトリウム 0.5%）にて、37℃で24時間、振盪培養した。培養後、培養液から遠心分離（15,000rpm、25℃、5分間）により培養上清を除去し、菌体を10mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）に懸濁し、超音波破碎機により菌体破碎した。遠心分離により、沈殿を除去し、SPG・2dの菌体破碎上清を得た。

[0112] 参考例2： プロテインAを含む培養上清の調製

Staphylococcus aureus CowanI株（ATCC12598）が生産する野生型プロテインAの免疫グロブリン結合領域（E・D・A・B・Cドメイン）を含むポリペプチドSPA・5d（配列番号22）をコードするDNAの5'末端にNcoI認識サイト、3'末端にBamHI認識サイトを付与したDNA（配列番号23）の人工合成遺伝子を、外注によって全合成した（ユーロフィンジェノミクス社）。このサブクローニング後の発現プラスミドを、制限酵素NcoIおよびBamHI（タカラバイオ社）で消化し、取得したDNA断片を、同じ制限酵素で消化したブレビバチルス発現用ベクターpNCMO2（タカラバイオ社）へライゲーションし、SPA・5dのアミノ酸配列をコードするDNAがブレビバチルス発現用ベクターpNCMO2に挿入された発現プラスミドを調製した。なお、プラスミドの調製には*Escherichia coli* JM109株

を用いた。

Brevibacillus choshinensis SP3株（タカラバイオ社）を得られたプラスミドで形質転換し、SPA・5dを分泌生産する遺伝子組換え体を育種した。この遺伝子組換え体を60 μ g/mLのネオマイシンを含む30mLのA培地（ポリペプトン 3.0%、酵母エキス 0.5%、グルコース 3%、硫酸マグネシウム 0.01%、硫酸鉄 0.001%、塩化マンガン 0.001%、塩化亜鉛 0.0001%）にて、30℃で3日間の振盪培養を行った。培養後、培養液から遠心分離（15,000rpm、25℃、5分間）により菌体を除去し、SPA・5dの培養上清を得た。

[0113] 参考例3： プロテインLを含む培養上清の調製

Peptostreptococcus magnus 312株由来株が生産する野生型プロテインLの免疫グロブリン結合領域を含むポリペプチドPPL・5d（配列番号24）をコードするDNAの5'末端にPstI認識サイト、3'末端にXbaI認識サイトを付与したDNA（配列番号25）の人工合成遺伝子を、外注によって全合成した（ユーロフィンジェノミクス社）。このサブクローニング後の発現プラスミドを、制限酵素PstIおよびXbaI（タカラバイオ社）で消化し、取得したDNA断片を、同じ制限酵素で消化したブレビバチルス発現用ベクターpNCMO2（タカラバイオ社）へライゲーションし、PPL・5dのアミノ酸配列をコードするDNAがブレビバチルス発現用ベクターpNCMO2に挿入された発現プラスミドを調製した。なお、プラスミドの調製には*Escherichia coli* JM109株を用いた。

Brevibacillus choshinensis SP3株（タカラバイオ社）を得られたプラスミドで形質転換し、PPL・5dを分泌生産する遺伝子組換え体を育種した。この遺伝子組換え体を参考例3と同様に培養、菌体分離し、PPL・5dの培養上清を得た。

[0114] 参考例4： プロテインLを含む菌体破碎後液の調製

Peptostreptococcus magnus 3316株が生産する野生型プロテインLの抗体結合領域を含むポリペプチドPPL・4d（配列番号26）をコードするDNAの5'末端にNdeI認識サイト、3'末端にPstI認識サイトを付与したDNA（配列番号27）の人工合成遺伝子を、外注によって全合成した（ユーロフィンジェノミクス社）。このサブクローニング後の発現プラスミドを、制限酵素NdeIおよびPstI（タカラバイオ社）で消化し、取得したDNA断片を、同じ制限酵素で消化したベクターpUCSNT（国際特許公報WO94/03613）へライゲーションし、PPL・4dのアミノ酸配列をコードするDNAがベクターpUCSNTに挿入された発現プラスミドを調製した。

Escherichia coli HB101株（タカラバイオ社）を得られたプラスミドで形質転換し、PPL・4dを生産する遺伝子組換え体を育種した。この遺伝子組換え体を参考例1と同様に培養、菌体分離、菌体破碎し、PPL・4dの菌体破碎後液を得た。

[0115] 実施例1

（1）SPG・2d菌体破碎上清／大腸菌由来の酸性加熱処理

大腸菌の菌体破碎後上清20mLに水を加え5倍希釈後、フィルターろ過（Thermo Scientific 500mL Rapid-Flow Bottle Top Filter, 0.2μm aPES membrane, 75mm dia, 45mm neck）することで培養上清を得た。この培養上清に10mMとなるよう1M酢酸Naを加え、2.5mLずつ5本の15mL遠沈管に分注し、pHを酢酸によりそれぞれ5.2、5.6、7.0に調整した。これらの溶液を各pHにつき0.5mLずつ4本の1.5mLチューブに分注し、各pHの溶液を25℃、55℃、60℃、65℃の各温度に設定したブロックヒーターにて60分間、加熱処理した。さらに処理後の各サンプルを遠心分離（12000rpm, 5分間）した後上清を回収した。回収した上清を150mMリン酸Na、pH7.0で3倍希釈し、SDSPAGEにて分析した。また、得られた上清中に含まれ

るSPG・2dの純度をデンストメトリー法にて求めた。結果を図1および図2に示す。

[0116] (2) SDS-PAGE

各希釈液20 μ Lを2倍濃縮のサンプル緩衝液（下記参照）にて希釈し、それぞれ40 μ Lのサンプル溶液とした。これをe-パジェルE-R15L（アトー製）15%均一ゲルの各ウェルに10 μ Lずつアプライし、電気泳動を行なった（40mA、90分）。その後、ゲルをBio-Safe CB BB G-250ステイン（バイオラッド）にて染色した。

[0117] 各緩衝液の組成は以下の通り

- ・泳動緩衝液（25mM トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、192mM グリシン、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム）

- ・2倍濃縮サンプル緩衝液（1M Tris-HCl（pH 6.8）12.48mL、ブロモフェノールブルー 0.02g、ドデシル硫酸ナトリウム 4g、グリセロール 28g、超純水 30mL）

[0118] (3) デンストメトリーによる純度の算出

前記操作にて得られたゲルを画像データとし、ImageJ（Broken Symmetry Software、Version 1.4.3.67）にて解析を行なった。ゲルの各レーンにおけるタンパク質由来バンドの全面積に対する目的物バンドの面積の割合を算出することで、各条件における目的物の純度を算出した。

[0119] (4) 結果

図1および図2より、pH7.0にて加熱処理のみを行なった場合、65℃まで加熱しても夾雑タンパク質の量に大きな変化は無く、SPG・2dの純度は47%までしか向上しなかった。また、25℃にて酸性処理のみを行なった場合、pHを5.2まで低下させてもSPG・2dの純度は36%までしか向上しなかった。一方、pHを5.6以下で且つ温度を55℃以上として酸性加熱処理を行なったところ、夾雑タンパク質の大部分が特異的に凝集沈殿し、SPG・2dの純度は86%以上となり、高純度に精製できるこ

とが分かった。以上の結果より、酸性および加熱処理を組み合わせした場合、酸性処理または加熱処理のみを行なう場合に比べ、SPA・2dをより高純度に精製できることが分かる。

[0120] 実施例2

(1) SPA・5d培養上清／ブレビバチルス由来の酸性加熱処理

ブレビバチルスの菌体培養液100mLを遠心分離(7500rpm, 15分間)し、フィルターろ過(Thermo Scientific 500mL Rapid-Flow Bottle Top Filter, 0.2μm PES membrane, 75mm dia, 45mm neck)することで培養上清を得た。この培養上清に10mMとなるよう1M酢酸Naを加え、2.5mLずつ5本の15mLチューブに分注し、pHを酢酸によりそれぞれ4.6、5.0、7.0に調整した。これらの溶液を各pHにつき0.5mLずつ4本の1.5mLチューブに分注し、各pHの溶液を25℃、55℃、60℃、65℃の温度に設定したブロックヒーターにて60分間、加熱処理した。さらに処理後の各サンプルを遠心分離(12000rpm, 5分間)した後に上清を回収した。回収した上清を150mMリン酸Na、pH7.0で2倍希釈し、SDS-PAGEにて分析した。また、得られた上清中に含まれるSPA・5dの純度をデンストメトリー法にて求めた。結果を図3および図4に示す。

[0121] (2) 結果

図3および図4より、pH7.0にて加熱処理のみを行なった場合、65℃まで加熱しても夾雑タンパク質の量に大きな変化は無く、SPA・5dの純度は64%までしか向上しなかった。また、25℃にて酸性処理のみを行なった場合、pHを4.6まで低下させてもSPA・5dの純度は64%までしか向上しなかった。一方、pHを5.0以下、温度を55℃以上として酸性加熱処理を行なったところ、夾雑タンパク質の大部分が特異的に凝集沈殿し、SPA・5dの純度は85%以上となり、高純度に精製できることが分かった。以上の結果より、酸性および加熱処理を組み合わせした場合、酸性

処理または加熱処理のみを行なう場合に比べ、SPA・5dをより高純度に精製できることが分かる。

[0122] 実施例3

(1) PPL・5d培養上清／ブレビバチルス由来の酸性加熱処理

培養上清の調製pHを4.5、7.0とした以外は実施例2に記載の方法にて実験を行なった。デンストメトリーによって求めた各条件におけるPPL・5dの純度を図5に示す。

[0123] (2) 結果

図5より、pH7.0にて加熱処理のみを行なった場合、65℃まで加熱しても夾雑タンパク質の量に大きな変化は無く、PPL・5dの純度は49%までしか向上しなかった。また、25℃にて酸性処理のみを行なった場合、pHを4.5としてもPPL・5dの純度は53%までしか向上しなかった。一方、pHを4.5、温度を55℃以上として酸性加熱処理を行なったところ、夾雑タンパク質の大部分が特異的に凝集沈殿し、PPL・5dの純度は89%以上となり、高純度に精製できることが分かった。以上の結果より、酸性および加熱処理を組み合わせた場合、酸性処理または加熱処理のみを行なう場合に比べ、PPL・5dをより高純度に精製できることが分かる。

[0124] 実施例4

(1) PPL・4d菌体破碎上清／大腸菌由来の酸性加熱処理

処理時の温度を25℃、55℃、65℃、pHを4.8、7.0とし、各条件における処理量を1mLとした以外は、実施例1に記載の方法にて実験を行った。デンストメトリーによって求めた各条件におけるPPL・4dの純度を図6に示す。

[0125] (2) 結果

図6より、pH7.0にて加熱処理のみを行なった場合、65℃まで加熱してもPPL・4dの純度は88%までしか向上しなかった。また、25℃にて酸性処理のみを行なった場合、pHを4.8としてもPPL・4dの純

度は76%までしか向上しなかった。一方、pHを4.8、温度を55℃以上として酸性加熱処理を行なったところ、夾雑タンパク質の大部分が特異的に凝集沈殿し、PPL・4dの純度は最高で99%となり、高純度に精製できることが分かった。以上の結果より、酸性および加熱処理を組み合わせた場合、酸性処理または加熱処理のみを行なう場合に比べ、PPL・4dをより高純度に精製できることが分かる。

[0126] 実施例5

(1) SPA・5d培養上清／ブレビバチルス由来の酸性加熱処理後のフィルターろ過

処理時の温度を25℃、60℃、65℃とし、各条件における処理量を1mLとした以外は、実施例2に記載の方法にて酸性加熱処理を行った。得られた酸性加熱処理液のうち0.8mLを、0.2μmフィルター(0.22μm pore size, 4mm diameter, Millex-GV Durapore^(R) (PVDF) membrane, hydrophilic)を装着した1mLシリンジに投入後、シリンジの押子が止まるまでろ過した。ろ液を1.5mLチューブに受け、ろ過前後のチューブ重量からろ液量を算出した。結果を図7に示す。

[0127] (2) 結果

図7より、加熱処理(pH7.0 60℃、pH7.0 65℃)あるいは酸性処理(25℃ pH4.6、25℃ pH5.0)の場合、ろ過量は0.05gから0.24gであった。それに対して、加熱処理と酸性処理を組み合わせるとろ過量は増大し、65℃ pH4.6、60℃ pH4.6の処理ではそれぞれ0.37g、0.4gとなった。

以上の結果から、酸性処理と加熱処理を組み合わせることによって酸性処理のみの場合に比べ約2倍、加熱処理のみに比べて約8倍も、ろ過量が向上することが分かった。

[0128] 実施例6

(1) 酸性加熱処理後の抗体結合活性を持ったポリペプチドの活性確認

実施例5にて得られた4種の酸性加熱処理液(60℃ pH 4.6、60℃ pH 5.0、65℃ pH 4.6、65℃ pH 5.0)を15mL遠沈管に集め、遠心分離により上清と沈殿に分離した(12000rpm, 5分間)。得られた上清に1Mトリス塩酸pH 8.8を加えてpHを8.0とした。

得られた溶液を、PBSにて平衡化したIgG Sepharose 6FF(クロマトシステム: Akta avant 25 GE Healthcare Life Sciences社、カラム: omnitit 株式会社アイシス、内径6.6mm×高さ6.2cm)に1mL負荷した。その後PBSにて洗浄を行い、5mM酢酸アンモニウム-酢酸バッファー(pH 5.0)により中間洗浄を行った。50mMクエン酸(pH 3.0)により溶出を行い、PBS 2M尿素により洗浄を行った。サンプル負荷、中間洗浄、溶出、洗浄工程のそれぞれにおいて、0.5mLずつ溶出液を分取した。得られた溶出液を実施例1と同様にSDS-PAGEにて分析した。得られたクロマトグラムと溶出液のSDS-PAGEの結果を図8および図9に示す。

[0129] (2) 結果

図8および図9よりSPA・5dはフロースルー画分および押し出し画分には漏出せずにほぼ全て溶出画分に回収できたことが分かった。以上の結果より、SPA・5dは酸性加熱処理後も抗体結合活性を保っていることが分かった。

請求の範囲

- [請求項1] 下記工程（１）～（３）を含む免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドの精製方法。
- （１）免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを生産する遺伝子組換え体を培養する工程
- （２）下記（ａ）～（ｅ）のいずれか一つ以上を酸性で加熱処理する工程
- （ａ）前記工程（１）にて得られた培養液
- （ｂ）前記（ａ）の培養液から菌体を除去して得られた培養上清
- （ｃ）前記（ａ）の培養液から培養上清を除去して得られた菌体の懸濁液
- （ｄ）前記（ｃ）の菌体を破碎することで得られる菌体破碎後液
- （ｅ）前記（ｄ）の菌体破碎後液から菌体を除去した菌体破碎後上清
- （３）沈殿を分離する工程
- [請求項2] 前記工程（３）の後に沈殿分離後の上清をクロマトグラフィーにより処理する工程を有することを特徴とする請求項１に記載の精製方法。
- [請求項3] 前記ポリペプチドが、微生物由来である請求項１または２に記載の精製方法。
- [請求項4] 前記ポリペプチドが免疫グロブリンのF_c領域、C_H領域、V_H領域、C_L領域およびV_L領域のいずれか一つ以上に結合するポリペプチドである請求項１～３のいずれかに記載の精製方法。
- [請求項5] 前記ポリペプチドが以下の（x）および（y）からなる群より選択されるいずれかのポリペプチドを含有している請求項１～４のいずれかに記載の精製方法。
- （x） 配列番号１～１９のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(y) 配列番号 1 ～ 19 のいずれかで示されるアミノ酸配列と 80 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド。

[請求項6] 前記遺伝子組換え体が微生物である、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の精製方法。

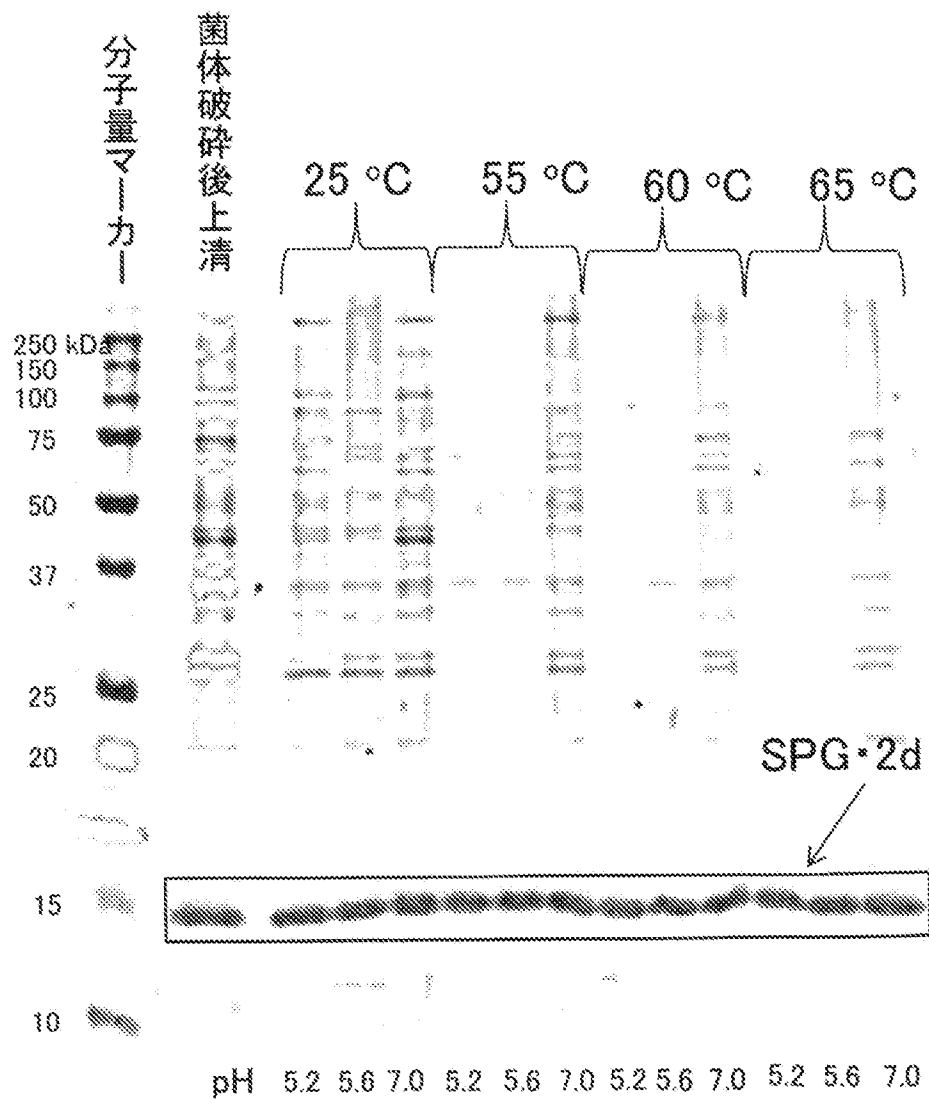
[請求項7] 免疫グロブリンの F c 領域、C H 領域、V H 領域、C L 領域および V L 領域のいずれか一つ以上を含むタンパク質の製造方法であって、
請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法にて免疫グロブリン結合活性を有するポリペプチドを製造する工程、

前記ポリペプチドをリガンドとして水不溶性担体に固定化してアフィニティー分離マトリックスを製造する工程、

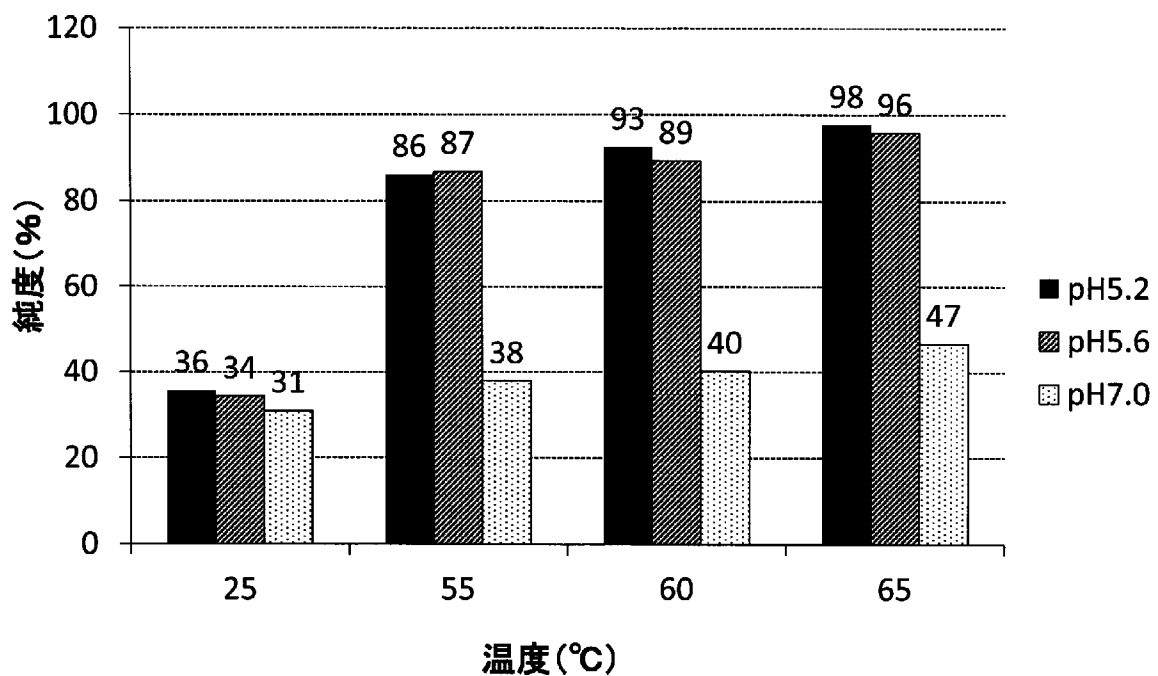
前記アフィニティー分離マトリックスと、免疫グロブリンの F c 領域、C H 領域、V H 領域、C L 領域および V L 領域のいずれか一つ以上を含むタンパク質を含む液体試料とを接触させる工程、および、

アフィニティー分離マトリックスに結合した前記タンパク質を、アフィニティー分離マトリックスから分離する工程を含むことを特徴とする方法。

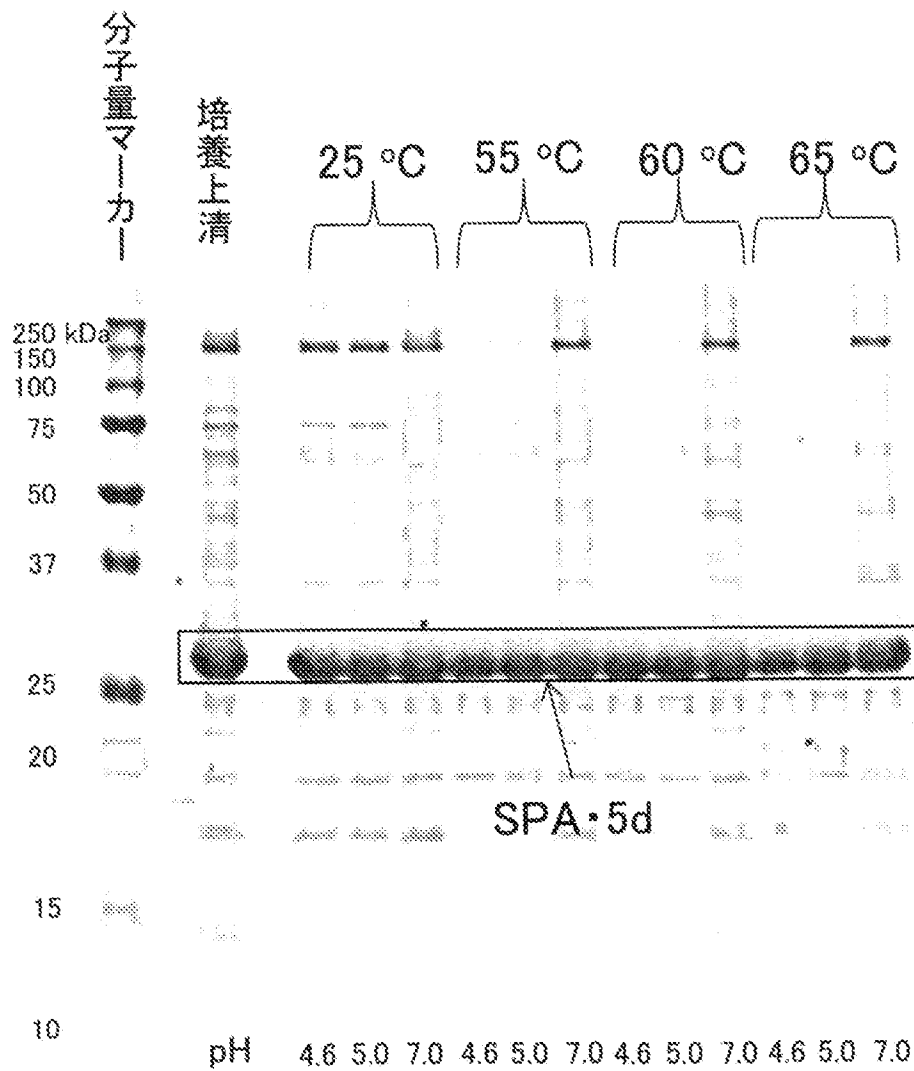
[図1]



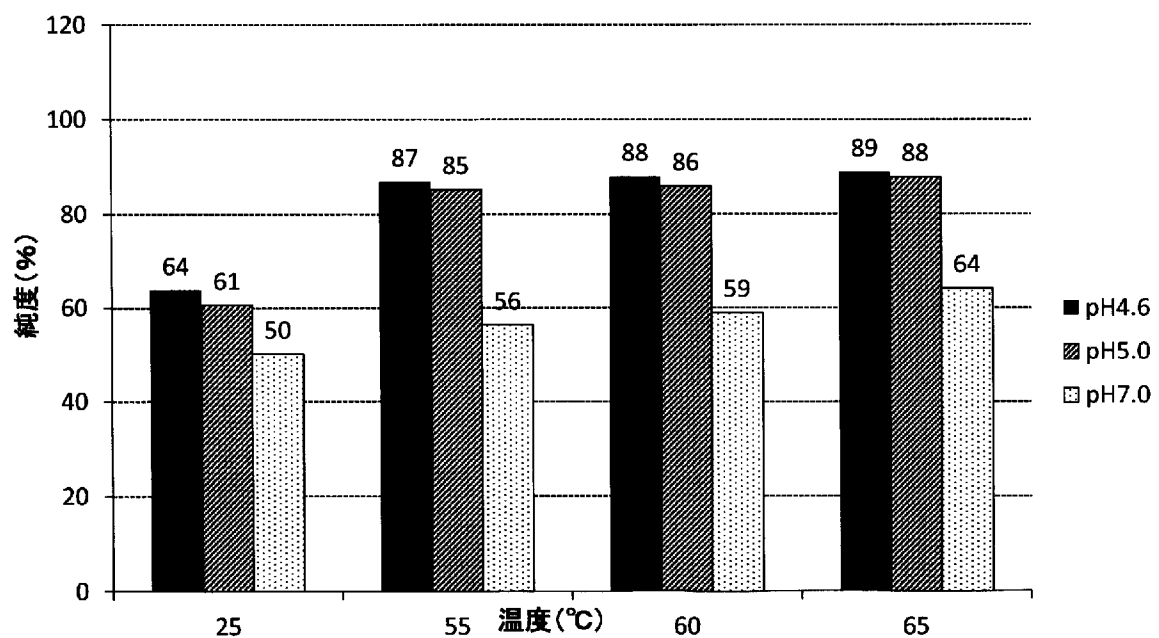
[図2]



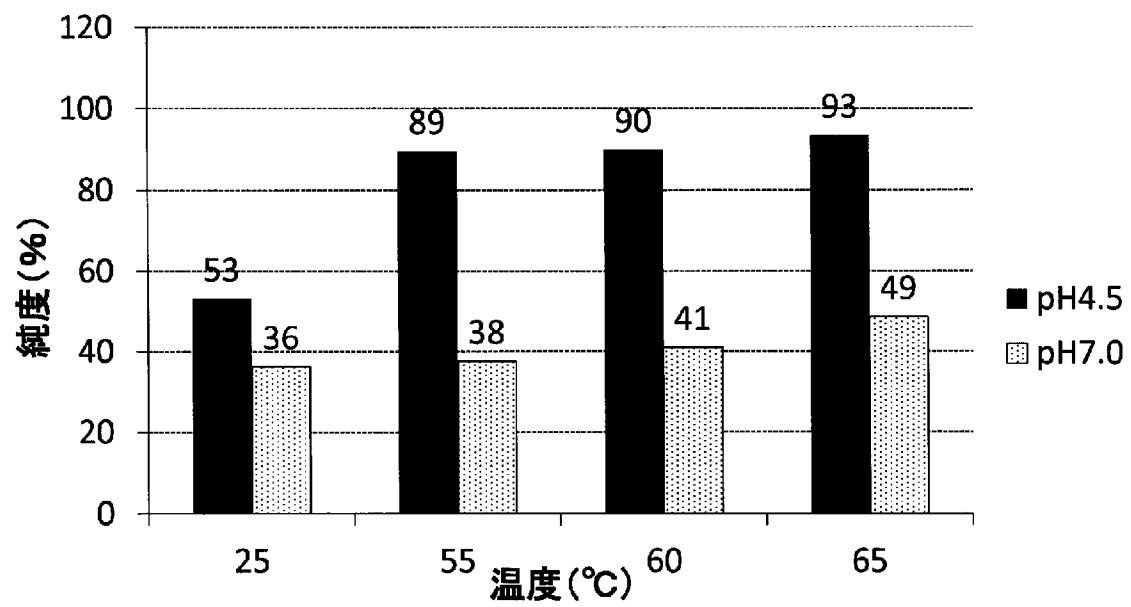
[図3]



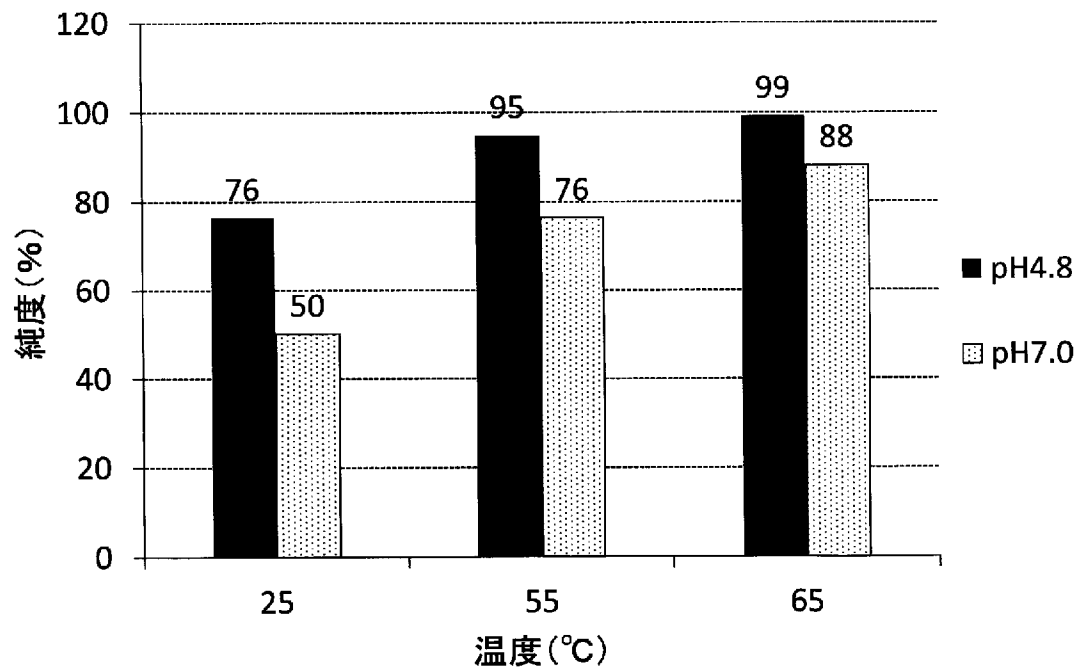
[図4]



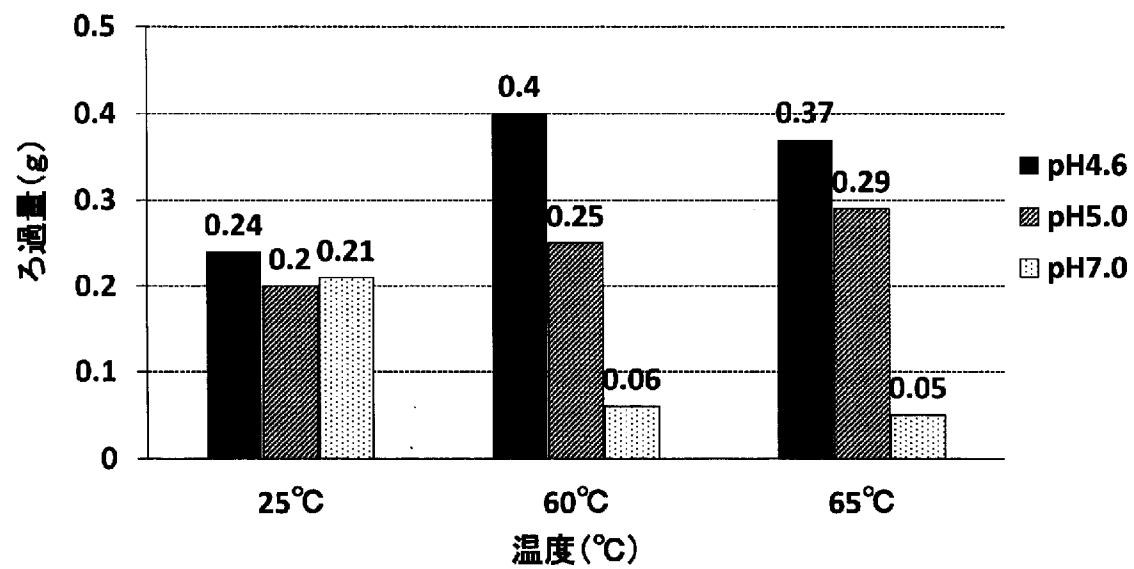
[図5]



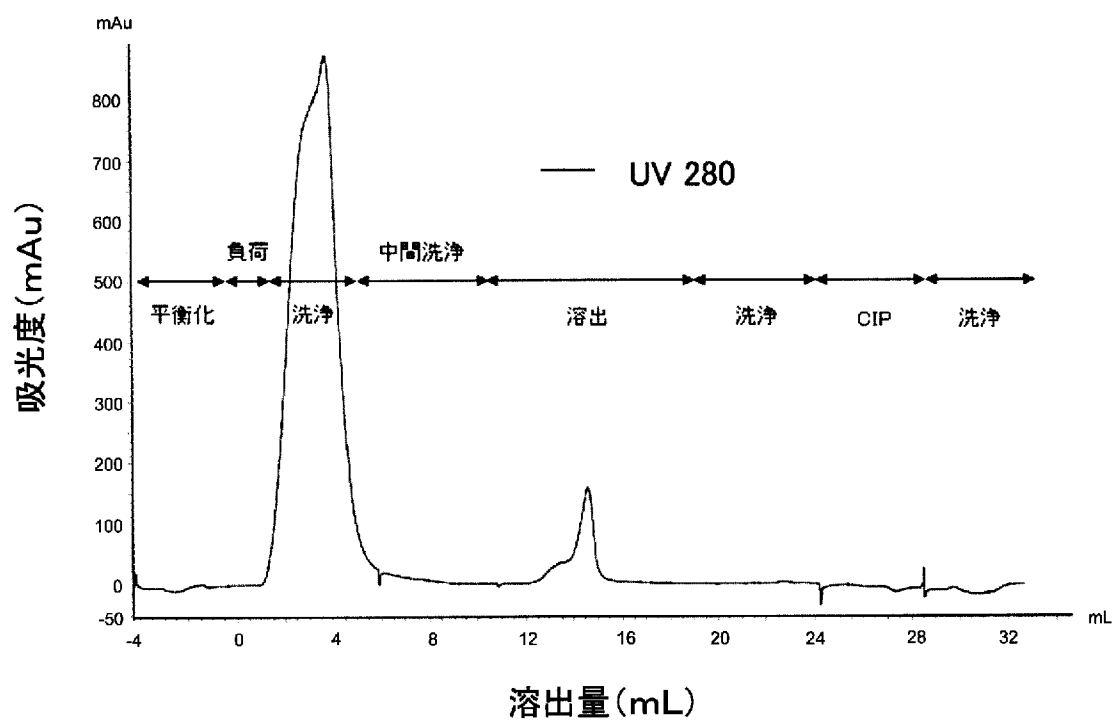
[図6]



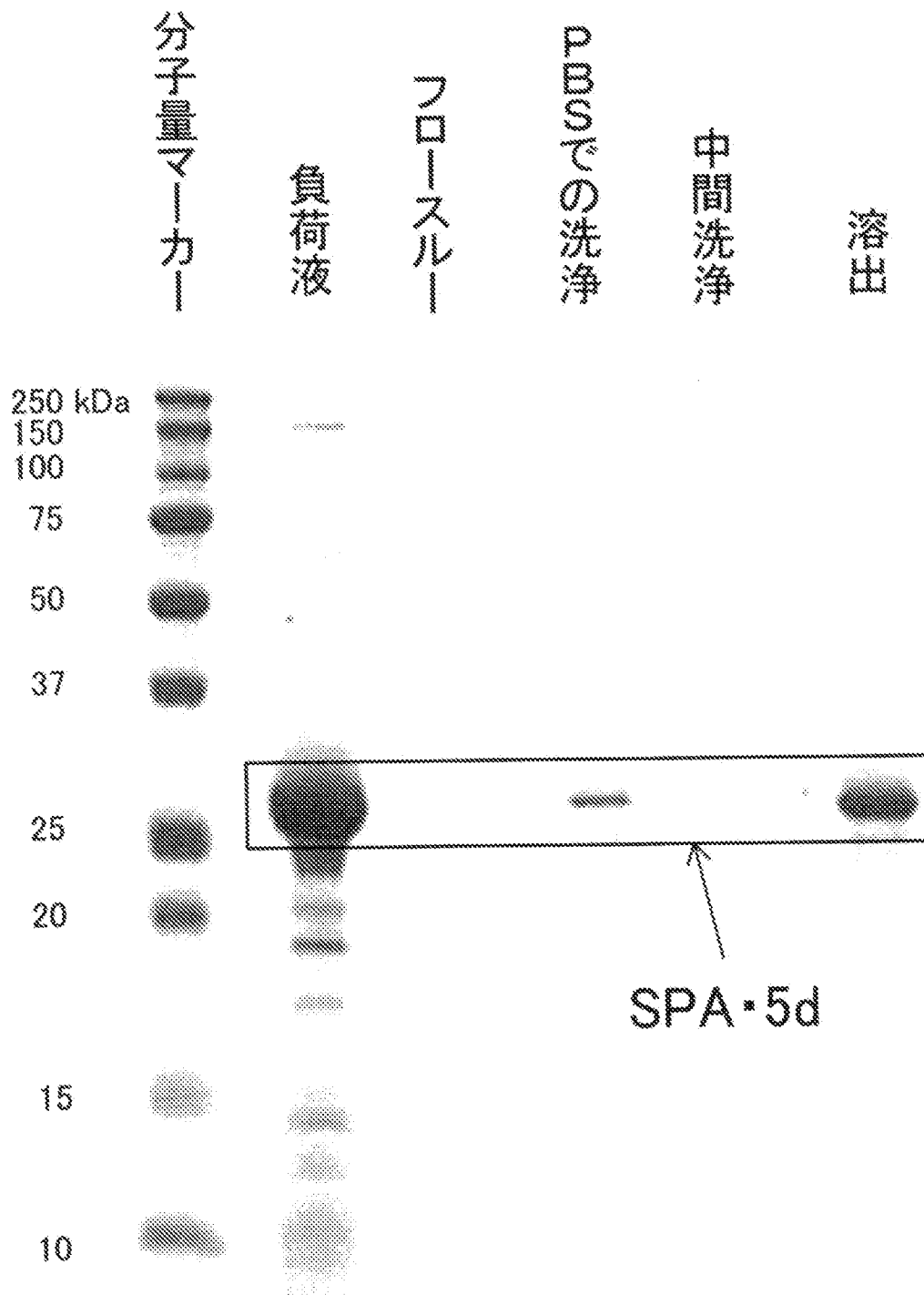
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/017326

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C07K1/14 (2006.01) i, B01D15/00 (2006.01) i, B01D15/12 (2006.01) i,
B01D15/38 (2006.01) i, B01J20/281 (2006.01) i, C12P21/02 (2006.01) i,
G01N30/88 (2006.01) i, B01J20/24 (2006.01) n, C07K14/00 (2006.01) n,
C07K16/00 (2006.01) n, C12N15/09 (2006.01) n

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C07K1/14, B01D15/00, B01D15/12, B01D15/38, B01J20/281, C12P21/02,
G01N30/88, B01J20/24, C07K14/00, C07K16/00, C12N15/09

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	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS
(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 63-275600 A (REPLIGEN CORP.) 14 November 1988, pages 4-5 & US 5314993 A, columns 1-2 & EP 289129 A2	1-7
A	JP 61-219395 A (GENENTECH INC.) 29 September 1986, pages 13-14 & US 4886747 A, column 14 & EP 200341 A1 & DE 3689495 T & DK 127786 A & IE 61119 B & IL 78197 A & AT 99737 T & DK 127786 AO	1-7
A	JP 1-501361 A (SANDOZ AG) 18 May 1989, page 15 & WO 1988/003807 A2, page 29 & EP 268561 A2 & AU 1104988 A & NZ 222569 A & PT 86144 A & FI 883363 A & DK 400088 A & HU 57059 A & ZA 8708608 A & IL 84484 D & AU 612617 B	1-7

☐ 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

"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
19 July 2018 (19.07.2018)

Date of mailing of the international search report
31 July 2018 (31.07.2018)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K1/14(2006.01)i, B01D15/00(2006.01)i, B01D15/12(2006.01)i, B01D15/38(2006.01)i,
B01J20/281(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i, G01N30/88(2006.01)i, B01J20/24(2006.01)n,
C07K14/00(2006.01)n, C07K16/00(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K1/14, B01D15/00, B01D15/12, B01D15/38, B01J20/281, C12P21/02, G01N30/88, B01J20/24, C07K14/00,
C07K16/00, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018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/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 63-275600 A (レプリゲン コーポレーション) 1988.11.14, 第4-5頁 & US 5314993 A, 第1-2欄 & EP 289129 A2	1-7
A	JP 61-219395 A (ジェネンテク, インコーポレイテッド) 1986.09.29, 第13-14頁 & US 4886747 A, 第14欄 & EP 200341 A1 & DE 3689495 T & DK 127786 A & IE 61119 B & IL 78197 A & AT 99737 T & DK 127786 A0	1-7

☑ 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

19.07.2018

国際調査報告の発送日

31.07.2018

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)

高山 敏充

4 B

4 1 5 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 1-501361 A (サンド・アクチエンゲゼルシャフト) 1989.05.18, 第 15 頁 & WO 1988/003807 A2, pp. 29 & EP 268561 A2 & AU 1104988 A & NZ 222569 A & PT 86144 A & FI 883363 A & DK 400088 A & HU 57059 A & ZA 8708608 A & IL 84484 D & AU 612617 B	1-7