

(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
2011年1月6日(06.01.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/001963 A1

- (51) 国際特許分類:
B01D 71/82 (2006.01) B01D 71/34 (2006.01)
B01D 69/08 (2006.01) C07K 1/34 (2006.01)
B01D 71/26 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/061031
- (22) 国際出願日: 2010年6月29日(29.06.2010)
- (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 2009-158421 2009年7月3日(03.07.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 旭化成ケミカルズ株式会社(Asahi Kasei Chemicals Corporation) [JP/JP]; 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目105番地 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 篠原 直志(SHINOHARA, Naoyuki) [JP/JP]; 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目105番地 Tokyo (JP). 石原 尚(ISHIHARA, Takashi) [JP/JP]; 〒3700013 群馬県高崎市萩原町100番地1 協和発酵キリン株式会社 バイオ生産技術研究所内 Gunma (JP). 白瀧 浩伸(SHIRATAKI, Hiironobu) [JP/JP]; 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目105番地 Tokyo (JP). 横山 敬郎(YOKOYAMA, Yoshiro) [JP/JP]; 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目105番地 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 稲葉 良幸, 外(INABA, Yoshiyuki et al.); 〒1066123 東京都港区六本木6-10-1 六本木ヒルズ森タワー23階 TMI 総合法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, 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, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, 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(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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR PURIFICATION OF ANTIBODY USING POROUS MEMBRANE HAVING AMINO GROUP AND ALKYL GROUP BOTH BOUND TO GRAFT CHAIN IMMOBILIZED ON POROUS BASE MATERIAL

(54) 発明の名称: 多孔質基材に固定されたグラフト鎖に結合しているアミノ基及びアルキル基を有する多孔膜を用いた抗体の精製方法

(57) Abstract: A method for purifying an antibody monomer, which comprises permeating an antibody solution containing dimeric or higher antibody aggregates through a porous membrane to cause the adsorption of the antibody aggregates onto the porous membrane to purify the antibody monomer in the permeated solution and collecting the antibody monomer, wherein the porous membrane comprises a hydrophobic porous base material and side chains immobilized on the surfaces of pores in the porous base material, and wherein the side chains comprise a hydrophilic molecule chain composed of a different material from the porous base material and a molecule chain containing a nitrogen atom to which 1 to 3 alkyl groups each having 2 or 3 carbon atoms are bound.

(57) 要約: 疎水性多孔質基材と、多孔質基材の細孔表面に固定された、多孔質基材と異なる材質の親水性を有する分子鎖と、炭素原子数が2又は3のアルキル基が1乃至3個結合している窒素原子を含む分子鎖の側鎖と、備える多孔膜を用いて、2量体以上の抗体凝集体を含む抗体溶液を多孔膜に透過させ、抗体凝集体を多孔膜に吸着させる事により、透過液中に精製された抗体モノマーを回収する、抗体モノマーの精製方法。

WO 2011/001963 A1

明 細 書

発明の名称：

多孔質基材に固定されたグラフト鎖に結合しているアミノ基及びアルキル基を有する多孔膜を用いた抗体の精製方法

技術分野

[0001] 本発明は、多孔質基材に固定されたグラフト鎖に結合しているアミノ基及びアルキル基を有する多孔膜、及び該多孔膜を用いたタンパク質の精製方法に関する。

背景技術

[0002] 食品及び医療分野において、有用なタンパク質を効率的に精製する方法が強く求められている。また近年、バイオテクノロジー産業においては、タンパク質の大量精製が重要な課題となっている。特に医薬の分野において、抗体医薬の需要が急速に拡大しており、効率的に大量のタンパク質を産生及び精製可能な技術の確立が強く望まれている。

[0003] 一般的に、タンパク質は、動物由来の細胞株を用いる細胞培養によって産生される。細胞培養液からタンパク質を精製する通常の手続きにおいては、最初に、細胞培養液を遠心分離し、濁質成分を沈降除去する。次いで、遠心分離で除去しきれない約 $1\ \mu\text{m}$ 以下の細胞デブリを、精密ろ過膜を用いるサイズろ過により除去する。さらに無菌化するために、最大細孔径が $0.22\ \mu\text{m}$ 以下のろ過膜を用いて無菌化ろ過を施し、目的タンパク質を含む無菌溶液を得る（ハーベスト工程）。続いて、代表的にはプロテインAを用いるアフィニティークロマトグラフィーを初めとする、複数のクロマトグラフィー技術の組み合わせによる精製プロセスを用いて、宿主細胞由来タンパク質（HCP: Host Cell Protein）、デオキシリボ核酸（DNA）、目的タンパク質の凝集体、エンドトキシン、ウィルス、カラムから脱離したプロテインA、並びにプロテインA及び抗体の凝集体等の夾雑物を、この無菌溶液から除去し、目的タンパク質を分離・精製する（ダウンストリーム

工程)。

- [0004] 以上説明した従来のタンパク質の精製方法の対象となる細胞培養液中の目的タンパク質の濃度は、現状では通常 1 g/L 程度である。また、夾雑物の濃度も、目的タンパク質の濃度とほぼ同程度又はそれ以下であると考えられる。かかる濃度においては、上記のハーベスト工程及びダウンストリーム工程を含む従来のタンパク質の精製方法でも有効でありうる。
- [0005] しかしながら、抗体医薬の需要が急速に拡大し、抗体医薬に用いられるタンパク質の大量生産が指向されたため、近年では細胞培養液中のタンパク質濃度を高める細胞培養技術が急速に発達している。そのため、細胞培養液中の目的タンパク質の濃度が 10 g/L 又はそれ以上に達することもある。同時に、細胞培養液中の夾雑物の濃度も同様に増加し、従来のタンパク質の精製方法では、目的タンパク質の精製が困難になりつつある。
- [0006] 特に、細胞培養液中の目的とする抗体タンパク質の濃度の増大に伴い、そのモノマーの凝集体、例えば 2 量体、3 量体などの多量体の濃度も顕著に増加する傾向にある。凝集体は、生体内への投与時に、補体の活性又はアナフィラキシーをもたらしうる。そのため、凝集体が抗体医薬の安全性に有害な影響を及ぼしうるとの指摘がされており、その有効な除去方法が近年希求されている。これに対し、凝集体を含む各種の夾雑物を有効に除去し、抗体医薬品として使われる抗体タンパク質、すなわちモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体及び免疫グロブリンなどを精製することを目的としたクロマトグラフィー工程が多数報告されている。
- [0007] イオン交換クロマトグラフィーは、抗体と、夾雑物と、の等電点の相違を利用して、これらを分離する方法である。特にアニオン交換クロマトグラフィーは、一般に等電点の値が抗体タンパク質より小さい HCP、DNA、及びウイルスなどの夾雑物の除去に多用されている。また、等電点がモノマーとほぼ等しい凝集体を除去して抗体モノマーを精製する方法も提案されている。
- [0008] HCP などの一般的な夾雑物を除去する方法として近年では、多孔質膜に

イオン交換基を導入して、タンパク質吸着能力を付与したタンパク質吸着膜が開発されている（例えば、特許文献 1 及び 2 参照）。また、タンパク質吸着膜の使用例として、特許文献 3 には、アニオン交換基を導入したセルロース多孔膜と、カチオン交換基を導入したセルロース多孔膜と、の 2 種類のタンパク質吸着膜を用いて、リンパ液からアルブミンを分離する方法が開示されている。さらに、特許文献 4 には、アニオン交換基を導入したセルロース多孔膜を用いて、核酸と、エンドトキシンと、を分離する方法が開示されている。またさらに、特許文献 5 及び 6 には、カチオン交換基及びアニオン交換基をポリエーテルスルホン多孔膜に導入したタンパク質吸着膜が開示されている。

[0009] 加えて、細胞培養液やカチオン交換クロマトグラフィー工程の溶出液のような、比較的塩濃度が高い、即ち、電気伝導度の高い状態の溶液から不純物を除去し、抗体モノマーを精製することに適した多孔膜として、特許文献 7 には 1 級アミンをアニオン交換基として固定した膨潤ゲル層を有する多孔膜が開示されている。

[0010] また、抗体の凝集体を除去する方法として例えば、特許文献 8 には、抗体モノマーと、凝集体と、の混合液を抗体の等電点の近傍の pH に調整し、アニオン交換クロマトグラフィーカラムに通液して透過液を回収し、さらに同じ pH の緩衝液を通液して洗浄液を回収し、これらの回収液を抗体モノマーの精製液とする抗体モノマーの精製方法が開示されている。凝集体はモノマーに比べて多くの電荷点を有するため、僅かではあるがアニオン交換基により固定されやすいという原理にこの精製方法は基づいている。また、特許文献 9 には、抗体モノマーと、凝集体と、をともにアニオン交換クロマトグラフィーカラムに吸着させた後、溶出液の塩濃度を徐々に上昇させるグラジエント溶出により、先に溶出される抗体モノマーの溶出ピークを回収する、抗体モノマーの精製方法が開示されている。

[0011] また、近年、効率的に抗体を夾雑物から分離精製するために、複数のリガンドを有する混合モードの樹脂を充填したクロマトグラフィーカラムを用い

ることが、広く検討されている。このようなクロマトグラフィーカラムには、ミックスモードリガンド又はマルチモーダルリガンドと呼ばれるリガンドが用いられている。このようなリガンドを用いるクロマトグラフィーにおいては、電荷による相互作用の差と、疎水性による相互作用の差という、複数の相互作用の差を利用するため、より高精度な分離が可能になるばかりでなく、複数の夾雑物を同時かつ有効に除去可能になることが期待される。

[0012] 例えば、特許文献 10 には、アニオン交換基及び疎水性基からなるマルチモーダルリガンドのクロマトグラフィーを用いたフロースルーモードにより、夾雑物を吸着して抗体モノマーを回収する方法、特に遊離したプロテイン A リガンド及び抗体モノマーからなる凝集体を吸着除去する方法が記載されている。また、特許文献 11 には、四級アンモニウム基、水素結合基及び疎水性基を有するマルチモーダルのクロマトグラフィーを用いて、DNA、ウイルス、エンドトキシン、凝集体、及び HCP などの殆どの夾雑物を吸着し、抗体モノマーをフロースルーにより回収する方法が記載されており、特に HCP はほぼ完全に除去されることが記載されている。さらに、特許文献 12 には、メルカプト基及び芳香族ピリジン環を有するミックスモードのクロマトグラフィーを用いて、抗体モノマーのみを吸着し、凝集体を非吸着画分として除去することにより、結合モードで抗体モノマーを精製する方法が記載されている。

[0013] 凝集体を選択的にカラムに吸着させ、より有効に凝集体を除去することを目的としたフロースルーモードで抗体モノマーを精製回収する方法として、特許文献 13 には、ヒドロキシアパタイトのクロマトグラフィーを適用した例が記載されている。また、グラフト鎖を介して基材表面にアミノ基によるアニオン交換基を固定した多孔膜については、特許文献 7 に記載されており、気相反応による限定されたアミノ基の固定方法が開示されている。さらに、特許文献 8 には、グラフト鎖を介してジエチルアミノ基及び 2-ヒドロキシエチルアミノ基を固定した多孔膜を用いて、卵白タンパク質を分離する方法が記載されている。

先行技術文献

特許文献

- [0014] 特許文献1：米国特許第5, 547, 575号明細書
特許文献2：米国特許第5, 739, 316号明細書
特許文献3：米国特許第6, 001, 974号明細書
特許文献4：米国特許第6, 235, 892号明細書
特許文献5：米国特許第6, 783, 937号明細書
特許文献6：米国特許第6, 780, 327号明細書
特許文献7：特開2009-53191号公報
特許文献8：米国特許第6, 177, 548号明細書
特許文献9：特表2002-517406号公報
特許文献10：特表2008-505851号公報
特許文献11：特表2008-517906号公報
特許文献12：特表2008-500972号公報
特許文献13：特表2007-532477号公報
特許文献14：特許第2796995号公報
特許文献15：特開平11-12300号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0015] 上述のとおり、細胞培養液中の多種多様な夾雑物から抗体を高精度で分離する方法が数多く提案され、報告されている。しかしながら、全ての夾雑物を有効かつ迅速に除去して抗体を精製することは、現状でも困難であり、特にアフィニティークロマトグラフィー後の塩濃度の高い中間精製溶液において、微量に残存するHCP及び凝集体などを医薬品として要求されるレベルにまで除去し、高精度な抗体モノマーを回収することは、細胞培養液中の目的タンパク質濃度が大幅に向上しつつある状況下、さらに困難になることが懸念される。また、抗体モノマーの精製、特に凝集体の除去を目的とした精製

を有効に実施する事は極めて困難である。

[0016] 特許文献 1 乃至 6 に開示されたタンパク質吸着膜は、細孔径が $1\ \mu\text{m}$ 以上であるため、濁質不純物である細胞デブリを除去する能力が乏しい。また溶存タンパク質の吸着容量が小さいため、大量のタンパク質を吸着できない。さらに細胞培養液には、通常、塩が含まれているが、細胞培養液に $0.1\ \text{mol/L}$ 以上の塩が含まれていると、特許文献 1 乃至 6 に開示されたタンパク質吸着膜のタンパク質の吸着量は著しく少なくなる。したがって、特許文献 1 乃至 6 に開示されたタンパク質吸着膜を用いて、電気伝導度の高い細胞培養液あるいはカチオン交換クロマトグラフィー工程の溶出液から、不純物タンパク質を除去することは、実用的ではない。

[0017] 特許文献 7 に開示された多孔膜は、塩を含む高電気伝導度の高い溶液に対して顕著なタンパク質吸着性を示す。しかし、吸着性能が高すぎるために不純物タンパク質のみを選択的に吸着除去することが難しく、目的タンパク質をも吸着しやすい。そのため、目的タンパク質の回収率が低下するという課題が生じる。また、吸着した不純物を十分に洗浄溶出することが出来ないため、繰返し使用することが出来ないという実用上の課題も生じる。

[0018] 特許文献 8 及び 9 に開示された、アニオン交換クロマトグラフィーカラムを用いた方法では、凝集体の除去のために極僅かな電荷相互作用の相違のみを用いるため、非常に精密な条件の制御と、分解能と、が要求される。そのため、高流速で通液することが困難であり、迅速な処理に適していない。

[0019] 特許文献 10 及び 11 に開示されたマルチモーダルのリガンドについても、同様にクロマトグラフィーカラムに用いるビーズのみをリガンドの固定対象としており、高流速で通液することが困難である。また、特許文献 12 及び 13 に開示されたミックスドモードのリガンドについても、クロマトグラフィーカラムに用いるビーズのみをリガンドの固定対象としており、高流速で通液することが困難である。これは、クロマトグラフィーに用いるビーズが多孔体粒子であり、本質的に溶液が拡散により多孔体の細孔内に侵入することによってのみ、タンパク質と、リガンドと、の接触が行われるためであ

る。そのため、通常ビーズによるカラムクロマトグラフィーの場合、有効に吸着がなされるための通液流速は100V/h（1時間あたりカラム体積の100倍の溶液を通液）程度である。

[0020] グラフト鎖を介して基材表面にアミノ基によるアニオン交換基を固定した多孔膜については、特許文献14に記載されているが、得られた多孔膜を用いたタンパク質の精製方法に関しての記載はない。また、特許文献15には、グラフト鎖を介してジエチルアミノ基と、2-ヒドロキシエチルアミノ基と、を固定した多孔膜を用いて、卵白タンパク質を分離する方法が記載されているが、タンパク質は卵白タンパク質に限定されており、抗体モノマーの精製方法に関する記載はない。

[0021] 全ての夾雑物を有効かつ迅速に除去して抗体を精製することの困難さは、フロースルーモード及び結合モードの両方において、有効に抗体を分離精製するための有効なpH、塩濃度、及び溶液組成などの条件、すなわち従来の精製技術のプロセスウィンドウが狭く、安定で汎用的な精製条件を決定することが容易ではないことにも起因する。この状況は、より効率的に夾雑物を除去することを目的とした混合モードリガンドのクロマトグラフィーにおいても同様である。

[0022] 加えて、中間精製において夾雑物を除去する工程は、高精度が要求されるために、分解能が高いクロマトグラフィーカラムによるプロセスが指向される。特に、アフィニティクロマトグラフィーにより低濃度にまで除去された状態から、さらに除去することが必要とされるHCPのような夾雑物の除去においては、なおさらプロセスウィンドウが狭いために条件の設定がより困難となる。さらに凝集体は、抗体モノマーに近似した相互作用の性質を有するために、特に条件の設定が困難であり、これまで吸着膜などを用いて迅速に除去することは不可能であった。このため、これまでに多孔質膜を用いて抗体モノマーから夾雑物を除去する方法については報告されていない。

[0023] かかる状況に鑑み、本発明の解決しようとする課題の一つは、高い濃度で抗体モノマー等のタンパク質及び夾雑物を含む、電気伝導度の高い溶液から

、簡便、高速、かつ広いプロセスウィンドウで、HCP、DNA、エンドトキシン、脂質、ウィルス及び目的タンパク質を含むタンパク質の凝集体等の夾雑物を、有効かつ迅速に除去可能な、多孔膜を用いたタンパク質の精製方法を提供することである。本発明の解決しようとするさらなる課題の一つは、夾雑物を捕捉後、適切な洗浄により吸着した不純物を洗浄することにより再利用可能な多孔膜を用いた、タンパク質の精製方法を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0024] 本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意検討した結果、多孔質基材と、多孔質基材表面に固定されたグラフト鎖の側鎖に結合しているアミノ基及び該アミノ基に結合しているアルキル基と、を有する多孔膜を用いることが、2量体を含む凝集体をはじめとするこれまで除去することが困難であった夾雑物の除去に有効であることを見出し、本発明を完成した。
- [0025] すなわち、本発明の態様は、疎水性の多孔質基材と、多孔質基材の細孔表面に固定された、多孔質基材と異なる材質の親水性を有する分子鎖と、炭素原子数が2又は3のアルキル基が1乃至3個結合した窒素原子を含む分子鎖の側鎖と、を備える多孔膜を用いて、2量体以上の抗体凝集体を含む抗体溶液を多孔膜に透過させ、抗体凝集体を多孔膜に吸着させる事により、透過液中に精製された抗体モノマーを回収する、抗体モノマーの精製方法であることを要旨とする。
- [0026] また、本発明の他の様態は、塩濃度が0.3mol/L以下の抗体モノマー溶液の精製方法であって、前記抗体モノマー溶液を多孔膜で濾過することで、少なくとも抗体モノマー溶液に含まれる不純物を多孔膜に吸着し、濾過された抗体モノマー溶液を回収する工程を有し、前記多孔膜は、疎水性の多孔質基材と、多孔質基材の細孔を含む表面に固定された、多孔質基材と異なる材質の親水性を有する分子鎖と、アルキル基が1乃至3個結合した窒素原子、水酸基及びカルボニル基を含む側鎖と、を備える、抗体モノマー溶液の精製方法であることを要旨とする。

発明の効果

[0027] 本発明の、多孔膜を用いたタンパク質の精製方法によれば、抗体等のタンパク質及び夾雑物を含む比較的塩濃度の高い溶液から、HCP、DNA、エンドトキシン、ウィルス及びタンパク質凝集体などの夾雑物を簡便かつ高速に除去可能であり、抗体等のタンパク質モノマーの精製を有効かつ迅速に実施することが可能となる。

発明を実施するための形態

[0028] 以下、本発明を実施するための形態（以下、「本実施の形態」という。）について詳細に説明する。なお、本発明は、以下の本実施の形態に限定されるものではなく、その要旨の範囲内で種々変形して実施することができる。

[0029] 本実施の形態に係る多孔膜は、疎水性の多孔質基材と、多孔質基材の細孔を含む表面に固定された、多孔質基材と異なる材質の親水性を有する分子鎖と、プロピルアミノ基、イソプロピルアミノ基、ジエチルアミノ基、トリエチルアミノ基、及びトリプロピルアミノ基より選択される、少なくとも1種類のアミノ基を含む分子鎖の側鎖と、を備える。また、本実施の形態に係る抗体モノマーの製造方法は、本実施の形態に係る多孔膜を用意することと、不純物を含む抗体モノマー溶液を多孔膜に透過させ、不純物を多孔膜に吸着させることと、80%以上の回収率で、透過液中に精製された抗体モノマーを回収することと、を含む。

[0030] 本実施の形態における「抗体」とは、生体内に侵入した抗原と抗原抗体反応を起こし、抗原に対する免疫性を生体に与えるタンパク質の総称であり、具体的には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体及び免疫グロブリンなどを指す。特に本実施の形態における精製方法は、抗体医薬の製造工程で用い得るという観点から、上記の抗体のうち、抗体医薬となり得る抗体が、本実施の形態に係る精製方法の精製対象として好適である場合もある。本実施の形態における「抗体モノマー」とは、上記の抗体のうち、単量体で存在するものを指す。

[0031] 本実施の形態における「夾雑物」とは、抗体モノマーを精製しようとする

対象溶液（混合液）中に含まれる、抗体モノマー以外の不純物を指す。例えば、抗体を細胞培養により産生させる際に培養槽内で産生される、目的抗体モノマー以外の不純物が、「夾雑物」として挙げられる。より具体的には、抗体モノマーの凝集体、誤って折りたたまれた抗体タンパクの種、HCP、エンドトキシン、DNA、プロテアーゼ、遊離プロテインA、ウィルス及びバクテリアなどが、「夾雑物」として挙げられる。

[0032] 本実施の形態における「凝集体」（「抗体モノマーの凝集体」ということもある）とは、1種若しくは複数種の抗体モノマー同士の複合体、又は抗体モノマーと他のタンパク質等の化合物との複合体を指し、例えば、抗体モノマーの2量体又は3量体などの多量体、並びに遊離したプロテインA及び抗体の複合体などを含む。

[0033] 本実施の形態における「抗体モノマー及び夾雑物を含む混合液」は、上記の抗体モノマー及び夾雑物を含有する溶液（又は含有する可能性のある溶液）であれば特に制限されず、本実施の形態に係る抗体モノマーの精製方法により、そこから抗体モノマーを精製しようとする対象溶液である。例えば、抗体の産生において用いられる細胞培養液又はその除濁液、あるいはそれらのダウンストリーム工程でのクロマトグラフィー工程中又は工程後の部分精製液等が挙げられる。

[0034] これらの中でも、ダウンストリーム工程における、代表的にはプロテインAを用いるアフィニティークロマトグラフィー工程前の除濁液、又はアフィニティークロマトグラフィー工程後の部分的に精製された溶液が、溶液が澄明であること、また夾雑物が部分的に除去されていることで後段の精製工程における負荷がより低減されることから、本実施の形態に係る精製方法の精製対象として好適である。混合液中の抗体モノマー及び夾雑物の濃度は、特に限定されない。しかし、本実施の形態における抗体モノマーの精製方法が、特に高濃度で抗体モノマー及び夾雑物を含有する混合液に対しても効率よく実施することができるという観点から、例えば、混合液は、抗体モノマー及び夾雑物を合わせて2 g/L以上含んでいてもよい。さらには、混合液は、抗

体モノマーを5 g/L以上含んでもよいし、夾雑物を1 g/L以上含んでもよい。

[0035] 本実施の形態において用いられる「多孔膜」は、疎水性の多孔質基材と、多孔質基材の細孔を含む表面に固定された、多孔質基材と異なる材質の親水性を有する分子鎖と、プロピルアミノ基、イソプロピルアミノ基、ジエチルアミノ基、トリエチルアミノ基、及びトリプロピルアミノ基より選択される、少なくとも1種類のアミノ基を含む分子鎖の側鎖と、を有する。なお、以下において、多孔質基材に固定された親水性を有する分子鎖を「グラフト鎖」という。また、多孔質基材の内部の細孔の側壁を含む多孔質基材の総ての表面を単に「表面」といい、多孔質基材の内部の細孔の側壁を含まない表面を「主表面」という。

[0036] 本実施の形態において用いられる多孔膜は、アミノ基と、アルキル基と、の組み合わせにより、タンパク質によって吸着性能及び精製条件に相違が生じることを利用する。そのため、目的に応じてアミノ基と、アルキル基と、の組み合わせを選択することにより、プロセスウィンドウの広い、タンパク質精製のための多孔膜を得ることが可能となる。特に抗体タンパク質の精製を目的とする場合は、2級アミノ基としては、プロピルアミノ基 ($-N-CH_2CH_2CH_3$)、及びイソプロピルアミノ基 ($-N-CH(CH_3)_2$) が好適である。3級アミノ基としては、ジエチルアミノ基 ($-N-(CH_2CH_3)_2$)、及びジイソプロピルアミノ基 ($-N-(CH(CH_3)_2)_2$) が好適である。4級アミノ基としては、トリエチルアミノ基 ($-N^+-(CH_2CH_3)_3$)、トリプロピルアミノ基 ($-N^+-(CH_2CH_2CH_3)_3$)、及びトリジプロピルアミノ基 ($-N^+-(CH(CH_3)_2)_3$) が好適である。なお、2級アミノ基、3級アミノ基、及び4級アミノ基は、それぞれ、モノアルキル置換アミノ基、ジアルキル置換アミノ基、及びトリアルキル置換アミノ基ともいう。

[0037] 一般に、アミンの級数が多く、疎水性が高いほど、高塩濃度でのタンパク質の吸着性は高いと予想される。これはアミン級数が多いほど、タンパク質

の有するカルボン酸と、アミンと、の静電的な相互作用が強く、また疎水性が高いほど、疎水性相互作用による吸着が起こりやすいためである。しかし、アミン級数が多いほど、塩濃度が高くなった場合に、静電相互作用の減衰が大きくなる傾向にある。また、塩濃度が高いほど、疎水性相互作用が強くなる傾向にある。そのため、アミンの級数及びアルキル基の種類のみから、高塩濃度においても吸着性を有する官能基を理論的に予想することは困難である。本実施の形態では、実験評価により得られた結果から、有効な静電相互作用と、疎水相互作用と、の組み合わせを決定した。

[0038] その結果、上記したアミノ基と、アルキル基と、の組み合わせの中でも、プロピルアミノ基、イソプロピルアミノ基、ジエチルアミノ基、トリエチルアミノ基、及びトリプロピルアミノ基が、高塩濃度での吸着を実現するために、より好ましいことを見出した。

また、側鎖に水酸基及びカルボニル基が含まれることにより、アミノ基によるアニオン交換性、アルキル基による疎水性に加えて、親水性、水素結合性、及び適度なカチオン交換性が相乗し、よりプロセスウィンドウの広いタンパク質精製が可能となることから好適である。

[0039] 多孔質基材の材料は、特に限定はされないが、疎水性であれば、タンパク質と、多孔質基材と、の間に付加的な疎水性相互作用が生じ得るという観点、並びに機械的性質を保持するという観点から、ポリオレフィン系重合体から構成されていることが好ましい。ポリオレフィン系重合体の例としては、例えば、エチレン、プロピレン、ブチレン及びフッ化ビニリデンなどのオレフィンの単独重合体、前記オレフィンの2種以上の共重合体、又は1種若しくは2種以上の前記オレフィンとパーハロゲン化オレフィンとの共重合体などが挙げられる。また、これらの重合体の2種以上の混合物であってもよい。パーハロゲン化オレフィンの例としては、テトラフルオロエチレン及びクロロトリフルオロエチレンなどが挙げられる。

[0040] これらの中でも、疎水性と、機械的強度と、に特に優れ、かつ高い吸着容量が得られる素材であるという観点から、多孔質基材の材料として、ポリエ

チレン又はポリフッ化ビニリデンが好ましく、ポリエチレンがより好ましい。
。

[0041] アルキル化されたアミノ基の多孔質基材への固定の方法は、特に制限されないが、一般に、エポキシのような反応性の高い官能基を多孔質基材の表面に導入し、その後、該官能基に有機アミン化合物を結合させる方法によって行うことができる。本実施の形態においては、エポキシ基を有するグラフト鎖を予め多孔質基材の表面に固定しておき、所望のアミノ基と、アルキル基と、の組み合わせからなる有機アミン化合物をエポキシ基に反応させることにより、多孔質基材の主表面及び多孔質基材に設けられた細孔の側壁に有機アミン化合物を固定する。

[0042] 本実施の形態において、「グラフト鎖」は、多孔質基材の主表面と、多孔質基材に設けられた細孔の側壁と、に結合した、多孔質基材の材料と異なる材料からなる分子鎖であり、基材を形成する基材骨格内部及び多孔質部分を形成する細孔内部の両方に存在しうる。グラフト鎖としては、例えば、グリシジルメタクリレート、グリシジルアクリレート、グリシジルソルベート、グリシジリティタレート、グリシジリマレエート、酢酸ビニル、ヒドロキシプロピルアセテート又はこれらのいずれか2種以上の重合体を含む分子鎖が挙げられる。これらの中でも、エポキシ基の開環によりアミノ基を導入しやすく、水酸基及びカルボニル基を側鎖に容易に導入できることから、グリシジルメタクリレートの重合体が好ましい。多孔質基材に対するグラフト鎖の結合率（グラフト率）は、例えば後述の実施例等に記載の手法を用いて測定可能であり、より高い吸着容量及び力学的に安定な強度をともに確保するという観点から、好ましくは10%～200%、より好ましくは20%～150%、更に好ましくは30%～100%である。

[0043] アミノ基は、グラフト鎖の全側鎖の60%以上97%以下、より好ましくは70%以上96%以下に導入されていることが好ましい。アミノ基が導入されなかったエポキシ基は、タンパク質との化学結合を抑制するためにアルカリ溶液処理などによって開環し、ジオール化することが好ましい。側鎖が

ジオール基を有する事により、グラフト鎖の親水性が増し、溶液が充填された細孔内にグラフト鎖が有効に広がり得る。ジオール基を有するグラフト鎖の側鎖は、全側鎖の3%以上40%以下が好ましく、より好ましくは4%以上30%以下である。ジオール基の比率が40%より高くなると、アミノ基によるアニオン交換相互作用の効果が低下する傾向にある。

[0044] 多孔質基材の表面及び細孔の側壁にグラフト鎖を導入し、さらにアルキル化されたアミノ基をグラフト鎖に固定する方法としては、限定されるものではないが、例えば特開平2-132132号公報に開示される方法が挙げられる。この方法では、気相反応に従うために、アミン化合物は、反応環境下において気相として存在し、エポキシ基と反応しうるものに限定される。液相反応によってアミン化合物をグラフト鎖に固定されたエポキシ基と反応させ固定する方法としては、例えばJournal of Chromatography A, 689 (1995) 211-218に記載された方法がある。ただし、当該文献には、ジエチルアミンを反応させる方法のみが開示されている。任意のアミン化合物をエポキシ基と反応させて固定する方法は、使用するアミン化合物によって適切に選択される必要があり、例えば後述の実施例等に記載の方法を用いて行う。

[0045] 本実施の形態に用いられる多孔膜は、多孔質基材と、多孔質基材の主表面及び多孔質基材に設けられた細孔の側壁に固定されたグラフト鎖と、グラフト鎖が有する側鎖に結合しているアミノ基及びアルキル基と、を備える。このような多孔膜は、多孔質基材に固定された各グラフト鎖が1以上の側鎖を有し、その側鎖にアミノ基及びアルキル基がそれぞれ1以上固定された構造を有する。そのため、アミノ基及びアルキル基が、細孔空間内に立体的に分布する。よって、電荷点を有するタンパク質などに対してアミノ基の吸着点の数が多く、吸着量が増加するとともに、相互作用の小さなタンパク質などの吸着性も高くなる。さらに、アニオン交換による電荷相互作用以外に、アルキル基、水酸基、及びカルボニル基が存在することによって、より高度に選択的なタンパク質の吸着が実現される効果がある。特に抗体などの、電荷

相互作用のみでは精製が困難なタンパク質を、有効に夾雑物から分離し、精製することが可能である。また、抗体モノマーと、夾雑物と、を含む溶液を通液することにより、夾雑物のみを選択的に吸着し、抗体を非吸着で透過させることにより、迅速かつ効率的に抗体精製を実施する目的に特に適している。

[0046] 多孔膜の最大細孔径は、溶液中の抗体モノマー及び／又は夾雑物を有効に吸着し、かつ高い透過流速を得るという観点から、上記のアニオン交換基の固定及びグラフト鎖の導入前の状態で、好ましくは $0.01\mu\text{m}\sim 5.0\mu\text{m}$ であり、より好ましくは $0.1\mu\text{m}\sim 3.0\mu\text{m}$ であり、さらに好ましくは $0.1\mu\text{m}\sim 1.0\mu\text{m}$ である。

[0047] 多孔膜の全体積に占める細孔の体積の割合である空孔率は、多孔膜の形状を保持しかつ通液時の圧損が実用上問題のない程度であれば、特に限定されないが、好ましくは $5\%\sim 99\%$ であり、より好ましくは $10\%\sim 95\%$ であり、さらに好ましくは $30\%\sim 90\%$ である。

[0048] 上記細孔径及び空孔率の測定は、Marcel Mulder 著「膜技術」（株式会社アイピーシー）などに記載されているような、当業者にとって公知の方法により行うことができる。例えば、電子顕微鏡による観察、バブルポイント法、水銀圧入法、及び透過率法などの測定方法が挙げられる。例えば最大細孔径の測定は、後述の実施例等に記載のバブルポイント法を適切に用いることができる。

[0049] 多孔質基材の形態は、溶液を通液することが可能な形態であれば特に限定されず、例えば、平膜、不織布、中空糸膜、モノリス、又はキャピラリーなどが挙げられる。これらの形態の中でも、製造のし易さ、スケールアップ性、及びモジュール成型した際の膜のパッキング性などの観点から、中空糸膜が好ましい。また、多孔質基材の形状は、例えば円板又は円筒状であってもよいが、これに限定されない。

[0050] 本実施の形態において、中空系多孔膜とは、中空部分を有する円筒状又は繊維状の多孔膜であり、中空系の内層と、外層と、が貫通孔である細孔によ

って連通しており、その細孔によって内層から外層、あるいは外層から内層に、液体又は気体が透過する性質を有する多孔体を意味する。中空糸の外径及び内径は、物理的に多孔膜が形状を保持することができ、かつモジュール成型可能であれば、特に限定されない。

[0051] 上述した本実施の形態に係る多孔膜に、抗体モノマー及び夾雑物を含む混合液を通液し、夾雑物及び／又は抗体モノマーを多孔膜に吸着させる工程を、以下に説明する。

本実施の形態による典型的な抗体モノマーの精製方法の例としては、特に限定するものではないが、抗体モノマーと、夾雑物と、を含む混合液を本実施の形態に係る多孔膜に通液し、混合液中の夾雑物を多孔膜に吸着させることより夾雑物を混合液から除去し、透過液を抗体モノマーの精製液として回収する方法が、最も簡便であり速やかに精製を実施することができることから好ましい。

[0052] 抗体モノマーの等電点（ pI ）は通常、 $6.5 \sim 8.5$ の範囲である。一方、HCP、DNA、及びウィルスなどの夾雑物の多くの pI は6以下にある。そのため、上記の多孔膜に通液する溶液の pH 範囲及び塩濃度（電気伝導度）を好適に制御することによって、夾雑物の多くを多孔膜の正に帯電したアミノ基に吸着させ、透過液を抗体モノマーの精製液として回収することが可能となる。夾雑物のうち、凝集体の pI は、抗体モノマーに近い、ほぼ等しい。しかし、抗体モノマーと、凝集体と、の相違点は、凝集体は抗体モノマーの複合体であるため、 pI が抗体モノマーと同程度であっても、凝集体の方が一つの分子が有する電荷点の数が多い点である。このため、凝集体は、正に帯電したアミノ基を有する多孔膜に、抗体モノマーよりも僅かながら吸着しやすい性質を有する。そのため、溶液の pH 及び塩濃度を適切に調整することにより、凝集体を多孔膜のアミノ基に吸着させ、透過液を抗体モノマーの精製液として回収することが可能となる。

[0053] 特に、多孔質基材にグラフト鎖を介してアミノ基が固定された多孔膜（好ましくは各グラフト鎖が1以上の側鎖を有し、各側鎖がアミノ基を有する多

孔膜)を用いる場合、多孔膜においてアミノ基が立体的に固定されていることになる。その結果、凝集体などのタンパク質は、電荷点において複数のアミノ基によって立体的に固定される。そのため、凝集体は抗体モノマーよりも、より強固に多孔膜に吸着される傾向にあり、抗体モノマーの精製を容易に行うことができる。

[0054] また、タンパク質、DNA、及びウィルスなどは、本質的に疎水性相互作用などアニオン交換相互作用以外の性質も有する。そのため、疎水性、水素結合性、及びカチオン交換性が適切に制御された性質を有する多孔膜を用いることにより、抗体の精製をより容易に行うことができる。したがって、グラフト鎖が適切なアルキル基、水酸基、及びカルボニル基を有することにより、より選択的に夾雑物を吸着除去することが可能になる。特に抗体モノマーの凝集体は、抗体モノマーとは疎水性の性質が異なる。したがって、グラフト鎖がアルキル基を有することにより、より選択的に凝集体を吸着除去することが可能になる。

[0055] 混合液中の夾雑物を多孔膜に吸着させ、吸着により夾雑物を混合液から除去し、透過液を抗体モノマーの精製液として回収する場合、夾雑物(特に凝集体)の多孔膜への吸着性が抗体モノマーよりも顕著になる条件に混合液のpH及び塩濃度を調整する。具体的には、pH 6～9及び塩濃度が0 mol/L以上0.3 mol/L以下の範囲に混合液を調整することが好ましい。

[0056] 塩濃度の調整に用いる塩としては、例えば、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、及び硫酸アンモニウムなどの他、クエン酸、リン酸又はグリシンの金属塩が挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、pHの調整は通常、簡便には塩酸又は水酸化ナトリウムの添加によって行うことができるが、これに限定されず、当業者に公知のpH調整方法を適宜用いることができる。溶液のpH及び塩濃度の測定は、例えば市販の測定機器を用いて、当業者に公知の手法を用いて行うことができる。

[0057] 上記のpH及び塩濃度の混合液を、本実施の形態における多孔膜に通液することにより、凝集体、HCP、DNA、エンドトキシン、及びウィルスな

どの pI が 6 以下の夾雑物が多孔膜に吸着される。混合液の pH 及び塩濃度を、精製対象とする抗体モノマーの pI に応じて調整することにより、夾雑物（特に凝集体）がより選択的に多孔膜に吸着され、抗体モノマーの精製をより有効に行うことができる。一般的な抗体モノマーの pI は 8 近辺にあるという観点から、混合液の酸性度は、好ましくは pH 6 ~ 9、より好ましくは pH 7 ~ 8.5、さらに好ましくは pH 7.5 ~ 8.5 である。また、混合液の塩濃度は、0 mol/L 以上が好ましく、0.01 mol/L 以上がより好ましく、0.02 mol/L 以上がさらに好ましい。また、0.3 mol/L 以下が好ましく、0.2 mol/L 以下がより好ましく、0.1 mol/L 以下がさらに好ましく、0.05 mol/L 以下が特に好ましい。

[0058] 具体的には、精製対象とする抗体モノマーによって異なるが、抗体モノマーの等電点が 7.5 以上、例えば 7.5 ~ 8.5 の範囲にある場合、混合液の pH 及び塩濃度を上記の範囲とすれば、抗体モノマーの精製を有効に行い得る。なお、上記の混合液と同じ pH 及び塩濃度を有する洗浄液で、混合液通液後の多孔膜を洗浄することで、抗体モノマーをより高収率で精製することが可能となる。

[0059] このように、抗体モノマー及び夾雑物を含む混合液の pH 及び塩濃度を調整し、本実施の形態に係る多孔膜に通液することによって、凝集体を含む夾雑物を容易に除去し、抗体モノマーの精製を簡便に行うことが可能となる。この際、通液する溶液と、多孔膜に固定されたアミノ基及びアルキル基と、の接触は、強制対流によってなされるため、カラムクロマトグラフィーの場合と比べて極めて早い通液流速、例えば、1000 V/h 又はそれ以上の流速でも抗体モノマーの精製を行うことができる。

[0060] 本実施の形態に係る方法及び多孔膜を用い、本明細書の記載を参照することにより、高濃度の抗体と、高濃度の夾雑物と、を含み、さらに塩を含む溶液から、夾雑物を、簡便、高速、かつ広いプロセスウィンドウで除去することが可能となる。そのため、有効かつ迅速に、溶液から抗体を精製することが可能となる。したがって、精製された抗体を工業的に効率的に得ることが

可能となる。

[0061] 以下、実施例及び比較例（本明細書中において、単に「実施例等」ともいう。）に基づいて本実施の形態をさらに具体的に説明するが、本実施の形態の範囲は以下の実施例のみに限定されない。

[0062] [製造例 1] アニオン交換基が表面に固定された多孔膜モジュールの作製

(i) 中空系状の多孔質基材へのグラフト鎖の導入

外径 3.1 mm、内径 2.1 mm、長さ 100 mm、空孔率 70%、重量 0.135 g、後述するバブルポイント法で測定した最大細孔径が 0.3 μ m のポリエチレン製で中空系状の多孔質基材（旭化成ケミカルズ製、ポリエチレン B 膜）を密閉容器に入れて、容器内の空気を窒素で置換した。その後、容器の外側からドライアイスで冷却しながら、 γ 線 200 kGy を照射し、ラジカルを発生させた。得られたラジカルを有するポリエチレン製で中空系状の多孔質基材をガラス反応管に入れて、200 Pa 以下に減圧することにより、反応管内の酸素を除いた。ここに 40°C に調整したグリシジルメタクリレート（GMA）2.5 体積部、及びメタノール 97.5 体積部からなる反応液を、中空系状の多孔質基材の 20 質量部に注入した後、12 時間密閉状態で静置してグラフト重合反応を施し、グラフト鎖が導入された中空系多孔膜を得た。なお、GMA 及びメタノールからなる反応液は予め窒素でバブリングして、反応液内の酸素を窒素置換した。

[0063] グラフト重合反応後、反応管内の反応液を捨てた。次いで、反応管内にジメチルスルホキシドを入れて中空系多孔膜を洗浄することにより、残存したグリシジルメタクリレート、そのオリゴマー及び中空系多孔膜に固定されなかったグラフト鎖を除去した。洗浄液を捨てた後、さらにジメチルスルホキシドを入れて 2 回洗浄を行った。次いでメタノールを用いて洗浄を同様に 3 回行った。洗浄後の中空系多孔膜を乾燥し、重量を測定したところ、中空系多孔膜の重量はグラフト鎖導入前の 155% の 0.209 g であった。グラフト鎖導入前の多孔膜基材の重量に対するグラフト鎖の重量の比として定義

されるグラフト率は、55%であった。また反応後の中空糸は外径3.35 mm、内径2.15 mm、長さ108 mmであった。

[0064] (i i) グラフト鎖へのアミノ基及びアルキル基の固定

グラフト鎖を導入した後乾燥させた中空糸多孔膜をメタノールに10分以上浸漬して膨潤させた後、純水に浸漬して水置換した。次に、アミノ基と、アルキル基と、を有するアミン化合物として、イソプロピルアミン、ノルマルプロピルアミン、ブチルアミン、ジメチルアミン、ジエチルアミン、ジプロピルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、及びトリプロピルアミンを用意した。さらに、後述する実施例及び比較例に記載する、それぞれのアミン化合物に適した反応条件により、グラフト鎖が有するエポキシ基を開環反応によりアミン化合物に置換し、アミノ基と、アルキル基と、をグラフト鎖に固定した。置換率Tは、エポキシ基のモル数 N_0 のうち、アミン化合物に置換されたモル数を N_1 として下記式(1)により表される。

$$T = N_1 / N_0 \cdots (1)$$

$N_1 = N_0$ の場合は $T = 1$ となり、エポキシ基の100%がアミン化合物に置換された状態を示す。 $T = 1$ の場合は、グラフト鎖にジオール基は存在しない。

[0065] アミン化合物が置換されなかったエポキシ基は強アルカリ性の反応条件において、水と反応する事によりジオール基となる。そのため、Tは、下記式(2)の一次方程式を解くことにより、解析的に得られる。

$$1 = \{ (W_2 - W_1) / (M_1 T + M_0 (1 - T)) \} / \{ W_1 (d_g / (d_g + 100)) / M_2 \} \cdots (2)$$

式(2)中、 M_1 はアミン化合物の分子量、 M_0 は水の分子量で18、 W_1 はグラフト重合反応後の中空糸多孔膜の重量、 W_2 はアミノ基置換反応後の中空糸多孔膜の重量、 d_g はグラフト率、 M_2 はGMAの分子量で142である。

[0066] (i i i) アミノ基と、アルキル基と、が固定された中空糸多孔膜モジュールの作製

(i i) で得られた、アミノ基と、アルキル基と、がグラフト鎖を介して

固定された中空系多孔膜 1 本の長手方向の両末端を、中空系多孔膜の中空部を閉塞しないようにエポキシ系ポッティング剤で、内径 0.5 cm、有効長 9.2 cm のポリスルホン酸製モジュールケースに固定して、中空系多孔膜モジュールを作製した。これを、以下の実施例等において、評価モジュールとして用いた。

[0067] [評価方法例 1] バブルポイント法

中空系多孔膜の最大細孔径は、バブルポイント法を用いて測定した。長さ 8 cm の中空系多孔膜の一方の末端を閉塞し、他方の末端に圧力計を介して窒素ガス供給ラインを接続した。この状態で窒素ガスを供給してライン内部を窒素に置換した後、中空系多孔膜をエタノールに浸漬した。この時、エタノールがライン内に逆流しないように極僅かに窒素で圧力をかけた状態で、中空系多孔膜をエタノールに浸漬した。中空系多孔膜を浸漬した状態で、窒素ガスの圧力をゆっくりと増加させ、中空系多孔膜から窒素ガスの泡が安定して出始めた圧力 P を記録した。これより、最大細孔径を d 、表面張力を γ として、下記式 (3) に従って、中空系多孔膜の最大細孔径を算出した。

$$d = C_1 \gamma / P \cdots (3)$$

式 (3) 中、 C_1 は定数である。エタノールを浸漬液としたときの $C_1 \gamma = 0.632$ (kg/cm) であり、上式に P (kg/cm²) を代入することにより、最大細孔径 d (μ m) を求めた。

[0068] [評価方法例 2] 中空系多孔膜のタンパク質動的吸着容量の測定

0 mol/L 又は 0.1 mol/L の塩化ナトリウムを含む、20 mmol/L の Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液に 1 g/L の濃度でウシ血清アルブミン (BSA) (Sigma-Aldrich 製) を溶解した BSA 溶液を用い、破過が開始するまで (iii) で作成した中空系多孔膜モジュールに BSA 溶液を透過させた。なお、BSA 溶液を通液する前に、あらかじめ 20 mmol/L の Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液を 20 mL 通液し、多孔膜を平衡化した。ここで、0 mol/L の塩化ナトリウムを含む BSA 溶液の電気伝導度は 1.3 mS/cm であった。また、0.1 m

0.1/Lの塩化ナトリウムを含むBSA溶液の電気伝導度は10.2 mS/cmであった。溶液は評価モジュール内の中空系多孔膜の内側から外側に向かって、流速3 mL/minにて通液した。評価はGEヘルスケアバイオサイエンス製AKTA explorer 100を用いて実施した。具体的には、同装置において得られる、透過液の280 nmのUV吸光度が、供給液の280 nmのUV吸光度(150 mAU)の1/10(15 mAU)となった時点を破過点とし、その時点までに供給したBSA溶液の体積から、動的吸着容量を算出した。ここで、BSA溶液の濃度Q、評価モジュールが破過した時までに透過させたBSA溶液の体積 V_B 、及び評価モジュール内の実施例に係る中空系多孔膜の体積 V_M から、下記式(4)に基づいて動的吸着容量Aは算出可能である。

$$A = Q \times V_B / V_M \quad \dots (4)$$

中空系多孔膜の体積とは、中空部分を除いた体積である。また破過とは、透過液中のBSA濃度が、供給されたBSA溶液の濃度の10%である0.1 g/Lを超えた時点のことをいう。

[0069] [評価方法例3] 抗体凝集体選択除去評価

(i) 凝集体を含む抗体たんぱく溶液の調整

0 mol/L又は0.1 mol/Lの塩化ナトリウムを含む、20 mmol/LのTris-HCl (pH 8.0) 緩衝液に、抗体タンパク質(株式会社ベネシス製、献血ヴェノグロブリン-IH)を添加し、抗体タンパク質1 mg/mLが溶解した溶液を作成した。こうして得られた溶液を供給液とし、製造例の方法にて作成した各種リガンドを有する中空系多孔膜モジュールに、中空系多孔膜モジュールに含まれる膜体積に対して100体積に相当する供給液を通液し、透過後の抗体タンパク質の回収率と、抗体凝集体である2量体と、の比率を測定した。

[0070] (ii) 抗体回収率の評価

中空系多孔膜モジュール透過液中の抗体タンパク質の回収率は、アフィニティクロマトグラフィーによって評価した。島津製作所株式会社製高速液体

クロマトグラフLC-20AシステムにアフィニティカラムとしてApplied Biosystems製POROS G (Protein Gカラム)を取り付け、50 mmol/Lリン酸に0.15 mol/L NaClを含むバッファー (pH 7.0)を用い、室温において流速2 mL/minでカラムに通液し、ここにサンプルを100 μ L添加した。また、溶出には12 mmol/L塩酸に0.15 mol/L NaClを含むバッファーを用いた。(i)にて調整した濃度が1 mg/mLの抗体タンパク質溶液をサンプルとして添加し、プロテインGカラムに吸着させ、さらにプロテインGカラムから溶出させた場合のピーク面積を、1 mg/mLの抗体タンパク質濃度に対応させた。さらに、中空糸多孔膜モジュールの透過液も同様にして、カラムに通液して溶出ピーク面積を求め、1 mg/mLの抗体タンパク質溶液より得られた溶出ピーク面積との比率から、中空糸多孔膜モジュールの透過液中の抗体タンパク質濃度を算出し、回収率を得た。

[0071] (iii) 抗体モノマーと、抗体凝集体と、の比率の測定

抗体タンパク質に含まれる、抗体モノマーと、凝集体と、の比率は、ゲルろ過クロマトグラフィーによって評価した。島津製作所株式会社製クロマトグラフLC-20Aシステムにゲルろ過カラムとして東ソー株式会社製TSK Gel G3000SWXLを取り付け、0.1 mol/Lのリン酸及び0.2 mol/Lのアルギニン (pH 6.8)を含むバッファーを用いて、25°Cにおいて流速0.8 mL/minでカラムに通液し、ここに評価サンプルを20 μ L添加した。カラム透過後に抗体モノマーと、凝集体と、はそれぞれ分離した溶出ピークを示し、得られた抗体モノマーと、凝集体と、のピーク面積比から、溶液中でのそれぞれの存在比率を算出した。評価に用いた混合前の抗体タンパク質、及び(i)にて調整した溶液中の抗体タンパク質に含まれる2量体比率は、ともに4.06%であった。

[0072] [評価方法例4] 不純物除去性並びに抗体の回収率

(i) 不純物を含む溶液の調整

インビトロジェン社製、CD OptiCHO (登録商標) 無血清培地を

用いて得られた細胞培養液を、最大孔径0.45 μm の精密ろ過膜（旭化成メディカル社製、MF-SL）によりろ過、除濁し、細胞培養液の清澄液を得た。得られた清澄液をGEヘルスケアバイオサイエンス社製、AKTA c l o s s f l o wを用いて、脱塩濃縮することにより、HCPを主成分とする細胞培養液の不純物濃縮溶液を得た。得られた不純物溶液のタンパク質濃度を、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質としたBradford法（novexin社製、Bradford ULTRA kit）により測定したところ、3mg/mLであった。

[0073] 次に、抗体タンパク質（株式会社ベネシス製、献血ヴェノグロブリン-IH）を用意した。さらに、0.15mol/L NaClを含む、20mmol/L Tris-HCl（pH7.5）緩衝液に、不純物0.1mg/mLと、用意した抗体タンパク質10mg/mLと、を溶解し、溶液を作成した。こうして得られた溶液を供給液とし、製造例の方法にて作成した各種リガンドを有する中空糸多孔膜モジュールに通液し、抗体タンパク質の回収率と、透過後の不純物濃度と、を測定した。

[0074] (ii) 抗体回収率及び不純物除去性の評価

中空糸多孔膜モジュール透過液中の抗体タンパク質の回収率と、HCPを主成分とする不純物タンパク質の濃度と、は、アフィニティクロマトグラフィーによって評価した。島津製作所株式会社製高速液体クロマトグラフLC-20AシステムにアフィニティカラムとしてApplied Biosystems製POROS G（Protein Gカラム）を取り付け、50mmol/Lリン酸に0.15mol/L NaClを含むバッファー（pH7.0）を用い、室温において流速2mL/minでカラムに通液し、ここにサンプルを100 μL 添加した。また溶出には12mmol/L塩酸に0.15mol/L NaClを含むバッファーを用いた。その後、システムに、プロテインGカラムに吸着・溶出した抗体タンパク質の溶出ピークと、カラム吸着せず流出した不純物の溶出ピークと、を表示させた。さらに、抗体タンパク質の溶出ピーク面積と、不純物の溶出ピーク面積と、から、溶液

中の抗体回収率と、不純物濃度と、を算出した。

[0075] また、透過液中のHCP濃度は、CYGNUS社製、CHO Host Cell Protein ELISA Kit、3rd Generationを用いたELISA法により定量した。微量に含まれるDNAは、invitrogen社製、dsDNA HS Assay Qubit Starter Kitを用いた、Fluorometerにより定量した。ELISA法により求めた供給液中のHCP濃度は $87\mu\text{g/mL}$ 、Fluorometer法で求めたこの溶液中のDNA濃度は $1.7\mu\text{g/mL}$ であった。

[0076] (iii) 中空糸多孔膜モジュール透過液中の抗体モノマーと、凝集体と、の比率の測定

中空糸多孔膜モジュール透過液として得られる抗体タンパク質溶液は、不純物を含むため、抗体タンパク質のみをアフィニティカラムクロマトグラフィーにて単離した後、評価方法例3(ii)に記載した方法により、抗体モノマーと、凝集体と、の比率を求めた。アフィニティカラムはGEヘルスケアバイオサイエンス製、HiTrap Protein G HP 1mlをGEヘルスケアバイオサイエンス製AKTA explorer 100に取り付け、 20mmol/L リン酸バッファー (pH 7.0) にて平衡化した後、カラムに中空糸多孔膜モジュール透過液2mlを通液して、抗体タンパク質のみをカラムに吸着させた。続いて、カラムを平衡化バッファー10mlで洗浄した後、 50mmol/L クエン酸バッファー (pH 3.3) を用いて、吸着した抗体タンパク質を溶出して、3mlの単離された抗体タンパク質溶液を回収し、ここに直ちに 50mmol/L Tris-HCl (pH 8.2) バッファー溶液17mlを加えて中和した。得られた抗体タンパク質単離液を評価方法例3(ii)の方法により評価し、抗体モノマーと、凝集体と、の比率を求めた。

[0077] [実施例1]

グラフト鎖へのイソプロピルアミノ基(2級アミノ基とイソプロピル基)の

固定：

製造例 1 (i) によって得られた、グラフト鎖を導入した中空糸多孔膜を、メタノールに 10 分以上浸漬して膨潤させた後、純水に浸漬して水置換した。また、精製水 20 mL にイソプロピルアミンを全体積が 40 mL となるまで攪拌しながら添加し、反応液を作製した。次に、上記 (i) で得られたグラフト鎖を導入した中空糸多孔膜の乾燥重量に対して 25 質量部の反応液をガラス反応管に入れ、40℃に調整した。その後、反応液に、純水浸漬後のグラフト鎖を導入した中空糸多孔膜を挿入し、48 時間静置して、グラフト鎖のエポキシ基をイソプロピルアミノ基に置換し、2 級アミノ基と、イソプロピル基と、がグラフト鎖を介して固定された中空糸多孔膜を得た。得られた中空糸多孔膜は外径 3.43 mm、内径 2.10 mm であり、式 (2) より、グラフト鎖が有する全エポキシ基の 72% がイソプロピルアミノ基によって置換されていた。

[0078] 次に、イソプロピルアミノ基を有する中空糸多孔膜を用いて、製造例 1 (i i i) に従って、中空糸多孔膜モジュールを作製した。中空糸多孔膜モジュール内に占める中空糸多孔膜の中空部分を除いた多孔膜のみの体積は 0.53 mL であった。中空糸多孔膜の内表面積は 6.1 cm² であった。得られた中空糸多孔膜モジュールを用いて、評価方法例 2 に従い BSA の動的吸着容量を求めたところ、塩化ナトリウム濃度が 0 mol/L の場合、63 mg/mL であり、塩化ナトリウム濃度が 0.1 mol/L の場合、33 mg/mL であった。

[0079] さらに、塩化ナトリウム濃度が 0 mol/L の場合の BSA の動的吸着容量を評価した後の中空糸多孔膜モジュールに、電気伝導度が 40 mS/cm 以上である、1 mol/L の NaCl を含む 20 mmol Tris-HCl (pH 8.0) 溶液 (電気伝導度 84 mS/cm) 20 mL を通液して、吸着した BSA を溶出した。その後、評価方法例 2 に従い、塩化ナトリウム濃度が 0 mol/L の場合の中空糸多孔膜モジュールの BSA の動的吸着容量を再度求めたところ、63 mg/mL と同じ値が得られた。即ち、実施例

1に係る中空糸多孔膜モジュールは、高濃度の塩を含む溶液により適切に洗浄され、再生することができた。

[0080] また、評価方法例2に従い、抗体タンパク質溶液透過後の回収率と、2量体比率と、を評価した。抗体回収率は、塩化ナトリウム濃度が0 mol/Lの場合、89%であり、塩化ナトリウム濃度が0.1 mol/Lの場合、95%であった。また、2量体比率は、塩化ナトリウム濃度が0 mol/Lの場合、1.03%であり、塩化ナトリウム濃度が0.1 mol/Lの場合、1.21%であった。これらの結果を表1に示す。

[表1]

	アミン化合物	置換率 [%]	BSA動的吸着容量 [mg/mL]			0M NaCl抗体溶液: 透過量100膜体積		0.1M NaCl抗体溶液: 透過量100膜体積	
			0M NaCl	0.1M NaCl	洗浄後 0M NaCl	抗体回収率 [%]	2量体比率 [%]	抗体回収率 [%]	2量体比率 [%]
実施例1	イソプロピルアミン(IPA)	72	63	33	63	89	1.03	95	1.21
比較例1	ブチルアミン(BA)	79	15	6	9	92	3.02	97	3.32
実施例2	プロピルアミン(PA)	78	49	21	47	90	1.08	95	1.24
実施例3	ジエチルアミン(DEA)	89	59	24	58	91	0.83	96	0.91
比較例2	ジメチルアミン(DMA)	69	22	11	21	93	3.13	97	3.65
比較例3	ジプロピルアミン(DPA)	68	16	7	10	94	3.21	98	3.54
実施例4	トリエチルアミン(TEA)	69	67	31	65	92	0.71	97	0.78
実施例5	トリプロピルアミン(TPA)	63	53	28	50	89	1.05	96	1.23
比較例4	トリメチルアミン(TMA)	90	60	5	58	88	3.26	98	3.45

[0081] [比較例 1]

グラフト鎖へのブチルアミノ基（2級アミノ基とブチル基）の固定：

製造例 1（i）によって得られた、グラフト鎖を導入した中空糸多孔膜を、メタノールに10分以上浸漬して膨潤させた後、純水に浸漬して水置換し

た。また、精製水 92.7 重量部にノルマルブチルアミン 7.3 重量部を添加し、攪拌溶解する事により、反応液を作製した。次に、上記 (i) で得られたグラフト鎖を導入した中空糸多孔膜の乾燥重量に対して 25 質量部の反応液をガラス反応管に入れ、40℃に調整した。その後、反応液に、純水浸漬後のグラフト鎖を導入した中空糸多孔膜を挿入し、20 時間静置して、グラフト鎖のエポキシ基をブチルアミノ基に置換し、2 級アミノ基と、ブチル基と、がグラフト鎖を介して固定された中空糸多孔膜を得た。得られた中空糸多孔膜は外径 3.49 mm、内径 2.16 mm であり、式 (2) より、グラフト鎖が有する全エポキシ基の 79% がブチルアミノ基によって置換されていた。

[0082] 次に、ブチルアミノ基を有する中空糸多孔膜を用いて、製造例 1 (iii) に従って、中空糸多孔膜モジュールを作製した。中空糸多孔膜モジュール内に占める中空糸多孔膜の中空部分を除いた多孔膜のみの体積は 0.53 mL であった。中空糸多孔膜の内表面積は 6.2 cm² であった。得られた中空糸多孔膜モジュールを用いて、評価方法例 2 に従い BSA の動的吸着容量を求めたところ、塩化ナトリウム濃度が 0 mol/L の場合、15 mg/mL であり、塩化ナトリウム濃度が 0.1 mol/L の場合、6 mg/mL であって、吸着容量は少なかった。

[0083] さらに、0 mol/L での BSA 吸着評価後の中空糸多孔膜モジュールに、1 mol/L の NaCl を含む 20 mmol Tris-HCl (pH 8.0) 溶液 20 mL を通液して、吸着した BSA を溶出した。その後、評価方法例 2 に従い、塩化ナトリウム濃度が 0 mol/L の場合の中空糸多孔膜モジュールの BSA の動的吸着容量を再度求めたところ、9 mg/mL と 1 回目より少ない値が得られた。即ち、比較例 1 に係る中空糸多孔膜モジュールは、高濃度の塩を含む溶液により適切に洗浄、再生することができなかった。

[0084] また、評価方法例 2 に従い、抗体タンパク質溶液透過後の回収率と、2 量体比率と、を評価した。抗体回収率は、塩化ナトリウム濃度が 0 mol/L

の場合、92%であり、塩化ナトリウム濃度が0.1mol/Lの場合、97%であった。また、2量体比率は、塩化ナトリウム濃度が0mol/Lの場合、3.02%であり、塩化ナトリウム濃度が0.1mol/Lの場合、3.32%であり、実施例1と比較して劣っていた。これらの結果を表1に示す。

[0085] [実施例2]

グラフト鎖へのプロピルアミノ基（2級アミノ基とプロピル基）の固定：

製造例1（i）によって得られた、グラフト鎖を導入した中空糸多孔膜を、メタノールに10分以上浸漬して膨潤させた後、純水に浸漬して水置換した。また、精製水20mLにノルマルプロピルアミンを全体積が40mLとなるまで攪拌しながら添加し、反応液を作製した。次に、上記（i）で得られたグラフト鎖を導入した中空糸多孔膜の乾燥重量に対して25質量部の反応液をガラス反応管に入れ、40℃に調整した。その後、反応液に、純水浸漬後のグラフト鎖を導入した中空糸多孔膜を挿入し、24時間静置して、グラフト鎖のエポキシ基をプロピルアミノ基に置換し、2級アミノ基と、プロピル基と、がグラフト鎖を介して固定された中空糸多孔膜を得た。得られた中空糸多孔膜は外径3.44mm、内径2.10mmであり、式（2）より、グラフト鎖が有する全エポキシ基の78%がプロピルアミノ基によって置換されていた。

[0086] 次に、プロピルアミノ基を有する中空糸多孔膜を用いて、製造例1（i i i）に従って、中空糸多孔膜モジュールを作製した。中空糸多孔膜モジュール内に占める中空糸多孔膜の中空部分を除いた多孔膜のみの体積は0.54mLであった。中空糸多孔膜の内表面積は6.1cm²であった。得られた中空糸多孔膜モジュールを用いて、評価方法例2に従いBSAの動的吸着容量を求めたところ、塩化ナトリウム濃度が、0mol/L及び0.1mol/Lの場合、それぞれ49mg/mL及び21mg/mLであった。

[0087] さらに、0mol/LでのBSA吸着評価後の中空糸多孔膜モジュールに、1mol/LのNaClを含む20mmol Tris-HCl（pH8

． 0) 溶液 20 mL を通液して、吸着した BSA を溶出した。その後、評価方法例 2 に従い、塩化ナトリウム濃度が 0 mol/L の場合の中空系多孔膜モジュールの BSA の動的吸着容量を再度求めたところ、47 mg/mL とほぼ同じ値が得られた。即ち、本中空系多孔膜モジュールは高濃度の塩を含む溶液により適切に洗浄され、再生することができた。

[0088] また、評価方法例 2 に従い、抗体タンパク質溶液透過後の回収率と 2 量体比率を評価した。抗体回収率は、塩化ナトリウム濃度が 0 mol/L の場合、90% であり、塩化ナトリウム濃度が 0.1 mol/L の場合、95% であった。また、2 量体比率は、塩化ナトリウム濃度が 0 mol/L の場合、1.08% であり、塩化ナトリウム濃度が 0.1 mol/L の場合、1.24% であった。これらの結果を表 1 に示す。

[0089] [実施例 3]

グラフト鎖へのジエチルアミノ基（3 級アミノ基とジエチルアミノ基）の固定：

製造例 1 (i) によって得られた、グラフト鎖を導入した中空系多孔膜を、メタノールに 10 分以上浸漬して膨潤させた後、純水に浸漬して水置換した。また、精製水 20 mL にジエチルアミンを全体積が 40 mL となるまで攪拌しながら添加し、反応液を作製した。次に、上記 (i) で得られたグラフト鎖導入後の中空系多孔膜の乾燥重量に対して 25 質量部の反応液をガラス反応管に入れ、30°C に調整した。その後、反応液に、純水浸漬後のグラフト鎖を導入した中空系多孔膜を挿入し、24 時間静置して、グラフト鎖のエポキシ基をジエチルアミノ基に置換し、3 級アミノ基と、エチル基と、がグラフト鎖を介して固定された中空系多孔膜を得た。得られた中空系多孔膜は外径 3.54 mm、内径 2.17 mm であり、式 (2) より、グラフト鎖が有する全エポキシ基の 89% がジエチルアミノ基によって置換されていた。

[0090] 次に、ジエチルアミノ基を有する中空系多孔膜を用いて、製造例 1 (ii) に従って、中空系多孔膜モジュールを作製した。中空系多孔膜モジュール

ル内に占める中空系多孔膜の中空部分を除いた多孔膜のみの体積は0.56 mLであった。中空系多孔膜の内表面積は6.3 cm²であった。得られた中空系多孔膜モジュールを用いて、評価方法例2に従いBSAの動的吸着容量を求めたところ、塩化ナトリウム濃度が0 mol/L及び0.1 mol/Lの場合、それぞれ59 mg/mL及び24 mg/mLであった。

[0091] さらに、0 mol/LでのBSA吸着評価後の中空系多孔膜モジュールに、1 mol/LのNaClを含む20 mmol Tris-HCl (pH 8.0) 溶液20 mLを通液して、吸着したBSAを溶出した。その後、評価方法例2に従い、塩化ナトリウム濃度が0 mol/Lの場合の中空系多孔膜モジュールのBSAの動的吸着容量を再度求めたところ、58 mg/mLとほぼ同じ値が得られた。即ち、本中空系多孔膜モジュールは、高濃度の塩を含む溶液により適切に洗浄され、再生することができた。

[0092] また、評価方法例2に従い、抗体タンパク質溶液透過後の回収率と、2量体比率と、を評価した。抗体回収率は、塩化ナトリウム濃度が0 mol/Lの場合、91%であり、塩化ナトリウム濃度が0.1 mol/Lの場合、96%であった。2量体比率は、塩化ナトリウム濃度が0 mol/Lの場合、0.83%であり、塩化ナトリウム濃度が0.1 mol/Lの場合、0.91%であった。これらの結果を表1に示す。

[0093] [比較例2]

グラフト鎖へのジメチルアミノ基（3級アミノ基とメチル基）の固定：

製造例1 (i) によって得られた、グラフト鎖を導入した中空系多孔膜を、メタノールに10分以上浸漬して膨潤させた後、純水に浸漬して水置換した。また、精製水25 mLにジメチルアミンを全体積が40 mLとなるまで攪拌しながら添加し、反応液を作製した。反応液を作製した。次に、上記(i) で得られたグラフト鎖導入後の中空系多孔膜の乾燥重量に対して25質量部の反応液をガラス反応管に入れ、30℃に調整した。その後、反応液に、純水浸漬後のグラフト鎖を導入した中空系多孔膜を挿入し、48時間静置して、グラフト鎖のエポキシ基をジメチルアミノ基に置換し、3級アミノ基

と、メチル基と、がグラフト鎖を介して固定された中空糸多孔膜を得た。得られた中空糸多孔膜は外径3.40mm、内径2.07mmであり、式(2)より、グラフト鎖が有する全エポキシ基の69%がジメチルアミノ基によって置換されていた。

[0094] 次に、ジメチルアミノ基を有する中空糸多孔膜を用いて、製造例1(i i)に従って、中空糸多孔膜モジュールを作製した。中空糸多孔膜モジュール内に占める中空糸多孔膜の中空部分を除いた多孔膜のみの体積は0.53mLであった。中空糸多孔膜の内表面積は6.0cm²であった。得られた中空糸多孔膜モジュールを用いて、評価方法例2に従いBSAの動的吸着容量を求めたところ、塩化ナトリウム濃度が、0mol/L及び0.1mol/Lの場合、それぞれ22mg/mL及び11mg/mLであり、吸着容量は少なかった。

[0095] さらに、0mol/LでのBSA吸着評価後の中空糸多孔膜モジュールに、1mol/LのNaClを含む20mmol Tris-HCl(pH8.0)溶液20mLを通液して、吸着したBSAを溶出した。その後、評価方法例2に従い、塩化ナトリウム濃度が0mol/Lの場合の中空糸多孔膜モジュールのBSAの動的吸着容量を再度求めたところ、21mg/mLとほぼ同じ値が得られた。したがって、比較例2に係る中空糸多孔膜モジュールは、高濃度の塩を含む溶液により適切に洗浄、再生することができたものの、BSAの動的吸着容量が少なかった。

[0096] また、評価方法例2に従い、抗体タンパク質溶液透過後の回収率と、2量体比率と、を評価した。抗体回収率は、塩化ナトリウム濃度が0mol/Lの場合、93%であり、塩化ナトリウム濃度が0.1mol/Lの場合、97%であった。また、2量体比率は、塩化ナトリウム濃度が0mol/Lの場合、3.13%であり、塩化ナトリウム濃度が0.1mol/Lの場合、3.65%であった。これらの結果を表1に示す。

[0097] [比較例3]

グラフト鎖へのジプロピルアミノ基(3級アミノ基とプロピル基)の固定:

製造例 1 (i) によって得られた、グラフト鎖を導入した中空糸多孔膜を、メタノールに 10 分以上浸漬して膨潤させた後、純水に浸漬して水置換した。また、精製水 5 mL と、イソプロピルアルコール 20 mL と、を混合攪拌した後、ジプロピルアミンを全体積が 40 mL となるまで攪拌しながら添加し、反応液を作製した。次に、上記 (i) で得られたグラフト鎖導入後の中空糸多孔膜の乾燥重量に対して 25 質量部の反応液をガラス反応管に入れ、30°C に調整した。その後、反応液に、純水浸漬後のグラフト鎖を導入した中空糸多孔膜を挿入し、48 時間静置して、グラフト鎖のエポキシ基をジプロピルアミノ基に置換し、3 級アミノ基と、プロピル基と、がグラフト鎖を介して固定された中空糸多孔膜を得た。得られた中空糸多孔膜は外径 3.46 mm、内径 2.11 mm であり、式 (2) より、グラフト鎖が有する全エポキシ基の 68% がジプロピルアミノ基によって置換されていた。

[0098] 次に、ジプロピルアミノ基を有する中空糸多孔膜を用いて、製造例 1 (i i i) に従って、中空糸多孔膜モジュールを作製した。中空糸多孔膜モジュール内に占める中空糸多孔膜の中空部分を除いた多孔膜のみの体積は 0.54 mL であった。中空糸多孔膜の内表面積は 6.1 cm² であった。得られた中空糸多孔膜モジュールを用いて、評価方法例 2 に従い BSA の動的吸着容量を求めたところ、塩化ナトリウム濃度が 0 mol/L 及び 0.1 mol/L の場合、それぞれ 16 mg/mL 及び 7 mg/mL であり、吸着容量は少なかった。

[0099] さらに、0 mol/L での BSA 吸着評価後の中空糸多孔膜モジュールに、1 mol/L の NaCl を含む 20 mmol Tris-HCl (pH 8.0) 溶液 20 mL を通液して、吸着した BSA を溶出した。その後、評価方法例 2 に従い、塩化ナトリウム濃度が 0 mol/L の場合の中空糸多孔膜モジュールの BSA の動的吸着容量を再度求めたところ、10 mg/mL と 1 回目より低い値が得られた。よって、比較例 3 に係る中空糸多孔膜モジュールは、高濃度の塩を含む溶液により適切に洗浄、再生することができなかった。

[0100] また、評価方法例 2 に従い、抗体タンパク質溶液透過後の回収率と、2 量体比率と、を評価した。抗体回収率は、塩化ナトリウム濃度が 0 mol/L の場合、94%であり、塩化ナトリウム濃度が 0.1 mol/L の場合、98%であった。また、2 量体比率は、塩化ナトリウム濃度が 0 mol/L の場合、3.21%であり、塩化ナトリウム濃度が 0.1 mol/L の場合、3.54%であった。これらの結果を表 1 に示す。

[0101] [実施例 4]

グラフト鎖へのトリエチルアミノ基（4 級アミノ基とエチル基）の固定：

製造例 1（i）によって得られた、グラフト鎖を導入した中空糸多孔膜を、メタノールに 10 分以上浸漬して膨潤させた後、純水に浸漬して水置換した。また、 1 mol/L の NaOH 水溶液 17 mL と、メタノール 17 mL と、を混合攪拌し、ここにトリエチルアミン塩酸塩 4.81 g を攪拌しながら添加し、反応液を作製した。次に、上記（i）で得られたグラフト鎖導入後の中空糸多孔膜の乾燥重量に対して 25 質量部の反応液をガラス反応管に入れ、 40°C に調整した。その後、調整した反応液に、純水浸漬後のグラフト鎖を導入した中空糸多孔膜を挿入し、36 時間静置して、グラフト鎖のエポキシ基をトリエチルアミノ基に置換し、4 級アミノ基と、エチル基と、がグラフト鎖を介して固定された中空糸多孔膜を得た。得られた中空糸多孔膜は外径 3.51 mm 、内径 2.13 mm であり、式（2）より、グラフト鎖が有する全エポキシ基の 69% がトリエチルアミノ基によって置換されていた。

[0102] 次に、トリエチルアミノ基を有する中空糸多孔膜を用いて、製造例 1（i i i）に従って、中空糸多孔膜モジュールを作製した。中空糸多孔膜モジュール内に占める中空糸多孔膜の中空部分を除いた多孔膜のみの体積は 0.56 mL であった。中空糸多孔膜の内表面積は 6.2 cm^2 であった。得られた中空糸多孔膜モジュールを用いて、評価方法例 2 に従い BSA の動的吸着容量を求めたところ、塩化ナトリウム濃度が 0 mol/L 及び 0.1 mol/L の場合、それぞれ 67 mg/mL 及び 31 mg/mL であった。

[0103] さらに、 0 mol/L でのBSA吸着評価後の中空糸多孔膜モジュールに、 1 mol/L のNaClを含む 20 mmol Tris-HCl ($\text{pH } 8.0$) 溶液 20 mL を通液して、吸着したBSAを溶出した。その後、評価方法例2に従い、塩化ナトリウム濃度が 0 mol/L の場合の中空糸多孔膜モジュールのBSAの動的吸着容量を再度求めたところ、 65 mg/mL とほぼ同じ値が得られた。即ち、実施例4に係る中空糸多孔膜モジュールは、塩を含む溶液により適切に洗浄され、再生することができた。

[0104] また、評価方法例2に従い、抗体タンパク質溶液透過後の回収率と、2量体比率と、を評価した。抗体回収率は、塩化ナトリウム濃度が 0 mol/L の場合、 92% であり、塩化ナトリウム濃度が 0.1 mol/L の場合、 97% であった。また、2量体比率は、塩化ナトリウム濃度が 0 mol/L の場合、 0.71% であり、塩化ナトリウム濃度が 0.1 mol/L の場合、 0.78% であった。これらの結果を表1に示す。

[0105] [実施例5]

グラフト鎖へのトリプロピルアミノ基（4級アミノ基とプロピル基）の固定：

製造例1（i）によって得られた、グラフト鎖を導入した中空糸多孔膜を、メタノールに10分以上浸漬して膨潤させた後、純水に浸漬して水置換した。また、メタノール 17 mL 、精製水 7.5 mL 、及び水酸化ナトリウム 0.84 g を混合攪拌し、ここにトリプロピルアミン塩酸塩 4.71 g を攪拌しながら添加し、反応液を作製した。次に、上記（i）で得られたグラフト鎖導入後の中空糸多孔膜の乾燥重量に対して25質量部の反応液をガラス反応管に入れ、 40°C に調整した。その後、調整した反応液に、純水浸漬後のグラフト鎖を導入した中空糸多孔膜を挿入し、46時間静置して、グラフト鎖のエポキシ基をトリプロピルアミノ基に置換し、4級アミノ基と、プロピル基と、がグラフト鎖を介して固定された中空糸多孔膜を得た。得られた中空糸多孔膜は外径 3.43 mm 、内径 2.09 mm であり、式（2）より、グラフト鎖が有する全エポキシ基の 63% がトリプロピルアミノ基によっ

て置換されていた。

[0106] 次に、トリプロピルアミノ基を有する中空糸多孔膜を用いて、製造例 1 (i i i) に従って、中空糸多孔膜モジュールを作製した。中空糸多孔膜モジュール内に占める中空糸多孔膜の中空部分を除いた多孔膜のみの体積は 0. 5 3 m L であった。中空糸多孔膜の内表面積は 6. 0 c m² であった。得られた中空糸多孔膜モジュールを用いて、評価方法例 2 に従い B S A の動的吸着容量を求めたところ、塩化ナトリウム濃度が 0 m o l / L 及び 0. 1 m o l / L の場合、それぞれ 5 3 m g / m L 及び 2 7 m g / m L であった。

[0107] さらに、0 m o l / L での B S A 吸着評価後の中空糸多孔膜モジュールに、1 m o l / L の N a C l を含む 2 0 m m o l T r i s - H C l (p H 8 . 0) 溶液 2 0 m L を通液して、吸着した B S A を溶出した。その後、評価方法例 2 に従い、塩化ナトリウム濃度が 0 m o l / L の場合の中空糸多孔膜モジュールの B S A の動的吸着容量を再度求めたところ、5 0 m g / m L とほぼ同じ値が得られた。即ち、実施例 5 に係る中空糸多孔膜モジュールは、塩を含む溶液により適切に洗浄され、再生することができた。

[0108] また、評価方法例 2 に従い、抗体タンパク質溶液透過後の回収率と、2 量体比率と、を評価した。抗体回収率は、塩化ナトリウム濃度が 0 m o l / L の場合、8 9 % であり、塩化ナトリウム濃度が 0. 1 m o l / L の場合、9 6 % であった。2 量体比率は、塩化ナトリウム濃度が 0 m o l / L の場合、1. 0 5 % であり、塩化ナトリウム濃度が 0. 1 m o l / L の場合、1. 2 3 % であった。これらの結果を表 1 に示す。

[0109] [比較例 4]

グラフト鎖へのトリメチルアミノ基 (4 級アミノ基とメチル基) の固定 :

製造例 1 (i) によって得られた、グラフト鎖を導入した中空糸多孔膜を、メタノールに 1 0 分以上浸漬して膨潤させた後、純水に浸漬して水置換した。また、精製水 1 2. 5 m L と、1 m o l / L N a O H 水溶液 1 2. 5 m L と、を混合攪拌し、ここに 1. 1 9 g のトリメチルアミン塩酸塩を加えて、反応液を作製した。次に、上記 (i) で得られたグラフト鎖導入後の中

中空系多孔膜の乾燥重量に対して25質量部の反応液をガラス反応管に入れ、40℃に調整した。その後、調整した反応液に純水浸漬後のグラフト鎖を導入した中空系多孔膜を挿入し、6時間静置して、グラフト鎖のエポキシ基をトリメチルアミノ基に置換し、4級アミノ基と、メチル基と、がグラフト鎖を介して固定された中空系多孔膜を得た。得られた中空系多孔膜は外径3.53mm、内径2.15mmであり、式(2)より、グラフト鎖が有する全エポキシ基の90%がトリメチルアミノ基によって置換されていた。

[0110] トリメチルアミノ基を有する中空系多孔膜を用いて、製造例1(iii)に従って、中空系多孔膜モジュールを作製した。中空系多孔膜モジュール内に占める中空系多孔膜の中空部分を除いた多孔膜のみの体積は0.56mLであった。中空系多孔膜の内表面積は6.2cm²であった。得られた中空系多孔膜モジュールを用いて、評価方法例2に従いBSAの動的吸着容量を求めたところ、塩化ナトリウム濃度が0mol/Lの場合、60mg/mLであったが、塩化ナトリウム濃度が0.1mol/Lの場合、6mg/mLと低かった。

[0111] さらに、0mol/LでのBSA吸着評価後の中空系多孔膜モジュールに、1mol/LのNaClを含む20mmol Tris-HCl(pH8.0)溶液20mLを通液して、吸着したBSAを溶出した。さらに、評価方法例2に従い、0mol/L塩化ナトリウムでの中空系多孔膜モジュールのBSAの動的吸着容量を再度求めたところ、58mg/mLとほぼ同じ値が得られた。即ち、比較例4に係る中空系多孔膜モジュールは、塩を含む溶液により適切に洗浄、再生することができたが、塩濃度の高い溶液でのタンパク質吸着性に劣ることが判明した。

[0112] また、評価方法例2に従い、抗体タンパク質溶液透過後の回収率と、2量体比率と、を評価した。抗体回収率は、塩化ナトリウム濃度が0mol/Lの場合、88%であり、塩化ナトリウム濃度が0.1mol/Lの場合、98%であった。2量体比率は、塩化ナトリウム濃度が0mol/Lの場合、3.26%であり、塩化ナトリウム濃度が0.1mol/Lの場合、3.4

5%であった。これらの結果を表1に示す。

[0113] [実施例7] イソプロピルアミノ基を有する多孔膜による抗体溶液の精製

評価方法例3にて作成したHCPを主成分とする不純物と、抗体タンパク質と、からなる供給液を、実施例1にて作成した中空糸多孔膜モジュールに通液した。さらに、中空糸多孔膜モジュールに含まれる膜体積に対して20体積に相当する透過液を、フラクションとして連続的に採取した。また、透過液量に対する抗体タンパク質の回収率、及び各透過フラクション中の不純物濃度を測定した。結果を表2に示す。表2に示すように、中空糸多孔膜モジュールの透過液中の不純物は、供給液に比べ大幅に減少した。また、透過液の体積が膜体積の40倍を超えると、抗体タンパク質の回収率は90%以上となった。さらに、各透過フラクションに含まれる抗体タンパク質のモノマーと、凝集体と、の比率を評価方法例3に記載する方法により評価し、抗体タンパク質中の2量体比率を求めた。この結果も表2に示す。表2に示すように、中空糸多孔膜モジュール透過液中の抗体タンパク質の2量体は、供給液に比べ有意に減少していた。

[表2]

	リガンド種	評価項目	供給原液	各フラクションの透過量 MV:膜体積(membrane volume)				
				20MV	40MV	60MV	80MV	100MV
実施例7	IPA	抗体回収率		84%	91%	93%	94%	96%
		不純物	100ug/mL	7.8ug/mL	10.9ug/mL	11.3ug/mL	12.5ug/mL	13.1ug/mL
		HCP	87ug/mL	6.9ug/mL	8.7ug/mL	9.5ug/mL	10.2ug/mL	11.1ug/mL
		DNA	1.7ug/mL	18.9ng/mL	18.5ng/mL	18.4ng/mL	18.3ng/mL	18.4ng/mL
実施例8	PA	2量体比率	4.06%	0.10%	0.54%	0.89%	1.09%	1.27%
		抗体回収率		82%	90%	93%	95%	97%
		不純物	100ug/mL	9.1ug/mL	11.4ug/mL	12.4ug/mL	13.1ug/mL	15.3ug/mL
		HCP	87ug/mL	7.4ug/mL	9.5ug/mL	10.2ug/mL	11.3ug/mL	12.8ug/mL
実施例9	DEA	DNA	1.7ug/mL	19.6ng/mL	18.7ng/mL	18.9ng/mL	19.1ng/mL	18.9ng/mL
		2量体比率	4.06%	0.11%	0.56%	0.97%	1.12%	1.35%
		抗体回収率		85%	92%	93%	95%	97%
		不純物	100ug/mL	14.7ug/mL	20.6ug/mL	23.2ug/mL	24.9ug/mL	26ug/mL
実施例10	TEA	HCP	87ug/mL	13.1ug/mL	16.2ug/mL	18.2ug/mL	19.3ug/mL	19.9ug/mL
		DNA	1.7ug/mL	20.4ng/mL	18.2ng/mL	19ng/mL	19.3ng/mL	18.4ng/mL
		2量体比率	4.06%	0.08%	0.43%	0.62%	0.86%	0.98%
		抗体回収率		87%	93%	95%	95%	98%
比較例5	TMA	不純物	100ug/mL	13.7ug/mL	19.9ug/mL	22.1ug/mL	23.8ug/mL	25.4ug/mL
		HCP	87ug/mL	11.5ug/mL	13.2ug/mL	14.6ug/mL	15.4ug/mL	16.9ug/mL
		DNA	1.7ug/mL	18.4ng/mL	18.2ng/mL	19.2ng/mL	19.1ng/mL	18.9ng/mL
		2量体比率	4.06%	0.00%	0.32%	0.45%	0.63%	0.83%
		抗体回収率		86%	93%	94%	95%	98%
		不純物	100ug/mL	43.8ug/mL	48.5ug/mL	53.2ug/mL	55.6ug/mL	58.9ug/mL
		HCP	87ug/mL	39.8ug/mL	42.3ug/mL	46.5ug/mL	49.3ug/mL	51.9ug/mL
		DNA	1.7ug/mL	19.4ng/mL	18.7ng/mL	20.1ng/mL	21.3ng/mL	21.2ng/mL
		2量体比率	4.06%	1.08%	3.13%	3.57%	3.82%	3.88%

[0114] [実施例8] プロピルアミノ基を有する多孔膜による抗体溶液の精製

評価方法例3にて作成したHCPを主成分とする不純物と、抗体タンパク質と、からなる供給液を、実施例2にて作成した中空糸多孔膜モジュールに通液した。さらに、中空糸多孔膜モジュールに含まれる膜体積に対して20体積に相当する透過液を、フラクションとして連続的に採取した。また、透過液量に対する抗体タンパク質の回収率、及び各透過フラクション中の不純

物濃度を測定した。結果を表 2 に示す。表 2 に示すように、中空糸多孔膜モジュールの透過液中の不純物は、供給液に比べ大幅に減少していた。また、透過液の体積が膜体積の 40 倍を超えると、抗体タンパク質の回収率は 90 % 以上となった。さらに、各透過フラクションに含まれる抗体タンパク質のモノマーと、凝集体と、の比率を評価方法例 3 に記載する方法により評価し、抗体タンパク質中の 2 量体比率を求めた。この結果も表 2 に示す。表 2 に示すように、中空糸多孔膜モジュール透過液中の抗体タンパク質の 2 量体は、供給液に比べ有意に減少していた。

[0115] [実施例 9] ジエチルアミノ基を有する多孔膜による抗体溶液の精製

評価方法例 3 にて作成した HCP を主成分とする不純物と、抗体タンパク質と、からなる供給液を、実施例 3 にて作成した中空糸多孔膜モジュールに通液した。さらに、中空糸多孔膜モジュールに含まれる膜体積に対して 20 体積に相当する透過液を、フラクションとして連続的に採取した。また、透過液量に対する抗体タンパク質の回収率、及び各透過フラクション中の不純物濃度を測定した。結果を表 2 に示す。表 2 に示すように、中空糸多孔膜モジュールの透過液中の不純物は、供給液に比べ大幅に減少していた。また、透過液の体積が膜体積の 40 倍を超えると、抗体タンパク質の回収率は 90 % 以上となった。さらに、各透過フラクションに含まれる抗体タンパク質のモノマーと、凝集体と、の比率を評価方法例 3 に記載する方法により評価し、抗体タンパク質中の 2 量体比率を求めた。この結果も表 2 に示す。表 2 に示すように、中空糸多孔膜モジュール透過液中の抗体タンパク質の 2 量体は、供給液に比べ有意に減少していた。

[0116] [実施例 10] トリエチルアミノ基を有する多孔膜による抗体溶液の精製

評価方法例 3 にて作成した HCP を主成分とする不純物と、抗体タンパク質と、からなる供給液を、実施例 4 にて作成した中空糸多孔膜モジュールに通液した。さらに、中空糸多孔膜モジュールに含まれる膜体積に対して 20 体積に相当する透過液を、フラクションとして連続的に採取した。また、透過液量に対する抗体タンパク質の回収率、及び各透過フラクション中の不純

物濃度を測定した。結果を表 2 に示す。表 2 に示すように、中空糸多孔膜モジュールの透過液中の不純物は、供給液に比べ大幅に減少していた。また、透過液の体積が膜体積の 40 倍を超えると、抗体タンパク質の回収率は 90 % 以上となった。さらに、各透過フラクションに含まれる抗体タンパク質のモノマーと、凝集体と、の比率を評価方法例 3 に記載する方法により評価し、抗体タンパク質中の 2 量体比率を求めた。この結果も表 2 に示す。表 2 に示すように、中空糸多孔膜モジュール透過液中の抗体タンパク質の 2 量体は、供給液に比べ大幅に減少していた。

[0117] [比較例 5] トリメチルアミノ基を有する多孔膜による抗体溶液の精製

評価方法例 3 にて作成した HCP を主成分とする不純物と、抗体タンパク質と、からなる供給液を、比較例 4 にて作成した中空糸多孔膜モジュールに通液した。さらに、中空糸多孔膜モジュールに含まれる膜体積に対して 20 体積に相当する透過液を、フラクションとして連続的に採取した。また、透過液量に対する抗体タンパク質の回収率、及び各透過フラクション中の不純物濃度を測定した。結果を表 2 に示す。表 2 に示すように、透過液の体積が膜体積の 40 倍を超えると、抗体タンパク質の回収率は 90 % 以上となるものの、比較例に係る中空糸多孔膜モジュールの透過液中の不純物は、供給液に比べ半分程度にしか減少していないことが示された。また、各透過フラクションに含まれる抗体タンパク質のモノマーと、凝集体と、の比率を評価方法例 3 に記載する方法により評価し、抗体タンパク質中の 2 量体比率を求めた。この結果も表 2 に示す。表 2 に示すように、比較例に係る中空糸多孔膜モジュールの透過液中の抗体タンパク質の 2 量体の減少程度は、少ないことが示された。

[0118] 以上により、疎水性の多孔質基材と、多孔質基材の細孔を含む表面に固定された、多孔質基材と異なる材質の親水性を有する分子鎖と、炭素原子数 2 又は 3 のアルキル基が 1 乃至 3 個結合している窒素原子、水酸基、及びカルボニル基を含む側鎖と、を備える多孔膜と、その製造方法とが示され、さらにその多孔膜を用いることにより、実用的な塩濃度において、抗体溶液から

不純物を吸着除去し、抗体を精製することが、高速でかつ簡便になされることが示された。

- [0119] 本出願は、２００９年７月３日に日本国特許庁に出願された日本特許出願（特願２００９－１５８４２１）に基づくものであり、その内容はここに参照として取り込まれる。

産業上の利用可能性

- [0120] 本実施の形態に係る方法は、従来のカラムクロマトグラフィーを用いる方法に比べて、より高速かつ高効率な処理が可能であり、スケールアップも容易である。このことから、工業レベルで医薬品を製造する際の抗体の精製に適するという、産業上の利用可能性を有する。

請求の範囲

- [請求項1] 疎水性多孔質基材と、前記多孔質基材の細孔表面に固定された、前記多孔質基材と異なる材質の親水性を有する分子鎖と、炭素原子数が2又は3のアルキル基が1乃至3個結合している窒素原子を含む前記分子鎖の側鎖と、備える多孔膜を用いて、2量体以上の抗体凝集体を含む抗体溶液を前記多孔膜に透過させ、前記抗体凝集体を前記多孔膜に吸着させる事により、透過液中に精製された抗体モノマーを回収する、抗体モノマーの精製方法。
- [請求項2] 前記抗体溶液が、宿主細胞由来タンパク質、デオキシリボ核酸、エンドトキシン、プロテアーゼ、及びウィルスより選択される少なくとも1種類の夾雑物をさらに含む、請求項1に記載の抗体モノマーの精製方法。
- [請求項3] 前記抗体溶液の塩濃度が0.3mol/L以下であり、前記側鎖が、水酸基及びカルボニル基をさらに含む、請求項1又は2に記載の抗体モノマー溶液の精製方法。
- [請求項4] 前記側鎖が、プロピルアミノ基、イソプロピルアミノ基、ジエチルアミノ基、トリエチルアミノ基、及びトリプロピルアミノ基より選択される、少なくとも1種類のアミノ基を含み、
前記抗体溶液が、不純物タンパク質、宿主細胞由来タンパク質、デオキシリボ核酸、エンドトキシン、プロテアーゼ、及びウィルスより選択される少なくとも1種類の不純物をさらに含み、
前記抗体モノマーの回収率が80%以上であり、
さらに、前記抗体溶液を前記多孔膜に透過させた後、40mS/cm以上の溶液を前記多孔膜に通液して前記多孔膜に吸着した不純物を溶出し、前記多孔膜を再利用可能にする、請求項1乃至3のいずれか一項に記載の抗体モノマーの精製方法。
- [請求項5] 前記多孔質基材が、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、及びポリフッ化ビニリデンより選択される

少なくとも一種からなる、請求項 1 乃至 4 のいずれか一項に記載の抗体モノマーの精製方法。

[請求項6] 前記分子鎖の骨格が、グリシジルメタクリレート、グリシジルアクリレート、グリシジルソルベート、グリシジリティタコレート、及びグリシジルマレエートから選択される少なくとも 1 種類の単量体よりなる重合体である、請求項 1 乃至 5 のいずれか一項に記載の抗体モノマーの精製方法。

[請求項7] 前記分子鎖の有する全側鎖の 60%以上 97%以下に、プロピルアミノ基、イソプロピルアミノ基、ジエチルアミノ基、トリエチルアミノ基、及びトリプロピルアミノ基より選択される窒素原子を含む官能基が 1 個結合している、請求項 1 乃至 6 のいずれか一項に記載の、抗体モノマーの精製方法。

[請求項8] 疎水性多孔質基材と、
前記多孔質基材の細孔表面に固定された、前記多孔質基材と異なる材質の親水性を有する分子鎖と、
を備える多孔膜であって、
前記分子鎖の有する全側鎖の 60%以上 97%以下に、プロピルアミノ基、イソプロピルアミノ基、ジエチルアミノ基、トリエチルアミノ基、及びトリプロピルアミノ基より選択される官能基が 1 個結合し、
前記分子鎖の有する全側鎖の 3%以上 40%以下の側鎖はジオール基を有する、
多孔膜。

[請求項9] 静電相互作用、疎水性相互作用、及び水素結合相互作用より選ばれる少なくとも一つの相互作用により、タンパク質を含む有機高分子を吸着する吸着体を用いた、抗体モノマーの精製方法であって、
前記吸着体の表面又は該吸着体の有する細孔の表面に、溶液中で負電荷を有する官能基が結合されており、

前記タンパク質を含む溶液を、前記吸着体に透過させることにより、前記タンパク質の凝集体を含む不純物を除去することを含み、

前記吸着体の透過液中の前記タンパク質の濃度は、透過前の前記タンパク質の濃度の $1/2$ 以上であり、前記透過液に含まれる前記タンパク質の回収率は 70% 以上である、タンパク質の精製方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/061031

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

B01D71/82(2006.01)i, B01D69/08(2006.01)i, B01D71/26(2006.01)i, B01D71/34(2006.01)i, C07K1/34(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)

B01D71/82, B01D69/08, B01D71/26, B01D71/34, C07K1/34

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)

MEDLINE/CAplus/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDplus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2008-517906 A (GE Healthcare Bio-Sciences AB.), 29 May 2008 (29.05.2008), & WO 2006/043895 A1 & US 2007/0167613 A1 & US 2007/0259453 A1 & EP 1807205 A	9/1-9
X/Y	JP 2008-505851 A (GE Healthcare Bio-Sciences AB.), 28 February 2008 (28.02.2008), & WO 2005/082926 A1 & US 2007/0112178 A1 & EP 1718668 A	9/1-9
Y	WO 2009/054226 A1 (Asahi Kasei Chemicals Corp.), 30 April 2009 (30.04.2009), (Family: none)	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

23 July, 2010 (23.07.10)

Date of mailing of the international search report

03 August, 2010 (03.08.10)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/061031

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6177548 B1 (Min Wan, et al.), 23 January 2001 (23.01.2001), (Family: none)	1-9
Y	PLATONOVA, G.A., et al., Quantitative fast fractionation of a pool of polyclonal antibodies by immunoaffinity membrane chromatography., J. Chromatogr. A, 1999, Vol.852, pp.129-140	1-9
P, X/P, Y	JP 2010-70490 A (Asahi Kasei Chemicals Corp.), 02 April 2010 (02.04.2010), (Family: none)	9/1-9
A	Takanobu SUGO et al., "Hoshasen Graft Jugo ni Okeru Ko Kinoka Saizensen Saishukai Hoshasen Graft Jugo Gijutsu o Oyo shita Shin Sozai no Sosei", Converttech, 2005, vol.33, no.12, pages 34 to 38	1-9
A	JP 2010-158624 A (Asahi Kasei Chemicals Corp.), 22 July 2010 (22.07.2010), (Family: none)	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/061031

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

The inventions according to claims 1-8 relate to a method for purifying an antibody monomer from an antibody solution containing a dimeric or more polymeric antibody aggregate using a porous membrane, wherein the porous membrane comprises a hydrophobic porous base material, a hydrophilic molecule chain of a material different from the porous base material which is immobilized on the surface of pores of the porous base material, and a side chain of the molecule chain which contains a nitrogen atom to which 1 to 3 C2 or C3 alkyl groups are attached. The invention according to claim 9 relates to a method for purifying an antibody monomer using an adsorbent capable of adsorbing
(continued to extra sheet)

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/061031

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

organic polymers including proteins through at least one interaction selected from an electrostatic interaction, a hydrophobic interaction and a hydrogen-bonding interaction.

The method of the invention according to claim 9 does not utilize the porous membrane recited in claims 1-8, and a common matter between the invention according to claim 9 and the inventions according to claims 1-8 is a matter that they relate to a method for purifying an antibody monomer using an adsorbent capable of separating an aggregate. However, the method is known and therefore cannot be regarded as a common special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. B01D71/82(2006.01)i, B01D69/08(2006.01)i, B01D71/26(2006.01)i, B01D71/34(2006.01)i, C07K1/34(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. B01D71/82, B01D69/08, B01D71/26, B01D71/34, C07K1/34			
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			
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） MEDLINE/Caplus/BIOSIS/WPIDS（STN）, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580（JDreamII）			
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
X/Y	JP 2008-517906 A（ジーイー・ヘルスケア・バイオサイエンス・アクチボラグ） 2008.05.29 & WO 2006/043895 A1 & US 2007/0167613 A1 & US 2007/0259453 A1 & EP 1807205 A		9/1-9
X/Y	JP 2008-505851 A（ジーイー・ヘルスケア・バイオサイエンス・アクチボラグ） 2008.02.28 & WO 2005/082926 A1 & US 2007/0112178 A1 & EP 1718668 A		9/1-9
☒ 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 23.07.2010		国際調査報告の発送日 03.08.2010	
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） 佐々木 大輔 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 3 9 6 2

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
Y	WO 2009/054226 A1 (旭化成ケミカルズ株式会社) 2009.04.30 (ファミリーなし)	1-9
Y	US 6177548 B1 (Min Wan, et al.) 2001.01.23 (ファミリーなし)	1-9
Y	PLATONOVA, G.A., et al., Quantitative fast fractionation of a pool of polyclonal antibodies by immunoaffinity membrane chromatography., J. Chromatgr. A, 1999, Vol.852, pp.129-140	1-9
P, X/P, Y	JP 2010-70490 A (旭化成ケミカルズ株式会社) 2010.04.02 (ファミリーなし)	9/1-9
A	須郷高信 他, 放射線グラフト重合における高機能化最前線 最終回 放射線グラフト重合技術を応用した新素材の創製, コンバーテック, 2005, Vol.33, No.12, pp.34-38	1-9
A	JP 2010-158624 A (旭化成ケミカルズ株式会社) 2010.07.22 (ファミリーなし)	1-9

第Ⅱ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）

法第8条第3項（P C T 17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。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ 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、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T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。

第Ⅲ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）

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きの国際調査機関は認めた。

請求項1－8に係る発明は、疎水性多孔質基材と、前記多孔質基材の細孔表面に固定された、前記多孔質基材と異なる材質の親水性を有する分子鎖と、炭素原子数が2又は3のアルキル基が1乃至3個結合している窒素原子を含む前記分子鎖の側鎖とを備える多孔膜を用いた2量体以上の抗体凝集体を含む抗体溶液から抗体モノマーを精製する方法に関する発明である。請求項9に係る発明は、静電相互作用、疎水性相互作用、及び水素結合相互作用より選ばれる少なくとも一つの相互作用により、タンパク質を含む有機高分子を吸着する吸着体を用いた抗体モノマーの精製方法に関する発明である。

そして、上記請求項9に係る発明は、請求項1－8の多孔膜を用いる方法ではなく、凝集体を分離可能な吸着体を用いた抗体モノマーの精製方法である点で共通するものの、そのような方法は公知であるから、PCT規則13.2における共通の特別な技術的特徴とは認められない。

1. ☐ 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項について作成した。
2. ☒ 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項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。
3. ☐ 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項のみについて作成した。
4. ☐ 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項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 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が、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。