(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
2014 年 10 月 23 日(23.10.2014)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2014/171437 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 1/18 (2006.01)
B01D 15/04 (2006.01)
B01D 15/08 (2006.01)
B01J 20/24 (2006.01)
B01J 20/26 (2006.01)
B01J 20/281 (2006.01)
B01J 20/30 (2006.01)
B01J 20/34 (2006.01)
B01J 39/04 (2006.01)
B01J 39/26 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)
C08F 291/00 (2006.01)
G01N 30/26 (2006.01)
G01N 30/54 (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2014/060677

(22) 国際出願日: 2014 年 4 月 15 日(15.04.2014)

(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 2013-086123 2013 年 4 月 16 日(16.04.2013) JP
特願 2013-221510 2013 年 10 月 24 日(24.10.2013) JP
特願 2014-032149 2014 年 2 月 21 日(21.02.2014) JP

(71) 出願人: 旭化成メディカル株式会社(ASAHI KASEI MEDICAL CO., LTD.) [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: 谷口 弘樹(TANIGUCHI, Hiroki); 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目１０５番地 Tokyo (JP). 後藤 雅子(GOTO, Masako); 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目１０５番地 Tokyo (JP). 小熊 一郎(KOGUMA, Ichiro); 〒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); 〒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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,

[続葉有]

(54) **Title**: METHOD FOR PURIFYING ANTIBODY PROTEIN

(54) 発明の名称 : 抗体タンパク質の精製方法

	CC	AA 凝集体成分① 含有量 (mg)	DD 凝集体成分① 含有率 (%)	CC AA 凝集体成分② 含有量 (mg)	DD 凝集体成分② 含有率 (%)	CC 単量体成分③ 含有量 (mg)	BB DD 単量体成分③ 含有率 (%)	EE 凝集体吸着率 (mg/mg)	FF 単量体回収率 (mg/mg)	HH GG 抗体の量量 抗体含有量 (mg)	II 抗体回収率 (%)	JJ 流速 (ml/min)	KK 担体容積 (ml)	LL 流速/担体体積 (ml/min/ml)
MM	混合溶液1 (プロテインA溶出画分)	0.87	1.2	0.35	1.7	54.44	97.1			56.06				
NN	実施例1 回収溶液	0.20	0.4	0.27	0.5	51.98	99.1	0.71	0.85	52.05	92.9%	0.40	5.30	0.20
OO	実施例2 回収溶液	0.17	0.4	0.29	0.6	44.90	99.4	0.64	0.82	45.16	00.6%	0.40	5.30	0.20
MM	混合溶液3 (プロテインA溶出画分)	1.40	0.5	3.17	1.2	256.95	98.8			260.36				
PP	実施例3 回収溶液	0.19	0.1	0.39	0.4	240.87	99.5	0.73	0.94	242.15	93.0%	0.40	5.30	0.20
MM	混合溶液3 (プロテインA溶出画分)	1.41	1.9	1.11	1.5	71.65	96.6			74.17				
QQ	実施例4 回収溶液	0.18	0.3	0.24	0.4	60.71	99.3	0.83	0.85	61.14	82.4%	6	0.6	10
MM	混合溶液4 (プロテインA溶出画分)	0.44	1.5	0.26	0.9	28.8	97.6			29.70				
RR	実施例5	0.11	0.4	0.08	0.3	25.57	99.3	0.71	0.91	25.76	89.5%	6	0.6	10
MM	混合溶液5 (プロテインA溶出画分)	1.4	2.1	0.72	1.1	64.7	96.8			66.8				
RR	実施例6	0.05	0.1	0.19	0.3	56.63	99.6	0.69	0.88	56.9	85.8%	6	0.6	10
MM	混合溶液6 (プロテインA溶出画分)	1.86	2.0	1.61	1.7	90.41	96.3			93.88				
RR	実施例7	0	0.0	0.0	0.4	92.04	99.6	0.91	0.92	92.14	00.6%	6	0.6	10
MM	混合溶液7 (プロテインA溶出画分)	4.05	4	2.85	2.8	94.51	93.2			101.4				
RR	実施例8	0.11	0.13	0.48	0.54	85.1	99.3	0.91	0.9	85.69	84.5%	1.5	2.25	6
MM	混合溶液8 (プロテインA溶出画分)	3.79	3.9	2.90	2.4	90.07	93.4			110.76				
RR	実施例9	0	0	0.39	0.49	80.5	99.5	0.92	0.84	80.89	80.7%	1.5	2.25	6
MM	混合溶液9 (プロテインA溶出画分)	1.58	1.6	2.17	2.3	92.55	96.1			96.32				
RR	実施例10	0	0	0.35	0.45	78.51	99.6	0.91	0.85	78.87	80.2%	1.5	2.25	6
MM	混合溶液10 (プロテインA溶出画分)	2.04	1.6	3.57	2.8	120.43	95.4			129.00				
RR	実施例11	0.6	0.58	1.16	1.12	101.74	98.3	0.7	0.82	103.5	80.6%	0.3	2.25	1.2
MM	混合溶液11 (プロテインA溶出画分)	1.65	1.5	2.95	2.8	121.36	96.2			126.14				
RR	実施例12	0.51	0.51	1.13	1.14	97.62	98.3	0.68	0.8	99.27	79.0%	0.3	2.25	1.2

AA Aggregate component
BB Monomer component
CC Content
DD Content rate
EE Aggregate adsorption rate
FF Monomer recovery rate
GG Total amount of antibody
HH Antibody content
II Antibody recovery rate
JJ Flow velocity
KK Carrier volume
LL Flow velocity/carrier volume
MM Mixed solution (Protein A elution fraction)
NN Example 1 Recovered solution
OO Example 2 Recovered solution
PP Example 3 Recovered solution
QQ Example 4 Recovered solution
RR Example

(57) **Abstract**: A method for purifying a biologically active agent from a mixed solution of impurities and the biologically active agent, wherein the method uses an ion exchange chromatography carrier which comprises a substrate and a copolymer that is fixed to the substrate surface and includes at least N- isopropyl acrylamide as a monomer unit, and recovers the biologically active agent by allowing the mixed solution to flow, at a constant temperature, through a container that stores the carrier.

(57) 要約: 不純物と生理活性物質を含む混合溶液から、生理活性物質を精製する精製方法であって、基材と、基材表面に固定された、少なくともＮ－イソプロピルアクリルアミドをモノマー単位として含む共重合体と、を備えるイオン交換クロマトグラフィー担体を使用し、混合溶液を、担体を格納する容器に一定温度でフロースルーさせることによって、生理活性物質を回収する、生理活性物質を精製する方法。

WO 2014/171437 A1

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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, 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, 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

発明の名称 ： 抗体タンパク質の精製方法

技術分野

[0001] 本発明は、生体分子の精製技術に関し、抗体タンパク質の精製方法に関する。

背景技術

[0002] 免疫グロブリン（抗体タンパク質）は、免疫反応を司る生理活性物質である。近年、医薬品、診断薬あるいは対応する抗原タンパク質の分離精製材料等の用途において、抗体タンパク質の利用価値が高まっている。抗体タンパク質は免疫した動物の血液あるいは抗体産生能を保有する細胞の細胞培養液又は動物の腹水培養液から取得される。但し、抗体タンパク質を含有する血液や培養液は、抗体タンパク質以外のタンパク質、又は細胞培養に用いた原料液に由来する複雑な夾雑成分等の不純物成分を包含する。そのため、不純物成分から抗体タンパク質を分離精製するには、煩雑で長時間を要する操作が通常必要である。

[0003] 液体クロマトグラフィーは、抗体タンパク質の分離精製に重要である。抗体タンパク質を分離するためのクロマトグラフィー手法として、ゲルろ過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、イオン交換クロマトグラフィー、及び逆相クロマトグラフィー等があり、これらの手法を組み合わせることで抗体タンパク質が分離精製される。

[0004] イオン交換クロマトグラフィーは、基材表面のイオン交換基を固定相として移動相中に存在する対イオンを可逆的に吸着することにより分離を行う方法である。基材の形状としては、ビーズや、平膜、中空糸等の膜などが採用されており、これらの基材にカチオン交換基又はアニオン交換基を結合したものが固体吸着剤（固定相）として市販されている。一般的に、カチオン交換基を有する固体吸着剤は、抗体タンパク質を主として吸着し、他の夾雑物の大半を素通りさせる特性を有するため、抗体タンパク質の濃縮分離に用い

られている。

[0005] カチオン交換基は、カルボキシル基等の弱カチオン交換基と、スルホン酸基等の強カチオン交換基と、に大別される。弱カチオン交換基を有する吸着剤は、移動相のｐＨが変化すると吸着剤表面の電荷が変化して、抗体タンパク質の結合容量が変動する欠点がある。そのため、弱カチオン交換基を有する吸着剤を抗体タンパク質の分離精製に用いた場合、分離の再現性が悪く、抗体タンパク質の回収率が低くなる可能性がある。一方、強カチオン交換基を有する吸着剤は、移動相のｐＨが変動しても吸着剤表面の電荷が変化しないため、抗体タンパク質の結合容量が変化しにくい。工業的な抗体タンパク質の分離精製プロセスでは、移動相のｐＨを一定に保つのが難しいにもかかわらず、一方では分離の再現性が厳しく要求されることから、強カチオン交換基を有する吸着剤が用いられている。

[0006] 従来のイオン交換基を有する吸着剤を用いた抗体タンパク質の精製方法では、移動相の塩濃度を高めることにより、抗体タンパク質と、吸着剤と、の静電的相互作用を弱くして、固定相に吸着させた抗体タンパク質を溶出させることが一般的に行われている。ここで、移動相の塩濃度が高いほど、抗体タンパク質の溶出が容易になる傾向にある。しかし、移動相の塩濃度が高くなると、タンパク質どうしの疎水性相互作用が高くなり、タンパク質の会合体や凝集体が生じやすくなる傾向にある。このように、抗体タンパク質の溶出の容易さと、凝集体の生じやすさとは、トレードオフの関係にある。そのため、抗体タンパク質の収率、濃度、及び溶出速度等、精製の際に要求される様々な条件を満たす移動相の塩濃度を設定することは困難である。

[0007] そこで、従来のイオン交換基を有する吸着材の問題を解決すべく、固定相に吸着させた抗体タンパク質等の生理活性物質を溶出する際に、移動相の塩濃度を高めるのではなく、表面の有効イオン交換基密度を温度によって変化させ、生理活性物質を溶出することが可能である温度応答性吸着剤が提案されている。

[0008] 特許文献１では、固定相表面の有効荷電密度を温度変化によって変化させ

ることが可能である、荷電を有する共重合体を含む充填剤、製造方法及びそれを用いた温度応答性クロマトグラフィー法が開示されている。特許文献２では、原子移動ラジカル重合法によって、基材表面に０～８０℃の温度範囲内で水和力が変化するポリマーを高密度に固定化した温度応答性クロマトグラフィーの固定相が開示されている。特許文献３には、イソプロピルアルコールを溶媒として、原子移動ラジカル法により、荷電を有し、０～８０℃の温度範囲内で水和力が変化するポリマーを成長反応させることを特徴とした温度応答性クロマトグラフィー担体の製造方法が開示されている。特許文献４では、水系移動相を含む特定の条件下で、生物学、医学、薬学等の分野において有用な高分子量の生理活性物質を分離できる、固体表面に０～８０℃の温度範囲内で水和力が変化する荷電ポリマーを固定した液体クロマトグラフィー用担体の製造方法が開示されている。非特許文献１では、原子移動ラジカル重合法により調製された、カルボキシル基を有する温度応答性クロマトグラフィー担体及びその製造法が開示されている。その中で、原子移動ラジカル重合法に用いるモノマー組成において、リゾチームの分離に最適化されたモノマー組成が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開第９９／０６１９０４号

特許文献2：特開２００７－６９１９３号公報

特許文献3：特開２００９－８５９３３号公報

特許文献4：国際公開第０１／０７４４８２号

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Ｐｏｌｙｍｅｒ　Ｐｒｅｐｒｉｎｔｓ，Ｊａｐａｎ　Ｖｏｌ．５８，Ｎｏ．２，３Ｔ１－１３（２００９）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] しかし、上述した文献は、生理活性物質を効率的に精製する方法を明示してはおらず、例えば、工業的な規模における生理活性物質の分離精製プロセスには適さない。そこで、本発明は、生理活性物質を効率的に精製することが可能な生理活性物質の精製方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは上記課題を解決するために、種々の角度から検討を加えて、研究開発を行った。その結果、本発明者らは、特定の温度において、不純物と、生理活性物質と、を含む混合溶液を、基材と、前記基材表面に固定された、少なくともＮ－イソプロピルアクリルアミドをモノマー単位として含む共重合体と、を備えるイオン交換クロマトグラフィー担体、あるいは、温度応答性イオン交換クロマトグラフィー担体に接触させることで、不純物をクロマトグラフィー担体に選択的に吸着させ、目的の生理活性物質を高純度に精製できることを見出した。

[0013] 係る本発明者らの知見に基づく本発明の態様は、不純物と生理活性物質を含む混合溶液から、生理活性物質を精製する精製方法であって、基材と、基材表面に固定された、少なくともＮ－イソプロピルアクリルアミドをモノマー単位として含む共重合体と、を備えるイオン交換クロマトグラフィー担体を使用し、混合溶液を、担体を格納する容器に一定温度でフロースルーさせることによって、生理活性物質を回収する、生理活性物質を精製する方法である。

[0014] 本発明の別の態様は、不純物と生理活性物質を含む混合溶液から、生理活性物質を精製する精製方法であって、少なくとも１つの温度応答性イオン交換クロマトグラフィー担体を使用し、混合溶液を、担体を格納する容器に一定温度でフロースルーさせることによって、生理活性物質を回収する、生理活性物質を精製する方法である。

[0015] 本発明のまた別の態様は、不純物と生理活性物質を含む混合溶液から、不純物を除去する方法であって、基材と、基材表面に固定された、少なくともＮ－イソプロピルアクリルアミドをモノマー単位として含む共重合体と、を

備えるイオン交換クロマトグラフィー担体を使用し、混合溶液を、担体を格納する容器に一定温度でフロースルーさせることによって、不純物を除去する方法である。

[0016] 本発明のさらに別の態様は、不純物と生理活性物質を含む混合溶液から、不純物を除去する方法であって、少なくとも１つの温度応答性イオン交換クロマトグラフィー担体を使用し、混合溶液を、担体を格納する容器に一定温度でフロースルーさせることによって、不純物を除去する方法である。

[0017] 本発明は、従来技術からは全く予想し得なかったもので、従来技術には全くなかった新規な抗体の分離システムへの発展が期待される。

発明の効果

[0018] 本発明に係る生理活性物質の精製方法によれば、生理活性物質を効率的に精製することが可能となる。特に、生理活性物質の失活を招く低ｐＨ条件や高温条件に晒すことなく、生理活性物質を効率的に精製し、また、不純物を効率的に除去することを可能としたものである。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]実施例１に係るプロテインＡカラムからの溶出画分をサイズ排除クロマトグラフィーにかけた際の吸光度のグラフである。

[図2]図１のグラフの拡大図である。

[図3]実施例３に係るプロテインカラムからの溶出画分をサイズ排除クロマトグラフィーにかけた際の吸光度のグラフである。

[図4]図３のグラフの拡大図である。

[図5]実施例１ないし１２の結果を示す表である。

発明を実施するための形態

[0020] 以下、本発明の好適な実施の形態（以下において、「実施の形態」という。）について詳細に説明する。なお以下の示す実施の形態は、この発明の技術的思想を具体化するための装置や方法を例示するものであって、この発明の技術的思想は構成部材の組み合わせ等を下記のものに特定するものではない。この発明の技術的思想は、特許請求の範囲において種々の変更を加える

ことができる。

[0021] 実施の形態に係る生理活性物質の精製方法は、不純物と生理活性物質を含む混合溶液から、生理活性物質を精製する精製方法であって、基材と、基材表面に固定された、少なくともＮ－イソプロピルアクリルアミドをモノマー単位として含む共重合体と、を備えるイオン交換クロマトグラフィー担体を使用し、特定の温度において、混合溶液を、担体を格納する容器にフロースルーさせることによって、生理活性物質を回収する、精製方法である。上記特定の温度とは、例えば、担体に不純物を質量分率で５０％以上吸着させられ、かつ、生理活性物質を質量分率で７０％以上回収できる温度であることが好ましい。

[0022] 以下において、イオン交換クロマトグラフィー担体は、イオン交換クロマトグラフィーの固体吸着剤、あるいはイオン交換クロマトグラフィーの固定相とも、表現される。例えば、固定相表面の有効荷電密度を温度変化によって変化させることが可能である、温度応答性カチオン性イオン交換担体が、イオン交換クロマトグラフィー担体として使用される。

[0023] 生理活性物質とは、例えば、抗体タンパク質の単量体成分である。不純物とは、例えば、抗体タンパク質の二量体以上の凝集体成分である。

[0024] 担体に不純物を質量分率で５０％以上吸着させられる温度とは、イオン交換クロマトグラフィー担体を格納する容器に加えられる前の混合溶液に含まれていた不純物の全質量に対し、担体に吸着した不純物の質量の比が５０％以上となるような温度である。ここで、温度が高くなるほど、イオン交換クロマトグラフィー担体に吸着する、抗体タンパク質の二量体以上の凝集体成分等の不純物の量は増える傾向にある。回収した溶液の質量に対する不純物の質量の割合は、例えば２％以下、好ましくは１％以下となる。

[0025] また、生理活性物質を質量分率で７０％以上回収できる温度とは、イオン交換クロマトグラフィー担体を格納する容器に加えられる前の混合溶液に含まれていた生理活性物質の全質量に対し、担体を格納する容器を通過した溶液に含まれる生理活性物質の質量の比（以下、「回収率」ともいう。）が７

０％以上となるような温度である。ここで、温度が高くなるほど、抗体タンパク質の単量体成分等の生理活性物質の回収率は低くなる傾向にある。

[0026] 担体を格納する容器に不純物と生理活性物質の混合溶液をフロースルーするときの設定温度としては、精製目的の生理活性物質の担体に対する吸着性が低く、不純物の担体に対する吸着性が高い温度を選択する。抗体タンパク質の単量体がカチオン性イオン交換担体に吸着しにくい傾向にあり、不純物が吸着しやすい傾向にある温度領域とは、例えば５℃以上６０℃以下、好ましくは１０℃以上５０℃以下、より好ましくは１５℃以上４０℃以下、さらに好ましくは２０℃以上３５℃以下、特に好ましくは２５℃である。

[0027] ここで、目的の生理活性物質の回収率を重視する場合は温度を下げ、純度を重視するときは温度を上げるといったように、バッファー等を変えることなく、温度を調節することにより、目的に応じた回収物が得られる。

[0028] 更に、目的の生理活性物質の特性により、精製目的の生理活性物質と不純物の吸着度合が異なる場合があるが、そのような場合でも、バッファー等を変えることなく、温度を調節することにより、目的の生理活性物質が回収物として得られる。

[0029] なお、生理活性物質の精製を行う現場では、２０℃以上３５℃以下の室温条件で用いることができるクロマトグラフィー担体が望まれている。その理由としては、高温条件に晒すことで生理活性物質が変性し活性が損なわれうることがわかっているからである。また、工業化する際に、温度を精度よく均一に制御することが困難であるから、一定温度の室温で利用できるクロマトグラフィー担体の需要は高い。

[0030] 生理活性物質の一例である抗体タンパク質は、生化学における一般的な定義のとおり、脊椎動物の感染防禦機構としてＢリンパ球が産生する糖タンパク質分子（ガンマグロブリン又は免疫グロブリンともいう）である。例えば、実施の形態に係る方法で精製される抗体タンパク質は、ヒトの医薬品として使用され、投与対象であるヒトの体内にある抗体タンパク質と実質的に同一の構造を有する。

[0031] 抗体タンパク質は、ヒト抗体タンパク質であってもよく、ヒト以外のウシ及びマウス等の哺乳動物由来抗体タンパク質であってもよい。あるいは、抗体タンパク質は、ヒトＩｇＧとのキメラ抗体タンパク質、及びヒト化抗体タンパク質であってもよい。ヒトＩｇＧとのキメラ抗体タンパク質とは、可変領域がマウスなどのヒト以外の生物由来であるが、その他の定常領域がヒト由来の免疫グロブリンに置換された抗体タンパク質である。また、ヒト化抗体タンパク質とは、可変領域のうち、相補性決定領域（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ－ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　ｒｅｇｉｏｎ：　ＣＤＲ）がヒト以外の生物由来であるが、その他のフレームワーク領域（ｆｒａｍｅｗｏｒｋ　ｒｅｇｉｏｎ：　ＦＲ）がヒト由来である抗体タンパク質である。ヒト化抗体タンパク質は、キメラ抗体タンパク質よりも免疫原性がさらに低減される。

[0032] 実施の形態に係る方法の精製対象の一例である抗体タンパク質のクラス（アイソタイプ）及びサブクラスは特に限定されない。例えば、抗体タンパク質は、定常領域の構造の違いにより、ＩｇＧ，ＩｇＡ，ＩｇＭ，ＩｇＤ，及びＩｇＥの５種類のクラスに分類される。しかし、実施の形態に係る方法が精製対象とする抗体タンパク質は、５種類のクラスの何れであってもよい。また、ヒト抗体タンパク質においては、ＩｇＧにはＩｇＧ１～ＩｇＧ４の４つのサブクラスがあり、ＩｇＡにはＩｇＡ１とＩｇＡ２の２つのサブクラスがある。しかし、実施の形態に係る方法が精製対象とする抗体タンパク質のサブクラスは、いずれであってもよい。なお、Ｆｃ領域にタンパク質を結合したＦｃ融合タンパク質等の抗体関連タンパク質も、実施の形態に係る方法が精製対象とする抗体タンパク質に含まれ得る。

[0033] さらに、抗体タンパク質は、由来によっても分類することができる。しかし、実施の形態に係る方法が精製対象とする抗体タンパク質は、天然のヒト抗体タンパク質、遺伝子組換え技術により製造された組換えヒト抗体タンパク質、モノクローナル抗体タンパク質、及びポリクローナル抗体タンパク質の何れであってもよい。これらの抗体タンパク質の中でも、実施の形態に係

る方法が精製対象とする抗体タンパク質としては、抗体医薬としての需要や重要性の観点から、ヒトＩｇＧが好適であるが、これに限定されない。

[0034] 実施の形態に係る精製方法で用いられる、基材と、基材表面に固定された、少なくともＮ－イソプロピルアクリルアミドをモノマー単位として含む共重合体と、を備えるイオン交換クロマトグラフィー担体は、カチオン性イオン交換基を含むことが好ましい。例えば、実施の形態に係るカチオン性イオン交換担体は、カチオン性イオン交換基を有するモノマー及び／又はカチオン性イオン交換基導入前駆体モノマーと、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドモノマーと、を含むモノマー組成物を、表面リビングラジカル重合法及び放射線グラフト重合法等の重合法によって基材表面に重合して形成される。

[0035] Ｎ－イソプロピルアクリルアミドの存在は熱分解ガスクロマトグラフ質量分析法（ＧＣ／ＭＳ）により特定できる。Ｎ－イソプロピルアクリルアミドの単独重合体を熱分解ＧＣ／ＭＳにより解析すると、イソプロピルアミン部位や、イソプロピルイソシアネート、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドのモノマー部位が測定できる。Ｎ－イソプロピルアクリルアミドの単独重合体の解析結果と、対象のイオン交換クロマトグラフィー担体の解析結果を比較することにより、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドがモノマー単位として含まれているかどうか判断できる。他のモノマー等と、Ｎ－イソプロピルアクリルアミド由来のピークが重なる時は、カラムの長さを変えたり、カラム自体を変えたりすることにより、解析条件を変え、対応することが可能である。

[0036] 実施の形態に係る温度応答性カチオン性イオン交換担体を備えるイオン交換クロマトグラフィーの固体吸着剤は、例えば基材と、基材表面に固定された温度応答性共重合体と、を含む。共重合体は、少なくともカチオン性イオン交換基を有する。例えば、実施の形態に係る温度応答性カチオン性イオン交換担体は、カチオン性イオン交換基を有するモノマー及び／又はカチオン性イオン交換基導入前駆体モノマーと、重合後に温度応答性を有するモノマーと、を含むモノマー組成物を、表面リビングラジカル重合法及び放射線グラフト重合法等の重合法によって基材表面に重合して形成される。

[0037] 重合後に温度応答性を有するモノマーとは、重合後、０～８０℃の温度範囲内で水和力が変化するポリマーになるもののことであり、０～８０℃の範囲内に下限臨界溶解温度（ＬＣＳＴ）を有するポリマー、および、上限臨界溶解温度（ＵＣＳＴ）を有するポリマーになるものが挙げられる。それらのホモポリマー、コポリマー、又は混合物のいずれであっても良い。

[0038] 実施の形態で使用する基材の形状は、特に限定されないが、例えばビーズ状、及び膜状でありうる。特に、膜状であれば圧上昇が抑えられる傾向にあり、処理速度が向上する傾向にある。また、膜状であれば、強制的に全ての処理液を担体の細孔を通過させるため、流速による不純物除去能力の低下が小さいという観点からも、処理速度の向上が望める。

[0039] 基材の形状がビーズ状の場合、さまざまな粒径のビーズが入手可能である。ビーズ状の基材の粒径は、特に限定されるものではないが、例えば１～３００μｍであり、好ましくは１０～２００μｍであり、さらに好ましくは２０～１５０μｍである。粒径が１μｍ以下であると、当該担体が充填されるカラム内でビーズの圧密化が起きやすいために、カラムに溶液を高速で通すことが困難となる傾向にある。また粒径が３００μｍ以上であると、ビーズ間の隙間が大きくなり、抗体タンパク質を当該担体に吸着させる際に、溶液の漏れが発生する傾向にある。

[0040] ビーズ状の基材の材料は、特に限定されないが、ガラス、シリカ、ポリスチレン樹脂、メタクリル樹脂、架橋アガロース、架橋デキストラン、架橋ポリビニルアルコール、及び架橋セルロースなどが使用できる。

[0041] 基材の形状が膜状の場合、平板状及び中空糸状が挙げられるが、操作性の観点から中空糸状が好ましい。

[0042] 膜状の基材の材料は、特に限定されないが、機械的性質保持のために、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単独重合体、該オレフィンの２種以上の共重合体、又は１種もしくは２種以上のオレフィンと、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。パーハロゲン化オレフィンとしては、テトラフルオロエチレン及び／又はクロロトリフルオロエチレンなどが挙げられる。これらの中でも、機械的強度に優れ、かつタンパク質などの夾雑物の高い吸着容量が得られる点で、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。

[0043] 実施の形態で使用する基材は、例えば複数の細孔を有する。細孔径は、特に限定されないが、例えば５～１０００ｎｍであり、好ましくは１０～７００ｎｍであり、さらに好ましくは２０～５００ｎｍである。細孔径が５ｎｍ以下であると、分離できる抗体タンパク質の分子量が低くなる傾向にある。また細孔径が１０００ｎｍ以上であると、基材の表面積が少なくなり、抗体タンパク質の結合容量が小さくなる傾向にある。

[0044] 実施の形態では、基材にカチオン交換基を有するポリマーが固定される。その固定方法としては、基材表面に原子移動ラジカル重合開始剤を固定し、その開始剤から触媒の存在下で温度応答性ポリマーを成長反応させる「原子移動ラジカル法」や、基材に放射線を照射してラジカルを生成し、生成したラジカルを起点としてポリマーを成長反応させる「放射線グラフト重合法」等があるが、特に限定されない。他の固定方法としては、表面リビングラジカル重合法である「原子移動ラジカル重合法」がある。「原子移動ラジカル重合法」は、基材表面にポリマーを高密度に固定することができるため、好適に用いられる。

[0045] ポリマーが「原子移動ラジカル重合法」で基材表面に固定される場合、その際に使用する開始剤は特に限定されるものではないが、基材が水酸基を有している場合、例えば、１－トリクロロシリル－２－（ｍ，ｐ－クロロメチルフェニル）エタン、２－（４－クロロスルホニルフェニル）エチルトリメトキシシラン、（３－（２－ブロモイソブチリル）プロピル）ジメチルエトキシシラン、及び２－ブロモイソ酪酸ブロミドなどが挙げられる。この開始剤よりポリマー鎖を成長させる。その際の触媒としては特に限定されるものでないが、ハロゲン化銅（ＣｕＩＸ）としてＣｕＩＣｌ、ＣｕＩＢｒ等を挙

げることができる。また、そのハロゲン化銅に対するリガンド錯体も特に限定されるものではないが、トリス（２－（ジメチルアミノ）エチル）アミン（Me_6ＴＲＥＮ）、Ｎ，Ｎ，Ｎ´´，Ｎ´´－ペンタメチルジエチレントリアミン（ＰＭＤＥＴＡ）、１，１，４，７，１０，１０－ヘキサメチルトリエチレンテトラアミン（ＨＭＴＥＴＡ）、１，４，８，１１－テトラメチル　１，４，８，１１－アザシクロテトラデカン（Me_4Ｃｙｃｌａｍ）、及びビピリジン等が挙げられる。

[0046] ポリマーが「放射線グラフト重合法」で基材表面に固定される場合、基材にラジカルを生成させるためにはいかなる手段も採用しうるが、基材に電離性放射線を照射すると、基材全体に均一なラジカルが生成するため、好適である。電離性放射線の種類としては、γ線、電子線、β線、及び中性子線等が利用できるが、工業規模での実施には電子線又はγ線が好ましい。電離性放射線はコバルト６０、ストロンチウム９０、及びセシウム１３７などの放射性同位体から、又はＸ線撮影装置、電子線加速器及び紫外線照射装置等により得られる。

[0047] 電離性放射線の照射線量は、１ｋＧｙ以上１０００ｋＧｙ以下が好ましく、より好ましくは２ｋＧｙ以上５００ｋＧｙ以下、さらに好ましくは５ｋＧｙ以上２００ｋＧｙ以下である。照射線量が１ｋＧｙ未満では、ラジカルが均一に生成しにくくなる傾向にある。また、照射線量が１０００ｋＧｙを超えると、基材の物理的強度の低下を引き起こす傾向にある。

[0048] 電離性放射線の照射によるグラフト重合法には、一般に基材にラジカルを生成した後、次いでラジカルを反応性化合物と接触させる前照射法と、膜を反応性化合物と接触させた状態で基材にラジカルを生成させる同時照射法と、に大別される。実施の形態においては、いかなる方法も適用しうるが、オリゴマーの生成が少ない前照射法が好ましい。

[0049] 実施の形態において重合時に使用する溶媒は、反応性化合物を均一溶解できるものであれば特に限定されない。このような溶媒として、例えば、エタノールやイソプロパノール、ｔ－ブチルアルコール等のアルコール類、ジエ

チルエーテルやテトラヒドロフラン等のエーテル類、アセトンや２－ブタノン等のケトン類、水、又はそれらの混合物等が挙げられる。

[0050] 例えば、基材表面に固定されるポリマーは、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドを有する。ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）は３２度に下限臨界温度を有することが知られている。Ｎ－イソプロピルアクリルアミドを有するポリマーを基材表面に導入した固体吸着剤は、臨界温度で親水性／疎水性の表面物性を大きく変化させる。そのため、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドを有するポリマーをクロマトグラフィーの充填剤の表面にグラフトもしくはコーティングして固体吸着剤とすることにより、固体吸着剤が抗体タンパク質を保持する力を温度によって変えることが可能となる。その結果、溶出液の組成を変化させずに、固体吸着剤の保持挙動を温度によって制御することができるようになる。

[0051] 下限臨界温度を３２℃以上にするためには、イソプロピルアクリルアミドよりも親水性のモノマーであるアクリルアミド、メタクリル酸、アクリル酸、ジメチルアクリルアミド、及びビニルピロリドンなどを、親水性のコモノマーとしてＮ－イソプロピルアクリルアミドと共重合させることによって調整することが可能である。

[0052] また、下限臨界温度を３２℃以下にしたいときは、疎水性モノマーであるスチレン、アルキルメタクリレート、アルキルアクリレートなどを、疎水性のコモノマーとしてＮ－イソプロピルアクリルアミドと共重合させることによって調整することが可能である。

[0053] 基材が中空糸状である場合、フロースルーでの処理温度が低いと不純物除去性能が低下する傾向にあり、精製可能な抗体の量を表す抗体処理量が低下する傾向にある。高温で処理すると抗体処理量が増加するが、高温では抗体が凝集しやすい傾向にある。そのため、温度応答性ポリマーを重合する際には、疎水性モノマーを共重合させ、下限臨界温度を下げることが望ましい。ここで、全モノマーに対する疎水性モノマーの割合は、処理温度低下の観点から例えば２％以上であり、好ましくは５％以上であり、より好ましくは１

０％以上であり、更に好ましくは２０％以上である。

[0054] 例えば、基材表面に固定されるポリマーは、カチオン交換基として、スルホン酸基等の強カチオン交換基を有する。強カチオン交換基を与える方法は特に限定されないが、第１の方法として、基材表面に固定されるポリマー鎖を合成する際、強カチオン交換基を有するモノマーを含めて共重合する方法が挙げられる。スルホン酸基を有するモノマー単位の例として、スルホン酸を有するポリマーの構成単位である（メタ）アクリルアミドアルキルスルホン酸、ビニルスルホン酸、アクリルアミドｔ－ブチルスルホン酸、及びスチレンスルホン酸等が挙げられる。

[0055] 例えば、共重合体のモノマー単位の少なくとも一部がビニルスルホン酸等のスルホン酸基を有するビニルモノマー由来である場合、スルホン酸基が、リンカーを介さず、主鎖に結合する。そのため、リンカーと、抗体タンパク質と、の疎水性相互作用が生じないため、抗体タンパク質が基材表面に吸着されにくい傾向にある。なお、強カチオン交換基を有する共重合体のモノマー単位の少なくとも一部は、R_1、R_2、R_3のそれぞれをＨ又はＭｅとして、下記化学式（１）でも表すことができる。

$$-CR_1R_2-CR_3(-SO_3H)- \quad \cdots (1)$$

[0056] 実施の形態において、基材表面に固定されるポリマーに強カチオン交換基を与える第２の方法として、「強カチオン交換基導入前駆体」を有するモノマーを含めて共重合した後、前駆体をスルホン酸基に変換する方法が挙げられる。なお、「強カチオン交換基導入前駆体」とは、「強カチオン交換基の前駆体」を含みうる。また、「強カチオン交換基の前駆体」とは、例えば強カチオン交換基に保護基がついたものである。スルホン酸基の前駆体を有するモノマーとして、フェニルビニルスルホネート等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0057] 実施の形態において、基材表面に固定されるポリマーに強カチオン交換基を与える第３の方法としては、強カチオン交換基導入前駆体モノマーとして強カチオン交換基を付与しうる官能基を有するモノマーを含めて共重合した

後、強カチオン交換基を付与しうる官能基をスルホン酸基に変換する方法が挙げられる。強カチオン交換基を付与しうる官能基を有するモノマーとして、スチレン及びグリシジルメタクリレート等が挙げられる。強カチオン交換基を有するモノマーを表面リビングラジカル重合法により重合する場合、十分な重合速度が得られない場合が多いが、グリシジルメタクリレート等の少なくとも一部がメタクリル酸誘導体又はアクリル酸誘導体である強カチオン交換基導入前駆体モノマーを用いることで、十分な重合速度を得ることができる。

[0058] また、強カチオン交換基を有する共重合体のモノマー単位の少なくとも一部がメタクリル酸誘導体又はアクリル酸誘導体であることにより、基材あるいは共重合体の他の部分と、凝集体等の不純物と、の疎水性相互作用を増大させ、凝集体等の不純物の吸着量を増大させることが可能になりうる。

[0059] さらに、強カチオン交換基を有する共重合体のモノマー単位の少なくとも一部がメタクリル酸誘導体又はアクリル酸誘導体であることにより、強カチオン交換基を有する共重合体のモノマー単位の少なくとも一部は、下記化学式（２）又は（３）で示される基を有する。

－ＣＨ（－ＯＨ）－CH_2－SO_3H ・・・（２）

－ＣＨ（－SO_3H）－CH_2－ＯＨ ・・・（３）

上記化学式（２）のモノマー単位のスルホン酸基は、少なくとも－ＣＨ（－ＯＨ）－CH_2－を含むリンカーを介して、主鎖に結合している。また、上記化学式（３）のモノマー単位のスルホン酸基は、少なくとも－ＣＨ－を含むリンカーを介して、主鎖に結合している。リンカーにより立体障害が減るため、凝集体等の不純物が、スルホン酸基にすばやく結合することが可能になりうる。

[0060] 実施の形態においては、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドに対する、強カチオン交換基を有するモノマー及び／又は強カチオン交換基導入前駆体モノマーの比率が、０．０１～５００．００ｍｏｌ％であるモノマー組成物を、表面グラフト重合法によって重合する。これにより、共重合体が、強カチオ

ン交換基を、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドに対してモノマー換算で０．０１～５００．００ｍｏｌ％含有する。上記比率は、好ましくは０．１～４００．０ｍｏｌ％、より好ましくは１～３００．０ｍｏｌ％、さらに好ましくは１．５～２００．０ｍｏｌ％、最も好ましくは４～１５０ｍｏｌ％である。上記比率が５００．００ｍｏｌ％を超えると、抗体タンパク質の吸着量が多くなり、抗体タンパク質の回収率が下がる傾向にある。一方、上記比率が０．０１ｍｏｌ％未満では、強カチオン交換基導入量が少なすぎるため、固体吸着剤への凝集体等の不純物の吸着量自体が少なくなってしまう傾向にある。

[0061] また、共重合体中のＮ－イソプロピルアクリルアミドの質量割合は、１％～９９％であることが望ましく、好ましくは、１０％～９０％、より好ましくは、２０％～８０％、更に好ましくは３０～７０％である。Ｎ－イソプロピルアクリルアミドの割合が少ないと、温度応答性が小さくなりすぎ、温度の調整により、回収率や回収抗体の純度のバランスを調整することが出来なくなる傾向にある。また、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドの割合が多いと、温度応答性が強く、温度に敏感になりすぎ、操作しにくくなる傾向にある。２０％～８０％、さらに、３０～７０％以下であれば、温度制御を必要とせず、室温で、効率的に凝集体を除去できる傾向にある。

[0062] また、抗体精製に使用した後のアルカリ再生に対する耐性が増す傾向にあることから、カチオン交換体のスルホン酸基密度は３０ｍｍｏｌ／Ｌ以上であることが望ましい。

[0063] 実施の形態おいて、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドに対する、強カチオン交換基を有するモノマー単位の共重合比率（組成）は、基材表面に固定された共重合体を分析することによって定量することが可能である。共重合比率の分析には、元素分析やＮＭＲ等の様々な分析手法を用いることが可能である。共重合体を基材から単離した後に共重合比率を分析することは、分析に与える基材の影響を排除することができるため、分析精度の観点から好ましい。共重合体を基材から単離出来ない場合は、溶液中で基材を用いずに共

重合体を重合することによって、共重合比率の分析に用いる共重合体を得ることができる。

[0064] 基材表面に固定されているポリマーは温度を変えることで水和、脱水和を起こすものであり、その温度域は、例えば０℃～８０℃である。８０℃を越えると移動相が水であるので蒸発等が生じ、作業性が悪くなる傾向にある。また、０℃より低いと移動相が凍結する傾向にある。

[0065] 実施の形態によって得られる固体吸着剤は、通常の液体クロマトグラフィー装置のカラムに格納されて、液体クロマトグラフィーシステムとして利用される。その際、固体吸着剤への温度の負荷方法は特に限定されないが、例えば固体吸着剤を所定の温度にしたアルミブロック、水浴、及び空気層に接触させるか、あるいは固体吸着剤をジャケットなどに装着すること等が挙げられる。

[0066] 実施の形態に係る固体吸着剤を用いて抗体タンパク質を精製する際には、１つの温度領域で固体吸着剤に目的とする抗体タンパク質の単量体成分を通過させ、凝集体成分を吸着させることで、抗体タンパク質の単量体成分のみを実質的に溶出させる、フロースルー（ＦＴ）法が用いられる。固体吸着剤に与えられる抗体タンパク質の量は、固体吸着剤が不純物を吸着しうる量を超えていてもよく、超えていなくてもよい。抗体タンパク質の凝集体は、単量体よりも荷電量が多いため、イオン交換樹脂との結合が、単量体よりも強くなる傾向にある。さらに、凝集体は、単量体よりも疎水性が強いため、固体吸着剤の疎水性部分と相互作用（疎水性相互作用）し、固体吸着剤との結合が強くなる傾向にある。

[0067] 実施の形態に係るクロマトグラフィーの移動相としては、中性の緩衝液を利用すればよく、有機溶媒を必要としないものである。ここで、緩衝液とは無機塩類を含む水溶液であって、具体的には、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、及び酢酸緩衝液等が挙げられるが、通常利用される緩衝液であれば特に限定されるものではない。その無機塩類の濃度は１～５０ｍｍｏｌ／Ｌがよく、好ましくは３～４０ｍｍｏｌ／Ｌがよく、さらに好ましくは５～３０ｍｍ

ｏｌ／Ｌがよい。

[0068] 緩衝液における無機塩類の濃度が１ｍｍｏｌ／Ｌより低いと、溶質である抗体タンパク質の活性を損ねる傾向にある。さらに、緩衝液における無機塩類の濃度が１ｍｍｏｌ／Ｌより低いと、温度応答性吸着剤表面のイオン交換基の解離度が高くなり、温度応答性吸着剤表面へ抗体タンパク質が強固に吸着してしまい、抗体タンパク質の回収率が低くなる傾向にある。

[0069] また、緩衝液における無機塩類の濃度が５０ｍｍｏｌ／Ｌより高いと、吸着剤表面のイオン交換基の解離度が低くなるため、吸着剤表面が凝集体等の不純物を保持することが困難となる傾向にある。そのため、凝集体成分から、抗体タンパク質を効率的に分離することが困難となる傾向にある。無機塩類の濃度を電気伝導度という尺度で表すと、好ましくは０．５～２０ｍＳ／ｃｍであることが好ましい。より好ましくは０．５ｍＳ／ｃｍ～１０ｍＳ／ｃｍ、さらに好ましくは０．５ｍＳ／ｃｍ～５ｍＳ／ｃｍである。

[0070] 緩衝液の水素イオン濃度は、例えばｐＨ３．０～９．０であり、好ましくはｐＨ４．５～８．５であり、さらに好ましくはｐＨ５．０～８．０、特に好ましくはｐＨ５．０～７．５である。緩衝液のｐＨが９．０より高くなると、抗体タンパク質同士の静電反発が小さくなり、凝集しやすい傾向にある。また、ｐＨが３．０より低くなると、抗体タンパク質の変性が起こり、活性の低下や、凝集体の生成等の品質低下が引き起こされる傾向にある。

[0071] 混合溶液をフロースルーさせる時の流速は、例えば、イオン交換クロマトグラフィー担体の体積の０．１倍の体積／分以上、担体の体積の３０倍の体積／分以下、好ましくは、イオン交換クロマトグラフィー担体の体積の１倍の体積／分以上、担体の体積の１０倍の体積／分以下である。基材が中空糸状の場合、処理効率が高いため高流速が可能となる。しかし、担体の体積の３０倍の体積／分を超えると、不純物除去性が低下する傾向にある。一方、基材の形状がビーズ状の場合は、特に、担体の体積の０．１倍の体積／分以上３倍の体積／分以下、０．１倍の体積／分以上２倍の体積／分以下、０．１倍の体積／分以上１倍の体積／分以下が好ましい。これは、３倍の体積／

分の流速を超えると、抗体溶液がビーズの間を素通りし、不純物除去性が低下する傾向があるためである。

[0072] 以上に示してきた実施の形態に係るカチオン性イオン交換担体に、担体に不純物を質量分率で５０％以上吸着させられ、かつ、生理活性物質を質量分率で７０％以上回収できる温度で抗体タンパク質の凝集体を吸着させ、抗体タンパク質の単量体をカチオン性イオン交換担体から回収すると、抗体タンパク質の凝集体の生成を抑制しつつ、効率的に抗体タンパク質の単量体を精製可能である。そのため、実施の形態に係る抗体タンパク質の精製方法によれば、医薬品等に利用できる極めて有用な抗体タンパク質を効率的に精製可能である。

[0073] さらに、本発明者らは、イオン交換クロマトグラフィー担体で生理活性物質を精製する前に、アフィニティークロマトグラフィーで不純物と生理活性物質を含む混合溶液を精製することにより、不純物をより少なくし、より効果的にイオンクロマトグラフィー担体による精製を行うことができることを見出した。この方法によれば、抗体と担体の接触時間を短くすることができ、さらに精製した抗体をすぐに適温にすることができるため、抗体の変性を抑制し、抗体を効率的に精製できることを本発明者らは見出した。アフィニティークロマトグラフィーには、プロテインＡ担体、酸溶出型アフィニティークロマトグラフィー担体、ないしは温度応答性アフィニティークロマトグラフィー担体を使用可能である。

[0074] 本実施形態において、温度応答性アフィニティークロマトグラフィー担体が温度に依存して抗体との結合性が変化するよう変異されたプロテインＡである温度応答性プロテインＡを備える場合、温度応答性プロテインＡは、特許文献（ＷＯ２００８／１４３１９９号パンフレット）を参考に調製することができる。

[0075] 本実施形態において、ＮＨＳ活性化されたカルボキシル基と、温度応答性プロテインＡと、のカップリング反応は、例えば以下のように行われる。まず、クエン酸緩衝液（ｐＨ３．０～６．２）、酢酸緩衝液（ｐＨ３．６～５

．６）、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ、ｐＨ５．８～８．５）、又は炭酸緩衝液（ｐＨ９．２～１０．６）などのアミノ基成分を含まない緩衝液を用いて、０．１～１００ｍｇ／ｍＬの温度応答性プロテインＡ溶液を準備する。この水溶液を活性エステル表面と接触させると、温度応答性プロテインＡに含まれるアミノ基等の官能基が活性エステルと反応し、アミド結合が形成される。その結果、温度応答性プロテインＡは共有結合によって表面に固定化される。ここで、接触時間は２分～１６時間の範囲で設定するとよい。温度応答性プロテインＡを固定化した後は、適当な洗浄液で担体を洗浄することが望ましい。このとき、洗浄液は０．５ｍｏｌ／Ｌ程度の塩（ＮａＣｌ）及び０．１％程度の非イオン性界面活性剤を含む緩衝液であることが望ましい。これによって、共有結合せずに物理吸着しているだけの温度応答性プロテインＡを取り除くことができるからである。

[0076] 温度応答性プロテインＡを担体表面に固定化した後（好ましくは更に温度応答性プロテインＡ固定化担体を洗浄した後）は、未反応のカルボキシル基又は活性エステルを、アミノ基を有する低分子化合物と結合させることにより、当該カルボキシル基又は活性エステルを反応性のより低い官能基に変換させることが好ましい。これによって、不純物等の精製対象外の分子が不本意に担体表面に固定化されるのを防ぐことができる。特に温度応答性プロテインＡ固定用担体の末端の官能基が活性エステルである場合、この操作がされることが好ましい。

[0077] ここでは、活性エステル基にアミノ基を有する低分子化合物を反応させる操作を特に「ブロッキング」と記述することがある。ただし、カルボキシル基又は活性エステルを低分子化合物と反応させた後の担体表面は、親水性であることが望ましい。なぜなら、親水性の表面は一般に生体関連物質の非特異的吸着を抑制する効果をもつからである。このためにはアミノ基を含有する低分子化合物として、アミノ基以外に親水性基を更に有する低分子化合物を使用することが好ましい。このような低分子化合物の非限定的な例としては、エタノールアミン、トリスヒドロキシメチルアミノメタン、及びジグリ

コールアミン（ＩＵＰＡＣ名：２－（２－アミノエトキシ）エタノール）が挙げられる。これらの低分子化合物はＰＢＳなどの緩衝液に１０～１，０００ｍｍｏｌ／Ｌとなるように溶解し、溶解液を温度応答性プロテインＡを固定化した担体と接触させる。例えば、反応温度は４～３７℃、反応時間は２分～１６時間の範囲で設定するとよい。

[0078] 温度応答性プロテインＡ固定化担体は、ｐＨ４～８の範囲の中性溶液を保存液とし、２～１０℃程度の低温で保存する。保存液としては、抗菌性を考慮して、２０％エタノールが好ましい。

[0079] 温度応答性プロテインＡは、低温で抗体を結合し、結合時の温度よりも高い温度で抗体を溶出できるといった特性がある。あらかじめ温度応答性プロテインＡの特性が変わる温度を確認しておき、その温度を挟むようにして温度変化させることにより抗体を吸脱着させることが好ましい。抗体を温度応答性プロテインＡに吸着させる温度領域は、例えば０℃以上２０℃以下、好ましくは１℃以上１５℃以下、最も好ましくは２℃以上１３℃以下の低温領域である。抗体を温度応答性プロテインＡから脱離させる温度は、例えば２０℃以上６０℃以下、好ましくは２５℃以上５０℃以下、最も好ましくは３０℃以上４５℃以下の高温領域である。

実施例 1

[0080] 以下に、実施の形態を実施例に基づいて更に詳しく説明するが、これらは実施の形態を何ら限定するものではない。

実施例１では、原子移動ラジカル重合法によって、スルホン酸基を有するビーズ状のカチオン性イオン交換担体を合成した。

[0081] １）開始剤の固定

架橋ポリビニルアルコールビーズ１ｇ（粒径１００μｍ）を純水で湿潤させ、３００ｍＬのガラス製三角フラスコに入れた。三角フラスコに、テトラヒドラフラン（安定剤不含、関東化学（株）社製）２００ｍＬ、２－ブロモイソ酪酸ブロミド（東京化成工業（株）製）１．２３ｍＬ、及びトリエチルアミン（和光純薬工業（株）社製）１．４０ｍＬを加え、室温で１６時間震

とうさせた。反応後、ろ過してから２００ｍＬエタノールで３回洗浄し、脱水イソプロパノール中で保存した。これにより、架橋ポリビニルアルコールビーズ表面に原子移動ラジカル重合（ＡＴＲＰ）開始剤である２－ブロモイソ酪酸ブロミドが導入された。

[0082] ２）表面グラフト重合

スルホン酸基の前駆体モノマーであるグリシジルメタクリレート（ＧＭＡ、東京化成工業（株）製）を、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドに対して１ｍｏｌ％の割合で含有するモノマー組成物を調整した。具体的には、Ｎ－イソプロピルアクリルアミド（ＩＰＡＡｍ、和光純薬工業（株）製）１８．４０ｇ、ＧＭＡ０．２３１ｇ、ブチルメタクリレート（ＢＭＡ、東京化成工業（株）製）１．２１７ｇ、塩化銅Ｉ（ＣｕＣｌ、和光純薬工業（株）製）０．０８５ｇ、及び塩化銅ＩＩ（ＣｕＣｌ２、和光純薬工業（株）製）０．０１２ｇを９０容量％イソプロパノール（ＩＰＡ）水溶液４２．８ｍＬに溶解させ、３０分間、窒素バブリングした。その後、窒素雰囲気下で溶液にトリス（２－ジメチルアミノエチル）アミン（Me_6ＴＲＥＮ）（Ａｌｆａ　Ａｅｓａｒ社製）０．２２１ｇを加えて、５分間攪拌しＣｕＣｌ／ＣｕＣｌ２／Me_6ＴＲＥＮの触媒を形成させた。この反応溶液を窒素雰囲気下で開始剤導入架橋ポリビニルアルコールビーズに反応させ、室温で１６時間のＡＴＲＰをおこなった。反応後、エタノール、５０ｍｍｏｌ／Ｌ－ＥＤＴＡ水溶液、純水の順に洗浄し、モノマー、ポリマー、及び銅触媒を洗浄した。

[0083] ３）スルホン酸基の導入

原子移動ラジカル重合法によりグラフト鎖を導入したビーズを、亜硫酸ナトリウムと、ＩＰＡと、の混合水溶液（亜硫酸ナトリウム／ＩＰＡ／純水＝１０／１５／７５ｗｔ％）２００ｇに投入し、８０℃で２４時間反応を行い、グラフト鎖中のエポキシ基をスルホン酸基に変換した。反応後、このビーズを純水で洗浄した。その後、このビーズを０．５ｍｏｌ／Ｌ硫酸中に投入し、８０℃で２時間反応を行うことで、グラフト鎖中に残存していたエポキシ基をジオール基に変換した。反応後、このビーズを純水で洗浄し、実施例

１に係るカチオン性イオン交換担体とした。カチオン性イオン交換担体を、カラムに充填した。

[0084] ４）共重合比率の測定

スルホン酸基の前駆体モノマーであるグリシジルメタクリレート（ＧＭＡ、東京化成工業（株）製）を、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドに対して１ｍｏｌ％の割合で含有するモノマー組成物を用い、基材を用いずに共重合体を重合した。具体的には、上記２）記載の反応溶液を窒素雰囲気下で２－ブロモイソ酪酸エチルに反応させ、室温で１６時間のＡＴＲＰをおこなった。反応後、反応溶液を透析膜（Ｓｐｅｃｔｒａ／ｐｏｒ　Ｄｉａｌｙｓｉｓ　Ｍｅｍｂｒａｎｅ，ＭＷＣＯ１０００，Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製）に入れ、エタノール、５０ｍｍｏｌ／Ｌ－ＥＤＴＡ水溶液、純水の順に浸漬することにより、モノマー、及び銅触媒を除去した。次に反応溶液を凍結乾燥することで得られた共重合体を、亜硫酸ナトリウムと、ＩＰＡと、の混合水溶液（亜硫酸ナトリウム／ＩＰＡ／純水＝１０／１５／７５ｗｔ％）２００ｇに投入し、８０℃で２４時間反応を行い、グラフト鎖中のエポキシ基をスルホン酸基に変換した。反応後、反応溶液を透析膜に入れ、純水に浸漬することにより、亜硫酸ナトリウムとＩＰＡを除去し、さらに反応溶液を凍結乾燥することで共重合体を得た。

[0085] 上記共重合体３０ｍｇを重水６７０ｍｇに溶解し、核磁気共鳴装置（Ｂｒｕｋｅｒ　Ａｖｅｎｖｅ－６００）を用いて１Ｈ－ＮＭＲを測定した。その後、Ｎ－イソプロピルアクリルアミド単位由来シグナル積分値と、スルホン酸基由来シグナル積分値と、から、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドに対する、強カチオン交換基を有するモノマー単位の共重合比率（組成）を計算した。その結果、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドに対する、強カチオン交換基を有するモノマー単位の共重合比率（組成）は０．７２ｍｏｌ％であった。また、合成した樹脂は、３１ｍｍｏｌ／Ｌのスルホン酸基密度を有していることをリチウムイオン交換によって確認した。

[0086] （細胞培養液の調整）

抗体タンパク質として、ＡＥ６Ｆ４抗体（ヒトモノクロナール抗体）を０．１１５ｍｇ／Ｌ含む培養上澄みを用意した。ＡＥ６Ｆ４産生細胞は、九州大学大学院農学研究院、片倉喜範准教授よりご提供頂いた。ＡＥ６Ｆ４抗体産生細胞の培養は、文献（日本生物工学会講演要旨集、１９９４年、６５巻、６５ページ）を参考に培養した。ＡＥ６Ｆ４抗体産生細胞を含む培養液を、ろ過膜（旭化成メディカル社製、商品名　ＢｉｏＯｐｔｉｍａｌ（登録商標）　ＭＦ－ＳＬ）を用いてろ過し、不純物と抗体を含む混合溶液（培養上澄）を取得した。ろ過は、提供者の取扱い説明書を参考に実施した。

[0087]　（プロテインＡカラムによる抗体タンパク質の精製）

リン酸緩衝液（２０ｍｍｏｌ／Ｌリン酸ナトリウム＋１５０ｍｍｏｌ／ＬＮａＣｌ（ｐＨ８．０））１５０ｍＬで平衡化したプロテインＡカラム（ＧＥヘルスケアバイオサイエンス製、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　Ｓｕｒｅを充填したもの）に、ろ過した混合溶液を２Ｌ添加し、プロテインＡに抗体タンパク質を吸着させた。次に、カラムにリン酸緩衝液（２０ｍｍｏｌ／Ｌのリン酸ナトリウム＋１５０ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ（ｐＨ８．０））２０ｍＬを通液して洗浄した後、カラムに溶出緩衝液（１００ｍｍｏｌ／Ｌクエン酸ナトリウム（ｐＨ３．６））を２４０ｍＬ通液して、プロテインＡカラムから抗体タンパク質を溶出させて、不純物がある程度低減された混合溶液を回収した。

[0088]　（ウイルス不活性化処理）

得られた溶出画分に、溶出画分の体積の０．５％の１ｍｏｌ／ＬＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）を加えて、溶出画分の水素イオン指数をｐＨ４に調整した。さらに、溶出画分に酢酸を滴下して、溶出画分の水素イオン指数をｐＨ３．５にして、溶出画分を一時間放置し、ウイルスの不活性化処理を行った。その後、トリス緩衝液を用いて、溶出画分の水素イオン指数をｐＨ５．０にし、酢酸バッファー（１５ｍｍｏｌ／Ｌ酢酸バッファー（ｐＨ６．０））にバッファー交換を行い、混合溶液１を得た。

[0089]　混合溶液１の吸光度を、下記の条件により、サイズ排除クロマトグラフィ

ー（ＳＥＣ：Ｓｉｚｅ　Ｅｘｃｌｕｓｉｏｎ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ）装置を用いて測定した。

カラム：Ｔｓｋｇｅｌ　Ｇ３０００ＳＷＸＬ（東ソー社製）

カラム温度：３０℃

ポンプ：ＬＣ－２０ＡＤ（島津製作所社製）

検出器：ＳＰＤ－２０Ａ（島津製作所社製）

オートサンプラー：ＳＩＬ－２０ＡＣ（島津製作所社製）

カラムオーブン：ＣＴＯ－２０ＡＣ（島津製作所社製）

デガッサー：ＤＧＵ－２０ＡＣ３

移動相：０．１ｍｏｌ／Ｌリン酸水素二ナトリウム＋０．２ｍｏｌ／Ｌ Ｌ（＋）－アルギニン水溶液（塩酸でｐＨ６．７に調整）

その結果、図１に示すように、吸光ピークの立ち上がりが急峻ではなく、抗体タンパク質の単量体のみならず、抗体タンパク質の凝集体成分（不純物）も含んでいることを示していた。図１のピークを拡大したものが図２である。ここで、図２のように単量体のピークを（３）、それより短時間で回収された凝集体ピークをそれぞれ（１）、（２）とすると、（１）のピークで現れる凝集体成分の含有量は０．６７ｍｇ、含有率は１．２％であり、（２）のピークで現れる凝集体成分の含有量は０．９５ｍｇ、含有率は１．７％であり、（３）のピークで現れる抗体タンパク質の単量体の含有量は５４．４４ｍｇ、含有率は９７．１％であった。回収された抗体の凝集体及び単量体の総量は５６．０６ｍｇであった（混合溶液１）。

[0090] （凝集体成分の除去）

カチオン性イオン交換担体脂を充填したカラムに、ウイルス不活性化処理を行ったプロテインＡカラムからの溶出画分（混合溶液１）を加え、カチオン性イオン交換担体に、抗体タンパク質の凝集体成分（不純物）と単量体成分（目的の生理活性物質）を含む混合溶液を接触させた。加えた溶出画分の量は１２ｍＬ（４．７ｍｇ／ｍｌ）であり、流速は０．４ｍＬ／ｍｉｎであり、温度は２０℃であった。その後、流速は０．４ｍＬ／ｍｉｎで流れる２

０℃の酢酸バッファー（１５ｍｍｏｌ／Ｌ酢酸バッファー（ｐＨ６．０））で温度応答性カチオン性イオン交換担体を充填したカラムを洗浄した。フロースルー工程と洗浄工程で、３２ｍｌ（１．６ｍｇ／ｍｌ）の溶液を回収した。回収した溶液をサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ：Ｓｉｚｅ Ｅｘｃｌｕｓｉｏｎ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ）にかけた。この場合も、吸光度を示すグラフ（不図示）において、抗体タンパク質の単量体のみならず、抗体タンパク質の凝集体成分（不純物）も含んでいることを示していた。ただし、図５に示すように、不純物の含有量は僅かであった。

なお、カチオン性イオン交換担体で処理前の混合溶液及びカチオン性イオン交換担体で処理後の回収溶液に含まれる凝集体成分及び単量体成分の質量割合を含有率として示した。

また、プロテインＡ溶出画分に含まれる抗体タンパク質の総量（凝集体成分と単量体成分を含む）を１００％としたとき、カチオン性イオン交換担体を充填したカラムをフロースルーして回収された抗体タンパク質の総量（凝集体成分と単量体成分を含む）を抗体回収率として示した。

凝集体の吸着率は、カチオン性イオン交換担体を充填したカラムをフロースルーした後の（１）及び（２）のピークで現れる凝集体成分の合計含有量を、カチオン性イオン交換担体を充填したカラムをフロースルーする前の（１）及び（２）のピークで現れる凝集体成分の合計含有量で除したものを、１から引いてパーセント表示したものである。単量体回収率は、カチオン性イオン交換担体を充填したカラムをフロースルーした後の単量体の含有量を、カチオン性イオン交換担体を充填したカラムをフロースルーする前の単量体の含有量で除したものをパーセント表示したものである。

実施例 2

[0091] ウイルス不活化処理を行ったプロテインＡからの溶出画分（実施例１に同じ組成）をカラムに充填されたカチオン性イオン交換担体に２５℃で接触させ、洗浄した以外は、実施例１と同様に操作した。結果を図５に示す。

実施例 3

[0092] 凝集体除去工程において混合溶液２（（１）のピークで現れる凝集体成分の含有率は０．５％であり、（２）のピークで現れる凝集体成分の含有率は１．２％であり、（３）のピークで現れる抗体タンパク質の単量体の含有率は９８．３％）を４６ｍＬ（５．５ｍｇ／ｍＬ）加え、カラムに充填されたカチオン交換樹脂に２５℃で接触させ、洗浄した。フロースルーと洗浄工程で６６ｍＬ（３．６ｍｇ／ｍＬ）の溶液を回収した。それ以外は実施例２と同様に操作した。結果を図５に示す。

実施例 4

[0093] 実施例４では、放射線グラフト重合法によって、スルホン酸基を有する中空糸状のカチオン交換膜を合成した。

[0094] １）放射線グラフト重合

Ｎ－イソプロピルアクリルアミド８．０９０ｇ、グリシジルメタクリレート０．１０２ｇ、ブチルメタクリレート０．２０８ｇを２５容量％ｔ－ブチルアルコール（和光純薬工業（株）社製）水溶液５００ｍＬに溶解させ、３０分間、窒素バブリングしたものを反応液として用いた。外径３．０ｍｍ、内径２．０ｍｍ、平均孔径０．２５ｕｍのポリエチレン多孔質中空糸６．０００ｇ（１５ｃｍ、３０本）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２００ｋＧｙ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多孔質中空糸をガラス反応管に移し、２００Ｐａ以下に減圧することにより、反応管内の酸素を除いた。これに４０℃に調整した上記反応液を、２５０ｍＬ導入し、１６時間静置した。その後、中空糸をエタノールで洗浄し、真空乾燥機中で真空乾燥させた。

[0095] ２）スルホン酸基の導入

放射線グラフト重合法によりグラフト鎖を導入した中空糸を、亜硫酸ナトリウムと、ＩＰＡと、の混合水溶液（亜硫酸ナトリウム／ＩＰＡ／純水＝１０／１５／７５ｗｔ％）２００ｇに投入し、８０℃で２４時間反応を行い、グラフト鎖中のエポキシ基をスルホン酸基に変換した。反応後、この中空糸

を純水で洗浄した。その後、この中空糸を０．５ｍｏｌ／Ｌ硫酸中に投入し、８０℃で２時間反応を行うことで、グラフト鎖中に残存していたエポキシ基をジオール基に変換した。これをモジュール化（膜体積０．６ｍＬ）し、実施例３に係るカチオン交換膜とした。

[0096] ３）Ｎ－イソプロピルアクリルアミドの検出は下記の条件により、熱分解ＧＣ／ＭＳにより行った。

熱分解装置：ＰＹ２０２０Ｄ（フロンティア・ラボ株式会社）

熱分解温度：６００℃

ＧＣ装置：アジレント６８９０（アジレント・テクノロジー株式会社）

ＭＳ装置：アジレント６９７３（アジレント・テクノロジー株式会社）

カラム：ＤＢ－１（アジレント・テクノロジー株式会社）

０．２５ｍｍ ｉ．ｄ． × ３０ｍ 液相厚 ０．２５ｕｍ

カラム温度：４０℃（５分保持）→（２０℃／分昇温）→３２０℃（１１ｍｉｎ保持）

注入口温度：３２０℃

スプリット比：１／１００

カラム流量：１．０ｍｌ／分 （ヘリウム）

イオン化法：電子イオン化（ＥＩ法）

イソプロピルアミン部位の検出時間：１分２４秒

イソプロピルイソシアネートの検出時間：１分４６秒

Ｎ－イソプロピルアクリルアミドモノマー部位の検出時間：８分９秒

[0097] 実施例１と同様の方法で、プロテインＡカラムによる抗体タンパク質の精製、及びウイルス不活化処理を行い、溶出画分を１５ｍｏｌ／Ｌ酢酸バッファー（ｐＨ６．０）にバッファー交換した混合溶液３を得た。

[0098] 混合溶液３の吸光度を、下記の条件により、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ：Ｓｉｚｅ Ｅｘｃｌｕｓｉｏｎ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ）装置を用いて測定した。

カラム；ＡＣＱＵＩＴＹ ＹＰＬＣ ＢＥＨ２００ ＳＥＣ１．７ｕｍ（

Ｗａｔｅｒｓ社製）

カラム温度：３０℃

システム：ＡＣＱＵＩＴＹ　ＵＰＬＣ　Ｈ　ＣＬＡＳＳ（ｗａｔｅｒｓ社製）

移動相：０．１ｍｏｌ／Ｌリン酸水素二ナトリウム＋０．２ｍｏｌ／Ｌ　Ｌ（＋）－アルギニン水溶液（塩酸でｐＨ６．７に調整）

その結果、図３のピークが得られ、それを拡大したものが図４である。なお、実施例３では、実施例１及び２とは異なる装置で吸光度を測定したが、装置の同等性は確認できた。ここでも、図４のように単量体のピークを（３）、それより短時間で回収された凝集体ピークをそれぞれ（１）、（２）とすると（１）のピークで現れる凝集体成分の含有量は１．４１ｍｇ、含有率は１．９％であり、（２）のピークで現れる凝集体成分の含有量は１．１１ｍｇ、含有率は１．５％であり、（３）のピークで現れる抗体タンパク質の単量体の含有量は７１．６５ｇ、含有率は９６．６％であった。回収された抗体の凝集体及び単量体の総量は７４．１７ｇであった。

[0099] （凝集体成分の除去）

モジュール化したカチオン交換膜に、ウイルス不活性化処理を行ったプロテインＡカラムからの溶出画分（混合溶液３）を加え、カチオン交換膜に、抗体タンパク質の凝集体成分（不純物）と単量体成分（目的の生理活性物質）を含む混合溶液を接触させた。加えた溶出画分の量は１５ｍＬ（４．９ｍｇ／ｍｌ）であり、流速は６．０ｍＬ／ｍｉｎであり、温度は３５℃であった。その後、流速は６．０ｍＬ／ｍｉｎで流れる３５℃の酢酸バッファー（１５ｍｍｏｌ／Ｌ酢酸バッファー（ｐＨ６．０））でモジュール化したカチオン交換膜を洗浄した。フロースルー工程と洗浄工程で、２７ｍｌ（２．３ｍｇ／ｍｌ）の溶液を回収した。回収した溶液をサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ：Ｓｉｚｅ　Ｅｘｃｌｕｓｉｏｎ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ）にかけた。この場合も、吸光度を示すグラフ（不図示）において、抗体タンパク質の単量体のみならず、抗体タンパク質の凝集体成分（不純物）

も含んでいることを示していた。ただし、図５に示すように、不純物の含有量は僅かであった。

実施例 5

[0100] 実施例５では凝集体除去工程において、混合溶液４（（１）のピークで現れる凝集体成分の含有率は１．５％であり、（２）のピークで現れる凝集体成分の含有率は０．９％であり、（３）のピークで現れる抗体タンパク質の単量体の含有率は９７．６％）を用い、３０℃で行った以外は、実施例４と同様に操作した。結果を図５に示す。なお、実施例４の温度３５℃で結果に比べ、凝集物除去性能が悪化していることからも明らかなように、実施例４に記載の中空糸状のカチオン交換膜を用いて、温度を下げていくと、凝集体除去性能が低下する。したがって、室温で用いるのには適さない。

実施例 6

[0101] 実施例６では、放射線グラフト重合で、Ｎ－イソプロピルアクリルアミド５．３８０ｇ、グリシジルメタクリレート０．０９８ｇ、ブチルメタクリレート２．９３９ｇを５０容量％ｔ－ブチルアルコール（和光純薬工業（株）社製）水溶液５００ｍＬに溶解させた溶液を用い、凝集体除去工程において混合溶液５（（１）のピークで現れる凝集体成分の含有率は２．１％であり、（２）のピークで現れる凝集体成分の含有率は１．１％であり、（３）のピークで現れる抗体タンパク質の単量体の含有率は９６．８％）を用いた以外は実施例５と同様に操作した。結果を図５に示す。

実施例 7

[0102] 実施例７では、放射線グラフト重合で、Ｎ－イソプロピルアクリルアミド５．１８７ｇ、グリシジルメタクリレート０．２９２ｇ、ブチルメタクリレート２．９１９ｇを５０容量％ｔ－ブチルアルコール（和光純薬工業（株）社製）水溶液５００ｍＬに溶解させた溶液を用い、凝集体除去工程において混合溶液６（（１）のピークで現れる凝集体成分の含有率は２．０％であり、（２）のピークで現れる凝集体成分の含有率は１．７％であり、（３）のピークで現れる抗体タンパク質の単量体の含有率は９６．３％）を用いた以

外は実施例６と同様に操作した。結果を図５に示す。

実施例 8

[0103] 実施例８では、放射線グラフト重合で、Ｎ－イソプロピルアクリルアミド３．６ｇ、グリシジルメタクリレート０．６ｇ、ブチルメタクリレート１．８ｇを５０容量％ｔ－ブチルアルコール（和光純薬（株）社製）水溶液２８０ｍＬに溶解させた溶液を１４０ｍＬ用いて、ポリエチレン多孔質中空糸３．０００ｇ（１５ｃｍ、１５本）と反応させた。その後、スルホン化により、カチオン交換膜を合成し、膜体積０．２５ｍＬでモジュール化した。凝集体除去工程において混合溶液７（（１）のピークで現れる凝集体成分の含有率は４．０％であり、（２）のピークで現れる凝集体成分の含有率は２．８％であり、（３）のピークで現れる抗体タンパク質の単量体の含有率は９３．２％）を２０ｍＬ（５．１ｍｇ／ｍＬ）加えた。流速は１．５ｍＬ／ｍｉｎであり、温度は２５℃であった。その後、流速１．５ｍＬ／ｍｉｎで流れる２５℃の酢酸バッファー（１５ｍｍｏｌ／Ｌ酢酸バッファー（ｐＨ６．０））でモジュール化したカチオン交換膜を洗浄した。フロースルー工程と洗浄工程で、２７．５ｍｌ（３．１ｍｇ／ｍｌ）の溶液を回収した。それ以外は実施例６と同様に操作した。結果を図５に示す。

実施例 9

[0104] 実施例９では、凝集体除去工程において、１５ｍｍｏｌ／Ｌトリス緩衝液（ｐＨ７．０）にバッファー交換した混合溶液８（（１）のピークで現れる凝集体成分の含有率は２．３％であり、（２）のピークで現れる凝集体成分の含有率は２．４％であり、（３）のピークで現れる抗体タンパク質の単量体の含有率は９５．４％）を２０ｍＬ（５．０ｍｇ／ｍＬ）加えた。流速は１．５ｍＬ／ｍｉｎであり、温度は２５℃であった。その後、流速１．５ｍＬ／ｍｉｎで流れる２５℃のトリス緩衝液（１５ｍｍｏｌ／Ｌトリス緩衝液（ｐＨ７．０））でモジュール化したカチオン交換膜を洗浄した。フロースルー工程と洗浄工程で、２７．５ｍｌ（２．９ｍｇ／ｍｌ）の溶液を回収した。それ以外は実施例８と同様に操作した。結果を図５に示す。

実施例 10

[0105] 実施例１０では、凝集体除去工程において、１５ｍｍｏｌ／Ｌトリス緩衝液（ｐＨ８．０）にバッファー交換した混合溶液９（（１）のピークで現れる凝集体成分の含有率は１．６％であり、（２）のピークで現れる凝集体成分の含有率は２．３％であり、（３）のピークで現れる抗体タンパク質の単量体の含有率は９６．１％）を２０ｍＬ（４．８ｍｇ／ｍＬ）加えた。流速は１．５ｍＬ／ｍｉｎであり、温度は２５℃であった。その後、流速１．５ｍＬ／ｍｉｎで流れる２５℃のトリス緩衝液（１５ｍｍｏｌ／Ｌトリス緩衝液（ｐＨ８．０））でモジュール化したカチオン交換膜を洗浄した。フロースルー工程と洗浄工程で、２７．５ｍｌ（２．９ｍｇ／ｍｌ）の溶液を回収した。それ以外は実施例８と同様に操作した。結果を図５に示す。

実施例 11

[0106] 実施例１１では、放射線グラフト重合で、Ｎ－イソプロピルアクリルアミド３．６ｇ、グリシジルメタクリレート１．２ｇ、ブチルメタクリレート１．２ｇを５０容量％ｔ－ブチルアルコール（和光純薬（株）社製）水溶液２８０ｍＬに溶解させた溶液を１４０ｍＬ用いて、ポリエチレン多孔質中空糸３．０００ｇ（１５ｃｍ、１５本）と反応させた。その後、スルホン化により、カチオン交換膜を合成し、膜体積０．２５ｍＬでモジュール化した。合成した膜は、３５ｍｍｏｌ／Ｌのスルホン酸基密度を有していることをリチウムイオン交換によって確認した。凝集体除去工程において混合溶液１０（（１）のピークで現れる凝集体成分の含有率は１．８％であり、（２）のピークで現れる凝集体成分の含有率は２．８％であり、（３）のピークで現れる抗体タンパク質の単量体の含有率は９５．４％）を２５ｍＬ(５．２ｍｇ／ｍＬ)加えた。流速は０．３ｍＬ／ｍｉｎであり、温度は２５℃であった。その後、流速０．３ｍＬ／ｍｉｎで流れる２５℃の酢酸バッファー（１５ｍｍｏｌ／Ｌ酢酸バッファー（ｐＨ６．０））でモジュール化したカチオン交換膜を洗浄した。フロースルー工程と洗浄工程で、３２．５ｍｌ（３．２ｍｇ／ｍｌ）の溶液を回収した。それ以外は実施例８と同様に操作した。結果を

図５に示す。

実施例 12

[0107] 実施例１１では、放射線グラフト重合で、Ｎ－イソプロピルアクリルアミド３．６ｇ、グリシジルメタクリレート１．３ｇ、ブチルメタクリレート１．１ｇを５０容量％ｔ－ブチルアルコール（和光純薬（株）社製）水溶液２８０ｍＬに溶解させた溶液を１４０ｍＬ用いて、ポリエチレン多孔質中空糸３．０００ｇ（１５ｃｍ、１５本）と反応させた。その後、スルホン化により、カチオン交換膜を合成し、膜体積０．２５ｍＬでモジュール化した。合成した膜は、４１ｍｍｏｌ／Ｌのスルホン酸基密度を有していることをリチウムイオン交換によって確認した。凝集体除去工程において混合溶液１１（（１）のピークで現れる凝集体成分の含有率は１．５％であり、（２）のピークで現れる凝集体成分の含有率は２．３％であり、（３）のピークで現れる抗体タンパク質の単量体の含有率は９６．２％）を２５ｍＬ(５．０ｍｇ／ｍＬ)加えた。流速は０．３ｍＬ／ｍｉｎであり、温度は２５℃であった。その後、流速０．３ｍＬ／ｍｉｎで流れる２５℃の酢酸バッファー（１５ｍｍｏｌ／Ｌ酢酸バッファー（ｐＨ６．０））でモジュール化したカチオン交換膜を洗浄した。フロースルー工程と洗浄工程で、３２．５ｍｌ（３．１ｍｇ／ｍｌ）の溶液を回収した。それ以外は実施例８と同様に操作した。結果を図５に示す。

[0108] 図５に示す通り、実施例１ないし１２では、（１）のピークで現れる凝集体成分の含有量、及び（２）のピークで現れる凝集体成分の含有量を、イオン交換クロマトグラフィー担体によって、５０％未満にすることができた。このことから、２０℃、２５℃、３０℃、３５℃において、担体に不純物を質量比で５０％以上吸着させられることが示された。また、抗体の単量体を７０％以上回収できることが示された。さらには、回収した溶液の質量に対する不純物（凝集体成分１と凝集体成分２の合計）の質量の割合（含有率）が２％以下になることが示された。

産業上の利用可能性

[0109] 実施の形態に係る方法に依れば、抗体タンパク質の単量体を温度変化によって工業規模で精製できるようになる。

請求の範囲

[請求項1] 不純物と生理活性物質を含む混合溶液から、前記生理活性物質を精製する精製方法であって、

基材と、前記基材表面に固定された、少なくともＮ－イソプロピルアクリルアミドをモノマー単位として含む共重合体と、を備えるイオン交換クロマトグラフィー担体を使用し、

前記混合溶液を、前記担体を格納する容器に一定温度でフロースルーさせることによって、前記生理活性物質を回収する、

生理活性物質を精製する方法。

[請求項2] 不純物と生理活性物質を含む混合溶液から、前記生理活性物質を精製する精製方法であって、

少なくとも１つの温度応答性イオン交換クロマトグラフィー担体を使用し、

前記混合溶液を、前記担体を格納する容器に一定温度でフロースルーさせることによって、前記生理活性物質を回収する、

生理活性物質を精製する方法。

[請求項3] 不純物と生理活性物質を含む混合溶液から、前記不純物を除去する方法であって、

基材と、前記基材表面に固定された、少なくともＮ－イソプロピルアクリルアミドをモノマー単位として含む共重合体と、を備えるイオン交換クロマトグラフィー担体を使用し、

前記混合溶液を、前記担体を格納する容器に一定温度でフロースルーさせることによって、不純物を除去する方法。

[請求項4] 不純物と生理活性物質を含む混合溶液から、前記不純物を除去する方法であって、

少なくとも１つの温度応答性イオン交換クロマトグラフィー担体を使用し、

前記混合溶液を、前記担体を格納する容器に一定温度でフロースル

ーさせることによって、不純物を除去する方法。

[請求項5] 前記一定温度が、前記担体に前記不純物を質量分率で５０％以上吸着させられ、かつ、前記生理活性物質を質量分率で７０％以上回収できる温度である、請求項１ないし４のいずれか１項に記載の方法。

[請求項6] 前記担体を格納する容器から回収した溶液の質量に対する前記不純物の質量の割合が２％以下である、請求項１ないし５のいずれか１項に記載の方法。

[請求項7] 前記温度が５℃以上６０℃以下である、請求項１ないし６のいずれか１項に記載の方法。

[請求項8] 前記温度が２０℃以上３５℃以下である、請求項１ないし７のいずれか１項に記載の方法。

[請求項9] 前記混合溶液をフロースルーさせる時の流速が、前記イオン交換クロマトグラフィー担体の体積の０．１倍の体積／分以上、前記担体の体積の３０倍の体積／分以下である、請求項１ないし８のいずれか１項に記載の方法。

[請求項10] 前記混合溶液をフロースルーさせる時の流速が、前記イオン交換クロマトグラフィー担体の体積の１倍の体積／分以上、前記担体の体積の１０倍の体積／分以下である、請求項１ないし９のいずれか１項に記載の方法。

[請求項11] 前記生理活性物質が抗体タンパク質の単量体である、請求項１ないし１０のいずれか１項に記載の方法。

[請求項12] 前記不純物が前記抗体タンパク質の二量体以上の凝集体成分である、請求項１ないし１１のいずれか１項に記載の方法。

[請求項13] 前記イオン交換クロマトグラフィー担体が、カチオン交換担体であり、ビーズ状である、請求項１ないし１２のいずれか１項に記載の方法。

[請求項14] 前記イオン交換クロマトグラフィー担体が、カチオン交換担体であり、膜状である、請求項１ないし１２のいずれか１項に記載の方法。

[請求項15] 前記カチオン交換担体が、中空糸膜である、請求項１４に記載の方法。

[請求項16] 前記イオン交換クロマトグラフィー担体を格納する容器に前記混合液をフロースルーさせることの前に、

アフィニティークロマトグラフィーにより前記混合溶液を精製することを更に含む、

請求項１ないし１５のいずれか１項に記載の方法。

[請求項17] 前記アフィニティークロマトグラフィーにプロテインＡ担体を使用する、請求項１６に記載の方法。

[請求項18] 前記アフィニティークロマトグラフィーに、酸溶出型アフィニティークロマトグラフィー担体を使用する、請求項１６又は１７に記載の方法。

[請求項19] 前記アフィニティークロマトグラフィーに、温度応答性アフィニティークロマトグラフィー担体を使用する、請求項１６又は１７に記載の方法。

[請求項20] 当該精製方法において移動相として用いられる緩衝液が０．５～２０ｍＳ／ｃｍの伝導率を有する、請求項１ないし１９のいずれか１項に記載の方法。

[請求項21] 当該精製方法において移動相として用いられる緩衝液の水素イオン指数がｐＨ３．０～９．０範囲内にある、請求項１ないし２０のいずれか１項に記載の方法。

[請求項22] 前記イオン交換クロマトグラフィー担体が少なくとも強カチオン交換基を有する共重合体を備え、

前記共重合体が、前記強カチオン交換基を、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドに対してモノマー換算で０．０１～５００．００ｍｏｌ％含有する、

請求項１ないし２１のいずれか１項に記載の方法。

[請求項23] 前記イオン交換クロマトグラフィー担体が少なくとも強カチオン交

換基を有する共重合体を備え、

前記共重合体が、前記強カチオン交換基を、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドに対してモノマー換算で１～３００．００ｍｏｌ％含有する、

請求項１ないし２１のいずれか１項に記載の方法。

[請求項24] 前記強カチオン交換基を有する共重合体のモノマー単位の少なくとも一部が、アクリル酸誘導体又はメタクリル酸誘導体であり、下記化学式（１）又は（２）で示される基を有する、請求項２２又は２３に記載の方法。

$-CH(-OH)-CH_2-SO_3H$ ・・・（１）

$-CH(-SO_3H)-CH_2-OH$ ・・・（２）

[請求項25] 前記強カチオン交換基を有する共重合体のモノマー単位の少なくとも一部が、スルホン酸基を有するビニルモノマー由来である、請求項２２又は２３に記載の方法。

[請求項26] 前記強カチオン交換基を有する共重合体のモノマー単位の少なくとも一部が、R_1、R_2、R_3のそれぞれをＨ又はＭｅとして下記化学式（３）で示される、請求項２２ないし２５のいずれか１項に記載の方法。

$-CR_1R_2-CR_3(-SO_3H)-$ ・・・（３）

[請求項27] 前記イオン交換クロマトグラフィー担体が少なくとも強カチオン交換基を有する共重合体を備え、

前記共重合体が、前記強カチオン交換基を有するモノマー及び／又は強カチオン交換基導入前駆体モノマーを、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドに対して０．０１～５００．００ｍｏｌ％の割合で含有するモノマー組成物を、重合法によって重合して形成された、

請求項１ないし２１のいずれか１項に記載の方法。

[請求項28] 前記イオン交換クロマトグラフィー担体が少なくとも強カチオン交換基を有する共重合体を備え、

前記共重合体が、前記強カチオン交換基を有するモノマー及び／又は強カチオン交換基導入前駆体モノマーを、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドに対して１～３００．００ｍｏｌ％の割合で含有するモノマー組成物を、重合法によって重合して形成された、

請求項１ないし２１のいずれか１項に記載の方法。

[請求項29] 前記強カチオン交換基を有する共重合体のモノマー単位の少なくとも一部が、アクリル酸誘導体又はメタクリル酸誘導体であり、下記化学式（４）又は（５）で示される基を有する、請求項２７又は２８に記載の方法。

$-CH(-OH)-CH_2-SO_3H$ ・・・（４）

$-CH(-SO_3H)-CH_2-OH$ ・・・（５）

[請求項30] 前記強カチオン交換基導入前駆体モノマーの少なくとも一部が、アクリル酸誘導体又はメタクリル酸誘導体であり、前記共重合体が、下記化学式（６）又は（７）で示される側鎖を有する、請求項２７又は２８に記載の方法。

$-CH(-OH)-CH_2-SO_3H$ ・・・（６）

$-CH(-SO_3H)-CH_2-OH$ ・・・（７）

[請求項31] 前記強カチオン交換基を有する共重合体のモノマー単位の少なくとも一部が、スルホン酸基を有するビニルモノマー由来である、請求項２７又は２８に記載の方法。

[請求項32] 前記強カチオン交換基を有するモノマーの少なくとも一部が、スルホン酸基を有するビニルモノマーである、請求項２７ないし３１のいずれか１項に記載の方法。

[請求項33] 前記強カチオン交換基を有する共重合体のモノマー単位の少なくとも一部が、R_1、R_2、R_3のそれぞれをＨ又はＭｅとして下記化学式（８）で示される、請求項２７ないし３２のいずれか１項に記載の方法。

$-CR_1R_2-CR_3(-SO_3H)-$ ・・・（８）

[請求項34] 前記強カチオン交換基がスルホン酸基である、請求項２２ないし３３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項35] 前記カチオン交換基密度が３０ｍｍｏｌ／Ｌ以上である、請求項２２ないし３４のいずれか１項に記載の方法。

[請求項36] 前記重合法が、表面リビングラジカル重合法である、請求項２７ないし３３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項37] 前記重合法が、放射線グラフト重合法である、請求項２７ないし３３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項38] 基材と、前記基材表面に固定された、少なくともＮ－イソプロピルアクリルアミドをモノマー単位として含む共重合体と、を備えるイオン交換クロマトグラフィー担体であって、

前記共重合体が少なくとも強カチオン交換基を有し、

前記共重合体が、前記強カチオン交換基を有するモノマー及び／又は強カチオン交換基導入前駆体モノマーを、Ｎ－イソプロピルアクリルアミドに対して０．０１～５００．００ｍｏｌ％の割合で含有するモノマー組成物を、重合法によって重合して形成されている、カチオン交換担体であるイオン交換クロマトグラフィー担体。

[請求項39] 基材と、前記基材表面に固定された、少なくともＮ－イソプロピルアクリルアミドをモノマー単位として含む共重合体と、を備えるイオン交換クロマトグラフィー担体であって、

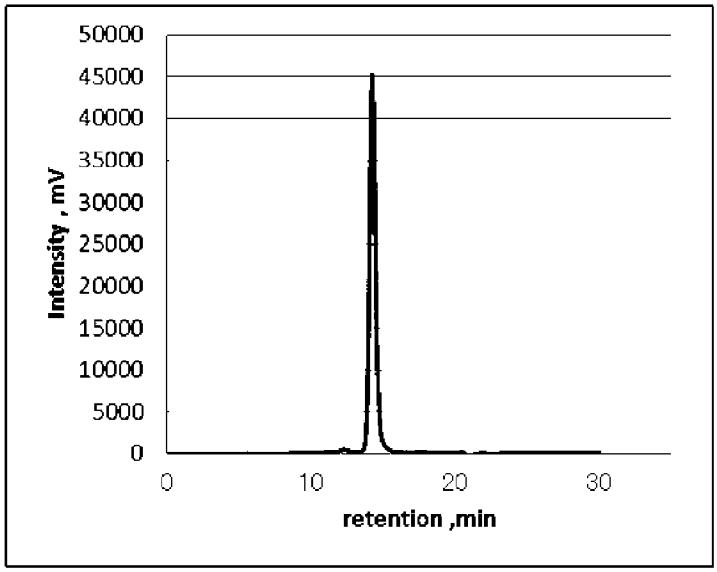
前記共重合体が少なくとも強カチオン交換基を有し、

前記共重合体中のＮ－イソプロピルアクリルアミドの質量割合が、１～９９％である、

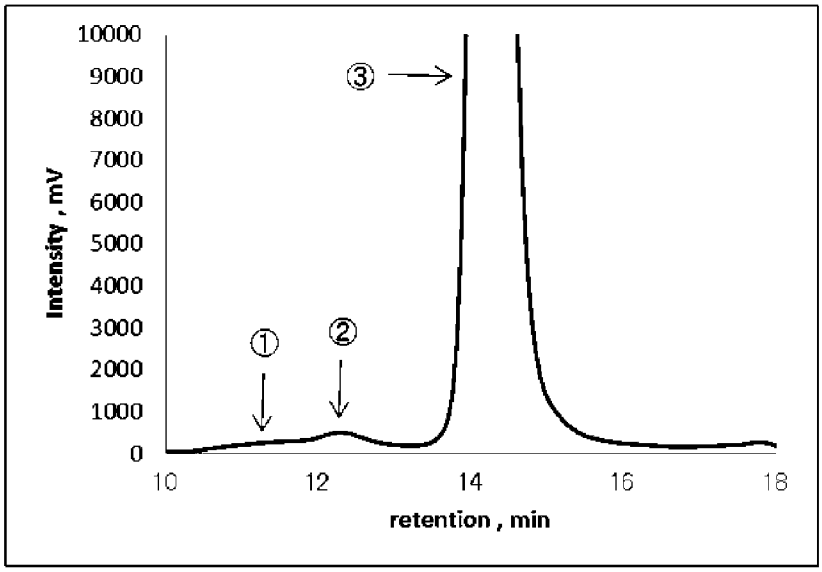
カチオン交換担体であるイオン交換クロマトグラフィー担体。

[請求項40] 前記共重合体中のＮ－イソプロピルアクリルアミドの質量割合が、２０～８０％である請求項３９に記載のカチオン交換担体であるイオン交換クロマトグラフィー担体。

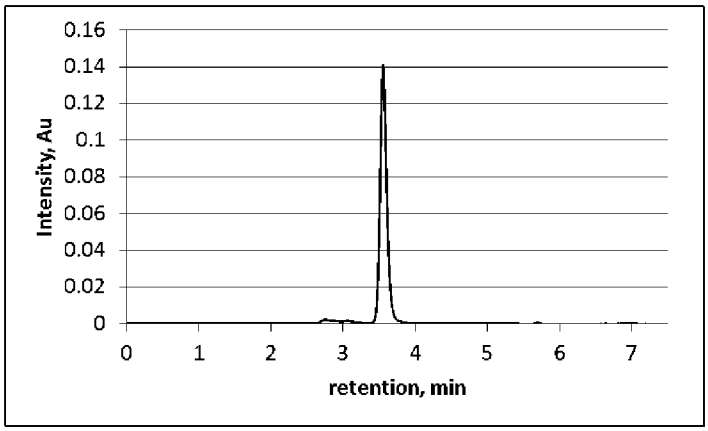
[図1]


50000
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Intensity , mV
0
10
20
30
retention ,min

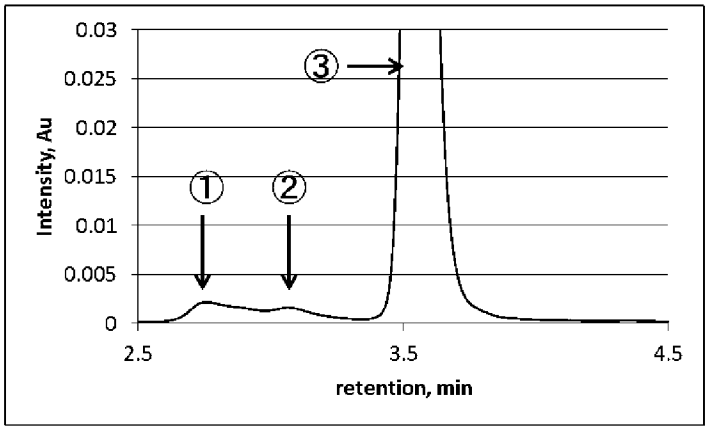
[図2]


10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Intensity , mV
①
②
③
10
12
14
16
18
retention , min

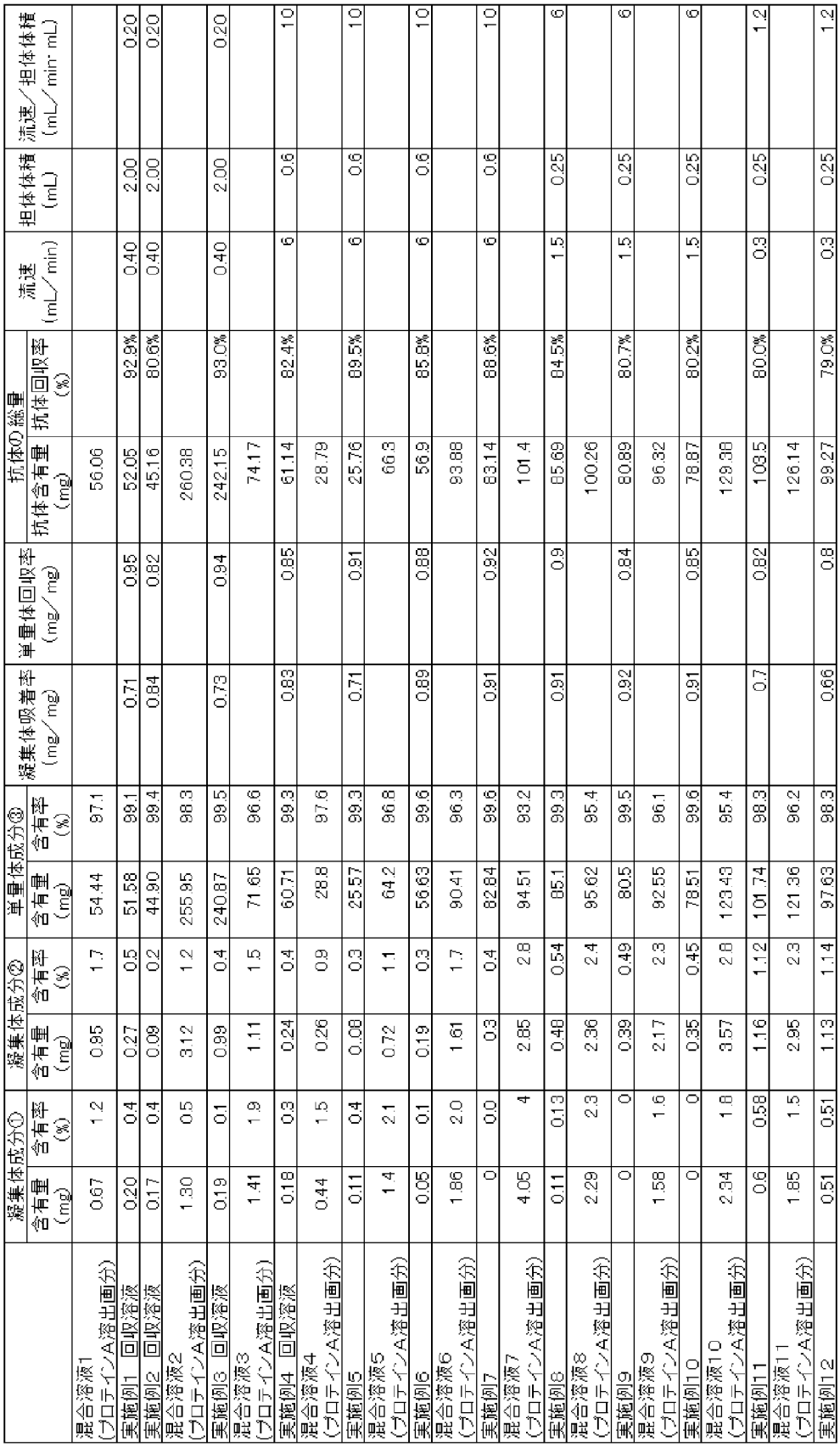
[図3]


0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
Intensity, Au
0
1
2
3
4
5
6
7
retention, min

[図4]


0.03
0.025
0.02
0.015
0.01
0.005
0
Intensity, Au
①
②
③
2.5
3.5
4.5
retention, min

[図5]



	凝集体成分①		凝集体成分②		単量体成分③		凝集体吸着率 (mg／mg)	単量体回収率 (mg／mg)	抗体の総量		流速 (mL／min)	担体体積 (mL)	流速／担体体積 (mL／min・mL)
	含有量 (mg)	含有率 (%)	含有量 (mg)	含有率 (%)	含有量 (mg)	含有率 (%)			抗体含有量 (mg)	抗体回収率 (%)			
混合溶液1 (プロテインA溶出画分)	0.67	1.2	0.95	1.7	54.44	97.1			56.06				
実施例1 回収溶液	0.20	0.4	0.27	0.5	51.58	99.1	0.71	0.95	52.05	92.9%	0.40	2.00	0.20
実施例2 回収溶液	0.17	0.4	0.09	0.2	44.90	99.4	0.84	0.82	45.16	80.6%	0.40	2.00	0.20
混合溶液2 (プロテインA溶出画分)	1.30	0.5	3.12	1.2	255.95	98.3			260.38				
実施例3 回収溶液	0.19	0.1	0.99	0.4	240.87	99.5	0.73	0.94	242.15	93.0%	0.40	2.00	0.20
混合溶液3 (プロテインA溶出画分)	1.41	1.9	1.11	1.5	71.65	96.6			74.17				
実施例4 回収溶液	0.18	0.3	0.24	0.4	60.71	99.3	0.83	0.85	61.14	82.4%	6	0.6	10
混合溶液4 (プロテインA溶出画分)	0.44	1.5	0.26	0.9	28.8	97.6			28.79				
実施例5	0.11	0.4	0.08	0.3	25.57	99.3	0.71	0.91	25.76	89.5%	6	0.6	10
混合溶液5 (プロテインA溶出画分)	1.4	2.1	0.72	1.1	64.2	96.8			66.3				
実施例6	0.05	0.1	0.19	0.3	56.63	99.6	0.89	0.88	56.9	85.8%	6	0.6	10
混合溶液6 (プロテインA溶出画分)	1.86	2.0	1.61	1.7	90.41	96.3			93.88				
実施例7	0	0.0	0.3	0.4	82.84	99.6	0.91	0.92	83.14	88.6%	6	0.6	10
混合溶液7 (プロテインA溶出画分)	4.05	4	2.85	2.8	94.51	93.2			101.4				
実施例8	0.11	0.13	0.48	0.54	85.1	99.3	0.91	0.9	85.69	84.5%	1.5	0.25	6
混合溶液8 (プロテインA溶出画分)	2.29	2.3	2.36	2.4	95.62	95.4			100.26				
実施例9	0	0	0.39	0.49	80.5	99.5	0.92	0.84	80.89	80.7%	1.5	0.25	6
混合溶液9 (プロテインA溶出画分)	1.58	1.6	2.17	2.3	92.55	96.1			96.32				
実施例10	0	0	0.35	0.45	78.51	99.6	0.91	0.85	78.87	80.2%	1.5	0.25	6
混合溶液10 (プロテインA溶出画分)	2.34	1.8	3.57	2.8	123.43	95.4			129.36				
実施例11	0.6	0.58	1.16	1.12	101.74	98.3	0.7	0.82	103.5	80.0%	0.3	0.25	1.2
混合溶液11 (プロテインA溶出画分)	1.85	1.5	2.95	2.3	121.36	96.2			126.14				
実施例12	0.51	0.51	1.13	1.14	97.63	98.3	0.66	0.8	99.27	79.0%	0.3	0.25	1.2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/060677

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
See extra sheet.

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)
C07K1/18, B01D15/04, B01D15/08, B01J20/24, B01J20/26, B01J20/281, B01J20/30, B01J20/34, B01J39/04, B01J39/26, C07K1/22, C08F291/00, G01N30/26, G01N30/54, G01N30/88

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/081727 A1 (Asahi Kasei Medical Co., Ltd.), 21 June 2012 (21.06.2012), claims; paragraph [0035]; examples & EP 2653218 A1 & JP 2012-139678 A & CN 103260744 A	1-15,20-40
X	WO 2012/121409 A1 (Asahi Kasei Medical Co., Ltd.), 13 September 2012 (13.09.2012), claims; examples (Family: none)	1-40

☒ 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	Date of mailing of the international search report
03 July, 2014 (03.07.14)	15 July, 2014 (15.07.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/060677

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2012-502924 A (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization), 02 February 2012 (02.02.2012), claims; examples & WO 2010/031144 A1 & US 2012/0052550 A1 & EP 2344517 A1 & CN 2737404 A	1-15,20-21
A	JP 2009-085933 A (Teruo OKANO), 23 April 2009 (23.04.2009), claims; examples (Family: none)	1-40
A	JP 2011-174944 A (Tokyo Women's Medical University), 08 September 2011 (08.09.2011), claims; examples (Family: none)	1-40
A	JP 2011-041475 A (Asahi Kasei Medical Co., Ltd.), 03 March 2011 (03.03.2011), claims (Family: none)	1-40
P,X	WO 2013/187512 A1 (Asahi Kasei Medical Co., Ltd.), 19 December 2013 (19.12.2013), claims (Family: none)	38-40
P,A	WO 2014/065276 A1 (Asahi Kasei Medical Co., Ltd.), 01 May 2014 (01.05.2014), claims (Family: none)	1-4,13-15
P,A	WO 2014/034644 A1 (Asahi Kasei Medical Co., Ltd.), 06 March 2014 (06.03.2014), claims (Family: none)	16-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/060677

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C07K1/18(2006.01)i, *B01D15/04*(2006.01)i, *B01D15/08*(2006.01)i, *B01J20/24*(2006.01)i, *B01J20/26*(2006.01)i, *B01J20/281*(2006.01)i, *B01J20/30*(2006.01)i, *B01J20/34*(2006.01)i, *B01J39/04*(2006.01)i, *B01J39/26*(2006.01)i, *C07K1/22*(2006.01)i, *C08F291/00*(2006.01)i, *G01N30/26*(2006.01)i, *G01N30/54*(2006.01)i, *G01N30/88*(2006.01)i

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

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／０６０６７７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　特別ページ参照

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.　C07K1/18, B01D15/04, B01D15/08, B01J20/24, B01J20/26, B01J20/281, B01J20/30, B01J20/34, B01J39/04, B01J39/26, C07K1/22, C08F291/00, G01N30/26, G01N30/54, G01N30/88

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	１９７１－２０１４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１４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）

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	WO 2012/081727 A1（旭化成メディカル株式会社）2012.06.21, 請求の範囲，［００３５］，実施例など， & EP 2653218 A1 & JP 2012-139678 A & CN 103260744 A	1-15,20-40
X	WO 2012/121409 A1（旭化成メディカル株式会社）2012.09.13, 請求の範囲，実施例など， （ファミリーなし）	1-40

☑　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 ０３．０７．２０１４	国際調査報告の発送日 １５．０７．２０１４
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 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）　４Ｂ　９４５１ 坂崎　恵美子 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
X	JP 2012-502924 A（コモンウェルス　サイエンティフィック　アンド　インダストリアル　リサーチ　オーガニゼイション） 2012.02.02, 特許請求の範囲，実施例など， & WO 2010/031144 A1 & US 2012/0052550 A1 & EP 2344517 A1 & CN 2737404 A	1-15,20-21
A	JP 2009-085933 A（岡野光夫）2009.04.23, 特許請求の範囲，実施例など， （ファミリーなし）	1-40
A	JP 2011-174944 A（学校法人東京女子医科大学）2011.09.08, 特許請求の範囲，実施例など， （ファミリーなし）	1-40
A	JP 2011-041475 A（旭化成メディカル株式会社）2011.03.03, 特許請求の範囲など， （ファミリーなし）	1-40
P，X	WO 2013/187512 A1（旭化成メディカル株式会社）2013.12.19, 請求の範囲， （ファミリーなし）	38-40
P，A	WO 2014/065276 A1（旭化成メディカル株式会社）2014.05.01, 請求の範囲， （ファミリーなし）	1-4,13-15
P，A	WO 2014/034644 A1（旭化成メディカル株式会社）2014.03.06, 請求の範囲， （ファミリーなし）	16-19

発明の属する分野の分類
C07K1/18(2006.01)i, B01D15/04(2006.01)i, B01D15/08(2006.01)i, B01J20/24(2006.01)i, B01J20/26(2006.01)i, B01J20/281(2006.01)i, B01J20/30(2006.01)i, B01J20/34(2006.01)i, B01J39/04(2006.01)i, B01J39/26(2006.01)i, C07K1/22(2006.01)i, C08F291/00(2006.01)i, G01N30/26(2006.01)i, G01N30/54(2006.01)i, G01N30/88(2006.01)i