

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-509076

(P2020-509076A)

(43) 公表日 令和2年3月26日(2020.3.26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 17/14 (2006.01)	C07K 17/14 ZNA	4G002
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4G066
C07K 16/00 (2006.01)	C07K 16/00	4H045
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 N	
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 541A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-556418 (P2019-556418)
 (86) (22) 出願日 平成30年1月4日 (2018.1.4)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年7月9日 (2019.7.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2018/071397
 (87) 国際公開番号 WO2018/127099
 (87) 国際公開日 平成30年7月12日 (2018.7.12)
 (31) 優先権主張番号 201710005878.8
 (32) 優先日 平成29年1月4日 (2017.1.4)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 中国 (CN)

(71) 出願人 519241381
 ナンジンジンズールイ サイエンス アン
 ド テクノロジー バイオロジー コーポ
 レーション
 NANJINGJINSIRUI SCI
 ENCE & TECHNOLOGY B
 IOLOGY CORP.
 中華人民共和国チアンス、ナンキン、ジャ
 ンニン、サイエンス、パーク、ヨンシー、
 ロード、28
 (74) 代理人 100107342
 弁理士 横田 修孝
 (74) 代理人 100155631
 弁理士 榎 保孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高負荷かつ耐アルカリ性のプロテインA 磁性ビーズ及びその使用方法

(57) 【要約】

高負荷かつ耐アルカリ性のプロテインA 磁性ビーズが提供される。この磁性ビーズは、pH 2 ~ 14 で化学安定性を維持することができ、50 mg/mL 超の免疫グロブリンG (IgG) 結合能を有する。更に、免疫グロブリンを精製及び/または検出するための方法であって、高負荷かつ耐アルカリ性のプロテインA 磁性ビーズに、免疫グロブリンを含む試料を接触させるステップを含む方法が提供される。耐アルカリ性プロテインA 磁性ビーズは、処置時間を約80%節約し、全精製コストを50%削減して、免疫グロブリンの迅速な精製を実現することができる。加えて、耐アルカリ性プロテインA 磁性ビーズは、高い耐アルカリ性を有する。使用後の磁性ビーズを再生するためにアルカリ性インサイチュ浄化方法を行うことができる。この磁性ビーズは、迅速な磁気応答及び良好な分散性を有し、迅速な磁性ビーズの濃縮、浄化、及び溶出を実現する。この磁性ビーズは、自動化されたハイスループットかつ大規模な試料の精製を容易にする。

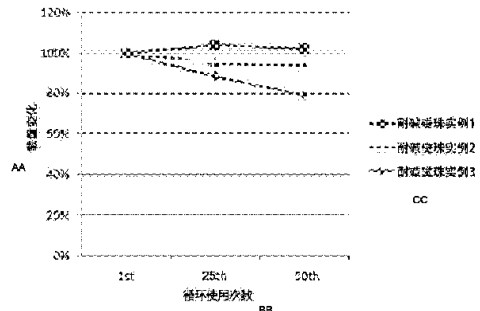


図 2

AA LOAD CHANGE
 BB USE CYCLE
 CC EMBODIMENT 1/2/3 OF THE ALKALI-RESISTANT MAGNETIC BEAD

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

pH 2 ~ 14 で化学安定性を維持することができ、50 mg / mL 超の免疫グロブリン I g G 結合能を有する、高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズ。

【請求項 2】

前記磁性ビーズが、pH 10 ~ 14 のアルカリ溶液中で各回 15 分間にわたり 50 回超インサイチュ浄化した後に 40 mg / mL 超の免疫グロブリン I g G 結合能を有する、請求項 1 に記載の高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズ。

【請求項 3】

前記磁性ビーズが、60 eum / g 超の比飽和磁化を有する、請求項 1 に記載の高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズ。

10

【請求項 4】

前記磁性ビーズが、20 nm ~ 200 nm または 30 μm ~ 200 μm の範囲の粒径を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズ。

【請求項 5】

前記磁性ビーズが磁性コア部分及びリガンド部分を含み、前記磁性コア部分の主成分が Fe_3O_4 であり、前記リガンド部分が耐アルカリ性プロテイン A である、請求項 1 に記載の高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズ。

【請求項 6】

前記磁性コア部分が Fe_2O_3 を更に含み、 $Fe_2O_3 : Fe_3O_4$ の質量比が 1 : 1 ~ 1 : 100 である、請求項 5 に記載の高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズ。

20

【請求項 7】

前記高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズ上の前記耐アルカリ性プロテイン A の量が 3 mg / mL 以上である、請求項 5 に記載の高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズ。

【請求項 8】

前記磁性コア部分が超常磁性である、請求項 5 または 6 に記載の高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズ。

30

【請求項 9】

前記磁性コア部分が、シリカ、グルカン、アガロース、ポリスチレン、ポリグリシジルメタクリレート、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリスチレン-グリシジルメタクリレート、及びそれらの組み合わせのうちの一つ以上から選択される無機材料または有機材料からなる被覆層で被覆されており、前記リガンド部分が前記被覆層にカップリングしている、請求項 5 に記載の高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズ。

【請求項 10】

前記被覆層が、前記リガンドと架橋するために必要とされる反応基、または前記被覆層の表面上の化学活性化もしくはカップリングによって前記リガンドと架橋するために必要とされる反応基を有する、請求項 9 に記載の高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズ。

40

【請求項 11】

前記反応基が、ヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基、及びエポキシ基から選択される、請求項 10 に記載の高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズ。

【請求項 12】

前記耐アルカリ性プロテイン A が、過酷なアルカリ性条件下で処置された後に免疫グロブリン I g G に確実に結合できるように、pH 10 ~ 14 の強アルカリ環境においてタンパク質高次構造の安定性を維持することができる、請求項 5 に記載の高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズ。

【請求項 13】

50

前記耐アルカリ性プロテイン A が、免疫グロブリン I g G に結合することができる 2 ~ 4 つのドメインを含む、請求項 5 に記載の高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズ。

【請求項 14】

前記耐アルカリ性プロテイン A が、前記アガロースにカップリングすることにより前記被覆層に結合している、請求項 5 に記載の高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズ。

【請求項 15】

前記耐アルカリ性プロテイン A が、配列番号 1 のアミノ酸配列または配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 5 に記載の高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズ。

【請求項 16】

前記耐アルカリ性プロテイン A が、前記アミノ酸配列の相同 2 ~ 4 量体及び / または異種 2 ~ 4 量体である、請求項 15 に記載の高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズ。

【請求項 17】

前記耐アルカリ性プロテイン A が、組換え発現された融合タンパク質の形態である、請求項 16 に記載の高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズ。

【請求項 18】

免疫グロブリンを精製及び / または検出するための方法であって、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズに、前記免疫グロブリンを含む試料を接触させるステップを含む、前記方法。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズを再生するための方法であって、前記高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズを、0.1 ~ 1 時間にわたり、0.1 M ~ 0.5 M の水酸化ナトリウム溶液もしくは水酸化カリウム溶液またはこれら両方の混合溶液に浸漬してから、前記磁性ビーズを純水もしくは緩衝液に浸すか、または前記磁性ビーズを 3 ~ 5 回すすいで、前記アルカリ溶液を完全に除去することと、前記高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズを平衡化緩衝液中で保存することとを含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、耐アルカリ性磁性ビーズ、特に高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズに関する。本発明は、耐アルカリ性プロテイン A 磁性ビーズを使用して抗体を精製するための方法にも関する。

【背景技術】

【0002】

バイオテクノロジーは、現在世界で最も急速に成長している先端技術の領域のうちの 1 つである。抗体薬は、バイオテクノロジーの分野のうちの 1 つとして、近年優れた市場実績を達成している。抗体薬は、基礎的な生物医学研究、ならびに疾患（例えばがん、臓器移植拒否反応、自己免疫疾患など）の診断及び処置において広く使用されてきた。多くの製薬会社、とりわけバイオテクノロジー製薬会社が、抗体薬の開発及び生産の分野に徐々に進出している。医療分野における多数の治療用医薬品抗体の出現に伴い、研究開発プロセスの加速及び生産プロセスの最適化がますます注目を集めている。

【0003】

一般に、新たな抗体の開発では、1) 抗体の初期ハイスループットスクリーニング及び 2) 抗体の大規模生産という 2 つの重要なプロセスにおいて精製技術が必要である。

【0004】

免疫化された動物は、抗原免疫化に供され、ポリクローナル抗体が生成される。効果的なモノクローナル抗体細胞を得るためには、これらの抗体産生細胞のその後の処理及びス

10

20

30

40

50

クリーニングが必要である。このセッションには、多数の抗体細胞スクリーニング作業が含まれる。従来スクリーニング方法は、少量のモノクローナル細胞（5～50 mL）を培養し、親和性樹脂を使用することにより細胞を精製し、細胞培養物から抗体を採取し、次に抗体の効果を試験することを含む。精製プロセスは、試料の遠心分離及び濾過、樹脂のカラム充填、負荷、洗浄、及び溶出などを含み、煩雑である。通常、1つの試料は1つのカラムに対応するため、ハイスループットかつ大規模な精製を達成することは困難である。磁性ビーズを用いた抗体の精製により、試料の遠心分離及び濾過、カラム充填などの煩雑な処理ステップを省くことができる。負荷及びインキュベーション、洗浄及び溶出などのプロセスを効率的に完了するため、迅速な磁気応答プロセスを自動化された装置と組み合わせる使用することにより、最大96個の試料を同時に処理することができ、これにより迅速かつハイスループットのスクリーニングが達成される。抗体の従来大規模生産において、精製は、精製樹脂を用いて行われる。樹脂を用いて大量の試料を精製する際にも、試料の遠心分離及び濾過、ならびに充填材料のカラム充填、ならびにカラムを通る流速の制限が原因で負荷、洗浄、及び溶出に必要とされる多くの時間及び労力を含む複雑なプロセスという、同じ問題が発生し得る。

10

20

30

40

50

【0005】

ハイスループットかつ大規模な抗体精製は、概して、磁性ビーズを使用して素早く容易に達成することができる。しかしながら、市販の磁性ビーズは、静的負荷、磁気応答、及び分散性が不十分であり、主に少量の微小試料の濃縮のために使用されるため、抗体またはタンパク質の大規模精製用途を満たすことができない。従来型の樹脂の動的負荷は概して35～45 mg/mLであり、試料の損失を防止するために、実際の試料負荷量は、実際に使用される負荷が20～36 mg/mLに相当するよう、樹脂の動的負荷の60%～80%に制御される。現在市販されている磁性ビーズは、最大でも35 mg/mLの静的負荷を有する。樹脂と同じ精製能力を達成するために必要とされる磁性ビーズの量は、使用される樹脂の量と基本的に同等である。磁性ビーズの生産コストは樹脂の生産コストの2～3倍であることが多いため、磁性ビーズは、精製における原材料のコスト面での利点を有しない。本発明の耐アルカリ性プロテインA磁性ビーズは、50 mg/mL超の結合負荷を有する。本発明の磁性ビーズを用いれば、相対的なコスト面での利点が効果的に増加すると同時に、抗体のハイスループットかつ大規模な精製が素早く容易に実現される。

【0006】

抗体は、細胞培養物から産生される。目的の抗体は細胞内で産生されるか、または周囲媒体中に分泌される。細胞を培養するプロセスでは、糖、アミノ酸、及び増殖因子などの補助因子を培養培地に添加することが要求されるため、ヒトのための治療剤として抗体を使用可能にするには、培養培地中の他の細胞成分から抗体を十分な純度まで分離させることが必要である。最も一般的に使用されている抗体精製方法は親和性クロマトグラフィである。親和性クロマトグラフィは、簡素、高速、かつ高度に選択的であるという利点を有し、その後の精製ステップを著しく低減させることができる。近代産業においては、低い生産コストを維持することも生産プロセスにおける重要な要件である。生産に必要とされる精製クロマトグラフィ媒体を繰り返し使用することができれば、抗体の生産コストが著しく低減し得る。しかしながら、クロマトグラフィ媒体を使用して抗体を精製する度に、溶出されないタンパク質、タンパク質凝集物、そして更にはウイルス及び内毒素といったヒトの身体に有害な物質が残留する場合があるため、クロマトグラフィ媒体を再利用する場合はこれを浄化しなければならない。現在、クロマトグラフィ媒体を回復させる最も効果的な方法は、インサイチュ浄化と呼ばれるアルカリ性プロセスである。この方法の標準的手順は、精製媒体を0.5 M水酸化ナトリウム（NaOH）で処置することを含む。この過酷な方法は不純物を効果的に除去することができるが、精製媒体を損傷する可能性が高い。本発明の耐アルカリ性プロテインA磁性ビーズのリガンドは、pH 12～14の高アルカリ環境に耐えることができる、耐アルカリ性の高いプロテインAである。したがって、本発明の磁性ビーズを使用することで、アルカリ性インサイチュ浄化モードが可能になり、不純物が効果的に除去され、磁性ビーズの高負荷結合特性が回復し、最大50回ま

たはそれ以上の反復使用の効果が達成される。

【発明の概要】

【0007】

一態様において、本発明は、高負荷かつ耐アルカリ性のプロテインA磁性ビーズを提供する。この磁性ビーズは、pH 2 ~ 14で化学安定性を維持することができ、50 mg / mL超の免疫グロブリンIgG結合能を有する。

【0008】

一実施形態において、高負荷かつ耐アルカリ性のプロテインA磁性ビーズは、pH 10 ~ 14のアルカリ溶液中で各回15分間にわたり50回超インサイチュ浄化した後に40 mg / mL超の免疫グロブリンIgG結合能を有する。

【0009】

一実施形態において、高負荷かつ耐アルカリ性のプロテインA磁性ビーズは、60 eu / g超の比飽和磁化を有する。

【0010】

一実施形態において、高負荷かつ耐アルカリ性のプロテインA磁性ビーズは、20 nm ~ 200 nmまたは30 μm ~ 200 μmの粒径を有する。

【0011】

一実施形態において、高負荷かつ耐アルカリ性のプロテインA磁性ビーズは、磁性コア部分及びリガンド部分を含み、磁性コア部分の主成分はFe₃O₄であり、リガンド部分は耐アルカリ性プロテインAである。好ましくは、磁性コア部分はFe₂O₃も含み、Fe₂O₃ : Fe₃O₄の質量比は1 : 1 ~ 1 : 100である。

【0012】

一実施形態において、高負荷かつ耐アルカリ性のプロテインA磁性ビーズ上の耐アルカリ性プロテインAの量は3 mg / mL以上である。

【0013】

一実施形態において、高負荷かつ耐アルカリ性のプロテインA磁性ビーズの磁性コア部分は超常磁性である。

【0014】

一実施形態において、磁性コア部分は、シリカ、グルカン、アガロース、ポリスチレン、ポリグリシジルメタクリレート、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリスチレン-グリシジルメタクリレート、及びそれらの組み合わせのうちの一つ以上から選択される無機材料または有機材料からなる被覆層で被覆されており、リガンド部分は被覆層にカップリングしている。

【0015】

一実施形態において、被覆層は、リガンドと架橋するために必要とされる反応基、または被覆層の表面上の化学活性化もしくはカップリングによってリガンドと架橋するために必要とされる反応基を有する。好ましくは、反応基は、ヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基、及びエポキシ基から選択される。好ましくは、アガロースは、架橋アガロースである。

【0016】

一実施形態において、耐アルカリ性プロテインAは、過酷なアルカリ性条件下で処置された後に免疫グロブリンIgGに確実に結合できるように、pH 10 ~ 14の強アルカリ環境においてタンパク質高次構造の安定性を維持することができる。

【0017】

一実施形態において、耐アルカリ性プロテインA磁性ビーズは、免疫グロブリンIgGに結合することができる2 ~ 4つのドメインを含む。

【0018】

一実施形態において、耐アルカリ性プロテインAは、アガロースにカップリングすることにより被覆層に結合している。

【0019】

10

20

30

40

50

特定の一実施形態では、耐アルカリ性プロテイン A は、配列番号 1 のアミノ酸配列もしくは配列番号 2 のアミノ酸配列、または配列番号 1 及び配列番号 2 のアミノ酸配列の両方を含む。

【0020】

特定の一実施形態では、耐アルカリ性プロテイン A は、前述のアミノ酸配列の共有結合により形成された相同 2 ~ 4 量体及び/または異種 2 ~ 4 量体、好ましくは二量体であり、これはホモ二量体及び/またはヘテロ二量体であり得る。

【0021】

別の態様では、本願はまた、免疫グロブリンを精製及び/または検出するための方法であって、前述の高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズに、免疫グロブリンを含む試料を接触させるステップを含む、方法を提供する。

10

【0022】

別の態様では、本願はまた、高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズを再生するための方法であって、高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズを、0.1 ~ 1 時間にわたり、0.1 ~ 0.5 M の水酸化ナトリウム溶液もしくは水酸化カリウム溶液またはこれら両方の混合溶液に浸漬してから、磁性ビーズを純水もしくは緩衝液に浸すか、または磁性ビーズを 3 ~ 5 回すすいで、アルカリ溶液を完全に除去することと、高負荷かつ耐アルカリ性のプロテイン A 磁性ビーズを平衡化緩衝液中で保存することを含む、方法を提供する。

【0023】

本願による耐アルカリ性プロテイン A 磁性ビーズは、50 mg/mL 超の静的負荷を有する。本発明の耐アルカリ性プロテイン A 磁性ビーズを使用することにより、処置時間を約 80% 節約することができ、全精製コストを 50% 削減することができる。加えて、本願による耐アルカリ性プロテイン A 磁性ビーズは、高い耐アルカリ性、迅速な磁気応答、及び良好な分散性を有し、迅速な磁性ビーズの濃縮、浄化、及び溶出を実現し、自動化されたハイスループットかつ大規模な試料の精製を容易にする。

20

【0024】

更に、本願による耐アルカリ性プロテイン A 磁性ビーズは耐アルカリ性を有するため、使用後の磁性ビーズを再生するためにアルカリ性インサイチュ浄化方法を行うことができる。

30

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図 1】免疫グロブリンの精製に関する本発明の耐アルカリ性プロテイン A 磁性ビーズの効果を示すゲル電気泳動写真である。レーン 1、2、3、及び 4 の負荷試料はそれぞれ、精製前の試料溶液（原液）、耐アルカリ性プロテイン A 磁性ビーズによる吸着後の試料溶液（上清）、耐アルカリ性プロテイン A 磁性ビーズを浄化した後の洗浄緩衝液（洗浄）、及び耐アルカリ性プロテイン A 磁性ビーズを浄化した後の溶出緩衝液（溶出）である。M は、分子量マーカーである。

【図 2】アルカリ溶液で複数回浄化した後の本発明の磁性ビーズの負荷の変化を示すグラフである。耐アルカリ性磁性ビーズの実施例 1、2、及び 3 はそれぞれ、独立して調製された 3 種の耐アルカリ性プロテイン A 磁性ビーズである。

40

【発明を実施するための形態】

【0026】

本明細書において使用される場合、「耐アルカリ性プロテイン A」という用語は、高アルカリ性条件（例えば、pH 10 ~ 14）において三次構造が保持され、よって IgG 結合活性が保持されるように、アミノ酸配列が人工的に変更されたプロテイン A を指す。

【0027】

本明細書において使用される場合、「耐アルカリ性プロテイン A 磁性ビーズ」という用語は、表面が上述の耐アルカリ性プロテイン A に結合する磁性ビーズを指す。耐アルカリ性プロテイン A は概して、磁性コア上の被覆層（例えば、アガロース）によって磁性ビー

50

ズに結合している。

【0028】

本明細書において使用される場合、「静的負荷」という用語は、結合させたい試料に磁性ビーズが十分に接触しているとき、磁性ビーズの単位量あたりに結合する IgG 抗体の容量を指す。「高負荷」とは、結合能が 50 mg/mL 超であることを意味する。

【0029】

本明細書において使用される場合、耐アルカリ性プロテイン A の「ホモ二量体」とは、本願下記のアミノ酸配列 1 またはアミノ酸配列 2 によって形成された二量体を指す。「ヘテロ二量体」とは、本願下記のアミノ酸配列 1 及びアミノ酸配列 2 によって形成された二量体を指す。二量体を形成する様式としては、発現された融合タンパク質を組換え法によってタンデムに連結すること、ならびに合成されたアミノ酸配列 1 及び/またはアミノ酸配列 2 を小分子（例えば、短いペプチド、有機分子）により連結することなどが挙げられる。

10

【0030】

耐アルカリ性磁性ビーズ A に関して使用される「化学安定性」という用語は、耐アルカリ性磁性ビーズ A が、アルカリ溶液における複数回のインサイチュ浄化後にその高い静的負荷を維持することを意味する。この化学安定性は、磁性ビーズの被覆層（例えば、アガロース）及び耐アルカリ性プロテイン A ならびに耐アルカリ性プロテイン A と被覆層との間のカップリングの安定性を含む。

【0031】

以下の具体的な実施例により、本発明を更に説明する。

20

【実施例】

【0032】

実施例 1：磁性コアの調製

本願において言及される磁性ビーズは、主に四酸化三鉄 (Fe_3O_4) からなる。つまり、四酸化三鉄の量は 50% 以上である。磁性コアは、機械的研磨法、沈殿法（化学的共沈法、酸化沈殿法、還元沈殿法）、マイクロエマルション法、ソルボサーマル法、ゾルゲル法、有機物熱分解、及び他の方法によって調製することができる。

【0033】

例えば、10 nm ~ 50 nm の粒径を有する Fe_3O_4 磁性コアは、従来の化学的共沈法によって調製可能である。硫酸第一鉄七水和物及び塩化第二鉄六水和物を 1 : 1 ~ 1 : 2 のモル比で混合し、0.5 ~ 2 モルの塩酸溶液に溶解させ、これに 10 ~ 25% のアンモニア水溶液をゆっくりと添加した。アンモニア水の添加中、攪拌パドルを使用して溶液を攪拌状態に保ち、攪拌パドルの回転速度は、高速かつ均一な混合を確実にするため 100 ~ 500 rpm に維持した。アンモニア水を連続的に添加するにつれ、溶液の pH は徐々に上昇した。pH が 1.3 に達したとき、アンモニア水の添加を停止し、0.5 ~ 2 時間にわたり攪拌を続けた。純水で浄化することにより可溶物を除去した。沈殿物は、 Fe_3O_4 に富んだ磁性コアであった。

30

【0034】

粒径がより大きい、例えば粒径が 30 μm ~ 200 μm の磁性コアは、ソルボサーマル法によって調製可能である。具体的に述べると、ポリエチレンビーカーにて適切な濃度の $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 及び $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ を 1 : 1 ~ 1 : 2 のモル比で混合し、これに適量の尿素及び界面活性剤 SDS を添加し、この混合物を均一に攪拌して、透明な溶液を得た。この溶液を高圧反応器に入れ、器本体の内壁とビーカーとの間に適量の水を加えて 0.6 の充填度とした。ナットを締め、反応器を密閉し、窒素ガスを（保護ガスとして）導入し、システムを 30 分間パージした。反応器を 125 °C に加熱し、システム圧力を約 5 ~ 7 atm に維持し、反応を一定期間持続させた。反応生成物を濾過し、洗浄し、乾燥させて、より大きな粒径を有する磁性コアを得た。

40

【0035】

実施例 2：シリカ被覆磁性ビーズの調製

50

実施例 1 で調製した磁性コアは超常磁性である。つまり、外部磁場の作用下で容易に磁化するが、ヒステリシスがなく、ある特定の条件下で化学安定性を有する。しかしながら、この磁性コアは容易に酸化してその超常磁性を失い、その溶液中の分散性は不十分である。酸化を阻止し、強酸及び強塩基に耐える能力を達成するためには、磁性コアを他の材料で被覆する必要がある。この実施例では、実施例 1 で調製した磁性コアが 1 つ以上のシリカ層で被覆されることを記載する。

【0036】

シリカ被覆磁性ビーズは、ケイ酸ナトリウム加水分解法によって調製することができる。ケイ酸ナトリウムを原材料として使用して飽和ケイ酸を調製し、酸性またはアルカリ性条件下でケイ酸を更に縮合してシリカにし、これで磁性ナノ粒子の表面を覆った。ケイ酸ナトリウムを Fe_3O_4 磁性粒子の分散システムに加え、 HCl をゆっくりと滴加して pH を約 6 ~ 10 に調整し、1 つ以上のシリカ層が Fe_3O_4 磁性コアの表面を覆うようにした。

10

【0037】

シリカ被覆磁性ビーズは、オルトケイ酸エチル加水分解法によって調製することもできる。適量の Fe_3O_4 ナノ粒子を秤量し、無水エタノールに分散させ、これに数滴のオレイン酸を滴加し、次にこの混合物を超音波によって 10 分間分散させた。次に、この分散溶液を 250 mL の三口フラスコに移し、オルトケイ酸エチル $Si(OC_2H_5)_4$ (TEOS) 及び $NH_3 \cdot H_2O$ を 1 : 2 のモル比で三口フラスコに加え、この溶液を 3 時間攪拌して反応させた。反応が完了した後、磁場の引力下にて、溶液が清澄になるまで蒸留水を使用して洗浄を繰り返し、結果として得られた沈殿物を 70 度の真空下で乾燥させて、シリカ / 四酸化三鉄複合体のナノ粒子磁性ビーズを最終的に得た。

20

【0038】

実施例 3 : アガロース被覆磁性ビーズの調製

アガロース被覆磁性ビーズは、それぞれ、有機相としてのシクロヘキサン、Span 80 (SP80)、及び二重蒸留水、乳化剤、ならびに水相を使用した、逆相懸濁法によって調製される。

【0039】

1000 mL の三口フラスコに 400 mL のシクロヘキサンを加え、水浴にて加熱し (水浴の温度は 60 度に調整した)、500 rpm にて均一に攪拌した。適量の SP80 を添加し、攪拌を 30 分間から 1 時間にわたって続けた。同時に、アガロース溶液を調製した。4% ~ 6% のアガロース溶液を 150 ~ 200 mL 調製し、実施例 2 で調製したシリカ被覆磁性ビーズを適量加え、電子レンジで加熱することによって溶解させた。完全に溶解した後、これを直ちにシクロヘキサン溶液に添加し、回転速度を 1400 rpm に調整したスターラーで 10 分間攪拌した。次に、温度を 25 度に低下させた。もう 15 分間攪拌した後、フラスコ中の溶液をビーカーに移し、磁力の作用下で、95% 無水エタノール及び二重蒸留水を交互に用いた浄化を 3 回行った。最後に、沈殿物を回収してアガロース被覆磁性ビーズを得た。

30

【0040】

実施例 4 : アガロース被覆磁性ビーズの表面活性化

耐アルカリ性プロテイン A などの他のリガンドが実施例 3 で調製した磁性ビーズの表面に化学的カップリングによって結合できるようにするには、リガンドへのカップリングを達成するために、例えば、磁性ビーズの表面上のヒドロキシル基のエポキシ活性化により、磁性ビーズの表面を化学的に活性化させることが必要である。100 mL のアガロース被覆磁性ビーズを 1 L の三角フラスコに加え、1 M $NaOH$ 溶液を同時に調製した。アガロース被覆磁性ビーズの $NaOH$ 溶液に対する体積比が 1 : 1 ~ 1 : 1.5 になるように、1 M $NaOH$ 溶液を三角フラスコに加え、この混合物を均一に振盪した。最後に、適量のエピクロロヒドリンを 1 L の三角フラスコに加え、三角フラスコを振盪インキュベータに入れ、温度を 37 度に調整し、反応を 1 ~ 1.5 時間持続させた。反応の最後に、表面が活性化されたアガロースビーズを得ることができた。

40

50

【0041】

リガンド部分は、様々な反応基を介してカップリングすることができた。例えば、エピクロロヒドリン、水酸化ナトリウム、及び水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) を、アガロース被覆磁性ビーズと共に、恒温振盪機においてある一定の温度でインキュベートすることにより、カップリングに必要とされるエポキシ反応基がもたらされた。エピクロロヒドリンに加えて、アシルグリシジルエーテル、臭化シアン、N-ヒドロキシサクシニミド (NHS)、ジメチルジヘプタジンジヒドロクロリド (DMP) などを含むがこれらに限定されない他の手段によって、アガロース微粒子を用いた化学活性化反応を行うことにより、カップリングに必要とされるカルボキシル基及びアミノ基などの反応基がもたらされた。

10

【0042】

実施例5：表面活性化磁性ビーズ及びプロテインAのカップリング

耐アルカリ性プロテインAは、アミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、またはスルフヒドリル基を介した共有結合により、活性化されたアガロース磁性ビーズにカップリングされ得る。例えば、耐アルカリ性プロテインAを含むアガロース磁性ビーズは、耐アルカリ性プロテインA中の窒素含有基を有するアミノ酸をエポキシ活性化アガロースの表面に結合させることにより調製され得る。

【0043】

1 mLの活性化アガロース磁性ビーズの表面にエポキシ基を介して約10 mgの耐アルカリ性プロテインAをカップリングするために、100 mLの活性化アガロース磁性ビーズを1 Lの三角フラスコに加えた。磁石で吸着することにより、磁性ビーズを二重蒸留水で4~5回浄化した。10~12 mg/mLの濃度、8.5~9.5のpHにて、耐アルカリ性プロテインA溶液を調製した。調製した耐アルカリ性プロテインA溶液100 mLを1 Lの三角フラスコに加え、温度を28 に調整した全温振盪インキュベータに三角フラスコを入れた。120 rpmで24時間おいた後、磁石で吸着することにより、二重蒸留水を使用して磁性ビーズを4~5回浄化し、沈殿物である耐アルカリ性プロテインA磁性ビーズを得た。

20

【0044】

結果として得られた磁性ビーズは、総体積4 mLの20%エタノール中の25%懸濁液として保存した。

30

【0045】

この実施例では、本発明者らが調製した耐アルカリ性プロテインA二量体を、活性化アガロース磁性ビーズにカップリングされるカップリングリガンドとして使用して、高負荷かつ耐アルカリ性のプロテインA磁性ビーズを調製した。耐アルカリ性プロテインAの特徴的な配列は次の通りである。

【0046】

【化 1】

耐アルカリ性プロテインAのアミノ酸配列1 (配列番号1):

Ala	Asp	Gly	Lys	Phe	Glu	Lys	Glu	Gln	Gln	Asn	Ala	Phe	Tyr	Glu
1			5					10					15	
Ile	Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Ala	Phe
			20					25					30	
Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Thr	Asn	Val	Leu
			35					40					45	
Gly	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys		
			50					55				58		

10

耐アルカリ性プロテインAのアミノ酸配列2 (配列番号2):

Ala	Asp	Gly	Lys	Phe	Glu	Lys	Glu	Gln	Gln	Asn	Ala	Phe	Tyr	Glu
1			5					10					15	
Ile	Leu	His	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Asn	Ala	Phe
			20					25					30	
Ile	Lys	Ser	Ile	Arg	Asp	Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Thr	Asn	Val	Leu
			35					40					45	
Gly	Glu	Ala	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Ala	Pro	Lys		
			50					55				58		

20

【0047】

上記の配列1または配列2を有するプロテインAのホモ二量体またはヘテロ二量体をリガンドとして使用すると、この実施例で調製した耐アルカリ性プロテインA磁性ビーズに結合する耐アルカリ性プロテインAの量は3mg/mL以上であり、したがって免疫グロブリンIgG(>50mg/mL)に結合する高い能力が得られる。

30

【0048】

実施例6:耐アルカリ性プロテインAにカップリングしたアガロース磁性ビーズを用いた免疫グロブリンの精製

実施例5で調製した高負荷かつ耐アルカリ性のプロテインAアガロース磁性ビーズを試験した。上記の磁性ビーズを均一に混合し、0.4mLを15mLの遠心管に入れ、磁石(天然の永久磁石または電磁石)を使用し、約30~60秒にわたって管壁内側に磁性ビーズを吸着させた。上清を捨てたか、またはピペットで除去した。磁石を外し、2mLの二重蒸留水を遠心管に加え、十分に混合してビーズを浄化した。磁性ビーズを磁石によって吸着して管壁内側に定着させた。吸着時間は約30~60秒であった。上清を捨てたか、またはピペットで除去した。このプロセスを2~3回繰り返して残りのエタノールを除去した。同様に、磁性ビーズを10mLの20mMリン酸緩衝液で2~3回浄化し、緩衝液を除去した。

40

【0049】

濃度1mg/mLのヒト血清免疫グロブリン10mLを試験試料として使用し、この試料を上記の15mL遠心管に加えた。試料の漏出を防ぐため、遠心管をパラフィルムで覆って密閉した。遠心管を回転混合ラック上で1~4時間インキュベートした。磁性ビーズを磁石によって吸着して管壁内側に定着させた。吸着時間は約60~90秒であった。上清を捨てたか、またはピペットで除去した。同様に、ビーズを10mLの20mMリン酸緩衝液で2~3回浄化して、未吸着試料及び不純物を除去した。目的のタンパク質を500μLの0.1Mグリシン溶出液(pH3.0)で3回溶出した後、ゲル濃度4~20%

50

の SDS-PAGE によって検出した。図 1 に示されるように、耐アルカリ性プロテイン A 磁性ビーズは、高純度の免疫グロブリンを分離することができる。耐アルカリ性プロテイン A 磁性ビーズの静的負荷は、最大 65 mg/mL と測定されている。市販のアガロース磁性ビーズの静的負荷はすべて 30 mg/mL 未満である (表 1)。

【0050】

【表 1】

アガロース磁性ビーズ	供給元	静的結合負荷 (mg/mL)
プロテイン A	GE	27
	Promega	18
	Beaver	25~30
	本願	>50

表 1: 様々な企業のアガロース磁性ビーズの静的負荷の比較

【0051】

実施例 7: 異なる数の結合ドメインを有するプロテイン A 磁性ビーズの結合能力の比較

免疫グロブリン IgG に結合した 2 つのドメインを含むプロテイン A、及び免疫グロブリン IgG に結合した 5 つのドメインを含むプロテイン A を、上記のカップリング方法によってそれぞれアガロース磁性ビーズにカップリングした。沈殿した磁性ビーズを各種 100 µl 取り、2 mL の二重蒸留水と十分に混合して磁性ビーズを浄化した。5 mg/mL のヒト IgG (hIgG) 2 mL を 20 mM PBS に溶解させ、前もって浄化した磁性ビーズと共に室温で 1 時間インキュベートした。次に、磁性ビーズを磁石によって吸着して管壁内側に定着させ、上清を除去した。磁性ビーズを 10 mL の 20 mM リン酸緩衝液で 2~3 回浄化して、未吸着試料及び不純物を除去した。最後に、目的のタンパク質を 500 µL の 0.1 M グリシン溶出液 (pH 3.0) で 3 回溶出した。各溶離液中の hIgG の量を測定して、磁性ビーズの単位体積あたりの静的結合負荷を求めた。結果を以下の表に示す。2 つのドメインを含むプロテイン A 磁性ビーズの負荷は、5 つのドメインを含むプロテイン A 磁性ビーズの負荷よりも高い。

【0052】

【表 2】

名称	第 1 の溶出 (500 µl)	第 2 の溶出 (500 µl)	第 3 の溶出 (500 µl)	静的結合負荷 (mg hIgG/ml)
5ドメインプロテイン A 磁性ビーズ	6.84	1.181	0.181	40.93
2ドメインプロテイン A 磁性ビーズ	11.189	1.729	0.228	65.73

表 2: 異なる数の結合ドメインを有するプロテイン A 磁性ビーズの結合能力の比較

【0053】

実施例 8: 耐アルカリ性プロテイン A 磁性ビーズの耐アルカリ性試験

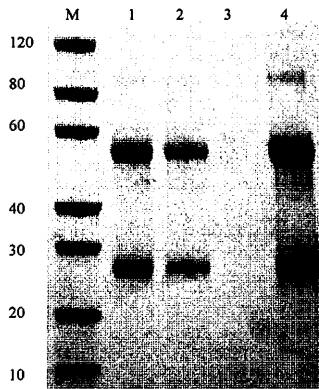
上記の実施例 5 で調製した耐アルカリ性プロテイン A アガロース磁性ビーズを、アルカリ溶液中インサイチュ浄化によって試験した。まず、実施例 6 の手順に従って免疫グロブリンの精製を行った。pH 3.0 の 0.1 M グリシン溶離液を用いて免疫グロブリンを溶出した後、インサイチュ浄化用アルカリ溶液としての 0.5 M NaOH 溶液 5 mL に磁性ビーズを 15 分間浸漬してから、10 mL の 20 mM リン酸緩衝液 (0.15 M Na

C l、30 mM Na_2HPO_4 、10 mM NaH_2PO_4 を含む。pH 7.0) を使用して3回浄化及び平衡化し、1試験サイクルのアルカリ溶液中インサイチュ浄化を完了した。耐アルカリ性プロテインA磁性ビーズの免疫グロブリン結合能力は、各サイクルにおいて、溶離液中の免疫グロブリンの量に基づいて決定することができる。

【 0 0 5 4 】

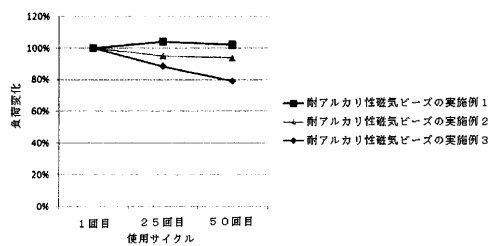
図 2 に示されるように、アルカリ溶液中インサイチュ浄化による50回の試験サイクルの後、リガンドとしての耐アルカリ性プロテインA磁性ビーズは、依然として良好な免疫グロブリン結合能力を維持する。

【 図 1 】



M: マーカー (M00516)
1: 原液 2 μ l
2: 上清 2 μ l
3: 洗浄 8 μ l
4: 溶出 5 μ l

【 図 2 】



【配列表】

2020509076000001.app

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2018/071397
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
B01J 20/32 (2006.01) i; G01N 33/50 (2006.01) i; B03C 1/01 (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)		
B01J; B03C; G01N		
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)		
CNABS, DWPI, VEN, CNKI, PubMed, ISI Web of Knowledge, Genbank: 南京金斯瑞生物科技有限公司, 望超, 贺瑞娜, 韩卫娟, 钱红, 白涛, 蛋白 A, 磁性, 超顺磁性, 珠子, 固定相, 壳, 二氧化硅, 琼脂糖, 耐碱, 载量, SEQ ID NO. 1, 2, proteinA, magnetic, super paramagnetic, bead, particle, support, solid, shell, SiO ₂ , silica, agarose, alkaline resistant, capacity		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 103483626 A (BEAVER NANO-TECHNOLOGIES SUZHOU CO., LTD.) 01 January 2014 (01.01.2014), claims 1, 3-5 and 7-9, and description, paragraphs [0004]-[0010] and [0013]-[0021]	3, 9, 14, 18, 19
Y	CN 103483602 A (BEAVER NANO-TECHNOLOGIES SUZHOU CO., LTD.) 01 January 2014 (01.01.2014), claims 1, 7 and 8, and description, paragraphs [0015], [0018] and [0024]-[0029]	1-19
Y	CN 101143888 A (BEIJING BOMAI CENTURY BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 19 March 2008 (19.03.2008), claims 1 and 2, description, page 2, line 18 to page 3, line 29, and tables 1 and 3	1-19
Y	CN 103007846 A (WUXI BIOCANAL SCIENTIFIC INC.) 03 April 2013 (03.04.2013), claims 1, 2, 4 and 10, and description, paragraphs [0015], [0016] and [0019]-[0027]	1-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier 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 19 March 2018	Date of mailing of the international search report 29 March 2018	
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer MAO, Ying Telephone No. (86-10) 53961979	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/071397

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005076938 A2 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 25 August 2005 (25.08.2005), claims 1, 2, 5, 6, 9, 46, 47 and 99, and description, paragraphs [0050]-[0052], [0055], [0066], [0080] and [0098]	1-19
Y	WO 2006112771 A1 (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB) 26 October 2006 (26.10.2006), claims 1-11 and 14, and description, page 4, line 25 to page 5, line 3 and page 7, line 15 to page 8, line 10	1-19
Y	WO 2007050017 A1 (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB) 03 May 2007 (03.05.2007), claims 1-12, description, embodiments 1 and 2	1-19
Y	CN 104059133 A (GENSCRIPT (NANJING) CO., LTD.) 24 September 2014 (24.09.2014), claims 1 and 7-9, and description, paragraphs [0004],[0007], [0009], [0013]-[0015], [0020] and [0022], embodiments 7 and 8, and SEQ ID NOs: 1 and 2	1-19
Y	任敬钢等. 蛋白 A-葡聚糖-Fe ₃ O ₄ 纳米磁珠的制备及对 IgG 分离纯化. 生物技术通报. 31 December 2014 (31.12.2014), no. 7, pp. 201-208. (REN, Jinggang et al. Fe ₃ O ₄ Magnetic Dextran Nanoparticles Modified with SPA Ligand for IgG Purification. Biotechnology Bulletin.)	1-19
Y	马力等. 免疫磁性微球的制备及对 IgG 的分离. 西华大学学报. 31 March 2010 (31.03.2010), 29(2), pp. 181-186. (MA, Li et al. Preparation of Sepharose-SPA Immunomagnetic Microspheres and Its Application in IgG Separation. Journal of Xihua University.)	1-19
A	WO 2014118237 A1 (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB) 07 August 2014 (07.08.2014), description, page 6, line 17 to page 7, line 5 and page 9, line 7 to page 11, line 18	1-19
A	WO 9851435 A1 (TANG, W. X. et al.) 19 November 1998 (19.11.1998), claims 1, 4 and 17, and description, page 9, line 78 to page 11, line 6, and page 23, line 6 to page 27, line 30	1, 4-6, 9-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/071397

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103483626 A	01 January 2014	CN 103483626 B	02 December 2015
CN 103483602 A	01 January 2014	CN 103483602 B	22 July 2015
CN 101143888 A	19 March 2008	CN 100593545 C	10 March 2010
CN 103007846 A	03 April 2013	CN 103007846 B	04 February 2015
WO 2005076938 A2	25 August 2005	EP 1721161 A4	01 April 2009
		JP 2007528784 A	18 October 2007
		EP 1721161 A2	15 November 2006
		WO 2005076938 A3	08 June 2006
		US 2005215687 A1	29 September 2005
		US 7795041 B2	14 September 2010
WO 2006112771 A1	26 October 2006	US 7897257 B2	01 March 2011
		US 2008152939 A1	26 June 2008
WO 2007050017 A1	03 May 2007	US 2008283792 A1	20 November 2008
CN 104059133 A	24 September 2014	WO 2014146350 A1	25 September 2014
		US 2016237124 A1	18 August 2016
WO 2014118237 A1	07 August 2014	US 2015360232 A1	17 December 2015
		GB 201301631 D0	13 March 2013
WO 9851435 A1	19 November 1998	AU 7685498 A	08 December 1998

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2018/071397
A. 主题的分类 B01J 20/32(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i; B03C 1/01(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) B01J; B03C; G01N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, DWPI, VEN, CNKI, PubMed, ISI Web of Knowledge, Genbank: 南京金斯瑞生物科技有限公司, 望超, 贺瑞娜, 韩卫娟, 钱红, 白涛, 蛋白A, 磁性, 超顺磁性, 珠子, 固定相, 壳, 二氧化硅, 琼脂糖, 耐碱, 载量, SEQ ID NO. 1, 2, proteinA, magnetic, super paramagnetic, bead, particle, support, solid, shell, SiO ₂ , silica, agarose, alkaline resistant, capacity		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 103483626 A (海狸纳米科技苏州有限公司) 2014年 1月 1日 (2014-01-01) 权利要求1, 3-5, 7-9, 说明书第4-10, 13-21段	3, 9, 14, 18, 19
Y	CN 103483602 A (海狸纳米科技苏州有限公司) 2014年 1月 1日 (2014-01-01) 权利要求1, 7, 8, 说明书第15, 18, 24-29段	1-19
Y	CN 101143888 A (北京博迈世纪生物技术有限公司) 2008年 3月 19日 (2008-03-19) 权利要求1, 2, 说明书第2页第18行-第3页第29行, 表一, 表三	1-19
Y	CN 103007846 A (无锡百运纳米科技有限公司) 2013年 4月 3日 (2013-04-03) 权利要求1, 2, 4, 10, 说明书第15, 16, 19-27段	1-19
Y	WO 2005076938 A2 (MASSACHUSETTS INST. TECHNOLOGY) 2005年 8月 25日 (2005-08-25) 权利要求1, 2, 5, 6, 9, 46, 47, 99, 说明书第50-52, 55, 66, 80, 98段	1-19
Y	WO 2006112771 A1 (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB) 2006年 10月 26日 (2006-10-26) 权利要求1-11, 14, 说明书第4页第25行-第5页第3行, 第7页第15行-第8页第10行	1-19
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2018年 3月 19日		国际检索报告邮寄日期 2018年 3月 29日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 毛颖 电话号码 (86-10)53961979

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/071397

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	WO 2007050017 A1 (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB) 2007年 5月 3日 (2007 - 05 - 03) 权利要求1-12, 说明书实施例1, 2	1-19
Y	CN 104059133 A (南京金斯瑞生物科技有限公司) 2014年 9月 24日 (2014 - 09 - 24) 权利要求1, 7-9, 说明书第4, 7, 9, 13-15, 20, 22段, 实施例7, 8, SBQ ID NO: 1, 2	1-19
Y	任敬钢等. "蛋白A-葡聚糖-Fe ₃ O ₄ 纳米磁珠的制备及对IgG分离纯化" 生物技术通报, 第7期, 2014年 12月 31日 (2014 - 12 - 31), 第201-208页	1-19
Y	马力等. "免疫磁性微球的制备及对IgG的分离" 西华大学学报, 第29卷, 第2期, 2010年 3月 31日 (2010 - 03 - 31), 第181-186页	1-19
A	WO 2014118237 A1 (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB) 2014年 8月 7日 (2014 - 08 - 07) 说明书第6页第17行-第7页第5行, 第9页第7行-第11页第18行	1-19
A	WO 9851435 A1 (TANG, W.X. 等) 1998年 11月 19日 (1998 - 11 - 19) 权利要求1, 4, 17, 说明书第9页第78行-第11页第6行, 第23页第6行-第27页第30行	1, 4-6, 9-11

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/071397

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	103483626	A	2014年 1月 1日	CN 103483626 B	2015年 12月 2日
CN	103483602	A	2014年 1月 1日	CN 103483602 B	2015年 7月 22日
CN	101143888	A	2008年 3月 19日	CN 100593545 C	2010年 3月 10日
CN	103007846	A	2013年 4月 3日	CN 103007846 B	2015年 2月 4日
WO	2005076938	A2	2005年 8月 25日	EP 1721161 A4	2009年 4月 1日
				JP 2007528784 A	2007年 10月 18日
				EP 1721161 A2	2006年 11月 15日
				WO 2005076938 A3	2006年 6月 8日
				US 2005215687 A1	2005年 9月 29日
				US 7795041 B2	2010年 9月 14日
WO	2006112771	A1	2006年 10月 26日	US 7897257 B2	2011年 3月 1日
				US 2008152939 A1	2008年 6月 26日
WO	2007060017	A1	2007年 5月 3日	US 2008283792 A1	2008年 11月 20日
CN	104059133	A	2014年 9月 24日	WO 2014146350 A1	2014年 9月 25日
				US 2016237124 A1	2016年 8月 18日
WO	2014118237	A1	2014年 8月 7日	US 2015360232 A1	2015年 12月 17日
				GB 201301631 D0	2013年 3月 13日
WO	9851435	A1	1998年 11月 19日	AU 7685498 A	1998年 12月 8日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/545 (2006.01)	G 0 1 N 33/545	Z
G 0 1 N 33/552 (2006.01)	G 0 1 N 33/552	
B 0 1 J 20/24 (2006.01)	B 0 1 J 20/24	C
B 0 1 J 20/28 (2006.01)	B 0 1 J 20/28	Z
B 0 1 J 20/34 (2006.01)	B 0 1 J 20/34	G
C 0 1 G 49/08 (2006.01)	C 0 1 G 49/08	A
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31	

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T J, TM), EP(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, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, G T, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX , MY, MZ, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . S P A N

(74)代理人 100137497

弁理士 大森 未知子

(74)代理人 100207907

弁理士 赤羽 桃子

(72)発明者 チャオ、ワン

中華人民共和国江蘇省、ナンキン、ジャンニン、ディストリクト、サイエンス、パーク、ヨンシー、ロード、ナンバー、28

(72)発明者 ルイナ、フウ

中華人民共和国江蘇省、ナンキン、ジャンニン、ディストリクト、サイエンス、パーク、ヨンシー、ロード、ナンバー、28

(72)発明者 ウェイジュアン、ハン

中華人民共和国江蘇省、ナンキン、ジャンニン、ディストリクト、サイエンス、パーク、ヨンシー、ロード、ナンバー、28

(72)発明者 ホン、チェン

中華人民共和国江蘇省、ナンキン、ジャンニン、ディストリクト、サイエンス、パーク、ヨンシー、ロード、ナンバー、28

(72)発明者 タオ、バイ

中華人民共和国江蘇省、ナンキン、ジャンニン、ディストリクト、サイエンス、パーク、ヨンシー、ロード、ナンバー、28

Fターム(参考) 4G002 AA04 AB02 AB04 AD04 AE02

4G066 AA13D AA22D AA27C AC01D AC03B AC14D AC17D BA09 BA20 BA36

BA38 CA54 DA07 EA02 GA11 GA31 GA35

4H045 AA10 AA20 AA30 BA40 BA61 BA62 BA63 EA50 FA50 FA67

FA81

专利名称(译)	高负荷和耐碱性蛋白A磁珠及其使用方法		
公开(公告)号	JP2020509076A	公开(公告)日	2020-03-26
申请号	JP2019556418	申请日	2018-01-04
[标]申请(专利权)人(译)	NANJINGJINSIRUI SCI & TECH生物学 南京金斯瑞生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	难禁新酥厄路易科技生物有限公司		
发明人	チャオ、ワン ルイナ、フウ ウェイジュアン、ハン ホン、チェン タオ、バイ		
IPC分类号	C07K17/14 C07K19/00 C07K16/00 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/552 B01J20/24 B01J20/28 B01J20/34 C01G49/08 C12N15/31		
CPC分类号	B01J20/0229 B01J20/103 B01J20/24 B01J20/28004 B01J20/28007 B01J20/28009 B01J20/3425 B03C1/01 B01J20/32 C07K1/14 C07K1/22 C07K16/00 G01N33/50		
FI分类号	C07K17/14.ZNA C07K19/00 C07K16/00 G01N33/53.N G01N33/543.541.A G01N33/545.Z G01N33/552 B01J20/24.C B01J20/28.Z B01J20/34.G C01G49/08.A C12N15/31		
F-TERM分类号	4G002/AA04 4G002/AB02 4G002/AB04 4G002/AD04 4G002/AE02 4G066/AA13D 4G066/AA22D 4G066/AA27C 4G066/AC01D 4G066/AC03B 4G066/AC14D 4G066/AC17D 4G066/BA09 4G066/BA20 4G066/BA36 4G066/BA38 4G066/CA54 4G066/DA07 4G066/EA02 4G066/GA11 4G066/GA31 4G066 /GA35 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA40 4H045/BA61 4H045/BA62 4H045/BA63 4H045/EA50 4H045/FA50 4H045/FA67 4H045/FA81		
优先权	201710005878.8 2017-01-04 CN		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了高负荷且耐碱性的蛋白A磁珠。磁珠可以在pH 2-14下保持化学稳定性，并具有大于50 mg / mL的免疫球蛋白G (IgG) 结合能力。还提供了一种纯化和/或检测免疫球蛋白的方法，其包括使含有免疫球蛋白的样品与高负荷和抗碱蛋白A磁珠接触的步骤。耐碱性蛋白A磁珠可实现免疫球蛋白的快速纯化，节省约80%的处理时间，并将总纯化成本降低50%。另外，耐碱性蛋白A磁珠具有高耐碱性。可以使用碱性方法进行原位清洁，以在使用后再生磁珠。磁珠具有快速的磁响应和良好的分散性，实现了磁珠的快速富集，清洁和洗脱。磁珠有助于样品的自动化，高通量和大量纯化。

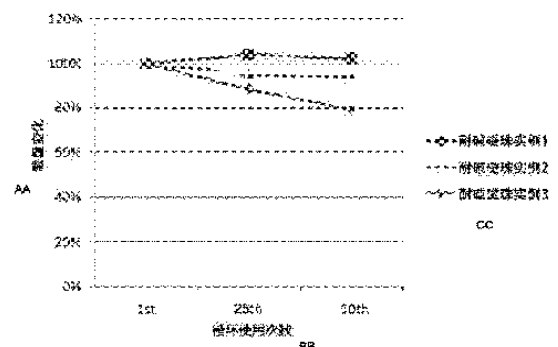


图 3

AA LOAD CHANGE
BB USE CYCLE
CC EMBODIMENT 1/2/3 OF THE ALKALI-RESISTANT MAGNETIC BEAD