

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7469584号
(P7469584)

(45)発行日 令和6年4月17日(2024.4.17)

(24)登録日 令和6年4月9日(2024.4.9)

(51)国際特許分類	F I			
G 0 1 N 30/88 (2006.01)	G 0 1 N 30/88	J Z N A		
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00			
B 0 1 J 20/281 (2006.01)	B 0 1 J 20/281	X		
G 0 1 N 30/86 (2006.01)	G 0 1 N 30/86	E		
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	B 0 1 J 20/281	R		
請求項の数 11 (全39頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願2019-111982(P2019-111982)	(73)特許権者	000003300 東ソー株式会社 山口県周南市開成町4560番地
(22)出願日	令和1年6月17日(2019.6.17)	(72)発明者	秋山 泰之 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東 ソー株式会社 東京研究センター内
(65)公開番号	特開2020-118664(P2020-118664 A)	(72)発明者	寺尾 陽介 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東 ソー株式会社 東京研究センター内
(43)公開日	令和2年8月6日(2020.8.6)	(72)発明者	遠藤 諭 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東 ソー株式会社 東京研究センター内
審査請求日	令和4年5月17日(2022.5.17)	(72)発明者	渡邊 遼子 神奈川県綾瀬市早川2743番地1 東 ソー株式会社 東京研究センター内
(31)優先権主張番号	特願2018-116611(P2018-116611)		
(32)優先日	平成30年6月20日(2018.6.20)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		
(31)優先権主張番号	特願2019-15596(P2019-15596)		
(32)優先日	平成31年1月31日(2019.1.31)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 抗体の分離方法および疾患の検査方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

疾患の有無、疾患の発症リスク、疾患の進行度合い、及び/又は加齢の進行度合いを検出するための方法であって、

以下の工程(c)：

(c) 抗体の分離パターンに係るデータを指標として、被検者における疾患の有無、疾患の発症リスク、疾患の進行度合い、及び/又は加齢の進行度合いを検出する工程を含み、

前記データが、抗体の分離パターンの特徴であり、

前記データが、以下の工程(a)および(b)により得られたものである、方法： 10

(a) 抗体のFc領域に対する結合能を有し、かつ抗体の糖鎖構造の違いを認識できるFc結合性タンパク質を固定化した不溶性担体を充填したカラムに、前記被検者から得た抗体を含有する溶液を添加し、該抗体を該担体に吸着する工程であって、

前記抗体のFc領域に対する結合能を有し、かつ抗体の糖鎖構造の違いを認識できるFc結合性タンパク質が、以下の(1)~(4)のいずれかのポリペプチドである工程：

(1) 配列番号1に記載のアミノ酸配列の17番目から192番目までのアミノ酸残基を含み、但し当該17番目から192番目までのアミノ酸残基において、少なくとも176番目のバリンがフェニルアラニンに置換されたポリペプチド；

(2) 配列番号1に記載のアミノ酸配列の17番目から192番目までのアミノ酸残基を含み、但し当該17番目から192番目までのアミノ酸残基において、少なくとも27番 20

目のバリンがグルタミン酸に、29番目のフェニルアラニンがイソロイシンに、35番目のチロシンがアスパラギンに、48番目のグルタミンがアルギニンに、75番目のフェニルアラニンがロイシンに、92番目のアスパラギンがセリンに、117番目のバリンがグルタミン酸に、121番目のグルタミン酸がグリシンに、171番目のフェニルアラニンがセリンに、および176番目のバリンがフェニルアラニンに置換されたポリペプチド；

(3) 配列番号1に記載のアミノ酸配列の17番目から192番目までのアミノ酸残基を含み、但し当該17番目から192番目までのアミノ酸残基において、少なくとも27番目のバリンがグルタミン酸に、29番目のフェニルアラニンがイソロイシンに、35番目のチロシンがアスパラギンに、48番目のグルタミンがアルギニンに、75番目のフェニルアラニンがロイシンに、92番目のアスパラギンがセリンに、117番目のバリンがグルタミン酸に、121番目のグルタミン酸がグリシンに、および171番目のフェニルアラニンがセリンに置換されたポリペプチド；

(4) 上記(1)～(3)のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列を含み、但し当該アミノ酸配列において、上記置換以外の位置において、1～10個のアミノ酸変異を含む、ポリペプチド；

(b) 前記担体に吸着した抗体を溶出液を用いて溶出し、前記データを得る工程。

【請求項2】

前記工程(c)の前に、前記工程(a)および(b)を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記工程(a)の前に、前記カラムに平衡化液を添加して、該カラムを平衡化する工程を含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記データの取得が、抗体の分離パターンを得る工程と、該分離パターンから前記特徴を抽出する工程を含む、請求項1～3の何れか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記特徴が、ピーク面積及び/又はピーク高さである、請求項1～4の何れか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記特徴が、ピーク面積%及び/又はピーク高さ%である、請求項1～5の何れか1項に記載の方法。

【請求項7】

前記特徴が、第1ピーク、第2ピーク、および第3ピークから選択される1種またはそれ以上のピークの特徴である、請求項1～6の何れか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記特徴が、第1ピークの特徴である、請求項1～7の何れか1項に記載の方法。

【請求項9】

前記工程(c)が、前記データを、対照被検者から得た抗体の分離パターンに係るデータと比較する工程を含む、請求項1～8の何れか1項に記載の方法。

【請求項10】

前記疾患が、がん、自己免疫疾患、感染症、アレルギー、炎症疾患、悪液質、および加齢関連疾患から選択される1種またはそれ以上の疾患である、請求項1～9の何れか1項に記載の方法。

【請求項11】

前記疾患が、膵がん、胃がん、乳がん、大腸がん、腎がん、リウマチ、シェーグレン症候群、および膵炎から選択される1種またはそれ以上の疾患である、請求項1～10の何れか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体の分離方法およびその利用に関する。本発明は、具体的には、例えば、

10

20

30

40

50

被検者から得た抗体を分離した際の分離パターンの特徴を指標として、被検者における疾患の有無、疾患の発症リスク、疾患の進行度合い、及び/又は加齢の進行度合いを検出する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、ガンや免疫疾患等の治療に抗体を含む医薬品（抗体医薬品）が用いられている。抗体医薬品に用いる抗体は、遺伝子工学的手法により得られた、当該抗体を発現可能な細胞（たとえば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞等）を培養後、カラムクロマトグラフィー等を用いて高純度に精製し製造されている。しかし、近年の研究により、そのようにして製造される抗体は酸化、還元、異性化、糖鎖付加等の修飾を受けることで多様な分子の集合体となっていることが判明しており、薬効や安全性への影響が懸念されている。特に、抗体に結合している糖鎖構造は、抗体医薬品の活性、動態、および安全性に大きな影響を与えることが報告されており、詳細な糖鎖構造の解析が重要である（非特許文献1）。また、リウマチ等の疾患では、血液中の抗体に付加される糖鎖構造の変化が知られており（非特許文献2および3）、抗体に付加された糖鎖構造を分析することで疾患を診断できる可能性がある。

10

【0003】

抗体医薬に用いる抗体の糖鎖構造を分析する方法として、糖鎖の切り出しを含むLC-MS分析（特許文献1および特許文献2）が主に実施されている。しかしながら、前記分析方法では非常に煩雑な操作を伴い、多大な時間を要する。より簡便な抗体の分子構造の分析方法としては、クロマトグラフィーによる分析が挙げられる。具体的には、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、抗体を分子量に基づき分離することで凝集体や分解物を分離および定量することが可能である。また、イオン交換クロマトグラフィーにより、抗体分子が有する電荷の違いを分離することができる。しかしながら前述したクロマトグラフィーによる分析では、糖鎖構造等の抗体分子の微小な構造変化を識別できないため、得られる分析結果は限定的であった。

20

【0004】

一方、不溶性担体に固定化されたアフィニティリガンドと抗体との親和性に基づく分析により抗体の性能を測定、判断することが可能であることが報告されている（特許文献3）。しかし、糖鎖構造の違いによる抗体の分離、特に糖鎖構造の違いによるヒト由来抗体の分離は行われていなかった。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】特開2016-194500号公報

【文献】特開2016-099304号公報

【文献】WO2013/120929号公報

【非特許文献】

【0006】

【文献】CHROMATOGRAPHY, 34(2), 83-88(2013)

【文献】Science, 320, 373(2008)

【文献】Nature Communication, 7, 11205(2016)

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、抗体の分離方法を提供することを課題とする。本発明は、一態様において、被検者における疾患の有無、疾患の発症リスク、疾患の進行度合い、及び/又は加齢の進行度合いを検出する方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

50

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意検討した結果、Fc結合性タンパク質を利用することにより糖鎖構造の違いに基づき抗体を分離できること、および被検者から得た抗体をFc結合性タンパク質を利用して分離した際の分離パターンの特徴を指標として、被検者における疾患の有無、疾患の発症リスク、疾患の進行度合い、及び/又は加齢の進行度合いを検出できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0009】

すなわち、本発明は、以下の通り例示できる。

[1]

疾患の有無、疾患の発症リスク、疾患の進行度合い、及び/又は加齢の進行度合いの検出方法であって、

以下の工程(c)：

(c)抗体の分離パターンに係るデータを指標として、被検者における疾患の有無、疾患の発症リスク、疾患の進行度合い、及び/又は加齢の進行度合いを検出する工程

を含み、

前記データが、抗体の分離パターンの特徴であり、

前記データが、以下の工程(a)および(b)により得られたものである、方法：

(a)Fc結合性タンパク質を固定化した不溶性担体を充填したカラムに、前記被検者から得た抗体を含有する溶液を添加し、該抗体を該担体に吸着する工程；

(b)前記担体に吸着した抗体を溶出液を用いて溶出し、前記データを得る工程。

[2]

前記工程(c)の前に、前記工程(a)および(b)を含む、前記方法。

[3]

前記工程(a)の前に、前記カラムに平衡化液を添加して、該カラムを平衡化する工程を含む、前記方法。

[4]

前記データの取得が、抗体の分離パターンを得る工程と、該分離パターンから前記特徴を抽出する工程を含む、前記方法。

[5]

前記特徴が、ピーク面積及び/又はピーク高さである、前記方法。

[6]

前記特徴が、ピーク面積%及び/又はピーク高さ%である、前記方法。

[7]

前記特徴が、第1ピーク、第2ピーク、および第3ピークから選択される1種またはそれ以上のピークの特徴である、前記方法。

[8]

前記特徴が、第1ピークの特徴である、前記方法。

[9]

前記工程(c)が、前記データを、対照被検者から得た抗体の分離パターンに係るデータと比較する工程を含む、前記方法。

[10]

前記疾患が、がん、自己免疫疾患、感染症、アレルギー、炎症疾患、悪液質、および加齢関連疾患から選択される1種またはそれ以上の疾患である、前記方法。

[11]

前記疾患が、膵がん、胃がん、乳がん、大腸がん、腎がん、リウマチ、シェーグレン症候群、および膵炎から選択される1種またはそれ以上の疾患である、前記方法。

[12]

Fc結合性タンパク質が、以下の(1)~(4)のいずれかのポリペプチドである、前記方法：

(1)配列番号1に記載のアミノ酸配列の17番目から192番目までのアミノ酸残基を含み、但し当該17番目から192番目までのアミノ酸残基において、少なくとも176

10

20

30

40

50

番目のバリンがフェニルアラニンに置換されたポリペプチド；

(2) 配列番号1に記載のアミノ酸配列の17番目から192番目までのアミノ酸残基を含み、但し当該17番目から192番目までのアミノ酸残基において、少なくとも27番目のバリンがグルタミン酸に、29番目のフェニルアラニンがイソロイシンに、35番目のチロシンがアスパラギンに、48番目のグルタミンがアルギニンに、75番目のフェニルアラニンがロイシンに、92番目のアスパラギンがセリンに、117番目のバリンがグルタミン酸に、121番目のグルタミン酸がグリシンに、171番目のフェニルアラニンがセリンに、および176番目のバリンがフェニルアラニンに置換されたポリペプチド；

(3) 配列番号1に記載のアミノ酸配列の17番目から192番目までのアミノ酸残基を含み、但し当該17番目から192番目までのアミノ酸残基において、少なくとも27番目のバリンがグルタミン酸に、29番目のフェニルアラニンがイソロイシンに、35番目のチロシンがアスパラギンに、48番目のグルタミンがアルギニンに、75番目のフェニルアラニンがロイシンに、92番目のアスパラギンがセリンに、117番目のバリンがグルタミン酸に、121番目のグルタミン酸がグリシンに、および171番目のフェニルアラニンがセリンに置換されたポリペプチド；

(4) 上記(1)~(3)のいずれかのポリペプチドのアミノ酸配列を含み、但し当該アミノ酸配列において、上記置換以外の位置において、1~10個のアミノ酸変異を含む、ポリペプチド。

[13]

2種またはそれ以上の抗体を含有する組成物であって、以下のIからIXのうち2つ以上の項目に該当する組成物；

I. G1Faを有する抗体の含有量をG0Fを有する抗体の含有量で割った値が重量比で0.4以下である；

II. G2Fを有する抗体の含有量をG0Fを有する抗体の含有量で割った値が重量比で0.2以下である；

III. G2F + 2SAを有する抗体の含有量をG0Fを有する抗体の含有量で割った値が重量比で0.03以下である；

IV. G1Fbを有する抗体の含有量をG1Faを有する抗体の含有量で割った値が重量比で0.5以上である；

V. G2Fを有する抗体の含有量をG1Fbを有する抗体の含有量で割った値が重量比で0.6以下である；

VI. G2F + SAを有する抗体の含有量をG1Fbを有する抗体の含有量で割った値が重量比で0.3以下である；

VII. G2F + 2SAを有する抗体の含有量をG1Fbを有する抗体の含有量で割った値が重量比で0.12以下である；

VIII. 抗体の総含有量に対するG2 + SAを有する抗体の含有量の比率が重量比で0.2%以下である；

IX. 抗体の総含有量に対するG2 + 2SAを有する抗体の含有量の比率が重量比で0.2%以下である。

[14]

2種またはそれ以上の抗体を含有する組成物であって、以下のIからIXのうち2つ以上の項目に該当する組成物；

I. G1Faを有する抗体の含有量をG0Fを有する抗体の含有量で割った値が重量比で1.8以上である；

II. G2Fを有する抗体の含有量をG0Fを有する抗体の含有量で割った値が重量比で0.6以上である；

III. G2F + 2SAを有する抗体の含有量をG0Fを有する抗体の含有量で割った値が重量比で0.06以上である；

IV. G1Fbを有する抗体の含有量をG1Faを有する抗体の含有量で割った値が重量比で0.3以下である；

10

20

30

40

50

V . G 2 F を有する抗体の含有量を G 1 F b を有する抗体の含有量で割った値が重量比で 3 . 0 以上である ;

V I . G 2 F + S A を有する抗体の含有量を G 1 F b を有する抗体の含有量で割った値が重量比で 0 . 6 以上である ;

V I I . G 2 F + 2 S A を有する抗体の含有量を G 1 F b を有する抗体の含有量で割った値が重量比で 0 . 3 以上である ;

V I I I . 抗体の総含有量に対する G 2 + S A を有する抗体の含有量の比率が重量比で 2 % 以上である ;

I X . 抗体の総含有量に対する G 2 + 2 S A を有する抗体の含有量の比率が重量比で 0 . 6 % 以上である。

10

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

本発明によれば、糖鎖構造の違いに基づき抗体を分離できる。また、本発明の一態様によれば、抗体の分離パターンの特徴を指標として、被検者における疾患の有無、疾患の発症リスク、疾患の進行度合い、及び / 又は加齢の進行度合いを検出できる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

【図 1】モノクローナル抗体を F c 結合性タンパク質固定化ゲルを充填したカラムで分析した際の分離パターンを示す図。

【図 2】ヒト由来ガンマグロブリンを F c 結合性タンパク質固定化ゲルを充填したカラムで分析した際の分離パターンを示す図。

20

【図 3】モノクローナル抗体を F c 結合性タンパク質固定化ゲルを充填したカラムで分離して分取した画分に含まれる抗体の糖鎖構造を示す図。

【図 4】ヒト由来ガンマグロブリンを F c 結合性タンパク質固定化ゲルを充填したカラムで分離して分取した画分に含まれる抗体の糖鎖構造を示す図。

【図 5】年齢の異なるヒト由来ガンマグロブリンを F c 結合性タンパク質固定化ゲルを充填したカラムで分析した際の分離パターンを示す図。

【図 6】年齢の異なるヒト由来ガンマグロブリンを F c 結合性タンパク質固定化ゲルを充填したカラムで分析した際の第 1 ピーク面積 % 値のプロットを示す図。

【図 7】がん患者由来ガンマグロブリンを F c 結合性タンパク質固定化ゲルを充填したカラムで分析した際の第 1 ピーク面積 % 値のプロットを示す図。

30

【図 8】自己免疫疾患患者由来ガンマグロブリンを F c 結合性タンパク質固定化ゲルを充填したカラムで分析した際の第 1 ピーク面積 % 値のプロットを示す図。

【図 9】がん患者由来ガンマグロブリンを F c 結合性タンパク質固定化ゲルを充填したカラムで分析した際の補正第 1 ピーク面積 % 値のプロットを示す図。

【図 10】膵がんおよび膵炎患者由来ガンマグロブリンを F c 結合性タンパク質固定化ゲルを充填したカラムで分析した際の補正第 1 ピーク面積 % 値および第 3 ピーク面積のプロットと膵がんおよび膵炎に対する R O C 曲線を示す図。

【図 11】喫煙および非喫煙の健常者由来ガンマグロブリンを F c 結合性タンパク質固定化ゲルを充填したカラムで分析した際の補正第 1 ピーク面積 % 値のプロットを示す図。

40

【図 12】年齢の異なるヒト由来ガンマグロブリンを F c 結合性タンパク質固定化ゲルを充填した F c R 9 __ F カラムもしくは F c R 9 __ V カラムで分析した際の第 1 ピーク高さ % および第 1 ピーク面積 % 値のプロットを示す図。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 2 】

以下、本発明について詳細に説明する。

< 1 > 方法

本発明は、F c 結合性タンパク質を利用して抗体を分離する方法を提供する。同方法を、「本発明の分離方法」ともいう。

【 0 0 1 3 】

50

本発明の分離方法は、具体的には、以下の工程（a）および（b）を含む、抗体を分離する方法であってよい：

（a）Fc結合性タンパク質を固定化した不溶性担体を充填したカラムに抗体を含有する溶液を添加し、該抗体を該担体に吸着する工程；

（b）前記担体に吸着した抗体を溶出液を用いて溶出する工程。

【0014】

工程（a）および（b）を、それぞれ、「吸着工程」および「溶出工程」ともいう。

【0015】

本発明の分離方法により、分離された抗体が得られてよい。すなわち、本発明の分離方法の一態様は、Fc結合性タンパク質を利用して抗体を分離することにより分離された抗体を製造する方法であってよい。すなわち、溶出工程の一態様は、担体に吸着した抗体を溶出液を用いて溶出し、溶出された抗体を得る工程であってよい。言い換えると、溶出工程の一態様は、担体に吸着した抗体を溶出液を用いて溶出する工程と、溶出された抗体を得る工程を含んでいてもよい。同方法を、「本発明の抗体製造方法」ともいう。

10

【0016】

本発明の抗体製造方法は、具体的には、以下の工程（a）および（b）を含む、分離された抗体を製造する方法であってよい：

（a）Fc結合性タンパク質を固定化した不溶性担体を充填したカラムに抗体を含有する溶液を添加し、該抗体を該担体に吸着する工程；

（b）前記担体に吸着した抗体を溶出液を用いて溶出し、溶出された抗体を得る工程。

20

【0017】

本発明の分離方法により、抗体の分離パターンに係るデータが得られてよい。すなわち、本発明の分離方法の一態様は、Fc結合性タンパク質を利用して抗体を分離することにより抗体の分離パターンに係るデータを製造する方法であってよい。すなわち、溶出工程の一態様は、担体に吸着した抗体を溶出液を用いて溶出し、抗体の分離パターンに係るデータを得る工程であってよい。言い換えると、溶出工程の一態様は、担体に吸着した抗体を溶出液を用いて溶出する工程と、抗体の分離パターンに係るデータを得る工程を含んでいてもよい。同方法を、「本発明のデータ製造方法」ともいう。抗体の分離パターンに係るデータを、「分離データ」ともいう。「データの測定」、「データの取得」、および「データの製造」は、同義に用いられてよい。

30

【0018】

本発明のデータ製造方法は、具体的には、以下の工程（a）および（b）を含む、分離データを製造する方法であってよい：

（a）Fc結合性タンパク質を固定化した不溶性担体を充填したカラムに抗体を含有する溶液を添加し、該抗体を該担体に吸着する工程；

（b）前記担体に吸着した抗体を溶出液を用いて溶出し、分離データを得る工程。

【0019】

分離データを指標として、被検者における疾患の有無、疾患の発症リスク、疾患の進行度合い、及び/又は加齢の進行度合いを検出することができる。すなわち、分離データは、被検者における疾患の有無、疾患の発症リスク、疾患の進行度合い、及び/又は加齢の進行度合いを検出するための指標として用いられるデータとみなしてよい。具体的には、被検者から得た抗体をFc結合性タンパク質を利用して分離することにより得られる分離データを指標として、該被検者における疾患の有無、疾患の発症リスク、疾患の進行度合い、及び/又は加齢の進行度合いを検出することができる。すなわち、本発明は、被検者から得た抗体をFc結合性タンパク質を利用して分離することにより得られる分離データを指標として、該被検者における疾患の有無、疾患の発症リスク、疾患の進行度合い、及び/又は加齢の進行度合いを検出する方法を提供する。同方法を、「本発明の検出方法」ともいう。疾患の有無、疾患の発症リスク、疾患の進行度合い、及び/又は加齢の進行度合いを総称して、「リスク」ともいう。「リスクの検出」、「リスクの評価」、および「リスクの判定」は、同義に用いられてよい。

40

50

【 0 0 2 0 】

本発明の検出方法は、具体的には、以下の工程（c）を含む、疾患の有無、疾患の発症リスク、疾患の進行度合い、及び／又は加齢の進行度合いの検出方法であってよい：

（c）分離データを指標として、被検者における疾患の有無、疾患の発症リスク、疾患の進行度合い、及び／又は加齢の進行度合いを検出する工程であって、前記データが、以下の工程（a）および（b）により得られたものである工程：

（a）Fc結合性タンパク質を固定化した不溶性担体を充填したカラムに、前記被検者から得た抗体を含有する溶液を添加し、該抗体を該担体に吸着する工程；

（b）前記担体に吸着した抗体を溶出液を用いて溶出し、前記データを得る工程。

【 0 0 2 1 】

本発明の検出方法は、工程（a）および（b）を含んでいてもよい。すなわち、本発明の検出方法は、より具体的には、以下の工程（a）～（c）を含む、疾患の有無、疾患の発症リスク、疾患の進行度合い、及び／又は加齢の進行度合いの検出方法であってよい：

（a）Fc結合性タンパク質を固定化した不溶性担体を充填したカラムに、被検者から得た抗体を含有する溶液を添加し、該抗体を該担体に吸着する工程；

（b）前記担体に吸着した抗体を溶出液を用いて溶出し、分離データを得る工程；

（c）前記データを指標として、前記被検者における疾患の有無、疾患の発症リスク、疾患の進行度合い、及び／又は加齢の進行度合いを検出する工程。

【 0 0 2 2 】

工程（c）を、「検出工程」ともいう。

【 0 0 2 3 】

これらの方法を総称して、「本発明の方法」ともいう。

< 吸着工程 >

吸着工程は、Fc結合性タンパク質を固定化した不溶性担体を充填したカラムに抗体を含有する溶液を添加し、該抗体を該担体に吸着する工程である。

【 0 0 2 4 】

「抗体」とは、Fc領域を含む分子を意味する。抗体は、Fc領域からなるものであってもよく、Fc領域に加えて他の領域を含んでいてもよい。Fc領域としては、免疫グロブリンのFc領域が挙げられる。抗体は、糖鎖が付加されていてよい。抗体は、例えば、少なくともそのFc領域に糖鎖が付加されていてよい。抗体は、モノクローナル抗体であってよく、ポリクローナル抗体であってよく、抗体の由来は、特に制限されない。抗体は、単一の生物に由来するものであってもよく、2種またはそれ以上の生物の組み合わせに由来するものであってもよい。抗体は、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、またはそれらのバリエーション（例えばアミノ酸置換体）であってよく、抗体としては、免疫グロブリンが挙げられる。免疫グロブリンとしては、IgG、IgM、IgA、IgD、IgEが挙げられる。免疫グロブリンとしては、特に、IgGが挙げられる。IgGとしては、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4が挙げられる。また、抗体としては、二重特異性抗体（バイスペシフィック抗体）、Fc領域と他のタンパク質との融合抗体、Fc領域と薬物との複合体（ADC）等の人工的に構造改変した抗体も挙げられる。抗体は、例えば、抗体医薬であってよく、抗体医薬としては、抗TNF-抗体であるインフリキシマブや抗IL-6抗体であるトシリズマブ、癌遺伝子HER2に対する抗体であるトラスツズマブが挙げられる。抗体は、例えば、CHO細胞、Sp2/0細胞、NS0細胞、ハイブリドーマ細胞等の生産細胞により生産できる。

【 0 0 2 5 】

糖鎖としては、図3および図4に記載の糖鎖構造が挙げられる。特に、抗体の分離に寄与し得る糖鎖としては、G0、G0F、G1、G0F+GN、G1Fa、G1Fb、G1F+GN、G2、G2F、G1F+SA、G2F+SA、G2F+2SA、G2F+GN、G2+SA、G2+2SA、S1、S2、S3が挙げられる。

【 0 0 2 6 】

ヒト由来の抗体は、通常、シアル酸を有する抗体を含有する。ヒト由来の抗体における

10

20

30

40

50

シアル酸を有する抗体の含有量は、例えば、抗体の総含有量に対して、重量比で、0.1～20%程度であり得る。ヒト由来の抗体においては、シアル酸が糖鎖末端に2つ結合することが多い。さらに、ヒト由来の抗体は、通常、バイセクティングG1cNAc(表5における「+GN」の表記)を、抗体の総含有量に対して、重量比で、1～20%程度含有し得る。一方、ハムスターおよびマウス由来の抗体には、通常、バイセクティングG1cNAcは存在せず、糖鎖末端のシアル酸結合数は0～1個である。

【0027】

吸着工程に供される抗体は、複数種類の抗体分子を含有する混合物であってよい。吸着工程に供される抗体は、具体的には、糖鎖構造の異なる複数種類の抗体分子を含有する混合物であってよい。吸着工程に供される抗体は、より具体的には、Fc領域に付加された糖鎖構造の異なる複数種類の抗体分子を含有する混合物であってよい。

10

【0028】

リスクの検出を目的とする場合は、被検者から得た抗体を用いて本発明の方法を実施すればよい。

【0029】

「被検者」とは、リスクの検出の対象とするヒト個体を意味する。ここでいう被検者を、後述する対照被検者と区別して、「標的被検者」ともいう。被検者は、それに由来する抗体試料を利用できるものであれば、すなわち、抗体試料を取得できるか、既に取得したものであれば、特に制限されない。被検者は、男性であってもよく、女性であってもよい。被検者は、子供、若者、中年、老人等、いずれの年代の個体であってもよい。被検者は、健常者であってもよく、そうでなくてもよい。

20

【0030】

「抗体試料」とは、抗体を含有する試料を意味する。抗体試料としては、血液(全血)、希釈血液、血清、血漿、髄液、臍帯血、成分採血液等の血液試料；尿、唾液、精液、糞便、痰、羊水、腹水等の血液由来成分を含み得る試料；肝臓、肺、脾臓、腎臓、皮膚、腫瘍、リンパ節等の組織の断片(組織片)や細胞；それらから分離された抗体が挙げられる。抗体試料は、そのまま、あるいは適宜前処理に供してから、吸着工程に用いてよい。前処理は、例えば、定法により実施してよい。前処理としては、遠心分離やカラムによる精製が挙げられる。具体的には、例えば、ガンマグロブリンを精製して吸着工程に用いてもよい。抗体試料は、抗体を含有する溶液の形態で吸着工程に用いられる。すなわち、抗体試料は、適宜、抗体を含有する溶液の形態に調製して吸着工程に用いてよい。例えば、上記例示したような抗体試料またはその前処理物を、適宜、液体媒体で溶解、懸濁、分散、または溶媒交換等して、抗体を含有する溶液として吸着工程に用いてよい。そのような液体媒体については、例えば、後述する平衡化液についての記載を準用できる。液体媒体は、平衡化液と同一であってもよく、なくてもよい。

30

【0031】

被検者から得た抗体についての記載は、他の抗体の利用にも準用できる。例えば、被検者から得た抗体以外の任意の抗体も、同様に、そのまま、あるいは適宜前処理に供してから、抗体を含有する溶液の形態で吸着工程に用いてよい。

【0032】

「Fc結合性タンパク質」とは、抗体のFc領域に対する結合能を有するタンパク質を意味する。Fc結合性タンパク質は、所望の抗体分離パターンが得られるものであれば、特に制限されない。抗体は、例えば、抗体の糖鎖構造(例えば、Fc領域の糖鎖構造)の違いに基づくFc結合性タンパク質との親和性の違いに基づき、分離することができる。抗体とFc結合性タンパク質の親和性(具体的には、抗体の糖鎖構造)は、例えば、抗体の薬効等の機能と相関し得る。また、抗体とFc結合性タンパク質の親和性(具体的には、抗体の糖鎖構造)は、例えば、被検者におけるリスクと相関し得る。すなわち、Fc結合性タンパク質は、例えば、抗体のFc領域に対する結合能を有し、かつ抗体の糖鎖構造(例えば、Fc領域の糖鎖構造)の違いを認識できるタンパク質であるのが好ましい。Fc結合性タンパク質としては、ヒトFc結合性タンパク質が挙げられる。ヒトFc結合性

40

50

タンパク質としては、ヒトに見出されるFc結合性タンパク質やそのバリエーションが挙げられる。ヒトFc結合性タンパク質として、具体的には、ヒトFcRIIIaの細胞外領域のアミノ酸配列の全長配列または部分配列を含むタンパク質が挙げられる。ヒトFcRIIIaの細胞外領域のアミノ酸配列としては、天然型ヒトFcRIIIaの場合、配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち17番目のグリシンから192番目までのグルタミンまでの領域が挙げられる。ヒトFcRIIIaの細胞外領域のアミノ酸配列の部分配列としては、ヒトFcRIIIaの細胞外領域のうち、少なくともFc領域（例えば、ヒトIgGのFc領域）に結合する機能を発現し得る領域のアミノ酸配列が挙げられる。ヒトFc結合性タンパク質の一例として、以下の(i)や(ii)のポリペプチドが挙げられる。

10

(i) 配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも17番目から192番目までのアミノ酸残基を含むポリペプチド；

(ii) 配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち少なくとも17番目から192番目までのアミノ酸残基を含み、かつ前記アミノ酸残基において1つ以上のアミノ酸残基の置換、挿入、または欠失を含むポリペプチド。

【0033】

前記(ii)の一態様としては、配列番号1に記載のアミノ酸配列のうち17番目から192番目までのアミノ酸残基を含み、かつ当該17番目から192番目までのアミノ酸残基において以下の(1)から(40)のうち少なくともいずれか1つのアミノ酸置換が生じている、ポリペプチド（特開2015-086216）が挙げられる。

20

(1) 配列番号1の18番目のメチオニンがアルギニンに置換

(2) 配列番号1の27番目のバリンがグルタミン酸に置換

(3) 配列番号1の29番目のフェニルアラニンがロイシンまたはセリンに置換

(4) 配列番号1の30番目のロイシンがグルタミンに置換

(5) 配列番号1の35番目のチロシンがアスパラギン酸、グリシン、リジン、ロイシン、アスパラギン、プロリン、セリン、スレオニン、またはヒスチジンに置換

(6) 配列番号1の46番目のリジンがイソロイシンまたはスレオニンに置換

(7) 配列番号1の48番目のグルタミンがヒスチジンまたはロイシンに置換

(8) 配列番号1の50番目のアラニンがヒスチジンに置換

(9) 配列番号1の51番目のチロシンがアスパラギン酸またはヒスチジンに置換

30

(10) 配列番号1の54番目のグルタミン酸がアスパラギン酸またはグリシンに置換

(11) 配列番号1の56番目のアスパラギンがスレオニンに置換

(12) 配列番号1の59番目のグルタミンがアルギニンに置換

(13) 配列番号1の61番目のフェニルアラニンがチロシンに置換

(14) 配列番号1の64番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換

(15) 配列番号1の65番目のセリンがアルギニンに置換

(16) 配列番号1の71番目のアラニンがアスパラギン酸に置換

(17) 配列番号1の75番目のフェニルアラニンがロイシン、セリン、またはチロシンに置換

(18) 配列番号1の77番目のアスパラギン酸がアスパラギンに置換

40

(19) 配列番号1の78番目のアラニンがセリンに置換

(20) 配列番号1の82番目のアスパラギン酸がグルタミン酸またはバリンに置換

(21) 配列番号1の90番目のグルタミンがアルギニンに置換

(22) 配列番号1の92番目のアスパラギンがセリンに置換

(23) 配列番号1の93番目のロイシンがアルギニンまたはメチオニンに置換

(24) 配列番号1の95番目のスレオニンがアラニンまたはセリンに置換

(25) 配列番号1の110番目のロイシンがグルタミンに置換

(26) 配列番号1の115番目のアルギニンがグルタミンに置換

(27) 配列番号1の116番目のトリプトファンがロイシンに置換

(28) 配列番号1の118番目のフェニルアラニンがチロシンに置換

50

- (2 9) 配列番号 1 の 1 1 9 番目のリジンがグルタミン酸に置換
- (3 0) 配列番号 1 の 1 2 0 番目のグルタミン酸がバリンに置換
- (3 1) 配列番号 1 の 1 2 1 番目のグルタミン酸がアスパラギン酸またはグリシンに置換
- (3 2) 配列番号 1 の 1 5 1 番目のフェニルアラニンがセリンまたはチロシンに置換
- (3 3) 配列番号 1 の 1 5 5 番目のセリンがスレオニンに置換
- (3 4) 配列番号 1 の 1 6 3 番目のスレオニンがセリンに置換
- (3 5) 配列番号 1 の 1 6 7 番目のセリンがグリシンに置換
- (3 6) 配列番号 1 の 1 6 9 番目のセリンがグリシンに置換
- (3 7) 配列番号 1 の 1 7 1 番目のフェニルアラニンがチロシンに置換
- (3 8) 配列番号 1 の 1 8 0 番目のアスパラギンがリジン、セリン、またはイソロイシンに置換

10

- (3 9) 配列番号 1 の 1 8 5 番目のスレオニンがセリンに置換
- (4 0) 配列番号 1 の 1 9 2 番目のグルタミンがリジンに置換

また、前記 (i i) の別の態様としては、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のうち 1 7 番目から 1 9 2 番目までのアミノ酸残基を含み、かつ当該 1 7 番目から 1 9 2 番目までのアミノ酸残基において以下の (4 1) から (5 7) のうち少なくともいずれか 1 つのアミノ酸置換が生じている、ポリペプチド (特開 2 0 1 6 - 1 6 9 1 9 7) が挙げられる。

- (4 1) 配列番号 1 の 2 9 番目のフェニルアラニンがイソロイシンまたはロイシンに置換
- (4 2) 配列番号 1 の 3 9 番目のグルタミン酸がグリシンに置換
- (4 3) 配列番号 1 の 4 8 番目のグルタミンがアルギニンに置換
- (4 4) 配列番号 1 の 5 1 番目のチロシンがセリンに置換
- (4 5) 配列番号 1 の 6 1 番目のフェニルアラニンがチロシンに置換
- (4 6) 配列番号 1 の 7 7 番目のアスパラギン酸がグリシンに置換
- (4 7) 配列番号 1 の 8 2 番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換
- (4 8) 配列番号 1 の 9 0 番目のグルタミンがアルギニンに置換
- (4 9) 配列番号 1 の 1 1 2 番目のグルタミンがロイシンに置換
- (5 0) 配列番号 1 の 1 1 7 番目のバリンがグルタミン酸に置換
- (5 1) 配列番号 1 の 1 1 9 番目のリジンがアスパラギンまたはグルタミン酸に置換
- (5 2) 配列番号 1 の 1 4 0 番目のスレオニンがイソロイシンに置換
- (5 3) 配列番号 1 の 1 4 2 番目のロイシンがグルタミンに置換
- (5 4) 配列番号 1 の 1 7 1 番目のフェニルアラニンがセリンに置換
- (5 5) 配列番号 1 の 1 7 5 番目のロイシンがアルギニンに置換
- (5 6) 配列番号 1 の 1 8 0 番目のアスパラギンがセリンに置換
- (5 7) 配列番号 1 の 1 8 8 番目のイソロイシンがバリンに置換

20

30

また、前記 (i i) のさらに別の態様としては、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のうち 1 7 番目から 1 9 2 番目までのアミノ酸残基を含み、かつ当該 1 7 番目から 1 9 2 番目までのアミノ酸残基において以下の (5 8) から (6 1) のうち少なくともいずれか 1 つのアミノ酸置換が生じている、ポリペプチド (特開 2 0 1 6 - 1 6 9 1 9 7) が挙げられる。

- (5 8) 配列番号 1 の 6 6 番目のロイシンがヒスチジンまたはアルギニンに置換
- (5 9) 配列番号 1 の 1 4 7 番目のグリシンがアスパラギン酸に置換
- (6 0) 配列番号 1 の 1 5 8 番目のチロシンがヒスチジンに置換
- (6 1) 配列番号 1 の 1 7 6 番目のバリンがフェニルアラニンに置換

40

また、前記 (i i) のさらに別の態様としては、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のうち 1 7 番目から 1 9 2 番目までのアミノ酸残基を含み、かつ当該 1 7 番目から 1 9 2 番目までのアミノ酸残基において上記 (1) から (6 1) のうち少なくともいずれか 1 つのアミノ酸置換が生じている、ポリペプチドが挙げられる。

【 0 0 3 4 】

前記 (i i) としては、特に、以下の (i i - 1) ~ (i i - 3) のポリペプチドが挙げられる。

50

(i i - 1) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 1 7 番目から 1 9 2 番目までのアミノ酸残基を含み、但し当該 1 7 番目から 1 9 2 番目までのアミノ酸残基において、少なくとも 1 7 6 番目のバリンがフェニルアラニンに置換されたポリペプチド；

(i i - 2) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 1 7 番目から 1 9 2 番目までのアミノ酸残基を含み、但し当該 1 7 番目から 1 9 2 番目までのアミノ酸残基において、少なくとも 2 7 番目のバリンがグルタミン酸に、2 9 番目のフェニルアラニンがイソロイシンに、3 5 番目のチロシンがアスパラギンに、4 8 番目のグルタミンがアルギニンに、7 5 番目のフェニルアラニンがロイシンに、9 2 番目のアスパラギンがセリンに、1 1 7 番目のバリンがグルタミン酸に、1 2 1 番目のグルタミン酸がグリシンに、1 7 1 番目のフェニルアラニンがセリンに、および 1 7 6 番目のバリンがフェニルアラニンに置換されたポリペプチド；

10

(i i - 3) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列の 1 7 番目から 1 9 2 番目までのアミノ酸残基を含み、但し当該 1 7 番目から 1 9 2 番目までのアミノ酸残基において、少なくとも 2 7 番目のバリンがグルタミン酸に、2 9 番目のフェニルアラニンがイソロイシンに、3 5 番目のチロシンがアスパラギンに、4 8 番目のグルタミンがアルギニンに、7 5 番目のフェニルアラニンがロイシンに、9 2 番目のアスパラギンがセリンに、1 1 7 番目のバリンがグルタミン酸に、1 2 1 番目のグルタミン酸がグリシンに、および 1 7 1 番目のフェニルアラニンがセリンに置換されたポリペプチド。

【 0 0 3 5 】

F c 結合性タンパク質は、F c 領域（例えば、ヒト I g G の F c 領域）に結合する機能を有する限りにおいて、上記例示した F c 結合性タンパク質（例えば、前記 (i) または (i i) のポリペプチド）のアミノ酸配列において、「一または数個」のアミノ酸変異（例えば、置換、挿入、または欠失）を含むポリペプチドであってもよい。「一または数個」とは、例えば、1 ~ 5 0 個、好ましくは 1 ~ 4 0 個、より好ましくは 1 ~ 3 0、更に好ましくは 1 ~ 2 0 個、特に好ましくは 1 ~ 1 0 個であってよい。「一または数個」のアミノ酸変異は、例えば、上記 (1) から (6 1) のアミノ酸置換から選択される上記例示した F c 結合性タンパク質が有するアミノ酸置換が保存されるように生じてよい。言い換えると、「一または数個」のアミノ酸変異は、例えば、上記 (1) から (6 1) のアミノ酸置換から選択される上記例示した F c 結合性タンパク質が有するアミノ酸置換以外の位置に生じてよい。

20

30

【 0 0 3 6 】

F c 結合性タンパク質は、F c 領域（例えば、ヒト I g G の F c 領域）に結合する機能を有する限りにおいて、上記例示した F c 結合性タンパク質（例えば、前記 (i) または (i i) のポリペプチド）のアミノ酸配列に対し高い相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであってもよい。「高い相同性」とは、7 0 % 以上、8 0 % 以上、9 0 % 以上、または 9 5 % 以上の相同性を意味してよい。「相同性」とは、類似性 (s i m i l a r i t y) または同一性 (i d e n t i t y) を意味してよい。「相同性」とは、特に、同一性 (i d e n t i t y) を意味してよい。アミノ酸配列の相同性は、B L A S T 等のアラインメントプログラムを利用して決定することができる。例えば、「アミノ酸配列の同一性」とは、b l a s t p を用いて算出されるアミノ酸配列間の同一性を意味してよく、具体的には、b l a s t p をデフォルトのパラメータで用いて算出されるアミノ酸配列間の同一性を意味してもよい。上記のような相同性の範囲でのアミノ酸配列の変化は、例えば、上記 (1) から (6 1) のアミノ酸置換から選択される上記例示した F c 結合性タンパク質が有するアミノ酸置換が保存されるように生じてよい。言い換えると、上記のような相同性の範囲でのアミノ酸配列の変化は、例えば、上記 (1) から (6 1) のアミノ酸置換から選択される上記例示した F c 結合性タンパク質が有するアミノ酸置換以外の位置に生じてよい。

40

【 0 0 3 7 】

F c 結合性タンパク質は、例えば、F c 結合性タンパク質をコードする遺伝子を有する宿主に同遺伝子を発現させることにより製造できる。F c 結合性タンパク質をコードする

50

遺伝子は、例えば、クローニング、化学合成、変異導入、またはそれらの組み合わせにより取得できる。宿主は、Fc結合性タンパク質を発現できるものであれば、特に制限されない。宿主としては、動物細胞、昆虫細胞、微生物が挙げられる。動物細胞としては、COS細胞、CHO細胞、HeLa細胞、NIH3T3細胞、HEK293細胞が挙げられる。昆虫細胞としては、Sf9、BTI-TN-5B1-4が挙げられる。微生物としては、酵母や細菌が挙げられる。酵母としては、*Saccharomyces cerevisiae*等の*Saccharomyces*属酵母、*Pichia Pastoris*等の*Pichia*属酵母、*Schizosaccharomyces pombe*等の*Schizosaccharomyces*属酵母が挙げられる。細菌としては、エシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属細菌が挙げられる。エシェリヒア・コリとしては、W3110株、JM109株、BL21(DE3)株が挙げられる。また、Fc結合性タンパク質は、例えば、Fc結合性タンパク質をコードする遺伝子を受容細胞タンパク質合成系で発現させることによって製造できる。

【0038】

「不溶性担体」とは、本発明の方法においてカラムに通液される液体（例えば、平衡化液や溶出液等の、抗体の吸着または溶出に用いる液体）に対して不溶性である担体を意味する。不溶性担体は、Fc結合性タンパク質を共有結合で固定化するための官能基（例えばヒドロキシ基）を備えてよい。不溶性担体としては、ジルコニア、ゼオライト、シリカ、皮膜シリカ等の無機系物質に由来した担体、セルロース、アガロース、デキストラン等の天然有機高分子物質に由来した担体、ポリアクリル酸、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリメタクリレート、ビニルポリマー等の合成有機高分子物質に由来した担体が挙げられる。

【0039】

Fc結合性タンパク質は、適宜、不溶性担体に固定化することができる。Fc結合性タンパク質は、例えば、不溶性担体に備わるFc結合性タンパク質を共有結合で固定化するための官能基（例えばヒドロキシ基）を利用して、共有結合で不溶性担体に固定化することができる。例えば、不溶性担体が表面にヒドロキシ基を備える場合、活性化剤を用いて当該ヒドロキシ基からFc結合性タンパク質と共有結合可能な活性化基を形成し、当該活性化基とFc結合性タンパク質とを共有結合することができる。ヒドロキシ基に対する活性化剤の具体例として、エピクロロヒドリン（活性化基としてエポキシ基を形成）、1,4-ブタンジオールジグリシジルエーテル（活性化基としてエポキシ基を形成）、トレスルクロリド（活性化基としてトレスル基を形成）、ビニルブロミド（活性化基としてビニル基を形成）が挙げられる。また、ヒドロキシ基をアミノ基やカルボキシル基等に変換した後、活性化剤を作用させて活性化することもできる。アミノ基やカルボキシル基等に対する活性化剤の具体例として、3-マレイミドプロピオン酸N-スクシンイミジル（活性化基としてマレイミド基を形成）、1,1'-カルボニルジイミダゾール（活性化基としてカルボニルイミダゾール基を形成）、ハロゲン化酢酸（活性化基としてハロゲン化アセチル基を形成）が挙げられる。

【0040】

Fc結合性タンパク質を固定化した不溶性担体を充填したカラムに抗体を含有する溶液を添加することにより、抗体を担体に吸着することができる。抗体を含有する溶液は、例えば、ポンプ等の送液手段を用いてカラムに添加することができる。液体をカラムに添加することを、「液体をカラムに送液する」ともいう。抗体を含有する溶液の添加量、液相の種類、液相の送液速度、カラム温度等の吸着工程の実施条件は、抗体が担体に吸着する限り、特に制限されない。吸着工程の実施条件は、抗体の種類、Fc結合性タンパク質の種類、不溶性担体の種類、カラムのスケール等の諸条件に応じて適宜設定できる。液相としては、後述する平衡化液が挙げられる。送液速度は、例えば、カラムの内径が4.6mmの場合に、0.1mL/分~1.5mL/分、0.2mL/分~1.0mL/分、または0.4mL/分~0.8mL/分であってよい。送液速度は、例えば、カラムの内径の2乗に比例するように設定してよい。カラム温度は、例えば、0~50℃であってよい。

【0041】

抗体を含有する溶液をカラムに添加する前に、平衡化液を用いてカラムを平衡化してよい。すなわち、本発明の方法は、吸着工程の前に、カラムに平衡化液を添加し、カラムを平衡化する工程を含んでよい。平衡化液としては、水性緩衝液が挙げられる。平衡化液として、具体的には、pH 4.0から6.9の弱酸性緩衝液が挙げられる。緩衝液の成分は、緩衝液のpH等の諸条件に応じて適宜選択できる。緩衝液の成分としては、リン酸、酢酸、ギ酸、MES (2-Morpholinoethanesulfonic acid)、MOPS (3-Morpholinopropanesulfonic acid)、クエン酸、コハク酸、グリシン、ピペラジンが挙げられる。

< 溶出工程 >

溶出工程は、担体に吸着した抗体を溶出液を用いて溶出する工程である。

【0042】

すなわち、カラムに溶出液を添加することにより、担体に吸着した抗体を溶出することができる。溶出液の種類、溶出液の送液形式、液相の送液速度、カラム温度等の溶出工程の実施条件は、所望の態様で抗体が分離される限り、例えば、所望の分離データが得られる限り、特に制限されない。溶出工程の実施条件は、抗体の種類、Fc結合性タンパク質の種類、不溶性担体の種類、カラムのスケール等の諸条件に応じて適宜設定できる。溶出液としては、抗体とFc結合性タンパク質との親和性を弱めるものを用いることができる。溶出液としては、溶出前の液相（例えば、平衡化液）よりもpHが低い水性緩衝液が挙げられる。溶出液として、具体的には、pH 2.5から4.5の酸性緩衝液が挙げられる。例えば、溶出前の液相（例えば、平衡化液）がpH 4.0から6.9の弱酸性緩衝液である場合に、溶出液がpH 2.5から4.5の酸性緩衝液であってよい。緩衝液の成分は、緩衝液のpH等の諸条件に応じて適宜選択できる。緩衝液の成分としては、リン酸、酢酸、ギ酸、MES (2-Morpholinoethanesulfonic acid)、MOPS (3-Morpholinopropanesulfonic acid)、クエン酸、コハク酸、グリシン、ピペラジンが挙げられる。溶出液の送液形式は、例えば、グラジエントであってもよく、イソクラティックであってもよい。溶出液の送液形式は、特に、グラジエントであってよい。すなわち、溶出は、特に、液相中の溶出液の比率を増大させることにより実施されてよい。グラジエントは、例えば、リニアグラジエントであってもよく、ステップワイズグラジエントであってもよく、それらの組み合わせであってもよい。グラジエントは、具体的には、例えば、10~60分、15~50分、または20~40分で液相中の溶出液の比率が0% (v/v) から100% (v/v) に増大するように設定されてよい。送液速度は、例えば、カラムの内径が4.6mmの場合に、0.1mL/分~1.5mL/分、0.2mL/分~1.0mL/分、または0.4mL/分~0.8mL/分であってよい。送液速度は、例えば、カラムの内径の2乗に比例するように設定してよい。カラム温度は、例えば、0~50 °Cであってよい。

【0043】

溶出工程により、分離された抗体が得られてよい。分離された抗体は、例えば、同抗体を含有する溶出画分として得られてよい。すなわち、分離された抗体を含有する溶出画分を分取することにより、分離された抗体が得られる。溶出画分は、例えば、常法により分取することができる。溶出画分は、具体的には、例えば、オートサンプラー等の自動フラクションコレクター等により分取することができる。さらに、分離された抗体を溶出画分から回収してもよい。分離された抗体は、例えば、常法により溶出画分から回収することができる。分離された抗体は、具体的には、例えば、タンパク質の分離精製に用いられる公知の方法により溶出画分から回収することができる。

【0044】

溶出工程により、分離データ（すなわち、抗体の分離パターンに係るデータ）が得られてよい。分離データは、被検者におけるリスクを検出するための指標として用いることができるものであれば、すなわち、被検者におけるリスクと相関するものであれば、特に制限されない。分離データとしては、抗体の分離パターンの特徴が挙げられる。抗体の分離

10

20

30

40

50

パターンの特徴を、単に、「特徴」ともいう。すなわち、分離データを得る工程は、例えば、抗体の分離パターンを得る工程と、抗体の分離パターンの特徴を抽出する（すなわち、抗体の分離パターンからその特徴を抽出する）工程を含んでいてもよい。抗体の分離パターンは、検出器により抗体を検出することにより得られる。検出器としては、UV検出器や質量検出器が挙げられる。抗体の分離パターンとしては、抗体の溶出時のクロマトグラムが挙げられる。特徴としては、抗体の分離パターンから得られる、被検者におけるリスクと関連するパラメータが挙げられる。特徴として、具体的には、溶出ピーク（すなわち、溶出した抗体のピーク）の特徴が挙げられる。溶出ピークの特徴として、具体的には、ピーク面積、ピーク溶出時間、ピーク幅、ピーク検出数、ピーク高さが挙げられる。ピーク面積やピーク高さ等の特徴の抽出の対象となる溶出ピークを、「対象ピーク」ともいう。溶出ピークの特徴としては、特に、ピーク面積やピーク高さが挙げられる。抗体の分離パターンは、そのまま、あるいは適宜、ベースラインの補正等の補正を実施してから、特徴の抽出に用いてよい。特徴は、絶対値であってもよく、相対値であってもよい。相対値としては、他の溶出ピーク（すなわち、対象ピーク以外のいずれかの溶出ピーク）の値に対する比率または差分や、全溶出ピーク（すなわち、対象ピークを含む全ての溶出ピーク）の値の合計に対する比率または差分が挙げられる。相対値としては、特に、他の溶出ピークの値に対する比率や、全溶出ピークの値の合計に対する比率が挙げられる。他の溶出ピークとしては、1つの溶出ピークを用いてもよく、2つまたはそれ以上の溶出ピークを組み合わせ用いてもよい。例えば、ピーク面積として、具体的には、ピーク面積%が挙げられる。「ピーク面積%」とは、全溶出ピーク的面積の合計値に対する対象ピーク的面積の比率（%）を意味する。また、例えば、ピーク高さとして、具体的には、ピーク高さ%が挙げられる。「ピーク高さ%」とは、全溶出ピークの高さの合計値に対する対象ピークの高さの比率（%）を意味する。特徴は、内部標準物質で得られたピークに基づく補正や被検者の性質に基づく補正等の、補正がなされていてもよい。例えば、特徴は、被検者の年齢に基づいて補正がなされていてもよい。すなわち、例えば、特徴が被検者の年齢に影響を受ける場合、抽出された特徴を被検者の年齢に基づいて補正してから、検出工程に用いてよい。被検者の年齢に基づいて補正された特徴は、例えば、加齢以外の症状についてのリスクの検出に利用でき得る。

10

20

【0045】

対象ピークは、リスクの種類等の諸条件に応じて適宜選択できる。対象ピークとしては、第1～第4ピークが挙げられる。対象ピークとしては、特に、第1ピーク、第2ピーク、第3ピークが挙げられる。対象ピークとして、さらに特には、第1ピークが挙げられる。第1ピークは、例えば、肺炎以外の症状についてのリスクの評価に好適に利用でき得る。第2ピークは、例えば、加齢についてのリスクの評価に好適に利用でき得る。第3ピークは、例えば、肺炎についてのリスクの評価に好適に利用でき得る。第3ピークは、具体的には、例えば、肺炎と膵がんの区別に好適に利用でき得る。対象ピークとしては、1つの溶出ピークを用いてもよく、2つまたはそれ以上の溶出ピークを組み合わせ用いてもよい。「第1～第4ピーク」とは、それぞれ、特記しない限り、溶出の開始後（例えば、グラジエントの開始後）に1～4番目に溶出するピークを意味してよい。なお、対象ピークは、特に、ピーク面積%が1%以上のものであってもよい。言い換えると、「第1～第4ピーク」とは、特に、それぞれ、溶出の開始後に1～4番目に溶出する、ピーク面積%が1%以上のピークを意味してもよい。また、「第1ピーク」とは、溶出工程をグラジエント溶出により実施する場合にあっては、例えば、液相のpHが5.4以下、5.2以下、5.0以下、または4.8以下になって最初に溶出するピークを意味してもよい。また、「第1ピーク」とは、溶出工程をグラジエント溶出により実施する場合にあっては、例えば、液相のpHが5.4～4.4、5.2～4.5、または5.0～4.6である期間に溶出するピークを意味してもよい。なお、液相のpHは、溶出の開始前の液相（例えば、平衡化液）のpHがX、溶出液のpHがY、液相中の溶出液の比率がZ%である場合、下記式（I）で算出されるものとする。また、ピークが溶出したpHは、カラムの容積等の流路の容積を考慮して、適宜補正されるものとする。

30

40

50

【 0 0 4 6 】

液相の $pH = X - ((X - Y) \times Z\%) \cdots (I)$

< 検出工程 >

検出工程は、分離データ（すなわち、抗体の分離パターンに係るデータ）を指標として、被検者におけるリスク（すなわち、疾患の有無、疾患の発症リスク、疾患の進行度合い、及び/又は加齢の進行度合い）を検出する工程である。

【 0 0 4 7 】

疾患としては、免疫細胞の活性（例えば、損傷作用や貪食作用）に影響を受ける疾患が挙げられる。免疫細胞としては、ナチュラルキラー細胞、単球、マクロファージが挙げられる。

10

【 0 0 4 8 】

疾患として、具体的には、がん、自己免疫疾患、感染症、アレルギー、炎症疾患が挙げられる。これらの疾患は、いずれも、免疫細胞の活性に影響を受ける疾患であり得る。

【 0 0 4 9 】

がんとしては、脳腫瘍、乳がん、子宮体がん、子宮頸がん、卵巣がん、食道がん、胃がん、虫垂がん、大腸がん、肝がん、胆嚢がん、胆管がん、膵がん、副腎がん、消化管間質腫瘍（GIST）、中皮腫、頭頸部がん、腎がん、肺がん、骨肉腫、ユーイング肉腫、軟骨肉腫、前立腺がん、精巣腫瘍、腎細胞がん、膀胱がん、横紋筋肉腫、皮膚がん、肛門がんが挙げられる。がんとしては、特に、膵がん、胃がん、乳がん、大腸がん、腎がんが挙げられる。

20

【 0 0 5 0 】

自己免疫疾患としては、ギラン・バレー症候群、重症筋無力症、多発性硬化症、慢性胃炎、慢性萎縮性胃炎、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性胆管炎、潰瘍性大腸炎、クローン病、原発性胆汁性胆管炎、自己免疫性膵炎、高安動脈炎、グッドパスチャー症候群、急速進行性糸球体腎炎、巨赤芽球性貧血、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性好中球減少症、特発性血小板減少性紫斑病、バセドウ病、橋本病、原発性甲状腺機能低下症、特発性アジソン病、1型糖尿病、慢性円板状エリテマトーデス、限局性強皮症、天疱瘡、膿疱性乾癬、尋常性乾癬、類天疱瘡、妊娠性疱疹、線状IgA水疱性皮膚症、後天性表皮水疱症、円形脱毛症、尋常性白斑、サットン後天性遠心性白斑・サットン母斑、原田病、自己免疫性視神経症、自己免疫性内耳障害、特発性無精子症、習慣性流産、リウマチ、全身性エリテマトーデス、抗リン脂質抗体症候群、多発性筋炎、皮膚筋炎、強皮症、シェーグレン症候群、IgG4関連疾患、血管炎症候群、混合性結合組織病が挙げられる。自己免疫疾患としては、特に、リウマチやシェーグレン症候群が挙げられる。

30

【 0 0 5 1 】

感染症としては、細菌感染症、真菌感染症、寄生性原虫感染症、寄生性蠕虫感染症、ウイルス感染症が挙げられる。細菌感染症としては、レンサ球菌、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、腸球菌、リステリア、髄膜炎菌、淋菌、病原性大腸菌、クレブシエラ、プロテウス、百日咳菌、緑膿菌、セラチア、シトロバクター、アシネトバクター、エンテロバクター、マイコプラズマ、クロストリジウム、リケッチア、クラミジア等の各種細菌による感染症；結核、非結核性抗酸菌症、コレラ、ペスト、ジフテリア、赤痢、猩紅熱、炭疽、梅毒、破傷風、ハンセン病、レジオネラ肺炎、レプトスピラ症、ライム病、野兔病、Q熱が挙げられる。真菌感染症としては、アスペルギルス症、カンジダ症、クリプトコッカス症、白癬菌症、ヒストプラズマ症、ニューモシスチス肺炎（カリニ肺炎）が挙げられる。寄生性原虫感染症としては、アメーバ赤痢、マラリア、トキソプラズマ症、リーシュマニア症、クリプトスポリジウム症が挙げられる。寄生性蠕虫感染症としては、エキノコックス症、日本住血吸虫症、フィラリア症、回虫症、広節裂頭条虫症が挙げられる。ウイルス感染症としては、インフルエンザ、ウイルス性肝炎、ウイルス性髄膜炎、ウイルス性胃腸炎、ウイルス性結膜炎、後天性免疫不全症候群（AIDS）、成人T細胞白血病、エボラ出血熱、黄熱、風邪症候群、狂犬病、サイトメガロウイルス感染症、重症急性呼吸器症候群（SARS）、中東呼吸器症候群（MERS）、進行性多巣性白質脳症、水痘・带状疱疹

40

50

疹、単純疱疹、手足口病、デング熱、日本脳炎、伝染性紅斑、伝染性単核球症、天然痘、風疹、急性灰白髄炎（ポリオ）、麻疹、咽頭結膜熱（プール熱）、マールブルグ出血熱、腎症候性出血熱、ラッサ熱、流行性耳下腺炎、ウエストナイル熱、ヘルパンギーナ、チクングニア熱が挙げられる。感染症は、例えば、日和見感染症であってもよい。

【 0 0 5 2 】

アレルギーとしては、アナフィラキシーショック、アレルギー性鼻炎、結膜炎、気管支喘息、蕁麻疹、アトピー性皮膚炎、溶血性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、薬剤性溶血性貧血、顆粒球減少症、血小板減少症、グッドパスチャー症候群、血清病、全身性エリテマトーデス（SLE）、リウマチ、糸球体腎炎、過敏性肺炎、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症（ABPA）、接触性皮膚炎、アレルギー性脳炎、移植拒絶反応、結核性空洞、類上皮細胞性肉芽腫が挙げられる。

10

【 0 0 5 3 】

炎症疾患としては、炎症性サイトカインにより誘導される疾患が挙げられる。炎症性サイトカインとしては、IL-6やTNF- α が挙げられる。炎症疾患として、具体的には、脳炎、骨髄炎、髄膜炎、神経炎、眼の炎症（涙腺炎、強膜炎、上強膜炎、角膜炎、脈絡網膜炎、網膜炎、脈絡網膜炎、眼瞼炎、結膜炎、ぶどう膜炎、等）、耳の炎症（外耳炎、中耳炎、内耳炎、等）、乳腺炎、心炎（心内膜炎、心筋炎、心膜炎、等）、血管炎（動脈炎、静脈炎、毛細血管炎、等）、呼吸器の炎症（副鼻腔炎、鼻炎、咽頭炎、喉頭炎、気管炎、気管支炎、細気管支炎、肺炎、胸膜炎、縦隔炎、等）、口腔の炎症（口内炎、歯肉炎、歯肉口内炎、舌炎、扁桃炎、シラデン炎、耳下腺炎、口唇炎、歯髄炎、鼻炎、等）、消化器の炎症（食道炎、胃炎、胃腸炎、腸炎、小腸炎、大腸炎、十二指腸炎、回腸炎、虫垂炎、直腸炎、等）、皮膚炎、蜂巣炎、汗腺炎、関節炎、皮膚筋炎、筋炎、滑膜炎、腱炎、脂肪織炎、骨炎、骨髄炎、骨膜炎、腎炎、輸尿管炎、膀胱炎、尿管炎、卵巣炎、卵管炎、子宮内膜炎、子宮頸管炎、膣炎、外陰炎、精巣炎、精巣上体炎、前立腺炎、精嚢膀胱炎、亀頭炎、包皮質炎、絨毛膜羊膜炎、臍帯炎、臍炎、肝炎、上行性胆管炎、胆嚢炎、膵炎、腹膜炎、下垂体炎、甲状腺炎、副甲状腺炎、副腎炎、リンパ管炎、リンパ節炎が挙げられる。炎症疾患としては、特に、膵炎が挙げられる。

20

【 0 0 5 4 】

疾患として、具体的には、悪液質や加齢関連疾患も挙げられる。加齢関連疾患としては、フレイル（虚弱）、サルコペニア、ロコモティブシンドロームが挙げられる。悪液質やこれらの加齢関連疾患は、いずれも、炎症疾患でもあり得る。

30

【 0 0 5 5 】

被検者におけるリスクの検出としては、被検者においてリスクがあるかないかの判定や、被検者においてリスクが高いか低いかの判定が挙げられる。

【 0 0 5 6 】

疾患の有無の検出としては、被検者が現在疾患を発症している可能性があるかないかの判定や、被検者が現在疾患を発症している可能性が高いか低いかの判定が挙げられる。また、疾患の発症リスクの検出としては、被検者が将来疾患を発症する可能性または発症した場合に重症化する可能性があるかないかの判定や、被検者が将来疾患を発症する可能性または発症した場合に重症化する可能性が高いか低いかの判定が挙げられる。また、疾患の進行度合いの検出としては、被検者における現在の疾患の進行度合い（例えば重症度）が大きい小さいかの判定が挙げられる。また、加齢の進行度合いの検出としては、被検者における現在の加齢の進行度合い（例えば重症度）が大きい小さいかの判定が挙げられる。

40

【 0 0 5 7 】

すなわち、「被検者においてリスクがある」とは、例えば、被検者が現在疾患を発症している可能性があること、被検者が将来疾患を発症する可能性があること、および/または被検者が将来疾患を発症した場合に重症化する可能性があることを意味してよい。「被検者においてリスクがない」とは、例えば、被検者が現在疾患を発症している可能性がないこと、被検者が将来疾患を発症する可能性がないこと、および/または被検者が将来疾

50

患を発症した場合に重症化する可能性がないことを意味してよい。「被検者においてリスクが高い」とは、例えば、被検者が現在疾患を発症している可能性が高いこと、被検者が将来疾患を発症する可能性が高いこと、被検者が将来疾患を発症した場合に重症化する可能性が高いこと、被検者における現在の疾患の進行度合いが大きいこと、および/または被検者における現在の加齢の進行度合いが大きいことを意味してよい。「被検者においてリスクが低い」とは、例えば、被検者が現在疾患を発症している可能性が低いこと、被検者が将来疾患を発症する可能性が低いこと、被検者が将来疾患を発症した場合に重症化する可能性が低いこと、被検者における現在の疾患の進行度合いが小さいこと、および/または被検者における現在の加齢の進行度合いが小さいことを意味してよい。

【0058】

検出工程は、例えば、分離データの値の高低（すなわち、分離データの値が高いか低いか）を指標として実施できる。分離データの値の高低は、例えば、分離データの値を所定の閾値と比較することにより決定できる。言い換えると、検出工程は、例えば、分離データの値を閾値と比較する工程を含んでいてよい。すなわち、「分離データの値が高い」とは、例えば、分離データの値が閾値を基準として高いことを意味してよい。「分離データの値が閾値を基準として高い」とは、例えば、分離データの値が閾値以上であること、分離データの値が閾値超であること、または分離データの値が閾値よりも統計学的に有意に高いことを意味してよい。「分離データの値が閾値を基準として高い」とは、具体的には、例えば、分離データの値が閾値の1.01倍以上、1.02倍以上、1.03倍以上、1.05倍以上、1.07倍以上、1.1倍以上、1.2倍以上、1.3倍以上、1.5倍以上、1.7倍以上、2倍以上、2.5倍以上、または3倍以上であることを意味してもよい。また、「分離データの値が低い」とは、例えば、分離データの値が閾値を基準として低いことを意味してよい。「分離データの値が閾値を基準として低い」とは、例えば、分離データの値が閾値以下であること、分離データの値が閾値未満であること、または分離データの値が閾値よりも統計学的に有意に低いことを意味してよい。「分離データの値が閾値を基準として低い」とは、具体的には、例えば、分離データの値が閾値の0.99倍以下、0.98倍以下、0.97倍以下、0.95倍以下、0.93倍以下、0.9倍以下、0.85倍以下、0.8倍以下、0.7倍以下、0.6倍以下、0.5倍以下、0.4倍以下、または0.3倍以下であることを意味してもよい。

【0059】

分離データの値は、例えば、閾値を基準に、危険範囲に区分されてよい。分離データの値は、例えば、閾値を基準に、非危険範囲に区分されてよい。分離データの値は、具体的には、例えば、閾値を基準に、危険範囲と非危険範囲とに区分されてもよい。「危険範囲」とは、分離データの値について、被検者においてリスクがある可能性が高い範囲を意味してよい。「非危険範囲」とは、分離データの値について、被検者においてリスクがない可能性が高い範囲を意味してよい。すなわち、分離データの値が危険範囲にあれば、被検者においてリスクがある、またはリスクが高いと判定してよい。一方、分離データの値が非危険範囲にあれば、被検者においてリスクがない、またはリスクが低いと判定してよい。

【0060】

例えば、第1ピークおよび/または第2ピークのピーク面積（例えば、ピーク面積%）および/またはピーク高さ（例えば、ピーク高さ%）の値が高い場合に、被検者においてリスクがある、またはリスクが高いと判定してよい。具体的には、例えば、第1ピークおよび/または第2ピークのピーク面積（例えば、ピーク面積%）および/またはピーク高さ（例えば、ピーク高さ%）の値が閾値を基準として高い場合に被検者においてリスクがある、またはリスクが高いと判定してよい。この場合、閾値を基準として高いとみなされる範囲が危険範囲であってよい。より具体的には、例えば、第1ピーク面積%が、14%以上、15%以上、16%以上、17%以上、18%以上、19%以上、20%以上、21%以上、22%以上、23%以上、24%以上、25%以上、26%以上、27%以上、28%以上、29%以上、または30%以上である場合に、被検者においてリスクがある、またはリスクが高いと判定してもよい。また、第1ピークおよび/または第2ピーク

10

20

30

40

50

のピーク面積（例えば、ピーク面積％）および／またはピーク高さ（例えば、ピーク高さ％）の値が高いほど、被検者においてリスクが高いと判定してもよい。

【0061】

例えば、第1ピークおよび／または第2ピークのピーク面積（例えば、ピーク面積％）および／またはピーク高さ（例えば、ピーク高さ％）の値が低い場合に、被検者においてリスクがない、またはリスクが低いと判定してよい。具体的には、例えば、第1ピークおよび／または第2ピークのピーク面積（例えば、ピーク面積％）および／またはピーク高さ（例えば、ピーク高さ％）の値が閾値を基準として低い場合に被検者においてリスクがない、またはリスクが低いと判定してよい。この場合、閾値を基準として低いとみなされる範囲が非危険範囲であってよい。より具体的には、例えば、第1ピーク面積％が、25％以下、24％以下、23％以下、22％以下、21％以下、20％以下、19％以下、18％以下、17％以下、16％以下、15％以下、14％以下、13％以下、12％以下、11％以下、10％以下、または9％以下である場合に、被検者においてリスクがない、またはリスクが低いと判定してもよい。また、第1ピークおよび／または第2ピークのピーク面積（例えば、ピーク面積％）および／またはピーク高さ（例えば、ピーク高さ％）の値が低いほど、被検者においてリスクが低いと判定してもよい。

10

【0062】

例えば、第3ピークのピーク面積（例えば、ピーク面積％）および／またはピーク高さ（例えば、ピーク高さ％）の値が低い場合に、被検者においてリスクがある、またはリスクが高いと判定してよい。具体的には、例えば、第3ピークのピーク面積（例えば、ピーク面積％）および／またはピーク高さ（例えば、ピーク高さ％）の値が閾値を基準として低い場合に被検者においてリスクがある、またはリスクが高いと判定してよい。この場合、閾値を基準として低いとみなされる範囲が危険範囲であってよい。また、第3ピークのピーク面積（例えば、ピーク面積％）および／またはピーク高さ（例えば、ピーク高さ％）の値が低いほど、被検者においてリスクが高いと判定してもよい。

20

【0063】

例えば、第3ピークのピーク面積（例えば、ピーク面積％）および／またはピーク高さ（例えば、ピーク高さ％）の値が高い場合に、被検者においてリスクがない、またはリスクが低いと判定してよい。具体的には、例えば、第3ピークのピーク面積（例えば、ピーク面積％）および／またはピーク高さ（例えば、ピーク高さ％）の値が閾値を基準として高い場合に被検者においてリスクがない、またはリスクが低いと判定してよい。この場合、閾値を基準として高いとみなされる範囲が非危険範囲であってよい。また、第3ピークのピーク面積（例えば、ピーク面積％）および／またはピーク高さ（例えば、ピーク高さ％）の値が高いほど、被検者においてリスクが低いと判定してもよい。

30

【0064】

第1ピークを対象ピークとする分離データを指標とする場合、リスクは、例えば、肺炎以外の症状についてのリスクから選択されてよい。第2ピークを対象ピークとする分離データを指標とする場合、リスクは、例えば、加齢についてのリスクから選択されてよい。第3ピークを対象ピークとする分離データを指標とする場合、リスクは、例えば、肺炎についてのリスクから選択されてよい。

40

【0065】

なお、「或る分離データが或る基準を満たす（例えば、低いもしくは高い、または或る範囲にある）場合に被検者においてリスクがある、ない、高い、または低いと判定する」とは、少なくとも当該基準を満たす範囲において被検者においてリスクがある、ない、高い、または低いと判定されることを意味し、当該基準を満たさない範囲において被検者においてリスクが判定されることを要求しない。しかし、一態様においては、「或る分離データが或る基準を満たす（例えば、低いもしくは高い、または或る範囲にある）場合に被検者においてリスクがある、ない、高い、または低いと判定する」場合、当該基準を満たさない範囲において、それぞれ、被検者においてリスクがない、ある、低い、または高いと判定してもよい。

50

【 0 0 6 6 】

閾値は、例えば、分離データの種類や所望の判定精度等の諸条件に応じて、当業者が適宜設定することができる。閾値は、例えば、疾患や加齢等の判定対象の症状ごとに設定されてよい。閾値を決定する手段は、特に制限されない。閾値は、例えば、集団を2群に区分するためのデータ解析に利用される公知の手法に従って決定することができる。

【 0 0 6 7 】

閾値は、例えば、対照被検者から得た抗体試料の分離データの値に基づいて決定することができる。対照被検者から得た抗体試料の分離データを、「対照分離データ」ともいう。対照分離データは、閾値の決定に用いられることにより、検出工程に用いられてよい。対照分離データは、具体的には、閾値の決定に用いられることにより、分離データとの比較に用いられてよい。言い換えると、検出工程は、例えば、分離データを対照分離データと比較する工程を含んでいてよい。

10

【 0 0 6 8 】

対照被検者としては、陽性対照や陰性対照が挙げられる。「陽性対照」とは、リスクがある、または高いと判定され得る被検者を意味してよい。「陰性対照」とは、リスクがない、または低いと判定され得る被検者を意味してよい。陽性対照としては、上記例示したような疾患（特に、リスクの検出対象となる疾患と同一の疾患）に罹患している、または罹患したことがある個体や、加齢が進行した個体、それらの組み合わせの性質を有する個体が挙げられる。陰性対照としては、上記例示したような疾患（特に、リスクの検出対象となる疾患と同一の疾患）に罹患していない、または罹患したことがない個体や、加齢が進行していない個体、それらの組み合わせの性質を有する個体が挙げられる。閾値は、陽性対照について測定された分離データの値のみに基づいて決定してもよく、陰性対照について測定された分離データの値のみに基づいて決定してもよく、陽性対照と陰性対照の両方について測定された分離データの値に基づいて決定してもよい。閾値は、通常、陽性対照と陰性対照の両方について測定された分離データの値に基づいて決定してよい。陽性対照と陰性対照の人数は、リスクの判定が所望の精度で可能となる閾値が得られる限り、特に制限されない。陽性対照と陰性対照の人数は、それぞれ、1人であってもよく、2人またはそれ以上であってもよい。陽性対照と陰性対照の人数は、それぞれ、通常、複数名であってもよい。陽性対照と陰性対照の人数は、それぞれ、例えば、5人以上、10人以上、20人以上、または50人以上であってもよい。陽性対照と陰性対照の人数は、それぞれ、例えば、10000人以下、1000人以下、または100人以下であってもよい。

20

30

【 0 0 6 9 】

陽性対照について測定された分離データの値のみに基づいて閾値を決定する場合には、例えば、陽性対照の複数個体で測定された分離データの値の上限から下限までの範囲から選択される値、例えば平均値、を閾値として設定してもよい。また、例えば、陽性対照の複数個体で測定された分離データの値の分布において、陽性対照の所定の割合が危険範囲に含まれるように閾値を決定してもよい。所定の割合とは、例えば、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、97%以上、または100%であってもよい。

【 0 0 7 0 】

陰性対照について測定された分離データの値のみに基づいて閾値を決定する場合には、例えば、陰性対照の複数個体で測定された分離データの値の上限から下限までの範囲から選択される値、例えば平均値、を閾値として設定してもよい。また、例えば、陰性対照の複数個体で測定された分離データの値の分布において、陰性対照の所定の割合が非危険範囲に含まれるように閾値を決定してもよい。所定の割合とは、例えば、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、97%以上、または100%であってもよい。

40

【 0 0 7 1 】

陽性対照について測定された分離データの値と陰性対照について測定された分離データの値の両方に基づいて閾値を決定する場合には、例えば、陽性対照の所定の割合が危険範囲に含まれ、且つ、陰性対照の所定の割合が非危険範囲に含まれるように閾値を決定してもよい。陽性対照の内の危険範囲に含まれるものの割合、および、陰性対照の内の非危険

50

範囲に含まれるものの割合は、いずれも高い方が好ましい。これらの割合は、それぞれ、例えば、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、97%以上、または100%であってよい。これらの割合の両方を高くすることが難しい場合は、例えば、本発明の方法による判定結果の利用目的等の諸条件に応じて、いずれかの割合が優先的に高くなるように閾値を設定してもよい。例えば、偽陰性率を下げるためには、陽性対照の内の危険範囲に含まれるものの割合が優先的に高くなるように閾値を設定してよい。

【0072】

閾値の決定は、例えば、ソフトウェアを用いて実施してもよい。例えば、統計解析ソフトウェアを用い、陰性対照と陽性対照とを統計学的に最も適切に判別できるような閾値を決定してもよい。そのようなソフトウェアとしては、「R」等の統計解析ソフトウェアが挙げられる。

10

【0073】

また、対照被検者としては、標的被検者自体も挙げられる。すなわち、例えば、被検者における分離データの変動を指標として、被検者におけるリスクを判定してもよい。「分離データの値が高い」ことには、分離データの値が増大した場合が包含されてよい。「分離データの値が増大した」とは、具体的には、分離データの値が過去の値と比較して増大したことを意味してよい。また、「分離データの値が低い」ことには、分離データの値が低下した場合が包含されてよい。「分離データの値が低下した」とは、具体的には、分離データの値が過去の値と比較して低下したことを意味してよい。すなわち、閾値としては、過去の値も挙げられる。「過去の値」とは、標的被検者から過去の或る時点で得た抗体試料の分離データの値を意味する。過去の或る時点における標的被検者は、例えば、陽性対照であってもよく、陰性対照であってもよい。

20

【0074】

被検者における分離データの変動を指標とする場合、被検者におけるリスクの増減を判定してもよい。「リスクがある、または高い」ことには、リスクが増大した場合が包含されてよい。「リスクが増大した」とは、具体的には、リスクが過去の或る時点と比較して増大したことを意味してよい。また、「リスクがない、または低い」ことには、リスクが低下した場合が包含されてよい。「リスクが低下した」とは、具体的には、リスクが過去の或る時点と比較して低下したことを意味してよい。

【0075】

なお、「或る分離データを得てリスクの検出の指標とする」とは、当該分離データの値そのものを得てリスクの検出の指標とする場合に限られず、当該分離データの値を反映する他の値を得て検出の指標とすることも包含される。例えば、溶出ピークが第1～第4ピークからなる場合、「第1ピークのピーク面積%を得てリスクの検出の指標とする」とは、第1ピークのピーク面積%の値そのものを得てリスクの検出の指標とする場合に限られず、第2～第4ピークのピーク面積%の合計値等の、第1ピークのピーク面積%の値を反映する他の値を得て検出の指標とすることも包含される。いずれの場合にも、リスクの検出に用いられる測定値や閾値等の数値は、分離データの種類に応じて、適宜補正して用いられる。例えば、溶出ピークが第1～第4ピークからなる場合、第1ピークのピーク面積%の値をX、第2～第4ピークのピーク面積%の合計値をYとすると、「 $X = 100\% - Y$ 」の関係が成立する。よって、第1ピークのピーク面積%の値そのもの（すなわち、「X」）に代えて第2～第4ピークのピーク面積%の合計値（すなわち、「Y」）を検出の指標とする場合、「Xが或る基準を満たす（例えば、低いもしくは高い、または或る範囲にある）」とは、「Yの補正值（すなわち、「 $100\% - Y$ 」）が当該基準を満たす」と読み替えるものとする。

30

40

【0076】

リスクの検出結果は、被検者に対してリスクを低減するための処置（以下、「リスク軽減処置」ともいう）を実施するかを決定するための指標として用いてもよい。言い換えると、本発明の検出方法を実施することにより、被検者に対してリスク軽減処置を実施するかを決定するための指標が得られる。すなわち、例えば、本発明の検出方法により被検者

50

においてリスクがある、または高いと判定された場合に、被検者に対してリスク軽減処置を実施すると決定してよい。本発明の検出方法は、例えば、単独で、あるいは他の手段と組み合わせて、被検者に対してリスク軽減処置を実施するかを決定するための指標として用いてよい。例えば、本発明の検出方法により被検者においてリスクがある、または高いと判定された症状について、他の手段により確定診断を実施してから、被検者に対してリスク軽減処置を実施すると決定してもよい。リスク軽減処置は、医療行為であってもよく、非医療行為であってもよい。リスク軽減処置としては、上記例示したような疾患や加齢の予防や治療が挙げられる。すなわち、本発明は、例えば、疾患や加齢等の症状の予防または治療方法を提供してよい。予防または治療方法は、例えば、本発明の検出方法を実施する工程、および本発明の検出方法により被検者においてリスクがある、または高いと判定された場合に、被検者に対して予防または治療を実施する工程を含む、疾患や加齢等の症状の予防または治療方法であってよい。具体的には、本発明の検出方法により被検者においてリスクがある、または高いと判定された症状について予防または治療を実施してよい。予防または治療は、例えば、各症状についての一般的な手段（例えば、投薬や外科手術）により実施することができる。

10

【0077】

以下、具体例について記載する。

【0078】

本発明の方法により、例えば、被検者の抗体を特定の疾患や加齢等の症状についてのリスクに特徴的な糖鎖構造に基づいて分離して分離データを取得することができ、基準となる分離データとの比較することにより、簡便にそのようなリスクを検出することが可能となる。また、疾患に対する何らかの処置（投薬、手術等）の前及び／又は後において分離データを取得して、基準となる分離データと比較することにより、疾患の治療経過のモニタリングや当該処置に対する方針の決定が可能となる。基準となる分離データとしては、対照被検者の分離データが挙げられる。基準となる分離データとして、具体的には、同一被検者の別の時点（例えば、健常時や同一疾患を発症している時点）での分離データ、健常者の分離データ、同一疾患を発症している異なる患者の分離データ、前記処置に対して奏効性の違いが得られる2群もしくはそれ以上の群に分ける際の基準となる分離データが挙げられる。

20

【0079】

例えば、健常者（モデル）の分離データをモデル分離データとし、被験者の分離データをモデル分離データと比較することによって、何らかの疾病を有するリスクや疾病を発症するリスク等のリスクを評価することが可能となる。さらに、モデルと被験者の分離データの差の要因となるピークの画分を分取することで、健常者（モデル）と被験者との抗体の糖鎖パターンの差が抽出できる。また、患者本人のある時点での分離データをモデル分離データとし、同一患者の別の時点での分離データとモデル分離データとを比較することで、当該患者の疾患のモニタリングを行うこともできる。なお、2つの異なる検体群を比較する場合、統計的確率（P値）を用いて2つの異なる検体群から得られた前記分離データの差が有意な差であるかを評価することができる。P値が小さくなると、前記評価結果は有意になるといわれており、P値が有意水準未満の場合、前記評価結果は統計的に有意な差があるといえる。有意水準は一般的に5%である。

30

40

【0080】

特定の疾患に係る糖鎖構造の特徴として、シアル酸の付加の有無や、シアル酸の付加量の違い等が挙げられる。特に、リウマチ患者では、抗体に付加したシアル酸およびガラクトースの量が減少することが知られており、Fc結合性タンパク質との相互作用の違いにより、シアル酸やガラクトースの有無や含有量、および健常人との違いを簡便に評価することが可能である。さらに、本発明の方法によれば、個々の糖鎖構造を特定することなくFc結合性という機能に基づいた糖鎖構造の総体として抗体を分離することができる。すなわち、本発明の方法によれば、シアル酸およびガラクトースの結合量と疾患との既知の相関では解明されていない糖鎖構造全体としてのFc結合性という機能を基に分離デ

50

ータとして特徴を抽出できるため、精度高く疾患の有無や疾患の発症リスク等のリスクを評価することができる。

【0081】

I g Gに結合する糖鎖の種類が、抗体を産生するB細胞によって一部制御されており、非特許文献(Mol. Cell. Proteom., 10, M110, 004655 (2011))によれば、サイトカインにより糖鎖修飾が変化することが報告されているため、当該サイトカインの分泌をI g Gに結合する糖鎖のパターンに基づき評価することもできる。サイトカインは細胞から放出される物質であり、様々な疾患と関連性がある。例えば、老化に伴いIL-6やTNF- α といった炎症性サイトカインの分泌が増え、フレイル(虚弱)やサルコペニアといった運動や認知機能の低下に繋がることが知られており、本発明の方法によれば、これらの加齢関連疾患の発症リスクを評価することも可能となる。また、悪性腫瘍に関連して放出される炎症性サイトカインは、がん患者の体重減少といった衰弱状態(悪液質)の原因となるため、本発明の方法は、悪液質を評価する上でも有用な方法となる。

10

【0082】

本発明によるFc結合性タンパク質に対する抗体の親和性の強さは、当該抗体が結合した結合性物質に対する損傷もしくは貪食作用を持つナチュラルキラー細胞および単球、マクロファージ等の免疫細胞の活性に影響を与えるため、当該親和性の違いを検出することで、ナチュラルキラー細胞および単球、マクロファージによる損傷もしくは貪食作用に影響を受ける疾患の発症リスクを評価することが可能となる。当該疾患としては、がん、自己免疫疾患、感染症、アレルギー、炎症疾患が挙げられる。感染症としては、日和見感染症が挙げられる。日和見感染症とは健康な状態では感染症を起こさないような病原体が原因で発症する感染症である。病原体としては、ウイルス、細菌、真菌、原虫が挙げられる。また、ワクチン接種や罹患によって獲得した抗体の免疫細胞に対する活性化への効果も、Fc結合性タンパク質に対する抗体の親和性の強さから評価することが可能である。当該獲得した抗体の血液中の量を測定する他に、当該抗体のFc結合性タンパク質に対する親和性の強さを測定することで、感染症に対する発症のリスクを精度よく予測することもできる。

20

<2>抗体混合物

本発明は、特定の組成の抗体混合物を提供する。同混合物を、本発明の抗体混合物ともいう。本発明の抗体混合物は、例えば、本発明の抗体製造方法により製造できる。本発明の抗体混合物は、例えば、抗体を含有する溶出画分として製造できる。

30

【0083】

本発明の抗体混合物としては、2種またはそれ以上の抗体を含有する組成物であって、以下のIからIXのうち2つ以上(例えば、2、3、4、5、6、7、8、または9つ)の項目に該当するものが挙げられる：

I. G1Faを有する抗体の含有量をG0Fを有する抗体の含有量で割った値が重量比で0.4以下である；

II. G2Fを有する抗体の含有量をG0Fを有する抗体の含有量で割った値が重量比で0.2以下である；

40

III. G2F+2SAを有する抗体の含有量をG0Fを有する抗体の含有量で割った値が重量比で0.03以下である；

IV. G1Fbを有する抗体の含有量をG1Faを有する抗体の含有量で割った値が重量比で0.5以上である；

V. G2Fを有する抗体の含有量をG1Fbを有する抗体の含有量で割った値が重量比で0.6以下である；

VI. G2F+SAを有する抗体の含有量をG1Fbを有する抗体の含有量で割った値が重量比で0.3以下である；

VII. G2F+2SAを有する抗体の含有量をG1Fbを有する抗体の含有量で割った値が重量比で0.12以下である；

50

V I I I . 抗体の総含有量に対する G 2 + S A を有する抗体の含有量の比率が重量比で 0 . 2 % 以下である ;

I X . 抗体の総含有量に対する G 2 + 2 S A を有する抗体の含有量の比率が重量比で 0 . 2 % 以下である。

【 0 0 8 4 】

本発明の抗体混合物としては、2種またはそれ以上の抗体を含有する組成物であって、以下の I から I X のうち 2 つ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、または 9 つ）の項目に該当するものも挙げられる :

I . G 1 F a を有する抗体の含有量を G 0 F を有する抗体の含有量で割った値が重量比で 1 . 8 以上である ;

I I . G 2 F を有する抗体の含有量を G 0 F を有する抗体の含有量で割った値が重量比で 0 . 6 以上である ;

I I I . G 2 F + 2 S A を有する抗体の含有量を G 0 F を有する抗体の含有量で割った値が重量比で 0 . 0 6 以上である ;

I V . G 1 F b を有する抗体の含有量を G 1 F a を有する抗体の含有量で割った値が重量比で 0 . 3 以下である ;

V . G 2 F を有する抗体の含有量を G 1 F b を有する抗体の含有量で割った値が重量比で 3 . 0 以上である ;

V I . G 2 F + S A を有する抗体の含有量を G 1 F b を有する抗体の含有量で割った値が重量比で 0 . 6 以上である ;

V I I . G 2 F + 2 S A を有する抗体の含有量を G 1 F b を有する抗体の含有量で割った値が重量比で 0 . 3 以上である ;

V I I I . 抗体の総含有量に対する G 2 + S A を有する抗体の含有量の比率が重量比で 2 % 以上である ;

I X . 抗体の総含有量に対する G 2 + 2 S A を有する抗体の含有量の比率が重量比で 0 . 6 % 以上である。

【 0 0 8 5 】

上記項目における糖鎖構造の表記は、図 3 および図 4 に記載の通りである。

【 0 0 8 6 】

本発明の抗体混合物の用途は、特に制限されない。本発明の抗体混合物は、例えば、診断用途に利用できる。診断用途としては、被検者におけるリスク（すなわち、疾患の有無、疾患の発症リスク、疾患の進行度合い、及び / 又は加齢の進行度合い）の検出が挙げられる。すなわち、本発明の抗体混合物が被検者から得た抗体を本発明の分離方法等により分離して得られたものである場合、本発明の抗体混合物を得た際の抗体の分離パターンに係るデータを指標として、被検者におけるリスクを検出することができる。また、本発明の抗体混合物における糖鎖構造のパターンを指標として、被検者におけるリスクを検出してもよい。

【実施例】

【 0 0 8 7 】

以下、非限定的な実施例を参照して本発明をより具体的に説明する。

【 0 0 8 8 】

F c 結合性タンパク質固定化ゲルの調製

実施例 1 F c R 9 の V a l 1 7 6 アミノ酸置換体の作製

W O 2 0 1 5 / 1 9 9 1 5 4 号に記載の方法で作製した F c R 9（配列番号 2）に対し、F c 結合性タンパク質の 1 7 6 番目のバリン（配列番号 1 に記載のアミノ酸番号で 1 7 6 番目の V a l）をフェニルアラニンに置換した F c 結合性タンパク質を作製した。具体的には F c R 9 をコードするポリヌクレオチド（配列番号 3）を含むプラスミド p E T - F c R 9（W O 2 0 1 5 / 1 9 9 1 5 4 号）に対し、P C R を用いてアミノ酸の置換を行ない、F c R 9 のうち V a l 1 7 6 をフェニルアラニンに置換した F c 結合性タンパク質を作製した。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 9 】

なおFcR9（配列番号2）は、配列番号4に示す野生型FcRIII細胞外領域を含むFc結合性タンパク質において、43番目のValをGluに（配列番号1では27番目に相当）、45番目のPheをIleに（配列番号1では29番目に相当）、51番目のTyrをAsnに（配列番号1では35番目に相当）、64番目のGlnをArgに（配列番号1では48番目に相当）、91番目のPheをLeuに（配列番号1では75番目に相当）、108番目のAsnをSerに（配列番号1では92番目に相当）、133番目のValをGluに（配列番号1では117番目に相当）、137番目のGluをGlyに（配列番号1では121番目に相当）および187番目のPheをSerに（配列番号1では171番目に相当）アミノ酸置換したFc結合性タンパク質である。

10

【 0 0 9 0 】

以下、各Fc結合性タンパク質の作製方法を詳細に説明する。

(1) Fc結合性タンパク質の176番目のバリン（配列番号1に記載のアミノ酸番号で176番目のVal）をフェニルアラニンへ置換するため、WO2015/199154号に記載の方法で作製したFcR9（配列番号2）をコードするポリヌクレオチド（配列番号3）を含むプラスミドpET-FcR9（WO2015/199154号記載）を鋳型とし、配列番号5（5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'）および配列番号6（5'-CATTTTGTGCTGCCGAACAGCCACGGCAGG-3'）に記載の配列からなるオリゴプライマーを用い表1に示す組成と同様の反応液を調製後、当該反応液を95℃で2分間熱処理し、95℃で30秒間の第1ステップ、50℃で30秒間の第2ステップ、72℃で90秒間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で7分間熱処理することでPCRを行なった。得られたPCR産物をV176p1とした。

20

【 0 0 9 1 】

【表1】

表1

組成	容量
鋳型DNA	2 μL
10 μM Forward primer	1 μL
10 μM Reverse primer	1 μL
5×PrimeSTAR buffer(タカラバイオ製)	4 μL
2.5 mM dNTPs	2 μL
2.5 U/μL PrimeSTAR HS(タカラバイオ製)	0.5 μL
H ₂ O	up to 20 μL

30

40

【 0 0 9 2 】

(2) WO2015/199154号に記載の方法で作製したFcR9（配列番号2）をコードするポリヌクレオチド（配列番号3）を含むプラスミドpET-FcR9（WO2015/199154号記載）を鋳型とし、配列番号7（5'-TATGCTAGTTAT TGCTCAG-3'）および配列番号8（5'-cctgccgtgggctgtTCGGCAGCAAAATG-3'）に記載の配列からなるオリゴプライマーを用い表1に示す組成と同様の反応液を調製後、当該反応液を95℃で2分間熱処理し、95℃で30秒間の第1ステップ、50℃で30秒間の第2ステップ、72℃で90秒間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行ない、最後に72℃で7分間熱処理することで

50

PCRを行なった。得られたPCR産物をV176p2とした。

(3)(1)および(2)で得られた2種類のPCR産物(V176p1、V176p2)を混合し、表2に示す組成の反応液を調製した。当該反応液を98℃で5分間熱処理後、98℃で10秒間の第1ステップ、55℃で5秒間の第2ステップ、72℃で1分間の第3ステップを1サイクルとする反応を5サイクル行なうPCRを行ない、V176p1とV176p2を連結したPCR産物V176pを得た。

【0093】

【表2】

表2

組成	容量
PCR産物	各2 μL
2.5 U/μL PrimeSTAR HS(タカラバイオ製)	0.5 μL
5×PrimeSTAR buffer(タカラバイオ製)	4 μL
2.5 mM dNTPs	2 μL
H ₂ O	up to 20 μL

【0094】

(4)(3)で得られたPCR産物V176pを鋳型とし、配列番号5および7に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとしてPCRを行なった。PCRは、表3に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を98℃で5分間熱処理し、98℃で10秒間の第1ステップ、55℃で5秒間の第2ステップ、72℃で1分間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル行なった。これによりFc結合性タンパク質(FcR9)の176番目のアミノ酸がフェニルアラニンに置換されたFc結合性タンパク質をコードするポリヌクレオチドを得た。得られたポリヌクレオチドをV176p3とした。

【0095】

【表3】

表3

組成	容量
PCR産物	2 μL
10 μM Forward primer	2 μL
10 μM Reverse primer	2 μL
5×PrimeSTAR buffer(タカラバイオ製)	10 μL
2.5 mM dNTPs	4 μL
2.5 U/μL PrimeSTAR HS(タカラバイオ製)	1 μL
H ₂ O	up to 50 μL

【0096】

(5)(4)で得られたポリヌクレオチドを精製後、制限酵素NcoIとHindIIIで消化し、あらかじめ制限酵素NcoIとHindIIIで消化した発現ベクターpET

Male (特開2011-206046号公報)にライゲーションし、これを用いて大腸菌BL21(DE3)株(ニッポンジーン製)を形質転換した。

(6)得られた形質転換体を50 μ g/mLのカナマイシンを添加したLB培地で培養した。回収した菌体(形質転換体)からプラスミドを抽出した。

(7)得られたプラスミドのヒトFcRIIIaをコードするポリヌクレオチドおよびその周辺の領域について、チェーンターミネータ法に基づくBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(ライフテクノロジーズ製)を用いてサイクルシーケンス反応に供し、全自動DNAシーケンサーApplied Biosystems 3130 Genetic Analyzer(ライフテクノロジーズ製)にてヌクレオチド配列を解析した。なお当該解析の際、配列番号5(5'-TAAACGACTCACTATAGGG-3')または配列番号7(5'-TATGCTAGTTATTGCTCAG-3')に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをシーケンス用プライマーとして使用した。配列解析の結果、Fc結合性タンパク質FcR9のVal176がPheに置換されたFc結合性タンパク質(配列番号9)を発現する形質転換体を得た。

【0097】

実施例2 システインタグを付加したFc結合性タンパク質(FcR9__F__Cys)の作製

(1)実施例1で作製した配列番号9に記載のアミノ酸配列をコードする配列番号10に記載のポリヌクレオチドを含んだ発現ベクターpET-FcR9__Fを鋳型としてPCRを実施した。当該PCRにおけるプライマーは、配列番号11(5'-TAGCCATGGGCATGCGTACCGAAGATCTGCCGAAAGC-3')および配列番号12(5'-CCCAAGCTTATCCGCAGGTATCGTTGCGGCACCCCTTG GGTAAATGGTAAATATTCACGGTCTCGCTGC-3')に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドを用いた。PCRは、表3に示す組成の反応液を調製後、当該反応液を98 $^{\circ}$ Cで5分熱処理し、98 $^{\circ}$ Cで10秒間の第1ステップ、55 $^{\circ}$ Cで5秒間の第2ステップ、72 $^{\circ}$ Cで1分間の第3ステップを1サイクルとする反応を30サイクル繰り返すことで実施した。

(2)(1)で得られたポリヌクレオチドを精製し、制限酵素NcoIとHindIIIで消化後、あらかじめ制限酵素NcoIとHindIIIで消化したWO2015/199154号に記載の方法で作製の発現ベクターpTrc-PelBV3にライゲーションし、当該ライゲーション産物を用いて大腸菌W3110株を形質転換した。

(3)得られた形質転換体を100 μ g/mLのカルベニシリンを含むLB培地にて培養後、QIAprep Spin Miniprep kit(キアゲン製)を用いて、発現ベクターpTrc-FcR9__F__Cysを得た。

(4)pTrc-FcR9__F__Cysのヌクレオチド配列の解析を、配列番号13(5'-TGTGGTATGGCTGTGCAGG-3')または配列番号14(5'-TCGGCATGGGGTCAAGGTG-3')に記載の配列からなるオリゴヌクレオチドをシーケンス用プライマーに使用した以外は、実施例1(7)と同様の方法で行なった。発現ベクターpTrc-FcR9__F__Cysで発現されるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号15に、当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの配列を配列番号16にそれぞれ示す。なお配列番号15において、1番目のメチオニン(Met)から22番目のアラニン(Ala)までが改良PelBシグナルペプチドであり、24番目のグリシン(Gly)から199番目のグルタミン(Gln)までがFc結合性タンパク質のアミノ酸配列(配列番号1の17番目から192番目までの領域に相当)、200番目のグリシン(Gly)から207番目のグリシン(Gly)までがシステインタグ配列である。

【0098】

実施例3 FcR9__F__Cysの調製

(1)実施例2で作製したFcR9__F__Cysを発現する形質転換体を2Lのバッフルフラスコに入った100 μ g/mLのカルベニシリンを含む400mLの2YT液体培地

(ペプトン 16 g / L、酵母エキス 10 g / L、塩化ナトリウム 5 g / L) に接種し、37 で一晩、好氣的に振とう培養することで前培養を行なった。

(2) グルコース 10 g / L、酵母エキス 20 g / L、リン酸三ナトリウム十二水和物 3 g / L、リン酸水素二ナトリウム十二水和物 9 g / L、塩化アンモニウム 1 g / L およびカルベニシリン 100 mg / L を含む液体培地 1.8 L に、(1) の培養液 180 mL を接種し、3 L 発酵槽 (バイオット製) を用いて本培養を行なった。温度 30、pH 6.9 から 7.1、通気量 1 VVM、溶存酸素濃度 30% 飽和濃度の条件に設定し、本培養を開始した。pH の制御には酸として 50% リン酸、アルカリとして 14% アンモニア水をそれぞれ使用し、溶存酸素の制御は攪拌速度を変化させることで制御し、攪拌回転数は下限 500 rpm、上限 1000 rpm に設定した。培養開始後、グルコース濃度が測定できなくなった時点で、流加培地 (グルコース 248.9 g / L、酵母エキス 83.3 g / L、硫酸マグネシウム七水和物 7.2 g / L) を溶存酸素 (DO) により制御しながら加えた。

10

(3) 菌体量の目安として 600 nm の吸光度 (OD 600 nm) が約 150 に達したところで培養温度を 25 に下げ、設定温度に到達したことを確認した後、終濃度が 0.5 mM になるよう IPTG を添加し、引き続き 25 で培養を継続した。

(4) 培養開始から約 48 時間後に培養を停止し、培養液を 4 で 8000 rpm、20 分間の遠心分離により菌体を回収した。

(5) 回収した菌体を 20 mM のトリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) に 5 mL / 1 g (菌体) となるように懸濁し、超音波発生装置 (インソネーター 201 M (商品名)、久保田商事製) を用いて、4 で約 10 分間、約 150 W の出力で菌体を破碎した。菌体破碎液は 4 で 20 分間、8000 rpm の遠心分離を 2 回行ない、上清を回収した。

20

(6) (5) で得られた上清を、あらかじめ 20 mM のリン酸緩衝液 (8 mM リン酸二水素ナトリウム、12 mM リン酸水素二ナトリウム) (pH 7.0) で平衡化した 140 mL の TOYOPEARL CM-650M (東ソー製) を充填した VL32 x 250 カラム (メルクミリポア製) に流速 5 mL / 分でアプライした。平衡化に用いた緩衝液で洗浄後、0.5 M の塩化ナトリウムを含む 20 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0) で溶出した。

(7) (6) で得られた溶出液を、あらかじめ 150 mM の塩化ナトリウムを含む 20 mM のトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化した IgG セファロース (GEヘルスケア製) 90 mL を充填した XK26 / 20 カラム (GEヘルスケア製) にアプライした。平衡化に用いた緩衝液で洗浄後、0.1 M のグリシン塩酸緩衝液 (pH 3.0) で溶出した。なお溶出液は、溶出液量の 1 / 4 量の 1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加えることで pH を中性付近に戻した。

30

【0099】

前記精製により、高純度の FcR9__F__Cys を約 20 mg 得た。

実施例 4 Fc 結合性タンパク質 (FcR9__F) 固定化ゲルの作製と抗体の分離

(1) 2 mL の分離剤用親水性ビニルポリマー (東ソー製: 液体クロマトグラフィー用充填剤) の表面の水酸基をヨードアセチル基で活性化後、実施例 3 で調製した FcR9__F__Cys を 4 mg 反応させることにより、FcR9__F 固定化ゲルを得た。

(2) (1) で作製した FcR9__F 固定化ゲル 1.2 mL を 4.6 mm x 75 mm のステンレスカラムに充填して FcR9__F カラムを作製した。

40

(3) (2) で作製した FcR9__F カラムを高速液体クロマトグラフィー装置 (東ソー製) に接続し、50 mM の塩化ナトリウムを含む 20 mM の酢酸緩衝液 (pH 5.5) の平衡化緩衝液で平衡化した。

(4) PBS (Phosphate Buffered Saline) (pH 7.4) で 1.0 mg / mL に希釈したモノクローナル抗体 (リツキサン、全薬工業製、マウスとヒトのキメラ抗体) を流速 0.6 mL / min にて 5 µL 添加した。

(5) 流速 0.6 mL / min のまま平衡化緩衝液で 2 分洗浄後、10 mM のグリシン塩酸緩衝液 (pH 3.0) による pH グラジエント (28 分で 10 mM のグリシン塩酸緩衝液 (pH 3.0) が 100% となるグラジエント) で吸着したモノクローナル抗体を溶出

50

した。

【0100】

結果（溶出パターン）を図1に示す。モノクローナル抗体はFc結合性タンパク質と相互作用するため、ゲルろ過クロマトグラフィーのような単一のピークではなく、複数のピークに分離された。溶出時間の早い1番目のピークをピークAとし、溶出時間の遅い3番目のピークをピークBとした。

【0101】

実施例5 Fc結合性タンパク質（FcR9__F）固定化ゲルを用いたヒト由来抗体の分離

抗体として、ヒト由来ガンマグロブリン製剤（化学及血清療法研究所製）を用いた以外は実施例4と同様に実施し、ヒト由来ガンマグロブリン製剤の分離パターンを図2に示した。実施例4のモノクローナル抗体（リツキサン）の分離結果（図1）とは異なる分離パターンを得た。

【0102】

また、ヒト由来抗体に特徴的な分離ピークである、図2におけるピークCおよびピークDを繰返し分取することで、各分画に含まれるヒト由来抗体を分取した。

【0103】

実施例6 モノクローナル抗体の糖鎖構造解析

実施例4で分離したピークA、およびピークB画分に含まれる抗体が有する糖鎖の構造解析を、特開2016-169197号記載の方法と同様な方法で実施した。結果を図3および表4に示した。Manはマンノースを表し、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、Galはガラクトース、Fucはフコース、NeuAcはN-アセチルノイラミン酸を表す。

【0104】

【表4】

表4

図3における略号	ピークA (組成割合%)	ピークB (組成割合%)
Man5	1.2	Not Detect
G0	5.9	3.0
G0F	64.2	16.4
G1Fa	15.4	57.6
G1Fb	9.9	3.6
G2F	1.7	12.7
G1F+SA	0.2	0.9
G2F+SA	0.3	2.9
G2F+2SA	Not Detect	1.6

【0105】

実施例7 ヒト由来抗体の糖鎖構造解析

実施例5で分取したピークCおよびピークDの画分に含まれる抗体が有する糖鎖の構造解析を実施例6と同様に実施し、ピークCおよびピークDの画分に含まれる抗体の有する糖鎖構造解析の結果を図4および表5に示した。

【 0 1 0 6 】

【表 5】

表 5

図 4 における 略号	ピークC (組成割合%)	ピークD (組成割合%)
G0	0.4	0.6
G0F	48.4	8.1
G1/G0F+GN	8.2	3.6
G1Fa	9.9	17.5
G1Fb	12.7	3.6
G1F+GN	2.1	4.1
G2	Not Detect	2.9
G2F	5.8	18.1
G1F+SA	1.2	1.9
G2F+SA	2.6	23.6
G2F+2SA	1.2	3.2
G2F+GN	0.9	1.8
S1	0.8	Not Detect
S2	2.5	2.3
S3	1.5	2.4
G2+SA	Not Detect	3.2
G2+2SA	Not Detect	0.8

【 0 1 0 7 】

実施例 6 および実施例 7 の結果から、Fc 結合性タンパク質を固定化したゲルを充填した FcR カラムを用いることで、ガラクトースの有無が抗体の分離に寄与していること（表 3 の G0F に関するピーク A と B の組成割合の比較、同様に G1F および G2F の比較。略号 G と F の間の数字はガラクトースの数を表す）、また同様にシアル酸の有無で抗体を分離していることが明らかとなった。さらに、図 3 と図 4 の比較から、ヒト由来ガンマグロブリンは、市販抗体医薬品であるマウスキメラ抗体のリツキサンとは異なり、ヒト特有の糖鎖構造を持つことが明らかとなった。これらのヒト特有糖鎖構造のなかでも、シアル酸の付加した糖鎖構造を持つ抗体は、特定の疾患の指標と成り得ることから、本発明の方法を利用することで、疾患の簡便な測定や、健常人との比較による異常の早期発見、罹患患者の予後管理等が可能となる。

【 0 1 0 8 】

実施例 8 Fc 結合性タンパク質 (FcR9_{__}F) 固定化ゲルを用いた年齢の異なるヒト由来抗体の分離
 (1) インフォームドコンセントを得た健常者から血液を採取した。健常者の年齢および性別を以下に示す。
 (A 検体) 36 歳、女性

(B 検体) 4 4 歳、女性

(C 検体) 5 5 歳、女性

(2) (1) で採取した血液を遠心することで得た血清を、Protein G が固相上に固定化されたガンマグロブリン G 精製キット (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いて、ガンマグロブリンを精製した。

(3) (2) で得られたガンマグロブリンを用いて、溶出条件として、流速 0 . 6 mL / min のまま平衡化緩衝液で 5 分洗浄後、10 mM のグリシン塩酸緩衝液 (pH 3 . 0) による pH グラジエント (30 分で 10 mM のグリシン塩酸緩衝液 (pH 3 . 0) が 100 % となるグラジエント) で吸着したガンマグロブリンを溶出した他は、実施例 4 と同様の方法でガンマグロブリンの分離パターンを得た。

(4) (3) で得られた分離パターンを、pH グラジエントをかけ始めてから溶出時間の早いピーク順に、第 1 ピーク、第 2 ピーク、第 3 ピーク、第 4 ピークと定義し、当該第 3 ピークの検出値を 1 として正規化した。

【 0 1 0 9 】

実施例 8 の結果を図 5 に示す。A 検体と比較して、B 検体および C 検体の順に年齢が増加するに従って、早く溶出されるガンマグロブリンの割合が増えていることがわかる。特に A 検体および B 検体と比較して C 検体では第 1 ピークおよび第 2 ピークのピーク面積 % が増大していることがわかる。溶出時間の長いガンマグロブリンの割合が多いということは、当該ガンマグロブリンのナチュラルキラー細胞および単球、マクロファージに対する結合能が高いことを意味しており、当該細胞の活性化を促進できる。一方、溶出時間の短いガンマグロブリンの割合が多い場合は、前記細胞の活性化が十分得られず、前記細胞の活性に影響を受ける疾患の発症リスクが高まる。このような疾患としては、例えばウイルスや細菌等による感染症やがん、アレルギー、炎症疾患等が挙げられる。実施例 8 のガンマグロブリンの分離パターンの変動から、当該発症リスクは年齢の増加により高まること

【 0 1 1 0 】

実施例 9 Fc 結合性タンパク質固定化ゲルを用いた年齢の異なるヒト由来抗体の分離 (1) インフォームドコンセントを得た健常者から血液を採取した。健常者の年齢層および検体数を以下に示す。

1 8 - 2 9 歳 : 2 3 検体

3 0 - 3 9 歳 : 2 1 検体

4 0 - 4 9 歳 : 2 1 検体

5 0 - 5 9 歳 : 2 4 検体

6 0 - 7 5 歳 : 1 5 検体

(2) (1) で採取した血液を遠心することで得た血清を PBS で 10 倍希釈した後、0 . 2 μ m 径のフィルター (Merck Millipore 社製) に通すことで測定サンプルを調製した。

(3) (2) で得られた測定サンプルを流速 0 . 6 mL / min にて 10 μ L 添加した他は、実施例 8 (3) と同様な方法でガンマグロブリンの分離パターンを得た。

(4) (3) で得られた分離パターンを、pH グラジエントをかけ始めてから溶出時間の早いピーク順に、第 1 ピーク、第 2 ピーク、第 3 ピーク、第 4 ピークと定義し、当該第 1 ピークの面積値を pH グラジエントをかけ始めてからかけ終わるまでの全体の面積値で除することで得た値を第 1 ピーク面積 % とした。

【 0 1 1 1 】

実施例 9 の結果を図 6 に示す。50 歳未満の検体と比較して、50 歳代の検体および 60 歳以上の検体の順に年齢が増加するに従って、第 1 ピーク面積 % の値が有意に上がったことから、早く溶出されるガンマグロブリンの割合が増えていくことがわかる。また、50 歳未満の検体においても、第 1 ピーク面積 % の値が高い検体も低い割合ながら存在することもわかる。この結果は、集団として評価した場合、加齢に従って免疫活性が低下することを意味しており、また個々人として評価した場合、若年層においても免疫活性が低下

し得ることを示している。

【0112】

実施例10 がん患者由来のガンマグロブリン分離

インフォームドコンセントを得た健常者および膵がん、胃がん、乳がん患者から採取した血液を用いた他は、実施例9と同様な方法でガンマグロブリンを分離し、第1ピーク面積%を求めた。

【0113】

実施例11 自己免疫疾患患者由来のガンマグロブリン分離

インフォームドコンセントを得たりウマチ、シェーグレン症候群患者から採取した血液を用いた他は、実施例9と同様な方法でガンマグロブリンを分離し、第1ピーク面積%を求めた。

10

【0114】

実施例10、11の結果をそれぞれ図7、8に示す。健常者の検体と比較して、膵がん(図7のパネルa)、胃がん(図7のパネルb)、乳がん(図7のパネルc)、リウマチ(図8のパネルa)、シェーグレン症候群(図8のパネルb)の患者では第1ピーク面積%の値が有意に上がった。またがん疾患においては病期によっても第1ピーク面積%の値が上がるのがわかった。なお前記病期とは、国際対がん連合(UICC)により定められた病期分類によるものである。この結果は、がん疾患および自己免疫疾患患者ではFc結合性タンパク質に關与する免疫活性が低下していることを意味しており、特にがん疾患において第1ピーク面積%が顕著に上がっていることから免疫活性が大きく低下していることがわかる。がん疾患もしくは自己免疫疾患において、前記免疫活性の低下が発症する要因であるか、もしくは発症により前記免疫活性が低下したと考えられる。健常者と検体の第1ピーク面積%の値が疾患検体との間で異なることから、疾患の診断に用いることが可能であり、またがん疾患において病期によっても第1ピーク面積%の値が変化することから、がんの進行性や悪性度の評価に用いることもできる。

20

【0115】

実施例12 年齢で補正したがん患者由来のガンマグロブリン分離評価

(1) インフォームドコンセントを得た腎がん、大腸がん患者から採取した血液を用いた他は、実施例9と同様な方法でガンマグロブリンを分離し、第1ピーク面積%を求めた。

(2) 実施例9の健常者検体の測定で得た第1ピーク面積%と年齢との相関曲線を多項式近似により求め、検体の各年齢を当該相関曲線の当該式に導入することにより導かれる値を補正值として算出した。

30

(3) (2)より算出した値を、実施例9の健常者、実施例10の膵がん、および(1)により求めた第1ピーク面積%から減ずることで、補正第1ピーク面積%を求めた。

【0116】

実施例12の結果を図9に示す。加齢に伴い増加する第1ピーク面積%を補正することで得た補正第1ピーク面積%を基に健常者の検体と、膵がん、腎がん、大腸がんとを比較すると、健常者と比較して有意に補正第1ピーク面積%が増加した。補正を行っていない第1ピーク面積%を基に健常者の検体と、膵がんとを比較した実施例10で見られた第1ピーク面積%の有意な増加と同様に、補正第1ピーク面積%でも増加が確認されたことから、年齢を加味した補正を行っても健常者とがん患者でIgG分離パターンの違いが確認できることがわかる。

40

【0117】

実施例13 膵がんおよび膵炎患者由来のガンマグロブリン分離評価

(1) インフォームドコンセントを得た膵がん、膵炎患者から採取した血液を用いた他は、実施例9(2)および(3)と同様な方法でガンマグロブリンを分離した。

(2) (1)で得られた分離パターンを、pHグラジエントをかけた後から溶出時間の早いピーク順に、第1ピーク、第2ピーク、第3ピークと定義し、当該第1ピークの面積値をpHグラジエントをかけた後からかけ終わるまでの全体の面積値で除することで得た値を第1ピーク面積%とし、実施例12(2)および(3)と同様な方法で補正第1ピ

50

ーク面積%を求め、さらに第3ピークの面積も求めた。

【0118】

実施例13の結果を図10に示す。図10のパネル(a)では膵がん患者検体と比較して、膵炎の患者では補正第1ピーク面積%の値が有意に低下した。また、実施例12の健常者検体と比較すると、膵炎患者の補正第1ピーク面積%はほぼ同じ値となり、健常者が膵炎になるだけでは補正第1ピーク面積%の値は変化しないことがわかる。補正第1ピーク面積%で膵がん膵炎の識別性をROC曲線によるAUCの値で評価すると0.83となった。一方、図10のパネル(b)では第3ピーク面積で比較すると、膵がん患者検体と比較して、膵炎の患者では値が有意に増加した。第3ピーク面積で膵がん膵炎の識別性をROC曲線によるAUCの値で評価すると1.00となり、補正第1ピーク面積%による評価より膵臓の病変を識別する際に悪性腫瘍であるか否かを精度よく見分けることが可能である。

10

実施例14 喫煙・非喫煙健常者由来のガンマグロブリン分離評価

インフォームドコンセントを得た喫煙および非喫煙の健常者から採取した血液を用いた他は、実施例12と同様な方法でガンマグロブリンを分離し、補正第1ピーク面積%を求めた。

【0119】

実施例14の結果を図11に示す。非喫煙の健常者と比較して、喫煙している健常者では補正第1ピーク面積%の値が有意に増加した。補正第1ピーク面積%の値の増加は、実施例12からがん患者から検出される傾向と同一であり、喫煙することでがんへの罹患リスクを高めていることがわかる。

20

実施例15 異なるFc結合性タンパク質(FcR9__FもしくはFcR9__V)固定化ゲル用いた年齢の異なるヒト由来抗体の分離

(1) 発現されるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号17に、当該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの配列を配列番号18にそれぞれ示す発現ベクターを用いた他は、実施例3と同様な方法を用いてシステインタグを付加したFc結合性タンパク質(FcR9__V__Cys)を調製した。

(2) (1)で調製したFc結合性タンパク質を用いた他は、実施例4(1)から(2)と同様な方法で、FcR9__Vカラムを作製した。

(3) インフォームドコンセントを得た健常者から血液を採取した。健常者の年齢および性別を以下に示す。

30

(健常者A) 21歳、男性

(健常者B) 26歳、男性

(健常者C) 36歳、男性

(健常者D) 47歳、男性

(4) カラムとしてFcR9__FカラムまたはFcR9__Vカラムを用いた他は、実施例8(2)および(3)と同様な方法でガンマグロブリンの分離パターンを得た。

(5) (4)で得られた分離パターンを、pHグラジエントをかけ始めてから溶出時間の早いピーク順に、第1ピーク、第2ピーク、第3ピークと定義し、当該第1ピークの面積値をpHグラジエントをかけ始めてからかけ終わるまでの全体の面積値で除することで得た値を第1ピーク面積%とした。さらに、当該第1ピークの高さを各ピークの高さの合計値で除することで得た値を第1ピーク高さ%とした。

40

【0120】

実施例15の結果を図12に示す。図12のパネル(a)では、FcR9__FカラムまたはFcR9__Vカラムで測定した健常者検体の測定値を示す図である。当該図から、加齢に伴い第1ピーク高さ%の値が増加していくことがわかり、さらにアミノ酸配列の異なる2種のFc結合性タンパク質を固定化した不溶性担体を充填したカラムを用いても、加齢に伴い第1ピーク高さ%が増加していく同一の傾向が得られた。この結果は、限定されたアミノ酸配列でなくともFc結合性タンパク質であれば、疾患、疾患の発症リスク及び/又は疾患の進行度合い、加齢の進行度合いを検出することが可能であることがわかる。

50

さらに、図 12 のパネル (b) では、FcR9__V カラムで測定した健常者検体の測定値として、第 1 ピーク面積%と第 1 ピーク高さ%をそれぞれ示す。当該面積%および当該高さ%をそれぞれ比較すると、どちらも加齢に伴い値が増加しており、どちらの値を用いても正確に評価可能であることがわかる。

【産業上の利用可能性】

【 0 1 2 1 】

本発明によれば、糖鎖構造の違いに基づき抗体を分離できる。また、本発明の一態様によれば、抗体の分離パターンの特徴を指標として、被検者における疾患の有無、疾患の発症リスク、疾患の進行度合い、及び/又は加齢の進行度合いを検出できる。

10

20

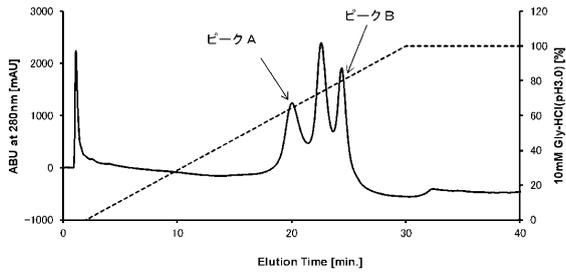
30

40

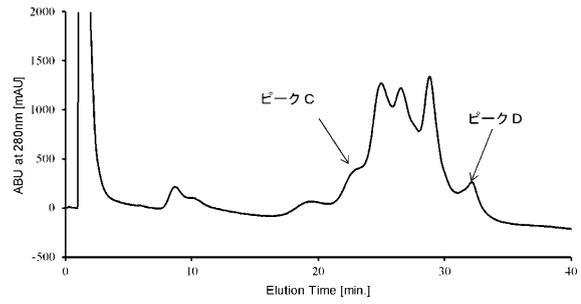
50

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

【図 3】

略号	糖鎖構造
Man5	
G0	
G0F	
G1Fa	
G1Fb	
G2F	
G1F+ SA	
G2F+ SA	

【図 4】

略号	糖鎖構造	略号	糖鎖構造
G0		G11+ SA	
G0F		G21+ SA	
G1		G21+ 2SA	
G0F+ GN		G21+ GN	
G1Fa		S1	
G1Fb		S2	
G1F+ GN		S3	
G2		G2+ SA	
G2F		G2+ 2SA	

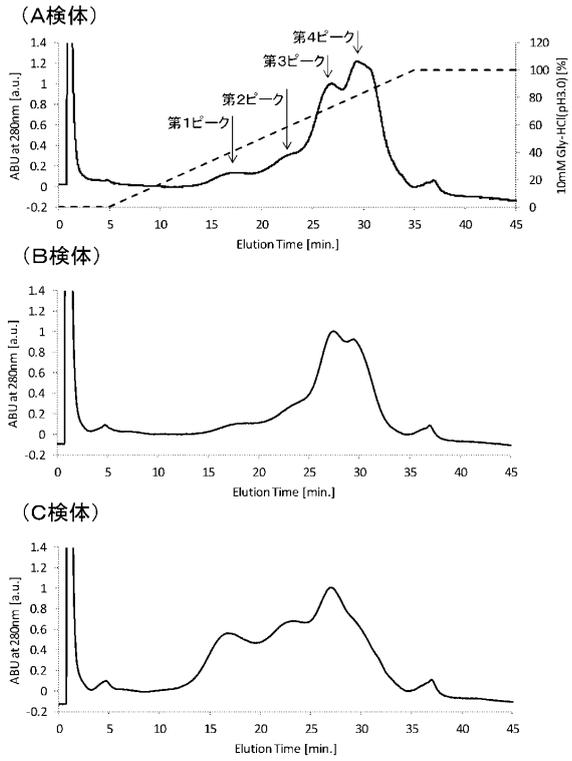
20

30

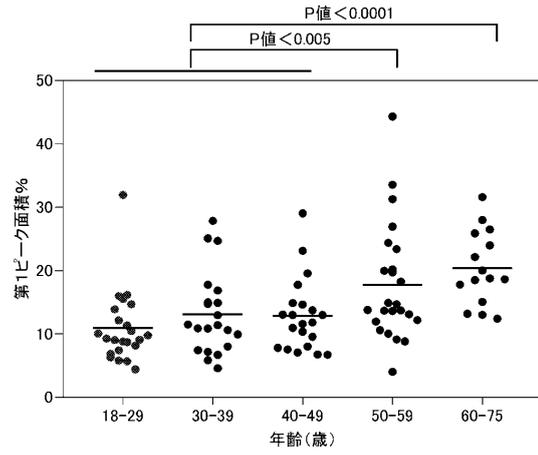
40

50

【図5】



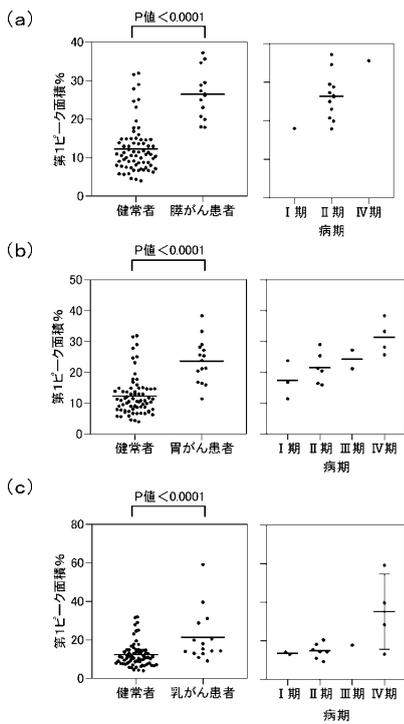
【図6】



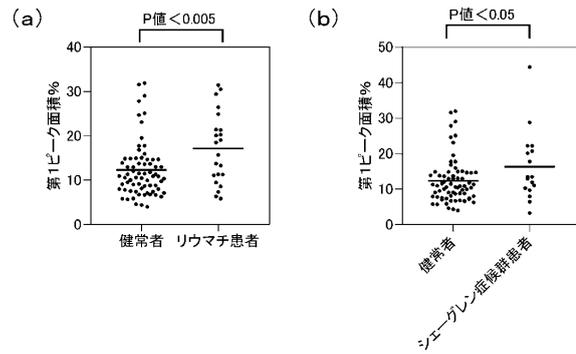
10

20

【図7】



【図8】

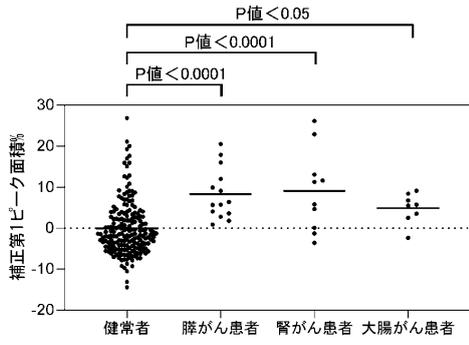


30

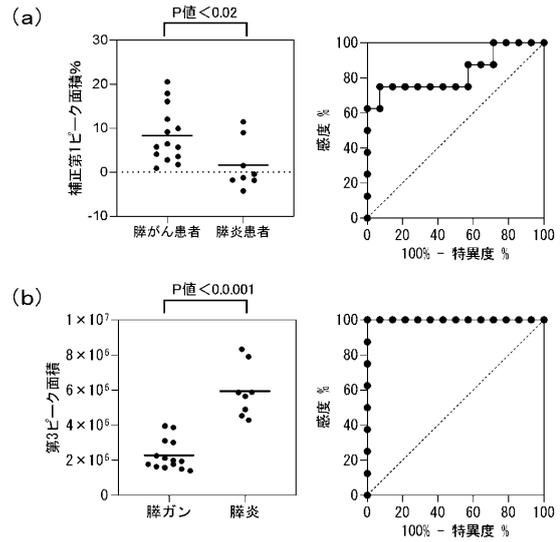
40

50

【図 9】

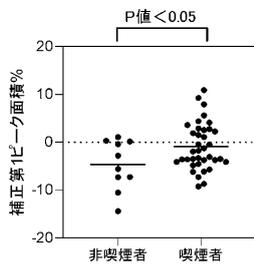


【図 10】

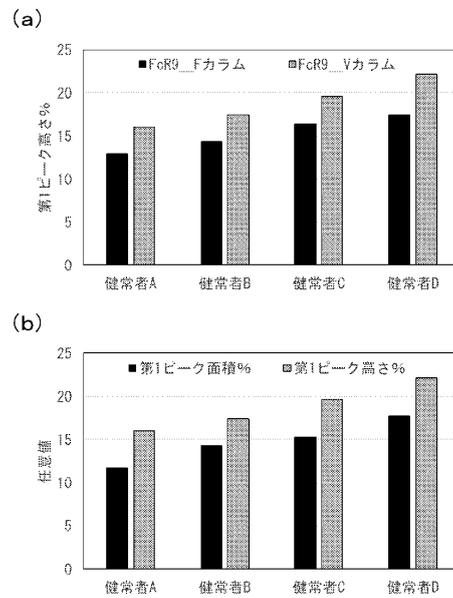


10

【図 11】



【図 12】



20

30

40

50

【配列表】

0007469584000001.app

10

20

30

40

50

