

明 細 書

発明の名称：複合型糖アスパラギン及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は複合型糖アスパラギン及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 糖鎖は、単糖が連結した生体高分子であって、その構造は基本結合単位となる単糖が複数の結合点を有するため多岐に渡る。

生体内における糖鎖は、タンパク質中や細胞表面に存在して、タンパク質や細胞の認識、情報伝達に関与している。

[0003] このような特徴を有する糖鎖は医療分野に利用されている。例えば、抗体医薬品の有効成分である抗体は、通常、糖鎖構造を有している。均一な糖鎖を有する抗体の利用が、抗体医薬品の副作用の抑制、薬効の向上及び血中半減期の延長といった抗体医薬品の品質や機能向上に繋がると期待されている。

[0004] また、糖鎖構造の異常が、種々の疾患と関連することが知られており、疾患のメカニズム解明に糖鎖の利用が試みられている。さらに、疾患のメカニズムの解明とともに、診断薬への糖鎖の応用も試みられている。

[0005] 多岐にわたる構造を有する糖鎖の中でも、バイセクティングGlcNAc構造やコアフコース構造を有する糖鎖は、がん等の疾患と関連することが知られている。そのため、バイセクティングGlcNAc構造及び／又はコアフコース構造を有する糖鎖を生体から抽出してそれらの構造を同定したり、化学合成により製造したりする試みがなされている。

[0006] 非特許文献1には、ニワトリ由来の血清IgGにおける糖部分の構造を解析したことが開示されている。非特許文献1では、糖部分の構造の解析のために、2-アミノピリジン(PA)で還元末端のN-アセチルグルコサミンの1位を還元的アミノ化反応により誘導化した化合物が用いられている。

[0007] 非特許文献2～3には、糖鎖へバイセクティングGlcNAc構造を導入

するための化学合成法が開示されている。

非特許文献4には、糖鎖へバイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造を導入するための化学合成法が開示されている。

非特許文献5には、酵素化学合成によりバイセクティングGlcNAc型糖鎖にGalを導入する合成法が開示されている。

先行技術文献

非特許文献

[0008] 非特許文献1: Glycobiology (2004) vol 14, pp275-292

非特許文献2: Chem. Asian J. (2018) vol 13, pp1544-1551

非特許文献3: Angew. Chem. Int. Ed. (2016) vol 55, pp10487-10492

非特許文献4: Angew. Chem. Int. Ed. (2018) vol 57, pp14543-14549

非特許文献5: ChemBioChem (2020) vol 21, pp3212-3215

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] しかしながら、非特許文献1～5には、バイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造とを有する複合型糖アスパラギンを化学合成したり、バイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造とを有する複合型糖アスパラギンを単離したりすることは開示されていない。

本願が解決しようとする課題は、バイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造とを有する新規の複合型糖アスパラギン及びその製造方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0010] 本願発明者らが鋭意検討した結果、バイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造とを有する新規の複合型糖アスパラギン及びその製造方法を見出し、本発明を完成した。

[0011] すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1]

鳥類抗体に由来する複合型糖アスパラギンであって、

バイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造とを有する、複合型糖アスパラギン（ここでAsn残基が保護されていてもよい。）。

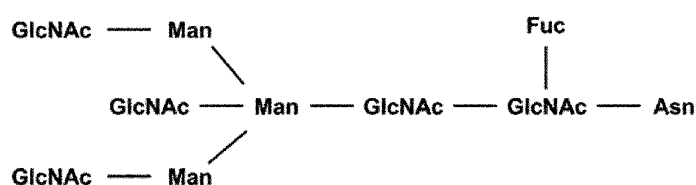
[2]

複合型糖アスパラギンの糖鎖が9～13糖のいずれかで構成される、[1]に記載の複合型糖アスパラギン（ここでAsn残基が保護されていてもよい。）。

[3]

下記構造を有する、[1]又は[2]に記載の複合型糖アスパラギン（ここでAsn残基が保護されていてもよい。）。

[化1]



[4]

GlcNAc—Man—ManのGlcNAcの一方又は双方に、Gal又はNeu5Ac—Galが結合している、[3]に記載の複合型糖アスパラギン（ここでAsn残基が保護されていてもよい。）。

[5]

鳥類抗体に由来する複合型糖アスパラギンを含有する混合物を準備する工程、及び

当該混合物を陰イオン交換樹脂に通して、複合型糖アスパラギンを精製する工程、を含み、

精製工程において、複合型糖アスパラギンがシアル酸の数ごとに分離される、

複合型糖アスパラギンを製造する方法。

[6]

混合物の準備工程が、

鳥類抗体を変性する工程、及び
変性した鳥類抗体をタンパク質分解酵素で分解する工程、を含む、〔５〕
に記載の方法。

〔７〕

鳥類抗体の変性工程において、鳥類抗体を熱又は有機溶媒により変性する
、〔６〕に記載の方法。

発明の効果

〔００１２〕 本発明によれば、バイセクティングＧＩｃＮＡｃ構造とコアフコース構造
とを有する新規の複合型糖アスパラギン及びその製造方法を提供することが
できる。

図面の簡単な説明

〔００１３〕〔図１〕実施例２において、糖数の異なる中性糖アスパラギン誘導体ごとに分離
した逆相クロマトグラフィーの結果を示す。

〔図２〕逆相クロマトグラフィーにて約８０分後に溶出する画分から得られた、
シアル酸数が０であり、バイセクティングＧＩｃＮＡｃ構造とコアフコース
構造を有する１１糖の複合型糖アスパラギン誘導体の¹H-NMRを示す。

〔図３〕逆相クロマトグラフィーにて約８０分後に溶出する画分から得られた、
シアル酸数が０であり、バイセクティングＧＩｃＮＡｃ構造とコアフコース
構造を有する１１糖の複合型糖アスパラギン誘導体の質量分析結果を示す。

〔図４〕逆相クロマトグラフィーにて約９２分後に溶出する画分から得られた、
シアル酸数が０であり、バイセクティングＧＩｃＮＡｃ構造とコアフコース
構造を有する１０糖の複合型糖アスパラギン誘導体の¹H-NMRを示す。

〔図５〕逆相クロマトグラフィーにて約９２分後に溶出する画分から得られた、
シアル酸数が０であり、バイセクティングＧＩｃＮＡｃ構造とコアフコース
構造を有する１０糖の複合型糖アスパラギン誘導体の質量分析結果を示す。

〔図６〕逆相クロマトグラフィーにて約１０２分後に溶出する画分から得られた
、シアル酸数が０であり、バイセクティングＧＩｃＮＡｃ構造とコアフコー
ス構造を有する１０糖の複合型糖アスパラギン誘導体の質量分析結果を示す

。

[図7]逆相クロマトグラフィーにて約118分後に溶出する画分から得られた、シアル酸数が0であり、バイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造を有する9糖の複合型糖アスパラギン誘導体の質量分析結果を示す。

[図8]シアル酸数が1であり、バイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造を有する12糖の複合型糖アスパラギン誘導体の¹H-NMRを示す。

。

[図9]シアル酸数が1であり、バイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造を有する12糖の複合型糖アスパラギン誘導体の質量分析結果を示す。

[図10]シアル酸数が2であり、バイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造を有する13糖の複合型糖アスパラギン誘導体の質量分析結果を示す。

[図11]逆相クロマトグラフィーにて約102分後に溶出する画分から得られた、シアル酸数が0であり、バイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造を有する10糖の複合型糖アスパラギン誘導体の¹H-NMRを示す。

。

[図12]逆相クロマトグラフィーにて約118分後に溶出する画分から得られた、シアル酸数が0であり、バイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造を有する9糖の複合型糖アスパラギン誘導体の¹H-NMRを示す。

[図13]シアル酸数が2であり、バイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造を有する13糖の複合型糖アスパラギン誘導体の¹H-NMRを示す。

[図14]シアル酸数が2であり、バイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造を有する13糖の複合型糖アスパラギン誘導体の質量分析結果を示す。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。なお、本発

明は、以下の実施の形態に限定されるものではなく、その要旨の範囲内で種々変形して実施することができる。

[0015] (複合型糖アスパラギン)

本発明の複合型糖アスパラギンは、鳥類抗体に由来する複合型糖アスパラギンであって、バイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造とを有する。

[0016] 複合型糖アスパラギンとは、複合型糖が、アスパラギンに結合した基本骨格を有する。一般に、N-結合型糖鎖として、高マンノース型 (high mannose)、混合型 (hybrid)、複合型 (complex) 糖鎖が知られていて、本発明の複合型糖アスパラギンは、N-結合型糖鎖の中の複合型糖鎖を有する。

[0017] 本発明の複合型糖アスパラギンは、鳥類抗体に由来する複合型糖アスパラギンであって、鳥類抗体中に含まれる複合型糖アスパラギンの構造を有する。したがって、本発明の複合型糖アスパラギンの構造の全体又は一部が、鳥類抗体中に含まれる複合型糖アスパラギンの構造と一致していてもよい。

ここで、鳥類抗体とは鳥類から得ることができる抗体である。鳥類抗体は、特に限定されるものではないが、抗体のすべてのアミノ酸配列が鳥類に由来する。

鳥類としては、ニワトリ、ガチョウ、アヒル等が挙げられ、好ましくはニワトリである。

鳥類抗体のアイソフォームも特に限定されるものではないが、IgY、IgA、IgMが挙げられ、IgYであることが好ましい。

鳥類抗体は、鳥類の卵や血液等から従来公知の方法により取得可能である。鳥類抗体として、特に限定されるものではないが、卵由来の抗体を利用してもよい。中でも、鳥類抗体として、ニワトリ、ガチョウ、アヒル等の卵由来の抗体であってよく、鶏卵からは、多くのIgYを取得可能であるため、鶏卵由来の抗体を利用してもよい。

[0018] 鳥類抗体については、IgYを例示して説明すると、IgYは、Fab鎖

域と F_c 領域とを有する。

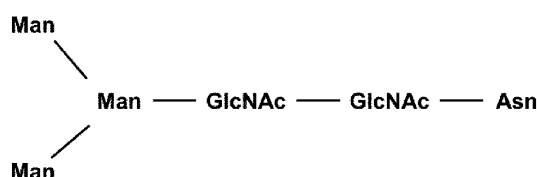
鳥類抗体のF a b領域は、ジスルフィド結合で結合した重鎖と軽鎖からなり、ヒンジ領域を介してF c領域と連結している。

本発明の鳥類抗体に由来する複合型糖アスパラギンは、鳥類抗体中に含まれる複合型糖アスパラギンであることから、Ig Y、Ig A、Ig Mに由来する複合型糖アスパラギンであってよく、Ig YのFab領域やFc領域といった抗体断片に由来する複合型糖アスパラギンであってよい。

[0019] 複合型糖鎖は、アスパラギンに還元末端を介して結合するコア5糖（core pentasaccharide）と呼ばれる構造を有していることが好ましい。

アスパラギンに還元末端を介して結合するコア5糖の構造としては、以下の構造が挙げられる。

[化2]



本明細書において、A s nはアスパラギンを意味し、M a nはマンノースを意味し、G l c N A cはN-アセチルグルコサミンを意味し、N e u 5 A cはシアル酸を意味し、G a lはガラクトースを意味し、F u cはフコースを意味する。上記構造においては、左端に存在する2つのM a nは、非還元末端を形成する。

各糖の間及びGlcNAcとAsnの間の直線は、結合手を意味し、各結合は、鳥類抗体に由来する構造中に存在する結合であれば、特に限定されるものではないが、 α 結合、 β 結合であってよい。

[0020] 本発明の複合型糖アスパラギンにおける糖鎖構造は、コア5糖の構造に加え、N-アセチルグルコサミン、シアル酸、ガラクトース、フコース等が結合した構造であってもよい。コア5糖の非還元末端側にN-アセチルグルコサミン、シアル酸、ガラクトース等が結合していてもよい。さらに、本発明

の複合型糖アスパラギンの非還元末端側の構造として分枝構造を有しているもよい。

[0021] (バイセクティングGlcNAc構造)

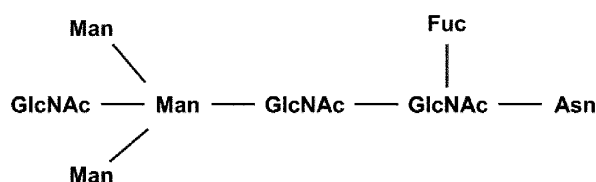
バイセクティングGlcNAc構造とは、N-結合型糖鎖のコア5糖のうち、GlcNAcに結合するマンノースに結合するN-アセチルグルコサミンを有する構造である。

[0022] (コアフコース構造)

コアフコース構造とは、N-結合型糖鎖のコア5糖のうち、Asnに結合する還元末端のN-アセチルグルコサミンに結合するフコースを有する構造である。

[0023] バイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造とを有する糖鎖として、以下の構造を有することが好ましい。

[化3]

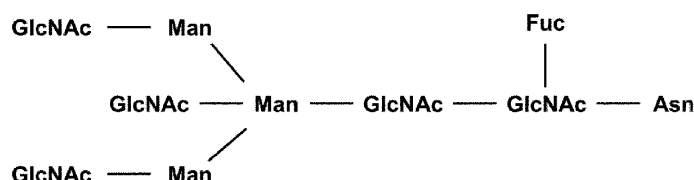


上記構造において、非還元末端として記載されていてManに結合するGlcNAcが、バイセクティングGlcNAc構造に相当し、Fucがコアフコース構造に相当する。

[0024] 複合型糖アスパラギンの糖鎖構造は、特に限定されるものではないが、9～13糖のいずれかで構成される糖鎖を有する、複合型糖アスパラギンであることが好ましい。

9糖で構成される糖鎖は、例えば以下の構造を有する。

[化4]



[0025] 10～13糖の糖鎖構造として、9糖で構成される糖鎖のGlcNAc-ManのGlcNAcの一方又は双方に、ガラクトース又はシアル酸が結合していてもよい。この場合において、バイセクティングGlcNAc構造のGlcNAcではないGlcNAcの一方又は双方に、ガラクトース又はシアル酸が結合していることが好ましい。

糖-糖間の各結合として、非還元末端側の糖が結合する還元末端側の糖の水酸基の位置も、鳥類抗体に由来する構造の中に存在する位置であれば、特に限定されるものではないが、糖-糖間の各結合は、1→2結合、1→3結合、1→4結合、1→6結合であってよい。また、1→2結合、1→3結合、1→4結合、1→6結合のそれぞれは、 α 結合であってもよく、 β 結合であってもよい。

糖-アスパラギンの結合は、通常、1→N結合であり、 β 1→N結合であることが好ましい。

N-アセチルグルコサミン、マンノース、ガラクトース、シアル酸は、それぞれ、通常、D糖である。

フコースは、通常、L糖である。

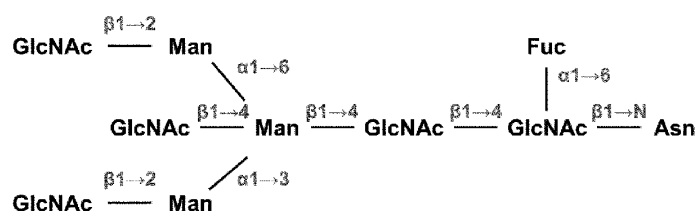
[0026] 複合型糖アスパラギンの糖鎖構造が、9～13糖で構成される糖鎖構造である場合、以下の具体的に示す構造を有する糖鎖構造であることが好ましい。

[0027] 複合型糖アスパラギンの糖鎖部分が、9糖で構成される場合、以下の構造を有してよい。

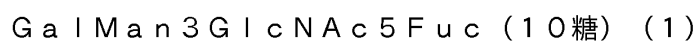
以下の構造中、例えば、GlcNAcとManの結合において、 β 1→2とあるのは、非還元末端側のN-アセチルグルコサミンが1位で、還元末端側のマンノースの2位水酸基に β 結合していることを意味する。また、 β 1→Nとあるのは、還元末端のN-アセチルグルコサミンが、1位で、AsnのNと β 結合していることを意味する。以下に示す9～13糖である場合の糖鎖においても同様である。

Man₃GlcNAc₅Fuc (9糖)

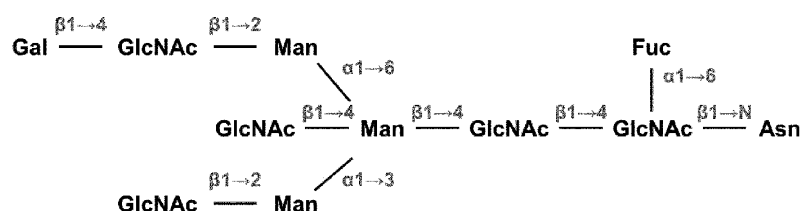
[0028] [化5]



[0029] 複合型糖アスパラギンの糖鎖部分が、10糖で構成される場合、以下の構造を有してよい。

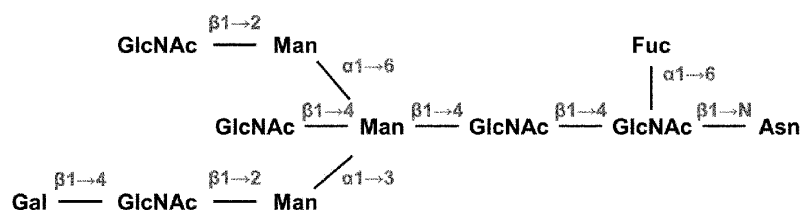


[0030] [化6]



[0031] G a l M a n 3 G l c N A c 5 F u c (10糖) (2)

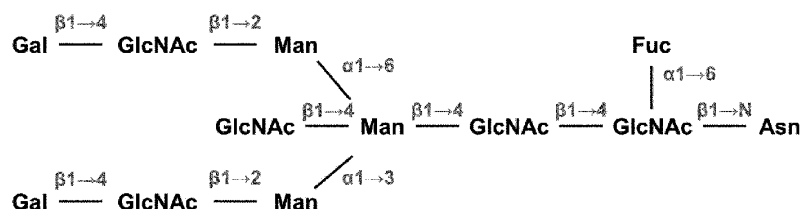
[0032] [化7]



[0033] 複合型糖アスパラギンの糖鎖部分が、11糖で構成される場合、以下の構造を有してよい。

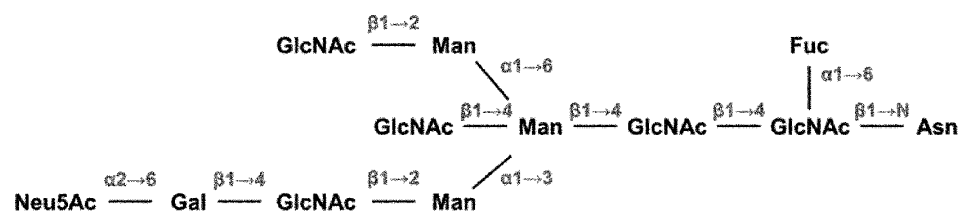


[0034] [化8]



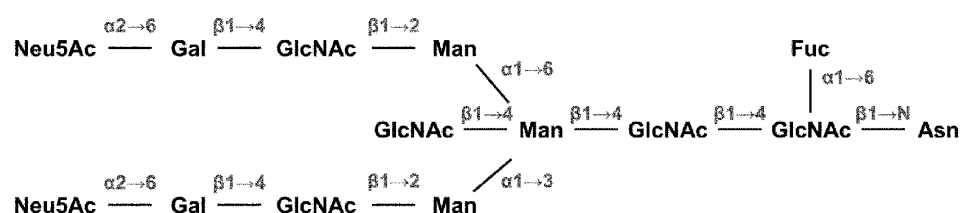
[0035] N e u 5 A c G a l M a n 3 G l c N A c 5 F u c (11糖) (2)

[0036] [化9]



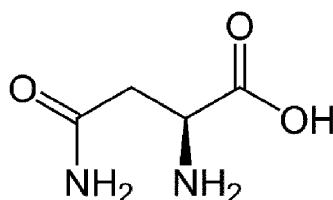
[0037] Neu5AcGalMan3GlcNAc5Fuc (11糖) (3)

[0044] [化13]



[0045] アスパラギンは、L-アスパラギンの場合、以下の構造を有する。N-結合型糖鎖において、アスパラギンはN末端に存在し、アスパラギンはCONH₂基で糖鎖と結合している。

[化14]



本発明の複合型糖アスパラギンにおけるアスパラギンは、糖鎖に結合するCONH₂基以外として残るNH₂基及びCOOH基が遊離の状態が存在し得るので、当該アミノ基及びカルボキシル基が保護されていてもよい。

Asn残基が保護されていてもよいとは、アスパラギン残基におけるアミノ基及び／又はカルボキシル基が保護されていることを意味する。

アスパラギン残基が保護されている場合の、保護されているとは、従来公知のアミノ酸の保護基により、具体的には、アミノ基及びカルボキシル基の保護基により保護されていることを意味する。

[0046] アミノ基、カルボキシル基の保護基として、利用可能な従来公知のアミノ酸の保護基としては、例えば、Greene's Protective Groups in Organic Synthesisに記載の保護基を選択すればよい。

アミノ基の保護基としては、特に限定されるものではないが、例えば、Fmoc基、t-ブトキシカルボニル (Boc) 基、ベンジルオキシカルボニル (Cbz又はZ) 基、p-メトキシベンジルオキシカルボニル (Z (OM

e) 又は pMZ) 基、2-(p-ビフェニル) イソプロピルオキシカルボニル (Bpoc) 基等が挙げられる。

カルボキシル基の保護基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチルエステル基、エチルエステル基、ベンジルエステル基、t-ブチルエステル基等が挙げられる。メチルエステル基、エチルエステル基、ベンジルエステル基、t-ブチルエステル基は、それぞれ、メチルアルコール、エチルアルコール、ベンジルアルコール、t-ブチルアルコールが、カルボキシル基とエステルを形成することによる保護基である。

[0047] アスパラギンのアミノ基やカルボキシル基は、遊離の状態 (NH_2 又は COOH) で存在していてもよく、 NH_3^+ 又は COO^- として存在していてもよく、それらの組み合わせであってもよい。

また、アスパラギンのアミノ基やカルボキシル基は、塩の状態であってもよい。ここで、塩である場合には、特に限定されるものではないが、例えば、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩、クエン酸塩、メタンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、トリフルオロ酢酸塩等の有機酸塩等であってもよく、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ金属塩又はアルカリ土類金属塩であってもよい。

[0048] (複合型糖アスパラギンの製造方法)

本発明における複合型糖アスパラギンを製造する方法は、
鳥類抗体に由来する複合型糖アスパラギンを含有する混合物を準備する工程、及び

当該混合物を陰イオン交換樹脂に通して、複合型糖アスパラギンを精製する工程、を含み、

精製工程において、複合型糖アスパラギンがシアル酸の数ごとに分離される、

複合型糖アスパラギンを製造する方法である。

[0049] (複合型糖アスパラギンを含有する混合物の準備)

鳥類抗体に由来する複合型糖アスパラギンを含有する混合物を準備する工程において準備される混合物は、鳥類抗体から切り出された複合型糖アスパラギンを含む。

鳥類抗体から切り出された複合型糖アスパラギンは、通常、複数の種類の複合型糖アスパラギンを含む。

混合物には、1種以上の複合型糖アスパラギンを含有する限り、特に限定されるものではないが、本発明における複合型糖アスパラギン以外の鳥類抗体由来の成分が含まれていてもよい。

当該複合型糖アスパラギン以外の鳥類抗体由来の成分としては、本発明の複合型糖アスパラギン以外の糖アスパラギンであってもよく、鳥類抗体に由来するペプチド断片や糖鎖やアミノ酸や糖ペプチドであってもよい。

また、混合物には、鳥類抗体に由来しない成分が含まれていてもよい。鳥類抗体に由来しない成分として、特に限定されるものではないが、例えば、鳥類抗体を変性し、又は分解するために必要な成分等が挙げられる。

[0050] 複合型糖アスパラギンを製造する方法において用いられる鳥類抗体として、上記複合型糖アスパラギンに関して説明した鳥類抗体に関する記載を参照して適用することができ、従来公知の方法により得られる鳥類抗体を用いてよい。

鳥類抗体は、特に限定されるものではないが、鳥類に由来する抗体であればよく、抗体のすべてのアミノ酸配列が、鳥類に由来するものである。

鳥類としては、ニワトリ、ガチョウ、アヒル等が挙げられ、好ましくはニワトリである。

鳥類抗体のアイソフォームも特に限定されるものではないが、IgY、IgA、IgMが挙げられ、IgYであることが好ましい。

鳥類抗体は、鳥類の卵や血液等から従来公知の方法により取得可能である。鳥類抗体として、特に限定されるものではないが、卵由来の抗体を利用してもよい。中でも、鳥類抗体として、ニワトリ、ガチョウ、アヒル等の卵由来の抗体鶏卵由来の抗体を利用してもよい。

鳥類抗体としては、Ig Y、Ig A、Ig M等をそのまま用いてもよいが、従来公知の方法により取得したFab領域及び／又はFc領域等の抗体断片を含む画分を用いてもよい。

鳥類抗体に由来する複合型糖アスパラギンを含有する混合物を準備する際に、鳥類抗体のFab領域、F(ab')₂領域、Fc領域等の抗体断片を用いる場合には、例えば、パパインやペプシン等の抗体を断片化可能なタンパク質分解酵素で処理する工程をさらに含む。

鳥類抗体を断片化することで得られた鳥類抗体のFab領域、F(ab')₂領域、Fc領域等の抗体断片を、鳥類抗体に由来する複合型糖アスパラギンを含有する混合物を準備するために用いてもよい。

鳥類抗体の断片化によって得られたFab領域、F(ab')₂領域、Fc領域等の抗体断片以外の成分は、従来公知の方法により精製して除去可能である。

[0051] (鳥類抗体の分解)

鳥類抗体に由来する複合型糖アスパラギンを含有する混合物を準備する工程には、鳥類抗体を分解する工程を含んでもよい。なお、鳥類抗体の分解工程における鳥類抗体は、Ig Y、Ig A、Ig M等や、その抗体断片であることを意味する。

抗体断片としては、特に限定されるものではないが、例えば、Fab領域、F(ab')₂領域、Fc領域等が挙げられる。

鳥類抗体を分解する方法は、鳥類抗体を分解して、複合型糖アスパラギンを含有する混合物を得ることができるものであれば、特に限定されるものではなく、従来公知の方法により鳥類抗体を分解すればよい。

鳥類抗体を分解するために、例えば、鳥類抗体をタンパク質分解酵素で分解してよい。

タンパク質分解酵素で鳥類抗体を分解することで、複合型糖が、鳥類抗体を構成するアミノ酸配列中で結合するアスパラギンと共に、複合型糖アスパラギンとして鳥類抗体から切り出される。

鳥類抗体のタンパク質分解酵素による反応液中には、鳥類抗体に由来する複合型糖アスパラギンを含む混合物が存在することになる。

また、当該複合型糖アスパラギン以外の鳥類抗体由来の成分も鳥類抗体のタンパク質分解酵素による反応液中に存在し得る。

[0052] 鳥類抗体を分解する方法において用いるタンパク質分解酵素として、複合型糖が結合するアスパラギンを切り出すことが可能な分解酵素であれば特に限定されるものではないが、例えば、アクチナーゼ E、プロナーゼ、オリエンターゼ等が挙げられる。

中でも、基質特異性の観点から、アクチナーゼ E が好ましい。

タンパク質分解酵素による反応温度は、タンパク質分解酵素が酵素活性を保持する限り特に限定されるものではないが、例えば、25℃～50℃の範囲内の温度であり、35℃～45℃の範囲内の温度が好ましい。

タンパク質分解酵素による反応時間は、複合型糖アスパラギンを含有する混合物を得ることができれば特に限定されるものではないが、例えば、12時間～168時間の範囲内の時間であり、24時間～96時間の範囲内の時間が好ましい。

[0053] タンパク質分解酵素による反応後、例えば、タンパク質分解酵素を失活させて得られる反応液を、複合型糖アスパラギンを含む混合物としてもよい。また、タンパク質分解酵素の失活後に得られる反応液をカラムクロマトグラフィー等によりさらに粗精製して得られる溶液を、複合型糖アスパラギンを含む混合物としてもよい。

タンパク質分解酵素の失活や、カラムクロマトグラフィー等による粗精製は、従来公知の方法により実施してよい。

[0054] 中でも、鳥類抗体に由来する複合型糖アスパラギンを含有する混合物を準備する工程には、複合型糖アスパラギンを含有する混合物中に含まれるアミノ酸やペプチド等を除去する工程をさらに含むことが好ましい。

利用可能な従来公知のアミノ酸やペプチド等を除去する工程としては、例えば、コットンカラムを用いた精製法が挙げられる。コットンカラムを用い

た精製法として、例えば、Chinese J. Anal. Chem., (2020), vol 48 (1), pp 34-39. に記載の方法によりアミノ酸やペプチド等を除去してもよい。

[0055] (鳥類抗体の変性)

複合型糖アスパラギンを含有する混合物の準備工程として、鳥類抗体を分解する工程の前工程として、鳥類抗体を変性する工程をさらに含んでもよい。

鳥類抗体を変性する方法は、鳥類抗体の立体構造を変化させられれば特に限定されるものではないが、従来公知の方法により鳥類抗体を変性すればよい。

鳥類抗体を変性するために、例えば、熱又は有機溶媒により変性する方法等が挙げられる。

鳥類抗体を分解する前に、鳥類抗体を変性することで、鳥類抗体の立体構造を変化させることができ、タンパク質分解酵素による鳥類抗体の分解反応性を向上させることができる。

[0056] 熱処理して鳥類抗体を変性する場合、タンパク質分解酵素による反応性の観点で、以下のような反応条件で熱処理を実施することが好ましい。

熱処理は、鳥類抗体を含む溶液に、直接、一定時間熱を与えることで行われてよい。

反応温度は、特に限定されるものではないが、例えば、65℃～95℃の範囲内の温度であり、70℃～90℃の範囲内の温度が好ましく、70℃～80℃の範囲内の温度がより好ましい。

反応時間は、特に限定されるものではないが、例えば、1分～20分の範囲内の時間であり、5分～10分の範囲内の時間が好ましい。

鳥類抗体を含む溶液の溶媒としては、特に限定されるものではないが、例えば、水が好ましく、緩衝液であっても水溶液であってもよい。

[0057] 有機溶媒処理して鳥類抗体を変性する場合、タンパク質分解酵素による反応性の観点で、以下のような反応条件で有機溶媒処理を実施することが好ま

しい。

有機溶媒処理は、鳥類抗体を含む溶液に、有機溶媒を添加して、一定時間保持して行ってもよい。

有機溶媒としては、特に限定されるものではないが、例えば、アセトン、メタノール、エタノール、2-プロパノール、クロロホルム、酢酸エチル等が挙げられる。

有機溶媒として、1種の溶媒を用いてもよく、2種以上の溶媒の混合溶媒を用いてもよい。

また、水溶性の有機溶媒については、有機溶媒を含む水溶液により鳥類抗体を変性してもよい。

反応時間は、特に限定されるものではないが、例えば、1時間～24時間の範囲内の時間であり、3時間～12時間の範囲内の時間が好ましい。

反応温度は、特に限定されるものではないが、例えば、室温であってよい。

有機溶媒処理においては、鳥類抗体を直接的に有機溶媒に浸漬あるいは接触させて処理してもよいが、鳥類抗体を含む溶液に対して、有機溶媒を添加してもよく、有機溶媒に対して、鳥類抗体を含む溶液を添加してもよい。

[0058] (複合型糖アスパラギンの精製)

複合型糖アスパラギンを精製する工程は、前工程により得られた鳥類抗体に由来する複合型糖アスパラギンを含有する混合物を陰イオン交換樹脂に通して精製する工程である。

本工程を行う前の混合物中には、鳥類抗体から切り出された複合型糖アスパラギンを含み、通常、複数の種類の複合型糖アスパラギンを含む。本工程により、混合物中に含まれる複合型糖アスパラギンがシアル酸の数ごとに分離される、

複合型糖アスパラギンに含まれるシアル酸の数としては、特に限定されるものないが、例えば、0～2である。

混合物中に含まれる複合型糖アスパラギンがシアル酸の数ごとに分離され

るとは、陰イオン交換樹脂による溶出液中で、複合型糖アスパラギンがシアル酸の数に応じて、順次溶出されてくることにより、シアル酸の数が、例えば、0、1、2個の複合型糖アスパラギンの各画分として分離して分取可能なことを意味する。

0個の複合型糖アスパラギンの画分、1個の複合型糖アスパラギンの画分、2個の複合型糖アスパラギンの画分にはそれぞれ、複数種類の複合型糖アスパラギンが含まれていてよい。

複合型アスパラギンを含む混合物を、陰イオン交換樹脂に通して、複合型糖アスパラギンを精製する前に、従来公知の方法で、複合型アスパラギンを含む混合物の粗精製を行ってもよい。

[0059] 陰イオン交換樹脂としては、特に限定されるものではないが、例えば、強陰イオン交換樹脂、弱陰イオン交換樹脂等が挙げられる。

陰イオン交換樹脂の基材としては、特に限定されるものではないが、例えば、スチレン、ジビニルベンゼン、セルロース、アガロース等が挙げられる。

強陰イオン交換樹脂としては、例えば、機材に4級アミノ基が導入されたものが挙げられる。

弱陰イオン交換樹脂としては、例えば、基材に3級アミノ基、ジエチルアミノエチル基、カルボキシルメチル基、ポリアミン等が導入されたものが挙げられる。

[0060] 複合型糖アスパラギンを含む混合物を、陰イオン交換樹脂に通して精製する方法として、特に限定されるものではないが、陰イオン交換クロマトグラフィーが挙げられる。

陰イオン交換クロマトグラフィーに用いる移動相としては、従来公知の緩衝液を用いることができる。

緩衝液に用いる溶媒としては、特に限定されるものではないが、例えば、水、アセトニトリル、アルコール等が挙げられ、1種の溶媒を用いてもよく、2種以上の溶媒の混合溶媒を用いてもよい。

緩衝液の成分としては、特に限定されるものではないが、例えば、酢酸、リン酸、クエン酸、アルキルアミン、アンモニウム、トリスヒドロキシメチルアミノメタン、ピリジン等の緩衝能を保持する成分が挙げられ、1種の成分を用いてもよく、2種以上の成分を用いてもよい。

移動相のpHは、特に限定されるものではないが、中性から塩基性の範囲内のpHが好ましく、pH7～pH10の範囲内のpHがより好ましい。

陰イオン交換クロマトグラフィーにより、複合型糖アスパラギンを含む混合物の精製する工程において、グラジエント条件下の移動相で溶出を行ってもよい。例えば、移動相にグラジエント条件下の移動相を使用する場合、pHが7～10の範囲内のグラジエント条件下で溶出してもよい。

[0061] 本発明における複合型糖アスパラギンを製造する方法において、さらに精製を行うために、シアル酸の数ごとに分離された複合型糖アスパラギンを精製する工程を含んでもよい。シアル酸の数ごとに分離された複合型糖アスパラギンを精製する工程として、純度を高めるために、シアル酸の数ごとに分離された複合型糖アスパラギンをさらに精製してもよい。

また、シアル酸の数ごとに分離された複合型糖アスパラギンとしては、シアル酸の数が同じであるものの糖鎖構造の異なる糖アスパラギンを含む場合があるので、糖鎖構造の異なる糖アスパラギンをさらに精製してもよい。

さらなる精製のための方法は、特に限定されるものではなく、従来公知の糖アスパラギン等の糖ペプチドの精製方法を用いることができる。

中でも、さらなる精製のための方法としては、陰イオン交換クロマトグラフィーによりシアル酸の数ごとに分離された複合型糖アスパラギンをそのまま次の精製工程に利用してもよいが、分離精製を行うために、アスパラギンに保護基を導入してもよい。

複合型糖アスパラギンのアスパラギンに保護基を導入することにより、糖鎖構造の異なる糖アスパラギンの分離精製を行ってもよく、中でも、脂溶性保護基を導入して、糖鎖構造の異なる糖アスパラギンの分離精製を行ってもよい。

[0062] 本発明における複合型糖アスパラギンを製造する方法において、さらに精製を行うために、シアル酸の数ごとに分離された複合型糖アスパラギンに保護基を導入する工程を含んでもよい。

複合型糖アスパラギンに対する保護基の導入反応は特に限定されるものではなく、従来公知の方法により実施可能である。

糖アスパラギンに導入される保護基としては、上記アスパラギンの保護基に関して説明した記載を参照して適用することができるが、中でも、Fmoc基、t-ブトキシカルボニル(Boc)基、ベンジルオキシカルボニル(Cbz又はZ)基、p-メトキシベンジルオキシカルボニル(Z(OMe)又はpMZ)基、2-(p-ビフェニル)イソプロピルオキシカルボニル(Bpoc)基等のアミノ基の保護基、及びメチルエステル基、エチルエステル基、ベンジルエステル基、t-ブチルエステル基等のカルボキシル基の保護基が挙げられる。中でも、Fmoc基又は/及びメチルエステル基を用いてよい。

また、糖アスパラギンに保護基を導入する工程で、シアル酸の遊離のカルボキシ基に保護基が導入されてもよい。シアル酸の遊離のカルボキシ基にも、上記アスパラギンの保護基に関して説明した記載を参照して適用することができるが、アンモニア、メチルアミン、芳香族アミン等でカルボキシ基をアミド化して保護してもよい。中でも、メチルエステル基、エチルエステル基、ベンジルエステル基、t-ブチルエステル基等のカルボキシル基の保護基が挙げられる。中でも、メチルエステル基を用いてよい。

[0063] 場合により保護基が導入された複合型糖アスパラギンに対して、特に限定されるものではないが、例えば、逆相クロマトグラフィー、親水性相互作用液体クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー又はサイズ排除クロマトグラフィー等により精製を行ってもよい。

各クロマトグラフィーは、従来公知の方法により実施可能である。また、各クロマトグラフィーを組み合わせ実施してもよい。

複合型糖アスパラギンの精製をさらに行うことで、本発明における各複合型糖アスパラギンをそれぞれ分取可能である。保護基が導入された複合型糖アスパラギンにおける保護基の脱保護は従来公知の方法により実施可能である。

[0064] 逆相クロマトグラフィーに用いられる担体としては、特に限定されるものではないが、例えば、シリカを基材としてオクタデシル、オクチル、フェニル、シアノプロピル、メチル等を充填剤表面に固定化したものが挙げられ、中でも、ODS樹脂が好ましい。

親水性相互作用液体クロマトグラフィーに用いられる担体としては、特に限定されるものではないが、例えば、シリカを基材として、アミノプロピル基、アミド基、ジオール、シアノ基、カルバモイル基などで修飾したシリカゲルや、ポリマー基材等を充填剤表面に固定化したものが挙げられる。

クロマトグラフィーに用いる移動相としては、例えば、特に限定されるものではないが、水、アセトニトリル、アルコール等が挙げられ、1種の溶媒を用いてもよく、2種以上の溶媒の混合溶媒を用いてもよい。また、移動相には、酸や塩基を添加してもよく、グラジエント条件下の移動相で溶出を行ってもよい。

[0065] また、シアル酸の数ごとに分離された複合型糖アスパラギンを精製する工程において、糖鎖の異なる複合型糖アスパラギンごとに分離、及び単離するために、クロマトグラフィーによる複合型糖アスパラギンの精製は一回に限られず、複数回行ってもよい。さらに、クロマトグラフィーによる精製の前に、複合型糖アスパラギンを粗精製する工程を含んでもよい。

実施例

[0066] 以下、本実施の形態を実施例及び比較例によってさらに具体的に説明するが、本実施の形態はこれらの実施例のみに限定されるものではない。なお、本実施の形態に用いられる測定方法は以下のとおりである。

[HPLC分析]

日本分光社製 LC-2000シリーズ PLUS

検出器：UV 273 nm

島津製作所社製 Nexera Prepシリーズ

検出器：UV 301 nm

逆相カラム：InertSustain AQ-C18 column 5
μm, 10×250 mm

HILICカラム：InertSustain Amide column
5 μm, 10×250 mm

[質量分析]

島津製作所社製 AXIMA-CFR plus

イオン化：MALDI

モード：Linear Positive

島津製作所社製 MALDI-8030

モード：Linear Positive

[¹H-NMR]

JEOL製 JNE-ECA500型FTNMR スペクトルメーター (5
00 MHz)

溶媒：D₂O

[0067] <実施例1>

(a) 約6.5 gのIgYが含まれている画分を80℃で10分間インキュベートし、トリス-塩酸・塩化カルシウム緩衝液 (pH=8.0, 3.0 L) になるよう調整し、0.05%の質量濃度になるようにアジ化ナトリウムを加えた。さらに、アクチナーゼ E (科研製薬社製, 650 mg) を加え、37℃で48時間反応させた。

(b) 反応終了後、遠心分離にて上清を回収した。その上清を、Cottonを詰めたカラムを用いてグラジエント (CH₃CN/H₂O=90/10→83/17→75/25→0/100) 条件下で精製し、糖アスパラギン群が含まれる画分を回収した。

(c) 得られた糖アスパラギンの画分を減圧濃縮し、陰イオン交換担体 (J

NC社製、セルファイン A-500) に適用して、陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。移動相として、10%アセトニトリル (pH=9.5) と3%酢酸：アセトニトリル=9：1 (pH=7.3) のグラジエント (100：0→97：3→80：20) を用いた。シアル酸の結合していない糖アスパラギンを、移動相の比率が100：0の時に溶出した。シアル酸が1つ結合している糖アスパラギンを、移動相の比率が97：3の時に溶出した。シアル酸が2つ結合している糖アスパラギンを移動相の比率が80：20の時に溶出した。質量分析にて、得られた糖アスパラギンの存在を確認した。

[0068] <実施例2>

(a) 実施例1で得られたシアル酸数が0の糖アスパラギン (中性糖アスパラギン) 群を、Cottonを詰めたカラムを用いて脱塩し、減圧濃縮した。得られた残留物 (約28.0mg) を水・アセトン溶媒 (水/アセトン=3/2, 1mL) に溶解させ、炭酸水素ナトリウム (9.7mg) を加えた。N-(9-フルオレニルメトキシカルボニルオキシ) スクシンイミド (Fmoc-OSu, 19.5mg) を加え、室温で2時間反応させ、TLCプレートにより反応終了を確認した。

(b) 得られたFmoc化したシアル酸数が0のアスパラギン誘導体群 (中性糖アスパラギン誘導体群) を、逆相カラムを用いて脱塩したのちに、HPLCを用いて逆相クロマトグラフィー (グラジエント：0.1% トリフルオロ酢酸のアセトニトリル溶液/0.1% トリフルオロ酢酸水溶液=16/84, 3mL/min, 140min) を行い、糖数の異なる中性糖アスパラギンごとに分離した (図1)。

(c) 逆相クロマトグラフィーにて約80分後に溶出する画分を分取し、減圧濃縮をしたのちにHPLCを用いてHILIC精製 (グラジエント：CH₃CN/100mM NH₄HCO₂=70/30→65/35, 3mL/min, 60min) を行った。約47分後に溶出する画分を分取し、ゲルろ過 (Cytiva社製, Sephadex G-10) によって脱塩し、シアル

酸数が0であり、バイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造を有する11糖の複合型糖アスパラギン誘導体を約4.2mg得た。得られた複合型糖アスパラギン誘導体の¹H-NMRデータ（図2）と質量分析結果（図3）を示す。Gal2Man3GlcNAc5Fuc（11糖）（1）として示す構造を有する複合型糖アスパラギンが確認された。

（d）逆相クロマトグラフィーにて約92分後に溶出する画分を分取し、減圧濃縮をしたのちにHPLCを用いてHILIC精製（グラジエント：CH₃CN／100mM NH₄HCO₂=71／29→66／34，3mL／min，60min）を行った。約38分後に溶出する画分を分取し、ゲルろ過によって脱塩し、シアル酸数が0であり、バイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造を有する10糖の複合型糖アスパラギン誘導体を約3.1mg得た。得られた複合型糖アスパラギン誘導体の¹H-NMRデータ（図4）と質量分析結果（図5）を示す。GalMan3GlcNAc5Fuc（10糖）（1）として示す構造を有する複合型糖アスパラギンが確認された。

（e）逆相クロマトグラフィーにて約102分後に溶出する画分を分取し、減圧濃縮をしたのちにHPLCを用いてHILIC精製（グラジエント：CH₃CN／100mM NH₄HCO₂=71／29→66／34，3mL／min，60min）を行った。約45分後に溶出する画分を分取し、ゲルろ過によって脱塩し、シアル酸数が0であり、バイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造を有する10糖の複合型糖アスパラギン誘導体を得た。得られた複合型糖アスパラギン誘導体の質量分析結果（図6）を示す。GalMan3GlcNAc5Fuc（10糖）（2）として示す構造を有する複合型糖アスパラギンが確認された。

（f）逆相クロマトグラフィーにて約118分後に溶出する画分を分取し、減圧濃縮をしたのちにHPLCを用いてHILIC精製（グラジエント：CH₃CN／100mM NH₄HCO₂=72／28→67／33，3mL／min，60min）を行った。約38分後に溶出する画分を分取し、ゲルろ

過によって脱塩し、シアル酸数が0であり、バイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造を有する9糖の複合型糖アスパラギン誘導体を得た。得られた複合型糖アスパラギン誘導体の質量分析結果(図7)を示す。Man₃GlcNAc₅Fuc(9糖)として示す構造を有する複合型糖アスパラギンが確認された。

[0069] <実施例3>

(a) 実施例1で得られたシアル酸数が1の糖アスパラギン群を、Cottontailを詰めたカラムを用いて脱塩し、減圧濃縮した。得られた残留物(約18.2mg)を水・アセトン溶媒(水/アセトン=3/2, 1mL)に溶解させ、炭酸水素ナトリウム(5.2mg)を加えた。N-(9-フルオレニルメトキシカルボニルオキシ)スクシンイミド(Fmoc-OSu, 10.4mg)を加え、室温で2時間反応させ、TLCプレートにより反応終了を確認した。

(b) 得られたFmoc化したシアル酸数が1のアスパラギン誘導体群(酸性糖アスパラギン誘導体群)を、逆相カラムを用いて脱塩したのちに、HPLCを用いて逆相クロマトグラフィー(グラジエント: 0.1% トリフルオロ酢酸のアセトニトリル溶液/0.1% トリフルオロ酢酸水溶液=17/83, 3mL/min, 60min)を行い、約40分後に溶出するシアル酸数が1のアスパラギン誘導体が含まれる画分を回収した。

(c) 逆相クロマトグラフィーにて約40分後に溶出する画分を分取し、減圧濃縮をしたのちにHPLCを用いてHILIC精製(グラジエント: CH₃CN/100mM NH₄HCO₂=67/33→62/38, 3mL/min, 45min)を行った。約35分後に溶出する画分を分取し、再度移動相を変更して逆相クロマトグラフィー(グラジエント: MeOH/50mM NH₄HCO₂=35/65→40/60, 4mL/min, 60min)を行い、約30分後に溶出する画分を分取した。ゲルろ過によって脱塩し、シアル酸数が1であり、バイセクティングGlcNAc構造とコアフコース構造を有する12糖の複合型糖アスパラギン誘導体を約2.8mg得た。得られ

た複合型糖アスパラギン誘導体の ^1H -NMRデータ（図8）を示す。Neu5AcGal2Man3GlcNAc5Fuc（12糖）（1）として示す構造を有する複合型糖アスパラギンが確認された。

（d）得られた複合型糖アスパラギン誘導体の一部に対して、MeOH（20 μL ）、1-（3-ジメチルアミノプロピル）-3-エチルカルボジイミド塩酸塩（250 mM）、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水合物（250 mM）を加え、37℃で1時間反応させた。得られた複合型糖アスパラギンのメチル化誘導体の質量分析結果（図9）を示す。Neu5AcGal2Man3GlcNAc5Fuc（12糖）（1）として示す構造を有する複合型糖アスパラギンが確認された。

<実施例4>

（a）実施例1で得られたシアル酸数が2の糖アスパラギン群を、Cottonを詰めたカラムを用いて脱塩し、減圧濃縮した。得られた残留物（約1.2 mg）の一部に対して、MeOH（20 μL ）、1-（3-ジメチルアミノプロピル）-3-エチルカルボジイミド塩酸塩（250 mM）、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水合物（250 mM）を加え、37℃で1時間反応させた。得られた複合型糖アスパラギンのメチル化誘導体の質量分析結果（図10）を示す。Neu5Ac2Gal2Man3GlcNAc5Fuc（13糖）として示す構造を有する複合型糖アスパラギンが確認された。

<実施例5>

（a）IgY約100 gを実施例1及び実施例2と同様に処理し、実施例2（e）に記載のGalMan3GlcNAc5Fuc（10糖）（2）を3.0 mg得た。得られた複合型糖鎖の ^1H -NMRデータ（図11）を示す。

<実施例6>

（a）IgY約100 gを実施例1及び実施例2と同様に処理し、実施例2（f）に記載のMan3GlcNAc5Fuc（9糖）を9.3 mg得た。得られた複合型糖鎖の ^1H -NMRデータ（図12）を示す。

<実施例 7>

(a) IgY 約 100 g を実施例 1 及び実施例 4 と同様に処理し、シアル酸数が 2 の糖アスパラギン群を 174.1 mg 得た。得られたシアル酸数が 2 の糖アスパラギン群を水・アセトン溶媒（水／アセトン＝3／2，18 mL）に溶解させ、炭酸水素ナトリウム（117.01 mg）を加えた。N-（9-フルオレニルメトキシカルボニルオキシ）スクシンイミド（Fmoc-OSu，191.1 mg）を加え、室温で 4 時間反応させ、TLC プレートにより反応終了を確認した。

(b) 得られた Fmoc 化したシアル酸数が 2 のアスパラギン誘導体群を、逆相カラムを用いて脱塩したのちに、HPLC を用いて HILIC 精製（グラジエント：CH₃CN／50 mM NH₄HCO₂＝72／28→69／31，3 mL/min，80 min）を行い、約 68 分後に溶出するシアル酸数が 2 のアスパラギン誘導体が含まれる画分を回収した。得られた画分を減圧濃縮したのち、HPLC を用いて逆相クロマトグラフィー（グラジエント：アセトニトリル／50 mM ギ酸アンモニウム水溶液＝12／88→17／83，5 mL/min，60 min）を行い、約 47 分後に溶出するシアル酸数が 2 のアスパラギン誘導体が含まれる画分を回収した。ゲルろ過によって脱塩し、シアル酸数が 2 であり、バイセクティング GlcNAc 構造とコアフコース構造を有する 13 糖の複合型糖アスパラギン誘導体を約 10.0 mg 得た。得られた複合型糖アスパラギン誘導体の ¹H-NMR データ（図 13）を示す。Neu5Ac2Gal2Man3GlcNAc5Fuc（13 糖）として示す構造を有する複合型糖アスパラギンが確認された。

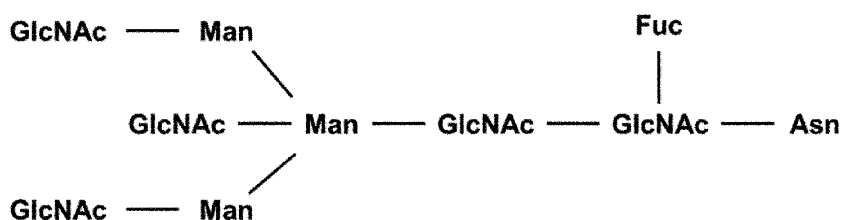
(c) 得られた複合型糖アスパラギン誘導体の一部に対して、MeOH（20 μL）、1-（3-ジメチルアミノプロピル）-3-エチルカルボジイミド塩酸塩（250 mM）、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（250 mM）を加え、37℃で 1 時間反応させた。得られた複合型糖アスパラギンのメチル化誘導体（Fmoc 保護体）の質量分析結果（図 14）を示す。Neu5Ac2Gal2Man3GlcNAc5Fuc（13 糖）として

示す構造を有する複合型糖アスパラギンが確認された。

請求の範囲

- [請求項1] 鳥類抗体に由来する複合型糖アスパラギンであって、
バイセクティングG l c N A c構造とコアフコース構造とを有する、
複合型糖アスパラギン（ここでA s n残基が保護されていてもよい。
）。。
- [請求項2] 複合型糖アスパラギンの糖鎖が9～13糖のいずれかで構成される、
請求項1に記載の複合型糖アスパラギン（ここでA s n残基が保護
されていてもよい。）。。
- [請求項3] 下記構造を有する、請求項1又は2に記載の複合型糖アスパラギン
（ここでA s n残基が保護されていてもよい。）。。

[化1]



- [請求項4] G l c N A c - M a n - M a n の G l c N A c の一方又は双方に、
G a l 又は N e u 5 A c - G a l が結合している、請求項3に記載の
複合型糖アスパラギン（ここで A s n 残基が保護されていてもよい。
）。
- [請求項5] 鳥類抗体に由来する複合型糖アスパラギンを含有する混合物を準備
する工程、及び
当該混合物を陰イオン交換樹脂に通して、複合型糖アスパラギンを
精製する工程、を含み、
精製工程において、複合型糖アスパラギンがシアル酸の数ごとに分
離される、
複合型糖アスパラギンを製造する方法。
- [請求項6] 混合物の準備工程が、
鳥類抗体を変性する工程、及び

変性した鳥類抗体をタンパク質分解酵素で分解する工程、を含む、
請求項 5 に記載の方法。

[請求項7] 鳥類抗体の変性工程において、鳥類抗体が熱又は有機溶媒により変性される、請求項 6 に記載の方法。