

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(10) 国際公開番号

WO 2011/125674 A1

(43) 国際公開日

2011年10月13日(13.10.2011)

PCT

- (51) 国際特許分類:
G01N 30/88 (2006.01) C08F 8/00 (2006.01)
B01D 15/08 (2006.01) C08F 220/26 (2006.01)
B01J 20/24 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/057886
- (22) 国際出願日: 2011年3月29日(29.03.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-081425 2010年3月31日(31.03.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): J S R 株式会社 (JSR CORPORATION) [JP/JP]; 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 田守 功二 (TAMORI, Kouji) [JP/JP]; 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 J S R 株式会社内 Tokyo (JP). 安倍 毅由 (ABE, Takayoshi) [JP/JP]; 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 J S R 株式会社内 Tokyo (JP). 岡野 友亮 (OKANO, Yusuke) [JP/JP]; 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 J S R 株式会社内 Tokyo (JP). 榎山 昌輝 (MOMIYAMA, Masaki) [JP/JP]; 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 J S R 株式会社内 Tokyo (JP). 川井 洋 (KAWAI, Hiroshi) [JP/JP]; 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 J S R 株式会社内 Tokyo (JP). 日向寺 慧 (HYUGAJI, Satoshi) [JP/JP]; 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 J S R 株式会社内 Tokyo (JP). 塩谷 知範 (SHIOTANI, Tomonori) [JP/JP]; 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 J S R 株式会社内 Tokyo (JP). 一久 和弘
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番8号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(54) Title: FILLER FOR AFFINITY CHROMATOGRAPHY

(54) 発明の名称: アフィニティークロマトグラフィー用充填剤

(57) Abstract: The disclosed filler for affinity chromatography has a high dynamic binding capacity for proteins, excellent alkali resistance, and excellent storage stability. Said filler contains porous particles comprising a copolymer of: between 40 and 99.5 mass parts of a methacryloyl-group-containing vinyl monomer (M-1) that contains a hydroxide group but no epoxy groups; between 0.5 and 30 mass parts of an epoxy-group-containing vinyl monomer (M-2); between 0 and 59.5 mass parts of a methacryloyl-group-containing vinyl monomer (M-3) other than (M-1) and (M-2); and between 0 and 25 mass parts of a vinyl monomer (M-4) other than (M-1), (M-2), and (M-3). The amounts of (M-1), (M-2), (M-3), and (M-4) sum to 100 mass parts. The disclosed filler also contains: ring-opened epoxy groups obtained by ring-opening epoxy groups in the aforementioned copolymer; and ligands bound to the porous particles.

(57) 要約: タンパク質の動的結合容量が高く、しかも耐アルカリ性および保存安定性に優れるアフィニティークロマトグラフィー用充填剤を提供する。本発明のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤は、(M-1)水酸基を含有しエポキシ基を含有しないメタクリロイル基を含有するビニル単量体 40~99.5質量部、(M-2)エポキシ基含有ビニル単量体 0.5~30質量部、(M-3)(M-1)および(M-2)以外のメタクリロイル基を含有するビニル単量体 0~59.5質量部、ならびに(M-4)(M-1)、(M-2)および(M-3)以外のビニル単量体 0~25質量部(但し、(M-1)、(M-2)、(M-3)および(M-4)の合計は100質量部である。)の共重合体からなる多孔質粒子と、前記共重合体に含まれるエポキシ基を開環させて得られる開環エポキシ基と、前記多孔質粒子に結合したリガンドとを含むことを特徴とする。



WO 2011/125674 A1

明 細 書

発明の名称：アフィニティークロマトグラフィー用充填剤

技術分野

[0001] 本発明は、タンパク質の動的結合容量が高く、しかも耐アルカリ性に優れた、タンパク質精製に有用なアフィニティークロマトグラフィー用充填剤に関する。特に、抗体精製などに有用な特定のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤に関する。

背景技術

[0002] アフィニティークロマトグラフィーは、モノクローナル抗体を含めたタンパク質の研究、開発および製造において重要な役割を担っている。アフィニティークロマトグラフィー用充填剤は一般的に、標的分子と選択的に結合するリガンドを有する固相担体を含む。アフィニティークロマトグラフィーは、固相担体上のリガンドが標的分子に対して高い選択性を有するために、イオンクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィーなどの他のクロマトグラフィーに比べて、優れた収率および高速で経済的な精製が可能となる。

[0003] 一般に、タンパク質精製用のアフィニティークロマトグラフィーでは、繰り返して行われる精製工程における洗浄に水酸化ナトリウム水溶液などの強アルカリ水溶液が用いられるので、アフィニティークロマトグラフィー用充填剤には高い耐アルカリ性が要求される。特にプロテインAのようなタンパク質をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィー用充填剤では、強アルカリ水溶液による洗浄や保存中に、タンパク質リガンド自体の劣化やタンパク質リガンドと固相担体上の残存反応基との反応劣化が進む場合があるため、耐アルカリ性と保存安定性の向上が求められる。分析用クロマトグラフィーなどで汎用的なシリカ系の充填剤は、強アルカリ水溶液に溶解してしまうために、繰り返して使用するタンパク質精製用のアフィニティークロマトグラフィーには使用できない。

- [0004] こうしたなか、アフィニティークロマトグラフィー用充填剤の固相担体として、高い親水性を有し、リガンドの活性が高く、標的分子に対する動的結合容量が高いアガロース粒子の使用が提案されている（特許文献1、2）。
- [0005] 他のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤の固相担体としては、耐アルカリ性に優れたスチレン-ジビニルベンゼンの共重合体からなる多孔質粒子の使用が提案されている（特許文献3、4）。
- [0006] 一方、水酸基含有メタクリレート系ビニル単量体の重合体からなる多孔質粒子をクロマトグラフィーに用いる例はあったものの、これらはいずれも分析を目的としたゲル濾過クロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィーのみに適合するものである（特許文献5、6）。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：特表2008-523140号公報
特許文献2：特表2009-522580号公報
特許文献3：特開平08-278299号公報
特許文献4：特表平10-501173号公報
特許文献5：特開2002-239380号公報
特許文献6：特許第3316915号明細書

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] しかしながら、アガロース粒子は、一般に弾性率が低いため、高速で媒体を流したときにカラムの圧力が高くなるという欠点を有している。また、アガロース粒子は、一般に、天然の海草から長く複雑な工程を経て製造されるために、一定の品質のものが得られにくい。一方、スチレン-ジビニルベンゼンのようなビニル単量体の共重合体からなる多孔質粒子は、一般に耐アルカリ性に優れるが、親水性が低いため、リガンドの活性が低く、標的分子に対する動的結合容量が低いという欠点を有する。さらに、従来のようなゲ

ル濾過クロマトグラフィーや逆相液体クロマトグラフィーに用いられていた水酸基含有架橋性ビニル単量体の重合体からなる多孔質粒子は、アフィニティークロマトグラフィー用充填剤としての高い動的結合容量と保存安定性の両立を達成できるものではない。

[0009] そこで、本発明は、特定のビニル単量体を用いた重合体からなる多孔質粒子と、前記多孔質粒子に結合するリガンドとを含むことにより、タンパク質の動的結合容量が高く、しかも耐アルカリ性および保存安定性に優れたアフィニティークロマトグラフィー用充填剤を提供する。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明の一態様に係るアフィニティークロマトグラフィー用充填剤は、
(M-1) 水酸基を含有しエポキシ基を含有しないメタクリロイル基を含有するビニル単量体 40～99.5質量部
(M-2) エポキシ基含有ビニル単量体 0.5～30質量部、
(M-3) (M-1) および (M-2) 以外のメタクリロイル基を含有するビニル単量体 0～59.5質量部、ならびに
(M-4) (M-1)、(M-2) および (M-3) 以外のビニル単量体 0～25質量部 (但し、(M-1)、(M-2)、(M-3) および (M-4) の合計は100質量部である。) の共重合体からなる多孔質粒子と、
前記共重合体に含まれるエポキシ基を開環させて得られる開環エポキシ基と、
前記多孔質粒子に結合したリガンドとを含む。

[0011] 上記アフィニティークロマトグラフィー用充填剤において、前記リガンドが、耐アルカリ性のイムノグロブリン結合性タンパク質であってもよい。

[0012] 上記アフィニティークロマトグラフィー用充填剤において、(M-1) 水酸基を含有しエポキシ基を含有しないメタクリロイル基を含有するビニル単量体が下記一般式 (A) で示される単量体であってもよい。



(式中、Rは水素原子または1価の有機基を示す。)

- [0013] この場合、上記一般式(A)におけるRがヒドロキシメチル基またはメタクリロイルオキシメチル基であってもよい。
- [0014] 上記アフィニティークロマトグラフィー用充填剤において、前記多孔質粒子の粒子径が35~100 μm であってもよい。
- [0015] 本発明の別の態様に係るイムノグロブリンを単離する方法は、
上記アフィニティークロマトグラフィー用充填剤を用いて、前記充填剤にイムノグロブリンを吸着させる工程、
前記イムノグロブリンを溶出させる工程、および
前記充填剤をアルカリ性液で洗浄する工程
を含む。
- [0016] 本発明の別の態様に係るカラムは、上記アフィニティークロマトグラフィー用充填剤が充填されたアフィニティークロマトグラフィー用充填カラムである。

発明の効果

- [0017] 本発明のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤によれば、タンパク質の動的結合容量が高く、しかも耐アルカリ性および保存安定性に優れる。また、上記アフィニティークロマトグラフィー用充填剤を、例えばイムノグロブリンの精製に用いた場合、繰り返し使用してもイムノグロブリンの動的結合容量が低下しにくいいため、安価なイムノグロブリン精製が可能となる。

図面の簡単な説明

- [0018] [図1] 図1は、本発明の実施例1で調製されたイムノグロブリン結合タンパク質(SP4Z)のアミノ酸配列を示す図である。
- [図2] 図2は、発現ベクター(pETM-11)に挿入された、本発明の実施例1に係るイムノグロブリン結合タンパク質をコードするDNAフラグメントの構成を説明する図である。
- [図3] 図3は、本発明の実施例2で調製されたイムノグロブリン結合タンパク

質（SPATK）のアミノ酸配列を示す図である。

[図4] 図4は、発現ベクター（pETM-11）に挿入された、本発明の実施例2に係るイムノグロブリン結合タンパク質をコードするDNAフラグメントの構成を説明する図である。

発明を実施するための形態

[0019] 以下、本発明のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤について、具体的に説明する。

[0020] 1. アフィニティークロマトグラフィー用充填剤

1. 1. 多孔質粒子の構成

本発明のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤を構成する多孔質粒子は、

(M-1) 水酸基を含有しエポキシ基を含有しないメタクリロイル基を含有するビニル単量体 40~99.5質量部、

(M-2) エポキシ基含有ビニル単量体 0.5~30質量部、

(M-3) (M-1) および (M-2) 以外のメタクリロイル基を含有するビニル単量体 0~59.5質量部、ならびに

(M-4) (M-1)、(M-2) および (M-3) 以外のビニル単量体 0~25質量部（但し、(M-1)、(M-2)、(M-3) および (M-4) の合計は100質量部）の共重合体からなり、該共重合体に含まれるエポキシ基を開環させて得られる開環エポキシ基を有する。ここで、多孔質粒子は、リガンド結合前の担体粒子をいう。

[0021] 1. 1. 1. (M-1) 水酸基を含有しエポキシ基を含有しないメタクリロイル基を有するビニル単量体

(M-1) 水酸基を含有しエポキシ基を含有しないメタクリロイル基を含有するビニル単量体は、1分子中に、1個以上のメタクリロイル基と、1個以上の水酸基とを有し、エポキシ基を含有しないビニル単量体である。(M-1) を特定量用いて、多孔質粒子を親水化し、これを含むことにより、タンパク質の動的結合容量が高く、しかも耐アルカリ性に優れたアフィニティ

ークロマトグラフィー用充填剤を得ることが出来る。

[0022] 以下、(M-1) 水酸基を含有しエポキシ基を含有しないメタクリロイル基を含有するビニル単量体として、(M-1-1) 1分子中に1個のメタクリロイル基を有する水酸基含有非架橋性ビニル単量体と、(M-1-2) 1分子中に2個以上のメタクリロイル基を有する水酸基含有架橋性ビニル単量体とに分けて説明する。

[0023] (M-1-1) 1分子中に1個のメタクリロイル基を有する水酸基含有非架橋性ビニル単量体としては、例えば、グリセロールモノメタクリレート、トリメチロールエタンモノメタクリレート、トリメチロールプロパンモノメタクリレート、ブタントリオールモノメタクリレート、ペンタエリスリトールモノメタクリレート、ジペンタエリスリトールモノメタクリレート、イノシトールモノメタクリレート、ヒドロキシエチルメタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、ヒドロキシエチルメタクリルアミド、ポリエチレングリコールメタクリルエステルなどが挙げられる。これらの中でも、式(A)で示される単量体が好ましい。

[0024]
$$\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})-\text{R} \cdots (\text{A})$$

(式中、Rは水素原子または1価の有機基を示す。)

[0025] 一般式(A)において、Rがメタクリロイル基を有さない1価の有機基である場合、1~8個の炭素原子を有する有機基であるのが好ましい。好ましい(M-1-1)としては、グリセロールモノメタクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、2-ヒドロキシプロピルメタクリレートなどが挙げられ、Rがヒドロキシメチル基に相当するグリセロールモノメタクリレートが最も好ましい。

[0026] (M-1-2) 1分子中に2個以上のメタクリロイル基を有する水酸基含有架橋性ビニル単量体としては、各種糖類の2置換以上のメタクリレート、多価アルコールのメタクリレート、または、多価アルコールのメタクリルアミドが好ましい。具体的には、グリセリンジメタクリレート、トリメチロールエタンジメタクリレート、トリメチロールプロパンジメタクリレート、ブ

タントリオールジメタクリレート、ペンタエリスリトールジメタクリレート、ペンタエリスリトールトリメタクリレート、ジペンタエリスリトールジメタクリレート、ジペンタエリスリトールトリメタクリレート、ジペンタエリスリトールテトラメタクリレート、ジペンタエリスリトールペンタメタクリレート、イノシトールジメタクリレート、イノシトールトリメタクリレート、イノシトールテトラメタクリレートなどが挙げられる。その他、各種糖類の2置換以上のメタクリレート、例えば、グルコースジメタクリレート、グルコーストリメタクリレート、グルコーステトラメタクリレート、マンニトールジメタクリレート、マンニトールトリメタクリレート、マンニトールテトラメタクリレート、マンニトールペンタメタクリレートなども挙げられる。さらに、ジアミノプロパノール、トリスヒドロキシメチルアミノメタン、グルコサミンなどの多価アミノアルコールとメタクリル酸との脱水縮合反応物と同様の構造を有する水酸基含有架橋性ビニル単量体なども挙げられる。

[0027] 中でも、式(A)に該当する化合物がより好ましい。

一般式(A)において、Rは、1~8個の炭素原子を有する有機基であるのが好ましい。このような(M-1-2)としては、Rがメタクリロイルオキシメチル基に相当するグリセリンジメタクリレートが最も好ましい。

[0028] (M-1)水酸基を含有しエポキシ基を含有しないメタクリロイル基を含有するビニル単量体の使用量は、共重合体を構成する全単量体100質量部のうち、40~99.5質量部、好ましくは45~95質量部である。(M-1)が40質量部未満であると、リガンドの活性が低くなるためタンパク質の動的結合量が低くなり、99.5質量部を超えると、(M-2)が0.5質量部未満となることから、リガンドの結合量が減ってタンパク質の動的結合量が低くなる。なお、(M-1)として、(M-1-1)と(M-1-2)とを併用してもよいが、(M-1-1)のみ用いるのが好ましい。

[0029] 1. 1. 2. (M-2)エポキシ基含有ビニル単量体

(M-2)エポキシ基含有ビニル単量体は、1分子中に、1個以上の重合性ビニル基(エチレン性不飽和結合を有する基)と、1個以上のエポキシ基

とを有する単量体である。エポキシ基含有ビニル単量体は、得られる共重合体からなる多孔質粒子に適切な量のエポキシ基を導入し、適切なりガンド結合量を得るための必須成分である。

[0030] (M-2) エポキシ基含有ビニル単量体としては、1分子中に、1個の重合性ビニル基と、1個のエポキシ基を有する単量体が工業的に容易に入手できる。このようなエポキシ基含有ビニル単量体としては、例えば、グリシジル(メタ)アクリレート、4-ヒドロキシブチル(メタ)アクリレートグリシジルエーテル、3,4-エポキシシクロヘキシルメチル(メタ)アクリレート、 α -(メタ)アクリル- ω -グリシジルポリエチレングリコール等の(メタ)アクリル酸エステル類；ビニルベンジルグリシジルエーテル等の芳香族ビニル化合物；アリルグリシジルエーテル、3,4-エポキシ-1-ブテン、3,4-エポキシ-3-メチル-1-ブテン等が挙げられ、グリシジルメタクリレート、4-ヒドロキシブチルアクリレートグリシジルエーテルが好ましく、グリシジルメタクリレートが特に好ましい。

[0031] そのほか、(M-2)として、水酸基とエポキシ基とを含有する、メタクリロイル基を含有するビニル単量体を使用することもできる。このような単量体としては、例えば、グリセリンモノメタクリレートグリシジルエーテル、ペンタエリスリトールジメタクリレートグリシジルエーテルなどが例示できる。

[0032] (M-2) エポキシ基含有ビニル単量体の使用量は、共重合体を構成する全単量体100質量部のうち、0.5~30質量部、好ましくは1~20質量部である。(M-2)が0.5質量部未満であると、リガンドの結合量が減ってタンパク質の動的結合量が低くなり、30質量部を超えると、保存中にリガンドの活性が低くなってタンパク質の動的結合量が低くなる。

[0033] 1. 1. 3. (M-3) 上記(M-1)および(M-2)以外のメタクリロイル基を含有するビニル単量体

(M-3) 上記(M-1)および(M-2)以外のメタクリロイル基を含有するビニル単量体としては、具体的には、(M-3-1) 1分子中に1個

のメタクリロイル基を有する水酸基非含有非架橋性ビニル単量体と、(M-3-2) 1分子中に2個以上のメタクリロイル基を有する水酸基非含有架橋性ビニル単量体とが挙げられる。以下、各々に分けて説明する。

[0034] (M-3-1) 1分子中に1個のメタクリロイル基を有する水酸基非含有非架橋性ビニル単量体としては、精製時の夾雑タンパク質の非特異吸着を防ぐ点から、非イオン性モノマーが好ましい。このような非イオン性モノマーとしては、例えば、メチルメタクリレート、エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、シクロヘキシルメタクリレート、メトキシエチルメタクリレートなどのメタクリレート類、メタクリルアミド、ジメチルメタクリルアミド、メタクリロイルモルホリン、ダイアセトンメタクリルアミドなどのメタクリルアミド類が挙げられる。なお、非イオン性モノマーであっても、2-エチルヘキシルメタクリレート、ステアシルメタクリレートのような疎水性メタクリレートは、精製時の夾雑タンパクの非特異吸着を増加させる場合があるので、好ましくない。

[0035] (M-3-2) 1分子中に2個以上のメタクリロイル基を有する水酸基非含有架橋性ビニル単量体としては、例えば、エチレングリコールジメタクリレート、ジエチレングリコールジメタクリレート、トリエチレングリコールジメタクリレート、テトラエチレングリコールジメタクリレート、プロピレングリコールジメタクリレート、ジプロピレングリコールジメタクリレート、トリプロピレングリコールジメタクリレート、テトラプロピレングリコールジメタクリレート、1,4-ブタンジオールジメタクリレート、1,6-ヘキサジオールジメタクリレート、トリメチロールプロパントリメタクリレート、ペンタエリスリトールテトラメタクリレートなどが挙げられる。比較的少量の使用で良好な多孔性が得られ、(M-1)の使用量を制限することが少ない点で、トリメチロールプロパントリメタクリレートが特に好ましい。

[0036] (M-3) 上記(M-1)および(M-2)以外のメタクリロイル基を含有するビニル単量体の使用量は、共重合体を構成する全単量体100質量部

のうち、0～59.5質量部、好ましくは0～50質量部である。(M-3)が59.5質量部を超えると、リガンドの活性が低くなってタンパク質の動的結合量が低くなる。

[0037] 1. 1. 4. (M-4) 上記 (M-1)、(M-2) および (M-3) 以外のビニル単量体

(M-4) 上記 (M-1)、(M-2) および (M-3) 以外のビニル単量体は、上記 (M-1)、(M-2) および (M-3) 以外の残余のビニル単量体である。本発明の目的である高いタンパク質の動的結合量と優れた耐アルカリ性を阻害しない範囲で25質量部以下の量で使用できる。(M-4)としては、非架橋性単量体として、エチレン、プロピレン、スチレン、酢酸ビニル、N-ビニルアセトアミドなどが挙げられ、架橋性単量体として、ジビニルベンゼン、ブタジエン、イソシアヌル酸ジアリル、イソシアヌル酸トリアリルなどが挙げられる。ジビニルベンゼンは、多孔質粒子の硬さを増し、クロマトグラフィーカラムの圧力を低下させるために有効な単量体である。(M-4)は、25質量部を超えると、タンパク質の動的結合量が低下したり、耐アルカリ性が低下したりする。

[0038] そのほか、好ましい共重合体を構成する単量体における好適な量比の具体例としては、

(M-1) 水酸基を含有しエポキシ基を含有しないメタクリロイル基を含有するビニル単量体 45～95質量部

(M-2) エポキシ基含有ビニル単量体 1～20質量部、

(M-3) (M-1) および (M-2) 以外のメタクリロイル基を含有するビニル単量体 0～50質量部、ならびに

(M-4) (M-1)、(M-2) および (M-3) 以外のビニル単量体 0～25質量部の共重合体(但し、(M-1)、(M-2)、(M-3) および (M-4) の合計は100質量部である。) が挙げられる。

[0039] 1. 1. 5. 多孔質粒子の製造

多孔質粒子は、公知のシード重合、懸濁重合などにより製造することができる。シード重合法として、特公昭57-24369号公報記載の二段膨潤重合法も好適に用いられる。重合に際しては、上記単量体の他、水、ポロジェンを必須成分とし、重合開始剤、高分子分散剤、界面活性剤、塩、シード粒子、水溶性重合禁止剤などを必要に応じて使用する。

[0040] 多孔質粒子の製造における好ましい重合法は、

上述の単量体混合物（(M-1) および (M-2)、ならびに必要に応じて (M-3) および/または (M-4)）100質量部と、

(P-1) 炭素数7~14である直鎖状、分岐鎖状および環状のアルコール、エーテル、アルデヒド、ケトン、エステル、炭素数8~10のアルキルベンゼンから選ばれる少なくとも1つのポロジェンと、を必須成分とする水系混合物の懸濁重合法である。

[0041] このとき、さらに (P-2) として (P-1) 以外のポロジェンを併用してもよい。ポロジェンの使用量は、好ましくはモノマー100質量部に対して合計で100~400質量部である。(P-1)の使用量はポロジェンの合計量100質量%中に10質量%以上であることが好ましい。

[0042] (P-1) のポロジェンを具体的に例示すると、

アルコールとして、1-ヘプタノール、2-ヘプタノール、3-ヘプタノール、4-ヘプタノール、2, 4-ジメチル-3-ペンタノール、5-メチル-2-ヘキサノール、2-エチル-1-ヘキサノール、2-オクタノール、3-オクタノール、5-メチル-3-ヘプタノール、1-ノナノール、3, 5, 5-トリメチルヘキサノール；

エーテルとして、ヘキシルメチルエーテル、ジブチルエーテル、シネオール；

アルデヒドとして、ヘプタナール、オクタナール、2-エチル-1-ヘキサナール、ノナナール、3, 5, 5-トリメチルヘキサナール、1-デカナール、ドデカナール；

ケトンとして、2-ヘプタノン、3-ヘプタノン、4-ヘプタノン、2,

4-ジメチル-3-ペンタノン、4, 4-ジメチル-2-ペンタノン、5-メチル-2-ヘキサノン、2-オクタノン、3-オクタノン、5-メチル-3-ヘプタノン、2, 6-ジメチル-4-ヘプタノン、2-ノナノン、3-ノナノン、4-ノナノン、3, 3, 5-トリメチルシクロヘキサノン、2-デカノン、3-デカノン、2-ウンデカノン、4-t-ペンチルシクロヘキサノン、2-ヘキシルシクロペンタノン、2-ヘプチルシクロペンタノン、ジシクロヘキシルケトン；

エステルとして、蟻酸ヘキシル、酢酸ペンチル、酢酸イソペンチル、プロピオン酸ブチル、プロピオン酸イソブチル、酪酸プロピル、酪酸イソプロピル、イソ酪酸プロピル、イソ酪酸イソプロピル、吉草酸エチル、イソ吉草酸エチル、ピバル酸エチル、ヘキサン酸メチル、酢酸ヘキシル、酢酸シクロヘキシル、酢酸-2-エチルブチル、プロピオン酸イソペンチル、酪酸ブチル、イソ酪酸ブチル、酪酸イソブチル、イソ酪酸イソブチル、吉草酸プロピル、イソ吉草酸プロピル、ヘキサン酸エチル、ヘプタン酸メチル、酢酸ヘプチル、プロピオン酸ヘキシル、酪酸ペンチル、酪酸イソペンチル、イソ酪酸ペンチル、イソ酪酸イソペンチル、吉草酸イソブチル、ヘキサン酸プロピル、ヘキサン酸イソプロピル、ヘプタン酸エチル、オクタン酸メチル、酢酸オクチル、酢酸イソオクチル、酢酸-2-エチルヘキシル、酪酸ヘキシル、酪酸シクロヘキシル、吉草酸ペンチル、イソ吉草酸イソペンチル、ヘキサン酸ブチル、ヘキサン酸イソブチル、オクタン酸エチル、ノナン酸メチル、酢酸ノニル、ヘキサン酸ペンチル、ノナン酸エチル、2-エチルヘキサン酸プロピル、3, 5, 5-トリメチルヘキサン酸エチル、デカン酸メチル、 δ -ドデカノラクトン、酢酸デシル、デカン酸エチル、酢酸シトロネリル、ドデカン酸メチル、酢酸ドデシル、ドデカン酸エチル；

アルキルベンゼンとして、キシレン、エチルベンゼン、クメン、n-プロピルベンゼン、n-ブチルベンゼン、t-ブチルベンゼン、sec-ブチルベンゼン、iso-ブチルベンゼン、エチルトルエン、シメン、メシチレンなどが挙げられる。

- [0043] (P-1) のポロジェンとしては、親水性を阻害せず、リガンドの活性を高く維持できることから、アルコール、エーテル、アルデヒド、ケトン、エステルが好ましく、ケトン、エステルがさらに好ましく、炭素数7~10のケトン、エステルが最も好ましい。
- [0044] (P-2) は (P-1) 以外のポロジェンであり、多孔質粒子の細孔容積を調整するために加えても良い成分であり、20℃における (P-2) の水への溶解度は20%以下であることが好ましい。
- [0045] ポロジェンの構成として、(P-2) のポロジェン、すなわち炭素数7未満の直鎖および分岐のアルコール、エーテル、アルデヒド、ケトン、エステル、炭素数8未満のアルキルベンゼンを主成分とすると、タンパク質分離などに適した大きな細孔径とはならず、また、細孔容積が小さくなる場合がある。また、炭素数14を超えるアルコール、エーテル、アルデヒド、ケトン、エステル、または、炭素数10を超えるアルキルベンゼンを主成分とすると、細孔容積が小さくなるか、あるいは、多孔質でない微小な粒子が形成される場合がある。
- [0046] (P-1) を含むポロジェンの合計量は、上記単量体混合物100質量部に対し、通常100~400質量部であり、好ましくは150~300質量部である。ポロジェンの合計量が100質量部未満であると、タンパク質分離などに適した大きな細孔径とはならず、また、細孔容積が小さくなる。ポロジェンの合計量が400質量部を超えると、細孔容積が過大になるか、あるいは、多孔質でない微小な粒子が形成される。
- [0047] (P-1) はポロジェンの合計量100質量%中に10質量%以上であることが好ましく、20質量%以上であることが好ましい。(P-1) がポロジェンの合計量中に10質量%以下であると、細孔容積が小さくなることがある。
- [0048] 懸濁重合における重合溶媒は、水である。水には、本発明の効果を損なわない範囲で、アルコール等の有機溶媒等が含まれていてもよい。水の量は、単量体全量100質量部に対し、好ましくは200~10000質量部、よ

り好ましくは500～5000質量部である。水の量が上記の範囲内であると重合中の粒子同士の合一が抑制され、粒径制御が容易であり、生産性に優れる。

[0049] 重合開始剤としては、過硫酸カリウム、過硫酸ナトリウム、過硫酸アンモニウムなどの過硫酸塩、過酸化水素、*t*-ブチルヒドロパーオキシド、*t*-ブチルパーオキシマレイン酸、コハク酸パーオキシド、2, 2'-アゾビス〔2-N-ベンジルアミジノ〕プロパン塩酸塩などの水溶性開始剤；ベンゾイルパーオキシド、ラウロイルパーオキシド、クメンヒドロパーオキシド、ジイソプロピルパーオキシジカーボネート、クミルパーオキシネオデカノエート、クミルパーオキシオクタノエート、*t*-ブチルパーオキシ-2-エチルヘキサノエート、3, 5, 5-トリメチルヘキサノイルパーオキシド、アゾビスイソブチロニトリル、アゾビスイソバレロニトリルなどの油溶性開始剤；有機パーオキシドと亜硫酸ナトリウム、ロンガリット、アスコルビン酸ナトリウムなどの還元剤を併用したレドックス系開始剤などが使用でき、好ましくは油溶性開始剤または油溶性のレドックス開始剤であり、生産性の点からより好ましくは油溶性開始剤である。重合開始剤の量は、単量体全量100質量部に対し、好ましくは0.01～10質量部、より好ましくは0.05～5質量部である。これら重合開始剤は、水、単量体混合物あるいはポロジェンに溶解して重合系に供してもよいし、室温および加熱中の重合系に単独で添加してもよい。過硫酸塩など、重合中に酸性または塩基性を示す開始剤を使用し、かつ、エポキシ基の加水分解を防止する必要がある場合は、pHを中性付近に維持する緩衝溶液中で懸濁重合することが好ましい。紫外線、電子線などを照射することにより開始剤を使用せずに懸濁重合することも可能であり、公知の光ラジカル開始剤を使用することも可能である。

[0050] 高分子分散剤としては、ケン化度80～95%のポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンなどの水溶性ポリマーを使用することができる。

[0051] 界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシルベンゼンスルホ

ン酸ナトリウム、ポリオキシエチレンドデシルエーテル硫酸エステル塩などのアニオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンアルキルエーテルなどの非イオン性界面活性剤などを使用することができる。

[0052] 塩としては、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、炭酸ナトリウムなどが好適に使用できる。

[0053] シード粒子としては、重量平均分子量 1,000~100,000 程度のポリスチレン粒子、ポリアルキル（メタ）アクリレート粒子などを使用することができる。

[0054] 水溶性重合禁止剤としては、ヨウ化カリウムなどのヨウ化物塩、亜硝酸ナトリウムなどの亜硝酸塩、チオ硫酸ナトリウムなどのチオ硫酸塩、スルホン化ナフトヒドロキノンアンモニウム塩などの水溶性キノン化合物などが好適に使用できる。

[0055] シード重合では、シード粒子の大きさと量、単量体の量、ポロジェンの量を調整することにより、本発明のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤として必要な粒径を有する多孔質粒子を得ることができる。懸濁重合では、高分子分散剤および界面活性剤の種類と量、攪拌速度、攪拌翼および重合容器の形状と大きさを調整することにより、本発明のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤として必要な粒径を有する多孔質粒子を得ることができる。

[0056] 多孔質粒子の細孔容積は、単量体とポロジェンとの比を変えることで調節することが公知である。他に、重合時に使用する塩や重合禁止剤の種類と量、重合温度などによっても多孔質粒子の細孔容積を調節することができる。アフィニティークロマトグラフィー用充填剤としての多孔質粒子の細孔容積は、リガンド結合前の多孔質粒子の細孔容積と、結合するリガンドの量によって調節することができる。

[0057] 重合の温度および時間は、レドックス系開始剤以外の開始剤を使用する場合、好ましくは 40~100℃で 30分~24時間、より好ましくは 60~90℃で 1~10時間である。

[0058] 重合完結後、シード粒子および／またはポロジェンの良溶媒を用いて洗浄することが、後述のリガンドの結合が容易となる点から、好ましい。洗浄溶媒としては、アセトン、エタノール、イソプロピルアルコールなどが好適に使用できる。また、必要に応じて、洗浄の前後に、超音波分散機などを用いて、多孔質粒子を分散しても良い。さらに、デカンテーション、ろ過などの方法により、小粒子や粗大粒子を除去することが、圧力特性の向上やタンパク質などの動的結合容量の向上の点から好ましい。

[0059] 1. 1. 6. エポキシ基含有量

リガンド結合前の多孔質粒子に含まれるエポキシ基は、リガンドを結合するための官能基であり、また、さらに開環後にアフィニティークロマトグラフィー用充填剤としての親水性向上の元となる官能基である。リガンド結合前の多孔質粒子のエポキシ基含有量は、好ましくは0.05~2mmol/gであり、さらに好ましくは0.08~1.5mmol/gであり、最も好ましくは0.10~1.0mmol/gである。リガンド結合前の多孔質粒子のエポキシ基含有量が0.05mmol/g以上であると、リガンドの結合量が適度であり、タンパク質の動的結合容量の低下が抑制される。リガンド結合前の多孔質粒子のエポキシ基含有量が2mmol/g以下であると、保存中におけるリガンドの活性の低下が抑制され、タンパク質の動的結合容量の低下も抑制される。リガンド結合前の多孔質粒子のエポキシ基含有量は、多孔質粒子に塩酸（または、塩化物イオンを含む塩）を過剰に添加して塩酸を付加反応することによりエポキシ基を開環し、残余の塩酸を過剰量の塩基（例えば水酸化ナトリウム水溶液）で中和した後、残余の水酸化ナトリウムを塩酸で逆滴定することにより定量することが出来る。リガンド結合前の多孔質粒子のエポキシ基含有量は、エポキシ基含ビニル単量体の量、重合温度、重合時間、重合液のpH、さらには、重合後の開環処理などによって、調整することが出来る。

[0060] 1. 2. アフィニティークロマトグラフィー用充填剤の構成

本発明のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤は、前記単量体の共

重合体からなり、前記共重合体に含まれるエポキシ基を開環させて得られる開環エポキシ基を有する多孔質粒子と、前記多孔質粒子に結合するリガンドと、を含む。

[0061] 1. 2. 1. リガンド

リガンドは、標的物に対して適度なアフィニティーを有するものであれば、その種類は特に限定されないが、例えば、プロテインA、プロテインG、アビジン等のタンパク質；インシュリン等のペプチド；モノクローナル抗体等の抗体；酵素；ホルモン；DNA；RNA；ヘパリン、ルイスX、ガングリオシド等の糖質；イミノジ酢酸、合成色素、2-アミノフェニル硼素酸、4-アミノベンズアミジン、グルタチオン、ビオチンやその誘導体のような低分子化合物を用いることができる。上記に例示したリガンドはその全体を用いてもよいが、リコンビナント、酵素処理等によって得られるそのフラグメントを用いてもよい。また、人工的に合成されたペプチドやペプチド誘導体であってもよい。

[0062] イムノグロブリンの分離または精製に好適なリガンドとしては、例えばプロテインAおよびプロテインGであり、さらに好ましくはプロテインAのイムノグロブリン結合ドメインであり、最も好ましくはプロテインAのイムノグロブリン結合ドメインの末端に、4個以上の連続するヒスチジン単位を含むペプチドを付加したタンパク質であり、このようなタンパク質としては、例えば、後述する一般式(1)または一般式(2)で表されるイムノグロブリン結合タンパク質が挙げられる。

[0063] なお、本発明において、「タンパク質」とは、ペプチド構造単位を有するあらゆる分子をいい、例えば、天然型タンパク質の部分的断片や天然型タンパク質のアミノ酸配列を人為的に改変した変異体を含む概念である。また、「イムノグロブリン結合ドメイン」とは、単独でイムノグロブリン結合活性を有するポリペプチドの機能単位を表し、「イムノグロブリン結合タンパク質」とは、イムノグロブリンに特異的な親和性を有し、かつ、「イムノグロブリン結合ドメイン」を含むタンパク質を表す。「イムノグロブリン結合」

とはイムノグロブリン分子の相補性決定領域（CDR）以外の領域、特にFcフラグメントに結合することを表す。本発明において、アフィニティークロマトグラフィーに関連して使用される用語「リガンド」とは、アフィニティークロマトグラフィーの標的物質と結合する分子のことを表す。

[0064] 1. 2. 2. イムノグロブリン結合ドメイン

プロテインAのイムノグロブリン結合ドメインは、天然型のイムノグロブリン結合ドメインであってもよいし、または、組換え型のイムノグロブリン結合ドメインであってもよい。プロテインAのイムノグロブリン結合ドメインは、Aドメイン、Bドメイン、Cドメイン、Dドメイン、Eドメイン、およびZドメインから選ばれる少なくとも1種であることが好ましい。Aドメイン、Bドメイン、Cドメイン、Dドメイン、およびEドメインのアミノ酸配列は例えば、Moks T, Abrahms L, et al., Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains, Eur J Biochem. 1986, 156, 637-643のFig. 1に記載されている。該文献はこの参照により開示に含まれる。また、上記文献に記載された各ドメインのアミノ酸配列と70%以上（好ましくは90%以上）の相同性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質も、本発明におけるプロテインAのイムノグロブリン結合ドメインとして使用することができる。

[0065] 組換え型のイムノグロブリン結合ドメインは、イムノグロブリン結合活性において、改変前のイムノグロブリン結合ドメインと同等のものとして扱うことができ、例えば、天然型のプロテインAのイムノグロブリン結合ドメインのアミノ酸配列と70%以上（好ましくは90%以上）の相同性を保持することが好ましい。具体例としては、ニルソン・ビー（Nilsson B.）他、プロテイン・エンジニアリング（Protein engineering）、1987年、第1巻、2号、107-113頁に記載されているZドメイン（配列番号1）、Hober Sらによる米国特許出願200

6/0194955A1に記載されているアルカリ耐性を有するZドメインの変異体 (mutant) が挙げられる。

[0066] 本発明のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤に用いられるリガンドは、複数の同一または異なる種類のイムノグロブリン結合ドメインを有していてもよい。

[0067] 例えば、上記リガンドは、プロテインAのイムノグロブリン結合ドメインとして、(Dドメイン-Aドメイン)ⁿ (ここで、nは1以上の整数 (好ましくは1~6) を示し、DドメインとAドメインとの間には任意のアミノ酸配列が存在していてもよい。)、すなわち、AドメインおよびDドメインを含む繰り返し単位を含むものであってもよい。また、本発明のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤は使用時にアルカリ水溶液に接触する機会を有するため、上記リガンドは、プロテインAのZドメインを含む繰り返し単位を含むものであってもよい。

[0068] また、本発明において、リガンドは、上記各ドメイン、またはそのフラグメントもしくは変異体を、単独でまたは組み合わせて2個以上含むことができる。

[0069] 本発明において、イムノグロブリン結合ドメインのフラグメントとは、当該ドメインのアミノ酸配列の一部を有するものであり、且つイムノグロブリン結合活性を有するものをいう。好ましくは、イムノグロブリン結合ドメインのフラグメントとは、当該ドメインのアミノ酸配列と90%以上、より好ましくは95%以上の配列同一性を有し、且つイムノグロブリン結合活性を有するものをいう。また本発明において、イムノグロブリン結合ドメインの変異体とは、好ましくは当該ドメインのアミノ酸配列と90%以上、より好ましくは95%以上の配列同一性を有し、且つイムノグロブリン結合活性を有するものをいう。

[0070] 例えば、本発明に用いられるリガンドは、Zドメイン、またはそのフラグメントもしくは変異体から選ばれる少なくとも1個を含むことができる。Zドメインについては、ニルソン・ビー (Nilsson B.) 他、プロテ

イン・エンジニアリング (Protein engineering)、1987年、第1巻、2号、107-113頁)に記載されている。

[0071] また、本発明において、リガンドは、Zドメイン、またはそのフラグメントもしくは変異体を単独でまたは組み合わせて2個以上（好ましくは4～10個）含むことができる。

[0072] Zドメインの変異体としては、例えば、特許第4391830号に記載された配列を有するタンパク質が挙げられる。例えば、特許第4391830号の請求項1には、配列番号1で規定される2以上の反復単位（Zドメイン）を含み、23位のアミノ酸残基がスレオニンであるタンパク質が記載されている。

[0073] また、Zドメインのフラグメント（Zフラグメント）とは、Zドメインのアミノ酸配列の一部を有するものであり、例えば、Zドメインのアミノ酸配列の90%以上を有するものであることが好ましく、95%以上を有するものであることがより好ましく、且つイムノグロブリン結合活性を有するものをいう。また、Zドメインの変異体とは、例えば、Zドメインのアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するものであり、95%以上の相同性を有するものであるのが好ましく、且つイムノグロブリン結合活性を有するものをいう。Zドメインの変異体は、Zドメインと比較してアルカリ耐性が改良されたものであることが好ましい。この場合、Zドメインの変異体がZドメインと比較してアルカリ耐性が改良されているかどうかは、後述する実施例記載の方法にて確認することができる。

[0074] 1. 2. 3. イムノグロブリン結合タンパク質1

好ましいリガンドの一例であるイムノグロブリン結合タンパク質（以下、「タンパク質1」ともいう。）は、下記一般式（1）で表される。

[0075] $R-R^2 \cdots \cdots (1)$

（式中、Rは4～20個のヒスチジンが連続した部位を含む4～300個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を示し、R²はプロテインAのイムノグロブリン結合ドメインを少なくとも1個含む50～500個のアミノ酸からなる

アミノ酸配列を示す（ここで、 R^2 がRに結合する末端はイムノグロブリン結合ドメインのC末端またはN末端である。）。）

[0076] 上記一般式（1）において、Rで表されるアミノ酸配列に含まれるアミノ酸の数は8～100個であることが好ましく、Rに含まれるヒスチジンが連続した部位のヒスチジンの数は4～8個であることが好ましい。また、上記一般式（1）において、 R^2 で表されるアミノ酸配列に含まれるアミノ酸の数は120～480個であることが好ましい。

[0077] 上記一般式（1）において、Rで表されるアミノ酸配列および R^2 で表されるアミノ酸配列のうち少なくとも一方が、リジン、アルギニン、およびシステインから選ばれる1種のアミノ酸を含む1～50個のアミノ酸からなるドメインtを含むことが好ましい。この場合、上記アミノ酸配列中に同一または異なるドメインtが複数含まれていてもよい。

[0078] また、上記一般式（1）において、 R^1 は下記一般式（2）で表される基であることが好ましい。

[0079] $R^1 - r - \dots (2)$

（式中、 R^1 は4～20個のヒスチジンが連続した部位を含む4～100個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を示し（ここで、 R^1 において、前記ヒスチジンが連続した部位の末端がrと結合する。）、rは7～200個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示す。）

[0080] 上記一般式（2）において、 R^1 で表されるアミノ酸配列に含まれるアミノ酸の数は4～25個であることが好ましく、 R^1 に含まれるヒスチジンが連続した部位のヒスチジンの数は4～8個であることが好ましく、rで表されるアミノ酸配列に含まれるアミノ酸の数は10～50個であることが好ましい。

[0081] また、上記一般式（2）に示されるrで表されるアミノ酸配列中には、TEVドメインが含まれていてもよい。rで表されるアミノ酸配列中にTEVドメインが含まれていることにより、TEVプロテアーゼによる切断によってRと R^2 との分離が可能になるうえ、TEVドメインは、担体への固定化量

が多く、かつ、当該担体のイムノグロブリン保持能力を高めるという効果を実現するために好ましい配列である。また、 r で表されるアミノ酸配列中に、TEVドメインの変異体 (Mutant) (該TEVプロテアーゼで切断できるか否かと関係なく、TEVドメインのアミノ配列と70%以上、好ましくは90%以上の相同性を有する。)が含まれていてもよい。

[0082] 本発明で用いるタンパク質1を構成するアミノ酸の総個数は通常54~800であり、粒子に結合させる用途に使用する場合、80~600であるのが好ましい。

[0083] 1. 2. 4. イムノグロブリン結合タンパク質2

リガンドは、耐アルカリ性のイムノグロブリン結合性タンパク質であってもよい。耐アルカリ性のイムノグロブリン結合性タンパク質として、好ましいリガンドの別の一例であるイムノグロブリン結合タンパク質(以下、「タンパク質2」ともいう。)は、下記一般式(3)で表される。

[0084] $R-R^2 \cdots \cdots (3)$

(式中、 R は4~20個のヒスチジンが連続した部位を含む4~300個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を示し、 R^2 はZドメイン、またはそのフラグメントもしくは変異体を含む50~500個のアミノ酸からなる、イムノグロブリンと結合可能なアミノ酸配列を示す(ここで、 R^2 が R に結合する末端はイムノグロブリン結合ドメインのC末端またはN末端である。))

[0085] 上記一般式(3)において、 R で表されるアミノ酸配列に含まれるアミノ酸の数は8~100個であることが好ましく、 R に含まれるヒスチジンが連続した部位のヒスチジンの数は4~8個であることが好ましい。また、上記一般式(1)において、 R^2 で表されるアミノ酸配列に含まれるアミノ酸の数は120~480個であることが好ましい。

[0086] また、上記一般式(3)において、 R は下記一般式(4)で表される基であることが好ましい。

[0087] $R^1-r \cdots \cdots (4)$

(式中、 R^1 は4~20個のヒスチジンが連続した部位を含む4~100個

のアミノ酸からなるアミノ酸配列を示し（ここで、 R^1 において、前記ヒスチジンが連続した部位の末端が r と結合する。）、 r は 7 ~ 200 個のアミノ酸からなる任意のアミノ酸配列を示す。）

[0088] また、上記一般式（2）と同様に、上記一般式（4）における r で表されるアミノ酸配列中には、TEVドメインが含まれていてもよい。 r で表されるアミノ酸配列中にTEVドメインが含まれていることにより、TEVプロテアーゼによる切断によって R と R^2 との分離が可能になるうえ、TEVドメインは、本発明の効果（担体への固定化量が多く、かつ、当該担体のイムノグロブリン保持能力を高めること）を実現するために好ましい配列である。また、 r で表されるアミノ酸配列中に、TEVドメインの変異体（Mutant）（該TEVプロテアーゼで切断できるか否かと関係なく、TEVドメインのアミノ配列と70%以上、好ましくは90%以上の相同性を有する。）が含まれていてもよい。

[0089] 上記一般式（4）において、 R^1 で表されるアミノ酸配列に含まれるアミノ酸の数は4~25個であることが好ましく、 R^1 に含まれるヒスチジンが連続した部位のヒスチジンの数は4~8個であることが好ましく、 r で表されるアミノ酸配列に含まれるアミノ酸の数は10~50個であることが好ましい。

[0090] 上記一般式（3）において、 R で表されるアミノ酸配列および R^2 で表されるアミノ酸配列のうち少なくとも一方が、リジン、アルギニン、およびシステインから選ばれる1種のアミノ酸を含む1~50個のアミノ酸からなるドメイン t を含むことが好ましい。この場合、上記アミノ酸配列中に同一または異なるドメイン t が複数含まれていてもよい。

[0091] 本発明のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤において、リガンドとしてタンパク質2を用いた場合、アルカリ性条件下での洗浄（例えば水酸化ナトリウム等のアルカリ性液を用いた洗浄）に対して高い耐性を有する。その理由としては、ヒスチジンが連続した部位をZドメインに付加したことにより、多孔質粒子とZドメインの結合位置がヒスチジン連続部位のない場

合とは異なること、および固定化後のZドメインに何らかの構造変化が起こり、アルカリ耐性が高くなったことなどが考えられる。実際の理由を実験により確認することはできていないが、耐アルカリ性の実験結果は、ヒスチジン連続部位を付加することによる作用効果があることを示している。

[0092] なお、本発明のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤を用いてイムノグロブリンを単離する場合、例えば、本発明のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤を用いて、前記充填剤にイムノグロブリンを吸着させる工程（第一の工程）、前記イムノグロブリンを溶出させる工程（第二の工程）、および前記充填剤をアルカリ性液でCIP洗浄する工程（第三の工程）により、イムノグロブリンを単離することができる。

[0093] 第一の工程では、上記アフィニティークロマトグラフィー用充填剤を充填したカラム等にイムノグロブリンを含有する溶液を、該充填剤のリガンドにイムノグロブリンが吸着する条件にて流す。ここで、上記イムノグロブリンを含有する溶液とは、イムノグロブリンを含有する任意の溶液であればよく、例えば、血清等の生体由来の検体、ハイブリドーマ培地の上清等が挙げられる。上記イムノグロブリンが吸着する条件としては、例えば、イムノグロブリン濃度0.1～10g/L、溶液のpH5～9、カラム中の滞留時間0.5～50分、温度0～40℃が挙げられる。

[0094] この第一の工程では、溶液中のイムノグロブリン以外の物質のほとんどは吸着されずカラムを通過する。通常、一部の弱く保持された物質を除去するため、充填剤をNaClなどの塩を含む中性の緩衝液、例えば、リン酸二水素ナトリウム/リン酸水素二ナトリウム溶液、クエン酸/リン酸水素二ナトリウム溶液、塩酸/トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン溶液、HEPES/水酸化ナトリウム溶液等、で洗浄する。第二の工程では、pH2～5の適切な緩衝液、例えば、クエン酸/クエン酸ナトリウム溶液、酢酸/酢酸ナトリウム溶液、塩酸/グリシン溶液等、を流しイムノグロブリンを溶出させる。第三の工程では、アルカリ性液で充填剤を洗浄（CIP洗浄）する。

[0095] ここで使用されるアルカリ性液としては、例えば、水酸化ナトリウム水溶

液、水酸化カリウム水溶液、トリエチルアミン、水酸化テトラブチルアンモニウム等が挙げられる。

[0096] 1. 2. 5. タンパク質1および2の製造

本発明で用いるタンパク質1および2を製造するための標準技術としては、例えば、Frederick M. AusbelらによるCurrent Protocols In Molecular BiologyやSambrookら編集のMolecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd edition, 2001)などに記載されている公知の遺伝子組換え技術を利用することができる。例えば、本発明で用いるタンパク質1または2は、米国特許第5,151,350号明細書に記載されている遺伝子組換え技術を用いて製造することができる。すなわち、目的の改変タンパク質(タンパク質1または2)をコードする核酸配列を含有させた発現ベクターを大腸菌などの宿主に形質転換し、当該細胞を適切な液体培地で培養することにより、培養後の細胞から、本発明で用いるタンパク質1または2を大量かつ経済的に取得することができる。好ましい発現ベクターとしては、細菌内で複製可能な既知のベクターのいずれをも用いることができ、例えば、米国特許第5,151,350号明細書に記載されているプラスミドや、Sambrookら編集のMolecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd edition, 2001)などに記載されているプラスミドが挙げられる。また、宿主中に核酸を導入することにより宿主を形質転換させるためには、当該技術分野において知られるいずれの方法を用いてもよく、例えば、Sambrookら編集のMolecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd edition, 2001)などに記載されている公知の方法を利用することができる。形質転換した細菌を培養して、発現されたタンパク質を回収する方法は、当業者によく知られている。

[0097] 具体的には、所望のアミノ酸配列をコードするDNAを数十塩基からなる合成オリゴヌクレオチドに分割して合成し、それらをDNAリガーゼによるライゲーション反応によって繋げてプラスミドに挿入することにより、目的の発現ベクターを取得することができる。その際に、当該タンパク質を大腸菌で効率良く発現させる目的で、大腸菌の至適コドンを用いた核酸配列を採用することは、当業者によって一般的に行われる方法である。また、後述する本発明の実施例に示されるように *Staphylococcus aureus* のゲノムDNAからPCR (Polymerase Chain Reaction) 技術を用いて所望のアミノ酸配列をコードするDNA配列を構築することが可能である。

[0098] 例えば、上記製造方法で用いる核酸は、イムノグロブリン結合タンパク質 (タンパク質1または2) あるいはその等機能変異体をコードし得る。本発明において、イムノグロブリン結合タンパク質の「等機能変異体 (functional variant)」とは、部分的なアミノ酸の付加、削除、置換、アミノ酸残基の化学的修飾等により改変されたイムノグロブリン結合タンパク質であって、改変前のイムノグロブリン結合タンパク質のアミノ酸配列と70%以上、好ましくは90%以上の相同性を保持し、かつ、イムノグロブリン結合活性において、改変前のイムノグロブリン結合タンパク質と同等のものとして扱うことができるものを意味する。すなわち、上記核酸としては、本明細書におけるタンパク質1または2をコードする核酸が含まれる。

[0099] また、上述したように、本発明で用いるタンパク質1および2は、イムノグロブリン結合ドメインを1個以上 (好ましくは2~12個、より好ましくは4~10個) を含むタンパク質であってもよい。このようなタンパク質をコードするcDNAは、1個のイムノグロブリン結合ドメインをコードするcDNA (相補的DNA) を所定の個数、直列に連結することにより、容易に作成することができる。こうして作成したcDNAを適切な発現プラスミドに挿入して利用することにより、イムノグロブリン結合ドメインを1個以上

含むタンパク質を容易に製造することができる。

[0100] 例えば、後述する実施例において示される配列番号4のアミノ酸配列を有するタンパク質（SPATK）や配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質（SP4Z）、配列番号2または配列番号4において1個または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつイムノグロブリン結合活性を有するタンパク質は、本発明で用いるイムノグロブリン結合タンパク質として好適である。

[0101] 1. 2. 6. リガンドの結合

上記担体と上記リガンドの結合方法としては、多孔質粒子に含まれるエポキシ基をそのままリガンドとの結合部位として利用することが、プロセスとして簡便であり、好ましい。その他に、多孔質粒子に含まれるエポキシ基を開環して生成するアルコール性水酸基をトシル基などで活性化してから、リガンドを結合する方法や、多孔質粒子に含まれるエポキシ基または、当該エポキシ基の開環により生成する基からさらにリンカーを伸ばしてから、当該リンカーを介して多孔質粒子にリガンドを結合しても良い。

[0102] リガンドの結合条件は、リガンド結合前の多孔質粒子のエポキシ基含有量、リガンドの種類により異なるが、当業者にとっての公知の方法を採用することができる。リガンドがタンパク質である場合は、タンパク質のN末端のアミノ基、タンパク質に含まれるリジン、システインがエポキシとの反応点になりうる。タンパク質を結合する場合、例えば、タンパク質の等電点に近いバッファー類の水溶液を用い、必要により塩化ナトリウムや硫酸ナトリウムなどの塩を添加し、タンパク質と多孔質粒子を混合しながら、0～40℃で1～24時間反応させて、リガンドであるタンパク質を結合することができる。

[0103] リガンドの結合量は、リガンドの種類、標的分子の種類などによって、適宜調節されるが、プロテインAのような抗体結合性タンパク質をリガンドとして結合する場合、多孔質粒子1g当たり、好ましくは10～200mg、より好ましくは25～100mgである。プロテインAのような抗体結合性

タンパク質をリガンドとして結合する場合、多孔質粒子 1 g 当たりのリガンドの結合量が 10 mg 以上であると動的結合容量に優れ、200 mg 以下であると、結合した抗体の溶出のために多量の溶出液の量が適量となる。

[0104] 1. 2. 7. 開環エポキシ基

本発明のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤を構成する多孔質粒子は、開環エポキシ基を有する。この開環エポキシ基は、上記特定の重合体からなる多孔質粒子にリガンドを結合した後に、該重合体に含まれるエポキシ基、すなわち、リガンドと結合したエポキシ基以外の残余のエポキシ基を開環させて得られる。これは、多孔質粒子をアフィニティークロマトグラフィー用充填剤として使用する前に、多孔質粒子の表面のエポキシ基が実質的に全て開環していることを意味する。

[0105] なお、多孔質粒子の表面のエポキシ基が実質的に全て開環しているとは、開環エポキシ基を有する多孔質粒子に残留するエポキシ基が、具体的には、好ましくは 0.04 mmol/g 未満、さらに好ましくは 0.02 mmol/g 未満であることを意味し、エポキシ基が残留していないことが最も好ましい。開環エポキシ基の残留量が 0.04 mmol/g 未満であると、保存安定性に優れる。

[0106] エポキシ基が開環して生成する開環エポキシ基であるアルコール性水酸基は、粒子表面を親水化し、タンパク質などの非特異吸着を防止すると共に、水中で粒子の靱性を向上させ、高流速下の粒子の破壊を防止する役割を果たす。多孔質粒子中のエポキシ基の開環方法としては、例えば、水溶媒中で、酸またはアルカリにより、加熱または室温で攪拌する方法を挙げることができる。また、メルカプトエタノール、チオグリセロールなどのメルカプト基を有するブロッキング剤やモノエタノールアミンなどのアミノ基を有するブロッキング剤で、エポキシ基を開環させても良い。最も好ましい開環エポキシ基は、多孔質粒子に含まれるエポキシ基をチオグリセロールにより開環させて得られる開環エポキシ基である。チオグリセロールは、原料としてメルカプトエタノールなどよりも毒性が低く、チオグリセロールが付加したエポ

キシ開環基は、アミノ基を有するブロッキング剤による開環基よりも非特異吸着が低い上に、動的結合量が高くなるといった利点を有する。

[0107] 1. 2. 8. 粒子径、細孔容積など

本発明のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤を構成する多孔質粒子の粒子径は、通常、 $35 \sim 100 \mu\text{m}$ であり、好ましくは $38 \sim 75 \mu\text{m}$ である。粒子径が、 $35 \mu\text{m}$ 以上であると、圧力特性に優れる。 $100 \mu\text{m}$ 以下であると、動的結合容量が高い充填剤が得られる。開環エポキシ基を有する多孔質粒子の粒子径は、上述の通り、多孔質粒子を重合する際の条件で調整することができる。なお、本発明における「粒子径」とは、レーザ回折散乱式粒度分布測定装置により得られる体積平均粒子径である。

[0108] 本発明のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤を構成する開環エポキシ基を有する多孔質粒子は、水銀ポロシメータで孔径 $10 \sim 5000 \text{nm}$ の範囲に相当するポアを測定したときに、好ましくは $1.00 \sim 3.00 \text{ml/g}$ 、さらに好ましくは $1.05 \sim 2.10 \text{ml/g}$ の細孔容積を有する。細孔容積が上記の範囲内であるとタンパク質の動的結合容量が高い充填剤が得られる。

[0109] 本発明のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤を構成する開環エポキシ基を有する多孔質粒子は、好ましくは $80 \sim 150 \text{m}^2/\text{g}$ 、より好ましくは $100 \sim 140 \text{m}^2/\text{g}$ の比表面積を有する。ここで、比表面積が $80 \text{m}^2/\text{g}$ 未満であると、動的結合容量に劣り、一方、 $150 \text{m}^2/\text{g}$ を超えると、充填剤の強度が劣るために高流速下で充填剤が破壊されて、カラム圧力が上昇する場合がある。本発明における「比表面積」とは、水銀ポロシメータにより得られる細孔径 $10 \sim 5000 \text{nm}$ の細孔の有する表面積を粒子の乾燥質量で除した値である。

[0110] 本発明のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤を構成する開環エポキシ基を有する多孔質粒子は、好ましくは $55 \sim 300 \text{nm}$ 、より好ましくは $60 \sim 250 \text{nm}$ の体積平均細孔径を有する。ここで、体積平均細孔径が 55nm 未満であると、高流速下の動的結合容量低下が顕著になる場合があ

り、一方、300nmを超えると、流速にかかわらず動的結合容量が低下する場合がある。本発明における「体積平均細孔径」とは、水銀ポロシメーターにより得られる細孔径10~5000nmの細孔の体積平均細孔径である。

実施例

[0111] 2. 実施例

以下、本発明のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤を、実施例を挙げてさらに具体的に説明する。また、以下の記載は本発明の態様を概括的に示すものであり、特に理由なく、かかる記載により本発明は限定されるものではない。

[0112] 2. 1. 評価方法

2. 1. 1. エポキシ基含有量

リガンド結合前の多孔質粒子のエポキシ基含有量は、重合で使用したエポキシ基含有モノマー量より計算されるエポキシ基のモル数が2.00mmolとなるように、質量濃度約10%で正確な質量濃度がわかっている多孔質粒子水分散体をポリエチレンボトルに質量で測り取り、これに濃度38%の塩化カルシウム水溶液25mLおよび2規定の塩酸2.00mLを加えて、75°Cで2時間30分攪拌することによりエポキシ基を開環し、冷却後、2規定の水酸化ナトリウム水溶液2.50mLで中和し、さらにpHメーターでpHをモニターしながら0.1規定の塩酸で逆滴定することにより定量した。

[0113] 2. 1. 2. 粒子径（体積平均粒子径）

レーザ回折散乱式粒度分布測定装置（ベックマン・コールター社製 LS 13320）により、粒子の体積平均粒子径を測定した。

[0114] 2. 1. 3. 細孔容積、比表面積、体積平均細孔径

40°Cで24時間真空乾燥させて乾燥粒子を得、水銀ポロシメーター（島津製作所社製 オートポアIV9520）にて乾燥粒子の細孔容積、比表面積、および体積平均細孔径（細孔径）を求めた。測定範囲は細孔径範囲で1

0～5000nmとした。

[0115] 2. 1. 4. 耐アルカリ性

得られた多孔質粒子とこれに結合したリガンドとを含む充填剤を1mL（5mmΦ×50mm長）カラムに充填し、GEヘルスケアバイオサイエンス社製AKTApriplusに接続して、20mMのリン酸バッファー（pH7.5）を20mL流して洗浄し、次に75mMグリシン塩酸塩バッファー（pH3.2）を流速0.2mL/分で流しながら、pH6.5に達するまでの通液容量を測定して、初期の中和通液量とした。次に、0.3規定の水酸化ナトリウム水溶液でカラム内を置換してから、25℃で15時間静置した。上記と同様に洗浄、中和通液量を測定し、アルカリ劣化後の中和通液量とした。初期の中和通液量とアルカリ劣化後の中和通液量との液量差（表2～表4において「液量差」と記載する。）を耐アルカリ性の指標とした。すなわち、初期の中和通液量とアルカリ劣化後の中和通液量との液量差が小さいほど、アルカリ劣化が少なく、耐アルカリ性が優れているといえる。

[0116] 2. 1. 5. タンパク質の動的結合容量

GEヘルスケアバイオサイエンス社製AKTApriplusを用いて、線流速300cm/hrにおけるタンパク質（ヒトIgG抗体）の動的結合容量を測定した。カラム容量は4mL（5mmΦ×200mm長）、ヒトIgG抗体（Equitech Bio社製 HGG-1000）は20mMリン酸バッファー（pH7.5）で5mg/mLに希釈したものを使用し、溶出先端10%ブレイクスルーのときのヒトIgG抗体吸着量とカラム充填体積から動的結合容量（表2～表4において「DBC」と記載する。）を求めた。以下、動的結合容量はDBCと記載することがある。

[0117] 2. 1. 6. 保存安定性

初期のDBCを測定したカラムのまま、40℃で3週間保存し、このカラムの保存後のDBCを同様に測定した。初期のDBCに対する保存後のDBCの割合（維持率）を%で示し、保存安定性の指標とした。

[0118] 2. 1. 7. プロテインA結合量

多孔質粒子に結合したリガンドであるプロテインA (SPA) の結合量は、ビシンコニン酸 (BCA) 試薬を用いた試薬セットで定量した。具体的には、固形分換算で1mgの充填剤をテストチューブに採取し、これをThermo Fisher Scientific社 (旧PIERCE社) のBCA Protein Assay Kitで定量した。反応は、37°Cで30分間、転倒混和することによって行った。検量線は、多孔質粒子に結合させたプロテインAと同一のロットのものを用いて作成した。

[0119] 2. 2. 実験例

2. 2. 1. 実施例1

(i) 多孔質粒子の懸濁重合

4251gの純水にポリビニルアルコール (クラレ社製 PVA-217) 8.50g、ドデシル硫酸ナトリウム (花王社製 エマール10G) 0.43gおよび硫酸ナトリウム21.3gを添加し、一晚攪拌して水溶液 (S-1) を調製した。重合当日、(S-1) の20gを別に抜き取っておいた。

[0120] 次に、(M-1) グリセロールモノメタクリレート (日本油脂社製) 82.4g、(M-2) グリシジルメタクリレート (三菱レーヨン社製) 16.5g、(M-3) トリメチロールプロパントリメタクリレート (サートマー社製) 65.9gを2-オクタノン (東洋合成社製) 246gおよびアセトフェノン (和光純薬工業社製) 61.7gに溶解させ、単量体溶液を調製した。なお、単量体の全質量を100質量部としたときの、各単量体の部数は、グリセロールモノメタクリレート80質量部、グリシジルメタクリレート10質量部、トリメチロールプロパントリメタクリレート40質量部である。

[0121] 抜き取っておいた (S-1) 20gに2, 2'-アゾイソブチロニトリル (和光純薬工業社製) 2.0gを添加して分散し、開始剤分散液とした。

[0122] 次に、準備した水溶液 (S-1) および単量体溶液をバツフル付きの7

セパラブルフラスコ内に投入し、温度計、攪拌翼、および冷却管を装着して、温水バスにセットし、窒素雰囲気下、240 rpmで攪拌を開始した。続いて、セパラブルフラスコを温水バスにより加温し、内温が85°Cに到達したところで、開始剤分散液を添加し、85°Cに温度を保持しつつ、5時間攪拌を行った。

[0123] 次いで、反応液を冷却したのち、かかる反応液をヌッチェでろ過し、純水とイソプロピルアルコールで洗浄した。洗浄した粒子をポリビンに移し、水に分散してデカンテーションを3回行い、小粒子を除いた。以上の操作により水に分散した12.5質量%の多孔質粒子1（粒子乾燥質量105g）を得た。多孔質粒子1のエポキシ基含有量は、0.55 mmol/gであった。

[0124] (ii) リガンドの作製

2. 2. 1. 1. SP4Z発現ベクターの構築

イムノグロブリン結合タンパク質（SP4Z）発現ベクターを下記のステップで構築した。図2は、SP4Zベクターの構築方法を説明する図である。

[0125] (1) ステップ1

単量体ZドメインをコードするDNAを出発物質として、NcoI切断部位およびEcoRI切断部位を有する単量体Zドメインベクター（A-pETM11）（SP1Z）を構築した。

[0126] (2) ステップ2

次に、A-pETM11ベクターにもう一個Zドメインを付加して、EcoRI切断部位およびSacI切断部位を有する2量体Zドメインベクター（AB-pETM11）（SP2Z）を構築した。

[0127] (3) ステップ3

次いで、AB-pETM11ベクターに更にもう一個Zドメインを付加して、SacI切断部位およびHindIII切断部位を有する3量体Zドメインベクター（ABC-pETM11）（SP3Z）を構築した。

[0128] (4) ステップ4

最後に、ABC-pETM11ベクターに4個目のZドメインを付加して、HindIII切断部位およびXhoI切断部位を有するpETM11-SP4Zのベクターを構築した。

[0129] 2. 2. 1. 2. SP1Z-pETM11ベクター（終止コドン有りの単量体Zドメインベクター）の構築（図2のステップ1）

SPZK DNA（配列番号3）をテンプレートとし、フォワードプライマーとしてプライマー153（配列番号5）およびリバースプライマーとしてプライマー156（配列番号8）を用いてPCRを実施した。プライマー153およびプライマー156にはそれぞれ、NcoI切断部位およびSacIの制限酵素切断部位が含まれる。PCRの条件は以下の通りである。

[0130] 段階1：94°C1分間1サイクル、段階2：94°C30秒間、55°C30秒間、72°C2.5分間（25サイクル）、段階3：72°C10分間1サイクル、その後4°Cで保持した。

[0131] PCR生成物はGEヘルスケアバイオサイエンス社製生成キットで精製した。次に、NcoI制限酵素およびSacI制限酵素を用いて切断されたpETM11ベクターとPCR生成物とのライゲーションを行った。制限酵素による消化反応は、New England Biolabs製NcoI制限酵素およびSacI制限酵素を用いて37°C1時間行い、GEヘルスケアバイオサイエンス社製生成キットでPCR精製した。

[0132] ライゲーション反応は、T4 DNAリガーゼ（Invitrogen社製）で室温にて終夜行った。ライゲーションで得られたベクターをDH5a competent cell（Biomedal Life Science社製）で形質転換させ、得られた形質転換体を、カナマイシンを含むLB培地で37°C終夜培養し、陽性Colonyからプラスミドを抽出し、挿入されたDNAフラグメントの配列が正しいことを3730 DNA Sequencer（Applied Biosystems社製）で確認した。

[0133] 2. 2. 1. 3. A-pETM11ベクター（終止コドン無しの単量体Zドメインベクター）の構築

プライマー153, 156の代わりに、フォワードプライマーとしてプライマー153およびリバースプライマーとしてプライマー154（配列番号6）を用いて、実験2. 2. 1. 2. と同様にA-pETM11ベクターを構築した。なお、DNAフラグメントの挿入は、pETM11のNcoI切断部位およびEcoRI切断部位を利用している。

[0134] 2. 2. 1. 4. SP2Z-pETM11ベクター（終止コドン有りの2量体Zドメインベクター）の構築

フォワードプライマーとしてプライマー155（配列番号7）およびリバースプライマーとしてプライマー156を用いて、PCRでEcoRI切断部位およびSacI切断部位を有する単量体ZドメインのDNAを調製し、A-pETM11のEcoRI切断部位およびSacI切断部位に挿入して構築した。実験は実験2. 2. 1. 2. と同様の条件で行った。

[0135] 2. 2. 1. 5. AB-pETM11ベクター（終止コドンなしの2量体Zドメインベクター）の構築

フォワードプライマーとしてプライマー155およびリバースプライマーとしてプライマー157（配列番号9）を用いて、PCRでEcoRI切断部位およびSacI切断部位を有する終止コドンなしの単量体ZドメインのDNAを調製し、A-pETM11のEcoRI切断部位およびSacI切断部位に挿入して、AB-pETM11ベクターを構築した。実験は実験2. 2. 1. 2. と同様の条件で行った。

[0136] 2. 2. 1. 6. SP3Z-pETM11ベクター（終止コドン有りの3量体Zドメインベクター）の構築

フォワードプライマーとしてプライマー158（配列番号10）およびリバースプライマーとしてプライマー161（配列番号13）を用いて、PCRでSacI切断部位およびXhoI切断部位を有する単量体ZドメインのDNAを調製し、AB-pETM11のEcoRI切断部位およびSacI

切断部位に挿入して構築した。実験は実験 2. 2. 1. 2. と同様の条件で行った。

- [0137] 2. 2. 1. 7. ABC-pETM11ベクター（終止コドン無しの3量体Zドメインベクター）の構築

フォワードプライマーとしてプライマー158およびリバースプライマーとしてプライマー159（配列番号11）を用いて、PCRでSacI切断部位およびHindIII切断部位を有する終止コドン無しの単量体ZドメインのDNAを調製し、ABC-pETM11のSacI切断部位およびHindIII切断部位に挿入して、ABC-pETM11ベクターを構築した。実験は実験 2. 2. 1. 2. と同様の条件で行った。

- [0138] 2. 2. 1. 8. SP4Z-pETM11ベクター（終止コドン有りの4量体Zドメインベクター）の構築

プライマー160（配列番号12）およびプライマー161を用いて、PCRでHindIII切断部位およびXhoI切断部位を有する単量体ZドメインのDNAを調製し、ABC-pETM11のHindIII切断部位およびXhoI切断部位に挿入して、SP4Z-pETM11ベクターを構築した。実験は実験 2. 2. 1. 2. と同様の条件で行った。

- [0139] 2. 2. 1. 9. SP4Zの発現および精製

得られたSP4Z-pETM11ベクターをE. coli（BL21株）細胞（STRATAGENE製）に導入し、18°Cで1mMのIPTG（Sigma-Aldrich製）を添加し、15時間インキュベートして、組み換え型イムノグロブリン結合タンパク質（SP4Z）を発現させた。誘導に先立って、吸光度（OD600）が約0.6に到達するまで上記細胞を37°Cでインキュベートした。タンパク質発現後、細胞を回収し、pH8.0のトリス緩衝液中で破碎した。

- [0140] 得られた組み換え型イムノグロブリン結合タンパク質（SP4Z）は、Niアフィニティークロマトグラフィー（Ni-NTA（ニトリロトリ酢酸）粒子、キアゲン社製）によって精製された。精製されたイムノグロブリン結合

タンパク質は陰イオン交換クロマトグラフィー（Q-セファロースFF、GEバイオサイエンス社製）によって、さらに精製された。SDS-PAGEによって確認されたイムノグロブリン結合タンパク質の純度は96%であった。

[0141] また、得られた組み換え型イムノグロブリン結合タンパク質（SP4Z）は、MALDI-TOFマスペクトル分析により、それぞれアミノ酸配列が一致したことにより、図1に示すアミノ酸配列（配列番号2）を有することが確認された。

[0142] なお、図1において、RおよびR²は上記一般式（1）及び（3）におけるRおよびR²に対応し、R¹およびrは上記一般式（2）及び（4）におけるR¹およびrに対応する。r中の下線部はTEVドメイン（TEVプロテアーゼ（ペプチド結合加水分解合成酵素）切断部位）を示す。

[0143] （iii）多孔質粒子とリガンドとの結合

粒子乾燥質量換算で1gの多孔質粒子1、0.1gのSP4Zが25mLの0.1Mリン酸バッファー（pH6.8）に分散した混合液を調製し、10°Cで24時間転倒混和し、SP4Z（リガンド）を多孔質粒子1に結合させた。生成した粒子を濾過した後、1Mチオグリセロール25mLと混合し30°Cで4時間反応させ、残余のエポキシ基を開環し、PBS/0.5%Tween20で洗浄後、PBSで洗浄し、開環エポキシ基を有しリガンドが結合した多孔質粒子からなるアフィニティークロマトグラフィー用充填剤1（A-1）を得た。Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay kitで定量測定を行ったところ、前記粒子に結合したSP4Zの量は84mg/g粒子であった。

[0144] （iv）評価

（A-1）の粒子径は58μm、細孔容積は1.22mL/g、比表面積は111m²/g、体積平均細孔径は74nmであった。アルカリ劣化による液量差は0.32mL、タンパク質（ヒトIgG抗体）の動的結合容量は43mg/mL、保存試験後のタンパク質（ヒトIgG抗体）の動的結合容量

は44mg/mLであり、DBC維持率は102%であった。

[0145] 2. 2. 2. 実施例2

(i) リガンドの作製

後述する調製例(1)～(5)により、図3に示されるアミノ酸配列を有するイムノグロブリン結合タンパク質(SPATK(配列番号4))を調製した。

[0146] (1) ステップ1

*Staphylococcus aureus*のゲノムDNAをテンプレートとして、制限酵素NcoIサイトを有するプライマー(Primer11)、及び制限酵素BamHIとHindIIIサイトを有するプライマー(Primer12)を用いてPCRでD-AドメンをコードするDNAを得た。このDNAを制限酵素NcoIおよびHindIIIで切断し、同じく制限酵素NcoIおよびHindIIIで切断されたpETM11にライゲーションしてSPAKプラスミドを構築した。

[0147] (2) ステップ2

次に、上記に得られたSPAKプラスミドをテンプレートとして制限酵素BamHIサイトを有するプライマー(Primer13)と制限酵素HindIIIサイトを有するプライマー(Primer14)を用いてPCRで新たなD-AドメンをコードするDNAを得た。このDNAを制限酵素BamHIおよびHindIIIで切断し、同じく制限酵素BamHIおよびHindIIIで切断された上記に得られたSPAKプラスミドにライゲーションしてSPATKプラスミドを構築した。

[0148] (3) SPAKプラスミドの構築

*Staphylococcus aureus*のゲノムDNAをテンプレートとして、Primer11とPrimer12を用いてPCRを実施した。PCRの条件は以下の通りである。

[0149] 段階1: 94°C1分間1サイクル、段階2: 94°C30秒間、53°C30秒間、72°C2.5分間(25サイクル)、段階3: 72°C10分間1サイ

クル、その後4°Cで保持した。

[0150] PCR生成物はGEヘルスケアバイオサイエンス社製の精製キットで精製した。次に、NcoI制限酵素およびHindIII制限酵素を用いて切断した。pETM11ベクターについて同じくNcoI制限酵素およびHindIII制限酵素で切断した。制限酵素による消化反応は、New England Biolabs製NcoI制限酵素およびHindIII制限酵素を用いて行い、GEヘルスケアバイオサイエンス社製精製キットで精製した。ライゲーション反応は、T4 DNAリガーゼ（Invitrogen社製）で室温にて終夜行った。ライゲーションで得られたベクターをDH5a competent cell（Biomedical Life Science社製）に形質転換させ、陽性colonyのプラスミド（SPAKプラスミド）の配列が正しいことを3730 DNA Sequencer（Applied Biosystems社製）で確認した。

[0151] (4) SPATKプラスミドの構築の構築

SPAKプラスミドをテンプレートとしてPrimer13とPrimer14を用いてPCRで新たなD-AドメンをコードするDNAを得た。PCRの条件は段階1：94°C1分間1サイクル、段階2：94°C30秒間、55°C30秒間、72°C2.5分間（25サイクル）、段階3：72°C10分間1サイクル、その後4°Cで保持した。PCR生成物はGEヘルスケアバイオサイエンス社製の精製キットで精製した。次に、BamHI制限酵素およびHindIII制限酵素を用いてこのDNAを切断した。SPAKプラスミドについても同じくBamHI制限酵素およびHindIII制限酵素で切断した。制限酵素による消化反応は、New England Biolabs製BamHI制限酵素およびHindIII制限酵素を用い、GEヘルスケアバイオサイエンス社製精製キットで精製した。ライゲーション反応は、T4 DNAリガーゼ（Invitrogen社製）で室温にて終夜行った。ライゲーションで得られたベクターをDH5a competent cell（Biomedical Life Science社製）に形質転

換させ、陽性 colony のプラスミド (SPATK プラスミド) の配列が正しいことを 3730 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社製) で確認した。

[0152] (5) SPATK の発現および精製

得られた SPATK プラスミドを *E. coli* (BL21 株) 細胞 (STRATAGENE 製) に形質転換した。18°C で 1mM の IPTG (Sigma-Aldrich 製) を添加し、15 時間インキュベートして、組み換え型イムノグロブリン結合タンパク質 (SPATK) を発現させた。誘導に先立って、吸光度 (OD600) が約 0.6 に到達するまで上記細胞を 37°C でインキュベートした。タンパク質発現後、細胞を回収し、pH 8.0 のトリス緩衝液中で破碎した。

[0153] 得られた組み換え型イムノグロブリン結合タンパク質 (SPATK) は、Ni アフィニティークロマトグラフィー (Ni-NTA (ニトリロトリ酢酸) 粒子、キアゲン社製) によって精製された。精製されたイムノグロブリン結合タンパク質は陰イオン交換クロマトグラフィー (Q-セファロース FF、GE バイオサイエンス社製) によって、さらに精製された。SDS-PAGE によって確認されたイムノグロブリン結合タンパク質の純度は 96% であった。

[0154] また、得られた組み換え型イムノグロブリン結合タンパク質 (SPATK) は、MALDI-TOF マススペクトル分析により、それぞれアミノ酸配列が一致したことにより、図 3 に示すアミノ酸配列を有することが確認された。

[0155]

[表1]

プライマー名	配列
Primer 11	5' -CAT GCC ATG GCG AAA GCT GAT GCG CAA CAA AAT
Primer 12	5' -CCC AAG CTT TTA CTT GGA TCC TTC TTT GTT GAA TTT GTT ATC CG
Primer 13	5'-CGG GGA TCC TCA GGC AAA GCT GAT GCG CAA CAA AAT
Primer 14	5'-CCC AAG CTT TTA CTT CGA CCC TTC TTT GTT GAA TTT GTT ATC CG

[0156] (i) 多孔質粒子とリガンドとの結合

リガンドとしてSP4Zの代わりにSPATKを使用した以外は、実施例1と同様にして、実施例1で得られた多孔質粒子1を使用して、開環エポキシ基を有しリガンドが結合した多孔質粒子からなるアフィニティークロマトグラフィー用充填剤2 (A-2) を得た。前記粒子に結合したSPATKの量は83 mg/g粒子であった。結果を表2に示す。

[0157] (A-2) の粒子径は58 μm 、細孔容積は1.23 mL/g、比表面積は112 m^2/g 、体積平均細孔径は76 nmであった。アルカリ劣化による液量差は0.33 mL、タンパク質 (ヒトIgG抗体) の動的結合容量は44 mg/mL、保存試験後のタンパク質 (ヒトIgG抗体) の動的結合容量は32 mg/mLであり、DBC維持率は74%であった。

[0158] 2. 2. 3. 比較例1~2

実施例1~2で、各単量体の部数を表2の通りとした以外は、同様にして、開環エポキシ基を有しリガンドが結合した多孔質粒子2からなるアフィニティークロマトグラフィー用充填剤1~2 (B-1~2) を得、評価した。結果を表2に示す。

[0159] 2. 2. 4. 実施例3

4091 gの純水にポリビニルアルコール (クラレ社製 PVA-217) 8.52 g、ドデシル硫酸ナトリウム (花王社製 エマール10G) 2.

13 g および炭酸ナトリウム 4.26 g を添加し、一晚攪拌して水溶液 (S-2-1) を調製した。さらに重合当日、(S-2-1) の 30 g を別に抜き取り、残りの (S-2-1) に亜硝酸ナトリウム 2.13 g を溶解して、水溶液 (S-2-2) を調製した。

[0160] 次に、グリセロールメタクリレート (日本油脂社製) 35.9 g、グリセリンジメタクリレート (新中村化学工業社製) 125 g、グリシジルメタクリレート (三菱レーヨン社製) 17.9 g を 2-オクタノン (東洋合成社製) 86.4 g およびアセトフェノン (和光純薬工業社製) 253 g に溶解させ、単量体溶液を調製した。なお、単量体の全質量を 100 質量部としたときの、各単量体の部数は、グリセロールメタクリレート 20 質量部、グリセリンジメタクリレート 70 質量部、グリシジルメタクリレート 10 質量部である。

[0161] (S-2-1) 30 g に 2, 2'-アゾイソブチロニトリル (和光純薬工業社製) 2.2 g を添加して分散し、開始剤分散液とした。

[0162] 次に、準備した水溶液 (S-2-2) および単量体溶液をバツフル付きの 7 L セパラブルフラスコ内に投入し、温度計、攪拌翼、および冷却管を装着して、温水バスにセットし、窒素雰囲気下、220 rpm で攪拌を開始した。続いて、セパラブルフラスコを温水バスにより加温し、内温が 85°C に到達したところで、開始剤分散液を添加し、85°C に温度を保持しつつ、5 時間攪拌を行った。

[0163] 次に、反応液を冷却したのち、かかる反応液をヌッチェでろ過し、純水とイソプロピルアルコールで洗浄した。洗浄した粒子をポリビンに移し、水に分散してデカンテーションを 3 回行い、小粒子を除いた。以上の操作により水に分散した 12.5 質量% の多孔質粒子 3 (粒子乾燥質量 123 g) を得た。多孔質粒子 3 のエポキシ基含有量は、0.47 mmol/g であった。

[0164] 多孔質粒子 1 の代わりに多孔質粒子 3 を使用した以外は、実施例 1 と同様にして、開環エポキシ基を有しリガンドが結合した多孔質粒子 3 からなるア

フィニティークロマトグラフィー用充填剤 3 (A-3) を得た。結果を表 3 に示す。

[0165] 2. 2. 5. 実施例 4

300 g の純水にポリビニルアルコール (クラレ社製 PVA-217) 0.600 g、ドデシル硫酸ナトリウム (花王社製 エマール 10G) 0.030 g および硫酸ナトリウム 1.50 g を添加し、一晚攪拌して水溶液 (S-3-1) を調製した。さらに重合当日、(S-3-1) の 5 g を別に抜き取り、残りの (S-3-1) に亜硝酸ナトリウム 0.150 g を溶解して、水溶液 (S-3-2) を調製した。

[0166] 次に、グリセリンジメタクリレート (新中村化学工業社製) 8.19 g、グリシジルメタクリレート (三菱レーヨン社製) 3.51 g を 2-オクタノン (東洋合成社製) 6.25 g およびアセトフェノン (和光純薬工業社製) 18.3 g に溶解させ、単量体溶液を調製した。なお、単量体の全質量を 100 質量部としたときの、各単量体の部数は、グリセリンジメタクリレート 70 質量部、グリシジルメタクリレート 30 質量部である。

[0167] (S-3-1) 5 g に 2, 2'-アゾイソブチロニトリル (和光純薬工業社製) 0.149 g を添加して分散し、開始剤分散液とした。

[0168] 次いで、得られた水溶液 (S-3-2) および単量体溶液をバツフル付きの 0.5 L セパラブルフラスコ内に投入し、温度計、攪拌翼、および冷却管を装着して、温水バスにセットし、窒素雰囲気下、680 rpm で攪拌を開始した。続いて、セパラブルフラスコを温水バスにより加温し、内温が 85 °C に到達したところで、開始剤分散液を添加し、85 °C に温度を保持しつつ、5 時間攪拌を行った。

[0169] 次いで、反応液を冷却したのち、かかる反応液をヌッチェでろ過し、純水とイソプロピルアルコールで洗浄した。洗浄した粒子をポリビンに移し、水に分散してデカンテーションを 3 回行い、小粒子を除いた。以上の操作により水に分散した 12.5 質量% の多孔質粒子 4 (粒子乾燥質量 8.7 g) を得た。多孔質粒子 4 のエポキシ基含有量は、1.7 mmol/g であった。

[0170] 多孔質粒子 1 の代わりに多孔質粒子 4 を使用した以外は、実施例 1 と同様にして、開環エポキシ基を有しリガンドが結合した多孔質粒子 4 からなるアフィニティークロマトグラフィー用充填剤 4 (A-4) を得た。結果を表 3 に示す。

[0171] 2. 2. 6. 実施例 5 ~ 7

実施例 4 において、単量体全量を 100 質量部としたときの、各単量体の部数を表 3 の通りとした以外は、同様にして、開環エポキシ基を有しリガンドが結合した多孔質粒子からなるアフィニティークロマトグラフィー用充填剤 5 ~ 7 (A-5 ~ 7) を得、評価した。結果を表 3 に示す。

[0172] 2. 2. 7. 実施例 8

343 g の純水にポリビニルアルコール (クラレ社製 PVA-217) 0.687 g、ドデシル硫酸ナトリウム (花王社製 エマール 10G) 0.071 g および硫酸ナトリウム 1.78 g を添加し、一晩攪拌して水溶液 (S-4) を調製した。重合当日、(S-4) の 10 g を別に抜き取っておいた。

[0173] 次に、グリセロールメタクリレート (日本油脂社製) 8.02 g、4-ヒドロキシブチルアクリレートグリシジルエーテル (日本化成社製) 1.60 g、トリメチロールプロパントリメタクリレート (サートマー社製) 6.41 g を 2-オクタノン (東洋合成社製) 19.4 g およびアセトフェノン (和光純薬工業社製) 4.99 g に溶解させ、単量体溶液を調製した。なお、単量体の全質量を 100 質量部としたときの、各単量体の部数は、グリセロールメタクリレート 50 質量部、4-ヒドロキシブチルアクリレートグリシジルエーテル 10 質量部、トリメチロールプロパントリメタクリレート 40 質量部である。

[0174] (S-4) 10 g に 2, 2'-アゾイソブチロニトリル (和光純薬工業社製) 0.190 g を添加して分散し、開始剤分散液とした。

[0175] 次いで、得られた水溶液 (S-4) および単量体溶液をバツフル付きの 0.5 L セパラブルフラスコ内に投入し、温度計、攪拌翼、および冷却管を装

着して、温水バスにセットし、窒素雰囲気下、550 rpmで攪拌を開始した。続いて、セパラブルフラスコを温水バスにより加温し、内温が85℃に到達したところで、開始剤分散液を添加し、85℃に温度を保持しつつ、5時間攪拌を行った。

[0176] 次いで、反応液を冷却したのち、かかる反応液をヌッチェでろ過し、純水とイソプロピルアルコールで洗浄した。洗浄した粒子をポリビンに移し、水に分散してデカンテーションを3回行い、小粒子を除いた。以上の操作により水に分散した12.5質量%の多孔質粒子8（粒子乾燥質量7.5g）を得た。多孔質粒子8のエポキシ基含有量は、0.33mmol/gであった。

[0177] 多孔質粒子1の代わりに多孔質粒子8を使用した以外は、実施例1と同様にして、開環エポキシ基を有しリガンドが結合した多孔質粒子8からなるアフィニティークロマトグラフィー用充填剤8（A-8）を得た。結果を表4に示す。

[0178] 2.2.8. 比較例3

実施例8で、単量体の種類および部数を、表4の通りとした以外は、同様にして、比較アフィニティークロマトグラフィー用充填剤3（B-3）を得、評価した。結果を表4に示す。

[0179] 2.2.9. 実施例9

実施例8で、ドデシル硫酸ナトリウムの量を0.036gとし、単量体の種類および部数を表4の通りとし、攪拌数を450rpmとした以外は、同様にして、開環エポキシ基を有しリガンドが結合した多孔質粒子9からなるアフィニティークロマトグラフィー用充填剤69（A-9）を得、評価した。結果を表4に示す。

[0180] 2.2.10. 比較例4

実施例9で、単量体の部数を、表4の通りとした以外は、同様にして、比較アフィニティークロマトグラフィー用充填剤4（B-4）を得、評価した。結果を表4に示す。

[0181] 2. 2. 11. 比較例 5

(i) 多孔質粒子の懸濁重合

4257 gの純水にポリビニルアルコール（クラレ社製 PVA-217）8.51 g、ドデシル硫酸ナトリウム（花王社製 エマール10G）0.425 gおよび硫酸ナトリウム21.3 gを添加し、一晚攪拌して水溶液（S-5-1）を調製した。さらに重合当日、（S-5-1）の20 gを別に抜き取り、残りの（S-5-1）にヨウ化カリウム2.13 gを溶解して、水溶液（S-5-2）を調整した。

[0182] 次に、ペンタエリスリトールトリアクリレート60質量%およびペンタエリスリトールテトラアクリレート40質量%からなる単量体（新中村化学工業社製商品名「NKエステルA-TMM-3LM-N」）104 g、4-ヒドロキシブチルアクリレートグリシジルエーテル（日本化成社製）20.7 g、ヒドロキシエチルアクリルアミド（興人社製）82.9 gを2-オクタノン（東洋合成社製）134 gおよびアセトフェノン（和光純薬工業社製）169 gに溶解させ、単量体溶液を調製した。なお、単量体の全質量を100質量部としたときの、各単量体の部数は、ペンタエリスリトールトリアクリレート30部、ペンタエリスリトールテトラアクリレート20部、4-ヒドロキシブチルアクリレートグリシジルエーテル10部、ヒドロキシエチルアクリルアミド40部である。

[0183] （S-5-1）20 gに2, 2'-アゾイソブチロニトリル（和光純薬工業社製）1.92 gを添加して分散し、開始剤分散液とした。

[0184] 次いで、準備した水溶液（S-5-2）および単量体溶液をバツフル付きの7Lセパラブルフラスコ内に投入し、温度計、攪拌翼、および冷却管を装着して、温水バスにセットし、窒素雰囲気下、300 rpmで攪拌を開始した。続いて、セパラブルフラスコを温水バスにより加温し、内温が80°Cに到達したところで、開始剤分散液を添加し、80°Cに温度を保持しつつ、5時間攪拌を行った。

[0185] 次いで、反応液を冷却したのち、かかる反応液をヌッチェでろ過し、純水

とイソプロピルアルコールで洗浄した。洗浄した粒子をポリビンに移し、水に分散してデカンテーションを3回行い、小粒子を除いた。以上の操作により水に分散した12.5質量%の多孔質粒子（粒子乾燥質量107g）を得た。多孔質粒子のエポキシ含有量は、0.29mmol/gであった。

[0186] (ii) リガンドの作製、(iii) 多孔質粒子とリガンドとの結合、および(iv) 評価は実施例1と同様の方法で行った。結果を表4に示す。

[0187]

[表2]

	M-1		M-2		M-3		エポキシ基含有量 mmol/g	粒径 μm	細孔容積 mL/g	比表面積 m ² /g	細孔径 nm	SPA 結合量 mg/g	液量差 mL	DBC mg/mL	保存安定性 %
	GLM	GMA	GMA	TMP	TMP										
実施例 1	50	10	10	40	40	0.55		58	1.22	111	74	Z84	0.32	43	102
実施例 2	50	10	10	40	40	0.55		58	1.23	112	76	T83	0.33	44	74
比較例 1	0	60	60	40	40	3.12		48	1.41	105	121	Z60	0.38	41	63
比較例 2	0	60	60	40	40	3.12		48	1.44	107	119	T58	0.39	43	46

GLM : グリセロールモノメタクリレート

GMA : グリジジルメタクリレート

TMP : トリメチロールプロパントリメタクリレート

SPA 結合量の数値の前の記号のうち「Z」は SP4Z が、「T」は SPATK が、それぞれ結合していることを示す。

[0188] [表3]

	M-1		M-2		エポキシ基含有量 mmol/g	粒径 μm	細孔容積 mL/g	比表面積 m ² /g	細孔径 nm	SPA 結合量 mg/g	液量差 mL	DBC mg/mL	保存安定性 %
	GLM	GLDM	GMA	GMA									
実施例 3	20	70	10	10	0.47	54	1.38	111	101	Z 41	0.92	40	100
実施例 4	0	70	30	30	1.7	50	1.07	104	68	T 44	0.91	39	53
実施例 5	0	80	20	20	1.1	49	1.11	105	70	T 42	0.94	38	64
実施例 6	0	90	10	10	0.62	53	1.06	104	68	T 47	0.93	33	72
実施例 7	0	95	5	5	0.31	55	1.01	103	63	T 85	0.96	29	78

GLM : グリセロールモノメタクリレート

GLDM : グリセリンジメタクリレート

GMA : グリシジルメタクリレート

SPA 結合量の数値の前の記号のうち「Z」は SP4Z が、「T」は SPATK が、それぞれ結合していることを示す。

[0189] [表4]

	M-1	M-2	M-3	M-4	エポキシ基含有量 mmol/g	粒径 μm	細孔容積 mL/g	比表面積 m ² /g	細孔径 nm	SPA 結合量 mg/g	液量差 mL	DBC mg/mL	保存安定性 %
実施例 8 TA340	GLM 50	HBAGE 10	TMP 40	-	0.33	43	1.12	103	73	Z 45	0.91	35	97
比較例 3 TA341	GLM 30	HBAGE 10	TMP 40	HEAA 20	0.50	39	1.28	112	80	Z 98	2.29	34	94
実施例 9 TA347	GLM 60	GMA 10	TMP 20	DVB 10	0.49	54	1.57	121	120	Z 77	0.39	34	100
比較例 4 TA349	GLM 60	HBAGE 10	-	DVB 30	0.35	55	1.79	132	136	Z 45	0.58	1	-
比較例 5	-	HBAGE 10	HEAA 40	PETA 50	0.29	38	1.72	102	169	Z 70	15.6	45	93

GLM：グリセロールモノメタクリレート

HBAGE：4-ヒドロキシブチルアクリレートグリシジルエーテル

TMP：トリメチロールプロパントリメタクリレート

HEAA：ヒドロキシエチルアクリルアミド

GMA：グリシジルメタクリレート

DVB：ジビニルベンゼン

TMP：トリメチロールプロパントリメタクリレート

PETA：ペンタエリスリトールトリアクリレートとペンタエリスリトールテトラアクリレートとの混合物

SPA 結合量の数値の前の記号のうち「Z」は SP4Z が、「T」は SPATK が、それぞれ結合していることを示す。

[0190] 表 2～4によれば、実施例 1～9の充填剤を用いた場合、比較例 1～5の充填剤を用いた場合と比較して、リガンドの保持量が多く、保存安定性に優れていることが理解できる。また、表 2～表 4によれば、リガンドとして S P 4 Zを用いた場合（実施例 1、3、8、9）、液量差がより小さく、耐アルカリ性がより良好であることが理解できる。

[0191] 本実施形態に係る説明は以上である。本発明は、上述した実施形態に限定されるものではなく、さらなる種々の変形が可能である。また本発明は、実施形態で説明した構成と実質的に同一の構成（例えば、機能、方法および結果が同一の構成、あるいは目的および結果が同一の構成）を含む。また、本発明は、実施形態で説明した構成の本質的でない部分を置き換えた構成を含む。また、本発明は、実施形態で説明した構成と同一の作用効果を奏する構成または同一の目的を達成することができる構成を含む。また、本発明は、実施形態で説明した構成に公知技術を付加した構成を含む。

産業上の利用可能性

[0192] 本発明のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤は、従来の担体と比較してイムノグロブリン結合タンパク質の保持量が多く、かつ、当該タンパク質の保持能に優れている。これにより、目的タンパク質の捕捉量を高めることができるため、目的タンパク質（抗体）の結合容量を増大させることができる。その結果、純度の高い目的タンパク質を効率良く、低コストでかつ大量に精製することができる。

請求の範囲

- [請求項1] (M-1) 水酸基を含有しエポキシ基を含有しないメタクリロイル基を含有するビニル単量体 40～99.5質量部
- (M-2) エポキシ基含有ビニル単量体 0.5～30質量部、
- (M-3) (M-1) および (M-2) 以外のメタクリロイル基を含有するビニル単量体 0～59.5質量部、ならびに
- (M-4) (M-1)、(M-2) および (M-3) 以外のビニル単量体 0～25質量部 (但し、(M-1)、(M-2)、(M-3) および (M-4) の合計は100質量部である。)
- の共重合体からなる多孔質粒子と、
- 前記共重合体に含まれるエポキシ基を開環させて得られる開環エポキシ基と、
- 前記多孔質粒子に結合したリガンドと
- を含むことを特徴とする、
- アフィニティークロマトグラフィー用充填剤。
- [請求項2] 前記リガンドが、耐アルカリ性のイムノグロブリン結合性タンパク質である、請求項1に記載のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤。
- [請求項3] (M-1) 水酸基を含有しエポキシ基を含有しないメタクリロイル基を含有するビニル単量体が下記一般式 (A) で示される単量体である、請求項1または2に記載のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤。
- $$\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})-\text{R} \quad \cdot \cdot \cdot (\text{A})$$
- (式中、Rは水素原子または1価の有機基を示す。)
- [請求項4] 上記一般式 (A) におけるRがヒドロキシメチル基またはメタクリロイルオキシメチル基である、請求項3に記載のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤。
- [請求項5] 前記多孔質粒子の粒子径が35～100μmである、請求項1～4

のいずれか1つに記載のアフィニティークロマトグラフィー用充填剤
。

[請求項6] 請求項1～5のいずれか1つに記載のアフィニティークロマトグラ
フィー用充填剤を用いて、前記充填剤にイムノグロブリンを吸着させ
る工程、

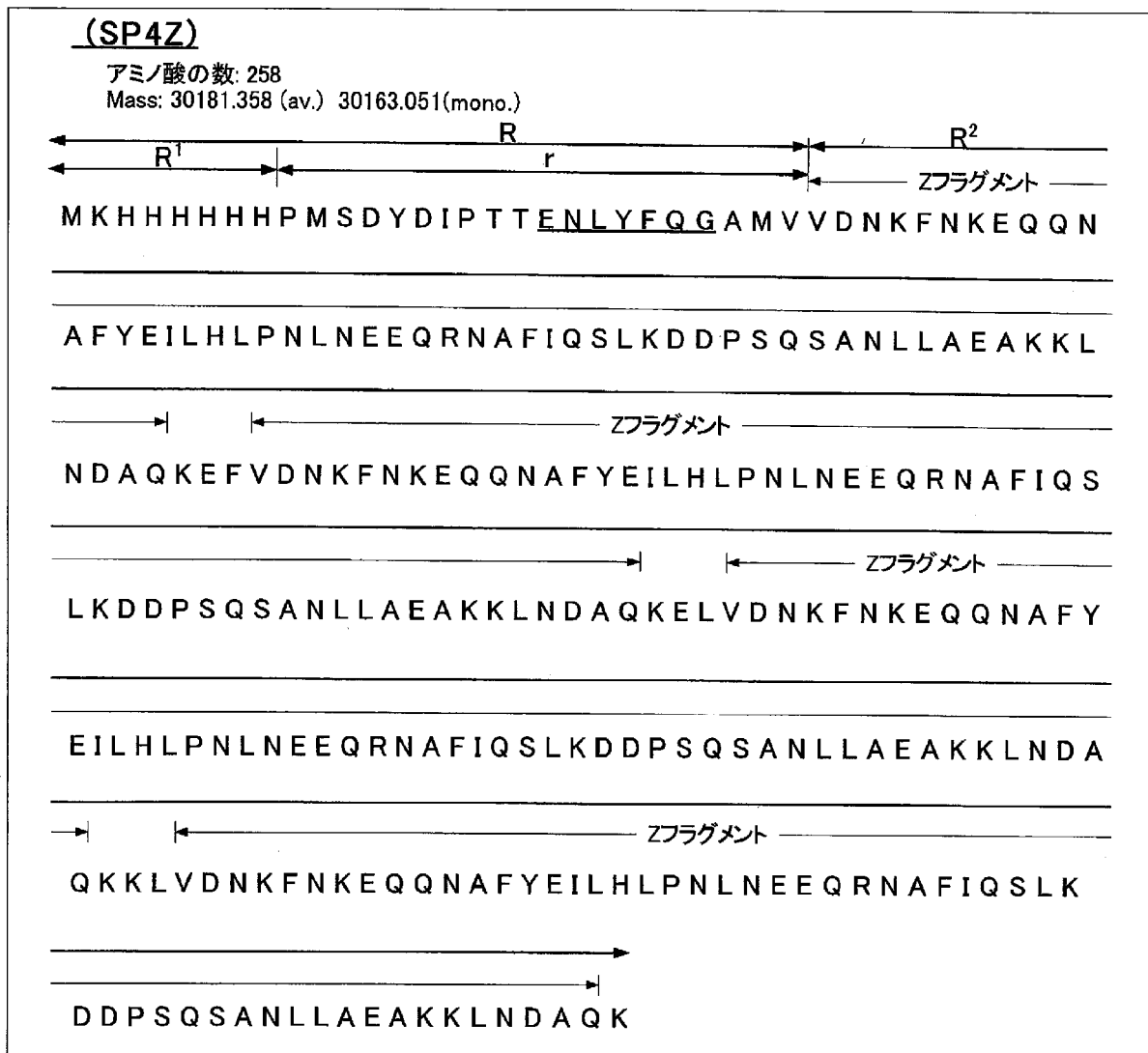
前記イムノグロブリンを溶出させる工程、および

前記充填剤をアルカリ性液で洗浄する工程

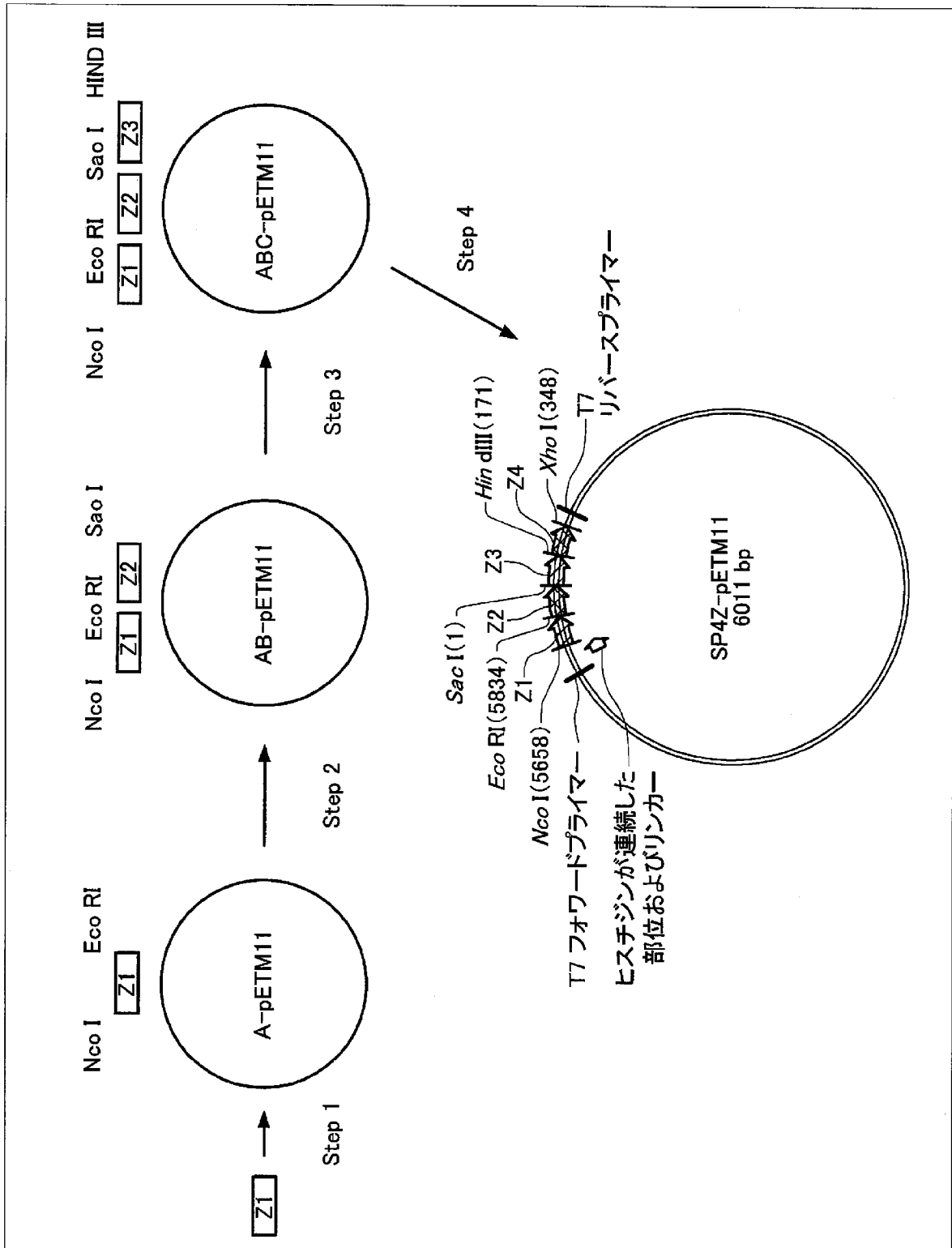
を含む、イムノグロブリンを単離する方法。

[請求項7] 請求項1～5のいずれか1つに記載のアフィニティークロマトグラ
フィー用充填剤が充填された、アフィニティークロマトグラフィー用
充填カラム。

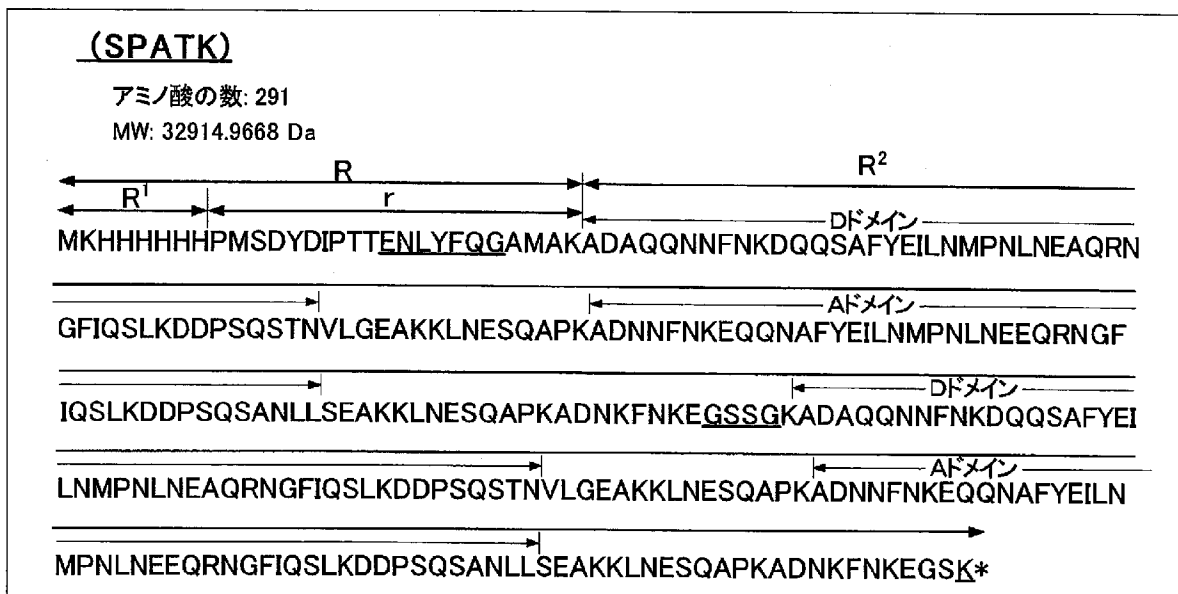
[図1]



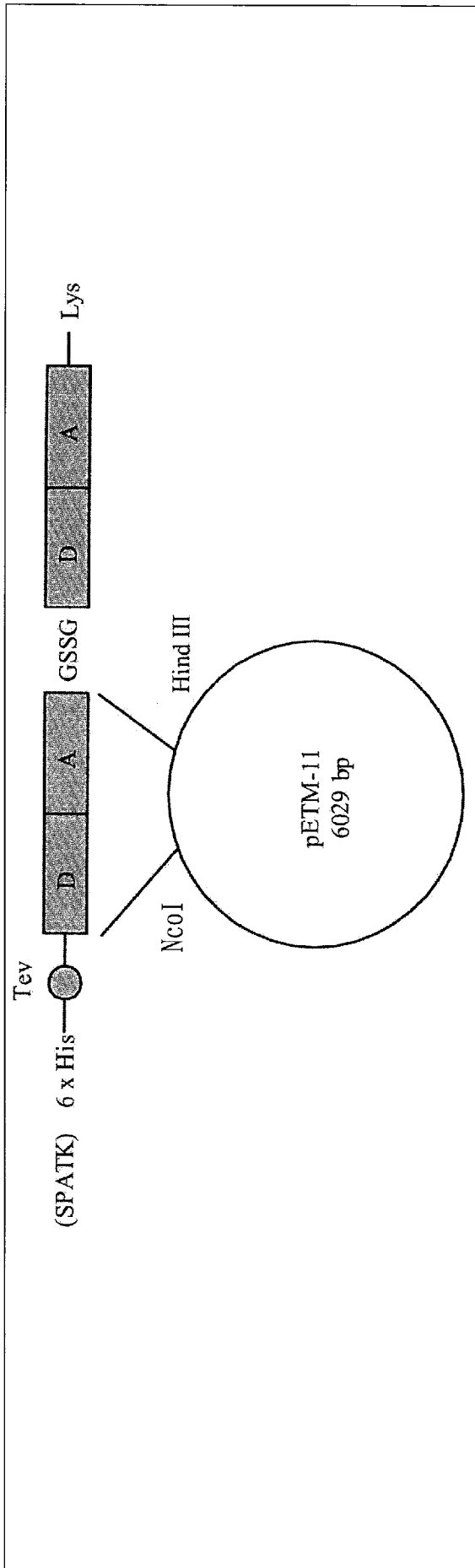
[図2]



[図3]



[]4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/057886

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N30/88(2006.01)i, B01D15/08(2006.01)i, B01J20/24(2006.01)i, C08F8/00(2006.01)i, C08F220/26(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)

G01N30/88, B01D15/08, B01J20/24, C08F8/00, C08F220/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

CA/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/142331 A1 (Reverse Proteomics Research Institute Co., Ltd.), 13 December 2007 (13.12.2007), paragraphs [0014] to [0019] & JP 2007-326045 A & US 2009/0298954 A1 & EP 2039424 A1	1-7
Y	JP 2003-231648 A (JSR Corp.), 19 August 2003 (19.08.2003), claims; paragraphs [0001], [0005] to [0007], [0014], [0031] (Family: none)	1-7
A	JP 5-005731 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 14 January 1993 (14.01.1993), paragraphs [0010] to [0012] (Family: none)	1-7

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 June, 2011 (13.06.11)

Date of mailing of the international search report
28 June, 2011 (28.06.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/057886

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 5-009233 A (Mitsubishi Kasei Corp.), 19 January 1993 (19.01.1993), paragraphs [0011] to [0013] & EP 467339 A1	1-7
A	JP 3-009908 A (Mitsubishi Kasei Corp.), 17 January 1991 (17.01.1991), page 2, upper right column, line 6 to lower left column, line 17 (Family: none)	1-7
A	JP 1-217035 A (Hitachi Chemical Co., Ltd.), 30 August 1989 (30.08.1989), page 2, lower left column, line 15 to page 3, upper left column, line 9 (Family: none)	1-7
A	JP 61-038462 A (Japan Exlan Co., Ltd.), 24 February 1986 (24.02.1986), page 2, upper right column, line 17 to lower right column, line 6 (Family: none)	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. G01N30/88(2006.01)i, B01D15/08(2006.01)i, B01J20/24(2006.01)i, C08F8/00(2006.01)i, C08F220/26(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. G01N30/88, B01D15/08, B01J20/24, C08F8/00, C08F220/26

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2011年
 日本国実用新案登録公報 1996-2011年
 日本国登録実用新案公報 1994-2011年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CA/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2007/142331 A1 (株式会社リバース・プロテオミクス研究所) 2007.12.13, 段落【0014】 - 【0019】 & JP 2007-326045 A & US 2009/0298954 A1 & EP 2039424 A1	1-7
Y	JP 2003-231648 A (ジェイエスアール株式会社) 2003.08.19, 【特許請求の範囲】, 段落【0001】, 【0005】 - 【0007】, 【0014】, 【0031】 (ファミリーなし)	1-7

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

<p>* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献</p>
---	---

国際調査を完了した日 13.06.2011	国際調査報告の発送日 28.06.2011
--------------------------	--------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 河野 隆一郎	2 J	3 7 0 8
	電話番号 03-3581-1101 内線 3252		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 5-005731 A (積水化学工業株式会社) 1993. 01. 14, 段落【0010】－【0012】 (ファミリーなし)	1-7
A	JP 5-009233 A (三菱化成株式会社) 1993. 01. 19, 段落【0011】－【0013】 & EP 467339 A1	1-7
A	JP 3-009908 A (三菱化成株式会社) 1991. 01. 17, 第2ページ右上欄 6行目～左下欄17行目 (ファミリーなし)	1-7
A	JP 1-217035 A (日立化成工業株式会社) 1989. 08. 30, 第2ページ 左下欄15行目～第3ページ左上欄9行目 (ファミリーなし)	1-7
A	JP 61-038462 A (日本エクスラン工業株式会社) 1986. 02. 24, 第2 ページ右上欄17行目～右下欄6行目 (ファミリーなし)	1-7