

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7671340号
(P7671340)

(45)発行日 令和7年5月1日(2025.5.1)

(24)登録日 令和7年4月22日(2025.4.22)

(51)国際特許分類	F I			
B 0 1 J 20/281 (2006.01)	B 0 1 J	20/281	X	
B 0 1 J 20/285 (2006.01)	B 0 1 J	20/281	G	
B 0 1 D 15/38 (2006.01)	B 0 1 J	20/285	S	
B 0 1 J 20/30 (2006.01)	B 0 1 J	20/281	R	
B 0 1 J 20/28 (2006.01)	B 0 1 D	15/38		
請求項の数 8 (全27頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願2023-509040(P2023-509040)	(73)特許権者	524412640 J S R株式会社 東京都港区東新橋一丁目9番2号
(86)(22)出願日	令和4年3月15日(2022.3.15)	(74)代理人	110000084 弁理士法人アルガ特許事務所
(86)国際出願番号	PCT/JP2022/011494	(72)発明者	小林 邦彦 東京都港区東新橋一丁目9番2号 J S R株式会社内
(87)国際公開番号	WO2022/202466	(72)発明者	秋山 源 東京都港区東新橋一丁目9番2号 J S R株式会社内
(87)国際公開日	令和4年9月29日(2022.9.29)	(72)発明者	井上 透矢 東京都港区東新橋一丁目9番2号 J S R株式会社内
審査請求日	令和6年4月30日(2024.4.30)	(72)発明者	菊地 真裕
(31)優先権主張番号	特願2021-51373(P2021-51373)		
(32)優先日	令和3年3月25日(2021.3.25)		
(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】 クロマトグラフィー用担体の製造方法、クロマトグラフィーカラムの製造方法、及びクロマトグラフィー用担体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の工程1及び工程2を備え、工程1で用意する固相支持体が、抗体アフィニティリガンドが固定されていない多孔質粒子又は抗体アフィニティリガンドが固定された多孔質粒子である、抗体アフィニティクロマトグラフィー用担体の製造方法。

(工程1) 固相支持体を用意する工程

(工程2) 前記固相支持体を湿式法でふるい分級することにより、抗体アフィニティリガンドが固定されたときの多孔質粒子の体積基準粒子径分布の変動係数が1%以上22%以下となり、且つ抗体アフィニティリガンドが固定されたときの多孔質粒子の体積基準粒子径分布の歪度が-0.1以上5以下となるように調整する工程

【請求項2】

以下の工程1及び工程2を備え、工程1で用意する固相支持体が、抗体アフィニティリガンドが固定された多孔質粒子である、抗体アフィニティクロマトグラフィー用担体の製造方法。

(工程1) 固相支持体を用意する工程

(工程2) 前記固相支持体を湿式法でふるい分級することにより、抗体アフィニティリガンドが固定された多孔質粒子の体積基準粒子径分布の変動係数が1%以上22%以下となり、且つ抗体アフィニティリガンドが固定された多孔質粒子の体積基準粒子径分布の歪度が-0.1以上5以下となるように調整する工程

【請求項3】

以下の工程 1 及び工程 2 を備え、工程 1 で用意する固相支持体が、抗体アフィニティリガンドが固定されていない多孔質粒子である、抗体アフィニティクロマトグラフィー用担体の製造方法。

(工程 1) 固相支持体を用意する工程

(工程 2) 前記固相支持体を湿式法でふるい分級することにより、抗体アフィニティリガンドが固定されたときの多孔質粒子の体積基準粒子径分布の変動係数が 1% 以上 2.2% 以下となり、且つ抗体アフィニティリガンドが固定されたときの多孔質粒子の体積基準粒子径分布の歪度が -0.1 以上 5 以下となるように調整する工程

【請求項 4】

(工程 3) 工程 2 でふるい分級された多孔質粒子に抗体アフィニティリガンドを固定する工程をさらに備える、

請求項 3 に記載のクロマトグラフィー用担体の製造方法。

【請求項 5】

工程 2 のふるい分級として、(工程 2 a) ふるい分級前の固相支持体の体積平均粒子径 (2 a - d) を 100% としたときに、目開きが (2 a - d) の 10% 以上 200% 未満のふるいにかけて、ふるい上残分を回収する工程と、(工程 2 b) 目開きが工程 2 a のふるいよりも大きく且つ (2 a - d) の 600% 未満のふるいにかけて、ふるい通過分を回収する工程とを、この順で又は逆の順で備える、

請求項 1 ~ 請求項 4 のいずれか 1 項に記載のクロマトグラフィー用担体の製造方法。

【請求項 6】

工程 2 a で用いるふるいの目開きが 35 μm 以上 60 μm 以下であり、工程 2 は、体積基準累積 50% 粒子径 d 50 が、55 μm 以上 100 μm 以下となるようにふるい分級される、請求項 5 に記載のクロマトグラフィー用担体の製造方法。

【請求項 7】

前記変動係数が 5% 以上 20% 以下であり、且つ前記歪度が 0.01 以上 3 以下である、請求項 1 ~ 請求項 6 のいずれか 1 項に記載のクロマトグラフィー用担体の製造方法。

【請求項 8】

工程 1 が、水系媒体中にモノマー組成物を分散させ懸濁重合させる工程を含む、

請求項 1 ~ 請求項 7 のいずれか 1 項に記載のクロマトグラフィー用担体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、クロマトグラフィー用担体の製造方法、クロマトグラフィーカラムの製造方法、及びクロマトグラフィー用担体に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、抗体医薬等に代表されるバイオ医薬品の分野では、タンパク質等の標的物質の発現技術が著しく進展し、それに伴いクロマトグラフィー等による精製工程での生産性の向上が求められている。生産性を向上させる方法として、宿主細胞由来タンパク質、デオキシリボ核酸のような、医薬品原料に混在する不純物の濃度を 1 回の精製で可能な限り低減させ、精製回数や工程を少なくすることが挙げられ、これを実現できるクロマトグラフィー用担体の需要が高まっている。このようなクロマトグラフィー用担体として、例えば、ジビニルベンゼン、エチルビニルベンゼン及びグリシジルメタクリレートを重ねさせ、更にアジピン酸ジヒドラジドで架橋した多孔質架橋粒子にリガンドを結合させた担体 (特許文献 1)、架橋アガロース粒子にリガンドを結合させた担体 (特許文献 2) が報告されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【文献】国際公開第 2019/039545 号パンフレット

10

20

30

40

50

【文献】特表 2016 - 507729 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、特許文献 1 ~ 2 に記載のクロマトグラフィー用担体は、通液性や通液時の圧力抵抗特性が不十分であり、例えば、流速を速くした場合やスケールを大きくした場合に圧縮が生じやすい、精製工程における後工程で負荷がかかり生産性が低下しやすいといった問題があった。

【0005】

したがって、本発明が解決しようとする課題は、通液性及び通液時の圧力抵抗特性に優れたクロマトグラフィー用担体を提供することにある。

10

【課題を解決するための手段】

【0006】

上記課題は、下記 < 1 > ~ < 12 > の手段により解決された。

< 1 > 以下の工程 1 及び工程 2 を備え、工程 1 で用意する固相支持体が、リガンドが固定されていない多孔質粒子又はリガンドが固定された多孔質粒子である、クロマトグラフィー用担体の製造方法（以下、本発明のクロマトグラフィー用担体の製造方法とも称する）。

（工程 1）固相支持体を用意する工程

（工程 2）前記固相支持体をふるい分級することにより、リガンドが固定されたときの多孔質粒子の体積基準粒子径分布の変動係数が 1 % 以上 22 % 以下となり、且つリガンドが固定されたときの多孔質粒子の体積基準粒子径分布の歪度が - 0.1 以上 5 以下となるように調整する工程

20

【0007】

< 2 > 以下の工程 1 及び工程 2 を備え、工程 1 で用意する固相支持体が、リガンドが固定された多孔質粒子である、クロマトグラフィー用担体の製造方法。

（工程 1）固相支持体を用意する工程

（工程 2）前記固相支持体をふるい分級することにより、リガンドが固定された多孔質粒子の体積基準粒子径分布の変動係数が 1 % 以上 22 % 以下となり、且つリガンドが固定された多孔質粒子の体積基準粒子径分布の歪度が - 0.1 以上 5 以下となるように調整する工程

30

< 3 > 以下の工程 1 及び工程 2 を備え、工程 1 で用意する固相支持体が、リガンドが固定されていない多孔質粒子である、クロマトグラフィー用担体の製造方法。

（工程 1）固相支持体を用意する工程

（工程 2）前記固相支持体をふるい分級することにより、リガンドが固定されたときの多孔質粒子の体積基準粒子径分布の変動係数が 1 % 以上 22 % 以下となり、且つリガンドが固定されたときの多孔質粒子の体積基準粒子径分布の歪度が - 0.1 以上 5 以下となるように調整する工程

< 4 > （工程 3）工程 2 でふるい分級された多孔質粒子にリガンドを固定する工程をさらに備える、< 3 > に記載のクロマトグラフィー用担体の製造方法。

40

【0008】

< 5 > 工程 2 のふるい分級として、（工程 2 a）ふるい分級前の固相支持体の体積平均粒子径（ $2a - d$ ）を 100 % としたときに、目開きが（ $2a - d$ ）の 10 % 以上 200 % 未満のふるいにかけて、ふるい上残分を回収する工程と、（工程 2 b）目開きが工程 2 a のふるいよりも大きく且つ（ $2a - d$ ）の 600 % 未満のふるいにかけて、ふるい通過分を回収する工程とを、この順で又は逆の順で備える、< 1 > ~ < 4 > のいずれかに記載のクロマトグラフィー用担体の製造方法。

< 6 > 工程 2 のふるい分級が湿式法である、< 1 > ~ < 5 > のいずれかに記載のクロマトグラフィー用担体の製造方法。

< 7 > 前記変動係数が 5 % 以上 20 % 以下であり、且つ前記歪度が 0.01 以上 3 以

50

下である、< 1 > ~ < 6 > のいずれかに記載のクロマトグラフィー用担体の製造方法。

< 8 > 工程 1 が、水系媒体中にモノマー組成物を分散させ懸濁重合させる工程を含む、< 1 > ~ < 7 > のいずれかに記載のクロマトグラフィー用担体の製造方法。

【 0 0 0 9 】

< 9 > 担体をカラム容器に充填する工程を備え、前記担体が、多孔質粒子にリガンドが固定されたものであり、前記担体の体積基準粒子径分布の変動係数が 1 % 以上 2 2 % 以下であり、且つ体積基準粒子径分布の歪度が - 0 . 1 以上 5 以下である、クロマトグラフィーカラムの製造方法（以下、本発明のクロマトグラフィーカラムの製造方法とも称する）。

【 0 0 1 0 】

< 1 0 > 分散媒に分散しているクロマトグラフィー用担体であって、前記担体が、多孔質粒子にリガンドが固定されたものであり、前記担体の体積基準粒子径分布の変動係数が 1 % 以上 2 2 % 以下であり、且つ体積基準粒子径分布の歪度が - 0 . 1 以上 5 以下である、クロマトグラフィー用担体（以下、本発明のクロマトグラフィー用担体とも称する）。

< 1 1 > 前記担体の体積基準累積 5 0 % 粒子径 d_{50} が $55 \mu\text{m}$ 以上 $100 \mu\text{m}$ 以下である、< 1 0 > に記載のクロマトグラフィー用担体。

< 1 2 > 前記担体の体積基準累積 1 % 粒子径 d_1 が $30 \mu\text{m}$ 以上 $75 \mu\text{m}$ 以下である、< 1 0 > 又は < 1 1 > に記載のクロマトグラフィー用担体。

【発明の効果】

【 0 0 1 1 】

本発明によれば、通液性及び通液時の圧力抵抗特性に優れるクロマトグラフィー用担体を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 2 】

【図 1】担体 W 1（実施例 1）の体積基準粒度分布を示す図。

【図 2】担体 W 3（実施例 3）の体積基準粒度分布を示す図。

【図 3】担体 W 5（実施例 5）の体積基準粒度分布を示す図。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 3 】

< クロマトグラフィー用担体の製造方法 >

本発明のクロマトグラフィー用担体の製造方法は、以下の工程 1 及び工程 2 を備え、工程 1 で用意する固相支持体が、リガンドが固定されていない多孔質粒子又はリガンドが固定された多孔質粒子であることを特徴とする。

（工程 1）固相支持体を用意する工程

（工程 2）前記固相支持体をふるい分級することにより、リガンドが固定されたときの多孔質粒子の体積基準粒子径分布の変動係数が 1 % 以上 2 2 % 以下となり、且つリガンドが固定されたときの多孔質粒子の体積基準粒子径分布の歪度が - 0 . 1 以上 5 以下となるように調整する工程

【 0 0 1 4 】

（工程 1）

工程 1 は、固相支持体を用意する工程である。また、工程 1 で用意する固相支持体は、リガンドが固定されていない多孔質粒子又はリガンドが固定された多孔質粒子である。

多孔質粒子としては、重合体を含む多孔質粒子が好ましい。このような多孔質粒子としては、アガロース、デキストラン、セルロース等の多糖類で構成される天然高分子系多孔質粒子でも合成高分子系多孔質粒子でもよいが、動的結合容量を大きくするためや粒子径の均一性を改善させ、ふるい分級処理を簡便化するために、好ましくは合成高分子系多孔質粒子である。また、多孔質粒子は、好ましくは水不溶性である。

固相支持体は常法に従って製造すればよいが、工程 1 としては、リガンドが固定されていない多孔質粒子を調製する工程（以下、工程 1 a ともいう）を含む工程が好ましい。

- 工程 1 a -

10

20

30

40

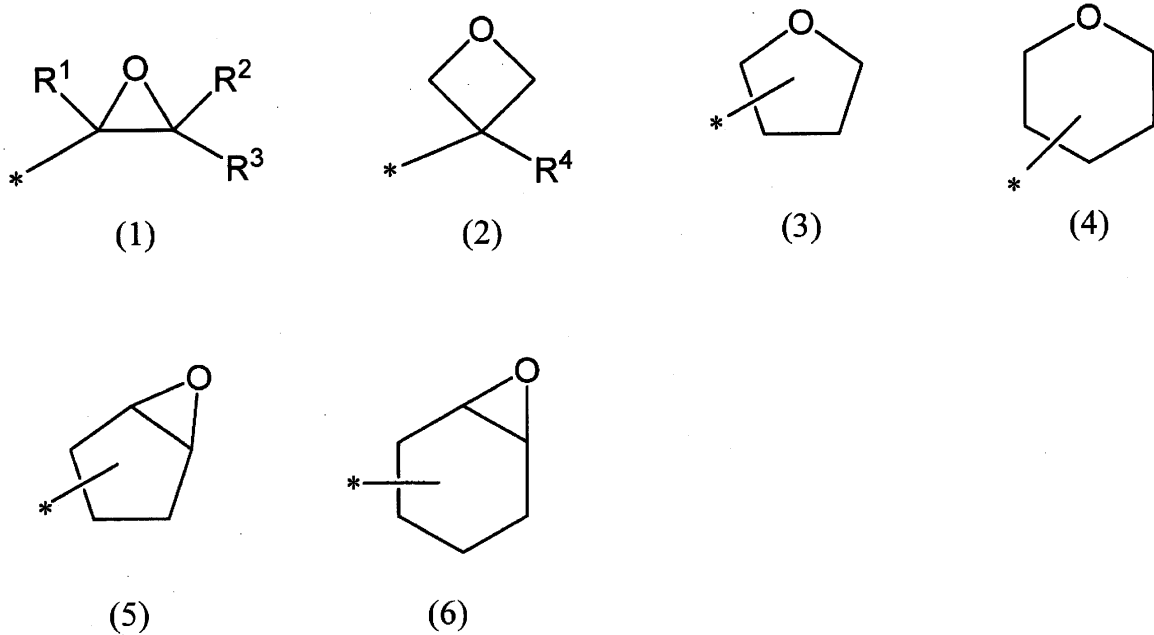
50

工程 1 a としては、所望の粒子径の合成高分子系多孔質粒子を調製しやすくするために、水系媒体中にモノマー組成物を分散させ懸濁重合させる工程が好ましい。工程 1 a で用いるモノマー組成物としては、官能基含有モノマーを含有するものが好ましい。このモノマーが含有する官能基は、追加の化学反応（架橋剤との反応等）に利用できるものが好ましく、リガンドを固定可能なものであってもよい。官能基としては、例えば、環状エーテル基、カルボキシ基、 $-C(=O)-O-C(=O)-$ 、コハク酸イミドオキシカルボニル基、ホルミル基、水酸基、及びイソシアネート基からなる群より選ばれる官能基が挙げられる。これらの中では、環状エーテル基が好ましい。

ここで、「環状エーテル基」としては、環を構成する原子数が 3 ~ 7 個の環状エーテル基が好ましい。環状エーテル基は、置換基としてアルキル基を有していてもよい。環状エーテル基の具体例としては、以下の式 (1) ~ (6) で表される環状エーテル基が挙げられるが、式 (1)、(3) 又は (6) で表される環状エーテル基が好ましく、式 (1) で表される環状エーテル基がより好ましい。

【0015】

【化1】



【0016】

〔式中、R¹ ~ R⁴は、それぞれ独立して、水素原子又はアルキル基を示し、*は、結合手を示す。〕

【0017】

R¹ ~ R⁴で示されるアルキル基の炭素数は、好ましくは 1 ~ 4 であり、より好ましくは 1 又は 2 である。アルキル基は直鎖状でも分岐鎖状でもよく、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基等が挙げられる。また、R¹ ~ R⁴としては、水素原子が好ましい。

【0018】

官能基含有モノマーとしては、リガンドを固定可能な官能基及び重合性不飽和基を有するモノマーが好ましい。このようなモノマーとしては、例えば、グリシジル(メタ)アクリレート、3-オキシラニルプロピル(メタ)アクリレート、4-オキシラニルブチル(メタ)アクリレート、5-オキシラニルペンチル(メタ)アクリレート、6-オキシラニルヘキシル(メタ)アクリレート、7-オキシラニルヘプチル(メタ)アクリレート、8-オキシラニルオクチル(メタ)アクリレート、(3-メチルオキシラニル)メチル(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、グリセリンモノ(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、3,4-エポキシシクロヘキシルエチル(メタ)アクリレート、3,4-エポキシシクロヘキシルプロピル(メタ)アクリレート、(メタ)アクリル-グリシジルポリエチレングリコール、テトラヒドロフルフリル(メタ)アクリレート等の環状エーテル基を有する(メタ)アクリレート系モノマー；(ビニルベンジル)グリシジルエーテル、(イソプロペニルベンジル)グリシジルエーテル、(ビニルフェネチル)グリシジルエーテル、(ビニルフェニルブチル)グリシジルエーテル、(ビニルベンジルオキシエチル)グリシジルエーテル、(ビニルフェニル)グリシジルエーテル、(イソプロペニルフェニル)グリシジルエーテル、1,2-エポキシ-3-(4-ビニルベンジル)プロパン等の環状エーテル基を有する芳香族ビニル系モノマー；アリルグリシジルエーテル等の環状エーテル基を有するアリルエーテル系モノマー；イソシアナトエチル(メタ)アクリレート等のイソシアネート基を有する(メタ)アクリレート系モノマー；マレイン酸無水物、メチルマレイン酸無水物、グルタコン酸無水物等の不飽和ジカルボン酸無水物系モノマーの他、(メタ)アクリル酸、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る。これらモノマーは、1種を単独で又は2種以上を組み合わせて使用できる。

10

これらモノマーの中では、環状エーテル基を有する(メタ)アクリレート系モノマーが好ましく、グリシジル(メタ)アクリレートが特に好ましい。

【0019】

官能基含有モノマーの合計使用量としては、工程1aで使用するモノマー総量100質量部に対して、好ましくは35質量部以上、より好ましくは45質量部以上、特に好ましくは55質量部以上であり、また、工程1aで使用するモノマー総量100質量部に対して、好ましくは99質量部以下、より好ましくは90質量部以下、特に好ましくは85質量部以下である。

20

【0020】

また、工程1aで用いるモノマー組成物は、上記官能基含有モノマーに加えて、さらに官能基含有モノマー以外のモノマー(以下、他のモノマーともいう)を含有していてもよい。

他のモノマーとしては、リガンドを固定可能な官能基をもたない重合性不飽和基含有モノマーが挙げられる。他のモノマーは、非架橋性モノマー、架橋性モノマーに大別され、これらのうち一方を用いても併用してもよい。なお、本発明によれば、ヒドロキシ基等の親水性基を含まないモノマーを他のモノマーとして用いた場合であっても、防汚性を満足させることができ、広範なモノマー組成に適用可能である。

30

【0021】

上記非架橋性モノマーとしては、例えば、(メタ)アクリレート系非架橋性モノマー、(メタ)アクリルアミド系非架橋性モノマー、芳香族ビニル系非架橋性モノマー、ビニルケトン系非架橋性モノマー、(メタ)アクリロニトリル系非架橋性モノマー、N-ビニルアミド系非架橋性モノマー等が挙げられる。これらは1種を単独で又は2種以上を組み合わせて使用できる。非架橋性モノマーの中では、(メタ)アクリレート系非架橋性モノマー、芳香族ビニル系非架橋性モノマーが好ましい。

【0022】

上記(メタ)アクリレート系非架橋性モノマーとしては、例えば、メチル(メタ)アクリレート、エチル(メタ)アクリレート、n-ブチル(メタ)アクリレート、4-tert-ブチル(メタ)アクリレート、イソブチル(メタ)アクリレート、n-オクチル(メタ)アクリレート、2-エチルヘキシル(メタ)アクリレート、シクロヘキシル(メタ)アクリレート、メトキシエチル(メタ)アクリレート、ヒドロキシエチル(メタ)アクリレート、ヒドロキシプロピル(メタ)アクリレート、グリセロールモノ(メタ)アクリレート、トリメチロールエタンモノ(メタ)アクリレート、トリメチロールプロパンモノ(メタ)アクリレート、ブタントリオールモノ(メタ)アクリレート、ポリエチレングリコールモノ(メタ)アクリレート、メトキシポリエチレングリコール(メタ)アクリレート、ペンタエリスリトールモノ(メタ)アクリレート、ジペンタエリスリトールモノ(メタ)

40

50

) アクリレート、イノシトールモノ(メタ)アクリレート等が挙げられる。これらは1種を単独で又は2種以上を組み合わせて使用できる。

【0023】

また、上記(メタ)アクリルアミド系非架橋性モノマーとしては、例えば、(メタ)アクリルアミド、ジメチル(メタ)アクリルアミド、ヒドロキシエチル(メタ)アクリルアミド、(メタ)アクリロイルモルホリン、ダイアセトン(メタ)アクリルアミド等が挙げられる。これらは1種を単独で又は2種以上を組み合わせて使用できる。

【0024】

また、上記芳香族ビニル系非架橋性モノマーとしては、例えば、スチレン、 α -メチルスチレン、ハロゲン化スチレン、4-メチルスチレン、2,4-ジメチルスチレン、2,4,6-トリメチルスチレン、エチルビニルベンゼン、4-イソプロピルスチレン、4-n-ブチルスチレン、4-イソブチルスチレン、4-tert-ブチルスチレン等のスチレン類；1-ビニルナフタレン、2-ビニルナフタレン等のビニルナフタレン類等が挙げられる。これらは1種を単独で又は2種以上を組み合わせて使用できる。

10

【0025】

また、上記ビニルケトン系非架橋性モノマーとしては、例えば、エチルビニルケトン、プロピルビニルケトン、イソプロピルビニルケトン等が挙げられる。これらは1種を単独で又は2種以上を組み合わせて使用できる。

また、上記(メタ)アクリロニトリル系非架橋性モノマーとしては、例えば、アクリロニトリル、メタクリロニトリル等が挙げられる。これらは1種を単独で又は2種以上を組み合わせて使用できる。

20

また、上記N-ビニルアミド系非架橋性モノマーとしては、例えば、N-ビニルアセトアミド、N-ビニルプロピオンアミド等が挙げられる。これらは1種を単独で又は2種以上を組み合わせて使用できる。

【0026】

非架橋性モノマーの合計使用量としては、工程1aで使用するモノマー総量100質量部に対して、好ましくは0.01質量部以上、より好ましくは0.05質量部以上、特に好ましくは0.1質量部以上であり、また、工程1aで使用するモノマー総量100質量部に対して、好ましくは30質量部以下、より好ましくは15質量部以下、特に好ましくは5質量部以下である。

30

【0027】

また、上記架橋性モノマーとしては、例えば、(メタ)アクリレート系架橋性モノマー、芳香族ビニル系架橋性モノマー、アリル系架橋性モノマー等が挙げられる。これらは1種を単独で又は2種以上を組み合わせて使用できる。また、架橋性モノマーとしては、2~5官能の架橋性モノマーが好ましく、2又は3官能の架橋性モノマーがより好ましい。架橋性モノマーの中では、(メタ)アクリレート系架橋性モノマー、芳香族ビニル系架橋性モノマーが好ましい。

【0028】

上記(メタ)アクリレート系架橋性モノマーとしては、例えば、エチレングリコールジ(メタ)アクリレート、ジエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、トリエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、テトラエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、ポリエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、プロピレングリコールジ(メタ)アクリレート、ジプロピレングリコールジ(メタ)アクリレート、トリプロピレングリコールジ(メタ)アクリレート、テトラプロピレングリコールジ(メタ)アクリレート、ポリプロピレングリコールジ(メタ)アクリレート、1,4-ブタンジオールジ(メタ)アクリレート、1,6-ヘキサジオールジ(メタ)アクリレート、グリセリンジ(メタ)アクリレート、トリメチロールエタンジ(メタ)アクリレート、トリメチロールプロパンジ(メタ)アクリレート、トリメチロールプロパントリ(メタ)アクリレート、ブタントリオールジ(メタ)アクリレート、ペンタエリスリトールジ(メタ)アクリレート、ペンタエリスリトールトリ(メタ)アクリレート、ペンタエリスリトールテトラ(メタ)アクリレ

40

50

ート、グルコースジ(メタ)アクリレート、グルコーストリ(メタ)アクリレート、グルコーステトラ(メタ)アクリレート、ジペンタエリスリトールジ(メタ)アクリレート、ジペンタエリスリトールトリ(メタ)アクリレート、ジペンタエリスリトールテトラ(メタ)アクリレート、ジペンタエリスリトールペンタ(メタ)アクリレート、イノシトールジ(メタ)アクリレート、イノシトールトリ(メタ)アクリレート、イノシトールテトラ(メタ)アクリレート、マンニトールジ(メタ)アクリレート、マンニトールトリ(メタ)アクリレート、マンニトールテトラ(メタ)アクリレート、マンニトールペンタ(メタ)アクリレート等が挙げられる。これらは1種を単独で又は2種以上を組み合わせで使用できる。

【0029】

また、上記芳香族ビニル系架橋性モノマーとしては、例えば、ジビニルベンゼン、トリビニルベンゼン、ジビニルトルエン、ジビニルキシレン、ジビニルエチルベンゼン、ジビニルナフタレン等が挙げられる。これらは1種を単独で又は2種以上を組み合わせで使用できる。

【0030】

また、上記アリル系架橋性モノマーとしては、例えば、フタル酸ジアリル、イソフタル酸ジアリル、テレフタル酸ジアリル、マレイン酸ジアリル、フマル酸ジアリル、イタコン酸ジアリル、トリメリット酸ジアリル、トリメリット酸トリアリル、シアヌル酸トリアリル、イソシアヌル酸ジアリル、イソシアヌル酸トリアリル等が挙げられる。これらは1種を単独で又は2種以上を組み合わせで使用できる。

さらに、架橋性モノマーとしては、上記例示したものの他に、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、グルコサミン等のアミノアルコールと(メタ)アクリル酸との脱水縮合反応物や、ブタジエン、イソプレン等の共役ジオレフィン等を挙げることができる。

【0031】

架橋性モノマーの合計使用量としては、工程1aで使用するモノマー総量100質量部に対して、好ましくは1質量部以上、より好ましくは5質量部以上、特に好ましくは10質量部以上であり、また、工程1aで使用するモノマー総量100質量部に対して、好ましくは50質量部以下、より好ましくは40質量部以下、特に好ましくは30質量部以下である。

【0032】

上記水系媒体としては、例えば水溶性高分子水溶液等が挙げられ、水溶性高分子としては、例えばヒドロキシエチルセルロース、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、デンプン、ゼラチン等が挙げられる。

水系媒体の合計使用量は、通常、モノマー総量100質量部に対して200質量部以上7000質量部以下程度である。

また、水系媒体の分散媒として水を用いる場合、例えば、炭酸ナトリウム、炭酸カルシウム、硫酸ナトリウム、燐酸カルシウム、塩化ナトリウム等の分散安定剤を使用してもよい。

【0033】

また、工程1aの具体的な方法としては、例えば、モノマー組成物及び必要に応じて多孔化剤を含む混合溶液(モノマー溶液)に重合開始剤を溶解させ、水系媒体中に懸濁させて所定温度まで加熱して重合させる方法や、モノマー組成物及び必要に応じて多孔化剤を含む混合溶液(モノマー溶液)に重合開始剤を溶解させ、所定温度まで加熱した水系媒体中に添加して重合させる方法、モノマー組成物及び必要に応じて多孔化剤を含む混合溶液(モノマー溶液)を、水系媒体中に懸濁させて所定温度まで加熱して、重合開始剤を添加し重合させる方法等が挙げられる。これらのうちいずれかの方法の工程1aを設けることにより、粒子径の均一性が改善され、通液性に優れた多孔質粒子を調製し易くなる。

【0034】

重合開始剤としてはラジカル重合開始剤が好ましい。ラジカル重合開始剤としては、例

10

20

30

40

50

例えば、アゾ系開始剤、過酸化物系開始剤、レドックス系開始剤等が挙げられ、具体的には、アゾビスイソブチロニトリル、アゾビスイソ酪酸メチル、アゾビス - 2 , 4 - ジメチルバレロニトリル、過酸化ベンゾイル、過酸化ジ - t e r t - ブチル、過酸化ベンゾイル - ジメチルアニリン等が挙げられる。重合開始剤の合計使用量は、通常、モノマー総量 1 0 0 質量部に対して 0 . 0 1 質量部以上 1 0 質量部以下程度である。

【 0 0 3 5 】

上記多孔化剤は、多孔質粒子を製造するために使用され、油滴内の重合において、モノマーと共に存在し、非重合成分として孔を形成する役割を有する。多孔化剤は、容易に除去可能なものであれば特に限定されるものではなく、例えば、各種の有機溶剤や混合モノマーに可溶な線状重合物が挙げられ、これらを併用してもよい。

10

【 0 0 3 6 】

上記多孔化剤としては、例えば、ヘキサン、ヘプタン、オクタン、ノナン、デカン、ウンデカン等の脂肪族炭化水素類；シクロペンタン、シクロヘキサン等の脂環式炭化水素類；ベンゼン、トルエン、キシレン、ナフタレン、エチルベンゼン等の芳香族炭化水素類；四塩化炭素、1, 2 - ジクロロエタン、テトラクロロエタン、クロロベンゼン等のハロゲン化炭化水素類；ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、ヘプタノール、4 - メチル - 2 - ペンタノール、2 - エチル - 1 - ヘキサノール等の脂肪族アルコール類；シクロヘキサノール等の脂環式アルコール類；2 - フェニルエチルアルコール、ベンジルアルコール等の芳香族アルコール類；ジエチルケトン、メチルイソブチルケトン、ジイソブチルケトン、アセトフェノン、2 - オクタノン、シクロヘキサノン等のケトン類；ジブチルエーテル、ジイソブチルエーテル、アニソール、エトキシベンゼン等のエーテル類；酢酸イソペンチル、酢酸ブチル、酢酸 - 3 - メトキシブチル、マロン酸ジエチル等のエステル類の他、非架橋性ビニルモノマーのホモポリマー等の線状重合物が挙げられる。多孔化剤は単独で又は 2 種以上を混合して用いることができる。

20

上記多孔化剤の合計使用量は、通常、モノマー総量 1 0 0 質量部に対して 2 0 質量部以上 1 0 0 0 質量部以下程度である。

【 0 0 3 7 】

また、工程 1 a には、アルキル硫酸エステル塩、アルキルアリアル硫酸エステル塩、アルキルリン酸エステル塩、脂肪酸塩等のアニオン性界面活性剤をはじめとする各種界面活性剤を用いてもよい。また、亜硝酸ナトリウム等の亜硝酸塩、ヨウ化カリウム等のヨウ化物塩、t e r t - ブチルピロカテコール、ベンゾキノン、ピクリン酸、ハイドロキノン、塩化銅、塩化第二鉄等の重合禁止剤を用いることもできる。また、ドデシルメルカプタン等の重合調製剤を用いてもよい。

30

【 0 0 3 8 】

また、工程 1 a の重合温度は重合開始剤に応じて決定すればよいが、通常 2 ~ 1 0 0 程度であり、アゾビスイソブチロニトリルを重合開始剤として用いる場合は、5 0 ~ 1 0 0 が好ましく、6 0 ~ 9 5 がより好ましい。また、重合時間は通常 5 分間 ~ 4 8 時間、好ましくは 1 0 分間 ~ 2 4 時間である。

【 0 0 3 9 】

- 工程 1 b -

40

本発明のクロマトグラフィー用担体の製造方法としては、工程 1 a で得られたリガンドが固定されていない多孔質粒子と、架橋剤とを接触させる工程（以下、工程 1 b ともいう）をさらに含むものが好ましい。工程 1 a でモノマー組成物として官能基含有モノマーを含有するものを用いた場合、工程 1 b によって、多孔質粒子が重合体分子内に有する官能基の一部に架橋剤が付加反応され、当該架橋剤由来の部分構造が導入される。これにより、上記官能基の残基同士が架橋剤由来の部分構造を介して架橋される。

なお、工程 1 a 後に工程 1 b を行わずに、工程 2 のふるい分級後の固相支持体と架橋剤とを接触させる工程を設けてもよい。このような工程を備える製造方法には、例えば、後述の工程 2 a と工程 2 b との間に固相支持体と架橋剤とを接触させる態様（具体的には、工程 2 a、架橋工程、工程 2 b の順で行う態様、工程 2 b、架橋工程、工程 2 a の順で行

50

う態様)、工程 2 a 及び 2 b の後に固相支持体と架橋剤とを接触させる態様(具体的には、工程 2 a、工程 2 b、架橋工程の順で行う態様、工程 2 b、工程 2 a、架橋工程の順で行う態様)が包含される。これらの中では、工程 2 a と工程 2 b との間に固相支持体と架橋剤とを接触させる態様が好ましい。

【0040】

工程 1 b で用いる架橋剤は、リガンドを固定可能な官能基と反応して架橋構造を導入できるものであればよいが、リガンドを固定可能な官能基と反応して架橋構造を導入できるとともに、 $-C(=O)-NH-$ で示される基を分子内に少なくとも 2 個含む架橋剤が好ましい。

【0041】

工程 1 a で得られた多孔質粒子が環状エーテル基を有する場合には、具体的には、架橋性基として $-C(=O)-NH-NH_2$ で示される基を分子内に少なくとも 2 個含む架橋剤、 $-C(=O)-NH-$ で示される基を分子内に少なくとも 2 個含む架橋剤等を使用することができる。

工程 1 a で得られた多孔質粒子がカルボキシ基、 $-C(=O)-O-C(=O)-$ 、コハク酸イミドオキシカルボニル基、ホルミル基又はイソシアネート基を有する場合には、具体的には、架橋性基として $-C(=O)-NH-NH_2$ で示される基を分子内に少なくとも 2 個含む架橋剤等を使用することができる。

【0042】

上記のような $-C(=O)-NH-$ で示される基を分子内に少なくとも 2 個含む架橋剤としては、例えば、オキサリルジヒドラジド、マロン酸ジヒドラジド、コハク酸ジヒドラジド、2,3-ジヒドロキシコハク酸ジヒドラジド、グルタル酸ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド、ピメリン酸ジヒドラジド、オクタン二酸ジヒドラジド、ノナン二酸ジヒドラジド、セバシン酸ジヒドラジド、ドデカン二酸ジヒドラジド、フタル酸ジヒドラジド、イソフタル酸ジヒドラジド、テレフタル酸ジヒドラジド、キノリン酸ジヒドラジド等のジカルボン酸ジヒドラジド類；シクロヘキサントリカルボン酸トリヒドラジド等のトリカルボン酸トリヒドラジド類；N1,N1-(エタン-1,2-ジイル)ビス(コハク酸モノアミド)等の(アルキレンビスイミノ)ビス(オキソアルカン酸)類等が挙げられる。架橋剤は、1種を単独で又は2種以上を組み合わせて使用できる。これら架橋剤の中では、通液性、通液時の圧力抵抗特性及び防汚性を改善させるために、ジカルボン酸ジヒドラジド類、(アルキレンビスイミノ)ビス(オキソアルカン酸)類が好ましく、ジカルボン酸ジヒドラジド類がより好ましい。

【0043】

また、工程 1 b においては、 $-C(=O)-NH-$ で示される基を分子内に少なくとも 2 個含む架橋剤以外の架橋剤を用いることもできる。このような架橋剤としては、例えば、多官能イソシアネート系架橋剤、多官能エポキシ系架橋剤、多官能アルデヒド系架橋剤、多官能チオール系架橋剤、多官能オキサゾリン系架橋剤、多官能アジリジン系架橋剤、金属キレート系架橋剤等が挙げられる。

【0044】

架橋剤の合計使用量は、官能基含有モノマーに由来する官能基 1 モルに対して、好ましくは 0.01 モル当量以上 0.8 モル当量以下であり、より好ましくは 0.05 モル当量以上 0.7 モル当量以下であり、特に好ましくは 0.1 モル当量以上 0.6 モル当量以下である。

【0045】

なお、工程 1 b は、塩基性触媒存在下で行ってもよい。塩基性触媒としては、トリエチルアミン、N,N-ジメチル-4-アミノピリジン、水酸化ナトリウム、ジイソプロピルエチルアミン等が挙げられ、1種を単独で又は2種以上を組み合わせて使用できる。

【0046】

また、工程 1 b の反応時間は特に限定されないが、通常 0.5 ~ 72 時間程度であり、好ましくは 0.5 ~ 48 時間である。また、反応温度は、溶媒の沸点以下で適宜選択すれ

10

20

30

40

50

ばよいが、通常 2 ~ 100 程度である。

【0047】

- 工程 1 c -

固相支持体として、リガンドが固定された多孔質粒子を用意する場合には、本発明のクロマトグラフィー用担体の製造方法としては、工程 1 a 又は工程 1 b で得られた多孔質粒子にリガンドを固定する工程（以下、工程 1 c ともいう）をさらに含むものが好ましい。工程 1 a でモノマー組成物として官能基含有モノマーを含有するものを用いた場合、工程 1 c によって、多孔質粒子が重合体分子内に有する官能基にリガンドが結合する。

上記リガンドは、標的物質と結合する分子または多孔質粒子表面の官能基を介して導入できるイオン交換基であればよいが、例えば、スルホ基、ホスホン基等の陽イオン交換基；アミノ基、四級アンモニウム基等の陰イオン交換基；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；DNA、RNA 等の核酸；酵素；イミノジ酢酸等のキレート化合物；抗体；抗原；ホルモン；ヘパリン、ルイス X、ガングリオシド等の糖質；レセプター；アプタマー；ピオチンやその誘導体等のビタミン類；金属イオン；合成色素の他、2 - アミノフェニルホウ素酸、4 - アミノベンズアミジン、グルタチオンのような低分子化合物等が挙げられる。なお、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。

上記リガンドの中でも、タンパク質、ペプチド、核酸、酵素、キレート化合物が好ましく、タンパク質、ペプチドがより好ましく、タンパク質が特に好ましい。特に、抗体を標的物質とする抗体アフィニティリガンドの中では、イムノグロブリン結合性タンパク質が好ましい。

【0048】

抗体アフィニティリガンドとしては、ペプチド性リガンド、タンパク質性リガンド、化学合成性リガンド（合成化合物）が挙げられ、好ましくはペプチド性又はタンパク質性リガンドである。中でも、プロテイン A、プロテイン G、プロテイン L、プロテイン H、プロテイン D、プロテイン A r p、プロテイン F c R、抗体結合性合成ペプチドリガンド、これらの類縁物質が好ましく、プロテイン A、プロテイン G、プロテイン L、これらの類縁物質がより好ましく、プロテイン A、その類縁物質が特に好ましい。

【0049】

リガンドの固定量は、動的結合容量を大きくするために、工程 1 a 又は工程 1 b で得られた多孔質粒子の乾燥重量 1 g 当たり、好ましくは 10 mg 以上 300 mg 以下、より好ましくは 25 mg 以上 150 mg 以下である。

【0050】

多孔質粒子へのリガンドの固定は常法と同様にして行えばよい。リガンド固定法としては、化学結合法が好ましい。例えば、リガンドを固定可能な官能基にリガンドを結合させる方法が挙げられる。この方法は、国際公開第 2015/119255 号パンフレット、国際公開第 2015/041218 号パンフレット等の記載を参考にして行えばよい。具体的には、多孔質粒子の環状エーテル基やカルボキシ基、 $-C(=O)-O-C(=O)-$ 、ホルミル基等とリガンドのアミノ基等を結合させる方法が挙げられる。

また、リガンドの配向性を制御する方法（米国特許第 6,399,750 号、Ljungquist C. 他著, rEur. J. Biochem., 1989 年, 186 巻, 557-561 頁）や、リンカー（スペーサー）を介してリガンドを多孔質粒子に固定する方法（米国特許第 5,260,373 号、特開 2010-133733 号公報、特開 2010-133734 号公報）、会合性基によりリガンドを多孔質粒子上に集積させる方法（特開 2011-256176 号公報）等を利用して固定してもよい。

なお、リガンドが固定された多孔質粒子を、メタンチオール、チオグリセロール等のチオール化合物と接触させ、未反応の官能基を開環等させてもよい。この処理は、国際公開第 2015/119255 号パンフレット等の記載を参考にして行えばよい。

【0051】

10

20

30

40

50

工程 1 で用意した固相支持体の体積平均粒子径は、好ましくは $30\ \mu\text{m}$ 以上、より好ましくは $40\ \mu\text{m}$ 以上、特に好ましくは $50\ \mu\text{m}$ 以上であり、また、好ましくは $120\ \mu\text{m}$ 以下、より好ましくは $100\ \mu\text{m}$ 以下、特に好ましくは $95\ \mu\text{m}$ 以下である。工程 1 で用意した固相支持体の体積平均粒子径の具体的な範囲としては、 $30\ \mu\text{m}$ 以上 $120\ \mu\text{m}$ 以下が好ましく、 $40\ \mu\text{m}$ 以上 $100\ \mu\text{m}$ 以下がより好ましく、 $50\ \mu\text{m}$ 以上 $95\ \mu\text{m}$ 以下が特に好ましい。

工程 1 で用意した固相支持体の体積平均粒子径は、ISO 13320 : 2009 に準拠して測定できる。

【0052】

(工程 2)

工程 2 は、工程 1 で用意した固相支持体をふるい分級することにより、リガンドが固定されたときの多孔質粒子の体積基準粒子径分布の変動係数が 1% 以上 22% 以下となり、且つリガンドが固定されたときの多孔質粒子の体積基準粒子径分布の歪度が -0.1 以上 5 以下となるように調整する工程である。

工程 2 のふるい分級は、多孔質粒子にリガンドを固定した後に測定したときの体積基準粒子径分布の変動係数が 1% 以上 22% 以下となり、且つ多孔質粒子にリガンドを固定した後に測定したときの体積基準粒子径分布の歪度が -0.1 以上 5 以下となるように行えばよい。また、多孔質粒子にリガンドを固定した後に測定したときの上記変動係数及び歪度が上記範囲になる限り、リガンド固定前及びリガンド固定後のどちらにふるい分級を行ってもよく、またこれらの両方にふるい分級を行ってもよい。なお、多孔質粒子にリガンドを固定した後に測定したときの変動係数や歪度が上記範囲になるように、遠心分離法や沈降分離法等の分級方法を併用してもよい。

【0053】

上記体積基準粒子径分布の変動係数が 1% 以上となるように調整することによって、担体の生産性が向上する。また、当該変動係数が 22% 以下となるように調整することによって、クロマトグラフィー用担体の通液性及び通液時の圧力抵抗特性が改善される。

上記体積基準粒子径分布の変動係数は、担体の生産性を向上させるために、好ましくは 5% 以上、より好ましくは 6% 以上、更に好ましくは 8% 以上、特に好ましくは 10% 以上であり、また、通液性及び通液時の圧力抵抗特性を改善させるために、好ましくは 20% 以下、より好ましくは 18% 以下、更に好ましくは 17% 以下、特に好ましくは 16% 以下である。具体的な範囲としては、5% 以上 20% 以下が好ましく、6% 以上 20% 以下がより好ましく、8% 以上 18% 以下が更に好ましく、8% 以上 17% 以下が更に好ましく、10% 以上 16% 以下が特に好ましい。

体積基準粒子径分布の変動係数を 18% 以下又は 17% 以下とした場合に、クロマトグラフィー用担体の通液性及び通液時の圧力抵抗特性が特に改善される。

上記体積基準粒子径分布の変動係数は、リガンドが固定された多孔質粒子について ISO 13319 : 2007 に準拠して測定した体積基準粒子径分布の変動係数であり、具体的には、後述する実施例に記載の方法により測定することができる。

【0054】

上記体積基準粒子径分布の歪度が -0.1 以上となるように調整することによって、クロマトグラフィー用担体の通液性及び通液時の圧力抵抗特性が改善される。また、当該歪度が 5 以下となるように調整することによって、動的結合容量が大きくなる。

上記体積基準粒子径分布の歪度は、通液性及び通液時の圧力抵抗特性を改善させるために、好ましくは -0.01 以上、より好ましくは 0.01 以上、更に好ましくは 0.1 以上、更に好ましくは 0.3 以上、特に好ましくは 0.4 以上であり、また、動的結合容量を大きくするために、好ましくは 4 以下、より好ましくは 3 以下、特に好ましくは 2 以下である。具体的な範囲としては、-0.01 以上 4 以下が好ましく、0.01 以上 3 以下がより好ましく、0.1 以上 3 以下が更に好ましく、0.3 以上 2 以下が更に好ましく、0.4 以上 2 以下が特に好ましい。

体積基準粒子径分布の歪度を 0.1 以上又は 0.3 以上とした場合に、クロマトグラフ

10

20

30

40

50

イー用担体の通液性及び通液時の圧力抵抗特性が特に改善される。

上記体積基準粒子径分布の歪度は、リガンドが固定された多孔質粒子についてISO 13319:2007に準拠して測定した体積基準粒子径分布の歪度であり、具体的には、後述する実施例に記載の方法により測定することができる。

【0055】

また、工程2においては、体積平均粒子径が、好ましくは40 μm以上、より好ましくは50 μm以上、特に好ましくは55 μm以上となるようにふるい分級され、また、体積平均粒子径が、好ましくは150 μm以下、より好ましくは100 μm以下、更に好ましくは90 μm以下、特に好ましくは80 μm以下となるようにふるい分級される。体積平均粒子径の具体的な範囲としては、40 μm以上150 μm以下が好ましく、50 μm以上100 μm以下がより好ましく、55 μm以上90 μm以下が更に好ましく、55 μm以上80 μm以下が特に好ましい。

10

上記体積平均粒子径は、ISO 13320:2009に従ってレーザ回折散乱法で測定した体積平均粒子径をいう。

【0056】

また、工程2においては、通液性及び通液時の圧力抵抗特性を改善させるために、体積基準累積1%粒子径d₁が、好ましくは20 μm以上、より好ましくは30 μm以上、更に好ましくは35 μm以上、特に好ましくは40 μm以上となるようにふるい分級され、また、動的結合容量を大きくするために、体積基準累積1%粒子径d₁が、好ましくは85 μm以下、より好ましくは75 μm以下、更に好ましくは65 μm以下、更に好ましくは58 μm以下、特に好ましくは55 μm以下となるようにふるい分級される。体積基準累積1%粒子径d₁の具体的な範囲としては、20 μm以上85 μm以下が好ましく、30 μm以上75 μm以下がより好ましく、35 μm以上65 μm以下が更に好ましく、40 μm以上58 μm以下が更に好ましく、40 μm以上55 μm以下が特に好ましい。

20

体積基準累積1%粒子径d₁を35 μm以上又は40 μm以上とした場合に、クロマトグラフィー用担体の通液性及び通液時の圧力抵抗特性が特に改善される。

【0057】

また、工程2においては、通液性及び通液時の圧力抵抗特性を改善させるために、体積基準累積5%粒子径d₅が、好ましくは20 μm以上、より好ましくは30 μm以上、更に好ましくは35 μm以上、更に好ましくは40 μm以上、特に好ましくは45 μm以上となるようにふるい分級され、また、動的結合容量を大きくするために、体積基準累積5%粒子径d₅が、好ましくは100 μm以下、より好ましくは80 μm以下、更に好ましくは70 μm以下、更に好ましくは65 μm以下、特に好ましくは60 μm以下となるようにふるい分級される。体積基準累積5%粒子径d₅の具体的な範囲としては、20 μm以上100 μm以下が好ましく、30 μm以上80 μm以下がより好ましく、35 μm以上70 μm以下が更に好ましく、40 μm以上65 μm以下が更に好ましく、45 μm以上60 μm以下が特に好ましい。

30

体積基準累積5%粒子径d₅を40 μm以上又は45 μm以上とした場合に、クロマトグラフィー用担体の通液性及び通液時の圧力抵抗特性が特に改善される。

【0058】

また、工程2においては、動的結合容量や圧力抵抗特性を改善させるために、体積基準累積50%粒子径d₅₀が、好ましくは20 μm以上、より好ましくは30 μm以上、更に好ましくは40 μm以上、特に好ましくは55 μm以上となるようにふるい分級され、また、動的結合容量や圧力抵抗特性を改善させるために、体積基準累積50%粒子径d₅₀が、好ましくは100 μm以下、より好ましくは90 μm以下、更に好ましくは85 μm以下、更に好ましくは75 μm以下、特に好ましくは65 μm以下となるようにふるい分級される。体積基準累積50%粒子径d₅₀の具体的な範囲としては、20 μm以上100 μm以下が好ましく、30 μm以上90 μm以下がより好ましく、30 μm以上85 μm以下が更に好ましく、40 μm以上75 μm以下が更に好ましく、55 μm以上65 μm以下が特に好ましい。

40

50

【 0 0 5 9 】

工程 2 においては、通液性及び通液時の圧力抵抗特性を改善させるために、体積基準累積 1 % 粒子径 d_1 を体積基準累積 5 0 % 粒子径 d_{50} で除した値 $[d_1 / d_{50}]$ が、好ましくは 0 . 5 5 以上、より好ましくは 0 . 6 0 以上、更に好ましくは 0 . 6 3 以上、更に好ましくは 0 . 6 5 以上、特に好ましくは 0 . 7 0 以上となるようにふるい分級され、また、カラムに充填した際に適度な充填状態になりやすくするために、体積基準累積 1 % 粒子径 d_1 を体積基準累積 5 0 % 粒子径 d_{50} で除した値 $[d_1 / d_{50}]$ が、好ましくは 1 . 0 以下、より好ましくは 0 . 9 5 以下、更に好ましくは 0 . 9 0 以下、特に好ましくは 0 . 8 5 以下となるようにふるい分級される。体積基準累積 1 % 粒子径 d_1 を体積基準累積 5 0 % 粒子径 d_{50} で除した値 $[d_1 / d_{50}]$ の具体的な範囲としては、0 . 5 5 以上 1 . 0 以下が好ましく、0 . 6 0 以上 0 . 9 5 以下がより好ましく、0 . 6 3 以上 0 . 9 0 以下が更に好ましく、0 . 6 5 以上 0 . 9 0 以下が更に好ましく、0 . 7 0 以上 0 . 8 5 以下が特に好ましい。

10

体積基準累積 1 % 粒子径 d_1 を体積基準累積 5 0 % 粒子径 d_{50} で除した値 $[d_1 / d_{50}]$ を 0 . 6 3 以上又は 0 . 7 0 以上とした場合に、クロマトグラフィー用担体の通液性及び通液時の圧力抵抗特性が特に改善される。

【 0 0 6 0 】

工程 2 においては、通液性及び通液時の圧力抵抗特性を改善させるために、体積基準累積 5 % 粒子径 d_5 を体積基準累積 5 0 % 粒子径 d_{50} で除した値 $[d_5 / d_{50}]$ が、好ましくは 0 . 5 0 以上、より好ましくは 0 . 6 0 以上、更に好ましくは 0 . 7 0 以上、特に好ましくは 0 . 8 0 以上となるようにふるい分級され、また、カラムに充填した際に適度な充填状態になりやすくするために、体積基準累積 5 % 粒子径 d_5 を体積基準累積 5 0 % 粒子径 d_{50} で除した値 $[d_5 / d_{50}]$ が、好ましくは 1 . 0 以下、より好ましくは 0 . 9 7 以下、更に好ましくは 0 . 9 5 以下、特に好ましくは 0 . 9 0 以下となるようにふるい分級される。体積基準累積 5 % 粒子径 d_5 を体積基準累積 5 0 % 粒子径 d_{50} で除した値 $[d_5 / d_{50}]$ の具体的な範囲としては、0 . 5 0 以上 1 . 0 以下が好ましく、0 . 6 0 以上 0 . 9 7 以下がより好ましく、0 . 7 0 以上 0 . 9 5 以下が更に好ましく、0 . 8 0 以上 0 . 9 0 以下が特に好ましい。

20

体積基準累積 5 % 粒子径 d_5 を体積基準累積 5 0 % 粒子径 d_{50} で除した値 $[d_5 / d_{50}]$ を 0 . 7 0 以上又は 0 . 8 0 以上とした場合に、クロマトグラフィー用担体の通液性及び通液時の圧力抵抗特性が特に改善される。

30

【 0 0 6 1 】

体積基準累積 1 % 粒子径 d_1 、体積基準累積 5 % 粒子径 d_5 及び体積基準累積 5 0 % 粒子径 d_{50} は、ISO 1 3 3 1 9 : 2 0 0 7 に準拠して測定した体積平均粒子径の値が、ISO 1 3 3 2 0 : 2 0 0 9 に準拠して測定した体積平均粒子径の値となる形状因子を使用して、ISO 1 3 3 1 9 : 2 0 0 7 に準拠して測定した d_1 、 d_5 及び d_{50} の値を補正したものをいい、具体的には、後述する実施例に記載の方法により測定することができる。

【 0 0 6 2 】

工程 2 のふるい分級は、乾式法でも湿式法でもよいが、所望の粒子径を有する多孔質粒子に調整しやすくし、また多孔質粒子が破損しにくくするために、好ましくは湿式法である。ふるい分級は、晃栄産業株式会社製佐藤式振動ふるい機、直下排出型振動ふるい機、解砕機構付振動ふるい機、高振動タイプ振動ふるい機、超音波発振器付き振動ふるい機等の通常の分級器を用いて行うことができる。

40

また、工程 2 のふるい分級としては、(工程 2 a) ふるい分級前の固相支持体の体積平均粒子径 ($2 a - d$) を 1 0 0 % としたときに、目開きが ($2 a - d$) の 1 0 % 以上 2 0 0 % 未満のふるいにかけて、ふるい上残分を回収する工程と、(工程 2 b) 目開きが工程 2 a のふるいよりも大きく且つ ($2 a - d$) の 6 0 0 % 未満のふるいにかけて、ふるい通過分を回収する工程とを、この順で又は逆の順で行う分級操作が好ましい。

【 0 0 6 3 】

50

工程 2 a で用いるふるいの目開きは、通液性及び通液時の圧力抵抗特性を改善させるために、(2 a - d) を 1 0 0 % としたときに、好ましくは 3 0 % 以上、より好ましくは 5 0 % 以上、更に好ましくは 6 0 % 以上、更に好ましくは 6 2 % 以上、特に好ましくは 6 8 % 以上であり、動的結合容量を大きくするために、(2 a - d) を 1 0 0 % としたときに、好ましくは 1 5 0 % 以下、より好ましくは 1 2 0 % 以下、更に好ましくは 1 0 5 % 以下、特に好ましくは 9 0 % 以下である。

工程 2 a で用いるふるいの目開きとしては、(2 a - d) を 1 0 0 % としたときに、好ましくは 3 0 % 以上 1 5 0 % 以下、より好ましくは 5 0 % 以上 1 2 0 % 以下、更に好ましくは 6 0 % 以上 1 0 5 % 以下、更に好ましくは 6 2 % 以上 9 0 % 以下、特に好ましくは 6 8 % 以上 9 0 % 以下である。

(2 a - d) を 1 0 0 % としたときの工程 2 a で用いるふるいの目開きを 6 2 % 以上又は 6 8 % 以上とした場合に、クロマトグラフィー用担体の通液性及び通液時の圧力抵抗特性が特に改善される。

【 0 0 6 4 】

工程 2 a で用いるふるいの目開きは、通液性及び通液時の圧力抵抗特性を改善させるために、好ましくは 1 6 μm 以上、より好ましくは 2 0 μm 以上、更に好ましくは 2 5 μm 以上、更に好ましくは 3 0 μm 以上、更に好ましくは 3 5 μm 以上、特に好ましくは 4 0 μm 以上であり、また、動的結合容量を大きくするために、好ましくは 1 0 0 μm 未満、より好ましくは 8 0 μm 以下、更に好ましくは 7 0 μm 以下、更に好ましくは 6 0 μm 以下、特に好ましくは 5 0 μm 以下である。具体的な範囲としては、1 6 μm 以上 1 0 0 μm 未満が好ましく、2 0 μm 以上 8 0 μm 以下がより好ましく、2 5 μm 以上 7 0 μm 以下が更に好ましく、3 0 μm 以上 6 0 μm 以下が更に好ましく、3 5 μm 以上 6 0 μm 以下が更に好ましく、4 0 μm 以上 5 0 μm 以下が特に好ましい。

【 0 0 6 5 】

工程 2 a で用いるふるいの目開きが 7 0 μm を超えて 8 0 μm 以下の場合、工程 2 b で用いるふるいの目開きは、好ましくは 9 0 μm 以上であり、工程 2 a で用いるふるいの目開きが 6 0 μm を超えて 7 0 μm 以下の場合、工程 2 b で用いるふるいの目開きは、好ましくは 7 5 μm 以上であり、工程 2 a で用いるふるいの目開きが 5 0 μm を超えて 6 0 μm 以下の場合、工程 2 b で用いるふるいの目開きは、好ましくは 6 5 μm 以上であり、工程 2 a で用いるふるいの目開きが 5 0 μm 以下の場合、工程 2 b で用いるふるいの目開きは、好ましくは 5 5 μm 以上である。

また、工程 2 b で用いるふるいの目開きは、通液性及び通液時の圧力抵抗特性を改善させるために、好ましくは 3 0 0 μm 未満、より好ましくは 2 5 0 μm 以下、更に好ましくは 2 0 0 μm 以下、更に好ましくは 1 5 0 μm 以下、特に好ましくは 1 0 0 μm 以下である。

【 0 0 6 6 】

工程 2 a と工程 2 b の順番の先後は問わず、工程 2 のふるい分級は、以下のふるい分級 A 及びふるい分級 B のどちらでもよいが、好ましくはふるい分級 B である。工程 2 のふるい分級がふるい分級 B の場合、ふるい分級機の破損を低減でき、且つ所望の粒子径に調整し易くなる。

ふるい分級 A (工程 2 a) 工程 1 で用意した固相支持体を、ふるい分級前の固相支持体の体積平均粒子径 (2 a - d) を 1 0 0 % としたときに、目開きが (2 a - d) の 1 0 % 以上 2 0 0 % 未満のふるいにかけて、ふるい上残分を回収し、(工程 2 b) 工程 2 a で回収したふるい上残分を、目開きが工程 2 a のふるいよりも大きく且つ (2 a - d) の 6 0 0 % 未満のふるいにかけて、ふるい通過分を回収する態様

ふるい分級 B (工程 2 b) 工程 1 で用意した固相支持体を、目開きが工程 2 a のふるいよりも大きく且つ (2 a - d) の 6 0 0 % 未満のふるいにかけて、ふるい通過分を回収し、(工程 2 a) 工程 2 b で回収したふるい通過分を、ふるい分級前の固相支持体の体積平均粒子径 (2 a - d) を 1 0 0 % としたときに、目開きが (2 a - d) の 1 0 % 以上 2 0 0 % 未満のふるいにかけて、ふるい上残分を回収する態様

10

20

30

40

50

【 0 0 6 7 】

(工 程 3)

工程 1 において、リガンドが固定されていない多孔質粒子を固相支持体として用意した場合には、本発明のクロマトグラフィー用担体の製造方法としては、工程 2 でふるい分級された多孔質粒子にリガンドを固定する工程（以下、工程 3 ともいう）をさらに含むものが好ましい。このようにして工程 2 の後に工程 3 を設けることによって、動的結合容量が大きくなり、また担体の生産性を向上させることができる。工程 1 a でモノマー組成物として官能基含有モノマーを含有するものを用いた場合、工程 3 によって、多孔質粒子が重合体分子内に有する官能基にリガンドが結合する。工程 3 は、工程 1 c と同様にして行うことができる。

10

【 0 0 6 8 】

なお、上記各工程で得られる反応生成物を、ろ過、洗浄等の分離手段で精製してもよい。

【 0 0 6 9 】

そして、本発明のクロマトグラフィー用担体の製造方法によれば、通液性及び通液時の圧力抵抗特性に優れるクロマトグラフィー用担体を簡便に且つ効率良く製造できる。

また、このようにして得られるクロマトグラフィー用担体は、親水性が高く優れた防汚性を有し、リガンドを固定した場合の標的物質に対する動的結合容量が大きい。また、アフィニティクロマトグラフィーへの使用に適する。

【 0 0 7 0 】

< クロマトグラフィーカラムの製造方法、クロマトグラフィー用担体 >

20

本発明のクロマトグラフィーカラムの製造方法は、担体をカラム容器に充填する工程を備え、前記担体が、多孔質粒子にリガンドが固定されたものであり、前記担体の体積基準粒子径分布の変動係数が 1 % 以上 2 2 % 以下であり、且つ体積基準粒子径分布の歪度が - 0 . 1 以上 5 以下であることを特徴とする。

本発明のクロマトグラフィー用担体は、分散媒に分散しているクロマトグラフィー用担体であって、前記担体が、多孔質粒子にリガンドが固定されたものであり、前記担体の体積基準粒子径分布の変動係数が 1 % 以上 2 2 % 以下であり、且つ体積基準粒子径分布の歪度が - 0 . 1 以上 5 以下であることを特徴とする。

本発明のクロマトグラフィーカラムの製造方法は、多孔質粒子にリガンドが固定されたものであり、体積基準粒子径分布の変動係数が 1 % 以上 2 2 % 以下であり、且つ体積基準粒子径分布の歪度が - 0 . 1 以上 5 以下である担体を用いること以外は、常法と同様にして行えばよい。

30

本発明のクロマトグラフィーカラムの製造方法で用いる担体、本発明のクロマトグラフィー用担体は、本発明のクロマトグラフィー用担体の製造方法で得られるクロマトグラフィー用担体のうち、リガンドが固定されたものと同様である。上記担体及び本発明のクロマトグラフィー用担体の体積基準粒子径分布の変動係数、体積基準粒子径分布の歪度、体積平均粒子径、体積基準累積 1 % 粒子径 d_1 、体積基準累積 5 % 粒子径 d_5 、体積基準累積 5 0 % 粒子径 d_{50} 、 $\{d_1 / d_{50}\}$ 、 $\{d_5 / d_{50}\}$ は、工程 2 で上記調整された範囲が好ましい。

【 0 0 7 1 】

40

また、上記担体、本発明のクロマトグラフィー用担体の比表面積は、好ましくは 1 ~ 5 0 0 m^2 / g であり、より好ましくは 1 0 ~ 3 0 0 m^2 / g である。また、上記担体、本発明のクロマトグラフィー用担体の体積平均細孔径は、好ましくは 1 0 ~ 3 0 0 nm である。

なお、上記比表面積及び体積平均細孔径は、ガス吸着法、水銀ポロシメーター法等により測定できる。

【 0 0 7 2 】

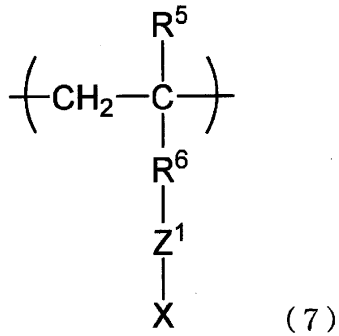
多孔質粒子が、重合体を含む多孔質粒子である場合、重合体としては、リガンドを固定可能な官能基の残基を Z^1 として有する、下記式 (7) で表される構造単位 (A) を有するものが好ましく、下記式 (7) で表される構造単位 (A)、及びリガンドを固定可能な官能基の残基を Z^2 として有する、下記式 (8) で表される構造単位 (B) を有するものがよ

50

り好ましい。なお、重合体を含む多孔質粒子へのリガンドの固定は常法と同様に行えばよい。

【0073】

【化2】



10

【0074】

〔式(7)中、

R⁵は、水素原子又はメチル基を示し、

R⁶は、単結合又は2価の連結基を示し、

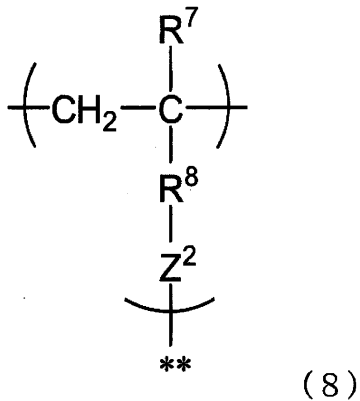
Z¹は、リガンドを固定可能な官能基の残基を示し、

Xは、-R¹⁵-R¹⁶を示す(R¹⁵は、単結合又は2価の連結基を示し、R¹⁶は、リガンドを示す。)

20

【0075】

【化3】



30

【0076】

〔式(8)中、

R⁷は、水素原子又はメチル基を示し、

R⁸は、単結合又は2価の連結基を示し、

Z²は、リガンドを固定可能な官能基の残基を示し、

**は、架橋剤(具体的には工程1bで挙げた架橋剤)由来の部分構造と結合する結合手を示す。]

40

【0077】

式(7)中のZ¹及び式(8)中のZ²で示されるリガンドを固定可能な官能基の残基としては、具体的には、環状エーテル基が開環してなる2価の基、-C(=O)-、-NH-C(=O)-が挙げられ、環状エーテル基が開環してなる2価の基が好ましい。当該環状エーテル基が開環してなる2価の基における「環状エーテル基」としては、官能基含有モノマーが有する官能基の一例として挙げたものと同様のものが好ましい。なお、環状エーテル基がエポキシ基である場合、環状エーテル基が開環してなる2価の基は、開環エポ

50

キシ基 (- C H O H - C H₂ -) である。

また、式 (8) 中の * * は、架橋剤由来の部分構造と結合する結合手を示し、架橋剤由来の部分構造で架橋されていることを意味する。

【 0 0 7 8 】

式 (7) 中の R⁶、式 (8) 中の R⁸ で示される 2 価の連結基としては、例えば、アルカンジイル基、炭素数 2 以上のアルカンジイル基の炭素 - 炭素原子間にエーテル結合を有する基、アリーレン基、 - C (= O) O - R⁹ - *、 - C (= O) N H - R¹⁰ - *、 - A r - R¹¹ - *、又は - A r - O R¹² - * 等が挙げられる。ここで、A r は、アリーレン基を示し、R⁶、R⁸ における * は、上記 Z¹ 又は Z² に結合する結合手を示す。R⁶、R⁸、A r で示されるアリーレン基としては、フェニレン基、ナフチレン基、フェナントレニレン基等が挙げられる。

10

また、R⁹ ~ R¹² は、それぞれ独立して、アルカンジイル基、又は炭素数 2 以上のアルカンジイル基の炭素 - 炭素原子間にエーテル結合を有する基を示す。

【 0 0 7 9 】

R⁶、R⁸、R⁹ ~ R¹² で示されるアルカンジイル基の炭素数としては、1 ~ 12 が好ましく、1 ~ 6 がより好ましく、1 ~ 3 が特に好ましい。当該アルカンジイル基は、直鎖状でも分岐鎖状でもよい。アルカンジイル基の具体例としては、メタン - 1, 1 - ジイル基、エタン - 1, 1 - ジイル基、エタン - 1, 2 - ジイル基、プロパン - 1, 1 - ジイル基、プロパン - 1, 2 - ジイル基、プロパン - 1, 3 - ジイル基、プロパン - 2, 2 - ジイル基、ブタン - 1, 1 - ジイル基、ブタン - 1, 2 - ジイル基、ブタン - 1, 3 - ジイル基、ブタン - 1, 4 - ジイル基、ペンタン - 1, 1 - ジイル基、ペンタン - 1, 2 - ジイル基、ペンタン - 1, 3 - ジイル基、ペンタン - 1, 4 - ジイル基、ペンタン - 1, 5 - ジイル基、ヘキサン - 1, 1 - ジイル基、ヘキサン - 1, 2 - ジイル基、ヘキサン - 1, 3 - ジイル基、ヘキサン - 1, 4 - ジイル基、ヘキサン - 1, 5 - ジイル基、ヘキサン - 1, 6 - ジイル基、ヘプタン - 1, 7 - ジイル基、オクタン - 1, 8 - ジイル基等が挙げられる。

20

【 0 0 8 0 】

R⁶、R⁸、R⁹ ~ R¹² で示される「炭素数 2 以上のアルカンジイル基の炭素 - 炭素原子間にエーテル結合を有する基」としては、 - R^a (O R^b)_p O R^c - で表される基が好ましい (R^a、R^b 及び R^c は、それぞれ独立して、炭素数 1 ~ 4 のアルカンジイル基を示し、p は 0 ~ 30 の整数を示す。)。

30

R^a、R^b 及び R^c で示されるアルカンジイル基は直鎖状でも分岐鎖状でもよい。具体的には、メタン - 1, 1 - ジイル基、エタン - 1, 1 - ジイル基、エタン - 1, 2 - ジイル基、プロパン - 1, 1 - ジイル基、プロパン - 1, 2 - ジイル基、プロパン - 1, 3 - ジイル基、プロパン - 2, 2 - ジイル基、ブタン - 1, 1 - ジイル基、ブタン - 1, 2 - ジイル基、ブタン - 1, 3 - ジイル基、ブタン - 1, 4 - ジイル基が挙げられる。p としては、0 ~ 20 の整数が好ましく、0 ~ 10 の整数がより好ましく、0 ~ 5 の整数が更に好ましく、0 が特に好ましい。なお、p が 2 ~ 30 の整数の場合、p 個の R^b は同一であっても異なってもよい。炭素数 2 以上のアルカンジイル基の炭素 - 炭素原子間にエーテル結合を有する基の好適な具体例としては、C₁₋₄アルカンジイルオキシC₁₋₄アルカンジイル基が挙げられる。

40

なお、R⁶、R⁸、R⁹ ~ R¹² で示されるアルカンジイル基、炭素数 2 以上のアルカンジイル基の炭素 - 炭素原子間にエーテル結合を有する基は、置換基を有していてもよい。当該置換基としては、例えば、ヒドロキシ基等が挙げられる。

【 0 0 8 1 】

上記のような R⁶、R⁸ の中では、重合体を製造しやすくするために、 - C (= O) O - R⁹ - * が特に好ましい。

【 0 0 8 2 】

式 (7) 中の R¹⁵ は、単結合又は 2 価の連結基を示し、R¹⁶ は、リガンドを示す。R¹⁶ で示されるリガンドとしては、工程 1 c で挙げたものが挙げられる。

50

R¹⁵で示される2価の連結基は、リガンドを固定可能な官能基の残基とリガンドとを連結できるものであればよい。

R¹⁵で示される2価の連結基としては、例えば、架橋剤（具体的には工程1bで挙げた架橋剤）由来の部分構造、ジグリシジルエーテル類由来の部分構造、及び酸素原子以外のヘテロ原子含有部分構造から選ばれる1種又は2種以上で構成されるものが挙げられる。

ジグリシジルエーテル類としては、1,4-ブタンジオールジグリシジルエーテル、1,6-ヘキサジオールジグリシジルエーテル、ビスフェノールAジグリシジルエーテル、エチレングリコールジグリシジルエーテル、ジエチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル、プロピレングリコールジグリシジルエーテル、トリプロピレングリコールジグリシジルエーテル、ポリプロピレングリコールジグリシジルエーテル、ネオペンチルグリコールジグリシジルエーテル、グリセリンジグリシジルエーテル等が挙げられる。

10

酸素原子以外のヘテロ原子含有部分構造としては、チオグリセロール由来の部分構造が挙げられる。

R¹⁵で示される2価の連結基としては、ジグリシジルエーテル類由来の2価の連結基、工程1bで挙げた架橋剤（好ましくはアジピン酸ジヒドラジド）由来の部分構造とジグリシジルエーテル類由来の部分構造とから構成される2価の連結基、チオグリセロール由来の部分構造とジグリシジルエーテル類由来の部分構造とから構成される2価の連結基が好ましい。

【0083】

20

構造単位(A)や構造単位(B)を誘導するモノマーとしては、上記官能基含有モノマーが好ましい。

【0084】

また、上記重合体は、構造単位(A)及び(B)の他にも構造単位を有していてもよい。このような構造単位を誘導するモノマーとしては、工程1aで挙げた他のモノマーが挙げられる。

また、重合体の含有量は、多孔質粒子（リガンドを除く）中、好ましくは90質量%以上100質量%以下であり、より好ましくは95質量%以上100質量%以下であり、特に好ましくは99質量%以上100質量%以下である。

架橋剤由来の部分構造の含有量は、重合体中、好ましくは0.5質量%以上50質量%以下であり、より好ましくは1質量%以上40質量%以下であり、特に好ましくは10質量%以上35質量%以下である。

30

【0085】

本発明のクロマトグラフィー用担体を分散させる分散媒としては、各種バッファー、水、アルコール等が挙げられる。また、この分散媒には、防腐剤等を添加してもよい。

クロマトグラフィー用担体の含有量は、クロマトグラフィー用担体と分散媒の合計を100質量%としたときに、好ましくは0.5質量%以上20質量%以下であり、より好ましくは1質量%以上15質量%以下である。

【0086】

本発明のクロマトグラフィーカラムの製造方法で得られるカラム、及び本発明のクロマトグラフィー用担体は、アフィニティークロマトグラフィー用として有用である。

40

本発明で得られるクロマトグラフィー用担体及びクロマトグラフィーカラム並びに本発明のクロマトグラフィー用担体は、標的物質の精製に使用できる。標的物質の精製は常法に従えばよい。

標的物質としては、例えば、抗原；モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体等の抗体；細胞（正常細胞；大腸がん細胞、血中循環がん細胞等のがん細胞）；DNA、RNA等の核酸；タンパク質、ペプチド、アミノ酸、糖、多糖、脂質、ビタミン等の生体関連物質が挙げられ、創薬ターゲットとなる薬物、ピオチン等の低分子化合物でもよい。

【実施例】

【0087】

50

以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0088】

(実施例1)

(1) 448gの純水にポリビニルアルコール(クラレ社製PVA-217)2.69gを添加し、加熱攪拌してポリビニルアルコールを溶解させ、水溶液Sを調製した。一方、ジビニルベンゼン(和光純薬工業社製)3.63g、1-エチル-4-ビニルベンゼン(ChemSampCo社製)0.36g及びグリシジルメタクリレート(三菱ガス化学社製)14.15gからなる単量体組成物を、2-オクタノン(東洋合成社製)29.38gに溶解させ、単量体溶液を調製した。次いで、前記水溶液Sを、セパラブルフラスコ内に全量投入し、温度計、攪拌翼及び冷却管を装着して、温水バスにセットし、窒素雰囲気下で攪拌を開始した。セパラブルフラスコ内に前記単量体溶液を全量投入して、温水バスにより加温し内温が85℃に到達したところで2,2'-アゾビス(イソ酪酸メチル)(和光純薬工業社製)1.34gを添加し、内温を86℃にした。

10

(2) その後、86℃に温度を維持したまま、3時間攪拌を行った。次いで、反応液を冷却した後、斯かる反応液をろ過し、純水とエタノールで洗浄した。洗浄した粒子を純水に分散させてデカンテーションを3回行い、小粒子を除いた。次いで、粒子の濃度が10質量%となるように粒子を純水に分散させ、多孔質粒子分散体を得た。この分散体に含まれる多孔質粒子を、「多孔質粒子1」と称する。

(3) その後、多孔質粒子1分散体100gにアジピン酸ジヒドラジド(東京化成工業社製)0.956g及びジイソプロピルエチルアミン(東京化成工業社製)1.418gを加え、70℃まで加温し、70℃を維持したまま、8時間攪拌を行った。次いで、反応液を冷却した後、斯かる反応液をろ過し、純水とエタノールで洗浄した。次いで、粒子の濃度が10質量%となるように粒子を純水に分散させ、多孔質粒子分散体を得た。この分散体に含まれる多孔質粒子を、「多孔質粒子2」と称する。なお、多孔質粒子2について、試験例1と同様にして体積平均粒子径を測定したところ、その値は53μmであった。

20

(4) その後、多孔質粒子2を、目開き77μmの金網メッシュ(太陽金網社製)を装着した佐藤式振動ふるい機(晃栄産業社製400DB-2S)に投入し、ふるい通過分(湿式分級後にふるいを通じた液)を回収した。次に、金網メッシュを目開き32μmの金網メッシュ(太陽金網社製)に変えた前記佐藤式振動ふるい機に、前記ふるい通過分を投入し、ふるい上残分(湿式分級後のふるい上に残った多孔質粒子)を純水で回収し、多孔質粒子分散体を得た。この分散体に含まれる多孔質粒子を、「多孔質粒子3」と称する。

30

(5) 次いで、多孔質粒子3(粒子乾燥質量換算で1g相当)にエチレングリコールジグリシジルエーテル(東京化成工業株式会社製)0.069gを16時間反応させた。次いで、改変プロテインA(Repligen製rSPA)0.15gを、1.2M硫酸ナトリウム/0.1Mリン酸ナトリウムバッファー(pH6.6)40mLに溶解させプロテインA溶解液を得て、このプロテインA溶解液に多孔質粒子3(粒子乾燥質量換算で1g相当)を添加した。この分散体を25℃で10時間振とう攪拌し、プロテインAを粒子に固定した。

40

次いで、生成したプロテインA固定粒子を、1.0M-チオグリセロール(東京化成工業株式会社製)/0.1M硫酸ナトリウム(pH8.3)40mLに分散させ、25℃で17時間振とう攪拌することで、未反応のエポキシ基を開環させた。さらに、得られた未反応のエポキシ基が開環したプロテインA固定粒子を、0.1Mリン酸ナトリウムバッファー(pH6.6)、0.1M水酸化ナトリウム水溶液、0.1Mクエン酸ナトリウムバッファー(pH3.2)で洗浄し、アフィニティークロマトグラフィー用充填剤含有液を得た。この液に含まれる充填剤を、「リガンド固定担体W1」と称する。

【0089】

(実施例2)

実施例1の工程(4)において、目開き32μmの金網メッシュを目開き34μmの金

50

網メッシュ（太陽金網社製）に変更した以外は、実施例 1 の工程（1）～（4）と同様の操作を行い、多孔質粒子分散体を得た。

次いで、実施例 1 の工程（5）と同様の工程を実施することで、アフィニティクロマトグラフィー用充填剤含有液を得た。この液に含まれる充填剤を、「リガンド固定担体 W 2」と称する。

【0090】

（実施例 3）

実施例 1 の工程（4）において、目開き 32 μm の金網メッシュを目開き 38 μm の金網メッシュ（アサダメッシュ社製）に変更した以外は、実施例 1 の工程（1）～（4）と同様の操作を行い、多孔質粒子分散体を得た。

10

次いで、実施例 1 の工程（5）と同様の工程を実施することで、アフィニティクロマトグラフィー用充填剤含有液を得た。この液に含まれる充填剤を、「リガンド固定担体 W 3」と称する。

【0091】

（実施例 4）

実施例 1 の工程（4）において、目開き 32 μm の金網メッシュを目開き 43 μm の金網メッシュ（太陽金網社製）に変更した以外は、実施例 1 の工程（1）～（4）と同様の操作を行い、多孔質粒子分散体を得た。

次いで、実施例 1 の工程（5）と同様の工程を実施することで、アフィニティクロマトグラフィー用充填剤含有液を得た。この液に含まれる充填剤を、「リガンド固定担体 W 4」と称する。

20

【0092】

（実施例 5）

実施例 1 の工程（4）において、目開き 32 μm の金網メッシュを目開き 45 μm の金網メッシュ（太陽金網社製）に変更した以外は、実施例 1 の工程（1）～（4）と同様の操作を行い、多孔質粒子分散体を得た。

次いで、実施例 1 の工程（5）と同様の工程を実施することで、アフィニティクロマトグラフィー用充填剤含有液を得た。この液に含まれる充填剤を、「リガンド固定担体 W 5」と称する。

【0093】

（実施例 6）

実施例 1 の工程（4）において、目開き 32 μm の金網メッシュを目開き 54 μm の金網メッシュ（太陽金網社製）に変更した以外は、実施例 1 の工程（1）～（4）と同様の操作を行い、多孔質粒子分散体を得た。

次いで、実施例 1 の工程（5）と同様の工程を実施することで、アフィニティクロマトグラフィー用充填剤含有液を得た。この液に含まれる充填剤を、「リガンド固定担体 W 6」と称する。

【0094】

（実施例 7）

アガロースベースの担体である M a b s e l e c t S u R e（C y t i v a 社製、体積平均粒子径：92 μm ）を、目開き 104 μm の金網メッシュ（太陽金網社製）を装着した前記佐藤式振動ふるい機に投入し、ふるい通過分を回収した。次に、目開き 62 μm の金網メッシュ（太陽金網社製）を装着した前記佐藤式振動ふるい機に投入し、ふるい上残分（湿式分級後のふるい上に残った粒子）を純水で回収し、アフィニティクロマトグラフィー用充填剤含有液を得た。この液に含まれる充填剤を、「リガンド固定担体 W 7」と称する。

40

【0095】

（実施例 8）

目開き 104 μm の金網メッシュを目開き 115 μm の金網メッシュ（太陽金網社製）に変更した以外は、実施例 7 と同様の操作を行い、アフィニティクロマトグラフィー用充

50

充填剤含有液を得た。この液に含まれる充填剤を、「リガンド固定担体W8」と称する。

【0096】

(実施例9)

アガロースベースの担体であるMabselect Sure(Cytiva社製、体積平均粒子径: 92 μm)を、目開き54 μmの金網メッシュ(太陽金網社製)を装着した前記佐藤式振動ふるい機に投入し、ふるい上残分(湿式分級後のふるい上に残った粒子)を純水で回収し、アフィニティクロマトグラフィー用充填剤含有液を得た。この液に含まれる充填剤を、「リガンド固定担体W9」と称する。

【0097】

(実施例10)

目開き54 μmの金網メッシュを目開き62 μmの金網メッシュ(太陽金網社製)に変更した以外は、実施例9と同様の操作を行い、アフィニティクロマトグラフィー用充填剤含有液を得た。この液に含まれる充填剤を、「リガンド固定担体W10」と称する。

【0098】

(比較例1)

実施例1の工程(1)~(3)と同様の操作を行い、「多孔質粒子2」を得た。

次いで、実施例1の工程(5)と同様の工程を実施することで、アフィニティクロマトグラフィー用充填剤含有液を得た。この液に含まれる充填剤を、「リガンド固定担体Y1」と称する。

【0099】

(比較例2)

実施例1の工程(1)~(3)と同様の操作を行い、「多孔質粒子2」を得た。この多孔質粒子2の分散体を1Lのポリボトルに充填し、1時間静置させた後に上澄み液を除去した。

次いで、実施例1の工程(5)と同様の工程を実施することで、アフィニティクロマトグラフィー用充填剤含有液を得た。この液に含まれる充填剤を、「リガンド固定担体Y2」と称する。

【0100】

(比較例3)

実施例1の工程(4)において、目開き77 μmの金網メッシュを目開き62 μmの金網メッシュ(太陽金網社製)に変更し、その後の目開き32 μmの金網メッシュ(太陽金網社製)を装着した佐藤式振動ふるい機による分級操作を除いた以外は、実施例1の工程(1)~(4)と同様の操作を行い、多孔質粒子分散体を得た。

次いで、実施例1の工程(5)と同様の工程を実施することで、アフィニティクロマトグラフィー用充填剤含有液を得た。この液に含まれる充填剤を、「リガンド固定担体Y3」と称する。

【0101】

(試験例1 粒子径及び粒子径分布の測定)

各実施例及び比較例で得られた担体W1~W10、Y1~Y3について、体積平均粒子径を、ISO13320:2009に従って、レーザ回折散乱式粒度分布測定装置(MicrotracBEL社製MT3000II)により測定した。なお、透過率が0.1%となるように測定試料中の担体の濃度調整を行い、溶媒(水)の屈折率は1.333に、粒子(担体)の屈折率は1.50に、それぞれ設定した。レーザ回折散乱式粒度分布測定装置により測定された体積平均粒子径の測定値を表1に示す。

【0102】

次に、各実施例及び比較例で得られた担体W1~W10、Y1~Y3について、体積基準粒度分布によるd1、d5及びd50の値を、ISO13319:2007に準拠し、Beckman Coulter社製Multisizer 4eを用いて測定した。なお、本装置を用いた多孔質粒子の測定では粒子径が小さく見積もられるため、本装置で測定した体積平均粒子径がISO13320:2009に従って測定した体積平均粒子径の値

10

20

30

40

50

となるような形状因子を使用して補正し、 d_{10} 、 d_{50} 及び d_{90} を算出した。この d_{10} 、 d_{50} 及び d_{90} の測定値を表1に示す。また、担体W1（実施例1）の体積基準粒度分布を図1に、担体W3（実施例3）の体積基準粒度分布を図2に、担体W5（実施例5）の体積基準粒度分布を図3に、それぞれ示す。

ISO 13319に準拠した粒子径の測定には、 $200\mu\text{m}$ のアパチャーを使用し、電解液としてBeckman Coulter社製ISOTON IIを用いた。測定条件は、総測定個数 30000個、粒径ビン数 400個、電流値 $1600\mu\text{A}$ 、ゲイン 2で行った。

【0103】

d_{10} 、 d_{50} 及び d_{90} は、以下の粒子径をそれぞれ意味する。

d_{10} = 体積基準粒子径分布を基準とする小粒子径側から累積体積1%に相当する粒子径

d_{50} = 体積基準粒子径分布を基準とする小粒子径側から累積体積5%に相当する粒子径

d_{90} = 体積基準粒子径分布を基準とする小粒子径側から累積体積90%に相当する粒子径

【0104】

また、変動係数（CV値）及び歪度を、ISO 13319に準拠して測定した各測定値から算出した。算出方法を以下に記載した。

【0105】

CV値（%） = {（体積基準粒子径分布の標準偏差） / （体積平均粒子径）} × 100

【0106】

【数1】

$$\text{歪度} = \left(n / (n-1) \times (n-2) \right) \times \sum_{i=1}^n \left(\frac{x_i - \bar{x}}{s} \right)^3$$

【0107】

【数2】

\bar{x} = 体積平均粒子径

【0108】

n = 測定データの総数

x_i = 測定した各粒子の粒子径

s = 粒子径の標準偏差

【0109】

（試験例2 通液性の評価）

各実施例及び比較例で得られた担体W1～W10、Y1～Y3を、内径26mm、充填高さ200mmとなるように二連結したHiscale 26/20カラム（Cytiva社製）に充填し、このカラムをCytiva社製AKTA AVANT 150に接続した。次いで、線流速100cm/hrで純水の通液を30分間行った後、上部カラムは取り外し、アダプターを担体層に接着させることでカラムに担体をパッキングした。その後、0.25MPaの背圧が生じるまで線流速を調整し、その際の線流速を記録した。結果を表1に示す。線流速の値が大きいほど、通液性が良好といえる。

【0110】

（試験例3 通液時の圧力抵抗特性の評価）

各実施例及び比較例で得られた担体W1～W10、Y1～Y3を、試験例2と同様にパッキングした後、線流速800cm/hrで純水を通液し、その際の背圧及び圧縮率

10

20

30

40

50

(充填高さの変化率)について記録した。圧縮率に関しては、以下の式を用いて算出した。結果を表1に示す。背圧及び圧縮率の値が小さいほど、圧力抵抗特性が良好といえる。

【0111】

(圧縮率) = $1 - \{ (800 \text{ cm/hで通液した後の充填高さ}) / (800 \text{ cm/hで通液する前の充填高さ}) \}$

【0112】

(試験例4 動的結合容量の評価)

GEヘルスケア社製AKTApriplusを用いて、線流速300cm/hrにおけるタンパク質(ヒトIgG抗体、EquitechBio社製HGG-1000)に対する実施例及び比較例の担体W1~W10、Y2~Y3のDBCを測定した。カラム容器は容量4mL(5mm x 200mm長)のものを、タンパク質は20mMリン酸ナトリウム/150mM塩化ナトリウム水溶液(pH7.5)にタンパク質を5mg/mL溶解したものをそれぞれ使用し、溶出先端10%ブレイクスルーのときのタンパク質捕捉量とカラム充填体積からDBCを求めた。結果を表1に示す。

【0113】

10

20

30

40

50

【表 1】

	実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4	実施例 5	実施例 6	実施例 7	実施例 8	実施例 9	実施例 10	比較例 1	比較例 2	比較例 3	
粒子種	合成高分子	○	○	○	○	○	—	—	—	—	○	○	○	
	アガロース	—	—	—	—	—	○	○	○	○	—	—	—	
目開き	[第1分級目開き / (2a-d) × 100] (%)	145	145	145	145	145	113	125	59	67	—	—	117	
	[第2分級目開き / (2a-d) × 100] (%)	60	64	72	81	85	102	67	—	—	—	—	—	
物性	体積平均粒子径 μm (ISO13320)	55	56	58	59	61	65	90	92	95	51	53	50	
	変動係数 (%)	20	18	16	15	12	11	14	20	18	25	23	20	
	歪度	-0.003	0.05	0.3	0.5	2	2.5	0.1	0.2	0.1	0.3	-0.361	0	-0.88
	d1 (μm)	31.0	35.0	43.1	45.9	50.5	56.9	56.8	57.8	53.9	59.3	17.8	27.8	20.2
	d5 (μm)	38.0	41.5	46.1	48.2	53.4	59.4	63.5	64.0	58.8	65.1	28.2	35.2	30.1
	d50 (μm)	55.6	56.3	57.4	58.8	61.3	66.2	85.5	89.9	93.0	94.6	51.1	54.3	50.1
特性	d1/d50	0.56	0.62	0.75	0.78	0.82	0.86	0.67	0.58	0.63	0.35	0.51	0.40	
	d5/d50	0.68	0.74	0.80	0.82	0.87	0.90	0.74	0.63	0.69	0.55	0.65	0.60	
	通液性 (cm/h)@0.25MPa	667	704	853	893	929	1018	1298	1342	1405	1497	623	640	621
	背圧 (MPa)@800cm/h	0.31	0.26	0.18	0.17	0.16	0.13	0.13	0.12	0.10	0.09	0.34	0.33	0.39
	圧縮率@800cm/h	0.22	0.21	0.19	0.19	0.19	0.17	0.08	0.07	0.06	0.05	0.24	0.23	0.25
	DBC(動的結合容量) mg/ml	63	62	60	60	59	55	47	43	40	40	—	63	63

10

20

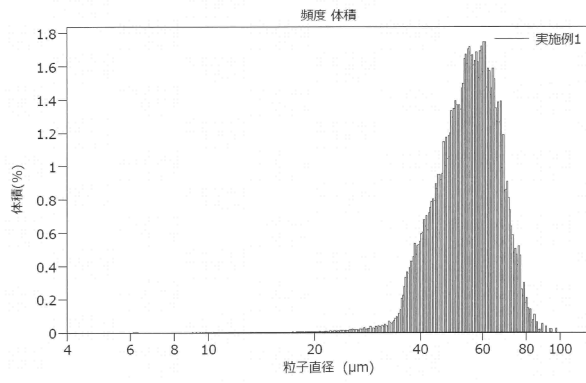
30

40

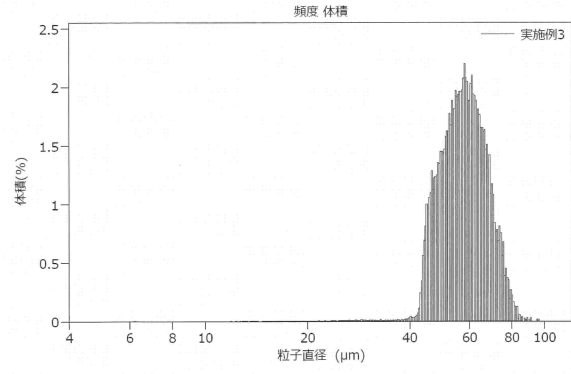
50

【図面】

【図 1】

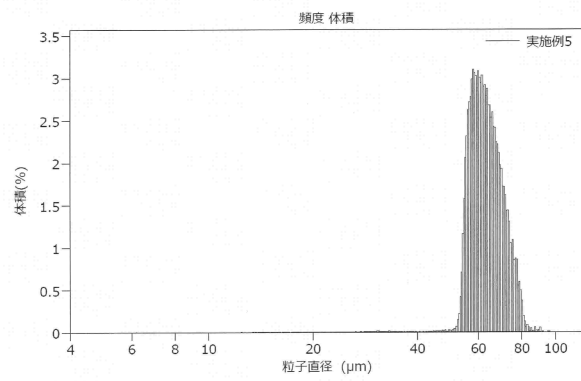


【図 2】



10

【図 3】



20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

B 0 1 J 20/26 (2006.01)

F I

B 0 1 J 20/30

B 0 1 J 20/28

B 0 1 J 20/26

Z

H

東京都港区東新橋一丁目9番2号 JSR株式会社内

審査官 大瀧 真理

(56)参考文献

特開2017-037069(JP,A)

国際公開第2017/204292(WO,A1)

特開2021-030181(JP,A)

特開2017-211352(JP,A)

特開2017-125815(JP,A)

国際公開第2020/096056(WO,A1)

特開2001-002716(JP,A)

特表2020-504776(JP,A)

米国特許出願公開第2012/0145623(US,A1)

米国特許出願公開第2010/0206797(US,A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

B 0 1 J 20/281 - 20/292

G 0 1 N 30/00 - 30/96