

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4814467号
(P4814467)

(45) 発行日 平成23年11月16日(2011.11.16)

(24) 登録日 平成23年9月2日(2011.9.2)

(51) Int.Cl.

F 1

C02F 1/42	(2006.01)	C02F	1/42	B
B01J 41/04	(2006.01)	B01J	41/04	G
B01J 41/12	(2006.01)	B01J	41/12	Z
B01J 49/00	(2006.01)	B01J	49/00	G
C07K 1/18	(2006.01)	C07K	1/18	

請求項の数 9 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2001-539792 (P2001-539792)
(86) (22) 出願日	平成12年11月22日 (2000.11.22)
(65) 公表番号	特表2003-531713 (P2003-531713A)
(43) 公表日	平成15年10月28日 (2003.10.28)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2000/011606
(87) 國際公開番号	W02001/038228
(87) 國際公開日	平成13年5月31日 (2001.5.31)
審査請求日	平成19年11月20日 (2007.11.20)
(31) 優先権主張番号	9904197-2
(32) 優先日	平成11年11月22日 (1999.11.22)
(33) 優先権主張国	スウェーデン(SE)

(73) 特許権者	597064713 ジーイー・ヘルスケア・バイオサイエンス ・アクチボラグ スウェーデン国エスエー-751 84 ウプサラ ビヨルクガタン 30
(74) 代理人	100137545 弁理士 荒川 智志
(72) 発明者	マコネン・ペレヴ スウェーデン、エス-756 46 ウプサラ、トリュッフェルヴァーゲン43番
(72) 発明者	ボーレナート・ヨハンソン スウェーデン、エス-752 64 ウプサラ、オスロガータン101番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】陰イオン交換吸着方法およびチオエーテル陰イオン交換体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

水性液体(I)中に存在する負荷電物質を除去する方法であつて、当該方法が、
 i) 陽荷電室素が存在する複数の混合モード陰イオン交換リガンドを有するポリヒドロキシポリマーべースマトリックスを含む陰イオン交換体(1)に上記水性液体(I)を接触させて上記リガンドを上記物質と結合させる段階、及び
 ii) 水性液体(II)を用いて上記物質を上記陰イオン交換体から脱着させる段階、
 を含んでおり、上記複数の混合モード陰イオン交換リガンドの全部又は一部がその陽荷電室素から1~7原子の距離以内にチオエーテル結合を有していて、該室素が第一級又は第二級アミンであり、チオエーテル結合を有する各リガンドがスペーサーと共に次式で表されることを特徴とする方法。



(式中、

S P は、リガンド [R₅ - S - R₁ - N⁺ (R₂ R₃ R₄)] をベースマトリックスに結合するスペーサーであり、

- - - は、上記スペーサーが [R₅ - S - R₁ - N⁺ (R₂ R₃ R₄)] の水素を置換していることを表し、

- - は、ベースマトリックスへの結合を表し、

R₁ は直鎖、分枝鎖又は環式炭化水素基であつて、(a)芳香族系及び/又は(b)不飽和結合、及び/又は(c)電子供与体-受容体相互作用に関与する1以上の原子又は基、

10

20

及び / 又は (d) 1 以上の位置にエーテル酸素及び / 又はアミン窒素が介在する炭素鎖を含むものであり、電子供与体 - 受容体相互作用に関する 1 以上の原子又は基の少なくとも 1 つは上記陽荷電窒素原子から 1 ~ 7 原子間隔の距離にあり、

R₂₋₅ は、水素及び R₁ と同じ種類の炭化水素基から選択される一価の基又はこれらの炭化水素基の二価の形態の基である。)。

【請求項 2】

R₂₋₅ の炭素鎖の 1 以上の位置にチオエーテル硫黄が介在している、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

少なくとも 1 種類の陰イオン交換リガンド及び / 又は陰イオン交換体が、12 以下の pKa を有するとともに / 又はチオエーテルを含む陰イオン交換リガンドが第一級又は第二級アミンであることを特徴とする請求項 1 又は請求項 2 記載の方法。 10

【請求項 4】

(i) 供与体原子 / 基が以下の (a) ~ (e) :

(a) 孤立電子対を有する酸素、

(b) 孤立電子対を有する硫黄、

(c) 孤立電子対を有する窒素、

(d) ハロゲン (フッ素、塩素、臭素及びヨウ素) 、及び

(e) s p - 及び s p² - 混成軌道を有する炭素

から選択されるとともに / 又は

20

(i i) 受容体基が、電子不足原子及び / 又は負に荷電した原子からなる群より選択されることを特徴とする、請求項 1 乃至請求項 3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

S P が上記 (b) ~ (d) に規定する R₁ の炭素に結合していることを条件として、S P が、リガンド [R₅ - S - R₁ N⁺ (R₂ R₃ R₄)] に直接結合した

(a) カルボニル炭素又は s p³ - 混成軌道を有する炭素、或いは

(b) アミノ又はアミド窒素、或いは

(c) チオエーテル硫黄原子、或いは

(d) エーテル酸素原子、

を与えることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 4 のいずれか 1 項記載の方法。 30

【請求項 6】

吸着 / 結合段階 (i) における水性液体 (I) のイオン強度が、0.25 M NaCl 水溶液のイオン強度と同じかそれよりも大きいことを特徴とする、請求項 1 乃至請求項 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7】

水性液体 (I) の pH が、陰イオン交換体又はリガンド [R₅ - S - R₁ - N⁺ (R₂ R₃ R₄)] の pKa + 2 以下であることを特徴とする、請求項 1 乃至請求項 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

物質の負電荷を減少させるために、水性液体 (II) の pH が水性液体 (I) の pH と異なることを特徴とする、請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載の方法。 40

【請求項 9】

水性液体 (II) の極性が、水性液体 (I) の極性より低いことを特徴とする、請求項 1 乃至請求項 8 のいずれか 1 項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、水性液体 (I) から、負荷電化合物 (= 物質) を除去する方法に関する。本方法は :

(i) 当該液体と、複数の混合モード陰イオン交換リガンド (陰イオン交換体) を有する

50

ベースマトリックスを含む陰イオン交換体を接触させる（ここで、リガンドと物質の間の結合を可能にする条件下で陽荷電室素が存在する）、

（i i）該物質を該陰イオン交換体から、液体（液体（I I））の使用により脱着させる段階を含む。

【0002】

本発明はまた混合モード陰イオン交換リガンドが存在する、新規陰イオン交換体に関する。

【0003】

「負荷電」及び「負に荷電した」なる用語は、物質が1個以上の負電荷を有する及び/又は正味負電荷を有することを意味する。10

【0004】

本明細書の内容において、「混合モード陰イオン交換リガンド」及び「バイモード陰イオン交換リガンド」なる用語は、結合する物質と相互作用する少なくとも2つの協同(co-operative)部位をもたらすことができるリガンドを意味する。この部位の1つは、リガンドと目的物質の間の電荷-電荷相互作用の興味深いタイプを提供する。第2の部位は、典型的に、電子供与体-受容体及び/又は疎水性相互作用を提供する。電子供与体-受容体相互作用は、水素結合、-、電荷移動、双極子-双極子、誘起双極子等の相互作用を含む。

【0005】

発明の背景

20

上記の方法は、充填または流動床の形のモノリスマトリックスまたは粒子マトリックスを利用したクロマトグラフィー手順、またバッチ式手順にも使用される。手順の目的は、陰性電荷を担持する物質の精製であり得、この場合、標的物質をマトリックスに結合させ、必要な場合、マトリックスからの脱着に続いて更に精製する。他の目的は、液体からの陰性電荷を担持する望ましくない物質の除去である。後者の場合、該液体を、段階(i)でマトリックスと接触させた後に更に処理し得る。両方の場合、そして望ましいなら、マトリックスを結合物質の脱着後に再使用し得る。

【0006】

他の使用は、陰性荷電を担持する物質または液体Iに残る物質のいずれかの測定が関与するアッセイ手順である。30

【0007】

先行の陰イオン交換吸着において、陽性に荷電したリガンドは、典型的に、1級、2級、3級または4級アンモニウム構造のような室素構造を含んでいる。ある場合、リガンドは、荷電構造および脱着プロトコールの必要な修飾をされている疎水性構造の両方を含むことによりデュアルまたはバイモード機能性である。・Simmonds et al (Biochem. J. 157 (1976) 153-159); Burton et al (J. Chromatog. A 814 (1998) 71-81); およびYon et al (Biochem. J. 151 (1975) 281-290)は、飽和炭化水素基を有する陰イオン交換リガンドを記載している。

・Crowther et al (J. Chrom. 282 (1983) 619-628); Crowther et al (Chromatographia 16 (1982) 349-353); Wongyai (Chromatographia 37 (7/8) (1994) 485-490); Bischoff et al (J. Chrom. 270 (1983) 117-126)は、芳香族成分が存在する陰イオン交換リガンドを担持する逆相でのオリゴヌクレオチドおよび小分子の高速液体クロマトグラフィーを記載している。

疎水性マトリックスに基づいた陰イオン交換体からの類似の効果が記載されているSasaki et al (J. Biochem. 86 (1979) 1537-1548)も参照のこと。

【0008】

セリンプロテアーゼは、p-アミノベンズアミジンがパラアミノ基を介して共有結合的に結合しているマトリックスに/から親和性吸着/脱着している。参照・脱着緩衝液よりもpHが高く、塩濃度が低い吸着緩衝液を使用しているChang et al (J. Chem. Tech.

50

Biotechnol. 59 (1994) 133 - 139; · Chang et alと同様の方法でpHを変えているが、塩濃度は変えていないLee et al (J. Chromatog. A 704 (1995) 307 - 314); および

· 脱着のためにリガンドアナログを使用しているKhamlich et al., J. Chromatog. 510 (1990) 123 - 132。吸着および脱着中のpH値は同じであった。イオン強度の増加のみによる脱着は失敗した。

これらの3つの文献のいずれも、陰イオン交換条件下での十分な脱着手順を記載していない。

【0009】

WO 9729825 (Amersham Pharmacia Biotech AB)は、電荷および、酸素と陽性荷電アミン窒素から2 - 3炭素距離のアミノ窒素が関与する水素に基づく相互作用を提供する、混合モード陰イオン交換体を記載する。本刊行物は、この種のリガンドが、結合物質を溶離するのに相対的に高いイオン強度を必要とする陰イオン交換体を提供できるという発見に基づく。10

【0010】

WO 9965607 (Amersham Pharmacia Biotech AB)は、結合物質を溶離するのに相対的に高いイオン強度を必要とする混合モードリガンドが存在する陽イオン交換体を記載する。

【0011】

相対的に高い溶出イオン強度を必要とする陰イオンおよび陽イオン交換リガンドを各々提供するWO 9729825 (U.S. 6,090,288)およびWO 9965607を、引用して本明細書に包含させる。20

【0012】

WO 9808603 (Upfront Chromatography)は、一般構造M - S P 1 - L (ここで、Mは親水性であり得る支持マトリックス、S P 1はスペーサーおよびLは、置換し得る単環または二環式同種芳香族または異種芳香族部分(同種芳香族部分は炭素原子のみから成る芳香族環を含む)である)の分離媒体を記載する。置換基は、主に酸性である。分離媒体は、イオン交換よりもむしろ疎水性相互作用によるタンパク質、特に免疫グロブリンの吸着のために提案されている(塩濃度2Mまで)。30

【0013】

WO 9600735、WO 9609116およびU.S. 6,52,348 (Burton et al)は、疎水性相互作用に基づいた分離媒体を記載する。吸着および脱着は、液体の塩濃度の各々上昇または低下により、またはpHの変化による吸着 / 脱着するリガンドおよび / または物質上の電荷の変化により支持される。リガンドは典型的に、芳香族構造を含み得る疎水性部分を含む。リガンドのいくつかは、加えて、またpH変化による媒体の疎水性 / 親水性バランスの変更を可能にするための荷電可能構造を含み得る。荷電可能構造は、アミン基であり得る。40

【0014】

U.S. 7,89,578 (Burton et al)は、支持マトリックスに結合した炭素 - 炭素二重結合にチオール基を付加させることにより、3 - メルカプトプロピオン酸、グルタチオン等のチオール含有リガンドを固定化することを提案する。発明者らは、この場合、陰イオン交換吸着のために得られる物質を用いておらず、使用を示唆していない。

【0015】

エピクロロヒドリンを使用したスルファニル酸の結合により製造した双極子吸収剤が記載されている(リガンド + スペーサー = - CH₂ CHO HCH₂N⁺H₂C₆H₄SO₃⁻) (Porat et al., J. Chromatog. 51 (1970) 479 - 489; およびOhkubo et al., J. Chromatog. A, 779 (1997), 113 - 122)。これらの文献は、リガンドが陽性に、取り除く物質が陰性に荷電している分離法を記載していない。

【0016】

WPI Abstract Accession No. 86 - 312313 (= DD - A - 237844, B50

ehrend et al)は、物質RHN_nR'Xを、担体、とりわけセルロースに結合させるための2, 4, 6 - トリハロ - 1, 3, 5 - トリアジンの使用を記載する。Rは水素、アリールまたはアルキルである。R'はアルキレンまたはアリレンである。Xはカルボキシ、スルホニル、ホスフェート、ホスホネート、ボロネート等である。

【0017】

本発明の目的

本発明の目的は：

a) タンパク質のような負に荷電した物質の、相対的に高いイオン強度での陰イオン交換体への吸着／結合を達成すること、

b) 減少したリガンド含量であるが、標的物質を結合する十分な能力を有することができる陰イオン交換媒体を提供すること、

c) 広いイオン強度の範囲内の陰イオン交換体に吸着／結合する物質の溶出／脱着を可能にすること、

d) タンパク質の高い破過容量、良好な回収率（しばしば、95%以上）を有する陰イオン交換体を設計すること、

e) クロマトグラフィー特性の有意な損失なく、アルカリ及び又は酸性環境での再生及び／又は洗浄に耐えることができる陰イオン交換体を設計すること、

f) 低いイオン強度が必要な処理において使用する、高いイオン強度のサンプルの大量の希釈を必要にすること、

g) 単純な脱塩手順を提供すること、

h) 支持マトリックスに結合したとき、負荷電物質の吸着において慣用の対照陰イオン交換体と同等か優れた、陰イオン交換体又は陰イオン交換リガンドの選択法を提供すること、

i) 例えば、生産性の改善及び／又は装置及び投資の費用の軽減のための、陰イオン交換体が関与する単純な工程を提供すること、

j) 1リットルより多いサンプル容量（=液体（I））が陰イオン交換体に適用され、処理される、例えば、大規模工程のための、分取適用に適した陰イオン交換体を提供すること、

k) 高塩濃度での陰イオン交換吸着剤の分離原則ベースの溶出の新規組合せ、例えば、イオン交換段階後の疎水性相互作用吸着のための機会を提供することである。

【0018】

これらの目的は、高塩濃度および高イオン強度で吸着するイオン交換体が有利であるという認識に基づく。これは、脱着段階で高塩濃度および高イオン強度を利用する慣用的イオン交換体と矛盾する。

【0019】

発明を支持する発見

本発明者らは、陽荷電窒素原子の近傍にチオエーテル結合を含むリガンドが、この目的を少なくとも部分的に満足する陰イオン交換体を提供し得ることを発見した。本発明者らは、陰イオン交換リガンド中の陽荷電原子の近傍に電子供与体 - 受容体相互作用に関与する付加的な原子又は基を加えると、物質と吸着剤の間の相互作用の強度を強め得ることも発見した。

【0020】

本明細書において、「近傍」なる用語は、チオエーテル硫黄と陽荷電窒素の間の距離が1～7原子、好ましくは2、3、4及び5原子以内であることを意味する。物質の陰イオン交換体への結合を強め得る電子供与体 - 受容体相互作用に関与する付加的な原子及び／又は基が存在する場合、同じ距離がまた当てはまる。

【0021】

電子供与体 - 受容体相互作用は、孤立電子対を伴う陰性に荷電した原子が供与体として作用し、供与体の電子対の受容体として働く電子不足原子に結合することを意味する。K

10

20

30

40

50

arger et al., An Introduction into Separation Science, John Wiley & Sons (1973) page 42 参照。

【0022】

供与体原子 / 基の具体例は :

- (a) ヒドロキシ、エーテル、カルボニル及びエステル (-O- 及び -CO-O-) 並びにアミドのような、孤立電子対を有する酸素
- (b) チオエーテル (-S-) におけるような、孤立電子対を有する硫黄、
- (c) アミン、スルホンアミドを含むアミドにおけるような、孤立電子対を有する窒素、
- (d) ハロ(フッ素、塩素、臭素及びヨウ素)、
- (e) s p - 及び s p² - 混成軌道を有する炭素

である。

【0023】

典型的な受容体原子 / 基は、金属イオン、シアノ、ニトロ中の窒素等のような電子不足原子又は基であり、ヒドロキシ及びカルボキシ中のHO-、アミド及びアミン中の-NH-、チオール中のHS-等のような負に荷電した原子への水素結合を含む。

【0024】

本発明

本発明の第1の態様は、水性液体(I)に存在する負荷電物質の除去法である。本方法は、上記のように段階(i)及び段階(ii)を含む。特徴的性質は

- (A) 複数の混合モード陰イオン交換リガンドの全て又は一部が、その陽荷電原子から1-7原子の距離以内にチオエーテル結合を有すること、
- (B) 陰イオン交換体(1)を、
- (a) 0.25M NaClに対応するイオン強度で、水性対照液体(II)中で、目的物質を結合でき、
- (b) pH範囲2~12で、慣用の陰イオン交換体(2)(対照陰イオン交換体)の物質の破過容量の200%以上、例えば、300%以上又は500%以上又は1000%以上の最大破過容量が可能である、
- (A) にしたがった陰イオン交換体から選択することである。

【0025】

主に、これらの割合の数字は、好ましくは正味の電荷として、物質が陰性に荷電し、リガンドが陽性に荷電していることを意味する、陰イオン交換条件中に行われる測定に適用される。

【0026】

この種の陰イオン交換体の発見の間接的な方法は、物質(陰性電荷を担持する)に関して、慣用の陰イオン交換体(対照陰イオン交換体)上の同じ物質で必要な溶出イオン強度と比較して、増加した最大溶出イオン強度を有する陰イオン交換体のスクリーニングである。したがって、陰イオン交換体は、液体(I)から除去される選択物質に適用する特定条件で、慣用の陰イオン交換体で必要な溶出イオン強度の125%以上、例えば、140%以上または200%以上の溶出イオン強度であるものから選択し得る。U.S. 0 9 0 , 2 8 8 (Amersham Pharmacia Biotech A B、WO 97 2 9 8 2 5に対応)参照。

【0027】

上記の比較は、陰イオン交換体(1)及び(2)に関して本質的に同じ条件下、すなわち、本質的に同じ支持マトリックス(支持物質、ビーズサイズ、孔サイズ、孔容量、充填法等)、pH、温度、溶媒組成、上記の式を有する荷電リガンドの数等で行なう測定を参照とする。破過容量は、該破過における物質の同じ相対的濃度で測定する(例えば、c/c₀=10、c/c₀に関しては実験部分を参照)。スペーサー及び結合化学は異なり得る。ある種の結合化学が、支持マトリックスの架橋を導き、より剛直なマトリックスをもたらし得る。この場合、比較を成す流動条件は、マトリックスが本質的に非圧縮であるレ

10

20

30

40

50

ベルで選択される。

【0028】

対照イオン交換体として、商品として入手可能な陰イオン交換体 Q - Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)を、本明細書の内容において選択した。この陰イオン交換体は、リガンドおよびスペーサーーム構造が：



である、強陰イオン交換体である。

その塩素イオンキャパシティーは 0.18 - 0.25 mmol / ml ゲルである。ベースマトリックスは、ビーズ形のエピクロロヒドリン架橋アガロースである。ビーズは 45 - 165 μm の範囲の直径を有する。球状タンパク質の排除限界は 4×10^6 である。

10

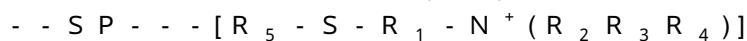
【0029】

本発明の内容で意図される陰イオン交換リガンドは、典型的に、存在し得るハロゲンの寄与による分子量以外に、1000未満、例えば、700未満ダルトンの分子量を有する。

【0030】

混合モード陰イオン交換リガンド

本発明の一つの変法において、複数の混合モード陰イオン交換リガンドがリガンドを含み、その各々は、そのスペーサー (SP)と共に、式：



により示される。

【0031】

20

式 $\cdots \text{SP} \cdots [\text{R}_5 - \text{S} - \text{R}_1 - \text{N}^+(\text{R}_2 \text{R}_3 \text{R}_4)]$ において、

・ $[\text{R}_5 - \text{S} - \text{R}_1 - \text{N}^+(\text{R}_2 \text{R}_3 \text{R}_4)]$ はリガンドである；

・ SP はリガンドをベースマトリックスに結合するスペーサーである。

・ - - - はスペーサーが $[\text{R}_5 - \text{S} - \text{R}_1 - \text{N}^+(\text{R}_2 \text{R}_3 \text{R}_4)]$ 中の水素を置換することを示す。

・ - - はベースマトリックスへの結合を示す。

【0032】

今後、低級炭化水素基および低級アルキル(低級アルキレンを含む)は、所望により置換され、下記 R₂、R₃、R₄ に関して記載するような炭素鎖を有する C_{1 - 10}、例えば、C_{1 - 6} の飽和炭化水素基を意味する。下記参照。

30

【0033】

陰イオン交換体中の好ましい陽性荷電構造 - N⁺(R₂R₃R₄)は、12.0未満、例えば、10.5未満の pKa 値を有する。これは、本発明で使用する典型的リガンドが 1 級、2 級または 3 級アンモニウム基であることを意味し、1 級および 2 級が好ましい。pKa の測定については、下記「吸着」の欄参照。

【0034】

基 R₁

R₁ は、芳香族系および / または不飽和を含んでも含んでいなくてもよい、直鎖、分枝鎖または環状 2 価炭化水素基から選択される 2 価リンカー基である。R₁ はまた、水素結合または上記のような他の電子ドナー - アクセプター相互作用に関与する 1 個以上の原子または基を含み得る。したがって、R₁ は 1 個以上の位置を

40

a) 1 個以上の水素が低級アルキルで置換され得る 1 級アンモニウム基 (- N⁺H₃)、および / または

b) 水素が低級アルキルで置換され得るヒドロキシ (- OH) で置換され得る。

【0035】

炭化水素基中の炭素鎖は、1 個以上の位置をエーテル酸素またはアミン窒素で中断され得る。

【0036】

R₁ - S - と - N⁺(R₂R₃R₄) の間の好ましい炭化水素鎖は、1 - 20 原子の範囲の

50

長さを有する。

【0037】

R_1 の典型的な基は、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2OCH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2OCH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH(CH_3)-$ 、 $-CH_2N^+(C_2H_5)_2CH_2CH_2-$ から選択される。これらのアルキレン鎖の 1 個以上の水素が、それらの炭素原子の 1 個または 2 個で、ヒドロキシおよび / あるいはヒドロキシ低級アルキルまたは低級アルキル(例えば、各々ヒドロキシメチルまたはメチル)で置換されていてもよい。

【0038】

R_1 の各 sp^3 - 混成軌道を有する炭素は、好ましくは、酸素および窒素から選択される多くても 1 個の原子を含む。 10

【0039】

R_1 の芳香族環系は、1 個以上の芳香族環、例えば、フェニレン、ビフェニレンまたはナフチレン構造および縮合環または二環式構造から成る他の芳香族環系を含み得る。芳香族環は、ヘテロ環式、すなわち、1 個以上の窒素、酸素または硫黄原子を含み得、これは、ピリミジン、ピロール、イミダゾール、チオフェン、ピラン等であり得る。

【0040】

基 R_{2-5}

R_{2-5} は、水素および、芳香族系および / または不飽和を含んでも含んでなくてもよい直鎖、分枝鎖または環状 2 倍炭化水素基から選択され得る。 R_{2-5} 炭化水素における炭素原子の数は、典型的には 1 - 20 個の間である。芳香族系は、原則として、 R_1 で記載したものと同じであり得る。 20

【0041】

R_{2-5} 炭化水素基における水素は、

- (a) $-OR''_1$ および / または
- (b) $-SR'''_1$ および / または
- (c) $-N^+(R'_2 R'_3 R'_4)$

から選択される基で 1 個以上の位置を置換され得る。

R'_{2-4} 、 R''_1 および R'''_1 は水素または低級アルキルであるが、ただし、 R'''_1 のみが、リガンドがマトリックスに結合しているとき、スペーサー(S P)により置換されている場合、水素であり得る。加えて、1 個以上の R_{2-5} の炭素鎖は、1 個以上の位置をエーテル酸素、および / またはチオエーテル硫黄および / またはアミノ窒素で中断され得る。 30

【0042】

R_{2-4} が炭化水素基である場合、1 個以上の R_{2-4} は窒素に結合した一端を有し、他方が R_1 の水素を置換するか、残りの R_2 、 R_3 、 R_4 または R_5 の 1 つを置換することにより、5 または 6 員環を形成する 2 倍アルキレンである。同様の形式で、 R_5 はその一端が硫黄に結合し、他方が R_1 の水素を置換する 2 倍アルキレンであり得る。

【0043】

1 個以上の R_{2-4} 、 R'_{2-4} 、 R''_1 および R'''_1 は典型的には、例えば、1 - 3 個の炭素原子を有する、低級アルキル / アルキレン基から選択される。 40

R_{2-4} 、 R'_{2-4} 、 R''_1 および R'''_1 の各 sp^3 - 混成軌道を有する炭素は、酸素および窒素から選択される多くても 1 個の原子を含むべきである。

【0044】

スペーサー(S P)が R_1 または硫黄原子に結合している場合、2 個または 3 個の R_{2-4} は好ましくは水素と同等である。スペーサーが窒素に結合している場合、全 R_{2-4} は好ましくは水素と同等である。

【0045】

好ましい変形において、 R_{2-4} の少なくとも 1 個は式

$Ar-R_6-$

を有し、本件と平行して出願され、S E 9 9 0 4 1 9 7 - 2 に基づく国際特許出願(陰イオン交換吸着のための方法および陰イオン交換体、Amersham Pharmacia Biotech AB)における基Ar-R₁-と同等である。

- ・ Arは芳香族環構造である、
- ・ R₆は[(L)_nR'₆]_mであり、ここで
- ・ nおよびmは0または1から選択される整数であるが、ただし(a)m=0または(b)m=1である場合、n=0である；
- ・ Lはアミノ窒素、エーテル酸素またはチオエーテル硫黄である；
- ・ R'₆は

1)直鎖、分枝鎖または環状炭化水素基；

10

2)-C(=NH)-

から選択される2価リンカーカー基

である。

【0046】

芳香族環構造Arは、1個以上の芳香族環、例えば、フェニル、ビフェニルまたはナフチル構造、および縮合環または2環式構造を含む他の芳香族環系を含み得る。芳香族環は、ヘテロ環であり得、すなわち、1個以上の窒素、酸素または硫黄原子を含む。環は、R₁および可能性のあるスペーサーに加えて、更なる置換基を有し得る。これらの他の置換基は、例えば、水素結合を可能にする、電子ドナーまたはアクセプター原子または基を含み得る。

20

【0047】

説明的Ar基は：ヒドロキシフェニル(2-、3-および4-)、2-ベンズイミダゾリル、メチルチオキシフェニル(2-、3-および4-)、3-インドリル、2-ヒドロキシ-5-ニトロフェニル、アミノフェニル(2-、3-および4-)、4-(2-アミノエチル)フェニル、3,4-ジヒドロキシフェニル、4-ニトロフェニル、3-トリフルオロメチルフェニル、4-イミダゾリル、4-アミノピリジン、6-アミノピリミジル、2-チエニル、2,4,5-トリアミノフェニル、4-アミノトリアジニル-、4-スルホニアミドフェニル等である。

【0048】

R'₆は2価炭化水素基または-C(=NH)-である。炭化水素基に関して、それらはR₁およびR₂-₅の基の同じ種から選択され得る。

30

【0049】

スペーサー(SP)

スペーサー(SP)は、ベースマトリックスから出発し、(a)-N⁺(R₂R₃R₄)の窒素まで、R₂-₄の1つを置換することにより、または(b)-N⁺(R₂R₃R₄)をR₅-S-に接続する原子の鎖まで、R₁の水素を置換することにより、または(c)R₅-S-の硫黄原子までR₅を置換することにより伸びる。SPは常にリガンド[R₅-C-R₁-N⁺(R₂R₃R₄)]の水素を置換する。したがって、スペーサーがリガンドの窒素または硫黄原子に直接結合する場合、置換基R₂-₅は水素である。

【0050】

40

スペーサーそれ自体は伝統的イオン交換体に慣用のものであり、したがって、直鎖、分枝鎖、環状、飽和、不飽和および芳香族炭化水素(例えば、1-20、例えば、1-10炭素原子まで)を含み得る。R₁-₅に関して上記のように、炭化水素基はヒドロキシ基、アルコキシおよびアリールオキシおよび対応するチオアナログ、および/またはアミノ基を担持し得る。炭素鎖は、1個以上の位置でアミノ窒素、エーテル酸素、チオエーテル硫黄により、R₁-₅に関して上記のように中断され得る。アミドおよびケトンにおけるようなカルボニル基、および加水分解に対して同等な安定性を有する他の基もあり得る。酸素、硫黄および窒素から選択される多くの基は、1つのそして同じsp³-混成軌道を有する炭素に結合する。

【0051】

50

S Pは上記のように、例えば、水素結合に関与することにより、物質の陰イオン交換体への結合を促進する1個以上の電子ドナーまたはアクセプター原子または基を提供し得る。これらの原子または基は、(a)ベースマトリックスからリガンドまで伸びるスペーサーにおける原子の鎖の一部またはそれに直接結合し得る、または(b)この鎖に結合する分枝基の一部であり得る。本明細書における分枝基は

- ・前段落に記載の原子の鎖に直接結合する、そして
- ・水素結合のような電子ドナーアクセプター相互作用に関与する原子または基を含む基である。

【0052】

好ましい変形において、直接 $\text{Ar}-\text{R}_1-\text{N}^+(\text{R}_2\text{R}_3\text{R}_4)$ に結合するS Pの部分は：

10

- ・炭素、好ましくはカルボニル炭素またはsp³-混成軌道を有する炭素；または・窒素、好ましくはアミノまたはアミド窒素；または
- ・硫黄、好ましくはチオエーテル硫黄；または
- ・酸素、好ましくはエーテル酸素

であるが、但し、S Pは(b)-(d)に関して、 $[\text{Ar}-\text{R}_1-\text{N}^+(\text{R}_2\text{R}_3\text{R}_4)]$ における炭素に結合する。

【0053】

直接 $[\text{Ar}-\text{R}_1-\text{N}^+(\text{R}_2\text{R}_3\text{R}_4)]$ に結合するS Pの典型的構造は：-CH₂-、-CH₂CH₂-、CH₂CH₂CH₂-、-CH₂CH(CH₃)-、-C(CH₃)₂-、-C(CH₂CH₃)₂-、-C(OCH₃)₂-、-CH₂OCH₂-、-CH₂SC₂H₂-、-CH₂NHCH₂-、-CH₂O-、-CH₂CH₂O-、-CH₂S-、-CH₂CH₂S-、-CH₂NH-、-CONH-、-NHCO-、-CONH(CH₂)₂SCH₂-、-NHCH₂CH₂CH₂CH₂CONH-、-CH₂CH₂NH-、-CH₂CH(OH)CH₂OCH₂CH(OH)CH₂O-である(Ar-R₁-N⁺(R₂R₃R₄)に結合する正確な原子価)。スペーサーの残りの部分は、伝統的イオン交換体と同じ種であり得る。

20

【0054】

スペーサーは、将来開発される技術も含む、慣用の共有結合的結合法により導入し得る。説明的結合化学は、エピクロロヒドリン、エピブロモヒドリン、アリル-グリシジルエーテル、ブタンジオールジグリシジルエーテルのようなビスエポキシド、ジクロロプロパンオールのようなハロゲン置換脂肪族物質、ジビニルスルホン、カルボニルジイミダゾール、グルタル酸ジアルデヒドのようなアルデヒド、キノン、シアノーゲンプロミド、メタ過ヨウ素酸ナトリウムのような過ヨウ素酸塩、カルボジイミド、クロロトリアジン、トシリクロライドおよびトレシルクロライドのようなスルホニルクロライド、N-ヒドロキシサクシンイミド、オキサゾロン、マレイイミド、2-フルオロ-1-メチルピリジニウムトルエン-4-スルホネート、ピリジルジスルフィドおよびヒドラジドを含む。

30

【0055】

ベースマトリックス

ベースマトリックスは有機および/または無機物質に基づく。

【0056】

ベースマトリックスは、好ましくは親水性であり、ポリマーの形であり、それは水に不溶性であり、多かれ少なかれ水中で膨張性である。親水性になるように誘導体化されている疎水性ポリマーはこの定義に含まれる。適当なポリマーは、例えば、アガロース、デキストラン、セルロース、澱粉、プルラン等のような多糖類系のポリヒドロキシポリマーであり、ポリアクリル酸アミド、ポリメタクリル酸アミド、ポリ(ヒドロキシアルキルビニルエーテル)、ポリ(ヒドロキシアルキルアクリレート)、及びポリメタクリレート(例えば、ポリグリシジルメタクリレート)、ポリビニルアルコール及びの完全な合成ポリマー、スチレン及びジビニルベンゼン系ポリマー、2個以上のモノマーが上記ポリマーに対応するコポリマーを含む。水に可溶性のポリマーは、例えば、架橋により、及び不溶性体に吸着又は共有結合的結合を介して結合することにより、不溶性となるように誘導

40

50

体化し得る。親水性基を、疎水性ポリマーに(例えば、モノビニル及びジビニルベンゼンのコポリマー上に)、OHに変換できる基を示すモノマーの重合化により、又は最終ポリマーの親水性化により、例えば、親水性ポリマーのような適当な化合物の吸着により、導入できる。

【0057】

ベースマトリックスに使用する適当な無機物質は、シリカ、酸化ジルコニアム、グラファイト、酸化タンタル等である。

好ましいマトリックスは、シラン、エステル、アミド基のような加水分解に対して不安定な基およびシリカ自体に存在する基を欠く。これは、使用する液体と直接接触する基に関して特に当てはまる。

10

【0058】

マトリックスは多孔性または無孔性であり得る。これは、マトリックスが除去する物質が完全に一部透過性であるか(多孔性)、または非透過性である(無孔性)、すなわち、マトリックスが除去する物質に対して0.40 - 0.95の間のKavを有すべきであることを意味する。これは、例えば、エクステンダーを有するあるマトリックスに関して、Kavがより低い、例えば、0.10まで低いまたはより低いことがあり得ることを排除しない。例えば、WO 98 33572 (Amersham Pharmacia Biotech AB) 参照。

【0059】

本発明の特に興味深い実施態様において、マトリックスは1 - 1000 μm、好ましくは高性能適用に関しては5 - 50 μmの、分取目的では50 - 300 μmの範囲のサイズの不規則なまたは球状粒子の形であり得る。

20

【0060】

マトリックスの興味深い形は、液体よりも高いまたは低い密度を有する。この種のマトリックスは、流動床または膨張床クロマトグラフィーでの、ならびに異なるバッチ式手順、例えば、攪拌タンクでの大規模操作に特に適用可能である。流動および膨張床手順は、WO 92 18237 (Amersham Pharmacia Biotech AB) およびWO 92 00799 (Kem-En-Tek)に記載されている。

【0061】

親水性マトリックスなる用語は、マトリックスの接近可能な表面が、水性液体がマトリックスを通過できる点で親水性であることを意味する。典型的に、親水性ベースマトリックスの接近可能な表面は、例えば酸素および/または窒素原子を含む複数の極性基を曝す。このような極性基の例は、ヒドロキシル、アミノ、カルボキシ、エステル、低級アルキルのエーテル(例えば、(-CH₂CH₂O-)_n(ここで、nは整数である))である。

30

【0062】

本発明で使用する陰イオン交換体における陰イオン交換リガンドのレベルは、通常、0.001 - 4 mmol / mlマトリックス、例えば、0.002 - 0.5 mmol / mlマトリックスの間から通常選択され、0.005 - 0.3 mmol / mlマトリックスが好ましい。可能性のあるそして好ましい範囲は、とりわけ、マトリックス、リガンド、除去する物質物質の種により決定される。したがって、陰イオン交換リガンドのレベルは、通常、アガロースベースのマトリックスに対して0.01 - 0.3の範囲であり、0.01 - 0.1 mmol / mlが好ましい。デキストランベースのマトリックスに関して、範囲は典型的には0.01 - 0.6 mmol / mlマトリックスであり、サブレンジは0.01 - 0.2 mmol / mlである。ある変形において、例えば、R₁が-C(=NH)-である場合、混合モードリガンドのレベルは、しばしば、この範囲の下半分である。本発明のこれらの変形において、陰イオン交換リガンドのレベルは、したがって、0.150 mmol / mlマトリックスより小さくおよび/または1 mmol / gマトリックス乾燥重量より小さい。「mmol / mlマトリックス」なる表現は、水で飽和された完全に沈降したマトリックスに関する。容量範囲は、クロライドイオンに結合するために完全にプロトン化された形のマトリックスの容量に関する。これは、また、基--[R₅-S-R₁-N⁺(R₂R₃R₄)]以外の、例えば、スペーサー、または基R₁-5、R'₁-4およびR''₁に存在する可能性のある荷電基に由来する寄与も含む。

40

50

【0063】

新規陰イオン交換体の適合性

本発明の陰イオン交換体／陰イオン交換リガンドは、陰イオン交換吸着を含む工程で通常適用される条件に耐えるべきである。一般的な原則として、これは、本発明の陰イオン交換体が0.1または1M NaOH水溶液に少なくとも10時間、全イオン結合能に本質的な減少なく耐えることができなければならないことを意味する。「全イオン結合能に本質的な減少なく」なる用語は、全イオン結合能が最大で10%減少することを意図する。構造的な観点から、これは、好ましい変形の陰イオン交換リガンドが、純粋炭化水素基(同種芳香族および異種芳香族構造を含む)、チオエーテルおよびエーテル基、ジスルフィド基、ヒドロキシ基、スルホキシド基またはスルホン基、カルボキサミド基、スルホニアミド基、アセタールおよびケタール基、および類似の加水分解安定性の基から選択される構造のみを含むべきであることを意味する。

10

【0064】

最良モード

最良モードは目的の物質によって変化し、今日までに発見された最良のリガンドを示す実験部分から明白である。

【0065】

吸着／脱着

吸着／脱着段階は、モノリス形のまたは充填もしくは流動床の形における粒子としての陰イオン交換マトリックスでのクロマトグラフィー手順として行ない得る。粒子状マトリックスに関して、これらの段階はまた、粒子が多かれ少なかれ液体中に完全に分散されているバッチ式モードで行ない得る(例えば、流動／膨張床)。

20

段階(i)および(ii)で使用する液体は水性、すなわち、水混和性溶媒と混合されていてもよい、水である。

【0066】

吸着

吸着の間、負に荷電した物質を含む液体サンプルを、上記で定義の陰イオン交換体と、好ましくは陰イオン交換による、吸着(結合)を可能にする条件下で接触させる。言い替えると、物質は少なくとも部分的に負に荷電しており、リガンドは少なくとも部分的に陽に荷電している。

30

【0067】

陰イオン交換なる用語は、除去する物質が負に荷電し、陰イオン交換体が陽に荷電している(=陰イオン交換条件)ことを意図する。水性液体に存在する両性物質に関して、これは、 $pH \geq pI \sim 5$ 、好ましくは、 $pH \geq pI$ を意味する。

【0068】

好ましい変形において、弱陰イオン交換体(好ましくは、陰イオン交換体に1級または2級アミン基として存在する)を、 $\leq pK_a + 2$ 、好ましくは $\leq pK_a + 1$ の範囲内に緩衝化する。下限は、少なくとも $pH = 1$ または2まで低下でき、主に酸性環境での陰イオン交換体の安定性および等電点(pI)、および除去する物質の安定性により決定される。陰イオン交換体のpKa値は、50%のその滴定可能基が中和されているpHとして取る。

40

【0069】

イオン強度(塩濃度または伝導度として測定)は、典型的にイオン交換体、結合する物質、温度とpH、溶媒組成等の特定の組合せに関する溶出イオン強度より低い。本発明の利点の一つは、上記で定義の混合モード陰イオン交換体の使用により、吸着／結合がまた、慣用のイオン交換体(対照イオン交換体)で通常行なわれるよりも、上昇したイオン強度でも行なうことが可能であることである。陰イオン交換体を除去する物質と適合させることにより。吸着は慣用のイオン交換体を使用するときよりも高いイオン強度で行ない得る(同じpHおよびそうでなければ同じ条件下で測定して)。使用する陰イオン交換体に依存して、イオン強度は上記で定義の対照陰イオン交換体よりも25%以上高い、例えば、40%以上高い可能性がある。

50

【0070】

前段落における記載の絶対的数値は、本発明の吸着が、15または20mS/cm以上または以下のイオン強度で行ない得ることを意味する。イオン強度は30mS/cmを超える場合、40mS/cmをさえ超える。有用なイオン強度は、しばしばNaCl濃度(純水) $> 0.1\text{M}$ 、例えば、 $> 0.3\text{M}$ 、または $> 0.5\text{M}$ に対応する。使用する伝導度/イオン強度は、使用するリガンド、そのマトリックス上の密度、結合する物質、その濃度等に依存する。

【0071】

選択する陰イオン交換体に依存して、対照陰イオン交換体での特定物質で得られる破過容量の200%以上、例えば300%以上又は500%以上又は1000%以上の最大破過容量が達成され得る(前記と同じ条件)。10

【0072】

脱着

脱着は、確立されたプロトコールにしたがって行い得る。好ましくは、脱着工程は少なくとも以下の手順の一つを含む:

- (A) 塩濃度(イオン強度)の増加、
- (B) リガンド上の陽電荷を減少させるためのpHの上昇、
- (C) 負電荷の減少又はマトリックスに結合した物質上の電荷を逆転させるためのpHの低下、
- (D) 水性液体(I)の極性を減少させるためのリガンドアナログ又は試薬(例えば溶媒)の添加。20

【0073】

(A)-(D)により提供される条件は、組合せてまたは単独で使用し得る。適当な選択は

- (a) 脱着する物質、
 - (b) 陰イオン交換体(リガンド、マトリックスの種類、スペーサーおよびリガンド密度)、および
 - (c) 水性液体IIの種々の可変要素(組成、極性、温度、pH等)
- の特定の組合せに依存する。

【0074】

水性液体I(吸着緩衝液)を水性液体II(脱着緩衝液)で置きかえることは、したがって、温度、pH、極性、イオン強度、可溶性リガンドアナログの含量等のような少なくとも一つの可変要素が異なるが、脱着が起こり得るように、他の条件は未変化であることを意味する。30

【0075】

最も単純な例において、これは、水性液体Iから水性液体IIに変える場合の:(a)イオン強度の増加及び/又は

- (b) 脱着する物質の負電荷の減少のためのpHの低下
- を意味する。選択枝(a)は低下、一定又は上昇したpHを含む。選択枝(b)は減少、上昇又は一定のイオン強度を含む。

【0076】

クロマトグラフィーおよび/またはバッチ手順において、脱着する物質を伴うマトリックスはカラムまたは他の適当な容器中に、吸着液体(水性液体I)と接触して存在する。液体により提供される条件を次いで上記のように所望の物質がマトリックスから溶出されるまで変える。吸着後、典型的な脱着工程は、イオン強度以外の他の可変要素が変化しない場合、イオン強度が吸着中と比較して上昇し、多くの場合、少なくとも0.4M NaCl、例えば、0.6M NaClに対応することを意味する。実際の値は上記の種々の因子に依存する。40

【0077】

脱着のための上昇したイオン強度の使用の必要性は、水性液体IIにより提供される条件にあまり厳密に依存しない可能性がある。下記参照。

条件における変化は、1個以上の段階で(段階的勾配)または連続的に(連続的勾配)達成できる。マトリックスと接触している液体の種々の可変要素は、一個ずつまたは組み合わせて変え得る。

イオン強度を変えるために使用する典型的な塩は、アルカリ金属またはアンモニウムイオンの塩化物、リン酸塩、硫酸塩等から選択される。

【0078】

段階(i)及び(ii)で使用する典型的な緩衝液は、好ましくは、緩衝成分がリガンドに結合できない酸・塩基対、すなわち、ピペラジン、1,3-ジアミノプロパン、エタノールアミン等から選択する。段階(ii)におけるpHの低下は脱着する物質の負電荷を減少し、脱着を助け、したがって、マトリックスからの放出に必要なイオン強度も減少する。使用するリガンドのpKa及び放出する物質のpIに依存して、pHの上昇は物質の放出又はイオン交換マトリックスへのその結合の増強をもたらし得る。10

【0079】

脱着はまた吸着液体(I)の極性よりも低い値への液体(II)の極性の調節により助けられ得る。これは、水混和性および/または低親水性有機溶媒の液体IIへの包含により達成し得る。このような溶媒の例はアセトン、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、アクリロニトリル等である。水性液体IIの極性の減少(水性液体Iと比較して)は、脱着を助け、したがって、またマトリックスからの物質の放出に必要なイオン強度を減少するようである。

【0080】

脱着はまた[R₅-S-R₁-N⁺(R₂R₃R₄)]の可溶性構造類似体(リガンドアナログ)の包含により助けられ得る。液体(II)におけるその濃度は、液体(I)におけるその濃度よりも大きくなければならない。「リガンドの構造類似体」または「リガンドアナログ」は、リガンドと構造的類似性を有し、可溶性形でマトリックスに結合したリガンドと除去する物質の間の結合を阻害する物質である。20

【0081】

回収率

下位の態様において、本発明法は吸着物質の高い回収率、例えば、60%を超える、例えば、80%を超える、または90%を超える回収を可能にする。回収率は、吸着/脱着段階における陰イオン交換体に適用した物質と比較した脱着物質の量である。多くの場合、回収率は95%を超え得、または本質的に定量的である。典型的に、陰イオン交換体に適用する物質の量は、その物質に対する陰イオン交換体の全結合能の10-80%、例えば、20-60%の間である。30

【0082】

液体(I)から除去する物質

本発明に従う物質の除去は、主にその物質または液体(I)に存在する他の物質の精製のために行なう。

【0083】

本発明は、上で定義された混合モードのリガンドと相互作用可能ないくつかの構造単位を有する分子量が大きい物質を第一に意図している。適当な物質は、典型的に、約1000ダルトン以上および/または生物有機のおよび/またはポリマーの分子量を有する。分子あたりの正味の陰性に荷電した基の数は、典型的に1以上である。好ましくは、物質の電荷はpHに依存する(すなわち、該物質は両性化合物である)。生体分子の中で、ポリペプチド構造、核酸構造、脂質構造、および炭水化物構造を有するものを本発明にしたがって液体から除去することは、一般的に可能である(ただし、それらが陰性荷電を有するか、または付与され得る場合)。原則として、本発明は、また、他の生体分子および有機物質に適用可能である(ただし、それらが上で与えられた構造的な要求を満たす場合)。40

【0084】

該物質は水性媒体に溶解し得るか、または小さい生体粒子(bio-particle)の、例えばコロイドの大きさの形態であり得る。生体粒子の説明的例はウイルス、細胞(細菌および他

10

20

30

40

50

の単細胞生物体を含む)ならびに細胞塊および細胞オルガネラを含む細胞内器官である。

【0085】

本発明は、特に、高濃度の塩と共に目的の物質を含む生物学的な流体由来の水性液体に適用可能であると信じられている。新規陰イオン交換体は、例えば、最初にpHを変え、吸着した物質の陽性電荷を減少させることで高いイオン強度での吸着および低いイオン強度での脱着を可能にすることにより、脱塩において極めて有用である。

【0086】

目的の標的物質を含む高いイオン強度の典型的な液体は、例えば細胞培養からの発酵プロセス / 液、およびそれに由来する液である。該細胞は脊椎動物、例えば哺乳動物、または無脊椎動物(例えばチョウおよび / またはその幼虫由来の細胞のような培養昆虫細胞)、または微生物(例えば培養真菌、細菌、酵母等)から生じ得る。また、植物細胞および他の種類の生細胞(好ましくは培養されたもの)も含まれる。10

【0087】

除去されるべき物質を含む水性液体(I)が粒子状物質を含む場合には、アップワードフロー(upward flow)と共に新規陰イオン交換リガンドを担持する流動化粒子状支持マトリックスを利用することは有益であり得る。この種の水性液体(I)は、(a)細胞の培養からの発酵プロセス / 液、(b)溶解した細胞を含む液体、(c)細胞および / または組織ホモジネートを含む液体、ならびに(d)細胞から得られるペースト由来であり得る。

【0088】

本発明の第二の観点20

この観点には、親水性ベースマトリックスに結合した複数の陰イオン交換リガンドを含む陰イオン交換体(1)が含まれる。スペーサーが結合したリガンドは、式



(ここで、記号は前に記載したのと同じ意味を有する。)

に従う。

特徴的説明は、陰イオン交換体(1)が少なくとも1つの対照タンパク質:Q-交換体(-CH₂CH(OH)CH₂N⁺(CH₃)₃(陰イオン交換体2))で得られた対応する最大破過容量の200%以上、例えば300%以上又は500%以上又は1000%以上である卵白アルブミン、コンアルブミン、ウシ血清アルブミン、-ラクトグロブリン、

-ラクトアルブミン、リゾチーム、1g G、ダイズトリプシンインヒビター(STI)30に関して、2-12のpH範囲のいずれかにおいて最大破過容量を有することである。同一の支持マトリックス、置換度、対イオン等は、上で議論したのと同一の意味で、本質的に同一である。陰イオン交換体(1)及び陰イオン交換体(2)の破過容量を測定するための操作条件(running condition)は、本明細書の他の部分で議論したのと本質的に同一である。

【0089】

破過容量は、「特定物質の除去のために使用される陰イオン交換体の選別」の欄で定義した陰イオン交換条件下で測定される。それぞれの対照物質の相対的な破過容量は、典型的な場合において、破過容量が測定されるべき緩衝液及び対象物質からなる水性液体を用いて別々に測定される。40

【0090】

さまざまな実施態様およびそれらの選択物は、上と同じである。したがって、好適な変形に関して、SP、R₁、R₂ - ₄およびR₅の少なくとも1つは、チオエーテル結合R₅-S-R₁-に加えて、本発明の第1の観点のために上で定義したような電子ドナーおよび / または電子アクセプター原子または基を含む。このような付加的な原子または基は、例えば水素結合に参加し得、および / またはスペーサー(SP)中またはリガンドとベースマトリックスとをつなぐ原子の鎖中の側鎖に存在し得る。

【0091】

ここで、実施例により本発明を説明する。本発明は、さらに、特許請求の範囲において定義される。50

【0092】

実験の部

第1部：陰イオン交換体の合成

一般：

マトリックスの容積は、沈降吸着床容積(sedimented bed volume)を意味する。グラムで与えられるマトリックスの重量は、吸引乾燥重量(suction dried weight)を意味する。これらのマトリックスはまだ水で溶媒和された物質であると理解される。大規模の反応について、マグネット・バー・スターラーの使用はビーズを傷つけるので、攪拌は懸垂型(suspended)の、モーター駆動スターラーの使用を意味する。小規模の反応(20mlまで)は振動テーブル上で、密閉バイアル内で行われた。機能性およびアリル化、エポキシ化の程度、またはビーズ上のイオン交換基の置換度の決定を通常の方法を用いて行った。ゲルの初步的な分析は、また、とりわけ硫黄含有量を分析するために行われた。

10

【0093】

上で記載した陰イオン交換体を製造するための典型例は、ベースマトリックスとして Sepharose 6 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いて下記のように例示される。

【0094】

1. マトリックス上へのアリル基の導入

典型的な手順において、アリル化はアリルグリシジルエーテルを用いて行われたが、固体支持体上へのアリル基の導入は、臭化アリルを用いても同様に容易に達成され得ることに注意せよ。80gの Sepharose 6 Fast Flow を 0.5g の NaBH₄、13g の Na₂SO₄ および 40ml の 50% NaOH 水溶液と混合した。混合液を 50 ml で 1 時間攪拌した。100ml のアリルグリシジルエーテルの添加後、懸濁液の温度を 50 °C に維持し、18 時間攪拌した。混合液をろ過し、ゲルを 500ml の蒸留水、500ml のエタノール、200ml の蒸留水、200ml の 0.2 M 酢酸および 500ml の蒸留水で連続的に洗浄した。

20

【0095】

滴定により、処理済ゲル置換度(アリル / ml)が 0.3 mmol と判明した。脱水したゲル(100ml のゲルから 75ml のゲル)から出発することにより 0.45 mmol のゲル置換度(アリル / ml)を得ることが可能であった。

【0096】

30

2. マトリックス上へのアミン基の導入

典型的な手順において、アミン基はアミン基の窒素原子を介するか、またはチオール含有誘導体における硫黄原子を介して直接的にマトリックス上に導入される。例えば、フェノールのような他の反応性のある求核性基を含む誘導体も同様に使用し得る。マトリックスへのカップリングをアリル基のプロモ化および塩基性条件下での求核置換を介して好ましく実施した。いくつかの場合において、そしてチオール含有誘導体に関して、該アリルへのラジカル付加も同様に行なった。ゲルへの結合部位がアミン以外の求核性基を介して達成された場合、アミン基は保護された形態として導入され得、その場合には脱保護の段階が必要となる。

【0097】

40

アミン基は、また、他の通常の方法、例えば還元的アミノ化により導入され得る。

【0098】

2.1. プロモ化を介するアリル Sepharose の活性化

100ml のアリル活性化 Sepharose 6 Fast Flow (0.4 mmol アリル基 / ml 脱水済ゲル) の攪拌懸濁液に永続的な黄色が得られるまで臭素を加え、次いで、4g の AcONa および 100ml の蒸留水を加えた。次いで、ギ酸ナトリウム(sodium formate)を懸濁液が完全に脱色されるまで加えた。反応混合液をろ過し、ゲルを 500ml の蒸留水で洗浄した。次いで活性化されたゲルの適当なアリコートを反応容器に移し、下記の手順に従って適当なリガンドとカップリングさせた。

【0099】

50

2.1.a. 2 - アミノ 4 - (トリフルオロメチル) - ベンゼンチオールの Sepharose 6 Fast Flowへのカップリング

6 gの臭素活性化ゲル(0.4 mmolアリル基/ml脱水済ゲル)を、50%のNaOH水溶液を加えることによりpH 11.5に調節した、2 - アミノ 4 - (トリフルオロメチル) - ベンゼンチオール(2.5 g)の水 / DMF(2 : 1、4 ml)溶液を含む反応溶液に移した。反応液を60℃で18時間攪拌した。懸濁液をろ過し、ゲルを3×10 mlの蒸留水、3×10 mlのEtOH、3×10 mlの0.5 M塩酸および最後に3×10 mlで連続的に洗浄した。ゲルの置換度は、0.07 mmolアミン基/mlであった。

【0100】

2.1.b. 2 - (Boc - アミノ)エタンチオールの Sepharose 6 Fast Flowへのカップリング 10

30 gの量の臭素活性化ゲル(0.4 mmolアリル基/ml脱水済ゲル)を2 - (Boc - アミノ)エタンチオール - I(7.35 g)の水 / DMSO(1 : 3、40 ml)溶液を含む反応溶液に移した。1 M NaOHでpHをpH 11に調節した。反応液を50℃で16時間攪拌した。反応混合液をろ過後、ゲルを3×50 mlの蒸留水、3×50 mlのDMSO、3×50 mlの蒸留水および最後に3×50 mlのEtOHで連続的に洗浄した。

【0101】

2.1.c. アミノエタンチオール誘導 Sepharose 6 Fast Flowへのシステアミンのカップリング

Boc保護アミノエタンチオールゲル(6 ml)(2.1.c.由来)をCH₂Cl₂(60 ml)中の10%トリフルオロ酢酸溶液で、室温で2時間処理した。懸濁液をろ過し、ゲルを3×10 mlのCH₂Cl₂、3×10 mlのEtOH、および3×10 mlの蒸留水で連続的に洗浄した。ゲルの置換度は0.29 mmolアミン基/mlであった。 20

【0102】

2.2. アリル基の直接的カップリング

2.2.a. システアミン誘導 Sepharose 6 Fast Flow

システアミン(4.7 g)のMeOH(15 ml)溶液をMeOH(40 ml)中の10 mlアリル活性化 Sepharose 6 Fast Flow(0.4 mmolアリル基/ml脱水済みゲル)のスラリーに加えた。反応混合液をUV照射し、40℃で16時間攪拌した。反応混合液をろ過し、ゲルを3×10 mlのMeOH、3×10 mlの蒸留水、3×10 mlの0.5 M塩酸および最後に3×10 mlの蒸留水で連続的に洗浄した。ゲルの置換度は0.34 mmolアミン基/mlであった。 30

【0103】

3. システアミン Sepharose 6 Fast Flowへのカップリング

3.1. Boc - L - フェニルアラニン誘導システアミン Sepharose

Boc - L - フェニルアラニン N - ヒドロキシスクシンイミドエステル(0.44 g、1.2 mmol)のDMF(2 ml)溶液をDMF(5 ml)中のシステアミン Sepharose(4 ml、0.2 mmolアミン基/mlゲル)およびN,N - デイソプロピルエチルアミン(1 mmol)の混合液に加えた。反応を室温で18時間継続した。反応混合物をろ過し、ゲルを3×10 mlのDMF、3×10 mlのアセトン、および最後に3×10 mlの蒸留水で連続的に洗浄した。滴定後のゲルの残余アミン基は、0.033 mmolアミン基/mlと計算された。 40

【0104】

3.2. L - フェニルアラニン誘導システアミン Sepharose

Boc保護L - フェニルアラニン誘導システアミンゲル(3 ml)(3.1または2.1.d由来)をCH₂Cl₂(4 ml)中の10%トリフルオロ酢酸溶液で、室温で2時間処理した。反応混合液をろ過し、ゲルを3×10 mlのCH₂Cl₂、3×10 mlのアセトン、および3×10 mlの蒸留水で連続的に洗浄した。ゲルの生成物の置換度は0.19 mmolアミン基/mlであった。

【0105】

3.3. Fmoc - L - チロシン誘導システアミン Sepharose

Fmoc - L - チロシン N - ヒドロキシスクシンイミドエステル(1.1 mmol)のDMF(3 m 50

I) 溶液を D M F (5 ml) 中の システアミン Sepharose (3 . 3 ml 、 0 . 3 mmol アミン基 / ml ゲル) のスラリーに加えた。混合物を室温で 18 時間攪拌した。懸濁液をろ過し、ゲルを 3 × 10 ml の D M F で洗浄した。

【 0106 】

3 . 4 . L - チロシン誘導システムアミン Sepharose F moc 保護 L - チロシン誘導システムアミンゲル (3 . 3 ml)(3 . 3 由来) を D M F (10 ml) 中の 10% 1 , 8 - ジアザビシクロ [5 , 4 , 0] - ウンデカ - 7 - エン溶液で、室温で 18 時間処理した。反応混合液をろ過し、ゲルを 3 × 10 ml の D M F 、 3 × 10 ml のアセトン、および 3 × 10 ml の蒸留水で連続的に洗浄した。ゲルの置換度は 0 . 28 mmol アミン基 / ml であった。

【 0107 】

第 2 部 クロマトグラフィー

本発明で示されたリガンドが対照陰イオン交換体よりも高いイオン強度でタンパク質を吸着することを確かめるため、ウシ血清アルブミン (B S A) の貫流容量を測定した。本研究において Sepharose Fast Flow に結合した新規「高塩濃度 (high - salt) 」陰イオン交換リガンドを Q Sepharose Fast Flow と比較した。また、3つのタンパク質、すなわちコンアルブミン (Con A) 、ラクトアルブミン (Lactalb) およびダイズトリプシンインヒビター (S T I) の溶出伝導度 (elution conductivity) を、すべての陰イオン交換体に関して測定した。この機能テストは、他のタンパク質と同様の高塩濃度の条件下での遅延を確かめるために使用された。高い貫流容量を有する 4 つの「高塩濃度」陰イオン交換リガンドを、また、アプライされたタンパク質 (B S A) の回収に関して試験した。

【 0108 】

A . 高塩濃度条件下での破過容量 (Q b 10 %)

Q b 10 % 値を、同一の条件下で使用された対照陰イオン交換 Q Sepharose Fast Flow に関して相対的に高い塩濃度 (0 . 25 M NaCl) で求めた。異なる陰イオン交換体の Q b 10 % 値を下記の前端分析法を用いて測定した。

【 0109 】

実験

I . 緩衝液およびサンプル溶液

サンプル溶液は 0 . 25 mM NaCl を加えた 20 mM ピペラジン (pH = 6 . 0) に溶解させた B S A であった。 B S A の濃度は 4 mg / ml であった。緩衝液およびサンプル溶液を、使用前に 0 . 45 μm Millipore Millex HA フィルターを通してろ過した。

【 0110 】

II . クロマトグラフィーのシステム

すべての実験を Unicorn 3 . 1 ソフトウェアを備えた Aekta Explorer 100 クロマトグラフィーシステム (Amersham Pharmacia Biotech AB , Uppsala , Sweden) を用いて室温で行った。サンプルを、 150 ml スーパーループ (superloop) を介してカラムにアプライした。終始、 1 ml / 分 (約 300 cm / 時) の流速を使用した。溶出液を、 10 mm フローセルを用いて 280 nm での吸収測定により連続的に観測した。

【 0111 】

I II . 前端分析

それぞれの陰イオン交換体の試作品を H R 5 / 5 カラム (充填吸着床容積 = 1) に充填し、ピペラジン緩衝液 (20 mM ピペラジン、 pH = 6 . 0 、 0 . 25 M NaCl を有する) で平衡化させた。破過容量 (Q b) を 10 % の最大 UV 検出シグナル (280 nm) で評価した。最大 UV シグナルは、試験溶液を UV 検出器に直接注入することにより評価された。破過容量は、デッドボリュームの修正後、最大シグナルの 10 % の高さでの保持容積から計算された。

【 0112 】

ピペラジン緩衝液で平衡化したカラムに、 1 ml / 分 (すなわち、約 300 cm / 時) の流速でサンプル溶液を (150 ml スーパーループを介して) 送り込んだ。サンプルの添加を、溶出液の A₂₈₀ がサンプル溶液の A₂₈₀ の 10 % のレベルに達するまで継続した。

10

20

30

40

50

そのようにして得られたデータ（すなわち、カラムに対する充填ゲル吸着床の体積（Vc）、その空隙容量、流速及びBSAの濃度）に基づいて、ゲルの破過容量（Qb10%）を計算し得る。得られた結果は、複数の「高塩濃度のリガンド」候補物質をスクリーニングするための基礎を形成し、その結果を以下に提供する。

【0113】

I V . 評価

BSAサンプル溶液の吸收最大の10%のレベルでの破過容量（QbBSA）は、式：

$$Q_b BSA = (T_{R10\%} - T_{RD}) \times C / V_c$$

ここで：

$T_{R10\%}$ = 吸收最大の10%での保持時間（分）

10

T_{RD} = システムの不感時間（分）

C = BSAの濃度（4mg/ml）

Vc = カラム容積（ml）

を用いて計算された。

【0114】

B . 機能テスト

陰イオン交換媒体を1.0mlのHR-5/5カラムに充填し、20カラム容積のA-緩衝液（20mMリン酸緩衝液；pH 6.8）で平衡化させた。50μlのタンパク質混合物（6mg/mlのCon A、4mg/mlのラクトアルブミンおよび6mg/mlのSTI）をカラムにアプライし、100%のB-緩衝液（A-緩衝液に2.0M NaClを加えたもの）まで直線的勾配（勾配の容積 = 20カラム容積）で溶出した。流速を0.3ml/分（100cm/時）に調節した。すべての実験をUnicorn 3.1 ソフトウェアを備えたAekta Explorer 100クロマトグラフィーシステムを用いて室温で行った。

20

【0115】

C . 「高塩濃度」陰イオン交換リガンドに結合したBSAの回収

カラム、充填吸着床容積、緩衝液、タンパク質溶液、流速及び装置の種類に関する詳細は上で概説されたものである。ピペラジン緩衝液（20mMピペラジン、pH=6.0、0.25M NaClを有する）で平衡化されたカラムに、破過容量の30%に相当する量がアプライされるまで50mlスーパーループからBSA溶液をアプライした。次いで、カラムを2吸着床容積の平衡化緩衝液で洗浄し、結合したBSAを適当な脱着緩衝液で溶出した。リガンド（チロシン）及び（2-アミノベンズイミダゾール）の場合には、吸着したBSAをピペラジン緩衝液（20mMピペラジン、pH=6.0、2.0M NaClを有する）で溶出した。さらに、リガンド（オクトパミン）及び（チロシノール）上に吸着したBSAをTRIS緩衝液（0.2M TRIS、pH=9.0、2M NaClを有する）で溶出した。

30

【0116】

結果

一連の代表的な「高塩濃度」陰イオン交換リガンドの破過容量に関して得られた結果を表1に要約し、リガンドの構造を第3部に記載する。これらの新規陰イオン交換体の大部分のリガンド置換度は、約0.05~0.3mmol/ml充填ゲルである。対照の陰イオン交換体として、商品として入手可能なQ Sepharose Fast Flowを使用した。リガンドの密度は、陰イオン交換体の新規シリーズと同一の範囲内にある。その結果により、次の傾向が示唆される。

40

1. 本発明の陰イオン交換リガンドは、対照の陰イオン交換体Q Sepharose Fast Flowと比較して、3つのタンパク質すべての溶出伝導度がずっと高い（表1）。

2. 本発明の陰イオン交換リガンドは、また、Q Sepharose Fast Flowと比較してBSAの破過容量（QbBSA）もずっと高い。最高のQb値を与えたリガンドは、対照陰イオン交換体に比べて4300%の増加に相当する。提供されたリガンド（表1）の中で、最低のQb値を与えたものは、Q Sepharose Fast

50

F low と比較して 500 % の増加に相当する。

3. 優れた陰イオン交換リガンドのすべては、第 1 級又は第 2 級アミンであるか、或いは第 1 級及び第 2 級アミンの両方である。第 4 級アミンに基づくリガンドで優れたものは発見されていない。

【0117】

表 1 異なる陰イオン交換体における 3 種類のタンパク質の pH 6 での溶出伝導度及び BSA の破過容量 (pH 6 及び 0.25 M NaCl)

【表 1】

リガンド	リガンド 密度 mmol/ml	破過 容量 (mg/ml)	溶出伝導度		
			QbBSA (mS/c m)	ConA (mS/c m)	ラクトアル ブミン (mS/cm) STI (mS/c m)
Q Sepharose Fast Flow	0.21	1	12	20	30
1. チオミカミン	0.13	43	ne	ne	ne
2. フェニルアラニン ／システアミン	0.20	33	ne	ne	ne
3. ベンジルシステイン ／システアミン	na	25	ne	ne	ne
4. 2-アミノ-4-(トリフルオロメチル)-ベンゼンチオール	0.01	21	ne	ne	ne
5. 4, 6-ジアミノ-2-メルカプトピリミジン	0.10	14	ne	ne	ne
6. トレオフェニルセリン ／システアミン	na	14	29	54	78
7. 4-アミノフェノール	0.05	13	ne	ne	ne
8. チエニルセリン ／システアミン	na	12	27	50	72
9. 4-アミノ-1, 3, 5-トリアジン-2-チオール	0.07	9	na	na	na

ne = 溶出せず、na = 分析せず

【0118】

第 3 部：リガンド

試験した最良のリガンドは以下の化合物から誘導した：

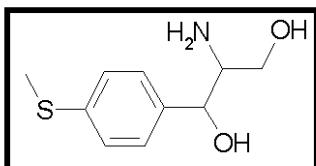
【化 1】

10

20

30

40

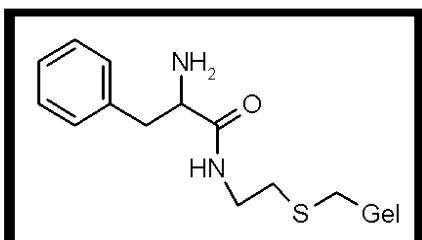


【0119】

1. チオミカミン (Thiomicamine) : R₁ = -p-C₆H₄-CH(OH)-CH(CH₂OH)-、R₂~₄ = 水素、R₅ = メチル

SPは -CH₂CH(OH)CH₂O- で終結し、そしてその水素の1つ(= R₁)を置換することによってアミノ基に結合している。 10

【化2】



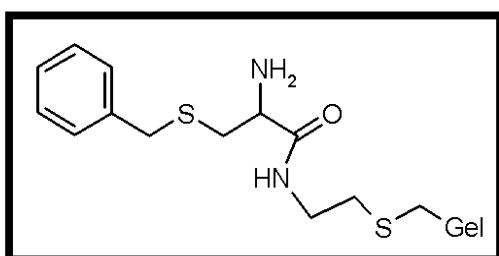
20

【0120】

2. フェニルアラニン / システアミン : R₁ = -CH(CH₂C₆H₅)-CO-NH-(CH₂)₂-、R₂~₄ = 水素、

SPは -CH₂- で終結し、そしてその水素(= R₅)を置換することによってメルカブト基に結合している。

【化3】

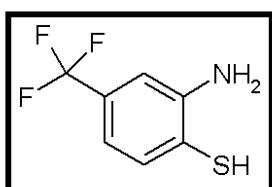


30

【0121】

3. ベンジルシステイン / システアミン : R₁ = -CH₂-CH<、R₂~₄ = 水素、R₅ = ベンジル、SPは -CONHC₆H₅CH₂SC₆H₅- で終結し、そしてR₁に結合している。

【化4】



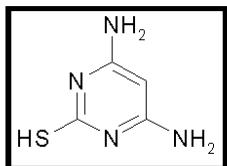
40

【0122】

4. 2-アミノ-4-(トリフルオロメチル)-ベンゼンチオール : R₁ = 4-トリフルオロメチル-1,2-フェニレン、R₂~₄ = 水素、SPはその水素(= R₅)を置換することによってメルカブト基に結合している。

【化5】

50

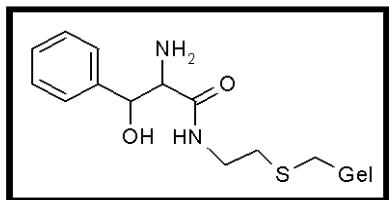


【0123】

5. 4,6-ジアミノ-2-メルカプトピリミジン : R₁ = 4-アミノ-1,6-ピリミジンジイル、R₂₋₄ = 水素、SPはその水素(=R₅)を置換することによってメルカプト基に結合している。

10

【化6】

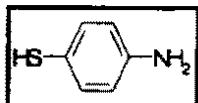


【0124】

6. トレオフェニルセリン / システアミン : R₁ = -CH(OH)C₆H₅) - CO - NH - CH₂CH₂ - 、R₂₋₄ = 水素、SPは-C₂H₂-で終結し、そしてその水素(=R₅)を置換することによってメルカプト基に結合している。

20

【化7】

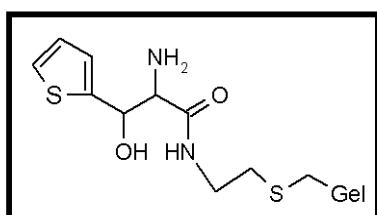


【0125】

7. 4-アミノチオフェノール : R₁ = 1,4-フェニレン、R₂₋₄ = 水素、SPは-C₂H₂-で終結し、そしてその水素(=R₅)を置換することによってメルカプト基に結合している。

30

【化8】

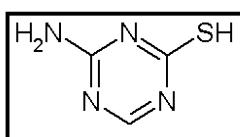


【0126】

8. チエニルセリン / システアミン : R₁ = CH(CH(OH)₂-チエニル) - CO - NH - CH₂CH₂ - 、R₂₋₄ = 水素、SPは-C₂H₂-で終結し、そしてその水素(=R₅)を置換することによってメルカプト基に結合している。

40

【化9】



【0127】

50

9.4-アミノ-1,3,5-トリアジン-2-チオール: $R_1 = 1,3,5$ -トリアジン-
2,6-ジイル、 R_{2-4} =水素、SPは-CH₂-で終結し、そしてその水素(=R₅)
を置換することによってメルカプト基に結合している。

【化10】

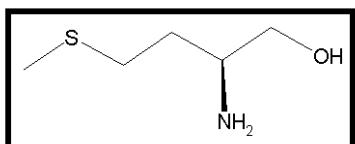


【0128】

10.2-アミノ-エタンチオール: $R_1 = -CH_2-CH_2-$ 、 R_{2-4} =水素、SP
は-CH₂-で終結し、そして水素(=R₅)を置換することによってメルカプト基に結合
している。QbBSA =

14mg/ml(UVカップリング17mg/mlによる)

【化11】



【0129】

11.メチオニノール: $R_1 = -CH_2-CH_2-CH-(CH_2OH)-$ 、 R_{2-4} =
水素、R₅=メチル、SPは-CH₂CH(OH)CH₂O-で終結し、そしてその水素の
1つ(=R₁)を置換することによってアミノ基に結合している。

10

20

フロントページの続き

(72)発明者 ジャン - リュック・マロワゼル
スウェーデン、エス - 118 69ストックホルム、ティデリウスガータン58番

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 特開平03-035010(JP,A)
特表平05-504097(JP,A)
特開昭50-025490(JP,A)
特開昭50-030794(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C02F 1/42
B01J 39/00-49/02
C07K 1/18
CA/REGISTRY(STN)