(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2019-18128
(P2019-18128A)
(43)公開日　平成31年2月7日(2019.2.7)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
B01J 20/26	***(2006.01)***	B01J	20/26	H	2G045
G01N 33/66	***(2006.01)***	G01N	33/66	Z	4G066
B01J 20/28	***(2006.01)***	B01J	20/28	Z	

審査請求 有　請求項の数 4　ＯＬ　（全 18 頁）

(21)出願番号　特願2017-136481 (P2017-136481)
(22)出願日　平成29年7月12日 (2017.7.12)
(11)特許番号　特許第6241564号 (P6241564)
(45)特許公報発行日　平成29年12月6日 (2017.12.6)

(71)出願人　000002141
住友ベークライト株式会社
東京都品川区東品川２丁目５番８号
(74)代理人　100110928
弁理士　速水　進治
(72)発明者　舩岡　創平
東京都品川区東品川２丁目５番８号　住友ベークライト株式会社内
(72)発明者　松元　孝行
東京都品川区東品川２丁目５番８号　住友ベークライト株式会社内
(72)発明者　豊田　雅哲
東京都品川区東品川２丁目５番８号　住友ベークライト株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】糖鎖捕捉性ポリマー粒子

(57)【要約】
【課題】糖鎖捕捉性およびハンドリング性のバランスに優れた糖鎖捕捉性ポリマー粒子を提供する。
【解決手段】本発明の糖鎖捕捉性ポリマー粒子は、糖鎖捕捉基を有するポリマー層、を備えており、水分散時におけるポリマー層の体積をＶ１（μｍ^3）とし、乾燥時におけるポリマー層の体積をＶ２（μｍ^3）としたとき、Ｖ１／Ｖ２が１．７以上１２．２以下である。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
糖鎖捕捉基を有するポリマー層、を備える糖鎖捕捉性ポリマー粒子であって、
水分散時における前記ポリマー層の体積をＶ１（μｍ^3）とし、
乾燥時における前記ポリマー層の体積をＶ２（μｍ^3）としたとき、
Ｖ１／Ｖ２が１．７以上１２．２以下である、糖鎖捕捉性ポリマー粒子。
【請求項２】
請求項１に記載の糖鎖捕捉性ポリマー粒子であって、
水分散時における前記ポリマー層の膜厚をＤ１（μｍ）とし、
乾燥時における前記ポリマー層の膜厚をＤ２（μｍ）としたとき、
Ｄ１／Ｄ２が１．２以上２．３以下である、糖鎖捕捉性ポリマー粒子。
【請求項３】
請求項１または２に記載の糖鎖捕捉性ポリマー粒子であって、
前記ポリマー層は、（メタ）アクリルモノマー、ビニルモノマー、アリルモノマー、（メタ）アクリルアミドモノマー、またはビニルアミドモノマーのいずれかに由来する構成単位を含有する、糖鎖捕捉性ポリマー粒子。
【請求項４】
請求項１から３のいずれか１項に記載の糖鎖捕捉性ポリマー粒子であって、
乾燥時における前記糖鎖捕捉基の密度が、１ｎｍｏｌ／ｍｇ以上４０００ｎｍｏｌ／ｍｇ以下である、糖鎖捕捉性ポリマー粒子。
【請求項５】
請求項１から４のいずれか１項に記載の糖鎖捕捉性ポリマー粒子であって、
前記糖鎖捕捉基が、ヒドラジド基またはオキシルアミノ基のいずれかである、糖鎖捕捉性ポリマー粒子。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、糖鎖捕捉性ポリマー粒子に関する。
【背景技術】
【０００２】
これまで生体高分子を捕捉する技術に関して様々な検討がなされてきた。生体高分子としては、糖鎖、糖タンパク質、タンパク質、核酸、脂質などが挙げられる。この種の技術としては、例えば、特許文献１に記載されている。特許文献１には、シリカ粒子等の無機粒子の表面に、生体高分子と結合可能なアクセプター基を結合させる技術が記載されている。同文献によれば、シランカップリング剤を介して無機粒子の表面にアクセプター基が結合されている。また、アクセプター基として、アミノ基やアルデヒド基等が記載されている。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００３】
【特許文献１】特開２００９－２８１７６０号公報
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００４】
本発明者が検討した結果、次のような点が判明した。
特許文献１に記載の技術は、シリカ粒子からタンパク質までのスペーサーが短いため、タンパク質の運動性が確保できず、運動性確保のための改善の余地があった。
【課題を解決するための手段】
【０００５】
本発明者はさらに検討したところ、糖鎖捕捉基を有するポリマー層を用いることにより

、上記運動性を確保できることを見出した。これにより、糖鎖捕捉性を高めることができる。しかしながら、ポリマー層を用いた場合、乾燥時と水分散時においてポリマー層の膨潤度合いが変化する。この変化の度合いが大きすぎると様々な不具合があることが分かってきた。例えば、水分散時にポリマー層が過剰に膨潤した場合、糖鎖捕捉性ポリマー粒子のハンドリング性が低下してしまうことが分かった。このような知見に基づきさらに鋭意研究したところ、水分散時と乾燥時におけるポリマー層の体積比率に着眼し、この体積比率の変化率がハンドリング性の指標となることが判明した。さらに検討を深めた結果、当該体積比率について所定値以上かつ所定値以下とすることにより、糖鎖捕捉性およびハンドリング性が改善されることを見出し、本発明を完成するに至った。

【０００６】

本発明によれば、

糖鎖捕捉基を有するポリマー層、を備える糖鎖捕捉性ポリマー粒子であって、

水分散時における前記ポリマー層の体積をＶ１（μｍ^3）とし、

乾燥時における前記ポリマー層の体積をＶ２（μｍ^3）としたとき、

Ｖ１／Ｖ２が１．７以上１２．２以下である、糖鎖捕捉性ポリマー粒子が提供される。

【発明の効果】

【０００７】

本発明によれば、糖鎖捕捉性およびハンドリング性のバランスに優れた糖鎖捕捉性ポリマー粒子が提供される。

【０００８】

以下、本発明の実施の形態について説明する。

まず、本実施形態の糖鎖捕捉性ポリマー粒子の概要について説明する。

【０００９】

本実施形態の糖鎖捕捉性ポリマー粒子は、糖鎖捕捉基を有するポリマー層を備えるものである。当該糖鎖捕捉性ポリマー粒子において、水分散時におけるポリマー層の体積をＶ１（μｍ^3）とし、乾燥時におけるポリマー層の体積をＶ２（μｍ^3）としたとき、Ｖ１／Ｖ２が１．７以上１２．２以下である事が好ましい。

【００１０】

本実施形態において、乾燥時に対する水分散時のポリマー層の体積比率Ｖ１／Ｖ２は、糖鎖捕捉性ポリマー粒子のハンドリング性を評価する指標に利用できる。

この点については、本発明者により見出された。具体的には次の通りである。すなわち、ポリマー層を用いた場合、乾燥時と水分散時においてポリマー層の膨潤度合いが変化する。この変化の度合いが大きすぎると様々な不具合があることが分かってきた。例えば、水分散時にポリマー層が過剰に膨潤した場合、糖鎖捕捉性ポリマー粒子のハンドリング性が低下してしまうことが分かった。このような知見に基づきさらに鋭意研究したところ、水分散時と乾燥時におけるポリマー層の体積比率に着眼し、この体積比率の変化率がハンドリング性の指標となることが判明した。

【００１１】

本実施形態において、上記Ｖ１／Ｖ２を上記上限値以下とすることにより、水分散時における糖鎖捕捉性ポリマー粒子の体積変化を抑制できるので、ハンドリング性を向上させることができる。例えば、水に分散中の糖鎖捕捉性ポリマー粒子をピペットなどで吸引する操作が容易になる。また、カラム等への充填率のバラツキを抑制できるため、本実施形態の糖鎖捕捉性ポリマー粒子を利用することにより、再現性に優れた糖鎖捕捉方法を実現することができる。

【００１２】

一方で、上記Ｖ１／Ｖ２を上記下限値以上とすることにより、糖鎖捕捉性ポリマー粒子の糖鎖捕捉性を向上させることができる。詳細なメカニズムは定かでないが、ある程度膨潤したポリマー層において、糖鎖を結合できる場をつくることができるため、糖鎖捕捉性を高めることができると考えられる。

【００１３】

ここで、上記特許文献１に記載には、タンパク質やヌクレオチドと結合可能なアクセプター基を表面に有するシリカ粒子が記載されている。このシリカ粒子は、ポリマー層（シランカップリング剤を除く）を有しない。このようなシリカ粒子の上記Ｖ１／Ｖ２は、シリカ粒子などの無機粒子は水分散時において膨潤しないとみなせるため、大きくても１．０５以下であると推察される。

【００１４】

また、本実施形態においては、糖鎖捕捉基を有するポリマー層を用いることにより、水中での糖鎖捕捉基の運動性が向上するので、より効率的に糖鎖を捕捉することができるだけでなく、より製造プロセス上のバラツキを抑制できるため、糖鎖捕捉性ポリマー粒子の製造安定性を向上させる。

【００１５】

このように本実施形態によれば、糖鎖捕捉性、製造安定性およびハンドリング性のバランスに優れた糖鎖捕捉性ポリマー粒子を提供することができる。

【００１６】

次に本実施形態の糖鎖捕捉性ポリマー粒子について詳細に説明する。

【００１７】

本実施形態の糖鎖捕捉性ポリマー粒子は、例えば、試料中の糖鎖を捕捉することができる。

【００１８】

本実施形態の糖鎖とは、糖がグリコシド結合によって結合した化合物であればよく、糖タンパク質や糖脂質等の複合糖質の一部である糖鎖であってもよい。

【００１９】

本明細書において「試料」とは、複合糖質及び又は糖鎖を含む溶液であって、例えば、生体試料、食品、有機合成された試料等が挙げられる。生体試料としては、例えば、血液、尿、及びその他の体液等が挙げられる。複合糖質が有機合成物である場合、試料は、例えば、反応触媒や反応中間体等を含んでいてもよい。複合糖質が酵素合成物である場合、複合糖質を含む溶液は、例えば、合成酵素等を含んでいてもよい。

また「試料中の糖鎖」とは、試料に含まれる複合糖質に結合した糖鎖、複合糖質から遊離させた糖鎖、及び試料に含まれる糖鎖を含む。試料が複合糖質を含む場合、必要に応じて、公知の糖鎖遊離方法を用いて複合糖質から糖鎖を遊離させてもよく、複合糖質から糖鎖を遊離させた後の試料を、本明細書における試料とすることもできる。「複合糖質から遊離させた糖鎖」とは、複合糖質を酵素又は化学処理することによって複合糖質から遊離させた糖鎖の一部又は全部（以下、「遊離糖鎖」ともいう）、及び複合糖質を切断して得られた単糖、及び遊離糖鎖を分解して得られた単糖を含む。

【００２０】

本明細書において「複合糖質」とは、糖鎖と糖鎖以外の物質とが結合した物質のことをいう。本明細書において「糖鎖」とは、１以上の単糖及び又は単糖の誘導体が鎖状にグリコシド結合により結合した分子のことをいい、単糖であってもよいし、２糖以上の糖鎖であってもよい。複合糖質としては、例えば、糖アミノ酸、糖ペプチド、糖タンパク質、糖脂質、グルコサミノグリカン、プロテオグリカン、グリコシルホスファチジルイノシトール、ペプチドグリカン、リポ多糖、及びそれらの誘導体等が挙げられる。複合糖質としては、例えば、生体由来物質、有機合成物、及び酵素合成物等が挙げられる。生体由来物質としては、例えば、組織由来物質、動物細胞由来物質、及び体液由来物質等が挙げられる。

【００２１】

本明細書において「試料中の糖鎖を捕捉する」とは、糖鎖捕捉性ポリマー粒子によって試料中の糖鎖を捕らえること、及び試料中の糖鎖を糖鎖捕捉性ポリマー粒子に結合させることを含む。中でも、試料中の糖鎖を糖鎖捕捉性ポリマー粒子に結合させることが好ましく、より好ましくは試料中の糖鎖を糖鎖捕捉性ポリマー粒子とヒドラゾン結合、オキシム結合又はアミド結合によって結合させることであり、捕捉効率及び収率の点からは、ヒド

ラゾン結合又はオキシム結合によって結合させることがさらに好ましい。
本明細書において「糖鎖を遊離させる」とは、糖鎖捕捉性ポリマー粒子に結合させた糖鎖を単糖に分解すること、また結合させた糖鎖を糖鎖捕捉性ポリマー粒子から切り出すことを含む。
【００２２】
本実施形態の糖鎖捕捉性ポリマー粒子は、例えば、糖タンパク質の捕捉に用いることができる。これにより、効率的に糖タンパク質を精製することが可能となる。この場合、糖タンパク質を含有する試料とは、例えば、全血、血清、血漿、尿、唾液、細胞、組織などの生体試料を用いることができる。また、精製された、あるいは未精製の糖タンパク質を用いることができる。糖タンパク質における糖鎖は、Ｏ型糖鎖であっても、Ｎ型糖鎖であってもよい。上記試料は、脱脂、脱塩、タンパク質分画などの方法により前処理されていてもよい。
【００２３】
本実施形態の糖鎖捕捉基は、糖鎖や糖の誘導体を捕捉するための官能基であればよく、糖鎖を特異的に結合する点から、反応性の一級アミノ酸を用いることができる。反応性の一級アミノ酸としては、例えば、オキシルアミノ基、ヒドラジド基、アミノ基、及びセミチオカルバジド基並びにそれらの誘導体が挙げられる。これらの中でも、糖鎖還元末端であるアルデヒド基をより特異的に結合する観点から、オキシルアミノ基、又はヒドラジド基が好ましい。また、糖鎖を捕捉しやすいだけでなく再遊離もさせやすいことから、ヒドラジド基が好ましい。
【００２４】
本実施形態における糖鎖捕捉性ポリマー粒子において、乾燥時における糖鎖捕捉基の密度の下限値は、例えば、１ｎｍｏｌ／ｍｇ以上でもよく、１００ｎｍｏｌ／ｍｇ以上でもよく、５００ｎｍｏｌ／ｍｇ以上でもよい。これにより、糖鎖捕捉性の効率を高めることができる。また、上記糖鎖捕捉基の密度の上限値は、特に限定されないが、例えば、４０００ｎｍｏｌ／ｍｇ以下としてもよく、３５００ｎｍｏｌ／ｍｇ以下としてもよく、３３００ｎｍｏｌ／ｍｇ以下としてもよい。これにより、糖鎖の捕捉性能を向上させることができる。測定方法としては、２，４，６－トリニトロベンゼンスルホン酸法（ＴＮＢＳ法）を用いたアミノ基の定量が挙げられる。
【００２５】
本実施形態において、糖鎖捕捉性ポリマー粒子は、糖鎖捕捉基を有するポリマー層を有する構造であれば特に限定されないが、例えば、糖鎖捕捉基を有するポリマー層からなる樹脂粒子、糖鎖捕捉基を有するポリマー層を表面に有する樹脂粒子、糖鎖捕捉基を有するポリマー層を表面に有する無機粒子のいずれかであってもよい。また、本実施形態において、ポリマー層は、架橋構造を有していてもよく、架橋構造を有していなくてもよい。
【００２６】
本実施形態において、樹脂粒子としては、特に限定されないが、例えば、アガロースやセファロース等の多糖類ゲルからなるゲル粒子、アクリル粒子、ポリスチレン粒子等の固体樹脂粒子が挙げられる。このような樹脂粒子は、ポリマー層の構成材料と同種また異種のいずれの樹脂材料で構成されていてもよい。この中でも、製造プロセス効率性の観点から、上記樹脂粒子は、ポリマー層の構成材料と同種の材料で構成されていることが好ましく、糖鎖捕捉基を有するポリマー層からなる樹脂粒子であることが好ましい。
【００２７】
本実施形態において、無機粒子としては、特に限定されないが、例えば、磁性粒子、シリカ粒子、アルミナ粒子等のセラミック粒子、ガラス粒子、金属粒子などが挙げられる。
【００２８】
本実施形態の糖鎖捕捉性ポリマー粒子の形状は、特に限定しないが、球状でもよく、略球状でもよく、不定形でもよい。たとえば、球状の場合、糖鎖捕捉性ポリマー粒子の平均粒径は、好ましくは０．０５μｍ以上１０００μｍ以下であり、より好ましくは０．０５μｍ以上５００μｍ以下であり、さらに好ましくは０．１μｍ以上２００μｍ以下であり

、最も好ましくは０．１μｍ以上１００μｍ以下である。平均粒径を上記下限値以上とすることにより、糖鎖捕捉性ポリマー粒子をカラムに充填する際、通液性の低下を抑制できる。また、糖鎖捕捉性ポリマー粒子を遠心分離やろ過で回収しやすくなる。平均粒径を上記上限値以下とすることにより、糖鎖の精製効率を向上させることができる。本実施形態において、糖鎖捕捉性ポリマー粒子の平均粒径は、例えば、数平均直径とすることができる。

【００２９】

本実施形態において、ポリマー層は、特に限定されないが、例えば、（メタ）アクリルモノマー、ビニルモノマー、アリルモノマー、（メタ）アクリルアミドモノマー、またはビニルアミドモノマーのいずれかに由来する構成単位を含有してもよい。これらを一種または二種以上含有してもよい。

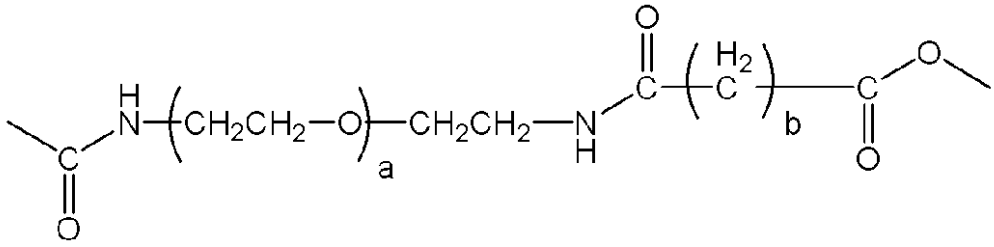
【００３０】

ポリマー層は、下記構造式Ａ１～Ａ５で表される構造単位を有していてもよく、さらに還元糖鎖と反応するヒドラジド基を有する構造とする場合、ポリマー化の後末端を１０体積パーセント以上の濃度のヒドラジン溶液処理を行うことで一部または全てをヒドラジド基に置換したポリマーを得られる。

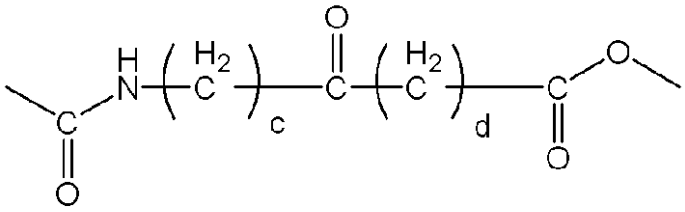
なお、下記構造式Ａ１～Ａ３中、ａ、ｂ、ｄは１から５の整数を表し、ｃは１から１０の整数を表す。下記構造式Ａ４中、R_1は、－Ｏ－、－Ｓ－、－ＮＨ－、－ＣＯ－、及び－ＣＯＮＨ－からなる群から選択される少なくとも１つで中断されてもよい炭素数０～３０の炭化水素鎖を示し、R_2はＨ、CH_3又は炭素数２～５の炭化水素鎖を示す。また、下記構造式Ａ５中、R_2はＨ、CH_3又は炭素数２～５の炭化水素鎖、ｎは０から３０の整数を示す。

【００３１】

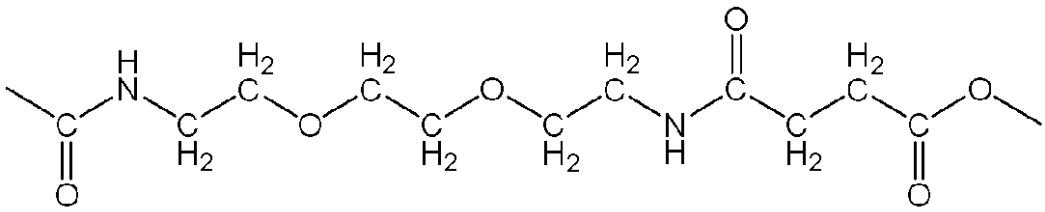
【化１】



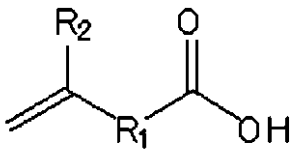
A1



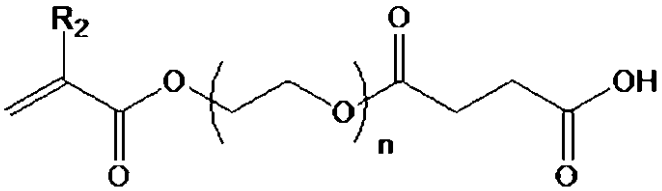
A2



A3



A4



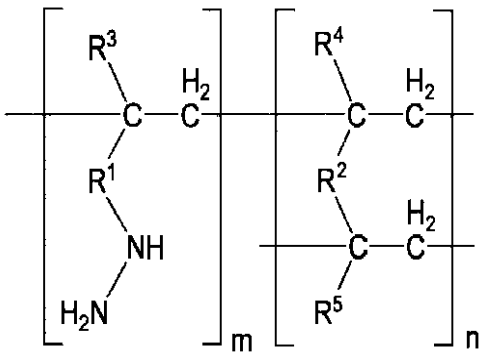
A5

【００３２】

また、本実施形態のポリマー層は架橋構造を有していてもよい。このようなポリマー層は、下記一般式（１）で表される構造単位を有してもよい。

【００３３】

【化２】



(1)

【００３４】

一般式（１）中、R^1及びR^2は同一又は異なり－Ｏ－、－Ｓ－、－ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）－及び－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－からなる群から選択される少なくとも一つが挿入されていてもよい炭素数１～２０の炭化水素鎖を示し、R^3、R^4及びR^5は同一又は異なり水素

原子、メチル基、又は炭素数２～５の炭化水素鎖を示し、ｍ及びｎはモノマーユニット数の比率を示す。

【００３５】

一般式（１）中、上記ｍとｎの比率は、例えば、ｍ：ｎ＝（８０～９９）：（２０～１）としてもよく、好ましくは（８５～９９）：（１５～１）としてもよい。

【００３６】

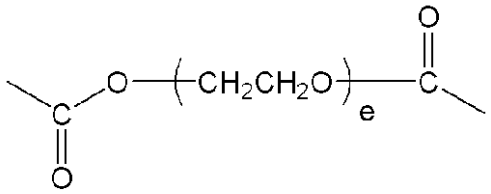
一般式（１）中、上記Ｒ^{1}は、－Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－及び－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－からなる群から選択される少なくとも一つが挿入された炭素数１～２０の炭化水素鎖が好ましく、より好ましくは少なくとも－Ｃ（＝Ｏ）－及び－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－のいずれかまたは両方が挿入された炭素数１～２０の炭化水素鎖である。例えば、上記Ｒ^{1}は、上記構造式Ａ１～Ａ３で表される構造単位のいずれかを有していてもよい。

【００３７】

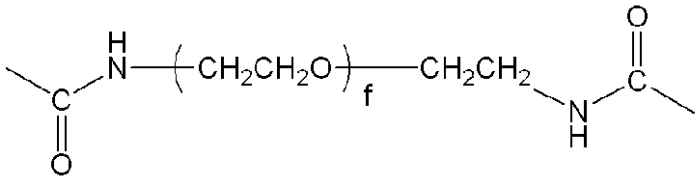
一般式（１）中、上記Ｒ^{2}は、－Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－及び－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－からなる群から選択される少なくとも一つが挿入された炭素数１～２０の炭化水素鎖が好ましい。例えば、上記Ｒ^{2}は、下記構造式Ｂ１～Ｂ４で表される構造単位のいずれかを有していてもよい。下記構造式Ｂ１～Ｂ４中、ｅ、ｆは１から５の整数を表し、ｇは１から１０の整数を表す。

【００３８】

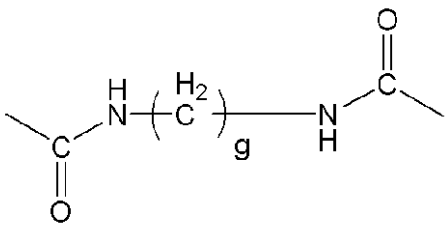
【化３】



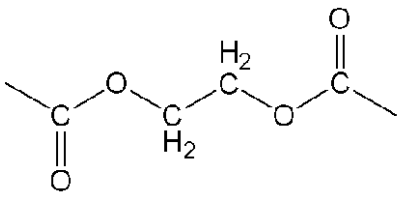
B1



B2



B3



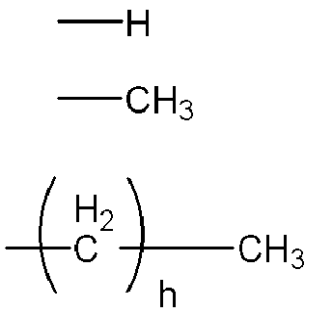
B4

【００３９】

上記構造式Ｂ１～Ｂ４中、Ｒ^{3}、Ｒ^{4}及びＲ^{5}は、それぞれ独立して、水素原子、メチル基、又は炭素数２～５の炭化水素鎖を示し、好ましくは水素原子、メチル基、炭素数２～５のアルキル基である。例えば、Ｒ^{3}、Ｒ^{4}及びＲ^{5}は、下記式で示される置換基のいずれかであってもよい。下記式中、ｈは１から４の整数を表す。

【００４０】

【化４】

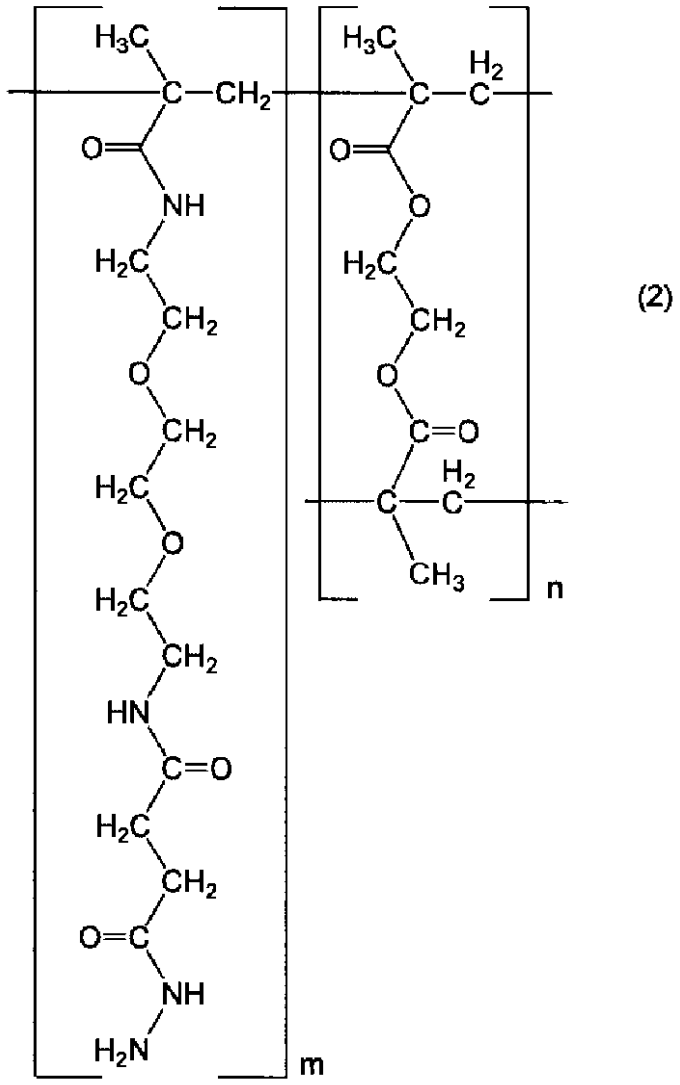


【００４１】

また、本実施形態において、上記一般式（１）で表される構成単位は、これらの中でも、下記式（２）で表される構成単位であってもよい。式（２）においてｍ及びｎは式（１）と同様である。

【００４２】

【化５】



(2)

【００４３】

このような架橋構造を有するポリマー層は、特に限定されないが、例えば、架橋剤を用いて作製することができる。具体的には、不飽和結合等の重合性基を含むモノマー（例えば、カルボン酸エステルモノマー等）を含む原料を架橋剤存在下で重合させる。このときのポリマー層は粒子形状でもよい。この後、ポリマー層を所定濃度の糖鎖捕捉基成分含有

溶液（たとえばヒドラジン溶液等）で処理することにより得ることができる。
このようなポリマー層は、下記のような構造をとるものを用いることができる。
－（ヒドラジド基等の糖鎖捕捉基含有化合物成分）ｍ－（架橋剤成分）ｎ－
【００４４】
上記架橋剤成分としては、多官能の化合物であって、カルボン酸エステルモノマーと共重合を行う化合物を好適に用いることができ、例えば（１）ポリオールのジまたはトリ（メタ）アクリル酸エステル類、例えばポリオールがエチレングリコール、プロピレングリコール、トリメチロールプロパン、グリセリン、ポリオキシエチレングリコール、ポリオキシプロピレングリコール、ポリグリセリン等であるもの、（２）上記（１）において、不飽和酸が（メタ）アクリル酸以外のもの、例えばマレイン酸、フマル酸などであるもの、（３）ビスアクリルアミド類、例えばＮ，Ｎ’－メチレンビスアクリルアミドなど、（４）ポリエポキシドと（メタ）アクリル酸を反応させて得られるジまたはトリ（メタ）アクリル酸エステル類、（５）ポリイソシアネートと（メタ）アクリル酸ヒドロキシエステルを反応させて得られるジ（メタ）アクリル酸カルバミルエステル類、例えばポリイソシアネートがトリレンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソシアネートなどであるもの、（６）多価アリル化合物、例えばアリル化デンプン、アリル化セルロース、ジアリルフタレート、テトラアリロキシエタン、ペンタエリストールトリアリルエーテル、トリメチロールプロパントリアリルエーテル、ジエチレングリコールジアリルエーテル、トリアリルトリメリテート等が挙げられる。これらの中でも、本実施形態では、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、Ｎ，Ｎ’－メチレンビス（メタ）アクリルアミド等が好ましい。
本明細書において、（メタ）アクリレートモノマー（（メタ）アクリル酸エステル類）とは、アクリレート、メタクリレートまたはこれらの混合物を表し、アクリル基を１以上有する、またはメタクリル基を１以上有するモノマーを用いることができる。本実施形態において、（メタ）アクリレートモノマーは、単官能モノマーまたは多官能モノマーのいずれでもよいが、２以上の多官能モノマーを少なくとも含有することができる。
【００４５】
本実施形態の糖鎖捕捉性ポリマー粒子において、ポリマー層の側鎖を長鎖とすることにより、水中での運動性を高め、糖鎖の捕捉力を向上させることができる。また、このような側鎖を親水性とすることにより、糖鎖と接近しやすくなり、糖鎖の捕捉効率を高めることができる。さらに、このようなポリマー層からなる粒子が水中で膨潤することにより、糖鎖捕捉能を発揮する有効な表面積を増大させることができるため、糖鎖の捕捉効率を向上させることができる。
【００４６】
次いで、本実施形態の糖鎖捕捉性ポリマー粒子の特性について説明する。
本実施形態の糖鎖捕捉性ポリマー粒子において、水分散時におけるポリマー層の体積をＶ１（μｍ^3）とし、乾燥時におけるポリマー層の体積をＶ２（μｍ^3）としたとき、乾燥時に対する水分散時のポリマー層の体積比率であるＶ１／Ｖ２が以下の所定の範囲内となることが好ましい。
【００４７】
上記Ｖ１／Ｖ２の下限値は、１．７０以上であり、１．７５以上が好ましく、より好ましくは２．００以上でもよく、さらに好ましくは２．５０以上でもよい。これにより、糖鎖捕捉性ポリマー粒子の糖鎖捕捉性を向上させることができる。一方で、上記Ｖ１／Ｖ２の上限値は、１２．２０以下であり、１２．０５以下が好ましく、より好ましくは１０．００以下でもよく、さらに好ましくは９．００以下でもよく、一層好ましくは６．００以下でもよい。これにより、糖鎖捕捉性ポリマー粒子のハンドリング性を向上させることができる。
【００４８】
また、本実施形態の糖鎖捕捉性ポリマー粒子において、水分散時におけるポリマー層の膜厚をＤ１（μｍ）とし、乾燥時におけるポリマー層の膜厚をＤ２（μｍ）としたとき、

乾燥時に対する水分散時のポリマー層の膜厚比率であるＤ１／Ｄ２が所定の範囲内となることが好ましい。

【００４９】

上記Ｄ１／Ｄ２の下限値は、例えば、１．２０以上であり、１．４０が以上好ましく、より好ましくは１．７０以上でもよい。これにより、糖鎖捕捉性ポリマー粒子の糖鎖捕捉性を向上させることができる。一方で、上記Ｄ１／Ｄ２の上限値は、例えば、２．３０以下であり、２．００以下が好ましく、１．９０以下がより好ましい。これにより、糖鎖捕捉性ポリマー粒子のハンドリング性を向上させることができる。

【００５０】

本実施形態において、ポリマー層の膜厚や体積は、次のような条件を踏まえて測定することが好ましい。

糖鎖捕捉性ポリマー粒子が糖鎖捕捉基を有するポリマー層からなる樹脂粒子である場合、当該樹脂粒子の半径をポリマー層の膜厚とみなす。

水分散時や乾燥時における糖鎖捕捉性ポリマー粒子の直径は、顕微鏡観察による数平均直径から算出する。すなわち、樹脂粒子を液温２５℃の純水中に分散させた状態で、水分散時の数平均膜厚Ｄ１を測定し、その後、真空乾燥を行い、乾燥時の数平均膜厚Ｄ２を測定する。Ｖ１／Ｖ２は、（Ｄ１／Ｄ２）の３乗の値として算出できる。

糖鎖捕捉性ポリマー粒子が糖鎖捕捉基を有するポリマー層を表面に有する無機粒子である場合、シリカ粒子などの無機粒子は、水分散時と乾燥時とで体積や半径が変更しないものとみなす。このとき、無機粒子の表面におけるポリマー層の体積の算出方法としては、ポリマー層が存在する状態で無機粒子の体積を測定し、当該ポリマー層を焼いた後の無機粒子の体積を測定し、これらの体積の差分をポリマー層の体積とする。この測定は、例えば示差熱熱重量同時測定装置（ＴＧ／ＤＴＡ）等で測定することが出来る。

【００５１】

このように本実施形態の糖鎖捕捉性ポリマー粒子においては、乾燥時に対する水分散時のポリマー層の膨潤度合いを適切に制御することで、糖鎖捕捉性、製造安定性およびハンドリング性のバランスに優れた糖鎖捕捉性ポリマー粒子を提供することができる。

【００５２】

ここで、このようなポリマー層の膨潤度合いは、上記Ｖ１／Ｖ２や上記Ｄ１／Ｄ２が指標となる。本実施形態では、たとえば糖鎖捕捉性ポリマー粒子中のポリマー層に含まれる各成分の種類や配合量、ポリマー層の調製方法等を適切に選択することにより、上記Ｖ１／Ｖ２や上記Ｄ１／Ｄ２を制御することが可能である。これらの中でも、たとえば、ポリマー層の分子量や架橋密度、糖鎖捕捉基の密度、ポリマー層の疎水度合い、全体の平均粒径を適切に調整すること等が、上記Ｖ１／Ｖ２や上記Ｄ１／Ｄ２を所望の数値範囲とするための要素として挙げられる。

【００５３】

次に、本実施形態の糖鎖捕捉性ポリマー粒子を用いた糖鎖試料の調製方法を説明する。

本実施形態の糖鎖試料の調製方法としては、具体的には（ａ）糖鎖を含む試料を糖鎖捕捉性ポリマー粒子に接触させ、当該糖鎖を当該糖鎖捕捉性ポリマー粒子に捕捉する工程と、（ｂ）糖鎖を捕捉した糖鎖捕捉性ポリマー粒子を洗浄する工程と、（ｃ）糖鎖を捕捉した糖鎖捕捉性ポリマー粒子から糖鎖を遊離させる工程とを含むことができる。また、必要に応じて任意のラベル化試薬で糖鎖の標識化を行ってもよい。

本実施形態の糖鎖捕捉性ポリマー粒子を用いて調製した試料は、液体クロマトグラフィーやマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦＭＳ）等の各種分析方法に好適に用いることができる。

【００５４】

本実施形態において、糖鎖を捕捉する糖鎖捕捉性ポリマー粒子によって糖鎖を捕捉する際の反応系のｐＨは、例えば、好ましくは２～９、より好ましくは２～７であり、さらに好ましくは２～６である。ｐＨ調整のためには、各種緩衝液を用いることができる。糖鎖捕捉時の温度は、好ましくは４～９０℃、より好ましくは４～８０℃、さらに好ましくは

３０～８０℃であり、最も好ましくは４０～８０℃である。反応時間は適宜設定することができる。糖鎖捕捉性ポリマー粒子をカラムに充填して試料溶液を通過させてもよい。

【００５５】

以上、図面を参照して本発明の実施形態について述べたが、これらは本発明の例示であり、上記以外の様々な構成を採用することもできる。

【実施例】

【００５６】

以下、本発明について実施例を参照して詳細に説明するが、本発明は、これらの実施例の記載に何ら限定されるものではない。

【００５７】

［実施例１］

［カルボキシル基を有する粒子の合成］

メタクリル酸（和光純薬工業株式会社製）４．３ｇ（５０ｍｍｏｌ）、エチレングリコールジメタクリレート（和光純薬工業株式会社製）０．２ｇ（１ｍｍｏｌ）、純水１ｍＬを混合し、さらにペルオキソ二硫酸カリウム２７ｍｇ（０．１ｍｍｏｌ）を加えモノマー溶液を作製した。０．１ｗｔ％ソルビタンモノステアレートのシクロヘキサン溶液１００ｍＬにモノマー溶液を添加し、撹拌しながら２０分間窒素ガスでバブリングした。撹拌とバブリングを継続しながら６０℃で１６時間加熱した後、純水で洗浄し、カルボキシル基を有する粒子を得た。

【００５８】

［粒子のヒドラジド化］

５０μＬ／ｍＬのヒドラジン一水和物溶液（ＰＢＳバッファにヒドラジン一水和物を溶解しＨＣｌでｐＨ５．８に調製）１０ｍＬに水溶性カルボジイミド０．１ｇを溶解した。この溶液に前記カルボキシル基を有する粒子を１ｇ添加し、３７℃で２時間転倒混和した。水洗後、粒子を１Ｎ　ＨＣｌに分散した。遠心分離して上清を除去し、さらに水洗を繰り返した。凍結乾燥してヒドラジド化したポリマー粒子を得た。

【００５９】

［実施例２］

エチレングリコールジメタクリレートを０．４ｇ（２ｍｍｏｌ）にした以外は実施例１と同様に実施例２のポリマー粒子を作製した。

【００６０】

［実施例３］

エチレングリコールジメタクリレートを０．１６ｇ（０．８ｍｍｏｌ）にした以外は実施例１と同様に実施例３のポリマー粒子を作製した。

【００６１】

［実施例４］

エチレングリコールジメタクリレートを１．０ｇ（５ｍｍｏｌ）にした以外は実施例１と同様に実施例４のポリマー粒子を作製した。

【００６２】

［実施例５］

（担体表面への連鎖移動基の導入）

メルカプトプロピルジメチルメトキシシラン（東京化成工業株式会社製、Ｍ０９２８）０．５ｍＬをｐＨ３．０の酢酸水溶液２５ｍＬとエタノール２５ｍＬとの混合液に添加し、シランカップリング剤を加水分解した後に、シリカ粒子（平均粒径５μｍ、細孔径１０００Å、富士シリシア化学株式会社製ＳＭＢ１０００－５）５ｇを投入し７０℃で２時間攪拌した後、吸引ろ過により反応溶液からシリカ粒子を回収し、１００℃で１時間加熱した。その後、エタノールで分散させてよく振盪した後、遠心分離により上清を除去し乾燥させた。

【００６３】

（担体表面への重合体の化学結合）

メタクリル酸（和光純薬工業株式会社製）モノマー濃度は０．５ｍｏｌ／Ｌになるように純水に溶解させ、モノマー混合溶液を作製した。そこに過硫酸カリウムを０．０１ｍｏｌ／Ｌになるように添加し、均一になるまで撹拌した。その後、上記の連鎖移動基を導入したシリカ粒子０．５ｇを投入し、アルゴンガス雰囲気下、７０℃で２２時間反応させた。次いで、遠心分離により反応溶液からシリカ粒子を回収し、純水に分散させ、よく振盪した後、吸引ろ過により粒子を回収し、乾燥させた。

【００６４】

（ヒドラジド基の導入）

得られた粒子全量を容器にとり、ヒドラジン一水和物（原液、９８体積％以上）３ｍＬを加えて撹拌し、室温で２時間静置した。反応後、ヒドラジン一水和物を除去し、メタノールで洗浄したのち、１Ｍ塩酸でリンスした。その後さらに純水で洗浄・乾燥し、実施例５の粒子を得た。

【００６５】

［比較例１］

エチレングリコールジメタクリレートを０．０８ｇ（０．４ｍｍｏｌ）にした以外は実施例１と同様に比較例１のポリマー粒子を作製した。

【００６６】

［比較例２］

メタクリル酸メチル（和光純薬工業株式会社製）４．３ｇ（５０ｍｍｏｌ）、メタクリル酸（和光純薬工業株式会社製）０．１７ｇ（２ｍｍｏｌ）、エチレングリコールジメタクリレート（和光純薬工業株式会社製）０．２ｇ（１ｍｍｏｌ）、クロロホルム５ｍＬを混合し、さらに２，２’－アゾビス（イソブチロニトリル）１６ｍｇ（０．１ｍｍｏｌ）を加えモノマー溶液を作製した。０．１ｗｔ％ポリビニルアルコール水溶液１００ｍＬにモノマー溶液を添加し、撹拌しながら２０分間窒素ガスでバブリングした。撹拌とバブリングを継続しながら６０℃で１６時間加熱した後、純水で洗浄し、カルボキシル基を有する粒子を得た。

【００６７】

［粒子のヒドラジド化］

５０μＬ／ｍＬのヒドラジン一水和物溶液（ＰＢＳバッファにヒドラジン一水和物を溶解しＨＣｌでｐＨ５．８に調製）１０ｍＬに水溶性カルボジイミド０．１ｇを溶解した。この溶液に前記カルボキシル基を有する粒子を１ｇ添加し、３７℃で２時間転倒混和した。水洗後、粒子を１Ｎ　ＨＣｌに分散した。遠心分離して上清を除去し、さらに水洗を繰り返した。凍結乾燥してヒドラジド化したポリマー粒子を得た。

【００６８】

【表１】

表1

	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5	比較例1	比較例2
V1/V2	5.29	2.80	12.03	1.76	2.92	16.10	1.48
水分散時の数平均膜厚D1（μm）	58.90	45.80	87.30	37.80	0.010	88.60	48.00
乾燥時の数平均膜厚D2（μm）	33.80	32.50	38.10	31.30	0.007	35.10	42.10
D1/D2	1.74	1.41	2.29	1.21	1.43	2.52	1.14
糖鎖捕捉性	○	○	○	○	○	－	×
ハンドリング性	○	○	○	○	○	×	○

【００６９】

得られた粒子のポリマー層について、水分散時の数平均膜厚Ｄ１、乾燥時の数平均膜厚Ｄ２、水分散時の数平均体積Ｖ１、乾燥時の数平均体積Ｖ２を、以下のようにして算出した。

ポリマー層からなる樹脂粒子の場合、樹脂粒子の半径をポリマー層の膜厚とした。数平均膜厚は、顕微鏡観察により算出した。すなわち、得られた樹脂粒子を液温２５℃の純水中に分散させた状態で、水分散時の数平均膜厚Ｄ１を測定し、その後、真空乾燥を行い、乾燥時の数平均膜厚Ｄ２を測定した。また、シリカ粒子は、水分散時と乾燥時とで体積や半径が変更しないものとみなした。シリカ粒子の表面におけるポリマー層の体積の算出方法は、ポリマー層が存在する状態でシリカ粒子の体積を測定し、当該ポリマー層を焼いた後のシリカ粒子の体積を測定し、これらの体積の差分をポリマー層の体積とした。

以上により、Ｄ１，Ｄ２を測定した。Ｖ１／Ｖ２は（Ｄ１／Ｄ２）の３乗の値として算

出した。結果を表１に示す。
【００７０】
＜ハンドリング性の評価＞
得られた粒子５０ｍｇを純水５００μＬに分散させたところ、実施例１～５および比較例２の粒子は均一に分散させることができたが、比較例１の粒子は粒子同士が凝集していた。
また、得られた粒子５０ｍｇを純水５００μＬに分散させて分散液を調製し、２μＬ～２００μＬ用ピペットチップを用いて、分散液中のポリマー粒子に対する吸引操作について評価を行った。糖鎖捕捉実験には粒子を５ｍｇ使用することから、吸引量は５０μＬとした。
実施例１～５および比較例２の粒子については、２μＬ～２００μＬ用のピペットチップを用いて、分散液中のポリマー粒子を吸引することができ、ディスポカラムに分注できた。しかし、比較例１の粒子については、２μＬ～２００μＬ用ピペットチップを用いて、分散液中のポリマー粒子を吸引することができなかった。したがって、比較例１の粒子については、分注の後の実験を遂行することができなかった。評価結果を表１に示す。表１中、ハンドリング性が良好な場合を○とし、ハンドリング性が十分ではない場合を×とした。
【００７１】
＜糖鎖捕捉性の評価＞
［ウシ血清由来ＩｇＧの糖鎖分析］
１．生体試料の予備処理
ウシ血清由来ＩｇＧ１ｍｇを１００ｍＭ重炭酸アンモニウム５０μＬに溶解させた後、１２０ｍＭ　ＤＴＴ（ジチオスレイトール）を５μＬ加え、６０℃で３０分間反応させた。反応終了後、１２３ｍＭ　ＩＡＡ（ヨードアセトアミド）１０μＬを加えて遮光下、室温で１時間反応させた。続いて４００Ｕのトリプシンによってプロテアーゼ処理をし、タンパク質部分をペプチド断片化した。反応溶液を９０℃で５分処理した後、５Ｕのグリコシダーゼ Ｆによる処理を行って糖鎖をペプチドから遊離させ、予備処理済の生体試料を得た。
【００７２】
２．糖鎖捕捉工程（ａ）、洗浄工程（ｂ）
実施例１、２の粒子各５ｍｇが入ったディスポカラムおよび実施例３の粒子１０ｍｇが入ったディスポカラムに予備処理済の生体試料の懸濁物２０μＬ及び１８０μＬの２％酢酸／アセトニトリル溶液を加え、８０℃で１時間反応させた。反応は開放系で行い、溶媒が完全に蒸発し組成物が乾固した状態であることを目視で確認した。続いて、グアニジン溶液、純水、メタノール、トリエチルアミン溶液にてポリマー粒子を洗浄後、１０％無水酢酸／メタノールを添加し、室温で３０分間反応させ、未反応のヒドラジド基をキャッピングした。キャッピング後、純水にて組成物を洗浄した。
【００７３】
３．糖鎖遊離工程（ｃ）
次に該ディスポカラムに純水２０μＬ及び２％酢酸／アセトニトリル溶液１８０μＬを加え、７０℃で１．５時間反応させた。反応は開放系で行い、溶媒が完全に蒸発し組成物が乾固した状態であることを目視で確認した。
【００７４】
４．標識化工程（ｄ）
さらに、２－ａｍｉｎｏｂｅｎｚａｍｉｄｅ（２－ＡＢ）及びシアノ水素化ホウ素ナトリウムの終濃度がそれぞれ０．３５Ｍ、１Ｍになるように３０％酢酸／ＤＭＳＯ混合溶媒に溶解させて調整した溶液５０μＬを添加し、６０℃で２時間反応させた。
【００７５】
前記、糖鎖捕捉工程（ａ）、洗浄工程（ｂ）、糖鎖遊離工程（ｃ）、及び標識化工程（ｄ）は同一の容器であるディスポカラム内で行なった。

【００７６】
５．余剰試薬除去工程
反応溶液５０μＬを回収し、アセトニトリルで１０倍に希釈した後、シリカゲル（Ｉａｔｒｏｂｅａｄｓ、６ＲＳ－８０６０、三菱化学ヤトロン社製）を詰めたカラムに添加してシリカゲルに標識糖鎖を吸着させた。アセトニトリル、アセトニトリル／水混合溶液（９５：５）にてカラムを洗浄後、純水５０μＬにて標識糖鎖を回収した。
【００７７】
６．標識化糖鎖の検出
得られた標識糖鎖をＨＰＬＣにて測定した。アミノカラム（Ｓｈｏｄｅｘ　Ａｓａｈｉｐａｋ　ＮＨ２Ｐ－５０）を用いて励起波長３３０ｎｍ、蛍光波長４２０ｎｍにて測定した。その結果、実施例１～５いずれの場合も、２ＡＢにより標識化された糖鎖が検出された。一方、比較例１については、ピペットで吸引することができず、分注不可であったため、糖鎖捕捉性の評価試験を実施することができなかった。結果を表１に示す。表１中、標識化糖鎖が十分に検出され、良好な糖鎖捕捉性を示す場合を○とし、標識化糖鎖の検出が十分ではない場合を×とし、分注不可により糖鎖捕捉性の評価試験が実施できなかった場合を－とした。
【００７８】
以上、実施例に基づいて本発明をさらに具体的に説明したが、これらは本発明の例示であり、上記以外の様々な構成を採用することもできる。
【手続補正書】
【提出日】平成29年9月21日(2017.9.21)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
糖鎖捕捉基を有するポリマー層、を備える糖鎖捕捉性ポリマー粒子であって、
水分散時における前記ポリマー層の体積をＶ１（μｍ^3）とし、
乾燥時における前記ポリマー層の体積をＶ２（μｍ^3）としたとき、
Ｖ１／Ｖ２が１．７以上１２．２以下であり、
前記糖鎖捕捉基が、ヒドラジド基またはオキシルアミノ基のいずれかである、糖鎖捕捉性ポリマー粒子。
【請求項２】
請求項１に記載の糖鎖捕捉性ポリマー粒子であって、
水分散時における前記ポリマー層の膜厚をＤ１（μｍ）とし、
乾燥時における前記ポリマー層の膜厚をＤ２（μｍ）としたとき、
Ｄ１／Ｄ２が１．２以上２．３以下である、糖鎖捕捉性ポリマー粒子。
【請求項３】
請求項１または２に記載の糖鎖捕捉性ポリマー粒子であって、
前記ポリマー層は、（メタ）アクリルモノマー、ビニルモノマー、アリルモノマー、（メタ）アクリルアミドモノマー、またはビニルアミドモノマーのいずれかに由来する構成単位を含有する、糖鎖捕捉性ポリマー粒子。
【請求項４】
請求項１から３のいずれか１項に記載の糖鎖捕捉性ポリマー粒子であって、
乾燥時における前記糖鎖捕捉基の密度が、１ｎｍｏｌ／ｍｇ以上４０００ｎｍｏｌ／ｍｇ以下である、糖鎖捕捉性ポリマー粒子。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】０００６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０００６】
本発明によれば、
糖鎖捕捉基を有するポリマー層、を備える糖鎖捕捉性ポリマー粒子であって、
水分散時における前記ポリマー層の体積をＶ１（μｍ^3）とし、
乾燥時における前記ポリマー層の体積をＶ２（μｍ^3）としたとき、
Ｖ１／Ｖ２が１．７以上１２．２以下であり、
前記糖鎖捕捉基が、ヒドラジド基またはオキシルアミノ基のいずれかである、糖鎖捕捉性ポリマー粒子が提供される。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００５５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００５５】
以上、図面を参照して本発明の実施形態について述べたが、これらは本発明の例示であり、上記以外の様々な構成を採用することもできる。
以下、参考形態の例を付記する。
１．　糖鎖捕捉基を有するポリマー層、を備える糖鎖捕捉性ポリマー粒子であって、
水分散時における前記ポリマー層の体積をＶ１（μｍ^3）とし、
乾燥時における前記ポリマー層の体積をＶ２（μｍ^3）としたとき、
Ｖ１／Ｖ２が１．７以上１２．２以下である、糖鎖捕捉性ポリマー粒子。
２．　１．に記載の糖鎖捕捉性ポリマー粒子であって、
水分散時における前記ポリマー層の膜厚をＤ１（μｍ）とし、
乾燥時における前記ポリマー層の膜厚をＤ２（μｍ）としたとき、
Ｄ１／Ｄ２が１．２以上２．３以下である、糖鎖捕捉性ポリマー粒子。
３．　１．または２．に記載の糖鎖捕捉性ポリマー粒子であって、
前記ポリマー層は、（メタ）アクリルモノマー、ビニルモノマー、アリルモノマー、（メタ）アクリルアミドモノマー、またはビニルアミドモノマーのいずれかに由来する構成単位を含有する、糖鎖捕捉性ポリマー粒子。
４．　１．から３．のいずれか１つに記載の糖鎖捕捉性ポリマー粒子であって、
乾燥時における前記糖鎖捕捉基の密度が、１ｎｍｏｌ／ｍｇ以上４０００ｎｍｏｌ／ｍｇ以下である、糖鎖捕捉性ポリマー粒子。
５．　１．から４．のいずれか１つに記載の糖鎖捕捉性ポリマー粒子であって、
前記糖鎖捕捉基が、ヒドラジド基またはオキシルアミノ基のいずれかである、糖鎖捕捉性ポリマー粒子。

フロントページの続き

Ｆターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA24 AA25 BA13 BB10 BB12 CA25 CA26 CB01
CB03 CB07 DA30 FA29 FB06 GC10
4G066 AA22C AC12B AC17B AC33B AC37B BA09 BA11 BA20 BA38 CA20
CA54 CA56 DA12 DA13 FA37