(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年6月14日(14.06.2018)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2018/105198 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 1/22 (2006.01)　*B01J 20/281* (2006.01)
B01D 15/36 (2006.01)　*C07K 7/64* (2006.01)
B01D 15/38 (2006.01)　*C07K 16/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2017/033642

(22) 国際出願日：　2017年9月19日(19.09.2017)

(25) 国際出願の言語：　日本語

(26) 国際公開の言語：　日本語

(30) 優先権データ：
特願 2016-239536　2016年12月9日(09.12.2016)　JP

(71) 出願人: 富士フイルム株式会社(**FUJIFILM CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布２丁目２６番３０号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 木原 史織(**KIHARA Shiori**); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島５７７番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 中島 順子, 外(**NAKASHIMA Junko** et al.); 〒2500111 神奈川県南足柄市竹松１２５０番地 ＦＦＴＰＭ０棟６Ｆ Kanagawa (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

WO 2018/105198 A1

(54) **Title:** MIXED MODE AFFINITY CHROMATOGRAPHY CARRIER

(54) 発明の名称： ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体

(57) **Abstract:** Provided is a mixed mode affinity chromatography carrier which has an excellent antibody adsorption capacity, and excellent impurity removal capability and drug resistance. The mixed mode affinity chromatography carrier comprises a substrate, a hydrophilic polymer, an antibody-binding cyclic peptide, and a cation exchange group.

(57) 要約：抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性のいずれにも優れたミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体を提供する。基材と、親水性ポリマーと、抗体結合性環状ペプチドと、陽イオン交換基と、を有するミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

明　細　書

発明の名称 ：

ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体

技術分野

[0001] 本発明は、ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体に関する。

背景技術

[0002] 近年、遺伝子工学、タンパク質工学および細胞工学の発展に伴い、抗体医薬品と呼ばれる、抗体の有する機能を利用した医薬品の開発が盛んに行われている。抗体医薬品は、従来の医薬品と比べて、標的分子に対してより特異的に働くために、副作用をより軽減させ、かつ、高い治療効果が得られることが期待されており、実際に様々な病態の改善に寄与している。

[0003] 一方、抗体医薬品は、生体に大量に投与されることから、他の組み換えタンパク質医薬品と比べた場合に、その純度が品質に与える影響は大きい。抗体医薬品は、遺伝子組換えにより宿主細胞に発現させた抗体を精製して製造されるため、宿主細胞および製造工程に由来する不純物の混入が問題となる。例えば、抗体医薬品に不純物として残留した宿主細胞由来タンパク質（ＨＣＰ；Ｈｏｓｔ　Ｃｅｌｌ　Ｐｒｏｔｅｉｎ）は、抗体医薬品投与時のアナフィラキシー発症との関連が疑われているため、精製純度を改善し、不純物を減少させることが求められている。

[0004] 例えば、特許文献１には、抗体アフィニティリガンドと陽イオン交換基を同一の分離マトリックスに有するミックスモード抗体アフィニティ分離マトリックスが記載されている（請求項１）。さらに、抗体アフィニティリガンドは、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Ａｒｐ、プロテインＦｃγＲ、抗体結合性合成リガンドおよびそれらの類縁物質から選択される少なくとも１種であることが記載されている（請求項５）。

[0005] また、例えば、特許文献２には、合成高分子支持体上に酸性基を含む基およびアフィニティリガンドを有することを特徴とする、ミックスモード用担体が記載されている（請求項１１）。さらに、抗体アフィニティリガンドとして、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Ａｒｐ、プロテインＦｃγＲ、抗体結合性合成ペプチドリガンドおよびそれら類縁物質が記載されている（＜００４３＞）。

[0006] また、例えば、特許文献３には、表面修飾多孔質架橋粒子に、相互作用性官能基を導入した分離剤が記載され（＜００１１＞）、相互作用性官能基として、イオン交換基；アフィニティリガンド；アルキル基、フェニル基およびポリアルキルエーテル基等の疎水基；が好ましく、このような相互作用性官能基を導入した分離剤は、特に蛋白質等の高分子物質の吸着剤として、とりわけクロマトグラフィー用分離剤として有効に用いることができること（＜００２６＞）が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第２０１４／０３４４５７号

特許文献2：特開２０１６－０６９３２９号公報

特許文献3：特開２０１３－０８８３９８号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 現在、抗体医薬品の精製は、アフィニティリガンドとしてプロテインＡを用いるアフィニティクロマトグラフィーによって行うことが一般的である。しかしながら、プロテインＡは黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ；スタフィロコッカス・アウレウス）由来のタンパク質であり、人体に対する免疫原性が高いことから、精製抗体中に混入して人体に投与された場合に、予期しない免疫応答を引き起こす場合がある。また、プロテインＡは、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）を用いて遺

伝子工学的方法により製造されるため、大腸菌由来のエンドトキシンであるＬＰＳ（Ｌｉｐｏｐｏｌｙｓａｃｃｈａｒｉｄｅ，リポ多糖；Ｌｉｐｉｄ Ａ，リピドＡ）が精製抗体中に混入するおそれもある。そのため、プロテインＡには高い精製度が求められており、これが抗体精製コストを高くする要因のひとつとなっている。

[0009] 本発明者は、ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体に用いるアフィニティリガンドとして、プロテインＡに比べて低コストで製造することができる抗体結合性ペプチドを用いることを着想し、抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性の検討を行った。

[0010] その結果、本発明者は、直鎖ペプチドをアフィニティリガンドとして用いたミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体では、抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性のうちいずれか１つ以上に改善の余地があることを知見した。例えば、後述する比較例２では、アフィニティリガンドとして直鎖ペプチドを用いているが、抗体吸着容量および薬品耐性が不十分であり、改善の必要があることが示されている。

[0011] そこで、本発明は、抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性のいずれにも優れたミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者は、上記目的を達成すべく鋭意検討を重ねた結果、基材と、親水性ポリマーと、環状ペプチドと、陽イオン交換基と、を有するミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体が、抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性のいずれにも優れることを知得し、本発明を完成させた。

[0013] すなわち、本発明は、次の［１］～［２１］を提供する。

［１］ 基材と、親水性ポリマーと、抗体結合性環状ペプチドと、陽イオン交換基と、を有するミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

［２］ 上記抗体結合性環状ペプチドは側鎖間の分子内架橋により環化し

た環状部を有する、上記［１］に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

［３］　上記分子内架橋が、ジスルフィド結合、チオエーテル結合、トリアゾール結合、およびアミド結合からなる群から選択される少なくとも１つを含む、上記［２］に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

［４］　上記分子内架橋が、ジスルフィド結合、チオエーテル結合、およびトリアゾール結合からなる群から選択される少なくとも１つを含む、上記［２］または［３］に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

［５］　上記ジスルフィド結合が、Ｌ－システインおよびＤ－システイン以外の側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基とＬ－システインおよびＤ－システイン以外の側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖チオール基との間で形成されたジスルフィド結合であり、上記チオエーテル結合が、Ｌ－システインおよびＤ－システイン以外の側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基と側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖ハロアセチル基との間で形成されたチオエーテル結合である、上記［４］に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

［６］　上記ジスルフィド結合が、システイン、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基とシステイン、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖チオール基との間で形成されたジスルフィド結合であり、上記チオエーテル結合が、システイン、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基と側鎖にハ

ロアセチル基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖ハロアセチル基との間で形成されたチオエーテル結合である、上記［４］に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

［７］　上記ジスルフィド結合が、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基とホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖チオール基との間で形成されたジスルフィド結合であり、上記チオエーテル結合が、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基と側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖ハロアセチル基との間で形成されたチオエーテル結合である、上記［４］～［６］のいずれか１つに記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

［８］　上記分子内架橋が、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基とホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖チオール基との間で形成されたジスルフィド結合、またはホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基と側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖ハロアセチル基との間で形成されたチオエーテル結合である、上記［２］または［３］に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

［９］　上記ジスルフィド結合がホモシステインに由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基とホモシステインに由来する第２のアミノ酸残基の側鎖チオール基との間で形成されたジスルフィド結合であり、上記チオエーテル結合がホモシステインに由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基

と側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖ハロアセチル基との間で形成されたチオエーテル結合である、上記［８］に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

［１０］　上記環状部のアミノ酸残基数が８～１４残基である、上記［２］～［９］のいずれか１つに記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

［１１］　上記抗体結合性環状ペプチドは直鎖部を有する、上記［１］～［１０］のいずれか１つに記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

［１２］　上記直鎖部は側鎖にヒドロキシ基およびカルボキシ基からなる群から選択される少なくとも１つを有するアミノ酸残基を含む、上記［１１］に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

［１３］　上記基材が多糖類、アクリレート系重合体、メタクリレート系重合体およびスチレン系重合体からなる群から選択される少なくとも１種である、上記［１］～［１２］のいずれか１つに記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

［１４］　上記基材が多糖類、アクリレート系重合体およびメタクリレート系重合体からなる群から選択される少なくとも１種である、上記［１］～［１３］のいずれか１つに記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

［１５］　上記基材がアガロースおよびセルロースからなる群から選択される少なくとも１種である、上記［１］～［１４］のいずれか１つに記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

［１６］　上記親水性ポリマーが親水性多糖類である、上記［１］～［１５］のいずれか１つに記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

［１７］　上記親水性多糖類がデキストラン、カルボキシメチルデキストラン、プルラン、ヒドロキシエチルセルロース、およびカルボキシメチルセ

ルロースからなる群から選択される少なくとも１種である、上記［１６］に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

［１８］　上記親水性多糖類が、デキストラン、カルボキシメチルデキストランおよびプルランからなる群から選択される少なくとも１種である、上記［１６］または［１７］に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

［１９］　上記抗体結合性環状ペプチドの分子量が５０００未満である、上記［１］～［１８］のいずれか１つに記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

［２０］　上記陽イオン交換基がカルボキシ基またはスルホキシ基である、上記［１］～［１９］のいずれか１つに記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

［２１］　上記陽イオン交換基がカルボキシ基である、上記［１］～［２０］のいずれか１つに記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

発明の効果

[0014]　本発明によれば、抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性のいずれにも優れたミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体を提供することができる。

発明を実施するための形態

[0015]　以下に、本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体およびその製造方法について詳細に説明する。

なお、本発明において、範囲を「～」を用いて表現した場合は、その範囲は「～」の両側を含むものとする。

[0016]［ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体］

本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体は、基材と、親水性ポリマーと、抗体結合性環状ペプチドと、陽イオン交換基と、を有する。

[0017] 本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体はこのような構成をとるため、抗体精製用アフィニティクロマトグラフィーに適用した際に、抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性のいずれにも優れるものと考えられる。その理由は限定されるわけではないが、およそ以下のとおりと推測される。

[0018] 抗体結合性環状ペプチドと陽イオン交換基とを同一担体に有することで、両方のリガンドが協奏的に作用し、特異的な吸着能と凝集体除去能をもつことにより、抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性のいずれにも優れたものとなった。

[0019] なお、本発明において、不純物除去能は、精製前のＨＣＰ量（ｐｐｍ）と精製後のＨＣＰ量（ｐｐｍ）の比であるＨＣＰ精製ファクター［精製前のＨＣＰ量（ｐｐｍ）／精製後のＨＣＰ量（ｐｐｍ）］であり、クロマトグラフィー担体の不純物除去性能の尺度である。

[0020] 〈基材〉

本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体に用いる基材は、特に限定されないが、好ましくは多糖類、アクリレート系重合体、メタクリレート系重合体およびスチレン系重合体からなる群から選択される少なくとも１種であり、より好ましくは多糖類、アクリレート系重合体およびメタクリレート系重合体からなる群から選択される少なくとも１種であり、さらに好ましくはアガロースおよびセルロースからなる群から選択される少なくとも１種である。

基材は１種を単独で用いてもよいし、２種以上を組み合わせて用いてもよい。

[0021] 《多糖類》

上記多糖類は、特に限定されないが、例えば、セルロース、アガロース、デキストラン、キトサン、および、グルコマンナン等の天然多糖類、ならびに、これら天然多糖類に架橋構造を導入した架橋多糖類等が挙げられる。架橋多糖類は、例えば、天然多糖類が有する水酸基に対して、エピクロロヒド

リン、（ポリ）アルキレングリコールジグリシジルエーテル、および、アルキレンジイソシアネート等の架橋剤を用いて架橋構造を導入することにより製造することができる。

[0022] 上記多糖類は、好ましくはセルロース、架橋セルロース、アガロースおよび架橋アガロースから選択される少なくとも１種、より好ましくはアガロースおよび架橋アガロースから選択される少なくとも１種である。

[0023] 《アクリレート系重合体》

上記アクリレート系重合体は、特に限定されないが、例えば、アクリル酸メチル、アクリル酸エチル、アクリル酸ヒドロキシエチル、アクリル酸ヒドロキシプロピル、アクリル酸ブチル、アクリル酸ステアリル、アクリル酸２－エチルヘキシル、シクロヘキシルアクリレート、グリセリンモノアクリレート、グリシジルアクリレート、４，５－エポキシブチルアクリレート、および、９，１０－エポキシステアリルアクリレート等のアクリル酸エステルの１種を重合してなる重合体、アクリル酸エステルの２種以上を共重合してなる共重合体、ならびに、アクリル酸エステルの１種以上とアクリル酸エステル以外のビニル基含有化合物の１種以上とを共重合してなる共重合体等が挙げられる。ここで、アクリル酸エステル以外のビニル基含有化合物としては、例えば、エチレン、および、プロピレン等のモノビニル化合物、ジビニルベンゼン、および、トリビニルベンゼン等の芳香族ポリビニル化合物、ならびに、ブタジエン、メチレンビスアクリルアミド、および、イソシアヌル酸トリアリル等のポリビニル化合物が挙げられる。これらの重合体または共重合体に対して、エピクロロヒドリン、（ポリ）アルキレングリコールジグリシジルエーテル、および、アルキレンジイソシアネート等の架橋剤を用いて架橋構造を導入してもよい。

[0024] 《メタクリレート系重合体》

上記メタクリレート系重合体は、特に限定されるものではないが、例えば、メタクリル酸メチル、メタクリル酸エチル、メタクリル酸ヒドロキシエチル、メタクリル酸ヒドロキシプロピル、メタクリル酸ブチル、メタクリル酸

ステアリル、メタクリル酸２－エチルヘキシル、シクロヘキシルメタクリレート、グリセリンモノメタクリレート、グリシジルメタクリレート、４，５－エポキシブチルメタクリレート、および、９，１０－エポキシステアリルメタクリレート等のメタクリル酸エステルの１種を重合してなる重合体、メタクリル酸エステルの２種以上を共重合してなる共重合体、ならびに、メタクリル酸エステルの１種以上とメタクリル酸エステル以外のビニル基含有化合物の１種以上とを共重合してなる共重合体等が挙げられる。メタクリル酸エステル以外のビニル基含有化合物としては、例えば、上述したアクリル酸エステル以外のビニル基含有化合物で例示した化合物が挙げられる。これらの重合体または共重合体に対して、アクリレート系重合体で用いられ得る上述した架橋剤を用いて架橋構造を導入してもよい。

[0025] 《スチレン系重合体》

上記スチレン系重合体は、特に限定されるものではないが、例えば、スチレン、メチルスチレン、エチルスチレン、ヒドロキシスチレン、および、クロロスチレン等のスチレン系化合物の１種を重合してなる重合体、スチレン系化合物の２種以上を重合してなる共重合体、ならびに、スチレン系化合物の１種以上とスチレン系化合物以外のビニル基含有化合物の１種以上とを共重合してなる共重合体等が挙げられる。スチレン系化合物以外のビニル基含有化合物としては、例えば、上述したアクリル酸エステル以外のビニル基含有化合物で例示した化合物が挙げられる。これらの重合体または共重合体に対して、アクリレート系重合体で用いられ得る架橋剤を用いて架橋構造を導入してもよい。

[0026] 《基材の構造》

基材は多孔質粒子または多孔質膜であることが好ましい。基材が多孔質粒子または多孔質膜であることにより、表面積が大きくなり、単位時間あたりの処理容量を大きくすることができる。

[0027] （細孔容積）

基材が多孔質粒子または多孔質膜である場合の細孔容積は、特に限定され

ないが、水銀ポロシメーターにより測定した細孔容積が、好ましくは０．２ｍＬ／ｇ～１０ｍＬ／ｇ、より好ましくは０．２ｍＬ／ｇ～５．０ｍＬ／ｇの範囲内である。細孔容積がこの範囲内であると、抗体吸着容量が大きくなる。また、機械的強度が低下しない。

[0028]（比表面積）

基材が多孔質粒子または多孔質膜である場合の比表面積は、特に限定されないが、ＢＥＴ（Brunauer、Emmett、Teller）法により測定した比表面積（ＢＥＴ比表面積）が、好ましくは２m^2／ｇ～１５００m^2／ｇ、より好ましくは５m^2／ｇ～１０００m^2／ｇの範囲内である。比表面積がこの範囲内であると、抗体吸着容量が大きくなる。

[0029]（平均粒子径）

基材が多孔質粒子である場合の平均粒子径は、特に限定されないが、好ましくは０．５μｍ～１０００μｍ、より好ましくは１μｍ～２５０μｍ、さらに好ましくは２μｍ～１５０μｍの範囲内である。平均粒子径がこの範囲内であると、カラムに充填して通液した時の圧力損失が小さく、通液速度を高くでき、処理効率が向上するとともに、抗体吸着容量が大きくなる。なお、多孔質粒子の平均粒子径は、既知の方法で測定することができる。例えば、光学顕微鏡にて、１００個以上の多孔質粒子の粒子径を測定し、その分布からメジアン径を算出することで平均粒子径が得られる。

[0030]《基材の具体例》

基材の具体例として、例えば、アガロース系の担体であるセファロースシリーズ（ＧＥヘルスケア社製）（“ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ”は登録商標）、セルロース系の架橋担体であるセルファインシリーズ（ＪＮＣ社製）（“ＣＥＬＬＵＦＩＮＥ”は登録商標）、アリルデキストランとＮ，Ｎ’－メチレンビスアクリルアミドの架橋ポリマーであるセファクリルシリーズ（ＧＥヘルスケア社製）（“ＳＥＰＨＡＣＲＹＬ”は登録商標）、ならびに、アクリレート系の担体であるトヨパールＨＷシリーズ（東ソー社製）（“トヨパール”および“ＴＯＹＯＰＥＡＲＬ”は登録商標）等の市販品が挙げられるが、

これらに限定されるものではない。

[0031] また、市販の基材にエポキシ基等の水酸基と共有結合しうる官能基を導入したものを基材として用いてもよい。例えば、アガロース系の担体を２－クロロメチルオキシラン（別名：エピクロロヒドリン）によって処理することにより、アガロースのヒドロキシ基をグリシジル化して、表面にエポキシ基を導入した担体を用いることができる。

[0032] 〈親水性ポリマー〉

基材を親水性ポリマーで被覆することで、本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体表面の親水性が増し、非特異的吸着物の吸着が抑制されるため、精製純度が改善する効果がある。

[0033] 本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体に用いる親水性ポリマーは、特に限定されないが、好ましくは親水性多糖類からなる群から選択される少なくとも１種であり、より好ましくはデキストラン、カルボキシメチルデキストラン、プルラン、ヒドロキシエチルセルロース、およびカルボキシメチルセルロースからなる群から選択される少なくとも１種であり、さらに好ましくはデキストラン、カルボキシメチルデキストラン、およびプルランからなる群から選択される少なくとも１種である。

[0034] 親水性ポリマーは１種を単独で用いてもよいし、２種以上を組み合わせて用いてもよい。

[0035] また、親水性ポリマーは、上記基材に対し、共有結合によって固定化されていることが好ましい。

上記基材が多孔質粒子である場合、表面にヒドロキシ基と共有結合しうる官能基を有することが好ましい。ここで、ヒドロキシ基と共有結合しうる官能基としては、例えば、エポキシ基およびグリシジル基；臭化シアン、Ｎ，Ｎ－ジスクシンイミジル炭酸塩（ＤＳＣ）などで活性化されるヒドロキシ基；アルデヒド基（ホルミル基）；ならびに、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステルおよびカルボニルジイミダゾール活性化エステル等の活性化カルボン酸基；などの反応性官能基等を挙げることができる。

[0036] 《親水性多糖類》

親水性多糖類は、特に限定されないが、精製純度を改善する効果が高いことから、好ましくはデキストラン、カルボキシメチルデキストランおよびプルランから選択される少なくとも１種であり、より好ましくはデキストランである。

[0037] 《親水性ポリマーの分子量》

親水性ポリマーの分子量は、特に限定されないが、極限粘度で、好ましくは０．１０ｄＬ／ｇ以上、より好ましくは０．１０ｄＬ／ｇ～０．９０ｄＬ／ｇ、さらに好ましくは０．１２ｄＬ／ｇ～０．４０ｄＬ／ｇ、いっそう好ましくは０．１５ｄＬ／ｇ～０．３０ｄＬ／ｇ、よりいっそう好ましくは０．１５ｄＬ／ｇ～０．２５ｄＬ／ｇの範囲内である。

極限粘度がこの範囲内であると、精製純度がさらに向上する。なお、極限粘度は、第１６改正日本薬局方に収載された一般測定法における粘度測定法、第１法「毛細管粘度計法」に従って、数個の異なる濃度の高分子溶液の粘度を求めて粘度の濃度依存性を測定し、得られた直線の濃度を０に外挿することにより求めることができる。

[0038] （極限粘度）

ところで、高分子の極限粘度ηと分子量Ｍとの間には、下記マーク－ホウィンク－桜田の式（Mark-Houwink-Sakurada equation）が成立することから、直接的な測定法でいくつかの試料の分子量を求め、分子量とそれぞれの極限粘度の値とからＫとαを決めておけば、同じ種類の高分子については、極限粘度ηを測定することによって分子量Ｍが、分子量Ｍを測定することによって極限粘度ηが、それぞれ、求められる。

$\eta = KM^{\alpha}$

ここで、Ｋおよびαは高分子の種類、溶媒の種類および温度によって定まる定数である。

[0039] 例えば、デキストランの極限粘度（$\eta_{Dextran}$）と重量平均分子量（$Mw_{Dextran}$）とは、下記の関係式を満たすことが知られている。

$\eta_{Dextran}$［ｄＬ／ｇ］＝９×１０$^{-4}$×Ｍｗ$_{Dextran}^{0.5}$［ｄＬ／ｇ］

[0040]《親水性ポリマーの被覆量》

親水性ポリマーの被覆量（以下、単に「親水性ポリマー被覆量」という場合がある。）は、特に限定されないが、好ましくは３ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌ～４５０ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌ、より好ましくは３ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌ～２５０ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌ、さらに好ましくは３ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌ～２３０ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌ、いっそう好ましくは１０ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌ～２３０ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌ、よりいっそう好ましくは２０ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌ～２３０ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌである。

[0041] 親水性ポリマー被覆量がこの範囲内であると、本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体の表面の親水性が適度に増して非特異的吸着物の吸着が抑えられるとともに、抗体が基材に拡散浸透する余地が多く残って抗体吸着容量が大きくなるため、精製純度を改善するとともに、精製コストを低減する効果がある。なお、親水性ポリマーは基材の表面をすべて覆っている必要はなく、基材の少なくとも一部を覆っていればよい。

[0042] なお、親水性ポリマー被覆量［単位：ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌ］は、被覆している親水性ポリマーの乾燥質量（W_P）［単位：ｍｇ］を、被覆前基材の乾燥質量（W_0）［単位：ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌ］で除した値である。また、親水性ポリマーの乾燥質量（W_P）は、担体全量の乾燥質量（W_1）と被覆前基材の乾燥質量（W_0）の差（W_1-W_0）［単位：ｍｇ］である。

従って、親水性ポリマー被覆量は以下の式により求めることができる。

親水性ポリマー被覆量（ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌ）＝W_P／W_0＝（W_1-W_0）／W_0

上記被覆前基材の乾燥質量（W_0）は、次のようにして算出することができる。

$W_0=W_{0,xg}\times w_0/x$

ここで、

$W_{0,xg}$：被覆前基材の湿ゲルｘｇの乾燥質量

w_0：親水性ポリマー被覆反応に用いた被覆前基材の湿ゲル質量

ｘ：乾燥に用いた被覆前基材の湿ゲル質量（ｘｇ）

である。

上記担体全量の乾燥質量（W_1）も、同様にして算出することができる。

[0043] 親水性ポリマー被覆量の測定方法の一例を挙げて説明する。

まず、被覆前基材の湿ゲル５ｇを５０℃で質量変化がなくなるまで減圧乾燥して質量を測定し、親水性ポリマー被覆反応に用いた被覆前基材の湿ゲル質量との積より、被覆前基材の乾燥質量とする。

次いで、被覆前基材に親水性ポリマーを被覆して得た担体の湿ゲル５ｇを５０℃で質量変化がなくなるまで減圧乾燥して質量を測定し、親水性ポリマー被覆反応後に得られた担体の湿ゲル質量との積より、担体の乾燥質量とする。

さらに、担体の乾燥質量と被覆前基材の乾燥質量との差を、被覆前基材を被覆している親水性ポリマーの乾燥質量とする。

最後に、親水性ポリマー被覆量を、被覆前基材の乾燥質量あたりの親水性ポリマーの乾燥質量として算出する。

[0044] （親水性）

なお、本発明では、ポリマーまたは多糖類について親水性とは、少なくとも１種類の親水性基を含むことをいう。親水性基とは、好ましくはカルボキシ基、カルボキシ基のアルカリ金属塩、スルホン酸基、スルホン酸基のアルカリ金属塩、ヒドロキシ基、アミド基、カルバモイル基、スルホンアミド基、スルファモイル基、リン酸基、リン酸基のアルカリ金属塩、オキシリン酸基、および、オキシリン酸基のアルカリ金属塩等の官能基が挙げられる。これらの親水性基は、ポリマー中のどの位置に存在してもよく、例えば、ポリマー主鎖末端および／または側鎖に、直接または連結基を介して結合していてもよい。また、親水性基は１分子中に、好ましくは複数個が存在する。

[0045] 〈抗体結合性環状ペプチド〉

本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体に用いる抗体結合性環状ペプチドは、特に限定されないが、好ましくは側鎖間の分子内架橋により環化した環状部を有する。

[0046] 上記分子内架橋は、好ましくは、ジスルフィド結合、チオエーテル結合、トリアゾール結合、およびアミド結合からなる群から選択される少なくとも１つを含み、より好ましくは、ジスルフィド結合、チオエーテル結合、およびトリアゾール結合からなる群から選択される少なくとも１つを含み、さらに好ましくは、ジスルフィド結合またはチオエーテル結合を含む。

[0047] なお、本明細書においては、上記抗体結合性環状ペプチドを単に「環状ペプチド」、または、「アフィニティリガンド」という場合がある。

[0048]《ジスルフィド結合》

ジスルフィド結合は「Ｓ－Ｓ」結合であれば特に限定されず、例えば、２個のチオール基（「メルカプト基」ともいう。）間で形成されるＳ－Ｓ結合が挙げられる。

[0049]（１）上記ジスルフィド結合は、好ましくは、側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基と側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖チオール基との間で形成されたジスルフィド結合である。

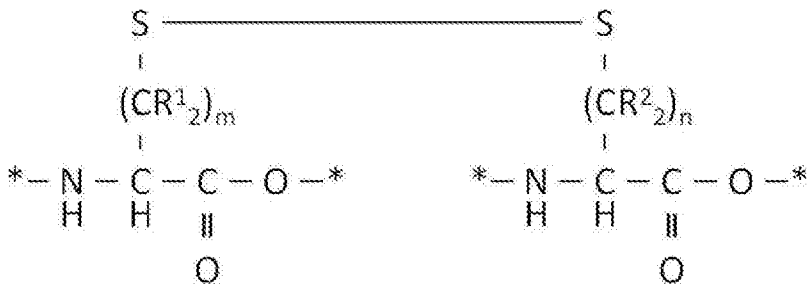
[0050]（２ａ）上記ジスルフィド結合は、より好ましくは、Ｌ－システインおよびＤ－システイン以外の側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基とＬ－システインおよびＤ－システイン以外の側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖チオール基との間で形成されたジスルフィド結合である。

[0051]（２ｂ）上記ジスルフィド結合は、より好ましくは、システイン、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基とシステイン、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖チオール基と

の間で形成されたジスルフィド結合である。

[0052] このようなジスルフィド結合としては、下記式で表されるものが挙げられる。

[0053] [化1]



[0054] ただし、上記式中：

mおよびnは、それぞれ独立に、１または２であり；

m＝１であるとき、R^1は水素原子またはメチル基であり；

m＝２であるとき、R^1は水素原子であり；

n＝１であるとき、R^2は水素原子またはメチル基であり；

n＝２であるとき、R^2は水素原子であり；

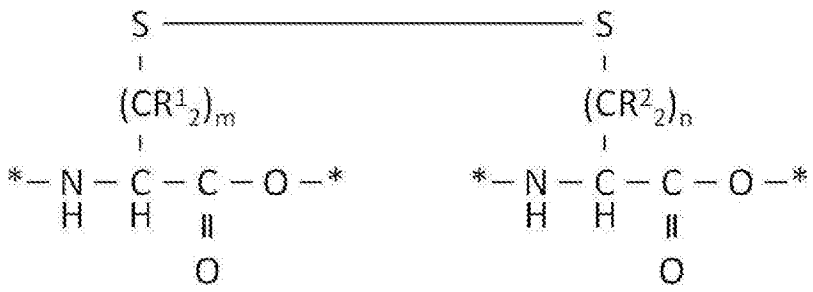
＊は他のアミノ酸残基または他の置換基との結合点を表す。

[0055] （３）上記ジスルフィド結合は、さらに好ましくは、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基とホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖チオール基との間で形成されたジスルフィド結合である。

[0056] このようなジスルフィド結合としては、下記式で表されるものが挙げられる。

[0057]

[化2]



[0058] ただし、上記式中：

ｍおよびｎは、それぞれ独立に、１または２であり；

ｍ＝１であるとき、Ｒ[1]はメチル基であり；

ｍ＝２であるとき、Ｒ[1]は水素原子であり；

ｎ＝１であるとき、Ｒ[2]はメチル基であり；

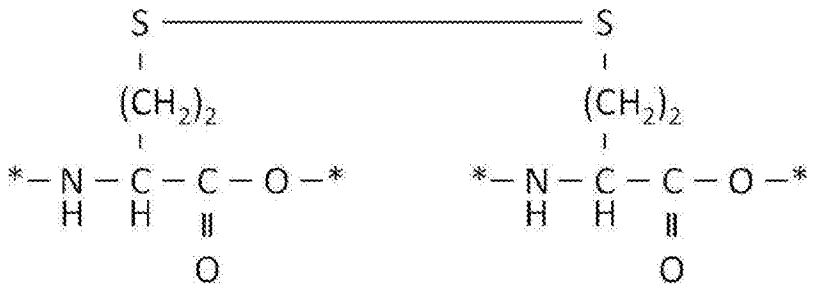
ｎ＝２であるとき、Ｒ[2]は水素原子であり；

＊は他のアミノ酸残基または他の置換基との結合点を表す。

[0059] （４）上記ジスルフィド結合は、いっそう好ましくは、ホモシステインに由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基とホモシステインに由来する第２のアミノ酸残基の側鎖チオール基との間で形成されたジスルフィド結合である。

[0060] このようなジスルフィド結合としては、下記式で表されるものが挙げられる。

[0061] [化3]



[0062] ただし、上記式中、＊は他のアミノ酸残基または他の置換基との結合点を表す。

[0063] （特に好ましいジスルフィド結合）

ジスルフィド結合はアルカリ耐性が高いことから、ミックスモードアフィ

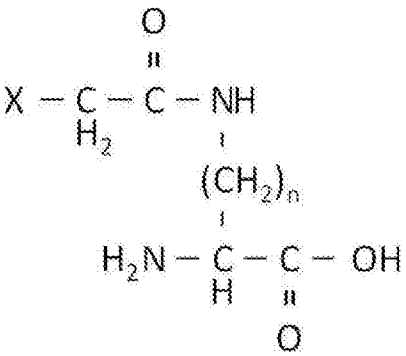
ニティクロマトグラフィー用担体は、アルカリによる洗浄を繰り返し行っても抗体結合性が維持され、抗体精製コストを低減することができる。このようなジスルフィド結合としては、２つのシステイン残基間で形成されたジスルフィド結合以外のジスルフィド結合が好ましく、システイン以外の側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基間で形成されたジスルフィド結合がより好ましく、２つのホモシステイン残基間で形成されたジスルフィド結合が特に好ましい。

[0064] 《チオエーテル結合》

チオエーテル結合は、エーテル結合「－Ｏ－」の酸素原子を硫黄原子で置換した形の「－Ｓ－」結合であれば特に限定されず、例えば、チオール基（「メルカプト基」ともいう。）とハロアセチル基との間で形成される－Ｓ－結合が挙げられる。ここで、ハロアセチル基は、好ましくはクロロアセチル基またはブロモアセチル基であり、より好ましくはクロロアセチル基である。また、ハロアセチル基は、側鎖アミノ基の水素原子を置換する形でアミノ酸に導入されたものが好ましい。

[0065] 側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸としては、下記式で表される者が挙げられる。

[0066] [化4]



[0067] ただし、上記式中、ｎは１以上の整数であり、Ｘはハロゲン原子である。

なお、ｎは、好ましくは１≦ｎ≦４を満たす整数であり、Ｘは、好ましくは塩素原子または臭素原子であり、より好ましくは塩素原子である。

[0068] 上記式で表されるアミノ酸は、

ｎ＝１であるとき、Ｎ^{3}－ハロアセチル－Ｌ－２，３－ジアミノプロパン酸〔（２Ｓ）－２－アミノ－３－［（２－ハロアセチル）アミノ］プロパン酸〕またはＮ^{3}－ハロアセチル－Ｄ－２，３－ジアミノプロパン酸〔（２Ｒ）－２－アミノ－３－［（２－ハロアセチル）アミノ］プロパン酸〕であり、

ｎ＝２であるとき、Ｎ^{4}－ハロアセチル－Ｌ－２，４－ジアミノブタン酸〔（２Ｓ）－２－アミノ－４－［（２－ハロアセチル）アミノ］ブタン酸〕またはＮ^{4}－ハロアセチル－Ｄ－２，４－ジアミノブタン酸〔（２Ｒ）－２－アミノ－４－［（２－ハロアセチル）アミノ］ブタン酸〕であり、

ｎ＝３であるとき、Ｎ－δ－ハロアセチル－Ｌ－オルニチン〔（２Ｓ）－２－アミノ－５－［（２－ハロアセチル）アミノ］ペンタン酸〕またはＮ－δ－ハロアセチル－Ｄ－オルニチン〔（２Ｒ）－２－アミノ－５－［（２－ハロアセチル）アミノ］ペンタン酸〕であり、

ｎ＝４であるとき、Ｎ－ε－ハロアセチル－Ｌ－リシン〔（２Ｓ）－２－アミノ－６－［（２－ハロアセチル）アミノ］ヘキサン酸〕またはＮ－ε－ハロアセチル－Ｄ－リシン〔（２Ｒ）－２－アミノ－６－［（２－ハロアセチル）アミノ］ヘキサン酸〕である。

[0069] （１）上記チオエーテル結合は、好ましくは、側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基と側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖ハロアセチル基との間で形成されたチオエーテル結合である。

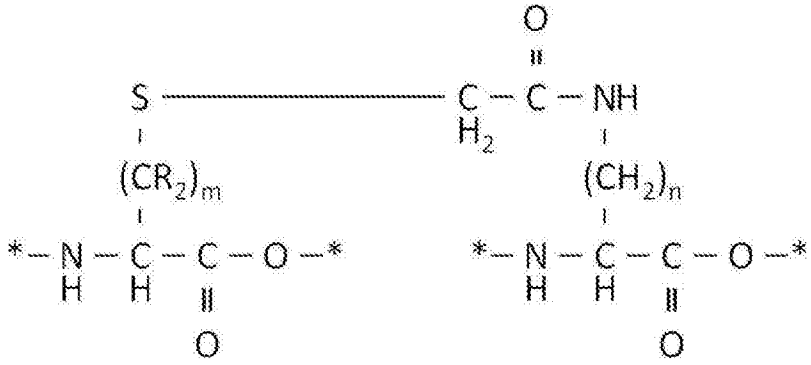
[0070] （２ａ）上記チオエーテル結合は、より好ましくは、Ｌ－システインおよびＤ－システイン以外の側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基と側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖ハロアセチル基との間で形成されたチオエーテル結合である。

[0071] （２ｂ）上記チオエーテル結合は、より好ましくは、システイン、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基と側鎖にハロ

アセチル基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖ハロアセチル基との間で形成されたチオエーテル結合である。

[0072] このようなチオエーテル結合としては、下記式で表されるものが挙げられる。

[0073] [化5]



[0074] ただし、上記式中：

ｍは１または２であり；

ｎは１以上の整数であり；

ｍ＝１であるとき、Ｒは水素原子またはメチル基であり；

ｍ＝２であるとき、Ｒは水素原子であり；

＊は他のアミノ酸残基または末端基との結合点を表す。

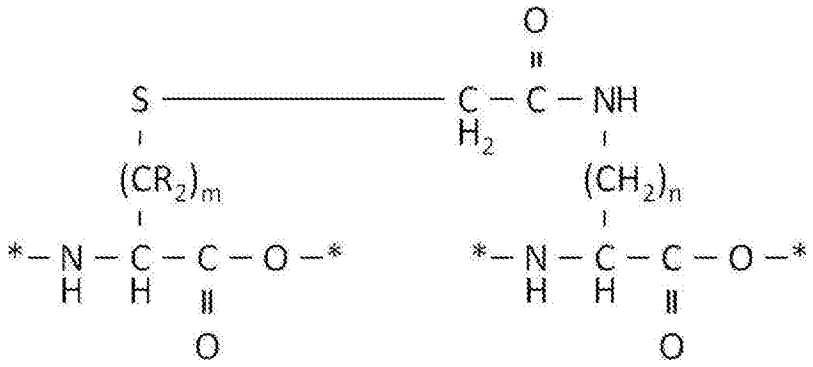
また、ｎは、好ましくは、１≦ｎ≦４を満たす整数である。

[0075] （３）上記チオエーテル結合は、さらに好ましくは、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基と側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖ハロアセチル基との間で形成されたチオエーテル結合である。

[0076] このようなチオエーテル結合としては、下記式で表されるものが挙げられる。

[0077]

[化6]



[0078] ただし、上記式中：

mは１または２であり；

ｎは１以上の整数であり；

ｍ＝１であるとき、Ｒはメチル基であり；

ｍ＝２であるとき、Ｒは水素原子であり；

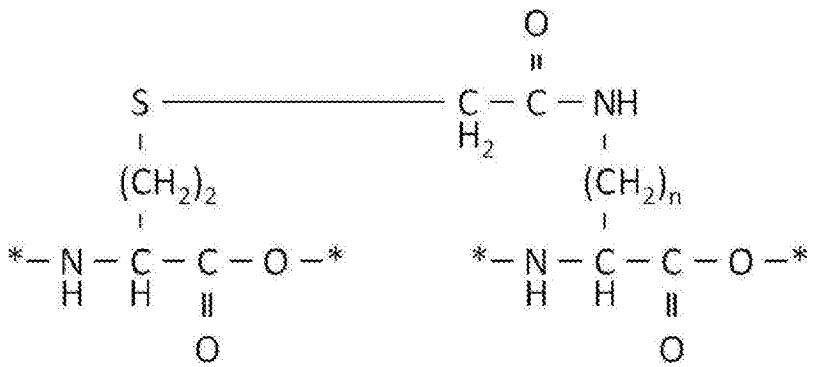
＊は他のアミノ酸残基または他の基との結合点を表す。

また、ｎは、好ましくは、１≦ｎ≦４を満たす整数である。

[0079] （４）上記チオエーテル結合は、いっそう好ましくは、ホモシステインに由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基と側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖ハロアセチル基との間で形成されたチオエーテル結合である。

[0080] このようなチオエーテル結合としては、下記式で表されるものが挙げられる。

[0081] [化7]



[0082] ただし、上記式中、ｎは１以上の整数であり、＊は他のアミノ酸残基また

は他の置換基との結合点を表す。また、ｎは、好ましくは、１≦ｎ≦４を満たす整数である。

[0083]（特に好ましいチオエーテル結合）

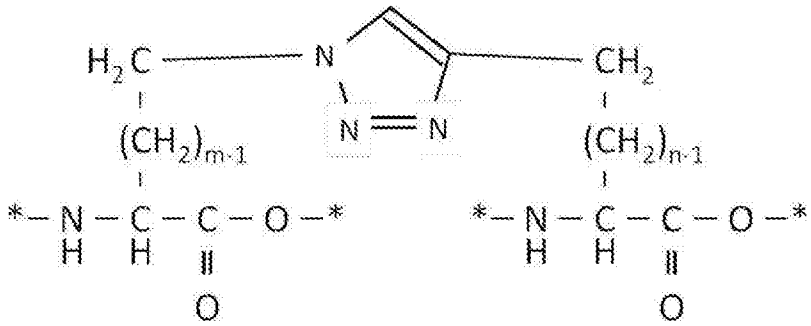
チオエーテル結合はアルカリ耐性が高いことから、ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体は、アルカリによる洗浄を繰り返し行っても抗体結合性が維持され、抗体精製コストを低減することができる。このようなチオエーテル結合としては、ホモシステイン残基とＮ－ε－クロロアセチルリシン残基との間で形成されたチオエーテル結合が特に好ましい。

[0084]《トリアゾール結合》

上記トリアゾール結合は、特に限定されないが、好ましくは側鎖にアジド基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖アジド基と側鎖にアルキニル基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖アルキニル基との間で形成されたトリアゾール結合である。

[0085] 上記側鎖にアジド基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖アジド基と側鎖にアルキニル基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖アルキニル基との間で形成されたトリアゾール結合としては、例えば、下記式で表されるものが挙げられる。

[0086][化8]



[0087] ただし、＊は他のアミノ酸残基または他の置換基との結合点であり、ｍおよびｎは、それぞれ独立に、１以上の整数であり、好ましくは、それぞれ独立に、１以上の整数であり、かつ、少なくとも一方は２以上の整数である。

[0088] ｍ＝１であるとき、側鎖にアジド基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基は、β－アジド－Ｌ－アラニンまたはβ－アジド－Ｄ－アラニンに由来

するアミノ酸残基であり、好ましくはβ－アジド－Ｌ－アラニンに由来するアミノ酸残基である。

ｍ-＝２であるとき、側鎖にアジド基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基は、γ－アジド－Ｌ－ホモアラニンまたはγ－アジド－Ｄ－ホモアラニンに由来するアミノ酸残基であり、好ましくはγ－アジド－Ｌ－ホモアラニンである。

ｍ＝３であるとき、側鎖にアジド基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基は、δ－アジド－Ｌ－オルニチンまたはδ－アジド－Ｄ－オルニチンに由来するアミノ酸残基であり、好ましくはδ－アジド－Ｌ－オルニチンである。

ｍ＝４であるとき、側鎖にアジド基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基は、ε－アジド－Ｌ－リシンまたはε－アジド－Ｄ－リシンに由来するアミノ酸残基であり、好ましくはε－アジド－Ｌ－リシンである。

[0089] ｎ＝１であるとき、側鎖にアルキニル基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基は、２－プロパルギル－Ｌ－グリシン〔（２Ｓ）－２－アミノ－４－ペンチン酸〕またはＤ－プロパルギルグリシン〔（２Ｒ）－２－アミノ－４－ペンチン酸〕に由来するアミノ酸残基であり、好ましくは２－プロパルギル－Ｌ－グリシン〔（２Ｓ）－２－アミノ－４－ペンチン酸〕に由来するアミノ酸残基である。

ｎ＝２であるとき、側鎖にアルキニル基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基は、２－プロパルギル－Ｌ－アラニン（Ｌ－ホモプロパルギルグリシン）〔（２Ｓ）－２－アミノ－５－ヘキシン酸〕または２－プロパルギル－Ｄ－アラニン（Ｄ－ホモプロパルギルグリシン）〔（２Ｒ）－２－アミノ－５－ヘキシン酸〕に由来するアミノ酸残基であり、好ましくは２－プロパルギル－Ｌ－アラニン（Ｌ－ホモプロパルギルグリシン）〔（２Ｓ）－２－アミノ－５－ヘキシン酸〕に由来するアミノ酸残基である。

ｎ＝３であるとき、側鎖にアルキニル基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基は、２－プロパルギル－Ｌ－ホモアラニン（２－プロパルギル－Ｌ

－ビスホモグリシン）〔（２Ｓ）－２－アミノ－６－ヘプチン酸〕または２－プロパルギル－Ｄ－ホモアラニン（２－プロパルギル－Ｄ－ビスホモグリシン）〔（２Ｒ）－２－アミノ－６－ヘプチン酸〕に由来するアミノ酸残基であり、好ましくは２－プロパルギル－Ｌ－ホモアラニン（２－プロパルギル－Ｌ－ビスホモグリシン）〔（２Ｓ）－２－アミノ－６－ヘプチン酸〕に由来するアミノ酸残基である。

[0090]（特に好ましいトリアゾール結合）

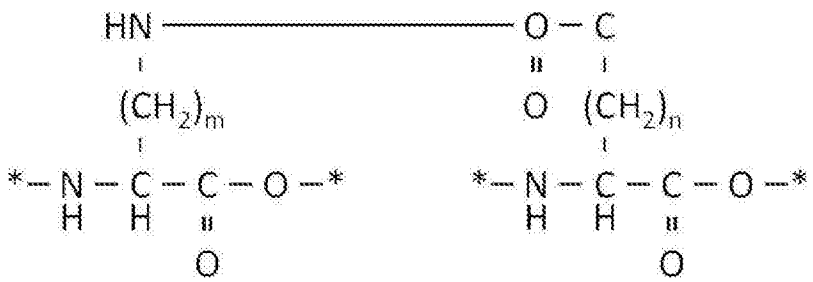
トリアゾール結合はアルカリ耐性が高いことから、分子内架橋にトリアゾール結合を含むと、ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体は、アルカリによる洗浄を繰り返し行っても抗体結合性が維持され、抗体精製コストを低減することができる。このようなトリアゾール結合としては、とりわけ、γ－アジドホモアラニン残基またはε－アジドリシン残基とホモプロパルギルグリシン残基またはビスホモプロパルギルグリシン残基との間で形成されるトリアゾール結合が好ましい。

[0091]《アミド結合》

上記アミド結合は、特に限定されないが、好ましくは側鎖にアミノ基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖アミノ基と側鎖にカルボキシ基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖カルボキシ基との間で形成されたアミド結合である。

[0092] 上記側鎖にアミノ基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖アミノ基と側鎖にカルボキシ基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖カルボキシ基との間で形成されたアミド結合としては、例えば、下記式で表されるものが挙げられる。

[0093][化9]



[0094] ただし、＊は他のアミノ酸残基または他の置換基との結合点であり、ｍおよびｎは、それぞれ独立に、１以上の整数であり、好ましくはｍ＝１，２，３，または４、かつ、ｎ＝１，２，または３であり、より好ましくはｍ＝２または３かつｎ＝１または２である。

[0095] ｍ＝１であるとき、側鎖にアミノ基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基は、Ｌ－２，３－ジアミノプロパン酸〔（２Ｓ）－２，３－ジアミノプロパン酸〕またはＤ－２，３－ジアミノプロパン酸〔（２Ｒ）－２，３－ジアミノプロパン酸〕に由来するアミノ酸残基であり、好ましくはＬ－２，３－ジアミノプロパン酸〔（２Ｓ）－２－アミノプロパン酸〕に由来するアミノ酸残基である。

ｍ＝２であるとき、側鎖にアミノ基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基は、Ｌ－２，４－ジアミノブタン酸〔（２Ｓ）－２，４－ジアミノブタン酸〕またはＤ－２，４－ジアミノブタン酸〔（２Ｒ）－２，４－ジアミノブタン酸〕に由来するアミノ酸残基であり、好ましくはＬ－２，４－ジアミノブタン酸〔（２Ｓ）－２，４－ジアミノブタン酸〕に由来するアミノ酸残基である。

ｍ＝３であるとき、側鎖にアミノ基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基は、Ｌ－オルニチン〔（２Ｓ）－２，５－ジアミノペンタン酸〕またはＤ－オルニチン〔（２Ｒ）－２，５－ジアミノペンタン酸〕に由来するアミノ酸残基であり、好ましくはＬ－オルニチン〔（２Ｓ）－２，５－ジアミノペンタン酸〕に由来するアミノ酸残基である。

ｍ＝４であるとき、側鎖にアミノ基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基は、Ｌ－リシン〔（２Ｓ）－２，６－ジアミノヘキサン酸〕またはＤ－リシン〔（２Ｒ）－２，６－ジアミノヘキサン酸〕に由来するアミノ酸残基であり、好ましくはＬ－リシン〔（２Ｓ）－２，６－ジアミノヘキサン酸〕に由来するアミノ酸残基である。

[0096] ｎ＝１であるとき、側鎖にカルボキシ基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基は、Ｌ－アスパラギン酸またはＤ－アスパラギン酸に由来するアミ

ノ酸残基であり、好ましくはＬ－アスパラギン酸に由来するアミノ酸残基である。

ｎ＝２であるとき、側鎖にカルボキシ基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基は、Ｌ－グルタミン酸またはＤ－グルタミン酸に由来するアミノ酸残基であり、好ましくはＬ－グルタミン酸に由来するアミノ酸残基である。

ｎ＝３であるとき、側鎖にカルボキシ基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基は、Ｌ－ホモグルタミン酸〔（２Ｓ）－２－アミノアジピン酸〕またはＤ－ホモグルタミン酸〔（２Ｒ）－２－アミノアジピン酸〕に由来するアミノ酸残基であり、好ましくはＬ－ホモグルタミン酸〔（２Ｓ）－２－アミノアジピン酸〕に由来するアミノ酸残基である。

[0097]（特に好ましいアミド結合）

アミド結合はアルカリ耐性が高いことから、ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体は、アルカリによる洗浄を繰り返し行っても抗体結合性が維持され、抗体精製コストを低減することができる。このようなアミド結合としては、とりわけ、リシン残基とグルタミン酸残基との間で形成されたアミド結合が好ましい。

[0098]《環状部のアミノ酸残基数》

上記環状部のアミノ酸残基数は、上記環状ペプチドの全アミノ酸残基数以下であれば特に限定されないが、好ましくは８～１４残基であり、より好ましくは９～１３残基であり、さらに好ましくは１０～１２残基であり、いっそう好ましくは１１残基である。

[0099]《直鎖部》

上記環状ペプチドは直鎖部を有してもよい。直鎖部とは上記環状ペプチドのポリペプチド鎖のうち、環状部に含まれない部分をいう。

[0100] 上記直鎖部は側鎖にヒドロキシ基およびカルボキシ基からなる群から選択される少なくとも１つを有するアミノ酸残基を含んでもよい。側鎖にヒドロキシ基およびカルボキシ基からなる群から選択される少なくとも１つを有するアミノ酸残基については後述する。

[0101] 上記直鎖部は、側鎖に固定化官能基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基を含んでもよい。固定化官能基および固定化官能基を有するアミノ酸については後述する。

[0102] 《環状ペプチドの基材および親水性ポリマーの少なくとも一方との結合》

上記環状ペプチドは基材および親水性ポリマーの少なくとも一方と共有結合を介して結合していることが好ましい。

このような共有結合としては、（ａ）環状ペプチド直鎖部のアミノ酸残基側鎖と基材および親水性ポリマーの少なくとも一方との間の共有結合、または（ｂ）環状ペプチドのポリペプチド鎖のＮ末端またはＣ末端と基材および親水性ポリマーの少なくとも一方との間の共有結合等が挙げられる。

上記（ａ）の共有結合としては、アミノ酸残基側鎖の固定化官能基と基材および親水性ポリマーの少なくとも一方の反応性官能基（固定化官能基と反応して共有結合を形成しうる官能基をいう。）との間で形成される結合等が挙げられる。この場合の固定化官能基および反応性官能基については後述する。

上記（ｂ）の共有結合としては、ポリペプチド鎖のＮ末端またはＣ末端と基材および親水性ポリマーの少なくとも一方のポリマー主鎖または側鎖との間のリンカーを介した、または介さない結合等が挙げられる。

この場合のリンカーとしては、ＰＥＧ（Polyethylene glycol；ポリエチレングリコール）リンカー等が挙げられる。ＰＥＧリンカーのエチレングリコール単位数は、１個以上であれば特に限定されないが、好ましくは１～２４個、より好ましくは１～１２個、さらに好ましくは４～８個である。

[0103] 《環状ペプチドの分子量》

上記環状ペプチドの分子量は、特に限定されるものではないが、合成コストの観点から１００００以下が好ましく、抗原性の観点から５０００以下が好ましい。上記環状ペプチドの分子量は、より好ましくは約４０００以下であり、さらに好ましくは約３０００以下であり、最も好ましくは約２０００以下である。ここで、「約」は±２％の範囲を含むことを意味する。

なお、ここで、環状ペプチドの分子量は、環状部と直鎖部とを合わせた分子量である。

分子量が５０００未満であると、抗原性が低減され、実質的に抗原性を示さなくなる。

また、上記環状ペプチドのアミノ酸残基数は、特に限定されないが、好ましくは１００残基以下であり、より好ましくは５０残基以下であり、さらに好ましくは４０残基以下であり、いっそう好ましくは３０残基以下であり、よりいっそう好ましくは２０残基以下である。

なお、ここで、環状ペプチドのアミノ酸残基数は、環状部と直鎖部とを合わせたアミノ酸残基数である。

[0104] 《抗体結合性》

本発明において、抗体結合性とは、抗体および／または抗体誘導体との結合性をいう。

抗体結合性が高いほど、アフィニティクロマトグラフィー用担体のアフィニティリガンドとして使用した際に、抗体の吸着力が高く、洗浄時でも脱離しにくくなる。

抗体とは、免疫グロブリンまたはその類縁体、フラグメントもしくは融合体をいう。

免疫グロブリンは、ＩｇＧ（Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ　Ｇ；免疫グロブリンＧ）、ＩｇＭ（Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ　Ｍ；免疫グロブリンＭ）、ＩｇＡ（Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ　Ａ；免疫グロブリンＡ）、ＩｇＤ（Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ　Ｄ；免疫グロブリンＤ）およびＩｇＥ（Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ　Ｅ；免疫グロブリンＥ）の５種類のクラス（アイソタイプ）のいずれでもよいが、ＩｇＧまたはＩｇＭが好ましく、ＩｇＧがより好ましい。

また、類縁体とは、免疫グロブリンの構造または機能が少なくとも部分的に保持された、天然の、または人工的に作製された、タンパク質またはタンパク質コンジュゲートをいう。

また、フラグメントとは、酵素的な処理または遺伝子工学的な設計によって作製された、免疫グロブリンの部分構造を有するタンパク質をいう。

また、融合体とは、各種サイトカイン、サイトカイン受容体等の生物活性を有するタンパク質の機能部分を、免疫グロブリンの全体または一部と遺伝子工学的に融合させて作製したタンパク質をいう。

[0105] また、誘導体とは、ヒト免疫グロブリンのＦｃ領域と非ヒト哺乳動物免疫グロブリンのＦａｂ領域とを融合させたキメラ抗体、ヒト免疫グロブリンのいくつかのＦｃ領域と非ヒト哺乳動物免疫グロブリンのいくつかのＦｖ領域とを融合させたキメラ抗体、非ヒト哺乳動物免疫グロブリンのＣＤＲ（Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ　Ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　Ｒｅｇｉｏｎ；相補性決定領域）部分を除いた残余の部分とヒト免疫グロブリンのＣＤＲ部分とを融合させた非ヒト哺乳動物化抗体、非ヒト哺乳動物免疫グロブリンのＦｃ領域とヒト免疫グロブリンのＦａｂ（Ｆｒａｇｍｅｎｔ，　ａｎｔｉｇｅｎ　ｂｉｎｄｉｎｇ；抗体結合断片）領域とを融合させたキメラ抗体、非ヒト哺乳動物免疫グロブリンのいくつかのＦｃ領域とヒト免疫グロブリンのいくつかのＦｖ領域とを融合させたキメラ抗体、ヒト免疫グロブリンのＣＤＲ部分を除いた残余の部分と非ヒト哺乳動物免疫グロブリンＣＤＲ部分とを融合させたヒト化抗体、非ヒト哺乳動物免疫グロブリンのＦｃ領域と非ヒト哺乳動物免疫グロブリンのＦａｂ領域とを融合させたキメラ抗体、非ヒト哺乳動物免疫グロブリンのいくつかのＦｃ領域と非ヒト哺乳動物免疫グロブリンのいくつかのＦｖ領域とを融合させたキメラ抗体、非ヒト哺乳動物免疫グロブリンのＣＤＲ（Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒｉｔｙ　Ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｎｇ　Ｒｅｇｉｏｎ；相補性決定領域）部分を除いた残余の部分と非ヒト哺乳動物免疫グロブリンＣＤＲ部分とを融合させた非ヒト哺乳動物型抗体、およびこれらの化学的修飾を加えたタンパク質であってＦｃ領域を保持するタンパク質をいう。

抗体としては、モノクローナル抗体または免疫グロブリンのＦｃ領域を有する融合体が好ましく、モノクローナル抗体がより好ましい。

[0106] 《環状ペプチドのさらに具体的な説明》

上記環状ペプチドをより具体的に説明する。

なお、ここでは、本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体にアフィニティリガンドとして導入する前の環状ペプチドについて説明する。

[0107] 本発明において、アミノ酸は、原則として、国際純正・応用化学連合と国際生化学・分子生物学連合による共同命名委員会（ＩＮＴＥＲＮＡＴＩＯＮＡＬ ＵＮＩＯＮ ＯＦ ＰＵＲＥ ＡＮＤ ＡＰＰＬＩＥＤ ＣＨＥＭＩＳＴＲＹ ａｎｄ ＩＮＴＥＲＮＡＴＩＯＮＡＬ ＵＮＩＯＮ ＯＦ ＢＩＯＣＨＥＭＩＳＴＲＹ ＡＮＤ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ ＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ Ｊｏｉｎｔ Ｃｏｍｍｉｓｓｉｏｎ ｏｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ（ＪＣＢＮ））で採用された名称、略号等を用いて表す。また、アミノ酸残基は、そのアミノ酸残基が由来するアミノ酸の略号を用いて表す。なお、アミノ酸残基には、Ｎ末端アミノ酸（Ｎ末端残基）およびＣ末端アミノ酸（Ｃ末端残基）を含む。

特に明示しない限り、ペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列（「１次構造」ともいう。）は、左端から右端にかけてＮ末端からＣ末端となるようにアミノ酸残基を１次元に並べて表す。ペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列中のアミノ酸残基を位置も含めて特定する場合には、アミノ酸残基の略号の右側にＮ末端側からの何番目のアミノ酸残基であるかを示す数字を付して表す場合がある。例えば、Ｎ末端から２番目のＬ－リシンをＬｙｓ２と表す場合がある。

[0108] また、アミノ酸をその名称を用いて表した場合であって、エナンチオマーの関係にある異性体、すなわち、Ｌ体およびＤ体が存在するときは、Ｌ体およびＤ体の別を明示的に示した場合を除いて、原則としてＬ体を表すものとする。例えば、「イソロイシン」は「Ｌ－イソロイシン」を表すものとし、「イソロイシン」のエナンチオマーは「Ｄ－イソロイシン」と表すものとする。アミノ酸残基についても同様である。

[0109] また、アミノ酸をその略号（３文字略号または１文字略号）を用いて表した場合であって、エナンチオマーの関係にある異性体、すなわち、Ｌ体およびＤ体が存在するときは、Ｌ体およびＤ体の別を明示的に示した場合を除いて、原則としてＬ体を表すものとする。ただし、任意のアミノ酸を表す「Ｘ」はこの限りではない。例えば、「Ｌｙｓ」および「Ｌ－Ｌｙｓ」はいずれも「Ｌ－リシン」を表すものとし、「Ｄ－Ｌｙｓ」は「Ｄ－リシン」を表すものとする。アミノ酸残基についても同様である。

[0110] また、アミノ酸をその名称を用いて表した場合であって、ジアステレオマーの関係にある異性体が存在する場合は、その名称により特定されるアミノ酸には含まれないものとする。ジアステレオマーは接頭辞「アロ」を用いて異なる種類のアミノ酸として扱う。例えば、「トレオニン」および「Ｌ－トレオニン」は「Ｌ－アロトレオニン」を含まず、「Ｄ－トレオニン」は「Ｄ－アロトレオニン」を含まないものとする。アミノ酸残基についても同様である。

[0111] １文字略号および３文字略号が公式に認められたアミノ酸の名称および略号（１文字略号、３文字略号）を表１に示す。

[0112] [表1]

表1

一文字略号	三文字略号	名称
A	Ala	L-アラニン
B	Asx	L-アスパラギン酸又はL-アスパラギン
C	Cys	L-システイン
D	Asp	L-アスパラギン酸
E	Glu	L-グルタミン酸
F	Phe	L-フェニルアラニン
G	Gly	グリシン
H	His	L-ヒスチジン
I	Ile	L-イソロイシン
K	Lys	L-リシン
L	Leu	L-ロイシン
M	Met	L-メチオニン
N	Asn	L-アスパラギン

一文字略号	三文字略号	名称
O	Pyl	L-ピロリシン
P	Pro	L-プロリン
Q	Gln	L-グルタミン
R	Arg	L-アルギニン
S	Ser	L-セリン
T	Thr	L-トレオニン
U	Sec	L-セレノシステイン
V	Val	L-バリン
W	Trp	L-トリプトファン
X	Xaa	任意のアミノ酸
Y	Tyr	L-チロシン
Z	Glx	L-グルタミン酸又はL-グルタミン

[0113] アミノ酸は、表１に挙げるものに限定されず、異常アミノ酸と称されるアミノ酸を使用することもできる。異常アミノ酸の例は以下の表２に挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0114]

[表2]

表2

三文字略号	名称	三文字略号	名称
Aad	ホモグルタミン酸	Gla	4-カルボキシグルタミン酸
βAad	3-アミノアジピン酸	Glp	5-オキソプロリン
Abu	2-アミノブタン酸	Hcy	ホモシステイン
A_2bu	2,4-ジアミノブタン酸	Hse	ホモセリン
Ahx	2-アミノヘキサン酸	Hsl	ホモセリンラクトン
Ahe	2--アミノヘプタン酸	5Hyl	5-ヒドロキシリシン（Hyl）
Aib	2－アミノイソ酪酸	aHyl	アロ－ヒドロキシリシン
εAhx	6-アミノヘキサン酸	3Hyp	3-ヒドロキシプロリン
βAla	β-アラニン	4Hyp	4-ヒドロキシプロリン
Ape	2-アミノペンタン酸	aIle	アロ－イソロイシン
A_2pr	2,3-ジアミノプロパン酸	Nle	ノルロイシン
Apm	2-アミノピメリン酸	Nva	ノルバリン
A_2pm	2,6-ジアミノピメリン酸	Orn	オルニチン
Cit	シトルリン	Sar	サルコシン
Cya	システイン酸	aThr	アロ－トレオニン
Dbu	2,4-ジアミノブタン酸	Thx	チロキシン
Dpm	2,6-ジアミノピメリン酸	Pen	ペニシラミン
Dpr	2,3-ジアミノプロパン酸		

[0115] 《式（Ｉ）》

上記環状ペプチドは、好ましくは下記式（Ｉ）によって表される環状ペプチドである。

$R^N-X_g-[X_i-X^a-X_m-X^1-X^2-X^3-X_n-X^b-X_j]_k-X_h-R^C$ ・・・（Ｉ）

[0116] 式（Ｉ）中、例えば、X_nは、ｎ個のＸが連結していることを意図する。言い換えれば、－（Ｘ）$_n$－ともいえる。なお、X_g、X_i、X_m、X_j、およびX_hの定義も、上記X_nと同様である。

[0117] （環状部、直鎖部、架橋部および抗体結合部）

本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体に用いる環状ペプチドにおいて、ポリペプチド鎖のうち、架橋によって閉じた環の部分を環状部、環状部に含まれない部分を直鎖部という。また、環状部のうち、本発明の環状ペプチドの分子内架橋構造を形成している部分を架橋部といい、本発明の環状ペプチドの抗体結合性に強く寄与する分を抗体結合部という。

式（Ｉ）によって表される環状ペプチドの環状部は「$X^a-X_m-X^1-X^2-X^3-X_n-X^b$」部分であり、直鎖部は「$X_g$」、「$X_h$」、「$X_i$」、および「$X_j$」であり、架橋部は「$X^a$」および「$X^b$」であり、抗体結合部は「$X^1-X^2-X^3$」である。

また、式（１）中、［$X_i-X^a-X_m-X^1-X^2-X^3-X_n-X^b-X_j$］を繰返し部という場合がある。

[0118]（X^1、X^2およびX^3）

上記式（１）において、X^1は、Ｌ－ロイシン残基、Ｌ－イソロイシン残基、Ｌ－メチオニン残基、Ｌ－リジン残基、またはＬ－アルギニン残基であり、好ましくはＬ－ロイシン残基またはＬ－イソロイシン残基であり、より好ましくはＬ－ロイシン残基である。

また、上記式（１）において、X^2は、Ｌ－バリン残基またはＬ－イソロイシン残基であり、好ましくはＬ－バリン残基である。

また、上記式（１）において、X^3は、Ｌ－トリプトファン残基またはＬ－フェニルアラニン残基であり、好ましくはＬ－トリプトファン残基である。

[0119]（X^aおよびX^b）

式（Ｉ）中、X^aおよびX^bは、以下の（ａ）～（ｄ）のうち、いずれか１つである。

[0120]（ａ）X^aおよびX^bがジスルフィド結合によって架橋している。

X^aおよびX^bは、好ましくは、それぞれ独立に、側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、より好ましくは、X^aおよびX^bの少なくとも一方がＬ－システインおよびＤ－システイン以外の側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、さらに好ましくは、X^aおよびX^bの両方がＬ－システインおよびＤ－システイン以外の側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基である。

[0121] すなわち、X^aおよびX^b間のジスルフィド結合は、好ましくは、側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する２つのアミノ酸残基間のジスルフィド結合であり、より好ましくは、Ｌ－システインおよびＤ－システイン以外の

側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基と側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基との間のジスルフィド結合であり、さらに好ましくはＬ－システインおよびＤ－システイン以外の側鎖にチオール基を有する２つのアミノ酸残基間のジスルフィド結合である。

[0122] X^aおよびX^b間のジスルフィド結合により架橋されてなる環状ペプチドの薬品耐性は、通常、X^aおよびX^bの両方がＬ－システインまたはＤ－システインに由来するアミノ酸残基である場合に比べて、X^aおよびX^bのうち一方がＬ－システインおよびＤ－システイン以外の側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基である場合に、より高いものとなり、X^aおよびX^bの両方がＬ－システインおよびＤ－システイン以外の側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基である場合に、さらに高いものとなる。すなわち、薬品耐性の観点からは、ジスルフィド結合は、Ｌ－システインまたはＤ－システインに由来する２つのアミノ酸残基間のジスルフィド結合以外のジスルフィド結合がより好ましく、Ｌ－システインおよびＤ－システイン以外の側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する２つのアミノ酸残基間のジスルフィド結合がさらに好ましく、ホモシステインに由来する２つのアミノ酸残基間のジスルフィド結合が特に好ましい。

[0123] 上記側鎖にチオール基を有するアミノ酸としては、例えば、Ｌ－システイン、Ｄ－システイン、Ｌ－ホモシステイン、Ｄ－ホモシステイン、Ｌ－ペニシラミン、およびＤ－ペニシラミン等が挙げられ、システイン、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択されるアミノ酸が好ましい。

また、上記Ｌ－システインおよびＤ－システイン以外の側鎖にチオール基を有するアミノ酸としては、例えば、Ｌ－ホモシステイン、Ｄ－ホモシステイン、Ｌ－ペニシラミン、およびＤ－ペニシラミン等が挙げられ、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択されるアミノ酸が好ましい。

[0124] （ｂ）X^aおよびX^bがチオエーテル結合によって架橋している。

X^aおよびX^bは、好ましくは、一方が側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、他方が側鎖にハロアセチル基を有するアミ

ノ酸に由来するアミノ酸残基である。

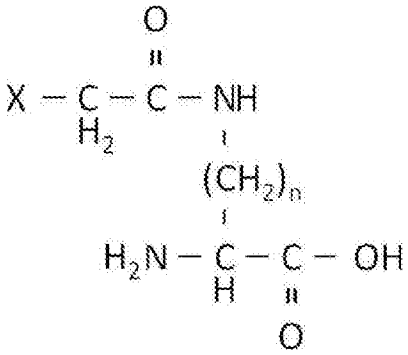
[0125] 上記側鎖にチオール基を有するアミノ酸は、好ましくは、Ｌ－システインおよびＤ－システイン以外の側鎖にチオール基を有するアミノ酸である。

また、上記側鎖にチオール基を有するアミノ酸は、好ましくは、システイン、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸である。

さらに、上記側鎖にチオール基を有するアミノ酸は、より好ましくは、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸であり、さらに好ましくは、ホモシステインである。

[0126] 上記側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸は、好ましくは、下記式で表されるアミノ酸である。

[0127] [化10]



[0128] ただし、上記式中、ｎは１以上の整数であり、Ｘはハロゲン原子である。

なお、ｎは、好ましくは１≦ｎ≦４を満たす整数であり、Ｘは、好ましくは塩素原子または臭素原子であり、より好ましくは塩素原子である。

[0129] 上記式は、

ｎ＝１であるとき、Ｎ^{3}－ハロアセチル－Ｌ－２，３－ジアミノプロパン酸〔（２Ｓ）－２－アミノ－３－［（２－ハロアセチル）アミノ］プロパン酸〕またはＮ^{3}－ハロアセチル－Ｄ－２，３－ジアミノプロパン酸〔（２Ｒ）－２－アミノ－３－［（２－ハロアセチル）アミノ］プロパン酸〕を表し、

ｎ＝２であるとき、Ｎ^{4}－ハロアセチル－Ｌ－２，４－ジアミノブタン酸〔（２Ｓ）－２－アミノ－４－［（２－ハロアセチル）アミノ］ブタン酸〕ま

たはN^{4}－ハロアセチル－Ｄ－２，４－ジアミノブタン酸〔（２Ｒ）－２－アミノ－４－［（２－ハロアセチル）アミノ］ブタン酸〕を表し、

ｎ＝３であるとき、Ｎ－δ－ハロアセチル－Ｌ－オルニチン〔（２Ｓ）－２－アミノ－５－［（２－ハロアセチル）アミノ］ペンタン酸〕またはＮ－δ－ハロアセチル－Ｄ－オルニチン〔（２Ｒ）－２－アミノ－５－［（２－ハロアセチル）アミノ］ペンタン酸〕を表し、

ｎ＝４であるとき、Ｎ－ε－ハロアセチル－Ｌ－リシン〔（２Ｓ）－２－アミノ－６－［（２－ハロアセチル）アミノ］ヘキサン酸〕またはＮ－ε－ハロアセチル－Ｄ－リシン〔（２Ｒ）－２－アミノ－６－［（２－ハロアセチル）アミノ］ヘキサン酸〕を表す。

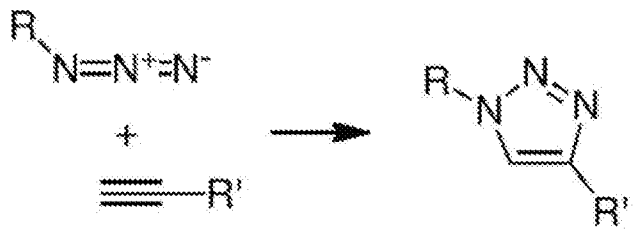
[0130] 上記側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸は、とりわけ好ましくはＮ－ε－クロロアセチル－Ｌ－リシン、Ｎ－ε－クロロアセチル－Ｄ－リシン、Ｎ－δ－クロロアセチル－Ｌ－オルニチン、またはＮ－δ－クロロアセチル－Ｄ－オルニチンであり、特に好ましくはＮ－ε－クロロアセチル－Ｌ－リシンまたはＮ－δ－クロロアセチル－Ｌ－オルニチンであり、最も好ましくはＮ－δ－クロロアセチル－Ｌ－オルニチンである。

[0131] （ｃ）Ｘ^{a}およびＸ^{b}がトリアゾール結合によって架橋している。

Ｘ^{a}およびＸ^{b}は、好ましくは、一方が側鎖にアジド基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、他方が側鎖にアルキニル基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基である。

[0132] ここで、トリアゾール結合は、下記式で表されるヒュスゲン反応によってアジド基とアルキニル基とが形成した結合である。

[0133] [化11]

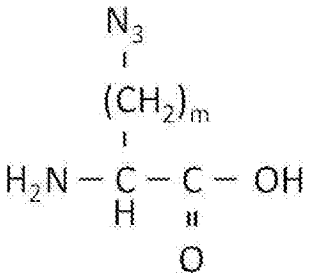


[0134] ただし、上記式中、Ｒはアジド基を側鎖に有するアミノ酸残基のアジド基

以外の部分を表し、Ｒ’は側鎖にアルキニル基を有するアミノ酸残基のエチニル基以外の部分を表す。

[0135] 上記側鎖にアジド基を有するアミノ酸としては、例えば、下記式で表されるものが挙げられる。ただし、下記式中、ｍは１以上の整数である。

[0136] [化12]



[0137] ｍは１以上であれば特に限定されないが、経済性の観点から、好ましくは１≦ｍ≦４であり、より好ましくは２≦ｍ≦４であり、さらに好ましくは３≦ｍ≦４であり、いっそう好ましくはｍ＝４である。

ｍ＝１であるとき、上記式で表される側鎖にアジド基を有するアミノ酸は、β－アジド－Ｌ－アラニンまたはβ－アジド－Ｄ－アラニンであり、好ましくはβ－アジド－Ｌ－アラニンである。

ｍ＝２であるとき、上記式で表される側鎖にアジド基を有するアミノ酸は、γ－アジド－Ｌ－ホモアラニンまたはγ－アジド－Ｄ－ホモアラニンであり、好ましくはγ－アジド－Ｌ－ホモアラニンである。

ｍ＝３であるとき、上記式で表される側鎖にアジド基を有するアミノ酸は、δ－アジド－Ｌ－オルニチンまたはδ－アジド－Ｄ－オルニチンであり、好ましくはδ－アジド－Ｌ－オルニチンである。

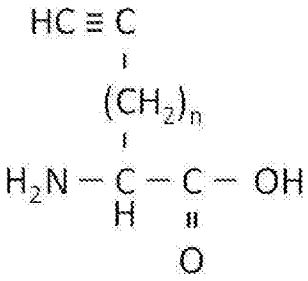
ｍ＝４であるとき、上記式で表される側鎖にアジド基を有するアミノ酸は、ε－アジド－Ｌ－リシンまたはε－アジド－Ｄ－リシンであり、好ましくはε－アジド－Ｌ－リシンである。

[0138] 上記側鎖にアジド基を有するアミノ酸は、とりわけ好ましくはε－アジド－Ｌ－リシン、δ－アジド－Ｌ－オルニチン、またはγ－アジド－Ｌ－ホモアラニンであり、特に好ましくはε－アジド－Ｌ－リシンまたはδ－アジド

－Ｌ－オルニチンであり、最も好ましくはε－アジド－Ｌ－リシンである。

[0139] 上記側鎖にアルキニル基を有するアミノ酸としては、例えば、下記式で表されるものが挙げられる。ただし、下記式中、ｎは１以上の整数である。

[0140] [化13]



[0141] ｎは１以上であれば特に限定されないが、経済性の観点から、好ましくは１≦ｎ≦３であり、より好ましくは２≦ｎ≦３である。

ｎ＝１であるとき、上記式で表される側鎖にアルキニル基を有するアミノ酸は、２－プロパルギル－Ｌ－グリシンまたは２－プロパルギル－Ｄ－グリシンであり、好ましくは２－プロパルギル－Ｌ－グリシンである。

ｎ＝２であるとき、上記式で表される側鎖にアルキニル基を有するアミノ酸は、２－プロパルギル－Ｌ－アラニン（２－プロパルギル－Ｌ－ホモグリシン）または２－プロパルギル－Ｄ－アラニン（２－プロパルギル－Ｄ－ホモグリシン）であり、好ましくは２－プロパルギル－Ｌ－アラニン（２－プロパルギル－Ｌ－ホモグリシン）である。

ｎ＝３であるとき、上記式で表される側鎖にアルキニル基を有するアミノ酸は、２－プロパルギル－Ｌ－ホモアラニン（２－プロパルギル－Ｌ－ビスホモグリシン）または２－プロパルギル－Ｄ－ホモアラニン（２－プロパルギル－Ｄ－ビスホモグリシン）であり、好ましくは２－プロパルギル－Ｌ－ホモアラニン（２－プロパルギル－Ｌ－ビスホモグリシン）である。

[0142] 上記側鎖にアルキニル基を有するアミノ酸は、とりわけ好ましくは２－プロパルギル－Ｌ－アラニン（２－プロパルギル－Ｌ－ホモグリシン）または２－プロパルギル－Ｌ－ホモアラニン（２－プロパルギル－Ｌ－ビスホモグリシン）であり、特に好ましくは２－プロパルギル－Ｌ－ホモアラニン（２

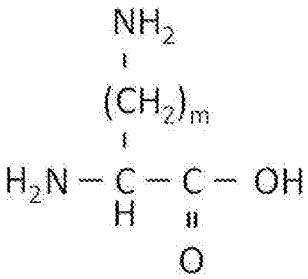
－プロパルギル－Ｌ－ビスホモグリシン）である。

[0143] （ｄ）X^aおよびX^bがアミド結合によって架橋している。

X^aおよびX^bは、好ましくは、一方が側鎖にアミノ基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基であり、他方が側鎖にカルボキシ基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基である。

[0144] 上記側鎖にアミノ基を有するアミノ酸としては、例えば、下記式で表されるものが挙げられる。ただし、下記式中、ｍは１以上の整数である。

[0145] [化14]



[0146] ｍは１以上であれば特に限定されないが、経済性の観点から、好ましくは１≦ｍ≦４であり、より好ましくは２≦ｍ≦４であり、さらに好ましくは３≦ｍ≦４であり、いっそう好ましくはｍ＝４である。

ｍ＝１であるとき、上記式で表される側鎖にアミノ基を有するアミノ酸は、Ｌ－２，３－ジアミノプロパン酸〔（２Ｓ）－２，３－ジアミノプロパン酸〕またはＤ－２，３－ジアミノプロパン酸〔（２Ｒ）－２，３－ジアミノプロパン酸〕であり、好ましくはＬ－２，３－ジアミノプロパン酸〔（２Ｓ）－２，３－ジアミノプロパン酸〕である。

ｍ＝２であるとき、上記式で表される側鎖にアミノ基を有するアミノ酸は、Ｌ－２，４－ジアミノブタン酸〔（２Ｓ）－２，４－ジアミノブタン酸〕またはＤ－２，４－ジアミノブタン酸〔（２Ｒ）－２，４－ジアミノブタン酸〕であり、好ましくはＬ－２，４－ジアミノブタン酸〔（２Ｓ）－２，４－ジアミノブタン酸〕である。

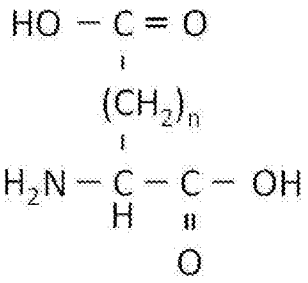
ｍ＝３であるとき、上記式で表される側鎖にアミノ基を有するアミノ酸は、Ｌ－オルニチンまたはＤ－オルニチンであり、好ましくはＬ－オルニチン

である。

ｍ＝４であるとき、上記式で表される側鎖にアミノ基を有するアミノ酸は、Ｌ－リシンまたはＤ－リシンであり、好ましくはＬ－リシンである。

[0147] 上記側鎖にカルボキシ基を有するアミノ酸としては、例えば、下記式で表されるものが挙げられる。ただし、下記式中、ｎは１以上の整数である。

[0148] [化15]



[0149] ｎは１以上であれば特に限定されないが、経済性の観点から、好ましくは１≦ｎ≦３であり、より好ましくはｎ＝１または２であり、さらに好ましくはｎ＝２である。

ｎ＝１であるとき、上記式で表される側鎖にカルボキシ基を有するアミノ酸は、Ｌ－アスパラギン酸またはＤ－アスパラギン酸であり、好ましくはＬ－アスパラギン酸である。

ｎ＝２であるとき、上記式で表される側鎖にカルボキシ基を有するアミノ酸は、Ｌ－グルタミン酸またはＤ－グルタミン酸であり、好ましくはＬ－グルタミン酸である。

ｎ＝３であるとき、上記式で表される側鎖にカルボキシ基を有するアミノ酸は、Ｌ－ホモグルタミン酸またはＤ－ホモグルタミン酸であり、好ましくはＬ－ホモグルタミン酸である。

[0150] （Ｘ）

式（Ｉ）中、Ｘは、アミノ酸残基を表し、Ｘが複数である場合は、複数のＸは互いに同一であっても異なっていてもよい。

上記Ｘは、アミノ酸残基であればよく、特に限定されないが、表１に示すアミノ酸（Ｂ、ＺおよびＸを除く。）および表２に示すアミノ酸からなる群

から選択されるアミノ酸に由来するアミノ酸残基であることが好ましく、表１に示すアミノ酸（Ｂ、ＺおよびＸを除く。）からなる群から選択されるアミノ酸に由来するアミノ酸残基であることがより好ましい。また、存在する場合には、これらのアミノ酸のエナンチオマーまたはジアステレオマーに由来するアミノ酸残基であってもよい。

[0151]（Ｎ末端基およびＣ末端基）

式（Ｉ）中、R^Nは、Ｎ末端基を表す。

上記Ｎ末端基としては、例えば、アミノ基が挙げられ、当該アミノ基は、Ｎ－アセチル化、Ｎ－ホルミル化、またはＮ－アシル化等のＮ末端修飾がされていてもよい。

[0152] 式（Ｉ）中、R^Cは、Ｃ末端基を表す。

上記Ｃ末端基としては、例えば、カルボキシ基が挙げられ、当該カルボキシ基は、アミド化等のＣ末端修飾がされていてもよい。

[0153]（ｇおよびｈ）

式（Ｉ）中、ｇおよびｈは、それぞれ独立に、０以上の整数である。

ｇは、好ましくは０≦ｇ≦２０を満たし、より好ましくは０≦ｇ≦１０を満たし、さらに好ましくは０≦ｇ≦５を満たす。

ｈは、好ましくは０≦ｈ≦２０を満たし、より好ましくは０≦ｈ≦１０を満たし、さらに好ましくは０≦ｈ≦５を満たす。

[0154]（ｉおよびｊ）

式（Ｉ）中、ｉおよびｊは、それぞれ独立に、０以上の整数である。

ｉは、好ましくは０≦ｉ≦２０を満たし、より好ましくは０≦ｉ≦１０を満たし、さらに好ましくは０≦ｉ≦５を満たす。

ｊは、好ましくは０≦ｊ≦２０を満たし、より好ましくは０≦ｊ≦１０を満たし、さらに好ましくは０≦ｊ≦５を満たす。

[0155]（ｍおよびｎ）

式（Ｉ）中、ｍおよびｎは、それぞれ、０≦ｍ≦９、および、０≦ｎ≦９を満たす整数である。

さらに、ｍおよびｎは、３≦ｍ＋ｎ≦９を満たし、好ましくは４≦ｍ＋ｎ≦８を満たし、より好ましくは５≦ｍ＋ｎ≦７を満たす。

[0156]（環状部のアミノ酸残基数）

上記式（Ｉ）において、環状部［$X^a-X_m-X^1-X^2-X^3-X_n-X^b$］のアミノ酸残基数［（ｍ＋ｎ＋５）残基］は、８～１４酸基であり、好ましくは９～１３残基であり、より好ましくは１０～１２残基である。

環状部のアミノ酸残基数がこの範囲内であると、環状ペプチドの分子内ひずみが大きくなり過ぎず、αヘリックス等の高次構造が安定化するため、本発明の環状ペプチドの抗体結合性が優れる。

[0157]（ｋ）

ｋは、ｋ≧１を満たす整数であり、好ましくは１≦ｋ≦３であり、より好ましくは１≦ｋ≦２であり、さらに好ましくはｋ＝１である。

繰返し単位の数は、特に限定されるものではないが、繰返し単位の数が多いほど環状部を多く含むことができるため、環状ペプチドの抗体結合性を向上させることができる可能性があり、繰返し単位の数が少ないほど総アミノ酸残基数を少なくできるため、環状ペプチドの抗原性を抑制することができる可能性がある。環状ペプチドの合成コストの観点からは、アミノ酸残基数が少ない方が好ましく、繰返し単位の数の少ないことが好ましい。

[0158]（ｋ≧２である場合の繰返し単位間の異同）

また、ｋ≧２である場合、すなわち、式（Ｉ）によって表される環状ペプチドが繰返し単位［$X_i-X^a-X_m-X^1-X^2-X^3-X_n-X^b-X_j$］を２個以上含む場合は、繰返し単位中の$X^1$、$X^2$、$X^3$、$X^a$、$X^b$、$X_i$、$X_j$、$X_m$、および$X_n$は、それぞれ、繰返し単位間で同一であってもよいし、相違していてもよい。

[0159]（環状ペプチドの総アミノ酸残基数）

さらに、上記式（Ｉ）において、環状ペプチドの総アミノ酸残基数は、好ましくは８～５０残基であり、より好ましくは９～４０残基であり、さらに好ましくは１０～３０残基であり、いっそう好ましくは１０～２０残基であ

る。

すなわち式（Ｉ）中、ｇ、ｈ、ｊ、ｊ、ｍ、ｎ、およびｋは、好ましくは８≦ｇ＋ｈ＋（ｉ＋ｊ＋ｍ＋ｎ＋５）×ｋ≦５０を満たし、より好ましくは９≦ｇ＋ｈ＋（ｉ＋ｊ＋ｍ＋ｎ＋５）×ｋ≦４０を満たし、さらに好ましくは１０≦ｇ＋ｈ＋（ｉ＋ｊ＋ｍ＋ｎ＋５）×ｋ≦３０を満たし、いっそう好ましくは１０≦ｇ＋ｈ＋（ｉ＋ｊ＋ｍ＋ｎ＋５）×ｋ≦２０を満たす。

通常、アミノ酸残基数が多くなるほど合成コストが高くなるため、経済的な観点からは、アミノ酸残基の総数は少ない方が好ましい。

[0160] 《式（ＩＡ）》

また、上記環状ペプチドは、より好ましくは、下記式（ＩＡ）によって表される環状ペプチドである。

$R^N-X_g-[X_{p2}-X^4{}_r-X_{p1}-X^a-X_m-X^1-X^2-X^3-X_n-X^b-X_{q1}-X^5{}_s-X_{q2}]_k-X_h-R^C$ ・・・（ＩＡ）

[0161] 式（ＩＡ）中、R^N、R^C、X^1、X^2、X^3、X^a、X^b、X_g、X_h、X_m、X_n、Ｘ、ｇ、ｈ、ｍ、ｎ、およびｋは、いずれも、上記式（Ｉ）中におけるものと同義である。

また、式（ＩＡ）中、X_nは、式（Ｉ）中のX_nと同様に、Ｘがｎ個連結していることを意図する。X_m、X_{p1}、X_{p2}、X_{q1}、およびX_{q2}についても同様である。

さらに、式（ＩＡ）中、$X^4{}_r$および$X^5{}_s$は、それぞれ、X^4がｒ個連結していること、および、X^5がｓ個連結していること、を意図する。

[0162] （環状部、直鎖部、架橋部および抗体結合部）

式（ＩＡ）によって表される環状ペプチドの直鎖部は「X_g」、「X_h」、「$X_{p2}-X^4{}_r-X_{p1}$」、および「$X_{q1}-X^5{}_s-X_{q2}$」である。環状部、架橋部、および抗体結合部は式（Ｉ）で表される環状ペプチドと同様である。

また、式（ＩＡ）中、繰返し単位は$[X_{p2}-X^4{}_r-X_{p1}-X^a-X_m-X^1-X^2-X^3-X_n-X^b-X_{q1}-X^5{}_s-X_{q2}]$である。

[0163] （X^4およびX^5）

式（ＩＡ）中、X^4およびX^5は、それぞれ独立に、側鎖にカルボキシ基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基または側鎖にヒドロキシ基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基を表す。

[0164] 上記側鎖にカルボキシ基を有するアミノ酸としては、例えば、Ｌ－アスパラギン酸、Ｄ－アスパラギン酸、Ｌ－グルタミン酸、Ｄ－グルタミン酸、Ｌ－ホモグルタミン酸、およびＤ－ホモグルタミン酸等が挙げられる。

[0165] 上記側鎖にヒドロキシ基を有するアミノ酸としては、例えば、Ｌ－セリン、Ｄ－セリン、Ｌ－ホモセリン、Ｄ－ホモセリン、Ｌ－チロシン、Ｄ－チロシン、Ｌ－トレオニン、Ｄ－トレオニン、Ｌ－アロトレオニン、およびＤ－アロトレオニン等が挙げられる。

[0166] 上記X^4およびX^5は、好ましくは、それぞれ独立に、Ｌ－セリン残基、Ｄ－セリン残基、Ｌ－ホモセリン残基、Ｄ－ホモセリン残基、Ｌ－アスパラギン酸残基、Ｄ－アスパラギン酸残基、Ｌ－グルタミン酸残基、Ｄ－グルタミン酸残基、Ｌ－ホモグルタミン酸残基、Ｄ－ホモグルタミン酸残基、Ｌ－チロシン残基、Ｄ－チロシン残基、Ｌ－ホモチロシン残基、Ｄ－ホモチロシン残基、Ｌ－トレオニン残基、Ｄ－トレオニン残基、Ｌ－アロトレオニン残基、およびＤ－アロトレオニン残基からなる群から選択されるアミノ酸残基であり、より好ましくは、それぞれ独立に、Ｌ－アスパラギン酸残基、Ｄ－アスパラギン酸残基、Ｌ－トレオニン残基およびＤ－トレオニン残基からなる群から選択されるアミノ酸残基であり、さらに好ましくは、X^4がＬ－アスパラギン酸残基であり、かつ、X^5がＬ－トレオニン残基である。

[0167] 上記X^4およびX^5が、それぞれ独立に、側鎖にカルボキシ基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基または側鎖にヒドロキシ基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基であると、環状部の抗体結合部と抗体とが水素結合および／または静電相互作用により、さらに強く相互作用することができ、抗体結合性が改善すると考えられる。

[0168] （ｐ１、ｐ２、ｑ１およびｑ２）

式（ＩＡ）中、ｐ１、ｐ２、ｑ１、およびｑ２は、それぞれ独立に、０以

上の整数である。

ｐ１は、好ましくは０≦ｐ１≦２０を満たし、より好ましくは０≦ｐ１≦１０を満たし、さらに好ましくは０≦ｐ１≦５を満たし、いっそう好ましくは０≦ｐ１≦２を満たす。

ｐ２は、好ましくは０≦ｐ２≦２０を満たし、より好ましくは０≦ｐ２≦１０を満たし、さらに好ましくは０≦ｐ２≦５を満たし、いっそう好ましくは０≦ｐ２≦２を満たす。

ｑ１は、好ましくは０≦ｑ１≦２０を満たし、より好ましくは０≦ｑ１≦１０を満たし、さらに好ましくは０≦ｑ１≦５を満たし、いっそう好ましくは０≦ｑ１≦２を満たす。

ｑ２は、好ましくは０≦ｑ２≦２０を満たし、より好ましくは０≦ｑ２≦１０を満たし、さらに好ましくは０≦ｑ２≦５を満たし、いっそう好ましくは０≦ｑ２≦２を満たす。

[0169]（ｒおよびｓ）

式（ＩＡ）中、ｒおよびｓは、それぞれ、０≦ｒ≦５、０≦ｓ≦５、および、１≦Ｍａｘ（ｒ，ｓ）≦５を満たす整数であり、好ましくは、０≦ｒ≦４、０≦ｓ≦４、および、１≦Ｍａｘ（ｒ，ｓ）≦４を満たす整数であり、より好ましくは、０≦ｒ≦３、０≦ｓ≦３、および、１≦Ｍａｘ（ｒ，ｓ）≦３を満たす整数である。

ただし、Ｍａｘ（ｒ，ｓ）は、ｒ≠ｓであるとき、ｒとｓの２数のうち大きい方を表し、ｒ＝ｓであるとき、ｒまたはｓを表す。

[0170]（環状部のアミノ酸残基数）

上記式（ＩＡ）において、環状部［$X^{a}-X_{m}-X^{1}-X^{2}-X^{3}-X_{n}-X^{b}$］のアミノ酸残基数［（ｍ＋ｎ＋５）残基］は、上記式（Ｉ）と同様に、８～１４酸基であり、好ましくは９～１３残基であり、より好ましくは１０～１２残基である。

環状部のアミノ酸残基数がこの範囲内であると、環状ペプチドの分子内ひずみが大きくなり過ぎず、αヘリックス等の高次構造が安定化するため、本

発明の環状ペプチドの抗体結合性が優れる。

[0171] （ｋ≧２である場合の繰返し単位間の異同）

また、ｋ≧２である場合、すなわち、式（ＩＡ）によって表される環状ペプチドが繰返し単位［$X_{p2}-X^{4}_{r}-X_{p1}-X^{a}-X_{m}-X^{1}-X^{2}-X^{3}-X_{n}-X^{b}-X_{q1}-X^{5}_{s}-X_{q2}$］を２個以上含む場合は、繰返し単位中の$X^{1}$、$X^{2}$、$X^{3}$、$X^{a}$、$X^{b}$、$X^{4}_{r}$、$X^{5}_{s}$、$X_{m}$、$X_{n}$、$X_{p2}$、$X_{p1}$、$X_{q1}$、および$X_{q2}$は、それぞれ、繰返し単位間で同一であってもよいし、相違していてもよい。

[0172] （環状ペプチドの総アミノ酸残基数）

さらに、上記式（ＩＡ）において、環状ペプチドの総アミノ酸残基数は、好ましくは８～５０残基であり、より好ましくは９～４０残基であり、さらに好ましくは１０～３０残基であり、いっそう好ましくは１０～２０残基である。

すなわち、式（ＩＡ）中、ｇ、ｈ、ｍ、ｎ、ｐ１、ｐ２、ｑ１、ｑ２、ｒ、ｓ、およびｋは、好ましくは$8 \leqq g+h+(m+n+p1+p2+q1+q2+r+s+5)\times k \leqq 50$を満たし、より好ましくは$9 \leqq g+h+(m+n+p1+p2+q1+q2+r+s+5)\times k \leqq 40$を満たし、さらに好ましくは$10 \leqq g+h+(m+n+p1+p2+q1+q2+r+s+5)\times k \leqq 30$を満たし、いっそう好ましくは$10 \leqq g+h+(m+n+p1+p2+q1+q2+r+s+5)\times k \leqq 20$を満たす。

通常、アミノ酸残基数が多くなるほど合成コストが高くなるため、経済的な観点からは、アミノ酸残基の総数は少ない方が好ましい。

[0173] 《式（ＩＢ）》

また、上記環状ペプチドは、より好ましくは下記式（ＩＢ）によって表される環状ペプチドである。

$$R^{N}-X_{v1}-X^{6}_{t}-X_{v2}-[X_{i}-X^{a}-X_{m}-X^{1}-X^{2}-X^{3}-X_{n}-X^{b}-X_{j}]_{k}-X_{w2}-X^{7}_{u}-X_{w1}-R^{C} \quad \cdots (IB)$$

[0174] 式（ＩＢ）中、R^{N}、R^{C}、X^{1}、X^{2}、X^{3}、X^{a}、X^{b}、X_{i}、X_{j}、X_{m}、X

$_n$、X、i、j、m、n、およびkは、いずれも、上記式（I）中におけるものと同義である。

また、式（IB）中、X_nは、式（I）中のX_nと同様に、Xがn個連結していることを意図する。X_m、X_{v1}、X_{v2}、X_{w1}、およびX_{w2}についても同様である。

さらに、式（IB）中、$X^6{}_t$および$X^7{}_u$は、それぞれ、X^6がt個連結していること、および、X^7がu個連結していること、を意図する。

[0175]（環状部、直鎖部、架橋部および抗体結合部）

式（IB）によって表される環状ペプチドの直鎖部は「X_i」、「X_j」、「$X_{v1}-X^6{}_t-X_{v2}$」、および「$X_{w2}-X^7{}_u-X_{w1}$」である。環状部、架橋部、および抗体結合部は式（I）で表される環状ペプチドと同様である。

また、式（IB）中、繰返し単位は、式（I）と同様に、［$X_i-X^a-X_m-X^1-X^2-X^3-X_n-X^b-X_j$］である。

[0176]（X^6およびX^7）

式（IB）中、X^6およびX^7は、それぞれ独立に、側鎖に固定化官能基を有するアミノ酸に由来するアミノ酸残基を表し、X^6またはX^7が複数である場合は、複数のX^6またはX^7は互いに同一であっても異なっていてもよい。

[0177] 上記「固定化官能基」とは、基材および／または親水性ポリマー上の官能基（「反応性官能基」という場合がある。）と反応して共有結合を形成することができる官能基をいう。

このような固定化官能基としては、例えば、アミノ基、カルボキシ基、ヒドロキシ基、チオール基、ホルミル基（アルデヒド基）、カルバモイル基、アジド基、および、アルキニル基等が挙げられる。

上記環状ペプチドが有する固定化官能基と基材および／または親水性ポリマー上の官能基の組合せとしては、アミノ基とカルボキシ基（アミド結合形成反応）、アミノ基とホルミル基（還元的アミノ化反応）、アミノ基とエポキシ基、カルボキシ基とヒドロキシ基（エステル結合形成反応）、チオール基とチオール基（ジスルフィド結合）、チオール基とエポキシ基、および、

アジド基とアルキニル基（ヒュスゲン環化付加反応）等が挙げられる。

上記環状ペプチドが有する固定化官能基と基材および／または親水性ポリマー上の官能基とが反応して共有結合を形成することにより、上記環状ペプチドが担体に固定化される。なお、上記環状ペプチドが有する固定化官能基の少なくとも一部が基材および／または親水性ポリマー上の官能基と反応して共有結合を形成すればよく、すべての固定化官能基が基材および／または親水性ポリマー上の官能基と反応しなくてもよい。

[0178] 上記側鎖に固定化官能基を有するアミノ酸において、固定化官能基は、好ましくはアミノ基、チオール基およびアルデヒド基からなる群から選択される少なくとも１つであり、より好ましくはアミノ基およびチオール基からなる群から選択される少なくとも１つである。

[0179] 上記側鎖に固定化官能基を有するアミノ酸は、好ましくは、Ｌ－リシン、Ｄ－リシン、Ｌ－システイン、Ｄ－システイン、Ｌ－ホモシステインおよびＤ－ホモシステインからなる群から選択される少なくとも１種のアミノ酸である。

[0180] アミノ基を固定化官能基として用いることによって、担体上のカルボキシ基とアミド結合を介して結合することができ、容易にアフィニティリガンドとしての本発明の環状ペプチドを固定化することができる。

[0181] また、チオール基を固定化官能基として使用することによって、担体上のエポキシ基と共有結合を介して結合することができ、容易にアフィニティリガンドとしての本発明の環状ペプチドを固定化することができる。

[0182] 側鎖にアミノ基を有するアミノ酸として、Ｌ－リシン、およびＤ－リシン等があり、側鎖にチオール基を有するアミノ酸として、Ｌ－システイン、Ｄ－システインがあり、これらは比較的安価であることから、本発明の環状ペプチドの合成コストを抑制することができるため、経済的な観点から好ましい。

[0183] （ｔおよびｕ）

式（ＩＢ）中、ｔおよびｕは、それぞれ、０≦ｔ≦５、０≦ｕ≦５、およ

び、１≦Ｍａｘ（ｔ，ｕ）≦５を満たす整数であり、好ましくは０≦ｔ≦４、０≦ｕ≦４、１≦Ｍａｘ（ｔ，ｕ）≦４を満たす整数であり、より好ましくは０≦ｔ≦３、０≦ｕ≦３、１≦Ｍａｘ（ｔ，ｕ）≦３を満たす整数である。

ただし、Ｍａｘ（ｔ，ｕ）は、ｔ≠ｕであるとき、ｔとｕの２数のうち大きい方を表し、ｔ＝ｕであるとき、ｔまたはｕを表す。

[0184]（ｖ１、ｖ２、ｗ１およびｗ２）

式（ＩＢ）中、ｖ１、ｖ２、ｗ１、およびｗ２は、それぞれ独立に、０以上の整数である。

ｖ１は、好ましくは０≦ｖ１≦２０を満たし、より好ましくは０≦ｖ１≦１０を満たし、さらに好ましくは０≦ｖ１≦５を満たし、いっそう好ましくは０≦ｖ１≦２を満たす。

ｖ２は、好ましくは０≦ｖ２≦２０を満たし、より好ましくは０≦ｖ２≦１０を満たし、さらに好ましくは０≦ｖ２≦５を満たし、いっそう好ましくは０≦ｖ２≦２を満たす。

ｗ１は、好ましくは０≦ｗ１≦２０を満たし、より好ましくは０≦ｗ１≦１０を満たし、さらに好ましくは０≦ｗ１≦５を満たし、いっそう好ましくは０≦ｗ１≦２を満たす。

ｗ２は、好ましくは０≦ｗ２≦２０を満たし、より好ましくは０≦ｗ２≦１０を満たし、さらに好ましくは０≦ｗ２≦５を満たし、いっそう好ましくは０≦ｗ２≦２を満たす。

[0185]（環状部のアミノ酸残基数）

また、上記式（ＩＢ）において、環状部［$X^a-X_m-X^1-X^2-X^3-X_n-X^b$］のアミノ酸残基数［（ｍ＋ｎ＋５）残基］は、上記式（Ｉ）と同様に、８～１４酸基であり、好ましくは９～１３残基であり、より好ましくは１０～１２残基である。

環状部のアミノ酸残基数がこの範囲内であると、環状ペプチドの分子内ひずみが大きくなり過ぎず、αヘリックス等の高次構造が安定化するため、本

発明の環状ペプチドの抗体結合性が優れる。

[0186] （ｋ≧２である場合の繰返し単位間の異同）

また、ｋ≧２である場合、すなわち、式（ＩＢ）によって表される環状ペプチドが繰返し単位［$X_i-X^a-X_m-X^1-X^2-X^3-X_n-X^b-X_j$］を２個以上含む場合は、繰返し単位中の$X^1$、$X^2$、$X^3$、$X^a$、$X^b$、$X_m$、$X_n$、$X_i$、および$X_j$は、それぞれ、繰返し単位間で同一であってもよいし、相違していてもよい。

[0187] （環状ペプチドの総アミノ酸残基数）

さらに、上記式（ＩＢ）において、環状ペプチドの総アミノ酸残基数は、好ましくは８～５０残基であり、より好ましくは９～４０残基であり、さらに好ましくは１０～３０残基であり、いっそう好ましくは１０～２０残基である。

すなわち、式（ＩＢ）中、ｉ、ｊ、ｍ、ｎ、ｔ、ｕ、ｖ１、ｖ２、ｗ１、ｗ２、およびｋは、好ましくは$8 \leqq (i+j+m+n+5) \times k+t+u+v1+v2+w1+w2 \leqq 50$を満たし、より好ましくは$(i+j+m+n+5) \times k+t+u+v1+v2+w1+w2 \leqq 40$を満たし、さらに好ましくは$10 \leqq (i+j+m+n+5) \times k+t+u+v1+v2+w1+w2 \leqq 30$を満たし、いっそう好ましくは$10 \leqq (i+j+m+n+5) \times k+t+u+v1+v2+w1+w2 \leqq 20$を満たす。

通常、アミノ酸残基数が多くなるほど合成コストが高くなるため、経済的な観点からは、アミノ酸残基の総数は少ない方が好ましい。

[0188] 《式（ＩＣ）》

さらに、上記環状ペプチドは、さらに好ましくは下記式（ＩＣ）によって表される環状ペプチドである。

$R^N-X_{v1}-X^6_t-X_{v2}-[X_{p2}-X^4_r-X_{p1}-X^a-X_m-X^1-X^2-X^3-X_n-X^b-X_{q1}-X^5_s-X_{q2}]_k-X_{w2}-X^7_u-X_{w1}-R^C$ ・・・（ＩＣ）

[0189] 式（ＩＣ）中、R^N、R^C、X^1、X^2、X^3、X^a、X^b、X_m、X_n、Ｘ、ｍ

、ｎ、およびｋは、いずれも、上記式（Ｉ）中におけるものと同義であり、X^4、X^5、ｐ１、ｐ２、ｑ１、ｑ２、ｒ、およびｓは、いずれも、式（ＩＡ）中におけるものと同義であり、X^6、X^7、ｔ、ｕ、ｖ１、ｖ２、ｗ１、およびｗ２は、いずれも、式（ＩＢ）中におけるものと同義である。

また、式（ＩＣ）中、X_nは、式（Ｉ）中のX_nと同様に、Ｘがｎ個連結していることを意図する。X_m、X_{p1}、X_{p2}、X_{q1}、X_{q2}、X_{v1}、X_{v2}、X_{w1}、およびX_{w2}についても同様である。

さらに、式（ＩＣ）中、$X^4{}_r$、$X^5{}_s$、$X^6{}_t$、および$X^7{}_u$は、それぞれ、X^4がｒ個連結していること、X^5がｓ個連結していること、X^6がｔ個連結していること、および、X^7がｕ個連結していること、を意図する。

[0190]（環状部、直鎖部、架橋部および抗体結合部）

式（ＩＣ）によって表される環状ペプチドの直鎖部は「$X_{v1}-X^6{}_t-X_{v2}$」、「$X_{w2}-X^7{}_u-X_{w1}$」、「$X_{p2}-X^4{}_r-X_{p1}$」、および「$X_{q1}-X^5{}_s-X_{q2}$」である。環状部、架橋部、および抗体結合部は式（Ｉ）で表される環状ペプチドと同様である。

また、式（ＩＣ）中、繰返し単位は、式（ＩＡ）と同様に、［$X_{p2}-X^4{}_r-X_{p1}-X^a-X_m-X^1-X^2-X^3-X_n-X^b-X_{q1}-X^5{}_s-X_{q2}$］である。

[0191]（環状部のアミノ酸残基数）

また、上記式（ＩＣ）において、環状部［$X^a-X_m-X^1-X^2-X^3-X_n-X^b$］のアミノ酸残基数［（ｍ＋ｎ＋５）残基］は、上記式（Ｉ）と同様に、８～１４酸基であり、好ましくは９～１３残基であり、より好ましくは１０～１２残基である。

環状部のアミノ酸残基数がこの範囲内であると、環状ペプチドの分子内ひずみが大きくなり過ぎず、αヘリックス等の高次構造が安定化するため、本発明の環状ペプチドの抗体結合性が優れる。

[0192]（ｋ≧２である場合の繰返し単位間の異同）

また、ｋ≧２である場合、すなわち、式（ＩＣ）によって表される環状ペ

プチドが繰返し単位［$X_{p2}-X^{4}{}_{r}-X_{p1}-X^{a}-X_{m}-X^{1}-X^{2}-X^{3}-X_{n}-X^{b}-X_{q1}-X^{5}{}_{s}-X_{q2}$］を２個以上含む場合は、繰返し単位中の$X^{1}$、$X^{2}$、$X^{3}$、$X^{a}$、$X^{b}$、$X^{4}{}_{r}$、$X^{5}{}_{s}$、$X_{m}$、$X_{n}$、$X_{p2}$、$X_{p1}$、$X_{q1}$、および$X_{q2}$は、それぞれ、繰返し単位間で同一であってもよいし、相違していてもよい。

[0193]（環状ペプチドの総アミノ酸残基数）

さらに、上記式（ＩＣ）において、環状ペプチドの総アミノ酸残基数は、好ましくは８～５０残基であり、より好ましくは９～４０残基であり、さらに好ましくは１０～３０残基であり、いっそう好ましくは１０～２０残基である。

すなわち、式（ＩＣ）中、ｍ、ｎ、ｐ１、ｐ２、ｑ１、ｑ２、ｒ、ｓ、ｔ、ｕ、ｖ１、ｖ２、ｗ１、ｗ２、およびｋは、好ましくは$8 \leqq (m+n+p1+p2+q1+q2+r+s+5) \times k+t+u+v1+v2+w1+w2 \leqq 50$を満たし、より好ましくは$9 \leqq (m+n+p1+p2+q1+q2+r+s+5) \times k+t+u+v1+v2+w1+w2 \leqq 40$を満たし、さらに好ましくは$10 \leqq (m+n+p1+p2+q1+q2+r+s+5) \times k+t+u+v1+v2+w1+w2 \leqq 30$を満たし、いっそう好ましくは$10 \leqq (m+n+p1+p2+q1+q2+r+s+5) \times k+t+u+v1+v2+w1+w2 \leqq 20$を満たす。

通常、アミノ酸残基数が多くなるほど合成コストが高くなるため、経済的な観点からは、アミノ酸残基の総数が少ない方が好ましい。

[0194]《$X_{m}-X^{1}-X^{2}-X^{3}-X_{n}$》

さらには、上記式（Ｉ）、（ＩＡ）、（ＩＢ）、または（ＩＣ）中のアミノ酸部分配列$X_{m}-X^{1}-X^{2}-X^{3}-X_{n}$は、下記式（１）で表されるアミノ酸配列（配列番号１）または下記式（２）で表されるアミノ酸配列（配列番号２）と、好ましくは７０％以上の、より好ましくは７５％以上の、さらに好ましくは８５％以上の、いっそう好ましくは９０％以上の配列相同性を有する。

Ａ－Ｙ－Ｈ－Ｌ^{1}－Ｇ－Ｅ－Ｌ^{2}－Ｖ－Ｗ　・・・（１）

Ａ－Ｙ－Ｈ－Ｒ－Ｇ－Ｅ－Ｌ^{2}－Ｖ－Ｗ　・・・（２）

[0195] 式（１）および式（２）中、ＡはＬ－アラニン残基またはＤ－アラニン残基を表し；ＹはＬ－チロシン残基またはＤ－チロシン残基を表し；ＨはＬ－ヒスチジン残基またはＤ－ヒスチジン残基を表し；Ｌ^{1}はＬ－ロイシン残基またはＤ－ロイシン残基を表し；ＲはＬ－アルギニン残基またはＤ－アルギニン残基を表し；Ｇはグリシン残基を表し；ＥはＬ－グルタミン酸残基またはＤ－グルタミン酸残基を表し；Ｌ^{2}はＬ－ロイシン残基を表し；ＶはＬ－バリン残基を表し；および、ＷはＬ－トリプトファン残基を表す。

[0196] ここで、２つのアミノ酸配列の配列相同性は、次のようにして求める。

（ｉ）２つのアミノ酸配列のアラインメントを行う

一致（マッチ）は＋１、不一致（ミスマッチ）は－１、ギャップは－１のスコアを与え、アラインメント・スコアが最大となるようにアラインメントを行う。

（ｉｉ）配列相同性を計算する

得られたアラインメントに基づいて、次式により配列相同性を計算する。

配列相同性［％］＝（一致ポジション数／全ポジション数）×１００［％］

全ポジション数はアラインメントの長さであり、一致ポジション数はアミノ酸の種類が一致するポジションの数である。

ここで、アミノ酸残基の種類が一致するか否かの判断は、そのアミノ酸残基の元になるアミノ酸の側鎖（アミノ酸側鎖）の構造が同一であるか否かによるものとする。なお、エナンチオマーの関係にあるアミノ酸の側鎖の構造は同一ではない。

（ｉｉｉ）配列相同性の計算例

例えば、次のアミノ酸配列を考える。

配列Ａ　ＡＹＨＲＧＥＬＶＷ

配列Ｂ　ＡＷＨＧＥＬＶＷ

これを、上記した条件の下でアラインメントすると、次のようになる。ここで、配列Ａ、Ｂ間でアミノ酸（残基）の種類が一致する箇所には、見やすくするため、ホモロジー・ストリング「｜」を付けている。また、「－」はギャップである。

配列Ａ　ＡＹＨＲＧＥＬＶＷ

｜　｜　｜｜｜｜｜

配列Ｂ　ＡＷＨＬＧＥＬＶＷ

このアラインメントのスコアは、一致（＋１）×７＋不一致（－１）×１＋ギャップ（－１）×１＝５である。

この例では、全ポジション数は９であり、一致ポジション数は７であるから、上記式に従って算出した配列相同性は、７／９×１００＝７７．８％である。

[0197] 本発明においては、上記式（Ｉ）～（ＩＣ）において、好ましくはｋ＝１である。

[0198] 繰返し単位が１つであると、環状ペプチドの全長を短くすることができ、合成が容易となる。また、環化する際のヒュスゲン反応によって、意図しない箇所で架橋を形成することを回避することができる。

[0199] 上記環状ペプチドとして、特に好ましくは、下記式（ＩＩ）によって表される環状ペプチドである。

$$R^{N}-X_{v0}-X^{6}{}_{t0}-X_{e0}-X^{4}{}_{r0}-X_{p0}-X^{a}-A-Y-H-X^{8}-G-E-L-V-W-X^{b}-X_{q0}-X^{5}{}_{s0}-X_{f0}-X^{7}{}_{u0}-X_{w0}-R^{C} \quad \cdots (II)$$

式（ＩＩ）中、X^{a}、X^{b}、Ｘ、R^{N}、およびR^{C}は、上記式（Ｉ）中におけるものと同義である。

また、式（ＩＩ）中、X_{e0}は、式（Ｉ）中のX_{n}と同様に、Ｘがｅ０個連結していることを意図する。X_{f0}、X_{p0}、X_{q0}、X_{v0}、およびX_{w0}についても同様である。

[0200] 式（ＩＩ）によって表される環状ペプチドの環状部は「X^{a}－Ａ－Ｙ－Ｈ－

X^8－Ｇ－Ｅ－Ｌ－Ｖ－Ｗ－X^b」であり、直鎖部は「X_{v0}－$X^6{}_{t0}$－X_{e0}－$X^4{}_{r0}$－X_{p0}－」および「X_{q0}－$X^5{}_{s0}$－X_{f0}－$X^7{}_{u0}$－X_{w0}」であり、架橋部は「X^a」および「X^b」であり、抗体結合部は「Ｌ－Ｖ－Ｗ」である。

[0201] 式（ＩＩ）中、X^4およびX^5は、上記式（ＩＡ）中におけるものと同義である。

式（ＩＩ）中、X^6およびX^7は、上記式（ＩＢ）中におけるものと同義である。

[0202] 式（ＩＩ）中、ｅ０およびｆ０は、それぞれ、０≦ｅ０≦１０、および、０≦ｆ０≦１０を満たす整数である。

ｅ０は、好ましくは０≦ｅ０≦５を満たし、より好ましくは０≦ｅ０≦３を満たし、さらに好ましくは０≦ｅ０≦２を満たす。

ｆ０は、好ましくは０≦ｆ０≦５を満たし、より好ましくは０≦ｆ０≦３を満たし、さらに好ましくは０≦ｆ０≦２を満たす。

[0203] 式（ＩＩ）中、ｐ０およびｑ０は、それぞれ、０≦ｐ０≦５、および、０≦ｑ０≦５を満たす整数である。

ｐ０は、好ましくは０≦ｐ０≦３を満たし、より好ましくは０≦ｐ０≦２を満たす。

ｑ０は、好ましくは０≦ｑ０≦３を満たし、より好ましくは０≦ｑ０≦２を満たす。

[0204] 式（ＩＩ）中、ｒ０およびｓ０は、それぞれ、０≦ｒ０≦５、および、０≦ｓ０≦５を満たす整数である。

ｒ０は、好ましくは０≦ｒ０≦３を満たし、より好ましくは０≦ｒ０≦２を満たす。

ｓ０は、好ましくは０≦ｓ０≦３を満たし、より好ましくは０≦ｓ０≦２を満たす。

[0205] 式（ＩＩ）中、ｔ０およびｕ０は、それぞれ、０≦ｔ０≦５、および、０≦ｕ０≦５を満たす整数である。

ｔ０は、好ましくは０≦ｔ０≦３を満たし、より好ましくは０≦ｔ０≦２

を満たす。

ｓ０は、好ましくは０≦ｓ０≦３を満たし、より好ましくは０≦ｓ０≦２を満たす。

[0206] 式（ＩＩ）中、ｖ０およびｗ０は、それぞれ、０≦ｖ０≦５、および、３≦ｗ０≦５を満たす整数である。

ｖ０は、好ましくは０≦ｖ０≦３を満たし、より好ましくは０≦ｖ０≦２を満たす。

ｗ０は、好ましくは０≦ｗ０≦３を満たし、より好ましくは０≦ｗ０≦２を満たす。

[0207] また、上記（ＩＩ）式中、ＡはＬ－アラニン残基またはＤ－アラニン残基を表し；ＹはＬ－チロシン残基またはＤ－チロシン残基を表し、ＨはＬ－ヒスチジン残基またはＤ－ヒスチジン残基を表し、$Ｌ^{1}$はＬ－ロイシン残基またはＤ－ロイシン残基を表し、Ｇはグリシン残基を表し、ＥはＬ－グルタミン酸残基またはＤ－グルタミン酸残基を表し、$Ｌ^{2}$はＬ－ロイシン残基を表し、ＶはＬ－バリン残基を表し、Ｗはトリプトファン残基を表す。

[0208] さらに、上記式（ＩＩ）において、環状ペプチドの総アミノ酸残基数は、１１～５０残基であり、好ましくは１１～４０残基であり、より好ましくは１１～３０残基であり、さらに好ましくは１１～２０残基である。

すなわち、式（ＩＩ）中、ｅ０、ｆ０、ｐ０、ｑ０、ｒ０、ｓ０、ｔ０、ｕ０、ｖ０、およびｗ０は、０≦ｅ０＋ｆ０＋ｐ０＋ｑ０＋ｒ０＋ｓ０＋ｔ０＋ｕ０＋ｖ０＋ｗ０≦３９を満たし、好ましくは０≦ｅ０＋ｆ０＋ｐ０＋ｑ０＋ｒ０＋ｓ０＋ｔ０＋ｕ０＋ｖ０＋ｗ０≦２９を満たし、より好ましくは０≦ｅ０＋ｆ０＋ｐ０＋ｑ０＋ｒ０＋ｓ０＋ｔ０＋ｕ０＋ｖ０＋ｗ０≦１９を満たし、さらに好ましくは０≦ｅ０＋ｆ０＋ｐ０＋ｑ０＋ｒ０＋ｓ０＋ｔ０＋ｕ０＋ｖ０＋ｗ０≦９を満たす。

[0209] 《環状部の具体例》

上記環状ペプチド環状部の例を以下に示すが、これらに限定されるものではない。

[0210] （チオエーテル結合により架橋されたもの）

-Xaa1-Ala-Tyr-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Xaa11- ・・・(i)

式(i)中、Ｘａａ１はＬ－ホモシステインに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ１１はＮ－ε－クロロアセチル－Ｌ－リシンに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ１とＸａａ１１とは、Ｌ－ホモシステインの側鎖のチオール基とＮ－ε－クロロアセチル－Ｌ－リシンの側鎖のクロロアセチル基との間でチオエーテル結合を形成して架橋している（配列番号３）。

[0211] -Xaa1-Ala-Tyr-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Xaa11- ・・・(ii)

式(ii)中、Ｘａａ１はＮ－ε－クロロアセチル－Ｌ－リシンに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ１１はＬ－ホモシステインに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ１とＸａａ１１とは、Ｎ－ε－クロロアセチル－Ｌ－リシンの側鎖のクロロアセチル基とＬ－ホモシステインの側鎖のチオール基との間でチオエーテル結合を形成して架橋している（配列番号４）。

[0212] -Xaa1-Ala-Tyr-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Xaa11- ・・・(iii)

式(iii)中、Ｘａａ１はＬ－システインに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ１１はＮ－ε－クロロアセチル－Ｌ－リシンに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ１とＸａａ１１とは、Ｌ－システインの側鎖のチオール基とＮ－ε－クロロアセチル－Ｌ－リシンの側鎖のクロロアセチル基との間でチオエーテル結合を形成して架橋している（配列番号５）。

[0213] -Xaa1-Ala-Tyr-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Xaa11- ・・・(iv)

式(iv)中、Ｘａａ１はＮ－ε－クロロアセチル－Ｌ－リシンに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ１１はＬ－ペニシラミンに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ１とＸａａ１１とは、Ｎ－ε－クロロアセチル－Ｌ－リシンの側鎖のクロロアセチル基とＬ－システインの側鎖のチオール基との間でチオエーテル結合を形成して架橋している（配列番号６）。

[0214] （ジスルフィド結合により架橋されたもの）

-Xaa1-Ala-Tyr-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Xaa11- ・・・(v)

式(v)中、Ｘａａ１およびＸａａ１１は、いずれも、Ｌ－ホモシステインに

由来するアミノ酸残基であり、Ｌ－ホモシステインの側鎖のチオール基間でジスルフィド結合を形成して架橋している（配列番号７）。

[0215] -Xaa1-Ala-Tyr-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Xaa11- ・・・(vi)

式(vi)中、Ｘａａ１およびＸａａ１１は、いずれも、Ｌ－ペニシラミンに由来するアミノ酸残基であり、Ｌ－システインの側鎖のチオール基間でジスルフィド結合を形成して架橋している（配列番号８）。

[0216] （トリアゾール結合により架橋されたもの）

-Xaa1-Ala-Tyr-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Xaa11- ・・・(vii)

式(vii)中、Ｘａａ１は２－プロパルギル－Ｌ－ホモグリシンに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ１１はβ－アジド－Ｌ－アラニンに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ１とＸａａ１１とは、２－プロパルギル－Ｌ－ホモグリシンの側鎖のプロパルギル基とβアジド－Ｌ－アラニンの側鎖のアジド基との間でトリアゾール結合を形成して架橋している（配列番号９）。

[0217] -Xaa1-Ala-Tyr-His-Arg-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Xaa11- ・・・(viii)

式(viii)中、Ｘａａ１はβ－アジド－Ｌ－アラニンに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ１１は２－プロパルギル－Ｌ－ホモグリシンに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ１とＸａａ１１とは、βアジド－Ｌ－アラニンの側鎖のアジド基と２－プロパルギル－Ｌ－ホモグリシンの側鎖のプロパルギル基との間でトリアゾール結合を形成して架橋している（配列番号１０）。

[0218] （アミド結合により架橋されたもの）

-Xaa1-Ala-Tyr-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Xaa11- ・・・(ix)

式(ix)中、Ｘａａ１はＬ－リシンに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ１１はＬ－グルタミン酸に由来するアミノ酸残基であり、Ｌ－リシンの側鎖のアミノ基とＬ－グルタミン酸の側鎖のカルボキシ基との間でアミド結合を形成して架橋している（配列番号１１）。

[0219] -Xaa1-Ala-Tyr-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Xaa11- ・・・(x)

式(ix)中、Ｘａａ１はＬ－グルタミン酸に由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ１１はＬ－リシンに由来するアミノ酸残基であり、Ｌ－グルタミン酸

の側鎖のカルボキシ基とＬ－リシンの側鎖のアミノ基との間でアミド結合を形成して架橋している（配列番号１２）。

[0220]《アフィニティリガンド導入量》

本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体のアフィニティリガンドの導入量（以下、単に「アフィニティリガンド導入量」という場合がある。）は、特に限定されないが、好ましくは０．０１ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ～１００ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ、より好ましくは０．０５ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ～５０ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ、さらに好ましくは０．１０ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ～１０ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ、いっそう好ましくは０．１０ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ～５．０ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ、よりいっそう好ましくは０．１０ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ～２．５ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌである。

[0221]《環状ペプチドの合成方法》

上記環状ペプチドの合成方法は特に限定されるものではないが、例えば、有機合成化学的ペプチド合成方法または遺伝子工学的ペプチド合成方法によって合成することができる。

有機合成化学的ペプチド合成方法としては、液相合成法、固相合成法のいずれも用いることができる。本発明のポリペプチドの合成方法としては、自動ペプチド合成装置を用いた固相合成法が簡便であり好ましい。

遺伝子工学的ペプチド合成方法は、細胞に遺伝子導入し、ペプチドを合成する方法である。細胞としては、細菌、線虫細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞、および、動物細胞等が用いられる。

例えば、４塩基コドン法を用いて、非天然アミノ酸を導入して合成することが可能である。また、直鎖ペプチドを合成し、環状部に導入されたアミノ酸残基の側鎖の架橋性官能基を反応させることにより環化し、合成できる。

ジスルフィド結合を形成する場合は、例えば、ホモシステイン残基同士の側鎖チオール基、またはホモシステイン残基の側鎖チオール基とホモシステインよりもメチレン鎖の長いアミノ酸残基の側鎖チオール基とを酸化条件下

で反応させてジスルフィド結合を形成することができる。

チオエーテル結合を形成する場合は、例えば、側鎖のアミノ基をクロロアセチル化したリシン残基またはオルニチン残基と、ホモシステイン残基の側鎖チオール基とを反応させてチオエーテル結合を形成することができる。

なお、チオエーテル結合形成は、リシン残基の側鎖アミノ基をクロロアセチル化（－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－CH_2－Ｃｌ；メチレン単位の数１）、または３－クロロプロピオン酸化（－ＮＨ－Ｃ（＝Ｏ）－（CH_2）$_2$－Ｃｌ；メチレン単位の数２）等によるクロロ化をした後、チオール基と反応させるものであるため、クロロ化に用いられる化合物は、ここに例示したものに限定されないが、メチレン単位の数が少ない、すなわちメチレン鎖が短いものほど環化効率が高まり、好ましい。

[0222] トリアゾール結合を形成する場合は、例えば、架橋性官能基として、アジド基およびアルキニル基を用いる。アジド基またはアルキニル基を導入したアミノ酸残基を含むポリペプチド鎖を合成するには、アジド基またはアルキニル基を導入したアミノ酸をペプチド合成の際にポリペプチド鎖に組み込む方法、または、ポリペプチド鎖を合成した後、所望のアミノ酸残基の側鎖にアジド基またはアルキニル基を導入する方法がある。いずれの方法によってもよい。

[0223] アジド基またはアルキニル基を導入したアミノ酸残基を含むポリペプチド鎖を合成した後、ヒュスゲン（Ｈｕｉｓｇｅｎ）反応により、アルキニル基とアジド基との付加反応を起こさせ、アミノ酸残基間を架橋する。ヒュスゲン反応はアジド（－Ｎ＝N^+＝N^-原子団をもつ化合物）とアルキン（炭素-炭素三重結合化合物）から１，２，３－トリアゾールを形成する１，３－双極子付加環化反応である。アジド基およびアルキニル基は多くの官能基や生体分子に対して不活性であり、両者からトリアゾール環を生成する反応は発熱的な熱力学的に有利な反応である。ヒュスゲン反応が銅触媒の存在下で反応が飛躍的に加速することから、銅触媒を使用することが好ましい。

[0224] 〈陽イオン交換基〉

陽イオン交換基は、抗体結合性環状ペプチドと協奏的に作用し、特異的な吸着能と凝集体除去能をもつことにより、本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体の不純物除去能を向上させると考えられる。

[0225] 本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体に用いる陽イオン交換基は、特に限定されないが、好ましくはカルボキシ基またはスルホキシ基であり、より好ましくはカルボキシ基である。カルボキシ基およびスルホキシ基のいずれも凝集体除去能に優れるが、カルボキシ基はスルホン酸基よりもイオン強度が弱く、非特異的吸着を低く抑制することができるため、特に有利である。

[0226] 《陽イオン交換基導入量》

本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体の陽イオン交換基の導入量（以下、単に「陽イオン交換基導入量」という場合がある。）は、特に限定されないが、イオン交換容量で、好ましくは１５ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ～６０ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌであり、より好ましくは１５ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ～５５ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌであり、さらに好ましくは１５ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ～４０ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌである。

[0227] 陽イオン交換基導入量がこの範囲内であると、アフィニティリガンド導入量を適度な範囲内とすることができ、非特異的吸着物の吸着を抑えることができる。

[0228] ［ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体の製造方法］

本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体は、基材を親水性ポリマーで被覆し、陽イオン交換基を導入し、さらにアフィニティリガンドを基材および親水性ポリマーの少なくとも一方に導入することにより製造することができる。

[0229] 基材、親水性ポリマーおよびアフィニティリガンドは、既に「ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体」に記載したとおりである。

[0230] （１）基材を親水性ポリマーで被覆する

基材を親水性ポリマーで被覆する方法は、親水性ポリマーを基材に共有結

合によって結合させることができるものであれば特に限定されるものではないが、例えば、基材に２－クロロメチルオキシラン（別名：エピクロロヒドリン）を反応させてエポキシ基を導入し、これに親水性ポリマーを反応させる方法、溶媒中、アルカリの存在下、基材を２－クロロメチルオキシラン（別名：エピクロロヒドリン）のような架橋剤と反応させ、得られた反応生成物を親水性ポリマーと反応させる方法、クロロ基（塩素原子）等のハロゲン基（ハロゲン原子）をハロゲン化剤を用いて基材に導入し、および、ウィリアムソンのエーテル合成法を用いて親水性ポリマーを固定化する方法等が挙げられる。

[0231] 基材を親水性ポリマーで被覆する際には、親水性ポリマー被覆量が、好ましくは３ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌ～４５０ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌ、より好ましくは３ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌ～２５０ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌ、さらに好ましくは３ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌ～２３０ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌいっそう好ましくは１０ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌ～２３０ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌ、よりいっそう好ましくは２０ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌ～２３０ｍｇ／ｇ－ｄｒｙ　ｇｅｌとなるようにする。

[0232] なお、本明細書において、親水性ポリマーで被覆する直前の基材を「被覆前基材」といい、この被覆前基材に親水性ポリマーを被覆したものを「被覆担体」という場合がある。

[0233] （２）被覆担体に陽イオン交換基を導入する

被覆担体に陽イオン交換基を導入する方法は、陽イオン交換基を有する化合物を被覆担体に共有結合によって結合させることができるものであれば特に限定されるものではないが、例えば、アルカリ条件下で被覆担体にクロロ酢酸を反応させて、被覆担体表面のヒドロキシ基の一部にカルボキシメチル基を導入する方法、被覆担体にホルミル基を導入し、アミノ酸等の陽イオン交換基およびアミノ基を有する化合物のアミノ基を介して還元的アミノ化法でホルミル基に陽イオン交換基を導入する方法等が挙げられる。

[0234] 被覆担体に陽イオン交換基を導入する際には、陽イオン交換基導入量がイ

オン交換量で１５ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ～６０ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ、好ましくは１５ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ～５５ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ、より好ましくは１５ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ～４０ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌとなるようにする。

[0235] なお、本明細書において、被覆担体に陽イオン交換基を導入したものを「陽イオン交換基導入担体」という場合がある。特に、被覆担体にカルボキシ基を導入したものを「カルボキシ基導入担体」、被覆担体にスルホキシ基を導入したものを「スルホキシ基導入担体」という場合がある。

[0236] （３）陽イオン交換基導入担体にアフィニティリガンドを導入（固定化）する

陽イオン交換基導入担体にアフィニティリガンドを導入（固定化）する方法は、アフィニティリガンドを陽イオン交換基導入担体に共有結合によって結合させることができるものであれば特に限定されないが、例えば、陽イオン交換基の一部をＥＤＣ（Ｎ－（３－ｄｉｍｅｔｈｙｌａｍｉｎｏｐｒｏｐｙｌ）－Ｎ’－ｅｔｈｙｌｃａｒｂｏｄｉｉｍｉｄｅ；Ｎ-（３-ジメチルアミノプロピル）－Ｎ’-エチルカルボジイミド）／ＮＨＳ（Ｎ－ｈｙｄｒｏｘｙｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ；Ｎ-ヒドロキススクシンイミド）化し、アフィニティリガンドと反応させ、反応後に未反応のＥＤＣ／ＮＨＳ化された陽イオン交換基を再生する方法、アミノ基を有するアフィニティリガンドの場合には、陽イオン交換基を保護して、ホルミル基を導入し、アミノ基を介して還元的アミノ化法でホルミル基にアフィニティリガンドを導入する方法等が挙げられる。

[0237] 陽イオン交換基導入担体にアフィニティリガンドを導入する際には、アフィニティリガンドの導入量が、好ましくは０．０１ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ～１００ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ、より好ましくは０．０５ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ～５０ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ、さらに好ましくは０．１０ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ～１０ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ、いっそう好ましくは０．１０ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ～５．０ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ、よりいっそう好ましくは０．

１０ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ～２．５ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌとなるようにする。

[0238] なお、アフィニティリガンドを陽イオン交換基導入担体の陽イオン交換基の一部に結合した場合のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体の陽イオン交換基導入量は、「陽イオン交換基導入担体の陽イオン交換基導入量－ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体のアフィニティリガンド導入量」で表す。

[0239] ［生体物質の精製方法、その精製方法により精製された生体物質］

本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体により精製される生体物質は、特に限定されるものではないが、好ましくは抗体または抗体誘導体、より好ましくは免疫グロブリンＧまたはその誘導体である。

これらは抗体医薬品の原料として利用される。

[0240] 以下に、本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体を用いた精製方法の詳細な説明を、生体物質が免疫グロブリンＧの場合について例示するが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0241] ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体を用いた生体物質（特に、抗体）の精製は、大きく、吸着工程、洗浄工程、イオン強度調節工程、および、溶出工程の４工程で構成されるほか、その後の再生工程および／またはＣＩＰ（cleaning-in-place；定置洗浄）工程、再平衡化工程等の再利用の為の工程を含んでもよい。

[0242] 吸着工程では、一般的なアフィニティクロマトグラフィー精製方法を用いることができる。すなわち、その一例において、免疫グロブリンＧを含むタンパク質溶液のｐＨが中性付近となるように調整した後、その溶液を本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体を充填したカラムに通過させ、アフィニティリガンドを介して免疫グロブリンＧを特異的にミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体に吸着させる。抗体結合性環状ペプチドをアフィニティリガンドとする場合、その負荷ｐＨ、すなわち生体物質の添加時ｐＨは、好ましくは５．０～９．０であり、より好ま

しくは５．３～９．０であり、さらに好ましくは５．５～９．０であり、いっそう好ましくは６．０～８．５である。哺乳類培養細胞により生産される免疫グロブリンＧの精製において、特にイオン強度の調製を必要としないほか、あらかじめイオン強度を上げてさらに非特異吸着を抑制することもできる。

[0243] 洗浄工程では、アフィニティリガンドが機能する条件範囲の緩衝液を適量通過させ、カラム内部を洗浄する。すなわち、緩衝液のｐＨの好ましい範囲は上記負荷時と同じ範囲であってもよく、例えば、好ましくはｐＨ５．０～９．０である。この時点で免疫グロブリンＧは本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体に吸着されている。この時、中性付近のｐＨでイオン強度および／または組成物の最適化により、不純物を効果的に除去できる場合がある。洗浄時において、陽イオン交換基が機能しない条件が好ましく、すなわち、中性付近のｐＨにすると共に一定以上のイオン強度の洗浄液の利用が好ましく、この過程でミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体および／または免疫グロブリンＧを介して非特異的にカラムに残留する不純物を洗浄することができる。イオン強度は、例えば、好ましくは０．２Ｍ以上であり、より好ましくは０．５Ｍ以上である。

[0244] イオン強度調節工程では、中性付近でイオン強度が低い緩衝液にカラムを置換し、溶出時の陽イオン交換基によるイオン強度依存的溶出機能の発現に備える。

[0245] 溶出工程では、酸性ｐＨ、イオン強度の組み合わせにより、アフィニティリガンドからの溶出時に陽イオン交換分離モードを機能させ、両リガンドの協奏的な作用で、単量体含量の高い画分を低イオン強度溶出画分に回収することができる。溶出液のｐＨはアフィニティリガンドからの免疫グロブリンＧの溶出ｐＨが適用できる。このｐＨは、ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体と免疫グロブリンＧの種類により決定される分離条件を中心に決定されることから、特段の条件設定を必要としない。

[0246] 溶出時ｐＨは、好ましくは２．０～５．０に設定される。ただし、生体物

質の酸変性を避ける目的から、より好ましくはｐＨ２．８以上、さらに好ましくはｐＨ３．０以上、いっそう好ましくはｐＨ３．２以上である。ｐＨは、好ましくは５．０以下、より好ましくは４．８以下である。

[0247] アフィニティリガンドとして用いる環状ペプチドのアルカリ耐性によっては、一般的に、溶出時ｐＨは、好ましくは３．２～４．０に設定されるが、これに限定されるものではない。また、溶出イオン強度は、アフィニティリガンドと陽イオン交換基の導入比率に依存するほか、単位体積当たりの免疫グロブリンＧの負荷量にも依存するが、グラジエント実験やステップワイズ溶出実験により最適化ポイントを容易に設定しうる。

[0248] 本発明により調製されるミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体からの抗体溶出は、塩濃度グラジエント溶出でもステップワイズ溶出でも適用可能であるが、溶出液量の低減を目的にした場合はイオン強度によるステップワイズ溶出が好ましい。さらに、操作の単純化のためには、ワンステップ溶出による抗体の回収と高精製純度を達成できる条件設定が好ましい。

[0249] なお、洗浄工程のイオン強度と酸性ｐＨの組み合わせでも凝集体がカラムに残留し溶出画分に混入しない場合は、イオン強度調節工程を省略することができる。

[0250] 本発明の精製方法によって精製された生体物質、特に抗体または抗体誘導体は、精製の前後でそれ自体の構造、特性は変化しないが、精製純度が高くなっている。ただし、どの程度高くなっているかは、精製前の溶液等に依存するため、一概に言うことはできない。

[0251] 本発明により調製されたミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体を用いて精製された免疫グロブリンＧは、単一の分離モードに基づくアフィニティクロマトグラフィー用担体よりも高いモノマー選択性を示し、その溶出液中のモノマー含量が高い。

[0252] 単一分離モードに基づくアフィニティクロマトグラフィー用担体を用いた場合にも、溶出ｐＨおよびイオン強度等の最適化により、モノマー含量を幾

分高めることは可能であるが、その効果が低く、効果発現にはより大きな回収率の低下を伴う。本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体を用いることにより、特異性の高いアフィニティ精製と、主に陽イオン交換クロマトグラフィーにより達成しうるモノマー含量の向上を、高回収率を維持したまま単一のクロマト操作で効率的に達成可能であることから、後段プロセスへの負荷の低減が可能となり、プロセス全体の収率向上と単量体含量の向上に貢献できる。すなわち、本発明の新規ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体の使用により、抗体医薬品の製造プロセスの生産性向上と高純度化に寄与できる。

実施例

[0253] 以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は何らこれらに制限されるものではない。

[0254] ［測定方法および評価方法］

Ａ．陽イオン交換基導入量の測定方法

カルボキシ化担体１ｇを３ｍＬの純水に懸濁し、内径１５ｍｍのディスポーザブルカラムに注ぎ、吸引ろ過で溶媒を除去した。０．２ｍｏｌ／Ｌの塩酸３ｍＬで４回洗浄し、その後純水４ｍＬで洗浄を繰返した。洗浄後、ベッド（カラムに堆積した担体部分）高を測定することで、カルボキシ化担体の体積を算出した。カルボキシ化担体を取り出し、１００ｍＬ容ビーカーに移し、４０ｍＬの０．１ｍｏｌ／Ｌの食塩水に懸濁し、自動滴定装置「ＣＯＭ－１６００」（平沼産業社製）を用い、０．１ｍｏｌ／Ｌの水酸化ナトリウム水溶液で滴定した。終点までの滴定液量からカルボキシ化担体１Ｌあたりのイオン交換容量（ｍｅｑ／Ｌ－ｇｅｌ）を算出した。さらに、単位を「ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ」に換算した（１ｍｅｑ／Ｌ－ｇｅｌ＝１ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌ）。陽イオン交換基導入量はイオン交換容量で表した。

[0255] Ｂ．アフィニティリガンド導入量（ペプチド固定化量）の測定方法

ペプチド固定化反応後のペプチド液、反応液および洗浄液を、それぞれ、ゲルろ過クロマトグラフィー（下記）にかけ、２８０ｎｍにおける吸光度の

ピーク面積値より、各溶液に含まれるペプチド量を算出した。

ペプチド固定化反応前のペプチド液、反応液および洗浄液に含まれるペプチド量との差より、ペプチド固定化量を算出した。

（ゲルろ過クロマトグラフィーの条件）

クロマトシステム：アクタアヴァント２５（AKTA avant 25）（ＧＥヘルスケア社製）

（“ＡＫＴＡＡＶＡＮＴ”は登録商標）

カラム：ペプチド精製用ゲルろ過クロマトグラフィーカラム「Superdex Peptide 10/300 GL（ＧＥヘルスケア社製）」

バッファー：２０ｍＭ　リン酸バッファー、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４

流速：０．５ｍＬ／ｍｉｎ

[0256] Ｃ．抗体吸着容量の評価方法

（ａ）抗体吸着容量の測定

実施例または比較例で製造したミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体１ｍＬをガラスカラム「トリコーン　１０／２０　カラム（Ｔｒｉｃｏｒｎ　１０／２０　ｃｏｌｕｍｎ）」（ＧＥヘルスケア社製）（“ＴＲＩＣＯＲＮ”は登録商標）に充填し、クロマトシステム「アクタアヴァント２５（ＡＫＴＡ　ａｖａｎｔ　２５）」（ＧＥヘルスケア社製）（“ＡＫＴＡＡＶＡＮＴ”は登録商標）に接続し、抗体吸着容量の測定を行った。

カラムを平衡化液（２０ｍＭリン酸バッファー、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）で平衡化した後に、ヒトＩｇＧ抗体（Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ　Ｇ：免疫グロブリンＧ）を標準バッファー（２０ｍＭリン酸バッファー、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）で５ｍｇ／ｍＬに調整した溶液１５ｍＬを流速０．４２ｍＬ／ｍｉｎにて添加した。その後、負荷後洗浄液（２０ｍＭリン酸バッファー、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を同じ流速で５ｍＬ流して洗浄した後に、溶出前洗浄液（２０ｍＭリン酸バッファー、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を同じ流速で５ｍＬ流した。その後、溶

出液（１００ｍＭクエン酸バッファー、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ３．２）を同じ流速で５ｍＬ流した。さらに連続して、定置洗浄（ＣＩＰ；ｃｌｅａｎｉｎｇ　ｉｎ　ｐｌａｃｅ）液（０．１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液）を同じ流速で５ｍＬ流し、その後、再平衡化液（２０ｍＭリン酸バッファー、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を、同じ流速で５ｍＬ流した。このとき、２８０ｎｍの吸光度をモニタリングして得られたＩｇＧ溶出ピークより、各分画における溶出液の抗体溶出量を算出した。溶出前洗浄液からＣＩＰ液までに溶出した抗体量を抗体吸着容量として算出した。

[0257] （ｂ）抗体吸着容量の評価

抗体吸着容量の評価は以下の基準に従って行った。

抗体吸着容量が３０ｇ/Ｌ超・・・評価「Ａ」

抗体吸着容量が３．５ｇ/Ｌ超、３０ｇ/Ｌ以下・・・評価「Ｂ」

抗体吸着容量が３．５ｇ/Ｌ以下・・・評価「Ｅ」

評価ＡおよびＢは抗体吸着容量が十分であることを表し、評価Ｅは抗体吸着容量が十分でないことを表す。

十分な抗体吸着容量を持つ本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体を抗体の精製に用いると、抗体の精製効率を高めることができ、抗体精製コストをより低減することができる。

[0258] Ｄ．不純物除去能の評価方法

（ａ）ＨＣＰ精製ファクターの算出

実施例または比較例で製造したミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体１ｍＬをガラスカラム「トリコーン　１０／２０　カラム（Ｔｒｉｃｏｒｎ　１０／２０　ｃｏｌｕｍｎ）」（ＧＥヘルスケア社製）（“ＴＲＩＣＯＲＮ”は登録商標）に充填し、クロマトシステム「アクタアヴァント２５（ＡＫＴＡ　ａｖａｎｔ　２５）」（ＧＥヘルスケア社製）（“ＡＫＴＡＡＶＡＮＴ”は登録商標）に接続し、各分画で溶出されるＨＣＰ（ｈｏｓｔ　ｃｅｌｌ　ｐｒｏｔｅｉｎ；宿主細胞由来タンパク質）量およびＩｇＧ（Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ　Ｇ；免疫グロブリンＧ）量の測定を

行った。

[0259] （ＩｇＧ量およびＨＣＰ量の測定）

カラムを平衡化液（２０ｍＭリン酸バッファー、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）で平衡化した後に、ＩｇＧ、ＣＨＯ－Ｓ（Ｃｈｉｎｅｓｅ　Ｈａｍｓｔｅｒ　Ｏｖａｒｙ　Ｓ）細胞由来ＨＣＰが、それぞれ、１．６ｍｇ／ｍＬ、０．３２ｍｇ／ｍＬになるように標準バッファー（２０ｍＭリン酸バッファー、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を用いて調製したＩｇＧ／ＨＣＰ混合液を、上述したＣで得られた抗体吸着容量の８割の抗体量が負荷されるような溶液量を流速０．２１ｍＬ／ｍｉｎにて添加した。その後、負荷後洗浄液（２０ｍＭリン酸バッファー、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を同じ流速で５ｍＬ流して洗浄した後に、溶出前洗浄液（２０ｍＭリン酸バッファー、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を流速０．４２ｍＬ／ｍｉｎで５ｍＬ流した。その後、イオン強度調節液（２０ｍＭリン酸バッファー、ｐＨ７．４）を同じ流速で５ｍＬ流した。その後、溶出液１（１００ｍＭクエン酸バッファー、ｐＨ３．２）を同じ流速で５ｍＬ流し、さらに連続して溶出液２（１００ｍＭクエン酸バッファー、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ３．２）、溶出液３（１００ｍＭクエン酸バッファー、７５ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ３．２）、溶出液４（１００ｍＭクエン酸バッファー、５００ｍＭ）を同じ流速で５ｍＬずつ流した。さらに連続して、ＣＩＰ液（０．１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液）を同じ流速で５ｍＬ流し、その後再平衡化液（２０ｍＭリン酸バッファー、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を同じ流速で５ｍＬ流した。

２８０ｎｍの吸光度をモニタリングして得られたＩｇＧ溶出ピークより、各分画における溶出液のＩｇＧ溶出量を算出した。

各分画の溶出液を回収し、１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ溶液を用いて各溶出液のｐＨを５～６とした後、宿主細胞由来タンパク質検出キット「ＣＨＯ　ＨＣＰ　３ｒｄ　Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ　ＥＬＩＳＡ　ｋｉｔ」（シグナステクノロジーズ社製）を用いたＥＬＩＳＡ法により、各分画における溶出液の

ＨＣＰ量を算出した。

[0260] （ＨＣＰ精製ファクターの算出）

算出した溶出液のＩｇＧ量およびＨＣＰ量を用いて、溶出液におけるＨＣＰ混入量を溶出液中のＩｇＧ量あたりのＨＣＰ量として、以下の式により算出した。

溶出液１～３のＨＣＰ混入量（ｐｐｍ）＝溶出液１～３の総ＨＣＰ量／溶出液１～３の総ＩｇＧ量

この溶出液のＨＣＰ混入量（ｐｐｍ）と負荷したＩｇＧ／ＨＣＰ混合液のＨＣＰ混入量（ｐｐｍ）からＨＣＰ精製ファクターを、以下の式により算出した。

ＨＣＰ精製ファクター＝負荷したＩｇＧ／ＨＣＰ混合液のＨＣＰ混入量（ｐｐｍ）／溶出液１～３のＨＣＰ混入量（ｐｐｍ）

[0261] （ｂ）不純物除去能の評価

不純物除去能の評価は以下の基準に従って行った。

ＨＣＰ精製ファクターが５０００超・・・評価「Ａ」

ＨＣＰ精製ファクターが１５００超、５０００以下・・・評価「Ｂ」

ＨＣＰ精製ファクターが１５００以下・・・評価「Ｅ」

評価ＡおよびＢは不純物除去能が十分であることを表し、評価Ｅは不純物除去能が十分でないことを表す。

十分な不純物除去能を持つ本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体を抗体の精製に用いると、抗体の精製純度を高めることができ、抗体の精製純度をより改善することができる。

[0262] Ｅ．薬品耐性の評価方法

（ａ）結合量変化率の算出

実施例または比較例で製造したミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体１ｍＬをガラスカラム「トリコーン　１０／２０　カラム（Ｔｒｉｃｏｒｎ　１０／２０　ｃｏｌｕｍｎ）」（ＧＥヘルスケア社製）（“ＴＲＩＣＯＲＮ”は登録商標）に充填し、クロマトシステム「アクタアヴァ

ント２５（ＡＫＴＡ　ａｖａｎｔ　２５）」（ＧＥヘルスケア社製）（“ＡＫＴＡＡＶＡＮＴ”は登録商標）に接続し、抗体結合容量の測定を行った。カラムを平衡化液（２０ｍＭリン酸バッファー、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）で平衡化した後に、ヒトＩｇＧ抗体を標準バッファー（２０ｍＭリン酸バッファー、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）で５ｍｇ／ｍＬに調整した溶液１５ｍＬを流速０．２１ｍＬ／ｍｉｎにて添加した。その後、負荷後洗浄液（２０ｍＭリン酸バッファー、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を同じ流速で５ｍＬ流して洗浄した後に、溶出前洗浄液（２０ｍＭリン酸バッファー、１Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を同じ流速で５ｍＬ流した。その後、溶出液（１００ｍＭクエン酸バッファー、ｐＨ３．２）を同じ流速で５ｍＬ流した。さらに連続して、ＣＩＰ（ｃｌｅａｎｉｎｇ　ｉｎ　ｐｌａｃｅ；定置洗浄）液（０．１Ｍ水酸化ナトリウム）を同じ流速で５ｍＬを流し、その後再平衡化液（２０ｍＭリン酸バッファー、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を同じ流速で５ｍＬ流した。このとき、２８０ｎｍの吸光度をモニタリングして得られたＩｇＧ（ＩｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎＧ；免疫グロブリンＧ）溶出ピークより、抗体原液の１０％が担体から漏れ出すまでに担体に抗体が結合した量を抗体結合容量として測定した。次に、ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体を０．２Ｍ　ＮａＯＨ水溶液に２５℃で６時間満たして静置した後、同様に担体の抗体結合容量を測定し、アルカリ処理前後の抗体結合量から結合量変化率を算出した。

[0263] （ｂ）薬品耐性の評価

薬品耐性の評価は以下の基準に従って行った。

結合量変化率が７５％超・・・・・・・・・・・・・・・ＡＡＡ

結合量変化率が６５％超、７５％以下・・・・・・・・・ＡＡ

結合量変化率が４０％超、６５％以下・・・・・・・・・Ａ

結合量変化率が１５％超、４０％以下・・・・・・・・・Ｂ

結合量変化率が１５％以下・・・・・・・・・・・・・・Ｅ

評価ＡＡＡ、ＡＡ、ＡおよびＢは薬品耐性が十分であることを表し、評価

Ｅは薬品耐性が十分でないことを表す。

十分な薬品耐性を持つ本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体を抗体の精製に用いると、洗浄後も抗体と特異的に繰り返し結合することができ、長期間、抗体を精製することが可能となり、抗体の精製コストをより低減することができる。

[0264] Ｆ．抗原性リガンド混入の評価方法

抗原性リガンド混入の評価は以下の基準に従って行った。

導入したアフィニティリガンドが低抗原性（分子量４，０００未満）・・・評価「Ａ」

導入したアフィニティリガンドが低抗原性（分子量５，０００未満）・・・評価「Ｂ」

導入したアフィニティリガンドが抗原性（分子量５，０００以上）・・・評価「Ｅ」

評価ＡおよびＢは精製した抗体に抗原性リガンドが実質的に混入しないことを表し、評価Ｅは精製した抗体に抗原性リガンドが混入するおそれがあることを表す。

抗原性リガンドが混入した抗体を生体に投与すると、意図しない免疫応答を誘導する場合があり、好ましくない副作用を生ずるおそれがある。

[0265] ［実施例１］

１．ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体の製造

（１）湿ゲルの調製

架橋アガロース系基材「セファローズ４　ファスト・フロー（Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　４　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ）」（ＧＥヘルスケア社製）（“ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ”は登録商標）を、グラスフィルター上で、純水を用いて懸濁およびろ過を繰り返すことによって洗浄し、基材スラリーを得た。この基材スラリーから、吸引ろ過によって純水を除去して、湿ゲルを得た。

[0266] （２）被覆前基材の調製　－　エポキシ基の導入

得られた湿ゲル５０ｇ、純水７６ｍＬおよび２－クロロメチルオキシラン

２５ｇを、３００ｍＬ容の三口フラスコに入れ、４５℃の温浴中で、フラスコ内容物の撹拌を開始した。フラスコ内の温度が４５℃になるまで撹拌を行った。４５℃の温浴中で、フラスコ内の温度を約４５℃に維持しながら、５０％（ｗ／ｗ）水酸化ナトリウム水溶液２０．４ｇを２時間かけてフラスコ内に滴下した。水酸化ナトリウム水溶液の全量を滴下した後、さらに１時間反応し、グラスフィルター上で、純水を用いて懸濁およびろ過を繰り返すことによって洗浄し、被覆前基材の湿ゲルを得た。

[0267] （３）担体の調製　－　親水性ポリマーによる被覆

デキストラン４０（重量平均分子量約４０，０００）３１ｇおよび純水７２ｍＬを、３００ｍＬ容の三口フラスコに入れ、室温で、フラスコ内容物の撹拌を開始した。デキストラン４０が完全に溶解するまで撹拌した。溶解後、被覆前基材の湿ゲル４２ｇをこの三口フラスコに加え、室温で、さらに撹拌した。三口フラスコ内の混合液が均一なってから、５０％（ｗ／ｗ）水酸化ナトリウム水溶液２．０ｇを加えた。水酸化ナトリウム水溶液を加えた後、室温で１６時間反応し、グラスフィルター上で、純水を用いて懸濁およびろ過を繰り返すことによって洗浄し、担体の湿ゲルを得た。

[0268] （４）カルボキシ化担体の調製　－　陽イオン交換基の導入

得られた担体の湿ゲル１５ｇ、クロロ酢酸ナトリウム５．１ｇおよび純水３１ｍＬを、１００ｍＬ容の三口フラスコに入れ、５０℃の温浴中で、フラスコ内容物の撹拌を開始した。クロロ酢酸ナトリウムが完全に溶解するまで撹拌した。溶解後、５０℃の温浴中で、フラスコ内温度を約５０℃に維持しながら、５０％（ｗ／ｗ）水酸化ナトリウム水溶液１１ｇを１時間かけて滴下した。水酸化ナトリウム水溶液の全量を滴下した後、さらに３時間反応し、グラスフィルター上で、純水を用いて懸濁およびろ過を繰り返すことによって洗浄し、カルボキシ化担体の湿ゲルを得た。

[0269] （５）環状ペプチド固定カルボキシ化担体の調製　－　環状ペプチドの導入

得られたカルボキシ化担体を、湿潤体積として２．５ｍＬ分、ディスポーザブルカラムに入れ、純水を用いて懸濁およびろ過を繰り返すことによって

洗浄し、担体スラリーを得た。この担体スラリーから、吸引ろ過によって純水を除去して、湿ゲルを得た。

得られた湿ゲル２．０ｇを反応容器にとり、ＥＤＣ（Ｎ－（３－ｄｉｍｅｔｈｙｌａｍｉｎｏｐｒｏｐｙｌ）－Ｎ’－ｅｔｈｙｌｃａｒｂｏｄｉｉｍｉｄｅ；Ｎ－（３－ジメチルアミノプロピル）－Ｎ’　－エチルカルボジイミド）溶液２ｍＬを加え、室温で、１０分間、転倒撹拌した。その後、反応容器にＮＨＳ（Ｎ－ｈｙｄｒｏｘｙｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ；Ｎ‐ヒドロキススクシンイミド）溶液２ｍＬを加え、室温で、３０分間、転倒撹拌した。ここで、ＥＤＣ溶液は、ＤＭＳＯ（ｄｉｍｅｔｈｙｌ　ｓｕｌｆｏｘｉｄｅ；ジメチルスルホキシド）２ｍＬにＥＤＣ　０．２ｇを溶解して調製したものであり、ＮＨＳ溶液は、ＤＭＳＯ　２ｍＬにＮＨＳ　０．２ｇを溶解して調製したものである。

反応ゲル溶液をディスポーザブルカラムに移し、氷冷した１ｍＭ塩酸６ｍＬで洗浄し、ＥＤＣ／ＮＨＳ活性化されたカルボキシ化担体を得た。

[0270] 得られたＥＤＣ／ＮＨＳ活性化カルボキシ化担体１．５ｇを反応容器に入れ、続いて、５ｍｇ／ｍＬ環状ペプチドＡ溶液１．５ｍＬを反応容器に加え、２５℃で、２時間、振盪した。

ここで、上記５ｍｇ／ｍＬ環状ペプチドＡ容液は、下記式（Ａ）で表される環状ペプチドＡ（配列番号１３）をＤＭＳＯに溶解して調製したものである。

Lys-Lys-Lys-Asp-Xaa5-Ala-Tyr-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Xaa15-Thr　・・・（Ａ）

ただし、式（Ａ）中、Ｘａａ５はＮ－ε－クロロアセチル－Ｌ－リシンに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ１５はＬ－ホモシステインに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ５とＸａａ１５とは、Ｎ－ε－クロロアセチル－Ｌ－リシンの側鎖のクロロアセチル基とＬ－ホモシステインの側鎖のチオール基との間でチオエーテル結合を形成して架橋している。

[0271] 次に、溶媒を１Ｍ塩化ナトリウム水溶液および０．５Ｍエタノールアミン

水溶液に置換し、洗浄し、環状ペプチド固定カルボキシ化担体を得た。

[0272] ２．カルボキシ基導入量の測定

得られたカルボキシ化担体のカルボキシ基導入量を、上述した「陽イオン交換基導入量の測定方法」に従って測定した。その結果、カルボキシ基導入量は３０ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌであった。

[0273] ３．環状ペプチド固定化量の測定

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の環状ペプチド固定化量（アフィニティリガンド導入量）を、上述した「アフィニティリガンド導入量（ペプチド固定化量）の測定方法」に従って測定した。その結果、環状ペプチド固定化量は１．７ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌであった。

[0274] ４．抗体吸着容量の評価

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の抗体吸着容量を、上述した「抗体吸着容量の評価方法」に従って評価した。評価結果を表３の「抗体吸着容量」欄に示す。

[0275] ５．不純物除去能の評価

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の不純物除去能を、上述した「不純物除去能の評価方法」に従って評価した。評価結果を表３の「不純物除去能」欄に示す。

[0276] ６．薬品耐性の評価

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の薬品耐性を、上述した「薬品耐性の評価方法」に従って評価した。評価結果を表３の「薬品耐性」欄に示す。

[0277] ７．抗原性リガンド混入の評価

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の抗原性リガンド混入を、上述した「抗原性リガンド混入の評価方法」に従って評価した。その結果、抗原性リガンド混入の評価は「Ａ」であった。

[0278] ［実施例２］

１．ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体の製造

「環状ペプチド固定カルボキシ化担体の調製　－　環状ペプチドの導入」において、上記環状ペプチドＡに代えて下記式（Ｂ）で表される環状ペプチドＢ（配列番号１４）を用いた点を除き、実施例１と同様にして環状ペプチド固定カルボキシ化担体を調製した。

Lys-Lys-Lys-Asp-Xaa5-Ala-Tyr-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Xaa15-Thr　・・・（Ｂ）

ただし、式（Ｂ）中、Ｘａａ５およびＸａａ１５は、いずれも、Ｌ－ホモシステインに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ５とＸａａ１５とは、Ｌ－ホモシステインの側鎖のチオール基間でジスルフィド結合を形成して架橋している。

[0279] ２．環状ペプチド固定化量の測定

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の環状ペプチド固定化量（アフィニティリガンド導入量）を上述した「アフィニティリガンド導入量（ペプチド固定化量）の測定方法」に従って測定した。その結果、環状ペプチド導入量は１．６ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌであった。

[0280] ３．抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性の評価

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性を、実施例１と同様にして評価した。評価結果を、それぞれ、表３の「抗体吸着容量」欄、「不純物除去能」欄および「薬品耐性」欄に示す。

[0281] ４．抗原性リガンド混入の評価

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の抗原性リガンド混入を、上述した「抗原性リガンド混入の評価方法」に従って評価した。その結果、抗原性リガンド混入の評価は「Ａ」であった。

[0282] ［実施例３］

１．ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体の製造

「カルボキシ化担体の調製　－　陽イオン交換基の導入」において、クロロ酢酸ナトリウム量を６．１ｇに変更した点を除き、実施例１と同様にして

、カルボキシ化担体を調製した。

[0283] さらに、「環状ペプチド固定カルボキシ化担体の調製　－　環状ペプチドの導入」において、上述のとおり調製したカルボキシ化担体を用いた点、および、上記環状ペプチドＡに代えて下記式（Ｃ）で表される環状ペプチドＣ（配列番号１５）を用いた点を除き、実施例１と同様にして環状ペプチド固定カルボキシ化担体を調製した。

Lys-Lys-Lys-Asp-Xaa5-Ala-Tyr-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Xaa15-Thr　・・・（Ｃ）

ただし、式（Ｃ）中、Ｘａａ５はＮ－ε－クロロアセチル－Ｌ－リシンに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ１５はＬ－ペニシラミンに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ５とＸａａ１５とは、Ｎ－ε－クロロアセチル－Ｌ－リシンの側鎖のクロロアセチル基とＬ－ペニシラミンの側鎖のチオール基との間でチオエーテル結合を形成して架橋している。

[0284] ２．カルボキシ基導入量の測定

得られたカルボキシ化担体のカルボキシ基導入量を、上述した「陽イオン交換基導入量の測定方法」に従って測定した。その結果、カルボキシ基導入量は３６ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌであった。

[0285] ３．環状ペプチド固定化量の測定

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の環状ペプチド固定化量（アフィニティリガンド導入量）を、上述した「アフィニティリガンド導入量（ペプチド固定化量）の測定方法」に従って測定した。その結果、環状ペプチド固定化量は２．０ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌであった。

[0286] ４．抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性の評価

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性を、実施例１と同様にして評価した。評価結果を、それぞれ、表３の「抗体吸着容量」欄、「不純物除去能」欄および「薬品耐性」欄に示す。

[0287] ５．抗原性リガンド混入の評価

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の抗原性リガンド混入を、上述した「抗原性リガンド混入の評価方法」に従って評価した。その結果、抗原性リガンド混入の評価は「Ａ」であった。

[0288] ［実施例４］

１．ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体の製造

「環状ペプチド固定カルボキシ化担体の調製　－　環状ペプチドの導入」において、上述のとおり調製したカルボキシ化担体を用いた点、および、上記環状ペプチドＡに代えて下記式（Ｄ）で表される環状ペプチドＤ（配列番号１６）を用いた点を除き、実施例３と同様にして環状ペプチド固定カルボキシ化担体を調製した。

Lys-Lys-Lys-Asp-Xaa5-Ala-Tyr-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Xaa15-Thr

・・・（Ｄ）

ただし、式（Ｄ）中、Ｘａａ５は２－プロパルギル－Ｌ－ホモグリシンに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ１５は、βアジド－Ｌ－アラニンに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ５とＸａａ１５とは、２－プロパルギル－Ｌ－ホモグリシンの側鎖のプロパルギル基とβアジド－Ｌ－アラニンの側鎖のアジド基との間でトリアゾール結合を形成して架橋している。

[0289] ２．環状ペプチド固定化量の測定

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の環状ペプチド固定化量（アフィニティリガンド導入量）を、上述した「アフィニティリガンド導入量（ペプチド固定化量）の測定方法」に従って測定した。その結果、環状ペプチド固定化量は１．７ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌであった。

[0290] ３．抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性の評価

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性を、実施例１と同様にして評価した。評価結果を、それぞれ、表３の「抗体吸着容量」欄、「不純物除去能」欄および「薬品耐性」欄に示す。

[0291] ４．抗原性リガンド混入の評価

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の抗原性リガンド混入を、上述した「抗原性リガンド混入の評価方法」に従って評価した。その結果、抗原性リガンド混入の評価は「Ａ」であった。

[0292] ［実施例５］

１．ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体の製造

「環状ペプチド固定カルボキシ化担体の調製　－　環状ペプチドの導入」において、上述のとおり調製したカルボキシ化担体を用いた点、および、上記環状ペプチドＡに代えて下記式（Ｅ）で表される環状ペプチドＥ（配列番号１７）を用いた点を除き、実施例３と同様にして環状ペプチド固定カルボキシ化担体を調製した。

Lys-Lys-Lys-Asp-Xaa5-Ala-Tyr-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Xaa15-Thr

・・・（Ｅ）

ただし、式（Ｅ）中、Ｘａａ５はＮ－ε－クロロアセチル－Ｌ－リシンに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ１５は、システインに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ５とＸａａ１５とは、Ｎ－ε－クロロアセチル－Ｌ－リシンの側鎖のクロロアセチル基とシステインの側鎖のチオール基との間でチオエーテル結合を形成して架橋している。

[0293] ２．環状ペプチド固定化量の測定

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の環状ペプチド固定化量（アフィニティリガンド導入量）を、上述した「アフィニティリガンド導入量（ペプチド固定化量）の測定方法」に従って測定した。その結果、環状ペプチド固定化量は１．９ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌであった。

[0294] ３．抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性の評価

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性を、実施例１と同様にして評価した。評価結果を、それぞれ、表３の「抗体吸着容量」欄、「不純物除去能」欄および「薬品耐性」欄に示す。

[0295] ４．抗原性リガンド混入の評価

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の抗原性リガンド混入を、上述した「抗原性リガンド混入の評価方法」に従って評価した。その結果、抗原性リガンド混入の評価は「Ａ」であった。

[0296] ［実施例６］

１．ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体の製造

「環状ペプチド固定カルボキシ化担体の調製　－　環状ペプチドの導入」において、上記環状ペプチドＡに代えて下記式（Ｆ）で表される環状ペプチドＦ（配列番号１８）を用いた点を除き、実施例１と同様にして環状ペプチド固定カルボキシ化担体を調製した。

Lys-Lys-Lys-Asp-Xaa5-Ala-Tyr-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Xaa15-Thr

・・・（Ｆ）

ただし、式（Ｆ）中、Ｘａａ５およびＸａａ１５は、いずれも、Ｌ－システインに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ５とＸａａ１５とは、Ｌ－システインの側鎖のチオール基間でジスルフィド結合を形成して架橋している。

[0297] ２．環状ペプチド固定化量の測定

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の環状ペプチド固定化量（アフィニティリガンド導入量）を、上述した「アフィニティリガンド導入量（ペプチド固定化量）の測定方法」に従って測定した。その結果、環状ペプチド固定化量は１．８ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌであった。

[0298] ３．抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性の評価

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性を、実施例１と同様にして評価した。評価結果を、それぞれ、表３の「抗体吸着容量」欄、「不純物除去能」欄および「薬品耐性」欄に示す。

[0299] ４．抗原性リガンド混入の評価

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の抗原性リガンド混入を、上述した「抗原性リガンド混入の評価方法」に従って評価した。その結果、抗

原性リガンド混入の評価は「Ａ」であった。

[0300] ［実施例７］

１．ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体の製造

「環状ペプチド固定カルボキシ化担体の調製　－　環状ペプチドの導入」において、上述のとおり調製したカルボキシ化担体を用いた点、および、上記５ｍｇ／ｍＬ環状ペプチドＡ溶液１．５ｍＬに代えて、下記式（Ｇ）で表される環状ペプチドＧ（配列番号１９）をＤＭＳＯに溶解して調製した１０ｍｇ／ｍＬ環状ペプチドＧ溶液１．５ｍＬを用いた点を除き、実施例３と同様にして環状ペプチド固定カルボキシ化担体を調製した。

Lys-Lys-Lys-Asp-Xaa5-Ala-Tyr-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Xaa15-Thr

・・・（Ｇ）

ただし、式（Ｇ）中、Ｘａａ５はＬ－リシンに由来するアミノ酸残基であり、Ｘａａ１５はＬ－グルタミン酸に由来するアミノ酸残基であり、Ｌ－リシンの側鎖のアミノ基とＬ－グルタミン酸の側鎖のカルボキシ基との間でアミド結合を形成して架橋している。

[0301] ２．環状ペプチド固定化量の測定

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の環状ペプチド固定化量（アフィニティリガンド導入量）を、上述した「アフィニティリガンド導入量（ペプチド固定化量）の測定方法」に従って測定した。その結果、環状ペプチド固定化量は１．２ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌであった。

[0302] ３．抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性の評価

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性を、実施例１と同様にして評価した。評価結果を、それぞれ、表３の「抗体吸着容量」欄、「不純物除去能」欄および「薬品耐性」欄に示す。

[0303] ４．抗原性リガンド混入の評価

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の抗原性リガンド混入を、上述した「抗原性リガンド混入の評価方法」に従って評価した。その結果、抗

原性リガンド混入の評価は「Ａ」であった。

[0304] ［比較例１］

１．ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体の製造

（１）湿ゲルの調製

架橋アガロース系基材「セファローズ４　ファスト・フロー（Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　４

Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ）」（ＧＥヘルスケア社製）を、グラスフィルター上で、純水を用いて懸濁およびろ過を繰り返すことによって洗浄し、基材スラリーを得た。この基材スラリーから、吸引ろ過によって純水を除去して、湿ゲルを得た。

[0305] （２）カルボキシ化担体の調製　－　陽イオン交換基の導入

得られた湿ゲル１５ｇ、クロロ酢酸ナトリウム１１．７ｇおよび純水３１ｍＬを１００ｍＬ容の三口フラスコに入れ、５０℃の温浴中で、フラスコ内容物の撹拌を開始した。クロロ酢酸ナトリウムが完全に溶解するまで撹拌した。溶解後、５０℃の温浴中で、フラスコ内温度を約５０℃に維持しながら、５０％（ｗ／ｗ）水酸化ナトリウム水溶液１１ｇを１時間かけて滴下した。水酸化ナトリウム水溶液の全量を滴下した後、さらに３時間反応し、グラスフィルター上で、純水を用いて懸濁およびろ過を繰り返すことによって洗浄し、カルボキシ化担体の湿ゲルを得た。

[0306] （３）環状ペプチド固定カルボキシ化担体の調製　－　環状ペプチドの導入

上述のとおり調製したカルボキシ化担体を用いた点を除き、実施例６と同様にして環状ペプチド固定カルボキシ化担体を調製した。

[0307] ２．カルボキシ基導入量の測定

得られたカルボキシ化担体のカルボキシ基導入量を、上述した「陽イオン交換基導入量の測定方法」に従って測定した。その結果、カルボキシ基導入量は２６ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌであった。

[0308] ３．環状ペプチド固定化量の測定

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の環状ペプチド固定化量（ア

フィニティリガンド導入量）を、上述した「アフィニティリガンド導入量（ペプチド固定化量）の測定方法」に従って測定した。その結果、環状ペプチド固定化量は１．１ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌであった。

[0309] ４．抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性の評価

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性を、実施例１と同様にして評価した。評価結果を、それぞれ、表３の「抗体吸着容量」欄、「不純物除去能」欄および「薬品耐性」欄に示す。

[0310] ５．抗原性リガンド混入の評価

得られた環状ペプチド固定カルボキシ化担体の抗原性リガンド混入を、上述した「抗原性リガンド混入の評価方法」に従って評価した。その結果、抗原性リガンド混入の評価は「Ａ」であった。

[0311] ［比較例２］

１．ミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体の製造

「環状ペプチド固定カルボキシ化担体の調製　－　環状ペプチドの導入」において、上述のとおり調製したカルボキシ化担体を用いた点、および、上記５ｍｇ／ｍＬ環状ペプチドＡ溶液１．５ｍＬに代えて、下記式（Ｈ）で表される直鎖ペプチドＨ（配列番号２０）を５０ｍＭ炭酸水素ナトリウムバッファーに溶解して調製した１０ｍｇ／ｍＬ直鎖ペプチドＨ溶液１．５ｍＬを用いた点を除き、実施例３と同様にして直鎖ペプチド固定カルボキシ化担体を調製した。

Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Glu-Gln-Gln-Asn-Ala-Phe-Tyr-Glu-Ile-Leu-His-Leu-Pro-Asn-Leu-Thr-Glu-Glu-Gln-Arg-Asn-Ala-Phe-Ile-Gln-Ser-Leu-Arg-Asp

・・・(Ｈ)

[0312] ２．直鎖ペプチド固定化量の測定

得られた直鎖ペプチド固定カルボキシ化担体の直鎖ペプチド固定化量（アフィニティリガンド導入量）を、上述した「アフィニティリガンド導入量（ペプチド固定化量）の測定方法」に従って測定した。その結果、直鎖ペプチ

ド固定化量は４．６ｍｍｏｌ／Ｌ－ｇｅｌであった。

[0313] ３．抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性の評価

得られた直鎖ペプチド固定カルボキシ化担体の抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性を、実施例１と同様にして評価した。評価結果を、それぞれ、表３の「抗体吸着容量」欄、「不純物除去能」欄および「薬品耐性」欄に示す。

[0314] ４．抗原性リガンド混入の評価

得られた直鎖ペプチド固定カルボキシ化担体の抗原性リガンド混入を、上述した「抗原性リガンド混入の評価方法」に従って評価した。その結果、抗原性リガンド混入の評価は「Ｂ」であった。

[0315] [表3]

表3

	基材	親水性ポリマー	アフィニティリガンド	陽イオン交換基	抗体吸着容量	不純物除去能	薬品耐性
実施例1	多糖類（4%アガロース）	あり	環状ペプチドA（Hcy－Lysチオエーテル結合）	あり	A	A	AAA
実施例2	多糖類（4%アガロース）	あり	環状ペプチドB（Hcy-Hcyジスルフィド結合）	あり	A	A	AAA
実施例3	多糖類（4%アガロース）	あり	環状ペプチドC（Pen－Lysチオエーテル結合）	あり	A	A	AA
実施例4	多糖類（4%アガロース）	あり	環状ペプチドD（トリアゾール結合）	あり	A	A	A
実施例5	多糖類（4%アガロース）	あり	環状ペプチドE（Cys-Lysチオエーテル結合）	あり	A	A	A
実施例6	多糖類（4%アガロース）	あり	環状ペプチドF（Cys-Cysジスルフィド結合）	あり	A	B	B
実施例7	多糖類（4%アガロース）	あり	環状ペプチドG（アミド結合）	あり	B	A	A
比較例1	多糖類（4%アガロース）	なし	環状ペプチドF（Cys-Cysジスルフィド結合）	あり	A	E	B
比較例2	多糖類（4%アガロース）	あり	直鎖ペプチドH	あり	E	B	E

[0316] 〈結果の説明〉

（抗体吸着容量）

実施例１～７のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体は、いずれも抗体吸着容量が「Ａ」または「Ｂ」評価であり、十分な抗体吸着容量を有していた。

また、比較例１のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体も、抗体吸着容量が「Ａ」評価であり、十分な抗体吸着容量を有していた。

これは、アフィニティリガンドとして環状ペプチドを用いたことによるものと考えられる。

一方、実施例１～７および比較例２のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体は、いずれも親水性ポリマーを含むが、抗体吸着容量が前者は「Ａ」または「Ｂ」評価、後者は「Ｅ」評価であり、十分な抗体吸着容量を有していなかった。これは、アフィニティリガンドが前者は環状ペプチドであるのに対し、後者は直鎖ペプチドであることから、直鎖ペプチドと親水性ポリマーとの組み合わせがよくないためと考えられるが、抗体吸着容量が異なるメカニズムについては現在のところ明確な説明をすることができない。

[0317]（不純物除去能）

実施例１～７のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体は、いずれも不純物除去能が「Ａ」または「Ｂ」評価であり、十分な不純物除去能を有していた。

これに対し、親水性ポリマーを含まない比較例１のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体は、不純物除去能が「Ｅ」評価であり、十分な不純物除去能を有していなかった。

一方、親水性ポリマーを含む比較例２のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体は、不純物除去能が「Ｂ」評価であり、十分な不純物除去能を有していた。

これらの結果は、不純物除去能が親水性ポリマーと陽イオン交換基が共存することにより改善されることによるのではないかと考えられる。

[0318]（薬品耐性）

実施例１～７および比較例１のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体は、薬品耐性が「Ｂ」評価以上であり、十分な薬品耐性を有していた。

これに対し、アフィニティリガンドとして直鎖ペプチドを用いた比較例２では、薬品耐性が「Ｅ」評価であり、十分な薬品耐性を有していなかった。

これらの結果は、薬品耐性において、直鎖ペプチドが環状ペプチドに劣ることによると考えられる。

また、実施例１～７および比較例１の中でも、実施例１および実施例２は評価が「ＡＡＡ」であり、特に優れていた。薬剤耐性の観点からは、環状ペプチドの架橋構造としては、ホモシステイン残基とハロアセチル基含有アミノ酸残基（側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸残基をいう。）間のチオエーテル結合およびホモシステイン残基間のジスルフィド結合が特に好ましく、ペニシラミン残基とハロアセチル基含有アミノ酸残基間のチオエーテル結合がその次に好ましく、システインとハロアセチル基含有アミノ酸残基間のチオエーテル結合、トリアゾール結合およびアミド結合がさらにその次に好ましいことがわかる。

[0319]（総括）

本発明のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体は、基材と、親水性ポリマーと、抗体結合性環状ペプチドと、陽イオン交換基と、をすべて備えることにより、抗体吸着容量、不純物除去能および薬品耐性のいずれにも優れたものとなっている。

請求の範囲

[請求項1] 基材と、親水性ポリマーと、抗体結合性環状ペプチドと、陽イオン交換基と、を有するミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

[請求項2] 前記抗体結合性環状ペプチドは側鎖間の分子内架橋により環化した環状部を有する、請求項１に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

[請求項3] 前記分子内架橋が、ジスルフィド結合、チオエーテル結合、トリアゾール結合、およびアミド結合からなる群から選択される少なくとも１つを含む、請求項２に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

[請求項4] 前記分子内架橋が、ジスルフィド結合、チオエーテル結合、およびトリアゾール結合からなる群から選択される少なくとも１つを含む、請求項２または３に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

[請求項5] 前記ジスルフィド結合が、Ｌ－システインおよびＤ－システイン以外の側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基と、Ｌ－システインおよびＤ－システイン以外の側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖チオール基との間で形成されたジスルフィド結合であり、

前記チオエーテル結合が、Ｌ－システインおよびＤ－システイン以外の側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基と、側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖ハロアセチル基との間で形成されたチオエーテル結合である、請求項４に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

[請求項6] 前記ジスルフィド結合が、システイン、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ

酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基と、システイン、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖チオール基との間で形成されたジスルフィド結合であり、

前記チオエーテル結合が、システイン、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基と、側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖ハロアセチル基との間で形成されたチオエーテル結合である、請求項４に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

[請求項7] 前記ジスルフィド結合が、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基と、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖チオール基との間で形成されたジスルフィド結合であり、

前記チオエーテル結合が、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基と、側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖ハロアセチル基との間で形成されたチオエーテル結合である、請求項４～６のいずれか１項に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

[請求項8] 前記分子内架橋が、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基と、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖チオール基との間で形成されたジス

ルフィド結合、または、ホモシステインおよびペニシラミンからなる群から選択される側鎖にチオール基を有するアミノ酸に由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基と、側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖ハロアセチル基との間で形成されたチオエーテル結合である、請求項２～４のいずれか１項に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

[請求項9] 前記ジスルフィド結合が、ホモシステインに由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基と、ホモシステインに由来する第２のアミノ酸残基の側鎖チオール基との間で形成されたジスルフィド結合であり、

前記チオエーテル結合がホモシステインに由来する第１のアミノ酸残基の側鎖チオール基と側鎖にハロアセチル基を有するアミノ酸に由来する第２のアミノ酸残基の側鎖ハロアセチル基との間で形成されたチオエーテル結合である、請求項８に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

[請求項10] 前記環状部のアミノ酸残基数が８～１４残基である、請求項２～９のいずれか１項に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

[請求項11] 前記抗体結合性環状ペプチドは直鎖部を有する、請求項１～１０のいずれか１項に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

[請求項12] 前記直鎖部は側鎖にヒドロキシ基およびカルボキシ基からなる群から選択される少なくとも１つを有するアミノ酸残基を含む、請求項１１に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

[請求項13] 前記基材が、多糖類、アクリレート系重合体、メタクリレート系重合体およびスチレン系重合体からなる群から選択される少なくとも１種である、請求項１～１２のいずれか１項に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

[請求項14] 前記基材が、多糖類、アクリレート系重合体およびメタクリレート系重合体からなる群から選択される少なくとも１種である、請求項１～１３のいずれか１項に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

[請求項15] 前記基材が、アガロースおよびセルロースからなる群から選択される少なくとも１種である、請求項１～１４のいずれか１項に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

[請求項16] 前記親水性ポリマーが親水性多糖類である、請求項１～１５のいずれか１項に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

[請求項17] 前記親水性多糖類が、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、プルラン、ヒドロキシエチルセルロース、およびカルボキシメチルセルロースからなる群から選択される少なくとも１種である、請求項１６に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

[請求項18] 前記親水性多糖類が、デキストラン、カルボキシメチルデキストランおよびプルランからなる群から選択される少なくとも１種である、請求項１６または１７に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

[請求項19] 前記抗体結合性環状ペプチドの分子量が５０００未満である、請求項１～１８のいずれか１項に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

[請求項20] 前記陽イオン交換基が、カルボキシ基またはスルホキシ基である、請求項１～１９のいずれか１項に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

[請求項21] 前記陽イオン交換基がカルボキシ基である、請求項１～２０のいずれか１項に記載のミックスモードアフィニティクロマトグラフィー用担体。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/033642

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C07K1/22(2006.01)i, B01D15/36(2006.01)i, B01D15/38(2006.01)i, B01J20/281(2006.01)i, C07K7/64(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl. C07K1/22, B01D15/36, B01D15/38, B01J20/281, C07K7/64, C07K16/00

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2017
Registered utility model specifications of Japan	1996-2017
Published registered utility model applications of Japan	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/027139 A1 (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB) 08 March 2007, claim 20, page 5, line 25, page 9, lines 27, 28, example 2 & JP 2009-506340 A & US 2008/0237124 A1 & EP 1937403 A1	1-21
Y	WO 2013/027796 A1 (OTSUKA CHEMICAL CO., LTD.; KAGOSHIMA UNIVERSITY) 28 February 2013, abstract, claims & JP 13-27796 A1 & US 2014/0274790 A1, claims & EP 2749646 A1	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 11 December 2017	Date of mailing of the international search report 19 December 2017
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/033642

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013/081037 A1 (KAGOSHIMA UNIVERSITY; OTSUKA CHEMICAL CO., LTD.) 06 June 2013, abstract, claims & JP 13-81037 A1 & US 2015/0044701 A1, claims & EP 2787079 A1	1-21
Y	WO 92/00997 A1 (IAF BIOCHEM INTERNATIONAL INC.) 23 January 1992, abstract, tables 5, 6 & JP 5-508837 A & US 5241047 A & EP 538283 A1	1-21
Y	WO 2014/034457 A1 (KANEKA CORPORATION) 06 March 2014, claim 8 & JP 14-34457 A1 & US 2015/0225445 A1, claim 8 & EP 2894159 A1	1-21
Y	JP 2010-133734 A (TOSOH CORPORATION) 17 June 2010, claim 3 (Family: none)	1-21
P, Y	WO 2017/069254 A1 (FUJIFILM CORPORATION) 27 April 2017, abstract, etc. (Family: none)	1-21
P, Y	WO 2017/069269 A1 (FUJIFILM CORPORATION) 27 April 2017, abstract, etc. & JP 2017-95443 A	1-21

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１７／０３３６４２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K1/22(2006.01)i, B01D15/36(2006.01)i, B01D15/38(2006.01)i, B01J20/281(2006.01)i, C07K7/64(2006.01)i, C07K16/00(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K1/22, B01D15/36, B01D15/38, B01J20/281, C07K7/64, C07K16/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１７年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１７年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１７年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	WO 2007/027139 A1 (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB) 2007.03.08, 請求項２０、第５頁第２５行、第９頁第２７－２８行、実施例２ & JP 2009-506340 A & US 2008/0237124 A1 & EP 1937403 A1	1-21
Y	WO 2013/027796 A1 (大塚化学株式会社、国立大学法人　鹿児島大学) 2013.02.28, 要約、特許請求の範囲 & JP 13-27796 A1 & US 2014/0274790 A1, Claims & EP 2749646 A1	1-21

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

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

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１１．１２．２０１７	１９．１２．２０１７

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　３９６１
小金井　悟
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	WO 2013/081037 A1 (国立大学法人　鹿児島大学、大塚化学株式会社) 2013.06.06, 要約、特許請求の範囲 & JP 13-81037 A1 & US 2015/0044701 A1, Claims & EP 2787079 A1	1-21
Y	WO 92/00997 A1 (IAF BIOCHEM INTERNATIONAL INC.) 1992.01.23, 要約、表５－６ & JP 5-508837 A & US 5241047 A & EP 538283 A1	1-21
Y	WO 2014/034457 A1 (株式会社カネカ) 2014.03.06, 請求項８ & JP 14-34457 A1 & US 2015/0225445 A1, Claim8 & EP 2894159 A1	1-21
Y	JP 2010-133734 A (東ソー株式会社) 2010.06.17, 請求項３ (ファミリーなし)	1-21
P, Y	WO 2017/069254 A1 (富士フイルム株式会社) 2017.04.27, 要約等 (ファミリーなし)	1-21
P, Y	WO 2017/069269 A1 (富士フイルム株式会社) 2017.04.27, 要約等 & JP 2017-95443 A	1-21