

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4422797号
(P4422797)

(45) 発行日 平成22年2月24日 (2010. 2. 24)

(24) 登録日 平成21年12月11日 (2009. 12. 11)

(51) Int. Cl.

F I

B O 1 J 41/20 (2006. 01)

B O 1 J 41/06

B O 1 D 15/08 (2006. 01)

B O 1 D 15/08

C O 2 F 1/42 (2006. 01)

C O 2 F 1/42 Z A B D

G O 1 N 30/88 (2006. 01)

G O 1 N 30/88 E

請求項の数 33 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願平9-529277

(86) (22) 出願日 平成9年2月14日 (1997. 2. 14)

(65) 公表番号 特表2000-504625 (P2000-504625A)

(43) 公表日 平成12年4月18日 (2000. 4. 18)

(86) 国際出願番号 PCT/SE1997/000237

(87) 国際公開番号 W01997/029825

(87) 国際公開日 平成9年8月21日 (1997. 8. 21)

審査請求日 平成16年2月5日 (2004. 2. 5)

(31) 優先権主張番号 9600590-5

(32) 優先日 平成8年2月19日 (1996. 2. 19)

(33) 優先権主張国 スウェーデン (SE)

(73) 特許権者

ジーイー・ヘルスケア・バイオサイエンス
・アクチボラグ
スウェーデン国エスエー 7 5 1 8 4
ウプサラビヨルクガタン 3 0

(74) 代理人

弁理士 青山 稔

(74) 代理人

弁理士 岩崎 光隆

(72) 発明者 バリイルンド, ロルフ

スウェーデン、エス 7 5 4 4 9 ウプサ
ラ、ラバーベルガータン 2 3 番

(72) 発明者 バリイストレム, ヤン

スウェーデン、エス 7 4 0 2 2 ベーリ
ング、レイニンクスヴェーゲン 3 番

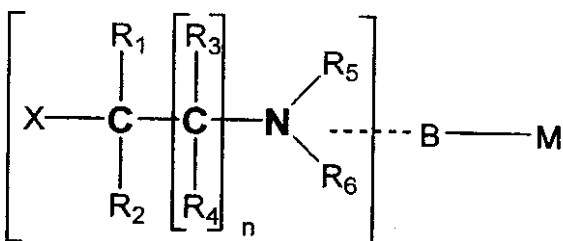
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチドおよび核酸のクロマトグラフィー的分離法、ならびに新規な高アフィニティーイオン交換マトリクス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ペプチドおよび核酸を分離するためのクロマトグラフィー法であって、所望ペプチドまたは核酸が溶液中の少なくとも1つの物質から分離されるように、陰イオン交換体 (I) が溶液中の物質と結合する条件下、ペプチドまたは核酸を含む水溶液を陰イオン交換体 (I) と接触させることを含み、ここで、



リガンド

リガンド アーム (B)

正電荷マトリクス (M)

式 I

[式中、

a. - - - は、リガンド アーム B がリガンドの R_{1-6} 基、または R_{1-6} 基の何れかの水素と置き換わっていることを意味し、

b. Mは、式 (I) の陰イオン交換リガンドをさらに含むポリマーマトリクスであり、
 c. Bは、シラン、カルボン酸エステル (- C O O -) またはカルボン酸アミド (- C O N H -) のように p H 2 - 1 4 で加水分解的に不安定な構造を持たず、所望により 1 個以上の酸素および / またはアミン窒素原子 (- N R ₇) で中断されていてよいまたは N⁺ R₈ R₉ R₁₀ または 1 個以上の基 - O R₁₁ で置換されていてよい直線状の、分枝状のまたは環状の飽和または不飽和炭化水素基であり、

d. n は、1 または 2 の整数であり、

e. R₁₋₆ は、水素または、所望により 1 個以上のアミン窒素またはエステル酸素原子 (各々 - N R₇ - および - O -) で中断されていてよい炭素鎖を有するかまたは 水素がアミノ基 (N⁺ R₈ R₉ R₁₀) または 1 個以上の基 - O R₁₁ で置換されていてよい 一価または二価 である直鎖状の、分枝状のまたは環状の飽和または不飽和炭化水素基から選択されるが、ただし、

・ R₁₋₆ が 2 価基であるならば、これは 2 個の R₁₋₆ 基からなり、式 I の太字で示した原子のうち少なくとも 1 つを伴って 5 員 (membered) または 6 員の環を形成し、そして

・ R₅ および R₆ の両方が、メチルおよびエチルから選択できないものとし、

f. R₇₋₁₁ および R₇₋₁₁ は、R₁₋₆ と同一の基から選択され、

g. X は、- O H または R₁₂₋₁₃ が R₁₋₆ と同一の基から選択される - N R₁₂ R₁₃ であり、

h. エポキシドによってトリエタノール アミンをセルロースに結合させることにより製造した陰イオン交換体は、含まれない。]

である、方法。

【請求項 2】

陰イオン交換体 (I) の必要とされる溶出イオン強度が Q - 基 (C H₃)₃ N⁺ - を有する第四級陰イオン交換体 (II) で必要とされる溶出イオン強度より少なくとも 1 2 5 % 高い、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

n が 1 である、請求項 1 の方法。

【請求項 4】

R₁₋₆ の炭化水素基の炭素鎖が、一つまたはそれ以上のアミノ窒素原子またはエーテル酸素原子 (それぞれ - N R₇ - および - O -) により中断され、および / または 一つまたはそれ以上の水素がアミノ基 (- N⁺ R₈ R₉ R₁₀) または - O R₁₁ 基で置換されている、請求項 1 から 3 の何れかに記載の方法。

【請求項 5】

B が、R₁ または R₂ を置き換えることを特徴とする請求項 1 から 4 の何れかの方法。

【請求項 6】

B が、直線状の、分枝状のまたは環状の飽和炭化水素鎖であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 の何れかの方法。

【請求項 7】

B の炭化水素鎖が、エーテル酸素原子により中断されている、請求項 6 の方法。

【請求項 8】

B の炭化水素鎖の 一つまたはそれ以上の水素がヒドロキシル基で置換されている、請求項 6 または 7 の方法。

【請求項 9】

B が、- C H₂ C H O H C H₂ - O - C H₂ - 、- C H₂ C H O H C H₂ - O - (C H₂)₄ - O - C H₂ - 、- C H₂ - であることを特徴とする請求項 1 ~ 8 の何れかの方法。

【請求項 10】

n が 1 および R₁₋₄ が水素であることを特徴とする請求項 1 ~ 9 の何れかの方法。

【請求項 11】

R₅ および / または R₆ が水素であることを特徴とする請求項 1 ~ 10 の何れかの方法。

【請求項 12】

X が、ヒドロキシル基であることを特徴とする請求項 1 ~ 11 の何れかの方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 3】

R_{5-6} の内少なくとも1つには、 R_{5-6} が結合する窒素原子から2炭素原子離れた位置にある $-N^+R_8R_9R_{10}$ または $-OR_{11}$ 基を含む[式中、 R_{8-11} を R_1 、 R_2 、 R_5 および R_6 と同様な基から選択される]ことを特徴とする請求項1～12の何れかの方法。

【請求項 1 4】

R_{8-11} が水素または低級アルキル(1-6炭素原子)から選択される、請求項1から13のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 5】

リガンドが、

$-CHOHCH_2NH_2$; $-CHOHCH_2NH(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH_2$; $-CHOHCH_2N[(CH_2)_3NH_2]_2$; $-CHOHCH_2NH[C(CH_3)_3]$; $-CHOHCH_2NHCH_2CH_2OH$; $-CHOHCH_2N(CH_2CH_2OH)_2$; $-CHOHCH_2NHC(CH_2OH)_3$; $-CHOHCH_2NHCH(CH_2OH)_2$; $-CHOHCH_2NHCH_2CH_2CH_3$; $-CHOHCH_2NHCH_2CHOHCH_2OH$; $-CHOHCH_2NHC(CH_3)(CH_2OH)_2$; $-CHOHCH_2NHCH_2(CHOH)_4CH_2OH$; $-CHOHCH_2N[C(CH_2OH)_3](CH_2)_3NHC(CH_2OH)_3$

10

から選択されることを特徴とする請求項1～14の何れかの方法。

【請求項 1 6】

ペプチドが分離され、陰イオン交換体が

$-CHOHCH_2NH_2$; $-CHOHCH_2NH(CH_2)_3NH(CH_2)_3NH_2$; $-CHOHCH_2NHCH_2CH_2OH$; $-CHOHCH_2NHCH(CH_2OH)_2$; $-CHOHCH_2NHCH_2CHOHCH_2OH$; $-CHOHCH_2NHC(CH_3)(CH_2OH)_2$; $-CHOHCH_2NHC(CH_2OH)_3$; $-CHOHCH_2N[C(CH_2OH)_3](CH_2)_3NHC(CH_2OH)_3$

20

から選択されるリガンドであることを特徴とする請求項1～15の何れかの方法。

【請求項 1 7】

陰イオン交換体への吸着によりペプチドを分離し、吸着したペプチドは、

- a. 水素結合開裂試薬、例えば尿素またはグアニジン、および/または
- b. 塩、および/または
- c. pHの変化

により溶出することを特徴とする請求項1～16の何れかの方法。

【請求項 1 8】

ペプチドが分離され、そのペプチドをイオン強度 15 mS / cm の溶液中で陰イオン交換体に適用することを特徴とする請求項1～17の何れかの方法。

30

【請求項 1 9】

核酸が分離され、陰イオン交換体が

$-CHOHCH_2NH[C(CH_3)_3]$; $-CHOHCH_2NHCH(CH_2OH)_2$; $-CHOHCH_2NHC(CH_2OH)_3$; $-CHOHCH_2NHCH_2CH_2OH$; $-CH_2CHOHCH_2NHCH_2CH_2CH_3$

から選択されるリガンドであることを特徴とする請求項1～15の何れかの方法。

【請求項 2 0】

イオン交換体への吸着により核酸を分離し、吸着した核酸は、その後

- a. 水素結合破壊試薬、例えば尿素またはグアニジン、および/または
- b. 塩、および/または
- c. リガンドが完全にまたは部分的に無負荷となるようpHを増加させる

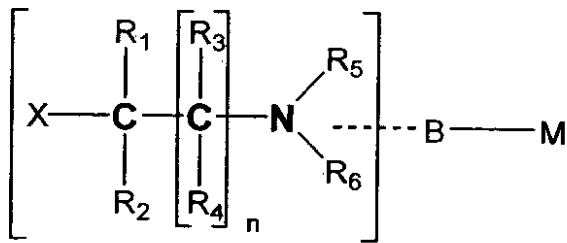
40

ことにより溶出することを特徴とする請求項1～15および18の何れかの方法。

【請求項 2 1】

核酸が合成オリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項1～15および19～20の何れかの方法。

【請求項 2 2】



リガンド リガンド アーム (B)

正電荷マトリクス (M)

式 I

[式中、

a. \cdots は、リガンド アーム B がリガンドの R_{1-6} 基または R_{1-6} 基の何れかの水素と置き換わっていることを意味し、

b. M は、陰イオン交換リガンドをさらに含むポリマーマトリクスであり、

c. B は、シラン、カルボン酸エステル ($-\text{COO}-$) またはカルボン酸アミド ($-\text{CONH}-$) のような加水分解的不安定構造を有さず、所望により 1 個以上の酸素および / またはアミノ窒素原子 ($-\text{NR}_7$) で中断されていてよいまたは $\text{N}^+\text{R}_8\text{R}_9\text{R}_{10}$ または $-\text{OR}_{11}$ の 1 個以上の基で置換されていてよい直線状の、分枝状のまたは環状の飽和または不飽和炭化水素基であり、

d. n は、1 または 2 の整数であり、

e. i. R_1 、 R_2 、 R_3 および R_4 は、水素および一価または二価である直鎖状の、分枝状のまたは環状の飽和または不飽和炭化水素基から選択されるが、

ただし、

・ $\text{R}_1 \sim \text{R}_4$ で示される何れかの炭化水素基が 2 価基であるならば、これは 2 個の R_{1-6} 基からなり、式 I の太字で示した原子のうち少なくとも 1 つを伴って 5 員 (membered) または 6 員の環を形成し、

ii. R_5 および R_6 は、 R_{1-4} と同一基から選択されるが、

ただし、

・ R_5 および R_6 の 1 つまたは 2 つが、1 つまたはそれ以上の窒素原子を含むならば、それらの基のうちの少なくとも 1 つは、1 つまたはそれ以上の酸素原子 ($-\text{OR}_{11}$ 、式中 R_{11} は、以下の段落 f. にしたがう) を含み、

・ R_5 および R_6 の両方が、同時にメチルおよびエチルから選択できず、

f. R_{7-11} および R_{11} は、 R_{1-4} と同一の基から選択され、

g. X は、 $-\text{OH}$ または $-\text{NR}_{12}\text{R}_{13}$ であり [式中、 R_{12} および R_{13} は R_{1-6} と同一の基から選択される]、

h. エポキシドによるトリエタノール アミンとセルロースとの結合により製造した陰イオン交換体は含まない。]

の構造を持つことを特徴とする陰イオン交換体。

【請求項 23】

n が 1 である、請求項 22 の陰イオン交換体。

【請求項 24】

R_1 、 R_2 、 R_3 および R_4 の炭化水素基が一つまたはそれ以上のアミノ窒素原子またはエーテル酸素原子 (それぞれ $-\text{NR}_7-$ および $-\text{O}-$) により中断され、および / またはアミノ基 ($-\text{N}^+\text{R}_8\text{R}_9\text{R}_{10}$) または $-\text{OR}_{11}$ 基に置換された一つまたはそれ以上の水素を有しており、ここで、 R_{7-11} が R_{1-4} と同一の基から選択される、請求項 22 または 23 のイオン交換体。

【請求項 25】

R_{7-11} が低級非置換基アルキル (C_{1-6}) および水素から選択される、請求項 24 の陰イオン交換体。

10

20

30

40

50

【請求項 26】

B が R_1 または R_2 に置き換わることを特徴とする請求項 22 ~ 25 の何れかの陰イオン交換体。

【請求項 27】

B が、直線状の、分枝状のまたは環状の飽和炭化水素鎖であることを特徴とする請求項 22 ~ 26 の何れかの陰イオン交換体。

【請求項 28】

炭化水素鎖がエーテル酸素原子により中断されている、請求項 27 の陰イオン交換体。

【請求項 29】

炭化水素鎖がヒドロキシル基により置換される一つまたはそれ以上の水素を保持する、請求項 27 または 28 の陰イオン交換体。

10

【請求項 30】

B が、

$-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$; $-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-\text{CH}_2-$; または $-\text{CH}_2-$

であることを特徴とする請求項 22 ~ 29 の何れかの陰イオン交換体。

【請求項 31】

n が、1 および R_{1-4} が水素であることを特徴とする請求項 22 ~ 30 の何れかの陰イオン交換体。

【請求項 32】

R_5 および / または R_6 が水素であることを特徴とする請求項 22 ~ 31 の何れかの陰イオン交換体。

20

【請求項 33】

リガンドが

$-\text{CHOHCH}_2\text{NH}_2$; $-\text{CHOHCH}_2\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]_2$; $-\text{CHOHCH}_2\text{NH}[\text{C}(\text{CH}_3)_3]$; $-\text{CHOHCH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$; -

$\text{CHOHCH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$; $-\text{CHOHCH}_2\text{NHC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$; $-\text{CHOHCH}_2\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{OH})_2$; -

$\text{CHOHCH}_2\text{NHCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$; $-\text{CHOHCH}_2\text{NHC}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{OH})_2$; $-\text{CHOHCH}_2\text{NHCH}_2(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$; -

$\text{CHOHCH}_2\text{N}[\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3](\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$; $-\text{CHOHCH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$

から選択されることを特徴とする請求項 22 ~ 32 の何れかの陰イオン交換体。

30

【発明の詳細な説明】

発明および定義の分野

本発明は、弱陰イオン交換体に関係する。それは、陰イオン交換リガンドとして第一級、第二級、第三級アミノのプロトン化された形態を持ち得るイオン交換体である。本発明は、リガンドの弱陰イオン交換基の窒素から 2 ~ 3 原子の距離に水素結合性原子を有するとき、この種類の陰イオン交換体はペプチドまたは核酸への結合特性が高まるという我々の発見に基づく。この結合は、グアニジンまたは尿素で開裂されるので、ペプチド / 核酸と陰イオン交換リガンドの間に水素結合があると解釈される。

我々の発見は、核酸またはペプチドの新規な分離法、およびその方法において使用できる新規なイオン交換吸着剤（イオン交換マトリクス）の両方に結びついた。

アミノ基という語は（構造および表現の何れの場合でも）、別途説明しない限り、プロトン化および非プロトン化の第一級、第二級、第三級アミノ基および第四級アンモニウム基を意味する。

40

“分離”という表現は、物質の各種複合混合物から一つまたはそれ以上の核酸 / ペプチドを取り出し、または分離すること意味する。分離は、核酸 / ペプチドの単離、精製および分析と関係して実施される。分離は、陰イオン交換体であるリガンドと物質との相互作用より実現される。この相互作用は、異なる物質ごとに異なり、そのことにより分離が行われる。

核酸という語は、RNA または DNA の両方を意味する。それには、一本鎖および二本鎖またはそれらの修飾物、例えば保護基および標識（アイソトープ、ビオチン、ハプテン等）であるホスホチオネート体を含める。核酸はオリゴヌクレオチドまたはポリ - ヌクレオ

50

チドである。塩基および塩基対（それぞれオリゴヌクレオチドである）の数は、典型的には200以下である。本発明は、合成的に製造されたオリゴヌクレオチドの単離と精製に好ましくは応用される。

ペプチドという語は、ポリペプチド構造をもつ化合物を意味する。すなわちリポタンパク質、糖タンパク質、プロテオグリカン等のタンパク質およびオリゴヌクレオチド（すなわち2-10アミノ酸を有するペプチド）である。

先行技術

E P 276,138およびD E 3,935,098に、イオン交換基の窒素から2炭素原子離れたところにヒドロキシル基がある弱陰イオン交換基を有する陰イオン交換体が記載されている。このイオン交換基は、二官能性試薬を用いて導入され、シラン基を介してガラスマトリクスに結合し、エポキシドによって第一級または第二級アミノと結合している。

$\text{glass-O-Si-(CH}_2)_3\text{-O-CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{-NH-(CH}_2)_2\text{-OH}$

シラン構造は比較的不安定であり、利用可能となるpH値の範囲は限られたものとなる。

E P 276,138には、マトリクスが有機ポリマーであることも提唱されている。しかしながら、有機マトリクスについては、十分安定な製品がその方法により得られるかどうかは定かではない。いずれの刊行物もポリヌクレオチドの分離に関係している。D E 3,935,098では、変性剤の尿素を含む溶離液をも使用する。それ以上の詳しい説明はなされていない。

E P 167,488は、窒素原子から2炭素原子離れたところにヒドロキシル基をもつ弱イオン交換基のあるイオン交換体について記載している。イオン交換基は、アミドを通じてマトリクスと結合している。ペプチドまたは核酸の分離についての記載はない。

E P 276,138の発明者らは、結合能が強すぎることを理由に、我々のリガンドを回避している。この説明は誤りであり、そのことがまた我々の新規リガンドの強い結合能（水素結合）に基づく一般的特性の利用を理解していないことの理由であろう。恐らく、彼らは、高いイオン強度での結合性の必要性さえも理解していない。

核酸の精製については、E C T E O L Aセルロースについての比較的広範囲の文献がある。E C T E O L Aセルロースは、エポキシドを使ってトリエタノールアミンN(CH₂CH₂OH)₃とセルロースとのカップリングにより製造されている。その結果生じる基は、-CH₂CHOHCH₂-N⁺(CH₂CH₂OH)₃であると考えられている。すなわち、E C T E O L Aセルロースは強イオン交換体である。しかしながら、E C T E O L Aセルロースの商業化されている製品には、pH 7 - 10において比較的高い緩衝能があり、それは弱イオン交換基の存在を示唆するものであり、これらのことはトリエタノールアミンのヒドロキシル基がセルロースとの結合に使用されていることを意味することが示されている。エポキシドとの反応によってセルロースに結合しているトリエタノールアミンからなるイオン交換体は、本発明の新規マトリクスの範囲内には含まれない。

アミノ基に関して多価性であるリガンドを有する弱イオン交換体は、従来からクロマトフォーカシングに使用されてきた。このタイプのクロマトグラフィーでは、内部pH勾配がカラム上で生じる。吸着および溶出は、緩衝液内の塩によって結合されている物質が置換されるのを避けるため弱いイオン強度のもので行う。現在、吸着に使用されているイオン強度は50mM NaCl未満であり、特に30mM未満である。溶出させるためのイオン強度は、さらに低いものとなっている（5倍低い）。Sluyterman et al., "Ten years of chromatofocusing: a discussion" (J., Chromatog. 470 (2) (1989) 417-426) 参照。この定義によるクロマトフォーカシングは、本発明の方法の範囲内には入らない。

本発明の要旨

クロマトグラフィーには、ペプチドおよび核酸分離のために改善された方法を得る一般的な必要性がある。発酵および他の細胞培養から得た上清からのタンパク質の精製が特に対象となる。これらの培地は、高濃度の塩

(伝導率 $\geq 15\text{--}20 \text{ mS/cm}$)

を含み、従来のイオン交換体へ直接適用することを困難にしている。例えば、脱塩または希釈による前処理をしなければならず、そのためコストのより高い方法となる。高いイオ

10

20

30

40

50

ン強度、好ましくは伝導率

$\geq 15 - 20 \text{ mS/cm}$

に相当するイオン強度において、吸着し、低イオン強度、例えば単なる pH 調整、によって脱離が可能となるイオン交換吸着剤が必要とされている。

合成的に生産したオリゴヌクレオチドは、しばしばイオン交換体で精製される。生産しようとしたオリゴヌクレオチドの他に、この合成ではより短い副産物が生産される。得られたオリゴヌクレオチドでは通常末端に保護基が残ったままとなっている。これにより、精製および処理が困難になる。クロマトグラフィーおよび脱保護を同時に行うことが好ましい。改良したイオン交換法にまた望まれることは、ペプチドおよび核酸の精製および単離のために改良されたダイナミクス、改良された処理能力および工程数の削減である。

10

本発明

最初に記載した高められた結合特性の発見が、タンパク質および核酸において優れたダイナミクスを示す陰イオン交換体 (I) の提供を可能にした。このことは、pH 2 - 14 範囲における陰イオン交換体 (I) の最大溶出イオン強度は実験部分 (Fig. 3) に記載したタンパク質、トランスフェリン、オボアルブミン 1、オボアルブミン 2、 γ -ラクトグロブリン 1、 γ -ラクトグロブリン 2 のうち、少なくとも 1 タンパク質の脱離において、イオン交換基 $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$ - (= Q - 基; 同じマトリクス、四級窒素からマトリクスへの同じカップリング基、陰イオン交換体 (I) に関する同一リガンド濃度、および同一 pH における測定) を有する第四級陰イオン交換体 (II) に対する必要溶出イオン強度の、好ましい例で 125% 以上、多くの場合 140% 以上、例えば 200% 以上高いという表現ができる。あるタンパク質について本発明使用の陰イオン交換体の pH にともなう溶出イオン強度の変化を図 2A に説明した。

20

本発明方法においては、分離される核酸および / またはペプチドを含む溶液を陰イオン交換体と接触させる。その交換体は、試料中の所望のひとつのタンパク質および / または核酸等をその溶液 (吸着工程の) 中の少なくとも 1 つの他の物質から分離する条件下において、ポリマー マトリクスに共有結合し、陽性荷電したアミノ基を有するリガンドを示している陰イオン交換体である。分離されたペプチド / 核酸が陰イオン交換体に吸着している場合、所望ならば、溶出液により脱離させることが可能である。この方法は以下の点で特徴的である。使用する陰イオン交換体が第一級、第二級、第三級であるアミノ基を有し、陰イオン交換基のアミノ窒素から 2 または 3 原子離れた位置の少なくとも一つの炭素原子上に、ヒドロキシル基または第一級、第二級もしくは第三級アミノ窒素を有する。この方法の特徴的な部分には以下の事項も含む。実験部分において示す少なくとも一つのタンパク質 (図 3; トランスフェリン、オボアルブミン 1、オボアルブミン 2、 γ -ラクトグロブリン 1 および γ -ラクトグロブリン 2) が上記溶出イオン強度を必要とするように陰イオン交換体 (I) が選択されている。

30

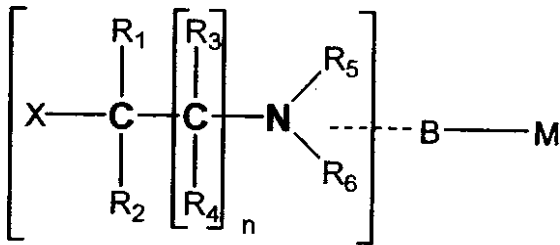
陰イオン交換を行う溶液 (溶出液を含む) は、典型的には水からなる水性であり、例えばエタノール、メタノール、アセトニトリル、水混和性混合液等の水混和性液体を含み得る。この溶液は、上記有機溶媒のうちの何れかであってもよい。この溶液、特に溶出液には、塩、緩衝物質、水素結合を開裂させる物質などがしばしば含まれる。

核酸 / ペプチドを含む溶液は、細胞培養の上清であり得るし、おそらく部分的に処理された合成混合液、または抽出液でもあり得る。溶液のイオン強度は、イオン交換体に所望の結合 / 吸着をさせ得るようなものでなければならない。イオン交換基ならびに吸着するタンパク質またはオリゴ - / ポリ - ヌクレオチドに依存して、イオン強度 / 伝導率は $15 - 20 \text{ mS/cm}$ より高くまたは低くなり得る。

40

本発明の方法により使用する陰イオン交換体

好ましい陰イオン交換体を式 I で示す。それらのうち幾つかは、新規である。当業者は、実験部分 (実施例 2) において示すような簡単な実験により、溶出イオン強度に対し上記の基準に一致するいずれかのイオン交換体を決定できる。



リガンド

リガンド アーム (B)

正電荷マトリクス (M)

10

式 I

- - - - は、リガンドアームがリガンドの R_{1-6} 基または R_{1-6} の何れかの基の水素と置き換わることを意味する。好ましくは、リガンドアームは R_1 または R_5 または R_6 と置き換わる。

リガンドはしばしば 1000 以下の分子量である。

M はマトリクスであり、他に典型的には式 I のイオン交換リガンドを含む。

n は整数であり、1 または 2、典型的には 1 である。

R_{1-6} は、水素および直鎖状の、分枝状のまたは環状の飽和または不飽和炭化水素（それは一価または二価となり得る）の中から選ばれる。二価基は、二つの連結した R_{1-6} 基からなり、太字で記された式 I 中の何れかの原子とともに 5 または 6 員 (membered) 環が形成される。二価基を形成する R_{1-6} の組の典型的な例は、 R_5 と R_6 、 R_1 と R_5 あるいは R_1 と R_6 である。意図されている炭化水素基において、一つまたはそれ以上のアミノ窒素原子またはエーテル酸素原子（それぞれ $-NR_7-$ および $-O-$ ）により炭素鎖が中断され、および/または一つまたはそれ以上の水素がアミノ基（ $-N^+R_8R_9R_{10}$ ）または $-OR_{11}$ 基に置換され得る。あるひとつの炭素原子は、炭素および水素に対する結合とは別に、典型的には最大 1 つの酸素原子または窒素原子と結合する。意図されている炭素鎖は（中断されている場合の酸素原子または窒素原子を含めて）、通常 10 原子以下の長さであり、好ましくは 6 またはそれ以下の原子の長さである。 R_{1-6} は、 R_5 と R_6 が結合している窒素原子から 2 または 3 原子の距離に一つまたはそれ以上のエーテル酸素原子、ヒドロキシル基またはアミノ窒素原子を持ち得る。（ R_5R_6 における上記すべて）。

20

30

R_1 、 R_3 および R_4 は好ましくは水素である。 $n = 2$ の場合、ある炭素原子上の R_3 および R_4 は、他の炭素原子のものとは異なり得る。

R_5 および R_6 のうち何れか、または両方とも水素であり得る。もし R_5 および R_6 の何れかが、水素であるならば、他が置換されないアルキル（ C_nH_{2n+1} またはそれに対応する環状の C_nH_{2n} ； n は整数であり、通常 1 - 10 である）であるのが好ましい。 R_5 および R_6 が、メチルまたはエチルから同時に選択されることはない。

R_{1-6} の例は、 $-N^+R_8R_9R_{10}$ 基または $-OR_{11}$ 基で置換されている対応する形態を含むメチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、 n -ブチル、sec-ブチル、 t -ブチルおよびイソブチル等の低級アルキル（1 - 6 炭素原子をもつ）である。置換された形態の代表例には、ヒドロキシルメチル； $-$ ヒドロキシルエチル；2-ヒドロキシプロピル、2-ヒドロキシ-1-メチルエチル；1-ヒドロキシメチル-2-ヒドロキシエチル；2-ヒドロキシブチル；1-（ヒドロキシメチル）プロピル；1-メチル-2-ヒドロキシプロピル；2-ヒドロキシ-1,1-ジ（ヒドロキシメチル）エチル；1,1-ジ（ヒドロキシメチル）エチル；1-ヒドロキシメチル-1-メチルエチル；1,1-ジ（ヒドロキシメチル）プロピル；2,3-ジヒドロキシプロピル；2,3,4-トリヒドロキシブチル；2,3,4,5-テトラヒドロキシペンチルおよび 2,3,4,5,6-ペンタヒドロキシヘキシル - ならびに例えば $-NH_2$ が一つまたはそれ以上の $-OH$ を置換する場合の対応するアミノ基がある。

40

50

R_{7-11} は、 R_{1-6} と同一の基から選択され、好ましくは R_{7-11} の 1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つが水素または低級アルキル C_{1-6} である。すべての R_{8-10} がアルキル基である場合、
 $-N^+R_8R_9R_{10}$ は、第四級アンモニウム基である。

R_{1-6} 基の対により形成できる二価炭化水素基は、例えば $-CH_2CH_2-$ および $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$; $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$; $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$; $-CH_2CH_2OCH_2CH_2-$; $-CH_2CH_2NHCH_2CH_2-$; $-CH_2NHCH_2CH_2-$; $-CH_2OCH_2CH_2-$; $-CH_2CH_2CHOHCH_2CH_2-$ および $-CH_2CH_2CH[N^+(CH_3)_3]CH_2CH_2-$ である。

X は $-OH$ または $-NR_{12}R_{13}$ であり、 R_{12-13} は R_1 、 R_3 、 R_5 および R_6 と同一の基の中から選択される。通常、 R_{12-13} の少なくとも一つは水素である。すなわち $-NHR_{12}$ または $-NHR_{13}$ である。

リガンド アームは、通常の陰イオン交換クロマトグラフィーの利用において使用される通常の pH 条件の下、すなわち、pH 2 - 14 では、加水分解に安定した有機構造体である。リガンド アームは、典型的にはシラン、カルボン酸エステル ($-COO-$) またはカルボン酸アミド ($-CONH-$) のような加水分解に不安定な構造を含まない。リガンド アームは、好ましくは直鎖状、分枝状または環状、飽和または不飽和炭化水素鎖であり、それは一つまたはそれ以上のエーテル酸素 - および / またはアミノ窒素原子 ($-NR'_7-$) で中断され、または一つまたはそれ以上の $-N^+R'_8R'_9R'_{10}$ 基または $-OR'_{11}$ により置換される。 R'_{7-11} は R_{7-11} と同一の方法により選択される。通常、 R'_7 および R'_{11} および、 R'_{8-10} のうち少なくとも一つは、水素であり、好ましくは二つまたは三つが水素である。水素ではない R'_{7-11} は典型的には低級アルキル (1 - 6 の炭素原子) である。リガンド アームのひとつのおよび同一の炭素原子は、炭素原子および水素原子とは別に典型的に殆どの場合一つの酸素原子または窒素原子に結合する。

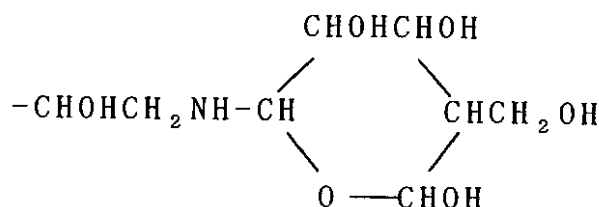
好ましいリガンド アーム B は、しばしば 0 - 20 原子の長さである。リガンド アーム B は、エポキシドまたは $-CH_2X'$ (X' はハロゲンであり、それは、トシレート等の、機能的に同等な他の基に置換できる。) およびアンモニア、第一級、第二級アミノ (NHR_5R_6 、 R_5 および R_6 は上記に従う) またはアルコール性ヒドロキシルの間の反応に含まれるカップリングによってしばしば得られる。 $-CH_2X'$ は、ハロヒドリン、アルキル ハライド、隣接ジハライド等に含まれ得る。エポキシド、ハロヒドリンおよび隣接ジハライドは、それら自体がアミノ基に対し 位 (2 炭素原子離れた位置において) にヒドロキシル基を形成するので、好ましいカップリングが、それらによって実現される。エポキシド、ハロヒドリンおよび隣接ジハライドを経たカップリングは、式 I で、 $n = 1$ 、 $X = OH$ および $R_{3-4} = H$ 、すなわち NHR_5R_6 に最も近い構造が $-CH_2CHOHCH_2-$ となることを意味する。このタイプのカップリングの結果として得られる好ましい構造 - B $-CHXCR_3R_4-$ は、 $-CH_2CHOHCH_2-O-CH_2CHOHCH_2-$; $-CH_2CHOHCH_2-O-(CH_2)_4-OCH_2CHOHCH_2-$; $-CH_2CHOHCH_2-O-(CH_2)_4-O-CH_2-$; $-CH_2CHOHCH_2-O-(CH_2)_4-O-CH_2-$; $-CH_2-$ である。エポキシド - / 隣接ジハライド - / ハロヒドリン基は、ヒドロキシル基を含むポリマーのアリレーションによる既知の方法で導入できる。それは、例えばアリルグリシジルエーテルと反応させ、その後ハロゲン化する反応である。例えば Nochumsson S (EP 87995) および Lindgren G (WO 9404192) 参照。

リガンド アーム B は、エーテル構造 (エーテル酸素はマトリクスのヒドロキシルに由来する) を介してマトリクス M に典型的に結合する。

チオエーテル ($-S-$) およびスルホンアミド ($-SO_2NH-$) は、エーテルに匹敵する加水分解安定性を有しており、リガンド アームまたは R_{1-13} または R'_{7-11} 基においてエーテルと等価的に置換できる。

もし、エポキシド / ハロハライド / 隣接ジハライドを結合しているマトリクスと下記化合物とを反応させると、好ましいリガンドが作られる：

化合物	リガンド (脱プロトン化状態)
アンモニア	$-\text{CHOHCH}_2\text{NH}_2$
プロピルアミン	$-\text{CHOHCH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
トリエチレンテトラアミン	$-\text{CHOHCH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
ビスアミノプロピルアミン	$-\text{CHOHCH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ または $-\text{CHOHCH}_2\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]_2$
t-ブチルアミン	$-\text{CHOHCH}_2\text{NH}[\text{C}(\text{CH}_3)_3]$
エタノールアミン	$-\text{CHOHCH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
ジエタノールアミン	$-\text{CHOHCH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$
トリス (ヒドロキシメチル) -メチルアミン	$-\text{CHOHCH}_2\text{NHC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$
2-アミノ-1,3-プロパンジオール	$-\text{CHOHCH}_2\text{NHCH}(\text{CH}_2\text{OH})_2$
3-アミノ-1,2-プロパンジオール	$-\text{CHOHCH}_2\text{NHCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$
2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパングジオール	$-\text{CHOHCH}_2\text{NHC}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{OH})_2$
1-アミノ-デオキシソルビトール	$-\text{CHOHCH}_2\text{NHCH}_2(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$
2-グルコサミン	



ビス- (トリス (ヒドロキシ-メチルメチル) アミノ) プロパン	$-\text{CHOHCH}_2\text{N}[\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3](\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$
-----------------------------------	---

ここに示したリガンドは、アミノ窒素によるカップリングで生成された。また、カップリングをヒドロキシ基で実施すると他の式 I のリガンドを与える。これは、本発明のひとつのおよび同一の陰イオン交換体が式 I の1つまたはそれ以上のリガンドを有することを意味するものである。カップリング反応は、それがアミノ窒素またはヒドロキシ酸素のいずれかにおいて、多かれ少なかれ選択的に起こるように調節され得る。リガンドには、マトリクスと結合させる化合物およびカップリングに利用される反応基の両方由来の原子を含み得ることが分かる。

優先権主張日当時、マトリクスに結合する隣接ジハライド、ハロヒドリンまたはエポキシドを t-ブチルアミン、2-アミノ-1,3-ジヒドロキシプロパン、トリス (ヒドロキシメチル) メチルアミン、エタノールアミンまたは n-プロピルアミンと反応させて得られたものが、核酸の分離に最も好ましいリガンドであった。

ペプチド分離に好ましい陰イオン交換体は、実験部分 (Fig. 3) で得られるタンパク質のうち少なくともひとつを脱離するために Q-基をともなう第四級イオン交換体に必要とされる溶出イオン強度の、典型的には 125% 以上、多くの場合は 140% 以上、例えば 200% 以上の溶出イオン強度を必要とする。

本発明のマトリクス M は、通常水に不溶性である親水性ポリマーであり、それは親水性となるように誘導体化した疎水性ポリマーも含む。実例は、アガロース、デキストラン、セルロース、デンプン、プルラン等のポリサッカライド、ならびにポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリ (ヒドロキシアルキル ビニル エタノール)、ポリ (ヒドロキ

10

20

30

40

50

シアルキル アクリレートおよび対応するポリメタクリレート、ポリビニル アルコール等の精製した合成ポリマーといったポリヒドロキシ ポリマー、スチレンおよびジビニルベンゼン (DVB)、および対応するモノマーを含むコポリマーからなるポリマーである。例えば架橋により、または吸着もしくは共有結合によって不溶体に結合させることにより、水に可溶性のポリマーを不溶性にできる。親水性基は、OHに変換できる基をもつモノマーと共に重合反応を実施することにより、または例えば親水性ポリマー等の適当な化合物の吸着による最終ポリマーの親水性化により、疎水性ポリマー (例えば、スチレン-DVB-コポリマー)へ導入することができる。マトリクスは、周囲の液体と接触する表面を増大させるために、しばしば多孔性である。ポリマーアーム (触手) は、マトリクスに含まれ得るので、各アームは、式IのリガンドアームBを介して結合した、一つまたはそれ以上のリガンドを有する。

10

好ましいマトリクスは、シラン基、エステル基およびアミド基等の加水分解に不安定な基を有しない。

本発明のイオン交換体の、および本発明の方法において使用できるイオン交換体内の式Iによるリガンドレベルは、通常、水で飽和したマトリクスmlあたり、0.001-4mmol、好ましくは0.01-1mmolの範囲である。可能であり、好ましい範囲は、マトリクスの構造によって決まる。アガロース・ベースのマトリクスの場合、リガンドレベルは通常膨潤したマトリクス (ゲル) mlあたり0.1-0.3mmolの範囲である。デキストラン・ベースのマトリクスの場合、範囲は、膨潤したマトリクス (ゲル) mlあたり0.5-0.6mmolまで拡大され得る。意図するリガンドレベルは、実験部分に示した方法により決定できる。

20

本発明の新規陰イオン交換体

R_5 基および R_6 基のうち1つまたは2つが1つまたはそれ以上の窒素原子を含むならば、それらの基のうち少なくとも1つが、1つまたはそれ以上の酸素原子 ($-OR_{11}$ 、式中 R_{11} は、上記によるものである) を含むという付加的条件をとまう式Iで表される陰イオン交換体である。 R_5 および R_6 はいずれも同時にメチルおよびエチルから選択できない。本発明のイオン交換体の好ましい形態は、上記溶出イオン強度を示す。エポキシドとの反応によってトリエタノールアミンを結合させることにより合成された陰イオン交換体は、ここでいう本発明の構成 (新規陰イオン交換体) とは異なる。- - - - - , B, M, X, R_{1-4} および R_{7-11} および R'_{7-11} は、式Iと同様である。

本方法の工程

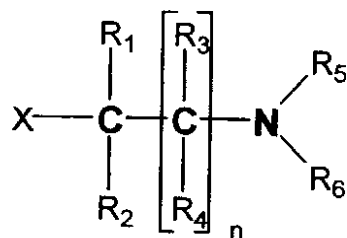
30

本発明の方法による吸着は上記方法で実施される。

吸着工程の後、場合によっては中間洗浄の後、水性溶出液のイオン強度の上昇により、および/または変性剤の添加により、および/またはpHを変えることにより、吸着させた物質、例えばペプチドおよび核酸を既知の方法で脱離させ、溶出液中の精製された所望の物質を回収することが可能となる。イオン強度、変性剤の添加量およびpHの変化は徐々に (1度またはそれ以上の段階において)、または連続的な勾配の形で実施される。特にペプチドの場合の脱離は、上記のQ-基を有する第四級イオン交換体から同一物質の脱離に必要とされるものよりも高イオン強度において行うことができる。

水素結合を開裂させる典型的な試薬 (変性剤) は、グアニジンまたは尿素である。水素結合開裂試薬に関する情報については、Levine et al., Biochemistry 2 (1963) 168-175を参照。脱離させるべき物質のリガンドとの結合の強固さおよび水素結合開裂試薬の選択によって、水素結合開裂試薬の濃度を0Mからそれぞれの試薬の溶解度まで変化させることができる。水素結合開裂試薬の典型的な濃度は、0.1Mから5Mまでの範囲である。脱離により水素結合を開裂する試薬のために、イオン交換マトリクスのリガンドはまた遊離形または下式の同類化合物の形で使用され得る

40



式 I I

[式中、 R_{1-6} 、 n および X は、式 I の場合と同一の意義を有する。]

10

pH の変化それ自体が水素結合の開裂を起こし得る。

変性試薬 / 水素結合開裂試薬の利用は、なかでも核酸の分離に利用可能であり、塩勾配 (= 伝導率勾配) または pH の変化と簡単に組み合わせ得る。

一般的に言うと、吸着が、水素結合の主要な部分に関与するならば、水素結合開裂試薬 (例えば遊離リガンド) が、脱離溶液内に含まれるときは、比較的低イオン強度において、またはリガンドを開放しまたは水素結合を減ずるような pH の上昇により脱離が行われ得る。

塩脱離 (おそらく勾配の形態) は、ペプチドおよび核酸にいずれにも利用でき、塩濃度 (イオン強度) が上昇することを意図する。その上昇は、0M からそれぞれの塩の溶解度まで変化し得る。その上昇は、しばしば 0.01-4M の範囲である。

20

最初に添加する水性溶液および溶出液の pH は変化し得る。主としてイオン性の相互作用によって吸着剤と結合するペプチドでは、弱陰イオン交換基が陽性電荷を帯び、分離されるべきペプチドが陰性電荷を帯びる pH において、異なるタンパク質に対し溶出液イオン強度に最大の違いが得られる。これは、高すぎる pH 値 (> 10) および低すぎる pH 値は避けるべきであることを一般的に意味する。水素結合の特性による相互作用は、本発明のタイプの陰イオン交換体が弱陽性電荷のタンパク質 (Fig. 2 A 参照) にも結合できることを意味する。

吸着した核酸 / ペプチドの脱離に使用する溶出液の pH は、緩衝成分 (それらは陽性に電荷を帯びている) が、陰イオン交換体のリガンドと結合できないように好ましくは調節する。適当な緩衝成分は、アミン等の陽イオン性塩基および酸ならびに双性イオン体である。

30

上記発明の方法は、上記クロマトフォーカシングおよび ECTEOLA - セルロースによる分離を含まない条件をとともう上記分離用陰イオン交換体の使用として理解され得る。本発明は、カラム内に充填され、流動床としたもの、バッチ法の吸着操作等による従来のクロマトグラフィー用に利用され得る。マトリクスは、粒子 (ビーズ)、モノリシック (monolithic) の形態、または表面 (例えばセンサーにおいて) の形態となり得る。

図

I . タンパク質のクロマトグラフィーの結果

Fig. 1 : 上記 (式 I = $(\text{HOCH}_2)_3\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CHOH}$ - のリガンド、リガンドアーム - $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2$ -) 記載のトリス - リガンドおよび Q - リガンド (リガンド = $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CHOH}$ - 、リガンドアーム - $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2$ -) をともうアガロースゲルと比較のクロマトグラフィー。破線のクロマトグラムは、Q - リガンド (Q - セファロース (商標登録) HP, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) である。実線のクロマトグラムは、トリス - リガンドである。

40

Fig. 2 A および 2 B : トリス - リガンド (2 A) および Q - 基 (2 B) それぞれをとともう上記アガロースゲルにおける蛋白についての溶出溶液イオン強度の pH の依存性

Fig. 3 : 溶出イオン強度 - 以下の異なる陰イオン交換リガンドの比較 :

A - C . Q - リガンドそれぞれ 0.03, 0.11, 0.17 mmol / ml

D . アンモニア 0.10 mmole / g ;

E . ビスアミノプロピルアミン 0.31 mmole / g ;

50

F . プロピルアミン0.13mmole/g ;
 G . t - ブチルアミン0.15mmole/g ;
 H . エタノールアミン0.14mmole/g ;
 I . ジエタノールアミン0.15mmole/g ;
 J . トリエタノールアミン0.06mmole / g ;
 K . 2 - アミノ - 1 , 3 - プロパンジオール0.14mmole/g ;
 L . 3 - アミノ - 1 , 2 - プロパンジオール0.14mmole/g ;
 M . 2 - アミノ - 2 - メチル - 1 , 3 - プロパンジオール0.15mmole/g ;
 N . トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン0.12mmol / g
 O . ビストリスプロパン0.11mmole/g ;
 P . アミノソルビトール0.11mmole/g ;
 Q . メチルモルホリン0.12mmole/g ;
 R . モルホリン0.28mmole/g

10

II . 核酸のクロマトグラフィーの結果

F i g . 4 : 実験 1 . pH7の塩溶液による溶出後、尿素溶液による溶出
 F i g . 5 : 実験 2 . pH7の尿素溶液による溶出の後、塩溶液による溶出
 F i g . 6 : 実験 3 . pH7の塩溶液の勾配による溶出
 F i g . 7 : 実験 4 . pH9の塩溶液による溶出 ロードするサンプルがpH8.2
 F i g . 8 A : 実験 5 . ロードするサンプルがpH6.8 塩溶液による溶出後、塩に尿素を
 付加した溶液による溶出
 F i g . 8 B : 実験 6 . ロードするサンプルがpH9.0 塩溶液による溶出

20

実験部分

1 . イオン交換体の合成

A . 標準的方法 (本発明のイオン交換体)

Porathら . (J . Chromatog.60 (1971) 167-77およびU . S . 3,959,251) に従いNaOH存在の下、エピクロルヒドリンおよびアガロース間の反応によりつくられるクロスリンクアガロース (30 μ パーティクル) を、0.18-0.22mmole/mlのアリルレベル ($\text{CH}_2 = \text{CHCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CHOCH}_2 -$) となるように塩基NaOHとアリルグリシジル エーテルと反応させた。水で洗浄したクロスリンクし、アリル化したアガロース40gを、吊り下げたマグネットスターラーを備えた400mlビーカーに160ml蒸留水および9 . 2g硫酸ナトリウムと一緒に添加した。その後、黄色色素が消えなくなるまで臭素水を加えた。過剰の臭素の還元は、ギ酸ナトリウムで実施した。その後、ゲルを蒸留水 (> 5 倍ベッド容積) で洗浄し、15 - 30秒間、吸引乾燥する。その後、臭素化したゲルを60ml蒸留水および60gトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (= トリス、式Iのリガンド (HOCH_2) ₃ $\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CHOH} -$) を与え、ここでは以後、このリガンドを トリス - リガンドと呼び、イオン交換体をトリス - イオン交換体と呼ぶ) を吊り下げたマグネットバーをともなう3 - 頸 100ml ベルコ - フラスコと一緒に添加した。最初は、pH10 . 9であった。反応は、40 において一夜 (23hr) 行った。完全に反応時間が経過した後のpHは、10 . 0であった。その後、ゲルを徹底的に蒸留水 (> 10 倍ベッド体積) で洗浄し、可能な保存は23 % (w / w) エタノールを含む蒸留水で行った

30

40

NaOH - 溶液で置換マトリクスの直接滴定による変曲点は0.13mmole/g吸引乾燥ゲルのリガンドレベルを与えた。

上記のクロスリンクしたアリルヒドロキシプロピル アガロースから始まって、アンモニア (0.10mmole/g) 、ビスアミノプロピルアミン (0.31mmole/g) 、プロピルアミン (0.13mmole/g) 、t - ブチルアミン (0.15mmole/g) 、エタノールアミン (0.14mmole/g) 、ジエタノールアミン (0.15mmole/g) 、トリエタノールアミン (0.06mmole/g) 、2 - アミノ - 1 , 3 - プロパンジオール (0.14mmole/g) 、3 - アミノ - 1 , 2 - プロパンジオール (0.14mmole/g) 、2 - アミノ - 2 - メチル - 1 , 3 - プロパンジオール (0.15mmole/g) 、ビストリスプロパン (0.11mmole/g) 、アミノソルビトール (0.11mmole/g) 、メチルモ

50

ルホリン (0.12mmole/g) を同様の方法によりカップリングした。イオン交換の許容量は、各完成イオン交換体のカッコ内に示している。

B. 第四級イオン交換体 (Q - イオン交換体; 比較用イオン交換体)

これらは前もって決定したイオン交換許容量に相当する量のアシル基で置換した、上記に従い作られたクロスリンクアガロースから製造された。アシル化したアガロースを臭素で処理し、トリメチルアミンと反応させた。三許容量のあるイオン交換体が準備された (0.03mmole/l、0.11mmole/l および 0.17mmole/l)。

C. リガンドレベルの決定

弱イオン交換体において pH 2 - 11 範囲でイオン交換体に直接的平衡コンディション条件下の 変曲点滴定。強イオン交換体を Cl^- で飽和し、過剰量は蒸留水で洗浄し、その後、吸着したクロライドイオンを AgNO_3 溶液で溶出させ、溶出の AgNO_3 滴定により決定した。

2. クロマトグラフィー (タンパク質)

A. トリスリガンドおよび Q - リガンドをとまなう上記アガロースゲルのクロマトグラフィーの比較

許容量 $0.17 \pm 0.3 \text{ mmole/ml}$ である Q - セファロース (商標登録) (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) および実験 1 B と同様であるカップリング化学およびマトリクス。上記ゲルをバックプレッシャー約 5 バール であり 5 - 6 cm の高さである HR5/5 カラム (Pharmacia Biotech AB) に詰めた。

サンプル: トランスフェリン 1mg/ml、オバルブミン 2mg/ml、
ラクトグロブリン 2mg/ml、ループボリュウム 50 μl

緩衝液 A: ピペラジン 20mM、pH 6.0

緩衝液 B: ピペラジン 20mM、pH 6.0

流速: 0.2ml/min

勾配容積: 40ml

UV - 検出器: 280nm 0.05AU

伝導率検出器最大値 = 100mS/cm

結果: トリス - イオン交換体は、第四級イオン交換体と比べたとき、かなり高いダイナミクスが得られた。Fig. 1 参照。

B. トリス - リガンドおよび Q - リガンドをそれぞれとまなう上記アガロースゲルにおける各タンパク質に対する溶出イオン強度の pH 依存性

2 A のカラムおよびゲル。流速 1ml/min。勾配: 0.5M NaCl に対し 20ml (適当な場合には、1.0M NaCl に対し 40ml)。サンプルは、Fig. 2 A および Fig. 2 B から明らかである。

各 pH による緩衝液

pH 4 ヘペス 20mM - HCl

pH 4.6 ピペラジン 20mM - HCl

pH 5 ピペラジン 20mM - HCl

pH 5.5 ピペラジン 20mM - HCl

pH 6 ピペラジン 20mM - HCl

pH 7 ベス 20mM

pH 7.5 ヘペス 20mM - NaOH

pH 8.0 ヘペス 20mM - NaOH

pH 8.2 トリス 20mM - HCl

pH 9 タウリン 20mM - NaOH

結果: Fig. 2 A および 2 B 参照。それは、伝導率の一番高い点を pH に対してプロットしたものである。Fig. 2 A は、第四級イオン交換体における異なる溶出イオン強度を示し、Fig. 2 B は、トリス - イオン交換体について示したものである。pH 6 ± 1 の範囲でトリス - イオン交換体の溶出イオン強度は第四級イオン交換体よりも相当高いことは、明白である。さらに、ゲルに対して結合力の強いタンパク質のイオン強度と結合力

10

20

30

40

50

の弱いタンパク質のイオン強度の差は、第四級イオン交換体の場合よりもトリス - イオン交換体の場合のほうが大きい (pH 約 7.5 まで)。これにより、本発明の弱イオン交換体の利用により分離 (イオン強度のより高い範囲において) のダイナミクスが上昇する可能性があることを示す。

C. 上記のクロス連結アガロースゲルと結合する異なる陰イオン交換リガンド間における比較

2 A のカラム。1 A のゲル。

サンプル: トランスフェリン (1mg/ml)、オバルブミン (1mg/ml)、 α -ラクトグロブリン (1mg/ml)

緩衝液 A: ピペラジン 20mM pH 6.0

緩衝液 B: ピペラジン 20mM、NaCl 1.0M または 0.5M、pH 6.0

勾配容積: それぞれ 40ml (1M まで) および 20ml (0.5M まで)

他のパラメーターは上記記載。

結果: Fig. 3 は、研究モデルタンパク質用に用意したイオン交換体の、pH 6.0 における溶出イオン強度を mS/cm で示す。これから、水素結合基から 2 炭素原子離れた第一級または第二級アミノ基があるイオン交換体が、研究モデルタンパク質を陰イオン交換クロマトグラフィーの手段により互いに分離する能力について第四級リガンドとは区別されることが明白となる。

3. クロマトグラフィー (核酸)

材料

リガンド: 実験は、タンパク質と同じリガンドで行った。トリス - イオン交換体の結果のみ記載する。

カラム: 約 1 ml のベッド容積をパックした HR 5 / 5 カラム。

緩衝液:

A. 20mM リン酸ナトリウム、pH 7.0

B. 2M NaCl を含む緩衝液 A、pH 7.0

C. 2M NaCl および 4M 尿素を含む緩衝液 A、pH 7.0

D. 4M 尿素を含む緩衝液 A、pH 7.0

E. 20mM Gly/NaOH、pH 9.0

F. 2M NaCl を含む緩衝液 E、pH 9.0

サンプル: 除去保護基 (トリチル) のあるホスホロチオエート化 25mer オリゴヌクレオチド (分子量 7500 ダルトン) の合成。濃度は 1.08mmole/ml (8.1mg/ml) であり、伝導率は約 2mS/cm であった。合成およびトリチル基の脱保護の後、サンプルを回転蒸発させ (アンモニアを除去するため)、脱イオン水に溶解した。パックしたカラム (HR 5/5、ベッド体積 1 ml) に適用する前に溶液の pH を典型的には 8.2 に調節した。

結果をとまなうテストプロトコール

緩衝液 A または E で未結合の内容物を洗浄し、緩衝液 A または E で前平衡化したカラム (HR 5/5、 $V_t = 1\text{ml}$) にサンプル (合成オリゴヌクレオチド 16mg を含む 2ml、合計 $A_{260} = 440$) を適用した。溶出は緩衝液 B および緩衝液 C (pH 7.0 で行うため) で、または緩衝液 F (pH 9.0 で行うため) で行った (溶出速度 153cm/h、温度 21)。溶出液は画分 A B C のように回収した。各画分について 260nm 吸収を測定した。カラムに適用した合計吸収に関するパーセント分布を各画分について計算した。回収した画分を脱イオン水で平衡化したセファデックス (商標登録) G - 25 で脱塩した。各画分の適当な体積を純度を決定する毛管電気泳動により検討した。

実験 1 pH 7 での溶出:

溶出コースは、Fig. 4 参照。サンプルは緩衝液 A で平衡化したカラムに添加した。平衡緩衝液で非結合の材料 (画分 A) を溶出させたのち、結合材料を緩衝液 B (画分 B) に続いて緩衝液 C (画分 C) で溶出させた。 A_{260} での吸収測定をもとにすると、オリゴヌクレオチドの分布は: 画分 A 6%、画分 B 32% および画分 C 62% であった。画分 B および C の毛管ゾーン電気泳動の分析から、画分 B はほとんど低分子混入物であったが

10

20

30

40

50

画分 C は少なくとも 90 % の純度である 25-mer であることが示された。この画分が 2 M NaCl および 4 M 尿素を含む緩衝液で溶出したという事実から、pH 7 におけるオリゴヌクレオチドと弱陰イオン交換体との結合にはイオン結合および水素結合が含まれていることを示唆している。

実験はサンプルを 2 倍量にして行った (32mg 25-mer)。その結果は前述と同様であり、陰イオン交換体はこのタイプのオリゴヌクレオチドに対し高い吸着許容量を示す。画分 C に相当する画分は高い純度を示した。それは、最も強く結合する内容物の純度を向上するサンプル - サンプル置換であることを示す (25-mer の場合)。

実験 2 尿素の効果、pH 7 における溶出

溶出パターンは Fig. 5 から明らかである。この実験では、平衡緩衝液で洗浄後、カラムを緩衝液 D (4 M 尿素) および緩衝液 C で最初に溶出させること以外は実験 1 の繰り返しであった。Fig. 4 から、少量の非結合材料は平衡緩衝液 (緩衝液 A) で洗浄され、結合しない構成物は緩衝液 D のみ溶出するが、第四級の溶出は緩衝液 C (画分 B) から得られることが明らかである。その結果は、弱陰イオン交換体との結合はイオン結合と水素結合の相互作用を通して影響を受けることを支持する。画分間のパーセント分布は - 画分 A 6 %、画分 B 93 % であった。毛管電気泳動の分析より、画分 B はいくらかの低分子ピークをとともう 78 % の純粋 25-mer であることが分かった。2 M NaCl (緩衝液 B、実験 1 参照) でカラムを中間洗浄した結果、画分 C に多量の低分子構成物および高純度の 25-mer が溶出することを証明する。

実験 3 pH 7 における勾配溶出

溶出パターンは Fig. 6 から明らかである。この実験では、平衡緩衝液で洗浄後、カラムを緩衝液 A から緩衝液 C (NaCl および尿素濃度は同時におよび直線的に増加する) へのまたは緩衝液 D から緩衝液 C への直線勾配で溶出させる以外は実験 1 の繰り返しであった。後の場合では、4 M 尿素を含む緩衝液でカラムを平衡化するため最初に緩衝液 D で洗浄した。いずれの実験においても、結合材料の溶出は、幾つかのショルダーのあるブロードピーク (特に前部において) となった。このピークを二つの画分として回収した (画分 B および画分 C、画分 A は平衡緩衝液で洗浄直後の物質)。毛管ゾーン電気泳動の分析より、前部には約 40 % 純度の 25-mer とともに多量の低分子混入物を含むことが判明した。溶出カーブの後部 (画分 C) には、およそ 94 % 純度の 25-mer オリゴヌクレオチドをほとんど排他的に含んでいた。

実験 4 pH 9 における溶出

オリゴヌクレオチド混合物の吸着および溶出を緩衝液 E および F を用い pH 9 で行う以外は、実験 1 の繰り返しであった。サンプルの pH は pH 8.2 に調節し、2 ml (16.2mg オリゴヌクレオチド) を緩衝液 E で平衡化したカラムに適用した。緩衝液 E での非結合画分 (A) の溶出後、結合構成物 (画分 B) を緩衝液 F で溶出した。画分 A および B について A_{260} をもとに、パーセント分布を計算すると画分 A は 47 %、画分 B は 49 % となった。溶出パターンは Fig. 7 に示す。得られた結果を以下に示す：

1. pH 7 における溶出結果とは反対に、結合構成物は 2 M NaCl で完全に溶出した (緩衝液 F)。この pH におけるオリゴヌクレオチドは、水素結合では全くなくイオン性相互作用のみにより結合していると思われた。

2. 毛管電気泳動の分析より、非結合構成物 (画分 A) には混入物が含まれ、画分 B は少なくとも 60 % の純度であることがわかった。緩衝液 E から緩衝液 F への直線勾配で溶出させたならば、画分 B の純度は約 90 % まで増大した。

実験 5 および 6 (サンプル pH の重要性)

pH 9 におけるオリゴヌクレオチドの分離は再現できないことに注目した。これは、原理的にはカラムに適用するサンプルの pH が違う為であり、それは、Fig. 8 A および 8 B の溶出パターンに見られ得る。実験は上記実験 4 と同じである。

Fig. 8 A は、適用するサンプルの pH が 6.8 であったときの溶出パターンである。結合構成物のおよそ 75 % は緩衝液 F で溶出したが、より少ない部分 (画分 C、適用した A_{260} の 10 %) は明らかにしっかりと結合しているため溶出には緩衝液 F を必要とする

10

20

30

40

50

。その結果は実験 1 で得られたものに類似し、適用したオリゴヌクレオチドはイオン結合力および水素結合力により陰イオン交換体と結合することを示す。これは、オリゴヌクレオチドには高密度に電荷を帯びた基があるためであり、それは次にそれらにオリゴヌクレオチドに高緩衝許容量を与える。ヌクレオチド溶液 (pH6.8に調節した)が同所を通過するとき、陰イオン交換体は実際には平衡-pHよりも低くなるとの結果となるであろう。この仮説は、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンがpH 9において僅かに分離するため有望である。溶出緩衝液のpHが実験を通して 9 . 0 であるにも拘わらず、結合画分 (B) のpHが8.2であるのに対し非結合画分 (画分 A) のpHが 8 . 9 であることから、我々の結果はこの仮説を支持する。

Fig . 8 B は、ロードしたサンプルのpHが9.0であったときに得られた溶出パターンを示す。この場合、ロードしたサンプルのほとんどが非結合 (8 8 %) であり、約 1 0 % が緩衝液 F で溶出した。これは Fig . 8 A の結果とは明らかに反対であり、オリゴヌクレオチドだけがイオン力を通して陰イオン交換体と結合すること示す。トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンがこのpHにおいて若干しかイオン化されていないため、陰イオン交換体の結合許容量は著しく低くなる。

実験 5 で得られた結果から、使用したトリス - イオン交換体におけるオリゴヌクレオチドの分離は陰イオン交換体およびサンプルのpHの影響を受けることが分かる。pH 値は、合成的生産オリゴヌクレオチドの混合液を含む粗生産物の精製を最適化するためにpH 7 と 9 の間で変化し得る。

実験 7 直線状pH勾配による溶出

非結合画分 A の溶出の後、マトリクスに結合したオリゴヌクレオチドを緩衝液 A (pH7.0) から緩衝液 F (pH9.0) への直線状勾配 (1 0 ベッド体積) により溶出したこと以外、実験 1 の繰り返しであった。その結果は、流出液のpHが約8.5になったとき、結合オリゴヌクレオチドがマトリクスから溶出し始めることを示した。溶出したピークはブロードとなり、強固に結合する構成物の純度は上記実験 3 で得られたものに匹敵した。その結果は、合成オリゴヌクレオチド (25-mer) はpH8.5まではイオン結合および水素結合の組み合わせにより、それ上のpHではイオン性の相互作用でのみマトリクスと結合していることを示している。

実験 8 Tris-HCl緩衝液による競合溶出

この実験の目的は、高濃度の Tris-HCl 緩衝液 (1 M、pH7.0) によりマトリクスと結合するオリゴヌクレオチドを置換し得るかどうか調べることであった。カラムは、50mM Tris-HCl 緩衝液により平衡化され (pH 7 . 0 (緩衝液 I))、2 ml のサンプルを平衡化カラムに適用した (上記実験 1 を比較のこと) 。平衡緩衝液による非結合画分 (A) の溶出の後、カラムを以下の順番に以下の緩衝液で洗浄した。

緩衝液 II : 3 M NaCl を含む平衡緩衝液 (緩衝液 I)

緩衝液 III : 1 M Tris-HCl 緩衝液、pH7.0、および

緩衝液 IV : 2 M NaCl、1 M Tris-HCl、pH7.0

その結果から、ロードした材料において

- 1 . 1 2 . 5 % はカラムに結合しなかった。
- 2 . 4 3 % は緩衝液 II により溶出した。
- 3 . 3 4 % は緩衝液 III により溶出した。
- 4 . 1 1 % は緩衝液 IV により溶出した。

ということが判明した。

大部分の強固に結合するオリゴヌクレオチドが 1 M Tris-HCl 緩衝液、pH7.0 で溶出することは明らかである。この最も可能性のある説明は、トリス (ヒドロキシメチル) メチルアミンおよびカウンターイオン Cl⁻ の組み合わせによりリガンドおよび結合オリゴヌクレオチド間の水素結合およびイオン結合がそれぞれ弱まるというものである。この説明は、トリス - リガンドおよびその類似体とオリゴヌクレオチドの吸着における提唱機構と一致している。この結果は、より高いイオン強度 (緩衝液 IV 参照) が最も強固に結合する画分の溶出に必要であるということも示す。これはさらに、pH7.0 における合成オリゴヌ

10

20

30

40

50

クレオチドとマトリクスとの結合（トリス - リガンドを示す）は、水素結合を通してかなり増強したイオン性相互作用の結果であるという我々の仮説を支持するものである。

実験9 “トリチル - オフ” 合成オリゴヌクレオチドから “トリチル - オン” 合成オリゴヌクレオチドの分離

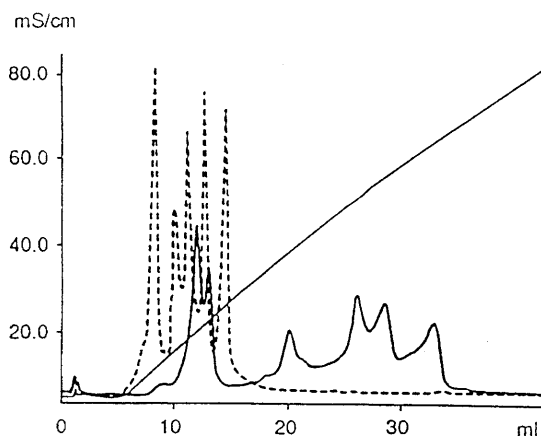
この実験はpH9.0で行い、上記実験4の手順に従った。粗サンプルには、“トリチル - オン” 合成オリゴヌクレオチドおよび “トリチル - オフ” 合成オリゴヌクレオチドの混合液を含んだ。1ml脱イオン水中のおよそ16mgのサンプルをカラムに適用し、実験は実験4に従って行った。緩衝液E（2 M NaClを含む20mM Gly/NaOH緩衝液、pH9.0）での溶出により十分に分離された2つの画分となった（BおよびCと命名）。プール画分における材料の260nmでの吸収（ A_{260} ）によるパーセント分布は、画分A = 14%、画分B = 45%および画分C = 44%であった。毛管ゾーン電気泳動の分析より、画分Aは排他的に低分子混入物を含み、画分Bには純度80%の合成オリゴヌクレオチドの “トリチル - オフ” 変異体を主に含み、さらに最も遅延する画分Cは少なくとも80%の純度であり、25-merオリゴヌクレオチドの “トリチル - オン” 変異体を含むことが分かった。

前述とともに、この結果は、高収率・高純度で合成オリゴヌクレオチドを簡単に精製するクロマトグラフィー法として本発明に大きな可能性があることを明らかに示すものである。吸着過程の最適pH条件を選ぶことにより、使用するマトリクスのオリゴヌクレオチド許容量は20mg/ml吸着剤よりも高くなり得る。

10

【図1】

Fig. 1



【図2A】

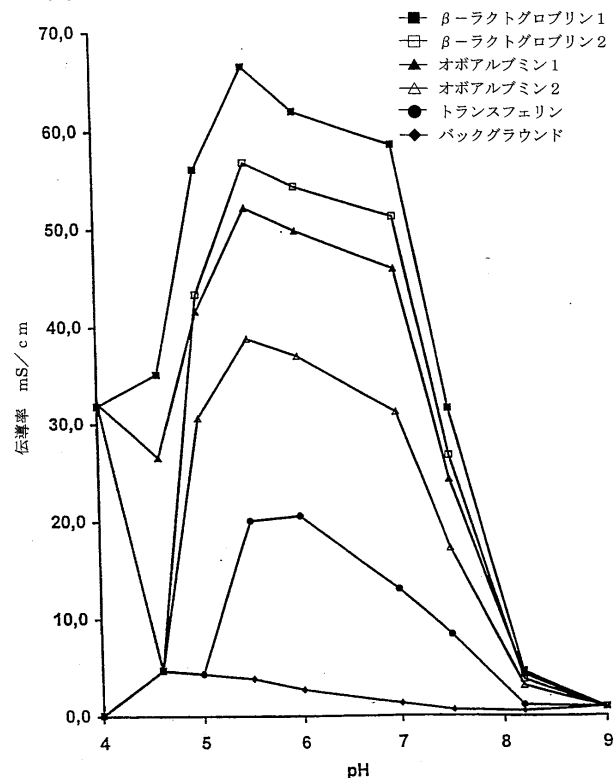


Fig. 2A 各pHにおけるTRISリガンドと各タンパク質の結合力

【図 2 B】

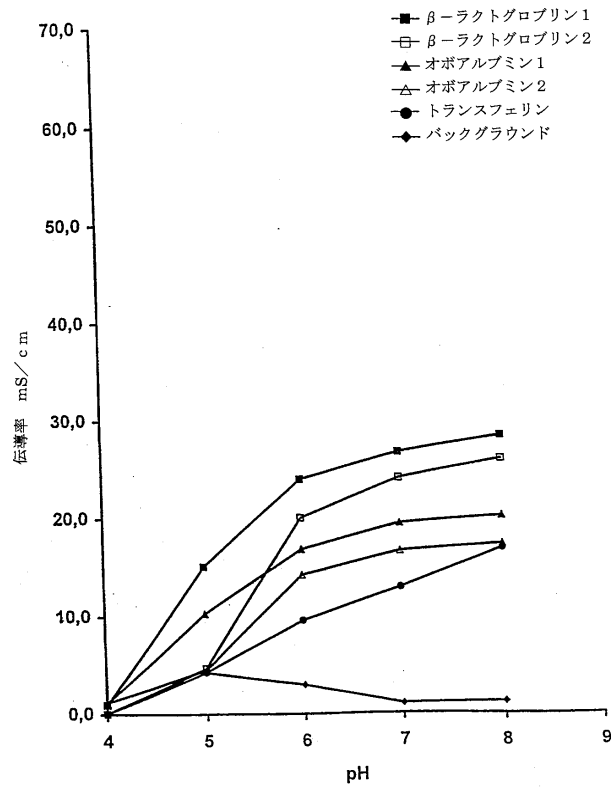


Fig. 2 B 各 pH における Q-リガンドと各タンパク質の結合力

【図 3】

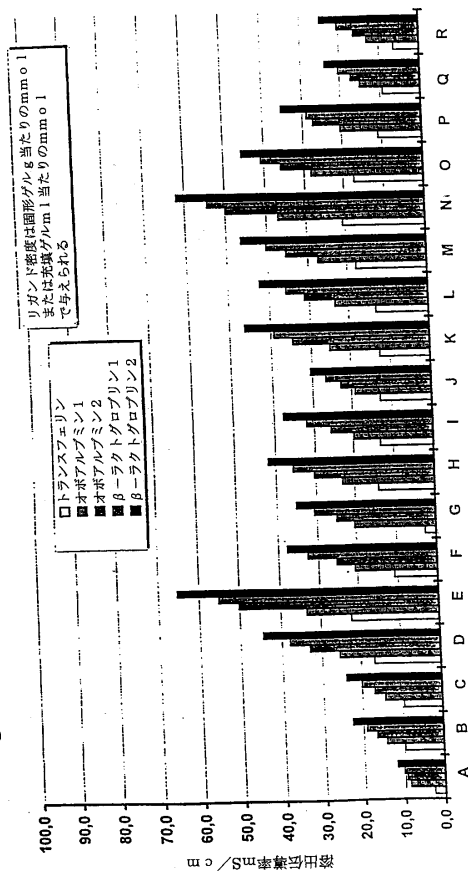
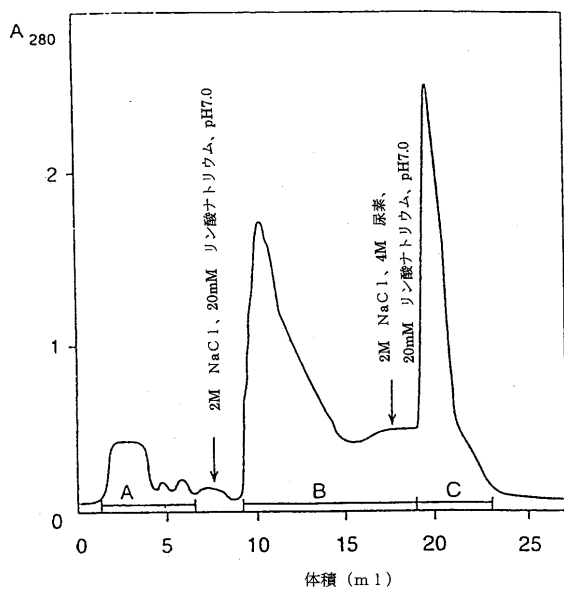


Fig. 3 pH6.0 における陰イオン交換体リガンドの比較

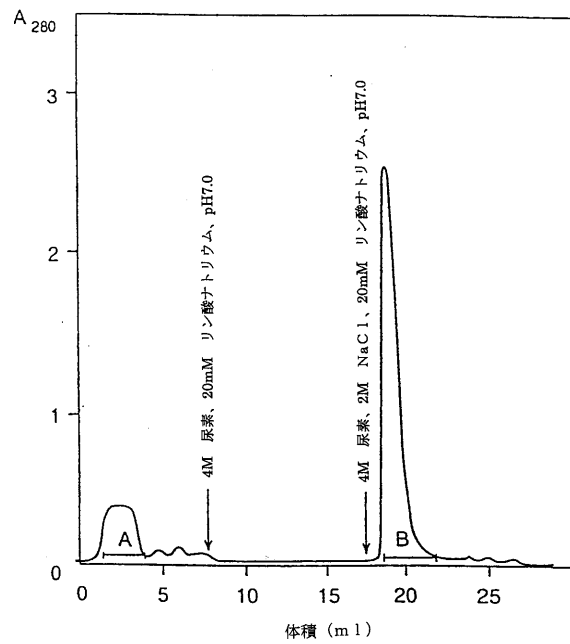
【図 4】

Fig. 4



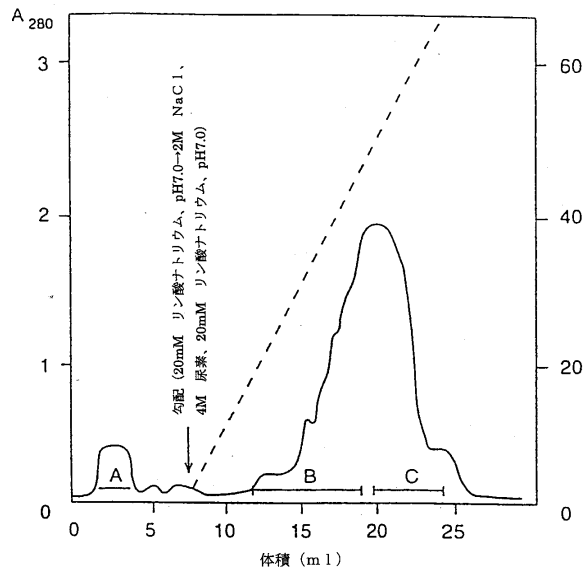
【図 5】

Fig. 5



【図 6】

Fig. 6



【図 7】

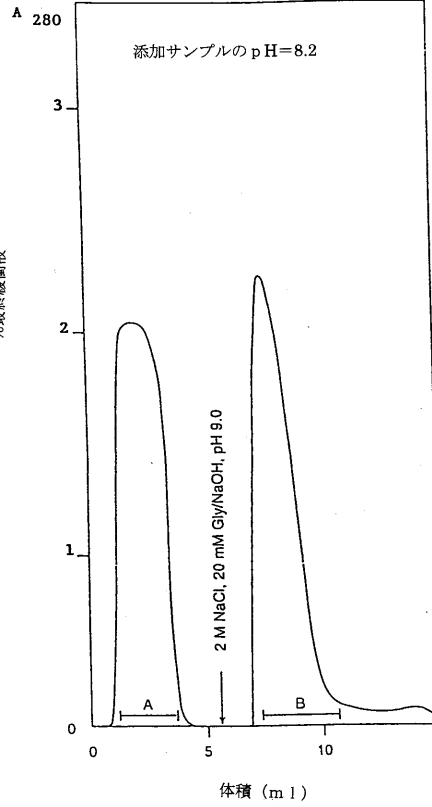


Fig. 7

【図 8 A】

A

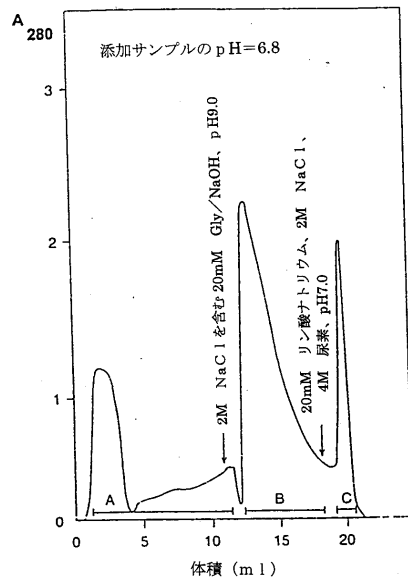


Fig. 8A

【図 8 B】

B

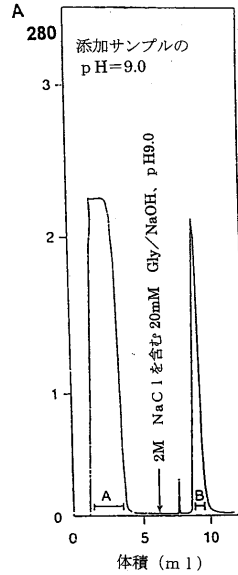


Fig. 8B

フロントページの続き

(72)発明者 ベレヴ, マコネン

スウェーデン、エス 756 46ウブサラ、トリュフェルヴェーゲン43番

(72)発明者 セデルバリィ, レナート

スウェーデン、エス 755 98ウブサラ、エクシャガーナ、クルセンバリィ

審査官 赤樫 祐樹

(56)参考文献 特表平04-506030(JP, A)

特開平04-061935(JP, A)

特開昭59-066353(JP, A)

特表平05-502940(JP, A)

国際公開第91/000145(WO, A1)

特開昭62-176547(JP, A)

特開昭64-006755(JP, A)

国際公開第90/014886(WO, A1)

欧州特許出願公開第00276138(EP, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

B01J 41/00 - 41/18

B01D 15/08

B01J 20/00 - 20/34

C02F 1/42

G01N 30/00 - 30/96