



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103816870 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 28

(21) 申请号 201410042852. 7

(22) 申请日 2009. 12. 03

(30) 优先权数据

2008-308899 2008. 12. 03 JP

2008-308898 2008. 12. 03 JP

2008-308897 2008. 12. 03 JP

2008-308896 2008. 12. 03 JP

2008-308893 2008. 12. 03 JP

2008-308894 2008. 12. 03 JP

2008-308895 2008. 12. 03 JP

(62) 分案原申请数据

200980148503. 0 2009. 12. 03

(71) 申请人 株式会社钟化

地址 日本大阪府

申请人 JNC 株式会社

(72) 发明人 河井义和 川寄宏明 川原直美

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 张永新

(51) Int. Cl.

B01J 20/22 (2006. 01)

B01J 20/30 (2006. 01)

B01D 15/08 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书30页

(54) 发明名称

含有甲酰基的多孔性载体、使用该多孔性载体的吸附体以及它们的制造方法

(57) 摘要

本发明涉及含有甲酰基的多孔性载体的制造方法,其包括:向具有甲酰基的多孔性粒子中导入间隔团,然后利用过碘酸和/或过碘酸盐对上述间隔团部分进行氧化,使其转变为甲酰基,其中,导入间隔团后的多孔性粒子的甲酰基含量为:每1mL多孔性粒子中的甲酰基含量为 $3\mu\text{mol}$ 以下。此外,本发明还涉及吸附体的制造方法,其包括:将含有氨基的配位体固定化于所述含有甲酰基的多孔性载体上。根据本发明,可以提供吸附量大、强度高且配位体洗脱少的含有甲酰基的多孔性载体,以及提供使用上述多孔性载体的吸附体。

1. 一种吸附体的制造方法,其包括:

通过亚氨基化及其还原反应这两步反应来进行,将含有氨基的配位体固定化于含有甲酰基的多孔性载体,并在亚氨基化反应之后,实施将反应液的 pH 调节为还原反应的 pH \pm 1 以内,并在不加入还原剂的情况下进行搅拌、振荡或放置的稳定化操作。

2. 权利要求 1 所述的吸附体的制造方法,其中,亚氨基化反应之后的稳定化操作实施 1 小时以上。

3. 权利要求 1 所述的吸附体的制造方法,其中,亚氨基化反应之后的稳定化操作在 pH2 ~ 10 条件下实施。

4. 权利要求 1 所述的吸附体的制造方法,其中,亚氨基化反应之后的稳定化操作在缓冲液中实施。

5. 权利要求 4 所述的吸附体的制造方法,其中,缓冲液中含有至少一种以上的能具有二价以上阴离子的盐。

6. 权利要求 4 所述的吸附体的制造方法,其中,缓冲液中含有多元羧酸盐和 / 或中性盐。

7. 权利要求 4 所述的吸附体的制造方法,其中,缓冲液中含有柠檬酸盐。

8. 权利要求 4 所述的吸附体的制造方法,其中,缓冲液中含有选自金属卤化物和硫酸盐中的至少 1 种以上。

9. 权利要求 4 所述的吸附体的制造方法,其中,在将含有氨基的配位体固定化于含有甲酰基的多孔性载体时,通过有机硼烷络合物,使配位体的固定化键稳定化并同时使其余的甲酰基钝化。

10. 权利要求 9 所述的吸附体的制造方法,其在含有缓冲液的溶剂中实施。

11. 权利要求 9 所述的吸附体的制造方法,其中,上述通过有机硼烷络合物使配位体的固定化键稳定化并同时使其余的甲酰基钝化的操作,实施 1 小时以上且 48 小时以下。

12. 权利要求 9 所述的吸附体的制造方法,其中,有机硼烷络合物是硼烷-胺络合物。

13. 权利要求 1 所述的吸附体的制造方法,其中,操作温度为 -10 ~ 40 $^{\circ}$ C。

14. 一种吸附体,其通过权利要求 1 ~ 13 中任一项所述的制造方法制得。

15. 权利要求 14 所述的吸附体,其中,含有氨基的配位体的导入量为:每 1mL 多孔性载体中导入含有氨基的配位体 1mg 以上且 500mg 以下。

16. 权利要求 14 或 15 所述的吸附体,其中,含有氨基的配位体的导入量为:每 1mL 多孔性载体中导入含有氨基的配位体 0.01 μ mol 以上且 15 μ mol 以下。

17. 权利要求 14 所述的吸附体,其中,所述含有氨基的配位体是蛋白质 A。

18. 权利要求 14 所述的吸附体,其中,从吸附体洗脱到目标物中的配位体浓度的第一次精制~第三次精制的平均值为 50ppm 以下。

19. 权利要求 14 所述的吸附体,其中,精制目标物的吸附量为:每 1mL 吸附体中精制目标物的吸附量为 1mg 以上且 100mg 以下。

20. 权利要求 14 所述的吸附体,其在压缩 5% 时的压缩应力为 0.01MPa 以上且 1MPa 以下,压缩 10% 时的压缩应力为 0.03MPa 以上且 3MPa 以下,以及压缩 15% 时的压缩应力为 0.06MPa 以上且 5MPa 以下。

21. 权利要求 14 所述的吸附体,其在压缩 5% 时的压缩应力为 0.02MPa 以上且 1MPa 以

下,压缩 10% 时的压缩应力为 0.06MPa 以上且 3MPa 以下,以及压缩 15% 时的压缩应力为 0.09MPa 以上且 5MPa 以下。

22. 权利要求 14 所述的吸附体,其树脂含量为 2% 以上且 50% 以下。

23. 权利要求 14 所述的吸附体,其体积平均粒径为 20 μm 以上且 1000 μm 以下。

24. 一种精制方法,其中使用了权利要求 14 ~ 23 中任一项所述的吸附体。

25. 权利要求 24 所述的精制方法,其中,使用直径为 0.5cm 以上且高度为 3cm 以上的柱。

26. 权利要求 24 所述的精制方法,其包括以 100cm/h 以上且 1000cm/h 以下的线速进行通液的工序。

含有甲酰基的多孔性载体、使用该多孔性载体的吸附体以及它们的制造方法

[0001] 本申请是国际申请日为 2009 年 12 月 3 日的申请号为 200980148503.0 的中国发明专利申请“含有甲酰基的多孔性载体、使用该多孔性载体的吸附体以及它们的制造方法”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及各种吸附体,特别是治疗用(医疗用)吸附体和抗体医药品精制用吸附体。

背景技术

[0003] 多孔性载体已被广泛用作各种吸附体,例如各种色谱法用吸附体及亲和吸附体。其中,亲和吸附体可以高效率地精制目标物,并且能够降低无用物的浓度,因此已越来越多地被用作医疗用吸附体和抗体医药品精制用吸附体。特别是,作为用于治疗风湿、血友病、扩张型心肌病的治疗用(医疗用)吸附体,受到关注的是将作为亲和配位体的蛋白质 A 固定化于多孔性载体而得到的吸附体(例如,非专利文献 1、非专利文献 2)。

[0004] 另一方面,作为能够特异性地吸附、洗脱免疫球蛋白(IgG)的吸附体,备受瞩目的是将作为亲和配位体的蛋白质 A 固定化于多孔性载体而得到的吸附体(抗体医药品精制用吸附体)。作为将以蛋白质 A 为代表的各种亲和配位体固定化于多孔性载体的方法,可以从例如非专利文献 3 的表 8.1 和图 8.15 中所示的溴化氰法、三氯三嗪法、环氧法、三氟乙烷磺酰氯法等各种固定化方法中选择。其中,从安全性的观点、以及固定化反应的容易程度、能够使用可通过较容易的方法生产的蛋白质、肽等理由来看,工业上优选将多孔性载体的甲酰基与亲和配位体的氨基之间的反应应用于固定化。

[0005] 作为向多孔性载体导入甲酰基的方法,可以列举通过过碘酸氧化法使具有连位(ビシナル)羟基的多糖凝胶氧化、从而在糖链上生成甲酰基的方法(以下简称为糖链开裂型)(例如非专利文献 4)。通过该方法得到的吸附体具有配位体洗脱少的优点。

[0006] 此外,还可以列举如非专利文献 3 的图 8.15、或非专利文献 5 所示地,介由通过使戊二醛发生作用的方法、使环氧基开环得到的甘油基与过碘酸盐作用的方法等得到的各种间隔团导入甲酰基的方法(以下简称为间隔团型)。使用了上述含有间隔团型甲酰基的多孔性载体的吸附体,具有目标物吸附量较大的倾向。此外,在专利文献 1 中公开了下述制造方法:向多孔性粒子的环氧基中导入氨基糖,并在该氨基糖部分经氧化开裂而生成的甲酰基上固定化含有氨基的配位体。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献 1:日本特开昭 62-15300

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献 1:Annals of the New York Academy of Sciences, 2005, Vol. 1051,

P635-646

[0012] 非专利文献 2 :American Heart Journal, Vol. 152(4), 2006

[0013] 非专利文献 3 :亲和色谱法, 笠井献一等著, 东京化学同人, 1991 年

[0014] 非专利文献 4 :Immunology, Vol. 20, p1061, 1971

[0015] 非专利文献 5 :Immobilized Affinity Ligand Techniques, Greg T. Hermanson et al., Academic Press, 1992

发明内容

[0016] 发明要解决的问题

[0017] 然而, 对于含有糖链开裂型甲酰基的多孔性载体而言, 糖链会因强氧化反应而开裂, 导致多孔性载体的强度变弱, 可能难以在高线速下使用。另外, 就抗体医药品精制用吸附体而言, 具有对目标物抗体的吸附量小的倾向, 难以高速地进行抗体精制。另一方面, 对于含有间隔团型甲酰基的多孔性载体而言, 如果甲酰基的导入量少, 则在治疗过程中及精制目标物的过程中, 可能发生亲和配位体洗脱而混入到患者血液或精制产品的情况, 因此从安全性和纯度的观点来看不优选。

[0018] 此外, 虽然在通常的亲合色谱领域的文献 (例如非专利文献 3 和非专利文献 5) 及活性化载体的产品目录中没有明确记载, 但本发明人等发现: 在专利文献 1 所述方法中, 对多孔性粒子进行环氧化时, 无论如何都会发生环氧基自动开环而副产甘油基的情况。这样, 在使氨基糖发生氧化开裂而导入甲酰基时, 由所述环氧基开环得到的甘油基也同时被氧化, 从而会导入与间隔团型相同的甲酰基, 可能使亲和配位体变得容易洗脱。

[0019] 本发明是鉴于现有技术存在的上述问题而完成的, 目的在于提供可以提高治疗和精制的安全性、实现高速化、并进一步提高精制产品的纯度的含有甲酰基的多孔性载体、使用该多孔性载体的吸附体、它们的制造方法、以及使用它们的精制方法。

[0020] 解决问题的方法

[0021] 为了解决上述问题, 本发明人等进行深入地研究, 结果完成了本发明。

[0022] 即, 本发明涉及含有甲酰基的多孔性载体的制造方法, 其包括: 向具有甲酰基的多孔性粒子中导入间隔团, 然后利用过碘酸和 / 或过碘酸盐对上述间隔团部分进行氧化, 使其转变为甲酰基, 其中, 导入间隔团后, 多孔性粒子的甲酰基含量为: 每 1mL 多孔性粒子中的甲酰基含量为 $3 \mu\text{mol}$ 以下。

[0023] 此外, 本发明涉及含有甲酰基的多孔性载体的制造方法, 其包括: 在加入酸而将 pH 调节至 1 ~ 6 范围的液体中, 使过碘酸或其盐与多孔性载体或与导入了间隔团的多孔性载体发生作用。

[0024] 此外, 本发明涉及含有甲酰基的多孔性载体的制造方法, 其包括: 使过碘酸和 / 或过碘酸盐与多孔性载体或与导入了间隔团的多孔性载体在 0°C 以上且 10°C 以下的温度下发生作用。

[0025] 此外, 本发明涉及通过上述任意一种含有甲酰基的多孔性载体的制造方法得到的含有甲酰基的多孔性载体。

[0026] 此外, 本发明涉及吸附体的制造方法, 其包括: 将含有氨基的配位体固定化于所述的含有甲酰基的多孔性载体上。

[0027] 此外,本发明涉及吸附体的制造方法,其中,在含有下述水溶液的反应液中,将含有氨基的配位体固定化于含有甲酰基的多孔性载体,所述水溶液包含选自羧酸盐、金属卤化物及硫酸盐中的1种以上化合物,且以羧酸盐为必要成分。

[0028] 此外,本发明涉及吸附体的制造方法,其中,在含有柠檬酸盐和/或硫酸盐的反应液中,将含有氨基的配位体固定化于含有甲酰基的多孔性载体。

[0029] 此外,本发明涉及吸附体的制造方法,其包括:通过亚氨基化及其还原反应这两步反应来进行将含有氨基的配位体固定化于含有甲酰基的多孔性载体,并在亚氨基化反应之后实施稳定化操作。

[0030] 此外,本发明涉及吸附体的制造方法,其中,在将含有氨基的配位体固定化于含有甲酰基的多孔性载体时,通过有机硼烷络合物,使配位体的固定化键稳定化并同时使其余的甲酰基钝化。

[0031] 此外,本发明涉及吸附体,其中,含有氨基的配位体的导入量为:每1mL多孔性载体中导入含有氨基的配位体1mg以上且500mg以下。

[0032] 此外,本发明涉及吸附体,其中,含有氨基的配位体的导入量为:每1mL多孔性载体中导入含有氨基的配位体 $0.01\mu\text{mol}$ 以上且 $15\mu\text{mol}$ 以下。

[0033] 此外,本发明涉及吸附体的制造方法,其中,所述含有氨基的配位体是蛋白质A。

[0034] 此外,本发明涉及吸附体,其中,从吸附体洗脱到目标物中的配位体浓度的第一次精制~第三次精制的平均值为50ppm以下。

[0035] 此外,本发明涉及吸附体,其在压缩5%时的压缩应力为0.01MPa以上且1MPa以下,压缩10%时的压缩应力为0.03MPa以上且3MPa以下,以及压缩15%时的压缩应力为0.06MPa以上且5MPa以下。

[0036] 此外,本发明涉及吸附体的制造方法、按照上述制造方法得到的吸附体以及使用上述吸附体的精制方法。

[0037] 此外,本发明涉及精制方法,其中,使用直径为0.5cm以上且高度为3cm以上的柱。

[0038] 此外,本发明涉及精制方法,其包括以100cm/h以上且1000cm/h以下的线速进行通液的工序。

[0039] 发明的效果

[0040] 根据本发明,可以提供高强度的含有甲酰基的多孔性载体。本发明的含有甲酰基的多孔性载体可以适用于吸附体,可以得到目标物吸附量大、且配位体的泄漏少的吸附体。此外,通过本发明的吸附体,可以提高治疗和精制的安全性,并提供治疗和精制的高速化及高纯度化。

[0041] 发明的具体实施方式

[0042] 本发明的含有甲酰基的多孔性载体的制造方法中,向具有甲酰基的多孔性粒子中导入间隔团,然后利用过碘酸和/或过碘酸盐对上述间隔团部分进行氧化,使其转变为甲酰基,其中,导入间隔团后,多孔性粒子的甲酰基含量为:每1mL多孔性粒子中的甲酰基含量为 $3\mu\text{mol}$ 以下。通过该方法,在导入亲和配位体后的吸附体中,配位体的洗脱量少,且可以抑制批次间偏差,并且,可以得到目标物吸附量大的吸附体。

[0043] 为了抑制配位体的泄漏,通常会针对配位体固定化后的还原反应加以研究,而除此之外,本发明人还着眼于在用于导入配位体的含有甲酰基多孔性载体的前驱体阶段,即

在向具有甲酰基的多孔性粒子导入间隔团之后,对于反应中未使用的多孔性粒子的甲酰基的处理。即,本发明人猜测,未经处理而残留的多孔性粒子的甲酰基可能是导致洗脱(溶出)发生的原因。

[0044] 对于向具有甲酰基的多孔性粒子中导入间隔团后,对间隔团导入反应中未使用的多孔性粒子的甲酰基的处理方法进行了研究,结果发现:在导入间隔团后,得到的多孔性载体中不存在甲酰基、或者存在下述含量的甲酰基:每 1mL 载体中的甲酰基含量为 $3\mu\text{mol}$ 以下。而使用这样的导入了间隔团的多孔性载体制造含有甲酰基的多孔性载体时,获得了出乎意料的结果:在导入亲和配位体后的吸附体中,配位体的洗脱量少,且批次间偏差得到了抑制。由此,可以减轻精制后工序的繁琐程度,此外,在用于精制抗体医药品的情况下,可以提高抗体医药品的安全性。

[0045] 导入了间隔团的载体中的甲酰基的含量优选为:每 1mL 载体中的甲酰基含量为 $0\mu\text{mol}$ 以上且 $3\mu\text{mol}$ 以下,进一步优选 $0\mu\text{mol}$ 以上且 $2\mu\text{mol}$ 以下,更优选 $0\mu\text{mol}$ 以上且 $1\mu\text{mol}$ 以下,特别优选 $0\mu\text{mol}$ 以上且 $0.5\mu\text{mol}$ 以下,最优选 $0\mu\text{mol}$ 以上且 $0.3\mu\text{mol}$ 以下。

[0046] 可以作为间隔团被导入至本发明的多孔性载体及吸附体的化合物,可以没有特别限定地使用,为了进一步减少配位体的洗脱量,优选具有环结构的化合物。作为具有环结构的化合物,没有特别限定,可以列举例如:以环戊烷或环己烷等为代表的仅由碳构成的 5 元环或 6 元环,以呋喃糖或吡喃糖等为代表的糖或糖类似物。其中,基于容易获得等理由,优选糖或糖类似物。此外,从多孔性载体和亲和配位体之间的成键更加坚固和/或亲和配位体难以解离的观点来看,更加优选上述糖为还原糖。

[0047] 本发明的多孔性载体中,作为间隔团而被导入的化合物可以没有特别限定地使用,采用过碘酸氧化法等作为导入甲酰基的方法的情况下,优选具有平伏位具有羟基的碳原子连续存在的部分,所述平伏位具有羟基的碳原子的连续个数为 2 或 3。

[0048] 作为向本发明的多孔性载体中导入间隔团的方法,优选利用含有甲酰基的多孔性粒子和作为间隔团而被导入的化合物的官能团之间的反应。对于含有甲酰基的多孔性粒子的官能团以及作为间隔团而被导入的化合物的官能团,各自并无特别限定,优选采用适于相互反应的组合,也优选使二者之间经由其它其它化合物进行反应。利用含有甲酰基的多孔性粒子的甲酰基的情况下,作为间隔团而被导入的化合物优选具有能够与甲酰基反应的官能团。作为与甲酰基反应的官能团,只要能够与甲酰基反应即可,没有特别限定,通常优选氨基。即,作为间隔团而被导入到本发明的多孔性载体中的化合物含有氨基;作为间隔团被导入的化合物是糖的情况下,更加优选为氨基糖。

[0049] 此外,本发明人等发现:在 pH7 ~ 11 的范围使具有 1,2-二醇结构的伯胺或仲胺与含有甲酰基的多孔性粒子缩合,和任选地,通过对形成的键实施还原反应使其稳定化时,出乎意料的是,可以高效率地将 1,2-二醇结构导入至载体。上述 pH 的范围更优选为 8 ~ 10, pH 特别优选 8.5 ~ 9.5。

[0050] 作为可作为间隔团而被导入到本发明的多孔性粒子中的含有氨基的糖(氨基糖),并无特别限定,可以列举选自下组中的一种以上或者它们的盐酸盐等盐等:葡糖胺、半乳糖胺、アンノサミン、乳糖胺、岩藻糖胺、甘露糖胺、葡甲胺、阿洛糖胺、阿卓糖胺、核糖胺、阿拉伯糖胺、古洛糖胺、艾杜糖胺、塔罗糖胺、木糖胺、来苏糖胺、山梨糖胺、塔格糖胺、阿

洛酮糖胺、果糖胺、亚氨基环多醇 (iminocyclitol)、黏多醣类、糖蛋白类、透明质酸、肝素、软骨素、4-硫酸软骨素、硫酸皮肤素、以及它们的D构型体、L构型体、消旋体等、含有这些糖作为构成成分的多糖、聚合物、糖脂等。其中,作为间隔团而被导入到本发明的多孔性载体中的糖,更优选为葡糖胺及其衍生物。

[0051] 作为可作为间隔团而被导入到本发明的多孔性载体中的葡糖胺,并无特别限定,更优选为D构型体。此外,对于可用于本发明的葡糖胺的制造方法,并无特别限定,可以通过将葡萄糖等进行化学修饰而得到,也可以使用甲壳类等的甲壳、几丁质、壳聚糖等来源的物质;用于精制抗体医药品时,优选为能够由植物性化合物等获得的葡糖胺,例如,协和发酵公司制造的被称作发酵葡糖胺的公知的物质等。此外,从溶解性的观点来看,可用于本发明的葡糖胺还优选为盐酸盐等盐。

[0052] 此外,作为可作为间隔团而被导入到本发明的多孔性载体中的糖或糖类似物的导入量,优选每1mL多孔性载体中,糖或糖类似物的导入量为 $1\mu\text{mol}$ 以上且 $500\mu\text{mol}$ 以下。若每1mL多孔性载体中糖或糖类似物的导入量为 $1\mu\text{mol}$ 以上,则将该多孔性载体用于吸附体时,目标物的吸附量变大,因此优选;若每1mL多孔性载体中糖或糖类似物的导入量为 $500\mu\text{mol}$ 以下,则可以抑制本发明的多孔性载体的制造成本,因此优选。进一步优选每1mL多孔性载体中糖或糖类似物的导入量为 $2\mu\text{mol}$ 以上且 $250\mu\text{mol}$ 以下,更优选 $4\mu\text{mol}$ 以上且 $125\mu\text{mol}$ 以下,特别优选 $6\mu\text{mol}$ 以上且 $50\mu\text{mol}$ 以下,最优选 $8\mu\text{mol}$ 以上且 $25\mu\text{mol}$ 以下。可以通过在导入反应终止后对反应溶液中的糖或糖类似物的减少量进行测定的方法、对反应后的多孔性载体进行滴定的方法(非水滴定等)、元素分析法等求出糖或糖类似物的导入量。

[0053] 此外,向含有甲酰基的多孔性粒子中导入可以作为间隔团而被导入的化合物时,对于作为间隔团而被导入的化合物的用量并无特别限定,为了达到更适合的导入量,优选为多孔性载体中该官能团含量的0.01摩尔倍以上,和/或,从废液处理和效率的观点来看,优选100摩尔倍以下;进一步优选0.1摩尔倍以上且50摩尔倍以下;更优选0.5摩尔倍以上且20摩尔倍以下;特别优选1摩尔倍以上且10摩尔倍以下。

[0054] 对于向多孔性粒子中导入作为间隔团而被导入的化合物时的溶剂,并无特别限定,可以使用水、二甲亚砜、二甲基甲酰胺、二氧杂戊环等常用的有机溶剂,乙醇、甲醇、丙醇等醇,以及选自上述中的2种以上的混合溶剂。

[0055] 此外,对反应液的pH并无特别限定,从反应效率的观点来看,优选在pH3以上进行反应,基于官能团的失活、对多孔性载体的损害少的理由,优选pH为13以下,进一步优选pH为4以上且12以下,特别优选pH为6以上且11以下,最优选pH为7以上且11以下。

[0056] 此外,对导入可以作为间隔团而被导入的化合物时的温度并无特别限定,基于对反应速度有利的理由,优选为 0°C 以上,从安全性和对载体的损害的观点来看,优选为 100°C 以下,基于官能团不易失活的理由,进一步优选 70°C 以下,进一步优选 4°C 以上且 50°C 以下,更优选 4°C 以上且 30°C 以下,特别优选 10°C 以上且 25°C 以下,最优选 12°C 以上且 18°C 以下。

[0057] 此外,优选一边搅拌或振动一边进行导入反应,对于每1分钟的转速或次数并无特别限定,基于可以均匀搅拌且不对载体产生物理损害的理由,优选1次以上且1000次以下,进一步优选10次以上且500次以下,更优选30次以上且300次以下,特别优选50次以

上且 200 次以下,最优选 75 次以上且 150 次以下,特别优选结合各原料的比重之差及载体的强度进行适当调节。

[0058] 对于向多孔性载体中导入可作为间隔团而被导入的化合物的反应时间并无特别限定,基于反应性和对载体的损害较少的理由,优选 0.2 小时以上且 100 小时以下,进一步优选 0.5 小时以上且 50 小时以下,更优选 1 小时以上且 24 小时以下,特别优选 2 小时以上且 15 小时以下,最优选 3 小时以上且 10 小时以下,优选结合反应性、pH 及反应温度进行调节。

[0059] 此外,通过向具有甲酰基的多孔性粒子中导入间隔团后对反应中未使用的多孔性粒子的甲酰基进行处理,可以得到本发明的多孔性载体。

[0060] 作为向具有甲酰基的多孔性粒子中导入间隔团后对反应中未使用的多孔性粒子的甲酰基进行处理的方法,并无特别限定,可以列举使用还原剂进行处理的方法、热处理方法、使用碱进行处理的方法、使用抗粘连剂进行处理的方法等。

[0061] 作为使用还原剂进行处理的方法,并无特别限定,优选使四氢硼酸钠等四氢硼酸盐发挥作用从而进行处理的方法。作为进行还原处理时的溶剂,并无特别限定,可以使用水、二甲亚砷、二甲基甲酰胺、二氧杂戊环等常用的有机溶剂,乙醇、甲醇、丙醇等醇,以及选自上述中的 2 种以上的混合溶剂。

[0062] 对于进行还原处理时的 pH 并无特别限定,从安全性的问题来看,优选 pH 为 7 以上。此外,为了减轻对载体及间隔团的损害,优选 pH 为 12 以下,进一步优选 pH 为 9 以上且 12 以下,更优选 pH 为 11 以上且 12 以下。

[0063] 此外,对于还原处理温度并无特别限定,从有利于反应速度的观点来看,优选为 0°C 以上,从安全性以及对载体和间隔团的损害的观点来看,优选为 100°C 以下。更优选 4°C 以上且 70°C 以下,特别优选 10°C 以上且 50°C 以下,最优选 10°C 以上且 40°C 以下。

[0064] 对于还原处理的时间并无特别限定,基于官能团的失活和载体的损害少的理由,优选 0.01 小时以上且 50 小时以下,进一步优选 0.1 小时以上且 25 小时以下,更优选 0.25 小时以上且 10 小时以下,特别优选 0.25 小时以上且 5 小时以下,最优选 0.5 小时以上且 2 小时以下,优选结合反应性、pH 及反应温度进行调节。

[0065] 对于还原次数并无特别限定,从向具有甲酰基的多孔性粒子中导入间隔团后对反应中未使用的多孔性粒子的甲酰基进行完全处理的观点来看,优选 1 次以上。此外,在 20 次以下时,可减轻对载体和间隔团的损害。进一步优选 2 次以上且 15 次以下,更优选 2 次以上且 10 次以下,最优选 3 次以上且 7 次以下。

[0066] 对还原剂的浓度并无特别限定,从对甲酰基的处理效率的观点来看,优选 0.0001M 以上,从安全性的问题来看,优选 2M 以下,进一步优选 0.001M 以上且 1M 以下,更优选 0.01M 以上且 0.5M 以下,特别优选 0.02M 以上且 0.25M 以下,最优选 0.05M 以上且 0.1M 以下。

[0067] 作为向具有甲酰基的多孔性粒子中导入间隔团后对反应中未使用的多孔性粒子的甲酰基进行热处理的方法,并无特别限定,从对反应速度有利的观点来看,优选 50°C 以上,从对载体和间隔团的损害的观点来看,优选 150°C 以下,进一步优选 50°C 以上且 130°C 以下,更优选 80°C 以上且 130°C 以下。

[0068] 作为向具有甲酰基的多孔性粒子中导入间隔团后利用碱对反应中未使用的多孔性粒子的甲酰基进行处理的方法,对于 pH 并无特别限定,由于当 pH 为 10 以上时可实现高

效率地处理,因此优选。为了减轻对载体和间隔团的损害,pH 优选为 13 以下。更优选 pH 为 10 以上且 12 以下,特别优选 pH 为 11 以上且 12 以下。

[0069] 作为向具有甲酰基的多孔性粒子中导入间隔团后利用封闭剂(封止剂)对反应中未使用的多孔性粒子的甲酰基进行处理的方法,并无特别限定,但优选封闭剂为含有与多孔性载体上的活性基团反应的官能团的低分子化合物。越是低分子化合物,则空间位阻越小,因此可以高效率地进行封闭反应(封止反应)。其中,优选使用含有氨基的低分子化合物,作为这类低分子化合物的一例,可以列举赖氨酸、甘氨酸、单乙醇胺和三(羟甲基)氨基甲烷等。

[0070] 作为向本发明的多孔性粒子中导入间隔团后向所述间隔团上导入甲酰基的方法,可以列举过碘酸氧化法。

[0071] 对于可用于本发明的过碘酸和/或过碘酸盐等并无特别限定,优选使过碘酸钠或过碘酸钾等过碘酸盐发挥作用,从而导入甲酰基。

[0072] 此外,作为本发明的多孔性载体的甲酰基含量,每 1mL 多孔性载体中的甲酰基含量优选 0.5 μmol 以上且 100 μmol 以下。每 1mL 多孔性载体中的甲酰基含量为 0.5 μmol 以上时,可以高效率地将亲和配位体固定化,将其用作吸附体的情况下,对目标物的吸附量变大,因此优选。此外,尽管理由还不明确,令人意料之外的是,每 1mL 多孔性载体中的甲酰基含量为 100 μmol 以下时,对目标物的吸附量较易变大,因此优选。此外,采用使过碘酸和/或过碘酸盐发挥作用而导入甲酰基的方法的情况下,每 1mL 多孔性载体中的甲酰基含量为 100 μmol 以下时,多孔性载体的强度较易变大,因此优选。

[0073] 每 1mL 多孔性载体中的甲酰基含量的更为优选的范围是 1 μmol 以上且 50 μmol 以下,更优选 1 μmol 以上且 25 μmol 以下,特别优选 1 μmol 以上且 10 μmol 以下,最优选 2 μmol 以上且 7 μmol 以下。甲酰基含量并无特别限定,例如,可根据导入甲酰基反应的时间、温度、过碘酸和/或过碘酸盐等的甲酰化剂的浓度等,来调节甲酰基的含量。

[0074] 甲酰基含量的测定可通过下述方法进行:向含有甲酰基多孔性载体中加入苯肼溶液,在 40°C 下搅拌 1 小时,通过 UV 测定反应后的上清液的吸收光谱,由苯肼的校正曲线测定苯肼的减少量,从而可求出甲酰基的含量。

[0075] 尽管理由还不确定,本发明人等经过深入研究后发现了下述结果,并基于该结果完成了本发明:在加入酸而将 pH 调节至 1~6 范围的液体中,使过碘酸或其盐发挥作用而得到含有甲酰基的多孔性载体,并将含有氨基的配位体固定化于所得含有甲酰基的多孔性载体来获得吸附体时,令人感到意外的是,目标物的吸附量变大,此外,含有氨基的配位体的泄漏量变小。

[0076] 即,本发明提供吸附体的制造方法,该方法包括:在加入酸而将 pH 调节至 1~6 范围的液体中,使过碘酸或其盐发挥作用而得到含有甲酰基的多孔性载体,在将含有氨基的配位体固定化于上述得到的含有甲酰基的多孔性载体。

[0077] 作为上述过碘酸的盐,并无特别限定,优选使用过碘酸钠或过碘酸钾等。

[0078] 此外,对于可用于本发明的上述酸并无特别限定,可以使用盐酸、硫酸、硝酸等无机酸或其盐等。此外,使用柠檬酸、乙酸、酒石酸、邻苯二甲酸、富马酸、油酸、乳酸、月桂酸等有机酸或其盐时,可以获得反应液的 pH 缓冲效果,因此更加优选。

[0079] 上述使过碘酸或其盐发挥作用的 pH 的范围优选为 2~5。进一步优选为 pH2~

4.5, 特别优选为 pH2 ~ 4。

[0080] 上述过碘酸或其盐的浓度优选为 5mM 以上且 300mM 以下。浓度在 5mM 以上时, 较容易向载体中导入甲酰基, 此外, 浓度在 300mM 以下时, 多孔性载体的强度不易减小, 因此优选。上述过碘酸或其盐的浓度进一步优选为 5mM 以上且 250mM 以下, 更优选为 5mM 以上且 150mM 以下。

[0081] 尽管理由还不确定, 本发明人等经过深入研究后发现了下述令人意外的结果: 通过使过碘酸和 / 或过碘酸盐在 0℃ 以上且 10℃ 以下的温度发挥作用而得到含有甲酰基的多孔性载体, 并将含有氨基的配位体固定化于所得含有甲酰基的多孔性载体来制造吸附体, 利用该制造方法制造的吸附体对目标物的吸附量变大。上述温度进一步优选为 0℃ 以上且 8℃ 以下。

[0082] 本发明的多孔性载体的材质并无特别限定, 可以列举例如: 多糖类、聚苯乙烯、苯乙烯-二乙烯基苯共聚物、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯醇、以及它们的衍生物等。上述材质还可以涂层, 所述涂层为甲基丙烯酸羟乙酯等具有羟基的高分子材料或由具有聚氧乙烯链的单体与其它聚合性单体形成的共聚物这样的接枝共聚物等。其中, 由于容易向载体表面导入活性基团, 因此优选使用多糖类、聚乙烯醇等。

[0083] 其中, 本发明的多孔性载体进一步优选含有多糖类。多糖类容易在工业中获得, 另外, 对生物体的安全性高, 因此优选。对于可用于本发明的多孔性载体的多糖类并无特别限定, 可以列举例如: 琼脂糖、纤维素、糊精、壳聚糖、几丁质、以及它们的衍生物等。

[0084] 此外, 本发明的多孔性载体进一步优选含有纤维素和 / 或纤维素衍生物。由于含有纤维素或纤维素衍生物的多孔性载体的机械强度较高且坚韧, 因此被破坏而生成微粒等的情况较少, 将其填充至柱中时, 即使以高线速流通液体, 也比较不易发生压紧化, 因此优选。此外, 从强度和成本的观点来看, 本发明的多孔性载体的最优选材质为纤维素。

[0085] 多孔性载体被广泛用作以治疗用 (医疗用) 吸附体为首的各种色谱法用吸附体和亲和吸附体, 特别是在抗体医药品精制领域, 伴随着抗体医药品市场的不断扩张, 精制的大规模化以及高线速化正积极展开。而伴随着精制的大规模化以及高线速化, 有时需要增加精制所使用的吸附体、即多孔性载体 (或多孔性粒子) 的强度。作为增加多孔性载体 (或多孔性粒子) 强度的方法, 并无特别限定, 优选增加多孔性载体 (或多孔性粒子) 的基质含量 (例如树脂含量) 的方法等, 从多孔性载体 (或多孔性粒子) 的细孔径不易变小的优点来看, 进一步优选使交联剂发挥作用, 以增大多孔性载体 (或多孔性粒子) 的强度。换言之, 本发明的多孔性载体 (或多孔性粒子) 优选经过交联。

[0086] 交联剂和交联反应条件并无特别限定, 可以使用公知的技术进行交联。例如, 可以通过使环氧氯丙烷、环氧溴丙烷、二氯丙醇等卤代醇, 间苯二酚二缩水甘油醚、新戊二醇二缩水甘油醚、1,6-己二醇二缩水甘油醚、氢化双酚 A 二缩水甘油醚、甘油二缩水甘油醚、三羟甲基丙烷二缩水甘油醚、对苯二甲酸二缩水甘油酯、邻苯二甲酸二缩水甘油酯、乙二醇二缩水甘油醚、二乙二醇二缩水甘油醚、丙二醇二缩水甘油醚等双官能以上的环氧化合物发挥作用来进行交联。

[0087] 使用上述交联剂增加多孔性载体 (或多孔性粒子) 的强度的方法并无特别限定, 从反应效率的观点来看, 优选在碱性条件下, 使上述交联剂对载体发挥作用。交联剂的投

料方法并无特别限定,可以在反应初期就投入全部用量,也可以将其分为数次重复反应,此外,还可以使用滴液漏斗等一点点地投入交联剂,或者将多孔性载体投入添加了交联剂的反应容器中。

[0088] 对交联反应的溶剂并无特别限定,可以使用水、二甲亚砜、二甲基甲酰胺、二氧杂戊环等常用的有机溶剂,乙醇、甲醇、1-丙醇等醇类,或者上述中 2 种以上的混合溶剂。此外,为了提高反应效率,进一步优选与硼氢化钠等还原剂共存。

[0089] 对交联反应时的温度并无特别限定,基于对反应速度有利的理由,优选 0℃ 以上,和 / 或,从安全性以及对多孔性载体(或多孔性粒子)的损害的观点来看,优选 100℃ 以下,基于官能团不易失活的理由,进一步优选 70℃ 以下。

[0090] 优选一边搅拌或振动一边进行交联反应,对于其每 1 分钟的转速或次数并无特别限定,基于可以均匀搅拌且不对多孔性载体(或多孔性粒子)产生物理损害的理由,优选每 1 分钟 1 次以上且 1000 次以下,进一步优选 10 次以上且 500 次以下,更优选 30 次以上且 300 次以下,特别优选 50 次以上且 200 次以下,最优选 75 次以上且 150 次以下,优选结合各原料的比重之差及多孔性载体(或多孔性粒子)的强度进行调节。

[0091] 对交联反应的时间并无特别限定,基于官能团失活以及对载体损害少的理由,使用卤代醇的情况下,优选 1 小时以上且 8 小时以下,使用双官能以上的环氧化合物的情况下,优选 1 小时以上且低于 15 小时,进一步优选结合交联剂的反应性、pH 及反应温度进行调节。

[0092] 此外,本发明优选在下述水溶液中,将含有氨基的配位体固定化于含有甲酰基的多孔性载体,所述水溶液包含选自羧酸盐、金属卤化物及硫酸盐中的 1 种以上化合物,且以羧酸盐为必要成分。

[0093] 作为上述羧酸盐并无特别限定,可以使用例如乙酸钠、乳酸钠、乳酸钙、柠檬酸钠、酒石酸氢钾、油酸钾、月桂酸钠、苯二甲酸钠、苯二甲酸钾、富马酸钠、富马酸钾、酒石酸钠、酒石酸钾等,特别优选柠檬酸钠。

[0094] 上述羧酸盐在水溶液中的浓度并无特别限定,优选 0.01M 以上且 5M 以下。若在 0.01M 以上,则容易增大配位体的固定化量,因此优选;从制造成本的观点来看,优选 5M 以下。上述羧酸盐水溶液的浓度进一步优选 0.05M 以上且 3M 以下,更优选 0.1M 以上且 1.5M 以下,特别优选 0.25M 以上且 1M 以下,最优选 0.4M 以上且 0.8M 以下。

[0095] 对上述金属卤化物并无特别限定,优选使用例如氯化锂、氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁等。此外,对上述金属卤化物在水溶液中的浓度并无特别限定,优选 0.001M 以上且 1M 以下。若在 0.005M 以上,则目标物的吸附量变大,因此优选;从成本的观点来看,优选在 1M 以下。上述金属卤化物在水溶液中的浓度进一步优选为 0.01M 以上且 0.75M 以下,更优选 0.05M 以上且 0.5M 以下,特别优选 0.075M 以上且 0.5M 以下。

[0096] 此外,本发明人等发现:作为更优选的实施方式,在含有柠檬酸盐和 / 或硫酸盐的反应液中,将含有氨基的配位体固定化于含有甲酰基的多孔性载体上时,与使用不含有柠檬酸盐和 / 或硫酸盐的反应液的情况相比,含有氨基的配位体的固定化量和 / 或固定化率变大。这一点可适用于本发明。

[0097] 对于可用于本发明的柠檬酸盐或硫酸盐并无特别限定,作为柠檬酸盐,可以列举例如柠檬酸单钠、柠檬酸单钾等柠檬酸单碱金属盐,柠檬酸二钠、柠檬酸二钾等柠檬酸二碱

金属盐,柠檬酸三钠、柠檬酸三钾等柠檬酸三碱金属盐,柠檬酸单铁钠、柠檬酸铁、柠檬酸铁铵、柠檬酸钾、异柠檬酸或其盐等,其中,上述化合物可以单独使用 1 种,也可以使用 2 种以上,此外,还可以使用其水合物、酸酐。

[0098] 作为硫酸盐,可以使用例如硫酸锂、硫酸钠、硫酸钾等碱金属硫酸盐,此外,还可以使用其水合物、酸酐。

[0099] 此外,在含有上述柠檬酸盐和 / 或硫酸盐的反应液中,还可以其它包含其它物质,作为其它物质,可以列举例如:氯化钠、氯化钾、碳酸盐、磷酸盐、乙酸、乙酸钠等乙酸盐、三乙胺等胺类等。

[0100] 此外,在本发明的制造方法中,对上述反应液中的柠檬酸和 / 或硫酸盐的浓度没有特别限定,优选为 0.01 ~ 2M。柠檬酸和 / 或硫酸盐的浓度在 0.01M 以上时,配位体的固定化量和 / 或固定化率变大,因此优选。此外,柠檬酸和 / 或硫酸盐的浓度在 2M 以下时,可缩减成本并且使反应液的粘度降低,因此优选。柠檬酸和 / 或硫酸盐的浓度进一步优选为 0.05 ~ 1.9M,更优选 0.1 ~ 1.7M,特别优选 0.25 ~ 1.5M,最优选 0.4 ~ 1M。

[0101] 此外,对上述含有柠檬酸盐和 / 或硫酸盐的反应液中可以含有的其它所述其它物质的浓度并无特别限定,优选为 0.001 ~ 1M。上述其它物质的浓度在 0.001M 以上时,吸附体的各种性能均改善,因此优选。此外,上述其它物质的浓度在 1M 以下,可缩减成本并且使反应液的粘度降低,另外还容易显示出柠檬酸和 / 或硫酸盐所带来的效果,因此优选。上述其它物质的浓度进一步优选为 0.005 ~ 0.7M,更优选 0.01 ~ 0.5M,特别优选 0.05 ~ 0.5M,最优选 0.1 ~ 0.25M。

[0102] 此外,在本发明的制造方法中,上述反应液的 pH 并无特别限定,优选为 7 ~ 13。上述反应液的 pH 为 7 以上时,配位体的固定化量和 / 或固定化率增大,因此优选。此外,上述反应液的 pH 在 13 以下时,对吸附体的基体材料及配位体的损害较少,因此优选。

[0103] 此外,在 pH 为 11.5 以上且低于 13.0 的反应液中将含有氨基的配位体固定化于含有甲酰基的多孔性载体时,可使含有氨基的配位体的固定化量和 / 或固定化率变大,因此进一步优选。pH 更优选为 11.5 以上且低于 12.6,特别优选 11.5 以上且低于 12.3,最优选 11.6 以上且低于 12.1。可以使用由 pH 为 3 ~ 5、6 ~ 7、9 ~ 10 的标准溶液进行 3 点校正的 pH 计来进行 pH 的测定。

[0104] 此外,本发明人等经过深入研究,还发现了下述的令人意外的结果:在通过亚氨基化及其还原反应这两步反应来进行将含有氨基的配位体固定化于含有甲酰基的多孔性载体时,与未实施稳定化操作的情况相比,在亚氨基化反应之后实施稳定化操作的情况下,在用作吸附体时能够增大对目标物的吸附量。

[0105] 即,本发明还提供一种吸附体的制造方法,其包括:通过亚氨基化及其还原反应这两步反应来进行将含有氨基的配位体固定化于含有甲酰基的多孔性载体,并在亚氨基化反应之后实施稳定化操作。

[0106] 本发明中的亚氨基化反应之后的稳定化操作,是指:在亚氨基化反应之后,将反应液的 pH 调节为还原反应的 pH \pm 1 以内,并不加入还原剂的情况下进行搅拌、振荡或放置。

[0107] 此外,对上述稳定化操作的时间并无特别限定,优选为 1 小时以上且 48 小时以内。稳定化时间在 1 小时以上时,可进一步增大吸附体对目标物的吸附量,因此优选;稳定化时间在 48 小时以内时,从制造成本的观点考虑更为优选。稳定化时间进一步优选在 1 小时以

上且 24 小时以内,更优选 1 小时以上且 15 小时以内,特别优选 2 小时以上且 15 小时以内。

[0108] 此外,所述亚氨基化反应后的稳定化操作,优选在 pH 为 2 ~ 10 的条件下实施。稳定化操作的 pH 为 2 以上时,从制造装置的耐久性和安全性的观点来看优选,pH 为 10 以下时,可进一步增大吸附体对目标物的吸附量,因此优选。稳定化操作的 pH 进一步优选为 2 ~ 9,更优选 2 ~ 8。

[0109] 此外,从 pH 稳定性的观点来看,本发明的亚氨基化反应、稳定化操作、还原反应优选在缓冲液中进行。对可以在本发明中使用的缓冲液并无特别限定,优选使用现有公知的缓冲液。

[0110] 此外,上述缓冲液优选含有至少 1 种以上能够具有二价以上阴离子的盐。尽管理由还不确定,但令人感到意外的是,当本发明的亚氨基化反应、稳定化操作、还原反应在含有至少 1 种以上能够具有二价以上阴离子的盐的缓冲液中进行时,可使含有氨基的配位体的固定化量进一步增加,因此优选。作为能够具有二价以上阴离子的盐,并无特别限定,可以使用例如:柠檬酸盐、草酸盐、苯二甲酸盐、琥珀酸盐、苹果酸盐、乙二胺四乙酸盐等多元羧酸盐、磷酸盐、硫酸盐、碳酸盐等。

[0111] 对缓冲液中能够具有二价以上阴离子的盐的浓度并无特别限定,优选 0.01M 以上且 5M 以下。当其浓度在 0.01M 以上时,容易增大配位体的固定化量,因此优选;当其浓度在 5M 以下,从制造成本的观点来看优选。上述羧酸盐在水溶液中的浓度进一步优选为 0.05M 以上且 3M 以下,更优选 0.1M 以上且 1.5M 以下,特别优选 0.25M 以上且 1M 以下,最优选 0.4M 以上且 0.8M 以下。

[0112] 此外,上述缓冲液进一步优选含有多元羧酸盐和/或中性盐。作为中性盐,没有特别限定,可以列举例如:硫酸钠、氯化钠、硝酸钠、氯化钾、氯化锂、氯化镁、氯化钙等。

[0113] 此外,上述缓冲液更优选含有柠檬酸盐。作为柠檬酸盐,并无特别限定,可以列举例如柠檬酸钠、柠檬酸钾、柠檬酸锂等。

[0114] 此外,上述含有柠檬酸盐的缓冲液优选含有金属卤化物和硫酸盐中的至少一种以上。对上述金属卤化物并无特别限定,优选使用例如氯化锂、氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁等。此外,对上述金属卤化物和/或硫酸盐在缓冲液中的浓度并无特别限定,优选 0.001M 以上且 1M 以下。当浓度为 0.001M 以上时,对目标物的吸附量增大,因此优选,当浓度为 1M 以下时,从成本的观点来看优选。进一步优选为 0.01M 以上且 0.5M 以下,更优选 0.05M 以上且 0.75M 以下,特别优选 0.075M 以上且 0.5M 以下,最优选 0.1M 以上且 0.3M 以下。

[0115] 此外,本发明人等还发现了下述令人意外的结果:在将含有氨基的配位体固定化于含有甲酰基的多孔性载体时,如果通过有机硼烷络合物使配位体的固定化键稳定化并同时使其余的甲酰基钝化,则吸附体对目标物的吸附量增大。

[0116] 即,本发明还涉及吸附体的制造方法,其中,在将含有氨基的配位体固定化于含有甲酰基的多孔性载体时,通过有机硼烷络合物,使配位体的固定化键稳定化并同时使其余的甲酰基钝化。这里,所述其余的甲酰基,是指多孔性载体上的甲酰基中,在固定化含有氨基的配位体时未被使用的残留的甲酰基。若所述其余的甲酰基未被钝化,则在将多孔性载体用作吸附体时,可能会引起非特异吸附。

[0117] 尽管本发明中使用了通常作为较弱还原剂使用的有机硼烷络合物,但本发明的特征在于:即使未使用在使用弱还原剂时通常被用作钝化剂的含有氨基的低分子量化合物

(例如,单乙醇胺、甘氨酸、三(羟甲基)氨基甲烷等)、所谓的抗粘连剂,也能够使其余的甲酰基钝化。

[0118] 此外,在含有羧酸盐的反应液中实施通过上述有机硼烷络合物使配位体的固定化键稳定化并同时使其余的甲酰基钝化的操作时,能够进一步促进配位体的固定化键的稳定化以及其余的甲酰基的钝化,因此优选。

[0119] 对于可用于本发明的羧酸盐并无特别限定,可以列举例如:乙酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、草酸盐、苯二甲酸盐、琥珀酸盐、苹果酸盐、乙二胺四乙酸盐等,作为这些羧酸盐的阳离子种类,并无特别限定,可以使用例如:锂、钠、钾、镁、钙等。其中,从成本的观点来看,可优选使用柠檬酸盐,特别是柠檬酸的碱金属盐。此外,对羧酸盐在反应液中的浓度并无特别限定,当其浓度在0.01M以上时,可以进一步促进配位体的固定化键的稳定化以及其余的甲酰基的钝化,因此优选。此外,当羧酸盐的浓度在2M以下时,不仅可以降低成本,而且可以降低反应液的粘度,此外,从操作性方面来看,也更为优选。羧酸盐的浓度进一步优选为0.05~1.9M,更优选0.1~1.7M,特别优选0.25~1.5M,最优选0.4~1M。

[0120] 此外,上述应液中可以含有除羧酸盐以外的其它物质,例如,优选含有金属卤化物和硫酸盐中的至少一种以上。对上述金属卤化物并无特别限定,可优选使用例如:氯化锂、氯化钠、氯化钾、氯化钙、氯化镁等。此外,对上述金属卤化物和/或硫酸盐在缓冲液中的浓度并无特别限定,优选为0.001M以上且1M以下。当其浓度在0.001M以上时,对目标物的吸附量变大,因此优选,当其浓度在1M以下时,从成本的观点来看优选。其浓度进一步优选为0.01M以上且0.5M以下,更优选为0.05M以上且0.75M以下,特别优选为0.075M以上且0.5M以下,最优选为0.1M以上且0.3M以下。

[0121] 此外,通过上述有机硼烷络合物使配位体的固定化键稳定化并同时使其余的甲酰基钝化的操作,优选实施1小时以上且48小时以下。上述操作实施1小时以上时,可进一步促进配位体的固定化键稳定化以及其余的甲酰基的钝化,因此优选;从制造成本的观点来看,上述操作优选实施48小时以下。上述操作时间进一步优选为2小时以上且24小时以下,更优选3小时以上且20小时以下,特别优选4小时以上且15小时以下,最优选5小时以上且10小时以下。

[0122] 此外,作为可用于本发明的上述有机硼烷络合物,并无特别限定,尽管理由尚不明确,令人感到意外的是:上述有机硼烷络合物为胺合硼烷络合物(包括氨基硼烷)时,更容易促进其余的甲酰基钝化,因此优选。作为可用于本发明的氨基硼烷络合物,并无特别限定,可以列举例如:4-(二甲基氨基)吡啶硼烷、N-乙基二异丙基胺合硼烷、N-乙基吗啉硼烷、N-甲基吗啉硼烷、N-苯基吗啉硼烷、二甲基吡啶硼烷、三乙胺硼烷、或三甲基胺合硼烷、4-(二甲基胺)吡啶硼烷、N-乙基二异丙基胺合硼烷、N-乙基吗啉硼烷、N-甲基吗啉硼烷、N-苯基吗啉硼烷、二甲基吡啶硼烷、硼烷氨、二甲胺硼烷、吡啶硼烷、4-甲基吡啶硼烷、N',N'-二乙基苯胺硼烷、N',N'-二异丙基乙基胺硼烷、2,6-二甲基吡啶硼烷、硼烷合胺、三(二甲基氨基)硼烷、三甲基氨基硼烷、环硼氮烷、1,3,5-三甲基环硼氮烷、2,4,6-三甲基环硼氮烷、六甲基环硼氮烷等。

[0123] 其中,从在反应液中的溶解性和安全性的观点来看,特别优选二甲胺硼烷。

[0124] 此外,本发明的亚氨基化反应、稳定化操作、还原反应的操作温度优选为-10~40℃。上述操作温度在-10℃以上时,从反应液的流动性的观点来看进一步优选;上述操作

温度在 40℃ 以下时,亲和配位体和多孔性载体的甲酰基不易失活,因此进一步优选。操作温度进一步优选为 -5 ~ 35℃,更优选为 0 ~ 30℃。

[0125] 此外,每 1mL 多孔性载体中,本发明吸附体中的亲和配位体的导入量优选为 1mg 以上且 500mg 以下。每 1mL 多孔性载体的亲和配位体的导入量为 1mg 以上时,对目标物的吸附量增大,因此优选;在 500mg 以下时,可使生产成本得到抑制,因此优选。每 1mL 多孔性载体的亲和配位体的导入量进一步优选为 2mg 以上且 120mg 以下,更优选为 3mg 以上且 60mg 以下,特别优选为 4mg 以上且 30mg 以下,最优选为 4mg 以上且 15mg 以下。

[0126] 此外,每 1mL 多孔性载体中,本发明吸附体中的亲和配位体的导入量优选为 0.01 μ mol 以上且 15 μ mol 以下。每 1mL 多孔性载体的亲和配位体的导入量为 0.01 μ mol 以上时,对精制目标物的吸附量增大,因此优选;在 15 μ mol 以下时,可使生产成本得到抑制,因此优选。每 1mL 多孔性载体的亲和配位体的导入量进一步优选为 0.03 μ mol 以上且 5 μ mol 以下,更优选 0.05 μ mol 以上且 2 μ mol 以下,特别优选 0.1 μ mol 以上且 0.75 μ mol 以下,最优选 0.1 μ mol 以上且 0.5 μ mol 以下。

[0127] 通过测定固定化反应后的反应液上清液中来自亲和配位体的吸光度,可以求出亲和配位体的导入量。此外,可以采用元素分析法求出亲和配位体的导入量。例如,对于含有氨基的亲和配位体而言,通过对吸附体进行 N 含量分析,可以测定亲和配位体的导入量。

[0128] 作为用于治疗用(医疗用)吸附体或抗体医药品精制用吸附体等情况下的亲和配位体,并无特别限定,可以列举例如:对抗体显示高度特异性的抗原或蛋白质、蛋白质 G、L 或其变异体、具有抗体结合活性的肽等。特别是,作为可以特异性地吸附、洗脱免疫球蛋白(IgG)等的吸附体,受到关注的是将蛋白质 A 作为亲和配位体固定化于载体而得到的吸附体。备受关注的是将固定化有蛋白质 A 的吸附体用作风湿病、血友病、扩张型心肌病的治疗用吸附体。此外,在抗体医药精制领域,期待一种能够以大规模、高速以及低成本实现对 IgG 等抗体的精制的吸附体。由上述观点来看,本发明的吸附体优选为导入了作为亲和配位体的蛋白质 A 的吸附体。

[0129] 对于可用于本发明的蛋白质 A 并无特别限定。可以不受限制地使用天然物、基因重组物等。此外,还可以使用含有抗体结合位点及其变异体、融合蛋白等。此外,也可以使用由菌体提取物或培养上清液、通过组合使用和/或重复进行下述精制法而之比的蛋白质 A,所述精制法选自利用了下述技术的分子量分级、分级沉淀法等方法:离子交换色谱法、疏水性相互作用色谱法、凝胶过滤色谱法、羟基磷灰石层析法等各种色谱法以及膜分离技术。特别优选通过国际公开专利公报 W02006/004067、美国专利公报 US5151350 中所述方法得到的蛋白质 A。

[0130] 此外,使用本发明的吸附体进行精制时,从吸附体洗脱到目标物中的配位体浓度的第一次精制~第三次精制的平均值优选为 50ppm 以下。当洗脱到目标物中的配位体浓度的第一次精制~第三次精制的平均值在 50ppm 以下时,可以提高治疗和精制的安全性,还可以提高目标物的纯度,而且可以减轻精制中后续工序的繁琐程度,因此优选。洗脱到目标物中的配位体浓度进一步优选为 0ppm 以上且 40ppm 以下,更优选 0ppm 以上且 30ppm 以下,特别优选 0ppm 以上且 25ppm 以下,最优选 0ppm 以上且 20ppm 以下。洗脱到目标物中的配位体浓度可以按照 Steindl F. et al., Journal of Immunological Methods, Vol. 235 (2000), 61-69 中记载的方法求出。

[0131] 为了进一步减少本发明的吸附体中含有氨基的配位体的泄漏量,优选对吸附体进行清洗。对清洗剂和清洗方法并无特别限定,优选使用含有选自水、乙酸、醇、各种有机溶剂、pH2 ~ 5 的液体、pH8 ~ 13 的液体、氯化钠、氯化钾、乙酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、缓冲剂、表面活性剂、尿素、胍、胍盐酸盐、其它再生剂等中的至少 1 种溶液等进行通液,或者投入上述溶液等并进行搅拌。此外,使用同种或者不同溶液进行数次清洗时,可以进一步减少配位体的泄漏量,因此优选。

[0132] 此外,每 1mL 吸附体中,本发明吸附体对目标物的吸附量优选为 1mg 以上。若每 1mL 吸附体对目标物的吸附量在 1mg 以上,则可以实现高效率的精制,因此优选。此外,若每 1mL 吸附体对目标物的吸附量在 100mg 以下,则吸附的目标物容易从吸附体上洗脱,因此优选。每 1mL 吸附体中,吸附体对目标物的吸附量进一步优选为 5mg 以上且 90mg 以下,更优选 10mg 以上且 80mg 以下,特别优选 20mg 以上且 70mg 以下,最优选 30mg 以上且 60mg 以下。

[0133] 可以按照下述方法求出目标物的吸附量。作为求算目标物吸附量的方法,并无特别限定,可以通过静态吸附量或动态吸附量求出。例如,测定静态吸附量的情况下,对于以 pH7.4 的磷酸缓冲液(Sigma 公司制造)置换的吸附体 0.5mL,使其与将 70mg 的目标物溶解于 35mL 的 pH7.4 的磷酸缓冲液(Sigma 公司制造)中而得到的溶液接触,并在 25℃ 搅拌 2 小时,然后通过测定上清液中目标物的减少量来求算目标物的吸附量。

[0134] 优选本发明的吸附体在压缩 5% 时的压缩应力为 0.01MPa 以上且 1MPa 以下、压缩 10% 时的压缩应力为 0.03MPa 以上且 3MPa 以下、压缩 15% 时的压缩应力为 0.06MPa 以上且 5MPa 以下。

[0135] 当吸附体压缩 5% 时的压缩应力为 0.01MPa 以上、压缩 10% 时的压缩应力为 0.03MPa 以上、以及压缩 15% 时的压缩应力为 0.06MPa 以上时,容易获得在高线速进行通液时也不会产生压紧化的吸附体,因此优选。此外,若吸附体压缩 5% 时的压缩应力为 1MPa 以下、压缩 10% 时的压缩应力为 3MPa 以下、以及压缩 15% 时的压缩应力为 5MPa 以下,则其脆性提高,可以抑制微粒子的产生,因此优选。

[0136] 此外,压缩应力进一步优选为:压缩 5% 时的压缩应力为 0.02MPa 以上且 1MPa 以下、压缩 10% 时的压缩应力为 0.06MPa 以上且 3MPa 以下、以及压缩 15% 时的压缩应力为 0.09MPa 以上且 5MPa 以下。压缩应力最优选为:压缩 5% 时的压缩应力为 0.04MPa 以上且 1MPa 以下、压缩 10% 时的压缩应力为 0.08MPa 以上且 3MPa 以下、压缩 15% 时的压缩应力为 0.11MPa 以上且 5MPa 以下。

[0137] 这里,所述压缩 5% 时的压缩应力,是指吸附体被压缩至体积较初始体积减少 5% 时的应力;所述压缩 10% 时的压缩应力,是指吸附体被压缩至体积较初始体积减少 10% 时的应力;所述压缩 15% 时的压缩应力,是指吸附体被压缩至体积较初始体积减少 15% 时的应力。所述初始体积是指,对含有吸附体的浆料施以振动的同时,使其发生沉降填充,直至达到吸附体的体积不再减少的状态时的体积。

[0138] 此外,对于本发明吸附体的单位填充体积中的树脂含量并无特别限定,优选 2% 以上且 50% 以下。当单位填充体积的树脂含量为 2% 以上时,可以得到即使以大规模、高线速进行精制也不会产生压紧化的吸附体,因此优选。此外,单位填充体积的树脂含量在 50% 以下时,可以确保能够使精制目标物通过的充分的孔,因此优选。此外,单位填充体积的树脂

含量进一步优选的范围是 3% 以上且 25% 以下,更优选 4% 以上且 15% 以下。

[0139] 对于单位填充体积的树脂含量而言,通过调节多孔性载体的量,使其沉降并填充直至多孔性载体的体积不再减少时,多孔性载体的体积为 1mL。将该载体在 105℃干燥 12 小时,可以由 1mL 凝胶的干燥重量 (g) 求出 1mL 凝胶的干燥重量百分比,即树脂含量。

[0140] 此外,对于本发明的吸附体,其体积平均粒径优选为 20 μm 以上且 1000 μm 以下。多孔性载体的体积平均粒径在 20 μm 以上时,不易产生压紧化,因此优选,体积平均粒径在 1000 μm 以下时,用于吸附体时对目标物的吸附量变大,因此优选。多孔性载体的体积平均粒径进一步优选的范围是 30 μm 以上且 250 μm 以下,更优选 40 μm 以上且 125 μm 以下,特别优选 50 μm 以上且 100 μm 以下,最优选 60 μm 以上且 85 μm 以下。可以通过测定随机选取的 100 个多孔性载体的粒径来求算体积平均粒径。各个多孔性载体的粒径,可以通过下述方法测定:拍摄各个多孔性载体的显微镜照片,以电子数据的形式保存,并利用粒径测定软件 (Media Cybernetics 公司制造的 Image-Pro Plus) 进行测定。

[0141] 通过本发明的吸附体和 / 或本发明的制造方法制造的吸附体,可以用于使用亲和色谱法对各种目标物进行的精制、非专利文献 3 中公开的各种精制方法、以及治疗用 (医疗用) 吸附体。精制方法和治疗方法并无特别限定,优选使用非专利文献 1、2、3 以及其它公知方法。

[0142] 此外,本发明的吸附体可实现对目标物的大规模、高速且低成本地精制。因此,使用本发明的吸附体进行精制或治疗时,优选使用直径为 0.5cm 以上且高度为 3cm 以上的柱。柱的直径为 0.5cm 以上且高度为 3cm 以上时,可以高效率地进行精制或治疗。此外,从精制或治疗的精度和效率的观点来看,柱的大小优选直径为 2000cm 以下且高度为 5000cm 以下。

[0143] 柱的大小进一步优选直径为 2cm 以上且 200cm 以下、高度为 5cm 以上且 300cm 以下,更优选直径为 5cm 以上且 100cm 以下以及高度为 8cm 以上且 150cm 以下,特别优选直径为 10cm 以上且 85cm 以下以及高度为 12cm 以上且 85cm 以下,最优选直径为 20cm 以上且 85cm 以下以及高度为 14cm 以上且 35cm 以下。

[0144] 此外,使用本发明的吸附体进行治疗或精制时,优选包括以 100cm/h 以上的线速进行通液的工序。若具有以 100cm/h 以上的线速进行通液的工序,则可以高效率地进行治疗或精制,因此优选。此外,从治疗或精制的精度和装置的耐久性的观点来看,使用本发明的吸附体进行治疗或精制时,优选以 1000cm/h 以下的线速进行。精制的线速进一步优选为 150cm/h 以上且 800cm/h 以下,更优选 250cm/h 以上且 750cm/h 以下,特别优选 300cm/h 以上且 700cm/h 以下,最优选 350cm/h 以上且 700cm/h 以下。

[0145] 与未使用本发明技术方案的情况相比,本发明的多孔性载体、使用该多孔性载体的吸附体、它们的制造方法以及使用它们的精制方法,可以实现高速的精制,提供纯度高且安全性高的精制产品。

实施例

[0146] 以下,针对本发明的实施例进行说明,但本发明并不限于这些实施例。需要说明的是,对于反应投料时的多孔性粒子以及多孔性载体的体积,若无特别记载,是指自然沉降体积。自然沉降体积是指,将由多孔性载体和 RO 水形成的浆料投入计量容器中,在无振动的状态下静置 2 小时以上,直至体积不再减少时的体积。此外,对于官能团含量中的多孔性

载体的体积,若无特别记载,是指将由多孔性载体和 RO 水形成的浆料投入计量容器中,施以振动的同时使其沉降,直至体积不再减少时的状态下的体积。

[0147] (甲酰基含量的测定)

[0148] 甲酰基含量是指,使以 pH8 的 0.1M 磷酸缓冲液置换后的多孔性载体(或多孔性粒子)2mL 与溶解了苯肼的 pH8 的 0.1M 磷酸缓冲液溶液 2mL 接触,在 40℃ 搅拌 1 小时,通过 UV 测定对反应液的上清液在 278nm 附近最大吸收处的吸光度进行测定,由此可估算出苯肼在多孔性载体(或多孔性粒子)的吸附量。此时,使苯肼的投料量为预想的甲酰基含量的 3 摩尔倍,而在多孔性载体(或多孔性粒子)中的吸附量为苯肼投料量的 15% 以下或 45% 以上的情况下,要重新调整苯肼的投料量,再次进行测定。

[0149] (压缩应力的测定)

[0150] 向内径为 15mm 的玻璃制量筒中投料多孔性粒子或吸附体占 50vol% 的浆料。对多孔性粒子或吸附体的量进行调节,使得在边对玻璃制量筒施以振动边使浆料发生沉降填充直至多孔性粒子或吸附体的体积不再减少时,多孔性粒子或吸附体的体积达到 4mL。将此时的体积视为初始体积。将金属制活塞(加工成不会与量筒的内壁发生摩擦、且不会使多孔性粒子或吸附体洗脱的形态)安装在装载有 20N 用负载传感器的自动绘图仪(SHIMADZU 制 EZ-TEST)上。使活塞的底面与相当于多孔性粒子或吸附体的 120vol% 的位置对齐。为了不产生气泡,以 5mm/min 的试验速度使活塞下降,压缩多孔性粒子或吸附体使其体积减少,以测定任意点的压缩应力。

[0151] (葡糖胺固定化量的定量)

[0152] 将多孔性载体 1mL 转移至玻璃过滤器(TOP 公司制造的 3G-2),使用凝胶 3 倍量的 0.01N 氢氧化钠溶液置换 3 次,使用凝胶 3 倍量的 RO 水清洗 6 次。然后,进行 5 分钟抽吸过滤(抽吸干燥),用乙酸(和光纯药工业制造)进行置换。使用非水滴定用乙酸(和光纯药工业制造)将置换后的凝胶转移至 50mL 烧杯中,并稀释(メスアップ)至 30mL。使用电位差自动滴定装置(KEM 公司制造 AT-610),以 0.004N 高氯酸/乙酸(使用非水滴定用乙酸对 0.1M 高氯酸/乙酸溶剂进行稀释:和光纯药工业制造)对其滴定,求出葡糖胺固定化量。

[0153] (动态吸附量、以及泄漏到目标物中的配位体浓度的测定)

[0154] (1) 制备溶液

[0155] 以 pH7.4 的磷酸缓冲液(Sigma 公司制造)作为 A 液、以 pH3.5 的 35mM 乙酸钠作为 B 液(使用和光纯药工业公司制造的乙酸、乙酸钠和 RO 水配制而成)、以 1M 乙酸(使用和光纯药工业公司制造的乙酸和 RO 水配制而成)作为 C 液、以 1mg/mL 的人多克隆 IgG 溶液(使用 Baxter 公司制造的 Gammagard 与 A 液配制而成)作为 D 液、以 6M 尿素作为 E 液、以添加了相对于 A 液为 0.2vol% 的表面活性剂(和光纯药工业公司制造的聚氧乙烯(20)失水山梨醇单月桂酸酯)的溶液作为 F 液、制备 2M 的三(羟甲基)氨基甲烷(使用 Sigma 公司制造的三(羟甲基)氨基甲烷和 RO 水配制而成)作为中和液,并在使用前对各溶液实施脱泡。

[0156] (2) 填充、准备

[0157] 使用 AKTAexplorer100(GE Healthcare Bioscienc 公司制造)作为柱色谱 法用装置,在直径 0.5cm、高度 15cm 的柱中安装 22 μ m 的网筛,分别装入本发明的吸附体 3mL,以 450cm/h 的线速通液 20% 的乙醇水溶液(使用和光纯药工业公司制造的乙酸和 RO 水配制而

成)1小时进行填充。在馏分收集器中设置15mL的采样用试管,预先在溶出液的采样用试管中装入中和液。

[0158] (3) IgG 的精制

[0159] 以300cm/h的线速通液A液9mL,然后,边监测UV边以300cm/h的线速通液D液,直至10%的IgG穿透(破過)。然后,以300cm/h的线速通液A液30mL,以300cm/h的线速通液B液30mL,使IgG洗脱。然后以300cm/h的线速通液C液9mL,并以300cm/h的线速通液E液9mL。继续重复进行2次吸附体填充终止后的操作2次,由此求出溶出液中的IgG量和向IgG中泄漏的配位体浓度。

[0160] (制造例1)

[0161] 使用90 μ m的网筛(NONAKA RIKAKI制,线径63 μ m)和分级机(筒井理化学器械公司制造的300-MM),对体积平均粒径为92 μ m、树脂含量为6%、分子量排阻极限为5000万的多孔性纤维素粒子(Chisso公司制造的CK-A)进行湿式分级2小时,得到体积平均粒径为83 μ m的多孔性粒子A。

[0162] 向2.3L的多孔性粒子A中加入RO水,使其体积为2.78L,再将其转移至可拆卸式烧瓶中。向其中加入4N NaOH(使用和光纯药工业公司制造和RO水进行调整)0.246L。此外,加入硼氢化钠3.3g,并在水槽中升温至40 $^{\circ}$ C。向其中加入含有作为交联剂的丙三醇多缩水甘油醚的Denacol EX314(Nagase Chemtex公司制造)1.64L,在40 $^{\circ}$ C搅拌5小时。反应终止后,一边在玻璃过滤器(TOP公司制造的26G-2)上进行抽滤,一边用多孔性粒子20倍体积分量的RO水清洗,得到交联多孔性粒子。该交联多孔性粒子在压缩5%时的压缩应力为0.020MPa、压缩10%时的压缩应力为0.049MPa、压缩15%时的压缩应力为0.080MPa。

[0163] 向得到的交联多孔性粒子中加入RO水,使其总量为交联多孔性粒子的2倍体积分量,加入到玻璃制烧杯(1L)中,以2片铝箔封口,使用高压釜(Sakura公司制造的高压灭菌器Neoclave)在120 $^{\circ}$ C加温40分钟。自然冷却至室温后,在玻璃过滤器(TOP公司制造的26G-2)上以多孔性粒子5倍体积分量的RO水进行清洗,得到环氧基转变成了甘油基的交联多孔性粒子。

[0164] 然后,向上述经过高压釜加温后的多孔性粒子2.3L中加入RO水至体积为2.78L,将其转移至可拆卸式烧瓶中。向其中加入4N-NaOH(使用和光纯药工业公司制造与RO水进行调整)0.246L。此外,加入硼氢化钠3.3g,在水槽中升温至40 $^{\circ}$ C。向其中加入Denacol EX314(Nagase Chemtex公司制造)1.64L,在40 $^{\circ}$ C搅拌5小时。反应终止后,一边在玻璃过滤器(TOP公司制造26G-2)上进行抽滤,一边用多孔性粒子20倍体积分量的RO水清洗,得到交联多孔性粒子。该交联多孔性粒子在压缩5%时的压缩应力为0.020MPa、压缩10%时的压缩应力为0.049MPa、压缩15%时的压缩应力为0.080MPa。

[0165] 向得到的交联多孔性粒子中加入RO水,使其总量为交联多孔性粒子的2倍体积分量,加入到玻璃制烧杯(1L)中,以2片铝箔封口,使用高压釜(Sakura公司制造的高压灭菌器Neoclave)在120 $^{\circ}$ C加温40分钟。自然冷却至室温后,在玻璃过滤器(TOP公司制造26G-2)所以多孔性粒子5倍体积分量的RO水进行清洗,得到多孔性粒子B。

[0166] (实施例1)

[0167] 向制造例1的多孔性粒子B523mL中加入RO水,使其总量为784.5mL,加入到2L的可拆卸式烧瓶中,并将该烧瓶安装在25 $^{\circ}$ C的恒温槽(Tomas科学公司制造的恒温水浴锅

T-2S) 中。然后,将过碘酸钠(和光纯药工业制造)溶解于 RO 水中,制备 11.5mg/mL 的过碘酸钠水溶液 523mL,将该溶液加入可拆卸式烧瓶中,在 25°C 以 120rpm 的转速搅拌 1 小时。反应后,在玻璃过滤器(TOP 公司制造的 26G-2)上以 RO 水进行清洗,直至滤液的电导率达到 $5\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下。随后向得到的多孔性粒子中加入 RO 水,使其总量为 784.5mL,将其加入到可拆卸式烧瓶中,并将该可拆卸式烧瓶安装在 25°C 恒温槽(Tomas 科学公司制造的恒温水浴锅 T-2S)中。然后,将过碘酸钠(和光纯药工业制造)溶解在 RO 水中,制备 11.5mg/mL 的过碘酸钠水溶液,将 523mL 该溶液加入到可拆卸式烧瓶中,在 25°C 以 120rpm 的转速搅拌 1 小时(Mazela Z)。反应后,在玻璃过滤器(TOP 公司制造的 26G-2)上进行清洗,直至清洗滤液的电导率达到 $5\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下,从而得到多孔性粒子 C。使用电导率计(EUTECH INSTRUMENTS 制造的 ECTestr10pure+)测定清洗滤液的电导率。利用上述方法测定所得多孔性粒子 C 的甲酰基含量,结果显示:每 1mL 多孔性粒子 C 中的甲酰基含量为 $68\ \mu\text{mol}$ 。

[0168] 然后,在可拆卸式烧瓶的 1042mL 处做标记,并使用 RO 水将所得多孔性粒子 C 521mL 转移。将其安装在 15°C 的恒温槽(Tomas 科学公司制造恒温水浴锅 T-2S、投入冷却装置 ADVANTEC TBC120DA)中,放置反应溶液直至达到 15°C。确认反应液到达 15°C 后,向其中加入多孔性粒子 C 的甲酰基含量的 10 摩尔倍的发酵葡糖胺 K(协和发酵公司制造),并加入氢氧化钠溶液使其 pH 达到 11。然后,一边使用 4N 氢氧化钠微调 pH 至 11,一边加入 RO 水,使反应液的总体积达到 1042mL,在 15°C 以 120rpm 的转速搅拌 5 小时。

[0169] 随后,加入 2.96g 硼氢化钠(和光纯药工业公司制造),搅拌 1 小时同时使其反应。反应后,在玻璃过滤器(TOP 公司制造的 26G-2)上以多孔性粒子 20 倍体积量的 RO 水进行清洗。将清洗后的凝胶加入可拆卸式烧瓶中,补足 RO 水直至达到可拆卸式烧瓶的 1042mL 标记处,加入 2.96g 硼氢化钠,在 25°C 搅拌 1 小时。反应后,在玻璃过滤器(TOP 公司制造的 26G-2)上以凝胶的 20 倍体积量的 RO 水进行清洗。然后,再重复进行 2 次在 25°C 下进行的 1 小时的硼氢化钠的反应,并使用 RO 水进行清洗,直至最后清洗时玻璃过滤器(TOP 公司制造的 26G-2)中的滤液的电导率达到 $5\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下,从而得到葡糖胺化多孔性载体。

[0170] 该多孔性载体中的葡糖胺导入量为:每 1mL 多孔性载体中导入了 $17\ \mu\text{mol}$ 葡糖胺。此外,未经还原剂处理完全的葡糖胺固定化后的甲酰基量为:每 1mL 多孔性载体中为 $0\ \mu\text{mol}$ 。

[0171] 向所得葡糖胺化多孔性载体 109mL 中加入 RO 水直至体积为 163.5mL,并转移至 500mL 的可拆卸式烧瓶中。然后,制备 11.5mg/mL 的过碘酸钠水溶液,并将 109mL 的该过碘酸钠水溶液加入到可拆卸式烧瓶中,在 25°C 以 120rpm 的转速搅拌 1 小时。反应后,在玻璃过滤器(TOP 公司制造的 26G-2)上以 RO 水进行清洗,直至滤液的电导率达到 $5\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下,从而得到含有甲酰基的多孔性载体 D。对于得到的含有甲酰基的多孔性载体 D,压缩 5% 时的压缩应力为 0.028MPa、压缩 10% 时的压缩应力为 0.067MPa、压缩 15% 时的压缩应力为 0.109MPa。每 1mL 多孔性载体 D 中的甲酰基含量为 $6.2\ \mu\text{mol}$ 。

[0172] (实施例 2)

[0173] 向制造例 1 的多孔性粒子 B 435mL 中加入 RO 水,使其总量为 652mL,加入到 2L 的可拆卸式烧瓶中,并将该烧瓶安装在 25°C 的恒温槽(Tomas 科学公司制造的恒温水浴锅 T-2S)中。然后,将过碘酸钠(和光纯药工业制造)溶解在 RO 水中,制备 46.0mg/mL 的过碘酸钠(和光纯药工业制造),将 217.5mL 该溶液加入可拆卸式烧瓶中,在 25°C 以 120rpm 的转速

搅拌 15 分钟。反应后,在玻璃过滤器 (TOP 公司制造的 26G-2) 上以 RO 水进行清洗,直至滤液的电导率为 $5 \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下,得到多孔性粒子 E。测定所得多孔性粒子 E 的甲酰基含量,结果显示:每 1mL 多孔性粒子 E 中甲酰基含量为 $45.6 \mu\text{mol}$ 。

[0174] 然后,在可拆卸式烧瓶的 820mL 处做标记,并使用 RO 水将所得多孔性粒子 E 410mL 转移。将其安装在 15°C 的恒温槽 (Tomas 科学公司制造的恒温水浴锅 T-2S、投入冷却装置 ADVANTEC TBC120DA) 中,放置反应溶液直至达到 15°C 。确认反应液到达 15°C 后,向其中加入多孔性粒子 E 的甲酰基含量的 10 摩尔倍的发酵葡糖胺 K (协和发酵公司制造),并加入 4N 氢氧化钠溶液 (使用和光纯药工业公司制造的氢氧化钠和 RO 水进行调整) 使其 pH 达到 11。然后,一边使用 4N 氢氧化钠微调 pH 至 11,一边加入 RO 水,使反应液的总体积达到 820mL,在 15°C 以 120rpm 的转速搅拌 5 小时。

[0175] 随后,加入 2.33g 硼氢化钠 (和光纯药工业公司制造),搅拌 1 小时同时使其反应。反应后,在玻璃过滤器 (TOP 公司制造的 26G-2) 上以多孔性粒子 20 倍体积量的 RO 水进行清洗。将清洗后的凝胶加入可拆卸式烧瓶中,补足 RO 水直至达到可拆卸式烧瓶的 820mL 标记处,加入 2.33g 硼氢化钠,在 25°C 搅拌 1 小时。反应后,在玻璃过滤器 (TOP 公司制造的 26G-2) 上以凝胶的 20 倍体积量的 RO 水进行清洗。然后,再重复进行 5 次在 25°C 下进行的 1 小时的硼氢化钠的反应,并使用 RO 水进行清洗,直至最后清洗时玻璃过滤器 (TOP 公司制造的 26G-2) 中的滤液的电导率达到 $5 \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下,从而得到葡糖胺化多孔性载体。

[0176] 该多孔性载体中的葡糖胺导入量为:每 1mL 多孔性载体中导入了 $11.0 \mu\text{mol}/\text{mL}$ 葡糖胺。此外,未经还原剂处理完全的葡糖胺固定化后的甲酰基量为:每 1mL 多孔性载体中为 $0.4 \mu\text{mol}$ 。

[0177] 向所得葡糖胺化多孔性载体 80mL 中加入 RO 水直至体积为 120mL,并转移至可拆卸式烧瓶中。然后,制备 $11.5\text{mg}/\text{mL}$ 的过碘酸钠水溶液,并将 40mL 的该水溶液加入到可拆卸式烧瓶中,在 25°C 以 150rpm 的转速搅拌 30 分钟 (Mazela Z)。反应后,在玻璃过滤器 (TOP 公司制造的 26G-2) 上以 RO 水进行清洗,直至滤液的电导率达到 $5 \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下,从而得到含有甲酰基的多孔性载体。每 1mL 多孔性载体中的甲酰基含量为 $3.4 \mu\text{mol}$ 。

[0178] (实施例 3)

[0179] 在葡糖胺固定化后的还原反应中,将在 15°C 、1 小时的反应进行 1 次、在 25°C 、1 小时的反应进行 6 次变更为:在 15°C 、1 小时的反应进行 1 次、在 37°C 、1 小时的反应进行 2 次,除此之外,按照与实施例 2 相同的方法得到了葡糖胺化多孔性载体,随后得到了含有甲酰基的多孔性载体。需要说明的是,每 1mL 葡糖胺化多孔性载体中,葡糖胺的导入量为 $9.6 \mu\text{mol}/\text{mL}$ 。此外,未经还原剂处理完全的葡糖胺固定化后的甲酰基量为:每 1mL 多孔性载体中为 $0.3 \mu\text{mol}$ 。此外,每 1mL 含有甲酰基的多孔性载体中,甲酰基含量为 $4.3 \mu\text{mol}$ 。

[0180] (实施例 4)

[0181] 在葡糖胺固定化后的还原反应中,将在 15°C 、1 小时的反应进行 1 次、在 25°C 、1 小时的反应进行 6 次变更为:在 15°C 、1 小时的反应进行 1 次、在 50°C 、1 小时的反应进行 1 次,除此之外,按照与实施例 2 相同的方法得到了葡糖胺化多孔性载体和含有甲酰基的多孔性载体。需要说明的是,每 1mL 葡糖胺化多孔性载体中,葡糖胺的导入量为 $8.7 \mu\text{mol}/\text{mL}$ 。此外,未经还原剂处理完全的葡糖胺固定化后的甲酰基量为:每 1mL 多孔性载体中为 $0.4 \mu\text{mol}$ 。此外,每 1mL 含有甲酰基的多孔性载体中,甲酰基含量为 $4.3 \mu\text{mol}$ 。

[0182] (实施例 5)

[0183] 利用 pH11 的 0.5M 柠檬酸钠 (和光纯药工业制造)+0.15M 食盐 (和光纯药工业制造) 的缓冲液 327mL, 置换实施例 1 中得到的甲酰基多孔性载体 109mL。使用 pH11 的 0.5M 柠檬酸钠 +0.15M 食盐缓冲液将置换后的含有甲酰基的多孔性载体转移至在 197.6mL 处做了标记的可拆卸式烧瓶中。向其中加入含有蛋白质 A 的溶液 (钟化公司制造的 PNXL30) 16.5mL, 该含有蛋白质 A 的溶液中的蛋白质 A 的浓度为 52.85mg/mL, 且其中的蛋白质 A 根据国际公开专利公报 W02006/004067 中所述方法制备得到。使用 4N NaOH (使用和光纯药工业公司制造和 RO 水进行调整) 调节 pH 至 11, 使反应液面与 197.6mL 处标记对齐, 在恒温槽中 (Tomas 科学公司制造的恒温水浴锅 T-2S、投入冷却装置 ADVANTEC TBC120DA), 于 4°C 下、以 150rpm 的转速进行 12 小时搅拌以使其反应 (Mazela Z)。

[0184] 反应后, 使用 4M 盐酸 (使用和光纯药工业公司制造的盐酸和 RO 水进行调整) 调节反应液的 pH 至 6.8, 然后加入硼氢化钠 (和光纯药工业制造) 0.309g, 在 4°C 缓慢搅拌 1 小时以使其反应。反应后, 测定反应液在 277nm 附近最大吸收处的吸光度, 由此可知: 每 1mL 多孔性载体中, 亲和配位体即蛋白质 A 的导入量为 7.2mg。

[0185] 在玻璃过滤器 (TOP 公司制造的 26G-2) 上, 以多孔性载体 20 倍体积量的 RO 水对反应后的多孔性载体进行清洗, 将清洗后的载体加入到可拆卸式烧瓶中, 向其中加入 RO 水直至到达 197.6mL 标记处, 加入 0.309g 硼氢化钠, 在 25°C 搅拌 1 小时。反应后, 以 20 倍量的 RO 水进行清洗。然后, 用 3 倍体积量的 0.01M 盐酸 (使用和光纯药工业公司制造盐酸和 RO 水进行调整) 置换, 向置换后的多孔性载体中加入 0.01M 盐酸使其总量达到 220mL, 并将该溶液加入至可拆卸式烧瓶中, 在室温下搅拌 30 分钟的同时实施酸清洗。

[0186] 酸清洗后, 在玻璃过滤器 (TOP 公司制造的 26G-2) 上, 以多孔性载体 20 倍体积量的 RO 水进行清洗, 然后, 用 3 倍体积量的 0.05M 氢氧化钠 +1M 硫酸钠水溶液 (使用和光纯药工业公司制造的氢氧化钠、硫酸钠和 RO 水配制而成) 置换。然后, 向置换后的多孔性载体中加入 0.05M 氢氧化钠 +1M 硫酸钠水溶液使其总量达到 220mL, 并将该溶液加入至可拆卸式烧瓶中, 在室温下搅拌 20 分钟的同时实施碱清洗。

[0187] 碱清洗后, 在玻璃过滤器 (TOP 公司制造 26G-2) 上, 以多孔性载体 20 倍体积量的 RO 水对多孔性载体进行清洗。然后, 使用多孔性载体 3 倍量的 pH7.4 的 PBS (SIGMA 公司制造) 进行置换, 然后使用 RO 水进行清洗, 直至清洗滤液的电导率达到 $5 \mu S/cm$ 以下, 得到固定化了目标蛋白质 A 的吸附体。使用电导率计 (EUTECH INSTRUMENTS 制造的 ECTestr10pure+) 测定清洗滤液的电导率。

[0188] 选择人多克隆 IgG (Baxter 公司制造的 Gammagard) 作为所得吸附体的目标物, 求出动态吸附量和洗脱至目标物中的配位体的量, 结果显示, IgG 动态吸附量 (5%Dynamic binding capacity) 为: 第 1 次 37mg、第 2 次 37mg、第 3 次 38mg。此外, 泄漏至精制 IgG 中的配位体在 IgG 中所占的浓度为: 第 1 次 38ppm、第 2 次 20ppm、第 3 次 19ppm。

[0189] (实施例 6)

[0190] 使用实施例 2 中得到的甲酰基多孔性载体, 按照与实施例 5 相同的方法, 得到固定化了蛋白质 A 的吸附体。求出所得吸附体的动态吸附量和洗脱至目标物中的配位体的量, 结果显示, IgG 动态吸附量 (5%Dynamic binding capacity) 为: 第 1 次 37mg、第 2 次 38mg、第 3 次 39mg。此外, 泄漏至精制 IgG 中的配位体在 IgG 中所占的浓度为: 第 1 次 23ppm、第

2 次 19ppm、第 3 次 19ppm。

[0191] (实施例 7)

[0192] 使用实施例 3 中得到的甲酰基多孔性载体,按照与实施例 5 相同的方法,得到固定化了蛋白质 A 的吸附体。求出所得吸附体的动态吸附量和洗脱至目标物中的配位体的量,结果显示,IgG 动态吸附量 (5%Dynamic binding capacity) 为:第 1 次 34mg、第 2 次 35mg、第 3 次 36mg。此外,泄漏至精制 IgG 中的配位体在 IgG 中所占的浓度为:第 1 次 27ppm、第 2 次 24ppm、第 3 次 16ppm。

[0193] (实施例 8)

[0194] 使用实施例 4 中得到的甲酰基多孔性载体,按照与实施例 5 相同的方法,得到固定化了蛋白质 A 的吸附体。求出所得吸附体的动态吸附量和洗脱至目标物中的配位体的量,结果显示,IgG 动态吸附量 (5%Dynamic binding capacity) 为:第 1 次 31mg、第 2 次 32mg、第 3 次 32mg。此外,泄漏至精制 IgG 中的配位体在 IgG 中所占的浓度为:第 1 次 16ppm、第 2 次 16ppm、第 3 次 8ppm。

[0195] (实施例 9)

[0196] 除了将蛋白质 A 的固定化温度由 4℃改变为 21℃以外,按照与实施例 7 相同的方法得到吸附体。求出所得吸附体的动态吸附量和洗脱至目标物中的配位体的量,结果显示,IgG 动态吸附量 (5%Dynamic binding capacity) 为 34mg。

[0197] (实施例 10)

[0198] 在固定化蛋白质 A 后加入硼氢化钠时,不直接加入其粉末,而是变更为将同量的硼氢化钠溶解于 RO 水中,制备 17mg/mL 的硼氢化钠溶液 12.4mL,在 1 小时内分 25 次将其总量加入,除此以外,按照与实施例 7 相同的方法得到吸附体。求出所得吸附体的动态吸附量,结果显示,IgG 动态吸附量 (5%Dynamic binding capacity) 为:第 1 次 39mg、第 2 次 38mg、第 3 次 39mg。

[0199] (实施例 11)

[0200] 在固定化蛋白质 A 后加入硼氢化钠时,不直接加入其粉末,而是变更为加入 17mg/mL 的硼氢化钠溶液 0.5mL,除此以外,按照与实施例 7 相同的方法得到吸附体。求出所得吸附体的动态吸附量和洗脱至目标物中的配位体的量,结果显示,IgG 动态吸附量 (5%Dynamic binding capacity) 为:第 2 次 39mg、第 3 次 39mg。

[0201] (实施例 12)

[0202] 在固定化蛋白质 A 后,不是一次性加入硼氢化钠,而是加入与硼氢化钠等摩尔量的二甲胺硼烷粉末,除此以外,按照与实施例 7 相同的方法得到吸附体。求出所得吸附体的动态吸附量,结果显示,IgG 动态吸附量 (5%Dynamic binding capacity) 为:第 1 次 36mg、第 3 次 38mg。

[0203] (比较例 1)

[0204] 除了在固定化葡糖胺后未进行还原反应以外,按照与实施例 1 相同的方法,得到葡糖胺化多孔性载体和含有甲酰基的多孔性载体 F。每 1mL 多孔性载体中的葡糖胺导入量为 20.2 μ mol。此外,未经还原剂处理完全的葡糖胺固定化后的甲酰基量为 7 μ mol。此外,每 1mL 多孔性载体 F 中,含有甲酰基的多孔性载体中甲酰基的含量为 14.5 μ mol。

[0205] 使用所得甲酰基多孔性载体,按照与实施例 5 相同的方法,得到固定化了蛋白质 A

的吸附体。求出所得吸附体的动态吸附量和洗脱至目标物中的配位体的量,结果显示,IgG 动态吸附量(5%Dynamic binding capacity)为:第1次 37mg、第2次 38mg、第3次 38mg。此外,泄漏至精制 IgG 中的配位体在 IgG 中所占的浓度为:第1次 87ppm、第2次 47ppm、第3次 56ppm。

[0206] (比较例 2)

[0207] 向制造例 1 的多孔性粒子 B64mL 中加入 RO 水,使其总量为 96mL,加入到可拆卸式烧瓶中,并将该烧瓶安装在 25℃的恒温槽(Tomas 科学公司制造的恒温水浴锅 T-2S)中。然后,将过碘酸钠(和光纯药工业制造)溶解在 RO 水中,制备 1.44mg/mL 的过碘酸钠水溶液,将 64mL 该溶液加入可拆卸式烧瓶中,在 25℃以 120rpm 的转速搅拌 1 小时(Mazela Z)。反应后,在玻璃过滤器(TOP 公司制造的 26G-2)上以 RO 水进行清洗,直至滤液的电导率达到 $5\mu\text{S}/\text{cm}$ 以下,得到含有甲酰基的多孔性载体 G。测定所得含有甲酰基的多孔性载体 G 的甲酰基含量,结果显示:每 1mL 多孔性载体中的甲酰基含量为 $5.9\mu\text{mol}$ 。

[0208] 在玻璃过滤器(TOP 公司制造的 25G-2)上,以 pH 为 11 的 0.5M 磷酸(和光纯药工业制造)+0.15M 食盐(和光纯药工业制造)的缓冲液 165mL,置换上述酰基多孔性载体 54.5mL。向置换后的含有甲酰基的多孔性载体中加入 pH11 的 0.5M 磷酸(和光纯药工业制造)+0.15M 食盐(和光纯药工业制造)的缓冲液,使其总量达到 90.5mL,并转移至可拆卸式烧瓶中,向其中加入含有蛋白质 A 的溶液(钟化公司制造的 PNXL30)8.25mL,该含有蛋白质 A 的溶液中的蛋白质 A 的浓度为 52.85mg/mL,且其中的蛋白质 A 根据国际公开专利公报 W02006/004067 中所述方法制备得到,在恒温槽中(Tomas 科学公司制造恒温水浴锅 T-2S、投入冷却装置 ADVANTEC TBC120DA),于 4℃下、以 150rpm 的转速使进行 12 小时搅拌以使其反应(Mazela Z)。

[0209] 反应后,使用 4M 盐酸(使用和光纯药工业公司制造盐酸和 RO 水进行调整)将反应液的 pH 调节为 8,然后加入硼氢化钠(和光纯药工业制造)0.155g,于 4℃缓慢搅拌 1 小时以使其反应。反应后,测定反应液在 276nm 附近最大吸收处的吸光度,由此可知:每 1mL 多孔性载体中,亲和配位体即蛋白质 A 的导入量为 6.7mg。

[0210] 在玻璃过滤器(TOP 公司制造的 26G-2)上,以多孔性载体 20 倍体积量的 RO 水对反应后的多孔性载体进行清洗,向清洗后的载体加入 RO 水至达到 109mL,并转移到可拆卸式烧瓶中,加入 0.155g 硼氢化钠,在 25℃搅拌 1 小时。反应后,以 20 倍量的 RO 水进行清洗。然后,用 3 倍体积量的 0.01M 盐酸(使用和光纯药工业公司制造盐酸和 RO 水进行调整)置换,向置换后的多孔性载体中加入 0.01M 盐酸使其总量达到 109mL,并将该溶液加入至可拆卸式烧瓶中,在室温下搅拌 30 分钟的同时实施酸清洗。

[0211] 酸清洗后,在玻璃过滤器(TOP 公司制造的 26G-2)上,以多孔性载体 20 倍体积量的 RO 水进行清洗,然后,用 3 倍体积量的 0.05M 氢氧化钠+1M 硫酸钠水溶液(使用和光纯药工业公司制造的氢氧化钠、硫酸钠和 RO 水配制而成)置换。然后,向置换后的多孔性载体中加入 0.05M 氢氧化钠+1M 硫酸钠水溶液使其总量达到 109mL,并将该溶液加入至可拆卸式烧瓶中,在室温下搅拌 20 分钟的同时实施碱清洗。

[0212] 碱清洗后,在玻璃过滤器(TOP 公司制造的 26G-2)上,以多孔性载体 20 倍体积量的 RO 水对多孔性载体进行清洗。然后,使用多孔性载体 3 倍量的 pH7.4 的 PBS(SIGMA 公司制造)进行置换,然后使用 RO 水进行清洗,直至清洗滤液的电导率达到 $5\mu\text{S}/\text{cm}$ 以下,得到

固定化了目标蛋白质A的吸附体。使用电导率计 (EUTECH INSTRUMENTS 制 ECTestr10pure+) 测定清洗 滤液的电导率。

[0213] 求出所得吸附体的动态吸附量和洗脱至目标物中的配位体的量,结果显示,IgG 动态吸附量 (5%Dynamic binding capacity) 为:第1次 35mg、第2次 35mg、第3次 35mg。此外,泄漏至精制 IgG 中的配位体在 IgG 中所占的浓度为:第1次 >100ppm、第2次 >100ppm、第3次 >100ppm。

[0214] (比较例 3)

[0215] 除了未对 Chisso 公司制造的 CK-A 分级以外,按照与制造例 1 相同的方法制得交联多孔性粒子。然后,向该交联多孔性粒子 11mL 中加入 RO 水使其总量达到 12.6mL,将其加入离心沉降管(岩城硝子公司制造 50mL),再向其中加入 2M 氢氧化钠水溶液(使用和光纯药工业公司制造的氢氧化钠和 RO 水配制而成)3.7mL,在 40℃加温 30 分钟。将液温加温至 40℃后,加入环氧氯丙烷(和光纯药工业公司制造)1.3mL,使用恒温振荡机(Tomas 科学公司制造的恒温水浴锅 T-25),在 40℃以 100 次/分振荡 2 小时以使其反应。

[0216] 反应终止后,在玻璃过滤器(TOP 公司制造的 17G-2)上,以多孔性粒子 20 倍体积量的 RO 水进行清洗,得到每 1mL 多孔性粒子中环氧基含量为 5.7 μmol 的环氧化多孔性粒子。在玻璃过滤器(TOP 公司制造的 17G-2)上,使用 pH 为 10 的 0.5M 碳酸缓冲液(使用和光纯药工业公司制造的碳酸氢钠、碳酸钠和 RO 水配制而成)30mL,将上述环氧化多孔性粒子 9.5mL 置换。向置换后的环氧化多孔性粒子中加入 pH 为 10 的 0.5M 碳酸缓冲液,使其总量为 19mL,将其加入离心沉降管(岩城硝子公司制造 50mL)中,再向其中加入 D(+)-葡糖胺盐酸盐(和光纯药工业公司制造)0.18g,使用恒温振荡机(Tomas 科学公司制造的恒温水浴锅 T-25),在 50℃以 100 次/分振荡一晚上以使其反应。

[0217] 反应后,在玻璃过滤器(TOP 公司制造 17G-2)上,以多孔性载体 20 倍体积量的 RO 水进行清洗,得到每 1mL 多孔性载体中的葡糖胺含量为 1.4 μmol 的葡糖胺化多孔性载体。向所得葡糖胺化多孔性载体 10mL 中加入 RO 水,使其总量达到 15mL,并将其装入离心沉降管(岩城硝子公司制造 50mL)中。然后,将 115mg 过碘酸钠(和光纯药工业公司制造)溶解于 10mL RO 水中,将所述过碘酸钠水溶液加入离心沉降管中,在恒温箱(岩城玻璃公司制造的恒温箱 LOW-TEMP ICB-151L)中,使用混合转子(井内盛荣堂公司制造的 Variable Mix Rotor VMR-5),在 25℃以 100 次/分振荡 1 小时,使其反应。

[0218] 反应后,在玻璃过滤器(TOP 公司制造 17G-2)上,以多孔性载体 20 倍体积量的 RO 水进行清洗,得到含有甲酰基的多孔性载体。按照上述方法,对得到的含有甲酰基的多孔性载体的甲酰基含量进行测定,结果为每 1mL 多孔性载体中的甲酰基含量为 5.9 μmol 。

[0219] 在玻璃过滤器(TOP 公司制造 17G-2)上,以 pH 为 10 的 0.5M 磷酸+0.15M 食盐的缓冲液(使用和光纯药工业公司制造的磷酸氢二钠、氯化钠、氢氧化钠和 RO 水配制而成)30mL,对上述含有甲酰基的多孔性载体 7.1mL 进行置换。向置换后的含有甲酰基的多孔性载体中加入 pH 为 10 的 0.5M 磷酸+0.15M 食盐的缓冲液,使其总量达到 11.8mL,并转移至离心沉降管(岩城硝子公司制造 50mL)中,向其中加入含有蛋白质 A 的溶液(钟化公司制造的 PNXL30)1.08mL,该含有蛋白质 A 的溶液中的蛋白质 A 的浓度为 52.6mg/mL,且其中的蛋白质 A 根据国际公开专利公报 W02006/004067 中所述方法制备得到,在恒温箱(岩城玻璃公司制造的恒温箱 LOW-TEMP ICB-151L),使用混合转子(井内盛荣堂公司制造的 Variable

Mix Rotor VMR-5), 于 4°C 下、以 100 次 / 分振荡 12 小时, 以使其反应。

[0220] 使用 4M 盐酸 (使用和光纯药工业公司制造的盐酸和 RO 水进行调整) 调节反应后的反应液的 pH 至 8, 然后加入硼氢化钠 0.02g, 在 4°C 缓慢振荡 1 小时以使其反应。反应后, 测定反应液在 277nm 附近最大吸收处的吸光度, 结果可知: 每 1mL 多孔性载体中, 亲和配位体即蛋白质 A 的导入量为 4.7mg。

[0221] 在玻璃过滤器 (TOP 公司制造的 17G-2) 上, 用 RO 水清洗反应后的多孔性载体, 直至清洗滤液的电导率达到 5 μ S/cm 以下, 得到固定化了目标蛋白质 A 的吸附体。

[0222] 选择人多克隆 IgG (Baxter 公司制造的 Gammagard) 作为所得吸附体的目标物, 按照下述方法求出动态吸附量和洗脱至目标物中的配位体的量, 结果显示, IgG 动态吸附量 (5% Dynamic binding capacity) 为: 第 1 次 22mg、第 2 次 23mg、第 3 次 27mg。此外, 泄漏至精制 IgG 中的配位体在 IgG 中所占的浓度为: 第 1 次 297ppm、第 2 次 214ppm、第 3 次 198ppm。

[0223] (制造例 2)

[0224] 按照与制造例 1 相同的方法制备多孔性粒子 B, 并向该多孔性粒子 B 100mL 中加入 RO 水, 使其总量为 150mL, 加入到可拆卸式烧瓶 (TOP 公司制造 500mL) 中。然后, 将 2.30g 的过碘酸钠 (和光纯药工业公司制造) 溶解于 50mL RO 水中, 将该过碘酸钠水溶液加入可拆卸式烧瓶中, 在 25°C、以 150 次 / 分搅拌 15 分钟的同时使其反应。反应后, 在玻璃过滤器 (TOP 公司制造 26G-2) 上, 以多孔性粒子 20 倍体积量的 RO 水进行清洗, 得到多孔性粒子 H。按照上述方法对得到的含有甲酰基的多孔性粒子的甲酰基含量进行测定, 结果显示: 每 1mL 多孔性粒子中的甲酰基含量为 57 μ mol。

[0225] (实施例 13)

[0226] 按照与制造例 2 相同的方法制备多孔性粒子 H, 并将 99mL 的该多孔性粒子 H 与 99mL 的 RO 水以 1:1 制备浆料, 将该浆料调节至 15°C, 然后, 在玻璃过滤器 (TOP 公司制造的 26G-2) 上抽滤 (抽吸干燥) 15 分钟。将得到的抽吸干燥后的多孔性粒子 I 全部投入到玻璃制可拆卸式烧瓶 (TOP 公司制造 500mL) 中。然后, 向该可拆卸式烧瓶中加入 3.3g 葡糖胺盐酸盐 (协和发酵公司制造的发酵葡糖胺 K)。随后, 一边使葡糖胺盐酸盐溶解, 一边加入 15°C 的 RO 水, 调节溶解后的反应液总量为 180mL。将反应液调节至 15°C 后, 使用 4N 的氢氧化钠水溶液和 RO 水, 调节至 pH 为 10、反应液的总量为 198mL。接着, 在 15°C 以 150 次 / 分搅拌 5 小时。然后, 添加硼氢化钠 (和光纯药工业公司制造) 0.56g, 在 15°C 以 150 次 / 分搅拌 60 分钟。反应后, 在玻璃过滤器 (TOP 公司制造的 26G-2) 上, 以多孔性载体 40 倍体积量的 RO 水进行清洗。

[0227] 将下述“ ” 内的操作共进行 2 次, 得到目标多孔性载体: “接着, 将清洗后的多孔性载体全部投入到玻璃制可拆卸式烧瓶 (TOP 公司制造 500mL) 中, 加入 RO 水, 调节其总量至 198mL。然后, 添加硼氢化钠 (和光纯药工业公司制造) 0.56g, 在 15°C 以 150 次 / 分搅拌 60 分钟。反应后, 在玻璃过滤器 (TOP 公司制造的 26G-2) 上, 以多孔性载体 40 倍体积量的 RO 水进行清洗。”。通过非水滴定测定该多孔性载体中的葡糖胺固定化量, 结果显示: 每 1mL 载体中的葡糖胺固定化量为 10 μ mol。

[0228] (实施例 14)

[0229] 除了在添加葡糖胺盐酸盐后实施 pH 调节时, 将 pH 设定为 9 以外, 按照与实施例 13 相同的方法制备了目标多孔性载体。每 1mL 载体中的葡糖胺固定化量为 10 μ mol。

[0230] (实施例 15)

[0231] 除了在添加葡糖胺盐酸盐后实施 pH 调节时,将 pH 设定为 8 以外,按照与实施例 13 相同的方法制备了目标多孔性载体。每 1mL 载体中的葡糖胺固定化量为 $10 \mu\text{mol}$ 。

[0232] (实施例 16)

[0233] 使用 pH3 的 0.01M 柠檬酸缓冲液(使用和光纯药工业公司制造的柠檬酸三钠二水合物、柠檬酸一水合物、RO 水配制而成)280mL 对实施例 13 中制备的多孔性载体 94mL 进行置换,加入该缓冲液,使其总量为 141mL,并加入至可拆卸式烧瓶(TOP 公司制造 500mL)中。然后,将 0.54g 过碘酸钠(和光纯药工业公司制造)溶解在 94mL RO 水中,并将该过碘酸钠水溶液加入可拆卸式烧瓶中,在 5°C 以 150 次/分使其搅拌 40 分钟以使其反应。反应后,在玻璃过滤器(TOP 公司制造 26G-2)上,以多孔性载体 40 倍体积量的 RO 水进行清洗,得到含有甲酰基的多孔性载体。按照上述方法测定制得的载体的甲酰基含量,结果显示:每 1mL 多孔性载体中的甲酰基含量为 $4 \mu\text{mol}$ 。

[0234] 在玻璃过滤器(TOP 公司制造的 26G-2)上,以 0.6M 柠檬酸三钠+0.2M 食盐的缓冲液(使用和光纯药工业公司制造的柠檬酸三钠二水合物、氯化钠和 RO 水制备)280mL 对 92.8mL 的上述含有甲酰基的多孔性载体进行置换。向置换后的该多孔性载体中加入 0.6M 柠檬酸三钠+0.2M 食盐的缓冲液,使其总量为 132mL,并将其加入可拆卸式烧瓶(TOP 公司制造 500mL)中。向其中加入含有蛋白质 A 的溶液(钟化公司制造的 PNXL30)14.06mL,该含有蛋白质 A 的溶液中的蛋白质 A 的浓度为 52.8mg/mL ,且其中的蛋白质 A 根据国际公开专利公报 W02006/004067 中记载的方法制备得到,加入 0.08M 的氢氧化钠水溶液(使用和光纯药工业公司制造的氢氧化钠和 RO 水配制而成),调节反应液的 pH 至 12,在 4°C 以 150 次/分搅拌 4 小时以使其反应。

[0235] 使用 0.1M 柠檬酸(使用和光纯药工业公司制造的柠檬酸一水合物与 RO 水配制而成)调节反应后的反应液 pH 至 7,然后加入二甲胺硼烷 408mg,以 150 次/分,分别在 40°C 搅拌 1 小时、然后在 25°C 搅拌 8 小时,以使其反应。反应后,测定反应液在 277nm 附近最大吸收处的吸光度,结果可知:每 1mL 多孔性载体中,亲和配位体即蛋白质 A 的固定化量为 7.6mg。

[0236] 在玻璃过滤器(TOP 公司制造 26G-2)上,以多孔性载体 10 倍体积量的 RO 水对反应后的多孔性载体进行清洗,然后,用 3 倍体积量的 0.1M 柠檬酸(使用和光纯药工业公司制造的柠檬酸一水合物和 RO 水配制而成)置换。然后向置换后的多孔性载体中加入 0.1M 柠檬酸,使其总量为 186mL,并加入至可拆卸式烧瓶(TOP 公司制造 500mL)中,以 150 次/分在 25°C 振荡 30 分钟的同时实施酸清洗。

[0237] 酸清洗后,在玻璃过滤器(TOP 公司制造 26G-2)上,以 3 倍体积量的 0.05M 氢氧化钠+1M 硫酸钠水溶液(使用和光纯药工业公司制造的氢氧化钠、硫酸钠和 RO 水配制而成)置换多孔性载体。然后,向置换后的多孔性载体中加入 0.05M 氢氧化钠+1M 硫酸钠水溶液,使其总量为 186mL,将其全部加入至可拆卸式烧瓶(TOP 公司制造 500mL)中,以 150 次/分在 25°C 振荡 20 分钟的同时实施碱清洗。

[0238] 碱清洗后,在玻璃过滤器(TOP 公司制造 26G-2)上,以 pH 为 6 的 0.5M 柠檬酸缓冲液(使用和光纯药工业公司制造的柠檬酸三钠二水合物、柠檬酸一水合物和 RO 水配制而成)278mL 置换多孔性载体,然后使用 RO 水进行清洗,直至清洗滤液的电导率为 $5 \mu\text{S/cm}$ 以

下。

[0239] 接着,使用 20% 乙醇水溶液(使用日本药局方的乙醇和 RO 水配制而成)置换多孔性载体,然后,使用 20% 乙醇水溶液将其加入到 250mL 的塑料容器(ポリ容器)(Sanplatec 公司制造)中,得到固定化了目标蛋白质 A 的吸附体。使用电导率计(EUTECH INSTRUMENTS 制造的 ECTestr10pure+)测定清洗滤液的电导率。

[0240] 选择人多克隆 IgG(Baxter 公司制造的 Gammagard)作为所得吸附体的目标物,按照下述方法求出动态吸附量和洗脱至目标物中的配位体的量,结果显示,IgG 动态吸附量(5%Dynamic binding capacity)为每 1mL 载体中 37mg。此外,泄漏至精制 IgG 中的配位体浓度为 24ppm。按照上述方法测定所得吸附体中甲酰基的含量,结果显示:每 1mL 多孔性载体中为 0.2 μ mol。

[0241] (实施例 17)

[0242] 除了使用实施例 14 中制备的多孔性载体以外,按照与实施例 16 相同的操作,得到目标吸附体。该 IgG 动态吸附量为:每 1mL 载体中为 37mg,泄漏至精制 IgG 中的配位体浓度为 22ppm。

[0243] (实施例 18)

[0244] 除了使用实施例 15 中制备的多孔性载体以外,按照与实施例 16 相同的操作,得到目标吸附体。该 IgG 动态吸附量为:每 1mL 载体中为 37mg,泄漏至精制 IgG 中的配位体浓度为 26ppm。

[0245] (实施例 19)

[0246] 除了使用 pH 为 2 的柠檬酸缓冲液(使用和光纯药工业公司制造的柠檬酸三钠二水合物、柠檬酸一水合物和 RO 水配制而成)来代替 pH 为 3 的柠檬酸缓冲液以外,按照与实施例 17 相同的操作来制备吸附体。此时,含有甲酰基的多孔性载体的甲酰基含量为:每 1mL 多孔性载体中为 6 μ mol,亲和配位体即蛋白质 A 的固定化量为:每 1mL 多孔性载体中为 7.2mg。此外,IgG 动态吸附量为 35mg,泄漏至精制 IgG 中的配位体浓度为 38ppm。

[0247] (实施例 20)

[0248] 除了使用 pH 为 5 的柠檬酸缓冲液(使用和光纯药工业公司制造的柠檬酸三钠二水合物、柠檬酸一水合物和 RO 水配制而成)来代替 pH 为 3 的柠檬酸缓冲液以外,按照与实施例 17 相同的操作来制备吸附体。此时,含有甲酰基的多孔性载体的甲酰基含量为:每 1mL 多孔性载体中为 4 μ mol,亲和配位体即蛋白质 A 的固定化量为:每 1mL 多孔性载体中为 6.5mg。此外,IgG 动态吸附量为 35mg,泄漏至精制 IgG 中的配位体浓度为 42ppm。

[0249] (实施例 21)

[0250] 在玻璃过滤器(TOP 公司制造的 26G-2)上,以 0.5M 柠檬酸三钠+0.15M 食盐的缓冲液(使用和光纯药工业公司制造的柠檬酸三钠二水合物、氯化钠和 RO 水配制而成)278mL,置换按照与实施例 1 相同的方法制备的 92.8mL 的含有甲酰基的多孔性载体。向置换后的含有甲酰基的多孔性载体中加入 0.5M 柠檬酸三钠+0.15M 食盐的缓冲液,使其总量为 130mL,并将其加入可拆卸式烧瓶(TOP 公司制造 500mL)中。向其中加入含有蛋白质 A 的溶液(钟化公司制造的 PNXL30)14.04mL,该含有蛋白质 A 的溶液中的蛋白质 A 的浓度为 52.85mg/mL,且其中的蛋白质 A 根据国际公开专利公报 W02006/004067 中记载的方法制备得到,加入 4M 的氢氧化钠水溶液(使用和光纯药工业公司制造的氢氧化钠和 RO 水配制而成),调节反

应液的 pH 至 11。然后,使用 pH 为 11 的 0.5M 柠檬酸三钠 +0.15M 食盐的缓冲液(使用和光纯药工业公司制造的柠檬酸三钠二水合物、氯化钠、氢氧化钠和 RO 水配制而成)调节反应液的总量为 168mL,在 4°C 以 150 次/分搅拌 12 小时以使其反应。

[0251] 反应后,使用 4M 盐酸(使用和光纯药工业公司制造的盐酸和 RO 水配制而成)调节反应液的 pH 至 6.8,然后加入硼氢化钠 263mg,在 4°C 以 150 次/分搅拌 1 小时以使其反应。反应后,测定反应液在 277nm 附近最大吸收处的吸光度,由此可知:每 1mL 多孔性载体中,亲和配位体即蛋白质 A 的导入量为 7.2mg。

[0252] 在玻璃过滤器(TOP 公司制造的 26G-2)上,以多孔性载体 10 倍体积量的 RO 水对反应后的多孔性载体进行清洗,然后将其全部装入可拆卸式烧瓶(TOP 公司制造 500mL)中,向其中加入 RO 水调节反应液总量为 168mL,然后,加入 263mg 的硼氢化钠,在 25°C 以 150 次/分搅拌 1 小时以使其反应。反应后,在玻璃过滤器(TOP 公司制造的 26G-2)上,以多孔性载体 10 倍体积量的 RO 水进行清洗,然后,用 3 倍体积量的 0.01M 盐酸(使用和光纯药工业公司制造盐酸和 RO 水配制而成)置换,然后,向置换后的多孔性载体中加入 0.01M 盐酸使其总量为 168mL,将其加入至可拆卸式烧瓶(TOP 公司制造 500mL)中,在 25°C 以 150 次/分振荡 30 分钟的同时实施酸清洗。

[0253] 酸清洗后,在玻璃过滤器(TOP 公司制造 26G-2)上,以多孔性载体 10 倍体积量的 RO 水对多孔性载体进行清洗,然后,用 3 倍体积量的 0.05M 氢氧化钠 +1M 硫酸钠水溶液(使用和光纯药工业公司制造的氢氧化钠、硫酸钠和 RO 水配制而成)置换。然后,向置换后的多孔性载体中加入 0.05M 氢氧化钠 +1M 硫酸钠水溶液使其总量为 168mL,将其全部加入至可拆卸式烧瓶(TOP 公司制造 500mL)中,在 25°C 以 150 次/分振荡 20 分钟的同时实施碱清洗。

[0254] 碱清洗后,在玻璃过滤器(TOP 公司制造的 26G-2)上,以 pH 为 6 的 0.01M 柠檬酸缓冲液(使用和光纯药工业公司制造的柠檬酸三钠二水合物、柠檬酸一水合物和 RO 水配制而成)278mL 对多孔性载体进行置换,然后,使用 RO 水进行清洗,直至清洗滤液的电导率达到 $5\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下。接着,使用 20% 乙醇水溶液(使用日本药局方的乙醇和 RO 水配制而成)置换多孔性载体,然后,使用 20% 乙醇水溶液将其加入至 250mL 的塑料容器(Sanplatec 公司制造)中,得到固定化了目标蛋白质 A 的吸附体。使用电导率计(EUTECH INSTRUMENTS 制造的 ECTestr10pure+)测定清洗滤液的电导率。

[0255] 选择人多克隆 IgG(Baxter 公司制造的 Gammagard)作为所得吸附体的目标物,求出动态吸附量和洗脱至目标物中的配位体的量,结果显示,IgG 动态吸附量(5%Dynamic binding capacity)为:第 1 次 36mg、第 2 次 36mg、第 3 次 37mg。此外,泄漏至精制 IgG 中的配位体浓度为:第 1 次 69ppm、第 2 次 47ppm、第 3 次 36ppm。

[0256] (实施例 22)

[0257] 除了使用 0.025M 磷酸 +1.5M 硫酸钠的缓冲液(使用和光纯药工业公司制造的 12 水合磷酸氢二钠、硫酸钠和 RO 水配制而成)来代替 0.5M 柠檬酸三钠 +0.15M 食盐的缓冲液,并使用 pH 为 11 的 0.025M 磷酸 +1.5M 硫酸钠的缓冲液(使用和光纯药工业公司制造的 12 水合磷酸氢二钠、硫酸钠、氢氧化钠和 RO 水配制而成)来代替 pH 为 11 的 0.5M 柠檬酸三钠 +0.15M 食盐的缓冲液以外,按照与实施例 21 相同的操作来制备吸附体。按照与实施例 2 相同的方法求出亲和配位体即蛋白质 A 的固定化量,结果为:每 1mL 多孔性载体中为 7.4mg。

[0258] (实施例 23)

[0259] 除了在实施例 21 中调节 pH 为 11 的操作中,将 pH11 改变为 pH12.5 以外,按照与实施例 21 相同的方法来制备吸附体。蛋白质 A 的固定化量为:每 1mL 多孔性载体中 6.0mg, IgG 动态吸附量 (5%Dynamic binding capacity) 为:第 1 次 33mg、第 2 次 33mg、第 3 次 33mg。此外,泄漏至精制 IgG 中的配位体的浓度为:第 1 次 35ppm。

[0260] (实施例 24)

[0261] 除了在实施例 21 中调节 pH 为 11 的操作中,将 pH11 改变为 pH13 以外,按照与实施例 21 相同的方法来制备吸附体。蛋白质 A 的固定化量为:每 1mL 多孔性载体中 4.0mg, IgG 动态吸附量 (5%Dynamic binding capacity) 为:第 1 次 28mg、第 2 次 33mg、第 3 次 33mg。此外,泄漏至精制 IgG 中的配位体的浓度为:第 1 次 23ppm。

[0262] (实施例 25)

[0263] 除了将实施例 21 中的调节 pH 为 11 的操作改变为 pH10 以外,按照与实施例 21 相同的方法来制备吸附体。蛋白质 A 的固定化量为:每 1mL 多孔性载体中 4.0mg, IgG 动态吸附量 (5%Dynamic binding capacity) 为 29mg。

[0264] (实施例 26)

[0265] 在玻璃过滤器 (TOP 公司制造的 26G-2) 上,以 0.6M 柠檬酸三钠 +0.2M 食盐的缓冲液 (使用和光纯药工业公司制造柠檬酸三钠二水合物、氯化钠和 RO 水配制而成) 280mL,置换按照与实施例 1 相同的方法制备的 92.8mL 的含有甲酰基的多孔性载体。向置换后的多孔性载体 F 中加入 0.6M 柠檬酸三钠 +0.2M 食盐的缓冲液,使其总量为 132mL,并加入到可拆卸式烧瓶 (TOP 公司制造 500mL) 中。向其中加入含有蛋白质 A 的溶液 (钟化公司制造的 PNXL30) 14.06mL,该含有蛋白质 A 的溶液中的蛋白质 A 的浓度为 52.8mg/mL,且其中的蛋白质 A 根据国际公开专利公报 W02006/004067 中记载的方法制备得到,加入 0.08M 的氢氧化钠水溶液 (使用和光纯药工业公司制造的氢氧化钠和 RO 水配制而成),调节反应后的反应液 pH 至 12,在 4°C 以 150 次/分搅拌 4 小时以使其反应。使用 0.1M 柠檬酸 (使用和光纯药工业公司制造柠檬酸一水合物和 RO 水配制而成) 调节反应后的反应液 pH 至 7。在同温度下继续搅拌 1 小时后,加入二甲胺硼烷 408mg,然后以 150 次/分分别在 4°C 搅拌 1 小时、然后在 25°C 搅拌 5 小时,同时使其反应。

[0266] 在玻璃过滤器 (TOP 公司制造的 26G-2) 上,以多孔性载体 10 倍体积量的 RO 水对反应后的多孔性载体进行清洗,然后,用 3 倍体积量的 0.1M 柠檬酸 (使用和光纯药工业公司制造的柠檬酸一水合物和 RO 水配制而成) 置换,然后,向置换后的多孔性载体中加入 0.1M 柠檬酸使其总量为 186mL,将其加入可拆卸式烧瓶 (TOP 公司制造 500mL) 中,以 150 次/分在 25°C 振荡 30 分钟的同时实施酸清洗。

[0267] 酸清洗后,在玻璃过滤器 (TOP 公司制造的 26G-2) 上,以 3 倍体积量的 0.05M 氢氧化钠 +1M 硫酸钠水溶液 (使用和光纯药工业公司制造氢氧化钠、硫酸钠和 RO 水配制而成) 置换多孔性载体。然后,向置换后的多孔性载体中加入 0.05M 氢氧化钠 +1M 硫酸钠水溶液使其总量为 186mL,将其全部加入至可拆卸式烧瓶 (TOP 公司制造 500mL) 中,以 150 次/分在 25°C 振荡 20 分钟的同时实施碱清洗。

[0268] 碱清洗后,在玻璃过滤器 (TOP 公司制造 26G-2) 上,以 pH 为 6 的 0.5M 柠檬酸缓冲液 (使用和光纯药工业公司制造的柠檬酸三钠二水合物、柠檬酸一水合物和 RO 水配制而

成) 278mL 置换多孔性载体。然后,使用 RO 水进行清洗,直至清洗滤液的电导率达到 $5 \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下。接着,使用 20% 乙醇水溶液(使用日本药局方的乙醇和 RO 水配制而成)置换多孔性载体,然后,使用 20% 乙醇水溶液将其加入到 250mL 的塑料容器(Sanplatec 公司制造)中,得到固定化了目标蛋白质 A 的吸附体。使用 RO 水进行清洗,直至清洗滤液的电导率达到 $5 \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下。接着,使用 20% 乙醇水溶液(使用日本药局方的乙醇和 RO 水配制而成)置换多孔性载体,然后,使用 20% 乙醇水溶液将其加入到 250mL 的塑料容器(Sanplatec 公司制造)中,得到固定化了目标蛋白质 A 的吸附体。使用电导率计(EUTECH INSTRUMENTS 制造的 ECTestr10pure+)测定清洗滤液的电导率。

[0269] 选择人多克隆 IgG(Baxter 公司制造的 Gammagard) 作为所得吸附体的目标物,求出动态吸附量和洗脱至目标物中的配位体的量,结果显示, IgG 动态吸附量(5%Dynamic binding capacity)为:每 1mL 载体中为 34mg。此外,泄漏至精制 IgG 中的配位体浓度为 30ppm。

[0270] (实施例 27)

[0271] 除了在使用 0.1M 柠檬酸调节 pH 至 7 后,将在同温度下继续搅拌的时间设定为 2 小时以外,按照与实施例 26 相同的操作得到吸附体。所得吸附体的 IgG 动态吸附量为:每 1mL 载体中为 36mg。

[0272] (实施例 28)

[0273] 除了在使用 0.1M 柠檬酸调节 pH 至 7 后,将在同温度下继续搅拌的时间设定为 4 小时以外,按照与实施例 26 相同的操作得到吸附体。所得吸附体的 IgG 动态吸附量为:每 1mL 载体中为 37mg,泄漏至精制 IgG 中的配位体浓度为 22ppm。

[0274] (实施例 29)

[0275] 除了在使用 0.1M 柠檬酸调节 pH 至 7 后,将在同温度下继续搅拌的时间设定为 6 小时以外,按照与实施例 26 相同的操作得到吸附体。所得吸附体的 IgG 动态吸附量为:每 1mL 载体中为 36mg,泄漏至精制 IgG 中的配位体浓度为 45ppm。

[0276] (实施例 30)

[0277] 除了使用 0.1M 柠檬酸调节 pH 至 7 后,将在同温度下继续搅拌的时间设定为 15 小时以外,按照与实施例 26 相同的操作得到吸附体。所得吸附体的 IgG 动态吸附量为:每 1mL 载体中为 37mg。

[0278] (实施例 31)

[0279] 在 pH12 的条件下使蛋白质 A 反应后,使用 1.6M 柠檬酸将 pH 调节为 3,然后将同温度下继续搅拌的时间设定为 4 小时,除此之外,按照与实施例 26 相同的操作得到吸附体。所得吸附体的 IgG 动态吸附量为:每 1mL 载体中为 36mg,泄漏至精制 IgG 中的配位体浓度为 30ppm。

[0280] (实施例 32)

[0281] 除了在刚刚使用 0.1M 柠檬酸调节 pH 至 7 之后加入二甲胺硼烷以外,按照与实施例 26 相同的操作得到吸附体。所得吸附体的 IgG 动态吸附量为:每 1mL 载体中 31mg,泄漏至精制 IgG 中的配位体浓度为 22ppm。

[0282] (实施例 33)

[0283] 使用 pH 为 3 的柠檬酸缓冲液(使用和光纯药工业公司制造的柠檬酸三钠二水合

物、柠檬酸一水合物和 RO 水配制而成) 282mL, 对在制造例 1 中制备的多孔性粒子 B 进行置换, 使用该缓冲液调节液体量, 此外, 将过碘酸钠设定为 0.16g, 除此之外, 按照与实施例 32 相同的操作得到吸附体。此时, 多孔性载体 E 中甲酰基的含量为: 每 1mL 多孔性载体中 $7 \mu\text{mol}$, 亲和配位体即蛋白质 A 的固定化量为: 每 1mL 多孔性载体中为 5.0mg。此外, IgG 的动态吸附量为 31mg, 泄漏至精制 IgG 中的配位体浓度为 36ppm。所得吸附体中甲酰基的含量为: 每 1mL 多孔性载体中为 $0.2 \mu\text{mol}$ 。

[0284] (比较例 4)

[0285] 不使用二甲胺硼烷, 按照与实施例 16 相同的操作得到吸附体。所得吸附体中甲酰基的含量为: 每 1mL 多孔性载体中为 $2 \mu\text{mol}$ 。此外, IgG 的动态吸附量为: 每 1mL 载体中为 27mg, 泄漏至精制 IgG 中的配位体浓度为 615ppm。