

(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
2012年6月21日(21.06.2012)



(10) 国際公開番号

WO 2012/081616 A1

- (51) 国際特許分類:
C08J 3/24 (2006.01) C08B 37/02 (2006.01)
B01J 20/281 (2006.01) C08B 37/08 (2006.01)
C08B 15/10 (2006.01) C08B 37/12 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01) C08J 3/14 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/078902
- (22) 国際出願日: 2011年12月14日(14.12.2011)
- (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 2010-278513 2010年12月14日(14.12.2010) JP
特願 2010-278514 2010年12月14日(14.12.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): JSR株式会社(JSR CORPORATION) [JP/JP]; 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 中村 聡(NAKAMURA, Satoshi) [JP/JP]; 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 JSR株式会社内 Tokyo (JP). 福田 哲夫(FUKUTA, Tetsuo) [JP/JP]; 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 JSR株式会社内 Tokyo (JP). 一久 和弘(IKKYU, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 JSR株式会社内 Tokyo (JP). 王 勇(WANG, Yong) [CN/JP]; 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 JSR株式会社内 Tokyo (JP). 川井 洋(KAWAI, Hiroshi) [JP/JP]; 〒1058640

東京都港区東新橋一丁目9番2号 JSR株式会社内 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所(THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番8号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING POLYMER PARTICLES, AND POLYMER PARTICLES

(54) 発明の名称: 高分子粒子の製造方法、及び、高分子粒子

(57) Abstract: Provided is a method for producing crosslinked polymer particles or polysaccharide compound particles, which have excellent resistant to fast flow rates and can therefore be used under fast flow rates when employed for a chromatography filler, and which also have a high binding capacity with target molecules, such as protein molecules, when an appropriate ligand has been introduced. These crosslinked polymer particles or polysaccharide compound particles are used for a chromatography filler or adsorbent for antibody purification. The production method comprises the following steps (1) through (3): (1) a step for preparing a polysaccharide solution in which two or more types of polysaccharides are dissolved in an ionic liquid; (2) a step for preparing a liquid droplet dispersion of the polysaccharide solution in which liquid droplets of the polysaccharide solution are dispersed in an organic solvent having low compatibility with the ionic liquid; and (3) a coagulation step in which the compound polysaccharide is caused to coagulate to obtain the polysaccharide compound particles.

(57) 要約: クロマトグラフィー用充填剤として使用した場合に、高流速下で使用できる優れた耐流速性を有し、且つ、適当なリガンドが導入された場合には、タンパク質等の目標分子に対する高い結合容量を併せ持つ架橋高分子粒子又は多糖複合粒子の製造方法、並びに、当該架橋高分子粒子又は多糖複合粒子を用いたクロマトグラフィー用充填剤又は抗体精製用吸着体であって、当該製造方法は下記の工程(1)～(3)を含む。(1)イオン液体に二種以上の多糖類を溶解する多糖類溶液の調製工程(2)前記多糖類溶液の液滴を前記イオン液体と相溶性の低い有機溶剤中に分散させる多糖類溶液の液滴分散液の調製工程(3)複合化された多糖を凝固させて当該多糖複合粒子を得る凝固工程

WO 2012/081616 A1

明 細 書

発明の名称： 高分子粒子の製造方法、及び、高分子粒子

技術分野

[0001] 本発明は、高分子粒子の製造方法、及び当該高分子粒子に関する。更には、多糖複合粒子の製造方法、及び当該多糖複合粒子、並びに架橋高分子粒子の製造方法、及び当該架橋高分子粒子に関する。

背景技術

[0002] 近年、抗体医薬等に代表されるバイオ医薬品の分野では、タンパク質等の目的物質の発現技術が著しく進展している。それに伴い、クロマトグラフィー等による精製工程での生産性の向上が求められている。

蛋白質などの生体高分子の精製を高効率に行うため、クロマトグラフィー用担体には、高流速での使用を可能にする高い耐圧性能、リガンドを導入した場合の生体高分子に対する高い結合容量が求められる。従来、クロマトグラフィー用担体として、シリカのような無機材料、ポリ（メタ）アクリルエステル類、ポリ（メタ）アクリルアミド類等の合成ポリマー、もしくは多糖類のような天然ポリマー等が用いられている。

[0003] シリカ粒子及び合成ポリマー粒子は強度が大きく、従って高流速での使用に適している。しかしながら、リガンド等を導入した場合に生体高分子の結合容量が小さい傾向があり、また担体を洗浄するために利用されるアルカリ性溶液に対して耐性が低いという欠点を有する。さらに、合成ポリマー粒子は一般にある程度の疎水性を有するため、非特異的な相互作用を生じやすく、結果として不純物の混入の原因となる。

[0004] 天然ポリマーとしては、通常アガロース、セルロースのような多糖類が用いられる。例えば、アガロースは高温で水に溶解させることができ、次いである温度（ゲル化点）に冷却すると多孔質ゲルを形成することから、アガロースが溶解した水相を有機溶剤に分散させて液滴を形成した後、ゲル化点以下に冷却することにより、アガロースゲル粒子が製造できる。

[0005] また、セルロースについては、セルロースを溶解－再生して多孔質ゲル粒子とする方法として、チオシアン酸カルシウム水溶液への溶解を経る方法（特許文献１）、ジメチルアセトアミド又はＮ－メチルピロリドンの塩化リチウム溶液への溶解を経る方法（特許文献２）、イオン液体への溶解を経る方法（非特許文献１）などが報告されている。

[0006] 斯かる多糖類ゲル粒子は分子中に多数の水酸基を含んでいるため、その表面は高い親水性を有している。従って、基本的に生体物質との非特異的な相互作用を生じないため、目的分子が高い精製度で得られる傾向がある。また一般に、シリカや合成ポリマー等から成る担体と比較して、生体分子に対する結合容量や、クロマトグラフィー用充填剤の洗浄に汎用されるアルカリ性溶液に対する耐性に優れている。

[0007] しかしながら、多糖類ゲル粒子をクロマトグラフィー用充填剤の担体として用いる場合には、一般にシリカ粒子もしくは合成ポリマー粒子と比較して機械的強度が小さい傾向があり、その結果、高流速で使用すると、カラム内で粒子が変形することで流路が失われ、結果としてカラムの背圧が限りなく上昇する圧密化が生じやすい傾向があり、耐流速性に劣るという問題がある。

以上のように、クロマトグラフィー用担体の各材料にはそれぞれ欠点がある。

[0008] 近年、それらの欠点を克服するための様々な技術が提案されている。例えば、シリカの表面を疎水性シロキサン化合物により被覆することで、アルカリに対する耐性を付与すること（特許文献７）、嵩高く疎水性の高い脂肪族置換基を含有するモノマーエステルで粒子を形成したのち、アルカリ条件下、ビスもしくはポリエポキシド類で粒子表面を修飾して親水性を付与すること（特許文献８）が報告されている。

[0009] 一方、天然ポリマーについては、多糖類ゲル粒子の機械的強度及び耐流速性を向上させる最も一般的な方法は、粒子形成後に多糖類ゲル粒子を架橋することである。斯かる架橋は多糖類ゲル粒子内部の水酸基間で起こり、一般

にエピクロロヒドリンなどの架橋剤を用いることにより行われる。架橋形成についてはこれまでに種々の改良法が報告され、例えば、6－12鎖長の二官能性又は多官能性架橋剤で架橋した後に、2－5鎖長の二官能性架橋剤で架橋することにより、架橋アガロースゲル粒子の機械的強度を改善できること（特許文献3）、架橋アガロース粒子の表面にデキストランを導入し、さらに陽イオン交換基導入のためにスルホン酸ビニルを反応させて、結合容量が向上した陽イオン交換粒子を得ること（特許文献9）等が報告されている。

また、セルロースゲル粒子を官能基間に水酸基が存在している架橋剤を用いて架橋することにより、適度な圧縮応力を有する多孔質担体を得ることができること（特許文献4）、セルロースゲル粒子を含む懸濁液に対して架橋剤とアルカリ溶液を逐次投入することにより、架橋剤全量を一度に投入する場合と比較して優れた耐流速性を有するセルロースゲル粒子が得られること（特許文献5）等が報告されている。

[0010] また、粒子内部をより効率的に架橋する方法としては、原料となる多糖類にあらかじめ官能基を導入したうえで粒子を形成し、その後該官能基を活性化して多糖鎖間を架橋する方法がある。この方法によれば、粒子形成後に架橋する方法と比較して、架橋剤が入り込みづらい微細な構造中も架橋を施すことが可能となり、従ってより高い機械的強度が得られると期待される。例えば、特許文献6には、アガロースをアリルグリシジルエーテルのエポキシ基と反応させてゲル粒子を形成した後、アリルグリシジルエーテルのアリル基を活性化して、該多糖類と架橋させることにより、架橋アガロースゲル粒子の機械的強度を改善できることが記載されている。しかしながら、当該技術ではアガロースの修飾から架橋に至るまでに多段階の反応工程を必要とし操作が煩雑である。また水中でアガロースとアリルグリシジルエーテルのエポキシ基とを反応させるために、反応系中の水によるエポキシ基の不活性化が起こり、反応効率が低くなる欠点がある。

[0011] このように、高分子粒子を担体とするクロマトグラフィー用充填剤の製造

に利用できる技術は多数存在するが、精製対象物質に対する高い結合容量と、高流速での処理を可能とする高い耐圧性能を両立するクロマトグラフィー用担体を製造する技術は、未だ十分に確立されてはいない。近年のバイオ医薬品市場の拡大に伴って、目標物質の精製工程における高速処理に対するニーズは急速に高まっており、当技術分野ではさらに高い耐流速性と結合容量を併せ持つクロマトグラフィー用充填剤の製造方法が強く求められている。

先行技術文献

特許文献

- [0012] 特許文献1：特許第3601229号公報
特許文献2：特許第3663666号公報
特許文献3：特開昭60-39558号公報
特許文献4：特開2008-279366号公報
特許文献5：特開2009-242770号公報
特許文献6：特許第4081143号公報
特許文献7：特開2010-52986号公報
特許文献8：国際公開第2006/1323330号パンフレット
特許文献9：特表2009-506340号公報

非特許文献

- [0013] 非特許文献1：J.Chromatogr.A 1217(2010), 1298-1304

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0014] 本発明が解決しようとする課題は、クロマトグラフィー用充填剤として使用した場合に、高流速下で利用できる、すなわち大量処理に適した優れた耐流速性を有し、且つ、適当なりガンドが導入された場合には、タンパク質等の目標分子に対する高い結合容量を併せ持つ、高分子粒子及びその製造方法、具体的には架橋高分子粒子及びその製造方法、多糖複合粒子及びその製造方法、当該高分子粒子を用いたクロマトグラフィー用充填剤、抗体精製用吸

着体等を提供することである。

課題を解決するための手段

[0015] 本発明者らは鋭意検討した結果、イオン液体に溶解した高分子を、前記イオン液体と相溶性の低い有機溶剤中で液滴分散させる手法を用いること、具体的には、(A) イオン液体中で二種類以上の多糖類を溶解し、これを該溶液と相溶性の低い有機溶剤に液滴分散させた後、多糖類を複合粒子として凝固させること、或いは(B) イオン液体に溶解した高分子を、前記イオン液体と相溶性の低い有機溶剤中で液滴分散させながら架橋剤と反応させるという方法を採用することにより、前記課題を解決できることを見いだした。

[0016] すなわち、本発明は以下の1)～20)に係るものである。

1) 下記の工程(1)～(3)：

(1) イオン液体に二種以上の多糖類を溶解する多糖類溶液の調製工程、

(2) 前記多糖類溶液の液滴を前記イオン液体と相溶性の低い有機溶剤中に分散させる多糖類溶液の液滴分散液の調製工程、及び、

(3) 複合化された多糖を凝固させて当該多糖複合粒子を得る凝固工程、を含むことを特徴とする多糖複合粒子の製造方法。

2) 多糖類がセルロース、アガロース、プルラン、デキストランから選ばれる二種以上である、上記1)の製造方法。

3) 多糖類のうち少なくとも一種がセルロースである、上記1)又は2)の製造方法。

4) イオン液体がアルキルイミダゾリウム塩である、上記1)～3)の製造方法。

5) イオン液体が酢酸1-エチル-3-メチルイミダゾリウム、1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムクロリド又はそれらの混合物である上記1)～4)の製造方法。

6) 前記工程(2)において、多糖類溶液の液滴分散が、前記イオン液体と相溶性の低い有機溶剤及び親油性高分子を含む溶液を前記多糖類溶液と混合することにより行われる、上記1)～5)の製造方法。

7) 上記1)～6)の製造方法によって製造された多糖複合粒子。

8) 内径0.5 cmのカラムに高さ20.0 cmまで充填した場合、25℃の水を流したときのカラム圧力0.4 MPaにおける線流速が1600～6000 cm/時間である、上記7)の多糖複合粒子。

9) 上記7)又は8)の多糖複合粒子を含むクロマトグラフィー用充填剤。

10) 上記7)又は8)の多糖複合粒子を用いた抗体精製用吸着体。

11) アフィニティーリガンドとしてプロテインAが導入された、上記10)の抗体精製用吸着体。

12) イオン液体に溶解した高分子を、前記イオン液体と相溶性の低い有機溶剤中で液滴分散させながら架橋剤と反応させる工程を含むことを特徴とする、架橋高分子粒子の製造方法。

13) 分散液にイオン液体に相溶し且つ実質的に該高分子を溶解しない媒体を加え、液滴を凝固させる工程をさらに含む、上記12)の方法。

14) 高分子が、多糖類、及びそれらの誘導体から選ばれる1種又は2種以上である、上記12)又は13)の方法。

15) 多糖類が、セルロース、アガロース、キトサン、デキストラン、プルラン及びそれらの誘導体から選ばれる1種又は2種以上である、上記14)の方法。

16) 多糖類が、少なくともセルロース又はその誘導体を含む、上記15)の方法。

17) 架橋剤がハロヒドリン類、ビスエポキシド類、ポリエポキシド類及びジビニルスルホンから選ばれる1種又は2種類以上である上記12)～16)の方法。

18) 上記12)～17)の方法により製造される架橋高分子粒子。

19) 内径0.5 cmのカラムに高さ20.0 cmまで充填して25℃の水を流したときのカラム圧力0.4 MPaにおける線流速が1600～6000 cm/時間である、上記18)の架橋高分子粒子。

20) 上記18)又は19)の架橋高分子粒子を用いたクロマトグラフィー用充填剤。

21) 上記18)又は19)の架橋高分子粒子を用いた抗体精製用吸着体。

22) アフィニティーリガンドとしてプロテインAが導入された、上記21)の抗体精製用吸着体。

発明の効果

[0017] 本発明によれば、リガンド等を導入した場合に蛋白質等の吸着容量が高く、クロマトグラフィー用粒子として高流速で使用可能な高分子粒子（多糖複合粒子、架橋高分子粒子）の製造方法、当該高分子粒子、クロマトグラフィー用充填剤、及び、抗体精製用吸着体を提供することができる。

そのため、バイオ医薬品等の精製工程での生産性を格段に向上させることが可能となる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]高分子粒子の耐流速性を示すグラフ。

発明を実施するための形態

[0019] 本明細書中、数値範囲を表す「A～B」は、「A以上、B以下」と同義であり、A及びBを数値範囲内に含む。

本発明において、「イオン液体」としては、原料とする本発明の高分子や多糖類を均一に溶解できるイオン液体であれば特に制限はない。ここで、「高分子や多糖類を均一に溶解できる」とは、例えばイオン液体に、3質量％溶液となる分量で高分子や多糖類を混合し、目視で溶解を確認できることが挙げられる。なお、前記の通り溶解すればその温度は問わないが、セルロースの熱分解の抑制の点から150℃以下で溶解するものが好ましい。

[0020] 斯かるイオン液体としては、カチオン成分とアニオン成分とから構成され、融点が200℃以下のものが好ましく、100℃以下のものがより好ましく、50℃以下のものがさらに好ましい。また、融点の下限としては、限定されるものではないが、-100℃以上が好ましく、-30℃以上がより好ましい。

[0021] カチオン成分としては、アルキル又はアルケニルイミダゾリウムカチオン、アルキル又はアルケニルピリジニウムカチオン、アルキル又はアルケニルアンモニウムカチオン、アルキル又はアルケニルフォスフォニウムカチオン、アルキル又はアルケニルスルフォニウムカチオン、N，N－ジアルキルピロリジニウムカチオン、N，N－ジアルキルピペリジニウムカチオン、N，N－ジアルキルモルフォルニウムカチオン等が挙げられる。このうち好適にはアルキルイミダゾリウムカチオン、アルキルピリジニウムカチオン、アルキルアンモニウムカチオンが挙げられる。ここで、「アルキル」とは、炭素数1～12の直鎖又は分岐のアルキル基が挙げられ、このうち炭素数1～8の直鎖アルキル基が好ましく、特に、メチル基、エチル基、n－プロピル基、n－ブチル基、n－ペンチル基等の炭素数1～5の直鎖アルキル基が好適である。また、「アルケニル」としては、炭素数2～8のアルケニル基が好ましく、アリル基がさらに好ましい。

[0022] カチオン成分としては、具体的には、N－メチルイミダゾリウムカチオン、N－エチルイミダゾリウムカチオン、1，3－ジメチルイミダゾリウムカチオン、1，3－ジエチルイミダゾリウムカチオン、1－エチル－3－メチルイミダゾリウムカチオン、1－プロピル－3－メチルイミダゾリウムカチオン、1－ブチル－3－メチルイミダゾリウムカチオン、1－ヘキシル－3－メチルイミダゾリウムカチオン、1，2，3－トリメチルイミダゾリウムカチオン及び1，2，3，4－テトラメチルイミダゾリウムカチオン、1－アリル－3－メチルイミダゾリウムカチオン、N－プロピルピリジニウムカチオン、N－ブチルピリジニウムカチオン、1，4－ジメチルピリジニウムカチオン、1－ブチル－4－メチルピリジニウムカチオン及び1－ブチル－2，4－ジメチルピリジニウムカチオン、トリメチルアンモニウムカチオン、エチルジメチルアンモニウムカチオン、ジエチルメチルアンモニウムカチオン、トリエチルアンモニウムカチオン、テトラメチルアンモニウムカチオン、トリエチルメチルアンモニウムカチオン、テトラエチルアンモニウムカチオン等が挙げられるが、このうち、1，3－ジメチルイミダゾリウムカチ

オン、1, 3-ジエチルイミダゾリウムカチオン、1-エチル-3-メチルイミダゾリウムカチオン、1-プロピル-3-メチルイミダゾリウムカチオン、1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムカチオン、1-ヘキシル-3-メチルイミダゾリウムカチオン等のジアルキルイミダゾリウムカチオンがより好ましく、1-エチル-3-メチルイミダゾリウムカチオン、1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムカチオンが更に好ましい。

[0023] アニオン成分としては、ハロゲン化物イオン (Cl^- 、 Br^- 、 I^- 等)、カルボン酸アニオン (例えば総炭素数1~3の $\text{C}_2\text{H}_5\text{CO}_2^-$ 、 CH_3CO_2^- 、 HCO_2^- 等)、擬ハロゲン化物イオン (例えば、一価でありハロゲン化物に類似した特性を有する CN^- 、 SCN^- 、 OCN^- 、 ONC^- 、 N_3^- 等)、スルホン酸アニオン、有機スルホン酸アニオン (メタンスルホン酸アニオン等)、リン酸アニオン (エチルリン酸アニオン、メチルリン酸アニオン、ヘキサフルオロリン酸アニオン等)、ホウ酸アニオン (テトラフルオロホウ酸アニオン等)、過塩素酸アニオン等が挙げられ、ハロゲン化物イオン、カルボン酸アニオンが好ましい。

[0024] 本発明のイオン液体としては、多糖類の溶解性、融点、粘度等の観点から、好適には、アルキルイミダゾリウム塩、ジアルキルイミダゾリウム塩が挙げられ、より好適にはアルキルイミダゾリウムアセテート、アルキルイミダゾリウムクロリド、更に好適にはジアルキルイミダゾリウムアセテート、ジアルキルイミダゾリウムクロリド、更に好適には、1-エチル-3-メチルイミダゾリウムアセテート、1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムクロリドが挙げられる。

[0025] 本発明において、「多糖類」としては、その由来は特に制限はなく、天然多糖、合成多糖の何れでもよい。

具体的には、セルロース、アガロース、キチン、キトサン、デキストラン、プルラン、デンプン、グアーガム、カラギナン、アルギン酸、アラビアガム、アラビノガラクトン、ペクチン、ローカストビーンガム、タラガム、タマリンドシードガム、サイリウムシードガム、カシアガム、グルコマンナン

、キサンタンガム、ジェランガム、カードラン、イヌリン、シクロデキストリン等が挙げられ、このうち好適な多糖類としては、セルロース、アガロース、プルラン、デキストランが挙げられる。

[0026] なお、イオン液体に溶解する限りにおいて、一部に官能基が導入された多糖類も使用でき、斯かる誘導体としては、例えば、多糖類の水酸基の一部がエステル化されたもの（エステル誘導体）、多糖類の水酸基がエーテル化されたもの（エーテル誘導体）が挙げられる。具体的には、セルロースを例にとると、例えば、酢酸セルロース、プロピオン酸セルロース、ニトロセルロース、りん酸セルロース、酢酸酪酸セルロース、硝酸セルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ベンジルセルロース、トリチルセルロース、シアノエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシエチルセルロース、アミノエチルセルロース、オキシエチルセルロース等が挙げられる。

[0027] 本発明において、「イオン液体と相溶性の低い有機溶剤」（以下、単に「有機溶剤」とも称する）とは、イオン液体と有機溶剤とを体積比で1：1で混合した際に、イオン液体と有機溶剤との間に界面が形成される有機溶剤を意味する。

[0028] ここで用いられる有機溶剤は、分散媒となるものであるが、前記イオン液体と相溶性の低いものであればその種類は限定されず、例えば、*n*-ヘキサン、*n*-ヘプタン、流動パラフィン等の脂肪族炭化水素、シクロヘキサン、メチルシクロヘキサン、シクロヘプタン、メチルシクロヘプタン等の脂環式炭化水素、ベンゼン、トルエン、キシレン、ジクロロベンゼン等の芳香族炭化水素等を挙げることができ、それらは、それぞれ単独で用いてもよく、2種以上を混合して用いてもよい。好ましくは芳香族炭化水素が挙げられ、より好ましくはトルエンが挙げられる。

[0029] 本発明において、液滴分散工程で使用される「界面活性剤」としては、表面張力を減ずる作用を有し、分子内に疎水性部位と親水性部位をもつ有機化合物であって、高分子溶液を液滴の状態を安定に保ったまま分散できるもの

あれば特に限定されない。

[0030] 当該界面活性剤としては、公知の脂肪酸ナトリウム、脂肪酸カリウム、アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム、アルキル硫酸エステルナトリウム、アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム、アルファオレフィンスルホン酸ナトリウム、アルキルスルホン酸ナトリウム等の陰イオン界面活性剤；アルキルアミノ脂肪酸ナトリウム、アルキルベタイン、アルキルアミノオキシド等の両性界面活性剤；

しょ糖脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエステル、脂肪酸アルカノールアミド、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンプロピレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンプロピレン脂肪酸エステル等のノニオン系の界面活性剤；

等が挙げられる。

これらのうちノニオン系の界面活性剤が好ましく、特に好ましくはソルビタンモノオレエート（SPAN 80）、ソルビタントリオレエート（SPAN 85）である。

[0031] 同様に、液滴分散工程で使用される「親油性高分子」としては、本発明の高分子溶液を液滴の状態を安定に保ったまま分散できるものあれば特に限定されないが、有機溶剤に溶解して粘度を上昇させ、増粘剤として公知の親油性高分子を用いるのが好ましい。斯かる増粘剤としては、例えば、セルロース誘導体等の多糖類誘導体、親油性ビニル誘導体、親油性アクリル酸系ポリマー等が挙げられる。

[0032] 上記セルロース誘導体の具体例としては、メチルセルロース、エチルセルロース、酢酸セルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース等が挙げられ、親油性ビニル誘導体としては、ポリ酢酸ビニル、ポリ塩化ビニル等が挙げられ、親油性アクリル酸系ポリマーとしては、アクリル酸エチル・メタクリル酸メチル・メタクリル酸塩化トリメチルアンモニ

ウムエチル共重合体、メタクリル酸メチル・アクリル酸エチル共重合体等が挙げられる。

これらのうち、セルロース誘導体が好ましく、とりわけエチルセルロースが好ましい。

上記親油性高分子は、１種のみを使用することができるが、２種以上を併用することもできる。

[0033] 以下、本発明の多糖複合粒子の製造方法、及び架橋高分子粒子の製造方法について、工程ごとに説明する。

(A) 多糖複合粒子の製造方法

本発明の多糖複合粒子の製造方法は、（１）イオン液体に二種類以上の多糖類を溶解する多糖類溶液の調製工程、（２）前記多糖類溶液の液滴を前記イオン液体と相溶性の低い有機溶剤中に分散させる多糖類溶液の液滴分散液の調製工程、及び、（３）複合化された多糖を凝固させて当該多糖複合粒子を得る凝固工程、を含むことを特徴とする。

[0034] （１）多糖類溶液の調製工程

本発明の多糖複合粒子の製造方法は、イオン液体に二種以上の多糖類を溶解する多糖類溶液の調製工程を含む。

本工程では、原料多糖類（原料として使用する多糖類。以下、単に「多糖類」ともいう。）をイオン液体に溶解して多糖類溶液が調製される。多糖類は、上述した有機溶剤に溶解しないか、有機溶剤に難溶性のものが好ましい。有機溶剤に難溶性のものとは、室温（２５℃）で、有機溶剤１００ｇに溶ける多糖類の質量（ｇ）が１ｇ以下であることを意味する。

[0035] 本発明において用いられる多糖類としては、上述したとおりであり、その２種以上が選択して使用されるが、好適な多糖類としては、セルロース、アラギロース、プルラン、デキストランが挙げられ、少なくとも１種がセルロースであるのが好ましい。

[0036] ２種以上の多糖類の混合比率は、特に限定されないが、最も少ない糖種が、糖総重量に対し０．５％以上であるのが好ましい。

また、セルロースを含む場合には、セルロースの含有量が、糖総重量に対し5%以上であるのが好ましく、20%以上であるのがより好ましく、50%以上であるのがさらに好ましい。

[0037] 使用されるイオン液体は上述したとおりであり、原料多糖類のイオン液体への溶解は、用いる多糖類及びイオン液体の種類によっても異なるが、通常、10～250℃、好適には25～120℃で、1～24時間程度、攪拌下に行うのが好ましい。

ここで、イオン液体は、溶液の粘度上昇による液滴の形成の困難性、及び多糖濃度低下による液滴形成時の微小粒子の多発を抑制する点から、溶液中の総多糖濃度が3～50質量%、好ましくは6～30質量%となるように用いるのが好ましい。

尚、原料多糖類のイオン液体への溶解濃度により、得られる多糖粒子の細孔径が変化する。すなわち、原料多糖類の溶解濃度が濃いほど多糖粒子の細孔径が小さくなる傾向がある。従って、上記の範囲内において、総多糖類濃度を調整することにより、任意の細孔径をもつ多糖粒子を得ることができる。尚、本発明の多糖粒子において細孔径に特に制限はないが、一般にクロマトグラフィー用充填剤として用いられる場合には数nm～数μm程度が好ましい。

[0038] (2) 多糖類溶液の液滴分散液の調製工程

本発明の多糖複合粒子の製造方法は、前記多糖類溶液の液滴を前記イオン液体と相溶性の低い有機溶剤中に分散させる多糖類溶液の液滴分散液の調製工程を含む。

本工程では、上記の如く調製された多糖類溶液を、イオン液体と相溶性の低い有機溶剤（以下、単に「有機溶剤」とも称する）中に分散させて、多糖類溶液の液滴分散液が調製される。

ここで、「イオン液体と相溶性の低い有機溶剤」は上述したとおりであり、その使用量は、多糖粒子の粒子径等を考慮して適宜決定すればよいが、イオン液体100質量部に対して好ましくは、50～2000質量部、更に好

ましくは50～500質量部である。

[0039] 多糖類溶液を有機溶剤中に液滴分散させる方法は、特に限定されるものではないが、例えば、多糖類溶液と有機溶剤とを、界面活性剤及び／又は親油性高分子と共に混合・攪拌することにより行うことができる。

[0040] ここで用いられる界面活性剤及び親油性高分子は、上述したとおりであり、その使用量は、多糖類に対する分散性能やイオン液体の性質を考慮して適宜選択され得るが、例えば有機溶剤100質量部に対して、好ましくは1質量部～100質量部、より好ましくは1質量部～25質量部である。

[0041] 多糖類溶液、有機溶剤、並びに、界面活性剤及び／又は親油性高分子の混合順序は、特に制限はないが、有機溶剤と界面活性剤及び／又は親油性高分子との混合液を、多糖類溶液に混合するのが好ましい。

[0042] 液滴の形成法としては、スタティックミキサー等の攪拌機を使用する等、公知の方法で行うことができる。攪拌時の回転数により多糖類の粒子径を制御できる。すなわち、回転数が大きいほど形成される液滴の径が小さくなることから、目的とする粒子径に応じて適宜混合器の回転速度を調節すれば良い。液滴形成時の温度は多糖類が分解せず、析出しない温度であればよいが、好ましくは室温～100℃である。

[0043] (3) 多糖複合粒子の凝固工程

本発明の多糖複合粒子の製造方法は、複合化された多糖を凝固させて当該多糖複合粒子を得る凝固工程を含む。

「複合化された多糖」とは、前記二種以上の多糖類を混合して含む多糖を意味し、「多糖複合粒子」とは、前記二種以上の多糖類を含む粒子を意味する。

本工程では、多糖類溶液の液滴分散液から多糖複合粒子を凝固させるが、斯かる方法としては、例えば、当該多糖類溶液の液滴分散液に、イオン液体に相溶し且つ実質的に多糖類を溶解しない媒体を接触させる方法が挙げられる。

[0044] ここで、「イオン液体に相溶し且つ実質的に多糖類を溶解しない媒体」と

は、常温でイオン液体と体積比で 1 : 1 で混合した際に均一に混和し、また常温で媒体 100 g に溶ける該高分子の質量が 1 g 以下であることを意味する。斯かる媒体としては、例えば、水、メタノール、エタノール等の極性溶剤の 1 種又は 2 種以上を挙げることができる。

媒体は直接多糖類溶液の液滴分散液に添加してもよいが、多糖類溶液の液滴の形状を保ったまま多糖複合体を凝固させることができる方法が好ましい。具体的にはイオン液体と相溶性の低い有機溶剤と、水、メタノール、エタノール等の媒体とを混合・攪拌して媒体の分散液を調製後、多糖類溶液の液滴分散液に接触させる方法を挙げることができる。このときの有機溶剤は多糖類溶液の分散媒と同種のものであることが好ましく、液滴形成のために界面活性剤及び／又は親油性高分子を含んでいてもよい。

[0045] 当該媒体の使用量は、イオン液体 100 質量部に対して、好ましくは、20～2,000 質量部、より好ましくは 50～200 質量部である。

[0046] 多糖類溶液の液滴分散液と前記媒体との接触は、0～100℃、好適には 25～80℃で行うことが好ましい。

[0047] 斯くして凝固した多糖複合粒子は、遠心分離、濾過、デカンテーション等公知の方法により固液分離することにより回収することができる。また、回収した多糖複合粒子はイオン液体及び上記有機溶剤に相溶性の溶媒、例えばエタノール、イソプロパノール、ブタノール等で洗浄され、次いで水洗浄を行うことにより精製される。

[0048] 斯くして、本発明の方法によれば、二種以上の多糖類により形成される粒子を安定的に製造することができる。尚、その粒子径は、既に述べたように、任意に調整することができるが、体積平均粒径は、クロマトグラフィー用担体として用いた場合の、高流速下での圧力の上昇及び蛋白質結合容量の低下等を考慮すると、20～300 μm であるのが好ましく、30～150 μm とするのがより好ましい。

後記実施例に示すとおり、本発明の多糖複合粒子を、クロマトグラフィー用担体として容器に充填し、適切な線速度で通液した場合、セルロース粒子

を用いた場合に比べ親和性物質等の動的結合容量が低下しにくいという性質を有する（試験例 A 1）。

[0049] (B) 架橋高分子粒子の製造方法

本発明の架橋高分子粒子の製造方法は、イオン液体に溶解した高分子を、前記イオン液体と相溶性の低い有機溶剤中で液滴分散させながら架橋剤と反応させ、形成された粒子を分離することを特徴とするものである。

[0050] 本発明において、原料高分子（原料として使用する高分子。以下、単に「高分子」ともいう。）としては、特に制限はないが、上述した有機溶剤に溶解しないか、有機溶剤に難溶性のものが好ましい。有機溶剤に難溶性のものは、室温（25℃）で、有機溶剤100gに溶ける高分子の質量（g）が1g以下であることを意味する。

[0051] 好適な高分子としては、例えば、多糖類、及びこれと類似した性質を有する、ポリビニルアルコール、ポリエチレンイミン、ポリビニルアミン等の水溶性直鎖状有機高分子が挙げられる。

多糖類としては、前述したものが挙げられ、それらを単独で、或いは複数を混合して用いることができる。好適な多糖類としては、セルロース、アガロース、キトサン、デキストラン、プルランが挙げられ、中でも、生体高分子の高結合容量と低非特異吸着性の観点から、セルロース、アガロースを主成分とするのが好ましく、さらに耐圧性の観点から、セルロースを主成分とするのが好ましい。

[0052] 上記原料高分子をイオン液体に溶解し、高分子のイオン液体溶液が調製される。

使用されるイオン液体は上述したとおりであり、原料高分子の上記イオン液体への溶解は、用いる多糖類及びイオン液体の種類によっても異なるが、通常、10～250℃、好適には25～120℃で、1～24時間程度、攪拌下に行うのが好ましい。

ここで、イオン液体は、溶液の粘度上昇による液滴の形成の困難性、及び高分子の濃度低下による液滴形成時の微小粒子の多発を抑制する点から、溶

液中の総高分子濃度が3～50質量%、好ましくは6～30質量%となるように用いるのが好ましい。

尚、原料高分子のイオン液体への溶解濃度により、得られる粒子の細孔径が変化する。すなわち、高分子の溶解濃度が濃いほど粒子の細孔径が小さくなる傾向がある。従って、上記の範囲内において、総高分子濃度を調整することにより、任意の細孔径をもつ粒子を得ることができる。尚、本発明の架橋高分子粒子において細孔径に特に制限はないが、一般にクロマトグラフィー用充填剤として用いられる場合には数nm～数μm程度が好ましい。

[0053] 上記の如く調製された高分子のイオン液体溶液は、前記イオン液体と相溶性の低い有機溶剤（以下、単に「有機溶剤」とも称する）に加えられ、懸濁、分散される。この際に高分子と架橋剤とを反応させる。

[0054] ここで、「イオン液体と相溶性の低い有機溶剤」は上述したとおりであり、有機溶剤の使用量は、高分子粒子の粒子径等を考慮して適宜決定すればよいが、イオン液体100質量部に対して好ましくは、50～2000質量部、更に好ましくは50～500質量部である。

[0055] 本反応に用いられる架橋剤としては、原料高分子と反応する官能基を含有するものであれば特に制限はなく、例えばエピクロロヒドリン等のハロヒドリン類、エチレングリコールジグリシジルエーテル、ジエチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリプロピレングリコールジグリシジルエーテル、ネオペンチルグリコールジグリシジルエーテル等のビスエポキシド類、グリセロールポリグリシジルエーテル、ジグリセロールポリグリシジルエーテル、ソルビトールポリグリシジルエーテル、トリメチロールプロパンポリグリシジルエーテル等のポリエポキシド類、ジビニルスルホン等が挙げられる。これらの架橋剤は単独で使用してもよいし、2種類以上の混合物として使用してもよい。

[0056] 架橋剤の使用量は、粒子形成に支障を来すことなく、且つ粒子性能の向上を図る点から、高分子に対して0.5～500質量%、好ましくは1～200質量%である。

[0057] 斯かる架橋剤は、前記高分子との反応に支障を来さなければ、その添加方法は制限されず、例えば、高分子のイオン液体溶液中に予め加えてもよいし、高分子のイオン液体溶液と有機溶剤を混合した後に加えてもよい。また、反応の進行を促進するため、架橋剤と共に触媒を加えてもよい。触媒としては、特に制限は無く、一般的な有機酸、無機酸、有機塩基、無機塩基を使用することができる。

[0058] 本発明において、架橋反応は、高分子のイオン液体溶液を有機溶剤中で分散させながら行われる。すなわち、本発明の方法では、高分子間の架橋形成は液滴中において進行し、同時に粒子形成が行われる。従って、架橋形成反応は、液滴分散を妨げるものでなければその条件は限定されないが、高分子が分解・析出せず、かつ架橋反応が進行する温度、例えば室温～110℃、好ましくは50～100℃で、概ね1～48時間、好ましくは4～24時間、混合攪拌することにより行うことができる。

[0059] 分散（液滴形成）の手法としては、スタティックミキサー等の攪拌機を使用する等、公知の手段を用いることができる。攪拌時の回転数により液滴の径を制御でき、結果として生成する粒子の粒子径を制御できる。すなわち、回転数が大きいほど形成される液滴の径が小さくなることから、目的とする粒子径に応じて適宜混合器の回転速度を調節すれば良い。

[0060] 尚、分散効率を上げるために、少なくともイオン液体及び有機溶剤のいずれかには、界面活性剤及び／又は親油性高分子を添加することが好ましい。ここで、用いられる界面活性剤は、表面張力を減ずる作用を有し、分子内に疎水性部位と親水性部位をもつ有機化合物であって、前記高分子のイオン液体溶液の液滴状態を安定に保ったまま分散できるものあれば特に限定されない。

[0061] ここで用いられる界面活性剤及び親油性高分子は、上述したとおりであり、その使用量は、分散性能やイオン液体の性質を考慮して適宜選択され得るが、例えば有機溶剤100質量部に対して、好ましくは1質量部～100質量部、より好ましくは1質量部～25質量部である。

[0062] 界面活性剤及び／又は親油性高分子を使用する場合、高分子のイオン液体溶液、有機溶剤、並びに界面活性剤及び／又は親油性高分子の混合順序は、特に制限はないが、有機溶剤と界面活性剤及び／又は親油性高分子との混合液を、高分子のイオン液体溶液に混合するのが好ましい。

[0063] 斯くして、液滴形成の過程で高分子間の架橋が進行する。架橋度が高い場合には、液滴中で強固な粒子が生成するので、このまま遠心分離、濾過、デカンテーション等公知の方法で固液分離することにより、架橋高分子粒子を分離回収することができる。

[0064] 一方、架橋度が低い場合には、高分子は液滴中で流動性を保っているので、イオン液体に相溶し且つ実質的に該高分子を溶解しない媒体と接触させることにより液滴を凝固させ架橋高分子粒子を得ることができる。

ここで、「イオン液体に相溶し且つ実質的に該高分子を溶解しない媒体」とは、常温でイオン液体と体積比で 1 : 1 で混合した際に均一に混和し、また常温で媒体 100 g に溶ける該高分子の質量が 1 g 以下であることを意味する。斯かる媒体としては、例えば、水、メタノール、エタノール等の極性溶剤の 1 種又は 2 種以上を挙げることができる。

媒体は上記の液滴分散液に添加してもよいが、液滴の形状を保ったまま架橋高分子を凝固させることができる方法が好ましい。具体的にはイオン液体と相溶性の低い有機溶剤と、水、メタノール、エタノール等の上記媒体、必要に応じて界面活性剤又は親油性高分子を、混合・攪拌して媒体の分散液を調製後、液滴分散液に接触させる方法を挙げることができる。このときの有機溶剤は高分子溶液の分散媒と同種のものであることが好ましい。

[0065] 当該媒体の使用量は、イオン液体 100 質量部に対して、好ましくは、20～2,000 質量部、より好ましくは 50～200 質量部である。

[0066] また、液滴分散液と前記媒体との接触は、0～100℃、好適には 25～80℃で行うことが好ましい。

[0067] 斯くして調製された架橋高分子粒子は、遠心分離、濾過、デカンテーション等公知の方法で固液分離することにより回収することができる。また、回

収した粒子はイオン液体及び有機溶剤に相溶性の溶媒、例えばエタノール、イソプロパノール、ブタノールなどで洗浄し、次いで水洗浄を行うことにより精製される。

本発明の方法で得られる架橋高分子粒子の体積平均粒径は、クロマトグラフィー用担体として用いた場合の、高流速下での圧力の上昇及びタンパク質等の精製対象物質の結合容量の低下等を考慮すると、好ましくは20～300 μm 、より好ましくは30～150 μm である。

[0068] 斯くして、本発明の方法によれば、高分子が液滴分散される過程で架橋形成が進行することから、粒子内部が効率的に架橋された剛性の高い粒子を製造することができる。結果として移動相を高流速で送液することができる優れた耐流速性をもつ架橋高分子粒子を製造できる（後記試験例B1）。そして、当該架橋高分子粒子をクロマトグラフィー用充填剤の担体として使用すると、架橋剤を使用しない一般的な方法で製造した高分子粒子を使用した場合と比較して、親和性物質の動的結合容量が高い（後記試験例B2）。

[0069] 斯くして、本発明の方法（A）及び（B）により得られた高分子粒子は、公知の方法（例えば、米国特許4973683号明細書、特開2009-242770号公報参照）により、さらに化学架橋が施されてもよい。化学架橋することにより、さらに粒子の剛性が高くなり、耐流速性が向上して、より高流速での使用が可能となる。架橋剤としては、原料高分子の水酸基と反応する官能基を含有するものであれば特に制限はなく、例えばエピクロロヒドリンなどのハロヒドリン類、エチレングリコールジグリシジルエーテル、ジエチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリプロピレングリコールジグリシジルエーテル、ネオペンチルグリコールジグリシジルエーテルなどのビスエポキシド類、グリセロールポリグリシジルエーテル、ジグリセロールポリグリシジルエーテル、ソルビトールポリグリシジルエーテル、トリメチロールプロパンポリグリシジルエーテルなどのポリエポキシド類、ジビニルスルホン等が挙げられる。これらの架橋剤は単独で使用してもよいし、2種類以上の混合物として使用

してもよい。

[0070] 本発明の高分子粒子は、以上のような性質を有することから、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、キレートクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等各種クロマトグラフィー用充填剤（担体）として、或いは、高分子担体、バイオリアクターの担体、検査薬の担体、体液浄化用担体、化粧品添加剤等として好適に用いることができる。

[0071] 本発明の高分子粒子は、クロマトグラフィー用充填剤として用いる場合、内径0.5 cmのカラムに高さ20.0 cmまで充填して25℃の水を流したときのカラム圧力0.4 MPaにおける線流速によって特徴づけることもできる。すなわち、本発明の高分子粒子は、内径0.5 cmのカラムに高さ20.0 cmまで充填して25℃の水を流したときのカラム圧力0.4 MPaにおける線流速が好ましくは1600～6000 cm/時間である。該線速度は、より好ましくは1650～5950 cm/時間であり、さらに好ましくは1700～5900 cm/時間である。

本発明の高分子粒子をクロマトグラフィー用充填剤として用いる場合には、その目的に応じて、公知の方法により、本発明の高分子粒子に、リガンド（例えば、抗体に特異性の高い抗原やタンパク質、プロテインA、プロテインGやその変異体、抗体結合活性を有するペプチド等）、荷電基、疎水性基等を導入することができる。

例えば、一態様として、本発明の高分子粒子の水酸基の少なくとも一部を介してプロテインAを公知の方法（米国特許6399750号等）により固定化することにより、抗体精製に好適なクロマトグラフィー用充填剤、すなわち抗体精製用吸着体とすることが挙げられる。

実施例

[0072] 以下、本発明を、実施例を挙げてさらに具体的に説明する。また、以下の記載は本発明の態様を概括的に示すものであり、特に理由無く、かかる記載により本発明は限定されるものではない。

[0073] 1. 評価方法

1. 1. 粒径分布の測定

レーザー散乱回折法粒度分布測定装置LS 13 320（ベックマン・コールター）により粒径分布を測定した。光学モデルはFluid R. I. Real 1.333、Sample R. I. Real 1.54 Imaginary 0を使用した。これより、セルロース粒子の体積平均粒径、及び体積粒度の変動係数（C. V. 値：（標準偏差／体積平均粒径）×100）を求めた。

[0074] 1. 2. 粒子沈降体積

粒子を水分散し、目盛り付き容器に入れ、12時間静置後の粒子沈降体積を目視により測定した。

[0075] 1. 3. 耐流速性の測定法

内径0.5cmのガラス製カラム（GEヘルスケア社製、Tricorn 5/200 column）に下記の実施例及び比較例で得られる粒子をベッド高20cmまで充填した。各カラムをクロマトグラフィーシステム（GEヘルスケア社製、AKTA prime）にセットして25℃の純水を流し、その際のカラム入り口とカラム出口の圧力差をカラム圧力とした。

[0076] 1. 4. 結合容量の測定法

下記の実施例及び比較例で得られる粒子の結合容量は、プロテインA結合状態でのヒトポリクローナルIgGに対する動的結合容量で評価した。すなわち、下記の実施例及び比較例で得られるプロテインA結合粒子をそれぞれ内径0.5cmのガラス製カラム（GEヘルスケア社製、Tricorn 5/200 column）にベッド高20cmまで充填した。各カラムをクロマトグラフィーシステム（GEヘルスケア社製、AKTA prime）にセットして20mMリン酸バッファー（pH7.4）で平衡化した後、ヒトポリクローナルIgG（5mg/ml）を含む20mMリン酸バッファー（pH7.4）を線流速300cm/時間で流し、吸光度モニターで溶出液中のヒトポリクローナルIgG濃度が10%ブレイクスルー（破過）の時

のヒトポリクロナル IgG 吸着量と充填剤体積から動的結合容量を求めた。また、上記の測定時の背圧を測定した。

[0077] 実施例 A 1 (セルロース／アガロース複合粒子の製造)

500 ml バッフル付きセパラブルフラスコ内で 1-エチル-3-メチルイミダゾリウムアセテート (Aldrich 社製) 60 g にセルロース粉末 (フナコシ株式会社製) 4.04 g、アガロース粉末 (清水食品株式会社製) 0.13 g を加え、温水バスにセットし 95℃ に加熱し、2 時間攪拌を行い溶解し多糖類溶液を得た。別の 500 ml セパラブルフラスコ内でトルエン 200 ml にエチルセルロース 45 (和光純薬工業社製) 16 g を加え、温水バスにセットし 80℃ で 2 時間攪拌を行い溶解した。さらに別のセパラブルフラスコ内でトルエン 150 ml にエチルセルロース 45 を 12 g 加え、温水バスにセットし 80℃ で 2 時間攪拌を行い溶解した後、0.2 M 硫酸ナトリウム水溶液 62.5 ml を加え 400 rpm、80℃ で 30 分間攪拌をおこない W/O 型エマルジョンを得た。次にエチルセルロース 45 含有トルエンを多糖類溶液に加え 400 rpm、90℃ で 10 分間攪拌し I L/O 型エマルジョン (ここで、I L はイオン液体) を調製後、上記で得られた W/O 型エマルジョンを加え 400 rpm で攪拌しながら室温に冷却した。その後、1500 ml エタノール中に注ぎ攪拌後静置しデカンテーションにより上澄み液を除去した。さらにエタノール 1500 ml でデカンテーションを 2 回おこなった後、エタノールで濾過洗浄を行い、さらに水で濾過洗浄を行い目的のセルロース／アガロース複合粒子を得た。次に、セルロース／アガロース複合粒子を 106 μm と 45 μm のふるいにかけて 45 μm ~ 106 μm の粒径をもつ粒子を得た。光学顕微鏡で確認したところ平均粒径は 89 μm であった。得られた粒子量は沈降体積 50 ml であった。

尚、粒子沈降体積は、粒子を水分散し、目盛り付き容器に入れ、12 時間静置後の粒子沈降体積を目視により測定した (以下同様)。

[0078] 実施例 A 2 (セルロース／プルラン複合粒子の製造)

実施例 1 でアガロース粉末の代わりにプルラン粉末 (林原生物化学研究所

社製)を用いた以外は実施例1と同様にしてセルロース／プルラン複合粒子を得た。光学顕微鏡で確認したところ平均粒径は $92\mu\text{m}$ であった。得られた粒子量は沈降体積 50ml であった。

[0079] 実施例A3 (セルロース／デキストラン複合粒子の製造[1])

実施例1でセルロース粉末(フナコシ株式会社製) 4.04g 、アガロース粉末(清水食品株式会社製) 0.13g の代わりにセルロース粉末 5.14g 、デキストラン40000(和光純薬工業社製) 0.64g を用いた以外は実施例1と同様にしてセルロース／デキストラン複合粒子を得た。光学顕微鏡で確認したところ平均粒径は $92\mu\text{m}$ であった。得られた粒子量は沈降体積 60ml であった。

[0080] 実施例A4 (セルロース／デキストラン複合粒子の製造[2])

500ml バッフル付きセパラブルフラスコ内で1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムクロリド(Aldrich社製) 60g にセルロース粉末 4.17g 、デキストラン40000(和光純薬工業社製) 0.13g を加え、温水バスにセットし 95°C に加熱し、2時間攪拌を行い溶解し多糖類溶液を得た。別の 500ml セパラブルフラスコ内でmineral oil (heavy) (Aldrich社製) 200ml にSpan 85(和光純薬工業株式会社製) 9ml を加え、温水バスにセットし 80°C で2時間攪拌を行い溶解した。さらに別のセパラブルフラスコ内でmineral oil (heavy) 150ml にSpan 85 6.75ml を加え、温水バスにセットし 80°C で2時間攪拌を行い溶解した後、 0.2M 硫酸ナトリウム水溶液 62.5ml を加え 400rpm 、 80°C で30分間攪拌をおこないW/O型エマルジョンを得た。次にSpan 85含有mineral oil (heavy)を多糖類溶液に加え 800rpm 、 100°C で10分間攪拌し多糖類溶液の液滴分散液(IL/O型エマルジョン)を調製後、上記で得られたW/O型エマルジョンを加え 800rpm で攪拌しながら室温に冷却した。その後、 1500ml エタノール中に注ぎ攪拌後静置しデカンテーションにより上澄み液を除去した。さらにエタノール 1500ml でデカンテ

ーションを2回おこなった後、エタノールで濾過洗浄を行い、さらに水で濾過洗浄を行い目的のセルロース／デキストラン複合粒子を得た。次に、セルロース／デキストラン複合粒子を $106\mu\text{m}$ と $40\mu\text{m}$ のふるいにかけて $40\mu\text{m}\sim 106\mu\text{m}$ の粒径をもつ粒子を得た。光学顕微鏡で確認したところ平均粒径は $92\mu\text{m}$ であった。得られた粒子沈降体積は 10ml であった。

[0081] 比較例A1（セルロース粒子の製造）

J. Chromatogr. A 1217(2010)1298-1304（前記非特許文献1）記載の方法に従って、セルロース粒子を製造した。

すなわち、 500ml バッフル付きセパラブルフラスコ内で1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムクロリド（Aldrich社製） 60g にセルロース粉末 4.17g を加え、温水バスにセットし 95°C に加熱し、2時間攪拌を行い溶解しセルロース溶液を得た。別の 500ml セパラブルフラスコ内でmineral oil（heavy）（Aldrich社製） 200ml にSpan 85（和光純薬工業株式会社製） 9ml を加え、温水バスにセットし 80°C で2時間攪拌を行い溶解した。さらに別のセパラブルフラスコ内でmineral oil（heavy） 150ml にSpan 85 6.75ml を加え、温水バスにセットし 80°C で2時間攪拌を行い溶解した後、 0.2M 硫酸ナトリウム水溶液 62.5ml を加え 400rpm 、 80°C で30分間攪拌をおこないW/O型エマルジョンを得た。次にSpan 85含有mineral oil（heavy）をセルロース溶液に加え 800rpm 、 100°C で10分間攪拌しセルロース溶液の液滴分散液（IL/O型エマルジョン）を調製後、上記で得られたW/O型エマルジョンを加え 800rpm で攪拌しながら室温に冷却した。その後、 1500ml エタノール中に注ぎ攪拌後静置しデカンテーションにより上澄み液を除去した。さらにエタノール 1500ml でデカンテーションを2回おこなった後、エタノールで濾過洗浄を行い、さらに水で濾過洗浄を行い目的のセルロース粒子を得た。次に、セルロース粒子を $106\mu\text{m}$ と $40\mu\text{m}$ のふるいにかけて $40\mu\text{m}\sim 106\mu\text{m}$ の粒径をもつ粒子を得た。光学顕微鏡で確認したところ平

均粒径は90 μ mであった。得られた粒子沈降体積は10 mlであった。

[0082] 実施例A5（セルロース／アガロース複合粒子の化学架橋及びプロテインAの固定化）

100 ml三口フラスコ内を用い実施例1で製造したセルロース／アガロース複合粒子25 ml（沈降体積）に水35 mlを加えた。次にNaBH₄ 120 mg、32重量%Na₂SO₄水溶液25 ml、45重量%NaOH水溶液0.6 mlを加え攪拌した。温度を50℃にして30分間攪拌を続けた。次に、45重量%NaOH 0.9 mlとエピクロロヒドリン0.72 mlを1時間おきに12回加えた。添加終了後、温度50℃で12時間反応させた。その後、濾過により粒子を回収し、純水で洗浄し、化学架橋セルロース／アガロース複合粒子を得た。得られた粒子5 ml（沈降体積）をサクシンドライし、水を加えて計7 mlの懸濁液とした。上記の懸濁液に5 N水酸化ナトリウム水溶液0.8 ml、NaBH₄ 24 mg、及びエピクロロヒドリン4 mlを加え、25℃で8時間振とうし、化学架橋セルロース／アガロース複合粒子にエポキシ基を導入した。その後、上記の反応液を純水、エタノール、純水の順で濾過洗浄を行った。得られた粒子をプロテインA（Replicon社、rPA50）102 mgを含む1.5 M硫酸ナトリウム、0.1 Mリン酸バッファー（pH 6.8）45 mlで懸濁した。上記懸濁液を25℃で24時間振とうし、プロテインAを粒子に結合させた。その後、粒子を遠心分離して上澄み液を除いた。次に1 Mチオグリセロール、0.5 M硫酸ナトリウム水溶液（pH 8.3）45 mlを加えて25℃で4時間反応させ、残余のエポキシ基をブロッキングし、0.1 Mクエン酸バッファー（pH 3.2）、0.1 M水酸化ナトリウム水溶液、PBS（-）で順次洗浄し、プロテインA固定化セルロース／アガロース複合粒子を得た。

[0083] 実施例A6（セルロース／プルラン複合粒子の化学架橋及びプロテインAの固定化）

実施例A2で得られたセルロース／プルラン複合化粒子を実施例A5と同様の方法によりプロテインA固定化セルロース／プルラン複合粒子を得た。

[0084] 実施例 A 7 (セルロース／デキストラン複合粒子の化学架橋及びプロテイン A の固定化[1])

実施例 A 3 で得られたセルロース／デキストラン複合化粒子を実施例 A 5 と同様の方法によりプロテイン A 固定化セルロース／デキストラン複合化粒子を得た。

[0085] 実施例 A 8 (セルロース／デキストラン複合粒子の化学架橋およびプロテイン A の固定化[2])

実施例 A 4 で得られたセルロース／デキストラン複合化粒子を実施例 A 5 と同様の方法によりプロテイン A 固定化セルロース／デキストラン複合化粒子を得た。

[0086] 比較例 A 2 (セルロース粒子の化学架橋及びプロテイン A の固定化)

比較例 A 1 で得られたセルロース粒子を実施例 A 5 と同様の方法によりプロテイン A を固定化し、プロテイン A 固定化セルロース粒子を得た。

[0087] 試験例 A 1 (イムノグロブリン G (I g G) 動的結合容量と圧力の測定)

実施例 A 5、A 6、A 7、A 8、比較例 A 2 で得られたプロテイン A 固定化多糖粒子をそれぞれ内径 0.5 cm のカラムにベッド高 20.0 cm まで詰めた。各カラムを 20 mM リン酸バッファー (pH 7.4) で平衡化した後、ヒトポリクローナル I g G (5 mg / ml) を含む 20 mM リン酸バッファー (pH 7.4) を、線流速 300 cm / 時間で流し、吸光度モニターで溶出液中のヒトポリクローナル I g G 濃度が 10% ブレークスルー (破過) の時のヒトポリクローナル I g G 吸着量と充填剤体積から動的結合容量を求めた。また、そのときのカラム圧を測定した。結果を表 1 に示す。本発明品はカラム圧が低く体積当たりの I g G 動的結合容量が高かった。

[0088]

[表1]

充填剤	I g G動的結合容量 (mg/ml)	カラム圧 (MPa)
実施例A 5	46	0.11
実施例A 6	50	0.08
実施例A 7	49	0.08
実施例A 8	41	0.13
比較例A 2	37	0.18

[0089] 実施例B 1 架橋高分子粒子の製造 (1)

500mlセパラブルフラスコ内で1-エチル-3-メチルイミダゾリウムアセテート (Aldrich社製) 60gにセルロース粉末3.86g (フナコシ株式会社製)を加え、温水バスにセットし95℃に加熱し、2時間攪拌を行い溶解してセルロース溶液を得た。別の500mlセパラブルフラスコ内でトルエン (和光純薬工業社製) 200mlにエチルセルロース45 (和光純薬工業社製) 16gを加え、温水バスにセットし80℃で2時間攪拌を行い溶解してエチルセルロース含有トルエンを得た。さらに別のセパラブルフラスコ内でトルエン150mlにエチルセルロース45を12g加え、温水バスにセットし80℃で2時間攪拌を行い溶解した後、0.2M硫酸ナトリウム水溶液62.5mlを加え400rpm、80℃で30分間攪拌を行いW/O型エマルジョンを得た。次に上記セルロース溶液にグリセロールポリグリシジルエーテル (製品名: エピオールG-100、日油社製) 0.4gを加え、さらに上記エチルセルロース45含有トルエンを加えて300rpm、90℃で4時間攪拌した。この懸濁液に上記W/O型エマルジョンを加え300rpmで攪拌しながら室温に冷却した。その後、エタノール1500ml中に注いで攪拌し、静置の後デカンテーションにより上澄み液を除去した。さらにエタノール1500mlでデカンテーションを2回行った後、エタノール及び純水で濾過洗浄を行い、さらに水浴中で篩分級して沈降体積50mlの粒子を得た。得られた粒子の体積平均粒径は64 μ m、C.V.値は41%であった。

[0090] 実施例 B 2

実施例 B 1 で得られた粒子 25 ml (沈降体積) を 25 ml の純水に懸濁し、さらに 32 重量%硫酸ナトリウム水溶液 40 ml を加えた。攪拌下で 45%水酸化ナトリウム水溶液 1 ml 及び NaBH_4 200 mg を加え、50℃に昇温した。50℃で攪拌を継続しながら、45 wt %水酸化ナトリウム水溶液 1.5 ml 及びエピクロロヒドリン (和光純薬工業社製) 1.2 ml を 1 時間おきに計 12 回加え、さらに 12 時間攪拌を継続した。その後、上記の懸濁液を冷却し、純水、エタノール、純水の順で濾過洗浄を行い、さらに水浴中で篩分級して沈降体積 25 ml の粒子を得た。得られた粒子の体積平均粒径は $62\ \mu\text{m}$ 、C. V. 値は 40% であった。

[0091] 実施例 B 3

実施例 B 2 で得られた粒子 5 ml (沈降体積) をサクションドライし、水を加えて計 7 ml の懸濁液とした。上記の懸濁液に 5 M 水酸化ナトリウム水溶液 0.8 ml、 NaBH_4 24 mg、及びエピクロロヒドリン (和光純薬工業社製) 4 ml を加え、25℃で 8 時間振とうした。その後、上記の反応液を純水、エタノール、純水の順で濾過洗浄を行い、沈降体積 5 ml の粒子を得た。

[0092] 実施例 B 4

実施例 B 3 で得られた粒子 5 ml (沈降体積) を、プロテイン A (製品名: rPA50、Replicon 社製) 102 mg を含む 1.5 M 硫酸ナトリウム、0.1 M リン酸バッファー (pH 6.8) 45 ml で懸濁した。上記懸濁液を 25℃で 24 時間振とうしたのち、遠心して上澄み液を除いた。残存する粒子に 1 M チオグリセロール、0.5 M 硫酸ナトリウム水溶液 (pH 8.3) 45 ml を加えて 25℃で 4 時間振とうしたのち、0.1 M クエン酸バッファー (pH 3.2)、0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液、PBS (ー) で順次洗浄し、沈降体積 5 ml の粒子を得た。

[0093] 実施例 B 5

原料としてセルロースとプルランの 2 種類の多糖類の混合物を用いた以外

は、実施例 B 1 の方法に従って粒子を製造した。すなわち、500 ml セパラブルフラスコ内で 1-エチル-3-メチルイミダゾリウムアセテート (Aldrich 社製) 60 g にセルロース粉末 3.86 g (フナコシ株式会社製) とプルラン 0.39 g (林原生物化学研究所社製) を加え、温水バスにセットし 95℃ に加熱し、2 時間攪拌を行い溶解してセルロースとプルランの混合物の溶液を得た。別の 500 ml セパラブルフラスコ内でトルエン (和光純薬工業社製) 200 ml にエチルセルロース 45 (和光純薬工業社製) 16 g を加え、温水バスにセットし 80℃ で 2 時間攪拌を行い溶解してエチルセルロース含有トルエンを得た。さらに別のセパラブルフラスコ内でトルエン 150 ml にエチルセルロース 45 を 12 g 加え、温水バスにセットし 80℃ で 2 時間攪拌を行い溶解した後、0.2 M 硫酸ナトリウム水溶液 62.5 ml を加え 400 rpm、80℃ で 30 分間攪拌を行い W/O 型エマルジョンを得た。次に上記セルロースとプルランの混合物の溶液にグリセロールポリグリシジルエーテル (製品名: エピオール G-100、日油社) 0.4 g を加え、さらに上記エチルセルロース含有トルエンを加えて 270 rpm、90℃ で 4 時間攪拌した。この懸濁液に上記 W/O 型エマルジョンを加え 270 rpm で攪拌しながら室温に冷却した。その後、エタノール 1500 ml 中に注いで攪拌し、静置の後デカンテーションにより上澄み液を除去した。さらにエタノール 1500 ml でデカンテーションを 2 回行った後、エタノール及び純水で濾過洗浄を行い、さらに水浴中で篩分級して沈降体積 50 ml の粒子を得た。得られた粒子の体積平均粒径は 65 μ m、C.V. 値は 44% であった。

[0094] 実施例 B 6

実施例 B 5 で得られた粒子を用い、実施例 B 2 に示した方法と同様の方法により、水沈降体積 25 ml の粒子を得た。得られた粒子の体積平均粒径は 65 μ m、C.V. 値は 35% であった。

[0095] 実施例 B 7

実施例 B 6 で得られた粒子を用い、実施例 B 3 に示した方法と同様の方法

により、沈降体積 5 m l の粒子を得た。

[0096] 実施例 B 8

実施例 B 7 で得られた粒子を用い、実施例 B 4 に示した方法と同様の方法により、沈降体積 5 m l の粒子を得た。

[0097] 比較例 B 1

J. Chromatogr. A 1217 (2010), 1298-1304 (前記非特許文献 1) 記載の方法に従って、セルロース粒子を製造した。すなわち、500 ml セパラブルフラスコ内で 1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムクロリド (Aldrich 社製) 60 g にセルロース粉末 4.17 g (フナコシ株式会社製) を加え、温水バスにセットし 95℃ に加熱し、2 時間攪拌を行い溶解してセルロース溶液を得た。別の 500 ml セパラブルフラスコ内で mineral oil (heavy) (Aldrich 社製) 200 ml に Span 85 (分子量 957) (和光純薬工業社製) 9 ml を加え、温水バスにセットし 80℃ で 2 時間攪拌を行い溶解して Span 85 含有 mineral oil (heavy) を得た。さらに別のセパラブルフラスコ内で mineral oil (heavy) 150 ml に Span 85 6.75 ml を加え、温水バスにセットし 80℃ で 2 時間攪拌を行い溶解した後、0.2 M 硫酸ナトリウム水溶液 62.5 ml を加え 400 rpm、80℃ で 30 分間攪拌を行い W/O 型エマルジョンを得た。次に上記セルロース溶液に上記 Span 85 含有 mineral oil (heavy) を加え 800 rpm、100℃ で 10 分間攪拌した。この懸濁液に上記 W/O 型エマルジョンを加え 800 rpm で攪拌しながら室温に冷却した。その後、エタノール 1500 ml 中に注いで攪拌し、静置の後デカンテーションにより上澄み液を除去した。さらにエタノール 1500 ml でデカンテーションを 2 回行った後、エタノール及び純水で濾過洗浄を行い、さらに水浴中で篩分級して水沈降体積 10 ml の粒子を得た。この操作を複数回繰り返し、必要量の粒子を得た。得られた粒子の体積平均粒径は 66 μ m、C.V. 値は 48% であった。

[0098] 比較例 B 2

比較例 B 1 で得られた粒子を用い、実施例 B 2 に示した方法と同様の方法により、水沈降体積 25 ml の粒子を得た。得られた粒子の体積平均粒径は $65\ \mu\text{m}$ 、C. V. 値は 47% であった。

[0099] 比較例 B 3

比較例 B 2 で得られた粒子を用い、実施例 B 3 に示した方法と同様の方法により、沈降体積 5 ml の粒子を得た。

[0100] 比較例 B 4

比較例 B 3 で得られた粒子を用い、実施例 B 4 に示した方法と同様の方法により、沈降体積 5 ml の粒子を得た。

[0101] 比較例 B 5

架橋剤であるグリセロールポリグリシジルエーテルの添加を除いた以外は、実施例 B 1 の方法に従って粒子を製造した。すなわち、500 ml セパラブルフラスコ内で 1-エチルー 3-メチルイミダゾリウムアセテート (Aldrich 社製) 60 g にセルロース粉末 (フナコシ株式会社製) 3.86 g を加え、温水バスにセットし 95°C に加熱し、2 時間攪拌を行い溶解してセルロース溶液を得た。別の 500 ml セパラブルフラスコ内でトルエン (和光純薬工業社製) 200 ml にエチルセルロース 45 (和光純薬工業社製) 16 g を加え、温水バスにセットし 80°C で 2 時間攪拌を行い溶解してエチルセルロース含有トルエンを得た。さらに別のセパラブルフラスコ内でトルエン 150 ml にエチルセルロース 45 を 12 g 加え、温水バスにセットし 80°C で 2 時間攪拌を行い溶解した後、0.2 M 硫酸ナトリウム水溶液 62.5 ml を加え 400 rpm、 80°C で 30 分間攪拌を行い W/O 型エマルジョンを得た。次に上記セルロース溶液に上記エチルセルロース含有トルエンを加えて 300 rpm、 90°C で 10 分間攪拌した。この懸濁液に上記 W/O 型エマルジョンを加え 300 rpm で攪拌しながら室温に冷却した。その後、エタノール 1500 ml 中に注いで攪拌し、静置の後デカンテーションにより上澄み液を除去した。さらにエタノール 1500 ml でデカンテー

ションを2回行った後、エタノール及び純水で濾過洗浄を行い、さらに水浴中で篩分級して水沈降体積50 mlの粒子を得た。得られた粒子の体積平均粒径は67 μm 、C. V. 値は36%であった。

[0102] 比較例 B 6

比較例 B 5 で得られた粒子を用い、実施例 B 2 に示した方法と同様の方法により、水沈降体積25 mlの粒子を得た。得られた粒子の体積平均粒径は72 μm 、C. V. 値は34%であった。

[0103] 比較例 B 7

比較例 B 6 で得られた粒子を用い、実施例 B 3 に示した方法と同様の方法により、沈降体積5 mlの粒子を得た。

[0104] 比較例 B 8

比較例 B 7 で得られた粒子を用い、実施例 B 4 に示した方法と同様の方法により、沈降体積5 mlの粒子を得た。

[0105] 試験例 B 1 耐流速性の比較

1. 3項に記載の方法に従って、実施例 B 2、実施例 B 6、比較例 B 2、及び比較例 B 6 の粒子の耐流速性を評価した。結果を表1と図1に示す。実施例 B 2 及び実施例 B 6 で得られる粒子は、比較例で得られる粒子と比較して一定線流速における背圧が低く、さらに比較例の粒子では圧密化が発生する大きな線流速での送液が可能であった。すなわち、実施例 B 2 及び実施例 B 6 の粒子は比較例の粒子よりも優れた耐流速性を示した。

[0106]

[表2]

		背圧 (M p a)			
		実施例 B 2	実施例 B 6	比較例 B 2	比較例 B 6
線速度 (cm/hr)	3 0 0	0 . 0 8	0 . 0 8	0 . 1 7	0 . 1 2
	6 0 0	0 . 1 4	0 . 1 2	0 . 2 6	0 . 2 0
	9 0 0	0 . 2 1	0 . 1 8	0 . 3 6	0 . 2 7
	1 2 0 0	0 . 2 7	0 . 2 4	0 . 4 6	0 . 3 5
	1 5 0 0	0 . 3 3	0 . 2 9	> 1	0 . 6 5
	1 8 0 0	0 . 5 2	0 . 3 5	—	> 1
	2 1 0 0	> 1	0 . 4 4	—	—

[0107] 試験例 B 2 結合容量及び耐流速性の比較

1. 4 項に記載の方法に従って、実施例 B 4、実施例 B 8、比較例 B 4、及び比較例 B 8 の粒子のヒトポリクローナル I g G に対する動的結合容量を評価した。結果を表 2 に示す。実施例 B 4 及び実施例 B 8 で得られる粒子は、比較例で得られる粒子と比較して、体積あたりの I g G 結合容量が大きく、また背圧が低かった。

[0108] [表3]

粒子	I g G 動的結合容量 (m g / m l)	カラム圧 (M P a)
実施例 B 4	4 8	0 . 0 9
実施例 B 8	5 0	0 . 0 8
比較例 B 4	3 7	0 . 1 8
比較例 B 8	4 2	0 . 1 2

請求の範囲

[請求項1] 下記の工程（１）～（３）：

（１）イオン液体に二種以上の多糖類を溶解する多糖類溶液の調製工程、

（２）前記多糖類溶液の液滴を前記イオン液体と相溶性の低い有機溶剤中に分散させる多糖類溶液の液滴分散液の調製工程、及び、

（３）複合化された多糖を凝固させて当該多糖複合粒子を得る凝固工程、

を含むことを特徴とする多糖複合粒子の製造方法。

[請求項2] 多糖類がセルロース、アガロース、プルラン、デキストランから選ばれる二種以上である、請求項１記載の製造方法。

[請求項3] 多糖類のうち少なくとも一種がセルロースである、請求項１又は２記載の製造方法。

[請求項4] イオン液体がアルキルイミダゾリウム塩である、請求項１～３の何れか１項記載の製造方法。

[請求項5] イオン液体が酢酸１－エチルー３－メチルイミダゾリウム、１－ブチルー３－メチルイミダゾリウムクロリド又はそれらの混合物である請求項１～４何れか１項記載の製造方法。

[請求項6] 前記工程（２）において、多糖類溶液の液滴分散が、前記イオン液体と相溶性の低い有機溶剤及び親油性高分子を含む溶液を前記多糖類溶液と混合することにより行われる、請求項１～５の何れか１項記載の製造方法。

[請求項7] 請求項１～６のいずれか１項記載の製造方法によって製造された多糖複合粒子。

[請求項8] 内径０．５ｃｍのカラムに高さ２０．０ｃｍまで充填して２５℃の水を流したときのカラム圧力０．４ＭＰａにおける線流速が１６００～６０００ｃｍ／時間である、請求項７に記載の多糖複合粒子。

[請求項9] 請求項７又は８記載の多糖複合粒子を含むクロマトグラフィー用充

填剤。

[請求項10] 請求項7又は8記載の多糖複合粒子を用いた抗体精製用吸着体。

[請求項11] アフィニティーリガンドとしてプロテインAが導入された、請求項10記載の抗体精製用吸着体。

[請求項12] イオン液体に溶解した高分子を、前記イオン液体と相溶性の低い有機溶剤中で液滴分散させながら架橋剤と反応させる工程を含むことを特徴とする、架橋高分子粒子の製造方法。

[請求項13] 分散液にイオン液体に相溶し且つ実質的に該高分子を溶解しない媒体を加え、液滴を凝固させる工程をさらに含む、請求項12記載の方法。

[請求項14] 高分子が、多糖類、及びそれらの誘導体から選ばれる1種又は2種以上である、請求項12又は13記載の方法。

[請求項15] 多糖類が、セルロース、アガロース、キトサン、デキストラン、プルラン及びそれらの誘導体から選ばれる1種又は2種以上である、請求項14記載の方法。

[請求項16] 多糖類が、少なくともセルロース又はその誘導体を含む、請求項15記載の方法。

[請求項17] 架橋剤がハロヒドリン類、ビスエポキシド類、ポリエポキシド類及びジビニルスルホンから選ばれる1種又は2種類以上である請求項12～16のいずれか1項記載の方法。

[請求項18] 請求項12～17のいずれか1項記載の方法により製造される架橋高分子粒子。

[請求項19] 内径0.5cmのカラムに高さ20.0cmまで充填して25℃の水を流したときのカラム圧力0.4MPaにおける線流速が1600～6000cm/時間である、請求項18記載の架橋高分子粒子。

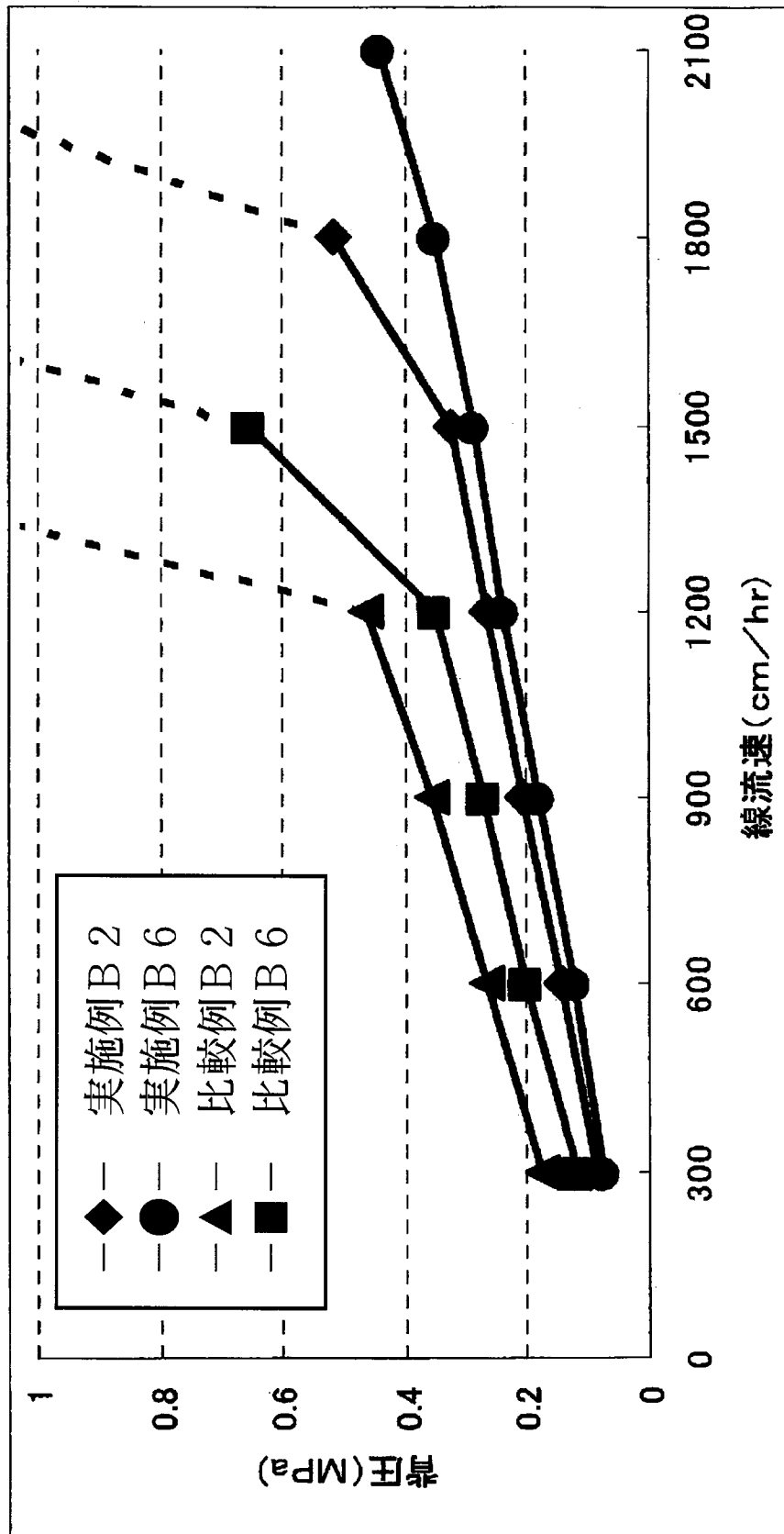
[請求項20] 請求項18又は19記載の架橋高分子粒子を含むクロマトグラフィー用充填剤。

[請求項21] 請求項18又は19記載の架橋高分子粒子を用いた抗体精製用吸着

体。

[請求項22] アフィニティーリガンドとしてプロテイン A が導入された、請求項
21 記載の抗体精製用吸着体。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/078902

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08J3/24(2006.01)i, B01J20/281(2006.01)i, C08B15/10(2006.01)i, C08B37/00(2006.01)i, C08B37/02(2006.01)i, C08B37/08(2006.01)i, C08B37/12(2006.01)i, C08J3/14(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)

C08J3/24, B01J20/281, C08B15/10, C08B37/00, C08B37/02, C08B37/08, C08B37/12, C08J3/14

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kai-Feng Du et al., Preparation and characterization of novel macroporous cellulose beads regenerated from ionic liquid for fast chromatography, Journal of Chromatography A, 2009.12.22, Vol.1217, pp. 1298-1304	1-11
Y	WO 2008/133269 A1 (Tokyo University of Agriculture and Technology), 06 November 2008 (06.11.2008), paragraphs [0030] to [0040] (Family: none)	1-11



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
05 March, 2012 (05.03.12)

Date of mailing of the international search report
19 March, 2012 (19.03.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/078902

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2009-242770 A (Chisso Corp.), 22 October 2009 (22.10.2009), claims; paragraphs [0033] to [0057], [0080] to [0081]; fig. 1 & US 2009/0062118 A1	8 12-22
Y A	WO 2010/095673 A1 (Chisso Corp.), 26 August 2010 (26.08.2010), paragraphs [0024] to [0062] (Family: none)	10, 11 12-22
A	Chun-xiang Lin et al., Novel Preparation and Characterization of Cellulose Microparticles Functionalized in Ionic Liquids, Langmuir, 2009.05.20, Vol.25, No.17, pp.10116-10120	12-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/078902

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/078902

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

The technical feature common to the invention of claim 1 and the invention of claim 12 is possession of a step of preparing a polymer solution by dissolving a polymer into an ionic liquid and a step of preparing a droplet dispersion liquid by dispersing droplets of the polymer solution into an organic solvent that has a low compatibility with the ionic liquid.

The common technical feature, however, cannot be considered as a special technical feature since it does not make a contribution over the prior art in view of the disclosure of document 1 (Kai-Feng Du et al., Preparation and characterization of novel macroporous cellulose beads regenerated from ionic liquid for fast chromatography, Journal of Chromatography A, 2009. 12. 22, Vol. 1217, pp. 1298-1304).

In addition, there is no other same or corresponding special technical feature between those inventions.

Consequently, claims of this international application contain the following two groups of inventions.

(Invention group 1) the inventions of claims 1-11

A method for producing polysaccharide composite particles by dissolving two or more kinds of polysaccharides into an ionic liquid and solidifying a composite of polysaccharides; or polysaccharide composite particles produced by the method.

(Invention group 2) the inventions of claims 12-22

A method for producing crosslinked polymer particles, wherein a polymer dissolved in an ionic liquid is dispersed into an organic solvent in the form of droplets and caused to react with a crosslinking agent; or crosslinked polymer particles produced by the method.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C08J3/24(2006.01)i, B01J20/281(2006.01)i, C08B15/10(2006.01)i, C08B37/00(2006.01)i, C08B37/02(2006.01)i, C08B37/08(2006.01)i, C08B37/12(2006.01)i, C08J3/14(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 (I P C))

Int.Cl. C08J3/24, B01J20/281, C08B15/10, C08B37/00, C08B37/02, C08B37/08, C08B37/12, C08J3/14

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 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)

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	Kai-Feng Du et al., Preparation and characterization of novel macroporous cellulose beads regenerated from ionic liquid for fast chromatography, Journal of Chromatography A, 2009.12.22, Vol.1217, pp.1298-1304	1-11
Y	W0 2008/133269 A1 (国立大学法人東京農工大学) 2008.11.06, [0030]-[0040] (ファミリーなし)	1-11

☒ 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

0 5 . 0 3 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

1 9 . 0 3 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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)

橋本 憲一郎

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 7

4 J

3 0 3 1

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 A	JP 2009-242770 A (チッソ株式会社) 2009.10.22, 特許請求の範囲, [0033]-[0057], [0080]-[0081], 図 1 & US 2009/0062118 A1	8 12-22
Y A	WO 2010/095673 A1 (チッソ株式会社) 2010.08.26, [0024]-[0062] (ファミリーなし)	10, 11 12-22
A	Chun-xiang Lin et al., Novel Preparation and Characterization of Cellulose Microparticles Functionalized in Ionic Liquids, Langmuir, 2009.05.20, Vol.25, No.17, pp.10116-10120	12-22

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求項 1 に係る発明及び請求項 12 に係る発明は、イオン液体に高分子を溶解して高分子溶液を調製する工程、及び、前記高分子溶液の液滴を前記イオン液体と相溶性の低い有機溶剤中に分散させて液滴分散液を調製する工程を含む点において、共通の技術的特徴を有している。

しかしながら、当該技術的特徴は、文献 1 (Kai-Feng Du et al., Preparation and characterization of novel macroporous cellulose beads regenerated from ionic liquid for fast chromatography, Journal of Chromatography A, 2009. 12. 22, Vol. 1217, pp. 1298-1304) の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。

また、これらの発明の間には、ほかに同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

そして、請求の範囲には以下に示す 2 の発明群が含まれる。

(発明群 1) 請求項 1-11 に係る発明

イオン液体に二種以上の多糖類を溶解し、複合化された多糖を凝固させて多糖複合粒子を製造する方法、又は当該方法によって製造された多糖複合粒子。

(発明群 2) 請求項 12-22 に係る発明

イオン液体に溶解した高分子を、有機溶剤中で液滴分散させながら架橋剤と反応させる架橋高分子粒子の製造方法、又は当該方法によって製造された架橋高分子粒子。