

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4368424号
(P4368424)

(45) 発行日 平成21年11月18日(2009.11.18)

(24) 登録日 平成21年9月4日(2009.9.4)

(51) Int.Cl.	F I
CO8B 37/12 (2006.01)	C O 8 B 37/12 A
CO8B 37/00 (2006.01)	C O 8 B 37/00 Z
BO1J 20/281 (2006.01)	B O 1 J 20/26 L

請求項の数 10 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願平10-538446	(73) 特許権者	597064713
(86) (22) 出願日	平成10年3月4日(1998.3.4)		ジーイー・ヘルスケア・バイオサイエンス
(65) 公表番号	特表2001-516376(P2001-516376A)		・アクチボラダ
(43) 公表日	平成13年9月25日(2001.9.25)		スウェーデン国エスエー751 84
(86) 国際出願番号	PCT/SE1998/000386		ウプサラ ビヨルクガタン 30
(87) 国際公開番号	W01998/039364	(74) 代理人	100137545
(87) 国際公開日	平成10年9月11日(1998.9.11)		弁理士 荒川 聡志
審査請求日	平成17年3月2日(2005.3.2)	(74) 代理人	100105588
(31) 優先権主張番号	9700768-6		弁理士 小倉 博
(32) 優先日	平成9年3月4日(1997.3.4)	(74) 代理人	100129779
(33) 優先権主張国	スウェーデン(SE)		弁理士 黒川 俊久
		(72) 発明者	バリィストレム, ヤン
			スウェーデン、エス740 22ペーリ
			ング、レイニンクスヴェーゲン3番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 官能性の挿入法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

基 A を提示する多孔性マトリックスに基 A と試薬 I との反応で官能基を導入することによる多孔性マトリックスの製造方法であって、基 A と比較して不足した量の試薬 I にマトリックスを接触させて、官能基の異なる 1 以上の層を内部に有するマトリックスを生じさせ、基 A が炭素 - 炭素二重結合であり、試薬 I が X₂ 又は XOH (式中、X は塩素、臭素及びヨウ素から選択されるハロゲンである。)であることを特徴とする方法。

【請求項 2】

マトリックスが親水性であり、親水性基をその内部表面及び外部表面に提示することを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

マトリックスがヒドロキシル基をその内部表面及び外部表面に提示することを特徴とする、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

マトリックスがポリヒドロキシポリマーから構築されたものであることを特徴とする、請求項 1 乃至請求項 3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

マトリックスがポリサッカライドから構築されたものであることを特徴とする、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

基 A と試薬 I の反応を水性媒体中で行うことを特徴とする、請求項 1 乃至請求項 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7】

導入される官能基が、続く段階でマトリックスに、イオン交換基、バイオアフィニティー基、疎水性基、共有結合クロマトグラフィーに使用できる基、硫黄含有基、キレートもしくはキレート形成基、
- 相互作用を発生させる芳香族系を有する基、水素結合を供与する基、架橋基、親水性基又は重合基のいずれかの基を生じる化合物 B と反応する反応性基であることを特徴とする、請求項 1 乃至請求項 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

化合物 B が親和性及び / 又はゲル濾過を基本にした 1 以上の分離特性を導入することを特徴とする、請求項 7 記載の方法。

10

【請求項 9】

請求項 7 又は請求項 8 記載の方法で製造したマトリックスを、分離に際して成分混合物から 1 種類の成分を捕獲するのに使用する方法。

【請求項 10】

前記分離がクロマトグラフィーを用いることを特徴とする、請求項 9 記載の使用方法。

【発明の詳細な説明】

本発明の技術的分野および使用

本発明は、多官能性多孔性マトリックスの製造法に関する。現在、本発明のマトリックスの主な使用は、液体に溶解したまたは分散した成分の混合物からの 1 個またはそれ以上の成分の分離である。マトリックスは、a) オリゴペプチドおよびオリゴヌクレオチドの合成、b) 親和性反応を使用した分析および測定法等に、固相としても使用できる。また他の使用も存在する。

20

現在の分離は、成分(複数も有る)を含む液体をマトリックスと接触させ、分離する成分(複数もある)をマトリックスに分配し、それにより、マトリックスへの分配が異なる(全く分配されないものも含む)残りの成分から除去することを含む。

“マトリックスへの分配”なる表現は、成分がマトリックスに結合するか、そうでなければマトリックス上 / 内に吸着されることを意味する。

成分は、全細胞およびその一部を含む、個々の物質 / 複合体構造を意味する。

技術的背景 - 分離マトリックスの合成および関連する問題

30

十分に高い純度の成分を得るために、異なる官能の数個のマトリックスがしばしば分離工程で使用されなければならない。これが、分離工程の数の減少をさせる多官能性マトリックスの製造という考えを導いている。例えば、本願と共に現在出願されている我々の特許出願“分離用マトリックスおよび該マトリックスを利用した分離法”参照。我々は、それで、異なる関連する分離特性の二個またはそれ以上の別の相を含むマトリックスを記載している。

一定の分離特性のマトリックスの合成は、しばしば、官能基 A を提示するベースマトリックスと、試薬 I との反応を含み、基 A との反応を介して、マトリックスは新規官能性を得る。A はしばしばヒドロキシ、アミノ(1 級、2 級および 3 級)、チオール、カルボキシ(-COOH / -COO⁻)、アリルの中のようなアルケニル、ハロゲン等および対応する活性化(反応性)形である。基 A がしばしばマトリックスにくまなく存在するため、以前に既知の方法は、挿入した官能性がマトリックス全体に渡り同様に位置することに関連している。挿入した官能性は、反応性基またはマトリックスの分離特性に寄与する基を意味する。挿入された反応性基は、マトリックスの分離特性、またはマトリックス結合形で使用することが望まれる他の特性に寄与する基の形成に利用される。

40

以前に既知の方法に従っては、多孔性マトリックスに層状官能性を挿入することは不可能であった。

本発明の目的

本発明の主な目的は、内部に異なる官能性の層を示す、通常異なる分離官能性の層となる(分離層)分離マトリックスのための多孔性マトリックスの製造を可能にすることである。

50

本発明

本発明は、技術的背景に記載の方法に従った多孔性マトリックスへの官能性の挿入法である。本発明は、マトリックス内の1個またはそれ以上の十分に定義された層に所望の官能性を挿入することを可能にする。本発明は、

a)マトリックスが接触する試薬Iの量が、試薬Iとの反応に先立って存在する基Aと比較して不足している、そして

b)試薬Iと基Aの間の反応が、試薬Iのマトリックス内への輸送と比較して速いように、試薬Iと反応条件を選択する(基Aとの反応が、試薬Iのマトリックス内への分散と比較して速い)

ことを特徴とする。

10

不足しているは、試薬Iの用量がマトリックス内の全A基との反応に不充分であることを意味する。新規官能性の層が試薬Iにより挿入される際に、同時にマトリックスの内部層は未反応のまま残る。不足を計算するとき、試薬Iが、蒸発などを介した副反応により不足し得ることを考慮しなければならない。

基Aと試薬Iの間の速い反応は、また試薬Iが速い物理化学的反應で基Aに局所的に吸着されると理解される。この場合、試薬Iは、マトリックスへの局所結合を促進する1個またはそれ以上の反応物の添加によりマトリックスに安定化できる。

本発明の基Aの典型的例は、ヒドロキシ、アミノ、カルボキシ($-COOH / -COO^-$)、メルカプト、炭素-炭素二重結合などである。

試薬Iは、意図される官能基を挿入する限り、マトリックスに分配するよりも速くマトリックスに結合できる任意の化合物であり得る。分配の速度とAとの反応の速度の比は、層官能化が試薬Iの基Aに対する反応性の増加により、また試薬Iのサイズの増加により促進されることを考慮して、試薬Iの適当な選択により最適化できる。反応はしばしば溶媒、pH、温度等に影響される。適当な条件は、各試薬および行う反応のタイプの慣用の経験により選択される。非極性および極性有機溶媒および中間の極性の有機溶媒およびそれらの混合物、および適当な場合また水との混合物が、本発明の工程で純水よりも適している場合がしばしばある。

20

試薬Iは、起こるための適当な条件に適合する限り(マトリックス内の輸送と比較して、速い基との反応)、所望の官能性を挿入する化合物であり得る。分離マトリックスの合成のために、試薬IとAとの反応の場合、予定された層に分離特性を挿入する。

30

試薬Iはまたいわゆる活性化試薬でもよい。これらは、通常更なる官能化、および導入部に従ったマトリックスの使用に必要な反応性基の挿入に利用する。活性化試薬は求電子剤、求核剤、遊離ラジカルに基づくものであり得る。

優先日当時、我々は求電子試薬の形の試薬Iでほとんど作業している。例は、 X_2 または XOH (Xは塩素、臭素、ヨウ素のようなハロゲン)または陽性荷電または非荷電ハロゲンを容易に分配するハロゲン化試薬である。ほとんどのハロゲン化試薬、特に X_2 または XOH は、炭素-炭素二重結合と瞬時の反応をする。炭素-炭素二重結合はまた反応性基として近接ジハライドまたはハロヒドリンをもたらし得、それは容易に反応性エポキシ基に変換する。

通常、反応性基それ自体は有用な分離特性に寄与しない。従って、それらはしばしば更に本発明に従って活性化された層内に所望の分離特性を挿入する化合物Bと反応する。化合物Bの使用により挿入できる特定の分離特性は、下記の“導入された分離特性”の標題の場所に記載する。化合物Bは、反応性基を挿入し、次ぎに化合物Cとの反応を介した分離特性の挿入に利用できるように選択し得る。理論的に、長い反応シーケンスを使用することが可能であり得る。化合物B、C等が先に挿入された基との反応よりも遅く分散されるように配置できる限り、本発明はまた化合物B、Cなどと先に挿入された反応基の間の反応の各々にも適応できる。

40

必要な場合、後に除去できる保護基の挿入が適していることがある。例えば、試薬(試薬I、化合物B、C等)が、その中にそれらが存在する層を介して輸送される際に、基が試薬を破壊する場合である。

50

架橋の程度、マトリックスの密度または多孔性は、官能性の特別な種類である。化合物 B の添加無しに、層様に変化できる。基 A としての炭素 - 炭素二重結合と試薬 I としての X_2 または XOH の組み合わせに関して、架橋は、本発明に従った、活性化後(実際には OH^- (= 化合物 B) の添加)の単純な pH の変化による層活性化で達成できる。あるいは、ある場合、活性化は架橋を可能にする pH で達成できる。

親水性表面層が、化合物 B が水、 OH^- または挿入された反応基と反応できる他の親水性低分子求核剤である場合、通常得られる。所望により、マトリックスの内部の残りの基 A は、次いで、例えば、本発明に従った官能化に利用できる。

分離特性を層に挿入した後、他の分離特性の層を挿入できる。例えば、マトリックスの更新された活性化により、化合物 B で得られる以外の分離特性を挿入する化合物 B' と反応させる。付加層は、必ずしも本発明の工程に従って挿入される必要はない。この場合、また、保護基の挿入が必要であり得る。

本発明で使用し得るベースマトリックス。

適当なベースマトリックスは、しばしば粒子の形である。それらは不溶性でなければならないが、濡らすことができ、しばしばそれらをその中で使用する液体媒体中で膨張性でもある。その内部および外部表面は、疎水性から親水性のものであり得る。親水性特性は、その内部および外部表面がヒドロキシ ($-OH$)、アミノ ($-NH_2$)、カルボキシ ($-COOH$ / $-COO^-$)、アミド ($-CONH_2$)、反復基 $-OCH_2CH_2-$ および $-OCH_2-CH_2CH_2-$ 、 $-OCH_2CH_2(CH_3)-$ 等のような親水性基を提示する場合、達成される。

疎水性特性は、疎水性基、例えば、2 個またはそれ以上の炭素原子を有する炭化水素基が対応して存在する場合、達成できる。中間の親水性 / 疎水性に関して、マトリックスの表面がしばしば両方のタイプの基を提示する。

マトリックスは、典型的に合成または生物学的起源であり得る有機または無機ポリマーの構築物である。特に、いわゆるバイオポリマーを特記し得る。

既知の親水性有機マトリックスは、多くの上記のタイプの親水性基を提示するポリマーである。既知の親水性ポリマーは、いわゆるポリヒドロキシポリマーおよびポリアミドであり、水性媒体に不溶性であり、例えばポリビニリクアルコール、ポリ(ヒドロキシアルキルメタクリレート)および対応するアクリレート、ポリアクリル酸およびポリメタクリル酸アミド(例えば、トリアクリル酸アミドおよびトリスメタクリル酸アミド(トリス = $(H_2OCH_2CH_2)_3CNH_2$))、アガロース、デキストラン、プルランおよびセルロースのようなポリサッカライドを基本にしており、所望により分離マトリックスとして適するように架橋する。

既知の疎水性有機マトリックスは、スチレンジビニルベンゼンポリマー、ポリ(アルキルメタクリレート)、過フッ素化炭化水素 (PFC) のポリマー等の多孔性形である。

分離マトリックスの無機変異体は、ガラス、ゼオライト、シリカゲル、混成物質、酸化ジルコニウム等の多孔性形を基本にし得る。

親水性マトリックス、疎水性マトリックス、無機マトリックス等は親水化 / 疎水化を介して所望の親水性 / 疎水性とし得る。

優先日当時の最も好ましいマトリックスは、

- a) 所望により架橋し、所望によりまたデキストランで孔中を誘導体化された、例えば、それぞれ Sepharose R および Superdex R の名前で市販されている等級のビーズの形のアガロース、
- b) 例えば、Sephadex R の名前で市販されている等級のビーズの形の架橋デキストラン、
- c) 例えば、Sephacel R の名前で市販されている等級のセルロース、
- d) デキストランで孔を誘導体化されたポリアクリルアミドの架橋多孔性粒子、例えば、Sephaeryl R、そして
- e) 例えば、MonoBeads R および Source R の名前で市販されている等級の、親水化された、とりわけ、実質的に疎水性物質、例えばスチレン - ジミビルベンゼンポリマーの単分散および多分散多孔性粒子

10

20

30

40

50

に基づいている。

これらの商標は、Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Swedenの製品に対応する。マトリックスの密度はそれらをその中で使用する液体媒体より高い、低いまたは同じであり得る(液体媒体で飽和されたマトリックスの密度)。粒子の形のマトリックスは、その密度を決める充填剤を含み得る。例えば、WO-A-9200799(Kem-En-Tek-Upfront Chromatography)およびWO9118237(Pharmacia Biotech AB)参照。

分離マトリックスの多孔性(排除限界)に関する要求は、主に分離する化合物のモル重量および形により決定される。本発明に関して、多孔性が試薬 I およびまたしばしば化合物 B のマトリックス内の輸送を可能にしなければならないことも重要である。

興味深い排除限界は、一般に $3 - 10^6$ の間である。本出願人、および将来の特許権者の技術的分野内で、少なくとも 10^6 の排除限界が特に有利であり得る。

挿入された分離特性

マトリックスの分離特性は、しばしばそれが担持する基により決定される。この意味で一般的な基は：

- 1 . イオン交換基
- 2 . バイオアフィニティー基
- 3 . 疎水性基
- 4 . 共有結合クロマトグラフィーに使用できる基
- 5 . 例えば、いわゆるチオフィリック相互作用の硫黄含有基
- 6 . キレートまたはキレート形成基
- 7 . 異なる化合物といわゆる - 相互作用を発生させる芳香族系を有する基
- 8 . 水素結合を供与する基
- 9 . 架橋基
- 10 . 親水性基等
- 11 . 重合基である。

本発明の内容で、化合物 B または B' または対応する物質が、連続反応中で 1 - 11 の基のいずれかを示すように、しばしば配置される。これらの基は、また化合物 B と先の工程で本発明に従って層内に挿入された反応性基の間の反応の結果としても製造される。後者は特にタイプ 1 またはタイプ 3 - 9 のより小さい基で当てはまる。ある場合、基はまた直接試薬 I により挿入できる。

イオン交換基は、1 級、2 級、3 級、4 級アンモニウム基、スルホニウム基等のようなアニオン交換またはカルボキシレート ($-COO^-$)、ホスホネートまたはホスフェート (それぞれ $-PO_3^{2-}$ および $-OPO_3^{2-}$)、スルホネートまたはスルフェート (それぞれ、 $-SO_3^-$ および $-OSO_3^-$) 等のカチオン交換であり得る。基 $-COO^-$ 、 $-PO_3^{2-}$ 、 OPO_3^{2-} 、 $-SO_3^-$ および $-OSO_3^-$ において、遊離原子価は直接炭素原子に結合する。

既知のバイオアフィニティー基は、a) 抗原 / ハプテンおよび抗体 (その抗原またはハプテン結合フラグメントを含む)、b) 核酸およびその相補的対応物、c) レクチンおよび炭素水和物(carbohydrate)構造、d) IgG 結合タンパク質およびこのようなタンパク質に結合する IgG の一部を提示するタンパク質、e) センスおよびアンチセンスをベースにしたアフィニティーシステム等のペアの一つのメンバーである。バイオアフィニティー基はまた合成的に製造した有機分子由来の基であり、天然に存在する生物特異的親和性を“模倣”する、いわゆる“模倣物”も含む。

疎水性基は、しばしば数個の酸素、窒素または硫黄原子を含むか、含まない炭化水素基である。疎水性基の典型的な例は、直鎖、分枝鎖および環状飽和、不飽和または芳香族炭化水素基である。

共有結合クロマトグラフィーに使用できる基の中で、ジスルフィド基、主に反応性ジスルフィド基 ($-S-S-R^1$) および遊離チオール基 ($-SH$) を特記できる。R¹ の例は 2 - ピリジルである。R¹ の更なる例は、例えば、US4,647,655(Pharmacia AB) 参照。

チオフィリック相互作用に利用できる硫黄含有基の中で、特記できる基は、本質的に疎水性であるが、1 個またはそれ以上のチオエーテル構造がその中に存在するものである。例

10

20

30

40

50

えば、Oscarsson & Porath WO-A-9533557 ; Porath EP-A-165912 ; およびPorath EP-A-16 8363参照。

水素結合基は、先に使用されている

(Belew, Berglund, Bergström, Söderberg, SE 9600590-5 (=WO 97 29825)

(引用して包含させる)。このタイプの基は、しばしばアンモニウム窒素と2または3炭素原子の距離のヒドロキシ基と共に、弱いアニオン交換アンモニウム基(1級、2級または3級)を示す。

架橋基は、試薬Iの使用により直接挿入できる。上記参照。あるいは、同時に2個またはそれ以上の反応性基と結合できる化合物Bを使用できる。

本発明の親水性基は、主に1個のヒドロキシおよび1個またはそれ以上のヒドロキシまたは反復基 - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ - を有する低級ヒドロキシアルキルである。この基は、しばしば低級分子、例えば、25炭素原子より小さい。

リガンド有りまたは無しの重合基は、ゲル濾過特性を付与できる。ポリマーは架橋できる。

適当な基は、典型的に、既知の方法に従って種々の構造であり得る架橋を介してマトリックスに結合する。橋構造は、上記の1-11の1個またはそれ以上の基を各橋に有する、重合、例えば、親水性または疎水性ポリマーであり得る。一般的な橋名は、触手、“エクステンダ”、フルーフ、“リンカー”、“スパーサー”等である。疎水性橋は主に疎水性液体媒体に適し、しばしば1-11の基の挿入に良好な有用性および能力を有する。親水性液体媒体と組み合わせた疎水性橋も対応が当てはまる。親水性ポリマー橋の例は、デキストランのようなポリサッカライドおよび他の水溶性ポリヒドロキシポリマーである。

本発明の更なる態様

本発明の一つの態様は、本発明に従って製造できるマトリックスである。これらのマトリックスは異なる官能性を有する1個またはそれ以上の層を含む。一つの層における少なくとも一つのリガンドの1-11の基での置換の程度は、他の層での同じリガンドの置換の程度としばしば異なる。本発明のマトリックスの多くの態様において、表面層の置換の程度は0かほとんど0であるが、同時に内部層に同じリガンドが存在する。またこの逆も真実であり得る。

本発明の別の態様は、導入部に従った分離のためのマトリックスの使用である。

マトリックスの選択および挿入された基(上記参照)に依存する分離は、アフィニティークロマトグラフィーとしてまたは分離する化合物のサイズおよび形に基づいたクロマトグラフィーとして(ゲル濾過)、または対応するバッチ式方法として設計できる。充填床および安定化流動/伸長床が使用できる。アフィニティークロマトグラフィーの例は、イオン交換クロマトグラフィー(アニオン交換、カチオン交換)、バイオアフィニティー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(HIC)、共有結合クロマトグラフィー、チオフィリッククロマトグラフィー、キレートに基づいたクロマトグラフィー、

相互作用を基本にしたクロマトグラフィー等である。原則として、条件およびプロトコールは分離法の各々のタイプの先の知識に従って選択する。

分離は、類似のまたは非常に異なる成分を含む混合物から行い得、すべて一つの小分子から、粒子凝集、バイオアフィニティー複合体、動物および植物細胞ならびにその一部、微生物およびその一部等においてのように、互いに複合的に結合した個々の成分である。関心の物質は、取り分け、オリゴヌクレオチドを含む核酸、ペプチドを含むタンパク質、脂質および他の有機および無機化合物である。

分離は、興味の成分がa)マトリックスに分配されるが、望まない物質は液体媒体に残ったままであるかまたはb)液体媒体に残るが、望まない物質がマトリックスに分配されることを含み得る。

本発明を多くの非限定的実施例と共に示す。本発明は、明細書の一部を構成する添付の請求の範囲に定義される。

実験部分

10

20

30

40

50

実施例 1 : ビーズの外部層内にロックを有する Q セファロース 4 ファーストフローイオン交換体の製造

A . 粒子形の架橋アリル化アガロースの製造 (アリル化セファロース 4 ファーストフロー) 。セファロース 4 ファーストフローは Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden 由来であった。平均粒子サイズ $90\text{ }\mu\text{m}$ の架橋アガロースを含むマトリックスを、エピクロロヒドリンとアガロースの NaOH 存在下での Porath et al. (J. Chromatog. 60(1971) 167-77 および US-A-3,959,251) に従った反応により製造した。アリル化は、完成した粒子とアリルグリシジルエーテルと塩基としての NaOH を、 0.26 mmole/mL ゲルのアリルレベル ($\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{OCH}_2\text{CHOCH}_2-$) まで反応させて達成させる。

B . 秤量平均分子量 50000 のデキストランの溶解。デキストラン T 500 は、Amersham Pharmacia Biotech AB から商品として入手可能であり、Leuconostoc mesenteroides 由来の加水分解および分画粗デキストランを含む。デキストラン T 500 12.8 g を、三首フラスコ内の蒸留水 250 mL に攪拌しながら溶解する。

C . 架橋アリル化アガロースの部分的臭素化。工程 A に従って製造した排出したアリル化アガロース 30 mL 、蒸留水 30 mL および無水 NaOAc 0.64 g を 100 mL 反応容器中に入れる。続いて、臭素化を、激しく攪拌しながら臭素 0.25 mL を添加することにより達成する。臭素の量の計算において、一部の揮発性臭素が蒸発することを考慮する。反応は、混合物が純水に白色になるまで数分続ける。臭素化後、ゲルをガラスフィルター上で蒸留水で洗浄する。

D . デキストラン T 500 の結合。工程 C 由来のゲルを吸引乾燥し、工程 B 由来の溶解デキストラン T 500 を含む反応容器に注意深く攪拌しながら添加する。混合物を 1 時間平衡化させる。続いて、反応を蒸留 H_2O 27.2 mL に溶解した NaOH 2.98 g および NaBH_4 0.12 g の添加により開始する。温度を 35°C に調節し、反応を一晩 (例えば 16 時間)、注意深く攪拌しながら続ける。攪拌を停止し、反応混合物をガラスフィルターで濾過する。ほとんどのデキストラン T 500 が、蒸留水で洗い出された後、数 mL の濃 HOAc で、直接濾過漏斗を $\text{pH} < 7$ に、好ましくは $5 - 6$ にして中和を行い、次いでゲルを再び蒸留水で洗浄する。結合後、残りのアリルレベルは 0.19 mmole/mL であった。

E . 残りのアリル基の臭素化。工程 D に従って製造した、ビーズの外部のデキストラン T 500 の層で修飾させた吸引されたアリル化アガロース 20 mL 、蒸留水 4.53 mL および無水 NaOAc 0.8 g および臭素 0.4 mL を、激しく攪拌しながら三首フラスコに添加する。攪拌を黄色着色 / 過剰の臭素が無くなるまで続ける。

F . 残りのアリル基を介したイオン交換基の挿入。アニオン交換 4 級アミン基 ($\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CHOCH}_2-$ の挿入を、E と同じ三首フラスコで直接続ける。65% トリメチルアンモニウムクロライド (TMAC) 9.9 g をフラスコに入れる。10 分攪拌し、次いで蒸留水 3.0 g に溶解した NaOH 3.0 g を入れる。この 50% NaOH 溶液の添加において、混合物は薄黄色になる。その直後、 NaBH_4 0.06 g をそれに入れる。温度を 24°C に調節し、攪拌を開始する。反応を一晩 (例えば 16 時間) 続ける。反応を、数 mL の濃 HOAc での直接フラスコ内の $\text{pH} < 7$ 、好ましくは $\text{pH} 5 - 6$ への中和により停止し、次いでゲルを蒸留水および数ゲル容量の 1.0 M NaCl で繰り返し洗浄する。最後に、ゲルを再び蒸留水で繰り返し洗浄する。イオン交換の能力を、 0.132 mmole/mL への塩化銀滴定により測定する。

G . ビーズの外部層内にロックを有する Q セファロース 4 ファーストフローイオン交換体の顕微鏡評価。全顕微鏡評価は、 200 の倍率での相コントラストの可変調節可能な顕微鏡で行った。実施例 1 の出発マトリックスであるセファロース 4 ファーストフローおよび完成した実施例 1 のロックを有する Q セファロース 4 ファーストフローイオン交換体を、比較のためにヘマトキシリンで染色した。後者の場合、ロックは撮った顕微鏡写真で、ビーズの外部相に明らかに見えた。ロックビーズが働く光学の観察を可能にするために、完成した Q セファロース 4 ファーストフローロックイオン交換体を数分ウシ CO - ヘモグロビンと、 $\text{pH} 8.2$; 0.020 M トリス - HCl 緩衝液でインキュベートした。過剰の

10

20

30

40

50

C O - ヘモグロビンを同じ緩衝液で洗い出した。次いでビーズを先の付加的染色無しに顕微鏡で観察した。顕微鏡写真において、ビーズの内部の赤色C O - ヘモグロビンが見られたが、ビーズのデキストランT 5 0 0 ロック層では見られない。

実施例 2 : ビーズの外部層内にロックを有するQセファロース 6 ファーストフローイオン交換体の製造

A . 粒子形の架橋アリル化アガロースの製造(アリル化セファロース 6 ファーストフロー)。セファロース 6 ファーストフローはAmersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden由来であった。平均粒子サイズ9 0 μmの架橋アガロースを含むマトリックスを、エピクロロヒドリンとアガロースのN a O H 存在下でのPorath et al.(J. Chromatog. 60(1971) 167-77およびUS-A-3,959,251)に従った反応により製造した。アリル化は、完成した粒子とアリルグリシジルエーテルと塩基としてのN a O H を、0 . 2 7 mmole / mLゲルのアリルレベル($\text{CH}_2 = \text{CHCH}_2\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2 -$)まで反応させて達成させる。

B . 秤量平均分子量5 0 0 0 0 0のデキストランの溶解。デキストランT 5 0 0 は、Amersham Pharmacia Biotech ABから商品として入手可能であり、Leuconostoc mesenteroides由来の加水分解および分画粗デキストランを含む。デキストランT 5 0 0 5 7 . 7 g を、三首フラスコ内の蒸留水1 5 7 mLにゆっくり攪拌しながら溶解する。

C . 架橋アリル化アガロースの部分的臭素化。工程Aに従って製造した排出したアリル化アガロース9 0 mL、蒸留水9 0 mLおよび無水N a O A c 1 . 9 2 g を5 0 0 mL三首フラスコに入れる。続いて、臭素化を、激しく攪拌しながら臭素0 . 6 9 mLを添加することにより達成する。臭素の量の計算において、一部の揮発性臭素が蒸発することを考慮する。反応は、混合物が純水に白色になるまで数分続ける。臭素化後、ゲルをガラスフィルター上で蒸留水で洗浄する。

D . デキストランT 5 0 0 の結合。工程C由来のゲルを吸引乾燥し、工程B由来の溶解デキストランT 5 0 0 を含む反応容器に注意深く攪拌しながら添加する。混合物を1時間平衡化させる。続いて、反応を蒸留H₂O 4 1 . 6 mLに溶解したN a O H 1 0 . 3 9 g およびN a B H₄ 0 . 3 6 gの添加により開始する。温度を3 5 に調節し、反応を一晩(例えば1 6 時間)、注意深く攪拌しながら続ける。攪拌を停止し、反応混合物をガラスフィルターで濾過する。ほとんどのデキストランT 5 0 0 が、蒸留水で洗い出された後、数mLの濃H O A c で、直接濾過漏斗をp H < 7 に、好ましくは5 - 6 にして中和を行い、次いでゲルを再び蒸留水で洗浄する。結合後、残りのアリルレベルは0 . 1 8 mmole / mLであった。

E . 残りのアリル基の臭素化。工程Dに従って製造した、ビーズの外部のデキストランT 5 0 0 の層で修飾させた吸引されたアリル化アガロース2 0 mL、蒸留水9 . 0 6 mLおよび無水N a O A c 1 . 6 g および臭素1 . 0 mLを、激しく攪拌しながら2 5 0 mL三首フラスコに添加する。攪拌を黄色着色 / 過剰の臭素が無くなるまで続ける。

F . 残りのアリル基を介したイオン交換基の挿入。アニオン交換4級アミン基(CH_3)₃N⁺CH₂CHOHCH₂-の挿入を、Eと同じ三首フラスコで直接続ける。6 5 %トリメチルアンモニウムクロライド(TMAC)1 9 . 9 g をフラスコに入れる。1 0 分攪拌し、次いで蒸留水6 . 0 g に溶解したN a O H 6 . 0 g を入れる。この5 0 % N a O H 溶液の添加において、混合物は薄黄色になる。その直後、N a B H₄ 0 . 1 2 g を入れる。温度を2 4 に調節し、攪拌を1 3 0 RPMで開始し、反応を一晩(例えば1 6 時間)続ける。反応を、数mLの濃H O A c での直接フラスコ内のp H < 7、好ましくはp H 5 - 6 への中和により停止し、次いでゲルを蒸留水および数ゲル容量の1 . 0 M N a C l で繰り返し洗浄する。最後に、ゲルを再び蒸留水で繰り返し洗浄する。イオン交換の能力を、0 . 1 4 2 mmole / mLへの塩化銀滴定により測定する。

G . デキストランT 5 0 0 Qセファロース 6 F Fのクロマトグラフィー評価。外部デキストラン層の硬化は、約1 mLのイオン交換体を充填されたHR5/5カラム(Amersham Pharmacia Biotech AB)で、勾配流を使用して行った。大きなタンパク質チオグロブリン6 6 0 kDおよび小さな - ラクトアルブミン1 4 . 4 kDを、サンプルとして両方とも陰性に荷電しているp H 8 . 2 で使用した。図1は、慣用の強度のアニオン交換体であるQセファロース

10

20

30

40

50

HPで流した勾配での両方のタンパク質の分離を、陽性に荷電したQリガンドの利用性のサイズに基づいた制限無しで示す。ここで、 α -ラクトアルブミン(ピーク1)は、チログロブリン(ピーク2)より前に溶出する。図2は、本実施例に従ったデキストランT500Qセファロース6FFイオン交換体上での、チログロブリンの勾配流の結果を示す。この大きなタンパク質は、吸着させることなくカラムを通して右に移動する。同様の方法で流した小さい α -ラクトアルブミンは、吸着され、勾配で溶出する(ピーク2)。図3参照。

実施例3：層活性化を使用したcat-アニオン交換体の合成

A．合成。実施例1および2の方法と同様にして、セファロースHPとアリルグリシジルエーテルを水中で、塩基としての水酸化ナトリウムと共に反応させることにより製造したアリルレベル約0.2 mmole/mLのアリル化セファロースHPを、ガラス反応容器中の蒸留水20 mLに懸濁し、それを0.3 mmole元素状態臭素と激しく攪拌して臭素化した。次いで、部分的に臭素化したゲルを、亜硫酸ナトリウムで飽和した0.1 M水酸化ナトリウム溶液2.5 mLと反応させた。反応は40℃で一晩であった。反応を酢酸で中和して停止させ、続いて約100 mL蒸留水でガラスフィルター漏斗で洗浄した。部分的に官能化されたマトリックスの残りのアリル基を、ゲル懸濁液の残存する黄色着色が得られるまで元素状態臭素を滴下することにより、20 mL蒸留水中、過剰の臭素で臭素化した。臭素化され部分的に官能化されたマトリックスを次いでガラスフィルター漏斗で蒸留水で洗浄し、次いでビス-(3-アミノプロピル)アミンの50%溶液2.5 mLに入れた。反応を50%塩酸で中和することにより停止させ、続いて約100 mL蒸留水でガラスフィルター漏斗で洗浄した。

B．層状cat-アニオン交換体のクロマトグラフィー評価。上記の詳述に従って製造したcat-アニオン交換体約1 mLをHR5/5カラム(Amersham Pharmacia Biotech AB)に充填し、FPLCシステムに接続し、pH 6.0緩衝液で平衡化した。タンパク質サンプルを吸着させ、次いでまたpH 6.0の塩勾配を使用して溶出した。

サンプルA．pH 6.0で陽性に荷電したタンパク質であるリソザイムを上記に従って流した。リソザイムがマトリックスの陰性スルフォネートリガンドに結合でき、次いで溶出できることを示す図4のクロマトグラム参照。

サンプルB．pH 6.0で陰性に荷電したタンパク質であるトランスフェリン、卵白アルブミンおよび α -ラクトグロブリンを上記に従って流した。トランスフェリン、卵白アルブミンおよび α -ラクトグロブリンがマトリックスの陽性荷電アミンリガンドに結合でき、次いで溶出できることを示す図5のクロマトグラム参照。

クロマトグラフィー試験AおよびBの結果は、粒子内に陽性荷電基のみを含む領域/層および陰性荷電基のみの領域/層が存在することを示す。

図

図1．QセファロースHPを含み、ベッド高5.9 cmのHR5/5カラム(Amersham Pharmacia Biotech)の0.5 mg/mL α -ラクトアルブミン(ピーク1)および0.5 mg/mLチログロブリン(ピーク2)を含む50 μ lサンプル流のクロマトグラム。

緩衝液A：20 mM トリス - HCl pH 8.2。

緩衝液B：20 mM トリス - HCl + 0.5 M NaCl

流速：1 mL / 分

図2．実施例2のデキストランT500Qセファロース6FFを含み、ベッド高6.5 cmのHR5/5カラム(Amersham Pharmacia Biotech)の0.25 mg/mL α -ラクトアルブミンを含む200 μ lサンプル流のクロマトグラム。

緩衝液A：20 mM トリス - HCl、50 mM NaCl pH 8.2。

緩衝液B：20 mM トリス - HCl + 1 M NaCl

流速：0.2 mL / 分

図3．実施例2のデキストランT500Qセファロース6FFを含み、ベッド高6.5 cmのHR5/5カラム(Amersham Pharmacia Biotech)の1 mg/mLチログロブリンを含む200 μ lサンプル流のクロマトグラム。

緩衝液A：20 mM トリス - HCl、50 mM NaCl pH 8.2。

緩衝液B：20 mM トリス - HCl + 1 M NaCl

流速：0.2 mL / 分

図4．実施例3のcat-アニオン交換体を含み、ベッド高4.2 cmのHR5/5カラム(Amersham Pharmacia Biotech)の1 mg / mLリソザイムを含む50 μ lサンプル流のクロマトグラム。

緩衝液A：20 mMピペラジン - HCl pH 6.0。

緩衝液B：20 mMピペラジン - HCl + 1 NaCl

流速：0.5 mL / 分

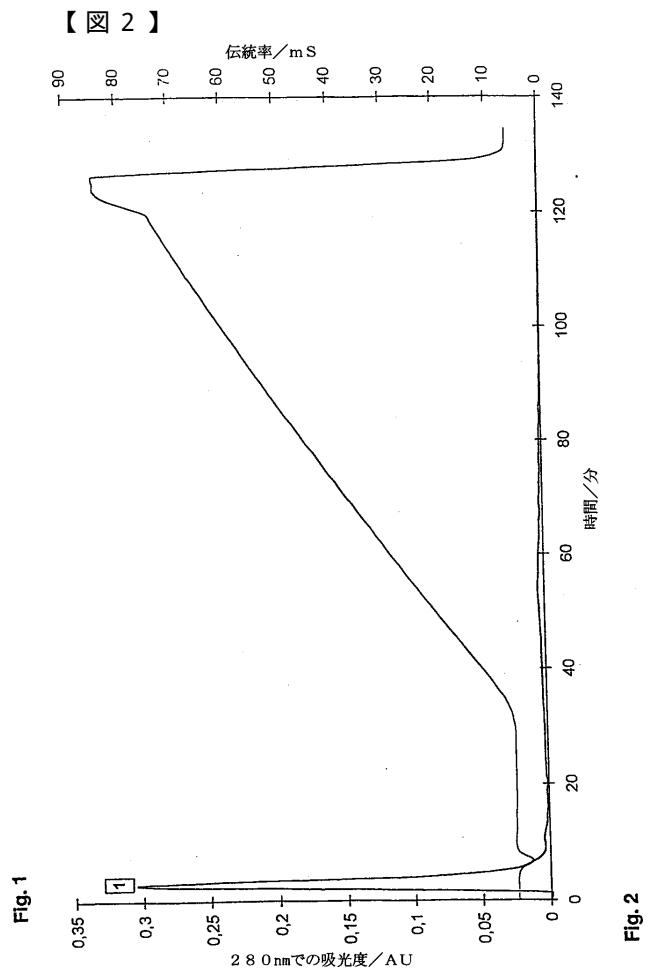
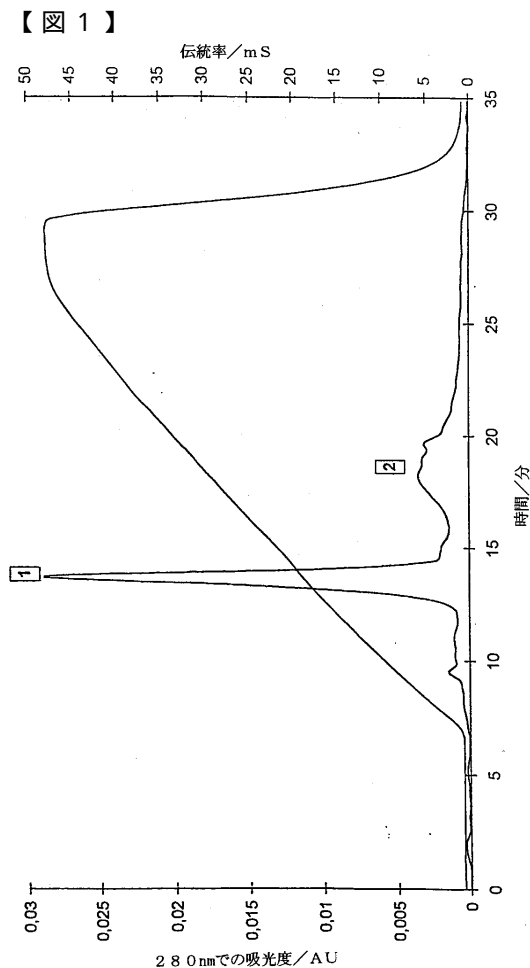
図5．実施例3のcat-アニオン交換体で、ベッド高4.2 cmの0.1 mg / mLトランスフェリン(ピーク1)、0.2 mg / mL卵白アルブミン(ピーク2および3)および0.2 mg / mL - ラクトグロブリン(ピーク4)を含む50 μ lサンプル流のクロマトグラム。

緩衝液A：20 mMピペラジン - HCl pH 6.0。

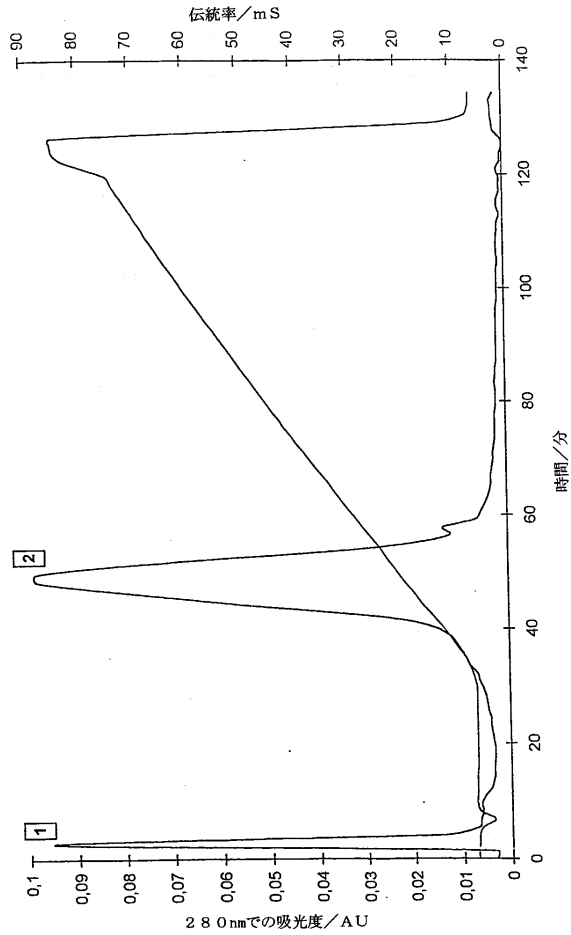
緩衝液B：20 mMピペラジン - HCl + 1 NaCl

流速：0.5 mL / 分

10



【図 3】



【図 4】

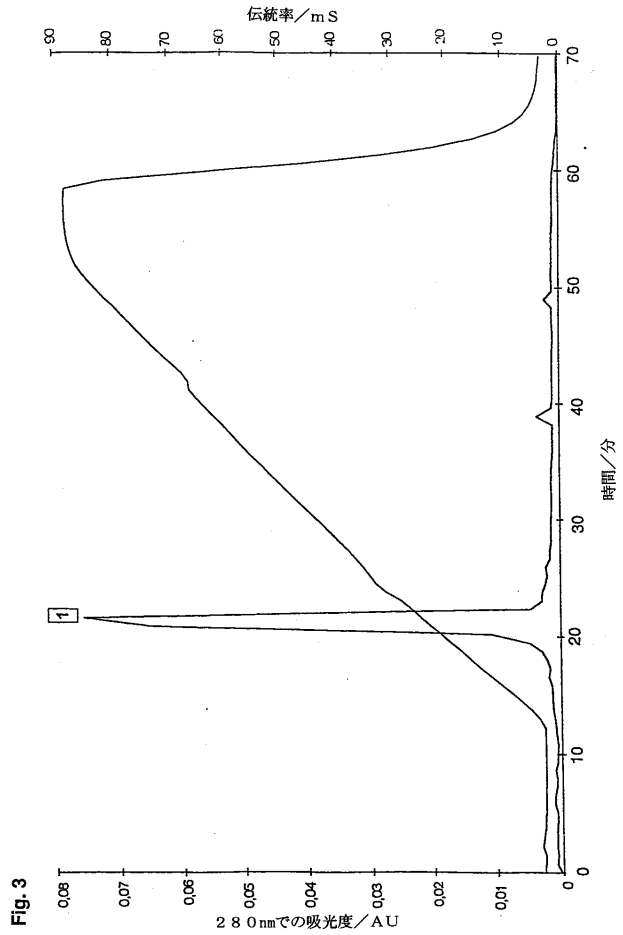


Fig. 3

Fig. 4

【図 5】

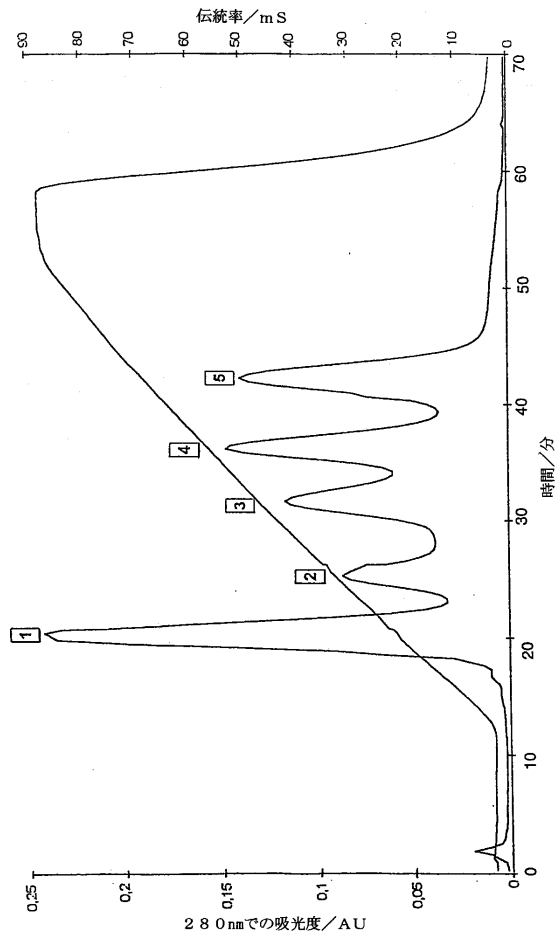


Fig. 5

フロントページの続き

(72)発明者 バリイルンド, ロルフ

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

(72)発明者 セデルバリィ, レナート

スウェーデン、エス 7 5 5 9 8 ウプサラ、エクシャガーナ、クルセンバリィ

審査官 福井 悟

(56)参考文献 特開昭 6 2 - 0 2 5 1 0 2 (J P , A)

特開昭 5 7 - 1 9 5 7 0 1 (J P , A)

特公昭 4 3 - 0 2 2 3 2 0 (J P , B 1)

特許第 4 0 8 1 1 4 3 (J P , B 2)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C08B 1/00 - 37/18

B01J 20/281 - 20/285

B01D 15/08