

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5941469号
(P5941469)

(45) 発行日 平成28年6月29日(2016.6.29)

(24) 登録日 平成28年5月27日(2016.5.27)

(51) Int.Cl.

F I

G O 1 N 30/60 (2006.01)

G O 1 N 30/60

B

G O 1 N 30/60

Z

G O 1 N 30/60

Q

請求項の数 9 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2013-530114 (P2013-530114)	(73) 特許権者	597064713
(86) (22) 出願日	平成23年9月21日 (2011.9.21)		ジーイー・ヘルスケア・バイオサイエンス
(65) 公表番号	特表2013-537977 (P2013-537977A)		・アクチボラダ
(43) 公表日	平成25年10月7日 (2013.10.7)		スウェーデン国エスエー 751 84
(86) 国際出願番号	PCT/SE2011/051132		ウプサラ ビヨルクガタン 30
(87) 国際公開番号	W02012/039670	(74) 代理人	100137545
(87) 国際公開日	平成24年3月29日 (2012.3.29)		弁理士 荒川 聡志
審査請求日	平成26年9月17日 (2014.9.17)	(74) 代理人	100105588
(31) 優先権主張番号	1050993-3		弁理士 小倉 博
(32) 優先日	平成22年9月24日 (2010.9.24)	(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	アンデルステッド, レナ
			スウェーデン国、エス 751 84 ウ
			プサラ ビヨルクガタン 30、ジーイー
			・ヘルスケア

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クロマトグラフィーカラム用プラスチックベッド支持体の湿潤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

クロマトグラフィーカラム用プラスチックベッド支持体の湿潤方法であって、

- a) その中に空気を含む細孔構造を有するプラスチックベッド支持体を用意する段階と、
b) 0.1 ~ 30 wt % の非界面活性剤系湿潤剤を含む水溶液中にプラスチックベッド支持体を浸すことで、前記細孔構造から 60 % 以上の空気を除去する段階と、
c) 前記水溶液中に浸したときに 10 kPa 以上の過圧を前記プラスチックベッド支持体に印加し、及び / 又は前記水溶液中に浸したときに前記プラスチックベッド支持体を振動させる段階と

を含んでなる方法。

【請求項 2】

段階 b) が 0.1 ~ 17 wt % の非界面活性剤系湿潤剤を含む水溶液中にプラスチックベッド支持体を浸すことを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

段階 b) において、前記水溶液が引火点を有しないか、或いは 30 以上の引火点を有する、請求項 1 又は請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記非界面活性剤系湿潤剤が、n-プロパノール、水酸化ナトリウム及び水酸化カリウムからなる群から選択される、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】

10

20

前記水溶液が12～21wt%のn-プロパノールを含む、請求項1乃至請求項4のいずれか1項記載の方法。

【請求項6】

前記プラスチックベッド支持体が5cm以上の直径を有する、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】

前記プラスチックベッド支持体がポリオレフィンからなる、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】

1以上のプラスチックベッド支持体(4)を含むカラム(7)上で生体分子を分離する方法であって、

a) その中に空気を含む細孔構造を有するプラスチックベッド支持体(4)を含むカラム(7)を用意する段階と、

b) 0.1～30wt%の非界面活性剤系湿潤剤を含む水溶液中に前記プラスチックベッド支持体を浸す段階と、

c) プラスチックベッド支持体を前記水溶液中に浸したときに10kPa以上の過圧を前記カラムに印加し、及び/又はプラスチックベッド支持体を前記水溶液中に浸したときに前記カラムを振動させることで、前記細孔構造から60%以上の空気を除去する段階と、

d) 前記プラスチックベッド支持体を洗浄する段階と、

e) 前記カラム中にクロマトグラフィー媒体のベッド(8)を充填する段階と、

f) 生体分子を含む液体を前記カラム上に適用する段階と、
を含んでなる方法。

【請求項9】

段階b)において、前記水溶液が12～21wt%のn-プロパノール或いは0.1～10wt%の水酸化ナトリウム又は水酸化カリウムを含む、請求項8記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は一般的には分離に関し、詳しくはプロセスクロマトグラフィーに関する。さらに詳しくは、本発明はクロマトグラフィーカラム用プラスチックベッド支持体の湿潤に関する。

【背景技術】

【0002】

クロマトグラフィーカラムは、プロセス液体の精製及びプロセス液体からの興味ある物質の分離のため、工業プロセスにおいて使用されることがある。1つの重要な用途はバイオプロセッシングであって、その場合にはタンパク質及び他のバイオ医薬品が複雑な生物学的供給材料から精製される。典型的なクロマトグラフィーカラムは中空のカラム管からなるカラム壁を含み、これは着脱自在の上部端板アセンブリ及び着脱自在の下部端板アセンブリに連結されている。一方の端板アセンブリには、通例は入口パイプ及び入口弁を含むプロセス流体入口装置が設けられ、他方の端板アセンブリには、通例は出口パイプ及び出口弁を含むプロセス流体出口装置が設けられている。カラム管の各端には、通常はカラムの内部に着脱自在の分配板が設けられている。これらの入口及び出口分配板はそれぞれの端板アセンブリに結合されることがあり、或いは上部分配板は端板アセンブリに対して着脱し得るように配置されることがある。使用時には、分配板間のカラム空間は通常はクロマトグラフィー媒体で満たされる。各分配系と媒体との間には、媒体粒子がカラムから脱出するのを防止するため、通常は多孔質のベッド支持体が設けられる。入口分配板は流入する流体をカラムの入口端にある媒体の表面に沿って均等に分配するためのものである一方、出口分配板はカラムの出口端にある媒体の表面から流体を均等に集めるためのものである。

【 0 0 0 3 】

多孔質のベッド支持体は実質的にカラムの内径全体にわたって延在し、通常はカラムの外周及びカラムの中心の位置で固定されている。支持体は金属又はポリマーの糸の織物から製造でき、或いは焼結粒子から製造できる。支持体はまた、例えば焼結によって接合された複数のメッシュ織物の多層構造物であることもある。生体分子の処理に際しては、高濃度の塩化物、酸性緩衝剤、次亜塩素酸塩などを含む溶液のような腐食性液体を使用することが普通であり、これらの場合にはステンレス鋼などの腐食を避けるためにプラスチックベッド支持体を使用することがしばしば好ましい。常用されるタイプのプラスチックベッド支持体は、焼結ポリマー粒子から製造される多孔質フリットからなっている。これらのフリットとしては、Porvair PLC（英国）及びPorex Corp（米国）のような会社から、ポリエチレン、ポリプロピレンなどの複数の材料からなるものが入

10

【 0 0 0 4 】

これらの材料は疎水性であり、乾燥状態で貯蔵した後にカラム中で使用する場合には、それを完全に湿潤させて細孔構造から空気を排除しなければならない。これを行うための方法の1つは、低い表面張力を有する液体（例えば、水混和性溶媒又は界面活性剤水溶液）中にベッド支持体を浸漬し、空気が置換された後に水又は水溶液で洗浄してからカラムの運転に使用することである。I Bemberis et al (BioPharm International Guide pp 23 - 30, July 2003) は、ベッド支持体を > 80 % のエタノール、イソプロパノール又はメタノール中に浸漬する

20

【 0 0 0 5 】

溶媒方法の欠点は、溶媒が可燃性であり、すべての電気機器が防爆性である爆発管理区域内でしか取り扱えないことである。大抵のバイオプロセッシング施設では通常は溶媒を取り扱わないので、これは実質的な追加のコストを必要とする。溶媒はまた、主として水系と共に使用するように設計されたバイオプロセッシングカラム中の材料を攻撃することがある。界面活性剤に関する問題は、それが発泡を引き起こすこと、並びにそれが細孔表面に強く吸着されて、緩徐な脱着及びその結果としてバイオ医薬生成物中への微量の界面活性剤の漏入を引き起こす可能性があることである。非経口医薬品においては、刺激及び細胞膜の破壊を引き起こす点で界面活性剤は望ましくない夾雑物である。

30

【 0 0 0 6 】

したがって、可燃性液体も界面活性剤も必要としない湿潤方法に対するニーズが存在している。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 7 】

米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 1 3 3 4 2 4 号明細書

【 発明の概要 】

【 0 0 0 8 】

本発明の一態様は、空気を含まないプラスチックベッド支持体を具備したカラムにおいて効率的なクロマトグラフィーを可能にすることである。これは、請求項 1 に記載される湿潤方法及び請求項 1 3 に記載されるクロマトグラフィー方法によって達成される。

40

【 0 0 0 9 】

かかる方法に関する 1 つの利点は、いかなる界面活性剤も可燃性溶液も使用する必要がないことである。

【 0 0 1 0 】

上記態様の 1 以上は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明によって達成できる。本発明の追加の態様、詳細及び利点は、以下の詳細な説明及び特許請求の範囲から明らかとなる。

【 図面の簡単な説明 】

50

【 0 0 1 1 】

【図 1】図 1 は、ベッド支持体を含むクロマトグラフィーカラムを示している。

【図 2】図 2 は、本発明に従ってプラスチックベッド支持体を湿潤させる方法を示している。

【図 3】図 3 は、本発明に従ってプラスチックベッド支持体を湿潤させる方法を示している。

【図 4】図 4 は、本発明に従ってクロマトグラフィーを実施する方法を示している。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 2 】

本明細書中で「非界面活性剤系湿潤剤」という用語は、界面活性剤でないプラスチックベッド支持体用の湿潤剤を意味する。（例えば、Kirk - Othmer Encyclopedia of Chemical Technology vol. 24 及び <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471238961.1921180612251414.a01.pub2/abstract> に定義されているように）界面活性剤は、 $C_8 \sim C_{18}$ 炭化水素又はフルオロカーボン鎖及び親水性基（極性又はイオン性）を含む化学種である。したがって、界面活性剤は 130D より高い分子量を有する。湿潤剤は、固体基体上における水性液体の展延力及び浸透力を高める添加剤である。非界面活性剤系湿潤剤の例は、水溶性溶媒及びアルカリ金属水酸化物である。

【 0 0 1 3 】

本明細書中で「引火点」という用語は、揮発性液体が気化して空気中に可燃性混合物を生じる最低温度を意味する。引火点は、例えば ASTM D 3828 又は ASTM D 93 密閉カップ法によって測定でき、液体の可燃性の指標である。

【 0 0 1 4 】

本明細書中で「水溶性」という用語は、物質が室温（即ち、約 25 ）の水に対して 2 wt % 以上の濃度に可溶であることを意味する。

【 0 0 1 5 】

本明細書中で「水混和性」という用語は、物質が室温（即ち、約 25 ）の水に対して 0 ~ 100 % の濃度範囲全体にわたって可溶であることを意味する。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 6 】

図 2 によって図示される本発明の一態様は、界面活性剤又は可燃性溶液を使用せずにプラスチックベッド支持体からの効率的な空気除去を可能にすることに関する。これは、細孔構造に空気を有する多孔質プラスチックベッド支持体を用意し、0.1 ~ 30 wt % の非界面活性剤系湿潤剤を含む水溶液中にプラスチックベッド支持体を浸すことで、細孔構造から約 60 % 以上の空気を除去する方法によって達成される。水溶液中の非界面活性剤系湿潤剤の濃度は、有利には 0.1 ~ 20 wt %、例えば 0.1 ~ 17 wt % 又は 12 ~ 17 wt % であり得る。本方法はまた、細孔構造から約 80 % 以上の空気、例えば約 90 % 以上の空気又は実質的にすべての空気を除去し得る。細孔構造中の空気は、例えば多孔質プラスチックベッド支持体の製造又は貯蔵に由来する任意のガス状物質を含んでいてもよいことを理解すべきである。空気の除去は、例えば、浸したベッド支持体を秤量することで検査できる。即ち、完全な空気除去は、全細孔容積が満たされた場合に相当する重量増加によって表される。細孔容積は通常は材料供給業者から提供されるが、当技術分野で公知の多孔度測定法又は密度測定法によって測定することもできる。空気除去をモニターするための別法は、処理済みのベッド支持体を含むカラムのクロマトグラフィー性能を測定することで可能となる。この場合、実質的にすべての空気の除去は、所定の充填材及びカラム構成に関して理論的に到達可能な段数が達成されると共に、カラムへの反復充填を実施した場合に安定な段数が得られることによって表される。

【 0 0 1 7 】

図 3 によって図示される一定の実施形態では、本方法はまた、前記水溶液中に浸した場

10

20

30

40

50

合に10kPa以上（例えば、50kPa以上又は100kPa以上）の過圧を前記プラスチックベッド支持体に印加し、及び／又は前記水溶液中に浸した場合に前記プラスチックベッド支持体を振動させる段階を含んでいる。振動は連続的でも断続的でもよく、一定振動数又は可変振動数の振動からなってもよい。過圧の印加は、独立の浸漬容器に対して行うこともできるし、或いは浸したプラスチックベッド支持体を含むクロマトグラフィーカラムに対して行うこともできる。過圧は、各パルス後に圧力を解放しながら1以上の圧力パルスとして印加することができる。パルスの長さは、最大数時間（例えば、1時間以上）であり得る。処理はまた、1以上の減圧（例えば、真空）パルスを含むこともできる。

【0018】

一定の実施形態では、本方法はさらに、クロマトグラフィーカラム中にプラスチックベッド支持体を装着する段階を含んでいる。この段階は、非界面活性剤系湿潤剤溶液中にベッド支持体を浸し、振動又は圧力を印加した後に実施できる。この場合には、ベッド支持体を独立の浸漬容器又は槽内で浸して振動又は圧力を印加し、その後のカラム中に装着することができる。この方法は、（例えば、直径300mm以下の）小さいベッド支持体に関して特に有利である。別法として、装着段階はまた、浸して振動又は圧力を印加する前に実施することもできる。この場合には、浸して振動又は圧力を印加することはカラム中で行われる。この場合には、非界面活性剤系湿潤剤を含む水溶液でカラムを部分的に完全に満たすことで簡便に浸すことができる。かかる方法は、（例えば、直径300mm以上の）大きいベッド支持体に関して特に有利である。

【0019】

若干の実施形態では、本方法はまた、プラスチックベッド支持体を洗浄して非界面活性剤系湿潤剤を除去する段階を含んでいる。洗浄は、ベッド支持体をカラム中に装着した場合に、例えばカラムを通して洗浄流体を流すことで行うことができる。別法として、浸漬容器又は槽内の湿潤剤溶液を洗浄流体と取り替えることで洗浄を行うこともできる。洗浄流体は、水或いは緩衝液又は塩溶液のような水性流体であり得る。

【0020】

一実施形態では、浸したベッド支持体を振動させる段階は、プラスチックベッド支持体に超音波を印加することを含んでいる。超音波は20～400kHzの周波数範囲内の振動を含むことができ、例えば、非界面活性剤系湿潤剤溶液中に超音波変換器を浸漬すること、浸漬容器／槽／カラムの壁に超音波変換器を接触させること、或いは浸漬容器又は槽として超音波浴を使用することで印加できる。超音波変換器及び浴は当技術分野で公知であり、多くの供給業者から入手できる。超音波を印加することの利点は、プラスチックベッド支持体の細孔構造への非界面活性剤系湿潤剤溶液の浸透が向上し、空気が小さい気泡として分散してベッド支持体から容易に除去し得ることである。具体的な実施形態では、超音波の周波数及び／又は振幅は、特定の組合せのベッド支持体及び浸漬容器／槽から最適の空気除去が可能になるように調整される。

【0021】

一定の実施形態では、浸したベッド支持体を振動させる段階はまた、プラスチックベッド支持体に非超音波周波数（即ち、20～400kHzの範囲外）の振動を印加することを含み得る。振動周波数は20kHz未満（例えば、25～500Hzの範囲内）であってもよく、この場合には例えばコンクリート振動用の市販装置が容易に入手できる。内部「火かき棒型」振動機及び容器／槽／カラム上に取り付けられた外部振動機の両方が使用できる。

【0022】

一定の実施形態では、非界面活性剤系湿潤剤は130D未満（例えば、110D未満、さらには70D未満）の分子量を有する。それは50～130Dの範囲内（例えば、50～110Dの範囲内）の分子量を有し得る。低い分子量を有することの利点は、湿潤剤を洗浄除去するのが容易なことである。一方、揮発性及び可燃性を低下させるため、最低の分子量を避けることは有利であり得る。

【 0 0 2 3 】

若干の実施形態では、非界面活性剤系湿潤剤は、アルカリ金属水酸化物並びに水溶性 $C_3 \sim C_6$ アルコール、グリコール及びグリコールエーテル（例えば、水溶性 $C_3 \sim C_6$ 第一アルコール）からなる群から選択される。好適なアルカリ金属水酸化物には、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、水酸化ルビジウム及び水酸化セシウムがある。コストの理由から、水酸化ナトリウム及び水酸化カリウムが好ましい。アルカリ金属水酸化物は、好適には $0.1 \sim 10 \text{ wt} \%$ （例えば、 $2 \sim 8 \text{ wt} \%$ ）の濃度で適用できる。アルカリ金属水酸化物溶液を用いて作業する場合には、保護ガラスのような適当な保護設備を使用することが重要である。アルカリ金属水酸化物の利点は、これらが不燃性であり、したがってその水溶液が引火点を有しないことである。

10

【 0 0 2 4 】

水溶性 $C_3 \sim C_6$ アルコールの例は、 n -プロパノール、イソプロパノール、 n -ブタノール、イソブタノール、 2 -ブタノール、 $tert$ -ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール及びベンジルアルコールであり、これらの内で n -プロパノール、 n -ブタノール、 n -ペンタノール、 n -ヘキサノール及びベンジルアルコールが第一アルコールである。 n -プロパノール及びイソプロパノールは、室温で水と完全に混和し得る。水溶性（及び完全に水混和性）の $C_3 \sim C_6$ グリコールの例には、 $1, 2$ -プロパンジオール、 $1, 2$ -ブタンジオール、 $1, 2$ -ペンタンジオール、 $1, 2$ -ヘキサジオール、 $1, 3$ -プロパンジオール、 $1, 4$ -ブタンジオール、ジエチレングリコールなどがある。水溶性（及び完全に水混和性）の $C_3 \sim C_6$ グリコールエーテルの例には、エチレングリコールメチルエーテル、エチレングリコールエチルエーテル、エチレングリコールプロピルエーテル、エチレングリコールブチルエーテル、ジエチレングリコールメチルエーテル、ジエチレングリコールエチルエーテル、プロピレングリコールメチルエーテル及びプロピレングリコールエチルエーテルがある。水溶性 $C_3 \sim C_6$ アルコール、グリコール又はグリコールエーテルを使用することの利点は、これらが例えばエタノールより良好な湿潤剤であり、したがってより低い濃度で使用できることである。等しい濃度では、これらの水溶性はまた、エタノール溶液より高い引火点を有している。一実施形態では、非界面活性剤系湿潤剤水溶液は、 1 種以上の $C_3 \sim C_6$ アルコール、グリコール又はグリコールエーテルを $2 \sim 30 \text{ wt} \%$ （例えば、 $10 \sim 25 \%$ 、 $12 \sim 21 \%$ 又は $12 \sim 17 \%$ ）含んでいる。アルコール、グリコール又はグリコールエーテルの濃度が 30% を超えないことの利点は、溶液の引火点を運転温度より高く保ち得ることである。もう一つの利点は、これらの濃度では、溶液が若干のバイオプロセスカラムにおける敏感な材料（例えば、アクリルカラム管及びゴムガasket）を攻撃しにくいことである。溶液は均質であってよい。即ち、水性非界面活性剤系湿潤剤液の濃度はそれは室温での水溶解度を超えていない。水性非界面活性剤系湿潤剤液の室温での水溶解度は $4 \text{ wt} \%$ 以上（例えば、 $12 \text{ wt} \%$ 以上）であり得るので、それは水と完全に混和し得る。

20

30

【 0 0 2 5 】

様々な非界面活性剤系湿潤剤の混合物もまた考慮される。これらは様々なアルコール、グリコール又はグリコールエーテルの混合物であってもよいし、これらの物質の 1 種以上と 1 種以上のアルカリ金属水酸化物との混合物であってもよい。この場合には、非界面活性剤系湿潤剤の総濃度は $0.1 \sim 30 \text{ wt} \%$ （例えば、 $0.1 \sim 20 \text{ wt} \%$ 、 $0.1 \sim 17 \text{ wt} \%$ 又は $12 \sim 17 \text{ wt} \%$ ）であり得る。

40

【 0 0 2 6 】

一定の実施形態では、段階 b ）における前記水溶液は約 30 以上の（例えば、約 35 又は約 40 より高い）引火点又は（密閉カップ）引火点を有しない。これは、水溶液が使用条件下で可燃性とは見なされず、したがって高価な防爆設備又は区域を使用する必要がないという利点を有する。アルカリ金属水酸化物は不燃性であり、したがってその水溶液が引火点を有しない、エタノール、 n -プロパノール及びイソプロパノールの水溶液に関する引火点を下記の表 1 に示す。

【 0 0 2 7 】

50

【表 1】

表 1. 様々な濃度のアルコール水溶液に関する密閉カップ引火点 (°C)

濃度 wt. %	エタノール	n-プロパノール	イソプロパノール
12	39-40	36-37	32-33
17	35	34	29
21	31-32	33	26-27
26	29	28	20

イソプロパノール及び特に n - プロパノールはエタノールより効率的な湿潤剤であり、したがってより低い濃度で使用する結果、より高い引火点を有する。分子量が高く、それに対応して揮発性が低いため、水溶性 $C_4 \sim C_6$ アルコール、グリコール及びグリコールエーテルは、一般に表中に示した $C_2 \sim C_3$ アルコールよの水溶液中で高い引火点を有すると予想できる。

【0028】

一実施形態では、非界面活性剤系湿潤剤は n - プロパノール、水酸化ナトリウム及び水酸化カリウムから選択される。特定の実施形態では、非界面活性剤系湿潤剤水溶液は 12 ~ 21 wt % (例えば、12 ~ 17 wt %) の n - プロパノールを含んでいる。

【0029】

一定の実施形態では、プラスチックベッド支持体は 5 cm 以上 (例えば、10 cm 以上又は 30 cm 以上) の直径を有している。大径のプロセスカラムに関しては空気の適切な除去が特に重要であり、また大径のベッド支持体に関しては可燃性も一層重要な問題である。これは、露出面積が大きいと共に、換気されたヒュームフードなどの中での作業が困難だからである。

【0030】

一定の実施形態では、プラスチックベッド支持体は焼結多孔質プラスチックからなっている。例えば Porvair PLC 社 (英国) 及び Porex Corp (米国) から入手し得る焼結多孔質プラスチックは、クロマトグラフィーベッド支持体として使用するのに適した細孔構造及び良好な機械的性質を有している。プラスチック支持体は、ポリエチレン (高密度又は低密度)、ポリプロピレン又はエチレン/プロピレンコポリマーのようなポリオレフィンからなり得る。それはまた、ポリテトラフルオロエチレン又はポリエーテルケトンのような他のプラスチックからなってもよい。別法として、プラスチックベッド支持体は、任意には多層構成の織布又は不織布構造体からなることもできる。かかる繊維は、例えばポリエチレン又はポリプロピレンのようなポリオレフィンから製造できる。

【0031】

図 1 及び図 4 によって図示される本発明のさらなる態様は、界面活性剤又は可燃性溶液を使用せずに空気を除去した 1 以上のプラスチックベッド支持体 4 を具備するカラム 7 上で生体分子のクロマトグラフィー分離を実施することに関する。これは、a) 細孔構造に空気を有するプラスチックベッド支持体 4 を含むカラム 7 を用意し、b) 0.1 ~ 30 wt % (例えば、0.1 ~ 20 wt %、0.1 ~ 17 wt % 又は 12 ~ 17 wt %) の非界面活性剤系湿潤剤を含む水溶液中にプラスチックベッド支持体 4 を浸し、c) プラスチックベッド支持体を前記水溶液中に浸した場合に振動又は 10 kPa 以上 (例えば、50 kPa 以上又は 100 kPa 以上) の過圧を前記カラムに印加することで、前記細孔構造から約 60 % 以上の空気を除去し、d) プラスチックベッド支持体を洗浄し、e) カラム中にクロマトグラフィー媒体のベッド 8 を充填し、f) 生体分子を含む液体をカラム上に適用する方法によって達成される。カラムは、カラム管 1、上部端板 2、上部分配板 3、下部分配板 5 及び下部端板 6 を含み得る。生体分子は、核酸、ワクチン又はタンパク質、例えばモノクローナル抗体のような免疫グロブリンであり得る。液体は、例えば、清澄化細胞培養物、血漿或いは以前のクロマトグラフィーカラムからの溶出液又は通過液であり得

10

20

30

40

50

る。

【 0 0 3 2 】

一定の実施形態では、約 8 0 % 以上（例えば、約 9 0 % 以上又は実質的にすべて）の空気が細胞構造から除去される。

【 0 0 3 3 】

一実施形態では、段階 b) における水溶液は引火点を有しないか、或いは 3 0 以上の（例えば、3 5 より高い）引火点を有する。

【 0 0 3 4 】

一実施形態に従えば、段階 b) における水溶液は 1 2 ~ 2 1 w t % の n - プロパノール（例えば、1 2 ~ 2 1 w t % の n - プロパノール）或いは 0 . 1 ~ 1 0 w t % の水酸化ナトリウム又は水酸化カリウムを含んでいる。

10

【 0 0 3 5 】

一実施形態では、プラスチックベッド支持体は焼結多孔質プラスチックからなっている。プラスチックベッド支持体は、ポリエチレンのようなポリオレフィンからなり得る。

【 0 0 3 6 】

一実施形態では、プラスチックベッド支持体は 1 0 c m 以上（例えば、3 0 c m 以上）の直径を有している。

【 0 0 3 7 】

本発明の他の特徴及び利点は、下記の実施例及び特許請求の範囲から明らかとなる。

【 0 0 3 8 】

20

本文書による説明では、最良の実施形態を含めて本発明を開示するため、また任意の装置又はシステムを製造しかつ使用すること及び任意の組み込まれた方法を実行することを含めて当業者が本発明を実施できるようにするために実施例を使用する。本発明の特許可能な範囲は特許請求の範囲によって定義され、当業者には想起される他の実施例を含み得る。このような他の実施例は、実施例が特許請求の範囲の文言と異なる構造要素を有する場合、又は実施例が特許請求の範囲の文言と実質的に異なる同等の構造要素を含む場合には、特許請求の範囲に包含されるものとする。

【実施例】

【 0 0 3 9 】

実施例 1 : 独立したポリエチレンフリットの湿潤

30

直径 1 0 0 m m の焼結ポリエチレン (P E) フリットディスク (P o r v a i r P L C V y o n (登録商標) F H D P E 、厚さ 3 . 2 m m 、孔径 2 0 ミクロン、細孔容積 3 6 %) を約 8 個の断片に切断した。各断片を乾燥状態で秤量し、乾燥重量を記録した。先ず、1 滴の各溶液を断片に加えて焼結体による吸収の度合を調べた。次いで、P E フリット断片を様々な溶液中に浸漬し、浸漬から 2 、6 及び 2 4 時間後に秤量した。次いで、断片を振盪機 (E d m u n d B u e h l e r S M) 上に 3 0 分間置き、最後に流れる純水ですすいだ。

【 0 0 4 0 】

ガラスのペトリ皿 (直径 1 9 . 5 c m) をそれぞれの溶液で満たし、フリット材料の断片を各溶液中に入れた。フリットは多かれ少なかれ液体の表面上に浮遊した。即ち、それは液体中に完全には沈まなかった。断続的に、プラスチックピペットを用いてフリットを押し込むと共に、それを僅かにたたいて空気を追い出した。1 時間後、断片をひっくり返し、さらに 1 時間後 (全部で 2 時間後) に断片を秤量し、重量を記録した。断片をペトリ皿に戻し、2 時間後にひっくり返した。さらに 2 時間後 (全部で 6 時間後) に断片を秤量し、重量を記録した。断片を再びペトリ皿に入れ、一晩放置した。約 2 4 時間後に断片を秤量し、重量を記録した。次いで、溶液中に入れた断片を振盪機上に 3 0 分間置き、秤量し、重量を記録した。最後に、断片を流水で約 1 分 3 0 秒間すすいだ。フリット断片を秤量する前に、実験台上に置いたティッシュに縁端を押しつけることで、縁端を軟らかいティッシュで手早くぬぐった。

40

【 0 0 4 1 】

50

超音波浴（E l m a S 4 5 0 H）中において、P E フリットの断片を各々の側について 1 5 分間ずつ 1 M（4 w t %）N a O H で湿潤させた。次いで、断片を流水ですすぎ、軟らかいティッシュで手早くぬぐって水滴を除去した。

【 0 0 4 2 】

実施例 1 a

下記の表 1 からわかる通り、2 6 w t % の 1 - プロパノール及び 2 6 w t % の 2 - プロパノール（I P A）は溶液取込み量として表される最良の湿潤を示した。これはまた、1 滴の溶液を P E フリットの様々な断片に加えた場合にも認められた。1 - プロパノール及び 2 - プロパノール溶液の液滴は P E フリットによって吸収されたのに対し、他の溶液の液滴はフリット表面上に残留した。これらの溶液中に入れた P E フリットの断片に関して
10
は、2 時間後に重量が約 5 0 % 増加した。超音波浴中において 1 M（4 w t %）N a O H で湿潤させた P E フリットの断片も使用した。下記の表 1 からわかる通り、この方法は 2 時間後に約 5 % の重量増加しか示さなかったが、流れる純水ですすいだ後には追加の湿潤によって 3 3 % の重量増加が見られた。8 M 尿素は、2 時間後に約 4 % の僅かな重量増加を示した。他の溶液は 4 ~ 3 0 % の重量増加を示した。

【 0 0 4 3 】

2 時間後には重量がほとんど増加しなかったので、時間は湿潤に対していかなる効果も及ぼさないように思われた。1 7 w t % エタノールに関しては、6 時間後に僅かな重量増加が認められるかもしれないが、さらに 1 8 時間後（例えば、全部で 2 4 時間後）に追加の溶液取込みは認められなかった。しかし、若干の溶液に関しては、水ですすいだ後に重
20
量増加が認められた（表 1 参照）。

【 0 0 4 4 】

【表 2】

表 2. 様々な溶液中への 2 ~ 2 4 時間浸漬後におけるフリットの重量増加 (%) を示すスクリーニング試験

試験溶液	2 時間後の重量増加, %	6 時間後の重量増加, %	24 時間後の重量増加, %	水洗後の重量増加, %
26 wt % 1-プロパノール	51	51	50	49
26 wt % 2-プロパノール (IPA)	50	51	51	49
1+1 (26 wt % 2-プロパノール (IPA) + 1 M NaOH)	45	45	46	46
4 wt % ベンジルアルコール	36	38	38	40
17 wt % エタノール	9	12	12	18
1 M NaOH 中の 300 ppm 次亜塩素酸ナトリウム	5	6	5	14
1 M NaOH	5	6	6	23
超音波浴中の 1 M NaOH, 水洗後	5	-	-	33
8 M 尿素	3	4	4	5

溶液の密度の差を補正するため、フリット材料 1 グラム当たりの吸収容量を計算した。計算結果を表 3 に示す。使用したフリット材料の細孔容積（3 6 %）及び H D P E 材料密度（0 . 9 5 g / m l）から、すべての空気の完全な排除に相当する取込み容量を 0 . 5 9 m l / g と計算することができる。

【 0 0 4 5 】

10

20

30

40

【表 3】

表3. PEフリット材料1グラム当たりの吸収容量

溶液	PEフリット材料1グラム当たりの取 込み容量 (2時間後), ml/g
26 wt % 1-プロパノール	0.53
26 wt % 2-プロパノール	0.52
1+1 (26 wt % 2-プロパノール (IPA) + 1 M NaOH)	0.45
4 wt % ベンジルアルコール	0.36
17 wt % エタノール	0.09
1 M NaOH 中の 300 ppm 次亜塩素酸ナ トリウム	0.05
1 M NaOH	0.05
超音波浴中の 1 M NaOH	0.05
8 M 尿素	0.03

10

実施例 1 b

下記の表 3 は、1 - プロパノール及び 2 - プロパノールを用いて実施した試験における
様々な濃度についての結果を示している。

20

【0046】

1 - プロパノールは、PEフリットの断片の湿潤に関して良好な効果を有するよう
に思われる。17 wt % の 1 - プロパノールは 2 時間後に 53 % の重量増加を示したの
に対し、2 - プロパノールは 29 % しか示さなかった。2 - プロパノールに関しては、
同じ効果を達成するのに 21 wt % を必要とした。低い濃度 (8 % 及び 12 %) に関
しては、24 時間後及び水洗後に重量増加を認めることができた。同じ効果は 17 wt %
の 2 - プロパノールに当てはまる。

【0047】

【表 4】

30

表4. 様々な濃度の 2-プロパノール及び 1-プロパノールに関して重量増加で示され
た結果

濃度, wt %	1-プロパノ ール, 2時間後の 重量増加, %	24時間後 の重量増 加, %	水洗後の重 量増加, %	2-プロパノ ール, 2時間後の重 量増加, %	24時間後 の重量増 加, %	水洗後の重量 増加, %
8	6	18	29	6	10	21
12	34	40	44	15	23	33
17	53	51	50	29	37	43
21	-	-	-	50	52	51
26	51	50	49	51	50	49

40

実施例 2 : カラム中に装着されたポリエチレンベッド支持体の湿潤

Porvair PLC Vyon (登録商標) F 焼結 PE の乾燥ディスク (厚さ 3 .
2 mm、孔径 20 ミクロン) を 1 M NaOH 中に浸漬し、超音波浴中で 2 × 15 分間処
理し、次いで 17 wt % エタノールで洗浄してから 300 mm カラム中に装着した。

【0048】

Porvair PLC Vyon (登録商標) F 焼結 PE の別の乾燥ディスク (厚さ
3 . 2 mm、孔径 20 ミクロン) を 300 mm カラム中に直接装着し、このカラムを 17
wt % の 1 - プロパノール水溶液で満たし、100 kPa の過圧に加圧し、2 時間インキ

50

ュベートした。

【 0 0 4 9 】

いずれの場合にも、カラムには S P S e p h a r o s e (登録商標) H P 陽イオン交換媒体 (G E H e a l t h c a r e L i f e S c i e n c e s 社) を 1 0 c m のベッド高さまで充填し、次いで同じ媒体の排出及び再充填を 2 回行った。各回の充填後、当技術分野で公知の標準的な方法によって段数 (N / m - 1 m 当たりの段数) 及び非対称係数を測定した。下記の表 3 に要約して示された結果は、満足できる段数が達成されることを示すと共に、カラム中において 1 7 w t % 1 - プロパノールをインサイチュで使用した湿潤実験が充填回数間で良好な一貫性を与えることを示し、最初から完全な湿潤を表している。ベッド支持体を水に接触させただけの比較実験は、不満足なカラム性能を示した。

10

【 0 0 5 0 】

【表 5】

表 5. 充填カラムに関する段数及び非対称係数

湿潤方法	充填回数	段数, N/m	非対称 As
1M NaOH + 超音波中の固定されない支持体	1	13842	1.03
	2	18072	1.16
	3	18725	1.15
	充填1から充填3までの%増加	35	12
17% 1-プロパノールを含むカラム中の支持体	1	18295	1.11
	2	18901	1.15
	3	19345	1.17
	充填1から充填3までの%増加	6	5

20

30

本明細書中で言及されたすべての特許、特許出願公開公報及び他の公開参考文献は、援用により、各々が引用によって本明細書中に個別にかつ詳細に組み込まれた場合と同様に完全な状態で組み込まれる。本発明の好ましい例示的な実施形態を記載したが、当業者であれば、本発明が限定ではなく例示のみを目的として記載された実施形態以外のやり方でも実施できることが容易に理解されよう。本発明は下記の特許請求の範囲によってのみ限定される。一実施形態に関して記載された任意の特徴は、記載された他の実施形態の 1 以上の特徴と組み合わせ使用することもできると想定されている。

【符号の説明】

【 0 0 5 1 】

- 1 カラム管
- 2 上部端板
- 3 上部分配板
- 4 プラスチックベッド支持体
- 5 下部分配板
- 6 下部端板
- 7 カラム
- 8 クロマトグラフィー媒体のベッド

40

【図 1】

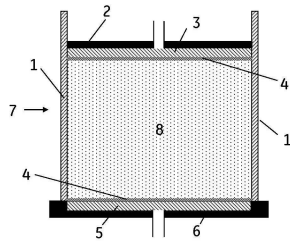


Figure 1.

【図 2】

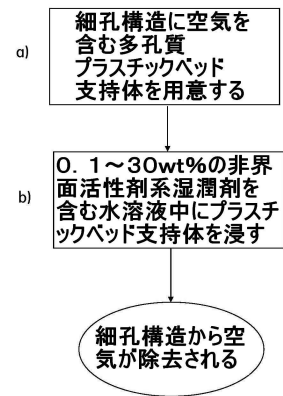


Figure 2.

【図 3】

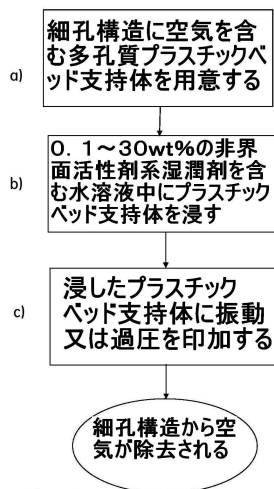


Figure 3.

【図 4】

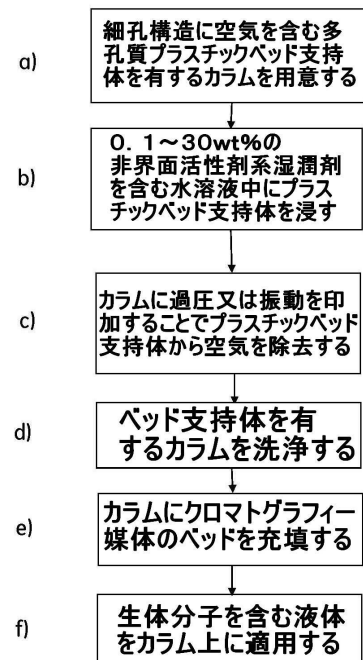


Figure 4.

フロントページの続き

- (72)発明者 アヴァリン, ヨハン・エフ
スウェーデン国、エス - 7 5 1 8 4 ウブサラ ビヨルクガタン 3 0、ジーイー・ヘルスケア
- (72)発明者 カールソン, ヨナス
スウェーデン国、エス - 7 5 1 8 4 ウブサラ ビヨルクガタン 3 0、ジーイー・ヘルスケア

審査官 田中 秀直

- (56)参考文献 特表 2 0 1 0 - 5 2 0 9 9 2 (J P , A)
特表 2 0 0 8 - 5 1 6 2 6 0 (J P , A)
特表 2 0 0 0 - 5 1 4 7 0 4 (J P , A)
特開平 0 2 - 1 9 1 5 3 3 (J P , A)
米国特許第 0 5 3 6 8 7 2 9 (U S , A)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
- | | |
|---------|-----------|
| G 0 1 N | 3 0 / 5 6 |
| G 0 1 N | 3 0 / 6 0 |
| G 0 1 N | 3 0 / 0 6 |
| B 0 1 D | 1 5 / 0 8 |