

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2007年12月13日 (13.12.2007)

PCT

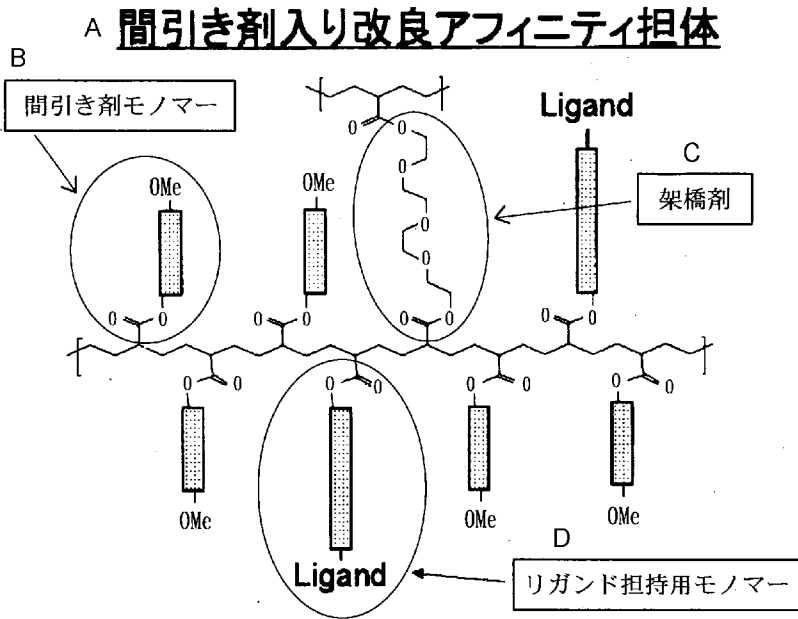
(10) 国際公開番号  
WO 2007/142331 A1

- (51) 国際特許分類:  
*B01J 20/26* (2006.01)    *C08F 220/26* (2006.01)  
*C08F 220/20* (2006.01)    *G01N 30/88* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/061640
- (22) 国際出願日: 2007年6月8日 (08.06.2007)
- (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2006-159594    2006年6月8日 (08.06.2006)    JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社リバース・プロテオミクス研究所 (REVERSE PROTEOMICS RESEARCH INSTITUTE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1010044 東京都千代田区鍛冶町一丁目9番11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): 細矢 憲 (HOSOYA, Ken) [JP/JP]; 〒6128031 京都府京都市伏見区桃山町松平筑前1番地1 ユニハイム桃山御陵109号 Kyoto (JP). 森 朋子 (MORI, Tomoko) [JP/JP]; 〒6408313 和歌山県和歌山市西787-8 Wakayama (JP). 田中 明人 (TANAKA, Akito) [JP/JP]; 〒3050051 茨城県つくば市二の宮1-16-76 Ibaraki (JP). 高橋 晃樹 (TAKAHASHI, Teruki) [JP/JP];

[続葉有]

(54) Title: AFFINITY CARRIER AND METHOD FOR PRODUCTION THEREOF

(54) 発明の名称: アフィニティ担体及びその製造方法



- A IMPROVED AFFINITY CARRIER  
CONTAINING THINNING AGENT
- B THINNING MONOMER
- C CROSSLINKING AGENT
- D LIGAND-CARRYING MONOMER

(57) Abstract: Disclosed is an organic-polymer-gel-like affinity carrier having such a bicontinuous structure that micrometer-sized pores are arranged continuously in a three-dimensional network structure. The affinity carrier comprises a copolymer composed of at least one member selected from a vinyl monomer compound having at least two functionalities as a crosslinking agent, at least one member selected from a methacrylate compound and an acrylate compound, at least one unifunctional hydrophilic monomer as a ligand-carrying monomer, and at least one unifunctional thinning monomer as a thinning agent ("an agent for adjusting hydrophilicity/hydrophobicity") for arbitrarily adjusting the condition of a ligand to be carried on the ligand-carrying monomer, wherein the ratio between the crosslinking agent and the copolymer of the unifunctional hydrophilic monomer and the unifunctional thinning monomer is 100-10:0-90 by volume.

(57) 要約: μmサイズの細孔が三次元網目状に連続した共連続構造を有する有機高分子ゲル状

のアフィニティ担体で、架橋剤としての、少なくとも二官能性以上のビニルモノマー化合物、メタクリレート化合物も

[続葉有]

WO 2007/142331 A1



〒5540022 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番  
98号 Osaka (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人みのり特許事務所 (MINORI  
Patent Profession Corporation); 〒6040835 京都府京都市  
中京区御池通高倉西入高宮町200番地 千代田生  
命京都御池ビル8階 Kyoto (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH,  
BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, MG,  
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,  
PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, 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 (AT, BE, BG,  
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,  
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

しくはアクリレート化合物の少なくともいずれか1種と、リガンド担持用モノマーとしての少なくとも1種の一官能性親水性モノマーと、前記リガンド担持用モノマーに担持されるリガンドの環境を任意に調整するための間引き剤としての、少なくとも1種の一官能性間引き剤モノマーとの共重合体であり、架橋剤と（一官能性親水性モノマーと一官能性間引き剤モノマーの共重合体）の体積比率は100～10:0～90である。

## 明 細 書

### アフィニティ担体及びその製造方法

#### 技術分野

- [0001] 本発明は、非特異的タンパク質吸着が少なく、リガンド担持用モノマーが有効に機能し、標的タンパク質捕捉能が向上するという特性を有した、マイクロメートルサイズの平均直径を有し、三次元網目状に連続した細孔と有機物質に富む骨格相からなる共連続構造をもつ粒子凝集型でない有機高分子ゲル状のアフィニティ担体(担持機能性ポリマーモノリス)、及び当該アフィニティ担体の製造方法に関するものである。

#### 背景技術

- [0002] 現在、製薬企業において新規創薬ターゲット探索が盛んに行われている。その中で、薬理活性強度や副作用、物性面等の問題からそのもの自身は薬とはならないが、その生理活性物質のターゲットタンパク質を同定し、より効率的な評価系を再構築することによって上記問題をクリアした新規生理活性物質を創出し、創薬を目指す研究手法が注目を集めている。こうして得られた新規創薬ターゲットのin vivoでの効果がオリジナル生理活性物質によって既に担保されているため、Forward Chemical Geneticsと呼ばれる本手法によって得られた医薬品候補化合物が創薬研究にとって“失敗”になる可能性が低くなることが期待されている。一方、既知の創薬ターゲットタンパク質との高いホモロジーを持つ等の理由から注目したタンパク質を創薬ターゲットとした研究においては、生体内での当該ターゲット候補タンパク質の役割が当初期待したものではなく、最終的に得られた医薬品候補化合物がin vivoにおいて期待する効果を発揮しないことが問題視されている(例えば、下記の非特許文献1及び2)。

Forward Chemical Genetics戦略において、生理活性物質のターゲットタンパク質を同定する目的ではアフィニティ樹脂が重要な役割を果たしている。

アフィニティクロマトグラフィーによるターゲットタンパク質の単離に関しては、いくつかの報告例がある(非特許文献1及び2参照)。

非特許文献1:S. L. Schreiber, The small-molecule approach to biology, Chem. Eng. News, 2003, 81, pp 51 - 61.

非特許文献2:M. Yoshida, 他, 特集 ケミカルゲノミクスの誕生, 蛋白質核酸酵素, 2005, 50, pp 1031 - 1077.

- [0003] 従来より使用されてきているアフィニティゲルとしては、例えば東ソー社製のトヨパール(商品名)に代表されるアクリレート系架橋樹脂、あるいは、ファルマシア社製のアフィゲル(商品名)で知られる天然物由来ゲルが挙げられる。しかしながら、上記のアフィニティゲルは双方利点もあるが欠点もある。前者は比較的高い疎水性のために非特異的なタンパク質吸着が起りやすく、望むリガンド(低分子)とタンパク質の相互作用解析の妨げとなる場合が多い。一方、後者のアフィゲル(商標)は、非特異的なタンパク質吸着を十分に抑制する親水性があるが、化学的安定性が低くその合成展開に大きな制限を持つなどの欠点を有している。アフィゲル(商標)の親水性と、トヨパール(商標)の安定性を有する新たなアフィニティゲルの開発が望まれており、ゲルを必要とするバイオ関連と、ゲルを作成する高分子分野の連携が無く、これまで新しいアフィニティゲルは販売されていない。
- [0004] アフィニティ樹脂の多くは、1～2部の架橋剤(2ないし3官能性モノマー)とリガンド担持用モノマー(99～98部)を共重合することで作成されている。これは、高架橋度になれば、物質移動が妨げられ、アフィニティ樹脂としての性能が発揮されない、という実験事実に基づいているが、実際には用いる溶媒によっては大きく樹脂が膨潤し体積、形態に変化をもたらす、ひいては、アフィニティ樹脂としての性能にまで悪影響を及ぼす場合もみられる。この問題点を解決するために、無細孔のナノ粒子、あるいは細孔の大きな多孔性粒子が合成されてきたが、いずれも、使用されているモノマー類の疎水性に起因して、非特異的なタンパク質吸着を起こすという問題点を解決できずにいる。これらは現状市販されているアフィニティ樹脂の問題点でもある。
- [0005] そこで、新たに骨格と流路が一体構造となった共連続体(モノリス)を合成し、アフィニティ樹脂として用いるという方法が試みられている。これは、骨格自体の大きさを1～2ミクロン程度に抑え、一方で、液体の流れる流路を2～5ミクロン程度と大きくすることが同時に可能で、それらが共に連続につながった構造をしていることから、構造自体は高架橋度としておいて、流路を大きくすることで旧来の問題点を解決するように設計されている。用いるモノマー類を親水的にすることによって、高架橋度のモノリス型

アフィニティ樹脂が開発され、旧来の欠点を克服する方向性を示している。

ところが、架橋構造を密にすることで、形態の安定性は向上するものの、一方で、肝心のリガンド担持部位が樹脂表面に適度の密度でうまく配向せず、結果、構造は良くなったものの、性能は期待したようには上がらないという結果が示されている。これは共重合法での限界であり、また、重合を行った後に表面修飾でリガンド担持部位を導入することも、表面での配向の問題で有意な解決策を得られないでいる。

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0006] これらのことを解決するためには、ある程度の架橋度を保ちつつ、一方で、リガンド担持用モノマーの密度を下げ、かつ、その存在環境を目的とするアフィニティ反応に有利な条件にすることが可能な、いわば第三のモノマーの使用が一法として考えられる。このモノマーの存在は、従来のアフィニティ樹脂の欠点を一掃できる可能性を有するものではあるが、重合系を複雑にし、当然のことながらモノリス構造の形成を危うくする、という欠点を有している。このため、旧来の方法の延長線上にはこの解決法は見出せない。本発明が解決しようとする課題は、このリガンドが有効に働くための環境を整えつつ、一方で、リガンドの密度を適度に下げて、アフィニティ反応が起こりやすい環境を得るための第三のモノマーの利用(間引き剤モノマー)とそれらを比較的自由に組み合わせた条件でのモノリス構造の構築法の開発と、それらを用いた標的タンパク質の捕捉性能の向上を目的としている。すなわち、本発明は、非特異的タンパク質吸着が少なく、かつリガンド担持用モノマーが有効に機能し、また、標的タンパク質捕捉能が向上する、という従来の問題点を一気に解決する新規なアフィニティ担体を提供しようとするものである。尚、第三のモノマーの導入がアフィニティ樹脂の機能向上に有効であるのは、細胞膜近傍に存在するタンパク質は、疎水的な環境で有効にリガンド分子と相互作用する傾向にあり、また、一方で細胞内タンパク質は逆に親水的な環境において本来の機能を発現するが多いためである。

又、上述の特性を有したアフィニティ担体を製造するのに適した方法を提供することも、本発明の課題である。

[0007] 本発明者等は種々検討を行った結果、PEG(ポリエチレングリコール)型のスパー

サーを有し、十分な親水性を有する新たなメタクリレート系リガンド固定用モノマーを開発し、これらと、同様にPEG型のスペーサーを有する二官能性のメタクリレート架橋剤を用いることで、十分な親水性を有し、また、十分に液体の流れを確保できる共連続構造を持つモノスタップのアフィニティゲルが得られることを見出して、本発明を完成した。一般に一官能性モノマーが増えるとモノリス構造が得られないことが多いが、それらを克服する手法も開発した。また、この手法では、リガンドの置かれる環境を親水的環境(細胞内タンパクを想定)や疎水的環境(膜タンパクを想定)に自由に設定可能な、いわゆる「間引き剤」的モノマーを含有させてもモノリス構造を維持できる特性を有しており、賦形技術としても優れている。

#### 課題を解決するための手段

- [0008] 上記の課題を解決可能な本発明のアフィニティ担体は、マイクロメートルサイズの平均直径を有し、三次元網目状に連続した細孔と有機物質に富む骨格相からなる共連続構造をもつ粒子凝集型でない有機高分子ゲル状物(いわゆる有機モノリス体)であって、当該アフィニティ担体が、架橋剤としての、少なくとも二官能性以上のビニルモノマー化合物、メタクリレート化合物もしくはアクリレート化合物の少なくともいずれか1種と、リガンド担持用モノマーとしての少なくとも1種の一官能性親水性モノマーと、前記リガンド担持用モノマーに担持されるリガンドの親水的・疎水的環境を任意に調整するための間引き剤としての、少なくとも1種の一官能性間引き剤モノマーとの共重合体であり、しかも、前記アフィニティ担体における前記架橋剤と(前記一官能性親水性モノマーと一官能性間引き剤モノマーの共重合体)の体積比率が100～10:0～90であることを特徴とする。
- [0009] 又、本発明は、上記の特徴を有したアフィニティ担体において、前記一官能性間引き剤モノマーが、アミノ基、アミド基、アンモニウム基、カルボキシル基、エステル基、エーテル基、カルボニル基、水酸基、スルホ基及びリン酸基から成るグループより選ばれた親水性基並びにアルキル基もしくはフェニル基およびその誘導体あるいはその保護体から成るグループより選ばれた官能性基を有するモノマーであることを特徴とするものでもある。
- [0010] 又、マイクロメートルサイズの平均直径を有し、三次元網目状に連続した細孔と有機

物質に富む骨格相からなる共連続構造をもつ粒子凝集型でない有機高分子ゲル状のアフィニティ担体を製造するための本発明の方法は、架橋剤としての、二官能性ビニルモノマー化合物、メタクリレート化合物もしくはアクリレート化合物の少なくともいずれか1種と、リガンド担持用モノマーとしての少なくとも1種の一官能性親水性モノマーと、前記リガンド担持用モノマーに担持されるリガンドの親水的・疎水的環境を任意に調整するための間引き剤としての、少なくとも1種の一官能性間引き剤モノマーとを、前記架橋剤と(前記一官能性親水性モノマーと一官能性間引き剤モノマーの共重合体)の体積比率が100～10:0～90となるように配合し、水もしくは分子量500以下の水溶性溶媒から成るグループより選ばれた少なくとも1種の溶媒中で、ラジカル重合開始剤の存在下で共重合させてゲル状体を得、その後、当該ゲル状体を水又は有機溶媒(例えばメタノール、アセトン、THF等)で浸漬して洗浄を行い、乾燥させることによって共連続構造を保つことを特徴とする。

- [0011] 更に、本発明は、上記の特徴を有したアフィニティ担体の製造方法において、前記水溶性溶媒が、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラエチレングリコール、ペンタエチレングリコール、ヘキサエチレングリコール、トリエチルアミン、ビニルピリジン、ホルムアミド、ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、アセトン、メタノールもしくはエタノールから成るグループより選ばれたものであることを特徴とするものでもある。

### 発明の効果

- [0012] 本発明のアフィニティ担体は、マイクロメートルサイズの細孔が三次元網目状に連続した構造を有した有機高分子ゲルで、メタクリレート系樹脂担体のように化学的安定性が高く、アガロース系樹脂のように非特異的吸着を十分に抑制する親水的特性を持ち、本発明の製法を用いることによって、このような特性を有したアフィニティ担体が、比較的簡単な工程にて効率良く製造可能である。

そして、本発明のアフィニティ担体は、今後の製薬技術の鍵を握るケミカルゲノミクスの中核を成す新たなアフィニティ担体として渴望されているものだけに、多くの潜在的なユーザーが見込まれる。また、これらの技術は単にアフィニティゲルとしての利用だけに止まらず、親水的あるいはイオン交換的な新規な共連続構造を持つ高分子素

材の創成にも寄与できることから、環境関連分野あるいは分析化学分野においても極めて大きな影響力を持つものとして期待できる。

#### 図面の簡単な説明

[0013] [図1]間引き剤モノマーを導入した本発明のアフィニティ担体の模式図である。

[図2]実施例1にて得られた本発明のアフィニティ担体(間引き剤モノマー導入アフィニティ担体)についての電子顕微鏡観察写真であり、架橋剤及び溶媒の種類を変えた場合のモリス構造への影響を示すものである。

[図3]実施例1にて得られた本発明のアフィニティ担体(間引き剤モノマー導入アフィニティ担体)についての電子顕微鏡観察写真であり、架橋剤の量を変えた場合のモリス構造への影響を示すものである。

[図4]実施例1にて得られた本発明のアフィニティ担体(間引き剤モノマー導入アフィニティ担体)についての電子顕微鏡観察写真であり、間引き剤モノマーの量を変えた場合のモリス構造への影響を示すものである。

[図5]実施例2に記載した本発明のアフィニティ担体を用いた場合のタンパク質結合試験の結果(アフィニティ樹脂の性能)を示すものである。

[図6]実施例3にて得られた共重合生成物についての電子顕微鏡観察写真であり、重合に使用した溶媒の種類を変えた場合のモリス構造への影響を示すものである。

#### 発明を実施するための最良の形態

[0014] 本発明のアフィニティ担体は、少なくとも二官能性以上のビニルモノマー架橋剤あるいはメタクリレート架橋剤あるいはアクリレート架橋剤の少なくともいずれか1種に、リガンド担持用モノマーとしての一官能性親水性モノマー(一官能性の親水的な機能性モノマー)の少なくとも1種と、前記リガンド担持用モノマーに担持されるリガンドの親水的・疎水的環境を任意に調整するための間引き剤としての、一官能性間引き剤モノマーの少なくとも1種とを0～90体積%、好ましくは5～50体積%含ませた担持機能性ポリマーモノリス型担体であって、これら化合物の共重合によって得られる。そして、このアフィニティ担体は、ゲル状の共重合体で、ポリマー粒子凝集型ではなく共連続構造を有し、化学的安定性が高く、アガロース系樹脂のように非特異的吸着を

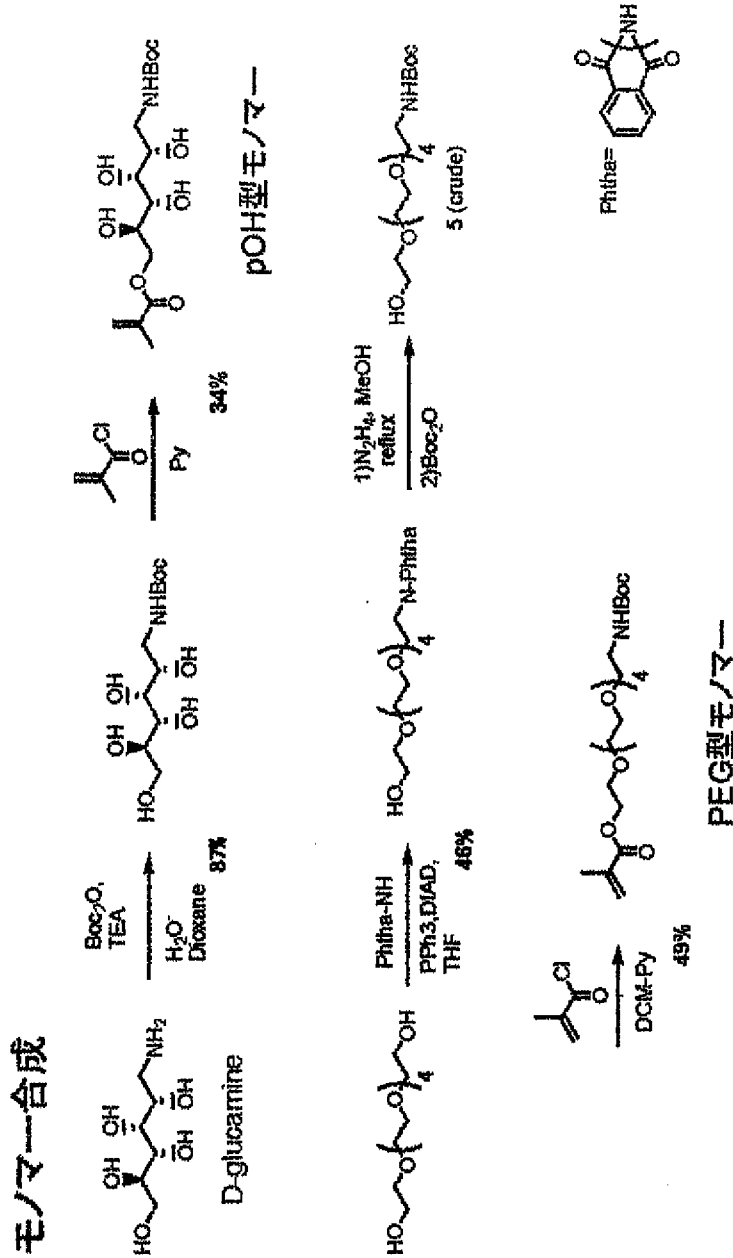
十分に抑制する親水的特性を有している。本発明のアフィニティ担体の共連続構造は、マイクロメートルサイズの平均直径を有し、三次元網目状に連続した細孔と有機物質に富む骨格相からなる。

本発明のアフィニティ担体においては、共連続した細孔のサイズが $0.1\ \mu\text{m}$ から $50\ \mu\text{m}$ で単分散であり、骨格サイズが $0.1\ \mu\text{m}$ から $50\ \mu\text{m}$ で単分散であるものの組み合わせである。

[0015] 本発明のアフィニティ担体と構成する「二官能性ビニルモノマー架橋剤あるいはメタクリレート架橋剤あるいはアクリレート架橋剤」としては、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメタクリレート、ジエチレングリコールジメタクリレート等のオリゴ、ポリエチレングリコールジメタクリレートおよびそのアクリレート置換体、グリセリンジメタクリレート、ビニルメタクリレート、N, N'-メチレンビスアクリルアミドなどが挙げられ、特に好ましい化合物としては、三次元網目状の細孔連続構造形成性の点から、9個のポリエチレングリコール単位を有するノナエチレングリコールジメタクリレートが挙げられる。この化合物は、例えば新中村化学工業株式会社から「NK ESTER 9G」という商品名で市販されており、本発明では、市販の二官能性架橋剤が利用できる。

[0016] 一方、本発明のアフィニティ担体を構成する「一官能性親水性モノマー」は、リガンドを担持するためのモノマーであり、具体的には、アミノ基、アミド基、カルボキシル基、エステル基、カルボニル基、水酸基、スルホ基、リン酸基およびその誘導体を含む親水的モノマー（一官能性の担持機能性モノマー）が挙げられ、例えば下記の化1の反応にて合成されるpOH型モノマーやPEG型モノマーが好適である。本発明において、上記の官能性基は、ゲルの疎水性に基づく非特異的吸着を排除する役割を果たす。

[0017] [化1]



[0018] また、親水基を導入可能なハロゲン化アルキル基を有するモノマー（例えばクロロメチルスチレン）や、エポキシ基を持つモノマー（例えばグリシジルメタクリレート）、フェニル基を有するモノマー（例えばスチレン）等も挙げられる。

[0019] 更に、本発明における「間引き剤モノマー」は、リガンド担持量の調整、アフィニティ担体表面の疎水的・親水的環境が調整が可能で、これらの調整により標的タンパク

質の結合量増加をもたらすために導入される一官能性モノマーであり、具体的には、アミノ基、アミド基、アンモニウム基、カルボキシル基、エステル基、エーテル基、カルボニル基、水酸基、スルホ基及びリン酸基から成るグループより選ばれた親水性基並びにアルキル基もしくはフェニル基およびその誘導体あるいはその保護体から成るグループより選ばれた官能性基を有するモノマーが挙げられ、2種類以上が導入されても良い。好ましい「間引き剤モノマー」としては、例えばジエチレングリコールモノメチルエーテルメタクリレート、ヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)、グリシジルメタクリレート等のヒドロキシル基、エーテル基を含むメタクリレートあるいはアクリレート、更には、メチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、トリデシルメタクリレート等のアルキルメタクリレート類あるいはスチレン類等が挙げられる。また、本発明では、用いる間引き剤モノマーを変化させることで、アフィニティ担体表面の環境を、細胞内タンパク質の存在環境である親水的な環境、あるいは膜タンパク質の存在環境である疎水的環境に変化させることが可能となるため、今後のアフィニティ担体を用いた標的タンパク質探索の応用に有効である。

[0020] 選択的で効率良くターゲットタンパク質が吸着するアフィニティ樹脂として好適な本発明のアフィニティ担体においては、前記二官能性架橋剤と(前記一官能性親水性モノマー+一官能性間引き剤モノマー)の構成重量比率が20~100:80~0であり、この際、50~95:50~5が好ましく、30~80:70~20が特に好ましい。本発明では、前記二官能性架橋剤の構成重量割合が10以下になると、モノリス構造(三次元網目構造)が安定に維持できなくなる。

尚、本発明のアフィニティ担体における間引き剤モノマーとリガンド担持用モノマーの比率は、必要とされるリガンド担持量や、アフィニティ担体表面の疎水的・親水的環境に応じて適宜選択される。上記の間引き剤モノマーを導入した改良アフィニティ担体の模式図を図1に示す。

[0021] 上述の構成モノマーより成る本発明のアフィニティ担体は、乾燥状態で水を担体表面に滴下した際に1分以内、好ましくは10秒以内、特に好ましくは1秒以内に担体内に水を収着するに十分な親水性を有しており、このような親水性は、細孔が三次元網目状に連続した構造と、構成モノマー中の親水性基に起因するものである。

本発明のアフィニティ担体の用途としては、アフィニティ担体、担持担体などの生化学用の固相体の他、イオン交換クロマトグラフィー担体、キラルクロマトグラフィー担体、フィリックスクロマトグラフィー担体、逆相クロマトグラフィー担体などのクロマトグラフィー固定相、気体や液体などの環境毒に対する捕捉担体や、水浄化用の固定相や電気泳動などの担体、細胞培養担体などが挙げられる。

[0022] 次に、上記のアフィニティ担体を効率良く製造するのに適した本発明の製造方法について説明する。

本発明の製法では、二官能性ビニルモノマー化合物、メタクリレート化合物もしくはアクリレート化合物の少なくともいずれか1種と、リガンド担持用モノマーとしての少なくとも1種の一官能性親水性モノマーと、前記リガンド担持用モノマーに担持されるリガンドの親水的・疎水的環境を任意に調整するための間引き剤としての、少なくとも1種の一官能性間引き剤モノマーとを準備した後、前記二官能性化合物と、(前記一官能性親水性モノマーと一官能性間引き剤モノマーの共重合体)とを、重量比率(混合比率)が10~100:90~0となるように配合して、水又は水溶性溶媒の中に添加、混合し、ラジカル重合開始剤を添加して加熱あるいは紫外線照射を行い、共重合させる。この際、前記水溶性溶媒としては、水に自由に溶解することが可能な低分子量(分子量500以下)の溶媒が使用でき、好ましい溶媒としては、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコールなどのエチレングリコール縮合系溶媒、トリエチルアミン、ビニルピリジン等のアミノ基を有する溶媒、ホルムアミド、ジメチルホルムアミドなどのアミド基を有する溶媒、アセトニトリルのようなシアノ基を有する溶媒、アセトンなどのカルボニル基を有する溶媒、メタノールやエタノールなどの水酸基を有する溶媒などが挙げられる。本発明においては、共重合を行う際の溶媒として、水に溶解しない溶媒(例えばパラフィン類、芳香族炭化水素、ハロゲン化炭化水素など)を使用することはできず、この場合には、ナノメートルサイズの細孔が三次元網目状に連続した構造を有した有機高分子ゲルは得られない。尚、上記水溶性溶媒に添加されるモノマーの総量は、溶媒100重量部に対して10~120重量部であることが好ましい。

[0023] 本発明では、共重合に使用されるラジカル重合開始剤の種類が特に限定されるもの

ではなく、加熱あるいは紫外線照射によって重合が開始可能な一般的なラジカル重合開始剤が種々使用でき、重合条件(重合温度や重合時間)についても特殊な条件を必要とせず、一般的な条件でラジカル重合が行える。本発明において適した開始剤としては、過酸化系ラジカル開始剤(過酸化ベンゾイル、過硫酸アンモニウム等)または、アゾ系ラジカル開始剤(アゾビスイソブチロニトリル(AIBN)、アゾビス2,4-ジメチルバレロニトリル(ADVN)等)、水溶性あるいは油溶性のレドックス系ラジカル開始剤(ジメチルアニリンと過酸化ベンゾイルからなる)が挙げられ、0.2部~10部、好ましくは0.5部~3部添加される。

[0024] 本発明では、上記の共重合を行った後、得られたゲル状体を水で浸漬して洗浄を行い、乾燥させる。この際、洗浄を2~3回繰り返し、加熱乾燥を行うのが一般的である。

このようにして得られた重合体の表面を走査型電子顕微鏡(SEM)にて観察すると、表面に10nm~10 $\mu$ m程度の細孔が三次元網目状に連続していることがわかる。そして、このような三次元網目状の細孔構造を有するアフィニティ担体は、化学的安定性が高く、アガロース系樹脂のように非特異的吸着を十分に抑制する親水的特性を有している。

以下、本発明の実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

## 実施例

[0025] 実施例1:本発明のアフィニティ担体の製造例

### [試薬及び溶媒]

ポリエチレングリコール単位を主鎖に含むメタクリレート系架橋剤としては、市販されているノナエチレングリコールジメタクリレート(商品名:NK ESTER 9G、新中村化学工業株式会社製)、及びテトラエチレングリコールジメタクリレート(商品名:NK ESTER 4G、新中村化学工業株式会社製)をそのまま用いた。

又、リガンド担持用モノマー(一つの官能性基を有する一官能性モノマー)としては、合成したPEG型モノマーの1種である化1に示されているもの(アミンの保護体)を用い、間引き剤モノマーとしては、ジエチレングリコールモノメチルエーテルメタクリレー

ト(東京化成工業、東京化成一級)をそのまま用いた。尚、ラジカル重合開始剤としては、2,2'-アゾビス-2,4-ジメチルバレロニトリル(ADV N)(和光純薬工業、和光一級)をそのまま使用し、溶媒としては、ジエチレングリコール(和光純薬工業、和光一級)又はヘキサエチレングリコール(和光純薬工業)をそのまま使用した。

[0026] [ゲルの作製]

1. 5mlエッペンドルフチューブに、以下の表1～表3で示した組成でリガンド担持用モノマー(Lig-m)、架橋剤、溶媒、間引き剤モノマー(Mab-m)を入れ、攪拌の意味も兼ねてアルゴン脱気を行った。さらにADV N5mgを入れ、再びアルゴン脱気を行い、ADV Nを完全に溶解した。バルカーテープで密閉し、60°Cの湯浴で24時間加熱重合した。重合後、アフィニティ担体を取り出し、メタノールに浸漬し、洗浄した。溶媒には、ジエチレングリコール(DEG)、ヘキサエチレングリコール(HEG)を用いた。また、架橋剤には前記9G、4Gを用いた。

[0027] [表1]

Table 1. 間引き剤入り改良アフィニティ担体の略号とその組成

	Lig-m (×0.043 mmol)	Mab-m (×0.043 mmol)	架橋剤 (×0.043 mmol)	溶媒 (μl)
A	1	1	4G 9	DEG 375
B	1	1	4G 9	HEG 375
C	1	1	9G 9	DEG 375
D	1	1	9G 9	HEG 375

[0028] [表2]

Table 2. 間引き剤入り改良アフィニティ担体の略号とその組成  
(架橋剤量変化)

	Lig-m (×0.043 mmol)	Mab-m (×0.043 mmol)	架橋剤 (×0.043 mmol)	溶媒 (μl)
E	1	7	9G 1.5	DEG 375
F	1	7	9G 3.0	DEG 375
G	1	7	9G 4.5	DEG 375
H	1	7	9G 6.0	DEG 375

[0029] [表3]

Table 3. 間引き剤入り改良アフィニティ担体の略号とその組成  
(間引き剤量変化)

	Lig-m (×0.043 mmol)	Mab-m (×0.043 mmol)	架橋剤 (×0.043 mmol)	溶媒 (ml)
I	1	3.5	9G 3	DEG 375
J	1	7	9G 3	DEG 375
K	1	10.5	9G 3	DEG 375
L	1	14	9G 3	DEG 375
M	1	21	9G 3	DEG 375
N	1	35	9G 3	DEG 375

[0030] 図2～図4は、間引き剤入り改良アフィニティ担体の走査型電子顕微鏡(SEM)観察写真(倍率:3000倍)である。

図2～図4の電子顕微鏡写真から、リガンド担持用モノマーと間引き剤モノマーの比率(モル比率)が1:1～1:14の範囲においては、モノリス構造(ナノメートルサイズの細孔が三次元網目状に連続した構造)が形成されるが、上記比率が1:21以上になると、モノリス構造が形成されないことが分かる。

[0031] 実施例2:本発明のアフィニティ担体によるタンパク質結合試験

CCB及びwestern blot

前記実施例1で得た間引き剤入り改良アフィニティ担体(組成A～D)において、リガンドとして、樹脂上のアミノ基に対して約0.1等量のFK506(32位からリンカー)を固定化し、タンパク質捕捉試験を行った。このFK506は、特異的結合タンパク質FKBP12と強力に結合することが知られている免疫抑制剤である。

図5に、間引き剤入り改良アフィニティ担体のタンパク質結合試験結果を示す。

[0032] 図5に示される上記のタンパク質結合試験から、FKBP12、calcineurinA結合量が飛躍的に増加し、間引き剤モノマーの導入による効果が確認できた。これまでの検討によりアフィニティ担体表面の固定化部位に100%FK506を固定化するとアフィニティ担体表面にFK506が多く(FK506同士の距離が近く)配置されるためFK506同士の疎水的相互作用が強まり、タンパク質の結合が妨げられたと考えられており、間引き剤モノマーを加えることで、FK506固定化部位数が減少し、FK506間での相互作用

用も減少したと考えられる。よって、タンパク質との結合がより強くなったため十分な標的タンパクの結合量が得られたと考えられる。また、間引き剤モノマーによって担体表面の疎水的・親水的環境が標的タンパクにとってリガンドとアクセスし易い環境となり、良好な結果が得られたと考えられる。

このように、本発明のアフィニティ担体を用いた場合には、アフィニティクロマトグラフィーによる標的タンパク質の単離において、アフィニティ樹脂への非特異的タンパク質の吸着が見られず、選択的で効率良く標的タンパク質が吸着されることが確認された。

[0033] 実施例3: 共重合に使用される溶媒の種類を変えた場合の共重合生成物の構造観察

前記実施例1に記載されるリガンド担持モノマー並びに間引き剤モノマーと、架橋剤としての前記9G及びエチレングリコールジメタクリレート(EDMA) (ナカライテスク、化学用)を使用し、溶媒として、キシレン、クロロペンタン及びジエチレングリコールを使用し、開始剤としてADV Nを用い、以下の表4に記載される組成にて、前記実施例1の重合条件にて重合を行い、得られた共重合生成物を取り出し、アルコールで洗浄し乾燥を行った。

[0034] [表4]

Table 4 . 間引き剤入りアフィニティ担体の略号とその組成

	Lig-m (×0.043 mmol)	Mab-m (×0.043 mmol)	架橋剤 (×0.043 mmol)	溶媒 (μl)
①	1	7	9G 3	キシレン 375
②	1	7	9G 3	クロロペンタン 375
③	1	7	EDMA 3	DEG 375

[0035] 図6に、この実施例3にて得られた共重合生成物の電子顕微鏡写真を示す。

図6の電子顕微鏡写真から、溶媒としてキシレンやクロロペンタンを使用した場合にはモノリス構造は得られないのに対して、水溶性溶媒の1種であるジエチレングリコールを用いた場合には、マイクロメートルサイズの平均直径を有し、三次元網目状に連続した細孔と有機物質に富む骨格相からなる共連続構造が形成されていることが分

かる。

#### 産業上の利用可能性

[0036] モノリス構造を有する本発明のアフィニティ担体は、担体中に導入される間引き剤モノマーの種類を適宜選択することによって、リガンドの置かれる環境を親水的環境にも疎水的環境にも自由に設定可能であり、製薬技術の分野において特に有用である。又、このような手法によりリガンドの置かれる環境を種々変化させる技術は、単にアフィニティゲルとしての利用だけに止まらず、親水的あるいはイオン交換的な新規な共連続構造を持つ高分子素材の創成にも寄与できることから、環境関連分野あるいは分析化学分野においても極めて有用である。

## 請求の範囲

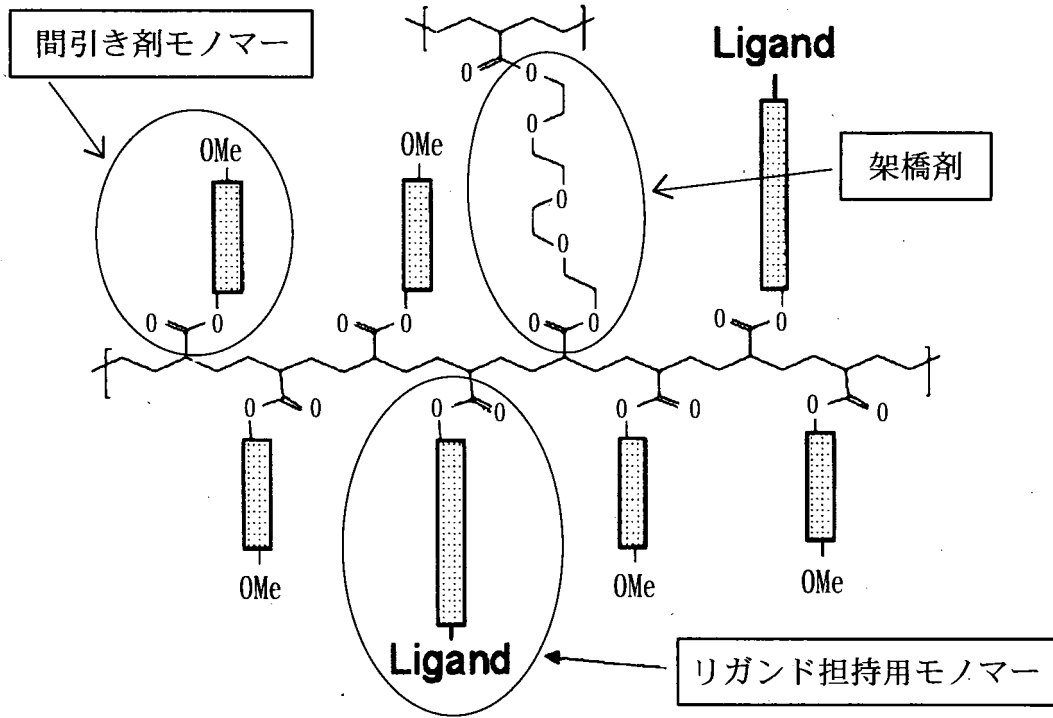
- [1] マイクロメートルサイズの平均直径を有し、三次元網目状に連続した細孔と有機物質に富む骨格相からなる共連続構造をもつ粒子凝集型でない有機高分子ゲル状のアフィニティ担体であって、当該アフィニティ担体が、架橋剤としての、少なくとも二官能性以上のビニルモノマー化合物、メタクリレート化合物もしくはアクリレート化合物の少なくともいずれか1種と、リガンド担持用モノマーとしての少なくとも1種の一官能性親水性モノマーと、前記リガンド担持用モノマーに担持されるリガンドの親水的・疎水的環境を任意に調整するための間引き剤としての、少なくとも1種の一官能性間引き剤モノマーとの共重合体であり、しかも、前記アフィニティ担体における前記架橋剤と(前記一官能性親水性モノマーと一官能性間引き剤モノマーの共重合体)の体積比率が100~10:0~90であることを特徴とするアフィニティ担体。
- [2] 前記一官能性間引き剤モノマーが、アミノ基、アミド基、アンモニウム基、カルボキシル基、エステル基、エーテル基、カルボニル基、水酸基、スルホ基及びリン酸基から成るグループより選ばれた親水性基並びにアルキル基もしくはフェニル基およびその誘導体あるいはその保護体から成るグループより選ばれた官能性基を有するモノマーであることを特徴とする請求項1記載のアフィニティ担体。
- [3] 前記一官能性間引き剤モノマーが、ヒドロキシル基又はエーテル基を含むメタクリレートあるいはアクリレート、アルキルメタクリレート及びその誘導体もしくはスチレン及びその誘導体から成るグループより選ばれたものであることを特徴とする請求項1又は2記載のアフィニティ担体。
- [4] 前記架橋剤が、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメタクリレート、ジエチレングリコールジメタクリレート、ポリエチレングリコールジメタクリレートおよびそのアクリレート置換体、グリセリンジメタクリレート、ビニルメタクリレート、N, N'-メチレンビスアクリルアミドから成るグループより選ばれたものであることを特徴とする請求項1~3のいずれか1項に記載のアフィニティ担体。
- [5] マイクロメートルサイズの平均直径を有し、三次元網目状に連続した細孔と有機物質に富む骨格相からなる共連続構造をもつ粒子凝集型でない有機高分子ゲル状のアフィニティ担体を製造するための方法であって、架橋剤としての、二官能性ビニルモ

ノマー化合物、メタクリレート化合物もしくはアクリレート化合物の少なくともいずれか1種と、リガンド担持用モノマーとしての少なくとも1種の一官能性親水性モノマーと、前記リガンド担持用モノマーに担持されるリガンドの親水的・疎水的環境を任意に調整するための間引き剤としての、少なくとも1種の一官能性間引き剤モノマーとを、前記架橋剤と(前記一官能性親水性モノマーと一官能性間引き剤モノマーの共重合体)の体積比率が100~10:0~90となるように配合し、水及び分子量500以下の水溶性溶媒から成るグループより選ばれた少なくとも1種の溶媒中で、ラジカル重合開始剤の存在下で共重合させてゲル状体を得、その後、当該ゲル状体を水で浸漬して洗浄を行い、乾燥させることによって共連続構造を保つことを特徴とするアフィニティ担体の製造方法。

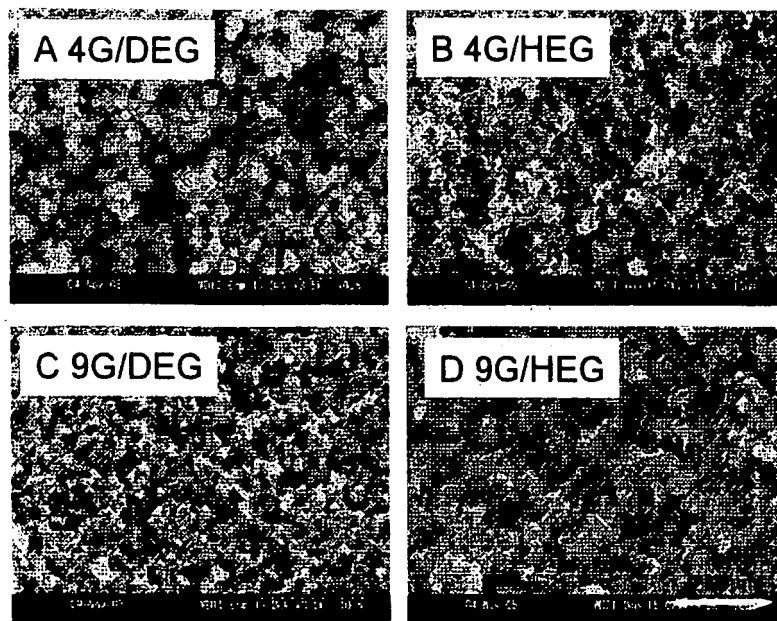
- [6] 前記水溶性溶媒が、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラエチレングリコール、ペンタエチレングリコール、ヘキサエチレングリコール、トリエチルアミン、ビニルピリジン、ホルムアミド、ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、アセトン、メタノールもしくはエタノールから成るグループより選ばれたものであることを特徴とする請求項5記載のアフィニティ担体の製造方法。

[図1]

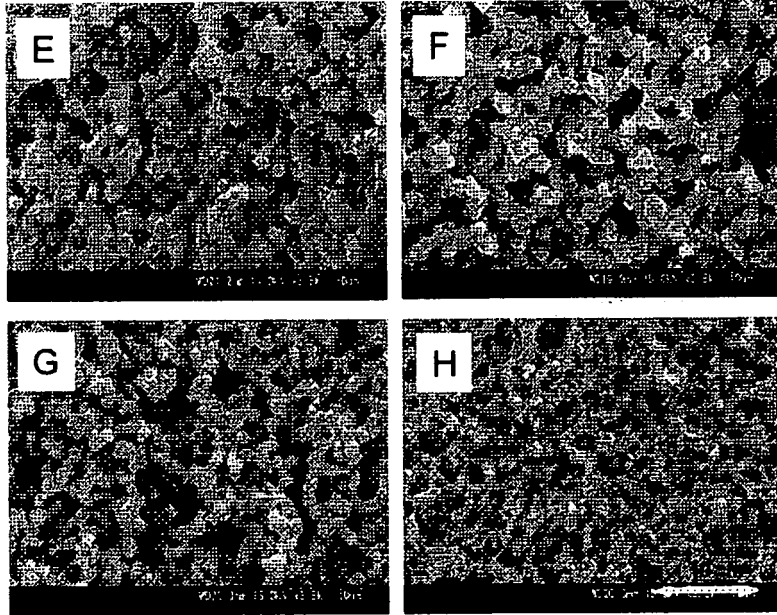
### 間引き剤入り改良アフィニティ担体



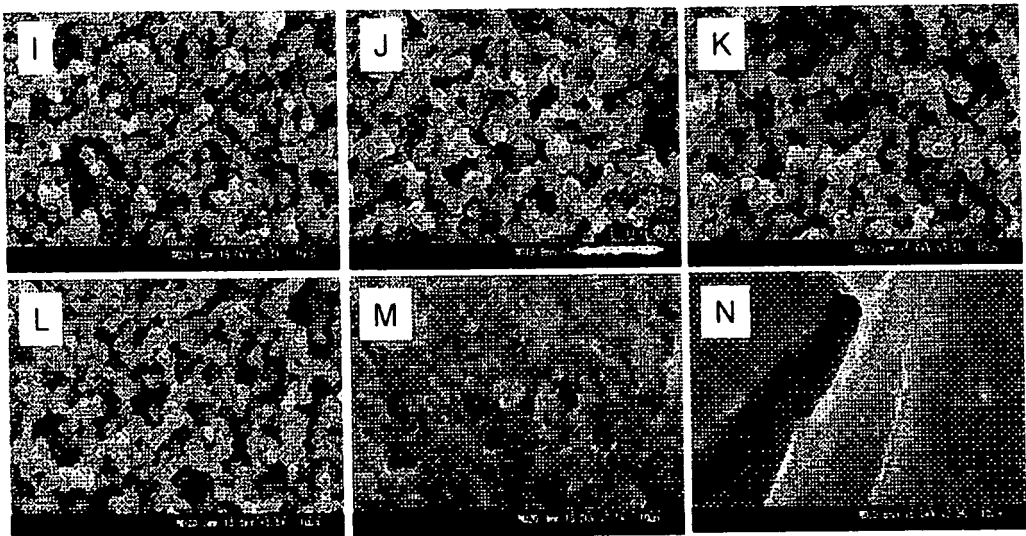
[図2]



[図3]



[図4]





**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2007/061640

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

B01J20/26(2006.01) i, C08F220/20(2006.01) i, C08F220/26(2006.01) i,  
G01N30/88(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)

B01J20/26, C08F220/20, C08F220/26, G01N30/88

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	1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2007	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2007

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.
X	WO 2005/037881 A1 (Reverse Proteomics Research Institute Co., Ltd.), 28 April, 2005 (28.04.05), Claims; page 31, 5th line from the bottom to page 34, line 8; preparation examples 16 to 26 & EP 1674486 A1	1, 2, 4-6
X	WO 2004/073843 A1 (McMASTER UNIVERSITY), 02 September, 2004 (02.09.04), Claims; page 4, line 26 to page 7, line 24; example 40 & JP 2006-519273 A1 & US 2004/0203149 A1 & EP 1617936 A1 & CA 2514471 A	1, 2, 4-6

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search  
10 September, 2007 (10.09.07)

Date of mailing of the international search report  
25 September, 2007 (25.09.07)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/061640

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2003-231648 A (JSR Corp.), 19 August, 2003 (19.08.03), Claims; Par. Nos. [0004] to [0014]; examples (Family: none)	1-6
A	JP 2005-255714 A (Showa Denko Kabushiki Kaisha), 22 September, 2005 (22.09.05), Full text (Family: none)	1-6
A	JP 2006-89641 A (Fuji Xerox Co., Ltd.), 06 April, 2006 (06.04.06), Full text (Family: none)	1-6
A	JP 2003-246809 A (Organo Corp.), 05 September, 2003 (05.09.03), Full text & US 2003/0125398 A1 & EP 1321187 A1	1-6
A	JP 2001-159626 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 12 June, 2001 (12.06.01), Full text (Family: none)	1-6
A	JP 1-217035 A (Hitachi Chemical Co., Ltd.), 30 August, 1989 (30.08.89), Full text (Family: none)	1-6
A	JP 1-107150 A (Showa Denko Kabushiki Kaisha), 25 April, 1989 (25.04.89), Full text (Family: none)	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. B01J20/26(2006.01)i, C08F220/20(2006.01)i, C08F220/26(2006.01)i, G01N30/88(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 (IPC)) Int.Cl. B01J20/26, C08F220/20, C08F220/26, G01N30/88			
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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2007年 日本国実用新案登録公報 1996-2007年 日本国登録実用新案公報 1994-2007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 請求の範囲の番号	
X	WO 2005/037881 A1 (株式会社リバース・プロテオミクス研究所) 2005.04.28, 請求の範囲、31頁下から5行-34頁第8行、製造例16-26 & EP 1674486 A1	1, 2, 4-6	
X	WO 2004/073843 A1 (McMASTER UNIVERSITY) 2004.09.02, 請求の範囲、4頁第26行-7頁第24行、実施例40 & JP 2006-519273 A1 & US 2004/0203149 A1 & EP 1617936 A1 & CA 2514471 A	1, 2, 4-6	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <span style="margin-left: 200px;"><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</span>			
* 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 10.09.2007		国際調査報告の発送日 25.09.2007	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 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) 中村 泰三 電話番号 03-3581-1101 内線 3468	
		4Q	9040

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 請求の範囲の番号
X	JP 2003-231648 A (ジェイエスアール株式会社) 2003.08.19, 特許請求の範囲、【0004】 - 【0014】、実施例 (ファミリーなし)	1-6
A	JP 2005-255714 A (昭和電工株式会社) 2005.09.22, 公報全文 (ファミリーなし)	1-6
A	JP 2006-89641 A (富士ゼロックス株式会社) 2006.04.06, 公報全文 (ファミリーなし)	1-6
A	JP 2003-246809 A (オルガノ株式会社) 2003.09.05, 公報全文 & US 2003/0125398 A1 & EP 1321187 A1	1-6
A	JP 2001-159626 A (積水化学工業株式会社) 2001.06.12, 公報全文 (ファミリーなし)	1-6
A	JP 1-217035 A (日立化成工業株式会社) 1989.08.30, 公報全文 (ファミリーなし)	1-6
A	JP 1-107150 A (昭和電工株式会社) 1989.04.25, 公報全文 (ファミリーなし)	1-6