

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4135812号

(P4135812)

(45) 発行日 平成20年8月20日(2008.8.20)

(24) 登録日 平成20年6月13日(2008.6.13)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88 1 O 1 P
BO 1 J 20/281 (2006.01)	GO 1 N 30/88 2 O 1 G
	BO 1 J 20/22 D

請求項の数 25 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願平10-538447	(73) 特許権者	ジーイー・ヘルスケア・バイオサイエンス ・アクチボラグ
(86) (22) 出願日	平成10年3月4日(1998.3.4)		スウェーデン国エスエー 7 5 1 8 4
(65) 公表番号	特表2001-514745 (P2001-514745A)		ウプサラ ビヨルクガタン 30
(43) 公表日	平成13年9月11日(2001.9.11)	(74) 代理人	弁理士 松本 研一
(86) 国際出願番号	PCT/SE1998/000387		
(87) 国際公開番号	W01998/039094	(74) 代理人	弁理士 小倉 博
(87) 国際公開日	平成10年9月11日(1998.9.11)		
審査請求日	平成17年2月28日(2005.2.28)	(74) 代理人	弁理士 伊藤 信和
(31) 優先権主張番号	9700769-4		
(32) 優先日	平成9年3月4日(1997.3.4)	(74) 代理人	弁理士 黒川 俊久
(33) 優先権主張国	スウェーデン(SE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 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

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ミクロポア系及び開口を有する該ミクロポア系の表面を呈するコアを含むマトリックスであって、上記ミクロポアに浸透できないほど大きな分子量のポリマー I で上記表面が被覆されており、ポリマー I が、開口を有するミクロポア系の表面に架橋及び／又は共有結合しているとともにポリマー I のすべて又は実質的にすべての分子がミクロポア内への輸送から排除され、ポリマー I が多孔質であって、コアの分離特性とは異なる分離特性を有することを特徴とするマトリックス。

【請求項 2】

前記開口の直径が 1 μm 未満であることを特徴とする、請求項 1 記載のマトリックス。

10

【請求項 3】

前記ミクロポア系が該系への対流性物質移行を防止する開口を有する拡散性細孔系を有することを特徴とする、請求項 1 又は請求項 2 記載のマトリックス。

【請求項 4】

前記ミクロポアの表面及びポリマー I が疎水性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 項記載のマトリックス。

【請求項 5】

前記ミクロポアの表面がヒドロキシ基を呈することを特徴とする、請求項 1 乃至請求項 4 のいずれか 1 項記載のマトリックス。

【請求項 6】

20

前記コアがポリマー（I I）からなることを特徴とする、請求項 1 乃至請求項 5 のいずれか 1 項記載のマトリックス。

【請求項 7】

ポリマー I I が疎水性であって、その表面が親水性化されていることを特徴とする、請求項 6 記載のマトリックス。

【請求項 8】

ポリマー I 及び I I の少なくとも一方、好ましくは両方が親水性ポリマー、特にポリヒドロキシポリマー、好ましくは多糖類から選択され、選択されたポリヒドロキシポリマーの少なくとも一方が架橋していることを特徴とする、請求項 6 又は請求項 7 記載のマトリックス。

10

【請求項 9】

ポリマー I 及び I I の少なくとも一方、好ましくは両方がプルラン、澱粉、セルロース、デキストラン及びアガロースから選択されることを特徴とする、請求項 6 又は請求項 7 記載のマトリックス。

【請求項 10】

ポリマー I を呈する表面及びコアのマイクロポア系が、ある分子量及び／又は形状の化合物の浸透能力に関して異なる密度（ストークス半径）を有することを特徴とする、請求項 1 乃至請求項 9 のいずれか 1 項記載のマトリックス。

【請求項 11】

前記マイクロポアが、ポリマー I で被覆された表面よりも浸透し易いことを特徴とする、請求項 10 記載のマトリックス。

20

【請求項 12】

前記マイクロポアが、ポリマー I で被覆された表面よりも浸透しにくいことを特徴とする、請求項 10 記載のマトリックス。

【請求項 13】

前記マイクロポア及び／又はポリマー I が、

- a. イオン交換基
- b. バイオアフィニティー基
- c. 疎水性基
- d. コバレントクロマトグラフィーに使用できる基
- f. キレート又はキレート形成基
- g. いわゆる π - π 相互作用を発揮できる芳香族系を有する基
- h. 水素結合性の基
- i. 親水性基

30

からなる群から選択される 1 種以上のリガンドを呈することを特徴とする、請求項 1 乃至請求項 12 のいずれか 1 項記載のマトリックス。

【請求項 14】

マイクロポアにおける 1 種以上の選択されたリガンドの置換度が、ポリマー I からなる表面層の同じリガンドの置換度とは異なることを特徴とする、請求項 13 記載のマトリックス。

40

【請求項 15】

マイクロポア又はポリマー I における 1 種以上の選択されたリガンドの置換度が実質的に 0 であることを特徴とする、請求項 13 又は請求項 14 記載のマトリックス。

【請求項 16】

粒径 1～10,000 μm の一群の粒子の形態にあることを特徴とする、請求項 1 乃至請求項 15 のいずれか 1 項記載のマトリックス。

【請求項 17】

粒子を液体媒体で満たしたときに液体媒体とは異なる密度を有することを特徴とする、請求項 16 記載のマトリックス。

【請求項 18】

50

単分散であることを特徴とする、請求項 1 6 又は請求項 1 7 記載のマトリックス。

【請求項 1 9】

粒子が一定範囲内の粒径及び／又は密度を示すことを特徴とする、請求項 1 6 又は請求項 1 7 記載のマトリックス。

【請求項 2 0】

請求項 1 乃至請求項 1 9 のいずれか 1 項記載のマトリックスの、該マトリックスへの分配による、液体媒体中、好ましくは水性媒体中の物質の分離への使用。

【請求項 2 1】

前記分離が、物質がマトリックスの構造／リガンドに結合する吸着法であることを特徴とする、請求項 2 0 記載の使用。

【請求項 2 2】

クロマトグラフィー法であることを特徴とする、請求項 2 0 乃至請求項 2 2 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 2 3】

前記マトリックスが一群の粒子を含み、粒子への分配が懸濁／流動床の形態の粒子で起こることを特徴とする、請求項 2 0 乃至請求項 2 2 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 2 4】

粒子が安定な流動床の形態であることを特徴とする、請求項 2 3 記載の使用。

【請求項 2 5】

粒子が充填床の形態であることを特徴とする、請求項 2 2 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、成分混合物からの 1 種以上の成分の分離に使用できるマトリックスに関する。特定のタイプのマトリックスではその他の用途も存在する。分離とは、1 種以上の成分を含む液体を特定のタイプのマトリックスと接触させ、除去すべき 1 種以上の成分をマトリックスに分配せしめて、マトリックスへの分配が異なる残りの成分から分離することを意味する。「マトリックスへの分配」という表現は、成分がマトリックスに結合又はマトリックス上（内）に吸着することを意味する。

分離法は、モノリシックマトリックスでの又は粒子の充填床もしくは流動床でのクロマトグラフィーの形態でもよいし、或いは懸濁粒子の回分プロセスとしても実施できる。マトリックスへの分配は、それぞれアフィニティークロマトグラフィー及びゲルクロマトグラフィーにおけるように、親和性又は分子の大きさ／分子形状に基づくものがある。

分離という用語は、除去すべきものを含む液体に分離マトリックスを接触させる脱塩、緩衝液交換、濃縮等も意味する。

分離すべき成分を含む液体では、ストリーミング又は乱流のために対流性物質移行が起こる。この物質移行に関連して、上述の分離に使用されるマトリックスは、典型的には、1) 対流性物質移行が起こる環境（対流性環境）と 2) 拡散性輸送のみが起こる環境（拡散性環境）の 2 種類の環境を呈する。これら 2 種類の環境は、通常、対流性物質移行を防止する開口を通して、使用した液体を介して互いに接触している。

モノリシックマトリックス及び粒子マトリックスは、両方の種類の環境を呈し得る。モノリシックマトリックスに関しては、それぞれスルーフロー細孔及び拡散細孔の形態である。粒子に関する追加の対流性環境は、粒子の周りの外部環境、即ち、充填ビーズにおける粒子間の空隙容量並びに懸濁床及び流動床における周囲の液体である。スルーフロー細孔及び拡散細孔の両方を呈するクロマトグラフィー用のマトリックスは、長い間、おそらく細孔の種類を最適に活用できずに使用されてきた。例えば、国際公開第 9 1 0 0 7 6 2 号（Perseptive Biosystems Inc.）参照。両方の細孔を呈する多糖類系のマトリックスは、国際公開第 9 3 1 9 1 1 5 号（Pharmacia Biotech AB）に記載されている。

スルーフロー細孔又は拡散細孔として機能する細孔の大きさの限界は、液体の移動性及び粘性（例えば流速）、細孔表面の特性、対流性物質移行を生じる流れを制限する表面のコ

10

20

30

40

50

ーティング等の結果である。分離用に重要なスルーフロー細孔の大きさは、 $0.4 \sim 1,000 \mu\text{m}$ の範囲内である。拡散性細孔の大きさは、スルーフロー細孔のものと同一変数の結果である。分離用の拡散性細孔は典型的には $1 \mu\text{m}$ 未満である。同様のことは、拡散性環境と対流性環境の間の開口についてもいえる。

【背景技術】

発明の効果及び発明が解決しようとする課題

純粋な生成物を確実に得るために、幾つかの異なる補足的なクロマトグラフィー法、例えばゲル濾過、イオン交換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、バイオアフィニティークロマトグラフィーが連続して用いられることが多い。幾つかの連続的クロマトグラフィー工程は煩わしく、費用がかかり、特に工業規模では、費用のために達成される精製能力が制限されかねない。

10

精製工程の数を減らすための多官能性クロマトグラフィー媒体を創生する多くの試みが、特に、精製すべき物質と様々な種類の物理的／化学的相互作用を生じる異なる官能基をクロマトグラフィー材料に設けることによって、なされてきた。実際には、異なる相互作用が互いに相殺して劣った結果をもたらすことが多い（例えば、静電相互作用と疎水性相互作用の組合せ）。

粒子状イオン交換体でのイオン交換は、粒子とは逆の電荷をもつ巨大分子の存在下でマトリックス粒子の凝集を導くことが多い。これらの問題は表面電荷に起因し、回分式懸濁法及び流動床で顕著となる。これに関しては、細胞培養上清、その他様々な種類の微生物を始めとする細胞全体及び／又はその一部を含む試料溶液が特筆される。

20

本発明では、同じクロマトグラフィー媒体で異なる分離原理の共操作を達成することができ、こうして精製プロセスに必要な分離段階の数が減る。

公知のマトリックス

デキストランでコートした架橋アガロースの多孔質粒子は、Superdex（登録商標）という商品名でAmersham Pharmacia Biotech AB（スウェーデン、ウプサラ）から市販されている。Superdex（登録商標）の製造では、デキストランが粒子の内部及び粒子の外部に存在できるような分子量分布を有するデキストランが使用される。

メンブラン／マトリックスの細孔表面は、細孔の目詰まりを防ぐ分子量のポリマーで被覆できる（欧州特許出願公開第221046号（Monsanto））。

30

本発明とは異なる構成の多官能性マトリックスは既に記載されている。米国特許第454485号（Purdue University；Hagestam & Pinkerton）、米国特許第5522994号（Cornell Res. Found.；& Svec）、国際公開第9409063号（Cornell Res. Found.；Frechet & Svec）、国際公開第9408686号（Cornell Res. Found.；Frechet, Smigol & Svec）及び国際公開第9317055号（Cornell Res. Found.；Frechet & Hosoya）参照。

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、以下のものを提供することである。

40

1. 大きさ及び形状の異なる成分間の識別に関して選択性の向上したゲル濾過媒体。
2. 官能基、電荷、疎水性／親水性環境等のタイプに関して内部環境がその表面環境と異なる多孔質粒子又は多孔質モノリシック構造。
3. 特に液体クロマトグラフィーにおいて、ゲル濾過、分配クロマトグラフィー及びアフィニティー（イオン交換、疎水性相互作用、バイオアフィニティー相互作用／反応等）に基づく単純化された分離法。
4. マトリックス内部又はマトリックス外部に、大きな細孔（マクロポア）又はマトリックス周囲から小さな内部細孔（ミクロポア）の境界を定める表面層を有する新規粒子又はモノリシック構造。この表面層は、ある大きさを超える化合物／成分が通過するのを防止するとともに、大きな化合物／成分がマトリックスに結合するのを防ぐ（表面層、ロック

50

）。ミクロポアの吸着特性も、ミクロポアに浸透する成分が、表面層内／上に付着しないように、表面層のものと異なってもよい。

【課題を解決するための手段】

本発明の改善は、小さな細孔（ミクロポア）の細孔系を画成する内部表面及び該ミクロポア系の境界を定める外部表面を呈するマトリックスで達成される。本発明を特徴づける性質は、マトリックス（コア）のこの外部表面にポリマー（I）が結合していて、該ポリマーがミクロポアに浸透できない分子量及び形状を有することである。関心のもたれるミクロポアは、場合によっては1 μm未満であるが、最終マトリックスの用途に応じて、これよりも大きくてもよい。ミクロポアは、多くの場合拡散性細孔に相当する。外部表面は、それに対して対流性物質移行が起こる表面であってもよい。外部表面が細孔表面に相当する限り、このような相当する細孔を以下マクロポアと呼ぶ。

「ミクロポアに浸透できない分子量及び形状」という表現は、コーティングに利用されるポリマー標品（ポリマーI）が、ミクロポアを通して裸のマトリックス中に輸送できる液体に該標品を溶解したときに、該標品中のすべて又は実質的にすべてのポリマー分子がミクロポア内への輸送から排除されるような分子量分布を有することを意味する。これは、ポリマーIを外部表面に固定したときに、ポリマーIがミクロポアの分離特性と異なる分離特性を該表面に付与できることを意味する。

【発明を実施するための最良の形態】

裸のマトリックス（コア）

原則として、クロマトグラフィー及びモレキュラーシーブの基本的マトリックスは、本発明のコアとして適している。このような基本的マトリックスは、モノリシックでも粒状でも、有機化合物又は無機化合物に基づくものでも、1種以上のポリマーに基づくものでも、親水性、疎水性又は中間的な親水性のものでもよい。

親水性有機コアの例は、ヒドロキシ基（ $-OH$ ）、アミン基（1級、2級、3級、4級アミン／アンモニウム）、カルボキシ基（ $-COOH$ ／ $-COO-$ ）、繰返し基 $-OCH_2CH_2-$ 、 $-OCH_2CH_2CH_2-$ 及び $-OCH_2CH_2(CH_3)-$ 、アミド基（ $-CONH_2$ 、低級アルキル（ C_{1-10} ）等で置換されていてもよい。）であり、親水性基は好ましくはポリマーの1つのモノマー単位に直接結合する。ポリヒドロキシポリマー及びポリアミドは典型的な親水性ポリマーであり、それらの中でも、水性媒体に不溶性であり、ポリビニルアルコール、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリレート）及び対応アクリレート、ポリアクリル及びポリメタクリルアミド（例えば、トリスアクリルアミド及びトリスメタクリルアミド（トリス＝ $(H_2C=CH)_3CNH_2$ ））で、場合によってN、N'-アルキレンビスメタクリルアミド又は対応ビスアクリルアミドで架橋されたもの、アガロース、デキストラン、プルラン及びセルロースのような多糖類系のポリマーが挙げられ、これらはすべて所望により架橋されていてもよい。好ましいポリヒドロキシポリマーは、分離に適した液体媒体（例えば水）中で、典型的に濡らすことができ、好ましくは膨張性である。疎水性コアの細孔の表面は、親水性化、つまり、水がコアの内部に容易に浸透できるように上述の1種以上の親水性基に暴露することによって誘導体化してもよい。数多くの親水性化法が既に公知であり、例えば、溶解状態でミクロポアに浸透でき、細孔表面に付着できる親水性ポリマーでの被覆があり（米国特許第4535010号，Axen他；及び米国特許第5030352号，Regnier他）、表面への架橋及び／又は共有結合によって安定化させることができる。別の方法では、コアを製造するための重合を親水性末端（反応性界面活性剤）を呈する共重合性モノマーの存在下で実施するか、或いは基本ポリマー骨格の疎水性基に親水性基を後で共有結合的に導入する。後者は、水溶性モノマー又はポリマー化合物の表面へのグラフト化／重合によって実施できる。

疎水性有機コアの例は、多孔質の形態の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（ PF_6 ）のポリマー等である。

無機コアの例は、多孔質の形態のガラス、シリカゲル、ゼオライト、珪藻土、複合材料、酸化ジルコニウム等である。

本願出願時点で、最も好ましいコアは、ビーズ状のアガロースに基づくもので場合によ

10

20

30

40

50

て架橋され、場合によって細孔内のデキストランで誘導体化したもの（例えばそれぞれ Sepharose（登録商標）及び Superdex（登録商標）という商品名で市販されている等級のもの）、ビーズ状の架橋デキストラン（例えば Sephadex（登録商標）という商品名で市販されている等級のもの）、セルロース（例えば Sephacel（登録商標）という商品名で市販されている等級のもの）、細孔内のデキストランで誘導体化されたポリアクリルアミドの架橋多孔質粒子（例えば Sephacryl（登録商標））、並びに例えばスチレンージビニルベンゼンポリマーの単分散又は多分散多孔質粒子を親水性化したもの（例えば MonoBeads（登録商標）及び Source（商標）という商品名で市販されている等級のもの）である。これらの商標は、Amersham Pharmacia Biotech AB（スウェーデン、ウプサラ）から市販の製品に対応する。

10

ミクロポアの境界を定める表面層のポリマー（ポリマー I）

ポリマー I は、分離に使用すべき液体媒体に応じて、親水性でも、疎水性でも、或いは中間的な親水性のものでもよい。

本発明では、マトリックスの内部表面及び外部表面への液体媒体の浸透（濡れ）を容易にするため、コアの細孔の表面と液体媒体とポリマー I が類似した親水性／疎水性を有しているのが好適であることが多い。極性液体媒体（例えば水性媒体）と極性コアとの組合せについて、ポリマー I として適しているのは、水溶性の形態のポリビニルアルコール（PVA）、デキストラン、セルロース、アガロース、ポリエーテル類、例えばポリエチレンオキサイド、ポリプロピレンオキサイド及びそれらのコポリマー等である。低又は非極性の液体媒体とコアの組合せに関しては、ポリスチレン、疎水性化したデキストラン又は同様の処理を施したセルロースがポリマー I として適している。これは、ミクロポアの疎水性表面と、さほど非極性でない又は親水性のポリマー I で境界が区切られた表面層と、親水性液体との組合せの使用を排除するものではない。

20

ポリマー I はミクロポアの境界を定める表面に結合する前に官能化してもよい。ここでいう官能化とは、最終表面層に存在する基又は後の誘導体化を容易にする基をポリマー I に設けることを意味する。ポリマー I はミクロポアに浸透できないコロイド粒子の形態であってもよい。

ポリマー I は、コアのポリマー（ポリマー II）と同じポリマーに基づくものでも、異なるポリマーに基づくものでもよい。

30

ポリマー I はポリマー混合物であってもよい。

コアにポリマー I を結合した後で、ポリマー I を架橋又は官能化してもよい。

多孔性及び粒径

興味深い排除限界（多孔度）は、一般に $3 \sim 10^6 \text{ \AA}$ の範囲のストークス半径に相当する。本願出願人及び将来の特許権者の技術分野では、 $10 \text{ \AA}$ 以上の排除限界が特に有利であろう。排除限界は、主に、混合物から分離すべき物質がミクロポア系に浸透できるが、混合物中の残りの成分の少なくともいずれかが排除されるように選択される。これとは逆の状況に基づく実施形態も存在する。

ある実施形態では、固定化ポリマー I からなる外部層はミクロポアよりも稠密である。つまり、マトリックス内部に移動できる成分が少なく、同時に大きな成分が効果的に排除される。その他の用途では、これとは逆のことを、ミクロポア系と外部層に適用し得る。多孔度はミクロポア系と外部層で同じであってもよい。

40

本発明で利用する粒子は、形状の異なるもの、例えば粉碎材料のように不規則なものであっても、程度の差はあってもビーズのような球形のものであってもよい。粒子の粒径は、当技術分野における従来の知識に基づいて選択される。本発明の分離法では、ある範囲内で粒径が変動し、平均値が $1 \sim 10,000 \mu\text{m}$ 、好ましくは $1 \sim 5,000 \mu\text{m}$ 、最も好ましくは $1 \sim 1,000 \mu\text{m}$ の範囲内にある粒子の集団を使用することができる。粒子の集団はこれらの範囲内に粒径を有する単分散のものであってもよい。

モノリシックマトリックスのマクロポアは、粒子に関する上記の説明と同様に、大きさ及び形状の異なるものであってもよい。かかる実施形態では、マクロポアの表面はポリマー

50

Iで被覆される。

粒子状マトリックスの密度

最終マトリックスの用途に応じて、それらが使用される液体媒体の密度よりも高い、低い又は同じ密度（液体媒体で飽和したマトリックスの密度）を有するマトリックスが必要とされることがある。粒子状マトリックスの製造は、マトリックスに充填材（多くの場合、さらに小さな粒子の形態）を導入することによって実施できる。分離用の液体媒体と大きく異なる密度の粒子状マトリックスは大抵は回分式懸濁法並びに膨張／流動床に使用されてきた。この実施形態で典型的な密度は 1.02 g/cm^3 超、好ましくは 1.1 g/cm^3 超、又は 0.98 g/cm^3 未満である。例えば、国際公開第9200799号（Kerm-En Tek/Upfront Chromatography）参照。また、使用する流動床のみを液体の流れで安定化すると多大な利点が得られることについて記載されている国際公開第9118237号（Amersham Pharmacia Biotech AB）も参照されたい。粒子の分離を簡単にするための磁気充填材を使用すること並びに磁場による流動床の安定化も一般的である。

10

マトリックスの製造—ポリマーIでの被覆

この手順は、典型的には、上述の多孔質コアを、所定の直径のミクロポアへのポリマーの浸透を防止する大きさ及び形状のポリマーIを溶解状態で含んだ液体と接触させることを含む。孔径の大きなミクロポア系に対しては、ポリマーIはコロイド粒子の形態であってもよい。ポリマーI、コア及び条件は、ミクロポア系の境界を定める表面にポリマーIが結合するように互いに調整される。

20

コアへのポリマーIの結合に関して、疎水性相互作用を利用できるだけでなく、荷電基間、極性構造間、荷電基と極性構造との間の相互作用、又は共有結合を利用できる。ポリマーIは、必要に応じて、後段での架橋によってコアに安定化させることができる。疎水性又は親水性相互作用による表面への結合（疎水性表面—親水性ポリマーI、及び親水性表面—親水性ポリマーI）は、欧州特許出願公開第221046号（Monsanto）に記載されている。ポリマーIと求核性基を提示するコアとを準備し、二官能性試薬でコアを含浸又は活性化させることによってコアにポリマーIを結合させることができる。Axen他（米国特許第453010）参照。使用できる二官能性試薬の例は、CNBr、エピハロヒドリン、ビスエポキシド等である。重要な変法は、アルケン構造へのハロゲン又は対応次亜ハロゲン酸塩の添加による活性化である。アルケンを呈する基の例は、「純然」たるアリル $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2-$ （ここで、自由原子価はマトリックスに直接結合している。）、アリルが橋かけ基を介して結合している基（ $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{OC}_6\text{H}_4-$ 、 $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2-$ 、 $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{OC}_6\text{H}_4\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2-$ 等）である。

30

特に、層の活性化／部分的活性化に関して我々が開発した方法を挙げることができる。この方法は、不足量の活性化剤による多孔質マトリックスの活性化／接触を含み、活性化剤は、マトリックス中への活性化剤の輸送よりも活性化を速く制御できるように選択される。典型例は、アルケン基を呈する多孔質マトリックスを不足量（アルケン基に対して）のハロゲンと反応させることである。この方法は、表面層での選択的な活性化を生じるように制御することができ、続く工程で、ポリマーIとの共有結合に使用できる。本願出願人の「官能基の挿入法」と題する同時出願（本願国際特許出願と同時に出願された対応国際特許出願を伴うスウェーデン国特許出願第9700768-6号）参照。コーティング反応に続いて、層又はコア全体のいずれかの形態のコアの残りの部分への官能性の導入及び／又は架橋のため、残りのアルケン基を活性化してもよい。この方法によって、各官能基がコアの層に位置する多官能性クロマトグラフィー媒体を製造することができる。

40

マトリックスの官能化

こうして用意したマトリックスは、液体クロマトグラフィーに使用するものと同じ種類の官能基（リガンド）を含んでいてもよい。例としては、以下のものが挙げられる。

1. イオン交換基、
2. バイオアフィニティー基、

50

3. 疎水性基、
4. コバレントクロマトグラフィーに使用できる基、
5. 硫黄含有基、例えば、いわゆるチオフィリック相互作用のための硫黄含有基、
6. キレート又はキレート形成基、
7. 異なる化合物といわゆる $\pi-\pi$ 相互作用を生じさせる芳香族系を有する基、
8. 水素結合性の基、
9. 親水性基。

ミクロポアにおける上記の1～9の基の1種以上のリガンドの置換度は、ミクロポアの境界を定める表面層における同じリガンドの置換度と往々にして異なる。本発明のマトリックスの多くの実施形態では、表面層のリガンドの置換度は0又は0付近であり、同時に同

10

じリガンドがミクロポア系に存在する。また、この逆も可能である。上記の1～2及び4～8の基から選択されるリガンドは、表面層に存在しなくてもよい。
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アニオン交換基でも、カルボキシレート ($-\text{COO}^-$)、ホスホネート又はホスフェート (それぞれ $-\text{PO}_3^{2-}$ 及び $-\text{OPO}_3^{2-}$)、スルホネート又はスルフェート (それぞれ、 $-\text{SO}_3^-$ 及び $-\text{OSSO}_3^-$) 等のカチオン交換基でもよい。 $-\text{COO}^-$ 、 $-\text{PO}_3^{2-}$ 、 OPO_3^{2-} 、 $-\text{SO}_3^-$ 及び $-\text{OSSO}_3^-$ 基において、自由原子価は炭素原子に直接結合する。

周知のバイオアフィニティー基は、a) 抗原／ハプテンと抗体 (それらの抗原又はハプテン結合フラグメントも含む)、b) 核酸とその相補的対応物、c) レクチンと炭水化物構造、d) IgG結合タンパク質とかかる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) センス及びアンチセンスに基づくアフィニティー系等の対の一方である。バイオアフィニティー基の中には、天然に存在する生物特異的親和性を「模倣」した、いわゆる「模倣物」と呼ばれる合成有機分子に由来する基もある。

20

疎水性基は、酸素、窒素又は硫黄原子をほとんど或いは全く含まない炭化水素基であることが多い。疎水性基の典型的な例は、直鎖、分枝鎖及び環状飽和、不飽和又は芳香族炭化水素基である。典型的に、これらの基の炭素原子数は25未満である。

コバレントクロマトグラフィーに使用できる基としては、ジスルフィド基、主に反応性ジスルフィド基 ($-\text{S}-\text{S}-\text{R}^1$) 及び遊離チオール基 ($-\text{SH}$) を挙げることができる。

R^1 の例は2-ピリジルである。 R^1 のその他の例については、例えば米国特許第4,647,655号 (Pharmacia AB) を参照されたい。

30

チオフィリック相互作用に利用できる硫黄含有基としては、かなり疎水性であるが、1個以上のチオエーテル構造が存在するものである。例えば、Oscarsson及びPorathの国際公開第9533557号、Porathの欧州特許出願公開第165912号及びPorathの欧州特許出願公開第168363号を参照されたい。

水素結合性基は最近使用されている (Blew, Berglund, Bergstrom, Soederberg, スウェーデン国特許出願第9600590-5号 (=国際公開第97/29825号))。このタイプの基は弱いアニオン交換アンモニウム基 (1級、2級又は3級) をアンモニウム窒素から2又は3炭素原子の距離にあるヒドロキシ基と共に提示することが多い。

本発明の親水性基は、主に1個のヒドロキシ基、1個以上のヒドロキシを有する低級ヒドロキシアルキル基、繰返し構造 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ を含む基等である。この基は低分子量、例えば炭素原子数25未満のものであることが多い。

40

リガンドを有する又は有さない親水性又は疎水性ポリマー基は、ゲル濾過特性を与えることができる。このタイプの基のポリマーは架橋し得る。

適当な基 (リガンド) は、典型的には、橋かけ基を介してマトリックスに結合し、橋かけ基は公知の技術に従って選択される構造を有し得る。橋かけ構造は高分子、例えば、上述の1～10の基の1個以上を各リンカーに有する親水性又は疎水性ポリマーとし得る。橋かけ基の通称として、「スペーサー」、「触手 (tentacle)」、「エクステンダー」、「フラッフ (fluff)」、「リンカー」等が用いられてきたが、これらの通称の各々がある種の意味をもつこともある。疎水性橋かけ基は主に疎水性液体媒体に適して

50

おり、それらが高分子であれば、挿入される上述の1～9の基の利用性及び能力の向上につながる。親水性橋かけ基と親水性液体媒体との組合せについても同様のことがいえる。親水性ポリマー橋の例は、デキストランのような多糖類並びにその他の水溶性ポリヒドロキシポリマーである。ポリマー橋かけ基は、ゲル濾過特性を有するマトリックスの製造に使用できる。

用途

マトリックスの主な用途は、本明細書の冒頭で述べた種類の分離である。上述の排除限界及び官能基によって、核酸、ペプチド含めたタンパク質及びその他の有機及び無機化合物の分離に本発明のマトリックスを使用することができるようになる。分離は、1種類の低分子から、粒状凝集物、生体親和性複合体、動物及び植物細胞並びにそれらの一部、微生物及びその一部のような複雑なものに至るまで、同種又は大きく異なる成分を含む混合物で実施し得る。

液体媒体と接触させるマトリックスは、モノリシックでも、充填粒子床の形態でもよく、液体媒体をマトリックスを通して流す（クロマトグラフィー）。マトリックスが粒子からなる場合には、これらは別法として、例えば、膨張床でのように液体流による攪拌又は流動化によって懸濁してもよい。懸濁法には、回分法が用いられる。安定流動床に関して、分離はクロマトグラフィーと同様に実施できる（国際公開第9218237号，Pharmacia Biotech AB）。

分離は、マトリックスと置換基（上記参照）の選択に応じて、アフィニティークロマトグラフィー、個々の化合物のサイズと形状に基づくクロマトグラフィー（ゲルクロマトグラフィー）又は対応する回分法として設計できる。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）、コバレント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、キレート式クロマトグラフィー、 π - π 相互作用に基づくクロマトグラフィー等である。原則的に、条件及びプロトコルは個々のタイプの分離法の従来知識に応じて選択される。

以下の実施例で本発明を例示するが、これらの実施例は本発明を限定するものではない。本発明は、特許請求の範囲及び本明細書で定義される。

【実施例】

実施例1：粗デキストランで被覆された粒子状の架橋アリル化アガロース

A. 粒子状の架橋アリル化アガロースの製造。Porath他（J. Chromatog. 60（1971）167-77及び米国特許第3,959,251号）によるNaOH存在下でのエピクロロヒドリンとアガロースの反応によって製造した架橋アガロース（34 μ m）を、塩基としてのNaOHと共にアリルグリシジルエーテルと、0.21 mmole/mLゲルのアリルレベル（ $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2-$ ）になるまで反応させた。水性媒体中で、我々は0.005～0.450 mmole/mLゲルの範囲のアリルレベルのゲルの製造に成功した。反応を有機溶媒中で行えば、置換度をさらに高めることができる。

B. 粗デキストランの溶解。粗デキストランはLeuconostoc mesenteroides由来の非加水分解デキストランであり、大抵は1千～3千万ダルトンの超高分子量である。エタノール沈殿の繰返しによる精製後は、粗デキストランは原則的に低分子量糖化合物を全く含まない。使用した粗デキストランは、Pharmacia Biotechの製造プラント（スウェーデン、スタンファンストルプ）で製造したものであった。エタノール沈殿し凍結乾燥した粗デキストラン45.7 gを、三首フラスコ内の蒸留水1000 mLにゆっくり攪拌しながら溶解した。

C. 架橋アリル化アガロースの部分的臭素化。工程Aで製造し、水切りしたアリル化アガロース200 mL、蒸留水200 mL及び無水NaOAc 5.72 gを1000 mL三首フラスコに入れた。その後、過剰の臭素水を滴下して臭素化を行った。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. カップリング反応。工程Cで得たゲルを吸引乾燥し、工程Bで得た溶解粗デキストラ

ンを含むフラスコに攪拌しながら注意深く移す。混合物を1時間平衡化させる。続いて、蒸留水91 mL中に溶解した29.2 gのNaOH及び0.73 gのNaBH₄の添加によって反応を開始する。温度を50℃に調節し、反応を一晩（例えば16時間）進行させた後、濃HOAcを直接反応容器に入れてpH7未満、好ましくは5～6に中和することによって反応を停止させる。その後、混合物をガラスフィルターで濾過し、蒸留水で洗浄する。

実施例2：実施例1で使用した粒子の架橋。架橋剤1，4-ブタンジオールジグリシジルエーテル

粗デキストランでコートした実施例1の粒子44.8 gを、予め秤量したプラスチック秤量ガラス中で、乾燥吸引した状態で秤量し、次いで容量を蒸留水で75 mLに合わせる（水とゲルの合計）。次いで混合物を250 mL三首フラスコに移し、それに1，4-ブタンジオールジグリシジルエーテル15 mLを室温で添加する。その後、11 MのKOH 35.0 mL（0.385 mole）を0.3 mL／分（開始）のポンプ輸送で容器に添加する。これは約2時間かかる。次いで、サーモスタットの温度を40℃に調節する。攪拌する。反応を一晩（約16時間）進行させ、濃HOAcでpH7未満、好ましくは5～6に中和することによって停止し、その後混合物をガラスフィルターで濾過し、最後にゲルを蒸留水で洗浄する。

実施例3：高分子量デキストランで被覆したフェニルセファロースHP

A. フェニル置換架橋アリル化アガロース（アリル化フェニルセファロースHP）の製造：フェニルセファロースHPはAmersham Pharmacia Biotech ABから入手可能である。これはフェニル化架橋アガロース（34 μm粒子）からなる。粒子を、塩基としてのNaOHと共にアリルグリシジルエーテルと0.17 mmole／mLゲルのアリルレベル（CH₂=CHCH₂OCH₂CHOHCH₂-）となるまで反応させることによってアリル化を行う。

B. 粗デキストランの溶解：エタノール沈殿し凍結乾燥した粗デキストラン53.5 gを、1,000 mLフラスコ内の蒸留水325 mLにゆっくり攪拌しながら溶解する。

C. アリル化フェニルセファロースHPの臭素化。工程Aで製造したアリル化フェニルセファロースHP 250 mL、蒸留水250 mL及びNaOAc（無水）5.23 gを1000 mL三首フラスコに入れる。その後、元素態臭素を滴下して臭素化を行い、次いで、ゲルをガラスフィルター上で蒸留水で洗浄する。

D. カップリング反応。工程Cで得たゲルを吸引乾燥し、工程Bで得た溶解粗デキストランを含むフラスコに注意深く攪拌しながら移す。混合物を注意深く攪拌しながら平衡化させる。その後、蒸留水114 mLに溶解した36.5 gのNaOH及び0.95 gのNaBH₄の添加によって反応を開始する。温度を35℃に調節し、反応を一晩（16時間）注意深く攪拌しながら進行させる。次いで、反応混合物を2 Lビーカーに注ぎ、濃HOAcでpH7未満、好ましくは5～6に中和することによって反応を停止させる。最後に、混合物をガラスフィルターで濾過し、蒸留水で洗浄する。

実施例4：高分子量デキストランで被覆されたQセファロースHP

A. アリル化Q置換架橋アガロース（アリル化QセファロースHP）の製造：QセファロースHPはAmersham Pharmacia Biotech ABから入手可能である。これは、0.15～0.20 mmole／mLゲルのイオン交換能を有する4級基（CH₃）₃N⁺CH₂CHOHCH₂-で置換された架橋アガロース（30 μm粒子）からなる。粒子を、塩基としてのNaOHと共にアリルグリシジルエーテルと、0.088 mmole／mLゲルのアリルレベル（CH₂=CHCH₂OCH₂CHOHCH₂-）まで反応させることによってアリル化を行う。

B. 粗デキストランの溶解：エタノール沈殿し凍結乾燥した粗デキストラン4.28 gを、100 mLフラスコ内の蒸留水26.0 mLにゆっくり攪拌しながら溶解する。

C. アリル化QセファロースHPの臭素化。工程Aで製造したアリル化QセファロースHP 20 mL（置換度：0.088 mmoleアリル基／mL）、20 mLの蒸留水と0.26 gの無水NaOAcを100 mL三首フラスコに入れる。その後、過剰の臭素水を滴

下して臭素化を行い、次いで、ゲルをガラスフィルター上で蒸留水で洗浄する。

D. カップリング反応：工程Cで得たゲルを吸引乾燥し、溶解粗デキストランを含むフラスコに移す。同時に、5.51gのPEG 35000 (Polyscience Inc. (米国ペンシルベニア州ワーリントン))を注意深く攪拌しながら添加する。混合物を、約1時間注意深く攪拌しながら平衡化させる。その後、蒸留水9.12mLに溶解した2.92gのNaOH及び0.08gのNaBH₄の添加によって反応を開始する。温度を35℃に調節し、反応を一晩(約16時間)注意深く攪拌しながら続ける。攪拌を止め、反応混合物をガラスフィルターで濾過する。粗デキストランを蒸留水で洗い出した後、濃H₂OAcでpH7未満、好ましくは5~6に中和し、ゲルを再び蒸留水で洗浄する。

実施例5：ゲル濾過、後段での架橋を伴う又は伴わない粗デキストラン修飾架橋アガロース

実施例1及び実施例2の粒子を非修飾ビーズとそれらのゲル濾過特性を試験することによって比較する。ゲルをAmersham Pharmacia Biotech AB製のHR10/30カラムに充填する。デキストランの1%溶液をサンプルとして使用した。粗デキストランを排除マーカーとして、エチレングリコールを総体積マーカー(V_o+V_i)として使用した。各々のサンプル100μLを注入した。サンプルを別のランで、1mL/分の流速の蒸留水で溶出し、流動屈折計で検出した。

$K_d = [V_e - V_o] / V_i$ を計算し、分子量に対して線形-対数($\ln - \log$)図にプロットした、図1参照。丸は非修飾粒子を意味し、四角は粗デキストラン修飾粒子を意味し、そして三角は粗デキストランで修飾し、次いで架橋した粒子を意味する。

粗デキストランで修飾を行うと、選択性は著しく変化する。選択性曲線 $K_d = f[\log(\text{分子量})]$ の傾きが急になり、低分子量にかなり偏る。排除限界は100,000のすぐ下まで減少する。結合粗デキストランの架橋は、選択性曲線のさらに低分子量側への偏りに寄与し、 K_d 値はさらに減少する。

実施例6：イオン交換、粗デキストラン修飾QセファロースHP

実施例4に従って修飾したQ-セファロースHP (Amersham Pharmacia Biotech AB)をAmersham Pharmacia Biotech AB製のHR5/5カラムに床高さ約5cmまで充填した。勾配クロマトグラフィーを、以下の条件下で、UV₂₈₀及び電導度測定セルを備えたFPLCシステムで実施した。

緩衝液A)	20mM トリス-HCl pH8.2
緩衝液B)	20mM トリス-HCl pH8.2 + 0.5M NaCl
流速	1.0mL/分
勾配容量	20mL
サンプル	チログロブリン、フェリチン、IgG、CO-Hb、EGF及び 場合によってトランスフェリン
サンプル濃度	緩衝液A中約1mg/mL
サンプル容量	50μL

最大ピークの溶出濃度を、非修飾Q-セファロースHP及び粗デキストラン修飾Q-セファロースHPで測定した。ロック効果の無次元値を、粗デキストラン修飾Q-セファロースHPでの溶出濃度と非修飾Q-セファロースHPの溶出濃度との間の比率として計算した。この比率は、サンプルが外側粗デキストラン層に浸透しビーズの内部と相互作用できる能力、つまりロック効果の尺度である。値0は、サンプルが完全に排除され、イオン性相互作用が全く起こらないことを意味する。値1.0は、非修飾Q-セファロースHPイオン交換体と同一の相互作用のときに得られる。

図2に、ロック効果を、線形-対数図で、使用した試験タンパク質の分子量に対してプロットする。図において、100kDに近い分子量を有するタンパク質が強く影響され、100kDのすぐ上の分子量ではタンパク質がイオン交換体と全く結合しないことが分かる。

実施例7：疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)。粗デキストラン修飾フェニルセファロースHP

実施例 4 に従って修飾したフェニルセファロースHPをHR 5 / 5 カラム (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h A B) に床高さ約 5 c m まで充填した。クロマトグラフィーランを、 UV_{280} 及び電導度測定セルを備えた F P L C システムで実施した。

大きなタンパク質は、小さなタンパク質よりも非修飾フェニルセファロースHPに強く吸着されることが多い。これは、大きなタンパク質は小さなものよりも疎水性官能基を多く含むことがあることに起因する共働的效果である。大きなタンパク質も溶出できるようにリン酸緩衝液の濃度を低く保った。

硫酸アンモニウム自体が顕著なUVシグナルを生じるので、各ゲルについてブランク値を測定し、クロマトグラム値からブランク値を引いから、それらの評価を行った。溶出値 (% B) は、試験管及びミキサのデッドボリュームについての補正後にピークの保持時間から計算した。これらの値は、上記のイオン交換の例と同様に、フェニルセファロースHPでのタンパク質の対応する値で除すことによって標準化し (ロック効果)、タンパク質の分子量に対して図にプロットした。

図 3 のクロマトグラフィーランは、以下の条件下で、 UV_{280} 及び電導度測定セルを備えた F P L C システムで実施した。

緩衝液A)	10 mM H_3PO_4 -KOH 及び 2.0 M NH_4SO_4 pH 7.0
緩衝液B)	10 mM H_3PO_4 -KOH pH 7.0
流速	1.0 mL/分
勾配容量	20 mL
サンプル	チログロブリン 660 kD、フェリチン 443 kD、 IgG 152 kD、キモトリプシノーゲンA 25 kD、 リゾチーム 14.3 kD、EGF 6 kD
サンプル濃度	0.16 mg/mL の EGF 以外 1 mg/mL
サンプル容量	50 μ L

図 3 から、粗デキストラン修飾フェニルセファロースHPの溶出性能が、非修飾フェニルセファロースHPから大きく変わったことが分かる。最大の変更は大きなタンパク質で認められる。IgG のような大きなタンパク質は、ビーズの内部に存在する疎水性フェニルから排除され、マトリックスに付着せずに直接溶出される。EGF、リゾチーム及びキモトリプシノーゲンA のような小さい分子は、粒子内に入って吸着される。IgG 及びフェリチンは、おそらくはサンプルが低分子量物質も含んでいたため、2つのピークを与えた。

マトリックス内部の使用されない不活性化カップリング基 (例えば、 $CH_2OH-CHOHCH_2-$) は排除効果を与え、これはフェニル基の利用性を低減し、ビーズ内部に吸着される分子の溶出に影響を与える。

【図面の簡単な説明】

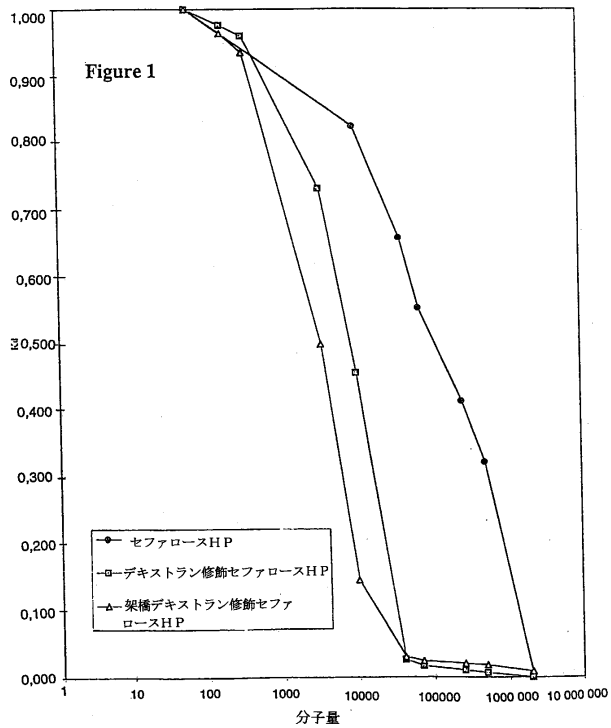
【図 1】ゲル濾過、後段での架橋を伴う又は伴わない粗デキストラン修飾セファロースHPの $K_d = f [\log (\text{分子量})]$

【図 2】イオン交換、粗デキストラン修飾Q-セファロースHPのロック効果 $= f [\log (\text{分子量})]$

【図 3】疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC)、粗デキストラン修飾フェニルセファロースHPのロック効果 $= f [\log (\text{分子量})]$ 。10 mM pH 硫酸アンモニウム 2.0 ~ 0 M。

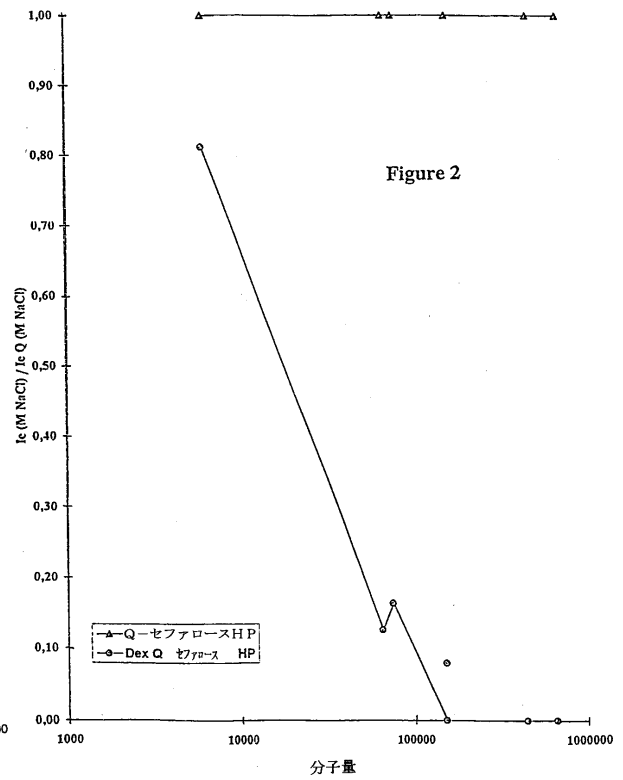
【図 1】

セファロースHPK dにおける粗デキストランのロックの、
種々の分子量のデキストランの関数としての作用



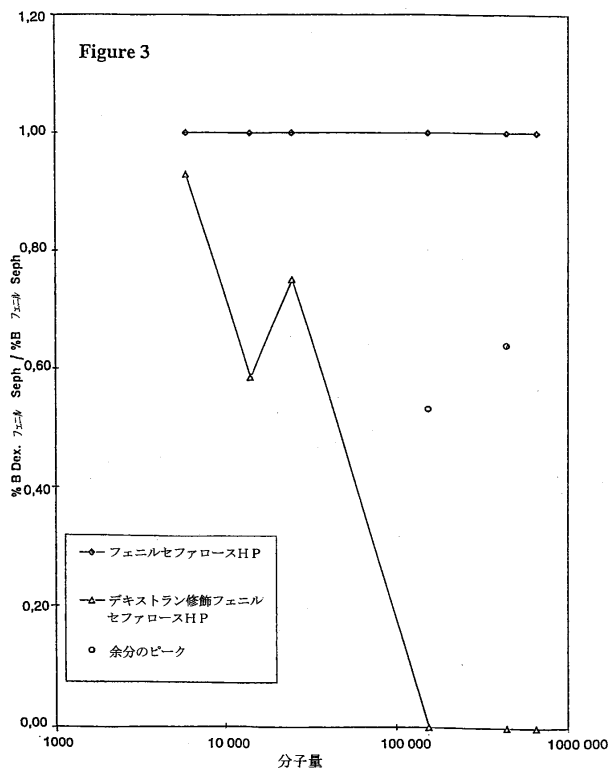
【図 2】

QセファロースHPにおける粗デキストランのロックの作用



【図 3】

フェニルセファロースHPにおける粗デキストランのロックの作用
リン酸カリウム緩衝液 10 mM pH 7.0
硫酸アンモニウム 2.0-0M



フロントページの続き

- (72)発明者 バリィストレム, ヤン
スウェーデン、エスー7 4 0 2 2 ベーリング、レイニックスヴェーゲン 3 番
- (72)発明者 バリィルンド, ロルフ
スウェーデン、エスー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、エスー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 郡山 順

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 30/88
B01J 20/281