

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4824147号
(P4824147)

(45) 発行日 平成23年11月30日(2011.11.30)

(24) 登録日 平成23年9月16日(2011.9.16)

(51) Int.Cl.

F 1

C07D 251/70	(2006.01)	C07D 251/70	F
B01D 15/08	(2006.01)	B01D 15/08	
C07D 251/50	(2006.01)	C07D 251/50	D
C07K 1/22	(2006.01)	C07K 1/22	

請求項の数 32 (全 50 頁)

(21) 出願番号	特願平9-512335
(86) (22) 出願日	平成8年9月19日(1996.9.19)
(65) 公表番号	特表平11-512442
(43) 公表日	平成11年10月26日(1999.10.26)
(86) 国際出願番号	PCT/DK1996/000399
(87) 国際公開番号	W01997/010887
(87) 国際公開日	平成9年3月27日(1997.3.27)
審査請求日	平成15年9月18日(2003.9.18)
審判番号	不服2008-21700(P2008-21700/J1)
審判請求日	平成20年8月25日(2008.8.25)
(31) 優先権主張番号	9519197.9
(32) 優先日	平成7年9月20日(1995.9.20)
(33) 優先権主張国	英国(GB)

(73) 特許権者	509091848 ノヴォ ノルディスク アー/エス デンマーク、ハウスヴェア ディーケー 2880, ノヴォ アレー
(73) 特許権者	308037029 プロメティック・バイオサイエンシズ・リ ミテッド イギリス国、アイエム9・2エーピー、ア イル・オブ・マン、バラーサラ、フリーポ ート(番地なし)
(74) 代理人	100108855 弁理士 蔵田 昌俊
(74) 代理人	100091351 弁理士 河野 哲

最終頁に続く

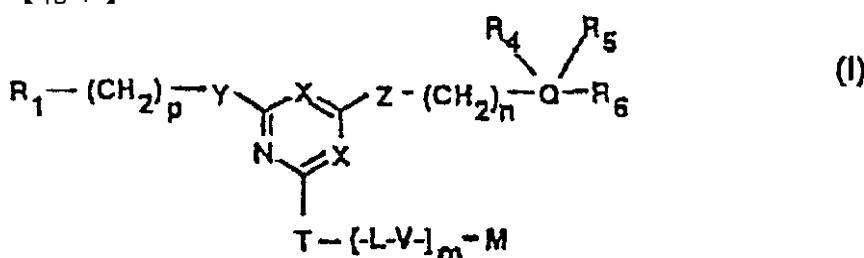
(54) 【発明の名称】新規な親和性リガンド類およびそれらの用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の一般式(I)で表される親和性リガンド-マトリックス複合体:

【化 1】



10

ここで、

R₁はヒドロキシル基またはカルボン酸基で置換されてよいフェニル基またはナフチル基であり;

YはN-H基であり;

ZはN-H基であり;

R₄、R₅およびR₆は夫々独立に、水素原子、ヒドロキシル基またはカルボン酸基を表し、

記号Xは窒素原子を表し;

Qはベンゼン環、ナフタレン環、または2-ベンズイミダゾール環を表し、R₁およびQ

20

の少なくとも一方は水酸基またはカルボキシル基を有し；

nは0～6の整数であり；

pは0であり；

Tは酸素原子、硫黄原子またはNHを表し；

Lは1～6の炭素原子を有するアルキレン基を表し；

Vは酸素原子、硫黄原子またはNHを表し；

mは0または1を表し；

Mは支持体マトリックスの残基を表す。

【請求項2】

前記nが0または2である、請求項1に記載の親和性リガンド・マトリックス複合体。 10

【請求項3】

請求項1または2の何れか1項に記載の親和性リガンド・マトリックス複合体であって、前記Lがエチレン基、プロピレン基、ヒドロキシプロピレン基、ブチレン基、ペンチレン基、ヘキシレン基であり、前記Vおよびmは上記で定義した通りである親和性リガンド・マトリックス複合体。

【請求項4】

請求項1～3の何れか1項に記載の親和性リガンド・マトリックス複合体であって、前記mは1であり、前記LおよびVは上記で定義した通りである親和性リガンド・マトリックス複合体。

【請求項5】

請求項1～4の何れか1項に記載の親和性リガンド・マトリックス複合体であって、前記支持体マトリックスMは、任意に、活性化されたアガロース、シリカ、セルロース、ガラス、ヒドロキシエチルメタクリレート、ポリアクリルアミド、スチレンジビニルベンゼン、またはパーカーフルオロカーボンである親和性リガンド・マトリックス複合体。 20

【請求項6】

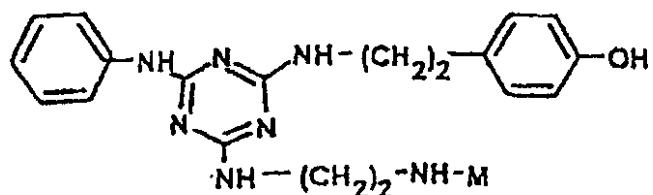
請求項5に記載の親和性リガンド・マトリックス複合体であって、前記Mは、任意に、トレシル(tresyl)活性化、塩化スルホニル活性化、トシリ活性化、ビニルスルホン活性化またはエポキシ活性化されたアガロースである親和性リガンド・マトリックス複合体。

【請求項7】

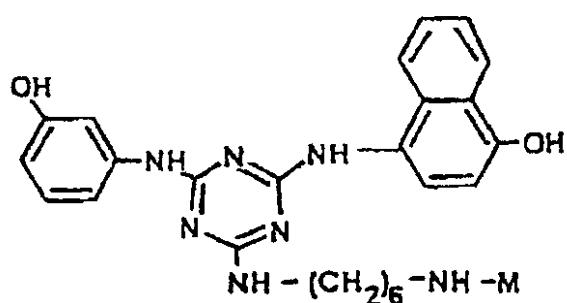
請求項1～6の何れか1項に記載の親和性リガンド・マトリックス複合体であって、以下に化学式で列記するものの中から選択される親和性リガンド・マトリックス複合体： 30

【化2】

i)



ii)



10

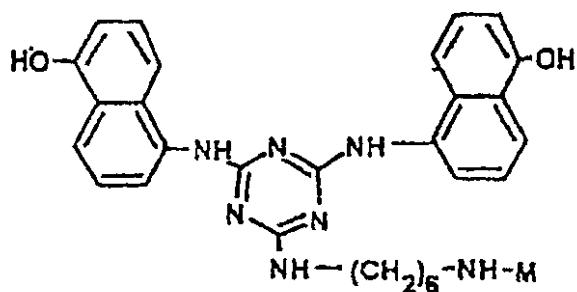
20

30

40

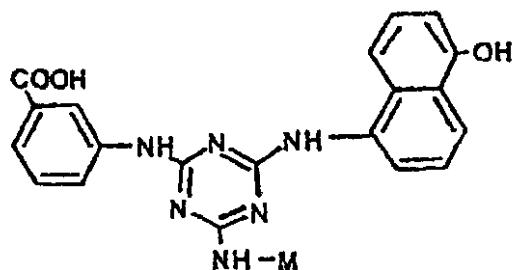
【化3】

iii)

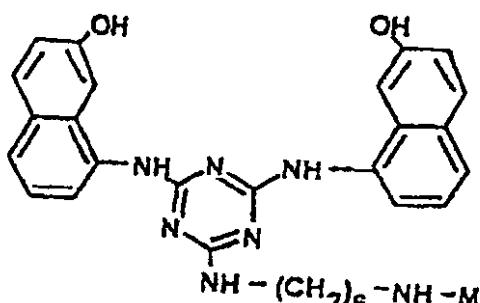


10

vi)

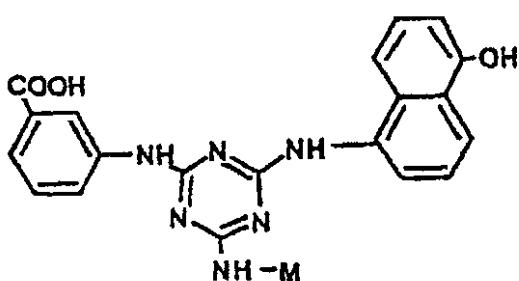


v)



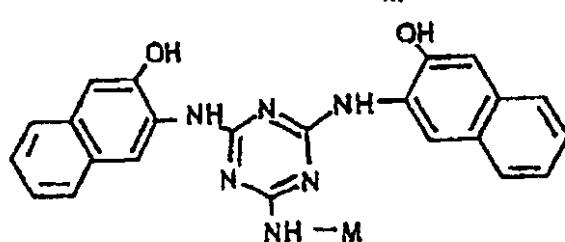
20

vi)



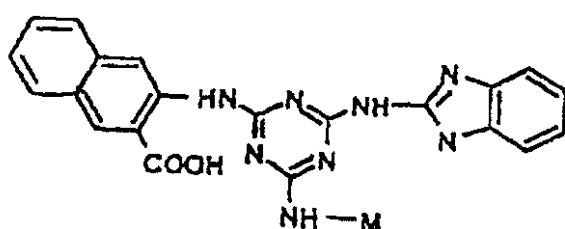
30

vii)



40

viii)



但し、Mは上記で定義した通りである。

【請求項8】

請求項1～7の何れか1項に記載の新規な親和性リガンド-マトリックス複合体の製造方法であって、

50

下記一般式 (II) のヘテロ環化合物

【化4】



(ここで、記号Xは窒素原子を表し、Wはハロゲン原子を表す)

を、下記の化合物(i)~(iii)

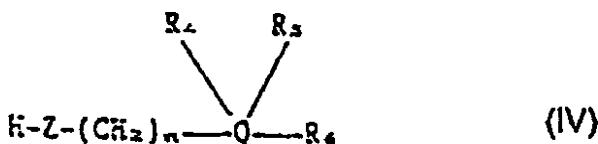
(i) 次の一般式 (III) の化合物：



(ここで、記号R₁、pおよびYは、請求項1で定義した通りである)

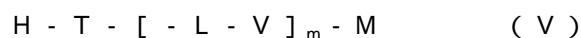
(ii) 次の一般式 (IV) の化合物：

【化5】



(ここで、記号R₄、R₅、R₆、Q、Zおよびnは、請求項1で定義した通りである)

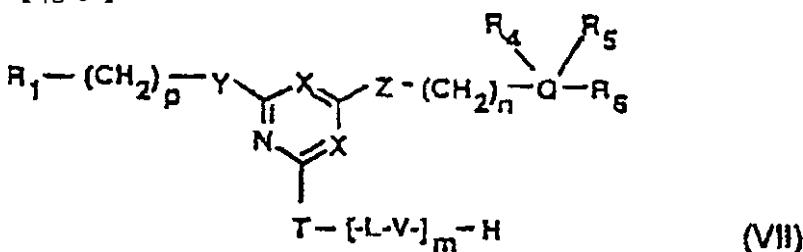
(iii) 次の一般式Vで表される支持体マトリックス誘導体：



(ここで、記号L、M、V、T、およびmは、請求項1で定義した通りである)

と任意の順序で反応させて、下記の一般式 (VII) の化合物

【化6】



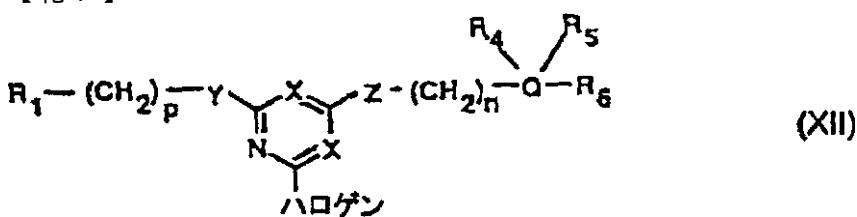
(ここで、R₁、R₄、R₅、R₆、T、Q、L、V、X、Y、Z、m、n、およびpは、請求項1で定義した通りである)

を得た後、該一般式 (VII) の化合物をマトリックス支持体と反応させることを具備した方法。

【請求項9】

下記一般式 (XII) の新規な親和性リガンド：

【化7】



ここで、

R₁はヒドロキシル基またはカルボン酸基で置換されてよいフェニル基またはナフチル基であり；

YはN-H基であり；

ZはN-H基であり；

R₄、R₅およびR₆は夫々独立に、水素原子、ヒドロキシル基またはカルボン酸基を表し

10

20

30

40

50

記号 X は窒素原子を表し；

Q はベンゼン環、ナフタレン環、または 2 - ベンズイミダゾール環を表し、R₁ および Q の少なくとも一方は水酸基またはカルボキシル基を有し；

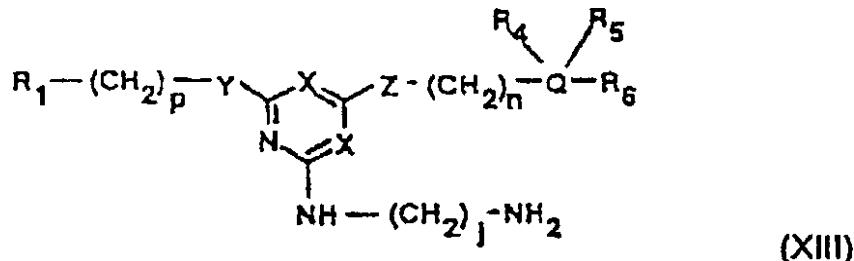
n は 0 ~ 6 の整数であり；

p は 0 である。

【請求項 10】

下記一般式 (XIII) の新規な親和性リガンド：

【化 8】



ここで、

R₁ はヒドロキシル基またはカルボン酸基で置換されてよいフェニル基またはナフチル基であり；

Y は N - H 基であり；

Z は N - H 基であり；

R₄、R₅ および R₆ は夫々独立に、水素原子、ヒドロキシル基またはカルボン酸基を表し

記号 X は窒素原子を表し；

Q はベンゼン環、ナフタレン環、または 2 - ベンズイミダゾール環を表し、R₁ および Q の少なくとも一方は水酸基またはカルボキシル基を有し；

n は 0 ~ 6 の整数であり；

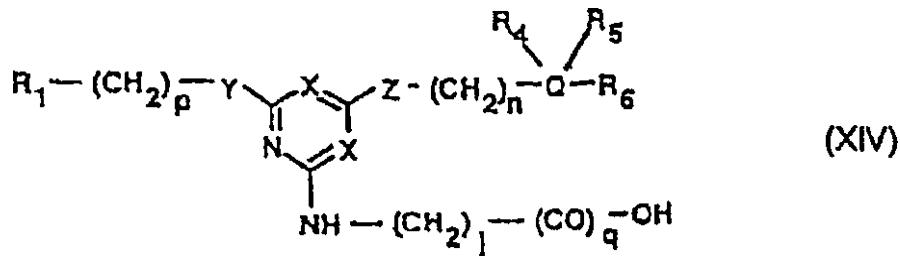
p は 0 であり；

j は 2 ~ 20 の整数である。

【請求項 11】

下記一般式 (XIV) の新規な親和性リガンド：

【化 9】



ここで、

R₁ はヒドロキシル基またはカルボン酸基で置換されてよいフェニル基またはナフチル基であり；

Y は N - H 基であり；

Z は N - H 基であり；

R₄、R₅ および R₆ は夫々独立に、水素原子、ヒドロキシル基またはカルボン酸基を表し

記号 X は窒素原子を表し；

Q はベンゼン環、ナフタレン環、または 2 - ベンズイミダゾール環を表し、R₁ および Q の少なくとも一方は水酸基またはカルボキシル基を有し；

n は 0 ~ 6 の整数であり；

10

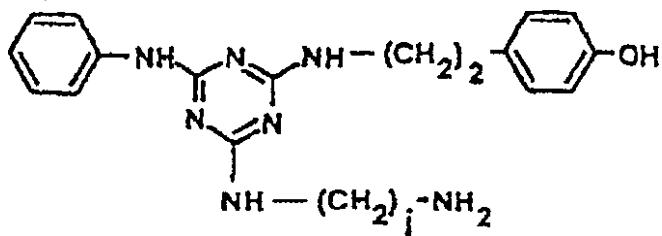
20

30

40

50

【化11】



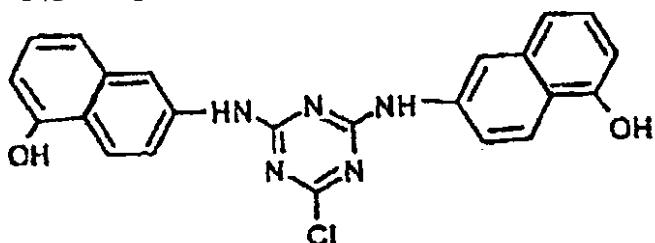
(XI)

(ここで、jは2～20の整数である)

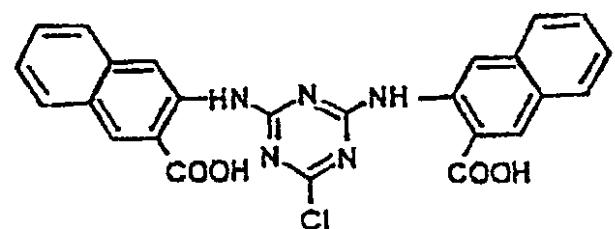
【請求項18】

請求項9に記載の親和性リガンドであって、下記のものの中から選択される親和性リガンド：
10

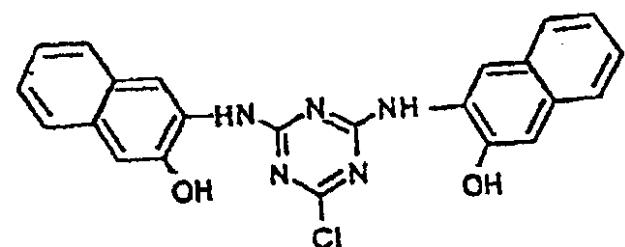
【化12】



(1)



(2)

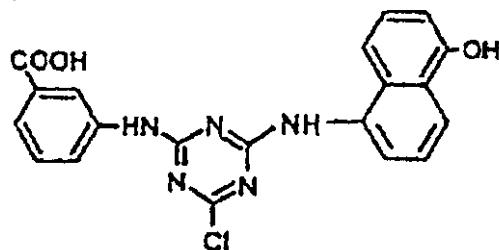


(3)

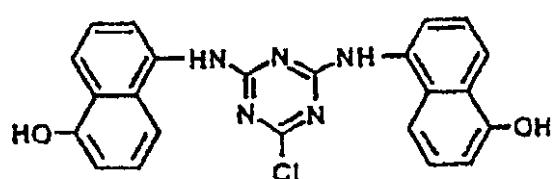
20

30

【化 1 3】

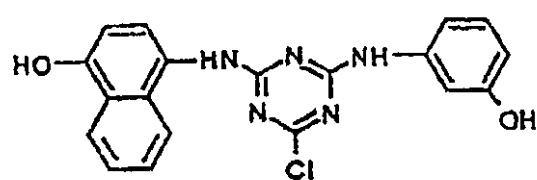


(4)

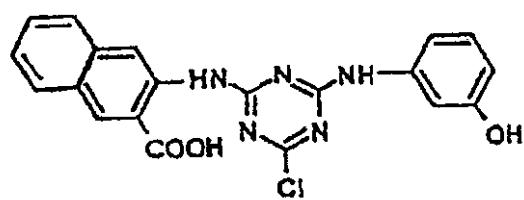


(5)

10

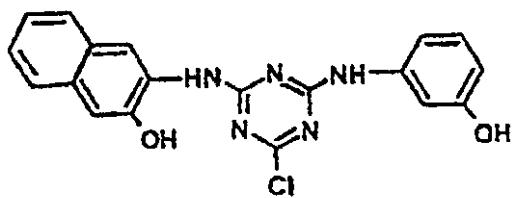


(6)



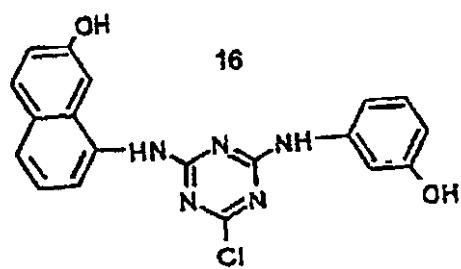
(7)

20

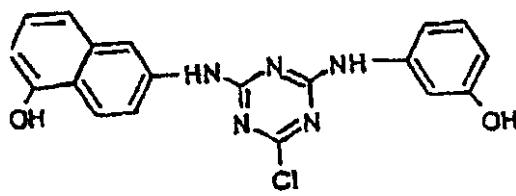


(8)

30



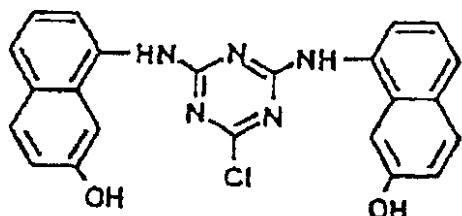
(9)



(10)

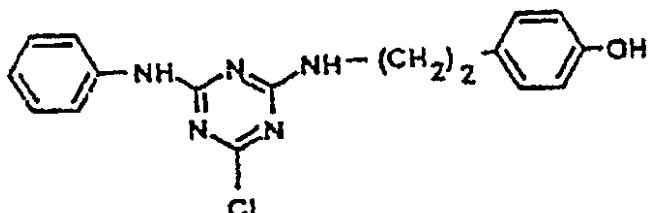
40

【化14】

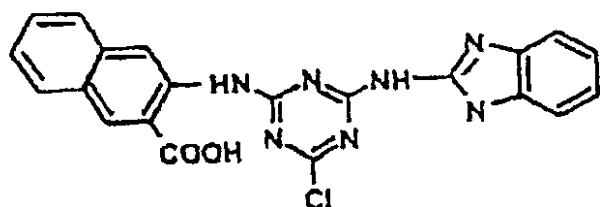


(11)

10



(12)



(13)

20

【請求項19】

請求項8で定義した一般式(VII)の化合物、請求項10で定義した一般式(XIII)の親和性リガンド、または請求項17で定義した一般式(XI)の親和性リガンドを、糖鎖または有機ポリマーのマトリックスに結合する方法であって、糖鎖または有機ポリマーのマトリックスを活性化剤と反応させ、続いてこの活性化されたマトリックスを、任意に酸結合剤の存在下で、前記新規な親和性リガンドと反応させることによる方法。

【請求項20】

請求項8で定義した一般式(VII)の化合物、請求項10で定義した一般式(XIII)の親和性リガンド、または請求項17で定義した一般式(XI)の親和性リガンドを、任意に有機ポリマーでコーティングされた金属酸化物、ガラスまたはシリカのマトリックスに結合させる方法であって、この任意にコーティングされた金属酸化物、ガラスまたはシリカのマトリックスを活性化剤と反応させ、続いてこの活性化されたマトリックスを、任意に酸結合剤の存在下で、前記新規な親和性リガンドと反応させることによる方法。

30

【請求項21】

請求項1～7の何れか1項に記載の親和性リガンド-マトリックス複合体の使用方法であって、タンパクの分離、単離、精製、特性研究、同定または定量における使用方法。

【請求項22】

請求項21に記載の使用方法であって、前記タンパク物質が、IgG、IgM、IgA、インスリン、第VII因子、ヒト成長ホルモン、またはこれらの類縁体、フラグメントおよび前駆体である使用方法。

40

【請求項23】

請求項21に記載の使用方法であって、前記タンパク物質が免疫グロブリン、またはそのサブクラス、フラグメント、前駆体若しくは誘導体である使用方法。

【請求項24】

請求項21に記載の使用方法であって、前記タンパク物質が免疫グロブリンG(IgG)、免疫グロブリンM(IgM)、免疫グロブリンA(IgA)またはそのサブクラス、フラグメント、前駆体若しくは誘導体である使用方法。

【請求項25】

請求項21に記載の使用方法であって、前記タンパク物質がインスリン若しくはインスリ

50

ン類縁体、または天然もしくは組換え体の何れの起源から誘導されたかを問わず、その誘導体、フラグメントもしくは前駆体である使用方法。

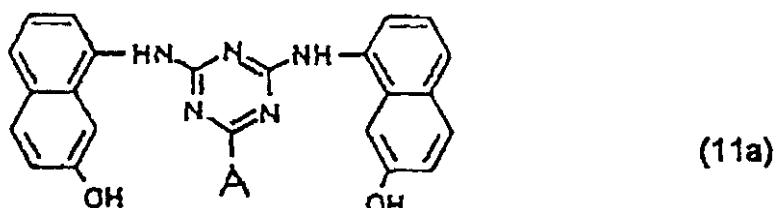
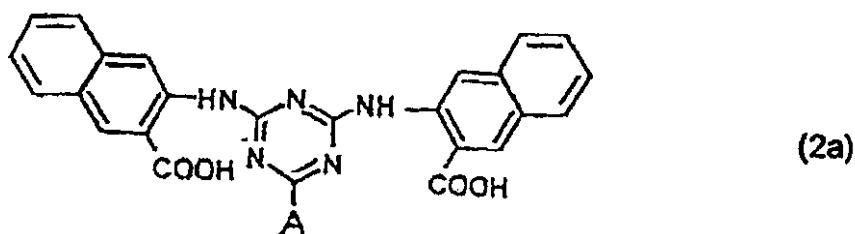
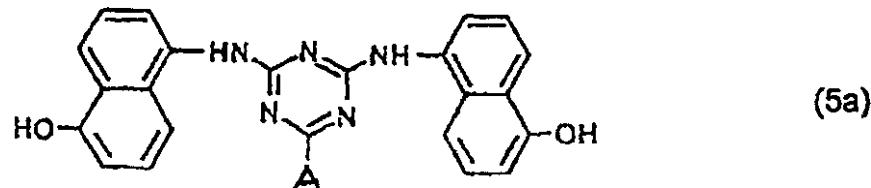
【請求項 2 6】

請求項 2 1 に記載の使用方法であって、前記タンパク物質がFVII、または天然もしくは組換え体の何れの起源から誘導されたかを問わず、その誘導体、フラグメントもしくは前駆体である使用方法。

【請求項 2 7】

請求項 2 1 に記載の使用方法であって、前記親和性リガンド - マトリックス複合体が以下のものの中から選択され、

【化 1 5】



上記リガンドは、任意に下記の一般式 (b) により表されるスペーサームを介して、位置 (A) において支持体マトリックスに結合される使用方法。

- T - [- L - V -] m - (b)

ここで、

T は酸素原子、硫黄原子または NH を表し；

L は 1 ~ 6 の炭素原子を有するアルキレン基を表し；

V は酸素原子、硫黄原子または NH を表し；

m は 0 または 1 を表す。

【請求項 2 8】

請求項 2 7 に記載の使用方法であって、前記リガンドが一般式 1 1 a に示されるものである使用方法。

【請求項 2 9】

請求項 2 6 または 2 7 に記載の使用方法であって、前記支持体マトリックスは、任意に活性化されたアガロース、セルロース、シリカまたはガラスである使用方法。

【請求項 3 0】

請求項 1 ~ 7 の何れか 1 項で定義された親和性リガンド - マトリックス複合体に対して、5 ~ 12.0 の範囲の pH で免疫グロブリンを適用し、続いて pH を 4.9 以下に低下させることにより除去、溶出または脱着させる何れかの方法による、免疫グロブリンを分離、単離、精製、特性研究、同定または定量する方法。

【請求項 3 1】

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 7 の何れか 1 項で定義された親和性リガンド - マトリックス複合体に対して、4.0 ~ 9.0 の範囲の pH でインスリン、インスリンの誘導体、類縁体および前駆体を適用し、続いて pH を 3.99 以下または 9.01 以上に変化させることにより除去、溶出または脱着させる何れかの方法による、インスリン、インスリン類縁体またはその誘導体および前駆体を分離、単離、精製、特性研究、同定または定量する方法。

【請求項 3 2】

2,4-ジクロロ-s-トリアジン-6-イルで活性化されたアガロースを、2-アミノベンズイミダゾールおよび 3-アミノ-2-ナフト酸と反応させて得た請求項 1 に記載の親和性リガンド - マトリックスへの FVIIa の結合を用いて、組換え FVIIa を細胞培養培地から分離する方法であって、5 mM の Ca^{2+} の存在下で前記 FVIIa を前記親和性リガンド - マトリックス複合体に適用し、続いて溶出させる方法。 10

【発明の詳細な説明】

本発明は、新規な親和性リガンド類、それらの製造方法、および固体、半固体、粒状またはコロイド状材料または可溶性ポリマーで構成され得るマトリックスへのそれらの結合に関する。更に、本発明は、これら新規な親和性リガンド - マトリックス複合体およびその製造方法、並びに例えば免疫グロブリン、インスリン、第VII因子、およびヒト成長ホルモンまたは類縁体、誘導体およびそられの断片および前駆体のようなタンパク質材料の精製におけるそれらの使用に関する。

【発明の背景】

現代のタンパク質精製原理は、ゲル透過クロマトグラフィ (G P C)、イオン交換クロマトグラフィ (I E C)、疎水性相互作用クロマトグラフィ (H I C)、逆相高速クロマトグラフィ (R P - H P L C)、および親和性クロマトグラフィー (A C) のようなクロマトグラフィ分離技術に依存するところが極めて大である。これらの技術は、研究および科学的実験が予定されたペプチドおよびタンパク質の実験室規模での精製に容易に適合し、その結果、純粋で生物学的に活性な物質をもたらす。ほとんどの場合に、その材料が医療試験にまれにしか使用されないこと、そして労働経費が装置およびマトリックスの費用をはるかに越えるので、加工費、加工有効性または適切な清掃手段にはほとんどまたは全く注意が払われない。しかし、大規模な工業上の下流工程を行うには、経済性、マトリックスの耐久力、例えば NaOH 、尿素またはエタノールで適切に清掃することのような因子を考慮しなければならない。今日、1 M NaOH 、7 M 尿素または 80% v / v エタノール中において安定で、安価で且つ耐久力のあるマトリックスの必要性は、G P C, I E C, H I C および R P - H P L C の分野の範囲内で多くの市販品によって満足される。極端な緩衝液および多くの精製段階を使用すると回収が悪くなり、費用が高くなり、塊状製品の安定性に問題が生じるが、長年に亘って、これらの原理を組合わせることにより殆ど純粋なタンパク質塊状物質がもたらされている。 20

親和性クロマトグラフィーの原理は、大規模操作に使用することもできることが長年の間に認識してきた。あいにく、モノクローナルまたはポリクローナル抗体のような天然の生物学的リガンド類で作製された吸着剤は、リガンド類自身がしばしば徹底的な精製を必要とするので、製造するのが高価である傾向があり、生物学的および化学的に変化を起こしやすく、それらの生物学的活性を維持しながら固定するのが困難である傾向にある。したがって、高価で且つ化学的および生物学的に変化を起こしやすいモノクローナルまたはポリクローナル抗体を、抗体の特異性に似た安価でより耐久力のあるリガンド類に置き換えるのに長期間を要してきた。 40

親和性クロマトグラフィーは、精製されるべきタンパク質が、抗体分子のような相補的結合物質に選択的にそして可逆的に吸着するので、分離技術において特有の位置を占めている。従来の精製方法が 5 ~ 50 倍の因子を提供するのに対して、しばしば数千倍の精製因子が高回収率で観察される。親和性クロマトグラフィーにおいて得られる高い精製因子によって、下流工程での精製段階の数は劇的に減少する。さらに、親和性クロマトグラフィーで観察される非特異的結合が非常に低いので、複雑な生物学的混合物から得られたタンパク質を精製し、野生型分子から不正確に折畳まれた形態のものを分離し、そして大量の組 50

織抽出または発酵培養からさえ特異的にタンパク質を回収することが可能になる。その親和性吸着剤には、適切なリガンドを共有結合させた、通常のクロマトグラフィカラムに含まれるような固体の、通常は透過性のある支持マトリックスが包まれる。固定化されたリガンドとの特異的結合の相互作用を促進する条件下で、相補的生体高分子を含有する粗サンプルが支持マトリックスを通過される。カラムを緩衝液で洗浄して未遅延の分子を除去した後、溶出段階において、そのタンパク質が純粋な形態で溶出される。典型的な親和性吸着剤は、固体支持体、スペーサーアームおよびリガンドを基本とする。その固体支持体は、開孔構造を有するビーズ形態のアガロースから調製される。スペーサーアームは、そのリガンドに接近し易くすることによって、タンパク質の結合を促進できる。スペーサー・アームの長さおよび特性は、当業者によって決定できる。そのリガンドは、固定化後でさえ精製されるべきタンパク質に特異的で且つ可逆的な結合を示す。抗体に加えて、補酵素因子類、アミノ酸類、ペプチド類、タンパク質類、コンカナバリンA、レクチン、チオール類および染料類を含む多くの化合物が親和性リガンド類として使用されてきた。
10

親和性クロマトグラフィーは、多くの用途に使用されてきている。総合リストは、例えばアイ・アール・エル・プレス (I R L P r e s s) から出された「親和性クロマトグラフィー・エイ・プラクティカル・アプローチ (Affinity Chromatography A Practical Approach) 」 (1985年) 、およびファルマシア・ファイン・ケミカルズから出された「親和性クロマトグラフィー・プリンシブルズ・アンド・メソッズ (Affinity Chromatography, Principles and Methods) 」 (1979年) に示される。
20

従来の基質または基質類縁体親和性リガンド類、特に染料類は、特異的酵素または酵素の群を大規模精製するのに使用されてきた (スカワン・エム・ディ . (Scawen M.D.) およびアトキンソン・ティ . (Atkinson T.) のリアクティブ・ダイズ・イン・プロテイン・アンド・エンザイム・テクノロジー (Reactive Dyes in Protein and Enzyme Technology) 、クロニス・ワイ・ディ . (Clonis Y.D.) ら編、マクミラン・プレス (Macmillan Press) 、 5 1 - 8 5 頁、 1987年) 。

染料親和性クロマトグラフィーは、そのようなマトリックスの価格が比較的低いこと、それらの耐久力、および N a O H 、尿素およびエタノールに耐えるそれらの能力のため、長年に亘って非常に興味が持たれてきた。この型の親和性クロマトグラフィーでより広く使用されるリガンド類のいくつかは、アガロースおよび他の支持体に固定された種々の反応性トリアジン基剤纖維染料であった。固定化染料で親和性クロマトグラフィーを使用することが検討された (ロウ・シー・アール . (Lowe C.R.) およびピアソン・ジェイ・シー・ (Pearson J.C.) のメソッズ・イン・エンチモロジー (Methods in Enzymology) 、 1 0 4 卷、 9 7 - 1 1 3 頁、 1984年) 。ウマ肝臓アルコールデヒドトゲナーゼの N A D + 結合部位との選択的相互作用は、シバクロン・ブルー (Cibacron Blue) F 3 G - A の染料類縁体で示される (ロウ・シー・アール . (Lowe C.R.) ら、 「 ジャーナル・オブ・クロマトグラフィ (Journal of Chromatography) 」 、 3 7 6 卷、 1 2 1 - 1 3 0 頁、 1986年) 。選択的精製法は、ブタ臓臓カリクレイン [バートン・エヌ・ピー . (Burton N.P.) および (ロウ・シー・アール . (Lowe C.R.) 、「 ジャーナル・オブ・モレキュラー・レコグニッショーン (Journal of Molecular Recognition) 」 、 5 卷、 5 5 - 5 8 頁、 1992年) を精製するためのフェニル・アルギニンのジペプチド基質を模倣する新規な親和性吸着剤のコンピュータ支援デザインでさらに例示された。
30

米国特許第 4 5 6 2 2 5 2 号には、糖タンパク質の分離について、トリアジン環に接着した 2 つの m - アミノフェニルホウ酸基から構成される特定のリガンド構造が開示されている。

しかし、過去数年でアフィニティー技術が急速に進展したにもかかわらず、いまだに、天然または組換え体源の何れから誘導されるかを問わず、例えば免疫グロブリン、インスリン、第VII因子、またはヒト成長ホルモンまたは類縁体、それらの誘導体および断片、および前駆体のようなタンパク様材料を分離および精製する上で、上記タンパク質の大規模精製を繰返す能力のある安価で安定なアフィニティー・カラムを製造するために、それに
40

よってタンパク質について特定の擬態（模倣）リガンドを同定できる技術を開発する必要性が存在している。

〔発明の詳細な説明〕

本発明は、新規な親和性リガンド類、その製造法およびマトリックスにへの結合、およびタンパク様材料の精製におけるこれら新規な親和性リガンド・マトリクス類の使用に関する。

本発明は、疎水性成分の複雑さおよび空間的形状を増加させること、および静電結合および水素結合の両方の相互作用をする能力のある種々の官能基を取込むことによって疎水性リガンド類の選択性が増大し、それによりタンパク結合部位との選択性的相互作用が増進するという考え方に基づいている。この研究によって、新規なリガンド属類の発見が導かれ、そのリガンド類は、一般的に親和性クロマトグラフィーによるタンパク質の単離および精製に適用できることが思いがけなくわかった。

酵素基質、それらの類縁体または基質擬態物がリガンド類として使用される上記選択的方法と対照的に、本発明で定義されたリガンド類は、タンパク質分子の全表面に指向されており、全てのタンパク質について適用できる原理をなしている。そのリガンド類は、コンピュータモデル化技術および／または擬態リガンド・ライブラリーのスクリーニングで設計される。さらに、本発明は、タンパク質結合部位構築物の構造がリガンドの設計および開発を必要としない点に利点を示し、そして結果として、ここで記載される材料および技術は、相當に高い有用性を示す。

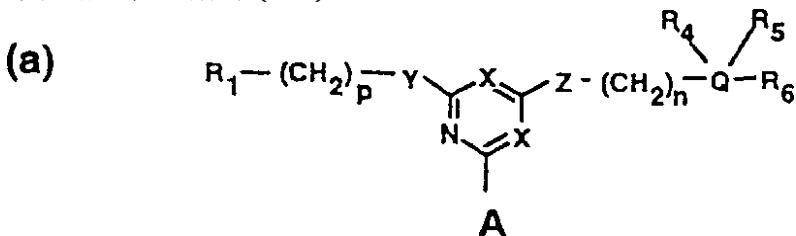
本発明の特徴は、タンパク質の分割、単離および精製のための一般的な道具を提供することである。微妙に異なる化学的構造群が合成され、それは様々のタンパク質と作用する能力を有する。所定のタンパク質に対する特に効果的なリガンド構造は、適切な結合特性について、本発明により提供される種々のリガンド類をスクリーニングすることによって同定される。

例えば、現在のところ、免疫グロブリンの分離および精製に使用できる選択性および特異性が高い親和性リガンド類は、しばしば細菌または組換え体源のいずれかから得られるタンパク様材料であり、プロテインA、プロテインGおよびプロテインLのような材料が挙げられる。これらおよび同様のタンパク質を固定化すると、しばしば、生物学的活性の相当な損失を起こす。アフィニティー媒体としての固定化タンパク質を連続および繰返して使用すると、生物学的活性のさらなる減少を引起す。さらに、これらの生物学的巨大分子の遺伝的特性は、親和性クロマトグラフィーおよび関連技術における緩衝塩、有機溶媒およびpHレベルの使用に関して厳密な制限を強いいる。

本発明によって提供される新規な親和性リガンド類は、プロテインAおよびプロテインGの代わりに適切に使用することができ、それらの使用は非常に融通性に富み、より耐久力があり、製造するのに安価で、しばしば当量レベルの精製を与える。

別の実施例は、本発明により提供される新規な親和性マトリックスのバイオテクノロジーにおける使用である。

本発明は、一般式（a）：



[式中、

R_1 は、水素原子、1～6個の炭素原子を含むアルキル基、1～6個の炭素原子を含むヒドロキシアルキル基、シクロヘキシル基、アミノ基、フェニル基、ナフチル基、1-フェニルピラゾール、インダゾール、ベンズチアゾール基、ベンゾキサゾール基またはベンズイミダゾール基を示し、その各々では、ベンゼン、ナフタレン、フェニルピラゾール、インダゾール、ベンズチアゾール、ベンズキサゾールまたはベンズイミダゾール環が、希望

により 1 ~ 6 個の炭素原子を含むアルキル基、1 ~ 6 個の炭素原子を含むアルコキシ基、1 ~ 6 個の炭素原子を含むアシロキシまたはアシルアミノ基、アミノ基、ヒドロキシル基、カルボン酸基、スルホン酸基、カルバモイル基、スルファモイル基、1 ~ 6 個の炭素原子を含むアルキルスルホニル基またはハロゲン原子で構成される基から独立に選択される 1 つまたはそれ以上の置換基で置換されている。

Y は酸素原子、硫黄原子または N - R₂ 基を示す。

Z は酸素原子、硫黄原子または $N - R_3$ 基を示す。

R_2 および R_3 はおのれの独立に、水素原子、1～6個の炭素原子を含むアルキル基、1～6個の炭素原子を含むヒドロキシアルキル基、ベンジル基または-フェニルエチル基を示す。

10

R_4 、 R_5 および R_6 はおのおの独立に、水素原子、ヒドロキシリル基、1～6個の炭素原子を含むアルキル基、1～6個の炭素原子を含むアルコキシ基、アミノ基または、1～6個の炭素原子を含むアシロキシまたはアシリアルアミノ基、カルボン酸基、スルホン酸基、カルバモイル基またはスルファモイル基、1～6個の炭素原子を含むアルキルスルホニル基またはハロゲン原子を示す。

記号 X の 1 つは窒素原子を示し、そして他方の記号 X は、窒素原子または、塩素原子またはシアノ基を担持する炭素基を示す。

Qは、ベンゼン、ナフタレン、ベンズチアゾール、ベンゾキサゾール、1-フェニルピラゾール、インダゾールまたはベンズイミダゾール環を示す。

n は、0 と 6 との間の整数である。

20

p は、0 と 20 との間の整数である。

そして

このリガンドは、所望によりマトリックスおよびリガンドの間に挟まれたスペーサー・アームを介して、位置Aにある支持体マトリックスに結合される。

所望のスペーサー・アームは、一般式 (b)

- T - r - L - V -] m - (b)

式中、Tは、酸素原子、硫黄原子またはN-R₇基を示す。

式中、 R_7 は、水素原子または 1 ~ 6 個の炭素原子を含むアルキル基を示す。

V は、酸素原子、硫黄原子、-COO- 基、CONH 基またはNHC O 基または-PO₃²⁻ 基、NH-アリーレン-SO₂-CH₂-CH₂ 基またはN-R₈ 基を示す。ここで、R₈ は、水素原子または1~6 個の炭素原子を含むアルキル基を示す。

88

Lは、所望により置換されていてもよい2～20個の炭素原子を含む炭化水素結合を示す；およびmは0または1である。

で云われるのが好ましい。」

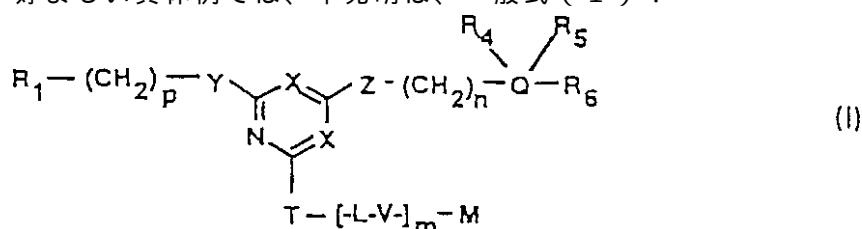
で示されるリガンドを包含する親和性リガンド-ナトリクス複合体に関する

支持体マトリックスは、親和性リガンド類との共に使用して親和性リガンド - マトリクス複合体を形成でき、そして親和性リガンド類を接触溶液中の溶質から分離する適切な手段を提供する任意の化合物または材料、粒状物または非粒状物、可溶性または不溶性、多孔性または非多孔性のものであってよい。

本発明は、新規な親和性リガンド - マトリクス複合体を提供し、その親和性リガンド - マトリクス複合体は、天然または組換え体源から誘導されたものであろうと、免疫グロブリン類、インスリン類、VITI因子、またはヒト成長ホルモンまたは類縁体、誘導体およびこれらの断片および前駆体のようなタンパク様材料の分離および精製に使用できる。

40

好ましい具体例では、本発明は、一般式 (T) :



50

(式中、

R_1 、 Y 、 Z 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 X 、 Q 、 n および p は、上で定義された意味を示し、

T は、酸素原子、硫黄原子または $N - R_7$ 基を示す。

V は、酸素原子、硫黄原子、 $-COO-$ 基、 $CONH$ 基または $NHCO$ 基または $-PO_3$
 H -基、 NH -アリーレン- $SO_2-CH_2-CH_2$ 基または $N - R_8$ 基を示す。

R_7 および R_8 は、おののの独立に水素原子または1～6個の炭素原子を含むアルキル基を示す。

L は、所望により置換されていてもよい2～20個の炭素原子を含む炭化水素結合を示す。

m は0または1である；および

M は、支持体マトリックスの残渣を示す。)

によって示される新規な親和性リガンド-マトリクス複合体を提供する。

ここで使用される「1～6個の炭素原子を含むアルキル基」の語句は、単独または組合させて、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、 n -ブチル、二級ブチル、イソブチル、三級ブチル、 n -ペンチル、2-メチルブチル、3-メチルブチル、 n -ヘキシル、4-メチルペンチル、ネオペンチル、 n -ヘキシルおよび2,2-ジメチルプロピルのような1～6個の炭素原子を含む直鎖または分枝鎖の飽和炭化水素鎖を意味する。

ここで使用される「1～6個の炭素原子を含むヒドロキシアルキル基」の語句は、単独または組合させて、例えばヒドロキシメチル、2-ヒドロキシエチル、3-ヒドロキシプロピル、2-ヒドロキシプロピル、4-ヒドロキシブチル、5-ヒドロキシペンチル、6-ヒドロキシヘキシルのような1つまたはそれ以上のヒドロキシ基、好ましくは1つのヒドロキシ基で置換された1～6個の炭素原子を含む直鎖または分枝鎖の飽和炭化水素鎖を意味する。

ここで使用される「1～6個の炭素原子を含むアルコキシ基」の語句は、単独または組合させて、例えばメトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、ペントキシのような、エーテル酸素から得られる遊離の原子価結合を有し、かつ1～6個の炭素原子を含むエーテル酸素を介して結合した1～6個の炭素原子を含むアルキル基を包含する直鎖または分枝鎖の一価の置換基を意味する。

「ハロゲン」の語句は、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素を意味する。

ここで使用される「1～6個の炭素原子を含むアシリルオキシまたはアシリルアミノ基」の語句は、メチルカルボニルオキシ、エチルカルボニルオキシ、メチルオキシカルボニルまたはエチルオキシカルボニル基のようなカルボニルオキシまたはオキシカルボニル基を介して結合するか、またはメチルカルボニルアミノ、エチルカルボニルアミノ、メチルアミノカルボニルまたはエチルアミノカルボニル基のようなカルボニルアミノまたはアミノカルボニル基を介して結合した1～5個の炭素原子を含むアルキル基を包含する一価の置換基を意味する。

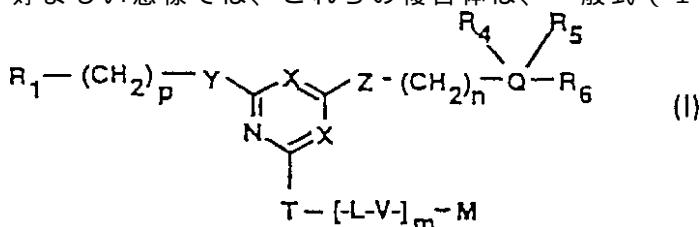
ここで使用される「1～6個の炭素原子を含むアルキルスルホニル基」の語句は、例えばメチルスルホニル、エチルスルホニル、 n -プロピルスルホニル、イソプロピルスルホニル、 n -ブチルスルホニル、二級ブチルスルホニル、イソブチルスルホニル、三級ブチルスルホニル、 n -ペンチルスルホニル、2-メチルブチルスルホニル、3-メチルブチルスルホニル、 n -ヘキシルスルホニル、4-メチルペンチルスルホニル、ネオペンチルスルホニル、 n -ヘキシルスルホニルおよび2,2-ジメチルプロピルスルホニルのようなスルホニル基を介して結合した1～6個の炭素原子を含むアルキル基を包含する一価の置換基を意味する。

「から独立に選択された1つまたはそれ以上の置換基」の語句は、1-3の置換基を意味するのがさらに好ましい。その語句は、1-2の置換基を意味するのがさらに好ましく、そして1つの置換基を意味するのが最も好ましい。

本明細書では、インスリンの語句が、複数または総称の意味で使用されるかどうかにかかわらず、天然に生じるインスリンとインスリン類縁体との両方、およびそれらの誘導体お

より前駆体を含むことを意図する。したがって、インスリンの語句からは、例えばヒト・インスリンのような任意の種から得られるインスリンも意味する。ここで使用される「インスリン類縁体」の語句は、1つまたは数種のアミノ酸置換、1つまたは数種のアミノ酸欠失、1つまたは数種のアミノ酸添加またはそれらの組合せを有するヒト・インスリンを意味する。「インスリン誘導体」の語句は、1つまたは数種の残渣で化学的に修飾されたインスリンを意味する。ここで使用される「インスリン前駆体」は、例えば酵素的または化学的置換によって、インスリン、デス - Th r (B 3 0) - インスリンのようなインスリン断片、インスリン類縁体またはインスリン誘導体を形成する任意の分子を意味する。ここで使用される「所望により置換されていてもよい2～20個の炭素原子を含む炭化水素結合」は、例えば1～6個の炭素原子を含むヒドロキシ基またはアルコキシ基で所望により置換されていてもよい、および2～20個の炭素原子を含有する鎖を供するアミノ、エーテル、チオエーテル、エステル、アミドまたはスルホンアミド結合によって所望により一緒に結合しててもよい1つまたはそれ以上の直鎖または分枝鎖アルキル基を意味する。この構造は、柔軟であることが好ましい。このような所望により置換されていてもよい炭化水素結合の構築は、例えばロウ・シー・エル・(Lowe,C.R.)およびダン・ピー・ディ・ジー・(Dean,P.D.G.)、親和性クロマトグラフィー(Affinity Chromatography)、ジョン・ウイレイ・アンド・サンズ(John Wiley & Sons)、ロンドン(London)、1974年に記載されている。そしてここで資料によって組込まれる。

好ましい態様では、これらの複合体は、一般式(I)：



(式中、R₁は、水素原子、1～6個の炭素原子を含むアルキル基、1～6個の炭素原子を含むヒドロキシアルキル基、シクロヘキシル基、アミノ基、フェニル基またはナフチル基を示し、そして1～6個の炭素原子を含むアルキル基、1～6個の炭素原子を含むアルコキシ基、1～6個の炭素原子を含むアシロキシまたはアシルアミノ基、アミノ基、ヒドロキシル基、カルボン酸基、スルホン酸基、カルバモイル基、スルファモイル基、アルキルスルホニル基またはハロゲン原子で、ベンゼンまたはナフタレン環上に置換されていてもよい。)

Tは酸素原子、硫黄原子またはN-R₇基を示す。

Yは酸素原子、硫黄原子またはN-R₂基を示す。

Zは酸素原子、硫黄原子またはN-R₃基を示す。

R₂およびR₃はおのの独立に、水素原子、1～6個の炭素原子を含むアルキル基、1～6個の炭素原子を含むヒドロキシアルキル基、ベンジル基または-フェニルエチル基を表す。

R₄、R₅およびR₆はおのの独立に、水素原子、ヒドロキシル基、1～6個の炭素原子を含むヒドロキシル基、1～6個の炭素原子を含むアルキル基、1～6個の炭素原子を含むアルコキシ基、アミノ基、1～6個の炭素原子を含むアシルオキシまたはアシルアミノ基、カルボン酸基、スルホン酸基、カルバモイル基またはスルファモイル基、アルキルスルホニル基またはハロゲン原子を示す；

記号Xの1つは、窒素原子を示し、そして他方の記号Xは、窒素原子または塩素原子またはシアノ基を担持する炭素原子またはシアノ基を示す；

Vは、酸素原子、硫黄原子、-COO-基、CONH基またはNHCO基または-PO₃H-基、NH-アリーレン-SO₂-CH₂-CH₂基またはN-R₈基を示す；

R₇およびR₈は、おのの独立に水素原子または1～6個の炭素原子を含むアルキル基を示す；

Lは、所望により置換されていてもよい2～20個の炭素原子を含む炭化水素結合を示す

10

20

30

40

50

;

Qは、ベンゼンまたはナフタレン環を示す；

nは、0と6との間の整数である；

pは、0と20との間の整数である；

mは0または1である；および

Mは、親和性リガンド類と共に使用して、一般式(I)で表される新規な親和性リガンド-マトリクス複合体を形成でき、そして接触溶液中の溶質から親和性リガンド類を分離する従来の手段を提供する任意の化合物または材料、粒子または非造粒物、可溶性または不溶性、多孔性または非多孔性であってよい支持体マトリックスの残渣を示す。

本発明は、中でもT-[L-V]₀₋₁-M置換基を担持するピリジン、ジアジンまたはトリアジンまたはそれらの前駆体、および異種原子を介してその環に結合した他の置換基である化合物の使用に関することが高く評価される。このような置換基としては、0~10または20の炭素原子を含む任意の非干渉基が挙げられる。

本発明の好ましい態様では、R₁は、フェニルまたはナフチル基を表し、その各々は、ヒドロキシル基またはカルボン酸基から構成される基から独立に選択された1つまたはそれ以上でベンゼンまたはナフタレン環上に所望により置換されている。

本発明の別の好ましい態様では、R₂は、水素原子を示す。

本発明の別の好ましい態様では、R₃は、水素原子を示す。

本発明の別の好ましい態様では、R₄は、水素原子、ヒドロキシ基、カルボン酸基、またはアミノ基を示す。

本発明の別の好ましい態様では、R₅は、水素原子、ヒドロキシ基、カルボン酸基、またはアミノ基を示す。

本発明の別の好ましい態様では、R₆は、水素原子、ヒドロキシ基、カルボン酸基、またはアミノ基を示す。

本発明の別の好ましい態様では、R₇は、水素原子を示す。

本発明の別の好ましい態様では、Tは、酸素原子またはNH基を示す。

本発明の別の好ましい態様では、Yは、N-R₂(ここでR₂は上記定義のとおり。)を示す。

本発明の別の好ましい態様では、Zは、N-R₃(ここでR₃は上記定義のとおり。)を示す。

本発明の別の好ましい態様では、両方のXは、窒素原子を示す。

本発明の別の好ましい態様では、Qは、ベンゼンまたはナフタレン環を示す。

本発明の別の好ましい態様では、nは、0または2を示す。

本発明の別の好ましい態様では、pは、0または2を示す。

本発明の別の好ましい態様では、mは、0または1を示す。

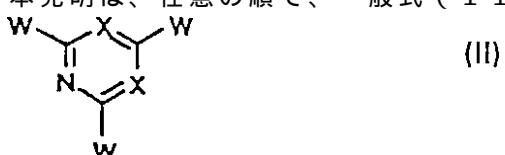
本発明の別の好ましい態様では、Lは、エチル、プロピル、ヒドロキシプロピル、ブチル、フェニル、ヘキシル、オクチルまたはデシル基を示し、そしてVおよびmは上記定義のとおりである。

本発明の別の好ましい態様では、Vは、酸素原子、-COO-基、-PO₃H-基、またはN-R₈基を示す；さらに好ましくは、酸素原子またはNH基であって、そしてLおよびmは上記定義のとおりである。

本発明の別の好ましい態様では、mは1を示し、そしてLおよびVは上記定義のとおりである。

「xとyとの間の整数」の語句としては、値x(ゼロを含めて)およびyを含んでよい。

本発明は、任意の順で、一般式(II)：



(式中、記号Xは、先に定義した意味を示し、そしてWは、ハロゲン原子を表す。)

10

20

30

40

50

で表されるハロゲン化複素環化合物を、

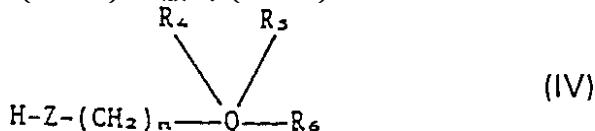
(i) 一般式 (I I I) :



(式中、記号 R_1 、 Y および p は、先に定義した意味を示し、そして H は水素である。)

で表される化合物、

(i i) 一般式 (I V)



(式中、記号 R_4 、 R_5 、 R_6 、 Q 、 Z および n は、先に定義した意味を示す。)

で表される化合物、および

(i i i) 一般式 (V)



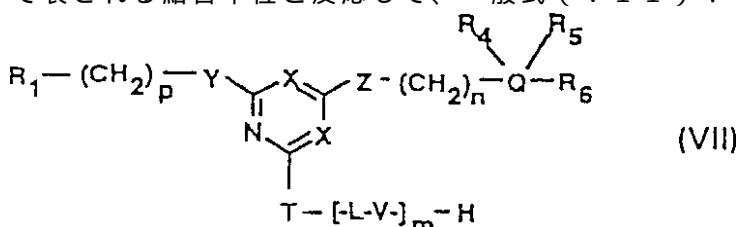
(式中、記号 L 、 M 、 V 、 T および m は、先に定義した意味を示す。)

で表される所望により誘導体化されていてよい支持体、または一般式(VI)



(式中、記号 H 、 L 、 V および T は、先に定義した意味を示す。)

で表される結合単位と反応して、一般式（VII）：



(式中、記号 R_1 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 Q 、 L 、 T 、 V 、 X 、 Y 、 Z 、 m 、 n および p は、先に定義した意味を示す。)

で表される化合物を得ること、そして一般式（VII）で表される化合物は、その後さらに、当業者によく知られた活性化および結合手段を用いて、その残渣がMによって示される支持体マトリックスと反応させることを含む新規な親和性リガンド類マトリックス複合体の製造方法を提供する。

一般式(II)で表されるハロゲン化複素環の例としては、5-クロロ-2,4,6-トリフルオロピリミジン、5-シアノ-2,4,6-トリクロロピリミジン、シアヌル酸フッ化物、シアヌル酸臭化物およびなによりシアヌル酸塩化物を挙げることができる。

一般式(ⅢⅠ)で表される化合物の例としては、アンモニア、メチルアミン、エチルアミン、プロピルアミン、イソプロピルアミン、ジイソプロピルアミン、イソブチルアミン、アミルアミン、ヘキシルアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、アニリン、N-メチルアニリン、N-エチルアニリン、N-イソプロピルアニリン、1,4-ジアミノブタン、1,6-ジアミノヘキサン、N-三級ブチルアニリン、p-トルイジン、p-ブチルアニリン、2,4-ジメチルアニリン、p-アニシジン、p-エトキシアニリン、p-アミノアセトアニリド、p-アミノフェノール、p-クロロアニリン、オルタニル酸、メタニル酸、スルファニル酸、4-メチルアニリン-2-スルホン酸、4-メトキシアニリン-2-スルホン酸、アニリン-2,5-ジスルホン酸、N-メチルメタニル酸、o-,m-およびp-アミノ安息香酸、p-アミノベンズアミド、p-アミノベンゼンスルホンアミド、1-アミノ-2-、3-、4-、5-、6-、7-および8-ナフトール、2-アミノ-3-、4-、5-、6-、7-および8-ナフトール、5-、6-および7-アミノ-1-ナフトール-3-スルホン酸、N-ベンジルアニリン、ベンジルアミン、4-メチルベンジルアミン、4-ヒドロキシベンジルアミン、4-メトキシベンジルアミン、4-アセトシルベンジルアミン、4-アセチルアミノベンジルアミン、N-メチルベンジルアミン、-フェニルエチルアミン、N-ブチルベンジルアミン、N-ベンジル-

10

20

30

40

50

- フェニルエチルアミン、N - (- ヒドロキシエチル) - ベンジルアミン、N - 三級ブチルベンジルアミン、N - ベンジルチラミンおよびチラミンのようなアミン類；フェノール、o - 、m - およびp - クレゾール、カテコール、レスルシノール、ヒドロキノン、p - クロロフェノール、1 - ナフトールおよび2 - ナフトール、1 - ナフトール - 4 - スルホン酸、2 - ナフトール - 6 - スルホン酸および2 - ヒドロキシ - 3 - ナフト酸のようなフェノール類；エチルチオール、チオグリコール酸、チオフェノールおよびチオ - p - クレゾールのようなチオール類、および5 - アミノ - 1 - フェニルピラゾール、6 - アミノインダゾール、2 - アミノベンズイミダゾール、2 - アミノベンズチアゾール、および2 - アミノ - 5 - クロロベンゾキサゾールのような芳香族複素環を挙げることができる。

10

一般式(IV)で表される化合物の例としては、アニリン、N - メチルアニリン、N - エチルアニリン、N - イソプロピルアニリン、N - 三級ブチルアニリン、p - トルイジン、p - ブチルアニリン、2 , 4 - ジメチルアニリン、p - アニシジン、p - エトキシアニリン、p - アミノアセトアニリド、p - アミノフェノール、p - クロロアニリン、オルタニル酸、メタニル酸、スルファニル酸、4 - メチルアニリン - 2 - スルホン酸、4 - メトキシアニリン - 2 - スルホン酸、アニリン - 2 , 5 - ジスルホン酸、N - メチルメタニル酸、o - 、m - およびp - アミノ安息香酸、1 - アミノ - 2 - 、3 - 、4 - 、5 - 、6 - 、7 - および8 - ナフトール、2 - アミノ - 3 、4 - 、5 - 、6 - 、7 - および8 - ナフトール、5 - 、6 - および7 - アミノ - 1 - ナフトール - 3 - スルホン酸、p - アミノベンズアミド、p - アミノベンゼンスルホンアミド、N - ベンジルアニリン、ベンジルアミン、4 - メチルベンジルアミン、4 - ヒドロキシベンジルアミン、4 - メトキシベンジルアミン、4 - アセトキシベンジルアミン、4 - アセチルアミノベンジルアミン、N - メチルベンジルアミン、- フェニルエチルアミン、N - ブチル - ベンジルアミン、N - ベンジル - - フェニルエチルアミン、N - (- ヒドロキシエチル) - ベンジルアミン、N - 三級ブチル - ベンジルアミン、N - ベンジルチラミンおよびチラミンのようなアミン類；フェノール、o - 、m - およびp - クレゾール、カテコール、レスルシノール、ヒドロキノン、p - クロロフェノール、1 - および2 - ナフトール、1 - ナフトール - 4 - スルホン酸、2 - ナフトール - 6 - スルホン酸および2 - ヒドロキシ - 3 - ナフト酸のようなフェノール類；チオフェノールおよびチオ - p - クレゾールのようなチオール類、および5 - アミノ - 1 - フェニルピラゾール、6 - アミノインダゾール、2 - アミノベンズイミダゾール、2 - アミノベンズチアゾールおよび2 - アミノ - 5 - クロロベンゾキサゾールのような芳香族複素環を挙げることができる。

20

その残渣がMで表される支持体マトリックスの例としては、天然に生じる高分子、例えば架橋結合アルブミンのようなポリペプチドまたはタンパク質、またはアガロース、アルギネット、カラゲナン、キチン、セルロース、デキストランまたは澱粉のような多糖；ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリアクロレイン、ポリビニルアルコール、ポリエチルアクリレート、ペルフルオロカーボンのような合成高分子；シリカ、ガラス、多孔質珪藻土、アルミナ、酸化鉄または他の金属酸化物のような無機化合物、または天然に生じる高分子、合成高分子または無機化合物を2つまたはそれ以上任意に組合させて構成される共重合体のような不溶性支持体マトリックスを挙げることができる。さらに、その残渣がMによって表される支持体材料の定義の範囲内で、液体分配で使用される親和性リガンド - マトリクス複合体を提供するデキストラン、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコールまたは加水分解澱粉のような高分子を包含する可溶性支持体マトリックスのもの、またはアフィニティーエマルジョンを形成するのに使用される親和性リガンド - マトリクス複合体を提供するペルフルオロデカリンのような化合物を包含する支持体マトリックスのものも含まれる。疑いを避けるために、支持体マトリックスは、粒状物または非粒状物、可溶性または不溶性、多孔性または非多孔性とにかくわらず、本発明による新規な親和性リガンド - マトリクス複合体を形成するのに使用でき、そして接触溶液中の溶質から親和性リガンド類を分離する従来の手段を提供する任意の化合物または材料としてここに定義される。

30

40

50

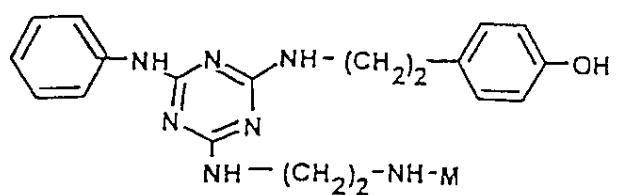
その残渣がMによって表される支持体マトリックスの定義の範囲内で、リガンドを付着させる前または最中に活性化剤で処理することによって改変（修飾）された、あるいはされているアガロース、セルロース、デキストラン、澱粉、アルギネート、カラゲナン、合成高分子、シリカ、ガラスおよび金属酸化物のような支持体マトリックスも含まれる。

本発明の好ましい態様では、Mは、所望により活性化されていてもよいアガロース、シリカ、ガラス、トーヨーパール（t o y o p e a r l）、ヒドロキシエチルメタクリレート、ポリアクリルアミド、スチレンジビニルベンゼン、ハイパーD、ペルフルオロカーボン類を表す。

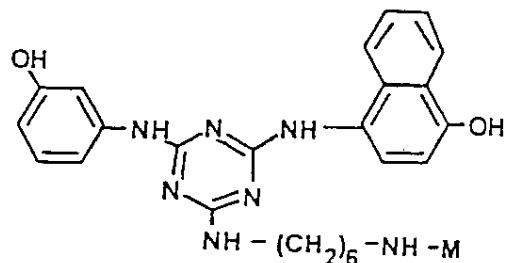
好ましくは、Mは、所望によりトレシル活性化、スルホニルクロリド活性化、トシル活性化、ビニルスルホン活性化またはエポキシ活性化アガロースを表す。

好ましくは、本発明による親和性リガンド - マトリックス複合体は、

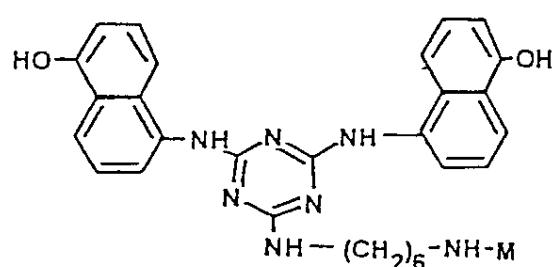
i)



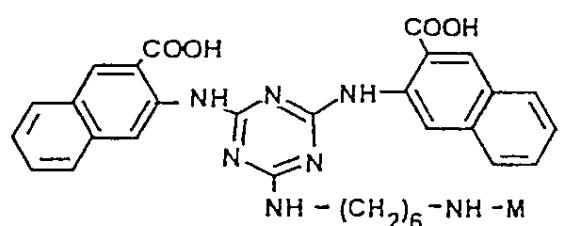
ii)



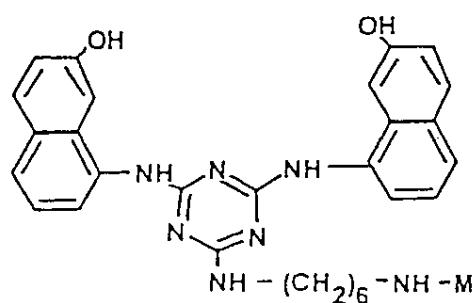
iii)



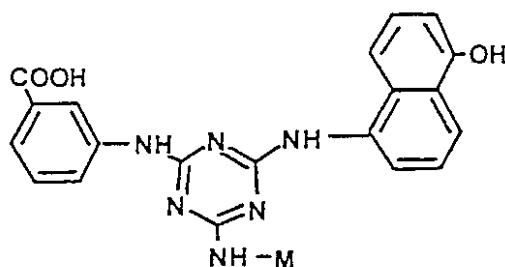
iv)



v)

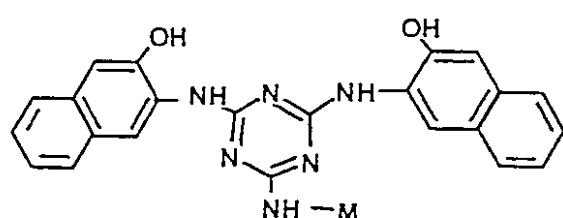


vi)



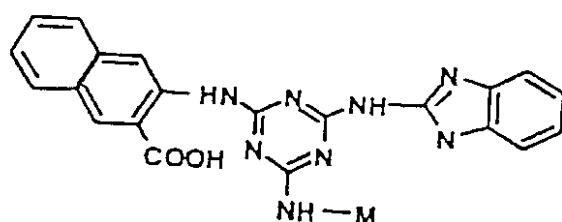
10

vii)



20

viii)



30

(式中、Mは上記定義のとおり。)

である。

マトリックスを支持するリガンド類を付着させる一般的な目的での使用が分かった相当な数の活性化剤が存在する。これらの化合物およびそれらの使用方法は、当業界でよく知られており、そして本発明の核心はマトリックスに付着したリガンドの特性にあり、付着の形態にはないので、これらの活性化剤の内の任意のものが、本発明の新規なマトリックス-リガンド複合体を製造するのに役割を果たす。このような活性化剤の限定されない例としては、臭化シアン、シアヌル酸塩化物、エピクロロヒドリン、ジビニルスルホン、塩化p-トルエンスルホニル、1,1'-カルボニルジイミダゾール、メタ-過ヨウ化ナトリウム、2-フルオロ-1-メチルピリジニウムトルエン-4-スルホネート、グリシドキシプロピルトリメトキシシランおよび塩化2,2,2-トリフルオロエタンスルホニルのような様々な化合物を挙げることができる。上述のとおり、このような活性化段かが行われる手段は、当業者によく知られている。

同様に、広範な種々の縮合化剤は、アガロース、セルロース、デキストラン、澱粉、アルギネット、カラゲナン、シリカまたはガラスのような支持体マトリックスに一般式(VI)で表される化合物を付着させるのに使用することができる。またその上、これらの化合物およびそれらの使用方法は、当業者によく知られており、そしてさらに本発明の核心はリガンドの特性にあり、付着の形態にはないので、これらの縮合化剤の内の任意のものが

40

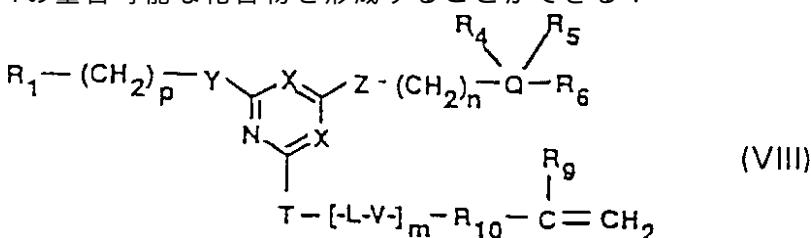
50

、本発明の新規なマトリックス・リガンド複合体を製造するのに役割を果たす。このような縮合化剤の限定されない例としては、N-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキノリン、ジシクロヘキシルカルボジイミドおよび1-エチル-3-(3-ジメチルアミノブロピル)-カルボジイミドを挙げることができる。

一般式 (VII) で表される化合物を製造するのに使用できる一般式 (VI) の結合単位の例としては、エチレンジアミン、N,N'-ジメチルエチレンジアミン、N-エチルエチレンジアミン、N-(- ヒドロキシエチル)エチレンジアミン、プロピレンジアミン、N-メチルプロピレンジアミン、N-(- ヒドロキシエチル)プロピレンジアミン、1,4-ジアミノブタン、1,5-ジアミノペンタン、1,6-ジアミノヘキサン、1,7-ジアミノヘプタン、1,8-ジアミノオクタン、1,9-ジアミノノナン、1,10-ジアミノデカン、1,12-ジアミノドデカン、ピペラジン、3-ヒドロキシ-1,5-ジアミノペンタン、m-およびp-フェニレンジアミン、m-およびp-アミノベンジルアミンのようなジアミン類；エタノールアミン、N-メチルエタノールアミン、N-ブロピルエタノールアミン、ジエタノールアミン、3-ヒドロキシプロピルアミン、2,3-ジヒドロキシプロピルアミン、イソプロパノールアミン、5-アミノペンタン-1-オールおよび6-アミノヘキサン-1-オールのようなアミノアルコール類；o-、m-およびp-アミノフェノールのようなアミノフェノール類、グリシン、N-メチルグリシン、3-および4-アミノ酪酸、3-アミノイソ酪酸、5-アミノ吉草酸、6-アミノカプロン酸、7-アミノヘプタン酸、m-およびp-アミノ安息香酸のようなアミノカルボン酸類；m-アミノベンゼンホスホン酸およびp-アミノベンジルホスホン酸のようなアミノホスホン酸類；およびアニリン-3- -スルフェートエチルスルホンおよびアニリン-4- -スルフェートエチルスルホンのようなアミノアリーレンビニルスルホン前駆体を挙げることができる。

一般式 (III)、(IV) および (V) または (VI) で表される化合物との一般式 (I) で表されるハロゲン化複素環化合物の反応は、水と混和できない有機溶媒、または水と混和できる有機溶媒、または水と水混和性有機溶媒の混合物中で行うことができる。水に混和性でない適切な有機溶媒の例は、トルエン、キシレンまたはクロロベンゼンである。水に混和性の適切な有機溶媒の例は、アセトン、メチルエチルケトンまたはジオキサンである。ハロゲン化複素環化合物の第一の反応は、0 と 25 との間、理想的には 0 と 5 との間の温度で行うことができる。第二の反応は、20 と 50 との間、理想的には 30 と 45 との間の温度で行うことができ、そして第三の反応は、20 と 100 との間の温度で行うことができる。このような反応の間、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、水酸化カルシウムまたは炭酸カルシウムのような酸結合剤を使用することによって、生成される塩酸またはフッ化水素酸のような無機酸を中和する。

更に一般式(VII)の化合物を反応性を有する重合可能なモノマーと反応させ、一般式VIIの重合可能な化合物を形成することができる：

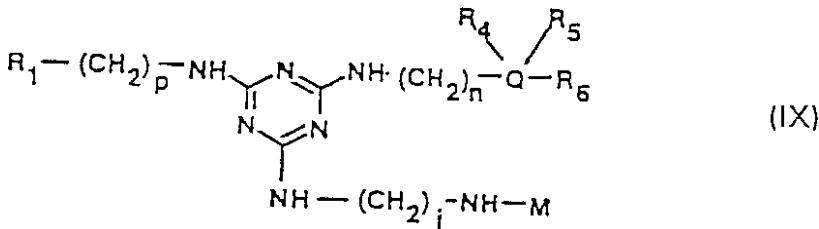


式中の R_1 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 Q 、 L 、 T 、 V 、 X 、 Y 、 Z 、 m 、 n および p は前記と同意である； R_3 は水素原子もしくは 1 から 6 つの炭素原子 1 を含むアルキル基である； R_10 はカルボニル基、メチレン基、-NH-CH₂- 基あるいは -S-CH₂ 基である。反応性重合可能モノマーとしては、塩化アクロリル、塩化メタクロリル、臭化アリル、アリルアミン、あるいは 3, 4-エポキシブタレンがある。一般式 (VIII) の重合可能化合物は、他の重合可能モノマー存在下でも重合させることができ、一般式 (I) の親和性リガンドマトリックス標識体を形成する。該重合操作は当業者に公知である。

本発明はさらに免疫グロブリン、インシュリン、第VII因子あるいはヒト成長ホルモン、もしくはその類縁体、誘導体ならびに断片、および前駆体の分離、単離、精製、定量化、同定、および分析へのこれら全ての親和性リガンド含有マトリックスに利用も包含している。

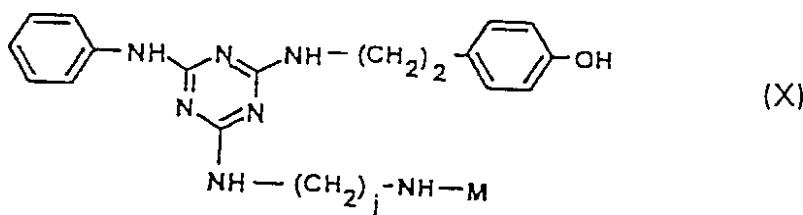
免疫グロブリンは共通構造を有する一群の蛋白質であり、しばしば Ig と略記される。また免疫グロブリンは総じて抗体とも呼ばれ、該蛋白質を記載する場合には上記 2 つの用語のいずれも用いることができる。免疫グロブリンには幾つかの型があり、例えば最も重要な抗体の型である Ig A、Ig D、Ig E、Ig G、Ig M ならびに Ig Y やその亜型などがある。免疫グロブリンは血漿、腹水、唾液、母乳あるいは卵黄の様な体液中に存在しているか、もしくは遺伝子工学的手法により作ることができる。免疫グロブリンは様々な方法を用いて改造し所望の性質を付与することができる。そのための方法は当該分野で公知であり、その結果得られる改造抗体もまた本発明の請求の範囲である。抗体改良技術については実施例に限定されるものではなく、化学的修飾や 1 種類もしくは複数の酵素を処理すること、あるいはその組み合わせによっても抗体断片、標識抗体、抗体が標識されたもしくは抗体が融合された蛋白質を得ることができる。抗体の修飾に使用されたことのある化学修飾用試薬ならびに酵素の数は極めて多く、その化合物ならびにその利用方法は当該分野に公知である。修飾したあるいは新規な抗体を得るために別の方法に遺伝子工学的方法がある。該方法ならびにその使用は当業者に公知であり、例えば抗体断片もしくは抗体融合体の製造に使用できる。遺伝子工学的方法により修飾した、あるいは作成した新規な抗体も本発明の請求の範囲である。

有用な親和性リガンド含有マトリックス群は一般式 (IX) で示される：



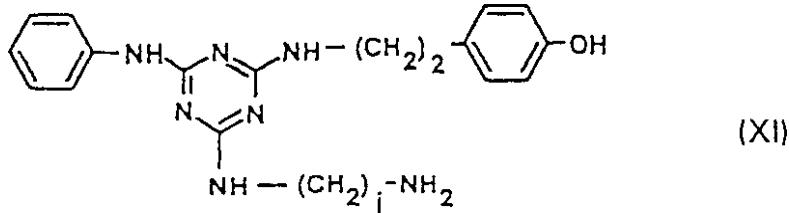
式中の R_1 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 M 、 Q 、ならびに p は前記と同意であり j は 2 から 20 の間の整数である。

特に有用な親和性リガンド含有マトリックス群は一般式 (X) で示される：



式中の j と M は前記と同意である。

典型例には、一般式 (X) の化合物は 10 から 30 の間で酸結合剤の存在下に 3 - プロポキシ - (1, 2 - エポキシ) - アガロースと反応し、蛋白性物質の精製に高い有用性を有する新規の親和性リガンドマトリックス結合体を产生する。



これら新規な親和性リガンドマトリックス結合体は蛋白質の中の免疫グロブリン群に高い親和性を有している。この特性が該結合体に、免疫グロブリン群の蛋白の分離、単離、精製、定量、同定ならびに分析に高い価値を付与する。

本発明の別の実施態様は一般式 (XII) の新規の親和性リガンドに関する：

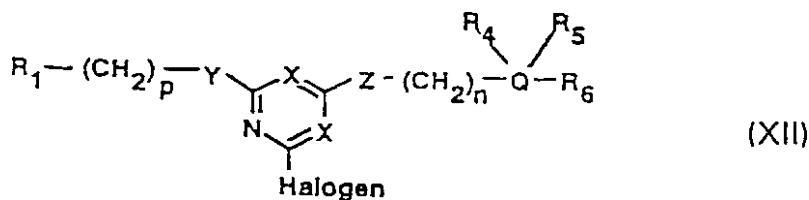
10

20

30

40

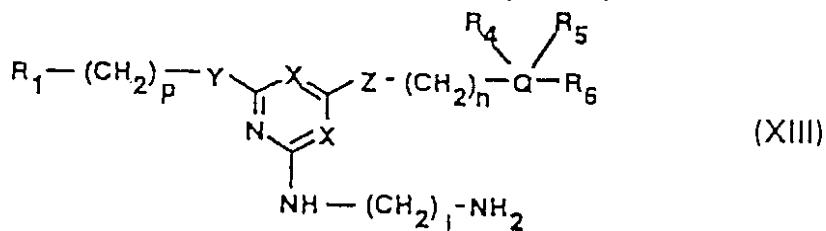
50



式中の $R_1, R_4, R_5, R_6, Q, X, Y, Z, n$ ならびに p は上記に同意であり、ハロゲンとしてはフッ素、塩素、臭素、あるいはヨード原子である。

更に、本発明は、前記一般式(XII)の新規な親和性リガンドを上記一般式(V)のマトリックスに、-20から121の間の温度で該新規な親和性リガンドを該マトリックスと反応させて結合させる方法に関する。

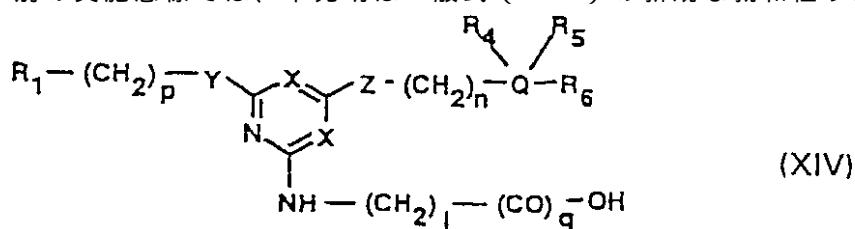
別の実施態様では、本発明は一般式(×111)の新規な親和性リガンドに関する：



式中の $R_1, R_4, R_5, R_6, Q, X, Y, Z, m, n$ および p は前記に同意であり、 j は 2 から 20 の間の整数である。

更に、本発明は酸結合剤存在下に前記一般式(XII)の化合物を一般式H₂N-(CH₂)_j-NH₂で表されるアルカリジアミンと0℃から100℃の間の温度で反応させ、前記一般式(XIII)の新規な親和性リガンドを調整する方法に関する。

別の実施態様では、本発明は一般式(XIV)の新規な親和性リガンドに関する：

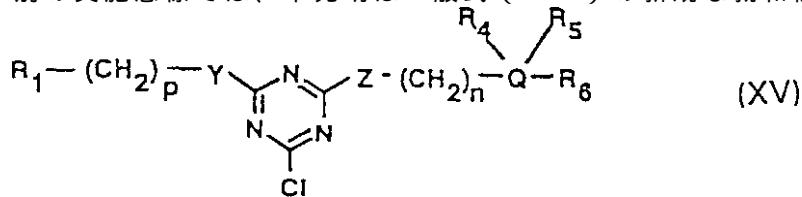


式中の R_1 、 R_4 、 R_5 、 Q 、 X 、 Y 、 Z 、 m 、 n ならびに p は前記に同じであり、 q は 0 または 1 であり、 i は 2 から 20 の間の整数である。

さらに本発明は前記一般式 (XII) の化合物を 0 から 100 の間の温度条件下に一般式 $\text{H}_2\text{N} - (\text{CH}_2)_j - (\text{CO})_q - \text{OH}$ で表されるアミノヒドロキシ化合物と、必要な場合には酸結合剤存在下に反応させることで前記一般式 (XIV) の新規な親和性リガンドを調整する方法に関する。

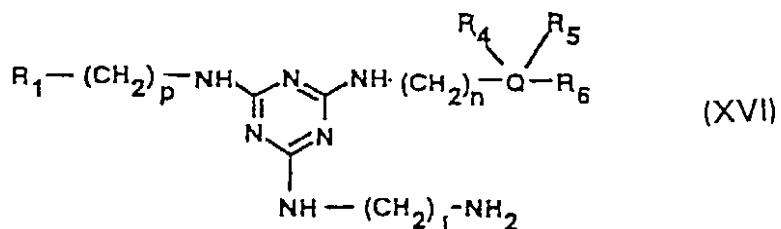
別の実施態様では、本発明は式中の R_1 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 L 、 Q 、 T 、 V 、 X 、 Y 、 Z 、 m 、 n および p は前記に同意である前記一般式 (VIII) の新規な親和性リガンドに関する ; R_9 は炭素分子を 1 分子から 6 分子含むアルキル基であり ; R_{10} はカルボニル基、メチレン基、-NH-CH₂- 基もしくは -S-CH₂- 基であり、；好ましくは L はエチル基、ブチル基、あるいはヘキシル基であり、好ましくは T は -NH- 基であり、好ましくは V は -NH- 基であり m は好ましくは 1 である。

別の実施態様では、本発明は一般式（XV）の新規な親和性リガンドに関する：



式中の R_1, R_4, R_5, R_6, Q, n ならびに p は前記に同じである。

別の実施態様では、本発明は一般式(XVI)の新規な親和性リガンドに関する：



20

式中の R_1, R_4, R_5, R_6, Q, n ならびに p は前記に同じであり、 j は 2 から 20 の間の整数である。

別の実施態様では、本発明は式中の R_1 がフェニル基もしくはナフチル基であって、かつそのベンゼン環あるいはナフタレン環が場合によっては 1 つもしくは複数のヒドロキ基あるいはカルボン酸によって独立に置換される一般式 (XII)、(XIII)、(XIV)、(XV) ならびに (XVI) の親和性リガンドに関する。

別の実施態様では、本発明は式中の R₄ が水素原子、ヒドロキシル基、カルボン酸、あるいはアミノ基である一般式 (XII)、(XIII)、(XIV)、(XV) ならびに (XVI) の親和性リガンドに関する。

別の実施態様では、本発明は式中の R_5 が水素原子、ヒドロキシル基、カルボン酸、あるいはアミノ基である一般式 (XII)、(XIII)、(XIV)、(XV) ならびに (XVI) の親和性リガンドに関する。

別の実施態様では、本発明は式中の R_6 が水素原子、ヒドロキシル基、カルボン酸、あるいはアミノ基である一般式 (XII)、(XIII)、(XIV)、(XV) ならびに (XVI) の親和性リガンドに関する。

別の実施態様では、本発明は式中のQがベンゼン環もしくはナフタレン環である一般式(XII)、(XIII)、(XIV)、(VIII)、(XV)ならびに(XVI)の親和性リガンドに関する。

別の実施態様では、本発明は式中のXが窒素原子である一般式(XII)、(XIII)、(XIV)ならびに(VIII)の親和性リガンドに関する。

別の実施態様では、本発明は式中のYが-NH-基である一般式(XII)、(XIII)、(XIV)ならびに(VIII)の親和性リガンドに関する。

別の実施態様では、本発明は式中のZが-NH-基である一般式(XII)、(XIII)、(XIV)ならびに(VIII)の親和性リガンドに関するものである。

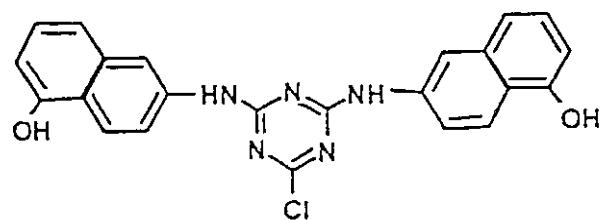
別の実施態様では、本発明は式中の n が 0 か 2 である一般式 (XII)、(XIII)、(XIV)、(XV)、(XVI) ならびに (XVII) の親和性リガンドに関する。

別の実施態様では、本発明は式中の p が 0 か 2 である一般式 (XII)、(XIII)、(XIV)、(XV)、(XVI) ならびに (XVII) の親和性リガンドに関する。

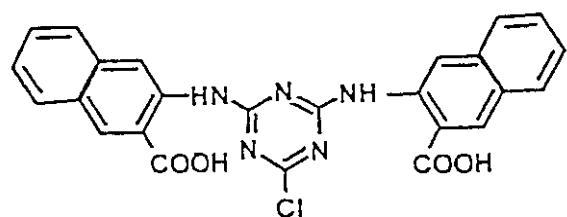
別の実施態様では、本発明は式中の j が 2、4、もしくは 6 のいずれかである一般式 (XIII)、(XIV) ならびに (XVI) の親和性リガンドに関する。

別の実施態様では、本発明は式中の j が 0 から 20 の間の整数である一般式 (X I) の親和性リガンドに関する。

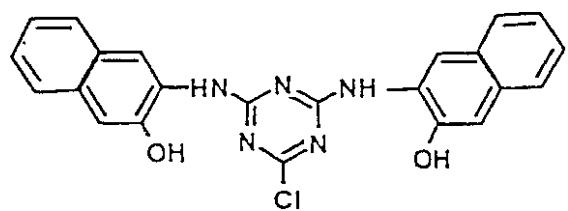
本発明の好適な親和性リガンドは以下の通りである：



(1)

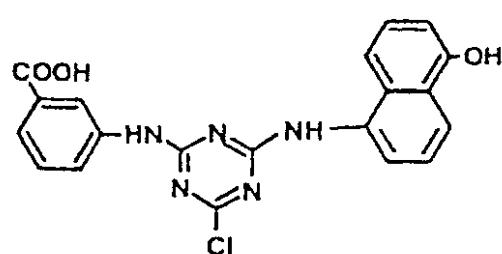


(2)



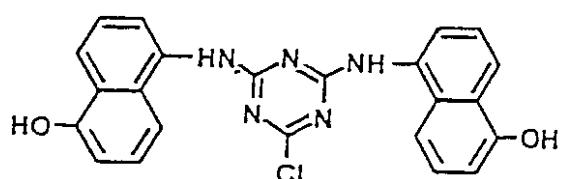
(3)

10



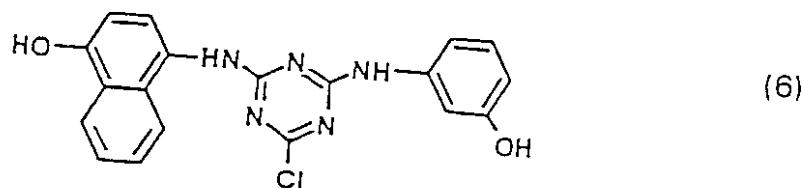
(4)

20



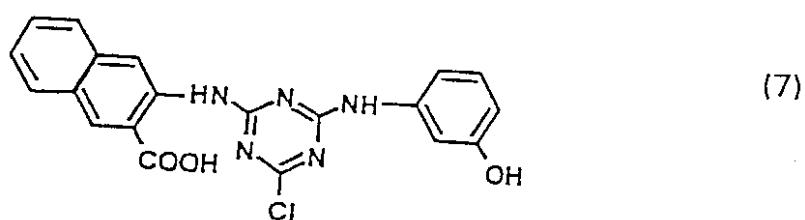
(5)

30



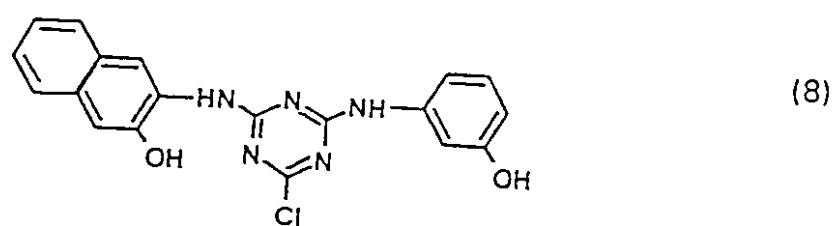
(6)

10



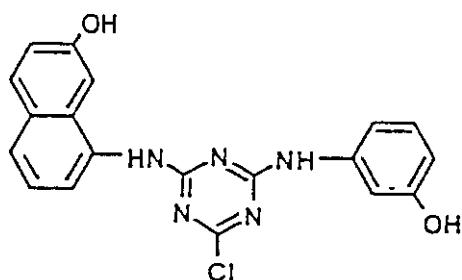
(7)

20



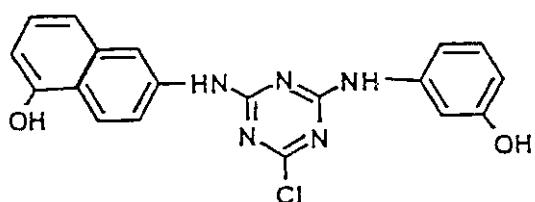
(8)

30



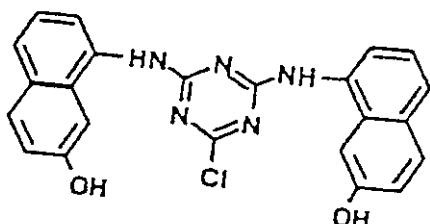
(9)

10



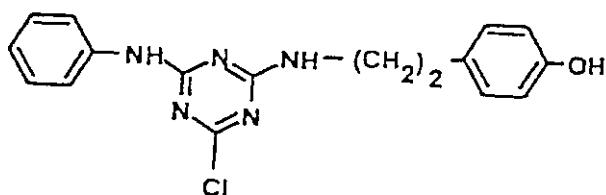
(10)

20

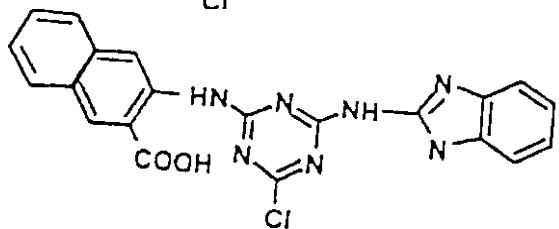


(11)

30



(12)



(13)

40

さらに本発明は、水酸化物もしくは有機重合体マトリックスを活性化剤と反応させ得られる活性化マトリックスを、必要に応じて酸結合剤存在下に新規な親和性リガンドに作用させることで前記一般式(VII)、(XIII)、(XVI)および(XI)の新規な親和性リガンドに炭水化物もしくは有機重合体マトリックスを結合させる方法に関する。また本発明は前記一般式(XIV)の新規な親和性リガンドをマトリックスと縮合させることにより、炭水化物マトリックスもしくは有機重合体マトリックスに結合させる方法にも関する。さ

50

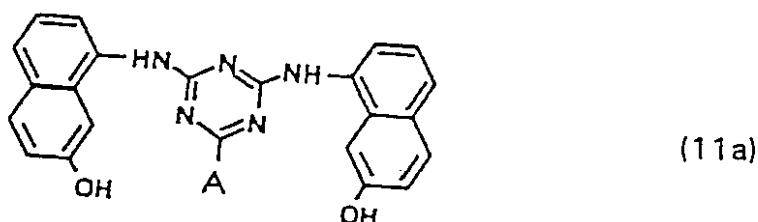
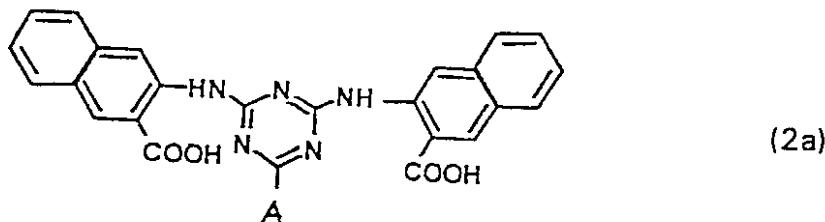
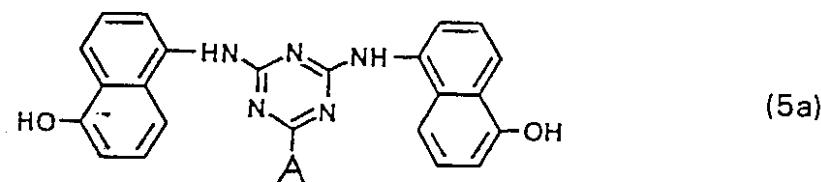
らに本発明は、金属酸化物、ガラスもしくはシリカマトリックスに前記一般式 (VII) 、前記 (XIII) 、前記 (XVI) 、および前記 (XI) の新規な親和性リガンドを結合させる方法、必要な場合には表面を被覆した金属酸化物、ガラスもしくはシリカマトリックスと活性化剤を反応させることにより有機重合体で被覆した後、該活性化マトリックスと新規な親和性リガンドを反応させ、必要ば場合には酸結合剤の存在下に反応させることによって金属酸化物、ガラスあるいはシリカマトリックスに該新規な親和性リガンドを結合させる方法に関する。本発明の別の実施態様は、前記一般式 (XIV) の新規な親和性リガンドを金属酸化物、ガラスあるいはシリカマトリックスと、必要な場合には該マトリックスとの縮合を利用して有機重合体で表面を覆った金属酸化物、ガラスあるいはシリカマトリックスに結合させる方法に関する。別の実施態様では、本発明は、前記一般式 (XV) 10 と前記 (XII) の新規な親和性リガンドを前記一般式 (V) のマトリックスに - 20 から 121 の間の温度条件で、必要に応じて酸結合剤存在下に反応させることで結合させる方法に関する。本発明はまた前記方法に従い結合、調整された親和性リガンドマトリックスの全てに関する。

別の実施態様では、本発明は本発明の親和性リガンドと本発明による該リガンドから成る親和性リガンドマトリックス結合体を用いた、その由来が天然のものである免疫グロブリンもしくはその亜型、断片、前駆体、もしくはそれらの誘導体、即ちその由来が天然または組換体である免疫グロブリン G (IgG) 、免疫グロブリン M (IgM) 、免疫グロブリン A (IgA) あるいはその亜型、断片、前駆体、もしくはそれらの誘導体の様な蛋白質もしくは蛋白性物質の分離、単離、精製、分析、同定、あるいは定量に関する。別の実施態様では、本発明は免疫グロブリンを本発明の親和性リガンドマトリックス結合体と pH 5.0 から 12.0 の間で作用させ、その後 pH を 4.9 以下に下げるによりこれを除去、溶出、もしくは破壊する工程から成るり免疫グロブリンを分離、単離、精製、分析、同定、もしくは定量に関する。20

本発明はまた前記一般式 (a) で示される生体特異的リガンドを用いた親和性クロマトグラフィーを行う工程を含む蛋白性物質の分離あるいは精製方法に関する。

本発明はまた本発明の親和性リガンドと本発明のリガンドを含む親和性リガンドマトリックス結合体を用いた由来が天然もしくは組換体であるインシュリンとその類縁体、誘導体ならびに断片および前駆体、ならびに第VII因子あるいはヒト成長因子あるいはその類縁体、誘導体ならびに断片と前駆体の分離、単離、精製、分析、同定もしくは定量に関する。30

実施例の方法により 60 種類以上のリガンドを含むライブラリーを設計した。該ライブラリーを部分精製したインシュリン前駆体を用いてスクリーニングしてから選別したリガンドを合成アガロースの固相に固定化した。このマトリックスについて結合方法、スペーサーアームの長さ、リガンド濃度等について最適化を行い、2 - 5 mg / ml の結合能力を有する 3 種類のプロトタイプを得た。インシュリン前駆体由来の組換体は、極めて穏やかな条件下に単一の疑似アフィニティー精製を行うことで清浄化した酵母発酵液から 95 % 以上の純度で精製できた。本発明の親和性リガンドならびに本発明の該リガンドを含む親和性リガンドマトリックス結合体のより好ましい利用は、由来が天然もしくは組換体であるインシュリンとその類縁体、誘導体ならびに断片および前駆体の精製である。この利用に関するより好ましい親和性リガンドマトリックス結合体は以下のリガンドを含むものである：40



リガンドは前記位置 A で支持体マトリックスと結合し、必要であればマトリックスとリガンドの間に前記一般式 (b) の様にしてスペースアームを挿入する。好ましくは、リガンドは 11a であり、支持マトリックスは別途活性化したアガロース、セルロース、シリカ、あるいはガラスであることが好ましい。

別の実施態様では、本発明はインシュリンあるいはインシュリン類縁体もしくは誘導体ならびに前駆体を本発明の親和性リガンドマトリックス結合体に pH 域 4.0 から 9.0 の間の条件下に結合させ、その後に pH を 3.99 以下あるいは 9.01 以上にすることによって除去、溶出、もしくは破壊する工程からなる該インシュリン、インシュリン誘導体あるいはその類縁体ならびに前駆体の分離、単離、精製、分析、同定、あるいは定量に関する。該溶出操作は、例えればイオン強度を下げたりあるいは有機溶媒の様な溶媒を共存させることでも実施できる。

以下本発明の詳細を以下の実施例により記載する。実施例は本発明を描写することを目的とするのであり、いかなる場合もこれにより本発明の範囲が限定されるものではない。

実施例 1

本実施例では、一般式 (II) のハロゲノ複素環化合物と一般式 (III) および (IV) の化合物との反応によって与えられる代表的な親和性リガンドの合成を説明する。

アセトン 50 部に 19.8 部のアニリンを溶解し、アセトン 200 部中の塩化シアヌル 36.8 部の溶液を氷 50 部と水 50 部の混合液中に注ぐことによって作成した懸濁液のなかに該溶液を入れる。該混合物を 2 時間攪拌し、300 部の水の中の炭酸水素ナトリウム 16.8 部の溶液を添加することによって、この間 pH を 6~7 の間に維持した。この時間が終了したら、2-アニリノ-4,6-ジクロロ-1,3,5-トリアジンの沈殿を濾過した後、水で洗浄し、真空で乾燥して、ジクロロメタンから結晶化した。

2-アニリノ-4,6-ジクロロ-1,3,5-トリアジン 4.82 部のアセトン溶液 (アセトン 100 部) に、アセトン 50 部と水 10 部の混合液中のチラミン 2.74 部の溶液を添加した。該混合液を 50 で加熱し、炭酸水素ナトリウム 1.68 部の水溶液 (水 30 部) を添加することによって、pH を

10

20

30

40

50

6~7の間に維持しながら、2時間この温度を保った。この時間が終了したら、2-アニリノ-4-[-(4'-ヒドロキシフェニル)-エチルアミノ]-6-クロロ-1,3,5-トリアジンの沈殿物を濾過して、水で洗浄し、真空で乾燥した。

実施例 2

本実施例では、固体支持相上への実施例1の産物の固定化を説明する。

30%のアセトン水溶液100部、次に70%のアセトン水溶液100部、続いてアセトン100部を用いた溶媒交換によって、アミノ基を有するアガロース10部をアセトン溶媒の中に移した。20部のアセトンに1部の2-アニリノ-4-[-(4'-ヒドロキシフェニル)-エチルアミノ]-6-クロロ-1,3,5-トリアジンを溶解して、50℃に加温した。該加温したアセトン溶液を、アミノ基を有するアガロース誘導体のアセトン懸濁液に加えた。得られた懸濁液に、0.42部の炭酸水素ナトリウムの水溶液(水5部)を添加し、次に該混合物を50℃で16時間攪拌した。この時間が終了したら、アセトンでアガロース支持マトリックスを洗浄し、結合していない2-アニリノ-4-[-(4'-ヒドロキシフェニル)-エチルアミノ]-6-クロロ-1,3,5-トリアジンを除去した。続いて、まず70%のアセトン水溶液で、次に30%のアセトン水溶液で、最後に水で洗浄することによって、得られた、誘導化されたアフィニティー支持体を水に戻した。

実施例 3

本実施例では、実施例2に記載した新規な親和性マトリックスを免疫グロブリン用の特異的クロマトグラフィーマトリックスとして使用することについて説明する。

3.75部のリン酸緩衝水溶液(pH7、濃度10mM)でヒト血漿1.25部を希釈し、実施例2で調製法を述べる親和性マトリックス1部からなるカラムにかけた。次に、洗浄液のUVモニタリングによって、全ての非結合タンパク質が除去されたことが示されるまで、リン酸緩衝液を用いて、該アフィニティーカラムを洗浄した。次に、洗浄液のUVモニタリングによって、結合したタンパク質の排出が終わったことが示されるまで、濃度0.2mM、pH3.8のクエン酸緩衝液で、該親和性マトリックスを洗浄した。該洗浄液中に含まれているタンパク質は、免疫グロブリンGであることが示された。

表1は、本発明の新規な親和性リガンドの実施例をさらに示している。該リガンドは、実施例1で用いた36.8部の塩化シアヌルを、表の第II列にリストされた同量のハロゲノ複素環化合物に置き換え、実施例1で用いた19.8部のアニリンを、表の第III列にリストされた同量のアミンに置き換え、実施例1で用いた2.74部のチラミンを表の第IV列にリストされた同量のアミンと置き換えることにより、実施例1の方法によって調製され得る。表の第I列には、実施例の番号を示してある。

I	II	III	IV
4	5-シアノ-2,4,6-トリクロロピリミジン	アニリン	チラミン
5	5-クロロ-2,4,6-トリフルオロピリミジン	アニリン	チラミン
6	塩化シアヌル	チラミン	チラミン
7	塩化シアヌル	アニリン	4-ヒドロキシ-ベンジルアミン
8	塩化シアヌル	アニリン	ベンジルアミン
9	塩化シアヌル	N-メチル-アニリン	4-ヒドロキシ-ベンジルアミン
10	塩化シアヌル	p-アニシジン	p-アミノフェノール
11	塩化シアヌル	アニリン	4-アセチルアミノ-ベンジルアミン
12	塩化シアヌル	p-トルイジン	チラミン
13	塩化シアヌル	p-クロロ-アニリン	チラミン
14	塩化シアヌル	p-アミノフェノール	チラミン
15	塩化シアヌル	シクロヘキシルアミン	チラミン
16	塩化シアヌル	β -フェニル-エチルアミン	チラミン
17	塩化シアヌル	4-ヒドロキシ-ベンジルアミン	チラミン
18	塩化シアヌル	4-ヒドロキシ-ベンジルアミン	4-ヒドロキシ-ベンジルアミン
19	塩化シアヌル	ベンジルアミン	チラミン
20	塩化シアヌル	チラミン	3-メチルスルフオニル-アニリン
21	塩化シアヌル	N-tert-ブチル-ベンジルアミン	チラミン
22	塩化シアヌル	N-イソプロピル-ベンジルアミン	チラミン
23	塩化シアヌル	p-アミノ-アセトアニリド	チラミン
24	塩化シアヌル	ジ-イソプロピル-アミン	チラミン
25	塩化シアヌル	アニリン	N-ベンジルチラミン
26	塩化シアヌル	チラミン	N-ベンジルチラミン

10

20

30

40

27	塩化シアヌル	p-アミノ-ベンズアミド	チラミン
28	塩化シアヌル	p-アミノベンゼン-スルフォンアミド	チラミン
29	塩化シアヌル	p-アミノ安息香酸	チラミン
30	塩化シアヌル	p-アミノ安息香酸	1-アミノ-4-ナフトール
31	塩化シアヌル	p-アミノフェノール	1-アミノ-5-ナフトール
32	塩化シアヌル	p-アミノ安息香酸	1-アミノ-5-ナフトール
33	塩化シアヌル	p-アミノフェノール	p-アミノフェノール
34	塩化シアヌル	m-アミノ安息香酸	アニリン
35	塩化シアヌル	m-アミノ安息香酸	チラミン
36	塩化シアヌル	1-アミノ-5-ナフトール	1-アミノ-5-ナフトール
37	塩化シアヌル	m-アミノフェノール	1-アミノ-5-ナフトール
38	塩化シアヌル	1-アミノ-4-ナフトール	1-アミノ-5-ナフトール

10

20

実施例4-38に記載されたこれらのリガンドは、実施例2で詳述した操作によって、アガロースマトリックスに接合させて、実施例3に示された操作による免疫グロブリンGの精製に使用し得る。

実施例39

2-アニリノ-4- [- (4'-ヒドロキシフェニル) -エチルアミノ] -6-クロロ-1,3,5-トリアジン2.5部のトルエン溶液(トルエ20部)に対して、6部のエチレンジアミンを加え、該混合物を100℃で16時間加熱した。該混合物から、減圧下でトルエンを蒸発させ、残留物を100部の水で5度洗浄し、次に70℃で乾燥した。

表2には、本発明の新規な親和性リガンドの実施例をさらに挙げる。該リガンドは、実施例39で用いた2-アニリノ-4- [- (4'-ヒドロキシフェニル) -エチルアミノ] -6-クロロ-1,3,5-トリアジン2.5部を、表2の第II列にリストされた同量のクロロトリアジンに置き換え、実施例39で用いたエチレンジアミンを、表2の第III列にリストされた同量のジアミン化合物またはアミノヒドロキシ化合物に置き換えた、実施例39の方法によって調製され得る。

30

表 2

I	II	III
40	実施例 1 に記載のクロロトリアジン	プロピレンジアミン
41	実施例 1 に記載のクロロトリアジン	1,6-ジアミノヘキサン
42	実施例 1 に記載のクロロトリアジン	1,8-ジアミノオクタン
43	実施例 1 に記載のクロロトリアジン	1,9-ジアミノノナン
44	実施例 1 に記載のクロロトリアジン	1,10-ジアミノデカン
45	実施例 1 に記載のクロロトリアジン	1,12-ジアミノドデカン
46	実施例 14 に記載のクロロトリアジン	1,6-ジアミノヘキサン
47	実施例 30 に記載のクロロトリアジン	1,6-ジアミノヘキサン
48	実施例 31 に記載のクロロトリアジン	1,6-ジアミノヘキサン
49	実施例 33 に記載のクロロトリアジン	1,6-ジアミノヘキサン
50	実施例 35 に記載のクロロトリアジン	1,6-ジアミノヘキサン
51	実施例 38 に記載のクロロトリアジン	1,6-ジアミノヘキサン
52	実施例 1 に記載のクロロトリアジン	N,N'-ジメチルエチレンジアミン
53	実施例 1 に記載のクロロトリアジン	N-β-ヒドロキシエチルエチレンジアミン
54	実施例 1 に記載のクロロトリアジン	ピペラジン
55	実施例 1 に記載のクロロトリアジン	エタノールアミン
56	実施例 1 に記載のクロロトリアジン	ジエタノールアミン
57	実施例 1 に記載のクロロトリアジン	イソプロパノールアミン

実施例 5 8

30

本実施例では、実施例 3 9 で製造した化合物の個体支持相上への固定化を説明する。60部のエポキシド基を有するアガロースを300部の水で洗浄し、次に180部のメタノールおよび120部の水に溶解させた5.95部の炭酸水素カリウムからなる溶液300部で洗浄した。実施例39により調製した化合物 1 部を60部のメタノールに溶解させ、40部の炭酸水素カリウム水溶液の溶液に加えた。次に、調製した、エポキシ基 (epoxy group) を有するアガロース60部の該懸濁液に、該メタノール水溶液100部を加え、生じた懸濁液を周囲の室温で16時間、穏やかに攪拌した。まず、360部のメタノール混合液と240部の水との混合液で、得られたアガロースベースのマトリックスを洗浄し、次に600部の水で洗浄した。

実施例 5 9

40

実施例3を繰り返すのであれば、実施例2で調製法が記載されている親和性マトリックス1部からなるカラムを、実施例58に調製法が記載されている親和性マトリックス1部からなるカラムと置き換える。再度、pH3.8の洗浄液中に含まれるタンパク質は免疫グロブリンGであることが示された。

実施例 6 0

50

本実施例では、実施例 3 9 で得られた産物の個体支持相上への固定化について説明する。

80部のアガロースを1050部の水で洗浄した後、1050部の30%アセトン水溶液、次に1050部の70%アセトン水溶液、最後に1425部のアセトンで洗浄した。次に、100部のアセトン中に該80部のアガロースを懸濁し、該懸濁液を37℃に加温した。15部のピリジンおよび25部のアセトンに溶かしたp-トルエンスルフォニルクロリド15部を該アガロース懸濁液に加えて、該混合物を8時間37℃に保った。続いて、該活性化されたアガロースを225部のアセトン

で洗浄した後、225部の70%アセトン水溶液、次に225部の30%アセトン水溶液、そして最後に225部の水で洗浄した。

178部のメタノールと47部の水との混合液に溶かした2.3部の炭酸水素カリウムからなる溶液225部で、45部の該活性化されたマトリックスを洗浄した。該活性化されたアガロース懸濁液に、1.5部の炭酸水素カリウムを含む45部のメタノールと30部の水の混合液中の、実施例39に従って調製した化合物0.75部の溶液を加えて、次に該混合物を室温で16時間放置した。炭酸水素カリウム9部を含む270部のメタノールと180部の水で、得られた親和性マトリックスを洗浄し、次に450部の水で洗浄した。

使用前に、0.36部の水酸化ナトリウム水溶液（水45部）中に、該得られた親和性マトリックス115部を懸濁した。

実施例 6 1

実施例3を繰り返すならば、実施例2で調製法が記載されている親和性マトリックス1部からなるカラムを、実施例60に調製法が記載されている親和性マトリックス1部からなるカラムと置き換える。再度、pH3.8の洗浄液中に含まれているタンパク質は免疫グロブリンGであることが示された。

実施例 6 2

pH8.0のリン酸緩衝液中に、実施例60によって調製した親和性マトリックス10部を16時間放置した。実施例3で使用したマトリックスを等量の該新規な親和性マトリックスと置き換え、実施例3で用いたヒト血漿の代わりに、マウス免疫グロブリン細胞培養液から得た無細胞上清を用いて、実施例3を繰り返した。再度、pH3.8の洗浄液中に含まれているタンパク質はマウス免疫グロブリンMであることが示された。

表3に、本発明の新規な親和性リガンドの接合例をさらに示す。該リガンドは、実施例58で用いた新規な親和性リガンドを表3の第II列に明記した同量の新規な親和性リガンドと置き換え、実施例58で用いた、エピクロロヒドリンで活性化したアガロース39部を表3の第IV列にリストした試薬によって活性化した、表3の第III列にリストした同量の炭水化物に置き換えることにより、実施例58の方法によって調製し得る。

表3

I	II	III	IV
61	実施例 39 のリガンド	アガロース	1,4-ブタンジオールジグリシルエーテル
62	実施例 39 のリガンド	アガロース	臭化シアン
63	実施例 39 のリガンド	アガロース	エピクロロヒドリン
64	実施例 39 のリガンド	アガロース	メタ過ヨウ素酸ナトリウム
65	実施例 39 のリガンド	アガロース	2,2,2-トリフルオロ-エタンスルホニルクロリド
66	実施例 39 のリガンド	アガロース	1,1'-カルボニルジ-イミダゾール
67	実施例 39 のリガンド	アガロース	2-フルオロ-1-メチル-ピリジニウムトルエン-4-スルホネート
68	実施例 39 のリガンド	アガロース	ジビニルスルホン
69	実施例 39 のリガンド	アガロース	塩化シアヌル

実施例 7 0

実施例1に詳述したリガンドの調製を繰り返すならば、2-アニリノ-4,6-ジクロロ-1,3,5-

10

20

30

40

50

トリアジン4.82部の代わりに、4.84部の2-フェノキシ-4,6-ジクロロ-1,3,5-トリアジンを2.74部のチラミンと反応させて、2-フェノキシ-4-[-(4'-ヒドロキシフェニル)-エチルアミノ]-6-クロロ-1,3,5-トリアジンを得る。これは、実施例2の方法による親和性マトリックスの調製における2-アニリノ-4-[-(4'-ヒドロキシフェニル)-エチルアミノ]-6-クロロ-1,3,5-トリアジンの代わりに使用し得る。

再度、実施例3に記載した手法により、ヒト血漿から免疫グロブリンGを簡便に単離し得る。

実施例 7 1

実施例70で使用した、4.84部の2-フェノキシ-4,6-ジクロロ-1,3,5-トリアジンの代わりに、5.16部の2-フェニルチオ-4,6-ジクロロ-1,3,5-トリアジンを使用すると、2-フェニルチオ-4-[-(4'-ヒドロキシフェニル)-エチルアミノ]-6-クロロ-1,3,5-トリアジンが得られ、同様に免疫グロブリンGを精製するのに使用し得る。

実施例 7 2

本実施例では、実施例2および実施例58で例示したような親和性リガンド-マトリックス複合体を製造するための、別のアプローチを説明する。

アセトン5部およびpH7、濃度0.5Mのリン酸緩衝水溶液5部とともに、アミノエチルアミノ基を有するアガロース10部を0~5で攪拌した。10部のアセトン中の塩化シアヌル1部を具備する溶液2.5部を該懸濁液に加え、次に該混合物を0~5の温度で1時間攪拌した。得られた、ジクロロトリアジンで活性化されたアガロースを50%のアセトン水溶液50部、水50部、50%のアセトン水溶液50部、100部の水で順次洗浄した。200部の水の中に1部のチラミンを具備する水溶液20部に、洗浄した、ジクロロトリアジンで活性化したアガロース20部を加えて、得られた懸濁液を周囲の室温で16時間攪拌した。この時間が終了したら、200部の水で得られた、誘導化されたマトリックスを洗浄し、200部の水に溶かした0.55部のアニリンを含む水溶液20部に加えた。得られた懸濁液を90で16時間攪拌し、その後該誘導化されたマトリックスを200部の水で洗浄した。

実施例 7 3

実施例3を繰り返すならば、実施例2で調製法が記載されている親和性マトリックス1部からなるカラムを、実施例72に調製法が記載されている親和性マトリックス1部からなるカラムと置き換える。再度、pH3.8の洗浄液中に含まれているタンパク質は免疫グロブリンGであることが示された。

実施例 7 4

本実施例では、本発明の親和性リガンド-マトリックス複合体のライブラー合成について説明する。該ライブラーは、引き続き、タンパク質の結合特性を決定するためにスクリーニングされ得る。

アミノ基を有するアガロース1部を1M、pH7.0のリン酸カリウム緩衝液1部と混合して、重力で沈降させた。緩衝化されたアミンアガロースを反応容器に移し、0~5で、0.5M、pH7.0のリン酸カリウム緩衝液0.5部およびアセトン0.5部と混合した。10部のアセトン中に1部の塩化シアヌルを含む溶液0.25部を加えて、該混合液を0~5で1時間攪拌し、その後該混合液を濾過した後、50%のアセトン10部、水6部、50%のアセトン6部および10部の水で順次洗浄して、2,4-ジクロロ-s-トリアジン-6-イルで活性化されたアガロースを得た。1部のアセトンと1部の水を含み、水酸化ナトリウムを添加して中性のpHに調整した溶液2~3部に溶解させた表4の第II列にリストされている、5モル当量のアミン化合物に、1部の2,4-ジクロロ-s-トリアジン-6-イルで活性化したアガロースを加えた。該懸濁液を30で24時間混合した。10部のジメチルホルムアミド、3部のプロパン-2-オールおよび7部の0.2M水酸化ナトリウムを含む溶液10部、10部の水で、得られたモノクロロ-s-トリアジン-6-イルで活性化したアガロースを順次洗浄して、重力下で沈降させた。

1部のジメチルホルムアミドと1部の水を含み、水酸化ナトリウムを添加して中性のpHに調整した溶液2~3部に溶解させた表4の第III列にリストされている、5モル当量のアミン化合物に、1部のモノクロロ-s-トリアジン-6-イルで活性化したアガロースを加えた。該懸濁液を85~95で72時間混合した。10部のジメチルホルムアミド、3部のプロパン-2-オールで活性化したアガロースを得た。

10

20

30

40

50

ルおよび7部の0.2M水酸化ナトリウムを含む溶液10部、10部の水で、得られた親和性リガンド-マトリクス複合体を順次洗浄し、重力下で沈降させた。本発明のアフィニティーガンドマトリックス複合体のライブラリーを合成した。その実施例は表4の第1列に明記されている。

表 4

I	II	III
75	1,3-ジアミノプロパン	チラミン
76	1,3-ジアミノプロパン	N-ベンジルフェネチルアミン
77	1,4-ジアミノブタン	3-アミノフェノール
78	1,4-ジアミノブタン	チラミン
79	1,4-ジアミノブタン	1-アミノ-5-ナフトール
80	1,4-ジアミノブタン	N-イソプロピルベンジルアミン
81	1,4-ジアミノブタン	N-ベンジルフェネチルアミン
82	アニリン	ジアミノプロパン
83	アニリン	アニリン
84	アニリン	3-アミノフェノール
85	アニリン	3-アミノ安息香酸
86	アニリン	チラミン

87	アニリン	1-アミノ-4-ナフトール
88	アニリン	1-アミノ-2-ナフトール
89	アニリン	3-アミノ-2-ナフトール
90	アニリン	1-アミノ-6-ナフトール
91	アニリン	N-イソプロピルベンジルアミン-4-フェニルブチルアミン
92	アニリン	N-ベンジルフェネチルアミン
93	3-アミノフェノール	3-アミノフェノール
94	3-アミノフェノール	1-アミノ-5-ナフトール
95	1,6-ジアミノヘキサン	チラミン
96	1,6-ジアミノヘキサン	4-フェニルブチルアミン
97	3-アミノ安息香酸	1-アミノ-5-ナフトール
98	チラミン	チラミン
99	チラミン	1-アミノ-5-ナフトール
100	チラミン	1-アミノ-7-ナフトール
101	チラミン	1-アミノ-6-ナフトール
102	1-アミノ-5-ナフトール	アニリン
103	1-アミノ-5-ナフトール	3-アミノフェノール
104	1-アミノ-5-ナフトール	4-アミノ安息香酸
105	1-アミノ-5-ナフトール	3,5-ジアミノ安息香酸
106	1-アミノ-5-ナフトール	ベンジルアミン

10

20

107	1-アミノ-5-ナフトール	チラミン
108	1-アミノ-5-ナフトール	1-アミノ-5-ナフトール
109	1-アミノ-7-ナフトール	3-アミノフェノール
110	1-アミノ-7-ナフトール	1-アミノ-7-ナフトール
111	1-アミノ-4-ナフトール	3-アミノフェノール
112	1-アミノ-4-ナフトール	1-アミノ-4-ナフトール
113	1-アミノ-2-ナフトール	3-アミノフェノール
114	1-アミノ-2-ナフトール	1-アミノ-2-ナフトール
115	3-アミノ-2-ナフトール	3-アミノフェノール
116	3-アミノ-2-ナフトール	3-アミノ-2-ナフトール
117	1-アミノ-6-ナフトール	3-アミノフェノール
118	1-アミノ-6-ナフトール	1-アミノ-6-ナフトール
119	2-アミノ-1-ナフトール	3-アミノフェノール
120	2-アミノ-1-ナフトール	2-アミノ-1-ナフトール
121	6-アミノ-1-ナフトール	3-アミノフェノール
122	6-アミノ-1-ナフトール	6-アミノ-1-ナフトール
123	1-アミノ-6-ナフタレンスルホン	3,5-ジアミノ安息香酸

30

40

	酸	
124	1-アミノ-6-ナフタレンスルホン酸	ベンジルアミン
125	1-アミノ-6-ナフタレンスルホン酸	チラミン
126	3-アミノ-2-ナフトエ酸 (3-amino-2-naphthoic acid)	3-アミノフェノール
127	3-アミノ-2-ナフトエ酸	3-アミノ-2-ナフトエ酸

実施例128

10

本実施例では、実施例74に記載した親和性リガンド - マトリクス複合体のタンパク質結合特性を決定し得るスクリーニング法を示す。

全容量が1mLのクロマトグラフィーカラムに、実施例75～127の親和性リガンド - マトリクス複合体を充填した。50mMのリン酸ナトリウム緩衝液pH8.0を10mL流して、該カラムを平衡化した。50mM、pH8.0のリン酸ナトリウム緩衝液1mL当たり1.5mgのヒトIgGを含む溶液1mLを各クロマトグラフィーカラムにかけて、その後10mLの50mMリン酸ナトリウム緩衝液pH8.0で洗浄して、結合していないIgGを除去した。各カラムに5mLの50mMクエン酸ナトリウム緩衝液pH3.0を流して、結合したIgGを溶出した。洗浄画分および溶出画分のIgG含量は、緩衝液をプランクとして、280nmの吸光度を測定することによって決定した。結果を分析すると、実施例75～127の親和性リガンド - マトリクス複合体は全て、ヒトIgG結合を示すことが明らかとなった。これらのうちで、実施例92、99、101、102、103、111、113および119の親和性リガンド - マトリクス複合体では、ほぼ定量的に結合したIgGを溶出することができたが、結果として、これはヒトIgGの分離、単離または精製における値としては極めて優れたものであると考えられる。

20

実施例129

実施例181による親和性マトリックスにかけた、細胞培養液からの組換え凝固因子VIIa(rFVIIa)の選択的結合および溶出

操作：

沈降した状態の容量が0.85mLの、実施例181の如く調製した親和性マトリックスを5×50mmカラム(Pharmacia HR5/5)に充填して、20mLの緩衝液A:20mM Tris、50mM NaCl、5mM CaCl₂、pH8.0で平衡化した。1.4mgのrFVIIaを高濃度に含有したBHK細胞順化培養液上清5mLを該充填したカラムにかけた。10mLの緩衝液Aで、未結合のタンパク質を洗い落とした後、5mLの緩衝液B:20mMクエン酸三ナトリウム、50mMのTris、pH8.0を流して、rFVIIaを溶出した。

30

クロマトグラフィー操作中の流速は0.3mL/分であった。

接続したUVモニターに該カラムの流出液を通して、1mLの画分を集め、分析用の逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)によって、各画分のrFVIIaおよび全タンパク質含量を分析した。

結果：

UVモニターの出力は、上清をカラムにかける間およびその後緩衝液Aで洗浄する間に、UV(280nm)を吸収する物質の多くが流出したことを示した。その後緩衝液Bで溶出する間に、明瞭なピークがモニターされたが、これはカラムにかけた量のrFVIIaに対して予想されるサイズと一致していた。

40

集めた画分をRP-HPLC分析することにより、カラムにかけたrFVIIaの量の90%が、緩衝液Bで溶出する間に、画分の中に出てくることが示された。これらの画分中のrFVIIaの純度は95%以上であった。

この結果は、高濃度に含有する培養液から得たrFVIIaが、使用したリガンドに対して選択的に結合したこと示している。

実施例130

実施例171によるリガンド-マトリックス複合体上でのインシュリンB鎖¹⁻²⁹-A-A-K-インシ

50

ユリンA鎖¹⁻²¹の精製

255mgのインシュリンB鎖¹⁻²⁹-Ala-Ala-Lys-インシュリンA鎖¹⁻²¹（バッチA202558）を51mLの水に懸濁した。該前駆体を可溶化するために、1Mの酢酸を10滴添加した。全容量510mLに対して、0.2Mのクエン酸カリウムpH5.5を加えて、0.12mg / mLの溶液を得た（RP-HPLC分析による）。pHの測定値は5.53、イオン強度は30.0mS / cm、および酸化還元電位は273mVであった。

12mLの上記マトリックス複合体を充填し、1.8mL / min、周囲の温度で0.2Mクエン酸カリウムpH5.5によって平衡化したファルマシアK16（1.6 × 6cm）カラムに400mLの上記溶液をかけた。1.8mL / minで、該カラムを50mLの0.2Mクエン酸カリウムpH5.5によって洗浄し、次に0.1Mの酢酸により溶出した。5.0mLの画分を12集めた。

50mLの0.5M NaOHで該カラムを洗浄し、50mLの0.1Mクエン酸、60%v / vエタノールで再生した。

RP-HPLC分析用のサンプルは、分析前に2Mの酢酸で希釈した。

サンプル	表示	MI3 濃度	容量	量	%
カラムにかけたサンプル	E091b	0.12mg/mL	400mL	48.8mg	100
流出液	E091c	0.00mg/mL		0.0mg	0
洗浄	E093a	0.00mg/mL		0.0mg	0
画分 3	E093b	0.01mg/mL	5.0mL	0.1mg	
画分 4	E093c	5.00mg/mL	5.0mL	25.0mg	
画分 5	E093d	2.62mg/mL	5.0mL	13.1mg	
画分 6	E093e	0.52mg/mL	5.0mL	2.6mg	
画分				40.8mg	83

このように、計83%の回収率が得られた。

RP-HPLC分析によれば、産物の純度は94%であった。残りの不純物は、インシュリン関連のものであった。

実施例 1 3 1

実施例 1 7 1 による親和性リガンド - マトリックス複合体上での、デス-Thr^{B30}-インシュリンの精製

150mgのデス-Thr^{B30}-インシュリン（INS-J-009）沈殿物を水50mLの中に懸濁した。2Mの酢酸を5滴添加して、該懸濁液を溶解させた。容量が500mLになるように、0.2Mクエン酸カリウムpH5.5を加えて、濃度を0.076mg / mLにした（RP-HPLCによる）。pHの測定値は5.52、イオン強度は30.0mS / cm、および酸化還元電位は264mVであった。

12mLの上記マトリックス複合体を充填し、1.8mL / min、周囲の温度で0.2Mクエン酸カリウムpH5.5によって平衡化したファルマシアK16（1.6 × 6cm）カラムに400mLの上記溶液をかけた。1.8mL / minで、該カラムを50mLの0.2Mクエン酸カリウムpH5.5によって洗浄し、次に0.1Mの酢酸により溶出した。5.0mLの画分を10集めた。

50mLの0.5M NaOHで該カラムを洗浄し、50mLの0.1Mクエン酸、60%v / vエタノールで再生した。

RP-HPLC分析用のサンプルは、分析前に2Mの酢酸で希釈した。

サンプル	表示	MI3 濃度	容量	量	%
カラムにかけたサンプル	E105a	0.076mg/mL	400mL	30.0mg	100
流出液	E105b	0.00mg/mL		0.0mg	0
洗浄	E105d	0.00mg/mL		0.0mg	0
画分 3	E105e	0.00mg/mL	5.0mL	0.0mg	0
画分 4	E105f	0.41mg/mL	5.0mL	2.1mg	
画分 5	E105n	1.93mg/mL	5.0mL	9.7mg	
画分 6	E105o	1.14mg/mL	5.0mL	5.7mg	
画分 7	E105p	0.48mg/mL	5.0mL	2.4mg	
画分 8	E105j	0.31mg/mL	5.0mL	1.6mg	
画分				21.5mg	71%

このように、計71%の回収率が得られた。

RP-HPLC分析によれば、産物の純度は91%であった。残りの不純物は、インシュリン関連のものであった。

実施例 132

実施例145による親和性リガンド - マトリクス複合体上での、インシュリンB鎖¹⁻²⁹-A-A-K - インシュリンA鎖¹⁻²¹の精製

5MのNaOHで、2Lの遠心した肉汁培地（バッチ628）のpHを5.5に調整し、ライツティーフェンフィルター（Leitz Tiefenfilter,Seitz EK）濾過器に通して濾過した後、次に、ライツティーフェンフィルター（Seitz EKS）濾過器に通して濾過した。RP-HPLCによる測定では、濃度は0.006mg / mLであった。イオン強度の測定値は12.2mS / cm、酸化還元電位は316mVであった。

12mLの上記マトリックス複合体を充填し、1.8mL / min、周囲の温度で0.2Mクエン酸カリウムpH5.5によって平衡化したファルマシアK16（1.6 × 6cm）カラムに1000mLの上記溶液をかけた。1.8mL / minで、該カラムを50mLの0.2Mクエン酸カリウムpH5.5によって洗浄し、次に0.1Mの酢酸により溶出した。5.0mLの画分を11集めた。

50mLの0.5M NaOHで該カラムを洗浄し、50mLの0.1Mクエン酸、60%v / vのエタノールで再生した。

RP-HPLC用のサンプルは、分析前に2Mの酢酸で希釈した。

サンプル	表示	MI3 濃度	容量	量	%
カラムにかけたサンプル	E111e	0.006mg/mL	1000mL	6.0mg	100
流出液	E115a	0.00mg/mL		0.0mg	0
洗浄	E115b	0.00mg/mL		0.0mg	0
画分 3	E115c	0.00mg/mL	5.0mL	0.0mg	0
画分 4	E115d	0.58mg/mL	5.0mL	2.9mg	
画分 5	E115e	0.11mg/mL	5.0mL	0.6mg	
画分 6	E115f	0.04mg/mL	5.0mL	0.2mg	
画分 7	E115g	0.02mg/mL	5.0mL	0.1mg	
画分				3.8mg	63%

このように、計63%の回収率が得られた。

RP-HPLC分析によれば、産物の純度は88%であった。残りの不純物は、インシュリン関連のものであった。

実施例 133

10

20

30

40

50

実施例171による親和性リガンド - マトリクス複合体上での、インシュリンB鎖¹⁻²⁹-A-A-K - インシュリンA鎖¹⁻²¹の精製

5MのNaOHで、2Lの遠心した肉汁培地（バッチ628）のpHを5.5に調整し、ライツティーフェンフィルター（Seitz EK）濾過器に通して濾過した後、次に、ライツティーフェンフィルター（Seitz EKS）濾過器に通して濾過した。RP-HPLCによる測定では、濃度は0.006mg / mLであった。イオン強度の測定値は12.2mS / cm、酸化還元電位は316mVであった。

12mLの上記マトリックス複合体を充填し、1.8mL / min、周囲の温度で0.2Mクエン酸カリウムpH5.5によって平衡化したファルマシアK16（1.6×6cm）カラムに、1000mLの上記溶液をかけた。1.8mL / minで、該カラムを50mLの0.2Mクエン酸カリウムpH5.5によって洗浄し、次に0.1Mの酢酸により溶出した。5.0mLの画分を11集めた。

50mLの0.5M NaOHで該カラムを洗浄し、50mLの0.1Mクエン酸、60%v / vエタノールで再生した。

RP-HPLC分析用のサンプルは、分析前に2Mの酢酸で希釈した。

サンプル	表示	MI3 濃度	容量	量	%
カラムにかけたサンプル	E111e	0.006mg/mL	830mL	5.0mg	100
流出液	E113a	0.00mg/mL		0.0mg	0
洗浄	E113b	0.00mg/mL		0.0mg	0
画分3	E113c	0.00mg/mL	5.0mL	0.0mg	0
画分4	E113d	0.58mg/mL	5.0mL	2.9mg	
画分5	E113e	0.10mg/mL	5.0mL	0.5mg	
画分6	E113f	0.04mg/mL	5.0mL	0.2mg	
画分7	E113g	0.02mg/mL	5.0mL	0.1mg	
画分				3.7mg	74%

このように、計74%の回収率が得られた。

RP-HPLC分析によれば、産物の純度は86%であった。残りの不純物は、インシュリン関連のものであった。

実施例134

実施例171による親和性リガンド - マトリクス複合体上での、EEAEPK-インシュリンB鎖（1-29）-AAK-インシュリンA鎖（1-21）の精製

遠心した酵母の肉汁培地（バッチY44）をライツティーフェンフィルター濾過器（Seitz EK）に通して濾過し、濃度を0.35mg / mL（RP-HPLC分析による）にした。pHの測定値は5.27、イオン強度は7.38mS / cm、酸化還元電位は221mVであった。

12mLの上記マトリックス複合体を充填し、1.8mL / min、周囲の温度で0.2Mクエン酸カリウムpH5.5によって平衡化したファルマシアK16（1.6×6cm）カラムに、120mLの上記溶液をかけた。1.8mL / minで、該カラムを50mLの0.2Mクエン酸カリウムpH5.5によって洗浄し、次に0.1Mの酢酸により溶出した。5.0mLの画分を11集めた。

50mLの0.5M NaOHで該カラムを洗浄し、50mLの0.1Mクエン酸、60%v / vエタノールで再生した。

RP-HPLC分析用のサンプルは、分析前に2Mの酢酸で希釈した。

10

20

30

40

サンプル	表示	MI3 濃度	容量	量	%
カラムにかけたサンプル	E127b	0.35mg/mL	120mL	42.0mg	100
流出液	E127c	0.00mg/mL		0.0mg	0
洗浄	E127d	0.00mg/mL		0.0mg	0
画分3	E127e	2.26mg/mL	5.0mL	11.3mg	
画分4	E127f	2.07mg/mL	5.0mL	10.4mg	
画分5	E127g	1.12mg/mL	5.0mL	5.6mg	
画分6	E127h	1.27mg/mL	5.0mL	6.4mg	
画分				33.6mg	79%

このように、計79%の回収率が得られた。

RP-HPLC分析によれば、産物の純度は93%であった。残りの不純物は、インシュリン関連のものであった。

実施例135

実施例171による親和性リガンド - マトリクス複合体上での、[Asp^{B28}] - インシュリンB鎖¹⁻²⁹-A-A-K-インシュリンA鎖¹⁻²¹の精製

5MのNaOHで、遠心した肉汁培地（バッヂGSG9414）のpHを5.5に調整し、ライツティーフェンフィルター（Seitz EK）濾過器に通して濾過した後、次に、ライツティーフェンフィルター（Seitz EKS）濾過器に通して濾過した。RP-HPLCによる測定では、濃度は0.02mg / mLであった。イオン強度の測定値は17.0mS / cm、酸化還元電位は308mVであった。

12mLの上記マトリックス複合体を充填し、1.8mL / min、周囲の温度で0.2Mクエン酸カリウムpH5.5によって平衡化したファルマシアK16（1.6×6cm）カラムに、800mLの上記溶液をかけた。1.8mL / minで、該カラムを50mLの0.2Mクエン酸カリウムpH5.5によって洗浄し、次に0.1Mの酢酸により溶出した。5.0mLの画分を12集めた。

50mLの0.5M NaOHで該カラムを洗浄し、50mLの0.1Mクエン酸、60%v / vエタノールで再生した。

RP-HPLC分析用のサンプルは、分析前に2Mの酢酸で希釈した。

サンプル	表示	MI3 濃度	容量	量	%
カラムにかけたサンプル	E107b	0.02mg/mL	800mL	16.0mg	100
流出液	E107c	0.00mg/mL		0.0mg	0
洗浄	E107d	0.00mg/mL		0.0mg	0
画分2	E109a	0.00mg/mL	5.0mL	0.0mg	0
画分3	E109b	0.12mg/mL	5.0mL	0.6mg	
画分4	E109c	0.76mg/mL	5.0mL	3.8mg	
画分5	E109d	1.04mg/mL	5.0mL	5.2mg	
画分6	E109e	0.31mg/mL	5.0mL	1.6mg	
画分7	E109f	0.10mg/mL	5.0mL	0.5mg	
画分8	E109g	0.06mg/mL	5.0mL	0.3mg	
画分				12mg	75%

このように、計75%の回収率が得られた。

RP-HPLC分析によれば、産物の純度は84%であった。残りの不純物は、インシュリン関連のものであった。

実施例136

本実施例では、さらに、本発明の親和性リガンド - マトリクス複合体のタンパク質結合特

性を決定し得るスクリーニング法を示す。

表4の第II列にリストしたアミン化合物5モル当量を表5の第II列にリストした同量のアミン化合物と置き換え、表4の第III列にリストしたアミン化合物5モル当量を表5の第III列にリストした同量のアミン化合物と置き換えて、実施例74により、本発明の親和性リガンド - マトリクス複合体のライブラリーを合成した。本発明の親和性リガンド - マトリクス複合体のライブラリーを合成した。表5の第I列には、その実施例が明記してある。

全容量が1mLのクロマトグラフィーカラムに、実施例137～180の親和性リガンド - マトリクス複合体を充填した。0.2Mの酢酸ナトリウム、0.1M塩化ナトリウム緩衝液pH5.0を10mL流して、該カラムを平衡化した。50mg / mLのヒトインシュリン前駆体を含有する清澄な発酵用肉汁培地12mLを各クロマトグラフィーカラムにかけて、その後12mLの0.2M酢酸ナトリウム、0.1M塩化ナトリウム緩衝液pH5.0で洗浄して、結合していない物質を除去した。各カラムに3mLの2M酢酸を流して、結合したヒトインシュリン前駆体を溶出した。流出画分、洗浄画分および溶出画分のヒトインシュリン前駆体の含量は、C18逆相シリカカラム (4 × 250mm) および緩衝液A (0.2M硫酸ナトリウム、40mMリン酸、および10% (v / v) アセトニトリル、pH2) と緩衝液B (50% (v / v) アセトニトリル) を具備する溶媒系 (緩衝液Aと緩衝液Bの割合は55%対45%、1mL / minの流速で送液された) 用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で決定した。ヒトインシュリン前駆体の溶出時間は、参照用の標準との比較で決定した。

分析結果から、実施例139、140、145、148、153、159、162、163、164、166、167、170、171、173の親和性リガンド - マトリクス複合体は全てヒトインシュリン前駆体を結合することが明らかとなり、これらは本実施例に記述した条件下で溶出された。結果として、実施例139、140、145、148、153、159、162、163、164、166、167、170、171、173の親和性リガンド - マトリクスは、ヒトインシュリン前駆体の分離、単離または精製における値としては極めて優れたものであると考えられる。

10

20

表 5

I	II	III
137	1-アミノ-6-ナフタレンスルホン酸	ベンジルアミン
138	1-アミノ-6-ナフタレンスルホン酸	3,5-ジアミノ安息香酸
139	1-アミノ-5-ナフトール	ベンジルアミン
140	1-アミノ-5-ナフトール	3,5-ジアミノ安息香酸
141	ベンジルアミン	3-アミノ安息香酸
142	ベンジルアミン	4-アミノ安息香酸
143	チラミン	3-アミノ安息香酸
144	チラミン	4-アミノ安息香酸
145	1-アミノ-5-ナフトール	1-アミノ-5-ナフトール
146	1-アミノ-5-ナフトール	3-アミノ安息香酸
147	1-アミノ-5-ナフトール	4-アミノ安息香酸
148	1-アミノ-5-ナフトール	チラミン
149	1-アミノ-6-ナフタレンスルホン酸	チラミン
150	1-アミノ-5-ナフトール	3-アミノ-1,2-プロパンジオール
151	1-アミノ-5-ナフトール	3-アミノプロパン-1-オール
152	1-アミノ-5-ナフトール	5-アミノプロパン-1-オール
153	1-アミノ-5-ナフトール	3-アミノフェノール
154	1-アミノ-5-ナフトール	6-アミノカプロン酸
155	1-アミノナフタレン	ベンジルアミン
156	1-アミノナフタレン	3,5-ジアミノ安息香酸
157	1-アミノナフタレン	3-アミノ安息香酸
158	1-アミノナフタレン	4-アミノ安息香酸
159	3-アミノ-2-ナフトエ酸	3-アミノフェノール
160	4-アミノ-1-ナフトール	3-アミノフェノール
161	1-アミノ-2-ナフトール	3-アミノフェノール
162	3-アミノ-2-ナフトール	3-アミノフェノール
163	1-アミノ-6-ナフトール	3-アミノフェノール
164	1-アミノ-7-ナフトール	3-アミノフェノール
165	2-アミノ-1-ナフトール	3-アミノフェノール
166	6-アミノ-1-ナフトール	3-アミノフェノール
167	3-アミノ-2-ナフトエ酸	3-アミノ-2-ナフトエ酸
168	4-アミノ-1-ナフトール	4-アミノ-1-ナフトール
169	1-アミノ-2-ナフトール	1-アミノ-2-ナフトール
170	3-アミノ-2-ナフトール	3-アミノ-2-ナフトール

10

20

30

40

171	1-アミノ-7-ナフトール	1-アミノ-7-ナフトール
172	2-アミノ-1-ナフトール	2-アミノ-1-ナフトール
173	6-アミノ-1-ナフトール	6-アミノ-1-ナフトール
174	3-アミノ-2-ナフトエ酸 (3-amino-2-naphthoic acid)	1-アミノ-5-ナフトール
175	3-アミノ-2-ナフトエ酸	4-アミノ-1-ナフトール
176	3-アミノ-2-ナフトエ酸	2-アミノ-1-ナフトール
177	1-アミノ-7-ナフトール	1-アミノ-5-ナフトール
178	1-アミノ-7-ナフトール	3-アミノ-2-ナフトエ酸
179	1-アミノ-7-ナフトール	4-アミノ-1-ナフトール
180	1-アミノ-7-ナフトール	2-アミノ-1-ナフトール

実施例 18 1

本実施例では、第VII因子の精製に価値ある本発明の親和性リガンド - マトリックス複合体を合成し得る方法を示す。

表4の第II列にリストしたアミン化合物5モル当量を同量の2-アミノベンゾイミダゾールに置き換え、表4の第III列にリストしたアミン化合物5モル当量を3-アミノ-2-ナフトエ酸に置き換えて、実施例74により本発明の親和性リガンド - マトリックス複合体を合成した。該親和性マトリックス複合体は、本発明の実施例129に従って、第VIIa因子を精製するのに用い得る。

実施例 18 2

実施例171による親和性リガンド - マトリックス複合体上での、EEAEPK-インシュリンB鎖¹⁻²⁹-A-A-K-インシュリンA鎖¹⁻²¹の精製

12mLの複合化マトリックスを充填し、1.8mL / min、周囲の温度で0.2Mクエン酸カリウムpH 5.5によって平衡化したファルマシアK16 (1.6 × 6cm) カラムに、イオン交換で精製したインシュリン前駆体50mL (EEAEPK-インシュリンB鎖¹⁻²⁹-A-A-K-インシュリンA鎖¹⁻²¹、2.2mg / mL) をかけた。1.8mL / minで、該カラムを50mLの0.1Mクエン酸カリウム、0.2M硫酸カリウムpH5.5によって洗浄し、次に0.1Mの酢酸により溶出した。5.0mLの画分を集めた。

50mLの0.5M NaOHで該カラムを洗浄し、50mLの0.1Mクエン酸、60%v / vエタノールで再生した。

RP-HPLC分析用のサンプルは、分析前に2Mの酢酸で希釈した。

サンプル	表示	濃度 mg/mL	容量 mL	量 mg	%
カラムにかけたサンプル	R-029e	2.27	50	114	100
流出液	R-033a	0.03	50	1.4	1.2
洗浄	R-033b	0.09	50	4.3	3.8
プール1	R-033c	5.61	15	84.2	74
プール2	R-033d	0.55	10	5.5	4.8

該前駆体の収率は88%であり、動的結合容量 (dynamic binding capacity) は、9.5mg / mLマトリックスであることが示された。

10

20

30

40

フロントページの続き

(74)代理人 100088683
弁理士 中村 誠

(74)代理人 100109830
弁理士 福原 淑弘

(74)代理人 100075672
弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100095441
弁理士 白根 俊郎

(74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100103034
弁理士 野河 信久

(74)代理人 100119976
弁理士 幸長 保次郎

(74)代理人 100153051
弁理士 河野 直樹

(74)代理人 100140176
弁理士 砂川 克

(74)代理人 100100952
弁理士 風間 鉄也

(74)代理人 100101812
弁理士 勝村 紘

(74)代理人 100070437
弁理士 河井 将次

(74)代理人 100124394
弁理士 佐藤 立志

(74)代理人 100112807
弁理士 岡田 貴志

(74)代理人 100111073
弁理士 堀内 美保子

(74)代理人 100134290
弁理士 竹内 将訓

(74)代理人 100127144
弁理士 市原 卓三

(74)代理人 100141933
弁理士 山下 元

(72)発明者 ロウ、クリストファー・アール
イギリス国、シービー10・2ピーダブリュ、サフラン・ウォルデン、ヘンプステッド、ザ・ライムズ(番地なし)

(72)発明者 スプルール、ケニス
イギリス国、シービー3・9エヌエヌ、ケンブリッジ、グランチェスター、ワイドナール・クローズ 3

(72)発明者 リ、ロンシュウ
イギリス国、シービー4・3エルエックス、ケンブリッジ、クリブドン・クローズ 31

(72)発明者 スチュワート、デイビッド・ジェイ
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 11743 ハンティングドン、スプリング・ロード 188

(72)発明者 パーソン、ジェイムズ・シー
イギリス国、シービー4・1ディーエックス、ケンブリッジ、チェスタートン、チャーチ・ストリ

ート、ピー・テラス 1
(72)発明者 バートン、スティーブン・ジェイ
イギリス国、シービー3・7エイチピー、ケンブリッジ、リトル・エバースデン、ハールトン・ロード 23、タッチウッド

合議体

審判長 横尾 俊一

審判官 森井 隆信

審判官 星野 紹英

(56)参考文献 独国特許出願公開第3222965(DE, A1)

特開平03-231974(JP, A)

米国特許第3060180(US, A)

特開昭50-024337(JP, A)

米国特許第3692711(US, A)

特開昭48-056244(JP, A)

Journal of Chromatography, 1980年, Vol. 202, No. 3, p. 381-390

Journal of Molecular Recognition, 1992年, Vol. 5, No. 2, p. 55-68

Analytical Biochemistry, 1980年, Vol. 108, No. 2, p. 354-359

Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 1984年, Vol. 32, No. 3, p. 247-253

Journal of the Institution of Chemists (India), 1981年, Vol. 53, No. 2, p. 85-88

Acta Ciencia Indica, Chemistry, 1985年, Vol. 11, No. 1, p. 66-70

Textile Research Journal, 1975年, Vol. 45, No. 1, p. 67-75

Textile Research Journal, 1974年, Vol. 44, No. 8, p. 568-573

有機化学合成化学協会誌, 1968年, Vol. 26, No. 10, p. 890-898

Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 1982年, Vol. 30, No. 1, p. 1-9

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07D251/70, C07D251/50, C07K1/22, B01D15/08

REGISTRY(STN), CA(STN)