

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-516928
(P2004-516928A)

(43) 公表日 平成16年6月10日(2004.6.10)

(51) Int.Cl.⁷B01J 47/00
B01D 15/00
B01D 15/04
B01D 15/08
B01J 20/26

F 1

B01J 47/00
B01D 15/00
B01D 15/04
B01D 15/08
B01J 20/26Z
M
H

テーマコード(参考)

4D017
4G066
4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 80 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-554197 (P2002-554197)
 (86) (22) 出願日 平成13年12月17日 (2001.12.17)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年6月26日 (2003.6.26)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2001/014895
 (87) 國際公開番号 WO2002/053252
 (87) 國際公開日 平成14年7月11日 (2002.7.11)
 (31) 優先権主張番号 0004932-0
 (32) 優先日 平成12年12月31日 (2000.12.31)
 (33) 優先権主張国 スウェーデン(SE)

(71) 出願人 597064713
 アメリシャム・バイオサイエンシーズ・ア
 クチボラグ
 Amersham Biosciences Aktiebolag
 スウェーデン国エスエー-751 84
 ウプサラ
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 葵
 (74) 代理人 100067035
 弁理士 岩崎 光隆
 (74) 代理人 100064610
 弁理士 中嶋 正二
 (74) 代理人 100072730
 弁理士 小島 一晃

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】混合モード吸着のための方法および混合モード吸着剤

(57) 【要約】

イオン交換により水性液体から物質を除去する方法であって、液体に存在する該物質を供給すること；少なくとも二つの異なるリガンドを含む吸収マトリックスを供給すること；物質をマトリックスへ吸着させるのに十分な期間および条件下に液体をマトリックスと接触させること；ならびに物質をマトリックスから脱着させる溶離剤を加えることを含む、方法。リガンドのそれぞれ一つは吸着工程の間物質と相互作用し、そして少なくとも一つのリガンドは荷電され、物質とイオン的相互作用をする能力がある。方法は、陽イオン交換もしくは陰イオン交換として操作され得る。物質の脱着は、増加するイオン強度を含む溶離剤を加えることにより実施される。本発明はまた、分離手順で使用されるとき同じ種類の物質と相互作用する少なくとも二つの構造的に異なるリガンドを含む吸着剤を包含する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

イオン交換により水性液体から物質を除去する方法であって、該方法は：

- 該物質が荷電状態で存在する、液体を提供する；
- 少なくとも一つの弱イオン交換体もしくは少なくとも一つの強イオン交換体を含む、少なくとも二つの構造的に異なるリガンドを含む吸着マトリックスを提供する；
- 物質をマトリックスへ吸着させるのに十分な期間で液体をマトリックスと接触させる；そして
- 物質をマトリックスから脱着させる溶離剤を加える；

工程を含み、

そこではそれぞれのリガンドは吸着工程の間に物質と相互作用し、そして少なくとも一つの該リガンドが荷電されてかつ物質とのイオン相互作用の能力がある、方法。

【請求項 2】

一つの荷電リガンドは陰イオン交換体でありそして除去される物質は始めは負に荷電されていて、吸着条件は陰に荷電した物質の $pH > pI$ によりおよびリガンドの正に荷電した基の $pH < pKa$ により規定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

物質についての吸着容量は、本質的にすべての荷電基が第四級アンモニウム基 (q-基) である対応する参照イオン交換体における同じ物質の吸着容量の 200% のような 100% である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

物質の脱着が増加するイオン強度勾配を含む溶離剤を加えることにより実施される、請求項 2 もしくは 3 に記載の方法。

【請求項 5】

一つの荷電リガンドは陽イオン交換体でありそして除去される物質は始めは正に荷電されていて、吸着条件は正に荷電した物質の $pH < pI$ によりおよびリガンドに対応する陰性の酸の $pH > pKa$ により規定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

物質についての吸着容量は、本質的にすべての荷電基がスルホプロピル基である対応する参照イオン交換体における同じ物質の吸着容量の 200% のような 100% である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

物質の脱着が増加するイオン強度を含む溶離剤を加えることにより実施される、請求項 5 もしくは 6 に記載の方法。

【請求項 8】

吸着が 0.10M NaCl、好ましくは 0.20M NaCl もしくは 0.30M NaCl の水溶液のイオン強度より高いかまたは同一なイオン強度において実施される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

リガンドが 0.25M NaCl に相当するイオン強度において水性参照液体中で興味のある物質を結合させる能力がある、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

少なくとも一つのリガンドは疎水性および / もしくは電子供与体 - 受容体相互作用により物質と相互作用する請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

該リガンドは荷電可能でありそしてマトリックスから物質の脱着は pH スイッチにより実施される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

溶離剤の極性は、物質が除去される水性液体のそれより低い、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

20

30

40

50

【請求項 1 3】

少なくとも一つのリガンドは、

(c) 物質との電荷 - 電荷引力的相互作用を与える第一のモード部位、および
(d) 物質との電荷 - 電荷引力的相互作用ならびに / または疎水性相互作用および / もしくは電子供与体 - 受容体相互作用を与える第二のモード部位
を含む混合モードリガンドである、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法であって、それは液体から生体高分子構造の除去のためのものであり、その構造は炭水化物構造、ペプチド構造、ペプチド核酸 (PNA) 構造および核酸構造から成る群から選択される、方法。 10

【請求項 1 5】

その電荷が pH - 依存性である生体高分子の除去のためのものである、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

両性物質の除去のためである、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法での使用に適する吸着剤であって、それは分離される物質との電子供与体 - 受容体相互作用に関与する少なくとも一つの官能基を含む第一および第二のリガンドを含み、その官能基は：

(i) 以下のような供与体原子 / 基：

- ・ ヒドロキシ、エーテル、ニトロ、カルボキシのようなカルボニル、エステル (-O- および -CO-O-) ならびにアミドにあるような、自由電子対を持つ酸素、
- ・ チオエーテル (-S-) にあるような、自由電子対を持つ硫黄、
- ・ アミン、スルホンアミドを含むアミドにあるような、自由電子対を持つ窒素、
- ・ ハロゲン (フッ素、塩素、臭素およびヨウ素)、ならびに
- ・ s p - および s p² - 混成炭素、または

(i i i) 受容体原子 / 基、即ち、金属イオン、シアノ、ニトロ中の窒素、例えば HO- (ヒドロキシ、カルボキシ等)、-NH- (アミド、アミン等)、HS- (チオール等) 等にあるような陰性原子に結合した水素のような、電子不足原子もしくは基

から成る群から選択される、吸着剤。 30

【請求項 1 8】

任意の対のセットについて置換度の間の比率は 0.02 ~ 50 以内である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

少なくとも支持マトリックスの部分において、第一および第二のリガンドが、それらがお互いにに関して本質的に無作為に存在するように導入されている、請求項 1 7 もしくは 1 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は、電荷を帯びておりかつ水性液体 (I) 中に存在する物質を除去する方法に関する。この方法は、

(i) 液体をイオン交換吸着剤 (1) と、吸着剤と物質の間に結合をさせる条件下に、接触させ、そして

(i i) 液体 (II) の使用により該物質を吸着剤から脱着させる工程を含む。

【0002】

本発明はまた、新規でかつ革新的な方法に使用され得る新規なイオン交換吸着剤に関する。

本発明の吸着剤は、同じベースマトリックス上で結合される二つもしくはそれ以上の異なる

10

20

30

40

50

るリガンドを含有する。リガンドは機能性および／もしくは構造元素に関して異なる。用語“混合モードリガンド”および“二項リガンド”とは、結合される物質と相互作用する少なくとも二つの異なるが共同的な部位を供給する能力のあるリガンドをいう。これらの部位は機能性および／種類に関して異なる。

【0003】

典型的に、荷電物質は生物有機性および／もしくは両性である。物質中の荷電基の数に関しては、もし一つ、二つもしくはそれ以上の正に荷電した基および／または一つ、二つもしくはそれ以上の負に荷電した基のように、二つもしくはそれ以上の荷電した基があれば、最大の利点が得られる。物質の分子量に関しては、もし分子量が、5,000ダルトン以上もしくは10,000ダルトン以上のように、1,000ダルトン以上であれば、最大の利点が得られる。

【0004】

背景技術

上で規定した方法としては、充てんもしくは流動床の形状で一体構造のまたは粒子の吸着剤を使用するクロマトグラフィー手順および典型的に粒子吸着剤のみを含むバッチ様手順が挙げられる。一体構造の吸着剤としては、多孔性膜、多孔性プラグおよびまた管壁ならびに他の形状の一体型マトリックスが挙げられる。この手順の目的は、電荷を帯びている物質を精製することであろうが、この場合には物質は工程(i)の間に吸着剤に結合されるようになり、そして、必要であれば、吸着剤からの脱着後にさらに精製される。もう一つの目的は、液体(I)から物質を、それがその中では望ましくない成分であるという理由で、除去することである。後者の場合には、液体を工程(i)の後でさらに処理してもよい。両方の場合において、およびそのように望まれるならば、吸着剤を結合された物質の脱着後に再使用してもよい。

【0005】

他の使用は、電荷を帯びている物質もしくは液体(I)に残存する物質のどちらかを測定することを伴うアッセイ手順である。

【0006】

二種類以上のリガンドで機能化されている吸着剤を記述する、数多くの出版物がある。

・ WO 9600735、WO 9609116およびUS 5,652,348 (Burton等)は、疎水性相互作用に基づく分離方法および基材を開示する。一つの実施態様において、基材はイオン化できるおよびイオン化できないリガンドの両方を含有してもよい。主なアイディアは、充てんを疎水性相互作用を促進する条件下で行い(中性の炭化水素リガンド)そして、吸着されたタンパク質に比較して反対の電荷でリガンドを荷電させるために(反発)、脱着をpHスイッチにより行うことである。かくして、WO 00/69872はマトリックス上で二つのリガンドを利用し、それらの一つは吸着の間に核酸と相互作用をしていて、そして他の一つは核酸の反発によるその脱着のために利用される。

・ Burton et al., Biotechnology and Bioengineering 56(1) (1997) 45-55は、(a)荷電できるが吸着の間には本質的に変化しない芳香族炭化水素リガンド(第二級アミン/アンモニウム)、もしくは

(b)荷電できない芳香族リガンドプラス未反応のスペーサーに対応する別の陽イオン交換リガンド(-COO⁻/COOH)(芳香族リガンドを導入するために使用されている)

を含む吸着剤上でキモシンを精製する試みを記載している。

・ Issaq et al., J. Liq. Chromatogr. 11(14) (1988) 2851-2861; Floyd et al., Anal. Biochem. 154 (1986) 570-577; and Buzewski et al., J. Liq. Chrom. & Rel. Technol. 20(15) (1997) 2321-2325は、二種類のリガンド(イオン-交換リガンドおよび疎水性(ア

10

20

30

40

50

ルキル) 相互作用リガンド) で誘導体化したシリカ粒子のクロマトグラフィー的性質を記載している。

・ Teichberg, J. Chromatog. 510 (1990) 49-57 10
は、正に荷電したリガンドが、加えてまた正に荷電した反発リガンドを保有する吸着剤上で中性のアフィニティーリガンドと相互作用しているアフィニティー反発クロマトグラフィーを記載している。

・ WO 9839094 (Amersham Pharmacia Biotech AB) および WO 9839364 (Amersham Pharmacia Biotech AB) は、一つの実施態様として、表面層中に一種類の荷電したリガンドがある一方で、ビーズの内部は反対の電荷を持つリガンドで機能化されているビーズを開示している 10。ビーズは生体分子の吸着用に提案されている。

・ 分離マトリックス上にアフィニティーリガンドの導入は、カップリング反応における非能率のために二種類以上の基および/もしくは残渣基をしばしば導入することは公知である。塩化N,N-ジエチルアミノエチルの多糖マトリックスとの反応は、例えば、典型的に(a)一つの第三級アンモニウム基のみを含有するリガンドを(b)第三級および第四級アンモニウム基の両方を含有するリガンドと一緒に導入する。我々の知る限りでは、高い塩濃度を含むイオン交換条件における異常に高いブレイクスルー容量は、このタイプの従来のイオン交換体については決して報告されていない。Burton et al., Biotechnology and Bioengineering 56 (1) (1997) 45-55 20 と比較されたい。

【0007】

発明の目的

本発明の目的は：

a) 比較的高いイオン強度においてイオン交換リガンドを有する吸着剤への、タンパク質のような、荷電物質の吸着/結合を達成すること；

b) 標的物質を結合する十分な容量を保持しながら、低減したリガンド含量を有することができるイオン交換基材を提供すること；

c) イオン交換体へ吸着/結合した物質の広範なイオン強度区間内で溶出/脱着を可能にすること、即ち選択性を増加させること；

d) 高いブレイクスルー容量 (典型的には、> 2 mg / 未乾ゲル ml、300 cm / 時間ににおける流動で 10 % ブレイクスルー)、タンパク質の良好な回収率 (しばしば 95 % もしくはそれ以上) 等を有するイオン交換体をデザインすること； 30

e) 高い塩濃度においてイオン交換により結合していて、そしてクロマトグラフィー的性質の著しい損失無しに、アルカリ性 (pH 13) および/もしくは酸性 (pH 3) 溶液での再生ならびに/または洗浄に耐えることができるイオン交換体をデザインすること；

f) 低いイオン強度を必要とするプロセスで用いられるべき比較的高いイオン強度を持つ試料の広範な希釈を不要にすること；

g) 簡略化脱塩手順を提供すること；

h) 例えば、生産性を改良しおよび/もしくはプロセス装置および投資のコストを低減させるために、イオン交換体を必要とする簡略化プロセスを提供すること； 40

i) 例えば、イオン交換体上で 1 リットルより多い試料量 (= 液体 (I)) が添加されて処理される大規模のプロセスにおいて、分取応用に適用されるイオン交換体を提供すること；

j) イオン交換工程後の疎水性相互作用吸着のような、高い塩濃度におけるイオン交換体吸着剤の溶出に基づく分離原理の新規な組合せのための機会を提供することである。

【0008】

一つもしくはそれ以上のこれらの目的は、比較的高い塩濃度でかつ比較的高いイオン強度で吸着するイオン交換体は利点を有することの認識に基づいている。これは、主として脱

10

20

30

40

50

着を達成するために高い塩濃度および高いイオン強度を利用する、伝統的なイオン交換体に反対である。

【0009】

本発明の概要

上述の一つもしくはそれ以上の目的は、添付の特許請求の範囲で規定されるよな方法を用いて達成され得る。かくして、本発明はイオン交換により水性液体から物質を除去する方法に関し、該方法は：

- 該物質が荷電状態で存在する、液体を提供する；
- 少なくとも一つの弱イオン交換体もしくは少なくとも一つの強イオン交換体を含む、少なくとも二つの構造的に異なるリガンドを含む吸着マトリックスを提供する；
- 物質をマトリックスへ吸着させるのに十分な期間で液体をマトリックスと接触させる；そして
- 物質をマトリックスから脱着させる溶離剤を加える；

工程を含み、

そこではそれぞれのリガンドは吸着工程の間に物質と相互作用し、そして少なくとも一つの該リガンドが荷電されてかつ物質とのイオン相互作用の能力がある。

【0010】

したがって、本発明は、二つのリガンドを使用するが一つだけが核酸を吸着するのに有効である、WO 00/69872と比較して、吸着の間に興味のある物質と両方が有効に相互作用する二つのリガンドを使用する。

【0011】

さらに、本発明は主としてイオン相互作用を利用するので、本方法は、疎水性相互作用が利用される、上で議論したWO 96/09116とはまた異なる。たとえ該WO 96/09116における実験は同じ条件を用いて幾つかのリガンドを試験するとしても、それぞれのものは単独で、組合せでなく試験され、それ故にただ一つのリガンド吸着剤がそこでは提案されている。さらに、この参照体の溶出は、疎水性相互作用クロマトグラフィーによる場合が典型的にそうであるように、塩濃度を低下させることにより実施される。反対に、本発明は溶出に塩濃度の増加を利用して、これは本吸着の主な相互作用はイオンタイプであることを示す。

【0012】

一つの実施態様において、少なくとも一つの荷電リガンドは陰イオン交換体であり、そして除去される物質は始めは負に荷電されていて、吸着条件は陰に荷電した物質の $pH > pI$ によりおよびリガンドの正に荷電した基の $pH < pKa$ により規定される。本発明による利点は、この吸着効率が予期しないほど高いと示されていることである。かくして、負に荷電した物質についての吸着容量は、本質的にすべての荷電基が第四級アンモニウム基 (q^- 基) である対応する参照イオン交換体における同じ物質の吸着容量の 100%、および 200% さえと高い。

【0013】

もう一つの実施態様において、少なくとも一つの荷電リガンドは陽イオン交換体であり、そして除去される物質は始めは正に荷電されていて、吸着条件は正に荷電した物質の $pH < pI$ によりおよびリガンドに対応する陰性の酸の $pH > pKa$ により規定される。ここでは、この物質についての吸着容量は、本質的にすべての荷電基がスルホプロピル基である対応する参照イオン交換体における同じ物質の吸着容量の 100%、および 200% さえと高い。

【0014】

本文脈において、吸着容量は、本出願において時々使用されているブレイクスルー容量と同じ変数を指すことを理解すべきである。動的吸着容量は、水性液体が吸着剤を通過するようにされる、クロマトグラフィー手順における容量を指す。同様に、静的吸着容量はバッチ手順の文脈で使用される。

【0015】

10

20

30

40

50

本方法の一つの実施態様において、吸着は、0.10M NaCl、好ましくは0.20M NaClもしくは0.30M NaClの水溶液のイオン強度より高いかまたは同一のイオン強度において実施される。

もう一つの実施態様において、リガンドは、0.25M NaClに相当するイオン強度において水性参照液体中で興味のある物質を結合させる能力があることを特徴とすることができます。

【0016】

特異的な実施態様において、少なくとも一つのリガンドは疎水性および／もしくは電子供与体・受容体相互作用により物質と相互作用する。該リガンドは好ましくは荷電可能であり、そしてマトリックスから物質の脱着はpHスイッチにより実施される。

10

本方法のなおもう一つの実施態様において、溶離剤の極性は、物質が除去される水性液体のそれより低い。

【0017】

有利な実施態様において、本方法は液体から生体高分子構造の除去のためのものであり、この構造は炭水化物構造、ペプチド構造、ペプチド核酸(PNA)構造および核酸構造から成る群から選択される。特異的な実施態様において、この方法は、その電荷がpH-依存性である生体高分子の除去のためのものである。

本方法をまた、両性物質の除去のために使用することができる。

【0018】

本発明はまた、少なくとも二つのリガンドを含み、そして少なくとも一つのリガンドは混合モードリガンドである、本発明にしたがう方法での使用に好適な吸着剤に関する。そのような混合モードリガンドは、

20

(a) 物質との電荷-電荷引力的相互作用を与える第一のモード部位、および
(b) 物質との電荷-電荷引力的相互作用ならびに／または疎水性相互作用および／もしくは電子供与体・受容体相互作用を与える第二のモード部位
を含むであろう。

【0019】

一つの実施態様において、本吸着剤は、分離される物質との電子供与体・受容体相互作用に関与する少なくとも一つの官能基を含む第一および第二のリガンドを含み、その官能基は：

30

(i) 以下のような供与体原子／基：

- ・ ヒドロキシ、エーテル、ニトロ、カルボキシのようなカルボニル、エステル(-O-および-CO-O-)ならびにアミドにあるような、自由電子対を持つ酸素、
- ・ チオエーテル(-S-)にあるような、自由電子対を持つ硫黄、
- ・ アミン、スルホンアミドを含むアミドにあるような、自由電子対を持つ窒素、
- ・ ハロゲン(フッ素、塩素、臭素およびヨウ素)、ならびに
- ・ s p - および s p² - 混成炭素、または

(ii) 受容体原子／基、即ち、金属イオン、シアノ、ニトロ中の窒素、例えばHO-(ヒドロキシ、カルボキシ等)、-NH-(アミド、アミン等)、HS-(チオール等)等にあるような陰性原子に結合した水素のような、電子不足原子もしくは基から成る群から選択される。

40

【0020】

一つの実施態様において、吸着剤において任意の対のセットについて置換度の間の比率は0.02～5.0以内である。一つの実施態様において、少なくとも支持マトリックスの部分において、第一および第二のリガンドは、それらがお互いに關して本質的に無作為に存在するように導入されている。

【0021】

本発明の第一の態様

以下に、本発明を、理解を容易にし、さらに種々の実施態様を例示するために、番号を付けた工程を参照してさらに詳しく説明する。かくして、本発明者が発見していることは、

50

もしイオン交換吸着剤(1)が、

(a)少なくとも一つのリガンドは液体(I)により与えられる条件下で物質上に存在する電荷に反対の電荷を有し、

(b)それぞれのリガンドは、液体(I)により与えられる条件下での結合のために物質と相互作用する能力がある、

少なくとも二つの異なるリガンド(リガンド1、リガンド2)で機能化されているベースマトリックスを含むことを特徴とするイオン交換吸着剤の中で選択されるならば、序言の部で規定されたプロセスにより一つもしくはそれ以上の上記目的を達成することができる

ことである。
相互作用は、他のリガンドのいずれかに関して独立したもしくは共同的な様式のどちらかにある。

【0022】

本発明の文脈で意図される典型的なリガンドの分子量は、<700のような<1000ダルトンである。存在し得るハロゲンの分子量の寄与はこれらの範囲に含まれていない。

【0023】

リガンド1は荷電リガンドである、即ち、工程(i)で与えられる条件下に電荷を帯びている、単一および混合モードリガンドから選択される(第一カテゴリー)。

リガンド2は、リガンド1と比較すると異なる種類の、例えば、

(a)電荷-電荷引力的相互作用を伴わないように相互作用する能力がある(第二カテゴリー)、即ち工程(i)で与えられる条件下で荷電されないリガンド、もしくは

(b)電荷-電荷相互作用による相互作用を可能にするがリガンドに比較して異なる種類を持つ電荷を有する、即ち第一カテゴリーから選択される

リガンドである。

(a)については、相互作用はファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用および/もしくは電子供与体-受容体相互作用を含んでもよい。

【0024】

発明の方法で使用されるべきイオン交換吸着剤のもう一つの特徴的な特色は、リガンドの組合せは、吸着剤が:

(A)0.25M NaClに相当するイオン強度において水性参照液体中で興味のある物質を結合させる能力がある;そして

(B)物質が該電荷を有する、pH区間2~12の部分区間ににおいて、

(a)本質的に全ての荷電リガンドがQ-リガンドである、対応する陰イオン交換体(吸着剤2a);もしくは

(b)本質的に全ての荷電リガンドがSP-リガンドである、対応する陽イオン交換体(吸着剤2b)

に対する物質のブレイクスルー容量の、200%もしくは300%もしくは500%もしくは1000%のような、100%の物質に対する最高ブレイクスルー容量を可能にする

ように選択されている(置換のタイプおよび度にしたがって)ことである。

【0025】

用語“SP基”は、アリル基を亜硫酸水素塩と反応させることにより得ることができるスルホプロピル基を意味する、即ちSP基としては、-CH₂CH₂CH₂SO₃-およびそのスルホン酸異性体が挙げられる。

用語“Q基”は、-OCH₂CH(OH)CH₂OCH₂CH=CH₂をハロゲンと反応させた後トリメチルアミンと反応させることにより得ることができる第四級アンモニウム基を意味する、即ちQ基としては、-OCH₂CH(OH)CH₂OCH₂CH(OH)CH₂N+(CH₃)₃および第四級トリメチルアンモニウム基を含有するその異性体が挙げられる。

【0026】

吸着剤2aは物質上の電荷が負であるときに、そして吸着剤2bは物質上の電荷が正であ

10

20

30

40

50

るときに使用される。水性参照液体は、NaCl、緩衝剤および電荷を帶びている興味ある物質を含有する。

【0027】

上の比較とは、イオン交換体(1)および(2a)ならびにイオン交換体(1)および(2b)について本質的に同じ条件下で実施される測定をいう、即ち、pH、温度、溶媒組成、流速等は(1)および(2a)の間でならびに(1)および(2b)の間で同じである。ブレイクスルー容量は、流動において物質の同じ相対濃度で(例えば、 $c/c_0 = 300 \text{ cm} / \text{時間の流速} \times 10\% = c/c_0$ については実験の部を参照)測定される。

【0028】

“対応する陰イオン交換体/陽イオン交換体”は、支持マトリックスが同じであることを意味する、即ち、支持材料、ビーズ径、孔径、孔容積、充てん手順等は同じである。イオン交換体1の一つ以上の荷電リガンドについての全置換度は参照イオン交換体(2a)もしくは(2b)(それぞれ、塩化物およびナトリウムイオンとして測定される)におけるのと本質的に同じである。対イオンもまた同じであるべきである。スペーサーおよびカップリング化学は異なってもよい。特定の種類のカップリング化学は支持マトリックスの架橋に至り、さらに硬質のマトリックスをもたらすかもしれない。この場合には、比較を行う流れの条件はマトリックスが本質的に非圧縮されているレベルで選択される。

【0029】

典型的には、物質に対する有用なブレイクスルー容量は、物質が(a)0.18~0.25mmol/gelmlの塩化物イオン容量を有する、市販で入手可能な陰イオン交換体であるQ-Sephadex Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)および/もしくは

(b)0.18~0.25mmol/gelmlのナトリウムイオン容量を有する、市販で入手可能な陰イオン交換体であるSP-Sephadex Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)の上に有する最高ブレイクスルー容量より高い。

【0030】

これら二つの参照イオン交換体におけるベースマトリックスはビーズ化形状のエピクロロヒドリン架橋アガロースである。ビーズは45~165μmの区間の直径を有する。球状タンパク質についての排除限界は 4×10^6 である。

【0031】

実用的見地から、上のことは、問題の物質に対するブレイクスルー容量は、300cm/時間の流速でかつ0.25M NaClにおいて10%のブレイクスルーについて、 $> 4 \text{ mg} / \text{未乾ゲル ml}$ のようなくらいであるべきであることを意味する。ブレイクスルー容量とは、室温、即ち約25℃で行われる測定を指す。

【0032】

同じ試薬および条件の使用により、例えば同じ条件を通して並列に、導入されるリガンドは、たとえそれらが構造的に異なっていても、同じ種類であると考えられる。特にこれは、形成されるリガンドが異性体であるときに、当てはまる。

【0033】

これらの基を最少化するために大過剰の誘導化試薬を使用した後でさえ残存基(未反応基)であるリガンドは非存在と考えられる。典型的には、このタイプの基は、誘導化される基の出発量に比較して5%以下のように10%以下のモル量で存在する。

典型的には、異なるリガンド間のモル比は0.01~100の区間、しばしば優先して0.02~50の区間、の中にある。

【0034】

第一カテゴリー：工程(i)で与えられる条件下で電荷を帶びている単一および混合モードリガンド

10

20

30

40

50

このカテゴリーのリガンドは、荷電した原子もしくは基および／または最も近接した1～3原子のような、最も近接した1～7原子の一つもしくはそれ以上に關して異なり、それらは：

(a) 正に荷電している種々の窒素；例えば、第一級アンモニウム、第二級アンモニウム、第三級アンモニウム、第四級アンモニウムおよびアミジニウム；

(b) 正に荷電している種々の硫黄；例えば、スルホニウム；

(c) 負に荷電している種々の酸素；例えば、カルボキシレート(-COO⁻)、ホスホネートもしくはホスフェート(それぞれ、-PO₃²⁻、-P(OH)O₂⁻および-OPO₃²⁻)、スルホネートもしくはスルフェート(それぞれ、-SO₃⁻および-O₂S⁻)、-アリール-O⁻(フェノレート／アリーロレート)等のような基の中の酸素

である。

自由結合(原子価)は、基をベースマトリックスに取り付ける鎖の一部である炭素に直接結合する。

【0035】

異なる種類の荷電リガンドの概念はまた相違を含み、それらは：

(i) 上の(a)および／もしくは(b)の荷電原子は線状もしくは環状構造の一部であり、または環状構造は芳香族もしくは非芳香族でありそして／または4-、5-、6-、7-、8-員等の環を含む、

(ii) 上の(a)もしくは(b)の荷電原子または上の(c)の荷電基に連結する鎖は、これらの原子／基に隣接して、炭素原子および／もしくはヘテロ原子のタイプに關して異なる1～3個の原子の一部を有する、

(iii) リガンドは单一もしくは混合モードリガンドであることである。

(i) で概説した相違は、全てもしくは一部の炭素原子はsp³-、sp²-およびsp-混成炭素の中で選択されること、またはチオエーテル硫黄、エーテル酸素およびハロゲンから選択されるヘテロ原子は存在してもしなくてよいことを含む。

【0036】

リガンドはpKa値に關して異なってもよい。適切な相違は、典型的に、1もしくは2pH単位のように、0.5pH単位である。

pH-依存性の電荷を有するリガンドは酸型および塩基型で存在する。以下のことはpH-依存性の電荷を有するイオン交換リガンドに當てはまる：

a) イオン交換リガンドおよびその対応する塩基の両方は、液体(I)のpHがpKa+2である限り同じ種類のリガンドであると考えられる。

b) イオン交換リガンドおよびその対応する酸の両方は、液体(I)のpHがpKa-2である限り同じ種類のリガンドであると考えられる。

pKaは、(a)リガンド(選択肢a)もしくはリガンドに相当する酸(選択肢b)のpKaを意味する。もし液体(I)のpHがこれらの判定基準に適合しなければ、リガンドの荷電型は非-本質的な量で存在する。

【0037】

用語“单一モード荷電リガンド”は、荷電原子(上のaもしくはb)または荷電基(上のc)をベースマトリックスに連結する鎖が、そのような原子もしくは基から7原子の距離以内にあるsp³-混成炭素および单一のエーテル酸素から選択される原子から成ることを意図する。鎖に付いた他の基は主として水素および／もしくはヒドロキシ、ならびにもしかするとまたメチルおよびメトキシである。正の窒素原子は、例えば、水素および／またはメチルもしくはエチルのような低級アルキル(C₁～₅)の中で選択される他の基と結合する。正に荷電した硫黄原子については、これらの追加的な基は、メチルもしくはエチルのような低級アルキル(C₁～₅)の中で主として選択される。

【0038】

用語“混合モード荷電リガンド”は、荷電原子(上のaもしくはb)からまたは荷電基(

10

20

30

40

50

上の c) から 7 原子の距離以内にあるリガンドが、上で規定したような疎水性相互作用および／もしくは電子供与体 - 受容体相互作用に関与することができる一つ、二つもしくはそれ以上の原子または基を、これらの原子または基は単一のエーテル酸素、単一のヒドロキシもしくは $s\ p^3$ - 炭素でないという条件で、有することを意図する。典型的には、距離は 1、2、3、4 原子である。

【 0 0 3 9 】

疎水性相互作用としては、リガンドの純粹な炭化水素基と物質の疎水性即ち脂質様基の間の相互作用が挙げられる。適当な純粹な炭化水素基は、2、3、4、5、6 もしくはそれ以上の炭素原子（純粹なアルキル、純粹なアリール、純粹なアラルキル、純粹なアルキルアリール、純粹なアルケニル、純粹なアルキイニル等および二つもしくはそれ以上の自由結合（原子価）を含む対応する基）を含む。ファンデルワールス相互作用は、疎水性相互作用の重要な部分であるであろう。

10

【 0 0 4 0 】

電子供与体 - 受容体相互作用としては、水素結合、-、電荷移動等のような相互作用が挙げられる。電子供与体 - 受容体相互作用は、自由電子対を持つ陰性原子が供与体として作用して、供与体の電子対に対する受容体として作用する電子不足原子に結合することを意味する。電子供与体 - 受容体相互作用に関する議論については、K a r g e r e t a l . 、「分離科学入門」、J o h n W i l e y & S o n s (1 9 7 3) 4 2 頁を参照されたい。

20

【 0 0 4 1 】

供与体原子 / 基の例示的な例は：

- (a) ヒドロキシ、エーテル、カルボニルおよびエステル (- O - および - CO - O -) ならびにアミドにあるような、自由電子対を持つ酸素、
- (b) チオエーテル (- S -) にあるような、自由電子対を持つ硫黄、
- (c) アミン、スルホンアミド、カルバミド、カルバメート、アミジン等を含むアミド、シアノにあるような、自由電子対を持つ窒素、
- (d) ハロゲン（フッ素、塩素、臭素およびヨウ素）、ならびに
- (e) $s\ p$ - および $s\ p^2$ - 混成炭素

である。

典型的な受容体原子 / 基は、金属イオン、シアノ、ニトロ中の窒素のような、電子不足原子もしくは基であり、そしてまたヒドロキシおよびカルボキシにある HO^- 、アミドおよびアミンにある $- NH^-$ 、チオールにある HS^- 等のような陰性原子に結合した水素を含む。

30

【 0 0 4 2 】

供与体および受容体の原子もしくは基は、

- ・ 荷電原子もしくは荷電基をベースマトリックスに連結する鎖、
- ・ 該鎖に結合した分枝、または
- ・ 荷電した原子もしくは基（特に陰イオン交換基 / リガンドについて）に直接結合した別の置換基

の中に位置し得る。

40

電子供与体 / 受容体の原子もしくは基は、リガンドをベースマトリックスに連結する鎖に結合した分枝中にそして荷電原子もしくは荷電基から 7 もしくはそれ以上の原子の距離において存在し得る。そのような場合には、完全な分岐は別のリガンドと考えられる。

【 0 0 4 3 】

特に興味深い混合モード荷電リガンドは、荷電した原子もしくは基の上述の距離以内に、チオエーテル (- S -) および / または、芳香族炭素のような、 $s\ p^2$ - 混成炭素を有する。例えば、我々の同時係続国際特許出願の P C T / E P 0 0 / 1 1 6 0 5 (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) および P C T / E P 0 0 / 1 1 6 0 6 (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) (両方とも陰イオン交換リガンドに言及する) 、ならびに 2 0 0 0 年 7 月 1 7 日に出願した S E 0 0 0 2 6

50

88-0(陽イオン交換リガンド)およびWO 996507(Amersham Pharmacia Biotech AB)(陽イオン交換リガンド)を参照されたい。WO 9729825(US 6,090,288)(Amer sham Pharmacia Biotech AB)は、一つもしくはそれ以上のヒドロキシおよび/または、第一級、第二級もしくは第三級アンモニウム窒素から2~3炭素の位置におけるアミノ/アンモニウム窒素を有する混合モード陰イオン交換リガンドを開示している。本特許の方法で潜在的に有用である混合モードイオン交換リガンドは、WO 9808603(Upt front Chromatography)、WO 9600735、WO 9609116およびUS 5,652,348(Burton等)に記載されている。このパラグラフで参照した全ての出版物は出典明示により本明細書の一部とする。 10

【0044】

上で意図したチオエーテル(-S-)において、自由結合(原子価)のそれぞれは、芳香族もしくは非芳香族であってもなくともよい環状構造の部分であってもなくともよいsp²-もしくはsp³-混成炭素に結合する。ここで意図したような用語“チオエーテル”はかくしてチオフェンおよび環原子として硫黄を含む他の複素環式芳香族環を含む。上述の距離以内に3、4、5もしくはそれ以上の炭素原子を含むアルキルタイプの純粹な炭化水素基もまたあり得る。 20

【0045】

上で意図した芳香族環構造は、一つもしくはそれ以上の芳香族環、例えば、フェニル、ビフェニルまたはナフチル構造および縮合環または二環式構造を含む他の芳香族環システムを含んでもよい。芳香族環は、複素環式であっても、即ち一つもしくはそれ以上の窒素、酸素または硫黄を含有してもよく、そして置換基を有してもよい。これら他の置換基は、例えば水素結合および/もしくは他の電子供与体-受容体相互作用を可能にする、電子供与体もしくは受容体の原子または基を含有してもよい。例示的な芳香族環構造は、ヒドロキシフェニル(2-、3-および4-)、2-ベンツイマドゾイル、メチルチオキシフェニル(2-、3-および4-)、3-インドリル、2-ヒドロキシ-5-ニトロフェニル、アミノフェニル(2-、3-および4-)、4-(2-アミノエチル)フェニル、3,4-ジヒドロキシフェニル、4-ニトロフェニル、3-トリフルオロメチルフェニル、4-イミダゾリル、4-アミノピリジン、6-アミノピリミジル、2-チエニル、2,4,5-トリアミノフェニル、4-アミノトリアジニル、4-スルホンアミドフェニル等である。 30

【0046】

好ましい陰イオン交換リガンドのおよび好ましい陽イオン交換リガンドについて対応する酸のpKaは3からおよびそれ以上の区間に見出すことができ、そして、イオン交換リガンドの適切な脱荷電を可能にするために、好ましくは11以下、好ましくは4~9の区間にある。 40

【0047】

特に興味のある陰イオン交換リガンドはpH依存性電荷を有しそして、10.5のような、12.0であるpKa値を有する。これは、これらのリガンドは、好ましくは第一級もしくは第二級アンモニウム基または第三級アンモニウム基の中で選択される荷電基を含むことを意味する。窒素が芳香族構造の部分である第三級アンモニウム基およびその-もしくは-位に芳香族炭素を有するアンモニウム基は、8以下のpKa値を有してもよい。通常、陰イオン交換リガンドのpKaは4のような、3である。 50

【0048】

特に興味のある負に荷電したリガンドはpH依存性電荷を帯びている。対応する酸についてのpKa値は通常4のような、3である。かくして、これらの種類のリガンドは、カルボキシレート(-COO⁻)、ホスホネートもしくはホスフェート(それぞれ、-PO₃²⁻、-P(OH)O₂⁻および-OPO(OH)O₂⁻、-OP(OH)O₃²⁻)、-アリール-O⁻(フェノレート/アリーロレート)ならびに他の弱酸基の中で選択される荷電基を含むべきである。 50

【0049】

これは、

- ・ 強酸 (pKa、2もしくは0のような、3) (対応する塩基は陽イオン交換リガンドとして作用する) および
- ・ 弱酸 (pKa、12のような、10、等) もしくはpHに依存しない電荷を帶びているリガンド

に対応するイオン交換リガンドはまた、我々の新しくかつ革新的な脱塩方法で使用されるべきイオン交換体中にそれらが組み入れられるときに、利点を有するであろうことを除外しない。他のイオン交換基については、これらの利点は脱塩される特定の物質の性質、例えは、その等電点およびイオン交換体との相互作用の強度、に依存する。

リガンドのpKa値は、問題のリガンドの50%が滴定されるpHとして得られる。

【0050】

第二カテゴリー：工程(i)で与えられる条件下で荷電されないが望ましい荷電物質と相互作用する能力があるリガンド

主として二種類の荷電されないリガンドがある：即ち

- (a) pHスイッチにより荷電され得るリガンド(クラスI) および
- (b) pHスイッチにより荷電され得ないリガンド(クラスII)

である。

【0051】

クラスIは、pH-依存性電荷を有することができる非荷電型リガンドを含む。上記を参考されたい。

クラスIIリガンドは、上で議論したように、疎水性相互作用および電子供与体-受容体相互作用を引き起こすことができる一つもしくはそれ以上の構造要素を含有する。典型的なクラスIIリガンドにおいては、上で規定したように、二つ、三つ、四つもしくはそれ以上の電子供与体-受容体原子または基がある。それぞれの原子もしくは基は、電子供与体-受容体原子または基から二つ、三つ、四つもしくはそれ以上のお互いに直接連結したs p³-混成炭素だけ離れている。

【0052】

クラスIIのリガンドは、ベースマトリックから突き出ていてかつ先行のパラグラフにおける規定に適合する基の最も外側の部分として規定される。用語“最も外側”は上で規定したようなアルキル基を伴う電子供与体-受容体相互作用にもしくは疎水性相互作用に関与する能力のある最も外側の原子から1~7原子の距離にある原子を意図する。

【0053】

かくして、第二のカテゴリーのそれぞれのリガンドは、リガンドが電子供与体-受容体相互作用および/もしくは疎水性相互作用を可能にする一つまたはそれ以上の原子を含むという条件で、イオン交換体においてリガンド2として使用されることができる。存在し得る原子ならびに/または基の例は：フェニル基を含み、置換もしくは未置換であってよいアリ-ル、純粋なアルキルおよび純粋なアルキレン(C₃およびC₈以下を優先してそれより多く)、チオエーテル、エーテル、未荷電のアミノ、ヒドキシ、アミド(スルホンアミド、カルバミド、カルバメート等を含むカルボキサミド)、ニトロ、スルホン、未荷電のカルボキシ等、である。この種類のリガンドにおいて、直接一緒に連結された二つもしくはそれ以上のs p³-混成炭素原子はしばしば原子または基をお互いから隔てている。

【0054】

確率的イオン交換体における種々のリガンドは、支持マトリックスでもしくはその部分でお互いに關して多少とも無作為に存在し得る。導入方法に依存して、リガンドの量の間の比率は変動してもよいが、マトリックスの実質的な部分において少なくとも二つのリガンドについて常に、0.02~50を優先して、0.01~100でなければならない。支持体内で種々のリガンドの不均一なもしくは層状の分布を達成するために、WO 98 39364 (Amersham Pharmacia Biotech AB) に略述された

一般原理を用いることができる。これら二つの特許出版物で主なゴールである鋭い層が導入されないように、反応性、拡散率およびリガンド形成試薬の濃度に関してしかるべき配慮を取らねばならない。WO 9839364は出典明示により本明細書の一部とする。

p 1 7

【 0 0 5 5 】

特に興味がある確率的イオン交換体は、リガンド1として強イオン交換リガンドをそしてリガンド2としてpHでのスイッチにより荷電/脱荷電され得るリガンドを含む。二つの典型的な組合せは：

(a) リガンド2として弱陰イオン交換リガンドを組合せたリガンド1として強陽イオン交換リガンド、もしくは

10

(b) リガンド1として強陰イオン交換リガンドおよびリガンド2として弱陽イオン交換リガンド

である。

この文脈において、強陽イオン交換リガンドは $pK_a < 3 \sim 4$ を持つ対応する酸を有する。強陰イオン交換リガンドの例は、第四級アンモニウムリガンドおよび、11もしくは12のような $pK_a > 10$ を有する陰イオン交換リガンドである。他の種類のイオン交換リガンドは弱と考えられる。

【 0 0 5 6 】

他の興味ある組合せは、例えば、同じベースマトリックス上で同様な pK_a を持つ二つの異なる弱の陰イオン - もしくは陽イオン - 交換リガンド、または同じマトリックスに結合した弱陰イオン - および弱陽イオン - 交換リガンドを有する確率的イオン交換体である。 pK_a における差が、2、3もしくは4 pH単位より小、より大リガンドまたはと同一であるように、リガンドを選択することができる。

20

【 0 0 5 7 】

異なる種類のリガンドを組合せる最大の利点は両性物質の脱塩に関する。典型的に、リガンドは、一つのリガンドは荷電される(リガンド1)一方で、他の一つ(リガンド2)は工程(i)の間は荷電されないで、工程(ii)の間に放出される物質と同じ電荷で荷電されるようになるような方式で組合される。それは、適切な組合せは脱塩される物質の等電点(pI)に依存することから起る。さらに下を参照されたい。

30

【 0 0 5 8 】

支持マトリックス/ベースマトリックス

支持マトリックスはベースマトリックスおよびベースマトリックスにリガンドを取り付ける任意のスペーサーを含む。

ベースマトリックスは有機のおよび/もしくは無機の材料をベースにする。

【 0 0 5 9 】

ベースマトリックスは、好ましくは親水性でそして、水に不溶性でかつ多少膨潤性であるポリマーの形状にある。親水性になるように誘導化されている疎水性ポリマーはこの規定に含まれる。適当なポリマーは、例えば、アガロース、デキストリン、セルロース、でんぶん、ブルラン等のような多糖をベースにするポリヒドロキシポリマーならびに、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリ(ヒドロキシアルキルビニルエーテル)、ポリ(ヒドロキシアルキルアクリレート)およびポリメタクリレート(例えば、ポリグリシルメタクリレート)、ポリビニルアルコールならびにスチレンおよびジビニルベンゼンをベースにするポリマー、および上述のポリマーに相当する二つもしくはそれ以上のモノマーが含まれるコポリマーのような、完全に合成的なポリマーである。水に可溶性であるポリマーは、例えば、架橋によりおよび吸着もしくは共有結合により、不溶性になるよう誘導化され得る。疎水性ポリマー上に(例えば、モノビニルおよびジビニルベンゼン上に)親水性基を、OHに転換され得る基を示すモノマーの重合により、もしくは、例えば親水性ポリマーのような適当な化合物の吸着による、最終ポリマーの親水性化により、導入することができる。

40

【 0 0 6 0 】

50

ベースマトリックに使用される適当な無機材料はシリカ、酸化ジルコニア、黒鉛、酸化タンタラム等である。

好ましいマトリックスは、シラン、エステル、アミド基およびシリカに存在するそのような基のように、加水分解に対して不安定である基を欠如する。これは特に、使用される液体に直接接觸する基に関して当てはまる。

【0061】

マトリックスは多孔性もしくは非-多孔性であってもよい。これは、マトリックスは、除去される物質（非-多孔性）に十分にもしくは部分的に浸透性である（多孔性）かまたは完全に不浸透性であってもよいことを意味する、即ち、マトリックスは除去される物質について0.40～0.95の区間で K_{av} を有しなければならない。これは、 K_{av} はさらに低く、例えば0.10にまでもしくは、例えば増量剤を有する特定のマトリックスについてはなおより低くてもよいことを除外しない。例えば、WO 9833572 (Amersham Pharmacia Biotech AB) を参照されたい。

【0062】

本発明の特に興味深い実施態様において、マトリックスは、1～1000 μm 、好ましくは高速の応用には5～50 μm で分取目的には50～300 μm の範囲のサイズを持つ不規則なもしくは球状の形状にある。

これに代えて、マトリックスは、管もしくは或る他の種類の容器の壁、多孔性プラグ、多孔性膜またはフィルターのように、一体構造であってもよい。

【0063】

マトリックスは、工程(i)で使用される液体よりも大きい密度を持つビーズ/粒子の形状にあってもよい。この種類のマトリックスは、流動もしくはエクスパンデッド床クロマトグラフィーの、ならびに種々のバッチ様手順の、例えば攪拌タンク中での、大規模操作において特に応用可能である。流動およびエクスパンデッド床手順はWO 9218237 (Amersham Pharmacia Biotech AB) およびWO 9200799 (Kem-En-Tek) に記載されている。

【0064】

用語“親水性マトリックス”は、マトリックスのアクセス可能な表面が、水性液体はマトリックスに浸透できるという意味で、親水性であることを意味する。典型的には、親水性ベースマトリックス上のアクセス可能な表面は、例えば酸素および/もしくは窒素原子を含む、複数の極性基を露出する。そのような極性基の例は、ヒドキシル、アミノ、カルボキシ、エステル、低級アルキルのエーテル(n が整数である、 $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-)_n\text{H}$ のような)である。

【0065】

スペーサーはベースマトリックスで始まり、上で規定したようなリガンドへ伸びる。そのようなスペーサーは伝統的なイオン交換体におけるように従来型であり、かくして、上で議論したように、線状の、分岐した、環状飽和の、不飽和および芳香族の炭化水素基（例えば、1～10個のようないかく、1～20個の炭素原子）を含んでもよい。これらの基は、上で議論したタイプの純粹な炭化水素基、ヒドロキシ基、アルコキシおよびアリールオキシならびに対応するチオ類似体、ならびに/もしくはアミノ基、を含んでもよい。炭化水素基における炭素鎖は、一つもしくはそれ以上の位置においてエーテル酸素およびチオエーテル硫黄により中断されてもよい。また、アミドおよびケトン基におけるようなカルボニル基ならびに加水分解に対して遜色のない安定性を持った基であってもよい。酸素、硫黄および窒素から選択されるせいぜい一つの原子が好ましくは、一つのかつ同じ $s\ p^3$ -混成炭素原子に結合される。

【0066】

スペーサーは、上で議論したように、例えば水素結合に関与することにより、望ましい物質のイオン交換体への結合を強化する、一つもしくはそれ以上の電子供与体もしくは受容体の原子または基を供給し得ることは明らかである。簡単のために、この種類の原子もしくは基はスペーサーの部分と考えられる。また、二つ以上のリガンドを一つで同じスペー

10

20

30

40

50

サーに取り付けてもよい。上の“分岐”を参照されたい。

【0067】

リガンドの密度

本発明で使用される吸着剤のイオン交換リガンドのレベルは、0.005~0.3mmol/マトリックスmlを優先して、0.002~0.5mmol/マトリックスmlのような、0.001~4mmol/マトリックスmlの区間で普通選択される。好ましい範囲は、マトリックスの種類、リガンドの種類、吸着される物質によりとりわけ決定される。表現“mmol/マトリックスml”は水で飽和された十分に沈渣したマトリックスを指す。リガンド密度の範囲は、十分にプロトン化した/荷電した型のマトリックスがナトリウムイオンおよび/もしくは塩化物イオンのような普通の対イオンを結合させる能力を指し、とりわけ、存在する陰イオンおよび/もしくは陽イオンリガンドに依存する。

10

【0068】

最良モード

本発明の最良モードバリエントは興味のある物質により変動する。これまで発見された最良モードは実験の部で提示される。

【0069】

使用されるイオン交換体の安定性

本発明で使用されるイオン交換体/イオン交換リガンドは、イオン交換吸着を含むプロセスで典型的に適用される条件に耐えなければならない。一般側として、これは、本発明にしたがう吸着剤は水中0.1もしくは1M NaOHに少なくとも10時間、全イオン結合容量に本質的に減少なしで、耐えることができなければならないことを意味する。“全イオン結合容量に本質的に減少なしで”は、全イオン結合容量は多くとも10%だけ減少されることを意図する。これは、イオン交換リガンドならびにベースマトリックスは、純粋な炭化水素基(ホモ芳香族および複素環式芳香族構造を含む)、チオエーテルおよびエーテル基(アセタールおよびケタール基を含む)、ヒドロキシ基、スルホン基、カルボキサミド基、スルホンアミド基ならびに同様な加水分解安定性を持つ基の中で選択される構造のみを含有しなければならないことを意味する。

20

【0070】

吸着/脱着

吸着および/もしくは脱着工程を、一体構造の形状での陰イオン交換体マトリックスによるクロマトグラフィー手順としてまたは充てんもしくは流動床の形状での粒子として行ってもよい。粒状のマトリックスについては、これらの工程を、液体中で多少とも完全に分散している粒子によるバッチ様モードで行ってもよい。

30

工程(i)および(ii)で使用される液体は水性、即ち、できれば水混和性溶媒と共に、水である。

【0071】

吸着

吸着の間、荷電物質を含有する液体試料は、好ましくはイオン交換により、吸着(結合)をさせる条件下で上に規定したイオン交換体と接触させられる。換言すれば、物質は、吸着工程(i)の間に荷電される最強の傾向を持つリガンドに比較して反対に荷電される少なくとも一つの基もしくは原子を保有する。

40

【0072】

好ましくは、物質の実効電荷は工程(i)の間イオン交換体の実効電荷に反対である。水性液体中に存在する両性物質については、陰イオン交換条件は典型的に、pH pI - 0.5、好ましくはpH pI、そして陽イオン交換条件は、pH pI + 0.5、好ましくはpH pIを意味する。

【0073】

本発明の利点の一つは、従来のイオン交換体(例えば、上で規定したような参考陰イオン交換体)で通常行われてきたものに比較してより高いイオン強度においてもまた吸着/結合を行うことが可能であることである。絶対的数字では、これは、本発明にしたがう吸

50

着は 15 もしくは 20 mS/cm の上または下のイオン強度で実施され得ることを意味する。イオン強度は 30 mS/cm を越えてもよく、或る場合には 40 mS/cm を越えることさえあり得る。有用なイオン強度はしばしば、0.3 もしくは 0.5 さえのような、0.1 の NaCl 濃度（純水）に相当する。使用される伝導率 / イオン強度は合計のリガンド、マトリックス上のそれらの密度、結合される物質およびその濃度等に依存するであろう。

【0074】

脱着

脱着プロセスは少なくとも一つの以下の手順を含まなければならない：

(A) 塩濃度（イオン強度）を増加させること；

(B) 望ましい物質とリガンドの間の相互作用を緩和するために pH を変えること；

(C) 水性液体 (I) の極性を減少させるリガンド類似体もしくは試薬（例えば溶媒）を加えること。

項 (B) は、(a) 望ましい物質へイオン - イオン引力相互作用により結合するリガンドの電荷を消去すること；および (b) 反対の電荷を有するリガンドへ結合する望ましい物質上の基の電荷を消去することを含んでもよい。pH の変更は、リガンドおよび物質が工程 (i) の間同じ電荷を有するであろうように、何度も行うことができる。

【0075】

(A) ~ (C) で与えられる条件を組合せてもしくは単独で使用してもよい。適切な選択は、

(1) 脱着される物質、

(2) イオン交換体（リガンド、マトリックスの種類、スペーサーおよびリガンド密度）、ならびに

(3) 水性液体 II の種々の変数（濃度、極性、温度、pH 等）

の特定の組合せに依存するであろう。

かくして、水性液体 (I)（吸着緩衝液）を水性液体 (II)（脱着緩衝液）と置換することは、温度、pH、極性、イオン強度、可溶性リガンド類似体等のような変数の少なくとも一つは、脱着が起り得るように他の条件を未変化に保持しながら、変更されねばならないことを意味する。

【0076】

最も簡単な場合には、これは、水性液体 I から水性液体 II へ変更するときに、

(a) イオン強度の増加および / もしくは

(b) 上で概略したように pH の変更

を意味する。選択肢 (a) は pH の低下、一定化もしくは増加を含む。選択肢 (b) はイオン強度の低下、増加もしくは一定化を含む。

【0077】

クロマトグラフィーおよび / もしくはバッチ手順において、脱着される物質を持つマトリックスはカラムもしくは液体 (I) に接触する適当な容器の中に存在する。次いで、液体により与えられた条件が、望ましい物質がマトリックスから溶出されるまで、上述のように変更される。典型的な脱着プロセスは、イオン強度が吸着の間に使用されたものに比較して増加され、そして多くの場合、もし他の変数のどれも変更されなければ、0.6 M NaCl のような、少なくとも 0.4 M NaCl に相当することを意味する。溶出 / 脱着についての実際のイオン強度値は、好みの場合はより低くてもよく、上で議論した種々の要因に依存するであろう。もしもリガンドが適切に選択されるならば、それは、リガンドのおよび / もしくは物質の実効電荷を、それらが反対の種類であるように、変更するためには pH の変更で十分であり得る。これは、塩濃度を使用される緩衝液の濃度と本質的に同じであるように減少させる可能性を意味する。

【0078】

脱着のために増加したイオン強度を用いる必要条件は、水性液体 II により与えられる条件に依存してより厳密でなくてもよい。下を参照されたい。

10

20

30

40

50

液体(Ⅰ)から液体(Ⅱ)への変更は一つもしくはそれ以上の工程で(段階的勾配)もしくは連続的に(連続勾配)達成され得る。マトリックスと接触する液体の種々の変数は、一つずつもしくは組合せて変更され得る。

【0079】

イオン強度を変更するために使用される典型的な塩は、アルカリ金属もしくはアンモニウムイオンの塩化物、リン酸塩、硫酸塩等の中で選択される。

pHを変更するために使用される緩衝成分は関与するリガンドの種類に依存し、典型的には吸着工程の間は同じである。例えば、もしもイオン交換リガンドが陽イオン性であるならば、緩衝する酸-塩基対は、好ましくは、緩衝成分がリガンドに結合できない酸-塩基対、即ち、ピペラジン、1,3-ジアミノプロパン、エタノールアミン等、の中で選択される。同様に、イオン交換リガンドが陰イオン性である場合における緩衝する酸-塩基対は、リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等である。

10

【0080】

脱着はまた、液体(Ⅱ)の極性を吸着液体(Ⅰ)の極性より低い値に調整することにより補佐され得る。これは、液体Ⅱの中に水混和性のおよび/もしくはより少ない親水性の有機溶媒を含有させることにより達成され得る。

【0081】

そのような溶媒の例は、アセトン、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、アクリロニトリル等である。水性液体Ⅱの極性の減少(水性液体Ⅰに比較して)は恐らく脱着を手助けし、かくしてまたマトリックスから物質の放出に必要なイオン強度を減少させる。

20

【0082】

脱着はまた、使用されるリガンドの一つもしくはそれ以上の可溶性構造類似体を含有させることにより補佐され得る。液体(Ⅱ)中の構造類似体の濃度は水性液体(Ⅰ)中のその濃度より高くなければならない。“リガンドの構造類似体”もしくは“リガンドの類似体”は、リガンドと構造的類似性を有し、可溶性型でリガンドおよび除去される物質の間の結合を阻害する能力のある物質である。

【0083】

重要なバリエント

バリエント1：リガンド1はpH-依存性の負電荷を有する陽イオン交換リガンドであり、そしてリガンド2は、荷電され得ないかもしくは相当部分が工程(i)のpHでは未荷電である荷電可能な塩基かのどちらかである。リガンド1に相当する酸のpKaはリガンド2(荷電可能であれば)に相当する酸のpKaより低い。吸着される物質はリガンド2のpKa以上であるpIを有する。液体(Ⅰ)のpHは物質が正の実効電荷を有する、即ちイオン交換体に吸着するであろうように選択される。pHを減少させることにより、物質および恐らくまたリガンド2はプロトン化されて、増加した正電荷を受け取るであろう。これは、中度のpHで物質の放出を助成して、液体(Ⅱ)中で低下した塩濃度において脱着をさせるであろう。

30

【0084】

バリエント2：リガンド1はpH-依存性の正電荷を有する陰イオン交換リガンドを含み、そしてリガンド2は、完全に荷電され得ないかもしくは相当部分が工程(i)のpHでは未荷電である荷電可能な酸型かのどちらかである。リガンド2のpKaはリガンド1のpKaより高い。吸着される(脱塩される)物質のpIはリガンド1のpKaおよびリガンド2のpKaの両方より低い。液体(Ⅰ)(工程(i))のpHは、物質は負の実効電荷を有しそしてリガンド1は、リガンド2が本質的に未荷電である一方で、正電荷を有するようにある。かくして、物質は工程(i)で吸着されるであろう。pHを増加させることにより、リガンド2は負に荷電されるようになるであろうが、これは液体(Ⅱ)中でさらに低い塩濃度における物質の脱着を意味する。

40

【0085】

副態様において、本発明方法は吸着された物質の高回収率、例えば 80% 以上もしくは 90% 以上のような 60% 以上の回収率を可能にする。回収率は、吸着 / 結合工程においてイオン交換体に加えた物質の量に比較して脱着される物質の量である。多くの例において、回収率は、本発明の発明的メリットにしたがい、95% さえを越える、即ち本質的に定量的であることができる。典型的には、イオン交換体に加える物質の量は、物質に対するイオン交換体の全結合容量の、20 ~ 60% のような、10 ~ 80% の区間にある。

【0086】

液体 (I) から除去される物質

本発明は主として、上で規定したリガンドと相互作用できる幾らかの構造ユニットを有する高分子量物質用である。適切な物質は 1000 ダルトン以上である分子量を有し、生物有機であり高分子である。一分子当たりの荷電基の数は典型的に一つもしくはそれ以上であり、pH に依存する。分子量および電荷の数に関するさらなるコメントは見出し “技術分野” に呈示されている。物質は両性でもよい。典型的に、物質はペプチド構造（例えば、オリゴ - もしくはポリペプチド構造）、核酸構造、炭水化物構造、脂質構造、ステロイド構造、アミノ酸構造、ヌクレオチド構造および、荷電されているかもしくは pH - スイッチにより荷電され得る任意の他の生物有機構造の中で選択される、構造を含む。

【0087】

物質は水性基材に溶解され得るかもしくは小さい生物粒子の、例えばコロイドディメンションの、形状にあり得る。生物粒子の例示的な例は、ウイルス、細胞（細菌および他の単細胞生物を含む）ならびに細胞凝集体および細胞小器官を含む細胞の部分である。

本発明は特に、興味のある物質を高濃度の塩と共に含む生物学的流体から得られる水性液体に適用可能であるであろうと信じられている。

【0088】

上で議論したタイプの種類の生物有機物質を含む、高イオン強度の典型的な液体は、例えば細胞の培養からの発酵プロス / 液、およびそれから得られる液体である。細胞は、哺乳動物のような、脊椎動物、または無脊椎動物（例えば、チョウおよび / もしくはそれらの幼虫からの細胞のような培養昆虫細胞）、または微生物（例えば、培養真菌、細菌、酵母等）から由来してもよい。また含まれるのは、植物細胞および、好ましくは培養された、他の種類の生体細胞である。

【0089】

液体 (I) がまた望ましくない異物を含有する場合なら、エキスパンデッド床技術を利用することが有益であろう。これは特に、液体 (I) が (a) 細胞の培養からの発酵プロス / 液、(b) 溶菌細胞を含む液体、(c) 細胞および / もしくは組織のホモジネートを含む液体、ならびに細胞から得られるペーストから由来するときに当てはまる。

【0090】

本明細書で説明されるイオン交換体は、塩濃度が高い水性出発組成物に比較してより低い塩濃度を有する生物有機物質を含む水性組成物の製造には特に良く向いている。この種類のプロセスは問題の物質の脱塩を意味する。この出願に並行して出願して、表題「低濃度の塩を含む組成物の製造方法」を有する我々の S E 特許出願をさらに参照されたい。

【0091】

本発明の第二の態様

この態様は、少なくとも一つのリガンドが pH - 依存性であってもなくてもよい荷電を有する少なくとも二つの異なるリガンド（リガンド 1、リガンド 2）で機能化される支持マトリックスを含むことを特徴とするイオン交換吸着剤の中で選択される、イオン交換吸着剤 (1) を含む。

【0092】

リガンド 1 は荷電されていて、单一もしくは混合モードのイオン交換種類に属し得る。かくして、リガンド 1 は、リガンドがファンデルワールス相互作用および / もしくは電子供与体 - 受容体相互作用に関与することを可能にする中性基を含んでも含まなくてもよい。関与する原子および / もしくは基は本発明の第一の態様について上で規定したのと同じで

10

20

30

40

50

ある。

【0093】

リガンド2は中性であっても荷電していてもよい。荷電していると、このリガンドの荷電した原子もしくは基は典型的に、リガンド1の荷電した原子もしくは基に比較して異なる種類に属する。関連する相違については、本発明の第一の態様を参照されたい。荷電したリガンドは、リガンド1と同じ様式で、単一モードもしくは混合モードのリガンドであってもよい。荷電しているか荷電していないことに無関係に、リガンド2は、上でリガンド1についてかつ本発明の第一の態様について議論したように、リガンドが疎水性相互作用および／もしくは電子供与体-受容体相互作用に関与することを可能にする未荷電の基ならびに／または原子を含み得る。

10

【0094】

この態様のイオン交換体は、オバルブミン、コナルブミン、ウシ血清アルブミン、-ラクトアルブミン、-ラクトアルブミン、リゾチーム、IgG、ダイズトリプシンインヒビター(STI)の中で選択され参照物質の少なくとも一つに対するそれが：

(A) 0.25M NaClに相当するイオン強度を有する水性参照液体中で該少なくとも一つの参照物質を結合させる能力があり；そして

(B) 物質が荷電リガンドに反対の実効電荷を有する、pH区間2～12の部分区間ににおいて、

(a) 物質の実効電荷が負でありそしてイオン交換吸着剤の実効電荷が正であるとき、Q-Sepharose Fast Flow(イオン交換体2a)、ならびに／または

20

(b) 物質の実効電荷が正でありそしてイオン交換吸着剤の実効電荷が負であるとき、SP-Sepharose Fast Flow(イオン交換体2b)

の上で該少なくとも一つの物質のブレイクスルー容量の、200%もしくは300%もしくは500%もしくは1000%のよう、100%である該少なくとも一つの参照物質について最高ブレイクスルー容量を有していることをさらに特徴とする。

原理的に、水性参照液体は、NaCl、緩衝成分および電荷を帯びている興味のある物質を含有する。Q-Sepharose Fast FlowおよびSP-Sepharose Fast Flowは本発明の第一の態様の項で呈示されている。

20

【0095】

上の比較は、イオン交換体(1)および(2a)について、もしくはイオン交換体(1)および(2b)について本質的に同じ条件下で実施される測定を指す、即ち、pH、温度、溶媒組成、対イオンおよび流速が同じである。ブレイクスルー容量は、流動(例えば $c/c_0 = 10\%$ 、 c/c_0 については実験の部を参照)における物質の同じ相対濃度で測定される。

30

【0096】

典型的には、本発明のこの態様のイオン交換体に対して少なくとも一つ、二つ、三つもしくはそれ以上の参照物質についてのブレイクスルー容量(300cm³/時間の流速における流動で10%)は>3もしくは4mg/gelmlのよう>2mg/gelmlである。

40

【0097】

種々の実施態様およびそれらの優先性は、本発明の第一の態様について規定されたイオン交換体に対するものと同じである。

本発明を特許実施例で今や例示する。本発明は添付の特許請求の範囲でさらに規定される。

【0098】

実験の部

1. 確率的イオン交換吸着剤の合成

一般事項：

マトリックスの容積は沈降した床の容積を指す。グラムで示すマトリックスの重量は吸引した乾燥重量を指す。大規模の反応では、攪拌をモーター駆動の攪拌機で実施した。小規模反応(ゲル20mlまで)は振とうテーブル上の密封バイアル中で実施された。イオン

50

交換体のアルキル化、エポキシ化、置換の度の測定は従来の方法で実施された。必要であれば、特に硫黄について元素分析を行った。

合成されたイオン交換吸着剤はベースマトリックスとして Sepharose 6 Fast Flow (AP Biotech AB, Uppsala, Sweden) を有した。

【0099】

1.1. Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 上にアリル基の導入
アリル化をアリルグリシジルエーテルで行った。他の代わりのルート、例えば臭化アリルとの反応、がまたある。

【0100】

1.1.1. Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (低度置換、フェニル 20 μmol / ゲルml) 上にアリル基の導入

a) 低度のアリル置換

水 10 ml 中の 50 g (固体ゲル 50 ml) の Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (低度置換、フェニル 20 μmol / ゲルml) を NaOH 含有 (50 %) 水溶液 20 ml、NaBH₄ 0.2 g および Na₂SO₄ 0.5 g と共に混合した。混合液を 50 で 1 時間攪拌した。アリルグリシジルエーテル 7 ml の添加後、懸濁液を激しい攪拌下に 50 でさらに 18 時間置いた。混合液をろ過後、ゲルを蒸留水 5 × 50 ml、エタノール 5 × 50 ml、蒸留水 2 × 50 ml、0.2 M 酢酸 2 × 50 ml および蒸留水 5 × 50 ml で順次洗浄した。置換度はアリル 0.13 mmol / ゲルml であった。

b) 中度のアリル置換

手順は、アリルグリシジルエーテル 28 ml を使用した以外は、1.1.1. a におけるのと同じであった。置換度はアリル 0.22 mmol / ゲルml であった。

c) 高度のアリル含量

手順は、アリルグリシジルエーテル 50 ml を使用した以外は、1.1.1. a におけるのと同じであった。置換度はアリル 0.4 mmol / ゲルml であった。

【0101】

1.1.2. Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (高度置換、フェニル 40 μmol / ゲルml) 上にアリル基の導入

a) 低度のアリル含量

水 10 ml 中の 50 g (固体ゲル 50 ml) の Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (高度置換、フェニル 40 μmol / ゲルml) を NaOH 含有 (50 %) 水溶液 20 ml、NaBH₄ 0.2 g および Na₂SO₄ 0.5 g と共に混合した。混合液を 50 で 1 時間攪拌した。アリルグリシジルエーテル 7 ml の添加後、懸濁液を激しい攪拌下に 50 でさらに 18 時間置いた。混合液をろ過後、ゲルを蒸留水 5 × 50 ml、エタノール 5 × 50 ml、蒸留水 2 × 50 ml、0.2 M 酢酸 2 × 50 ml および蒸留水 5 × 50 ml で順次洗浄した。置換度はアリル 0.17 mmol / ゲルml であった。

b) 中度のアリル含量

手順は、アリルグリシジルエーテル 28 ml を使用した以外は、1.1.2. a におけるのと同じである。置換度はアリル 0.22 mmol / ゲルml であった。

c) 高度のアリル含量

手順は、アリルグリシジルエーテル 50 ml を使用した以外は、1.1.2. a におけるのと同じである。置換度はアリル 0.4 mmol / ゲルml であった。

【0102】

1.2. スルホプロピル Phenyl Sepharose 6 Fast Flow の作成
1.2.1. Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (低度置換、フェニル 20 μmol / ゲルml) 上にスルホプロピルの導入

a) 1.1.1. a で作成された中間生成物から。得られた生成物を Cat 3 と呼ぶ。

10

30

40

50

二亜硫酸ナトリウム 9 g を水 15 ml 中の 45 g (固形ゲル 45 ml) のアリル低度置換アリル (アリル 0.13 mmol / ゲル ml) 低度置換 Phenyl (フェニル 20 μ mol / ゲル ml) Sepharose 6 Fast Flow のスラリーに加えた。NaOH 水溶液 (50 %) の添加により pH を 6.5 に調整した。反応混合液を室温で攪拌下にゆっくり空気を泡立たせながら 18 時間保持した。混合液をろ過後、ゲルを蒸留水 4 × 50 ml 、 0.5 M HCl 2 × 50 ml および 1 mM HCl 3 × 50 ml で順次洗浄した。置換度はスルホプロピル 0.12 mmol / ゲル ml であった。

b) 1.1.1. b で作成された中間生成物から。得られた生成物を Cat 4 と呼ぶ。
手順は、アリルの置換度が 0.22 mmol / ゲル ml であり、反応時間が 17 時間であった以外は、1.2.1. a におけるのと同じである。置換度はスルホプロピル 0.18 mmol / ゲル ml であった。 10

【 0103 】

1.2.2. Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (高度置換、フェニル 40 μ mol / ゲル ml) 上にスルホプロピルの導入

a) 1.1.2. a で作成された中間生成物から。得られた生成物を Cat 1 と呼ぶ。
手順は、アリルの含量がアリル 0.17 mmol / ゲル ml であり、Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (高度置換、フェニル 40 μ mol / ゲル ml) を使用した以外は、1.2.1. a におけるのと同じである。置換度はスルホプロピル 0.12 mmol / ゲル ml であった。 20

b) 1.1.2. b で作成された中間生成物から。得られた生成物を Cat 2 と呼ぶ。
手順は、アリルの含量がアリル 0.22 mmol / ゲル ml であり、Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (高度置換、フェニル 40 μ mol / ゲル ml) を使用した以外は、1.2.1. a におけるのと同じである。置換度はスルホプロピル 0.15 mmol / ゲル ml であった。 30

【 0104 】

1.3. アリル化 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow の活性化

50 ml のアリル化 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (アリル 0.4 mmol / ゲル ml) 、蒸留水 50 ml および酢酸ナトリウム 2 g の攪拌した懸濁液中に、持続する黄色が得られるまで臭素を加えた。次いで、ギ酸ナトリウムを懸濁液が十分に脱色するまで加えた。反応混合液をろ過し、ゲルを蒸留水 250 ml で洗浄した。次いで、活性化ゲルを反応容器へ移して、適切なリガンド - 形成化合物とさらに反応させた。 30

【 0105 】

1.4. Phenyl Sepharose 6 Fast Flow から得られる陰イオン交換体

1.4.1. Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 上に 1,3-ジアミノプロパンから得られたアミンリガンドの導入

a) 1.1.2. c で作成された中間生成物から。得られた生成物を An 1 と呼ぶ。
5 ml の臭素活性化、アリル化 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (アリル 0.4 mmol / ゲル ml ; フェニル 40 μ mol / ゲル ml) を 1,3-ジアミノプロパン (7.5 ml 、リガンド - 形成化合物) を含有する反応バイアルへ移した。反応を攪拌下 55 度 17 時間続けた。反応混合液をろ過後、ゲルを蒸留水 3 × 10 ml 、 0.5 M HCl 3 × 10 ml および最後に蒸留水 3 × 10 ml で順次洗浄した。置換度はイオン交換リガンド 0.15 mmol / ゲル ml であった。 40

b) 1.1.1. c で作成された中間生成物から。得られた生成物を An 2 と呼ぶ。
手順は、アリル化 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (アリル 0.4 mmol / ゲル ml ; フェニル 20 μ mol / ゲル ml) を使用した以外は、1.4.1. a におけるのと同じである。置換度はイオン交換リガンド 0.25 mmol / ゲル ml であった。 50

【 0106 】

1.4.2. Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 上に 1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパンから得られたアミンリガンドの導入

a) 1.1.2.c で作成された中間生成物から。得られた生成物を An 3 と呼ぶ。

手順は、アリル化 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (アリル 0.4 mmol / ゲル ml ; フェニル 40 μmol / ゲル ml) および、 1,3-ジアミノプロパンの代わりに、蒸留水 (1.5 ml) 中 1,3-ジアミノ-2-プロパノール (3 g) の溶液を使用した以外は、 1.4.1. におけるのと同じである。置換度はイオン交換リガンド 0.16 mmol / ゲル ml であった。

b) 1.1.1.c で作成された中間生成物から。得られた生成物を An 4 と呼ぶ。

手順は、アリル化 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (アリル 0.4 mmol / ゲル ml ; フェニル 40 μmol / ゲル ml) を使用した以外は、 1.4.2.a におけるのと同じである。置換度はイオン交換リガンド 0.16 mmol / ゲル ml であった。

【0107】

1.5. Phenyl Sepharose 6 Fast Flow から得られる陽イオン交換体

1.5.1. Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 上にメルカプトプロピオン酸から得られたカルボキシリガンドの導入

a) 1.1.1.c で作成された中間生成物から。得られた生成物を Cat 5 と呼ぶ。

100 ml の臭素活性化、アリル化 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (アリル 0.42 mmol / ゲル ml ; フェニル 40 μmol / ゲル ml) を反応容器へ移し、17.5 ml のメルカプトプロピオン酸 (アリル基当り 6 当量) および NaCl 112 g の水溶液 (蒸留水 50 ml) と反応させた。添加の前に、pH を 50% NaOH 水溶液で 11.5 に調整した。反応を攪拌下 50 で 18 時間続けた。反応混合液のろ過および蒸留水 500 ml での洗浄により、イオン交換ゲルを得た。置換度は CO₂H リガンド 0.27 mmol / ゲル ml であった。

b) 1.1.1.c で作成された中間生成物から。得られた生成物を Cat 5 と呼ぶ。

手順は、アリル化 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (アリル 0.41 mmol / ゲル ml ; フェニル 20 μmol / ゲル ml) を使用し、バッヂサイズが 50% であった以外は、 1.5.1.a におけるのと同じであった。置換度は CO₂H リガンド 0.28 mmol / ゲル ml であった。

【0108】

1.6. Sepharose 6 Fast Flow 上にメルカプトプロピオン酸から得られたカルボキシリガンドおよび 2-メルカプトピリジンから得られたピリジルリガンドの導入

1.6.1. アリル化 Sepharose 6 Fast Flow の作成

Sepharose 6 Fast Flow 80 g を NaBH₄ 0.5 g 、 Na₂SO₄ 13 g および 50% NaOH 水溶液 50 ml と共に混合した。混合液を 50 で 1 時間攪拌した。アリルグリシジルエーテル 100 ml の添加後、懸濁液を激しい攪拌下に 50 でさらに 18 時間置いた。混合液をろ過後、ゲルを蒸留水 500 ml 、エタノール 500 ml 、蒸留水 200 ml 、 0.2 M 酢酸 200 ml および蒸留水 500 ml で順次洗浄した。置換度はアリル 0.41 mmol / ゲル ml であった。

【0109】

1.6.2. アリル化 Sepharose 6 Fast Flow の臭素化による活性化
これは、アリル化 Sepharose 6 Fast Flow を用いた以外は、上の 1.3 項で説明したように実施された。

【0110】

1.6.3.2-メルカプトピリジンから得られたピリジルリガンド (低度置換) およびメルカプトプロピオン酸から得られたカルボキシリガンドで置換された Sepharose 6 Fast Flow の合成。生成物を Cat A n 1 と呼ぶ。

反応バイアル中で、0.5M重炭酸ナトリウム5ml中の2-メルカプトピリジン0.5mmolの溶液のpHを50%NaOH水溶液を加えることによりpH10.5に調整した。別に、蒸留水1ml中3-メルカプトプロピオン酸1.2gの溶液を調製し、そのpHを50%NaOH水溶液を加えることにより11に調整した。2-メルカプトピリジン溶液を含有するバイアルへ、10mlの臭素活性化、アリルSephadose 6 Fast Flow(アリル0.41mmol/ゲルml)を加え、反応を攪拌下50で継続した。1.5時間後、3-メルカプトプロピオン酸を含有する溶液を加え、混合液を45で16時間攪拌した。反応混合液をろ過し、ゲルを蒸留水5×10mlで洗浄した。微量分析により、ピリジンリガンドについて43μmol/ゲルmlおよびプロピオン酸リガンドについて251μmol/ゲルmlの置換度を得た。

10

【0111】

1.6.4.2-メルカプトピリジンから得られたピリジルリガンド(中度置換)およびメルカプトプロピオン酸から得られたカルボキシリガンドで置換されたSephadose 6 Fast Flowの合成。生成物をCatA n 2と呼ぶ。

手順は、2-メルカプトピリジンの量が二倍増された以外は、1.6.3.におけるのと同じであった。微量分析により、ピリジンリガンドについて86μmol/ゲルmlおよびプロピオン酸リガンドについて215μmol/ゲルmlの置換度を得た。

【0112】

1.6.5.2-メルカプトピリジンから得られたピリジルリガンド(高度置換)およびメルカプトプロピオン酸から得られたカルボキシリガンドで置換されたSephadose 6 Fast Flowの合成。生成物をCatA n 3と呼ぶ。

手順は、2-メルカプトピリジンの量が三倍増された以外は、1.6.3.におけるのと同じであった。微量分析により、ピリジンリガンドについて127μmol/ゲルmlおよびプロピオン酸リガンドについて171μmol/ゲルmlの置換度を得た。

【0113】

2.クロマトグラフィー

2.1.混合リガンド陽イオン交換基材

三つの精製タンパク質[塩基性(リゾチーム=Lys)、中性～弱塩基性(IgG)および酸性(BSA)タンパク質を代表する]を使用して、新しいシリーズの“高塩”混合リガンド陽イオン交換基材をブレイクスルー容量(Qb_{10%})に関して特性化した。リゾチームの結合および溶出を通常の陽イオン交換操作手順、即ち、中性pHにおける吸着および高濃度の塩(例えば2M NaCl)を含有する緩衝液での同じpHにおける溶出、によって行った。IgGは、pH4.5において結合させて、比較的低濃度(0.1M)の塩を含有する、pH7.0の緩衝液で溶出させた。IgGは、相当な多量が種々の基材に高いpHにおけるより低いpHにおいて吸着され得るので、低いpHで結合させた。BSAは、それが正に荷電される(BSAのpI=4.9)、pH4.0において結合させて、IgGの場合のように、pHを7.0に上げることにより溶出させた。さらに、三つの塩基性タンパク質(即ち、リボヌクレアーゼ、チトクロームCおよびリゾチーム)の溶出伝導率をまた全ての混合リガンド陽イオン交換基材について測定した。新しいシリーズの“高塩”混合リガンド陽イオン交換基材についてブレイクスルー容量および溶出伝導率を測定するために使用した手順は下に概略されている。

30

【0114】

2.1.1.“高塩”条件におけるブレイクスルー容量(Qb_{10%})

混合リガンド陽イオン交換基材を“高塩”基材として適格であるとする主な判定基準の一つは、同一の条件下で操作される参照陽イオン交換体のものと比較して比較的高い濃度の塩の存在下におけるタンパク質についてのその結合容量である。ブレイクスルー容量は下で説明される前端分析の方法を用いて測定される。

40

【0115】

2.1.2.実験の部

緩衝液

50

緩衝液 1 : 20 mM リン酸ナトリウム、0.3 M 塩化ナトリウム、pH 6.8
 緩衝液 2 : 20 mM 酢酸ナトリウム、0.25 M 塩化ナトリウム、pH 4.0
 緩衝液 3 : 20 mM 酢酸ナトリウム、0.25 M 塩化ナトリウム、pH 4.5
 緩衝液 4 : 20 mM リン酸ナトリウム、2 M 塩化ナトリウム、pH 6.8
 緩衝液 5 : 100 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0

【0116】

タンパク質溶液

1. リゾチーム : 緩衝液 1 中 4 mg / mL
2. BSA : 緩衝液 2 中 4 mg / mL
3. IgG : 緩衝液 3 中 4 mg / mL

10

全ての緩衝液およびタンパク質溶液を、使用前に、0.45 μm の Millipore Millipore HA フィルターを通してろ過した。

【0117】

2.1.3. クロマトグラフィーシステム

全ての実験は、Unicorn 3.1 ソフトウェア (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) を装備した Aekta Explorer 100 クロマトグラフィーシステムを用いて室温で実施された。試料を 150 mL スーパーループを経由してカラムに加えた。溶出液を 10 mM フローセルを用いて 280 nm における吸光度測定により連続的にモニターした。

20

【0118】

前端分析

“高塩”混合リガンド陽イオン交換基材のそれぞれのプロトタイプを HR 5 / 5 カラム (充てん床容積 = 1 mL) 中に充てんし、適切な pH および塩濃度 (緩衝液 1、2 もしくは 3) の緩衝液で平衡化した。適切なタンパク質溶液を 1 mL / 分 (即ち 300 cm / 時間) の流速でカラムに供給した。試料の添加を、溶出液の A_{280} がカラムに加えた試料の A_{280} の 10 % レベルに達するまで、継続した。試料についての最高 UV シグナルは、UV 検出器中に試験溶液を直接注入することにより評価された。そのように得られたデータに基づいて (式 1 参照)、添加タンパク質の濃度の 10 % レベルにおける充てんゲルのブレイクスルー容量 ($Q_{b10\%}$) を計算できる。そのようにして得られた結果は、数多くの“高塩”混合リガンド陽イオン交換基材をスクリーニングするための基礎を形成しており、三つのタンパク質、即ち、リゾチーム、ウシ血清アルブミン (BSA) およびヒト免疫グロブリン (IgG)、について下に提示する。

30

【0119】

最高吸光度の 10 % レベルにおけるブレイクスルー ($Q_{b10\%}$) を以下の関係式を用いて計算した。

$$Q_{b10\%} = (T_{R10\%} - T_{RD}) \times C / V_c \quad (1)$$

$T_{R10\%}$ = 最高吸光度の 10 % における保持時間 (分)

T_{RD} = システムのボイド容積 (分)

C = 供給タンパク質の濃度 (4 mg / mL)

40

V_c = カラムの充てん床容積 (mL)

【0120】

2.1.5. 機能試験

混合リガンド陽イオン交換基材を 1.0 mL の HR 5 / 5 カラムに充てんし、20 カラム容積の緩衝液 A (20 mM ピペラジン緩衝液、pH 6.0) で平衡化した。50 μL のタンパク質混合液 (6 mg / mL リボヌクレアーゼ、2 mg / mL チトクローム C および 2 mg / mL リゾチーム) をカラムに加えて、100 % の緩衝液 B (緩衝液 A プラス 2.0 M NaCl) への直線的勾配 (勾配容積 = 20 カラム容積) により溶出させた。流速を 0.3 mL / 分 (100 cm / 時間) に保持した。

【0121】

2.2. 混合リガンド陰イオン交換基材

50

本発明で提案される基材が参照陰イオン交換体より高いイオン強度においてタンパク質を吸着することを検証するために、ウシ血清アルブミン (B S A) のブレイクスルー容量を測定した。S e p h a r o s e 6 F a s t F l o w に付けた陰イオン交換リガンドをベースとする新しい“高塩”混合リガンドをこの試験の Q S e p h a r o s e 6 F a s t F l o w と比較した。加えて、B S A の回収率 (脱着され得る、吸着 B S A の量、詳細は下を参照) をまた試験した。さらに、三つのタンパク質、即ち、コナルブミン (C o n A) 、ラクトアルブミン (L a c t a l b) およびダイズトリプシンインヒビター (S T I) 、の溶出伝導率をまた全ての陰イオン交換体について測定した。この機能試験をまた用いて、他のタンパク質について高塩条件における遅延を同様に検証した。

【 0 1 2 2 】

10

2 . 2 . 1 . 高塩条件におけるブレイクスルー容量 (Q b _{10%})

Q b _{10%} - 値を、同一の条件下で操作される参照陰イオン交換体 Q S e p h a r o s e 6 F a s t F l o w と比べて比較的高い塩濃度で評価した。種々の陰イオン交換基材についての Q b _{10%} - 値は下で説明される前端分析の方法を用いて測定された。

【 0 1 2 3 】

20

B S A (4 m g / m L) の溶液を 0 . 2 5 M N a C l を含有する 2 0 m M ピペラジン (p H = 6 . 0) 中で調製した。緩衝液およびタンパク質溶液を、使用前に、0 . 4 5 μ m の M i l l i p o r e M i l l i e x H A フィルターを通してろ過し、そして実験を 2 . 1 . 3 . で説明したのと同じ装置および機器のセッティングで実施した。

【 0 1 2 4 】

20

混合リガンド陰イオン交換基材のそれぞれのプロトタイプを H R 5 / 5 カラム (充てん床容積 = 1 m L) 中に充てんし、ピペラジン緩衝液 (2 0 m M ピペラジン、 p H = 6 . 0 、 0 . 2 5 M N a C l を含有) で平衡化した。B S A 試料溶液の最高吸光度の 1 0 % レベルにおけるブレイクスルー容量 (Q b _{10%} B S A) を 2 . 1 . 4 . 項の手順にしたがって計算した。

【 0 1 2 5 】

20

2 . 2 . 2 . 回収率

カラムのタイプ、充てん床容積、緩衝液、タンパク質溶液、流速および器具のタイプは上に概略されている。ピペラジン緩衝液 (2 0 m M ピペラジン、 H C l 、 p H = 6 . 0 、 0 . 2 5 M N a C l) で平衡化したカラムに、B S A 溶液を 5 0 m L スーパールーフから、そのブレイクスルー容量の 3 0 % に相当する量が加えられるまで、加えた。次いで、カラムを 2 床容積の平衡緩衝液で洗浄し、結合した B S A を脱着緩衝液 (2 0 m M ピペラジン、 p H = 6 . 0 、 2 . 0 M N a C l) で溶出した。溶出した B S A の量を計算し、B S A の回収率を以下の関係式を用いて確定した：

溶出した B S A の濃度を式 2 にしたがい計算した。

$$C_s = A / b \quad (2)$$

C _s = 溶出した B S A 試料の濃度 (m g / m L)

A = 2 8 0 n m における吸光度

= 特定の波長におけるモル吸光率、 M ⁻¹ c m ⁻¹

b = 通路長、 c m

40

式 3 を B S A の回収率を計算するために使用した。

$$\text{回収率、 \%} = C_s \cdot V_s / C_L \cdot V_L \quad (3)$$

V _s = 溶出した B S A 溶液の容積、 m L

C _L = 添加した B S A 溶液の濃度、 m g / m L

V _L = 添加した B S A 溶液の容積、 m L

【 0 1 2 6 】

40

2 . 2 . 3 . 機能試験

“高塩”混合リガンド陰イオン交換基材を H R 5 / 5 カラム (1 m L 床容積) に充てんし、 2 0 カラム容積の A - 緩衝液 (2 0 m M リン酸塩緩衝液、 p H 6 . 8) で平衡化した。5 0 μ l のタンパク質混合液 (6 m g / m L C o n A 、 4 m g / m L ラクトアルブミ

50

ンおよび 6 mg / mL STI) をカラムに加えて、100% の B - 緩衝液 (A - 緩衝液 プラス 2.0 M NaCl) への直線的勾配 (勾配容積 = 20 カラム容積) により溶出させた。流速を 0.3 mL / 分 (100 cm / 時間) に保持した。

【0127】

2.3. 結果

2.3.1. 高塩条件における混合リガンド陽イオン交換基材のブレイクスルー容量および通常の陽イオン交換クロマトグラフィー条件における溶出伝導率

一連の代表的な“高塩”混合リガンド陽イオン交換基材 (表 1 参照) についてのブレイクスルー容量について得られた結果を表 2 にまとめた。表 1 は、本発明の幾らかの基本概念を例示するために用いた種々の基材の幾らかの特定のリガンド性質を示す。大多数のこれらの新しい混合リガンド陽イオン交換体のリガンド比率は 3 ~ 14 の区間にあった。参照陽イオン交換体として、市販で入手可能な Sulphopropyl (もしくは SP) Sepharose 6 Fast Flow を使用した。そのリガンド濃度は約 0.22 mmol / 充てんゲル mL であった。結果 (表 2) は以下の傾向を示す：

1. 一つの例外をもって、新しい陽イオン交換リガンドは、参照陽イオン交換体 SP Sepharose 6 Fast Flow に比較して、全ての三つのタンパク質についてはるかに高い $Q_{b_{10\%}}$ を持つ。

2. Cat A n 3 は Lys (54 mg / mL) について；Cat 5 および Cat 6 は HSA (45 mg / mL) についてならびに Cat A n 1 は IgG (26 mg / mL) について、最高の $Q_{b_{10\%}}$ を与えた。これらの値は、参照陽イオン交換体 (SP Sepharose 6 Fast Flow) に比べて上の四つの基材上で、Lys、HSA および IgG について、それぞれ、1300%、1500% および 2600% の増加に相当する。

3. 基材 Cat 1、Cat 2 および Cat 3 は、IgG についてより BSA についてはるかに高い $Q_{b_{10\%}}$ を持つ。これらの結果は、これらの基材が IgG 製剤から BSA を除去するのに有用であり得ることを示唆する。

4. 三つの基材 Cat A n 1 ~ 3 は、いかにリゾチームおよび IgG の $Q_{b_{10\%}}$ - 値が二つの混合リガンド (メルカプトプロピオン酸およびメルカプトピリジン) のリガンド比率に関係するかを示す。リガンド比率 (メルカプトプロピオン酸のリガンド密度 / メルカプトピリジンのリガンド密度) が減少するとき、 $Q_{b_{10\%}}_{Lys}$ は増加し、 $Q_{b_{10\%}}_{IgG}$ は減少する (表 1 および 2)。三つのタンパク質の通常の陽イオン交換クロマトグラフィーにおける溶出伝導率 (表 2) はまた、基材 Cat A n 1 ~ 3 のリガンド比率により選択性に大きい変動を示す。

【0128】

2.3.2. 高塩条件における混合リガンド陰イオン交換基材のブレイクスルー容量および通常の陰イオン交換クロマトグラフィーにおける溶出伝導率

一連の代表的な“高塩”混合リガンド陰イオン交換基材 (A n 1 ~ 4) についてのブレイクスルー容量について得られた結果を表 3 にまとめ、そしてリガンドの構造を表 1 に提示した。参照陰イオン交換体として、市販で入手可能な Q Sepharose Fast Flow を使用した。結果は以下の傾向を示す：

1. 新しい混合 - リガンド陰イオン交換基材は、参照陰イオン交換体 Q Sepharose Fast Flow に比較して、全ての三つのタンパク質についてはるかに高い溶出伝導率 (表 3) を持つ。

2. 新しい陰イオン交換リガンドはまた、Q Sepharose Fast Flow に比較して、BSA についてはるかに高いブレイクスルー容量 ($Q_{b_{10\%}}_{BSA}$) を持つ。最高の $Q_{b_{10\%}}$ - 値を与えた基材は、参照陰イオン交換体に比べて 2900% の増加に相当する。表 3 に示す基材の中、最低の $Q_{b_{10\%}}$ - 値を与えた基材は、Q Sepharose Fast Flow に比べて 2200% の増加を呈示した。

3. 回収率のデータは、吸着された BSA は、71% より大きい回収率をもって塩工程により溶出され得ることを示す (表 3)。

10

20

30

40

50

【0129】

表1. 種々の“高塩”混合リガンドイオン交換基材のタイプおよびリガンド比重比率

【表1】

| 基材 | リガンド1 | リガンド2 | リガンド比重比率 (リガンド1/リガンド2) |
|-----------------------|-------------------|---------------|---------------------------|
| Cat 1 ^a | スルホプロピル | フェニル | 3.0 |
| Cat 2 ^a | スルホプロピル | フェニル | 3.8 |
| Cat 3 ^b | スルホプロピル | フェニル | 6.0 |
| Cat 4 ^b | スルホプロピル | フェニル | 9.0 |
| Cat 5 ^a | メルカプトプロピオニ酸 | フェニル | 6.8 |
| Cat 6 ^b | メルカプトプロピオニ酸 | フェニル | 14 |
| An 1 ^a | 1,3-ジアミノプロパン | フェニル | 6.0 |
| An 3 ^b | 1,3-ジアミノプロパン | フェニル | 13 |
| An 3 ^a | 1,3-ジアミノ-2-プロパノール | フェニル | 4.0 |
| An 4 ^b | 1,3-ジアミノ-2-プロパノール | フェニル | 9.0 |
| Cat An 1 ^c | メルカプトプロピオニ酸 | メルカプト ピリジン | R1 |
| Cat An 2 ^c | メルカプトプロピオニ酸 | メルカプト ピリジン | R2 |
| Cat An 3 ^c | メルカプトプロピオニ酸 | メルカプト ピリジン | R3 |

^a これらの基材は、約40 μmol / 基材mLのリガンド比重を持つPhenyl Se pharose Fast Flow (高度置換)をベースにした。

^b これらの基材は、約20 μmol / 基材mLのリガンド比重を持つPhenyl Se pharose Fast Flow (低度置換)をベースにした。

^c これらの基材のリガンド比率は、R1 > R2 > R3の順番で減少する。さらに詳細については、リガンドのカップリングについての項を参照されたい。

【0130】

表2. 三つのタンパク質についてpH6における溶出伝導率ならびに種々の“高塩”混合リガンド陽イオン交換基材の上のリゾチーム(pH6.8および0.3M NaCl)、BSAならびにIgG(pH4.0および0.25M NaCl)のブレイクスルー容量

【表2】

10

20

30

40

| 基材 | 溶出伝導率 | | | ブレイクスルー容量 | | |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Rib mS/cm | Cyt mS/cm | Lys mS/cm | Qb _{10%Lys} mg/mL | Qb _{10%BSA} mg/mL | Qb _{10%IgG} mg/mL |
| SP FF ^a | 19 | 32 | 32 | 4 | 3 | 1 |
| Cat1 | 23 | 29 | 54 | 20 | 41 | 4 |
| Cat2 | 20 | 27 | 41 | 5 | 37 | 3 |
| Cat3 | 18 | 22 | 43 | 7 | 40 | 3 |
| Cat4 | 19 | 28 | 37 | 4 | 18 | 2 |
| Cat5 | 27 | 32 | 53 | 6 | 45 | 12 |
| Cat6 | 26 | 31 | 52 | 6 | 45 | 12 |
| CatAn1 | 26 | 35 | 60 | 23 | na | 26 |
| CatAn2 | 29 | 38 | 78 | 48 | na | 21 |
| CatAn3 | 31 | 41 | 132 | 54 | na | 20 |

10

20

30

40

^a S P S e p h a r o s e 6 F a s t F l o wna = 低いQb_{10%} - 値のために分析せず

【0131】

表3. 三つのタンパク質（コナルブミン、ラクトアルブミンおよびダイズトリプシンインヒビター）についてpH 6における溶出伝導率、BSA（pH 6および0.25M NaCl）のブレイクスルー容量ならびに種々の“高塩”混合リガンド陰イオン交換基材上のBSAの回収率

【表3】

| 基材 | 溶出伝導率 | | | ブレイクスルー容量 | 回収率 |
|-----|----------------|------------------|--------------|-------------------------------|----------|
| | Con A mS/cm | Lactalb mS/cm | STI mS/cm | Qb _{10%BSA} mg/mL | BSA % |
| QFF | 12 | 20 | 30 | 1 | na |
| An1 | 31 | 55 | 79 | 22 | 90 |
| An2 | 30 | 54 | 78 | 23 | 85 |
| An3 | 32 | 54 | 86 | 29 | 86 |
| An4 | 32 | 53 | 84 | 28 | 71 |

^a Q S e p h a r o s e 6 F a s t F l o wna = 低いQb_{10%} - 値のために分析せず

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
11 July 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/053252 A2

(51) International Patent Classification⁷: B01D 15/00 (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, IR, IU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) International Application Number: PCT/EP01/14895

(22) International Filing Date:
17 December 2001 (17.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0004932-0 31 December 2000 (31.12.2000) SE(71) Applicant (for all designated States except US): AMER-
SHAM BIOSCIENCES AB [SE/SE]; Björkgatan 30,
S-751 84 Uppsala (SE).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BELEW, Makon-
nen [SE/SE]; Amersham Biosciences AB, Björkgatan
30, S-751 84 Uppsala (SE); JOHANSSON, Bo-Lennart
[SE/SE]; Amersham Biosciences AB, Björkgatan 30,
S-751 84 Uppsala (SE); MALOISEL, Jean-Luc [FR/SE];
Amersham Biosciences AB, Björkgatan 30, S-751 84
Uppsala (SE).(74) Agents: FRANKS, Barry, G. et al.; Amersham plc, The
Grove Centre, White Lion Road, Amersham, Bucking-
hamshire HP7 9LL (GB).(81) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BH, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, MI, MR,
NL, SN, TD, TG).

Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that report
entirely in electronic form (except for this front page) and
available upon request from the International Bureau

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.



A2

WO 02/053252 (54) Title: A METHOD FOR MIXED MODE ADSORPTION AND MIXED MODE ADSORBENTS

(57) **Abstract:** Method for the removal of a substance from an aqueous liquid by ion exchange comprising providing a liquid with said substance is present; providing an adsorption matrix which comprises at least two different ligands; contacting the liquid with the matrix under a period of time and conditions sufficient to allow adsorption of the substance to the matrix; and adding an eluent that desorbs the substance from the matrix. Each one of the ligands interacts with the substance during the adsorption step, and at least one of the ligands is charged and capable of ionic interaction with the substance. The method can be run as a cation or anion exchange. The substance desorption can be performed by adding an eluent comprising an increasing ionic strength. The invention also encompasses an adsorbent comprising at least two structurally different ligands, which interact with the same kind of substance when used in a separation procedure.

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

1 A METHOD FOR MIXED MODE ADSORPTION AND MIXED MODE ADSORBENTS**Field of invention**

The present invention relates to a method for the removal of a substance that carries a charge and is present in an aqueous liquid (I). The method comprises the steps of:

- 5 (i) contacting the liquid with an ion-exchange adsorbent (1) under conditions permitting binding between the adsorbent and the substance, and
- (ii) desorbing said substance from the adsorbent by the use of a liquid (II),

The invention also relates to novel ion-exchange adsorbents that may be used in the
10 novel and innovative method.

An adsorbent of this invention contains two or more different ligands that are coupled on the same base matrix. The ligands are different with respect to functionality and/or structural elements. The terms "a mixed mode ligand" and "a bimodal ligand" refer to a ligand that is capable of providing at least two different, but co-operative, sites which interact with the substance to be bound. The sites are different with respect to functionality and/or kind.

The charged substance typically is bio-organic and/or amphoteric. With respect to
20 the number of charged groups in the substance, the greatest advantages are obtained if there are two or more charged groups, such as one, two, or more positively charged groups and/or one, two or more negatively charged groups. With respect to the molecular weight of the substances the greatest advantages are achieved if the molecular weight is above 1,000 Dalton, such as above 5,000 Dalton
25 or above 10,000 Dalton.

Background technology.

The method defined above includes chromatographic procedures that use monolithic or particle adsorbents in the form of packed or fluidised beds, and batch-wise
30 procedures that typically include only particle adsorbents. Monolithic adsorbents include porous membranes, porous plugs and also tube walls and other forms of integral matrices. The purpose of the procedures may be to purify the substance carrying the charge, in which case the substance becomes bound to the adsorbent during step (i), and, if necessary, is further purified subsequent to desorption from

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

2
the adsorbent. Another purpose is to remove the substance from liquid (I) because it is an undesired component therein. In this latter case, the liquid may be further processed after step (i). In both cases and if so desired, the adsorbent may be reused after desorption of the bound substance.

5

Other uses are assay procedures involving determination of either the substance carrying the charge or of a substance remaining in liquid (I).

There are a number of publications, which describe adsorbents that are 10 functionalized with more than one kind of ligand.

- WO 9600735, WO 9609116 and US 5,652,348 (Burton et al) disclose separation methods and media based on hydrophobic interaction. In one embodiment the media may contain both ionizable and non-ionizable ligands. The main idea is that loading is done under conditions promoting hydrophobic interaction (neutral 15 hydrocarbon ligands) and desorption by a pH switch in order to charge ligands with an opposite charge compared to the adsorbed protein (repulsion). Thus, WO 00/69872 utilises two ligands on the matrix, one of which is interacting with a nucleic acid during adsorption and the other one of which is utilised for desorption thereof by repulsion of the nucleic acid.
- 20 • Burton et al., Biotechnology and Bioengineering 56(1) (1997) 45-55 describe attempts to purify chymosin on adsorbents comprising
 - (a) aromatic hydrocarbon ligands that are chargeable but essentially uncharged during adsorption (secondary amine/ammonium), or
 - (b) an unchargeable aromatic ligand plus a separate cation-exchange ligand 25 corresponding to the unreacted spacer (-COO'/COOH) (which has been used to introduce the aromatic ligand).
- Issaq et al., J. Liq. Chromatog. 11(14) (1988) 2851-2861; Floyd et al., Anal. Biochem. 154 (1986) 570-577; and Buzewski et al J. Liq. Chrom. & Rel. Technol. 20(15) (1997) 2313-2325 describe chromatographic properties of silica particles 30 derivatized with two kinds of ligands (an ion-exchange ligand and a hydrophobic (alkyl) interaction ligand)
- Teichberg, J. Chromatog. 510 (1990) 49-57 describes affinity repulsion chromatography in which a positively charged ligand is interacting with a neutral

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

3

affinity ligand on an adsorbent that in addition also carries a positively charged repulsion ligand.

- WO 9839094 (Amersham Pharmacia Biotech AB) and WO 9839364 (Amersham Pharmacia Biotech AB) disclose as one embodiment beads in which there is one kind of charged ligands in a surface layer while the interior of the beads is functionalised with ligands of the opposite charge. The beads are suggested for the adsorption of biomolecules.
- It is known that the introduction of affinity ligands on separation matrices often introduces more than one kind of groups and/or residual groups due to inefficiencies in the coupling reaction. Reaction of N,N-diethyl aminoethyl chloride with polysaccharide matrices, for instance, typically introduces (a) ligands only containing one tertiary ammonium group together with (b) ligands containing both tertiary and quaternary ammonium groups. To our knowledge unusual high breakthrough capacities at ion-exchange conditions comprising high salt concentrations have never been reported for this type of conventional ion-exchangers. Compare Burton et al., Biotechnology and Bioengineering 56(1) (1997) 45-55

The objectives of the invention

- 20 The objectives of the present invention are:
 - a) to achieve adsorption/binding of charged substances, such as proteins, to adsorbents having ion-exchange ligands at relatively high ionic strengths;
 - b) to provide ion-exchange media that can have a reduced ligand content while retaining a sufficient capacity to bind target substances;
 - c) to enable elution/desorption within broad ionic strength intervals of substances adsorbed/bound to an ion-exchanger, i.e. to increase the selectivity;
 - d) to design ion-exchangers which have high breakthrough capacities (typically > 2 mg/ml wet gel, 10 % breakthrough in the flow through at 300 cm/h), good recovery of proteins (often 95% or higher) etc;
 - 30 e) to design ion-exchangers that are binding by ion-exchange at high salt concentration and that can withstand regeneration and/or cleaning with alkaline (pH ≥ 13) and or acidic solutions (pH ≤ 3) without significant loss of chromatographic properties;

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

4

- f) to obviate extensive dilutions of samples of relatively high ionic strength that are to be used in processes requiring a lowered ionic strength;
- g) to provide simplified desalting procedures;
- h) to provide simplified processes involving ion-exchangers, for instance to improve 5 productivity and/or reduce the costs for process equipment and investments;
- i) to provide ion-exchangers that are adapted to preparative applications, for instance in large scale processes in which a sample volume (= liquid (l)) larger than a litre is applied and processed on an ion-exchanger;
- j) to provide opportunities for novel combinations of separation principles based on 10 elution of ion-exchanger adsorbents at high salt concentration, for instance hydrophobic interaction adsorption after an ion-exchange step.

One or more of these objectives are based on the recognition that ion-exchangers adsorbing at relatively high salt concentrations and at relatively high ionic strengths 15 have benefits. This is contrary to traditional ion-exchangers, which have utilised high salt concentrations, and high ionic strengths primarily to achieve desorption.

Summary of the present invention

One or more of the objectives described above can be reached by using a method 20 as defined in the appended claims. Thus, the present invention relates to a method for the removal of a substance from an aqueous liquid by ion exchange, said method comprising the steps of:

- providing a liquid wherein said substance is present in a charged state;
- 25 -providing an adsorption matrix which comprises at least two structurally different ligands, comprising at least one weak ion exchanger or at least one strong ion exchanger;
- contacting the liquid with the matrix under a sufficient period of time to allow adsorption of the substance to the matrix; and
- 30 -adding an eluent that desorbs the substance from the matrix;

wherein each ligand interacts with the substance during the adsorption step and at least one of said ligands is charged and capable of ionic interaction with the substance.

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

5

Accordingly, the present invention uses two ligands that both actively interacts with the substance of interest during the adsorption, as compared to WO 00/69872, wherein two ligands are used but only one is active to adsorb a nucleic acid.

5 Furthermore, since the present invention utilises mainly ionic interactions the present method differs also from the above discussed WO 96/09116, wherein hydrophobic interactions are utilised. Even though experiments in said WO 96/09116 test several ligands using the same conditions, each one was tested alone and not in combination and therefore only one ligand adsorbents are suggested therein.

10 Furthermore, the elution of this reference is performed by a decrease of salt concentration, as is typically the case with hydrophobic interaction chromatography. Contrary, the present invention can utilise an increase in salt concentration for elution, which indicates that the main interaction of the present adsorption is of ionic type.

15

In one embodiment, at least one charged ligand is an anion exchanger and the substance to be removed is initially negatively charged, the conditions for adsorption being defined by a $\text{pH} > \text{pI}$ of the negatively charged substance and $\text{pH} < \text{pKa}$ of the positively charged groups of the ligand. An advantage with the present invention is 20 that the adsorption efficiency thereof has been shown to be unexpectedly high. Thus, the adsorption capacity for the negatively charged substance is as high as $\geq 100\%$, and even $\geq 200\%$, of the adsorption capacity of the same substance in a corresponding reference ion-exchanger in which essentially all of the charged groups are quaternary ammonium groups (q-groups).

25

In another embodiment, at least one charged ligand is a cation ion exchanger and the substance to be removed is initially positively charged, the conditions for adsorption being defined by a $\text{pH} < \text{pI}$ of the positively charged substance and $\text{pH} > \text{pKa}$ of the negatively acid corresponding to the ligand. Here the adsorption capacity 30 for the substance is as high as $\geq 100\%$, and even $\geq 200\%$, of the adsorption capacity of the same substance in a corresponding reference ion-exchanger in which essentially all charged groups are sulfopropyl group.

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

6
In the present context, it is to be understood that adsorption capacity refers to the same variable as breakthrough capacity, which is sometimes used in the present application. A dynamic adsorption capacity refers to the capacity in a chromatographic procedure, wherein the aqueous liquid is brought to pass the
5 adsorbent. Similarly, a static adsorption capacity is used in the context of a batch procedure.

In one embodiment of the present method, the adsorption is performed at an ionic strength higher than or equal to that of a water solution of 0.10 M NaCl, preferably
10 0.20 M NaCl or 0.30 M NaCl.

In another embodiment, the ligands can be characterised by being capable of binding the substance of interest in an aqueous reference liquid at an ionic strength corresponding to 0.25 M NaCl.

15 In a specific embodiment, at least one ligand interacts with the substance by hydrophobic and/or electron donor-acceptor interaction. Said ligand is preferably chargeable and desorption of the substance from the matrix is performed by a pH switch.

20 In yet another embodiment of the present method, the polarity of the eluent is lower than that of the aqueous liquid from which the substance is removed.

In an advantageous embodiment, the present method is for removal of a biopolymer
25 structure from a liquid, which structure is selected from the group comprised of carbohydrate structures, peptide structures, peptide nucleic acid (PNA) structures and nucleic acid structures. In a specific embodiment, the method is for removal of a biopolymer the charge of which is pH-dependent.

The present method can also be used for removal of an amphoteric substance.

30 The present invention also relates to an adsorbent suitable for use in the method according to the invention, which comprises at least two ligands and wherein at least one ligand is a mixed mode ligand. Such a mixed mode ligand will comprise

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

7
(a) a first mode site which gives charge-charge attractive interaction with the substance, and
(b) a second mode site which gives charge-charge attractive interaction and/or hydrophobic interaction and/or electron donor-acceptor interaction with the substance.

In one embodiment, the present adsorbent comprises a first and a second ligand comprising at least one functional group that participates in electron donor-acceptor interaction with the substance to be separated, which functional group is selected 10 from the group comprised of:

(i) donor atoms/groups such as:
• oxygen with a free pair of electrons, such as in hydroxy, ethers, nitro, carbonyls, such as carboxy, esters (-O- and -CO-O-) and amides,
• sulphur with a free electron pair, such as in thioethers (-S-),
15 • nitrogen with a free pair of electron, such as in amines, amides including sulphone amides,
• halo (fluorine, chlorine, bromine and iodine), and
• sp- and sp²-hybridised carbons, or
(ii) acceptor atoms/groups, i.e. electron deficient atoms or groups, such as
20 metal ions, cyano, nitrogen in nitro, hydrogen bound to an electronegative atom as for instance in HO- (hydroxy, carboxy etc), -NH- (amides, amines etc), HS- (thiol etc) etc.

In one embodiment, the ratio between the degrees of substitution for any pair of the 25 sets in the adsorbent is within 0.02-50. In one embodiment, the first and the second ligands have been introduced so that they occur essentially at random in relation to each other, at least in a part of the support matrix.

The first aspect of the invention

30 Below, the present invention will be described in more detail with reference to numbered steps to facilitate the understanding and to further illustrate various embodiments. Thus, the present inventors have discovered that one or more of the objectives above can be met by the process defined in the introductory part, if the ion-exchange adsorbent (1) is selected amongst ion-exchange adsorbents that are

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

8

characterised by comprising a base matrix which is functionalised with at least two different ligands (ligand 1, ligand 2) for which

- (a) at least one of the ligands has a charge which is opposite to a charge present on the substance under the conditions provided by liquid (l),
- 5 (b) each ligand is capable of interacting with the substance for binding under the conditions provided by liquid (l).

The interaction is either in an independent or in a co-operative fashion in relation to any of the other ligands.

10 The molecular weights of the typical ligands contemplated in the context of the instant invention < 1000, such as < 700 Dalton. The molecular weight contributions of halogens that may be present are not included in these ranges.

15 Ligand 1 is a charged ligand, i.e. is selected from single and mixed mode ligands carrying a charge under the conditions provided in step (i) (the first category).

Ligand 2 is a ligand that is of a different kind compared to ligand 1, for instance

- (a) is capable of interacting in a way that does not involve charge-charge attractive interaction (second category), i.e. ligands that are uncharged under the 20 conditions provided in step (i), or
- (b) has a charge that enables interaction via charge-charge interaction but is of a different kind compared to ligand, i.e. is selected from the first category.

For (a) the interaction may involve van der Waals interaction, hydrophobic interaction and/or electron donor-acceptor interaction.

25

Another characteristic feature of ion-exchange adsorbents that are to be used in the inventive method is that the combination of ligands has been selected (according to type and degrees of substitution) such that the adsorbent:

- (A) is capable of binding the substance of interest in an aqueous reference liquid at 30 an ionic strength corresponding to 0.25 M NaCl; and
- (B) permits in the subinterval of the pH interval 2-12, where the substance has said charge, a maximal breakthrough capacity for the substance \geq 100 %, such as \geq 200 % or \geq 300% or \geq 500% or \geq 1000 %, of the breakthrough capacity of the substance for

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

9
(a) the corresponding anion-exchanger (adsorbent 2a) in which essentially all charged ligands are Q-ligands;; or
(b) the corresponding cation-exchanger (adsorbent 2b) in which essentially all charged ligands are SP-ligands.

5 By the term "SP groups" is meant sulphopropyl groups that can be obtained by reacting an allyl group with bisulphite, i.e. SP groups include $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ and its sulphonic acid isomers.

10 By the term "Q groups" is meant quaternary ammonium groups that can be obtained by reacting $-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ with halogen followed by reaction with trimethylamine, i.e. Q-groups include $-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ and its isomers containing a quaternary trimethylammonium group.

15 Adsorbent 2a is used when the charge on the substance is negative and adsorbent 2b when the charge on the substance is positive. The aqueous reference liquid in contains NaCl, buffer and the substance of interest carrying the charge.

20 The comparisons above refer to measurements performed under essentially the same conditions for ion-exchanger (1) and (2a) and for ion-exchanger (1) and (2b), i.e. pH, temperature, solvent composition, flow velocity etc are the same between (1) and (2a) and between (1) and (2b). The breakthrough capacities are measured at the same relative concentration of the substance in the flow through (for instance $c/c_0 = 10\%$ at a flow velocity of 300 cm/h, for c/c_0 see the experimental part).

25 The "corresponding anion-exchanger/cation-exchanger" means that the support matrix is the same, i.e. support material, bead size, pore sizes, pore volume, packing procedure etc are the same. The total degree of substitution for charged ligand(s) of ion-exchanger 1 is/are essentially the same as on the reference ion-exchanger (2a or 2b) (measured as chloride and sodium ion capacity, respectively). The counter-ion 30 should also be the same. The spacer and coupling chemistry may differ. Certain kinds of coupling chemistries may lead to cross-linking of the support matrix resulting in a more rigid matrix. In this case the flow conditions at which the comparison is made is selected at a level where the matrix is essentially non-compressed.

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

10 Typically a useful breakthrough capacity for the substance is higher than the maximal breakthrough capacity the substance has on
(a) the commercially available anion-exchanger Q-Sepharose Fast Flow (Amersham
5 Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) which has a chloride ion capacity of 0.18-
0.25 mmol/ml gel and/or
(b) the commercially available anion-exchanger SP-Sepharose Fast Flow
(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) which has a sodium ion
capacity of 0.18-0.25 mmol/ml gel.

10 The base matrix in these two reference ion-exchangers is epichlorohydrin cross-linked agarose in beaded form. The beads have diameters in the interval 45-165 μ m.
The exclusion limit for globular proteins is 4×10^6 .

15 From a practical point of view the above means that the breakthrough capacity for
the substance at issue should be > 2 mg/ml of wet gel, such as > 4 mg/ml of wet gel,
for a breakthrough of 10% at a flow velocity of 300 cm/h and at 0.25 M NaCl.

Breakthrough capacities refer to measurements made at room temperature, i.e.
about 25°C.

20 Ligands that are introduced by the use of the same reagent and conditions, for
instance in parallel during the same conditions, are considered to be of the same
kind even if they are structurally different. This in particular applies if the formed
ligands are isomers.

25 Ligands that are residual groups (unreacted groups) even after the use of large
excesses of derivatizing reagents in order to minimise these groups are considered
non-existent. Typically this type of groups is present in molar amounts less than 10%
such as less than 5 % compared to the starting amount of the group to be
30 derivatised.

The molar ratio between different ligands is typically in the interval of 0.01-100, often
with preference for the interval 0.02-50.

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

11

First category: Single and mixed mode ligands carrying a charge under the conditions provided in step (i).

The ligands of this category differ with respect to the charged atom or group and/or one or more of the closest 1-7 atoms, such as the closest 1-3 atoms:

- 5 (a) different nitrogens that are positively charged; for instance primary ammonium, secondary ammonium, tertiary ammonium, quaternary ammonium and amidinium;
- (b) different sulphurs that are positively charged, for instance sulphonium,
- (c) different oxygens that are negatively charged, for instance in groups such as

10 carboxylate (-COO⁻), phosphonate or phosphate (-PO₃²⁻, -P(OH)O₂⁻, and -OP(OH)O₂⁻, -OPO₃²⁻ respectively), sulphonate or sulphate (-SO₃⁻ and -OSO₃⁻ respectively), -aryl-O⁻ (phenolate/arylolate) etc.

The free bond (valence) binds directly to a carbon that is part of a chain attaching the group to the base matrix.

15

The concept of different kinds of charged ligands also includes the differences:

- (i) the charged atom of (a) and/or (b) above are part of a linear or cyclic structure, or that a cyclic structure is aromatic or non-aromatic and/or comprises a 4-, 5-, 6-, 7-, 8- etc membered ring.
- 20 (ii) the chain linking a charged atom of (a) or (b) above or the charged group of (c) above, next to these atoms/groups has a part of 1-3 atoms that differs with respect to type of carbon atoms and/or heteroatoms
- (iii) the ligand is a single or mixed mode ligand.

The difference outlined in (ii) includes that all or a portion of the carbon atoms are/is 25 selected amongst sp³-, sp²- and sp-hybridised carbons or that a heteroatom selected from thioether sulphur, ether oxygen and halogen may or may not be present.

Ligands may differ with respect to pKa-values. Relevant differences are typically \geq 0.5 pH units, such as ≥ 1 or ≥ 2 pH units.

30

Ligands that have a pH-dependent charge exist in an acid form and a base form.

The following applies for ion-exchange ligands that have a pH-dependent charge:

- a) Both of the ion-exchange ligand and its corresponding base is considered being ligands of the same kind as long as pH of liquid (l) is \leq pKa + 2.

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

12
b) Both of the ion-exchange ligand and its corresponding acid is considered being ligands of the same kind as long as the pH of liquid (l) is \geq pKa -2.
pKa stands for the pKa of (a) the ligand (alternative a) or the acid corresponding to the ligand (alternative b). If the pH of liquid (l) does not comply with these criteria the 5 charged form of the ligand is present in non-essential amounts.

The term "a single mode charged ligand" contemplates that the chain linking the charged atom (a or b above) or the charged group (c above) to the base matrix consists of atoms selected from sp^3 -hybridised carbons and single ether oxygen 10 within 7 atoms' distance from such an atom or group. Other groups attached to the chain are primarily hydrogens and/or hydroxy, and possibly also methyl and methoxy. A positive nitrogen atom binds other groups, e.g. selected amongst hydrogen and/or lower alkyls (C₁₋₅), such as methyl or ethyl. For a positively charged sulphur atom these additional groups are primarily selected amongst lower alkyls (C₁₋₅), such as 15 methyl or ethyl.

The term "a mixed mode charged ligand" contemplates that the ligand within a distance of 7 atoms from the charged atom (a or b above) or from the charged group (c above) has one, two or more atoms or groups that are able to participate in 20 hydrophobic interactions and/or electron-donor acceptor interactions as defined above, with the proviso that these atoms or groups are not a single ether oxygen, a single hydroxy or sp^3 -carbons. Typically the distance is 1, 2, 3, 4 atoms.

Hydrophobic interaction includes the interaction between a pure hydrocarbon group 25 of a ligand and a hydrophobic or lipid-like group in a substance. Suitable pure hydrocarbon groups comprise 2, 3, 4, 5, 6 or more carbon atoms (pure alkyl, pure aryl, pure aralkyl, pure alkylaryl, pure alkenyl, pure alkynyl etc and corresponding groups comprising two or more free bonds (valencies)). Van der Waals interaction may be a significant part of hydrophobic interactions.

30
Electron donor-acceptor interaction includes interactions such as hydrogen-bonding, $\pi-\pi$, charge transfer, etc. Electron donor-acceptor interactions mean that an electronegative atom with a free pair of electrons acts as a donor and bind to an electron-deficient atom that acts as an acceptor for the electron pair of the donor.

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

13

See Karger et al., "An Introduction into Separation Science", John Wiley & Sons (1973) page 42 for a discussion about electron donor acceptor interactions.

Illustrative examples of donor atoms/groups are:

- (a) oxygen with a free pair of electrons, such as in hydroxy, ethers, carbonyls, and esters (-O- and -CO-O-) and amides,
- (b) sulphur with a free electron pair, such as in thioethers (-S-),
- (c) nitrogen with a free pair of electron, such as in amines, amides including sulphone amides, carbamides, carbamates, amidines etc, cyano,
- (d) halo (fluorine, chlorine, bromine and iodine), and
- (e) sp- and sp²-hybridised carbons.

Typical acceptor atoms/groups are electron deficient atoms or groups, such as metal ions, cyano, nitrogen in nitro etc, and include also a hydrogen bound to an electronegative atom such as HO- in hydroxy and carboxy, -NH- in amides and amines, HS- in thiol etc.

15

Donor and acceptor atoms or groups may be located in

- the chain linking the charged atom or the charged group to the base matrix,
- a branch attached to said chain or
- a separate substituent directly attached to the charged atom or group (in particular for anion-exchange groups/ligands).

An electron donor/acceptor atom or group may be present in a branch attached to the chain linking the ligand to the base matrix and at a distance of 7 or more atoms from the charged atom or charged group. In such a case the complete branch is considered as a separate ligand.

25

Particularly interesting mixed mode charged ligands have a thioether (-S-) and/or a sp²-hybridised carbon, such as an aromatic carbon, within the above-mentioned distances of the charged atoms or groups. See for instance our copending International Patent Applications PCT/EP00/11605 (Amersham Pharmacia Biotech AB) and PCT/EP00/11606 (Amersham Pharmacia Biotech AB) (both of which refer to anion-exchange ligands), and SE 0002688-0 filed July 17, 2000 (cation-exchange ligands) and WO 996507 (Amersham Pharmacia Biotech AB) (cation-exchange ligands). WO 9729825 (US 6,090,288) (Amersham Pharmacia Biotech AB) discloses mixed mode anion-exchange ligands which have one or more hydroxy and/or

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

14 amino/ammonium nitrogen at a position 2-3 carbon from a primary, secondary or tertiary ammonium nitrogen. Mixed mode ion-exchange ligands that are potentially useful in the instant innovative method are described in WO 9808603 (Upfront Chromatography), WO 9800735, WO 9809116 and US 5,652,348 (Burton et al). All 5 the publications referred to in this paragraph are incorporated by reference.

In the thioethers (-S-) contemplated above, each of the free bonds (valences) binds to a sp^2 - or sp^3 -hybridised carbon which may or may not be part of a cyclic structure that may or may not be aromatic or non-aromatic. The term "thioethers" as 10 contemplated herein thus comprises thiophene and other heteroaromatic rings comprising sulphur as a ring atom.

There may also be a pure hydrocarbon group of the alkyl type comprising 3, 4, 5 or more carbon atoms within the above-mentioned distances.

15 The aromatic ring structure contemplated above may comprise one or more aromatic rings, for instance a phenyl, a biphenyl or a naphthyl structure and other aromatic ring systems that comprise fused rings or bicyclic structures. Aromatic rings may be heterocyclic, i.e. contain one or more nitrogen, oxygen or sulphur atoms, and may 20 have substituents. These other substituents may contain an electron donor or acceptor atom or group, for instance enabling hydrogen-bonding and/or other electron donor-acceptor interactions. Illustrative aromatic ring structures are: hydroxyphenyl (2-, 3- and 4-), 2-benzimidazolyl, methylthioxyphenyl (2-, 3- and 4-), 3-indolyl, 2-hydroxy-5-nitrophenyl, aminophenyl (2-, 3- and 4-), 4-(2-aminoethyl) 25 phenyl, 3,4-dihydroxyphenyl, 4-nitrophenyl, 3-trifluoromethylphenyl, 4-imidazolyl, 4-aminopyridine, 6-aminopyrimidyl, 2-thienyl, 2,4,5-triaminophenyl, 4-aminotriazinyl-, 4-sulphoneamidophenyl etc.

The pKa of the preferred anion-exchange ligands and of the corresponding acids for 30 the preferred cation-exchange ligands can be found in the interval from 3 and upwards and is preferably below 11, preferably in the interval of 4-9 in order to permit appropriate decharging of the ion-exchange ligand.

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

15

Particularly interesting anion-exchange ligands have a pH dependent charge and have pKa values that are ≤ 12.0 , such as ≤ 10.5 . This means that these ligands comprise a charged group, which preferably is selected amongst primary or secondary ammonium groups or tertiary ammonium groups. Tertiary ammonium groups in which the nitrogen is part of an aromatic structure and ammonium groups having an aromatic carbon in its α - or β -position may have pKa values below 8. Normally the pKa of anion-exchange ligands is ≥ 3 , such as ≥ 4 .

Particularly interesting negatively charged ligands carry a pH-dependent charge. The pKa-values for the corresponding acids normally are ≥ 3 , such as ≥ 4 . These kind of ligands thus should comprise charged groups selected amongst carboxylate ($-COO^-$), phosphonate or phosphate ($-PO_3^{2-}$, $-P(OH)O_2^-$, and $-OP(OH)O_2^-$, $-OPO_3^{2-}$ respectively), $-aryl-O^-$ (phenolate/aryloate) and other weak acid groups.

15 This does not exclude that ion-exchanging ligands corresponding to

- strong acids ($pKa \leq 3$, such as ≤ 2 or ≤ 0) (the corresponding base acts as a cation-exchange ligand), and
- weak acids ($pKa \geq 10$, such as ≥ 12 ,etc) or ligands carrying a charge that is independent of pH

20 will also have advantages when they are incorporated in an ion-exchanger that is to be used in our new and innovative desalting method. As for the other ion-exchanging groups, these advantages are dependent on the properties of the particular substance to be desalted, for instance its isoelectric point and the strength of its interaction with the ion-exchanger.

25

The pKa-value of a ligand is taken as the pH at which 50 % of the ligand in question are titrated.

30 **Second category: Ligands that are uncharged under the conditions provided in step (I) but capable of interacting with the desired charged substance.**

There are mainly two kinds of uncharged ligands:

- (a) ligands that can be charged by a pH-switch (class I) and

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

16

(b) ligands that can not be charged by a pH switch (class II).

Class I comprises uncharged forms of ligands that can have a pH-dependent charge.

See above.

5

A Class II ligand contains one or more structural elements that can give rise to hydrophobic interactions and electron donor-acceptor interactions as discussed above. In a typical class II ligand there are two, three, four or more electron donor-acceptor atoms or groups as defined above. Each of the atoms or groups is 10 separated from other electron donor acceptor atoms or groups by two, three, four or more sp^3 -hybridised carbon atoms linked directly to each other.

A ligand of class II is defined as the outermost part of a group that is projecting from the base matrix and complies with the definition in the preceding paragraph. By the 15 term "outermost" is contemplated atoms that are at 1-7 atoms' distance from the outermost atom that is capable of participating in electron donor-acceptor interactions or in hydrophobic interactions involving an alkyl group as defined above.

Each ligands of the second category can thus be used as Ligand 2 in the ion- 20 exchangers provided the ligand comprises one or more atoms which enables electron donor-acceptor interactions and/or hydrophobic interactions. Examples of atoms and/or groups that may be present are: aryls that may be substituted or unsubstituted including phenyl groups, pure alkyl and pure alkylene (C_3 and higher with preference for less than C_8), thioether, ether, uncharged amino, hydroxy, amido 25 (carboxamido including sulphonamido, carbamido, carbamate etc), nitro, sulphone, uncharged carboxy etc. In this kind of ligands, two or more sp^3 -hybridised carbon atoms linked directly together often separate the atoms or groups from each other.

The different ligands in stochastic ion-exchangers may be present more or less at 30 random in relation to each other in the support matrix or in a part thereof. Depending on the method of introduction the ratio between the amounts of the ligands may vary but should always be 0.01-100, with preference for 0.02-50, for at least two ligands in a substantial part of the matrix. In order to accomplish uneven or layered distribution of different ligands within a support, the general principals outlined in WO 9839364

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

17

(Amersham Pharmacia Biotech AB) can be used. Due care has to be taken with respect to values of reactivity, diffusivity and concentration of ligand-forming reagents so that the sharp layers that are the primary goal in these two patent publications are not introduced. WO 9839364 is hereby incorporated by reference.

5

Particularly interesting stochastic ion exchangers comprise as Ligand 1 a strong ion-exchange ligand and as Ligand 2 a ligand can be charged/decharged by a switch in pH. Two typical combinations are:

10 (a) a strong cation-exchange ligand as Ligand 1 combined with a weak anion-exchange ligand as Ligand 2, or
(b) a strong anion-exchange ligand as Ligand 1 and a weak cation-exchange ligand as Ligand 2.

In this context a strong cation-exchange ligand has a corresponding acid with a pKa < 3-4. Examples of strong anion-exchange ligands are quaternary ammonium 15 ligands and anion-exchange ligands having a pKa > 10, such as ≥ 11 or ≥ 12 . Other kinds of ion-exchange ligands are considered weak.

Other interesting combinations are for instance stochastic ion-exchangers having two different weak anion- or cation-exchange ligands of similar pKa on the same base 20 matrix, or a weak anion- and a weak cation-exchange ligand bound to the same matrix. The ligands can be selected such that the difference in pKas is less than, larger than or equal to two, three or four pH-units.

The largest advantages with combining ligands of different kind concern desalting of 25 amphoteric substances. The ligands are typically combined in such a way that one of the ligands is charged (Ligand 1) while the other one (Ligand 2) is uncharged during step (i) and capable of becoming charged with the same charge as the substance to be released during step (ii). It follows that the proper combination will depend on the isoelectric point (pI) of the substance to be desalted. See further below.

30

Support matrix/Base matrix.

The support matrix comprises the base matrix and any spacer attaching a ligand to the base matrix.

The base matrix is based on organic and/or inorganic material.

The base matrix is preferably hydrophilic and in the form of a polymer, which is insoluble and more or less swellable in water. Hydrophobic polymers that have been 5 derivatized to become hydrophilic are included in this definition. Suitable polymers are polyhydroxy polymers, e.g. based on polysaccharides, such as agarose, dextran, cellulose, starch, pullulan, etc. and completely synthetic polymers, such as polyacrylic amide, polymethacrylic amide, poly(hydroxyalkyl/vinyl ethers), poly(hydroxyalkylacrylates) and polymethacrylates (e.g. polyglycidylmethacrylate), 10 polyvinyl alcohols and polymers based on styrenes and divinylbenzenes, and copolymers in which two or more of the monomers corresponding to the above-mentioned polymers are included. Polymers, which are soluble in water, may be derivatized to become insoluble, e.g. by cross-linking and by coupling to an insoluble body via adsorption or covalent binding. Hydrophilic groups can be introduced on 15 hydrophobic polymers (e.g. on copolymers of monovinyl and divinylbenzenes) by polymerisation of monomers exhibiting groups which can be converted to OH, or by hydrophilization of the final polymer, e.g. by adsorption of suitable compounds, such as hydrophilic polymers.

20 Suitable inorganic materials to be used in base matrices are silica, zirconium oxide, graphite, tantalum oxide etc.

Preferred matrices lack groups that are unstable against hydrolysis, such as silan, ester, amide groups and groups present in silica as such. This in particular applies 25 with respect to groups that are in direct contact with the liquids used.

The matrix may be porous or non-porous. This means that the matrix may be fully or 30 partially permeable (porous) or completely impermeable to the substance to be removed (non-porous), i.e. the matrix should have a Kav in the interval of 0.40-0.95 for substances to be removed. This does not exclude that Kav may be lower, for instance down to 0.10 or even lower for certain matrices, for instance having extenders. See for instance WO 9833572 (Amersham Pharmacia Biotech AB).

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

19

In a particularly interesting embodiment of the present invention, the matrix is in the form of irregular or spherical particles with sizes in the range of 1-1000 μm , preferably 5-50 μm for high performance applications and 50-300 μm for preparative purposes.

5

Alternatively the matrix may be monolithic, such as a wall in a tube or in some other kind of vessel, a porous plug, a porous membrane or a filter.

The matrix may be in form of beads/particles with a density, which is larger than the 10 liquid used in step (i). This kind of matrices is especially applicable in large-scale operations for fluidised or expanded bed chromatography as well as for different batch wise procedures, e.g. in stirred tanks. Fluidised and expanded bed procedures are described in WO 9218237 (Amersham Pharmacia Biotech AB) and WO 9200799 (Kem-En-Tek).

15

The term hydrophilic matrix means that the accessible surface of the matrix is hydrophilic in the sense that aqueous liquids are able to penetrate the matrix. Typically the accessible surfaces on a hydrophilic base matrix expose a plurality of polar groups for instance comprising oxygen and/or nitrogen atoms. Examples of 20 such polar groups are hydroxyl, amino, carboxy, ester, ether of lower alkyls (such as $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-)_n\text{H}$ where n is an integer).

The spacer starts at the base matrix and extends to the ligand as defined above.

25 The spacer as such is conventional as in traditional ion-exchangers and may thus comprise linear, branched, cyclic saturated, unsaturated and aromatic hydrocarbon groups (e.g. with up to 1-20, such as 1-10 carbon atoms) as discussed above. These groups may comprise pure hydrocarbon groups of the type discussed above, hydroxy groups, alkoxy and aryloxy and the corresponding thio analogues, and/or 30 amino groups. Carbon chains in hydrocarbon groups may at one or more positions be interrupted by ether oxygen and thioether sulphur. There may also be carbonyl groups, such as in amide and ketone groups, and other groups having the comparable stability against hydrolysis. At most one atom selected from oxygen,

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

20 sulphur and nitrogen is preferably bound to one and the same sp^3 -hybridised carbon atom.

It is apparent that the spacer may provide one or more electron donor or acceptor atoms or groups enhancing binding of the desired substance to the ion-exchanger as discussed above, for instance by participating in hydrogen-bonding. For reason of simplicity, this kind of atoms or groups is considered part of the spacer. There may also be attached more than one ligand to one and the same spacers. See "branches" above.

10

Ligand density.

The level of the ion-exchange ligands of the adsorbents used in the invention is usually selected in the interval of 0.001-4 mmol/ml of the matrix, such as 0.002-0.5 mmol/mL of the matrix, with preference for 0.005-0.3 mmol/ml of the matrix. Preferred ranges are among others determined by the kind of matrix, kind of ligand, substance to be adsorbed etc. The expression "mmol per ml of the matrix" refers to fully sedimented matrices saturated with water. The ligand density range refers to the capacity of the matrix in fully protonated/charged form to bind common counterions such as sodium ions and/or chloride ions and depends on the kind of anionic and/or cationic ligands that is present, among others.

Best Mode

The best mode variants of the invention vary with the substance of interest. The best modes so far discovered are presented in the experimental part.

25

Stability of the ion-exchangers used

The ion-exchangers/anion-exchange ligands used in the invention should withstand the conditions typically applied in processes comprising ion-exchange adsorptions. As a general rule, this means that an adsorbent according to the invention should be able to resist 0.1 or 1 M NaOH in water for at least 10 hours with essentially no reduction in total ion binding capacity. By "essentially no reduction in total ion binding capacity" is contemplated that the total ion binding capacity is reduced at most by 10%. This means that the ion-exchange ligand and the base matrix should only contain structures selected among pure hydrocarbon groups (including

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

21

homoaromatic and heteroaromatic structures), thioether and ether groups (including acetal and ketal groups), hydroxy groups, sulphone groups, carboxamide groups, sulphone amide groups, and groups of similar hydrolytic stability.

5 Adsorption/desorption

The adsorption and/or desorption steps may be carried out as a chromatographic procedure with the anion-exchange matrix in a monolithic form or as particles in the form of a packed or a fluidised bed. For particulate matrices, these steps may be carried out in a batch-wise mode with the particles being more or less completely 10 dispersed in the liquid.

The liquids used in steps (i) and (ii) are aqueous, i.e. water, possibly mixed with a water-miscible solvent.

15 Adsorption

During adsorption, a liquid sample containing the charged substance is contacted with the ion-exchanger defined above under conditions permitting adsorption (binding), preferably by ion-exchange. In other words the substance carries at least one group or atom that is oppositely charged compared to the ligand having the 20 strongest tendency to be charged during the adsorption step (i).

Preferably the net charge of the substance is opposite to the net charge of the ion-exchanger during step (i). For an amphoteric substance that is present in an aqueous liquid, anion-exchange conditions typically mean a $\text{pH} \geq \text{pI}-0.5$, preferably 25 $\text{pH} \geq \text{pI}$, and cation-exchange conditions a $\text{pH} \leq \text{pI}+0.5$, preferably $\text{pH} \leq \text{pI}$.

One of the benefits of the invention is that it will be possible to carry out adsorption/binding also at elevated ionic strengths compared to what normally has been done for conventional ion-exchangers (e.g. the reference anion-exchangers as 30 defined above). In absolute figures this means that adsorption according to the present invention may be performed at ionic strengths above or below 15 or 20 mS/cm. The ionic strength may exceed 30 mS/cm and in some cases even exceed 40 mS/cm. Useful ionic strengths often correspond to NaCl concentrations (pure water) ≥ 0.1 M, such as ≥ 0.3 M or even ≥ 0.5 M. The conductivity/ionic strengths to

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

22

be used will depend on the ligands combined, their densities on the matrix, the substance to be bound and its concentration etc.

Desorption

5 The desorption process should comprise at least one of the following procedures:
(A) increasing the salt concentration (ionic strength);
(B) altering the pH in order to loosen the interaction between the desired substance and the ligands;
(C) Adding a ligand analogue or an agent (e.g. a solvent) that reduces the polarity of

10 the aqueous liquid (I).
Item (B) may include (a) diminishing the charge on ligands that bind via ion-ion attractive interaction to the desired substance; and (b) diminishing the charge of a group on the desired substance that binds to a ligand having the opposite charge.
The change in pH can many times be taken so that the ligand and the substance will

15 have the same charge during step (ii).

The conditions provided by (A)-(C) may be used in combination or alone. The proper choice will depend on the particular combination of

(1) substance to be desorbed,
20 (2) ion-exchanger (ligands, kind of matrix, spacer and ligand density), and
(3) various variables of aqueous liquid II (composition, polarity, temperature, pH etc).
Replacing aqueous liquid (I) (adsorption buffer) with aqueous liquid (II) (desorption buffer), thus means that at least one variable such as temperature, pH, polarity, ionic strength, content of soluble ligand analogue etc shall be changed while maintaining
25 the other conditions unchanged so that desorption can take place.

In the simplest cases this means:

(a) an increase in ionic strength and/or
(b) a change in pH as outlined above
30 when changing from aqueous liquid I to aqueous liquid II. Alternative (a) includes a decreased, a constant or an increased pH. Alternative (b) includes a decreased, an increased or a constant ionic strength.

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

23

In chromatographic and/or batch procedures the matrix with the substance to be desorbed is present in a column or other suitable vessel in contact with liquid (I). The conditions provided by the liquid are then changed as described above until the desired substance is eluted from the matrix. A typical desorption process means that 5 the ionic strength is increased compared to that used during adsorption and in many cases corresponds to at least 0.4 M NaCl, such as at 0.6 M NaCl, if none of the other variables are changed. The actual ionic strength value for elution/desorption may in preferred cases be lower and will depend on the various factors discussed above. If the ligands are properly selected it may suffice with a change in pH in order to 10 change the net charge of the ligands and/or of the substance such that they are of opposite kind. This implies the possibility of reducing the salt concentration to be essentially the same as the concentration of the buffer used.

The requirement for using an increased ionic strength for desorption may be less 15 strict depending on the conditions provided by aqueous liquid II. See below.

The change from liquid (I) to liquid (II) can be accomplished in one or more steps (step-wise gradient) or continuously (continuous gradient). The various variables of the liquid in contact with the matrix may be changed one by one or in combination.

20

Typical salts to be used for changing the ionic strength are selected among chlorides, phosphates, sulphates etc of alkali metals or ammonium ions).

The buffer components to be used for changing pH are dependent upon the kind of 25 ligands involved and are typically the same as during the adsorption step. For instance, if the ion-exchange ligand is cationic the buffering acid base pair is preferably selected amongst acid-base pairs in which the buffering components can not bind to the ligand, i.e. buffers based on piperazine, 1,3-diaminopropane, ethanolamine etc. In an analogous fashion, the buffering acid-base pair in the case 30 the ion-exchange ligand is anionic is phosphate, citrate, acetate, etc.

Desorption may also be assisted by adjusting the polarity of liquid (II) to a value lower than the polarity of the adsorption liquid (I). This may be accomplished by including a water-miscible and/or less hydrophilic organic solvent in liquid II.

WO 02/053252

24

PCT/EP01/14895

Examples of such solvents are acetone, methanol, ethanol, propanols, butanols, dimethyl sulfoxide, dimethyl formamide, acrylonitrile etc. A decrease in polarity of aqueous liquid II (compared to aqueous liquid I) is likely to assist in desorption and thus also reduce the ionic strength needed for release of the substance from the matrix.

Desorption may also be assisted by including a soluble structural analogue of one or more of the ligands used. The concentration of a structural analogue in liquid (II) should be larger than its concentration in aqueous liquid (I). A "structural analogue of the ligand" or a "ligand analogue" is a substance that has a structural similarity with the ligand and in soluble form is capable of inhibiting binding between the ligand and the substance to be removed.

Important variants.

15 **Variant 1:** Ligand 1 is a cation-exchange ligand that has a pH-dependent negative charge and ligand 2 is either unchargeable or a chargeable base for which a significant portion is uncharged at the pH of step (i). pKa of the acid corresponding to ligand 1 is lower than pKa of the acid corresponding to ligand 2 (if chargeable). The substance to be adsorbed has a pI, which is above pKa of ligand 2. The pH of liquid 20 (I) is selected such that the substance has a net positive charge, i.e. will adsorb to the ion-exchanger. By decreasing the pH, the substance and possibly also ligand 2 will be protonated and receive an increased positive charge. This will assist the release of the substance at a moderate pH and will permit desorption at a lowered salt concentration in liquid (II).

25

Variant 2: Ligand 1 comprises an anion-exchange ligand that has a pH dependent positive charge and ligand 2 is either completely unchargeable or a chargeable acid form for which a significant portion is uncharged at the pH of the step (i). The pKa of the ligand 2 is higher than the pKa of the ligand 1. The pI of the substance to be 30 adsorbed (desalted) is below both pKa of ligand 1 and pKa of ligand 2. The pH of liquid (I) (step (i)) is such that substance has a net negative charge and ligand 1 a positive charge while ligand 2 is essentially uncharged. The substance thus will be adsorbed in step (i). By increasing the pH, ligand 2 will become negatively charged meaning desorption of the substance at a lowered salt concentration in liquid (II).

Recovery

In a sub-aspect the present inventive method enables high recoveries of an adsorbed substance, for instance recoveries above 60% such as above 80% or 5 above 90%. Recovery is the amount of the desorbed substance compared to the amount of the substance applied to an ion-exchanger in the adsorption/binding step. In many instances, the recovery can exceed even 95% or be essentially quantitative according to the inventive merits of the invention. Typically the amount of the substance applied to the ion-exchanger is in the interval of 10-80%, such as 20-60%, 10 of the total binding capacity of the ion-exchanger for the substance.

The substance to be removed from the liquid (I).

The present invention is primarily intended for large molecular weight substances that have several structural units that can interact with the ligands defined above. 15 Appropriate substances have a molecular weight that is above 1000 Dalton, and is bio-organic and polymeric. The number of charged groups per molecule is typically one or more and depends upon pH. Further comments concerning the molecular weight and the number of charges are given under the heading "Technical Field" .. The substances may be amphoteric. The substances typically comprise a structure 20 selected amongst peptide structure (for instance oligo- or polypeptide structure), nucleic acid structure, carbohydrate structure, lipid structure, steroid structure, amino acid structure, nucleotide structure and any other bio-organic structure that is charged or can be charged by a pH-switch.

25 The substance may be dissolved in the aqueous medium or be in the form of small bio-particles, for instance of colloidal dimensions. Illustrative examples of bio-particles are viruses, cells (including bacteria and other unicellular organisms) and cell aggregates and parts of cells including cell organelles.

30 It is believed that the invention in particular will be applicable to aqueous liquids that are derived from biological fluids comprising a substance of interest together with high concentrations of salts.

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

26

Typical liquids of high ionic strength that contain bio-organic substances of the kind discussed above are fermentation broths/liquids, for instance from the culturing of cells, and liquids derived therefrom. The cells may originate from a vertebrate, such as a mammal, or an invertebrate (for instance cultured insect cells such as cells from butterflies and/or their larvae), or a microbe (e.g. cultured fungi, bacteria, yeast etc). Included are also plant cells and other kinds of living cells, preferably cultured.

In the case liquid (I) also contains undesirable particulate matter then it may be beneficial to utilise expanded bed technology. This particularly applies when liquid (I) originates from (a) a fermentation broth/liquid from the culture of cells, (b) a liquid containing lysed cells, (c) a liquid containing cell and/or tissue homogenates, and (d) pastes obtained from cells.

The ion exchangers described herein are particularly well adapted for the manufacture of aqueous compositions containing bio-organic substances which have reduced concentrations of salt compared to an aqueous starting composition which is high in the concentration of salt. This kind of processes means desalting of the substance in question. See further our SE patent application filed in parallel with this application and having the title "A method for the manufacture of compositions containing a low concentration of salt".

The second aspect of the invention

This aspect comprises an ion-exchange adsorbent (1) which is selected amongst ion-exchange adsorbents that are characterised by comprising a support matrix which is functionalised with at least two different ligands (Ligand 1, Ligand 2) for which at least one ligand has a charge which may or may not be pH-dependent

Ligand 1 is charged and can be of the single or mixed mode ion-exchange kind. Ligand 1 thus may or may not contain neutral groups that enable the ligand to participate in van der Waals interactions and/or electron donor-acceptor interactions. The atoms and/or groups involved are the same as defined above for the first aspect of the invention.

WO 02/053252

27

PCT/EP01/14895

Ligand 2 may be neutral or charged. If charged the charged atom or group of the ligand is typically of a different kind compared to the charged atom or group of ligand 1. For relevant differences, see the first aspect of the invention. A charged ligand may in the same manner as ligand 1 be a single mode or a mixed mode ligand.

5 Independent of being charged or not charged, ligand 2 may comprise uncharged groups and/or atoms that enable the ligands to participate in hydrophobic interactions and/or electron donor-acceptor interactions as discussed for ligand 1 above and for the first aspect of the invention.

10 The ion-exchanger of this aspect is further characterised in that it for at least one reference substance selected amongst ovalbumin, conalbumin, bovine serum albumin, β -lactoglobulin, α -lactalbumin, lysozyme, IgG, soybean trypsin inhibitor (STI):

(A) is capable of binding said at least one reference substance in an aqueous reference liquid having an ionic strength corresponding to 0.25 M NaCl; and

15 (B) has a maximal breakthrough capacity for said at least one reference substance which in the subinterval of the pH interval 2-12, where the substance has a net charge opposite to a charged ligand, which is $\geq 100\%$, such as $\geq 200\%$ or $\geq 300\%$ or $\geq 500\%$ or $\geq 1000\%$, of the breakthrough capacity of said at least one substance on

20 (a) Q Sepharose Fast Flow (ion-exchanger 2a), when the net charge of the substance is negative and the net charge of the ion-exchange adsorbent is positive, and/or

(b) SP Sepharose Fast Flow (ion-exchanger 2b), when the net charge of the substance is positive and the net charge of the ion exchange adsorbent is

25 negative.

The aqueous reference liquid in principle contains NaCl, buffer components and the substance of interest carrying the charge. Q Sepharose Fast Flow and SP Sepharose Fast Flow are given under the first aspect of the invention.

30 The comparisons above refer to measurements performed under essentially the same conditions for ion-exchanger (1) and (2a) or for ion-exchanger (1) and (2b), i.e. pH, temperature, solvent composition, counter-ions, and flow velocity are the same. Breakthrough capacities are measured at the same relative concentration of the

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

28

substance in the flow through (for instance $c/c_0 = 10\%$, for c/c_0 see the experimental part).

Typically the breakthrough capacity (10% in the flow through at a flow rate of 300 cm/h) for at least one, two, three or more of the reference substances for an ion-exchanger of this aspect of the invention is > 2 mg/ml gel such as > 3 or 4 mg/ml gel.

The various embodiments and their preferences are the same as for the ion-exchanger defined for the first aspect of the invention.

10

The invention will now be illustrated with patent examples. The invention is further defined in the appending claims.

EXPERIMENTAL

1. SYNTHESIS OF STOCHASTIC ION-EXCHANGE ADSORBENTS

General:

Volumes of matrix refer to settled bed volume. Weights of matrix given in gram refer to suctioned dry weight. For large-scale reactions, stirring performed with a motor-driven stirrer. Small-scale reactions (up to 20 ml of gel) were performed in closed vials on a shaking table. Determination of the degrees of allylation, epoxidation, substitution of ion-exchanger groups on the beads was performed with conventional methods. If needed elementary analysis of the gels in particular for sulphur was carried out.

25

The synthesised ion-exchange adsorbents had Sepharose 6 Fast Flow (APBiotech AB, Uppsala, Sweden) as the base matrix.

30 1.1 Introduction of allyl groups on Phenyl Sepharose 6 Fast Flow

Allylation was carried out with allyl glycidyl ether. There are also other alternative routes, e.g. reaction with allyl bromide.

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

29

1.1.1. Introduction of allyl groups on Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low-substituted, 20 μ mol phenyl/ml of gel).**a) Low degree of allyl substitution.**

5 50 g (50 ml drained gel) of Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low-substituted 20 μ mol phenyl/ml of gel) in 10 ml water were mixed with 20 ml of an aqueous solution containing NaOH (50%), 0.2 g of NaBH₄ and 6.5 g of Na₂SO₄. The mixture was stirred for 1 hour at 50 °C. After addition of 7 ml of allylglycidyl ether the suspension was left at 50 °C under vigorous stirring for an additional 18 hours. After filtration of the mixture, the gel was washed successively, with 5x50 ml of 10 distilled water, 5x50 ml of ethanol, 2x50 ml of distilled water, 2x50 ml of 0.2 M acetic acid and, 5x50 ml of distilled water. The degree of substitution was 0.13 mmol of allyl/ml of gel.

b) Medium degree of allyl substitution.

15 The procedure was the same as in 1.1.1.a except that 28 ml of allylglycidyl ether were used. The degree of substitution was 0.22 mmol of allyl/ml of gel.

c) High degree of allyl content.

16 The procedure was the same as in 1.1.1.a except that 50 ml of allylglycidyl ether were used. The degree of substitution was 0.4 mmol of allyl/ml of gel.

20

1.1.2. Introduction of allyl groups on Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high-substituted, 40 μ mol of phenyl/ml).**a) Low degree of allyl content.**

20 50 g (50 ml drained gel) of Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high-substituted, 40 μ mol of phenyl/ml of gel) in 10 ml of water were mixed with 20 ml of an aqueous solution containing NaOH (50%), 0.2 g of NaBH₄ and 6.5 g of Na₂SO₄. The mixture was stirred for 1 hour at 50 °C. After addition of 7 ml of allylglycidyl ether the suspension was left at 50 °C under vigorous stirring for an additional 18 hours. After filtration of the mixture, the gel was washed successively, with 5x50 ml of 30 distilled water, 5x50 ml of ethanol, 2x50 ml of distilled water, 2x50 ml of 0.2 M acetic acid and, 5x50 ml of distilled water. The degree of substitution was 0.17 mmol of allyl/ml of gel.

b) Medium degree of allyl content.

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

30

The procedure is the same as in 1.1.2.a except that 28 ml of allylglycidyl ether were used. The degree of substitution was 0.22 mmol of allyl/ml of gel.

c) High degree of allyl content.

The procedure is the same as in 1.1.2.a except that 50 ml of allylglycidyl ether 5 were used. The degree of substitution was 0.4 mmol of allyl/ml of gel.

1.2. Preparation of Sulfopropyl Phenyl Sepharose 6 Fast Flow

1.2.1. Introduction of sulfopropyl on Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low-substituted, 20 µmol of phenyl/ml).

a) From intermediate product prepared under 1.1.1.a. The obtained product is designated as Cat3.

9 g of sodium disulfite were added to a slurry of 45 g (45 ml drained gel) of allyl 15 low-substituted allyl (0.13 mmol of allyl/ml of gel) low-substituted Phenyl (20 µmol of phenyl/ml of gel) Sepharose 6 Fast Flow in 15 ml of water. The pH was adjusted to 6.5 by addition of an aqueous solution of NaOH (50%). The reaction was maintained for 18 hours under stirring at room temperature with a slow air bubbling. After filtration of the mixture, the gel was washed successively, with 4 x 20 50 ml of distilled water, 2 x 50 ml of 0.5 M HCl and, 3 x 50 ml of 1mM HCl. The degree of substitution was 0.12 mmol of sulfopropyl/ml of gel.

b) From intermediate product prepared under 1.1.1.b. The obtained product is designated as Cat4.

The procedure is the same as in 1.2.1.a except that the degree of substitution of 25 allyl was 0.22 mmol/ml of gel and the reaction time was 17 hours. The degree of substitution was 0.18 mmol of sulfopropyl/ml of gel.

1.2.2. Introduction of sulfopropyl on Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high-substituted, 40 µmol of phenyl/ml of gel).

a) From intermediate product prepared under 1.1.2.a. The obtained product is designated as Cat1.

The procedure is the same as in 1.2.1.a except that the allyl content was 0.17 30 mmol allyl/ml of gel and Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high-substituted, 40 µmol

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

31
of phenyl/ml of gel) was used. The degree of substitution was 0.12 mmol sulfopropyl/ml of gel.

5 **b) From intermediate product prepared under 1.1.2.b. The obtained product is designated as Cat2.**

The procedure was the same as in 1.2.1.a except that the allyl content was 0.22 mmol of allyl/ml of gel and Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high-substituted, 40 of μ mol phenyl/ml of gel) was used. The degree of substitution was 0.15 mmol sulfopropyl/ml of gel.

10

1.3. Activation of allylated Phenyl Sepharose 6 Fast Flow.

Bromine was added to a stirred suspension 50 ml of allylated Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (0,4 mmol of allyl/ml of gel), 50 ml of distilled water and 2 g of sodium acetate until a persistent yellow colour was obtained. Sodium formate was then 15 added until the suspension was fully decolourised. The reaction mixture was filtered and the gel washed with 250 ml of distilled water. The activated gel was then transferred to a reaction vessel and further reacted with the appropriate ligand-forming compound.

20 **1.4. Anion-exchangers derived from Phenyl Sepharose 6 Fast Flow**

1.4.1. Introduction of an amine ligand derived from 1,3-Diaminopropane on Phenyl Sepharose 6 Fast Flow.

25 **a) From intermediate product prepared under 1.1.2.c. The obtained product is designated as An1.**

5 ml of bromine activated allylated Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (0,4 mmol of allyl/ml of gel; 40 μ mol of phenyl/ml of gel) was transferred to a reaction vial containing 1,3-diaminopropane (7.5 ml, ligand-forming compound). The reaction was continued for 17 hours under stirring at 55 °C. After filtration of the reaction 30 mixture the gel was successively washed with 3x 10 ml of distilled water, 3x 10 ml of aqueous 0.5 M HCl and finally 3x 10 ml of distilled water. The degree of substitution was 0,24 mmol of ion-exchange ligand/ml of gel.

b) From intermediate product prepared under 1.1.1.c. The obtained product is designated as An2.

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

32

The procedure is the same as in 1.4.1.a except that allylated Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (0,4 mmol of allyl/ml of gel, 20 μ mol of phenyl/ml of gel) was used. The degree of substitution was 0.25 mmol of ion-exchange ligand/ml of gel.

5 **1.4.2. Introduction of an amine ligand derived from 1,3-Diamino-2-hydroxy propane on Phenyl Sepharose 6 Fast Flow.**

a) *From intermediate product prepared under 1.1.2.c. The obtained product is designated as An3.*

The procedure is the same as for 1.4.1 except that allylated Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (0,4 mmol of allyl/ml of gel, 40 μ mol of phenyl/ml of gel) and solution of 1,3-diamino-2-propanol (3 g) in distilled water (1,5 ml) instead of 1,3-diaminopropane were used. The degree of substitution was 0.16 mmol of ion-exchange ligand/ml of gel.

b) *From intermediate product prepared under 1.1.1.c. The obtained product is designated as An4.*

The procedure is the same as for 1.4.2.a except that allylated Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (0,4 mmol of allyl/ml of gel, 40 μ mol of phenyl/ml of gel) was used. The degree of substitution was 0.16 mmol of ion-exchange ligands/ml of gel.

20 **1.5. Cation-exchangers derived from Phenyl Sepharose 6 Fast Flow**

1.5.1. **Introduction of a carboxy ligand derived from mercaptopropionic acid on Phenyl Sepharose 6 Fast Flow.**

a) *From intermediate product prepared under 1.1.1.c. The obtained product is designated as Cat5.*

25 100 ml of bromine activated allylated Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (0,42 of mmol allyl/ml of gel, 40 μ mol of phenyl/ml of gel) was transferred to a reaction vessel and treated with an aqueous solution (50 ml of distilled water) of 17.5 ml of mercaptopropionic acid (6 equivalents per allyl group) and 12 g of NaCl. Before 30 the addition, the pH was adjusted to 11.5 with 50 % aq. NaOH. The reaction was continued for 18 hours under stirring at 50 °C. Filtration of the reaction mixture and washing with 500 ml of distilled water gave the cation-exchange gel. The degree of substitution was 0.27 mmol of CO₂H ligands/ml of gel.

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

33

b) From intermediate product prepared under 1.1.1.c. The obtained product is designated Cat5.

The procedure was the same as in 1.5.1.a except that allylated Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (0.41 mmol of allyl/ml of gel, 20 μ mol of phenyl/ml of gel) was used 5 and the batch size was 50%. The degree of substitution was 0.28 mmol CO₂H ligands/ml of gel.

1.6. Introduction of a carboxy ligand derived from mercaptopropionic acid and a pyridyl ligand derived from 2-mercaptopyridine on Sepharose 6 Fast Flow.

10

1.6.1. Preparation of allylated Sepharose 6 Fast Flow.

80 g of Sepharose 6 Fast Flow was mixed with 0.5 g of NaBH₄, 13 g of Na₂SO₄ and 50 ml of 50% aqueous solution of NaOH. The mixture was stirred for 1 hour at 50 °C. After addition of 100 ml of allylglycidyl ether the suspension was left at 50 °C under 15 vigorous stirring for an additional 18 hours. After filtration of the mixture, the gel was washed successively, with 500 ml of distilled water, 500 ml of ethanol, 200 ml of distilled water, 200 ml of 0.2 M acetic acid and, and 500 ml of distilled water. The degree of substitution was 0.41 mmol of allyl/ml of gel.

20 1.6.2. Activation of allylated Sepharose 6 Fast Flow by bromination

This was performed as described in section 1.3 above with exception that allylated Sepharose 6 Fast Flow was used.

25 1.6.3. Synthesis of Sepharose 6 Fast Flow substituted with a pyridyl ligand derived from 2-mercaptopyridine (low sub) and a carboxy ligand derived from mercaptopropionic acid. The product is designated as CatAn1.

In a reaction vial, the pH of a solution of 0.5 mmol of 2-mercaptopyridine in 5 ml of 0.5 M sodium bicarbonate was adjusted to pH 10.5 by adding a 50 % aqueous solution of NaOH. Separately, a solution of 1.2 g of 3-mercaptopropionic acid in 1 ml 30 of distilled water was prepared and its pH adjusted to 11 by adding a 50 % aqueous solution of NaOH. To the vial containing the solution of 2-mercaptopyridine, 10 ml of bromine-activated allyl Sepharose 6 Fast Flow (0.41 mmol of allyl/ml of gel) was added and the reaction continued under stirring at 50 °C. After 1.5 hours the solution containing 3-mercaptopropionic acid was added and the mixture was stirred at 45 °C

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

34

for 16 hours. The reaction mixture was filtered and the gel washed with 5x10 ml of distilled water. Microanalysis gave a degree of substitution of 43 μ mol/ml of gel for the pyridine ligand and 251 μ mol/ml of gel for the propionic acid ligand.

5 **1.6.4. Synthesis of Sepharose 6 Fast Flow substituted with a pyridyl ligand derived from 2-mercaptopuridine (medium sub) and a carboxy ligand derived from mercaptopropionic acid. The product is designated as CatAn2.**

The procedure was the same as in 1.6.3 except that the amount of 2-10 mercaptopuridine was doubled. Microanalysis gave a degree of substitution of 86 μ mol/ml of gel for the pyridine ligand and 215 μ mol/ml of gel for the propionic acid ligand.

15 **1.6.5. Synthesis of Sepharose 6 Fast Flow substituted with a pyridyl ligand derived from 2-mercaptopuridine (high sub) and a carboxy ligand derived from mercaptopropionic acid. The product is designated as CatAn3.**

The procedure was the same as in 1.6.3 except that the amount of 2-mercaptopuridine was trebled. Microanalysis gave a degree of substitution of 127 μ mol/ml of gel for the pyridine ligand and 171 μ mol/ml of gel for the propionic acid ligand.

2. Chromatography

25 2.1. Mixed-ligand cation-exchange media

Three purified proteins [representing basic (lysozyme = Lys), neutral to weakly basic (IgG) and acidic (BSA) proteins] were used to characterise the new series of "high salt" mixed-ligand cation-exchange media with respect to their breakthrough capacities ($Q_{b10\%}$). The binding and elution of lysozyme was done with normal 30 cation-exchange operating procedures, i.e. adsorption at neutral pH and elution with buffer containing a high concentration of salt (e.g. 2 M NaCl) at the same pH. The IgG was bound at pH 4.5 and eluted with buffer of pH 7.0 containing relatively low salt concentration (0.1 M). IgG was bound at low pH because a significantly higher amount could be adsorbed to the various media at low pH than at high pH. BSA was

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

35

bound at pH 4.0 where it is positively charged (pI of BSA = 4.9) and eluted by raising the pH to 7.0, as in the case of IgG. Furthermore, the elution conductivities of three basic proteins (i.e. ribonuclease, cytochrome C and lysozyme) were also determined for all of the mixed-ligand cation-exchange media. The procedures used to determine breakthrough capacities and elution conductivity for the new series of "high salt" mixed-ligand cation-exchange media are outlined below.

2.1.1. Breakthrough capacity ($Q_{b,10\%}$) at "high salt" conditions

One of the main criteria that qualifies a mixed-ligand cation-exchange medium as a "high salt" medium is its binding capacity for proteins in the presence of relatively high concentrations of salt compared with that of a reference cation-exchanger that is operated under identical conditions. This breakthrough capacity is determined using the method of frontal analysis as described below.

2.1.2. Experimental

Buffer solutions

Buffer 1: 20 mM sodium phosphate, 0.3 M sodium chloride, pH 6.8

Buffer 2: 20 mM sodium acetate, 0.25 M sodium chloride, pH 4.0

Buffer 3: 20 mM sodium acetate, 0.25 M sodium chloride, pH 4.5

Buffer 4: 20 mM sodium phosphate, 2 M sodium chloride, pH 6.8

Buffer 5: 100 mM sodium phosphate, pH 7.0

Protein solutions

1. Lysozyme: 4 mg/mL in Buffer 1

2. BSA: 4 mg/mL in Buffer 2

3. IgG: 4 mg/mL in Buffer 3

All buffers and protein solutions were filtered through 0.45 μ m Millipore Millex HA filters before use.

30

2.1.3. Chromatography system

All experiments were performed at room temperature using Äkta Explorer 100 chromatography system equipped with Unicorn 3.1 software (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden). Samples were applied to the columns via a 150 mL

WO 02/053252

36

PCT/EP01/14895

superloop. The effluents were monitored continuously by absorbance measurements at 280 nm using a 10 mm flow cell.

2.1.4. Frontal analysis

5 Each prototype of the "high salt" mixed-ligand cation-exchange media was packed in an HR5/5 column (packed bed volume = 1 mL) and equilibrated with a buffer of appropriate pH and salt concentration (Buffer 1, 2 or 3). The appropriate protein solution was continuously fed to the column at a flow rate of 1 mL/min (i.e. 300 cm/h). The application of the sample was continued until the A_{280} of the effluent 10 reached a level of 10% of the A_{280} of the sample applied to the column. The maximum UV signal for the sample was estimated by pumping the test solution directly into the UV detector. On the basis of data so obtained (see equation 1), the breakthrough capacity ($Q_{b10\%}$) of the packed gel at a level of 10% of the concentration of the applied protein can be calculated. The results so obtained have 15 formed the basis for the screening of a number of "high salt" mixed-ligand ion-exchange media and will be presented below for three proteins, viz. lysozyme, bovine serum albumin (BSA) and human immunoglobulin (IgG).

The breakthrough at a level of 10% of the maximum absorbance ($Q_{b10\%}$) was 20 calculated using the following relationship:

$$Q_{b10\%} = (T_{R10\%} - T_{RD}) \times C / V_c \quad (1)$$

$T_{R10\%}$ = retention time (min) at 10% of the maximum absorbance

T_{RD} = void volume of the system (min)

C = concentration of the feed protein (4 mg/mL)

25 V_c = packed bed volume of the column (mL)

2.1.5. Function test

The mixed-ligand cation-exchange media were packed in 1.0 mL HR 5/5 columns and equilibrated with 20 column volumes of Buffer A (20 mM piperazin buffer; pH 30 6.0). 50 μ L of a protein mixture (6 mg/mL Ribonuclease, 2 mg/mL Cytochrome C and 2 mg/mL Lysozyme) were applied to the column and eluted with a linear gradient (gradient volume = 20 column volumes) to 100 % of Buffer B (Buffer A plus 2.0 M NaCl). The flow rate was maintained to 0.3 mL/min (100 cm/h).

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

37

2.2. Mixed-ligand anion-exchange media

To verify that the media suggested in this invention adsorb proteins at higher ionic strengths than the reference anion-exchanger, breakthrough capacities of bovine serum albumin (BSA) were determined. The new "high-salt" mixed-ligand media based on an anion-exchange ligand attached to Sepharose 6 Fast Flow were compared to Q Sepharose Fast Flow in this study. In addition, the recovery of BSA (the amount of adsorbed BSA that can be desorbed, see details below) was also studied. Furthermore, the elution conductivities of three proteins, namely conalbumin (Con A), lactalbumine (Lactalb) and soybean trypsin inhibitor (STI), were also determined for all anion-exchangers. This function test was also used to verify retardation at high salt conditions for other proteins as well.

2.2.1. Breakthrough capacity ($Q_{b10\%}$) at high salt condition

The $Q_{b10\%}$ -value was evaluated at relatively high concentration of salt (0.25 M NaCl) relative to the reference anion-exchanger Q Sepharose Fast Flow that was operated under identical conditions. The $Q_{b10\%}$ -values for different anion-exchange media were determined using the method of frontal analysis described below.

A solution of BSA (4 mg/mL) was prepared in 20 mM piperazin (pH = 6.0) containing 0.25 M NaCl. Buffer and sample solutions were filtered through 0.45 μ m Millipore Millex HA filters before use and experiments were performed with the same equipment and instrumental settings as described in 2.1.3.

Each prototype mixed-ligand anion-exchange media was packed in a HR 5/5 column (packed bed volume = 1 mL) and equilibrated with the piperazine buffer (20 mM piperazin, pH = 6.0, with 0.25 M NaCl). The breakthrough capacity at a level of 10% of maximum absorbance of the BSA sample solution ($Q_{b10\%BSA}$) was calculated according to the procedure in section 2.1.4.

2.2.2. Recovery

Details concerning type of column, packed bed volume, buffers, protein solution, flow rate and type of apparatus are outlined above. To a column equilibrated with piperazin buffer (20 mM piperazin, HCl, pH = 6.0, 0.25 M NaCl), a solution of BSA was applied from a 50 mL super loop until an amount corresponding to 30% of its

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

38

breakthrough capacity was applied. The column was then washed with two bed volumes of the equilibrium buffer and the bound BSA was eluted with the desorption buffer (20 mM piperazin, pH = 6.0, 2.0 M NaCl). The amount of eluted BSA was calculated and the recovery of BSA was established using the following relationships:

5

The concentration of the eluted BSA was calculated according to equation 2.

$$C_S = \frac{A}{\epsilon \cdot b} \quad (2)$$

C_S = concentration of the eluted BSA sample (mg/mL)

A = Absorbance at 280 nm.

10 ϵ = molar absorbtivity at a specific wavelength, $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$

b = path length, cm

Equation 3 was used for calculating the recovery of BSA

$$\text{Recovery, \%} = \frac{C_S \cdot V_S}{C_L \cdot V_L} \quad (3)$$

15 V_S = Volume of the eluted BSA solution, mL

C_L = Concentration of the applied BSA solution, mg/mL

V_L = Volume of the applied BSA solution, mL

2.2.3. Function test

20 The "high salt" mixed-ligand anion-exchange media were packed in HR 5/5 columns (1 mL bed volume) and equilibrated with 20 column volumes of the A-buffer (20 mM phosphate buffer; pH 6.8). 50 μ l of a protein mixture (6 mg/mL Con A, 4 mg/mL Lactalbumin and 6 mg/mL STI) were applied to the column and eluted with a linear gradient (gradient volume = 20 column volumes) to 100 % of the B-buffer (A-buffer plus 2.0 M NaCl). The flow rate was maintained at 0.3 mL/min (100 cm/h).

2.3. RESULTS

2.3.1. Breakthrough capacity of mixed-ligand cation-exchange media at high

25 salt conditions and elution conductivity at normal cation-exchange

chromatographic conditions

30 The results obtained for breakthrough capacities for a series of representative "high salt" mixed-ligand cation-exchange media (see Table 1) are summarised in Table 2.

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

39

Table 1 shows some specific ligand properties of the various media used to exemplify some basic concepts of this invention. The ligand ratios of the majority of these new mixed-ligand cation-exchangers were in the interval of 3-14. As reference cation-exchangers, the commercially available Sulphopropyl (or SP) Sepharose 6

5 Fast Flow was used. Its ligand concentration is about 0.22 mmol/mL packed gel. The results (Table 2) indicate the following trends:

1. With one exception, the new cation-exchange ligands have a much higher $Qb_{10\%}$ for all three proteins compared to the reference cation-exchanger SP Sepharose
- 10 Fast Flow.
2. CatAn3 gave the highest $Qb_{10\%}$ for Lys (54 mg/mL); Cat5 and Cat6 for HSA (45 mg/mL) and CatAn1 for IgG (26 mg/mL). These values correspond to an increase of 1300%, 1500% and 2600% for Lys, HSA and IgG, respectively, on the above four media relative to the reference cation-exchanger (SP Sepharose 6 Fast
- 15 Flow).
3. Media Cat1, Cat2 and Cat3 have a much higher $Qb_{10\%}$ for BSA than for IgG. The results suggest that these media can be useful for removing BSA from IgG preparations.
4. The three media CatAn1-3 illustrate how the $Qb_{10\%}$ -values of Lysozyme and IgG
- 20 are related to the ligand ratio of the two mixed ligands (mercaptopropionic acid and mercaptopyridine). $Qb_{10\%Lys}$ increases and $Qb_{10\%IgG}$ decreases when the ligand ratio (ligand density of mercaptopropionic acid/ligand density of mercaptopyridine) decreases (Tables 1 and 2). The elution conductivity at normal cation-exchange chromatography of the three proteins (Table 2) also shows great
- 25 variation in selectivity due to the ligand ratio of the media CatAn1-3.

2.3.2. Breakthrough capacity of mixed-ligand anion-exchange media at high salt conditions and elution conductivity at normal anion-exchange chromatography

30 The results obtained for breakthrough capacities for a series of representative "high salt" mixed-ligand anion-exchange media (An1-4) are summarised in Table 3 and the structures of the ligands are presented in Table 1. As a reference anion-exchanger, the commercially available Q Sepharose Fast Flow was used. The results indicate the following trends.

1. The new mixed-ligand anion-exchange media have much higher elution conductivity for all three proteins compared with the reference anion-exchanger Q Sepharose Fast Flow (Table 3).
5. 2. The new anion-exchange ligands also have a much higher breakthrough capacity for BSA ($Q_{b10\%BSA}$) compared to Q Sepharose Fast Flow. The medium that gave the highest $Q_{b10\%}$ -value corresponds to an increase of 2900% relative to the reference anion-exchanger. Of the media shown in table 3, the one that gave the lowest $Q_{b10\%}$ -value displayed a 2200% increase compared to Q Sepharose Fast Flow.
10. 3. The recovery data show that the adsorbed BSA can be eluted by a salt step with recoveries larger than 71% (Table 3).

Table 1. The type and ligand density ratios of various "high-salt" mixed-ligand ion-exchange media.

| Medium | Ligand 1 | Ligand 2 | Ligand density ratio (Lig. 1/Lig. 2) |
|---------------------|------------------------|----------------|---|
| Cat1 ^a | Sulphopropyl | Phenyl | 3.0 |
| Cat2 ^a | Sulphopropyl | Phenyl | 3.8 |
| Cat3 ^b | Sulphopropyl | Phenyl | 6.0 |
| Cat4 ^b | Sulphopropyl | Phenyl | 9.0 |
| Cat5 ^b | Mercaptopropionic acid | Phenyl | 6.8 |
| Cat6 ^b | Mercaptopropionic acid | Phenyl | 14 |
| An1 ^a | 1,3-Diaminopropane | Phenyl | 6.0 |
| An2 ^b | 1,3-Diaminopropane | Phenyl | 13 |
| An3 ^a | 1,3-Diamino-2-propanol | Phenyl | 4.0 |
| An4 ^b | 1,3-Diamino-2-propanol | Phenyl | 9.0 |
| CatAn1 ^c | Mercaptopropionic | Mercaptopyridi | R1 |

| | | | |
|---------------------|------------------------|------------------|----|
| | acid | ne | |
| CatAn2 ^a | Mercaptopropionic acid | Mercaptopyridine | R2 |
| CatAn3 ^a | Mercaptopropionic acid | Mercaptopyridine | R3 |

^a These media were based on Phenyl Sepharose Fast Flow (high sub) with a ligand density of ca 40 μ mol/mL medium

^b These media were based on Phenyl Sepharose Fast Flow (low sub) with a ligand density of ca 20 μ mol/mL medium

^c The ligand ratio of these media decreases in the order: R1>R2>R3. See the section on coupling of ligands for more details.

Table 2. Elution conductivity at pH 6 for three proteins and breakthrough capacities of Lysozyme (pH 6.8 and 0.3 M NaCl), BSA and IgG (pH 4.0 and 0.25 M NaCl) on 10 different "high-salt" mixed-ligand cation-exchange media.

| Mediu m | Elution conductivity | | | Breakthrough capacity | | |
|--------------------|----------------------|------|------|-----------------------|---------------------|--------------------|
| | Rib | Cyt | Lys | Qb _{10%Ly} | Qb _{10%BS} | Qb _{10%I} |
| | mS/c | MS/c | mS/c | s | A | gG |
| | m | m | m | Mg/mL | mg/mL | mg/m L |
| SP FF ^a | 19 | 32 | 32 | 4 | 3 | 1 |
| Cat1 | 23 | 29 | 54 | 20 | 41 | 4 |
| Cat2 | 20 | 27 | 41 | 5 | 37 | 3 |
| Cat3 | 18 | 22 | 43 | 7 | 40 | 3 |
| Cat4 | 19 | 28 | 37 | 4 | 18 | 2 |
| Cat5 | 27 | 32 | 53 | 6 | 45 | 12 |
| Cat6 | 26 | 31 | 52 | 6 | 45 | 12 |
| CatAn1 | 26 | 35 | 60 | 23 | na | 26 |
| CatAn2 | 29 | 38 | 78 | 48 | na | 21 |
| CatAn3 | 31 | 41 | 132 | 54 | na | 20 |

^a SP Sepharose 6 Fast Flow

na=not analyzed

Table 3. Elution conductivity at pH 6 for three proteins (Conalbumin, Lactalbumin and soybean trypsin inhibitor), breakthrough capacity of BSA (pH 6 and 0.25 M NaCl) and recovery of BSA on different "high-salt" mixed-ligand anion-exchange media.

| Medium | Elution conductivity | | | Breakthrough capacity $Qb_{10\%BSA}$ | Recovery BSA % |
|-------------------|----------------------|------------------|--------------|---|----------------|
| | ConA mS/cm | Lactalb mS/cm | STI mS/cm | | |
| | | | | | |
| Q FF ^a | 12 | 20 | 30 | 1 | na |
| An1 | 31 | 55 | 79 | 22 | 90 |
| An2 | 30 | 54 | 78 | 23 | 85 |
| An3 | 32 | 54 | 86 | 29 | 86 |
| An4 | 32 | 53 | 84 | 28 | 71 |

^aQ Sepharose Fast Flowna=not analysed due to low $Qb_{10\%}$ -value

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

43
CLAIMS

1. A method for the removal of a substance from an aqueous liquid by ion exchange, said method comprising the steps of:
 - providing a liquid wherein said substance is present in a charged state;
 - providing an adsorption matrix which comprises at least two structurally different ligands, comprising at least one weak ion exchanger or at least one strong ion exchanger;
 - contacting the liquid with the matrix under a sufficient period of time to allow adsorption of the substance to the matrix; and
 - adding an eluent that desorbs the substance from the matrix;wherein each ligand interacts with the substance during the adsorption step and at least one of said ligands is charged and capable of ionic interaction with the substance.
- 15 2. A method according to claim 1, wherein one charged ligand is a anion exchanger and the substance to be removed is initially negatively charged, the conditions for adsorption being defined by a pH > pI of the negatively charged substance and pH < pKa of the positively charged groups of the ligand.
3. A method according claim 2, wherein the adsorption capacity for the substance is $\geq 100\%$, such as $\geq 200\%$, of the adsorption capacity of the same substance in a corresponding reference ion-exchanger in which essentially all of the charged groups are quaternary ammonium groups (q-groups).
4. A method according to claim 2 or 3, wherein the desorption is performed by adding an eluent comprising an increasing ion-strength gradient.
- 25 5. A method according to claim 1, wherein one charged ligand is a cation ion exchanger and the substance to be removed is initially positively charged, the conditions for adsorption being defined by a pH < pI of the positively charged substance and pH > pKa of the negatively acid corresponding to the ligand.
6. A method according claim 5, wherein the adsorption capacity for the substance is $\geq 100\%$, such as $\geq 200\%$, of the adsorption capacity of the same substance in a corresponding reference ion-exchanger in which essentially all charged groups are sulfopropyl group.
- 30 7. A method according to claim 5 or 6, wherein the desorption is performed by adding an eluent comprising an increasing ionic strength.

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

44

8. A method according to any one of the previous claims, wherein the adsorption is performed at an ionic strength higher than or equal to that of a water solution of 0.10 M NaCl, preferably 0.20 M NaCl or 0.30 M NaCl.
9. A method according to any one of the previous claims, wherein the ligands are capable of binding the substance of interest in an aqueous reference liquid at an ionic strength corresponding to 0.25 M NaCl.
10. A method according to any one of the previous claims, wherein at least one ligand interacts with the substance by hydrophobic and/or electron donor-acceptor interaction.
- 10 11. A method according to claim 10, wherein said ligand is chargeable and desorption of the substance from the matrix is performed by a pH switch.
12. A method according to any one of the previous claims, wherein the polarity of the eluent is lower than that of the aqueous liquid from which the substance is removed.
- 15 13. A method according to any one of the previous claims, wherein at least one ligand is a mixed mode ligand comprising
 - (c) a first mode site which gives charge-charge attractive interaction with the substance, and
 - (d) a second mode site which gives charge-charge attractive interaction and/or hydrophobic interaction and/or electron donor-acceptor interaction with the substance.
- 20 14. A method according to any one of the previous claims, which is for removal of a biopolymer structure from a liquid, which structure is selected from the group comprised of carbohydrate structures, peptide structures, peptide nucleic acid (PNA) structures and nucleic acid structures.
- 25 15. A method according to any one of the previous claims, which is for removal of a biopolymer the charge of which is pH-dependent.
16. A method according to any one of the previous claims, which is for removal of an amphoteric substance.
- 30 17. An adsorbent suitable for use in the method according to any one of claims 1-16, which comprises a first and a second ligand comprising at least one functional group that participates in electron donor-acceptor interaction with the substance to be separated, which functional group is selected from the group comprised of:

WO 02/053252

PCT/EP01/14895

45

(i) donor atoms/groups such as:

- oxygen with a free pair of electrons, such as in hydroxy, ethers, nitro, carbonyls, such as carboxy, esters (-O- and -CO-O-) and amides,
- sulphur with a free electron pair, such as in thioethers (-S-),
- 5 • nitrogen with a free pair of electron, such as in amines, amides including sulphone amides],
- halo (fluorine, chlorine, bromine and iodine), and
- sp- and sp²-hybridised carbons, or

(iii) acceptor atoms/groups, i.e. electron deficient atoms or groups, such as

10 metal ions, cyano, nitrogen in nitro, hydrogen bound to an electronegative atom as for instance in HO- (hydroxy, carboxy etc), -NH- (amides, amines etc), HS- (thiol etc) etc.

18. An adsorbent according to claim 17, wherein the ratio between the degrees of substitution for any pair of the sets is within 0.02-50.

15 19. An adsorbent according to claim 17 or 18, wherein the first and the second ligands have been introduced so that they occur essentially at random in relation to each other, at least in a part of the support matrix.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
11 July 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/053252 A3

(51) International Patent Classification: B01J 39/06. (74) Agents: FRANKS, Barry, G. et al.; Amersham plc, The Grove Centre, White Lion Road, Amersham, Buckinghamshire HP7 9LL (GB).

(21) International Application Number: PCT/EP01/14895

(22) International Filing Date:
17 December 2001 (17.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0004932-0 31 December 2000 (31.12.2000) SE

(71) Applicant (for all designated States except US): AMERSHAM BIOSCIENCES AB [SU/SE]; Björkgatan 30, S-751 84 Uppsala (SE).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,

AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,

GM, IR, IU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,

LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SI,

SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,

ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NL, SN, TD, TG).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BELEW, Makonnen [SE/SE]; Amersham Biosciences AB, Björkgatan 30, S-751 84 Uppsala (SE), JOHANSSON, Bo-Lennart [SU/SU]; Amersham Biosciences AB, Björkgatan 30, S-751 84 Uppsala (SE), MALOISEL, Jean-Luc [FR/SU]; Amersham Biosciences AB, Björkgatan 30, S-751 84 Uppsala (SE).

Published:
— with international search report(88) Date of publication of the international search report:
26 September 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



A3

(54) Title: A METHOD FOR MIXED MODE ADSORPTION AND MIXED MODE ADSORBENTS

(57) Abstract: Method for the removal of a substance from an aqueous liquid by ion exchange comprising providing a liquid with said substance is present; providing an adsorption matrix which comprises at least two different ligands; contacting the liquid with the matrix under a period of time and conditions sufficient to allow adsorption of the substance to the matrix; and adding an eluent that desorbs the substance from the matrix. Each one of the ligands interacts with the substance during the adsorption step, and at least one of the ligands is charged and capable of ionic interaction with the substance. The method can be run as a cation or anion exchange. The substance desorption can be performed by adding an eluent comprising an increasing ionic strength. The invention also encompasses an adsorbent comprising at least two structurally different ligands, which interact with the same kind of substance when used in a separation procedure.

WO 02/053252

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/14895

| | | | | | | |
|-------------------------------------|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | IPC 7 | B01J39/06 | B01J41/06 | B01J39/04 | B01J41/04 | B01J43/00 |
|-------------------------------------|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|

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)

IPC 7 B01J C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| P, X | WO 01 38228 A (AMERSHAM PHARMACIA) 31 May 2001 (2001-05-31) page 17, line 5 - line 21 page 1, line 23 - line 27 page 18, line 4 - line 12 page 20, line 5 - line 6 page 18, line 15 - line 17 ---- | 1-4, 8-18 |
| X | BISCHOFF R ET AL: "ISOLATION OF SPECIFIC TRNAS USING AN IONIC-HYDROPHOBIC MIXED-MODE CHROMATOGRAPHIC MATRIX" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ORLANDO, FL, US, vol. 151, 1985, pages 526-533, XP001000887 ISSN: 0003-2697 the whole document ---- | 1, 10, 14 -/- |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubt on priority (claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or to show the state of the art (specification)
- *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

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 underlying invention

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

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered in combination with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

2 July 2002

11/07/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentamt 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hilgenga, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/14895

| C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | MCLAUGHLIN L W: "Mixed-mode chromatography of nucleic acids" CHEMICAL REVIEWS, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON, US, vol. 89, 1989, pages 309-319, XP002152137 ISSN: 0009-2665 page 309, right-hand column, line 5 - line 15 page 313, right-hand column, line 13 page 312, right-hand column, line 5 - line 10 | 1,10,14 |
| A | WO 00 69872 A (PROMEGA CORPORATION) 23 November 2000 (2000-11-23) cited in the application page 8, line 19 - line 23; claim 36 page 18, line 13 -page 19, line 17 | 1-3,13, 14 |
| A | WO 99 65607 A (AMERSHAM PHARMACIA) 23 December 1999 (1999-12-23) page 4, line 20 - line 26; claims 1,6 page 5, line 15 - line 17 page 8, line 19 - line 23 | 1-5-7, 14-16 |
| A | US 6 090 288 A (R. BERGLUND) 18 July 2000 (2000-07-18) column 7, line 62 - line 67; claim 1 | 1-4, 14-16 |
| A | WO 96 09116 A (MASSEY UNIVERSITY) 28 March 1996 (1996-03-28) cited in the application | --- |
| A | EP 0 276 138 A (DU PONT) 27 July 1988 (1988-07-27) | ----- |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 01/14895

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|---|------------------|---|--|
| WO 0138228 | A | 31-05-2001 | AU 1704401 A AU 2507901 A WO 0138227 A2 WO 0138228 A1 | 04-06-2001 04-06-2001 31-05-2001 31-05-2001 |
| WO 0069872 | A | 23-11-2000 | US 6310199 B1 AU 5126100 A EP 1179057 A2 WO 0069872 A2 US 2001014650 A1 | 30-10-2001 05-12-2000 13-02-2002 23-11-2000 16-08-2001 |
| WO 9965607 | A | 23-12-1999 | AU 4815099 A EP 1094899 A1 WO 9965607 A1 | 05-01-2000 02-05-2001 23-12-1999 |
| US 6090288 | A | 18-07-2000 | AU 713635 B2 AU 1818097 A CA 2242927 A1 EP 0888157 A1 JP 2000504625 T WO 9729825 A1 | 09-12-1999 02-09-1997 21-08-1997 07-01-1999 18-04-2000 21-08-1997 |
| WO 9609116 | A | 28-03-1996 | US 5652348 A AU 683588 B2 AU 3621295 A CA 2200735 A1 EP 0783366 A1 JP 10506987 T WO 9609116 A1 NZ 293707 A US 5945520 A | 29-07-1997 13-11-1997 09-04-1996 28-03-1996 16-07-1997 07-07-1998 28-03-1996 29-03-1999 31-08-1999 |
| EP 0276138 | A | 27-07-1988 | US 4767670 A CA 1318654 A1 DE 3862383 D1 EP 0276138 A2 JP 1006755 A | 30-08-1988 01-06-1993 23-05-1991 27-07-1988 11-01-1989 |

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
|---------------------------|---------------|------------|
| B 0 1 J 20/34 | B 0 1 J 20/34 | G |
| B 0 1 J 39/06 | B 0 1 J 39/06 | |
| B 0 1 J 41/06 | B 0 1 J 41/06 | |
| B 0 1 J 49/00 | B 0 1 J 49/00 | F |
| C 0 7 K 1/18 | B 0 1 J 49/00 | G |
| | C 0 7 K 1/18 | |

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72) 発明者 マコネン・ベレヴ

スウェーデン、エス-751 84ウプサラ、ビヨルクガーテン30番、アメルシャム・バイオサイエンシーズ・アクチボラグ

(72) 発明者 ボー・レナート・ヨハンソン

スウェーデン、エス-751 84ウプサラ、ビヨルクガーテン30番、アメルシャム・バイオサイエンシーズ・アクチボラグ

(72) 発明者 ジャン・リュック・マロワゼル

スウェーデン、エス-751 84ウプサラ、ビヨルクガーテン30番、アメルシャム・バイオサイエンシーズ・アクチボラグ

F ターム(参考) 4D017 AA11 BA04 BA07 CA17 CB01 DA02 DA03 DB02 EB01

4G066 AB05D AD01B AD10B AD13B AD15B AE10B CA20 CA54 EA01 GA11

4H045 AA20 GA23