

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第3594629号
(P3594629)

(45) 発行日 平成16年12月2日(2004. 12. 2)

(24) 登録日 平成16年9月10日(2004. 9. 10)

(51) Int.Cl.⁷
C O 8 F 220/06
C O 8 F 2/18
C O 8 J 3/24

F I
C O 8 F 220/06
C O 8 F 2/18
C O 8 J 3/24 C E Y Z

請求項の数 10 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願平5-127332	(73) 特許権者	590002035
(22) 出願日	平成5年5月28日(1993.5.28)		ローム アンド ハース カンパニー
(65) 公開番号	特開平6-49139		ROHM AND HAAS COMPA NY
(43) 公開日	平成6年2月22日(1994.2.22)		アメリカ合衆国 1 9 1 0 6 - 2 3 9 9
審査請求日	平成12年5月24日(2000.5.24)		ペンシルバニア州 フィラデルフィア、イ ンディペンデンス モール ウェスト 1 0 0
(31) 優先権主張番号	891381	(74) 代理人	100073139
(32) 優先日	平成4年5月29日(1992.5.29)		弁理士 千田 稔
(33) 優先権主張国	米国(US)	(74) 代理人	100101281
			弁理士 辻永 和徳
		(72) 発明者	ラリー ウェイン ステフィアー
			アメリカ合衆国ニュージャージー州チェリ ー ヒル, ファウンティン コート 4
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 架橋された球形の共重合体ビーズおよびその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 0 μ m ~ 2 m m の粒径を有する架橋された球形の共重合体ビーズであって、前記共重合体が、重合単位として、全単量体重量を基準として少なくとも 5 0 重量 % の無水メタクリル酸を含む、ポリ(無水メタクリル酸)である、前記架橋された球形のマクロポーラス共重合体ビーズ。

【請求項 2】

ビーズが、5 0 μ m ~ 1 m m の直径を有する、請求項 1 に記載の共重合体ビーズ。

【請求項 3】

ビーズが、5 ~ 1 0 , 0 0 0 n m の直径を有する孔を有し、該孔が、ビーズの容積の少なくとも 5 % である内部孔容積をビーズに与えている、請求項 1 に記載の共重合体ビーズ。

【請求項 4】

共重合体が官能基で官能化されている、請求項 1 に記載の共重合体ビーズ。

【請求項 5】

共重合体がカルボン酸官能基、アンモニウム塩官能基、およびアミン塩官能基からなる群から選択される少なくとも 1 つの官能基で官能化されている、請求項 1 に記載の共重合体ビーズ。

【請求項 6】

(a) 水性懸濁用媒質中に、単量体の少なくとも 5 0 重量 % である量の無水メタクリル酸、架橋性単量体、および単量体に可溶性の遊離基重合開始剤を含む単量体混合物の小滴を

懸濁させ、(b)これらの小滴を、単量体混合物が重合して共重合体ビーズを形成するまで、重合開始剤の分解温度以上に加熱し、(c)これら共重合体ビーズを懸濁用媒質から分離することを含み、

前記単量体混合物が更にポロゲンを含有している、

請求項1に記載のマクロポーラス共重合体ビーズの製造方法。

【請求項7】

ポロゲンが、イソオクタン、メチルイソブチルケトン、メチルイソブチルカルビノール、キシレン、トルエンおよびジ-n-ブチルエーテルから成る群から選ばれる、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

タンパク質を請求項4に記載の共重合体ビーズと接触させ、該共重合体ビーズ上にタンパク質を吸着させることを含む、タンパク質回収方法。

【請求項9】

タンパク質が水性懸濁液になっている、請求項8に記載のタンパク質回収方法。

【請求項10】

請求項9に記載のタンパク質回収方法であって、請求項4に記載の共重合体ビーズ上に吸着したタンパク質が、該共重合体ビーズから前記水性懸濁液とは異なる液体中に実質的に移される工程をさらに含む、タンパク質回収方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、架橋された不溶性共重合体に関する。更に詳細には、吸着剤およびイオン交換樹脂前駆体として使用するのに適した無水メタクリル酸の架橋された共重合体に関する。

【0002】

発明の背景

アクリル酸およびメタクリル酸と架橋性単量体とを共重合することによって造られたイオン交換樹脂はよく知られており、そして弱酸のカチオン交換体として有用である。これらの酸の単量体は親水性であり、そして有意の程度まで水溶性であるので、これらの共重合体は、アクリル酸エステルおよびメタクリル酸エステルから造られた樹脂よりも懸濁重合によって造ることは難しい。これらのエステルは、比較的水に不溶性であり、かつ疎水性であり、その結果として、油相の小滴内で重合させ、比較的透明なビーズを形成させる。しかし、酸類は、同様に水性懸濁相内で部分的に重合する傾向があり、単量体を浪費しそして透明な重合体ビーズの形成に干渉する望ましくない水性相の重合体を生成する。

【0003】

水性相中に溶解するための酸単量体のこの傾向を最少にするために、特別な技術を使用しなければならない。そのような技術の1つは、水性相に無機塩を添加して単量体を「塩析」させるか、または生じたブライン(b r i n e)中での単量体の溶解性を、単量体の重合が望まれる油相に単量体を移動させる点まで減少させることである。前記の塩は、再使用のために、または廃水性相の生態的に責任のある処分のために、回収しなければならないだけでなく、それは、油相小滴を重合中にゆがめる原因になる傾向にある。これは、非球体の共重合体ビーズの形成を促進させ、そのようなビーズは、予想できない液圧の性質を有し、かつイオン交換樹脂カラム内への詰め込みを貧弱にする。

【0004】

特に、多孔性樹脂のビーズは、ある種の用途のために、例えば急速な動的な性質(r a p i d k i n e t i c p r o p e r t i e s)を有する吸着剤としてまたはイオン交換体として、有利である。多孔性は、多くの異った方法でビーズに導入される。Meitzner等の米国特許第4,221,871号に開示されているような、相分離剤を使用して巨大網状ビーズ(m a c r o r e i t i c u l a r b e a d s)を形成させることは、この多孔性を生成させる通常の1つの方法である。油相内のメタクリル酸は、水性相からいくらかの水を溶解するので、この水は、油相内の全単量体溶液の溶解性を減少させ、

10

20

30

40

50

そして導入される相分離剤が存在しなくても相の分離が生起する。結果的には、メタクリル酸から巨大網状樹脂を製造することはより簡単であるが、しかし孔のパラメーター (parameter) についての調節が制限される。

【0005】

酸の無水物は、強酸または強塩基の存在において加水分解され、酸自体を生成することは知られている。酸無水物重合体例えば無水マレイン酸の重合体は、Semon等の米国特許第2,988,541号またはHueper等の米国特許第3,871,964号に開示されているような、次の反応例えばイオン交換官能化のために使用することができる共重合体の反応部位に導入される。無水メタクリル酸は、メタクリル酸のエステル類、アミド類およびニトリル類の広範囲の開示内において、弱酸カチオン交換体として次いで官能化することができる共重合体を製造するための単量体として開示されており (Kauterの米国特許第2,324,935号)、そしてBayerの英国特許第894,391号には、オレフィン性不飽和カルボン酸類、エステル類および酸無水物類〔これらから、「スポンジ構造 (sponge structure) を有する共重合体を造ることができる〕の広範囲の1つとして無水メタクリル酸が教示されているが、しかしそのような共重合体の実際の製造は示されていない。

10

【0006】

その他の特許、例えばKraemer等の米国特許第4,070,348号、Lohmann等の米国特許第3,764,477号およびBarnesの米国特許第2,308,581号には、塊状重合または沈殿重合または逆相の懸濁重合であって連続した懸濁相は水性液体よりもむしろ有機液体である懸濁重合によって、無水メタクリル酸の共重合体が造られている。前記Lehmann等には、1つの可能性として懸濁重合が述べられているが、しかし実際の製造は例示されていない。

20

【0007】

発明の概要

本発明者は、吸着剤、親和性のあるクロマトグラフィー用物質、イオン交換樹脂およびこれらの物質の前駆体として有用な架橋された無水メタクリル酸共重合体のビーズであって、これらのビーズは、無水メタクリル酸の少なくとも約50重量%およびポリエチレン性不飽和架橋性単量体の約0.1~約50重量%から成る混合物から重合される、前記の無水メタクリル酸共重合体のビーズを見出した。更に、本発明者は、調節された表面積および粒径を有するこれらの共重合体ビーズを製造する方法および多孔性ビーズを製造する場合には、また多孔度を調節できる方法を見出した。この方法は、

30

(a) 水性懸濁用媒質中に、単量体の少なくとも50重量%である量の無水メタクリル酸、架橋性単量体、および単量体に可溶性の遊離基重合開始剤から成る単量体混合物の小滴を懸濁させ、

(b) これら小滴を、単量体混合物が重合して共重合体ビーズを形成するまで、重合開始剤の分解温度以上に加熱し、

(c) これら共重合体ビーズを懸濁用媒質から分離することから成っている。

【0008】

40

発明の詳細

他の単量体はメタクリル酸と共重合して本発明の共重合体ビーズを形成するが、共重合体は主としてポリ(無水メタクリル酸)である。本明細書で用いられている用語「主として (predominantly)」は、指示された重合体、本発明のケースにおいてはポリ(無水メタクリル酸)、の重合単位を少なくとも50重量%含有していることを意味している。

【0009】

無水メタクリル酸と共重合して本発明の共重合体ビーズを形成する単量体は、全単量体の約0.1~約50重量%のレベルにおいて存在する少なくとも1種のポリエチレン性不飽和架橋性単量体を含有している。架橋性単量体は、脂肪族例えばアクリル系架橋剤、例え

50

ばジメタクリル酸エチレングリコール、ジアクリル酸エチレングリコール、ジ - およびトリ - アクリル酸トリメチロールプロパン、ジ - およびトリ - メタクリル酸トリメチロールプロパン、ジビニルケトン、アクリル酸アリル、マレイン酸ジアリル、フマル酸ジアリル、コハク酸ジアリル、炭酸ジアリル、マロン酸ジアリル、修酸ジアリル、アジピン酸ジアリル、セバシン酸ジアリル、セバシン酸ジビニル、N, N - メチレンジアクリルアミド、N, N - メチレンジメタクリルアミド、およびグリコールの、グリセロールの、ペンタエリトリールの、グリコールまたはレゾルシノールのモノ - またはジ - 誘導体の、ポリビニルエーテルまたはポリアリルエーテル等、であり、または芳香族例えばスチレン系架橋剤、例えばジビニルベンゼン、トリビニルベンゼン、ジビニルトルエン、ジビニルナフタレン、フタル酸ジアリル、ジビニルキシレン、ジビニルエチルベンゼン等、であり、またはヘテロ環式架橋剤、例えばジビニルピリジン、である。そのような架橋性単量体は当業者にはよく知られている。

10

【0010】

無水メタクリル酸と共重合する他の単量体には、他のアクリル系単量体、アクリル酸およびメタクリル酸およびそれらのエステル（これらには、 $C_1 - C_{18}$ アルキルアルコール、シクロアルキルアルコール、アリールアルコール、アラキルアルコールおよびアルカリルアルコールが包含される）が包含される。無水メタクリル酸と共重合する他の脂肪族単量体には、アクリロニトリルおよびメタクリロニトリル、塩化ビニル、ギ酸ビニル、ビニルアルキルエーテル例えばメチルビニルエーテル、アクリルアミド、メタクリルアミド、および芳香族単量体、例えばエチルビニルベンゼン、スチレン、 α - メチルスチレン、ビニルトルエン、ビニルナフタレン等、が包含される。他の単量体は、単独で、または1種またはそれ以上の他の単量体の混合物として存在させることができる。無水メタクリル酸は、本発明の共重合体ビーズを製造するために有用な全ての単量体混合物中に少なくとも50重量%のレベルで存在させる。

20

【0011】

本発明の巨大多孔性共重合体ビーズは、無水メタクリル酸の少なくとも50重量%を含有する単量体混合物を懸濁重合することによって造ることができる。懸濁重合においては、単量体混合物を、安定剤および安定な均一のサイズの小滴を促進させるための他の添加剤を任意的に含有している水性懸濁用媒質中に、小滴として懸濁させる。反応は、単量体混合物の中に遊離基を発生させることによって開始される。これら遊離基は、単量体の存在下で、遊離基発生性開始剤例えば過酸化物、過酸の塩、アゾ開始剤等の熱分解から生じ、またレドックス開始剤（redox initiators）例えばt - ブチルハイドロパーオキサイドとホルムアルデヒドヒドロ亜硫酸ナトリウムとの併用、から生じ、または紫外線またはその他のイオン化性放射線からも生じる。重合を開始させるのに好ましい方法は、単量体混合物中に、単量体に可溶性の熱に不安定な開始剤を含有させ、そして単量体の小滴が懸濁している懸濁用媒質を、開始剤の熱分解点以上の温度に加熱することである。

30

【0012】

そのような単量体に可溶性の熱に不安定な開始剤の例には、過酸化物およびハイドロパーオキサイドおよびそれらに関連する開始剤、例えば過酸化ベンゾイル、t - ブチルハイドロパーオキサイド、過酸化クメン、過酸化テトラリン、過酸化アセチル、過酸化カプロイル、過安息香酸t - ブチル、ジ過フタル酸t - ブチル、メチルエチルケトンパーオキサイド等、が包含される。また、有用な開始剤は、アゾ開始剤、例えばアゾジイソブチロニトリル、アゾジイソブチラミド、アゾビス（ α - ジメチルバレロニトリル）、アゾビス（ α - メチルブチロニトリル）およびジメチル - 、ジエチル - またはジブチル - アゾビス（メチルバレレート）、である。過酸化物開始剤は、好ましくは、単量体の全重量に基づいて約0.01 ~ 約3重量%のレベルにおいて使用し、そしてアゾ開始剤は、好ましくは、単量体の全重量に基づいて約0.01 ~ 約2重量%のレベルにおいて使用する。

40

【0013】

好ましい開始剤は、比較的分解点、すなわち約60 °C以下を有する開始剤、例えば、

50

- クミルパーオキシネオデカノエートおよびジ(4-t-ブチルシクロヘキシル)パーオキシジカーボネートである。なぜなら、これらは、酸無水物官能基が、加水分解しそうでなく、また反応に存在する他の成分と反応しそうでない比較的低温度において重合を可能にするからである。

【0014】

本発明の好ましい共重合体ビーズは巨大多孔性である。すなわち、前記共重合体ビーズは、約5～約10,000nmの直径を有する孔(pores)を含有しており、これらの孔は、ビーズ自体の容積の少なくとも約5%(5%孔容積)である内部孔容積をビーズに与えている。この多孔性の結果として、巨大多孔性ビーズの表面積は、(巨大多孔性を含有していない)ゲル重合体ビーズのための表面積よりも有意に大きい。この巨大多孔性を導入する1つの方法は、前述したMeitzner et al.の米国特許第4,221,871号に開示されており、そしてそれには、単量体混合物に、沈殿剤として知られているポロゲン(porogen)、相エキステンダー(phase extender)および相分離剤を導入することが包含される。ポロゲンは、単量体のための良好な溶剤であるが、重合体のためには貧弱な溶剤であり、そして好ましいポロゲンは、単量体または重合体と反応しない。本発明の共重合体ビーズを製造するのに有用な特に好ましいポロゲンには、イソオクタン、メチルイソブチルケトン、メチルイソブチルカルビノール、キシレン、トルエン、ジ-n-ブチルエーテル等、が包含される。特に好ましいものは、より多く疎水性のポロゲン例えばイソオクタンおよびキシレンである。なぜなら、これらは、重合中に酸無水物基の加水分解を促進させようとしなからである。巨大多孔性重合体ビーズの孔のサイズおよび表面積は、当業者に容易に明らかな技術によって調節することができ、これらの技術には、ポロゲンのタイプおよび濃度、架橋剤のタイプおよび濃度、開始剤のタイプおよび濃度、重合温度等を変えることが含まれている。また、当業者に知られている、共重合体ビーズの中に巨大多孔性を導入する他の方法も使用することができる。

【0015】

別法として、ゲル状のビーズまたは巨大多孔性ビーズのどちらにしても、前述の無水メタクリル酸単量体または単量体の混合物を使用して、共重合体ビーズを造る他の既知方法を用いて本発明の共重合体ビーズを造ることができる。種ビーズ(seed beads)として知られかつ単量体の中で膨潤性である予め形成した重合体ビーズの水性懸濁液に単量体を導入し、次いで、前記ビーズの中に入った単量体がそれらビーズを膨潤させ、重合する。この方法においては、重合体ビーズは架橋され、この場合には、無水メタクリル酸が唯一の単量体であり、または単量体混合物は、追加の架橋性単量体を省くことができる。また、重合体ビーズが未架橋であり、この場合には、単量体混合物に、好ましくは、架橋性単量体を含有させる。好ましくは、単量体混合物に重合開始剤を含有させる。この方法においては種粒子の生長を調節できるので、この種を用いる方法は、最終の粒径を効果的に調節できる。更に、種ビーズが均一の直径を有するビーズであるならば、粒径分類からの結果として、または均一な粒径の粒子を本質的に造る方法例えば乳化重合のような方法からの結果として、酸無水物を含有する結果的に得られる共重合体ビーズは、また大きさにおいて均一でありそして種ビーズより大きい。

【0016】

また、均一な直径を有するビーズを造る傾向にある他の別法においては、懸濁している媒質の動いている流れの中に、均一の直径を有する1つまたはそれ以上のオリフィス(orifices)を通して、調節された速度において、単量体混合物を噴射することによって、懸濁している媒質中に単量体混合物を導入することである。このようにして形成された単量体の小滴は均一の直径を有し、そして開始剤の分解点以上の温度に、懸濁している媒質中において、これらの小滴を加熱することによって重合するときは、その結果得られた共重合体ビーズは、粒径の均一性を保持している。これらのビーズは、形成されたビーズとして使用してもよいし、またそれらを、種ビーズをより大きな調節された大きさに生長させる前述の方法のための種ビーズとして役立たせてもよい。

【0017】

これらの別法の両方、および本発明の共重合体ビーズを製造するために有用な方法として当業者に容易に思い出されるその他の方法において、前述のような、ビーズに多孔性を導入することは、好ましい態様である。

【0018】

前述の方法のいずれかによって造られるビーズの大きさは、約 $10\ \mu\text{m}$ ~ 約 $2\ \text{mm}$ 、更に好ましくは約 $50\ \mu\text{m}$ ~ 約 $1\ \text{mm}$ の範囲にわたって調節することができる。懸濁重合における粒径の調節は、当業者には容易に明らかであり、そして油 - 水の界面における界面張力を変えること、いずれかの相または両方の相の粘度を変えること、および攪拌の速度を変えるような、そのような技術が包含される。

10

【0019】

懸濁重合によって本発明の共重合体ビーズを製造する方法において明らかである本発明の特別な利益は、単量体の水に対する溶解性を減少させるために、水性懸濁用媒質中に、任意の無機塩または他の水溶性成分、例えば水性重合体の発生を減少するのに使用される水性相防止剤、を含有させる必要性を排除することである。前述のように、単量体の溶解性は、弱酸カチオン交換樹脂をメタクリル酸単量体から造るときに、特別な問題である。無水メタクリル酸単量体は比較的水に対して不溶性であるので、そのような塩および他の水溶性成分が存在することを必要としない。ただし、最も広く考えられているように、これらの存在は、本発明からそのプロセスを除外するものではない。

【0020】

20

本発明の共重合体ビーズが形成されると、これらの共重合体ビーズは、イオン交換性またはキレート性 (chelating) の官能基、特別な親和力のあるリーガンド (ligand)、または親水性または疎水性の部分の広範囲の寄せ集めのいずれか、またはこれらの組み合わせ、をビーズに導入するために、反応させてもよい。無水メタクリル酸単量体からの酸無水物官能基は、共重合体中に存在しており、特に反応性であり、そして他の官能基を結合させるための便利な反応部位を提供する。また、酸無水物を弱酸のカルボキシル基に加水分解することは、共重合体上にカチオン交換樹脂官能基を生成させるための1つの経路でもある。重合反応中に、酸無水物基の少なくとも部分 (fraction) は加水分解されてカルボン酸を生成することは注目されるべきことである。この部分は、理論的に共重合体中に存在するであろう全酸無水物基の典型的には約 20% 以下、しばしば約 15% 以下、である。更に、水素形態における弱酸カルボキシル基を生成させるために酸を用いる加水分解、またはアルカリ金属形態における弱酸カルボキシル基を生成させるために水酸化アルカリ金属を用いる加水分解、が弱酸の官能化を増加させるのに使用される。

30

【0021】

ビーズに官能基を生成させるのに使用される反応の他の例および得られる官能基には、カルボン酸基のアンモニウム塩を生成させるためのアンモニアを用いる反応、およびアミン塩を生成させるためのアミン (これには、第1アミン、第2アミン、および第3アミン、およびポリエチレンアミンが包含される) を用いる反応、が包含される。酸無水物重合体の他の適当な誘導体には、アルキルエステルまたはその他のエステルおよびアミド、好ましくは $\text{C}_1 - \text{C}_8$ アルキルエステルおよびアミド、およびアルキルアミド、ジアルキルアミド、アリールアミド、アルカリルアミドおよびアミン置換基を有するアルキルアミド、が包含され、これらは、重合体上のカルボキシル基を、適当なアミンまたはアルキルまたはフェニルアルキルアルコールと反応させることにより、またアミノエステル、アミノアミド、ヒドロキシアミドおよびヒドロキシエステルと反応させることにより、造られたものであり、それらの場合には、

40

官能基が、アルキレン、フェニル、アルキレンアミン、アルキレンオキサイド、フェニルアルキル、フェニルアルキルフェニルまたはアルキルフェニルアルキルまたは他のアリール基によって分離されているアミンまたはアミン塩 (これらには第4級アミン塩基が包含される) を有する置換基は、重合体上のカルボキシル基を多官能性アミン例えばジメチル

50

アミノエタノールと反応させて重合体とアミド結合を生成させることにより、またはある種の場合には、より高い温度を使用したときは、近隣のカルボキシルとイミド結合を生成することにより、または重合体上の酸無水物基を同じ多官能性アミンと反応させて、重合体とエステル結合を生成させることにより、便利に生成させることができる。同様に、硫黄含有誘導体は、酸無水物基をチオールおよびチオアルコールと反応させることによって造ることができる。共重合体ビーズのそのような官能化を行う方法は、当業者に容易に明らかであろうし、また重合体ビーズに導入してもよい追加の官能基も当業者に容易に明らかであろう。

【0022】

ハイブリッド樹脂(hybrid resins)は、本発明の巨大多孔性共重合体ビーズまたは官能化された樹脂ビーズの孔に、巨大多孔性ビーズを造るのに使用した単量体と同じかまたは異なる単量体を充填し、その単量体を重合し、次いで孔の中に新しく生成した重合体を、ビーズ上の官能基から異なる官能基で官能化して2重の官能基を有するビーズを生成させることにより造ることができる。別法として、従来技術からの巨大多孔性共重合体ビーズまたは官能化された樹脂ビーズの表面を、本発明の無水メタクリル酸単量体で被覆するか、または孔に本発明の無水メタクリル酸単量体を充填し、次いで重合して2重の官能基を有するハイブリッド樹脂または本発明の無水メタクリル酸重合体の被覆を有する巨大網状ビーズのいずれかを生成させることである。この後者の構造によって提供される利益には、ベースの巨大多孔性重合体の選択による動的な膨潤および拡散の調節、被覆されたビーズの改良された化学安定性、およびビーズの汚れ潜在性の減少が含まれる。

【0023】

次の実施例には、本発明を例証することが意図されており、特許請求の範囲に限定されている以外は本発明を限定することは意図されていない。特にことわりがなければ、全ての%および比は重量によって表わしており、また使用された全ての試薬は、特にことわりがなければ良好な市販の品質のものである。

【0024】

実施例 1

この実施例は、無水メタクリル酸から本発明の巨大多孔性樹脂ビーズを製造することを例示している。

【0025】

攪拌機、液体で冷却された冷却器およびサーモカップル用プローブ(thermocouple probe)を備えた1リットルの4ツ口丸底フラスコに、脱イオン水462.45g、2%ヒドロキシエチルセルロース水溶液27.5g、分子量11,000~31,000を有する98%加水分解したポリビニルアルコールの10%水溶液9.0g、および亜硝酸ナトリウム0.15gを仕込んだ。この仕込み物を300rpmにおいて1時間攪拌した。別に、o-キシレン12.5g、80%ジビニルベンゼン(残余は、主としてエチルビニルベンゼンである)4.7g、無水メタクリル酸(純度99.5%)32.8g、 γ -クミルパーオキシネオデカノエートの75%ミネラルスピリット(mineral spirit)溶液0.5gおよびジ(4-t-ブチルシクロヘキシル)パーオキシジカーボネート0.375gを混合することによって有機混合物を造り、その混合物を、開始剤が完全に液体中に溶解するまで攪拌した。1時間の攪拌時間の終りにおいて、有機混合物をゆっくりとフラスコに加えながら、フラスコ仕込み物の攪拌を続けた。有機混合物の添加を完了したときに、フラスコの内容物を、攪拌しながら1 /分において35 に加熱し、次いで0.2 /分において75 に加熱した。フラスコ内容物を攪拌しながら75 において1時間保持し、次いで室温に冷却した。得られたビーズを排水し、ビーズ容量と同じアセトンの量を用いて3回洗い、次いでブフナーロート(Buchner funnel)内で減圧で乾燥した。乾燥後、共重合体ビーズの25g試料を、水酸化ナトリウムの50%(重量/重量)水溶液120gを用いて処理し、脱イオン水300mlを用いて80~90 の温度において約3時間処理し、そして攪拌しながら一夜冷却して、共重合体の中の酸無水物基を弱酸のナトリウム塩に変換した。この反応に続いて、ビ

10

20

30

40

50

ーズを脱イオンで水洗し、排水し、そして乾燥した。これらのビーズおよび次の実施例 2 ~ 6 のビーズの性質を、後述の第 1 表に示した。

【0026】

実施例 2

この実施例は、同じ有機混合物、異った懸濁剤およびより低い最終重合温度にしたより急な温度分布を使用して、実施例 1 の巨大多孔性樹脂ビーズの製造に類似する本発明の前記ビーズの製造を例示している。

【0027】

フラスコに入れた最初の仕込み物を、脱イオン水 449.15 g、カルボキシメチル - メチルセルロース 0.75 g およびラウリル硫酸ナトリウム 0.05 g にし、そして反応混合物を、1 / 分において 60 に加熱し、そしてその反応混合物を室温に冷却する前に、その温度において 5 時間保持した以外は、実施例 1 の手順を繰り返した。

【0028】

実施例 3

この実施例は、ジビニルベンゼンの代りにアクリル系架橋剤トリメチロールプロパントリメタクリレート、および o - キシレンの代りに異った有機溶媒メチルイソブチルケトンを使用して、実施例 2 の巨大多孔性重合体ビーズの製造に類似する本発明の前記ビーズの製造を例示している。

【0029】

実施例 1 の手順およびフラスコに入れる仕込み物および実施例 2 の加熱スケジュールを用い、別に、造った有機混合物としてメチルイソブチルケトン 23.0 g、トリメチロールプロパントリメタクリレート 10.0 g、無水メタクリル酸（純度 99.5 %）27.5 g、 - クパーオキシネオデカノエートの 75 % ミネラルスピリット溶液 0.5 g およびジ（4 - t - ブチルシクロヘキシル）パーオキシジカーボネート 0.375 g を使用して、重合体ビーズを造った。

【0030】

実施例 4

この実施例は、異った条件および試薬を使用して、本発明の巨大多孔性樹脂ビーズを製造する更に他の製造例を示している。

【0031】

実施例 1 の手順を使用して、反応フラスコ中において、脱イオン水 750 g、カルボキシメチルメチルセルロース 1.26 g および純粋なラウリル硫酸ナトリウム粉末 0.09 g の水性混合物を造り、これに、メチルイソブチルケトン 50.0 g、トリメチロールプロパントリメタクリレート 30.0 g、無水メタクリル酸（純度 92 %）82.5 g、 - クミルパーオキシネオデカノエートの 75 % ミネラルスピリット 1.0 g およびジ（4 - t - ブチルシクロヘキシル）パーオキシジカーボネート 0.76 g の有機混合物を加えた。反応混合物を、1 / 分において 50 に、0.5 / 分において 50 ~ 58 に加熱し、58 において 1.5 時間保持し、次いで室温に冷却し、そして本発明の樹脂ビーズを回収し、乾燥し、そして実施例 1 に記載したように後処理した。

【0032】

これらビーズの 1 部を、次の手順に従ってポリアミンを用いて官能化してアニオン交換樹脂を造った。乾燥共重合体ビーズの追加の 0.677 g 試料を 1 リットルの丸底フラスコに移し、そして脱イオン水 250 g に攪拌しながら懸濁させた。500 ml ビーカーの中で、トリエチレンテトラリン（TEETA）3.0 g を脱イオン水 250 ml に懸濁し、この懸濁させたアミンを、共重合体ビーズを含有するフラスコに、滴下しながら加えた。アミンの添加後、フラスコの内容物を 50 に加熱してその温度において 5 時間保持し、その後冷却し、脱イオン水で水洗し、そして乾燥した。粒径の測定結果は、これらの TEETA で官能化したビーズである。

【0033】

実施例 5

この実施例は、異った有機混合物を使用する本発明の巨太多孔性樹脂ビーズの製造例を示している。

【0034】

実施例1の手順および水性混合物および実施例4の温度分布を用い、有機混合物として、メチルイソブチルケトン50.0g、トリメチロールプロパントリメタクリレート15.0g、無水メタクリル酸（純度92%）97.5g、 γ -クミルパーオキシネオデカノエートの75%ミネラルスピリット溶液1.0gおよびジ（4-t-ブチルシクロヘキシル）パーオキシジカーボネート0.76gを使用して、樹脂ビーズを造った。この共重合体ビーズを回収し、乾燥し、そして実施例1の手順に従って後処理した。乾燥後、共重合体の試料を、実施例4に記載したようにTETA形態に変換した。粒径の測定結果は、これらのTETAで官能化したビーズである。

10

【0035】

実施例6

この実施例は、実施例3～5のメチルイソブチルポロゲン（porogen）と共に実施例1のジビニルベンゼン架橋剤の低レベルを使用する、本発明の巨太多孔性樹脂ビーズの製造例を示している。

【0036】

実施例1の手順、実施例4および5の水性混合物、およびメチルイソブチルケトン30.645g、ジビニルベンゼン（純度80%）2.563g、無水メタクリル酸（純度92%）47.95g、 γ -クミルパーオキシネオデカノエートの75%ミネラルスピリット溶液0.665gおよびジ（4-t-ブチルシクロヘキシル）パーオキシカーボネート0.5gの有機混合物を使用して、樹脂ビーズを造った。反応混合物を、1 /分において50 に加熱し、50 において4時間保持し、次いで室温に冷却した。これら重合体ビーズを回収し、乾燥し、そして実施例1の手順に従って後処理した。

20

【0037】

シトクロム-cに対する吸着容量および回収の測定（Cytochrome-c Capacity and Recovery Determination）

前述のようにして造った樹脂のそれぞれに対して、タンパク質、シトクロム-cを吸着しそして溶離する樹脂の能力について試験した。シトクロム-cの吸着容量、すなわち、樹脂が、樹脂の単位容量20mlにつき溶液から吸着できるシトクロム-cの量、を測定するために、各樹脂の湿潤試料を、内径2.5cmおよび長さ少なくとも20cmを有するガラス製クロマトグラフィーのカラムに移すことによって各樹脂を前処理した。カラムの頂上に2パール（bars）の空気圧を適用することによってカラムからフリーの液体（free liquid）を押し出した。次いで、このカラムにHPLC級のメタノールを充填し、同様にこのメタノールを2パールの圧力においてカラムを通して押し出した。メタノールの200mlがカラムを通して押し出されるまで、これを繰り返した。次いで、メタノールを押し出し、そして純粋な脱イオン水200mlを同じようにしてカラムを通して押し出した。水をカラムから押し出し、そして0.05M酢酸塩緩衝溶液（氷酢酸3.0gを水1000mlに溶かし、50%水酸化ナトリウム水溶液を用いてpH5.4に調節した緩衝溶液）を同じようにしてカラムを通して押し出した。

30

40

【0038】

前述のようにして前処理した樹脂の約2ml試料の正確な容量を測定し、そしてこれら試料を、酢酸塩緩衝溶液を用いて、樹脂+緩衝溶液が80mlの全容量になるように希釈した。各試料を250ml容器に移し、そしてシトクロム-c（Sigma C-2506；Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）の20mg/ml酢酸塩緩衝溶液の20mlを速く加えた。この容器のふたを閉め、30分間振盪し、その後樹脂を5分間沈降させた。その上澄み液の紫外線の吸光度を550ナノメートル（nm）において測定し、そして標準のシトクロム-cの紫外線吸光度と比較して、濃度未定のシトクロム-cの濃度を測定した。樹脂のシトクロム-c吸着容量は次の式1を用いて計算した：

50

【式 1】

$$\text{吸着容量} = (400 - (100 \times C_s)) / V_r \quad (\text{式 1})$$

【0039】

〔式中、 C_s は、上澄み液中のシトクロム - c の濃度 (mg/ml) であり、そして V_r は、樹脂試料の容量 (ml) である〕

【0040】

シトクロムの回収、すなわち、樹脂から溶離することができる樹脂に吸着されたシトクロム - c の量は、前述の吸着容量測定からの各 2 ml 試料の全てを、内径 1 cm を有するガラス製クロマトグラフィーカラムに移し、そしてそれらを、酢酸緩衝溶液を用いてすすいで、残留しているシトクロム - c 溶液のできるだけ多くを除去することによって測定した。次いで、0.5 M 塩化ナトリウム酢酸緩衝溶液の正確に 100.0 ml を 1 ml / 分の速度において各樹脂試料を通して流し、集めた塩化ナトリウム溶液の紫外線吸光度を 550 nm において測定した。塩化ナトリウム溶液中の濃度未定のシトクロム - c の濃度を標準溶液と比較することにより、前述のようにして測定し、樹脂の回収を次の式 2 から計算した：

【式 2】

$$\text{回収 (\%)} = (100 \times C_r) / (V_r \times \text{吸着能力}) \quad (\text{式 2})$$

【0041】

〔式中、 C_r は、塩化ナトリウム溶液中のシトクロムの濃度 (mg/ml) である〕。
吸着容量は、式 1 によって計算されたような樹脂のシトクロム - c 吸着容量であり、 V_r は、前述のように、樹脂試料の容量である。実施例 1 ~ 6 の樹脂のためのこれらの測定の両者の結果を、次の第 1 表に示した。

【0042】

次の第 1 表に示されているのは、実施例 4、5 および 6 の共重合体のストレプトマイシン吸着容量の測定の結果である。これらの結果は、湿潤樹脂の 1 ml あたりのストレプトマイシンの活性単位で示されている。ストレプトマイシン硫酸塩の各 mg は、767 ストレプトマイシンの活性単位にほとんど等しい。

【0043】

また、次の第 1 表には、従来技術の 2 種の異った粉碎されそして分類された、弱酸の巨大多孔性のメタクリル酸 - ジビニルベンゼン樹脂が示されている。その 1 つ (比較例 A) は、150 ~ 300 μm の範囲の粒径分布を有し、そして他のもの (比較例 B) は、75 ~ 105 μm の範囲の粒径分布を有している。

【表 1】

10

20

30

第 1 表

実施例	粒 径 (μm)	CEC ³ (meq/g)	シト-C ⁴ 吸着容量 (mg/ml)	シト-C ⁴ 回収 (%)	ストレプトマイシン 回収 (ストレプトマイシン 単位) ⁵
1	—	—	72	91	—
2	277 ¹	6.86	144	82	—
3	202 ¹	5.48	157	98	—
4	160 ²	6.95-7.72	19	85	305
5	160 ²	8.73-9.17	44	81	251
6	500	6.9	—	—	101
A	150-300	11.7	82	100	
B	75-150	10.3	11	87	

(注) 1-粒径はナトリウム形態で測定した。

2-粒径はTETA形態で測定した。

3-カチオン交換樹脂容量

4-シトクロム-c

5-ストレプトマイシン活性単位におけるストレプトマイシン吸着容量

【0044】

前記の実施例1～6および第1表から見られるように、本発明の樹脂のイオン交換容量は多くの目的のためには満足するものであり、タンパク質例えばシトクロム-cおよびストレプトマイシンのための吸着能力および回収は、良好～優秀の範囲にあり、そして樹脂自体は、単量体の溶解性の問題を排除するための塩析を伴う手順を念入りに行う必要もなく造ることができる。

【0045】

実施例7

この実施例は、実施例2の懸濁助剤を使用し、かつポロゲンを省いて、本発明の架橋された球形のゲル状の共重合体ビーズを製造する方法を例示している。

【0046】

2リットルの丸底フラスコ中において、脱イオン水958.47g、カルボキシメチル-メチルセルロース1.44g、およびラウリル硫酸ナトリウム0.0864gを、固体物質が溶解するまで攪拌することにより、水性相を造った。別に、市販ジビニルベンゼン(純度55%)88.87g、無水メタクリル酸(純度94%)163.97g、ジ(4-t-ブチルシクロヘキシル)パーオキシジカーボネート開始剤4.8gおよび-クミルパーオキシネオデカノエート開始剤3.2gを、開始剤が溶解するまで攪拌して、有機相を造った。この有機相を、攪拌しながら水性相に添加して水性相中に有機物の小滴の懸濁液を生成させた。この混合物を、0.5/分において25～60に加熱し、そして60において4時間保持した。発熱のために、温度は20分間で65に上昇した。反応時間の終りににおいて、フラスコ内容物を冷却し、プフナーポート内で固体物質を液体から分離し、固体物質をアセトンで洗った。この固体物質は、架橋された球形の、非多孔性

またはゲル状の共重合体ビーズの形態をしていた。

フロントページの続き

審査官 佐々木 秀次

(56)参考文献 米国特許第04070348(US,A)
米国特許第03764477(US,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C08F220/06

C08F 2/18

CA(STN)

REGISTRY(STN)