明　細　書

発明の名称 ：

Ｆｃ融合タンパク質を精製するためのクロマトグラフィー用担体、及びそれを用いたＦｃ融合タンパク質の精製方法

技術分野

[0001] 本発明は、Ｆｃ融合タンパク質を精製するためのクロマトグラフィー用担体、及びそれを用いたＦｃ融合タンパク質の精製方法に関する。

背景技術

[0002] 抗体医薬等をはじめとするバイオ医薬品の製造プロセスでは、抗体等の目的の医薬用タンパク質を、発現培地から分離し、治療薬や診断薬として許容できる純度に精製する必要がある。医薬用タンパク質は、一般にアフィニティクロマトグラフィーによる精製を経て製造される。このようなクロマトグラフィー精製に用いるアフィニティ担体には、標的タンパク質に対する結合容量の向上や、培地中成分等の不純物の非特異吸着の低減などが求められる。

[0003] 特許文献１には、ジビニルベンゼン、エチルジビニルベンゼン及びグリシジルメタクリレートを重合させ、次いでこれを架橋して得られた多孔質架橋粒子を、ふるい分級して所定の粒度分布を有するようにした後、タンパク質リガンドを結合させてアフィニティクロマトグラフィー用担体を製造したこと、また該担体の抗体に対する動的結合容量が向上したことが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開公報第２０２２／２０２４６６号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] Ｆｃ融合タンパク質は、イムノグロブリンのＦｃフラグメントに、標的分子への特異的結合能を有するタンパク質（受容体の細胞外ドメイン等）を融合させたタンパク質であり、分子標的治療薬として臨床使用されている。Ｆｃ融合タンパク質は、抗体医薬と同様にアフィニティクロマトグラフィーにより精製されている。しかし、従来のアフィニティ担体は、主に抗体の精製を目的として製造されているため、これをＦｃ融合タンパク質の精製に用いた場合、動的結合容量（ＤＢＣ）又は不純物の夾雑等の点で、抗体精製と同等の性能は得られなかった。より高効率に、より高純度のＦｃ融合タンパク質を分離することが望まれる。本発明は、Ｆｃ融合タンパク質に対するＤＢＣが大きく、かつ夾雑物が少ないより高純度なＦｃ融合タンパク質を分離することを可能にするクロマトグラフィー用担体、及びそれを用いたＦｃ融合タンパク質の精製方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明は、代表的実施形態として、以下を提供する。

〔１〕Ｆｃ融合タンパク質を精製するためのクロマトグラフィー用担体であって、

リガンドが固定化された多孔質粒子を備え、

該多孔質粒子は合成高分子系又は天然高分子系の多孔質粒子であり、

該リガンドはプロテインＡ、プロテインＧ、プロテインＬ及びこれらの類縁物質からなる群から選択される少なくとも１種であり、

該リガンドが固定化された多孔質粒子の平均細孔径は７５～１２０ｎｍである、

クロマトグラフィー用担体。

〔２〕前記リガンドが固定化された多孔質粒子の平均細孔径が１０１～１１０ｎｍである、〔１〕記載のクロマトグラフィー用担体。

〔３〕前記Ｆｃ融合タンパク質が、分子量が１６０～３００ｋＤａである、〔１〕又は〔２〕記載のクロマトグラフィー用担体。

〔４〕前記リガンドが固定化された多孔質粒子が、体積平均粒子径が４５～

１００μｍであり、空孔率が７０～９５％（ｖ／ｖ）である、〔１〕～〔３〕のいずれか１項記載のクロマトグラフィー用担体。

〔５〕前記Ｆｃ融合タンパク質が、エタネルセプト、リロナセプト、及びエフモロクトコグアルファからなる群から選択される少なくとも１種である、〔１〕～〔４〕のいずれか１項記載のクロマトグラフィー用担体。

〔６〕前記Ｆｃ融合タンパク質が、配列番号４又は配列番号５のアミノ酸配列、又はこれらの配列のいずれかと８５％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるＦｃ融合タンパク質である、〔１〕～〔５〕のいずれか１項記載のクロマトグラフィー用担体。

〔７〕前記多孔質粒子が、リガンドを固定可能な官能基及び重合性不飽和基を有するモノマーと、該官能基をもたない重合性不飽和基含有モノマーとの重合体である、〔１〕～〔６〕のいずれか１項記載のクロマトグラフィー用担体。

〔８〕前記官能基をもたない重合性不飽和基含有モノマーが、非架橋性モノマー及び架橋性モノマーを含む、〔７〕記載のクロマトグラフィー用担体。

〔９〕Ｆｃ融合タンパク質の精製方法であって、以下：

（工程１）〔１〕～〔８〕のいずれか１項記載のクロマトグラフィー用担体を含むカラムに、Ｆｃ融合タンパク質を含む溶液を通液し、該担体に該Ｆｃ融合タンパク質を結合させる工程；

（工程２）該担体を洗浄する工程；及び、

（工程３）該担体から該Ｆｃ融合タンパク質を回収する工程、

を含む、方法。

〔１０〕さらに、以下：

（工程４）前記工程３の後、前記カラムにアルカリ性液を通液する工程、

を含む、〔９〕記載の方法。

〔１１〕工程１から工程４を複数回繰り返すことを含む、〔１０〕記載の方法。

発明の効果

[0007] 本発明のクロマトグラフィー用担体は、Ｆｃ融合タンパク質に対するＤＢＣが大きく、かつ標的のＦｃ融合タンパク質と夾雑物を分離する性能に優れる。したがって、本発明のクロマトグラフィー用担体を用いたＦｃ融合タンパク質の精製方法によれば、より高効率に、より高純度のＦｃ融合タンパク質を分離することができる。

発明を実施するための形態

[0008] 本明細書中で引用された全ての特許文献、非特許文献、及びその他の刊行物は、その全体が本明細書中において参考として援用される。

[0009] 本明細書で、「Ａ～Ｂ」等の数値範囲を表す表記は、「Ａ以上、Ｂ以下」と同義であり、Ａ及びＢをその数値範囲に含む。

[0010] 本明細書において、アフィニティクロマトグラフィーに関連して使用される用語「リガンド」とは、アフィニティクロマトグラフィーの標的物質と結合する分子のことを表す。「タンパク質リガンド」とは、該標的物質と結合する部分がタンパク質で構成されているリガンドを表す。

[0011] 本明細書において、「Ｆｃ」及び「Ｆｃ領域」とは、イムノグロブリンのＦｃ領域又はＦｃフラグメントをいう。本明細書において、「Ｆｃ結合ドメイン」とは、単独でＦｃに対する結合活性を有するポリペプチドの機能単位を表す。本明細書において、「Ｆｃ結合タンパク質」とは、該「Ｆｃ結合ドメイン」を含み、イムノグロブリンのＦｃに特異的な親和性を有するタンパク質を表す。

[0012] 本明細書において、「Ｆｃ融合タンパク質」とは、イムノグロブリンのＦｃフラグメントに、異種タンパク質を融合させたタンパク質である。該異種タンパク質は、ヒト由来でも非ヒト由来であってもよいが、イムノグロブリンＦａｂ以外のタンパク質であり、この点においてＦｃ融合タンパク質は、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＭ等のイムノグロブリンやキメラ抗体等を含む抗体及びその断片とは区別される。典型的には、該異種タンパク質は、受容体の細胞外ドメイン、受容体アンタゴニスト、酵素などの標的分子への特異的結合能を有するタンパク質である。臨床では、Ｆｃ融合タンパ

ク質は、関節リウマチ等の炎症性疾患、血友病等の出血性疾患などの治療のための分子標的治療薬として使用されている。Ｆｃ融合タンパク質を用いた分子標的治療薬の例として、エタネルセプト、リロナセプト、エフモロクトコグアルファなどが挙げられる。

[0013] 本明細書において、アミノ酸配列に関する「８５％以上の同一性」とは、好ましくは９０％以上、より好ましくは９４％以上、さらに好ましくは９６％以上、さらに好ましくは９８％以上、さらに好ましくは９９％以上の同一性をいう。アミノ酸配列の同一性は、ＢＬＡＳＴアルゴリズム（Ｐｒｏ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．，１９９３，９０：５８７３－５８７７）を用いて決定することができる。このＢＬＡＳＴアルゴリズムに基づいて、ＢＬＡＳＴＮ、ＢＬＡＳＴＸ、ＢＬＡＳＴＰ、ＴＢＬＡＳＴＮ及びＴＢＬＡＳＴＸとよばれるプログラムが開発されている（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１９９０，２１５：４０３－４１０）。これらのプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いることができる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である（[www.ncbi.nlm.nih.gov]参照）。

[0014] 本明細書において、アミノ酸配列上の「相当する位置」は、目的配列と参照配列（例えば、配列番号１のアミノ酸配列）とを、各アミノ酸配列中に存在する保存アミノ酸残基に最大の相同性を与えるように整列（アラインメント）させることにより決定することができる。アラインメントは、公知のアルゴリズムを用いて実行することができ、その手順は当業者に公知である。例えば、アラインメントは、Ｃｌｕｓｔａｌ　Ｗマルチプルアラインメントプログラム（Ｔｈｏｍｐｓｏｎ　Ｊ．Ｄら，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，１９９４，２２：４６７３－４６８０）をデフォルト設定で用いることにより行うことができる。Ｃｌｕｓｔａｌ　Ｗは、例えば、国立遺伝学研究所が運営する日本ＤＮＡデータバンク（DDBJ [www.ddbj.nig.ac.jp/index.html]）のウェブサイト上で利用することができる。上述のアラインメントにより参照配列の任意の位置にアラインされた目的配列の位置は、当該任

意の位置に「相当する位置」とみなされる。

[0015] 本明細書において、アミノ酸残基は次の略号でも記載される：アラニン（Ａｌａ又はＡ）、アルギニン（Ａｒｇ又はＲ）、アスパラギン（Ａｓｎ又はＮ）、アスパラギン酸（Ａｓｐ又はＤ）、システイン（Ｃｙｓ又はＣ）、グルタミン（ＧｌｎまたはＱ）、グルタミン酸（Ｇｌｕ又はＥ）、グリシン（Ｇｌｙ又はＧ）、ヒスチジン（Ｈｉｓ又はＨ）、イソロイシン（Ｉｌｅ又はＩ）、ロイシン（Ｌｅｕ又はＬ）、リジン（Ｌｙｓ又はＫ）、メチオニン（Ｍｅｔ又はＭ）、フェニルアラニン（Ｐｈｅ又はＦ）、プロリン（Ｐｒｏ又はＰ）、セリン（Ｓｅｒ又はＳ）、トレオニン（Ｔｈｒ又はＴ）、トリプトファン（Ｔｒｐ又はＷ）、チロシン（Ｔｙｒ又はＹ）、バリン（Ｖａｌ又はＶ）、及び任意のアミノ酸残基（Ｘａａ又はＸ）。また本明細書において、ペプチドのアミノ酸配列は、常法に従って、アミノ末端（以下Ｎ末端という）が左側、カルボキシル末端（以下Ｃ末端という）が右側に位置するように記載される。

[0016] 〔Ｆｃ融合タンパク質を精製するためのクロマトグラフィー用担体〕

一実施形態において、本発明は、Ｆｃ融合タンパク質を精製するためのクロマトグラフィー用担体を提供する。本発明のクロマトグラフィー用担体は、Ｆｃ融合タンパク質への結合能を有するリガンドが固定された多孔質粒子を備え、かつ該担体は、調整された細孔径を有する。

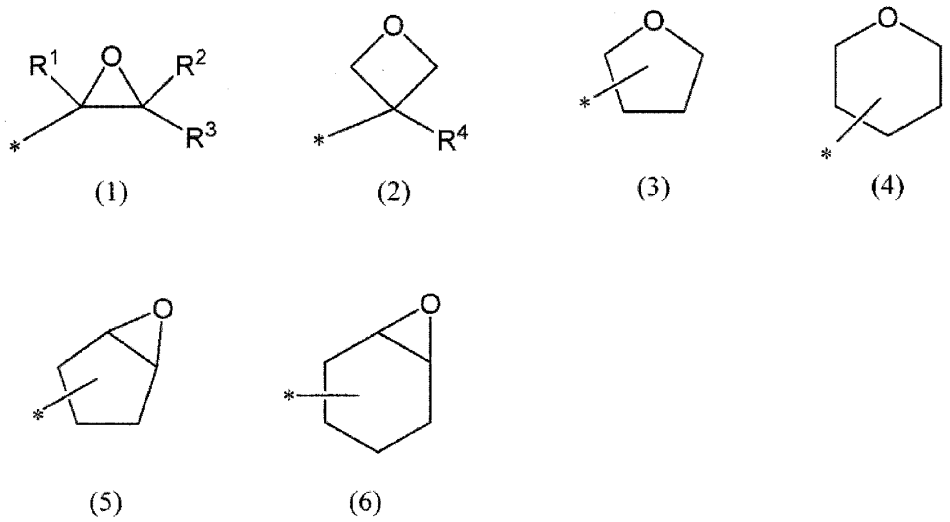
[0017] （多孔質粒子）

本発明のクロマトグラフィー用担体に用いる多孔質粒子は、天然高分子系多孔質粒子でも合成高分子系多孔質粒子でもよいが、該担体の細孔径を調整するためには、好ましくは合成高分子系多孔質粒子である。また、多孔質粒子は、好ましくは水不溶性である。該多孔質粒子は、水系媒体中にモノマー組成物を多孔化剤とともに懸濁し、モノマーを重合させることにより製造することができる。以下に、本発明のクロマトグラフィー用担体に用いる多孔質粒子の製造方法について説明する。

[0018] 前記モノマー組成物としては、官能基含有モノマーを含有するものが好ま

しい。該モノマーが含有する官能基は、追加の化学反応（架橋剤との反応等）に利用できるものが好ましく、リガンドを固定可能なものであってもよい。官能基としては、例えば、環状エーテル基、カルボキシ基、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、コハク酸イミドオキシカルボニル基、ホルミル基、水酸基、及びイソシアネート基からなる群より選ばれる官能基が挙げられる。これらの中では、環状エーテル基が好ましい。ここで、「環状エーテル基」としては、環を構成する原子数が３～７個の環状エーテル基が好ましい。該環状エーテル基は、置換基としてアルキル基を有していてもよい。該環状エーテル基の例としては、以下の式（１）～（６）で表される環状エーテル基が挙げられ、このうち式（１）、（３）又は（６）で表される環状エーテル基が好ましく、式（１）で表される環状エーテル基がより好ましい。

[0019] [化1]



[0020] 〔式中、R^1～R^4は、それぞれ独立して、水素原子又はアルキル基を示し、＊は、結合手を示す。〕

[0021] R^1～R^4で示されるアルキル基の炭素数は、好ましくは１～４であり、より好ましくは１又は２である。該アルキル基は直鎖状でも分岐鎖状でもよく、例えば、メチル基、エチル基、ｎ－プロピル基、イソプロピル基、ｎ－ブチル基、ｓｅｃ－ブチル基、ｔｅｒｔ－ブチル基等が挙げられる。また、R^1～

R^4としては、水素原子が好ましい。

[0022] 前記官能基含有モノマーとしては、リガンドを固定可能な官能基及び重合性不飽和基を有するモノマーが好ましい。このようなモノマーとしては、例えば、グリシジル（メタ）アクリレート、３－オキシラニルプロピル（メタ）アクリレート、４－オキシラニルブチル（メタ）アクリレート、５－オキシラニルペンチル（メタ）アクリレート、６－オキシラニルヘキシル（メタ）アクリレート、７－オキシラニルヘプチル（メタ）アクリレート、８－オキシラニルオクチル（メタ）アクリレート、（３－メチルオキシラニル）メチル（メタ）アクリレート、４－ヒドロキシブチル（メタ）アクリレートグリシジルエーテル、グリセリンモノ（メタ）アクリレートグリシジルエーテル、３，４－エポキシシクロヘキシルメチル（メタ）アクリレート、３，４－エポキシシクロヘキシルエチル（メタ）アクリレート、３，４－エポキシシクロヘキシルプロピル（メタ）アクリレート、α－（メタ）アクリル－ω－グリシジルポリエチレングリコール、テトラヒドロフルフリル（メタ）アクリレート等の環状エーテル基を有する（メタ）アクリレート系モノマー；（ビニルベンジル）グリシジルエーテル、（イソプロペニルベンジル）グリシジルエーテル、（ビニルフェネチル）グリシジルエーテル、（ビニルフェニルブチル）グリシジルエーテル、（ビニルベンジルオキシエチル）グリシジルエーテル、（ビニルフェニル）グリシジルエーテル、（イソプロペニルフェニル）グリシジルエーテル、１，２－エポキシ－３－（４－ビニルベンジル）プロパン等の環状エーテル基を有する芳香族ビニル系モノマー；アリルグリシジルエーテル等の環状エーテル基を有するアリルエーテル系モノマー；イソシアナトエチル（メタ）アクリレート等のイソシアネート基を有する（メタ）アクリレート系モノマー；マレイン酸無水物、メチルマレイン酸無水物、グルタコン酸無水物等の不飽和ジカルボン酸無水物系モノマーの他、（メタ）アクリル酸、３，４－エポキシ－１－ブテン、３，４－エポキシ－３－メチル－１－ブテン等が挙げられる。これらモノマーは、１種を単独で又は２種以上を組み合わせて使用できる。これらモノマーの中では、環状

エーテル基を有する（メタ）アクリレート系モノマーが好ましく、グリシジル（メタ）アクリレートがより好ましい。

[0023] 前記モノマー組成物における前記官能基含有モノマーの合計含有量は、該モノマー組成物中のモノマー総量１００質量部に対して、好ましくは３５質量部以上、より好ましくは４５質量部以上、さらに好ましくは５５質量部以上であり、他方、該モノマー組成物中のモノマー総量１００質量部に対して、好ましくは９９質量部以下、より好ましくは９０質量部以下、さらに好ましくは８５質量部以下である。

[0024] 前記モノマー組成物は、前記官能基含有モノマーに加えて、さらに該官能基含有モノマー以外のモノマー（以下、他のモノマーともいう）を含有していてもよい。該他のモノマーとしては、リガンドを固定可能な官能基をもたない重合性不飽和基含有モノマーが挙げられる。該他のモノマーは、非架橋性モノマー、架橋性モノマーに大別され、これらのうち一方を用いても併用してもよい。

[0025] 前記他のモノマーとして使用可能な非架橋性モノマーとしては、例えば、（メタ）アクリレート系非架橋性モノマー、（メタ）アクリルアミド系非架橋性モノマー、芳香族ビニル系非架橋性モノマー、ビニルケトン系非架橋性モノマー、（メタ）アクリロニトリル系非架橋性モノマー、Ｎ－ビニルアミド系非架橋性モノマー等が挙げられる。これらは１種を単独で又は２種以上を組み合わせて使用できる。該非架橋性モノマーの中では、（メタ）アクリレート系非架橋性モノマー、芳香族ビニル系非架橋性モノマーが好ましい。

[0026] 前記（メタ）アクリレート系非架橋性モノマーとしては、例えば、メチル（メタ）アクリレート、エチル（メタ）アクリレート、ｎ－ブチル（メタ）アクリレート、４－ｔｅｒｔ－ブチル（メタ）アクリレート、イソブチル（メタ）アクリレート、ｎ－オクチル（メタ）アクリレート、２－エチルヘキシル（メタ）アクリレート、シクロヘキシル（メタ）アクリレート、メトキシエチル（メタ）アクリレート、ヒドロキシエチル（メタ）アクリレート、ヒドロキシプロピル（メタ）アクリレート、グリセロールモノ（メタ）アク

リレート、トリメチロールエタンモノ（メタ）アクリレート、トリメチロールプロパンモノ（メタ）アクリレート、ブタントリオールモノ（メタ）アクリレート、ポリエチレングリコールモノ（メタ）アクリレート、メトキシポリエチレングリコール（メタ）アクリレート、ペンタエリスリトールモノ（メタ）アクリレート、ジペンタエリスリトールモノ（メタ）アクリレート、イノシトールモノ（メタ）アクリレート等が挙げられる。これらは１種を単独で又は２種以上を組み合わせて使用できる。

[0027] 前記（メタ）アクリルアミド系非架橋性モノマーとしては、例えば、（メタ）アクリルアミド、ジメチル（メタ）アクリルアミド、ヒドロキシエチル（メタ）アクリルアミド、（メタ）アクリロイルモルホリン、ダイアセトン（メタ）アクリルアミド等が挙げられる。これらは１種を単独で又は２種以上を組み合わせて使用できる。

[0028] 前記芳香族ビニル系非架橋性モノマーとしては、例えば、スチレン、α－メチルスチレン、ハロゲン化スチレン、４－メチルスチレン、２，４－ジメチルスチレン、２，４，６－トリメチルスチレン、エチルビニルベンゼン、４－イソプロピルスチレン、４－ｎ－ブチルスチレン、４－イソブチルスチレン、４－ｔｅｒｔ－ブチルスチレン等のスチレン類；１－ビニルナフタレン、２－ビニルナフタレン等のビニルナフタレン類等が挙げられる。これらは１種を単独で又は２種以上を組み合わせて使用できる。

[0029] 前記ビニルケトン系非架橋性モノマーとしては、例えば、エチルビニルケトン、プロピルビニルケトン、イソプロピルビニルケトン等が挙げられる。これらは１種を単独で又は２種以上を組み合わせて使用できる。

[0030] 前記（メタ）アクリロニトリル系非架橋性モノマーとしては、例えば、アクリロニトリル、メタクリロニトリル等が挙げられる。これらは１種を単独で又は２種以上を組み合わせて使用できる。

[0031] 前記Ｎ－ビニルアミド系非架橋性モノマーとしては、例えば、Ｎ－ビニルアセトアミド、Ｎ－ビニルプロピオンアミド等が挙げられる。これらは１種を単独で又は２種以上を組み合わせて使用できる。

[0032] 前記モノマー組成物における前記非架橋性モノマーの合計含有量は、該モノマー組成物中のモノマー総量１００質量部に対して、好ましくは０．０１質量部以上、より好ましくは０．０５質量部以上、さらに好ましくは０．１質量部以上であり、他方、該モノマー組成物中のモノマー総量１００質量部に対して、好ましくは３０質量部以下、より好ましくは１５質量部以下、さらに好ましくは５質量部以下である。

[0033] 前記他のモノマーとして使用可能な架橋性モノマーとしては、例えば、（メタ）アクリレート系架橋性モノマー、芳香族ビニル系架橋性モノマー、アリル系架橋性モノマー等が挙げられる。これらは１種を単独で又は２種以上を組み合わせて使用できる。該架橋性モノマーとしては、２～５官能の架橋性モノマーが好ましく、２又は３官能の架橋性モノマーがより好ましい。また該架橋性モノマーの中では、（メタ）アクリレート系架橋性モノマー、芳香族ビニル系架橋性モノマーが好ましい。

[0034] 前記（メタ）アクリレート系架橋性モノマーとしては、例えば、エチレングリコールジ（メタ）アクリレート、ジエチレングリコールジ（メタ）アクリレート、トリエチレングリコールジ（メタ）アクリレート、テトラエチレングリコールジ（メタ）アクリレート、ポリエチレングリコールジ（メタ）アクリレート、プロピレングリコールジ（メタ）アクリレート、ジプロピレングリコールジ（メタ）アクリレート、トリプロピレングリコールジ（メタ）アクリレート、テトラプロピレングリコールジ（メタ）アクリレート、ポリプロピレングリコールジ（メタ）アクリレート、１，４－ブタンジオールジ（メタ）アクリレート、１，６－ヘキサンジオールジ（メタ）アクリレート、グリセリンジ（メタ）アクリレート、トリメチロールエタンジ（メタ）アクリレート、トリメチロールプロパンジ（メタ）アクリレート、トリメチロールプロパントリ（メタ）アクリレート、ブタントリオールジ（メタ）アクリレート、ペンタエリスリトールジ（メタ）アクリレート、ペンタエリスリトールトリ（メタ）アクリレート、ペンタエリスリトールテトラ（メタ）アクリレート、グルコースジ（メタ）アクリレート、グルコーストリ（メタ

）アクリレート、グルコーステトラ（メタ）アクリレート、ジペンタエリスリトールジ（メタ）アクリレート、ジペンタエリスリトールトリ（メタ）アクリレート、ジペンタエリスリトールテトラ（メタ）アクリレート、ジペンタエリスリトールペンタ（メタ）アクリレート、イノシトールジ（メタ）アクリレート、イノシトールトリ（メタ）アクリレート、イノシトールテトラ（メタ）アクリレート、マンニトールジ（メタ）アクリレート、マンニトールトリ（メタ）アクリレート、マンニトールテトラ（メタ）アクリレート、マンニトールペンタ（メタ）アクリレート等が挙げられる。これらは１種を単独で又は２種以上を組み合わせて使用できる。

[0035] 前記芳香族ビニル系架橋性モノマーとしては、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、ジビニルキシレン、ジビニルエチルベンゼン、ジビニルナフタレン等が挙げられる。これらは１種を単独で又は２種以上を組み合わせて使用できる。

[0036] 前記アリル系架橋性モノマーとしては、例えば、フタル酸ジアリル、イソフタル酸ジアリル、テレフタル酸ジアリル、マレイン酸ジアリル、フマル酸ジアリル、イタコン酸ジアリル、トリメリット酸ジアリル、トリメリット酸トリアリル、シアヌル酸トリアリル、イソシアヌル酸ジアリル、イソシアヌル酸トリアリル等が挙げられる。これらは１種を単独で又は２種以上を組み合わせて使用できる。

[0037] さらに、前記架橋性モノマーとしては、上記で例示したものの他に、ジアミノプロパノール、トリスヒドロキシメチルアミノメタン、グルコサミン等のアミノアルコールと（メタ）アクリル酸との脱水縮合反応物や、ブタジエン、イソプレン等の共役ジオレフィン等を挙げることができる。

[0038] 前記モノマー組成物における前記架橋性モノマーの合計含量は、該モノマー組成物中のモノマー総量１００質量部に対して、好ましくは１質量部以上、より好ましくは５質量部以上、さらに好ましくは１０質量部以上であり、他方、該モノマー組成物中のモノマー総量１００質量部に対して、好ましくは５０質量部以下、より好ましくは４０質量部以下、さらに好ましくは３０

質量部以下である。

[0039] 前記多孔質粒子の製造に用いる水系媒体としては、例えば水溶性高分子水溶液等が挙げられる。該水溶性高分子としては、例えばヒドロキシエチルセルロース、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、デンプン、ゼラチン等が挙げられる。該多孔質粒子の製造における該水系媒体の合計使用量は、通常、モノマー総量１００質量部に対して２００質量部以上７０００質量部以下程度である。該水系媒体の分散媒として水を用いる場合、例えば、炭酸ナトリウム、炭酸カルシウム、硫酸ナトリウム、燐酸カルシウム、塩化ナトリウム等の分散安定剤を使用してもよい。

[0040] 前記多孔質粒子の製造において、前記多孔化剤は、前記モノマーの重合の際に、非重合成分として存在し、該重合で得られる粒子に孔を形成する役割を有する。該多孔化剤は、製造された多孔質粒子の表面から容易に除去可能なものであれば特に限定されない。該多孔化剤としては、例えば、各種の有機溶剤や混合モノマーに可溶な線状重合物等が挙げられ、これらを併用してもよい。

[0041] 前記多孔化剤としては、例えば、ヘキサン、ヘプタン、オクタン、ノナン、デカン、ウンデカン等の脂肪族炭化水素類；シクロペンタン、シクロヘキサン等の脂環式炭化水素類；ベンゼン、トルエン、キシレン、ナフタレン、エチルベンゼン、ポリスチレン等の芳香族炭化水素類；四塩化炭素、１，２－ジクロロエタン、テトラクロロエタン、クロロベンゼン等のハロゲン化炭化水素類；ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、ヘプタノール、４－メチル－２－ペンタノール、２－エチル－１－ヘキサノール等の脂肪族アルコール類；シクロヘキサノール等の脂環式アルコール類；２－フェニルエチルアルコール、ベンジルアルコール等の芳香族アルコール類；ジエチルケトン、メチルイソブチルケトン、ジイソブチルケトン、アセトフェノン、２－オクタノン、シクロヘキサノン等のケトン類；ジブチルエーテル、ジイソブチルエーテル、アニソール、エトキシベンゼン、ポリエチレングリコール、

ポリプロピレングリコール等のエーテル類；酢酸イソペンチル、酢酸ブチル、酢酸－３－メトキシブチル、マロン酸ジエチル等のエステル類；ならびに、メチルセルロース、エチルセルロース、アセチルセルロース、酢酸セルロース、三酢酸セルロース、アルキルセルロース等の多糖類及び非架橋性ビニルモノマーのホモポリマー等の、線状重合物、が挙げられる。これらの多孔化剤は、１種を単独で又は２以上を組み合わせて使用できる。

[0042] 前記多孔化剤は、重量平均分子量が、好ましくは４００００以上、より好ましくは５００００以上であり、他方、好ましくは１８００００以下、より好ましくは１０００００以下である。また、前記多孔質粒子の製造における該多孔化剤の合計使用量は、モノマー総量１００質量部に対して、好ましくは４０質量部以上、より好ましくは７０質量部以上であり、他方、好ましくは６００質量部以下、より好ましくは４００質量部以下である。該多孔化剤の重量平均分子量及びその使用量は、後述するリガンド固定多孔質粒子の細孔径に影響し得る。例えば、該多孔化剤の重量平均分子量が小さくなる、又は使用量が減ると、リガンド固定多孔質粒子の細孔径は小さくなる傾向がある。使用する多孔化剤の分子量及びその使用量を調整することで、多孔質粒子の細孔径を調整することができる。

[0043] 本発明に用いる多孔質粒子の製造の具体的な方法としては、例えば、前記モノマー組成物及び多孔化剤を含む混合溶液（モノマー溶液）に重合開始剤を溶解させ、前記水系媒体中に懸濁させて所定温度まで加熱して重合させる方法や、前記モノマー組成物及び多孔化剤を含む混合溶液（モノマー溶液）に重合開始剤を溶解させ、所定温度まで加熱した前記水系媒体中に添加して重合させる方法、前記モノマー組成物及び多孔化剤を含む混合溶液（モノマー溶液）を、前記水系媒体中に懸濁させて所定温度まで加熱して、重合開始剤を添加し重合させる方法、等が挙げられる。該多孔化剤としてエチルセルロース等の一部の多糖類を用いる場合は、該多孔化剤を予め加熱攪拌してから、前記モノマー組成物と混合してモノマー溶液を調製し、次いでこれに重合開始剤を添加することが好ましい。

[0044] 前記重合開始剤としてはラジカル重合開始剤が好ましい。該ラジカル重合開始剤としては、例えば、アゾ系開始剤、過酸化物系開始剤、レドックス系開始剤等が挙げられ、具体的には、アゾビスイソブチロニトリル、アゾビスイソ酪酸メチル、アゾビス－２，４－ジメチルバレロニトリル、過酸化ベンゾイル、過酸化ジ－ｔｅｒｔ－ブチル、過酸化ベンゾイル－ジメチルアニリン等が挙げられる。前記多孔質粒子の製造における該重合開始剤の合計使用量は、通常、モノマー総量１００質量部に対して０．０１質量部以上１０質量部以下程度である。

[0045] 前記多孔質粒子の製造には、アルキル硫酸エステル塩、アルキルアリール硫酸エステル塩、アルキルリン酸エステル塩、脂肪酸塩等のアニオン性界面活性剤をはじめとする各種界面活性剤を用いてもよい。また、亜硝酸ナトリウム等の亜硝酸塩、ヨウ化カリウム等のヨウ化物塩、ｔｅｒｔ－ブチルピロカテコール、ベンゾキノン、ピクリン酸、ハイドロキノン、塩化銅、塩化第二鉄等の重合禁止剤を用いることもできる。また、ドデシルメルカプタン等の重合調整剤を用いてもよい。

[0046] 前記多孔質粒子の製造において、モノマーの重合温度は、重合開始剤に応じて決定すればよいが、通常２～１００℃程度であり、５０～１００℃が好ましい。また、モノマーの重合時間は、通常５分間～４８時間、好ましくは１０分間～２４時間である。

[0047] 得られた多孔質粒子は、架橋剤及び親水化剤からなる群より選択される少なくとも１種と反応させてもよい。架橋剤及び親水化剤の両方を用いる場合、架橋反応を行った後に親水化反応を行っても、親水化反応を行った後に架橋反応を行ってもよい。また、架橋反応と親水化反応を同時に行ってもよい。あるいは、該多孔質粒子の架橋反応及び親水化反応は、各々、前記重合開始剤によるモノマーの重合反応と並行して行われてもよい。前記モノマー組成物として官能基含有モノマーを含有するものを用いた場合、該架橋反応によって、該多孔質粒子の重合体分子内に存在する該官能基の一部に、該架橋剤が付加反応されて該架橋剤由来の部分構造が導入される。これにより、該

官能基の残基同士が該架橋剤由来の部分構造を介して架橋される。また、前記モノマー組成物として官能基含有モノマーを含有するものを用いた場合、該親水化反応によって、該多孔質粒子の重合体分子内に存在する該官能基の一部に、該親水化剤が付加反応されて該親水化剤由来の部分構造が導入される。

[0048] 前記架橋反応で用いる架橋剤は、リガンドを固定可能な官能基と反応して架橋構造を導入できるものであればよい。リガンドを固定可能な官能基と反応して架橋構造を導入できるとともに、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－で示される基を分子内に少なくとも２個含む架橋剤が好ましい。

[0049] 前記多孔質粒子が環状エーテル基を有する場合には、好ましくは、架橋性基として－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－NH_2で示される基を分子内に少なくとも２個含む架橋剤、－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－で示される基を分子内に少なくとも２個含むとともに、架橋性基としてカルボキシ基を分子内に少なくとも２個含む架橋剤等を使用することができる。また、前記多孔質粒子がカルボキシ基、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、コハク酸イミドオキシカルボニル基、ホルミル基又はイソシアネート基を有する場合には、好ましくは、架橋性基として－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－NH_2で示される基を分子内に少なくとも２個含む架橋剤等を使用することができる。

[0050] 前記の－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－NH_2で示される基を分子内に少なくとも２個含む架橋剤としては、例えば、オキサリルジヒドラジド、マロン酸ジヒドラジド、コハク酸ジヒドラジド、２，３－ジヒドロキシコハク酸ジヒドラジド、グルタル酸ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド、ピメリン酸ジヒドラジド、オクタン二酸ジヒドラジド、ノナン二酸ジヒドラジド、セバシン酸ジヒドラジド、ドデカン二酸ジヒドラジド、フタル酸ジヒドラジド、イソフタル酸ジヒドラジド、テレフタル酸ジヒドラジド、キノリン酸ジヒドラジド等のジカルボン酸ジヒドラジド類；シクロヘキサントリカルボン酸トリヒドラジド等のトリカルボン酸トリヒドラジド類が挙げられる。前記の－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－で示される基を分子内に少なくとも２個含むとともに、架橋性基

としてカルボキシ基を分子内に少なくとも２個含む架橋剤としては、例えば、Ｎ１，Ｎ１－（エタン－１，２－ジイル）ビス（コハク酸モノアミド）等の（アルキレンビスイミノ）ビス（オキソアルカン酸）類等が挙げられる。これらの架橋剤は、１種を単独で又は２種以上を組み合わせて使用できる。これら架橋剤の中では、クロマトグラフィー用担体の通液性、又は通液時の圧力抵抗特性及び防汚性を改善させるためには、ジカルボン酸ジヒドラジド類、（アルキレンビスイミノ）ビス（オキソアルカン酸）類が好ましく、ジカルボン酸ジヒドラジド類がより好ましい。

[0051] 前記架橋反応においては、前述した架橋剤以外の架橋剤を用いることもできる。このような架橋剤としては、例えば、多官能イソシアネート系架橋剤、多官能エポキシ系架橋剤、多官能アルデヒド系架橋剤、多官能チオール系架橋剤、多官能オキサゾリン系架橋剤、多官能アジリジン系架橋剤、金属キレート系架橋剤等が挙げられる。

[0052] 前記架橋反応における前記架橋剤の合計使用量は、前記多孔質粒子の製造に用いた官能基含有モノマーに由来する官能基１モルに対して、好ましくは０．０１モル当量以上、より好ましくは０．０５モル当量以上、さらに好ましくは０．１モル当量以上であり、他方、好ましくは～０．８モル当量以下、より好ましくは０．７モル当量以下、さらに好ましくは０．６モル当量以下である。

[0053] 前記親水化反応で用いる親水化剤としては、クロマトグラフィー用担体の防汚性又はリガンド低漏出性を改善させるためには、ヒドロキシ基及びメルカプト基から選ばれる少なくとも１種の親水性基を分子内に合計で２個以上有する化合物が好ましく、ヒドロキシ基及びメルカプト基から選ばれる少なくとも１種の親水性基を分子内に合計で２～４個有する化合物がより好ましい。該親水化剤としては、例えば、メルカプトエタノール、チオグリセロール等のメルカプト基を分子内に有するアルコール；グリセロール、ジグリセロール等の多価アルコールが挙げられる。これらの親水化剤は、１種を単独で又は２種以上を組み合わせて使用できる。これらの中でも、該担体の防汚

性又はリガンド低漏出性を改善させるためには、メルカプト基を分子内に有するアルコールが好ましく、チオグリセロールがより好ましい。

[0054] 前記親水化反応における前記親水化剤の合計使用量は、前記多孔質粒子の製造に用いた官能基含有モノマーに由来する官能基１モルに対して、好ましくは０．５モル当量以上、より好ましくは１モル当量以上、さらに好ましくは２モル当量以上であり、他方、好ましくは１０モル当量以下、より好ましくは８モル当量以下、さらに好ましくは６モル当量以下である。

[0055] 前記架橋反応又は親水化反応は、塩基性触媒存在下で行ってもよい。該塩基性触媒としては、トリエチルアミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－４－アミノピリジン、水酸化ナトリウム、ジイソプロピルエチルアミン等が挙げられ、１種を単独で又は２種以上を組み合わせて使用できる。

[0056] 前記架橋反応又は親水化反応の反応時間は特に限定されないが、通常０．５～７２時間程度であり、好ましくは０．５～４８時間である。また、反応温度は、溶媒の沸点以下で適宜選択すればよいが、通常２～１００℃程度である。

[0057] （リガンド）

前記多孔質粒子に固定されるリガンドは、Ｆｃ融合タンパク質への結合能を有するタンパク質リガンドであり、好ましくは、プロテインＡ、プロテインＧ、プロテインＬ及びこれらの類縁物質からなる群より選択される１種又は２種以上のタンパク質リガンドである。該リガンドは、好ましくは、プロテインＡ又はプロテインＡの類縁物質であり、より好ましくは、プロテインＡの類縁物質である。

[0058] プロテインＡには、Ｅ、Ｄ、Ａ、Ｂ及びＣの５つのドメインが含まれ、これらはイムノグロブリンのＦｃに対して結合能を有しており、よってＦｃ結合ドメインである。好ましくは、本発明でリガンドとして用いるプロテインＡの類縁物質は、プロテインＡのＦｃ結合ドメイン又はその改変型Ｆｃ結合ドメインを含む、Ｆｃ結合タンパク質である。好ましくは、本発明のリガンドは、プロテインＡのＢドメイン、Ｃドメイン又はそれらの改変型ドメイン

からなる群より選択される１種又は２種以上のＦｃ結合ドメインを含む。より好ましくは、該リガンドは、配列番号１のアミノ酸配列からなるプロテインＡのＣドメイン、又はその改変型ドメインからなる群より選択される１種又は２種以上のＦｃ結合ドメインを含む。さらに好ましくは、該リガンドに含まれるＦｃ結合ドメインは、配列番号１のアミノ酸配列からなるプロテインＡのＣドメインの、改変型ドメインである。

[0059] クロマトグラフィー用担体における、Ｆｃ融合タンパク質に対するＤＢＣの向上のため又はリガンドの漏出を抑えるためには、前記リガンドは、配列番号１のアミノ酸配列又はこれと８５％以上の同一性を有するアミノ酸配列（親Ｆｃ結合ドメインのアミノ酸配列）に対して、以下の（ａ）～（ｉ）からなる群より選択される１又は２以上の置換がされたアミノ酸配列からなるＦｃ結合ドメインを含むことが好ましい：

（ａ）配列番号１のアミノ酸配列の１位に相当する位置のアミノ酸残基のバリン残基への置換；

（ｂ）配列番号１のアミノ酸配列の３位に相当する位置のアミノ酸残基のアラニン残基への置換；

（ｃ）配列番号１のアミノ酸配列の６位に相当する位置のアミノ酸残基のアラニン残基又はアスパラギン酸残基への置換；

（ｄ）配列番号１のアミノ酸配列の９位に相当する位置のアミノ酸残基のアラニン残基への置換；

（ｅ）配列番号１のアミノ酸配列の１１位に相当する位置のアミノ酸残基のアラニン残基、グルタミン残基又はグルタミン酸残基への置換；

（ｆ）配列番号１のアミノ酸配列の２３位に相当する位置のアミノ酸残基のロイシン残基への置換；

（ｇ）配列番号１のアミノ酸配列の２９位に相当する位置のアミノ酸残基のアラニン残基への置換；

（ｈ）配列番号１のアミノ酸配列の４３位に相当する位置のアミノ酸残基のアラニン残基への置換；

（ｉ）配列番号１のアミノ酸配列の４９位に相当する位置のアミノ酸残基のアルギニン残基への置換。

[0060] 好ましくは、前記リガンドに含まれるＦｃ結合ドメインは、前記親Ｆｃ結合ドメインのアミノ酸配列に対して、前記（ａ）～（ｉ）からなる群より選択される、３以上の置換、より好ましくは３～９の置換、さらに好ましくは３～６、さらに好ましくは３～５の置換がされたアミノ酸配列からなる。

[0061] 前記リガンドに含まれるＦｃ結合ドメインが有する置換の好ましい例としては、以下が挙げられる：

（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｇ）、（ｈ）及び（ｉ）からなる群より選択される３以上の置換；

（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｇ）、（ｈ）及び（ｉ）からなる群より選択される２以上の置換と、（ｅ）及び（ｆ）からなる群より選択される１以上の置換との組み合わせを含む、３以上の置換；

（ａ）、（ｂ）、（ｃ）、（ｄ）、（ｇ）、（ｈ）及び（ｉ）からなる群より選択される３以上の置換と、（ｅ）及び（ｆ）からなる群より選択される１以上の置換との組み合わせを含む、４以上の置換；

（ａ）及び（ｄ）からなる群より選択される１以上の置換と、（ｅ）及び（ｆ）からなる群より選択される１以上の置換と、（ｂ）、（ｃ）、（ｇ）、（ｈ）及び（ｉ）からなる群より選択される１以上の置換との組み合わせを含む、３以上の置換。

このような置換の具体的な例としては、以下が挙げられる：

（ａ）と（ｂ）と（ｇ）との組み合わせ；

（ａ）と（ｃ）と（ｇ）との組み合わせ；

（ａ）と（ｂ）と（ｃ）と（ｇ）との組み合わせ；

（ａ）と（ｄ）と（ｇ）との組み合わせ；

（ａ）と（ｅ）と（ｇ）との組み合わせ；

（ｄ）と（ｅ）と（ｈ）との組み合わせ；

（ａ）と（ｅ）と（ｆ）と（ｇ）との組み合わせ；

（ａ）と（ｅ）と（ｇ）と（ｉ）との組み合わせ；

（ａ）と（ｂ）と（ｃ）と（ｅ）と（ｇ）との組み合わせ；

（ａ）と（ｂ）と（ｃ）と（ｅ）と（ｇ）と（ｉ）との組み合わせ。

[0062] 本発明で用いるリガンドに含まれるＦｃ結合ドメインは、公知の技術に従って調製することができる。例えば、前記Ｆｃ結合ドメインは、それをコードするポリヌクレオチドを発現させることによって調製することができる。該Ｆｃ結合ドメインをコードするポリヌクレオチドは、細胞から単離してもよく、又は化学合成することができる。例えば、配列番号１のアミノ酸配列からなるＦｃ結合ドメインをコードするポリヌクレオチドは、プロテインＡを発現する微生物（例えばスタフィロコッカス・アウレウス）から単離することができる。単離したポリヌクレオチドに公知の手段により所望の変異を加えることもできる。例えば、前記のアミノ酸残基の置換を含むＦｃ結合ドメインは、親ドメイン（例えば配列番号１又はこれと８５％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるＦｃ結合ドメイン）をコードするポリヌクレオチドに対して、所望のアミノ酸残基の置換が生じるように変異導入することで調製することができる。ポリヌクレオチドに対する変異導入のための具体的な手法としては、部位特異的突然変異、相同組換え法、ＳＯＥ（ｓｐｌｉｃｉｎｇ ｂｙ ｏｖｅｒｌａｐ ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ）－ＰＣＲ法（Ｇｅｎｅ，１９８９，７７：６１－６８）などを挙げることができ、これらの詳細な手順は当業者に周知である。

[0063] 本発明で用いるリガンドは、前記Ｆｃ結合ドメインを１つ以上含んでいればよいが、好ましくは２個以上、より好ましくは２～１２個、さらに好ましくは４～７個含む。該リガンドが該Ｆｃ結合ドメインを２個以上含む場合、各々の該ドメインは同じものであっても異なっていてもよい。好ましくは、該リガンドは、２個以上の前記Ｆｃ結合ドメインのアミノ酸配列が直鎖状に連結されたＦｃ結合タンパク質である。ここで、アミノ酸配列が「直鎖状に連結」とは、２個以上のアミノ酸配列がリンカーを介して又はリンカーを介さずに直列に連結された構造を意味する。例えば、リンカーを介する場合、

「直鎖状に連結」とは、１つのアミノ酸配列のＣ末端と別のアミノ酸配列のＮ末端とがリンカーを介して直列に連結された構造を意味し、一方、リンカーを介さない場合、「直鎖状に連結」とは、１つのアミノ酸配列のＣ末端と別のアミノ酸配列のＮ末端とがペプチド結合によって直列に連結された構造を意味する。

[0064] 前記リガンドは、Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋ Ｍ．Ａｕｓｂｅｌらによる Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ Ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙや、Ｓａｍｂｒｏｏｋら編集のＭｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，３ｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，２００１）などに記載されている公知の遺伝子組換え技術を利用して製造することができる。例えば、前記Ｆｃ結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを宿主細胞に形質転換し、得られた組換え体を適切な液体培地で培養することにより、培養後の細胞から、目的のタンパク質リガンドを取得することができる。好ましい発現ベクターとしては、宿主細胞内で複製可能な既知のベクターのいずれをも用いることができ、例えば、米国特許第５，１５１，３５０号明細書に記載されているプラスミドや、Ｓａｍｂｒｏｏｋら編集のＭｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，３ｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，２００１）などに記載されているプラスミドが挙げられる。また、形質転換のための宿主としては、特に限定されないが、大腸菌などの細菌、真菌細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞等の組換えタンパク質を発現させるために用いられる公知の宿主を用いることができる。宿主を形質転換させるためのポリヌクレオチドの導入には、各宿主に応じて当該技術分野において知られるいずれの方法を用いてもよく、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら編集のＭｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，３ｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，２００１）などに記載されている公知の方法を利用することができる。得られた形質転換体（好ましくは細菌等の細

胞）を培養して発現されたタンパク質を回収する方法は、当業者によく知られている。あるいは、本発明のＦｃ結合タンパク質は、無細胞タンパク質合成系を用いて発現させてもよい。

[0065]（多孔質粒子へのリガンドの固定）

前記多孔質粒子への前記リガンドの固定は常法に従って行えばよい。該粒子へのリガンド固定法としては、化学結合法が好ましく、例えば、該多孔質粒子に含まれる、リガンドを固定可能な官能基に、該リガンドを結合させる方法が挙げられる。具体的な例としては、該多孔質粒子に含まれる環状エーテル基やカルボキシ基、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、ホルミル基等と、該リガンドのアミノ基等とを結合させる方法が挙げられる。この方法は、国際公開第２０１５／１１９２５５号、国際公開第２０１５／０４１２１８号等の記載を参考にして行えばよい。

[0066] 前記リガンドは、リンカー（スペーサー）を介して前記多孔質粒子に固定することができる。多孔質粒子へのリンカー導入及びリンカーを用いたリガンド固定は、米国特許第５，２６０，３７３号、特開２０１０－１３３７３３号公報、特開２０１０－１３３７３４号公報を参考にして行えばよい。該リンカーを与える化合物としては、例えば、エチレングリコールジグリシジルエーテル、ジエチレングリコールジグリシジルエーテル、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル、１，２－プロピレングリコールジグリシジルエーテル、ジプロピレングリコールジグリシジルエーテル、ポリプロピレングリコールジグリシジルエーテル、１，４－ブタンジオールジグリシジルエーテル、ネオペンチルグリコールジグリシジルエーテル、１，６－ヘキサンジオールジグリシジルエーテル、グリセロールジグリシジルエーテル等の脂肪族ポリヒドロキシ化合物のジグリシジルエーテル類；ソルビトールポリグリシジルエーテル、グリセロールポリグリシジルエーテル、トリメチロールプロパンポリグリシジルエーテル、ジグリセロールポリグリシジルエーテル、ポリグリセロールポリグリシジルエーテル等の脂肪族ポリヒドロキシ化合物のポリグリシジルエーテル類等が挙げられる。これらの中でも、前述し

た多孔質粒子の親水化反応を行った場合には、脂肪族ポリヒドロキシ化合物のジグリシジルエーテル類が好ましい。

[0067] 前記多孔質粒子へのリンカー導入反応及びリガンド固定反応は、反応効率を高めるために、ｐＨ７～１４のバッファー中で行うことが好ましい。また、該リンカー導入反応において、反応時間は特に限定されないが、通常０．５～７２時間程度であり、反応温度は、溶媒の沸点以下で適宜選択すればよいが、通常２～１００℃程度である。また、該リガンド固定反応において、反応時間は特に限定されないが、通常０．１～７２時間程度であり、また反応温度は、溶媒の沸点以下で適宜選択すればよいが、通常２～１００℃程度である。

[0068] あるいは、リガンドの配向性を制御する方法（米国特許第６，３９９，７５０号、Ｌｊｕｎｇｑｕｉｓｔ Ｃら，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１９８９，１８６：５５７－５６１）、会合性基によりリガンドを多孔質粒子上に集積させる方法（特開２０１１－２５６１７６号公報）等を利用してリガンドを多孔質粒子に固定してもよい。

[0069] 前記多孔質粒子へのリガンドの固定量は、ＤＢＣを大きくするためには、該多孔質粒子の乾燥重量１ｇ当たり、好ましくは１０ｍｇ以上、より好ましくは２５ｍｇ以上であり、他方、好ましくは３００ｍｇ以下、より好ましくは１５０ｍｇ以下である。

[0070] 得られたリガンド固定多孔質粒子は、クロマトグラフィー用担体の防汚性又はリガンド低漏出性を改善させるためには、親水化させることが好ましい。親水化反応では、該リガンド固定多孔質粒子と、親水性基を有する化合物とを反応させる。該親水性基を有する化合物としては、ヒドロキシ基及びメルカプト基からなる群より選択される少なくとも１種の親水性基を、分子内に合計で２～４個有する化合物が好ましい。このような化合物としては、例えば、メルカプトエタノール、チオグリセロール等のメルカプト基を分子内に有するアルコール；グリセロール、ジグリセロール等の多価アルコールが挙げられる。これらの化合物は、１種を単独で又は２種以上を組み合わせて

使用できる。これらの化合物の中でも、該担体の防汚性又はリガンド低漏出性を改善するためには、メルカプト基を分子内に有するアルコールが好ましく、チオグリセロールがより好ましい。

[0071] 前記親水化反応における、前記親水性基を有する化合物の合計使用量は、前記リガンド固定多孔質粒子（乾燥重量）１００質量部に対して、好ましくは１質量部以上、より好ましくは１０質量部以上、さらに好ましくは１００質量部以上であり、他方、好ましくは１０００質量部以下、より好ましくは８００質量部以下、さらに好ましくは６００質量部以下である。

[0072] 前記親水化反応は、塩基性触媒存在下で行ってもよい。該塩基性触媒としては、トリエチルアミン、Ｎ，Ｎ－ジメチル－４－アミノピリジン、水酸化ナトリウム、ジイソプロピルエチルアミン等が挙げられ、これらは１種を単独で又は２種以上を組み合わせて使用できる。

[0073] 前記親水化反応において、反応時間は特に限定されないが、通常０．５～７２時間程度、好ましくは０．５～４８時間であり、反応温度は、溶媒の沸点以下で適宜選択すればよいが、通常２～１００℃程度である。

[0074] 得られたリガンド固定多孔質粒子は、ろ過、洗浄等の分離手段で精製することができる。また、該リガンド固定多孔質粒子は分級してもよい。

[0075] 前記リガンド固定多孔質粒子は、体積平均粒子径が、好ましくは４０～１５０μｍ、より好ましくは４５～１００μｍ、さらに好ましくは５０～１００μｍ、さらに好ましくは５０～８０μｍである。該リガンド固定多孔質粒子は、体積平均粒子径が上記の範囲にあることで、Ｆｃ融合タンパク質に対するＤＢＣ、及び通液時の圧力抵抗特性が向上する。該体積平均粒子径の変動係数は、好ましくは４０％以下、より好ましくは３０％以下である。また、本発明のクロマトグラフィー用担体は、比表面積が、好ましくは１～５００m^2／ｇ、より好ましくは１０～３００m^2／ｇである。本明細書において、リガンド固定多孔質粒子の体積平均粒子径とは、ＪＩＳ　Ｚ　８８２５（２０１３）に従いレーザー回折散乱法で測定される体積平均粒子径をいう。具体的には、粒子の体積平均粒子径は、後述する実施例に記載されるように、

ＪＩＳ　Ｚ　８８２５（２０１３）に従って、レーザー回折散乱式粒度分布測定装置（例えば、ベックマン・コールター社製　ＬＳ１３３２０等）により該粒子の体積基準の粒径分布を測定することで求めることができる。また本明細書において、クロマトグラフィー用担体の比表面積とは、レーザー回析・散乱粒子径分布測定等により測定された値をいう。

[0076]（Ｆｃ融合タンパク質精製への応用）

本発明で用いる前記リガンド固定多孔質粒子は、平均細孔径が特定の範囲になるように調整されており、それによって、Ｆｃ融合タンパク質を精製する能力を改善する。該リガンド固定多孔質粒子の平均細孔径は、好ましくは７５ｎｍ以上、より好ましくは１０１ｎｍ以上であり、他方、好ましくは１２０ｎｍ以下、より好ましくは１１０ｎｍ以下である。該リガンド固定多孔質粒子は、平均細孔径が上記の範囲にあることで、Ｆｃ融合タンパク質に対するＤＢＣ、及び通液時の圧力抵抗特性が向上する。

[0077] 本明細書において、平均細孔径は、Ｈａｇｅｌら（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ　Ａ，１９９６，Ｖｏｌ．７４３：３２－４２）に記載の方法に従って算出される。具体的には、平均細孔径は、後述する実施例に記載の方法に従って算出すればよい。すなわち、プルランの分子サイズと分配係数Ｋｄのプロットを作成し、近似直線を引き、Ｋｄ＝ε（１－分子サイズ／平均ポアサイズ）＾（１／２）が成り立つことから、切片と傾きから平均細孔径を算出する。プルランの分配係数Ｋｄは、Ｋｄ＝（プルランの溶出体積－デキストランの溶出体積）／（塩化ナトリウムの溶出体積－デキストランの溶出体積）で表される。プルラン、デキストラン及び塩化ナトリウムの溶出体積は、それぞれ、前記リガンド固定多孔質粒子を充填したカラムに、プルランを含有する２０ｍＭリン酸ナトリウム／１５０ｍＭ塩化ナトリウム水溶液、デキストランを含有する２０ｍＭリン酸ナトリウム／１５０ｍＭ塩化ナトリウム水溶液、及び５００ｍＭ塩化ナトリウム水溶液を流すことで測定することができる。

[0078] また、前記リガンド固定多孔質粒子は、湿潤状態での空孔率が、好ましく

は７０～９５％（ｖ／ｖ）、より好ましくは７５～８５％（ｖ／ｖ）である。該リガンド固定多孔質粒子は、空孔率が上記の範囲にあることで、Ｆｃ融合タンパク質に対するＤＢＣ、及び通液時の圧力抵抗特性が向上する。本明細書において、リガンド固定多孔質粒子の湿潤状態での空孔率とは、湿潤状態で測定したときのリガンド固定多孔質粒子における、粒子容積（多孔質粒子の非空孔部と多孔質粒子の空孔部とリガンド部分との合計体積）に対する、細孔容積（空孔部の体積）の割合をいう。例えば、空孔率は、リガンド固定多孔質粒子を充填したカラムからの５００ｍＭ塩化ナトリウム水溶液の溶出体積、及び該カラムからのデキストラン含有２０ｍＭリン酸ナトリウム／１５０ｍＭ塩化ナトリウム水溶液の溶出体積に基づいて求めることができる。

[0079] リガンド固定多孔質粒子の平均細孔径、及び湿潤状態での空孔率は、具体的には、後述する実施例に記載の方法に従い測定すればよい。

[0080] 前記リガンド固定多孔質粒子は、Ｆｃ融合タンパク質の精製に用いた場合、ＤＢＣの高さ及び非特異的結合（不純物の夾雑）の少なさの点で、高い性能を発揮することができる。これは、従来の担体をＦｃ融合タンパク質精製に用いた場合には高い性能は得られなかったことを考慮すると、本発明のクロマトグラフィー用担体が、Ｆｃ融合タンパク質を精製する能力が高いことを示す。したがって、該リガンド固定多孔質粒子を、Ｆｃ融合タンパク質を精製するためのクロマトグラフィー用担体として用いることができる。

[0081]〔クロマトグラフィーカラム〕

本発明のクロマトグラフィー用担体を含むことを特徴とするクロマトグラフィーカラムが提供される。本発明のクロマトグラフィーカラムは、本発明のクロマトグラフィー用担体を含む以外は、通常のクロマトグラフィーカラムと同様である。具体的には、カラム容器と当該カラム容器に充填された本発明のクロマトグラフィー用担体とを備えるクロマトグラフィーカラムが挙げられる。本発明のクロマトグラフィーカラムは、アフィニティクロマトグラフィーへの使用に適する。

[0082]〔Ｆｃ融合タンパク質の精製方法〕

一実施形態において、本発明は、前述した本発明のクロマトグラフィー用担体を用いたＦｃ融合タンパク質の精製方法を提供する。本発明によるＦｃ融合タンパク質の精製方法は、本発明のクロマトグラフィー用担体を用いること以外は、アフィニティクロマトグラフィーによる抗体精製のための一般的な手順に従って行うことができる。

[0083] 好ましい一実施形態において、本発明によるＦｃ融合タンパク質の精製方法は、本発明のクロマトグラフィー用担体を含むカラムに、Ｆｃ融合タンパク質を含む溶液を通液し、該担体に該Ｆｃ融合タンパク質を結合させる工程（工程１）；該担体を洗浄する工程（工程２）；及び、該担体から該Ｆｃ融合タンパク質を回収する工程（工程３）、を含む。

[0084] 前記工程１では、前記クロマトグラフィー用担体を含むカラムに、Ｆｃ融合タンパク質を含む溶液（試料溶液）を、該担体のタンパク質リガンドに該Ｆｃ融合タンパク質が結合する条件にて流す。ここで、該試料溶液としては、例えば、Ｆｃ融合タンパク質発現細胞の培養物の抽出液、又はそれを含む緩衝液などが挙げられる。該Ｆｃ融合タンパク質が結合する条件としては、例えば、タンパク質濃度０．１～１０ｇ／Ｌ、溶液のｐＨ５～９、カラム中の滞留時間０．５～５０分、温度０～４０℃が挙げられる。

[0085] 前記工程１では、前記試料溶液中のＦｃ融合タンパク質以外の物質のほとんどはカラムを通過する。前記工程２では、該カラム中に残った夾雑物（例えば、該試料溶液中のＦｃ融合タンパク質以外のタンパク質等）を洗浄により除去する。該洗浄には、充填剤をＮａＣｌなどの塩を含む中性の緩衝液、例えば、リン酸ナトリウム／塩化ナトリウム水溶液、リン酸二水素ナトリウム／リン酸水素二ナトリウム溶液、クエン酸／リン酸水素二ナトリウム溶液、塩酸／トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン溶液、ＨＥＰＥＳ／水酸化ナトリウム溶液等を用いることができる。

[0086] 前記工程３では、該カラムに溶離液を流して、該カラムからＦｃ融合タンパク質を溶出させることで、精製されたＦｃ融合タンパク質を回収する。該

溶離液としては、ｐＨ２～５の緩衝液、例えば、クエン酸／クエン酸ナトリウム溶液、酢酸／酢酸ナトリウム溶液、塩酸／グリシン溶液等を用いることができる。

[0087] 前記工程３でカラムから溶出された溶出液に含まれるＦｃ融合タンパク質をさらに精製してもよい。Ｆｃ融合タンパク質の精製は、例えば、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ミックスモードクロマトグラフィー、親水性相互作用クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせて使用して行うことができる。

[0088] 本発明によるＦｃ融合タンパク質の精製方法で標的とするＦｃ融合タンパク質の種類は特に限定されないが、分子量が１６０～３００ｋＤａであるものが好ましい。標的Ｆｃ融合タンパク質の好ましい例として、エタネルセプト、リロナセプト、及びエフモロクトコグアルファが挙げられ、このうち、エタネルセプトがより好ましい。標的Ｆｃ融合タンパク質の別の好ましい例として、エタネルセプト、リロナセプト又はエフモロクトコグアルファのバイオシミラーが挙げられ、その例としては、エタネルセプト、リロナセプト又はエフモロクトコグアルファとアミノ酸配列において８５％以上の同一性を有し、かつそのＦｃフラグメントに相当する領域が本発明のクロマトグラフィー用担体に含まれる前記リガンドとの結合性を有するＦｃ融合タンパク質が挙げられる。エタネルセプトのアミノ酸配列は、配列番号４で表すことができる。リロナセプトのアミノ酸配列は、配列番号５で表すことができる。したがって、配列番号４又は配列番号５のアミノ酸配列、又はこれらの配列のいずれかと８５％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるＦｃ融合タンパク質は、標的Ｆｃ融合タンパク質の好ましい例として挙げられる。

[0089] 本発明によるＦｃ融合タンパク質の精製方法は、前記工程３の後に、前記クロマトグラフィー用担体にアルカリ性液を通液する工程（工程４）をさらに含んでいてもよい。該工程４に使用されるアルカリ性液としては、例えば、水酸化ナトリウム水溶液、水酸化カリウム水溶液、トリエチルアミン、水

酸化テトラブチルアンモニウム等が挙げられる。該工程４で使用される該アルカリ性溶液中のアルカリ塩のモル濃度は、好ましくは０．０１～４．０Ｍ、より好ましくは０．１～２．０Ｍ以上である。使用される該アルカリ性溶液のｐＨとしては、好ましくはｐＨ１１．０～１５．０、より好ましくはｐＨ１２．０～１４．０である。

[0090] 前記工程４の後、前記クロマトグラフィー用担体は、再度Ｆｃ融合タンパク質の精製に使用することができる。したがって、一実施形態において、本発明によるＦｃ融合タンパク質の精製方法は、前記工程１から工程４を複数回、好ましくは５０回以上、より好ましくは１００回以上繰り返すことを含む。本発明のクロマトグラフィー用担体は、繰り返し使用しても、Ｆｃ融合タンパク質に対する高いＤＢＣと、非特異的結合（不純物の夾雑）の少ない状態を維持することができる。また本発明のクロマトグラフィー用担体は、カラムに充填し、通液した際の圧力抵抗特性に優れており、これも繰り返し使用にとっての利点である。

実施例

[0091] 以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0092]（調製例１）リガンドの調製

Ｆｃ結合タンパク質ＰｒＡ－１及びＰｒＡ－２を調製した。ＰｒＡ－１及びＰｒＡ－２は、Ｆｃ結合ドメインが直列に連結したホモペンタマーを含むＦｃ結合タンパク質である。ＰｒＡ－１及びＰｒＡ－２に含まれるＦｃ結合ドメインは、プロテインＡのＣドメイン（配列番号１）の改変型ドメインであり、それぞれ、配列番号１の親ドメインに対して表１記載の変異が導入されたアミノ酸配列からなる。

[0093]

[表1]

Fc 結合タンパク質	Fc 結合ドメイン			ドメイン数
	親ドメイン	導入変異	配列番号	
PrA-1	ADNKFNKEQQNAFYEILHLP NLTEEQRNGFIQSLKDDPSV SKEILAEAKKLNDAQAPK （配列番号1）	A1V, N3A, N6D, N11Q, G29A, K49R	2	5
PrA-2		A1V, N11E, G29A,	3	5

[0094] ＰｒＡ－１及びＰｒＡ－２の発現と精製はそれぞれ以下のように行った。ＰｒＡ－１及びＰｒＡ－２をコードするプラスミドをそれぞれ用いて大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）を形質転換し、得られた形質転換体を富栄養培地中３７℃で対数増殖期まで培養した。その後、培地に終濃度１ｍＭイソプロピル－β－チオガラクトピラノシド（和光純薬工業社製）を添加して、さらに３７℃で４時間培養することにより、目的タンパク質を発現させた。続いて培養液を遠心分離して上清を除き、得られた菌体に卵白由来リゾチーム（和光純薬工業社製）及びポリオキシエチレン（１０）オクチルフェニルエーテル（和光純薬工業社製）を含むｐＨ９．５の３０ｍＭトリス緩衝液を添加して菌体を破砕した。得られた細胞破砕液から、陽イオン交換クロマトグラフィー（ＳＰ－セファロースＦＦ、ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社製）及び陰イオン交換クロマトグラフィー（Ｑ－セファロースＦＦ、ＧＥヘルスケアバイオサイエンス社製）によって組換えＦｃ結合タンパク質を精製した。精製したＦｃ結合タンパク質を、１０ｍＭクエン酸緩衝液ｐＨ６．０に対して透析した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって確認された組換えＦｃ結合タンパク質の純度は９５％以上であった。

[0095] （実施例１）クロマトグラフィー用担体の製造及びＦｃ融合タンパク質の精製

（１）多孔質粒子の調製

工程（ａ）：４４８ｇの純水にポリビニルアルコール（クラレ社製ＰＶＡ－２１７）２．６９ｇを添加し、加熱撹拌してポリビニルアルコールを溶解させ、水溶液Ｓを調製した。２－オクタノン（東洋合成社製）２６．４４ｇにエチルセルロース（ダウ・ケミカル社製ＥＴＨＯＣＥＬ™１４）２．９４ｇ

を添加し、加熱攪拌してエチルセルロースを溶解させ、有機物溶液Ｐを調製した。次いで、ジビニルベンゼン（和光純薬工業社製）３．６３ｇ、１－エチル－４－ビニルベンゼン（ＣｈｅｍＳａｍｐＣｏ社製）０．３６ｇ及びグリシジルメタクリレート（三菱ガス化学社製）１４．１５ｇからなる単量体組成物を、該有機物溶液Ｐに溶解させ、単量体溶液を調製した。

[0096] 工程（ｂ）：前記水溶液Ｓを、セパラブルフラスコ内に全量投入し、温度計、撹拌翼及び冷却管を装着して、温水バスにセットし、窒素雰囲気下、４７０ｒｐｍの撹拌速度で撹拌を開始した。該セパラブルフラスコ内に前記単量体溶液を全量投入して、温水バスにより加温し内温が８５℃に到達したところで２，２’－アゾビス（イソ酪酸メチル）（和光純薬工業社製）１．３４ｇを添加し、内温を８６℃に調整した。その後、溶液を８６℃に維持しながら、チオグリセロール（東京化成工業社製）８６．３８ｇ及びジイソプロピルエチルアミン（東京化成工業社製）１０．１５ｇを加え、計３時間攪拌した。得られた反応液を冷却した後、ろ過して粒子を回収し、純水とエタノールで洗浄した。洗浄した粒子を純水に分散させてデカンテーションを３回行い、小粒子を除いた。次いで、粒子の濃度が１０質量％となるように粒子を純水に分散させ、多孔質粒子の分散液を得た。

[0097] 工程（ｃ）：得られた分散液中の多孔質粒子に含まれるチオグリセロール由来ヒドロキシ基に、エチレングリコールジグリシジルエーテルを反応させた。すなわち、純水８．８ｇ、硫酸ナトリウム（和光純薬工業社製）０．９１ｇ及び炭酸ナトリウム（和光純薬工業社製）０．０８ｇを混合して炭酸バッファー（ｐＨ９．５）を得た。該炭酸バッファーに、エチレングリコールジグリシジルエーテル（ナガセケムテックス社製デナコールＥＸ８１０）０．２７ｇ、及び多孔質粒子を８ｍＬ添加し、２３℃で１６時間振とう撹拌した。次いで、粒子の濃度が５０体積％となるように粒子を純水に分散させ、多孔質粒子分散体を得た。この分散体に含まれる多孔質粒子を、「多孔質粒子１」と称する。

[0098] （２）リガンド固定多孔質粒子の調製

多孔質粒子１にリガンドを固定した。すなわち、純水２８．８ｇ、硫酸ナトリウム（和光純薬工業社製）５．４ｇ、炭酸水素ナトリウム（和光純薬工業社製）０．２ｇ、及び炭酸ナトリウム（和光純薬工業社製）０．１６ｇを混合して炭酸バッファー（ｐＨ９．３）を得た。該炭酸バッファー２５ｍＬに、調製例１で調製したＦｃ融合タンパク質ＰｒＡ－１を０．１７ｇ、及び多孔質粒子１を８ｍＬ添加し、２３℃で１．５時間振とう撹拌し、得られた反応液をろ過して粒子を回収した。純水８．８ｇ、硫酸ナトリウム（和光純薬工業社製）０．１ｇ、及び水酸化ナトリウム（和光純薬工業社製）０．０３ｇを混合してバッファーを得た後、チオグリセロール（東京化成工業社製）を４．５ｇ添加して親水化反応液を調製した。前記粒子に該親水化反応液を添加し、２３℃で１６時間振とう撹拌することで、親水化反応を行った。次いで、粒子の濃度が５０体積％となるように粒子を純水に分散させ、リガンド固定多孔質粒子分散体を得た。この分散体に含まれるリガンド固定多孔質粒子の平均細孔径を下記手順にて算出した。このリガンド固定多孔質粒子を、「担体１」と称する。

[0099] ＜体積平均粒子径の算出＞

担体１の体積平均粒子径を、ＪＩＳ　Ｚ　８８２５（２０１３）に従って、レーザー回折散乱式粒度分布測定装置（ベックマン・コールター社製　ＬＳ１３３２０）により測定した。ここで、溶媒（水）の屈折率は１．３３３に、リガンド固定多孔質粒子の屈折率は１．５０に、それぞれ設定した。

[0100] ＜空孔率の算出＞

担体１の湿潤状態での空孔率を、以下の方法で測定した。２０ｍＭリン酸ナトリウム／１５０ｍＭ塩化ナトリウム水溶液を用いて、担体１を４ｍＬ容積（１）のカラム（５ｍｍφ×２００ｍｍ長）に充填した。該カラムに５００ｍＭ塩化ナトリウム水溶液５０μＬを打ち込み、溶出体積（２）を測定した。また、該カラムにデキストラン（分子量：５，０００，０００～４０，０００，０００、和光純薬社製）を含有する２０ｍＭリン酸ナトリウム／１５０ｍＭ塩化ナトリウム水溶液５０μＬを打ち込み、溶出体積（３）を測定

した。カラム体積からデキストラン含有水溶液の溶出体積（３）（粒子空隙容積）を引いた値を「粒子容積」とし、塩化ナトリウム水溶液（２）の溶出体積からデキストランの溶出体積（３）を引いた値を「細孔容積」とした。下記式に従い、粒子容積に対する細孔容積をの割合（％）を「湿潤状態での空孔率」として算出した。

空孔率（％）＝細孔容積／粒子容積×１００

＝｛（２）－（３）｝／｛（１）－（３）｝×１００

（１）：カラム体積

（２）：５００ｍＭ塩化ナトリウム水溶液の溶出体積

（３）：デキストラン含有水溶液の溶出体積

[0101] ＜平均細孔径の算出＞

担体１の湿潤状態での平均細孔径を、Ｈａｇｅｌら（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ　Ａ，１９９６，Ｖｏｌ．７４３：３２－４２）に記載の方法に従って算出した。２０ｍＭリン酸ナトリウム／１５０ｍＭ塩化ナトリウム水溶液を用いて、担体１を４ｍＬ容積（５ｍｍφ×２００ｍｍ長）のカラムに充填した。該カラムに５００ｍＭ塩化ナトリウム水溶液５０μＬを打ち込み、該塩化ナトリウム水溶液の溶出体積（１）を測定した。また、該カラムにデキストラン（分子量：５，０００，０００～４０，０００，０００、和光純薬社製）を含有する２０ｍＭリン酸ナトリウム／１５０ｍＭ塩化ナトリウム水溶液５０μＬを打ち込み、該デキストラン含有水溶液の溶出体積（２）を測定した。また、該カラムにプルランのスタンダードサンプル（昭和電工社製Ｐ－８２）を含有する２０ｍＭリン酸ナトリウム／１５０ｍＭ塩化ナトリウム水溶液５０μＬを打ち込み、該プルラン含有水溶液の溶出体積（３）を測定した。

プルランの分配係数Ｋｄを下記式に従って求めた。

プルランのＫｄ＝｛（３）－（２）｝／｛（１）－（２）｝

（１）：５００ｍＭ塩化ナトリウム水溶液の溶出体積

（２）：デキストラン含有水溶液の溶出体積

（３）：プルラン含有水溶液の溶出体積

プルランの分子サイズと分配係数Ｋｄのプロットを作成し、近似直線を引き、Ｋｄ＝ε（１－分子サイズ／平均ポアサイズ）＾（１／２）が成り立つことから、切片と傾きから担体１の平均細孔径を算出した。

[0102] 後述する担体２～８及び担体０１についても、上記と同じ手順で体積平均粒子径、空孔率、及び平均細孔径を算出した。

[0103] （３）クロマトグラフィーによるＦｃ融合タンパク質の精製

前記担体１を用いたクロマトグラフィーにより、Ｆｃ融合タンパク質を精製した。Ｃｙｔｉｖａ社製Ｔｒｉｃｏｒｎ　５０／２００カラムに、前記担体１を４ｍＬ充填し、このカラムをＣｙｔｉｖａ社製ＡＫＴＡ　ａｖａｎｔ２５に接続した。試料溶液として、Ｆｃ融合タンパク質（エタネルセプト）発現細胞の培養液（エタネルセプト濃度：１．１ｍｇ／ｍＬ）を調製した。

下記（ｉ）～（ｉｖ）の工程を１サイクルとし、これを１００サイクル繰り返した。

（ｉ）カラムに２０ｍＭリン酸ナトリウム／１５０ｍＭ塩化ナトリウム水溶液（ｐＨ７．５）３ＣＶ（Ｃｏｌｕｍｎ　Ｖｏｌｕｍｅ：カラム充填体積）を、２３℃環境下流速１ｍＬ／分で通液して、カラムを平衡化した。

（ｉｉ）保持時間４分で３６．３６ｍＬの前記試料溶液をカラムにロードし、次いで洗浄液（２０ｍＭリン酸ナトリウム／５００ｍＭ塩化ナトリウム水溶液：ｐＨ７．５）によるカラム洗浄を実施した。

（ｉｉｉ）溶離液（１００ｍＭ酢酸ナトリウム水溶液：ｐＨ３．３）をカラムに通液し、溶出液を回収した後、カラムを２０ｍＭリン酸ナトリウム／１５０ｍＭ塩化ナトリウム水溶液（ｐＨ７．５）で平衡化した。

（ｉｖ）カラムにアルカリ性液（０．１Ｍ水酸化ナトリウム水溶液）３ＣＶを流速１ｍＬ／分で通液した後、２０ｍＭリン酸ナトリウム／１５０ｍＭ塩化ナトリウム水溶液（ｐＨ７．５）で平衡化した。

[0104] （実施例２）

有機物溶液Ｐに含まれるエチルセルロース（ダウ・ケミカル社製ＥＴＨＯ

ＣＥＬ™１４）をエチルセルロース（ダウ・ケミカル社製ＥＴＨＯＣＥＬ™１０）に変更した以外は、実施例１（１）と同様の手順で多孔質粒子（「多孔質粒子２」と称する）を調製した。該多孔質粒子２を用いて、実施例１（２）と同様の手順でリガンド固定多孔質粒子（「担体２」と称する）を調製した。該担体２を用いて、実施例１（３）と同様の手順でＦｃ融合タンパク質の精製を実施した。

[0105]（実施例３）

有機物溶液Ｐに含まれるエチルセルロース（ダウ・ケミカル社製ＥＴＨＯＣＥＬ™１４）をエチルセルロース（ダウ・ケミカル社製ＥＴＨＯＣＥＬ™２０）に変更した以外は、実施例１（１）と同様の手順で多孔質粒子（「多孔質粒子３」と称する）を調製した。該多孔質粒子３を用いて、実施例１（２）と同様の手順でリガンド固定多孔質粒子（「担体３」と称する）を調製した。該担体３を用いて、実施例１（３）と同様の手順でＦｃ融合タンパク質の精製を実施した。

[0106]（実施例４）

工程（ｂ）における撹拌速度を４９０ｒｐｍに変更した以外は、実施例１（１）と同様の手順で多孔質粒子（「多孔質粒子４」と称する）を調製した。該多孔質粒子４を用いて、実施例１（２）と同様の手順でリガンド固定多孔質粒子（「担体４」と称する）を調製した。該担体４を用いて、実施例１（３）と同様の手順でＦｃ融合タンパク質の精製を実施した。

[0107]（実施例５）

工程（ｂ）における撹拌速度を２３０ｒｐｍに変更した以外は、実施例１（１）と同様の手順で多孔質粒子（「多孔質粒子５」と称する）を調製した。該多孔質粒子５を用いて、実施例１（２）と同様の手順でリガンド固定多孔質粒子（「担体５」と称する）を調製した。該担体５を用いて、実施例１（３）と同様の手順でＦｃ融合タンパク質の精製を実施した。

[0108]（実施例６）

試薬の量を、工程（ａ）で、２－オクタノン（東洋合成社製）を２３．７

０ｇに、エチルセルロース（ダウ・ケミカル社製ＥＴＨＯＣＥＬ™１４）を２．６４ｇに、ジビニルベンゼン（和光純薬工業社製）を４．３５ｇに、１－エチル－４－ビニルベンゼン（ＣｈｅｍＳａｍｐＣｏ社製）を０．４３ｇに、グリシジルメタクリレート（三菱ガス化学社製）を１６．９４ｇに、工程（ｂ）で、２，２’－アゾビス（イソ酪酸メチル）（和光純薬工業社製）を１．６０ｇに、チオグリセロール（東京化成工業社製）を１０３．３９ｇに、ジイソプロピルエチルアミン（東京化成工業社製）を１２．１５ｇに変更した以外は、実施例１（１）と同様の手順で多孔質粒子（「多孔質粒子６」と称する）を調製した。該多孔質粒子６を用いて、実施例１（２）と同様の手順でリガンド固定多孔質粒子（「担体６」と称する）を調製した。該担体６を用いて、実施例１（３）と同様の手順でＦｃ融合タンパク質の精製を実施した。

[0109]（実施例７）

試薬の量を、工程（ａ）で、２－オクタノン（東洋合成社製）を２８．３７ｇに、エチルセルロース（ダウ・ケミカル社製ＥＴＨＯＣＥＬ™１４）を３．１５ｇに、ジビニルベンゼン（和光純薬工業社製）を３．１２ｇに、１－エチル－４－ビニルベンゼン（ＣｈｅｍＳａｍｐＣｏ社製）を０．３１ｇに、グリシジルメタクリレート（三菱ガス化学社製）を１２．１７ｇに、工程（ｂ）で、２，２’－アゾビス（イソ酪酸メチル）（和光純薬工業社製）を１．１５ｇに、チオグリセロール（東京化成工業社製）を７４．２９ｇに、ジイソプロピルエチルアミン（東京化成工業社製）を８．７３ｇに変更した以外は、実施例１（１）と同様の手順で多孔質粒子（「多孔質粒子７」と称する）を調製した。該多孔質粒子７を用いて、実施例１（２）と同様の手順でリガンド固定多孔質粒子（「担体７」と称する）を調製した。該担体７を用いて、実施例１（３）と同様の手順でＦｃ融合タンパク質の精製を実施した。

[0110]（実施例８）

リガンドをＰｒＡ－２に変更した以外は、実施例１（１）及び（２）と同

様の手順で、前記多孔質粒子１からリガンド固定多孔質粒子（「担体８」と称する）を調製した。該担体８を用いて、実施例１（３）と同様の手順でＦｃ融合タンパク質の精製を実施した。

[0111]（実施例９）

前記試料溶液をリロナセプト発現細胞の培養液（リロナセプト濃度：１．１ｍｇ／ｍＬ）に変更し、かつ工程（ｉｉ）で、保持時間４分で２９．０９ｍＬの該試料溶液をカラムにロードした以外は、実施例１（３）と同様の手順で、前記担体１を用いてＦｃ融合タンパク質（リロナセプト）の精製を実施した。

[0112]（実施例１０）

前記試料溶液をエフモロクトコグアルファ（Ｅｆｍｏｒｏｃｔｏｃｏｇａｌｆａ）発現細胞の培養液（エフモロクトコグアルファ濃度：１．１ｍｇ／ｍＬ）に変更し、かつ工程（ｉｉ）で、保持時間４分で２２．５９ｍＬの該試料溶液をカラムにロードした以外は、実施例１（３）と同様の手順で、前記担体１を用いてＦｃ融合タンパク質（エフモロクトコグアルファ）の精製を実施した。

[0113]（実施例１１）

前記工程（ｉｉ）で用いた洗浄液を２０ｍＭリン酸ナトリウム／１５０ｍＭ塩化ナトリウム水溶液（ｐＨ７．５）に変更した以外は、実施例１（３）と同様の手順で、前記担体１を用いてＦｃ融合タンパク質の精製を実施した。

[0114]（実施例１２）

前記工程（ｉｉ）で用いた洗浄液を２０ｍＭリン酸ナトリウム／５００ｍＭ塩化ナトリウム水溶液（ｐＨ６．５）に変更した以外は、実施例１（３）と同様の手順で、前記担体１を用いてＦｃ融合タンパク質の精製を実施した。

[0115]（実施例１３）

前記工程（ｉｖ）で用いたアルカリ性液を０．５Ｍ　ＮａＯＨ水溶液に変更した以外は、実施例１（３）と同様の手順で、前記担体１を用いてＦｃ融合タンパク質の精製を実施した。

[0116]（比較例１）

有機物溶液Ｐとして２－オクタノン（東洋合成社製）２９．４４ｇを用いた以外は、実施例１（１）と同様の手順で多孔質粒子（「多孔質粒子０１」と称する）を調製した。該多孔質粒子０１を用いて、実施例１（２）と同様の手順でリガンド固定多孔質粒子（「担体０１」と称する）を調製した。該担体０１を用いて、実施例１（３）と同様の手順でＦｃ融合タンパク質の精製を実施した。

[0117]（試験例１）動的結合容量（ＤＢＣ）測定

実施例１～１３、及び比較例１におけるクロマトグラフィーの１サイクル目及び１００サイクル目での標的タンパク質に対するＤＢＣを測定した。すなわち、溶出先端１０％ブレークスルーのときの標的タンパク質捕捉量とカラム充填体積からＤＢＣを求めた。１サイクル目のＤＢＣ（ｍｇ／ｍＬ）、及び１サイクル目に対する１００サイクル目のＤＢＣの百分率（％ＤＢＣ）を算出した。結果を表２～３に示す。

[0118]（試験例２）宿主細胞由来タンパク質（ＨＣＰ）量測定

実施例１～１３、及び比較例１におけるクロマトグラフィーの１サイクル目及び１００サイクル目で得られた溶出液における、標的タンパク質含有量当たりの残留ＨＣＰ含有量（ＨＣＰ残留率：ＨＣＰ／ｔａｒｇｅｔ）を算出した。溶出液中の残留ＨＣＰ含有量は、ＨＣＰ　ＥＬＩＳＡ　ｋｉｔ（Ｆ５５０－１）により測定した。溶出液中の標的タンパク質の含有量は、吸光度に基づいて測定した。１サイクル目の残留ＨＣＰ含有率（ｐｐｍ）、及び１サイクル目に対する１００サイクル目のＨＣＰ残留率の百分率（％［ＨＣＰ／ｔａｒｇｅｔ］）を算出した。結果を表２～３に示す。

[0119]（試験例３）通液時の圧力抵抗特性の評価

Ｈｉｓｃａｌｅ　２６／２０カラム（Ｃｙｔｉｖａ社製）を二連結し、内径２６ｍｍ、充填高さ２００ｍｍのカラムを用意した。該カラムに担体１、４、７のいずれかを充填した。各カラムをＣｙｔｉｖａ社製ＡＫＴＡ　ＡＶＡＮＴ　１５０に接続し、次いで、線流速１００ｃｍ／ｈｒで純水の通液を

３０分間行った後、上部カラムを取り外し、アダプターを担体層に接着させることでカラムに担体をパッキングした。この後、該カラムに線流速８００ｃｍ／ｈｒで純水を通液し、その際の背圧を測定した。結果を表２に示す。背圧の値が小さいほど、圧力抵抗特性が良好といえる。

[0120] [表2]

	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5	実施例6	実施例7	比較例1
担体	担体1	担体2	担体3	担体4	担体5	担体6	担体7	担体01
多孔質粒子	多孔質粒子1	多孔質粒子2	多孔質粒子3	多孔質粒子4	多孔質粒子5	多孔質粒子6	多孔質粒子7	多孔質粒子01
リガンド	PrA-1	PrA-1	PrA-1	PrA-1	PrA-1	PrA-1	PrA-1	PrA-1
体積平均粒子径（μm）	50	50	50	40	85	50	50	50
空孔率（%）	78	78	78	78	78	70	87	75
平均細孔径（nm）	105	80	120	105	105	90	112	50
Fc融合タンパク質	エタネルセプト	エタネルセプト	エタネルセプト	エタネルセプト	エタネルセプト	エタネルセプト	エタネルセプト	エタネルセプト
分子量（kDa）	150	150	150	150	150	150	150	150
中間洗浄	20mMリン酸/500mM NaCl	20mMリン酸/500mM NaCl	20mMリン酸/500mM NaCl	20mMリン酸/500mM NaCl	20mMリン酸/500mM NaCl	20mMリン酸/500mM NaCl	20mMリン酸/500mM NaCl	20mMリン酸/500mM NaCl
アルカリ洗浄	0.1 M NaOH	0.1 M NaOH	0.1 M NaOH	0.1 M NaOH	0.1 M NaOH	0.1 M NaOH	0.1 M NaOH	0.1 M NaOH
1サイクル目DBC（mg/mL）	15.0	14.2	14.0	16.4	10.7	11.8	15.8	10.3
%DBC	96%	93%	93%	94%	94%	93%	95%	86%
背圧（MPa）（線流速 800cm/hr）	0.41			0.68			0.59	
1サイクル目[HCP/target]（ppm）	6800	7200	7100	6900	7000	7100	6900	6900
%[HCP/target]	94%	97%	99%	95%	97%	94%	95%	86%

[0121]

[表3]

	実施例8	実施例9	実施例10	実施例11	実施例12	実施例13
担体	担体8	担体1		担体1		
多孔質粒子	多孔質粒子1	多孔質粒子1		多孔質粒子1		
リガンド	PrA-2	PrA-1		PrA-1		
体積平均粒子径（μm）	50	50		50		
空孔率（%）	78	78		78		
平均細孔径（nm）	105	105		105		
Fc融合タンパク質	エタネルセプト	リロナセプト	エフモロクトコグアルファ	エタネルセプト		
分子量（kDa）	150	250	220	150		
中間洗浄	20mMリン酸/500mM NaCl			20mMリン酸/150mM NaCl	20mMリン酸/500mM NaCl	20mMリン酸/500mM NaCl
アルカリ洗浄	0.1 M NaOH			0.1 M NaOH		0.5 M NaOH
1サイクル目DBC（mg/mL）	14.0	12.4	12.7	14.9	15.1	14.8
%DBC	95%	92%	93%	91%	94%	90%
1サイクル目[HCP/target]（ppm）	7200	3800	5500	8200	7400	7000
%[HCP/target]	91%	97%	93%	90%	94%	89%

請求の範囲

[請求項1] Ｆｃ融合タンパク質を精製するためのクロマトグラフィー用担体であって、

リガンドが固定化された多孔質粒子を備え、

該多孔質粒子は合成高分子系又は天然高分子系の多孔質粒子であり、

該リガンドはプロテインＡ、プロテインＧ、プロテインＬ及びこれらの類縁物質からなる群から選択される少なくとも１種であり、

該リガンドが固定化された多孔質粒子の平均細孔径は７５～１２０ｎｍである、

クロマトグラフィー用担体。

[請求項2] 前記リガンドが固定化された多孔質粒子の平均細孔径が１０１～１１０ｎｍである、請求項１記載のクロマトグラフィー用担体。

[請求項3] 前記Ｆｃ融合タンパク質が、分子量が１６０～３００ｋＤａである、請求項１記載のクロマトグラフィー用担体。

[請求項4] 前記リガンドが固定化された多孔質粒子が、体積平均粒子径が４５～１００μｍであり、空孔率が７０～９５％（ｖ／ｖ）である、請求項１記載のクロマトグラフィー用担体。

[請求項5] 前記Ｆｃ融合タンパク質が、エタネルセプト、リロナセプト、及びエフモロクトコグアルファからなる群から選択される少なくとも１種である、請求項１記載のクロマトグラフィー用担体。

[請求項6] 前記Ｆｃ融合タンパク質が、配列番号４又は配列番号５のアミノ酸配列、又はこれらの配列のいずれかと８５％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるＦｃ融合タンパク質である、請求項１記載のクロマトグラフィー用担体。

[請求項7] 前記多孔質粒子が、リガンドを固定可能な官能基及び重合性不飽和基を有するモノマーと、該官能基をもたない重合性不飽和基含有モノマーとの重合体である、請求項１記載のクロマトグラフィー用担体。

[請求項8] 前記官能基をもたない重合性不飽和基含有モノマーが、非架橋性モノマー及び架橋性モノマーを含む、請求項７記載のクロマトグラフィー用担体。

[請求項9] Ｆｃ融合タンパク質の精製方法であって、以下：

（工程１）請求項１～８のいずれか１項記載のクロマトグラフィー用担体を含むカラムに、Ｆｃ融合タンパク質を含む溶液を通液し、該担体に該Ｆｃ融合タンパク質を結合させる工程；

（工程２）該担体を洗浄する工程；及び、

（工程３）該担体から該Ｆｃ融合タンパク質を回収する工程、

を含む、方法。

[請求項10] さらに、以下：

（工程４）前記工程３の後、前記カラムにアルカリ性液を通液する工程、

を含む、請求項９記載の方法。

[請求項11] 工程１から工程４を複数回繰り返すことを含む、請求項１０記載の方法。