

明 細 書

発明の名称：組成物、糖鎖試料の調製方法及び糖鎖の分析方法 技術分野

[0001] 本発明は、組成物、糖鎖試料の調製方法及び糖鎖の分析方法に関する。

背景技術

[0002] 糖鎖、糖タンパク、糖ペプチド、ペプチド、オリゴペプチド、タンパク質、核酸、脂質などといった生体高分子は、医学、細胞工学、臓器工学などのバイオテクノロジー分野において重要な役割を担っており、これら物質による生体反応の制御機構を明らかにすることはバイオテクノロジー分野の発展に繋がることになる。

[0003] 糖鎖は、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、キシロース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、シアル酸などの単糖およびこれらの誘導体がグリコシド結合によって鎖状に結合した分子の総称である。生体高分子の中でも、糖鎖は、非常に多様性に富んでおり、天然に存在する生物が有する様々な機能、例えば、細胞間情報伝達や、タンパク質の機能や相互作用の調整などに深く関わっていることが明らかになりつつある。

[0004] 糖鎖は生体内でタンパク質や脂質などに結合した複合糖質として存在することが多い。糖鎖を有する生体高分子としては、例えば、細胞の安定化に寄与する植物細胞の細胞壁のプロテオグリカン、細胞の分化、増殖、接着、移動などに影響を与える糖脂質、及び細胞間相互作用や細胞認識に関与している糖タンパク質などが挙げられる。これらの生体高分子に含まれる糖鎖が、この生体高分子と互いに機能を代行、補助、増幅、調節、あるいは阻害しあいながら高度で精密な生体反応を制御する機構が次第に明らかにされつつある。このような糖鎖と細胞の分化増殖、細胞接着、免疫、及び細胞の癌化との関係が明確にされれば、この糖鎖工学と、医学、細胞工学、あるいは臓器工学とを密接に関連させて新たな展開を図ることが期待できる。

[0005] 糖タンパク質医薬品では、その糖鎖が生物活性発現などに重要な役割を担っている場合が多い。したがって、糖タンパク質医薬品の品質管理のパラメーターとして、糖鎖の評価はきわめて重要である。特に抗体医薬品については、その糖鎖構造が抗体依存性細胞傷害活性（ADCC活性）を左右するとの報告がされており、糖鎖構造解析の重要性が高まっている。

[0006] このため、近年、糖鎖構造を迅速、簡便、かつ精度高く解析する方法が求められるようになり、高速液体クロマトグラフィ（HPLC）、核磁気共鳴法、キャピラリー電気泳動法（CE法）、質量分析法、レクチンアレイ法などの多種多様な方法により糖鎖解析が行われている。

[0007] これら種々の手法を用いて糖鎖を解析するためには、あらかじめ生体試料中に含まれるタンパク質、ペプチド、脂質、核酸などと糖鎖を分離・精製することが必要である。これら糖鎖の精製や標識化は時間と工数がかかり、一度に多種多量の試料を調製するのは困難を要する。

[0008] この問題を解決する技術として、ヒドラジド基やアミノオキシ基などの糖鎖を捕捉するための官能基を有するポリマー粒子を利用した糖鎖試料の調製方法が報告されている（特許文献1）。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開第2008／018170号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 製品の輸送の際には、しばしば製品が50℃を超える温度条件に曝されることも考えられる。このため本発明者らは、糖鎖を捕捉するための官能基を有するポリマー粒子の高温条件下における品質安定性を検討した。その結果、60℃という高温条件下においてポリマー粒子に凝集が生じることが判明した。この凝集は、当該ポリマー粒子の性能や操作性に影響を与えることから、当該凝集を抑制する必要がある。

[0011] そこで、本発明は、糖鎖を捕捉するための官能基を有するポリマー粒子において、高温条件下における凝集を抑制させたポリマー粒子を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] [1] 糖鎖を捕捉するための官能基を有するポリマー粒子を含有し、下記式（F1）で算出される質量の変化率が90%超112%未満である、組成物。

$$\text{変化率（\%）} = A / B \times 100 \quad \cdots (F1)$$

[式（F1）中、Aは相対湿度50%、25℃の環境下で4時間静置処理後の前記組成物の質量を表し、Bは前記静置処理前の前記組成物の質量を表す。]

[0013] [2] 下記式（F2）で算出される平均粒径の変化率が90%以上120%以下である、[1]に記載の組成物。

$$\text{変化率（\%）} = C / D \times 100 \quad \cdots (F2)$$

[式（F2）中、Cは前記組成物を乾燥条件下60℃で3日間保温処理後に水に懸濁し、レーザー回折・散乱式粒度分析計で測定した、前記組成物中のポリマー粒子の平均粒径を表し、Dは前記保温処理前の前記組成物を水に懸濁し、レーザー回折・散乱式粒度分析計で測定した、前記組成物中のポリマー粒子の平均粒径を表す。]

[0014] [3] 前記ポリマー粒子を含有する組成物が、さらに界面活性剤を含有する、[1]または[2]に記載の組成物。

[0015] [4] 前記ポリマー粒子が前記界面活性剤で被覆されている、[3]に記載の組成物。

[0016] [5] 前記界面活性剤がソルビタン脂肪酸エステル又はアニオン性界面活性剤である、[3]または[4]に記載の組成物。

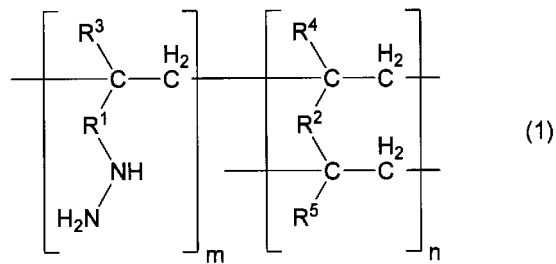
[0017] [6] 前記ポリマー粒子の平均粒径が0.05 μm以上1000 μm以下である、[1]ないし[5]のいずれかに記載の組成物。

[0018] [7] 前記官能基がヒドラジド基またはアミノオキシ基である、[1]ない

し〔6〕のいずれかに記載の組成物。

[0019] 〔8〕前記ポリマー粒子が下記式（1）で表される架橋型ポリマー構造を有するものである、〔1〕ないし〔7〕のいずれかに記載の組成物。

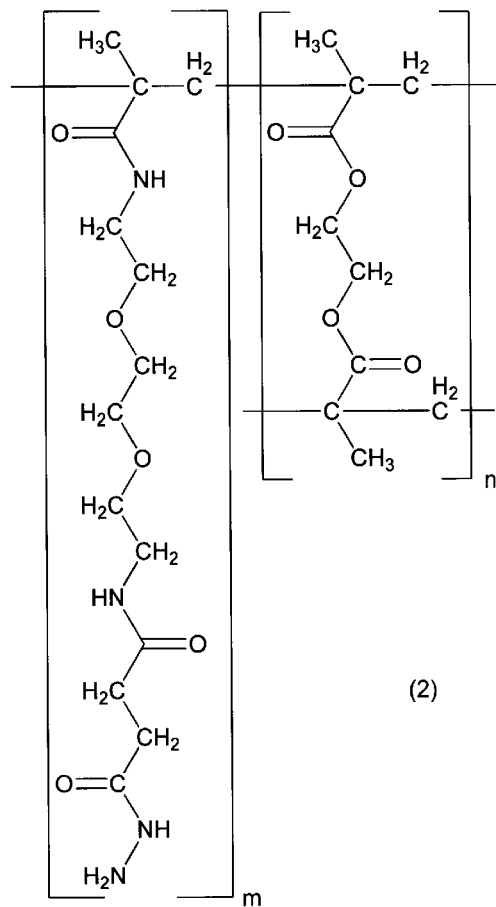
[化1]



〔式（1）中、 R^1 、 R^2 は $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $-CO-$ 、 $-CONH-$ で中断されてもよい炭素数1以上20以下の炭化水素鎖を表し、 R^3 、 R^4 、 R^5 は H 、 CH_3 又は炭素数2以上5以下の炭化水素鎖を表し、 $m:n=9:1 \sim 70:30$ である。〕

[0020] 〔9〕前記架橋型ポリマー構造が下記式（2）で表されるものである、〔8〕に記載の組成物。

[化2]



[式 (2) 中、 $m : n = 99 : 1 \sim 70 : 30$ である。]

[0021] [10] 糖鎖試料の調製方法であって、

- (a) 糖鎖を含む試料及び [1] ないし [9] のいずれかに記載の組成物を混合し、前記糖鎖及び前記組成物中のポリマー粒子を結合させる工程、
 - (b) 前記糖鎖が結合した前記ポリマー粒子を洗浄する工程、
 - (c) 前記糖鎖が結合した前記ポリマー粒子から前記糖鎖を遊離させる工程、
- を含む方法。

[0022] [11] 試料中の糖鎖の分析方法であって、

- (a) 糖鎖を含む試料及び [1] ないし [9] のいずれかに記載の組成物を混合し、前記糖鎖及び前記組成物中のポリマー粒子を結合させる工程、
- (b) 前記糖鎖が結合した前記ポリマー粒子を洗浄する工程、

(c) 前記糖鎖が結合した前記ポリマー粒子から前記糖鎖を遊離させる工程

、

(d) 遊離させた前記糖鎖を分析する工程、

を含む方法。

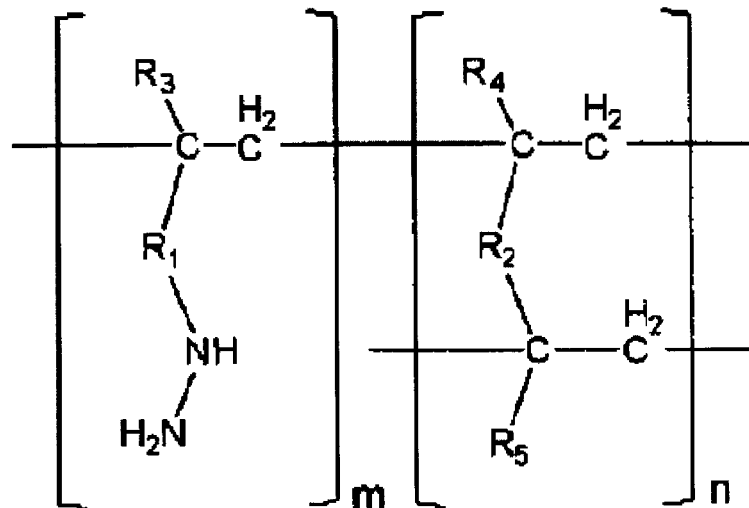
[0023] (1) 糖鎖を捕捉するための官能基を有し、かつ、界面活性剤で被覆されているポリマー粒子。

[0024] (2) 糖鎖を捕捉するための官能基がヒドラジド基またはアミノオキシ基である、(1)に記載のポリマー粒子。

[0025] (3) ポリマー粒子が下記(式1)で表される架橋型ポリマー構造を有するものである、(2)に記載のポリマー粒子。

[0026] [化3]

(式1)



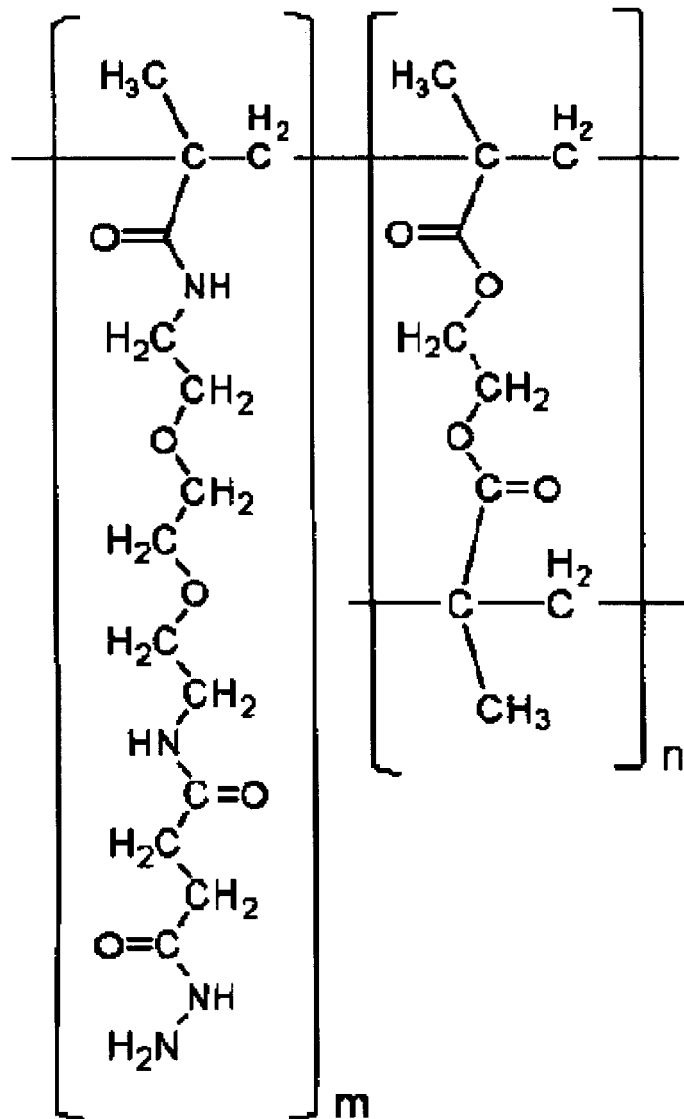
[0027] (R_1 , R_2 は $-O-$, $-S-$, $-NH-$, $-CO-$, $-CONH-$ で中断されてもよい炭素数1~20の炭化水素鎖, R_3 , R_4 , R_5 はH, CH_3 , または炭素数2~5の炭化水素鎖を示す。m, nはモノマーユニット数を示す。)

[0028] (4) ポリマー粒子が下記(式2)で表される架橋型ポリマー構造を有するものである、(3)に記載のポリマー粒子。

[0029]

[化4]

(式2)



[0030] (m, nはモノマーユニット数を示す。)

[0031] (5) 界面活性剤がソルビタンモノステアレート、ソルビタントリスステアレート、またはラウリル硫酸ナトリウムである、(1)から(4)のいずれかに記載のポリマー粒子。

[0032] (6) 糖鎖を捕捉するための官能基を有するポリマー粒子の高温条件下における凝集を抑制する方法であって、当該ポリマー粒子を界面活性剤で被覆することを特徴とする方法。

[0033] (7) 糖鎖を捕捉するための官能基を有するポリマー粒子の吸湿性を低下

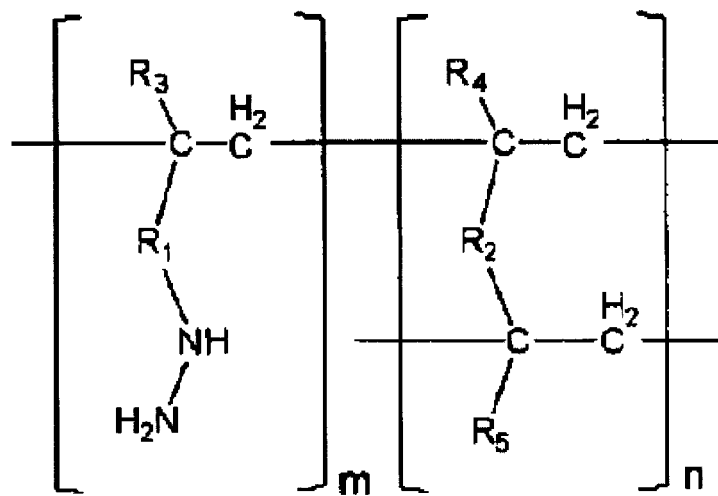
させる方法であって、当該ポリマー粒子を界面活性剤で被覆することを特徴とする方法。

[0034] (8) 糖鎖を捕捉するための官能基がヒドラジド基である、(6) または (7) に記載の方法。

[0035] (9) ポリマー粒子が下記(式1)で表される架橋型ポリマー構造を有するものである、(8) に記載の方法。

[0036] [化5]

(式1)



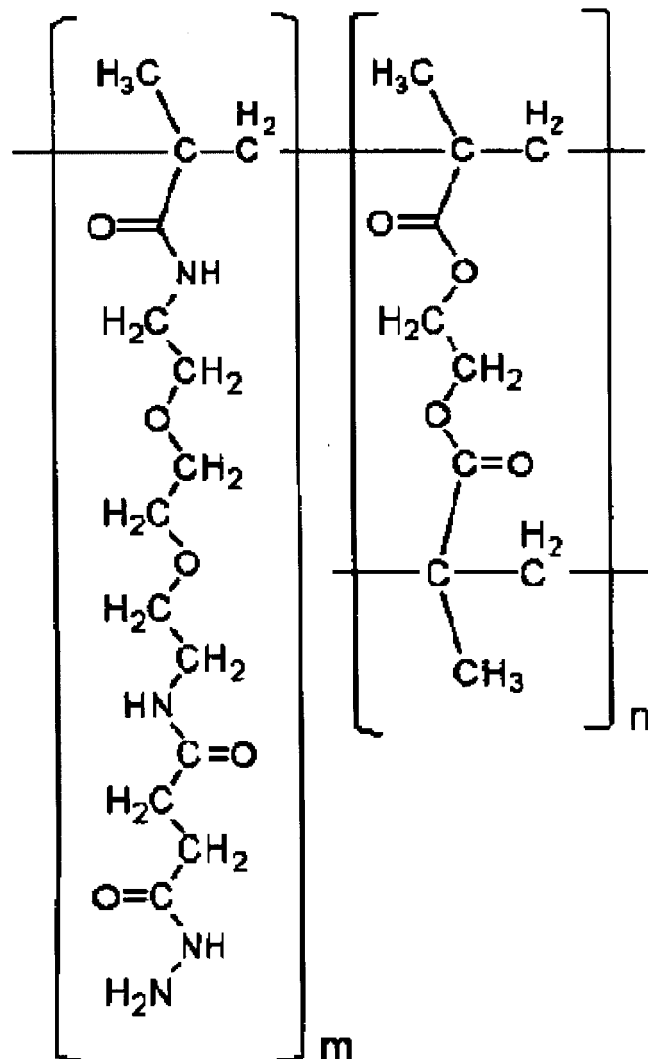
[0037] (R_1 , R_2 は $-O-$, $-S-$, $-NH-$, $-CO-$, $-CONH-$ で中断されてもよい炭素数1~20の炭化水素鎖, R_3 , R_4 , R_5 はH, CH_3 , または炭素数2~5の炭化水素鎖を示す。 m , n はモノマーユニット数を示す。)

[0038] (10) ポリマー粒子が下記(式2)で表される架橋型ポリマー構造を有するものである、(9) に記載の方法。

[0039]

[化6]

(式2)



[0040] (m , n はモノマーユニット数を示す。)

[0041] (1 1) 界面活性剤がソルビタンモノステアレート、ソルビタントリステアレート、またはラウリル硫酸ナトリウムである、(6) から (1 0) のいずれかに記載の方法。

[0042] (1 2) 糖鎖試料の調製方法であって、

- (a) 糖鎖を含む試料を (1) から (5) のいずれかに記載のポリマー粒子に接触させ、当該糖鎖を当該ポリマー粒子に捕捉する工程、
- (b) 糖鎖を捕捉したポリマー粒子を洗浄する工程、
- (c) 糖鎖を捕捉したポリマー粒子から糖鎖を遊離させる工程、

を含む方法。

- [0043] (13) 試料中の糖鎖の分析方法であって、
- (a) 糖鎖を含む試料を(1)から(5)のいずれかに記載のポリマー粒子に接触させ、当該糖鎖を当該ポリマー粒子に捕捉する工程、
 - (b) 糖鎖を捕捉したポリマー粒子を洗浄する工程、
 - (c) 糖鎖を捕捉したポリマー粒子から糖鎖を遊離させる工程、
 - (d) 遊離させた糖鎖を分析する工程、
- を含む方法。

発明の効果

- [0044] 本発明により、糖鎖を捕捉するための官能基を有するポリマー粒子において、その糖鎖捕捉能を低下させることなく、高温条件下における凝集を抑制させることが可能となった。

図面の簡単な説明

- [0045] [図1]実施例1，4および比較例1，2で得られたHPLCチャートから求めたピーク総面積を示すグラフである。
- [図2]実施例1，4および比較例1，2より得られたHPLCチャートで検出された各ピークの面積比率を示すグラフである。
- [図3]糖鎖捕捉性能の検討結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

- [0046] <<組成物>>

一実施形態において、本発明は、糖鎖を捕捉するための官能基を有するポリマー粒子を含有し、下記式(F1)で算出される質量の変化率が90%超112%未満である組成物を提供する。式(F1)中、Aは相対湿度50%、25℃の環境下で4時間静置処理後の前記組成物の質量を表し、Bは前記静置処理前の前記組成物の質量を表す。

$$\text{変化率}(\%) = A / B \times 100 \quad \cdots (F1)$$

- [0047] 発明者らは、上記式(F1)で算出される質量の変化率が上記の範囲内である組成物は、組成物中のポリマー粒子の高温条件下における凝集が抑制さ

れることを見出し、本発明を完成させた。

[0048] 上記式 (F 1) で算出される質量の変化率は、例えば 95%超 112%未満、例えば 100%超 112%未満、例えば 105%超 112%未満、例えば 90%超 110%未満、例えば 95%超 110%未満、例えば 100%超 110%未満、例えば 105%超 110%未満であってもよい。

[0049] 質量の変化率が上記の範囲内である組成物において、高温条件下におけるポリマー粒子の凝集が抑制される理由について、発明者らは次のように推測している。すなわち、ヒドラジド基やアミノオキシ基に代表される糖鎖と反応しうる官能基は親水性であることが多い。そこで、これらの糖鎖を捕捉するための官能基を有するポリマー粒子は空気中の水分を吸収しやすい。ポリマー粒子に吸収された水分のうち、一部の水分子はポリマー粒子表面に吸着しており、高温での保管中にこの水分子を介して水素結合によりポリマー粒子同士が凝集すると推測される。したがって、粒子の吸湿量、特に表面における水分子の吸着量を低減することにより、凝集を抑制できるものと考えられる。

[0050] また、上記質量の変化率の範囲内にあることを達成するための構成の一例として、上記の組成物が界面活性剤を含有することが挙げられ、さらに界面活性剤がポリマー粒子を被覆していることが好ましい。ここで、「被覆」とは、ポリマー粒子の表面の少なくとも一部に界面活性剤が付着していることを意味する。

[0051] 上記の「ポリマー粒子」としては、固体粒子やゲル粒子を好適に用いることができる。このようなポリマー粒子を用いれば、ポリマー粒子に糖鎖を捕捉させたのち、遠心分離やろ過などの手段によって、当該ポリマー粒子を容易に回収することができる。また、ポリマー粒子をカラムに充填して用いることも可能である。カラムに充填して用いる方法は、特に連続操作化の観点から重要となる。反応容器としてフィルタープレート（例えば、Millipore社製のMultiScreen Solvinert Filter Plate）を用いることにより、複数のサンプルを同時に処理するこ

とが可能となり、例えば、ゲルろ過に代表されるカラム操作による従来の精製手段と比較して、精製のスループットが大幅に向上される。また、当該ポリマー粒子として磁性体ビーズを用いれば、磁力を使って容器壁面などにビーズを集積できるため、ビーズの洗浄を容易に行うことができる。

[0052] ポリマー粒子の形状は特に限定しないが、球状またはそれに類する形状が好ましい。ポリマー粒子が球状の場合、平均粒径は好ましくは $0.05\mu\text{m}$ 以上 $1000\mu\text{m}$ 以下であり、より好ましくは $0.05\mu\text{m}$ 以上 $200\mu\text{m}$ 以下であり、さらに好ましくは $0.1\mu\text{m}$ 以上 $200\mu\text{m}$ 以下であり、最も好ましくは $0.1\mu\text{m}$ 以上 $100\mu\text{m}$ 以下である。平均粒径が下限値未満では、ポリマー粒子をカラムに充填して用いる際、通液性が悪くなるために大きな圧力を加える必要がある。また、ポリマー粒子を遠心分離やろ過で回収することも困難となる。平均粒径が上限値を超えると、ポリマー粒子と試料溶液の接触面積が少なくなり、糖鎖捕捉の効率が低下する。また、ピペット等でポリマー粒子を吸い上げることが困難になる。

[0053] 上記の組成物は、下記式（F2）で算出される、組成物中のポリマー粒子の平均粒径の変化率が、例えば90%以上120%以下、例えば95%以上110%以下、例えば95%以上105%以下であることが好ましい。式（F2）中、Cは組成物を乾燥条件下60℃で3日間保温処理後に水に懸濁し、レーザー回折・散乱式粒度分析計で測定した、組成物中のポリマー粒子の平均粒径を表し、Dは保温処理前の組成物を水に懸濁し、レーザー回折・散乱式粒度分析計で測定した、組成物中のポリマー粒子の平均粒径を表す。

$$\text{変化率（\%）} = C / D \times 100 \quad \dots (\text{F}2)$$

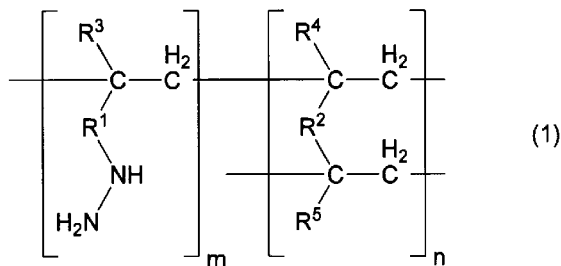
[0054] ここで、「乾燥条件下」とは、例えば、対象の組成物を約23℃で12時間以上真空乾燥した後、シリカゲル乾燥剤とともにアルミ袋に封入し、密閉した状態であってもよい。このようにして密閉した組成物を60℃で3日間保温処理し、上記の測定を行うとよい。

[0055] ポリマー粒子における「糖鎖を捕捉するための官能基」としては、ヒドロジド基又はアミノオキシ基が好ましい。これら官能基は、糖鎖のアルデヒド

基と反応して、ヒドラジド結合またはオキシム結合により糖鎖を捕捉することができる。本発明においては、ヒドラジド基が特に好ましい。

[0056] ヒドラジド基を有するポリマー粒子は、前記式（F 1）を満たすものであれば限定されないが、下記式（1）で表される構造を有する架橋型ポリマー構造を有する粒子であることが好ましい。

[0057] [化7]

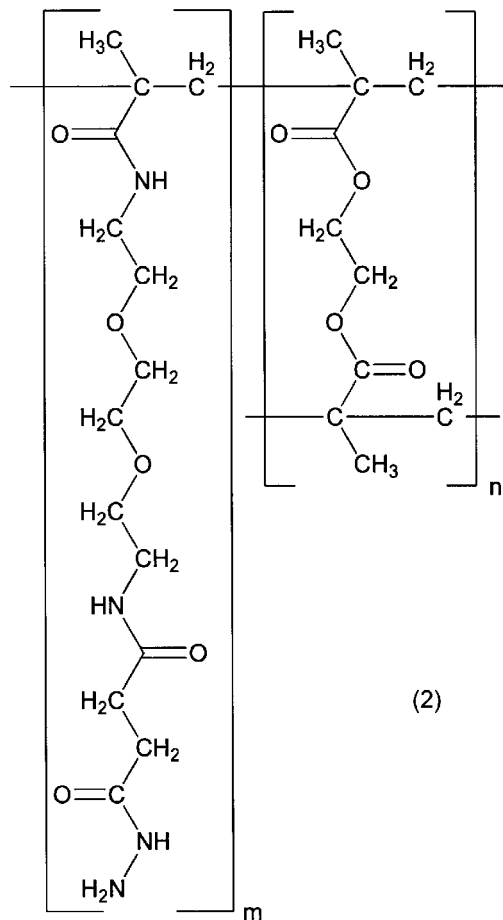


[0058] 式（1）中、 R^1 、 R^2 は $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $-CO-$ 、 $-CONH-$ で中断されてもよい炭素数1以上20以下の炭化水素鎖を表し、 R^3 、 R^4 、 R^5 は H 、 CH_3 又は炭素数2以上5以下の炭化水素鎖を表す。また、 m 、 n はモノマーユニット数を表し、 m と n の比は $m:n=99:1\sim70:30$ である。

[0059] 上記の架橋型ポリマー構造は、下記式（2）で表されるものであることが好ましい。

[0060]

[化8]



[0061] 式(2)中、 m 、 n はモノマーユニット数を表し、 m と n の比は $m:n=99:1\sim70:30$ である。

[0062] 上記の構造を有するポリマー粒子を調製する方法としては、本実施例に記載の通り、懸濁重合反応を利用した方法であっても、逆相懸濁重合反応を利用した方法であってもよい。基本的な反応工程は、例えば、国際公開第2008/018170号公報に記載されている。

[0063] 一実施形態において、本発明のポリマー粒子は、前記記載のとおり界面活性剤により被覆されていることを特徴とする。これによりポリマー粒子の吸湿性を顕著に低下させることができ、また、高温条件下におけるポリマー粒子の凝集を顕著に抑制することができる。従って、一実施形態において、本発明は、糖鎖を捕捉するための官能基を有するポリマー粒子の吸湿性を低下させる方法であって、当該ポリマー粒子及び界面活性剤を共存させることを

特徴とする方法、及び、糖鎖を捕捉するための官能基を有するポリマー粒子の高温条件下における凝集を抑制する方法であって、当該ポリマー粒子及び界面活性剤を共存させることを特徴とする方法を提供する。本発明のポリマー粒子の凝集を評価する際の「高温条件」とは、典型的には、60℃である。

[0064] ポリマー粒子及び界面活性剤を共存させるとは、界面活性剤がポリマー粒子同士の接触に影響を及ぼす状態で、ポリマー粒子と界面活性剤とを共に存在させることを意味する。例えば、ポリマー粒子の表面に界面活性剤を付着させることであってもよく、ポリマー粒子を界面活性剤で被覆することであってもよい。

[0065] ポリマー粒子と共存させる界面活性剤としては、ポリマー粒子に上記の特性を付与するものであれば、特に制限はない。非イオン界面活性剤、アニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、両性界面活性剤など様々な種類の界面活性剤から適宜選択することができる。界面活性剤による処理後のポリマー粒子の操作性から、界面活性剤は、常温で固体であるものが好ましい。

[0066] 好ましい界面活性剤としては、例えば、ソルビタンモノステアレート、ソルビタントリスステアレート、ソルビタンモノオレエート、ソルビタンモノイソステアレート、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート、ソルビタンセスキオレエート、ソルビタントリオレエート、ペンター２－エチルヘキシル酸ジグリセロールソルビタン、テトラ－２－エチルヘキシル酸ジグリセロールソルビタンなどのソルビタン脂肪酸エステル類；ポリオキシエチレン（POE）－ソルビタンモノオレエート、POE－ソルビタンモノステアレート、POE－ソルビタンモノオレエート、POE－ソルビタンテトラオレエートなどのPOE－ソルビタン脂肪酸エステル類；モノ綿実油脂肪酸グリセリン、モノエルカ酸グリセリン、セスキオレイン酸グリセリン、モノステアリン酸グリセリン、モノオレイン酸グリセリンなどのグリセリン脂肪酸エステル類；POE－グリセリンモノステアレート、POE－グリセリンモノイソステアレート、POE－グリセリントリイソステアレートな

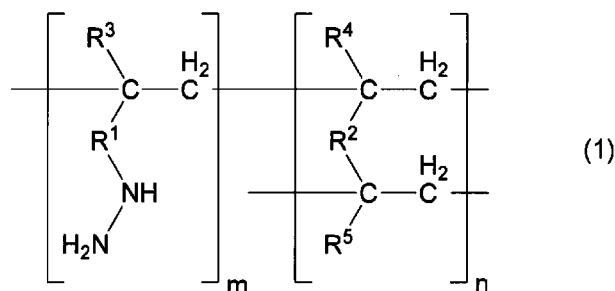
どのPOEーグリセリン脂肪酸エステル類；POEーモノオレエート、POEージステアレート、POEーモノジオレエート、ジステアリン酸エチレングリコールなどのPOEー脂肪酸エステル類；POEーラウリルエーテル、POEーオレイルエーテル、POEーステアリルエーテル、POEーベヘニルエーテル、POEー2ーオクチルドデシルエーテル、POEーコレスタノールエーテルなどのPOEーアルキルエーテル類；プルロニックなどのプルロニック型類界面活性剤；POE・POPー2ーデシルテトラデシルエーテル、POE・POPーモノブチルエーテル、POE・POPー水添ラノリン、POE・POPーグリセリンエーテルなどのPOE・ポリオキシプロピレン（POP）ーアルキルエーテル類；テトロニックなどのテトラPOE・テトラPOPーエチレンジアミン縮合物類；POEーヒマシ油、POEー硬化ヒマシ油、POEー硬化ヒマシ油モノイソステアレート、POEー硬化ヒマシ油トリイソステアレート、POEー硬化ヒマシ油モノピログルタミン酸モノイソステアリン酸ジエステル、POEー硬化ヒマシ油マレイン酸などのPOEーヒマシ油誘導体やPOEー硬化ヒマシ油誘導体；POEーソルビットミツロウなどのPOEーミツロウ・ラノリン誘導体；POEープロピレングリコール脂肪酸エステル、POEーアルキルアミン、POEー脂肪酸アミド、ショ糖脂肪酸エステル、POEーノニルフェニルホルムアルデヒド縮合物、アルキルエトキシジメチルアミンオキシド、トリオレイルリン酸、セスキカプリル酸ポリグリセリル、ジカプリル酸ポリグリセリル、モノラウリン酸ポリグリセリル、モノステアリン酸ポリグリセリル、モノオレイン酸ポリグリセリル、ジステアリン酸ポリグリセリル、ジオレイン酸ポリグリセリルなどのポリグリセリン脂肪酸エステル；メチルポリシロキサン・セチルメチルポリシロキサン・ポリ（オキシエチレン・オキシプロピレン）メチルポリシロキサン共重合体などの変性シリコーン；硬化ヒマシ油誘導体、グリセリンアルキルエーテル、デシルグルコシドなどの非イオン性界面活性剤；ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリル硫酸ナトリウム、ミリスチル硫酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ラウリン酸ナトリウム、ミリスチン酸ナトリウ

ム、ステアリルスルホン酸ナトリウム、ラウリルスルホン酸ナトリウム、ジ
 オクチルスルホコハク酸ナトリウムなどのアニオン性界面活性剤；ステアリ
 ルトリメチルアンモニウムクロライド、ラウリルピリジニウムクロライドな
 どのカチオン性界面活性剤；2-ウンデシル-N, N, N-(ヒドロキシエ
 チルカルボキシメチル)-2-イミダゾリンナトリウムなどのイミダゾリン
 系両性界面活性剤やラウリルジメチルアミノ酢酸ベタイン、コカミドプロピ
 ルベタインやラウリルベタインなどのアルキルベタイン、アミドベタイン、
 スルホベタイン、ココベタインなどのベタイン系両性界面活性剤を含む各種
 両性界面活性剤が挙げられ、これらを一種又は二種以上で用いることができ
 る。

[0067] なかでも、ソルビタンモノステアレート、ソルビタントリスステアレート、
 ラウリル硫酸ナトリウムが、処理後の操作性のよさと吸湿抑制効果の balan
 スのから特に好ましい。

[0068] 糖鎖を捕捉するための官能基を有するポリマー粒子の吸湿性を低下させる
 方法、及び糖鎖を捕捉するための官能基を有するポリマー粒子の凝集を抑制
 する方法におけるポリマー粒子としては、上述した、ポリマー粒子と界面活
 性剤とを含有する組成物における、ポリマー粒子と同様のものが挙げられる
 。すなわち、糖鎖を捕捉するための官能基はヒドラジド基であることが好ま
 しく、ポリマー粒子は下記式（1）で表される架橋型ポリマー構造を有する
 ものであることが好ましい。

[0069] [化9]



[0070] 式（1）中、R¹, R²は-O-, -S-, -NH-, -CO-, -CON

る。

[0075] <混合工程及び乾燥工程>

ポリマー粒子の界面活性剤による被覆は、本実施例に記載の通り、ポリマー粒子を界面活性剤の溶液に分散後、溶液を除去して乾燥させることにより、簡便に実施することができる。

[0076] 本実施形態の製造方法において、界面活性剤は、ソルビタン脂肪酸エステル又はアニオン性界面活性剤であることが好ましい。

[0077] 界面活性剤及び溶媒を含む液体における界面活性剤溶液の濃度は、0.01%以上10w/v%以下であってもよく、0.1%以上5%以下であってもよい。

[0078] 界面活性剤及び溶媒を含む液体における溶媒としては、後で除去が容易であるものが好ましい観点から、沸点が130℃以下のものが好ましく、例えば、水；メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール等のアルコール；ペンタン、ヘキサン、シクロヘキサン等の炭化水素；酢酸エチル、酢酸プロピル、酢酸ブチル等のエステル；ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン等のエーテル等が挙げられる。溶媒は、1種を単独で用いてもよく、2種以上を混合して用いてもよい。

[0079] <ポリマー粒子合成工程>

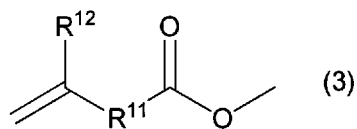
本実施形態の製造方法において、ポリマー粒子は、(A1)重合性基を含むカルボン酸エステルモノマー、又は(A2)重合性基と、保護基[P]で保護されたヒドラジル基又はオキシルアミノ基とを含むモノマーと、(B)架橋剤とを重合させて、(C)前記ポリマー粒子を合成するポリマー粒子合成工程、により製造されたものであってもよい。ポリマー粒子合成工程は、ポリマー粒子の収率が向上する観点から、油中水滴型エマルション中で行うことが好ましいが、水中油滴型エマルション中で行うこともできる。

[0080] [重合性基を含むカルボン酸エステルモノマー (A1)]

本実施形態の製造方法に用いる重合性基を含むカルボン酸エステルモノマー (A1) (以下、「モノマー (A1)」ともいう。)) としては、下記式

(3) で表されるモノマーが挙げられる。

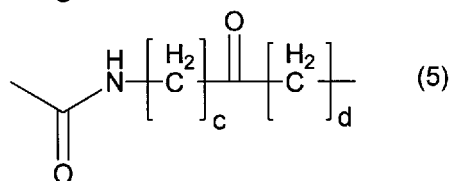
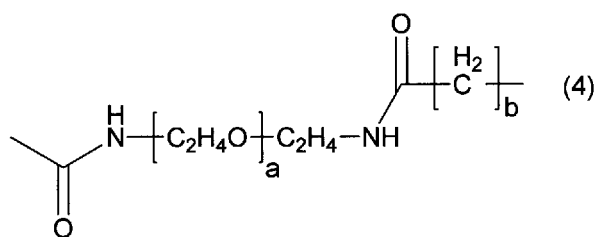
[0081] [化11]



[式 (3) 中、 R^{11} は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{CO}-$ 、及び $-\text{CONH}-$ からなる群から選択される少なくとも一つで中断されてもよい炭素数 1 以上 20 以下の炭化水素鎖を示し、 R^{12} は、 H 、 CH_3 又は炭素数 2 以上 5 以下の炭化水素鎖を示す。]

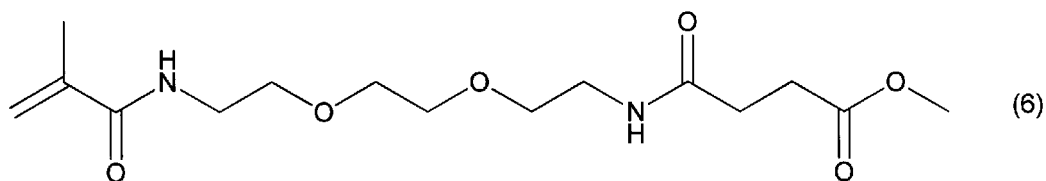
[0082] 式 (3) 中、 R^{11} としては、下記式 (4) 又は (5) で表されるものが挙げられる。下記式中、 a 、 b 及び d は、1 以上 5 以下の整数を表し、 c は、1 以上 10 以下の整数を表す。

[0083] [化12]



[0084] 上記式 (3) の化合物としては、下記式 (6) で表されるものが挙げられる。

[化13]



[0085] 重合反応前の反応溶液におけるモノマー（A1）の含有量は、溶媒100 mLに対し、例えば5 mmol以上50 mmol以下であり、例えば5 mmol以上30 mmol以下であり、例えば10 mmol以上20 mmol以下である。モノマー（A1）は、1種を単独で、又は2種以上を混合して用いることができる。

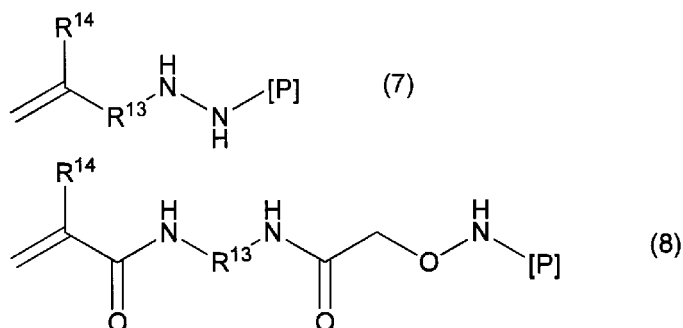
[0086] 本実施形態の製造方法を、モノマー（A1）を用いて行う場合、重合反応後に、得られた（C）ポリマー粒子にヒドラジド基を付与する工程を行う。

（C）ポリマー粒子にヒドラジド基を付与する工程は、重合反応により得られた（C）ポリマー粒子をヒドラジン溶液で処理することにより行う。ヒドラジン溶液におけるヒドラジン濃度は、10体積パーセント以上、30体積パーセント以上、80体積パーセント以上、90体積パーセント以上、又は98体積パーセント以上である。

[0087] [重合性基と保護基[P]で保護されたヒドラジル基又はオキシルアミノ基を含むモノマー（A2）]

本実施形態の製造方法に用いる重合性基と保護基[P]で保護されたヒドラジル基又はオキシルアミノ基を含むモノマー（A2）（以下、「モノマー（A2）」ともいう）は、重合性基を含み、かつ、保護基[P]で保護されたヒドラジル基又はオキシルアミノ基を含む。モノマー（A2）としては、下記式（7）又は（8）で表されるモノマーが挙げられる。

[0088] [化14]

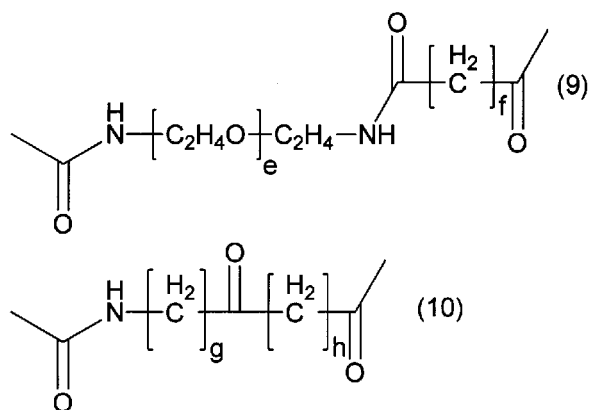


[式（7）及び（8）中、R¹³は、-O-、-S-、-NH-、-CO-、及び-CONH-からなる群から選択される少なくとも一つで中断されても

よい炭素数 1 以上 20 以下の炭化水素鎖を示し、 R^{14} は、 H 、 CH_3 又は炭素数 2 以上 5 以下の炭化水素鎖を示し、 $[P]$ は、保護基を示す。]

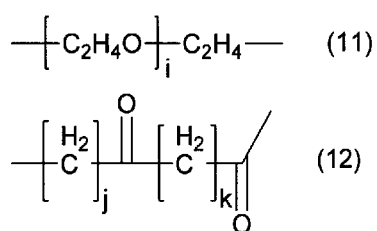
[0089] 式(7)中、 R^{13} としては、下記式(9)又は(10)で表されるものが挙げられる。下記式中、 e 、 f 及び h は1以上5以下の整数を表し、 g は1以上10以下の整数を表す。

[0090] [化15]



[0091] 式(8)中、 R^{13} としては、下記式(11)又は(12)で表されるものが挙げられる。下記式中、 i 及び k は1以上5以下の整数を表し、 j は1以上10以下の整数を表す。

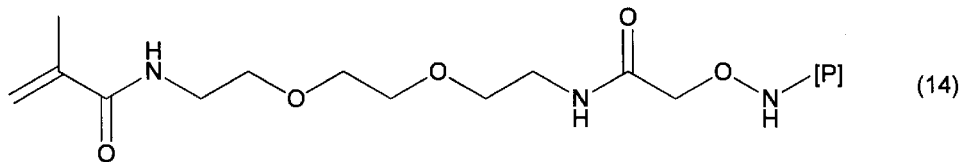
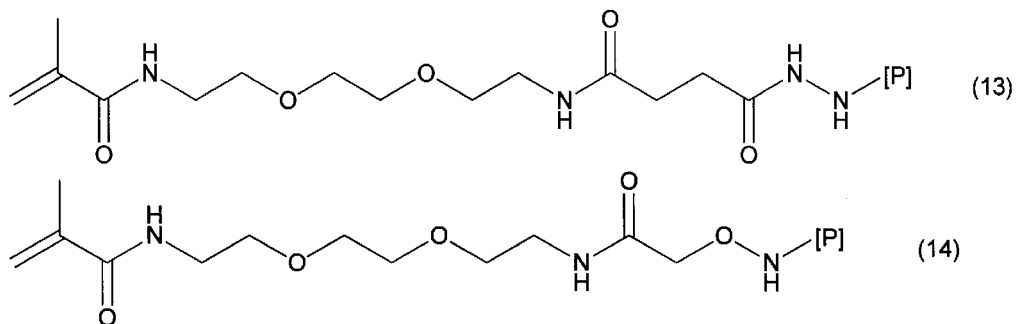
[0092] [化16]



[0093] 式(7)又は(8)で表される化合物としては、例えば、それぞれ下記式(13)又は(14)で表されるものが挙げられる。

[0094]

[化17]



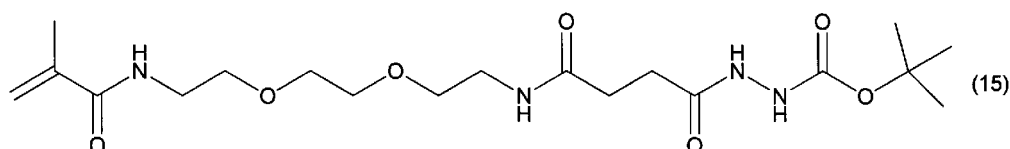
[0095] 重合反応前の反応溶液におけるモノマー（A2）の含有量は、溶媒100 mLに対し、例えば5 mmol以上50 mmol以下であり、例えば5 mmol以上30 mmol以下であり、例えば10 mmol以上20 mmol以下である。

[0096] 保護基 [P] としては、例えば、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基 (Fmoc)、tert-ブトキシカルボニル基 (Boc)、ベンジルオキシカルボニル基 (Cbz)、2, 2, 2-トリクロロエトキシカルボニル基 (Troc)、アリルオキシカルボニル基 (Alloc)、4-メチルトリチル基 (Mmt)、アミノ基、炭素数3から20個のアルキル基、9-フルオレンアセチル基、1-フルオレンカルボン酸基、9-フルオレンカルボン酸基、9-フルオレノン-1-カルボン酸基、ベンジルオキシカルボニル基、キサンチル基 (Xan)、トリチル基 (Trt)、4-メチルトリチル基 (Mtt)、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチル-ベンゼンスルホニル基 (Mtr)、メシチレン-2-スルホニル基 (Mts)、4, 4-ジメトキシベンゾヒドリル基 (Mbh)、トシル基 (Tos)、2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル基 (Pmc)、4-メチルベンジル基 (MeBzl)、4-メトキシベンジル基 (MeOBzl)、ベンジルオキシ基 (BzIO)、ベンジル基 (Bzl)、ベンゾイル基 (Bz)、3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基 (Npys)、1-(4, 4-ジメチル-2, 6-ジアキソクロヘキシリデン)エチル基 (Dde)、2, 6-ジクロロベンジル基 (2, 6-DiCl-Bzl)、2-クロロベンジ

ルオキシカルボニル基（ $2-C1-Z$ ）、2-ブロモベンジルオキシカルボニル基（ $2-Br-Z$ ）、ベンジルオキシメチル基（ Bom ）、シクロヘキシルオキシ基（ $cHxO$ ）、 t -ブトキシメチル基（ Bum ）、 t -ブトキシ基（ $tBuO$ ）、 t -ブチル基（ tBu ）、アセチル基（ Ac ）、トリフルオロアセチル基（ TFA ） o -ブロモベンジルオキシカルボニル基、 t -ブチルジメチルシリル基、2-クロロベンジル（ $C1-z$ ）基、シクロヘキシル基、シクロペンチル基、イソプロピル基、ピバリル基、テトラヒドロピラン-2-イル基、トリメチルシリル基等が挙げられる。

[0097] モノマー（ $A2$ ）は、例えば、下記式（15）で表される化合物である。

[0098] [化18]



[0099] 本実施形態の製造方法を、モノマー（ $A2$ ）を用いて行う場合、重合反応後に、得られた（ C ）ポリマー粒子の保護基〔 P 〕を脱保護する。脱保護は、保護基の種類に応じた公知の方法で行うことができる。

[0100] [架橋剤（ B ）]

架橋剤（ B ）としては、多官能の化合物であって、カルボン酸エステルモノマーと共重合を行う化合物を好適に用いることができ、

（1）ポリオール（ジ又はトリ（メタ）アクリル酸エステル類、例えばポリオールがエチレングリコール、プロピレングリコール、トリメチロールプロパン、グリセリン、ポリオキシエチレングリコール、ポリオキシプロピレングリコール、ポリグリセリン等であるもの、

（2）前記（1）において、不飽和酸が（メタ）アクリル酸以外のもの、例えばマレイン酸、フマル酸などであるもの、

（3）ビスアクリルアミド類、例えば N,N' -メチレンビスアクリルアミド等、

（4）ポリエポキシドと（メタ）アクリル酸を反応させて得られるジ又は

トリ（メタ）アクリル酸エステル類、

（５）ポリイソシアネートと（メタ）アクリル酸ヒドロキシエステルを反応させて得られるジ（メタ）アクリル酸カルバミルエステル類、例えばポリイソシアネートがトリレンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソシアネート等であるもの、又は、

（６）多価アリル化合物、例えばアリル化デンプン、アリル化セルロース、ジアリルフタレート、テトラアリロキシエタン、ペンタエリストールトリアリルエーテル、トリメチロールプロパントリアリルエーテル、ジエチレングリコールジアリルエーテル、トリアリルトリメリテート等、が挙げられる。

[0101] 架橋剤（Ｂ）は、例えば、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、又は、 N, N' -メチレンビス（メタ）アクリルアミドであってもよい。

[0102] 重合反応前の反応溶液における（Ｂ）架橋剤の含有量は、モノマー（Ａ１又はＡ２）に対し、例えば１ｍｏｌ％以上３０ｍｏｌ％以下であり、例えば３ｍｏｌ％以上２０ｍｏｌ％以下であり、例えば３ｍｏｌ％以上１５ｍｏｌ％以下である。

[0103] 架橋剤（Ｂ）の重合反応系への添加タイミングは特に限定されず、重合前、重合中、重合後のいずれか時点で添加することができる。

[0104] [重合反応（油中水滴型エマルション中における重合）]

本実施形態の製造方法において「油中水滴型エマルション中における重合」とは、逆相懸濁重合をいう。逆相懸濁重合とは、水溶性モノマー、必要に応じて他のモノマー、架橋剤、重合開始剤等を含有する水相を、重合に不活性な疎水性有機溶媒を含む油相中に分散又は懸濁させ、油中水滴型の懸濁重合を行う方法である。重合反応は、（Ａ１）重合性基を含むカルボン酸エステルモノマー又は（Ａ２）重合性基と保護基〔Ｐ〕で保護されたヒドラジル基又はオキシルアミノ基とを含むモノマー、（Ｂ）架橋剤、水、及び重合開始剤を含む混合物を、有機溶媒中に分散させて油中水滴型エマルションを形

成し、油中水滴型エマルション中で行うことができる。

[0105] (有機溶媒)

有機溶媒は、重合に不活性な疎水性有機溶媒である。有機溶媒は、(A 1) 重合性基を含むカルボン酸エステルモノマー又は(A 2) 重合性基と保護基[P]で保護されたヒドラジル基又はオキシルアミノ基とを含むモノマー、(B) 架橋剤、水、及び重合開始剤を含む混合物を分散させるために用いられることから、有機分散媒ということもできる。本実施形態の製造方法に使用しうる有機溶媒としては、脂肪族炭化水素、脂環族炭化水素、芳香族炭化水素、脂肪族アルコール、脂肪族ケトン、脂肪族エステル類等が挙げられる。脂肪族炭化水素としては、n-ペンタン、n-ヘキサン、n-ヘプタン等の炭素数5以上の脂肪族炭化水素が挙げられる。脂環族炭化水素としては、シクロペンタン、メチルシクロペンタン、シクロヘキサン、メチルシクロヘキサン等の炭素数5以上の脂環族炭化水素が挙げられる。芳香族炭化水素としては、ベンゼン及びトルエン、キシレン等のベンゼン誘導体等が挙げられる。脂肪族アルコールとしては、n-ブチルアルコール、n-アミルアルコール等の炭素数4以上又は4以上6以下の脂肪族アルコール等が挙げられる。脂肪族ケトンとしては、メチルエチルケトン等の炭素数4以上又は4以上6以下の脂肪族ケトン等が挙げられる。脂肪族エステル類としては、酢酸エチル等の炭素数4以上又は4以上6以下の脂肪族エステル類等が挙げられる。本実施形態の製造方法に使用しうる有機溶媒は、1種を単独で、又は2種以上を混合して用いることができる。

[0106] 有機溶媒の使用量は特に制限されず、モノマー(A 1又はA 2)の量等に応じて適宜設定することができる。前記モノマー(A 1又はA 2)100質量部に対する有機溶媒の使用量は、例えば500質量部以上5000質量部以下であり、例えば500質量部以上3000質量部以下である。

[0107] (重合開始剤)

重合開始剤としては、本系に用いられるものであれば特に制限はないが、水溶性のラジカル重合開始剤等が挙げられる。重合開始剤としては、(1)

過酸化水素、(2) 過硫酸ナトリウム、過硫酸カリウム、過硫酸アンモニウム等の過硫酸塩、(3) 過塩素酸カリウム、過塩素酸ナトリウム等の過塩素酸塩、(4) 塩素酸カリウム、臭素酸カリウム等のハロゲン酸塩、(5) *t*-ブチルヒドロパーオキシド、クメンヒドロパーオキシド、ジアルキルパーオキシド(ジ-*t*-ブチルパーオキシド、*t*-ブチルクミルパーオキシド等)等のパーオキシド類、(6) メチルエチルケトンパーオキシド、メチルイソブチルケトンパーオキシド等のケトンパーオキシド、(7) *t*-ブチルパーオキシアセテート、*t*-ブチルパーオキシイソブチレート、*t*-ブチルパーオキシピバレート等のアルキルパーオキシエステル、(8) アゾビスイソブチロニトリル、2, 2'-アゾビス(N, N'-ジメチレンイソブチルアミジン)ジヒドロクロリド等のアゾ化合物等が挙げられる。

[0108] 前記重合開始剤の使用量は、重合の条件に応じて適宜設定することができ、モノマー(A1又はA2)100質量部に対して、例えば0.005質量部以上20質量部以下であり、例えば0.01質量部以上10質量部であり、例えば0.02質量部以上10質量部以下であり、例えば0.05質量部以上5質量部以下である。なお、前記重合開始剤の添加方法は特に制限されず、モノマー(A1又はA2)とは別に溶媒に添加してもよく、前記モノマー(A1又はA2)の溶液に予め添加して重合開始剤含有液を調製し、これを溶媒に添加してもよい。

[0109] (分散安定剤)

重合を行う際には、溶媒に分散安定剤を含有させることが好ましい。分散安定剤としては、HLBが例えば3以上10以下、例えば3以上9以下の分散安定剤等が挙げられる。

[0110] 重合反応を有機溶媒中で行う場合には、油溶性の分散安定剤が好ましく、例えば、ソルビタン脂肪酸エステル(ソルビタンモノステアレート、ソルビタンモノラウレート、ソルビタン、ソルビタンモノオレート、ソルビタントリスステアレート等)、ショ糖脂肪酸エステル(ショ糖と、ステアリン酸、パルミチン酸、ラウリン酸、オレイン酸等の脂肪酸とのモノ、ジ又はトリエス

テル等)等が挙げられる。

[0111] 分散安定剤は1種を単独で、又は2種以上を混合して用いることができる。

[0112] 分散安定剤の使用量は特に制限されず、重合の条件に応じて適宜選択することができる。分散安定剤の使用量は、モノマー(A1又はA2)100質量部に対して、例えば0.1質量部以20質量部以下であり、例えば0.1質量部以上15質量部以下であり、例えば0.1質量部以10質量部以下である。

[0113] 逆相懸濁重合反応は、例えば、反応槽中でN₂ガスを通気しながら、(A1)重合性基を含むカルボン酸エステルモノマー又は(A2)重合性基と保護基[P]で保護されたヒドラジル基又はオキシルアミノ基とを含むモノマー、(B)架橋剤、水、重合開始剤を含む混合物が有機溶媒に分散した油中水滴型エマルジョンを懸濁しながら重合を行う。油中水滴型エマルジョンの形成と懸濁は同時であってもよく、油中水滴型エマルジョンの形成が先であってもよい。また、各成分は、全量を重合反応前に混合してもよく、一部又は全部を攪拌しながら添加混合してもよい。重合反応条件は、温度は例えば50℃以上90℃以下、例えば60℃以上80℃以下で、時間は例えば0.5時間以上24時間以下、例えば1時間以上20時間以下である。

[0114] [重合反応(水中油滴型エマルジョン中における重合)]

重合反応は、(A1)重合性基を含むカルボン酸エステルモノマー又は(A2)重合性基と保護基[P]で保護されたヒドラジル基又はオキシルアミノ基とを含むモノマー、(B)架橋剤、有機溶媒、及び重合開始剤を含む混合物を、水中に分散させて水中油滴型エマルジョンを形成し、水中油滴型エマルジョン中で行ってもよい。

[0115] 水中油滴型エマルジョン中で重合反応を行う場合、例えば、反応槽中で溶媒にN₂ガスを通気するとともに溶媒を攪拌しながら、(A1)重合性基を含むカルボン酸エステルモノマー又は(A2)重合性基と保護基[P]で保護されたヒドラジル基又はオキシルアミノ基とを含むモノマー、(B)架橋剤

、有機溶媒及び重合開始剤を含む混合物を投入してモノマー液滴を形成させ、例えば50℃以上90℃以下、例えば60℃以上80℃以下で、例えば0.5時間以上24時間以下、例えば1時間以上20時間以下反応させるとよい。

[0116] (重合開始剤)

重合開始剤としてはラジカル重合開始剤が挙げられ、本発明の目的を達成可能な範囲において特に限定されないが、例えば、2, 2'-アゾビスイソブチロニトリル (AIBN)、2, 2'-アゾビス-(2-メチルプロパンニトリル)、2, 2'-アゾビス-(2, 4-ジメチルペンタンニトリル)、2, 2'-アゾビス-(2-メチルブタンニトリル)、1, 1'-アゾビス-(シクロヘキサンカルボニトリル)、2, 2'-アゾビス-(2, 4-ジメチル-4-メトキシバレロニトリル)、2, 2'-アゾビス-(2, 4-ジメチルバレロニトリル)等のアゾ系重合開始剤を主に例示することができる。また、有機過酸化物系重合開始剤も本発明に適用することができる。有機過酸化物系重合開始剤として、具体的には、t-ブチルパーオキシピバレート、t-ブチルパーオキシ2-エチルヘキサノエート、クミルパーオキシ2-エチルヘキサノエート等のパーオキシエステル類；ジ-3, 5, 5-トリメチルヘキサノイルパーオキシド、ジラウロイルパーオキシド等のジアシルパーオキシド等のジアシルパーオキシド類を例示することができる。ラジカル重合開始剤は1種類を単独で用いても良いし、複数を適宜混合して用いても良い。

[0117] 前記重合開始剤の使用量は、重合の条件に応じて適宜設定することができる。モノマー (A1) 又は (A2) 100質量部に対して、例えば0.005質量部以上20質量部以下であり、例えば0.01質量部以上10質量部以下であり、例えば0.02質量部以上10質量部以下であり、例えば0.05質量部以上5質量部以下である。なお、前記重合開始剤の添加方法は特に制限されず、モノマー (A1) 又は (A2) とは別に溶媒に添加してもよく、前記モノマー (A1) 又は (A2) の溶液に予め添加して重合開始剤含有

液を調製し、これを溶媒に添加してもよい。

[0118] (分散安定剤)

重合反応を水中で行う場合には、分散安定剤としては、ポリビニルアルコール、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、アミノメチルヒドロキシプロピルセルロース、アミノエチルヒドロキシプロピルセルロース等のセルロース誘導体類、デンプン、トラガント、ペクチン、グルー、アルギン酸またはその塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸またはその塩、ポリメタアクリル酸またはその塩、ポリアクリルアミド、ポリメタアクリルアミド、酢酸ビニルとマレイン酸、無水マレイン酸、アクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸、フマル酸、クロトン酸等の不飽和酸との共重合体、スチレンと上記不飽和酸との共重合体、ビニルエーテルと上記不飽和酸との共重合体および前記共重合体の塩類またはエステル類等が挙げられる。分散安定剤は1種を単独で、又は2種以上を混合して用いることができる。

[0119] 分散安定剤の使用量は特に制限されず、重合の条件に応じて適宜選択することができる。分散安定剤の使用量は、モノマー（A1）又は（A2）100質量部に対して、例えば0.1質量部以上20質量部以下であり、例えば0.1質量部以上15質量部以下であり、例えば0.1質量部以上10質量部以下である。

[0120] [ポリマー粒子（C）]

（A1）重合性基を含むカルボン酸エステルモノマーを用いて重合を行った場合、（C）ポリマー粒子として、カルボン酸エステルを有するポリマー粒子を得ることができる。したがって、本実施形態の製造方法は、「カルボン酸エステルを有するポリマー粒子」の製造方法であるともいえる。

[0121] このようにして得られた（C）ポリマー粒子にヒドラジド基を付与する工程することにより、ヒドラジド基を有するポリマー粒子を製造することがで

きる。(C) ポリマー粒子にヒドラジド基を付与する方法としては、上述したものが挙げられる。

[0122] (A 2) 重合性基を含み保護基 [P] で保護されたヒドラジル基を含むモノマーを用いて重合を行った場合、(C) ポリマー粒子として、保護基 [P] で保護されたヒドラジル基を有するポリマー粒子を得ることができる。したがって、本実施形態の製造方法は「保護基 [P] で保護されたヒドラジル基を有するポリマー粒子」の製造方法であるともいえる。

[0123] このようにして得られた (C) ポリマー粒子を脱保護することで、ヒドラジド基を有するポリマー粒子を製造することができる。(C) ポリマー粒子を脱保護する方法としては、上述したものが挙げられる。

[0124] (A 2) 重合性基を含み保護基 [P] で保護されたオキシルアミノ基を含むモノマーを用いて重合を行った場合、(C) ポリマー粒子として、保護基 [P] で保護されたオキシルアミノ基を有するポリマー粒子を得ることができる。したがって、本実施形態の製造方法は、「保護基 [P] で保護されたオキシルアミノ基を有するポリマー粒子」の製造方法であるともいえる。

[0125] このようにして得られた (C) ポリマー粒子を脱保護することで、オキシルアミノ基を有するポリマー粒子を製造することができる。(C) ポリマー粒子を脱保護する方法としては、上述したものが挙げられる。

[0126] 別の実施形態において、本発明は、糖鎖を捕捉するための官能基を有するポリマー粒子と、界面活性剤とを含有する組成物を提供する。上記のポリマー粒子は界面活性剤で被覆されていることが好ましい。

[0127] 本実施形態の組成物によれば、糖鎖を捕捉するための官能基を有するポリマー粒子の糖鎖捕捉能を低下させることなく、高温条件下における凝集を抑制させ、さらに、吸湿性をも低下させることができる。

[0128] 上記の組成物は、下記式 (F 1) で算出される質量の変化率が 90% 以下または 112% 以上であってもよい。式 (F 1) 中、A は相対湿度 50%、25℃の環境下で 4 時間静置処理後の前記組成物の質量を表し、B は前記静置処理前の前記組成物の質量を表す。

$$\text{変化率 (\%)} = A / B \times 100 \quad \dots (F1)$$

[0129] 本実施形態の組成物において、ポリマー粒子、界面活性剤等としては、上述したものを使用可能である。

[0130] ≪糖鎖試料の調製方法及び分析方法≫

1 実施形態において、本発明は、上記の組成物を利用した糖鎖試料の調製方法及び試料中の糖鎖の分析方法を提供する。上記の組成物中のポリマー粒子は、驚くべきことに、界面活性剤と共存した状態でも優れた糖鎖捕捉能を有していた。従って、組成物から界面活性剤を除去することなく、そのまま糖鎖の捕捉に利用することができ、利便性においても優れている。

[0131] 本実施形態の方法においては、まず、糖鎖を含む試料を上記の組成物に接触させ、当該糖鎖及び組成物中のポリマー粒子を結合させる（工程（a））。いいかえると、上記の糖鎖を上記のポリマー粒子に捕捉させる。

[0132] 「糖鎖を含む試料」は、例えば、生体試料から調製することができる。生体試料としては、例えば全血、血清、血漿、尿、唾液、細胞、組織、ウイルス、植物組織などが挙げられる。また、本発明においては、精製された、あるいは未精製の糖タンパク質を用いることができる。試料は脱脂、脱塩、タンパク質分画、熱変性などの方法により前処理されていてもよい。

[0133] 糖鎖遊離手段を用いて上記生体試料に含まれる糖鎖を含む分子（例えば、糖タンパク質）から糖鎖を遊離させることができる。糖鎖遊離手段としては、N-グリコシダーゼあるいはO-グリコシダーゼを用いたグリコシダーゼ処理、ヒドラジン分解、アルカリ処理によるβ脱離などの方法を用いることができる。N型糖鎖の分析を行う場合は、N-グリコシダーゼを用いる方法が好ましい。グリコシダーゼ処理に先立って、トリプシンやキモトリプシンなどを用いてプロテアーゼ処理を行ってもよい。

[0134] こうして調製した試料を、本発明のポリマー粒子に接触させることにより、糖鎖を当該ポリマー粒子に捕捉することができる。糖鎖は生体内物質のなかで唯一、アルデヒド基をもつ物質である。糖鎖は水溶液などの状態で環状のヘミアセタール型と、非環状型のアルデヒド型とが平衡で存在する。タン

パク質や核酸、脂質など糖鎖以外の生体内物質にはアルデヒド基が含まれていない。このことから、アルデヒド基と特異的に反応して安定な結合を形成するヒドラジド基やアミノオキシ基を有するポリマー粒子を利用すれば、糖鎖のみを選択的に捕捉することが可能である。

[0135] ポリマー粒子によって糖鎖を捕捉する際の反応系のpHは、好ましくは2以上9以下、より好ましくは2以上7以下であり、さらに好ましくは2以上6以下である。pH調整のためには、各種緩衝液を用いることができる。また、糖鎖を捕捉する際の溶媒としては、酸と有機溶媒の混合溶媒を用いることもできる。使用する酸としては、特に制限されるものではないが、例えば、酢酸、ギ酸、トリフルオロ酢酸、塩酸、クエン酸、リン酸、硫酸が好ましく、より好ましくは酢酸、ギ酸、トリフルオロ酢酸、リン酸、さらに好ましくは酢酸、トリフルオロ酢酸が好適に用いられる。有機溶剤としては糖と前記の酸を溶解するものであれば制限はないが、捕捉時に乾固すると捕捉効率が上昇することが多いため、アセトニトリルなど比較的低沸点の有機溶媒が好適に用いられる。酸と有機溶媒の混合比率は、好ましくは0.1 : 9.9、9 ~ 10 : 90、より好ましくは0.5 : 9.5 ~ 5 : 95、最も好ましくは1 : 9.9 ~ 5 : 95である。糖鎖捕捉時の温度は、好ましくは4℃以上90℃以下、より好ましくは30℃以上90℃以下であり、さらに好ましくは30℃以上80℃以下であり、最も好ましくは40℃以上80℃以下である。反応時間は適宜設定することができる。ポリマー粒子をカラムに充填して試料溶液を通過させてもよい。

[0136] 続いて、糖鎖と結合した（糖鎖を捕捉した）ポリマー粒子を洗浄する（工程（b））。

[0137] 糖鎖を捕捉したポリマー粒子の洗浄により、ポリマー粒子に捕捉された物質のうち糖鎖以外の物質（非特異的に吸着した物質）を除去することができる。

[0138] 糖鎖以外の物質を除去する方法としては、疎水結合を解離する能力のあるカオトロピック試薬であるグアニジン水溶液で洗浄する方法や、純水や水溶

性緩衝液（例えばリン酸緩衝液、トリス緩衝液など）で洗浄する方法を用いることができる。洗浄工程における洗浄条件としては、温度が4℃以上40℃以下、洗浄時間が10秒以上30分以下である。洗浄方法としては、ポリマー粒子は、洗浄液に浸漬し、洗浄液の交換を繰り返すことで洗浄することができる。

[0139] 具体的には、遠沈管やチューブにポリマー粒子を入れ、洗浄液を加え、振とうの後、遠心操作によりポリマー粒子を沈殿させて、上清を除去する操作を繰り返すことにより洗浄する。例えば、遠心チューブ内にポリマー粒子を入れ、洗浄液を加え、ポリマー粒子を自然沈降、または、遠心分離により強制的に沈降させた後、上清を除去する操作を繰り返すことで洗浄することができる。前記洗浄操作は3回以上6回以下行うことが好ましい。磁性ビーズを用いる場合には、遠心操作は不要であり、簡便である。

[0140] また、チューブ状の容器であって、底面部に、液体透過可能で該ポリマー粒子が不透過な孔径を有するフィルターを装着するフィルターチューブを用いることも可能である。該フィルターチューブにポリマー粒子を入れて使用することで、洗浄に要した洗浄液を、フィルターを介して除去することが可能となり、前記の遠心操作後の上清除去の工程が必要なくなり、作業性の向上を図ることができる。

[0141] また、6～384穴のマルチウェルプレートの底部が前記フィルターを装着したものが各種市販されており、これらのプレートを用いることでハイスループット化することが可能である。特に96穴マルチウェルプレートは、溶液分注機器、吸引除去システム、およびプレートの搬送システムなどが開発されており、ハイスループット化に最適である。

[0142] 連続式にて糖鎖捕捉反応を行った場合には、洗浄処理は、カラムに洗浄溶液を通して糖鎖捕捉反応から連続的に処理してもよい。また、マルチプレートを用いた場合には、ろ過操作あるいは遠心操作により糖鎖を捕捉したポリマー粒子以外の物質を除去してもよい。

[0143] なお、ポリマー粒子上の余剰官能基は、例えば、無水酢酸などを利用して

キャッピングすることができる。

[0144] 続いて、糖鎖を結合した（糖鎖を捕捉した）ポリマー粒子から糖鎖を遊離させる（工程（c））。

[0145] ポリマー粒子から糖鎖を切り離すためには、酸処理を行うことが好ましい。酸処理においては、酸と有機溶媒の混合溶媒あるいは酸と水と有機溶媒の混合溶媒を用いることができる。酸と水と有機溶媒の混合溶媒の場合、水の含有率は好ましくは0.1%以上90%以下、より好ましくは0.1%以上80%以下、さらに好ましくは0.1%以上50%以下である。水の代わりに水性緩衝液を含有してもよい。緩衝液の濃度は好ましくは0.1mM以上1M以下、より好ましくは0.1mM以上500mM以下、さらに好ましくは1mM以上100mM以下である。反応溶液のpHは、好ましくは2以上9以下、より好ましくは2以上7以下であり、さらに好ましくは2以上6以下である。使用する酸は、例えば、酢酸、ギ酸、トリフルオロ酢酸、塩酸、クエン酸、リン酸、硫酸が好ましく、より好ましくは酢酸、ギ酸、トリフルオロ酢酸、リン酸、さらに好ましくは酢酸、トリフルオロ酢酸である。反応温度に関しては4℃以上90℃以下が好ましく、好ましくは25℃以上90℃以下で、さらに好ましくは40℃以上90℃以下である。反応時間は、10分以上24時間以下、好ましくは10分以上8時間以下、より好ましくは10分以上3時間以下である。反応は、糖鎖を遊離させる反応を効率よく行う観点から、開放系で行って溶媒を完全に蒸発させることが好ましい。

[0146] 弱酸性から中性付近で、糖鎖の遊離反応を行うことができるため、従来の強酸性処理、たとえば10%トリフルオロ酢酸処理による切出しのような強酸の存在下での切出し反応に比べて、シアル酸残基の脱離など糖鎖の加水分解などを引き起こすことを抑制することができるようになる。

[0147] 続けて、上記工程で得られた遊離の糖鎖を標識化することも可能である。標識化の方法としては、還元的アミノ化法と交換反応法が挙げられる。

[0148] 還元的アミノ化法においては、アミノ基を有する化合物により、糖鎖を標識化する。反応系においては、酸と有機溶媒の混合溶媒あるいは酸と水と有

機溶媒の混合溶媒を用いることができる。使用する酸としては、特に制限されるものではないが、例えば、酢酸、ギ酸、トリフルオロ酢酸、塩酸、クエン酸、リン酸、硫酸が好ましく、より好ましくは酢酸、ギ酸、トリフルオロ酢酸、リン酸、さらに好ましくは酢酸、トリフルオロ酢酸が好適に用いられる。有機溶剤としては前記の酸を溶解するものであれば制限はないが、ジメチルスルホキシドなどが好適に用いられる。酸と有機溶媒の混合溶媒の場合、酸と有機溶媒の混合比率は、好ましくは1 : 99 ~ 50 : 50、より好ましくは5 : 95 ~ 50 : 50、最も好ましくは10 : 90 ~ 50 : 50である。また、酸と水と有機溶媒の混合溶媒の場合、有機溶媒の比率に関わらずpH測定した際に得られた結果が、酸性から中性の条件であるのが好ましく、好ましくはpH 2以上9以下、より好ましくは2以上8以下であり、さらに好ましくは2以上7以下である。酸と有機溶媒の混合溶媒の場合も酸と水と有機溶媒の混合溶媒の場合も、反応温度に関しては4℃以上90℃以下が好ましく、好ましくは25℃以上90℃以下で、さらに好ましくは40℃以上90℃以下である。アミノ化合物の濃度は、1 mM以上10 M以下であるのが好ましく、還元剤の濃度は、1 mM以上10 M以下であるのが好ましい。反応時間は、10分以上24時間以下、好ましくは10分以上8時間以下、より好ましくは10分以上3時間以下である。

[0149] ここで、アミノ基を有する化合物は、紫外可視吸収特性又は蛍光特性を有することが好ましく、具体的には下記の群から選ばれる少なくとも1つであることが好ましい。

8-Aminopyrene-1, 3, 6-trisulfonate, 8-Aminonaphthalene-1, 3, 6-trisulphonate, 7-amino-1, 3-naphthalenedisulfonic acid, 2-Amino-9(10H)-acridone, 5-Aminofluorescein, Dansylethylenediamine, 2-Aminopyridine, 7-Amino-4-methylcoumarine, 2-Aminobenzamide, 2-Ami

nobenzoic acid, 3-Aminobenzoic acid, 7-Amino-1-naphthol, 3-(Acetylamino)-6-aminoacridine, 2-Amino-6-cyanoethylpyridine, Ethylp-aminobenzoate, p-Aminobenzonitrile, 及び 7-aminonaphthalene-1, 3-disulfonic acid。

[0150] 特に、アミノ化合物が 2-aminobenzamide の場合の反応条件は以下の通りである。反応系においては、酸と有機溶媒の混合溶媒あるいは酸と水と有機溶媒の混合溶媒を用いることができる。酸と有機溶媒の混合溶媒の場合、酸と有機溶媒の混合比率は、好ましくは 1 : 99 ~ 50 : 50、より好ましくは 5 : 95 ~ 50 : 50、最も好ましくは 10 : 90 ~ 50 : 50 である。また、酸と水と有機溶媒の混合溶媒の場合、有機溶媒の比率に関わらず pH 測定した際に得られた結果が、酸性から中性の条件であるのが好ましく、好ましくは pH 2 以上 9 以下、より好ましくは 2 以上 8 以下であり、さらに好ましくは 2 以上 7 以下である。反応温度に関しては 4℃ 以上 90℃ 以下、好ましくは 30℃ 以上 90℃ 以下で、さらに好ましくは 40℃ 以上 80℃ 以下である。アミノ化合物の濃度は 1 mM 以上 10 M 以下、好ましくは 10 mM 以上 10 M 以下で、さらに好ましくは 100 mM 以上 1 M 以下である。還元剤の濃度は、1 mM 以上 10 M 以下、好ましくは 10 mM 以上 10 M 以下、さらに好ましくは 100 mM 以上 2 M 以下である。反応時間は、10 分以上 24 時間以下、好ましくは 10 分以上 8 時間以下、さらに好ましくは 1 時間以上 3 時間以下である。

[0151] また、還元剤は、例えば、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、メチルアミンボラン、ジメチルアミンボラン、トリメチルアミンボラン、ピコリンボラン、ピリジンボランなどが使用可能であるが、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを使用するのが反応性の面から考えて好ましい。

[0152] 先の糖鎖の切り離し工程後、得られる溶液は標識された糖鎖と過剰量加えた未反応アミノ化合物、還元剤が存在するため、これら余剰試薬を除去する

工程を行うのが好ましい。シリカカラムによる除去、ゲル濾過による除去、イオン交換樹脂による除去、いずれの方法を用いても良いが、シアル酸の離脱を防ぐために使用する溶媒は中性であることが好ましい。

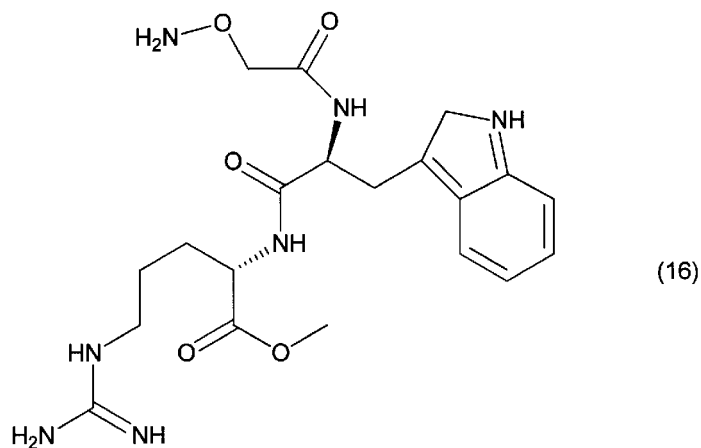
[0153] 一方、交換反応法においては、洗浄操作後、アミノオキシ基を有する化合物を作用させることにより、ヒドラゾン-オキシム交換反応（糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基がヒドラジド基の場合）またはオキシム-オキシム交換反応（糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基がアミノオキシ基の場合）によって糖鎖がポリマー粒子から切り離され、同時にアミノオキシ化合物によって標識化される。よって、本標識方法の場合、酸処理によって糖鎖をポリマー粒子から切り離す操作は不要となる。

[0154] アミノオキシ基を有する化合物は、アルギニン残基、トリプトファン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、システイン残基およびこれら誘導体の少なくとも一つからなる部分を含むことが好ましい。

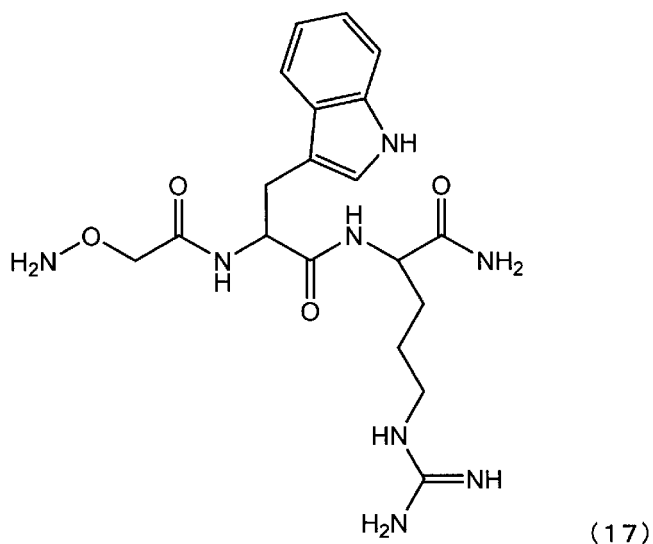
[0155] これらを含む化合物の一例として、O-benzylhydroxylamine; O-phenylhydroxylamine; O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine; O-(4-nitrobenzyl)hydroxylamine; 2-aminooxypyridine; 2-aminooxymethylpyridine; 4-[(aminooxyacetyl)amino]benzoic acid methyl ester; 4-[(aminooxyacetyl)amino]benzoic acid ethyl ester; 4-[(aminooxyacetyl)amino]benzoic acid n-butylester; 及びN-Aminooxyacetyl-tryptophyl(arginine amide)から選ばれた物質またはその塩が挙げられ、特に下記式(16)又は(17)で表される構造を有するものが好ましい。

[0156]

[化19]



[0157] [化20]



[0158] 交換反応時の反応系においては、酸と有機溶媒の混合溶媒あるいは酸と水と有機溶媒の混合溶媒を用いることができる。酸と有機溶媒の混合溶媒の場合、酸と有機溶媒の混合比率は、好ましくは0.1 : 99.9 ~ 10 : 90、より好ましくは0.5 : 99.5 ~ 5 : 95、最も好ましくは1 : 99 ~ 5 : 95である。また、酸と水と有機溶媒の混合溶媒の場合、有機溶媒の比率に関わらずpH測定した際に得られた結果がpH 2以上7以下が好ましく、pH 3以上6以下がより好ましく、pH 3.5以上5.5以下が最も好ましい。酢酸／アセトニトリル溶液を加えることにより、反応液を上記のpHに調整することができる。交換反応時の温度は、50℃以上95℃以下が好

ましく、60℃以上90℃以下がより好ましく、70℃以上90℃以下が最も好ましい。交換反応時、反応容器を開放して加熱操作を行うことにより、溶媒を蒸発させながら反応を進め、最終的に乾固させることにより、効率よく交換反応を行うことができる。

[0159] 以上の工程により、糖鎖試料を調製することができる。試料中の糖鎖の分析方法においては、上述した糖鎖試料の調製方法により遊離させた糖鎖を分析する（工程（d））。上記の方法を経て回収した糖鎖溶液はそのまま、あるいは、過剰に含まれる標識化合物を除去したのち、質量分析（例えば、MALDI-TOF MS）、クロマトグラフィ（例えば、HPLCやHPLC-MS）、電気泳動（例えば、キャピラリー電気泳動）などの公知の方法により、糖鎖の分析（例えば、糖鎖の構造や量の分析）に供することができる。糖鎖の分析においては、必要に応じて、各種データベース（例えば、GlycoMod、Glycosuite、SimGlycan^(R)など）を参照することができる。

実施例

[0160] 以下、実施例及び比較例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

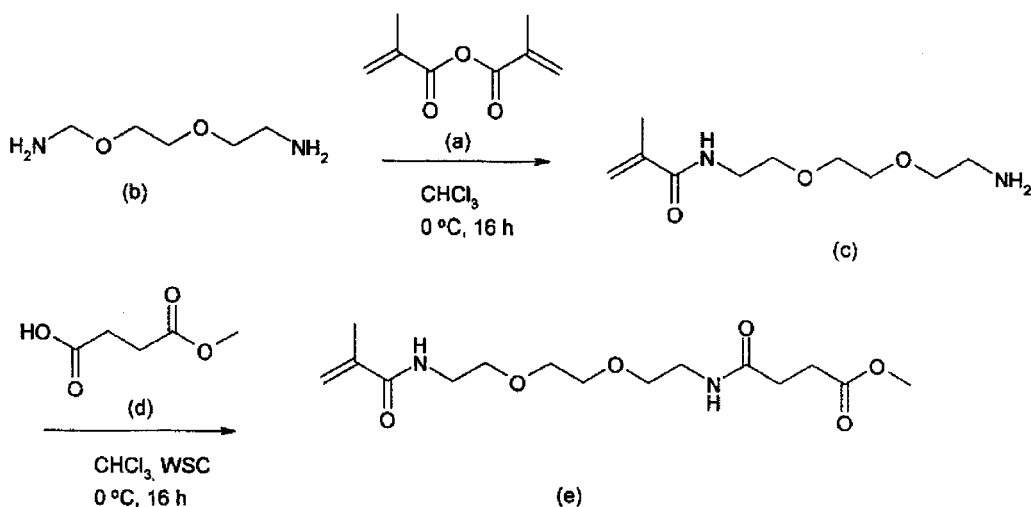
[0161] [実施例1]

（重合性基を含むカルボン酸エステルモノマー（A1）の合成）

以下のスキームで重合性基を含むカルボン酸エステルモノマーである化合物（e）を合成した。

[0162]

[化21]



[0163] 無水メタクリル酸 (MAH : 5 g、0.03 mol) を100 mLのクロロホルムに溶解させた溶液を、25 gの(エチレンジオキシ)ビス(エチルアミン) (EDBEA : 25 g、0.17 mol) を100 mLのクロロホルムに溶解させた溶液に氷浴上で滴下投入した。そこへ窒素を封入し、終夜撹拌させた。得られた反応溶液から溶媒を蒸発させて得た残留物を、シリカゲルカラム (展開溶媒 : クロロホルム90容/メタノール10容の混合溶媒) にかけて所定のフラクションを分取して、このフラクションから溶媒を蒸発させて中間生成物 (c) を得た。この中間生成物 (c) 5 g (0.023 mol) を100 mLのクロロホルムに溶解させた溶液に、1.5当量のコハク酸モノメチル及び1.5当量の水溶性カルボジイミド化合物 (WSC) である1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドを加えて、密栓した。そこへ窒素を封入し、終夜撹拌させた。得られた反応溶液から溶媒を蒸発させて得た残留物を、シリカゲルカラム (展開溶媒 : クロロホルム90容/メタノール10容の混合溶媒) にかけて所定のフラクションを分取して、このフラクションから溶媒を蒸発させて重合性基を含むカルボン酸エステルモノマー (e) を得た。また、得られた化合物 (e) は、NMR、マトリックス支援レーザーイオン化-飛行時間型質量分析器 (MALDI-TOF-MS) により目的物であることを確認した。

[0164] (逆相懸濁重合反応によるポリマー粒子の合成)

密閉可能な重合容器に40 mLの0.2%ソルビタンモノステアレート含有シクロヘキサンを装入し、窒素で系中の酸素をパージした。2 gの前記カルボン酸エステルモノマー (e) (6 mmol)、エチレングリコールジメタクリレート (EGDMA: メチルエステル含有モノマーに対して5 mol%)、1.5 mLの純水、及び0.0175 gのペルオキシ二硫酸カリウム (全モノマーに対して1 mol%) からなる混合物を、窒素パージしながら前記重合容器に導入し、ソルビタンモノステアレート含有シクロヘキサン中に分散させた。窒素パージを停止し密閉した後、攪拌しながら70℃で16時間反応させた。

生成したポリマー粒子を遠心分離により回収し、エタノールと水とで洗浄した。

[0165] (ヒドラジド基の導入)

ポリマー粒子500 mgを容器にとり、ヒドラジーン水和物 (原液、98体積%以上) 4 mLを加えて攪拌し、室温で2時間静置した。反応後、ヒドラジーン水和物を除去し、メタノールで洗浄したのち、1 M塩酸でリンスした。その後さらに純水で洗浄し、ヒドラジド基を有するポリマー粒子を得た。

[0166] (界面活性剤による被覆)

前記ヒドラジド基を有するポリマー粒子100 mgをソルビタンモノステアレートの2 wt%シクロヘキサン溶液1 mLに分散させた後、遠心分離した。その後、上清を除去してから真空乾燥し、界面活性剤で被覆された、実施例1のポリマー粒子 (ポリマー粒子と界面活性剤とを含有する組成物) を得た。

[0167] [実施例2]

実施例1において界面活性剤で被覆する際、ソルビタンモノステアレートの2 wt%シクロヘキサン溶液の代わりにソルビタントリスステアレートの2 wt%シクロヘキサン溶液を使用した点以外は実施例1と同様にして、実施

例 2 の組成物を得た。

[0168] [実施例 3]

実施例 1 において界面活性剤で被覆する際、ソルビタンモノステアレートの 2 w t % シクロヘキサン溶液の代わりにラウリル硫酸ナトリウムの 2 w t % エタノール溶液を使用した点以外は実施例 1 と同様にして、実施例 3 の組成物を得た。

[0169] [実施例 4]

(懸濁重合反応によるポリマー粒子の合成)

密閉可能な重合容器に 40 mL の 0.15 % ポリビニルアルコール水溶液を装入し、窒素で系中の酸素をパージした。2 g の前記カルボン酸エステルモノマー (e) (6 mmol)、エチレングリコールジメタクリレート (EGDMA: メチルエステル含有モノマーに対して 5 mol %)、1.5 mL のクロロホルム、及び 0.011 g のアゾビスイソブチロニトリル (全モノマーに対して 1 mol %) からなる混合物を、窒素パージしながら前記重合容器に導入し、ポリビニルアルコール水溶液中に分散させた。窒素パージを停止し密閉した後、攪拌しながら 70 °C で 16 時間反応させた。生成したポリマー粒子を遠心分離により回収し、メタノールと水とで洗浄した。

[0170] (ヒドラジド基の導入)

ポリマー粒子 500 mg を容器にとり、ヒドラジーン水和物 (原液、98 体積%以上) 4 mL を加えて攪拌し、室温で 2 時間静置した。反応後、ヒドラジーン水和物を除去し、メタノールで洗浄したのち、1 M 塩酸でリンスした。その後さらに純水で洗浄し、ヒドラジド基を有するポリマー粒子を得た。

[0171] (界面活性剤による被覆)

前記ヒドラジド基を有するポリマー粒子 100 mg をソルビタンモノステアレートの 2 w t % シクロヘキサン溶液 1 mL に分散させた後、遠心分離した。その後、上清を除去してから真空乾燥し、界面活性剤で被覆された、実施例 4 のポリマー粒子 (ポリマー粒子と界面活性剤とを含有する組成物) を

得た。

[0172] [実施例 5]

実施例 4 において界面活性剤で被覆する際、ソルビタンモノステアレートの 2 w t %シクロヘキサン溶液の代わりにソルビタントリスステアレートの 2 w t %シクロヘキサン溶液を使用した点以外は実施例 1 と同様にして、実施例 5 の組成物を得た。

[0173] [実施例 6]

実施例 4 において界面活性剤で被覆する際、ソルビタンモノステアレートの 2 w t %シクロヘキサン溶液の代わりにラウリル硫酸ナトリウムの 2 w t %メタノール溶液を使用した点以外は実施例 1 と同様にして、実施例 6 の組成物を得た。

[0174] [比較例 1]

実施例 1 において界面活性剤で被覆しなかったものを比較例 1 の組成物とした。

[0175] [比較例 2]

実施例 4 において界面活性剤で被覆しなかったものを比較例 2 の組成物とした。

[0176] <実験例 1>

[6 0℃保存前後での粒径の変化]

実施例および比較例の組成物それぞれ 5 0 m g を 2 3℃で 1 2 時間以上真空乾燥した。続いて、各組成物をプラスチック製容器に入れ、さらにシリカゲル乾燥剤とともにアルミ袋に封入した。これを 6 0℃のオーブン内で 3 日間保温処理した。

[0177] 6 0℃で保温処理した組成物の粒度分布を日機装株式会社製レーザー回折・散乱式粒度分析計 M T 3 3 0 0 を用いて測定し、組成物中のポリマー粒子の平均粒径を 6 0℃保存前の測定結果と比較した。

[0178] また、次式 (F 2) に基づいて平均粒径の変化率を算出した。式 (F 2) 中、C は保温処理後の組成物中のポリマー粒子の平均粒径を表し、D は保温

処理前の組成物中のポリマー粒子の平均粒径を表す。

$$\text{変化率 (\%)} = C / D \times 100 \quad \dots (F2)$$

[0179] [表1]

	実施例1	実施例2	実施例3	比較例1	実施例4	実施例5	実施例6	比較例2
保存前 (μm)	82	83	81	80	68	69	69	68
保存後 (μm)	78	81	80	123	67	70	68	118
変化率 (%)	95.1	97.6	98.8	153.8	98.5	101.4	98.6	173.5

[0180] 界面活性剤処理を施した実施例ではいずれも60℃保温処理前後で粒径変化はほとんどなかったが、界面活性剤処理をしなかった比較例では60℃保温処理後に粒径が大きくなった。すなわち、界面活性剤処理により60℃保温処理における凝集が抑制できたと考えられた。

[0181] <実験例2>

[60℃保温処理前後でのヒドラジド基量の変化]

実施例および比較例の組成物について、60℃で保温処理前後でのヒドラジド基量を、2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)を用いて測定した。すなわち、各組成物をTNBS水溶液に分散させ、分散前後の345nmの吸光度の違いからヒドラジド基量を算出した。測定結果を次に示した。

[0182] [表2]

	実施例1	実施例2	実施例3	比較例1	実施例4	実施例5	実施例6	比較例2
保存前	3.0	2.9	3.0	3.0	3.4	3.3	3.5	3.4
保存後	3.0	3.0	2.9	3.0	3.4	3.4	3.4	3.3

単位: $\mu\text{mol}/\text{mg}$

[0183] 実施例でも比較例でも、60℃保温処理によりヒドラジド基量が変わらなかった。すなわち、界面活性剤処理の有無に関わらず、60℃でのヒドラジド基量の保存性が示された。

[0184] <実験例3>

[ポリマー粒子の吸湿性評価]

実施例および比較例の組成物を一定量プラスチック製容器に採取し、大気

解放（相対湿度 50 %、25 °C の環境下で静置）して 4 時間後の質量の変化率を調査し、吸湿性を評価した。質量の変化率は、下記式（F 1）に基づいて算出した。式（F 1）中、A は相対湿度 50 %、25 °C の環境下で 4 時間静置処理後の組成物の質量を表し、B は静置処理前の組成物の質量を表す。

$$\text{変化率 (\%)} = A / B \times 100 \quad \dots (F 1)$$

[0185] 実験は複数回行った。代表的な実験結果を表 3 及び表 4 に示す。

[0186] [表3]

	実施例 1	実施例 2	実施例 3	比較例 1	実施例 4	実施例 5	実施例 6	比較例 2
質量 変化率 (%)	108	106	109	115	107	105	108	110

[0187] [表4]

	実施例 1	実施例 2	実施例 3	比較例 1	実施例 4	実施例 5	実施例 6	比較例 2
質量 変化率 (%)	108	107	111	118	108	106	109	116

[0188] その結果、多少のばらつきが存在するものの、実施例の組成物は、比較例の組成物よりも吸湿が少ない（質量の変化率が小さい）ことが示された。また、比較例 1 では、吸湿に伴い、ポリマー粒子が凝集したり、プラスチック容器に吸着したりするなど、操作性が悪化したが、界面活性剤処理した実施例の組成物ではいずれもそのような現象は認められなかった。

[0189] <実験例 4>

[ウシ血清由来 IgG の糖鎖分析]

1 生体試料の予備処理

ウシ血清由来 IgG 1 mg を 100 mM 重炭酸アンモニウム 50 μL に溶解させた後、120 mM DTT（ジチオスレイトール）を 5 μL 加え、60 °C で 30 分間反応させた。反応終了後、123 mM IAA（ヨードアセトアミド）10 μL を加えて遮光下、室温で 1 時間反応させた。続いて 400 U のトリプシンによってプロテアーゼ処理をし、タンパク質部分をペプチド断片化した。反応溶液を 90 °C で 5 分処理した後、5 U のグリコシダーゼ

Fによる処理を行って糖鎖をペプチドから遊離させ、予備処理済の生体試料を得た。

[0190] 2 糖鎖捕捉工程 (a)、洗浄工程 (b)

実施例および比較例のポリマー粒子（組成物）各5mgが入ったディスポカラムに予備処理済の生体試料の懸濁物20μL及び180μLの2%酢酸／アセトニトリル溶液を加え、80℃で1時間反応させた。反応は開放系で行い、溶媒が完全に蒸発し組成物が乾固した状態であることを目視で確認した。続いて、グアニジン溶液、純水、メタノール、トリエチルアミン溶液にてポリマー粒子を洗浄後、10%無水酢酸／メタノールを添加し、室温で30分間反応させ、未反応のヒドラジド基をキャッピングした。キャッピング後、純水にて組成物を洗浄した。

[0191] 3 糖鎖遊離工程 (c)

次に該ディスポカラムに純水20μL及び2%酢酸／アセトニトリル溶液180μLを加え、70℃で1.5時間反応させた。反応は開放系で行い、溶媒が完全に蒸発し組成物が乾固した状態であることを目視で確認した。

[0192] 4 標識化工程 (d)

さらに、2-aminobenzamide (2-AB) 及びシアノ水素化ホウ素ナトリウムの終濃度がそれぞれ0.35M、1Mになるように30%酢酸／DMSO混合溶媒に溶解させて調整した溶液50μLを添加し、60℃で2時間反応させた。

[0193] 前記、糖鎖捕捉工程 (a)、洗浄工程 (b)、糖鎖遊離工程 (c)、及び標識化工程 (d) は同一の容器であるディスポカラム内で行なった。

[0194] 5 余剰試薬除去工程

反応溶液50μLを回収し、アセトニトリルで10倍に希釈した後、シリカゲル (Latrobeads、6RS-8060、三菱化学ヤトロン製) を詰めたカラムに添加してシリカゲルに標識糖鎖を吸着させた。アセトニトリル、アセトニトリル／水混合溶液 (95:5) にてカラムを洗浄後、純水50μLにて標識糖鎖を回収した。

[0195] 6 標識化糖鎖の検出

得られた標識糖鎖をHPLCにて測定した。アミノカラム（Shodex Asahipak NH2P-50）を用いて励起波長330nm、蛍光波長420nmにて測定した。その結果、2ABにより標識化された糖鎖が検出された。

[0196] 図1に、実施例1、4および比較例1、2で得られたHPLCチャートから求めたピーク総面積を示す。図1に示すように、いずれの組成物でもピーク総面積は同等の大きさであった。すなわち、総糖鎖捕捉量はいずれも同等であった。他の実施例でも同様の結果であった。

[0197] 図2に、実施例1、4および比較例1、2より得られたHPLCチャートで検出された主要7ピークの面積比率を示した。横軸はピーク番号を示す。図2に示すように、いずれの組成物でも各ピークの面積比率は同等で、同じ糖鎖が同じ比率で捕捉できていることが分かった。他の実施例でも同様の結果であった。

[0198] 以上より、界面活性剤は糖鎖捕捉性能を阻害することがないことが示された。

<実験例5>

[加速試験]

実施例4および比較例2の組成物を一定量プラスチック製容器に採取し、約23℃で12時間以上真空乾燥した後、シリカゲル乾燥剤とともにアルミ袋に封入し、密閉した状態で37℃で3か月保存した。この処理は、別途実施した、アレニウスプロットの結果から、4℃で2.8年の保存に相当する。

[0199] これらの組成物を水に分散させ、ピペットで吸引したところ、比較例2の組成物はピペットの先端にポリマー粒子が詰まったのに対し、実施例4の組成物ではそのような現象は認められなかった。

[0200] 続いてこれらの粒子の粒度分布を上述したものと同様にして測定し、静置処理の前後で平均粒径を比較したところ、比較例2の組成物中のポリマー粒

子では $68\mu\text{m}$ から $133\mu\text{m}$ に大きく増加し、凝集が進行していたのに対し、実施例4の組成物中のポリマー粒子では $68\mu\text{m}$ から $85\mu\text{m}$ への変化に留まっていた。

[0201] また、静置処理後の実施例4の組成物と、上記静置処理を行っていた期間 4°C で保存していた実施例4の組成物について、ヒドラジド基量を求めたところ、いずれも製造直後と同じであり、差は認められなかった。

[0202] 更に、 $0.1\mu\text{g}$ のマルトヘプタオースを用いて、実験例4と同様にして糖鎖捕捉性能を検討した。図3は、糖鎖捕捉性能の検討結果を示すグラフである。図3に示すように、静置処理の前後で、HPLCチャートから求めたピーク総面積に変化は認められなかった。この結果は、静置処理後の組成物が、糖鎖捕捉性能を維持していることを示す。

[0203] 以上の結果から、実施例の組成物は、糖鎖捕捉性能を維持したまま、従来よりも凝集を抑制できることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0204] 本発明のポリマー粒子は、糖鎖捕捉能に加えて品質安定性や操作性に優れている。糖鎖研究はもとより、天然物からの糖鎖回収や糖鎖標準物質の製造にも利用でき、さらには、糖鎖分析による疾患マーカーの探索や糖鎖分析による診断など医療の分野にも応用可能である。

請求の範囲

[請求項1] 糖鎖を捕捉するための官能基を有するポリマー粒子を含有し、下記式（F 1）で算出される質量の変化率が90%超112%未満である、組成物。

$$\text{変化率（\%）} = A / B \times 100 \quad \dots (F 1)$$

[式（F 1）中、Aは相対湿度50%、25℃の環境下で4時間静置処理後の前記組成物の質量を表し、Bは前記静置処理前の前記組成物の質量を表す。]

[請求項2] 下記式（F 2）で算出される平均粒径の変化率が90%以上120%以下である、請求項1に記載の組成物。

$$\text{変化率（\%）} = C / D \times 100 \quad \dots (F 2)$$

[式（F 2）中、Cは前記組成物を乾燥条件下60℃で3日間保温処理後に水に懸濁し、レーザー回折・散乱式粒度分析計で測定した、前記組成物中のポリマー粒子の平均粒径を表し、Dは前記保温処理前の前記組成物を水に懸濁し、レーザー回折・散乱式粒度分析計で測定した、前記組成物中のポリマー粒子の平均粒径を表す。]

[請求項3] 前記ポリマー粒子を含有する組成物が、さらに界面活性剤を含有する、請求項1または2に記載の組成物。

[請求項4] 前記ポリマー粒子が前記界面活性剤で被覆されている、請求項3に記載の組成物。

[請求項5] 前記界面活性剤がソルビタン脂肪酸エステル又はアニオン性界面活性剤である、請求項3または4に記載の組成物。

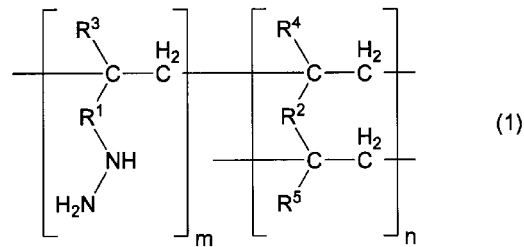
[請求項6] 前記ポリマー粒子の平均粒径が0.05 μm以上1000 μm以下である、請求項1ないし5のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項7] 前記官能基がヒドラジド基またはアミノオキシ基である、請求項1ないし6のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項8] 前記ポリマー粒子が下記式（1）で表される架橋型ポリマー構造を有するものである、請求項1ないし7のいずれか一項に記載の組成物

。

[化1]

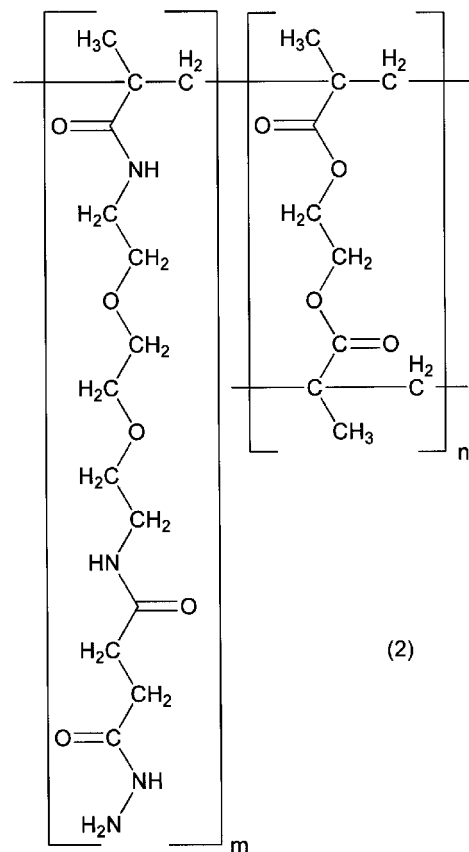


[(式 (1) 中、 R^1 , R^2 は $-O-$, $-S-$, $-NH-$, $-CO-$, $-CONH-$ で中断されてもよい炭素数1以上20以下の炭化水素鎖を表し、 R^3 , R^4 , R^5 は H , CH_3 又は炭素数2以上5以下の炭化水素鎖を表し、 $m:n=99:1\sim70:30$ である。]

[請求項9]

前記架橋型ポリマー構造が下記式 (2) で表されるものである、請求項8に記載の組成物。

[化2]



[式(2)中、 $m:n=99:1\sim70:30$ である。]

[請求項10]

糖鎖試料の調製方法であって、

(a) 糖鎖を含む試料及び請求項1ないし9のいずれか一項に記載の組成物を混合し、前記糖鎖及び前記組成物中のポリマー粒子を結合させる工程、

(b) 前記糖鎖が結合した前記ポリマー粒子を洗浄する工程、

(c) 前記糖鎖が結合した前記ポリマー粒子から前記糖鎖を遊離させる工程、

を含む方法。

[請求項11]

試料中の糖鎖の分析方法であって、

(a) 糖鎖を含む試料及び請求項1ないし9のいずれか一項に記載の組成物を混合し、前記糖鎖及び前記組成物中のポリマー粒子を結合させる工程、

(b) 前記糖鎖が結合した前記ポリマー粒子を洗浄する工程、

(c) 前記糖鎖が結合した前記ポリマー粒子から前記糖鎖を遊離させる工程、

(d) 遊離させた前記糖鎖を分析する工程、

を含む方法。