

明 細 書

発明の名称：クロマトグラフィー担体の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、クロマトグラフィー担体の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、抗体医薬等に代表されるバイオ医薬品の分野では、タンパク質等の標的物質の発現技術が著しく進展し、それに伴いクロマトグラフィー等による精製工程での生産性の向上が求められている。生産性を向上させる方法として、宿主細胞由来タンパク質、デオキシリボ核酸のような、医薬品原料に混在する不純物の濃度を1回の精製で可能な限り低減させ、精製回数や工程を少なくすることが挙げられ、これを実現できるクロマトグラフィー担体の需要が高まっている。このようなクロマトグラフィー担体の製造方法としては、例えば、重合反応や架橋反応、官能基導入反応等により合成高分子系固相担体や天然高分子系固相担体を得て、これにタンパク質性リガンドを結合させる手法が知られている（特許文献1）。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開2017-37069号公報

特許文献2：WO2008/146906号パンフレット

特許文献3：WO2019/121296号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] また、上記で得られたタンパク質性リガンドが結合された担体には、未反応のタンパク質性リガンドをはじめとする、各製造工程で生じた不純物が付着している。そのため、抗体精製時に未反応のタンパク質性リガンドが漏出して抗体に混入するのを防ぐことを目的として、リガンドを結合させた後に水酸化ナトリウム水溶液や塩酸で攪拌洗浄されることがあるが（特許文献2

、3)、水酸化ナトリウムや塩酸によりリガンドがダメージを受け、抗体又はその断片に対する動的結合容量が低下することがあった。また、このような洗浄をするのみの場合、担体同士の凝集が生じやすくなることもわかってきた。担体同士の凝集が発生しやすいものは、ロット間で性能のばらつきを生じさせ得る。

[0005] 本発明が解決しようとする課題は、抗体又はその断片に対する動的結合容量が大きく、タンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくく、且つ担体同士の凝集が生じにくいクロマトグラフィー担体を簡便に製造できる方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、タンパク質性リガンドを固相担体に結合させた後に洗浄を行うことに加えて、タンパク質性リガンドの結合に先立って、過酸化水素を含む洗浄液、過酢酸を含む洗浄液、及びpH0以上3以下又はpH12.5超14以下の洗浄液（但し、過酸化水素を含む洗浄液及び過酢酸を含む洗浄液を除く）から選ばれる少なくとも1種という特定の洗浄液で固相担体を洗浄することにより、固相担体表面が親水性化され、クロマトグラフィー担体の抗体又はその断片に対する動的結合容量が大きくなり且つ担体同士の凝集が生じにくくなるだけでなく、上記洗浄がタンパク質性リガンド結合に先立ったものであるにも拘わらず、タンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくなることを見出した。

[0007] すなわち、本発明は、以下の<1>～<16>を提供するものである。

<1> 以下の固相担体洗浄工程、リガンド結合工程及びリガンド結合担体洗浄工程を備える、クロマトグラフィー担体の製造方法（以下、本発明のクロマトグラフィー担体の製造方法とも称する）。

（固相担体洗浄工程）過酸化水素を含む洗浄液、過酢酸を含む洗浄液、及びpH0以上3以下又はpH12.5超14以下の洗浄液（但し、過酸化水素を含む洗浄液及び過酢酸を含む洗浄液を除く）から選ばれる少なくとも1種の洗浄液で固相担体を洗浄し、固相担体表面を親水性化させる工程

(リガンド結合工程) 前記固相担体洗浄工程で洗浄された固相担体にタンパク質性リガンドを結合させる工程

(リガンド結合担体洗浄工程) 前記リガンド結合工程で得られた担体を洗浄する工程

[0008] <2> 前記リガンド結合担体洗浄工程が、pH 3 超 12.5 以下の洗浄液で洗浄する工程である、<1>に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

<3> 前記リガンド結合担体洗浄工程が、前記リガンド結合工程で得られた担体を pH 3 超 12.5 以下の洗浄液で合計 2 回以上洗浄する工程である、<2>に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

<4> 前記リガンド結合担体洗浄工程が、前記リガンド結合工程で得られた担体を pH 3 超 12.5 以下の洗浄液で合計 3～4 回洗浄する工程である、<2>に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

[0009] <5> 前記リガンド結合担体洗浄工程が、以下のリガンド結合担体ベッド形成工程、リガンド結合担体通液洗浄工程及びリガンド結合担体攪拌洗浄工程を含む工程である、<1>～<4>のいずれかに記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

(リガンド結合担体ベッド形成工程) リガンド結合担体を容器内に充填しリガンド結合担体ベッドを形成させる工程

(リガンド結合担体通液洗浄工程) 前記リガンド結合担体ベッド形成工程で形成されたりガンド結合担体ベッドを、pH 3 超 12.5 以下の洗浄液で 1 回以上通液洗浄する工程

(リガンド結合担体攪拌洗浄工程) 前記リガンド結合担体通液洗浄工程後のリガンド結合担体を、pH 3 超 12.5 以下の洗浄液中で 1 回以上攪拌洗浄する工程

[0010] <6> 前記リガンド結合担体通液洗浄工程の通液洗浄回数が、2～5 回である、<5>に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

[0011] <7> 前記固相担体洗浄工程が、以下の固相担体ベッド形成工程及び固

相担体通液洗浄工程を含む、固相担体表面を親水性化させる工程である、＜1＞～＜6＞のいずれかに記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

（固相担体ベッド形成工程）固相担体を容器内に充填し固相担体ベッドを形成させる工程

（固相担体通液洗浄工程）前記固相担体ベッド形成工程で形成された固相担体ベッドを、過酸化水素を含む洗浄液、過酢酸を含む洗浄液、及びpH0以上3以下又はpH12.5超14以下の洗浄液（但し、過酸化水素を含む洗浄液及び過酢酸を含む洗浄液を除く）から選ばれる少なくとも1種の洗浄液で1回以上通液洗浄する工程

[0012] ＜8＞ 前記固相担体洗浄工程が、以下の固相担体ベッド形成工程、固相担体通液洗浄工程及び固相担体攪拌洗浄工程を含む、固相担体表面を親水性化させる工程である、＜1＞～＜6＞のいずれかに記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

（固相担体ベッド形成工程）固相担体を容器内に充填し固相担体ベッドを形成させる工程

（固相担体通液洗浄工程）前記固相担体ベッド形成工程で形成された固相担体ベッドを、過酸化水素を含む洗浄液、過酢酸を含む洗浄液、及びpH0以上3以下又はpH12.5超14以下の洗浄液（但し、過酸化水素を含む洗浄液及び過酢酸を含む洗浄液を除く）から選ばれる少なくとも1種の洗浄液で1回以上通液洗浄する工程

（固相担体攪拌洗浄工程）前記固相担体通液洗浄工程後の固相担体を、過酸化水素を含む洗浄液、過酢酸を含む洗浄液、及びpH0以上3以下又はpH12.5超14以下の洗浄液（但し、過酸化水素を含む洗浄液及び過酢酸を含む洗浄液を除く）から選ばれる少なくとも1種の洗浄液中で1回以上攪拌洗浄する工程

[0013] ＜9＞ 前記固相担体通液洗浄工程の通液洗浄回数が、2～5回である、＜7＞又は＜8＞に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

＜10＞ 前記固相担体通液洗浄工程の通液洗浄回数と、前記リガンド結

合担体通液洗浄工程の通液洗浄回数との合計回数が、2～8回である、＜7＞又は＜8＞に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

＜11＞ 前記リガンド結合担体洗浄工程が、pH10.5以上12以下の洗浄液で洗浄する工程である、＜1＞～＜10＞のいずれかに記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

＜12＞ 前記固相担体洗浄工程で用いる洗浄液が、強酸性pH調整剤又は強塩基性pH調整剤を含み、前記リガンド結合担体洗浄工程で用いる洗浄液が、酸性pH調整剤又は塩基性pH調整剤を含む、＜1＞～＜11＞のいずれかに記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

[0014] ＜13＞ 前記固相担体洗浄工程で用いる洗浄液が、pH13.2以上14以下の洗浄液（但し、過酸化水素を含む洗浄液及び過酢酸を含む洗浄液を除く）である、＜1＞～＜12＞のいずれかに記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

＜14＞ 前記固相担体洗浄工程が、過酸化水素を含む洗浄液、過酢酸を含む洗浄液、及びpH0以上3以下又はpH12.5超14以下の洗浄液（但し、過酸化水素を含む洗浄液及び過酢酸を含む洗浄液を除く）から選ばれる少なくとも1種の洗浄液で固相担体を合計2回以上洗浄する工程である、＜1＞～＜13＞のいずれかに記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

[0015] ＜15＞ 前記固相担体洗浄工程が、過酸化水素を含む洗浄液、過酢酸を含む洗浄液、及びpH0以上3以下又はpH12.5超14以下の洗浄液（但し、過酸化水素を含む洗浄液及び過酢酸を含む洗浄液を除く）から選ばれる少なくとも1種の洗浄液で固相担体を合計3～4回洗浄する工程である、＜1＞～＜14＞のいずれかに記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

＜16＞ 前記タンパク質性リガンドが、改変プロテインAである、＜1＞～＜15＞のいずれかに記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

発明の効果

[0016] 本発明のクロマトグラフィー担体の製造方法によれば、抗体又はその断片に対する動的結合容量が大きく、タンパク質性リガンドが単離の際に漏出し

にくく、且つ担体同士の凝集が生じにくいクロマトグラフィー担体を簡便に製造できる。

発明を実施するための形態

[0017] [クロマトグラフィー担体の製造方法]

本発明のクロマトグラフィー担体の製造方法は、以下の固相担体洗浄工程、リガンド結合工程及びリガンド結合担体洗浄工程を備えるものである。

(固相担体洗浄工程) 過酸化水素を含む洗浄液、過酢酸を含む洗浄液、及び pH 0 以上 3 以下又は pH 1.2. 5 超 1.4 以下の洗浄液（但し、過酸化水素を含む洗浄液及び過酢酸を含む洗浄液を除く）から選ばれる少なくとも 1 種の洗浄液で固相担体を洗浄し、固相担体表面を親水性化させる工程

(リガンド結合工程) 前記固相担体洗浄工程で洗浄された固相担体にタンパク質性リガンドを結合させる工程

(リガンド結合担体洗浄工程) 前記リガンド結合工程で得られた担体を洗浄する工程

[0018] (固相担体洗浄工程)

固相担体洗浄工程は、過酸化水素を含む洗浄液、過酢酸を含む洗浄液、及び pH 0 以上 3 以下又は pH 1.2. 5 超 1.4 以下の洗浄液（但し、過酸化水素を含む洗浄液及び過酢酸を含む洗浄液を除く）から選ばれる少なくとも 1 種の洗浄液で固相担体を洗浄し、固相担体表面を親水性化させる工程である。本工程は、タンパク質性リガンドの結合に先立って行われる。

このような固相担体洗浄工程を備えることによって、抗体又はその断片に対する動的結合容量が大きく、タンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくく、且つ担体同士の凝集が生じにくいクロマトグラフィー担体を得られる。また、リガンド結合担体洗浄工程に用いる洗浄液として種々の pH のものを使用できるようになる。例えば、pH 3 超 1.2. 5 以下の洗浄液をリガンド結合担体洗浄工程に用いた場合であっても、タンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくいクロマトグラフィー担体を得られる。このようにして単離の際にリガンドが漏出しにくくなる理由は必ずしも明らかではないが、固

相担体洗浄工程によって固相担体表面が親水性化され優れた防汚性を備えたものとなり、その後のリガンド結合工程で一般的に付着する未反応のタンパク質性リガンドが、洗浄液のpHが例えば3超12.5以下であっても洗浄されやすくなったためと本発明者らは推察する。例えば、環状エーテル基や水酸基等のリガンドを結合可能な官能基、又はカルボニル結合等の官能基を固相担体が分子内に含む場合、これら官能基が加水分解されることで又は水酸基やカルボキシ基等が多量に存在することで親水性が高くなり優れた防汚性を備えたものになると本発明者らは推察する。

また、本発明のクロマトグラフィー担体の製造方法は、リガンドの結合に先立って固相担体を洗浄するものであるにも拘らず、リガンド結合工程で固相担体にリガンドが十分に結合され、抗体又はその断片に対する動的結合容量が大きいクロマトグラフィー担体を製造できる。このような動的結合容量が得られる理由についても必ずしも明らかではないが、複数の洗浄工程を適切なタイミングで組み合わせて行うことによって、クロマトグラフィー担体へのダメージを大きく低減できたことが理由の一つと本発明者らは推察する。

なお、本発明において「親水性化」とは、水に対する親和性が高くなることをいう。

[0019] 固相担体としては、リガンドを結合可能な官能基（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）を分子内に有するものが好ましい。このような固相担体を用いた場合に、タンパク質性リガンド低漏出性に特に優れたものが得やすくなる。

固相担体としては、粒子状固相担体、モノリス状固相担体、板状固相担体、膜状固相担体、繊維状固相担体、チップ状固相担体が挙げられるが、粒子状固相担体が好ましく、多孔質粒子状固相担体（以下、単に「多孔質粒子」とも称する）がより好ましい。

多孔質粒子としては、重合体を含む多孔質粒子が好ましい。このような多孔質粒子としては、アガロース、デキストラン、セルロース等の多糖類で構成される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、動的結合容量を大きくするためや粒子径の均一性を改善させるために、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。

固相担体は、市販品を用いても常法に従って製造したものを用いてもよい。ここで、固相担体の製造方法について説明する。

[0020] 固相担体として多孔質粒子を得る場合、多孔質粒子は、水系媒体中にモノマー組成物を分散させ懸濁重合させる工程（以下、工程 P 1 ともいう）を含む方法で製造できる。

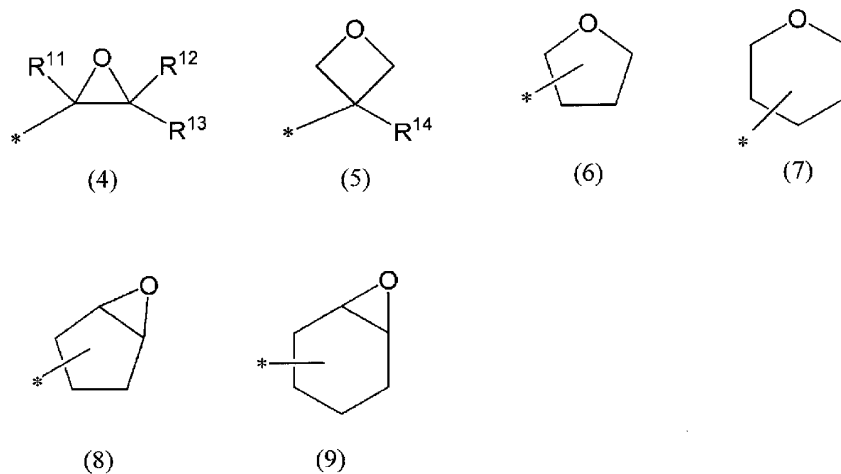
[0021] ー工程 P 1 ー

工程 P 1 で用いる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。この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、リガンドを結合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。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。環状エーテル基の具体例としては、以下の式（4）～（9）で表される環状エーテル基が挙げられるが、式（4）、（6）又は（9）で表される環状エーテル基が好ましく、式（4）で表される環状エーテル基がより好ましい。

[0022]

[化1]



[0023] [式中、 $R^{11} \sim R^{14}$ 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。]

[0024] $R^{11} \sim R^{14}$ 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。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、 $R^{11} \sim R^{14}$ としては、水素原子が好ましい。

[0025] 官能基含有モノマーとしては、リガンドを結合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）グリシジリエーテル、（イソプロペニルベンジル）グリシジリエーテル、（ビニルフェネチル）グリシジリエーテル、（ビニルフェニルブチル）グリシジリエーテル、（ビニルベンジルオキシエチル）グリシジリエーテル、（ビニルフェニル）グリシジリエーテル、（イソプロペニルフェニル）グリシジリエーテル、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；アリルグリシジリ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）アクリレートが特に好ましい。

[0026] 官能基含有モノマーの合計使用量としては、工程P1で使用するモノマー総量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、特に好ましくは55質量部以上であり、また、工程P1で使用するモノマー総量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、特に好ましくは85質量部以下である。

[0027] また、工程P1で用いるモノマー組成物は、上記官能基含有モノマーに加えて、さらに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。

他のモノマーとしては、リガンドを結合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。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。

[0028] 上記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使用できる。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。

[0029] 上記(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使用できる。

[0030] また、上記(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使用できる。

[0031] また、上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使用できる。

[0032] また、上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使用できる。

また、上記（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使用できる。

また、上記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使用できる。

[0033] 非架橋性モノマーの合計使用量としては、工程P1で使用するモノマー総量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、特に好ましくは0.1質量部以上であり、また、工程P1で使用するモノマー総量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、特に好ましくは5質量部以下である。

[0034] また、上記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使用できる。また、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。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。

[0035] 上記（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使用できる。

[0036] また、上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使用できる。

[0037] また、上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使用できる。

さらに、架橋性モノマーとしては、上記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] 架橋性モノマーの合計使用量としては、工程P1で使用するモノマー総量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、特に好ましくは10質量部以上であり、また、工程P1で使用するモノマー総量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、特に好ましくは30質量部以下である。

[0039] 工程P1で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、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。

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。

また、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] また、工程P1の具体的な方法としては、例えば、モノマー組成物及び必要に応じて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、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、モノマー組成物及び必要に応じて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水系媒体中に添加して重合させる方法、モノマー組成物及び必要に応じて多孔化剤を含む混合溶液（モノマー溶液）を、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。

- [0041] 重合開始剤としてはラジカル重合開始剤が好ましい。ラジカル重合開始剤としては、例えば、アゾ系開始剤、過氧化物系開始剤、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。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。
- [0042] 上記多孔化剤は、多孔質粒子を製造するために使用され、油滴内の重合において、モノマーと共に存在し、非重合成分として孔を形成する役割を有する。多孔化剤は、多孔質表面において容易に除去可能なものであれば特に限定されるものではなく、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。
- [0043] 上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の他、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。多孔化剤は単独で又は2種以上を混合して用いることができる。

上記多孔化剤の合計使用量は、通常、モノマー総量100質量部に対して40質量部以上600質量部以下程度である。

[0044] また、工程P1には、アルキル硫酸エステル塩、アルキルアリアル硫酸エステル塩、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製剤を用いてもよい。

[0045] また、工程P1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、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。

[0046] ー工程P2ー

また、固相担体洗浄工程に先立ち、工程P1で得られた多孔質粒子と、架橋剤及び親水化剤から選ばれる少なくとも1種とを反応させる工程（以下、工程P2ともいう）を行ってもよい。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。

工程P1で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、上記架橋反応によって、多孔質粒子が重合体分子内に有する官能基の一部に架橋剤が付加反応され、当該架橋剤由来の部分構造が導入される。これにより、上記官能基の残基同士が架橋剤由来の部分構造を介して架橋される。

また、工程P1で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、上記親水化反応によって、多孔質粒子が重合体分子内に有する官能基の一部に親水化剤が付加反応され、当該親水化剤由来の部分構造が導入される。

[0047] 工程 P 2 で用いる架橋剤は、リガンドを結合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が、リガンドを結合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。

[0048] 工程 P 1 で得られた多孔質粒子が環状エーテル基を有する場合には、具体的には、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。

工程 P 1 で得られた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、具体的には、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。

[0049] 上記のような $-C(=O)-NH-$ 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；N 1, N 1-(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(オキシアルカン酸)類等が挙げられる。架橋剤は、1 種を単独で又は 2

種以上を組み合わせ使用できる。これら架橋剤の中では、通液性、通液時の圧力抵抗特性及び防汚性を改善させるために、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。

[0050] また、工程 P 2 においては、 $-C(=O)-NH-$ 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。

[0051] 架橋剤の合計使用量は、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 0.8 モル当量以下であり、より好ましくは 0.05 モル当量以上 0.7 モル当量以下であり、特に好ましくは 0.1 モル当量以上 0.6 モル当量以下である。

[0052] 工程 P 2 で用いる親水化剤としては、防汚性やタンパク質性リガンド低漏出性を改善させるために、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。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。親水化剤は、1 種を単独で又は 2 種以上を組み合わせ使用できる。

これらの中でも、防汚性やタンパク質性リガンド低漏出性を改善させるために、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特に好ましい。

[0053] 親水化剤の合計使用量は、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 10 モル当量以下であり、より好ましくは 1 モル当量以上 8 モル当量以下であり、特に好ましくは 2 モル当量以

上6モル当量以下である。

[0054] 工程P2は、塩基性触媒存在下で行ってもよい。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使用できる。

[0055] また、工程P2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。

[0056] ー工程P3ー

また、リガンド結合工程でリンカー（スペーサー）を介してリガンドを多孔質粒子に結合させる場合には、固相担体洗浄工程に先立ち、工程P1又は工程P2で得られた多孔質粒子と、リンカーを与える化合物とを反応させる工程（以下、工程P3ともいう）を行ってもよい。

[0057] 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、工程P2で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。

リンカー導入反応は、反応効率を高めるために、pH7～14のバッファ

一中で行うのが好ましい。また、リンカー導入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。

[0058] ここで、固相担体洗浄工程について詳細に説明する。

固相担体洗浄工程は、過酸化水素を含む洗浄液、過酢酸を含む洗浄液、及びpH0以上3以下又はpH12.5超14以下の洗浄液（但し、過酸化水素を含む洗浄液及び過酢酸を含む洗浄液を除く）から選ばれる少なくとも1種の洗浄液（以下、「固相担体洗浄液」とも称する）で洗浄する工程であるが、固相担体洗浄液の中では、固相担体表面の親水性を高めるためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするために、pH0以上3以下又はpH12.5超14以下の洗浄液が好ましく、pH12.5超14以下の洗浄液がより好ましい。

固相担体洗浄液としては、水性洗浄液が好ましい。「水性洗浄液」とは、少なくとも水を含有する洗浄液を意味する。水性洗浄液としては、例えば、水又は水と低級アルコールとの混液を含有するものが挙げられる。低級アルコールとしては、エタノール及びイソプロパノールから選ばれる1種以上が挙げられる。

[0059] 過酸化水素を含む洗浄液のpHは、タンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするために、好ましくは4.5以上7未満、より好ましくは5以上6.8以下、特に好ましくは5.5以上6.5以下であり、最も好ましくは6以上6.5以下である。

また、過酸化水素の濃度は、タンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするために、上記洗浄液中、好ましくは0.001M以上10M以下、より好ましくは0.005M以上5M以下、特に好ましくは0.01M以上1M以下である。

過酢酸を含む洗浄液のpHは、タンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするために、好ましくは1以上7未満、より好ましくは2以上6以下、特に好ましくは3以上5以下であり、最も好ましくは4以上5以下である。

。

また、過酢酸の濃度は、タンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするために、上記洗浄液中、好ましくは0.001M以上5M以下、より好ましくは0.005M以上3M以下、特に好ましくは0.01M以上1M以下である。

[0060] 固相担体洗浄液には、過酸化水素を含む洗浄液及び過酢酸を含む洗浄液の他に、pH0以上3以下の洗浄液、pH12.5超14以下の洗浄液が包含される。

pH0以上3以下の洗浄液のpHは、固相担体表面の親水性を高めるためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするために、好ましくは0以上2.5以下、より好ましくは0以上2以下である。

pH12.5超14以下の洗浄液のpHは、固相担体表面の親水性を高めるためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするために、好ましくは12.7以上14以下、より好ましくは13以上14以下、特に好ましくは13.2以上14以下である。

pH12.5超14以下の洗浄液のpHを13.2以上14以下とした場合に、得られるクロマトグラフィー担体の固相担体表面の親水性が高くなり、また、タンパク質性リガンドが単離の際に特に漏出しにくくなる。

[0061] 固相担体洗浄液としては、固相担体表面の親水性を高めるためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするために、強酸性pH調整剤又は強塩基性pH調整剤を含むものが好ましく、強塩基性pH調整剤を含むものがより好ましい。

強酸性pH調整剤としては、硫酸、塩酸、硝酸等の無機酸系強酸性pH調整剤が好ましく、塩酸がより好ましい。また、強塩基性pH調整剤としては、水酸化リチウム、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム等のアルカリ金属水酸化物が好ましく、水酸化カリウム、水酸化ナトリウムがより好ましい。

強塩基性pH調整剤を用いた場合に、洗浄液のpHを12.5超14以下の範囲に調整しやすくなり、また、強酸性pH調整剤を用いた場合に、洗浄

液のpHを0以上5以下の範囲に調整しやすくなる。

また、強酸性pH調整剤又は強塩基性pH調整剤の濃度は、タンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするために、固相担体洗浄液中、好ましくは0.001M以上2.5M以下、より好ましくは0.005M以上10M以下、更に好ましくは0.01M以上5M以下、更に好ましくは0.05M以上2.5M以下、更に好ましくは0.25M以上1.5M以下、特に好ましくは0.5M以上1M以下である。

強酸性pH調整剤又は強塩基性pH調整剤の濃度を0.25M以上又は0.5M以上とした場合に、タンパク質性リガンド低漏出性に特に優れたものになる。

固相担体洗浄液は、所望のpHに調整するためや目的のpHを維持するために、緩衝剤や2種以上のpH調整剤を含んでいてもよい。

[0062] 固相担体洗浄液を用いた洗浄は合計1回でも合計2回以上でもよいが、固相担体表面の親水性を高めるためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするため、担体同士の凝集を抑えるために、好ましくは合計2回以上、より好ましくは合計2～20回、更に好ましくは合計2～15回、更に好ましくは合計2～10回、更に好ましくは合計2～8回、特に好ましくは合計3～4回である。なお、合計2回以上洗浄する場合、各回に使用する固相担体洗浄液の種類は同種でも異種でもよいが、同種が好ましい。

固相担体洗浄液を用いた洗浄回数を合計3回以上とした場合に、タンパク質性リガンド低漏出性に特に優れたものになる。また、固相担体洗浄液を用いた洗浄回数を合計4回以下とした場合に、低凝集性に特に優れたものになる。

[0063] 洗浄1回あたりの固相担体洗浄液の使用量は、固相担体の乾燥固形分100体積部に対して、好ましくは40体積部以上、より好ましくは60体積部以上、特に好ましくは80体積部以上であり、また、固相担体の乾燥固形分100体積部に対して、好ましくは1000体積部以下、より好ましくは500体積部以下、特に好ましくは300体積部以下である。具体的な範囲と

しては、固相担体の乾燥固形分 100 体積部に対して、40 体積部以上 100 体積部以下が好ましく、60 体積部以上 500 体積部以下がより好ましく、80 体積部以上 300 体積部以下が特に好ましい。

[0064] 洗浄温度は特に限定されないが、通常 10～50℃の範囲、好ましくは 15～45℃の範囲である。

また、バッチ式洗浄でも連続式洗浄でもよい。

[0065] 固相担体洗浄液を用いた洗浄の手法は特に限定されない。例えば、通液洗浄、攪拌洗浄、静置洗浄等が挙げられる。この中でも、固相担体表面の親水性を高めるためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするため、動的結合容量を大きくするため、担体同士の凝集を抑えるために、通液洗浄、攪拌洗浄が好ましく、置換効率を更に改善するためには通液洗浄が、担体同士の凝集を抑えるためには攪拌洗浄が、それぞれより好ましく、通液洗浄と攪拌洗浄との組み合わせが特に好ましい。通液洗浄と攪拌洗浄を行う場合、その先後や回数は特に限定されないが、通液洗浄の後に攪拌洗浄を行い、これらを少なくとも 1 回ずつ行うのが好ましい。

固相担体洗浄工程として通液洗浄と攪拌洗浄とを組み合わせで行った場合、タンパク質性リガンド低漏出性、低凝集性、置換効率に特に優れたものになる。

なお、合計 2 回以上洗浄する場合、各回で使用する洗浄手法の種類は同種でも異種でもよい。

[0066] 通液洗浄は、固相担体ベッドに固相担体洗浄液を 1 回以上通液するものであればよいが、通液洗浄を行う場合、固相担体洗浄工程としては、以下の固相担体ベッド形成工程及び固相担体通液洗浄工程を含むものが好ましい。

（固相担体ベッド形成工程）固相担体を容器内に充填し固相担体ベッドを形成させる工程

（固相担体通液洗浄工程）前記固相担体ベッド形成工程で形成された固相担体ベッドを、過酸化水素を含む洗浄液、過酢酸を含む洗浄液、及び pH 0 以上 3 以下又は pH 12.5 超 14 以下の洗浄液（但し、過酸化水素を含む洗

浄液及び過酢酸を含む洗浄液を除く）から選ばれる少なくとも１種の洗浄液で１回以上通液洗浄する工程

[0067] （固相担体ベッド形成工程）

本発明において「固相担体ベッド」は、固相担体固形分層を意味し、乾燥していても湿潤していてもよい。固相担体ベッドを形成させる具体的な手法としては、固相担体のスラリー（例えば、水、アルコール（エタノール、イソプロパノール等）、水とアルコールとの混液、緩衝液（炭酸バッファー等）等を分散媒とするもの）を容器に投入し、重力沈降や遠心沈降で固相担体固形分を容器底部に沈降させ、固液分離操作（例えば、デカンテーション、遠心分離、ろ過等）によりスラリーの液相を除去する手法が挙げられる。

また、容器としては、固相担体ベッド形成工程で形成された固相担体ベッドに、固相担体通液洗浄工程でそのまま洗浄液を通液でき簡便なため、固液分離器が好ましい。具体的には、フィルタ付きカラム容器、フィルタ付き漏斗、フィルタ付き遠心分離機、フィルターリアクター等が挙げられる。

[0068] 固相担体の含有割合は、スラリー中、好ましくは５体積％以上、より好ましくは１５体積％以上、特に好ましくは３０体積％以上であり、また、スラリー中、好ましくは８０体積％以下、より好ましくは７５体積％以下、特に好ましくは７０体積％以下である。具体的な範囲としては、スラリー中、５体積％以上８０体積％以下が好ましく、１５体積％以上７５体積％以下がより好ましく、３０体積％以上７０体積％以下が特に好ましい。

なお、スラリー中の担体の体積％は、例えば、コーニング社製の容量２５０ｍＬのガラス製メスシリンダー（ＪＩＳ Ｒ３５０５クラスＡ準拠）に、スラリー２００ｍＬを充填させ、静置して３時間経過後の沈降体積を、上記メスシリンダーに充填させたスラリーの体積で除することにより算出できる。

[0069] （固相担体通液洗浄工程）

本発明において固相担体の「通液洗浄」とは、固相担体ベッドに洗浄液を通液することを意味し、例えば、固相担体ベッドの一方向から反対方向に洗

浄液を通過させるようにして洗浄される。具体的には、フィルタ付きカラム容器、フィルタプレート、フィルタ付き漏斗、ブフナー漏斗、N u t s c h フィルタ、フィルタ付き遠心分離機、フィルターリアクター等の固液分離器を用いて洗浄することができる。なお、固相担体ベッドに流入させた洗浄液を好ましくは30秒間～3時間、より好ましくは2分間～60分間インキュベートしてから流出させてもよい。

固相担体通液洗浄工程の通液洗浄回数は、固相担体表面の親水性を高めるためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするため、担体同士の凝集を抑えるために、好ましくは1回以上、より好ましくは1～20回、更に好ましくは1～10回、更に好ましくは1～5回、更に好ましくは2～5回、特に好ましくは2～3回である。

通液洗浄回数を2回以上とした場合に、タンパク質性リガンド低漏出性に特に優れたものになる。また、通液洗浄回数を3回以下とした場合に、低凝集性に特に優れたものになる。

固相担体洗浄液の種類や1回あたりの固相担体洗浄液の使用量は、上記のとおりである。

なお、通液洗浄は、重力による流下を利用した通液洗浄でも加圧通液による洗浄でも、減圧による通液洗浄でもよい。

[0070] (固相担体攪拌洗浄工程)

攪拌洗浄は、固相担体洗浄液中で固相担体を攪拌するものであればよいが、固相担体表面の親水性を高めるためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするため、動的結合容量を大きくするため、担体同士の凝集を抑えるために、固相担体通液洗浄工程後の固相担体を、固相担体洗浄液中で1回以上攪拌洗浄するものが好ましい。

固相担体攪拌洗浄工程の攪拌洗浄回数は、固相担体表面の親水性を高めるためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするため、担体同士の凝集を抑えるために、好ましくは1回以上、より好ましくは1～20回、更に好ましくは1～10回、更に好ましくは1～5回、更に好ましくは1～

2回、特に好ましくは1回である。

攪拌洗浄回数を1回以上とした場合に、低凝集性に特に優れたものになる。また、攪拌洗浄回数を2回以下とした場合に、タンパク質性リガンド低漏出性に特に優れたものになる。

固相担体攪拌洗浄工程の攪拌速度としては、10～150rpmが好ましく、20～100rpmがより好ましく、30～80rpmが特に好ましい。

固相担体攪拌洗浄工程1回あたりの攪拌時間は、好ましくは30秒間～300分間、より好ましくは1分間～180分間、更に好ましくは2分間～120分間、特に好ましくは5分間～90分間である。

固相担体洗浄液の種類や1回あたりの固相担体洗浄液の使用量は、上記のとおりである。

なお、固液分離器を用いて固相担体通液洗浄工程を行った場合、固相担体通液洗浄工程で使用した固液分離器のろ液排出口を開口させたまま固相担体攪拌洗浄工程を実施することで連続式攪拌洗浄を実施でき、また、閉口させたものを容器として固相担体攪拌洗浄工程に用いることでバッチ式攪拌洗浄を実施できる。

[0071] なお、固相担体洗浄終了後、リガンド結合工程に先立ち、必要に応じて洗浄液の除去や水又は水と低級アルコールとの混液への固相担体の分散をしてもよい。

[0072] (リガンド結合工程)

リガンド結合工程は、固相担体洗浄工程で洗浄された固相担体にタンパク質性リガンドを結合させる工程である。

タンパク質性リガンドとしては、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選ばれる1種又は2種以上のリガンドが好ましく、動的結合容量を大きくするためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするために、プロテインA、改変プロテインAが好ましく、改変プロテインAがより好ましい。

また、プロテイン A にはイムノグロブリンに対して結合能を有する、E、D、A、B 及び C の 5 つのドメインが含まれるが、上記リガンドの中でも、B 及び C ドメインの改変型ドメインを有するプロテイン A の類縁物質が好ましく、C ドメインの改変型ドメインを有するプロテイン A の類縁物質がより好ましい。

[0073] また、タンパク質性リガンドの中でも、動的結合容量を大きくするためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするために、配列番号 1 (プロテイン A の C ドメイン) で示されるアミノ酸配列と 85 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列に対して、少なくとも、以下の (a) ~ (i) から選ばれる 1 又は 2 以上の置換がされたアミノ酸配列を有するタンパク質性リガンドが好ましい。このようなタンパク質性リガンドの中でも、以下の (a) ~ (i) から選ばれる 2 以上の置換がされたアミノ酸配列を有するものが好ましく、以下の (a) ~ (i) から選ばれる 2 ~ 9 の置換がされたアミノ酸配列を有するものがより好ましく、以下の (a) ~ (i) から選ばれる 2 ~ 6 の置換がされたアミノ酸配列を有するものが特に好ましい。また、このようなアミノ酸配列を 2 個以上有するリガンドが好ましく、2 ~ 12 個有するリガンドがより好ましく、4 ~ 7 個有するリガンドが特に好ましい。アミノ酸配列を 2 個以上含む場合、それらのアミノ酸配列は同種でも異類でもよい。

[0074] (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

[0075] アミノ酸残基の置換の手段としては、ドメインをコードするポリヌクレオチドに対する部位特異的突然変異 (Site-specific mutation) 等の公知の手段が挙げられる。

ここで、アミノ酸配列に関する「85%以上の相同性」とは、好ましくは90%以上の相同性、より好ましくは95%以上の相同性、更に好ましくは97%以上の相同性、更に好ましくは98%以上の相同性、特に好ましくは99%以上の相同性をいう。

[0076] 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. et al, 1994, Nucleic Acids Res., 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、欧州バイオインフォマティクス研究所 (European Bioinformatics Institute: EBI [www.ebi.ac.uk/index.html]) や、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。

[0077] 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（A l a又はA）、アルギニン（A r g又はR）、アスパラギン（A s n又はN）、アスパラギン酸（A s p又はD）、システイン（C y s又はC）、グルタミン（G l n又はQ）、グルタミン酸（G l u又はE）、グリシン（G l y又はG）、ヒスチジン（H i s又はH）、イソロイシン（I l e又はI）、ロイシン（L e u又はL）、リジン（L y s又はK）、メチオニン（M e t又はM）、フェニルアラニン（P h e又はF）、プロリン（P r o又はP）、セリン（S e r又はS）、トレオニン（T h r又はT）、トリプトファン（T r p又はW）、チロシン（T y r又はY）、バリン（V a l又はV）、及び任意のアミノ酸残基（X a a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。

[0078] 本明細書において、アミノ酸配列の特定の位置に対する「前」及び「後」の位置とは、それぞれ、該特定の位置のN末端側及びC末端側に隣接する位置をいう。例えば、特定の位置の「前」及び「後」の位置へアミノ酸残基を挿入する場合、該特定の位置のN末端側及びC末端側に隣接する位置に、挿入後のアミノ酸残基が配置される。

[0079] 好ましい実施形態において、タンパク質性リガンドは、配列番号1で示されるアミノ酸配列と85%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質性リガンド（親ドメイン）に対して、上記の（a）～（i）から選ばれる1又は2以上の置換を行うことによって製造される。

[0080] 配列番号1で示されるアミノ酸配列と85%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質性リガンド（親ドメイン）を置換する手段としては、親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方法が挙げられる。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（s p l i c i n g b y o v e r l a p e x t e

nsion) –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。

製造されたりガンドは、イムノグロブリン結合活性を有し、イムノグロブリン結合ドメインとして機能する。

[0081] タンパク質性リガンドの好ましい例としては、配列番号1 (プロテインAのCドメイン) で示されるアミノ酸配列と85%以上の相同性を有するアミノ酸配列に対して、少なくとも、以下の(a)～(i)から選ばれる1又は2以上の置換がされたアミノ酸配列が2個以上直鎖状に連結されたものが挙げられる。なお、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。

具体的には、配列番号2～4及び同配列番号と85%以上の相同性を有する(ただし、配列番号1で示されるアミノ酸配列と85%以上の相同性を有する)アミノ酸配列ドメインの3～5量体である改変プロテインAが挙げられるが、タンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするために、好ましくは配列番号2～3及び同配列番号と85%以上の相同性を有する(ただし、配列番号1で示されるアミノ酸配列と85%以上の相同性を有する)アミノ酸配列ドメインの3～5量体である改変プロテインAである。

[0082] タンパク質性リガンドの結合量は、動的結合容量を大きくするために、固相担体の乾燥重量1g当たり、好ましくは10mg以上300mg以下、より好ましくは25mg以上150mg以下である。

[0083] リガンド結合工程における固相担体へのタンパク質性リガンドの結合は常法と同様にして行えばよい。リガンド結合法としては、化学結合法が好ましい。例えば、リガンドを結合可能な官能基にリガンド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号パンフレット、国際公開第2015/041218号パンフレット等の記載を参考にして行えばよい。具体的には、固相担体の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。リガンド結合反応は、反応効率を高めるために、 $pH 7 \sim 14$ のバッファー中で行うのが好ましい。また、リガンド結合反応の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。

[0084] また、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. 他著、*rEur. J. Biochem.*, 1989年, 186巻, 557-561頁）や、リンカー（スペーサー）を介してリガンドを固相担体に結合する方法（米国特許第5,260,373号、特開2010-133733号公報、特開2010-133734号公報）、会合性基によりリガンドを固相担体上に集積させる方法（特開2011-256176号公報）等を利用して結合してもよい。

[0085] 本発明のクロマトグラフィー担体の製造方法としては、防汚性を高めるためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするために、リガンド結合工程とリガンド結合担体洗浄工程の間に、リガンド結合担体親水化工程を更に備え、リガンド結合担体親水化工程で得られた親水性基含有リガンド結合担体を前記リガンド結合工程後のリガンド結合担体としてリガンド結合担体洗浄工程で用いる方法が好ましい。

（リガンド結合担体親水化工程）リガンド結合工程でリガンドが結合された担体と、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とを反応させる工程

[0086] リガンド結合担体親水化工程で用いる、親水性基を分子内に合計で2個以上有する化合物としては、防汚性を高めるためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするために、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個有する化合物が好ましい。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。親水性基を分子内に合計で2個以上有する化合物は、1種を単独で又は2種以上を組み合わせ使用できる。

これらの中でも、防汚性を高めるためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするために、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特に好ましい。

[0087] リガンド結合担体親水化工程における親水性基を分子内に合計で2個以上有する化合物の合計使用量は、リガンド結合担体（乾燥固形分）100質量部に対して、好ましくは1質量部以上1000質量部以下であり、より好ましくは10質量部以上800質量部以下であり、特に好ましくは100質量部以上600質量部以下である。

[0088] リガンド結合担体親水化工程は、塩基性触媒存在下で行ってもよい。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使用できる。

[0089] また、リガンド結合担体親水化工程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。

[0090] （リガンド結合担体洗浄工程）

リガンド結合担体洗浄工程は、リガンド結合工程で得られた担体を洗浄する工程である。

リガンド結合担体洗浄工程は、洗浄液（以下、「リガンド結合担体洗浄液」とも称する）で洗浄するのが好ましい。

リガンド結合担体洗浄液としては、水性洗浄液が好ましい。「水性洗浄液」とは、少なくとも水を含有する洗浄液を意味する。水性洗浄液としては、

例えば、水又は水と低級アルコールとの混液を含有するものが挙げられる。低級アルコールとしては、エタノール及びイソプロパノールから選ばれる１種以上が挙げられる。

[0091] リガンド結合担体洗浄液のpHは、固相担体表面の親水性を高めるためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするため、動的結合容量を大きくするために、好ましくは3超、より好ましくは6以上、更に好ましくは7以上、更に好ましくは8.5以上、更に好ましくは9.5以上、特に好ましくは10.5以上であり、また、動的結合容量を大きくするために、好ましくは12.5以下、より好ましくは12以下、特に好ましくは11.8以下である。具体的な範囲としては、pH3超12.5以下が好ましく、pH6以上12.5以下がより好ましく、pH7以上12.5以下が更に好ましく、pH8.5以上12以下が更に好ましく、pH9.5以上12以下が更に好ましく、pH10.5以上12以下が更に好ましく、pH10.5以上11.8以下が特に好ましい。

本発明のクロマトグラフィー担体の製造方法によれば、リガンド結合担体洗浄工程に用いる洗浄液のpHが上記のような温和なpH領域の場合であっても、タンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくいクロマトグラフィー担体を得られる。また、リガンド結合担体洗浄工程に用いる洗浄液のpHを上記のような温和なpH領域にした場合には動的結合容量が大きくなるため、優れた動的結合容量と優れた低漏出性が両立される。

リガンド結合担体洗浄液のpHを8.5以上、9.5以上又は10.5以上とした場合に、動的結合容量及びタンパク質性リガンド低漏出性に特に優れたものになる。また、リガンド結合担体洗浄液のpHを12以下又は11.8以下とした場合に、動的結合容量に特に優れたものになる。

[0092] リガンド結合担体洗浄液は、上記pH領域とするために、pH調整剤を含むものが好ましい。

pH調整剤は、酸性pH調整剤、塩基性pH調整剤に大別される。具体的には、硫酸、塩酸、硝酸等の無機酸系強酸性pH調整剤；リン酸二水素ナト

リウム、炭酸、リン酸、フッ化水素、硫化水素等の無機酸系弱酸性 pH 調整剤；酢酸、シュウ酸等の有機酸系弱酸性 pH 調整剤；アルカリ金属水酸化物、炭酸ナトリウム、リン酸三ナトリウム等の無機塩基系強塩基性 pH 調整剤；トリエチルアミン等の有機塩基系強塩基性 pH 調整剤；炭酸水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、アンモニア、水酸化銅、水酸化マグネシウム、水酸化亜鉛、水酸化鉄、水酸化アルミニウム等の無機塩基系弱塩基性 pH 調整剤；ジエタノールアミン等の有機塩基系弱塩基性 pH 調整剤等が挙げられる。

アルカリ金属水酸化物としては、水酸化リチウム、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム等が挙げられる。

[0093] また、pH 調整剤の濃度は、タンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするために、リガンド結合担体洗浄液中、好ましくは 0.001 M 以上 10 M 以下、より好ましくは 0.005 M 以上 2.5 M 以下、更に好ましくは 0.01 M 以上 0.5 M 以下、特に好ましくは 0.05 M 以上 0.3 M 以下である。

上記 pH 調整剤の濃度を 0.05 M 以上とした場合に、タンパク質性リガンド低漏出性に特に優れたものになる。また、上記 pH 調整剤の濃度を 0.3 M 以下とした場合に、動的結合容量に特に優れたものになる。

リガンド結合担体洗浄液は、所望の pH に調整するためや目的の pH を維持するために、緩衝剤や 2 種以上の pH 調整剤を含んでいてもよい。

[0094] リガンド結合担体洗浄液を用いた洗浄は合計 1 回でも合計 2 回以上でもよいが、固相担体表面の親水性を高めるためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするため、置換効率を更に良好にするため、担体同士の凝集を抑えるために、好ましくは合計 2 回以上、より好ましくは合計 2～20 回、更に好ましくは合計 2～15 回、更に好ましくは合計 2～10 回、更に好ましくは合計 2～8 回、特に好ましくは合計 3～4 回である。なお、合計 2 回以上洗浄する場合、各回に使用するリガンド結合担体洗浄液の種類は同種でも異種でもよいが、同種が好ましい。

リガンド結合担体洗浄液を用いた洗浄回数を合計3回以上とした場合に、置換効率が良好となり、また得られるクロマトグラフィー担体がタンパク質リガンド低漏出性に特に優れたものになる。また、リガンド結合担体洗浄液を用いた洗浄回数を合計4回以下とした場合に、低凝集性に特に優れたものになる。

[0095] 洗浄1回あたりのリガンド結合担体洗浄液の使用量は、リガンド結合担体の乾燥固形分100体積部に対して、好ましくは40体積部以上、より好ましくは60体積部以上、特に好ましくは80体積部以上であり、また、リガンド結合担体の乾燥固形分100体積部に対して、好ましくは1000体積部以下、より好ましくは500体積部以下、特に好ましくは300体積部以下である。具体的な範囲としては、リガンド結合担体の乾燥固形分100体積部に対して、40体積部以上1000体積部以下が好ましく、60体積部以上500体積部以下がより好ましく、80体積部以上300体積部以下が特に好ましい。

[0096] 洗浄温度は特に限定されないが、通常10～50℃の範囲、好ましくは15～45℃の範囲である。

また、バッチ式洗浄でも連続式洗浄でもよい。

[0097] リガンド結合担体洗浄液を用いた洗浄の手法は特に限定されない。例えば、通液洗浄、攪拌洗浄、静置洗浄等が挙げられる。この中でも、固相担体表面の親水性を高めるためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするため、動的結合容量を大きくするため、担体同士の凝集を抑えるために、通液洗浄、攪拌洗浄が好ましく、置換効率を更に改善するためには通液洗浄が、担体同士の凝集を抑えるためには攪拌洗浄が、それぞれより好ましく、通液洗浄と攪拌洗浄との組み合わせが特に好ましい。通液洗浄と攪拌洗浄を行う場合、その先後や回数は特に限定されないが、通液洗浄の後に攪拌洗浄を行い、これらを少なくとも1回ずつ行うのが好ましい。

リガンド結合担体洗浄工程として通液洗浄と攪拌洗浄とを組み合わせで行った場合、タンパク質性リガンド低漏出性、低凝集性、置換効率に特に優れた

たものになる。

なお、合計2回以上洗浄する場合、各回で使用する洗浄手法の種類は同種でも異種でもよい。

[0098] 通液洗浄は、リガンド結合担体ベッドにリガンド結合担体洗浄液を1回以上通液するものであればよいが、通液洗浄を行う場合、リガンド結合担体洗浄工程としては、以下のリガンド結合担体ベッド形成工程及びリガンド結合担体通液洗浄工程を含むものが好ましい。

(リガンド結合担体ベッド形成工程) リガンド結合担体を容器内に充填しリガンド結合担体ベッドを形成させる工程

(リガンド結合担体通液洗浄工程) 前記リガンド結合担体ベッド形成工程で形成されたりガンド結合担体ベッドをリガンド結合担体洗浄液(好ましくはpH3超12.5以下の洗浄液)で1回以上通液洗浄する工程

[0099] (リガンド結合担体ベッド形成工程)

本発明において「リガンド結合担体ベッド」は、リガンド結合担体の固形分層を意味し、乾燥していても湿潤していてもよい。リガンド結合担体ベッドを形成させる具体的な手法としては、リガンド結合担体のスラリー(例えば、水、アルコール(エタノール、イソプロパノール等)、水とアルコールとの混液、緩衝液(炭酸バッファー等)等を分散媒とするもの)を容器に投入し、重力沈降や遠心沈降でリガンド結合担体固形分を容器底部に沈降させ、固液分離操作(例えば、デカンテーション、遠心分離、ろ過等)によりスラリーの液相を除去する手法が挙げられる。

また、容器としては、リガンド結合担体ベッド形成工程で形成されたりガンド結合担体ベッドに、リガンド結合担体通液洗浄工程でそのまま洗浄液を通液でき簡便なため、固液分離器が好ましい。具体的には、フィルタ付きカラム容器、フィルタ付き漏斗、フィルタ付き遠心分離機、フィルターリアクター等が挙げられる。

[0100] リガンド結合担体の含有割合は、スラリー中、好ましくは5体積%以上、より好ましくは15体積%以上、特に好ましくは30体積%以上であり、ま

た、スラリー中、好ましくは80体積%以下、より好ましくは75体積%以下、特に好ましくは70体積%以下である。具体的な範囲としては、スラリー中、5体積%以上80体積%以下が好ましく、15体積%以上75体積%以下がより好ましく、30体積%以上70体積%以下が特に好ましい。

なお、スラリー中の担体の体積%は、例えば、コーニング社製の容量250mLのガラス製メスシリンダー（J I S R 3 5 0 5 クラスA 準拠）に、スラリー200mLを充填させ、静置して3時間経過後の沈降体積を、上記メスシリンダーに充填させたスラリーの体積で除することにより算出できる。

[0101] （リガンド結合担体通液洗浄工程）

本発明においてリガンド結合担体の「通液洗浄」とは、リガンド結合担体ベッドに洗浄液を通液することを意味し、例えば、リガンド結合担体ベッドの一方向から反対方向に洗浄液を通過させるようにして洗浄される。具体的には、フィルタ付きカラム容器、フィルタープレート、フィルタ付き漏斗、ブフナー漏斗、N u t s c h フィルタ、フィルタ付き遠心分離機、フィルターリアクター等の固液分離器を用いて洗浄することができる。なお、リガンド結合担体ベッドに流入させた洗浄液を好ましくは30秒間～3時間、より好ましくは2分間～60分間インキュベートしてから流出させてもよい。

リガンド結合担体通液洗浄工程の通液洗浄回数は、固相担体表面の親水性を高めるためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするため、置換効率を更に良好にするため、担体同士の凝集を抑えるために、好ましくは1回以上、より好ましくは1～20回、更に好ましくは1～10回、更に好ましくは1～5回、更に好ましくは2～5回、特に好ましくは2～3回である。

通液洗浄回数を2回以上とした場合に、置換効率が良好になり、得られるクロマトグラフィー担体がタンパク質性リガンド低漏出性に特に優れたものになる。また、通液洗浄回数を3回以下とした場合に、低凝集性に特に優れたものになる。

[0102] 固相担体通液洗浄工程の通液洗浄回数と、リガンド結合担体通液洗浄工程の通液洗浄回数との合計回数は、固相担体表面の親水性を高めるためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするため、置換効率を更に良好にするため、担体同士の凝集を抑えるために、好ましくは2回以上、より好ましくは2～30回、更に好ましくは2～16回、更に好ましくは2～8回、更に好ましくは3～6回、特に好ましくは4～5回である。

固相担体通液洗浄工程の通液洗浄回数と、リガンド結合担体通液洗浄工程の通液洗浄回数との合計回数を4回以上とした場合に、置換効率が良好になり、得られるクロマトグラフィー担体がタンパク質性リガンド低漏出性に特に優れたものになる。また、固相担体通液洗浄工程の通液洗浄回数と、リガンド結合担体通液洗浄工程の通液洗浄回数との合計回数を5回以下とした場合に、低凝集性に特に優れたものになる。

[0103] リガンド結合担体洗浄液の種類や1回あたりのリガンド結合担体洗浄液の使用量は、上記のとおりである。

なお、通液洗浄は、重力による流下を利用した通液洗浄でも加圧通液による洗浄でも、減圧による通液洗浄でもよい。

[0104] (リガンド結合担体攪拌洗浄工程)

攪拌洗浄は、リガンド結合担体洗浄液中でリガンド結合担体を攪拌するものであればよいが、固相担体表面の親水性を高めるためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするため、動的結合容量を大きくするため、担体同士の凝集を抑えるために、リガンド結合担体通液洗浄工程後のリガンド結合担体を、リガンド結合担体洗浄液（好ましくはpH3超12.5以下の洗浄液）中で1回以上攪拌洗浄するものが好ましい。

リガンド結合担体攪拌洗浄工程の攪拌洗浄回数は、固相担体表面の親水性を高めるためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするため、担体同士の凝集を抑えるために、好ましくは1回以上、より好ましくは1～20回、更に好ましくは1～10回、更に好ましくは1～5回、更に好ましくは1～2回、特に好ましくは1回である。

攪拌洗浄回数を1回以上とした場合に、低凝集性に特に優れたものになる。また、攪拌洗浄回数を2回以下とした場合に、タンパク質性リガンド低漏性に特に優れたものになる。

[0105] 固相担体攪拌洗浄工程の攪拌洗浄回数と、リガンド結合担体攪拌洗浄工程の攪拌洗浄回数との合計回数は、固相担体表面の親水性を高めるためやタンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくくするため、置換効率を更に良好にするため、担体同士の凝集を抑えるために、好ましくは2回以上、より好ましくは2～30回、更に好ましくは2～16回、更に好ましくは2～8回、更に好ましくは2～6回、特に好ましくは2～3回である。

[0106] リガンド結合担体攪拌洗浄工程の攪拌速度としては、10～150rpmが好ましく、20～100rpmがより好ましく、30～80rpmが特に好ましい。

リガンド結合担体攪拌洗浄工程1回あたりの攪拌時間は、好ましくは30秒間～300分間、より好ましくは1分間～180分間、更に好ましくは2分間～60分間、特に好ましくは5分間～30分間である。

リガンド結合担体洗浄液の種類や1回あたりのリガンド結合担体洗浄液の使用量は、上記のとおりである。

なお、固液分離器を用いてリガンド結合担体通液洗浄工程を行った場合、リガンド結合担体通液洗浄工程で使用した固液分離器のろ液排出口を開口させたままリガンド結合担体攪拌洗浄工程を実施することで連続式攪拌洗浄を実施でき、また、閉口させたものを容器としてリガンド結合担体攪拌洗浄工程に用いることでバッチ式攪拌洗浄を実施できる。

[0107] なお、上記各工程で得られる反応生成物を、ろ過、洗浄等の分離手段で精製してもよい。また、分級してもよい。

[0108] そして、本発明のクロマトグラフィー担体の製造方法によれば、抗体又はその断片に対する動的結合容量が大きく、タンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくく、且つ担体同士の凝集が生じにくいクロマトグラフィー担体を製造できる。また、置換効率が良好であり製造が簡便である。なお、本発

明のクロマトグラフィー担体の製造方法は、リガンドの結合に先立って固相担体を洗浄するものであるにも拘らず、意外にも抗体又はその断片に対する動的結合容量が大きいクロマトグラフィー担体を製造できる。

また、リガンド結合担体洗浄工程に用いる洗浄液として種々のpHのものを使用できる。例えば、pH 3超12.5以下の洗浄液をリガンド結合担体洗浄工程に用いた場合であっても、タンパク質性リガンドが単離の際に漏出しにくいクロマトグラフィー担体を得られる。

[0109] なお、本明細書において「抗体」は、例えば、IgG、IgA、IgD、IgE、IgM、及びこれらのサブクラス等の任意のクラスのイムノグロブリン、それらの変異体を包含する概念である。また、本明細書において「抗体」は、ヒト化抗体等のキメラ抗体、抗体複合体、及び抗原認識部位を含む他のイムノグロブリン修飾体などであってもよい。

また、本明細書において「抗体の断片」は、抗原認識部位を含む抗体の断片であっても、抗原認識部位を含まない抗体の断片であってもよい。抗原認識部位を含まない抗体の断片としては、例えば、イムノグロブリンのFc領域のみからなるタンパク質、Fc融合タンパク質、及びそれらの変異体や修飾体などが挙げられる。

[0110] 上記のようにして得られるクロマトグラフィー担体の体積平均粒子径は、好ましくは40～150 μm であり、より好ましくは50～100 μm である。また、体積平均粒子径の変動係数は、好ましくは40%以下であり、より好ましくは30%以下である。

また、クロマトグラフィー担体の比表面積は、好ましくは1～500 m^2/g であり、より好ましくは10～300 m^2/g である。

また、クロマトグラフィー担体の体積平均細孔径は、好ましくは10～300 nm である。

なお、上記体積平均粒子径、変動係数、比表面積及び体積平均細孔径は、レーザー回析・散乱粒子径分布測定等により測定できる。

[0111] また、上記のようにして得られるクロマトグラフィー担体は、抗体又はそ

の断片を含む試料から抗体又はその断片を分離するのに有用であるが、試料としては、例えば、全血、血清、血漿、各種血球、血餅、血小板等の血液組成成分、尿、精液、母乳、汗、間質液、間質性リンパ液、骨髓液、組織液、唾液、胃液、関節液、胸水、胆汁、腹水、羊水等の体液、菌体液、細胞培養の培地、細胞培養上清、組織細胞の破碎液等の各種液体試料が挙げられる。

実施例

[0112] 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。

[0113] (調製例 リガンド(イムノグロブリン結合タンパク質)の調製)

イムノグロブリン結合タンパク質PrA-0～PrA-3を取得した。PrA-0は、プロテインAのCドメイン(配列番号1)が直列に連結したホモペンタマーを含むイムノグロブリン結合タンパク質である。PrA-1～PrA-3は、PrA-0の各イムノグロブリン結合ドメインに対して表1記載の変異を導入した変異体である。

[0114]

[表1]

イムノグロブリン結合タンパク質	親ドメイン	導入変異	変異ドメイン	ドメイン数
PrA-0	(Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys)	-	配列番号 1	5
PrA-1		A1V, G29A	配列番号 2	5
PrA-2		A1V, N3A, N6D, N11Q, G29A, K49R	配列番号 3	5
PrA-3		A1V, N11E, G29A	配列番号 4	5

[0115] PrA-0~PrA-3の発現と精製はそれぞれ以下のように行った。PrA-0~PrA-3をコードするプラスミドを用いて大腸菌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1 mMイソプロピルー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30 mMトリス緩衝液を添加して菌体を破碎した。得られた細胞破碎液から、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) によって組み換えイムノグロブリン結合タンパク質を精製した。精製したイムノグロブリン結合タンパク質を、10 mM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み換え型イムノグロブリン結合タンパク質の純度は95%以上であった。

[0116] [実施例1]

(工程1 多孔質粒子の重合工程)

448 gの純水にポリビニルアルコール (クラレ社製PVA-217) 2.69 gを添加し、加熱攪拌してポリビニルアルコールを溶解させ、水溶液を得た。一方、ジビニルベンゼン (和光純薬工業社製) 3.63 g、1-エチルー4-ビニルベンゼン (ChemSampCo社製) 0.36 g及びグリシジルメタクリレート (三菱ガス化学社製) 14.15 gからなる単量体組成物を、2-オクタノン (東洋合成社製) 29.38 gに溶解させ、単量体溶液を調製した。次いで、前記水溶液を、セパラブルフラスコ内に全量投入し、温度計、攪拌翼及び冷却管を装着して、温水バスにセットし、窒素雰囲気下で攪拌を開始した。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）1.34 gを添加し、内温を86℃にした。その後、86℃に温度を維持したまま、3時間攪拌を行った。次いで、反応液を冷却した後、斯かる反応液をろ過し、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。

その後、多孔質粒子1分散体100 gにアジピン酸ジヒドラジド（東京化成工業社製）0.956 g、チオグリセロール（東京化成工業社製）8 g及びジイソプロピルエチルアミン（東京化成工業社製）1.418 gを加え、70℃まで加温し、70℃を維持したまま、8時間攪拌を行った。次いで、反応液を冷却した後、斯かる反応液をろ過し、純水とエタノールで洗浄した。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2」と称する。

次に、多孔質粒子2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8.7 g、硫酸ナトリウム（和光純薬工業社製）1.2 g及び炭酸ナトリウム（和光純薬工業社製）0.10 gを混合して炭酸バッファー（pH 11.2）を得た。この炭酸バッファーに、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）0.5 g、及び多孔質粒子2を8 mL添加し23℃で16時間振とう攪拌した。次いで、反応液を濾過し、純水で洗浄を行った後に、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3」と称する。

[0117] （工程2 多孔質粒子の洗浄工程）

次いで、多孔質粒子3を洗浄した。

すなわち、フィルター（桐山製作所製桐山ロート用ろ紙）を敷いた漏斗（

桐山製作所製桐山ロート)を準備し、多孔質粒子3の分散体16 mLを減圧条件で漏斗に投入した。このようにして分散体から純水を吸引する過程により別することで、分散体の固形分を漏斗底部(ろ床)に沈降させてベッドを形成させた。

その後、減圧吸引させたまま0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液(pH 13.7)を8 mL投入し通液させることで上記ベッドの上方から下方に流れるように攪拌せずにそのまま濾過する「切り抜き洗浄(以下、単に「S」又は「洗浄S」ともいう)」を、2回実施した。

次に、漏斗先端を閉口しておき、0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液(pH 13.7)8 mLを投入し、漏斗内スラリー全体を攪拌(10分間、60 rpm)してから吸引濾過する「リスラリー洗浄(以下、単に「R」又は「洗浄R」ともいう)」を、1回実施した。

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4」と称する。

[0118] (工程3 リガンドの結合工程)

次いで、多孔質粒子4にリガンドを結合した。すなわち、純水28.8 g、硫酸ナトリウム(和光純薬工業社製)5.4 g、炭酸水素ナトリウム(和光純薬工業社製)0.2 g、及び炭酸ナトリウム(和光純薬工業社製)0.16 gを混合して炭酸バッファー(pH 9.3)を得た。この炭酸バッファー25 mLに、調製例で調製したイムノグロブリン結合タンパク質PrA-1(配列番号2のアミノ酸配列ドメインの5量体である改変プロテインA)を0.17 g、及び多孔質粒子4を8 mL添加し、23℃で1.5時間振とう攪拌し、反応液を濾過した。次いで、純水8.8 g、硫酸ナトリウム(和光純薬工業社製)0.1 g、及び水酸化ナトリウム(和光純薬工業社製)0.03 g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4.5 g添加して調製した親水化反応液を、リガンドを結合した多孔質粒子に添加し、23℃で16時間振とう攪拌することで、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、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5」と称する。

[0119] (工程4 結合工程後の洗浄工程)

次いで、多孔質粒子5を洗浄した。

すなわち、フィルター（桐山製作所製桐山ロート用ろ紙）を敷いた漏斗（桐山製作所製桐山ロート）を準備し、多孔質粒子5の分散体16mLを減圧条件で漏斗に投入した。このようにして分散体から純水を吸引する過程によりろ別することで、分散体の固形分を漏斗底部（ろ床）に沈降させてベッドを形成させた。

その後、減圧吸引させたまま0.1M 炭酸ナトリウム水溶液（pH11.4）を8mL投入し通液させることで「洗浄S」を2回実施した。

次に、漏斗先端を閉口しておき、0.1M 炭酸ナトリウム水溶液（pH11.4）を8mL投入し、漏斗内スラリー全体を攪拌（10分間、60rpm）してから吸引濾過する「洗浄R」を1回実施した。

次いで、クエン酸ナトリウムバッファーで中和した後に、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、「担体1」と称する。

[0120] [実施例2]

「工程2 多孔質粒子の洗浄工程」で用いた0.5M 水酸化ナトリウム水溶液を0.1M 塩酸に変更した以外は実施例1と同様の操作を行い、担体2を得た。

[実施例3]

「工程2 多孔質粒子の洗浄工程」で用いた0.5M 水酸化ナトリウム水溶液を1.0M 塩酸に変更した以外は実施例1と同様の操作を行い、担体3を得た。

[実施例4]

「工程2 多孔質粒子の洗浄工程」で用いた0.5M 水酸化ナトリウム

水溶液を0.01M 塩酸に変更した以外は実施例1と同様の操作を行い、担体4を得た。

[0121] 〔実施例5〕

「工程2 多孔質粒子の洗浄工程」で用いた0.5M 水酸化ナトリウム水溶液を0.1M 過酸化水素水溶液に変更した以外は実施例1と同様の操作を行い、担体5を得た。

〔実施例6〕

「工程2 多孔質粒子の洗浄工程」で用いた0.5M 水酸化ナトリウム水溶液を0.1M 過酢酸水溶液に変更した以外は実施例1と同様の操作を行い、担体6を得た。

〔実施例7〕

「工程2 多孔質粒子の洗浄工程」で用いた0.5M 水酸化ナトリウム水溶液を1.0M 水酸化ナトリウム水溶液に変更した以外は実施例1と同様の操作を行い、担体7を得た。

[0122] 〔実施例8〕

「工程2 多孔質粒子の洗浄工程」で用いた0.5M 水酸化ナトリウム水溶液を0.1M 水酸化ナトリウム水溶液に変更した以外は実施例1と同様の操作を行い、担体8を得た。

〔実施例9〕

「工程2 多孔質粒子の洗浄工程」で実施した「洗浄S」を2回から4回に変更した以外は実施例1と同様の操作を行い、担体9を得た。

〔実施例10〕

「工程2 多孔質粒子の洗浄工程」で実施した「洗浄S」を2回から1回に変更した以外は実施例1と同様の操作を行い、担体10を得た。

[0123] 〔実施例11〕

「工程4 結合工程後の洗浄工程」で用いた0.1M 炭酸ナトリウム水溶液(pH11.4)を0.1M リン酸ナトリウム水溶液(pH7.5)になるように0.1M リン酸2水素ナトリウム水溶液と0.1M リン酸水

素2ナトリウム水溶液を混合して調製した)に変更した以外は実施例1と同様の操作を行い、担体11を得た。

〔実施例12〕

「工程4 結合工程後の洗浄工程」で用いた0.1M 炭酸ナトリウム水溶液(pH11.4)を0.5M リン酸ナトリウム水溶液(pH7.5になるように0.5M リン酸2水素ナトリウム水溶液と0.5M リン酸水素2ナトリウム水溶液を混合して調製した)に変更した以外は実施例1と同様の操作を行い、担体12を得た。

〔実施例13〕

「工程4 結合工程後の洗浄工程」で用いた0.1M 炭酸ナトリウム水溶液(pH11.4)を0.01M リン酸ナトリウム水溶液(pH7.5になるように0.01M リン酸2水素ナトリウム水溶液と0.01M リン酸水素2ナトリウム水溶液を混合して調製した)に変更した以外は実施例1と同様の操作を行い、担体13を得た。

[0124] 〔実施例14〕

「工程4 結合工程後の洗浄工程」で用いた0.1M 炭酸ナトリウム水溶液(pH11.4)を0.1M 炭酸ナトリウム水溶液(pH12.5になるように水酸化ナトリウム水溶液を添加して調製した)に変更した以外は実施例1と同様の操作を行い、担体14を得た。

〔実施例15〕

「工程4 結合工程後の洗浄工程」で用いた0.1M 炭酸ナトリウム水溶液(pH11.4)を0.1M 炭酸ナトリウム水溶液(pH10になるように0.1M 炭酸水素ナトリウム水溶液と0.1M 炭酸ナトリウム水溶液を混合して調製した)に変更した以外は実施例1と同様の操作を行い、担体15を得た。

〔実施例16〕

「工程4 結合工程後の洗浄工程」で実施した「洗浄S」を2回から4回に変更した以外は実施例1と同様の操作を行い、担体16を得た。

[0125] 〔実施例 17〕

「工程 4 結合工程後の洗浄工程」で実施した「洗浄 S」を 2 回から 1 回に変更した以外は実施例 1 と同様の操作を行い、担体 17 を得た。

〔実施例 18〕

「工程 1 多孔質粒子の重合工程」で得た多孔質粒子 3 をアガロースベーズの粒子 (WorkBeads 40 ACT (Bio-works 社製)) に変更した以外は実施例 1 と同様の操作を行い、担体 18 を得た。

〔実施例 19〕

「工程 3 リガンドの結合工程」で使用したイムノグロブリン結合タンパク質 PrA-1 をイムノグロブリン結合タンパク質 PrA-0 に変更した以外は実施例 1 と同様の操作を行い、担体 19 を得た。

[0126] 〔実施例 20〕

「工程 3 リガンドの結合工程」で使用したイムノグロブリン結合タンパク質 PrA-1 をイムノグロブリン結合タンパク質 PrA-3 に変更した以外は実施例 1 と同様の操作を行い、担体 20 を得た。

〔実施例 21〕

「工程 3 リガンドの結合工程」で使用したイムノグロブリン結合タンパク質 PrA-1 をイムノグロブリン結合タンパク質 PrA-2 に変更した以外は実施例 1 と同様の操作を行い、担体 21 を得た。

[0127] 〔実施例 22〕

「工程 3 リガンドの結合工程」で使用したイムノグロブリン結合タンパク質 PrA-1 を Pierce (登録商標) Recombinant Protein L (Thermo fisher scientific 社製 21189) に変更した以外は実施例 1 と同様の操作を行い、担体 22 を得た。

〔実施例 23〕

「工程 3 リガンドの結合工程」で使用したイムノグロブリン結合タンパク質 PrA-1 を Pierce (登録商標) Recombinant Pr

rotein G (Thermo fisher scientific 社製 21193) に変更した以外は実施例 1 と同様の操作を行い、担体 23 を得た。

[0128] [比較例 1]

「工程 2 多孔質粒子の洗浄工程」を実施せず、また、「工程 4 結合工程後の洗浄工程」で用いた 0.1 M 炭酸ナトリウム水溶液 (pH 11.4) を 0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液 (pH 13.7) に変更した以外は実施例 1 と同様の操作を行い、比較例 1 の担体を得た。

[比較例 2]

「工程 2 多孔質粒子の洗浄工程」で用いた 0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液を純水に、また、「工程 4 結合工程後の洗浄工程」で用いた 0.1 M 炭酸ナトリウム水溶液 (pH 11.4) を 0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液 (pH 13.7) に変更した以外は実施例 1 と同様の操作を行い、比較例 2 の担体を得た。

[比較例 3]

「工程 2 多孔質粒子の洗浄工程」で用いた 0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液を 0.1 M 炭酸ナトリウム水溶液 (pH 11.4) に変更した以外は実施例 1 と同様の操作を行い、比較例 3 の担体を得た。

[0129] [比較例 4]

「工程 4 結合工程後の洗浄工程」で実施した「洗浄 S」を 2 回から 6 回に変更し、「洗浄 R」を 1 回から 0 回に変更した以外は比較例 1 と同様の操作を行い、比較例 4 の担体を得た。

[比較例 5]

「工程 4 結合工程後の洗浄工程」で実施した「洗浄 S」を 2 回から 0 回に変更し、「洗浄 R」を 1 回から 3 回に変更した以外は比較例 1 と同様の操作を行い、比較例 5 の担体を得た。

[比較例 6]

「工程 2 多孔質粒子の洗浄工程」を実施しなかった以外は実施例 1 と同

様の操作を行い、比較例6の担体を得た。

〔比較例7〕

「工程2 多孔質粒子の洗浄工程」で用いた0.5M 水酸化ナトリウム水溶液を純水に変更した以外は実施例1と同様の操作を行い、比較例7の担体を得た。

[0130] (試験例1) 動的結合容量(DBC)測定試験

Cytiva社製AKTA avant 25を用いて、保持時間4分におけるタンパク質(ヒトIgG抗体、LGC社製1875-0007)に対する実施例1~21及び比較例の各担体のDBCを測定した。カラム容器は容量4mL(5mmφ×200mm長)のものを、タンパク質は20mM リン酸ナトリウム/150mM 塩化ナトリウム水溶液(pH7.5)にタンパク質を5mg/mL溶解したものをそれぞれ使用し、溶出先端10%ブレイクスルーのときのタンパク質捕捉量とカラム充填体積からDBCを求め、以下の基準で評価した。結果を表2~4、6に示す。

[0131] (DBCの評価基準)

AA(優) : 62mg/mL以上
A(良) : 61mg/mL以上62mg/mL未満
B(不良) : 61mg/mL未満

[0132] (試験例2) プロテイン漏出量測定試験

Cytiva社製AKTA avant 25を用いて、保持時間4分で7.5mLの細胞培養液(Herceptin、titer:4.38mg/mL)を実施例及び比較例の各担体にロードし、その後溶出液で抗体を回収した。カラム容器は容量0.8mL(5mmφ×40mm長)のものを、溶出液は100mM 酢酸ナトリウム水溶液(pH3.3)をそれぞれ使用し、溶出前に20mM リン酸ナトリウム/500mM 塩化ナトリウム水溶液(pH7.5)による洗浄を実施した。

次に、実施例22の担体についてはProtein L-Ligand Leakage Elisa Kit(genaxxon bioscience)

n c e社製)を、実施例23の担体についてはP r o t e i n G E l i s a K i t (A l p h a D i a g n o s t i c I n t e r n a t i o n a l社製)を、その他の担体についてはP r o t e i n A E L I S A k i t (F 7 4 0)をそれぞれ使用して溶出液中のプロテイン量を、吸光度から溶出液中の抗体濃度を、それぞれ求めて、これらの値から回収した溶出液中の抗体量当たりのプロテイン漏出量 (l e a c h) を算出し、以下の基準で評価した。結果を表2～6に示す。

[0133] (プロテイン漏出量の評価基準)

A A A (特優) : 8 p p m / I g G 以下

A A (優) : 8 p p m / I g G 超 1 0 p p m / I g G 未満

A (良) : 1 0 p p m / I g G 以上 1 3 p p m / I g G 未満

B (不良) : 1 3 p p m / I g G 以上

[0134] (試験例3) 凝集量評価

実施例及び比較例の各担体の分散液 1 6 m L を金網メッシュ (大洋株式会社製、替アミ式ロート アミ 3 0 メッシュ) に通し、メッシュ上に残存した粒子を、純水を用いて回収した。回収した粒子分散液をアルミ皿に移し、2 0 0 ° C のホットプレートで 1 0 分間熱して乾燥粒子を得た。この乾燥粒子の重量を測定し、凝集量 (g) とした。得られた凝集量の値が小さいほど、凝集が少ないといえる。結果を表2～6に示す。

[0135] (試験例4) 洗浄液の置換効率

「工程4 結合工程後の洗浄工程」で最初に使用する洗浄液の電気伝導度を、H O R I B A 社製電気伝導度計を用いて測定した。続いて、「工程4 結合工程後の洗浄工程」で実施したクエン酸ナトリウムバッファーで洗浄する直前の最後のろ液を回収し、上記と同様にして電気伝導度を測定した。洗浄液の置換効率 (%) を、以下の式から算出した。この値が 1 0 0 % に近いほど、置換効率が良好といえる。結果を表2～6に示す。

$$\text{洗浄液の置換効率 (\%)} = (\text{ろ液の電気伝導度} / \text{洗浄液の電気伝導度}) \times 100$$

[0136] (試験例 5) 相対親水性評価

各実施例及び比較例の工程 1 ～ 2 で得られた多孔質粒子 4 (リガンド結合前粒子) の乾燥粒子 10 質量部に、水 30 質量部を添加して分散具合を目視で確認した。

粒子が塊になっておらずきれいに分散しているものは「A」、分散しているが小さい塊がみえるものは「B」、大きめの塊が残っているものは「C」とそれぞれ判定した。結果を表 2 ～ 6 に示す。

[0137]

[表2]

粒子種		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	実施例8
リガンド種		合成樹脂							
粒子洗浄 (リガンド結合前)	洗浄液種	塩酸				過酸化水素		過酢酸	
	濃度	水酸化ナトリウム				PrA-1		水酸化ナトリウム	
	pH	0.5M	0.1M	1.0M	0.01M	0.1M	0.1M	1.0M	0.1M
	洗浄方法	13.7	1.0	0	2.0	6.3	4.6	14	13
	相対親水性	SSR	SSR	SSR	SSR	SSR	SSR	SSR	SSR
担体洗浄 (リガンド結合後)	洗浄液種	A	B	B	B	B	B	A	B
	濃度	炭酸ナトリウム							
	pH	0.1M							
プロテイン漏出量	洗浄方法	SSR							
	測定値 (ppm/IgG)	7.2	10.7	10.0	12.5	11.1	10.7	6.5	10.5
	評価	AAA	A	A	A	A	A	AAA	A
	凝集量評価 (g)	0	0	0	0	0	0	0	0
	DBC	62.8	62.0	62.1	62.5	62.2	62.0	62.4	62.7
液の置換効率	測定値 (mg/ml)	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
	評価	101.1	101.9	99.8	98.1	100.6	99.4	98.3	101.0

[0138] [表3]

粒子種		実施例9	実施例10	実施例11	実施例12	実施例13	実施例14	実施例15
リガンド種		合成樹脂						
粒子洗浄 (リガンド結合 前)	洗浄液種	PrA-1						
	濃度	水酸化ナトリウム						
	pH	0.5M						
	洗浄方法	13.7						
担体洗浄 (リガンド結合 後)	相対親水性	SSSSR	SR	SSR				
		A	A	A				
	洗浄液種	リン酸ナトリウム ($\text{NaH}_2\text{PO}_4+\text{Na}_2\text{HPO}_4$)						
	濃度	0.1M	0.1M	0.5M	0.01M	0.1M*	炭酸ナトリウム+水酸化ナトリウム	炭酸ナトリウム+炭酸水素ナトリウム
プロテイン漏出 量	pH	11.4	7.5	7.5	7.5	12.5	10.0	
	洗浄方法	SSR						
	測定値 (ppm/1gG)	8.0	10.1	8.2	8.0	10.1	7.1	10.5
	評価	AAA	A	AA	AAA	A	AAA	A
凝集量評価 (g)		0.11	0	0	0	0	0	0
	測定値 (mg/ml)	62.4	62.8	62.1	61.3	62.0	61.4	62.3
	評価	AA	AA	AA	A	AA	A	AA
	液の置換効率	98.2	99.8	101.9	100.6	99.4	98.6	101.3

* 1: 炭酸ナトリウム濃度

[0139] [表4]

粒子種		合成樹脂		アガロース	PrA-0	PrA-3	PrA-2
リガンド種		PrA-1		水酸化ナトリウム			
粒子洗浄 (リガンド結合 前)	洗浄液種	0.5M					
	濃度	13.7					
	pH	SSR					
	洗浄方法	A					
	相対親水性	炭酸ナトリウム					
担体洗浄 (リガンド結合 後)	洗浄液種	0.1M					
	濃度	11.4					
	pH	SSR					
	洗浄方法	SSSR	SR	SSR			
	測定値 (ppm/IgG)	6.9	12.9	7.5	8.8	9.2	7.9
プロテイン漏出 量	評価	AAA	A	AAA	AA	AA	AAA
	凝集量評価 (g)	0.14	0	0	0	0	0
DBC	測定値 (mg/ml)	62.5	62.0	62.3	61.0	62.2	62.4
	評価	AA	AA	AA	A	AA	AA
液の置換効率		100.0	93.7	99.7	100.5	99.3	99.9

[0140] [表5]

		実施例22	実施例23
粒子種		合成樹脂	
リガンド種		プロテインL	プロテインG
粒子洗浄 (リガンド結合前)	洗浄液種	水酸化ナトリウム	
	濃度	0.5M	
	pH	13.7	
	洗浄方法	SSR	
	相対親水性	A	
担体洗浄 (リガンド結合後)	洗浄液種	炭酸ナトリウム	
	濃度	0.1M	
	pH	11.4	
	洗浄方法	SSR	
プロテイン漏出量	測定値 (ppm/IgG)	8.5	7.7
	評価	AA	AAA
凝集量評価 (g)		0	0
液の置換効率		99.2	99.8

[0141]

[表6]

粒子種		比較例1	比較例2	比較例3	比較例4	比較例5	比較例6	比較例7
リガンド種		合成樹脂 PrA-1						
粒子洗浄 (リガンド結合前)	洗浄液種	炭酸ナトリウム		洗浄なし		洗浄なし		純水 (pH7)
	濃度	0.1M		C		C		
	pH	11.4		C		C		
	洗浄方法	SSR		C		C		
	相対親水性	C		C		C		
	洗浄液種	水酸化ナトリウム		炭酸ナトリウム		炭酸ナトリウム		
担体洗浄 (リガンド結合後)	濃度	0.1M		0.5M		0.1M		
	pH	11.4		13.7		11.4		
	洗浄方法	SSR		SSSSS		RRR		
	測定値 (ppm/IgG)	14.2		10.6		14.2		
プロテイン漏出量	評価	B		A		B		
	凝集量評価 (g)	0		0.22		0		
DBC	測定値 (mg/ml)	62.2		60.8		60.4		
	評価	AA		B		B		
液の置換効率		99.6		101.1		94.6		
		101.1		100.3		100.2		

請求の範囲

- [請求項1] 以下の固相担体洗浄工程、リガンド結合工程及びリガンド結合担体洗浄工程を備える、クロマトグラフィー担体の製造方法。
- （固相担体洗浄工程）過酸化水素を含む洗浄液、過酢酸を含む洗浄液、及びpH0以上3以下又はpH12.5超14以下の洗浄液（但し、過酸化水素を含む洗浄液及び過酢酸を含む洗浄液を除く）から選ばれる少なくとも1種の洗浄液で固相担体を洗浄し、固相担体表面を親水性化させる工程
- （リガンド結合工程）前記固相担体洗浄工程で洗浄された固相担体にタンパク質性リガンドを結合させる工程
- （リガンド結合担体洗浄工程）前記リガンド結合工程で得られた担体を洗浄する工程
- [請求項2] 前記リガンド結合担体洗浄工程が、pH3超12.5以下の洗浄液で洗浄する工程である、請求項1に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。
- [請求項3] 前記リガンド結合担体洗浄工程が、前記リガンド結合工程で得られた担体をpH3超12.5以下の洗浄液で合計2回以上洗浄する工程である、請求項2に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。
- [請求項4] 前記リガンド結合担体洗浄工程が、前記リガンド結合工程で得られた担体をpH3超12.5以下の洗浄液で合計3～4回洗浄する工程である、請求項2に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。
- [請求項5] 前記リガンド結合担体洗浄工程が、以下のリガンド結合担体ベッド形成工程、リガンド結合担体通液洗浄工程及びリガンド結合担体攪拌洗浄工程を含む工程である、請求項1～4のいずれか1項に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。
- （リガンド結合担体ベッド形成工程）リガンド結合担体を容器内に充填しリガンド結合担体ベッドを形成させる工程
- （リガンド結合担体通液洗浄工程）前記リガンド結合担体ベッド形成

工程で形成されたりガンド結合担体ベッドを、pH 3 超 12.5 以下の洗浄液で 1 回以上通液洗浄する工程

(リガンド結合担体攪拌洗浄工程) 前記リガンド結合担体通液洗浄工程後のリガンド結合担体を、pH 3 超 12.5 以下の洗浄液中で 1 回以上攪拌洗浄する工程

[請求項6] 前記リガンド結合担体通液洗浄工程の通液洗浄回数が、2～5 回である、請求項5に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

[請求項7] 前記固相担体洗浄工程が、以下の固相担体ベッド形成工程及び固相担体通液洗浄工程を含む、固相担体表面を親水性化させる工程である、請求項1～6のいずれか1項に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

(固相担体ベッド形成工程) 固相担体を容器内に充填し固相担体ベッドを形成させる工程

(固相担体通液洗浄工程) 前記固相担体ベッド形成工程で形成された固相担体ベッドを、過酸化水素を含む洗浄液、過酢酸を含む洗浄液、及びpH 0 以上 3 以下又はpH 12.5 超 14 以下の洗浄液(但し、過酸化水素を含む洗浄液及び過酢酸を含む洗浄液を除く)から選ばれる少なくとも1種の洗浄液で1回以上通液洗浄する工程

[請求項8] 前記固相担体洗浄工程が、以下の固相担体ベッド形成工程、固相担体通液洗浄工程及び固相担体攪拌洗浄工程を含む、固相担体表面を親水性化させる工程である、請求項1～6のいずれか1項に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

(固相担体ベッド形成工程) 固相担体を容器内に充填し固相担体ベッドを形成させる工程

(固相担体通液洗浄工程) 前記固相担体ベッド形成工程で形成された固相担体ベッドを、過酸化水素を含む洗浄液、過酢酸を含む洗浄液、及びpH 0 以上 3 以下又はpH 12.5 超 14 以下の洗浄液(但し、過酸化水素を含む洗浄液及び過酢酸を含む洗浄液を除く)から選ばれ

る少なくとも1種の洗浄液で1回以上通液洗浄する工程

（固相担体攪拌洗浄工程）前記固相担体通液洗浄工程後の固相担体を、過酸化水素を含む洗浄液、過酢酸を含む洗浄液、及びpH0以上3以下又はpH12.5超14以下の洗浄液（但し、過酸化水素を含む洗浄液及び過酢酸を含む洗浄液を除く）から選ばれる少なくとも1種の洗浄液中で1回以上攪拌洗浄する工程

[請求項9] 前記固相担体通液洗浄工程の通液洗浄回数が、2～5回である、請求項7又は8に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

[請求項10] 前記固相担体通液洗浄工程の通液洗浄回数と、前記リガンド結合担体通液洗浄工程の通液洗浄回数との合計回数が、2～8回である、請求項7又は8に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

[請求項11] 前記リガンド結合担体洗浄工程が、pH10.5以上12以下の洗浄液で洗浄する工程である、請求項1～10のいずれか1項に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

[請求項12] 前記固相担体洗浄工程で用いる洗浄液が、強酸性pH調整剤又は強塩基性pH調整剤を含み、前記リガンド結合担体洗浄工程で用いる洗浄液が、酸性pH調整剤又は塩基性pH調整剤を含む、請求項1～11のいずれか1項に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

[請求項13] 前記固相担体洗浄工程で用いる洗浄液が、pH13.2以上14以下の洗浄液（但し、過酸化水素を含む洗浄液及び過酢酸を含む洗浄液を除く）である、請求項1～12のいずれか1項に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

[請求項14] 前記固相担体洗浄工程が、過酸化水素を含む洗浄液、過酢酸を含む洗浄液、及びpH0以上3以下又はpH12.5超14以下の洗浄液（但し、過酸化水素を含む洗浄液及び過酢酸を含む洗浄液を除く）から選ばれる少なくとも1種の洗浄液で固相担体を合計2回以上洗浄する工程である、請求項1～13のいずれか1項に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

[請求項15] 前記固相担体洗浄工程が、過酸化水素を含む洗浄液、過酢酸を含む洗浄液、及びpH0以上3以下又はpH12.5超14以下の洗浄液（但し、過酸化水素を含む洗浄液及び過酢酸を含む洗浄液を除く）から選ばれる少なくとも1種の洗浄液で固相担体を合計3～4回洗浄する工程である、請求項1～14のいずれか1項に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。

[請求項16] 前記タンパク質性リガンドが、改変プロテインAである、請求項1～15のいずれか1項に記載のクロマトグラフィー担体の製造方法。