

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-180716

(P2016-180716A)

(43) 公開日 平成28年10月13日(2016.10.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 U	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 0 1 J	
	GO 1 N 33/543 5 2 5 W	
	GO 1 N 33/543 5 2 5 E	
	GO 1 N 33/53 M	
審査請求 未請求 請求項の数 20 O L (全 23 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-61880 (P2015-61880)
 (22) 出願日 平成27年3月25日 (2015. 3. 25)

(71) 出願人 000002141
 住友ベークライト株式会社
 東京都品川区東品川2丁目5番8号
 (72) 発明者 松元孝行
 東京都品川区東品川二丁目5番8号 住友
 ベークライト株式会社内

(54) 【発明の名称】 アフィニティビーズ

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 生理活性物質の固定化能力に優れ、非特異吸着の少ない医療用粒子、および目的とする生体分子の捕捉能力に優れ、非特異的吸着の少ない分析用粒子を提供する。

【解決手段】 核となる粒子と、該粒子の表面に高分子化合物を含む層とを有する医療用粒子であって、式(1)を満たす。式(1) $A/B \geq 0.8$ mg/平方メートル、A: TG測定で求められる、核となる粒子1 g当たりの粒子の表面に高分子化合物を含む層の重量(mg)、B: 核となる粒子1 gあたりの表面積(平方メートル)

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核となる粒子と、該粒子の表面に高分子化合物を含む層とを有する医療用粒子であって、下記式（１）を満たす、医療用粒子。

$$\text{式（１）} \quad A/B \geq 0.8 \text{ mg/平方メートル}$$

A：TG測定で求められる、核となる粒子 1 g 当たりの粒子の表面に高分子化合物を含む層の重量（mg）

B：核となる粒子 1 g あたりの表面積（平方メートル）

10

【請求項 2】

前記核となる粒子が無機材料を含む、請求項 1 に記載の医療用粒子。

【請求項 3】

前記無機材料が酸化ケイ素である請求項 2 に記載の医療用粒子。

【請求項 4】

前記高分子化合物が、シランカップリング剤を介して核となる粒子に結合している請求項 1 ないし 3 に記載の医療用粒子。

【請求項 5】

前記高分子化合物が、側鎖に非特異吸着抑制構造を有する第 1 ユニットと、側鎖の末端に生理活性物質を固定化する捕捉部を有する第 2 ユニットとを有する、請求項 1 ないし 4 に記載の医療用粒子。

20

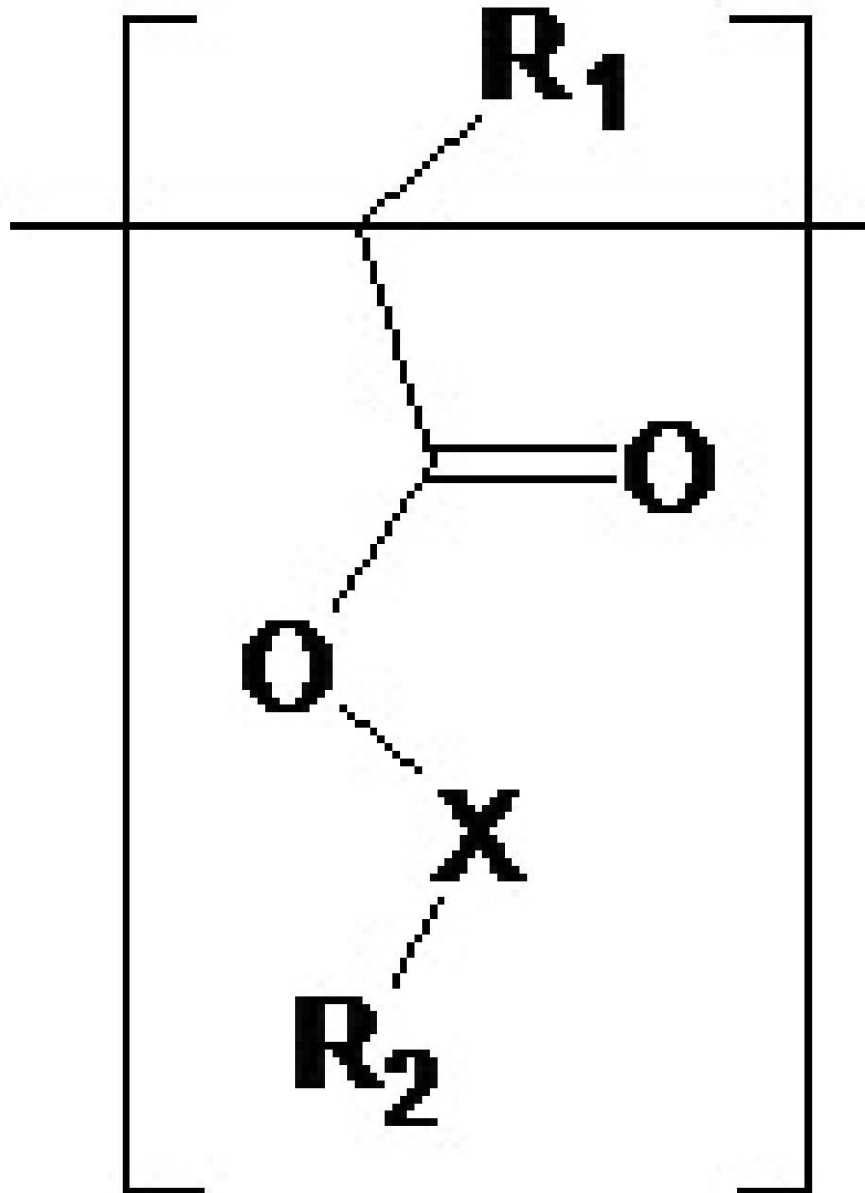
【請求項 6】

前記第 1 ユニットが、アルキレングリコール残基および／またはベタイン構造を含む請求項 5 に記載の医療用粒子。

【請求項 7】

前記第 1 ユニットが下記（化 1）で表される、請求項 5 または 6 に記載の医療用粒子。

【化 1】



10

20

30

(式中 R 1 は水素原子またはメチル基を示し、R 2 はベタイン構造を有する官能基、水素原子、または炭素数 1 ～ 2 0 のアルキル基を示す。X は－O－，－S－，－NH－，－CO－，－CONH－で中斷されてもよい炭素数 0 ～ 2 0 の炭化水素鎖、アルキレングリコール残基またはその繰返し構造を示す。ただし、第 1 ユニット中にアルキレングリコール残基および／またはベタイン構造を含むものとする。)

【請求項 8】

40

前記第 1 ユニットが、メトキシポリエチレングリコール（メタ）アクリレート、エトキシポリエチレングリコール（メタ）アクリレート、2－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンいずれかに由来する、請求項 5 ないし 7 のいずれかに記載の医療用粒子。

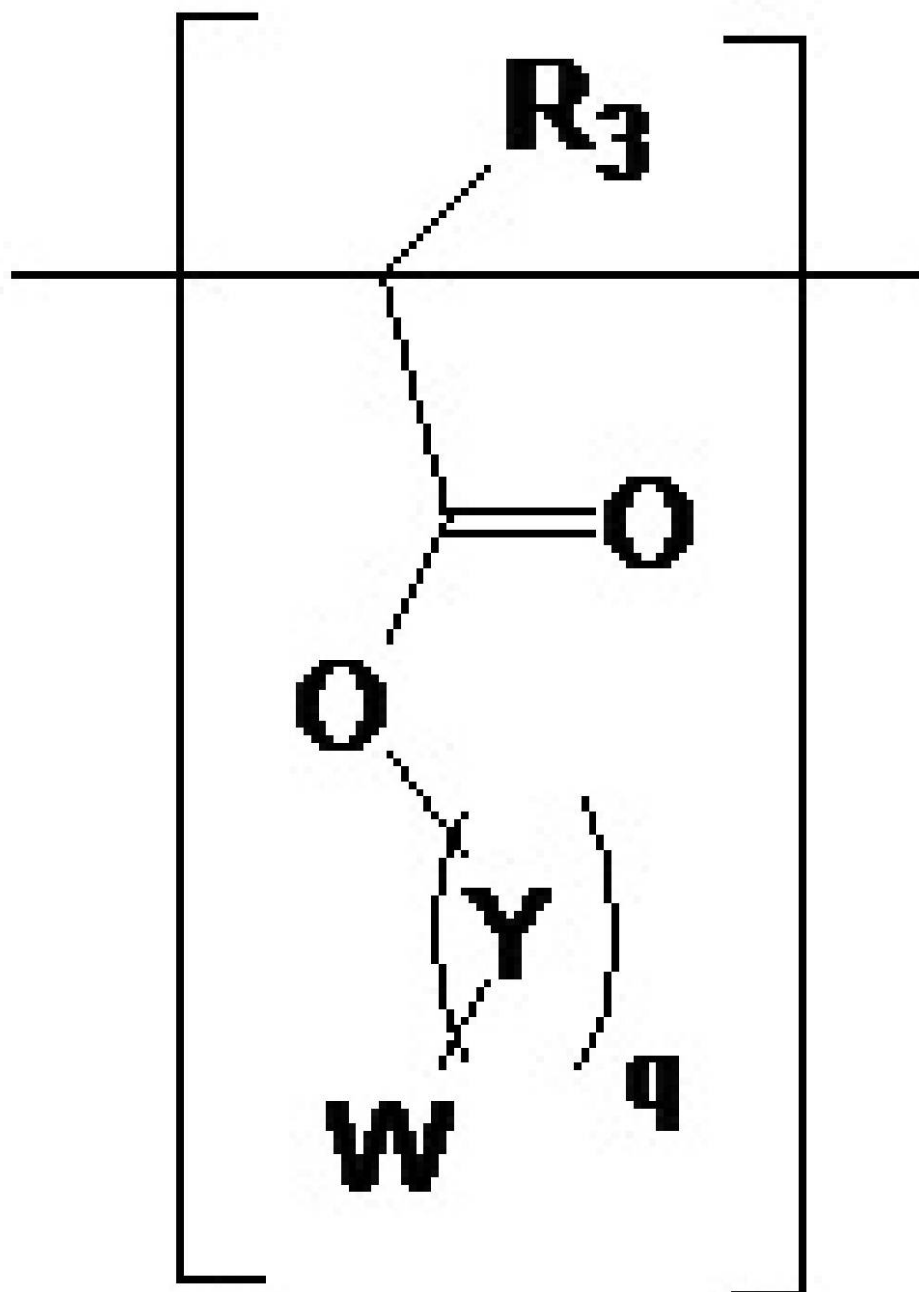
【請求項 9】

前記メトキシポリエチレングリコール（メタ）アクリレート及び／又はエトキシポリエチレングリコール（メタ）アクリレートのエチレングリコール残基の平均繰返し数が 3 ～ 1 0 0 である請求項 8 に記載の医療用粒子。

【請求項 1 0】

前記第 2 ユニットが下記（化 2）で表される、請求項 5 ないし 9 に記載の医療用粒子。

【化 2】



10

20

30

40

50

(式中 R_3 は水素原子またはメチル基を示し、 Y は $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $-CO-$ 、 $-CONH-$ で中断されてもよい炭素数 $0 \sim 20$ の炭化水素鎖、アルキレングルコール残基を示す。 q は $1 \sim 100$ の整数を示す。 q が 2 以上 100 以下の整数である場合、繰り返される Y は、それぞれ同一であっても、異なってもよい。 W は生理活性物質を固定化する基を示す。)

【請求項 11】

前記生理活性物質を固定化する基が、カルボキシル基、アルデヒド基、活性エステル基、エポキシ基、ビニルスルホン基、アミノオキシ基、ヒドラジド基及びビオチニル基から選ばれる少なくとも一つの官能基を有する請求項 5 ないし 10 に記載の医療用粒子。

【請求項 12】

前記活性エステル基が p -ニトロフェニルエステル又は N -ヒドロキシスクシンイミドエステルである、請求項 11 に記載の医療用粒子。

【請求項 13】

請求項 1 ないし 1 2 いずれかに記載の医療用粒子の製造方法であって、重合性官能基、または連鎖移動基を有するアルコキシシランを酸性溶液中で加水分解する工程、次いで前記重合性官能基、または連鎖移動基を有するアルコキシシランの酸性溶液中で核となる粒子を攪拌下、加熱する工程、及び乾燥後、更に加熱する工程、を含む医療用粒子の製造方法。

【請求項 1 4】

更に、重合性官能基、または連鎖移動基を導入した核となる粒子と重合性モノマーを溶媒中で混合することにより重合反応を進行させる工程、及び乾燥する工程を含む請求項 1 3 に記載の医療用粒子の製造方法。

【請求項 1 5】

前記重合反応がラジカル重合反応であることを特徴とする請求項 1 4 に記載の医療用粒子の製造方法。

【請求項 1 6】

請求項 2 ないし 1 2 に記載の医療用粒子に、その生理活性物質を固定化する官能基を介して生理活性物質を固定化したことを特徴とする分析用粒子。

【請求項 1 7】

前記生理活性物質が核酸、アプタマー、タンパク質、抗体、抗原、プロテイン A、プロテイン G、リガンド、ペプチド、グルタチオン、低分子化合物、ビオチン、糖鎖、レクチン、糖脂質、及び糖タンパクよりなる群から選ばれる少なくとも一つである請求項の 1 6 に記載の分析用粒子。

【請求項 1 8】

請求項 1 6 または 1 7 に記載の分析用粒子の製造方法であって、請求項 2 ないし 1 2 に記載の医療用粒子に、生理活性物質をリン酸塩水溶液に溶解した溶液を接触させる工程を含む分析用粒子の製造方法。

【請求項 1 9】

前記リン酸塩水溶液のリン酸塩濃度が 0.1 M 以上 5 M 以下である請求項 1 8 に記載の分析用粒子の製造方法。

【請求項 2 0】

請求項 1 6 または 1 7 に記載の分析用粒子を、標的生体分子の溶解液、血液、血漿、血清、細胞破碎液、細胞培養液、及び組織破碎液から選ばれる少なくとも一つの溶液に接触させることにより標的生体物質を回収することを特徴とする分析用粒子の使用方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生理活性物質を固定化する機能を有する医療用粒子、生体分子の相互作用を分析するための分析用粒子、並びにそれらの製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ポリマーでさまざまな粒子を被覆したポリマー被覆粒子は、工業分野で広く用いられてきただけでなく、近年においては基礎的な生物学や医療の分野においてその重要性が高まっている。例えばアフィニティークロマトグラフィーの担体への応用、医療における診断や薬物送達システム（ドラッグデリバリーシステム、DDS）、創薬用途などへの応用に対する関心が高まっている。創薬用途への応用例としては、例えば様々な粒子（担体）に固定されたりガンドと呼ばれる生理活性物質を介して特定のタンパク質などの生体分子を捕捉し、これを分離精製するものがある。

【0003】

粒子を担体として用いる際に求められる条件は、主には（１）穏和な条件下でリガンド、又はスパーサーを固定化できる官能基を有すること、またその固定化量が多いこと、（２）粒子自体がタンパク質などの生体物質一般に対して非特異的吸着をしないこと、（３

10

20

30

40

50

）目的・用途に応じた機械的強度を有すること、である。しかし、これらの条件を満たす粒子は未だ開発されていない。

【0004】

特に、リガンドの固定化量は担体の性能を左右する大きな要因であり、できるだけ大きな固定化量が要求される。リガンドの固定化量が大きくなれば、それに伴い捕捉するタンパク質の総量が増加するからである。特に、目的とするタンパク質がリガンドに捕捉されるタンパク質の中でもマイナーな成分である場合、固定化量が少ないとそれを発見できなくなる恐れもあるため、なおさらリガンド固定化量の大きな粒子が求められている。

【0005】

一方、捕捉したいタンパク質以外の成分の非特異的吸着を抑制することも極めて重要である。従来の粒子のうち、無機系のシリカゲル粒子は物理的強度の強い粒子で、多孔質であることから分離には良いとされているが、非特異的吸着の度合いが高いという欠点があるため実際に使用されている例は極めて少ない。また、合成高分子系では、ポリアクリルアミドゲル（商品名：Bio-Gel P、バイオラッド社）、ポリスチレン、エチレンー無水マレイン酸共重合体などなる粒子が開発されているが、これらの高分子も生体関連物質の非特異的吸着が起り易いという欠点がある。

【0006】

上記のように、粒子を医療用担体又は分析用担体として用いる場合には、非特異的吸着も問題になることが多い。そのため、それを回避するために様々な手法が検討されている。例えば、表面に目的の生理活性物質をつけたあと、残りの粒子表面をウシ血清アルブミン（BSA）等の害の少ないタンパクを先に吸着させておくブロッキングの手法などがあるが、効果は十分ではない。また、表面がエポキシ基からなる粒子に特定のタンパク質と特異的に結合するDNAを結合させ、タンパク質の精製用途に用いる例もある（例えば特許文献1）。この方法では、タンパク質の非特異吸着性が少ないという理由から、粒子表面へのエポキシ基導入にグリシジルメタクリレートなどを用いている。しかし、エポキシ基にDNA等生理活性物質を直接結合させる方法は、アルカリ条件下や高温条件下で反応させる必要があるなど相当厳しい反応条件を必要とする。このため、固定化させる生理活性物質がアルカリや高温で不安定な場合、固定化プロセスで生理活性物質が変質してしまう恐れがあるので不適當である。

【0007】

その他、粒子の非特異吸着低減方法としては、非特異吸着の少ないポリマー粒子を乳化重合法などで合成する例がある。例えば、特許文献2には、生理活性物質と反応可能な反応基を有するエチレン系不飽和重合性モノマー、ポリオキシアルキレン側鎖を有するエチレン系不飽和重合性モノマー及び疎水性を付与するエチレン系不飽和重合性ビニル芳香族モノマーを乳化重合法、又は懸濁重合法にて共重合し、粒子を得る方法が記載されている。しかし、このような方法では、得られる粒子径の制御が困難である。一般に、乳化重合法では、比較的均一な粒径を有する粒子が得られるものの、粒子径がサブミクロン程度のものしかできない。一方、懸濁重合法で得られる粒子は、粒子径分布が広く、例えばカラム用充填剤として用いるためには粒子を分級する必要があるが、特別な装置のない場合にはポリマー粒子を高度に分級することが難しい。しかも、得られる粒子のサイズが数十ミクロンから数百ミクロンであり、それよりも小さい径の粒子を合成することが難しい。さらに、重合で得られる粒子は、高分子であるがために担体としての強度に自ずと限界がある。粒子強度が求められる用途に使用する場合には、高分子中のエチレン系不飽和重合性ビニル芳香族モノマーの比率を上げるなど強度を上げるための処方を余儀なくされ、そのことは逆に非特異的吸着に不利であった。

【0008】

【特許文献1】特許第2753762号公報

【特許文献2】特許第3215455号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

【0009】

粒子強度を確保しつつ、非特異吸着の少ない医療用粒子を得るには、物理的強度の強いシリカゲル粒子など、核となる粒子に高分子化合物を含む層を形成することで非特異吸着を抑制し、さらにはその高分子化合物で標的分子を捕捉する生理活性物質を固定化することが有効であると考えられる。そこで、本発明の第一の課題は、生理活性物質の固定化能力に優れ、非特異吸着の少ない医療用粒子を提供することである。また、本発明の第二の課題は、目的とする生体分子の捕捉能力に優れ、非特異的吸着の少ない分析用粒子を提供することである。

【課題を解決するための手段】

10

【0010】

本発明は以下の通りである。

(1) 核となる粒子と、該粒子の表面に高分子化合物を含む層とを有する医療用粒子であって、下記式〔1〕を満たす、医療用粒子。

式〔1〕 $A/B \geq 0.8 \text{ mg/平方メートル}$

A：TG測定で求められる、核となる粒子1g当たりの粒子の表面に高分子化合物を含む層の重量 (mg)

B：核となる粒子1gあたりの表面積 (平方メートル)

(2) 前記核となる粒子が無機材料を含む、(1)に記載の医療用粒子。

(3) 前記無機材料が酸化ケイ素である(1)または(2)に記載の医療用粒子。

20

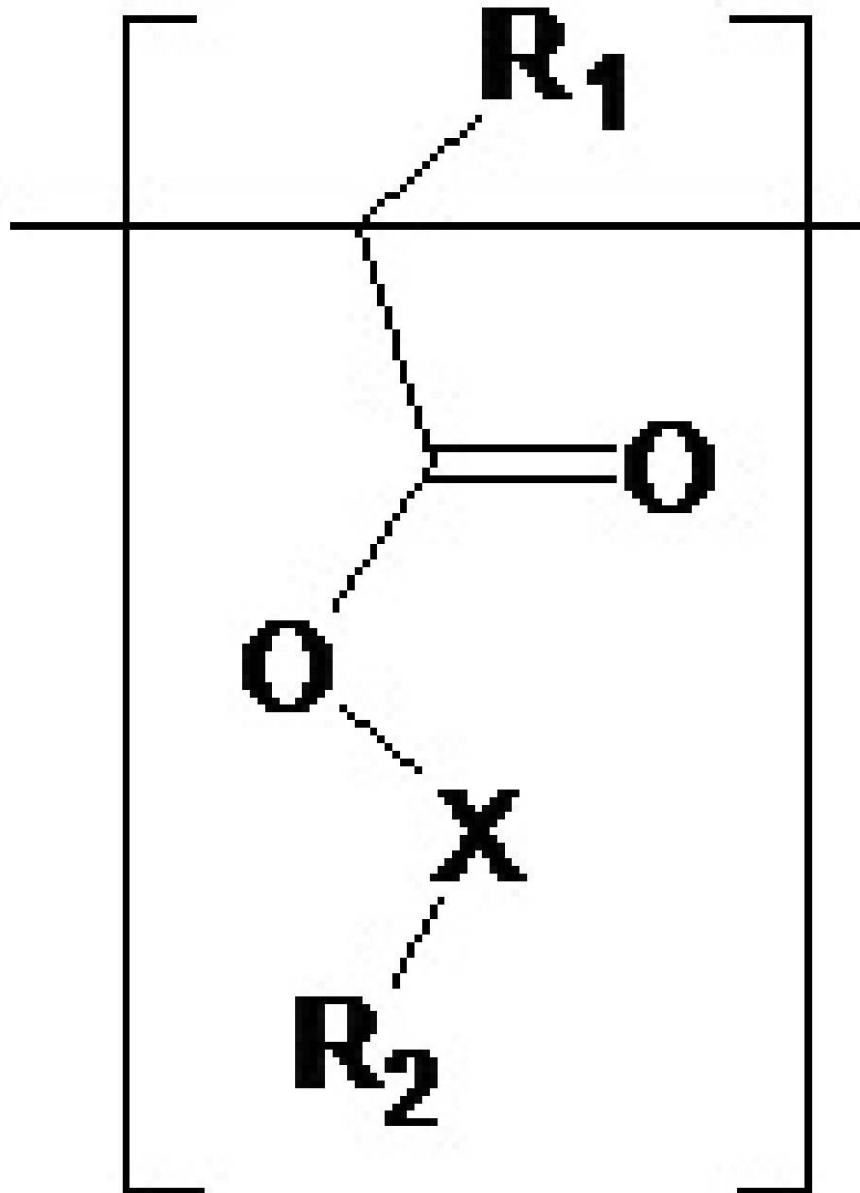
(4) 前記高分子化合物が、シランカップリング剤を介して核となる粒子に結合している(1)ないし(3)に記載の医療用粒子。

(5) 前記高分子化合物が、側鎖に非特異吸着抑制構造を有する第1ユニットと、側鎖の末端に生理活性物質を固定化する捕捉部を有する第2ユニットとを有する、(1)ないし(4)に記載の医療用粒子。

(6) 前記第1ユニットが、アルキレングリコール残基および／またはペタイン構造を含む(5)に記載の医療用粒子。

(7) 前記第1ユニットが下記(化1)で表される、(5)または(6)に記載の医療用粒子。

【化 1】



10

20

30

(式中 R 1 は水素原子またはメチル基を示し、R 2 はベタイン構造を有する官能基、水素原子、または炭素数 1 ～ 2 0 のアルキル基を示す。X は－O－，－S－，－NH－，－CO－，－CONH－で中断されてもよい炭素数 0 ～ 2 0 の炭化水素鎖、アルキレングリコール残基またはその繰り返し構造を示す。ただし、第 1 ユニット中にアルキレングリコール残基および／またはベタイン構造を含むものとする。)

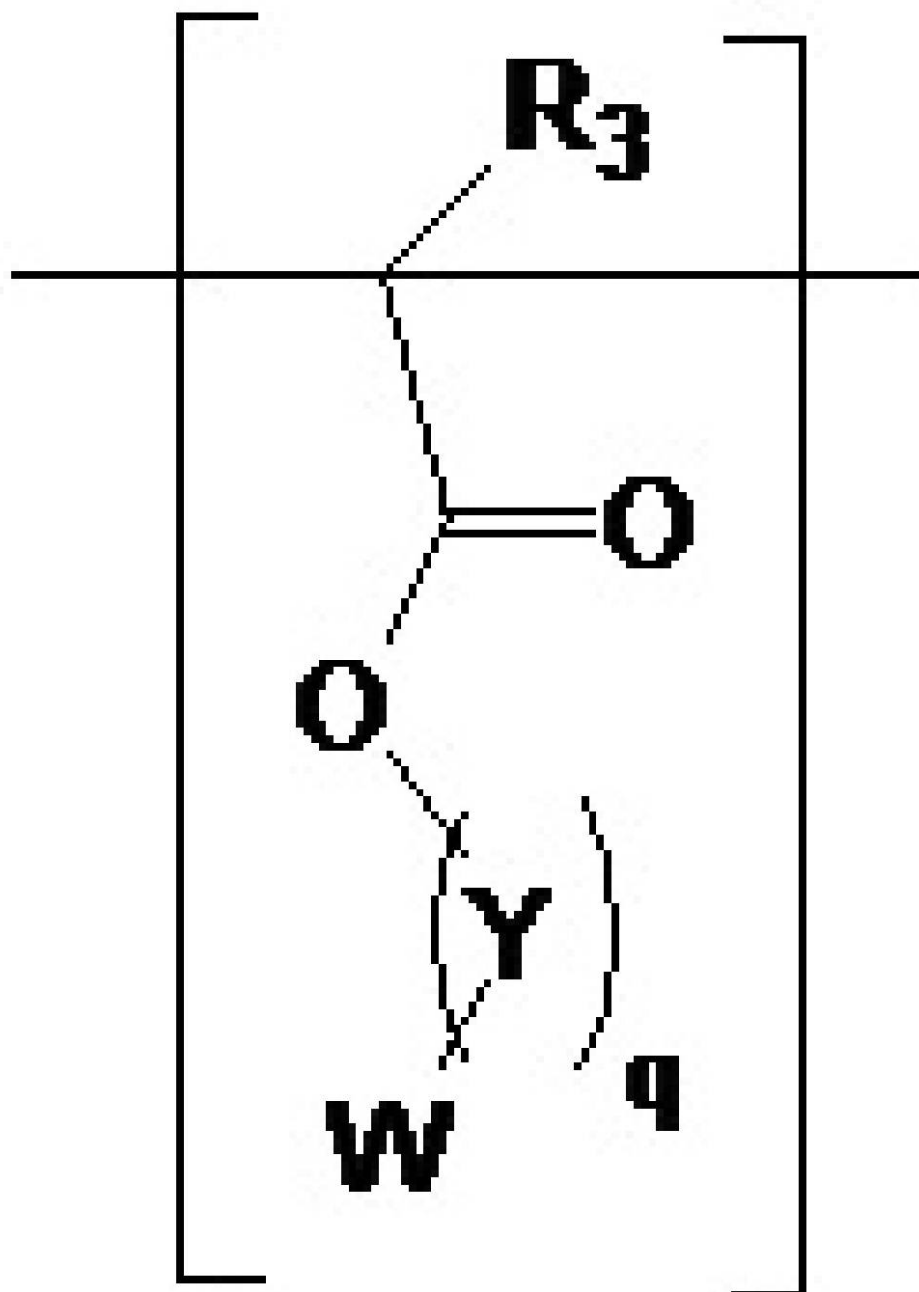
(8) 前記第 1 ユニットが、メトキシポリエチレングリコール (メタ) アクリレート、エトキシポリエチレングリコール (メタ) アクリレート、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンいずれかに由来する、(5) ないし (7) のいずれかに記載の医療用粒子。

40

(9) 前記メトキシポリエチレングリコール (メタ) アクリレート及び／又はエトキシポリエチレングリコール (メタ) アクリレートのエチレングリコール残基の平均繰り返し数が 3 ～ 1 0 0 である (8) に記載の医療用粒子。

(1 0) 前記第 2 ユニットが下記の (化 2) で表される、(5) ないし (9) のいずれかに記載の医療用粒子。

【化 2】



10

20

30

40

50

(式中 R_3 は水素原子またはメチル基を示し、 Y は $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $-CO-$ 、 $-CONH-$ で中断されてもよい炭素数 $0 \sim 20$ の炭化水素鎖、アルキレングルコール残基を示す。 q は $1 \sim 100$ の整数を示す。 q が 2 以上 100 以下の整数である場合、繰り返される Y は、それぞれ同一であっても、異なってもよい。 W は生理活性物質を固定化する基を示す。

(11) 前記生理活性物質を固定化する基が、カルボキシル基、アルデヒド基、活性エステル基、エポキシ基、ビニルスルホン基、アミノオキシ基、ヒドラジド基及びビオチニル基から選ばれる少なくとも一つの官能基を有する(5)ないし(10)に記載の医療用粒子。

(12) 前記活性エステル基が p -ニトロフェニルエステル又は N -ヒドロキシスクシンイミドエステルである、(11)に記載の医療用粒子。

(13) (1)(12)いずれかに記載の医療用粒子の製造方法であって、重合性官能基、または連鎖移動基を有するアルコキシシランを酸性溶液中で加水分解する工程、次いで

前記重合性官能基、または連鎖移動基を有するアルコキシシランの酸性溶液中で核となる粒子を攪拌下、加熱する工程、及び乾燥後、更に加熱する工程、を含む医療用粒子の製造方法。

(14) 更に、重合性官能基、または連鎖移動基を導入した核となる粒子と重合性モノマーを溶媒中で混合することにより重合反応を進行させる工程、及び乾燥する工程を含む(13)に記載の医療用粒子の製造方法。

(15) 前記重合反応がラジカル重合反応であることを特徴とする(14)に記載の医療用粒子の製造方法。

(16) (2)ないし(12)に記載の医療用粒子に、その生理活性物質を固定化する官能基を介して生理活性物質を固定化したことを特徴とする分析用粒子。

(17) 前記生理活性物質が核酸、アプタマー、タンパク質、抗体、抗原、プロテインA、プロテインG、リガンド、ペプチド、グルタチオン、低分子化合物、ビオチン、糖鎖、レクチン、糖脂質、及び糖タンパクよりなる群から選ばれる少なくとも一つである(16)に記載の分析用粒子。

(18) (16)または(17)に記載の分析用粒子の製造方法であって、(2)ないし(12)に記載の医療用粒子に、生理活性物質をリン酸塩水溶液に溶解した溶液を接触させる工程を含む分析用粒子の製造方法。

(19) 前記リン酸塩水溶液のリン酸塩濃度が0.1M以上5M以下である(18)に記載の分析用粒子の製造方法。

(20) (16)または(17)に記載の分析用粒子を、標的生体分子の溶解液、血液、血漿、血清、細胞破碎液、細胞培養液、及び組織破碎液から選ばれる少なくとも一つの溶液に接触させることにより標的生体物質を回収することを特徴とする分析用粒子の使用

方法。

【発明の効果】

【0011】
前記のとおり、核となる粒子の単位表面積あたりに含まれる高分子化合物の重量を前記量に規定することにより、生理活性物質を効率的に固定化することができ、且つ非特異吸着を抑制した粒子を簡便に作製し、提供することが可能となった。

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下、本発明の医療用粒子、分析用粒子、およびそれらの製造方法および使用方法について説明する。

【0013】

本発明の医療用粒子は、生理活性物質の固定化能力に優れ、非特異吸着の少ない医療用粒子であって、核となる粒子に高分子化合物を含む層を形成がされている。ここで、筆者らは、核となる粒子の単位表面積あたりに含まれる高分子化合物の重量を一定の値以上にすることで、効果的に非特異吸着を抑制し、S/N比を高めることができ、さらにはその高分子化合物で生理活性物質を固定化することができることを見出した。

【0014】

具体的には、核となる粒子の単位表面積あたりに含まれる高分子化合物の重量は、下記式〔1〕を満たすとよい。

式〔1〕 $A/B \geq 0.8 \text{ mg/平方メートル}$

A：TG測定で求められる、核となる粒子1g当たりの粒子の表面に高分子化合物を含む層の重量(mg)

B：核となる粒子1gあたりの表面積(平方メートル)

ここでいうTG測定とは、物質および基準物質の温度を調節されたプログラムに従って変化させながら、その物質の質量を温度の関数として測定する技法である。温度のプログラムは、典型的には室温から500℃まで10℃/minで上昇させた後、500℃で1時間維持することなどが挙げられる。測定は空気を200/minで供給しながら行われるのが好ましい。核となる粒子1g当たりの粒子の表面に高分子化合物を含む層の重量は、

前記 T G 測定において、初期重量と測定終了時の重量の差を、粒子表面に存在する高分子化合物を含む層の重量とみなすことで算出できる。

【0015】

一方、核となる粒子 1 g あたりの表面積は、粉体粒子の表面に吸着占有面積のわかったガス分子を吸着させ、その量から試料の比表面積を求める B E T 法で求めることができる。吸着占有面積のわかったガス分子とは典型的には窒素である。

【0016】

核となる粒子の単位表面積あたりに含まれる高分子化合物の重量が前記式〔1〕を満たすことにより、効果的に非特異吸着を抑制し、さらにはその高分子化合物で生理活性物質を固定化することが可能となる。これを実現する方法としては、核となる粒子にあらかじめ合成した高分子化合物を吸着させる方法、核となる粒子にあらかじめ合成した高分子化合物を化学的に結合させる方法などが挙げられるが、中でも、高分子化合物を生成するための官能基を、核となる粒子に導入し、この官能基を利用して粒子表面に高分子化合物を生成する方法が好ましい。高分子化合物を生成するための官能基としては、重合性官能基や連鎖移動基が挙げられ、ラジカル反応性の面から、ビニル基、アリル基、アクリル基、メタクリル基、メルカプト基であることがより好ましい。核となる粒子にこれらの官能基を導入する方法は特に限定されるものではないが、たとえばシリカ粒子に、これらの官能基を導入する場合、これらの官能基を有するシランカップリング剤をシリカ粒子表面に反応させることで達成できる。

なお、高分子化合物の吸着量は、 $A/B \leq 5.0 \text{ mg/平方メートル}$ であることがさらに好ましい。 5.0 mg/平方メートル を超えても、十分な非特異吸着抑制能を担保できない。

【0017】

前記高分子化合物は、生理活性物質が捕捉する標的生体物質以外のタンパク質等の非特異吸着を抑制しうる第 1 ユニットと、官能基として側鎖の末端に生理活性物質を固定化する機能を有する第 2 ユニットと、を有することが好ましい。

【0018】

第 1 ユニットが、後述の生理活性物質によって捕捉可能な標的生体物質以外のタンパク質等の非特異吸着を抑制する役割を果たす。

【0019】

また、第 2 ユニットが、側鎖の末端に生理活性物質を固定化する機能を有することにより、さまざまな生理活性物質を効率良く、かつ簡易に担体に結合することを可能とする。これにより、該標的生体物質を特異的に捕捉できるようになる。

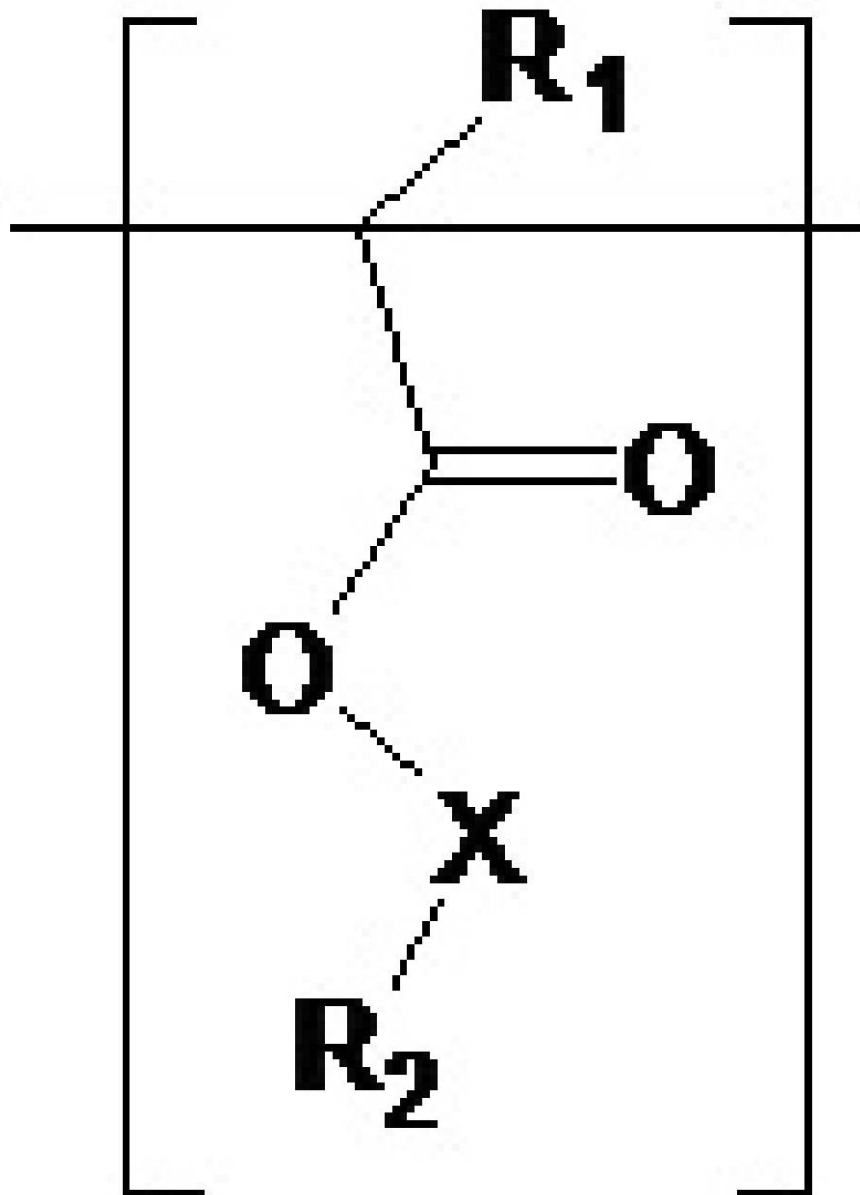
【0020】

生理活性物質によって捕捉可能な物質以外のタンパク質等の非特異吸着を抑制しうる第 1 ユニットとしては、例えば、側鎖にアルキレングリコール残基、水酸基、ペタイン構造などを有するユニットが挙げられ、特に非特異吸着性が高いという観点からアルキレングリコール残基および／またはペタイン構造を有するものが好ましい。

【0021】

第 1 ユニットは、さらには、(化 1) で表わされる構造のものが好ましい。

【化 1】



10

20

30

(式中 R 1 は水素原子またはメチル基を示し、R 2 はベタイン構造を有する官能基、水素原子、または炭素数 1 ～ 2 0 のアルキル基を示す。X は－O－，－S－，－NH－，－CO－，－CONH－で中斷されてもよい炭素数 0 ～ 2 0 の炭化水素鎖、アルキレングリコール残基またはその繰り返し構造を示す。ただし、第 1 ユニット中にアルキレングリコール残基および／またはベタイン構造を含むものとする。)

【0022】

40

アルキレングリコール残基を有する第 1 ユニットを構成するための、由来元のモノマーとしては、例えば、メトキシポリエチレングリコール（メタ）アクリレート、エトキシポリエチレングリコールメタクリレート；2－ヒドロキシエチル（メタ）アクリレート、2－ヒドロキシプロピル（メタ）アクリレート、2－ヒドロキシブチル（メタ）アクリレート等の水酸基の一置換エステルの（メタ）アクリレート類；グリセロールモノ（メタ）アクリレート；ポリプロピレングリコールを側鎖とする（メタ）アクリレート；2－メトキシエチル（メタ）アクリレート；2－エトキシエチル（メタ）アクリレート；メトキシジエチレングリコール（メタ）アクリレート；エトキシジエチレングリコール（メタ）アクリレート等が挙げられるが、アッセイ時の非特異的吸着の少なさ及び入手性からメトキシポリエチレングリコールメタクリレート又はエトキシポリエチレングリコールメタクリレー

50

トが好ましい。

【0023】

前記メトキシポリエチレングリコールメタクリレート又はエトキシポリエチレングリコールメタクリレートの、エチレングリコール残基の平均繰返し数は、モノマーの入手性と反応性の観点から、3～100が好ましい。

【0024】

ベタイン構造を有する第1ユニットを構成するための、由来元のモノマーとしては、例えばカルボキシベタイン系モノマー、スルホベタイン系モノマー、ホスホベタイン系モノマー、ホスホリルコリン系モノマーなどが挙げられる。

【0025】

カルボキシベタイン系モノマーの具体例としては、例えばジメチル（2-メタクリロイルオキシエチル）（2-カルボキシラトエチル）アミニウム、ジメチル（2-アクリロイルオキシエチル）（2-カルボキシラトエチル）アミニウム、ジメチル（2-メタクリロイルオキシエチル）（3-カルボキシラトプロピル）アミニウム、ジメチル（2-アクリロイルオキシエチル）（3-カルボキシラトプロピル）アミニウム、ジメチル（2-メタクリロイルオキシエチル）（4-カルボキシラトブチル）アミニウム、ジメチル（2-アクリロイルオキシエチル）（4-カルボキシラトブチル）アミニウム、ジメチル（2-メタクリロイルオキシエチル）（カルボキシラトメチル）アミニウム、ジメチル（2-アクリロイルオキシエチル）（カルボキシラトメチル）アミニウム等が挙げられる。

【0026】

スルホベタイン系モノマーの具体例としては、例えばジメチル（2-メタクリロイルオキシエチル）（2-スルホナトエチル）アミニウム、ジメチル（2-アクリロイルオキシエチル）（2-スルホナトエチル）アミニウム、ジメチル（2-メタクリロイルオキシエチル）（3-スルホナトプロピル）アミニウム、ジメチル（2-アクリロイルオキシエチル）（3-スルホナトプロピル）アミニウム、ジメチル（2-メタクリロイルオキシエチル）（4-スルホナトブチル）アミニウム、ジメチル（2-アクリロイルオキシエチル）（4-スルホナトブチル）アミニウム、ジメチル（2-メタクリロイルオキシエチル）（スルホナトメチル）アミニウム、ジメチル（2-アクリロイルオキシエチル）（スルホナトメチル）アミニウム等が挙げられる。

【0027】

ホスホベタイン系モノマーの具体例としては、例えばジメチル（2-メタクリロイルオキシエチル）（2-ホスホナトエチル）アミニウム、ジメチル（2-アクリロイルオキシエチル）（2-ホスホナトエチル）アミニウム、ジメチル（2-メタクリロイルオキシエチル）（3-ホスホナトプロピル）アミニウム、ジメチル（2-アクリロイルオキシエチル）（3-ホスホナトプロピル）アミニウム、ジメチル（2-メタクリロイルオキシエチル）（4-ホスホナトブチル）アミニウム、ジメチル（2-アクリロイルオキシエチル）（4-ホスホナトブチル）アミニウム、ジメチル（2-メタクリロイルオキシエチル）（ホスホナトメチル）アミニウム、ジメチル（2-アクリロイルオキシエチル）（ホスホナトメチル）アミニウム等が挙げられる。

【0028】

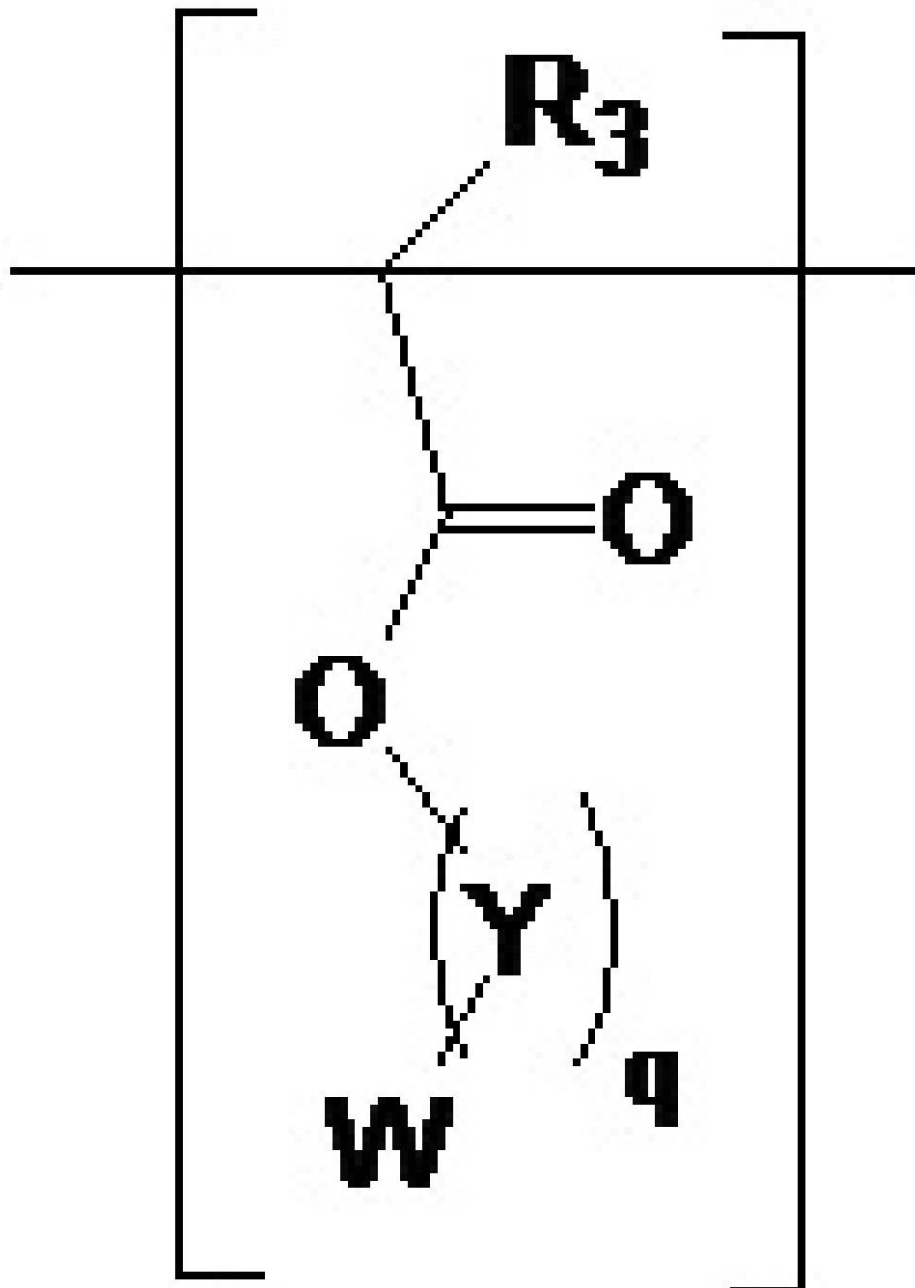
また、ホスホリルコリン系モノマーの具体例としては、例えば2-（メタ）アクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、2-（メタ）アクリロイルオキシエトキシエチルホスホリルコリン、6-（メタ）アクリロイルオキシヘキシルホスホリルコリン、10-（メタ）アクリロイルオキシエトキシノニルホスホリルコリン、2-（メタ）アクリロイルオキシプロピルホスホリルコリン、2-（メタ）アクリロイルオキシブチルホスホリルコリン等が挙げられる。

【0029】

これらの中でも、アッセイ時の非特異的吸着の少なさ及び入手性から2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンが好ましい。

【0030】

側鎖の末端に生理活性物質を固定化する捕捉部を有する第2ユニットとしては、例えば、下記(化2)で示されるように、生理活性物質を固定化する捕捉部が $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $-CO-$ 、 $-CONH-$ で中断されてもよい炭素数0～20の炭化水素鎖、アルキレングルコール残基を介して結合した化合物であることが挙げられる。
【化2】



(式中 R_3 は水素原子またはメチル基を示し、 Y は $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $-CO-$ 、 $-CONH-$ で中断されてもよい炭素数0～20の炭化水素鎖、アルキレングルコール残基を示す。 q は1～100の整数を示す。 q が2以上100以下の整数である場合、繰り返される Y は、それぞれ同一であっても、異なってもよい。 W は生理活性物質を固定化する基を示す。

【0031】

前記(化2)中の Y がアルキレン基である場合、 q は1～100の整数であり、好ましくは1～20であり、より好ましくは1～10であり、最も好ましくは1～6である。 q の値が前記範囲内であることにより、タンパク質等の非特異吸着抑制に優れる。

【0032】

前記（化2）中のYがアルキレングリコール残基である場合、アルキレングリコール残基Yの炭素数は1～10であり、好ましくは1～6であり、より好ましくは2～4であり、更に好ましくは2～3であり、最も好ましくは2である。炭素数が前記範囲内であると、特にタンパク質等の非特異吸着抑制に優れる。

また、アルキレングリコール残基Yの繰り返し数qは、特に限定されるものではないが、好ましくは1～100の整数であり、より好ましくは2～100の整数であり、更に好ましくは2～95の整数であり、最も好ましくは4～90の整数である。前記繰り返し数qが前記範囲内であると、特にタンパク質等の非特異吸着抑制に優れる。

【0033】

前記（化2）中の生理活性物質を固定化する基Wは、カルボキシル基、アルデヒド基、活性エステル基、エポキシ基、ビニルスルホン基、アミノオキシ基、ヒドラジド基及びビオチニル基から選ばれる少なくとも一つの官能基が好ましい。なお、これらの基は保護基で保護されていてもよく、生理活性物質を固定化する際に脱保護して使用しても構わない。

【0034】

本発明の使用する「活性エステル」は、エステル基の片方の置換基に酸性度の高い電子求引性基を有して求核反応に対して活性化されたエステル群、すなわち反応活性の高いエステル基を意味するものとして、各種の化学合成、たとえば高分子化学、ペプチド合成等の分野で慣用されているものである。実際的には、フェノールエステル類、チオフェノールエステル類、N-ヒドロキシアミンエステル類、複素環ヒドロキシ化合物のエステル類等がアルキルエステル等に比べてはるかに高い活性を有する活性エステルとして知られている。

【0035】

このような活性エステルとしては、たとえばp-ニトロフェニル活性エステル、N-ヒドロキシスクシンイミド活性エステル、コハク酸イミド活性エステル、フタル酸イミド活性エステル、5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド活性エステル等が挙げられるが、保存安定性と反応性のバランスからp-ニトロフェニル活性エステル又はN-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルが好ましい。

【0036】

これら活性エステルは、活性エステルを有するモノマーを重合することで高分子化合物に組み込んでもよいし、あるいは、活性エステルを導入する官能基を有する高分子化合物をあらかじめ合成しておき、後から活性エステルを導入してもよい。

【0037】

前記高分子化合物の第1ユニットと、第2ユニットとの共重合比（第1ユニット／第2ユニット）は、特に限定されないが、例えば97／3～5／95であることが挙げられ、特に90／10～10／90であることが好ましい。共重合比が前記範囲内であると、特に非特異吸着を効果的に抑制するとともに、生理活性物質を固定化する効果に優れる。

【0038】

また、前記高分子化合物は第1ユニットと、第2ユニットの他に、核となる粒子に該高分子化合物を吸着させやすくする部分を有するユニットや化学的に結合させるための官能基を有するユニットと含んでいてもよい。これらは、核となる粒子の組成や表面に存在する官能基に応じて適宜選択することができる。

【0039】

前記共重合比は、例えばX線光電子分光分析（XPS）で元素組成を評価することで算出できる。

【0040】

本発明の高分子化合物の化学構造は、その結合方式がランダム、ブロック、グラフトなどの形態であることが挙げられ、なかでも、第1繰り返しユニットと第2繰り返しユニットを含むランダム共重合体であることが好ましい。これにより、第2繰り返しユニットの

10

20

30

40

50

側鎖の末端に存在する活性エステルが分散するために、有効に作用することができる。

【0041】

前記高分子化合物の重量平均分子量は、特に限定されないが、例えば5000～10000000であることが挙げられ、特に10000～1000000であることが好ましい。重量平均分子量が前記範囲内であると、合成時のハンドリングがよく、また、タンパク質等の非特異吸着を効果的に抑制することができる。

【0042】

前記粒子の基材は、特に限定されるものではなく、有機材料、無機材料を問わず用いることができる。有機材料としては、例えばアフィニティークロマトグラフィーの担体として用いられる多孔性のアガロース粒子（商品名：Sephacrose）、デキストラン粒子（商品名：Sephadex）の他に、ポリアクリルアミドゲル（商品名：Bio-Gel P、バイオラッド社）、ポリスチレン、エチレン-無水マレイン酸共重合体、ポリメタクリル酸メチル、ポリオレフィン、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリアミド、アクリル系樹脂等の各種樹脂材料等が挙げられる。また、無機材料としては、金、銀、白金、パラジウム、イリジウム、ロジウム、オスmium、鉄、銅、コバルト、アルミニウムおよびこれらの合金や無機酸化物等が挙げられる。

これらの中でも無機材料が粒子自体の強度が高い点で好ましく、さらに酸化ケイ素が取り扱いやすく最も好ましい。また、酸化ケイ素を担体として用いると、Si-O結合が疎水性低分子化合物の吸着を抑制することが知られており好ましい（文献 特開2008-107310参照）。

【0043】

本発明の医療用粒子の平均粒径は、目的および用途に応じて適宜選択される。特に、無機物の場合、粒径の制御が困難な乳化重合や懸濁重合で有機物の粒子を製造する方法に比較して、粒径の制御が容易である。

【0044】

具体的に、本発明の分析用担体に用いる粒子の粒径としては、用途によっても異なるが、一般的に平均粒径が数nm～100μm程度のものが挙げられ、100nm～50μmが好ましく、1μm～40μmがさらに好ましい。前記担体の平均粒径が前記範囲内であると、特に生理活性物質の固定化量とハンドリングの良さとのバランスに優れる。このような平均粒径は、例えば粒度分布計で測定することができる。また、形状が多孔質になると、比表面積が大きくなり、表面に含まれる高分子化合物の量を増加させることができる。この孔径の大きさは、1nm以上200nm以下であることが好ましく、5nm以上100nm以下であることがさらに好ましい。この範囲にあることで、十分な比表面積を担保し、かつ標的生体分子を効果的に捕捉することが可能となる。

【0045】

前にも述べたように、核となる粒子の単位表面積あたりに含まれる高分子化合物の重量が前記式〔1〕を満たすようにするには、核となる粒子にあらかじめ合成した高分子化合物を吸着させる方法、核となる粒子にあらかじめ合成した高分子化合物を化学的に結合させる方法などが挙げられる。このような高分子化合物は、核となる粒子に吸着しやすい成分や、核となる粒子表面に存在する反応性官能基と反応しうる官能基を有する成分を、合成する際に共重合体として組み込むことで得られる。核となる粒子表面に存在する反応性官能基と反応しうる官能基としては、シランカップリング剤を加水分解して得られるシラノール基が、反応性が高く好ましい。

【0046】

前記高分子化合物を粒子表面に塗布することで、高分子化合物が粒子表面に吸着または化学的に結合させることができる。塗布方法としては、高分子化合物の溶液を調製し、浸漬、吹きつけ等の公知の方法が挙げられる。塗布後、室温下ないしは加温下にて乾燥させるのが好ましい。化学結合を行う場合は、さらにそれぞれに応じた反応条件で実施するとよい。

【0047】

前述の高分子化合物の溶液濃度は特に制限されるものではないが、一例として0.05重量%以上であることが挙げられ、好ましくは0.1～30重量%、より好ましくは0.1～20重量%、さらに好ましくは0.3～10重量%であることが挙げられる。

【0048】

また、高分子化合物を生成するための官能基を、核となる粒子に導入し、この官能基を利用して粒子表面に高分子化合物を生成する方法によっても前記式〔1〕を満たすようにすることができる。高分子化合物を生成するための官能基としては、重合性官能基または連鎖移動基がよく、例えばビニル基、アリル基、アクリル基、メタクリル基、メルカプト基が挙げられる。これらは単独で用いてもよいし、または2種以上組合せてもよい。これらの基を担体に導入するには、これらの基を有するシランカップリング剤と粒子を結合させる方法が挙げられる。

10

【0049】

前記シランカップリング剤としては、例えばメタクリロキシプロピルジメチルメトキシシラン、メタクリロキシプロピルジメチルエトキシシラン、メタクリロキシプロピルメチルジメトキシシラン、メタクリロキシプロピルメチルジエトキシシラン、メタクリロキシプロピルトリメトキシシラン、メタクリロキシプロピルトリエトキシシラン、アクリロキシプロピルジメチルメトキシシラン、アクリロキシプロピルジメチルエトキシシラン、アクリロキシプロピルメチルジメトキシシラン、アクリロキシプロピルメチルジエトキシシラン、アクリロキシプロピルトリメトキシシラン、アクリロキシプロピルトリエトキシシラン、3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン、3-メルカプトプロピルトリエトキシシラン、3-メルカプトプロピルメチルジメトキシシラン、3-メルカプトプロピルメチルジエトキシシラン、メルカプトエチルトリエトキシシラン、ALLYLTRIMETHOXY SILANE、VINYLTRIACETOXY SILANE、VINYLTRIACETOXY SILANE、VINYLTRIACETOXY SILANE、VINYLTRIACETOXY SILANE、VINYLTRIS (2-METHOXYETHOXY) SILANE、VINYLTRIS (METHYLETHYLKETOXIMINO) SILANE、ALLYLOXYUNDECYLTRIMETHOXY SILANE、ALLYLTRIETHOXY SILANE 3- (TRIETHOXY Silyl) -1-PROPENEなどが挙げられる。

20

30

【0050】

高分子化合物を生成するための官能基を、核となる粒子に導入し、この官能基を利用して粒子表面に高分子化合物を生成した粒子の製造方法としては、例えば、

(1) 重合性官能基、または連鎖移動基を有するアルコキシシランを酸性溶液中で加水分解する工程、

(2) 前記重合性官能基、または連鎖移動基を有するアルコキシシランの酸性溶液中で核となる粒子を攪拌下、加熱する工程、及び乾燥後、更に加熱する工程、

(3) 重合性官能基、または連鎖移動基を導入した核となる粒子と重合性モノマーを溶媒中で混合することにより重合反応を進行させる工程を含むことが挙げられる。

40

【0051】

本発明の医療用粒子の作製方法は、製造の容易さから、例えば粒子表面に、重合性官能基、または連鎖移動基を有するシランカップリング剤を化学結合させ、タンパク質等の非特異吸着を抑制しうるモノマーと、生理活性物質を固定化しうる捕捉部を有する重合性モノマーおよび該粒子を含む混合物を、重合開始剤存在下、溶媒中で重合することが挙げられる。こうすることで粒子表面にシランカップリング剤を介して結合した高分子化合物を生成することができる。

【0052】

重合性官能基または連鎖移動基を有するシランカップリング剤としては、前述のシランカ

50

ップリング剤を好適に用いることができる。

【0053】

重合性官能基、または連鎖移動基を有するシランカップリング剤を、粒子表面に化学結合させる際のシランカップリング剤濃度については、例えば0.01～20wt%であることが挙げられ、0.1～10wt%が好ましく、3～10wt%であることがより好ましい。また、シランカップリング剤の使用量は、細孔内を含めた粒子の表面積を被覆できる量以上を用いることが好ましい。この値は、細孔内を含めた粒子の表面積とシランカップリング剤の最小被覆面積から算出するとよい。

【0054】

溶媒は、シランカップリング剤が溶解すればよいが、例えば、pH 2～5の酸性水溶液または、これと有機溶媒との混合物が、シランカップリング剤が加水分解しやすく、また、加水分解により生成したシラノール基が安定して存在できるようになるので好ましい。この処理に用いられる酸としては各種公知の無機酸及び／又は有機酸を用いることができる。無機酸としては、硫酸、硝酸、塩酸、フッ酸等が挙げられ、また有機酸としては蟻酸、酢酸、安息香酸等が挙げられるが、なかでも取り扱いが比較的容易な酢酸がより好適である。有機溶媒としては2-ブタノン、メタノール、エタノール、ト-ブチルアルコール、イソプロピルアルコール、n-ブタノール、テトラヒドロフラン、ジオキサン、アセトン、アセトニトリルなどが好ましい。

【0055】

シランカップリング剤がアルコキシシランの場合、加水分解により生成されたシラノール基が、粒子表面の水酸基、アミノ基、カルボニル基、シラノール基等と脱水縮合して共有結合を形成する。シラノール基の脱水縮合により形成される共有結合は加水分解されにくい性質があるので、これを介して粒子表面に固定化された重合体は容易に溶解したり、核となる粒子から脱離してしまうことはない。シラノール基の脱水縮合は加熱処理により促進される。例えば、60～120℃で5分間～24時間加熱処理するのが好ましい。

【0056】

その後、さらに粒子を乾燥させ、加熱することでよりシランカップリング剤と粒子との結合が促進される。例えば、80～120℃で5分間～24時間加熱処理するのが好ましい。

【0057】

前記のようにして得られた重合性官能基、または連鎖移動基を導入した核となる粒子は、重合性モノマーと溶媒中で混合し、重合反応を進行させる工程をおこなうことで、その表面に高分子化合物を含む層を形成できる。重合性モノマーとしては、側鎖に非特異吸着抑制構造を有する第1ユニットの由来元となるモノマーと、側鎖の末端に生理活性物質を固定化しうる捕捉部を有する第2ユニットの由来元となるモノマーが好ましく、必要に応じて、他の重合性モノマーや重合開始剤を加えてもよい。また、攪拌しながら重合を行うと粒子表面にムラなく高分子化合物を形成できるので好ましい。

【0058】

重合する際の条件としては、例えば温度が40℃～100℃、重合時間は1時間～48時間であることが挙げられる。

【0059】

また、溶媒としてはそれぞれのモノマーが溶解するものであればよく、例えば、2-ブタノン、メタノール、エタノール、ト-ブチルアルコール、ベンゼン、トルエン、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジクロロメタン、クロロホルム、ジメチルスルホキシド、N,N-ジメチルホルムアミドなどを挙げることができる。これらの溶媒は、単独または2種以上の組み合わせで用いられる。

【0060】

重合終了後は、粒子に吸着した高分子化合物などを洗浄により除去し、乾燥するとよい。乾燥する方法は特に限定されない。加熱することで溶媒を揮発させてもよいし、真空乾燥してもよいし、それらを組み合わせてもよい。

10

20

30

40

50

【0061】

前記重合反応は、ラジカル重合が簡便で好ましい。重合開始剤としては通常のラジカル開始剤ならいずれでもよく、例えば、2, 2'-アゾビスイソブチロニトリル、1, 1'-アゾビス(シクロヘキサン-1-カルボニトリル)などのアゾ化合物、過酸化ベンゾイル、過酸化ラウリルなどの有機過酸化物などを挙げることができる。

【0062】

また、本発明の医療用粒子の作製方法は、担体表面に重合開始基を共有結合させ、前記側鎖に非特異吸着抑制構造を有する第1ユニットの由来元となるモノマーと、側鎖の末端に生理活性物質を固定化する捕捉部を有する第2ユニットの由来元となるモノマーおよび該粒子を含む混合物を、溶媒中でリビングラジカル重合してもよい。

10

【0063】

リビングラジカル重合には様々な方法があるが、特に制限を受けるものではなく、原子移動ラジカル重合、可逆的付加-開裂連鎖移動重合、ニトロキシドを介したラジカル重合などを好適に用いることができる。

【0064】

前記のようにして得られた医療用粒子は、官能基を介して生理活性物質を固定化することにより、免疫沈降法やプルダウンアッセイ等に用いる分析用粒子として利用できる。該医療用粒子を、生理活性物質を溶解した液体と接触させ、粒子上の捕捉部と生理活性物質とを反応させることで、生理活性物質を粒子に固定化することができる。

【0065】

20

前記生理活性物質は、核酸、アプタマー、タンパク質、抗体、抗原、プロテインA、プロテインG、リガンド、ペプチド、グルタチオン、低分子化合物、ビオチン、糖鎖、レクチン、糖脂質、及び糖タンパクよりなる群から選ばれる少なくとも一つであることが好ましい。

【0066】

医療用粒子に活性エステル基が存在する場合、生理活性物質を溶解した液体のpHは7.0~12.0であることが好ましく、pH7.5~11がより好ましい。pHが上記範囲であることにより、固定化を効率よく行うことができるとともに、生理活性物質の変性・分解を抑制することが可能となる。このような液体としては、リン酸塩水溶液が好ましい。あるいは、生理活性物質を溶解した液体はトリエチルアミンなど触媒を含有する有機溶媒でもよいし、これとリン酸塩水溶液との混合物でもよい。

30

【0067】

前記リン酸塩は特に限定されるものではないが、リン酸2水素カリウム、リン酸2水素ナトリウム、リン酸水素2カリウム、又はリン酸水素2ナトリウムが生理活性物質への影響が少なく、特に好ましい。

【0068】

前記リン酸塩水溶液のリン酸塩濃度は0.1M以上5M以下であることが好ましい。この範囲にあることで、効率的に生理活性物質を粒子に固定化することができる。

【0069】

生理活性物質付着後は、2-アミノエタノール等のアミノ基を有する低分子物質で担体を処理し未反応の活性エステル基を失活させてしまうことが好ましい。

40

【0070】

前記のように作製した分析用担体は、免疫沈降法やプルダウンアッセイ等に用いる分析用粒子として利用できる。例えば、該分析用担体に、標的生体分子の溶解液、血液、血漿、血清、細胞破碎液、細胞培養液、及び組織破碎液から選ばれる少なくとも一つの溶液に接触させることにより、標的生体物質の捕捉が可能となる。

【実施例】

【0071】

以下、本発明を実施例および比較例に基づいて詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

50

【0072】

<実施例1>

【0073】

(p-ニトロフェニルオキシカルボニル-ポリエチレングリコールメタクリレート (MEONP) の重合)

0.01molのポリエチレングリコールモノメタクリレート (Blenmer PE-200 (n=4)、日本油脂(株)製)を20mLのクロロホルムに溶解させた後、-30℃まで冷却した。-30℃に保ちながらこの溶液に、予め作製しておいた0.01molのp-ニトロフェニルクロロフォーマート (Aldrich製)と0.01molのトリエチルアミン (和光純薬(株)製)及びクロロホルム20mLの均一溶液をゆっくりと滴下した。-30℃にて1h反応させた後、さらに2時間溶液を攪拌した。その後反応液から塩をろ過により除去し、溶媒を留去してp-ニトロフェニルオキシカルボニル-ポリエチレングリコールメタクリレート (MEONP)を得た。得られたモノマーを重クロロホルム溶媒中¹H-NMRで測定し、エチレングリコール残基が平均4.5単位含まれていることを確認した。

10

【0074】

(粒子表面へのシランカップリング剤の導入)

メタクリロキシプロピルジメチルメトキシシラン (Gelest社製SIM6486.5) 13gをpH3.0の酢酸水溶液100mLとエタノール100mLとの混合液に添加し、シランカップリング剤を加水分解した後に、シリカビーズ (平均粒径5μm、細孔径70Å、富士シリシア化学株式会社製SMB70-5) 10gを投入し70℃で2時間攪拌した後、吸引ろ過により反応溶液からシリカビーズを回収し、100℃で1時間加熱した。その後、エタノールで分散させてよく振盪した後、遠心分離により上澄みを除去し乾燥させた。

20

【0075】

(粒子表面への、高分子化合物を含む層の形成)

メトキシポリエチレングリコールメタクリレート (PEGMA、数平均分子量Mn=468、エチレングリコール残基数は平均9単位、新中村化学株式会社製)と先に重合したMEONPを、エタノールに溶解させ、モノマー混合溶液を150mL作製した。総モノマー濃度は0.4mol/L、それぞれのモル比はPEGMA、MEONPの順に80:20である。そこにAIBNを0.008mol/Lになるように添加し、均一になるまで攪拌した。その後、上記のメタクリロキシプロピルジメチルメトキシシランで処理したシリカビーズ10gを投入し、アルゴンガス雰囲気下、70℃で6時間反応させた。次いで、遠心分離により反応溶液からシリカビーズを回収し、ジメチルスルホキシドに分散させ、よく振盪した後、吸引ろ過によりビーズを回収し、真空乾燥させた。これを4ロット繰り返し合成した。

30

【0076】

<実施例2>

実施例1の粒子表面への、高分子化合物を含む層の形成において、総モノマー濃度を0.2mol/Lにしたものを実施例2とした。

40

【0077】

<比較例>

実施例2の担体表面へのシランカップリング剤の導入において、メタクリロキシプロピルジメチルメトキシシランの処方量を5.0gにしたものを比較例とした。

【0078】

(粒子の表面に導入された、高分子化合物を含む層の重量の測定)

粒子の表面に導入された、高分子化合物を含む層の重量は、TGA装置 (セイコーインスツルメント社製TG/DTA6200)を用いて、空気雰囲気中、室温から500℃へ10℃/分で昇温し、さらに500℃を1時間維持した後の重量減少率を測定した。この値と、別途BET法で求めた単位重量当たりの粒子の表面積から、粒子の表面に導入された

50

、高分子化合物を含む層の重量を算出した。

【0079】

（粒子に対する非特異吸着量の測定）

- ・ 粒子の不活性化

実施例および比較例の粒子それぞれ20mgをエッペンチューブに採取し、0.1M 2-エタノールアミンのtris-HClバッファ溶液（pH 9.5）1mLを投入、1時間転倒混和することで、MEONPのp-ニトロフェニル基を不活性化した。その後tris-HClバッファ（pH 7.4）で洗浄した。

【0080】

（2）粒子へのタンパク質吸着および回収

不活性化した粒子2mg分を新たなエッペンチューブに移し、遠心分離後、上清を除去した。そこに0.3mg/mLに調整したHeLa細胞ライセート1mLを添加し、4℃で2時間転倒混和し、粒子にタンパク質を吸着させた。その後0.05% Tween 20含有tris-HClバッファ（pH 7.4）で粒子を洗浄した。遠心分離後、上清を除去し、グリシン-HClバッファを30μL加え、ボルテックスミキサーで混合、再度遠心分離し、粒子に吸着したタンパク質が溶解した上清を回収した。

【0081】

- ・ SDS-PAGEおよび銀染色

（2）で得た上清および既知量のBSAを用いてSDS-PAGEを行い、さらに銀染色を実施した。

【0082】

- ・ 非特異吸着量の測定

染色後のゲルをスキャナで読み取り、画像処理を行いバンドの濃さを数値化した。数値化においてはフリーソフトImageJを利用した。BSAのバンドの濃さから検量線を作成し、これに基づき、単位重量あたりに非特異吸着していたタンパク質の量を算出した。

【0083】

（抗体を固定した粒子の抗原捕捉能）

- ・ 1次抗体固定化

実施例および比較例で得られた粒子各20mgに対し、50μg/mLに調製したCRP抗体（Abnova製）の1.2Mりん酸水素二カリウム溶液1mLを加え、室温にて1晩転倒混和した。0.05% Tween 20含有PBSで3回洗浄した。さらに0.1M 2-エタノールアミンのtris-HClバッファ溶液（pH 9.5）で室温下、1時間処理し、粒子に残存しているMEONPのp-ニトロフェニル基の不活性化を行った。

【0084】

- ・ CRPとの反応

CRP抗体を固定化した粒子5mgに3μg/mLに調製したCRPのPBS溶液1mLを加え、室温にて1時間転倒混和した。遠心分離で粒子を回収後0.05% Tween 20含有PBSで3回洗浄した。

【0085】

- ・ 2次抗体との反応

CRPを反応させた粒子に、1μg/mLに調製したHRP標識化CRP抗体（Abnova製）溶液を1mL加え、室温にて1時間転倒混和した。遠心分離で粒子を回収後0.05% Tween 20含有PBSで3回洗浄した。

【0086】

- ・ CRP捕捉量の定量

HRP標識化CRP抗体を反応させた粒子を、住友ベークライト株式会社製ペルオキシダーゼ発色キットを用いて発色させ、450nmの吸光度を測定することによりCRPの捕捉量を見積もった。

【0087】

10

20

30

40

50

また、実施例および比較例の粒子にCRP抗体を固定化せずに不活化のみを行ったものに対して、上記と同様にCRPとの反応、2次抗体との反応を実施し、CRPの非特異吸着量の定量を行った。

【0088】

単位表面積あたりに含まれる高分子化合物の重量、タンパク質の非特異吸着量、CRP抗体を固定した粒子の抗原捕捉能をまとめて表1に示す。

【0089】

【表1】

		単位表面積あたりに含まれる高分子化合物の重量 (mg/m ²)	タンパク質の非特異吸着量 (ng/mg)	CRP抗体を固定した粒子の抗原捕捉能	
				450nmにおける吸光度	
				抗体固定化粒子	不活性化粒子
実施例1	1	1.07	4	1.18	0.1
	2	1.04	8	1.05	0.09
	3	1	12	1.12	0.12
	4	0.98	18	1.03	0.11
実施例2		0.89	31	0.98	0.12
比較例		0.78	105	0.6	0.18

10

20

【0090】

単位表面積あたりに含まれる高分子化合物の重量の増加に伴い、タンパク質の非特異吸着量が減少する傾向が認められる。タンパク質の非特異吸着量は約50ng/mg以下でなければ、S/Nの低下など実用上問題が発生することから、単位表面積あたりに含まれる高分子化合物の重量は0.8mg/m²以上が望ましいといえる。また、単位表面積あたりに含まれる高分子化合物の重量が多いほど、抗体固定化粒子が標的である抗原を多く捕捉する傾向が認められ、0.8mg/m²以上では十分にシグナルを検出できていることが分かる。以上より、単位表面積あたりに含まれる高分子化合物の重量が0.8mg/m²以上になると、分析用粒子としての性能が十分に発揮できることがわかる。

30

【産業上の利用可能性】

【0091】

本発明により、生理活性物質を効率的に固定化することができ、且つ非特異吸着を抑制した粒子を提供することが可能となった。さらには、生理活性物質を固定化した粒子で目的とする生体分子を効率的に捕捉できるようになった。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

G 0 1 N 33/543 5 2 5 G

专利名称(译)	亲和珠		
公开(公告)号	JP2016180716A	公开(公告)日	2016-10-13
申请号	JP2015061880	申请日	2015-03-25
[标]申请(专利权)人(译)	住友电木株式会社		
申请(专利权)人(译)	住友ベークライト株式会社		
[标]发明人	松元孝行		
发明人	松元孝行		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/543.525.U G01N33/543.501.J G01N33/543.525.W G01N33/543.525.E G01N33/53.M G01N33/543.525.G		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供具有优异生理活性物质固定能力且具有较少非特异性吸附的医用颗粒，以及具有优异目标生物分子捕获能力且具有较少非特异性吸附的分析颗粒。医用颗粒具有核颗粒和在颗粒表面上含有高分子化合物的层，并且满足式(1)。式(1) $A/B \geq 0.8 \text{ mg/平方米}$ ，A：通过TG测定，每1g核粒子的粒子表面含有高分子化合物的层的重量(mg)，B：粒子：核表面积每1克(平方米) 【选择图表】无

