

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年2月23日 (23.02.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/018901 A1

(51) 国際特許分類: G01N 33/543, 37/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/012218

(22) 国際出願日: 2004年8月19日 (19.08.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社リバース・プロテオミクス研究所 (REVERSE PROTEOMICS RESEARCH INSTITUTE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒2920818 千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目6番地7 Chiba (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田中 明人 (TANAKA, Akito) [JP/JP]; 〒2920818 千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目6番地7 株式会社リバース・プロテオミクス研究所内 Chiba (JP). 寺田 知弘 (TERADA, Tomohiro) [JP/JP]; 〒2920818 千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目6番地7 株式会社リバース・プロテオミクス研究所内 Chiba (JP). 田村 鶴紀 (TAMURA, Tsuruki) [JP/JP]; 〒2920818 千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目6番地7 株式会社リバース・プロテオミクス研究所内 Chiba (JP). 市山 高明 (SHIYAMA, Takaaki) [JP/JP]; 〒2920818 千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目6番地7 株式会社リバース・プロテオミクス研究所内 Chiba (JP). 山崎 晃 (YAMAZAKI, Akira) [JP/JP]; 〒2920818 千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目6番地7 株式会社リバース・プロテオミクス研究所内 Chiba (JP). 古屋 実 (FURUYA, Minoru) [JP/JP]; 〒2920818 千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目6番地7 株式会社リバース・プロテオミクス研究

所内 Chiba (JP). 原村 昌幸 (HARAMURA, Masayuki) [JP/JP]; 〒2920818 千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目6番地7 株式会社リバース・プロテオミクス研究所内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD FOR SUPPRESSING INTERMOLECULAR NONSPECIFIC INTERACTION AND FOR INTENSIFYING INTERMOLECULAR SPECIFIC INTERACTION ON METAL SURFACE

(54) 発明の名称: 金属表面上における分子間の非特異的な相互作用の抑制方法ならびに分子間の特異的な相互作用の増強方法

(57) Abstract: A method of searching for a target molecule to a ligand immobilized on a metal surface, or of analyzing the interaction between the ligand and the target molecule, characterized in that the immobilization of the ligand on the metal surface is carried out through a hydrophilic spacer. In this method, not only can any nonspecific interactions being obstacles in the analysis of intermolecular interactions on metal surfaces be eliminated or suppressed but also any intermolecular specific interactions can be intensified.

(57) 要約: 金属表面に固定化されたリガンドに対するターゲット分子の探索あるいは当該リガンドとターゲット分子との相互作用を解析する方法であって、リガンドの金属表面への固定化が親水性スパーサーを介して実施されることを特徴とする本発明の方法は、金属表面上での分子間相互作用解析において障害となる非特異的な相互作用を排除、抑制するとともに分子間の特異的な相互作用を増強することができる。

WO 2006/018901 A1

明細書

金属表面上における分子間の非特異的な相互作用の抑制方法

ならびに分子間の特異的な相互作用の増強方法

技術分野

5 本発明は、固相担体を用いた分子間相互作用における基盤技術に関する。より詳しくは、解析を目的とする分子を金属表面に固定化し、当該金属表面上での分子間相互作用を利用し、当該相互作用を測定、解析することによって、解析を目的とする分子に特異的な相互作用を有する分子を選別、精製する、あるいは分子間の特異的な相互作用を解析する技術に関する。

10

背景技術

 近年、分子間相互作用を基盤とした手法を用い、ある特定の分子に特異的な相互作用を有する分子を探索する試み、あるいは分子間相互作用を詳細に検討する研究が盛んに行われている。これは具体的には、低分子－低分子、低分子－高分子、あるいは高分子－高分子の組み合わせのうちの片方の分子を固相担体に固定し、両分子間の相互作用を測定する研究、あるいはそれに基づいて目的とするターゲット分子（固相担体に固定化した分子に特異的な相互作用を有する分子）を精製する研究に代表される。分子間相互作用を基盤とした各種手法の例としては、後者の例としての1) アフィニティー樹脂を用いたターゲット研究、前者の例としての2) 表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance: S P R)を応用した方法が有名である。

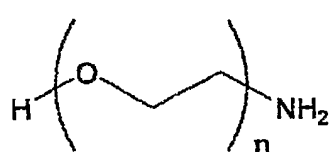
15 1) の例としては、1989年のシュライバー教授によるアフィニティー樹脂を用いた免疫抑制剤FK506の結合タンパク質FKBP (FK506 binding proteins) の発見 (FK506の細胞内結合タンパク質としてのFKBP12の発見; 例えばネイチャー(Nature), (英国), 1989年10月26日, 第341巻, p. 758－760参照)、及び引き続き行われたFK506－FKBP複合体によるFK506

20 6薬効メカニズムにおけるカルシニューリン阻害作用の発見 (例えばセル(Cell), (米国), 1991年8月23日, 第66巻, 第4号, p. 807－815参照)

25 や、抗癌剤T r a p o x i nのターゲットタンパク質としてのHDAC (例えばサ

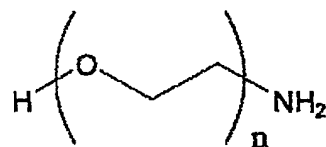
イエンス(Science), (米国), 1996年4月19日, 第272巻, p. 408-411参照) 発見等が有名である。また2) の例としては、固相担体として金薄膜を利用し、化合物あるいはタンパク質等とそれと特異的に相互作用するタンパク質等との相互作用を詳細に検討できるB I A C O R E (商品名) が有名である。

- 5 しかし、これまでに上記手法において、1) アフィニティー樹脂を用いたターゲット探索においてはアフィニティー樹脂に結合したタンパク質をSDSゲル等で解析する際に特異的タンパク質を覆い隠すような非特異的タンパク質が存在し、特異的タンパク質の検出が困難になる、あるいは2) B I A C O R E等を用いた解析においては、大きな非特異的タンパク吸着に起因するピークの存在により特異的タン
- 10 パク結合によるピーク判別が困難になる等、特異的な分子間相互作用に基づく選別、精製の障害となる非特異的な分子間相互作用の存在が問題となってきた。これらは、重要な基盤技術である固相担体、詳しくは固相担体の表面の性状が原因と経験上考えられてきたが、どのような性状が非特異的な相互作用の要因となっているのか、また当該非特異分子間相互作用を効率的に抑制する方法は明確に知られていないの
- 15 が現状である。例えばTentaGel (Fluka 社、Cat. No=86364) 等一部の樹脂はPEGスペーサーを有する化学的・物理的に安定でかつアフィニティークロマト用樹脂としても使用されているが(例; Thorpe DS, Walle S., Combinatorial chemistry defines general properties of linkers for the optimal display of peptide ligands for binding soluble protein targets to TentaGel microscopic beads.,
- 20 Biochem Biophys Res Commun 2000 Mar 16;269(2):591-5)), 非特異的な相互作用の抑制にどのような構造がどのように寄与しているのか等の基礎的な技術は知られないできているし、その非特異的な相互作用がどの程度抑制されているかあるいはアフィニティー樹脂として十分機能しているのかについての情報も充分でないのが現状である。そのようなPEGスペーサーとしては上記したTentaGelやArgoGel
- 25 (Argonaut 社) が市販されている。これらの構造は下記の通りである。



n=平均68

TentaGel



n=29-58

ArgoGel

また、親水的な性質を有する糖誘導体から構成される樹脂（例えば、アフィゲル（A f f i G e l ; Bio-Rad 社、Cat. No=153-2401）やセファロース誘導体（ファ
 5 ルマシア社、ECH Sepharose 4B、Cat. No=17-0571-01）等が知られている）は、非
 特異的な分子間相互作用は小さいものの、糖誘導体であるため物理的・化学的に不
 安定でありその使用は制限されるものであった。

上記分子間相互作用を基盤とした手法において、非特異的な相互作用を人為的に
 抑制することが可能となれば、得られた結果が特異的タンパク結合によるものかあ
 るいは非特異的タンパク吸着によるものかの検定をする必要がなくなり、両者の区
 10 別が現実的に不可能であつたためによる研究の中断の機会が減少するばかりでなく、使
 用するタンパク質等の必要量も大幅に削減でき時間的側面、労力的側面においても
 大幅なコスト削減が可能となる等、これらの手法の適応は一段と増すと考えられる。

本発明者らは、これまでに、樹脂等の固相担体にリガンドを固定化する際に、親
 水性スペーサーを介在させることによって、固定化したリガンド分子及び／または
 15 樹脂自身と、該リガンドに対して特異的でない分子との非特異的な相互作用を低減
 化させることができることを既に見出している（WO 2004/025297）。
 しかしながらかかる方法は、主として分子間の非特異的な相互作用を抑制すること
 により S/N 比を改善するという仕組みに基づくものであり、依然として分子間の
 特異的な相互作用そのものを増強させる方法が求められている。

20 本発明は、特に金属表面上での分子間相互作用解析において障害となる非特異的
 な相互作用を排除、抑制する方法の提供を目的とし、さらに当該方法を利用して、

金属表面上に固定化されたリガンドと特異的な相互作用を有するターゲット分子を精製・解析する方法を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは、上記課題に鑑み、種々検討を行った結果、驚くべきことに、親水性スパーサーの固相担体への導入は、特に固相担体として金属を用いた場合に、非特異的な相互作用の抑制作用のみならず、特異的な相互作用の増強をももたらすことを見出し、より正確なリガンドのターゲットの探索やリガンドとターゲット分子との特異的な相互作用の解析等を行うことに成功して本発明を完成するに至った。

即ち本発明は下記の通りである。

〔１〕リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を解析する過程において、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことを特徴とする、リガンド及び／または金属表面とターゲット分子以外の分子との非特異的な相互作用を抑制する方法。

〔２〕リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を解析する過程において、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことを特徴とする、リガンドとターゲット分子との特異的な相互作用を増強する方法。

〔３〕リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を解析する過程において、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことを特徴とする、リガンド及び／または金属表面とターゲット分子以外の分子との非特異的な相互作用を抑制し、且つリガンドとターゲット分子との特異的な相互作用を増強する方法。

〔４〕リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を用いてターゲット分子を選別する過程において、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことを特徴とする、リガンド及び／または金属表面とターゲット分子以外の分子との非特異的な相互作用を抑制する方法。

〔５〕リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を用いてターゲット分子を選別する過程において、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことを特徴とする、リガンドとターゲット分子との特異的な相互作用を増強する方法。

５ 〔６〕リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を用いてターゲット分子を選別する過程において、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことを特徴とする、リガンド及び／または金属表面とターゲット分子以外の分子との非特異的な相互作用を抑制し、且つリガンドとターゲット分子との特異的な相互作用を増強する方法。

10 〔７〕金属表面の疎水的性質を低減させる処理が、リガンドの金属表面への固定化の際にそれらの間に親水性スペーサーを導入することである、上記〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の方法。

〔８〕親水性スペーサーが、金属表面及びリガンドと結合した状態で以下の特徴の少なくともいずれか１つを有するものである、上記〔７〕記載の方法：

15 （１）水素結合アクセプター数が６以上である、
 （２）水素結合ドナー数が５以上である、
 （３）水素結合アクセプター数及び水素結合ドナー数の総計が９以上である。

〔９〕さらに、親水性スペーサーがその分子中にカルボニル基を１以上有するものである、上記〔８〕記載の方法。

20 〔１０〕さらに、親水性スペーサーが水溶液中で電荷的に陽性あるいは陰性になる官能基を有さないことを特徴とする、上記〔８〕または〔９〕記載の方法。

 〔１１〕リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を解析する方法であって、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことにより、リガンド及び／または金属表面とターゲット分子以外の分子との非特異的な相互作用を抑制することを特徴とする方法。

25

 〔１２〕リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を解析する方法であって、金属表面の疎

水的性質を低減させる処理を行うことにより、リガンドとターゲット分子との特異的な相互作用を増強することを特徴とする方法。

〔1 3〕リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を解析する方法であって、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことにより、リガンド及び／または金属表面とターゲット分子以外の分子との非特異的な相互作用を抑制し、且つリガンドとターゲット分子との特異的な相互作用を増強することを特徴とする方法。

〔1 4〕リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を用いて、ターゲット分子を選別する方法であって、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことにより、リガンド及び／または金属表面とターゲット分子以外の分子との非特異的な相互作用を抑制することを特徴とする方法。

〔1 5〕リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を用いて、ターゲット分子を選別する方法であって、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことにより、リガンドとターゲット分子との特異的な相互作用を増強することを特徴とする方法。

〔1 6〕リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を用いて、ターゲット分子を選別する方法であって、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことにより、リガンド及び／または金属表面とターゲット分子以外の分子との非特異的な相互作用を抑制し、且つリガンドとターゲット分子との特異的な相互作用を増強することを特徴とする方法。

〔1 7〕金属表面の疎水的性質を低減させる処理が、リガンドの金属表面への固定化の際にそれらの間に親水性スペーサーを導入することである、上記〔1 1〕～

〔1 6〕のいずれかに記載の方法。

〔1 8〕親水性スペーサーが、金属表面及びリガンドと結合した状態で以下の特徴の少なくともいずれか1つを有するものである、上記〔1 7〕記載の方法：

- (1) 水素結合アクセプター数が6以上である、
- (2) 水素結合ドナー数が5以上である、
- (3) 水素結合アクセプター数及び水素結合ドナー数の総計が9以上である。

5 [19] さらに、親水性スペーサーがその分子中にカルボニル基を1以上有するものである、上記[18]記載の方法。

[20] さらに、親水性スペーサーが水溶液中で電荷的に陽性あるいは陰性になる官能基を有さないことを特徴とする、上記[18]または[19]記載の方法。

[21] リガンドに対して特異的な相互作用を有するターゲット分子のスクリーニング方法であって、少なくとも以下の工程を含む方法：

- 10 (1) リガンドを金属表面に親水性スペーサーを介して固定化する工程、
- (2) ターゲット分子を含むかまたは含まない試料を上記(1)で得られたリガンドが固定化された金属表面に接触させる工程、
- (3) リガンドに特異的な相互作用を示したか、または示さなかった分子を同定し、解析する工程、及び
- 15 (4) 上記(3)で得られた解析結果に基づいて、リガンドに対して特異的な相互作用を有する分子をターゲット分子であると判断する工程。

[22] 親水性スペーサーが、金属表面及びリガンドと結合した状態で以下の特徴の少なくともいずれか1つを有するものである、上記[21]記載の方法：

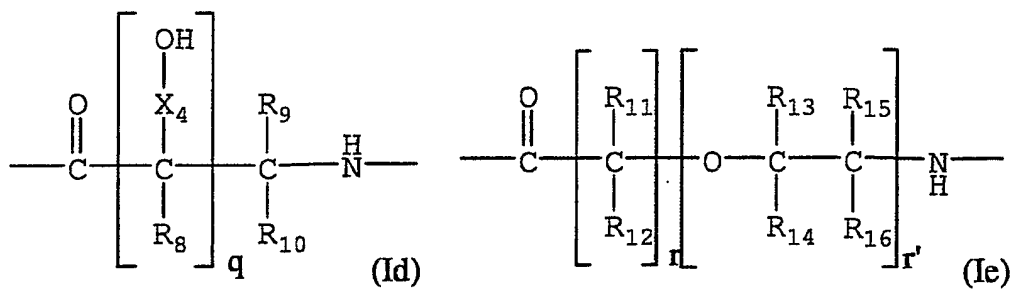
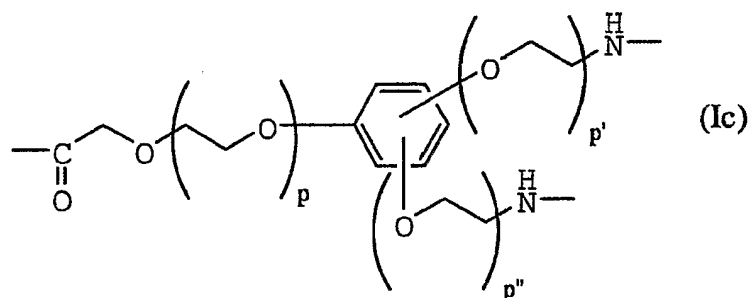
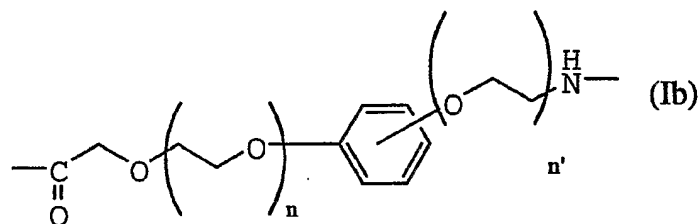
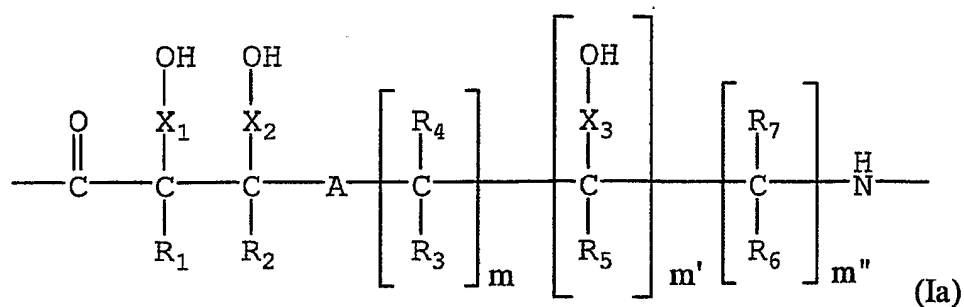
- 20 (1) 水素結合アクセプター数が6以上である、
- (2) 水素結合ドナー数が5以上である、
- (3) 水素結合アクセプター数及び水素結合ドナー数の総計が9以上である。

[23] さらに、親水性スペーサーがその分子中にカルボニル基を1以上有するものである、上記[22]記載の方法。

25 [24] さらに、親水性スペーサーが水溶液中で電荷的に陽性あるいは陰性になる官能基を有さないことを特徴とする、上記[22]または[23]記載の方法。

[25] 親水性スペーサーが以下の式(Ia)～(Ie)からなる群より選択されるいずれか1つの式で表される部分構造を少なくとも1つ有するものである、上記

[7] ~ [10]、[17] ~ [24] のいずれかに記載の方法：



(式 (I a) 中、

Aは適当な連結基であり、

- 5 $X_1 \sim X_3$ はそれぞれ同一または異なって単結合あるいは炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基であり、
 $R_1 \sim R_7$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分

枝状のアルキル基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ あるいは水酸基であり、

m は0～2の整数であり、 m' は0～10の整数であり、 m'' は0～2の整数であり、

5 $R_3 \sim R_7$ が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく、 X_3 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく；

式 (I b) 中、

n 及び n' はそれぞれ同一または異なって1～1000の整数であり；

式 (I c) 中、

p 、 p' 及び p'' はそれぞれ同一または異なって1～1000の整数であり；

10 式 (I d) 中、

X_4 は単結合あるいは炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基であり、

$R_8 \sim R_{10}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ あるいは水酸基であり、

15 q は1～7の整数であり、

R_8 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく、 X_4 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく；

式 (I e) 中、

20 $R_{11} \sim R_{16}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ あるいは水酸基であり、

r は1～10の整数であり、 r' は1～50の整数であり、

$R_{11} \sim R_{16}$ がそれぞれ複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよい。

25 [26] 親水性スペーサーが式 (I a) ～ (I e) からなる群より選択されるいずれか1つの式で表される部分構造を2つ以上有するものである、上記 [25] 記載の方法。

[27] リガンドが固定化された固相担体であって、当該固相担体が金属であり、

且つ該金属とリガンドとの間に親水性スペーサーが介在することを特徴とする、固相担体。

〔28〕親水性スペーサーが上記式（I a）～（I e）からなる群より選択されるいずれか1つの式で表される部分構造を少なくとも1つ有するものである、上記

5 〔27〕記載の固相担体。

〔29〕金属が金である、上記〔27〕または〔28〕記載の固相担体。

〔30〕リガンドと金属表面との間への親水性スペーサーの導入を確認するための方法であって、リガンドの金属表面への固定化の際にそれらの間に親水性スペーサーを導入する工程において、親水性スペーサーに由来する保護基が脱保護されること

10 によって生じる脱離基を検出することを含む方法。

〔31〕脱離基の検出が質量分析を用いて実施される、上記〔30〕記載の方法。

〔32〕保護基が9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基である、上記〔30〕記載の方法。

図面の簡単な説明

15 図1は、金膜表面（リガンド）への非特異的結合タンパク質の吸着ならびに特異的タンパク質の結合について、親水性スペーサーを介してリガンドを金膜表面に固定化した場合（製造例11）と、親水性スペーサー無しにリガンドを金膜表面に固定化した場合（参考例1）とを比較した結果を表す電気泳動写真である。

発明の詳細な説明

20 本発明は、特異的な分子間相互作用を解析し、それを利用する技術において問題視されてきた、非特異的な分子間相互作用（例えばタンパク質の固相担体への非特異的な吸着に代表される）が、固相担体における固相表面とタンパク質等の分子との疎水性相互作用によるものであるという知見に基づく。特に本発明においては、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことによって、当該金属表面への

25 種々の分子の非特異的な吸着を抑制し、また、特異的な吸着量を向上させることも可能とする方法を提供する。

本明細書中、疎水的な性質は、一般的に疎水性パラメーターによって表すことが

できるが、例えば分配係数、具体的にはLOG Pによって表すことができる。LOG Pの算出には、簡便には、CLOG P（化合物の疎水性パラメーターを計算機によって見積もるソフトによって得られる予測値；例えばCorwin/Leo's program (CLOGP, Daylight Chemical Information System Co., Ltd.)を使用して計算できる）等が利用されるが、疎水性パラメーターはCLOG Pによって算出されるものに限定されるものではない。本発明では定性的に疎水性傾向が強まるにつれて、非特異的な相互作用が増加する。例えばCLOG Pについて言えば、CLOG Pが大きい程、疎水性が高いことを意味し、CLOG Pの増加は非特異的な相互作用（例えば金属表面へのタンパク質の非特異的な吸着）の増加と相関関係にある。ここで疎水性パラメーターの変更は、例えば金属表面上に固定化するリガンドを様々な値（例えばCLOG P）のものに変更することによって実施され得るし、また、金属表面とリガンドとの間に親水性のスペーサーを導入することによって、金属表面の疎水的な性質を緩和、低減することもできる。

当該スペーサーの導入は、CLOG Pが大きいことが予測されるリガンドを金属表面に固定化する必要がある場合に好ましい態様であり、以下に分子間の非特異的な相互作用を抑制する手段として親水性スペーサーを用いた場合について詳述する。

本発明は、金属表面に固定化される分子（本明細書中、リガンドとも称する）と当該分子に対して特異的な相互作用を有する分子（本明細書中、ターゲット分子とも称する）との相互作用を解析する技術、かかる解析をもとにターゲット分子を同定、選別するという技術を提供する。本明細書中、リガンドならびにターゲット分子という用語は、互いに特異的な分子間相互作用を有する組み合わせを意図するものであって、当該組み合わせのうち、片方をリガンドとして固相に固定化すれば他方がターゲット分子となり、すなわちどちらを固相に固定化するかによって、それらの呼称は相互に変更され得る。リガンドに特異的な相互作用を有するターゲット分子は1種類とは限らず、また同様にターゲット分子に特異的な相互作用を有するリガンドも1種類とは限らない。本明細書ではリガンドならびにターゲット分子という用語は、ある特定の分子を指すものではなく特異的な相互作用を有する分子同

士の各々を意図するものである。

「特異的な相互作用」とは、特定のリガンド（特定のターゲット分子）のみを特異的に認識して結合するような特性を発揮する作用であり、アゴニストあるいはアンタゴニストに対する特異的受容体、基質に対する酵素、そして例えばFK506（リガンド）に対するFK506結合タンパク質（ターゲット分子）や、ステロイドホルモンに対するステロイドホルモン受容体（例；dexamethasone と glucocorticoid receptor）、抗がん剤 *traxin* に対するHDAC等の関係が「特異的な相互作用」に該当する。一方、「非特異的な相互作用」とは、それによる結合の対象が広範にわたり且つ特定分子に限定されず、反応条件によって種々変化するような状況を生じる作用をいい、本発明においては、固相上のリガンドや固相担体自体の表面に、結合・吸着するような不特定の分子間の作用を意味する。

「非特異的な相互作用」は、「特異的な相互作用」に基づくリガンドとターゲット分子との結合の障害となるか、あるいは混同されることにより「特異的な相互作用」による結合を見落としてしまう危険性がある。

本発明において「特異的な相互作用を解析する」とは、リガンドとターゲット分子との間の相互作用の特異性の程度を、相互作用情報として得ることであって、例えばK_d（解離速度定数）、K_a（結合速度定数）等の数値として得ることができる。本発明において「選別」とは、上記相互作用情報に基づき、リガンドと特異的な相互作用を有するか否かを判定し、ターゲット分子を同定することを意図する。

本発明においては、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を必須とする。かかる処理としては、例えば、金属表面へのリガンドの固定化の際にそれらの間に親水性スペーサーを導入する方法が挙げられる。親水性スペーサーを導入することにより金属表面の疎水的な性質が変化し、非特異的な相互作用を抑制することができ、加えて、特異的な相互作用を増強することができる。このような金属表面とリガンドとの間に導入された親水性スペーサーという金属表面の疎水的な性質を低減させる手段を用いることによって、リガンドに特異的な相互作用を有する分子（ターゲット分子）を同定、選別すること及び両者の相互作用を正確に測定することが可能

となる。

本発明において用いられる固相担体としての金属は、通常当分野で利用される種々のものであり、具体的には金、銀、鉄、シリコン等である。これらは、いかなる形状のものであってもよく、また上記した金属の種類や、その後に実施するリガンドとターゲット分子との相互作用の解析、ターゲット分子の同定、選別の工程の
5 為に行われる方法に応じて適宜決定される。例えば板状、薄膜状、糸状、コイル状等が挙げられるが、金属の薄膜であれば表面プラズモン共鳴によるB I A C O R E等の担体として好適に使用できる。

本発明において使用する金属は、上述の如く、その種類や形状に特に制限はないが、当然のことながら、リガンドが固定化されないような、あるいはリガンドが固定化されるもののターゲット分子との特異的な相互作用を発揮することができないような構造上の障害を有するものは、余分な工程を経る必要があつて操作が煩雑になつたり、あるいは使用に耐えなかつたりする場合があるので、本発明を実施する
10 上で好ましくない。

本発明において、「親水性スペーサー」とは、リガンドの金属表面への固定化の際に導入されて金属表面とリガンドとの間に介在する基となる物質であつて、親水性である。親水性の程度については後述する。ここで「スペーサーが介在する」とは、該スペーサーが固相内の官能基からリガンド内の官能基までの間に存在することを意味する。該スペーサーは、その一端を固相内の官能基と結合し、他端をリガ
15 ンド内の官能基と結合する。

また当該親水性スペーサーは、結果的に金属表面とリガンドとの間に介在する基として機能し得るものであれば2以上の化合物を順次、結合、重合させることによって得られるものであつても構わない。好ましくは単位化合物の重合反応によって得られる。2以上の化合物を結合あるいは重合させる過程は好ましくは金属表面上
20 で行われる。金属表面と親水性スペーサーとの結合、親水性スペーサーとリガンドとの結合、ならびに親水性スペーサーを構成する各成分の結合や重合はアミド結合や、シッフ塩基、C-C結合、エステル結合、水素結合、疎水性相互作用等の共有

結合あるいは非共有結合であり、いずれも当分野で公知の材料ならびに反応により形成される。

本発明において、金属表面の疎水的な性質を低減させる手段として当該金属表面とリガンドとの間に導入する親水性スペーサーとしては、金属表面の疎水的な性質を変化させ、非特異的な相互作用を排除するかあるいは抑制し、且つ、特異的な相互作用を増強するようなものであれば特に限定されないが、好ましくは金属表面及びリガンドと結合した状態（以下、この様な状態にある親水性スペーサーを便宜上「親水性スペーサー部分」と称する）で水素結合アクセプター（HBA ; hydrogen bond acceptor）数が6以上であるか、水素結合ドナー（HBD ; hydrogen bond donor）数が5以上であるか、あるいは該スペーサー1分子あたりのHBA数及びHBD数の総計が9以上の化合物である。またこれらの条件を2つもしくは全て満たすような化合物であってもよい。特に好ましくはHBA数は7以上であり、HBD数は6以上である。

ここで、水素結合アクセプター数（HBA数）とは、含まれる窒素原子（N）と酸素原子（O）の総数であり、水素結合ドナー数（HBD数）とは、含まれるNHとOHの総数である（例えば「アドバンスド ドラッグ デリバリー レビューズ (Advanced Drug Delivery Reviews)」, (オランダ国), 1997年, 第23巻, p. 3-25参照)。

金属表面にリガンドを固定化するには通常、チオール化合物やジスルフィド化合物を金属表面に吸着させて自己組織化単分子膜(Self-Assembled Monolayer; SAM)を形成させ、その末端でリガンドを固定化する方法が採用されている (Dojin News No. 91 p3 (1999)参照)。金属表面にSAMを形成させSAM中の官能基を介してリガンドをその表面に固定化することによって、リガンドとターゲット分子との相互作用を、金修飾電極、表面プラズモン共鳴、水晶発振子マイクロバランス (QCM; Quartz Crystal Microbalance) 等によって検出することができる (具体的にはそれぞれ電流、反射角、振動数の変化によって検出する)。例えば固相担体である金属として金を用いる場合にはチオール化合物としてアルカンチオールが用いられる。

従って、本発明においては、金属表面とリガンドとの間に介在する基であっても、リガンドと金属表面とを結合させるのに最低限必要な連結部分（具体的には上記したチオール化合物やジスルフィド化合物に由来する部分）については本発明の親水性スペーサー部分には含めず、従って、それぞれHBA数やHBD数に含めない。

- 5 また、リガンドと親水性スペーサーとの結合をより容易にする為にリガンドと親水性スペーサーとの間に任意の基を親水性スペーサーとの結合の前にあらかじめリガンドに結合あるいは導入することができるが、これらはリガンドに応じて適宜選択されるものであって、金属表面の疎水的な性質の緩和への寄与が少ないと考えられるので、当該基に含まれるNやO、あるいはNHやOHも本発明におけるHBD数
10 やHBA数には含めない。尚、リガンドと親水性スペーサーの間への任意の基の導入も上述したような種々の共有結合あるいは非共有結合が利用され、いずれも当分野で公知の材料ならびに反応により実施される。

- 本願発明の状況下ではHBA数が6以上（好ましくは7以上）、HBD数が5以上（好ましくは6以上）、HBA数とHBD数の総計が9以上、というこれらの条件を少なくとも1つ、好ましくは2つ以上満たさなければ、非特異的な相互作用を十分に抑制することができず、また、特異的な相互作用を十分に増強させることも困難である。従って、本願発明の親水性スペーサーにおいて「親水性」とは上記の性質を満たすことを意味する。本発明において親水性スペーサーのHBD数あるいはHBA数の上限としては、親水性であり且つ分子間の非特異的な相互作用を抑制
20 することができるものであれば特に限定されるものではなく、適切に重合反応等を繰り返すことにより極めて高い親水性を有するスペーサーを得ることができる。また、該スペーサーはタンパク質等の高分子であってもよく、そういった観点から、いずれも5万程度の値を上限とする。

- また、本発明においては、「親水性」の程度は上記定義を満たすものの、物理
25 的・化学的に不安定な化合物、例えば糖誘導体やセファロース誘導体をその基本骨格とする親水性スペーサーは、その不安定さ故にリガンドの固定化、続く種々の処理に耐えられない場合があり使用するのに好ましくない。具体的には従来、金薄膜

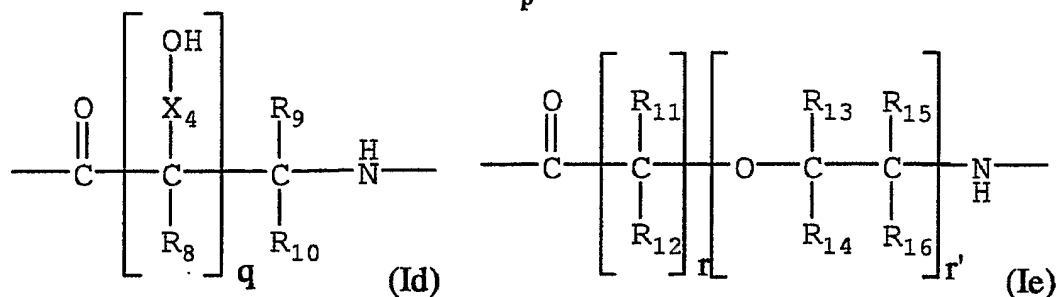
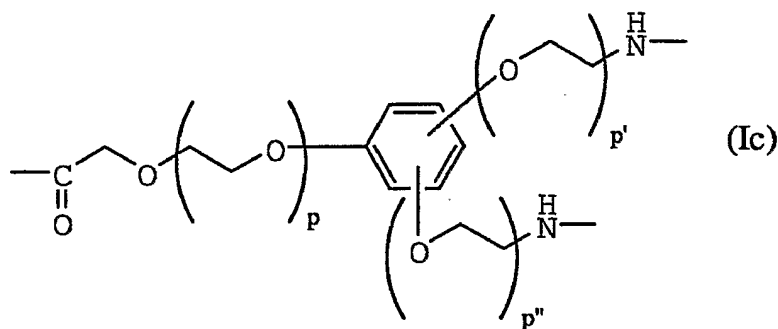
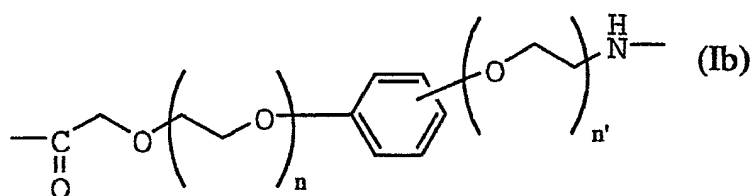
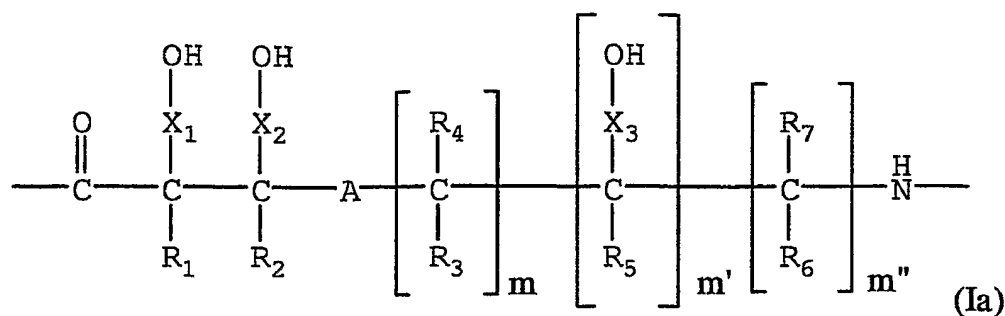
へのリガンド固定化の際に用いられるカルボキシメチルデキストランは本発明において使用する親水性スぺーサーには含めない。

さらに本発明において使用する親水性スぺーサーは、それ自体非特異的な相互作用（例えば該スぺーサーへのタンパク質の吸着等）を生じるものでないことが好ま

5 しい。具体的には、該スぺーサーが水溶液中で電荷的に陽性あるいは陰性になるような官能基を有さないことであり、当該官能基としてはアミノ基（ただし、該アミノ基に該アミノ基の塩基性を減弱させる官能基（例えばカルボニル基、スルホニル基）が結合している場合は除く）、カルボキシル基、硫酸基、硝酸基、ヒドロキサム酸基等が挙げられる。ここで水溶液中とは、具体的には、金属表面上でのリガンドとターゲット分子との相互作用を解析する過程、ターゲット分子を選別する過程、
10 あるいはターゲット分子をスクリーニングする為に実施されるリガンドとターゲット分子との結合反応（特異相互作用反応）が行われる環境下であって、親水性スぺーサーが電荷的に陽性あるいは陰性になるような官能基を有する場合にはイオン化するような条件下である。かかる条件は、例えば水溶液中、pH 1～11、温度0
15 ～100℃であり、好ましくはpH中性付近（pH 6～8）、約4℃～約40℃程度である。

さらに、本発明で使用する親水性スぺーサーは、後述する好適な親水性スぺーサーとして例示される各種の構造ないしは化合物から理解されるように、その分子内に1以上のカルボニル基を有していることが好ましい。

20 例えば、本発明で使用する親水性スぺーサーは、下記式（I a）～（I e）からなる群より選択されるいずれか1つの式で表される部分構造を少なくとも1つ有する化合物である。



(式 (I a) 中、

Aは適当な連結基であり、

$X_1 \sim X_3$ はそれぞれ同一または異なって単結合あるいは炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基であり、

R₁～R₇はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ あるいは水酸基であり、

m は $0 \sim 2$ の整数であり、 m' は $0 \sim 10$ の整数であり、 m'' は $0 \sim 2$ の整数であ

り、

$R_3 \sim R_7$ が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく、 X_3 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく；

式 (I b) 中、

5 n 及び n' はそれぞれ同一または異なって $1 \sim 1000$ の整数であり；

式 (I c) 中、

p 、 p' 及び p'' はそれぞれ同一または異なって $1 \sim 1000$ の整数であり；

式 (I d) 中、

10 X_4 は単結合あるいは炭素数 $1 \sim 3$ の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基であり、

$R_8 \sim R_{10}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数 $1 \sim 3$ の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ あるいは水酸基であり、

q は $1 \sim 7$ の整数であり、

15 R_8 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく、 X_4 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく；

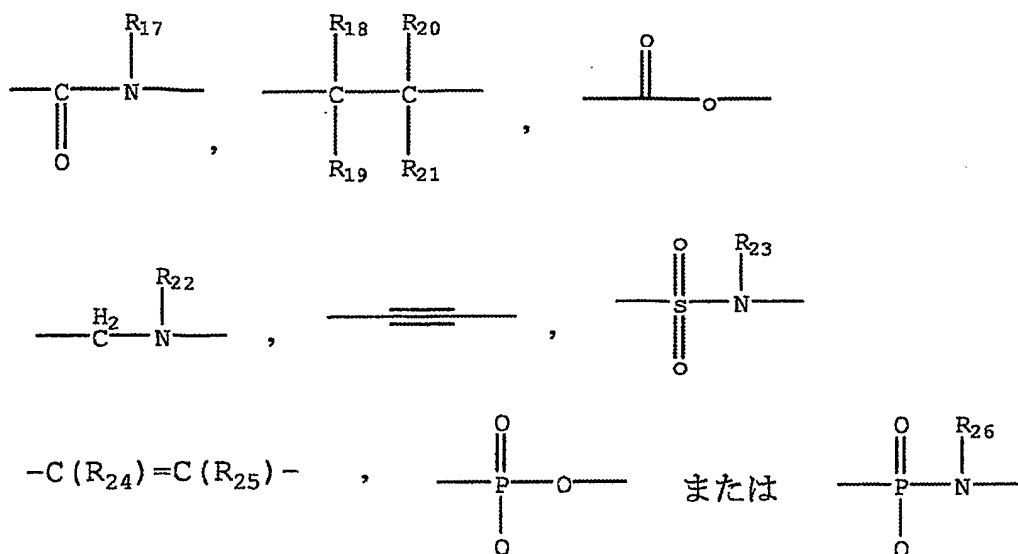
式 (I e) 中、

$R_{11} \sim R_{16}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数 $1 \sim 3$ の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ あるいは水酸基であり、

r は $1 \sim 10$ の整数であり、 r' は $1 \sim 50$ の整数であり、

20 $R_{11} \sim R_{16}$ がそれぞれ複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよい。

本明細書において各基の定義中、「適当な連結基」とは隣接する各々の部位を連結することができる基であれば特に限定されないが、具体的には以下の基が用いられる。



- 5 (式中、 R_{17} は水素原子または炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基であり、 $\text{R}_{18} \sim \text{R}_{21}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ あるいは水酸基であり、 $\text{R}_{22} \sim \text{R}_{26}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基（該アルキル基は水酸基、カルボン酸基、アミノ基等の親水性置換基で置換されている）である）。

10 本明細書において各基の定義中「炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基」としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基等が挙げられる。

本明細書において、「炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されているメチレン基」とは無置換のメチレン基ならびに上記した炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基で1または2置換されたメチレン基を意図する。

- 15 本発明の親水性スペーサーは、上記部分構造を2つ以上有していてもよく、その場合それらの部分構造は同一の式で表されるものであっても異なる式で表されるものであってもよい。

上記親水性スペーサーを少なくとも1種金属表面に固定化する。金属表面上のス

ペーサーの数は特に限定されず、リガンドの種類や量及びターゲット分子の種類や量、ならびに使用するスペーサーの種類や特性に応じて当業者は適宜設定することができるし、所望の分子間相互作用が検出できれば特に決める必要はない。通常、スペーサーは、固相担体として用いる金属ならびにリガンドに対して過剰量用いて
5 固定化する。金属表面に結合しなかった親水性スペーサーは、洗浄等の処理により反応系から容易に排除できる。

本発明において金属表面に固定化するリガンドは特に限定されず、公知の化合物であっても今後開発される新規な化合物であってもよい。また、低分子化合物であっても高分子化合物であってもかまわない。ここで低分子化合物とは分子量1000
10 0未満程度の化合物であって、例えば医薬品として通常使用し得る有機化合物及びその誘導体や無機化合物が挙げられ、有機合成法等を駆使して製造される化合物やその誘導体、天然由来の化合物やその誘導体、プロモーター等の小さな核酸分子や各種の金属等であり、望ましくは医薬品として使用し得る有機化合物及びその誘導体、核酸分子をいう。また、高分子化合物としては分子量1000以上程度の化合物であって、タンパク質、ポリ核酸類、多糖類、及びこれらを組み合わせたものな
15 どもが挙げられ、望ましくはタンパク質である。これらの低分子化合物あるいは高分子化合物は、公知のものであれば商業的に入手可能であるか、各報告文献に従って採取、製造、精製等の工程を経て得ることができる。これらは、天然由来であっても、また遺伝子工学的に調製されるものであってもよく、また半合成等によって得
20 ることもできる。

本発明では、上記リガンドを固定化した金属表面上で該リガンドとの特異的な相互作用に基づいてターゲット分子を選別する過程を要する。従ってターゲット分子は、リガンドと特異的に相互作用するものであれば特に限定されるものではなく、公知化合物である場合もあれば新規物質である場合も予想される。ターゲット分子
25 としては低分子化合物であっても高分子化合物であってもかまわない。ターゲット分子が低分子化合物の場合には、低分子化合物であるリガンドとの低分子化合物と低分子化合物との特異的相互作用に基づき、あるいは高分子化合物であるリガンド

との高分子化合物と低分子化合物との特異的相互作用に基づき、ターゲット分子が選別され得る。またターゲット分子が高分子化合物の場合には、低分子化合物であるリガンドとの低分子化合物と高分子化合物との特異的相互作用に基づき、あるいは高分子化合物であるリガンドとの高分子化合物と高分子化合物との特異的相互作用に基づき、ターゲット分子が選別され得る。好ましいリガンドとターゲット分子の組み合わせは低分子化合物と高分子化合物、あるいは高分子化合物と高分子化合物という組み合わせである。

ターゲット分子との相互作用の解析、ならびにターゲット分子の選別は簡便には固相である金属表面上で行う。ターゲット分子として予め候補物質が予測される場合には、候補物質を単独で上記金属表面に固定化されたリガンドと接触させ両者の相互作用を測定し、候補物質がターゲット分子であるか否かを判断すればよいが、通常、複数の物質（高分子化合物及び／または低分子化合物）を含む試料をリガンドと接触させ、複数の物質（高分子化合物及び／または低分子化合物）の各々とリガンドとの相互作用の有無ならびにその相互作用の程度を測定することによりターゲット分子であるか否かを判断し、選別する。ここで複数の物質を含む試料としては、全て公知化合物から構成されるものであっても、一部新規な化合物を含むものであっても、さらには全て新規な化合物から構成されるものであってもよい。しかしながら、リガンドのターゲット分子の探索、あるいは昨今のプロテオーム解析の進歩によれば、全てその構造が公知な化合物の混合物であることが望ましい。全て公知な化合物から構成される試料としては、大腸菌等によって遺伝子工学的に調製されたタンパク質の混合物等であり、一部新規な化合物を含むものとしては、細胞や組織の抽出物（ライゼート；Lysate）であり、また全て新規な化合物から構成されるものとしては、まだその機能や構造が知られていない新規なタンパク質や新しく合成された化合物等の混合物が挙げられる。試料が混合物の場合、特に公知化合物を含む場合には、任意にこれらの化合物の試料中の含有量を所望の値に設定しておくこともできる。リガンドのターゲット分子の探索という見地にたてば、低分子化合物ならびに高分子化合物であるのが好ましく、ヒト等の動物体内でのターゲッ

ト分子の探索についていえば高分子化合物であることが好ましい。

本発明は、上記金属表面に固定化されたリガンドを用いて、当該リガンドに特異的な相互作用を有するターゲット分子をスクリーニングする方法を提供する。該スクリーニング方法は以下の工程を少なくとも含む。尚、本スクリーニング法における、リガンド及びターゲット分子や金属（金属表面）、ならびに親水性スパーサーの各々の定義は上記した通りである。

（１）リガンドを金属表面に親水性スパーサーを介して固定化する工程。

当該工程は、リガンドと親水性スパーサーとの結合、親水性スパーサーと金属表面との結合からなる。リガンドに親水性スパーサーを結合させて、その後それらの複合体を金属表面に結合させてもよいし、金属表面に親水性スパーサーを結合させてからリガンドを結合させてもよく、リガンドが金属表面に固定化されたか否かは、リガンド、あるいはリガンドに予め結合・導入された任意の基に含まれるある特定の構造または置換基等に基づく反応等を利用して確認することができる。例えばリガンドあるいは親水性スパーサー中のアミノ基の保護基である 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基（Fmoc 基）から脱保護反応時に生成する脱離基を検出・測定する方法等が利用できる。個々の結合は、通常当分野で実施される反応を利用して実施される。簡便且つ確実な手段としてアミド結合形成反応を利用する方法が挙げられる。本反応は、例えば「ペプチド合成の基礎と実験」（ISBN 4-621-02962-2、丸善、昭和 60 年初版）に従って実施できる。各反応に用いられる試薬や溶媒については当分野で通常用いられるものが利用でき、採用する結合反応によって適宜選択される。

（２）ターゲット分子を含むかまたは含まない試料を上記（１）で得られたリガンドが固定化された金属に接触させる工程。

本工程において用いる試料は、上記同様、複数の物質を含むものである。その態様は特に限定されず、固相担体として使用する金属やその形状、後の工程（３）及び（４）の同定方法あるいは解析方法にどのような原理や手段、方法を用いるかによって適宜変更し得る。例えばリガンドが固定化された金薄膜を用いて B I A C O

RE（商品名）にて解析を行う場合には、液状とするのが好ましい。ターゲット分子を含まない試料であれば、工程（３）でリガンドに特異的な相互作用を示さなかった分子（複数種存在する場合あり）の同定ならびに解析を行う。ターゲット分子を含む試料であれば、工程（３）でリガンドに特異的な相互作用を示したターゲット分子（複数種存在する場合あり）を同定、解析する。試料と金属表面とを接触させる方法は、試料内のターゲット分子が金属表面に固定化されたリガンドと結合することができれば特に限定されず、使用する金属の種類や形状、後の工程（３）及び（４）の同定方法あるいは解析方法にどのような原理や手段、方法を用いるかによって適宜変更し得る。例えばリガンドが固定化された金薄膜を用いる場合には、液状にした試料中に当該金薄膜を浸す等の処理により実施される。

（３）リガンドに特異的な相互作用を示したか、または示さなかった分子を同定し、解析する工程。

かかる工程は、固相担体として使用する金属の種類や形状、リガンドの種類等によって適宜変更し得るが、通常当分野で実施されている低分子化合物あるいは高分子化合物を同定する為の各種方法により行う。また、今後開発されるであろう方法によっても実施可能であろう。例えばその表面にリガンドが固定化された金属として、リガンドが固定化された金薄膜を用いた場合〔工程（１）〕、続く試料の添加により〔工程（２）〕、リガンドにターゲット分子を結合させる。結合したターゲット分子を緩衝液の極性を変える、あるいは過剰のリガンドをさらに加える等の処理によってリガンドから解離させ、その後同定したり、あるいは金属表面上のリガンドと結合した状態でそのまま界面活性剤等によって抽出して同定したりすることもできる。同定方法としては具体的には電気泳動法、免疫学的反応を用いたイムノブロッティングや免疫沈降法、クロマトグラフィー、マススペクトラム、アミノ酸シーケンス、NMR（低分子のときに特に）、表面プラズモン共鳴を利用した反応等の公知の手法により、またこれらの方法を組み合わせて実施する。リガンドに結合しない分子を同定する工程も上記リガンドに結合する分子を同定する方法に準じて行うことができるが、カラムの素通り画分に含まれる分子を同定の対象とするので、

同定工程に入る前に予め濃縮や粗精製等の処理を行うことが好ましい。得られたデータならびに既存の報告をもとに各分子を同定し、リガンドのターゲット分子であるか否かを判断する。

5 また、本工程は自動化されていてもよい。例えば2次元電気泳動で得られた種々の分子のデータを直接読み取り、既存のデータベースに基づいて分子の同定を行うことも可能である。

以下に本発明において使用する親水性スパーサーの一般的製法について記載するが、記載される以外の通常当分野で実施される方法、あるいはそれらの方法を組み合わせた方法によっても製造し得ることは当業者には明らかである。

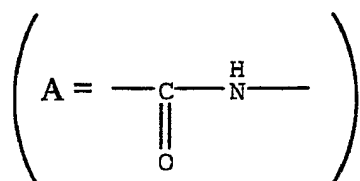
10 尚、本明細書で使用する略語は下記の通りである。

略語	正式名称
A c	アセチル基
B n	ベンジル基
B u ₃ P	トリブチルフォスフィン
DMAP	ジメチルアミノピリジン
DMF	ジメチルホルムアミド
EDC	1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド
E t	エチル基
Fm o c	9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基
Fm o c-O S u	9-フルオレニルメチルスクシンイミジルカルボネート
G o l d f o i l	金膜
H O B t	1-ヒドロキシベンゾトリアゾール
H y T	ヒドラジノタータリックアミド
M e	メチル基
P E G	ポリエチレングリコール
P h ₃ P	トリフェニルフォスフィン
P y B O P	ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス- -ピロリジノーホスホニウム ヘキサフルオロホス フェート
T B A F	フッ化テトラブチルアンモニウム
T B D M S	t e r t-ブチルジメチルシリル基
T B D M S O T f	トリフルオロメタンスルホン酸 t-ブチルジメチ ルシリル基
T B D P S	t e r t-ブチルジフェニルシリル基
T B S	t e r t-ブチルジメチルシリル基
t B u	t e r t-ブチル基
T F A	トリフルオロ酢酸
T H F	テトラヒドロフラン
T M A D	N, N, N', N'-テトラメチルアゾジカルボキ サミド
T r	トリチル基
T s	トシル基 (トルエンスルホニル基)
W S C	水溶性カルボジイミド (N-エチル-N'-(3'- -ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド)

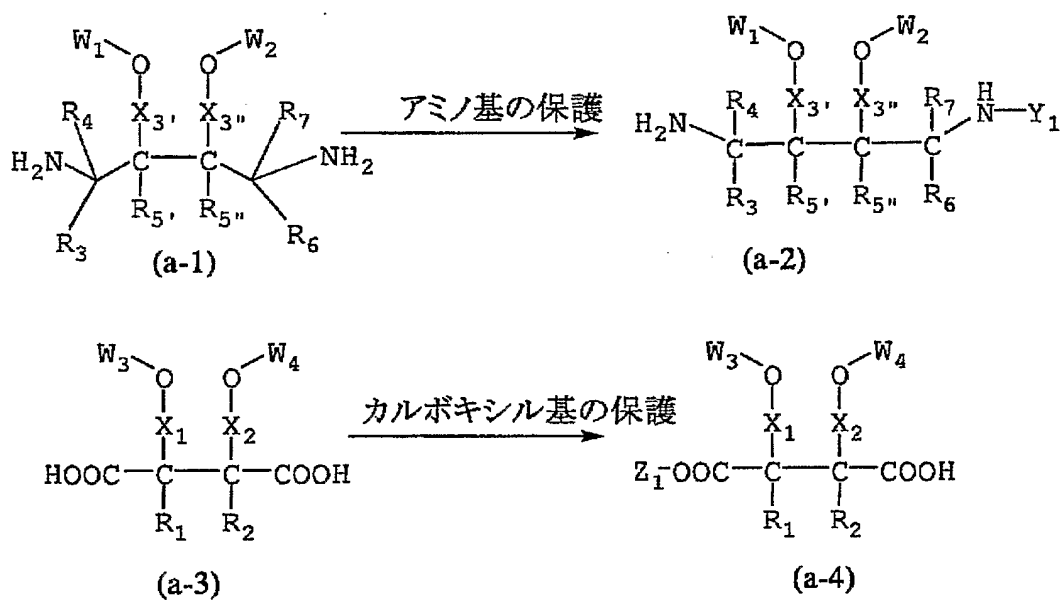
製法 1：一般式 (I a) で表される部分構造を有する親水性スパーサーの製造方法

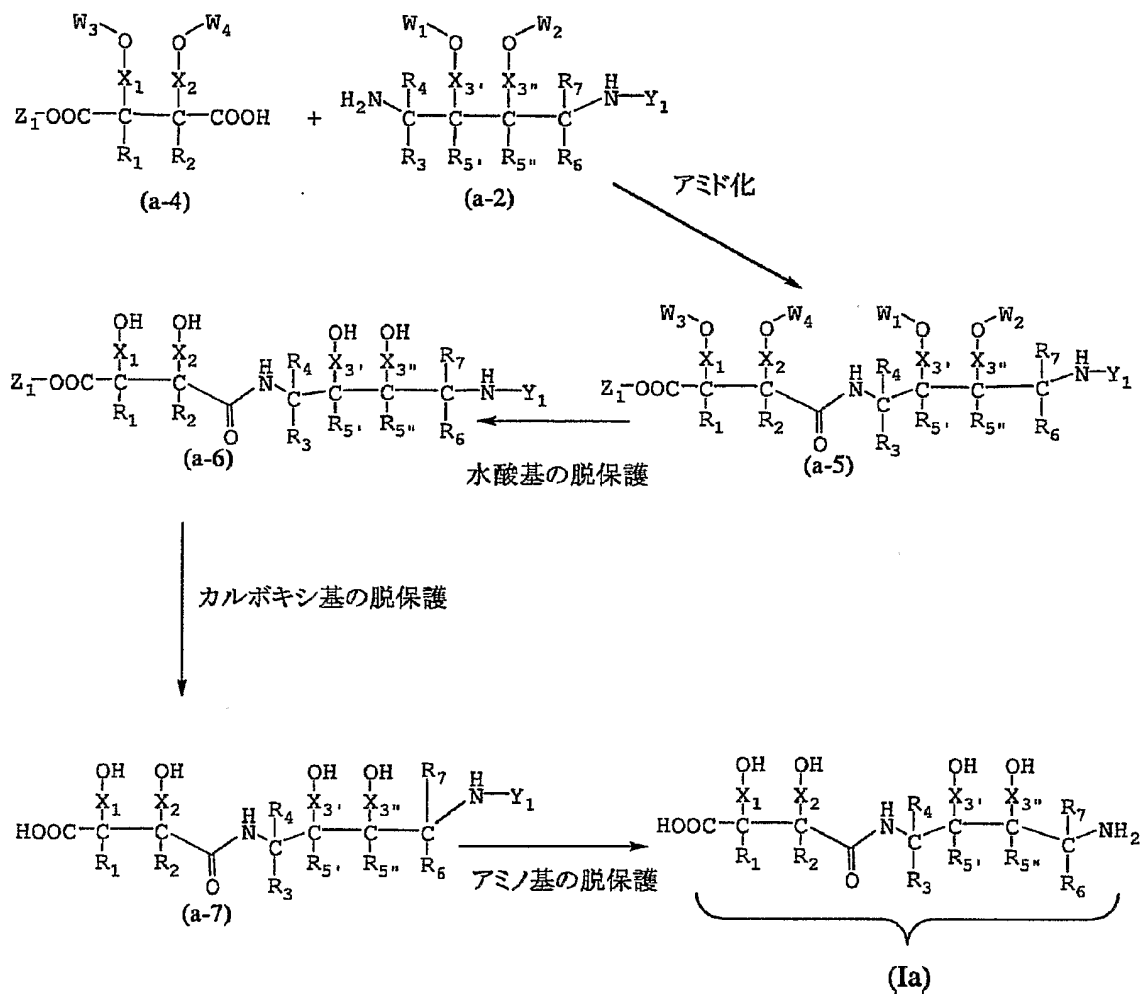
(1)

($m=1$, $m'=2$, $m''=1$)



5





式中、 $W_1 \sim W_4$ は水酸基の保護基であり、 Z_1 はカルボキシ基の保護基であり、 Y_1 はアミノ基の保護基である。 X_3' は X_3 と同義であり、また X_3'' も X_3 と同義である。 R_5' は R_5 と同義であり、また R_5'' も R_5 と同義である。またそれ以外の各記号の定義は上述の通りである。

水酸基の保護基としては、当分野で通常用いられている任意の各基が用いられるが、具体的には、tert-ブチル基等のアルキル基；アセチル基、プロピオニル基、ピバロイル基、ベンゾイル基等のアシル基；メトキシカルボニル基、tert-ブトキシカルボニル基等のアルコキシカルボニル基；ベンジルオキシカルボニル基等のアラルキルオキシカルボニル基；ベンジル基、ナフチルメチル基等のアリー

ルシリル基、tert-ブチルジフェニルシリル基等のシリル基；エトキシメチル基、メトキシメチル基等の低級アルコキシメチル基などが例示され、好ましくは、tert-ブチルジメチルシリル基、tert-ブチルジフェニルシリル基、メトキシメチル基、tert-ブチル基が挙げられる。カルボキシ基の保護基としては、当分野で通常用いられている任意の各基が用いられるが、具体的には、メチル基、エチル基、プロピル基、tert-ブチル基、イソブチル基、アリル基等の炭素数1～6の直鎖状もしくは分枝状の低級アルキル基；ベンジル基等のアラルキル基；tert-ブチルジメチルシリル基、tert-ブチルジフェニルシリル基等のシリル基などが例示され、好ましくは、アリル基、tert-ブチル基、ベンジル基、tert-ブチルジフェニルシリル基が挙げられる。アミノ基の保護基としては、当分野で通常用いられている任意の各基が用いられるが、具体的には、tert-ブトキシカルボニル基、メトキシカルボニル基、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基等の低級アルコキシカルボニル基；ベンジロキシカルボニル基等のアラルキルオキシカルボニル基；ベンジル基等のアラルキル基；ベンゼンスルホニル基、p-トルエンスルホニル基、メタンスルホニル基等の置換スルホニル基などが例示され、好ましくは、tert-ブトキシカルボニル基、ベンジロキシカルボニル基が挙げられる。

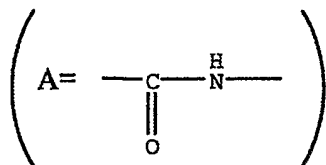
アミノ基の保護及び脱保護、カルボキシ基の保護及び脱保護、及び水酸基の脱保護は使用する保護基に応じて適宜公知の方法及び試薬によって実施される。また、化合物中に複数の「アミノ基の保護基」、「カルボキシ基の保護基」及び／または「水酸基の保護基」が存在する場合には、それぞれ同一のものであっても異なってもよく、保護の必要な部位に応じて適宜選択される。

化合物(a-4)及び化合物(a-2)をアミド化によって脱水縮合する反応は、通常、等量のアミノ体とカルボン酸の存在下、1.1当量程度のN-エチル-N'-ジメチルアミノカルボジイミド、N-ヒドロキシーベンゾトリアゾール等の縮合剤を用いて、DMFや塩化メチレン等の溶媒中で、室温下1時間から10時間程度反応させることによって行なわれる。

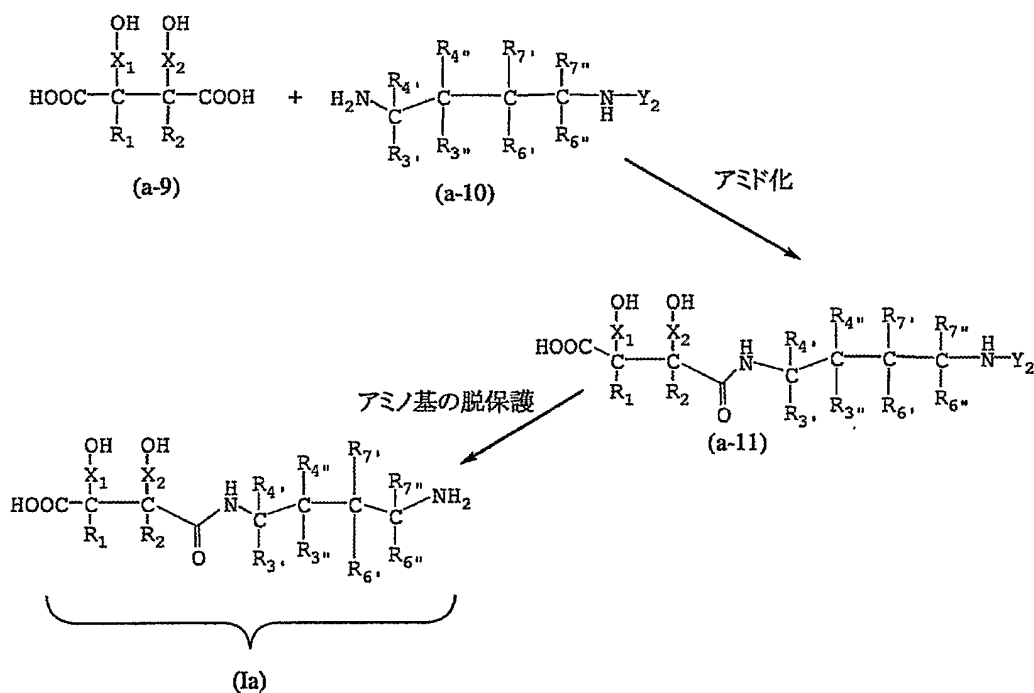
製法 2：一般式 (I a) で表される部分構造を有する親水性スパーサーの製造方法

(2)

($m = 2$, $m' = 0$, $m'' = 2$)



5



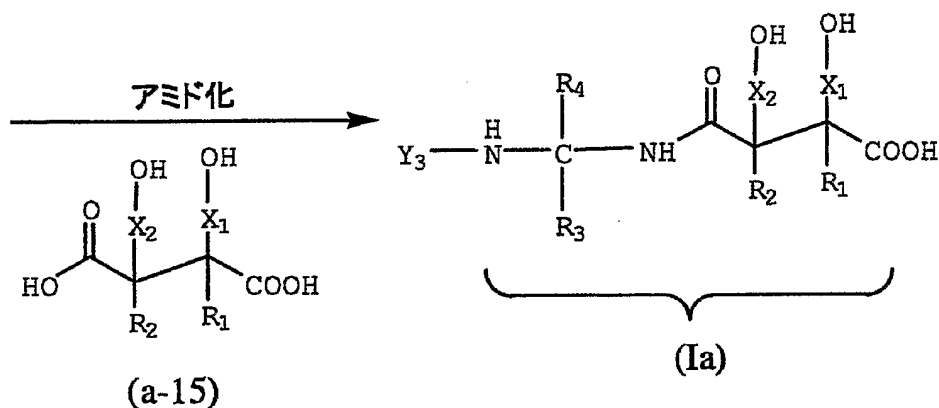
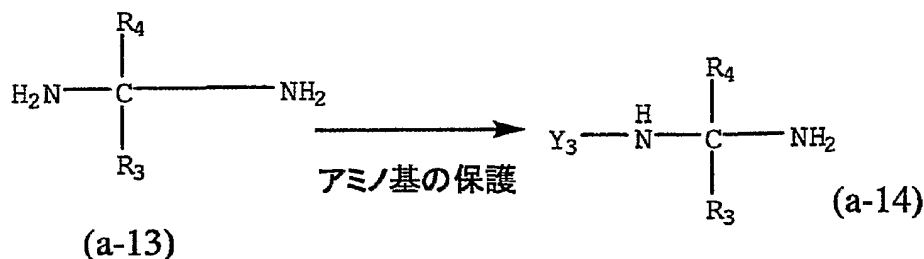
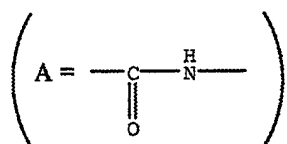
式中、Y₂はアミノ基の保護基である。R₃'はR₃と同義であり、またR₃''もR₃と同義である。R₄'はR₄と同義であり、またR₄''もR₄と同義である。R₆'はR₆と同義であり、またR₆''もR₆と同義である。R₇'はR₇と同義であり、またR₇''もR₇と同義である。それ以外の各記号の定義は上述の通りである。アミノ基の保護基としては、上記したものと同様のものが例示される。アミノ基の脱保護は使用する保護基によって適宜公知の方法及び試薬によって実施される。

化合物 (a-9) 及び化合物 (a-10) をアミド化によって脱水縮合する反応

は、通常、等量のアミノ体とカルボン酸の存在下、1.1当量程度のN-エチル-N'-ジメチルアミノカルボジイミド、及びN-ヒドロキシベンゾトリアゾール等の縮合剤を用いて、DMFや塩化メチレン等の溶媒中で、室温下1時間から10時間程度反応させることによって行なわれる。

5 製法3：一般式(Ia)で表される部分構造を有する親水性スパーサーの製造方法
(3)

($m=1$, $m'=0$, $m''=0$)



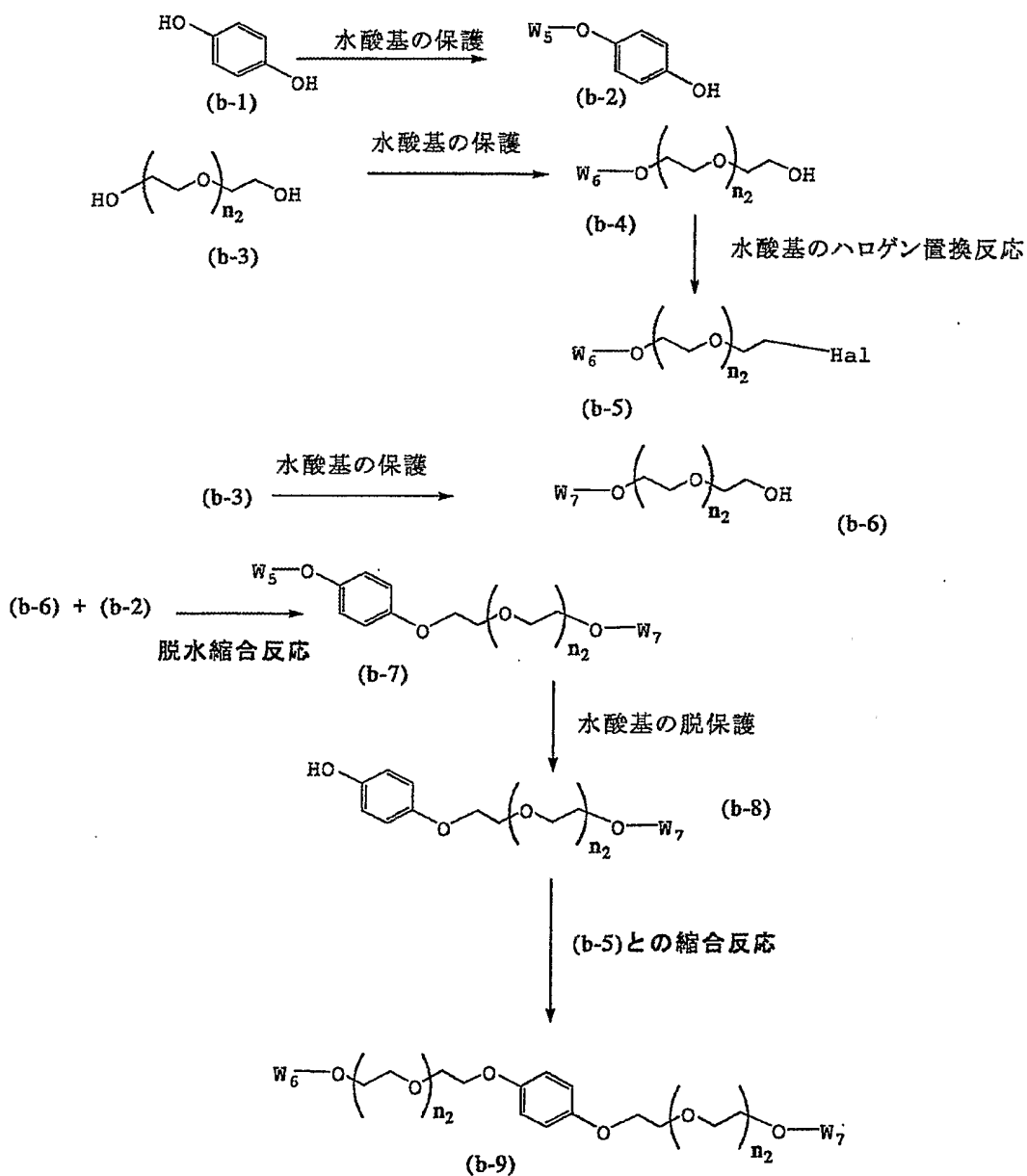
10

式中、 Y_3 はアミノ基の保護基であり、それ以外の各記号の定義は上述の通りである。アミノ基の保護基としては、上記したものと同様のものが例示される。

化合物(a-14)及び化合物(a-15)をアミド化によって脱水縮合する反

応は、通常、等量のアミノ体とカルボン酸の存在下、1. 1当量程度のN-エチル-N'-ジメチルアミノカルボジイミド、及びN-ヒドロキシベンゾトリアゾール等の縮合剤を用いて、DMFや塩化メチレン等の溶媒中で、室温下1時間から10時間程度反応させることによって行なわれる。

- 5 製法4：一般式(Ib)で表される部分構造を有する親水性スパーサーの製造方法
($n-1=n'-1=n_2$)



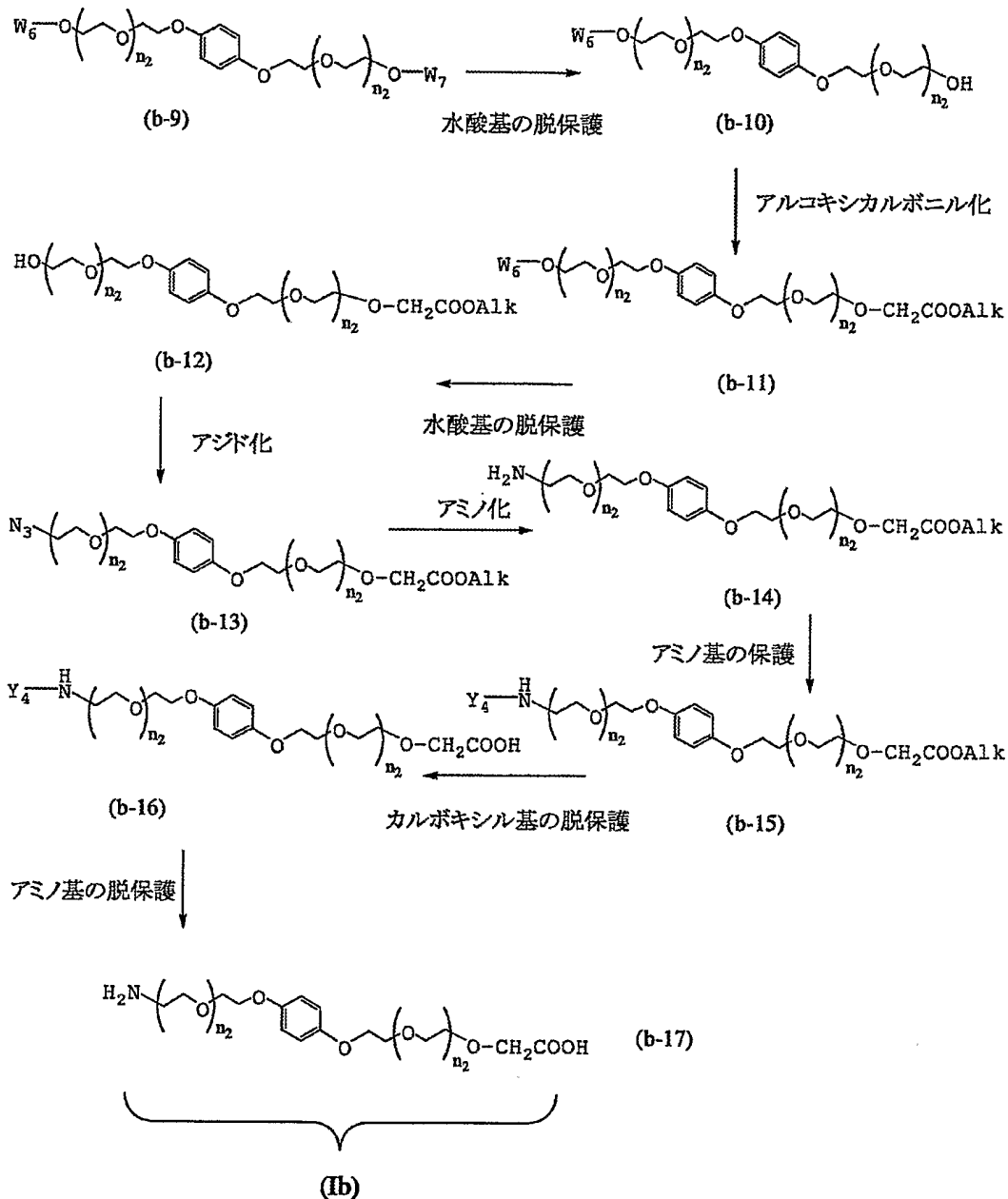
式中、 $W_5 \sim W_7$ は水酸基の保護基であり、 $H a 1$ はハロゲン原子（塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、フッ素原子）を表し、それ以外の各記号の定義は上述の通りである。水酸基の保護基としては、上記したものと同様のものが例示される。尚 n_2 は、 $n-1$ あるいは $n'-1$ である（ n 、 n' は上述のとおり）。

- 5 水酸基の保護、脱保護は使用する保護基によって適宜公知の方法及び試薬によって実施される。

- 化合物（b-4）の化合物（b-5）へのハロゲン置換反応は、通常、1当量のアルコール体に2～3当量の四臭化炭素、及び1～2当量のトリフェニルフォスフィン塩化メチレン等の溶媒中で、 0°C ～室温で、1時間から数時間反応させることによって行なわれる。
- 10

- 化合物（b-6）と化合物（b-2）との脱水縮合反応は、通常、1当量のアルコール体と1当量のトリブチルフォスフィンをトルエン溶媒中室温で1時間程度反応を行い、ここに1当量のフェノール体及び1，1'-アゾビス（N，N-ジメチルホルムアミド）等の縮合剤を加え、 $0 \sim 50^{\circ}\text{C}$ で数時間から終夜、反応させることによって行なわれる。
- 15

化合物（b-8）と化合物（b-5）との縮合反応は、通常、 $0 \sim 10^{\circ}\text{C}$ において、1当量のフェノール体と約10倍当量の過剰の水素化ナトリウムのような強塩基をTHF等の溶媒中で、10～60分程度反応させ、そこに2当量程度のハロゲン体を加え、室温下1～10時間程度反応させることによって行なわれる。



式中、Alkは炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基（上述と同義）、
 Y₄はアミノ基の保護基であり、それ以外の各記号の定義は上述の通りである。水
 酸基の保護基及びアミノ基の保護基としては、上記したものと同様のものが例示さ
 れる。

水酸基あるいはアミノ基の脱保護、もしくはカルボキシル基の脱保護は使用する
 保護基によって適宜公知の方法及び試薬によって実施される。

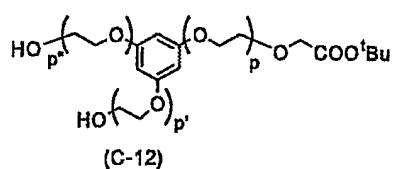
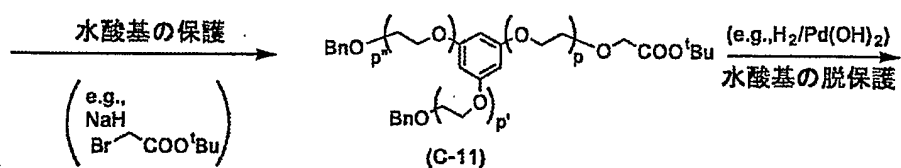
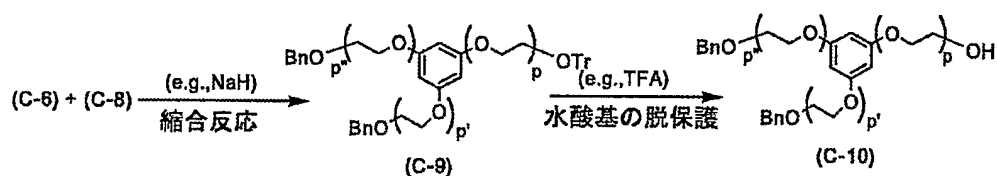
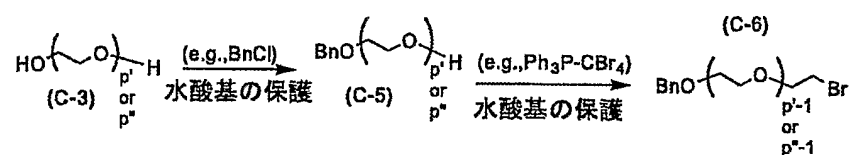
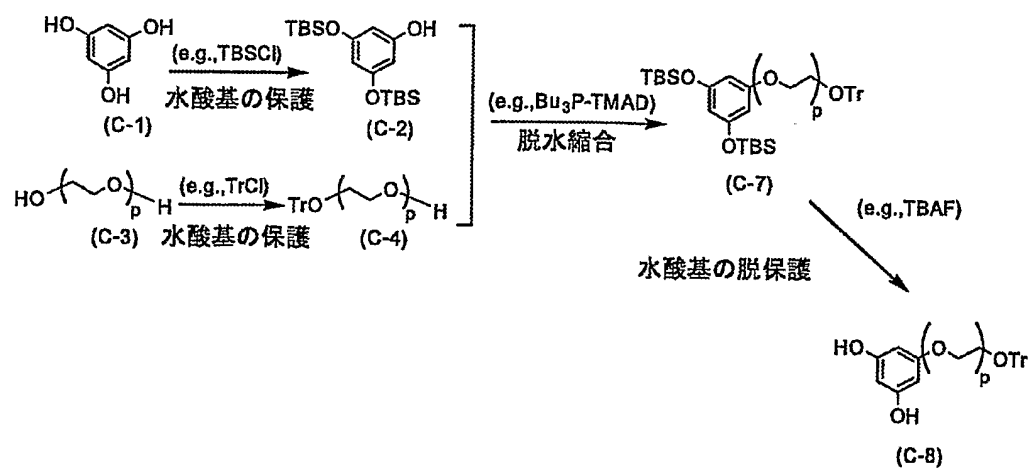
化合物 (b-10) の化合物 (b-11) へのアルコキシカルボニル化は、通常、0～10℃において、1当量のアルコール体と3～5倍当量程度の過剰の水素化ナトリウムのような強塩基をTHF等の溶媒中で、10～60分程度反応させ、そこに3～5倍当量程度の過剰のハロゲン体（ブromo酢酸-tert-ブチルエステル）を加え、室温下1～10時間程度反応させることによって行なわれる。

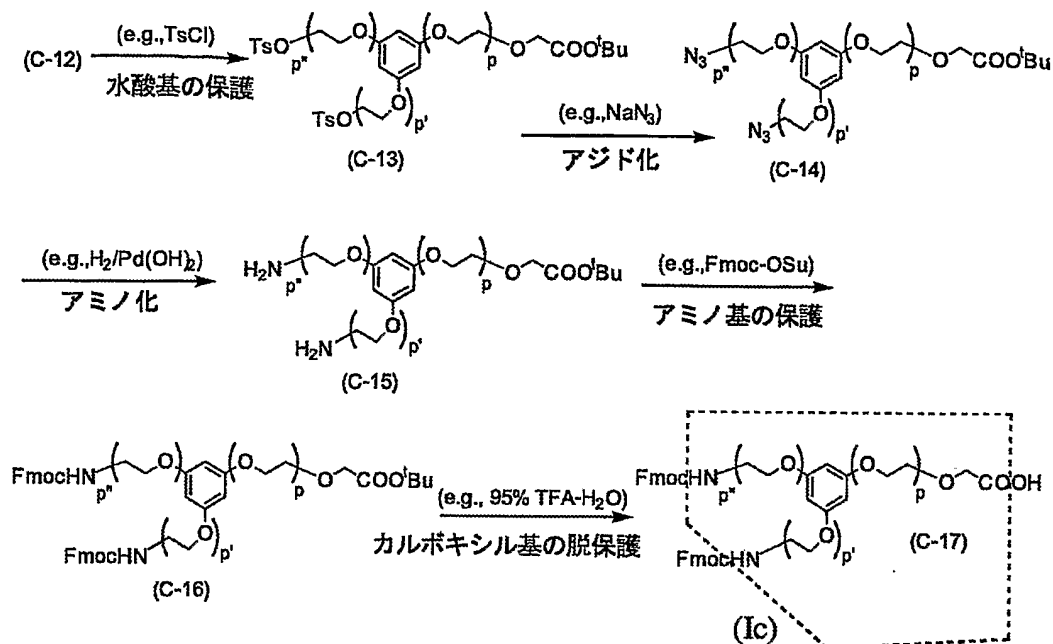
化合物 (b-12) の化合物 (b-13) へのアジド化は、通常、1当量のアルコール体と1.5当量程度のp-トルエンスルフォニルクロライド及び0.2当量程度の4-ジメチルアミノピリジンのような塩基をピリジン等の溶媒中で、30～50℃で、数時間反応させることによって得られるO-トシル体を単離し、それに約10倍当量程度の過剰のアジ化ナトリウムを加え、DMF等の溶媒中で、50～90℃で数時間反応させることにより行なわれる。

化合物 (b-13) の化合物 (b-14) へのアミノ化は、通常、1当量のアジド体を、0.1当量程度の水酸化パラジウムのような触媒を用いてメタノール等の溶媒存在下、1～数気圧の水素存在下、室温で数時間反応させることによって得られる。

製法5：一般式 (Ic) で表される部分構造を有する親水性スペーサーの製造方法

各構造式中、特定の基、特定の化合物を記載する場合があるが、それらは一例であって、特にこれらに限定されるものではない。同等の働きを有するものであれば適宜変更し得る。





式中、各記号の定義は上述の通りである。式中の水酸基の保護基、アミノ基の保護基、カルボキシル基の保護基はその一例を示したものであって、それ以外にも通常当分野で用いられる任意の各基が用いられる。具体的には上記したものと同様なものが例示される。アミノ基の保護、カルボキシル基の脱保護、及び水酸基の保護ならびに脱保護の方法は、本明細書に記載する以外にも、使用する保護基に応じて適宜公知の方法及び試薬によって実施され得ることは当業者には明らかであろう。

化合物 (c-1) の化合物 (c-2) への水酸基の保護は、例えば保護基として TBS を使用する場合には、通常、1 当量のフェノール体、3 当量程度の塩基（例えばイミダゾール）及び 2 当量程度のシリルクロライドを、DMF 等の溶媒中で、室温で 10 時間程度反応させることによって行なわれる。

化合物 (c-2) と化合物 (c-4) との脱水縮合反応は、通常、1 当量のアルコール体と 1 当量のトリブチルフォスフィンとをトルエン溶媒中室温で 1 時間程度反応を行い、ここに 1.3 当量のフェノール体及び 1.3 当量の 1, 1'-アゾビス (N, N-ジメチルホルムアミド) 等の縮合剤を加え、室温で数時間から終夜反応させることによって行なわれる。

化合物(c-7)の化合物(c-8)への水酸基の脱保護は、通常、1当量のフェノール保護体(例えばシリル保護体)、1.2当量程度のテトラブチルアンモニウムフルオライドをTHF等の溶媒中で、室温で1時間程度反応させることにより行う。

5 化合物(c-8)と化合物(c-6)との縮合反応は、通常、室温で1当量のフェノール体と約5.2当量の過剰の水素化ナトリウムのような強塩基をTHFやDMF等の溶媒中で、10~60分程度反応させ、そこに4当量程度のハロゲン化物(例えばアルキルブロマイド)を加え、室温で約4時間程度反応させることにより行われる。この縮合反応によって化合物(c-9)が得られる。

10 化合物(c-9)の化合物(c-10)への水酸基の脱保護は、通常、1当量のフェノール保護体(例えばトリチル保護体)を、TFAを含む塩化メチレン等の溶媒中で、室温で約1時間程度反応させることにより行なわれる。

化合物(c-10)の化合物(c-11)への水酸基の保護は、例えば保護基としてtert-ブトキシカルボニル基を使用する場合には、通常、1当量のアルコール体、約4当量の水素化ナトリウム等の強塩基、約4当量のブromo酢酸tert-ブチルエステルを、THFやDMF等の溶媒中で、室温で約4時間程度反応させることにより行われる。

15 化合物(c-11)の化合物(c-12)への水酸基の脱保護は、通常、1当量のフェノール保護体(例えばベンジル保護体)、触媒量の水酸化パラジウムを、水素ガス雰囲気下、メタノール等の溶媒中で、室温で約6時間程度反応させることにより行なわれる。

20 化合物(c-12)の化合物(c-13)への水酸基の保護は、例えば保護基としてTsを使用する場合には、通常、1当量のアルコール体、触媒量のDMAP等の塩基、約6当量のトシルクロライドを、ピリジン等の溶媒中で、室温~40℃で約2時間程度反応させることにより行われる。

25 化合物(c-13)の化合物(c-14)へのアジド化は、1当量のトシル体、約1.5当量のアジ化ナトリウムを、DMF等の溶媒中で、約60℃、約2時間程度

反応させることによって行われる。

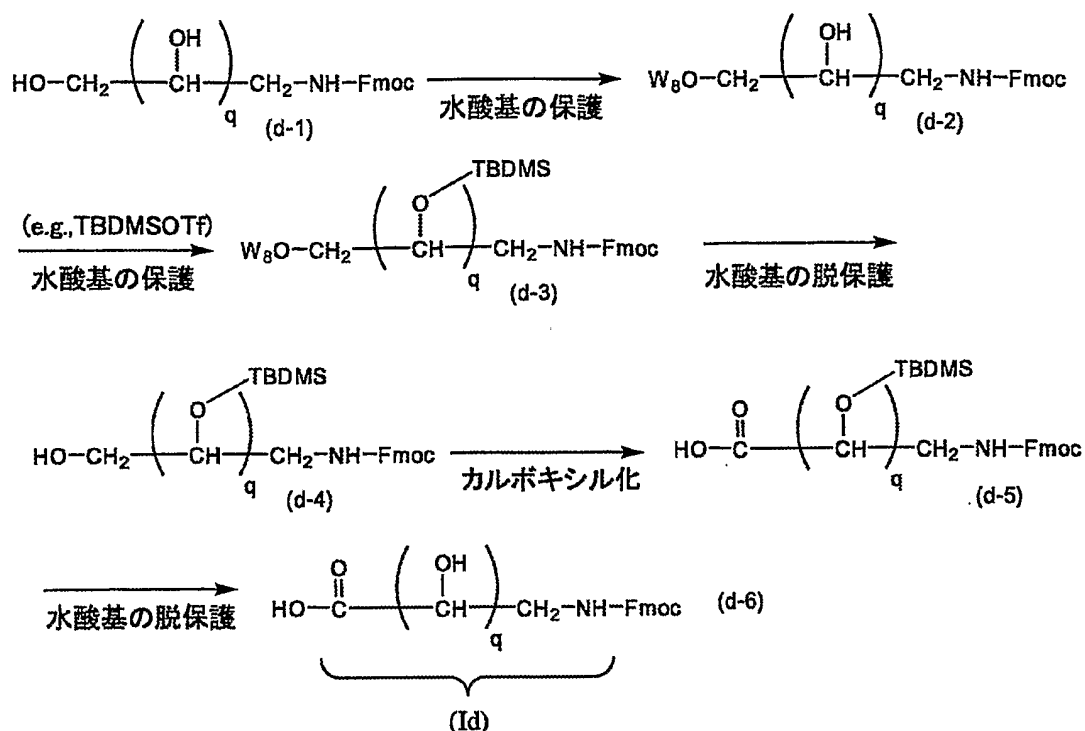
化合物 (c-14) の化合物 (c-15) へのアミノ化及び、化合物 (c-16) へのアミノ基の保護基の導入は、通常、1当量のフェノール保護体 (ベンジル保護体)、触媒量の水酸化パラジウムを水素ガス雰囲気下、メタノール等の溶媒中で、室温で約1時間程度反応させることによって得られるアミン体 (c-15) に、
5 約0.84当量の炭酸9-フルオレニルメチルスクシンイミジル、約1.5当量のトリエチルアミンのような塩基を加え、THF等の溶媒中で、室温で約1時間程度反応させることによって行われる。

化合物 (c-16) の化合物 (c-17) へのカルボキシル基の脱保護は、通常、
10 1当量のフェノール保護体 (例えば t-ブチル保護体) を TFA を含む水溶液中で、室温、約10時間程度反応させることによって行われる。

製法6：一般式 (Id) で表される部分構造を有する親水性スパーサーの製造方法

($R_{10}=R_9$ =水素原子, R_8 =水素原子, X_4 =単結合)

各構造式中、特定の基、特定の化合物を記載する場合があるが、それらは一例であって、特にそれらに限定されるものではない。同等の働きを有するものであれば
15 適宜変更し得る。



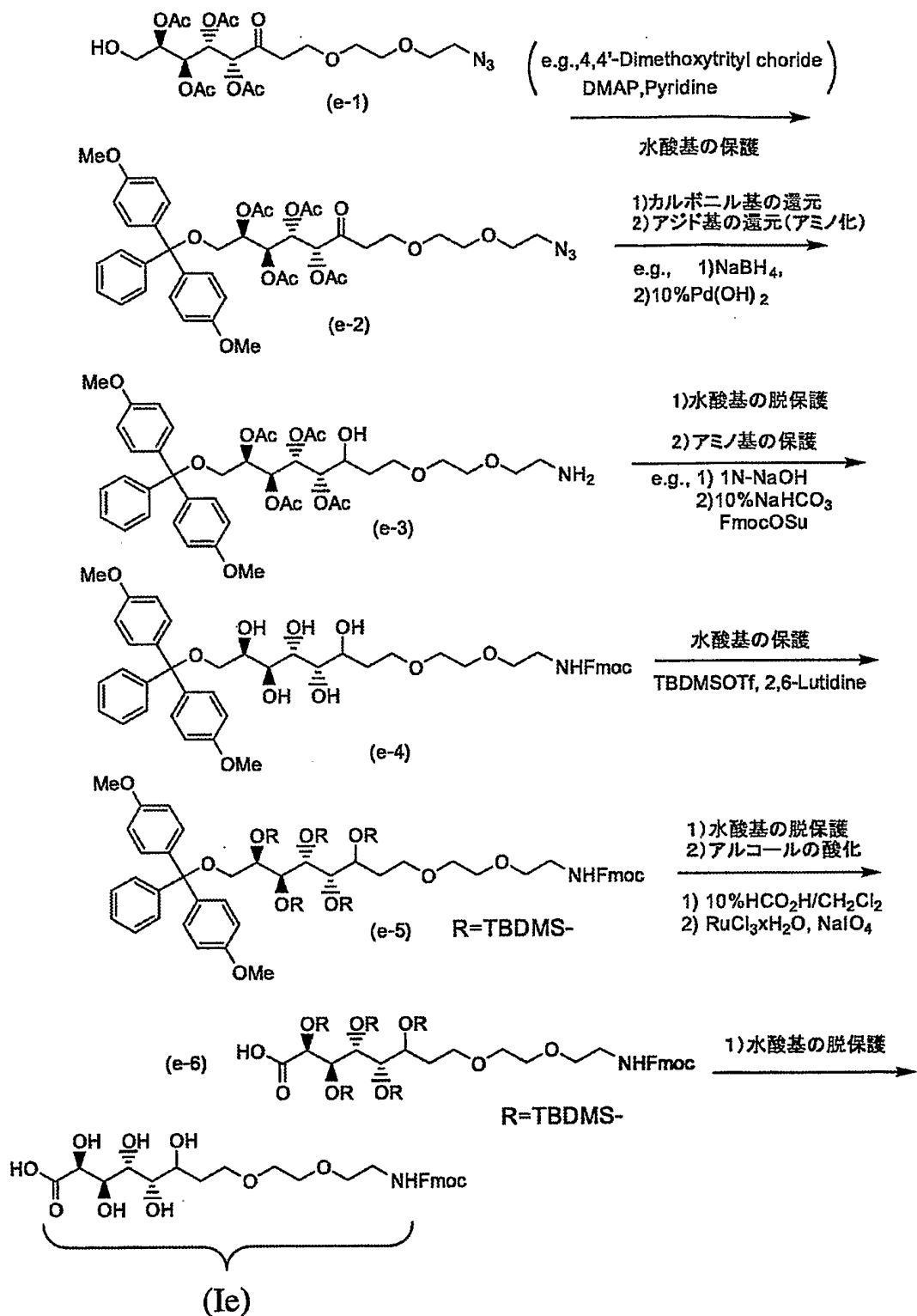
式中、 W_8 は水酸基の保護基であり、他の記号の定義は上述の通りである。水酸基の保護基としては上記したものと同様なものが例示される。水酸基の脱保護は使用する保護基に応じて適宜公知の方法及び試薬によって実施される。

- 5 化合物 (d-4) から (d-5) へのカルボキシ化は、通常、1当量のアルコール体を、10当量の過ヨウ素酸ナトリウム、0.4当量程度の塩化ルテニウム水和物 (III) のような酸化剤を水、アセトニトリル、ジクロロメタン等の溶媒存在下、室温で数時間反応させることによって得られる。

製法7：一般式 (I e) で表される部分構造を有する親水性スパーサーの製造方法

10 (1)

各構造式中、特定の基、特定の化合物を記載する場合があるが、それらは一例であって、特に限定されるものではない。同等の働きを有するものであれば適宜変更し得る。



水酸基の保護基、アミノ基の保護基としては上記したものと同様なものが例示さ

れる。水酸基の脱保護は使用する保護基によって適宜公知の方法及び試薬によって実施される。

化合物 (e-2) の化合物 (e-3) へのカルボニル基の還元反応は 1.2 当量程度の NaBH_4 のような還元剤をメタノール等の溶媒中で反応させ、引き続きア
 5 ジド基の還元反応 (アミノ化) は、通常、1 当量のアジド体を、0.1 当量程度の水酸化パラジウムのような触媒をメタノール等の溶媒存在下、1～数気圧の水素存在下、室温で数時間反応させることによって得られる。

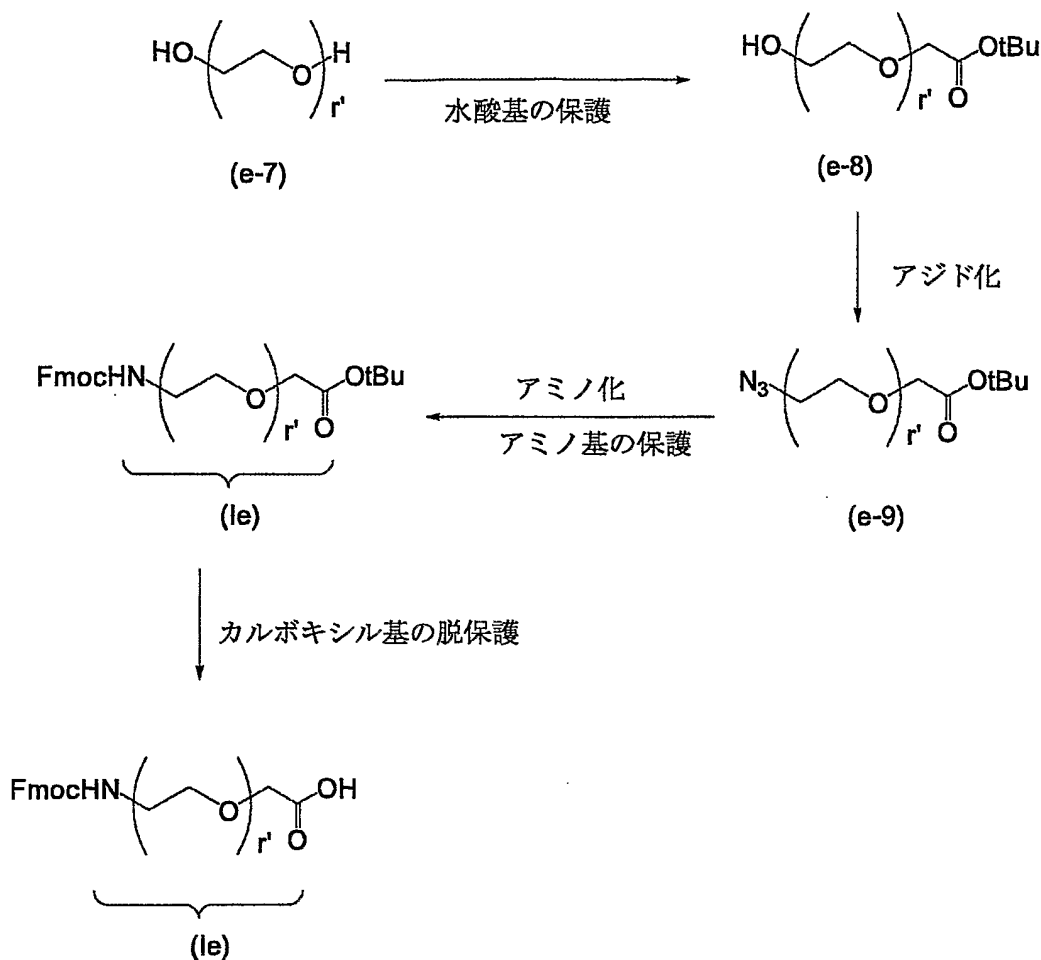
化合物 (e-3) の化合物 (e-4) への水酸基の脱保護は 1 N 水酸化ナトリウム等のアルカリをジオキサン、水等の混合溶媒中で反応させ、引き続きアミノ基の
 10 保護は (c-15) から (c-16) と同様な反応により行うことが出来る。

化合物 (e-4) の化合物 (e-5) への水酸基の保護は 20 当量程度の TBDMSOTf を 2, 6-Lutidine 等の存在下反応させることにより行うことが出来る。

化合物 (e-5) の化合物 (e-6) への水酸基の脱保護は 10% ギ酸/ジクロ
 15 ロメタンと反応させ、引き続きアルコールの酸化は化合物 (d-4) から化合物 (d-5) への反応と同様により行うことが出来る。

製法 8 : 一般式 (I e) で表される部分構造を有する親水性スパーサーの製造方法
 (2)

($\text{R}_{13} \sim \text{R}_{16} = \text{H}$, $\text{R}_{11} = \text{H}$, $\text{R}_{12} = \text{H}$, $r = 1$)



式中、各記号の定義は上述の通りである。式中の水酸基の保護基、アミノ基の保護基、カルボキシル基の保護基はその一例を示したものであって、それ以外にも通常当分野で用いられる任意の各基が用いられる。具体的には上記したものと同様なものが例示される。アミノ基の保護、カルボキシル基の脱保護、及び水酸基の保護の方法は、本明細書に記載する以外にも、使用する保護基に応じて適宜公知の方法及び試薬によって実施され得ることは当業者には明らかであろう。

化合物 (e-8) から化合物 (e-9) へのアジド化は、1 当量の化合物 (e-8)、触媒量の DMA P 等の塩基、約 10 当量のトシルクロライドを、塩化メチレンなどの溶媒中で、室温～40℃で約2時間～終夜反応させることによって化合物 (e-8) のトシル誘導体を得、得られたトシル誘導体1当量に対して約15当量のアジ化ナトリウムを、DMSO等の溶媒中で、約60～70℃で約5時間程度反

応させることによって行われる。

化合物 (e-9) をアミノ化することによって、また、続いて当該アミノ基を保護することによって、式 (I e) で表される部分構造を有する化合物が得られる。

通常、1当量の化合物 (e-9)、触媒量の水酸化パラジウムを水素雰囲気下、
5 メタノールやエタノールなどの溶媒中で、室温で約1～2時間程度反応させること
によってアミン体を得る。アミノ基の保護基を導入する場合には、得られたアミン
体を常法に従い、例えば炭酸9-フルオレニルメチルスクシンイミジル等を用いて、
トリエチルアミンのような塩基の存在下、THF等の溶媒中で反応させる。

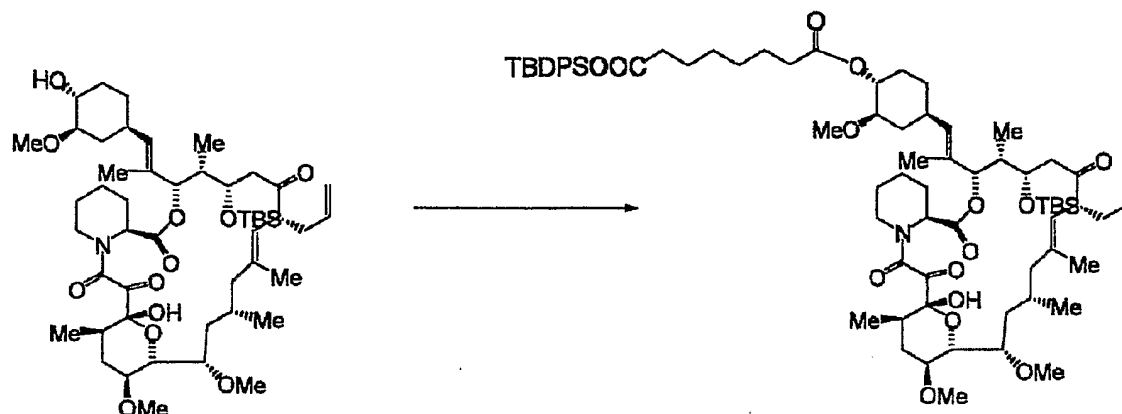
本発明においては、親水性スペーサーとして上記した各化合物に加え、それらを
10 重合して得られる重合体もまた親水性スペーサーとして利用できる。かかる重合に
は、当分野で通常実施されている種々の方法を採用できる。

具体的には上記した各化合物を用いてアミド化、N-置換アミド化、シッフ塩基
形成（シッフ塩基形成後、該当箇所を還元反応に付すこともできる）、エステル化、
アミンあるいは水酸基によるエポキシ開裂反応等の化学反応に付すことによって実
15 施する。当該重合反応は、もとになるモノマー成分がフリーな状態でも行うことが
できるが、後の精製工程が容易になるという点から、好ましくはもとになるモノマ
ー成分を金属表面に固定化し、次いで金属表面上で重合反応を行う。これらの反応
に使用する試薬や反応条件は通常当分野で実施されている方法に準じる。

実施例

20 以下、製造例ならびに実施例、実験例により本発明をさらに詳細に説明するが、
本発明はこれらの例により何ら限定されるものではない。

製造例1：17-アリル-14-(tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキ
シ)-1-ヒドロキシ-12-{2-[4-(7-(tert-ブチル-ジメチル
-シラニルオキシ-カルボニル)ヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ-シクロ
25 ヘキシル]-1-メチル-ビニル}-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21,
27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ[2.2.3.
1.0^{4,9}]オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオンの合成

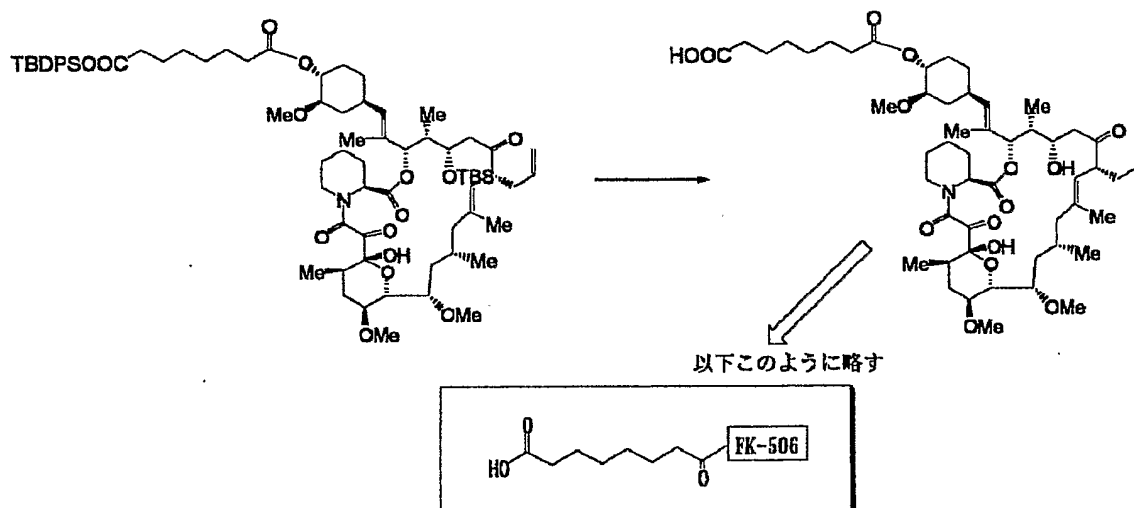


17-アリル-14-(tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキシ)-1-
 ヒドロキシ-12-[2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-シクロヘキシル)-
 1-メチル-ビニル]-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テト
 ラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ[2.2.3.1.0^{4,9}
 5] オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン (FK506; 1
 38mg, 0.15mmol)、O-モノ(tert-ブチル-ジメチル-シラニ
 ル) オクタン二酸 (86.7mg, 0.218mmol)、ジメチルアミノピリジ
 ン (DMAP; 16.5mg, 0.098mmol)、1-[3-(ジメチルアミ
 10 ノ) プロピル]-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC·HCl; 69.1m
 g, 0.261mmol) 及び塩化メチレン (CH₂Cl₂; 1ml) の混合物を室
 温で1.5時間攪拌した。反応物を酢酸エチル-水混合液に注ぎ、抽出した。得ら
 れた有機相を水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウム (MgSO₄) で乾燥し
 た。MgSO₄を濾別後、減圧濃縮した。こうして得られた残渣をシリカゲルカラ
 15 ムで精製し (20% AcOEt (n-ヘキサン中) で溶出)、目的とする17-ア
 リル-14-(tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキシ)-1-ヒドロキシ
 -12-{2-[4-(7-(tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキシ-カ
 ルボニル) ヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ-シクロヘキシル]-1-メチ
 ル-ビニル}-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル
 20 -11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ[2.2.3.1.0^{4,9}] オクタ
 コス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン (44mg, 24.6%) を

得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : -0.1-0.1 (12H, m), 0.7-2.6 (47H, m), 0.85 and 0.86 (18H, s), 1.50 (3H, s), 1.63 (3H, s), 2.75 (1H, m), 3.31 (3H, s), 3.35 (3H, s), 3.39 (3H, s), 4.05 (1H, m), 3.0-4.4 (6H), 4.5-5.8 (9H, m).

- 5 製造例2 : 17-アリル-1, 14-ジヒドロキシ-12-{2-[4-(7-カルボキシ-ヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ-シクロヘキシル]-1-メチル-ビニル}-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ [22.3.1.0^{4,9}] オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオンの合成



10

15

製造例1で調製した17-アリル-14-(tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキシ)-1-ヒドロキシ-12-{2-[4-(7-(tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキシ-カルボニル)-ヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ-シクロヘキシル]-1-メチル-ビニル}-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ [22.3.1.0^{4,9}] オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン (44mg, 0.037mmol) とアセトニトリル (0.88ml) の混合物に46-48%のフッ化水素 (HF) 水 (0.12ml) を静かに加え室温にて終夜攪拌した。反応物を酢酸エチル-水混合液に注ぎ、抽出した。得られた有機相

を水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウム (MgSO_4) で乾燥した。 MgSO_4 を濾別後、減圧下濃縮した。こうして得られた残渣をシリカゲルカラムで精製し (5%メタノール (クロロホルム中))、目的とする 17-アリル-1, 14-ジヒドロキシー-12-{2-[4-(7-カルボキシーヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシシクロヘキシル]-1-メチル-ビニル}-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ [2.2.3.1.0^{4,9}] オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン (14.2 mg, 40%) を得た。

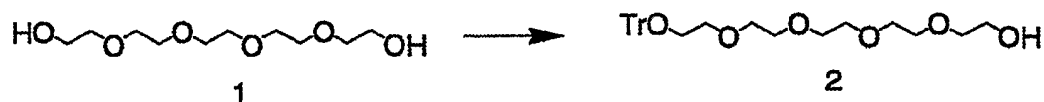
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.7-2.6 (47H, m), 1.50 (3H, s), 1.63 (3H, s), 2.75

(1H, m), 3.31 (3H, s), 3.35 (3H, s), 3.39 (3H, s), 4.05 (1H, m), 3.0-4.4 (6H), 4.5-5.8 (11H, m).

MS (m/z): 960 (M^+)

製造例 3: 親水性スペーサー分子の合成 (1-1)

2-(2-{2-[2-(2-トリチルオキシ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ) エタノールの合成



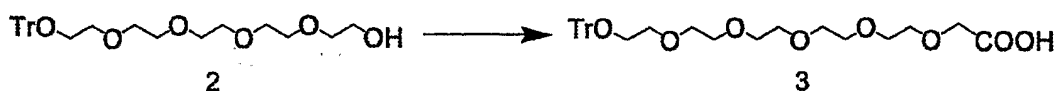
ペンタエチレングリコール (化合物 1; 10 g, 42.0 mmol) をピリジン (100 ml) に溶解し、トリフェニルメチルクロライド (11.6 g, 41.6 mmol) 及び 4-ジメチルアミノピリジン (0.9 g, 7.4 mmol) を室温で加えた後、35°C で終夜攪拌した。これを減圧濃縮して得られた残渣をクロロホルムに溶解し、有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、及び飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。固形物を綿ろ過にて除去し、クロロホルムで洗浄し、ろ液と洗液を合わせて減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 60N; 600 ml) に供し、溶出液 (60:1 クロロホルム (CHCl_3)-メタノール (MeOH)) にて目的の 2-(2-{2-

[2-(2-(トリチルオキシ-エトキシ)-エトキシ)-エトキシ]エタノール (化合物2; 10.4 g, 51.2%) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 2.53 (1H, t), 3.16 (2H, t), 3.49-3.63 (18H, m), 7.14-7.41 (15H, m).

5 製造例4: 親水性スペーサー分子の合成(1-2)

[2-(2-{2-[2-(2-トリチルオキシ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ]酢酸の合成

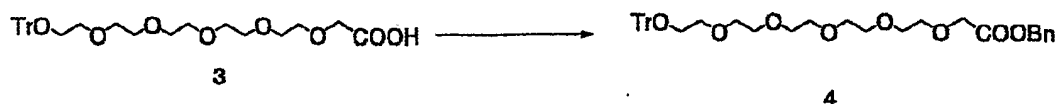


製造例3で得られた化合物2 (10.2 g, 21.2 mmol) をテトラヒドロフラン (THF; 200 ml) 及びDMF (50 ml) の混合溶媒に溶解し、0℃にて水素化ナトリウム (3.1 g; 油性, 60 wt%) を少しずつ加えた後、室温で30分間攪拌した。これを0℃に冷却した後、ブromo酢酸 (6.5 g, 46.8 mmol) を少しずつ加え、室温で30分間攪拌した。その後更に水素化ナトリウム (11.6 g; 油性, 60 wt%) を室温で少しずつ加えて室温で1時間攪拌した。反応液を0℃に冷却し、水 (25 ml) を徐々に加えた後、反応液の量が約100 ml になるまで減圧濃縮した。これに酢酸エチル (200 ml) 及び、飽和食塩水 (100 ml) を加え、攪拌しながら2M硫酸水素カリウム水溶液を加え、pHを6に調製した。有機相を抽出し、30℃にて減圧濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 60N; 400 ml) に供し、溶出液 (85:15 CHCl_3 -MeOH) にて目的の [2-(2-{2-[2-(2-トリチルオキシ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ]酢酸 (化合物3) の粗精製物 (12.4 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 3.34 (2H, t), 3.76-3.84 (20H, m), 4.13 (2H, s), 7.30-7.83 (15H, m).

25 製造例5: 親水性スペーサー分子の合成(1-3)

[2-(2-{2-[2-(2-トリチルオキシ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ] 酢酸 ベンジルエステルの合成

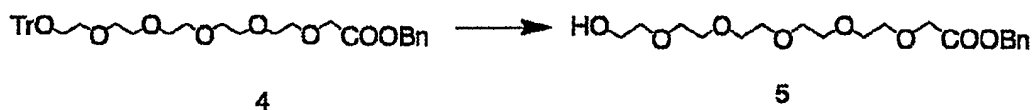


製造例4で得られた化合物3の粗精製物(12.4 g)を塩化メチレン(100 ml)に溶解し、4-ジメチルアミノピリジン(0.29 g, 2.4 mmol)、ベンジルアルコール(3.1 ml, 30.0 mmol)を加えた。これを0℃に冷却し、水溶性カルボジイミド(N-エチル-N'-(3'-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド;WSC;4.5 g, 23.5 mmol)を加え、室温にて終夜攪拌した。反応液をクロロホルムで抽出し、有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、及び飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。固形物を綿ろ過にて除去し、クロロホルムで洗浄し、ろ液と洗液を合わせて減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(関東化学 60N;600 ml)に供し、溶出液(1:1 酢酸エチル-ヘキサン)にて目的の[2-(2-{2-[2-(2-トリチルオキシ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ] 酢酸 ベンジルエステル(化合物4;12.0 g, 90.1%, 2 steps)を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 3.16 (2H, t), 3.55-3.65 (20H, m), 4.11 (2H, s), 5.11 (2H, s), 7.15-7.40 (20H, m).

製造例6:親水性スペーサー分子の合成(1-4)

[2-(2-{2-[2-(2-ヒドロキシ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ] 酢酸 ベンジルエステルの合成



製造例5で得られた化合物4(12.0 g)を5%トリフルオロ酢酸塩化メチレ

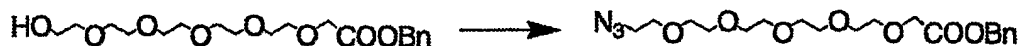
ン溶液 (150 ml) に溶解し、0℃にて水 (10 ml) を加えて、0℃にて20分間攪拌した。反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に注いで抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥した。固形物を綿ろ過にて除去し、クロロホルムで洗浄し、ろ液と洗液を合わせて減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 60N; 400 ml) に供し、溶出液 (1000 : 15

CHCl₃-MeOH) にて目的の [2- (2- {2- [2- (2-ヒドロキシ-エトキシ) -エトキシ] -エトキシ} -エトキシ) -エトキシ] 酢酸 ベンジルエステル (化合物5; 7.0 g, 95%) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 2.80 (1H, t), 3.62-3.76 (20H, m), 4.22 (2H, s), 5.20 (2H, s), 7.36-7.41 (5H, m).

製造例7: 親水性スパーサー分子の合成(1-5)

[2- (2- {2- [2- (2-アジド-エトキシ) -エトキシ] -エトキシ} -エトキシ) -エトキシ] 酢酸 ベンジルエステルの合成



5

6

製造例6で得られた化合物5 (7.0 g, 18.1 mmol) 及び4-ジメチルアミノピリジン (0.4 g, 3.3 mmol) をピリジン (45 ml) に溶解し、0℃に冷却した。これにp-トルエンスルホンクロライド (5.2 g, 27.2 mmol) を加えて室温で終夜攪拌し、更にp-トルエンスルホンクロライド (3.1 g, 16.2 mmol) 及び4-ジメチルアミノピリジン (120 mg, 0.98 mmol) を加えて30℃で2時間攪拌した。反応液を0℃に冷却し、水 (3 ml) を加えて減圧濃縮し、得られた残渣を酢酸エチルに溶解し、有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、及び飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。固形物を綿ろ過にて除去し、酢酸エチルで洗浄し、ろ液と洗液を合わせて減圧濃縮した。得られた残渣をDMF (50 ml) に溶解し、アジ化ナトリウム

(11.8 g, 0.18 mol)を加えて60℃で1時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで抽出し、有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、及び飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。固形物を綿ろ過にて除去し、酢酸エチルで洗浄し、ろ液と洗液を合わせて減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（関東化学 60N; 250 ml）に供し、溶出液（3:1 酢酸エチル-ヘキサン）にて目的の[2-(2-{2-[2-(2-アジド-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ]酢酸ベンジルエステル（化合物6; 3.3 g, 44.3%）を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 3.31 (2H, t), 3.54-3.87 (20H, m), 4.13 (2H, s), 5.12 (2H, s), 7.20-7.30 (5H, m).

製造例8: 親水性スペーサー分子の合成(1-6)

[2-(2-{2-[2-(2-アミノ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ]酢酸の合成



6

7

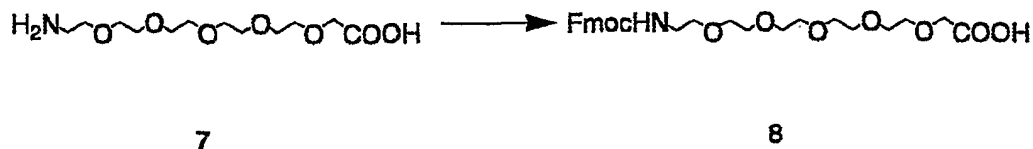
製造例7で得られた化合物6 (1.94 g, 4.72 mmol)をメタノール(50 ml)に溶解し、10% Pd-C (500 mg)を加えて、室温で2.5時間接触水素添加を行った。固形物をセライトろ過にて除去し、メタノールで洗浄し、ろ液と洗液を合わせて減圧濃縮して目的の[2-(2-{2-[2-(2-アミノ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ]酢酸（化合物7; 1.4 g, 定量的）を得た。

MS (m/z): 296 (M⁺)

製造例9: 親水性スペーサー分子の合成(1-7)

{2-[2-(2-{2-[2-(9H-フルオレン-9-イル-メトキシカルボニルアミノ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}酢酸

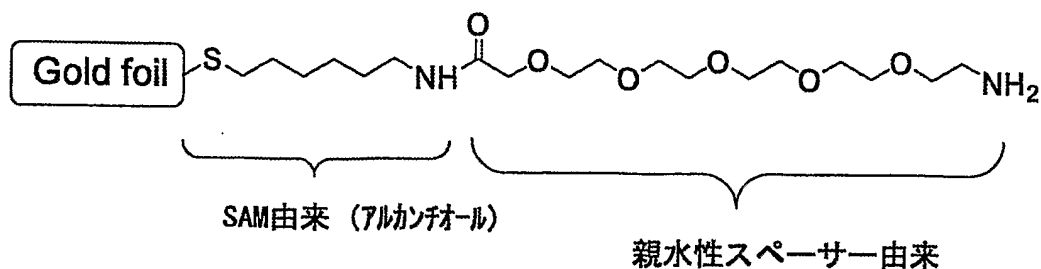
酸の合成



製造例 8 で得られた化合物 7 (1.25 g, 4.23 mmol) を 10% 炭酸ナトリウム水溶液 (14 ml) に溶解し、ジメトキシエタン (14 ml) に懸濁した
 5 9-フルオレニルメチルスクシンイミジルカルボネート (2.15 g, 6.37 mmol) を室温で滴下した後、室温で終夜攪拌した。固形物をセライトにてろ別後、クロロホルムで洗浄した。ろ液と洗液を合わせてクロロホルムで抽出し、有機相を 2M 硫酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。固形物を綿ろ過にて除去し、クロロホルムで洗浄し、ろ液と洗液を合わせて減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 60
 10 N; 150 ml) に供し、溶出液 (1000 : 7 CHCl₃-MeOH) にて目的の {2-[2-(2-{2-[2-(9H-フルオレン-9-イル-メトキシカルボニルアミノ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ} 酢酸 (化合物 8; 1.38 g, 63.0%) を得た。

15 ¹H-NMR(CDCl₃) δ: 3.34 (2H, t), 3.50-3.71 (18H, m), 4.05 (2H, s), 4.12 (1H, t), 4.33 (2H, d), 5.57 (1H, s), 7.22-7.95 (8H, m).

製造例 10: 親水性スペーサー付金膜の合成: ヘキサエチレングリコール誘導体付金膜 (高純度化学研究所社; 純金、純度 99.9% up、形状 10 mm × 10 mm × 0.01 mm (厚)) の合成

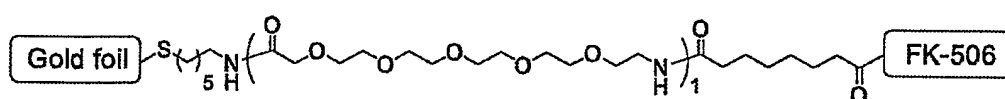


Piranha 溶液 (30%過酸化水素 : 濃硫酸 = 1 : 4 混合溶液) に数時間浸した金膜 (約 1 cm²) をミリQ水 (ミリポアの純水製造装置でろ過した水)、エタノールで洗浄した。これを (6-メルカプトヘキシル) -カルバミン酸 9H-フルオレン-9-イル-メチル エステルの 1.5 mM エタノール溶液 (0.5 ml) に終夜浸して、金薄膜上に SAM を形成させた。反応終了後、金膜をエタノール、アセトニトリルで十分に洗浄した後、製造例 12 に記載の方法により金膜上にアミンが約 250 pmol 存在することを確認した。

この金膜をアセトニトリルで十分に洗浄した後、アセトニトリル (0.25 ml) に溶解した {2-[2-(2-{2-[2-(9H-フルオレン-9-イル-メトキシカルボニルアミノ) -エトキシ] -エトキシ} -エトキシ) -エトキシ] -エトキシ} 酢酸 (製造例 9 で得られた化合物 8 ; 12.5 mg, 0.024 mmol) を加え、更にアセトニトリル (0.25 ml) に溶解したベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス-ピロリジノ-ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート (PyBOP ; 13 mg, 0.025 mmol)、及び N, N-ジイソプロピルエチルアミン (8.9 μl, 0.50 mmol) を加え、室温で終夜振とうした。反応液を除き、金膜をアセトニトリルで洗浄後、同様の条件で終夜反応を行った。反応終了後、金膜をアセトニトリルで十分に洗浄した後、アセトニトリル (0.25 ml) に溶解した酢酸 (0.3 μl, 0.005 mmol) を加え、更にアセトニトリル (0.25 ml) に溶解したベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス-ピロリジノ-ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート (PyBOP ; 2.6 mg, 0.005 mmol)、及び N, N-ジイソプロピルエチル

アミン (1.7 μ l, 0.010 mmol) を加え、室温で5時間振とうした。
 金膜をアセトニトリルで十分に洗浄した後、製造例12に記載の方法により縮合率
 を定量した (約90%)。かくして親水性スペーサーとしてのヘキサエチレングリ
 コール誘導体が、SAM由来のアルカンチオールを介して結合している金膜を得た
 5 (ヘキサエチレングリコール誘導体付き金膜)。

製造例11: FK506誘導体結合型親水性スペーサー付金膜の合成
 (金膜 + (PEG)₁-FK506)



製造例10で得られたヘキサエチレングリコール誘導体付金膜を用い、製造例2
 10 で調製した17-アリル-1, 14-ジヒドロキシ-12-{2-[4-(7-カル
 ボキシ-ヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ-シクロヘキシル]-1-メチ
 ル-ビニル}-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル
 -11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ[22.3.1.0^{4,9}]オクタコ
 ス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン (4.8 mg, 0.005 mmol)
 15 o1)、EDC·HCl (1.0 mg, 0.005 mmol)、1-ヒドロキシベン
 ズトリアゾール (HOBt; 0.7 mg, 0.005 mmol) 及びジメチルホル
 ムアミド (DMF; 0.5 ml) の混合物とともに室温で終夜攪拌した。反応終了
 後、金膜をDMFで十分に洗浄し、DMF (0.25 ml) に溶解した酢酸 (0.
 3 μ l, 0.005 mmol)、EDC·HCl (1.0 mg, 0.005 mmol)
 20 1)、HOBt (0.7 mg, 0.005 mmol) を溶解したDMF (0.5 ml)
 の混合物に浸し、室温で終夜攪拌した。金膜をジメチルホルムアミド (DM
 F)、アセトニトリルで十分に洗浄し、親水性スペーサーを有するFK506結合
 型金膜 [金膜 + (PEG)₁-FK506] を合成した。

金膜とFK506の間に介在する親水性スペーサー部分のHBA数は7、HBD
 25 数は1である。但しSAM由来のアルカンチオール部分とFK506にあらかじめ

導入された基に由来する分は数に入れない。

製造例 12 : フルオレン誘導体の定量による低分子の金薄膜上への固定化量の定量

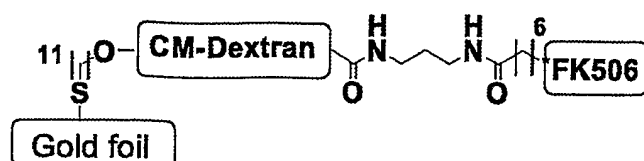
製造例 10 において、終夜金薄膜を浸した (6-メルカプトヘキシル) -カルバミン酸 9H-フルオレン-9-イル-メチル エステルの 1.5 mM エタノール溶液を除き、金膜をエタノール、アセトニトリルで十分に洗浄した後、金薄膜を 1 mL の 20% のピペリジンを含むアセトニトリル溶液に浸し、30 分間振とうした。このアセトニトリル溶液を回収し、さらに 1 mL のアセトニトリルで金薄膜を洗浄した。回収したアセトニトリル溶液と金薄膜の洗浄に用いたアセトニトリル溶液を合わせ、減圧濃縮した。更に 50℃ にて 1 時間真空乾燥を行った。室温まで放冷した後、100 μ L のアセトニトリルで容器内に付着したフルオレン誘導体を溶解し、更に 100 μ L のミリ Q 水を注いだ。この溶液をろ過した後、LC/MS にて脱保護反応により Fmoc 基から生成したフルオレン誘導体の質量分析を行い、得られたピーク (M+1 ; 264) エリアからフルオレン誘導体の定量を行った。脱保護により生成したアミノ基に、製造例 9 で得られた Fmoc 基をもつ親水性スパーサーを縮合後、同様に 20% ピペリジンによる脱保護、生成したフルオレン誘導体の質量分析を行い、金薄膜上への親水性スパーサーの結合量を求めた。

参考例 1 : FK506 誘導体結合型 (アルカンチオール直付き / 親水性スパーサーなし) 金膜の合成

製造例 10 記載の方法により、金膜を (6-メルカプトヘキシル) -カルバミン酸 9H-フルオレン-9-イル-メチル エステルで処理することによって、金膜上にアルカンチオールを固定化した後、製造例 11 記載に準じた方法により、17-アリル-1, 14-ジヒドロキシ-12- {2- [4- (7-カルボキシーヘプタノイル-オキシ) -3-メトキシ-シクロヘキシル] -1-メチル-ビニル} -23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザ-トリシクロ [2.2.3.1.0^{4,9}] オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオンを導入した。

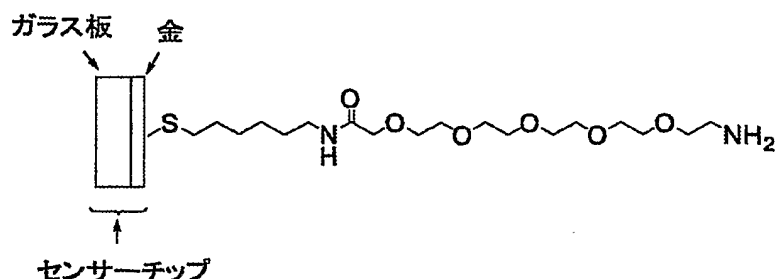
参考例 2 : FK506 誘導体結合型デキストラン付金膜の合成

(金膜+デキストラン-FK506)



Piranha 溶液 (30% 過酸化水素 : 濃硫酸 = 1 : 4 混合溶液) に数時間浸した金膜 (高純度化学研究所社 ; 純金、純度 99.9% up、形状 10 mm × 10 mm × 0.01 mm (厚)) (約 1 cm²) をミリ Q 水、エタノールで洗浄した。ついで、この金膜を用いて文献記載 (J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1526-1528, 1990) の方法により、カルボキシメチルデキストラン (CM-Dextran) 付金膜を作成した。得られたカルボキシメチルデキストラン付金膜を用いて、製造例 2 で調製した 17-アリル-1, 14-ジヒドロキシ-12-{2-[4-(7-カルボキシーヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシシクロヘキシル]-1-メチル-ビニル}-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ [2.2.3.1.0^{4,9}] オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン (9.6 mg, 0.01 mmol)、EDC·HCl (1.92 mg, 0.01 mmol)、HOBt (1.33 mg, 0.01 mmol)、トリエチルアミン (3.03 mg, 0.03 mmol) 及びミリ Q 水 (1 ml) の混合物とともに室温で終夜攪拌した。反応終了後、金膜をミリ Q 水で十分に洗浄し、酢酸 (0.57 μl, 0.01 mmol)、EDC·HCl (1.92 mg, 0.01 mmol)、HOBt (1.33 mg, 0.01 mmol) を溶解したミリ Q 水 (1 ml) の混合物に浸し、室温で終夜攪拌した。金膜をミリ Q 水で十分に洗浄し、デキストランを有する FK506 結合型金膜 [金膜+デキストラン-FK506] を合成した。

製造例 13 : 親水性スパーサー付 BIACORE センサーチップの合成 : ヘキサエチレングリコール誘導体付センサーチップ (BIACORE 社 ; SIA センサーチップ) の合成



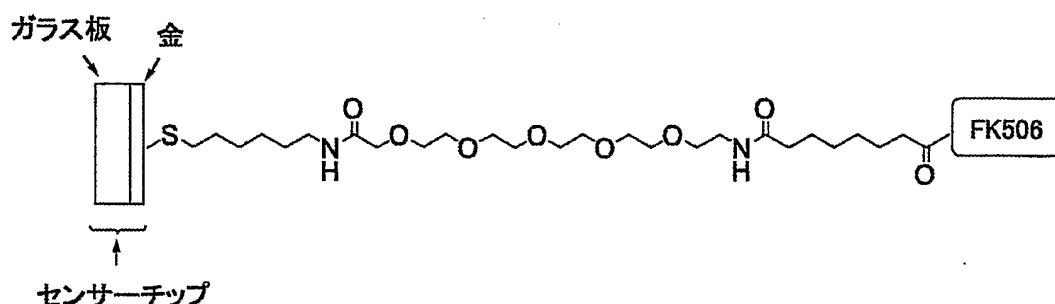
Piranha 溶液（30%過酸化水素：濃硫酸＝1：4 混合溶液）に数時間浸したセンサーチップ（BIACORE 社；SIA センサーチップ）をミリQ水、エタノールで洗浄した。これを（6-メルカプトヘキシル）-カルバミン酸 9H-フルオレン-9-イル-メチル エステルの 1.5 mM エタノール溶液（0.5 mL）に終夜浸して、センサーチップ上の金表面に SAM を形成させた。反応終了後、センサーチップをエタノール、アセトニトリルで十分に洗浄した後、ピペリジン／アセトニトリル（1／4）の混合溶液（1 mL）を加えて室温で 30 分間振とうした。

アセトニトリルで十分洗浄した後、アセトニトリル（0.25 mL）に溶解した {2-[2-(2-{2-[2-(9H-フルオレン-9-イル-メトキシカルボニルアミノ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ} 酢酸（製造例 9 で得られた化合物 8；12.5 mg, 0.024 mmol）を加え、更にアセトニトリル（0.25 mL）に溶解したベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス-ピロリジノ-ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート（PyBOP；13 mg, 0.025 mmol）、及び N,N-ジイソプロピルエチルアミン（8.9 μ L, 0.050 mmol）を加え、室温で終夜振とうした。反応液を除き、センサーチップをアセトニトリルで洗浄後、同様の条件で終夜反応を行った。反応終了後、センサーチップをアセトニトリルで十分に洗浄した後、アセトニトリル（0.25 mL）に溶解した酢酸（0.3 μ L, 0.005 mmol）、更にアセトニトリル（0.25 mL）に溶解したベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス-ピロリジノ-ホスホニウム

ヘキサフルオロホスフェート（PyBOP；2.6 mg, 0.005 mmol）、及び N,N-ジイソプロピルエチルアミン（1.7 μ L, 0.010 mmol）

の混合溶液に浸し、室温で5時間振とうした。センサーチップをアセトニトリルで十分に洗浄した後、上述のようにピペリジン／アセトニトリル（1／4）の混合溶液（1 ml）で処理し、親水性スパーサー付B I A C O R Eセンサーチップを調製した。

- 5 製造例14：FK506誘導体結合型親水性スパーサー付センサーチップの合成
（センサーチップ＋（PEG）₁－FK506）



- 製造例13で得られたヘキサエチレングリコール誘導体付センサーチップを用い、製造例2で調製した17-アシル-1, 14-ジヒドロキシ-12- {2- [4-
10 (7-カルボキシ-ヘプタノイル-オキシ) -3-メトキシ-シクロヘキシル] -
1-メチル-ビニル} -23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラ
メチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ [22. 3. 1. 0^{4,9}]
オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン (4. 8 mg, 0. 0
05 mmol)、EDC・HCl (1. 0 mg, 0. 005 mmol)、HOBT
15 (0. 7 mg, 0. 005 mmol) 及びDMF (0. 5 ml) の混合物を室温で
終夜攪拌した。反応終了後、センサーチップをDMFで十分に洗浄し、DMF (0.
25 ml) に溶解した酢酸 (0. 3 μ l, 0. 005 mmol)、EDC・HCl
(1. 0 mg, 0. 005 mmol)、HOBT (0. 7 mg, 0. 005 mmol)
20 を溶解したDMF (0. 5 ml) の混合物に浸し、室温で終夜攪拌した。セン
サーチップをDMF、アセトニトリルで十分に洗浄し、親水性スパーサーを有する
FK506結合型センサーチップ [センサーチップ＋（PEG）₁－FK506] を
合成した。金表面を有するセンサーチップとFK506の間に介在する親水性スパー

ーサー部分のHBA数は7、HBD数は1である。但しSAM由来のアルカンチオール部分とFK506にあらかじめ導入された基に由来する分は数に入れない。

参考例3：FK506誘導体結合型（アルカンチオール直付き／親水性スぺーサーなし）センサーチップの合成

- 5 製造例10記載の方法により、センサーチップを（6-メルカプト-ヘキシル）-カルバミン酸 9H-フルオレン-9-イル-メチル エステルで処理することによって、センサーチップ上にアルカンチオールを固定化した後、製造例11記載に準じた方法により、17-アリル-1, 14-ジヒドロキシ-12- {2- [4- (7-カルボキシ-ヘプタノイル-オキシ) -3-メトキシ-シクロヘキシル] -1-メチル-ビニル} -23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ [2.2.3.1.0^{4,9}] オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオンを導入した。

実施例1

(1) ライゼート (lysate) の調製

- 15 ラットの脳 (2.2 g) を混合液A (0.25Mシュクロース, 25mM Trisバッファー (pH7.4), 22ml) に混ぜ、ホモジネートを作成後、9500rpmで10分間遠心分離した。遠心分離上清を取り、50000rpmでさらに30分間遠心分離した。こうして得られた上清をライゼートとして使用した。なお、実験はすべて4℃あるいは氷上で行った。

20 (2) 結合実験

上記したFK506を結合した各種金膜（FK506結合金膜）を用いて以下の手順でライゼートとの結合実験を行った。なお、ライゼートは混合液Aで1/2に希釈して使用した。FK506を結合した各種金膜はそれぞれ10mm×10mm×0.01mm（厚）1枚を使用した。

- 25 尚、FK506を結合した金膜としては、ヘキサエチレングリコール誘導体の導入された製造例11のFK506誘導体結合型親水性スぺーサー付金膜を用いた。また、比較例として参考例1のFK506付金膜（親水性スぺーサーなし）あるい

は参考例2のFK506付金膜（デキストランスペーサー）を用いた。

FK506結合金膜とライゼート（1ml）を4℃で終夜、静かに振とうした。その後、上清を除き、残ったFK506結合金膜を混合液Aで3回十分に洗浄して各FK506結合金膜を十分に洗浄した。

- 5 こうして得られたFK506結合金膜に25 μ lのSDS-PAGE用loading buffer (nakalai cat. NO=30566-22、電気泳動用 sample buffer solution with 2-ME(2-mercaptoethanol) (2x) for SDS PAGE) を加え、ピペッティングした。こうして得られたサンプル液を市販のSDSゲル (BioRad readyGel J, 15% SDS, cat. NO=161-J341) で分離し、
- 10 そのSDSゲルを解析した（図1）。結果、図1レーン4に示す親水性スペーサーを導入したものではレーン3の親水性スペーサー無しのものに比べ、非特異的な相互作用に基づくと思われるバンドの濃さの減少あるいは消失が認められ、且つ特異的な相互作用に基づくと思われるバンド（FKBP12）の濃さの増強が認められた。かかる結果は、親水性スペーサーの導入により非特異的な相互作用が抑制され、
- 15 且つ特異的な相互作用が増強されていることを示している。

実施例2

（1）ライゼート（Lysate）の調製

実施例1に準ずる。

（2）結合実験

- 20 上記したFK506を結合した各種センサーチップを用いて以下の手順でライゼートとの結合実験を行った。なお、ライゼートは混合液Aで1/2に希釈して使用した。FK506を結合した各種センサーチップはそれぞれ1枚を使用した。

- 尚、FK506を結合したセンサーチップとしては、ヘキサエチレングリコール誘導体の導入された製造例14のFK506誘導体結合型親水性スペーサー付センサーチップを用いた。また、比較例として参考例3のFK506結合型センサーチップを用いた。
- 25

FK506結合型センサーチップとライゼート（1ml）を4℃で終夜、静かに

振とうした。その後、上清を除き、残ったFK506結合型センサーチップを混合液Aで3回十分に洗浄してFK506結合型センサーチップ表面を十分に洗浄した。

こうして得られたFK506結合型センサーチップの金表面へ25 μ lのSDS-PAGE用loading buffer (nakalai cat. NO=30566-22、電気泳動用 sample buffer solution with 2-ME(2-mercaptoethanol) (2x) for SDS PAGE)を加え、ピペッティングした。こうして得られたサンプル液を市販のSDSゲル(BioRad readyGel J, 15% SDS, cat. NO=161-J341)で分離し、そのSDSゲルを解析した。結果、親水性スパーサーを導入したものに非特異的な相互作用に基づくと思われるバンドの濃さの減少あるいは消失が認められ、且つ特異的な相互作用に基づくと思われるバンド(具体的にはFKBP12に相当するバンド)の濃さの増強が認められた。かかる結果は、親水性スパーサーの導入により非特異的な相互作用が抑制され、且つ特異的な相互作用が増強されていることを示している。

産業上の利用可能性

固相担体としての金属の表面へのリガンドの固定化の際に、金属表面と検討対象のリガンドとの間に親水性のスパーサーを導入することにより、金属表面の疎水的な性質を低減し、分子間の非特異的な相互作用を抑制することが出来る。また同時に分子間の特異的な相互作用を増強することが出来る。

低分子-低分子、低分子-高分子、高分子-高分子の相互作用を測定、あるいは相互作用をベースとして目的とするターゲットを精製する研究において、本願発明の技術により非特異的な相互作用を人為的に抑制し、且つ特異的な相互作用を増強することが可能である。すなわち、本技術は低分子-高分子、低分子-低分子、高分子-高分子相互作用を片方の分子を固相担体に固定し、相互作用を測定、あるいは相互作用をベースとして目的とするターゲットを精製する研究を容易にするものである。これらの成果は生命科学全般、特に創薬研究、ポストゲノム研究、プロテオミクス、ケミカルジェノミクス、ケミカルプロテオミクス等に広く応用できるものである。

請求の範囲

1. リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を解析する過程において、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことを特徴とする、リガンド及び／または金属表面と
5 ターゲット分子以外の分子との非特異的な相互作用を抑制する方法。
2. リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を解析する過程において、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことを特徴とする、リガンドとターゲット分子との特異的な相互作用を増強する方法。
- 10 3. リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を解析する過程において、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことを特徴とする、リガンド及び／または金属表面とターゲット分子以外の分子との非特異的な相互作用を抑制し、且つリガンドとターゲット分子との特異的な相互作用を増強する方法。
- 15 4. リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を用いてターゲット分子を選別する過程において、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことを特徴とする、リガンド及び／または金属表面とターゲット分子以外の分子との非特異的な相互作用を抑制する方法。
- 20 5. リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を用いてターゲット分子を選別する過程において、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことを特徴とする、リガンドとターゲット分子との特異的な相互作用を増強する方法。
- 25 6. リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を用いてターゲット分子を選別する過程において、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことを特徴とする、リガンド及び／または金属表面とターゲット分子以外の分子との非特異的な相互作用を抑制

し、且つリガンドとターゲット分子との特異的な相互作用を増強する方法。

7. 金属表面の疎水的性質を低減させる処理が、リガンドの金属表面への固定化の際にそれらの間に親水性スペーサーを導入することである、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

5 8. 親水性スペーサーが、金属表面及びリガンドと結合した状態で以下の特徴の少なくともいずれか1つを有するものである、請求項7記載の方法：

(1) 水素結合アクセプター数が6以上である、

(2) 水素結合ドナー数が5以上である、

(3) 水素結合アクセプター数及び水素結合ドナー数の総計が9以上である。

10 9. さらに、親水性スペーサーがその分子中にカルボニル基を1以上有するものである、請求項8記載の方法。

10. さらに、親水性スペーサーが水溶液中で電荷的に陽性あるいは陰性になる官能基を有さないことを特徴とする、請求項8または9記載の方法。

15 11. リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を解析する方法であって、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことにより、リガンド及び／または金属表面とターゲット分子以外の分子との非特異的な相互作用を抑制することを特徴とする方法。

20 12. リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を解析する方法であって、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことにより、リガンドとターゲット分子との特異的な相互作用を増強することを特徴とする方法。

25 13. リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を解析する方法であって、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことにより、リガンド及び／または金属表面とターゲット分子以外の分子との非特異的な相互作用を抑制し、且つリガンドとターゲット分子との特異的な相互作用を増強することを特徴とする方法。

14. リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのター

ゲット分子との間での特異的な相互作用を用いて、ターゲット分子を選別する方法であって、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことにより、リガンド及び／または金属表面とターゲット分子以外の分子との非特異的な相互作用を抑制することを特徴とする方法。

- 5 15. リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を用いて、ターゲット分子を選別する方法であって、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことにより、リガンドとターゲット分子との特異的な相互作用を増強することを特徴とする方法。

- 10 16. リガンドを金属表面に固定化し、当該金属表面上での該リガンドとそのターゲット分子との間での特異的な相互作用を用いて、ターゲット分子を選別する方法であって、金属表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことにより、リガンド及び／または金属表面とターゲット分子以外の分子との非特異的な相互作用を抑制し、且つリガンドとターゲット分子との特異的な相互作用を増強することを特徴とする方法。

- 15 17. 金属表面の疎水的性質を低減させる処理が、リガンドの金属表面への固定化の際にそれらの間に親水性スペーサーを導入することである、請求項11～16のいずれか1項に記載の方法。

18. 親水性スペーサーが、金属表面及びリガンドと結合した状態で以下の特徴の少なくともいずれか1つを有するものである、請求項17記載の方法：

- 20 (1) 水素結合アクセプター数が6以上である、
(2) 水素結合ドナー数が5以上である、
(3) 水素結合アクセプター数及び水素結合ドナー数の総計が9以上である。

19. さらに、親水性スペーサーがその分子中にカルボニル基を1以上有するものである、請求項18記載の方法。

- 25 20. さらに、親水性スペーサーが水溶液中で電荷的に陽性あるいは陰性になる官能基を有さないことを特徴とする、請求項18または19記載の方法。

21. リガンドに対して特異的な相互作用を有するターゲット分子のスクリーニン

グ方法であって、少なくとも以下の工程を含む方法：

(1) リガンドを金属表面に親水性スペーサーを介して固定化する工程、

(2) ターゲット分子を含むかまたは含まない試料を上記(1)で得られたリガンドが固定化された金属表面に接触させる工程、

5 (3) リガンドに特異的な相互作用を示したか、または示さなかった分子を同定し、解析する工程、及び

(4) 上記(3)で得られた解析結果に基づいて、リガンドに対して特異的な相互作用を有する分子をターゲット分子であると判断する工程。

22. 親水性スペーサーが、金属表面及びリガンドと結合した状態で以下の特徴の
10 少なくともいずれか1つを有するものである、請求項21記載の方法：

(1) 水素結合アクセプター数が6以上である、

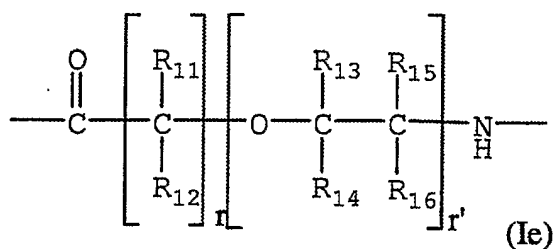
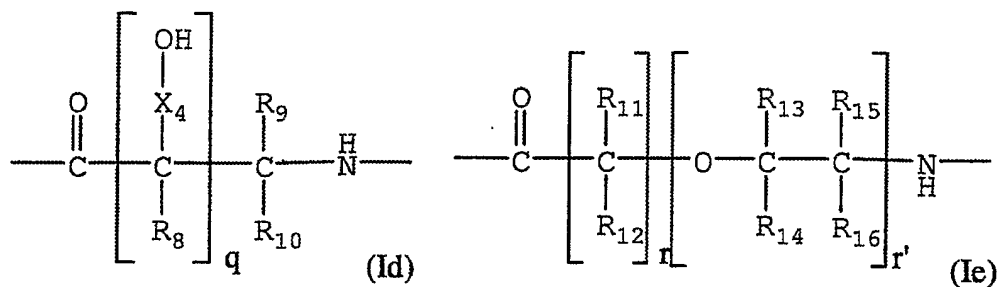
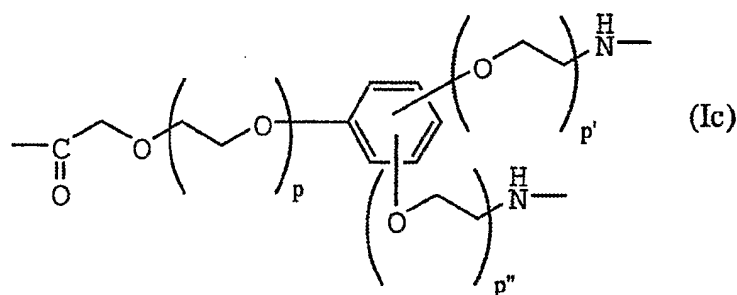
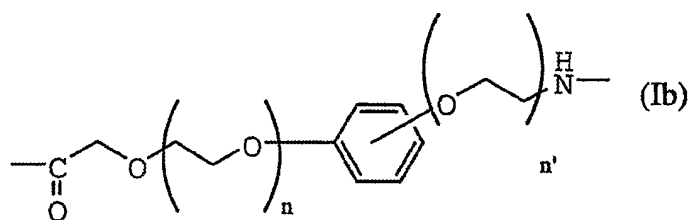
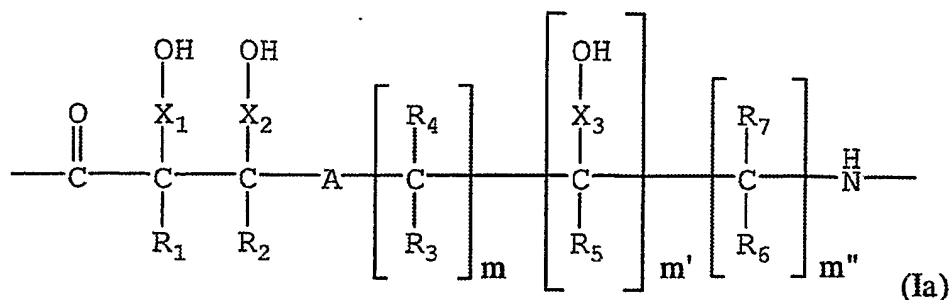
(2) 水素結合ドナー数が5以上である、

(3) 水素結合アクセプター数及び水素結合ドナー数の総計が9以上である。

23. さらに、親水性スペーサーがその分子中にカルボニル基を1以上有するもの
15 である、請求項22記載の方法。

24. さらに、親水性スペーサーが水溶液中で電荷的に陽性あるいは陰性になる官能基を有さないことを特徴とする、請求項22または23記載の方法。

25. 親水性スペーサーが以下の式(I a)～(I e)からなる群より選択される
いずれか1つの式で表される部分構造を少なくとも1つ有するものである、請求項
20 7～10、17～24のいずれか1項に記載の方法：



(式 (I a) 中、

Aは適当な連結基であり、

X₁～X₃はそれぞれ同一または異なって単結合あるいは炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基であり、

R₁～R₇はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、-CH₂OHあるいは水酸基であり、

m は0～2の整数であり、 m' は0～10の整数であり、 m'' は0～2の整数であり、

$R_3 \sim R_7$ が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく、 X_3 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく；

5 式 (I b) 中、

n 及び n' はそれぞれ同一または異なって1～1000の整数であり；

式 (I c) 中、

p 、 p' 及び p'' はそれぞれ同一または異なって1～1000の整数であり；

式 (I d) 中、

10 X_4 は単結合あるいは炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基であり、

$R_8 \sim R_{10}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ あるいは水酸基であり、

q は1～7の整数であり、

15 R_8 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく、 X_4 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく；

式 (I e) 中、

$R_{11} \sim R_{16}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ あるいは水酸基であり、

20 r は1～10の整数であり、 r' は1～50の整数であり、

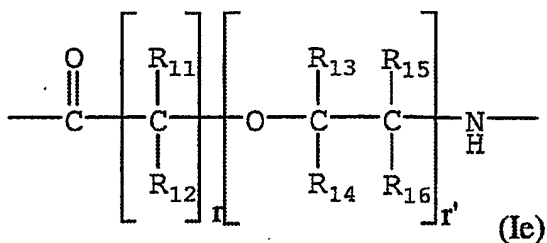
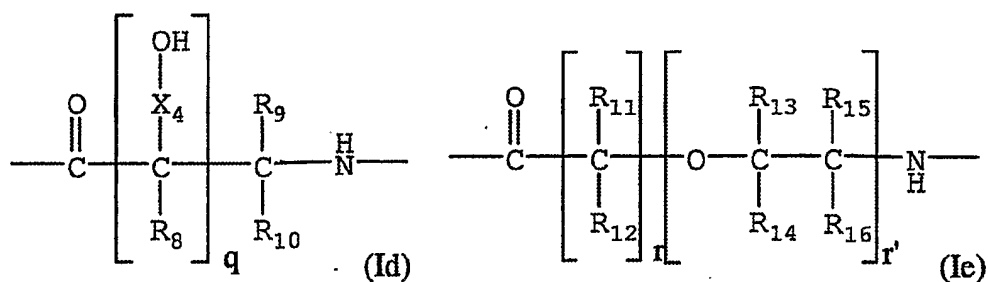
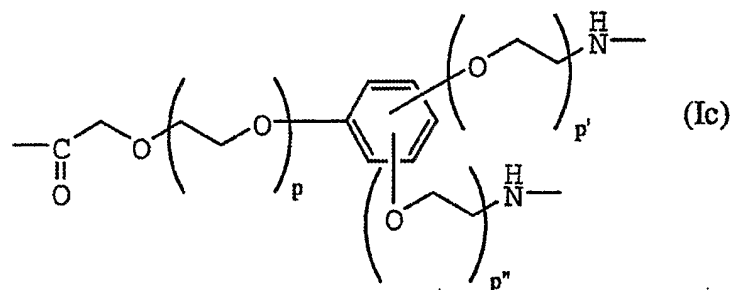
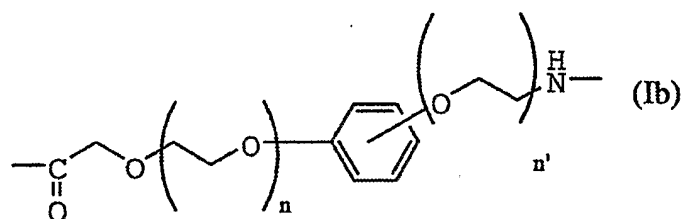
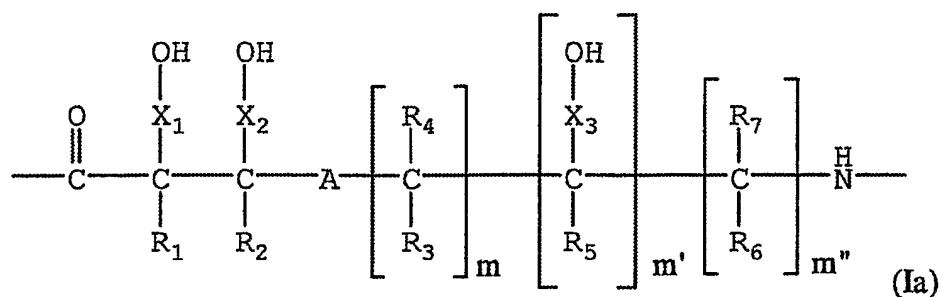
$R_{11} \sim R_{16}$ がそれぞれ複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよい)。

26. 親水性スペーサーが式 (I a) ～ (I e) からなる群より選択されるいずれか1つの式で表される部分構造を2つ以上有するものである、請求項25記載の方法。

27. リガンドが固定化された固相担体であって、当該固相担体が金属であり、且つ該金属とリガンドとの間に親水性スペーサーが介在することを特徴とする、固相

担体。

28. 親水性スペーサーが式(Ia)～(Ie)からなる群より選択されるいずれか1つの式で表される部分構造を少なくとも1つ有するものである、請求項27記載の固相担体：



5

(式(Ia)中、

Aは適当な連結基であり、

X₁～X₉はそれぞれ同一または異なって単結合あるいは炭素数1～3の直鎖状また

は分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基であり、

$R_1 \sim R_7$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ あるいは水酸基であり、

m は0～2の整数であり、 m' は0～10の整数であり、 m'' は0～2の整数であり、

$R_3 \sim R_7$ が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく、 X_3 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく；

式(I b)中、

n 及び n' はそれぞれ同一または異なって1～1000の整数であり；

式(I c)中、

p 、 p' 及び p'' はそれぞれ同一または異なって1～1000の整数であり；

式(I d)中、

X_4 は単結合あるいは炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基であり、

$R_8 \sim R_{10}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ あるいは水酸基であり、

q は1～7の整数であり、

R_8 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく、 X_4 が複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよく；

式(I e)中、

$R_{11} \sim R_{16}$ はそれぞれ同一または異なって水素原子、炭素数1～3の直鎖状または分枝状のアルキル基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ あるいは水酸基であり、

r は1～10の整数であり、 r' は1～50の整数であり、

$R_{11} \sim R_{16}$ がそれぞれ複数個存在する場合にはそれぞれ同一でも異なってもよい)。

29. 金属が金である、請求項27または28記載の固相担体。

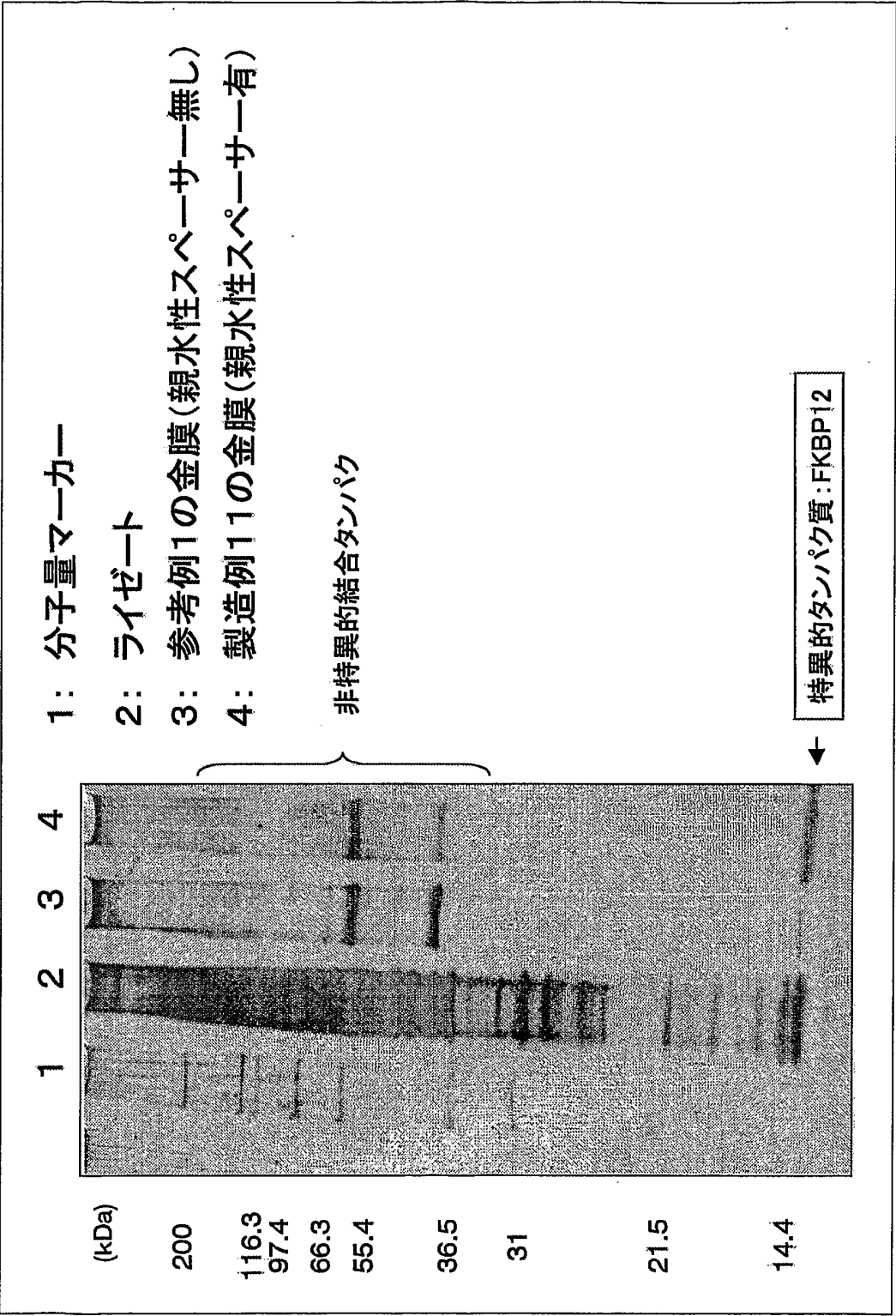
30. リガンドと金属表面との間への親水性スペーサーの導入を確認するための方

法であって、リガンドの金属表面への固定化の際にそれらの間に親水性スペーサーを導入する工程において、親水性スペーサーに由来する保護基が脱保護されることによって生じる脱離基を検出することを含む方法。

3 1. 脱離基の検出が質量分析を用いて実施される、請求項 3 0 記載の方法。

- 5 3 2. 保護基が 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基である、請求項 3 0 記載の方法。

図 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012218

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/543, G01N37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/543, G01N37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/025297 A (Kabushiki Kaisha Ribasu Puroteomikusu), 25 March, 2004 (25.03.04), & AU 2003254782 A	1-32



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 June, 2005 (30.06.05)

Date of mailing of the international search report

19 July, 2005 (19.07.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ G 0 1 N 3 3 / 5 4 3, G 0 1 N 3 7 / 0 0		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ G 0 1 N 3 3 / 5 4 3, G 0 1 N 3 7 / 0 0		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2005年 日本国実用新案登録公報 1996-2005年 日本国登録実用新案公報 1994-2005年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2004/025297 A (株式会社リバース・プロテオ ミクス) 2004.03.25 & AU 2003254782 A	1-32
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 30.06.2005	国際調査報告の発送日 19.7.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 竹中 靖典 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2J 9507