

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4629660号  
(P4629660)

(45) 発行日 平成23年2月9日(2011.2.9)

(24) 登録日 平成22年11月19日(2010.11.19)

(51) Int. Cl.	F I
<b>CO7C 319/18</b> (2006.01)	CO7C 319/18
<b>CO7C 323/63</b> (2006.01)	CO7C 323/63
<b>BO1J 20/281</b> (2006.01)	BO1J 20/26 L
<b>BO1D 15/08</b> (2006.01)	BO1D 15/08
<b>GO1N 30/88</b> (2006.01)	GO1N 30/88 2O1X
請求項の数 12 (全 18 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2006-507946 (P2006-507946)  
 (86) (22) 出願日 平成16年3月5日(2004.3.5)  
 (65) 公表番号 特表2006-523220 (P2006-523220A)  
 (43) 公表日 平成18年10月12日(2006.10.12)  
 (86) 国際出願番号 PCT/SE2004/000317  
 (87) 国際公開番号 W02004/078349  
 (87) 国際公開日 平成16年9月16日(2004.9.16)  
 審査請求日 平成19年3月1日(2007.3.1)  
 (31) 優先権主張番号 0300625-1  
 (32) 優先日 平成15年3月5日(2003.3.5)  
 (33) 優先権主張国 スウェーデン(SE)  
 (31) 優先権主張番号 0300711-9  
 (32) 優先日 平成15年3月12日(2003.3.12)  
 (33) 優先権主張国 スウェーデン(SE)

(73) 特許権者 597064713  
 ジーイー・ヘルスケア・バイオサイエンス  
 ・アクチボラグ  
 スウェーデン国エスエー751 84  
 ウプサラ ビヨルクガタン 30  
 (74) 代理人 100137545  
 弁理士 荒川 聡志  
 (74) 代理人 100105588  
 弁理士 小倉 博  
 (74) 代理人 100106541  
 弁理士 伊藤 信和  
 (74) 代理人 100129779  
 弁理士 黒川 俊久

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マルチモードアニオン交換リガンドの製造法

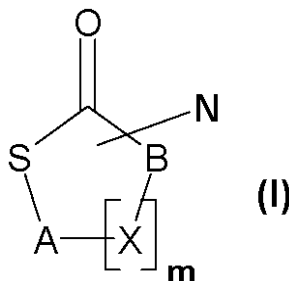
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

1 以上のマルチモードアニオン交換リガンドの製造方法であって、

(a) 一般式(I)で定義される1以上の骨格を準備する段階

【化1】



(式中、A、B及びXは互いに独立に炭素原子又は酸素、硫黄、窒素及びノもしくはシリカであり、mは1~3の整数であり、官能基Nは窒素であって、いずれかのXを置換或いはA、B及びXのいずれかに結合している。)、及び

(c) 残基Rに結合したアミンを含む試薬(ただし、Rは線状、枝分れ、環状の飽和、不飽和又は芳香族炭化水素基である。)の添加によるアミノ分解によって誘導体の環構造を開環させて、開環した骨格のカルボニル炭素に上記アミンを付加させる段階を含んでなる方法。

## 【請求項 2】

式 (I) の A、B 及び X が炭素原子であり、m が 1 である、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

前記骨格がホモシステインチオラクトンである、請求項 1 又は請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

段階 (a) と段階 (c) の間に、(b) 上記骨格の環構造を維持しながら、上記骨格の窒素を誘導体化してアニオン交換基を導入及び / 又はアミンを保護する段階をさらに含む、請求項 1 乃至請求項 3 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 5】

段階 (b) における前記誘導体化が第二級、第三級又は第四級アミンを与えるアルキル化である、請求項 4 項記載の方法。 10

## 【請求項 6】

誘導体化骨格を与えるため段階 (a) 及び (b) を前もって実施しておく、請求項 4 又は請求項 5 記載の方法。

## 【請求項 7】

得られた開環生成物をそのチオール基を介して、反応性基を含むベースマトリックスに固定化する段階 (d) をさらに含む、請求項 1 乃至請求項 6 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 8】

ベースマトリックスの反応性基を臭素化する段階もさらに含んでいて、反応性基が炭素 - 炭素二重結合である、請求項 1 乃至請求項 7 のいずれか 1 項記載の方法。 20

## 【請求項 9】

ラジカル反応に適した条件下で、ベースマトリックスの反応性基を活性化する段階をさらに含んでいて、反応性基が炭素 - 炭素二重結合である、請求項 1 乃至請求項 7 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 10】

マルチモードアニオン交換リガンド又はベースマトリックスに複数のマルチモードアニオン交換リガンドが結合した分離媒体であって、当該リガンド又は媒体が請求項 1 乃至請求項 9 のいずれか 1 項記載の方法で製造したものである、リガンド又は媒体。

## 【請求項 11】

請求項 10 記載の分離媒体を充填したアニオンクロマトグラフィー用クロマトグラフィーカラム。 30

## 【請求項 12】

液体から目標物質を分離する方法であって、請求項 10 記載の分離媒体を準備し、媒体を液体に接触させてその表面に目標物質を吸着させることを含む方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、マルチモードアニオン交換リガンドの製造法、並びにベースマトリックスへのかかるリガンドの固定化による分離媒体の製造法に関する。

## 【背景技術】 40

## 【0002】

クロマトグラフィーという用語は、密接に関連した一群の分離法を包含する。他の大半の理化学的分離法と区別されるクロマトグラフィーの特徴は、非混和性の 2 つの相を接触させ、一方の相を固定相とし、他方を移動相とすることである。移動相に導入された試料混合物は、移動相によって系内を運搬される際に固定相と移動相の間で何度も一連の相互作用 (分配) を受ける。相互作用は試料中の成分の理化学的性質の差異を利用する。こうした差異が、固定相を収容したカラム内を移動する移動相の影響下での各成分の移動速度を支配する。分離された成分は、固定相との相互作用の低いものから高いものへと順次流出する。妨害の最も少ない成分が最初に溶出し、最も強く保持された物質が最後に溶出する。分離は、試料成分がカラムから溶出する際に、ある成分の流出速度が隣接する溶質の 50

ゾーンと重ならないように十分に遅くなった場合に達成される。

【0003】

国際公開第97/29825号(Amersham Pharmacia Biotech AB)には、正荷電アミン窒素から炭素2~3個分離したアミノ窒素と酸素の関与する水素結合と荷電による相互作用をもたらす混成モードのアニオン交換体によるクロマトグラフィーが開示されている。このクロマトグラフィーは、結合物質の溶出に比較的高いイオン強度を要するアニオン交換体をこの種のリガンドで得ることができるという知見に基づく。

【0004】

最近、高塩濃度リガンドと呼ばれるある種のリガンドが開示された。例えば、国際公開第01/38227号(Amersham Biosciences AB(スウェーデン、ウプサラ))参照。これらのリガンドは混成モードのアニオン交換リガンドとして機能し、しかも高い塩濃度に耐え得るのでサンプルを実質的に希釈する必要がないため、タンパク質精製などの多くの工業的用途で多大な関心もたれている。高塩濃度リガンドは、従前の方法に比して必要とされるサンプルの全体積が少なく、かかる用途に必要な装置の総コスト及び作業労力が低減するので、生物工学的な分離での使用に好適である。

【0005】

混成モードのアニオン交換リガンドを分離に用いるとコスト及び労力が低減されるが、従前の分離法には幾つかの短所があり、その実用性が損なわれている。ほとんどの場合、混成モードのアニオン交換体リガンドの固定化は、リガンドのアミン基によるエポキシド誘導体化ゲルの開環に基づく。この種の求核置換反応は、アミン基の $pK_a$ だけでなく、その求核性及び立体障害因子にも大きく依存するので、適用できる汎用法がなく、固定化の最適化を個々の事例毎に行わなければならない。さらに、求核性に劣るアミン基の場合、高価なリガンドが大過剰(2当量を超える)必要とされる。もう一つの短所は、反応性の基本的な相違のため、例えば第二級アミンと第三級アミンとの固定化条件の大きな相違を最適化しなければならないことである。

【0006】

上述の国際公開第01/38227号のもう一つの短所は、アミン官能基を介して固定化を行うので、第一級アミン基を有する媒体を直接得ることができないことである。

【0007】

第一級アミン基を得るため、国際公開第01/38277号では保護基が用いられているが、合成のための時間とコストが増し、また不十分な脱保護のため不均質な媒体を生じおそれも増す。

【0008】

媒体で第一級アミンを得るための別の解決策が、ポリアミンの使用で実証される。しかし、かかるポリアミンは複数の部位で結合する可能性があり、同じく均質性に劣る媒体が得られる。

【0009】

このように、従前提案された方法で、ライブラリの作成又はパラレルフォーマットでの使用に十分な汎用性と信頼性をもつものはない。

【0010】

混成モードのカチオン交換リガンドの製造に関して知られた同様の問題に対する具体的解決策が、PCT/SE02/01650(Amersham Pharmacia Biotech(スウェーデン、ウプサラ))で示唆されているが、この出願は、本願の出願時点では公開されていなかったものである。この国際出願には、三官能性骨格、好ましくはホモシステインチオラクトンが開示されており、カチオン交換リガンドの製造のため出発物質として用いられる。この方法では、多様性に富む様々なリガンドのライブラリーを作成できる。

【0011】

現在、上述の方法の機能的代替法がないので、分離法に用いるための混成モードのアニ

10

20

30

40

50

オン交換リガンドの改良製造法法に対するニーズが当技術分野で存在する。

【0012】

最後に、Feistoy及びDanna(“Sulphydryl cellulose: A New Medium for Chromatography of Mercurated Polynucleotides”, Patricia L. Feist and Kathleen J. Danna, Biochemistry, 20(15), p. 4243 - 4246)は、アミノエチルセルロースをN-アセチルホモシステインチオラクトンと混合することを含むスルフヒドリルセルロースの製造法を開示している。

【特許文献1】国際公開第97/29825号パンフレット

10

【特許文献2】国際公開第01/38227号パンフレット

【特許文献3】国際公開第2003/024588号パンフレット

【非特許文献1】P. L. Feist and K. J. Danna, “Sulphydryl cellulose: A New Medium for Chromatography of Mercurated Polynucleotides”, Biochemistry, 20(15), p. 4243 - 4246

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明の一つの目的は、マルチモードアニオン交換リガンドの製造法であって、簡単で汎用性のある堅調な方法を提供することである。

20

【0014】

本発明の別の目的は、ベースマトリックス容易に固定化できるマルチモードアニオン交換リガンドを提供することである。

【0015】

したがって、本発明の別の目的は、マルチモードアニオン交換リガンドを含む分離媒体の製造法を提供することである。

【0016】

本発明の別の目的は、新しい選択性や溶出プロファイルのような新しいクロマトグラフィ特性を示す分離媒体の製造法を提供することである。

30

【0017】

本発明の別の目的は、大過剰のリガンドによらずに、信頼性のある制御された方法で固定化マルチモードアニオン交換体リガンドを製造する方法を提供することである。

【0018】

本発明の別の目的は、同一骨格に基づく多種多様なマルチモードアニオン交換リガンドのライブラリーの作成法であって、特定の用途に向けたリガンドの至適化に使用できる方法を提供することである。

【0019】

本発明の以上の目的は、上記請求項のいずれか1以上によって達成できる。本発明のその他の目的、利点及び実施形態は、以下の詳細な説明から明らかであろう。

40

【課題を解決するための手段】

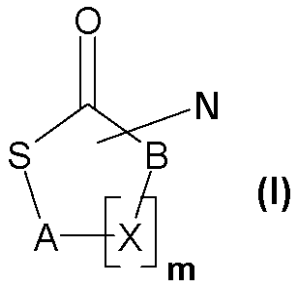
【0020】

第一の態様では、本発明は、1以上のマルチモードアニオン交換リガンドの製造方法であって、

(a)一般式(I)で定義される1以上の骨格を準備する段階

【0021】

【化 1】



【 0 0 2 2 】

10

(式中、A、B及びXは互いに独立に炭素原子又はヘテロ原子、例えば酸素、硫黄、窒素及び/又はシリカであり、mは0～4の整数、例えば1～3、好ましくは1又は2であり、官能基Nは窒素であって、いずれかのXを置換或いはA、B及びXのいずれかに結合している。)、

(b)任意段階として、上記骨格の環構造を維持しながら、上記骨格の窒素を誘導体化してアニオン交換基を導入及び/又はアミンを保護する段階、及び

(c)残基Rに結合したアミンを含む試薬の添加によるアミノ分解によって誘導体の環構造を開環させて、開環した骨格のカルボニル炭素に上記アミンを付加させる段階を含んでなる方法である。

【 0 0 2 3 】

20

#### 定義

「分離媒体」という用語は、本明細書では、例えばクロマトグラフィーカラムの充填材として有用な材料、具体的には、ベースマトリックスに1以上のリガンドが結合したものからなる材料に用いる。ベースマトリックスは担体として作用し、リガンドはクロマトグラフィーで目標物質と相互作用する官能基を与える。

【 0 0 2 4 】

「スペーサー」という用語は、ベースマトリックスからリガンドを離隔するための化学物質に用いる。

【 0 0 2 5 】

「リガンド」という用語は、本明細書では、目標物質に結合し得る化学物質をいう。かかる目標物質は、クロマトグラフィーでの単離又は除去が望まれる化合物でもよいし、或いは分析の目標物質でもよい。

30

【 0 0 2 6 】

「正電荷を有する」及び「正荷電」という用語は、物質が1以上の正電荷及び/又は正味の正電荷を有することを意味する。

【 0 0 2 7 】

「混成モードのアニオン交換リガンド」及び「マルチモードアニオン交換リガンド」という用語は、結合すべき物質と相互作用する2以上の異なる(ただし、協働的な)部位を与え得るリガンドをいう。これらの部位の一方は、リガンドと目標物質を引きつけ合う電荷-電荷相互作用を与える。第二の部位は、通例、電子受容体-供与体相互作用及び/或いは疎水性及び/又は親水性相互作用を与える。電子供与体-受容体相互作用としては、水素結合、 $\pi$ - $\pi$ 、電荷移動、双極子-双極子、誘発双極子などの相互作用が挙げられる。

40

【 0 0 2 8 】

「高塩濃度」リガンドという用語は、同一条件下で操作される参照イオン交換体に比して高濃度の塩(例えば0.3M NaCl)の存在下でタンパク質と結合し得るリガンドをいう。これは、以下の実施例に記載したフロント分析法を用いて決定できる。

【 0 0 2 9 】

「電子供与体-受容体相互作用」は、非共有電子対を有する電気陰性原子が供与体として作用し、この供与体の電子対の受容体として作用する電子不足原子に結合することを意

50

味する(例えば、Karger et al., An Introduction into Separation Science, John Wiley & Sons (1973) 42頁参照)。典型的な受容体原子/基は、金属イオン、シアノ、ニトロの窒素などの電子不足原子又は基であり、ヒドロキシ及びカルボキシの-OH、アミド及びアミンの-NH-、チオールのHS-などの、電気陰性原子と結合した水素も挙げられる。

【0030】

「アニオン交換体」とは、除去すべき物質が負電荷を有し、アニオン交換体が正に荷電している(=アニオン交換条件)ことをいう。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0031】

最も好適な実施形態では、式(I)のA、B及びXは炭素原子であり、mは1である。特定の実施形態では、骨格はホモシステインチオラクトンである。ただし、当業者には自明であろうが、mは5~500のように4を超える整数でもよく、例えば、リガンドの所望サイズに応じて10~250、特に50~100とし得る。

【0032】

本発明の方法の一実施形態では、アミンの誘導体化は、アシル化又はスルホニル化、又はアルキル化とアシル化、又はアルキル化とスルホニル化によって実施され、いかなる荷電基も生成せずに二次相互作用を生じる。この実施形態では、荷電基は段階(c)におけるポリアミン基でのアミノ分解によって導入される。

20

【0033】

別の実施形態では、アニオン交換基は段階(b)及び(c)で導入される。

【0034】

本発明の方法の一実施形態では、段階(b)の誘導体化はアルキル化、還元アミノ化その他の所望のアニオン交換基及び/又は保護基を与えるのに適した反応である。例えば、ある具体的実施形態では、段階(b)は、第二級、第三級又は第四級アミンを与えるアルキル化である。この基を選択すれば弱アニオン交換リガンド又は強アニオン交換リガンドを得ることができる。

【0035】

例えば、強アニオン交換リガンドを得るには、骨格のアミン基を完全にアルキル化して、Q基とも呼ばれる第四級アミンを生成させる。かかる第四級リガンドは、ヌクレオチド及び/又はアンチセンスオリゴヌクレオチド(例えばアンチセンス誘導体)の単離に好適に使用される。使用するアルキル化剤は同一でもよいし、同じ窒素原子に異なる基を与えるため異なるものでよい。第三級アミンでも、同様の方法が用いられる。

30

【0036】

最終的マルチモードリガンドで第二級及び第一級アミンが望まれる実施形態では、重合を防ぐため好ましくは保護基が用いられる。かかる保護法は当業者に周知であり、常法で簡単に実施できる。別の実施形態では、段階(c)のアミノ分解に過剰のアミンを使用することによって保護段階は不要となる。本発明で製造される第一級アミン官能基を有するリガンドは、高イオン強度の環境下での目標化合物の単離、例えば発酵培地からのタンパク質や核酸などの生体分子の分離に好適に使用される。

40

【0037】

一実施形態では、段階(b)で、窒素を誘導体化してC(O)-R残基(式中のRは以下で定義する。)を有する基でアミンを保護する。次いでアミノ分解によって環構造を開環すると、C(O)基がCH<sub>2</sub>に還元され、以下の実施例の「合成経路5」に示す種類のアニオン交換体が得られる。

【0038】

本発明の方法の一実施形態では、段階(c)のアミノ分解を起こすために添加される試薬は残基Rに結合したアミンを含むものであり、Rは線状、枝分れ、環状の飽和、不飽和又は芳香族炭化水素基であり、好ましくは炭素原子数が約1~20、例えば1~10のも

50

のである。

【0039】

具体的には、かかる炭化水素基はヒドロキシ基、ハロゲン、アルコキシ及びアリアルオキシ、それらの対応チオ類似体、及びノ又はアミノ基を有していてもよい。用途によっては、炭素鎖の1以上の部位にアミノ窒素、エーテル酸素、チオエーテル硫黄などが介在していてもよい。アミドやケトンのようにカルボニル基が存在してもよいし、加水分解に対して同等の安定性を有するその他の基が存在していてもよい。酸素、硫黄及び窒素から選択される多くとも1個の原子が好ましくは同一の $sp^3$ 混成炭素原子に結合する。さらに、Rは、上述の通り、目標物質がアニオン交換体に結合できるようにする1以上の電子供与体又は受容体原子又は基を与える。Rはさらに、最終的リガンドが全体として正に荷電してアニオン交換体として機能することができる全間隔枠を示す限り、荷電基を含んでいてもよい。好適な実施形態ではポリアミンが望ましく、Rは1以上のアミンを与える基である。

10

【0040】

最終的な分離媒体はイオン交換モードで用いられるので、残基Rは所望のマルチモード特性の導入に用いられる。当業者には自明であろうが、最終的リガンドでは、Rは結合に作用する2以上の部分からなるものであればよく、これらの部分の間には適宜スペーサーが介在していてもよい。このレベルでは、多種多様なアミンでの開環によってマルチモードアニオン交換リガンドのライブラリを生成することができ、ベースマトリックスへの固定化の準備が整う。

20

【0041】

本発明の方法の一実施形態では、誘導体化骨格を与えるため段階(a)及び(b)を前もって実施しておく。

【0042】

好適な実施形態では、本発明の方法は、こうして得られた開環生成物をそのチオール基を介して、反応性基を含むベースマトリックスに固定化する段階(d)をさらに含むが、反応性基は適宜スペーサーを介してベースマトリックスに結合していてもよい。

【0043】

したがって、特定の実施形態では、本発明の方法はベースマトリックスの反応性基を臭素化する段階をさらに含み、反応性基は炭素-炭素二重結合である(固定化法の概説に関しては、例えば、Immobilized Affinity Ligand Techniques, Hermanson et al, Greg T. Hermanson, A. Krishna Mallia and Paul K. Smith, Academic Press, INC, 1992を参照されたい。)

30

【0044】

別の実施形態では、本発明の方法は、ラジカル反応に適した条件下でベースマトリックスの反応性基を活性化する段階をさらに含み、反応性基は炭素-炭素二重結合である。

【0045】

第二の態様では、本発明は、マルチモードアニオン交換リガンドの製造における出発物質としてのホモステインチオラクトンの使用に関する。ホモステインチオラクトンは市販されており(例えばAldrich社のカタログ番号H1, 580-2t)、CAS番号は6038-19-3である。

40

【0046】

第三の態様では、本発明は、マルチモードアニオン交換リガンド又はベースマトリックスに複数のマルチモードアニオン交換リガンドが結合した分離媒体であり、当該リガンド又は媒体が上述の方法で製造したものである。分離媒体をクロマトグラフィーに使用する場合、ベースマトリックスは一般にゲルのようなビーズの形態或いはモノリシクな形態である。別の実施形態では、ベースマトリックスは、例えばメンブレン、フィルター、1以上のチップ、表面、キャピラリーなどであってもよい。

【0047】

50

一実施形態では、ベースマトリックスは、天然のポリマーから好ましくは多孔質ビーズの形に形成されるが、これは、逆懸濁ゲル化 (S H j e r t e n : B i o c h i m B i o p h y s A c t a 79 (2), 393 - 398 (1964) 又は回転ディスク法 (例えば、国際公開第88/07414号 (Prometic Biosciences Inc) 参照) ) などの常法で当業者が容易に実施し得る。或いは、天然ポリマービーズは、Amersham Biosciences AB (スウェーデン、ウプサラ) などの供給元から市販されている。かかる有用な天然高分子ビーズの商品名としては、例えば Sepharose (商標) や Sephadex (商標) として知られるものがある。  
【0048】

別の実施形態では、ベースマトリックスは、スチレン又はスチレン誘導体、ジビニルベンゼン、アクリルアミド、アクリル酸エステル、メタクリル酸エステル、ビニルエステル、ビニルアミドなどの架橋合成ポリマーからなる合成ポリマーから、好ましくは多孔質ビーズの形に作製される。かかるポリマーは常法で容易に合成できる。例えば、“Styrene based polymer supports developed by suspension polymerization” (R Arshady : Chimica e L'Industria 70 (9), 70 - 75 (1988)) を参照されたい。或いは、Source (商標) (Amersham Biosciences AB (スウェーデン、ウプサラ)) などの市販の製品を、本発明によって表面改質することができる。

【0049】

本発明の第四の態様は、上記定義したような、一般式 (I) によって定義された骨格と、アルキル化剤などの任意選択の誘導体化剤と、上記定義したような残基 R に結合した1種又は複数のアミンとを、マルチモードアニオン交換リガンドを製造するための取扱説明面と共に含むキットである。特定の実施形態では、本発明のキットはベースマトリックスをさらに含み、取扱説明書面は、複数のマルチモードアニオン交換リガンドを含んだ分離媒体を製造するためのものである。ベースマトリックスは、上記のいずれかであればよい。

【0050】

好適な実施形態では、本発明のキットは、高塩濃度リガンドを生成するためのものである。

【0051】

別の態様では、本発明は、アニオンクロマトグラフィー用クロマトグラフィーカラムに関し、このカラムには、上述の分離媒体が充填されている。カラムは、任意の所望のサイズのものでよく、例えば大量生産や実験室に合わせたもの又は分析を行うのに適切なサイズにすることができる。カラムは、分離媒体及び適宜適切な液体と組み合わせることもでき、それによって、本発明に包含される第二の種類のキットが提供される。

【0052】

さらに本発明は、液体から目標物質を分離する方法であって、上記で定義した分離媒体を準備し、媒体を液体に接触させてその表面に目標物質を吸着させることを含む方法を包含する。本発明は、好ましくはクロマトグラフィー法であるが、別の実施形態では、容器内の媒体に液体を適切な時間だけ接触させる、回分法でよい。好適な実施形態では、本発明の方法は、多次元クロマトグラフィーである。本発明の方法は、生体分子など、本明細書に記述されるリガンドへの吸着が可能な、任意の目標分子の単離に有用である。この文脈において、生体分子は、例えばタンパク質、ペプチド、DNA や RNA などの核酸、プラスミド、オリゴヌクレオチド、ウイルス、細胞などである。特定の実施形態では、本発明の方法は、液体からヌクレオチドを分離する方法である。別の実施形態では、本発明の方法は、液体からアンチセンスオリゴヌクレオチドを分離する方法である。上記論じた目標物質を分離するためのクロマトグラフィーの一般原則は、当技術分野で周知であり、当業者なら、本発明の方法を使用する際に必要なパラメータを容易に用いることができる。

【0053】

別の実施形態では、本発明の方法は、液体中の目標物質を同定するためのものであり、この方法は、分析法に適している。しかし、当業者に容易に理解されるように、本発明は、汚染タンパク質や任意のその他の望ましくない生体分子など、液体から1種又は複数の成分を除去することが望まれる場合に等しく有用である。

【0054】

図面の詳細な説明

図1は、例示的な骨格としてホモシステインチオラクトンを使用して、本発明でマルチモードアニオン交換リガンドのライブラリを生成するための、基本的方法の概略図(スキーム2)である。使用した例示的な骨格は、ホモシステインチオラクトンであり、3種の異なる誘導体化した骨格が示されている。必要なら、保護段階を、誘導体化の前に含めることができる。R基に結合したアミンからなる化合物を使用して、環構造を開く段階(c)で、図1では3種の異なる例示的なリガンド構造が得られ、その第一の構造は、弱アニオン交換リガンドであり、第二の構造は、強アニオン交換リガンド、即ちその電荷がすべてのpH値で維持されるリガンドであり、第三の構造は、弱アニオン交換リガンドである。

10

【0055】

図2は、本発明で製造することができるマルチモードアニオン交換リガンドの、代替の方法の概略図(スキーム3)である。この場合も、使用した例示的な骨格はホモシステインチオラクトンである。図2に表されるように、弱及び強アニオン交換リガンドを製造することができる。

20

【0056】

図3は、本発明で製造することができる、例示的な正荷電基及びポリカチオンリガンドを示す(スキーム4)。この場合も、弱及び強アニオン交換リガンドを本発明で製造することが示されている。

【実施例】

【0057】

以下の実施例は、例示を目的としたものにすぎず、特許請求の範囲によって規定される本発明の範囲を限定するものではない。本明細書のいずれかの箇所で引用した文献の記載内容は援用によって本明細書の内容の一部をなす。

【0058】

アニオン交換体クロマトグラフィー用の新しい媒体を生成するために、D, L - ホモシステインチオラクトンを使用する手順

30

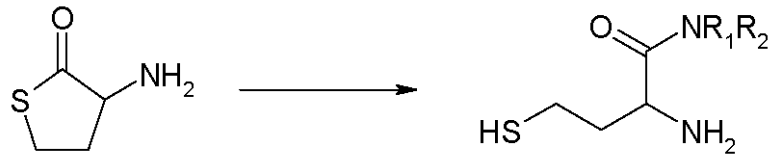
アニオン交換体リガンドの製造は、例えば、ホモシステインチオラクトンの使用を介して実現することができ、これはいくつかの戦略的合成経路を介して考え出すことができるものである。リガンドのアニオン基は、直接開環誘導体化段階(合成経路1)又は保護、脱保護方法(合成経路2)を介して、ホモシステインチオラクトンのアミン官能基から得ることができる。アニオン基は、開環誘導体段階で、N-保護チオラクトン又は保護されていないチオラクトンに導入することもでき(合成経路3)、或いは誘導体化ホモシステインチオラクトンにも導入することができる(合成経路4)。アニオン基は、アミド基の還元によって生成することもできる(合成経路5)。N-保護/脱保護戦略を使用する場合、カップリングは、脱保護の後又は前に行うことができる。すべてのカップリングは、求核置換又はラジカル付加を介して行った。

40

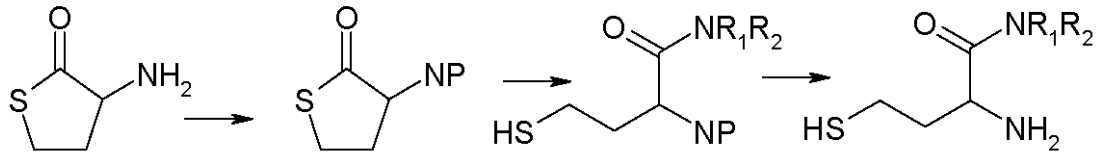
【0059】

## 【化2】

## 合成経路 1

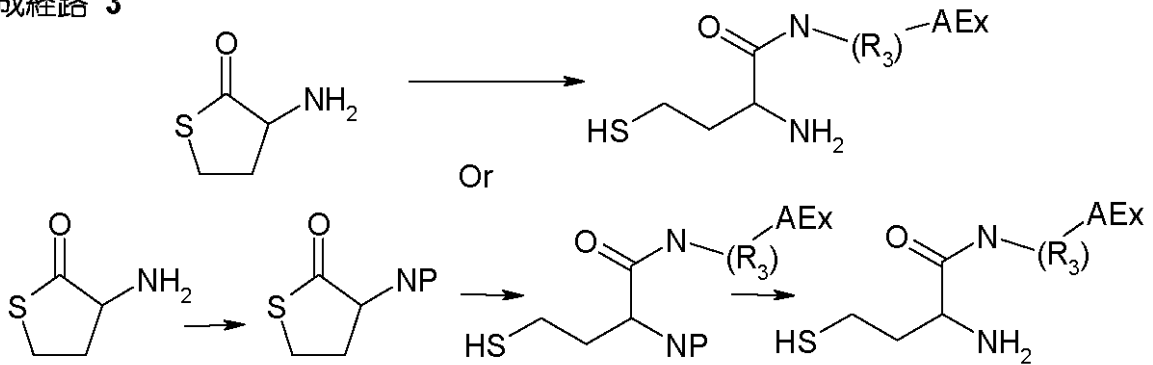


## 合成経路 2



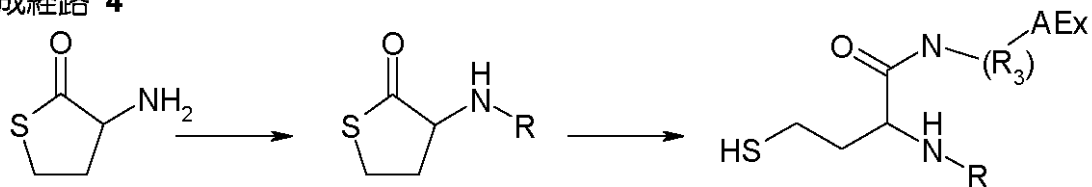
10

## 合成経路 3



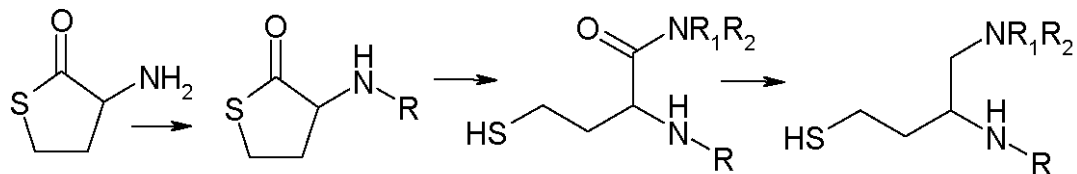
20

## 合成経路 4



30

## 合成経路 5



P: N-保護基, AEx: アニオン交換基, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R 置換基

## スキーム1: アニオン交換リガンドの合成経路の例

40

## 【0060】

## リガンドの製造

## 合成経路 1

## 実施例 1 a :

室温のアルゴン中、ベンジルアミン (3.7 ml、33.9 mmol) を、塩酸 D, L-ホモシステインチオラクトン (1 g、6.51 mmol) の THF (40 ml) 攪拌溶液に添加した。4 時間後、溶液を蒸発させ、真空乾燥した。残留物を HPLC (水/アセトニトリル) で精製して、白色生成物 (0.77 g、52%) を得た。

## 【0061】

50

実施例 1 b :

室温のアルゴン中、ブチルアミン (1.6 ml、16.2 mmol) を、塩酸 D, L-ホモシステインチオラクトン (1 g、6.51 mmol) の THF (40 ml) 攪拌溶液に添加した。2 時間後、溶液を蒸発させ、真空乾燥した。残留物を HPLC (水/アセトニトリル) で精製して、白色残留物を得た。

【0062】

実施例 1 c :

室温のアルゴン中、2-(トリフルオロメチル)ベンジルアミン (4.5 ml、32.1 mmol) を、塩酸 D, L-ホモシステインチオラクトン (0.99 g、6.47 mmol) の THF (40 ml) 攪拌溶液に添加した。3 時間後、溶液を蒸発させ、真空乾燥した。残留物を HPLC (水/アセトニトリル) で精製して、白色固体 (0.48 g、25%) を得た。

10

【0063】

合成経路 2実施例 2 a :ホモシステインチオラクトンのアミン基の保護

塩酸 D, L-ホモシステインチオラクトン (7.04 g、45.82 mmol)、N-ジイソプロピルエチルアミン (DIPEA、8.40 ml、48.22 mmol) 及びジクロロメタン (DCM、200 ml) を、窒素雰囲気中で混合した。反応物を、氷浴中で数分間攪拌し、次いでジカルボン酸ジ-t-ブチル (10.53 g、48.25 mmol) を添加した。0 で 20 分間攪拌した後、反応混合物を室温まで温めた。20 時間後、溶媒を真空除去し、フラッシュクロマトグラフィー (溶出剤ジクロロメタン) にかけた結果、白色固体 (5.88 g、59%) を得た。

20

【0064】

保護ホモシステインチオラクトンの開環

上述の生成物 (933 mg、4.29 mmol) を、THF 50 ml に溶解し、アルゴンで脱ガスを行った。次いでチオフエン-2-メチルアミン (2.59 g、22.88 mmol) を添加し、反応混合物を 4 日間攪拌した。溶媒を蒸発させ、残留物を酢酸エチル (45 ml) で抽出し、10%クエン酸水溶液 (2 x 15 ml)、水 (10 ml) で洗浄した。Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥した後、有機相を蒸発させ、得られた残留物を次の段階で直接使用した。

30

【0065】

保護ホモシステインチオラクトンの脱保護

上記得られた残留物を、ジクロロメタン (DCM) 45 ml に溶かした溶液に、トリフルオロ酢酸 (5 ml) を添加し、アルゴンで脱ガスを行った。

【0066】

反応物を室温で 4 時間攪拌した後に、溶媒を蒸発させた。残留物を分取クロマトグラフィー (水/アセトニトリル) にかけた結果、白色固体 (0.76 g、最後の 2 段階 72%) を得た。

【0067】

合成経路 3実施例 3 a :

室温のアルゴン中、N, N-ジメチルエチレンジアミン (1.77 ml、16.26 mmol) を、塩酸 D, L-ホモシステインチオラクトン (1 g、6.51 mmol) の THF (40 ml) 攪拌溶液に添加した。4 時間後、溶液を蒸発させ、真空乾燥した。残留物を、カップリングに直接使用した。

【0068】

合成経路 4実施例 4 a :

塩化ベンゾイル (0.87 ml、7.5 mmol) を 5 ml の DCM に溶かした溶液を

50

、D, L - ホモシステインチオラクトン ( 1 . 1 5 g 、 7 . 5 m m o l ) 及びD I P E A ( 2 . 6 m l 、 1 5 m m o l ) をジクロロメタン ( D C M 、 1 5 m l ) に溶かした溶液に、0 で1滴ずつ添加した。混合物を、室温で一晩攪拌した。溶媒を真空蒸発させ、反応残留物を酢酸エチル ( 3 0 m l ) で抽出した。有機相を、クエン酸10%水溶液 ( w / w 、 2 0 m l ) 、 $K_2CO_3$  10%水溶液 ( 2 0 m l ) 、水 ( 2 0 m l ) で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。濾過した後、溶媒を除去し、白色固体 ( 1 . 3 7 g 、 8 3 % ) を得た。N, N - ジメチルエチレンジアミン ( 0 . 6 8 m l 、 6 . 2 5 m m o l ) を、室温のアルゴン中、上記得られた白色固体 ( 0 . 5 5 g 、 2 . 4 9 m m o l ) の乾燥T H F ( 2 0 m l ) 攪拌溶液に添加した。6時間後、溶液を蒸発させ、真空乾燥した結果、白色粉末が得られ、これをカップリングに直接使用した。

10

## 【0069】

リガンドとアリル化S e p h a r o s e ( 商標 ) 6 F F とのカップリングゲル1 a の製造 :

アリル基の濃度が167  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ であるS e p h a r o s e ( 商標 ) 6 F F 2 . 0 g を、水 ( 5 × 1 0 m l ) 及びジオキサン ( 5 × 1 0 m l ) で洗浄し、0 . 5 m l のジオキサンが入っているフラスコに添加した。リガンド1 a ( 2 9 2 m g 、 1 . 3 m m o l ) 及びA I B N ( 2 , 2 ' - アゾイソブチロニトリル ) ( 2 0 4 m g 、 1 . 2 m m o l ) を、1 m l のジオキサンの溶解した。溶液に、窒素を10分間フラッシュし、ゲルに添加し、反応フラスコを70 で一晩振盪させた。反応後、ゲルを濾過し、ジオキサン ( 5 × 2 0 m l ) 、エタノール ( 5 × 2 0 v o l . ) 及び水 ( 3 × 2 0 m l ) で洗浄した。ゲルに対するリガンドの投入量を、以下の手順を使用して、アミン官能基を滴定することによって測定した。ゲル1 m l を0 . 5 M H C l 溶液で洗浄し、その後、1 m M H C l 溶液で洗浄した。ゲルをフラスコに移し、水19 m l 及び濃H N O <sub>3</sub> 2滴を添加した。滴定を、硝酸銀0 . 1 M 溶液を使用して行った。結果 : 8 5  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ゲル。

20

## 【0070】

ゲル1 b の製造 :

リガンド1 b ( アリル基当たり、リガンド約3当量 ) を、水 ( 3 . 5 m l ) に溶解し、50% ( w / w ) N a O H 水溶液の添加によってpHを8 . 5 に調節した。溶液を、臭素で活性化したアリルS e p h a r o s e ( 商標 ) F a s t F l o w ゲルに添加し ( 2 g 、 2 3 0  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ゲル ) 、その混合物を、振盪板上に60 で放置した。18時間後、ゲルを濾過し、水 ( 2 × 3 0 m l ) 、エタノール ( 2 × 3 0 m l ) 、0 . 2 M 酢酸 ( 2 × 3 0 m l ) 及び水 ( 2 × 3 0 m l ) で洗浄した。アミン基の滴定によって測定したゲルのイオン容量は、190  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ゲルであることがわかった。

30

## 【0071】

ゲル1 c の製造 :

アリル基の濃度が167  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ であるS e p h a r o s e ( 商標 ) 6 F F 2 . 0 g を、水 ( 5 × 1 0 m l ) 及びジオキサン ( 5 × 1 0 m l ) で洗浄し、0 . 5 m l のジオキサンが入っているフラスコに添加した。リガンド1 c ( 2 4 0 m g 、 0 . 8 3 m m o l ) 及びA I B N ( 1 9 0 m g 、 1 . 1 4 m m o l ) を、1 m l のジオキサンの溶解した。溶液に、窒素を10分間フラッシュし、ゲルに添加し、反応フラスコを、70 で振盪板上に放置した。19時間後、ゲルを濾過し、ジオキサン ( 5 × 2 0 m l ) 、エタノール ( 5 × 2 0 v o l . ) 及び水 ( 3 × 2 0 m l ) で洗浄した。ゲルに対するリガンドの投入量は、アミン官能基の滴定によって測定した結果、106  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ゲルであった。

40

## 【0072】

ゲル2 a の製造 :

アリル基の濃度が230  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ であるS e p h a r o s e ( 商標 ) 6 F F 2 . 0 g を、水 ( 5 × 1 0 m l ) 及びジオキサン ( 5 × 1 0 m l ) で洗浄し、0 . 5 m l のジオキサンが入っているフラスコに添加した。リガンド2 a ( 2 9 0 m g 、 1 . 2 6 m m o l ) 及びA I B N ( 1 9 0 m g 、 1 . 1 4 m m o l ) を、1 m l のジオキサンの溶解し

50

た。溶液に、窒素を10分間フラッシュし、ゲルに添加し、反応フラスコを、70 で振盪板上に放置した。19時間後、ゲルを濾過し、ジオキサン(5×20ml)、エタノール(5×20vol.)及び水(3×20ml)で洗浄した。ゲルに対するリガンドの投入量は、アミン官能基の滴定によって測定した結果、142 μmol/mlゲルであった。

#### 【0073】

##### ゲル3aの製造:

リガンド3a(アリル基当たり、リガンド約3当量)を水(3.5ml)に溶解し、50%(w/w)NaOH水溶液の添加によってpHを8.5に調節した。溶液を、臭素で活性化したアリルSephacryl Fast Flowゲルに添加し(2g、230 μmol/mlゲル)、その混合物を、振盪板上に60 で放置した。18時間後、ゲルを濾過し、水(2×30ml)、エタノール(2×30ml)、0.2M酢酸(2×30ml)及び水(2×30ml)で洗浄した。アミン基の滴定によって測定したゲルのイオン容量は、156 μmol/mlゲルであることがわかった。

#### 【0074】

##### ゲル4aの製造:

リガンド4a(0.32g、1.02mmol)を、DMSO/水:80/20(2.5ml)に溶解し、50%(w/w)NaOH水溶液の添加によってpHを9に調節した。溶液を、臭素で活性化したアリルSephacryl Fast Flowゲルに添加し(2g、230 μmol/mlゲル)、その混合物を、振盪板上に60 で放置した。18時間後、ゲルを濾過し、水(2×30ml)、エタノール(2×30ml)、0.2M酢酸(2×30ml)及び水(2×30ml)で洗浄した。アミン基の滴定によって測定したゲルのイオン容量は、133 μmol/mlゲルであることがわかった。

#### 【0075】

##### ゲルのクロマトグラフィー評価:

##### ・イオン交換体に関する実験参照手順

##### 材料

##### 緩衝液

緩衝液1: 20mMピペラジン+0.25NaCl pH6.0

##### タンパク質溶液:

BSA: 緩衝液1中、4mg/ml

すべての緩衝液及びタンパク質溶液は、使用前に、0.45 μm Millipore Millex HAフィルターに通して濾過した。

#### 【0076】

##### クロマトグラフィーシステム

すべての実験は、Unicorn 3.1ソフトウェアを備えたAKTA(商標)Explorer 100クロマトグラフィーシステム(Amersham Biosciences AB)を使用して、室温で行った。サンプルを、150mLスーパーループを介してカラムに注いだ。全体を通し、1ml/分(約300cm/時)の流量を使用した。10mmフローセルを使用して、280nmで吸光度を測定して、溶出物を連続的にモニタした。

#### 【0077】

##### 溶出伝導率

プロトタイプのアニオン交換体のそれぞれを、HR5/5カラム(充填床容積=1ml)に充填し、20カラム体積の20mMリン酸緩衝液(pH6.8)で平衡にした。タンパク質混合物(6mg/mlコンアルブミン、4mg/mlラクトアルブミン及び6mg/ml大豆トリプシンインヒビター)50 μlをカラムに注ぎ、100%の前述の緩衝液及び2M NaClに至る線形勾配(20カラム体積)で溶出した。流量は、0.3ml/分(100cm/時)に調節した。

#### 【0078】

10

20

30

40

50

### フロント分析

プロトタイプのアニオン交換体のそれぞれを、HR5/5カラム（充填床容積 = 1 mL）に充填し、適切なpH及び塩濃度の緩衝液で平衡にした。システムの空隙容量は、非結合条件下、適切なタンパク質溶液をカラムに加えることによって決定した。溶出物の $A_{280}$ が、加えられたタンパク質の $A_{280}$ の10%に到達するまでの時間を、このシステムの空隙容量とした（分で表す）。

#### 【0079】

緩衝液1で平衡にしたカラムに、同じ平衡緩衝液（上記参照）に溶解したサンプルタンパク質を、1 mL / 分（即ち約300 cm / 時）の流量で、連続的に供給した（例えば150 mL スーパーloopを介して）。このサンプルは、溶出物の $A_{280}$ が、カラムに加えられたサンプル $A_{280}$ の10%のレベルに到達するまで加えた。このように得られたデータに基づいて〔即ち充填ゲル床の容積（ $V_c$ ）、その空隙容量、カラムに供給されたタンパク質の流量及び濃度〕、そこに加えられたタンパク質の濃度の10%のレベルでの、充填ゲルのブレイクスルー容量（ $Q_{B_{10\%}}$ ）を、計算することができる。

#### 【0080】

##### ブレイクスルー及び評価

最大吸光度の10%のレベルでのブレイクスルー（ $Q_{B_{10\%}}$ ）を、以下の関係式を使用して計算した。

#### 【0081】

$$Q_{B_{10\%}} = (T_{R_{10\%}} - T_{R_D}) \times C / V_c$$

式中、 $T_{R_{10\%}}$  = 最大吸光度の10%での保持時間（分）、

$T_{R_D}$  = システムの空隙容量（分）、

$C$  = 供給タンパク質の濃度（4 mg / mL）及び

$V_c$  = カラムの充填床容積（mL）。

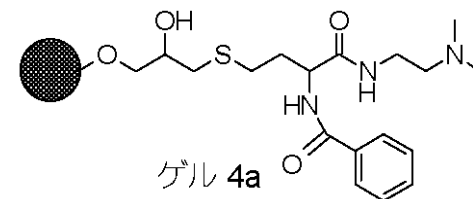
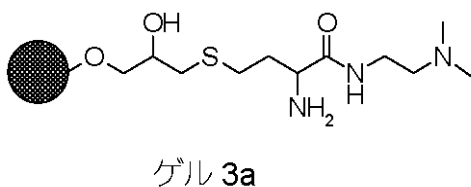
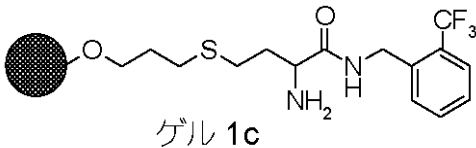
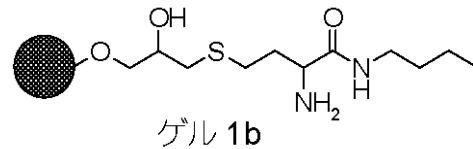
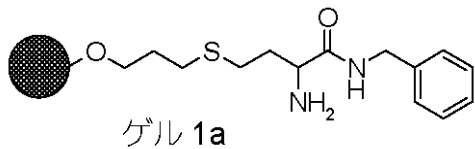
#### 【0082】

##### ・結果：

以下の表に、ゲル1a、1b、1c、2a、3a及び4aの、タンパク質の混合物（コンアルブミン、ラクトアルブミン及び大豆トリプシンインヒビター）に関する溶出伝導率と、BSA（ $Q_{10\%}$ ）容量を、Amersham Biosciences ABのQ Sepharose（商標）FFと比較したものを示す。

#### 【0083】

##### 【化3】



#### 【0084】

10

20

30

40

【表 1】

ゲル	溶出伝導率 (mS/cm)			Q10% (mg/ml)
	コンアルブミン	ラクトアルブミン	STI <sup>2</sup>	BSA <sup>1</sup>
ゲル 1a	17.9	17.9	93.4	26.3
ゲル 1b	18	18	59	15.2
ゲル 1c	15.8	ND	ND	25.2
ゲル 2a	26.1	ND	ND	30.9
ゲル 3a	16.6	32	47.3	3.8
ゲル 4a	18.9	50.3	86.2	5.8
Q <sup>3</sup>	12.2	20.3	29.5	1.1

<sup>1</sup> (20mM ピペラジン, 0.25M NaCl; pH 6.0), <sup>2</sup>STI: 大豆トリプシンインヒビター,

<sup>3</sup>Q: Q Sepharose™ Fast Flow, ND: 測定せず

【図面の簡単な説明】

【 0 0 8 5 】

【図 1】例示的な骨格としてホモシステインチオラクトンを使用して、マルチモードアニオン交換リガンドのライブラリを生成する、基本的な方法を示す概略図（スキーム 2）である。

【図 2】本発明で製造することができる、マルチモードアニオン交換リガンドの代替の方法を示す概略図（スキーム 3）である。

【図 3】本発明で製造することができる、正荷電基及びポリカチオンリガンドを示す図である。

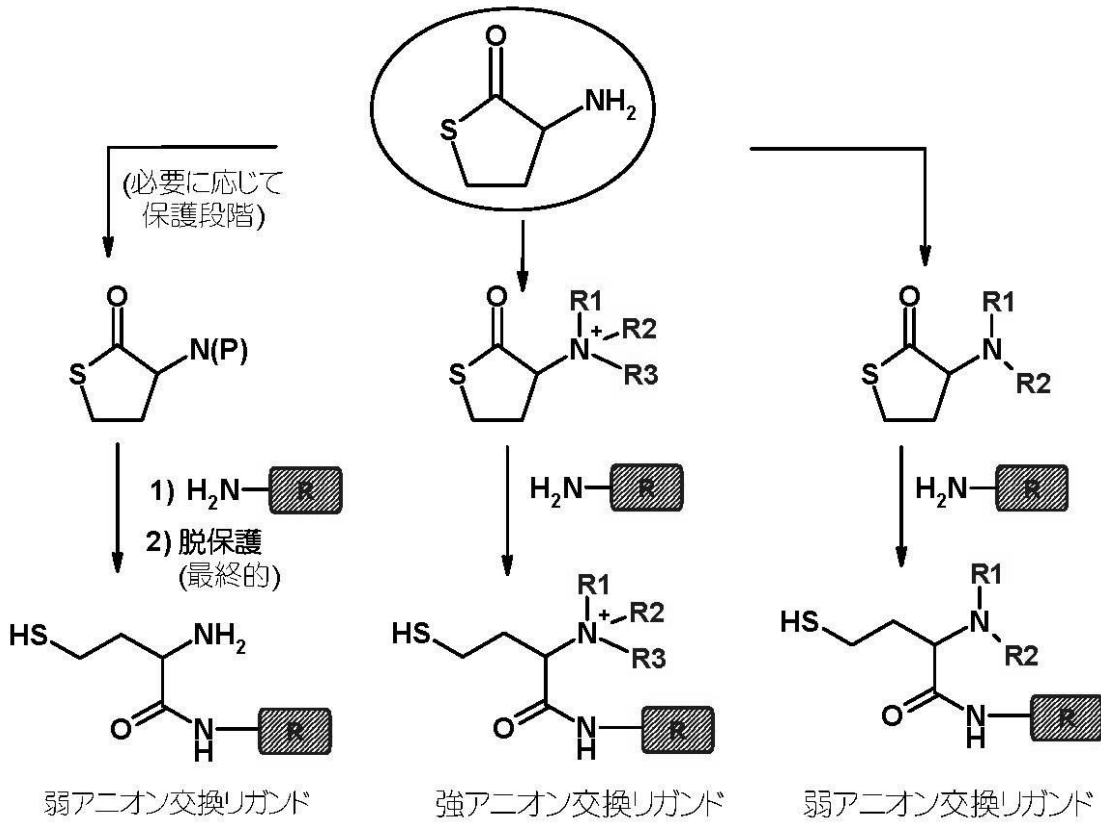
10

20

30

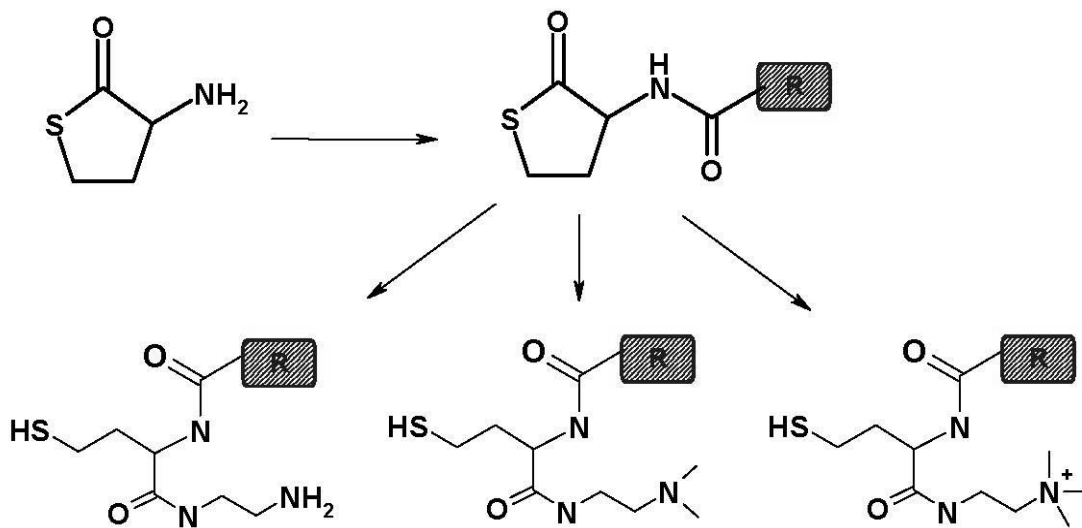
【図1】

Figure 1

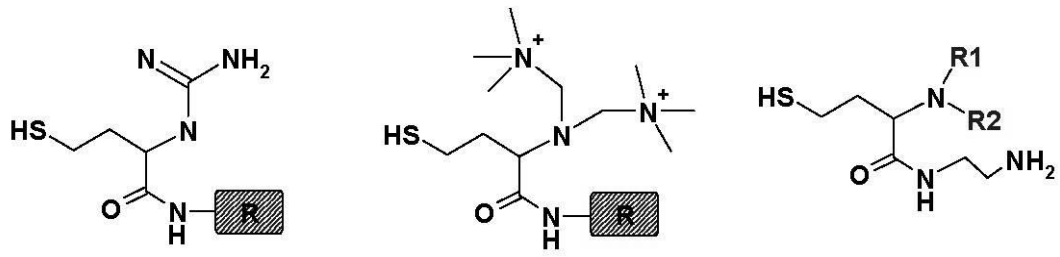


【図2】

Figure 2



【 図 3 】  
Figure 3



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
G 0 1 N 30/88 P

- (72)発明者 カールソン, ウルリカ  
スウェーデン国、エス - 7 5 1 ・ 8 4 ・ ウブサラ ビヨルクガタン・30、アメルシャム・バイオサイエンス・アクチボラグ(番地なし)
- (72)発明者 マロワゼル, ジャン・ルック  
スウェーデン国、エス - 7 5 1 ・ 8 4 ・ ウブサラ ビヨルクガタン・30、アメルシャム・バイオサイエンス・アクチボラグ(番地なし)
- (72)発明者 セヴェニン, ニコラス  
スウェーデン国、エス - 7 5 1 ・ 8 4 ・ ウブサラ ビヨルクガタン・30、アメルシャム・バイオサイエンス・アクチボラグ(番地なし)

審査官 河野 隆一朗

- (56)参考文献 特開昭59 - 104377 (JP, A)  
特開2000 - 351776 (JP, A)  
特表平04 - 503157 (JP, A)  
国際公開第01 / 038227 (WO, A1)  
国際公開第02 / 053288 (WO, A1)  
国際公開第03 / 024588 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07C 319/18  
C07C 323/63  
B01D 15/00 - 15/08  
B01J 20/281  
G01N 30/88  
CA/REGISTRY(STN)  
JSTPlus(JDreamII)  
JST7580(JDreamII)