

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010 年 5 月 14 日(14.05.2010)

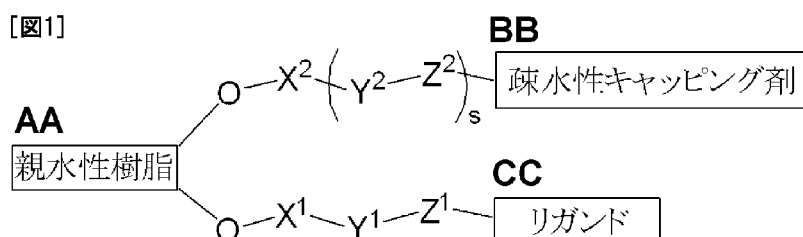
PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/053115 A1

- (51) 国際特許分類:
C08G 81/00 (2006.01) G01N 30/88 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/068893
- (22) 国際出願日: 2009 年 11 月 5 日(05.11.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-286338 2008 年 11 月 7 日(07.11.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大日本住友製薬株式会社(Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) [JP/JP]; 〒5418524 大阪府大阪市中央区道修町 2 丁目 6 番 8 号 Osaka (JP). 住友化学株式会社 (SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1048260 東京都中央区新川二丁目 2 7 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山崎 晃 (YAMAZAKI, Akira) [JP/JP]; 〒5640053 大阪府吹田市江の木町 3 3 番 9 4 号 大日本住友製薬株式会社内 Osaka (JP). 山本 貴義(YAMAMOTO, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒5640053 大阪府吹田市江の木町 3 3 番 9 4 号 大日本住友製薬株式会社内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 五十部 穰(ISOBE, Yutaka); 〒5640053 大阪府吹田市江の木町 3 3 番 9 4 号 大日本住友製薬株式会社 知的財産部 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, 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 (条約第 21 条(3))

(54) Title: NOVEL AFFINITY SUPPORT

(54) 発明の名称: 新規アフィニティー担体



AA HYDROPHILIC RESIN
BB HYDROPHOBIC CAPPING AGENT
CC LIGAND

(57) Abstract: Disclosed is a solid-phase support for affinity chromatography, said support being useful for isolating/purifying a membrane protein that specifically binds to a ligand. Specifically disclosed is a solid-phase support for affinity column chromatography, wherein a ligand and a hydrophobic capping agent, which is selected from among cholesterol derivatives, fatty acid derivatives and aliphatic amines, are immobilized to a hydrophilic resin. The solid-phase support is characterized in that the ligand is covalently bonded to the hydrophilic resin via a spacer that contains a polyethylene glycol moiety.

(57) 要約: 課題 リガンド特異的に結合する膜蛋白質を単離、精製するために有用な、アフィニティークロマトグラフィー用固相担体を提供する。 解決手段 コレステロール誘導体、脂肪酸誘導体及び脂肪族アミンから選択される疎水性キャッピング剤、並びにリガンドが、親水性樹脂に固定化されてなるアフィニティークロマトグラフィー用の固相担体であって、前記リガンドが、ポリエチレングリコール部分を含むスペーサーを介して前記親水性樹脂と共有結合していることを特徴とする固相担体。

WO 2010/053115 A1

明 細 書

発明の名称 : 新規アフィニティー担体

技術分野

[0001] 本発明は、リガンド及び疎水性キャッピング剤が固定化されてなる親水性固相担体、当該固相担体を用いるリガンド特異的結合蛋白質の濃縮、単離又は精製方法等を提供する。

背景技術

[0002] 近年、分子間相互作用を基盤とした手法を用い、特定の化合物に特異的な相互作用を有する蛋白質を探索する試み、あるいは相互作用を詳細に検討する研究が盛んに行われている。具体的には、特定の低分子化合物リガンドを固相担体に固定化し、当該リガンドに特異的に相互作用する蛋白質をこれに結合させた後、溶出させることによって、リガンド特異的結合蛋白質を単離・精製するアフィニティーカラムクロマトグラフィーが知られている。例えば1989年に、シュライバーらは、アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いることによって、免疫抑制剤、FK506の結合蛋白質（FKBP : FK506 binding proteins）を同定した（非特許文献1を参照）。このように、アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いることによって、医薬品又は医薬品候補化合物が生体内で特異的に結合する蛋白質を単離、精製、同定することができる。

しかし、アフィニティーカラムクロマトグラフィーでは、リガンド特異的に結合する物質のみならず、非特異的な疎水性相互作用により担体と相互作用する物質が吸着されるという問題があった。

さらに、膜結合型蛋白質の場合、通常の水溶性蛋白質とは異なり、生体内において脂質二重膜に組み込まれた状態で存在するため、取り扱いが非常に難しく、機能や構造等いまだ未解明の部分が多い。そのような膜蛋白質をアフィニティーカラムクロマトグラフィーで精製する場合、膜蛋白質に適したアフィニティー担体や汎用性のある方法が存在しないのが現状である。

ところで、国際公開第2004/25297号パンフレット（特許文献1）には、アフィニティーカラムクロマトグラフィーのリガンドとポリスチレン等の固相担体表面との間に導入可能な親水性スパーサーが記載されており、国際公開第2005/37881号パンフレット（特許文献2）には、親水性スパーサーを、メタクリレート系樹脂のモノマーに組み込んだ、アガロース系樹脂に匹敵する親水性特性を有するアフィニティークロマトグラフィー用樹脂が記載されている。更に国際公開第2006/18901号パンフレット（特許文献3）には、金属の固相担体に親水性スパーサーを導入することにより非特異的蛋白質の吸着が抑制され、かつ分子間の特異的相互作用が増強されることが記載されている。

また、国際公開第2005/10528号パンフレット（特許文献4）には、ステアリン酸等の疎水性キャッピング剤をメタクリレート系樹脂上に固定化し、ターゲット蛋白質探索の障害となる非特異的蛋白質との結合を抑制できること等が開示されており、国際公開第2006/80559号パンフレット（特許文献5）には、リガンドとしてのケトプロフェン及びキャッピング剤としてのステアリン酸がそれぞれ固定化され、固相担体表面の疎水性性質が調節されたアフィニティー用アガロース系固相担体が開示されている。

しかしながら、リガンド特異的に結合する膜結合型蛋白質を効率良く吸着させることができる、キャッピング剤が樹脂上に固定化され、かつリガンドが親水性ポリマーを介して樹脂上に固定化された、アフィニティークロマトグラフィー用固相担体は知られていなかった。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：ネイチャー（Nature）、第341巻、p. 758-760（1989年）

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2004/25297号パンフレット

特許文献2：国際公開第2005/37881号パンフレット

特許文献3：国際公開第2006/18901号パンフレット

特許文献4：国際公開第2005/10528号パンフレット

特許文献5：国際公開第2006/80559号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0005] 本発明が解決しようとする課題は、リガンド特異的に結合する膜蛋白質を吸着可能な親水性固相担体、当該親水性固相担体を用いて、リガンド特異的に結合する膜蛋白質を単離、精製する方法等を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0006] 本発明者らは、リガンド特異的に結合する膜蛋白質を効率よく単離、精製するために有用な、アフィニティークロマトグラフィー用固相担体を得るべく鋭意検討を重ねた結果、リガンドが親水性スペーサーを介して固定化された親水性固相担体を得た。即ち本発明は、

〔1〕 コレステロール誘導体、脂肪酸誘導体及び脂肪族アミンから選択される疎水性キャッピング剤、並びにリガンドが、親水性樹脂に固定化されるアフィニティークラムクロマトグラフィー用の固相担体であって、前記リガンドが、ポリエチレングリコール部分を含むスペーサーを介して前記親水性樹脂と共有結合していることを特徴とする固相担体；

〔2〕 親水性樹脂が、糖類が重合してなる樹脂、又は高度親水性モノマーが重合してなる樹脂である、〔1〕に記載の固相担体；

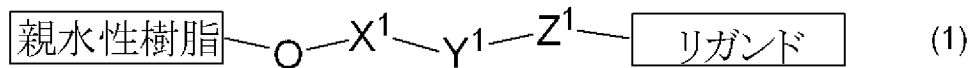
〔3〕 糖類が重合してなる親水性樹脂が、セファロース系樹脂、デキストラン系樹脂、セルロース系樹脂、アミロース系樹脂又はアガロース系樹脂である、〔2〕に記載の固相担体；

〔4〕 高度親水性モノマーが重合してなる樹脂が、ポリエチレングリコール基又はポリオール基を有するメタクリル酸が重合したメタクリレート系樹脂である、〔2〕に記載の固相担体；

〔5〕 リガンドが、膜結合型蛋白質に特異的に吸着する物質である、〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の固相担体；

〔6〕 固相担体が、以下の式（１）：

[化1]

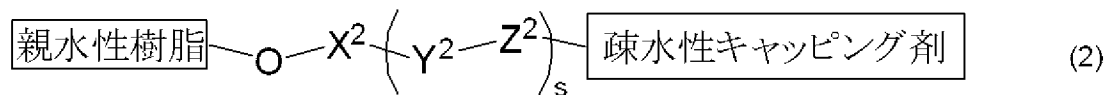


（ X^1 は単結合、又は親水性樹脂における水酸基とポリエチレングリコール部分を共有結合で連結する二価基を表し、 Z^1 はリガンドと前記ポリエチレングリコール部分を共有結合で連結する二価基を表し、 Y^1 は１～５０個のエチレングリコールユニットを含むポリエチレングリコール部分を表す）

で表される部分構造を含む、〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の固相担体；

〔７〕 固相担体が、以下の式（２）：

[化2]



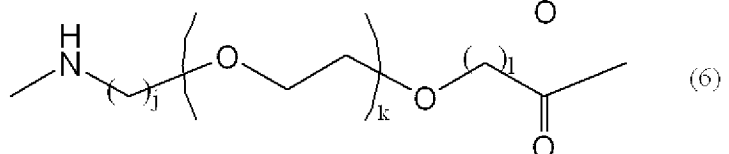
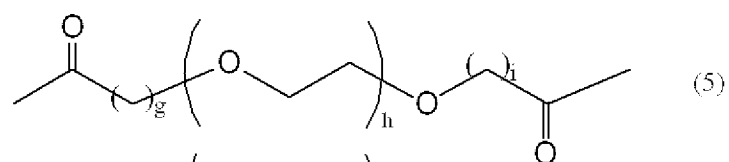
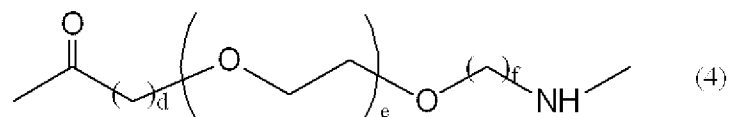
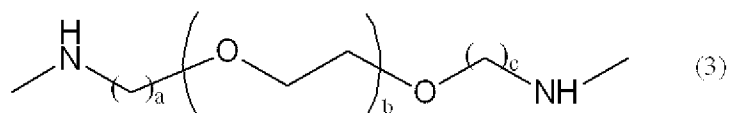
（ s は０又は１を表し、 X^2 は単結合、又は親水性樹脂における水酸基とポリエチレングリコール部分もしくは疎水性キャッピング剤を共有結合で連結する二価基を表し、 Z^2 は２つのポリエチレングリコール部分どうし、又は疎水性キャッピング剤と前記ポリエチレングリコール部分を共有結合で連結する二価基を表し、 Y^2 は１～５０個のエチレングリコールユニットを含むポリエチレングリコール部分を表す）

で表される部分構造を含む、〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の固相担体；

〔８〕 式（２）において、 s が１である、〔７〕に記載の固相担体；

〔９〕 式（１）における Y^1 及び式（２）における Y^2 が以下の式（３）～（６）：

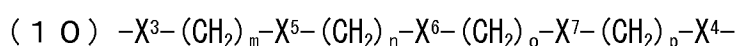
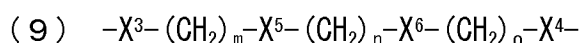
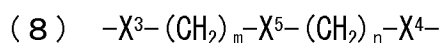
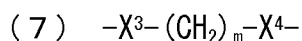
[化3]



(a、c、f 及び j は独立して 2～5 の整数を表し、d、g、i 及び l は独立して 1～5 の整数を表し、b、e、h 及び k は独立して 1～50 の整数を表す)

から独立して選択される二価基、又は前記式 (3)～式 (6) から独立して選択される同一もしくは異なる 1 又は複数の二価基がアミド結合を介して結合して形成される二価基である、〔6〕～〔8〕のいずれかに記載の固相担体；

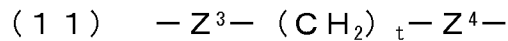
〔10〕 式 (1) における X^1 、及び式 (2) における X^2 が、単結合及び式 (7)～(10)：



(式中、 X^3 は単結合又は CO を表し、 X^5 、 X^6 及び X^7 は O 、 S 、 NR^1 、 NH 、 CO 又は CONH を表し、 X^4 は酸素原子、 NH 又は CO を表し、 R^1 は水素原子又は炭素数 1～3 のアルキル基を表し、m、n、o 及び p は独立して 1～5 の整数を表す)

のいずれかで表される二価基から独立して選択されることを特徴とする、〔 6 〕～〔 9 〕のいずれかに記載の固相担体；

〔 1 1 〕 式（ 1 ）における Z^1 、及び式（ 2 ）における Z^2 が、単結合、NH、CO、及び式（ 1 1 ）：



（式中、 Z^3 はNH又はCOを表し、 Z^4 はNH、CO、NHCO、CONH、CO-O又はO-COを表し、 t は1～5の整数を表す）

で表される二価基から、独立して選択されることを特徴とする、〔 6 〕～〔 1 0 〕のいずれかに記載の固相担体；

〔 1 2 〕 Y^1 におけるエチレングリコールのユニット数が、 Y^2 におけるエチレングリコールのユニット数よりも2以上大きいことを特徴とする、〔 6 〕～〔 1 1 〕のいずれかに記載の固相担体；

〔 1 3 〕 Y^1 におけるエチレングリコールのユニット数が2～36であり、 Y^2 におけるエチレングリコールのユニット数が0～6である、〔 1 2 〕に記載の固相担体；

〔 1 4 〕 以下の（ a ）～（ b ）の工程を含む、リガンド特異的結合蛋白質の濃縮、単離又は精製方法：

（ a ）〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載の固相担体及び試料を接触させる工程；及び

（ b ）固相担体から、リガンド特異的結合蛋白質を溶出する工程；

〔 1 5 〕 リガンド特異的結合蛋白質が、膜結合型蛋白質である、〔 1 4 〕に記載の精製方法；

〔 1 6 〕 〔 1 〕～〔 1 3 〕のいずれかに記載の固相担体の、アフィニティーカラムクロマトグラフィー用担体としての使用；
に関する。

発明の効果

[0007] 本発明により、リガンド特異的に結合する膜結合型蛋白質を吸着可能な親水性固相担体を提供することが可能になった。また、当該担体は、アフィニ

ティークロマトグラフィー用カラム充填剤として有用であり、リガンド特異的な結合蛋白質を単離、精製、同定するために使用することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]本発明の代表的なアフィニティークロマトグラフィー用固相担体を示す図である。

[図2]実施例5に記載の結合実験、SDS-PAGE、ウエスタンブロッティング実験により得られるバンドである。実施例1で得られた式(1-13)で表される固相担体がアフィニティークロマトグラフィー用樹脂としてγ-セクレターゼを特異的に結合するか否かを示す。

[図3]式(1-13)で表される固相担体が、多量に存在する蛋白質を非特異的に結合するものではないことを示す図である。

[図4]式(1-13)及び式(1-19)に相当する、アフィゲルのかわりに疎水性樹脂であるトーヨーパールを用いた固相担体を対照として製造し、非特異的な蛋白質の結合の有無を調べた結果を示す図である。

[図5]実施例8に記載の結合実験、SDS-PAGE、ウエスタンブロッティング実験により得られるバンドである。リンカーの長さが異なるDAPTをそれぞれ固定化したアフィニティー樹脂の検討結果を示す。

発明を実施するための形態

[0009] 本明細書において「膜結合型蛋白質」とは、細胞または細胞小器官等の生体膜に付着している蛋白質である。これら蛋白質は該生体膜に部分的に包含されている蛋白質、該生体膜を貫通している蛋白質、又は内在性膜蛋白質と一時的に結合している蛋白質である。ここで生体膜としては、細胞膜、ミトコンドリア外膜、ミトコンドリア内膜、核膜、小胞体膜、ゴルジ体膜等が挙げられる。

これら膜結合型蛋白質は、複数のタンパク質が会合して複合体を形成していても良い。膜結合型蛋白質として、受容体、チャンネル、トランスポーター、ポンプ、酵素等が挙げられる。

前記細胞としては特に限定は無く、本発明の固相担体を用いたアフィニテ

ィーカラムクロマトグラフィーの試料に用いられる細胞として、具体的には、ラット、マウス、ヒト組織から調製された任意の細胞、細胞バンク等より入手可能な細胞株を培養し用いてもよい。

前記細胞小器官としては、核、小胞体、ゴルジ体、エンドソーム、リソソーム、ミトコンドリア、ペルオキシソーム等が挙げられる。

本発明のアフィニティークロマトグラフィー用固相担体により精製可能な蛋白質として、好ましくは分子量として5kDa～500kDaの膜結合型蛋白質が挙げられる。

[0010] 「リガンド」とは、前記膜結合型蛋白質特異的に結合する化合物であり、アフィニティークロマトグラフィーにおけるプローブとなる低分子化合物等を表す。当該低分子化合物はスペーサーと結合可能な官能基、もしくは当該官能基へ変換可能な部分構造を少なくとも一つ有している化合物であれば、特に限定はなく、好ましくは分子量 1,000以下の化合物が挙げられる。特に好ましくは、水酸基、アミノ基、カルボキシ基、チオール基および／またはホルミル基、あるいはこれらの基に変換可能な基を有する分子量 1,000以下の化合物であり、例えば、 γ -セクレターゼ阻害剤（DAPT、L-685458など）、ヒスタミンH1受容体阻害剤（エバスチン、アレグラ等）、カルシウム拮抗剤（アムロジピン等）、カンビノイドCB1受容体拮抗剤（リモナバン等）、シクロオキシゲナーゼ-2阻害剤（セレコキシブ等）、ドーパミンD₂阻害剤、セロトニン5-HT₂阻害剤（ブロナンセリン、リスペリドン等）、MAO-B阻害剤（ラサジリン等）、MAO-A阻害剤（モクロベミド等）、カリウムチャネル拮抗剤（アミオダロン、ドフェチリド等）、ナトリウムチャネル拮抗剤（シベンゾリン、フルカイニド、モラシジン等）、ベンゾジアゼピン拮抗剤（フルマゼニル等）、アドレナリン β 遮断薬（アロチノール、アモスラロール、カラゾロール等）、抗てんかん剤（ゾニサミド等）等、及びこれらの薬学上等価な誘導体が挙げられる。ここで、薬学上等価な誘導体としては、リガンドの生物活性を維持するために不可欠ではない部分構造を化学的に改変した誘導体、リガンドの生物活性に影響を与えない部分構造を

化学的に付加した誘導体等が挙げられる。

[0011] 「疎水性キャッピング剤」とは、細胞膜、ミトコンドリア外膜、ミトコンドリア内膜、核膜、小胞体膜、ゴルジ体膜等の膜に存在するタンパク質と親和性を有する疎水性の構造を有する化合物であって、コレステロール誘導体、脂肪酸誘導体及び脂肪族アミンから選択される。疎水性キャッピング剤はスペーサーもしくは親水性樹脂と結合可能な官能基、又は当該官能基へ変換可能な部分構造を少なくとも一つ有している化合物であれば、特に限定はなく、好ましくは分子量1,000以下の化合物が挙げられる。

リガンドもしくは疎水性キャッピング剤における官能基としては、水酸基、アミノ基、カルボキシ基、チオール基、ホルミル基等が挙げられる。また、当該官能基へ変換可能な部分構造としては、特に限定は無く、加水分解によりカルボキシ基へ変換可能なカルボン酸エステル、酸化反応により水酸基へ変換可能な炭素－炭素二重結合等が挙げられ、適宜当業者に周知の合成方法により官能基への変換反応を行えばよい。

また、リガンドに官能基を導入する方法としては、1) 芳香族化合物等に酸化剤を用いて水酸基を導入する方法、2) S9mix（ラット等の哺乳動物の腹腔内にフェノバルビタール等の薬物を投与して代謝酵素を誘導した肝ホモジネートの上清画分S9に補助因子を添加したもの）等代謝酵素を用いて水酸基を導入する方法、3) 芳香族化合物にニトロ基を導入後、還元剤を用いてアミノ基へ変換する方法、4) 芳香族化合物の芳香環上にハロゲン原子を導入後、パラジウム触媒等を用い、カルボン酸等を導入する方法等が挙げられる。

リガンド及び疎水性キャッピング剤は、上記官能基が親水性樹脂やスペーサーとエステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ジスルフィド結合、アミン結合、アミド結合、ウレア結合又はウレタン結合等を形成することにより、親水性樹脂に固定化される。従って、反応性を上げるために上記官能基を適宜修飾して固定化してもよく、具体的にはカルボキシ基を酸クロリドや酸ブロミド等の酸ハライドとしたり、水酸基をメタンスルホニル化した

りして、官能基の反応性を高めることができる。

[0012] コレステロール誘導体としては、ステロイド骨格を有するコレステロール誘導体であれば特に限定は無いが、具体的には、コレステロール(cholesterol)、6-ケトコレスタノール(6-Ketocholestanol)、スティグマスタノール(Stigmastanol)、 5α -コレスタン- 3β -オール (5α -cholestan- 3β -ol)、 5β -コレスタン- 3α -オール (5β -cholestan- 3α -ol)、 5β -コレスタン- 3β -オール (5β -cholestan- 3β -ol)、 α -コレスタノール (α -cholestanol)、 5α -ヒドロキシコレスタノール (5α -hydroxycholestanol)、 5α -コレスタン- $3\beta, 6\alpha$ -ジオール (5α -cholestan- $3\beta, 6\alpha$ -diol)、 5β -コレスタン- $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -トリオール (5β -cholestan- $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -triol)、 5α -コレスタン- 24α -メチル- 3β -オール (5α -cholestan- 24α -methyl- 3β -ol)、 5α -コレスタン- 3β -オール-6-オン 3-アセテート (5α -cholestan- 3β -ol-6-one 3-acetate)、 5α -コレスタン- $3\beta, 6\beta$ -ジオール (5α -cholestan- $3\beta, 6\beta$ -diol)、 5α -コレスタン- $3\beta, 5\alpha$ -ジオール-6-オン (5α -cholestan- $3\beta, 5\alpha$ -diol-6-one)、 5α -コレスタン- $3\beta, 5\beta, 6\beta$ -トリオール (5α -cholestan- $3\beta, 5\beta, 6\beta$ -triol)、 5β -コレスタン- $3\beta, 6\beta$ -ジオール (5β -cholestan- $3\beta, 6\beta$ -diol)、 5α -コレスタン- $3\beta, 7\alpha$ -ジオール (5α -cholestan- $3\beta, 7\alpha$ -diol)、 5α -コレスタン- $3\beta, 7\beta$ -ジオール (5α -cholestan- $3\beta, 7\beta$ -diol)、 20α -ヒドロキシコレステロール (20α -hydroxycholesterol)、 β -シトステロール (β -sitosterol)、7-ケトコレステロール (7-ketocholesterol)、フコステロール (fucosterol)、デスモステロール (desmosterol)、22-ケトコレステロール (22-ketocholesterol)、25-ヒドロキシコレステロール (25-hydroxycholesterol)、 3β -ヒドロキシ- $\delta 5$ -コレニック アシッド (3β -hydroxy- $\delta 5$ -cholenic acid)、22(R)-ヒドロキシコレステロール (22(R)-hydroxycholesterol)、エピコレステロール (epicholesterol)、5-コレニックアシッド- 3β -オール メチルエーテル (5-cholenic acid- 3β -ol methyl ether)、3-[3β -コレスト-5-エン-3-イルオキシ]-1-プロパナミン (3-[3β -cholest-5-en-3-yloxy]-1-propanamine)、5-コレステン- 24α -エチル- 3β -オール

(5-cholesten-24 α -ethyl-3 β -ol)、24-ケトコレステロール (24-ketocholesterol)、又は7,5 α -コレステレン-24 α -メチル-3 β -オール (7,5 α -cholesten-24 α -methyl-3 β -ol) 等を挙げることができ、コレステロール誘導体の水酸基はエステル結合又はエーテル結合を介して、スペーサーと結合している。あるいは、コレステロール誘導体がアミド結合、ウレア結合又はウレタン結合等を介して親水性樹脂やスペーサーと化学結合できるように、当該コレステロール誘導体にアミノ基、水酸基、カルボキシ基等の官能基を導入した誘導体を適宜用いることもできる。

- [0013] コレステロール誘導体は、適宜水酸基、アミノ基もしくはカルボキシ基等の官能基を修飾することによって、本発明の固相担体を製造するための中間体へと導くことができる。具体的には、コレステロール誘導体の水酸基とコハク酸等のジカルボン酸を反応させたカルボキシ基を有する化合物、コレステロール誘導体の水酸基をクロロフォルメートへ変換した化合物等が挙げられる。例えば5 α -コレスタン-3 α -オール ヘミスクシネート (5 α -cholestan-3 α -ol hemisuccinate)、5 α -コレスタン-3 β -オール ヘミスクシネート (5 α -cholestan-3 β -ol hemisuccinate)、3 β ,5 α ,6 β -トリヒドロキシコレスタン 3-ヘミスクシネート (3 β ,5 α ,6 β -trihydroxycholestan 3-hemisuccinate)、5 β -コレスタン-3 α -オール ヘミスクシネート (5 β -cholestan-3 α -ol hemisuccinate)、5 β -コレスタン-3 β -オール ヘミスクシネート (5 β -cholestan-3 β -ol hemisuccinate)、コレステリル ハイドロジェン スクシネート (cholesteryl hydrogen succinate)、5 α -コレスタン-3 α -オール ヘミスクシネート (5 α -cholestan-3 α -ol hemisuccinate)、5 α -コレスタン-3 β -オール ヘミスクシネート (5 α -cholestan-3 β -ol hemisuccinate)、3 β ,5 α ,6 β -トリヒドロキシコレスタン 3-ヘミスクシネート (3 β ,5 α ,6 β -trihydroxycholestane 3-hemisuccinate)、5 β -コレスタン-3 α -オール ヘミスクシネート (5 β -cholestan-3 α -ol hemisuccinate)、5 β -コレスタン-3 β -オール ヘミスクシネート (5 β -cholestan-3 β -ol hemisuccinate)、コレステリル ハイドロジェン スクシネート (chole

steryl hydrogen succinate)、25-ヒドロキシコレステロール 3-ヘミスクシネート (25-hydroxycholesterol 3-hemisuccinate)、25-ヒドロキシコレステロール 3-ヘミスクシネート (25-hydroxycholesterol 3-hemisuccinate)、5-コレステレン-24 α -エチル-3 β -オール クロロフォルメート (5-cholesten-24 α -ethyl-3 β -ol chloroformate)、5 α -コレスタン-3 β -オール クロロフォルメート (5 α -cholestan-3 β -ol chloroformate)、コレステリル クロロフォルメート (cholesteryl chloroformate)、5-コレステレン-24 α -エチル-3 β -オール クロロフォルメート (5-cholesten-24 α -ethyl-3 β -ol chloroformate) 等を例示できる。

[0014] 脂肪酸誘導体としては、1～6の不飽和結合（二重結合もしくは三重結合）を有していてもよい炭素数6～30の直鎖もしくは分枝のカルボン酸、リン酸もしくはスルホン酸、又はこれらのエステルが挙げられる。具体的には、直鎖飽和脂肪酸（例えば、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸）、直鎖不飽和脂肪酸（オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、DHA）、分枝飽和脂肪酸（例えば、19-メチルエイコサノイックアシッド (19-methyleicosanoic acid)、12-メチルテトラデカノイックアシッド (12-methyltetradecanoic acid)、イソステアリックアシッド (isostearyl acid) 等）、又は分枝不飽和脂肪酸（例えば、2-プロピル-2,4-ペンタジエノイックアシッド、2-メチルヘプタジエノイックアシッド、(6Z)-8-メチルノネノイックアシッド等）が挙げられる。好ましくは炭素数8～24、更に好ましくは炭素数14～20の飽和脂肪酸が挙げられる。

[0015] 脂肪族アミンとしては、1～6の不飽和結合（二重結合もしくは三重結合）を有していてもよい炭素数6～30の直鎖もしくは分枝の脂肪族アミンが挙げられる。具体的にはアルキルアミン（例えば、ステアリルアミン、1-アミノデカン (1-aminodecane)、ミリスチルアミン (myristylamine)、オクタデシルアミン等）、アルケニルアミン（例えば、オレイルアミン (oleylamine) 等）等が挙げられる。好ましくは炭素数8～18のアルキルアミンが挙げられる。

[0016] 「親水性樹脂」としては、複数の水酸基もしくはポリエチレングリコール基を有する親水性モノマーが重合してなる親水性樹脂を表す。具体的には、糖類が重合してなる親水性樹脂、又は高度親水性モノマーが重合してなる樹脂が挙げられる。

[0017] 「糖類が重合してなる親水性樹脂」としては、セファロース系樹脂、デキストラン系樹脂、アミロース系樹脂、セルロース系樹脂又はアガロース系樹脂が挙げられる。

セファロース系樹脂としては、GEヘルスケア社製のECHセファロース4B、EAH-セファロース4B（登録商標）等が挙げられる。デキストラン系樹脂としては、GEヘルスケア社製のセファデックス（登録商標）等が挙げられる。

アミロース系樹脂としては、ニュー・イングランド・バイオラボ(New England BioLab) 社製のアミロースレジン (Amylose resin、登録商標)、アミロースセファロースレジン、アミロースアガロースアフィニティレジン等が挙げられる。

セルロース系樹脂としては、シグマ社製のセルロース（商品名：Cellulose (cat. No; 22182)、Cellulose, beaded (cat. No; C7079)、Sodium carboxymethyl cellulose (cat. No; 419311)）等が挙げられる。

尚、セファロース系樹脂及びアミロース系樹脂は、ともに水酸基を有しているため、カルボキシ基を有する化合物とエステル結合を形成させることができる。また、以下の製造法2で示す方法で、水酸基をアルキル化することにより、カルボキシ基やアミノ基を有する製造中間体へ導くことができる。

[0018] アガロース系樹脂としては、バイオラッド社製 アフィゲル(Affi-gel; 登録商標。具体的にはアフィゲル10、アフィゲル102及びアフィゲル15が挙げられる)、シグマ社製のアガロース（商品名：Iminodiacetic acid Agarose (cat. No; 14758)）、アガロースビーズテクノロジー社(AGAROSE BEAD TECHNOLOGIES社)のLow Density Aminoethyl 6 BCL, Amine Reactive Agarose 等が挙げられる。

[0019] また、上記の糖類が重合してなる親水性樹脂が、金膜上に担持されたビア

コア用チップ（GEヘルスケア；Sensor Chip CM5；cat. No；BR-1000-12）もまた、本発明の親水性樹脂の範疇に含まれる。

[0020] 「高度親水性モノマーが重合してなる樹脂」における「高度親水性モノマー」としては、ポリエチレングリコール基又はポリオール基を有するメタクリル酸が挙げられる。具体的には、メタクリル酸のカルボキシ基にポリエチレングリコール基が必要であればスペーサーを介して共有結合したモノマー、又はメタクリル酸のカルボキシ基に2以上の水酸基を有するアルキル基がエステル結合したモノマー等が挙げられる。「高度親水性モノマーが重合してなる樹脂」として、国際公開パンフレットW02007/142331号に記載された樹脂、又はアクアファームス（AQUAFIRMUS；商品名）として市販されている樹脂を用いることもできる。

[0021] リガンドもしくは疎水性キャッピング剤が「固定化される」とは、リガンドもしくは疎水性キャッピング剤に含まれるアミノ基、水酸基、カルボキシ基、チオール基、ホルミル基（CHO）等の官能基が、親水性樹脂上の水酸基と、必要であればスペーサーを介して共有結合していることを意味する。すなわち、リガンドもしくは疎水性キャッピング剤の官能基は、スペーサーもしくは親水性樹脂の官能基とエステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ジスルフィド結合、アミン結合、アミド結合、ウレア結合又はウレタン結合等を介して共有結合している。

ここでリガンド及び疎水性キャッピング剤の親水性樹脂表面上の水酸基に対する結合率（これを固定化率という）は、特に限定はなく、0.1%～60%程度の水酸基にリガンド又はキャッピング剤が結合している。

また、リガンド及び疎水性キャッピング剤の比は特に限定はなく、リガンド：疎水性キャッピング剤としては、1：100～100：1が挙げられる。

また、本発明の固相担体は複数種類の疎水性キャッピング剤を有していてもよく、好ましくは、1～3種類の疎水性キャッピング剤を有していてもよい。複数種類の疎水性キャッピング剤を有する固相担体として、具体的には

、コレステロール誘導体及び脂肪酸誘導体、コレステロール誘導体及びリン脂質誘導体が固定化された固相担体を挙げることができる。

[0022] 本明細書において、「スペーサー」とは、キャッピング剤もしくはリガンド及び親水性樹脂を連結している二価基を表し、リガンドを親水性樹脂に固定化するためのスペーサーは、ポリエチレングリコール部分を含む化学的に安定な共有結合を形成可能な二価基であれば特に限定はない。また、疎水性キャッピング剤を親水性樹脂に固定化するためのスペーサーは、化学的に安定な共有結合を形成可能な二価基であれば特に限定はなく、ポリエチレングリコール部分を含んでいてもよい

リガンドを親水性樹脂に固定化するためのスペーサーとして具体的には、式（１）における「 $-X^1-Y^1-Z^1-$ 」で表される二価基が、疎水性キャッピング剤を親水性樹脂に固定化するためのスペーサーとして具体的には、式（２）における「 $-X^2-(Y^2-Z^2)_s-$ 」で表される二価基がそれぞれ挙げられる。

式（１）において X^1 は単結合又は親水性樹脂における水酸基とポリエチレングリコール部分を共有結合で連結する二価基を表す。 X^1 における二価基は、 Y^1 で表されるポリエチレングリコール部分の末端の官能基と親水性樹脂における水酸基とを化学的に安定につなぐ二価基であれば特に限定はない。すなわち、当該二価基として、任意のメチレン基が適宜酸素原子、硫黄原子、 NR^1 （ R^1 は前記と同義）、 $NHCO$ 又は $CONH$ で置換されていてもよい化学的に安定な炭素数２～２５の直鎖アルキレンが挙げられる。具体的には、前記式（７）～式（１０）のいずれかで表される二価基が挙げられる。

式（２）において X^2 は単結合又は親水性樹脂における水酸基とポリエチレングリコール部分もしくは疎水性キャッピング剤とを共有結合で連結する二価基を表す。

式（２）において s が０を表す場合、すなわち疎水性キャッピング剤及び親水性樹脂をつなぐスペーサーがポリエチレングリコール部分を含まない場合、 X^2 は疎水性キャッピング剤が親水性樹脂上の水酸基と安定な共有結合を

形成するための二価基を表す。また、 s が0を表し、疎水性キャッピング剤がカルボキシ基を有する場合、 X^2 は単結合を表していてもよい。

式(2)において s が1を表す場合、 X^2 は単結合又は親水性樹脂における水酸基とポリエチレングリコール部分を共有結合で連結する二価基を表す。 X^2 における二価基は、 Y^2 で表されるポリエチレングリコール部分の末端の官能基と親水性樹脂における水酸基を化学的に安定につなぐ二価基であれば特に限定はない。すなわち、当該二価基として、任意のメチレン基が適宜酸素原子、硫黄原子、 NR^1 (R^1 は前記と同義)、 $NHCO$ 又は $CONH$ で置換されていてもよい化学的に安定な炭素数2~25の直鎖アルキレンが挙げられる。具体的には、前記式(7)~式(10)のいずれかで表される二価基が挙げられる。

式(1)における Y^1 は、1~50個のエチレングリコールユニット($-O-CH_2CH_2-$ で表わされる二価基)を含むポリエチレングリコール部分を表す。ここでポリエチレングリコール部分は、両端に X^1 もしくは親水性樹脂における水酸基、及び Z^1 と、それぞれエステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ジスルフィド結合、アミン結合、アミド結合、ウレア結合又はウレタン結合を形成可能な官能基を有する。また、当該ポリエチレングリコール部分は、エチレングリコールユニットを1~50個含んでいれば、個々のエチレングリコールユニット間の結合様式に特に限定は無く、エチレングリコールが1~50個重合してポリエチレングリコールを形成しているか、あるいは、エチレングリコールが1~50個、好ましくは2~15個重合したポリエチレングリコールの両端に適宜炭素数1~5個の直鎖アルキレンを介して官能基を有する同一もしくは異なる二価基が1又は複数結合し、全体でエチレングリコールユニットを1~50個含む二価基を形成していてもよい。具体的には、前記式(3)~式(6)から選択される二価基、又は前記式(3)~式(6)から独立して選択される同一もしくは異なる二価基がアミド結合を介して結合して形成される二価基等が挙げられる。

Y^1 に含まれるエチレングリコールユニット数は好ましくは2~36であり

、更に好ましくは、5から24である。

[0023] 式(2)における Y^2 は、1～50個のエチレングリコールユニットを含むポリエチレングリコール部分を表す。ここでポリエチレングリコール部分は、両端に X^2 もしくは親水性樹脂における水酸基、及び Z^2 と、それぞれエステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ジスルフィド結合、アミン結合、アミド結合、ウレア結合又はウレタン結合を形成可能な官能基を有する。また、当該ポリエチレングリコール部分は、エチレングリコールユニットを1～50個含んでいれば、個々のエチレングリコールユニット間の結合様式に特に限定は無く、エチレングリコールが1～50個重合したポリエチレングリコールを形成しているか、あるいは、エチレングリコールが1～50個、好ましくは2～15個重合したポリエチレングリコールの両端に適宜炭素数1～5個の直鎖アルキレンを介して官能基を有する同一もしくは異なる二価基が1又は複数結合し、全体でエチレングリコールユニットを1～50個含む二価基を形成していてもよい。具体的には、前記式(3)～式(6)から選択される二価基、又は前記式(3)～式(6)から独立して選択される同一もしくは異なる二価基がアミド結合を介して結合して形成される二価基が挙げられる。

Y^2 に含まれるエチレングリコールユニット数は好ましくは1～6であり、更に好ましくは、1から4である。好ましくは、 Y^1 に含まれるエチレングリコールユニット数は、 Y^2 に含まれるエチレングリコールユニット数よりも2以上大きい。

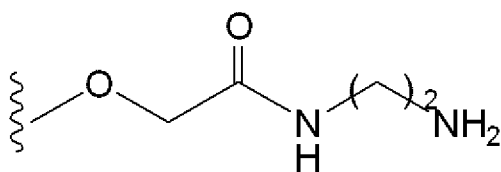
[0024] 式(1)における Z^1 は、隣接するポリエチレングリコール部分とリガンドもしくは疎水性キャッピング剤とを、共有結合で連結する二価基、又は単結合を表す。また、式(2)における Z^2 は、隣接する2つのポリエチレングリコール部分、又はポリエチレングリコール部分と疎水性キャッピング剤とを、共有結合で連結する二価基、又は単結合を表す。 Z^1 及び Z^2 における二価基は、ポリエチレングリコール部分の末端の官能基とリガンドもしくは疎水性キャッピング剤とを化学的に安定につなぐ二価基であれば特に限定はない。

すなわち、当該二価基として、NH、CO、又は任意のメチレン基が適宜酸素原子、硫黄原子、NR¹（R¹は前記と同義）、NHCO又はCONHで置換されていてもよい、化学的に安定な炭素数1～10、好ましくは炭素数1～7の直鎖アルキレンが挙げられる。具体的には、前記式（11）で表される二価基が挙げられる。

[0025] リガンドもしくは疎水性キャッピング剤の官能基とスペーサーの官能基との縮合反応は当業者に周知の方法で行うことができる。すなわち、適宜スペーサーを介して官能基が導入された親水性樹脂と、前記官能基と共有結合を形成できる官能基が適宜スペーサーを介して導入されたりガンドもしくは疎水性キャッピング剤を縮合すればよい。ここでリガンド、疎水性キャッピング剤もしくはスペーサーの官能基は、適宜反応性の高い官能基に変換されていてもよい。例えばカルボキシ基をN-ヒドロキシコハク酸イミドエステル等との活性エステルとし、水酸基もしくはアミノ基との脱水縮合反応に用いることができる。また、チオール基を2-チオピリジルジスルフィドへ変換し、ジスルフィド結合を形成するために用いることができる。また、官能基としてアルデヒド基を有する化合物を、アミノ基を有する化合物と還元剤（例えばシアノ水素化ホウ素ナトリウム等のホウ素系還元剤等が挙げられる）の存在下で反応させることもできる。

具体的には、例えばアガロース系樹脂であるアフィゲル102は、アガロース系樹脂の水酸基に、カルボキシ基を有する化合物とアミド結合形成可能なスペーサーが導入されており、以下の式：

[0026] [化4]

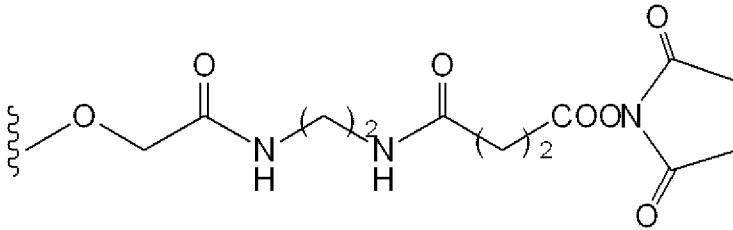


で表される官能基を有する。また、アフィゲル10は、アフィゲル102を無水コハク酸で処理しカルボキシ酸体とした後、N-ヒドロキシコハク酸イミドで活性エステルとした担体であり、アミノ基もしくは水酸基を有する化合物とア

ミド結合もしくはエステル結合形成可能なスペーサーが導入されて以下の式

:

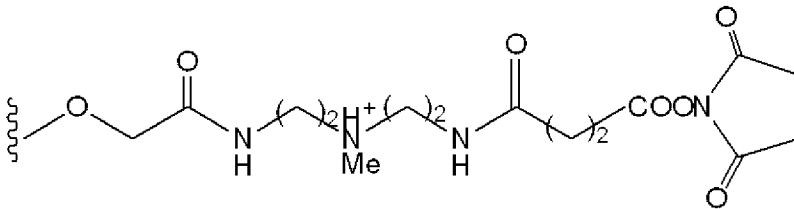
[0027] [化5]



で表される。

また、アフィゲル15における活性型官能基は以下の式：

[0028] [化6]



で表され、スペーサー内に4級アミンを含む担体であり、アミノ基もしくは水酸基を有する化合物とアミド結合もしくはエステル結合等を形成可能である。

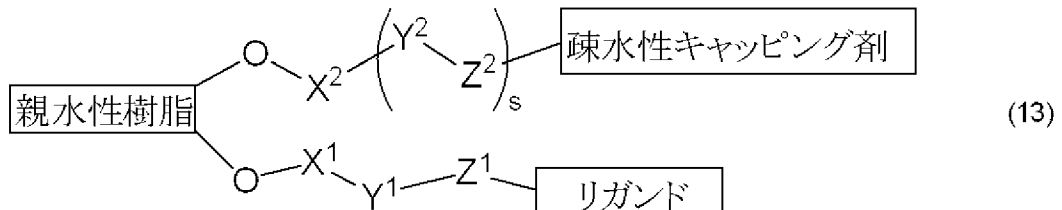
。

また、セファロース系樹脂にはN-ヒドロキシコハク酸イミドで活性エステル化されたカルボキシ基を有する6-Aminocaproic acid N-hydroxysuccinimide ester-activated-Sepharose 4B(登録商標)、6-Aminohexanoic acid N-hydroxysuccinimide ester-activated Sepharose 4B及びCH-activated Sepharose 4B、臭化シアンで活性化されたCNBr-activated Sepharose 4B等がアミノ基を有する化合物を混合するだけでそのまま共有結合を形成できる活性型担体として市販されている。また、アミノ基を有するEAM-Sepharose 4B、及びカルボキシ基を有するECH-Sepahroseが市販されている。更に、エポキシ基を有するEpoxy-activated Sepharose 6Bが、アミノ基、水酸基又はチオール基を有する化合物と共有結合を形成できる担体として市販されている。また、活性化されたチオール基を有するActivated Thiol Sepharose 4Bは、チオール

基を有する化合物とジスルフィド結合を形成できる担体として市販されている。

[0029] 本発明の固相担体は、好ましくは以下の式（１３）：

[0030] [化7]

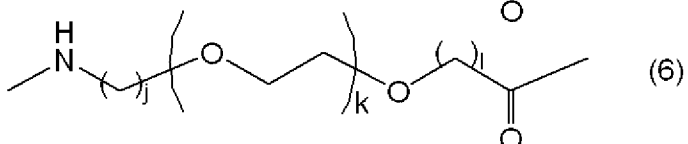
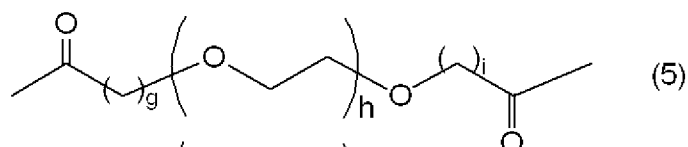
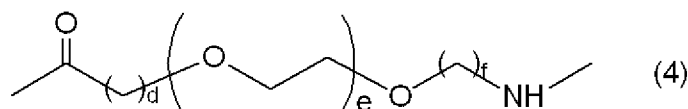
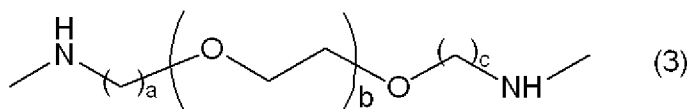


（式中、 X^1 、 X^2 、 Z^1 、 Z^2 、 Y^1 、 Y^2 及び s は前記と同義である）

で表される（図１）。ここで、疎水性キャッピング剤もしくはリガンドが固定化されている親水性樹脂上の水酸基の割合、又は、固定化されたキャッピング剤及び固定化されたリガンドの割合に特に限定は無いが、担体としてアフィゲルを用いる場合、水酸基を、アミノ基等を有する基に変換（官能基化）し、当該官能基化された水酸基に対して、リガンドは６０％から９０％程度、キャッピング剤は０．１％から４０％程度が固定化されていることが好ましい。

式（１）の Y^1 や式（２）の Y^2 におけるポリエチレングリコール部分として、以下の式（３）～（６）：

[0031] [化8]



(a、b、c、d、e、f、g、h、i、j、k 及び l は前記と同義である)

で表される二価基が挙げられる。

[0032] 式(3)で表される二価基は、エチレングリコールユニットをb個有する二価基であって、両端にNHを有する。従って、当該二価基は式(1)における X^1 、または式(2)における X^2 とアミド結合により結合することができる。従って、 X^1 もしくは X^2 が前記式(7)～式(10)のいずれかで表される二価基の場合、式(7)～式(10)における X^4 はCOを表す。

また、式(3)で表される二価基がキャッピング剤もしくはリガンドと結合し、当該キャッピング剤もしくはリガンドがカルボキシ基を有する場合、アミド結合を介して結合できる。この場合、式(1)における Z^1 、又は式(2)における Z^2 は単結合を表す。また、式(3)で表される二価基はキャッピング剤もしくはリガンドが水酸基を有する場合、NHCOO結合を介して結合できる。この場合、式(1)における Z^1 、又は式(2)における Z^2 はカルボニル基を表す。また、式(3)で表される二価基はキャッピング剤もしくはリガンドがアミノ基を有する場合、NHCONH結合を介して結合できる。この場合、式(1)における Z^1 、又は式(2)における Z^2 はカルボニル基を表す。

また、式(3)で表される二価基は、前記式(11)で表される二価基からなるスペーサーを介してキャッピング剤もしくはリガンドと結合してもよく、この場合式(1)における Z^1 又は式(2)における Z^2 は式(11)で表され、式(11)において Z^3 はカルボニル基を表す。

[0033] 式(4)で表される二価基は、エチレングリコールユニットをe個有する二価基であって、両端にカルボニル基、及びNHをそれぞれ有する。従って、当該二価基は式(1)における X^1 、または式(2)における X^2 とアミド結合により結合することができる。具体的には、 X^1 もしくは X^2 が前記式(7)～式(10)のいずれかで表される二価基の場合、式(7)～式(10)における X^4 はNHを表す。

また、式（４）で表される二価基がキャッピング剤もしくはリガンドと結合し、当該キャッピング剤もしくはリガンドがカルボキシ基を有する場合、アミド結合を介して結合できる。この場合、式（１）における Z^1 、又は式（２）における Z^2 は単結合を表す。また、式（４）で表される二価基はキャッピング剤もしくはリガンドが水酸基を有する場合、 NHCOO 結合を介して結合できる。この場合、式（１）における Z^1 、又は式（２）における Z^2 はカルボニル基を表す。また、式（４）で表される二価基はキャッピング剤もしくはリガンドがアミノ基を有する場合、 NHCONH 結合を介して結合できる。この場合、式（１）における Z^1 、又は式（２）における Z^2 はカルボニル基を表す。

また、式（４）で表される二価基は、前記式（１１）で表される二価基からなるスペーサーを介してキャッピング剤もしくはリガンドと結合してもよく、この場合式（１）における Z^1 又は式（２）における Z^2 は式（１１）で表され、式（１１）において Z^3 はカルボニル基を表す。

[0034] 式（５）で表される二価基は、エチレングリコールユニットを h 個有する二価基であって、両端にカルボニル基を有する。従って、当該二価基は式（１）における X^1 、または式（２）における X^2 とアミド結合により結合することができる。具体的には、 X^1 もしくは X^2 が前記式（７）～式（１０）のいずれかで表される二価基の場合、 X^4 は NH を表す。

また、式（５）で表される二価基がキャッピング剤もしくはリガンドと結合し、当該キャッピング剤もしくはリガンドがアミノ基もしくは水酸基を有する場合に用いられ、アミド結合もしくはエステル結合を介して結合できる。この場合、式（１）における Z^1 、又は式（２）における Z^2 は単結合を表す。

また、式（５）で表される二価基は、前記式（１１）で表される二価基からなるスペーサーを介してキャッピング剤もしくはリガンドと結合してもよく、この場合式（１）における Z^1 又は式（２）における Z^2 は式（１１）で表され、式（１１）において Z^3 は NH 基を表す。

[0035] 式（６）で表される二価基は、エチレングリコールユニットを k 個有する二価基であって、末端に NH 及びカルボニル基を有する。従って、当該二価基は式（１）における X^1 、または式（２）における X^2 とアミド結合により結合することができる。具体的には、 X^1 もしくは X^2 が前記式（７）～式（１０）のいずれかで表される二価基の場合、式（７）～式（１０）における X^4 はカルボニル基を表す。

また、式（６）で表される二価基がキャッピング剤もしくはリガンドと結合し、当該キャッピング剤もしくはリガンドがアミノ基もしくは水酸基を有する場合に用いられ、アミド結合もしくはエステル結合を介して結合できる。この場合、式（１）における Z^1 、又は式（２）における Z^2 は単結合を表す。

また、式（６）で表される二価基は、前記式（１１）で表される二価基からなるスペーサーを介してキャッピング剤もしくはリガンドと結合してもよく、この場合式（１）における Z^1 又は式（２）における Z^2 は式（１１）で表され、式（１１）において Z^3 は NH 基を表す。

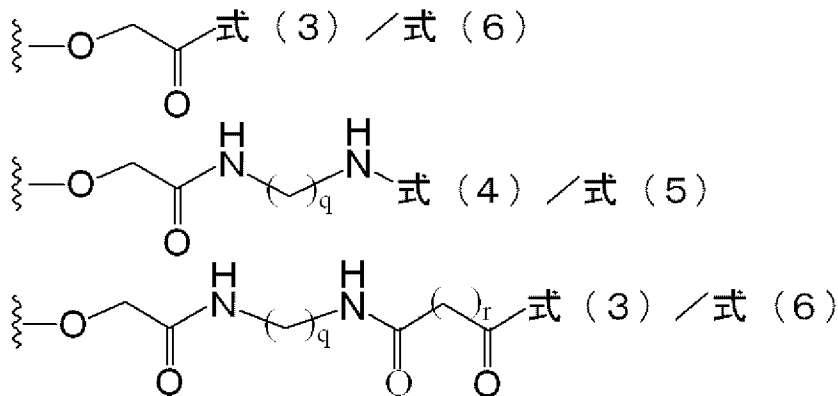
[0036] 尚、ポリエチレングリコール部分として、エチレングリコールが１～１５個、好ましくは１～６個重合したエチレングリコールオリゴマーの両端にカルボキシ基もしくはアミノ基を有する上記式（３）～（６）のいずれかで表されるいずれかの二価基が、同一もしくは異なって１～５個重合したものをを用いることもできるが、この場合、当該二価基は相互にアミド結合を形成可能な任意の組み合わせから選択され得る。

また、式（１）における Z^1 、及び式（２）における Z^2 が前記式（１１）で表わされる場合、キャッピング剤もしくはリガンドがカルボキシ基を有する場合、式（１１）における Z^4 は NH を表す。また、キャッピング剤もしくはリガンドが水酸基を有する場合、式（１１）における Z^4 はカルボニル基もしくは NHCO を表す。キャッピング剤もしくはリガンドがアミノ基を有する場合、式（１１）における Z^4 はカルボニル基もしくは NHCO を表す。

[0037] 親水性樹脂とポリエチレングリコール部分の結合部位として、具体的には

、以下の式：

[0038] [化9]



(qは2～6の整数を表し、rは1～6の整数を表す)

で表される部分構造等が挙げられる。

本発明の固相担体の好ましい態様として、上記式(13)で表される構造を有する固相担体が挙げられる。式(13)において、Y²は、好ましくは上記式(3)～式(6)から選択される、同一もしくは異なる1～5個の二価基がアミド結合で結合して形成される二価基を表し、この場合、Y²に含まれるポリエチレングリコールのユニット数は好ましくは1～6である。好ましくは、Y²が式(3)～(6)のいずれかを表し、当該式(3)～(6)においてb、e、h及びkが1～5、好ましくは1～3を表す。

式(13)において、Y¹としては、好ましくは上記式(3)～式(6)から選択される同一もしくは異なる1～5個の二価基がアミド結合で結合して形成される二価基が挙げられ、この場合、Y¹に含まれるポリエチレングリコールのユニット数は好ましくは2～36である。好ましくは、Y¹が式(3)～(6)のいずれかから選択される同一もしくは異なる任意の基が2～5個結合して形成される二価基を表し、当該式(3)～(6)においてb、e、h及びkが1～5、好ましくは2～3を表す。

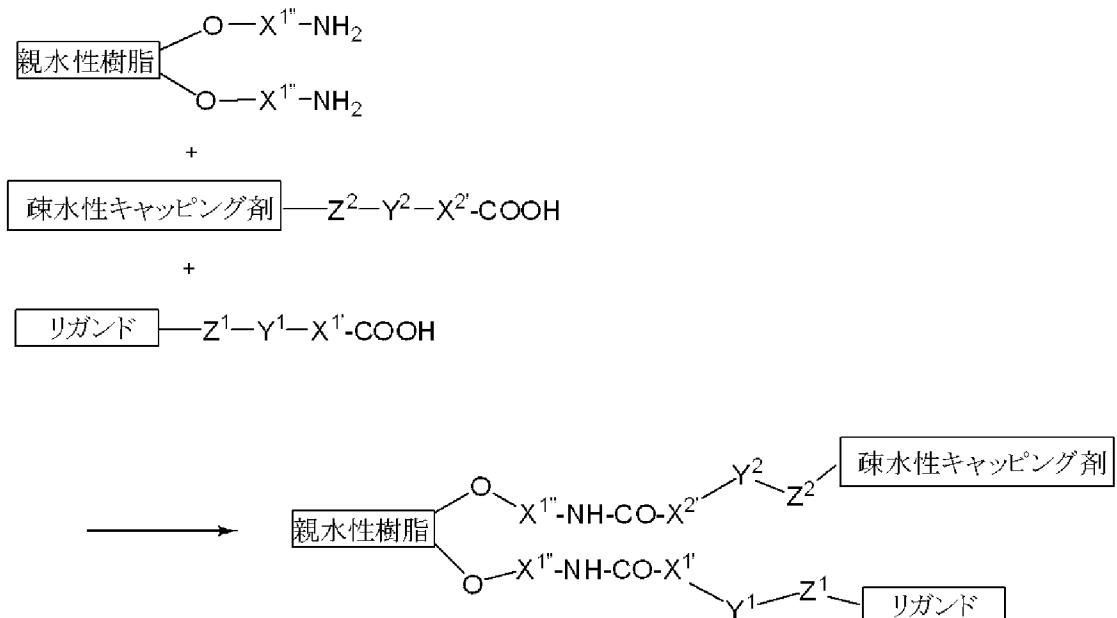
[0039] 本発明の固相担体は、適宜スペーサーを有していてもよい親水性樹脂を、適宜スペーサーを有していてもよいリガンド及び疎水性キャッピング剤と縮合することにより、当業者に周知の方法で製造することができる。

以下に本発明の固相担体の製造方法について、具体的に例示する。

〔製造方法 1〕

本発明の固相担体は、以下の工程で製造することができる：

[0040] [化10]

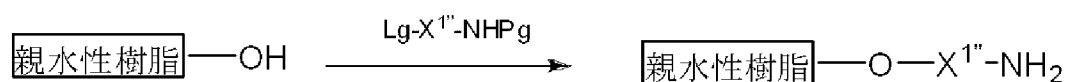


（式中、「 $-\text{X}^{1''}-\text{NHCO}-\text{X}^{1'}$ 」は式（1）における「 $-\text{X}^{1'}$ 」に相当する二価基であり、「 $-\text{X}^{1''}-\text{NHCO}-\text{X}^{2'}$ 」は式（2）における「 $-\text{X}^{2'}$ 」に相当する二価基であり、 Y^1 、 Y^2 、 Z^1 及び Z^2 は前記と同義である）。

すなわち、アミノ基を有する担体、カルボキシ基を有するキャッピング剤及びカルボキシ基を有するリガンドを適当な溶媒中で混合し、脱水縮合剤を用いてアミド化反応を行うことにより、本発明の固相担体を製造することができる。

ここで原料となるアミノ基を有する担体は、以下の工程で製造することができる：

[0041] [化11]



（式中 $\text{X}^{1''}$ は前記と同義であり、 Lg は臭素原子等の脱離基を表し、 Pg は

保護基を表す)。

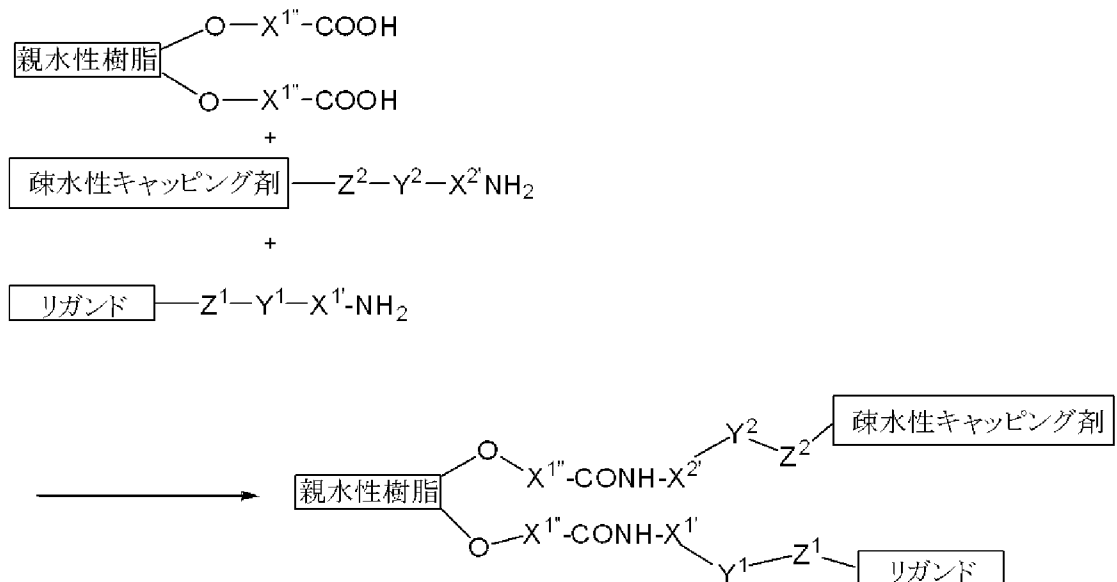
すなわち、1) アルキル化反応 (L g で表される脱離基が臭素原子やメタン
スルホニルオキシ基等であり、担体と X^{1''} がエーテル結合をしている場合
)、又はジシクロヘキシルカルボジイミド、1-エチル-3-(3'-ジメチルアミノ
プロピル) カルボジイミド (WSCD) もしくは 2-(1H-7-アザベンゾトリアゾー
ル-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロフォスフェート

メタナミニウム (H A T U) 等の縮合剤による脱水縮合反応 (L g で表さ
れる脱離基が水酸基であり、担体と X^{1''} がエステル結合をしている場合)、
2) アミノ基の保護基を除去する脱保護反応を経て製造することができる。

[0042] [製造方法 2]

カルボキシ基を有する担体を用いて以下の工程で本発明の固相担体を製造
することもできる：

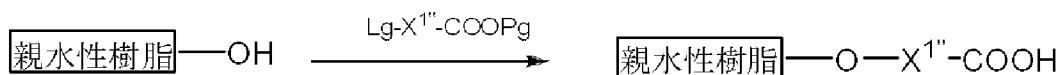
[0043] [化12]



(式中、「 $-\text{X}^{1''}-\text{CONH}-\text{X}^{1'}$ 」は式(1)における「 $-\text{X}^{1'}$ 」に相
当する二価基であり、「 $-\text{X}^{1''}-\text{CONH}-\text{X}^{2'}$ 」は式(2)における「
 $-\text{X}^{2'}$ 」に相当する二価基であり、Y¹、Y²、Z¹及びZ²は前記と同義である
)。

カルボキシ基を有する担体は、以下の工程で製造することができる：

[0044] [化13]



(式中 $\text{X}^{1''}$ は前記と同義であり、 Lg は臭素原子等の脱離基を表し、 Pg は保護基を表す)。

すなわち、1) アルキル化反応 (Lg で表される脱離基が臭素原子やメタンシルホニルオキシ基等であり、担体と $\text{X}^{1''}$ がエーテル結合をしている場合)、又はジシクロヘキシルカルボジイミド、1-エチル-3-(3'-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(WSCD)、もしくは2-(1H-7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロフォスフェートメタナミニウム(HATU)等の縮合剤による脱水縮合反応 (Lg で表される脱離基が水酸基であり、担体と $\text{X}^{1''}$ がエステル結合をしている場合)、2) カルボキシ基の保護基を除去する脱保護反応を経て製造することができる。

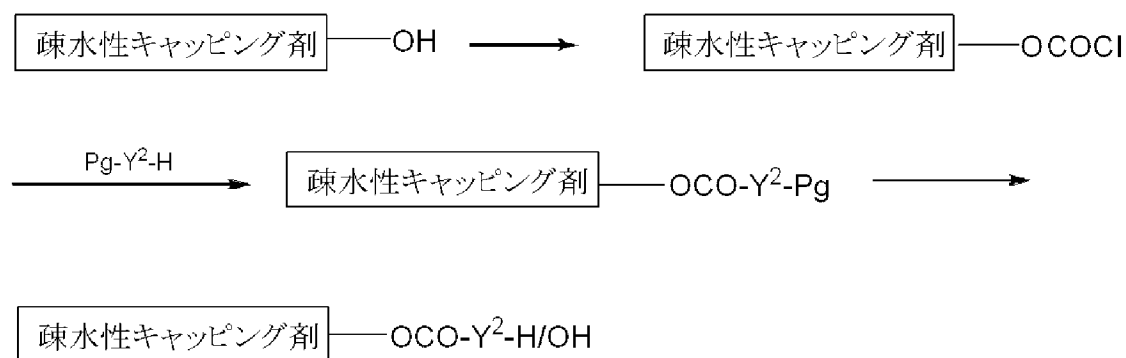
あるいは、 $\text{X}^{1''}$ が $-\text{CO}(\text{CH}_2)_2-$ を表す場合、無水コハク酸を用いてカルボキシ基を有する担体を製造することもできる。

[0045] [製造方法3]

次いで、キャッピング剤もしくはリガンドにポリエチレングリコール部分を導入した中間体の製造方法について説明する。

キャッピング剤が水酸基を有する場合、キャッピング剤にポリエチレングリコール部分を導入した中間体は、例えば以下の工程で製造できる。

[0046] [化14]



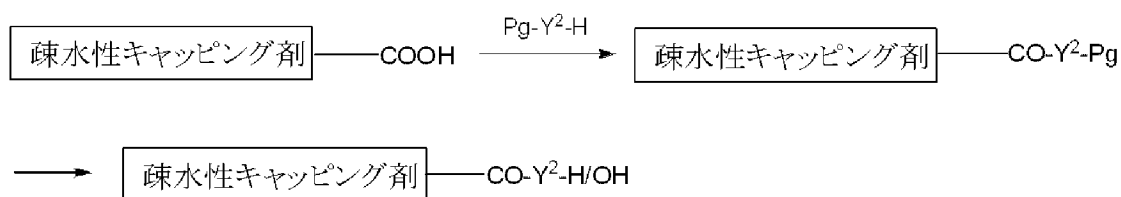
(式中 Y^2 及びPgは前記と同義である)。

すなわち、キャッピング剤上の水酸基を、トリホスゲン等の試薬を用いてクロロ蟻酸化し、次いで塩基の存在下にPg- Y^2 -Hで表される化合物のアミノ基もしくはヒドロキシ基と反応させた後保護基を脱保護する。

リガンドが水酸基を有する場合、リガンドにポリエチレングリコール部分を導入した中間体は、前記と同様の方法で製造できる。

キャッピング剤がカルボキシ基を有する場合、キャッピング剤にポリエチレングリコール部分を導入した中間体は、例えば以下の工程で製造できる：

[0047] [化15]



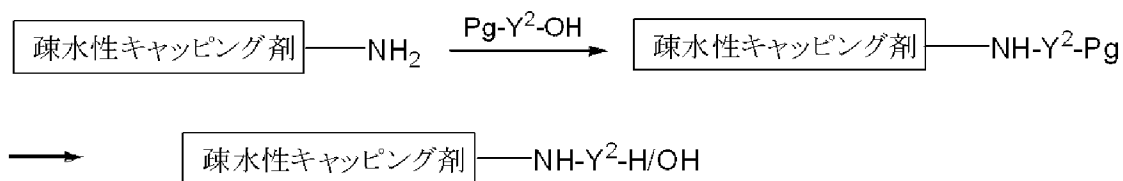
(式中 Y^2 及びPgは前記と同義である)。

すなわち、キャッピング剤を、塩基及びジシクロヘキシルカルボジイミド、WSCDもしくはHATU等の脱水縮合剤の存在下にPg- Y^2 -Hで表される化合物のアミノ基もしくはヒドロキシ基と、反応させた後、保護基を脱保護する。

リガンドがカルボキシ基を有する場合、リガンドにポリエチレングリコール部分を導入した中間体は前記と同様の方法で製造できる。

キャッピング剤がアミノ基を有する場合、キャッピング剤にポリエチレングリコール部分を導入した中間体は、例えば以下の工程で製造できる：

[0048] [化16]



(式中 Y^2 及びPgは前記と同義である)。

すなわち、キャッピング剤を、塩基及びジシクロヘキシルカルボジイミド、WSCDもしくはHATU等の脱水縮合剤の存在下にPg- Y^2 -OHで表される化合物の力

ルボキシ基と反応させた後、保護基を脱保護する。

リガンドがアミノ基を有する場合、リガンドにポリエチレングリコール部分を導入した中間体は前記と同様の方法で製造できる。

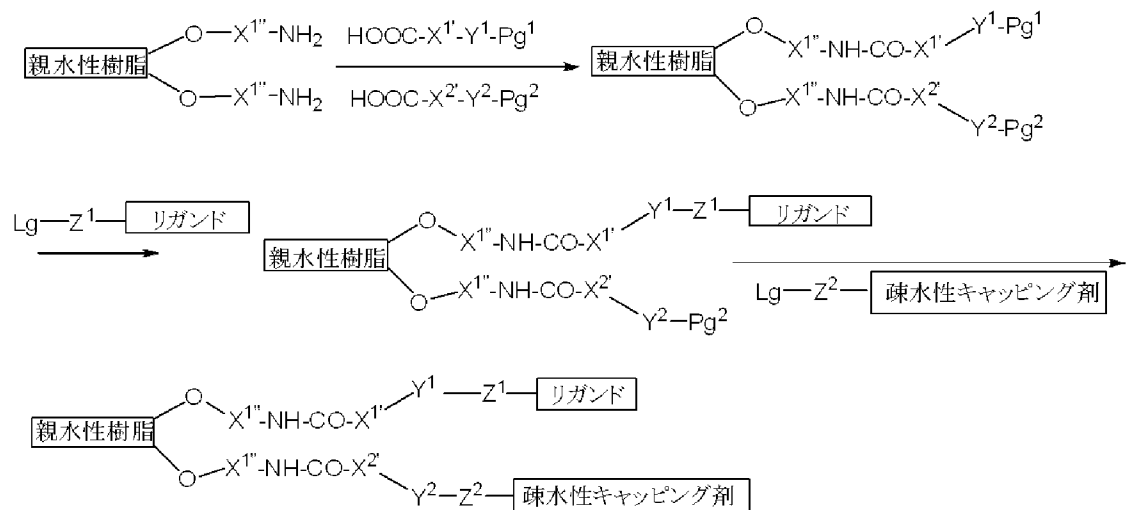
尚、上記製造方法 3 に記載された、アミド化（エステル化）反応及び脱保護反応を適宜繰り返すことにより、より高分子量のポリエチレングリコール部分を導入することができる。

[0049] [製造方法 4]

本発明の固相担体は、担体にポリエチレングリコール部分を導入した後、キャッピング剤及びリガンドを固定化することもできる。例えば、以下の式

:

[0050] [化17]



（式中、 $\text{X}^{1''}$ 、 $\text{X}^{1'}$ 、 $\text{X}^{2'}$ 、 Y^1 、 Y^2 、 Z^1 、 Z^2 及び Lg は前記と同義であり、 Pg^1 及び Pg^2 は異なる条件で脱保護可能な保護基を表す）

で示される方法で製造できる。

すなわち、上記製造方法 1～3 に記載のアミド化反応及び脱保護反応を行うことにより、ポリエチレングリコール部分を有する固相担体を製造し、これにリガンド及びキャッピング剤を反応させることができる。

また、カルボキシ基を有する担体から出発して、同様の方法で本発明の固相担体を製造することもできる。

[0051] 本発明の別の態様として、本発明の固相担体を用いたリガンド特異的結合

蛋白質の精製方法が挙げられる。

すなわち、本発明は、以下の（a）～（b）の工程を含む、リガンド特異的結合蛋白質の濃縮、単離又は精製方法：

（a）〔1〕に記載の固相担体及び試料を接触させる工程；及び

（b）固相担体から、リガンド特異的結合蛋白質を溶出する工程を包含する。

上記精製方法は、リガンド特異的蛋白質が膜結合型蛋白質である場合に好適である。すなわち、上記精製方法に供される「試料」としては、膜結合型蛋白質を含む試料であれば純度等に限定は無いが、本発明の精製方法は、細胞膜に結合した状態の膜結合型蛋白質を含む試料を精製するために特に有用である。従って試料としては、ヒト、動物由来の生体組織、臓器由来の細胞膜画分を含む試料（粗精製されたものも未精製のものも含む）が挙げられる。

[0052] 以下に本発明の精製方法の各工程について詳細に説明する。

〔工程（a）〕

固相担体と試料は、通常緩衝液（バッファー）中で接触させる。ここで用いられるバッファーとしてはMESバッファー、HEPESバッファー、トリス(Tris)ー塩酸バッファー、MOPSバッファー、リン酸（Phosphate）バッファー等が挙げられる。

上記バッファーのpHは5.0～9.0に調整され、好ましくは6.0～8.0に調整される。

固相担体と接触させる際の試料の濃度としては特に限定は無いが、蛋白質混合物（ライゼート）、すなわち組織、細胞から抽出したタンパク質混合物の場合、0.1mg/ml～10mg/mlが好ましく、更に好ましくは0.5mg/ml～5mg/mlである。

試料及び固相担体を接触させる時間に特に限定はないが、通常10分～24時間接触させることにより、試料中に含まれる膜結合型蛋白質を固相担体に吸着させることができる。また、通常4～37℃下に接触させる。

試料を固相担体に吸着させた後、洗浄バッファーで固相担体を3～20回洗浄する。洗浄バッファーとしては、通常試料を接触させる際に用いたものと同じものを用いる。

[0053] [工程 (b)]

リガンド特異的に結合する膜結合型蛋白質の溶出には、通常高濃度にリガンドを溶解した水溶液やバッファーを用いることができる。適宜1～70%の親水性有機溶媒（アセトニトリルやイソプロパノールが挙げられる）を添加してもよい。また、適宜1%～5%のSDSや、0.1%～10%の界面活性剤（例えばチャップス、チャプソー、オクチルグルコシド、ドデシルマルトシド、トリトン等）を添加してもよい。具体的には、0.1M Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 20% Glycerol, 0.2% BPPB、0.2M DTTからなる組成のバッファーを挙げることができる。

[0054] あるいは、1%～5%のSDSを含む水溶液もしくはバッファーや、0.1%～10%の界面活性剤を含む水溶液を用いて吸着した膜結合型蛋白質を溶出させることもできる。また、8Mウレアや6M塩酸グアニジン等を用いて溶出することも可能である。

溶出液のpHは特に限定は無く、酸性条件（pH2.0～5.0）、アルカリ性条件（pH9.0～11.0）、中性条件（pH5.0～9.0）のいずれでもよい。好ましくは中性条件で溶出される。溶出温度は4℃～95℃である。

溶出された膜結合型蛋白質は、ウェスタンブロッティング等の当業者に公知の方法で検出することができる。すなわち、溶出された蛋白質溶液をSDS-PAGEに付し、PVDF膜等に蛋白質をトランスファーし、抗体等を用いて得られたバンドを解析すればよい。または、溶出された蛋白質溶液をSDS-PAGEに付し、目的のバンドを切りだし、解析すればよい。具体的には、目的のバンドをゲルから切り出し、インゲルトリプシン消化法にて得られるペプチドを質量スペクトル法にて解析することができる。

あるいは、樹脂に結合している状態の蛋白質を溶出することなくトリプシ

ン等の消化酵素で処理し、得られるペプチド断片を含む溶液を質量スペクトル解析することもできる。

[0055] また、本発明の別の態様として、本発明の固相担体は、ターゲット蛋白質に特異的に結合するリガンド化合物を探索するために用いることができる。すなわち、特定の膜タンパク質、当該タンパク質に特異的に結合する公知リガンドを有する本発明の固相担体及び被験物質を接触させ、当該被験物質が当該タンパク質と公知リガンドとの特異的結合を拮抗するか否かを調べることにより、当該被験物質が当該タンパク質に特異的に結合するリガンドか否かを評価することができる。具体的には、以下の（a）～（b）の工程でターゲット蛋白質の特異的リガンドを同定することができる：

（a）ターゲットタンパク質に特異的に結合する公知のリガンドを有する〔1〕に記載の固相担体、ターゲットタンパク質、及び被験物質を接触させる工程；

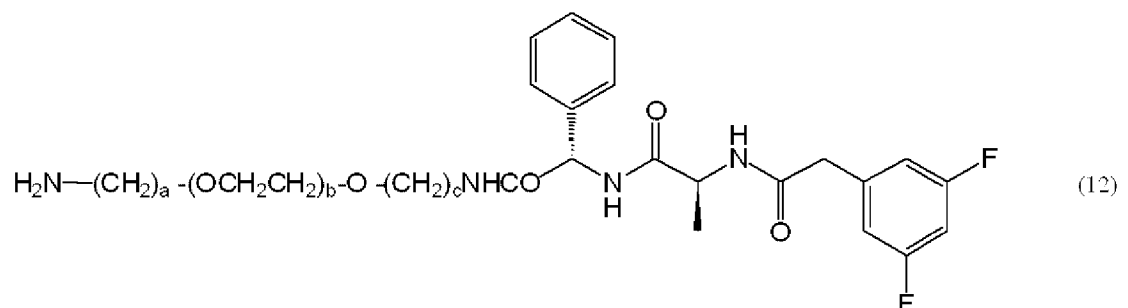
（b）前記固相担体から、ターゲット蛋白質を溶出する工程；

（c）溶出されたターゲット蛋白質を検出する工程；及び

（d）（c）の検出結果に基づき、ターゲット蛋白質の検出量が小さい被験物質をターゲット蛋白質特異的リガンドであると判定する工程を包含する。

[0056] また、本発明の別の態様として、式（12）：

[0057] [化18]



（a、b及びcは、式（3）と同義である）

で表わされる化合物またはその塩が挙げられる。当該化合物またはその塩は、γ-セクレターゼを精製するためのアフィニティークロマトグラフィー用

固相担体の製造中間体として有用である。すなわち式（１２）で表わされる化合物又はその塩は、 γ -セクレターゼのリガンドとする本発明の固相担体を製造するためのスペーサーを導入した化合物に相当する。

前記塩は、当業者に周知の塩であれば特に限定は無く、有機酸塩又は無機酸塩が用いられる。具体的には塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩等を例示することができる。

式（１２）で表わされる化合物は、実施例１に記載の方法に準じて製造することができる。

[0058] 以下に、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明は必ずしもこれらに限定されるものではない。

尚、本明細書で用いられる略号は以下のとおりである：

iPr₂NEt：ジイソプロピルエチルアミン

AcOEt：酢酸エチル

DMF：ジメチルホルムアミド

WSCD：水溶性カルボジイミド（１-エチルー３-（３'-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド）

HOBt：N-ヒドロキシベンゾトリアゾール

Boc：tert-ブトキシカルボニル

DAPT：N-[N-(3,5-ジフルオロフェニルアセチル)-L-アラニル]-S-フェニルグリシン-t-ブチルエステル

HATU：2-(1H-7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロフォスフェート メタナミニウム（2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl uronium hexafluorophosphate Methanaminium）

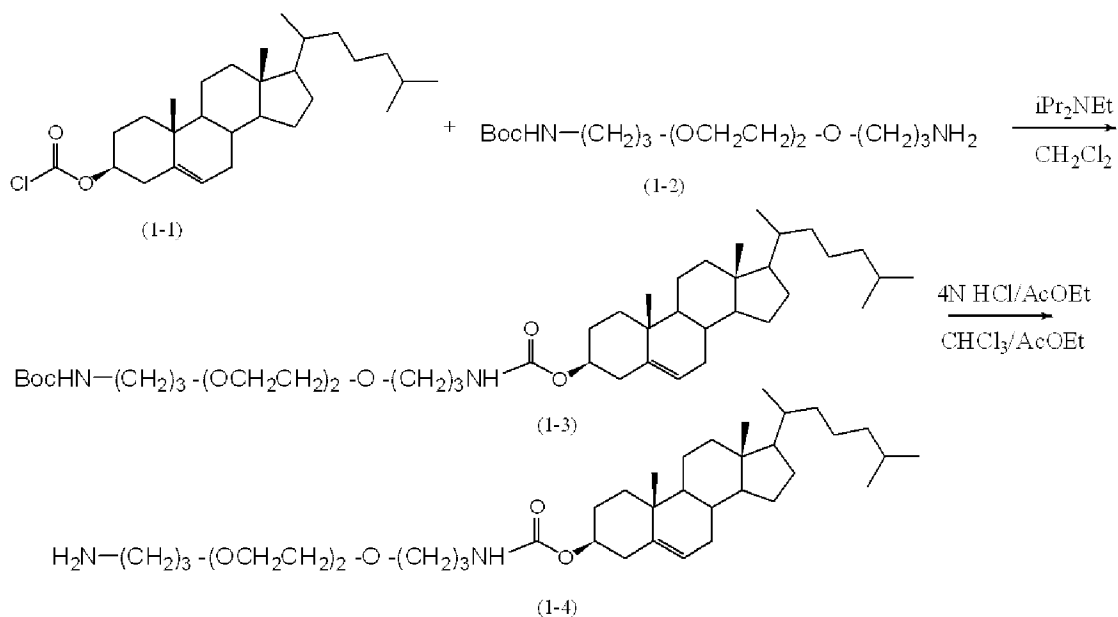
実施例

[0059] 実施例 1

[0060] （１）コレステロール-PEG(1)-NH₂（１-４）の合成

[0061]

[化19]



クロロギ酸コレステロール（１－１）（東京化成、Cat. no. C0694；637mg，1.42mmol）をジクロロメタン60m lに溶かし、氷冷下撹拌した。Mono-N-t-Boc-amido-dPEG3TM-amine（１－２）（QUANTA BIODESIGN製；500mg, 1.56mmol）をジクロロメタン1m lに溶かし、ゆっくりと滴下した。ジイソプロピルエチルアミン（494μ l，2.84mmol）を加え、室温にて一昼夜撹拌した。減圧濃縮後、酢酸エチル200m lを加えた。酢酸エチル層を水100m l、飽和食塩水にて洗浄した。無水硫酸マグネシウムにて乾燥後、減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した。目的のBoc体（１－３）（770mg）を収率74%にて得た。質量分析結果：MS（m/z）：733（MH⁺）。

得られたBoc体（１－３）（770mg，1.05mmol）を酢酸エチル60m lに溶かし、4N-HCl/AcOEt（国産化学製；5m l）を加え、室温にて5時間撹拌した。反応完結後、溶媒を留去し、クロロホルム50m lを加え、減圧下溶媒を留去した。この操作を3回繰り返した。真空ポンプにて溶媒を完全に留去し、目的のアミノ体塩酸塩（１－４）（703mg）を定量的に得た。質量分析結果：MS（m/z）：633（MH⁺）。

以下に、製造した化合物の¹H-NMRデータを示した。

式（１－３）の化合物：

¹H-NMR (CDCl₃) δ 0.67 (s, 3H), 0.86 (d, J=6.6Hz, 3H), 0.87 (d, J=6.6Hz, 3H), 0.91 (d, J=6.4Hz, 3H), 0.94–1.06 (m, 3H), 1.00 (s, 3H), 1.06–1.18 (m, 5H), 1.30–1.40 (m, 3H), 1.40–1.45 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.45–1.60 (m, 7H), 1.76 (m, 4H), 1.84 (m, 1H), 1.86 (m, 2H), 1.94 (m, 1H), 2.00 (m, 2H), 2.27 (br d, J=13.1, 5.1, 1.9Hz, 1H), 2.35 (ddd, J=13.1, 5.1, 1.9Hz, 1H), 3.22 (br t, J=6.1Hz, 2H), 3.27 (m, 2H), 3.51–3.57 (m, 4H), 3.57–3.62 (m, 4H), 3.62–3.66 (m, 4H), 4.48 (m, 1H), 5.36 (m, 1H), 4.95 (br s, 1H), 5.14 (br s, 1H);

HRMS-ESI (m/z): [M+H]⁺calcd. for C₄₃H₇₇O₇N₂, 733.5725; found, 733.5724.

式（１－４）の化合物：

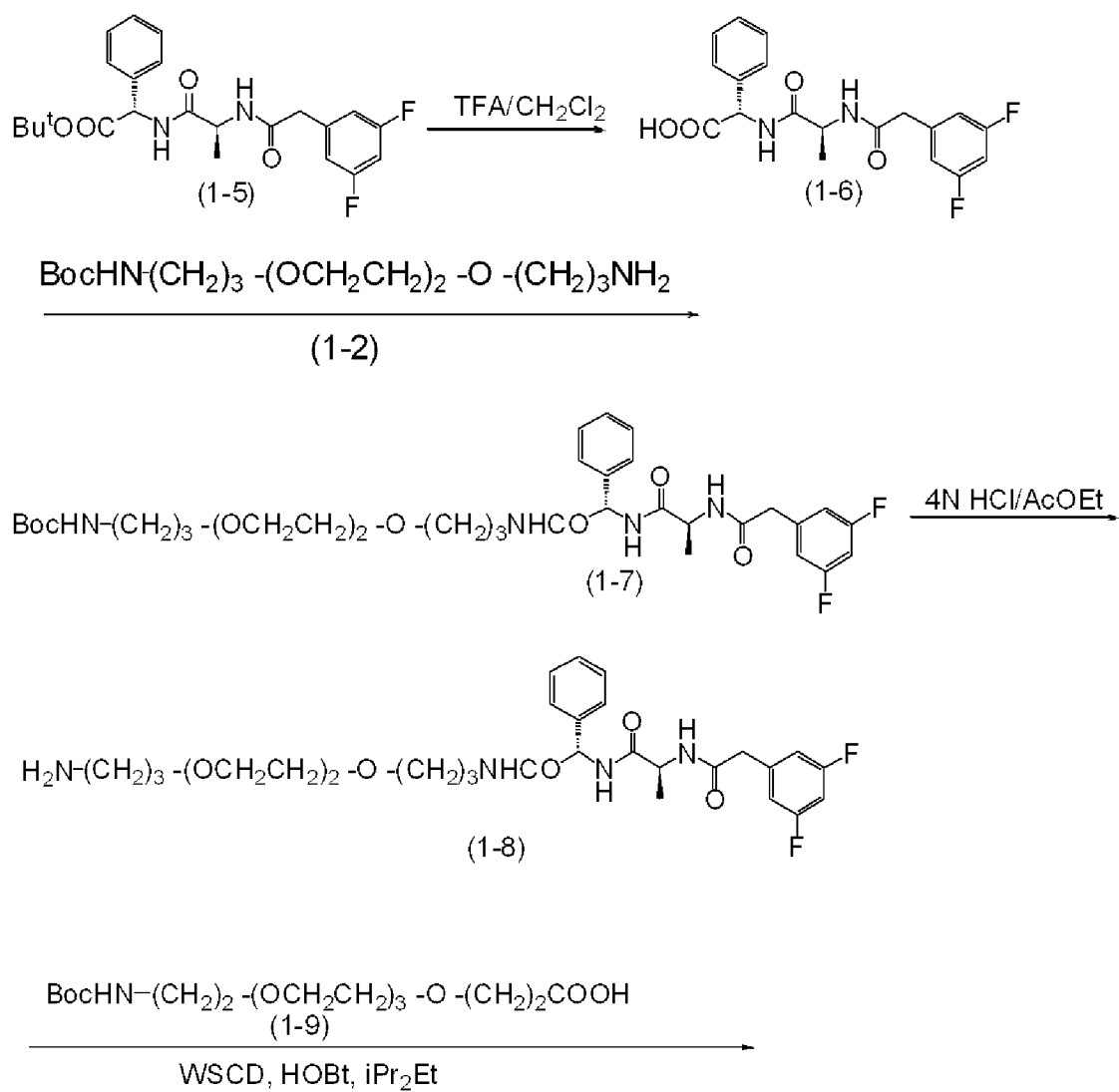
¹H-NMR (CDCl₃) δ 0.67 (s, 3H), 0.86 (d, J=6.6Hz, 3H), 0.87 (d, J=6.6Hz, 3H), 0.88–0.94 (m, 1H), 0.91 (d, J=6.6Hz, 3H), 0.94–1.06 (m, 3H), 1.00 (s, 3H), 1.04–1.20 (m, 5H), 1.20–1.40 (m, 4H), 1.40–1.60 (m, 6H), 1.76–1.90 (m, 4H), 1.80 (m, 2H), 1.92–2.12 (m, 3H), 2.06 (m, 2H), 2.29 (br dd, J=13.1, 2.3Hz, 1H), 2.34 (ddd, J=13.1, 5.2, 1.7Hz, 1H), 3.20–3.30 (m, 4H), 3.58 (m, 2H), 3.64 (m, 6H), 3.73 (m, 4H), 4.44 (m, 1H), 5.35 (m, 1H), 8.05–8.30 (m, 3H);

HRMS-ESI (m/z): [M+H]⁺calcd. for C₃₈H₆₉O₅N₂, 633.5201; found, 633.5192

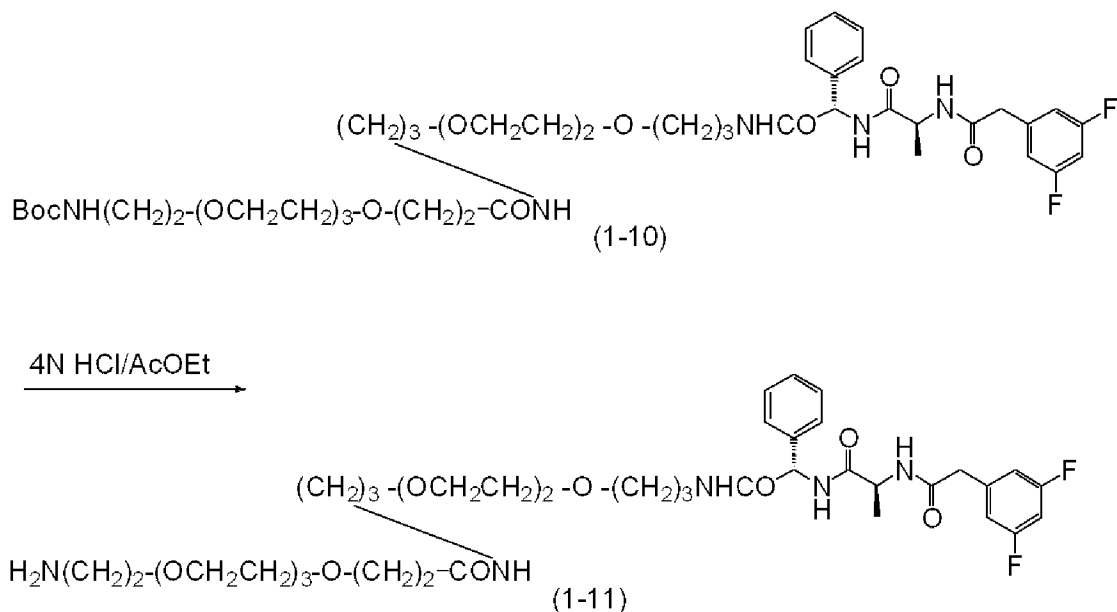
[0062] (２) DAPT-PEG(2)-NH₂ (１－１１) の合成

[0063]

[化20]



[化21]



DAPT (1-5) (5.0 g、11.56mmol) をジクロロメタン 100 ml に溶かし室温にて攪拌した。TFA 10 ml をゆっくりと滴下し、室温にて一昼夜攪拌した。溶媒を留去し、クロロホルム 50 ml を加え、減圧下溶媒を留去した。この操作を 2 回繰り返した。析出した結晶をジエチルエーテルにて洗浄し、結晶を濾取した。減圧下乾燥し、目的のカルボン酸体 (1-6) (4.28g) を 98.4% にて得た。

カルボン酸体 (1-6) (978mg, 2.60mmol) をジクロロメタン 40 ml に溶かし、窒素気流下、4℃にて攪拌した。WSCD (546 μl, 3.12mmol), HOBt (420mg, 3.12mmol) をゆっくりと加え、室温にて 60 分間攪拌した。再度、4℃にて攪拌後、Mono-N-t-Boc-amido-dPEG3TM-amine (QUANTA BIODESIGN; 1.0g, 3.12mmol) をジクロロメタン 2ml に溶かし、ゆっくりと滴下した。ジイソプロピルエチルアミン (542 μl, 3.12mmol) を加え、室温にて 60 分間攪拌した。溶媒を留去後、反応液を酢酸エチル 100 ml に溶かし、水 100 ml、飽和食塩水 100 ml にて洗浄した。無水硫酸マグネシウムにて乾燥後、減圧濃縮した。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、目的の Boc 体 (1-7) (1.14g) を収率 64.6% にて得た。質量分析結果: MS (m/z) : 67

9 (MH⁺)。

得られたBoc体 (1-7) (1.14g, 1.68mmol) を酢酸エチル 50 ml、クロロホルム 50 ml の混合溶媒に溶かし、4M(N)-HCl/AcOEt (国産化学製; 10ml) を加え、室温にて一昼夜攪拌した。反応完結後、溶媒を留去し、クロロホルム 30 ml を加え、減圧下溶媒を留去した。この操作を 3 回繰り返した。真空ポンプにて溶媒を完全に留去し、目的のアミノ体塩酸塩 (1-8) (1.0g) を収率 97% にて得た。質量分析結果: MS (m/z): 579 (MH⁺)。

N-t-Boc-amido-d-PEG4TM-acid (QUANTA BIODESIGN; 715mg, 1.96mmol) (1-9) をジクロロメタン (70ml) 及びクロロホルム (10ml) の混合溶媒に溶かし、窒素気流下 4℃ にて攪拌した。WSCD (343 μl, 1.96mmol), HOBt (264mg, 1.96mmol) をゆっくりと加え、室温にて 60 分間攪拌した。再度、4℃ にて攪拌後、アミノ体塩酸塩 (1-8) (1.0g, 1.63mmol) をジクロロメタン 10 ml、クロロホルム 5 ml の混合溶媒に溶かし、反応系中に滴下した。ジイソプロピルエチルアミン (681 μl, 3.91mmol) を加え、室温にて 60 分間攪拌した。溶媒を留去後、クロロホルム 100 ml を加え、水 50 ml、飽和食塩水 50 ml にて洗浄した。無水硫酸マグネシウムにて乾燥し、減圧濃縮した。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、目的のBoc体 (1-10) (1.07g) を収率 70.9% にて得た。質量分析結果: MS (m/z): 926 (MH⁺)。

得られたBoc体 (1-10) (1.0g, 1.08mmol) をクロロホルム (60ml) - 酢酸エチル (20ml) の混合溶媒に溶かし、4M(N)-HCl/AcOEt (国産化学製; 10ml) を加え、室温にて 1 時間攪拌した。反応完結後、溶媒を留去し、クロロホルム (30ml) を加え、減圧下溶媒を留去した。この操作を 3 回繰り返した。真空ポンプにて溶媒を完全に留去し、目的のアミノ体塩酸塩 (1-11) (931mg) を定量的に得た。質量分析結果: MS (m/z): 826 (MH⁺)。

尚原料となる DAPT は、公知化合物であり、J. Neurochem. 2001, 76, p17

3、Org. Biomol. Chem., 2005, 3, p2450-2457、及びBioorganic & Medicinal Chemistry Letters., 2004, 14, p1983-1985に記載の方法で製造できる。
また、市販品（シグマ社、Cat. No. D5942）を入手することもできる。

以下に、製造した化合物の¹H-NMRデータを示した。

式（1-7）の化合物：

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 1.21 (d, J=7.1Hz, 3H), 1.36 (s, 9H), 1.52-1.62 (m, 4H), 2.94 (q, J=6.6Hz, 2H), 3.07 (m, 2H), 3.26-3.54 (m, 14H), 4.40 (quin, J=7.1Hz, 1H), 5.35 (d, J=8.1Hz, 1H), 6.73 (br t, J=6.6Hz, 1H), 6.92-7.00 (m, 1H), 7.06 (tt, J=9.5, 2.4Hz, 1H), 7.22-7.36 (m, 5H), 8.19 (t, J=5.6Hz, 1H), 8.35 (d, J=7.1Hz, 1H), 8.38 (d, J=8.1Hz, 1H);
HRMS-ESI (m/z): [M+H]⁺calcd. for C₃₄H₄₉O₈N₄F₂, 679.3513; found, 679.3519

式（1-8）の化合物：

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 1.22 (d, J=7.1Hz, 3H), 1.58 (quin, J=6.7Hz, 2H), 1.76 (quin, J=6.7Hz, 2H), 2.83 (t, J=6.7Hz, 2H), 3.08 (m, 2H), 3.30 (t, J=6.7Hz, 2H), 3.38-3.54 (m, 12H), 4.40 (quin, J=7.1Hz, 1H), 5.36 (d, J=7.8Hz, 1H), 6.94-7.00 (m, 2H), 7.07 (tt, J=9.4, 2.4Hz, 1H), 7.22-7.38 (m, 5H), 7.69 (br s, 2H), 8.23 (t, J=5.6Hz, 1H), 8.381 (d, J=7.8Hz, 1H), 8.383 (d, J=7.1Hz, 1H);
HRMS-ESI (m/z): [M+H]⁺calcd. for C₂₉H₄₁O₈N₄F₂, 579.2989; found, 579.2983

式(1-10)の化合物：

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 1.22 (d, J=7.2Hz, 3H), 1.37 (s, 9H), 1.54-1.64 (m, 4H), 2.28 (t, J=6.5Hz, 2H), 3.02-3.10 (m, 10H), 3.26-3.54 (m, 28H), 3.57 (t, J=6.5Hz, 2H), 4.41 (quin, J=7.2Hz, 1H), 5.36 (d, J=7.8Hz, 1H), 6.74 (t, J=5.4Hz, 1H), 6.85-7.00 (m, 2H), 7.07 (tt, J=9.5, 2.4Hz, 1H), 7.20-7.40 (m, 5H), 7.78 (t, J=5.6Hz, 1H), 8.21 (t, J=5.6Hz, 1H), 8.36 (d, J=7.2Hz, 1H), 8.39 (d, J=7.8Hz, 1H);
HRMS-ESI (m/z): [M+H]⁺calcd. for C₄₅H₇₀O₁₃N₅F₂, 926.4933; found, 926.4945

式(1-11)の化合物：

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 1.22 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 1.52–1.64 (m, 4H), 2.29 (t, $J=6.5\text{Hz}$, 2H), 2.97 (q, $J=5.5\text{Hz}$, 2H), 3.02–3.12 (m, 4H), 3.26–3.62 (m, 30H), 4.40 (quin, $J=7.1\text{Hz}$, 1H), 5.36 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 6.94–7.00 (m, 2H), 7.07 (tt, $J=9.5, 2.4\text{Hz}$, 1H), 7.22–7.38 (m, 5H), 7.77 (br s, 2H), 7.82 (t, $J=6.5\text{Hz}$, 1H), 8.22 (t, $J=5.5\text{Hz}$, 1H), 8.37 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 1H), 8.38 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H);

HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{40}\text{H}_{62}\text{O}_{11}\text{N}_5\text{F}_2$, 826.4408; found, 826.4414

式(1-7)の化合物の製造例（別法）

カルボン酸体（1-6）（587mg, 1.56mmol）Mono-N-t-Boc-amido-dPEG3TM-amine（QUANTA BIODESIGN; 500mg, 1.56mmol）をDMF10ml に溶かし、ジイソプロピルエチルアミン（300 μl , 1.72mmol）を加え、氷冷下攪拌した。HATU（渡辺化学工業, Cat, no, A01695; 652mg, 1.72mmol）を加え氷冷下3時間攪拌した。クロロホルム150mlを加え、有機層を水100mlにて2回、飽和食塩水100mlにて洗浄した。無水硫酸マグネシウムにて乾燥後、減圧濃縮した。

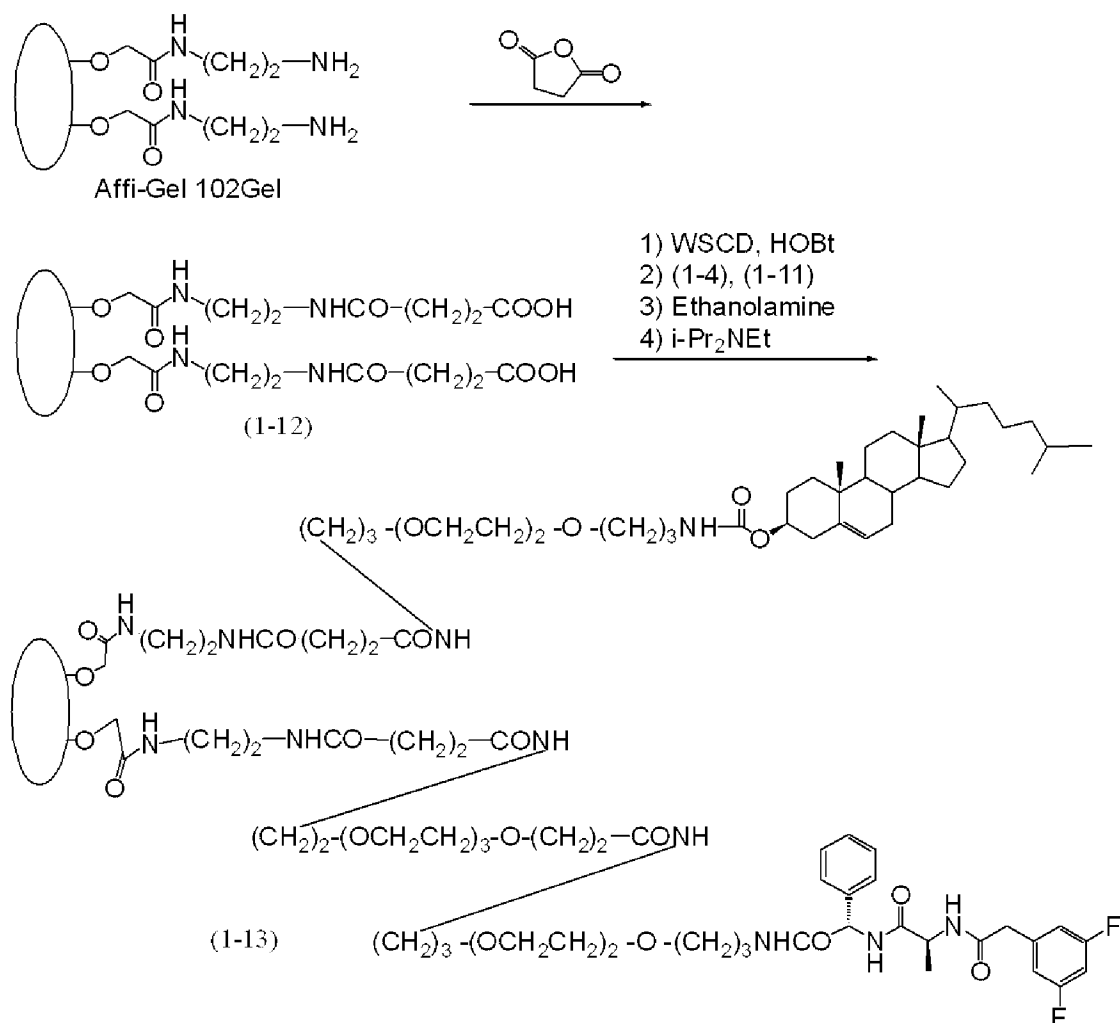
シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、目的のBoc体（1-7）（656mg）を収率62%にて得た。

同様に、縮合剤としてWSCD及びHOBtのかわりにHATUを用いて、式（1-10）、式（1-13）、式（1-14）、式（1-19）、式（1-20）、式（1-21）、式（1-22）、式（6-3）、式（6-4）及び式（9-1）化合物を合成することができる。

[0064] （3）Affi-gelの修飾（DAPT-PEG(2)+Chole-PEG(1)）

[0065]

[化22]



Affi-Gel 102Gel (BIO-RAD, cat. No; 153-2401) 12ml (144 μ mol) をDMFにて置換し、無水コハク酸 (28.8mg, 288mol)、iPr₂NEt (75 μ mol, 432 μ mol)を加え、室温にて一昼夜攪拌した。樹脂をDMFにて洗浄後、ニンヒドリンテストを行い、定量的に目的のカルボン酸体 (1-12) (144 μ mol) が得られたのを確認した。引き続き、樹脂を20%無水酢酸DMF溶液にて30分間室温で攪拌した。得られたカルボン酸樹脂 (1-12) (36 μ mol) にDMF 10mlを加え、WSCD (7.5 μ l, 43.2 μ mol), HOBT (5.8mg, 43.2 μ mol)を加え室温にて30分間攪拌した。化合物 (1-11) (18.6mg, 21.6 μ mol), 化合物 (1-4) (7.2mg, 10.8 μ mol), エタノールアミン (0.22mg, 3.6 μ mol), iPr₂NEt (15 μ l, 86.4 μ mol)を加え、室温にて一昼夜攪拌した。樹脂をDMFにて洗浄後、引き続き20%エタノール水溶液にて洗浄し、目的の固相担体: DAPT-PE

G(2)+コレステロール-PEG(1) (1-13) を得た。

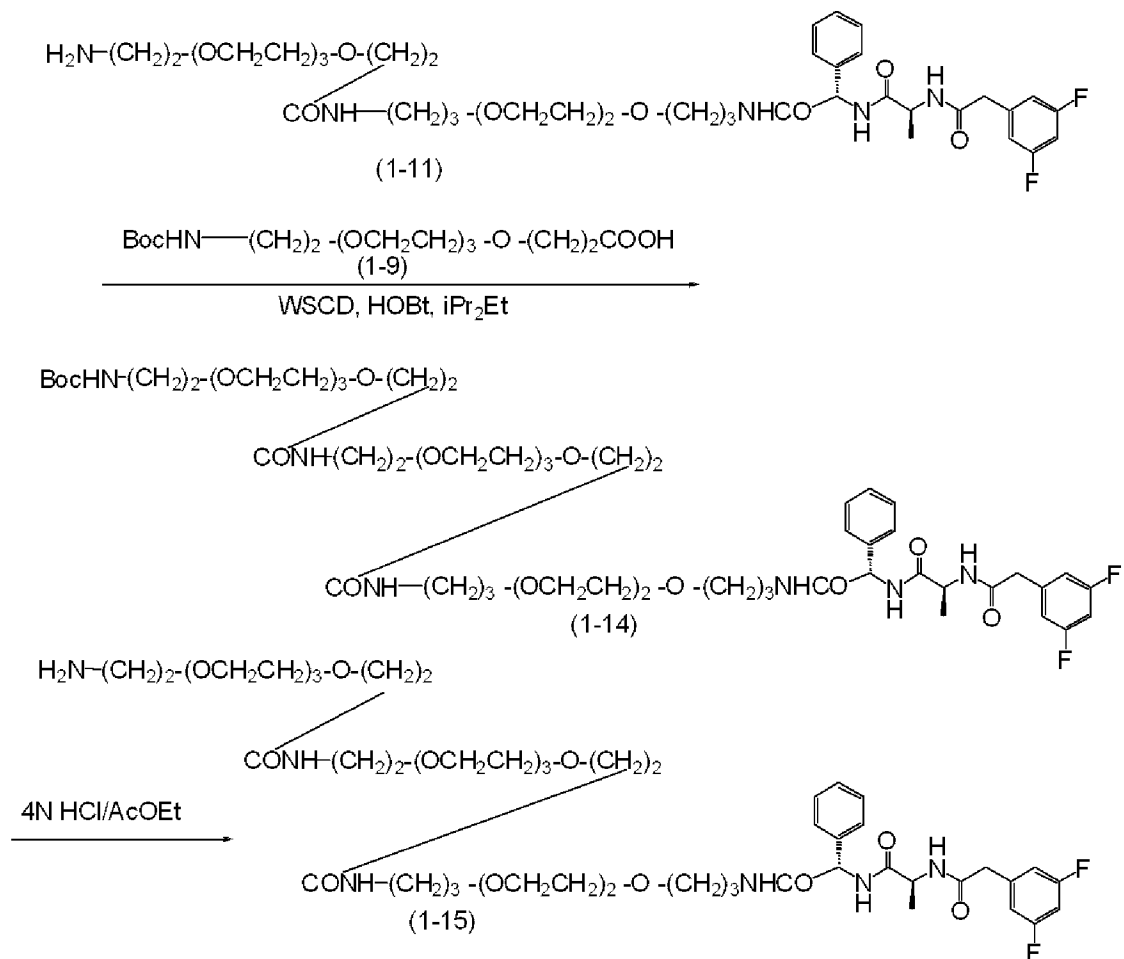
樹脂に結合しない化合物 (1-11), 化合物 (1-4) を、HPLC を用い定量した結果、樹脂上のカルボン酸官能基に対して (1-11) が 57%, (1-12) が 30% 固定化された樹脂: DAPT-PEG(2)+コレステロール-PEG(1) (1-13) を得た。

尚、リガンドもしくは疎水性キャッピング剤の固定化率が異なる固相担体は、目的とする固定化率を達成するために理論的に必要なモル比に応じたりリガンドもしくは疎水性キャッピング剤を原料として反応させることにより、製造した。

[0066] 実施例 2

(1) DAPT-PEG(3)-NH₂ (1-15) の合成

[0067] [化23]



N-t-Boc-amido-d-PEG4TM-acid (化合物 (1-9)、QUANTA BIODESIGN, ;12

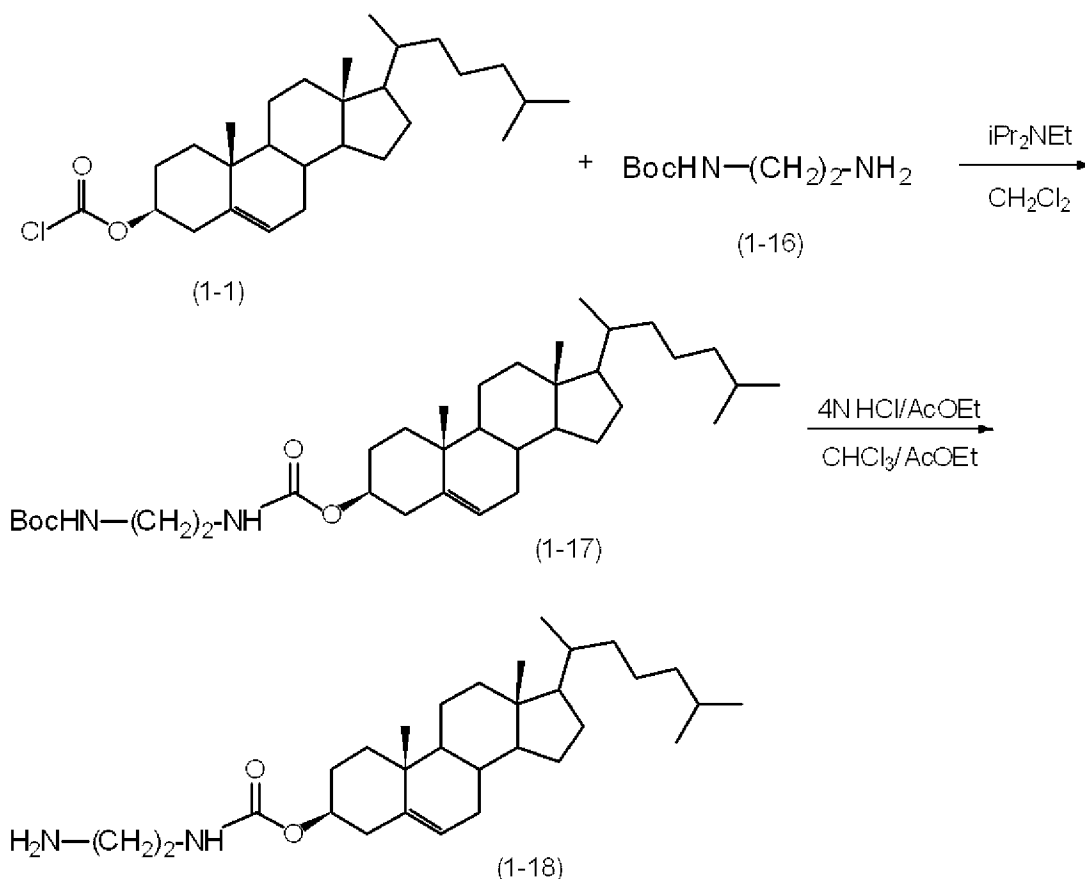
7mg, 0.348mmol) をジクロロメタン 10 ml、クロロホルム 4 ml の混合溶媒に溶かし、窒素気流下 4℃にて攪拌した。WSCD (343 μ l, 1.96mmol), HOBt (264mg, 1.96mmol) をゆっくりと加え、室温にて 60 分間攪拌した。再度、4℃にて攪拌後、上記で得られたアミノ体塩酸塩 (1-11) (250mg, 0.29mmol) ジクロロメタン 1 ml, クロロホルム 2.5 ml の混合溶媒に溶かし、反応系中に滴下した。ジイソプロピルエチルアミン (121 μ l, 0.696mmol) を加え、室温にて 1 昼夜攪拌した。

溶媒を留去後、クロロホルム 100 ml を加え、水 50 ml、飽和食塩水 50 ml にて洗浄した。無水硫酸マグネシウムにて乾燥し、減圧濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、目的の Boc 体 (1-14) (150mg) を収率 44% にて得た。質量分析結果: MS (m/z): 1173 (MH⁺)。得られた Boc 体 (1-14) (150mg, 0.128mmol) をクロロホルム 10 ml - 酢酸エチル 2 ml の混合溶媒に溶かし、4M (N)-HCl/AcOEt (国産化学製; 2ml) を加え、室温にて 2 時間攪拌した。反応完結後、溶媒を留去し、クロロホルム 30 ml を加え、減圧下溶媒を留去した。この操作を 3 回繰り返した。真空ポンプにて溶媒を完全にとばし、目的のアミノ体塩酸塩 (1-15) (123mg) を定量的に得た。質量分析結果: MS (m/z): 1073 (MH⁺)。

[0068] (2) コレステロール-PEG(0)-NH₂ (1-18) の合成

[0069]

[化24]



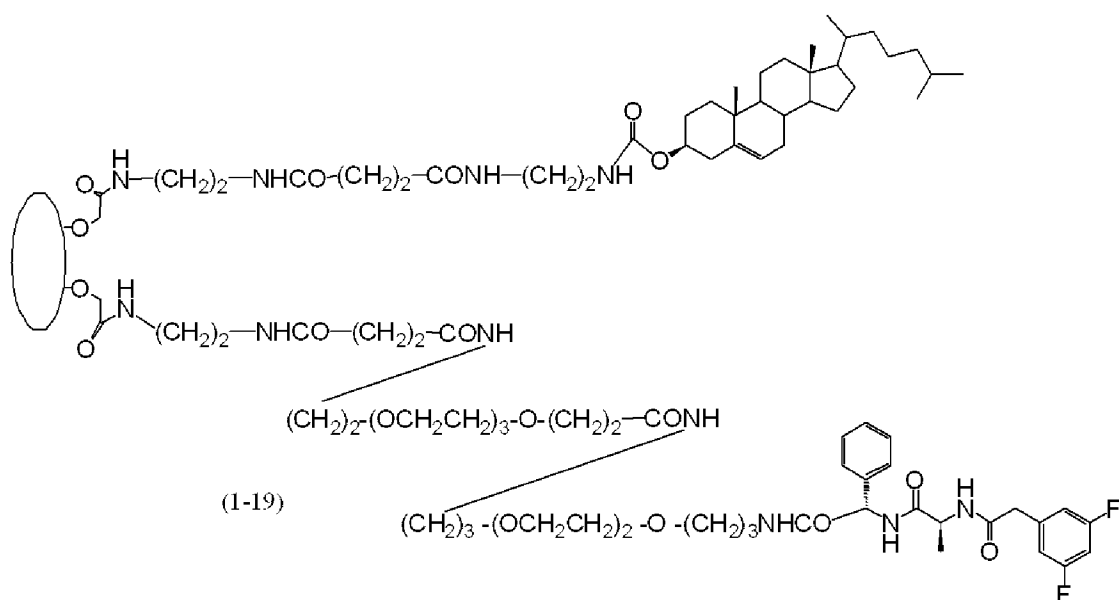
クロロギ酸コレステロール（１－１）（東京化成；637mg, 1.42mmol）をジクロロメタン60m lに溶かし、氷冷下攪拌した。N-(2-アミノエチル)カルバミン酸tert-ブチル（東京化成；250mg, 1.56mmol）をジクロロメタン1m lに溶かし、ゆっくりと滴下した。ジイソプロピルエチルアミン（494μl, 2.84mmol）を加え、室温にて一昼夜攪拌した。減圧濃縮後、酢酸エチル200m lを加えた。酢酸エチル層を水100m l、飽和食塩水にて洗浄した。無水硫酸マグネシウムにて乾燥後、減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した。目的のBoc体（１－１７）（645mg, 1.12mmol）を収率79%にて得た。質量分析結果：MS（m/z）：595（M+Na）。

得られたBoc体（１－１７）（645mg, 1.12mmol）を酢酸エチル10m lークロロホルム30m lの混合溶媒に溶かし、4M（N）-HCl/AcOEt（国産化学製；3ml）を加え、室温にて3時間攪拌した。反応完結後、結晶を濾取し、結晶をクロロホルム2m lにて洗浄した。減圧下乾燥し、目的のアミノ体塩酸塩

(1-18) (570mg) を定量的に得た。質量分析結果: MS (m/z): 473 (MH^+)。

化合物 (1-13) を得た同様の方法で、化合物 (1-4)、(1-15)、(1-11)、(1-18) を組み合わせることによりポリエチレングリコール部分の長さの異なるアフィニティー樹脂 (1-19) (DAPT-PEG(2)+Chole-PEG(0)):

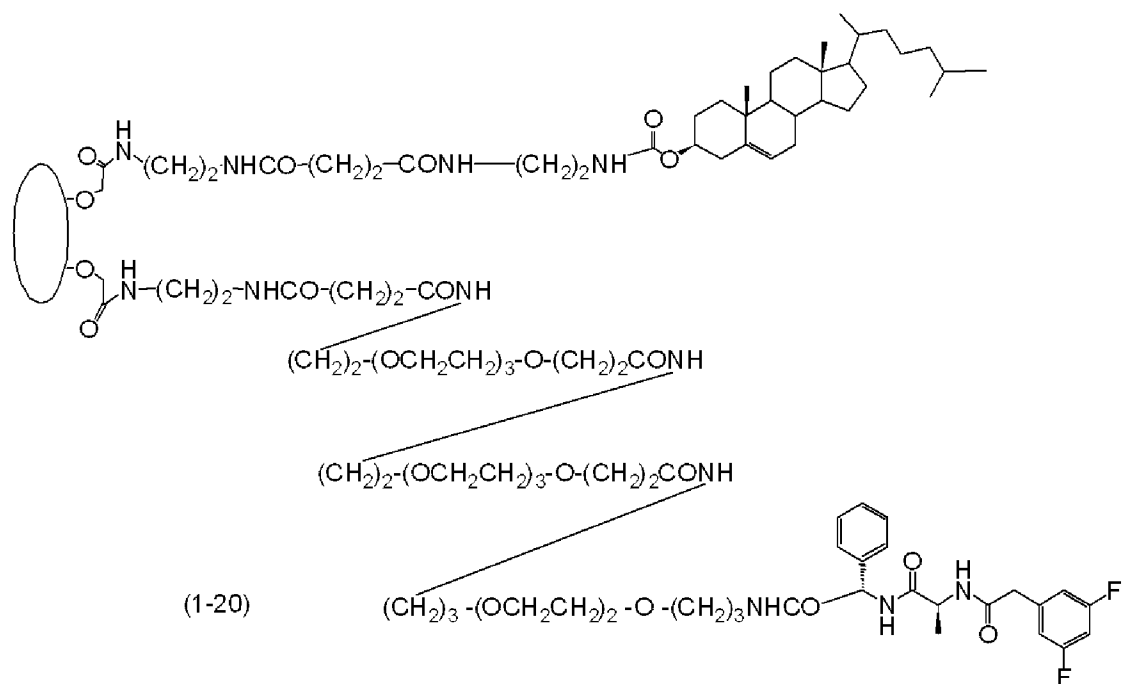
[0070] [化25]



、式 (1-20) (DAPT-PEG(3)+Chole-PEG(0)):

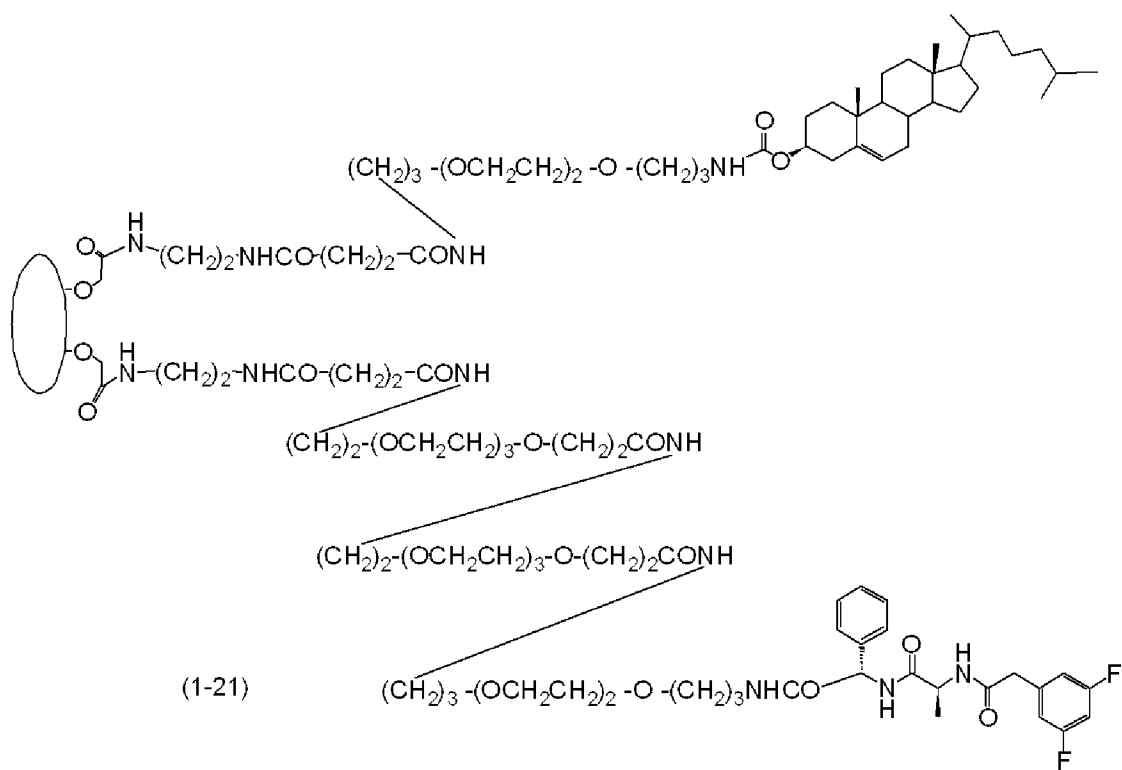
[0071]

[化26]



及び式 (1 - 2 1) (DAPT-PEG (3)+Chole-PEG (1)) :

[0072] [化27]



を合成した。

[0073] 実施例 3

(1) ラット脳抽出物の作成

i) ラット全脳 (2g) を、20 ml のバッファーA (subcellular buffer A) (20mM Hepes pH7.5, 50mM KCl, 2mM EGTA+proteaseinhibitor) 中でホモジナイズした。

ii) 遠心分離した (回転数1000 x g, 10分間)

iii) ii) で得られた上清を更に遠心分離した (回転数10,000 x g, 15分間)

iv) iii) で得られた上清を更に遠心分離し (回転数100,000 x g, 60分間)、ペレットを得た (0.26g)。

v) 得られたペレット (0.26g) に、1%チャプソー入りバッファーA (1% CHAPS0/buffer A ; 2.6ml) を加えて懸濁し、氷冷下に60分間インキュベートした。4℃下に遠心分離 (回転数100,000 x g, 30分間) し、2.6 ml のbuffer Aを加え、最終濃度が0.5%CHAPS0となるように調製した。

(2) 結合実験

実施例1で調製したアフィニティー樹脂 (1-13) (4.8 μmol 相当) を正確にはかり取り、(1) で得られたラット脳ライゼート (200 μl) と示された結合条件 (温度・時間) で結合実験を実施した。拮抗 (+) はあらかじめLysateに100 mM DAPT 0.2 μl 加え (最終濃度 100 μM)、各実験温度にて30分間インキュベーションした後、結合実験に用いた。結合実験終了後、樹脂を12,000 x gにて遠心分離し、上澄みを捨て、残された樹脂をbufferB

(20mM Hepse pH7.5, 50mM KCl, 2mM EGTA+ protease inhibitor, 0.5%CHAPS0) 800 μl にて3回 (15分 x 3) 洗浄した。樹脂にSDS用ローディングバッファー (nakalai cat. No; 30566-22, 2-ME (2-メルカプトエタノール) 含有電気泳動サンプルバッファー溶液 (2 x)) 40 μl を加え、90℃にて3分間インキュベーションした。こうして得られたサンプル液を市販のSDSゲル (BioRad ready Gel J, 5-20%SDS, cat. No; 161-J371V) で分離し、そのSDSゲルを解析した。

[0074] (3) ウェスタンブロッティング

SDS-PAGEによって分離した蛋白質をPVDF Membrane Filter Paper Sandwich 0.2um Pore Size, 20/pk. (invitrogen cat. No: LG2002)へトランスファーした。PVDF膜をトレーに移し、ブロッキング剤であるBlocking One (nakalai) を50ml加え、室温にて1時間振とうした。TBS-Tにて3回洗浄した(10分×3)。1次抗体をCan Get Signal Solution 1 (TOYOBO, cat. No: NKB-101)にて希釈し、室温にて1時間振とうした。TBS-Tにて3回洗浄した(10分×3)。2次抗体をCan Get Signal Solution 2 (TOYOBO, cat. No: NKB-101)にて希釈し、室温にて1時間インキュベーションした。TBS-Tにて3回洗浄した(10分×3)。検出試薬はECL Plus western Blotting Detection System (GE Healthcare cat. No: RPN2132)を用いて行った。検出装置としてルミノ・イメージアナライザーLAS-1000(富士フィルム)を用いて検出した。

その結果、脳抽出物にあらかじめγ-セクレターゼ阻害剤であるDAPTを添加しなかった場合はγ-セクレターゼ(ニカストリン(Nct), プレセニリン1(PS1-NTF, PS1-CTF), アフー1(Aph-1), ペン-2(Pen-2)のコンプレックス体)と結合するが、脳抽出物に拮抗剤であるDAPTをあらかじめ添加した場合にはNct, PS1, Aph-1, Pen-2のバンドが検出されなかった。バンドの消失からこれら4つの構成成分がコンプレックス体としてDAPTに特異的に結合していることがわかった。従って、式(1-13)の固相担体とγ-セクレターゼの構成成分との結合は、DAPTにより拮抗される特異的なものであることがわかった。

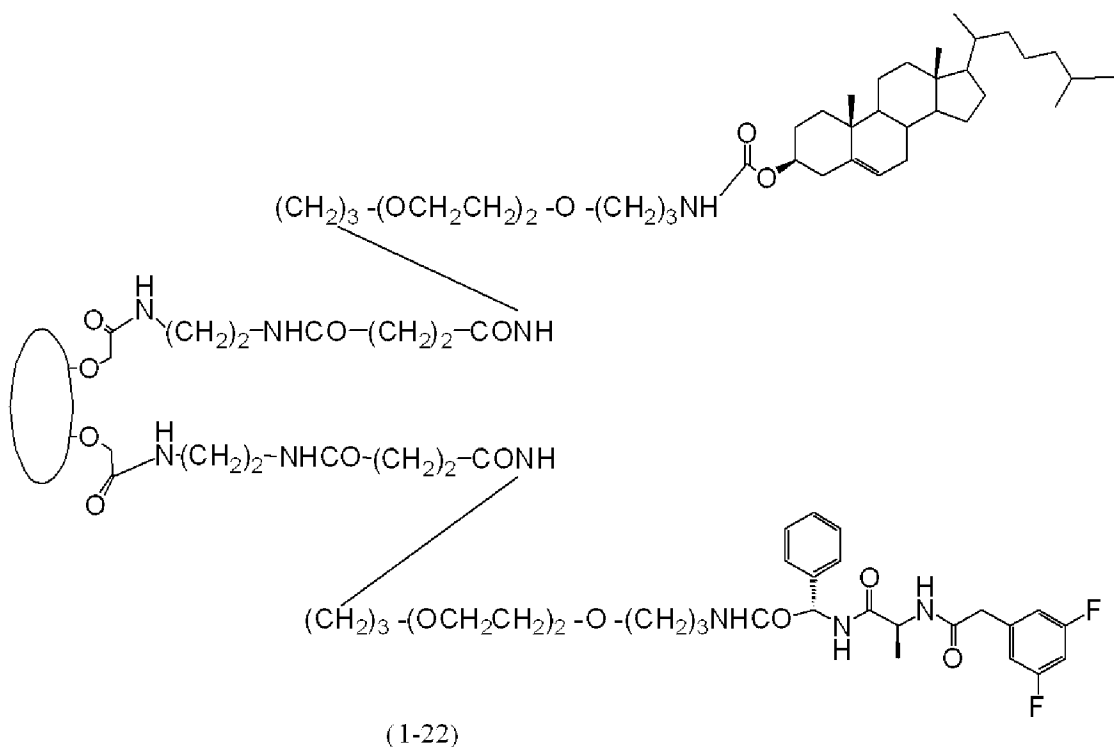
[0075] 実施例 4

実施例 1 と同様の方法で、以下の式(1-22)で表される固相担体(DAPT-(PEG)1-Chol(PEG1))を製造した。

式(1-22) :

[0076]

[化28]



Affi-Gel 102Gel (BIO-RAD, cat. No: 153-2401) 12ml (144 μ mol) をDMFにて置換し、無水コハク酸 (28.8mg, 288 μ mol)、 $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (75 μ l, 432 μ mol) を加え、室温にて一昼夜攪拌した。樹脂をDMFにて洗浄後、ニンヒドリンテストを行い、定量的に目的のカルボン酸体 (1-12) が得られたのを確認した。引き続き、樹脂を20%無水酢酸DMF溶液にて30分間室温で攪拌した。得られたカルボン酸樹脂 (1-12) (36 μ mol) にDMF 10ml を加え、WSCD (7.5 μ l, 43.2 μ mol), HOBt (5.8mg, 43.2 μ mol) を加え室温にて30分間攪拌した。化合物 (1-8) (21.6 μ mol), 化合物 (1-4) (7.2mg, 10.8 μ mol), エタノールアミン (0.22mg, 3.6 μ mol), $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (15 μ l, 86.4 μ mol) を加え、室温にて一昼夜攪拌した。樹脂をDMFにて洗浄後、引き続き20%エタノール水溶液にて洗浄し、目的の固相担体: DAPT-PEG(1)+コレステロール-PEG(1) (式 (1-22)) を得た。

[0077] 実施例 5

実施例 1 で得られた式 (1-13) で表される固相担体についてアフィニティークロマトグラフィー用樹脂として γ -セクレターゼを特異的に結合す

るか否かを調べた。すなわち、D A P Tの固定化率が10%、30%、60%と異なる3種類の固相担体について、結合実験、S D S - P A G E、ウエスタンブロッティング実験により得られるバンドを解析した。

実施例1で調製したアフィニティー樹脂(1-13)(4.8 μ mol相当)を正確にはかり取り、実施例3と同様の方法で得られたラット脳ライゼート(200 μ l)と示された結合条件(温度・時間)で結合実験を実施した。結合実験終了後、樹脂を12,000 $\times$ gにて遠心分離し、上澄みを捨て、残された樹脂をbufferB(20mM Hepse pH7.5, 50mM KCl, 2mM EGTA+ protease inhibitor, 0.5%CHAPS)800 μ lにて3回(15分 $\times$ 3)洗浄した。樹脂にSDS用ローディングバッファー(nakalai cat. No: 30566-22, 2-ME(2-メルカプトエタノール)含有電気泳動サンプルバッファー溶液(2 $\times$))40 μ lを加え、90 $^{\circ}$ Cにて3分間インキュベーションした。こうして得られたサンプル液を市販のSDSゲル(BioRad ready Gel J, 5-20%SDS, cat. No: 161-J371V)で分離した。

ウエスタンブロッティング

SDS-PAGEによって分離した蛋白質をPVDF Membrane Filter Paper Sandwich 0.2 μ m Pore Size, 20/pk. (invitrogen cat. No: LC2002)へトランスファーした。PVDF膜をトレイに移し、ブロッキング剤であるBlocking One (nakalai)を50ml加え、室温にて1時間振とうした。TBS-Tにて3回洗浄した(10分 $\times$ 3)。1次抗体をCan Get Signal Solution 1 (TOYOB0, cat. No: NKB-101)にて希釈し、室温にて1時間振とうした。TBS-Tにて3回洗浄した(10分 $\times$ 3)。2次抗体をCan Get Signal Solution 2 (TOYOB0, cat. No: NKB-101)にて希釈し、室温にて1時間インキュベーションした。TBS-Tにて3回洗浄した(10分 $\times$ 3)。検出試薬はECL Plus western Blotting Detection System (GE Healthcare cat. No: RPN2132)を用いて行った。検出装置としてルミノ・イメージアナライザーLAS-1000(富士フィルム)を用いて検出した。

結果を図2に示す。

図2に示すとおり、アフィゲル102ゲル上のアミノ基を無水コハク酸で

処理することで得られるカルボン酸樹脂（１－１２）上のカルボキシル基に対し、１０％～１００％でＤＡＰＴがポリエチレングリコールを介して固定化されている固相担体（レーン１－４）、及び樹脂上のカルボキシル基（１－１２）に対し、３０％でコレステロールが固定化されている固相担体（レーン８）にはγ-セクレターゼが全く結合できないのに対して、樹脂上のカルボキシル基（１－１２）に対し、１０～６０％にポリエチレングリコールを介してＤＡＰＴが固定化され、かつ３０％にコレステロールが固定化されている固相担体（レーン５－７）にはγ-セクレターゼの４種類の構成成分が結合した。

また、式（１－１３）で表される固相担体が、サンプル中に存在する多量の蛋白質を非特異的に吸着するものでないことを確認した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ後、ゲルを１０％酢酸４０％メタノール水溶液中で３０分間振とうし、溶液を除いた後、ＣＢＢ染色液（ナカライテスク製）５０ｍｌ中にて１５分間振とうした。水でゲルを数回洗い得られたバンドを解析した。結果を図３に示す。

図３に示されるとおり、式（１－１３）で表される固相担体は、多量に存在する蛋白質を非特異的に結合するものではないことが確認された。一方アフィゲルのかわりに疎水性樹脂であるトーヨーパールを用いて製造した固相担体で同様の実験を行った。その結果、図４に示されるとおり、式（１－１３）に相当する固相担体（１）及び式（１－１９）に相当する固相担体（２）においては、いずれも非特異的な蛋白質の結合が観察された。

[0078] 実施例 6

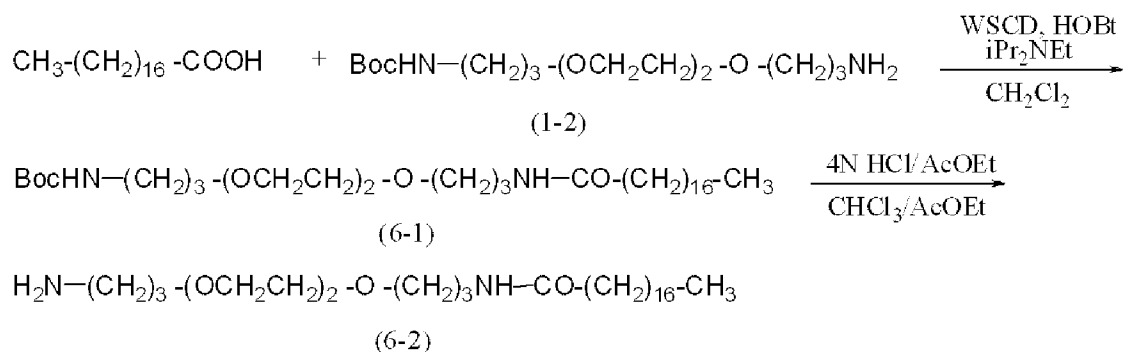
（１） C18-PEG(1)-NH₂（６－２）の合成

ステアリン酸（４０４ｍｇ，１．４２ｍｍｏｌ）をジクロロメタン６０ｍｌに溶かし、氷冷下攪拌した。WSCD（３４３μｌ，１．９６ｍｍｏｌ）、HOBt（２６４ｍｇ，１．９６ｍｍｏｌ）をゆっくりと加え、室温にて６０分間攪拌した。再度、４℃にて攪拌後、Mono-N-*t*-boc-amido-dPEG3TM-amine（１－２）（QUANTA BIODESIGN製；５００ｍｇ，１．５６ｍｍｏｌ）をジクロロメタン１ｍｌに溶かし、ゆっくりと滴下した。ジイソプロピル

エチルアミン (494 μ l, 2.84mmol) を加え、室温にて一昼夜攪拌した。減圧濃縮後、酢酸エチル 200 ml を加えた。酢酸エチル層を水 100 ml、飽和食塩水にて洗浄した。無水硫酸マグネシウムにて乾燥後、減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した。目的の Boc 体 (6-1) (730mg) を収率 87% にて得た。質量分析結果: HRMS-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calcd. for C33H67O6N2, 587.4994; found, 587.4986。

得られた Boc 体 (700mg, 1.19mmol) を酢酸エチル 60 ml に溶かし、4N-HCl / AcOEt (国産化学製; 5 ml) を加え、室温にて 5 時間攪拌した。反応完結後、溶媒を留去し、クロロホルム 50 ml を加え、減圧下溶媒を留去した。この操作を 3 回繰り返した。真空ポンプにて溶媒を完全に留去し、目的のアミノ体塩酸 (6-2) を得た。質量分析結果: HRMS-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calcd. for C28H59O4N2, 487.4469; found, 487.4449。

[0079] [化29]

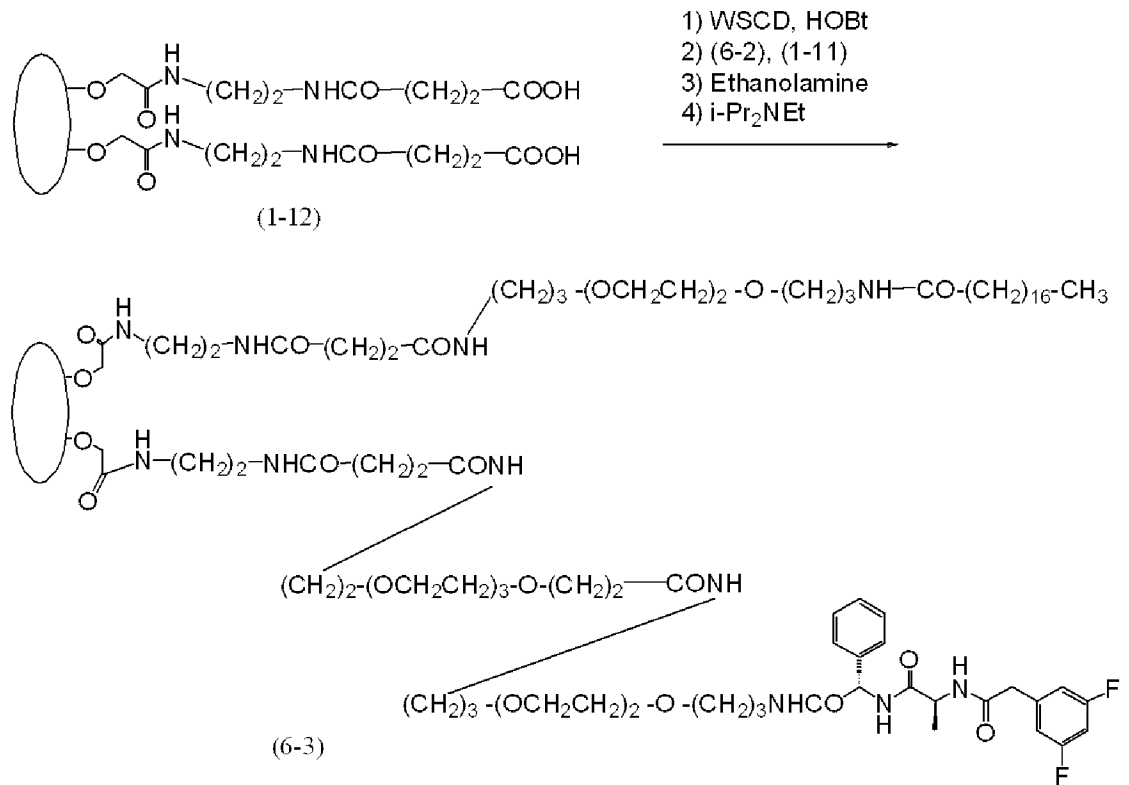


[0080] (2) C18-PEG(1)によるAffi-Gelの修飾

実施例 1 に記載の方法で調製したカルボン酸樹脂 (1-12) (36 μ mol) に DMF 10 ml を加え、WSCD (7.5 μ l, 43.2 μ mol), HOBT (5.8mg, 43.2 μ mol) を加え室温にて 30 分間攪拌した。化合物 (1-11) (18.6mg, 21.6 μ mol), C18-PEG(1)-NH₂ (5.7mg, 10.8 μ mol), エタノールアミン (0.22mg, 3.6 μ mol), *i*Pr₂NEt (15 μ l, 86.4 μ mol) を加え、室温にて一昼夜攪拌した。樹脂を DMF にて洗浄後、引き続き 20% エタノール水溶液にて洗浄し、目的の固相担体: DAPT-PEG(2)+C18-PEG(1) (6-3) を得た。

[0081]

[化30]

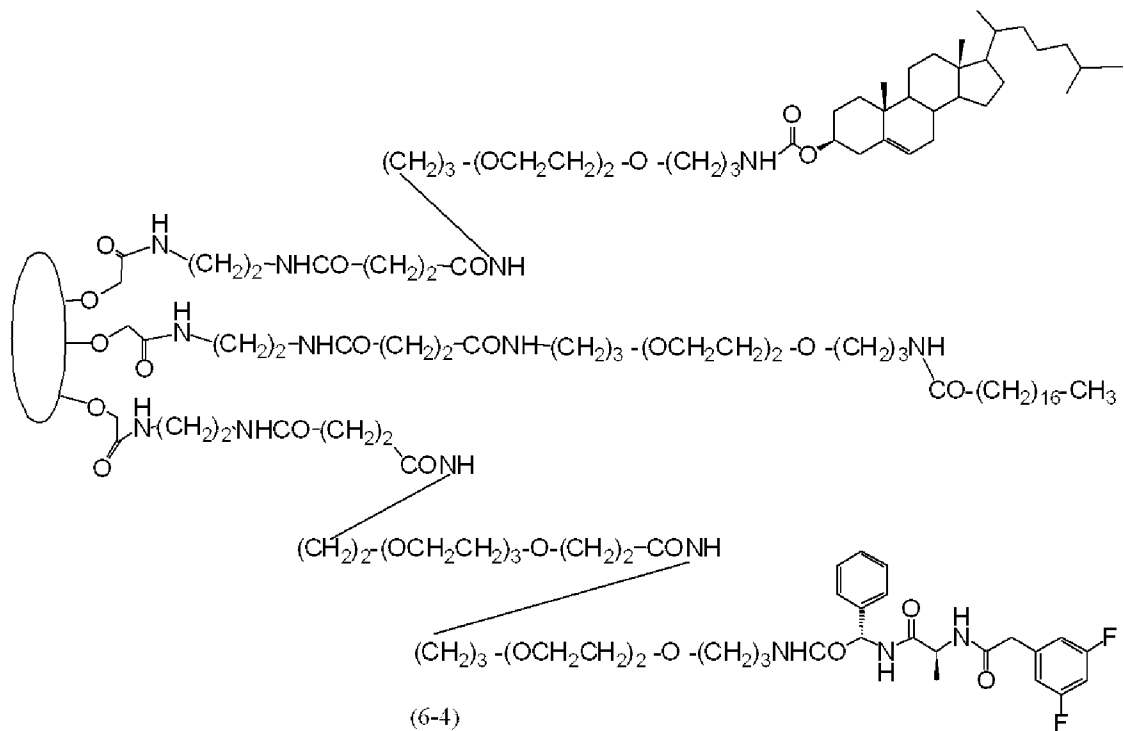


(3) C18-PEG(1) 及びコレステロール-PEG(1) によるAffi-Gel の修飾

上記(2)と同様の方法で、カルボン酸樹脂(1-12) (36 μ mol) にDMF 10ml を加え、WSCD (7.5 μ l, 43.2 μ mol), HOBT (5.8mg, 43.2 μ mol) を加え室温にて30分間攪拌した。化合物(1-11) (18.6mg, 21.6 μ mol), 化合物(1-4) (2.4mg, 3.6 μ mol), C18-PEG(1)-NH₂ (6-2) (3.8mg, 7.2 μ mol), エタノールアミン(0.22mg, 3.6 μ mol), iPr₂NEt (15 μ l, 86.4 μ mol) を加え、室温にて一昼夜攪拌した。樹脂をDMFにて洗浄後、引き続き20% エタノール水溶液にて洗浄し、目的の固相担体: DAPT-PEG(2)+C18-PEG(1)+コレステロール-PEG(1) (6-4) を得た。

[0082]

[化31]



[0083] 実施例 7

コレステロール以外のキャッピング剤の効果を検討した。

すなわち、60%DAPT-PEG(2)にキャッピング剤であるC18-PEG(1)、又はコレステロール-PEG(1)及びC18-PEG(1)を導入した樹脂を作成し、 γ -セクレターゼの結合量を解析した。

実施例6で調製したアフィニティー樹脂(6-3)(4.8 μ mol相当)を正確にはかり取り、実施例3と同様の方法で得られたラット脳ライゼート(200 μ l)と示された結合条件(温度・時間)で結合実験を実施した。結合実験終了後、樹脂を12,000 $\times$ gにて遠心分離し、上澄みを捨て、残された樹脂をbufferB(20mM Hepse pH7.5, 50mM KCl, 2mM EGTA+ protease inhibitor, 0.5%CHAPS)800 μ lにて3回(15分 $\times$ 3)洗浄した。樹脂にSDS用ローディングバッファー(nakalai cat. No; 30566-22, 2-ME(2-メルカプトエタノール)含有電気泳動サンプルバッファー溶液(2 $\times$))40 μ lを加え、90 $^{\circ}$ Cにて3分間インキュベーションした。こうして得られたサンプル液を市販のSDSゲル(BioRad ready Gel J, 5-20%SDS, cat. No; 161-J371V)で

分離した。

ウエスタンブロッティング

SDS-PAGEによって分離した蛋白質をPVDF Membrane Filter Paper Sandwich 0.2um Pore Size, 20/pk. (invitrogen cat. No: LG2002)へトランスファーした。PVDF膜をトレーに移し、ブロッキング剤であるBlocking One (nakalai)を50ml加え、室温にて1時間振とうした。TBS-Tにて3回洗浄した(10分×3)。1次抗体をCan Get Signal Solution 1 (TOYOBO, cat. No: NKB-101)にて希釈し、室温にて1時間振とうした。TBS-Tにて3回洗浄した(10分×3)。2次抗体をCan Get Signal Solution 2 (TOYOBO, cat. No: NKB-101)にて希釈し、室温にて1時間インキュベーションした。TBS-Tにて3回洗浄した(10分×3)。検出試薬はECL Plus western Blotting Detection System (GE Healthcare cat. No: RPN2132)を用いて行った。検出装置としてルミノ・イメージアナライザーLAS-1000(富士フィルム)を用いて検出した。

カルボン酸樹脂(1-12)上のカルボキシル基に対し、100%でDAPTがポリエチレングリコールを介して固定化されている固相担体、カルボン酸樹脂(1-12)上のカルボキシル基に対し、30%でステアリン酸が固定化されている固相担体及びカルボン酸樹脂(1-12)上のカルボキシル基に対し、30%でコレステロールが固定化されている固相担体にはγ-セクレターゼが全く結合できなかった。一方、カルボン酸樹脂(1-12)上のカルボキシル基に対し、60%でDAPTがポリエチレングリコールを介して固定化され、かつ30%もしくは20%のコレステロールが固定化されている固相担体、30%もしくは20%のステアリン酸が固定化されている固相担体、並びに10%のコレステロール及び10%ステアリン酸が固定化されている固相担体にはγ-セクレターゼの4種類(Nct, PS1 (PS1-NTF, PS1-CTF), Aph-1, Pen2)の構成成分が結合した。

[0084] 実施例 8

キャッピング剤であるコレステロール-PEG(1)を固定化し、リンカーの長さが異なるDAPTをそれぞれ固定化したアフィニティー樹脂を用い

、特異的結合 γ -セクレターゼを解析した。

実施例2で調整したアフィニティー樹脂（1-21）（4.8 μ mol 相当）を正確にはかり取り、実施例3と同様の方法で得られたラット脳ライゼート（200 μ l）と示された結合条件（温度・時間）で結合実験を実施した。拮抗（+）はあらかじめLysateに100mM DAPT 0.2 μ l加え（最終濃度 100 μ M）、各実験温度にて30分間インキュベーションした後、結合実験に用いた。結合実験終了後、樹脂を12,000 $\times$ gにて遠心分離し、上澄みを捨て、残された樹脂をbufferB（20mM Hepse pH7.5, 50mM KCl, 2mM EGTA+ protease inhibitor, 0.5%CHAPS）800 μ lにて3回（15分 $\times$ 3）洗浄した。樹脂にSDS用ローディングバッファー（nakalai cat. No: 30566-22, 2-ME（2-メルカプトエタノール）含有電気泳動サンプルバッファー溶液（2 $\times$ ））40 μ lを加え、90°Cにて3分間インキュベーションした。こうして得られたサンプル液を市販のSDSゲル（BioRad ready Gel J, 5-20%SDS, cat. No: 161-J371V）で分離した。

ウエスタンブロッティング

SDS-PAGEによって分離した蛋白質をPVDF Membrane Filter Paper Sandwich 0.2 μ m Pore Size, 20/pk. (invitrogen cat. No: LC2002)へトランスファーした。PVDF膜をトレイに移し、ブロッキング剤であるBlocking One (nakalai) を50m l加え、室温にて1時間振とうした。TBS-Tにて3回洗浄した（10分 $\times$ 3）。1次抗体をCan Get Signal Solution 1 (TOYOB0, cat. No: NKB-101)にて希釈し、室温にて1時間振とうした。TBS-Tにて3回洗浄した（10分 $\times$ 3）。2次抗体をCan Get Signal Solution 2 (TOYOB0, cat. No: NKB-101)にて希釈し、室温にて1時間インキュベーションした。TBS-Tにて3回洗浄した（10分 $\times$ 3）。検出試薬はECL Plus western Blotting Detection System (GE Healthcare cat. No: RPN2132)を用いて行った。検出装置としてルミノ・イメージアナライザーLAS-1000（富士フィルム）を用いて検出した。

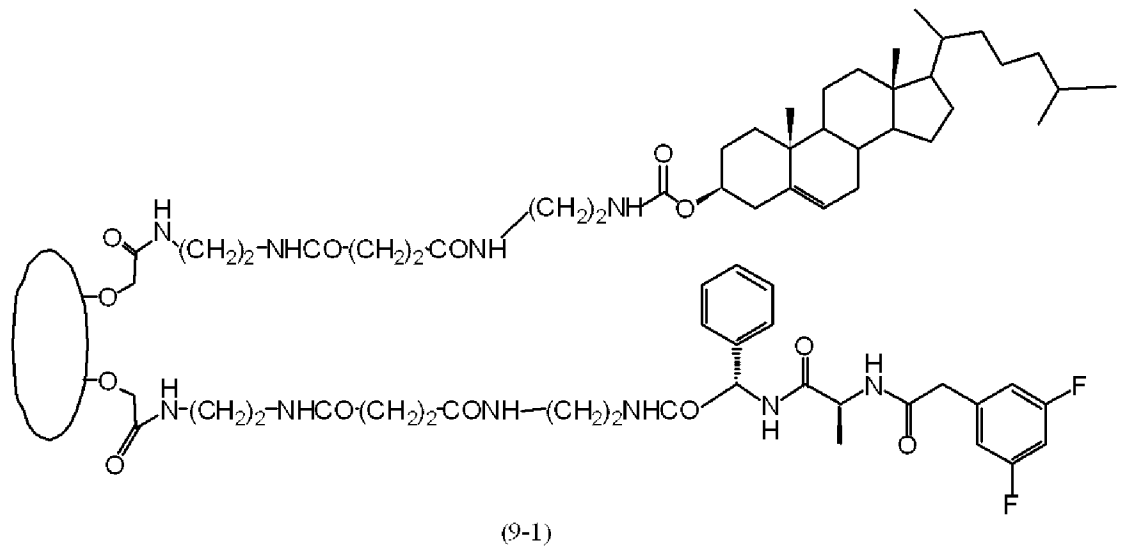
図5に示すとおり、親水性樹脂及びDAPTの間のポリエチレングリコール部分の長さが長い程、 γ -セクレターゼの構成成分が良好に結合している

(レーン 3、5 及び 7)。一方、親水性樹脂及び DAPT の間にポリエチレングリコールを含まない固相担体 (レーン 1) では、PS-1 (C 末端を認識する抗体で検出したもの) 及び Pen-2 の結合量が十分でないことがわかった。

[0085] 実施例 9

実施例 2 と同様の方法で、以下の固相担体を製造した。

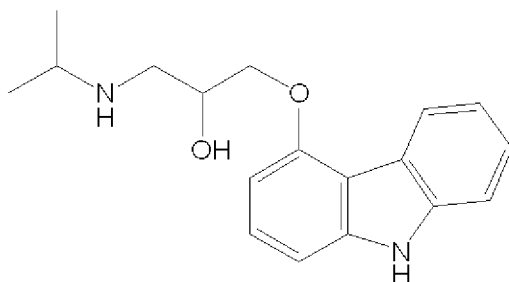
[0086] [化32]



[0087] 実施例 10

DAPT (式 (1-5) で表される化合物) の代わりに、カラゾロール (Carazolin; Life Sci. 1979, 24(24), 2255-64 を参照) :

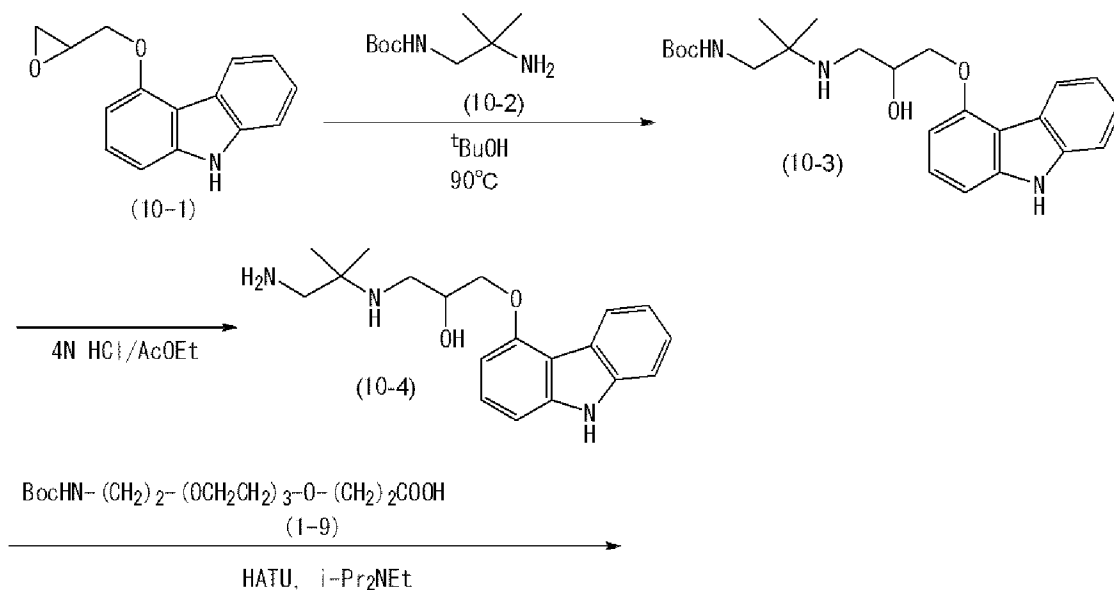
[化33]



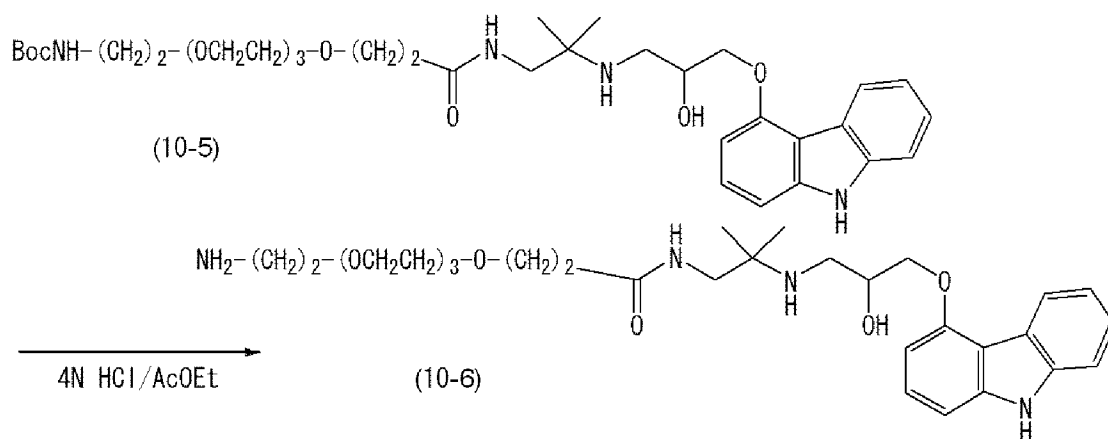
をリガンドとして有するアフィニティークロマトグラフィー用担体を製造すべく、

式（１０－６）で表される化合物を製造した。

[化34]



[化35]



４－グリシジルオキシカルバゾール（化合物（１０－１）；東京化成；Cat. No, G0296；976mg, 4.08mmol）と（２－アミノ－２－メチルプロピル）－カルバミックアシッド *t* ブチルエステル（化合物（１０－２）；Prime Organic s. Inc；852mg, 4.53mmol）を１－ブタノール 2 m l に加え 90 °C にて 5 時間加熱還流した。１－ブタノールを留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。目的の Boc 体（化合物（１０－３）；1.263 g）を収率 72.4 % にて得た。HRMS-ESI (*m/z*): [M+H]⁺calcd. for C₂₄H₃₃N₃O₄, 428.2544；found, 428.2541.

得られたBoc体 (1.185g, 2.77mmol) をクロロホルム 30 ml に溶かし、4M (N)-HCl/AcOEt (国産化学製; 5 ml) を加え、室温にて6時間攪拌した。反応完結後、溶媒を留去し、クロロホルム 30 ml を加え、減圧下溶媒を留去した。この操作を3回繰り返した。真空ポンプにて溶媒を完全に留去し、目的のアミノ体塩酸塩 (10-4) を定量的に得た。

HRMS-ESI (m/z): [M+H]⁺ calcd. for C₁₉H₂₅N₃O₂, 328.2020; found, 328.2018.

N-t-Boc-amido-d-PEG4TM-acid (化合物 (1-9); QUANTA BIODESIGN; 500mg, 1.37mmol) と得られたアミノ体塩酸塩 (化合物 (10-4); 548mg, 1.37mmol) をDMF 3 ml に加え窒素気流下 4 °C にて攪拌した。HATU (572mg, 1.51mmol), ジイソプロピルエチルアミン (107 μl, 2.736mmol) を加え、窒素気流下、4 °C にて1時間攪拌した。クロロホルム 100 ml を加え、水 50 ml、飽和食塩水 50 ml にて有機層を洗浄した。無水硫酸マグネシウムにて有機層を乾燥し、減圧濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、目的のBoc体 (化合物 (10-5); 359mg) を収率38.9%にて得た。HRMS-ESI (m/z): [M+H]⁺ calcd. for C₃₅H₅₄N₄O₉, 675.3964; found, 675.3960.

得られたBoc体 (10-5) (302mg, 0.45mmol) をクロロホルム 30 ml に溶かし、4M (N)-HCl/AcOEt (国産化学製; 5 ml) を加え、室温にて6時間攪拌した。反応完結後、溶媒を留去し、クロロホルム 30 ml を加え、減圧下溶媒を留去した。

この操作を3回繰り返した。真空ポンプにて溶媒を完全に留去し、目的のアミノ体塩酸塩 (化合物 (10-6)) を定量的に得た。HRMS-ESI (m/z): [M+H]⁺ calcd. for C₃₀H₄₆N₄O₇, 575.3439; found, 575.3440.

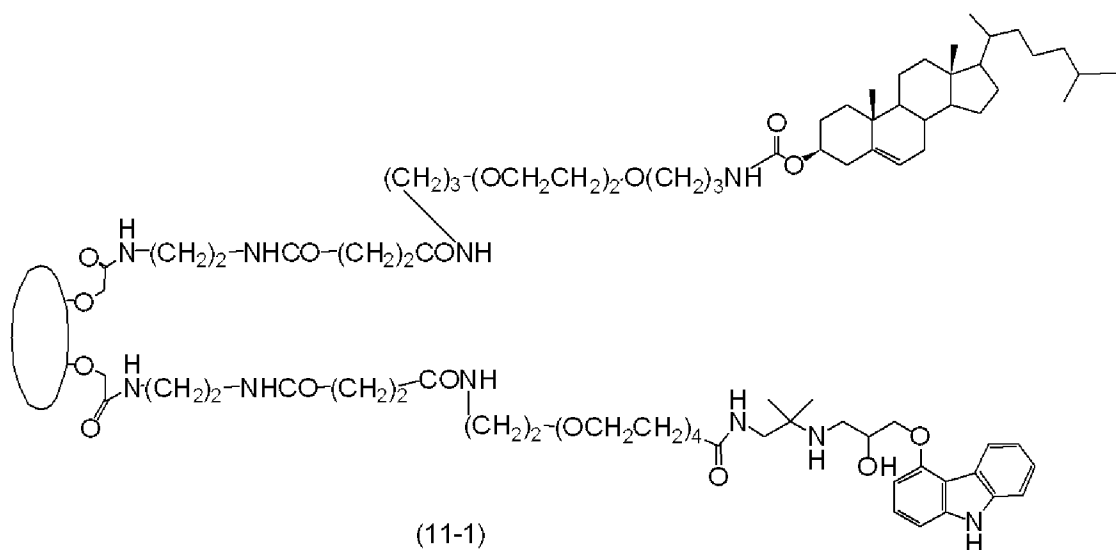
実施例 11

[0088] 実施例4と同様の方法で、実施例4における化合物 (1-8) の代わりに実施例10で得られた化合物 (10-6) を用いて、アフィニティーカラムクロマトグラフィー用担体を製造した。

すなわち、以下の式 (11-1) で表される固相担体 (Carazolol-PEG(1)-Chole-PEG(1)) を製造した。

式 (11-1) :

[0089] [化36]



Affi-Gel 102Gel (BIO-RAD, cat. No; 153-2401) 12ml (144 μ mol) をDMFにて置換し、無水コハク酸 (28.8mg, 288 μ mol)、iPr₂NEt (75 μ l, 432 μ mol)を加え、室温にて一昼夜攪拌した。樹脂をDMFにて洗浄後、ニンヒドリンテストを行い、定量的に目的のカルボン酸体 (1-12) が得られたのを確認した。引き続き、樹脂を20%無水酢酸DMF溶液にて30分間室温で攪拌した。得られたカルボン酸樹脂 (1-12) (36 μ mol) にDMF 10mlを加え、アミノ体塩酸塩 (10-6) (14mg, 21.6 μ mol), (化合物 (1-4) (7.2mg, 10.8 μ mol), エタノールアミン (0.22mg, 3.6 μ mol), HATU (15mg, 39.6 μ mol), iPr₂NEt (22.5 μ l, 129.6 μ mol)を加え、室温にて一昼夜攪拌した。樹脂をDMFにて洗浄後、引き続き20%エタノール水溶液にて洗浄し、目的の固相担体: Carazolol-PEG(1)+コレステロール-PEG(1) (式(11-1))を得た。

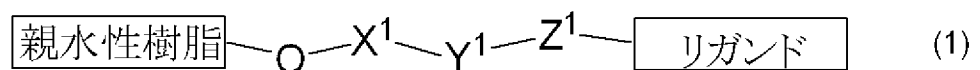
産業上の利用可能性

[0090] 本発明のアガロース系固相担体は、医薬品又は医薬品候補化合物の作用機序を解明する上で重要な、特異的結合蛋白質、詳しくは受容体等の膜結合型蛋白質を単離、精製、同定するために有用である。

請求の範囲

- [請求項1] コレステロール誘導体、脂肪酸誘導体及び脂肪族アミンから選択される疎水性キャッピング剤、並びにリガンドが、親水性樹脂に固定化されてなるアフィニティーカラムクロマトグラフィー用の固相担体であって、前記リガンドが、ポリエチレングリコール部分を含むスペーサーを介して前記親水性樹脂と共有結合していることを特徴とする固相担体。
- [請求項2] 親水性樹脂が、糖類が重合してなる樹脂、又は高度親水性モノマーが重合してなる樹脂である、請求項1に記載の固相担体。
- [請求項3] 糖類が重合してなる親水性樹脂が、セファロース系樹脂、デキストラン系樹脂、セルロース系樹脂、アミロース系樹脂又はアガロース系樹脂である、請求項2に記載の固相担体。
- [請求項4] 高度親水性モノマーが重合してなる樹脂が、ポリエチレングリコール基又はポリオール基を有するメタクリル酸が重合したメタクリレート系樹脂である、請求項2に記載の固相担体。
- [請求項5] リガンドが、膜結合型蛋白質に特異的に吸着する物質である、請求項1～4のいずれかに記載の固相担体。
- [請求項6] 固相担体が、以下の式（1）：

[化1]

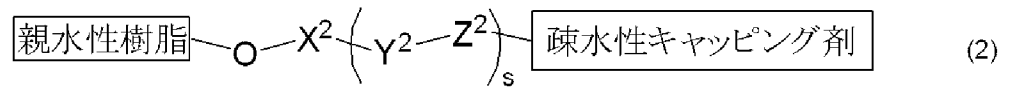


（X¹は単結合、又は親水性樹脂における水酸基とポリエチレングリコール部分を共有結合で連結する二価基を表し、Z¹はリガンドと前記ポリエチレングリコール部分を共有結合で連結する二価基を表し、Y¹は1～50個のエチレングリコールユニットを含むポリエチレングリコール部分を表す）

で表される部分構造を含む、請求項1～5のいずれかに記載の固相担体。

[請求項7] 固相担体が、以下の式（2）：

[化2]



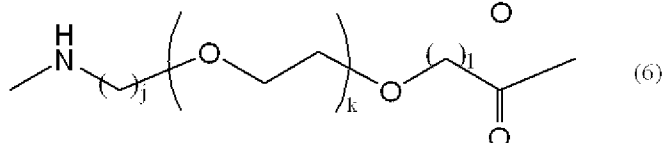
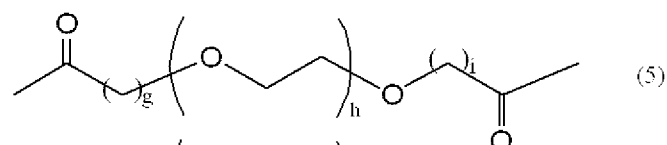
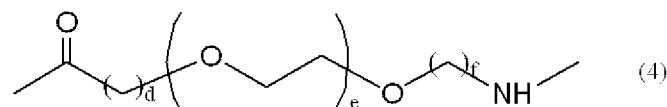
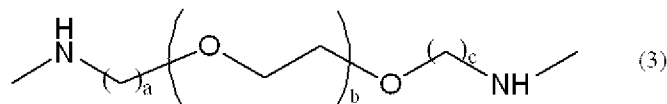
（sは0又は1を表し、X²は単結合、又は親水性樹脂における水酸基とポリエチレングリコール部分もしくは疎水性キャッピング剤を共有結合で連結する二価基を表し、Z²は2つのポリエチレングリコール部分どうし、又は疎水性キャッピング剤と前記ポリエチレングリコール部分を共有結合で連結する二価基を表し、Y²は1～50個のエチレングリコールユニットを含むポリエチレングリコール部分を表す）

で表される部分構造を含む、請求項1～6のいずれかに記載の固相担体。

[請求項8] 式（2）において、sが1である、請求項7に記載の固相担体。

[請求項9] 式（1）におけるY¹及び式（2）におけるY²が以下の式（3）～（6）：

[化3]

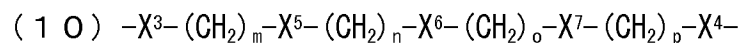
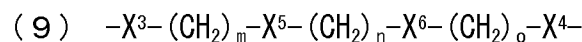
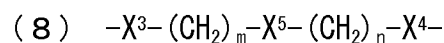
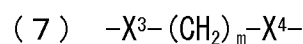


（a、c、f及びjは独立して2～5の整数を表し、d、g、i及び

l は独立して 1 ～ 5 の整数を表し、b、e、h 及び k は独立して 1 ～ 50 の整数を表す)

から独立して選択される二価基、又は前記式 (3) ～式 (6) から独立して選択される同一もしくは異なる 1 又は複数の二価基がアミド結合を介して結合して形成される二価基である、請求項 6 ～ 8 のいずれかに記載の固相担体。

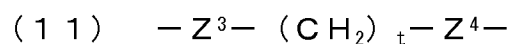
[請求項10] 式 (1) における X^1 、及び式 (2) における X^2 が、単結合及び式 (7) ～ (10) :



(式中、 X^3 は単結合又は CO を表し、 X^5 、 X^6 及び X^7 は O、S、N、 R^1 、NHCO 又は CONH を表し、 X^4 は酸素原子、NH 又は CO を表し、 R^1 は水素原子又は炭素数 1 ～ 3 のアルキル基を表し、m、n、o 及び p は独立して 1 ～ 5 の整数を表す)

のいずれかで表される二価基から独立して選択されることを特徴とする、請求項 6 ～ 9 のいずれかに記載の固相担体。

[請求項11] 式 (1) における Z^1 、及び式 (2) における Z^2 が、単結合、NH、CO、及び式 (11) :



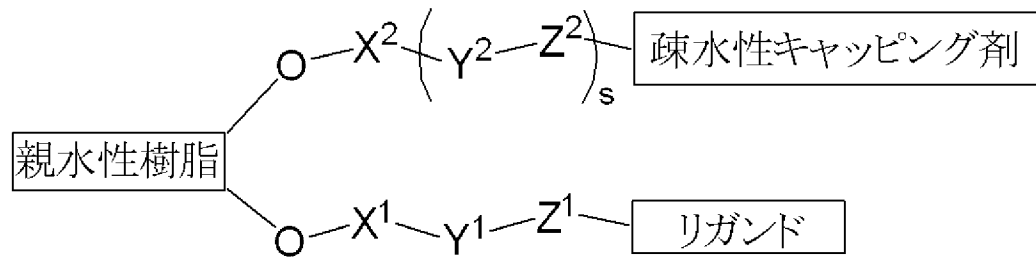
(式中、 Z^3 は NH 又は CO を表し、 Z^4 は NH、CO、NHCO、CONH、CO-O 又は O-CO を表し、t は 1 ～ 5 の整数を表す)

で表される二価基から、独立して選択されることを特徴とする、請求項 6 ～ 10 のいずれかに記載の固相担体。

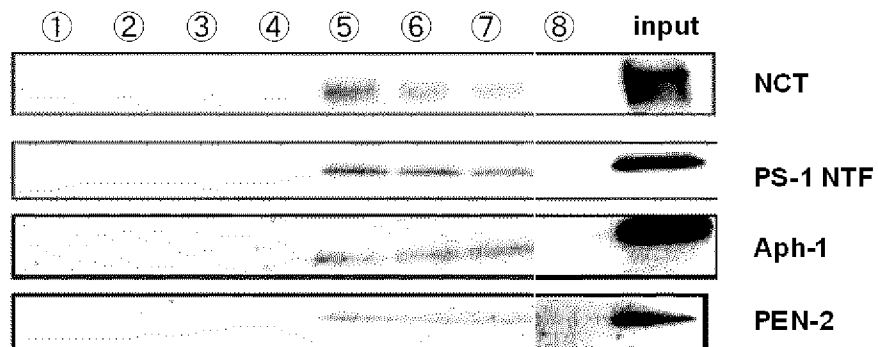
[請求項12] Y^1 におけるエチレングリコールのユニット数が、 Y^2 におけるエチレングリコールのユニット数よりも 2 以上大きいことを特徴とする、請求項 6 ～ 11 のいずれかに記載の固相担体。

- [請求項13] Y¹におけるエチレングリコールのユニット数が2～36であり、
Y²におけるエチレングリコールのユニット数が0～6である、請求
項12に記載の固相担体。
- [請求項14] 以下の（a）～（b）の工程を含む、リガンド特異的結合蛋白質の
濃縮、単離又は精製方法：
（a）請求項1～13のいずれかに記載の固相担体及び試料を接触さ
せる工程；及び
（b）固相担体から、リガンド特異的結合蛋白質を溶出する工程。
- [請求項15] リガンド特異的結合蛋白質が、膜結合型蛋白質である、請求項14
に記載の精製方法。
- [請求項16] 請求項1～13のいずれかに記載の固相担体の、アフィニティーカ
ラムクロマトグラフィー用担体としての使用。

[図1]

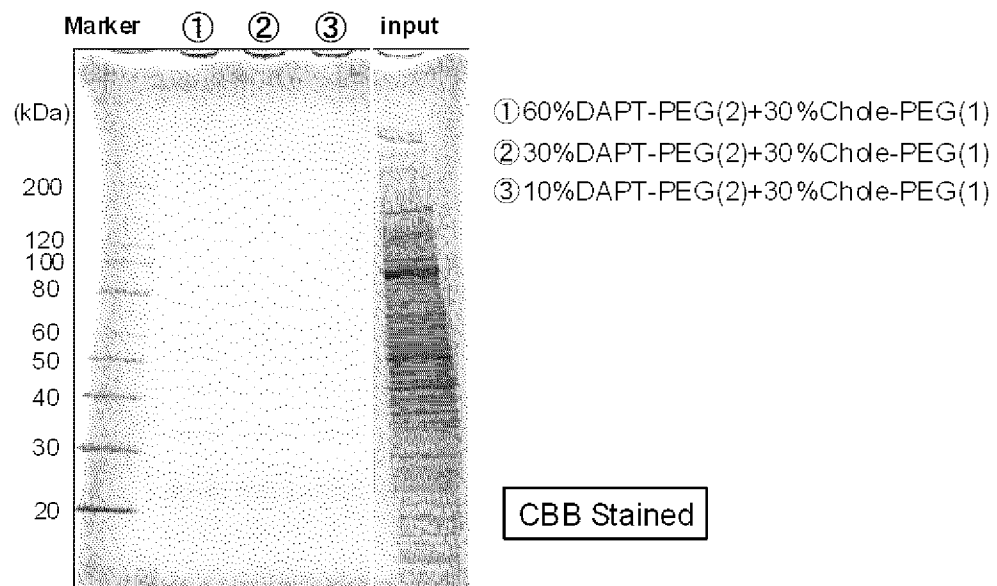


[図2]

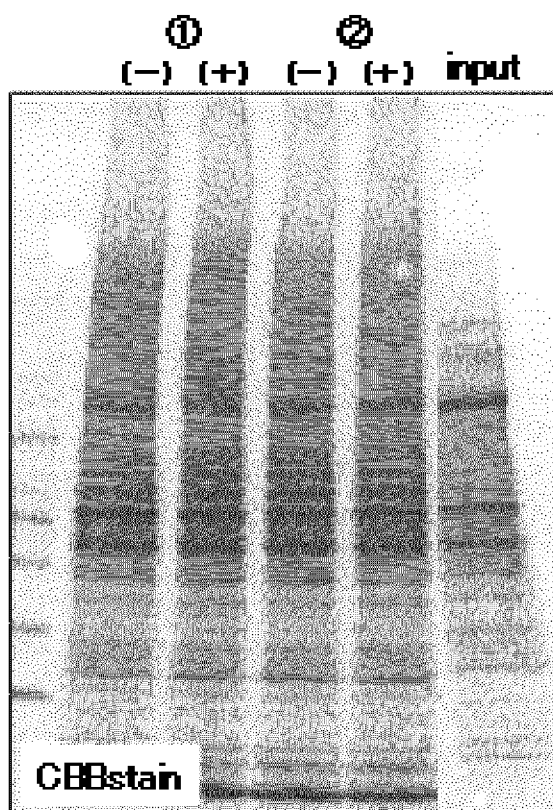


- ①10%DAPT-PEG (2)
- ②30%DAPT-PEG (2)
- ③60%DAPT-PEG (2)
- ④100%DAPT-PEG (2)
- ⑤60%DAPT-PEG (2)+30%Chole-PEG (1)
- ⑥30%DAPT-PEG (2)+30%Chole-PEG (1)
- ⑦10%DAPT-PEG (2)+30%Chole-PEG (1)
- ⑧30%Cholesterol

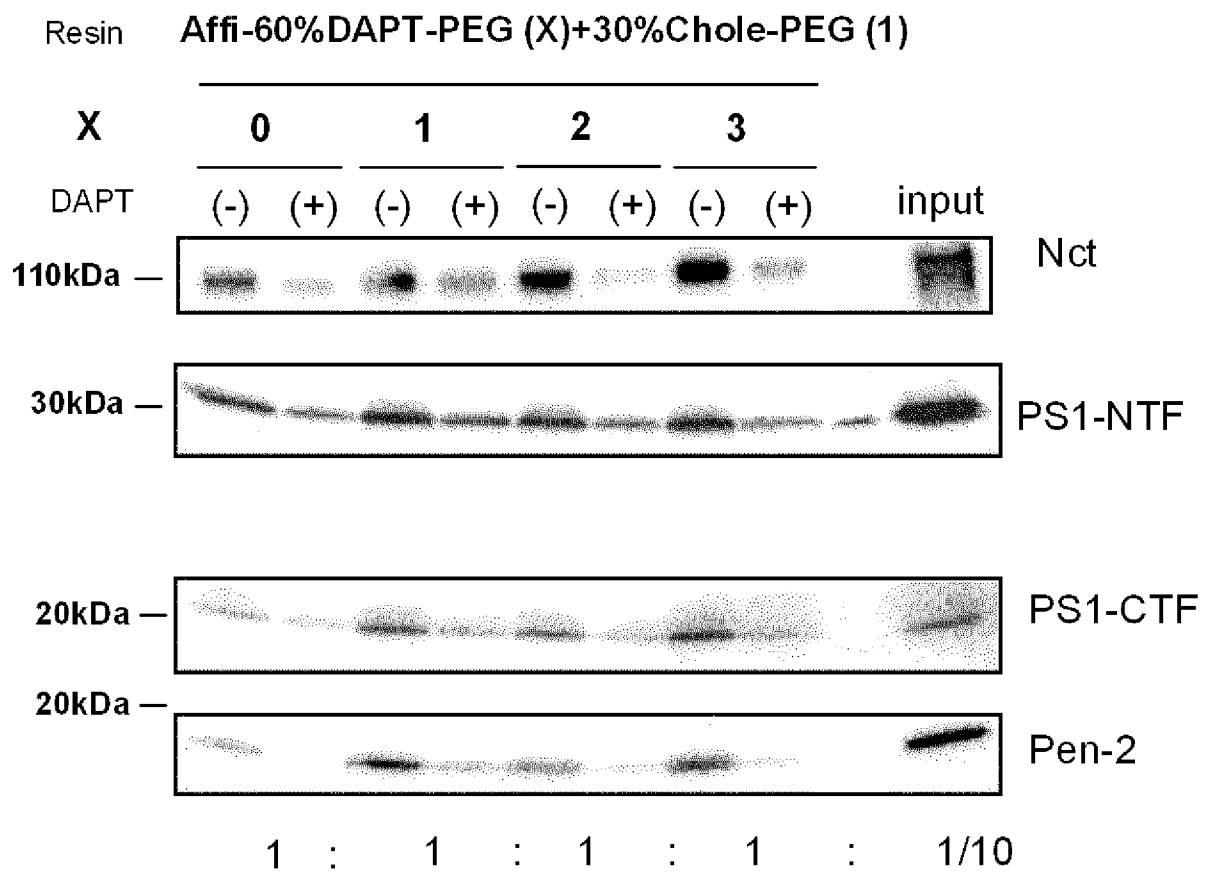
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/068893

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08G81/00(2006.01)i, C07K1/22(2006.01)i, G01N30/88(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i

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)

C08G81/00, C07K1/22, G01N30/88, G01N33/543

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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.
E, A	JP 2009-292804 A (Canon Inc.), 17 December 2009 (17.12.2009), claims; examples (Family: none)	1-16
A	WO 2005/037881 A1 (Reverse Proteomics Research Institute Co., Ltd.), 28 April 2005 (28.04.2005), claims; page 7; examples & EP 1674486 A1 & US 2007/0167594 A1	1-16
A	WO 2004/040305 A1 (Reverse Proteomics Research Institute Co., Ltd.), 13 May 2004 (13.05.2004), claims; page 5; examples & EP 1564555 A1 & US 2006/0024845 A1	1-16



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
02 February, 2010 (02.02.10)

Date of mailing of the international search report
09 February, 2010 (09.02.10)

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（I P C））

Int.Cl. C08G81/00(2006.01)i, C07K1/22(2006.01)i, G01N30/88(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i

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（I P C））

Int.Cl. C08G81/00, C07K1/22, G01N30/88, G01N33/543

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 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 請求項の番号
E, A	J P 2 0 0 9 - 2 9 2 8 0 4 A (キヤノン株式会社) 2 0 0 9 . 1 2 . 1 7、特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1 - 1 6
A	W O 2 0 0 5 / 0 3 7 8 8 1 A 1 (株式会社リバース・プロテ オミクス研究所) 2 0 0 5 . 0 4 . 2 8、特許請求の範囲、7 頁、実施例 & E P 1 6 7 4 4 8 6 A 1 & U S 2 0 0 7 / 0 1 6 7 5 9 4 A 1	1 - 1 6

☒ 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

の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

0 2 . 0 2 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

0 9 . 0 2 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / 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）

船岡 嘉彦

4 J

6 9 5 8

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 7

C (続き) . 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 請求項の番号
A	WO 2 0 0 4 / 0 4 0 3 0 5 A 1 (株式会社リバース・プロテ オミクス研究所) 2 0 0 4 . 0 5 . 1 3、特許請求の範囲、5 頁、実施例 & EP 1 5 6 4 5 5 5 A 1 & US 2 0 0 6 / 0 0 2 4 8 4 5 A 1	1 - 1 6