

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6302560号
(P6302560)

(45) 発行日 平成30年3月28日(2018.3.28)

(24) 登録日 平成30年3月9日(2018.3.9)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 11/06 (2006.01)
C 12 N 5/071 (2010.01)C 12 N 11/06
C 12 N 5/071

請求項の数 16 (全 107 頁)

(21) 出願番号 特願2016-541241 (P2016-541241)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月19日 (2014.12.19)
 (65) 公表番号 特表2017-501708 (P2017-501708A)
 (43) 公表日 平成29年1月19日 (2017.1.19)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2014/078739
 (87) 國際公開番号 WO2015/091948
 (87) 國際公開日 平成27年6月25日 (2015.6.25)
 審査請求日 平成28年8月16日 (2016.8.16)
 (31) 優先権主張番号 13006040.3
 (32) 優先日 平成25年12月20日 (2013.12.20)
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 591003013
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCHE
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 T
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
 グレンツアーヘルストラツセ124
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100101373
 弁理士 竹内 茂雄
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ポリエチレングリコール部分を含む化合物を用いて支持体に細胞を固定化する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞を支持体に固定化するための方法であって、

a) 下記の化合物またはその塩を用意する：

親水性ドメインに結合した1以上の疎水性ドメインを含みまたはそれらからなり、

該1以上の疎水性ドメインは該親水性ドメインに共有結合しており、

該1以上の疎水性ドメインはそれぞれ、線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミンを含み、親水性ドメインはポリエチレングリコール (PEG) 部分を含む

化合物であって、該化合物は連結基を含む；そして、

該親水性ドメインは式(I)の化合物を含み：

 $X_1 - [A_1 - (L_1)_n]_{k_1} - Z - [A_2 - (L_1)_n]_{k_2} - X_2 \quad (I)$

{式中：

Zは、1~100、1~50、または4~30の-O-CH₂-CH₂-部分を含む線状ポリエチレングリコール (PEG) 部分であり、ここで、該ポリエチレングリコール部分は2つの-O-CH₂-CH₂-部分を連結する1以上のスペーサー部分SPを含んでよく、そして該線状PEG部分は一端または両端にリンカー部分L₃を含んでもよく、各L₁は、互いに独立して選択されるリンカー部分であり、

各nは、0または1のいずれかであり、互いに独立して選択され、

A₁およびA₂は、互いに独立して選択される2官能性または3官能性の部分であり、ただし、少なくとも1つのA₁またはA₂は3官能性であり、

10

20

k₁およびk₂は、0～10の整数であり、互いに独立して選択される、ただし、k₁およびk₂のうち少なくとも1つは0ではなく、

X₁およびX₂は、独立して水素または保護基から選択され、

L₃は、独立して、1～10個のC原子を含む線状アルキルまたはアルケニル鎖から選択され、それは(i)1～3個のN、OまたはS原子により中断されていてもよく、および/または(ii)1～4個のヒドロキシル、カルボニル、アミノまたはチオール基により置換されていてもよい}、

該1以上の疎水性ドメインは、該親水性ドメインに3官能性ドメインを介して共有結合し、

b) 該化合物が細胞の膜と相互作用できる条件下で細胞を該化合物と接触させ、それにより該連結基を該細胞の表面に固定化する；そして 10

c) 細胞に固定化された該連結基を、該連結基を結合できる支持体と接触させ、それにより該細胞を支持体に固定化する

ことを含む、前記方法。

【請求項2】

式(I)中のZは、下記の構造：

- (L₃)_{n₂} - [O - C H₂ - C H₂]_y - (S P)_{n₁}]_m - [O - C H₂ - C H₂]_{y₁} - (L₃)_{n₂}

{式中：

S Pは、スペーサー部分であり、

各スペーサー部分S Pは互いに独立して選択され、

各n₁は、0または1のいずれかであり、m個の部分それぞれについて独立して選択され、

各n₂は、0または1のいずれかであり、互いに独立して選択され、

mは、1から100、1から50、または4から30の整数であり、

yは、1から100、1から50、または4から30の整数であり、

y₁は、0から30、0から10、または0から4の整数であり、

ただし、y * m + y₁ 100であり、

L₃は、独立して、1～10個のC原子を含む線状アルキルまたはアルケニル鎖から選択され、それは(i)1～3個のN、OまたはS原子により中断されていてもよく、および/または(ii)1～4個のヒドロキシル、カルボニルまたはチオール基により置換されていてもよい} 30

を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

(a) n₁はm個の部分 - [O - C H₂ - C H₂]_y - (S P)_{n₁}] - について同一である、および/または

(b) y₁は0である、および/または

(c) yは4、5または6であり、n₁は1である、または

(d) yは4、5または6であり、n₁は1である、および/または

(e) スペーサー部分S Pは、互いに独立して、ホスフェートおよび2官能性部分からなる群から選択される、および/または 40

(f) n₂は両方とも0である、または

(g) 一方または両方のn₂=1であり、L₃は1～10個のC原子をもつアルキル基であり、それはアミド基、カルボニル基、カルバメートおよび/またはN H基を含んでもよい、

請求項2に記載の方法。

【請求項4】

(a) X₁またはX₂は疎水性ドメインにより置き換えられている、および/または

(b) 連結基はビオチンである、

請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。 50

【請求項 5】

前記線状脂質は、

- (a) 飽和または不飽和脂肪酸である、および／または
- (b) 8から26個のC原子または12から22個のC原子を有する脂肪酸であり、または
- (c) オレイン酸、ミリスチン酸、ステアリン酸およびベヘン酸からなる群から選択される。

請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6】

- (a) 前記ステロイドはステロールである、または
- (b) 前記ステロイドは、コレステロール；ステロイドホルモン、アンドロゲン、同化ステロイド、アンドロステンジオン、デヒドロエピアンドロステロン、ジヒドロテストステロン、テストステロン、エストロゲン、エストラジオール、エストリオール、またはエストロン；黄体ホルモン物質、プロゲステロン、プロゲスチン、コルチコステロイド、グルココルチコイド、またはミネラルコルチコイド；エクジステロイド、またはエクジステロン；フィトステロール；ブラシノステロイド；ホパノイド；およびエルゴステロールからなる群から選択され、または
- (c) 前記疎水性ビタミンは -トコフェロールである、

請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

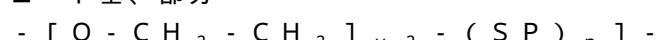
- (a) 1、2、3または4つの疎水性ドメインが親水性ドメインに共有結合しており、および／または
- (b) 親水性ドメインに共有結合している2以上の疎水性ドメインが異なるかまたは同一である、

請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】

前記疎水性ドメインは

- (a) 線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミンからなる、または
- (b) 3官能性部分A1にリンカー部分L2を介して共有結合した線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミンを含み、該L2は下記のものを含み、またはそれからなる：ホスフェート基、部分



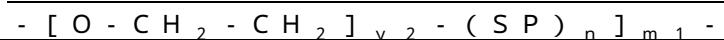
{式中：

S Pおよびnは前記に定めたものであり、y2は1から30または3から10の整数であり、m1は1から10の整数である}、グリセロール部分、カルバメート基、アミド基、1～10個のC原子を有する線状アルキル基：そのアルキル鎖は末端C原子に官能基を含み、それは1、2、3、4または5つの部分R1により置換されていてもよく、ここで、R1は独立してC1-C4アルキル、C1-C4ヒドロキシアルキル、C1-C4アミノアルキル、C1-C4シアノアルキル、ヒドロキシリル、チオール、アミノまたはカルボニル部分である、

請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】

前記L2は、ホスフェート、アミド、カルバメート、エステル基、および部分



{式中：

S Pおよびnは前記に定めたものあり、

y2は、1から30または3から10の整数であり、

m1は、1から10または1から3の整数である}

からなる群から選択される、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

10

20

30

40

50

前記の線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミンは、リンカー部分テトラエチレンジリコール(TEG)またはホスフェートを介して3官能性部分A1に結合している、請求項8または9に記載の方法。

【請求項11】

- (a) k1は、1、2、3、4または5である、および/または
- (b) 前記疎水性ドメインは、3官能性部分A1のみを介して親水性ドメインに共有結合している、および/または
- (c) k2は、1、2、3、4、5または6である、
請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

10

- (a) 化合物はさらに標識部分を含み、および/または
1以上の部分A2は標識部分であり、および/または
- (b) 連結基は3官能性部分A2を介して共有結合している、
請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

- (a) リンカーレベル1は、独立してホスフェート、アミド、カルバメートおよびエステル基からなる群から選択される、および/または
- (b) 部分A1およびA2は、独立して、下記のものから選択される：ホスフェート基、カルバメート基、アミド基、核酸塩基を含む部分、dT、および1～10個のC原子を有する線状アルキル基であって末端C-原子に官能基を含むアルキル鎖からなる群から選択される2官能性基；ならびに1～10個のC原子を有し、少なくとも1つの-OH、-SH、および/または少なくとも1つの-NH₂基を含む3官能性部分、および/または
- (c) リンカーレベル2は、独立してホスフェート、アミド、カルバメート、エステル基、および部分

20

- [O - CH₂ - CH₂]_{y2} - (SP)_n]_{m1} -
{式中：

SPおよびnは前記に定めたものであり、
y2は、1から30の整数であり、
m1は、1から10の整数である}

からなる群から選択される、

30

請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

前記化合物またはその塩の1種類以上を含む組成物を用意する、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

目的細胞を含む細胞集団を支持体に固定化する方法であって、

- a) 請求項1～13のいずれか1項において定義される化合物を用意する；
- b) 該化合物が細胞の膜と相互作用できる条件下で細胞集団を該化合物と接触させ、それにより該細胞の表面に連結基を固定化する；
- c) 細胞に固定化された該連結基を、該連結基を結合できる支持体と接触させ、それにより該細胞を該支持体に固定化し、そして該支持体に固定化された目的細胞を所望により検出する

40

ことを含む、前記方法。

【請求項16】

前記細胞が懸濁状態の細胞であり、および/または該細胞が動物もしくはヒトの細胞、脊椎動物細胞、または哺乳動物細胞である、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、細胞を支持体に固定化するための方法に関するものであって、その方法は、
a) 化合物またはその塩を用意する、該化合物またはその塩は親水性ドメインに結合した
1 以上の疎水性ドメインを含み、好ましくはそれらからなり、1 以上の疎水性ドメインは
親水性ドメインに共有結合しており、1 以上の疎水性ドメインはそれぞれ、線状脂質、ス
テロイドまたは疎水性ビタミンを含み、親水性ドメインはポリエチレングリコール(PEG)
部分を含み、連結基を含む；b) 化合物が細胞の膜と相互作用できる条件下で細胞を
その化合物と接触させ、それにより連結基を細胞の表面に固定化する；そして c) 細胞に
固定化された連結基を、連結基が結合できる支持体と接触させ、それにより細胞を支持体
に固定化することを含む。

【発明の概要】

10

【0002】

US2005/0208644A1では、細胞を固定化するために2種類の化合物を使用する系を用いて
いる。そこに開示されるのは、細胞に対する親和性をもつ化学物質の使用により細胞を希望
するパターンで固相表面に固定化するための方法である。より容易に固相表面に固定化
されるもうひとつの第2化学物質の使用によって、第1化合物は第2化合物に結合する。
第1化学物質は、膜に対する生体適合性アンカー(biocompatible anchor for membrane)
(BAM)であると記載されている。このアンカーは脂肪族基をもち、それが細胞膜に挿入
されるのに伴なって結合し、細胞に損傷を与えることなく非共有結合により固定化でき
る。Kato K. et al., Biotechnol. Prog. 2004, 20, 897-904には、いわゆるBAM類(
BAM90: 1つのオレイル鎖; DOPPE-BAM80: ジオレイルホスファチジルエタノールアミン)
が、高い水溶性、タンパク質を細胞膜の外葉(outside leaflet)に迅速にアンカリングする能
力、細胞膜における高い保持率、および細胞溶解活性の欠如の結果として、タンパク質を細
胞膜にアンカリングする試薬として有用であり、これはこのアンカリング技術が細胞表面工学に
有望であることを示唆すると記載されている。”Kato K. Et al. BioTechniques 2003 35:1014-1021には、生体適合性アンカー分子、すなわちオレイル-O-オイル(エチレングリコール)-スクシニル-N-ヒドロキシ-スクシンイミジル-エステルによる懸濁細胞付着が記載されている。

20

【0003】

しかし、先行技術の化合物は幾つかの欠点をもつ。そのような化合物を用いる細胞固定化
は定量的ではなく、細胞タイプ-非依存性でもない。また、種々の細胞タイプの混合物
、たとえば血液試料において自然に生じるものと、定量的にかつ細胞表現型に依存せずに
表面に付着させることはできない。さらに、表面への細胞の結合は後続処理工程、たとえば
免疫化学的染色および洗浄に十分なほど堅牢ではない。現状水準の技術の他の欠点は、
記載されたリンカー分子が細胞によりインターナリゼーションされるかまたは細胞により
拒絶されて、最終的に細胞の解離および/または喪失を生じる可能性があることである。

30

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

したがって、生存性に影響を及ぼすことなく細胞を固定化するための新規方法が求めら
れている。

【課題を解決するための手段】

40

【0005】

本発明の方法はこの課題を解決し、先行技術の欠点を克服する。PEG-ベースの化合
物を用いる本発明方法によれば、懸濁細胞および接着性細胞を含めて、すべてのタイプの
細胞を捕獲することができる。

【0006】

1 様様において、本発明は、細胞を支持体に固定化するための方法に関するものであつ
て、その方法は、

a) 下記の化合物またはその塩を用意する：

親水性ドメインに結合した1以上の疎水性ドメインを含み、好ましくはそれらからなり

、

50

1 以上の疎水性ドメインは親水性ドメインに共有結合しており、
1 以上の疎水性ドメインはそれぞれ、線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミンを含み、親水性ドメインはポリエチレングリコール(PEG)部分を含む化合物であって、連結基を含む化合物；

b) 化合物が細胞の膜と相互作用できる条件下で細胞をその化合物と接触させ、それにより連結基を細胞の表面に固定化する；そして

c) 細胞に固定化された連結基を、その連結基を結合できる支持体と接触させ、それにより細胞を支持体に固定化することを含む。

【0007】

10

意外にも、細胞を支持体に固定化する前に細胞を前記に定めた化合物で処理した場合、そのような化合物を表面に固定化した後にそれに細胞を固定化するとの比較して細胞の固定化はより効果的であることが見出された(たとえば、実施例3～5を参照)。

【0008】

本発明の方法は細胞を支持体に固定化することができる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1：実施例6の実験に用いたプレート：ストレプトアビシン処理MTP(Microplate)，12ウェル，NUNC，MC ID：604 176，ロット番号：1665 C2。

20

【図2】図2：実施例6の実験のデザインを示す。4×判定。横列A：200 μlのPBSを導入し、1nmolの化合物をそれにそれぞれ添加し、混合し、約30分間インキュベートし、PBSで2回洗浄し、800 μlのPBSを導入し、300.000のWBC(非処理)を添加した。横列B：800 μlのPBSを導入し、300.000のWBC(非処理)を添加した。横列C：1ml中10×10^6のWBCを10nmolの本発明化合物と共に10分間インキュベートし、800 μlのPBS/ウェルを導入し、300.000の処理済みWBCをそれぞれ添加した。第1 MTPプレートを30分後にPBSで2回洗浄し、Hoechstを積層し、15分間インキュベートした。> Cellavista(Operator s9s5)測定した。第2プレートを90分後に測定した。第3プレートを150分後に測定した。

30

【図3】図3：30、90または120分間のインキュベーション後の実施例6の結果を示す。

【図4】図4：30、90または120分間のインキュベーション後の実施例6の結果をグラフとして示す。

【図5】図5：30、90または150分間のインキュベーション後の実施例6のプレートを示す。

【図6-1】図6：A：本発明方法に有用な例示的化合物および合成副産物の化学構造。C：ビオチン-PEG-Lys-(C18)2の合成および合成副産物。

【図6-2】図6：A：本発明方法に有用な例示的化合物および合成副産物の化学構造。C：ビオチン-PEG-Lys-(C18)2の合成および合成副産物。

40

【図6-3】図6：A：本発明方法に有用な例示的化合物および合成副産物の化学構造。C：ビオチン-PEG-Lys-(C18)2の合成および合成副産物。

【図6-4】図6：A：本発明方法に有用な例示的化合物および合成副産物の化学構造。C：ビオチン-PEG-Lys-(C18)2の合成および合成副産物。

【図6-5】図6：A：本発明方法に有用な例示的化合物および合成副産物の化学構造。C：ビオチン-PEG-Lys-(C18)2の合成および合成副産物。

【図7-1】図7：A)社内参考番号29.891180をもつコレステリル含有化合物、B)社内参考番号29.891180をもつミリストン酸含有化合物による、細胞の染色を示す。C)MDA-MB468の染色。D)およびE)：模式的に示す本発明方法に有用な異なる化合物による異なる曝露時間の細胞染色。実施例3による例示的写真。

50

【図7-2】図7：A)社内参照番号29.891180をもつコレステリル含有化合物、B)社内参照番号29.891180をもつミリスチン酸含有化合物による、細胞の染色を示す。C)MDA-MB468の染色。D)およびE)：模式的に示す本発明方法に有用な異なる化合物による異なる曝露時間の細胞染色。実施例3による例示的写真。

【図8-1】図8：A)およびB)は、実施例3によるジャーカット細胞(Jurkat cell)を用いたxCel1igence実験の結果を示す。B)：1：PBS+ビオチンリンカー；2：PBS+10% FCS+ビオチンリンカー；3：PBS+1% FCS+ビオチンリンカー；4：PBS w/o(含まない)ビオチンリンカー；5：PBS+10% FCS w/o ビオチンリンカー；6：PBS+1% FCS w/o ビオチンリンカー；7：PBS+ビオチンリンカー w/o SA；8：PBS w/o ビオチンリンカー w/o SA。
10

【図8-2】図8：A)およびB)は、実施例3によるジャーカット細胞(Jurkat cell)を用いたxCel1igence実験の結果を示す。B)：1：PBS+ビオチンリンカー；2：PBS+10% FCS+ビオチンリンカー；3：PBS+1% FCS+ビオチンリンカー；4：PBS w/o(含まない)ビオチンリンカー；5：PBS+10% FCS w/o ビオチンリンカー；6：PBS+1% FCS w/o ビオチンリンカー；7：PBS+ビオチンリンカー w/o SA；8：PBS w/o ビオチンリンカー w/o SA。

【図9-1】図9：実施例3によるWBC細胞を用いたxCel1igence実験の結果を示す。B)：1：PBS+ビオチンリンカー；2：PBS+10% FCS+ビオチンリンカー；3：PBS+1% FCS+ビオチンリンカー；4：PBS w/o(含まない)ビオチンリンカー；5：PBS+10% FCS w/o ビオチンリンカー；6：PBS+1% FCS w/o ビオチンリンカー。
20

【図9-2】図9：実施例3によるWBC細胞を用いたxCel1igence実験の結果を示す。B)：1：PBS+ビオチンリンカー；2：PBS+10% FCS+ビオチンリンカー；3：PBS+1% FCS+ビオチンリンカー；4：PBS w/o(含まない)ビオチンリンカー；5：PBS+10% FCS w/o ビオチンリンカー；6：PBS+1% FCS w/o ビオチンリンカー。

【図10】図10：実施例3による固定化細胞の染色を示す。左縦列：DA-MB468-抗体：K5/8。中縦列：MDA-MB468-抗体：EpCAM Miltenyi FITC。右縦列：MDA-MB468-抗体：EGFR。
30

【図11】図11：実施例3による固定化細胞の染色を示す。左縦列：MDA-MB468-抗体：EpCAM Biologend。中縦列：MDA-MB468-抗体：EpCAM Miltenys APC。右縦列：WBC-抗体：CD45 Biologend。

【図12-1】図12：本発明方法に有用なさらなる化合物および参照化合物ならびに中間体の構造を示す。

【図12-2】図12：本発明方法に有用なさらなる化合物および参照化合物ならびに中間体の構造を示す。

【図12-3】図12：本発明方法に有用なさらなる化合物および参照化合物ならびに中間体の構造を示す。
40

【図12-4】図12：本発明方法に有用なさらなる化合物および参照化合物ならびに中間体の構造を示す。

【図12-5】図12：本発明方法に有用なさらなる化合物および参照化合物ならびに中間体の構造を示す。

【図12-6】図12：本発明方法に有用なさらなる化合物および参照化合物ならびに中間体の構造を示す。

【図13】図13：異なる分子を用いた遠心分離および細胞固定化の後のWBC回収率を示す。分子プローブHH1749*、HH1750*およびHH1755*(*ビオチン-PAGE-リジン-(C18)2)は遠心分離後の回収率に関して異なる性能を示す：
50

分子の濃度が高いほど、遠心分離後の細胞回収率はより高い。遠心分離特性：10分，300×g。

【図14】図14：異なる分子を用いた遠心分離および細胞固定化の後のWBC回収率を示す。分子プローブHH1749*、HH1750*およびHH1755*は異なる濃度で細胞固定化率に関して異なる性能を示す：リンカー濃度が高いほど、細胞固定化率はより高い。

【図15】図15：本発明方法に有用な異なる化合物を用いた異なる時点での遠心分離後のWBC回収率を示す。分子AおよびB（A：コレステリル-TEG-コレステリル-TEG-（スペーサーC18）7-F1u0s-ビオチン-TEG；B：ビオチン-PEG-リジン-（C18）2）は遠心分離後の回収率に関して異なる性能を示す。それぞれの左カラム：本発明化合物を含まない；それぞれ左から2つ目のカラム：0, 35nmolの分子A；それぞれ左から3つ目のカラム：100nmolの分子B；それぞれの右カラム：0, 5nmolの分子B。分子濃度が高いほど、遠心分離後の細胞回収率はより高い。分子Bは3.5時間以内に細胞を固定化できる。遠心分離特性：10分，300×g。

【図16】図16：異なる実験者による遠心分離後のWBC回収率を示す。各アッセイの左、中および右カラムはそれぞれ異なる実験者1、2および3を表わす。分子濃度が高いほど、遠心分離後の細胞回収率はより高い。さらに、細胞安定化は実験者とは無関係である。遠心分離特性：10分，300×g。分子：コレステリル-TEG-コレステリル-TEG-（スペーサーC18）7-F1u0s-ビオチン-TEG。

【図17】図17：異なる時点および遠心分離設定における遠心分離後のWBC回収率を示す。下記の分子を試験した：1234:5'-(コレステリル-TEG)2-スペーサーC18-dT-ビオチン-TEG-3'；1248:3'-(コレステリル-TEG)2-PEG2000-F1u0s-ビオチン-TEG-5' INVERS；1254:3'-(コレステリル-TEG)2-スペーサーC18-F1u0s-ビオチン-TEG-5' INVERS；1255:3'-(ミリスチン酸)2-PEG2000-dT-ビオチン-TEG-5' INVERS。すべての分子が2時間以内に細胞を固定化できる。PBS中のWBCは300×gで20分間の遠心分離に際して損傷を受ける。分子1234は最良の性能を示し、化合物1255および1254がそれに続く。遠心分離特性：20分，300×g。それぞれの左カラム：分子と共に10分間のインキュベーション。それぞれの中カラム：分子と共に1時間 分間のインキュベーション。それぞれの右カラム：分子と共に2時間のインキュベーション。

【図18】図18：異なる時点および遠心分離設定における遠心分離後のWBC回収率を示す。下記の分子を試験した：1255:3'-(ミリスチン酸)2-PEG2000-dT-ビオチン-TEG-5' INVERS；1234:5'-(コレステリル-TEG)2-スペーサーC18-dT-ビオチン-TEG-3'；1248:3'-(コレステリル-TEG)2-PEG2000-F1u0s-ビオチン-TEG-5' INVERS；1254:3'-(コレステリル-TEG)2-スペーサーC18-F1u0s-ビオチン-TEG-5' INVERS。すべての分子が2時間以内に細胞を固定化できる。PBS中のWBCは500×gで20分間の遠心分離に際して損傷を受ける。分子1234は最良の性能を示し、化合物1255および1254がそれに続く。遠心分離特性：20分，500×g。それぞれの左カラム：分子と共に10分間のインキュベーション。それぞれの中カラム：分子と共に1時間 分間のインキュベーション。それぞれの右カラム：分子と共に3時間のインキュベーション。

【図19】図19：異なる時点および遠心分離設定における遠心分離後のWBC回収率を示す。下記の分子を試験した：1255:3'-(ミリスチン酸)2-PEG2000-dT-ビオチン-TEG-5' INVERS；1234:5'-(コレステリル-TEG)2-スペーサーC18-dT-ビオチン-TEG-3'；1248:3'-(コレステリル-TEG)2-PEG2000-F1u0s-ビオチン-TEG-5' INVERS；1254:3'-(コレステリル-TEG)2-スペーサーC18-F1u0s-ビオチン-TEG-5' INVERS。すべての分子が2時間以内に細胞を固定化でき

10

20

30

40

50

る。P B S 中のW B C は $1000 \times g$ で 20 分間の遠心分離に際して損傷を受ける。遠心分離特性：20分， $1000 \times g$ 。それぞれの左カラム：分子と共に 10 分間のインキュベーション。それぞれの中カラム：分子と共に 1 時間 分間のインキュベーション。それぞれの右カラム：分子と共に 2 時間のインキュベーション。

【図 20】図 20：異なる時点での遠心分離後のジャーカット細胞回収率を示す。それぞれのカラムは左から：1：分子と共に 10 分間のインキュベーション。2：分子と共に 1 時間のインキュベーション。3：分子と共に 3 , 5 時間のインキュベーション。4：分子と共に 5 , 5 時間 分間のインキュベーション。下記の分子を試験した：1255 : 3' - (ミリスチン酸) 2 - P E G 2 0 0 0 - d T - ピオチン - T E G - 5' IN V E R S . 1 2 3 4 : 5' - (コレステリル - T E G) 2 - スペーサー C 1 8 - d T - ピオチン - T E G - 3' ; 1 2 4 8 : 3' - (コレステリル - T E G) 2 - P E G 2 0 0 0 - F l u o s - ピオチン - T E G - 5' IN V E R S ; 1 2 5 4 : 3' - (コレステリル - T E G) 2 - スペーサー C 1 8 - F l u o s - ピオチン - T E G - 5' IN V E R S 。ジャーカット培養細胞は、P B S 中、および異なる分子を用いた遠心分離プロセスに際して 5 . 5 時間以内は安定である。遠心分離特性：20 分間， $500 \times g$ 。

【図 21 - 1】図 21：3 官能性リンカー部分が細胞生存性に影響を及ぼさないことを示す。3 官能性リンカー部分が異なる、本発明方法に有用な異なる化合物を用いて、W S T - 1 増殖キット (R A S) を用いる細胞生存性試験を実施した。これらの異なるリンカーは 4 時間のリンカーインキュベーション時間中、細胞生存性に影響を及ぼさないと思われる。A) 2 時間後および B) 4 時間後の生存性試験。

【図 21 - 2】図 21：3 官能性リンカー部分が細胞生存性に影響を及ぼさないことを示す。3 官能性リンカー部分が異なる、本発明方法に有用な異なる化合物を用いて、W S T - 1 増殖キット (R A S) を用いる細胞生存性試験を実施した。これらの異なるリンカーは 4 時間のリンカーインキュベーション時間中、細胞生存性に影響を及ぼさないと思われる。A) 2 時間後および B) 4 時間後の生存性試験。

【図 22 - 1】図 22：3 官能性リンカー部分が細胞生存性に影響を及ぼさないことを示す。本発明方法に有用な被験化合物、すなわち A)：コレステロール部分を含む化合物としての N o . 1 2 4 4 、および B)：ステアリン酸部分を含む化合物としての 1 2 7 4 は、4 . 5 時間のリンカーインキュベーション時間中、細胞形態に影響を及ぼさないことが分かった。左の写真：1 時間のインキュベーション。中の写真：2 , 5 時間のインキュベーション。右の写真：4 , 5 時間のインキュベーション。上の写真：明視野。下の写真：D A P I 。

【図 22 - 2】図 22：3 官能性リンカー部分が細胞生存性に影響を及ぼさないことを示す。本発明方法に有用な被験化合物、すなわち A)：コレステロール部分を含む化合物としての N o . 1 2 4 4 、および B)：ステアリン酸部分を含む化合物としての 1 2 7 4 は、4 . 5 時間のリンカーインキュベーション時間中、細胞形態に影響を及ぼさないことが分かった。左の写真：1 時間のインキュベーション。中の写真：2 , 5 時間のインキュベーション。右の写真：4 , 5 時間のインキュベーション。上の写真：明視野。下の写真：D A P I 。

【図 23】図 23：リンカーインキュベーションを行なわない場合の異なる時点での細胞形態を示す。本発明方法に有用な分子を添加しない場合、細胞は 4 . 5 時間のインキュベーション時間中に離散する。左の細胞ではインキュベーション時間中に細胞形態が影響を受けていない。左の写真：1 時間のインキュベーション。中の写真：2 , 5 時間のインキュベーション。右の写真：4 , 5 時間のインキュベーション。上の写真：明視野。下の写真：D A P I 。

【図 24】図 24：異なる時点での遠心分離後の M D A - M B 4 6 8 細胞回収率を示す。それぞれのカラムは左から：1：分子と共に 10 分間のインキュベーション。2：分子と共に 1 時間のインキュベーション。3：分子と共に 3 時間のインキュベーション。4：分子と共に 5 時間 分間のインキュベーション。本発明方法に有用な下記の化合物を試験した：1 2 3 4 : 5' - (コレステリル - T E G) 2 - スペーサー C 1 8 - d T - ピオチン

10

20

30

40

50

- T E G - 3' ; 1 2 5 5 : 3' - (ミリスチン酸) 2 - P E G 2 0 0 0 - d T - ビオチン - T E G - 5' IN V E R S。 M D A - M B 4 6 8 培養細胞は、 P B S 中、 および本発明方法に有用な異なる化合物を用いた遠心分離プロセスに際して、 5 時間以内は安定である。遠心分離特性： 20 分間， 5 0 0 × g。

【発明を実施するための形態】

【0010】

用語“支持体”または“表面”は、液相中の試薬と不均一反応により相互作用する材料を表わす。好ましくは、支持体は固体支持体である。

用語“固体支持体”は、液相中の試薬と不均一反応により相互作用する固相材料を表わす。固体支持体の使用は化学、生化学、医薬および分子生物学の分野で周知である。解決すべき技術的課題に応じて多数のタイプの固体支持体が開発されている。本発明に関してこれらのはずれかを使用できる。たとえば、本発明方法に使用する固体支持体は、シリカ、酢酸セルロース、ニトロセルロース、ナイロン、ポリエステル、ポリエーテルスルホン、ポリオレフィン、もしくはポリフッ化ビニリデン、またはその組合せの成分を含むことができる。さらなる適切な固体支持体にはコントロールドポアガラス、ガラスプレートまたはスライドガラス、ポリスチレン、および活性デキストランが含まれるが、これらに限定されない。他の観点において、合成有機ポリマー、たとえばポリアクリルアミド、ポリメタクリレートおよびポリスチレンも例示的な支持体表面である。さらに、多糖類、たとえばセルロースおよびデキストランは支持体表面のさらなる例示である。他の支持体表面、たとえば繊維も作動可能である。

【0011】

固体支持体を容器に収容することができ、その際、容器はチューブ、たとえば遠心チューブもしくはスピンドルチューブ、注射器、カートリッジ、チャンバー、マルチウェルプレート、もしくは試験管、またはその組合せである。細胞の固定化を可能にするために、固体支持体を前処理または官能化することができる。たとえば、実施例に示すように、ウェル・プレートをストレプトアビシンで前処理することができる。1 様において、通常は適切な接触が可能になるように固体支持体は繊維状または粒状であってもよい。使用するのに適した固体支持体のサイズは変更できる。細胞を 1 つの固体支持体（たとえば、1 つの容器またはマルチウェルプレート）のみに結合させることができ、あるいは多数の固体支持体（たとえば、ビーズ）に結合させることができる。使用するのに適した固体支持体の形状は、たとえばシート、プレカットしたディスク、シリンダー、単纖維、または粒状物から構成される固体支持体であってもよい。好ましい 1 様において、固体支持体は平坦であり、あるいは実質的に平坦であってキャビティを備えている。1 様において、固体支持体は繊維状または粒状であってもよい。固体支持体のサイズは変更でき、実施すべき方法または適用に応じて選択できる。

【0012】

ある様において、固相は試験片、チップ、特にマイクロアレイチップもしくはナノアレイチップ、マイクロタイター・プレート、またはマイクロ粒子である。

本発明方法に使用できる化合物の細胞固定化の基本原理は、本発明方法に使用できる化合物の末端疎水性部分が目的細胞膜の脂質二重層内へ固着(anchor)することであると仮定される。次いで細胞を、たとえばその後、特異的に修飾された表面に付着させ、所望により視覚化および／または検出のために標識することができる。疎水性部分に応じて、特定の細胞への優先的または排他的な結合を達成することもできる。

【0013】

さらに、固定化方法には、実施例に詳細に示すように、細胞に対する有利な安定化効果をさらに示す化合物を用いる。これは、固定化された細胞の細胞生存性および／または細胞生理が目的かつ重要である場合に特に重要である。

【0014】

特に、疎水性部分としてコレステロール部分を含む化合物が殊に好ましい。

安定化効果、特に剪断保護効果は、特に本発明方法に使用できる化合物の疎水性部分と

10

20

30

40

50

してのコレステロール、ミリスチン酸およびステアリン酸について証明される（参照：実施例5）。

【0015】

ポリエチレングリコール（PEG）部分は、少なくとも1つの-O-CH₂-CH₂-部分、好ましく1～50、より好ましくは4～30の-O-CH₂-CH₂-部分を含む、線状または分岐状、好ましくは線状の部分であると理解される。

【0016】

安定化・固定化を得るのに加えて、この基本原理は、結合分子の末端疎水性部分が細胞膜の脂質二重層内へ固着することであると仮定される。この疎水性分子の固定化により原形質膜流動性が低減し、したがって細胞が安定化される。

10

【0017】

本発明方法に使用する化合物は連結基を含む。

連結基は、化合物を表面または支持体、特に固体支持体に可逆的もしくは不可逆的に、および/または共有結合もしくは非共有結合により固定化するのに適した部分である。好ましい態様において、連結基は抗体もしくは抗原結合性抗体フラグメント、受容体もしくはその結合部位、受容体に対するリガンド、酵素もしくはその結合部位、酵素に対する基質、タグ結合部位、タグ、または官能基である。

【0018】

官能基はたとえばチオール基であってもよく、それを金コートした基材表面に共有結合性の不可逆的な-S-S-結合の形成により結合させることができる。

20

ストレプトアビジンへのビオチンの結合、または抗体もしくは抗原結合性抗体フラグメントの結合は、非共有結合性かつ可逆的である。固体支持体への非共有結合を用いるそのような連結基は、細胞をさらに使用するために、たとえば動物モデルに投与するために、再び離脱させることを意図する場合に好ましい。

【0019】

好ましい態様において、連結基は、たとえばストレプトアビジンコートした表面または支持体に非共有結合できるビオチン部分、または固体支持体としての金コートした基材表面に結合できるチオール基であってもよい。

【0020】

本発明による特に好ましい連結基はビオチンである。実施例に示すように、連結基としてビオチンを含む化合物は細胞を固定化するために特に有用であることが見出された。

30

脂質は、脂肪、ろう、ステロール、脂溶性疎水性ビタミン、たとえばビタミンA、D、EおよびK、脂肪酸のモノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、ならびにリン脂質から選択される疎水性小分子である。

【0021】

疎水性ビタミンは、ビタミンA、D、EおよびKからなる群から選択される小分子である。より好ましい態様において、疎水性ビタミンは-トコフェロールである。

本発明方法に使用できる化合物は、1以上の疎水性ドメイン、親水性ドメイン、および連結基を含み、好ましくはそれらからなる。

【0022】

好ましくは、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10の疎水性ドメインが親水性ドメインに共有結合している。

40

実施例に示すように、本発明方法に使用する化合物を細胞と接触させる。固定化は好ましくは生細胞または生存可能性のある細胞について行なわれるので、細胞は一般に、好ましくは緩衝化されたおよび/または栄養素を含有する水溶液中に存在し、たとえば細胞はPBSまたは培地に懸濁されている。本発明方法に使用する化合物を、たとえば溶液の形で、たとえば水溶液として、ピペッティングなど当技術分野で既知の方法により細胞に添加することができる。

【0023】

一般に、化合物をたとえば水溶液の形で目的とする細胞懸濁液に添加する。一般に、細

50

胞の生存性を維持するために、混合は穏やかに行なわれる。

一般に、接触は約 1 ~ 45 、好ましくは 10 ~ 30 、より好ましくは 22 ~ 38 の温度で行なわれる。好ましくは、細胞の生存性に影響を及ぼさない温度が選択される。

【 0024 】

同様に、細胞生存性を維持するために、接触は一般に約 900 ~ 1100 mbar の圧力で行なわれる。

同様に、細胞を化合物と共に、結合させるのに十分な時間、インキュベートすることが好ましい。一般に、細胞を化合物と共に、1分~3日間、好ましくは5分~24時間、よりいっそう好ましくは10分~8時間、インキュベートすることが好ましい。

10

【 0025 】

さらに、水溶液は一般に細胞の統合性および / または生存性に影響を及ぼさないように選択される。

そのような条件により化合物は細胞の膜と相互作用することができる。それにより、連結基が細胞に固定化される。

【 0026 】

本発明方法の工程 c) は、細胞に固定化された連結基を、連結基を結合できる支持体と接触させ、それにより細胞を支持体に固定化することに関する。そのような接触は、工程 b) で得られた細胞を適切な支持体に添加することにより、たとえば工程 b) で得られた細胞を適切な支持体にピペッティングすることにより実施できる。この態様において、工程 b) の細胞と支持体は工程 c) 以前には空間的に分離されている。たとえば、本明細書に開示するビオチン部分を含む化合物を細胞に固定化することができる。インキュベーション後に、それにより得られた細胞を、ストレプトアビジンでコートされたアレイまたはウェル - プレートヘピペッティングその他の方で移すことができる。ビオチン部分とストレプトアビジン部分は結合し、それにより細胞は表面に固定化される。

20

【 0027 】

あるいは、工程 b) で得られた細胞は支持体から空間的に分離されてはいない。そのような態様において、細胞は既にたとえばウェル - プレート内にあり、連結基を含む本発明方法に使用できる化合物が懸濁状態の細胞に添加されるか、あるいは連結基を含む本発明方法に使用できる化合物がたとえばウェル内に存在し、適切な緩衝液に懸濁された細胞がそれに添加される。この態様において、連結基は特定の条件下でのみ結合できる部分であり、それにより分子スイッチとなる。たとえば、連結基は、補因子もしくは反応体を添加した場合にのみ連結基を結合できる支持体と反応する官能基であるか、あるいは結合のために補因子を必要とするバイオアファイン (生物親和性) (bioaffine) 結合対のメンバーであってもよく、それにより細胞を支持体に固定化する。

30

【 0028 】

好ましくは、化合物を工程 b) で、支持体または表面から空間的に分離されている細胞と接触させる。実施例に示すように、ビオチンとストレプトアビジンを結合対として使用できる。実施例においては、ビオチンを化合物の連結基として用い、この連結基を結合できる支持体はストレプトアビジンでコートされた支持体である。

40

【 0029 】

連結基を結合できる支持体は、チオール基と反応できる金表面の場合のように支持体自体が連結基を結合できるならば処理されていない支持体であるか、あるいは適切な結合対のメンバーまたは連結基と反応する官能基を含むように前処理できる支持体である。前処理の性質は、支持体および連結基を結合するために支持体に付着させる部分の化学的性質に依存する。好ましい態様において、連結基を結合できる支持体は、前処理され、バイオアファイン結合対の一方のメンバーを含む；特に、支持体は、それに結合した、好ましくはそれに共有結合した、抗体もしくは抗原結合性抗体フラグメント、受容体もしくはその結合部位、受容体に対するリガンド、酵素もしくはその結合部位、酵素に対する基質、タグ結合部位、タグ、または官能基を含む。

50

【0030】

連結基を結合できる支持体を得るために、前処理された支持体上の部分を連結基に対応して選択することは理解される。

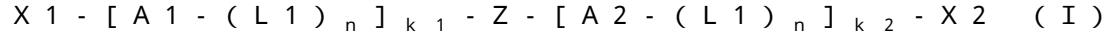
好ましい態様において、本発明は、化合物が下記の化合物またはその塩である本発明方法に関する：

1以上の疎水性ドメインおよび親水性ドメインを含み、好ましくはそれらからなり、

1以上の疎水性ドメインは親水性ドメインに共有結合しており、

1以上の疎水性ドメインはそれぞれ、線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミンを含み、

親水性ドメインは式(I)の化合物を含み：



{式中：

Zは、1～100、好ましくは1～50、より好ましくは4～30の-O-CH₂-CH₂-部分を含む線状ポリエチレングリコール(PEG)部分であり、その際、ポリエチレングリコール部分は2つの-O-CH₂-CH₂-部分を連結する1以上のスペーサー部分SPを含んでもよく、線状PEG部分は一端または両端にリンカー部分L3を含んでもよく、

各L1は、互いに独立して選択されるリンカー部分であり、

各nは、0または1のいずれかであり、互いに独立して選択され、

A1およびA2は、互いに独立して選択される2官能性または3官能性の部分であり、ただし、少なくとも1つのA1またはA2は3官能性であり、

k1およびk2は、0～10の整数であり、互いに独立して選択され、ただし、k1およびk2のうち少なくとも1つは0ではなく、

X1およびX2は、独立して水素または保護基から選択され、

L3は、独立して、1～10個のC原子を含む線状アルキルまたはアルケニル鎖から選択され、それは(i)1～3個のN、OまたはS原子により中断されてもよく、および/または(ii)1～4個のヒドロキシル、カルボニル、アミノまたはチオール基により置換されていてもよい}、

1以上の疎水性ドメインは、親水性ドメインに3官能性ドメインを介して共有結合しており、

化合物はさらに連結基を含む。

【0031】

安定化効果を得るためには、本発明方法に使用する化合物は2または3以上、より好ましくは2または3つの疎水性ドメインを含むのが有利であることが見出された。特に有利には、特定の態様において、少なくとも1つの脂質疎水性ドメインがステロイドを含む。

【0032】

本発明の好ましい1態様において、2または3以上、より好ましくは2または3つの疎水性部分である疎水性ドメインが、親水性ドメインに共有結合している。

本明細書における一般的理解のために、“疎水性部分”は“疎水性ドメイン”に含まれ、その主要部を形成し、よってその疎水性を決定する。

【0033】

2以上の疎水性部分を含む化合物についての疎水性部分は同一であってもよく、あるいは異なってもよい。たとえば、2つの疎水性ドメインを含む本発明方法に使用する化合物は、2つのミリスチン酸部分、またはミリスチン酸部分とコレステリル部分を含むことができる。

【0034】

疎水性ドメインは、それぞれ線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミンを含み、好ましくはそれからなる。

線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミンは、3官能性部分に直接に、またはリンカ-L2を介して結合していてもよい。線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミンが3官

10

20

30

40

50

能性部分に直接結合している化合物の例は、化合物ミリスチン酸 - ミリスチン酸 - (スペーサー C 18) 7 - F 1 u o s - ビオチン - T E G である。線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミンがリンカー L 2 を介して 3 官能性部分に結合している化合物の例は、化合物コレステリル - T E G - コレステリル - T E G - (スペーサー C 18) 7 - F 1 u o s - ビオチン - T E G である。この後者の例において T E G (テトラエチレングリコール) がリンカー L 2 である。

【 0 0 3 5 】

好み 1 態様において、疎水性ドメインはそれぞれ、線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミンからなる。この事象において、線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミンは疎水性、より好み 1 は親油性であるので、疎水性ドメインが疎水性、より好み 1 は親油性であるのは明らかである。10

【 0 0 3 6 】

疎水性部分は、ある質量の水から忌避される部分であると理解される。好み 1 は、その部分は親油性である；すなわち、それは脂肪または脂肪酸のような他の非極性親油性物質に溶解する傾向をもつ。

【 0 0 3 7 】

他の好み 1 態様において、疎水性ドメインはそれぞれ、線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミン、および 1 以上のさらなる部分を含む。この態様において、疎水性部分は全体として疎水性、より好み 1 は親油性である。

【 0 0 3 8 】

よりいっそう好み 1 態様において、線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミンを含む本発明方法に使用できる化合物の疎水性ドメインは、細胞膜に挿入できる。これは、当技術分野で既知の方法により判定できる。20

【 0 0 3 9 】

好み 1 態様において、本発明方法に使用できる化合物の 2 または 3 つの疎水性部分は異なる疎水性ドメインであり、あるいは 3 つの疎水性部分の場合、2 つは第 3 のものと異なり、または 3 つすべてが互いに異なる。

【 0 0 4 0 】

本発明のこの好み 1 態様において、第 1 疎水性ドメインは飽和脂肪酸、特にミリスチン酸、ステアリン酸またはベヘン酸、特にミリスチン酸を含み、好み 1 はそれからなり、および / または第 2 疎水性ドメインはコレステロールを含み、好み 1 はそれからなる。第 3 疎水性ドメインの場合、このドメインは好み 1 はコレステロールまたは飽和脂肪酸、特にミリスチン酸、ステアリン酸またはベヘン酸、特にミリスチン酸を含み、好み 1 はそれからなり、および / または第 1 または第 2 疎水性ドメインと同一である。30

【 0 0 4 1 】

このコンホメーションは、一価分子、すなわち、本発明の疎水性部分を 1 つ含む分子と比較して、細胞に対してより高い結合親和性をもつことが示された。したがって、本発明方法に有用な化合物の剪断保護効果を達成するのに必要な濃度は、一価分子と比較してより低い。

【 0 0 4 2 】

分子の親水性部分は本発明方法に有用な化合物のインターナリゼーションを阻害し、疎水性部分を外側原形質膜内へ取り込むことにより剪断保護効果が誘導される。本発明方法に有用な標識された化合物を用いた実験により、化合物は細胞内部に影響を及ぼすことなく外側原形質膜に取り込まれるだけであることが確認された。40

【 0 0 4 3 】

固定化に関して、疎水性部分をもつ化合物は、すべての細胞タイプのターゲティングおよび緊密な保持を示すことが実施例において見出された（特に実施例 2 を参照）。特に、コレステロール、ミリスチン酸、ステアリン酸およびベヘン酸部分は、本発明方法に使用するための化合物において特に有用であることが見出された。

【 0 0 4 4 】

10

20

40

50

1、2または3つの疎水性部分を含む化合物を用いる方法は定量的な細胞固定化のために有利であることも見出された。

本発明によれば、“コレステロール - 二重リンカー分子”は、2つの疎水性部分を含み、それらが両方ともコレステロールである、本発明方法に有用な化合物であると理解される。したがって、“ミリスチン酸 - 三重リンカー分子”は、3つの疎水性部分を含み、それらがすべてミリスチン酸である化合物であると理解される。

【0045】

本発明によれば、“非対称二重リンカー分子”は、2つの疎水性部分を含み、それら2つの疎水性部分が互いに異なる化合物であると理解される。

本発明方法に使用する化合物は、例において大部分がこのモジュール型の模式的様式で記載される。 10

【0046】

本発明によれば、図6A)に示す化合物“コレステリル - TEG - コlesteryl - TEG - (スペーサーC18)7 - Fluos - ビオチン - TEG”は、疎水性部分としての2つのコレステロール部分がTEG(テトラエチレングリコール)を介して3官能性部分に結合している化合物であると理解される。

【0047】

化学式と並行して化合物のモジュール型記述を示す図6によれば、“(スペーサーC18)”はスペーサー部分として長さ18原子のPEG部分にホスフェート部分が続くものであると理解される。したがって、-(スペーサーC18)7-は7つの“(スペーサーC18)”部分からなる部分であると理解される。 20

【0048】

本発明によれば、“Fluos”は3官能性部分A2に直接結合したフルオレセイン部分であると理解される。

本発明によれば、“ビオチン - TEG”はリンカーTEGを介して3官能性部分A2に結合したビオチン部分であると理解される。

【0049】

この模式的様式で開示した、本発明方法に使用する化合物の場合、3官能性部分A1はTEG結合 - 疎水性部分については一般にグリセロールである(参照:図6A)。さらに、3官能性部分としてのグリセロールに代わるセリノールまたは6-[(2-ヒドロキシエチル)アミノ] - 1 - ヘキサノールを含む態様を同様に開示する。そのような3官能性部分に代わる他のものは当業者が入手できる。 30

【0050】

図6Aの化合物について3官能性部分A1はセリノールであり、その際、疎水性部分は3官能性部分A1に直接結合している。

よりいっそう模式的様式で、“コレステリル - TEG - コlesteryl - TEG - (スペーサーC18)7 - Fluos - ビオチン - TEG”は構造“5' - X X Y Y Y Y Y Y F Z - 3'”のものであると記載することができ、その際、YはPEG + スペーサー部分であり、Xは3官能性リンカーを介して親水性部分に結合した疎水性部分であり、Fは蛍光標識フルオレセインであり、Zは連結基(ビオチン)である。5'および3'は、ヌクレオチドと同様に、実施例に示す自動合成による合成の方向を示す。 40

【0051】

同様に、-PEG2000-はPEG2000部分；すなわち、45のC₂H₆O₂サブユニットからなるポリエチレングリコール(PEG)鎖であると理解される。

実験の部に記載する本発明方法に使用する化合物において、そうではないと明確に指摘しなければ、L1が存在し(n=1)、それはホスフェートである。

【0052】

実施例に具体的に開示した本発明方法に使用する化合物に関して“スペーサー”は、ホスフェート部分を含むPEG部分であると理解される。PEG部分の長さは、たとえばC9またはC12により決定され、それはPEG部分がそれぞれ9または12原子の長さを 50

もつことを示す。

【0053】

“dT”は、図6B)に例示されるチミジンであると理解される。この部分dTは吸光により化合物の濃度を決定するために使用でき、本発明による2官能性部分である。

特に、コレステロール-二重リンカー分子、ミリスチン酸-二重または三重リンカー分子、およびステアリン酸-二重リンカー分子は、白血球および種々の培養細胞系を用いる定量的細胞固定化を達成するのに適切であることが見出された。さらに、コレステロール-二重リンカーとミリスチン酸-二重リンカー分子の組合せは、単一の二重リンカー分子と比較してある細胞タイプの弱い固定化率増大を示す。

【0054】

コレステロール部分とミリスチン酸部分の両方を含む非対称二重リンカーは定量的な細胞固定化も示すことも示された。

さらに、親水性ドメインに共有結合した2または3つの疎水性分子を含む本発明方法に有用な化合物は、細胞への緊密な結合を示し、それはおそらく協同結合効果の利用によるものであろう。細胞へのそのような分子の結合は、疎水性分子を1つだけ含む化合物を用いる結合または固定化と比較して100~1000倍強い。

【0055】

さらに、1態様において、2または3つの疎水性部分は、リンカー部分L1の使用により空間的に分離されていることが好ましい。これは細胞の定量的固定化のために特に有用である。適切なリンカーを用いると、本発明方法において血液からのすべての種類の希少細胞および普通細胞を固定化するために理想的に適したテイラード結合分子が得られる。

【0056】

そのような好ましい態様において、n=1であり、したがってL1が存在する。

本発明方法に有用な化合物の親水性ドメインはPEG部分を含み、したがってフレキシブルである。

【0057】

本発明方法に有用な化合物の末端疎水性部分(单数または複数)に続いて長いフレキシブル親水性ドメインがある。

この親水性ドメインは、目的細胞の周囲で細胞を安全に包埋するのに必要なフレキシブルフォールディングを行なうことができ、それにより細胞の形態および機能を存続させるために重要な細胞フレンドリーなヒドロゲル様環境を生成する。

【0058】

フレキシブル親水性ドメインを得るために、長さの異なる、および/またはPEG部分間のホスフェートのような構成スペーサー部分の異なる、種々の線状PEG部分を使用できる。たとえば、45のC₂H₆O₂サブユニットを含むポリエチレンギリコール(PEG)鎖(PEG2000)(参照:実施例6B))または前記の-(スペーサー-C18)-7-のようなホスフェートスペーサーを含むPEG部分を使用できる。

【0059】

適切な保護基は当技術分野で知られている。ホスホルアミダイト化学に適切な保護基は、たとえば(4,4'-ジメトキシトリチル(DMT)、およびフルオレノメトキシカルボニル(Fmoc)である。特に好ましい保護基はDMT(4,4'-ジメトキシトリチル)である。

【0060】

本発明方法に使用する化合物の多様な塩類、たとえば図1に示すように本発明方法に有用な化合物のNa⁺および/またはTEA⁺塩類を使用できる。

他の塩類も可能であり、当業者に知られている。好ましくは、細胞の生存性または機能に全くまたは実質的に影響を及ぼさない塩類を使用する。

【0061】

本発明の好ましい態様において、式(I)中の部分Zは下記の構造をもつ:



10

20

30

40

50

$^2]_{y_1} - (L_3)_{n_2} -$
式中：

S P は、スペーサー部分であり、

各スペーサー部分 S P は互いに独立して選択され、

各 n 1 は、0 または 1 のいずれかであり、m 個の部分それぞれについて独立して選択され、

各 n 2 は、0 または 1 のいずれかであり、互いに独立して選択され、

m は、1 から 100、好ましくは 1 から 50、より好ましくは 4 から 30 の整数であり

y は、1 から 100、好ましくは 1 から 50、より好ましくは 4 から 30 の整数であり 10

y 1 は、0 から 30、好ましくは 0 から 10、より好ましくは 0 から 4 の整数であり、
ただし、 $y^* m + y_1 = 100$ であり、

L 3 は、前記に定めたものである。

【0062】

本発明のさらなる好ましい態様において、n 1 は m 個の部分 - [O - CH₂ - CH₂]_y - (S P)_{n 1}] - について同一である。

例から分かるように、n 1 は一般に、本発明方法に有用な化合物において常に 0 あり
あるいは本発明方法に有用な化合物において常に 1 である。

【0063】

n 1 = 1 の例示的化合物は、コレステリル - T E G - スペーサー C 12 - コlesteryl - T E G - (スペーサー C 18) 7 - F l u o s - ビオチン - T E G である。 20

n 1 = 0 の例示的化合物は、コレステリル - T E G - コlesteryl - T E G - P E G 2 0 0 0 - F l u o s - ビオチン - T E G である。

【0064】

本発明のさらなる好ましい態様において、y 1 は 0 である。

y 1 = 0 の例示的化合物は、コレステリル - T E G - スペーサー C 12 - コlesteryl - T E G - (スペーサー C 18) 7 - F l u o s - ビオチン - T E G である。

【0065】

本発明のさらなる態様において、y 1 は 1 である。 30

y 1 = 1 の例示的化合物は、5' - コlesteryl T E G - コlesteryl T E G - (スペーサー C 18) 7 - スペーサー C 3 - d T - ビオチン T E G - 3' である。

【0066】

本発明のさらなる好ましい態様において、y は 3、4、5 または 6 であり、n 1 は 1 である。よりいっそう好ましくは、m は 3、4、5、6、7、8、9 または 10 である。

本発明のさらなる好ましい態様において、スペーサー部分 S P は互いに独立してホスフェートおよび 2 官能性部分からなる群から選択される。

【0067】

すべてのスペーサー部分 S P が同一であることが好ましい。よりいっそう好ましくは、すべての部分 S P がホスフェートである。 40

本発明による 2 官能性部分は本発明方法に使用する化合物の合成前に 2 つの官能基を含む部分であると理解される。したがって、そのような 2 官能性部分は線状化合物の合成に適切である。適切な 2 官能性基は、好ましくは下記のものからなる群から選択される：ホスフェート基、カルバメート基、アミド基、核酸塩基を含む部分、よりいっそう好ましくは d T、および 1 ~ 10 個の C 原子、特に 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個の原子を含む線状アルキル基であって、末端 C 原子に、特に、独立してアミン、カルボニル、ヒドロキシル、チオール、炭酸基から選択される官能基を含むアルキル鎖。末端官能基をもつ適切な線状アルキル基の例は、ジアミノアルキル部分、たとえば H₂N - (CH₂)₅ - NH₂ またはヒドロキシル - カルボニル部分、たとえば - C (O) - (CH₂)₄ - O - である。 50

【0068】

本発明による3官能性部分は、本発明方法に使用する化合物の合成前に3つの官能基を含む部分であると理解される。したがって、そのような3官能性部分は分岐化合物の合成に適切である。適切な3官能性部分は、好ましくは1~10個のC原子、特に1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のC原子をもち、かつ少なくとも1つの-OH、-SHおよび/または少なくとも1つの-NH₂基をもつ3官能性部分から選択され、より好ましくはアミノ酸、たとえばリジンまたはセリン、セリノール、-O-CH₂-CH((CH₂)₄-NH₂)-CH₂-、グリセロール、および1,3-ジアミノグリセロール部分から選択される。

【0069】

10

本発明のさらなる好ましい態様において、X₁および/またはX₂、好ましくはX₁またはX₂は、疎水性ドメインにより置き換えられている。X₁が疎水性ドメインにより置き換えられている例示的化合物は、実施例に示すビオチン-PEG-Lys-(C18)₂である。

【0070】

本発明のさらなる好ましい態様において、n₂は両方とも0である。そのような態様において、中心の線状PEG部分は部分X₁-[A₁-(L₁)_n]_{k₁}および[A₂-(L₁)_n]_{k₂}-X₂に直接結合している。

【0071】

20

本発明のさらなる好ましい態様において、一方または両方のn₂が1であり、L₃は1~10個のC原子をもつアルキル基であり、それはアミド基、カルボニル基、カルバメート、および/またはNH基を含んでいてもよい。本発明のさらなる好ましい態様において、L₃は1~10個のC原子をもつアルキル基であり、それはアミド基、カルボニル基、カルバメート、および/またはNH基を含んでいてもよい。たとえば、本発明の化合物ビオチン-PEG2000-Lys-(C18)₂の場合のように、1つのL₃は-NH-CH₂-CH₂NHCO-CH₂-CH₂-であってもよい。

【0072】

本発明のさらなる好ましい態様において、線状脂質は
(a)飽和もしくは不飽和脂肪酸、および/または
(b)8から26個のC原子、好ましくは12から22個のC原子、より好ましくは14から18個のC原子をもつ脂肪酸
である。

30

【0073】

脂肪酸は、飽和または不飽和のいずれかの長い脂肪族テイル(鎖)をもつカルボン酸である。大部分の天然脂肪酸は4から28の偶数の炭素原子の鎖をもつ。

飽和脂肪酸の例は、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリストン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、およびセロチン酸である。

【0074】

適切な不飽和脂肪酸の例は下記のものである。

40

【0075】

【表1】

<u>一般名</u>	<u>Δx</u>	<u>鎖長:二重結合</u>	
ミリストレイン酸	cis- $\Delta 9$	14:1	
パルミトトレイン酸	cis- $\Delta 9$	16:1	
サピエン酸	cis- $\Delta 6$	16:1	
オレイン酸	cis- $\Delta 9$	18:1	10
エライジン酸	trans- $\Delta 9$	18:1	
バクセン酸	trans- $\Delta 11$	18:1	
リノール酸	cis,cis- $\Delta 9,\Delta 12$	18:2	
リノエライジン酸	trans,trans- $\Delta 9,\Delta 12$	18:2	
α -リノレン酸	cis,cis,cis- $\Delta 9,\Delta 12,\Delta 15$	18:3	
アラキドン酸	cis,cis,cis,cis- $\Delta 5\Delta 8,\Delta 11,\Delta 14$	20:4	
エイコサペンタエン酸	cis,cis,cis,cis,cis- $\Delta 5,\Delta 8,\Delta 11,\Delta 14,\Delta 17$	20:5	20
エルシン酸	cis- $\Delta 13$	22:1	
ドコサヘキサエン酸	cis,cis,cis,cis,cis,cis- $\Delta 4,\Delta 7,\Delta 10,\Delta 13,\Delta 16,\Delta 19$		

【0076】

よりいっそう好ましい態様において、線状脂質はオレイン酸、ミリスチン酸、ステアリン酸およびベヘン酸からなる群から選択され、より好ましくはミリスチン酸およびオレイン酸から選択される。

【0077】

さらなる好ましい態様において、ステロイドを疎水性部分として使用できる。

ステロイドは、互いに連結した特徴的配列の4つのシクロアルカン環を含むタイプの有機化合物である。ステロイドのコアは17個の炭素原子からなり、それらが互いに結合して4つの縮合環の形をとる：3つのシクロヘキサン環（環A、BおよびCと表記する）および1つのシクロペンタン環（D環）。ステロイドは、この4環コアに結合する官能基およびそれらの環の酸化状態により変異する。ステロールは特殊な形のステロイドであり、位置3のヒドロキシル基およびコレスタンから誘導された骨格をもつ。

【0078】

本発明のさらなる好ましい態様において、

(a) ステロイドはステロールである、または

(b) ステロイドは、コレステロール；ステロイドホルモン、好ましくは生殖腺ステロイド、より好ましくはアンドロゲン、たとえば同化ステロイド、アンドロステンジオン、デヒドロエピアンドロステロン、ジヒドロテストステロン、またはテストステロン、エストロゲン、たとえばエストラジオール、エストリオール、またはエストロン；黄体ホルモン物質、たとえばプロゲステロンまたはプロゲスチン、コルチコステロイド、特にグルココルチコイドまたはミネラルコルチコイド；エクジステロイド(ecdysteroid)、たとえばエクジステロン(ecdysterone)；フィトステロール； brassinosteroid；ホパノイド(hopanoid)；およびエルゴステロールからなる群から選択される、

より好ましくは、ステロイドはコレステロールである、または

(c) 疎水性ビタミンは - トコフェロールである。

【0079】

30

40

50

本発明のさらなる好ましい態様において、1、2、3または4、好ましくは1、2または3つの疎水性ドメインが親水性ドメインに共有結合している。

本発明のさらなる好ましい態様において、親水性ドメインに共有結合している2以上の疎水性ドメインは異なるかまたは同一である。

【0080】

本発明のさらなる好ましい態様において、疎水性ドメイン（単数または複数）は線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミンからなる。

本発明のさらなる好ましい態様において、疎水性ドメイン（単数または複数）は3官能性部分A1にリンカー部分L2を介して共有結合した線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミンを含み、好ましくはそれからなる。

10

【0081】

疎水性部分を直接またはリンカーL2を介して結合させるために、そのような2官能性および3官能性の部分を本発明方法に使用する化合物中に用いるのに成功した。

リンカーL2は、独立して、疎水性部分を親水性部分に共有結合させるのに適したいずれかのリンカー部分であり、そのリンカーは疎水性部分とそれぞれA1またはA2との間に50、30もしくは20原子またはそれ未満の長さをもつ。

【0082】

好ましい1態様において、リンカーL2は下記のものを含み、好ましくはそれからなる；ホスフェート基、部分-[O-CH₂-CH₂]_{y2}-(SP)_n]_{m1}-{式中：SPおよびnは前記に定めたものであり、好ましくはn=0であり、y2は1から30、好ましくは3から10の整数であり、m1は1から10、好ましくは1から3の整数である}、グリセロール部分、カルバメート基、アミド基、1~10個のC原子、特に1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の原子を有する線状アルキル基：そのアルキル鎖は末端C原子に、特に、独立してアミン、カルボニル、ヒドロキシル、チオール、炭酸基から選択される官能基を含み、それは1、2、3、4または5つの部分R1により置換されてもよく、その際、R1は独立してC1-C4アルキル、C1-C4ヒドロキシアルキル、C1-C4アミノアルキル、C1-C4シアノアルキル、ヒドロキシル、チオール、アミノまたはカルボニル部分を含む。末端官能基を含む適切な線状アルキル基の例は、ジアミノアルキル部分、たとえばH₂N-(CH₂)₅-NH₂またはヒドロキシル-カルボニル部分、たとえば-C(O)-(CH₂)₄-O-である。好ましくは、線状アルキル基は置換されていない。よりいっそう好ましくは、線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミンは3官能性部分A1に、リンカー部分-(O-CH₂-CH₂)_j-{式中、jは1、2、3、4、5、6、7、8、9または10から選択され、好ましくはjは3である}、特にテトラエチレングリコール(TEG)、ホスフェート部分、またはTEG、グリセロールおよびホスフェート部分を含む部分、または-TEG-グリセリル-ホスフェート-O-(CH₂)₄-C(O)-を含むかもしくはそれからなる部分を介して結合している。

20

【0083】

本発明方法のより好ましい態様において、化合物は3官能性部分A1にリンカー部分L2を介して共有結合した線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミンを含み、好ましくはその際、L2は、ホスフェート、アミド、カルバメート、エステル基、および部分

30

-[O-CH₂-CH₂]_{y2}-(SP)_n]_{m1}-{式中：

SPおよびnは前記に定めたものであり、好ましくはn=0であり、y2は、1から30、好ましくは3から10の整数であり、m1は、1から10、好ましくは1から3の整数である}

からなる群から選択され、

より好ましくは、線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミンはリンカー部分テトラエチレングリコール(TEG)またはホスフェートを介して3官能性部分A1に結合している。

40

50

【0084】

本発明のさらなる好ましい態様において、 k_1 は1、2、3、4または5、好ましくは1、2または3である。

本発明の特に好ましい態様において、疎水性ドメイン（単数または複数）は、3官能性部分（単数または複数） A_1 のみを介して、または前記のドメイン $X_1 - [A_1 - (L_1)_n]_{k_1}$ を介して、その親水性ドメインに共有結合している。そのような態様に、本発明方法に使用する化合物のさらなる好ましい態様も適用される。そのような化合物において、疎水性ドメインは専ら分子の一方の末端部に位置し、これに対し、さらなる基、たとえば連結基（単数または複数）、および所望により標識部分（単数または複数）は、そこから空間的に離れた他方の末端部に位置する。

10

【0085】

本発明のさらなる好ましい態様において、 k_2 は1、2、3、4、5または6、好ましくは1、2または3である。

本発明方法に使用する化合物がdT部分を2官能性部分 A_2 として含む場合、 k_2 は好ましくは3、4、5または6である。

【0086】

本発明の他の好ましい態様において、 k_1 は0であり、 X_1 は疎水性ドメインにより置き換えられており、それは好ましくはステロイド、より好ましくはコレステロールを含む。特に好ましい態様において、 Z は部分 $- (L_3)_{n_2} - TEG (L_3)_{n_2} -$ であり、式中の n_2 は独立して0または1である。本発明のよりいっそう好ましい態様において、 k_2 は1、2、3、4、5または6、好ましくは3、4、5または6である。よりいっそう好ましくは、1以上、特に1つの、さらなる疎水性部分（単数または複数）が部分 $- [A_2 - (L_1)_n]_{k_2} - X_2$ に結合し、その際、さらなる疎水性部分（単数または複数）はステロイド、より好ましくはコレステロールを含む。よりいっそう好ましくは、 L_2 はリンカーパートテトラエチレングリコール（TEG）、ホスフェート、またはTEG、グリセロールおよびホスフェート部分を含む部分、または-TEG-グリセリル-ホスフェート-O-(CH₂)₄-C(O)-を含むかもしくはそれからなる部分である。本発明方法に使用する例示的化合物は、図12に示すChol-TEG-Chol-TEG-Doubler-ビオチン-dTである。

20

【0087】

本発明方法に使用する化合物がdT部分を2官能性部分 A_2 として含む場合、 k_2 は好ましくは3、4、5または6である。

30

本発明方法のさらなる好ましい態様において、工程a)の化合物はさらに標識部分を含む。したがって、本発明のさらなる好ましい態様において、化合物は標識部分および連結基を含む。

【0088】

そのような化合物は、細胞の固定化と検出の両方を達成すべき場合に、たとえば固定化された細胞の位置確認(localization)または細胞の定量のために、特に適切である。そのような化合物の例は5'--(コレステリル-TEG)₂-PEG2000-Fluos-ビオチン-TEG-3'であり、これを本発明の方法に用いて、ストレプトアビジン-コートしたプレートに細胞を固定化し、そしてこれらの細胞を検出するのに成功した。

40

【0089】

適切な標識部分は in vitro 検出に適した部分であり、当業者に知られている。検出は、発光、特に蛍光の場合のように直接的であってもよく、あるいは酵素またはその基質の場合のように間接的であってもよい。よって、直接検出または間接検出に適した標識部分を両方とも使用できる。

【0090】

本明細書中で用いる“標識”または“標識部分”は、直接検出または間接検出のための信号を発生できるいざれかの物質を表わす。よって、標識部分を直接または間接的に検出できる。直接検出のために、本発明に使用するのに適した標識部分をいざれか既知の検出

50

可能なマーカーグループ、たとえば色原体、化学発光性グループ（たとえば、アクリジニウムエステルまたはジオキセタン）、電気化学発光性化合物、色素、または蛍光色素（たとえば、フルオレセイン、クマリン、ローダミン、オキサジン、レゾルフィン、シアニン、およびその誘導体）、発光性金属錯体、たとえばルテニウムまたはユーロピウムの錯体、および放射性同位体から選択できる。

【0091】

間接検出系において、バイオアファイン結合対の第1パートナーは本発明方法に使用する化合物の標識部分である；すなわち、第1パートナーは本発明に使用する化合物に共有結合しており、その一部である。適切な結合対の例は、ハプテンまたは抗原／抗体、ビオチンまたはビオチニアナログ、たとえばアミノビオチン、イミノビオチンまたはデスチオビオチン／アビジンまたはストレプトアビジン、糖／レクチン、核酸または核酸アナログ／相補的核酸、および受容体／リガンド、たとえばステロイドホルモン受容体／ステロイドホルモンである。好ましい第1結合対メンバーは、ハプテン、抗原およびホルモンを含む。同様に好ましいものは、ハプテン、タゲ、ジゴキシンおよびビオチン、ならびにそのアナログである。そのような結合対の第2パートナー、たとえば抗体、ストレプトアビジンなどは、通常は直接検出できるように、たとえば前記の標識部分により標識される。

【0092】

したがって、好ましい態様において、標識部分は直接標識化または間接標識化のための標識部分である。

好ましい1態様において、標識部分は下記のものから選択される：(a) 色原体、化学発光性グループ（たとえば、アクリジニウムエステルまたはジオキセタン）、電気化学発光性化合物、色素、蛍光色素（たとえば、フルオレセイン、クマリン、ローダミン、オキサジン、レゾルフィン、シアニン、およびその誘導体）、発光性金属錯体、たとえばルテニウムまたはユーロピウムの錯体、および放射性同位体からなる群から選択される直接標識化部分；(b) あるいは間接検出系の一方のパートナー、好ましくは標識部分が下記のものからなる群から選択される結合対のメンバーのうちの一方であるもの：(i) ハプテンまたは抗原／抗体、(ii) ビオチンまたはビオチニアナログ、たとえばアミノビオチン、イミノビオチンまたはデスチオビオチン／アビジンまたはストレプトアビジン、(iii) 糖／レクチン、(iv) 核酸または核酸アナログ／相補的核酸、および(v) 受容体または受容体フラグメント／リガンド、たとえばステロイドホルモン受容体／ステロイドホルモン。

【0093】

間接検出に適した標識部分として好ましい第1結合対メンバーは、ハプテン、抗原およびホルモンを含む。同様に好ましいものは、ハプテン、ジゴキシンおよびビオチンならびにそのアナログである。そのような結合対の第2パートナー、たとえば抗体、ストレプトアビジンなどは、一般に直接検出できるように、たとえば前記の直接標識部分により標識される；しかし、本発明方法に使用する化合物中に抗体を用い、標識された抗原またはハプテンを検出のために用いることもできる。

【0094】

上記の結合対メンバーの記載において、抗体という用語は抗体およびその抗原結合性フラグメントの両方を包含すると理解される。

好ましい態様において、標識部分は直接標識化のための標識部分であり、よりいっそく好ましくは標識部分は蛍光性部分または色素である。

【0095】

適切な蛍光性部分（または色素）は当技術分野で知られており、下記のものを含む：フルオレセイン、C_y3、C_y5、C_y5.5、C_y2、C_y3.5、C_y3b、C_y7、A_le_xa F_{lu}o_r色素、キサンテン誘導体、たとえばローダミン、オレゴングリーン(Oregon green)、エオシン、またはテキサスレッド(Texas red)、シアニン誘導体、たとえばシアニン、インドカルボシアニン(indocarbocyanine)、オキサカルボシアニン(oxa carbocyanine)、チアカルボシアニン(thiacarbocyanine)、およびメロシアニン(merocyanine)

10

20

30

40

50

ine)、ナフタレン誘導体、たとえばダンシル(dansyl)およびプロダン(prodan)誘導体、クマリン誘導体、オキサジアゾール誘導体、たとえばピリジルオキサゾール、ニトロベンゾオキサジアゾールおよびベンゾオキサジアゾール、ピレン誘導体、たとえばカスケードブルー(cascade blue)、オキサジン誘導体、たとえばナイルレッド(Nile red)、ナイルブルー(Nile blue)、クレシルバイオレット(cresyl violet)、オキサジン170、アクリジン誘導体、たとえばプロフラビン、アクリジンオレンジ、アクリジンイエロー、アリールメチン誘導体、たとえばオーラミン、クリスタルバイオレット、マラカイトグリーン、テトラピロール誘導体、たとえばポルフィン、フタロシアニンおよびビリルビン。

【0096】

実施例において、フルオレセインを例示的な標識として用いた。これによって高感度の標識検出が可能になり、標識の位置確認および/または定量が共に可能になる。蛍光標識は本発明の特に好ましい標識部分である。10

【0097】

標識化に適した放射性同位体(radioactive isotopeまたはradioisotope)、および本発明方法に使用する化合物をそのような放射性標識で標識するための方法は、当業者に知られている。たとえば、下記の同位体のうちの1つを使用できる： ^{14}C 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、および ^{131}I 。

【0098】

抗体または抗原結合性フラグメントを間接系である抗体/抗原またはハプテンのメンバーとして用いる場合、エピトープまたはハプテンに対して特異的な抗体または抗原結合性フラグメントが本発明方法に使用する化合物の一部であってもよく、あるいはエピトープまたはハプテンが本発明方法に有用な化合物の一部であってもよい。したがって、後続検出のために、それぞれ他方のメンバーを、たとえば蛍光標識で直接標識することができる。適切な抗体または抗原結合性フラグメントを後記にさらに詳細に記載する。20

【0099】

本発明の好ましい態様において、連結基および所望により標識部分を部分[A2-(L1)_n]_{k2}-X2に結合させる。

本発明の特に好ましい態様において、疎水性ドメイン(単数または複数)は親水性ドメインに3官能性部分(単数または複数)A1のみを介して(または前記のドメインX1-[A1-(L1)_n]_{k1}を介して)共有結合しており、連結基および所望により標識部分は部分[A2-(L1)_n]_{k2}-X2に結合している。これにより、細胞膜内への挿入のための疎水性ドメインと固定化および所望により標識化のための部分との空間的分離が確実になる。30

【0100】

本発明のより好ましい態様において、化合物はさらに標識部分を含み、その際、標識部分は3官能性部分A2を介して共有結合している。たとえば、そのような標識部分は蛍光色素である。

【0101】

そのような化合物は、固定化に加えて標識化および検出するための本発明方法に使用するのに特に適切である。40

本発明の他の好ましい態様において、1以上の部分(単数または複数)A2は標識部分であり、より好ましくは部分A2は核酸塩基を含む部分であり、よりいっそう好ましくは実施例に記載する特定の化合物の場合のように、部分A2はdTである。

【0102】

本発明の他の好ましい態様において、化合物はさらに標識部分を含み、その際、標識部分は3官能性部分A2を介して共有結合している。たとえば、そのような標識部分は蛍光色素であり、1以上の部分(単数または複数)A2は標識部分であり、より好ましくは部分A2は核酸塩基を含む部分であり、よりいっそう好ましくは部分A2はdTである。

【0103】

dTを含むそのような化合物を実施例において化合物の濃度を決定するために用いた。

50

そのような態様において、本発明方法に使用する化合物はフルオレセインおよびdTを含むことができる。

【0104】

さらなる好ましい態様において、連結基は3官能性部分A2を介して共有結合し、たとえば連結基はビオチンである。

よりいっそう好ましい態様において、連結基は3官能性部分A2を介して共有結合しており、標識部分は3官能性部分A2を介して共有結合している。

【0105】

本発明のさらなる特に好ましい態様において、疎水性ドメイン(単数または複数)は親水性ドメインに3官能性部分(単数または複数)A1のみを介して(または前記のドメインX1-[A1-(L1)_n]_{k1}を介して)共有結合しており、連結基および標識部分が部分[A2-(L1)_n]_{k2}-X2に結合している。
10

【0106】

そのような化合物により、固定化と、標識化、検出および定量との両方が可能になる。

本発明のいっそうさらなる特に好ましい態様において、疎水性ドメイン(単数または複数)は親水性ドメインに3官能性部分(単数または複数)A1のみを介して(または前記のドメインX1-[A1-(L1)_n]_{k1}を介して)共有結合しており、連結基が部分[A2-(L1)_n]_{k2}-X2に結合しているが、標識部分は結合していない。

【0107】

そのような化合物は、結合した細胞の固定化のみを意図する場合に使用できる。
20

本発明のよりいっそう好ましい態様において、本発明方法に使用する化合物は標識部分および連結基を含み、その際、標識部分は蛍光標識であり、および/または連結基はビオチンである。

【0108】

本発明の他の好ましい態様において、化合物がさらに標識部分を含むことはない。例示的化合物は5'-コレステリルTEG-コレステリルTEG-P EG 2000-ビオチンTEG-3である。

【0109】

本発明のさらなる好ましい態様において、リンカーL1は、独立してホスフェート、アミド、カルバメート、およびエステル基からなる群から選択される。
30

本発明のさらなる好ましい態様において、部分A1およびA2は、独立して、下記のものから選択される：ホスフェート基、カルバメート基、アミド基、核酸塩基を含む部分、よりいっそう詳しくはdT、および1~10個のC原子を有する線状アルキル基であって末端C-原子に、特に、独立してアミン、カルボニル、ヒドロキシル、チオール、炭酸基から選択される官能基を含むアルキル鎖からなる群から選択される2官能性基；ならびに1~10個のC原子を有し、少なくとも1つの-OH、-SH、および/または少なくとも1つの-NH₂基を含み、詳しくはリジン、セリン、セリノール、-O-CH₂-CH((CH₂)₄-NH₂)-CH₂-、グリセロール、および1,3-ジアミノグリセロール部分から選択される3官能性部分。

【0110】

本発明のさらなるより好ましい態様において、リンカーL2は、独立してホスフェート、アミド、カルバメート、エステル基、および部分

-[O-CH₂-CH₂]_{y2}-(SP)_n]_{m1}-

{式中：

SPおよびnは前記に定めたものであり、詳しくはn=0であり、

y2は、1から30、詳しくは3から10の整数であり、

m1は、1から10、詳しくは1から3の整数である}

からなる群から選択される。

【0111】

PEG-ベースのリンカー、すなわちTEG-リンカーは、本発明方法に有用な例示的
50

化合物に有用であることが示された。例示的化合物は 5' - コレスチリル T E G - コレスチリル T E G - (スペーサー C 18) 7 - F l u o s - ビオチン T E G - 3' である。

【 0 1 1 2 】

本発明方法に有用な化合物およびその中間体は、当業者に知られている方法により製造できる。本発明方法に有用な化合物の例示的な合成を図 6 C に示す。本発明方法に有用な化合物の合成に用いた中間体も図 1 2 に示す。さらに、合成の一般的概念を実施例 1 にそれらの化合物について簡単に記載する。それらの化合物は、ホスホルアミダイト - ベースのスクレオチド合成と同様に固相で製造できる。それらの化合物は、実施例に記載するように、C P G のような固体支持体上の合成により合成できる。特に、それらの化合物は、当業者に知られている条件下での後続カップリング工程、および固体支持体（実施例において：C P G (controlled pore glass) (コントロールドポアガラス)）からの開裂により合成できる。他の固体支持体、たとえばマクロ多孔質ポリスチレンも合成に使用できる。合成は保護基を保持することにより、または保護基を開裂させることにより実施できる。特に、それらの化合物は、D M T オン（保有）またはD M T オフ（離脱）のいずれかの方式で、3' 末端と表示する分子末端に D M T 分子を残して、または D M T 基を開裂除去することにより合成できる。それらの化合物を、たとえば透析によってさらに精製してもよい。

【 0 1 1 3 】

ビオチン - P E G - L y s - (C 18) 2 の合成を図 6 C に詳細に示す。

本発明方法に有用な他の化合物を当技術分野で知られている方法に従って同様に製造できる。

【 0 1 1 4 】

前記に説明したように、本発明方法に用いる化合物を工程 b) で組成物として、たとえば水溶液として接触させることができる。

好み 1 様において、1 種類より多い前記化合物を含む組成物を使用できる。

【 0 1 1 5 】

より好み 1 様において、化合物またはその塩は 1 種類以上の前記化合物を含む組成物中にある。

したがって、1 様において、本発明は、細胞を支持体に固定化するための方法に関するものであって、その方法は、

a) 下記の化合物またはその塩を含む組成物を用意する：

親水性ドメインに結合した 1 以上の疎水性ドメインを含み、好み 1 からなり

、
1 以上の疎水性ドメインは親水性ドメインに共有結合しており、

1 以上の疎水性ドメインはそれぞれ、線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミンを含み、親水性ドメインはポリエチレングリコール (P E G) 部分を含む化合物であって、連結基を含む化合物；

b) 化合物が細胞の膜と相互作用できる条件下で、前記化合物を含む組成物と細胞を接触させ、それにより連結基を細胞の表面に固定化する；そして

c) 細胞に固定化された連結基を、その機能性ドメインを結合できる表面と接触させ、それにより細胞を表面に固定化することを含む。

【 0 1 1 6 】

よりいっそう好み 1 様において、組成物は少なくとも 3 種類の異なる前記化合物を含み、

(i) 異なる化合物は少なくともそれらの疎水性ドメインにおいて異なり、

(i i) 異なる化合物は標識部分を含む。

【 0 1 1 7 】

よりいっそう好み 1 様において、組成物は少なくとも 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 または 10 種類の異なる前記化合物を含む。

10

20

30

40

50

本発明はさらに、本発明方法に有用な少なくとも1種類の化合物が少なくとも1つの細胞、好ましくは生細胞に結合したものを含む組成物に関する。そのような組成物は、それぞれ細胞の固定化および所望により検出に有用である。

【0118】

好ましい1態様において、そのような組成物はさらに固体支持体を含み、本発明方法に有用な少なくとも1種類の化合物が連結基を介してそれに結合している。そのような態様において、少なくとも1つの細胞が本発明方法に有用な化合物を介して固体支持体に固定化されている。化合物がさらに標識部分を含む場合、細胞（単数または複数）の位置確認、検出および定量が可能である。

【0119】

他の好ましい態様において、少なくとも1つの細胞に結合した本発明方法に有用な少なくとも1種類の化合物を含む組成物は水性緩衝液を含み、本発明方法に有用な少なくとも1種類の化合物が結合した少なくとも1つの細胞は該緩衝液に懸濁されている。そのような組成物は、その中の細胞を、たとえば固定化工程の前、または固定化工程の後の、たとえばFACSまたは遠心分離に際して、およびその後の離脱に際して、適切に安定化するのに適している。

【0120】

本発明方法に有用な化合物は、脂質二重層を含むいずれかの細胞に結合するのに適切である。好ましくは、細胞は真核細胞、より好ましくは動物細胞、よりいっそう好ましくは脊椎動物細胞、最も好ましくはヒト細胞である。

【0121】

好ましい態様において、細胞は懸濁状態の細胞であり、および/または細胞は動物細胞またはヒト細胞、特に脊椎動物細胞、殊に哺乳動物細胞である。よりいっそう好ましくは、細胞は懸濁状態の細胞であり、動物細胞またはヒト細胞、特に脊椎動物細胞、殊に哺乳動物細胞である。

【0122】

たとえば、細胞は白血球、希少細胞、腫瘍細胞、または変異細胞、より好ましくは脊椎動物またはヒトの白血球、希少細胞、腫瘍細胞、または変異細胞である。

さらなる態様において、本発明は、本発明方法に有用な1種類またはそれ以上の化合物を含む組成物を使用する本発明方法に関する。

【0123】

本発明方法に有用な2種類以上の異なる化合物を含むある組成物は、細胞タイプ - 非依存性の固定化および標識化のために特に有用であることを示すことができた。

したがって、他の態様において、本発明は、本発明方法に有用な少なくとも3種類の異なる化合物を含む組成物を使用する本発明方法に関するものであり、その際、異なる化合物は少なくともそれらの疎水性ドメインにおいて異なり、異なる化合物は標識部分を含む。

【0124】

少なくとも2種類はそれらの疎水性ドメイン（単数または複数）において異なる、本発明方法に有用な多様な化合物の使用により、すべての細胞タイプを結合する組成物を得ることができ、それにより細胞タイプ - 非依存性の固定化が提供される。

【0125】

よりいっそう好ましい態様において、よって組成物は本発明方法に有用な少なくとも4、5、6、7、8、9または10種類の異なる化合物を含む。よりいっそう好ましい態様において、そのような組成物の2、3、4、5、6、7、8、9、10またはすべての化合物が少なくともそれらの疎水性ドメインにおいて異なる。

【0126】

適切な好ましい疎水性ドメインは、前記に定めたものである。

より好ましい態様において、少なくとも1種類の化合物の疎水性ドメインが飽和脂肪酸、殊にミリスチン酸、ステアリン酸またはベヘン酸、特にミリスチン酸を含み、好ましく

10

20

30

40

50

はそれからなり、および／または少なくとも1種類の化合物の疎水性ドメインがステロイド、特にコレステロール、または疎水性ビタミン、特に-トコフェロールを含み、好ましくはそれからなる。

【0127】

好ましい態様において、本発明は、本発明方法に有用な1種類またはそれ以上の化合物を含む水溶液を使用する本発明方法に関する。

本発明方法に使用する水溶液は、好ましくは緩衝化されている。たとえば、溶液はリン酸緩衝化生理食塩水（P B S）、トリス、および／またはH e p e s 緩衝液であってもよい。

【0128】

本発明方法に有用な溶液のp Hは、好ましくは約5，5～8，5、より好ましくは6，5～7，5である。

なおさらなる態様において、本発明は、細胞を固定化するための、前記に開示した少なくとも1種類の化合物または組成物を含むキットの使用に関する。

【0129】

キットはさらに、個別に、たとえば容器または注射器に保存された、本発明方法に使用するための2種類以上の化合物を含むことができる。それらは乾燥形態、たとえば凍結乾燥もしくは乾燥した状態で、または溶液として、または凍結形態で、たとえば凍結溶液として保存できる。

【0130】

1態様において、本発明の方法は、希少細胞の固定化、ならびに所望により検出および／または特性分析のために、好ましくは1つの希少細胞の特性分析のために使用できる。

したがって、他の態様において、本発明は目的細胞を含む細胞集団を支持体に固定化する方法に関するものであって、その方法は、

a) 下記の化合物またはその塩を含む組成物を用意する：

親水性ドメインに結合した1以上の疎水性ドメインを含み、好ましくはそれからなり、

1以上の疎水性ドメインは親水性ドメインに共有結合しており、

1以上の疎水性ドメインはそれぞれ、線状脂質、ステロイドまたは疎水性ビタミンを含み、親水性ドメインはポリエチレングリコール（P E G）部分を含む化合物であって、連結基を含む化合物；

b) 化合物が細胞の膜と相互作用できる条件下で細胞集団をその化合物と接触させ、それにより細胞の表面に連結基を固定化する；

c) 細胞に固定化された連結基を、その連結基を結合できる表面と接触させ、それにより細胞をその表面に固定化する；そして

d) 表面に固定化された目的細胞を所望により検出することを含む。

【0131】

細胞の集団は少なくとも2種類の細胞を含む組成物であり、それは少なくとも2種類の異なる細胞を含有し、あるいは含有すると推定される。そのような異なる細胞は、たとえばそれぞれT細胞とB細胞、異なるT細胞のサブセット、または腫瘍細胞と非腫瘍細胞、または内皮細胞と上皮細胞であってもよい。

【0132】

本発明による“細胞の膜”は原形質膜であると理解される。

この本発明方法には、細胞を表面に固定化するための前記の本発明方法のものと同じ態様が適用される。したがって、適切な化合物を含む組成物も前記のように使用できる。

【0133】

特に好ましい態様において、目的細胞は白血球、特に希少細胞、たとえば循環型の腫瘍細胞、内皮細胞または上皮細胞である

よりいっそう好ましくは、細胞は懸濁状態の細胞であり、および／または細胞は動物細

10

20

30

40

50

胞またはヒト細胞、特に脊椎動物細胞、殊に哺乳動物細胞である。

【0134】

表面に固定化された目的細胞の検出は、そのような目的細胞に特異的な検出剤の使用により実施できる：たとえば、特異的細胞表面マーカーを認識する抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、または複数の特異的細胞表面マーカーを認識する複数の抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、たとえば特定のT細胞サブセット集団を検出するためのもの、または特定の腫瘍細胞タイプを検出するための特異的な腫瘍マーカー（単数または複数）を認識するもの。前記のように、また当業者に知られているように、抗体またはその抗原結合性フラグメントのような検出剤を、次いで直接または間接的に検出できる。直接検出の場合は、検出剤自体が直接検出可能な標識、たとえば蛍光色素で標識されている。あるいは、間接検出可能な標識を使用でき、たとえば標識部分、たとえば蛍光性部分を備えた二次抗体を検出することができる。その際、蛍光を検出できる。

10

【0135】

目的細胞を検出するための検出可能な標識は、目的細胞の特異的検出を可能にするために、本発明の工程a)およびb)に用いる化合物の標識部分と異なることが好ましい。蛍光色素を用いる場合、それぞれの色素は好ましくは別個の励起および／または発光スペクトラルを示す。

【0136】

目的細胞を固定化するそのような態様において、たとえば全血から単離した有核細胞を、本発明方法の実施により規定の支持体または表面に、特にアレイ状に、より好ましくはマイクロアレイまたはナノアレイ状に固定化することができる。この有核細胞集団内の、たとえば白血球（WBC）集団内の希少細胞、たとえば循環型の腫瘍細胞、内皮細胞または上皮細胞をこの表面または支持体に定量的に結合させ、その希少細胞集団に特異的な抗原または生化学的特性に対する抗体または特異的結合分子により同定することができる。これにより、必要であればさらなる特性分析工程のための厳密な位置確認および再-位置確認が可能になる。

20

【0137】

したがって、本発明の好ましい態様において、表面に固定化された目的細胞を検出する工程d)を実施する。

本発明のさらなる態様において、さらに標識部分を含む本発明方法に有用な化合物を用いる。これにより細胞集団自体の検出が可能になり、その細胞集団と比較した目的細胞についての情報を得ることが可能になる。

30

【0138】

したがって、本発明はまた、1つの希少細胞の特性分析のための、本発明方法の使用に関する。

したがって、本発明のさらなる態様において、1つの希少細胞の特性分析はさらなる工程e)として、たとえば細胞表面マーカーの検出により実施される。

【0139】

さらなる態様において、本発明の方法は、特に抗体スクリーニングのようなスクリーニング目的で懸濁細胞を固定化するために使用できる。たとえば、抗体または抗原結合性フラグメントを表面に提示している固定化細胞を、当技術分野で既知の方法により、抗原への結合についてスクリーニングすることができる。

40

【0140】

培養細胞系における抗体またはその抗原結合性フラグメントのスクリーニングは、抗体開発に一般に適用される。1適用は、抗体を細胞表面の特異的受容体分子に結合させることを含む。二次抗体（サンドイッチ効果）を用いて一次抗体の結合特性を調べることができる。懸濁細胞を用いてそのような実験を行なうのは困難である。本発明の方法は、細胞の生理学的特性をいずれも喪失することなく懸濁細胞を慎重に固定化でき、したがってそのようなスクリーニングアッセイを実施するために使用できる。

【0141】

50

同様に、本発明の方法を用いて懸濁細胞を細胞の機能アッセイのために固定化することができる。細胞の機能を *in vitro* または *in vivo* で調べるためにアッセイは重要である：細胞の機能アッセイは、医薬、農業およびバイオテクノロジーの研究および開発において、小分子化合物または生体物質を調べるために、あるいは小分子のクラスをハイスループットスクリーニングで同定するために、一般に用いられる。ある機能アッセイは表面依存アッセイを基礎とし、したがって一般に接着性細胞について実施される。本発明の方法を懸濁細胞の固定化のために実施して、そのような機能アッセイを後続工程として適用することができる。

【0142】

したがって、本発明のさらなる態様において、本方法は、工程 e) 固定化された細胞のスクリーニング、たとえば固定化された細胞の抗体スクリーニングを含む。10

本発明のなおさらなる態様において、本方法は、工程 e) 固定化された細胞を用いる細胞の機能アッセイの実施をさらに含む。

【0143】

したがって、本発明はまた、懸濁細胞の固定化のための、好ましくはスクリーニングのための、よりいっそう好ましくは抗体もしくは抗原結合性抗体フラグメントまたは他の方式の結合分子についてのスクリーニングのための、本発明方法の使用に関する。

【0144】

したがって、本発明はまた、細胞の機能アッセイの実施のための、本発明方法の使用に関する。20

好ましい 1 態様において、本発明の方法は *in vitro* 法である。

【0145】

さらに、本発明の方法に統じて、細胞を離脱させる後続工程を行なうことができる。たとえば、生細胞を固体支持体または表面に固定化するために本発明の方法を実施し、統じて支持体または表面から離脱させてマウスモデルに移植することができる。これらの種類の機能アッセイは、たとえば循環型異常細胞の腫瘍誘発ポテンシャルを調べるためにきわめて重要である。

【0146】

この態様において、離脱は、本発明の工程 c) : 細胞に固定化された連結基を、その連結基を結合できる表面と接触させ、それにより細胞をその表面に固定化した後；または工程 d) : 表面に固定化された目的細胞を検出した後、好ましくは工程 d) : 表面に固定化された目的細胞を検出した後に実施できる。30

【0147】

さらなる好ましい態様において、スクリーニング工程、および / または希少細胞の特性分析工程、および / または細胞の機能アッセイ工程は、細胞を離脱させる前に実施される。

【0148】

したがって、本発明のさらなる態様において、本方法はその後の固定化細胞の離脱に関する工程をさらに含む。

本発明の方法はラボ・オン・チップ(*lab on a chip*)として実施できる：2 ~ 50 個のような少数の細胞または単一細胞の細胞形態または細胞機能を調べるために、本発明方法に有用な化合物を支持体または表面に選択的かつ系統的にスポットすることができる。このスポットティングによって少数の細胞または単一細胞をそのようなスポット上にターゲティッド固定化することができる。これよりその支持体または表面(チップ)で直接に分子分析できる。40

【0149】

したがって、1 態様において、2、3、4 またはそれ以上の本発明方法を並行して、特に固体支持体、たとえばチップ上で実施する。チップはアレイ、特にマイクロアレイまたはナノアレイであってもよい。たとえば、50、1000 または 10000 の固定化法を並行して実施する。50

【0150】

そのような固体基材は、粒子、たとえばナノ粒子、特に磁性ナノ粒子、カラム、または平坦な基材、アレイまたはウェルプレート、特にオリゴウェルまたはマルチウェル・プレートであってもよい。好ましい態様において、アレイはマイクロアレイまたはナノアレイである。

【0151】

本発明方法に使用する化合物は、たとえば剪断応力を示す条件に際しての細胞の安定化にも有用である。

したがって、本発明はまた、本発明方法の固定化に際して、または工程 a) 以前の培養に際して、少なくとも 1 つの細胞を安定化するための、本発明方法の使用に関する。 10

【0152】

本発明方法に有用な化合物は、さらに、バイオテクノロジーにおける、たとえば大規模な動物細胞培養における、細胞安定化のために有用である：哺乳動物細胞の剪断感受性は大規模な動物細胞培養の開発を複雑にする可能性のある関連問題となる可能性があると発表された。本化合物はこれらの問題を軽減する。

【0153】

本発明方法に有用な化合物は、さらにフローサイトメトリーおよび / または蛍光活性化セルソーティングにおける細胞安定化のために有用である：

フローサイトメトリーは特定の細胞集団を分離するためにごく一般的に用いられる方法である。このプロセスに際して、細胞は流速に応じた高い剪断応力を受ける。本発明方法に有用な化合物はこの剪断応力を低減する。 20

【0154】

本発明方法に有用な化合物は、さらにビーズ - ベースの細胞分離プロセスにおける細胞安定化のために有用である：

異なる表現型をもつ細胞集団を、磁性ビーズに結合した特異的抗体により分離することができる。このプロセスに際して、細胞はビーズのサイズに応じた高い剪断応力を受ける。本発明方法に有用な化合物はこの剪断応力を低減する。

【0155】

抗体および抗原結合性抗体フラグメントに関して、当業者にはそのような分子が分かれている：天然抗体は、基本構造を共有する免疫グロブリンとしても知られる球形血漿タンパク質（約 150 kDa (http://en.wikipedia.org/wiki/Dalton_unit)）である。それらはアミノ酸残基に付加した糖鎖をもつので、それらは糖タンパク質である。それぞれの抗体の基本的な機能単位は免疫グロブリン（Ig）モノマー（1 つの Ig 単位のみを含む）である；分泌型抗体は、IgA のように 2 つの Ig 単位を含むダイマー型、真骨魚類(telost fish) IgM のように 4 つの Ig 単位を含むテトラマー型、または哺乳動物 IgM のように 5 つの Ig 単位を含むペンタマー型の場合もある。本発明において、適切なフォーマットの例には IgA、IgD、IgE、IgG および IgM として知られる抗体アイソタイプを含む天然抗体のフォーマットが含まれる。 30

【0156】

天然抗体のほかに、抗体フラグメントを含む人工抗体フォーマットが開発された。それらのうち幾つかを以下に記載する。 40

すべての抗体の一般構造がきわめて類似するが、特定抗体の固有の特性は前記に詳述したように可変（V）領域により決定される。より具体的には、それぞれ軽鎖（VL）上に 3 つ、重鎖（VH）上に 3 つの可変ループが、抗原への結合、すなわちそれの抗原特異性に関与する。これらのループは相補性決定領域（CDR）と呼ばれる。VH と VL の両ドメインからの CDR が抗原 - 結合部位に寄与するので、最終的な抗原特異性を決定するのは重鎖と軽鎖の組合せであって、いずれか単独ではない。

【0157】

したがって、本明細書中で用いる用語“抗体”は、天然抗体に対する構造類似性をもち、かつ各ターゲットに特異的に結合できる、いずれかのポリペプチドを意味し、その際、 50

結合特異性は C D R により決定される。よって、"抗体"は各ターゲットに結合する免疫グロブリン由来の構造体に関係するものとし、下記のものを含むが、それらに限定されない：全長抗体もしくは全抗体、抗原結合性フラグメント（理学的または概念的に抗体構造体から誘導されたフラグメント）、以上のいずれかの誘導体、キメラ分子、以上のいずれかと他のポリペプチドとの融合体、またはいずれか別の構造体／組成物であって各ターゲットに選択的に結合するもの。抗体またはその機能活性部分は、少なくとも 1 つの抗原結合性フラグメントを含むいずれかのポリペプチドであってもよい。抗原結合性フラグメントは、少なくとも重鎖の可変ドメインおよび軽鎖の可変ドメインからなり、それらの両ドメインが一緒に特定の抗原に結合できるように配置されている。

【0158】

10

"全長"または"完全"抗体は、ジスルフィド結合により相互に結合した 2 つの重 (H) 鎖および 2 つの軽 (L) 鎖を含むタンパク質を表わし、それらは下記のものを含む：(1) 重鎖に関しては、可変領域、ならびに 3 つのドメイン C H 1、C H 2 および C H 3 を含む重鎖定常領域；ならびに(2) 軽鎖に関しては、軽鎖可変領域、および 1 つのドメイン C L を含む軽鎖定常領域。

【0159】

20

"抗原結合性抗体フラグメント"または"その抗原結合性フラグメント"も、少なくとも 1 つの前記に定めた抗原結合性フラグメントを含み、その機能活性部分（またはフラグメント）が由来する完全抗体と本質的に同じ機能および結合特異性を示す。パパインによる限定的なタンパク質分解消化は、I g プロトタイプを 3 つのフラグメントに開裂する。それぞれ 1 つの全 L 鎖および約半分の H 鎖を含む 2 つの同一アミノ末端フラグメントは、抗原結合性フラグメント (F a b) である。サイズは類似するが両重鎖のカルボキシル末端側半分をそれらの鎖間ジスルフィド結合と共に含む第 3 フラグメントは、結晶性フラグメント (F c) である。F c は炭水化物、補体結合部位および F c R - 結合部位を含む。限定的なペプシン消化により、両 F a b 片、および H - H 鎖間ジスルフィド結合を含めたヒンジ領域を含む、単一の F (a b')₂ フラグメントが得られる。F (a b')₂ は抗原結合について二価である。F a b'を得るために、F (a b')₂ のジスルフィド結合を開裂させることができる。さらに、重鎖および軽鎖の可変領域を互いに融合させて一本鎖可変フラグメント (s c F v) を形成することができる。

【0160】

30

可変ドメイン (F v) は、1 つの V L および 1 つの V H からなる無傷の抗原結合性ドメインを含む最小フラグメントである。結合ドメインのみを含むそのようなフラグメントは、酵素法により、またはたとえば細菌細胞および真核細胞における関連遺伝子フラグメントの発現により作製できる。種々の方法を使用できる：たとえば、F v フラグメントのみ、または F v と第 1 定常ドメインを含めた "Y" の上側アームのうちの 1 つを含む 'F a b' - フラグメント。これらのフラグメントは、通常は 2 つの鎖間にポリペプチドリンクを導入することによって安定化され、その結果、一本鎖 F v (s c F v) が生成する。あるいは、ジスルフィド連結した F v (d s F v) フラグメントを使用できる。結合ドメインのフラグメントは、全長抗体を作製するためにいずれかの定常ドメインと組み合わせることができ、あるいは他のタンパク質およびポリペプチドと融合させることができる。

【0161】

40

ある組換え抗体フラグメントは一本鎖 F v (s c F v) フラグメントである。s c F v の開裂によりモノマー s c F v が生成し、それを複合体化してダイマー（ダイアボディ (diabody)）、トリマー（トリアボディ (triabody)）、またはより大きな凝集体、たとえば T a n d A b および（フレキシボディ (Flexibody)）にすることができる。

【0162】

2 つの結合ドメインをもつ抗体は、2 つの s c F v を単純なポリペプチドリンクで結合させることにより (s c F v)₂、または 2 つのモノマーのダイマー化により（ダイアボディ）作製できる。最も簡単なデザインは 2 つの機能性抗原結合性ドメインをもつダイアボディであり、それらのドメインは同一、類似である（二価ダイアボディ）か、あるいは

50

別個の抗原に対する特異性をもつことができる（二重特異性ダイアボディ）。

【0163】

重鎖の4つの可変ドメインおよび軽鎖の4つの可変ドメインを含む抗体フォーマットも開発された。これらの例には、四価二重特異性抗体（T and A b およびフレキシボディ，Affimed Therapeutics AG, ドイツ、ハイデルベルク）が含まれる。フレキシボディはscFvとダイアボディマルチマーモチーフを組み合わせて、細胞表面の互いにかなり離れた2つの分子を連結させるために高度のフレキシビリティーを備えた多価分子したものである。2より多い機能性抗原結合性ドメインが存在し、それらが別個の抗原に対する特異性をもつならば、その抗体は多重特異性である。

【0164】

まとめると、抗体またはその抗原結合性フラグメントである特異的免疫グロブリンタイプには下記の抗体が含まれるが、それらに限定されない：Fab（可変軽鎖（VL）、可変重鎖（VH）、定常軽鎖（CL）および定常重鎖1（CH1）ドメインをもつ一価フラグメント）、Fab'（2つのFabフラグメントを含む二価フラグメントがヒンジ領域においてジスルフィド橋または別のものにより連結したもの）、Fv（VLおよびVHドメイン）、scFv（VLとVHがリンク、たとえばペプチドリンクにより連結した一本鎖Fv）、二重特異性抗体分子（本明細書に記載する特異性を備えた抗体分子が、その抗体とは異なる結合特異性をもつ第2の機能性部分（限定ではなく、他のペプチドもしくはタンパク質、たとえば抗体、または受容体リガンドを含む）に連結したもの）、二重特異性一本鎖Fvダイマー、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ（scFvがCH3に連結したもの）。

【0165】

抗体はモノクローナル抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体であってもよい。

タグは、バイオテクノロジーにおける認識のために用いられるペプチドモチーフである。周知のタグは、N²⁺-カラムに結合させることができるHis-タグ（6×ヒスチジン）である。

【0166】

核酸または核酸アナログ／相補的核酸を結合対として用いる場合、いずれかの核酸配列とそれの相補的配列を使用できる。

レクチンは、糖部分に対して高特異的な炭水化物結合性タンパク質である。適切なレクチンとして、コンカナバリンAを使用でき、これは-D-マンノシルおよび-D-グルコシル残基、分歧-D-マンノシド型(mannosidic)構造体（高-D-マンノースタイプ、またはハイブリッドタイプ、およびニアンテナ型複合体(biantennary complex)タイプのN-グリカンに結合する。

【0167】

受容体／リガンド結合対としては、たとえばステロイドホルモン受容体／ステロイドホルモンを使用できる。たとえば、エストロゲンをステロイドとして使用し、その受容体をそれぞれの結合パートナーとして使用できる。

【実施例】

【0168】

実施例1：本発明方法に有用な化合物の合成

本発明方法に有用な下記の化合物を合成した：

【0169】

10

20

30

40

【表 2 - 1】

<u>社内No.</u>	<u>規模</u>	<u>化学構造(モジュール型)</u>	<u>収量</u>
BMO 29.891131	10μMol 規模	5'-αトコフェロール-TEG-PEG2000-Fluos-3'	58 pMol/μL-234 nMol
		DMTrON-合剤/全 20 分. カップリング標準-CPG-開裂DMTrOFF/透析非精製粗生成物Fluos-Conc.	
BMO 29.891132	10μMol 規模	5'-コレステリル-TEG-PEG2000-Fluos-3'	61 pMol/μL-216 nMol
		DMTrON-合剤/全 20 分. カップリング標準-CPG-開裂DMTrOFF/透析非精製粗生成物Fluos-Conc.	
BMO 29.891133	10μMol 規模	5'-コレステリル-TEG-コレステリル-TEG-PEG2000-Fluos-3'	43 pMol/μL-153 nMol
		DMTrON-合剤/全 20 分. カップリング標準-CPG-開裂DMTrOFF/透析非精製粗生成物Fluos-Conc.	
BMO 29.891137	10μMol 規模	5'-コレステリル-TEG-コレステリル-TEG-PEG2000-ビオチン-TEG-3'	111 pMol/μL-200 nMol
		DMTrOFF-合剤/全 20 分. カップリング標準-CPG-開裂透析非精製粗生成物Conc. 推定	
BMO 29.891180	10μMol 規模	5'-コレステリル-TEG-コレステリル-TEG-PEG2000-Fluos-ビオチン-TEG-3'	3577 pMol/μL-6440 nMol

【 0 1 7 0 】

■ DMTrOFF-合成全 20 分. カップリング標準-CPG-開裂透析/非精製透析生成物/Fluos-Conc.

			(34)	JP 6302560 B2 2018.3.28
BMO 29.891194_Ch01	1μMol 規模	5'-ミリスチン酸-ミリスチン酸-PEG2000-Fluos-ビオチン TEG-3'	10 pMol/μL-12 nMol	
DMTrON-合成カップリング:	1+2=10 分-3=2×8 分-4+5=10 分標準-CPG-開裂/C18-精製/DMTrOFF透析/F30-39-TEA+/Fluos-Conc.			
BMO 29.891194_Ch02	1μMol 規模	5'-ミリスチン酸-ミリスチン酸-PEG2000-Fluos-ビオチン TEG-3'	22 pMol/μL-24 nMol	
DMTrON-合成カップリング:	1+2=10 分-3=2×8 分-4+5=15 分標準-CPG-開裂/C18-精製/F89-98-TEA+/蒸発/DMTrOFF/Fluos-Conc.			
BMO 29.891194_Ch03	1μMol 規模	5'-ミリスチン酸-ミリスチン酸-PEG2000-Fluos-ビオチン TEG-3'	11 pMol/μL-11 nMol	
DMTrON-合成全 20 分. カップリング標準-CPG-開裂/C18-精製/F69-79-TEA+/蒸発/DMTrOFF/Fluos-Conc.				
BMO 29.891197	1μMol 規模	5'-ミリスチン酸-スペーサー-C9-ミリスチン酸-PEG2000-Fluos-ビオチン TEG-3'	0.5 pMol/μL-0.7 nMol	
DMTrON-合成全 20 分. カップリング標準-CPG-開裂/C18-精製/F67-72-TEA+/蒸発/DMTrOFF/Fluos-Conc.				
BMO 29.891213_Ch01	10μMol 規模	5'-ミリスチン酸-ミリスチン酸-スペーサー-C18-Fluos-ビオチン TEG-3'	538 pMol/μL-808 nMol	
DMTrON-合成全 20 分. カップリング標準-CPG-開裂/T1-C18-精製/T1=F40-44-TEA+/蒸発/Fluos-Conc.				
BMO 29.891213_Ch02		5'-ミリスチン酸-ミリスチン酸-スペーサー-C18-Fluos-ビオチン TEG-3'	613 pMol/μL-919 nMol	

【表 2 - 3】

T2-C18-精製/T2=F73-99-TEA+/蒸発/DMTrOFF/Fluos-Conc.

BMO 29.891214 1μMol 規模 5'-ミリスチン酸-ミリスチン酸-(スペーサー-C18)7-Fluos-ビオチン-TEG-3' 100 pMol/μL-100 nMol
DMTrON-合成/全 10 分. カップリング/標準-CPG-開裂/C18-精製/F49-53-TEA+/蒸発/DMTrOFF/Fluos-Conc.

BMO 29.891218 1μMol 規模 5'-ミリスチン酸-スペーサーC9-ミリスチン酸-(スペーサー-C18)7-Fluos-ビオ
 チン-TEG-3' 40 pMol/μL-44 nMol
DMTrON-合成/カップリング: 1+2=20 分-3-9=5 分-10-12=20 分/標準-CPG-開裂/C18-精製/F30-35-TEA+/蒸発/DMTrOFF/Fluos-Conc.

BMO 29.891219 1μMol 規模 5'-ミリスチン酸-スペーサー-C12-ミリスチン酸-(スペーサー-C18)7-Fluos-ビ
 オチン-TEG-3' 15 pMol/μL-22 nMol
DMTrON-合成/カップリング: 1+2=20 分-3-9=5 分-10-12=20 分/標準-CPG-開裂/C18-精製/F28-32-TEA+/蒸発/DMTrOFF/Fluos-Conc.

BMO 29.891220 1μMol 規模 5'-ミリスチン酸-スペーサー-C18-ミリスチン酸-(スペーサー-C18)7-Fluos-ビ
 オチン-TEG-3' 56 pMol/μL-79 nMol
DMTrON-合成/カップリング: 1+2=20 分-3-9=5 分-10-12=20 分/標準-CPG-開裂/C18-精製/F34-38-TEA+/蒸発/DMTrOFF/Fluos-Conc.

BMO 29.891221 1μMol 規模 5'-ミリスチン酸-ミリスチン酸-ミリスチン酸-(スペーサー-C18)7-Fluos-ビオ
 チン-TEG-3' 38 pMol/μL-42 nMol
10
20
30

【 0 1 7 2 】

DMTrON-合成カッティング: 1+2=20 分-3-9=5 分-10-12=20 分標準-CPG-開裂/C18-精製/F32-41-TEA+/蒸発/DMTrOFF/Fluos-Conc.

【表 2 - 4】

(36)

JP 6302560 B2 2018.3.28

<i>BMO 29.891222_Ch03</i>	1μMol 規模	5'-コレステリル TEG-コレステリル TEG-(スペーサー-C18)7-Fluos-ビオチン DMTrON-合成カッティング: 1+2=2x10 分-3-9=5 分-10-12=2x10 分/標準-CPG-開裂/C8-精製/F69-73-TEA+/蒸発/DMTrOFF/Fluos-Conc.	TEG-3` 12 pMol/μL-14 nMol
<i>BMO 29.891222_Ch04</i>	1μMol 規模	5'-コレステリル TEG-コレステリル TEG-(スペーサー-C18)7-Fluos-ビオチン DMTrON-合成カッティング: 1+2=2x15 分-3-9=5 分-10-12=2x15 分/標準-CPG-開裂/C4-精製/F10-13-TEA+/蒸発/DMTrOFF/Fluos-Conc.	TEG-3` 6 pMol/μL-7 nMol
<i>BMO 29.891222_Ch05</i>	1μMol 規模	5'-コレステリル TEG-コレステリル TEG-(スペーサー-C18)7-Fluos-ビオチン DMTrOFF-合成カッティング: 1+2=2x15 分-3-9=5 分-10-12=2x15 分/標準-CPG-開裂/C4-精製/F60-64-TEA+/蒸発/Fluos-Conc.	TEG-3` 13 pMol/μL-17 nMol
<i>BMO 29.891224</i>	1μMol 規模	5'-コレステリル TEG-スペーサー-C12-コレステリル TEG-(スペーサー-C18)7-Fluos-ビオチン DMTrON-合成カッティング: 1+2=20 分-3-9=5 分-10-12=20 分/標準-CPG-開裂/C18-精製/F26-33-TEA+/蒸発/DMTrOFF/Fluos-Conc.	TEG-3` 74 pMol/μL-81 nMol

【表 2 - 5】

	BMO 29.891225	1μMol 規模	5'-コレステリル TEG-スペーサーC18-コレステリル TEG-(スペーサーC18)7-Fluos-ビオチン TEG-3' C18)7-Fluos-ビオチン TEG-3' 5 pMol/μL-6 nMol
DMTrON-合成カップリング: 1+2=20 分-3-9=5 分-10-12=20 分 [†] 標準-CPG-開裂[C18-精製]F14-19-TEA+/蒸発/DMTrOFF/Fluos-Conc.			

BMO 29.891227 1μMol 規模 5'-ミリスチン酸-コレステリル TEG-(スペーサーC18)7-Fluos-ビオチン TEG-3' 20 pMol/μL-21 nMol

DMTrON-合成カップリング: 1+2=20 分-3-9=5 分-10-12=20 分[†]標準-CPG-開裂[C18-精製]F34-40-TEA+/蒸発/DMTrOFF/Fluos-Conc.

BMO 29.891228_Ch02 1μMol 規模 5'-コレステリル TEG-ミリスチン酸-(スペーサーC18)7-Fluos-ビオチン TEG-3' 9 pMol/μL-11 nMol

DMTrON-合成カップリング: 1+2=20 分-3-9=5 分-10-12=20 分[†]標準-CPG-開裂[C18-精製]F28-31-TEA+/蒸発/DMTrOFF/Fluos-Conc.

BMO 29.891234_Ch03 10μMol 規模 5'-コレステリル TEG-コレステリル TEG-(スペーサーC18)7-dT(濃度の決定)-ビオチン TEG-3' 239 pMol/μL-358 nMol

DMTrOFF-合成-Universal-CPG/カップリング: 1=20 分-3-8=5 分-9-11=20 分(CPG-開裂-NH3-Isopropyl/C8-精製)F65-70-TEA+/蒸発/260nm Conc.

BMO 29.891234_Ch04 10μMol 規模 5'-コレステリル TEG-コレステリル TEG-(スペーサーC18)7-dT(濃度の決定)-ビオチン TEG-3' 204 pMol/μL-307 nMol

DMTrOFF-合成-Universal-PSI/カップリング: 1=20 分-3-8=5 分-9-11=20 分(CPG-開裂-NH3-Isopropyl/C8-精製)F83-88-TEA+/蒸発/260nm Conc.

【表 2 - 6】

【 0 1 7 5 】	<i>BMO 29.891234_Ch07</i>	10μMol 規模	5'-コレステリル TEG-コレステリル TEG-(スペーサー-C18)9 ビス 10-dT(濃度の決定)-ビオチン TEG-3'	277 pMol/μL-415 nMol
	<i>DMTrOFF-合成-Universal-PS+Hyazinthactivator/スペーサー-C18=0.2Ml カップリング: 1+2=3 分-3=2x5 分-4-11=3 分 CPG-開裂=NH3-Isopropyl/C8-精製 F55-59-Na+/Vivaspin 2'000/260nm Conc.</i>			

	<i>BMO 29.891234_Ch08</i>	10μMol 規模	5'-コレステリル TEG-コレステリル TEG-(スペーサー-C18)9 ビス 10-dT(濃度の決定)-ビオチン TEG-3'	306 pMol/μL-460 nMol
	<i>DMTrOFF-合成-Universal-PS+Hyazinthactivator/スペーサー-C18=0.2Ml カップリング: 1+2=3 分-3=2x5 分-4-11=3 分 CPG-開裂=NH3-Isopropyl/C8-精製 F37-41-Na+/Vivaspin 2'000/260nm Conc.</i>			

	<i>BMO 29.891234_Ch09</i>	10μMol 規模	5'-コレステリル TEG-コレステリル TEG-(スペーサー-C18)7-スペーサー-C3-dT(濃度の決定)-ビオチン TEG-3'	下記を参照
	<i>DMTrOFF-合成-1000A-Universal-CPG+Hyazinthactivator/スペーサー-C18=0.2Ml カップリング: 1+2=3 分-3+4=2x10 分-5-10=10 分-11+12=3 分 CPG-開裂=NH3-Isopropyl/C8-精製 F= 下記を参照 Vivaspin 2'000/260nm Conc.</i>			

T1_crude	1'356 pMol/μL-2'033 nMol
T2_crude_Na	1'165 pMol/μL-1'747 nMol
T3_F38-40	53 pMol/μL-80 nMol

【表 2 - 7】

T4_F38-40_Na 51 pMol/μL-77 nMol

BMO 29.891236_Ch10 10μMol 規模
 $DMT_{OFF}\text{-合成-}1000A\text{-Universal-CPG+Hyazinthalactivator/スペーサー-C18=0,2Ml\text{カッティング}: 1+2=3 分-3+4=2x10 分-5-10=10 分-11+12=3 分/CPG\text{-開裂=NH}_3\text{-Isoprop/粗製およびC8-精製} F=\text{下記を参照} Vivaspin 2'000/260nm Conc.}$

T1_crude	2430 pMol/μL-3'645 nMol
T2_F37-39_Na	227 pMol/μL-341 nMol

5'-コレステリル TEG-コレステリル TEG-(スペーサー-C18)7-dT(濃度の決定)-ビオチン TEG-p-3'、下記を参照
 $DMTr_{OFF}\text{-合成-}2000A\text{-dT-CPG/スペーサー-C18=0,2Ml\text{カッティング}: 1+2=20 分-3+4=2x10 分-5-10=10 分-11+12=20 分/CPG\text{-開裂=NH}_3\text{-Isoprop/粗製およびC8-精製} F=\text{下記を参照} Vivaspin 2'000/260nm Conc.$

F42-45_Na	166 pMol/μL-248 nMol
F47-49_Na	100 pMol/μL-150 nMol

5'-コレステリル TEG-コレステリル TEG-(スペーサー-C18)7-dT(濃度の決定)-ビオチン TEG-p-3'、下記を参照
 $DMTr_{OFF}\text{-合成-}2000A\text{-dT-CPG/スペーサー-C18=0,2Ml\text{カッティング}: 1+2=20 分-3+4=2x10 分-5-10=10 分-11+12=20 分/CPG\text{-開裂=NH}_3\text{-Isoprop/粗製およびC8-精製} F=\text{下記を参照} Vivaspin 2'000/260nm Conc.$

【表 2 - 8】

DMTrOFF-合成-2000A-dT-CPG/スペーザー-C18=0.2Ml/カッブリソング; 1+2=20 分-3+4=2x10 分-5-10=10 分-11+12=20 分/CPG-開裂-NH3-Isopropyl粗製およびC8-精製/F=下記を参照/Vivaspin 2'000/260nm Conc.

F51-53_Na	216 pMol/μL-324 nMol
F56-59_Na	160 pMol/μL-250 nMol

【 0 1 7 7 】

10

20

30

40

50

【実施した代表的合成およびその結果:
A)】

【0 1 7 8】

DK1194Ch0 2	1μMol 規模 5'- ミリスチン酸	ミリスチン酸 ミリスチニン 酸	PEG- 2000 Fluos TEG -3· 11 pMol/μL 定	合成 オよび決
DK1197 1μMol 規模 5'- 酸	ミリスチン スペーサーC9	ミリスチニン酸 ミリスチニン 酸	PEG- 2000 Fluos TEG -3· 0.5 pMol/μL 定	合成 オよび決
DK1213 模	10μMol 規 5'- ミリスチン酸	ミリスチニン 酸	スペーザ -C18 Fluos TEG -3· 538 pMol/μL 定	2回分の装填を合成 オよび決
DK1214 1μMol 規模 5'- 酸	(スペー サー C18)x7	ミリスチニン 酸 ミリスチニン 酸	(スペー サー C18) Fluos TEG -3· 100 pMol/μL 定	合成 オよび決

【表4-1】

		2回分の装 填を合成お よび決定	
DK1213	10μMol 規模	ミリスチン 酸	ミリスチン酸 スペーサー-C18 Fluos
DK1214	1μMol 規模	ミリスチン 酸	ミリスチン (スペーサー- C18)x7
DK1218	1μMol 規模	ミリスチン 酸	ミリスチン スペーサー- C9
DK1219	1μMol 規模	ミリスチン 酸	ミリスチン スペーサー- C12
DK1220	1μMol 規模	ミリスチン 酸	ミリスチン スペーサー- C18
DK1221	1μMol 規模	ミリスチン 酸	ミリスチン 酸

ミリスチン
酸
スペーサー-C18 Fluos

ミリスチン
酸
スペーサー-C18

ミリスチン
酸
-

6カルボキシ
ビオチン-TEG 3'
-
100 pMol/μL 決定

6カルボキシ
Fluos
ビオチン-TEG 3'
-
40 pMol/μL

6カルボキシ
Fluos
ビオチン-TEG 3'
-
40 pMol/μL

6カルボキシ
Fluos
ビオチン-TEG 3'
-
15 pMol/μL

6カルボキシ
Fluos
ビオチン-TEG 3'
-
56 pMol/μL

6カルボキシ
Fluos
ビオチン-TEG 3'
-
38 pMol/μL

【表4-2】

0 1 8 0	DK1222 1μMol 規模	5'- コレステリル-TEG	コレステリル-TEG	(スペーサー-) C18)x7	6カルボキシ Fluos	ビオチン-TEG 3' -	- 12 + 6 + 13 pMol/μL
	DK1223 1μMol 規模	5'- コレステリル-TEG	スペーサー-コレステリル-TEG	(スペーサー-) C18)x7	6カルボキシ Fluos	ビオチン-TEG 3' -	- 合成困難
	DK1224 1μMol 規模	5'- コレステリル-TEG	スペーサー-コレステリル-TEG	(スペーサー-) C18)x7	6カルボキシ Fluos	ビオチン-TEG 3' -	74 pMol/μL
	DK1225 1μMol 規模	5'- コレステリル-TEG	スペーサー-コレステリル-TEG	(スペーサー-) C18)x7	6カルボキシ Fluos	ビオチン-TEG 3' -	5 pMol/μL
	DK1226 1μMol 規模	5'- コレステリル-TEG	コレステリル-TEG	(スペーサー-) C18)x7	6カルボキシ Fluos	ビオチン-TEG 3' -	合成困難
	DK1227 1μMol 規模	5'- ミリスチン酸	コレステリル-TEG	(スペーサー-) C18)x7	6カルボキシ Fluos	ビオチン-TEG 3' -	20 pMol/μL
	DK1228 1μMol 規模	5'- コレステリル-TEG	ミリスチン酸	(スペーサー-) C18)x7	6カルボキシ Fluos	ビオチン-TEG 3' -	- 合成困難
	DK1229 1μMol 規模	5'- コレステリル-TEG	スペーサー-コレステリル-TEG	スペーサー-C3 TEG	コレステリル-TEG C3)x7	(スペーサー-) C3)x7	6カルボキシ Fluos
	1μMol 規模	5'- コレステリル-TEG	スペーサー-ミリスチン酸	(スペーサー-) C18)x7	6カルボキシ Fluos	ビオチン-TEG 3' -	ビオチン-TEG 3'

【 0 1 8 1 】

【表4-3】

<i>1μMol 規模</i>	コレステリル コレステリル コレステリル	スペーサー C12 C18	ミリスチン酸 ミリスチン酸 ミリスチン酸	(スペーサー C18)x7 (スペーサー C18)x7 (スペーサー C18)x7	6カルボキシ Fluos 6カルボキシ Fluos 6カルボキシ Fluos	ピオチニ-TEG 3' -
-----------------	----------------------------	---------------------	----------------------------	--	---	------------------

DK1193	ミリスチン酸	PA-	11	0,1 M	0,5g	4,50mL ACN
10-1975 TEG	コレステリル-PA-	PA-	13	0,1 M	1x0,25g+1x100μMol à 11+4 力 ツプリング	3,10mL ACN
10-1964 Fluos	6カルボキシ PA-	PA-	11	0,1 M	1x0,25g+1x100μMol à 11+4 力 ツプリング	3,20mL ACN
10-1909 スペーサー-C9	スペーサー	PA-	4	0,1 M	1x100μMol	1,00mL ACN
10-1928 C12	スペーサー	PA-	5	0,1 M	1x100μMol	1,00mL ACN
10-1918 C18	スペーサー	PA-	6	0,1 M	5x0,25g à 18 カップリング	16,00mL ACN

【表 5 - 1】

C)
 0 1 8 2 10 μ Mol 規
 DK1213 横 5'-
 0 1 8 2 1 μ Mol 規模 5'-
 DK1214 横 5'-

				ミリスチン 酸	ミリスチン 酸	スペーサー-C18 Fluos	6カルボキシ TEG	-3'	538 pMol/ μ L 合成および決定	2回分の装填を
DK1214 1 μ Mol 規模 5'-	ミリスチン 酸	ミリスチン 酸	(スペーサー C18)x7	6カルボキシ Fluos	ビオチン- TEG	-3'	100 pMol/ μ L 合成および決定			
DK1218 1 μ Mol 規模 5'- 酸	ミリスチン 酸 C9	ミリスチン 酸	(スペーサー C18)x7	6カルボキシ Fluos	ビオチン- TEG	-3'	40 pMol/ μ L			
DK1219 1 μ Mol 規模 5'- 酸	ミリスチン 酸 C12	ミリスチン 酸	(スペーサー C18)x7	6カルボキシ Fluos	ビオチン- TEG	-3'	15 pMol/ μ L			
DK1220 1 μ Mol 規模 5'- 酸	ミリスチン 酸 C18	ミリスチン 酸	(スペーサー C18)x7	6カルボキシ Fluos	ビオチン- TEG	-3'	56 pMol/ μ L			
DK1221 1 μ Mol 規模 5'- 酸	ミリスチン 酸	ミリスチン 酸	(スペーサー C18)x7	6カルボキシ Fluos	ビオチン- TEG	-3'	38 pMol/ μ L			
DK1222 1 μ Mol 規模 5'-	コレステリ ル-TEG	コレステリ ル-TEG	(スペーサー C18)x7	6カルボキシ Fluos	ビオチン- TEG	-3'	12 + 6 + 13 pMol/ μ L			
DK1223 1 μ Mol 規模 5'- ル-TEG	コレステリ C9	コレステリ ル-TEG	(スペーサー C18)x7	6カルボキシ Fluos	ビオチン- TEG	-3'	合成困難			

【表 5 - 2】

0	DK1224	1μMol 規模	5'-ル-TEG	コレステリ	スペーサー	コレステリ	(スペーサー)C18)x7	6カルボキシ	ビオチン-	TEG	-3'	74 pMol/μL
1	DK1225	1μMol 規模	5'-ル-TEG	コレステリ	スペーサー	コレステリ	(スペーサー)C18)x7	6カルボキシ	ビオチン-	TEG	-3'	5 pMol/μL
2	DK1226	1μMol 規模	5'-ル-TEG	コレステリ	コレステリ	(スペーサー)C18)x7	6カルボキシ	ビオチン-	TEG	-3'	合成困難	
3	DK1227	1μMol 規模	5'-ル-TEG	ミリスチン	酸	コレステリ	(スペーサー)C18)x7	6カルボキシ	ビオチン-	TEG	-3'	20 pMol/μL
	DK1228	1μMol 規模	5'-ル-TEG	コレステリ	ミリスチン	(スペーサー)C18)x7	6カルボキシ	ビオチン-	TEG	-3'	9 pMol/μL	
	DK1229	1μMol 規模	5'-ル-TEG	コレステリ	スペーサー	コレステリル-C3	コレステリル-C3	(スペーサー)C3)x7	6カルボキシ	Fluos	ビオチン-TEG	-3'
				コレステリ	スペーサー	ミリスチン	(スペーサー)C18)x7	6カルボキシ	ビオチン-	TEG	-3'	合成なし
				コレステリ	スペーサー	ミリスチン	(スペーサー)C12	6カルボキシ	ビオチン-	TEG	-3'	合成なし
				コレステリ	スペーサー	ミリスチン	(スペーサー)C18	6カルボキシ	ビオチン-	TEG	-3'	合成なし
				コレステリ	コレステリ	(スペーサー)C18)x7	dT(濃度の決定)	ビオチン-	TEG	-3'	239 + 307 pMol/μL	
	DK1234	横	5'-ル-TEG									10
												20
												30
												40

【 0 1 8 3 】

D) 本発明方法に有用な例示的化合物および副産物の化学構造

本発明方法に有用な例示的化合物および合成副産物の化学構造を図 6 A および B に示す。

【0184】

E) ビオチン - PEG - Lys - (C18)2 の合成

本発明のビオチン - PEG - Lys - (C18)2 の合成を図 6 C に示す。

F) 本発明方法に有用なさらなる化合物および参照化合物ならびにその中間体の構造

本発明方法に有用な化合物および参照化合物の合成のために下記の中間体を用いた：

コレステリル - TEG - CE - PA (Glen Research 10-1975),

ミリスチン酸 - CE - PA (社内製造),

ビオチン - TEG - CE - PA (Glen Research 10-1955),

10

ビオチン - dT - CE - PA (Glen Research 10-1038),

dT - CE - PA (Glen Research 10-1030),

対称 doubler - CE - PA (Glen Research 10-1920),

PEG - 200 - CED - PA (ChemGenes CLP-2119),

6 - フルオレセイン - CE - PA (Glen Research 10-1964) および

universal - CPG (Proligo 1000A M401010)

本発明方法に有用なさらなる化合物および参照化合物ならびに中間体の構造を図 12 に示す。

【0185】

20

2. 本発明方法に有用な化合物を用いる細胞標識化

【0186】

【表 6 - 1】

	リノール(1,1'-ジ) ノレイル-3,3',3'-テ トラメチルインドカ ルボシアニン過塩素 酸塩, Invitrogen)	PKH26 (ミリス チン酸, ベヘン 酸, SIGMA) (NOF-BAM)	PKH67 (SIGMA)	PKH2 (SIGMA)	ホスファチジル-エタノールア ミン(N-(4,4'-ジフルオロ-5,7-ジ メチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s- インダセン-3-プロピオニル)- 1,2-ジヘキサデカノイル-sn-ブ リセロ-3-ホスホエタノールア ミン, トリエチルアンモニウム 塩, Invitrogen)	スフィンゴミエリン(N- (4,4'-ジフルオロ-5,7-ジ メチル-4-ボラ-3a,4a-ジ アザ-s-インダセン-3-ペ ンタノイル)スフィンゴ シルホスホコリン; Invitrogen)
WBCs	大部分の細胞が取り 込む(他の分子と比 較してより多い(曝 露時間: 20-50 ミリ 秒) ✓	すべての細胞 が取り込む(可 能性) ✓	顆粒球および他 のほぼすべての 血球を染色(1 実験: 3種類の 細胞が染色され ない) ✓	ほぼすべての 細胞を染色; 明 らかに単球は 染色されない, リノールと PKH67 の組 合させ-すべて の細胞を染色 ✓	すべての細胞を 染色するわけで はない, 他の PKH の方が良 好 ✓	(x)-きわめて不良 x

WBC: 白血球

【 0 1 8 7 】

【表 6 - 2】

U937	✓	✓	✓	✓
MDA-MB468	✓	✓	すべてではない	✓
ジャーナット	✓	✓	✓	✗
CHO	✗	✓	✓	✗ ×きわめて弱い
COS7	✓	✓	✓	✗
HeLa	✓	✓	✓*	✗
NIH 3T3	✓	✓	✓	✗
上皮細胞	✓	✓	✓すべてではなく い	✓ ✗すべてではなく い ✗

* 1種類の細胞が弱く染色された

【表 7 - 1】

コレステロール (Invitrogen; コレステリル 4,4-ジフルオロ-5-(2-ピロリル)-4-ボラン-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3-ウンデカノエート)	BMO 29.891133 ID: 3882 5'-XYZ-3' X=コレスチリル- TEG Y=PEG2000 Z=Fluos	BMO: 29.891132 ID: 3880 5'-XYZ-3' X=コレステリル- TEG Y=PEG2000 Z=Fluos	BMO: 29.891131 ID: 3879 5'-XYZ-3' X=a-トコフェロール- TEG Y=PEG2000 Z=Fluos	1,1'ジオクタデシル-3,3',3'-テトラメチルインドカルボシアニン過塩素酸塩 Sigma 42364 - 100mg	BM0: Sulfo-JA133-ブエニルレボロン酸 15.000078
WBCs	x	大部分の細胞が取り込まれる他の分子と比較してより多い (曝露時間: 50-200ミリ秒) ✓	✓すべてではない	✓すべてではない い	✓すべてではない い
U937		✓	✓	✓	✓
MDA-MB468		✓	✓	✓	✓
ジャーカット	x	✓		✓	
CHO	x	✓		✓	

【表 7 - 2】

COS 7	x		✓	
HeLa		x/ ✓	✓	
NIH 3T3	x		✓	
上皮細胞	x きわめて弱い		✓	✓

* 1種類の細胞が染色されなかつた

実施例3：細胞の固定化に関する実験の結果

下記を以下の化合物のモジュール型記載に適用する：

X = 疎水性部分，Y = P E G 2 0 0 0 , Z = ビオチン - T E G , F = F l u o s = フルオレセイン

下記の実験において細胞の回収率を決定した。

【0191】

【表8-1】

A)

被験化合物	モジュラー型構造	社内参考番号	回収率	細胞	濃度
Sunbright(OE-080CS)DADOO-ビオチン		15.260250			
BAM-SH		15.260254	28,0%	WBCs	
コレステリル-TEG-コレステリル-TEG-PEG2000-ビオチン-TEG	5'-XXYZ-3'	29.891137	77,1%	WBCs	
ビオチン-PEG2000-ボロン酸		15.260267	16,3%	WBCs	
コレステリル-TEG-コレステリル-TEG-PEG2000-Fluos-ビオチン-TEG	5'-XXYFZ-3'	29.891180	71 - 90 %	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
			77,7%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
			62,3%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
			95,8%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
			77,9%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
			88,5%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞

【0192】

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

		69,7%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		79,2%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		72,5%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[ビオチニル(PEG2000)]	DSPE-PEG(2000) ビオチン (Avantlipids)	54-83%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
ミリスチン酸-ミリスチン酸-PEG2000-Fluos-ビオチン-TEG	5'-XXYFZ-3'	29.891194	21-26%	WBCs
ビオチン-PEG-Lys-(C14)2	15.260268	52-86%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
ミリスチン酸-ミリスチン酸-(スペーサーXXYYYYYYFYZ-3' (Y=スペーサー-)	29.891214	78,9%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
C187-Fluos-ビオチン-TEG		68,7%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		90,5%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		81,1%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		65,9%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		84,9%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		85,1%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞

【0193】

10

20

30

40

【表 8 - 3】

ミリスチン酸-ミリスチン酸-スペーサー C18-Fluos-ビオチン-TEG	5'-XXYFZ-3' (Y=スペーサー) スペーサー)	29.891213	67,4%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
			61,9%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
			80,2%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
			70,4%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
ミリスチン酸-スペーサーC9-ミリスチン 酸-PEG2000-Fluos-ビオチン-TEG	5'-XSXYFZ-3' (S=スペーサー) スペーサー)	29.891197	材料が不十分; 染色不良	WBCs	
ミリスチン酸-スペーサーC9-ミリスチン 酸-(スペーサーC18)7-Fluos-ビオチン- TEG	5'- XYXXXXYYFZ- 3' (Y=スペーサー) スペーサー)	29.891218	50,3%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
			55,1%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
ミリスチン酸-コレスステリル-TEG-(スペ ーサーC18)7-Fluos-ビオチン-TEG	5'- XEYYYYYYFZ-3' (Y=スペーサー; X=Myrl; E=Chol.)	29.891227	64,9%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
			69,6%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
			77,8%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
			77,8%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞

【0 1 9 4】

【表 8 - 4】

(ミリスチン酸)3-(スペーサーC18)7-Fluos-ビオチン-TEG	5'-XXXXYYYYYYFZ-3' (Y=スペーサー) 29.891221	46,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		79,4%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		68,8%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		76,5%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		83,4%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
ミリスチン酸-スペーサーC12-ミリスチン酸-(スペーサーC18)7-Fluos-ビオチン-TEG	5'-XYXXXXYYFZ-3' (V=スペーサーC12, Y=スペーサーC18) 29.891219	46,3%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		39,4%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		53,7%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		56,6%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
ミリスチン酸-スペーサーC18-ミリスチン酸-(スペーサーC18)7-Fluos-ビオチン-TEG	5'-XXXXYYYYYYFZ-3' (Y=スペーサーC18) 29.891220	35,8%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		41,4%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞

【0195】

【表 8 - 5】

		55,9%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		63,5%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
5'- XXXXXXYYFZ-3' (Y=スペーサー C18) コレステリル-TEG-コレステリル-TEG- コレステリル-TEG-コレステリル-TEG- (スペーサー-C18)7-Fluos-ビオチン-TEG	29.891222	52,6%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		76,3%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		80,3%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		70,4%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		71,3%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		80,3%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		4,1%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		38,8%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
		13,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞 非希釈
		11,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞 1:1 希釈
		77,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞 非希釈
		79,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞 1:1 希釈
		23,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞 非処理

【 0 1 9 6 】

【表 8 - 6】

		WBCs 17,0%	350 pmol/ 10e6 細胞 US + 10' 98°C
		WBCs 68,0%	350 pmol/ 10e6 細胞 非処理
		WBCs 61,0%	350 pmol/ 10e6 細胞 US + 10' 98°C
5'- XWXXXXYYFZ- 3' (W=スペーサー- C12, Y=スペーザー- C18)	29.891224	119,4%	WBCs 350 pmol/ 10e6 細胞
コレステリル-TEG-スペーサー-C12-コレ ステリル-TEG-(スペーサー-C18)7-Fluos- ピオチン-TEG		60,6%	WBCs 350 pmol/ 10e6 細胞
		64,4%	WBCs 350 pmol/ 10e6 細胞
		70,3%	WBCs 350 pmol/ 10e6 細胞
		78,1%	WBCs 350 pmol/ 10e6 細胞
5'- XYYYYYYYYFZ- 3' (Y=スペーサー- C18)	29.891225	38,8%	WBCs 350 pmol/ 10e6 細胞
コレステリル-TEG-スペーサー-C18-コレ ステリル-TEG-(スペーサー-C18)7-Fluos- ピオチン-TEG		46,5%	WBCs 350 pmol/ 10e6 細胞

【表 8 - 7】

「0198」	コレステリル-ミリスチン酸-TEG-(スペーサー-C18)7-Fluos-ビオチン-TEG	5'-EXYYYYYYFZ-3' (Y=スペーサー; X=Myr; E=Chol.)	29.891228	76,1%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
				64,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
				17,4%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
				52,1%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
	コレステリル-TEG-コレステリル-TEG-(スペーサー-C18)7-ビオチン-TEG	5'-XXYYYYYYTZ-3' (Y=スペーサー C18)	29.891234	9,6%	WBCs	10 pmol/ 10e6 細胞
				18,8%	WBCs	100 pmol/ 10e6 細胞
				24,9%	WBCs	500 pmol/ 10e6 細胞
				35,4%	WBCs	1000 pmol/ 10e6 細胞
				12,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞 非希釈
				22,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞 1:1 希釈
				17,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞 非処理
				27,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞 US + 10' 98°C
				10,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞 0,001% Tween20

【表 8 - 7】

【表 8】

	12,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	0,0003% Tween20
	22,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	0,0001% Tween21
	22,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	0,00003% Tween22
	12,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	0,00003% Tween20
	14,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	0,00001% Tween20
	13,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	0,000003% Tween21
	11,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	0,0% Tween22
	26,8%	WBCs	300 pmol/ 10e6 細胞	
	41,7%	WBCs	1nmol/ 10e6 細胞	
	99,7%	WBCs	10 nmol/ 10e6 細胞	
	36,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	非希釀
	25,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	1:1 希釀
	13,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	非處理
	23,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	US + 10°98°C
	15,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	0,001% Tween20
	18,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	0,0003% Tween20
	28,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	0,0001% Tween21

【0199】

10

20

30

40

【表 8 - 9】

【 0 2 0 0 】		36,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	0,000003% Tween22
		20,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	0,000003% Tween20
		23,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	0,000001% Tween20
		25,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	0,0000003% Tween21
		35,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	0,0% Tween22
<hr/>					
ビオチン-PEG-リジン-C18(ステアリン酸)	15,260271	21,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	より高濃度でもこれより良好ではない
		27,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	より高濃度でもこれより良好ではない
ビオチン-PEG-リジン-C22(ベヘン酸)		4,8%	WBCs	10 pmol/ 10e6 細胞	
ビオチン-PEG-リジン-(C18)2 溶解		6,8%	WBCs	100 pmol/ 10e6 細胞	
		21,8%	WBCs	1 nmol/ 10e6 細胞	
		60,6%	WBCs	10 nmol/ 10e6 細胞	
		43,0%	WBCs	10 nmol/ 10e6 細胞	
		69,0%	WBCs	50 nmol/ 10e6 細胞	
		81,8%	WBCs	100 nmol/ 10e6 細胞	
		29,6%	WBCs	1 nmol/ 10e6 細胞	

10

20

30

40

50

【表 8 - 10】

			WBCs	10 nmol/ 10e6 細胞
	68,5%	WBCs		
	83,9%	WBCs		100 nmol/ 10e6 細胞
	9,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	0,001% Tween20
	10,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	0,0003% Tween20
	10,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	0,0001% Tween21
	15,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	0,00003% Tween22
	75,0%	WBCs	100 nmol/ 10e6 細胞	
	44,0%	WBCs	5 nmol/10e6 細胞	
	25,0%	WBCs	0,5 nmol/ 10e6 細胞	
	66,0%	WBCs	100 nmol/ 10e6 細胞	
	34,0%	WBCs	5 nmol/10e6 細胞	
	27,0%	WBCs	0,5 nmol/ 10e6 細胞	
				1,5-2 時間のブレート曝露によるものであろう
			33,0%	100 nmol/ 10e6 細胞
			16,0%	5 nmol/10e6 細胞
			38,0%	0,5 nmol/ 10e6 細胞

【0201】

10

20

30

40

50

コレステリル-TEG-コレステリル-TEG-
(スペーサー-C18)7-ビオチン-TEG

$5'$ - XXXXYYYYTZ-3' (Y=スペーサー C18)	29.891234	18,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	蒸発せず, VIVA Spin
$5'$ - XXXXYYYYTZ-3' (Y=スペーサー C18)		42,0%	WBCs	1000 pmol/ 10e6 細胞	蒸発せず, VIVA Spin
$5'$ - コレステリル-TEG-コレステリル-TEG- (スペーサー-C18)7-ビオチン-TEG	29.891234	19,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	蒸発せず, VIVA Spin
$5'$ -YY XXXXXXTZ-3' (X=スペーサー C18)		45,0%	WBCs	1000 pmol/ 10e6 細胞	蒸発せず, VIVA Spin
$5'$ -(コレステリル-TEG)2-(スペーサー C18)7-dT-ビオチン-TEG-3'	29.891234	7,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	
$5'$ -YY XXXXXXTZ-3' (X=スペーサー C18)		13,0%	WBCs	1 nmol/ 10e6 細胞	
$5'$ -(コレステリル-TEG)2-(スペーサー C18)7-dT-ビオチン-TEG-3'	29.891234	63,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞	
		71,0%	WBCs	1 nmol/ 10e6 細胞	

【表 8 - 12】

【 0 2 0 3 】	5'-YY XXXXXXXTZ-3' (X=スペーサー C18)	29.891234	52,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
	5'-YY XXXXXXXTZ-3' (W=スペーサー C3, X=スペーサー C18)	29.891234	78,0%	WBCs	1 nmol/ 10e6 細胞
	5'-YY XXXXXXXTZ-3' (W=スペーサー C3, X=スペーサー C18)	29.891234	33,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
	5'-YY XXXXXXXTZ-3' (W=スペーサー C3, X=スペーサー C18)		44,0%	WBCs	1 nmol/ 10e6 細胞
	5'-YY XXXXXXXTZ-3' (W=スペーサー C3, X=スペーサー C18)	29.891236	46,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞
	5'-YY XXXXXXXTZ-3' (W=スペーサー C3, X=スペーサー C18)		64,0%	WBCs	1 nmol/ 10e6 細胞
	5'-YY XXXXXXXTZ-3' (W=スペーサー C3, X=スペーサー C18)	29.891236	37,0%	WBCs	350 pmol/ 10e6 細胞

10

20

30

40

【表 8 - 13】

			47,0%	WBCs	1 nmol/ 10e6 細胞
0	2	0	4		
5'-YY XXXXXXWTZ-3' (W=スペーサー C3, X=スペーサー C18)	29,891237	8,1%	WBCs	10 pmol/ 10e6 細胞	
		15,1%	WBCs	100 pmol/ 10e6 細胞	
		41,3%	WBCs	1 nmol/ 10e6 細胞	
		59,1%	WBCs	10 nmol/ 10e6 細胞	
5'-YY XXXXXXWTZ-3' (W=スペーサー C3, X=スペーサー C18)	29,891237	10,5%	WBCs	10 pmol/ 10e6 細胞	
		16,4%	WBCs	100 pmol/ 10e6 細胞	
		35,4%	WBCs	1 nmol/ 10e6 細胞	
		62,0%	WBCs	10 nmol/ 10e6 細胞	
5'-Y XXXXXXWTZ- 3' (W=スペーサー C3, X=スペーサー C18)	29,891244	14,00%	WBCs	10 pmol/ 10e6 細胞	

【0 2 0 4】

10

20

30

40

【表 8 - 14】

		27,00%	WBCs	100 pmol/ 10e6 細胞
		51,00%	WBCs	1 nmol/ 10e6 細胞
		57,00%	WBCs	10 nmol/ 10e6 細胞
5'-YY XXXXXXXTZ-3' (W=スペーサー C3, X=スペーサー C18)	29,891246	9,50%		10 pmol/ 10e6 細胞
		20,50%		100 pmol/ 10e6 細胞
		50,70%		1 nmol/ 10e6 細胞
		68,90%		10 nmol/ 10e6 細胞
5'-XXXXXXXTZ-3' (W=スペーサー C3, X=スペーサー C18)	29,891245	9,30%		10 pmol/ 10e6 細胞
		6,20%		100 pmol/ 10e6 細胞
		8,40%		1 nmol/ 10e6 細胞
		27,50%		10 nmol/ 10e6 細胞

【0205】

10

20

30

40

【表 8 - 15】

5'-YY XXXXXXTZ-3' (W=スペーサー C3, X=スペーサー C18) 5'-(コレステリル-TEG)2-(スペーサー C18)7-dT-ビオチン-TEG-3'	29,891246 74,50%	10 nmol/ 10 ⁶ 細胞
5'-Y XXXXXXTZ- 3' (W=スペーサー C3, X=スペーサー C18) 5'-(コレステリル-TEG)-(スペーサー C18)7-dT-ビオチン-TEG-3'	29,891244 51,70%	10 nmol/ 10 ⁶ 細胞
5'-XXXXXXXXTZ-3' (W=スペーサー C3, X=スペーサー C18) 5'-(スペーサー-C18)7-dT-ビオチン-TEG- 3' 44 + 45+ 46 の混合物	29,891245 24,70%	10 nmol/ 10 ⁶ 細胞
5'-YY XXXXXXTZ-3' (W=スペーサー C3, X=スペーサー C18) 5'-(コレステリル-TEG)2-(スペーサー C18)7-dT-ビオチン-TEG-3'	29,891246 66,90%	10 nmol/ 10 ⁶ 細胞
5'-Y XXXXXXTZ- 3' (W=スペーサー C3, X=スペーサー C18) 5'-(コレステリル-TEG)-(スペーサー C18)7-dT-ビオチン-TEG-3'	29,891244 63,70%	10 nmol/ 10 ⁶ 細胞

【 0 2 0 6 】

10

20

30

40

【表 8 - 16】

5'-XXXXXXXTZ-3' (W=スペーサー C3, X=スペーサー C18) 3'	29,891245 44 + 45+ 46 の混合物	26,50% 79,46%	10 nmol/ 10e6 細胞 10 nmol/ 10e6 細胞
5'-XTZ-3' (W=スペ ーサー C3, X=スペ ーサーC18)	29891240	12,80%	1 nmol/ 10e6 細胞
5'-YY XXXXXXXTZ-3' (W=スペーサー C3, X=スペーサー C18)		14,90%	10 nmol/ 10e6 細胞
5'-(コレステリル-TEG)2(スペーサー C18)7-dT-ビオチン-TEG-3'	29,891246	85,50%	1nmol 1C18+10nmol CholChol
ミックス		83,22%	10nmol 1C18+10nmol CholChol
1,2 ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホス ホエタノールアミン-N-[ビオチニル (PEG2000)]	DSPE-PEG(2000) ビオチン (Avantlipids)		10nmol/10^6 ジステ アリン EDTA-Kな し

【0207】

10

20

30

40

【表 8 - 17】

		10nmol/10 ⁶ ジステ アリン 0,3mM EDTA-K	10nmol/10 ⁶ ジステ アリン 1mM EDTA- K	10nmol/10 ⁶ ジステ アリン 3mM EDTA- K	10nmol/10 ⁶ ジステ アリン EDTA-Kな し	10nmol/10 ⁶ ジステ アリン 0,3mM EDTA-K	10nmol/10 ⁶ ジステ アリン 1mM EDTA- K	10nmol/10 ⁶ ジステ アリン 3mM EDTA- K
71,60%								
76,50%								
72,00%								
78,30%								
82,70%								
88,50%								
81,80%								

【0208】

【表 8 - 18】

		10 nmol/ 10e6 細胞	
68,90%		10 nmol/ 10e6 細胞	
69,60%		10 nmol/ 10e6 細胞	
68,90%		10 nmol/ 10e6 細胞	
95,90%		10 nmol/ 10e6 細胞	
84,40%		10 nmol/ 10e6 細胞	
90,80%		10 nmol/ 10e6 細胞	
1,2-ジオレイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-(Cap-ビオチン)-Na	Avantilipids	10 pmol/10e6 細胞	
		100 pmol/10e6 細胞	
		1 nmol/ 10e6 細胞	
		リンクなし	
		74,40%	
		107,10%	
		101,76%	
		26,85%	
		81,00%	
		80,10%	
		64,90%	

10

20

30

40

【0209】

【表 8 - 19】

	80,55%	100 pmol/ 10e6 細胞		
	70,85%	100 pmol/ 10e6 細胞		
	80,74%	100 pmol/ 10e6 細胞		
	53,97%	100 pmol/ 10e6 細胞		
	69,60%	100 pmol/ 10e6 細胞		
	80,16%	500 pmol/ 10e6 細胞		
	95,94%	500 pmol/ 10e6 細胞		
	89,19%	10 nmol/ 10e6 細胞		
	105,12%	10 nmol/ 10e6 細胞		
ジパルミチル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-(Cap-ビオチン)-Na Avantlipids				
	54,30%	10 pmol/10e6 細胞		
	72,20%	100 pmol/10e6 細胞		
	84,90%	1 nmol/ 10e6 細胞		
	11,10%	リンカーナシ		
	45,40%	10 pmol/10e6 細胞		
	86,10%	100 pmol/10e6 細胞		
	89,30%	1 nmol/ 10e6 細胞		
	14,10%	リンカーナシ		

【0210】

10

20

30

40

【表 8 - 20】

		300 pmol/ 10e6 細胞	
	51,80%	300 pmol/ 10e6 細胞	
	55,90%	300 pmol/ 10e6 細胞	
	52,60%	300 pmol/ 10e6 細胞	
	73,07%	300 pmol/ 10e6 細胞	
	61,27%	300 pmol/ 10e6 細胞	
	71,40%	300 pmol/ 10e6 細胞	
<hr/> 5'-(コレステリル-TEG)2-PEG2000-Fluos-ビオチン-TEG-3'			
精製	29.891.247	13,38%	10 pmol/ 10e6 細胞
		15,26%	100 pmol/ 10e6 細胞
		13,27%	1 nmol/ 10e6 細胞
		45,75%	10 nmol/ 10e6 細胞
<hr/> 5'-(コレステリル-TEG)2-スペーサーC18-Fluos-ビオチン-TEG-3'			
精製	29.891.251	25,57%	10 pmol/ 10e6 細胞
		57,82%	100 pmol/ 10e6 細胞
		89,71%	1 nmol/ 10e6 細胞
		92,63%	10 nmol/ 10e6 細胞
		68,57%	100 pmol/ 10e6 細胞
		82,61%	1 nmol/ 10e6 紡

10

20

30

40

【0211】

【表 8 - 21】

5-(コレステリル-TEG)2-PEG2000-Fluos-ビオチン-TEG-3' INVERS 精製	29.891248	32,80%	10 pmol/ 10e6 細胞
		65,36%	100 pmol/ 10e6 細胞
		83,99%	1 nmol/ 10e6 細胞
		81,10%	10 nmol/ 10e6 細胞
		70,75%	100 pmol/ 10e6 細胞
5-(コレステリル-TEG)2-ズペーザー- C18-Fluos-ビオチン-TEG-3' INVERS 精製		86,03%	1 nmol/ 10e6 細胞
	29.891254	40,30%	10 pmol/ 10e6 細胞
		64,60%	100 pmol/ 10e6 細胞
		92,50%	1 nmol/ 10e6 細胞
		83,60%	10 nmol/ 10e6 細胞
		57,63%	100 pmol/ 10e6 細胞
		82,19%	1 nmol/ 10e6 細胞
		65,69%	100 pmol/ 10e6 細胞
		81,79%	1 nmol/ 10e6 細胞
		70,07%	100 pmol/ 10e6 細胞
		81,28%	100 pmol/ 10e6 細胞

10

20

30

40

【表 8 - 2 2】

			74,68%	1 nmol/ 10e6 細胞
<u>3'-(ミリスチン酸)2-PEG2000-dT-ビオチン-TEG-5' INVERS</u>	非精製	29.891255	24,70% 50,61% 87,55% 83,53%	10 pmol/ 10e6 細胞 100 pmol/ 10e6 細胞 1 nmol/ 10e6 細胞 10 nmol/ 10e6 細胞
<u>3'-(ミリスチン酸)2-PEG2000-Fluos-ビオチン-TEG-5' INVERS</u>	非精製	29.891256	35,79% 73,42% 85,13%	10 pmol/ 10e6 細胞 100 pmol/ 10e6 細胞 1 nmol/ 10e6 細胞
<u>5-(コレステリル-TEG)2-PEG2000-dT-L-オチニ-TEG-3'</u>	非精製	29.891249	11,38% 16,16% 37,73% 61,04%	10 pmol/ 10e6 細胞 100 pmol/ 10e6 細胞 1 nmol/ 10e6 細胞 10 nmol/ 10e6 細胞
<u>5-(コレステリル-TEG)2-スペーサーC18-dT-ビオチン-TEG-3' INVERS</u>	非精製	29.891252	28,56% 55,41%	10 pmol/ 10e6 細胞 100 pmol/ 10e6 細胞

【0 2 1 3】

10

20

30

40

50

【表 8 - 2 3】

		71,99%	1 nmol/ 10e6 細胞
		88,05%	10 nmol/ 10e6 細胞
		16,03%	10 pmol/ 10e6 細胞
		52,46%	100 pmol/ 10e6 細胞
		80,83%	1 nmol/ 10e6 細胞
		85,47%	10 nmol/ 10e6 細胞
<u>5-(コレスチリル-TEG)2-スペーサー</u>			
C12-dT-ビオチン_TEG-3' INVERS	非精製	29.891253	47,42%
			73,46%
			96,84%
			102,36%
			41,44%
			72,13%
			62,59%
			79,02%
<u>5-(コレスチリル-TEG)1-Doubler-dT-ビオ</u>			
チン-3'		29.891272	65,03%
			83,08%

10

20

30

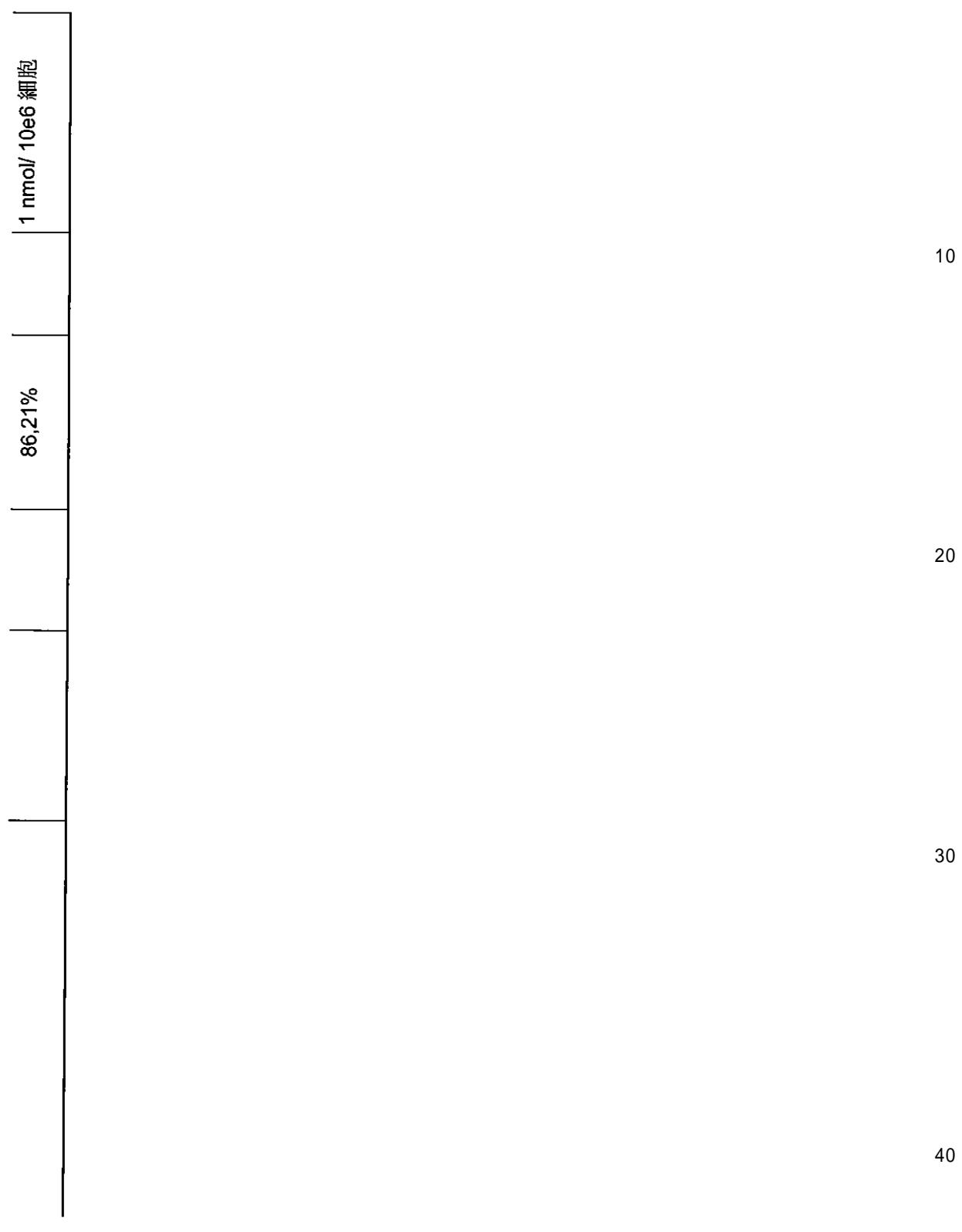
40

【 0 2 1 4 】

【表 8 - 2 4】

	Cells lysed	1 nmol/ 10e6 細胞 10 nmol/ 10e6 細胞	ペニクル形成
5'-(コレステリル-TEG)2-PEG2000-dT-ビオチン_TEG-3'	精製	56,49% 72,13%	100 pmol/ 10e6 細胞 1 nmol/ 10e6 細胞
5'-(コレステリル-TEG)2-PEG2000-Fluos-ビオチン_TEG-3' INVERS	精製	62,11% 82,47%	100 pmol/ 10e6 細胞 1 nmol/ 10e6 細胞
5'-dT-ビオチン_TEG-3' INVERS	精製	82,01%	100 pmol/ 10e6 細胞
5'-(コレステリル-TEG)2-PEG2000-dT-ビオチン_TEG-3' INVERS	精製	29.891249 87,24%	100 pmol/ 10e6 細胞 1 nmol/ 10e6 細胞
C18-dT-ビオチン_TEG-3' INVERS	精製	29.891250 81,29%	100 pmol/ 10e6 細胞 1 nmol/ 10e6 細胞
C12-dT-ビオチン_TEG-3' INVERS	精製	29.891253 71,41%	100 pmol/ 10e6 細胞

【表 8 - 25】



【0 2 1 6】

【表9-1】

試験した分子/その組合せ	社内番号	回収率 処理した細胞(SA プレート)	回収率 非処理細胞 (SA プレート)	回収率 処理した細胞 (非処理プレ ート)	回収率 非処理細胞(非処理 プレート)	注釈
コレステロール-化合物 (5'-XXYFZ-3')	29.891180	73,2%	16,3%	56,7%	68,7%	強い染色
ボロン酸-化合物 (单一)	15.260267	16,3%	13,0%	32,5%	41,3%	
コレステロール-化合物 (5'-XXYFZ-3')	29.891180	71,7%	24,4%			
ジステアロイル-化合物 (Avanti)		53,8%				
コレステロール-化合物 + ジステアロイル-化合物	29.891180	74,7%				
コレステロール-化合物 (5'-XXYFZ-3')	29.891180	83,2%	30,6%			
ジステアロイル-化合物 (Avanti)		66,7%				
コレステロール-化合物 + ジステアロイル-化合物	29.891180	80,2%				
コレステロール-化合物 200 µl Zellsus.	29.891180	67,6%/ 71,9%				
コレステロール-化合物 400 µl Zellsus.	29.891180	78,4%/ 84,1%				

B)

【0217】

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

コレステロール-化合物 800 μ l Zellsus.	29.891180	81,1% / 86,4%	
コレステロール-化合物 (5'-XXYFZ-3')	29.891180	80,9%	30,8%
ジステアロイル-化合物 (Avanti)		50,6%	
コレステロール-化合物 + ジステアロイル-化合物	29.891180	77,8%	
ミリスチン酸-化合物 (5'-XXYFZ-3')C1	29.891194	20,7%	21,6%
ミリスチン酸-化合物 (5'-XXYFZ-3')C2	29.891194	22,1%	
ミリスチン酸-化合物 (5'-XXYFZ-3')C1	29.891194	33,1%	19,5%
ミリスチン酸-化合物 (C14-Lys-PEG)	15.260268	47,7%	19,5%
コレステロール-化合物 (5'-XXYFZ-3')	29.891194	63,4%	10,7%
ミリスチン酸-化合物 (C14-Lys-PEG)	15.260268	53,9%	
コレステロール-化合物 + ミリスチン酸-化合物	29.891194/15.260268	43,6%	

コレステロール-化合物 + ミリスチン酸-化合物	29.891194/15.260268	43,6%	
WBCs	29.891180	78,6%	
WBCs	29.891180	68,6%	

【0 2 1 8】

10

20

30

40

50

【表 9 - 3】

コレステロール-化合物 216 µg/2x10e6 WBCs	29.891180	50,1%	
ミリスチン酸-化合物 2,16 µg/2x10e6 WBCs	15.260268	39,6%	より高い濃度を 再試験する予定
ミリスチン酸-化合物 21,6 µg/2x10e6 WBCs	15.260268	46,7%	
コレステロール-化合物 (5'-XXYFZ-3') ジステアロイル-化合物 (Avanti)	29.891194	89,6%	
ミリスチン酸-化合物 (C14-Lys-PEG) コレステロール-化合物 + ジステアロイル-化合物	15.260268	85,7%	
コレステロール-化合物 + ミリスチン酸-化合物 Chol + ジステアロイル + Myr	29.891194	84,3%	
コレステロール-化合物 (5'-XXYFZ-3') ジステアロイル-化合物 (Avanti)	29.891194	74,0%	
ミリスチン酸-化合物 (C14-Lys-PEG)	15.260268	45,6%	

【0 2 1 9】

10

20

30

40

【表 9 - 4】

0 2 2 0	コレステロール化合物 + ジステアロイル化合物	29.891194	71,7%
	コレステロール化合物 + ミリスチノ酸-化合物	29.891194/15.260268	68,4%
	Chol + ジステアロイル + Myr	29.891194/15.260268	64,9%
	コレステロール-化合物 10 分 4°C	29.891194	81,6%
	コレステロール-化合物 60 分 4°C	29.891194.	81,7%
	コレステロール-化合物 10 分 室温	29.891194	88,3%
	コレステロール-化合物 60 分 室温	29.891194	85,5%
	コレステロール-化合物 10e4 MDAs, WBC 中	29.891194	99,0%
	コレステロール-化合物 5x 10e5 WBCs	29.891194	70,0%
	コレステロール-化合物 20e3 MDAs, WBC 中	29.891194	102,0%
	コレステロール-化合物 5x 10e5 WBCs	29.891194	70,8%
	コレステロール-化合物 40e3 MDAs, WBC 中	29.891194	102,0%
	コレステロール-化合物 10e6 WBCs	29.891194	69,4%

】

10

20

30

40

【表 9 - 5】

			強い染色	弱い染色
			67,4%	24,4%
Myr-Myr-C18-Fluos	29.891213			
Myr-Myr-PEG-Fluos	29.891194			
Myr-Myr-7xC18-Fluos	29.891214	78,9%		
Myr-C9-Myr-PEG-Fluos	29.891197	材料が不十分		

10

20

30

40

【0221】

C) プレートのウェルまたは細胞のいずれかを本発明方法に有用な分子で前処理した際

50

に得られた結果の比較

下記に示すように、異なるインキュベーション時間、実験を実施した：

【 0 2 2 】

【表 1 0 - 1】

30分		ターピット: 300,000 WBC		
ウェル		MW	標準偏差	平均 %
a1	ウェルを処理	61470		
a2	ウェルを処理	67259		21,64
a3	ウェルを処理	74951		2,71
a4	ウェルを処理	55956	64909	8131,2
b1	非処理	5575		
b2	非処理	32017		9,69
b3	非処理	17166		6,56
b4	非処理	11481	29059,75	19683,1
c1	WBC を処理	213072		
c2	WBC を処理	237475		77,28
c3	WBC を処理	243445		4,39

【0 2 2 3】

10

20

30

40

50

【表 10 - 2】

c4 WBC を処理		90 分	ターゲット: 300,000 WBC	MW	標準偏差	平均 %	平均 %
a1	ウェル	ウェルを処理	124492				
a2		ウェルを処理	143548				
a3		ウェルを処理	154212				
a4		ウェルを処理	149208	142865	13000,28		
b1		非処理	46601				
b2		非処理	29206				
b3		非処理	21199				
b4		非処理	14882	27972	13732,98		
c1		WBC を処理	237185				
c2		WBC を処理	252944				
c3		WBC を処理	254697				

【0224】

【表10-3】

c4	WBCを処理	252559	249346,25	8160,72	
----	--------	--------	-----------	---------	--

120分 ターゲット: 300,000 WBC

ウェル	MW	標準偏差	平均%	平均%
a1 ウエルを処理	167671			
a2 ウエルを処理	177678		57,02	6,37
a3 ウエルを処理	192194			
a4 ウエルを処理	146708	19104,5		
b1 非処理	46402			
b2 非処理	35669		9,74	4,88
b3 非処理	20989			
b4 非処理	13798	29214,5		
c1 WBCを処理	256949			
c2 WBCを処理	268552		86,23	2,43
c3 WBCを処理	258291			
c4 WBCを処理	250979	258692,75	7300,9	

【0225】

10

20

30

40

【表 10 - 4】

	30 分	90 分	120 分	
	WBC 回収率 [%]	標準偏差	WBC 回収率 [%]	標準偏差
表面に結合した 本発明方法に有 用な分子	21,64	2,71	47,6	4,33
本発明方法に有 用な分子 + 細胞	77,28	4,39	83,1	2,72
非処理	9,69	6,56	9,3	4,58

固定化の結果は下記のようにまとめられる:

【0226】

	30 分	90 分	120 分	
	WBC 回収率 [%]	標準偏差	WBC 回収率 [%]	標準偏差
表面に結合した本発明 方法に有用な分子	21,64	47,6	57,02	6,37

【表 1 0 - 5】

本発明方法に有用な分子 + 細胞	77,28	83,1	86,23
非処理	9,69	9,3	9,74

10

20

30

40

【0 2 2 7】

D) 例示的化合物ビオチン - PEG - 1 y s - (C14)2についての回収率の決定：
化合物ビオチン - PEG - 1 y s - (C14)2について下記の回収率が決定された：

50

M = 2708 , 90 g / mol
5 , 4 mg / 10 ml EtOH
c = n / V = m / M * V
c = 5 , 4 g / (2708 , 9 g / mol * 10) = 1 , 99 10 e - 4 mol / l
1 , 99 * 10 e - 4 mol / l = 7 , 96 nmol / 4 μl

4 μl = 4 , 5 * 10 e 6 細胞
1 , 77 nmol / 10 e 6 細胞

この実験における回収率 : 85 , 72 %

実施例4：本発明方法に有用な1つの疎水性部分を含む化合物と2つの疎水性部分を含む化合物との比較

10

この実験の目的：ストレプトアビシン - コートした表面への本発明方法に有用な異なる分子を用いる白血球固定化の試験。特に、單一コレステロール - 分子および異なる二重リンクカーモル（すなわち、2つの疎水性部分を含むもの）の性能を試験した。詳細には、ストレプトアビシン - コートした表面への異なるリンクカーモルを用いる白血球（WBC）の固定化を、12 - ウェルプレートで試験した：300000 WBC / ウェル。これに続いて、細胞の固定化および洗浄後の細胞回収率をCellavista計測器（10 x Nuclei Operator s9s5）により測定した。

【0228】

【表 1-1-1】

被験分子	特徴	社内 No	構造
5'-(コレステロール-TEG)1-DoublerdT-ビオチン-3'	モノリンクマー	29.891272	$ \begin{array}{c} 5' - Y \\ \backslash \quad / \\ X \quad Z-3' \end{array} $ <p> $Y = \text{コレステリル-TEG}$ $X = \text{Doubler}$ $Z = dT \text{ ビオチン}$ </p>
5'-(コレステリル-TEG)2-ヌペーザー C12-dT-ビオチン-TEG-3' INVERS	二重リンクマー	29.891253	$ 3' - YY \times T \ Z-5' $ <p> $Y = \text{コレステリル-TEG}$ $X = \text{スペーザー C12}$ $Z = \text{ビオチン-TEG}$ </p>

【0229】

10

20

30

40

【表 1-1-2】

3'-YYXWZ-5'	
5-(コレステリル-TEG)2-スペーサー-C18-Fluos-ビオチン-TEG-3' INVERS	二重リンカー
Y = コレステリル-TEG	29.891254 X = スペーサー C18
W = フルオレセイン	Z = ビオチン-TEG

【0230】

結果は下記のとおりである:

試料 1

	化合物の社内 参照 No.		平均標準偏差	回収率	標準偏差
A1	29.891253	105061	17632,25	41,44%	5,88%
	29.891253	128195			
	29.891253	139678			
A2	29.891254	157660	190148	57,63%	5,45%
	29.891254	190148			

10

20

30

40

【表 1 1 - 3】

C2	29.891254	170850		
A3	29.891272	147132		
B3	29.891272	179643		
C3	29.891272	181620		
			19366,19	56,49% 6,46%

化合物濃度: 1 nmol/10⁶ WBCs

	化合物の社内 参照 No.		平均標準偏差	回収率	標準偏差
A1	29.891253	218861			
B1	29.891253	221471		72,13%	2,23%
C1	29.891253	208802		6689,53	
A2	29.891254	244649			
B2	29.891254	234262		82,19%	4,45%
C2	29.891254	260760		13351,64	
A3	29.891272	199973			
B3	29.891272	220701		72,13%	4,91%
C3	29.891272	228481		14735,92	

【 0 2 3 1 】

10

20

30

40

【表 1-1-4】

A) 化合物濃度: 100 pmol/10⁶ WBCs

試料2

	化合物の社内参考No.	平均	平均標準偏差	回収率	標準偏差
A1	29.891253	178919			
	29.891253	197130			
	29.891253	187224	187757,67	9117,22	62,59% 3,04%
B2	29.891254	185100			
	29.891254	200184			
	29.891254	205917	197067,00	10752,84	65,69% 3,58%
C2	29.891272	161504			
	29.891272	201424			
	29.891272	196021	186316,33	21657,26	62,11% 7,22%
A3					
B3					
C3					

B) 化合物濃度: 1 nmol/10⁶ WBCs

【0 2 3 2】

10

20

30

40

【表 1 1 - 5】

	化合物の社内参考 照 No.	平均	平均標準偏差	回収率	標準偏差
A1	29.891253	239105		79,02%	1,65%
	29.891253	240632			
	29.891253	231420	237052,33	4937,14	
A2	29.891254	244396			
	29.891254	244304			
	29.891254	247428	245376,00	1777,68	
A3	29.891272	241232			
	29.891272	254894			
	29.891272	246129	247418,33	6921,66	

結論：コレステロール-モノリンカーモノ（すなわち、単一の疎水性部分コレステロールを含む化合物）は、二重リソルカーモノ（すなわち、2つの疎水性部分を含む化合物）と比較して類似の細胞固定化特性を示す。

【0233】

実施例5：本発明方法に有用な化合物を用いる細胞安定化

本発明方法に有用な化合物が細胞の安定化および固定化に及ぼす効果を判定した。

A) 異なる分子を用いた遠心分離および細胞固定化の後のWBC回収率

図14に示すように、分子プローブHH1749*、HH1750*およびHH1755*(* ビオチン - PEG - リジン - (C18)2)は遠心分離後の回収率に関して異なる性能を示す：分子の濃度が高いほど、遠心分離後の細胞回収率は高くなる。遠心分離特性：10分、300×g。図15から分かるように、分子プローブHH1749*、HH1750*およびHH1755*は、異なる濃度での細胞固定化率に関して異なる性能を示す。リンカー濃度が高いほど、細胞固定化率は高くなる。

【0234】

B) 異なる化合物を用いた遠心分離後のWBC回収率 - 異なる時点

図16から分かるように、分子AおよびB(A:コレステリル-TEG-コレステリル-TEG-(スペーサーC18)7-F1u0s-ビオチン-TEG; B:ビオチン-PEG-リジン-(C18)2)は遠心分離後の回収率に関して異なる性能を示す。分子濃度が高いほど、遠心分離後の細胞回収率は高くなる。分子Bは3.5時間以内に細胞を固定化できる。遠心分離特性：10分、300×g。A:コレステリル-TEG-コレステリル-TEG-(スペーサーC18)7-F1u0s-ビオチン-TEG。B:ビオチン-PEG-リジン-(C18)2。

【0235】

C) 遠心分離後のWBC回収率 - 異なる実験者

図17から分かるように、分子濃度が高いほど、遠心分離後の細胞回収率は高くなる。さらに、細胞安定化は実験者とは無関係である。遠心分離特性：10分、300×g。分子：コレステリル-TEG-コレステリル-TEG-(スペーサーC18)7-F1u0s-ビオチン-TEG。

【0236】

D) 遠心分離後のWBC回収率 - 異なる時点および遠心分離設定

第1実験の結果を図18に示す。下記の分子を試験した：

- 1234 : 5' - (コレステリル-TEG)2 - スペーサーC18 - dT - ビオチン-TEG - 3'
- 1248 : 3' - (コレステリル-TEG)2 - PEG2000 - F1u0s - ビオチン-TEG - 5' INVERS 1254 : 3' - (コレステリル-TEG)2 - スペーサーC18 - F1u0s - ビオチン-TEG - 5' INVERS
- 1255 : 3' - (ミリスチン酸)2 - PEG2000 - dT - ビオチン - TE G - 5' INVERS
- すべての分子が2時間以内に細胞を固定化できる
- PBS中におけるWBCは300×gで20分間の遠心分離に際して損傷を受ける
- 分子1234は最良の性能を示し、化合物1255および1254がそれに続く。

【0237】

遠心分離特性：20分、300×g。

これに関する第2実験の結果を図19に示す。下記の分子を試験した：

- 1255 : 3' - (ミリスチン酸)2 - PEG2000 - dT - ビオチン - T E G - 5' INVERS 1234 : 5' - (コレステリル - T E G)2 - スペーサーC18 - dT - ビオチン - T E G - 3'
- 1248 : 3' - (コレステリル - T E G)2 - PEG2000 - F1u0s - ビオチン - T E G - 5' INVERS
- 1254 : 3' - (コレステリル - T E G)2 - スペーサーC18 - F1u0s - ビオチン - T E G - 5' INVERS

結果は下記のとおりである：

- すべての分子が2時間以内に細胞を固定化できる
- PBS中におけるWBCは500×gで20分間の遠心分離に際して損傷を受ける
- 分子1234は最良の性能を示し、分子1255および1254がそれに続く。

【0238】

遠心分離特性：20分、500×g。これに関する第3実験の結果を図20に示す。下

記の分子を試験した：

- 1255 : 3' - (ミリスチン酸) 2 - PEG2000 - dT - ビオチン - TEG - 5' INVERS
- 1234 : 5' - (コレステリル - TEG) 2 - スペーサー C18 - dT - ビオチン - TEG - 3'
- 1248 : 3' - (コレステリル - TEG) 2 - PEG2000 - Fluos - ビオチン - TEG - 5' INVERS
- 1254 : 3' - (コレステリル - TEG) 2 - スペーサー C18 - Fluos - ビオチン - TEG - 5' INVERS

結果は下記のとおりである：

- すべての分子が 2 時間以内に細胞を固定化できる
- PBS 中における WBC は $1000 \times g$ で 20 分間の遠心分離に際して損傷を受ける

遠心分離特性： 20 分、 $500 \times g$ 。

【0239】

E) 遠心分離後のジャーカット回収率 - 異なる時点

この実験の結果を図 21 に示す。下記の分子を試験した：

- 1255 : 3' - (ミリスチン酸) 2 - PEG2000 - dT - ビオチン - TEG - 5' INVERS
- 1234 : 5' - (コレステリル - TEG) 2 - スペーサー C18 - dT - ビオチン - TEG - 3'
- 1248 : 3' - (コレステリル - TEG) 2 - PEG2000 - Fluos - ビオチン - TEG - 5' INVERS
- 1254 : 3' - (コレステリル - TEG) 2 - スペーサー C18 - Fluos - ビオチン - TEG - 5' INVERS

結果は下記のとおりである：

- ジャーカット培養細胞は、 PBS 中および異なる分子を用いた遠心分離プロセスに際して 5 . 5 時間以内に安定である

遠心分離特性： 20 分、 $500 \times g$ 。

【0240】

F) 3 官能性リンカー部分は細胞生存性に影響を及ぼさない

これに関する第 1 実験の結果を図 22A および B に示す。

3 官能性リンカー部分が異なる、本発明方法に有用な異なる化合物を用いて、 WST - 1 増殖キット (R A S) を用いる細胞生存性試験を実施した。

【0241】

図 22 から分かるように、これらの異なるリンカーは 4 時間のリンカーアインキュベーション時間中に細胞生存性に影響を及ぼさない。

これに関する第 2 実験の結果を図 23A および B に示す。本発明方法に有用な被験分子 (No. 1244 および 1274) は、 4 . 5 時間のリンカーアインキュベーション時間中に細胞形態に影響を及ぼさないことが見出された。

【0242】

G) 本発明方法に有用な分子とのインキュベーションを行なわない場合の細胞形態 - 異なる時点

この実験の結果を図 24 に示す。下記のことが見出された：

- 本発明方法に有用な分子を添加しない場合、細胞は 4 . 5 時間のインキュベーション時間中に離散する

• インキュベーション時間中に残った細胞の細胞形態は影響を受けていない。

【0243】

H) 遠心分離後の MDA - MB468 回収率 - 異なる時点

この実験の結果を図 25 に示す。本発明方法に有用な下記の分子を試験した：

10

20

30

40

50

- 1234 : 5' - (コレステリル-TEG)2-スペーサーC18-dT-ビオチン-TEG-3'
- 1255 : 3' - (ミリスチン酸)2-P EG2000-dT-ビオチン-TEG-5' INVERS

下記のことが見出された：

- MDA-MB468 培養細胞は、PBS中における、および本発明方法に有用な異なる分子を用いた遠心分離プロセスに際して、5時間以内は安定である

遠心分離特性：20分、500×g。

【0244】

実施例6：本発明方法に有用な化合物と共にインキュベートしたSA-プレート（ストレプトアビジン-プレート）と本発明方法に有用な化合物と共にインキュベートしたWC（白血球）との比較

出発物質として5' - (コレステリル-TEG)2-P EG2000-F1uos-ビオチン-TEG-3' INVERS (14530 pmol/μl)（社内参照No.：29.891250）、およびストレプトアビジン処理したMTP (Microcoat)、12ウェルプレートを用いた。

【0245】

赤血球溶解を下記に従って実施した：

- EDTA - 全血 59.423 6.400 WBC / μl (Ambulanz Roche)

細胞溶解緩衝液：100 mM NH₄Cl + 5 mM Hepes + 0, 5 mM KHC_O₃ + 0, 1 mM EDTA-K

Ca 1×8 ml の全血を細胞溶解緩衝液と共に 50 ml Falcon チューブに充填し、室温で 10 分間インキュベートした。

【0246】

250 g で 15 分間遠心分離し、ペレットを反復ピペットингにより細胞溶解緩衝液に再懸濁した； 50 ml まで細胞溶解緩衝液を充填した。

250 g で 15 分間遠心分離し、ペレットを PBS で再懸濁し、50 ml まで PBS を充填し、250 g で 15 分間遠心分離し、50 ml まで PBS を充填した。

【0247】

WBC を Sysmex で測定した。

1 : 37.100 の WBC / μl

- プレート上で実験のデザインを以下に説明する（参照：図2）：

3×12 ウェル MTP：本発明方法に有用な化合物による WBC の処理：

4×判定：

横列 A : 200 μl の PBS を導入し、それぞれ 1 nmol の化合物をそれに添加し、混合し、約 30 分間インキュベートし、PBS で 2 回洗浄し、800 μl の PBS を導入し、300.000 の WBC (非処理) を添加した；

横列 B : 800 μl の PBS を導入し、300.000 の WBC (非処理) を添加した；

横列 C : 1 ml 中の 10×10⁶ の WBC を 10 nmol の本発明方法に有用な化合物と共に 10 分間インキュベートし、それぞれ 800 μl の PBS / ウェル、300.00 の処理済み WBC を導入した。

【0248】

- 第 1 MTP プレートを 30 分後に PBS で 2 回洗浄し、Hoechst を積層し、15 分間インキュベートした。> Cellavista (Operator s9s5) 測定した。

【0249】

- 第 2 プレートを 90 分後に測定した。

- 第 3 プレートを 150 分後に測定した。

10

20

30

40

50

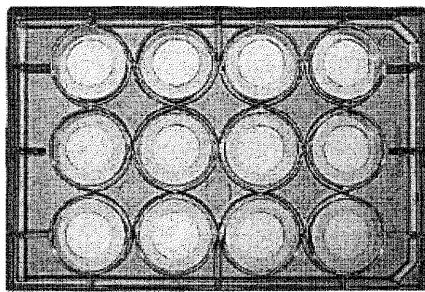
計算した結果を図 3 に示す。これらの結果を表わすグラフを図 4 に示す。実験のプレートを図 5 に示す。

【 0 2 5 0 】

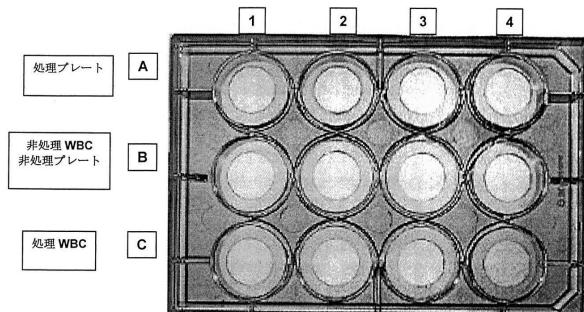
本発明の方法は明らかに予想外に有利であることが分かった。

【 図 1 】

Figure 1



【 図 2 】



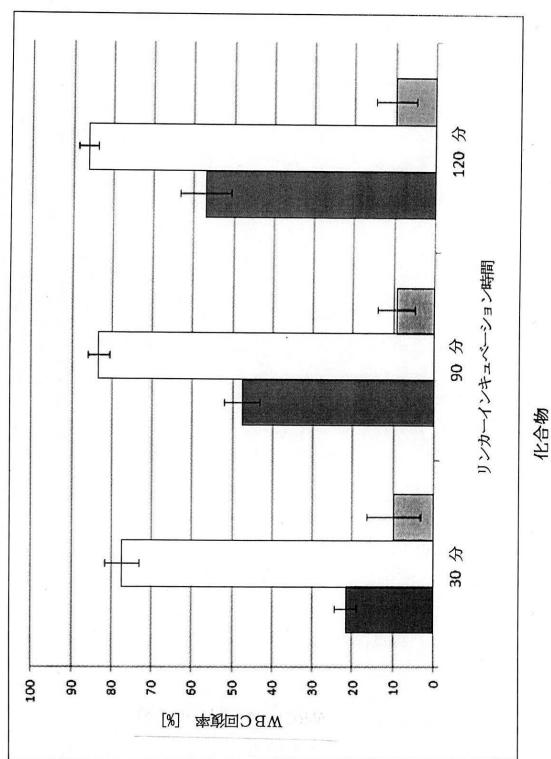
【 図 3 】

30 分 ターゲット: 300,000 WBC		MW	STD	平均 %	STD %
ウェル					
a1	ウェルを処理	61470			
a2	ウェルを処理	67259			
a3	ウェルを処理	74951			
a4	ウェルを処理	55956	64909	8131,2	
b1	非処理	55575			
b2	非処理	32017			
b3	非処理	17166			
b4	非処理	11481	29059,75	19683,1	
c1	WBC を処理	213072			
c2	WBC を処理	237475			
c3	WBC を処理	243345			
c4	WBC を処理	233327	231829,75	13176,7	

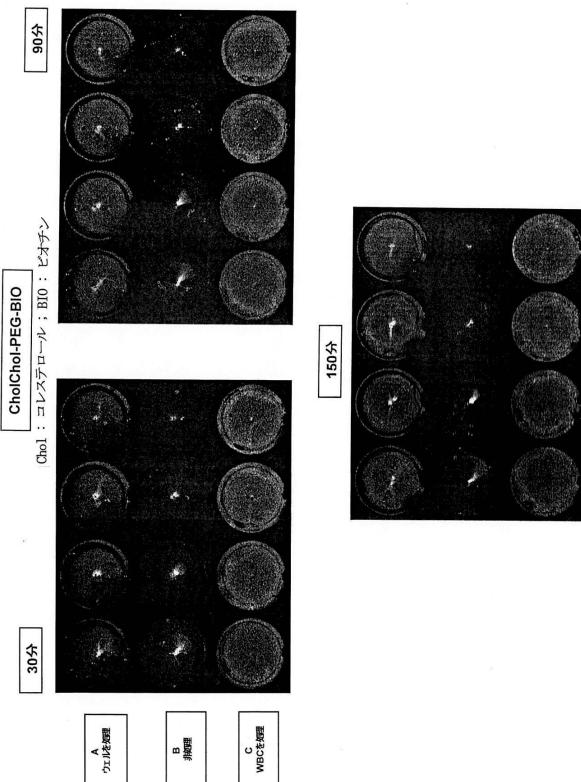
90 分 ターゲット: 300,000 WBC		MW	STD	平均 %	平均 %
ウェル					
a1	ウェルを処理	124492			
a2	ウェルを処理	143548			
a3	ウェルを処理	154212			
a4	ウェルを処理	149208	142865	13000,28	
b1	非処理	46601			
b2	非処理	29206			
b3	非処理	21199			
b4	非処理	14882	27972	13732,98	
c1	WBC を処理	237185			
c2	WBC を処理	252944			
c3	WBC を処理	254697			
c4	WBC を処理	252559	249346,25	8160,72	

120 分 ターゲット: 300,000 WBC		MW	STD	平均 %	平均 %
ウェル					
a1	ウェルを処理	167671			
a2	ウェルを処理	177678			
a3	ウェルを処理	192194			
a4	ウェルを処理	146708	171062,75	19104,5	
b1	非処理	46402			
b2	非処理	35669			
b3	非処理	20989			
b4	非処理	13798	28214,5	14633,3	
c1	WBC を処理	256949			
c2	WBC を処理	268552			
c3	WBC を処理	258291			
c4	WBC を処理	250979	258692,75	7300,9	

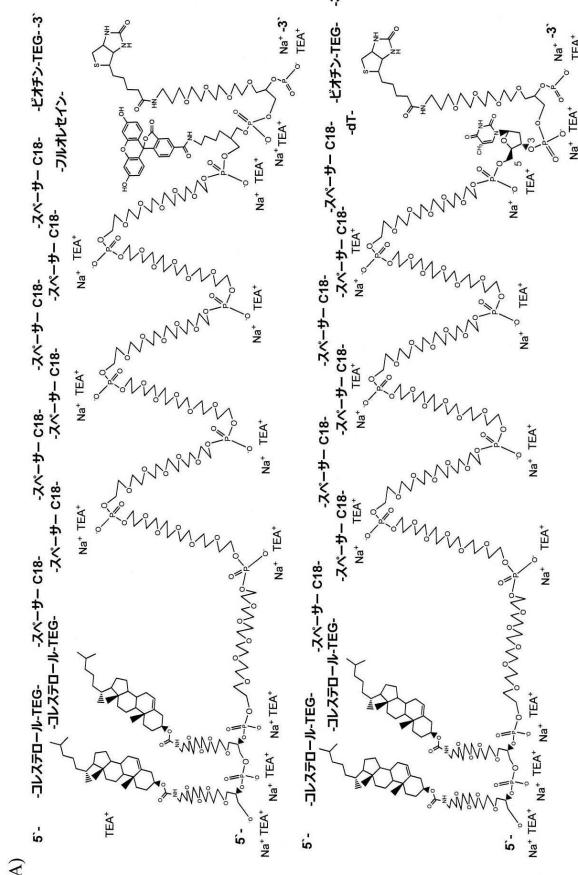
【 四 4 】



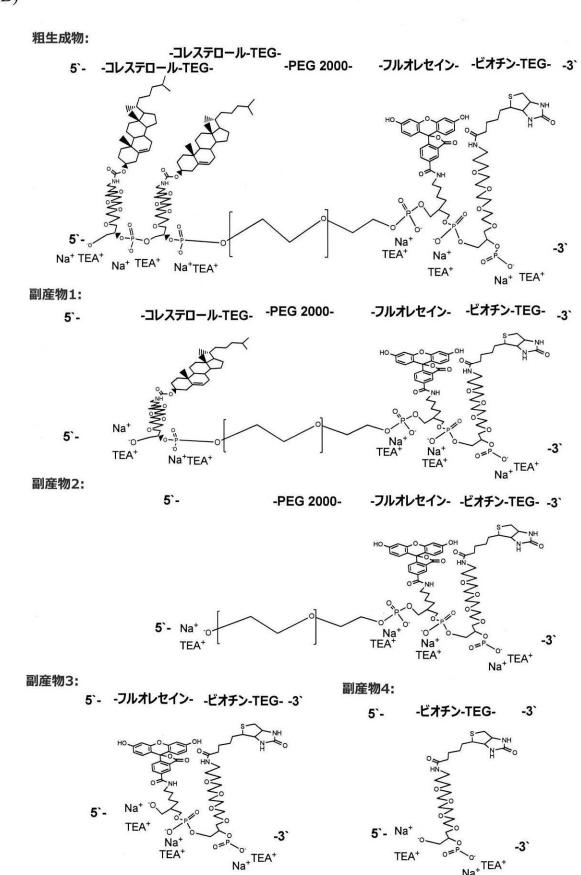
【図5】



【図 6 - 1】

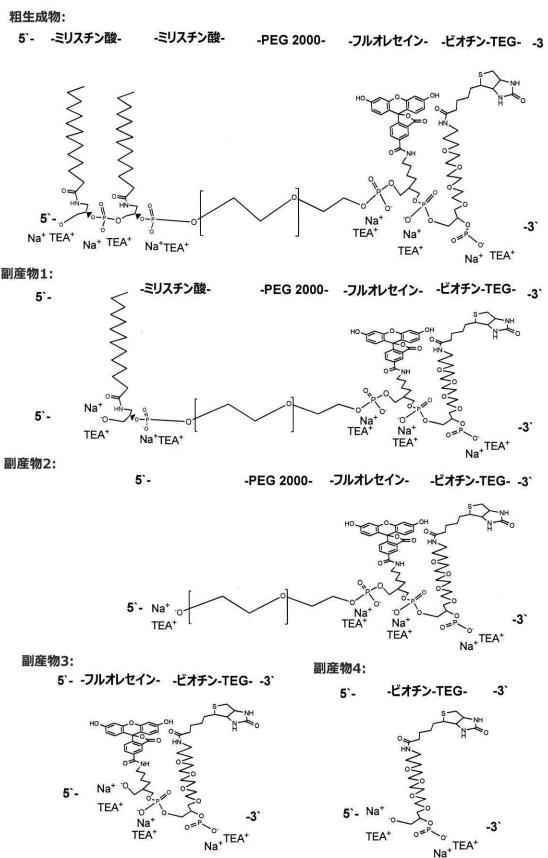


【図 6 - 2】



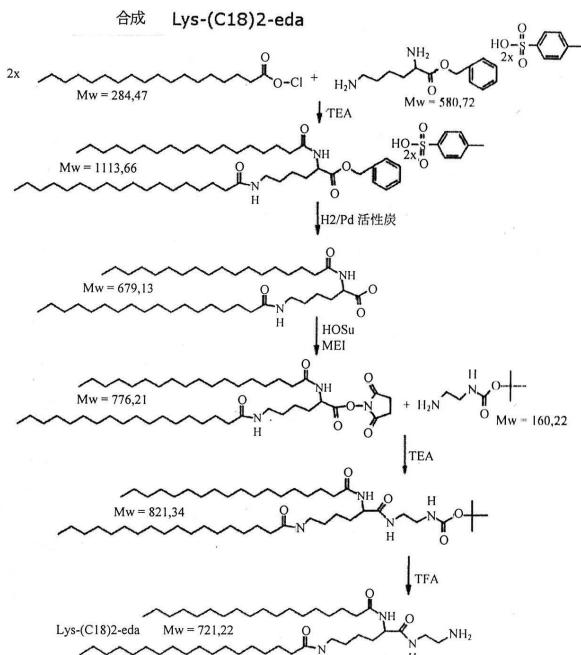
【図 6 - 3】

C)

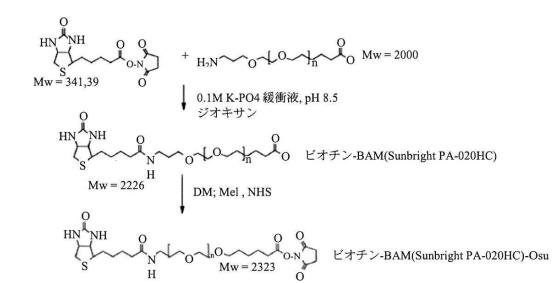


【図 6 - 4】

C)

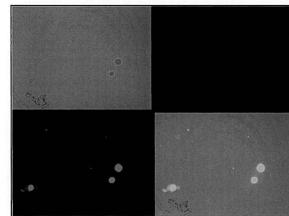


【図 6 - 5】

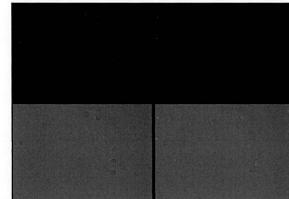


【図 7 - 1】

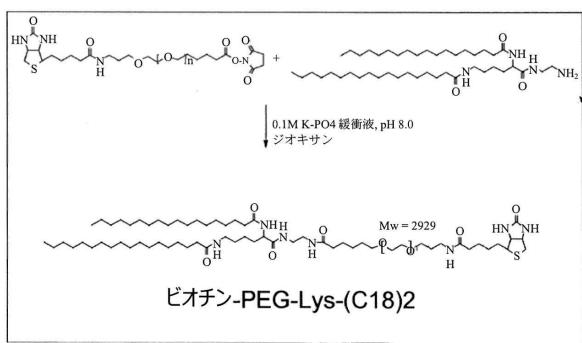
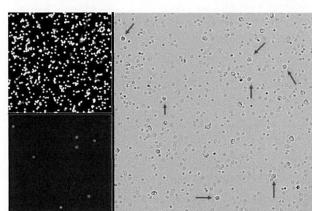
A)



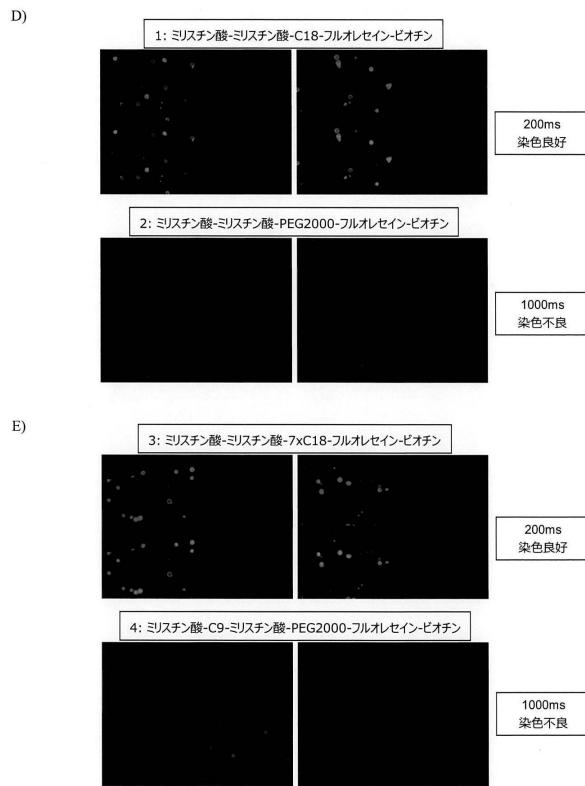
B)



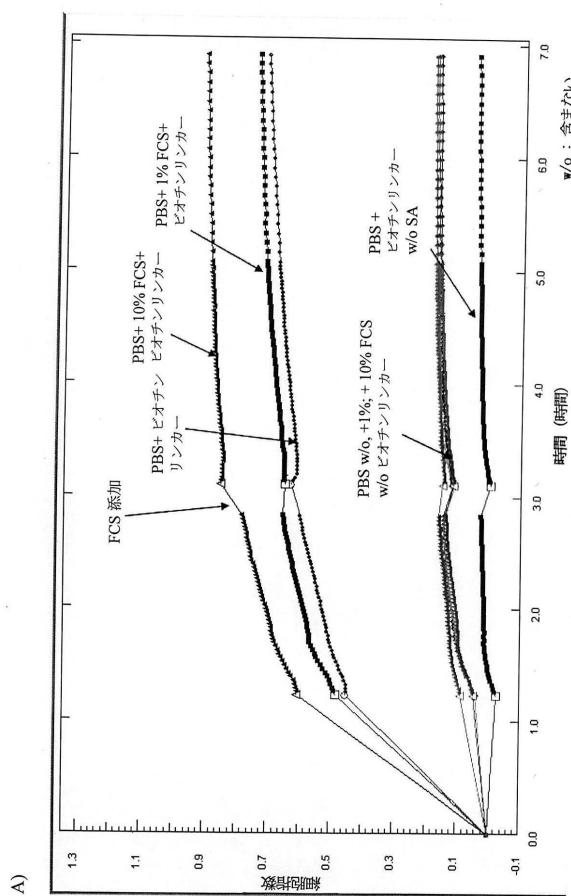
C)



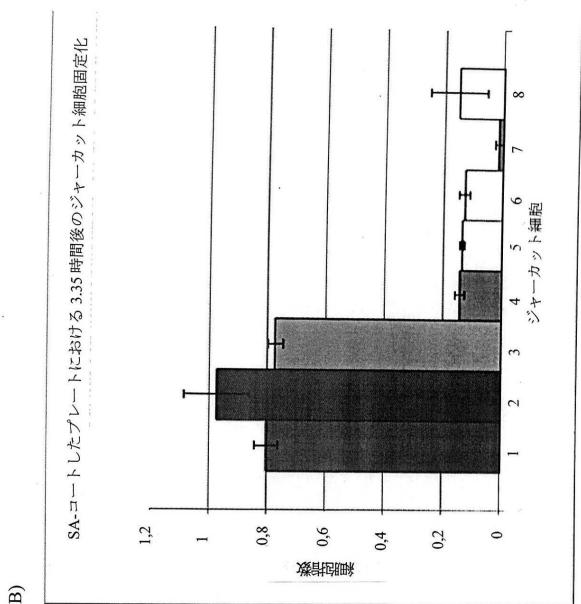
【図 7 - 2】



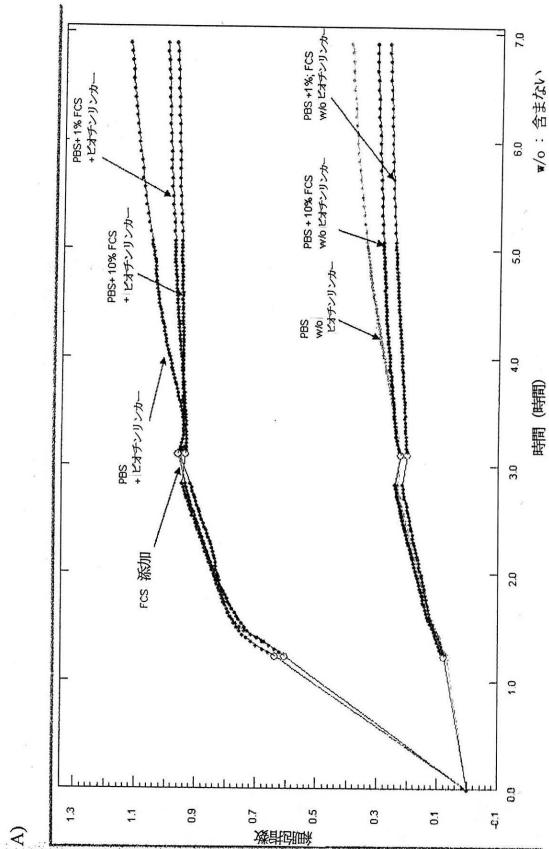
【図 8 - 1】



【図 8 - 2】

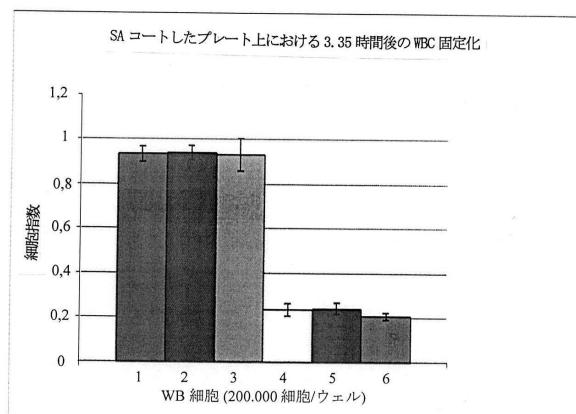


【図 9 - 1】



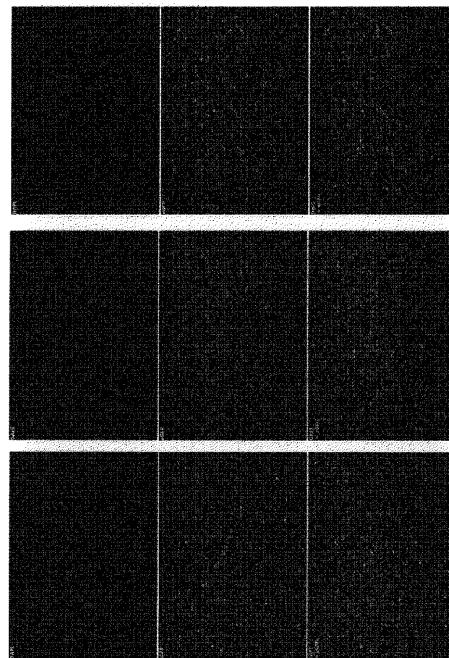
【図9-2】

B)



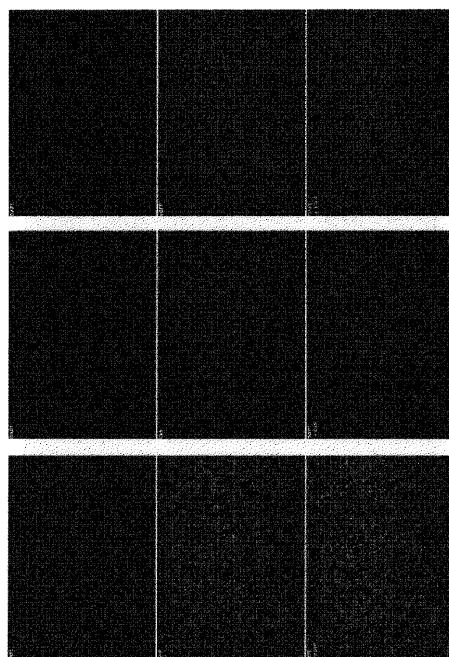
【図10】

Figure 10



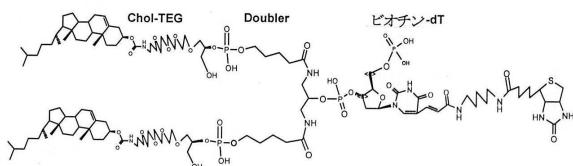
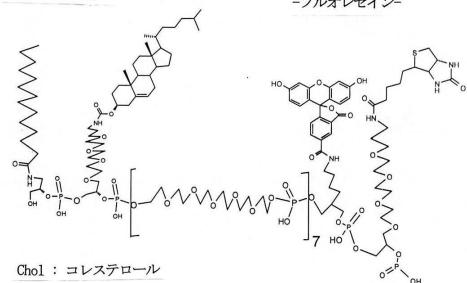
【図11】

Figure 11



【図12-1】

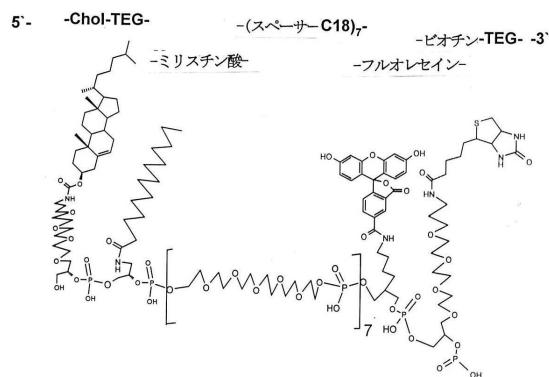
29891272 Chol-TEG-Chol-TEG-Doubler-ビオチン-dT

29891227 Myr-Chol-TEG-(スペーサー-C18)₇-Fluos-ビオチン-TEG5'-
-ミリスチン酸- -Chol-TEG- -(スペーサー C18)₇- -ビオチン-TEG- -3'
-フルオレセイン-

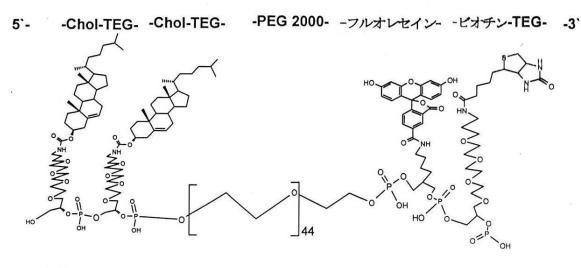
Chol : コレステロール

【図12-2】

29891228 Chol-TEG-Myr-(スペーサー-C18)-Fluos-ビオチン-TEG

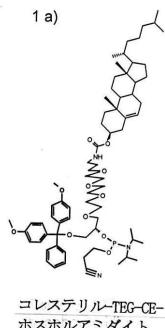


29891180 Chol-TEG-Chol-TEG-PEG2000-Fluos-ビオチン-TEG

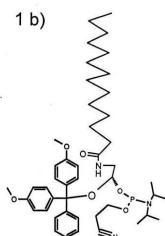


【図12-3】

合成に用いたホスホルアミダイト:

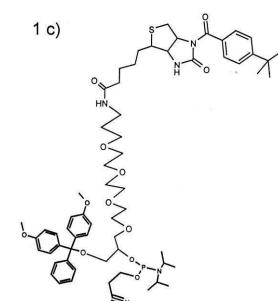


a) コレステリル-TEG-CE-PA (GlenResearch 10-1975),

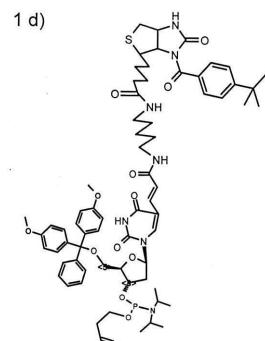


b) ミリスチン酸-CE-PA (社内作製),

【図12-4】

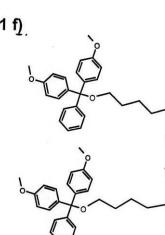
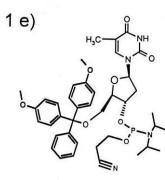


c) ビオチン-TEG-CE-PA (GlenResearch 10-1955),



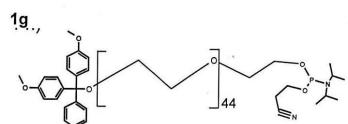
d) ビオチン-dT-CE-PA (GlenResearch 10-1038),

【図12-5】

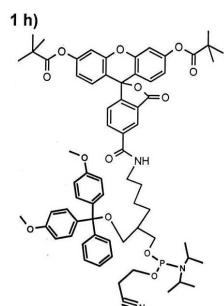


f) 対称 doubler-CE-PA (GlenResearch 10-1920),

【図 1 2 - 6】

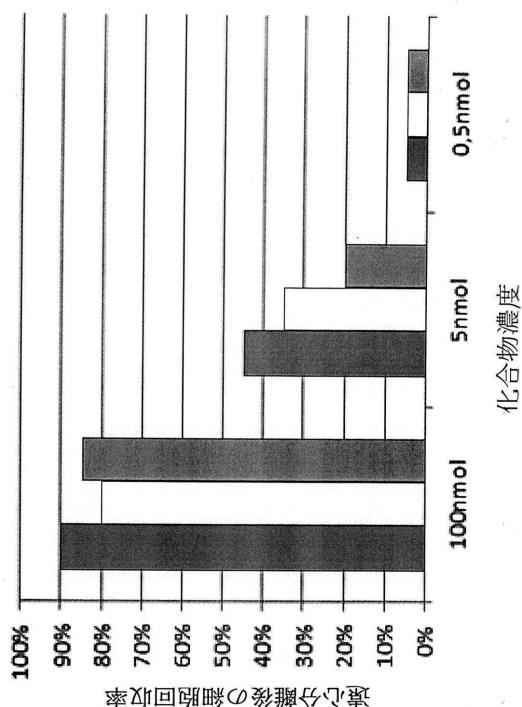
PEG-2000-CE-
ホスホアミダイト

g) PEG-200-CED-PA (ChemGenes CLP-2119),

6-フルオレセイン-CE-
ホスホアミダイト

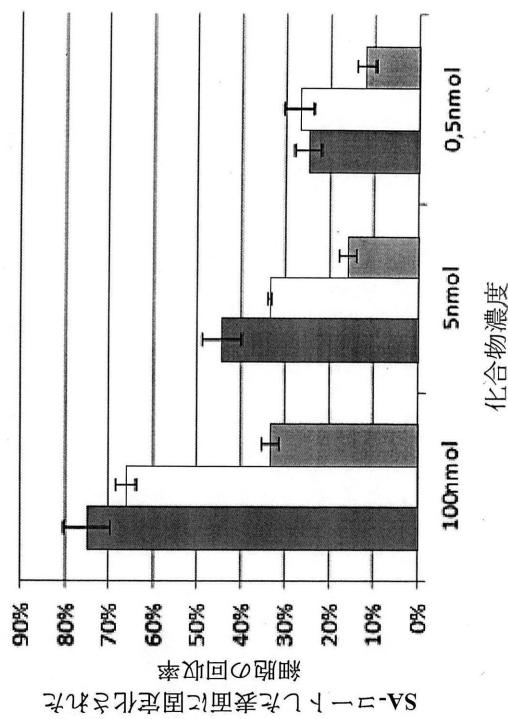
h) 6-フルオレセイン-CE-PA (GlenResearch 10-1964)

【図 1 3】



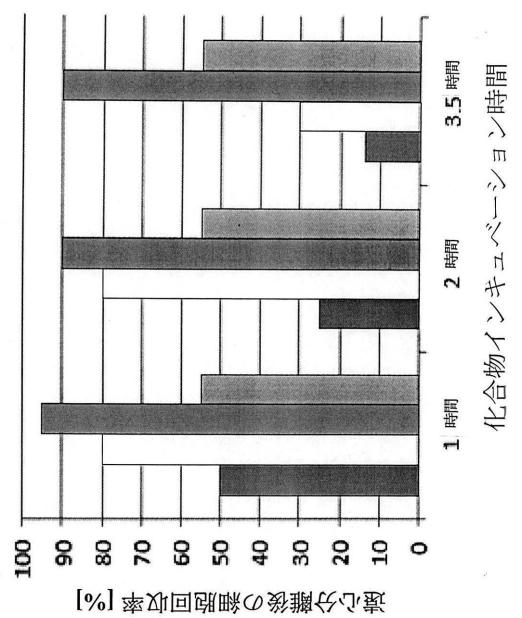
導入分離後の細胞回収率

【図 1 4】



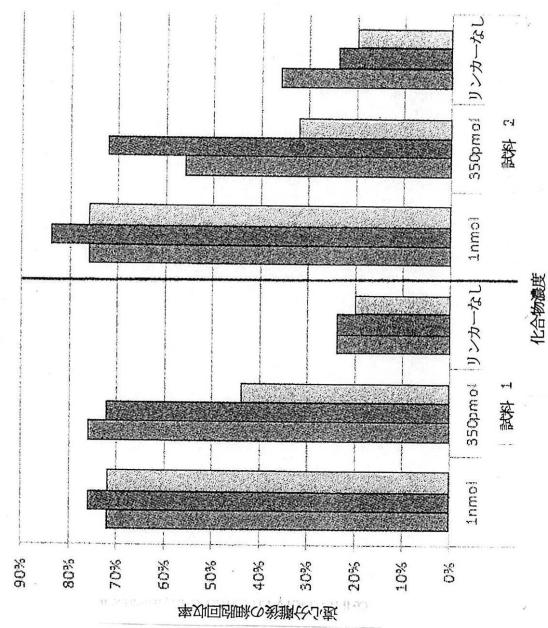
SA-ビニル化表面活性化化合物

【図 1 5】

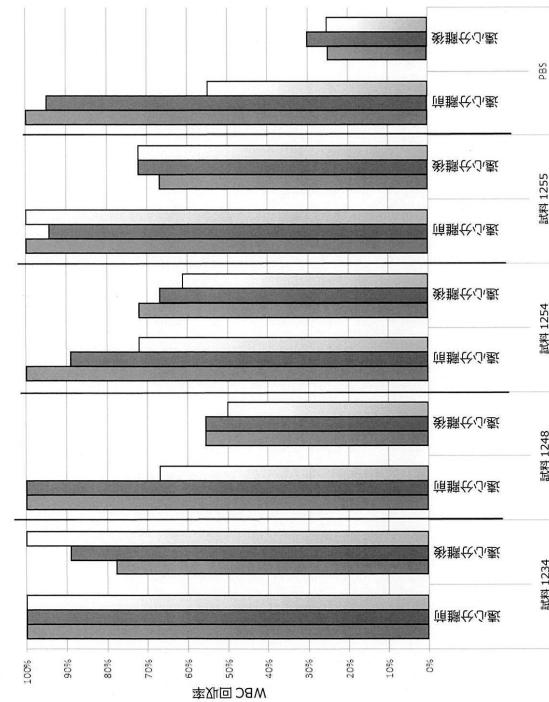


導入分離後の細胞回収率 [%]

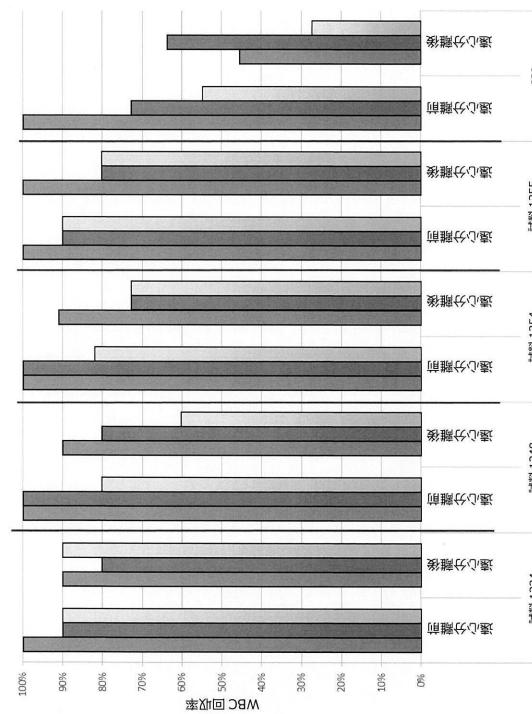
【図16】



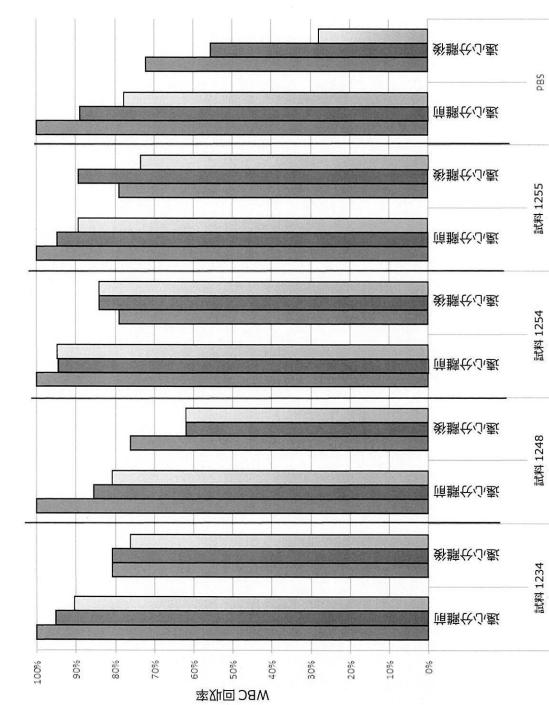
【図17】



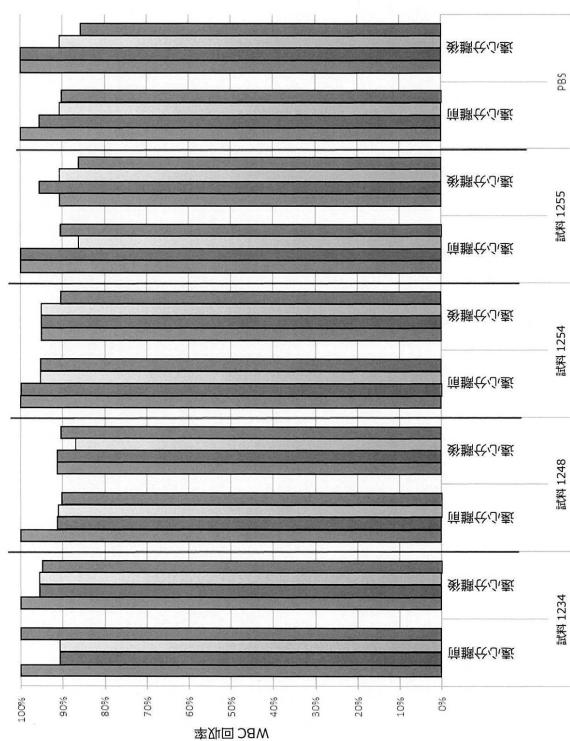
【図18】



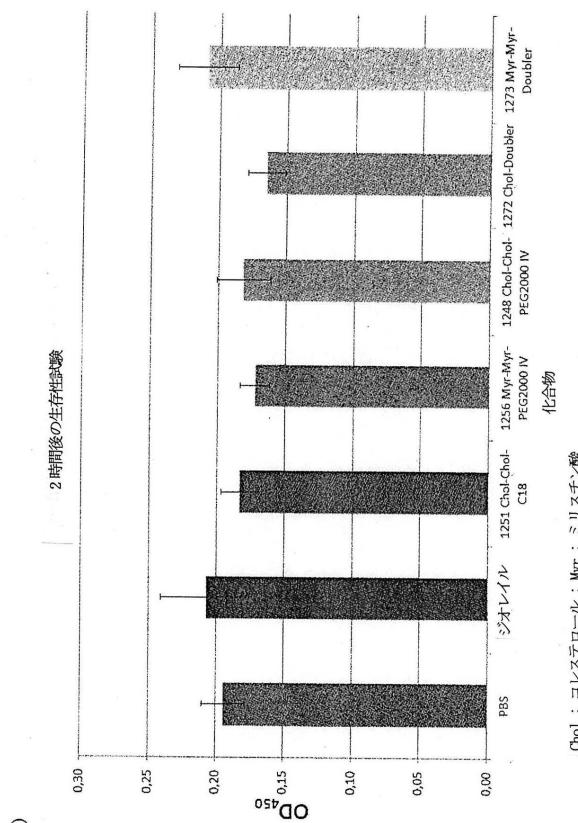
【図19】



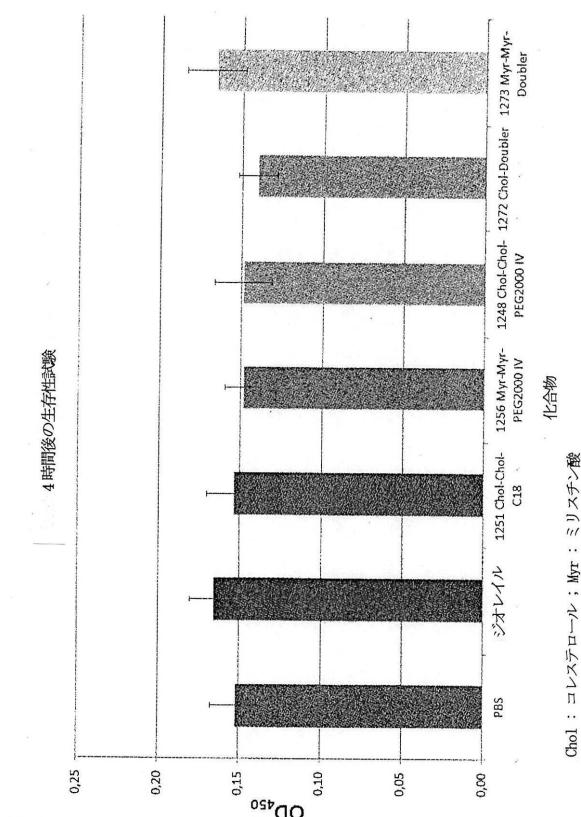
【図20】



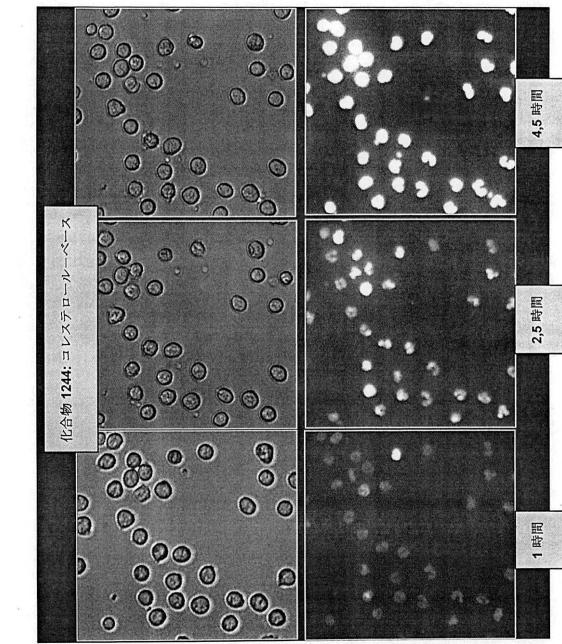
【図21-1】



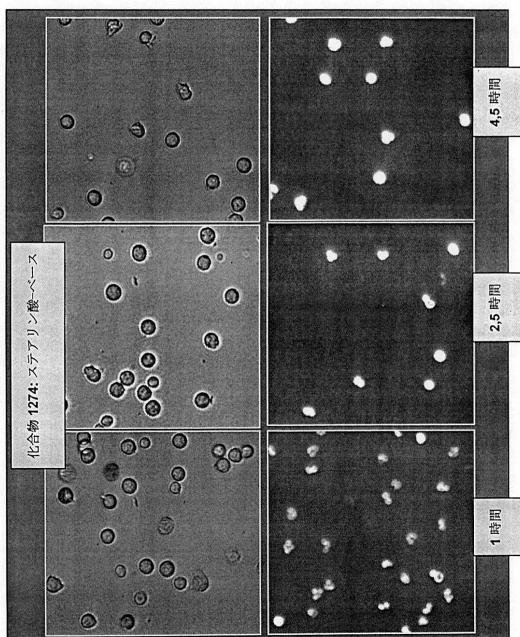
【図21-2】



【図22-1】

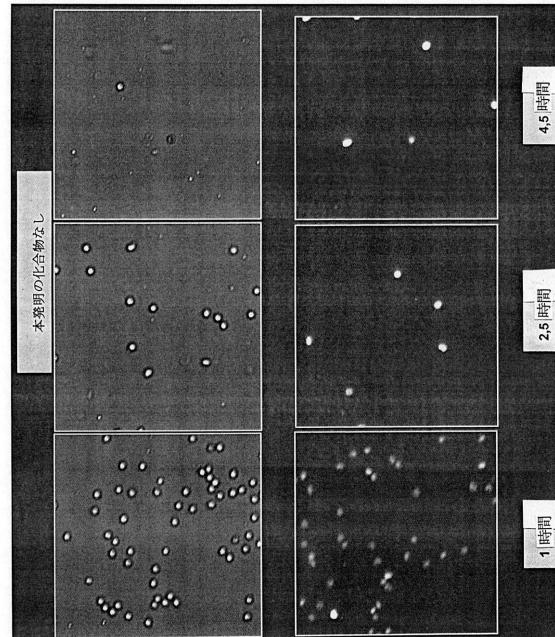


【図 2 2 - 2】

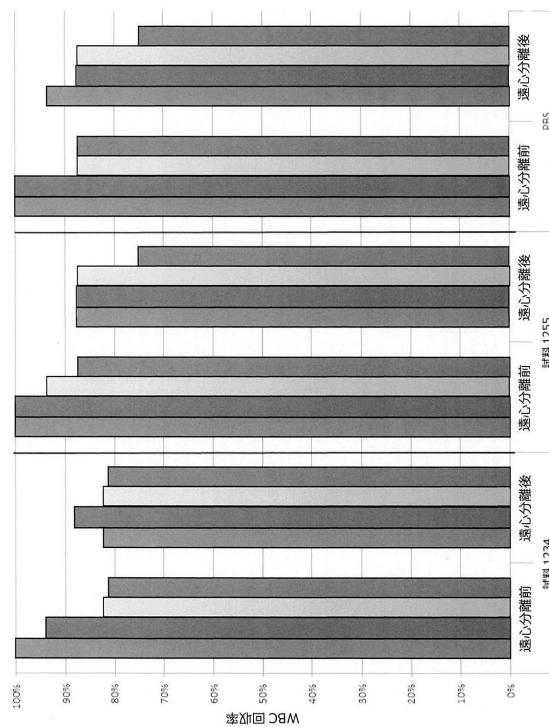


B)

【図 2 3】



【図 2 4】



フロントページの続き

(74)代理人 100173635
弁理士 吉田 樹里
(72)発明者 ヨーゼル, ハンス - ペーター
ドイツ国 82362 ヴァイルハイム, ウルメンシュトラーセ 28
(72)発明者 ハインドル, ディーター
ドイツ国 81377 ミュンヘン, マグノーリエンヴェーク 7
(72)発明者 フレーリッヒ, トーマス
ドイツ国 82377 ペンツベルク, ザンクト・クララ - シュトラーセ 38
(72)発明者 フレーナー, シュテファニー
ドイツ国 82377 ペンツベルク, ザンクト・クララ - シュトラーセ 36

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 特開2005-312377(JP, A)
特許第4284412(JP, B2)
特開2008-081486(JP, A)
日本細胞生物学会大会講演要旨集, 2001, Vol.54th, p.59
Integr. Biol., 2012, Vol. 4, no. 12, pp. 1550-1555

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 11/06
C12N 5/071
JST Plus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)