

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4124361号
(P4124361)

(45) 発行日 平成20年7月23日 (2008. 7. 23)

(24) 登録日 平成20年5月16日 (2008. 5. 16)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 30/00 (2006. 01)

GO 1 N 30/00

B

BO 1 J 20/281 (2006. 01)

GO 1 N 30/48

Z

GO 1 N 30/88 (2006. 01)

GO 1 N 30/54

F

GO 1 N 30/54 (2006. 01)

GO 1 N 1/10

C

GO 1 N 1/10 (2006. 01)

請求項の数 4 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2004-37589 (P2004-37589)
 (22) 出願日 平成16年2月16日 (2004. 2. 16)
 (65) 公開番号 特開2005-227190 (P2005-227190A)
 (43) 公開日 平成17年8月25日 (2005. 8. 25)
 審査請求日 平成18年12月11日 (2006. 12. 11)

(73) 特許権者 801000072
 農工大ティー・エル・オー株式会社
 東京都小金井市中町二丁目24番16号
 (74) 代理人 230104019
 弁護士 大野 聖二
 (74) 代理人 100106840
 弁理士 森田 耕司
 (74) 代理人 100105991
 弁理士 田中 玲子
 (74) 代理人 100114465
 弁理士 北野 健
 (72) 発明者 千葉 一裕
 東京都府中市幸町3-8-5 東京農工大
 大学農学部内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学物質の分離方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第1の物質と第2の物質との反応によって生成した反応物を分離する方法であって、
 (a) 第1の物質と液相状態の温度感受性担体とを混合する工程、
 (b) 反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を固相状態に変化させて、第1の物質のアンカー部位を温度感受性担体に固定させる工程、
 (c) 温度感受性担体に固定された第1の物質の反応部位に第2の物質を反応させて反応物を得る工程、
 (d) 反応系から不純物を除去する工程、
 (e) 反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を液相状態に変化させて、反応物のアンカー部位を温度感受性担体から放出させる工程、
 を含み、

ここで、第1の物質は、温度感受性担体に固定されうるアンカー部位と、第2の物質と反応する反応部位とを有し、
 温度感受性担体は、温度を変化させることにより、固相状態から液相状態に可逆的に変化し、固相状態でアンカー部位を固定し、液相状態でアンカー部位を固定しない、
 方法。

【請求項 2】

第1の物質と第2の物質との反応によって生成した反応物を分離する方法であって、
 (a) 第1の物質と第2の物質とを反応させて反応物を得る工程、

10

20

(b) 反応物と液相状態の温度感受性担体とを混合する工程、
(c) 反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を固相状態に変化させて、反応物のアンカー部位を温度感受性担体に固定させる工程、
(d) 反応系から不純物を除去する工程、
(e) 反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を液相状態に変化させて、反応物のアンカー部位を温度感受性担体から放出させる工程、
を含み、

ここで、第1の物質は、温度感受性担体に固定されうるアンカー部位と、第2の物質と反応する反応部位とを有し、第1の物質と第2の物質とを反応させることにより、反応物にアンカー部位が導入され、

温度感受性担体は、温度を変化させることにより、固相状態から液相状態に可逆的に変化し、固相状態でアンカー部位を固定し、液相状態でアンカー部位を固定しない、
方法。

【請求項3】

第1の物質と第2の物質との相互作用によって生成した複合体を分離する方法であって、

(a) 第1の物質と液相状態の温度感受性担体とを混合する工程、
(b) 反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を固相状態に変化させて、第1の物質のアンカー部位を温度感受性担体に固定させる工程、
(c) 温度感受性担体に固定された第1の物質の相互作用部位に第2の物質を相互作用させて複合体を得る工程、
(d) 反応系から不純物を除去する工程、
(e) 反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を液相状態に変化させて、複合体のアンカー部位を温度感受性担体から放出させる工程、
を含み、

ここで、第1の物質は、温度感受性担体に固定されうるアンカー部位と、第2の物質と相互作用しうる相互作用部位とを有し、

温度感受性担体は、温度を変化させることにより、固相状態から液相状態に可逆的に変化し、固相状態でアンカー部位を固定し、液相状態でアンカー部位を固定しない、
方法。

【請求項4】

第1の物質と第2の物質との相互作用によって生成した複合体を分離する方法であって、

(a) 第1の物質と第2の物質とを相互作用させて複合体を得る工程、
(b) 複合体と液相状態の温度感受性担体とを混合する工程、
(c) 反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を固相状態に変化させて、複合体のアンカー部位を温度感受性担体に固定させる工程、
(d) 反応系から不純物を除去する工程、
(e) 反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を液相状態に変化させて、複合体のアンカー部位を温度感受性担体から放出させる工程、
を含み、

ここで、第1の物質は、温度感受性担体に固定されうるアンカー部位と、第2の物質と相互作用する相互作用部位とを有し、第1の物質と第2の物質とを相互作用させることにより、複合体にアンカー部位が導入され、

温度感受性担体は、温度を変化させることにより、固相状態から液相状態に可逆的に変化し、固相状態でアンカー部位を固定し、液相状態でアンカー部位を固定しない、
方法。

10

20

30

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、化学物質の分離方法に関する。さらに詳しくは、特定の温度感受性担体と、アンカー部位を有する物質との相互作用を用い、化学物質を効率的に分離する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

化学プロセス、生化学プロセスにおける物質の化学反応や相互作用は、多くの場合溶液中で実施される。このようなプロセスにおいて、必要な物質と不要な物質を各々分離する操作は、目的物質をできる限り高い純度で効率よく得るために必須である。従来、物質の分離を行うために、固体である担体粒子を用いた各種クロマトグラフィーや、固相合成法が広く用いられている。例えば、アフィニティークロマトグラフィーは、固相担体表面に予め化学結合させたプローブ分子に対し、親和性の高いリガンド分子が特異的に結合することにより、その他の分子と区別し、分離を行うものである。この方法では、固相に結合した物質と液相に溶解した物質の分離は容易である一方で、固相から物質を切断して目的物を得るためには、一定の処理を行わなければならない。すなわち、表面に物質を捕捉した後、再放出させるためには特定の化学処理、生化学処理、光照射、電気刺激付与などの物理処理などが必要となる（非特許文献1参照）。

【0003】

【非特許文献1】「コーン・スタンプ 生化学」第3版、p 133、東京化学同人

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の課題は、固相を利用した物質の分離方法において、固相に固定された物質を、化学処理、生化学処理、光照射、電気刺激付与等を与えることなく、容易に分離することができる方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、アンカー部分を有する物質のアンカー部分と、温度感受性担体との相互作用を利用することにより、特定物質の捕捉または放出を制御することを可能にするものである。

【0006】

即ち、本発明の第1の態様は、第1の物質と第2の物質との反応によって生成した反応物を分離する方法であって、(a)第1の物質と液相状態の温度感受性担体とを混合する工程、(b)反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を固相状態に変化させて、第1の物質のアンカー部位を温度感受性担体に固定させる工程、(c)温度感受性担体に固定された第1の物質の反応部位に第2の物質を反応させて反応物を得る工程、(d)反応系から不純物を除去する工程、(e)反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を液相状態に変化させて、反応物のアンカー部位を温度感受性担体から放出させる工程、を含み、ここで、第1の物質は、温度感受性担体に固定されうるアンカー部位と、第2の物質と反応する反応部位とを有し、温度感受性担体は、温度を変化させることにより、固相状態から液相状態に可逆的に変化し、固相状態でアンカー部位を固定し、液相状態でアンカー部位を固定しない、方法である。

【0007】

本発明の第2の態様は、第1の物質と第2の物質との反応によって生成した反応物を分離する方法であって、(a)第1の物質と第2の物質とを反応させて反応物を得る工程、(b)反応物と液相状態の温度感受性担体とを混合する工程、(c)反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を固相状態に変化させて、反応物のアンカー部位を温度

10

20

30

40

50

感受性担体に固定させる工程、(d)反応系から不純物を除去する工程、(e)反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を液相状態に変化させて、反応物のアンカー部位を温度感受性担体から放出させる工程、を含み、ここで、第1の物質は、温度感受性担体に固定されうるアンカー部位と、第2の物質と反応する反応部位とを有し、第1の物質と第2の物質とを反応させることにより、反応物にアンカー部位が導入され、温度感受性担体は、温度を変化させることにより、固相状態から液相状態に可逆的に変化し、固相状態でアンカー部位を固定し、液相状態でアンカー部位を固定しない、方法である。

【0008】

本発明の第3の態様は、第1の物質と第2の物質との相互作用によって生成した複合体を分離する方法であって、(a)第1の物質と液相状態の温度感受性担体とを混合する工程、(b)反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を固相状態に変化させて、第1の物質のアンカー部位を温度感受性担体に固定させる工程、(c)温度感受性担体に固定された第1の物質の相互作用部位に第2の物質を相互作用させて複合体を得る工程、(d)反応系から不純物を除去する工程、(e)反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を液相状態に変化させて、複合体のアンカー部位を温度感受性担体から放出させる工程、を含み、ここで、第1の物質は、温度感受性担体に固定されうるアンカー部位と、第2の物質と相互作用しうる相互作用部位とを有し、温度感受性担体は、温度を変化させることにより、固相状態から液相状態に可逆的に変化し、固相状態でアンカー部位を固定し、液相状態でアンカー部位を固定しない、方法である。

【0009】

本発明の第4の態様は、第1の物質と第2の物質との相互作用によって生成した複合体を分離する方法であって、(a)第1の物質と第2の物質とを相互作用させて複合体を得る工程、(b)複合体と液相状態の温度感受性担体とを混合する工程、(c)反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を固相状態に変化させて、複合体のアンカー部位を温度感受性担体に固定させる工程、(d)反応系から不純物を除去する工程、(e)反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を液相状態に変化させて、複合体のアンカー部位を温度感受性担体から放出させる工程、を含み、ここで、第1の物質は、温度感受性担体に固定されうるアンカー部位と、第2の物質と相互作用する相互作用部位とを有し、第1の物質と第2の物質とを相互作用させることにより、複合体にアンカー部位が導入され、温度感受性担体は、温度を変化させることにより、固相状態から液相状態に可逆的に変化し、固相状態でアンカー部位を固定し、液相状態でアンカー部位を固定しない、方法である。

【発明の効果】

【0010】

本発明により化学物質、生化学物質の連続合成・精製・分離作業が著しく効率化するばかりではなく、生体物質間の相互作用を利用した物質分離生成法や特定物質の検出・分析法などきわめて広範な技術分野において革新的な進展が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明に用いる温度感受性担体は、温度を変化させることにより、固相状態から液相状態に可逆的に変化し、固相状態で第1の物質のアンカー部位を固定し、液相状態でアンカー部位を固定しない性質を有するものである。温度感受性担体としては、このような性質を有するものであれば特に制限はないが、例えば、炭化水素を挙げることができる。この中でも、炭素原子数10～30の炭化水素が好ましく、ノルマルテトラデカン、ノルマルヘキサデカン、ノルマルオクタデカン、エイコサン、シクロヘキサンがより好ましい。そして、これらの炭化水素の炭素鎖を変化させることにより、固相状態から液相状態に変化する温度を、所望により変化させることができる。また、2種以上の炭化水素を混合することにより、固相状態から液相状態に変化する温度を変化させることもできる。

【0012】

なお、これらの炭化水素では、温度を上昇させることにより固相状態から液相状態に変

10

20

30

40

50

化するが、逆に、温度を上昇させることにより液相状態から固相状態に変化する物質を用いてもよい。

【 0 0 1 3 】

なお、本発明において、液相状態とは、液相であることのほか、温度感受性担体が軟化した状態若しくは半固体の状態も含まれる。また、本発明において、固相状態とは、固相であることのほか、温度感受性担体が硬化した状態も含まれる。そして、温度感受性担体が硬化した状態では、アンカー部を固定し、軟化した状態若しくは半固体の状態では、アンカー部を固定しない性質を示すこととなる。

【 0 0 1 4 】

本発明に用いる温度感受性担体の形態としては、図 1 に示すように、温度感受性担体全体が固相状態から液相状態に可逆的に変化する形態のほか、図 2 に示すように、他の固体担体の表面に温度感受性担体を吸着若しくは結合させた形態でもよい。この際に用いる固体担体としては、温度感受性担体を吸着若しくは結合できるものであれば特に制限はないが、例えば、オクタデシル基を表面に結合させたシリカゲル（ODS）やガラスビーズ、白金粉末、等を挙げることができる。また、シクロヘキサン等にあらかじめ溶解させた、シクロヘキサンより融点の高いアルカン類を、シクロヘキサンと混合物の形で冷却、析出させることにより、これらを担体とみなすこともできる。

【 0 0 1 5 】

また、本発明に用いる温度感受性担体の他の形態としては、図 3 に示すように、界面活性剤に囲まれたミセルまたはエマルジョンの形態でもよい。この際に用いる界面活性剤としては、ミセルまたはエマルジョンを形成するものであれば特に制限はないが、例えば、ホスファチジルコリンやリゾホスファチジルコリン等のリン脂質等を挙げることができる。これらの、界面活性剤は、適宜 2 種以上を混合して用いることもできる。

【 0 0 1 6 】

本発明に用いる、第 1 の物質としては、温度感受性担体に固定されうるアンカー部位と、第 2 の物質と反応する反応部位若しくは第 2 の物質と相互作用する相互作用部位とを有するものである。アンカー部位としては、温度感受性担体に固定されうるものであれば特に制限はないが、例えば、長鎖アルキル基、ポリエチレングリコール（PEG）などのポリエーテル鎖、ポリスチレンやポリエチレンなどのポリマー類等を挙げることができる。

【 0 0 1 7 】

また、第 1 の物質の反応部位としては、第 2 の物質と反応するものであれば特に制限はないが、例えば、アミノ基、カルボキシル基、アルデヒド基、スルホン酸基、ヒドロキシル基、チオール基、ハロゲン化アルキル基、不飽和炭化水素基、ニトロ基、酸無水物、酸ハロゲン化物イソシアネート基、イソチオシアネート基等を挙げることができる。

【 0 0 1 8 】

さらに、第 1 の物質の相互作用部位としては、第 2 の物質と相互作用するものであれば特に制限はないが、例えば、アビジン、ビオチン、抗原、抗体、生理活性物質、ペプチド、オリゴ糖、糖ペプチド、核酸、ペプチドやタンパク質のエピトープ等を挙げることができる。

【 0 0 1 9 】

本発明に用いる、第 1 の物質は上記アンカー部位と、反応部位若しくは相互作用部位とを結合させることにより製造することができる。また、必要に応じ、アンカー部位と反応部位若しくは相互作用部位との間に、リンカー部位を設けてもよい。リンカー部位は、アンカー部位と反応部位若しくは相互作用部位との間に、適切な距離を持たせ、第 2 の物質と反応若しくは相互作用しやすくする働きを有する。リンカー部位としては、特に制限はないが、例えば、長鎖アルキル基、ポリエチレングリコール（PEG）などのポリエーテル鎖、ポリチオエーテル鎖等を挙げることができる。

【 0 0 2 0 】

なお、これら第 1 の物質を製造する方法としては特に制限はなく、通常の化学合成等により得ることができる。

【 0 0 2 1 】

本発明に用いる第2の物質としては、第1の物質の反応部位と反応するものであれば特に制限はないが、例えば、カルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基、スルホン酸基、ヒドロキシル基、チオール基、ハロゲン化アルキル基、不飽和炭化水素基、ニトロ基、酸無水物、酸ハロゲン化物イソシアネート基、イソチオシアネート基等を有するものをあげることができる。または、第2の物質としては、第1の物質の相互作用部位と相互作用するものであれば特に制限はないが、例えば、ビオチン、アビジン、抗原、抗体、生理活性物質、ペプチド、オリゴ糖、糖ペプチド、核酸、ペプチドやタンパク質のエピトープ等を挙げることができる。

【 0 0 2 2 】

例えば、ペプチド合成を行う場合には、第1の物質の反応部位としてはアミノ基を、第2の物質としては、アミノ基をt - BOCで保護し、カルボキシル基をジイソプロピルカルビジイミド(DIPCD)等で活性化したアミノ酸を挙げることができる。

【 0 0 2 3 】

次に、本発明の第1の態様について説明する。

本発明の第1の態様は、第1の物質と第2の物質との反応によって生成した反応物を分離する方法であって、(a)第1の物質と液相状態の温度感受性担体とを混合する工程、(b)反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を固相状態に変化させて、第1の物質のアンカー部位を温度感受性担体に固定させる工程、(c)温度感受性担体に固定された第1の物質の反応部位に第2の物質を反応させて反応物を得る工程、(d)反応系から不純物を除去する工程、(e)反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を液相状態に変化させて、反応物のアンカー部位を温度感受性担体から放出させる工程、を含み、ここで、第1の物質は、温度感受性担体に固定されうるアンカー部位と、第2の物質と反応する反応部位とを有し、温度感受性担体は、温度を変化させることにより、固相状態から液相状態に可逆的に変化し、固相状態でアンカー部位を固定し、液相状態でアンカー部位を固定しない、方法である。

【 0 0 2 4 】

上記(a)工程では、第1の物質と温度感受性担体が均一に溶解または分散することとなる。この場合、水等の溶媒を適宜用いて第1の物質と温度感受性担体を溶解または分散させてもよい。次に、(b)工程において、温度を変化させることにより温度感受性担体を固相状態に変化させ、このときに第1の物質のアンカー部位が温度感受性担体に固定されることとなる。そして、(c)工程において、第1の物質の反応部位と第2の物質とが反応し、アンカー部位を固定された反応物が得られることとなる。この際に、反応促進剤や、反応活性化剤等を用いてもよい。さらに、(d)工程において、未反応の第2の物質、反応促進剤、反応活性化剤等の不純物を除去することとなる。除去の方法としては、反応系を溶媒で洗浄し、濾過すること等を挙げることができる。この際、反応物のアンカー部位が温度感受性担体に固定されているため、容易に不純物と反応物とを分離することが可能となる。また、温度感受性固体のサイズが小さい場合には、溶媒または溶媒に溶解した不純物との分離のために、温度感受性固体と溶媒との比重の差を利用した遠心分離による分離、あるいは温度感受性固体表面に特定の物質に対し親和性の高い物質を予め結合または捕捉させ、この親和性部分と相互作用する別の固体表面、あるいは高分子との相互作用を用いて、特定の固体表面に対し、サイズの小さな温度感受性固体粒子を固定してもよい。この場合は、溶液と温度感受性固体粒子との比重差がない場合でも、容易に分離が可能となる。そして、(e)工程において、温度感受性担体を液相状態とし、これにより反応物が温度感受性担体から放出されることとなる。この際に、化学反応等を行うことなしに反応物を放出することができることとなる。この放出された反応物を回収することにより、目的物を得ることができる。

【 0 0 2 5 】

なお、例えば、ペプチド合成の場合は、(d)工程の後、さらに伸張するアミノ酸を第2の物質として用いて(c)工程および(d)工程を繰り返し行うことにより、所望のア

10

20

30

40

50

ミノ酸長のペプチドを合成することができる。

【0026】

次に、本発明の第2の態様について説明する。

本発明の第2の態様は、第1の物質と第2の物質との反応によって生成した反応物を分離する方法であって、(a)第1の物質と第2の物質とを反応させて反応物を得る工程、(b)反応物と液相状態の温度感受性担体とを混合する工程、(c)反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を固相状態に変化させて、反応物のアンカー部位を温度感受性担体に固定させる工程、(d)反応系から不純物を除去する工程、(e)反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を液相状態に変化させて、反応物のアンカー部位を温度感受性担体から放出させる工程、を含み、ここで、第1の物質は、温度感受性担体に固定されうるアンカー部位と、第2の物質と反応する反応部位とを有し、第1の物質と第2の物質とを反応させることにより、反応物にアンカー部位が導入され、温度感受性担体は、温度を変化させることにより、固相状態から液相状態に可逆的に変化し、固相状態でアンカー部位を固定し、液相状態でアンカー部位を固定しない、方法である。

10

【0027】

上記(a)工程では、第1の物質と第2の物質を反応させて反応物を得ることとなる。この際に、反応促進剤や、反応活性化剤等を用いてもよい。この反応は、溶媒中の均一系で行うことが可能であり、従来の固相合成法に比べ、効率的な反応が可能となる。次に(b)工程において、反応物と温度感受性担体が均一に溶解または分散することとなる。そして、(c)工程において、温度を変化させることにより温度感受性担体を固相状態に変化させ、このときに反応物のアンカー部位が温度感受性担体に固定されることとなる。さらに、(d)工程において、未反応の第2の物質、反応促進剤、反応活性化剤等の不純物を除去することとなる。除去の方法としては、反応系を溶媒で洗浄し、濾過すること等を挙げることができる。この際、反応物のアンカー部位が温度感受性担体に固定されているため、容易に不純物と反応物とを分離することが可能となる。そして、(e)工程において、温度感受性担体を液相状態とし、これにより反応物が温度感受性担体から放出されることとなる。この際に、化学反応等を行うことなしに反応物を放出することができることとなる。この放出された反応物を回収することにより、目的物を得ることができる。

20

【0028】

なお、例えば、ペプチド合成の場合は、(e)工程の後、さらに伸張するアミノ酸を第2の物質として用いて(a)工程～(e)工程を繰り返し行うことにより、所望のアミノ酸長のペプチドを合成することができる。図7に、ペプチド合成の概念図を示す。図7(i)において、例えば0においてDMF中に分散された固相(ODS)表面にシクロヘキサンが保持され固化する。このとき、アンカー分子に結合したC末端アミノ酸は、固相担体表面に固化したシクロヘキサンとともに保持される。そして、図7(ii)において、例えば50に加温することにより、固相表面のシクロヘキサンはDMFに完全に溶解する。それに伴い、アンカー分子に結合したC末端アミノ酸もDMF相に溶解する。このとき、アミノ酸伸張試薬と均一溶液中で反応が起こる。そして、図7(iii)において、攪拌しながら再び0まで冷却すると、DMF中に溶解していたアンカー分子およびシクロヘキサンは、ODS表面において、シクロヘキサンの固化によって強く保持される。この状態で、過剰のアミノ酸伸張試薬をDMFをもちいて洗浄、除去することができることとなる。

30

40

【0029】

次に、本発明の第3の態様について説明する。

本発明の第3の態様は、第1の物質と第2の物質との相互作用によって生成した複合体を分離する方法であって、(a)第1の物質と液相状態の温度感受性担体とを混合する工程、(b)反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を固相状態に変化させて、第1の物質のアンカー部位を温度感受性担体に固定させる工程、(c)温度感受性担体に固定された第1の物質の相互作用部位に第2の物質を相互作用させて複合体を得る工程、(d)反応系から不純物を除去する工程、(e)反応系の温度を変化させることにより

50

温度感受性担体を液相状態に変化させて、複合体のアンカー部位を温度感受性担体から放出させる工程、を含み、ここで、第１の物質は、温度感受性担体に固定されうるアンカー部位と、第２の物質と相互作用しうる相互作用部位とを有し、温度感受性担体は、温度を変化させることにより、固相状態から液相状態に可逆的に変化し、固相状態でアンカー部位を固定し、液相状態でアンカー部位を固定しない、方法である。

【 0 0 3 0 】

上記（ a ）工程では、第１の物質と温度感受性担体が均一に溶解または分散することとなる。この場合、水等の溶媒を適宜用いて第１の物質と温度感受性担体を溶解または分散させてもよい。次に、（ b ）工程において、温度を変化させることにより温度感受性担体を固相状態に変化させ、このときに第１の物質のアンカー部位が温度感受性担体に固定されることとなる。そして、（ c ）工程において、第１の物質の相互作用部位と第２の物質とが相互作用し、アンカー部位を固定された複合体が得られることとなる。この際に、第１の物質と相互作用しない他の物質は、複合体を形成することではなく、溶媒に溶解または分散したままとなる。さらに、（ d ）工程において、第１の物質と相互作用しない他の物質等の不純物を除去することとなる。除去の方法としては、反応系を溶媒で洗浄し、濾過すること等を挙げることができる。この際、複合体は、アンカー部位が温度感受性担体に固定されているため、容易に不純物と複合体とを分離することが可能となる。そして、（ e ）工程において、温度感受性担体を液相状態とし、これにより複合体が温度感受性担体から放出されることとなる。この際に、化学反応等を行うことなしに複合体を放出することができることとなる。この放出された複合体を回収することにより、目的物を得ることができる（図 4 参照）。

【 0 0 3 1 】

次に、本発明の第４の態様について説明する。

本発明の第４の態様は、第１の物質と第２の物質との相互作用によって生成した複合体を分離する方法であって、（ a ）第１の物質と第２の物質とを相互作用させて複合体を得る工程、（ b ）複合体と液相状態の温度感受性担体とを混合する工程、（ c ）反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を固相状態に変化させて、複合体のアンカー部位を温度感受性担体に固定させる工程、（ d ）反応系から不純物を除去する工程、（ e ）反応系の温度を変化させることにより温度感受性担体を液相状態に変化させて、複合体のアンカー部位を温度感受性担体から放出させる工程、を含み、ここで、第１の物質は、温度感受性担体に固定されうるアンカー部位と、第２の物質と相互作用する相互作用部位とを有し、第１の物質と第２の物質とを相互作用させることにより、複合体にアンカー部位が導入され、温度感受性担体は、温度を変化させることにより、固相状態から液相状態に可逆的に変化し、固相状態でアンカー部位を固定し、液相状態でアンカー部位を固定しない、方法である。

【 0 0 3 2 】

上記（ a ）工程では、第１の物質と第２の物質を相互作用させて複合体を得ることとなる。この際に、第１の物質と相互作用しない他の物質は、複合体を形成することはない。次に（ b ）工程において、複合体と温度感受性担体が均一に溶解または分散することとなる。この場合、水等の溶媒を適宜用いて第１の物質と温度感受性担体を溶解または分散させてもよい。そして、（ c ）工程において、温度を変化させることにより温度感受性担体を固相状態に変化させ、このときに複合体のアンカー部位が温度感受性担体に固定されることとなる。さらに、（ d ）工程において、第１の物質と相互作用していない他の物質等の不純物を除去できることとなる。除去の方法としては、反応系を溶媒で洗浄し、濾過すること等を挙げることができる。この際、複合体は、アンカー部位が温度感受性担体に固定されているため、容易に不純物と複合体とを分離することが可能となる。そして、（ e ）工程において、温度感受性担体を液相状態とし、これにより複合体が温度感受性担体から放出されることとなる。この際に、化学反応等を行うことなしに複合体を放出することができることとなる。この放出された複合体を回収することにより、目的物を得ることができる。

【実施例 1】

【0033】

< アンカー付リガンド分子の合成 >

ビオチン (0.11 g)、N, N'-ジスクシイミジルカーボネート (0.12 g) およびトリエチルアミン (0.24 g) を DMF 15 ミリリットルに溶解し、室温にて 6 時間攪拌した。次に、この溶液に 8 - アミノ - 3, 6 - ジオキサオクタンアミンコレステリルカーバメート (0.26 g) を添加し、反応溶液を 16 時間攪拌した。溶媒を、ロータリーエバポレータにより減圧、留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離・精製し、リガンド付きアンカー分子である、{ 3 - [2 - (2 - { 2 - [5 - (2 - オキソ - ヘキサヒドロ - チエノ [3, 4 - d] イミダゾール - 4 - イル) - ペンタノイルアミノ] - エトキシ } - エトキシ) - エトキシ] - エチル } - カルバミックアシッド 13 - (1, 5 - ジメチル - ヘキシル) - 10 - メチル - 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 - テトラデカヒドロ - 1 H - シクロペンタ [a] フェナントレン - 3 - イルエステルを収率 60 % で得た。

10

【0034】

< 温度感受性ミセル担体の調製 >

水 2 ミリリットルに、ホスファチジルコリン 7.5 ミリグラム、リゾホスファチジルコリン 5.0 ミリグラム、アンカー付きプローブ分子である、{ 3 - [2 - (2 - { 2 - [5 - (2 - オキソ - ヘキサヒドロ - チエノ [3, 4 - d] イミダゾール - 4 - イル) - ペンタノイルアミノ] - エトキシ } - エトキシ) - エトキシ] - エチル } - カルバミックアシッド 13 - (1, 5 - ジメチル - ヘキシル) - 10 - メチル - 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 - テトラデカヒドロ - 1 H - シクロペンタ [a] フェナントレン - 3 - イルエステル 35.0 ミリグラム、ノルマルヘキサデカン 30 ミリグラムを溶解させ 30 の湯浴中にて二重円筒ミキサー (I K A (登録商標) - W E R K E) で 20000 rpm にて、3 分間攪拌した。その後氷浴で 10 分冷却した (図 5 参照) 。

20

【0035】

< 電気泳動による A v i d i n の検出 >

得られたミセル溶液 20 マイクロリットルに、6 ミリグラム / ミリリットルのアビジン (I m m u n o P u r e (登録商標) A v i d i n ; P I E R C E) 水溶液を 20 マイクロリットルを加え 1 分間ホモミキサー (I K A (登録商標) - W E R K E) で攪拌した。その後サンプルを常時冷やしながらか緩衝液 (トリス塩酸緩衝液 + E D T A) を加えて洗浄し、マイクロコン YM - 100 (M i c r o c o n (登録商標) 遠心式フィルター、M . W . 10 万 ; M I L L I P O R E) を利用して濃縮を 5 回繰り返した。反応液を 40 の湯浴中で攪拌しながら、1 時間加熱した。その後、遠心分離 (チピタン - II 卓上遠心機 ; M I L L I P O R E) によってミセルを取り除いて下相の水溶液をサンプリングし、以下の条件で電気泳動を行った。

30

電気泳動槽 : X V P A N T E R A S Y S T E M E R I C A

電気泳動用ゲル : X V P A N T E R A G E L

染色液 : B i o - S a f e TM C o o m a s s i e ; C o m m a s i e (登録商標) G 2 5 0 S t a i n (B I O - R A D TM)

40

バッファー : 0.0625 M T r i s H C l (p H 6.8)、5 % 2 - メルカプトエタノール、0.005 % B P B、20 % グリセロール、2 % S D S

【0036】

サンプル 4 マイクロリットルをサンプルバッファー 4 マイクロリットルで希釈した後、90 で 15 分間加熱して変性させた。電気泳動用ゲルをミリ Q 水で洗浄し、6 マイクロリットルずつサンプルをレーンに流し、17 分間電流 (200 V) を流した。終了後ゲルをミリ Q 水で 3 回洗浄し、染色液に一時間浸した。さらに、脱色のためミリ Q 水に一晩浸漬した。本操作によりリガンドアンカー分子と相互作用することによって、ミセル表面に捕捉されたアビジン分子を分離、検出した。

50

【実施例 2】

【0037】

<温度感受性均一溶液反応(相互作用)・固相表面捕捉システムの構築(1)>
シクロヘキサン1ミリリットル、DMF(ジメチルホルムアミド)9ミリリットルを25
で混合した溶液に、ODS(オクタデシル基を表面に結合したシリカゲル)2.0グラム
を分散させた。同温度でボルテックスミキサーを用いて攪拌することにより、二相に分
離により上層の主成分となっていたシクロヘキサンはODS表面に保持された。次にこの
溶液を0 に冷却すると、ODS表面のシクロヘキサンは凝固し、表面保持状態で固化し
た。次に、この分散液を50 に加温すると、シクロヘキサンは融解するとともに、DM
Fと均一に溶解した。この現象は、温度変化によって可逆的に繰り返すことが可能であ
った。

10

【0038】

<シクロヘキサン・DMF・ODS系を用いたペプチド結合形成>

DMFを用いて作成した上記温度感受性均一溶液反応(相互作用)・固相表面捕捉シ
ステムを50 に加温した後、2-アミノ-3-メチル-ブチリクアシッド3,4,5-
トリス-オクタデシロキシ-ベンジルエステル 0.1ミリモルを溶解した。ここにFm
oc-Gly-Obt 0.3ミリモル、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPCD)
0.5ミリモルを含むDMF溶液20ミリリットルを添加し90分間攪拌した。次に本
反応システムを攪拌しながら0 まで冷却した。冷却後、吸引ろ過法によりDMF溶液を
除去し、固形物(シクロヘキサン・ODS)を5 以下に冷却したDMF20ミリリットル
で3回洗浄した。次に、固形物(シクロヘキサン・ODS)を40 に加温、真空ポン
プを用いてシクロヘキサンを減圧留去した。最後にODSをアセトニトリルを用いて洗浄
した。アセトニトリル溶液から、2-[2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカル
ボニルアミノ)-アセチルアミノ]-3-メチル-ブチリクアシッド3,4,5-トリ
ス-オクタデシルオキシベンジルエステルを収率97%で得た。

20

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz) d: 7.77 (2H, d, $J=7.3\text{ Hz}$), 7.59 (2
H, d, $J=7.3\text{ Hz}$), 7.40 (2H, t, $J=7.3\text{ Hz}$), 7.31 (2H,
dt, $J=0.7, 7.3\text{ Hz}$), 6.52 (2H, s), 6.38 (1H, d, $J=8$
.4 Hz), 5.44-5.37 (1H, br), 5.10 (1H, d, $J=12.1\text{ Hz}$),
5.02 (1H, d, $J=12.1\text{ Hz}$), 4.62 (2H, dd, $J=8.4$,
4.8 Hz), 4.42 (2H, d, $J=7.0\text{ Hz}$), 4.24 (1H, t, $J=7$
.0 Hz), 3.96-3.92 (8H, m), 2.21-2.16 (1H, m), 1.8
1-1.76 (4H, m), 1.75-1.70 (2H, m), 1.48-1.43 (6
H, m), 1.37-1.21 (84H, br), 0.91 (3H, d, $J=7.0\text{ Hz}$),
0.88 (9H, t, $J=7.0\text{ Hz}$), 0.86 (3H, d, $J=7.0\text{ Hz}$);
 $^{13}\text{C-NMR}$ (150MHz) d: 171.5, 168.7, 156.5, 153.1, 1
43.6, 141.2, 138.3, 130.0, 127.7, 127.0, 125.0
, 120.0, 107.0, 73.4, 69.2, 67.5, 67.4, 57.1, 47
.1, 32.0, 31.4, 30.4, 29.8, 29.7, 29.5, 29.4, 26
.1, 22.8, 19.0, 17.7, 14.2; MALDI TOF-MS (pos) c
alcd for $\text{C}_{83}\text{H}_{138}\text{N}_2\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1314, found 131
4.

30

40

【実施例 3】

【0039】

<温度感受性均一溶液反応(相互作用)・固相表面捕捉システムの構築(2)>
シクロヘキサン1ミリリットル、NMP(N-メチル-2-ピロリドン) 7ミリリット
ルを20 で混合した溶液に、ODS(オクタデシル基を表面に結合したシリカゲル)
2.0グラムを分散させた。同温度でボルテックスミキサーを用いて攪拌することにより
、二相に分離により上層の主成分となっていたシクロヘキサンはODS表面に保持された
。次にこの溶液を-10 に冷却すると、ODS表面のシクロヘキサンは凝固し、表面保

50

持状態で固化した。次に、この分散液を20℃に加熱すると、シクロヘキサンは融解するとともに、NMPと均一に溶解した。この現象は、温度変化によって可逆的に繰り返すことが可能であった。

【0040】

<シクロヘキサン・NMP・ODS系を用いたペプチド結合形成>

NMPを用いて作成した上記温度感受性均一溶液反応（相互作用）・固相表面捕捉システムを20℃に加熱した後、2-アミノ-3-メチル-ブチリクアシッド3,4,5-トリス-オクタデシロキシベンジルエステル 0.1ミリモルを溶解した。ここにFmoc-Gly-OBt 0.3ミリモル、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPCD) 0.5ミリモルを含むNMP溶液10ミリリットルを添加し90分間攪拌した。次に本反応システムを攪拌しながら-10℃まで冷却した。冷却後、吸引ろ過法によりNMP溶液を除去し、固形物（シクロヘキサン・ODS）を5℃以下に冷却したNMP 20ミリリットルで3回洗浄した。次に、固形物（シクロヘキサン・ODS）を20℃に加熱、真空ポンプを用いてシクロヘキサンを減圧留去した。最後にODSをアセトニトリルを用いて洗浄した。アセトニトリル溶液から、2-[2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-アセチルアミノ]-3-メチル-ブチリクアシッド3,4,5-トリス-オクタデシロキシ-ベンジルエステルを収率99%で得た（図6参照）。

【実施例4】

【0041】

<シクロヘキサン・DMF・ODS系を用いたペプチド結合逐次連続形成反応>

DMFを用いて作成した上記温度感受性均一溶液反応（相互作用）・固相表面捕捉システムを50℃に加熱した後、2-アミノ-3-メチル-ブチリクアシッド3,4,5-トリス-オクタデシロキシ-ベンジルエステル 0.1ミリモルを溶解した。ここにFmoc-Gly-OBt 0.3ミリモル、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPCD) 0.5ミリモルを含むDMF溶液20ミリリットルを添加し90分間攪拌した。次に本反応システムを攪拌しながら0℃まで冷却した。冷却後、吸引ろ過法によりDMF溶液を除去し、固形物（シクロヘキサン・ODS）をDMF 20ミリリットルで3回洗浄した。次に、固形物（シクロヘキサン・ODS）を20℃に加熱した後、10%DBU/DMF溶液を10ミリリットル添加した。同温度にて2分間攪拌した後、攪拌しながら反応液を0℃に冷却する。冷却固化が完了した後、再びろ過、DMFによる洗浄をおこなった。DBU処理操作によりN末端アミノ基に結合したFmoc基ははずれ、アミノ基に変換された。同操作を繰り返すことにより、ペプチド結合を逐次形成することができた。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz) d: 7.74 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 6.53 (2H, s), 5.11 (1H, d, $J = 12.1$ Hz), 5.02 (1H, d, $J = 12.1$ Hz), 4.61 (1H, dd, $J = 9.2, 5.1$ Hz), 3.95 (4H, t, $J = 6.6$ Hz), 3.94 (2H, t, $J = 6.6$ Hz), 3.39 (2H, s), 2.24 - 2.18 (1H, m), 1.81 - 1.76 (4H, m), 1.75 - 1.71 (2H, m), 1.49 - 1.44 (6H, m), 1.37 - 1.20 (84H, br), 0.93 (3H, d, $J = 7.0$ Hz), 0.90 - 0.86 (12H, m); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz) d: 172.6, 171.8, 153.1, 130.3, 125.5, 106.9, 73.4, 69.2, 67.2, 56.6, 44.8, 32.0, 31.3, 30.4, 30.3, 29.8, 29.7, 29.5, 29.4, 26.2, 22.8, 19.1, 17.8, 14.2; MALDI TOF-MS (pos) calc'd for $\text{C}_{68}\text{H}_{128}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 1091, found 1091.

【実施例5】

【0042】

<シクロヘキサン・NMP・ODS系を用いたペプチド結合逐次連続形成反応>

NMPを用いて作成した該温度感受性均一溶液反応（相互作用）・固相表面捕捉システムを20℃に加熱した後、2-アミノ-3-メチル-ブチリクアシッド3,4,5-トリス-オクタデシロキシベンジルエステル 0.1ミリモルを溶解した。ここにFmoc

- G l y - O B t 0 . 3 ミリモル、ジイソプロピルカルボジイミド (D I P C D) 0 . 5 ミリモルを含む N M P 溶液 1 0 ミリリットルを添加し 9 0 分間攪拌した。次に本反応システムを攪拌しながら - 1 0 まで冷却した。冷却後、吸引ろ過法により D M F 溶液を除去し、固形物 (シクロヘキサン・ O D S) を 5 以下に冷却した N M P 2 0 ミリリットルで 3 回洗浄した。次に、固形物 (シクロヘキサン・ O D S) を 2 0 に加温した後、 1 0 % D B U / N M P 溶液を 1 0 ミリリットル添加した。同温度にて 2 分間攪拌した後、攪拌しながら反応液を - 1 0 に冷却する。冷却固化が完了した後、再びろ過、N M P による洗浄をおこなった。D B U 処理操作により N 末端アミノ基に結合した F m o c 基ははずれ、アミノ基に変換された。同操作を繰り返すことにより、ペプチド結合を逐次形成することができた。

10

【実施例 6】**【 0 0 4 3 】**

< シクロヘキサン・ D M F ・エイコサン (アルカン) を用いたペプチド結合逐次連続形成反応 >

2 - アミノ - 3 - メチル - ブチリッックアシッド 3 , 4 , 5 - トリス - オクタデシロキシベンジルエステル 0 . 1 ミリモル、エイコサン 1 0 0 ミリグラムを D M F 9 ミリリットル、シクロヘキサン 1 ミリリットル溶解した。ここに F m o c - G l y - O B t 0 . 3 ミリモル、ジイソプロピルカルボジイミド (D I P C D) 0 . 5 ミリモルを含む D M F 溶液 5 ミリリットルを添加し 9 0 分間 2 5 にて攪拌した。次に本反応システムを攪拌しながら - 1 0 まで冷却した。このとき、白色固形粒子が析出した。吸引ろ過法により D M F 溶液を除去し、固形物 (シクロヘキサン・エイコサン) を 0 以下に冷却した D M F 2 0 ミリリットルで 3 回洗浄した。次に、固形物 (シクロヘキサン・エイコサン) を 2 0 に加温した後、 1 0 % D B U / D M F 溶液を 1 0 ミリリットル添加した。同温度にて 2 分間攪拌した後、攪拌しながら反応液を - 1 0 に冷却した。冷却固化が完了した後、再びろ過、0 以下に冷却した D M F による洗浄をおこなった。D B U 処理操作により N 末端アミノ基に結合した F m o c 基ははずれ、アミノ基に変換された。同操作を繰り返すことにより、ペプチド結合を逐次形成することができた。

20

【実施例 7】**【 0 0 4 4 】**

< アミノ基を有する物質を均一溶液系から除去するスカベンジャーとしての応用方法 (O D S 粒子を利用する場合) (1) >

5 0 においてアニリン 0 . 0 5 ミリモルが溶解した D M F 溶液 1 0 ミリリットルに、3 , 4 , 5 - トリス - オクタデシロキシ ベンズアルデヒド 0 . 1 ミリモルおよびシクロヘキサン 3 ミリリットルを溶解した。1 6 時間攪拌し、O D S 2 . 0 グラムを添加後、攪拌しながら - 1 0 まで冷却した。冷却後、吸引ろ過法により D M F 溶液と固形物 (シクロヘキサン・ O D S) を分離した。固形部分は冷却時に 0 以下に冷却した D M F 1 0 ミリリットルを用いて洗浄した。本操作によりアニリンはアルデヒドと反応し、固形物中に 9 8 % の反応収率で捕捉された。

30

【実施例 8】**【 0 0 4 5 】**

< アミノ基を有する物質を均一溶液系から除去するスカベンジャーとしての応用方法 (O D S 粒子を利用しない場合) (2) >

5 0 においてアニリン 0 . 0 5 ミリモルが溶解した N M P 溶液 1 0 ミリリットルに、3 , 4 , 5 - トリス - オクタデシロキシ ベンズアルデヒド 0 . 1 ミリモルおよびシクロヘキサン 3 ミリリットルを溶解した。1 6 時間攪拌し、攪拌しながら - 1 0 まで冷却した。冷却後、吸引ろ過法により N M P 溶液と固形物 (シクロヘキサン) を分離した。固形部分は冷却時に N M P 1 0 ミリリットルを用いて洗浄した。本操作によりアニリンはアルデヒドと反応し、固形物中に 9 6 % の反応収率で捕捉された。

40

【実施例 9】**【 0 0 4 6 】**

50

< アミノ基を有する物質を均一溶液系から除去するスカベンジャーとしての応用方法 (O D S 粒子を利用しない場合) (3) >

50 においてアニリン 0.05 ミリモルが溶解した D M F 溶液 10 ミリリットルに、3, 4, 5 - トリス - オクタデシロキシ ベンズアルデヒド 0.1 ミリモル、シクロヘキサン 3 ミリリットル、エイコサン 500 ミリグラムを溶解した。16 時間攪拌し、攪拌しながら 0 まで冷却した。冷却後、吸引ろ過法により D M F 溶液と固形物 (シクロヘキサンおよびエイコサンの混合物) を分離した。固形部分は冷却時に D M F 10 ミリリットルを用いて洗浄した。本操作によりアニリンはアルデヒドと反応し、固形物中に 98 % の反応収率で捕捉された。

10

【 0047 】

(参考例)

< 温度感受性固相担体の調製 >

水 2 ミリリットルに、アンカー付プローブ分子である、{ 3 - [2 - (2 - { 2 - [5 - (2 - オキソ - ヘキサヒドロ - チエノ [3, 4 - d] イミダゾール - 4 - イル) - ペンタノイルアミノ] - エトキシ } - エトキシ) - エトキシ] - エチル } - カルバミックアシッド 13 - (1, 5 - ジメチル - ヘキシル) - 10 - メチル - 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 - テトラデカヒドロ - 1 H - シクロペンタ [a] フェナントレン - 3 - イルエステル 35.0 ミリグラム、ノルマルヘキサデカン 300 ミリグラムを溶解させ、30 の湯浴中にて二重円筒ミキサー (I K A (登録商標) - W E R K E) で 20000 r p m にて、3 分間攪拌した。そのまま攪拌をしながら、容器を 0 まで急冷した。これにより、アンカー付プローブ分子のプローブ部分を水相に配向した形で、温度感受性担体を水中に分散、固定化した。

20

【図面の簡単な説明】

【 0048 】

【図 1】図 1 は、温度感受性担体の温度による固相状態、液相状態の変化を示す図である。

【図 2】図 2 は、固相担体表面に吸着させた温度感受性担体を示す図である。

【図 3】図 3 は、ミセルまたはエマルジョンの状態の温度感受性担体を示す図である。

【図 4】図 4 は、相互作用によりえられた複合体の分離方法を示す図である。

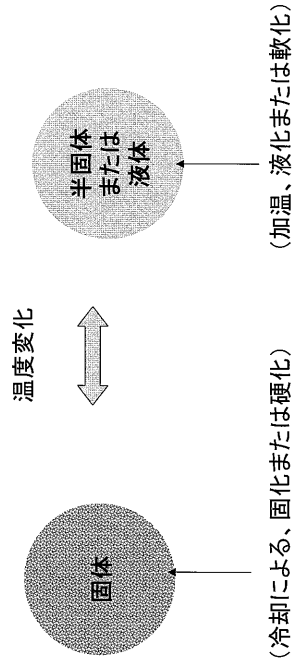
30

【図 5】図 5 は、温度感受性ミセル担体を示す図である。

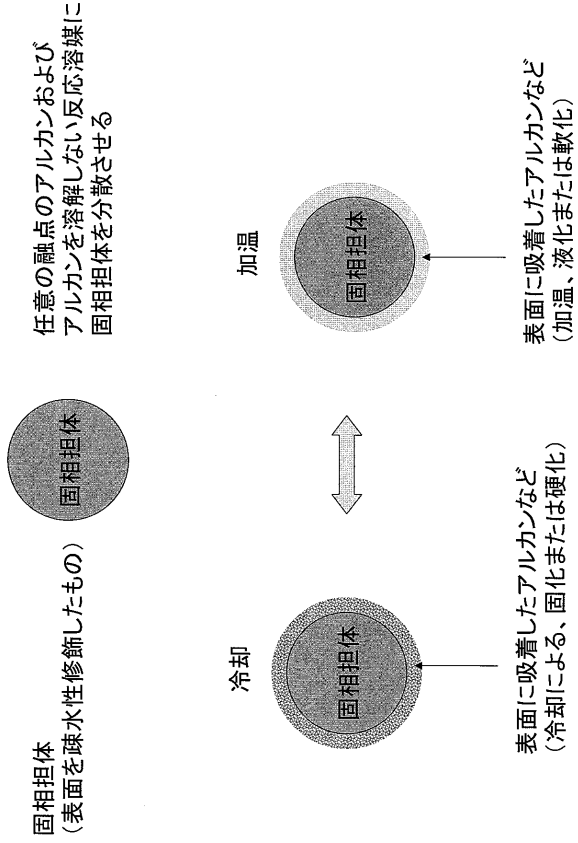
【図 6】図 6 は、ペプチド合成を示す図である。

【図 7】図 7 は、ペプチド合成を示す図である。

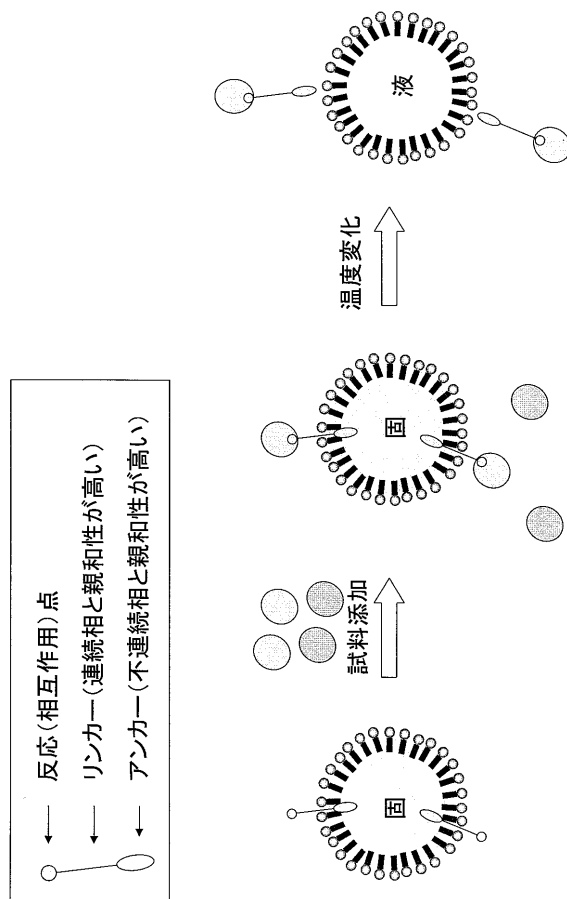
【図 1】



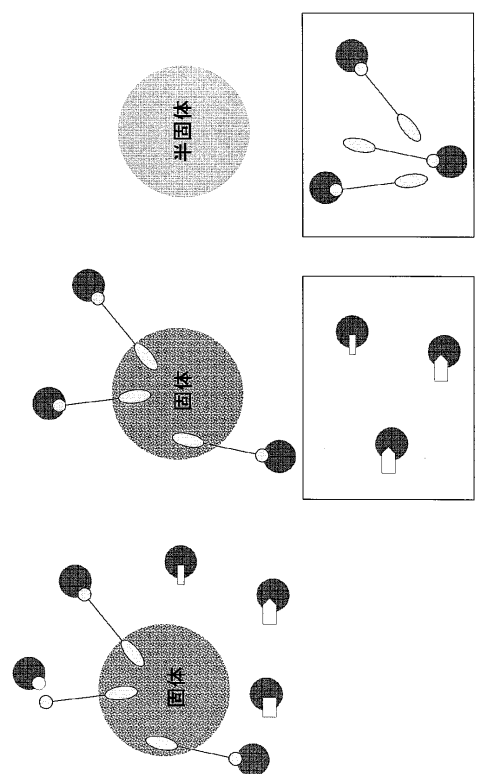
【図 2】



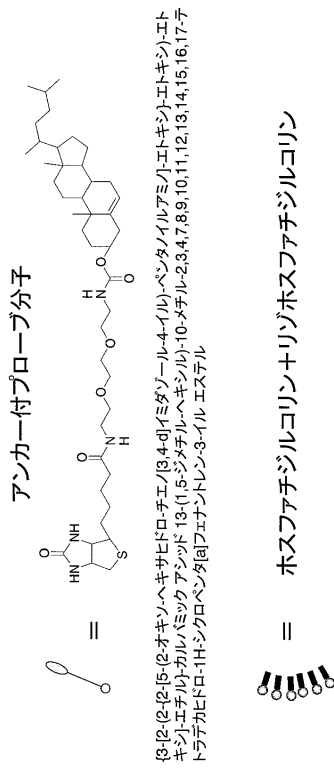
【図 3】



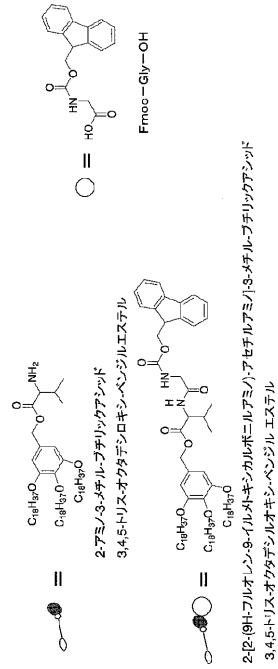
【図 4】



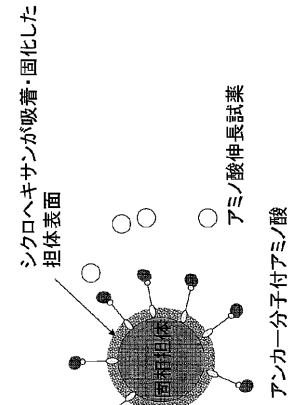
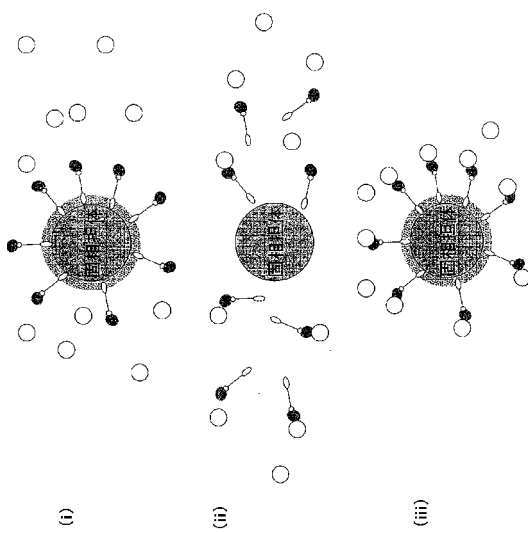
【図 5】



【図 6】



【図 7】



フロントページの続き

審査官 宮澤 浩

(56)参考文献 特開 2 0 0 1 - 9 6 1 0 4 (J P , A)
特開 2 0 0 2 - 2 4 9 5 2 3 (J P , A)
特開 2 0 0 2 - 2 7 3 2 1 7 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G 0 1 N	3 0 / 0 0
B 0 1 J	2 0 / 2 8 1
G 0 1 N	3 0 / 5 4
G 0 1 N	3 0 / 8 8
G 0 1 N	1 / 1 0