(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3995260号
(P3995260)
(45)発行日　平成19年10月24日(2007.10.24)　(24)登録日　平成19年8月10日(2007.8.10)

(51)Int.Cl.　F I
C07K 1/18 (2006.01)　C07K 1/18
C07C 217/08 (2006.01)　C07C 217/08

請求項の数 5　(全 26 頁)

(21)出願番号　特願平7-521912
(86)(22)出願日　平成7年2月16日(1995.2.16)
(65)公表番号　特表平9-509178
(43)公表日　平成9年9月16日(1997.9.16)
(86)国際出願番号　PCT/US1995/001966
(87)国際公開番号　WO1995/022555
(87)国際公開日　平成7年8月24日(1995.8.24)
審査請求日　平成14年1月30日(2002.1.30)
(31)優先権主張番号　08/197,146
(32)優先日　平成6年2月16日(1994.2.16)
(33)優先権主張国　米国(US)

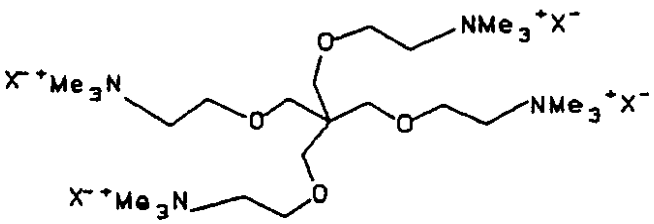
(73)特許権者　507124922
クラマー，スティーブン　エム
アメリカ合衆国、１２３０９　ニューヨーク、　スケネクタディ、トロッティンガム　ドライブ　７８３番地
(73)特許権者　507124933
ムーア，ジェームス　エイ
アメリカ合衆国、１２１８０　ニューヨーク、トロイ、アール．ディー．シャープ４、オードリ　レーン　３番地
(74)代理人　100059306
弁理士　三宅　正夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】低分子量ディスプレイサーを用いるタンパク質の置換クロマトグラフィー

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
適当な負荷溶媒に溶かしたタンパク質をイオン交換性固定相に負荷させ、分子量１６２０未満で且つ下記の化合物群から選ばれるディスプレイサーを用いる置換クロマトグラフィーによって前記のタンパク質を前記の固定相から押し出すことを包含するタンパク質の精製方法：
ポリ（第４級アンモニウム）塩、アミノ酸エステル、アミノ酸アミド、Ｎ－アシルアミノ酸、樹枝状高分子電解質および陽イオン性抗生物質からなる群。
【請求項２】
前記の固定相が陽イオン交換樹脂であり、前記のディスプレイサーが、ポリ（第４級アンモニウム）塩、樹枝状高分子電解質および陽イオン性抗生物質からなる群より選ばれる陽イオン系化合物である請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記のディスプレイサーが次式の化合物：

【化１】



（ただし、X^-は、ハロゲン、サルフェート、スルホネート、パークロレート、アセテート、ホスフェート及びナイトレートからなる群から選ばれた対向陰イオンである）である請求項２に記載の方法。

【請求項４】

前記のディスプレイサーが、リジンの炭素数６以下の低級アルキル・エステル及びアミド、アルギニンの炭素数６以下の低級アルキル・エステル及びアミド、N^{α}－アシル化リジンの炭素数６以下の低級アルキル・エステル及びアミド、及びN^{α}－アシル化アルギニンの炭素数６以下の低級アルキル・エステル及びアミドからなる群から選ばれる請求項１に記載の方法。

【請求項５】

前記のディスプレイサーを溶媒系に溶解すること及び前記のディスプレイサーを下記の電解質から選択することであって、その電解質の固有電荷（ν）及び平衡定数（Ｋ）は、縦座標（logＫ）、横座標（ν）の座標系を作成したときに、縦座標軸上のＡ点に始まりディスプレイサーのＫ及びνによって定まる点を通る線が、同じＡ点に始まり精製されるべきタンパク質のＫ及びνによって定まる点を通る対応線よりも大きい勾配を有し、かつ前記のＡ点は、その値が、このディスプレイサーを溶解する前記の溶媒系におけるディスプレイサー操作線の勾配（Δ）に相当するものである請求項１に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

連邦政府支援研究における権利に関する説明

本発明は、全米科学財団（National Science Foundation）補助金第BCS-9112481号による支援のもとに行われたものである。合衆国政府は、本発明において何らかの権利を有することもあり得る。

発明の技術分野

本発明は、低分子量のディスプレイサー〔置換剤、押し出し剤〕（displacer）を用いるタンパク質の置換クロマトグラフィー（displacement chromatography）に関するものであり、また、タンパク質のクロマトグラフィーに有用な新規な樹枝状ポリマー（dendritic polymer）基盤高分子電解質に関するものである。

発明の背景技術

置換方式のクロマトグラフィーは、Tswettによって1906年に初めて認識されたものである。Tswettは、過負荷状態の溶離クロマトグラフィー（elution chromatography）のもとで試料の置換が起きることに気づいたのである。1943年にTiseliusは、前端クロマトグラフィー（frontal chromatography）、溶離クロマトグラフィー及び置換クロマトグラフィーという分類を発展させた。その時以来、多くの開発や応用、特に分析用クロマトグラフィーにおけるそれらは、溶離クロマトグラフィーの分野で行われ、事実、特に断りのないクロマトグラフィーという言葉は溶離クロマトグラフィーのことをいうのが普通となっている。しかし、過去50年の文献の中では溶離クロマトグラフィーの理論と実務が支配的分量を占めるものの、置換クロマトグラフィーの理論と実務は、クロマトグラフィー学において小さいながら一つの領域を占めている。

二つのタイプのクロマトグラフィー、すなわち溶離型と置換型とは、理論及び実務の両面で容易に区別されるものである。溶離クロマトグラフィーでは、精製すべき試料〔本発明の場合はタンパク質〕の溶液を固定相、一般にはカラムに添加する。移動相は、試料が非可逆的に吸着されたり、全面的に吸着されなかったりすることなく、むしろ可逆的に結合

するように選ばれる。移動相が固定相に流れ込むと、この移動相と固定相との間に平衡関係が確立され、それによって、その固定相への親和性に応じて、試料は、原試料で起きるかもしれない他の成分に関する親和性を反映した速度でカラムに沿って通過する。差動的移行（differential migration）の過程を第１図に模式的に示し、典型的なクロマトグラムを第２図に示す。標準的な溶離クロマトグラフィーにおいて特に注意すべきことは、溶離用溶媒の前端、すなわち定組成溶離（isocratic elution）におけるゼロカラム容積（zero column volume）は、つねにカラムを離れる試料に先行するという事実である。

定組成溶離クロマトグラフィーの改変と拡張は階段的傾斜（step gradient）クロマトグラフィーに見いだされる。この場合は、組成の異なる一連の溶離液（eluent）を固定相に通過させる。イオン交換クロマトグラフィーでは、移動相塩濃度及び／又はpHの階段的変更を用いてタンパク質の溶離又は脱着を行う。

置換クロマトグラフィーは基本的には脱着（desorption）クロマトグラフィー〔例えばアフィニティー・クロマトグラフィー、階段的傾斜クロマトグラフィー〕とは異なる。仕込成分のいずれよりも高い親和性を有するディスプレイサーが、固定相の吸着部位と効果的に競合する。置換と脱着との間の重要な区別は、ディスプレイサー前端がつねに置換列（displacement train）中の隣接仕込帯域よりも背後にとどまり、一方、脱着物〔例えば塩、有機変性剤（modifier）〕が仕込帯域を通って移動することである。このような区別の持つ意味は、置換クロマトグラフィーは潜在的に、低い分別因子（separation factor）を有する混合物から成分を濃縮し、精製することができるという点で、きわめて特徴的であり、一方、脱着クロマトグラフィーの場合は、満足すべき分割を与えるには比較的大きな分別因子が一般に必要である。

置換クロマトグラフィーでは、溶離液〔すなわちディスプレイサー〕は、分別されるべき混合物中の各成分のいずれよりも、固定相に対して高い親和性を有する。これは溶離クロマトグラフィーとは対照的であり、後者の場合は溶離液が比較的低い親和性を有するのが普通である。置換クロマトグラフィーを溶離又は脱着クロマトグラフィーと区別させる主要な操作上の特徴は、ディスプレイサー分子の使用である。置換クロマトグラフィーでは、分別されるべき成分が全て固定相に対して比較的高い親和性を有するような条件のもとで、カラムをまずキャリヤー溶媒で平衡化させる。大量の希釈仕込混合物をカラムに負荷させることができ、個々の成分は固定相に吸着されるだろう。すなわち、これらは仕込溶液から固定相上に分配されて、そこにとどまる。全ての成分を置換によって分別したいときは、キャリヤー溶媒は試料を含まずにカラムから出てくる。いまや試料は固定相に位置し、カラム上の各成分の位置は、固定相に対する相対的親和性に相関する。概念的にいえば、固定相に対して最高の親和性を有する成分の各分子が、固定相上のある部位で比較的低い親和性を有する成分の分子を置換していき、それによって、個々の成分は、最終的にはカラム上で最高親和性から最低親和性までの順序に配置されることになる、と考えることができる。

ある場合には、一部の成分をキャリヤー溶媒とともにカラムを通過させることが有利となる。この場合は、カラムに残る仕込成分だけが置換クロマトグラフィーによって分割されることになる。

カラムに試料を負荷させた後、ディスプレイサー溶液を導入する。このディスプレイサー溶液は、ディスプレイサーを適当な溶媒に溶解したものである。このディスプレイサーは、固定相に対するその親和性が各仕込成分のいずれの親和性よりも高くなるように選択する。ディスプレイサー及び移動相が適切に選ばれていると仮定して、生成物成分は、吸着親和性が次第に増加する順序で、高濃縮度の純物質の隣合う矩形波帯域としてカラムから出て行く。これを第３図に模式的に示す。精製成分の帯域がいくつか続いて後、ディスプレイサーがカラムから出る。ある置換クロマトグラフィーによる代表的なクロマトグラムを第４図に示す。これは、ディスプレイサーが試料より後から出ること、ならびに、仕込成分が、高濃縮度の純物質の隣接「矩形波」帯域としてコラムから排出されること、などの事実によって、第２図に示した溶離クロマトグラフィーのクロマトグラムとは容易に区別できる。最後に、ディスプレイサーの漏出（breakthrough）の後に、ディスプレイサー

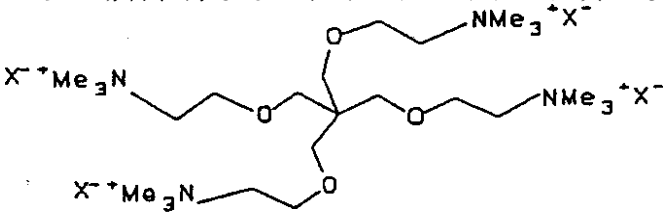
の固定相からの脱着によってカラムを再生して、次の運転サイクルに使えるようにする。
置換クロマトグラフィーは、タンパク質のような生物学的巨大分子の製造規模のクロマトグラフィーとして、いくつか特に有利な特質を有する。第１に、そして最も有意義なものとして、置換クロマトグラフィーは一つの工程で製品分別と濃縮を達成することができる。対照的に、定組成溶離クロマトグラフィーでは、分別中に製品の希釈が行われる。第２に、この置換工程は、平衡等温線（equilibrium isotherm）の非線形域（nonlinear region）において操作されるので、高カラム負荷が可能である。これによって溶離クロマトグラフィーよりもはるかにすぐれたカラム活用が可能となる。第３に、カラムの展開自体には同等な溶離工程の場合よりも溶媒が少なくてすむ。第４に、置換クロマトグラフィーでは、低い分別因子の混合物から各成分を濃縮し、精製することができるが、脱着クロマトグラフィーでは満足すべき分別を達成するには比較的大きな分別因子が必要である。
これら全ての利点から見て、置換クロマトグラフィーは広範囲に利用されるだろうものと考えられる。しかしながら、置換クロマトグラフィーは、これまで知られているように、タンパク質の精製には、溶離クロマトグラフィーに比していくつかの欠点を有している。「タンパク質」なる言葉は、本技術分野で一般に理解されているところでは、また、本明細書において用いるところでは、分子量10KDa又はそれ以上のポリペプチドをいう。この約定によれば、10KDa未満の分子量のポリペプチドは一般にオリゴペプチドと呼ばれる。
主要な問題点の二つは、(1)カラムの再生と、(2)精製区分の一部にディスプレイサーが存在することとである。
この置換工程にはディスプレイサーとして高親和性の化合物が用いられるので、溶離クロマトグラフィーに比べて再生時間及び再平衡化時間が長くなる。さらに、再生工程で比較的大量の溶媒がしばしば必要となり、溶離クロマトグラフィーに比べた場合の利点は溶媒消費量という点で事実上削減される。
第２の問題点として、ディスプレイサーの混在という問題が生じる。それは、タンパク質分別に用いるディスプレイサーに共通な特質が、分子量の比較的高いことにあったからである。これまでは、〔以下にも説明するように、〕置換されるべきタンパク質よりも高い結合係数（binding coefficient）を確保するために、大きな高分子電解質を用いる必要がある、という考えから、タンパク質の置換には高分子量の高分子電解質を使用するようこの技術分野で教えられていた。高分子量のディスプレイサーは、前記のような二つの短所を示す。すなわち、このものは固定相に強固に結合し、そのために、カラムの再生には思い切った条件が必要となる。また、生成物区分に混在するかも知れない痕跡量のディスプレイサーは除去が困難である。
従って、カラムの大規模な再生を要せず、またタンパク質製品から容易に除去できるような種類のディスプレイサーを得ることは有利であろう。本技術分野において出願人の知る例が一つある。それは、コンアルブミンをオボアルブミンから分別するために、ポリエチレンイミン被覆弱陰イオン交換樹脂の上で２キロダルトンのポリ（ビニルスルホン酸）を用いる試みである。この実験は、この二種のタンパク質が分別されたという点では成功していたように思える〔Jen and Pinto,Journal of Chromatography 519,87-98(1990)参照〕。しかし、その後の報告〔Jen and Pinto,Journal of Chromatographic Science 29,478-484(1991)参照〕でも論じられているように、この分別は溶離クロマトグラフィーと置換クロマトグラフィーとの混合機構によって効果を上げていたようで、後者の報告では、著者は、このポリ（ビニル・サルフェート）ディスプレイサーを放棄し、高分子量デキストラン・サルフェートを採用している。Jen及びPintoは、この第２の報告の中で、分子量の小さいポリビニル・サルフェートに比して分子量の大きいデキストラン・サルフェートの優秀性を実証している。
Jen及びPintoは、その後の論文〔Reactive Polymers 19,145-161(1993)の147頁〕で、イオン交換性固定相上のタンパク質の置換クロマトグラフィーに用いられる全てのディスプレイサーの一覧表を掲げている。彼らは、その成果についての論評の中で、前回同様、2KDaポリビニル・サルフェートが部分的に第２のタンパク質に置き換わり、第１のものを溶離させるものと結論している。

意外なことに、非常に低分子量の荷電体（charged species）からなるいくつかの種類が、置換クロマトグラフィーにおけるタンパク質のディスプレイサーとして非常に効果的に機能することが、ここに見いだされたのである。

発明の概要

一面では、本発明は、タンパク質〔一つ又は複数〕を精製する方法に関するもので、適当な移動相中のタンパク質をイオン交換性固定相に負荷させ、分子量2000未満のディスプレイサーを用いる置換クロマトグラフィーによって固定相からタンパク質を押し出す（displace）という工程を包含するものである。

ある実施態様では、この固定相は陽イオン交換樹脂であり、ディスプレイサーが陽イオン系化合物である。種々の好ましい実施態様において、このディスプレイサーは、ポリ（第４級アンモニウム）塩であり、あるいは、このディスプレイサーは、アミノ酸エステル、アミノ酸アミド又はＮ－アシルアミノ酸、好ましくは、リジン、アルギニン、N^{α}－アシル化リジン又はN^{α}－アシル化アルギニンの低級アルキル・エステル又は低級アルキル・アミドである。低級アルキルとは、直鎖状、分岐状又は環状の、炭素数６個以下の飽和炭化水素残基をいう。このディスプレイサーはまた、陽イオン系の抗生物質、あるいは樹枝状ポリマー（dendritic polymer）であってもよい。ディスプレイサーが樹枝状ポリマーである場合、好ましいディスプレイサーは次のものである。

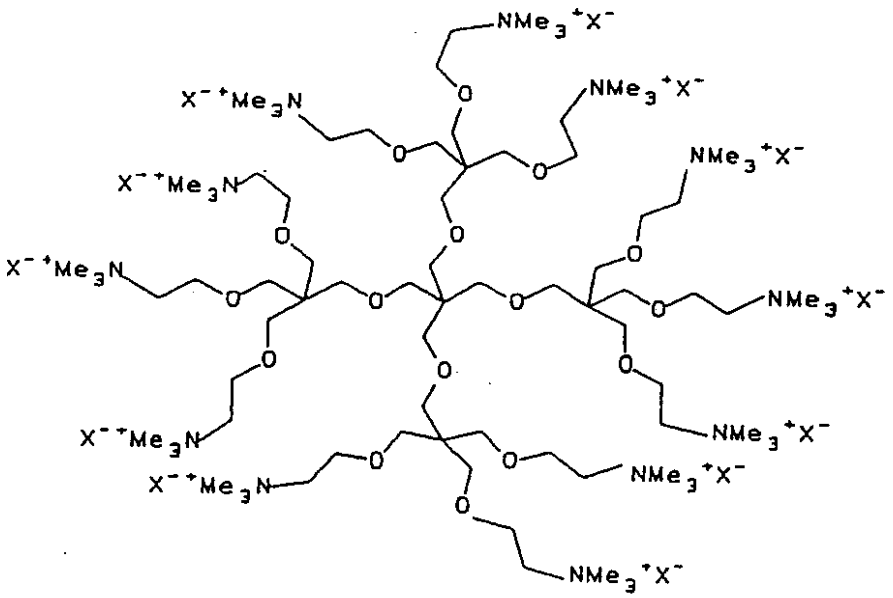


12

ここに、X^-は対向陰イオン、例えば、ハロゲン、サルフェート、スルホネート、パークロレート、アセテート、ホスフェート又はナイトレートである。

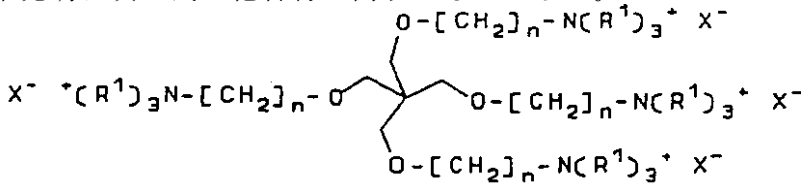
一般にこのディスプレイサーは次のような電解質から選ぶのが有利である。すなわち、その固有電荷（characteristic charge）（ν）及び平衡定数（equilibrium constant）（Ｋ）が、縦座標にlogＫを、横座標にνを置いた座標系を作成したときに、縦座標軸上のＡ点から、ディスプレイサーのＫ及びνによって定まる点を通って構成される線が、同じＡ点から、精製されるべきタンパク質のＫ及びνによって定まる点を通って構成される対応線よりも大きな勾配を有するようなものである。Ａ点は、その値において、興味ある系におけるディスプレイサー操作線の勾配（Δ）に相当する。これについては以下にさらに詳しく説明する。分子量が900より低いディスプレイサーが特に有利である。

別の面として、本発明は、適当な負荷溶媒に溶かしたタンパク質を、イオン交換性固定相に負荷させ、樹枝状高分子電解質ディスプレイサーを用いる置換クロマトグラフィーによって固定相からこのタンパク質を押し出すことを包含する、タンパク質の精製方法に関するものである。この固定相は、陽イオン交換樹脂であることを得る。その場合には、高分子電解質はポリカチオンとなるであろう。好ましくは、この高分子電解質はポリ（第４級アンモニウム）塩である。もう一つの好ましい樹枝状ポリマーは次のものである。

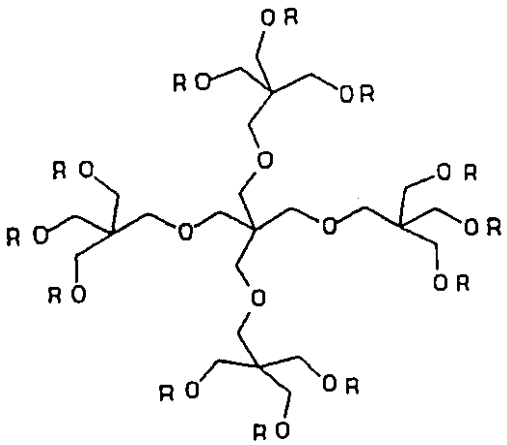


14

別の面では、本発明は次の式の化合物に関するものである。



及び



ここに、Ｒは-$(CH_2)_n$-$N(R^1)_3^+X^-$であり、R^1は低級アルキル基であり、ｎは２ないし６であり、Ｘは前述の通りである。これらの化合物は置換クロマトグラフィーにおけるディスプレイサーとして有用である。

【図面の簡単な説明】

第１図は、標準定組成線形溶離クロマトグラフィー（linear elution chromatography）を模式的に示したものである。

第２図は、溶離クロマトグラフィーからの典型的なクロマトグラムである。

第３図は、置換クロマトグラフィーを模式的に示したものである。

第４図は、置換クロマトグラフィーからの典型的なクロマトグラムである。

第５図は、二つのタンパク質及び本発明の二つのディスプレイサーについて平衡定数（Ｋ

）を固有電荷（ν）に対してプロットしたものである。
第６図、第７図及び第８図は、本発明のディスプレイサーを用いたタンパク質のクロマトグラムである。

好ましい実施態様を含む本発明の詳細な説明

タンパク質のクロマトグラフィーにおけるディスプレイサーとして、低分子化合物が効果的に使用できるという意外な発見をよりよく理解するには、置換クロマトグラフィーの改良数学モデルを少し考えてみることである。この仮説的論理構成は、この現象の理論的説明には有益であるが、これは本発明の十分な広さを限定することを意図するものではない。

本発明者の一人が開発したステリック・マス・アクション（ＳＭＡ）イオン交換モデルは、他のモデルとは異なり、多成分タンパク質平衡における立体効果を明確に説明し、イオン交換型置換系における複雑な行動を予言することができる。タンパク質や高分子電解質のような巨大分子の溶質は、イオン交換表面上で多点付着の形をとるものと考えられ、吸収性表面と一個の巨大分子との間の相互作用数を、溶質分子の固有電荷と定義する。ある溶質の固有電荷は、吸着の際にイオン交換表面から溶質によって押し出される塩の対向イオンの数に数値的に等しい。しかし、高分子電解質が現実に相互に作用する部位の他に、イオン交換表面に結合する大きな溶質巨大分子もまた、結合溶質分子の下及び隣接個所への、同じ大きさの巨大分子の吸着を立体的に阻害する。表面において立体的に阻害される塩の対向イオンの数〔吸着溶質分子当たり〕、すなわち流体相中の他の溶質分子との交換に利用されないものの数は、その吸着巨大分子の立体因子（steric factor）として定義される。マス・アクション・イオン交換平衡関係のこれまでの議論では、ある巨大分子の吸着表面への結合性は、その固有電荷に等しい吸着性部位の数にのみ影響すると考えられていた。事実、固定相の部位の立体的遮蔽（steric shielding）が、イオン交換系における巨大分子の非線形吸着行動において重要な役割を果たしている。
溶質分子〔タンパク質又は高分子電解質〕と、交換可能な塩の対向イオンとの化学量論的交換は次式で示すことができる。

$$C_i + \nu_i \overline{Q_s} \rightleftharpoons Q_i + \nu_i C_s \qquad (1)$$

ここに、Ｃ及びＱは、移動相及び固定相の濃度であり、ν_iは溶質の固有電荷であり、下付き文字ｉ及びｓはそれぞれ、溶質分子及び塩対向イオンをいう。頂部横線は、溶液中の溶質巨大分子と交換可能な結合塩対向イオンを表す。イオン交換表面に吸着される溶質の平衡定数K_iは次式で与えられる。

$$K_i = \left(\frac{Q_i}{C_i}\right)\left(\frac{C_s}{\overline{Q_s}}\right)^{\nu_i} \qquad (2)$$

平衡定数は、その分子の親和性の尺度である。固定相における電気的中性の条件は次の関係式で与えられる。

$$\Lambda \equiv \overline{Q_s} + (\nu_i + \sigma_i) Q_i \qquad (3)$$

ここに、σ_iは、ディスプレイサー又はタンパク質の立体因子である。
等式３を等式２に代入して整理すれば、一つのタンパク質又はディスプレイサーについての次の平衡関係式が得られる。

$$C_i = \left(\frac{Q_i}{K_i}\right)\left(\frac{C_s}{\Lambda - (\nu_i + \sigma) Q_i}\right)^{\nu_i} \qquad (4)$$

かくて、移動相の対向イオン濃度C_S、カラムのイオン床容積Λ、及び各成分のモデル・パラメーターの値を知れば、陰関数式（implicit equation)(4)から単一成分等温線を容易に生じることができる。各成分に必要なモデル・パラメーターは、固有電荷ν_i、立体因子σ_i及び平衡定数K_iである。置換行動の予測にこのモデルを利用するためには、タンパク質及びディスプレイサーのモデル・パラメーターを決める必要がある。

イオン床容積Λは、前端クロマトグラフィー技法を用いてその場で測定することができる。〔Gadam et al., J. Chromatog. 630, 37-52(1993)を参照。〕
移動相中で低ないし中程度の塩濃度で顕著な塩感受性保持行動を示すタンパク質分子については、線形溶離クロマトグラフィーを使用して、イオン交換系ですでに確立されている関係を用いて、三つのＳＭＡモデル・パラメーターの内の二つ〔すなわち、固有電荷と平衡定数〕を決定することができる〔Kopaciewicz et al., J. Chromatog. 266, 3(1983)を参照〕。線形溶離試験は、次式：

$$\log k' = \log(\beta K_i \Lambda^{\nu_i}) - \nu_i \log C_s \qquad (5)$$

によって固有電荷（ν_i）及び平衡定数（K_i）を決定するために、種々の移動相塩濃度で実施される。なお、前記の式において、log k'v log C_s plotに対して、slope＝$-\nu_i$；intercept＝log（$\beta K_i \Lambda^{\nu_i}$）である。
タンパク質の固有電荷及び平衡定数が決定されれば、タンパク質について残るＳＭＡパラメーター、すなわち、立体因子σ_iは、次式：

$$\sigma_i = \frac{\beta}{C_{f_i}\Pi}\left(\Lambda - C_s\left(\frac{\Pi}{\beta K_i}\right)^{1/\nu_i}\right) - \nu_i \qquad (6)$$

ただし、

$$\Pi = \left(\frac{\nu_b}{\nu_o} - 1\right) \qquad (7)$$

によって単一非線形前端クロマトグラフィー試験から個別に決定される。多くのタンパク質は、その固有電荷に比してきわめて高い立体因子を示すが、これは、タンパク質分子における立体配座の束縛（conformational constraint）からみて驚くにはあたらない。あるタンパク質についてＳＭＡパラメーターが得られたなら、このモデルを用いて、任意の塩濃度における吸着等温線（adsorption isotherm）を作成することができる。
線形溶離データからの固有電荷及び平衡定数の決定は、緩やかに保持されたタンパク質についてはうまく行われるが、親和性の高いディスプレイサーをこのやり方で特徴づけることはきわめて困難である。これに対して、このような高親和性化合物のパラメーター評価には、前端クロマトグラフィーがよく適している。ディスプレイサーの固有電荷ν_Dは、次式：

$$\nu_D = \frac{n_1}{n_D} = \frac{\Delta C_s}{C_D} \qquad (8)$$

を用いて、誘導塩傾斜（induced salt gradient）から決定することができる。ここに、n_1は押し出されたイオンの全量、n_Dは固定相に吸着されたディスプレイサーのモル数、C_Dは高分子電解質ディスプレイサーの移動相濃度、ΔC_Sはディスプレイサー吸着時の移動相対向イオン濃度における階段的増加（step increase）である。
移動相塩濃度が十分低い場合は、ディスプレイサーは固体相材料を完全に飽和する。このような条件における前端試験（frontal experiment）を用いて、次の式：

$$\sigma_D = \frac{\Lambda}{Q_D^{max}} - n_D \qquad (9)$$

から立体因子σ_Dを決定することができる。ここに、Λはイオン床容積であり、Q_D^{max}は、高分子電解質ディスプレイサーの最大固定相容積である。あるいはその代わりに、例えば、次式：

$$\sigma_D = \frac{n_2}{n_D} \qquad (10)$$

によって与えられるように、アンモニウム前端によって押し出される立体的に障害を受けたナトリウム・イオンn_2の測定（床容積測定に類似）によって、立体因子を決定することもできよう。

イオン交換工程のための平衡定数は、式２によって定義される。前記のようにして固有電荷及び立体因子を個別に測定したなら、前端試験を用いて平衡定数K_Dが決定される。この試験は、溶質が床を完全に飽和させないような高移動相塩条件のもとで行う。平衡定数は、次式：

$$K_D = \frac{1}{\beta}\left(\frac{\nu_b}{\nu_o} - 1\right)\left(\frac{C_S}{\Lambda - (\nu_D + \sigma_D)\frac{C_D}{\beta}\left(\frac{\nu_b}{\nu_o} - 1\right)}\right)^{\nu_D} \quad (11)$$

によって、個別に決定した固有電荷（ν_D）及び立体因子（σ_D）の値を用いて漏出容積（breakthrough volume）から直接に計算する。前記の式で、βはカラム相比、C_Sはキャリヤー中の初期塩濃度である。固有電荷、立体因子及び平衡定数が決定されたなら、前述のＳＭＡ形式論（SMA formalism）を用いて、タンパク質及び高分子電解質の等温線をシュミレートすることができる。

多糖類誘導体ディスプレイサーを用いて観察された結果に基づく従来の知識によれば、タンパク質置換クロマトグラフィーには、比較的高い固有電荷と、高い立体因子／固有電荷比を持った高分子量化合物が必要である。これまでのところ、ディスプレイサー相互間の効力の選定や決定のために明確に定義された基準は存在しない。ディスプレイサー操作線の勾配が知られたなら、前述の数学モデルを用いて、各成分の固有電荷及び平衡定数の関数として、仕込成分の溶離順序（elution order）を予測することが可能である。

有効な置換クロマトグラフィーの数学的基準を、$\log K_i$対ν_iのプロットとして再構成できる〔第５図参照〕。アイソタチック置換列（isotachic displacement train）における溶離順序はディスプレイサー操作線の勾配Δ：

$$\Delta = \frac{Q_d}{C_d} = K_{1_d}\left[\frac{\Lambda - (\nu_d + \sigma_d)Q_d}{(C_1)_d}\right] \quad (12)$$

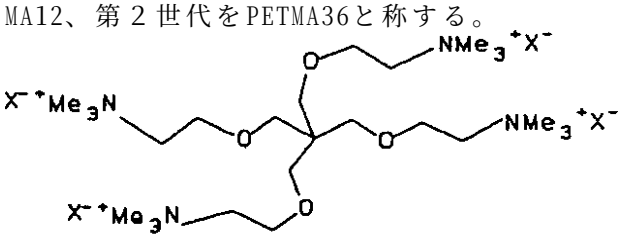
に相当する縦座標軸上の点から、溶質の平衡パラメーター〔固有電荷及び平衡定数〕によって定義される各点を通る線を構成させることによって、図形的に決定することができる。仕込成分の溶離順序は、これらの「親和性」線の反時計方向順序〔すなわち勾配増大〕に相応する。式(12)において、$(C_1)_d$は、ディスプレイサーが遭遇する塩濃度〔すなわちキャリヤー塩濃度〕、Q_dは、固定層におけるディスプレイサーの濃度、C_dは、移動層におけるディスプレイサーの濃度である。

出願人はこの仮説的論理構成に拘束されることを望まないが、これは、小さな分子が効果的なディスプレイサーであり得るという発見と矛盾しないように思える。なぜなら、大きさは決定的なパラメーターではないからである。この理論によって、K_i及びν_iが、当該タンパク質からの親和性プロットに対して反時計方向であるような分子であれば、このタンパク質に対して効果的なディスプレイサーとして機能するだろう。

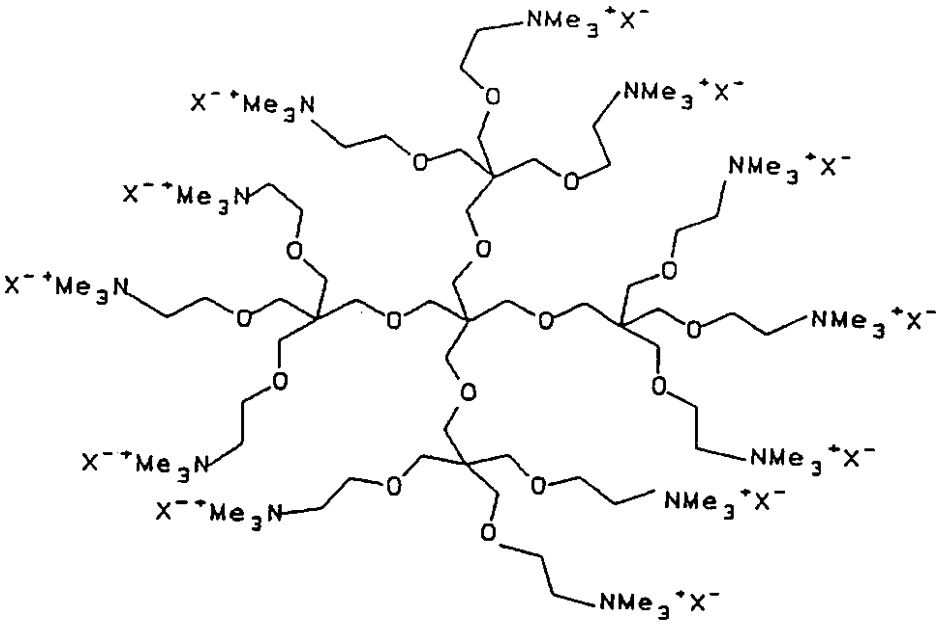
この予測と一致して、多数の低分子量ディスプレイサーを試験し、タンパク質置換（protein displacement）として有効であることを見いだした。

樹枝状ポリマー〔スターバースト（starburst）ポリマーとしても知られている〕は、三次元、高次（highly ordered）のオリゴマー化合物又はポリマー化合物であって、アンモニアやペンタエリスリトールのような小さい分子である「反応開始核（initiator cores）」から出発して、反復反応シークウェンスによって形成されるものである。選ばれた構築ブロックと成長反応によって、大きさ、形状、トポロジー、柔軟性、表面化学などの臨界的な（critical）分子設計パラメーターは、分子レベルで正確に制御することができる。合成は、世代（generation）と呼ばれる個別の段階を経て進む。デンドリマー（dendrimer）は、三つの明確な構造的特徴を有する。すなわち、(1)反応開始核領域（initiator-core region）、(2)この反応開始核に放射状に結合した分岐セルのカスケード列（cascad

ing tiers of branch cells）を含んだ内部領域、及び、(3)最外部世代に結合した末端部分からなる外部領域又は表面領域である。
ゼロ(12)、第１(14)、及び第２〔スキーム２に示したような(16)〕世代のペンタエリスリトール基盤デンドリマーの合成を、以下に詳しく記述するように実施した。便宜上、ゼロ世代のデンドリマーをPETMA4（PentaErythrityl(TriMethylAmmonium)$_4$）、第１世代をPETMA12、第２世代をPETMA36と称する。



12



14

ゼロ世代、第１世代、及び第２世代のデンドリマーのＳＭＡモデル平衡パラメーターを、前端クロマトグラフィー技法を用いて、50×5mm I.D.SCXカラム中で測定した。
第１表から判るように、各デンドリマーの全電荷数の約１／３が表面に結合している。第１世代（PETMA12）及び第２世代（PETMA36）のデンドリマーは、同様な吸着行動を示し、σ_D/ν_D及び$Q_D^*\nu_D$の値は同様であり、塩濃度の減少に伴ってQ_Dが限界的増加（marginal increase）した。

第１表

ペンタエリスリトール基盤樹枝状ディスプレイサーのＳＭＡパラメーターの平均値

ディスプレイサー（分子量）	塩（Na+）濃度（mM）	溶質濃度 C（mM）	固有電荷（νD）	立体因子（σD）	（σD／νD）	QD（mM）	QD＊νD（meq）
PETMA４（480）	20	15	1.5	2.6	17.3	140	210
PETMA４（480）	50	21	1.6	1.5	0.94	183	293
PETMA４（480）	50	4.18	N.D.	N.D.	N.D.	177	N.D.
PETMA12（1620）	20	6.17	4.2	6.3	1.50	55.3	232
PETMA12（1620）	75	6.17	4.2	N.D.	N.D.	51.5	216
PETMA36（5128）	20	1.96	11	16.7	1.52	20.9	230
PETMA36（5128）	50	1.96	10.5	N.D.	N.D.	18.3	192

第１表から判るように、第２世代デンドリマーであるPETMA36は、第１世代デンドリマーより比較的高い固有電荷を有するが、σ_i / ν_i比は同程度である。理論上は、PETMA36は効率的なディスプレイサーとして働くはずであるが、それが事実であることが見いだされた。100×５mm陽イオン交換カラム中で、PETMA36を用いて、二つのタンパク質〔α－キモトリプシノーゲンＡ及びシトクロムＣ〕の置換分別（displacement separation）を実施した。かなり良好な理論と実験の整合が見られた。精製した〔ダイアフィルトレーションによる〕第１世代ペンタエリスリトールPETMA12をディスプレイサーとして用いて、この実験を繰り返した。このような置換によって、分子量と、デンドリマー上の電荷グループ数とが減少しても、そのディスプレイサーとしての効力にほとんど影響がないらしいことが示されている。この予想をさらに１段拡張すれば、ゼロ世代のデンドリマーもタンパク質ディスプレイサーとして作用するものと予想できよう。この予想は、イオン交換系におけるタンパク質のディスプレイサーとして、高固有電荷の高分子量の高分子電解質を用いるという従来の知識に逆行するものである。〔ゼロ世代デンドリマーは、正味の（net）電荷４、固有電荷1.7、分子量480Daである。〕

このゼロ世代樹枝状ディスプレイサーを用いた、α－キモトリプシノーゲンＡ及びシトクロム－Ｃからなる二つのタンパク質の混合物を置換クロマトグラフィーにかけた結果を第６図に示す。この図からわかるように、二つのタンパク質のすぐれた置換分別が、明確な境界線を有し、比較的混合の少ない、高度に濃縮された、合い接する帯域の状態で観察される。この結果はまさに革命的であり、大規模タンパク質分別に置換クロマトグラフィーを用いる場合にきわめて有意義なものである。

ゼロ世代、第１世代、及び第２世代の樹枝状高分子電解質が、イオン交換系におけるタン

パク質の有効なディスプレイサーとして機能することは明かである。さらに顕著なこととして、「ゼロ」世代デンドリマー〔分子量480〕のような低分子量化合物が比較的高分子量タンパク質を置換する能力を有することは、置換現象についての現状の理解においては全く興味深いことである。分子量と、デンドリマー上の電荷グループ数とが、そのディスプレイサーとしての効果にほとんど影響しないように思えることから、「ゼロ」世代のデンドリマーをディスプレイサーとして用いる方が有利であるかも知れない。このような分子の合成ははるかに容易であり、工程が少なくてすむ。〔従って廉価である。〕このものは、置換後の、サイズ基準下降流処理（size-based downstream processing）における仕込成分帯域からの分別が容易であるという別の利点を有する。

その他の低分子量電解質も、タンパク質のディスプレイサーとして有効に機能するようである。例えば、変性アミノ酸や陽電荷担持抗生物質をディスプレイサーとして用いることができる。変性によるとは、アミノ酸を両性から陽イオン性〔陽イオン交換置換クロマトグラフィー用〕又は陰イオン性〔陰イオン交換クロマトグラフィー用〕に変わるように変化させることを意味する。これを最も好都合に達成するには、カルボキシル基をエステル化して陽イオン性化合物にするか、あるいは、アミンをアシル化して陰イオン性化合物にする。

カルボキシル基誘導化アミノ酸は非常に有効な陽イオン性ディスプレイサーとなる。例えば、カルボベンゾキシリジン・メチル・エステル、ベンゾイルアルギニン・エチル・エステル（ＢＡＥＥ）、アルギニン・メチル・エステル、及びアルギニンアミドは、α－キモトリプシノーゲン及びシトクロム－Ｃの置換クロマトグラフィーにおいて、全て効果的なディスプレイサーである。初めの二つは、一つの陽電荷を有する。アルギニン・メチル・エステル及びアルギニンアミドは、二つの陽電荷を有し、その結果、固定層への親和性がより高い。アイソタシックな（isotacic）置換におけるα－キモトリプシノーゲンとシトクロム－Ｃとの分割は、ＤＥＡＥデキストランのような高分子量ディスプレイサーを用いて得られる分割に匹敵するものである。45mMのベンゾイルアルギニン・エチル・エステルを50mM塩溶液に溶かしたpH6.0の溶液を用いた、８ミクロン強陽イオン交換カラムでのα－キモトリプシノーゲンＡ及びシトクロムＣの置換クロマトグラムの例を第７図に示す。変性アミノ酸ディスプレイサーは、高分子量ディスプレイサーの費用の何分の１かの費用で、きわめて純粋な形で購入することができる。その上、サイズが小さいことから、輸送性がよく、より速い動力学を与える。

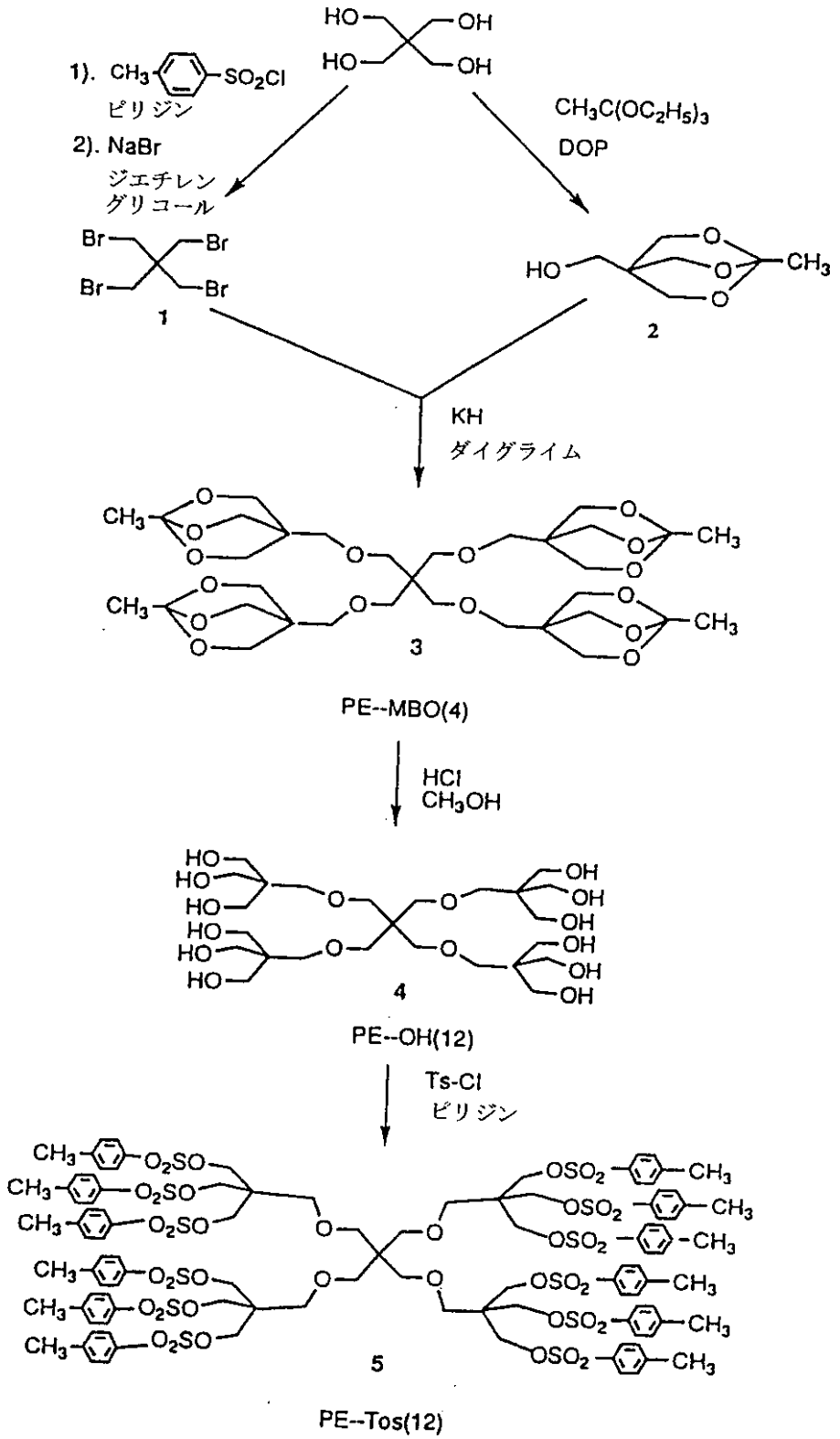
多くの抗生物質は、もし所望のタンパク質区分中に見いだされたとしても、容易に除去できるほど小さいという利点を有する。さらに、これらはタンパク質区分の中に残ることが有利な場合がしばしばあり得る。高い固有電荷と平衡定数との所望の組合わせを達成するために、一つ又はそれ以上の強解離性官能性を有する抗生物質が特に有用のようである。このような抗生物質には、二つのグアニジン官能性を有するストレプトマイシンが含まれる。45mMのストレプトマイシンサルフェート塩〔分子量581〕を30mM塩溶液に溶かしたpH6.0の溶液を用いた、８ミクロン強陽イオン交換カラムでのα－キモトリプシノーゲンＡ及びシトクロムＣの置換クロマトグラムの例を第８図に示す。

いずれも分子量が600以下であるアミノ酸エステル、解離性抗生物質及びゼロ世代デンドリマーがきわめて有効なディスプレイサーであることが実証されたことで、タンパク質クロマトグラフィー用のディスプレイサーとしては2000を越える分子量は必要でないことが確かめられている。事実、我々は、固有電荷と平衡定数が、そのＳＭＡ解析によって効果を予測できるようなもの〔第５図に示し、先に説明したように〕である限り、分子量2000未満の電荷化合物で機能しなかった例を見ていない。

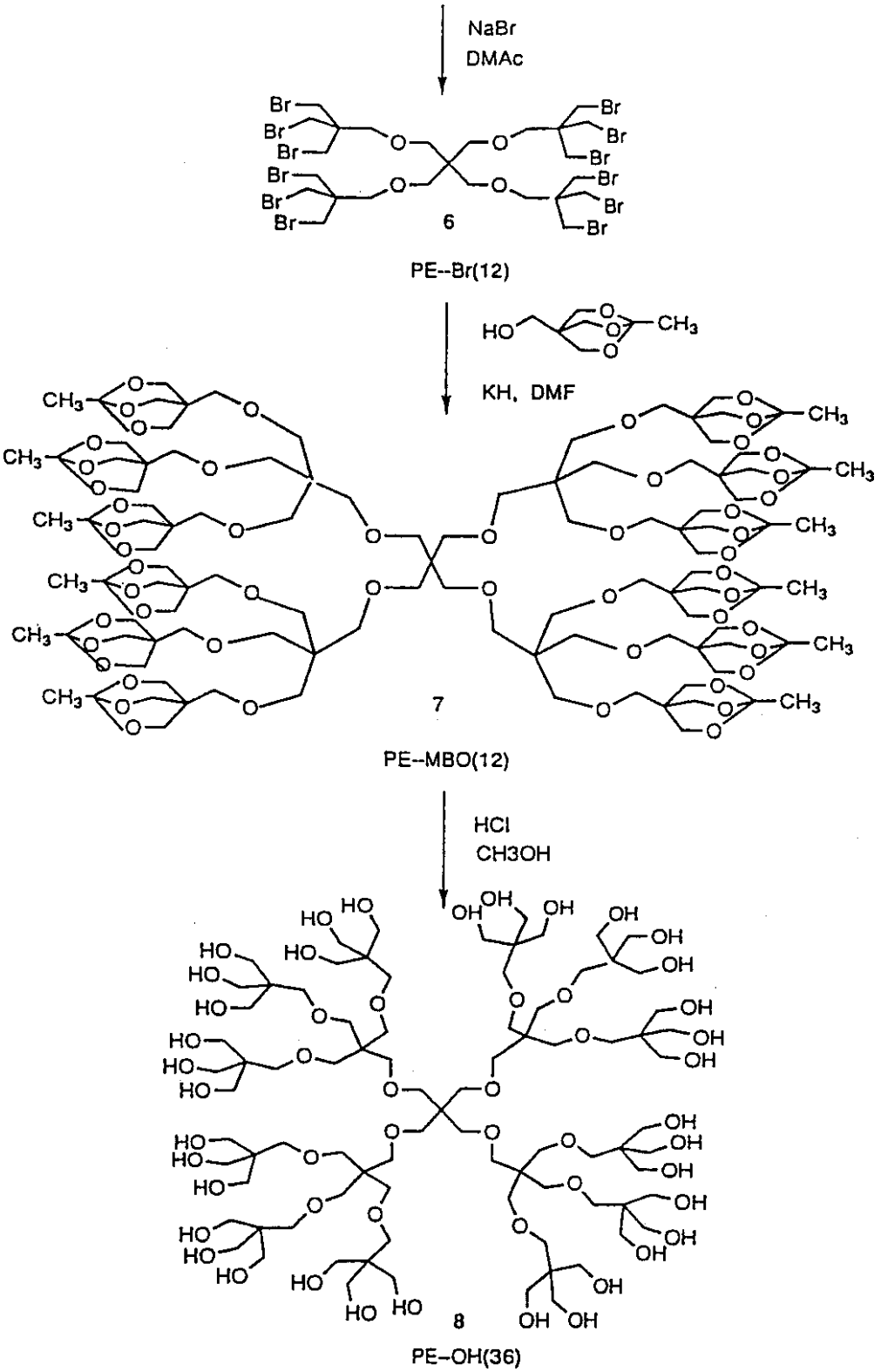
粗製のPETMA(12)をディスプレイサーとして用いて、100×５mm陽イオン交換カラム中で、２成分タンパク質混合物の置換分別を実施した。タンパク質成分は押し出されて、隣接帯域としてうまく分別されたが、溶出液のプロフィルは、不純なＤＥＡＥ－デキストランをディスプレイサーとして用いた従前の置換と類似した特性を示した。最も目立つこととして、シトクロム－Ｃ帯域は、α－キモトリプシノーゲンＡ帯域に比べてかなり濃度が低かった。恐らく、ディスプレイサー中の不純物がタンパク質の脱着と、その等温線の降下に

影響したもの思われる。従って、デンドリマーを精製することが有利と考えられる。
デンドリマーの一つの特質は、そのデンドリマーの表面に、種々の末端部分を存在させ得ることである。この末端グループは、異なる有用性の可能性を与える官能性に容易に変化させることができ、デンドリマーは、最終の外層に高密度の末端部分を有するものとなる。これらの密な分子の表面にある有機基を、第４級アンモニウム塩やスルホネートなどの電荷基となるように官能基化すれば、それらは、クロマトグラフィー媒体に対して、ある種のタンパク質よりも高い親和性を示し、クロマトグラフィー分別における新型のディスプレイサーとして有用なものとなる。樹枝状ポリエーテルの基幹の合成をスキーム１に示し、それを新規なポリ（エーテル－アミン）へ官能基化する経路をスキーム２に例示する。デンドリマー前駆物質の陰イオン性デンドリマー〔スルホネート〕への官能基化をスキーム３に示す。スキーム１で用いた戦略は、Hall及びPadiasの業績〔J. Org. Chem. 52, 5305(1987)〕から導かれた変性手順である。ペンタエリスリトール（PE）は反応開始核でもあるが、構築ブロックとして、ヒドロキシメチル・ビサイクリック・オルソフォルメート（HTBO）の代わりに、１－メチル－４－（ヒドロキシメチル）－２，６，７－トリオキサビシクロ－［２．２．２］－オクタン（MHTBO）が用いられる。第３級アミン部位を導入するためのシントンとして、Ｎ，Ｎ－ジメチルエタノールアミンが用いられる。

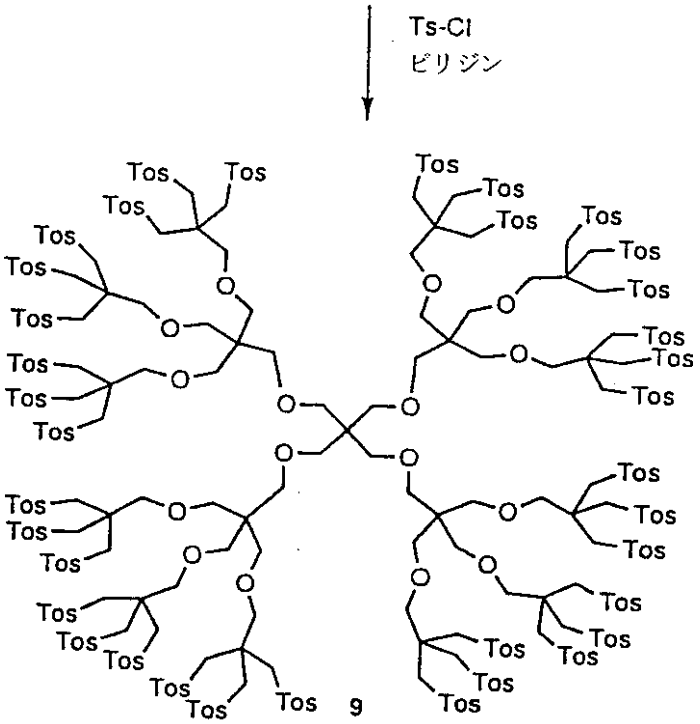
スキーム１

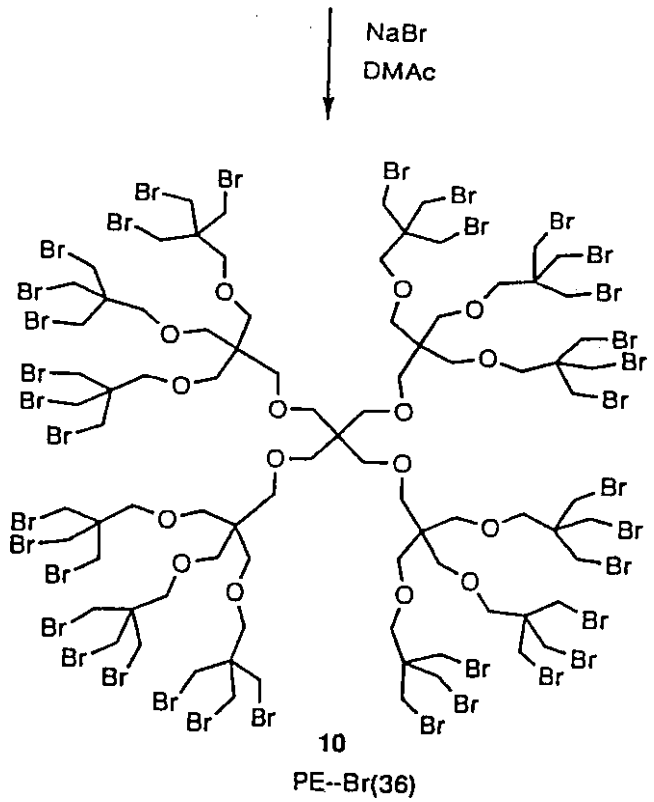

1). CH3 SO2Cl
ピリジン
2). NaBr
ジエチレン
グリコール
CH3C(OC2H5)3
DOP
1
2
KH
ダイグライム
3
PE--MBO(4)
HCl
CH3OH
4
PE--OH(12)
Ts-Cl
ピリジン
5
PE--Tos(12)

スキーム１（続き）

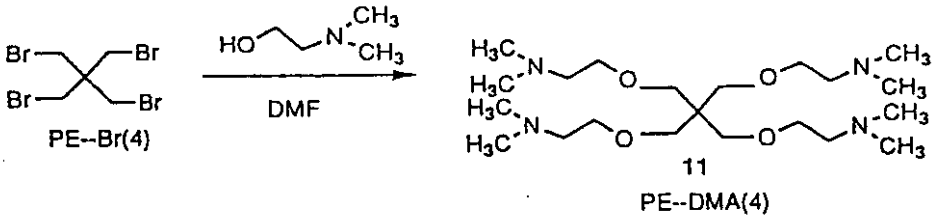


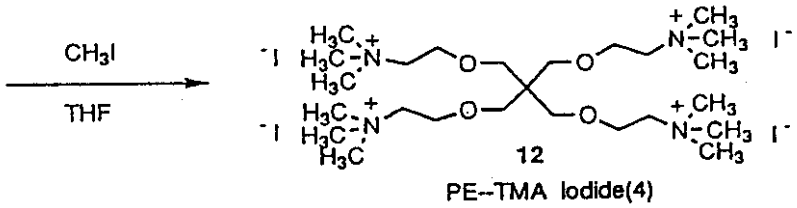
スキーム１（続き）

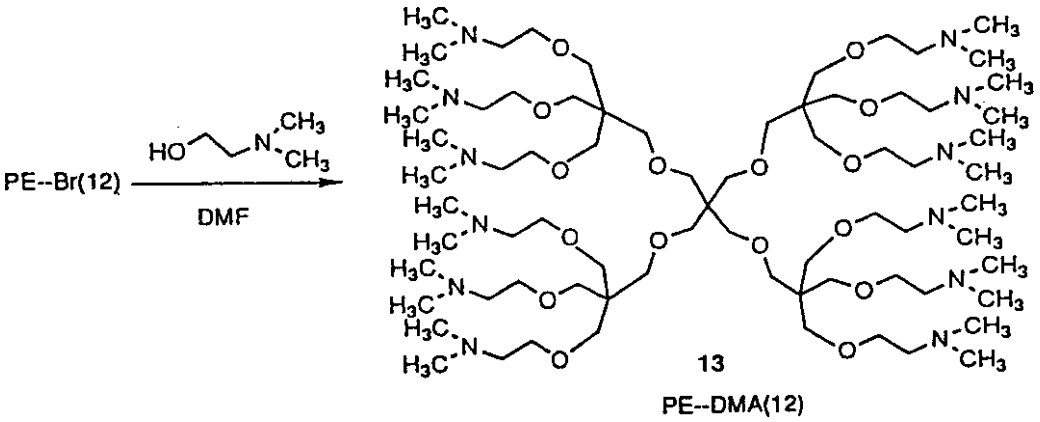


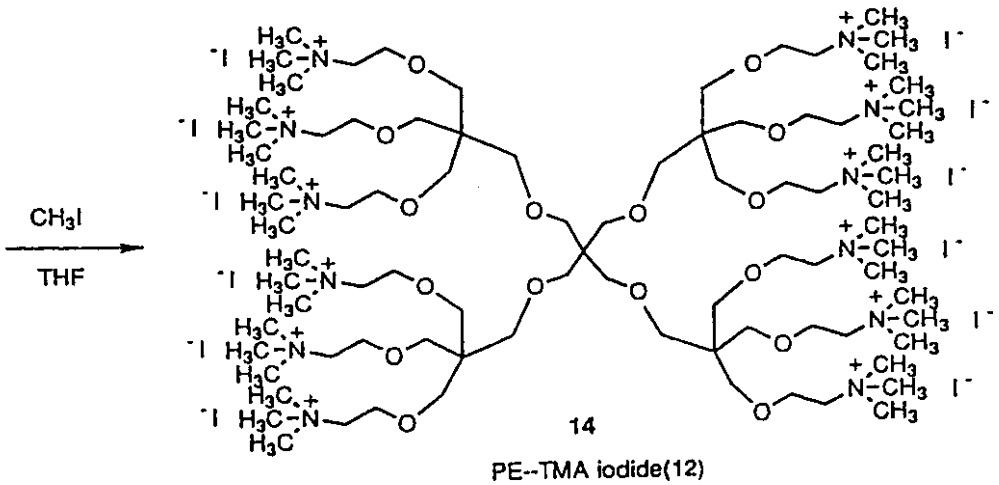


スキーム２

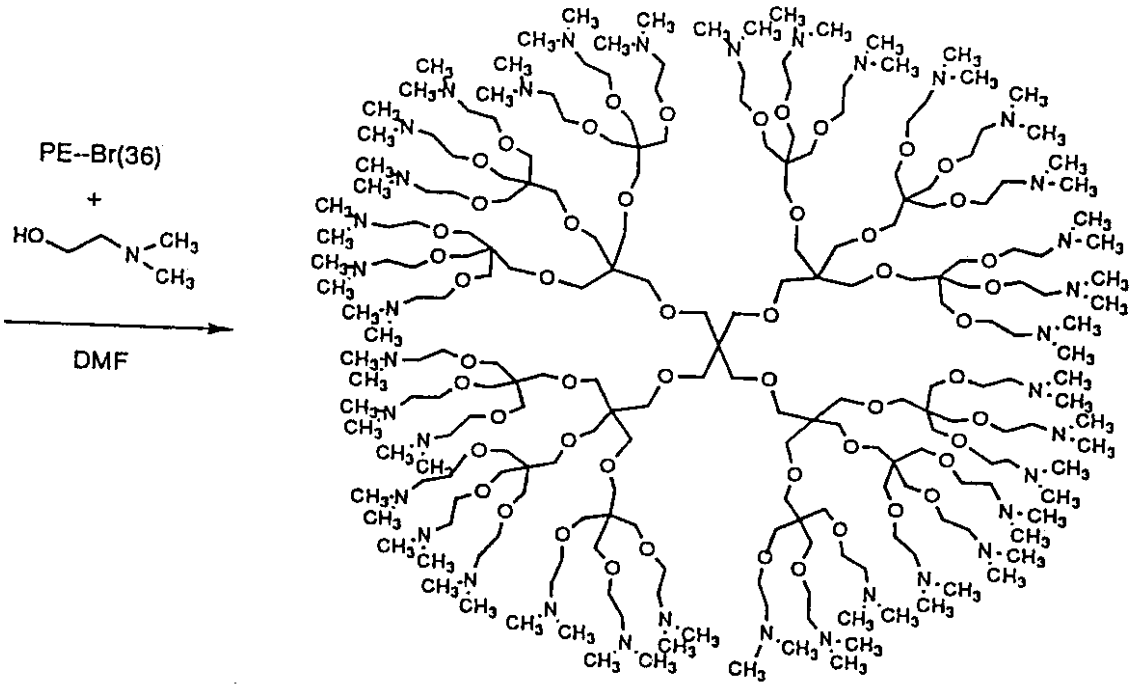

Br
Br
Br
Br
PE--Br(4)
HO
N
CH3
CH3
DMF
H3C
N
O
CH3
11
PE--DMA(4)


CH3I
THF
H3C
N
+
CH3
I-
12
PE--TMA Iodide(4)


PE--Br(12)
HO
N
CH3
DMF
H3C
N
O
CH3
13
PE--DMA(12)

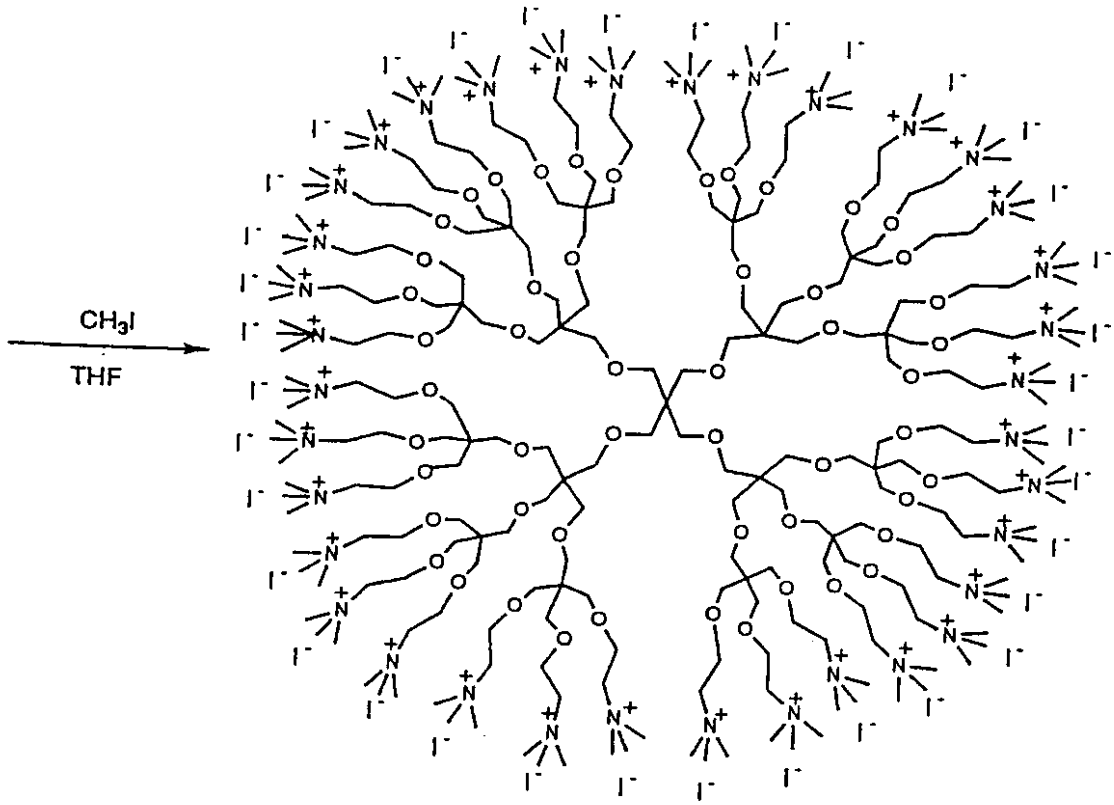

CH3I
THF
H3C
N
+
CH3
I-
14
PE--TMA iodide(12)

スキーム２（続き）



15

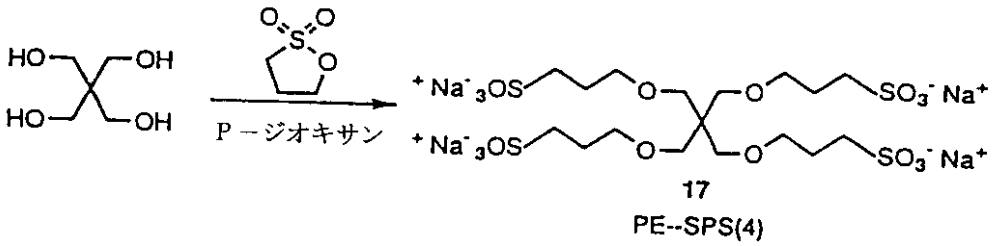
PE--DMA(36)

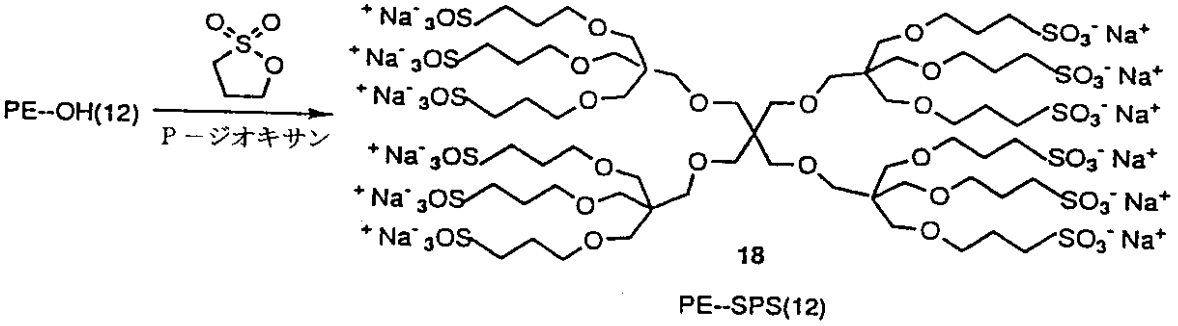


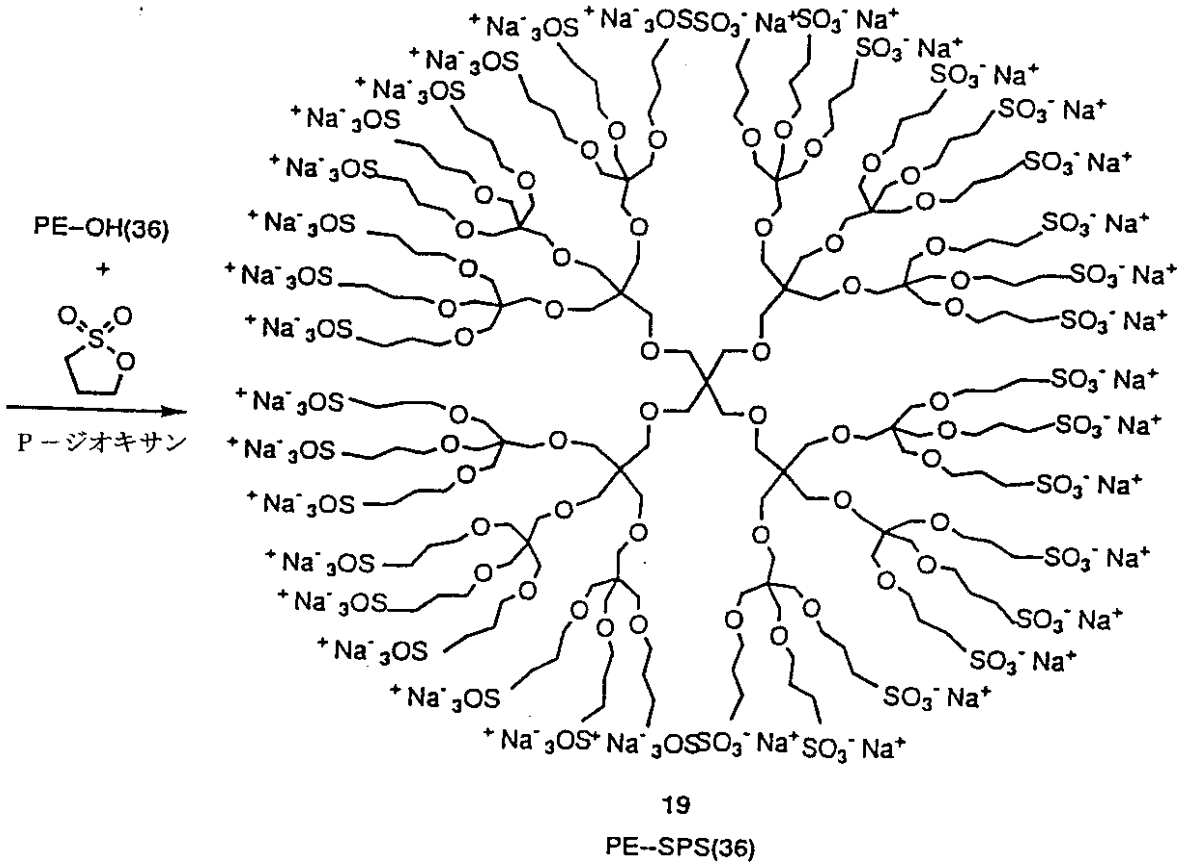
16

PE--TMA iodide(36)

スキーム３







デンドリマー電解質の調製

ヘキサン、テトラヒドロフラン（THF）及び２－メトキシエチル・エーテル（ダイグライム）をナトリウム上で乾燥させ、使用する直前に蒸留した。Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（DMF）は、ＨＰＬＣグレイドのものをAldrich Chemical Co.から購入した。その他の溶媒及び試薬は全て、操作中で特に断らない限り、それ以上の精製を行うことなく使用した。

ペンタエリスリチル・テトラブロマイド、PE-Br(4)〔化合物１〕
機械的撹拌器及び温度計を取り付けた１Ｌ容三口丸底フラスコに、ペンタエリスリトール（26.0g,0.19mol）及び200mＬのピリジンを加えた。撹拌を開始し、この懸濁液を氷浴中で冷却しながら、これに、固体状のｐ－トルエンスルホニル・クロライド（152.52g,0.8mol）を、温度が30℃より上がらないような速度で加えた。添加完了後、得られたスラリーを35-40℃でさらに２時間撹拌した。水200mＬ、メタノール400mＬ及び濃塩酸160mＬからなる溶液を激しく撹拌し、この溶液に、スラリーを徐々に加えた。さらに氷を加えることによって、無色の粗製ペンタエリスリチル・トルエンスルホネートをさらに冷却し、吸引濾過し、水１Ｌ及び、冷メタノール200mＬを二つの区分に分けて洗浄した。
機械的撹拌器、温度計及びコンデンサーを取り付けた１Ｌ容三口丸底フラスコ中で、わずかに湿ったペンタエリスリチル・トルエンスルホネート（約140g）、臭化ナトリウム（120g,1.16mol）及びジエチレン・グリコール300mＬを混合した。次いでこの混合物を、緩やかな撹拌のもとで140-150℃に加熱し、この温度範囲で一夜反応させた。室温にまで冷却後、この混合物を400mＬの水の中へ撹拌下に注入し、沈澱物を吸引濾過し、水500mＬで洗浄した。粗製物を減圧下（１トル）に50℃で一夜乾燥させ、アセトンから再結晶させた。収量：52g(70％）。融点：157-160℃。
１－メチル－４－（ヒドロキシメチル）－２，６，７－トリオキサビシクロ［２．２．２］オクタン、MHTBO
〔化合物２〕
通常の蒸留装置を取り付けた250mＬ容丸底フラスコ中で、ペンタエリスリトール（13.6g,0.1mol）、トリエチル・オルソアセテート（16.22g,0.1mol,18.3mＬ）、ピリジン・ｐ－トルエンスルホネート（PPTS）（0.5g,2mmol）及び100mＬのジオクチル・フタレートを混合した。この混合物を130-140℃に加熱し、エタノールを徐々に留去した。エタノールの量が理論値に近くなった時点で、圧力を＜0.1トルに減じ、生成物を減圧下で蒸留した。留出した白色の生成物はコンデンサー中で結晶化して、13.6-14.9gのMHTBOを与えた。収量：85-93%。この化合物はトルエンから再結晶させることができるが、そのままで使用することができる。融点：110-112℃。
PE-MBO(4)〔化合物３〕
機械的撹拌器、温度計及び添加漏斗を備えた500mＬ容三口フラスコ中で、アルゴン雰囲気下に、カリウム・ハイドライド（2.8g,0.07mol,35％懸濁液として8.0g）をヘキサンで２回洗浄し、洗浄液を傾瀉して除き、ダイグライム100mＬを加えた。撹拌下に混合物を０℃に冷却し、MHTBO 10.25g(0.064mol）をダイグライム100mＬに溶かした溶液を滴加し、混合物を室温で３時間撹拌した。次いで、ペンタエリスリチル・テトラブロマイド5.82g（0.015mol）をダイグライム100mＬに溶かした溶液を、同じく室温で滴加した。混合物を加熱して24時間還流させた。次いで混合物を600mＬの氷水中に注入し、沈澱物を濾過し、水で洗浄し、真空下（１トル）に50℃で一夜乾燥させた。白色の固体（8.2g,78％）を得た。パイルシュタイン試験によるブロマイドは陰性であった。この生成物を、最後に４：１酢酸エチル／ヘキサンから再結晶させた。収量：5.86g,55%。融点：220℃でわずかに収縮し、230-244℃で溶融。
PE-OH(12)〔化合物４〕
250mＬ容丸底フラスコ中で、PE-MBO(4)（6.0g,8.53mmol）を100mＬのメタノール及び１mＬの濃塩酸と混合した。混合物を徐々に加熱して還流させ、１時間還流を継続した。溶媒の約１／３だけが残るまで、メタノールと酢酸メチルを留去した。白色の生成物を濾過し、乾燥させた。収量：4.86g(8.0mmol)、94%。融点：180℃で収縮し、220-235℃で溶融。
PE-Tos(12)〔化合物５〕
500mＬ容三角フラスコ中で、PE-OH(12)（2.24g,3.68mmol）を40mＬのピリジンに溶解し、０℃に冷却した。21.2gのｐ－トルエンスルホニル・クロライド（0.11mol,30equiv）を100mＬのピリジンに溶かした溶液を、添加漏斗から滴加した。溶液を０℃でさらに１時間撹拌し、室温で４日間放置した。混合物を500mＬの氷水に注入し、沈澱物がビーカーの底に凝集した後に、溶媒を傾瀉して除いた。粗製物９gを真空下（１トル）50℃で一夜乾燥さ

せ、次いで４：1エタノール／クロロホルムから再結晶させた。収量：8.16g(3.32mmol)、90%。融点：130-133℃。

PE-Br(12)〔化合物６〕

PE-Tos(12)（8.0g,3.25mmol）を50mＬのＮ，Ｎ－ジメチルアセトアミド（DMAc）に溶解し、次いで10.06gのNaBr（98mmol,30equiv））を加えた。生じた懸濁液を撹拌し、150℃に加熱し、この温度でさらに１時間保った。混合物を室温に冷却し、氷水中に注入した。沈澱物を濾過し、真空下（１トル）に一夜乾燥させ、酢酸エチルから再結晶させた。収量：3.40g（77%）。融点：150℃で収縮、172-177℃で溶融。

PE-MBO(12)〔化合物７〕

機械的撹拌器、温度計及び添加漏斗を取り付けた500mＬ容三口丸底フラスコ中で、アルゴン雰囲気下に、カリウム・ハイドライド（1.6g,40mmol,35%懸濁液として4.57g）をヘキサンで２回洗浄し、洗浄液を傾瀉して除き、100mＬのDMFを加えた。混合物を０℃に冷却し、5.76gのMHTBO〔化合物２〕（36mmol,24equiv）を50mＬのDMFに溶かした溶液を滴加した。生じた懸濁液を室温で３時間撹拌した。このドデカブロマイド（2.05g,1.5mmol）を50℃で100mＬ DMFに溶解し、次いで、ただちに反応フラスコに、まだ温かい内に急速に滴加した。混合物を加熱して24時間還流させ、次いで、約50gの塩化ナトリウムを含む氷水中に注入した。沈澱物を濾過し、真空下（１トル）、40℃で一夜乾燥させた。粗収量は定量的（3.45g）であった。固定層としてシリカ・ゲルを、溶離液として１：1酢酸エチル／ヘキサン混合物を用いるカラム・クロマトグラフィーによって、生成物を精製した。Ｒf値：0.42。収量：2.9g(1.25mmol),82%。バイルシュタイン試験によるハロゲンは陰性であった。融点：78℃で収縮し、88-90℃でゲル化、170℃で軟化。

PE-OH(36)〔化合物８〕

250mＬ容丸底フラスコに、PE-MBO(12)（4.4g,1.9mmol）、100mＬのメタノール、及び１mＬの濃塩酸を入れた。混合物を加熱して、１時間還流させる。溶液の15-20mＬだけが残るまで、メタノール及び酢酸メチルを留去し、この溶液をビーカーに移した。残りの溶媒を完全に蒸発させた後、シロップ状物を真空下（１トル）で乾燥させて発泡体を得た。収量：3.35g(1.66mmol),88%。融点：75℃で収縮、83-85℃でゲル化し、220-230℃で軟化した。

PE-Tos(36)〔化合物９〕

500mＬ容三角フラスコ中で、PE-OH(36)（4.17g,2.05mmol）を180mＬのピリジンに溶解し、０℃に冷却した。ｐ－トルエンスルホニル・クロライド（29.4g,0.15mol,75equiv）を200mＬのピリジンに溶かした溶液を滴加した。混合物をさらに１時間０℃で撹拌し、次いで室温に７日間放置した。褐色の溶液を２Ｌの氷水に注入し、沈澱物を濾過し、真空下（１トル）に40℃で一夜乾燥させた。収量：14.36g(1.88mol)、92%。融点：120℃で収縮、220-245℃で溶融。

PE-Br(36)〔化合物10〕

250mＬ容三口丸底フラスコ中で、7.58g(1.0mmol)のPE-Tos(36)、8.32g(80mmol,80equiv)のNaBr及び100mＬのDMAcを混合した。この混合物を撹拌し、150℃に加熱し、この温度に１時間保った。次いで、混合物を室温に冷却し、２Ｌの氷水中に撹拌下に注入した。沈澱物を濾過し、さらに500mＬの水で洗浄し、室温で真空下（１トル）に一夜乾燥させた。収量：4.18g,98%。融点：48℃で収縮、52-68℃で溶融。

テトラキス［（（Ｎ，Ｎ－ジメチルアミノ）エトキシ）メチル］メタン、PE-DMA(4)〔化合物11〕

機械的撹拌器、添加漏斗及び温度計を備えた500mＬ容三口丸底フラスコ中で、アルゴン雰囲気下に、カリウム・ハイドライド（5.2g,0.13mol,35%懸濁液として14.8g）をヘキサンで２回洗浄し、100mＬのDMFを加えた。混合物を０℃に冷却し、10.7g(0.12mol,6equiv)のＮ，Ｎ－ジメチルエタノールアミンを100mＬのDMFに溶かした溶液を滴加し、室温で３時間撹拌した。7.8g(0.02mol)のペンタエリスリチル・テトラブロマイドを100mＬのDMFに溶かした溶液を滴加した。混合物を80℃に加熱し、80-90℃で12時間反応させた。次いで温度を上げて、さらに12時間還流させた。得られた混合物を50℃未満に冷却し、300mＬの氷

水中に注入した。蒸発器上で溶媒を全て除去し、800mＬのエチル・エーテルで、残留物をいくつかの区分に抽出し、抽出液を合わせて、$MgSO_4$上で乾燥させた。このエーテルを蒸発させた後、粗製物を真空下（＜0.1トル）に蒸留して、5.7gの油状液体のPE-DMA(4)を得た。溶離液として４：１酢酸エチル／ヘキサン混合物を用いて、Al_2O_3カラムで、この化合物をさらに澄明な液体にまで精製した。R_f値：0.57。収量：4.66g,59%。沸点：140-143℃（0.03mmHg）。

テトラキス［（（Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウム・アイオダイド）エトキシ）メチル］メタン、PE-TMAiodide(4)〔化合物12〕

100mＬ容三口フラスコ中に、アルゴン雰囲気下に、PE-DMA(4)（2.3g,5.5mmol）と30mＬのTHFを入れた。この溶液を０℃に冷却し、CH_3I（9.3g,66mmol,12equiv,4.1mＬ）を20mＬのTHFに溶かした溶液を滴加した。添加完了後、混合物を室温でさらに５時間撹拌した。帯黄色の沈澱を濾過し、真空下（１トル）に60℃で一夜乾燥させ、最後にメタノールから再結晶させた。この化合物は、高度に吸湿性である。収量：3.84g,70%。

PE-OMA(12)〔化合物13〕

操作は、PE-DMA(4)で用いたものと同様である。アルゴン雰囲気下に、カリウム・ハイドライド（2,8g,0.07mol,35%懸濁液として8.0g）をヘキサンで２回洗浄し、100mＬのDMFを加えた。６mＬ（0.06mol,5.34g）のＮ，Ｎ－ジメチルエタノールアミンを50mＬのDMFに溶かした溶液を０℃で滴加し、混合物を室温で３時間撹拌した。PE-Br(12)（2.72g,32mmol）を150mＬのDMFに50℃で溶解し、この溶液を、まだ温かいうちに、添加漏斗を通じて滴加した。この混合物を加熱して24時間還流させ、300mＬの氷水中に注入した。DMF及び水を全て蒸発させた後に、800mＬのエーテルで、この残留物をいくつかの区分に抽出し、$MgSO_4$上で乾燥させた。このエーテル溶液を濾過し、約200mＬに濃縮した。300mＬ容三口フラスコ中で、この溶液にHClガスを導入し、塩がそれ以上形成されなくなった時点でこの溶媒を傾瀉して除いた。塩を無水エーテルで２回洗浄し、アルゴン下に半時間乾燥させ、水に溶解し、pH＞10に塩基性化した。得られた水溶液を回転蒸発器で乾燥させ、残留物を500mＬのエーテルで抽出し、$MgSO_4$上で乾燥させた。エーテルを蒸発させた後、2.1gのかなり純粋な生成物を得た。この化合物は粘性の油状物である。沸点：0.02トルで220℃。収量：72%。

PE-TMAiodide(12)〔化合物14〕

操作は、PE-TMAiodide(4)で用いたものと同一である。PE-DMA(12)（2.04g,1.4mmol）を60mＬのTHFに溶解した。3.2mＬ（7.12g,50mmol,36equiv）のCH_3Iを20mＬのTHFに溶かした溶液を０℃で滴加した。混合物を室温でさらに３時間撹拌した。黄色の沈澱物を濾過し、真空下（１トル）に、60℃で一夜乾燥させた。この塩はメタノールから再結晶することができず、限外濾過によってさらに精製してからディスプレイサーとして試験した。収量：3.74g,84%。

PE-DMA(36)〔化合物15〕

この操作は、PE-DMA(12)で用いたものと同一である。

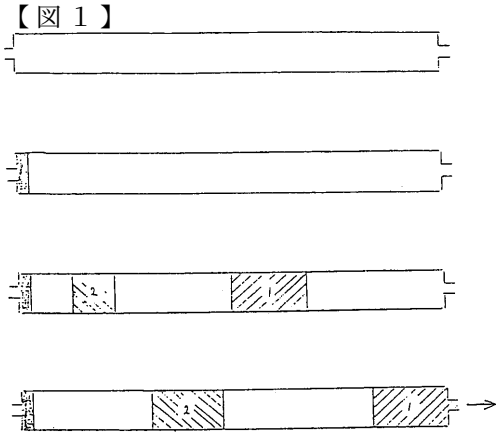
カリウム・ハイドライド（2.8g,0.07mmol,35%懸濁液として8.0g）をヘキサンで２回洗浄し、100mＬのDMFを加えた。6.4mＬ（5.7g,64mmol,80equiv）のＮ，Ｎ－ジメチルエタノールアミンを50mＬのDMFに溶かした溶液を０℃で加え、混合物を室温で３時間撹拌した。PE-Br(36)（3.43g,0.8mmol）を100mＬのDMFに溶解し、室温で滴加した。次いで混合物を加熱して24時間還流させ、200mＬの氷水中に注入した。全ての溶媒を除去した後、残留物を800mＬのエーテルで抽出した。エーテル溶液中にHClガスをバブルさせることによって、このポリアミンを塩に変換し、次いで水溶液をpH＞10に塩基性化することによって遊離させた。この化合物は非常に粘重なシロップであり、高度に吸湿性である。収量：1.86g,51%。

PE-TMAiodide(36)〔化合物16〕

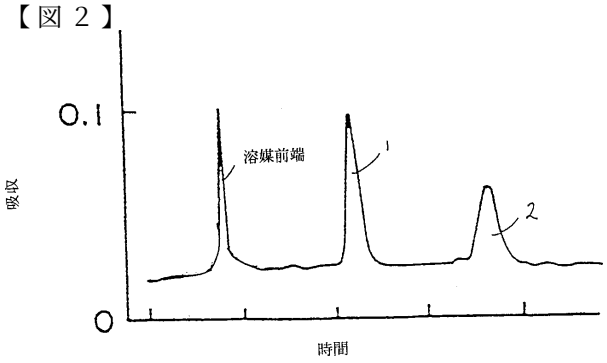
操作は、PE-TMAiodide(4)及びPE-TMA(12)で用いたものと同一である。PE-DMA(36)（1.79g,0.39mmol）を100mＬのTHFに溶解し、０℃に冷却した。4.2g（1.82mＬ,30mmol,75equiv）のCH_3Iを20mＬのTHFに溶かした溶液を加え、この混合物を室温でさらに３時間撹拌した。

次いで沈澱物を濾過し、真空下（１トル）に60℃で一夜乾燥させた。収量：2.8g,75%。
本発明は、その好ましい実施態様に関連して特に示し、記述されているが、本発明の精神と範囲から逸脱することなく、形式ならびに詳細においてその他の変更を行い得ることは、当業熟練者によって理解されることであろう。

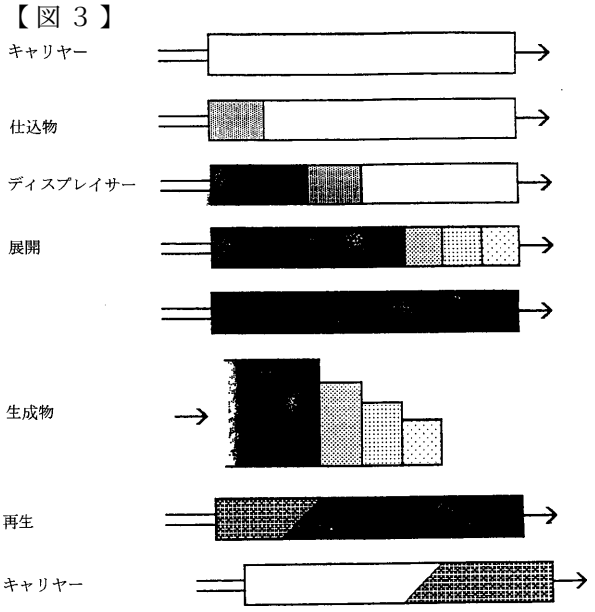
【図１】



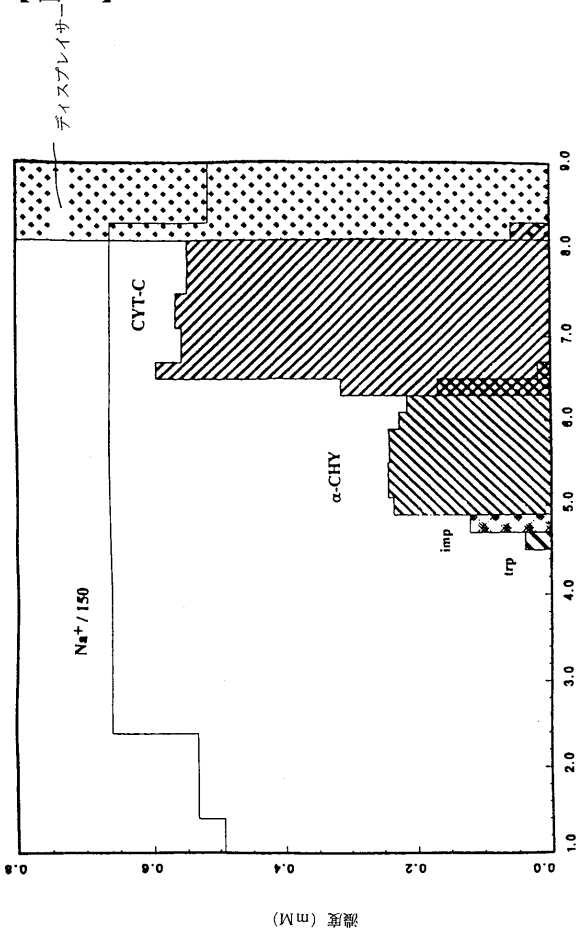
【図２】



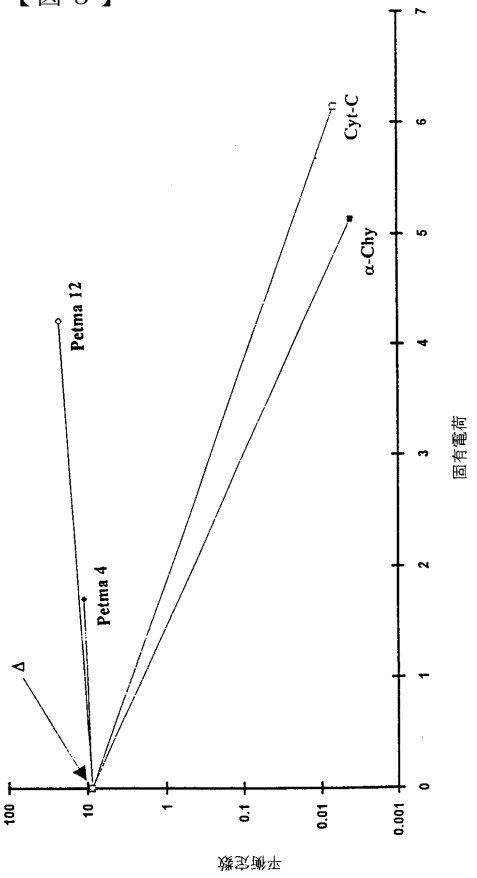
【図３】



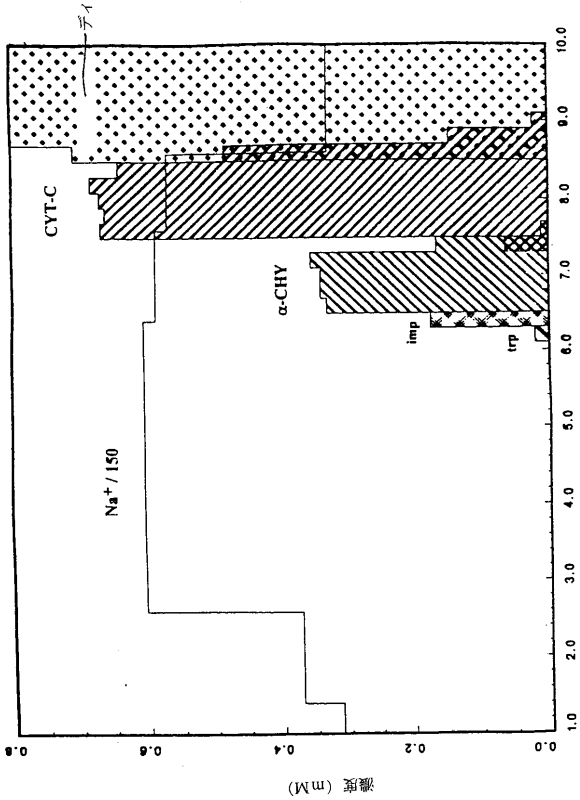
【図４】


ディスプレイサー
CYT-C
α-CHY
imp
trp
Na+ / 150
濃度 (mM)
溶出液容積 (mℓ)

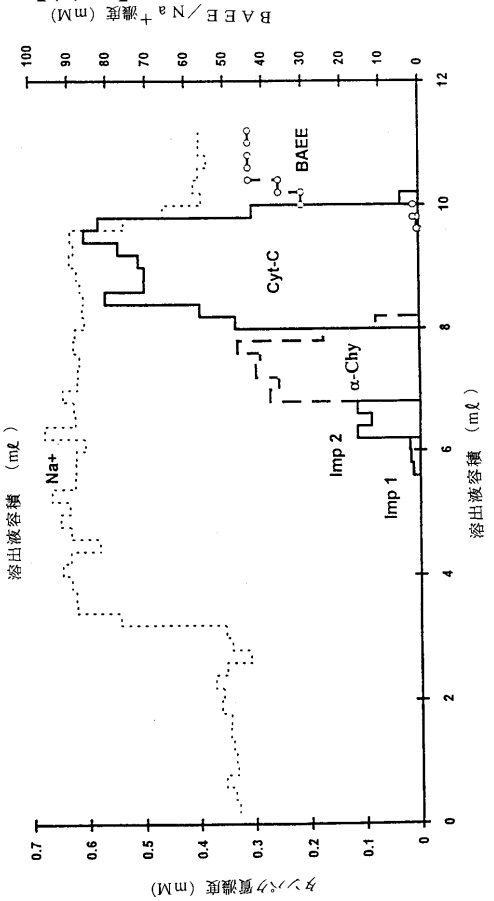
【図５】


Cyt-C
α-Chy
Petma 12
Petma 4
Δ
平衡定数
固有電荷

【図６】


ディスプレイサー
CYT-C
α-CHY
imp
trp
Na+ / 150
濃度 (mM)
溶出液容積 (mℓ)

【図７】


BAEE/Na+濃度 (mM)
BAEE
Cyt-C
α-Chy
Imp 2
Imp 1
Na+
タンパク質濃度 (mM)
溶出液容積 (mℓ)

【図８】

フロントページの続き

(72)発明者 クンドウー，アミタバ
アメリカ合衆国、１２１８０ ニューヨーク、トロイ、イーグル ストリート ７７番地
(72)発明者 リー，ユーフェイ
中華人民共和国、ベイジン、アカデミア シニカ、インスティチュート オブ ケミストリー
(72)発明者 ジャヤラマン，グーハム
インド国、６００００１７、マドラス、ティー．ナガー、バーキット ロード エー－４ ５７番地

審査官 植原 克典

(56)参考文献 米国特許第０５０４３４２３（ＵＳ，Ａ）
S.C.David Jen et al., Use of the sodium salt of poly(vinylsulfonic acid) as a low-molecular-weight displacer for protein s, J. of Chrmatography, １９９０年, Vol.519, 87-98

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C07K 1/18
C07C217/08
CAplus(STN)