

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 10 月 6 日(06.10.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/158327 A1

- (51) 国際特許分類:
C07D 207/46 (2006.01) C12M 3/00 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) C12N 11/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/057852
- (22) 国際出願日: 2016 年 3 月 11 日(11.03.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-070210 2015 年 3 月 30 日(30.03.2015) JP
62/300,346 2016 年 2 月 26 日(26.02.2016) US
- (71) 出願人: 国立大学法人 東京大学(THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 長棟 輝行(NAGAMUNE, Teruyuki); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 山口 哲志(YAMAGUCHI, Satoshi); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 山平 真也(YAMAHIRA, Shinya); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 青木 篤, 外(AOKI, Atsushi et al.); 〒1058423 東京都港区虎ノ門三丁目 5 番 1 号 虎

ノ門 3 7 森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

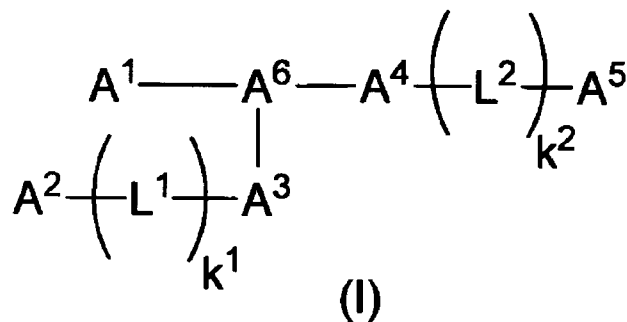
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: COMPOUND FOR FIXING LIPID MEMBRANE-CONTAINING COMPOSITION, BASE MATERIAL MODIFIED BY COMPOUND, METHOD FOR PATTERNING LIPID MEMBRANE-CONTAINING COMPOSITION ON BASE MATERIAL, AND METHOD FOR ISOLATING LIPID MEMBRANE-CONTAINING COMPOSITION ON BASE MATERIAL

(54) 発明の名称: 脂質膜含有物を固定化するための化合物、当該化合物で修飾された基材、当該基材上に脂質膜含有物をパターンニングする方法及び脂質膜含有物を当該基材上で単離する方法



(57) Abstract: The present invention pertains to: a compound represented by a compound of formula (I) (in the formula, A¹ represents a lipid membrane binding group that binds to a lipid membrane in a lipid membrane-containing composition, A² represents a lipid membrane binding inhibition group that inhibits binding of the lipid membrane binding group to a lipid membrane, A³ represents a photoreactive group, A⁴ represents a hydrophilic group, A⁵ represents a group having reactivity against a modification-target base material, A⁶ represents a scaffold site having at least three binding hands, L¹ and L² represent linkers, and k¹ and k² are each independently 0 or 1), wherein, through photoreaction, binding inhibition by the lipid membrane binding inhibition group is resolved and the lipid membrane binding group becomes capable of binding to a lipid membrane; a base material modified by the compound; a method for patterning the lipid membrane-containing composition on the base material; and a method for isolating the lipid membrane-containing composition on the base material.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2016/158327 A1



本発明は、式（I）の化合物〔式中、 A^1 は、脂質膜含有物中の脂質膜と結合する脂質膜結合基であり、 A^2 は、前記脂質膜結合基の脂質膜への結合を阻害する脂質膜結合阻害基であり、 A^3 は、光反応基であり、 A^4 は、親水性基であり、 A^5 は、修飾対象基材への反応基であり、 A^6 は、少なくとも3本の結合手を有する足場部位であり、 L^1 及び L^2 は、リンカーであり、 k^1 及び k^2 は、それぞれ独立して0又は1である〕で表される化合物であって、光反応により、脂質膜結合阻害基による結合阻害が解消されて、前記脂質膜結合基が脂質膜に結合可能となる、前記化合物、当該化合物で修飾された基材、当該基材上に脂質膜含有物をパターンニングする方法、及び当該基材上で脂質膜含有物を単離する方法に関する。

明 細 書

発明の名称：

脂質膜含有物を固定化するための化合物、当該化合物で修飾された基材、当該基材上に脂質膜含有物をパターンニングする方法及び脂質膜含有物を当該基材上で単離する方法

技術分野

[0001] 本発明は、脂質膜含有物を固定化するための化合物、当該化合物で修飾された基材、当該基材上に脂質膜含有物をパターンニングする方法及び当該基材上で脂質膜含有物を単離する方法に関する。

背景技術

[0002] 生体内の組織では、複数種類の細胞が特定の位置に配置され、組織化することにより、正常な機能を発現している。このような生体内の組織に近い機能を発現する移植用組織や組織モデルの構築を可能とする、複数種類の細胞をそれぞれ任意の位置に配置する技術の開発が求められている。

[0003] また、多種種類の細胞を配置した基材を用いることで、多種種類の細胞サンプルに対する薬剤スクリーニングが一度に可能となる。したがって、複数種類の細胞をそれぞれ任意の位置に配置する技術により、アッセイのハイスループット化や試薬の節約が可能となる。

[0004] 複数種類の細胞からなるパターンを作製可能とする技術として、複数種類の細胞特異性の高い抗体を用いる方法が知られている（非特許文献1）。

[0005] また、光照射によって細胞を自発的に接着可能とする機能性ポリマーを用いる方法が知られている（非特許文献2及び3）。

[0006] さらに、相補的なDNAを細胞及び基材上に修飾し、それらの相補性を利用して複数種類の細胞からなるパターンを作製する技術が知られている（非特許文献4）。

[0007] また、細胞に障害を与えることなく、当該細胞表面を修飾することができる生体適合性アンカーとして、BAM（Biocompatible Anchor for cell Mem

brane) が知られている (非特許文献 5)。BAM は疎水性の脂肪族炭化水素基であるオレイル基と親水性基である PEG 基を有する両親媒性化合物である。BAM の疎水性部位が、脂質膜である細胞膜と非共有結合することで、当該細胞膜を修飾することが可能である。また、疎水性鎖と親水性鎖を持つ担体 (BAM を含む) を基材に結合させて、細胞やリポソームを固定化できることが報告されている (特許文献 1)。

[0008] また、癌は遠隔転移を起こすことが知られている。原発巣の一部の癌細胞が血管内に侵入し、血中循環癌細胞 (CTC) として血液内を循環し、原発癌から離れた部位に転移巣を形成する。癌患者の死亡する原因の多くは遠隔転移である。したがって、癌患者の血液検体から CTC を早期に検出することによって、遠隔転移の有無や、原発癌に対する外科手術、放射線治療、分子標的薬剤療法、または化学療法の効果を判断することができ、ひいては癌患者の生存率の向上の延長に寄与することが可能となる。さらに、CTC を生きたまま単離し、培養を行うことで、CTC の解析が可能になると期待されている。

[0009] CTC の数は、血液に含まれる白血球細胞数と比較して非常に少なく、血液 1 mL あたり赤血球細胞 50 億個、白血球細胞 300 万～1000 万個に対し、CTC の数は 10 個程度である。そのため、CTC を検出するためには、大量の血球細胞と少数の癌細胞とが混合された状態の細胞群の中から、少数の癌細胞のみを何らかの方法を利用して濃縮し、さらに血球細胞と癌細胞とを何らかの方法を利用して識別しなければならない。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献 1 : 国際公開第 2003/074691 号

非特許文献

[0011] 非特許文献 1 : Lab Chip, 2010, 10, 3413-3421, 3413

非特許文献 2 : Langmuir 2008, 24, 13084-13095

非特許文献 3 : Biotechnology and Bioengineering, Vol. 103, No. 3, June

15, 2009, 552-561

非特許文献4 : Angew. Chem. Int. Ed. 2011, 50, 7378 -7380

非特許文献5 : Bio Techniques, 2003, Vol. 35, No. 5, 1014-1021

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0012] 非特許文献1のように複数種類の細胞特異性の高い抗体を用いる方法は、高価な抗体を用いなければならない。また、抗体により特定の細胞のみを結合させるため、抗体と細胞の組み合わせを考慮する必要があり、煩雑な組み合わせの探索が必要となる。また、特異的な抗体が得られていない細胞もあるため、汎用性に欠ける。さらに、プロテアーゼ等の酵素や変性剤の混入等で容易に分解・変性するため、厳重な品質管理が必要となるなどの問題点がある。
- [0013] また、非特許文献2及び3のように光照射によって細胞を自発的に接着可能とする機能性ポリマーを用いる方法では、細胞の接着性を利用するため、非接着性細胞や弱接着性細胞に適用することができない。また、一種類の細胞をパターン化するために数時間から一日以上必要であり、スループット性が低いという問題点がある。
- [0014] また、非特許文献4のようにDNAの相補性を利用する方法では、事前に細胞表面にDNAを修飾する必要があるために、作業が煩雑になる。また、DNAはmgスケール以上の大量合成が難しいため、産業化が困難である。さらに、DNase等の酵素の混入で容易に分解するため、厳重な品質管理が必要となるなどの問題点がある。
- [0015] また、血中に極めて少量しか含まれていないCTCを特異的に単離できる技術が求められている。また、多数の夾雑物を含む混合物の中から特定の脂質膜含有物を単離し得る技術が求められている。
- [0016] 従って本発明は、複数種類の細胞を基材上に迅速かつ簡便にパターンニングする方法の提供を課題とする。さらに本発明は、細胞のみならず、その他の脂質膜含有物（例えば細胞小器官、小胞、ウイルス、リポソーム、ミセル及

び脂質で被覆された量子ドット)のパターニングにも適用可能である方法の提供を課題とする。また本発明は、特定の脂質膜含有物を単離する方法を提供することも課題とする。

課題を解決するための手段

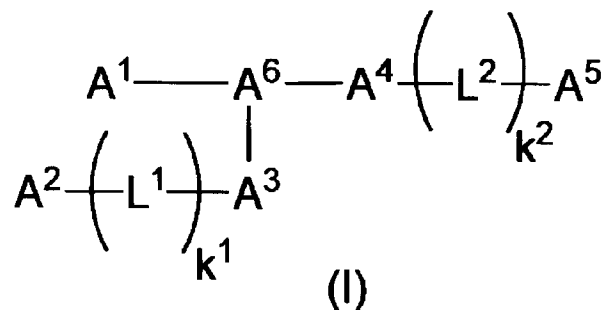
[0017] 本発明者らは上記課題に鑑み、鋭意検討した結果、光照射により、細胞をはじめとした脂質膜含有物を固定化する機能を有する新規化合物を開発した。当該化合物を表面に修飾した基材は、光照射を行うことにより、細胞の自発的な接着性を必要とせずに、任意の細胞を迅速に固定化できることが明らかとなった。一方、光照射を行っていない基材表面には細胞が固定化されない。また本発明者らは、当該基材表面に光照射と細胞播種とを繰り返すことにより、複数種類の細胞を迅速かつ簡便にパターニングできることを見出した。さらに本発明者らは、当該基材を使用することで特定の脂質膜含有物を選択的に単離し得ることを見出した。本発明は上記知見に基づく。

[0018] すなわち本発明は、以下の態様を有する。

[1]

以下の式(Ⅰ)

[化1]



[式中、

A¹は、脂質膜含有物中の脂質膜と結合する脂質膜結合基であり、

A²は、前記脂質膜結合基の脂質膜への結合を阻害する脂質膜結合阻害基であ

り、

A³は、光反応基であり、

A⁴は、親水性基であり、

A⁵は、修飾対象基材への反応基であり、

A⁶は、少なくとも3本の結合手を有する足場部位であり、

L¹及びL²は、リンカーであり、

k¹及びk²は、それぞれ独立して0又は1である]

で表される化合物であって、光反応により、脂質膜結合阻害基による結合阻害が解消されて、前記脂質膜結合基が脂質膜に結合可能となる、前記化合物。

[2]

前記脂質膜含有物が、細胞、細胞小器官、小胞、ウイルス、リポソーム、ミセル及び脂質で被覆された量子ドットからなる群から選択される、上記[1]に記載の化合物。

[3]

前記修飾対象基材が、ウシ血清アルブミン(BSA)、3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)及びコラーゲンからなる群から選択される少なくとも1つで被覆された基材である、上記[1]又は[2]に記載の化合物。

[0019] [4]

A¹及びA²が、それぞれ独立してC₇₋₂₂アルキル基、C₆₋₁₄アリール基、C₆₋₁₄アリールC₇₋₂₂アルキル基及びC₇₋₂₂アルキルC₆₋₁₄アリール基からなる群から選択され、ここで前記C₇₋₂₂アルキル基中の隣接する炭素原子は、1～3個の不飽和結合によって連結されていてもよい、上記[1]～[3]のいずれか1つに記載の化合物。

[5]

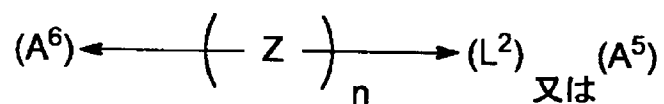
A³が、2-ニトロベンジル骨格、クマリン-4-イルメチル骨格、フェニルカルボニルメチル骨格、7-ニトロインドリノカルボニル骨格、アゾベン

ゼン骨格、フルギド骨格、スピロピラン骨格、スピロオキサジン骨格及びジアリールエテン骨格からなる群から選択される骨格を有する二価の基である、上記 [1] ～ [4] のいずれか 1 つに記載の化合物。

[6]

A⁴が、以下：

[化2]



[式中、

Zは、炭素数 2 ～ 4 のオキシアルキレン基であり、nは炭素数 2 ～ 4 のオキシアルキレン基の平均付加モル数を示し、かつ $2 \leq n \leq 500$ であり、

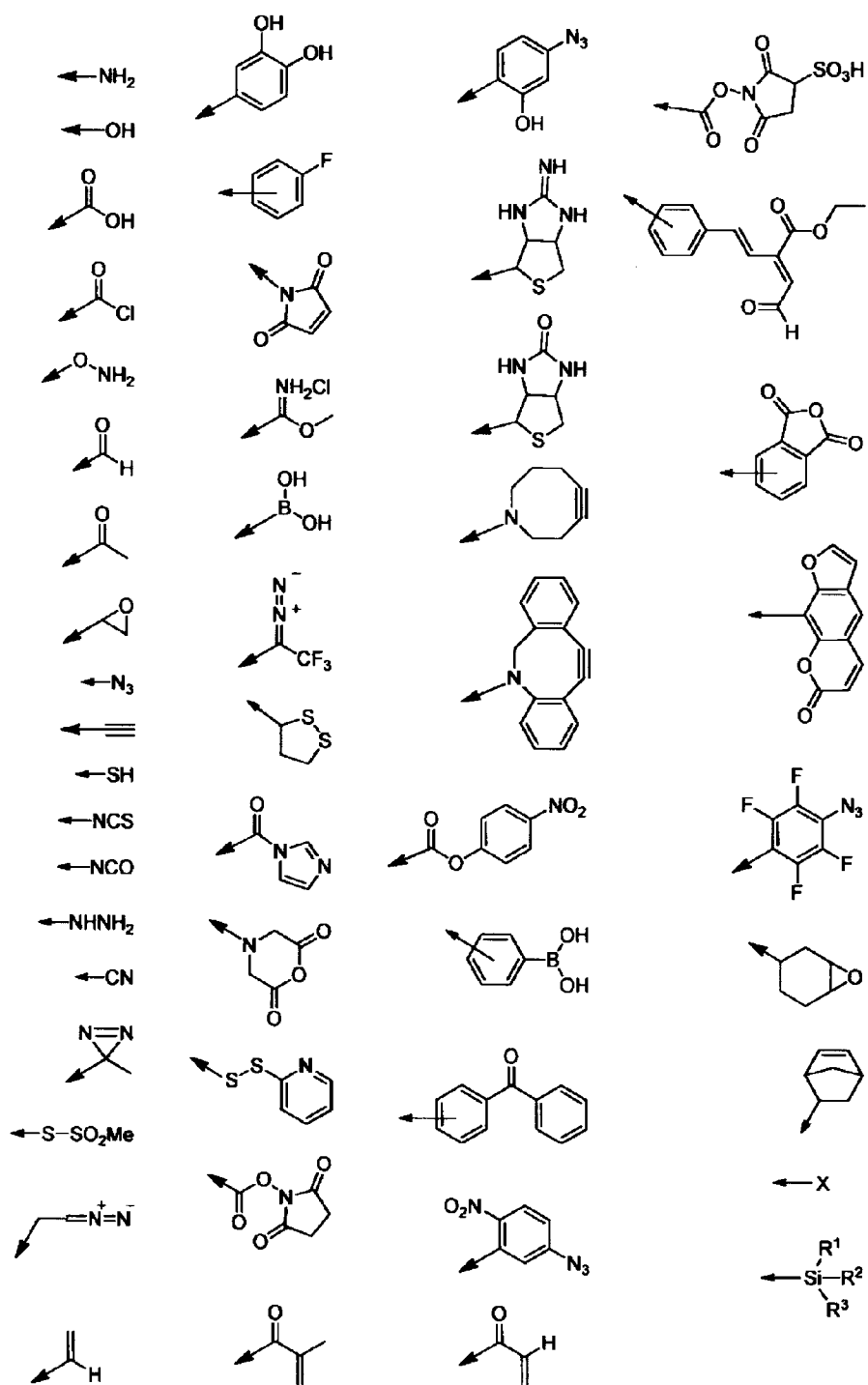
左側の矢印は、A⁶への連結を示し、右側の矢印は、k²が 0 の場合には A⁵への連結を示し、k²が 1 の場合には L²への連結を示す]

で表される、上記 [1] ～ [5] のいずれか 1 つに記載の化合物。

[7]

A⁵が、以下の置換基：

[化3]



[式中、

矢印は、 k^2 が0の場合には A^4 への連結を示し、 k^2 が1の場合には L^2 への連

結を示し、

Xはハロゲンであり、 R^1 、 R^2 及び R^3 はそれぞれ独立して、 C_{1-10} アルキル基、ハロゲン、 C_{1-10} アルコキシ基からなる群から選択される]

からなる群から選択される、上記[1]～[6]のいずれか1つに記載の化合物。

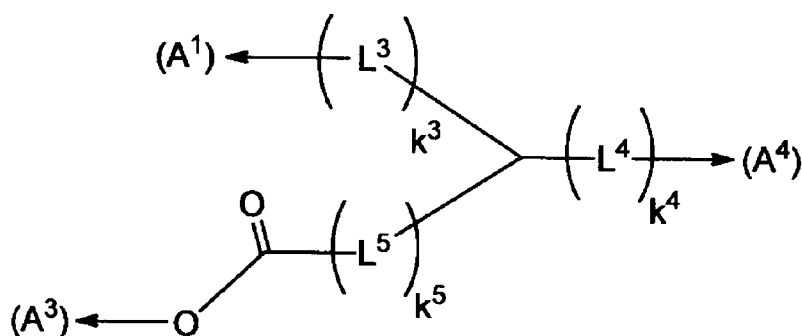
[8]

L^1 及び L^2 が、それぞれ独立して、 C_{6-14} アリーレン基又は C_{1-10} アルキレン基であり、ここで前記アルキレン基中の炭素原子は1～5個のオキシ基で置換されていてもよく、隣接する炭素原子同士が1～5個の不飽和結合で結ばれていてもよく、そして前記アルキレン基中の炭素原子のうち、1～4個の炭素原子がNH、N(C_{1-10} アルキル)、O又はSで置き換えられていてもよい、上記[1]～[7]のいずれか1つに記載の化合物。

[9]

A^6 が、以下：

[化4]



[式中、

L^3 、 L^4 及び L^5 は、それぞれ独立して、 C_{6-14} アリーレン基又は C_{1-10} アルキレン基であり、ここで前記アルキレン基中の炭素原子は1～5個のオキシ基で置換されていてもよく、隣接する炭素原子同士が1～5個の不飽和結合で結ばれていてもよく、そして前記アルキレン基中の炭素原子のうち、1～4個の炭素原子がNH、N(C_{1-10} アルキル)、O又はSで置き換えられていても

よく、

k^3 、 k^4 及び k^5 は、それぞれ独立して0又は1であり、

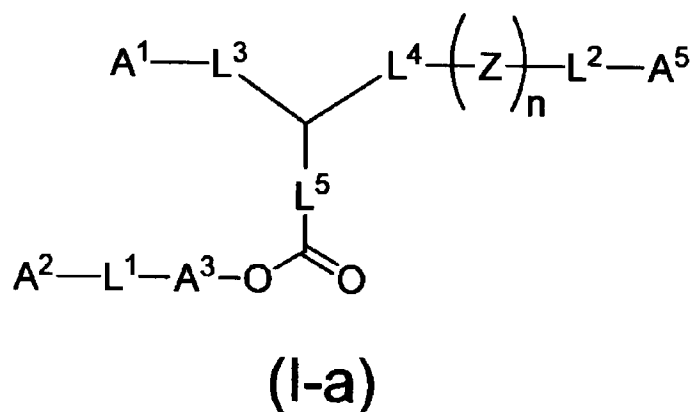
(A^1)、(A^3)及び(A^4)への矢印はそれぞれ、 A^1 、 A^3 及び A^4 への連結を示す]

で表される、上記[1]～[8]のいずれか1つに記載の化合物。

[10]

以下の式(1-a)：

[化5]



[式中、

A^1 及び A^2 が、それぞれ独立して C_{7-22} アルキル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{6-14} アリール C_{7-22} アルキル基及び C_{7-22} アルキル C_{6-14} アリール基からなる群から選択され、ここで前記 C_{7-22} アルキル基中の隣接する炭素原子は、1～3個の不飽和結合によって連結されていてもよく、

L^1 ～ L^5 が、それぞれ独立して、 C_{6-14} アリーレン基又は C_{1-10} アルキレン基であり、ここで前記アルキレン基中の炭素原子は1～5個のオキソ基で置換されていてもよく、隣接する炭素原子同士が1～5個の不飽和結合で結ばれていてもよく、そして前記アルキレン基中の炭素原子のうち、1～4個の炭素原子がNH、N(C_{1-10} アルキル)、O又はSで置き換えられていてもよく、 A^3 が、ニトロベンゼン骨格、クマリン骨格、ヒドロキシフェナンシル骨格、

ニトロインドリン骨格、アゾベンゼン骨格、フルギド骨格、スピロピラン骨格、スピロオキサジン骨格及びジアリールエテン骨格からなる群から選択される骨格を有する二価の基であり、

A⁵が、以下の置換基：

Xはハロゲンであり、 R^1 、 R^2 及び R^3 はそれぞれ独立して、 C_{1-10} アルキル基、ハロゲン、 C_{1-10} アルコキシ基からなる群から選択される)

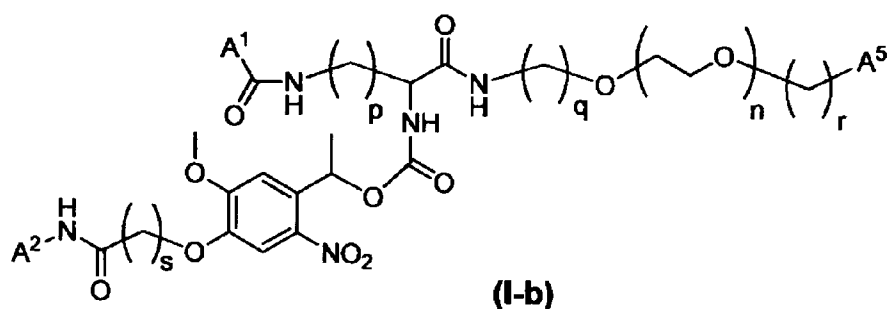
からなる群から選択される]

で表される、上記 [1] ~ [9] のいずれか 1 つに記載の化合物。

[11]

以下の式 (I-b) :

[化7]



[式中、

A^1 及び A^2 が、それぞれ独立して C_{7-22} アルキル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{6-14} アリール C_{7-22} アルキル基及び C_{7-22} アルキル C_{6-14} アリール基からなる群から選択され、ここで前記 C_{7-22} アルキル基中の隣接する炭素原子は、1~3個の不飽和結合によって連結されていてもよく、

n はオキシエチレン基の平均付加モル数を示し、かつ $45 \leq n \leq 500$ であり、

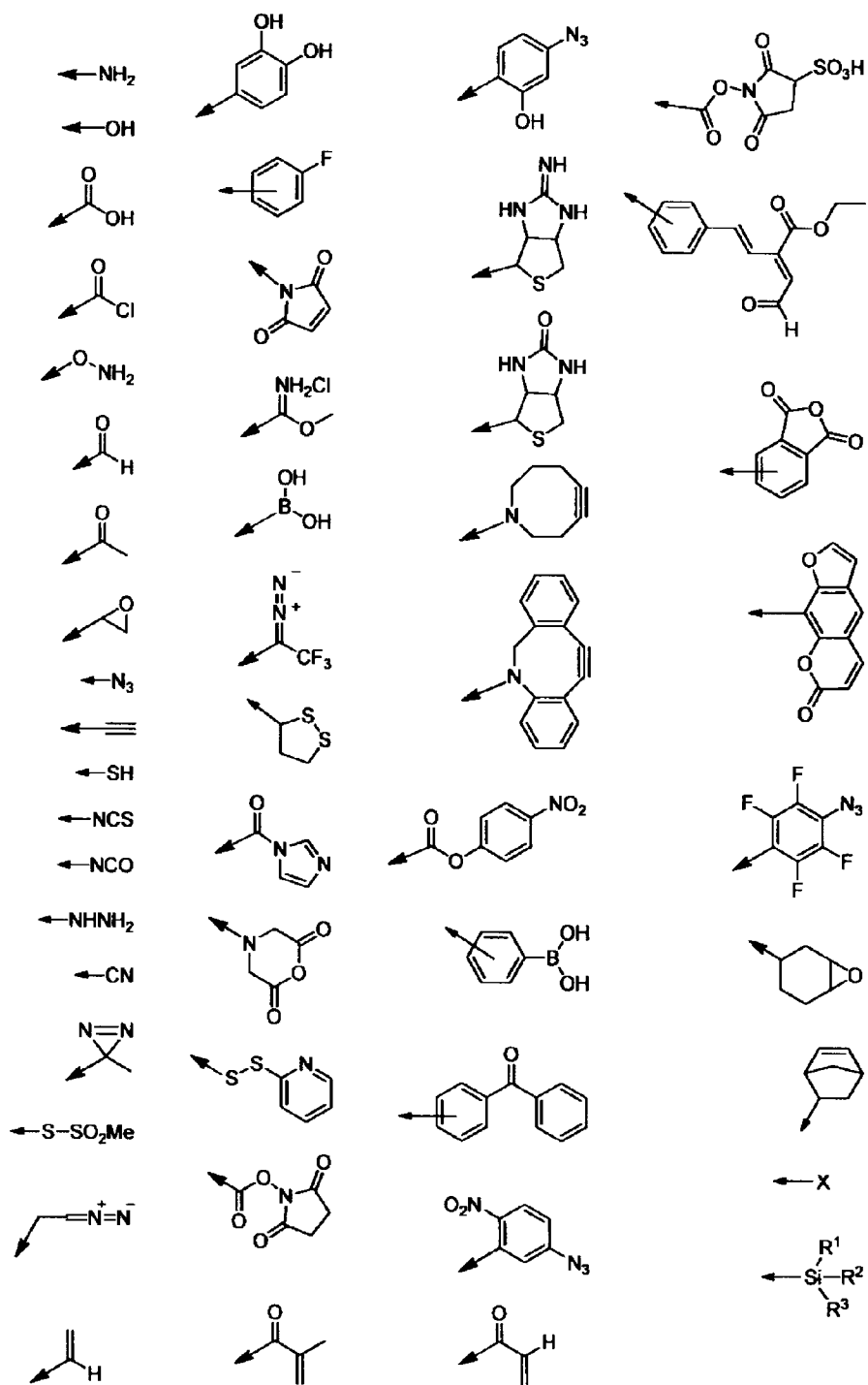
p は0~8であり、

q 及び s は、それぞれ独立して0~7であり、

r は0~10であり、

A^5 が、以下の置換基：

[化8]



(式中、

矢印は、化合物の残りの部分への連結を示し、

Xはハロゲンであり、 R^1 、 R^2 及び R^3 はそれぞれ独立して、 C_{1-10} アルキル基、ハロゲン、 C_{1-10} アルコキシ基からなる群から選択される)

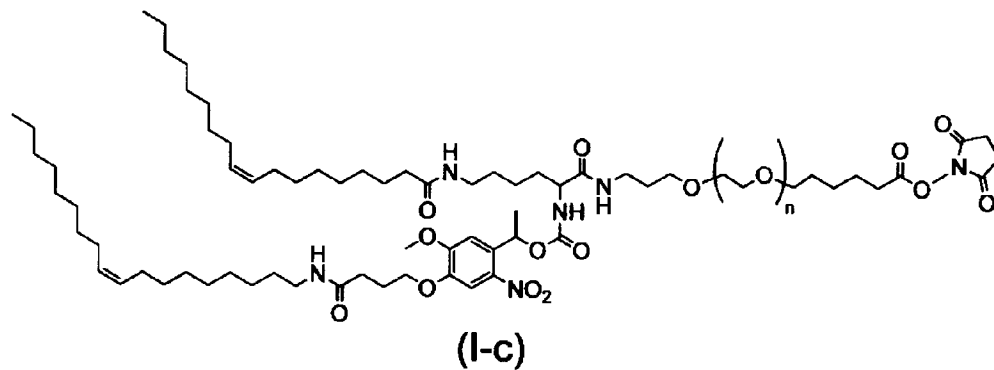
からなる群から選択される]

で表される、上記 [1] ~ [10] のいずれか1つに記載の化合物。

[12]

以下の式 (I-c)

[化9]



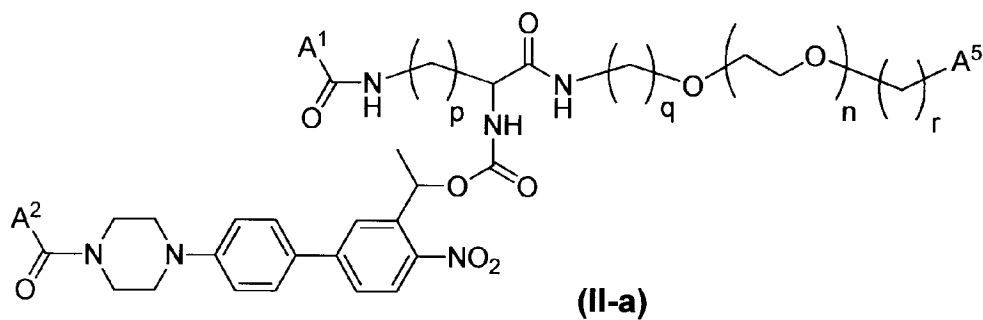
[式中、 n はオキシエチレン基の平均付加モル数を示し、かつ $45 \leq n \leq 500$ である]

で表される、上記 [1] ~ [11] のいずれか1つに記載の化合物。

[13]

以下の式 (II-a)

[化10]



[式中、

A^1 及び A^2 が、それぞれ独立して C_{7-22} アルキル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{6-14} アリール C_{7-22} アルキル基及び C_{7-22} アルキル C_{6-14} アリール基からなる群からから選択され、ここで前記 C_{7-22} アルキル基中の隣接する炭素原子は、1～3個の不飽和結合によって連結されていてもよく、

n はオキシエチレン基の平均付加モル数を示し、かつ $45 \leq n \leq 500$ であり、

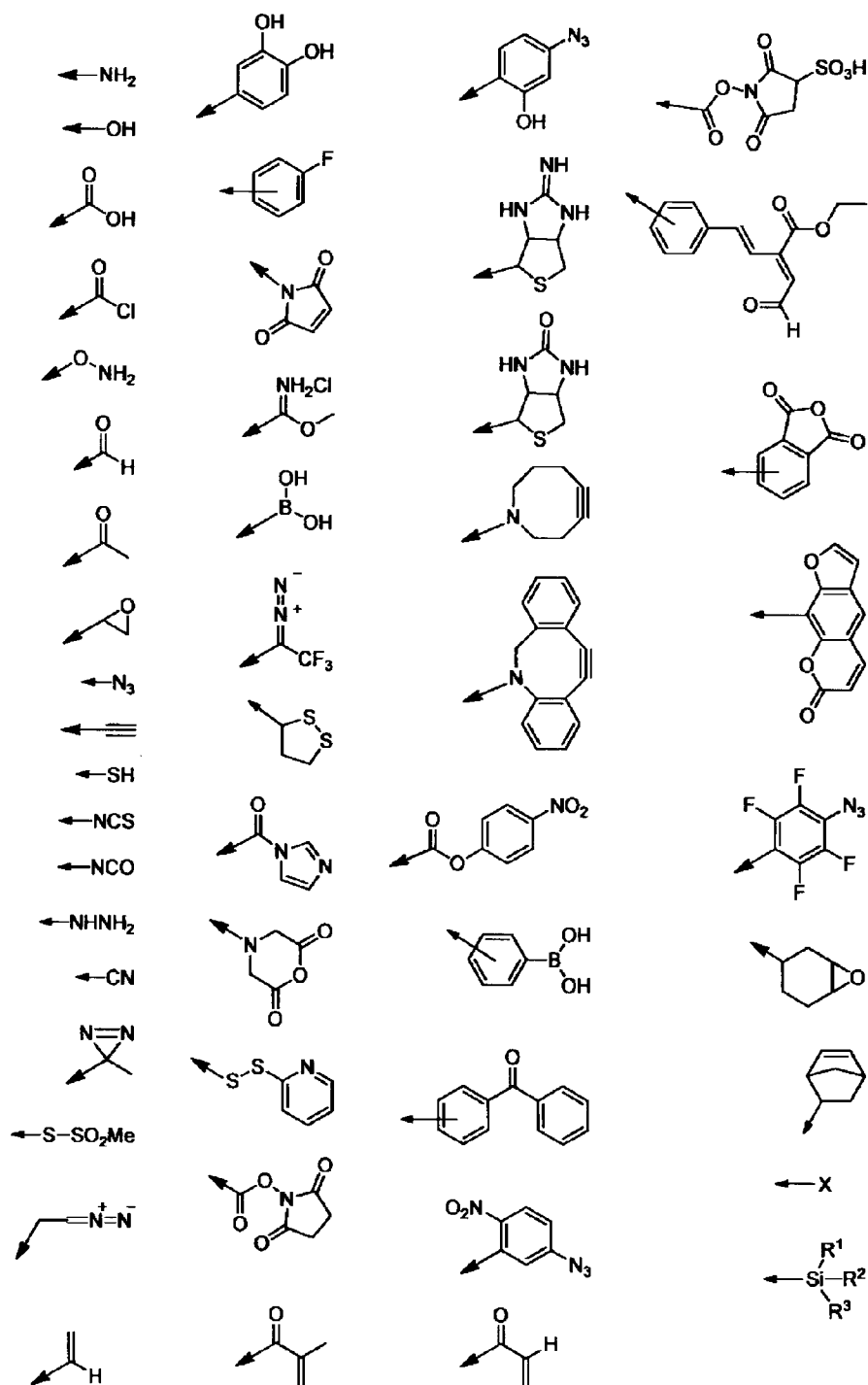
p は0～8であり、

q は、それぞれ独立して0～7であり、

r は0～10であり、

A^5 が、以下の置換基：

[化11]



(式中、

矢印は、化合物の残りの部分への連結を示し、

Xはハロゲンであり、 R^1 、 R^2 及び R^3 はそれぞれ独立して、 C_{1-10} アルキル基、ハロゲン、 C_{1-10} アルコキシ基からなる群から選択される)

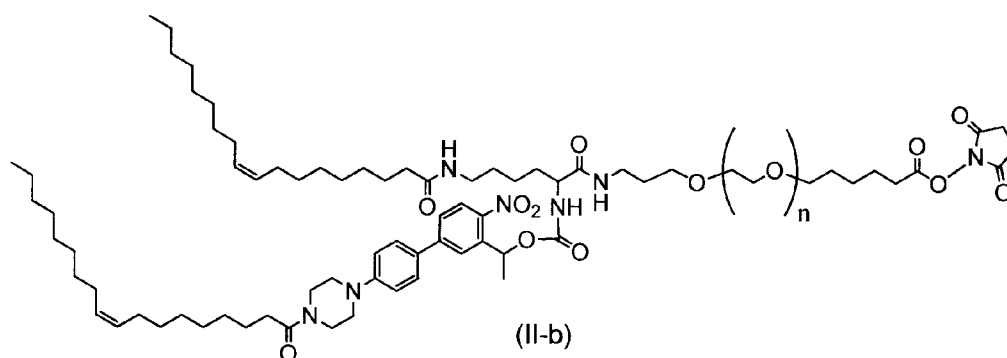
からなる群から選択される]

で表される、[1]～[10]のいずれか1つに記載の化合物。

[14]

以下の式 (I-b)

[化12]



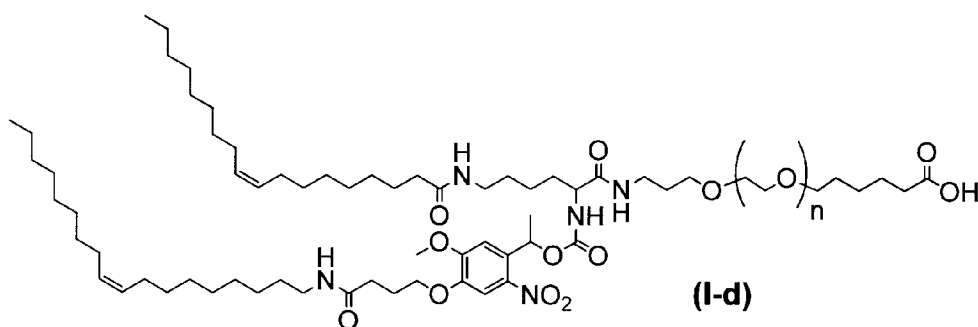
[式中、 n はオキシエチレン基の平均付加モル数を示し、かつ $45 \leq n \leq 500$ である]

で表される、[13]に記載の化合物。

[15]

以下の式 (I-d)

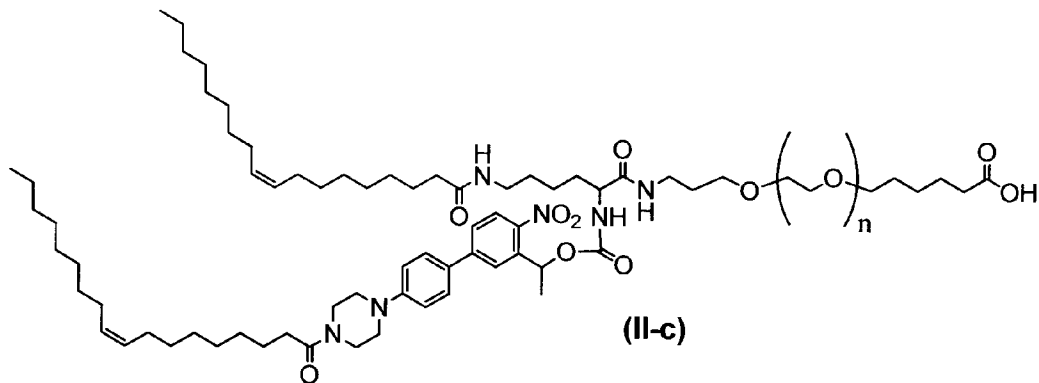
[化13]



[式中、 n はオキシエチレン基の平均付加モル数を示し、かつ $4.5 \leq n \leq 50.0$ である]

または、以下の式 (II-c)

[化14]



[式中、 n はオキシエチレン基の平均付加モル数を示し、かつ $4.5 \leq n \leq 50.0$ である]

で表される、[1] ~ [10] のいずれか1つに記載の化合物。

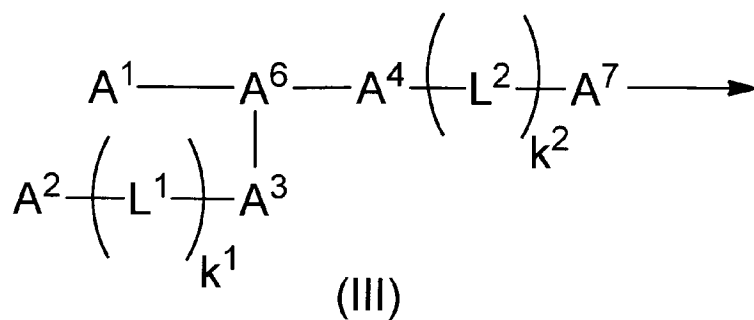
[16]

上記 [1] ~ [15] のいずれか1つに記載の化合物とその修飾対象基材とを反応させて得られた、脂質膜含有物を固定化するための基材。

[17]

以下の式 (III) の基：

[化15]



[式中、

$A^1 \sim A^4$ 、 A^6 、 L^1 、 L^2 、 k^1 及び k^2 は、[1]～[15]のいずれか1項に定義された通りであり、

A^7 は、式(111)のその他の部分と修飾対象基材とを連結する二価の基であるか、又は基材と非共有結合で連結可能な反応基であり、

矢印は、基材への共有結合又は非共有結合による連結を示す]

を有する、脂質膜含有物を固定化するための基材。

[18]

基材上に脂質膜含有物をパターンニングする方法であって、以下のステップ

:

(1) 上記[16]又は[17]に記載の脂質膜含有物を固定化するための基材上において脂質膜含有物のパターンを形成する部分に光を照射して、当該部分の脂質膜結合基を脂質膜と結合可能な状態とし;

(2) 前記脂質膜含有物を前記脂質膜結合基と反応させて前記脂質膜含有物のパターンを形成すること

を含む、前記方法。

[19]

以下のステップ:

(3) ステップ(2)で得られた基材を洗浄して、未反応の脂質膜含有物を基材から除去し;

(4) 以前のステップで使用した脂質膜含有物とは異なる脂質膜含有物を使用して、ステップ(1)～(3)を繰り返すことで、複数の異なる脂質膜含有物のパターンを形成すること

をさらに含む、[18]に記載の方法。

[20]

脂質膜含有物を単離する方法であって、以下のステップ:

(1) 上記[16]又は[17]に記載の脂質膜含有物を固定化するための基材上に、脂質膜含有物を含む試料を適用し;

- (2) 基材上の前記脂質膜含有物の位置を顕微鏡観察に基づいて検出し；
 - (3) 前記位置に光を照射して、前記位置の脂質膜結合基を脂質膜と結合可能な状態とし、基材上に前記脂質膜含有物を固定化し；
 - (4) ステップ(3)で得られた基材を洗浄して、基材に固定化されていない物質を基材から除去すること
- を含む、前記方法。

発明の効果

[0020] 本発明によれば、単一種類の細胞のみならず、複数種類の細胞も迅速かつ簡便にパターンニングすることが可能である。また、本発明は細胞のみならず、その他の脂質膜含有物（例えば細胞小器官、小胞、ウイルス、リポソーム、ミセル及び脂質で被覆された量子ドット）のパターンニングにも適用可能である。さらに、特定の脂質膜含有物を選択的に単離することも可能である。

図面の簡単な説明

- [0021] [図1]図1は、高密度な一細胞アレイを作製するためのフォトマスクを示す。
- [図2]図2は、基板上にB a / F 3細胞が高密度に配置されたアレイの顕微鏡写真（蛍光、明視野、×4対物レンズ）である。
- [図3]図3は、複数細胞集団の一細胞アレイ作製法の手順を示す。
- [図4]図4は、E G F P及びC y t o r e dで蛍光標識された複数細胞集団の一細胞アレイの顕微鏡写真である。
- [図5]図5は、実施例5で使用された流路装置である。
- [図6]図6は、複数細胞集団ラインパターンニングを示す。
- [図7]図7は、複数細胞集団の人型パターンニングを示す。
- [図8]図8は、化合物（I - c）で修飾された基板表面上での細胞培養における細胞増殖及び細胞生存率の評価結果を示す。
- [図9]図9は、接着性細胞（H e p G 2細胞）の一細胞アレイパターンニングの顕微鏡写真である。
- [図10]図10は、初代培養細胞（N H D F細胞）の一細胞アレイパターンニングの顕微鏡写真である。

[図11]図 1 1 は、ローダミンで標識されたりポソームのアレイパターンニングの顕微鏡写真である。

[図12]図 1 2 は、ビオチンが修飾された脂質被覆量子ドットのヒト型パターンニングを示す。

[図13]図 1 3 は、カルボン酸が修飾された脂質被覆量子ドットのヒト型パターンニングを示す。

[図14]図 1 4 は、非接着性細胞（B a / F 3 (K O)）と接着性細胞（H E K 2 9 3 T (E G F P)）との共ラインパターンニングを示す。

[図15]図 1 5 は、ローダミンで標識されたりポソームと接着性細胞（H E K 2 9 3 T (E G F P)）との共ラインパターンニングを示す。

[図16]図 1 6 は、化合物（I - c）をコートしたマイクロ流路において、血中循環癌細胞（C T C）が捕捉及び単離されたことを示す。

[図17]図 1 7 は、化合物（I I - b）で修飾された基板に、光照射により B a / F 3 細胞を固定化できることを示す顕微鏡写真である。

[図18]図 1 8 は、脂質膜結合阻害基として機能し得る置換基の評価結果を示す。

発明を実施するための形態

[0022] 本明細書において、「C₇₋₂₂アルキル基」とは、炭素数 7 ～ 2 2 の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基である。C₇₋₂₂アルキル基の例としては、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル（ステアリル）基、ノナデシル基、イコシル基、ヘニコサニル基、ドコサニル基及びそれらの異性体が挙げられる。

[0023] 本明細書において、「C₁₋₁₀アルキル基」とは、炭素数 1 ～ 1 0 の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基である。C₁₋₁₀アルキル基の例としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基及びそれらの異性体が挙げられる。

[0024] 本明細書において、「C₁₋₁₀アルコキシ基」とは、酸素原子に上記 C₁₋₁₀アル

キル基が置換された基である。 C_{1-10} アルコキシ基の例としては、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、ブトキシ基、ペンチルオキシ基、ヘキシルオキシ基、ヘプチルオキシ基、オクチルオキシ基、ノニルオキシ基、デシルオキシ基及びそれらの異性体が挙げられる。

[0025] 本明細書において「ハロゲン」とは、ハロゲン原子の1価基であり、具体的には例えばフルオロ基、クロロ基、ブロモ基、ヨード基が挙げられる。

[0026] 本明細書において、 C_{7-22} アルキル基中において「隣接する炭素原子は、1～3個の不飽和結合によって連結されていてもよい」とは、炭素数7～22の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキル基中に1～3個の不飽和結合が含まれてもよいことを示す。ここで不飽和結合は二重結合又は三重結合のいずれかである。隣接する炭素原子が1～3個の不飽和結合によって連結された C_{7-22} アルキル基の例としては、例えば、シス-9-ヘキサデセン-1-イル（パルミトレイル）基、トランス-9-オクタデセニル（エライジル）基、シス-9-オクタデセニル（オレイル）基、シス，シス-9，12-オクタデカジエニル（リノレニル）基、（9E，12E，15E）-オクタデカ-9，12，15-トリエニル（エライドリノレニル）基などが挙げられる。

[0027] 本明細書において、「 C_{6-14} アリール基」とは、炭素数6～14の芳香族環式基をいい、具体的には例えば、フェニル基、ナフチル基、アントラセニル基などが挙げられる。

[0028] 本明細書において、「 C_{6-14} アリール C_{7-22} アルキル基」とは、上記「 C_{6-14} アリール基」の置換可能な部分が上記「 C_{6-14} アリール基」で置換された基である。 C_{6-14} アリール C_{7-22} アルキル基の例としては、フェニルヘプチル基、フェニルオクチル基、フェニルノニル基、フェニルデシル基、フェニルウンデシル基、フェニルドデシル基、フェニルトリデシル基、フェニルテトラデシル基、フェニルペンタデシル基、フェニルヘキサデシル基、フェニルヘプタデシル基、フェニルオクタデシル基、フェニルノナデシル基、フェニルイコシル基、フェニルヘニコサニル基、フェニルドコサニル基、ナフチルヘプチル基、ナフチルオクチル基、ナフチルノニル基、ナフチルデシル基、ナフチル

ウンデシル基、ナフチルドデシル基、ナフチルトリデシル基、ナフチルテトラデシル基、ナフチルペンタデシル基、ナフチルヘキサデシル基、ナフチルヘプタデシル基、ナフチルオクタデシル基、ナフチルノナデシル基、ナフチルイコシル基、ナフチルヘニコサニル基、ナフチルドコサニル基、アントラセニルヘプチル基、アントラセニルオクチル基、アントラセニルノニル基、アントラセニルデシル基、アントラセニルウンデシル基、アントラセニルドデシル基、アントラセニルトリデシル基、アントラセニルテトラデシル基、アントラセニルペンタデシル基、アントラセニルヘキサデシル基、アントラセニルヘプタデシル基、アントラセニルオクタデシル基、アントラセニルノナデシル基、アントラセニルイコシル基、アントラセニルヘニコサニル基、アントラセニルドコサニル基などが挙げられる。

- [0029] 本明細書において、「 C_{7-22} アルキル C_{6-14} アリール基」とは、上記「 C_{6-14} アリール基」の置換可能な部分が上記「 C_{7-22} アルキル基」で置換された基である。 C_{7-22} アルキル C_{6-14} アリール基の例としては、ヘプチルフェニル基、オクチルフェニル基、ノニルフェニル基、デシルフェニル基、ウンデシルフェニル基、ドデシルフェニル基、トリデシルフェニル基、テトラデシルフェニル基、ペンタデシルフェニル基、ヘキサデシルフェニル基、ヘプタデシルフェニル基、オクタデシルフェニル基、ノナデシルフェニル基、イコシルフェニル基、ヘニコサニルフェニル基、ドコサニルフェニル基、ヘプチルナフチル基、オクチルナフチル基、ノニルナフチル基、デシルナフチル基、ウンデシルナフチル基、ドデシルナフチル基、トリデシルナフチル基、テトラデシルナフチル基、ペンタデシルナフチル基、ヘキサデシルナフチル基、ヘプタデシルナフチル基、オクタデシルナフチル基、ノナデシルナフチル基、イコシルナフチル基、ヘニコサニルナフチル基、ドコサニルナフチル基、ヘプチルアントラセニル基、オクチルアントラセニル基、ノニルアントラセニル基、デシルアントラセニル基、ウンデシルアントラセニル基、ドデシルアントラセニル基、トリデシルアントラセニル基、テトラデシルアントラセニル基、ペンタデシルアントラセニル基、ヘキサデシルアントラセニル基、ヘプタデ

シルアントラセニル基、オクタデシルアントラセニル基、ノナデシルアントラセニル基、イコシルアントラセニル基、ヘニコサニルアントラセニル基、ドコサニルアントラセニル基などが挙げられる。

[0030] 本明細書において、「オキシ基」とは、それが結合する炭素原子と一緒になってカルボニル基を形成する基のことである。

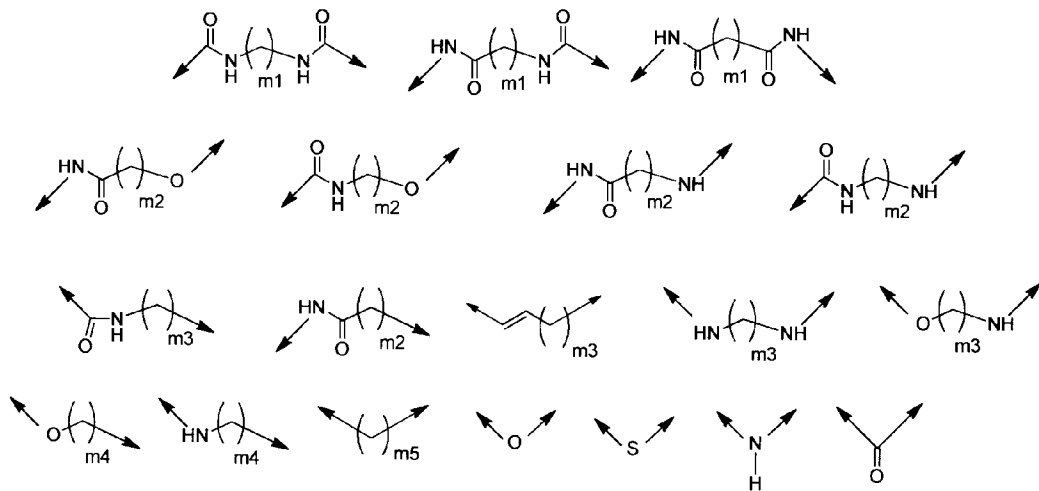
[0031] 本明細書において、「炭素数2～4のオキシアルキレン基」としては、例えばオキシエチレン基、オキシプロピレン基、オキシトリメチレン基、オキシブチレン基、オキシテトラメチレン基などが挙げられる。

[0032] 本明細書において、「C₆₋₁₄アリーレン基」とは、炭素数6～14のアリーレン基のことである。具体的には例えば、フェニレン基、ナフチレン基、アントラニレン基などが挙げられる。

[0033] 本明細書において、「C₁₋₁₀アルキレン基」とは、炭素数1～10の直鎖もしくは分枝鎖状のアルキレン基のことである。具体的には例えば、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、ブチレン基、ペンチレン基、ヘキシレン基、ヘプチレン基、オクチレン基、ノニレン基、デカレン基及びそれらの異性体が挙げられる。

[0034] 本明細書において、C₁₋₁₀アルキレン基について「前記アルキレン基中の炭素原子は1～5個のオキシ基で置換されていてもよく、隣接する炭素原子同士が1～5個の不飽和結合で結ばれていてもよく、そして前記アルキレン基中の炭素原子のうち、1～4個の炭素原子がNH、N(C₁₋₁₀アルキル)、O又はSで置き換えられていてもよい」とは、例えば、以下のような構造を取り得ることを示す。

[化16]

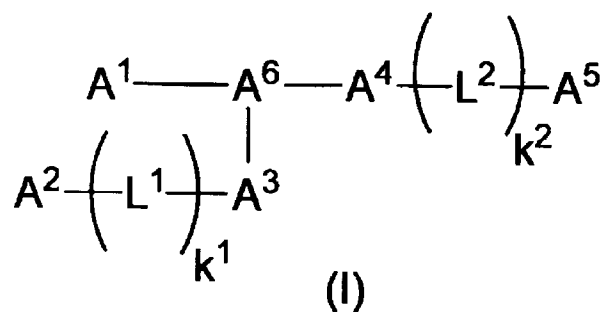


[式中、

m 1 は 0 ～ 6 であり、m 2 は 0 ～ 7 であり、m 3 は 0 ～ 8 であり、m 4 は 0 ～ 9 であり、m 5 は 0 ～ 10 であり、NH は、任意に N (C₁₋₁₀ アルキル) で置き換えられてもよい。]

[0035] 本発明は、以下の式 (I)

[化17]



[式中、

A¹は、脂質膜含有物中の脂質膜と結合する脂質膜結合基であり、

A²は、前記脂質膜結合基の脂質膜への結合を阻害する脂質膜結合阻害基であり、

A³は、光反応基であり、
A⁴は、親水性基であり、
A⁵は、修飾対象基材への反応基であり、
A⁶は、少なくとも3本の結合手を有する足場部位であり、
L¹及びL²は、リンカーであり、
k¹及びk²は、それぞれ独立して0又は1である]

で表される化合物であって、光反応により、脂質膜結合阻害基による結合阻害が解消されて、前記脂質膜結合基が脂質膜に結合可能となる、前記化合物（以下、「本発明の化合物」とも呼ぶ）に関する。

[0036] 本明細書中、「脂質膜含有物」とは、任意の脂質膜を含む物質のことである。ここで「脂質膜」とは膜状の脂質のことである。本明細書中、「脂質」とは、水に溶けにくく、有機溶媒に溶けやすい物質群をいう。通常、脂質には、長鎖脂肪酸及びその誘導体、または類似体が含まれるが、本明細書においては、ステロイド、カロテノイド、テルペノイド、イソプレノイド、脂溶性ビタミンなどの有機化合物群もまた包含される。脂質としては、例えば、
1) 単純脂質（脂肪酸とアルコールとのエステルで中性脂質ともいう。例えば、油脂（トリアシルグリセロール）、蠟（ワックス、高級アルコールの脂肪酸エステル）、ステロールエステル、ビタミンの脂肪酸エステルなどが挙げられる）；2) 複合脂質（エステル結合あるいはアミド結合を有し、脂肪酸とアルコールのほかにリン酸、糖、硫酸、アミンなど極性基をもつ化合物のことである。例えばリン脂質（グリセロリン脂質及びスフィンゴリン脂質など）、糖脂質（グリセロ糖脂質及びスフィンゴ糖脂質など）、リポタンパク質、スルホ脂質などが含まれる）；3) 誘導脂質（単純脂質および複合脂質の加水分解によって生成する化合物のうち脂溶性のものをいい、脂肪酸、高級アルコール、脂溶性ビタミン、ステロイド、炭化水素などが含まれる）が挙げられるが、それらに限定されない。

[0037] 脂質膜含有物としては特に限定されないが、脂質膜で被覆された構造体（例えば、細胞、細胞小器官、小胞、ウイルス、リポソーム、ミセル及び脂質

で被覆された量子ドット)が挙げられる。細胞としては、例えば、動物細胞、プロトプラスト化された植物細胞、及び微生物などが挙げられる。細胞は、接着性細胞であっても非接着性細胞であってもよい。

[0038] 本明細書中、「脂質膜結合基」とは、脂質膜含有物の脂質膜に対して非共有結合的に結合する基のことである。脂質膜結合基としては特に限定されないが、例えば、 C_{7-30} アルキル基（好ましくは C_{7-22} アルキル基）、 C_{6-14} アリール基、 C_{6-14} アリール C_{7-30} アルキル基（好ましくは C_{6-14} アリール C_{7-22} アルキル基）、及び C_{7-30} アルキル C_{6-14} アリール基（好ましくは C_{6-14} アリール C_{7-22} アルキル基）などの疎水性基が挙げられる。ここで前記 C_{7-30} アルキル基中の隣接する炭素原子は、1～3個の不飽和結合によって連結されていてもよい。脂質膜結合基としては、疎水性基が好ましい。また脂質膜結合基としては、隣接する炭素原子が1～3個の不飽和結合によって連結されていてもよい C_{7-30} アルキル基、隣接する炭素原子が1～3個の不飽和結合によって連結されていてもよい C_{7-22} アルキル基、又は隣接する炭素原子が1～3個の不飽和結合によって連結されていてもよい C_{11-22} アルキル基、又は隣接する炭素原子が1～3個の不飽和結合によって連結されていてもよい C_{16-18} アルキル基がより好ましい。また脂質膜結合基としては、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル（ステアシル）基、シス-9-ヘキサデセニル（パルミトレイル）基、シス-8-ヘプタデセニル基、トランス-8-ヘプタデセニル基、トランス-9-オクタデセニル（エライジル）基、シス-9-オクタデセニル（オレイル）基、シス、シス-9, 12-オクタデカジエニル（リノレニル）基、(9E, 12E, 15E)-オクタデカ-9, 12, 15-トリエニル（エライドリノレニル）基がさらに好ましく、シス-8-ヘプタデセニル基、オレイル基が特に好ましい。

[0039] 本明細書中、「脂質膜結合阻害基」とは、脂質膜結合基の脂質膜への結合を物理的に又は化学的に阻害する基のことである。脂質膜結合阻害基の構造は、脂質膜結合基の構造と同一であっても異なってもよい。脂質膜結合阻害基としては、特に限定されないが、例えば C_{7-30} アルキル基（好ましくは C_{7-22}

アルキル基)、 C_{6-14} アリール基、 C_{6-14} アリール C_{7-30} アルキル基(好ましくは C_{6-14} アリール C_{7-22} アルキル基)、及び C_{7-30} アルキル C_{6-14} アリール基(好ましくは C_{7-22} アルキル C_{6-14} アリール基)、コレステリル基などの疎水性基が挙げられる。ここで前記 C_{7-30} アルキル基中の隣接する炭素原子は、1～3個の不飽和結合によって連結されていてもよい。脂質膜結合阻害基としては、疎水性基が好ましい。また脂質膜結合阻害基としては、隣接する炭素原子が1～3個の不飽和結合によって連結されていてもよい C_{7-30} アルキル基、隣接する炭素原子が1～3個の不飽和結合によって連結されていてもよい C_{7-22} アルキル基、又は隣接する炭素原子が1～3個の不飽和結合によって連結されていてもよい C_{11-22} アルキル基、又は隣接する炭素原子が1～3個の不飽和結合によって連結されていてもよい C_{16-18} アルキル基がより好ましい。また脂質膜結合阻害基としては、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル(ステアリル)基、シス-9-ヘキサデセニル(パルミトレイル)基、シス-8-ヘプタデセニル基、トランス-8-ヘプタデセニル基、トランス-9-オクタデセニル(エライジル)基、シス-9-オクタデセニル(オレイル)基、シス, シス-9, 12-オクタデカジエニル(リノレニル)基、(9E, 12E, 15E)-オクタデカ-9, 12, 15-トリエニル(エライドリノレニル)基がさらに好ましく、シス-8-ヘプタデセニル基、オレイル基が特に好ましい。

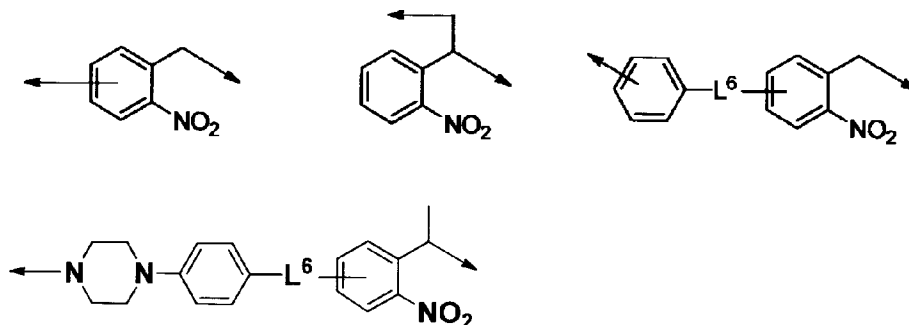
[0040] 本明細書中、「光反応基」とは、光反応によって当該光反応基中の結合が切断されるか、又はその構造が変化する基のことである。

[0041] 光反応によって脂質膜結合阻害基による物理的又は化学的結合阻害が解消されて、本発明の化合物中の脂質膜結合基は、脂質膜に結合可能となる。一の実施形態において、光反応基は、光反応によって、脂質膜結合阻害基と連結されたまま足場部位から切り出される。これにより、脂質膜結合阻害基による結合阻害が解消される。本実施形態において使用され得る光反応基は、足場部位から切り出される限り特に限定されないが、例えば、2-ニトロベンジル骨格、クマリン-4-イルメチル骨格、フェニルカルボニルメチル骨

格又は7-ニトロインドリノカルボニル骨格を有する二価の基である。

[0042] 本明細書中、「2-ニトロベンジル骨格を有する二価の基」とは、以下の構造又はその誘導体構造を有する二価の基である。

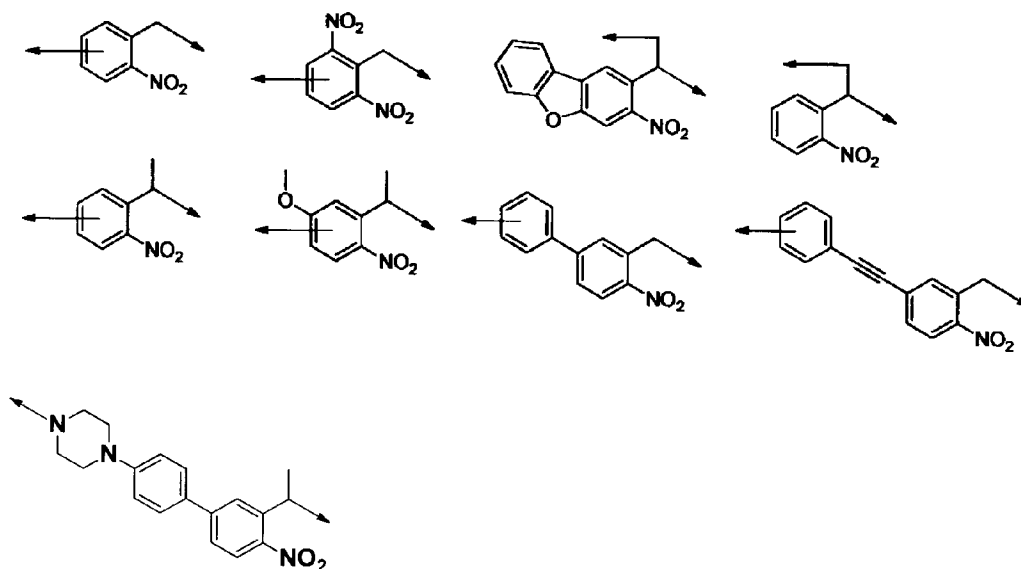
[化18]



[式中、右側の矢印は足場部位への連結を示し、左側の矢印は、 k^1 が0の場合には A^2 への連結を示し、 k^1 が1の場合には L^1 への連結を示し、 L^6 はエチニレン基であるか、又は存在しない。]

[0043] 2-ニトロベンジル骨格を有する二価の基としては、以下のものが好ましい。

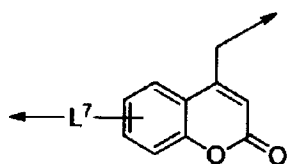
[化19]



[式中、右側の矢印は足場部位への連結を示し、左側の矢印は、 k^1 が0の場合には A^2 への連結を示し、 k^1 が1の場合には L^1 への連結を示す。]

[0044] 本明細書中、「クマリンー4-イルメチル骨格を有する二価の基」とは、以下の構造又はその誘導体構造を有する二価の基である。

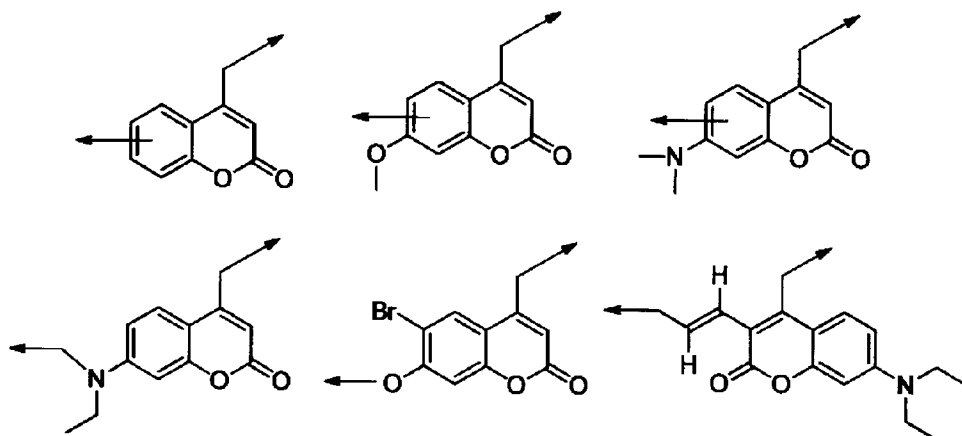
[化20]



[式中、右側の矢印は足場部位への連結を示し、左側の矢印は、 k^1 が0の場合には A^2 への連結を示し、 k^1 が1の場合には L^1 への連結を示し、 L^7 は、 C_{1-10} アルキレン基であるか又は存在せず、ここで前記アルキレン基中の炭素原子は1～5個のオキシ基で置換されていてもよく、隣接する炭素原子同士が1～5個の不飽和結合で結ばれていてもよく、そして前記アルキレン基中の炭素原子のうち、1～4個の炭素原子がNH、N(C_{1-10} アルキル)、O又はSで置き換えられていてもよい。]

[0045] クマリンー4-イルメチル骨格を有する二価の基としては、以下のものが好ましい。

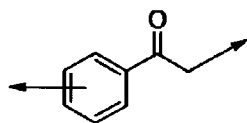
[化21]



[式中、右側の矢印は足場部位への連結を示し、左側の矢印は、 k^1 が0の場合には A^2 への連結を示し、 k^1 が1の場合には L^1 への連結を示す。]

[0046] 本明細書中、「フェニルカルボニルメチル骨格を有する二価の基」とは、以下の構造又はその誘導体構造を有する二価の基である。

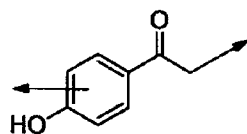
[化22]



[式中、右側の矢印は足場部位への連結を示し、左側の矢印は、 k^1 が0の場合には A^2 への連結を示し、 k^1 が1の場合には L^1 への連結を示す。]

[0047] フェニルカルボニルメチル骨格を有する二価の基としては、以下のものが好ましい。

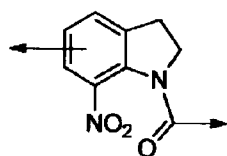
[化23]



[式中、右側の矢印は足場部位への連結を示し、左側の矢印は、 k^1 が0の場合には A^2 への連結を示し、 k^1 が1の場合には L^1 への連結を示す。]

[0048] 本明細書中、「7-ニトロインドリノカルボニル骨格を有する二価の基」とは、以下の構造又はその誘導体構造を有する二価の基である。

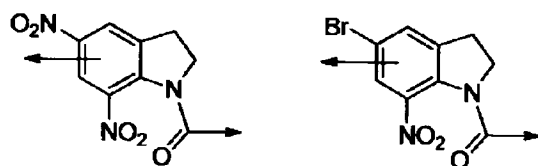
[化24]



[式中、右側の矢印は足場部位への連結を示し、左側の矢印は、 k^1 が0の場合には A^2 への連結を示し、 k^1 が1の場合には L^1 への連結を示す。]

[0049] 7-ニトロインドリノカルボニル骨格を有する二価の基としては、以下のものが好ましい。

[化25]



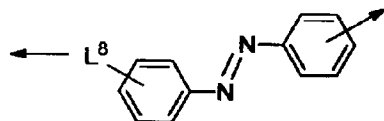
[式中、右側の矢印は足場部位への連結を示し、左側の矢印は、 k^1 が0の場合には A^2 への連結を示し、 k^1 が1の場合には L^1 への連結を示す。]

[0050] また別の実施形態において、光反応によって、光反応基の構造が変化し、それに伴って光反応基に連結した脂質膜結合障害基と脂質膜結合基との間の距離が離れる。これにより、脂質膜結合障害基による結合障害が解消される。本実施形態において使用され得る光反応基は、光反応によって脂質膜結合障害基による結合障害を解消するものであれば特に限定されないが、例えば、アゾベンゼン骨格、フルギド骨格、スピロピラン骨格、スピロオキサジン

骨格又はジアリールエテン骨格を有する二価の基である。

[0051] 本明細書中、「アゾベンゼン骨格を有する二価の基」とは、以下の構造又はその誘導体構造を有する二価の基である。

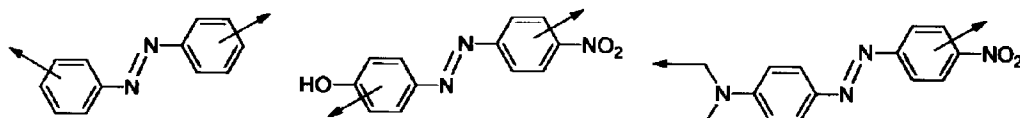
[化26]



[式中、右側の矢印は足場部位への連結を示し、左側の矢印は、 k^1 が0の場合には A^2 への連結を示し、 k^1 が1の場合には L^1 への連結を示し、 L^8 は、 C_{1-10} アルキレン基であるか、又は存在せず、ここで前記アルキレン基中の炭素原子は1～5個のオキシ基で置換されていてもよく、隣接する炭素原子同士が1～5個の不飽和結合で結ばれていてもよく、そして前記アルキレン基中の炭素原子のうち、1～4個の炭素原子がNH、N(C_{1-10} アルキル)、O又はSで置き換えられていてもよい。]

[0052] アゾベンゼン骨格を有する二価の基としては、以下のものが好ましい。

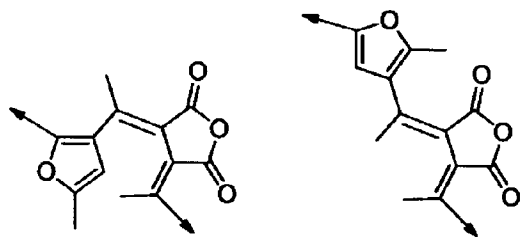
[化27]



[式中、右側の矢印は足場部位への連結を示し、左側の矢印は、 k^1 が0の場合には A^2 への連結を示し、 k^1 が1の場合には L^1 への連結を示す。]

[0053] 本明細書中、「フルギド骨格を有する二価の基」とは、以下の構造又はその誘導体構造を有する二価の基である。

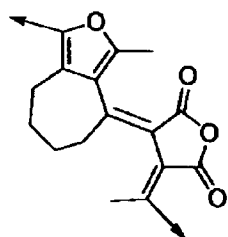
[化28]



[式中、右側の矢印は足場部位への連結を示し、左側の矢印は、 k^1 が0の場合には A^2 への連結を示し、 k^1 が1の場合には L^1 への連結を示す。]

[0054] フルギド骨格を有する二価の基としては、以下のものが好ましい。

[化29]



[式中、右側の矢印は足場部位への連結を示し、左側の矢印は、 k^1 が0の場合には A^2 への連結を示し、 k^1 が1の場合には L^1 への連結を示す。]

[0055] 本明細書中、「スピロピラン骨格を有する二価の基」とは、以下の構造又はその誘導体構造を有する二価の基である。

[化30]

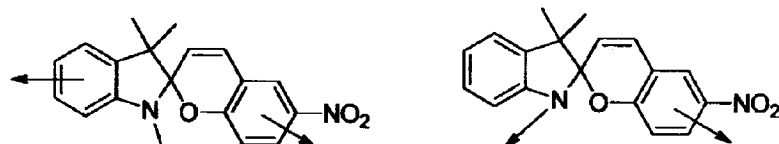


[式中、右側の矢印は足場部位への連結を示し、左側の矢印は、 k^1 が0の場合

合には A^2 への連結を示し、 k^1 が 1 の場合には L^1 への連結を示す。]

[0056] スピロピラン骨格を有する二価の基としては、以下の骨格が好ましい。

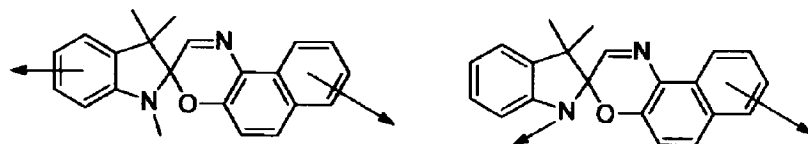
[化31]



[式中、右側の矢印は足場部位への連結を示し、左側の矢印は、 k^1 が 0 の場合には A^2 への連結を示し、 k^1 が 1 の場合には L^1 への連結を示す。]

[0057] 本明細書中、「スピロオキサジン骨格を有する二価の基」とは、以下の構造又はその誘導体構造を有する二価の基である。

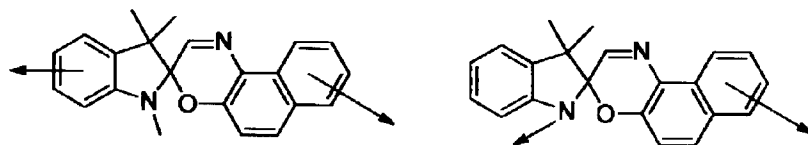
[化32]



[式中、右側の矢印は足場部位への連結を示し、左側の矢印は、 k^1 が 0 の場合には A^2 への連結を示し、 k^1 が 1 の場合には L^1 への連結を示す。]

[0058] スピロオキサジン骨格を有する二価の基としては、以下のものが好ましい。

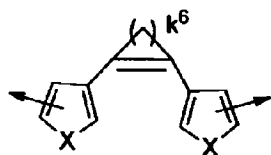
[化33]



[式中、右側の矢印は足場部位への連結を示し、左側の矢印は、 k^1 が0の場合には A^2 への連結を示し、 k^1 が1の場合には L^1 への連結を示す。]

[0059] 本明細書中、「ジアリールエテン骨格を有する二価の基」とは、以下の構造又はその誘導体構造を有する二価の基である。

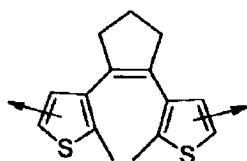
[化34]



[式中、XはS、NH、N (C_{1-10} アルキル) 又はOであり、右側の矢印は足場部位への連結を示し、左側の矢印は、 k^1 が0の場合には A^2 への連結を示し、 k^1 が1の場合には L^1 への連結を示し、 k^6 は1～6を示す。]

[0060] ジアリールエテン骨格を有する二価の基としては、以下のものが好ましい。

[化35]

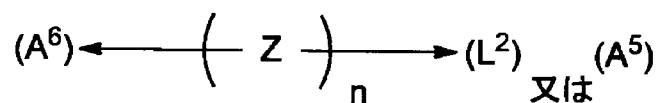


[式中、右側の矢印は足場部位への連結を示し、左側の矢印は、 k^1 が0の場合には A^2 への連結を示し、 k^1 が1の場合には L^1 への連結を示す。]

[0061] 本明細書中、「親水性基」とは、水溶性の化合物残基を含む二価の基であり、好ましくは水溶性の高分子化合物残基を含む二価の基である。そのような残基を与える化合物は特に限定されないが、例えばポリアルキレングリコール、ポリサッカライド、ポリ乳酸、ポリビニルアルコール、ポリペプチド、ポリアクリル酸及びポリアクリルアミドなどが挙げられる。

[0062] 本発明の化合物の「親水性基」は、好ましくは以下の構造を有する：

[化36]



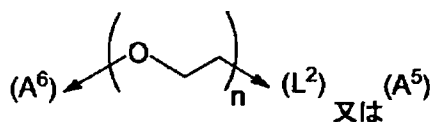
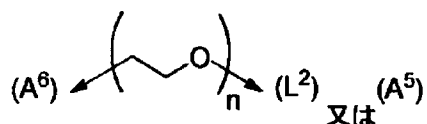
[式中、

Zは、炭素数2～4のオキシアルキレン基であり、nは炭素数2～4のオキシアルキレン基の平均付加モル数を示し、かつ $2 \leq n \leq 500$ であり、

左側の矢印は、 A^6 への連結を示し、右側の矢印は、 k^2 が0の場合には A^5 への連結を示し、 k^2 が1の場合には L^2 への連結を示す。]

[0063] 上記式において、Zはオキシエチレン基が好ましい。すなわち、親水性基は以下の2つの構造のいずれかであることが好ましい。

[化37]



[式中、

Zは、nは炭素数2～4のオキシアルキレン基の平均付加モル数を示し、かつ $2 \leq n \leq 500$ であり、

左側の矢印は、 A^6 への連結を示し、右側の矢印は、 k^2 が0の場合には A^5 への連結を示し、 k^2 が1の場合には L^2 への連結を示す。]

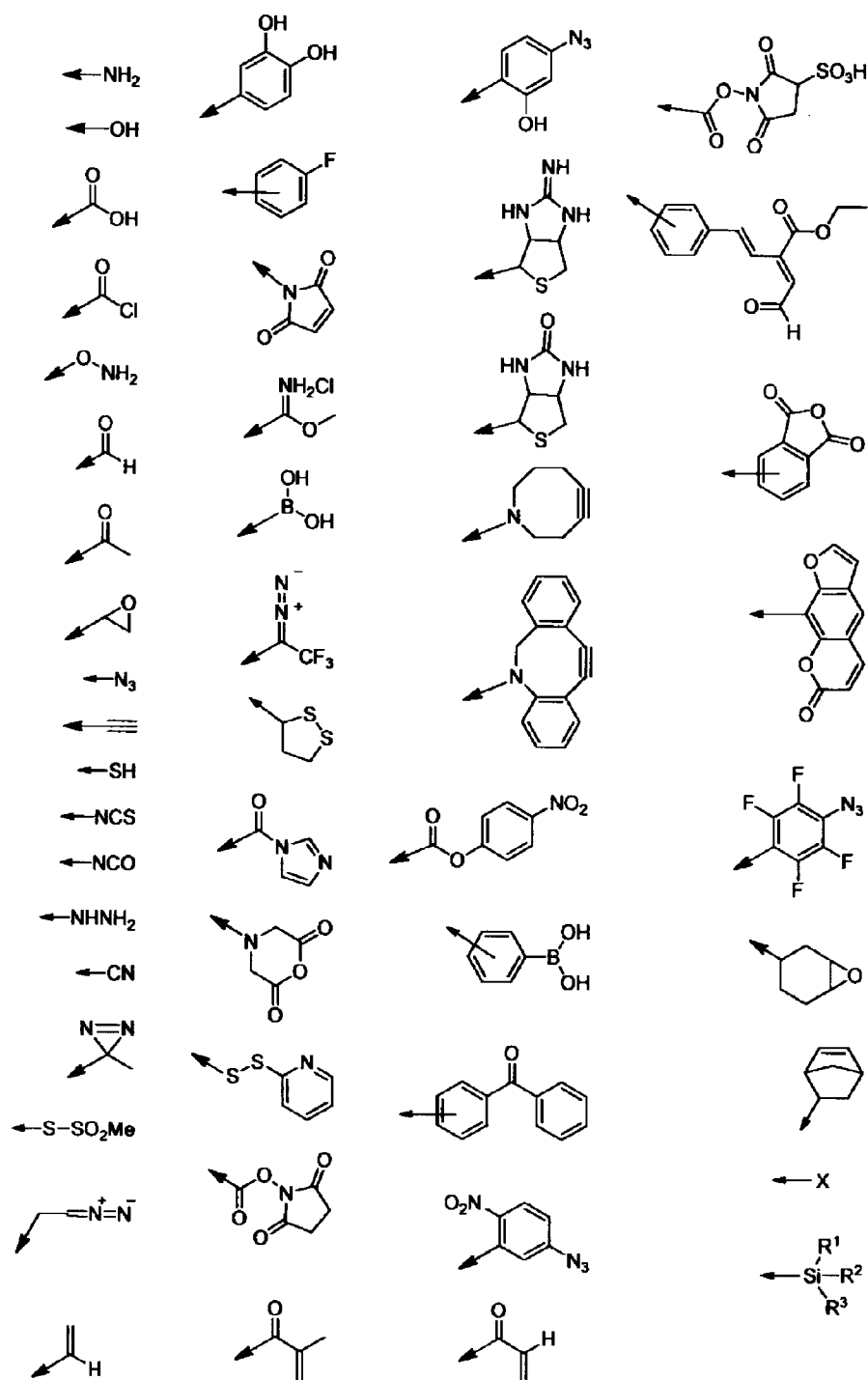
[0064] 上記式において、nの数だけオキシアルキレン基が存在するが、このオキシアルキレン基は1種単独であってもよく、あるいは2種以上が組み合わせ

れていてもよい。2種以上が組み合わせられる場合には、その組み合わせ方に制限はない。またオキシアルキレン基はブロック状であってもランダム状であってもよい。全オキシアルキレン基に対するオキシエチレン基の比率は50～100モル%である場合、良好な水溶性が得られる点で好ましい。

[0065] 上記式において、 n は $45 \leq n \leq 500$ が好ましく、 $45 \leq n \leq 200$ がより好ましい。

[0066] 本明細書中、「修飾対象基材への反応基」（以下、単に「反応基」とも呼ぶ）とは、修飾対象基材と共有結合的に又は非共有結合的に反応して、本発明の化合物を当該修飾対象基材上に固定化するための基である。反応基と修飾対象基材との反応が共有結合である場合、修飾対象基材は反応基と共有結合可能な官能基を少なくとも一つ有する。そのような共有結合可能な官能基としては、例えば以下のものが挙げられる。

[化38]

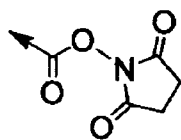


[式中、矢印は修飾対象基材との連結を示す。]

[0067] 共有結合性の「修飾対象基材への反応基」としては、修飾対象基材に含ま

[式中、
 矢印は、 k^2 が0の場合には A^4 への連結を示し、 k^2 が1の場合には L^2 への連結を示し、
 X はハロゲンであり、 R^1 、 R^2 及び R^3 はそれぞれ独立して、 C_{1-10} アルキル、ハロゲン、 C_{1-10} アルコキシからなる群から選択される。]
 この中でも、カルボキシル基及び以下の置換基が好ましい。

[化40]



[0068] 本発明の化合物の「修飾対象基材への反応基」（以下、単に「反応基」とも呼ぶ。）を、修飾対象基材と非共有結合的に反応させて固定化する例として、例えば以下が挙げられる。

(i) 本願発明の化合物の反応基として疎水性置換基を採用し、疎水性置換基を含む修飾対象基材との疎水性相互作用により固定化する場合。

(ii) 本願発明の化合物の反応基としてポリペプチドや核酸を採用し、それらと結合可能な物質を含む修飾対象基材と反応させて固定化する場合（例えば、相補的なDNA鎖の組み合わせ；ビオチンとアビジンとの組み合わせなど）。

(iii) 本願発明の化合物の反応基として超分子（例えばシクロデキストリン）を認識可能な小分子（例えばフェロセン）を採用し、超分子を含む修飾対象基材と反応させて固定化する場合。

[0069] 本明細書中、本発明の化合物の「修飾対象基材」としては、特に限定されないが、例えば、基板（本発明の化合物が修飾されるべき部位がプレート状又はフィルム状のもの、例えばスライドガラス、ディッシュ、マイクロプレート、マイクロアレイ用基板）、担体（例えばビーズ）、繊維状構造物、管、容器（例えば試験管及びバイアル）などが挙げられる。修飾対象基材の原

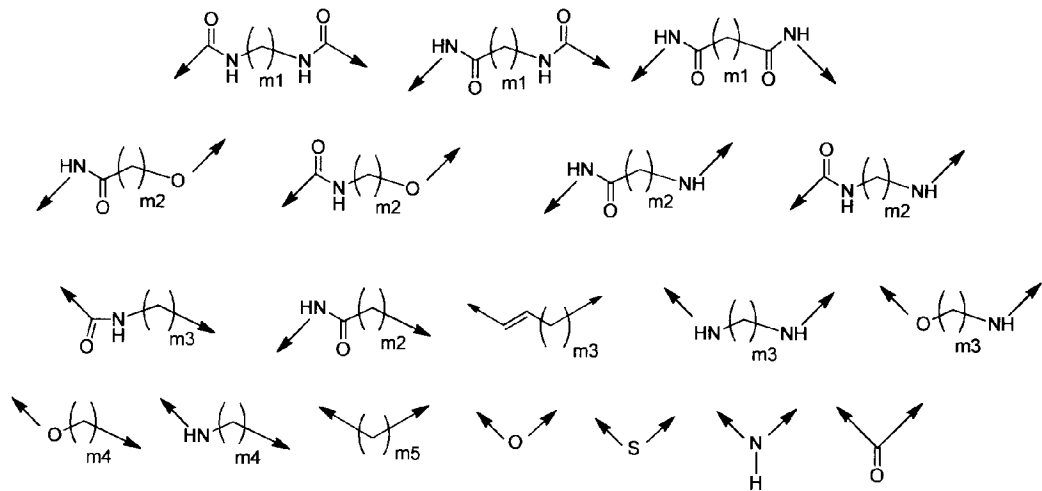
料としては、ガラス；セメント；陶磁器等のセラミックスもしくはファインセラミックス；ポリエチレンテレフタレート、酢酸セルロース、ポリカーボネート、ポリスチレン及びポリメチルメタクリレートなどのポリマー樹脂；ポリペプチド及びタンパク質などの生体材料；シリコン；活性炭；多孔質ガラス；多孔質セラミックス；多孔質シリコン；多孔質活性炭；不織布；濾紙；メンブレンフィルター；金などの導電性材料、などが挙げられる。修飾対象基材の表面は、アミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシ基などを導入するため、ポリ陽イオンなどのポリマーによる被覆処理、あるいは基材表面への導入置換基を有するシランカップリング剤による処理が施されていてもよい。あるいはプラズマ処理により反応性官能基が導入されていてもよい。本発明の化合物の「修飾対象基材」として、ウシ血清アルブミン（BSA）、 γ -アミノプロピルトリエトキシシラン（APTES）及びコラーゲンからなる群から選択される少なくとも1つで被覆された基材が好ましい。

[0070] 本発明の化合物は、 A^2 と A^3 との間にリンカー L^1 が存在してもよく、そして A^4 と A^5 との間に、リンカー L^2 が存在してもよい。本明細書において「リンカー」とは、二つの官能基を連結するための二価の基である。リンカーとしては特に限定されないが、例えば、 C_{6-14} アリーレン基又は C_{1-10} アルキレン基である。ここで前記アルキレン基中の炭素原子は1～5個のオキシ基で置換されていてもよく、隣接する炭素原子同士が1～5個の不飽和結合で結ばれていてもよく、そして前記アルキレン基中の炭素原子のうち、1～4個の炭素原子がNH、N（ C_{1-10} アルキル）、O又はSで置き換えられていてもよい。

[0071] 本発明の化合物中、 L^1 と A^2 の間及び L^1 と A^3 の間、ならびに L^2 と A^4 の間及び L^2 と A^5 の間は、それぞれ独立して、アルキレン構造、アミド構造、エステル構造、アミノ構造、及びエーテル構造からなる群から選択される構造を有することが好ましい。

[0072] 「リンカー」である L^1 及び L^2 としては、例えば、以下の式：

[化41]



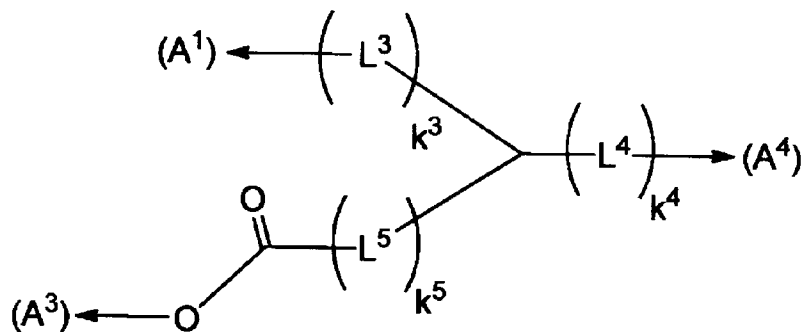
[式中、

m_1 は 0～6 であり、 m_2 は 0～7 であり、 m_3 は 0～8 であり、 m_4 は 0～9 であり、 m_5 は 0～10 であり、NH は、任意に N (C_{1-10} アルキル) で置き換えられてもよい]

で表される構造を有することが好ましい。

[0073] 本明細書中、「足場部位」とは、少なくとも 3 本の結合手を有する化学構造のことである。当該足場部位が、脂質膜結合基、光反応基及び親水性基と連結することにより、本発明の化合物が形成される。足場部位としては特に限定されないが、例えば以下の構造を有する：

[化42]



[式中、

L^3 、 L^4 及び L^5 は、それぞれ独立して、 C_{6-14} アリーレン基又は C_{1-10} アルキレン基であり、ここで前記アルキレン基中の炭素原子は1～5個のオキシ基で置換されていてもよく、隣接する炭素原子同士が1～5個の不飽和結合で結ばれていてもよく、そして前記アルキレン基中の炭素原子のうち、1～4個の炭素原子がNH、N (C_{1-10} アルキル)、O又はSで置き換えられていてもよく、

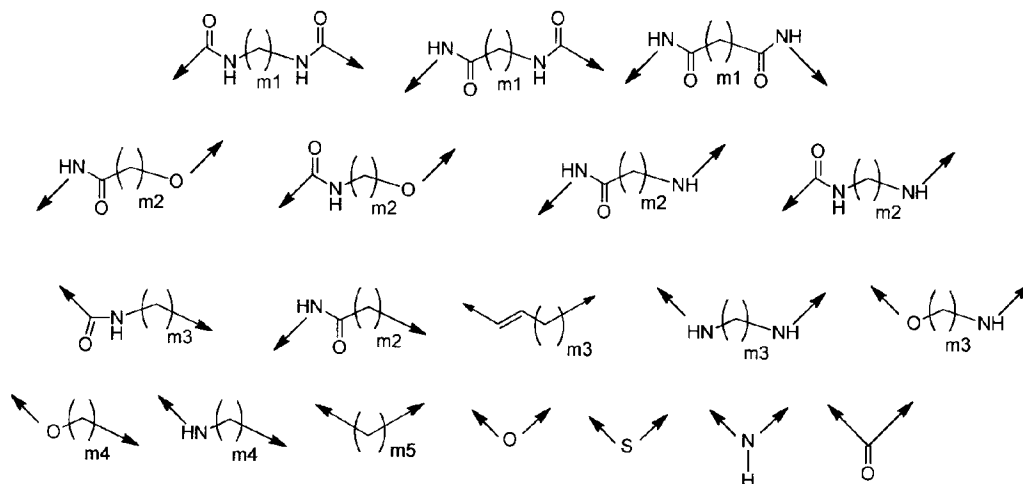
k^3 、 k^4 及び k^5 は、それぞれ独立して0又は1であり、

(A^1)、(A^3)及び(A^4)への矢印はそれぞれ、 A^1 、 A^3 及び A^4 への連結を示す。]

[0074] 上記式において、 L^3 と A^1 との間、及び L^4 と A^4 の間は、それぞれ独立して、アルキレン構造、アミド構造、エステル構造、アミノ構造、及びエーテル構造からなる群から選択される構造を有することが好ましい。

[0075] 上記式において、 L^3 、 L^4 及び L^5 としては、例えば、以下の式：

[化43]



[式中、

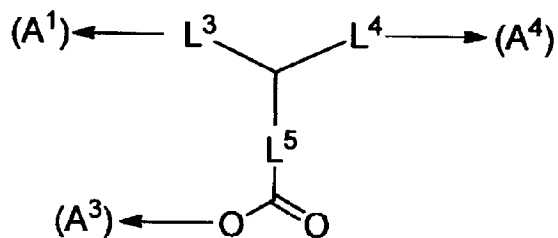
m_1 は0～6であり、 m_2 は0～7であり、 m_3 は0～8であり、 m_4 は0～9であり、 m_5 は0～10であり、NHは、任意にN (C_{1-10} アルキル)で

置き換えられてもよい]

で表される構造を有することが好ましい。

[0076] 足場部位として、好ましくは、

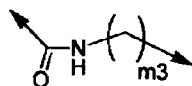
[化44]



[式中、

L^3 は

[化45]



(式中、

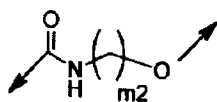
m_3 は0～8であり、

左側の矢印は脂質膜結合基への連結を示し、右側の矢印は足場部位の中心炭素への連結を示す)

であり、

L^4 は、

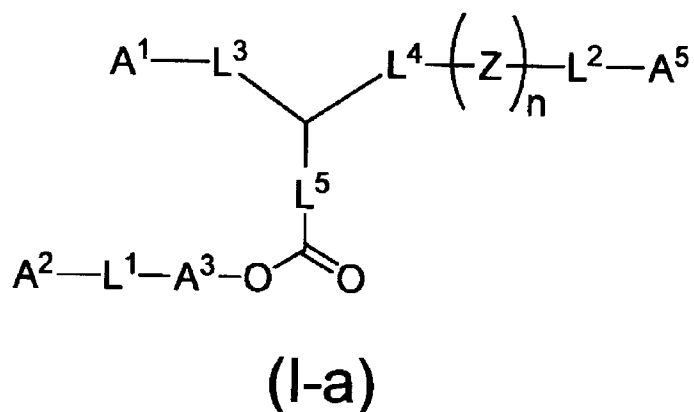
[化46]



(式中、
 m_2 は 0 ～ 7 であり、
 左側の矢印は足場部位の中心炭素への連結を示し、右側の矢印は親水性基への連結を示す)
 であり、
 L^5 は、NH である]
 である。

[0077] 式 (I) の好ましい化合物として、以下の式 (I-a) :

[化47]

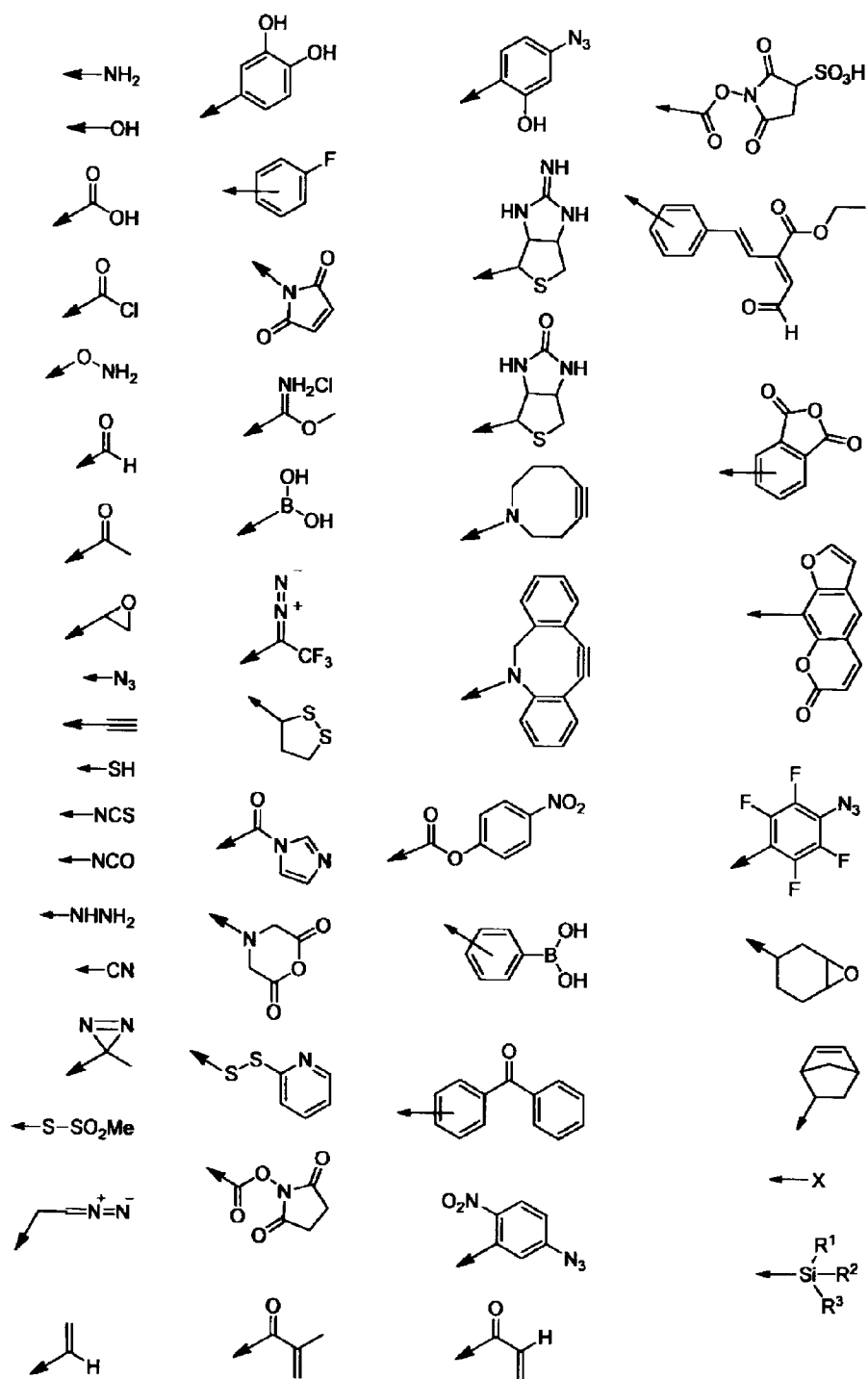


[式中、
 A^1 及び A^2 が、それぞれ独立して C_{7-22} アルキル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{6-14} アリール C_{7-22} アルキル基及び C_{7-22} アルキル C_{6-14} アリール基からなる群から選択され、ここで前記 C_{7-22} アルキル基中の隣接する炭素原子は、1 ～ 3 個の不飽和結合によって連結されていてもよく、
 $L^1 \sim L^5$ が、それぞれ独立して、 C_{6-14} アリーレン基又は C_{1-10} アルキレン基であり、ここで前記アルキレン基中の炭素原子は 1 ～ 5 個のオキソ基で置換されていてもよく、隣接する炭素原子同士が 1 ～ 5 個の不飽和結合で結ばれていてもよく、そして前記アルキレン基中の炭素原子のうち、1 ～ 4 個の炭素原子が NH、N (C_{1-10} アルキル)、O 又は S で置き換えられていてもよく、

A³が、ニトロベンゼン骨格、クマリン骨格、ヒドロキシフェナンシル骨格、ニトロインドリン骨格、アゾベンゼン骨格、フルギド骨格、スピロピラン骨格、スピロオキサジン骨格及びジアリールエテン骨格からなる群から選択される骨格を有する二価の基であり、

A⁵が、以下の置換基：

[化48]



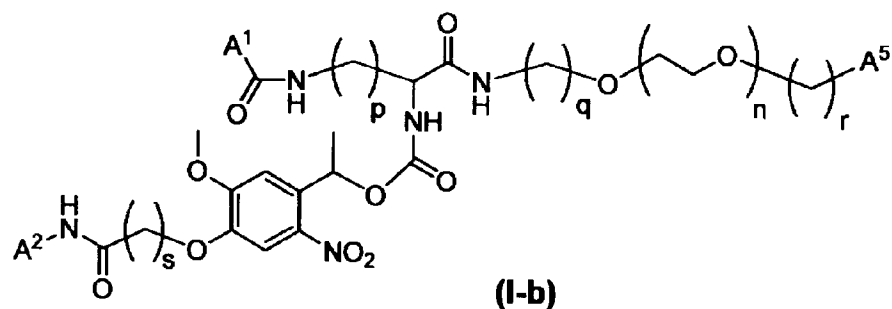
[式中、

矢印は、 L^2 への連結を示し、

Xはハロゲンであり、 R^1 、 R^2 及び R^3 はそれぞれ独立して、 C_{1-10} アルキル、ハロゲン、 C_{1-10} アルコキシからなる群から選択される) からなる群から選択される] で表される化合物が挙げられる。

[0078] 式(1)のより好ましい化合物として、以下の式(1-b)：

[化49]



[式中、

A^1 及び A^2 は、それぞれ独立して C_{7-22} アルキル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{6-14} アリール C_{7-22} アルキル基及び C_{7-22} アルキル C_{6-14} アリール基からなる群から選択され、ここで前記 C_{7-22} アルキル基中の隣接する炭素原子は、1～3個の不飽和結合によって連結されていてもよく、

n はオキシエチレン基の平均付加モル数を示し、かつ $45 \leq n \leq 500$ であり、

p は0～8であり、

q 及び s は、それぞれ独立して0～7であり、

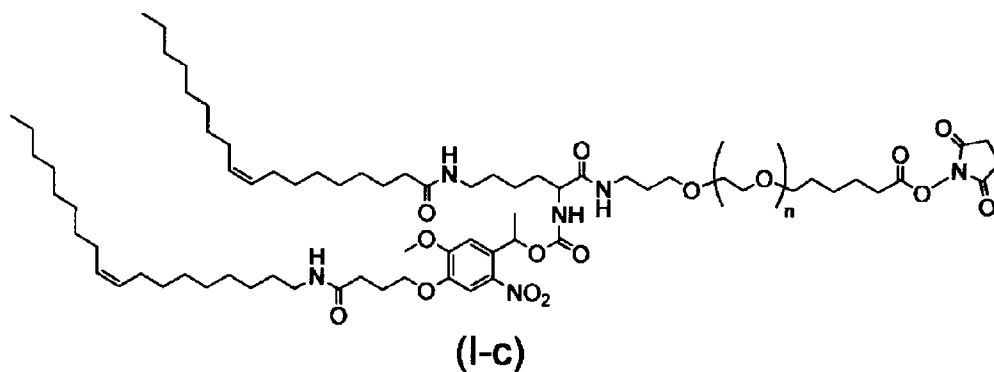
r は0～10であり、

A^5 は、以下の置換基：

Xはハロゲンであり、 R^1 、 R^2 及び R^3 はそれぞれ独立して、 C_{1-10} アルキル、ハロゲン、 C_{1-10} アルコキシからなる群から選択される)からなる群から選択される]で表される化合物が挙げられる。

[0079] 式(1)のさらに好ましい化合物として、以下の式(1-c)：

[化51]

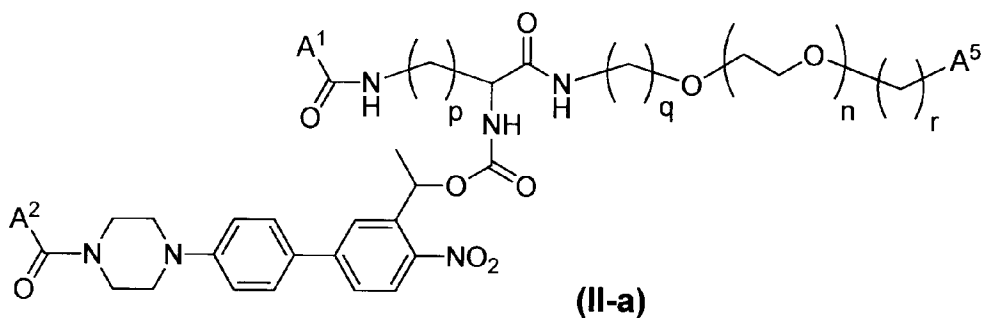


[式中、 n はオキシエチレン基の平均付加モル数を示し、かつ $4.5 \leq n \leq 50.0$ である]

で表される化合物が挙げられる。

[0080] また、式(1)の好ましい化合物として、以下の式(II-a)：

[化52]



[式中、

A^1 及び A^2 が、それぞれ独立して C_{7-22} アルキル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{6-14} ア

リール C_{7-22} アルキル基及び C_{7-22} アルキル C_{6-14} アリール基からなる群からから選択され、ここで前記 C_{7-22} アルキル基中の隣接する炭素原子は、1～3個の不飽和結合によって連結されていてもよく、

n はオキシエチレン基の平均付加モル数を示し、かつ $45 \leq n \leq 500$ であり、

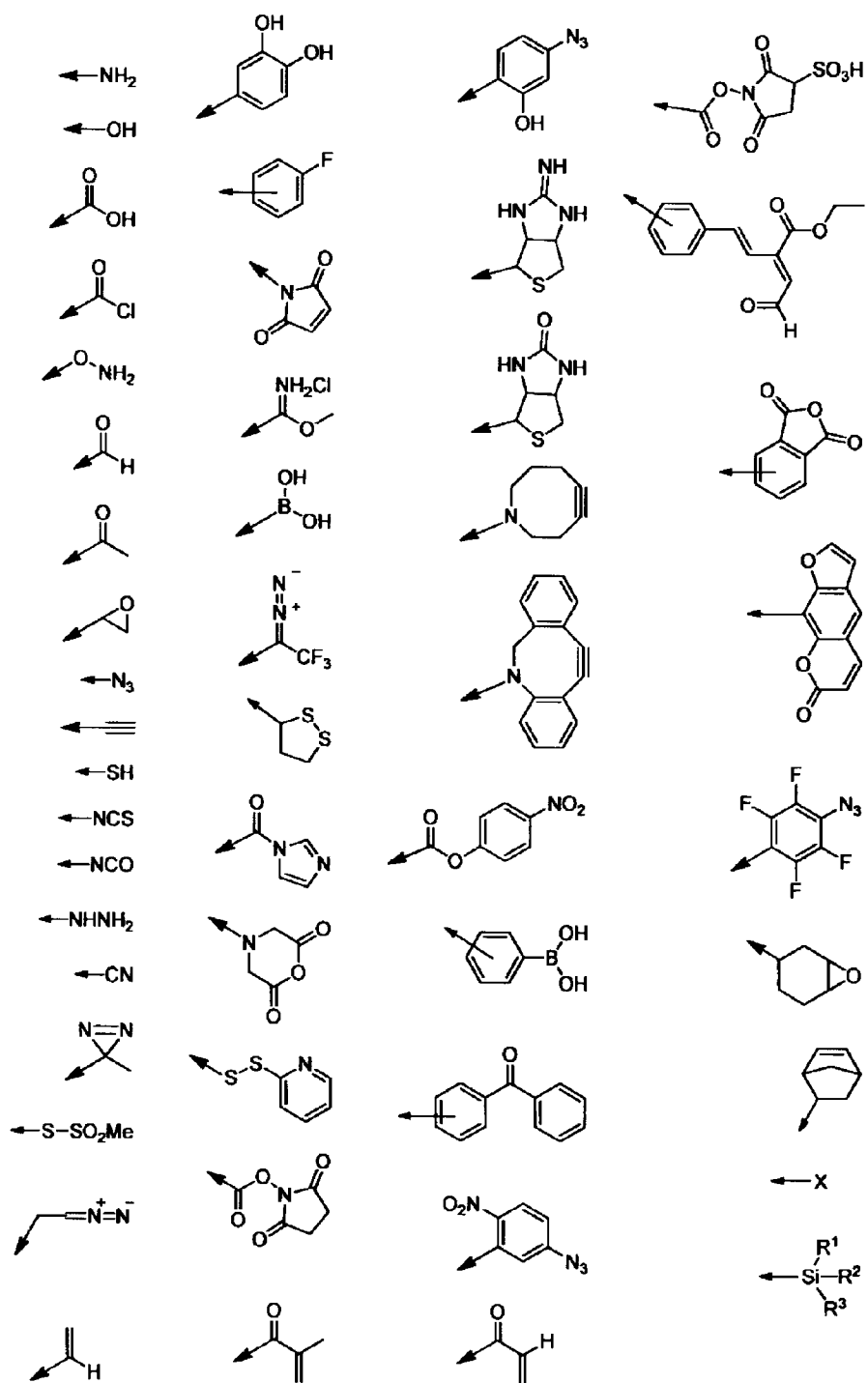
p は 0～8 であり、

q は、それぞれ独立して 0～7 であり、

r は 0～10 であり、

A^5 が、以下の置換基：

[化53]



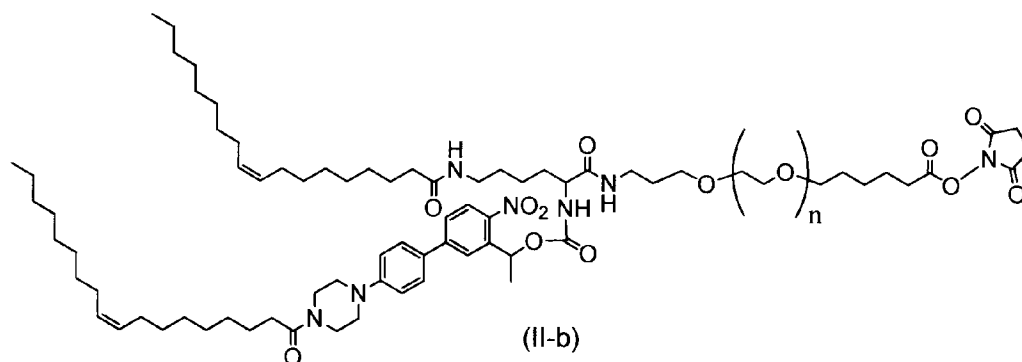
(式中、

矢印は、化合物の残りの部分への連結を示し、

Xはハロゲンであり、 R^1 、 R^2 及び R^3 はそれぞれ独立して、 C_{1-10} アルキル基、ハロゲン、 C_{1-10} アルコキシ基からなる群から選択される)からなる群から選択される]
で表される化合物が挙げられる。

[0081] 式(II-a)の好ましい化合物として、以下の式(II-b)：

[化54]

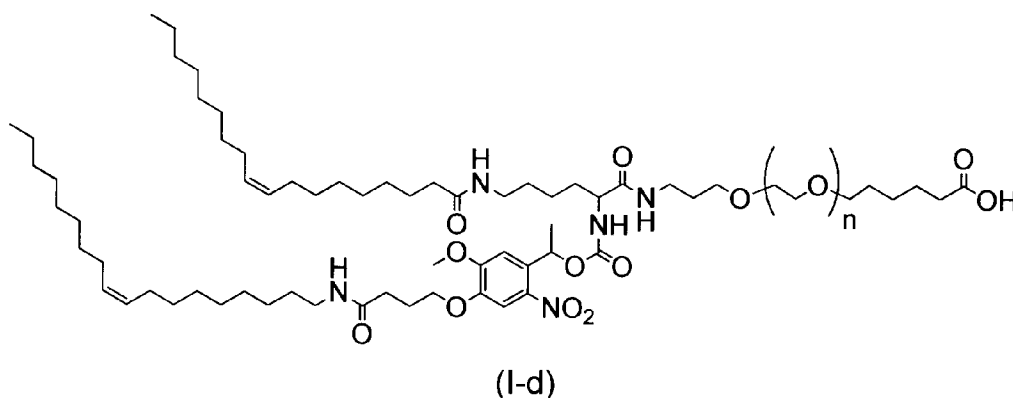


[式中、 n はオキシエチレン基の平均付加モル数を示し、かつ $4.5 \leq n \leq 50.0$ である]

で表される化合物が挙げられる。

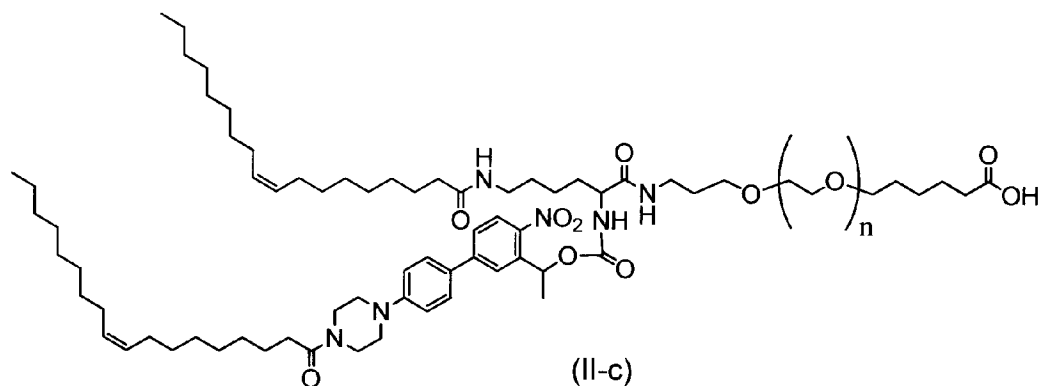
[0082] また、式(I)の好ましい化合物として、以下の式(I-d)の化合物及び式(II-c)の化合物が挙げられる。

[化55]



[式中、 n はオキシエチレン基の平均付加モル数を示し、かつ $4.5 \leq n \leq 50.0$ である。]

[化56]



[式中、 n はオキシエチレン基の平均付加モル数を示し、かつ $4.5 \leq n \leq 50.0$ である。]

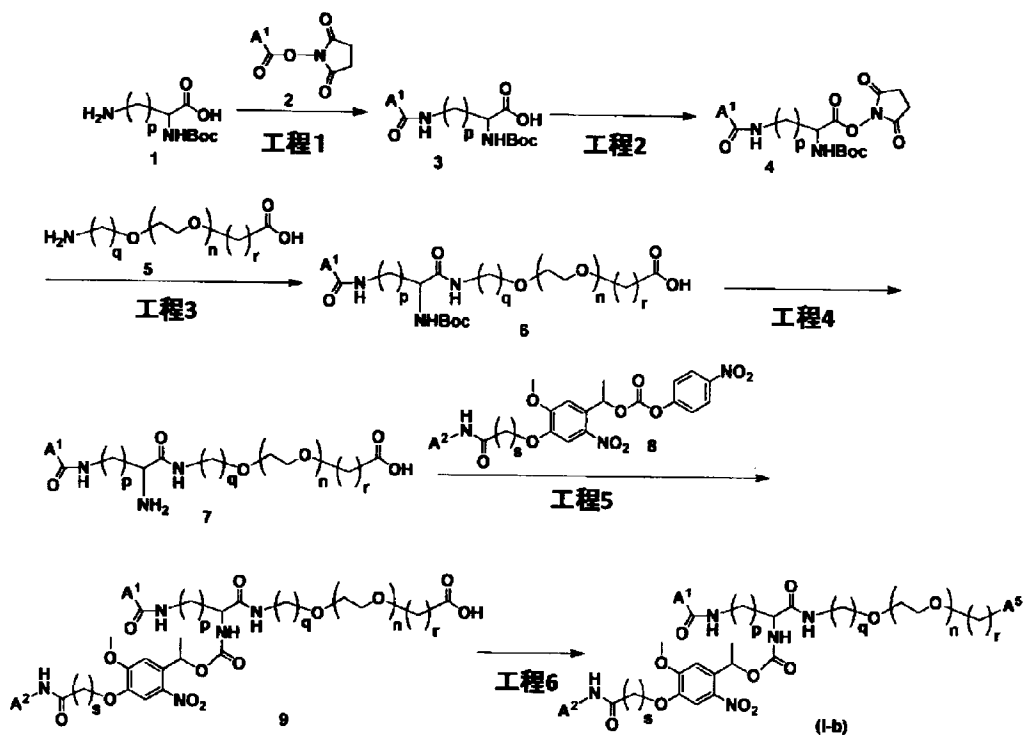
[0083] 一般的製造法

式(1)で示される化合物は、その基本骨格あるいは置換基の種類に基づく特徴を利用し、種々の公知の合成法を適応して合成することができる。以下に代表的な製造法を例示するが、以下に記載の方法のみに限定されるものではない。なお、官能基の種類によっては、当該官能基を原料もしくは中間体の段階で適当な保護基、すなわち容易に当該官能基に転化可能な基に変えておくことが製造技術上効果的な場合があり、必要に応じて保護基を除去し、所望の化合物を得ることができる。このような官能基としては、水酸基、カルボキシル基、アミノ基等を挙げることができ、それら保護基としては例えば、グリーン (Greene) 及びウツツ (Wut t) 著プロテクティブグループス イン オーガニック シンセシス 第3版「Protective Groups in Organic Synthesis (third edition)」に記載の保護基を挙げることができ、これらを反応条件に応じて適宜用いればよい。出発原料及び反応試薬は、公知の化合物であるか、又は公知化合物から有機化学の分野で周知の方法に従って容易に製造するこ

とができる。

[0084] 式(1)に含まれる、式(1-b)で示される化合物は、以下のスキーム1で概説されるように調製され得る。なお以下のスキーム中の記号は、上記のものと同一である。

[化57]



[0085] 工程 1

化合物 1 のアミノ基を N-ヒドロキシスクシンイミドエステルである化合物 2 と反応させて、化合物 3 を製造することができる。本工程で用いる溶媒としては、反応を阻害しないものであれば特に制限はないが、例えば、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1, 4-ジオキサン、ベンゼン、トルエン、キシレン、ヘキサン、シクロヘキサン、N, N-ジメチルホルムアミド、酢酸エチル、ジクロロメタン、クロロホルム、1, 2-ジクロロエタン、ジメチルスルホキシド、アセトン、アセトニトリル、又は、それらの混合

溶媒等が挙げられる。好ましくはN，N-ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、アセトニトリルである。本工程における反応温度は、使用する原料、溶媒によって異なるが、通常、 $-78 \sim 200^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $0 \sim 100^{\circ}\text{C}$ であり、反応時間は、通常、1時間～7日間、好ましくは1時間～72時間である。

[0086] 本工程は、 $\text{A}^1-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ のN-ヒドロキシスクシンイミドエステルの代わりに、別の活性化剤を用いて得られた活性化エステルを用いて行うこともできる。そのような活性化剤は特に限定されないが、例えば、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド、クロロギ酸4-ニトロフェニル、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール及び1-ヒドロキシー-7-アザベンゾトリアゾールが挙げられる。

[0087] 工程2

化合物3のカルボキシル基をN-ヒドロキシスクシンイミドと反応させて、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルである化合物4を製造することができる。本工程で用いる溶媒としては、反応を阻害しないものであれば特に制限はないが、例えば、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1，4-ジオキサン、ベンゼン、トルエン、キシレン、ヘキサン、シクロヘキサン、N，N-ジメチルホルムアミド、酢酸エチル、ジクロロメタン、クロロホルム、1，2-ジクロロエタン、ジメチルスルホキシド、アセトン、アセトニトリル、又は、それらの混合溶媒などが挙げられる。好ましくはジクロロメタンである。本工程における反応温度は、使用する原料、溶媒によって異なるが、通常、 $-78 \sim 200^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $0 \sim 100^{\circ}\text{C}$ であり、反応時間は、通常、1時間～3日間、好ましくは1時間～24時間である。

[0088] なお、工程2において化合物3のカルボキシル基をN-ヒドロキシスクシンイミドエステルの代わりに、別の活性化剤を用いて得られた活性化エステルを用いて、その後の工程3に付すこともできる。行うこともできる。そのような活性化エステルは特に限定されないが、例えば、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド、クロロギ酸4-ニトロフェニル、1-ヒドロキシベンゾ

トリアゾールや1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾールが挙げられる。
。

[0089] 工程3

N-ヒドロキシスクシンイミドエステルである化合物4を化合物5のアミノ基と反応させて、化合物6を製造することができる。本工程で用いる溶媒としては、反応を阻害しないものであれば特に制限はないが、例えば、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、ベンゼン、トルエン、キシレン、ヘキサン、シクロヘキサン、N,N-ジメチルホルムアミド、酢酸エチル、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、ジメチルスルホキシド、アセトン、アセトニトリル、又は、それらの混合溶媒などが挙げられる。好ましくはジクロロメタンである。本工程における反応温度は、使用する原料、溶媒によって異なるが、通常、 $-78 \sim 200^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $0 \sim 100^{\circ}\text{C}$ であり、反応時間は、通常、1時間～3日間、好ましくは1時間～24時間である。

[0090] 工程4

化合物6のアミノ基の保護基であるBoc基を、酸性条件下で脱保護して、化合物7を得ることができる。本工程で用いる酸としては、特に制限はないが、例えば、塩酸、硫酸、硝酸、ギ酸、トリフルオロ酢酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸が挙げられる。好ましくは、トリフルオロ酢酸もしくは塩酸である。本工程で用いる溶媒としては、反応を阻害しないものであれば特に制限はないが、例えば、メタノール、エタノール、2-プロパノール、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、ベンゼン、トルエン、キシレン、ヘキサン、シクロヘキサン、N,N-ジメチルホルムアミド、酢酸エチル、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、ジメチルスルホキシド、アセトン、アセトニトリル、又は、それらの混合溶媒などが挙げられる。好ましくはジクロロメタン、もしくはメタノールである。本工程における反応温度は、使用する原料、溶媒によって異なるが、通常、 $-78 \sim 200^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $0 \sim 100^{\circ}\text{C}$ であり、

反応時間は、通常、1時間～3日間、好ましくは1時間～24時間である。

[0091] 工程5

化合物7と8とを塩基存在下で縮合して、化合物9を製造することができる。本工程で用いる塩基としては、特に制限はないが、例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、トリイソプロピルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、トリブチルアミン、ピリジン、4-ジメチルアミノピリジンが挙げられる。好ましくは、トリメチルアミン又はトリエチルアミンである。本工程で用いる溶媒としては、反応を阻害しないものであれば特に制限はないが、例えば、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、ベンゼン、トルエン、キシレン、ヘキサン、シクロヘキサン、N,N-ジメチルホルムアミド、酢酸エチル、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、ジメチルスルホキシド、アセトン、アセトニトリル、又は、それらの混合溶媒などが挙げられる。好ましくはジクロロメタンである。本工程における反応温度は、使用する原料、溶媒によって異なるが、通常、 $-78\sim 200^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $0\sim 100^{\circ}\text{C}$ であり、反応時間は、通常、1時間～7日間、好ましくは12時間～72時間である。

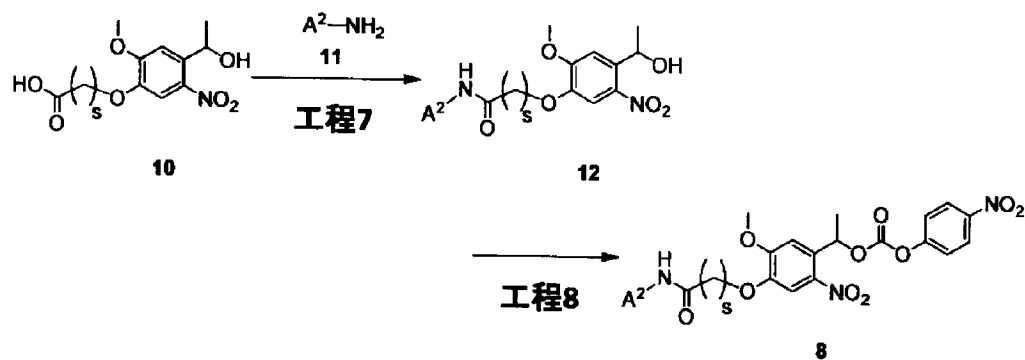
[0092] 工程6

化合物9のカルボキシル基を活性化剤により活性化して、修飾対象基材への反応基A5を有する式(1-b)の化合物を製造することができる。本工程で用いる溶媒としては、反応を阻害しないものであれば特に制限はないが、例えば、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、ベンゼン、トルエン、キシレン、ヘキサン、シクロヘキサン、N,N-ジメチルホルムアミド、酢酸エチル、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、ジメチルスルホキシド、アセトン、アセトニトリル、又は、それらの混合溶媒などが挙げられる。好ましくはジクロロメタンである。本工程における反応温度は、使用する原料、溶媒によって異なるが、通常、 $-78\sim 200^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $0\sim 100^{\circ}\text{C}$ であり、反応時間は、通常、1時間～3日間、好ましくは1時間～24時間である。例えば、A5がN-ヒ

ドロキシスクシンイミドエステルである場合、上記工程 2 と同様に製造することができる。

[0093] 上記スキーム 1 中の化合物 8 は、例えば以下のスキーム 2 に従って製造され得る。

[化58]



[0094] 工程 7

化合物 10 のカルボキシル基を化合物 11 のアミノ基を、縮合剤存在下で反応させて、化合物 12 を製造することができる。本工程で用いる縮合剤としては、特に制限はないが、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリスジメチルアミノホスホニウム塩、ヘキサフルオロリン酸(ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリピロリジノホスホニウム、4-(4,6-ジメトキシー-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリドなどが挙げられる。好ましくは1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩である。本工程で用いる溶媒としては、反応を阻害しないものであれば特に制限はないが、例えば、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、ベンゼン、トルエン、キシレン、ヘキサン、シクロヘキサン、N,N-ジメチルホルムアミド、酢酸

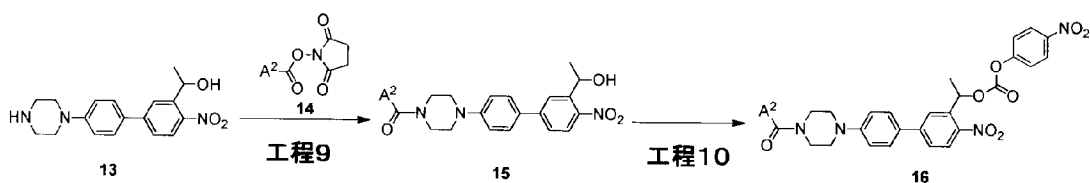
エチル、ジクロロメタン、クロロホルム、1, 2-ジクロロエタン、ジメチルスルホキシド、アセトン、アセトニトリル、又は、それらの混合溶媒などが挙げられる。好ましくはテトラヒドロフラン、もしくはジクロロメタンである。本工程における反応温度は、使用する原料、溶媒によって異なるが、通常、 $-78 \sim 200^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $0 \sim 100^{\circ}\text{C}$ であり、反応時間は、通常、1時間～3日間、好ましくは1時間～24時間である。

[0095] 工程 8

化合物 12 のヒドロキシル基を、塩基存在下、クロロギ酸 4-ニトロフェノールと反応させて式 8 の化合物を製造することができる。本工程で用いる塩基としては、特に制限はないが、例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、トリイソプロピルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、トリブチルアミン、ピリジン、4-ジメチルアミノピリジンが挙げられる。好ましくは、トリエチルアミンである。本工程で用いる溶媒としては、反応を阻害しないものであれば特に制限はないが、例えば、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1, 4-ジオキサン、ベンゼン、トルエン、キシレン、ヘキサン、シクロヘキサン、N, N-ジメチルホルムアミド、酢酸エチル、ジクロロメタン、クロロホルム、1, 2-ジクロロエタン、ジメチルスルホキシド、アセトン、アセトニトリル、又は、それらの混合溶媒などが挙げられる。好ましくはテトラヒドロフランである。本工程における反応温度は、使用する原料、溶媒によって異なるが、通常、 $-78 \sim 200^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $0 \sim 100^{\circ}\text{C}$ であり、反応時間は、通常、5分～3日間、好ましくは15分～24時間である。

[0096] また、式 (11-b) の化合物は、上記スキーム 1 中の化合物 8 を以下のスキーム 3 に従って製造され得る化合物 16 と置き換えることで製造され得る。

[化59]



スキーム3

[0097] 上記スキーム 3 の工程 9 は、上記スキーム 1 の工程 1 と同様に行うことができる。また、上記工程 10 は上記スキーム 2 の工程 8 と同様に行うことができる。化合物 13 は、例えば本願実施例に記載の方法で製造することができる。

[0098] 本明細書中の各反応において、加熱を伴う反応は、当業者にとって明らか
なように、水浴、油浴、砂浴又はマイクロウェーブを用いて行なうことがで
きる。

[0099] 本明細書中の各反応において、適宜、高分子ポリマー（例えば、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、ポリプロピレン、ポリエチレングリコール等）に相持させた固相相持試薬を用いてもよい。

[0100] 以上のようにして得られた式(1)の化合物及び各中間体は、抽出、結晶化、再結晶、透析、各種クロマトグラフィーなどの通常の有機合成操作により単離精製される。

[0101] 本発明の一態様は、本発明の化合物とその修飾対象基材とを反応させて得られた、脂質膜含有物を固定化するための基材である（以下、「本発明の基材」とも呼ぶ）。本発明の基材の形態は特に限定されないが、例えば、基板（本発明の化合物が修飾されるべき部位がプレート状又はフィルム状のもの、例えばスライドガラス、ディッシュ、マイクロプレート、マイクロアレイ用基板）、担体（例えばビーズ）、繊維状構造物、管、容器（例えば試験管及びバイアル）などが挙げられる。修飾対象基材の原料としては、ガラス；セメント；陶磁器等のセラミックスもしくはファインセラミックス；ポリエ

チレンテレフタレート、酢酸セルロース、ポリカーボネート、ポリスチレン及びポリメチルメタクリレートなどのポリマー樹脂；ポリペプチド及びタンパク質などの生体材料；シリコン；活性炭；多孔質ガラス；多孔質セラミックス；多孔質シリコン；多孔質活性炭；不織布；濾紙；メンブレンフィルター；金などの導電性材料、などが挙げられる。修飾対象基材の表面は、アミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシ基などを導入するため、ポリ陽イオンなどのポリマーによる被覆処理、あるいは基材表面への導入置換基を有するシランカップリング剤による処理が施されていてもよい。あるいはプラズマ処理により反応性官能基が導入されていてもよい。

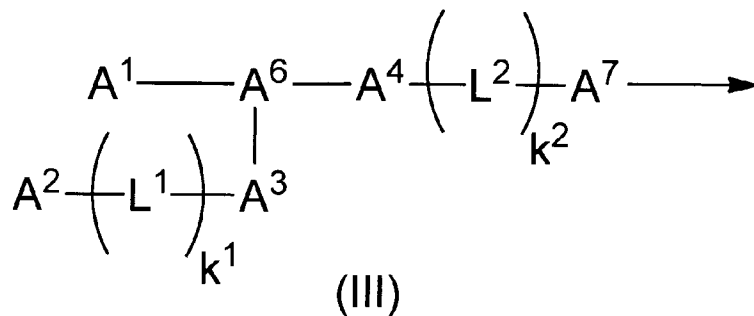
[0102] 一の実施形態において、本発明の化合物とその修飾対象基材との反応は、修飾対象基材表面を本発明の化合物と接触させることによって行われる。当該接触により、本発明の化合物の「修飾対象基材への反応基」が修飾対象基材と非共有結合的に反応して固定化され、脂質膜含有物を固定化するための基材が調製される。当該反応において、本発明の化合物とその修飾対象基材との反応で用いる溶媒の種類は、反応に関与しない溶媒であれば特に制限されないが、例えばリン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、酢酸緩衝液、炭酸緩衝液、グッドの緩衝液等の緩衝液もしくはその等張液；又はアセトニトリル、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド等の有機溶媒；又は前記緩衝液若しくは等張液と前記有機溶媒との混合液を用いることができる。修飾対象基材を損傷・変性させないために、本発明の化合物を溶解しやすい有機溶媒（例えばアセトニトリル、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド）に溶解した後に、前記緩衝液若しくは等張液で十分に希釈した溶液を使用することが好ましい。反応温度は、特に限定されないが、例えば、 $-78 \sim 200^{\circ}\text{C}$ 、さらに $0 \sim 100^{\circ}\text{C}$ が好ましい。反応時間は通常は1分～72時間程度であり、30分～24時間が好ましい。反応後、基材を水で洗浄することが好ましい。

[0103] 他の実施形態において、本発明の化合物とその修飾対象基材との反応は、修飾対象基材と本発明の化合物とを混合することによって行われる。当該混

合は、例えば基材原料を本発明の化合物と混合し、当該混合物を用いて基材を製造する場合も含む。この場合、基材原料と本発明の化合物との混合工程時に両者が反応してもよいし、混合工程後、基材の製造工程時に両者が反応してもよい。混合工程は、基材原料と本発明の化合物とを固体状態で混合することにより行われてもよいし、本発明の化合物を溶媒（例えば上記の水性溶媒及び／又は有機溶媒）に溶解後、得られた溶液と基材原料とを混合することにより行われてもよい。基材の製造工程は、その基材の製造業者にとって周知の一般的な方法により行われ得る。

[0104] 本発明の一態様は、以下の式 (111) の基:

[化60]



[式中、

A¹～A⁴、A⁶、L¹、L²、k¹及びk²は、上の本発明の化合物で定義された通りであり、

A⁷は、式(111)のその他の部分と基材とを連結する二価の基であるか、又は基材と非共有結合で連結可能な反応基であり、

矢印は、基材への共有結合又は非共有結合による連結を示す]

を有する、脂質膜含有物を固定化するための基材に関する。以下で「本発明の式（ⅠⅠⅠ）の基を有する基材」とも呼ぶ。

[0105] 本発明の式(111)の基を有する基材の形態及び原料は、「本発明の基材」の形態及び原料として上で例示したものであってもよい。

[0106] 本発明の式(111)の基を有する基材において、式(111)のその他

の部分と基材とを連結する二価の基とは、特に限定されないが、例えば本発明の化合物中の共有結合性の「修飾対象基材への反応基」と修飾対象基材に含まれる官能基との反応により形成された二価の基が挙げられる。共有結合性の「修飾対象基材への反応基」としては、本発明の化合物に関して上で例示したものであってもよい。

[0107] 本発明の式 (111) の基を有する基材において、基材と非共有結合で連結可能な反応基とは、特に限定されないが、例えば上記の、本発明の化合物中の「修飾対象基材への反応基」を修飾対象基材と非共有結合的に反応させて固定化する例において挙げられたものであってもよい。

[0108] 本発明の式 (111) の基を有する基材は、例えば、本発明の化合物とその修飾対象基材とを反応させて得ることができる。その反応条件は、例えば上記した「本発明の基材」の調製方法が適用され得る。

[0109] 本発明の一態様は、基材上に脂質膜含有物をパターンニングする方法であって、以下のステップ：(1) 本発明の基材上において脂質膜含有物のパターンを形成する部分に光を照射して、当該部分の脂質膜結合基を脂質膜と結合可能な状態とし；(2) 前記脂質膜含有物を前記脂質膜結合基と反応させて前記脂質膜含有物のパターンを形成すること、を含む、前記方法に関する（以下、「本発明のパターンニング方法」とも呼ぶ）。

[0110] 本明細書中「パターンニング」とは、基材上を局所的に改質し、脂質膜含有物を当該基材上の所望の位置に配置し、固定化することをいう。パターンニングにおいて、基材上に単一種類の脂質膜含有物を特定のパターンで配置してもよく、複数種類の脂質膜含有物を特定のパターンで配置してもよい。パターンの形状は、特に限定されないが、例えば脂質膜含有物を一定の間隔を空けて配置してもよい。この場合、脂質膜含有物を配置する場所の個数に制限はなく、たとえ一点であっても「パターンニング」に含まれる。また、パターンの形状は、脂質膜含有物を連続的に配置してもよい。

[0111] 上記ステップ (1) において、照射する光の波長は、本発明の化合物中の光反応基の種類に応じて決めればよく、通常、157～600 nmの範囲の

波長、好ましくは250～450nm付近の波長の光を照射する。しかし、多光子吸収により光反応を行う場合は、上記よりも長波長の光を用いることも可能である。光源は太陽光、水銀灯などの電灯光、レーザー光（半導体レーザー、固体レーザー、ガスレーザー）、発光ダイオードの発光、エレクトロルミネッセント素子の発光などが利用できる。光照射の方法は、光源からの光を必要に応じて適当なフィルターを介して基材表面に均一に照射することもできるし、いわゆるマスクを用いて所望の形状のパターン露光をしてもよい。あるいは、光をレンズや鏡を用いて集光し、微細な形状に照射してもよい。あるいは、集光した光線を走査露光してもよい。パターン露光の場合、マスク（レチクル）とワーク（試料）を接触させて露光する露光形式であるコンタクト露光で行われてもよい。また、マスク（レチクル）とワーク（試料）の隙間を数 μm から数十 μm 程度に設定して露光する非接触の露光方式であるプロキシミティ露光で行われてもよい。さらには、液晶やデジタルミラーデバイスで作製した像をワーク表面に投影する投影露光法（マスクレス露光法）を用いてもよい。反応温度は、特に限定されないが、通常 $-78\sim 200^{\circ}\text{C}$ であり、 $0\sim 100^{\circ}\text{C}$ が好ましく、細胞等の生物試料を含む水性媒体がワーク上に存在する場合は、 $4\sim 50^{\circ}\text{C}$ がより好ましい。光照射エネルギーは、本化合物で修飾された基材表面が脂質膜含有物を固定化する機能を発揮できる程度であればよく、通常は $0.001\sim 1000\text{ J/cm}^2$ であり、 $0.01\sim 100\text{ J/cm}^2$ が好ましい。

[0112] 上記ステップ（2）における反応は、通常は $-78\sim 200^{\circ}\text{C}$ で、好ましくは $0\sim 100^{\circ}\text{C}$ で行い、細胞等の生物試料を含む水性媒体がワーク上に存在する場合は、 $4\sim 50^{\circ}\text{C}$ がより好ましい。通常は1秒間～120分間で、好ましくは15秒間～30分間行う。

[0113] 上記ステップ（1）及び（2）を繰り返すことで、基材上に複数の異なる脂質膜含有物を、迅速かつ簡便にパターンニングすることが可能である。ステップ（2）の終了後、ステップ（1）を再度行う前に、未反応の脂質膜含有物を基材から除去するための洗浄ステップが行われてもよい。

[0114] 一の実施形態において、本発明のパターニング方法は、以下のステップ：

（３）ステップ（２）で得られた基材を洗浄して、未反応の脂質膜含有物を基材から除去し；（４）以前のステップで使用した脂質膜含有物とは異なる脂質膜含有物を使用して、ステップ（１）～（３）を繰り返すことで、複数の異なる脂質膜含有物のパターンを形成すること、をさらに含んでもよい。

[0115] 本発明の一態様は、脂質膜含有物を単離する方法であって、以下のステップ：（１）「本発明の基材」又は「本発明の式（１１１）の基を有する基材」に、脂質膜含有物を含む試料を適用し；（２）基材上の前記脂質膜含有物の位置を顕微鏡観察に基づいて検出し；（３）前記位置に光を照射して、前記位置の脂質膜結合基を脂質膜と結合可能な状態とし、基材上に前記脂質膜含有物を固定化し；（４）ステップ（３）で得られた基材を洗浄して、基材に固定化されていない物質を基材から除去することを含む、前記方法に関する。（以下、「本発明の単離方法」とも呼ぶ）。

[0116] 本発明の単離方法で単離されるべき脂質膜含有物は、特に限定されないが、例えば血中循環腫瘍細胞（Circulating Tumor Cells: CTC）が挙げられる。

[0117] 本発明の単離方法で単離されるべき脂質膜含有物の顕微鏡観察に基づく検出は、脂質膜含有物を標識することなく、単離されるべき脂質膜含有物の特有の形態や特性などに基づいて行われても良い。また、単離されるべき脂質膜含有物を標識して当該標識に基づいて行われても良い。

[0118] 本発明の単離方法におけるステップ（２）の光照射条件、及び脂質膜含有物の固定化条件は、本発明のパターニング方法のステップ（１）及び（２）と同様の条件で行い得る。

実施例

[0119] 以下に示す実施例及び比較例を参照して本発明をさらに詳しく説明するが、本発明の範囲は、これらの実施例によって限定されるものでないことは言うまでもない。

[0120] なお、下記実施例中で用いられている略号は下記の意味を示す。

^1H -NMR: プロトン核磁気共鳴スペクトル

APTES: 3-アミノプロピルトリエトキシシラン

BOC: N-tert-ブトキシカルボニル

BSA: ウシ血清アルブミン

CDCl_3 : 重水素化クロロホルム

CHCl_3 : クロロホルム

DCC: N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

DCM: ジクロロメタン

DMEM: ダルベッコ改変イーグル培地

DMF: N,N-ジメチルホルムアミド

DMSO: ジメチルスルホキシド

eq: 化学当量

Et_3N : トリエチルアミン

FBS: ウシ胎児血清

MeOH: メタノール

MW: 分子量

NHS: N-ヒドロキシスクシンイミド

PBS: リン酸緩衝生理食塩水

PEG: ポリエチレングリコール

Ph: 位相差顕微鏡

PL: 光切断性リンカー (Photo cleavable linker), 4-[4-(1-ヒドロキシ-エチル)-2-メトキシ-5-ニトロフェノキシ] 酪酸

Rf: 保持因子

rpm: 回毎分

TFA: トリフルオロ酢酸

THF: テトラヒドロフラン

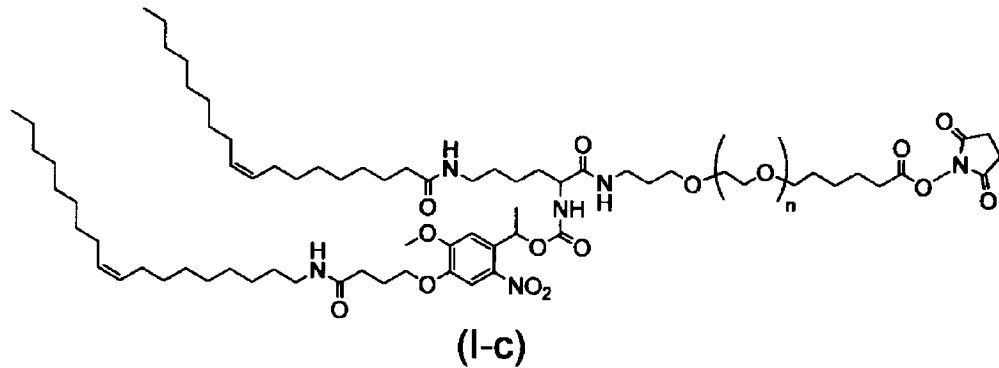
TLC: 薄層クロマトグラフィー

WSC: 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩

[0121] 実施例 1

式 (I-c) の化合物の製造

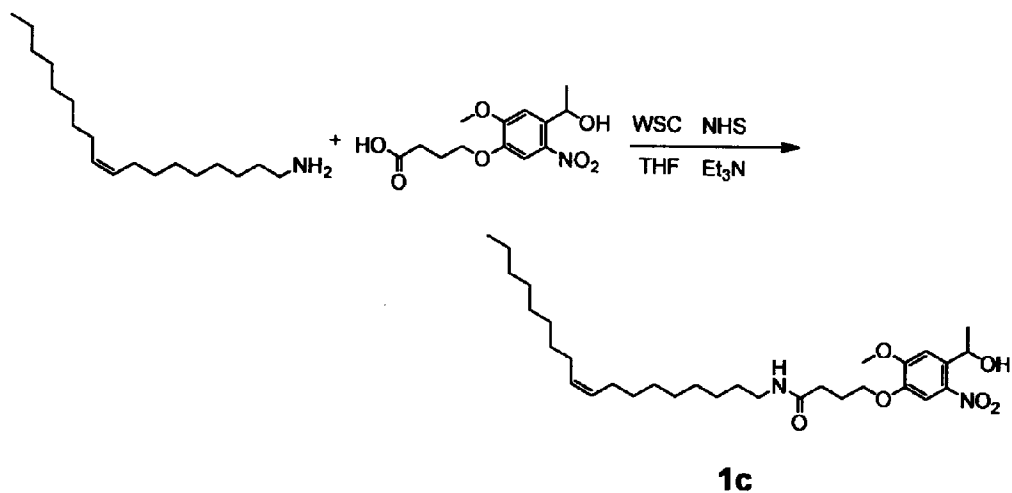
[化61]



[式中、nは72である。]

[0122] (1) 化合物 1c の製造

[化62]



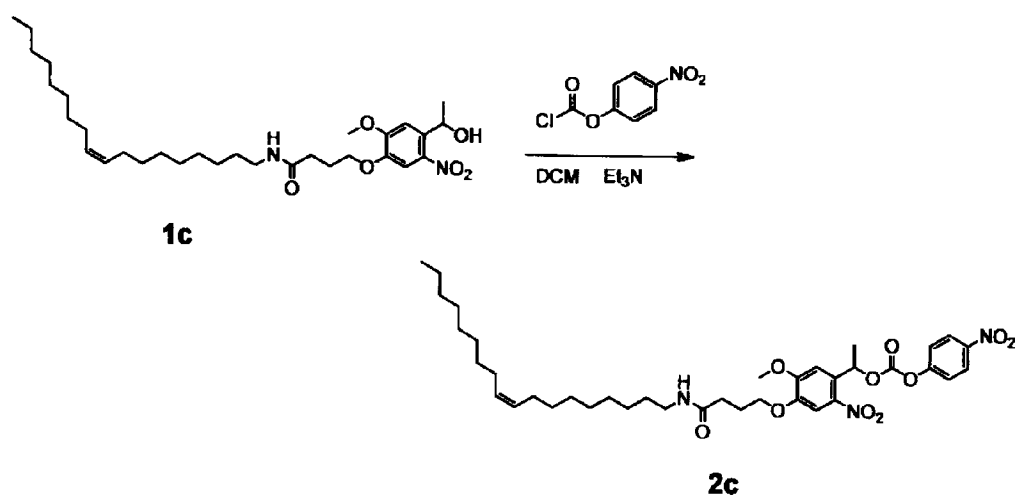
[0123] 50mLナスフラスコ中にオレイルアミン(MW: 267.5, 264.0 mg, 987.0 μmol , 2.01 eq)と、4-[4-(1-ヒドロキシ-エチル)-2-メトキシ-5-ニトロフェノキシ] 酪酸 (以下、「Photo cleavable linker」又は「PL」とも呼ぶ) (MW: 299.28, 143.8 mg, 480.5 μmol , 1.0 eq)を入れ、乾燥THF 5 mLを入れ攪拌

した。WSC (MW: 191.7, 268.7 mg, 1401.6 μmol , 2.92 eq)、NHS (MW: 115.1, 97.3 mg, 1.76 eq)、乾燥 Et_3N 3滴を入れ、17時間反応させた。TLC(CHCl_3 : MeOH =6:1)により、PL (R_f : 0.4)のスポットの消失により反応の完了を確認した。減圧乾燥したのち、直径3.0 cmのカラム管に高さ10 cmまでシリカゲルを詰め、反応物を CHCl_3 3 mLでロードし、カラム精製した。減圧乾燥により、オイル状の黄色固体を得た。 ^1H -NMRにより解析を行った。

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ . 0.88 (t, CH_2CH_3 , 3H); 1.20–1.40 (br m, CH_3CH_2 , $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, 22H); 1.47 (tt, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, 2H); 1.56 (d, $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, 3H); 1.93–2.08 (m, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$, 4H); 2.20 (tt, OCH_2CH_2 , 2H); 2.40 (t, $\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2$, 2H); 3.23 (dt, NHCH_2 , 2H); 3.98 (s, OCH_3 , 3H); 4.12 (t, OCH_2 , 2H); 5.29–5.43 (br m, $\text{CH}=\text{CH}$, 2H); 5.58 (m, CHOH , 1H); 7.30 (s, aromatic $\text{CH}-m-\text{NO}_2$, 1H); 7.58 (s, aromatic $\text{CH}-o-\text{NO}_2$, 1H).

[0124] (2) 化合物 2 c の製造

[化63]



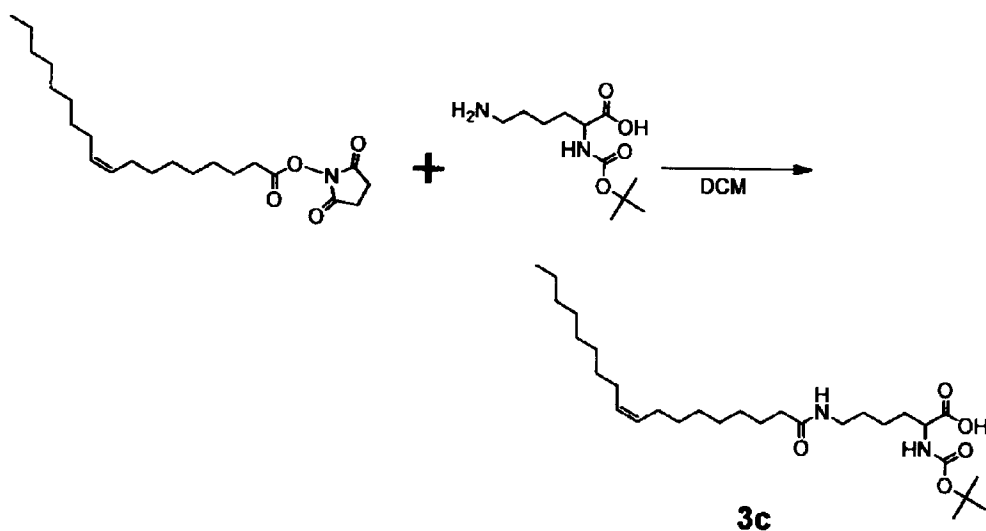
50mL ナスフラスコ中に化合物1 (MW: 548.77, 261.0 mg, 475.6 μmol , 1 eq)を入れ、減圧乾燥した。乾燥DCM 2 mLを入れ攪拌した。乾燥 Et_3N (MW: 101.19, $d=0.726$, 200 μL , 145.2 mg, 1.435 mmol, 3.0 eq)、クロロギ酸4-ニトロフェノール (MW: 201.56, 115.0 mg, 570.7 μmol , 1.2 eq)を入れて30分

後、TLC($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=24:1$)によって確認したところ、化合物1のスポット(R_f : 0.33)はほぼ消失しており、反応の完了を確認した。直径3.0 cmのカラム管に高さ15 cmまでシリカゲルを詰め、反応物を CHCl_3 2.5 mLでロードし、カラム精製した。減圧乾燥し酢酸エチルによる共沸により、固体-ロウ状の黄色物質を得た。 $^1\text{H-NMR}$ により解析を行った。

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ . 0.88 (t, CH_2CH_3 , 3H); 1.20–1.40 (br m, CH_3CH_2 , $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, 22H); 1.48 (tt, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, 2H); 1.78 (d, $\text{CH}(\text{O})\text{CH}_3$, 3H); 1.93–2.08 (m, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$, 4H); 2.21 (tt, OCH_2CH_2 , 2H); 2.39 (t, $\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2$, 2H); 3.25 (dt, NHCH_2 , 2H); 4.00 (s, OCH_3 , 3H); 4.14 (t, OCH_2 , 2H); 5.30–5.42 (br m, $\text{CH}=\text{CH}$, 2H); 6.54 (q, CH_3CHO , 1H); 7.11 (s, aromatic $\text{CH}-\text{m}-\text{NO}_2$, 1H); 7.35 (d, aromatic $\text{CH}-\text{o}-\text{NO}_2$, 2H); 7.62 (s, aromatic $\text{CH}-\text{o}-\text{NO}_2$, 1H); 8.26 (d, aromatic $\text{CH}-\text{m}-\text{NO}_2$, 2H).

[0125] (3) 化合物3cの製造

[化64]



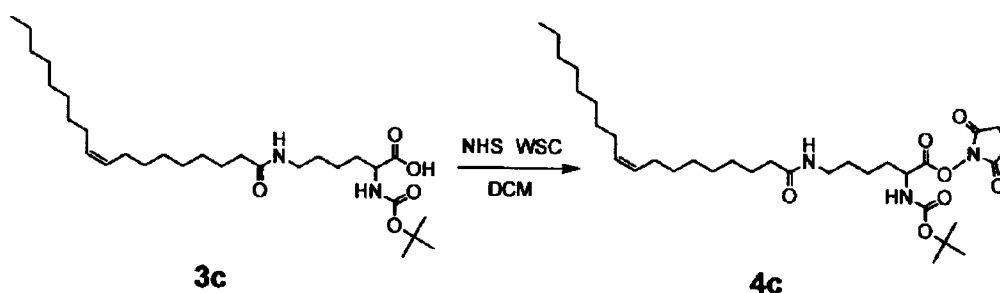
50mL ナスフラスコ中にオレイン酸NHS (MW: 379.53, 104.0 mg, 274.0 μmol , 1.5eq)、モノBoc-Lys-OH (MW: 246.3, 45.0 mg, 182.7 μmol , 1.0eq)、を入れ、減圧乾燥後、乾燥DMF 2 mLを入れた。30.5時間反応し、TLC($\text{CHCl}_3:\text{Me}$

OH=3:1)で確認したところ、ニンヒドリンによりモノBoc-Lys-OH (Rf: 0.0)が検出されなかったため、反応を終えた。真空減圧により溶媒を除去した後、ナスフラスコをドライアイス/MeOHで冷凍下、MeOHで共沸した。ヘキサン4 mL + 酢酸エチル4 mLに溶解後、MilliQ水 8 mLで分液ロートを用いて2回洗浄した。有機層を減圧乾燥し、直径1.5 cmカラム管を使い、CHCl₃:MeOH= 12:1を展開溶媒として、フラッシュカラムを行った。TLC(CHCl₃:MeOH= 6:1)において、ニンヒドリンによる染色とライターによる加熱で出現するRf: 0.4のスポットの化合物を回収し、減圧乾燥した。液状透明の化合物が得られ、CDCl₃溶媒で¹H-NMRを測定した。

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ . 0.88 (t, CH₂CH₃, 3H); 1.20-1.40 (br m, CH₃CH₂, CH=CHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂, 22H); 1.42 (m, NHCH₂CH₂CH₂, 2H); 1.45 (s, C(CH₃)₃, 9H); 1.54 (m, NHCH₂CH₂, 2H); 1.71 (m, NHCHCH₂, 2H); 1.87 (m, CH₂CH₂C(=O), 2H); 1.93-2.08 (m, CH₂CH=CH, 4H); 2.17 (t, CH₂C(=O), 2H); 3.25 (dt, NHCH₂, 2H); 3.73 (dt, NHCHC(=O), 1H); 5.20-5.40 (br m, CH=CH, 2H).

[0126] (4) 化合物 4 c の製造

[化65]



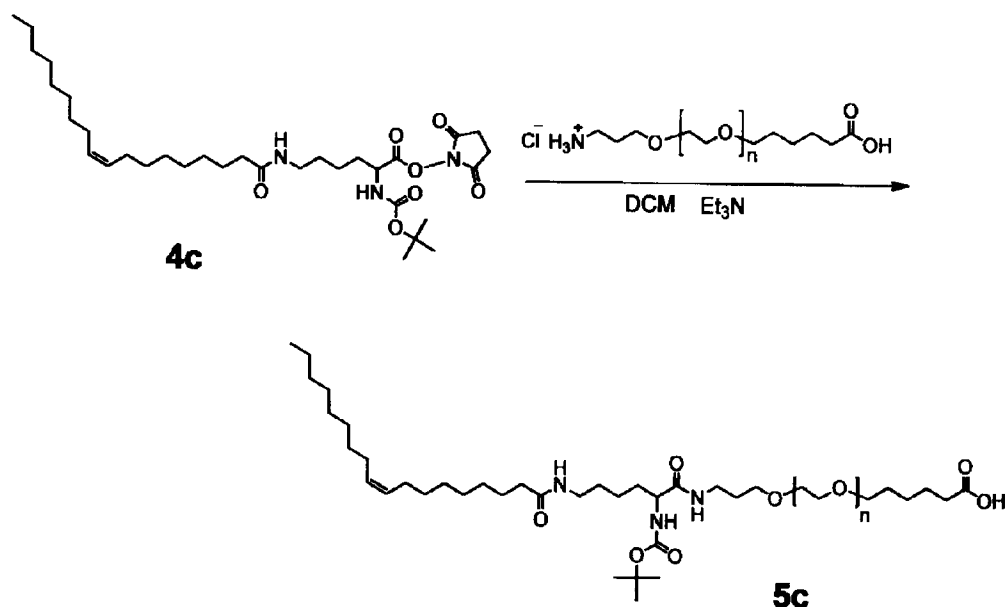
50mLナスフラスコ中に化合物 3 c (MW: 510.75, 95.5 mg, 187.8 μmol, 1.0 eq)、NHS (MW: 115.1, 34.6 mg, 300.6 μmol, 1.6 eq)を入れ、減圧乾燥後、乾燥DCM 2 mLを入れた。WSC (MW: 191.7, 68.5 mg, 357.3 μmol, 1.9eq)を入れ、1時間反応させた。TLC(CHCl₃:MeOH=12:1)で確認したところ、ニンヒ

ドリンによる染色とライターによる加熱により化合物 3 (Rf: 0.25) の消失と目的物 (Rf: 0.45) の出現が確認されたため、反応を終えた。反応液を分液漏斗に入れ、8 mL の DCM で洗い込み、10 mL の MilliQ 水で一回洗浄した。DCM 層を減圧乾燥したところ、透明粘性液体を得た。CDCl₃ 溶媒で ¹H-NMR を測定した。

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ . 0.88 (t, CH₂CH₃, 3H); 1.20–1.40 (br m, CH₃CH₂CH₂, CH=CHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂, 20H); 1.46 (s, C(CH₃)₃, 9H); 1.52–1.72 (br m, NHCH₂CH₂CH₂CH₂, 6H); 1.91 (m, CH₂CH₂C(=O), 2H); 2.01 (m, CH₂C(H)=CH, 4H); 2.85 (s, C(=O)CH₂CH₂C(=O), 4H); 3.19–3.35 (m, NHCH₂, 2H); 3.72 (m, NHCHC(=O), 1H); 5.34 (m, CH=CH, 2H).

[0127] (5) 化合物 5 c の製造

[化66]



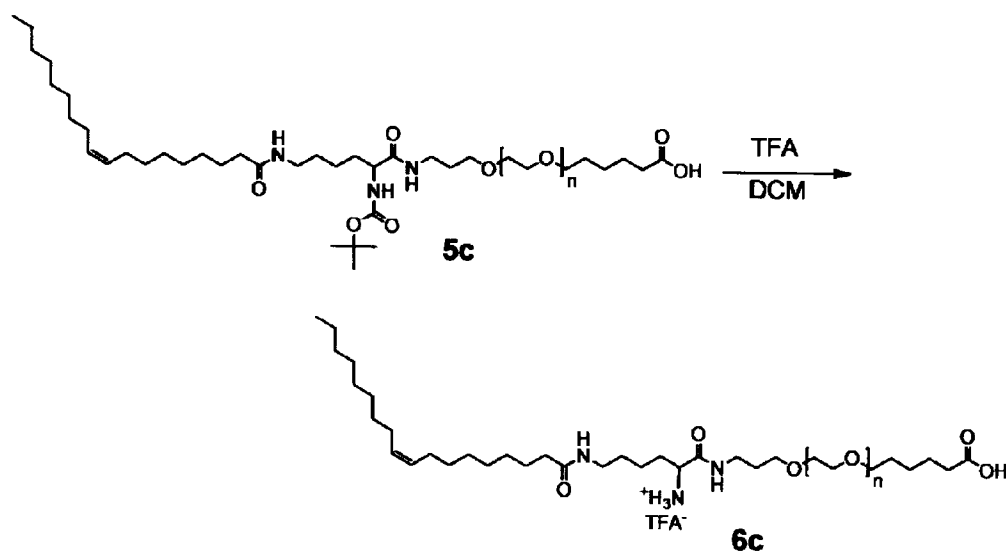
50mL ナスフラスコ中に化合物 4 c (MW: 607.82, 40.0 mg, 65.8 μmol, 1.2eq)、Cl-NH₃⁺-PEG-COOH (MW: 3400, 186.2 mg, 54.8 μmol, 1.0eq)を入れ、減圧乾燥後、乾燥DCM 2 mLを入れた。乾燥Et₃N (MW: 101.19, d=0.726, 40 μL, 29.0 mg, 287.0 μmol, 5.2 eq)を入れ、反応を開始した。17時間後、TLC (CHCl₃:MeOH=3:1)とニンヒドリンにより、Cl-NH₃⁺-PEG-COOHのスポット (Rf: 0.3

4 ブロード)の消失を確認し、減圧乾燥した。攪拌中のジエチルエーテル40 mLに2.0 mLのDCMに反応物を溶解して滴下した。10000 rpm, 15分 遠心し、デカンテーションにより上清を除去したのち、減圧乾燥したところ薄黄色固体を得た。 $^1\text{H-NMR}$ により解析を行った。

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ . 0.88 (t, CH_2CH_3 , 3H); 1.20–1.35 (br m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, 20H); 1.38–1.40 (br m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, 4H); 1.44 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, 9H); 1.57–1.69 (br m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, 4H); 1.73–1.86 (br m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2$, 4H); 2.01 (m, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$, 4H); 2.15 (t, $\text{CH}_2\text{CHC}(=\text{O})\text{NH}$, 2H); 2.32 (t, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, 2H); 3.23 (m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2$, 2H); 3.33 (s, $\text{CHC}(=\text{O})\text{NHCH}_2$, 2H); 3.47 (t, $\text{CHC}(=\text{O})\text{NH}$, 1H); 3.50–3.80 (br m, $\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 5.34 (m, $\text{CH}=\text{CH}$, 2H).

[0128] (6) 化合物 6 c の製造

[化67]



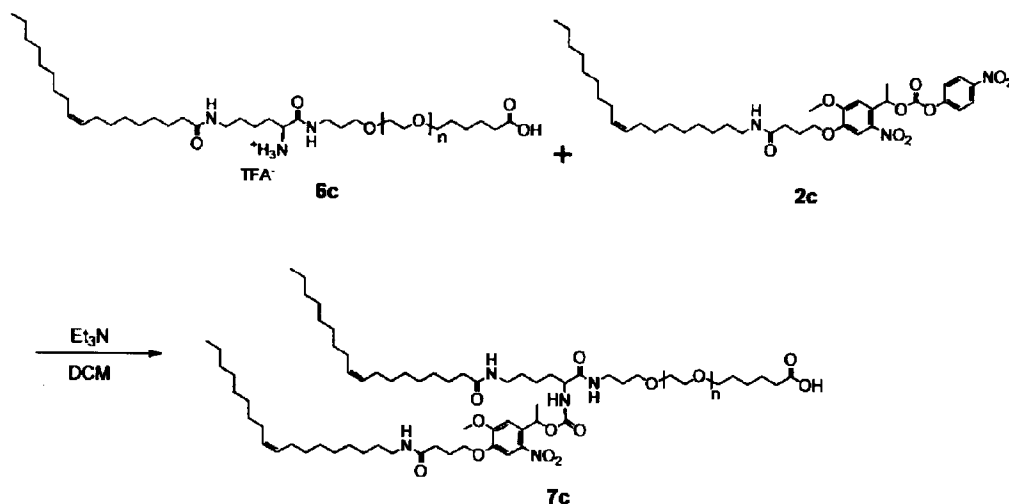
50mL ナスフラスコ中に化合物 5 c (MW: 3856.27, 163.2 mg, 42.3 μmol , 1.0 eq)を入れ、減圧乾燥後、乾燥DCM 4.9 mLを入れた。TFAを0.1 mL入れ、1時間反応、0.4 mLのTFAを加えて1時間反応させ、さらに50℃で15分反応させ

た。減圧乾燥し、乾燥DCM 4mLに溶解し、TFA 2 mLを入れ、さらに2時間反応させた。一晩減圧乾燥を行い、攪拌中のジエチルエーテル40 mLに、1.5 mLのDCMに溶解して滴下した。12000 rpm, 15分で遠心後、上清をデカンテーションにより除去し、減圧乾燥を行ったところ薄黄色固体が得られた。

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ . 0.88 (t, CH_2CH_3 , 3H); 1.20–1.38 (br m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, 20H); 1.38–1.48 (br m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})$, NH $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, 4H); 1.53–1.72 (br m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)$, 6H); 1.73–1.86 (br m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2$, 4H); 2.00 (m, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$, 4H); 2.29 (t, $\text{CH}_2\text{CHC}(=\text{O})\text{NH}$, 2H); 2.34 (t, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, 2H); 3.27 (m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2$, 2H); 3.33 (s, $\text{CHC}(=\text{O})\text{NHCH}_2$, 2H); 3.48 (m, $\text{CHC}(=\text{O})\text{NH}$, 1H); 3.50–3.80 (br m, $\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 5.34 (m, $\text{CH}=\text{CH}$, 2H).

[0129] (7) 化合物 7 c の製造

[化68]



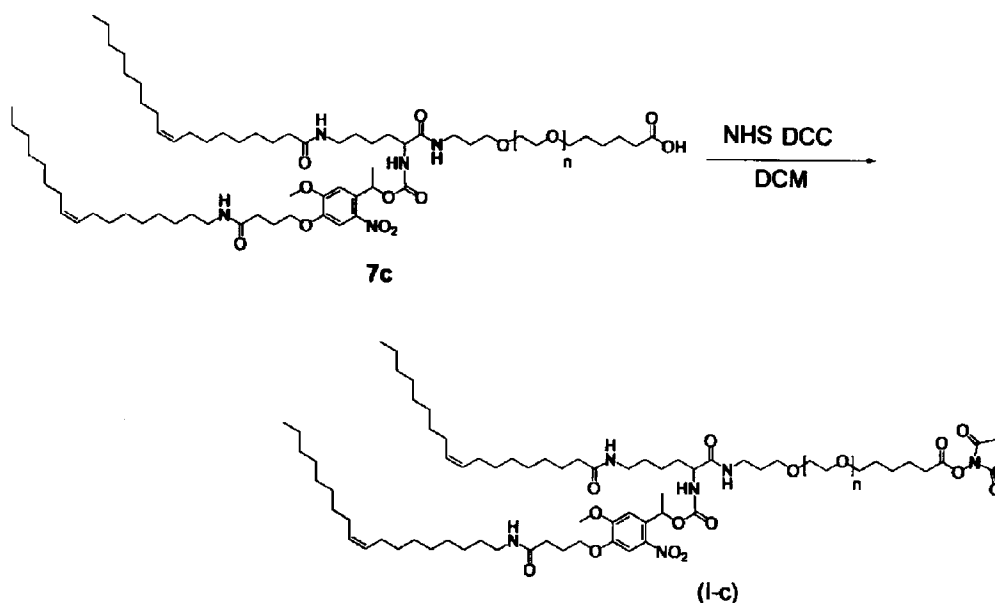
50mL ナスフラスコ中に化合物 6 c (MW: 3870.18, 87.1 mg, 22.5 μmol , 1.0 eq)、化合物 2 c (MW: 713.39, 35.2 mg, 49.3 μmol , 2.19 eq)を入れ、減圧乾燥後、乾燥DCM 2 mLを入れた。乾燥 Et_3N (MW: 101.19, $d=0.726$, 10 μL , 29.1 mg, 287.6 μmol , 12.8 eq)を入れ、41時間反応させた。TLC($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=6:1$)とニンヒドリンで確認したところ、呈色は起きなかったため、反応

を完了した。攪拌中のジエチルエーテル40 mLに、1.5 mLのDCMに溶解して滴下した。12000 rpm, 15分で遠心後、上清をデカンテーションにより除去し、減圧乾燥を行ったところ薄黄色固体が得られた。

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ . 0.88 (t, CH_2CH_3 , 3H); 1.20–1.36 (br m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, 42H); 1.38–1.53 (br m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 4H); 1.55–1.68 (br m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)$, 6H); 1.70–1.84 (m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}$, 4H); 2.00 (m, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$, 8H); 2.08–2.24 (br m, $\text{CH}_2\text{CHC}(=\text{O})\text{NH}$, $\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 4H); 2.32 (t, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, 2H); 2.39 (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2$, 4H); 3.24 (m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2$, 2H); 3.33 (m, $\text{CHC}(=\text{O})\text{NHCH}_2$, 2H); 3.48 (m, $\text{CHC}(=\text{O})\text{NH}$, 1H); 3.50–3.80 (br m, $\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 3.97 (d, OCH_3 , 3H); 4.10 (t, $\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 2H); 5.34 (m, $\text{CH}=\text{CH}$, 2H); 5.62 (m, $\text{CHC}(=\text{O})\text{NH}$, 1H); 6.32 (m, CHO , 1H); 7.08 (s, aromatic $\text{CH}-m-\text{NO}_2$, 1H); 7.55 (s, aromatic $\text{CH}-o-\text{NO}_2$, 1H).

[0130] (8) 式 (I-c) の化合物の製造

[化69]



50mL ナスフラスコ中に化合物 7 c (MW: 4331.35, 86.5 mg, 20.0 μ mol, 1.0 eq)、NHS (MW: 115.1, 4.6 mg, 40.0 μ mol, 2.0 eq)、DCC (MW: 206.33, 8.5 mg, 41.2 μ mol, 2.1 eq)を入れ、減圧乾燥後、乾燥DCM 2 mLを入れた。3時間反応させ、減圧乾燥を行った。攪拌中のジエチルエーテル40 mLに、1.3 mLのDCMに溶解して滴下した。12000 rpm、15分遠心後、上清をデカンテーションにより除去し、減圧乾燥を行ったところ、薄黄色固体が得られた。

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ . 0.88 (t, CH_2CH_3 , 3H); 1.20–1.36 (br m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, 42H); 1.41–1.54 (br m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 4H); 1.53–1.69 (br m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)$, 6H); 1.70–1.83 (m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}$, 4H); 2.01 (m, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$, 8H); 2.08–2.24 (br m, $\text{CH}_2\text{CHC}(=\text{O})\text{NH}$, $\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 4H); 2.38 (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2$, 4H); 2.62 (t, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}$, 2H); 2.85 (s, $\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})$, 4H); 3.24 (m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2$, 2H); 3.34 (m, $\text{CHC}(=\text{O})\text{NHCH}_2$, 2H); 3.47 (m, $\text{CHC}(=\text{O})\text{NH}$, 1H); 3.50–3.80 (br m, $\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 3.96 (d, OCH_3 , 3H); 4.10 (m, $\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 2H); 5.34 (m, $\text{CH}=\text{CH}$, 2H); 5.62 (m, $\text{CHC}(=\text{O})\text{NH}$, 1H); 6.35 (m, CHO , 1H); 7.03 (s, aromatic $\text{CH}-m-\text{NO}_2$, 1H); 7.57 (s, aromatic $\text{CH}-o-\text{NO}_2$, 1H).

[0131] 実施例 2 : 細胞を固定化するための基板の製造方法

(1) コラーゲンコート基板の調製

スライドガラスを4 well plateに入れ、0.3 mg/mLコラーゲン/pH 3.0 HCl 溶液を4 mL入れた。室温で一晩静置し、MilliQ水で3回洗浄して乾燥させた。

(2) 脂質膜含有物を固定化するための基板の製造

実施例 1 で製造された式 (I-c) の化合物のDMSO溶液 (1 mM) をPBS溶液で100倍希釈した溶液を、上記 (1) で調製したコラーゲンコート基板と直径3.5cmのディッシュ中で、4時間、37°Cで反応させた。実施例1で製造された式(I-c)の化合物のPBS溶液を除去し、1 mLのMilliQ水による洗浄を6回行った後、乾燥させて、細胞を固定化するための基板を製造した。

[0132] 実施例 3 : 高密度一細胞アレイの作製

実施例2で調製した基板の表面に対して、図1に示すフォトマスクを用いてコンタクト露光(0.6 mW/cm^2 , 3000 秒, 1.8 J/cm^2)し、3.5 cm ディッシュ底面に設置した。ここに2 mLのPBS溶液を入れ、 $5 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ Ba/F3細胞/PBS懸濁液1 mLを播種し、15分静置し、固定されなかった細胞をPBS溶液により洗浄除去した。Ba/F3細胞を、 $0.25 \text{ } \mu\text{g/mL}$ カルセイン-AM/PBS 1 mLで15分染色したのち、顕微鏡観察(蛍光, 明視野, $\times 4$ 対物レンズ)した。結果を図2に示す。

[0133] 非常に高密度な一細胞アレイを作製することができた。 $14 \text{ } \mu\text{m}$ 四方に一細胞が固定化され、細胞の密度は $5.1 \times 10^5 \text{ 細胞/cm}^2$ であった。

[0134] 実施例4：一細胞単位の複数種細胞パターンニング

底面が食品用ラップ(膜厚約 $10 \text{ } \mu\text{m}$, ポリ塩化ビニリデン)で作製された、直径25 mmのディッシュを作製した。このディッシュに1 mLの 0.3 mg/mL Type I コラーゲン/pH 3.0 HClを入れ、一晚コラーゲンを被覆した。MilliQ水で3回洗浄し、乾燥させた。実施例1で製造された式(1-c)の化合物のDMSO溶液(1mM)をPBS溶液で100倍希釈した溶液(1 mL)で4時間、 37°C で反応させた。MilliQ水で6回洗浄し、乾燥させた。微量のMilliQ水でこのディッシュ底面の裏にフォトマスクを張り付け、 1.8 J/cm^2 (365 nm, 1.0 mW/cm^2 , 1800秒)のプロミキシティ露光を行った。ここに1 mLのPBS溶液を入れ、 $5 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ のBa/F3(EGFP)細胞/PBS 1 mLを播種した。15分の静置の後、1 mLのPBS溶液で6回洗浄した。ディッシュ底面の裏にフォトマスクを張り付け、顕微鏡で観察しながら作製された細胞パターンとフォトマスクのアライメントを行い、ふたたび 1.8 J/cm^2 (365 nm, 1.0 mW/cm^2 , 1800秒)でプロミキシティ露光を行った。ここに、CytoRedで染色したBa/F3細胞(Ba/F3(CytoRed))のPBS懸濁液($5 \times 10^6 \text{ cells/mL}$)を1 mL播種した。15分の静置の後、1 mLのPBSで6回洗浄した。本実験の手順の模式図を図3に示す。作製された複数細胞集団の細胞パターンを共焦点顕微鏡で観察した。結果を図4に示す。

[0135] 実施例5：共焦点顕微鏡を用いたレーザー描画による複数細胞集団のパターンニング

マイクロ流路(μ -Slide VI ^{0.1}, 流路幅1 mm x 全長17 mm x 高さ0.1 mm, ibidi社製)に1 w/v%BSA/PBS溶液を導入し、一晩、室温で静置した。その後、流路の両出口にあるチャンバーにそれぞれ100 μ LのMilliQ水を入れ、除去する洗浄を3回行った。100 μ LのMilliQ水を片方のチャンバーにのみ入れ、大気圧でもう一方のチャンバーに流路を通して流れ込ませることにより、流路内を洗浄した。両チャンバーに溜まっている洗浄液を除去し、片方のチャンバーにのみ、実施例1で製造された式(1-c)の化合物のDMSO溶液(10 mM)をPBS溶液で100倍希釈した溶液を100 μ L入れることにより、大気圧により式(1-c)の化合物の溶液を流路内に流れ込ませた。37°Cで4時間反応させることにより、式(1-c)の化合物を基板に結合させた。流路の両出口にあるチャンバーにそれぞれ100 μ LのMilliQ水を入れ、除去する洗浄を6回行った。100 μ LのMilliQ水を片方のチャンバーにのみ入れ、大気圧でもう一方のチャンバーに流路を通して流れ込ませることにより、流路内を洗浄した。この流路の入り口に5 mLシリンジを加工した大型チャンバーを増設し、出口にシリンジポンプに接続したチューブを取り付けた(図5)。

[0136] パターニングする細胞として、5色の異なる蛍光を示すBa/F3細胞を調製した。緑色の細胞として高感度緑色蛍光タンパク質(Enhanced Green Fluorescent Protein)(EGFP)を発現させたBa/F3(EGFP)細胞を用いた。赤色の細胞として、Kusabira Orangeを発現させたBa/F3(KO)細胞を用いた。青色の細胞として、Hoechst33342で染色したBa/F3(Hoechst)細胞を用いた。黄色の細胞として、Ba/F3(KO)細胞をCalcein-AM(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)で染色したBa/F3(KO+Calcein)を用いた。水色の細胞としてHoechst33342とCalcein-AMで染色したBa/F3(Hoechst+Calcein)を用いた。それぞれの細胞は、 1×10^8 cells/mLの濃度でPBSに懸濁し、パターニング用細胞溶液を調製した。

[0137] レーザー光による図形の描画、細胞の播種、洗浄を繰り返すことにより、5種類の細胞それぞれを任意の形にパターニングした。詳細な方法は以下の通りとなる。

(1) 共焦点顕微鏡を用いて、式(1-c)化合物修飾表面を作製した流路底面に405 nmレーザーを任意の形に照射した。

(2) 50 μ Lの各種細胞溶液を流路入口に設置した大型チャンバーに入れ、その溶液をシリンジポンプで20 μ L引き入れることにより、流路内に細胞を導入した。

(3) 20分静置後、固定化されていない細胞の洗浄溶液としてPBSを大型チャンバーに入れた。シリンジポンプを用いて30 mL/hの流速で1分間、続いて60 mL/hの流速で2分間、流路内をPBS溶液で洗浄した。

この(1)レーザー描画、(2)細胞播種、(3)洗浄を緑、黄色、水色、青、赤の細胞の順に行い、複数細胞集団のパターニングを行った。

[0138] 結果、式(1-c)の化合物修飾表面を用いることにより、複数種類の細胞サンプルを、それぞれ任意の形にパターニングすることが可能であった。

(図6及び7)。この実験では、5種の細胞を3時間程度でパターニングすることができた。

[0139] 実施例6：化合物(1-c)で修飾された基板表面上での細胞培養

直径34 mmのカバーガラス上に0.3 mg/mLコラーゲン/pH 3.0 HCl 溶液を500 μ L塗布し、スピンコーター(20秒で3000 rpmまで加速、3000 rpmで20秒回転、20秒かけて停止)でコラーゲンのコーティングを行った。MilliQ水で3回洗浄して乾燥させた。コラーゲンコート基板を直径35 mmディッシュ中に置き、化合物(1-c)のDMSO溶液(1 mM)をPBS溶液で100倍希釈した溶液1.5 mLで、3時間、37°Cで反応させた。化合物(1-c)のPBS溶液を除去し、MilliQ水による洗浄を6回行った後、乾燥させて、細胞を固定化するための基板を製造した。これを6 well plateの底面に設置し、1 mLの70%エタノールで滅菌後、2 mLのPBSで二回洗浄した。FBS不含DMEM培地に懸濁させたHEK293T細胞(接着性細胞、ヒト胎児由来腎臓上皮細胞株)を 2×10^5 cells/wellとなるように播種した。30分静置した後、培地中に10%v/vとなるようにFBSを添加した。3日間37°C、5% CO₂環境下において培養した。トリプシン処理により細胞を回収後、トリパンブルーにより死細胞を染色し、生細胞数と細胞生存率を計測し

た。

[0140] 光照射(365 nm、1.6 J/cm²)・非照射にかかわらず、化合物(1-c)表面上での培養における細胞数と細胞生存率は、ともにコラーゲン表面や細胞培養用ディッシュ等のポジティブコントロールと同様であった(図8)。これらの結果から、化合物(1-c)表面上では光固定化した細胞を培養することが可能であり、高い細胞適合性を持つことが示された。

[0141] 実施例7：接着性細胞(HepG2細胞)、初代培養細胞(NHDF細胞)、リポソーム(ローダミン蛍光)の一細胞レベルパターンニング

直径34 mmのカバーガラスを0.3 mg/mLコラーゲン/pH 3.0 HCl 溶液に浸漬した後、スピンコーティング(20秒で3000 rpmまで加速、3000 rpmで20秒回転、20秒かけて停止)を行うことにより、コラーゲンのコーティングを行った。MilliQ水で3回洗浄して乾燥させた。コラーゲンコート基板を直径35 mmディッシュ中に置き、化合物(1-c)のDMSO溶液(1 mM)をPBS溶液で100倍希釈した溶液1.5 mLで、4時間、37°Cで反応させた。化合物(1-c)のPBS溶液を除去し、MilliQ水による洗浄を6回行った後、乾燥させて、細胞を固定化するための基板を製造した。これをアレイパターンが描画されたフォトマスク上に置き、波長365 nm、1.6 J/cm²にてコンタクト露光を行った。70%エタノールで滅菌後、PBSで3回洗浄した。

[0142] この基板を直径35 mmディッシュ中に置き、2 mLのPBSを入れた後、HepG2細胞(ヒト肝癌由来細胞株、接着性細胞)もしくはNHDF細胞(正常ヒト皮膚線維芽細胞、初代培養細胞、接着性細胞)のPBS懸濁液(3×10^6 cells/mL)を1 mL入れて5分後に非固定化細胞の洗浄除去を行った。固定化されたHepG2細胞において、培地を10%v/v FBS含有DMEM培地に交換し、37°Cで2時間培養したところ、一細胞アレイ化されたHepG2細胞が伸展し基板に接着していることが確認された(図9)。固定化されたNHDF細胞においても、培地を10%v/v FBS含有DMEM培地に交換し、37°Cで15分培養したところ、一細胞アレイ化されたNHDF細胞が伸展し基板に接着していることが確認された(図10)。

[0143] 上記と同様の基板において、アレイパターンのコンタクト露光後に、リポ

ソーム (F60203F-R, FormuMax Scientific社製) の PBS100 倍希釈用液を 1 mL 入れて 10 分後に洗浄したところ、リボソームのアレイパターンが確認された (図 11)。

[0144] 実施例 8 : 量子ドットのパターンニング

実施例 5 と同様の方法で作製した化合物 (I-c) 修飾マイクロ流路表面に、405 nm レーザー光を用いてヒト型のパターンを照射した。そこへビオチン修飾脂質被覆量子ドット (biotin-labeled Qdot (登録商標) 655 nanocrystals, Thermo Fisher Scientific社製) を Qdot (登録商標) incubation buffer (Thermo Fisher Scientific社製) で 20 nM に希釈した溶液を導入し、5 分間静置した。PBS により固定化されなかった量子ドットを洗浄除去したところ、ヒト型に量子ドットがパターンニングされていることが確認された (図 12)。また、同様の方法でカルボン酸修飾脂質被覆量子ドット (CdSeS/ZnS alloyed quantum dots, COOH functionalized, fluorescence λ_{em} 525 nm, Sigma-Aldrich社製) の 10 μ g/mL MilliQ 水溶液のパターンニングを試みたところ、ヒト型に量子ドットがパターンニングされていることが確認された (図 13)。

[0145] 実施例 9 : 非接着性細胞と接着性細胞の共パターンニング

直径 34 mm のカバーガラスを 0.3 mg/mL コラーゲン/pH 3.0 HCl 溶液に浸漬した後、スピンコーティング (20 秒で 3000 rpm まで加速、3000 rpm で 20 秒回転、20 秒かけて停止) を行うことにより、コラーゲンのコーティングを行った。MilliQ 水で 3 回洗浄して乾燥させた。コラーゲンコート基板を直径 35 mm ディッシュ中に置き、化合物 (I-c) の DMSO 溶液 (1 mM) を PBS 溶液で 100 倍希釈した溶液 1.5 mL で、4 時間、37°C で反応させた。化合物 (I-c) の PBS 溶液を除去し、MilliQ 水による洗浄を 6 回行った後、乾燥させて、細胞を固定化するための基板を製造した。これをラインパターン (幅 200 μ m, 間隔 200 μ m) が描画されたフォトマスク上に置き、波長 365 nm, 1.6 J/cm² にてコンタクト露光を行った。70% エタノールで滅菌後、PBS で 3 回洗浄した。この基板を直径 35 mm ディッシュ中に置き、2 mL の PBS を入れた後に、赤色蛍光タンパク質を発現させた Ba/F3(K0) 細胞の PBS 懸濁液 (5 × 10⁶ cells/mL) を 1 mL 入れた。1

0分間静置後、PBSで非固定化細胞を洗浄除去し、直径50 mm、ガラス観察窓直径40 mmのディッシュ(WillCo-Dish, WillCo Wells社製)中に置き、2 mLのPBSを入れた。これをラインパターン(幅200 μm , 間隔 200 μm)が描画されたフォトマスク上に、Ba/F3(K0)細胞のラインパターンとフォトマスクのラインパターンが直交するように置き、波長365 nm, 1.6 J/cm²にて露光を行った。細胞パターンニング基板を直径35 mmディッシュ中に移し、2 mLのPBSを入れた後に、緑色蛍光タンパク質を発現させたHEK293T(EGFP)細胞のPBS懸濁液(2.5×10^6 cells/ml)を1 mL入れた。10分間静置後、PBSで非固定化細胞を洗浄除去したところ、それぞれBa/F3(K0)細胞とHEK293T(EGFP)細胞から構成される直交する二つのラインパターンが確認された(図14左)。また、培地を10%v/v FBS含有DMEM培地に交換し、37°Cで3時間培養したところ、HEK293T(EGFP)細胞が伸展し基板に接着していることが確認された(図14右)。

[0146] また、同様の手法で、リポソーム(ローダミン蛍光)のラインパターンニング、続いてHEK293T(EGFP)細胞のラインパターンニングを行ったところ、それぞれリポソーム(ローダミン蛍光)とHEK293T(EGFP)細胞から構成される直交する二つのラインパターンが確認された(図15)。この時、幅100 μm , 間隔100 μm のラインパターンが描画されたフォトマスクを用いた。

[0147] 実施例10：担癌マウスからのCTCのソーティング

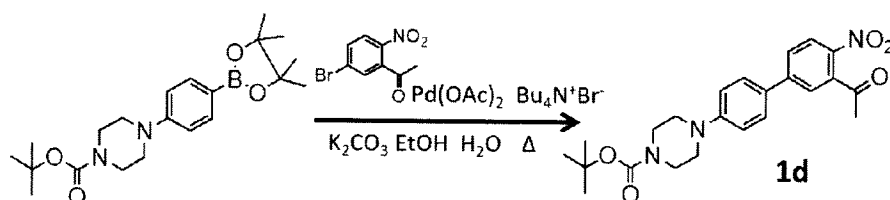
CTC単離のモデル実験として、担癌マウス末梢血からの癌細胞の光捕捉を行った。DLD1細胞を担癌したマウスの心臓から末梢血を採取した。末梢血を0.9%塩化アンモニウムで処理して赤血球を溶血したのち、PBSで遠心洗浄を行った。100 nMのビオチン修飾抗Epiregulin抗体を15分反応させた後、10 nMのストレプトアビジン修飾量子ドット(Qdot (登録商標) 655 Streptavidin Conjugate, Thermo Fisher Scientific)を5分反応させることにより、末梢血中の癌細胞を蛍光標識した。この細胞溶液を実施例5と同様の方法で化合物(1-c)をコートしたマイクロ流路に導入し、量子ドットの蛍光(ex/em 488/655 nm)から癌細胞を検出した。検出した癌細胞に対してのみ405 nmレーザーを照射することにより、癌細胞を流路内に固定化し、その他の細胞をPBSにより洗浄

除去した。結果、末梢血中から癌細胞を選択的に流路内に単離することに成功した(図16)。

[0148] 実施例11：光活性化PEG脂質誘導体である化合物(II-b)の合成

(1) 化合物1dの合成

[化70]



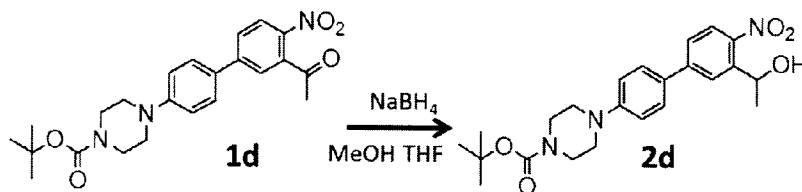
100 mL ナスフラスコ中にエタノール 20 mLと、MilliQ水を10 mL入れ、そこへ4-(4-tert-ブトキシカルボニルピペラジニル)フェニルボロン酸ピナコールエステル (MW: 388.32, 154.0 mg, 397 μ mol, 1.0 eq)、1-(5-ブromo-2-ニトロフェニル)エタノン (MW: 244.04, 127.3 mg, 522 μ mol, 1.3 eq)、炭酸カリウム (MW: 138.2, 158.3 mg, 1.15 mmol, 2.9 eq)、テトラブチルアンモニウムブロミド (MW: 322.4, 126.2 mg, 391 μ mol, 1.0 eq)を入れ、酢酸パラジウム(II)を触媒量添加した。マイクロウェーブ反応装置で150°C, 10分、150 Wの出力にて還流反応を行った。放冷した後、MilliQ水を40 mL加え、酢酸エチル40 mLで二回抽出を行った。抽出用液を飽和食塩水40 mLで二回洗浄し、さらにMilliQ水40 mLで二回洗浄した。有機層を減圧乾燥した後、直径3.0 cmのカラム管に高さ5 cmまでシリカゲルを詰め、粗精製物をヘキサン:酢酸エチル=1:1の溶媒 4.0 mLでロードし、ヘキサン:酢酸エチル=5:1、続いてヘキサン:酢酸エチル=3:1の展開溶媒でカラム精製した。減圧乾燥を行ったところ、109.0 mg(収率65%)の橙色固体が得られた。

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ . 1.49 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, 9H); 2.58 (s, $\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$, 3H); 3.26 (br, $\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_2)_2$, 2H); 3.61 (br, $\text{N}(\text{CH}_2)_2$, 2H); 7.00 (d, aromatic $\text{N}(\text{CH}_2)_2$, 2H); 7.51 (s, aromatic $\text{C}(=\text{O})\text{CCH}$, 1H); 7.56 (d, aromatic $\text{C}(\text{CH}_2)_2$, 2H); 7.71 (d, aromatic $\text{CH}-m-\text{NO}_2$, 1H); 8.17 (d, aromatic $\text{CH}-o$

-NO₂, 1H)

[0149] (2) 化合物2dの合成

[化71]

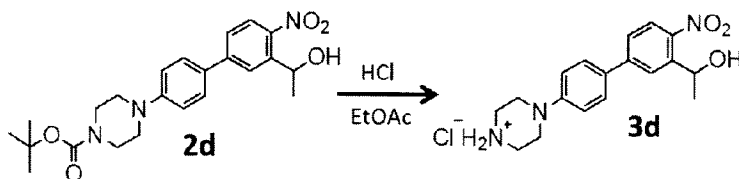


50 mL ナスフラスコ中に化合物1d(MW: 425.48, 109.0 mg, 256 μ mol, 1.0 eq)、水素化ホウ素ナトリウム (MW: 37.83, 14.8 mg, 391 μ mol, 1.5 eq) を入れ、減圧乾燥した。乾燥MeOH 5 mLと乾燥THF 5 mLを氷上で加え、撹拌した。2時間後、TLC(ヘキサン:酢酸エチル=3:1)によって確認したところ、化合物1dのスポット(Rf: 0.17)は消失しており、反応の完了を確認した。減圧乾燥した後、酢酸エチル50 mLに溶解し、飽和食塩水50 mLで二回洗浄し、さらにMilliQ水50 mLで二回洗浄した。減圧乾燥を行ったところ、107.3 mg(収率98%)の橙色固体が得られた。

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ . 1.49 (s, C(CH₃)₃, 9H); 1.63 (s, C(=O)CH₃, 3H); 3.25 (br, C(=O)N(CH₂)₂, 2H); 3.61 (br, N(CH₂)₂, 2H); 5.55 (m, CHOH, 1H); 7.01 (d, aromatic NC(CH₂)₂, 2H); 7.58 (d, aromatic CH-m-NO₂, 1H); 7.59 (d, aromatic C(CH₂)₂, 2H); 8.02 (d, aromatic CH-o-NO₂, 1H); 8.03 (s, aromatic C(OH)CCH, 1H)

[0150] (3) 化合物3dの合成

[化72]

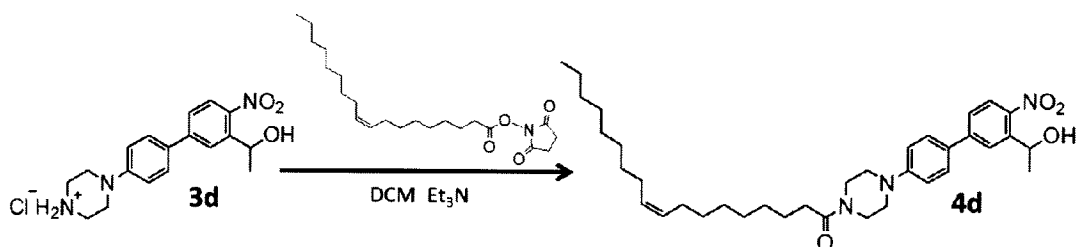


50 mL ナスフラスコ中に化合物2d(MW: 427.49, 107.3 mg, 251 μ mol, 1.0 eq)を入れ、減圧乾燥した。10 mLの4N HCl/酢酸エチルを加え、30分の攪拌の後、減圧乾燥を行った。116.0 mg(収率>99%)の橙色固体が得られた。

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ . 1.60 (s, C(=O)CH₃, 3H); 3.46 (br, NH(CH)₂, 2H); 3.66 (br, N(CH)₂, 2H); 5.52 (m, CHOH, 1H); 7.16 (d, aromatic N C(CH)₂, 2H); 7.58 (d, aromatic C(CH)₂, 2H); 7.79 (d, aromatic CH-m-NO₂, 1H); 8.02 (d, aromatic CH-o-NO₂, 1H); 8.07 (s, aromatic C(OH)CCH, 1H)

[0151] (4) 化合物4dの合成

[化,73]



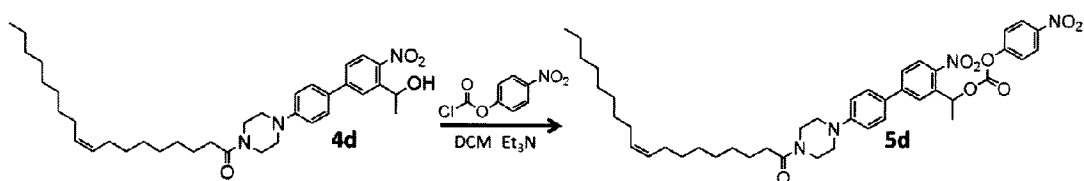
50 mL ナスフラスコ中に化合物3d (MW: 363.84, 91.0 mg, 250 μ mol, 1.0 eq)、オレイン酸NHS (MW: 379.53, 142.0 mg, 374 μ mol, 1.5eq)を入れ、減圧乾燥した。乾燥DCM 5 mLと乾燥Et₃N (MW: 101.19, d=0.726, 360 μ L, 261.4 mg, 2.58 mmol, 10 eq)を加えて攪拌した。1.5時間後、TLC(CHCl₃:MeOH=6:1)によって確認したところ、化合物3dのスポット(Rf: 0.2)は消失しており、反応の完了を確認した。減圧乾燥した後、酢酸エチル50 mLに溶解し、飽和食塩水50 mLで二回洗浄し、さらにMilliQ水50 mLで二回洗浄した。減圧乾燥を行った後、シクロヘキサン40 mLに懸濁し、10000 Gで10℃, 3分遠心した後に上清を除去する洗浄を3回行った。減圧乾燥したところ、115.6 mg (収率78%)の橙色固体が得られた。

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ . 0.88 (t, CH₂CH₃, 3H); 1.20–1.36 (br m, CH
3CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂, CH=CHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂, 20H); 1.60–1.72 (m, CH(OH)

CH₃, NC(=O)CH₂CH₂, 5H); 2.01 (m, CH₂CH=CH, 4H); 2.38 (t, C(=O)CH₂, 2H); 3.22–3.32 (br, N(CH)₂, 2H); 3.66, 3.81 (br, C(=O)N(CH)₂, 2H); 5.35 (m, CH=CH, 2H); 5.55 (m, CHOH, 1H); 7.01 (d, aromatic NC(CH)₂, 2H); 7.58 (d, aromatic CH–m-NO₂, 1H); 7.59 (d, aromatic C(CH)₂, 2H); 8.02 (d, aromatic CH–o-NO₂, 1H); 8.03 (s, aromatic C(OH)CCH, 1H)

[0152] (5) 化合物5dの合成

[化74]



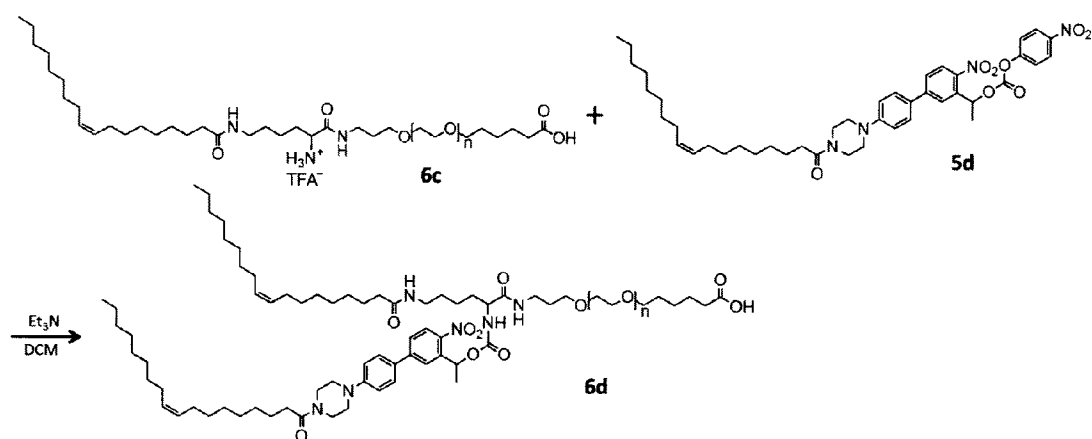
50 mL ナスフラスコ中に化合物4d(MW: 591.82, 115.6 mg, 195.3 μmol , 1.0 eq)、クロロギ酸4-ニトロフェノール(MW: 201.56, 68.8 mg, 341 μmol , 1.7 eq)を入れ、減圧乾燥した。乾燥DCM 5 mLと乾燥Et₃N (MW: 101.19, d=0.726, 500 μL , 363 mg, 3.59 mmol, 18 eq)を加えて攪拌した。4時間後、TLC(ヘキサン:酢酸エチル=1:1)によって確認したところ、化合物4dのスポット(Rf: 0.22)は消失しており、反応の完了を確認した。減圧乾燥した後、直径2.0 cmのカラム管に高さ15 cmまでシリカゲルを詰め、反応物をヘキサン:酢酸エチル1:1の溶媒 3.0 mLでロードし、ヘキサン:酢酸エチル=3:2の展開溶媒でカラム精製した。減圧乾燥を行ったところ、140.2 mg(収率95%)の橙色固体が得られた。

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ . 0.88 (t, CH₂CH₃, 3H); 1.20–1.36 (br m, CH
3CH₂CH₂CH₂CH₂ CH₂CH₂, CH=CHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂, 20H); 1.67 (t, NC(=O)CH₂,
2H); 1.84 (d, CH(OH)CH₃, 3H); 2.01 (m, CH₂CH=CH, 4H); 2.38 (t, C(=O)
CH₂, 2H); 3.24–3.33 (br, N(CH)₂, 2H); 3.67, 3.82 (br, C(=O)N(CH)₂, 2H
); 5.35 (m, CH=CH, 2H); 6.52 (m, CHOH, 1H); 7.03 (d, aromatic NC(CH)₂
, 2H); 7.34 (d, aromatic C(=O)OC(CH)₂, 2H); 7.58 (d, aromatic C(CH)₂,

2H); 7.65 (d, aromatic CH-m-NO₂, 1H); 7.87 (s, aromatic C(OH)CCH, 1H)
; 8.11 (d, aromatic CH-o-NO₂, 1H); 8.25 (d, aromatic (CH)₂-o-NO₂, 2H)

[0153] (6) 化合物6dの合成

[化75]



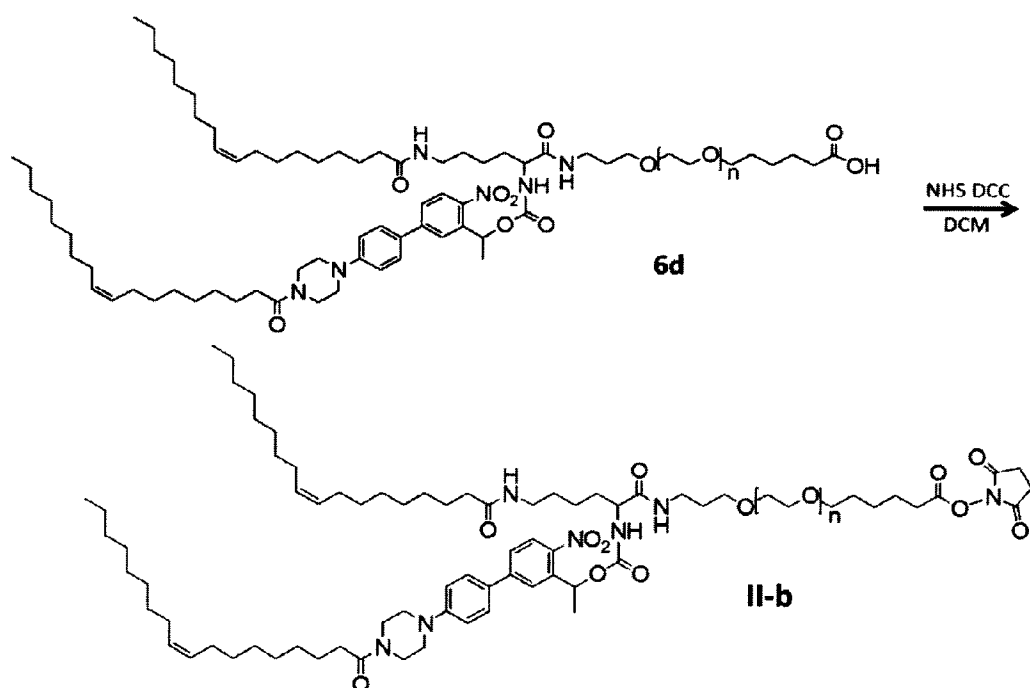
50 mL ナスフラスコ中に化合物6c(MW: 3870.18, 116.0 mg, 30.0 μ mol, 1.0 eq)、化合物5d(MW: 756.93, 31.2 mg, 41.2 μ mol, 1.4 eq)を入れ、減圧乾燥した。乾燥DCM 3 mLと乾燥Et₃N (MW: 101.19, d=0.726, 42 μ L, 30.5 mg, 301 μ mol, 10 eq)を加えて攪拌した。2日後、TLC(CHCl₃:MeOH=6:1)とニンヒドリンで確認したところ、呈色は起きなかったため、反応を完了した。攪拌中のジエチルエーテル40 mLに、1.5 mLのDCMに溶解して滴下した。10000 gで10分遠心後、上清をデカンテーションにより除去し、減圧乾燥を行ったところ、125.6 mg(収率96%)の薄黄色固体が得られた。

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ . 0.88 (t, CH₂CH₃, 6H); 1.20–1.36 (br m, CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂, CH=CHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂, NHCH₂CH₂CH₂CH₂, 44H); 1.38–1.53 (br m, CH₂CH₂CH₂CH₂C(=O)NH, NHCH₂CH₂CH₂CH₂, 4H); 1.55–1.68 (br m, CH₂CH₂CH₂C(=O)OH, CH₂CH₂CH(NH₂), 6H); 1.70–1.84 (m, CH₂C(=O)NH, 4H); 2.00 (m, CH₂CH=CH, 8H); 2.08–2.24 (br m, CH₂CHC(=O)NH, NHC(=O)CH₂CH₂CH₂CH₂, 4H); 2.32 (t, CH₂C(=O)OH, 2H); 2.39 (m, CH₂CH₂NHC(=O)CH₂, 4H); 3.24–3.40 (br m, N(CH)₂, CH₂C(=O)NHCH₂, CHC(=O)NHCH₂, 6H); 3.48 (m,

CHC(=O)NH, 1H); 3.50–3.88 (br m, CH₂O(CH₂CH₂O)_nCH₂, OCH₂CH₂CH₂CH₂, C(=O)N(CH₂)₂); 5.34 (m, CH=CH, 4H); 5.59 (m, CHC(=O)NH, 1H); 6.37 (m, CH₂, 1H); 7.05 (d, aromatic NC(CH₂)₂, 2H); 7.56–7.62 (m, aromatic C(CH₂)₂, aromatic CH-m-NO₂, 3H); 7.82 (s, aromatic OCH(CH₃)CCH, 1H); 8.05 (t, aromatic CH-o-NO₂, 1H);

[0154] (7) 化合物(II-b)の合成

[化76]



10 mL ナスフラスコ中に化合物**6d**(MW: 4373.97, 21.9 mg, 5.01 μ mol, 1.0 eq)、NHS (MW: 115.1, 0.9 mg, 7.51 μ mol, 1.5 eq)、DCC (MW: 206.33, 2.1 mg, 10.2 μ mol, 2.0 eq)を入れ、減圧乾燥後、乾燥DCM 1 mLを入れた。21時間反応させ、減圧乾燥を行った。0.8 mLのDCMを加えて析出物をろ過により除去し、攪拌中のジエチルエーテル12 mLに、滴下した。10000 g、10分遠心後、上清を除去し、減圧乾燥を行ったところ、21.7 mg(収率98%)の薄黄色固体が得られた。

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ . 0.88 (t, CH₂CH₃, 6H); 1.20–1.36 (br m, CH

3CH₂CH₂CH₂CH₂ CH₂CH₂, CH=CHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂, NHCH₂CH₂CH₂CH₂, 44H); 1.38–1.53 (br m, CH₂CH₂CH₂CH₂C(=O)NH, NHCH₂CH₂CH₂O, 4H); 1.55–1.68 (br m, CH₂CH₂CH₂C(=O)OH, CH₂CH₂CH(NH₂), 6H); 1.70–1.84 (m, CH₂C(=O)NH, 4H); 2.00 (m, CH₂CH=CH, 8H); 2.08–2.24 (br m, CH₂CHC(=O)NH, NHC(=O)CH₂CH₂CH₂O, 4H); 2.39 (m, CH₂CH₂NHC(=O)CH₂, 4H); 2.62 (t, CH₂C(=O)O, 2H); 2.85 (s, C(=O)CH₂CH₂C(=O), 4H); 3.24–3.40 (br m, N(CH)₂, CH₂C(=O)NHCH₂, CHC(=O)NHCH₂, 6H); 3.48 (m, CHC(=O)NH, 1H); 3.50–3.88 (br m, CH₂O(CH₂CH₂)_nCH₂, OCH₂CH₂CH₂CH₂, CON(CH)₂); 5.34 (m, CH=CH, 4H); 5.59 (m, CHC(=O)NH, 1H); 6.37 (m, CH₃, 1H); 7.05 (d, aromatic NC(CH)₂, 2H); 7.56–7.62 (m, aromatic C(CH)₂, aromatic CH–m–NO₂, 3H); 7.82 (s, aromatic OC(CH₃)CCH, 1H); 8.05 (t, aromatic CH–o–NO₂, 1H)

[0155] 実施例 10：化合物(II-b)の細胞固定化機能の評価

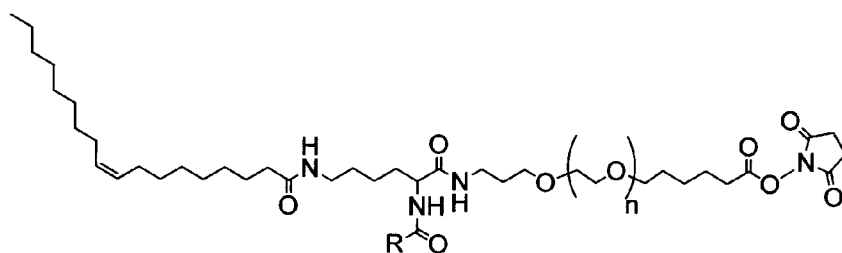
実施例 5 と同様の方法でマイクロ流路にBSAのコート、続いて化合物(II-b)の修飾を行った。ただし、化合物(II-b)をH₂O:DMSO=1:1(v/v)に溶解した溶液を基板修飾に用いた。また、化合物(II-b)修飾後の洗浄は、PBSによって行った。そのマイクロ流路に405 nmの光を照射し、45 μLのBa/F3(EGFP)細胞(2×10⁸ cells/mL)PBS懸濁液をマイクロ流路の片方のチャンバーにのみ入れ、大気圧により流路内に細胞を流れ込ませた。30分静置後、1 mLのPBSで非固定化細胞を洗浄除去し、蛍光顕微鏡により流路内に固定化されている細胞を観察した。光を照射しなかった表面には細胞はほとんど固定化されなかったが(図 17 左)、光照射表面には細胞が固定化された(図 17 右)。したがって、化合物(II-b)も光照射による細胞固定化に利用可能であることが確認された。

[0156] 参考例 1

脂質膜結合阻害基の効果についての検討

以下のモデル化合物 (I-e) ~ (I-k) を合成し、脂質膜結合阻害基として機能する置換基を検討した。

[化77]

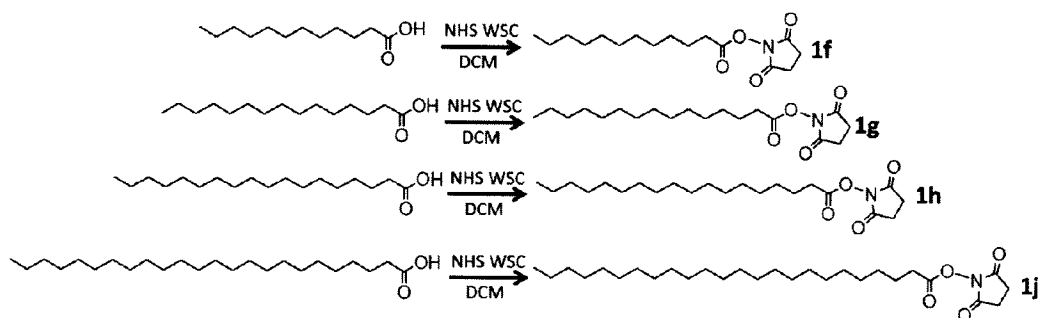


化合物	R	
I-e	$\text{H}_3\text{C}-\frac{\text{C}}{\text{C}}$	メチル (C1)
I-f		ウンデシル (C11)
I-g		テトラデシル (C14)
I-h		ヘプタデシル (C17)
I-i	シス-8-ヘプタデセニル	(C17)
I-j		トリコシル(C23)
I-k		コレステリル

[0157] (1) 化合物(I-e、I-f、I-g、I-h、I-i、I-j)の合成

(1-1) 化合物1f、1g、1h、1jの合成

[化78]



ラウリン酸、ペンタデシル酸、ステアリン酸、リグノセリン酸をNHSで活性化した。これらの脂肪酸NHS活性エステルは、共通して、以下に示す当該業者に既知の手法で合成した。それぞれの脂肪酸と過剰量のN-ヒドロキシスクシンイミドを、WSCを縮合剤として用いて乾燥DCM中で反応させた。減圧乾燥した後に酢酸エチルに溶解し、飽和食塩水で二回、続いて水で二回分液洗浄を行った。有機相の減圧乾燥を行い、白色の固体として各種脂質のNHS活性エステル体を得た。

[0158] (1-2) 化合物(1-e)、(1-f)、(1-g)、(1-h)、(1-i)、(1-j)の合成

合成によって得た脂肪酸NHS活性エステルである化合物1f、1g、1h、1j、そして購入した化合物1e (N-アセトキシスクシンイミド) 及び化合物1i (オレイン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル) を化合物6cのアミノ基に結合させ、続いてPEG末端カルボン酸をNHS活性エステル化した。これらのNHS活性エステルとアミノ基の反応、そしてカルボン酸のNHS活性エステル化は、共通して、以下に示す当該業者に既知の手法で行った。化合物6cと過剰量の脂肪酸NHS活性エステルを、乾燥Et₃Nの存在下で、乾燥DCM中で反応させた。ニンヒドリンを用いて反応の完了を確認した後、減圧乾燥を行った。過剰量のN-ヒドロキシスクシンイミドとDCCを加えて、乾燥DCM中で反応させた。反応溶液をろ過することにより、余剰のN-ヒドロキシスクシンイミドとDCC由来の反応副生成物を除去した。これを攪拌中のジエチルエーテルに滴下し、

遠心後、上清をデカンテーションにより除去した。減圧乾燥を行ったところ、白色固体として化合物(1-e)、(1-f)、(1-g)、(1-h)、(1-i)、(1-j)を得た。

[0159] 化合物 (1-e)

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ . 0.88 (t, CH_2CH_3 , 3H); 1.20–1.36 (br m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, 24H); 1.38–1.53 (br m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 6H); 1.55–1.68 (br m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)$, 6H); 1.70–1.84 (m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}$, 2H); 2.00–2.08 (m, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$, $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{NH}$, 7H); 2.15 (br m, $\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 2H); 2.62 (t, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}$, 2H); 2.85 (s, $\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})$, 4H); 3.24–3.40 (br m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2$, $\text{CHC}(=\text{O})\text{NHCH}_2$, 4H); 3.50–3.88 (br m, $\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 4.34 (m, $\text{CHC}(=\text{O})\text{NH}$, 1H); 5.34 (m, $\text{CH}=\text{CH}$, 2H)

[0160] 化合物 (1-f)

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ . 0.88 (t, CH_2CH_3 , 6H); 1.20–1.36 (br m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9$, 44H); 1.38–1.53 (br m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 4H); 1.55–1.68 (br m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)$, 6H); 1.70–1.84 (m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}$, 2H); 2.00 (m, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$, 4H); 2.15 (br m, $\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 2H); 2.21 (m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}$, 2H); 2.62 (t, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}$, 2H); 2.85 (s, $\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})$, 4H); 3.24–3.40 (br m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2$, $\text{CHC}(=\text{O})\text{NHCH}_2$, 4H); 3.50–3.88 (br m, $\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 4.34 (m, $\text{CHC}(=\text{O})\text{NH}$, 1H); 5.34 (m, $\text{CH}=\text{CH}$, 2H)

[0161] 化合物 (1-g)

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ . 0.88 (t, CH_2CH_3 , 6H); 1.20–1.36 (br m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}$, 50H); 1.38–1.53 (br m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 4H); 1.55–1.68 (br m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)$, 6H); 1.70–1.84 (m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}$, 2H); 2.00 (m, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$, 4H); 2.15 (br m, $\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 2H); 2.21 (m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}$, 2H); 2.62 (t, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}$, 2H); 2.85 (s, $\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})$, 4H); 3.24–3.40 (br m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2$, $\text{CHC}(=\text{O})\text{NHCH}_2$, 4H); 3.50–3.88 (br m, $\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 4.34 (m, $\text{CHC}(=\text{O})\text{NH}$, 1H); 5.34 (m, $\text{CH}=\text{CH}$, 2H)

C(=O)NH, 2H); 2.00 (m, CH₂CH=CH, 4H); 2.15 (br m, NHC(=O)CH₂CH₂CH₂O, 2H); 2.21 (m, CH₂C(=O)NHCH, 2H); 2.62 (t, CH₂C(=O)O, 2H); 2.85 (s, C(=O)CH₂CH₂C(=O), 4H); 3.24–3.40 (br m, CH₂C(=O)NHCH₂, CHC(=O)NHCH₂, 4H); 3.50–3.88 (br m, CH₂O(CH₂CH₂)_nCH₂, OCH₂CH₂CH₂CH₂); 4.34 (m, CHC(=O)NH, 1H); 5.34 (m, CH=CH, 2H)

[0162] 化合物 (I – h)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ . 0.88 (t, CH₂CH₃, 6H); 1.20–1.36 (br m, CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂, CH=CHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂, NHCH₂CH₂CH₂CH₂, CH₃(CH₂)₁₅, 56H); 1.38–1.53 (br m, CH₂CH₂CH₂CH₂C(=O)NH, NHCH₂CH₂CH₂O, 4H); 1.55–1.68 (br m, CH₂CH₂CH₂C(=O)OH, CH₂CH₂CH(NH₂), 6H); 1.70–1.84 (m, CH₂C(=O)NH, 2H); 2.00 (m, CH₂CH=CH, 4H); 2.15 (br m, NHC(=O)CH₂CH₂CH₂O, 2H); 2.21 (m, CH₂C(=O)NHCH, 2H); 2.62 (t, CH₂C(=O)O, 2H); 2.85 (s, C(=O)CH₂CH₂C(=O), 4H); 3.24–3.40 (br m, CH₂C(=O)NHCH₂, CHC(=O)NHCH₂, 4H); 3.50–3.88 (br m, CH₂O(CH₂CH₂)_nCH₂, OCH₂CH₂CH₂CH₂); 4.34 (m, CHC(=O)NH, 1H); 5.34 (m, CH=CH, 2H)

[0163] 化合物 (I – i)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ . 0.88 (t, CH₂CH₃, 6H); 1.20–1.36 (br m, CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂, CH=CHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂, NHCH₂CH₂CH₂CH₂, 44H); 1.38–1.53 (br m, CH₂CH₂CH₂CH₂C(=O)NH, NHCH₂CH₂CH₂O, 4H); 1.55–1.68 (br m, CH₂CH₂CH₂C(=O)OH, CH₂CH₂CH(NH₂), 6H); 1.70–1.84 (m, CH₂C(=O)NH, 2H); 2.00 (m, CH₂CH=CH, 4H); 2.15 (br m, NHC(=O)CH₂CH₂CH₂O, 2H); 2.21 (m, CH₂C(=O)NHCH, 2H); 2.62 (t, CH₂C(=O)O, 2H); 2.85 (s, C(=O)CH₂CH₂C(=O), 4H); 3.24–3.40 (br m, CH₂C(=O)NHCH₂, CHC(=O)NHCH₂, 4H); 3.50–3.88 (br m, CH₂O(CH₂CH₂)_nCH₂, OCH₂CH₂CH₂CH₂); 4.34 (m, CHC(=O)NH, 1H); 5.34 (m, CH=CH, 4H)

[0164] 化合物 (I – j)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ . 0.88 (t, CH₂CH₃, 6H); 1.20–1.36 (br m, CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂, CH=CHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂, NHCH₂CH₂CH₂CH₂, CH₃(CH₂)₂

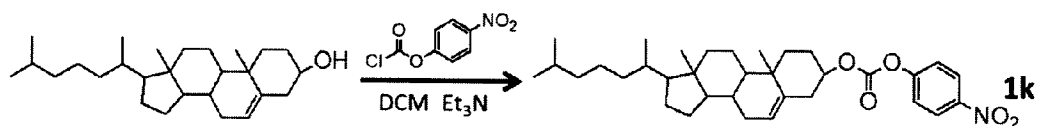
1, 68H); 1.38–1.53 (br m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 4H); 1.55–1.68 (br m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)$, 6H); 1.70–1.84 (m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}$, 2H); 2.00 (m, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$, 4H); 2.15 (br m, $\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 2H); 2.21 (m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}$, 2H); 2.62 (t, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}$, 2H); 2.85 (s, $\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})$, 4H); 3.24–3.40 (br m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2$, $\text{CHC}(=\text{O})\text{NHCH}_2$, 4H); 3.50–3.88 (br m, $\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 4.34 (m, $\text{CHC}(=\text{O})\text{NH}$, 1H); 5.34 (m, $\text{CH}=\text{CH}$, 2H)

[0165] (2) 化合物(1-k)の合成

(2-1) 化合物1kの合成

実施例1(2)における化合物cの製造と同様の手法でコレステロールのp-ニトロフェノール誘導体化を行った。

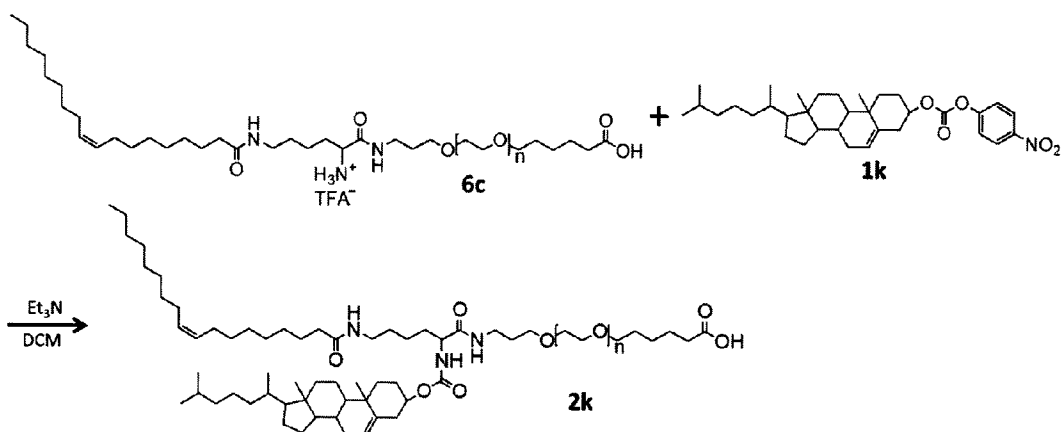
[化79]



[0166] (2-2) 化合物2kの合成

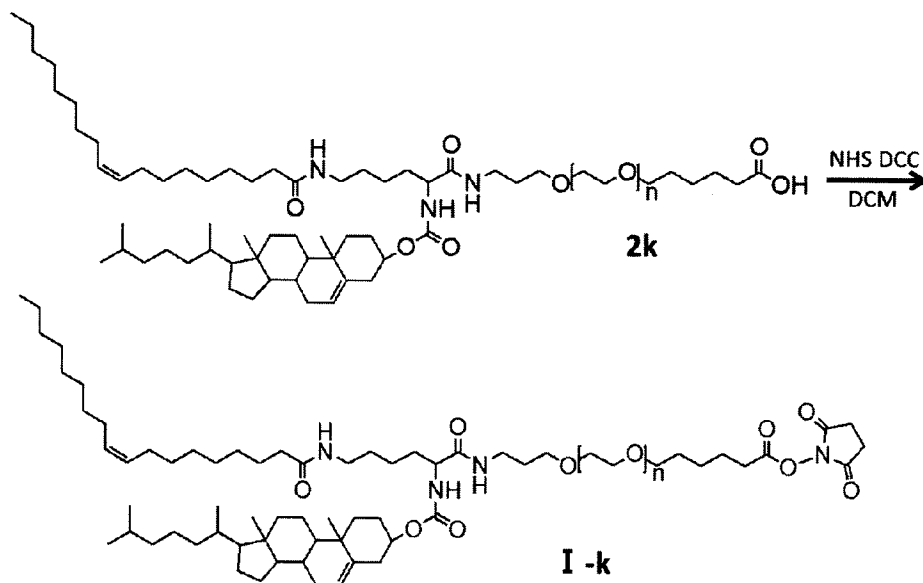
実施例1(7)における化合物7cの製造と同様の手法で化合物1kを化合物6cに結合させた。

[化80]



[0167] (2-3) 化合物(1-k)の合成

[化81]



実施例1(8)に記載の方法と同様の方法で、化合物(1-k)を得た。

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ . 0.68 (s, $\text{CH}_3\text{C}(\text{CH})_2\text{CH}_2$, 3H), 0.84-0.93 (m, CH_2CH_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH})\text{CH}_2$, 12H); 1.00 (s, $\text{CH}_3\text{C}(\text{CH})(\text{CH}_2)\text{C}$, 3H); 1.20-1.36 (br m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{21}$, 68H); 1.38-1.53 (br m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}$, $\text{NHCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 4H); 1.55-1.68 (br m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)$, 6H); 1.70-1.91 (m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NH}$, CCH_2CH , 4H); 2.00 (m, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$, 4H); 2.15 (br m, $\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 2H); 2.62 (t, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}$, 2H); 2.85 (s, $\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})$, 4H); 3.24-3.40 (br m, $\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{NHCH}_2$, $\text{CHC}(=\text{O})\text{NHCH}_2$, 4H); 3.50-3.88 (br m, $\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 4.08 (br, $\text{CH}(\text{CH}_2)\text{O}$, 1H); 4.34 (m, $\text{CHC}(=\text{O})\text{NH}$, 1H); 4.47 (br, $\text{CH}=\text{C}$, 1H); 5.34 (m, $\text{CH}=\text{CH}$, 2H)

[0168] 実施例5と同様の方法でマイクロ流路にBSAのコート、続いて各種PEG脂質誘導体の修飾を行った。ただし、PEG脂質を $\text{H}_2\text{O}:\text{DMSO}=1:1(\text{v/v})$ に溶解した溶液を基板修飾に用いた。また、PEG脂質修飾後の洗浄は、PBSによって行った。1

00 μL のBa/F3(EGFP)細胞(1×10^7 cells/mL)PBS懸濁液をマイクロ流路の片方のチャンバーにのみ入れ、大気圧により流路内に細胞を流れ込ませた。30分静置後、1 mLのPBSで非固定化細胞を洗浄除去し、流路内に固定化されている細胞数を計測した。結果を図18に示す。

[0169] 脂質膜結合阻害基がメチル基である場合のモデルである化合物(1-e)を修飾した流路には、細胞が固定化され、細胞固定化機能が阻害されることが無かった。一方、脂質膜結合阻害基が、メチルよりも長鎖のアルキル基(C11、C14、C17及びC23)及びコレステリル基などの疎水性基である場合のモデルである化合物(1-f、1-g、1-h、1-i、1-j、1-k)を修飾した流路には細胞が固定化されず、脂質膜結合機能が阻害された。したがって、脂質膜結合阻害基が疎水性基である場合に、脂質膜結合機能の阻害が好適になされることが示された。

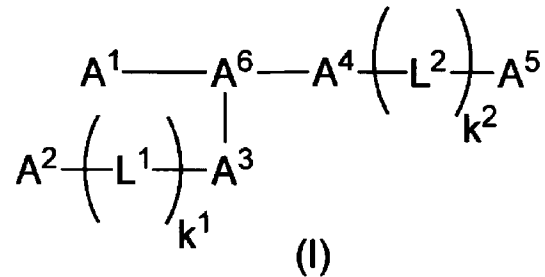
産業上の利用可能性

[0170] 本発明によれば、単一種類の脂質膜含有物のみならず、複数種類の脂質膜含有物も迅速かつ簡便にパターンニングすることが可能である。そのため、例えば、同一基板上に複数の異なる種類の細胞を配置して、薬剤候補品が効果を示す病態を一度に調べるなど、ハイスループットな薬剤スクリーニングが可能となる。また、単に細胞をランダムに混ぜ合わせただけの組織様構造物よりも、実際の生体組織に近い機能を有する組織を構築可能である。さらに、特定の細胞を選択的に単離することも可能である。

請求の範囲

[請求項1] 以下の式 (I)

[化1]



[式中、

A^1 は、脂質膜含有物中の脂質膜と結合する脂質膜結合基であり、

A^2 は、前記脂質膜結合基の脂質膜への結合を阻害する脂質膜結合阻害基であり、

A^3 は、光反応基であり、

A^4 は、親水性基であり、

A^5 は、修飾対象基材への反応基であり、

A^6 は、少なくとも3本の結合手を有する足場部位であり、

L^1 及び L^2 は、リンカーであり、

k^1 及び k^2 は、それぞれ独立して0又は1である]

で表される化合物であって、光反応により、脂質膜結合阻害基による結合阻害が解消されて、前記脂質膜結合基が脂質膜に結合可能となる、前記化合物。

[請求項2] 前記脂質膜含有物が、細胞、細胞小器官、小胞、ウイルス、リポソーム、ミセル及び脂質で被覆された量子ドットからなる群から選択される、請求項1に記載の化合物。

[請求項3] 前記修飾対象基材が、ウシ血清アルブミン、3-アミノプロピルトリエトキシシラン及びコラーゲンからなる群から選択される少なくとも

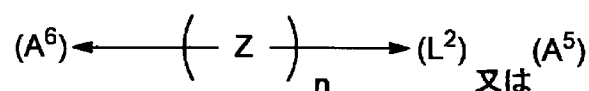
も1つで被覆された基材である、請求項1又は2に記載の化合物。

[請求項4] A^1 及び A^2 が、それぞれ独立して C_{7-22} アルキル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{6-14} アリール C_{7-22} アルキル基及び C_{7-22} アルキル C_{6-14} アリール基からなる群から選択され、ここで前記 C_{7-22} アルキル基中の隣接する炭素原子は、1～3個の不飽和結合によって連結されていてもよい、請求項1～3のいずれか1項に記載の化合物。

[請求項5] A^3 が、2-ニトロベンジル骨格、クマリン-4-イルメチル骨格、フェニルカルボニルメチル骨格、7-ニトロインドリノカルボニル骨格、アゾベンゼン骨格、フルギド骨格、スピロピラン骨格、スピロオキサジン骨格及びジアリールエテン骨格からなる群から選択される骨格を有する二価の基である、請求項1～4のいずれか1項に記載の化合物。

[請求項6] A^4 が、以下：

[化2]



[式中、

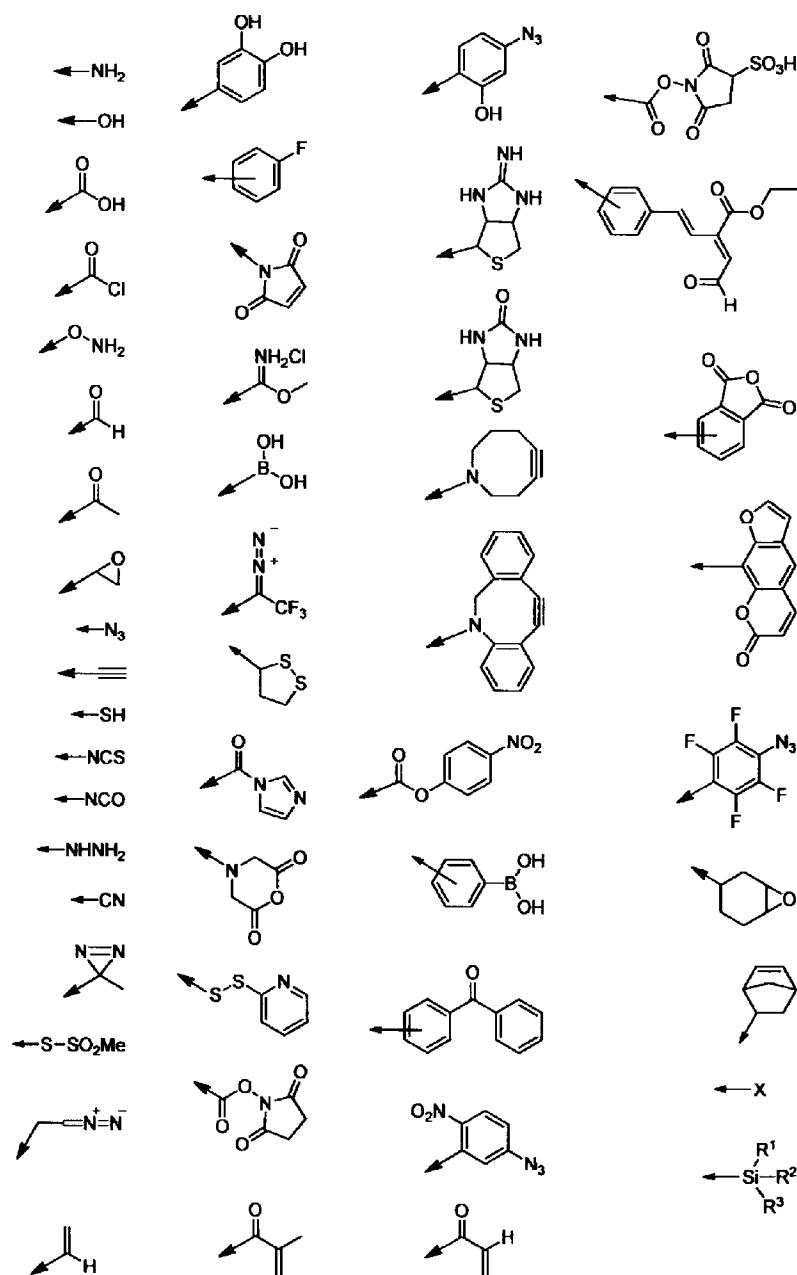
Zは、炭素数2～4のオキシアルキレン基であり、nは炭素数2～4のオキシアルキレン基の平均付加モル数を示し、かつ $2 \leq n \leq 500$ であり、

左側の矢印は、 A^6 への連結を示し、右側の矢印は、 k^2 が0の場合には A^5 への連結を示し、 k^2 が1の場合には L^2 への連結を示す]

で表される、請求項1～5のいずれか1項に記載の化合物。

[請求項7] A^5 が、以下の置換基：

[化3]



[式中、

矢印は、 k^2 が0の場合には A^4 への連結を示し、 k^2 が1の場合には L^2 への連結を示し、

Xはハロゲンであり、 R^1 、 R^2 及び R^3 はそれぞれ独立して、 C_{1-10} アルキル基、ハロゲン及び C_{1-10} アルコキシ基からなる群から選択される

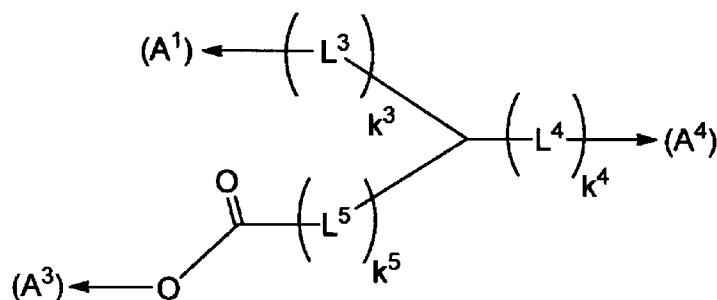
]

からなる群から選択される、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の化合物。

[請求項 8] L^1 及び L^2 が、それぞれ独立して、 C_{6-14} アリーレン基又は C_{1-10} アルキレン基であり、ここで前記アルキレン基中の炭素原子は 1 ～ 5 個のオキシ基で置換されていてもよく、隣接する炭素原子同士が 1 ～ 5 個の不飽和結合で結ばれていてもよく、そして前記アルキレン基中の炭素原子のうち、1 ～ 4 個の炭素原子が NH、N (C_{1-10} アルキル)、O 又は S で置き換えられていてもよい、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の化合物。

[請求項 9] A^6 が、以下：

[化 4]



[式中、

L^3 、 L^4 及び L^5 は、それぞれ独立して、 C_{6-14} アリーレン基又は C_{1-10} アルキレン基であり、ここで前記アルキレン基中の炭素原子は 1 ～ 5 個のオキシ基で置換されていてもよく、隣接する炭素原子同士が 1 ～ 5 個の不飽和結合で結ばれていてもよく、そして前記アルキレン基中の炭素原子のうち、1 ～ 4 個の炭素原子が NH、N (C_{1-10} アルキル)、O 又は S で置き換えられていてもよく、

k^3 、 k^4 及び k^5 は、それぞれ独立して 0 又は 1 であり、

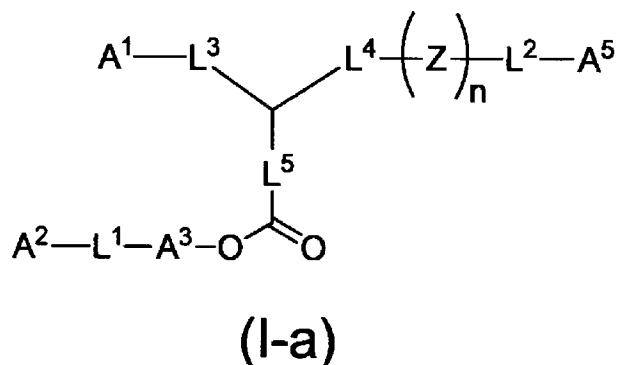
(A^1) 、 (A^3) 及び (A^4) への矢印はそれぞれ、 A^1 、 A^3 及び A^4 へ

の連結を示す]

で表される、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の化合物。

[請求項10] 以下の式 (I-a) :

[化5]



[式中、

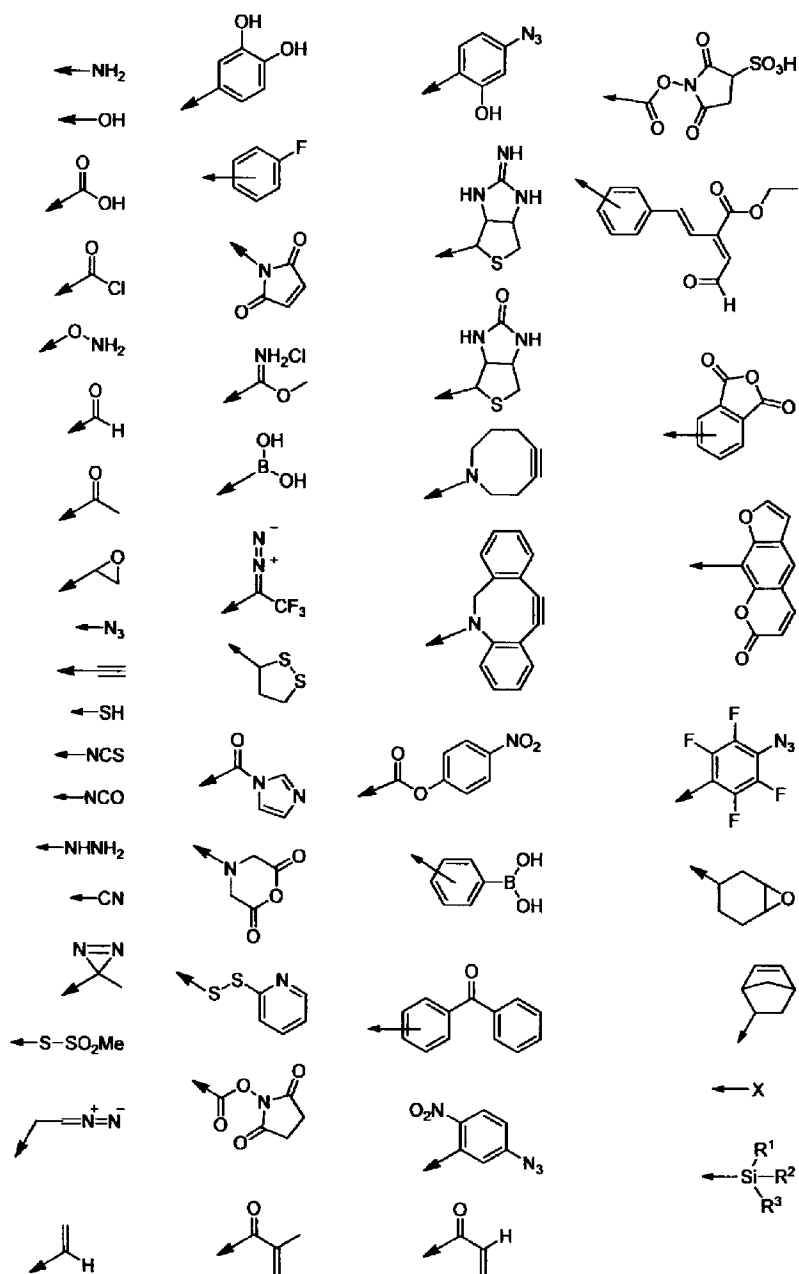
A¹及びA²は、それぞれ独立してC₇₋₂₂アルキル基、C₆₋₁₄アリール基、C₆₋₁₄アリールC₇₋₂₂アルキル基及びC₇₋₂₂アルキルC₆₋₁₄アリール基からなる群から選択され、ここで前記C₇₋₂₂アルキル基中の隣接する炭素原子は、1～3個の不飽和結合によって連結されていてもよく、

L¹～L⁵は、それぞれ独立して、C₆₋₁₄アリーレン基又はC₁₋₁₀アルキレン基であり、ここで前記アルキレン基中の炭素原子は1～5個のオキソ基で置換されていてもよく、隣接する炭素原子同士が1～5個の不飽和結合で結ばれていてもよく、そして前記アルキレン基中の炭素原子のうち、1～4個の炭素原子がNH、N(C₁₋₁₀アルキル)、O又はSで置き換えられていてもよく、

A³は、ニトロベンゼン骨格、クマリン骨格、ヒドロキシフェナンシル骨格、ニトロインドリン骨格、アゾベンゼン骨格、フルギド骨格、スピロピラン骨格、スピロオキサジン骨格及びジアリールエテン骨格からなる群から選択される骨格を有する二価の基であり、

A⁵は、以下の置換基：

[化6]



(式中、

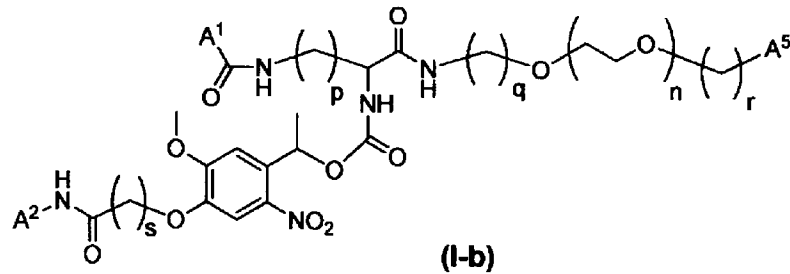
矢印は、 L^2 への連結を示し、

Xはハロゲンであり、R¹、R²及びR³はそれぞれ独立して、C₁₋₁₀アルキル基、ハロゲン、C₁₋₁₀アルコキシ基からなる群から選択される)からなる群から選択される]

で表される、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の化合物。

[請求項 11] 以下の式 (I-b) :

[化 7]



[式中、

A^1 及び A^2 が、それぞれ独立して C_{7-22} アルキル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{6-14} アリール C_{7-22} アルキル基及び C_{7-22} アルキル C_{6-14} アリール基からなる群から選択され、ここで前記 C_{7-22} アルキル基中の隣接する炭素原子は、1 ～ 3 個の不飽和結合によって連結されていてもよく、 n はオキシエチレン基の平均付加モル数を示し、かつ $4.5 \leq n \leq 50$ であり、

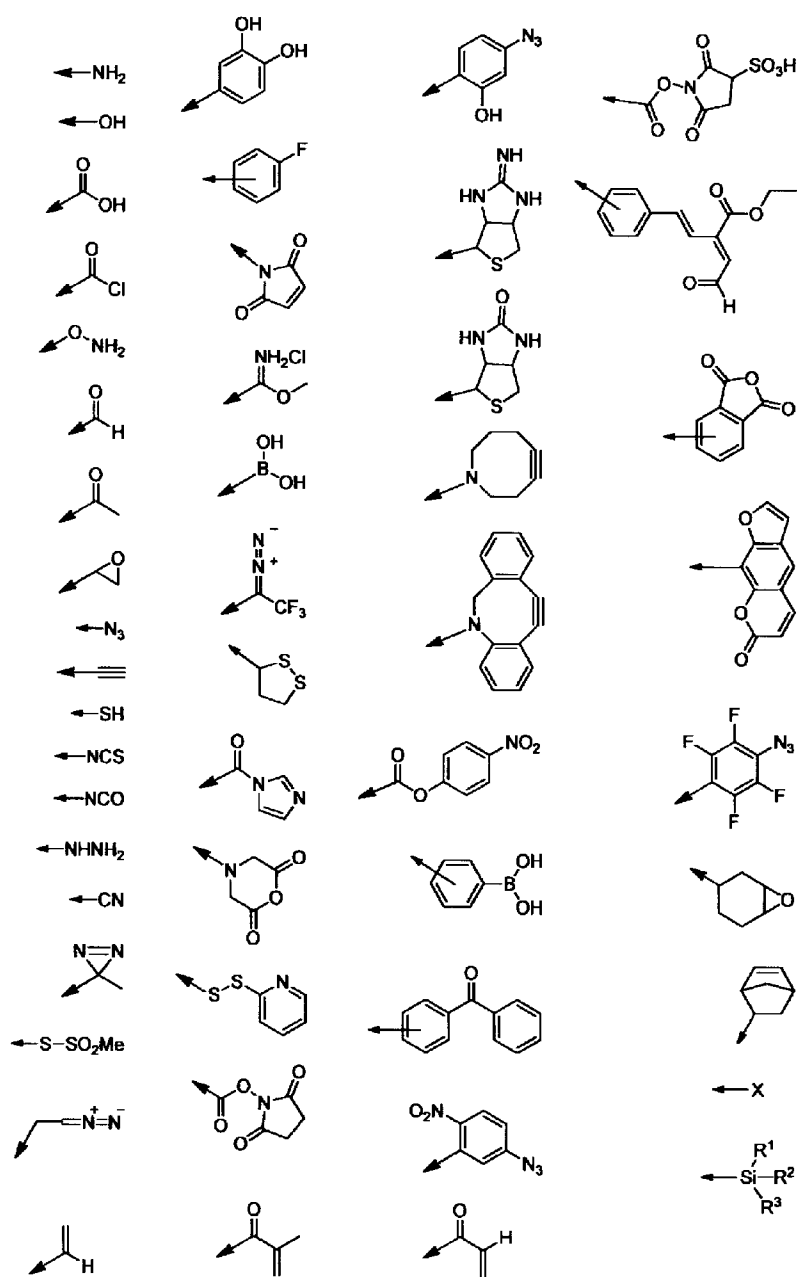
p は 0 ～ 8 であり、

q 及び s は、それぞれ独立して 0 ～ 7 であり、

r は 0 ～ 10 であり、

A^5 が、以下の置換基：

[化8]



(式中、

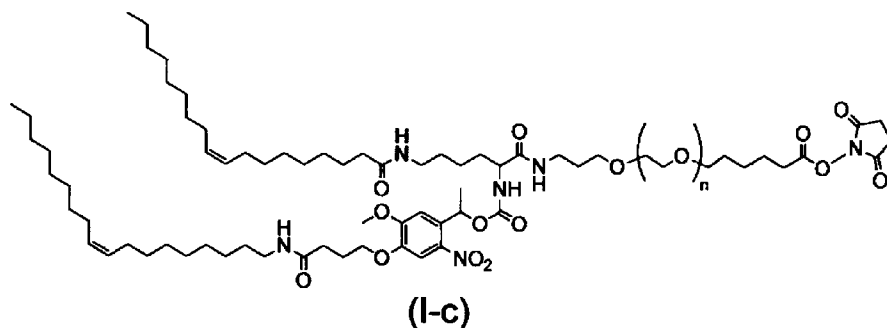
矢印は、化合物の残りの部分への連結を示し、

Xはハロゲンであり、 R^1 、 R^2 及び R^3 はそれぞれ独立して、 C_{1-10} アルキル基、ハロゲン、 C_{1-10} アルコキシ基からなる群から選択される)
からなる群から選択される]

で表される、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の化合物。

[請求項12] 以下の式 (I - c)

[化9]

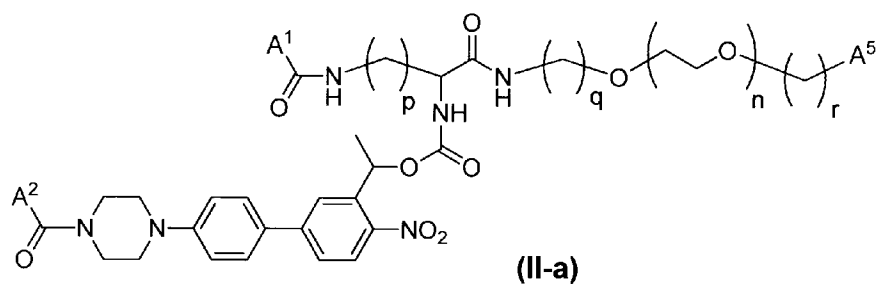


[式中、 n はオキシエチレン基の平均付加モル数を示し、かつ $4.5 \leq n \leq 500$ である]

で表される、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項に記載の化合物。

[請求項13] 以下の式 (II - a)

[化10]



[式中、

A^1 及び A^2 が、それぞれ独立して C_{7-22} アルキル基、 C_{6-14} アリール基、 C_{6-14} アリール C_{7-22} アルキル基及び C_{7-22} アルキル C_{6-14} アリール基からなる群から選択され、ここで前記 C_{7-22} アルキル基中の隣接する炭素原子は、1 ～ 3 個の不飽和結合によって連結されていてもよく、 n はオキシエチレン基の平均付加モル数を示し、かつ $4.5 \leq n \leq 50$

(式中、

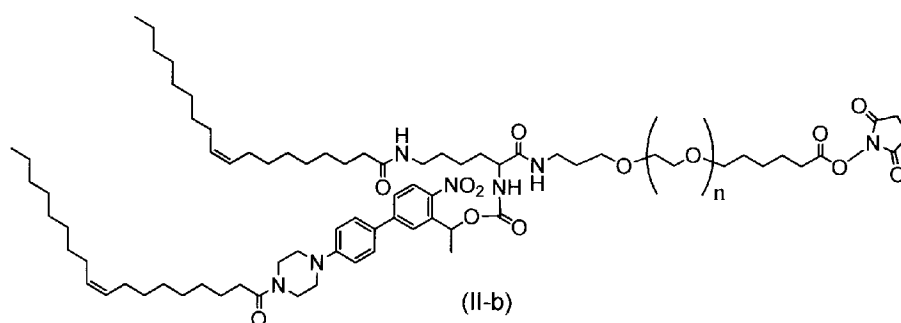
矢印は、化合物の残りの部分への連結を示し、

Xはハロゲンであり、 R^1 、 R^2 及び R^3 はそれぞれ独立して、 C_{1-10} アルキル基、ハロゲン、 C_{1-10} アルコキシ基からなる群から選択される)からなる群から選択される]

で表される、請求項1～10のいずれか1項に記載の化合物。

[請求項14] 以下の式 (II-b)

[化12]

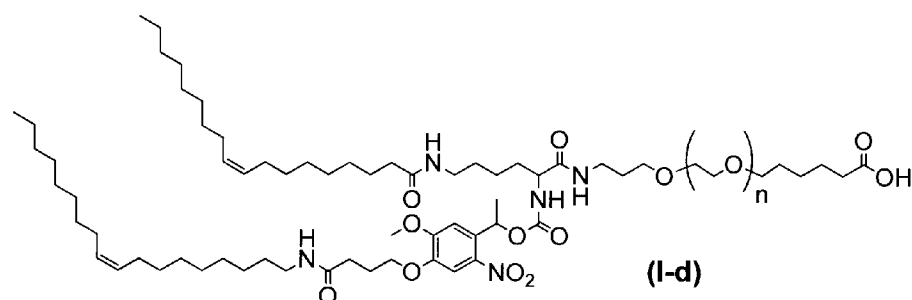


[式中、 n はオキシエチレン基の平均付加モル数を示し、かつ $4.5 \leq n \leq 500$ である]

で表される、請求項13に記載の化合物。

[請求項15] 以下の式 (I-d)

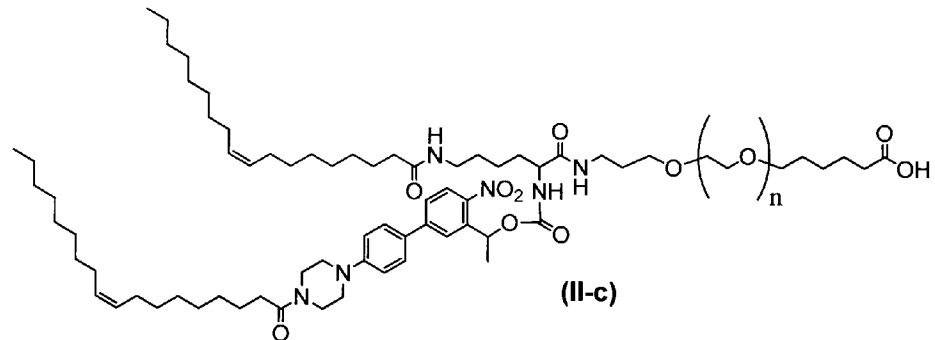
[化13]



[式中、 n はオキシエチレン基の平均付加モル数を示し、かつ $4.5 \leq n \leq 500$ である]

または、以下の式 (II-c)

[化14]



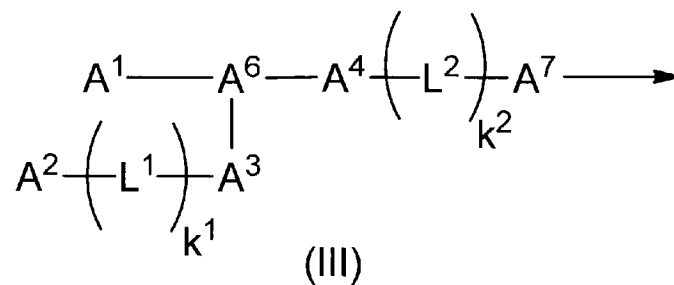
[式中、nはオキシエチレン基の平均付加モル数を示し、かつ $4.5 \leq n \leq 500$ である]

で表される、請求項1～10のいずれか1項に記載の化合物。

[請求項16] 請求項1～15のいずれか1項に記載の化合物とその修飾対象基材とを反応させて得られた、脂質膜含有物を固定化するための基材。

[請求項17] 以下の式 (III) の基：

[化15]



[式中、

$A^1 \sim A^4$ 、 A^6 、 L^1 、 L^2 、 k^1 及び k^2 は、請求項1～15のいずれか1項に定義された通りであり、

A^7 は、式 (III) のその他の部分と基材とを連結する二価の基であるか、又は基材と非共有結合で連結可能な反応基であり、

矢印は、基材への共有結合又は非共有結合による連結を示す]

を有する、脂質膜含有物を固定化するための基材。

[請求項18] 基材上に脂質膜含有物をパターンニングする方法であって、以下のステップ：

（１）請求項１６又は１７に記載の脂質膜含有物を固定化するための基材上において脂質膜含有物のパターンを形成する部分に光を照射して、当該部分の脂質膜結合基を脂質膜と結合可能な状態とし；

（２）前記脂質膜含有物を前記脂質膜結合基と反応させて前記脂質膜含有物のパターンを形成することを含む、前記方法。

[請求項19] 以下のステップ：

（３）ステップ（２）で得られた基材を洗浄して、未反応の脂質膜含有物を基材から除去し；

（４）以前のステップで使用した脂質膜含有物とは異なる脂質膜含有物を使用して、ステップ（１）～（３）を繰り返すことで、複数の異なる脂質膜含有物のパターンを形成することを含む、請求項１８に記載の方法。

[請求項20] 脂質膜含有物を単離する方法であって、以下のステップ：

（１）請求項１６又は１７に記載の脂質膜含有物を固定化するための基材に、脂質膜含有物を含む試料を適用し；

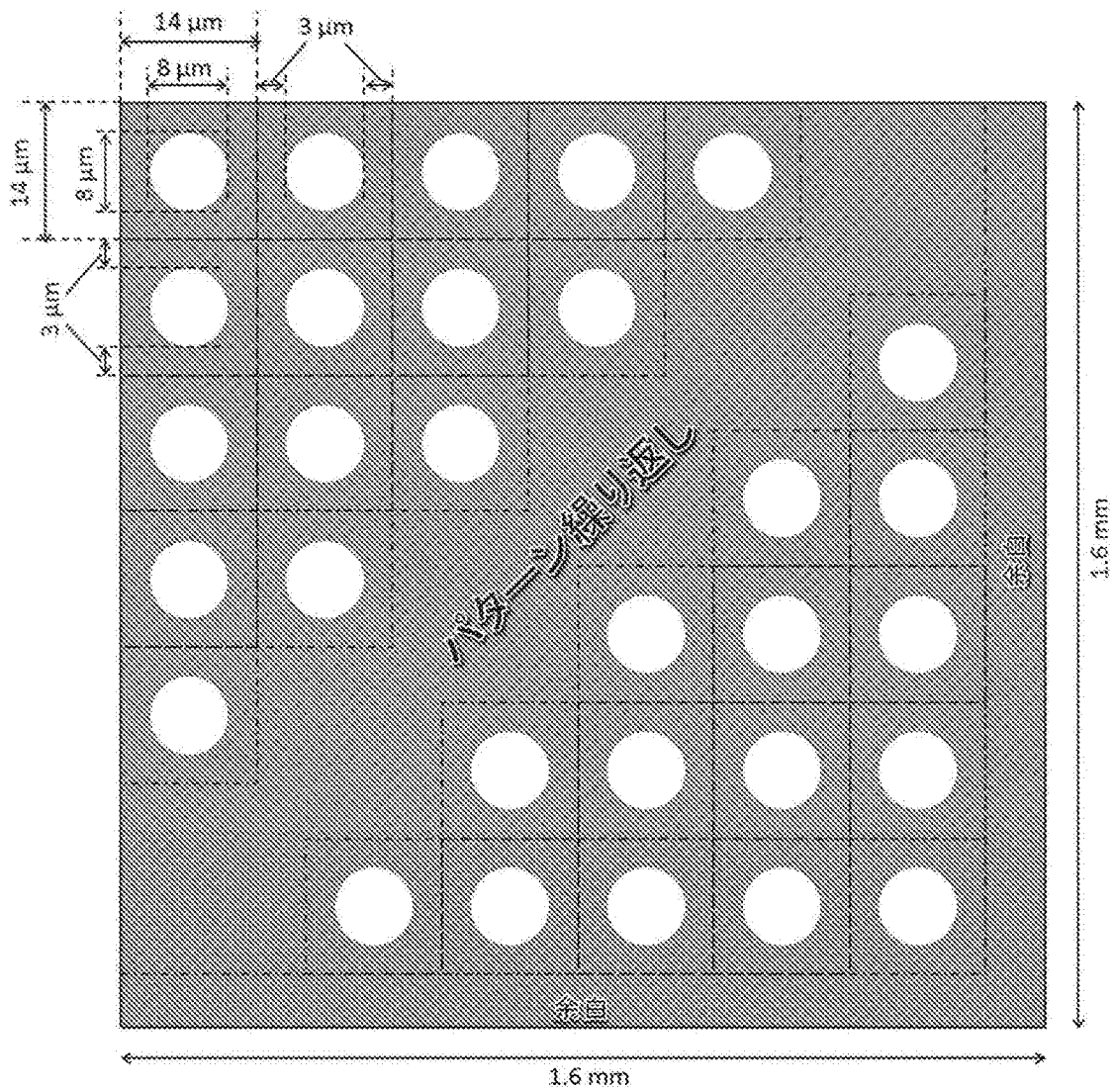
（２）基材上の前記脂質膜含有物の位置を顕微鏡観察に基づいて検出し；

（３）前記位置に光を照射して、前記位置の脂質膜結合基を脂質膜と結合可能な状態とし、基材上に前記脂質膜含有物を固定化し；

（４）ステップ（３）で得られた基材を洗浄して、基材に固定化されていない物質を基材から除去することを含む、前記方法。

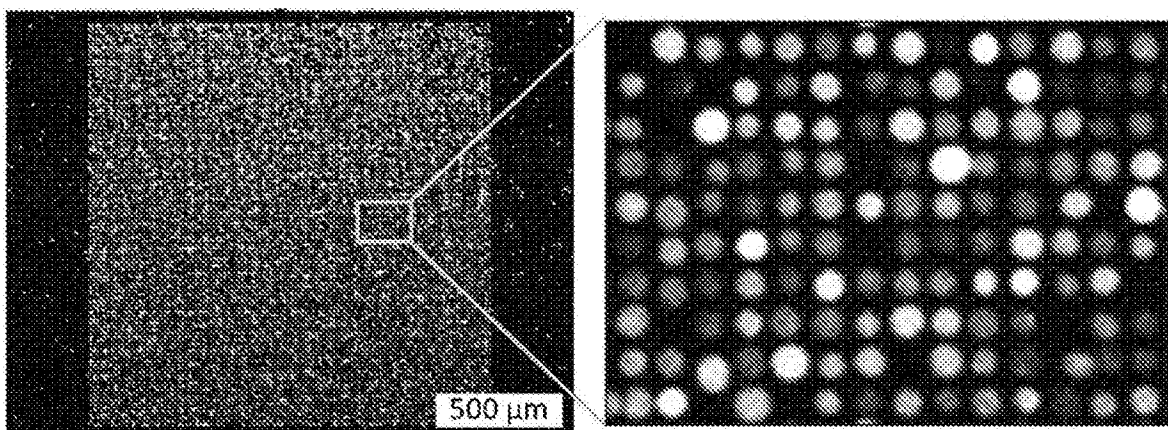
[図1]

図1



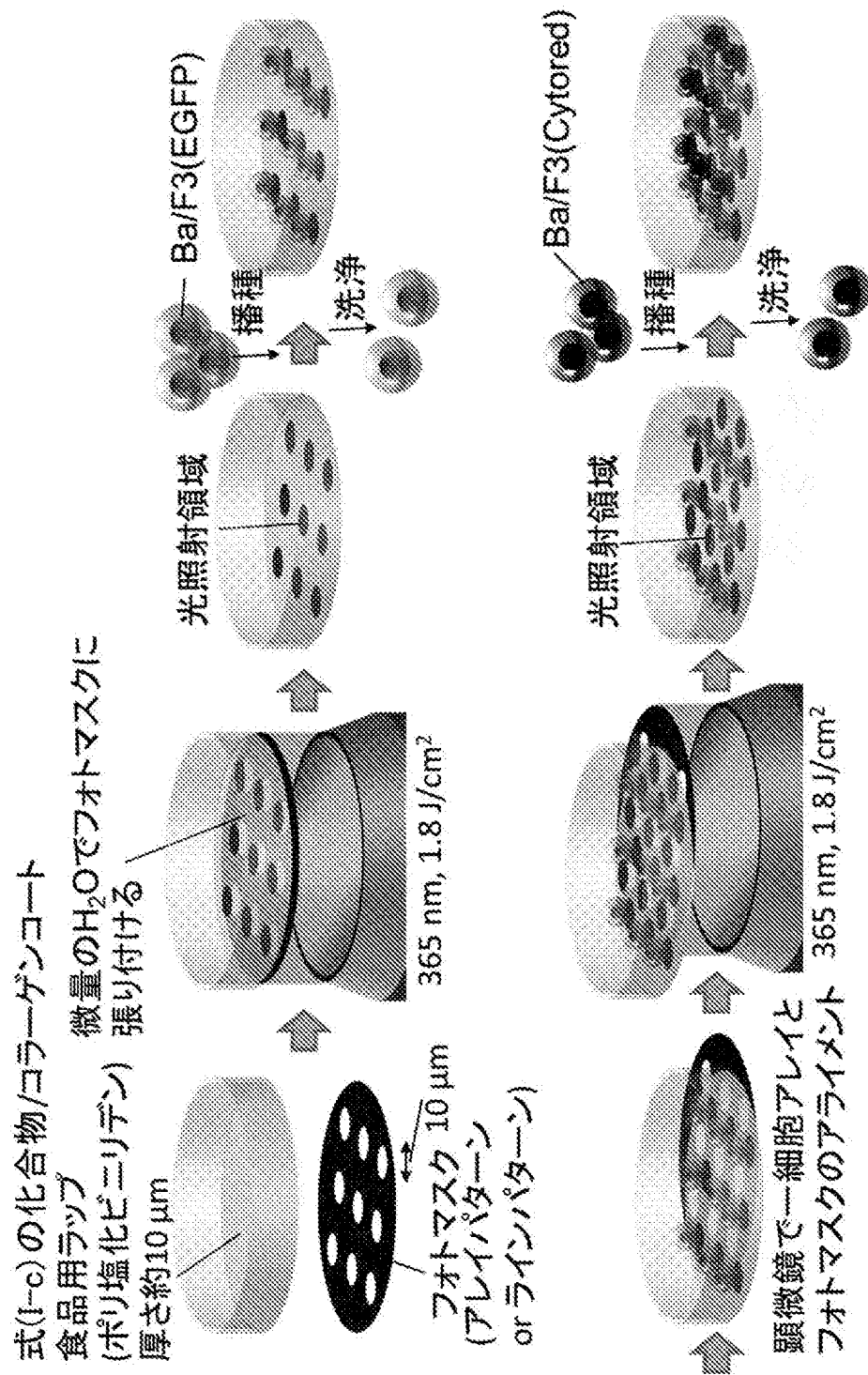
[図2]

図2



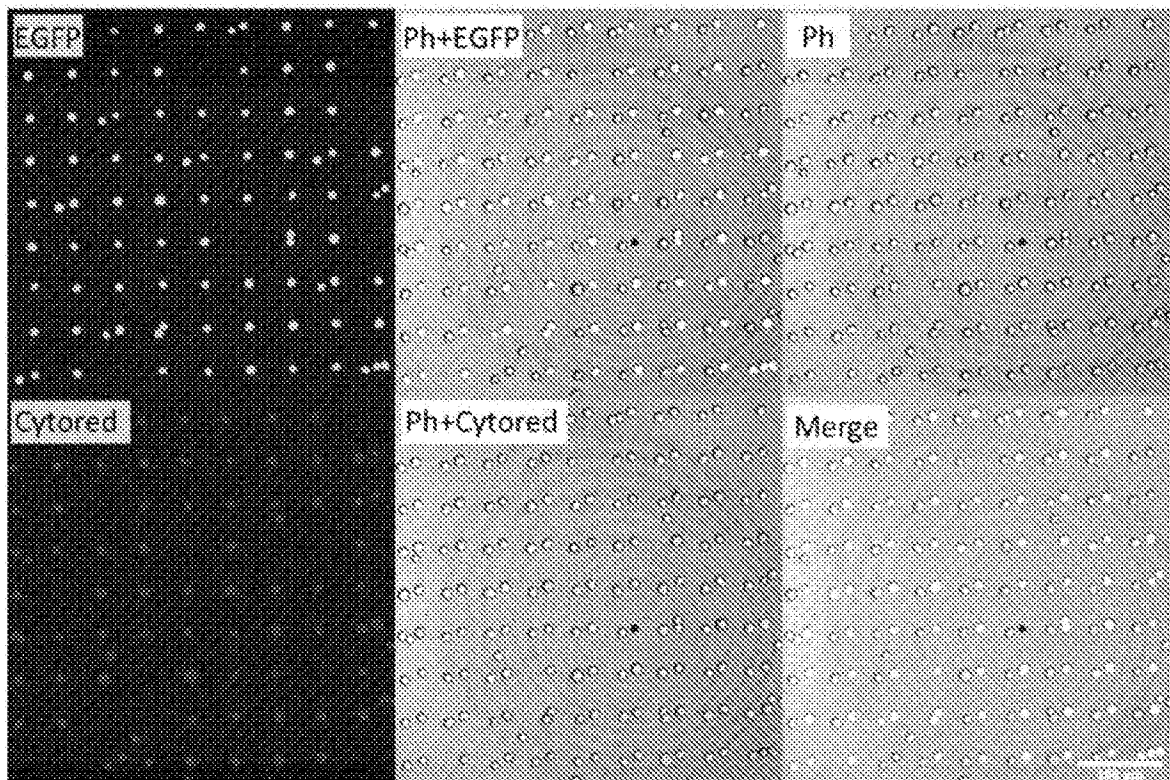
[図3]

図3



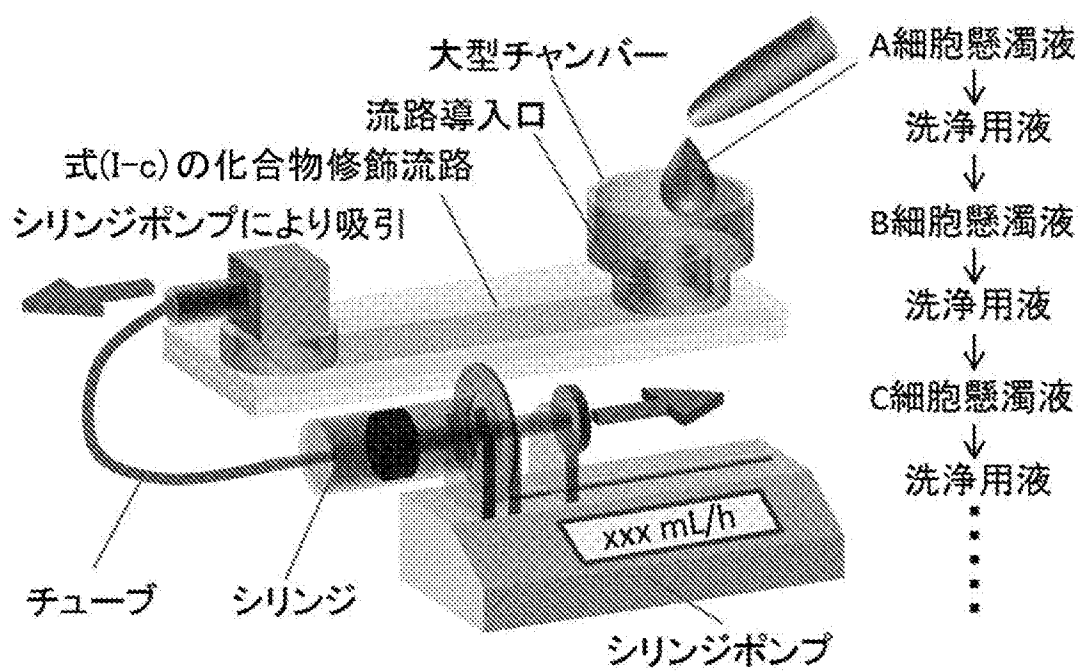
[図4]

図4



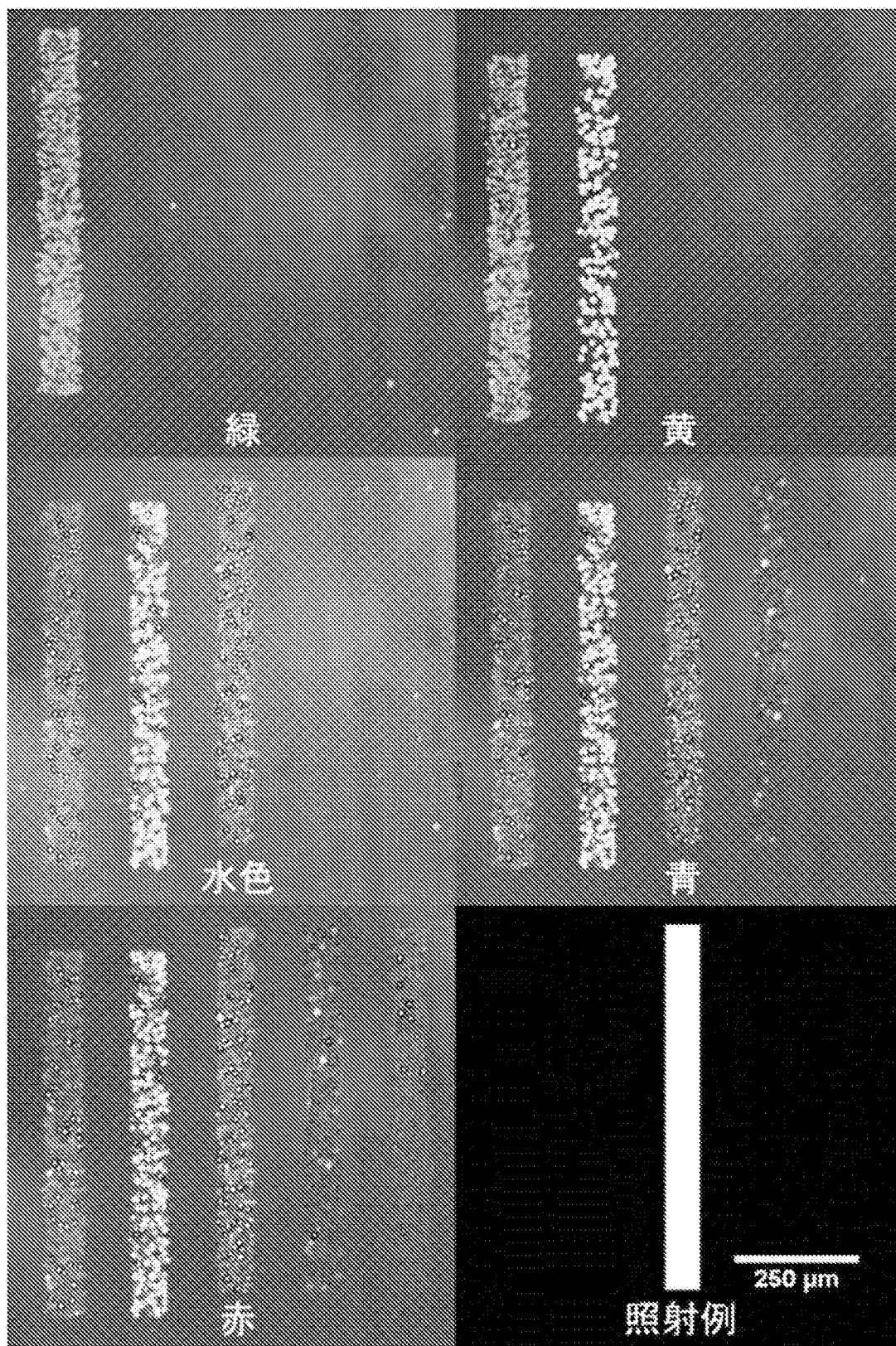
[図5]

図5



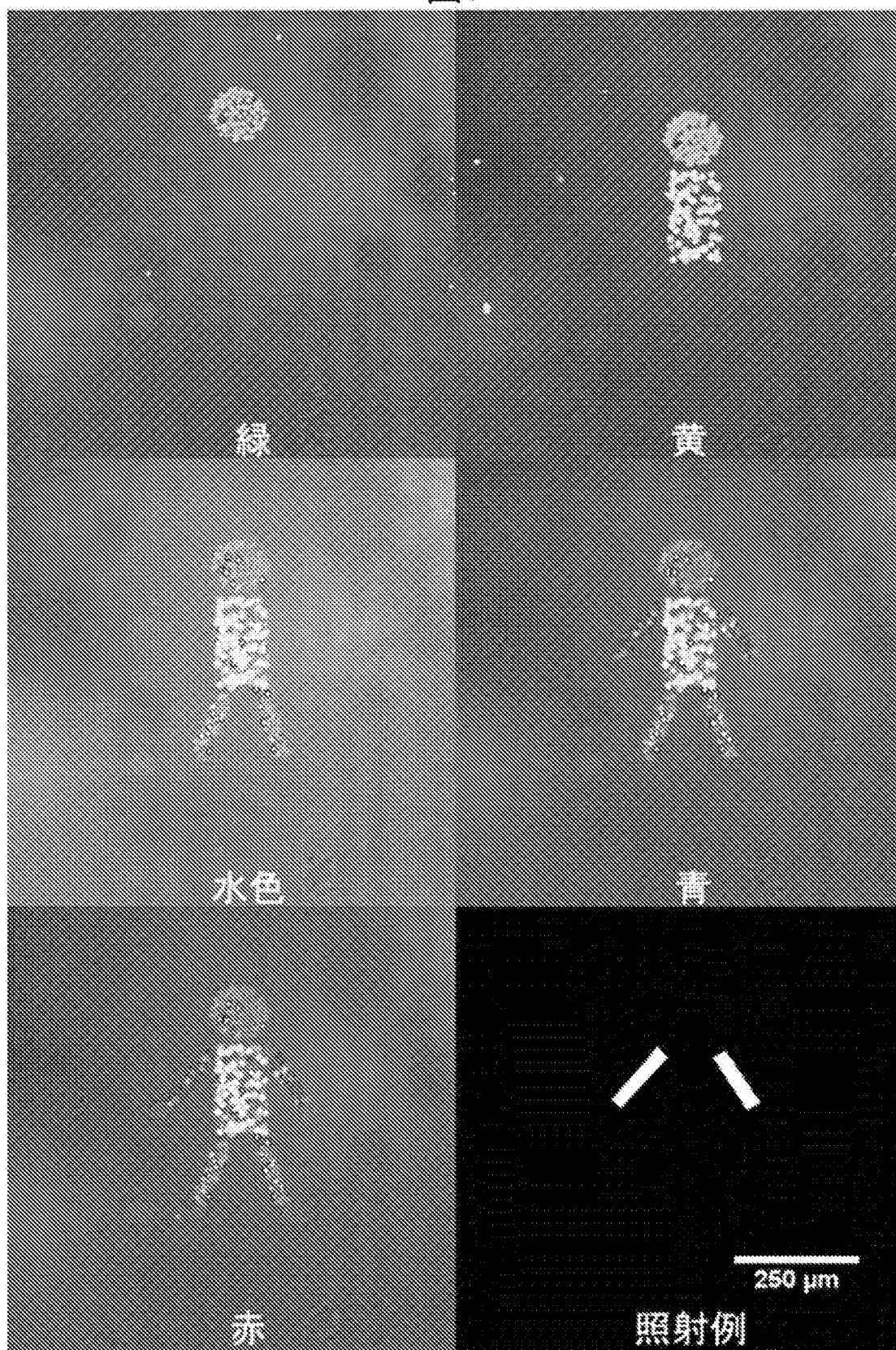
[図6]

図6



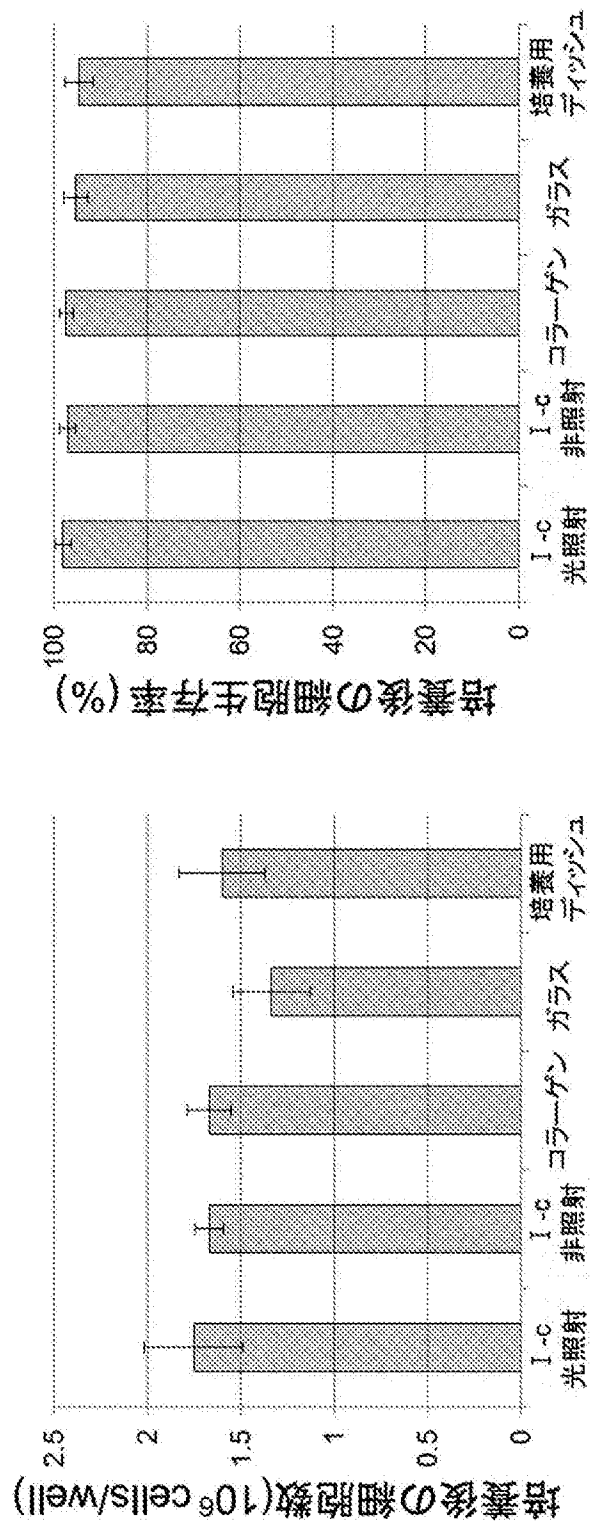
[図7]

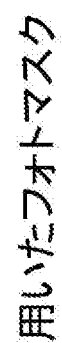
図7



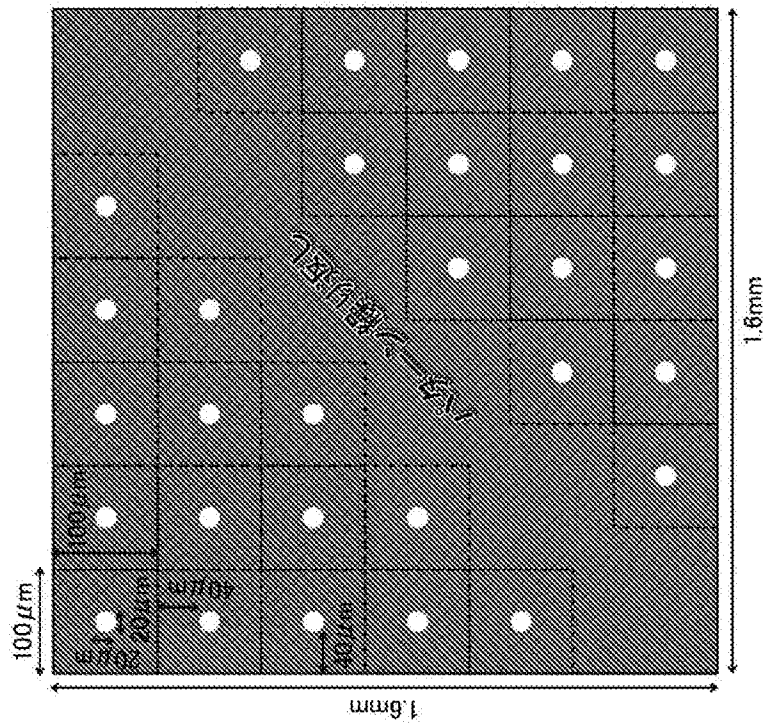
[図8]

図8



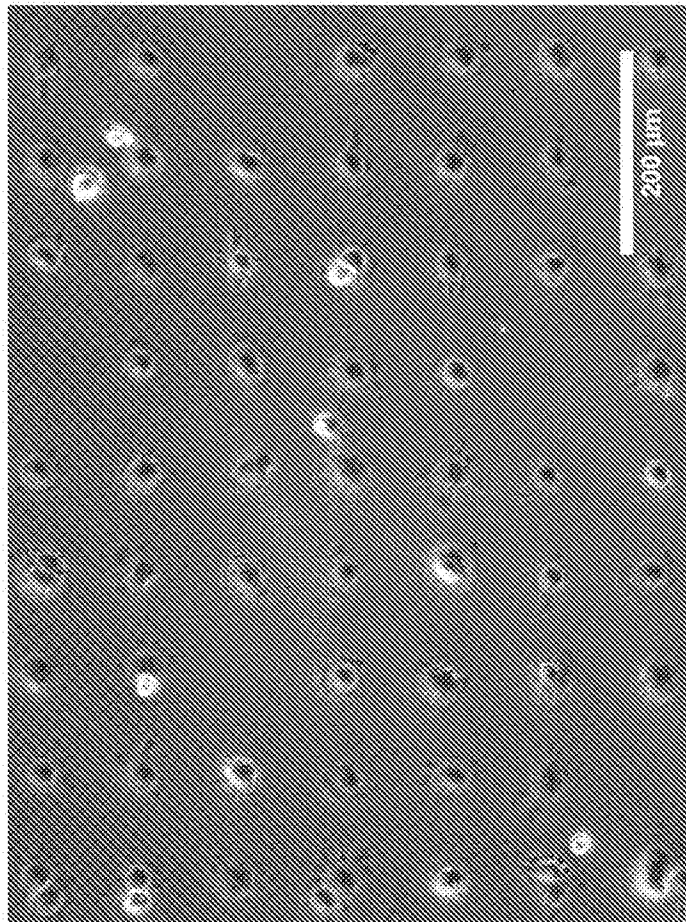


[図10]



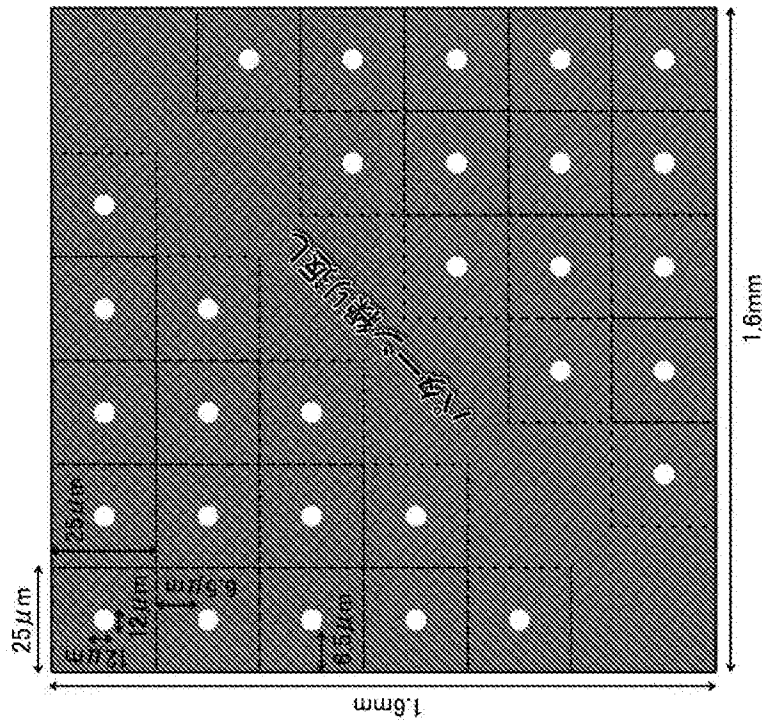
用いたフォトマスク

図10



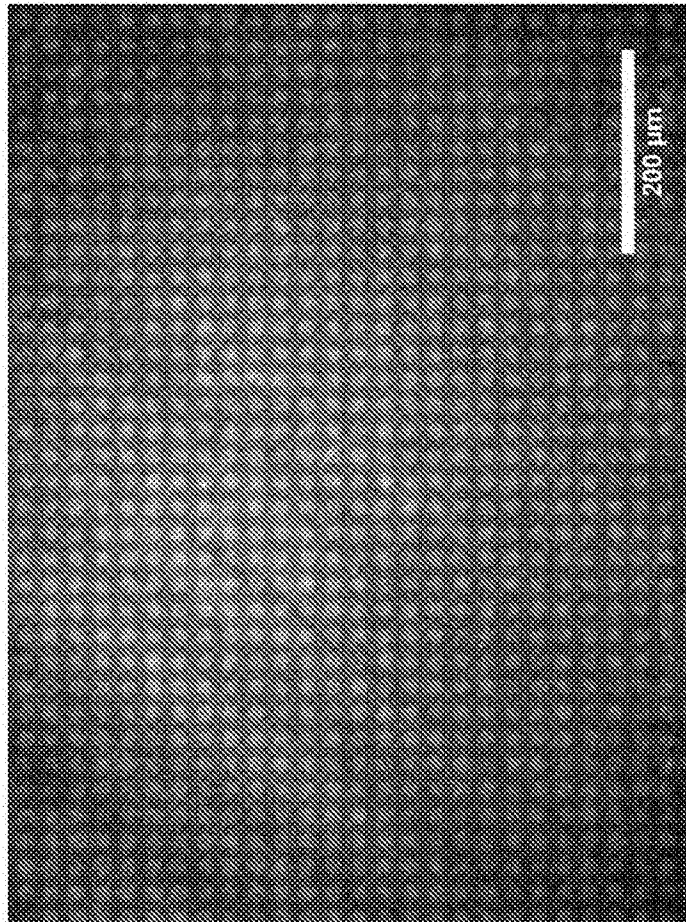
NHDF(接着性,初代培養細胞)

[図11]



用いたフォトマスク

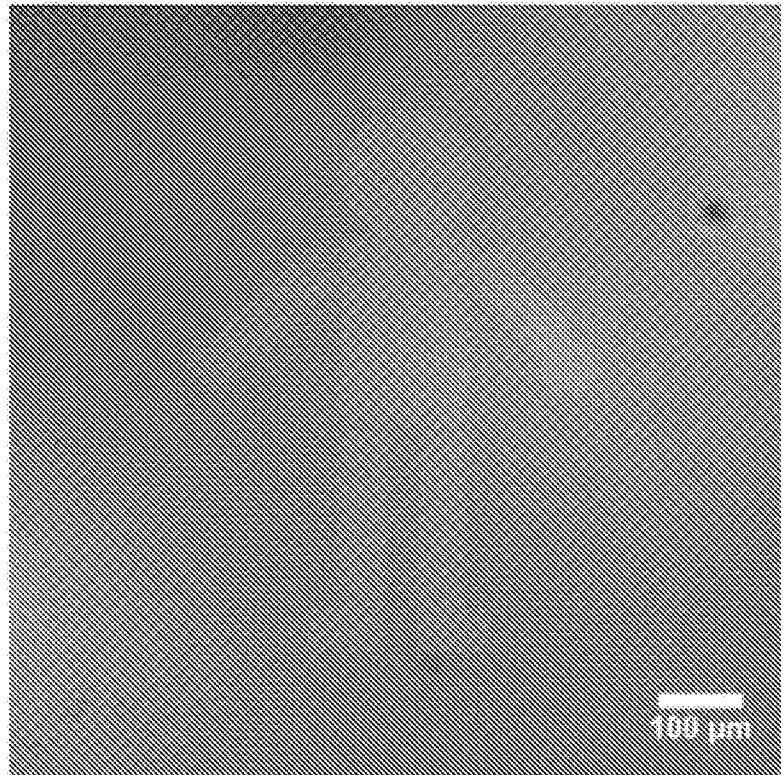
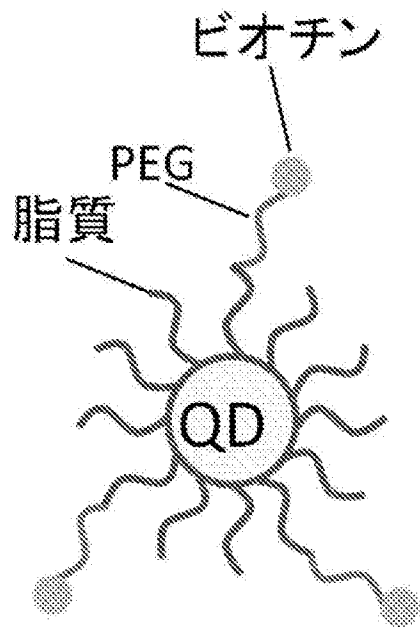
図11



リポソーム(ローダミン蛍光)

[図12]

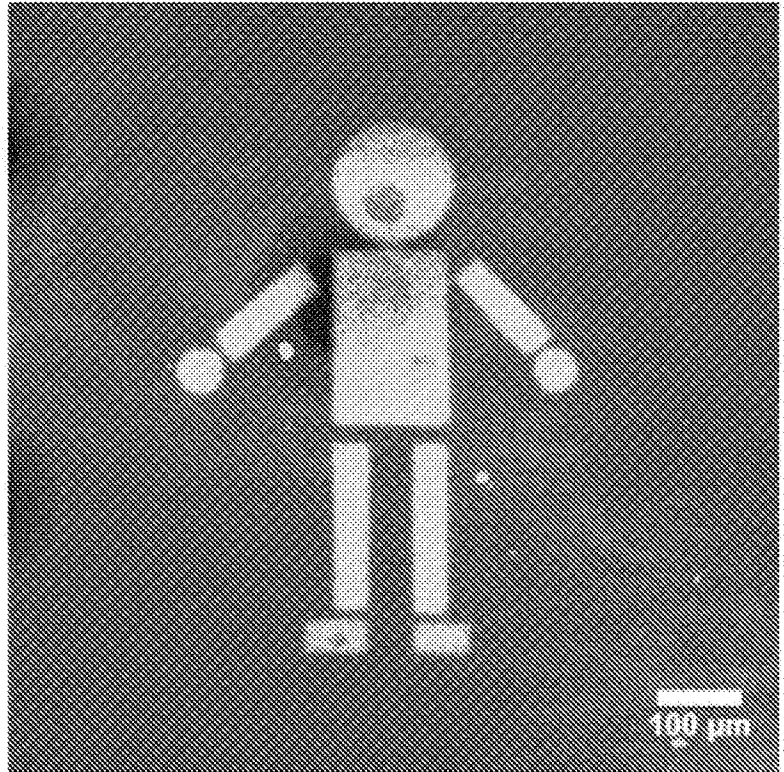
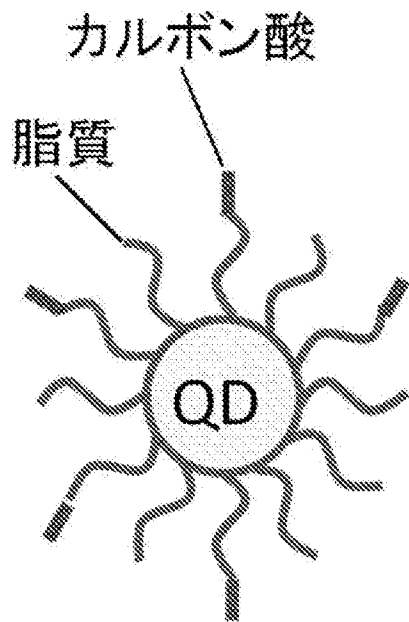
図12



ビオチン修飾量子ドット(近赤外蛍光)

[図13]

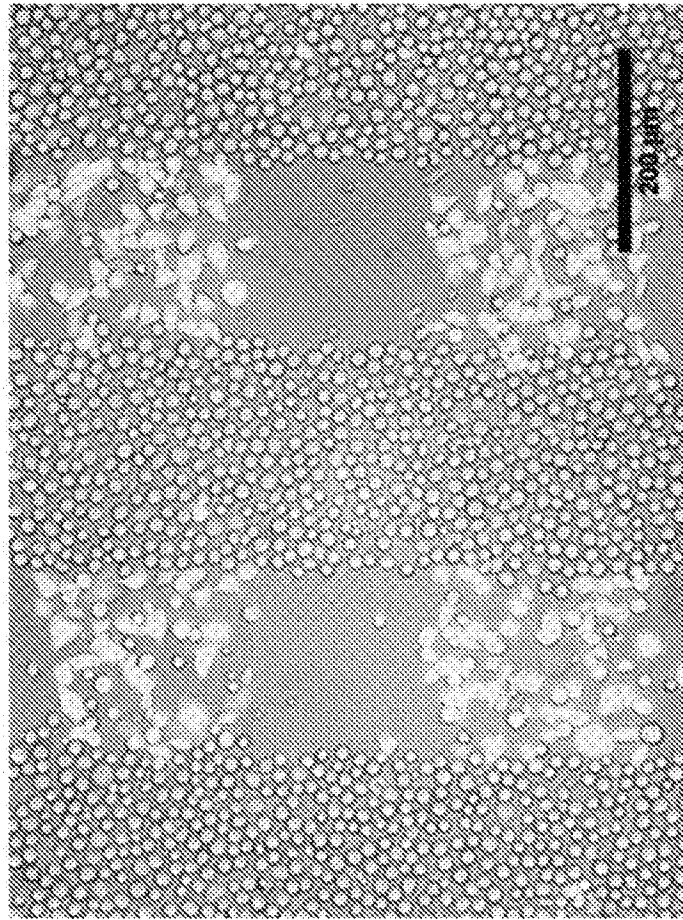
図13



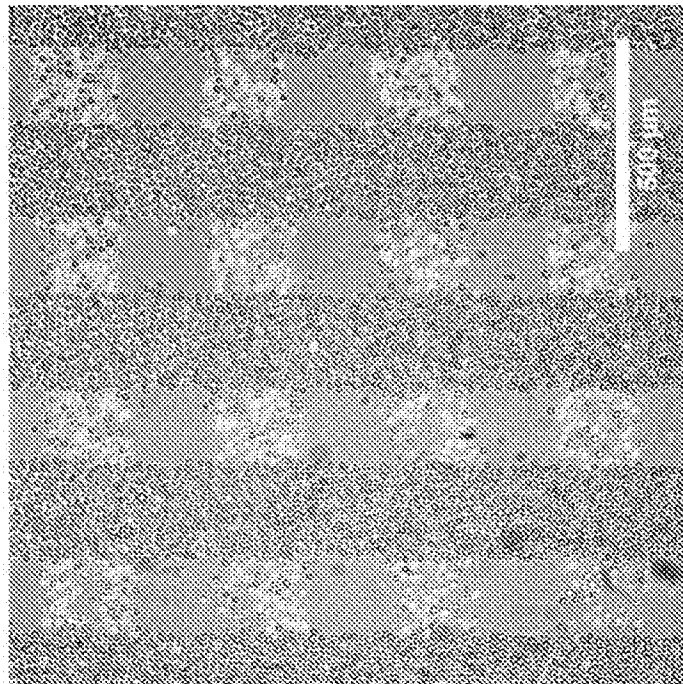
カルボン酸修飾量子ドット(緑蛍光)

[図14]

図14



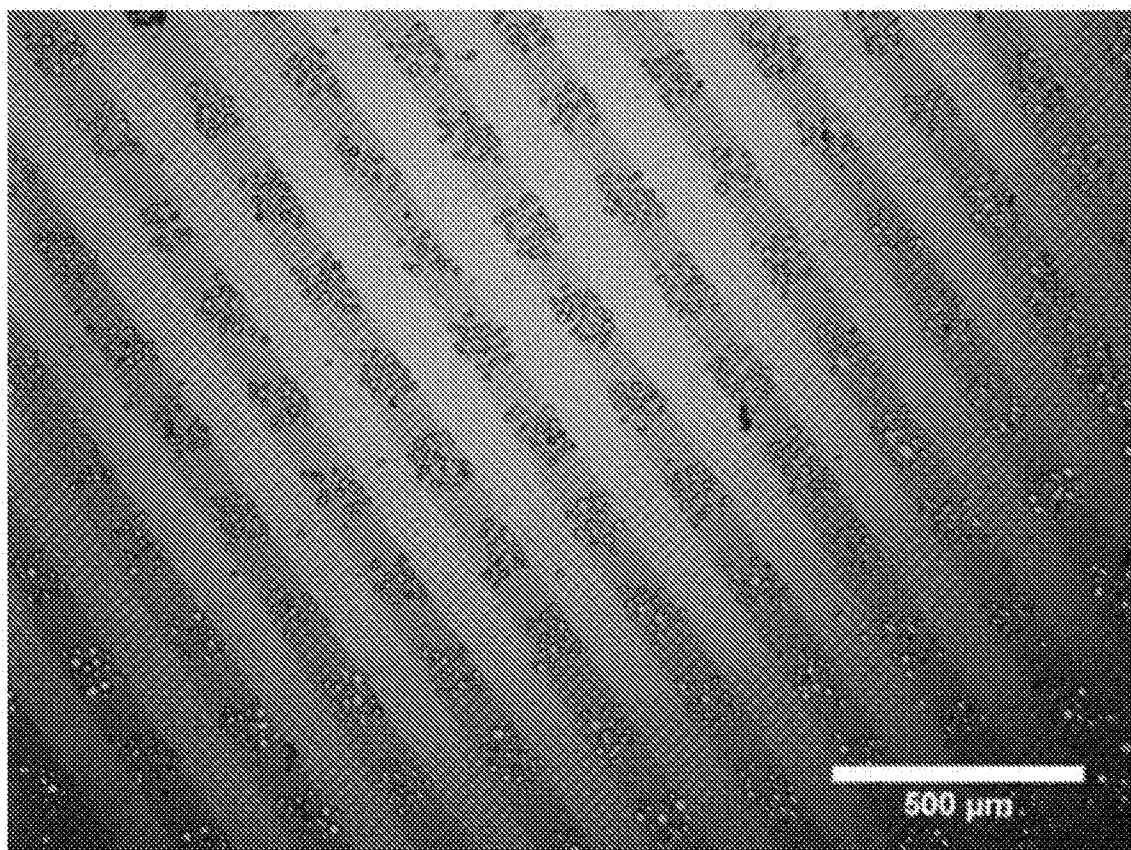
3時間培養後



パターニング直後

[図15]

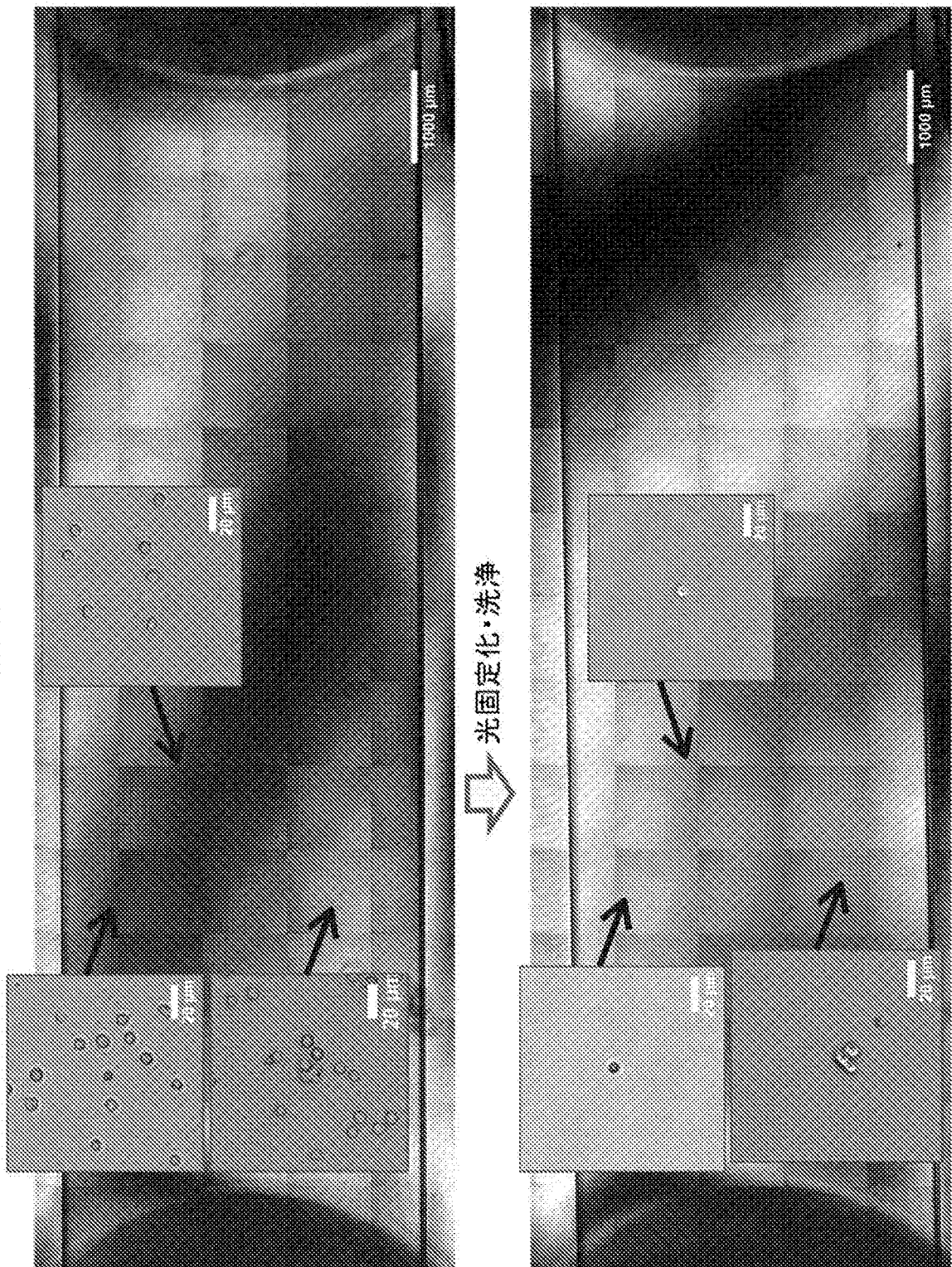
図15



リポソーム(ローダミン蛍光) + HEK293T(EGFP)

[図16]

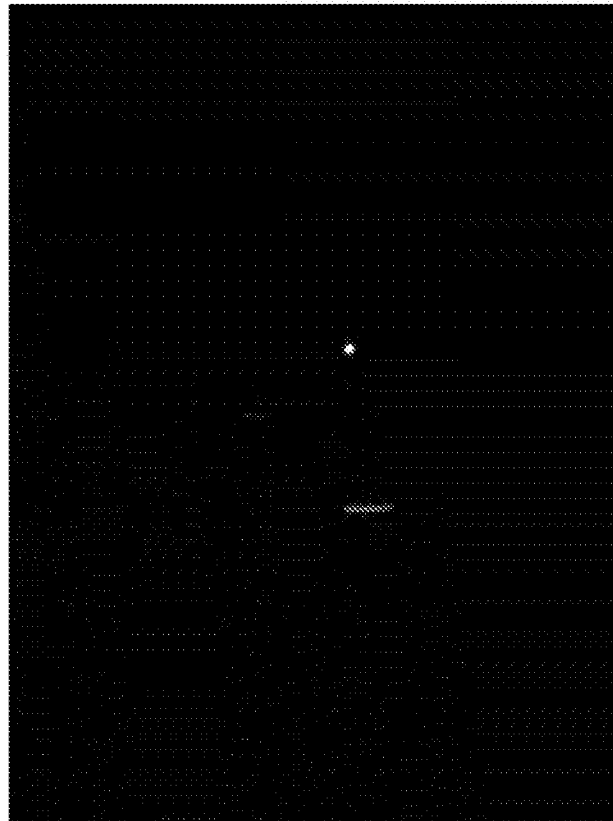
図16



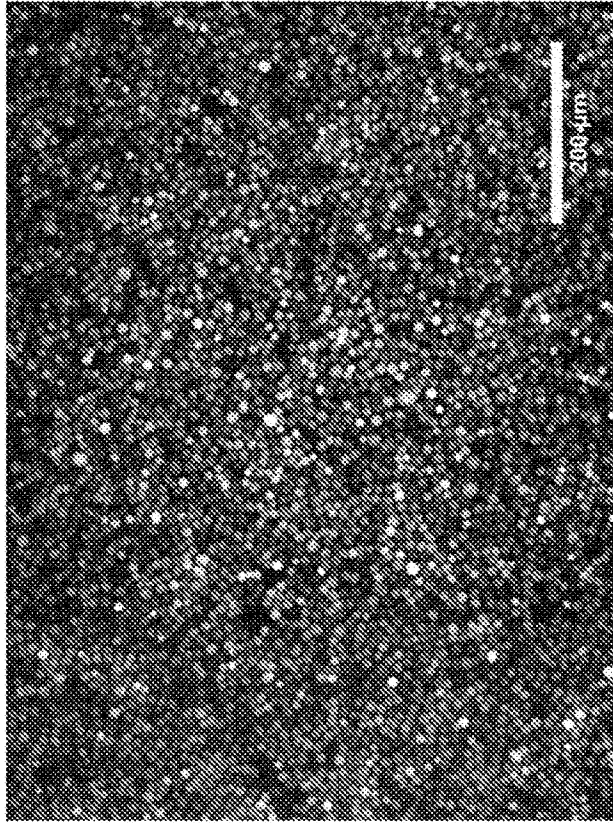
光固定化・洗浄

[図17]

図17

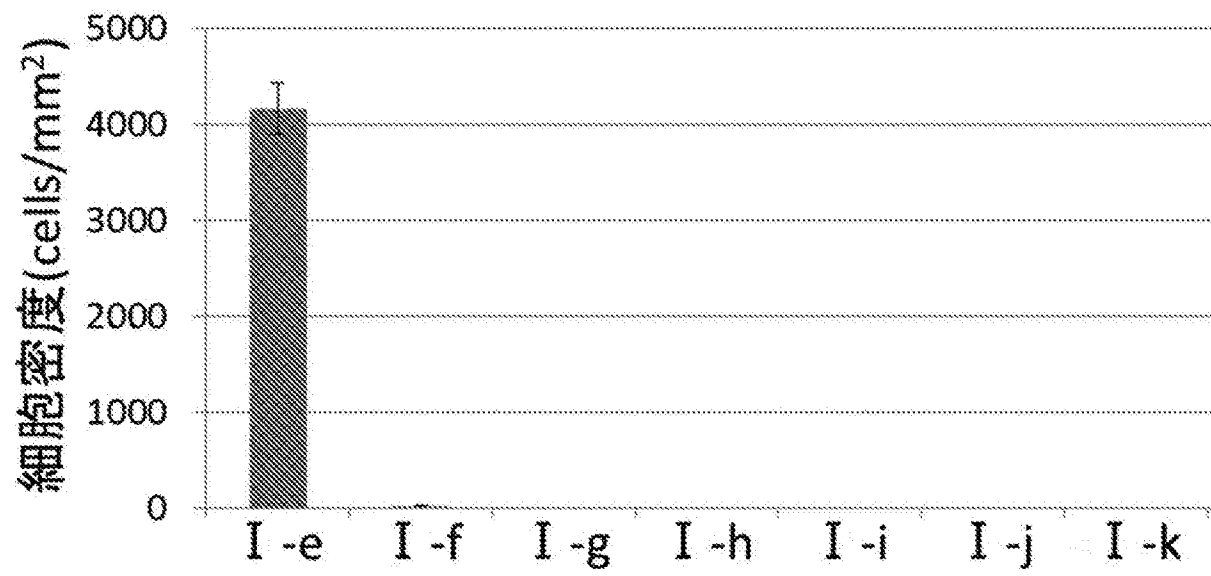


非照射表面

光照射表面(16 J/cm², 405 nm)

[図18]

図18



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/057852

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D207/46(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M3/00(2006.01)i, C12N11/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D207/46, C12M1/00, C12M3/00, C12N11/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 2014/188911 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 27 November 2014 (27.11.2014), entire text; particularly, fig. 10 & EP 3000836 A1 fig. 10	1-3, 5-8, 16-20/4, 9-15
X/A	JP2014-226088A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 08 December 2014 (08.12.2014), entire text; particularly, fig. 12, 13 (Family: none)	1-3, 5-8, 16-20/4, 9-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 May 2016 (17.05.16)

Date of mailing of the international search report
07 June 2016 (07.06.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/057852

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 2014-226089 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 08 December 2014 (08.12.2014), entire text; particularly, paragraph [0064] (Family: none)	1-3, 5-8, 16-20/4, 9-15
X/A	TANG, X. et al, Profiling the Membrane Proteome of <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 with New Affinity Labeling Probes, Journal of Proteome Research, 2007, Vol.6, No.2, pp.724-734	1-3, 5-8, 16-20/4, 9-15
X/A	US 2010/0047814 A1 (WASHINGTON STATE UNIVERSITY), 25 February 2010 (25.02.2010), fig. 11B & US 2006/0115871 A1	1-3, 5-8, 16-20/4, 9-15
X/A	US 2006/0116383 A1 (WASHINGTON STATE UNIVERSITY), 01 June 2006 (01.06.2006), paragraph [0264] & WO 2006/053342 A2 & EP 1828144 A1	1-5, 7-8/6, 9-15
X/A	JP 4-112863 A (TDK Corp.), 14 April 1992 (14.04.1992), compounds (I-1), (I-2), (I-3) (Family: none)	1-5, 8-9/6-7, 10-15
A	YAMAGUCHI, S. et al, Angew Chem Int Ed, 2011. 11.18, Vol.51, No.1, pp.128-131	1-20
A	SUSANI-ETZERODT, H. et al, A versatile library of activity-based probes for fluorescence detection and/or affinity isolation of lipolytic enzymes, Chemistry and Physics of Lipids, 2006, Vol.144, No.1, pp.60-68	1-20
A	BRIEKE, C. et al, Light-Controlled Tools, Angew Chem Int Ed, 2012, Vol.51, No.34, pp.8446-8476	1-20
P, X/P, A	LAC, D. et al, Covalent Chemical Ligation Strategy for Mono- and Polyclonal Immunoglobulins at Their Nucleotide Binding Sites, Bioconjugate Chemistry, 2016, Vol.27, No.1, pp.159-169	1-3, 5-8, 16-20/4, 9-15

Object to be covered by this search:

The inventions in claims 1-10 and the inventions in the parts depending on claims 1-10 of claims 16-20 relate to a compound represented by formula (I) that is composed of A¹⁻⁶ and L¹⁻² with extremely broad scope of structures, i.e., [A¹ is a lipid membrane-binding group that is capable of binding to a lipid membrane in a lipid membrane-containing substance; A² is a group inhibiting binding to lipid membrane that inhibits the binding of the lipid membrane-binding group to a lipid membrane; A³ is a photoreactive group; A⁴ is a hydrophilic group; A⁵ is a group that is reactive with a base material to be modified; A⁶ is a scaffold member having at least three bonds; and L¹ and L² represent a linker] and a method for patterning a lipid membrane-containing substance using the compound. However, a person skilled in the art cannot clearly grasp or understand the specific chemical structures of the aforesaid groups or substances that are expressed as "lipid membrane-binding group", "group inhibiting binding to lipid membrane", "photoreactive group", "hydrophilic group", "group that is reactive with a base material to be modified", "scaffold member" and "linker".

That is to say, the inventions in claims 1-10 and the inventions in the parts depending on claims 1-10 of claims 16-20 include inventions of compounds with widely various chemical structures and inventions of uses thereof. In the description, however, only 11 compounds (i.e., 7c, I-c, 6-d, II-b, I-f to I-k and 2k), said 11 compounds being included within a category of specific compounds having specific structures of the lipid membrane-binding group, group inhibiting binding to lipid membrane, photoreactive group, hydrophilic group, group that is reactive with a base material to be modified, scaffold member and linkers respectively at specific binding positions as described in claims 11-15, were exclusively produced in practice and the physical properties, etc. thereof were confirmed.

In the technical field of compounds, it is generally difficult to understand how to produce a target compound. Since the description merely discloses production methods, physical properties, etc. of only very limited compounds in practice, it cannot be considered that a person skilled in the art can produce all of the compounds according to the inventions in claims 1-10, which include compounds having largely different structures and carrying various substituents, without an excessively large amount of trials and errors.

Physical properties and behaviors in usage of these compounds widely vary depending on the structure and size of each group and the binding position thereof. Therefore, there is no reason why the content disclosed in the description can be expanded or generalized to the compounds according to the inventions in claims 1-10 and the inventions in the parts depending on claims 1-10 of claims 16-20, said compounds being different in the structures of the lipid membrane-binding group, group inhibiting binding to lipid membrane, photoreactive group, hydrophilic group, group that is reactive with a base material to be modified, scaffold member and linkers and the binding positions thereof from the specific compounds described in claims 11-15.

Consequently, the invention of the portion of claims 1-10, 16-20 other than the inventions of claims 11-15 exceed the range set forth in the description, and do not comply with the requirement concerning the support prescribed under PCT Article 6.

(Continued to next extra sheet)

Considering the disclosure in the description as discussed above and the common general knowledge that, between compounds having largely different structures, the properties of the compounds and methods for producing the same are also different, a person skilled in the art cannot understand how to produce the compounds according to the inventions in claims 1-10 and the inventions in the parts depending on claims 1-10 of claims 16-20, said compounds being different from the specific compounds described in claims 11-15. With regard to these compounds, furthermore, a person skilled in the art cannot understand too a compound with what structure is usable in what method for patterning a lipid membrane-containing substance.

Consequently, the description is not clearly and fully stated to a degree such that a person skilled in the art can work the inventions of claims 1-10 and the invention of the portion of claims 16-20 referring to claims 1-10, and therefore do not comply with the requirements prescribed under PCT Article 5.

With regard to the inventions in claims 1-10 and the inventions in the parts depending on claims 1-10 of claims 16-20, therefore, the search has been practiced exclusively on the compounds in claims 11-15 within a scope where chemical structures thereof can be understood, on the basis of the compounds that are specifically cited (for example, the compounds production methods of which are described in practice) in the description.

Meanwhile, concerning the inventions of claims 11-15 and the invention of the portion of claims 16-20 referring to claims 11-15, a search has been carried out with respect to the whole range.

In the process of performing the search on the inventions in claims 11-15, publicly known documents wherein compounds corresponding to claim 1, etc. are described were discovered. Some of these documents are presented herein, though these documents are not included in the scope of subject of the search as described above.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07D207/46(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M3/00(2006.01)i, C12N11/10(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07D207/46, C12M1/00, C12M3/00, C12N11/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X / A	W0 2014/188911 A1 (独立行政法人産業技術総合研究所) 2014. 11. 27, 全文, 特に図 10 & EP 3000836 A1; Fig.10	1-3, 5-8, 16-20/ 4, 9-15
X / A	JP 2014-226088 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2014. 12. 08, 全文, 特に図 12, 図 13 (ファミリーなし)	1-3, 5-8, 16-20/ 4, 9-15

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 7 . 0 5 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

0 7 . 0 6 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

安藤 倫世

4 P

9 8 3 7

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 9 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X / A	JP 2014-226089 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2014. 12. 08, 全文, 特に段落 0064 (ファミリーなし)	1-3, 5-8, 16-20/ 4, 9-15
X / A	TANG, X. et al, Profiling the Membrane Proteome of Shewanella oneidensis MR-1 with New Affinity Labeling Probes, Journal of Proteome Research, 2007, Vol.6, No.2, pp.724-734	1-3, 5-8, 16-20/ 4, 9-15
X / A	US 2010/0047814 A1 (WASHINGTON STATE UNIVERSITY) 2010.02.25, Figures 11B & US 2006/0115871 A1	1-3, 5-8, 16-20/ 4, 9-15
X / A	US 2006/0116383 A1 (WASHINGTON STATE UNIVERSITY) 2006.06.01, 段落 0264 & WO 2006/053342 A2 & EP 1828144 A1	1-5, 7-8 / 6, 9-15
X / A	JP 4-112863 A (ティーディーケー株式会社) 1992.04.14, 化合物(I-1), (I-2), (I-3) (ファミリーなし)	1-5, 8-9 / 6-7, 10-15
A	YAMAGUCHI, S. et al, Angew Chem Int Ed, 2011.11.18, Vol.51, No.1, pp.128-131	1-20
A	SUSANI-ETZERODT, H. et al, A versatile library of activity-based probes for fluorescence detection and/or affinity isolation of lipolytic enzymes, Chemistry and Physics of Lipids, 2006, Vol.144, No.1, pp.60-68	1-20
A	BRIEKE, C. et al, Light-Controlled Tools, Angew Chem Int Ed, 2012, Vol.51, No.34, pp.8446-8476	1-20
P, X / P, A	LAC, D. et al, Covalent Chemical Ligation Strategy for Mono- and Polyclonal Immunoglobulins at Their Nucleotide Binding Sites, Bioconjugate Chemistry, 2016, Vol.27, No.1, pp.159-169	1-3, 5-8, 16-20/ 4, 9-15

<調査の対象について>

請求項1-10に係る発明、及び、請求項16-20のうちの請求項1-10を引用する部分の発明は、請求項1に記載の、

「A¹は、脂質膜含有物中の脂質膜と結合する脂質膜結合基であり、
A²は、前記脂質膜結合基の脂質膜への結合を阻害する脂質膜結合阻害基であり、
A³は、光反応基であり、
A⁴は、親水性基であり、
A⁵は、修飾対象基材への反応基であり、
A⁶は、少なくとも3本の結合手を有する足場部位であり、
L¹及びL²は、リンカーであり」

という、極めて広範な構造を有するA¹⁻⁶とL¹⁻²からなる式(I)で表された化合物と、当該化合物を使用する脂質膜含有物のパターンニング方法に関するものであり、脂質膜結合基、脂質膜結合阻害基、光反応基、親水性基、修飾対象基材への反応基、足場部位、及びリンカーのいずれの語句も、具体的な化学構造を、当業者が明確に把握し、認識することができないものである。

このように、請求項1-10に係る発明、及び、請求項16-20のうちの請求項1-10を引用する部分の発明は、極めて多様な化学構造からなる化合物の発明ならびにそれらの用途発明を包含するものであるが、明細書において具体的に製造され、その物性値等が確認された化合物は、請求項11-15に記載された、特定の、脂質膜結合基、脂質膜結合阻害基、光反応基、親水性基、修飾対象基材への反応基、足場部位、及びリンカーの構造を、特定の結合位置に有する、特定の化合物に包含される、7c, I-c, 6-d, II-b, I-f~I-k, 及び2kの11化合物のみに過ぎない。一般に、化合物の技術分野では、目的の化合物をどのように製造するかを理解することが困難であるため、明細書に極限られた化合物についてのみその製造方法および物性値等が具体的に開示されているだけでは、これらと構造や性質の大きく異なる置換基を有する化合物を含む請求項1-10に係る発明の化合物全てについて、当業者が過度の実験を要することなく製造することができるとは認められない。

そして、各基の構造や大きさ、結合手位置が異なれば、当該化合物の物性や、使用態様における挙動は大きく異なるものであるから、請求項1-10に係る発明、及び、請求項16-20のうちの請求項1-10を引用する部分の発明のうちの、上記請求項11-15に記載の特定の化合物とは異なる、脂質膜結合基、脂質膜結合阻害基、光反応基、親水性基、修飾対象基材への反応基、足場部位、及びリンカーの構造や、結合位置に関する部分についてまで、上記の、明細書に開示された内容を拡張ないし一般化するための根拠は見いだせない。

したがって、請求項1-10, 16-20に係る発明のうちの、請求項11-15に係る発明以外の部分の発明は、明細書に記載した範囲を超えるものであり、PCT第6条に規定される裏付けに関する要件を満たしていない。

また、上記のような明細書の記載、及び、構造が大きく異なる化合物であれば、化合物の性質も、当該化合物を製造するための方法も、それぞれに異なるという技術常識を考慮すると、請求項1-10に係る発明、及び、請求項16-20のうちの請求項1-10を引用する部分の発明のうちの、上記の請求項11-15に記載の特定の化合物とは異なる化合物に関する部分について、当該部分に関する化合物をどの様に製造するのか、または、当該部分に関する化合物がどのような構造であるときに、どのような脂質膜含有物のパターンニング方法に用いることができるのかを、当業者は理解できない。

したがって、明細書は、請求項1-10に係る発明、及び、請求項16-20のうちの請求項1-10を引用する部分の発明を、当業者がすべて実施できる程度に明確かつ十分に記載されておらず、PCT第5条に規定される要件を満たしていない。

(続く)

(続き)

よって、請求項1－10に係る発明、及び、請求項16－20のうちの請求項1－10を引用する部分の発明の調査は、明細書に具体的な製造例等の具体例が記載されている化合物に基づいて、化学構造が把握できる範囲の化合物についての、請求項11－15に係る化合物に関してのみ行った。

なお、請求項11－15に係る発明、及び、請求項16－20のうちの請求項11－15を引用する部分については、すべての範囲について調査を行った。

なお、請求項11－15に係る発明についての調査を行う過程において、請求項1等に相当する化合物を記載する公知文献を発見したので、上記調査の対象についての範囲外であるものも、一部提示している。