

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 10 月 21 日 (21.10.2004)

PCT

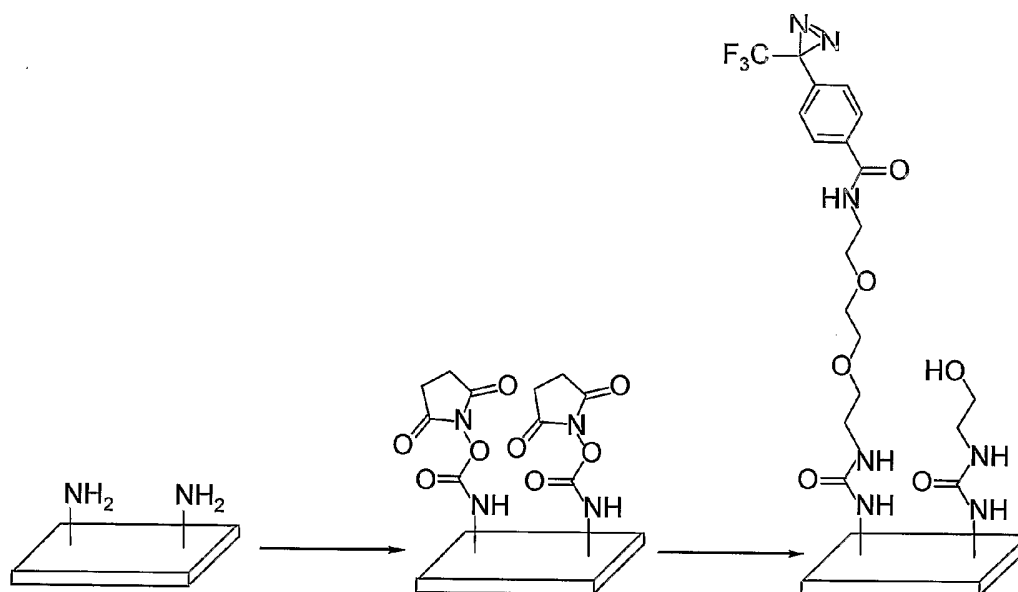
(10) 国際公開番号
WO 2004/090540 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/53, 37/00, 33/547 (72) 発明者; および
(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004175 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 長田 裕之 (OS-
ADA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢
(22) 国際出願日: 2004 年 3 月 25 日 (25.03.2004) 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP).
(25) 国際出願の言語: 日本語 叶 直樹 (KANO, Naoki) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県
(26) 国際公開の言語: 日本語 和光市広沢 2 番 1 号 独立行政法人理化学研究所内
(30) 優先権データ: 特願2003-104928 2003 年 4 月 9 日 (09.04.2003) JP Saitama (JP).
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP).
(74) 代理人: 野村 健一, 外 (NOMURA, Kenichi et al.); 〒2210835 神奈川県横浜市神奈川区鶴屋町 3 丁目 3 0 番
(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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, の 1 農機会展 4 階 Kanagawa (JP).

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF FIXING LOW-MOLECULAR COMPOUND TO SOLID-PHASE SUPPORT

(54) 発明の名称: 固相担体への低分子化合物の固定方法



(57) Abstract: A method of fixing a low-molecular compound to a solid-phase support, which comprises a step in which a solution containing a low-molecular compound is brought into contact with a solid-phase support having a photoreactive compound bonded to the surface, a step in which the solution containing a low-molecular compound is evaporated to dryness in the state of being in contact with the solid-phase support, and a step in which the solid-phase support is irradiated with light to form a covalent bond between the photoreactive compound and the low-molecular compound. This fixing method enables a low-molecular compound to be fixed to a solid-phase support without the aid of a functional group.

(57) 要約: 光反応性化合物が表面に結合している固相担体に、低分子化合物を含む溶液を接触させる工程、低分子化合物を含む溶液を、固相担体に接触させた状態で乾固させる工程、及び固相担体に光を照射し、光反応性化合物と低分子化合物との間に共有結合を形成させる工程を含む低分子化合物の固相担体への固定方法を提供する。この固定方法により、官

[続葉有]

WO 2004/090540 A1



ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

固相担体への低分子化合物の固定方法

技術分野

本発明は、低分子化合物の固相担体への固定方法、並びにこの方法により得られる低分子マイクロアレイ、この方法を利用した低分子化合物と相互作用をする物質の検出方法、及び低分子化合物における相互作用部位の特定方法に関する。

背景技術

ガラススライドに代表される基板に、低分子化合物を微量ずつ多種類導入し固定化した低分子マイクロアレイは、酵素等のタンパク質の阻害剤開発や機能解明のツールとして有用である。しかし現在までの低分子マイクロアレイ製造手法では、低分子化合物を固定化するには低分子側に水酸基やアミノ基等の官能基を一律に必要とするため、これらの官能基を一様に有した合成コンビナトリアルライブラリー化合物群のみアレイ化が可能であった（非特許文献 1）。また、低分子化合物中、これらの官能基を含んだ部分構造は、基板との結合面に面しており、アレイ上でのタンパク質との結合実験においては無視されるが、低分子化合物をアレイ上から切り出し溶液中に溶解させた場合、またアレイに固定化させる前の化合物をバッファー等に溶解させた場合に、この部分と不特定のタンパク質との相互作用の可能性が生じるため、医薬開発の段階において副作用の原因となることが考えられた。

ところで、DNA を固相担体上に固定するに当たり、光反応性化合物を利用することが既に報告されている（特許文献 1）。この固定化方法を低分子マイクロアレイの作製法に適用すれば、上述した従来の低分子マイクロアレイ作製方法の問題点を解決できると考えられる。しかしながら、現在までのところ、前述した DNA の固定化方法を低分子化合物に適用したような事例は全く報告されていない。

〔特許文献 1〕 特開 2001-178472 号公報

〔非特許文献 1〕 MacBeath et al., J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 7967

発明の開示

上述のように従来の低分子マイクロアレイの作製方法では、固定化可能な低分子は特定の官能基を持った一群の分子群に限定され、また、基板との結合に使われる官能基を含む部分構造は、アレイ上でのタンパク質等との結合実験では無視されてしまう。

本発明は以上のような技術的背景の下になされたものであり、上記問題点を解消した低分子マイクロアレイの作製手段を提供することを目的とする。

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、低分子化合物を、光反応性化合物を利用して基板上に固定することにより、官能基に依存せずに低分子化合物を固定できることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、以下の工程を含むことを特徴とする低分子化合物の固相担体への固定方法である。

(1) 光反応性化合物が表面に結合している固相担体に、低分子化合物を含む溶液を接触させる工程

(2) 低分子化合物を含む溶液を、固相担体に接触させた状態で乾固させる工程

(3) 固相担体に光を照射し、光反応性化合物と低分子化合物との間に共有結合を形成させる工程

また、本発明は、上記方法によって得られる低分子マイクロアレイである。

更に、本発明は、以下の工程を含むことを特徴とする低分子化合物と相互作用をする物質の検出方法である。

(1) 上記低分子マイクロアレイに、標識された試料物質を含む溶液を接触させる工程

(2) 低分子化合物と結合しない物質を除去する工程

(3) 試料物質の標識を検出する工程

更に、本発明は、以下の工程を含むことを特徴とする低分子化合物における相互作用部位の特定方法である。

(1) 光反応性化合物と、特定物質と相互作用をする低分子化合物を混合する工程

(2) 前記混合物に光を照射し、光反応性化合物と低分子化合物との間に共有結合を形成させる工程

(3) 光反応性化合物と低分子化合物の複合体を、低分子化合物の結合部位の違いにより分別する工程

(4) 分別された前記複合体をそれぞれマイクロアレイ用基板に固定する工程

(5) 前記基板上に固定された複合体に、標識された前記特定物質を含む溶液を接触させる工程

(6) 基板上に固定された複合体のうち、標識が検出されないものを選択し、その結合体の低分子化合物と光反応性化合物との間の結合部位を特定する工程

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の低分子化合物の固相担体への固定方法は、以下の(A-1)～(A-3)の工程を含むことを特徴とするものである。

工程(A-1)では、光反応性化合物が表面に結合している固相担体に、低分子化合物を含む溶液を接触させる。

光反応性化合物は、光照射により活性化され、低分子化合物との間に共有結合を形成できるものであれば特に限定されず、例えば、以下の(a)～(c)の一群の化合物を挙げることができる。

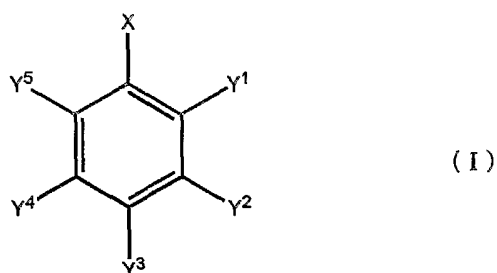
(a) ナイトレン、カルベン、ラジカル、又は炭素求電子剤を発生し得る化合物

これらの活性種を発生し得る化合物は、特開 2001-178472 号公報、1995 年発行のテトラヘドロン誌 (Tetrahedron) 第 51 巻、12479-12520 ページの S. A. Fleming の著した総説、および 1998 年発行の有機合成化学協会誌、第 56 巻 581-590 ページの畑中保丸の著した総説などに記載されている。例えば、ナイトレンを発生する化合物としては、芳香族アジド、アルキルアジド、ヘテロ環アジドなどのアジド基を有する化合物であり、カルベンを発生する化合物としてはジアゾ基またはジアジリン環を有する化合物であり、ラジカルを発生する化合物としてはベンゾフェノン類やエノン類のような共役ケトン類、芳香族ハロゲン化物類、オレフィン類などであり、炭素求電子剤を発生する化合物としては芳香族ジアゾニウム塩、ニトロベンゼン類、スルホニウム塩、ホスホニウム塩、アンモニウム塩などである。

(b) ジアゾニウム基、アジド基、ジアジリン環、又はジアゾ基を部分構造として含む化合物

これらの部分構造を持つ化合物も前述した特開 2001-178472 号公報などに記載されている。

(c) 式 (I) :



〔式中、Xは、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{C}^*(\text{R}^1)\text{N}=\text{N}^*$ (*同士は連結して三員環を形成する)、 $-\text{N}_2^+\text{Z}^-$ 、 $-\text{C}(\text{R}^2)=\text{O}$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}_3$ 、 $-\text{Cl}$ 、又は $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}=\text{N}_2$ を表し； R^1 は、水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、又は置換基を有していてもよいアリール基を表し； R^2 は置換基を有していてもよいアリール基を表し； Z^- は陰イオンを表し； Y^1 、 Y^2 、 Y^3 、 Y^4 、及び Y^5 のいずれか一つは固相担体表面に担持された官能基と反応して共有結合を形成しうる基を表し、他の四つはそれぞれ独立して水素原子又はハロゲン原子を表す。〕

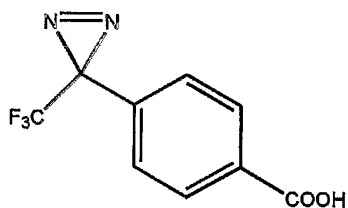
で表される化合物

一般式 (I) で表される化合物において、 R^1 で表される基は好ましくは炭素原子数が1乃至6の置換基を有していてもよいアルキル基、炭素原子数が6乃至12の置換基を有していてもよいフェニル基であり、特に好ましくはフッ素原子などの電子吸引基で置換されたアルキル基である。 R^2 で表される基は好ましくはフェニル基である。 Z^- で表される陰イオンは好ましくはハロゲン化物イオン、四フッ化ホウ素イオン、又は六フッ化リン酸イオンである。固相担体表面に担持された官能基と反応して共有結合を形成しうる基は、 Y^1 、 Y^2 、 Y^3 、 Y^4 、 Y^5 のいずれでもよいが、 Y^3 であることが好ましい。固相担体表面に担持された官能基と反応して共有結合を形成しうる基として好ましいものは、カルボキシル基、

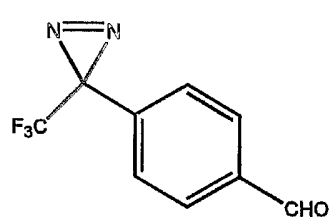
ホルミル基、活性エステル基、水酸基、チオール、スルフィド、アミノ基、ハロゲン置換アルキル基、トリアルコキシシリル基、およびこれらの置換基を有する基である。

一般式（I）で表される化合物の具体例として、以下の化合物1～化合物27を例示できるが、これらに限定されるわけではない。

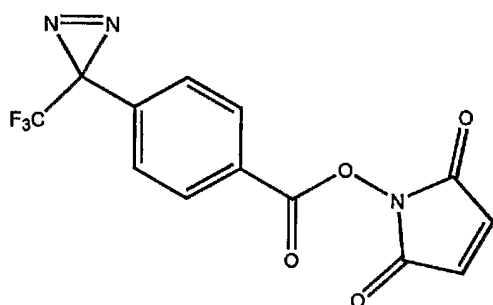
化合物1



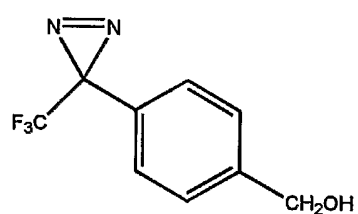
化合物2



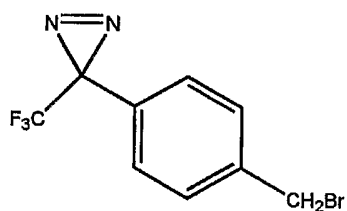
化合物3



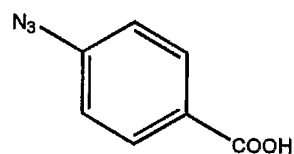
化合物4



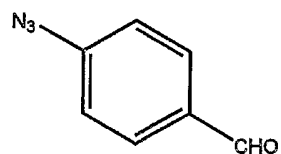
化合物5



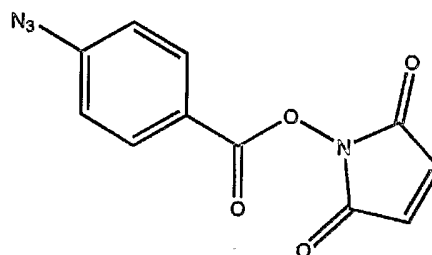
化合物6



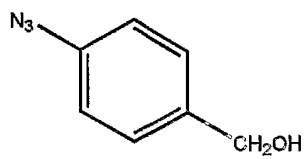
化合物7



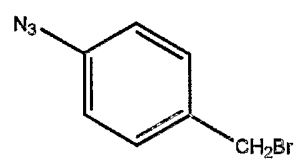
化合物8



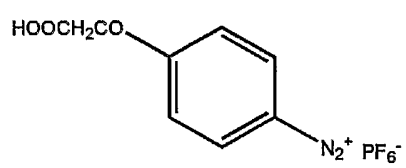
化合物9



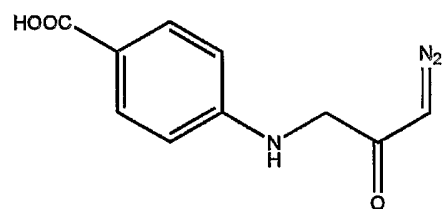
化合物10



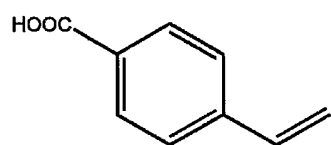
化合物11



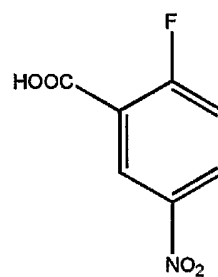
化合物12



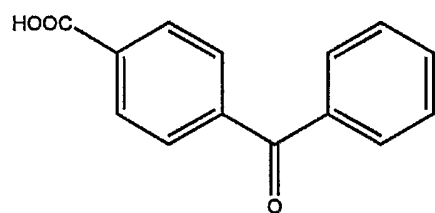
化合物13



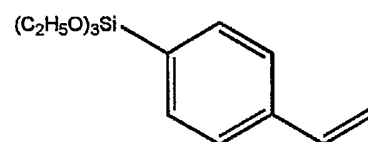
化合物14



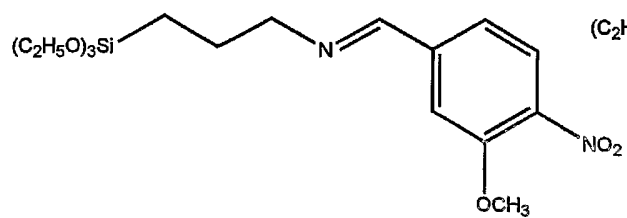
化合物15



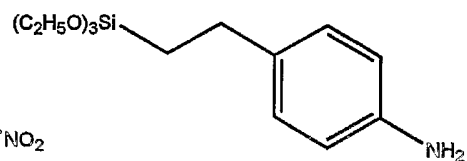
化合物16



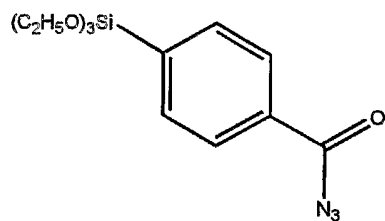
化合物17



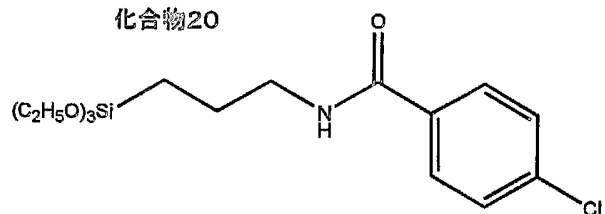
化合物18



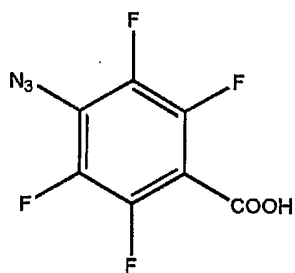
化合物19



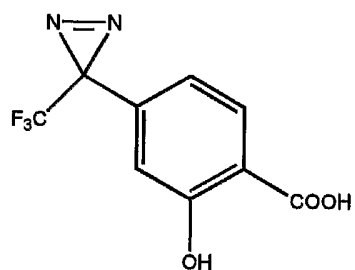
化合物20



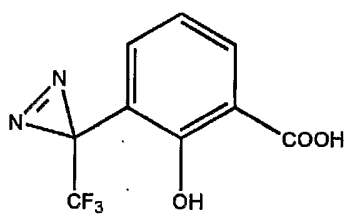
化合物21



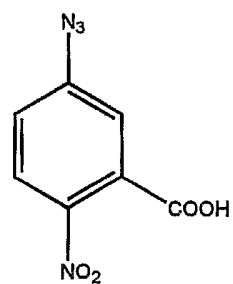
化合物22



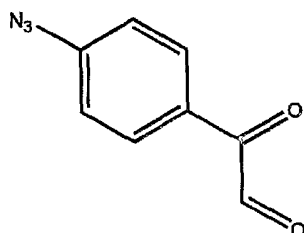
化合物23



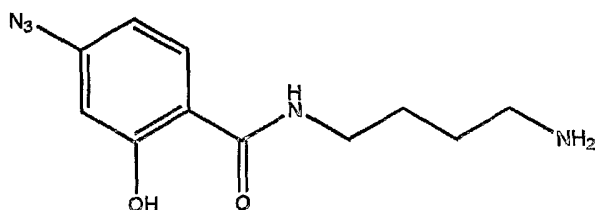
化合物24



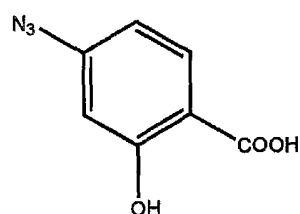
化合物25



化合物26



化合物27



光反応性化合物を、固相担体表面に結合させる手段は特に限定されず、例えば、特開 2001-178472 号公報記載の方法に従って行うことができる。光反応性化合物は、固相担体表面に直接結合させることが好ましいが、別の化合物を固相担体表面に結合させ、その化合物を介して結合させてもよい。また、光反応性化合物自体を結合させるのではなく、その前駆体を固相担体表面に結合させ、その後、適当な反応処理を施すことにより光反応性化合物に変換させてもよい。

固相担体は、光反応性化合物を結合させ得るものであればどのようなものでもよく、マイクロアレイ用基板、ビーズ、繊維、管、容器（試験管やバイヤル）などを固相担体とすることができ、これらの中でもマイクロアレイ用基板が最も好ましい。低分子化合物を固定化したマイクロアレイ用基板は、低分子マイクロアレイとして、タンパク質などの検出に使用することができる。固相担体の材質としては、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックスもしくはニューセラミックス、ポリエチレンテレフタレート、酢酸セルロース、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等のポリマー、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、織物、編み物、不織布、濾紙、短繊維、メンブレンフィルター等の多孔質物質、

金などの導電性材料などを挙げることができ、これらの中でもガラス、シリコン、金などが好ましい。固相担体の表面は、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、あるいは固相担体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。

本発明における低分子化合物とは、主に炭素、水素、酸素、窒素、硫黄を主成分の原子とする有機化合物で、オリゴ糖、ポリペプチド等の1次代謝産物、また、脂肪酸、ポリケチド（アセトゲニン）、イソプレノイド、フェニルプロパノイド、アルカロイド等の2次代謝産物、また、芳香環、複素環を含む分子量 2000 程度までの合成有機化合物、またはこれらの複合体などを指し、主にタンパク質と結合することでそのタンパク質の機能を阻害もしくは阻害する可能性を有するものをいう。

低分子化合物溶液の調製に用いる溶媒は、低分子化合物の種類に応じて適宜決めることができ、例えば、水、ジメチルスルホキシド（DMSO）、N,N-ジメチルホルムアミド（DMF）、ジオキサン、アセトニトリル、クロロホルムなどを使用することができる。また、低分子化合物溶液の濃度は、低分子化合物や溶媒の種類、あるいは接触の方法により異なるが、例えば、分子量 500 程度のポリケチドの DMSO 溶液を固相担体上に滴下する場合は 0.1~10 mM 程度、分子量 1200 程度のポリペプチドの DMSO 溶液を固相担体上に滴下する場合は 0.1~100 mM 程度である。

低分子化合物溶液を、固相担体と接触させる方法は、光照射により低分子化合物を固相担体に固定できる方法であればどのようなものでもよく、例えば、固相担体がマイクロアレイ用基板の場合、低分子化合物を含む溶液をこの基板上に滴下すればよい。このときの滴下量は、低分子化合物の種類や溶液の濃度などにより異なるが、1 nL~0.2 μ L 程度である。

工程（A-2）では、低分子化合物を含む溶液を、固相担体に接触させた状態で乾固させる。

溶液を乾固させる方法は特に限定されず、自然乾燥によって乾固させてもよいが、真空ポンプ等を用いて人為的に乾燥させることが好ましい。

溶液を乾固させることにより、低分子化合物と光反応性基が密接に接近し、低分子化合物が、様々な部位で光反応性化合物と結合するようになる。これは、低分子化合物のあらゆる部位を固相担体の表面に露出していることになり、低分子化合物の分子全体の性質（結合能など）を調べることが可能になる。また、溶液の乾固により、低分子化合物の分子密度が高くなり、光反応性化合物との反応効率が向上するという効果も得られる。

工程（A－3）では、固相担体に光を照射し、光反応性化合物と低分子化合物との間に共有結合を形成させる。

照射する光の波長は、光反応性化合物の種類に応じて決めればよく、通常、200～400nmの範囲の波長、好ましくは360nm付近の波長の光を照射する。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、水銀灯などの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固相担体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。または、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。または、集光した光線を走査露光してもよい。照射時間は特に限定されない。

光照射後の固相担体は、適当な溶媒又はバッファーで洗い、固定されなかった低分子化合物を除去する。これにより、低分子化合物が固定された固相担体を得ることができる。

本発明の固定方法は、以下に述べる「低分子化合物と相互作用をする物質の検出方法」及び「低分子化合物における相互作用部位の特定方法」に応用できる。

本発明の低分子化合物と相互作用をする物質の検出方法は、以下の（B－1）～（B－3）の工程を含むことを特徴とするものである。

工程（B－1）では、上述の本発明の固定方法により得られる低分子マイクロアレイに、標識された試料物質を含む溶液を接触させる。

試料物質は特に限定されないが、主としてタンパク質などの生体物質を使用する。試料物質の標識方法も特に限定されず、RI法で標識してもよいし、非RI法（蛍光法、ビオチン法等）で標識してもよい。

試料物質溶液の調製に用いる溶媒は、試料物質の種類に応じて適宜決めることができ、例えば、水、リン酸バッファー、酢酸バッファー、トリスバッファーなどを使用することができる。また、試料物質溶液の濃度は、低分子化合物や溶媒の種類により異なるが、例えば、分子量 160,000 程度の蛍光標識化タンパク質のバッファー溶液の場合は 10~100 $\mu\text{g/mL}$ 程度である。

試料物質溶液を、低分子マイクロアレイと接触させる方法は特に限定されず、例えば、試料物質溶液をマイクロアレイ上に滴下すればよい。このときの滴下量は、試料物質の種類や溶液の濃度などにより異なるが、0.1~1 $\mu\text{L} \cdot \text{mm}^{-2}$ 程度である。

工程（B-2）では、低分子化合物と結合しない物質を除去する。

低分子化合物と結合しない物質の除去は、適当なバッファーや溶媒等で洗浄することにより行う。

工程（B-3）では、試料物質の標識を検出する。

標識の検出は、標識物質の種類に応じて行うことができる。例えば、蛍光物質により標識した場合は、蛍光スライドスキャナーなどにより検出することができる。

この工程で、標識が検出されれば、試料物質は低分子化合物と相互作用をする物質であると判断することができ、標識が検出されなければ試料物質は低分子化合物と相互作用をしない物質であると判断することができる。

従来のマイクロアレイ法は、特定の官能基を利用して低分子化合物を固相担体に固定するが、その際、官能基を含んだ部分構造は固相担体との結合面を向いており、固相担体の表面には露出しない。従って、その官能基を含んだ部分構造が試料物質との相互作用に関与しているような場合には、実際には試料物質と相互作用をする低分子化合物であっても、それを相互作用をしないものとして判断してしまう可能性がある。本発明の検出方法では、低分子化合物のあらゆる部分が基板表面に露出しているマイクロアレイを用いるので、前述したような誤った判断をする可能性がなく、高い精度で低分子化合物と相互作用をする物質を検出することができる。

本発明の低分子化合物における相互作用部位の特定方法は、以下の工程（C-

1) ~ (C-6) を含むことを特徴とするものである。

工程 (C-1) では、光反応性化合物と、特定物質と相互作用をする低分子化合物を混合する。

光反応性化合物は、その形態が粉末状、油状を問わず、本発明の固定化方法と同様のものを使用できる。

低分子化合物は、本発明の固定化方法と同様の化合物を使用できるが、この方法ではそのような化合物の中でも特に既に特定物質と相互作用をすることが確認されているものを使用する。

工程 (C-2) では、前記混合物に光を照射し、光反応性化合物と低分子化合物との間に共有結合を形成させる。

この工程は、本発明の固定方法の (A-3) 工程と同様に行うことができる。

工程 (C-3) では、光反応性化合物と低分子化合物の複合体を、低分子化合物の結合部位の違いにより分別する。

複合体を分別する方法は特に限定されず、例えば高速液体クロマトグラフィーにより分別することができる。

工程 (C-4) では、分別された前記複合体をそれぞれマイクロアレイ用基板上に固定する。

複合体をマイクロアレイ用基板上に固定する方法は常法に従って行うことができ、固相担体表面に担持された官能基を利用して固定化することが可能である。

工程 (C-5) では、前記基板上に固定された複合体に、標識された前記特定物質を含む溶液を接触させる。

この工程は、本発明の検出方法の (B-1) 工程と同様に行うことができる。但し、基板に接触させる物質は、低分子化合物と相互作用をするかどうかかわからない物質（試料物質）ではなく、低分子化合物と相互作用をすることが確認されている物質である。

工程 (C-7) では、基板上に固定された複合体のうち、標識が検出されないものを選択し、その複合体の低分子化合物と光反応性化合物との間の結合部位を特定する。

結合部位を特定する方法としては、例えば、マスペクトル、核磁気共鳴スペ

クトルなどによって行うことができる。

以上の低分子化合物における相互作用部位の特定方法を図 1 を用いて説明する。図中の低分子化合物 1 は、SH 基を持っており、この基が特定物質 3 との相互作用に参与している。工程 (C-1) 及び (C-2) により、低分子化合物 1 は、光反応性化合物 2 と結合する。このとき、低分子化合物 1 は、SH 基の部分だけでなく、様々な部位で光反応性化合物 2 と結合する (図 1 b)。低分子化合物 1 と光反応性化合物 2 の結合体群は、工程 (C-3) ~ 工程 (C-4) により分別され、基板 4 上に固定される。低分子化合物 1 に特定物質 3 を接触させると、本来ならばすべての低分子化合物 1 は特定物質 3 と相互作用するはずであるが、一部の低分子化合物 1 は相互作用をしない (図 1 c)。この特定物質 3 と相互作用をしない低分子化合物 1 の構造を遡って解析すれば (図 1 b)、低分子化合物 1 において、特定物質 3 と相互作用をしていた部位 (この図では SH 基) を特定できる。

低分子化合物のどの部位が、タンパク質等との相互作用に参与しているのかを特定することは、医薬等の開発において非常に重要である。従来このような部位の特定は、低分子化合物中に存在する官能基を一つずつ変換して相互作用の有無を調べるといった煩雑な作業が必要であった。しかし、本発明の方法によれば、そのような煩雑な作業は不要であり、一回の作業で相互作用をする部位を特定することができる。

図面の簡単な説明

第 1 図は、本発明の低分子化合物における相互作用部位の特定方法を模式的に表した図であり、第 2 図は、ガラス基板の修飾工程の概要を示す図であり、第 3 図は、488nm、532nm、635nm の波長の光を照射した低分子固定化スライドを、蛍光スキャナーで観測した画像である。

発明を実施するための最良の形態

〔実施例 1〕 光親和性原子団へのポリエチレングリコールリンカーの導入

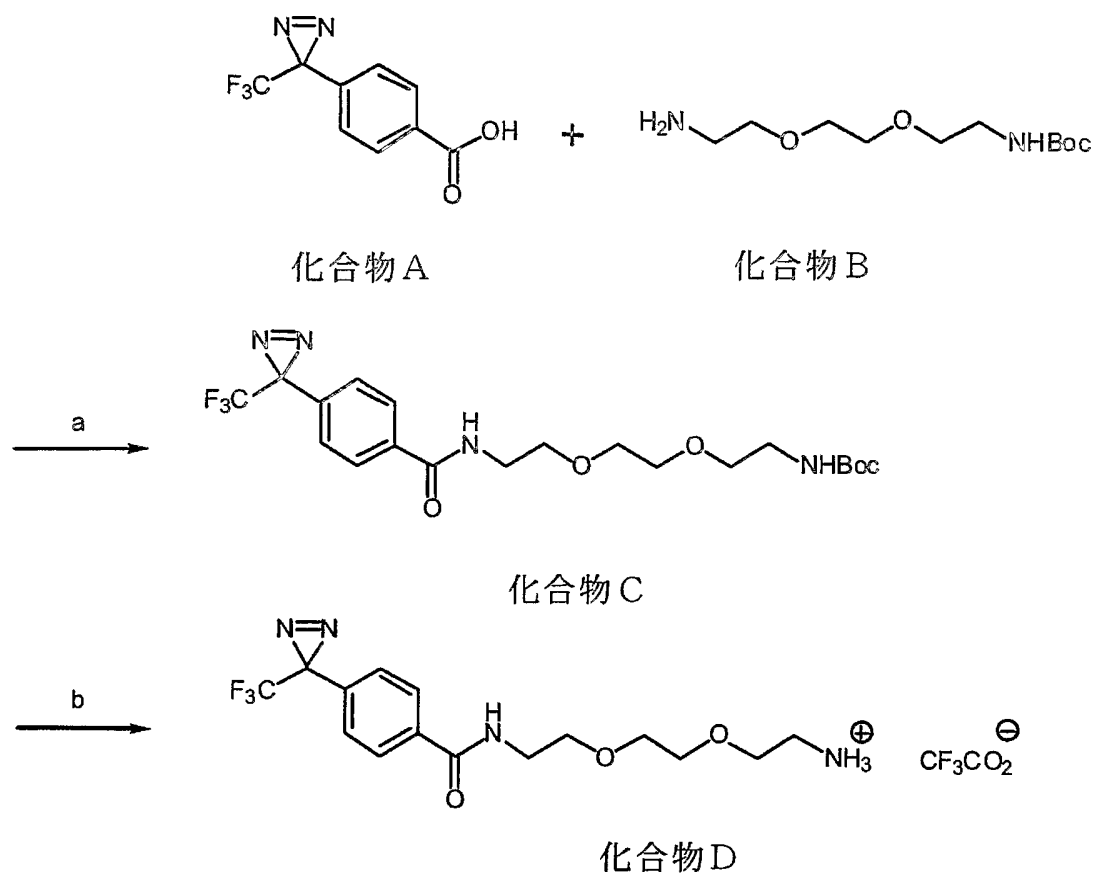
4-(3-トリフルオロメチル-3H-ジアジリン-3-イル)-安息香酸 (化合物 A)

(17.9mg、72.0 μ mol)、{2-[2-(2-アミノ-エトキシ)-エトキシ]-エチル}-カルバミン酸 tert-ブチルエステル (化合物B) (73.8mg、297 μ mol、4.1eq)、N,N-ジメチルアミノピリジン (3.1mg、25.4 μ mol、0.35eq) の無水 THF 溶液 (1mL) に室温で 1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (24.1mg、126 μ mol、1.7eq) を加え、暗所で 20 時間攪拌した。溶媒を減圧下留去後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (1g、クロロホルム：メタノール=25：1) で精製して [2-(2-[2-[4-(3-トリフルオロメチル-3H-ジアジリン-3-イル)-ベンゾイルアミノ]-エトキシ]-エトキシ)-エチル]-カルバミン酸 tert-ブチルエステル (化合物C) を 27.6mg (59.9 μ mol、収率 83%) 得た。

得られた化合物C (27.6mg、59.9 μ mol) をジクロロメタン (1mL) とトリフルオロ酢酸 (150 μ L) に溶解させ、室温で 70 分間攪拌した。溶媒を減圧下で留去後、逆相カラムクロマトグラフィー (メタノール：水=4:1 メタノール) で精製し、N-[2-[2-(2-アミノ-エトキシ)-エトキシ]-エチル]-4-(3-トリフルオロメチル-3H-ジアジリン-3-イル)-ベンズアミドのトリフルオロ酢酸塩 (化合物D) を 21.1mg (44.5 μ mol、収率 74%) 得た。

化合物D：無色油状物質、¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.90 (2H, brd, J=8.6Hz), 7.34 (2H, d, J=8.6Hz), 3.62-3.71 (8H, m), 3.58 (2H, t, J=4.8Hz), 3.07 (2H, t, J=5.6Hz).

なお、上記反応の概略を以下に示す。



(a) EDCI · HCl, DMAP, DMF, r.t., 20 h, 83%; (b) CF₃CO₂H, CH₂Cl₂, r.t., 70 min.

〔実施例 2〕 ガラス基板の修飾

アミノ化スライドガラス〔松浪ガラス製 DNA マイクロアレイ用コートスライドガラス（高密度アミノ基導入タイプ 1 スライド） 76x26mm〕上に、N, N'-ジスクシンイミジル カルボネート（74.2mg、290 μmol）、N, N-ジイソプロピルエチルアミン（48mL、276 μmol）、DMF（600 μL）の混合液を、0.18 μL · mm⁻² の割合で添加し、室温で 16 時間処理した。処理後のスライドガラスを順にエタノール、脱イオン水、エタノール、脱イオン水で各 10 分間洗浄後、脱水遠心機（400xg）で 1 分間脱水し、更に真空乾燥させ、スクシンイミジル化スライドを得た。

得られたスクシンイミジル化スライド上に、N-(2-[2-(2-アミノ-エトキシ)-エトキシ]-エチル)-4-(3-トリフルオロメチル-3H-ジアジリン-3-イル)-ベンズアミドのトリフルオロ酢酸塩（化合物 D）（17.4mg、36.7 μmol）、N, N-ジイソプロピ

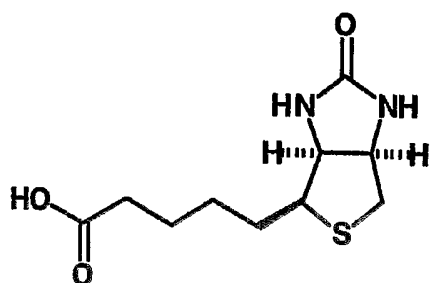
ルアミン ($40\ \mu\text{L}$ 、 $230\ \mu\text{mol}$)、DMF ($360\ \mu\text{L}$) の混合液を $0.11\ \mu\text{L}\cdot\text{mm}^{-2}$ の割合で添加し、暗所、室温で 14 時間処理した。スライド上に残った過剰の試薬をエタノール、脱イオン水で順に除去し、脱水遠心機 ($400\times g$) で 1 分間脱水した。このスライドにエタノールアミンの 1M DMF 溶液を $72\text{nL}\cdot\text{mm}^{-2}$ の割合で添加し、ブロッキング処理を暗所、室温で 1 時間行った。スライド上に残った過剰の試薬をエタノール、脱イオン水で順に除去し、脱水遠心機 ($400\times g$) で 1 分間脱水して、光親和性原子団導入スライドを得た。以上のガラス基板の修飾工程の概要を図 2 に示す。

〔実施例 3〕 低分子化合物の固定化

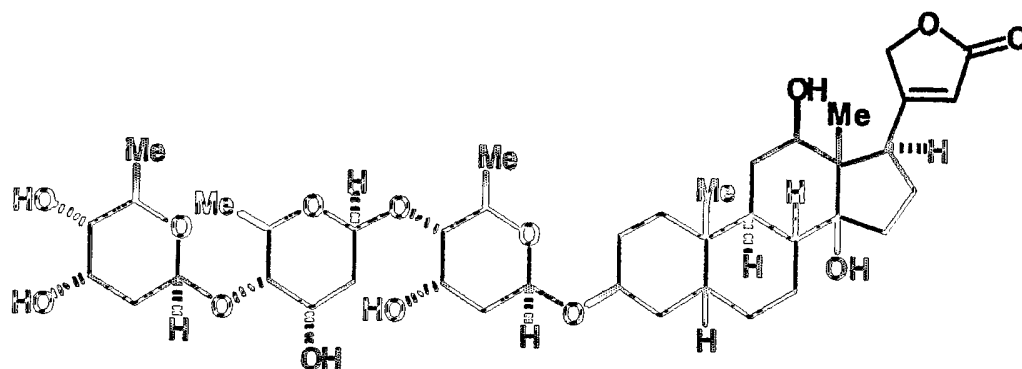
光親和性原子団導入スライド上に、あらかじめ 100、10、1、0.1、0.01mM に調製された低分子化合物（ビオチン、ロダミン B、ジゴキシン）の各 DMSO 溶液を各 $0.2\ \mu\text{L}$ ずつスポットした。このスライドを 35°C のインキュベーターで 3 時間乾燥させた後、真空ポンプを用いて 20 時間乾燥させた。このスライドに 365 nm の紫外線を 30 分間照射した後、スライド上に固定化されなかった過剰の低分子化合物をエタノールで洗い流した。更にこのスライドをエタノール、DMF、THF、エタノール、脱イオン水（各 1 時間）に順に浸して震盪洗浄し、低分子が固定化されたスライドを得た。

なお、ビオチン、ジゴキシン、ロダミン B の構造式は以下に示す通りである。

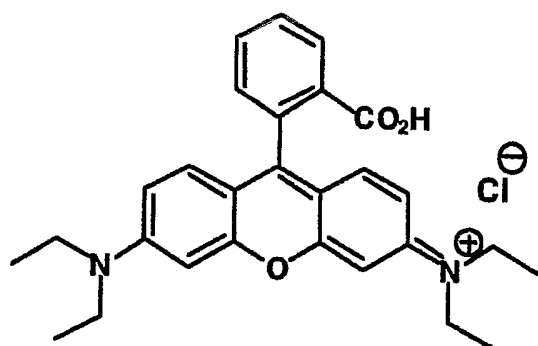
ビオチン



ジゴキシン



ロダミンB



〔実施例 4〕 低分子-タンパク質間結合の検出

低分子固定化スライドに、タンパク質溶液（ $162 \mu\text{g/mL}$ 抗ジゴキシンモノクローナル抗体クローン DI-22-FITC 結合体、 $3.7 \mu\text{g/mL}$ ストレプトアビジン-Alexa Fluor 633 結合体、1% (w/v) スキムミルク、77mM NaCl、0.05% (w/v) Tween 20、50mM Tris-HCl、pH 7.5）を $0.18 \text{ mL} \cdot \text{mm}^{-2}$ の割合で添加し、室温下 1 時間処理した。このスライドを洗浄バッファー（77mM NaCl、0.05% (w/v) Tween 20、50mM Tris-HCl、pH 7.5）で 3 回震盪洗浄した後、脱イオン水ですすぎ、脱水遠心機（400xg）で 1 分間脱水した。このスライドを波長が各々 488、532、635nm の光で励起させ、生じた蛍光を蛍光スライドスキャナーを用いて観測した。この結果を図 3 に示す。図 3 において、左列の画像はタンパク質溶液に浸す前のスライドを蛍光スキャナーで観測したものであり、右列の画像はタンパク質溶液で処理後に蛍光スキャナーで観測したものである。

図 3 に示すように、635nm の波長の光を照射した場合は、ビオチン溶液をスポットした部分にのみ蛍光が検出され、ビオチンがタンパク質（ストレプトアビジ

ン-Alexa Fluor 633 結合体) と結合したことが確認された。また、488nm の波長の光を照射した場合は、ジゴキシン溶液をスポットした部分にのみ蛍光が検出され、ジゴキシンがタンパク質 (抗ジゴキシンモノクローナル抗体クローン DI-22-FITC 結合体) と結合したことが確認された。

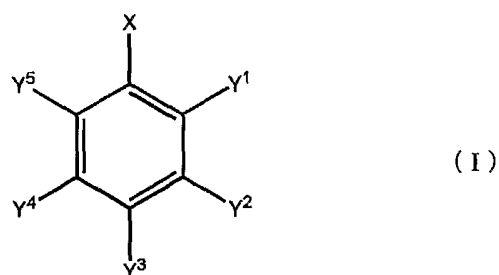
本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願 2003-104928 の明細書および／または図面に記載されている内容を包含する。また、本発明で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

本発明の固定方法は、官能基非依存的に低分子化合物を固定できるので、従来の固定方法よりも、多様な化合物を固定化できる。また、固定される低分子化合物は、分子中の様々な部位で、固相担体と結合しているので、低分子化合物のあらゆる部分が固相担体表面に露出することになり、この結果、低分子化合物の分子全体の結合性等を調べるのが可能になる。

請 求 の 範 囲

1. 以下の工程を含むことを特徴とする低分子化合物の固相担体への固定方法。
 - (1) 光反応性化合物が表面に結合している固相担体に、低分子化合物を含む溶液を接触させる工程
 - (2) 低分子化合物を含む溶液を、固相担体に接触させた状態で乾固させる工程
 - (3) 固相担体に光を照射し、光反応性化合物と低分子化合物との間に共有結合を形成させる工程
2. 光反応性化合物が、ナイトレン、カルベン、ラジカル、又は炭素求電子剤を発生し得る化合物であることを特徴とする請求項1記載の低分子化合物の固相担体への固定方法。
3. 光反応性化合物が、ジアゾニウム基、アジド基、ジアジリン環、又はジアゾ基を部分構造として含む化合物であることを特徴とする請求項1記載の低分子化合物の固相担体への固定方法。
4. 光反応性化合物が、式(I)：



〔式中、Xは、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{C}^*(\text{R}^1)\text{N}=\text{N}^*$ （*同士は連結して三員環を形成する）、 $-\text{N}_2^+\text{Z}^-$ 、 $-\text{C}(\text{R}^2)=\text{O}$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}_3$ 、 $-\text{Cl}$ 、又は $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}=\text{N}_2$ を表し； R^1 は、水素原子、置換基を有していてもよいアルキル基、又は置換基を有していてもよいアリール基を表し； R^2 は置換基を有していてもよいアリール基を表し； Z^- は陰

イオンを表し； Y^1 、 Y^2 、 Y^3 、 Y^4 、及び Y^5 のいずれか一つは固相担体表面に担持された官能基と反応して共有結合を形成しうる基を表し、他の四つはそれぞれ独立して水素原子又はハロゲン原子を表す。]

で表される化合物であることを特徴とする請求項1記載の低分子化合物の固相担体への固定方法。

5. 固相担体が、マイクロアレイ用基板であることを特徴とする請求項1乃至4のいずれか一項記載の低分子化合物の固相担体への固定方法。

6. 請求項5記載の方法によって得られる低分子マイクロアレイ。

7. 以下の工程を含むことを特徴とする低分子化合物と相互作用をする物質の検出方法。

(1) 請求項6記載の低分子マイクロアレイに、標識された試料物質を含む溶液を接触させる工程

(2) 低分子化合物と結合しない物質を除去する工程

(3) 試料物質の標識を検出する工程

8. 以下の工程を含むことを特徴とする低分子化合物における相互作用部位の特定方法。

(1) 光反応性化合物と、特定物質と相互作用をする低分子化合物を混合する工程

(2) 前記混合物に光を照射し、光反応性化合物と低分子化合物との間に共有結合を形成させる工程

(3) 光反応性化合物と低分子化合物の複合体を、低分子化合物の結合部位の違いにより分別する工程

(4) 分別された前記複合体をそれぞれマイクロアレイ用基板に固定する工程

(5) 前記基板上に固定された複合体に、標識された前記特定物質を含む溶液を接触させる工程

(6) 基板上に固定された複合体のうち、標識が検出されないものを選択し、その結合体の低分子化合物と光反応性化合物との間の結合部位を特定する工程

図 1

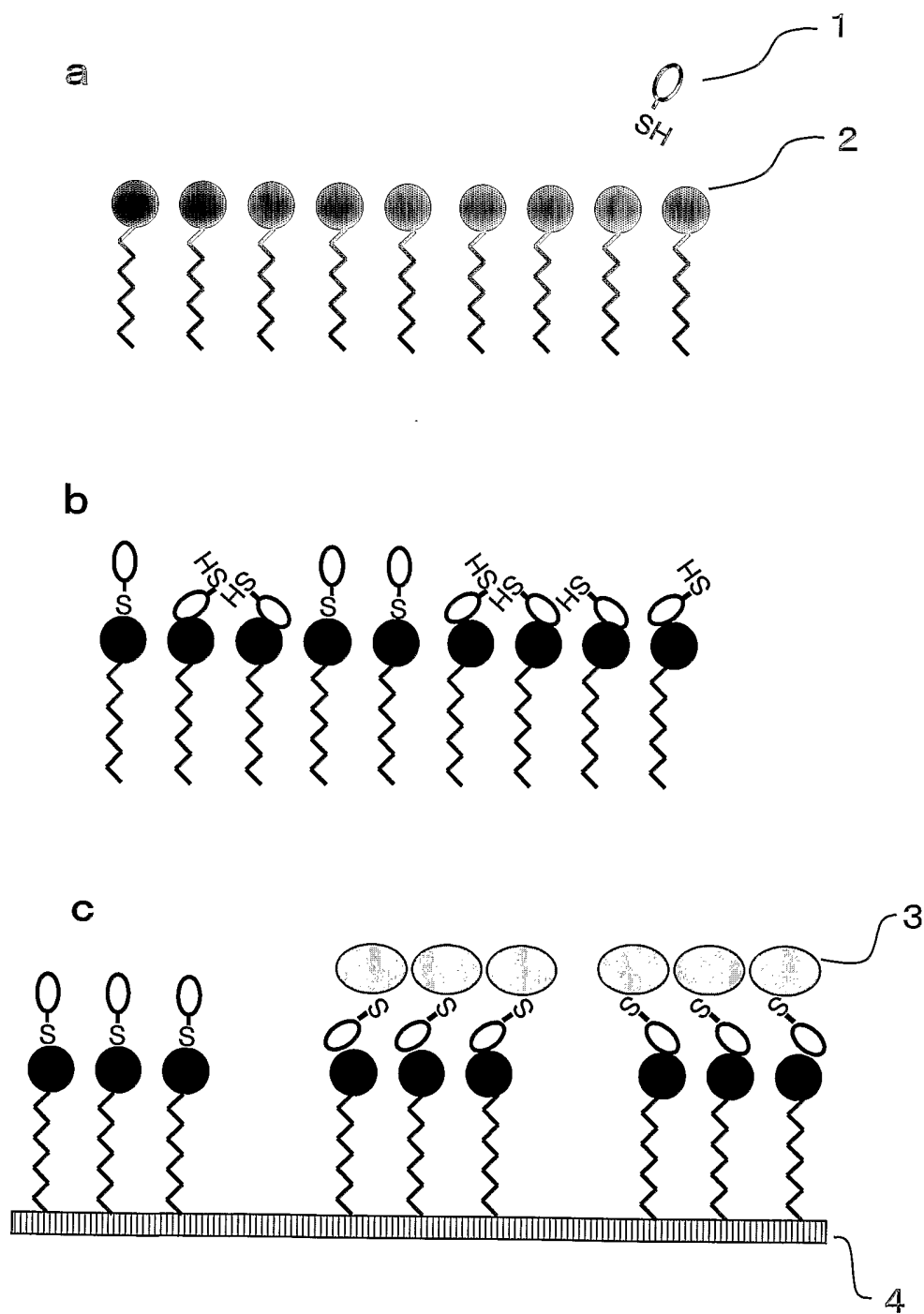


図2

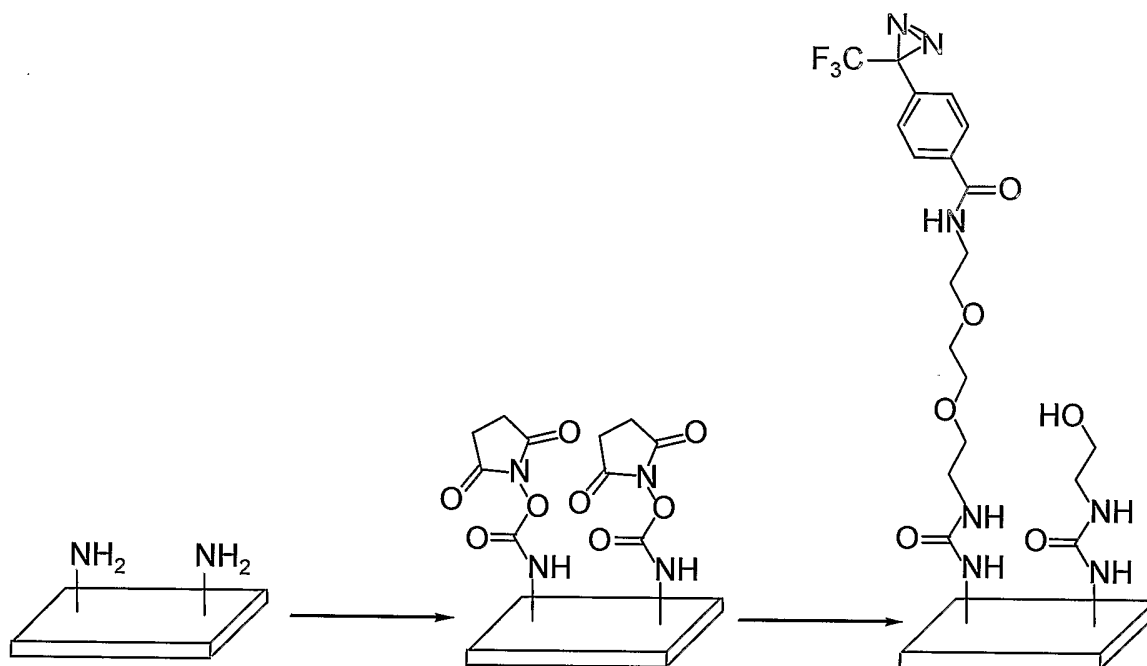
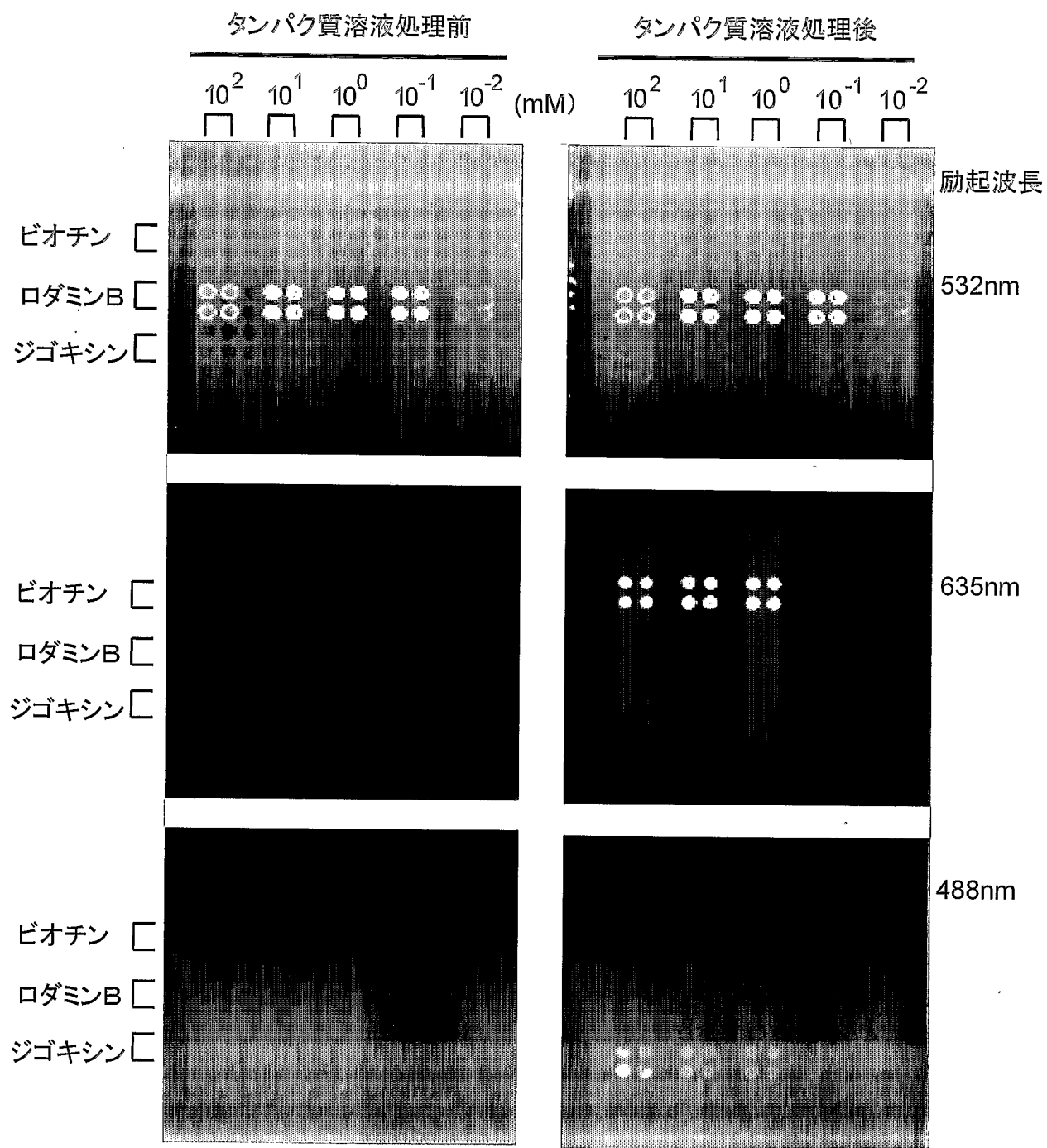


図3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004175

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00, G01N35/06

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)

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00, G01N35/06

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-178472 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 03 July, 2001 (03.07.01), Claims; Par. Nos. [0028] to [0032], [0036]; examples (Family: none)	1-7
X	WO 02/26376 A (SURMODICS INC.), 04 April, 2002 (04.04.02), & JP 2004-510147 A & WO 04/20085 A & EP 1326707 A & US 2003-082604 A	1-7
X	WO 01/32935 A (HU CELINE), 10 May, 2001 (10.05.01), & JP 2003-517589 A & EP 1230397 A & CN 1402796 A	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 April, 2004 (20.04.04)

Date of mailing of the international search report
11 May, 2004 (11.05.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004175

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-504695 A (Sur Modics, Inc.), 12 February, 2002 (12.02.02), & EP 1003561 A & US 6121027 A & WO 9908717 A	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004175

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 8
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claim 8 of this application relates to a subject matter in which composites are classified by the site at which a low-molecular compound is bonded to thereby specify that site of the low-molecular compound which undergoes (continued to extra sheet)
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004175

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

interaction. However, there is no sufficient disclosure in the description as to whether it is actually possible.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00, G01N33/547

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 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00, G01N33/547

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	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2001-178472 A(富士写真フイルム株式会社) 2001.07.03 特許請求の範囲、【0028】-【0032】、【0036】、実施例等参照 (ファミリーなし)	1-7
X	WO 02/26376 A(SURMODICS INC) 2002.04.04 & JP 2004-510147 A & WO 04/20085 A & EP 1326707 A & US 2003-082604 A	1-7

☒ 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

20.04.2004

国際調査報告の発送日

11.5.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美 一恵

2 J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

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 請求の範囲の番号
X	WO 01/32935 A (HU CELINE) 2001.05.10 & JP 2003-517589 A & EP 1230397 A & CN 1402796 A	1-7
X	JP 2002-504695 A (サーモディックス, インコーポレイティド) 2002-02-12 & EP 1003561 A & US 6121027 A & WO 9908717 A	1-7

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 8 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
本願請求の範囲8は、低分子化合物の結合部位の違いにより複合体を分別すること
で、低分子化合物における相互作用部位の特定を行うものであるが、明細書にそれが実
際に可能であるかについての十分な開示がない。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。