

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

**特表2018-516899**

(P2018-516899A)

(43) 公表日 **平成30年6月28日(2018.6.28)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 47/34 (2017.01)</b>	A 6 1 K 47/34	4 B 0 6 3
<b>G O 1 N 33/545 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/545	Z 4 C 0 7 6
<b>G O 1 N 33/574 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/574	D
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53	Y
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁)

(21) 出願番号 特願2017-559614 (P2017-559614)  
 (86) (22) 出願日 平成28年5月9日 (2016.5.9)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年1月9日 (2018.1.9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/SE2016/050413  
 (87) 国際公開番号 W02016/182494  
 (87) 国際公開日 平成28年11月17日 (2016.11.17)  
 (31) 優先権主張番号 1530062-7  
 (32) 優先日 平成27年5月9日 (2015.5.9)  
 (33) 優先権主張国 スウェーデン (SE)

(71) 出願人 512202794  
 ファセ ホログラフィック イマイング  
 ペーホーイー アクティブボラード  
 スウェーデン国, エス-2 2 3 6 3 ル  
 ンド, シェーレベージェン 2 2

最終頁に続く

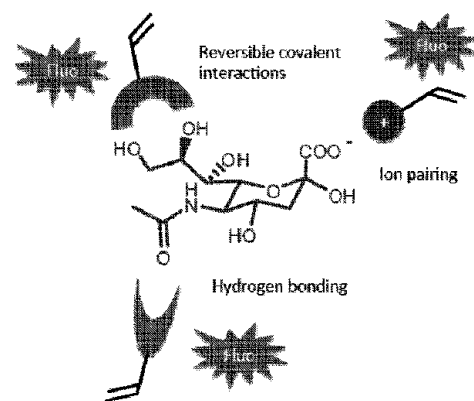
(54) 【発明の名称】 分子インプリントポリマー

(57) 【要約】

本発明は、グリカンを結合させるための分子インプリントポリマーに関するものであり、この分子インプリントポリマーは、糖鑄型を用意し；その鑄型と協同的に相互作用することのできる少なくとも2つの機能性モノマーを用意し；架橋モノマーを用意し；前記糖鑄型の存在下で、これらモノマーを場合によっては溶媒の中に溶解させて重合させ；前記鑄型を形成されたポリマーから除去することによって得られる。本発明は、その分子インプリントポリマーの製造方法と、その分子インプリントポリマーの利用にも関する。

【選択図】 図 1

Chart 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

- a) 糖鑄型を用意し；
  - b) その鑄型と協同的に相互作用することのできる少なくとも 2 つの機能性モノマーを用意し；
  - c) 架橋モノマーを用意し；
  - d) 前記糖鑄型の存在下で、前記モノマーを場合によっては溶媒の中に溶解させて重合させ；
  - e) 前記鑄型を形成されたポリマーから除去すること
- によって得られることを特徴とする分子インプリントポリマー。

10

## 【請求項 2】

前記鑄型が、エピトープとなる糖であり、その糖の少なくとも一部が細胞表面グリカンに対応している、請求項 1 に記載の分子インプリントポリマー。

## 【請求項 3】

前記鑄型が、図 2 に示したグリカンを例とする腫瘍特異的細胞表面グリカンである、請求項 1 に記載の分子インプリントポリマー。

## 【請求項 4】

前記鑄型が、図 2 に示したグリカンを例とするウイルス特異的グリカンである、請求項 1 に記載の分子インプリントポリマー。

## 【請求項 5】

前記鑄型が、 $\text{Sia}_{2-6}\text{GalNAc}$  (シアリルTn)、 $\text{Sia}_{2-3}\text{Gal}_{1-3}\text{GalNAc}$  (シアリルT)、 $\text{Sia}_{2,3}\text{Gal}_{1,4}(\text{Fuc}_{1,3})\text{GlcNAc}$  (シアリルルイスX)、 $\text{Sia}_{2,3}\text{Gal}_{1,3}(\text{Fuc}_{1,4})\text{GlcNAc}$  (シアリルルイスA)、 $\text{Sia}_{2,3}\text{-Gal}$ 、 $\text{Sia}_{2,6}\text{-Gal}$ 、 $\text{Sia}_{2,3}\text{-N-アセチルラクトサミン}$ 、 $\text{Sia}_{2,6}\text{-N-アセチルラクトサミン}$ 、 $\text{N-アセチルノイラミン酸}$  ( $\text{Neu5Ac}$ 、ヒト形態のシアル酸 (SA))、 $\text{N-グリコリルノイラミン酸}$  ( $\text{Neu5Gc}$ 、動物形態のシアル酸)、 $\text{GlcA}_2\text{SO}_3$ 、 $1,4\text{-Glc}_2\text{NSO}_3$ 、 $\text{GlcA}_2\text{SO}_3$ 、 $1,4\text{-Glc}_2\text{NSO}_3$ 、 $6\text{SO}_3$  のいずれかである、請求項 1 に記載の分子インプリントポリマー。

20

## 【請求項 6】

前記鑄型が、シアル酸であるか、1 つ以上のシアル酸を含むグリカンである、請求項 1 に記載の分子インプリントポリマー。

30

## 【請求項 7】

前記鑄型が、単糖、二糖、三糖、四糖のいずれかである、請求項 1 に記載の分子インプリントポリマー。

## 【請求項 8】

前記機能性モノマーの 1 つが、前記鑄型とイオン対を形成することのできるモノマーである、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の分子インプリントポリマー。

## 【請求項 9】

前記機能性モノマーの 1 つが、前記鑄型とイオン対を形成することのできる図 3 A に示したいずれかのタイプのモノマー、例えば 2 - ビニルピリジン (2 - VPY)、4 - ビニルピリジン (4 - VPY)、ジエチルアミノエチルメタクリレート (DEAEMA)、2 - アミノエチルメタクリレート (AEMA)、2 - アミノエチルメタクリルアミド (AEMAM)、N - ビニルイミダゾール (VIM)、N - (ジメチル) - 2 - エチル - メタクリレート (DMAEMA)、アリルアミン (ALAM)、p - ビニル - N, N' - ジエチル - ベンズアミジン (VDEAB)、p - ビニルベンジルアミン (VBA) である、請求項 8 に記載の分子インプリントポリマー。カチオン性モノマーは一般式が  $\text{N}^+\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3\text{R}_4^+\text{X}^-$  である (ただしすべての R 基が N に直接接続されていて、 $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$ 、 $\text{R}_4$  のうちの少なくとも 1 つは重合可能な基であり、 $\text{X}^-$  は対アニオンである)。カチオン性モノマーの例は、N - (トリメチル) - 2 - エチルメタクリレート - 塩化アンモニ

40

50

ウム (TMAEMA)、N-(トリメチル)-p-ビニルベンジル-塩化アンモニウム (TMVBA)、N-ビニル-N'-ベンジル-塩化イミダゾリウム (VBI)、塩化N-ビニルピリジウム (N-VPY)である。酸性モノマーの例は、メタクリル酸 (MAA)、アクリル酸 (AA)、トリフルオロメチルアクリル酸 (TFM)、イタコン酸 (ITA)、p-ビニル安息香酸 (PVB)、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸 (AMPSSA)である。

【請求項10】

前記機能性モノマーの1つが2-アミノエチル-メタクリレートである、請求項9に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項11】

前記機能性モノマーの1つが、前記鑄型と水素結合することのできる中性モノマーである、請求項1~7のいずれか1項に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項12】

前記機能性モノマーの1つが、前記鑄型と水素結合することのできる図3Bのいずれかのタイプの中性モノマー、例えばN-ビニルピロリドン (NVP)、スチレン (S)、2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA)、アシロニトリル (AN)、シアノスチレン (CS)、N-イソプロピルアクリルアミド (NIPAM)、アクリルアミド (AAM)、メタクリルアミド (MAAM)、N-t-ブチルアクリルアミド (TBAM)である、請求項11に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項13】

前記機能性モノマーの1つが、 $R_1-NHCONH-R_2$ のタイプの1,3二置換尿素モノマーである(ただし置換基 $R_1$ と $R_2$ の少なくとも1つは重合可能な基である)、請求項11に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項14】

前記機能性モノマーの1つが、2-(3-(4-ニトロベンゾ[c][1,2,5]オキサジアゾ-7-イル)ウレイド)エチルメタクリレートまたは1-(4-スチリル)-3-(3,5-トリフルオロメチル-フェニル)-尿素 (TFU)であるか、図3Dのタイプのいずれかである、請求項12に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項15】

前記架橋モノマーが、図3Cのいずれかのタイプ、例えばエチレングリコールジメタクリレート (EGDMA)、ジビニルベンゼン (DVB)、トリメチルプロパントリメタクリレート (TRIM)、ペンタエリトリールトリアクリレート (PETA)、エチル-ジアクリルアミド (EBA)、ピペラジン-ジアクリルアミド (PBA)、メチレンビスアクリルアミド (MBA)である、請求項1~14のいずれか1項に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項16】

前記機能性モノマーの1つが、前記鑄型と共有結合性相互作用できるモノマーである、請求項1~7のいずれか1項に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項17】

前記機能性モノマーの1つが、前記鑄型と共有結合性相互作用できる図3Eまたは図3Fに示したいずれかのタイプのモノマー、例えば $R-B(OH)_2$ 、 $R-B(OH)OR_2$ (ただし $R_2$ はアルキル置換基またはアリール置換基である)、ヒドラジン $R-NH-NH_2$ 、アミン(ベンジルアミン $R-Bz1-NH_2$ 、ポリアミンなど)、スルホンヒドラジン $R-PhSO_2NHNH_2$ である、請求項16に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項18】

前記機能性モノマーの1つが4-ビニルベンゼンボロン酸である、請求項17に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項19】

前記機能性モノマーが、図3に示した3つのタイプすべてを代表する少なくとも3つの

10

20

30

40

50

モノマーである、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項 20】

1 つの機能性モノマーがアミンであり、1 つの機能性モノマーが尿素であり、1 つの機能性モノマーがボロン酸である、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項 21】

1 つの機能性モノマーがアミンであり、1 つの機能性モノマーが尿素であり、1 つの機能性モノマーが、図 3 と図 4 に示した構造のいずれかに従うボロン酸である、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項 22】

1 つの機能性モノマーが、2 - アミノエチル - メタクリレートヒドロクロリドであり、1 つの機能性モノマーが、2 - ( 3 - ( 4 - ニトロベンゾ [ c ] [ 1 , 2 , 5 ] オキサジアゾ - 7 - イル ) ウレイド ) エチルメタクリレートであり、1 つの機能性モノマーが、4 - ビニルベンゼンボロン酸である、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項 23】

1 つの機能性モノマーが蛍光レポータモノマーである、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項 24】

前記機能性モノマーが、図 3 の 1、図 4 の 2 のような蛍光レポータモノマーである、請求項 23 に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項 25】

前記蛍光モノマーが、図 3 D に示したいずれかの構造である、請求項 23 に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項 26】

表面インプリントポリマーである、請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項 27】

表面開始重合によって製造される表面インプリントポリマーである、請求項 26 に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項 28】

前記表面インプリントポリマーが、沈殿重合、ミニエマルジョン重合、重合からのグラフティングと呼ばれる方法のいずれかによって調製される、請求項 26 に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項 29】

前記表面インプリントポリマーが、可逆的付加断片化連鎖移動重合 ( R A F T ) の技術によって調製される、請求項 26 に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項 30】

前記表面インプリントポリマーが、そのインプリントポリマーの合成後に R A F T 基がアミノ分解またはラジカル反応によって変換される可逆的付加断片化連鎖移動重合 ( R A F T ) の技術によって調製される、請求項 26 に記載の分子インプリントポリマー。

【請求項 31】

分子インプリントポリマーを調製する方法であって、その分子インプリントポリマーが、

- a) 糖鋳型を用意し；
- b) その鋳型と協同的に相互作用することのできる少なくとも 2 つの機能性モノマーを用意し；
- c) 架橋モノマーを用意し；
- d) 前記糖鋳型の存在下で、これらモノマーを場合によっては溶媒の中に溶解させて重合させ；

10

20

30

40

50

e) 前記鑄型を形成されたポリマーから除去することによって得られることを特徴とする方法。

【請求項 32】

インビトロでの、

- 細胞分離を含む分離のため
- 細胞のグリコシル化状態を研究するため
- 血液型分類と細胞接着のため
- 組織化学的染色のため
- 酵素のアッセイのため
- 分子標的の同定と濃度のためのセンサーとして
- グリカン決定基のアッセイ（例えば ELISA）のため
- フローサイトメトリーアッセイのため
- 生体内またはインビトロでのバイオマーカーのイメージングのため、または造影剤として
- 電気泳動における検出ツールとして
- 治療剤（例えば薬）として
- 触媒として

10

の請求項 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の分子インプリントポリマーの利用。

【請求項 33】

インビトロでの細胞または組織のイメージング、インビトロでのセルソーティング、インビトロでのグリコミクスと細胞グリコシル化バイオマーカー分析、医学における例えばインビトロでの細胞表面相互作用の選択的抑制での、請求項 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の分子インプリントポリマーの利用。

20

【請求項 34】

がん患者に由来する循環している腫瘍細胞（CTC）のインビトロでの同定と分子特徴づけのための、請求項 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の分子インプリントポリマーの利用。

【請求項 35】

エンドサイトーシスを通じて治療薬として使用するための、または薬の細胞内標的化送達のための、または細胞表面相互作用の選択的抑制のための、請求項 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の分子インプリントポリマー。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、グリカンを結合させるための新規な分子インプリントポリマーと、その製造方法と、そのグリカン結合ポリマーの利用を記述する。

【背景技術】

【0002】

細胞表面グリカンとは、血漿の膜結合タンパク質または膜結合脂質に付着する多彩なグリカンモチーフを意味する。それは細胞の最外面を構成していて、細胞コミュニケーションや、宿主 - 病原体認識、感染、細胞分化、細胞増殖、細胞移動などのプロセスに参与している。哺乳動物のグリカンの十分な多様性を生み出すには約 700 のタンパク質が必要とされる。そのグリカンは、10 種類の単糖だけ、すなわちフコース（Fuc）、ガラクトース（Gal）、グルコース（Glc）、N - アセチルガラクトサミン（GalNAc）、N - アセチルグルコサミン（GlcNAc）、グルクロン酸（GlcA）、イズロン酸（IdoA）、マンノース（Man）、シアル酸（SA）、キシロース（Xyl）から組み立てられる。グリコシル化において最もよく見られるがん関連変化は、シアル化、フコシル化、O - グリカン切断、N 結合型グリカン分岐、O 結合型グリカン分岐である（図 1）。

40

【0003】

50

SAは、糖脂質と糖タンパク質のグリカン鎖の最も外側にある単糖単位であり、病原体が付着する認識部位となることがしばしばある。SAの出現は、心血管疾患、神経疾患、がんなどのいくつかの疾患状態と関連していることが証明されている(B. Adamczyk, T. Tharmalingam, P. M. Rudd, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2012年、第1820巻、1347~1353ページ)。臨床的には、シアル化の増加は、がん患者における浸潤および悪い予後と関係していることがしばしばある。合成プロセスが不完全だと切断された構造が生合成されることになる。それを、胃腸がんと乳がんにおけるSTn(図1)の発現に見ることができる。STn(Neu5Ac<sub>2-6</sub>GalNAc-O-R)とTn(GalNAc-O-R)は、ヒトのがんの80%で発現していて、正常な組織では存在しないか、弱く発現するだけであるため、診断と治療の標的として広く注目を集めてきた。しかしTnとSTnに対するIgG抗体を作製することは難しく、STnに対するIgG抗体は親和性が小さいため捕獲戦略における性能が悪い。SAが利用できる数少ないレクチン(SNAとMAA)は特異性が広くて親和性が小さいため、捕獲アッセイにおける性能が悪い。

10

20

30

40

50

#### 【0004】

逆に、ステージが進んだがんで一般に観察される新合成とは、多くのがんにおけるいくつかの抗原(シアルルイスa(SLea)やシアルルイスX(SLex))のデノボ発現に見られるように、糖質決定基の発現に関与するいくつかの遺伝子のがんに関連して誘導されることを意味する。ポリシアル酸は、いくつかのタイプのがんに関連する増加したシアル化であり、ステージの進んだ腫瘍で頻繁に発現する。

#### 【0005】

哺乳動物の主要なSAとして、Neu5Ac(N-アセチルノイラミン酸)とNeu5Gc(N-グリコリルノイラミン酸)の2つがある(図1参照)。これらは酸素原子が1個だけ異なっていて、その酸素は、細胞質の中でシチジン-リン酸N-アセチルノイラミン酸ヒドロキシラーゼ(CMAH)という酵素によって付加される。ヒトは、CMAH遺伝子の不活性化変異が原因でこの酵素活性を欠いている。このSAの代替物が通常は存在しないため、免疫寛容が起きない。その結果として、Neu5Gcが食事源から取り込まれた後に糖共役体に組み込まれるとき、この糖に対する「自己抗体」が発達し、それが、がんの開始に関係する炎症経路を強化することが提案されている。これらの形態を識別するとともに、動物とヒトの結合特異的グリコシル化に関する2-3結合シアル酸と2-6結合シアル酸を識別するための新規な親和性試薬が強く望まれている。

#### 【0006】

したがってこれらグリコシル化モチーフを分析して決定することが診断における重要な1つの目的だが、この仕事は、レクチンとグリカン特異的抗体の入手が限られているため困難であることがわかった(N. Fujitani, J. - i. Furukawa, K. Araki, T. Fujioka, Y. Takegawa, J. Piao, T. Nishioka, T. Tamura, T. Nikaido, M. Ito, Y. Nakamura, Y. Shinohara, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013年、第110巻、2105~2110ページ)。

#### 【0007】

しかし多数の高感度法が公開されていて、それらの方法では、全シアル酸含量を測定するか、さまざまなタイプのシアル酸を測定する。これらの方法はコストがかかり、作業が厄介で、時間がかかるため、実施には熟練した操作者などの一般に洗練された手段が必要とされる。したがって日常的な用途にはあまり適していない。いくつかのタイプのシアル酸のためのレクチン系アッセイが存在しているが、アッセイの開発では、感度が低くて特異度が悪いという障害に遭遇することがしばしばある。シアロ糖タンパク質中のシアル酸、または遊離部分としてのシアル酸の検出には、高性能液体クロマトグラフィ(HPLC)、ガスクロマトグラフィと質量分析の組み合わせ(GC-MS)、核磁気共鳴分光法(

NMR)、キャピラリー電気泳動(CE)の利用が含まれる。これらの方法は、シアル化パターンをモニタするのにサンプル調製、特別な装置、標的タンパク質の精製、長くて複雑なデータ分析が大いに必要とされるため複雑である。

#### 【0008】

これが、例えば細胞または組織のイメージング、セルソーティング、標的化グライコミクス、細胞グリコシル化バイオマーカー分析に使用したり、医学において例えば標的化薬送達や細胞表面相互作用の選択的抑制の用途に使用したりできると考えられる代わりにグリカン特異的受容体を開発する正当な理由となる。イメージングに応用するため、極めて多数の低分子量ホストが系統的に設計されて、例えば蛍光レポータ基または量子ドットに共役されている。シアル酸のための最も強力なホストは、2つ以上の直交結合基、ジオール基に向かうボロン酸、カルボキシレート基に向かう帯電した、または中性のアニオン受容体である。他の強力な結合基は、多機能性が組み込まれた2つ以上のボロン酸基である。これは、ジオールとのpH依存性可逆的エステル化に参与し、5員または6員の環構造になる。

10

#### 【0009】

単糖選択的受容体を分子インプリントの技術によって用意できることが以前から知られている。Wulffらは、2つのビニルベンゼンボロン酸に共役した単糖鑄型を用い、マンノース、フルクトース、ガラクトースのための非常に識別性のあるボロン酸塩系受容体を報告した(1)。別の研究者は、後にこの手続きを採用してシアル酸インプリントバルクポリマーやセンサーコーティングを合成した。これらボロン酸含有MIPは、塩基性緩衝液/アセトニトリル混合物(pH 8)の中で調べたとき、強い鑄型親和性を特徴としていた。その後、より簡単なワンポットプロトコルを利用して糖タンパク質選択的MIPが合成された(X. BiとZ. Liu, *Analytical Chemistry*, 2013年、第86巻、959~966ページ)。ここではボロン酸塩モノマーが、塩基触媒の存在下にてその場でSA含有糖タンパク質に共役され、その後、架橋モノマーと共重合されてインプリントポリマーを形成する。これまでのところ、SAインプリント受容体は、水中で、特に生理学的条件下で調べたとき、糖標的に対して弱い結合( $K < 10^3 \text{ M}^{-1}$ )しか示さないことが報告されている。これは、設計された最も強力なホスト(上記参照)とは対照的である。そのホストでは、結合が十分に強い( $10^5 \text{ M}^{-1}$ 超)ため、細胞をベースとしたイメージングが可能であり、セルソーティングの用途さえ可能だからである。しかしその受容体がより複雑なグリカン(二糖、高級糖)を標的とするように設計するのは面倒である。そのためには、強力な結合物を同定するために多数の類似体を合成する多大な努力と試験が一般に必要とされる。

20

30

#### 【0010】

そのような受容体は、細胞または組織のイメージングの用途以外に、レクチンまたは抗体の代替物として使用することが、標的化グライコミクス、グリカンセンサー、特定のグリカンモチーフの豊富化、セルソーティング、医学(例えば標的化薬送達や、細胞表面相互作用の選択的抑制)において可能であると考えられる。

#### 【0011】

1つの応用は、がん患者の体内を循環している腫瘍細胞(CTC)の同定と分子特徴づけに関する。これらの細胞の特徴を明らかにすることは、転移プロセスと可能性のある治療戦略を理解する上で重要であり、そうすることで予後と治療のガイドとなる。この分野の進歩はゆっくりとしていた。その理由の一端は、CTCが「干し草の山の中の針」のように少ないことにある。CTCは、転移性疾患を有する患者の体内で信頼性よく検出することができるとはいえ、より少数のCTCで初期段階の治療可能ながんを検出することが課題として残されている。CTCを検出するための現在優勢な技術は、稀な細胞を検出する確率を最適化するための初期豊富化工程の後に細胞が無傷なままで残る細胞測定アッセイである。優勢な豊富化技術は、典型的には、上皮タンパク質マーカー(EpCam)に依存した免疫磁性分離に基づいている。しかしがん細胞から放出される細胞表面グリカンまたは循環O-糖タンパク質も、診断と予後予測のための重要な血清バイオマーカーであ

40

50

る。循環しているO-糖タンパク質ががんに関連して異常な糖形態になっているものを選択的に検出できると、がんバイオマーカーアッセイの特異度を大きくすることが可能になる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

腫瘍への薬の標的化送達が、がんの診断と治療における大きな進歩を表わしている。したがって新規な腫瘍特異的リガンドまたは医薬ナノ担体が開発されることが大いに望ましい。そのナノ担体に薬を搭載し、身体の中の疾患組織だけが存在する特定の部分に送達することにより、健康な組織との相互作用を回避することができると考えられる。エンドサイトーシスを通じて送達用ビヒクル(ナノ担体)を標的とする特定の細胞器官に向けて送達することで、巨大分子薬に特に適したより特異的な標的化が提供される。がん関連グリカンを発現している細胞をそのようなナノ担体の選択的標的とすることが、1つの重要な目的である。

10

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、グリカンに対する中程度( $10^3 \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ )から大きな( $10^8 \text{ M}^{-1}$ 超)親和性を特徴とするグリカン特異的分子インプリントポリマー(MIP)を開示する。このMIPは、1つ以上の単糖、二糖、高級糖(グリカン、グリカンを含む分子または種(糖タンパク質、糖脂質、オリゴ糖、プロテオグリカンなど)が含まれる)から選択した鑄型を用いて調製したものである。

20

【0014】

一実施態様では、鑄型は、1~5個の糖を含んでいて一般に末端糖としてシアル酸を有するグリカンの最外側端部に対応する。

【0015】

別の一実施態様では、1つ以上の糖酸、好ましくはシアル酸またはグルクロン酸がグリカンに組み込まれている。

【0016】

別の一実施態様では、1つ以上の硫酸基またはリン酸基がグリカンに組み込まれている。

30

【0017】

MIPは、架橋モノマーおよび/または機能性モノマーから選択した少なくとも1つのモノマーを用いて調製され、鑄型と、場合によっては溶媒との存在下で重合されることを特徴とする。その鑄型が得られたポリマーから除去されることで、分子インプリントポリマー(MIP)が得られる。

【0018】

一実施態様では、MIPは、ボロン酸および/またはカチオン基および/または水素結合基などの直交結合基を含む少なくとも2つの機能性モノマーを用いて調製される。

【0019】

第2の実施態様では、MIPは、蛍光部分を備えていて、結合に反応して蛍光が変化するゲスト反応性蛍光を示す。

40

【0020】

第3の実施態様では、MIPは、インプリントシェルと、機能性コアまたは非機能性コアを含むコアシェル形状を有する粒子の形態に調製される。

【0021】

受容体はさらに、長い商品寿命を持つ丈夫で安定なものであり、低コストの簡単な手順を利用して調製することができる。したがってこれらの特徴により上記の欠点が回避される。受容体は、新規なインプリント法を利用して調製され、その結果としてグリカン標的に対する結合親和性が顕著に向上する。そのため、二糖や、より複雑な標的(例えばルイスX四糖などの腫瘍特異的な糖に見られるような高級糖や分岐構造が含まれる)のための

50

グリカン特異的受容体の設計が可能になる。

【0022】

第4の実施態様では、MIPは、細胞または組織のイメージング、セルソーティング、グライコミクス、細胞グリコシル化バイオマーカー分析や、医学における例えば標的化薬送達や細胞表面相互作用の選択的抑制の用途に用いられる。

【0023】

第5の実施態様では、MIPは、がん患者の体内を循環している腫瘍細胞(CTC)の同定と分子特徴づけに用いられる。

【0024】

第6の実施態様では、MIPは、エンドサイトーシスを通じて治療作用を及ぼすか、治療のためエンドサイトーシスを通じた細胞内標的化薬送達に用いられる。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】糖インプリントポリマーが標的とするグリカンの例。鑄型は、グリカンの断片、またはグリカンの構造全体に対応することができる。

【0026】

【図2】鑄型の異なるサブユニットに直交して結合する少なくとも2つの、好ましくは3つの機能性モノマーを用いた糖インプリントの原理。図2は、糖インプリントポリマーが標的とするグリカンの例を開示している。鑄型は、グリカンの断片、またはグリカンの構造全体に対応することができる。

【0027】

【図3A】(A)塩基性、カチオン性、酸性、アニオン性の機能性モノマーの例。アミン含有モノマーは一般式が $NR_1R_2R_3$ である(ただしすべてのR基がNに直接結合していて、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ のうち少なくとも1つは重合可能な基である)。アミン含有モノマーの例は、2-ビニルピリジン(2-VPY)、4-ビニルピリジン(4-VPY)、ジエチルアミノエチルメタクリレート(DEAEMA)、2-アミノエチルメタクリレート(AEMA)、2-アミノエチルメタクリルアミド(AEMAM)、N-ビニルイミダゾール(VIM)、N-(ジメチル)-2-エチルメタクリレート(DMAEMA)、アリルアミン(ALAM)、p-ビニル-N,N'-ジエチル-ベンズアミジン(VDEAB)、p-ビニルベンジルアミン(VBA)である。カチオン性モノマーは一般式が $NR_1R_2R_3R_4^+X^-$ である(ただしすべてのR基がNに直接接続されていて、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ のうち少なくとも1つは重合可能な基であり、 $X^-$ は対アニオンである)。カチオン性モノマーの例は、N-(トリメチル)-2-エチルメタクリレート-塩化アンモニウム(TMAEMA)、N-(トリメチル)-p-ビニルベンジル-塩化アンモニウム(TMVBA)、N-ビニル-N'-ベンジル-塩化イミダゾリウム(VBI)、塩化N-ビニルピリジウム(N-VPY)である。酸性モノマーの例は、メタクリル酸(MAA)、アクリル酸(AA)、トリフルオロメチルアクリル酸(TFM)、イタコン酸(ITA)、p-ビニル安息香酸(PVB)、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸(AMPSA)である。

【0028】

【図3B】(B)糖鑄型と相互作用する中性モノマーと水素結合モノマーの例。中性モノマーの例は、N-ビニルピロリドン(NVP)、スチレン(S)、2-ヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)、アシロニトリル(AN)、シアノスチレン(CS)、N-イソプロピルアクリルアミド(NIPAM)、アクリルアミド(AAM)、メタクリルアミド(MAAM)、N-t-ブチルアクリルアミド(TBAM)である。尿素系機能性モノマーの例。 $R_1-NHCONH-R_2$ のタイプの1,3二置換尿素モノマー(ただし置換基 $R_1$ と $R_2$ のうち少なくとも1つは重合可能な基である)。尿素系モノマーの例は、1-(4-スチリル)-3-(3,5-トリフルオロメチル-フェニル)-尿素(TFU)である。

【0029】

10

20

30

40

50

【図3C】(C)架橋剤の例：エチレングリコールジメタクリレート(EGDMA)、ジビニルベンゼン(DVB)、トリメチルプロパントリメタクリレート(TRIM)、ペンタエリトリールトリアクリレート(PETA)、エチル-ジアクリルアミド(EBA)、ピペラジン-ジアクリルアミド(PBA)、メチレンビスアクリルアミド(MBA)。

【0030】

【図3D】(D)図に示してある置換基Rを有する蛍光発生尿素系機能性モノマーの例。

【0031】

【図3E】(E)糖誘型に共有結合するモノマーの例(ただしRは重合可能な基である)。例は、R-B(OH)<sub>2</sub>またはR-B(OH)OR<sub>2</sub>のタイプのボロン酸(ただしR<sub>2</sub>はアルキル置換基またはアリール置換基である)、ヒドラジンR-NH-NH<sub>2</sub>、アミン(ベンジルアミンR-Bzl-NH<sub>2</sub>、ポリアミンなど)、スルホンヒドラジドR-PhSO<sub>2</sub>NHNH<sub>2</sub>。

10

【0032】

【図3F】(F)糖インプリントに用いるボロン酸モノマーの例。

【0033】

【図4】協同的インプリントに基づいてグリカンインプリントポリマーを調製するための典型的な手続き。これは、共有結合と非共有結合の混合アプローチ(可逆的ボロン酸塩エステル化が含まれる)(1)によって、水素結合安定化とゲスト反応性蛍光レポータ基(2)によって、アミン触媒と静電安定化(3)によって、RAFTを媒介としてシリカコア粒子の表面にSA誘型シェルをグラフトすることからなる。

20

【0034】

【図5】SAインプリントコアシェルナノ粒子(A、B)またはGAインプリントコアシェルナノ粒子(C、D)のTEM画像。スケール棒=0.5μm(A、C)または50nm(B、D)。

【0035】

【図6】SA-MIP(上方の赤線)、GA-MIP(中央の青線)、RAFT修飾コア粒子(下方の黒線)の透過FTIRスペクトル(KBr)。

【0036】

【図7】A)2%の水、B)50%の水、C)98%の水を含むメタノールと水の混合物の中のSA-MIPに添加されたSA(黒丸)またはGA(白三角)と、GA-MIPに添加されたSA(白丸)またはGA(黒三角)の結合曲線。SA-MIPに結合したSAとGAに対応する結合曲線は、ラングミュア単一部位モデルにフィットさせ、各グラフの横に掲載した結合パラメータを得た。GA-MIPに対応するデータはラングミュア式にうまくフィットしなかったため、それ以上評価しなかった。

30

【0037】

【図8】27μg/mlのSA-MIP(A)または80μg/mlのSA-MIP(B)とともにインキュベートしたDU145細胞、27μg/mlのGA-MIP(C)または80μg/mlのGA-MIP(D)とともにインキュベートしたDU145細胞の蛍光顕微鏡画像。透過モード画像から、細胞の数がA~Dで同様であることが確認された。スケール棒は2μmを表わす。

40

【0038】

【図9】DAPI(exc=359nm; em=461nm)を用いて核染色した後、水(2%メタノール)中でSA-MIP(20μg/ml)(A)またはFITC-レクチン(1μg/ml)(B)とともにインキュベートしたDU145細胞の蛍光顕微鏡画像。スケール棒=10μm。

【0039】

【図10】FITC-レクチン(1μg/ml)とともにインキュベートしたDU145細胞(A、C)とPC3細胞(B、D)の蛍光顕微鏡画像。CとDは、FITC-レクチンなしで記録した対照である。スケール棒は10μmを表わす。

【0040】

50

【図11】DU145細胞の細胞蛍光を添加したSA-MIPプローブ(A)またはFITC-レクチン(B)の関数としてフローサイトメトリーに基づいて定量し、陽性細胞の%として表現した図。

【0041】

【図12】DU145細胞とPC3細胞(A、C)またはJurkat細胞(B、D)の細胞蛍光を添加したSA-MIPプローブ(A、B)またはFITC-レクチン(C、D)の関数としてフローサイトメトリーに基づいて定量し、陽性細胞の%として表現したグラフ。

【0042】

【図13】SA-MIP 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (A)とともにインキュベートしたDU145細胞、または5 U/mlのシアリダーゼ(B)または10 U/mlのシアリダーゼ(C)であらかじめ処理した後にSA-MIP 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ とともにインキュベートしたDU145細胞の蛍光顕微鏡画像。Dは、シアリダーゼとSA-MIPの両方が存在しない対照である。スケール棒は10  $\mu\text{m}$ を表わす。

10

【0043】

【図14】DU145細胞系(丸)、PC3細胞系(正方形)、Jurkat細胞系(三角形)の細胞蛍光を、結合部位の濃度(N 10  $\mu\text{mol}/\text{g}$ )として表わした添加したSA-MIPプローブの関数としてフローサイトメトリーに基づいて定量した。非線形曲線フィッティングにより、結合定数(K)として、Jurkatに関しては $3.6 (\pm 1.8) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、DU145に関しては $4.8 (\pm 0.4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、PC3に関しては $4.5 (\pm 0.6) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ が得られた。

20

【0044】

【図15】(A)水中でそれぞれNeu5Ac-MIPまたはNeu5Gc-MIPとともにインキュベーションした後のNeu5GcとNeu5Acの結合率(結合した%)。(B)Neu5Ac-MIPまたはNeu5Gc-MIPの懸濁液から(ウシまたはヒトの)トランスフェリンを欠乏させた後の上清分画のPAGE。

【0045】

【図16-1】SA-MIPを用いた生存細胞の染色。

【0046】

【図16-2】SA-MIPを用いた生存細胞の染色。

30

【0047】

【図17】Neu5Ac-MIPとNeu5Gc-MIPを用いたヒト細胞系と動物細胞系の染色。

【0048】

【図18-1】SAMIPとともに1時間(A)、5時間(B)、24時間(C、D)インキュベートした後に蛍光顕微鏡で分析した生存RAWマウスのマクロファージ細胞。

【0049】

【図18-2】SAMIPとともに24時間(C、D)インキュベートした後に蛍光顕微鏡で分析した生存RAWマウスのマクロファージ細胞。

【0050】

40

【図19】悪性であることが知られているヒト乳がん細胞系をSA-MIPを用いて染色した結果。MB-231はヒト乳がん細胞よりも攻撃的であるのに対し、CCD1095Skはヒト乳がん細胞よりも良性である。

【発明を実施するための形態】

【0051】

定義

「重合可能な基」は、モノマーの一部を形成していて、そのモノマー自身と、または他のモノマーと反応することができてポリマーを形成する一群の原子である。

【0052】

MIPの「特異的結合」は、そのMIPが、標的に対して、または少数の標的群に対し

50

て、または好ましいエピトープに対して大きな親和性を示し、顕著な交差反応性は示さないことを意味する。

【0053】

「ナノ粒子」は、平均サイズ（粒子の直径）が1 μm未満の無機または有機の粒子を意味する。

【0054】

「抗原」（免疫生物学）は、抗体の産生を引き起こす物質である。

【0055】

「アッセイ」は、分析物（薬学、分子生物学）の定性的検出と定量的検出のための標準化された反応手続きである。

10

【0056】

「制御されたラジカル重合（CRP）」は、決定反応が可逆的であるため広い範囲のモノマーで所定の分子量と狭い分子量分布を実現することが可能な重合法である。

【0057】

「リガンド」は、生体分子と複合体を形成し、通常は生物学的な目的で利用される。

【0058】

「分子インプリントポリマー（MIP）」。ポリマーマトリックス中に空洞を残す分子インプリント技術を利用して処理されて、選択された「鑄型」分子に対する親和性を有するポリマー。

【0059】

「ナノゲル/マイクロゲル」。それぞれ、親水性ポリマーネットワークからなるナノ粒子または微粒子。

20

【0060】

「分配係数」は、平衡した混和しない2つの相（例えば、MIPに結合した鑄型と、溶液中に遊離している鑄型）の混合物中の化合物の濃度比である。

【0061】

「定常相」は、クロマトグラフィ法で所定の場所に固定される物質である。

【0062】

MIPの文脈における「標的」は、MIPが結合するはずの分子である。これは、鑄型と同じである必要はない（エピトープ法）。

30

【0063】

シアル酸（SA）またはシアリル（Sia）は、シアル酸のヒトN-アセチルノイラミン酸（Neu5Ac）と、動物N-グリコリルノイラミン酸（Neu5Gc）の両方を意味することができる。

【0064】

発明の詳細な説明

本発明によれば、

- 1) 糖鑄型を用意し；
  - 2) その鑄型と協同的に相互作用することのできる少なくとも2つの機能性モノマーを用意し；
  - 3) 架橋モノマーを用意し；
  - 4) 前記糖鑄型の存在下で、前記モノマーを場合によっては溶媒の中に溶解させて重合させ；
  - 5) 前記鑄型を形成されたポリマーから除去すること
- によって得られることを特徴とする分子インプリントポリマーが提供される。

40

【0065】

一実施態様では、本発明は、鑄型が、エピトープとなる糖であり、その糖の少なくとも一部が細胞表面グリカンに対応している分子インプリントポリマーに関する。

【0066】

一実施態様では、鑄型は腫瘍特異的細胞表面グリカンであり、その例は、図2に示した

50

グリカンである。

【0067】

一実施態様では、鑄型はウイルス特異的グリカンであり、その例は、図2に示したグリカンである。

【0068】

一実施態様では、鑄型は、Sia<sub>2-6</sub>GalNAc(シアリルTn)である。

【0069】

一実施態様では、鑄型は、Sia<sub>2-3</sub>Gal<sub>1-3</sub>GalNAc(シアリルT)である。

【0070】

一実施態様では、鑄型は、Sia<sub>2,3</sub>Gal<sub>1,4</sub>(Fuc<sub>1,3</sub>)GlcNAc(シアリルルイスX)である。

【0071】

一実施態様では、鑄型は、Sia<sub>2,3</sub>Gal<sub>1,3</sub>(Fuc<sub>1,4</sub>)GlcNAc(シアリルルイスA)である。

【0072】

一実施態様では、鑄型は、Sia<sub>2,3</sub>-Galである。

【0073】

一実施態様では、鑄型は、Sia<sub>2,6</sub>-Galである。

【0074】

一実施態様では、鑄型は、Sia<sub>2,3</sub>-N-アセチルラクトサミンである。

【0075】

一実施態様では、鑄型は、Sia<sub>2,6</sub>-N-アセチルラクトサミンである。

【0076】

一実施態様では、鑄型は、N-アセチルノイラミン酸(Neu5Ac、シアル酸(SA)のヒト形態)である。

【0077】

一実施態様では、鑄型は、N-グリコリルノイラミン酸(Neu5Gc、シアル酸の動物形態)である。

【0078】

一実施態様では、鑄型は、GlcA<sub>2</sub>SO<sub>3</sub><sub>1,4</sub>-Glc<sub>2</sub>NSO<sub>3</sub>またはGlcA<sub>2</sub>SO<sub>3</sub><sub>1,4</sub>-Glc<sub>2</sub>NSO<sub>3</sub><sub>6</sub>SO<sub>3</sub>である。

【0079】

一実施態様では、鑄型は、シアル酸であるか、1つ以上のシアル酸を含むグリカンである。

【0080】

一実施態様では、鑄型は、単糖である。

【0081】

一実施態様では、鑄型は、二糖である。

【0082】

一実施態様では、鑄型は、三糖である。

【0083】

一実施態様では、鑄型は、四糖である。

【0084】

一実施態様では、本発明は、機能性モノマーの1つが、鑄型とイオン対を形成することのできるモノマーである分子インプリントポリマーに関する。

【0085】

一実施態様では、本発明は、機能性モノマーの1つが、図3Aのタイプのいずれかであって鑄型とイオン対を形成することのできるモノマーである分子インプリントポリマーに関する。

10

20

30

40

50

## 【0086】

一実施態様では、本発明は、機能性モノマーの1つが2 - アミノエチル - メタクリレートである分子インプリントポリマーに関する。

## 【0087】

一実施態様では、本発明は、機能性モノマーの1つが、鑄型と水素結合することのできる中性モノマーである分子インプリントポリマーに関する。

## 【0088】

一実施態様では、本発明は、機能性モノマーの1つが、図3Bのタイプのいずれかであって鑄型と水素結合することのできる中性モノマーである分子インプリントポリマーに関する。

10

## 【0089】

一実施態様では、本発明は、機能性モノマーの1つが、2 - (3 - (4 - ニトロベンゾ [c] [1, 2, 5] オキサジアゾ - 7 - イル) ウレイド) エチルメタクリレートである分子インプリントポリマーに関する。

## 【0090】

一実施態様では、本発明は、架橋モノマーが図3Bのタイプのいずれかである分子インプリントポリマーに関する。

## 【0091】

一実施態様では、本発明は、機能性モノマーの1つが、鑄型と共有結合性相互作用することのできるモノマーである分子インプリントポリマーに関する。

20

## 【0092】

一実施態様では、本発明は、機能性モノマーの1つが、図3Cに示したタイプのいずれかであって鑄型と共有結合性相互作用することのできるモノマーである分子インプリントポリマーに関する。

## 【0093】

一実施態様では、本発明は、機能性モノマーの1つが4 - ビニルベンゼンボロン酸である分子インプリントポリマーに関する。

## 【0094】

一実施態様では、本発明は、機能性モノマーが、図3に示した3つのタイプすべてを代表する少なくとも3つのモノマーである分子インプリントポリマーに関する。

30

## 【0095】

一実施態様では、本発明は、1つの機能性モノマーがアミンであり、1つの機能性モノマーが尿素であり、1つの機能性モノマーがボロン酸である分子インプリントポリマーに関する。

## 【0096】

一実施態様では、本発明は、1つの機能性モノマーがアミンであり、1つの機能性モノマーが尿素であり、1つの機能性モノマーが、図3と図4に示した構造のいずれかに従うボロン酸である分子インプリントポリマーに関する。

## 【0097】

一実施態様では、本発明は、1つの機能性モノマーが2 - アミノエチル - メタクリレートヒドロクロリドであり、1つの機能性モノマーが2 - (3 - (4 - ニトロベンゾ [c] [1, 2, 5] オキサジアゾ - 7 - イル) ウレイド) エチルメタクリル酸であり、1つの機能性モノマーが4 - ビニルベンゼンボロン酸である分子インプリントポリマーに関する。

40

## 【0098】

一実施態様では、本発明は、1つの機能性モノマーが蛍光レポータモノマーである分子インプリントポリマーに関する。

## 【0099】

一実施態様では、蛍光モノマーは、図21に示したいずれかの構造である。

## 【0100】

50

一実施態様では、本発明は、1つの機能性モノマーが、図3の1や図4の2のような蛍光レポーターモノマーである分子インプリントポリマーに関する。

【0101】

一実施態様では、本発明は、表面インプリントポリマーに関する。

【0102】

一実施態様では、本発明は、表面開始重合によって製造される表面インプリントポリマーに関する。

【0103】

一実施態様では、本発明は、沈殿重合、ミニエマルジョン重合、重合からのグラフティングと呼ばれる方法のいずれかによって調製される表面インプリントポリマーに関する。

10

【0104】

一実施態様では、本発明は、可逆的付加断片化連鎖移動重合(RAFT)の技術によって調製される表面インプリントポリマーに関する。

【0105】

一実施態様では、本発明は、合成後にRAFT基がアミノ分解またはラジカル反応によって変換される可逆的付加断片化連鎖移動重合(RAFT)の技術によって調製される表面インプリントポリマーに関する。

【0106】

本発明により、分子インプリントポリマーを調製する方法として、その分子インプリントポリマーが、

20

- 1) 糖鑄型を用意し；
- 2) その鑄型と協同的に相互作用することのできる少なくとも2つの機能性モノマーを用意し；
- 3) 架橋モノマーを用意し；
- 4) 前記糖鑄型の存在下で、前記モノマーを場合によっては溶媒の中に溶解させて重合させ；
- 5) 前記鑄型を形成されたポリマーから除去することによって得られることを特徴とする方法も提供される。

【0107】

本発明により、グリカン結合ポリマーの利用として、

30

- 細胞分離を含む分離のため
- 細胞のグリコシル化状態を研究するため
- 血液型分類と細胞接着のため
- 組織化学的染色のため
- 酵素のアッセイのため
- 分子標的の同定と濃度のためのセンサーとして
- グリカン決定基のアッセイ(例えばELISA)のため
- フローサイトメトリーアッセイのため
- 生体内またはインビトロでのバイオマーカーのイメージングのため、または造影剤として
- 電気泳動における検出ツールとして
- 治療剤(例えば薬)として
- 標的化薬送達のため
- 細胞表面相互作用を抑制するため
- 触媒として

40

の利用も提供される。

【0108】

一実施態様では、MIPは、細胞または組織のイメージング、セルソーティング、グライコミクス、細胞グリコシル化バイオマーカー分析や、医学における例えば標的化薬送達や細胞表面相互作用の選択的抑制の用途で使用される。したがって一実施態様では、イン

50

ビトロでの細胞または組織のイメージング、インビトロでのセルソーティング、インビトロでのグライコミクスと細胞グリコシル化バイオマーカー分析や、医学における例えばインビトロでの細胞表面相互作用の選択的抑制での分子インプリントポリマーの利用が提供される。

【0109】

一実施態様では、MIPは、がん患者の体内を循環している細胞（CTC）の同定と分子特徴づけに使用される。本発明の一実施態様では、MIPはがんを治療するために提供される。一実施態様では、がん患者からの循環している細胞（CTC）のインビトロでの同定と分子特徴づけのための、本明細書に開示した分子インプリントポリマーの利用が提供される。

10

【0110】

一実施態様では、MIPは、エンドサイトーシスを通じて治療作用を及ぼすか、治療のためエンドサイトーシスを通じた細胞内標的化薬送達に用いられる。一実施態様では、エンドサイトーシスを通じて治療薬として使用するための、またはエンドサイトーシスを通じて薬を細胞内標的化送達するための、または細胞表面相互作用を選択的に抑制するための分子インプリントポリマーが提供される。

【実施例】

【0111】

材料

【0112】

オルトケイ酸テトラエチル（TEOS）、3-アミノプロピルトリエトキシシラン（APTES）、4-シアノ-4-(チオベンゾイルチオ)ペンタン酸（CPDB）、エチレングリコールジメタクリレート（EGDMA）、トリエチルアミン（TEA）、クロロギ酸エチルをSigma Aldrich社（シュタインハイム、ドイツ国）から入手した。

20

【0113】

メタノール（MeOH）はAcros Organics社（ギール、ベルギー国）から来た。アセトニトリル（ACN）はMerck社（ダルムシュタット、ドイツ国）から取得した。EGDMAは、活性化塩基性アルミナのカラムを通過させて阻害剤を除去し、重合するまで-20で保管した。鑄型シアル酸（N-アセチルノイラミン酸、SA）とD-グルクロン酸（GA）は、それぞれCalbiochem社とFluka社から受け取った。モノマーである4-ビニルベンゼンボロン酸（1）と2-アミノエチル-メタクリレートヒドロクロリド（3）は、それぞれSigma Aldrich社とPolyscience社から購入した。2-(3-(4-ニトロベンゾ[c][1,2,5]オキサジアゾ-7-イル)ウレイド)エチルメタクリレート（2）は、われわれが以前に公開したプロトコルに従って合成した。ヒト前立腺がん細胞系であるDU145およびPC-3と、T細胞白血病細胞系であるJurkatは、LGC Standards社（デントン、ミドルセックス州）から取得した。ウシ胎仔血清（FBS）はLife Technologies社（ペイズリー、イギリス国）から来た。SA特異的triticum vulgansレクチンと、Clostridium perfringensからのノイラミニダーゼ（シアリダーゼ）は、Sigma Aldrich社（セントルイス、ミズーリ州、アメリカ合衆国）から購入した。核染色用の4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI）は、Molecular probe社（アメリカ合衆国）から購入した。ポリリンスライドはWVR社（ラドノー、ペンシルヴェニア州、アメリカ合衆国）から取得した。

30

40

【0114】

装置と方法

【0115】

HPLC：UV-DAD検出器と自動サンプラーを備えたWater Alliance 2795分離モジュールでHPLC測定を実施した。

50

## 【0116】

NMR: Agilent (Varian社) Mercury 400 MHz 装置でのNMR測定。

## 【0117】

元素分析: ヨハネス・ゲーテンベルク大学(マインツ)の有機化学部で Heraeus CHN-高速分析装置(ハナウ、ドイツ国)を用いた元素分析によって炭素と窒素の含有量を求めた。

## 【0118】

攪拌ユニット: 重合の間の攪拌は、乾燥ブロックヒーターを備えたKS130ベーシックIKA装置(IKA社、シュタウフェン、ドイツ国)を用いて実行した。

10

## 【0119】

FT-IR分光測定: これは、Bruker社のEquinox 55分光器を用いて実施した。

## 【0120】

TEM: 透過電子顕微鏡写真はTecnai透過電子顕微鏡を用いて記録した。

## 【0121】

UV-VISと蛍光の分光測定のための装置: Analytik Jena社からのSpectord 210を用いてUV-Visを測定した。蛍光スペクトルは、Horiba社からのFluoroMax 4分光計を用いて記録した。

## 【0122】

蛍光顕微鏡法とフローサイトメトリーのための装置: Olympus AX 70顕微鏡を用いて試料を20倍の倍率で眺めた。フローサイトメトリーをAccuri C6フローサイトメータ(BD Accuri C6フローサイトメータ、ニュージャージー州、アメリカ合衆国)で実施した。励起波長は495 nm、検出波長は519 nmであった。

20

## 【0123】

実施例1。RAFT修飾シリカコア粒子の合成

## 【0124】

単分散SiO<sub>2</sub>ナノ粒子(SiNP)の合成

## 【0125】

Stober法をわずかに変更して利用して単分散SiO<sub>2</sub>ナノ粒子(SiNP: 直径200 nm)を調製した。典型的な合成操作において、同体積の2つの溶液を急速に混合して全体積を約250 mlにした。一方の溶液はエタノール(114 ml)とTEOS(11.4 ml)を含んでいたのに対し、他方は、エタノール(50 ml)、水(76.5 ml)、水酸化アンモニウム(水中に25重量%、7.6 ml)を含んでいた。この反応混合物は、約10分後にSiO<sub>2</sub>粒子が形成されると一般に白濁する。反応を完了させるため、軽く攪拌しながら室温で6時間反応を続けさせた(収量3.5 g)。その後、粒子を遠心分離(5000 rpm、10分間)によって回収し、純エタノールの中への再分散を繰り返すことによって少なくとも3回洗浄した。

30

## 【0126】

アミノ修飾シリカナノ粒子(SiNP-NH<sub>2</sub>)の合成

## 【0127】

トルエン中のシリカナノ粒子(SiNP)の懸濁液(7.00 g、100 ml)を、窒素下で攪拌しながら15分間かけて三首丸底フラスコに添加した。次に、シリカ表面上のシラノール基の理論的な数(8 μmol/m<sup>2</sup>)に基づき、過剰なAPTES(1.26 g、5.71ミリモル)を添加し、この混合物を窒素保護下で130 °Cにて一晚環流させた。次にこの混合物を室温まで冷却し、大量のヘキサン(500 ml)に添加した。5000 rpmで10分間遠心分離することによって粒子を回収し、40 mlのアセトンの中に再分散させた後、300 mlのヘキサンの中で再び沈殿させた。あとでRAFT剤とカップリングさせるため、このアミノ機能化粒子を70 mlのTHFの中に

40

50

直接分散させた。

【0128】

RAFT修飾シリカナノ粒子(SiNP-RAFT)の合成

【0129】

CPDB(0.385 g、1.38ミリモル)、クロロギ酸エチル(132 μl、1.38ミリモル)、TEA(192 μl、1.38ミリモル)をTHF(50 ml)に溶かした溶液を、上方に攪拌装置を備えた三首丸底フラスコ(250 ml)に添加した。この溶液を窒素でパージし、-70 のエタノール-液体窒素浴の中で40分間冷却した。その後、7.00 g(70 mlの貯蔵溶液)のアミノ修飾シリカ(SiNP-NH<sub>2</sub>、アミノ基が1.38ミリモル)を-10 で添加し、一晚反応させた。その後、ヘキサン(500 ml)を添加し、粒子を遠心分離(5000 rpm、10分間)によって回収した。次いで粒子をアセトン(80 ml)の中に再分散させ、300 mlのヘキサンの中で再び沈殿させ、5000 rpmで10分間遠心分離した。得られたナノ粒子(SiNP-RAFT)を室温にて真空下で乾燥させた(6.5 g、収率93%)

10

【0130】

実施例2。シアル酸(SA: Neu5AcまたはNeu5Gc)またはグルクロン酸(GA)を鑄型として用いたコアシェル分子インプリントポリマーの合成

【0131】

Neu5Ac(5.3 mg、17.1 μモル)またはNeu5Gc(5.5 mg、17.1 μモル)またはGA(3.3 mg、17.1 μモル)と、1(2.5 mg、17.1 μモル)と、25% w/vの3を含む23 μlの水(5.6 mg、34.1 μモル)と、2(5.7 mg、17.1 μモル)と、EGDMA(128 μl、678 μモル)を、20 mlのスクリュウキャップ付きシンチレーションバイアルの中に入れて12 mlのメタノールに溶かした溶液に、SiNP-RAFT(400 mg)を懸濁させた。この重合前混合物に対して30分間超音波処理をした後、窒素で20分間パージした。その後、開始剤ABDV(2.31 mg、9.3 μモル)を添加し、懸濁液を再び窒素で5分間パージした。バイアルをシリコン製絶縁テープで密封した後、50 にあらかじめ加熱したヒーターブロックの上にバイアルを保持し、480 rpmの攪拌速度で重合を開始した。反応を23時間継続させた。次に、メタノール(80.9%)、ギ酸(14.3%)、水(4.8%)からなる5 mlの溶液の中で粒子を4×1時間インキュベートした後、メタノール(15 ml)とともに1×30分間インキュベートし、5000 rpmで遠心分離することによって粒子を中間分離した。最後に粒子を50 にて真空下で乾燥させると、約0.4 gのSA-MIPとGA-MIPがそれぞれ得られた。上清を回収し、逆相HPLCによって鑄型の存在を分析した。そうすることで、最終洗浄液に鑄型が存在しないことが確認された。Neu5Acインプリント粒子を透過電子顕微鏡と透過FTIRによって特徴づけた。その結果を図5と図6に示す。

20

30

【0132】

実施例3。Sia<sub>2-3</sub>Gal<sub>1-3</sub>GalNAc(シアリルT)を鑄型として用いたコアシェル分子インプリントポリマーの合成

40

【0133】

Sia<sub>2-3</sub>Gal<sub>1-3</sub>GalNAc(シアリルT)(15 mg、17 μモル)と、1(2.5 mg、17 μモル)と、25% w/vの3を含む23 μlの水(5.6 mg、34.1 μモル)と、2(5.7 mg、17.1 μモル)と、EGDMA(128 μl、678 μモル)を、20 mlのスクリュウキャップ付きシンチレーションバイアルの中に入れて12 mlのメタノールに溶かした溶液に、SiNP-RAFT(400 mg)を懸濁させた。この重合前混合物に対して30分間超音波処理をした後、窒素で20分間パージした。その後、開始剤ABDV(2.31 mg、9.3 μモル)を添加し、懸濁液を再び窒素で5分間パージした。バイアルをシリコン製絶縁テープで密封した後、バイアルを50 にあらかじめ加熱したヒーターブロックの上に保持し、4

50

80 rpmの撹拌速度で重合を開始した。反応を23時間継続させた。次に、メタノール(80.9%)、ギ酸(14.3%)、水(4.8%)からなる5 mlの溶液の中で粒子を4×1時間インキュベートした後、メタノール(15 ml)とともに1×30分間インキュベートし、5000 rpmで遠心分離することによって粒子を中間分離した。最後に粒子を50 にて真空下で乾燥させると、約0.4 gのMIPが得られた。上清を回収し、逆相HPLCによって鑄型の存在を分析した。そうすることで、最終洗浄液に鑄型が存在しないことが確認された。

【0134】

実施例4。Sia<sub>2,3</sub>Gal<sub>1,4</sub>(Fuc<sub>1,3</sub>)GlcNAc(シアリルルイスX)を鑄型として用いたコアシェル分子インプリントポリマーの合成

10

【0135】

Sia<sub>2,3</sub>Gal<sub>1,4</sub>(Fuc<sub>1,3</sub>)GlcNAc(シアリルルイスX)(20 mg、17 μmol)と、1(2.5 mg、17 μmol)と、25% w/vの3を含む23 μlの水(5.6 mg、34.1 μmol)と、2(5.7 mg、17.1 μmol)と、EGDMA(128 μl、678 μmol)を、20 mlのスクリーキャップ付きシンチレーションバイアルの中に入れた12 mlのメタノールに溶かした溶液に、SiNP-RAFT(400 mg)を懸濁させた。この重合前混合物に対して30分間超音波処理をした後、窒素で20分間パージした。その後、開始剤ABDV(2.31 mg、9.3 μmol)を添加し、懸濁液を再び窒素で5分間パージした。バイアルをシリコン製絶縁テープで密封した後、バイアルを50 にあらかじめ加熱したヒーターブロックの上に保持し、480 rpmの撹拌速度で重合を開始した。反応を23時間継続させた。次に、メタノール(80.9%)、ギ酸(14.3%)、水(4.8%)からなる5 mlの溶液の中で粒子を4×1時間インキュベートした後、メタノール(15 ml)とともに1×30分間インキュベートし、5000 rpmで遠心分離することによって粒子を中間分離した。最後に粒子を50 にて真空下で乾燥させると、約0.4 gのMIPが得られた。上清を回収し、逆相HPLCによって鑄型の存在を分析した。そうすることで、最終洗浄液に鑄型が存在しないことが確認された。

20

【0136】

実施例5。Sia<sub>2,3</sub>Gal<sub>1,3</sub>(Fuc<sub>1,4</sub>)GlcNAc(シアリルルイスA)を鑄型として用いたコアシェル分子インプリントポリマーの合成

30

【0137】

Sia<sub>2,3</sub>Gal<sub>1,3</sub>(Fuc<sub>1,4</sub>)GlcNAc(シアリルルイスA)(20 mg、17 μmol)と、1(2.5 mg、17 μmol)と、25% w/vの3を含む23 μlの水(5.6 mg、34.1 μmol)と、2(5.7 mg、17.1 μmol)と、EGDMA(128 μl、678 μmol)を、20 mlのスクリーキャップ付きシンチレーションバイアルの中に入れた12 mlのメタノールに溶かした溶液に、SiNP-RAFT(400 mg)を懸濁させた。この重合前混合物に対して30分間超音波処理をした後、窒素で20分間パージした。その後、開始剤ABDV(2.31 mg、9.3 μmol)を添加し、懸濁液を再び窒素で5分間パージした。バイアルをシリコン製絶縁テープで密封した後、バイアルを50 にあらかじめ加熱したヒーターブロックの上に保持し、480 rpmの撹拌速度で重合を開始した。反応を23時間継続させた。次に、メタノール(80.9%)、ギ酸(14.3%)、水(4.8%)からなる5 mlの溶液の中で粒子を4×1時間インキュベートした後、メタノール(15 ml)とともに1×30分間インキュベートし、5000 rpmで遠心分離することによって粒子を中間分離した。最後に粒子を50 にて真空下で乾燥させると、約0.4 gのMIPが得られた。上清を回収し、逆相HPLCによって鑄型の存在を分析した。そうすることで、最終洗浄液に鑄型が存在しないことが確認された。

40

【0138】

実施例6。Sia<sub>2-6</sub>GalNAc(シアリルTn)を鑄型として用いたコアシェル分子インプリントポリマーの合成

50

## 【0139】

Sia 2-6GalNAc (10 mg、17  $\mu$ mol) と、1 (2.5 mg、17  $\mu$ mol) と、25% w/v の3を含む23  $\mu$ lの水 (5.6 mg、34.1  $\mu$ mol) と、2 (5.7 mg、17.1  $\mu$ mol) と、EGDMA (128  $\mu$ l、678  $\mu$ mol) を、20 mlのスクリーキャップ付きシンチレーションバイアルの中に入れて12 mlのメタノールに溶かした溶液に、SiNP-RAFT (400 mg) を懸濁させた。この重合前混合物に対して30分間超音波処理をした後、窒素で20分間バージした。その後、開始剤ABDV (2.31 mg、9.3  $\mu$ mol) を添加し、懸濁液を再び窒素で5分間バージした。バイアルをシリコン製絶縁テープで密封した後、バイアルを50 にあらかじめ加熱したヒーターブロックの上に保持し、480 rpmの撹拌速度で重合を開始した。反応を23時間継続させた。次に、メタノール (80.9%)、ギ酸 (14.3%)、水 (4.8%) からなる5 mlの溶液の中で粒子を4 x 1時間インキュベートした後、メタノール (15 ml) とともに1 x 30分間インキュベートし、5000 rpmで遠心分離することによって粒子を中間分離した。最後に粒子を50 にて真空下で乾燥させると、約0.4 gのMIPが得られた。上清を回収し、逆相HPLCによって鑄型の存在を分析した。そうすることで、最終洗浄液に鑄型が存在しないことが確認された。

10

## 【0140】

実施例7。Sia 2,3-Gal またはSia 2,6-Gal を鑄型として用いたコアシェル分子インプリントポリマーの合成

20

## 【0141】

Sia 2,3-Gal またはSia 2,6-Gal (10 mg、17  $\mu$ mol) と、1 (2.5 mg、17  $\mu$ mol) と、25% w/v の3を含む23  $\mu$ lの水 (5.6 mg、34.1  $\mu$ mol) と、2 (5.7 mg、17.1  $\mu$ mol) と、EGDMA (128  $\mu$ l、678  $\mu$ mol) を、20 mlのスクリーキャップ付きシンチレーションバイアルの中に入れて12 mlのメタノールに溶かした溶液に、SiNP-RAFT (400 mg) を懸濁させた。この重合前混合物に対して30分間超音波処理をした後、窒素で20分間バージした。その後、開始剤ABDV (2.31 mg、9.3  $\mu$ mol) を添加し、懸濁液を再び窒素で5分間バージした。バイアルをシリコン製絶縁テープで密封した後、バイアルを50 にあらかじめ加熱したヒーターブロックの上に保持し、480 rpmの撹拌速度で重合を開始した。反応を23時間継続させた。次に、メタノール (80.9%)、ギ酸 (14.3%)、水 (4.8%) からなる5 mlの溶液の中で粒子を4 x 1時間インキュベートした後、メタノール (15 ml) とともに1 x 30分間インキュベートし、5000 rpmで遠心分離することによって粒子を中間分離した。最後に粒子を50 にて真空下で乾燥させると、約0.4 gのMIPが得られた。上清を回収し、逆相HPLCによって鑄型の存在を分析した。そうすることで、最終洗浄液に鑄型が存在しないことが確認された。

30

## 【0142】

実施例8。Sia 2,3-N-アセチルラクタサミンまたはSia 2,6-N-アセチルラクタサミンを鑄型として用いたコアシェル分子インプリントポリマーの合成

40

## 【0143】

Sia 2,3-N-アセチルラクタサミンまたはSia 2,6-N-アセチルラクタサミン (15 mg) と、1 (2.5 mg、17  $\mu$ mol) と、25% w/v の3を含む23  $\mu$ lの水 (5.6 mg、34.1  $\mu$ mol) と、2 (5.7 mg、17.1  $\mu$ mol) と、EGDMA (128  $\mu$ l、678  $\mu$ mol) を、20 mlのスクリーキャップ付きシンチレーションバイアルの中に入れて12 mlのメタノールに溶かした溶液に、SiNP-RAFT (400 mg) を懸濁させた。この重合前混合物に対して30分間超音波処理をした後、窒素で20分間バージした。その後、開始剤ABDV (2.31 mg、9.3  $\mu$ mol) を添加し、懸濁液を再び窒素で5分間バージした。バイアルをシリコン製絶縁テープで密封した後、バイアルを50 にあらかじめ加熱したヒーターブロ

50

ックの上に保持し、480 rpmの撹拌速度で重合を開始した。反応を23時間継続させた。次に、メタノール(80.9%)、ギ酸(14.3%)、水(4.8%)からなる5 mlの溶液の中で粒子を4×1時間インキュベートした後、メタノール(15 ml)とともに1×30分間インキュベートし、5000 rpmで遠心分離することによって粒子を中間分離した。最後に粒子を50 にて真空下で乾燥させると、約0.4 gのMIPが得られた。上清を回収し、逆相HPLCによって鑄型の存在を分析した。そうすることで、最終洗浄液に鑄型が存在しないことが確認された。

【0144】

実施例9。図3Dに示した任意の蛍光尿素系モノマーを用いた分子インプリントポリマーの合成

【0145】

実施例10。バッチ結合試験と等温吸着式

【0146】

結合試験を実施して糖鑄型に対する粒子の親和性を調べた。メタノールと、さまざまな濃度(1~20 μM)の鑄型を含む水(水が2%、50%、98%)との混合物1 mlを1.5 mlのマイクロフュージ管に入れ、その中に鑄型なしの乾燥した粒子(20 mg)を懸濁させた。軽く振盪しながら室温で2時間インキュベーションした後、溶液を10000 rpmで15分間遠心分離した。上清をHPLC用バイアルに移し、逆相HPLC分析によって遊離した溶質の濃度(F)を測定した。そのとき、移動相として20 mMのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を用い、C-18逆相カラム(Phenomenex Luca C-18、250×4.6 mm)を使用し、流速を0.7 ml/分、注入体積20 μlにした。検出は、215 nmでのUV吸光度測定によって実施した。ポリマー粒子が結合した溶質の具体的な量(B)は、以下の式:

$$(1) \quad B = (C_0 - F) v / m$$

によって求めた。ただしC<sub>0</sub>は溶質の初期濃度であり、Fは上清に含まれる溶質の最終濃度であり、v(ml)は吸着混合物の全体積であり、mは各バイアル中のポリマーの質量である。結合曲線は、Prism 6曲線フィッティングソフトウェア(Graphpad Inc.社)を用いてラングミュア単一部位モデルへの非線形回帰によってフィットさせた。結合曲線に関しては図7を、結合パラメータに関しては表1を参照されたい。

【0147】

【表1】

水 (%)	シアル酸(SA)		グルクロン酸(GA)	
	K(M <sup>-1</sup> )	Bmax(μモル/g)	K(M <sup>-1</sup> )	Bmax(μモル/g)
2	6.6×10 <sup>5</sup>	12.0	3.3×10 <sup>4</sup>	13.3
50	3.5×10 <sup>4</sup>	9.0	2.1×10 <sup>4</sup>	8.2
98	5.9×10 <sup>3</sup>	8.4	1.8×10 <sup>3</sup>	10.7

【0148】

実施例11。細胞培養

【0149】

ヒト前立腺がん細胞系であるDU145とPC-3を、10%FBSを含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)とともにフラスコの中で培養し、湿度100%の中で5%CO<sub>2</sub>とともに37 でインキュベートした。T細胞白血病細胞系であるJurkatを、10%FBSとガラマイシン(50 μg/ml)を含むRPMI 1640の中で培養し、湿度100%の中で5%CO<sub>2</sub>とともに37 でインキュベートした。マウスマクロファージ細胞系であるRAW 264.7を、10%FBSとペニシリン-ストレプトマイシンを含むRPMI 1640の中で培養し、ヒトマクロファージ細胞系であるTHP-1を、10%FBSとガラマイシン(50 μg/ml)を含むRPMI 1640の中で培養し、湿度100%の中で5%CO<sub>2</sub>とともに37 でインキュベートした。マウス

10

20

30

40

50

線維芽細胞系である L929 を、10% FBS とグルタミンを含む DMEM の中で培養し、湿度 100% の中で 5% CO<sub>2</sub> とともに 37 °C でインキュベートした。乳がん細胞系である CCD1095-Sk を、10% FBS を含むイーグルの最少必須培地 (MEM) の中で培養し、MDA-MB231 を、10% FBS を含む DMEM の中で培養し、MCF-7 を、10% FBS とペニシリン - ストレプトマイシンを含む RPMI の中で培養し、湿度 100% の中で 5% CO<sub>2</sub> とともに 37 °C でインキュベートした。

#### 【0150】

接着細胞が集密状態に到達したとき、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) で洗浄した後、トリプシン / EDT で処理することにより、接着細胞を継代培養した。顕微鏡で調べるため、細胞を、丸いガラス製カバースリップ (直径 12 mm) を備えた 12 ウェル細胞培養プレートの中で培養した。10,000 個の DU145 細胞と 20,000 個の PC-3 細胞をそれぞれ 100 μl の細胞懸濁液の中に調製し、各カバースリップの上にピペットで移した。3 時間後、1 ml の細胞培地を添加し、湿度 100% の中で 5% CO<sub>2</sub> とともに 37 °C で細胞を少なくとも 48 時間放置して増殖させることにより、集密状態に到達させた。Jurkat 細胞を顕微鏡で調べるため、50,000 個の細胞を含む 100 μl の細胞懸濁液を 37 °C で 2 時間ポリリシンスライドに接着させた。その後、細胞を 100 μl の PBS で注意深く 2 回洗浄した。

#### 【0151】

実施例 12。蛍光顕微鏡検査のための細胞固定、シアリダーゼ処理、MIP 染色

#### 【0152】

集密細胞を含むカバースリップを 2 ml の PBS で 2 回洗浄した後、1 ml の 4% ホルムアルデヒドの中で室温 (RT) にて 10 分間インキュベートすることによって細胞固定を実施した。次にホルムアルデヒドを各ウェルから吸引することによって固定を中断した後、2 ml の PBS で 3 回洗浄した。

#### 【0153】

SA-MIP 染色と GA-MIP 染色のため、VWR 超音波洗浄機を用いた 4 分間 + 4 分間の超音波処理により、乾燥させた MIP 粒子を水 (3% メタノール) の中に懸濁させた。この貯蔵懸濁液をさらに希釈し、超音波処理した後に使用した。細胞を 2 ml の水 (3% メタノール) で 2 回洗浄した後、希釈して超音波処理した 500 μl の粒子懸濁液 (20 μg/ml または 80 μg/ml) を各ウェルに添加した。それに加え、粒子を含まない 1 つの陰性対照も用意した。細胞を MIP とともに 37 °C で 60 分間インキュベートした。インキュベーションの後、ウェルを 2 ml の水 (3% メタノール) で 3 回洗浄し、次いで蛍光顕微鏡検査のためのカバースリップを用意した。これは、封入剤である Prolong (登録商標) Gold アンチフェード封入剤または Prolong (登録商標) Gold アンチフェード試薬の 1 滴を DAPI (Molecular probe 社) とともに用いてカバースリップを顕微鏡スライドの表面にひっくり返して取り付けることによって実施した。実施例 2 ~ 6 の MIP 粒子で染色した細胞の典型的な画像に関しては、図 8 と図 9 を参照されたい。

#### 【0154】

シアリダーゼ (*Clostridium perfringens* からのノイラミニダーゼ) で処理するため、DU145 細胞をダルベッコ改良イーグル培地 (DMEM) で洗浄し、5 U/ml と 10 U/ml の酵素 200 μl をそれぞれ細胞に 37 °C で 60 分間かけて添加した。1 つの陰性対照を、200 μl の DMEM だけと一緒にして放置した。その後、細胞を DMEM で 3 回洗浄した。その後、細胞を 2 ml の水 (3% メタノール) で 2 回洗浄し、濃度 20 μg/ml の SA-MIP で染色した。処理した細胞と処理していない細胞を比較した典型的な画像に関しては図 10 を参照されたい。

#### 【0155】

実施例 13。蛍光顕微鏡検査のためのレクチン - FITC 染色

#### 【0156】

上記のようにしてカバースリップの表面で増殖させた集密的な DU145 細胞または PC

10

20

30

40

50

- 3細胞を2 mlのPBSで2回洗浄し、1 mlの4%ホルムアルデヒドの中で室温にて10分間固定した。固定を停止させるため、ホルムアルデヒドを各ウエルから吸引し、2 mlのPBSで3回洗浄した。細胞を0.5~1 µg/mlのFITC標識SA特異的レクチン500 µlでRTにて60分間染色した後、PBSで3回洗浄した。蛍光顕微鏡イメージングのため、1回ごとに、1滴の装着培地Prolong (登録商標) Goldアンチフェード装着剤またはProlong (登録商標) Goldアンチフェード試薬をDAPI (Molecular probe社)とともに用いてガラス製カバースリップを顕微鏡スライドに装着した。典型的な画像に関しては図9と図11を参照されたい。

【0157】

実施例14。MIPとレクチン-FITCのフローサイトメトリー分析

【0158】

5 × 10<sup>5</sup>個のDu145細胞、PC-3細胞、Jurkat細胞、C-1細胞のそれぞれを2 mlのPBSで2回洗浄し、1 mlの4%ホルムアルデヒドの中で室温にて20分間固定した。吸引と、PBSを用いた3回の洗浄の後、細胞を2 mlのインキュベーション用溶媒(水(3%メタノール)、二重蒸留水、PBS緩衝液のいずれか)で2回洗浄し、その後に、指示された濃度(5~80 µg/ml)の超音波処理したSA-MIP懸濁液500 µlで染色した後、37 °Cで60分間インキュベートした。インキュベーションの後、細胞を2 mlのインキュベーション用溶媒で3回洗浄し、同じ溶媒300 µlの中に再懸濁させ、フローサイトメトリーによって分析した。

【0159】

SA特異的レクチンをフローサイトメトリーで分析するため、5 × 10<sup>5</sup>個のDu145細胞、PC-3細胞、Jurkat細胞のそれぞれを2 mlのPBSで2回洗浄し、さまざまな濃度(5~50 ng/ml)のレクチン-FITC溶液で染色し、暗所で氷上にて20分間インキュベートした。インキュベーションの後、細胞をPBSで2回洗浄し、300 µlのPBSの中に再懸濁させ、フローサイトメトリーによって分析した。添加したプローブに依存して変化する陽性細胞の%に関しては、図12と図13を参照されたい。DU145へのMIPプローブの結合の結合定数に関しては、図14を参照されたい。

【0160】

実施例15。Neu5AcインプリントMIPまたはNeu5GcインプリントMIPを用いた動物形態とヒト形態のトランスフェリンの認識

【0161】

2.5 µgのヒトトランスフェリンタンパク質とウシトランスフェリンタンパク質を100 µlの水に溶かし、4 mgのNeu5Acインプリント粒子またはNeu5Gcインプリント粒子(それぞれNeu5Ac-MIP、Neu5Gc-MIP)をこの溶液に懸濁させた。この懸濁液を室温で3時間攪拌した、遠心分離の後、上清を30 µl採取してポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)を実施した。結果を図15に示す。

【0162】

実施例16。SA-MIPを用いた生存細胞の染色

【0163】

生存細胞へのSA-MIPの結合をフローサイトメトリーで分析するため、5 × 10<sup>5</sup>個の細胞を2 mlのPBSで2回洗浄し、PBSに溶かしたさまざまな濃度(0.4~0.8 mg/ml)のSA-MIPで染色し、37 °Cで60分間インキュベートした。インキュベーションの後、細胞をPBSで2回洗浄し、300 µlのPBSの中に再懸濁させ、フローサイトメトリーによって分析した後、蛍光顕微鏡検査を実施した(図16参照)。

【0164】

実施例17。Neu5Ac MIPとNeu5Gc MIPを用いたヒト細胞系と動物細胞系の染色

10

20

30

40

50

## 【0165】

ヒトDU145細胞とマウスL929細胞を2 mlのPBSで2回洗浄し、1 mlの4%ホルムアルデヒドの中でRTにて20分間固定した。吸引と、PBSを用いた3回の洗浄の後、細胞を2 mlの水(3%メタノール)で2回洗浄し、その後に、超音波処理した100 µlのNeu5Ac MIPとNeu5Gc MIP(濃度が20~80 µg/ml)でそれぞれ染色した後、37 °Cで60分間インキュベートした。インキュベーションの後、細胞を2 mlの水(3%メタノール)で3回洗浄し、300 µlのメタノール/水の中に再懸濁させ、フローサイトメトリーによって分析した。蛍光顕微鏡実験のため、細胞をDAPI(Molecular probe社)で対比染色した後、分析した(図17参照)。

10

## 【0166】

実施例18。エンドサイトーシス実験。

## 【0167】

生きているRAW 264.7細胞へのSA-MIPの結合をフローサイトメトリーで分析するため、12ウエルプレート中の500 µlの培地の中で $1 \times 10^6$ 個の細胞をインキュベートした。一晩インキュベートした後、PBSに溶かしたさまざまな濃度(0.4~0.8 mg/ml)のSA-MIPを添加し、細胞を37 °Cで60分間~24時間インキュベートした。インキュベーションの後、細胞をPBSで2回洗浄し、リソソームマーカーLysoTrackerで60分間染色し、洗浄し、300 µlのPBSの中に再懸濁させ、蛍光顕微鏡検査によって分析して粒子の取り込みとリソソーム活性を調べた(図18参照)。

20

## 【0168】

実施例19。悪性であることが知られているヒト乳がん細胞系のSA-MIPを用いた染色

## 【0169】

ヒト乳がん細胞系であるCCD1095-Sk(良性)、MDA-MB231(悪性)、MCF-7(悪性)を2 mlのPBSで2回洗浄した後、1 mlの4%ホルムアルデヒドの中でRTにて20分間固定した。吸引と、PBSを用いた3回の洗浄の後、細胞を2 mlの水(3%メタノール)で2回洗浄し、その後、超音波処理した100 µlのSA-MIP(濃度20~80 µg/ml)で染色し、37 °Cで60分間インキュベートした。インキュベーションの後、細胞を2 mlの水(3%メタノール)で3回洗浄し、300 µlのメタノール/水の中に再懸濁させ、フローサイトメトリーによって分析した。蛍光顕微鏡実験のため、細胞をDAPI(Molecular probe社)で対比染色した後、分析した(図19参照)。

30

## 【0170】

実施例20。SA-MIPを用いたヒト脳腫瘍細胞系と皮膚がん(メラノーマ)細胞系の染色

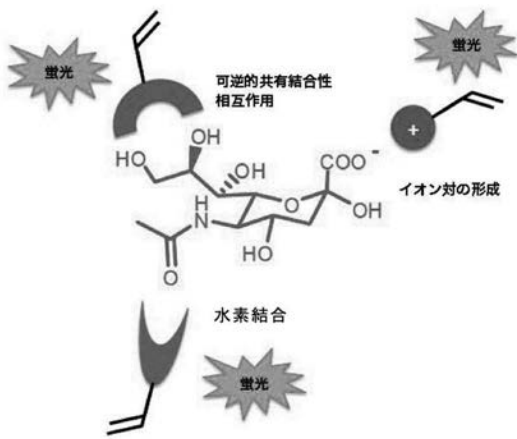
## 【0171】

9種類の異なるヒト脳腫瘍細胞系と2種類の異なるメラノーマ細胞系を2 mlのPBSで2回洗浄し、1 mlの4%ホルムアルデヒドの中でRTにて20分間固定した。吸引と、PBSを用いた3回の洗浄の後、細胞を2 mlの水(3%メタノール)で2回洗浄し、その後に、超音波処理した100 µlのSA-MIP(濃度20~80 µg/ml)でそれぞれ染色した後、37 °Cで60分間インキュベートした。インキュベーションの後、細胞を2 mlの水(3%メタノール)で3回洗浄し、300 µlのメタノール/水の中に再懸濁させ、フローサイトメトリーによって分析した。

40

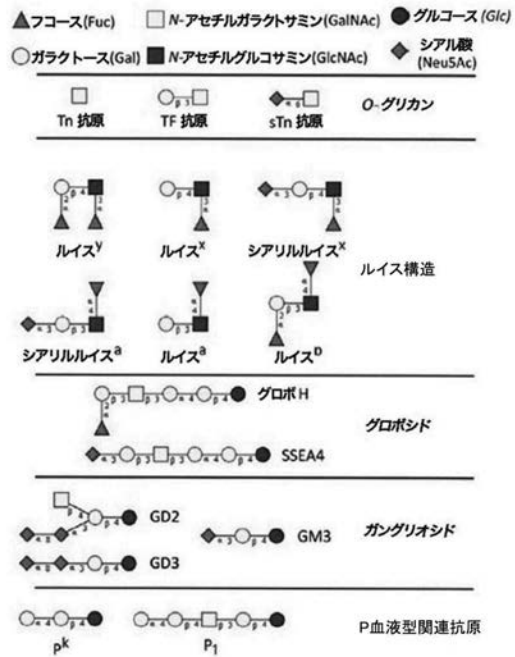
【 図 1 】

Chart 1



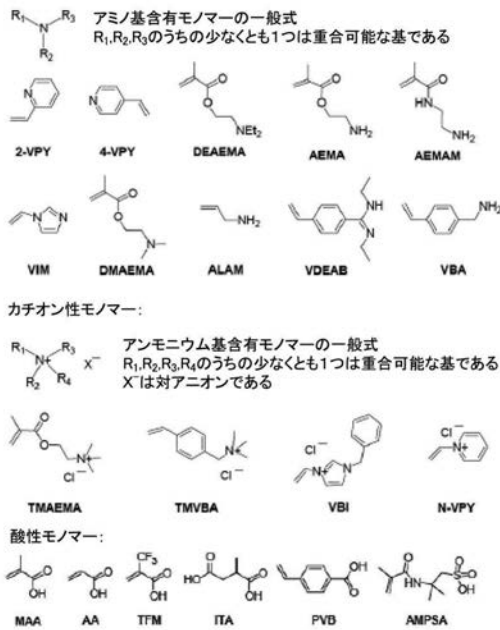
【 図 2 】

Chart 2



【 図 3 A 】

Chart 3A



【 図 3 B 】

Chart 3B

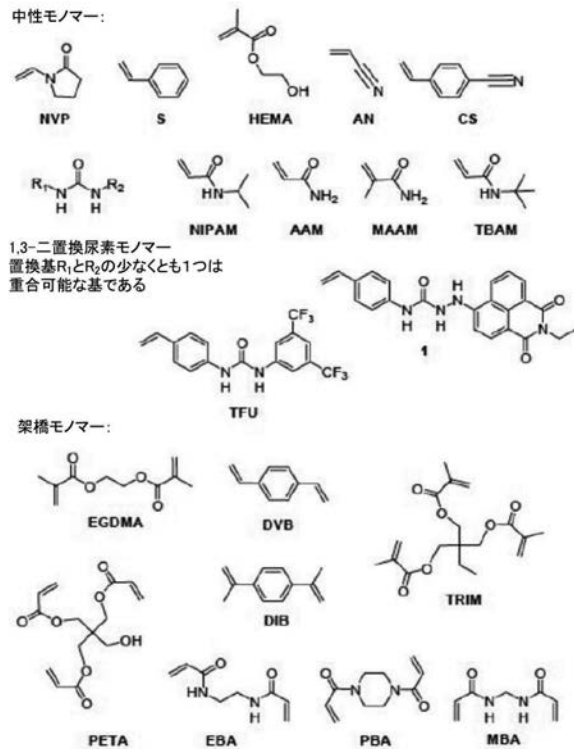
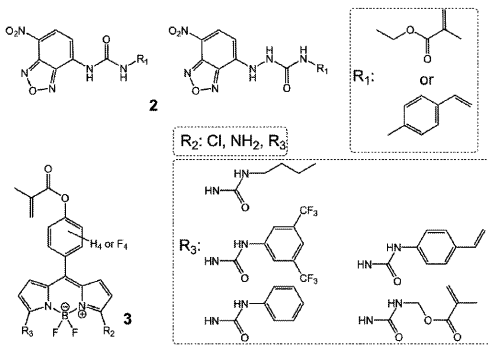


Chart 3C

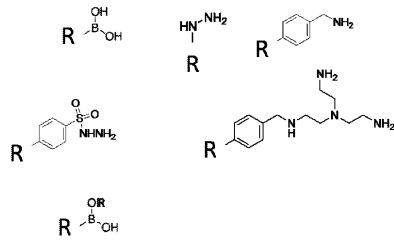
【 図 3 D 】

Chart 3D



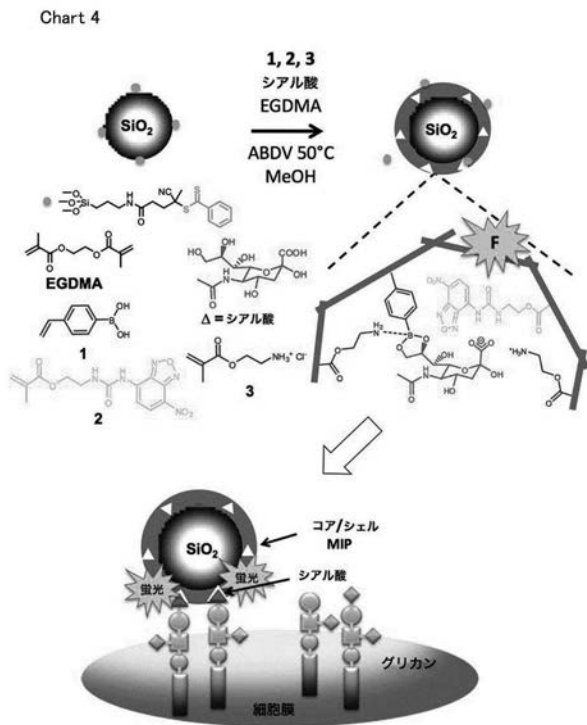
【 図 3 E 】

Chart 3E



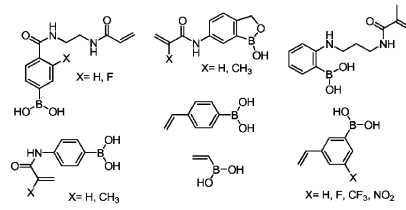
【 図 4 】

Chart 4



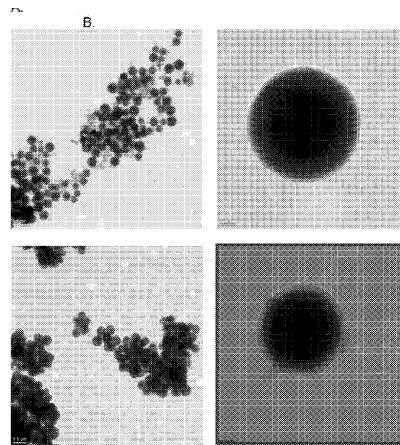
【 図 3 F 】

Chart 3F



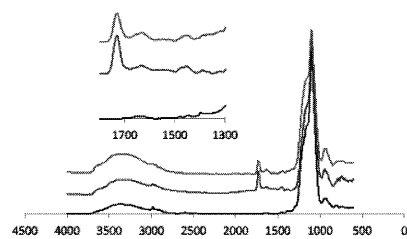
【 図 5 】

Chart 5



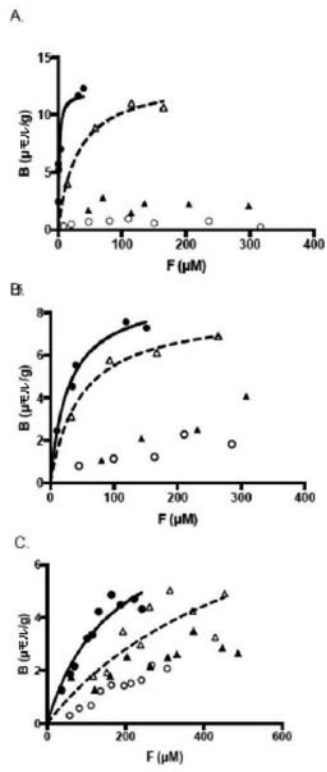
【 図 6 】

Chart 6



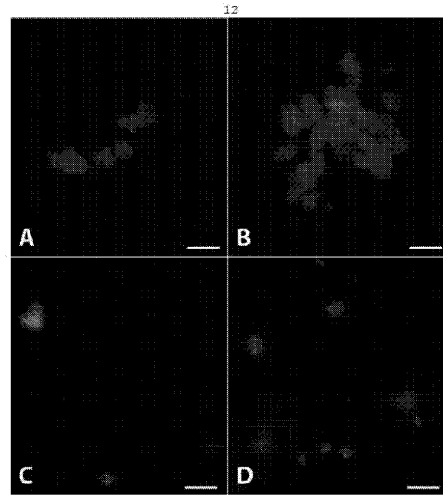
【 図 7 】

Chart 7

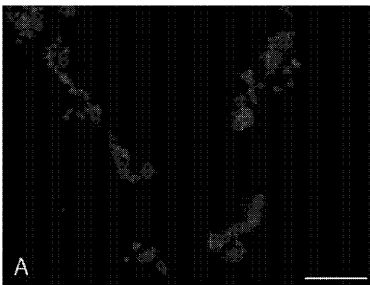


【 図 8 】

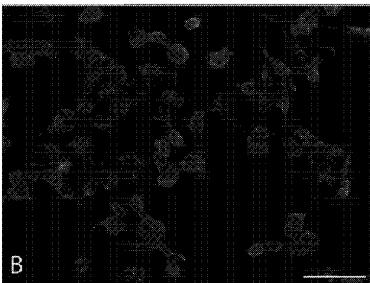
Chart 8



【 図 9 A 】



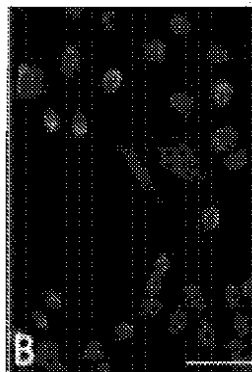
【 図 9 B 】



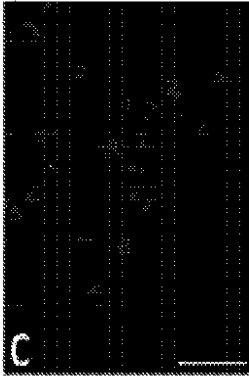
【 図 10 A 】



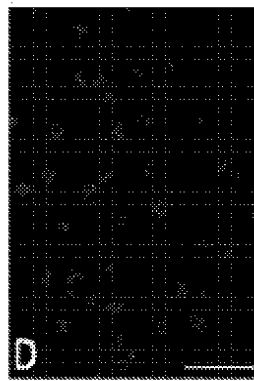
【 図 10 B 】



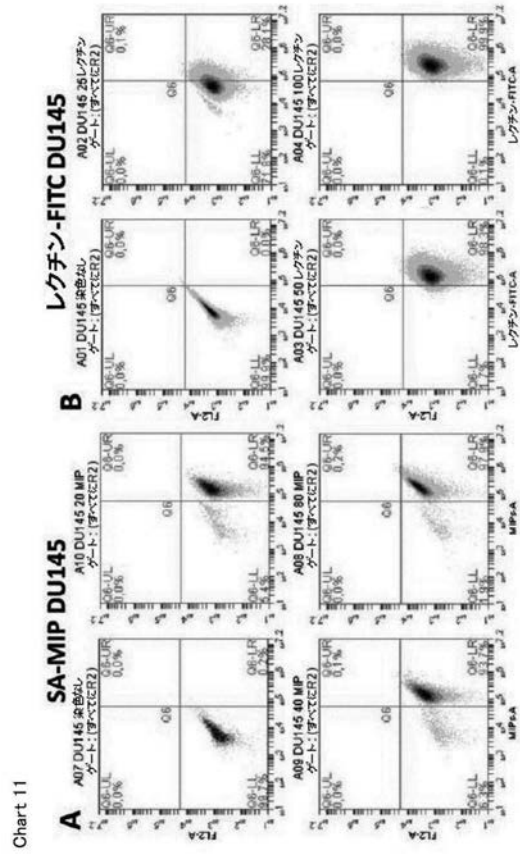
【 図 1 0 C 】



【 図 1 0 D 】

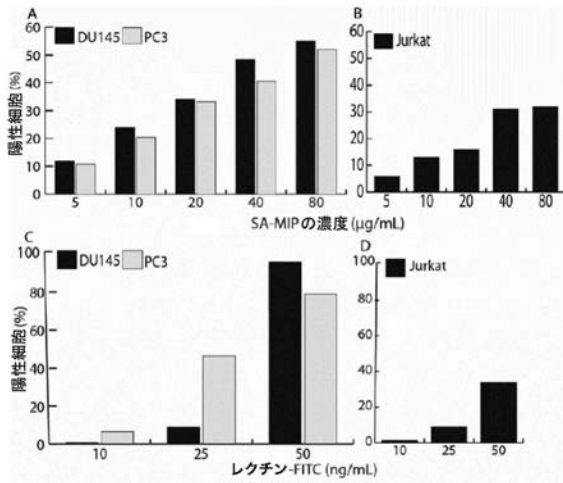


【 図 1 1 】

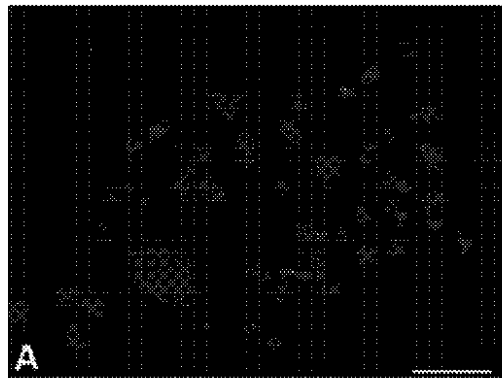


【 図 1 2 】

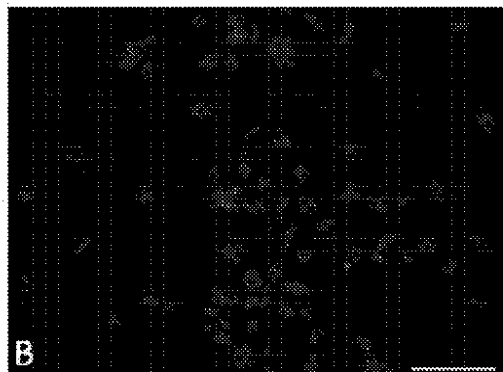
Chart 12



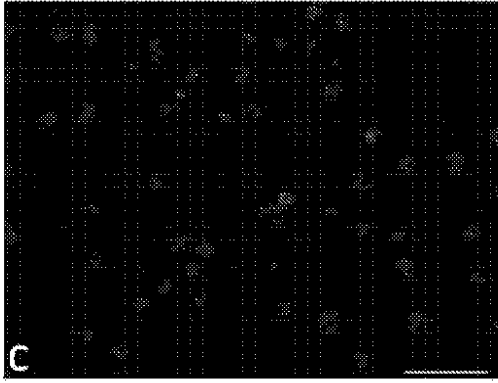
【 図 1 3 A 】



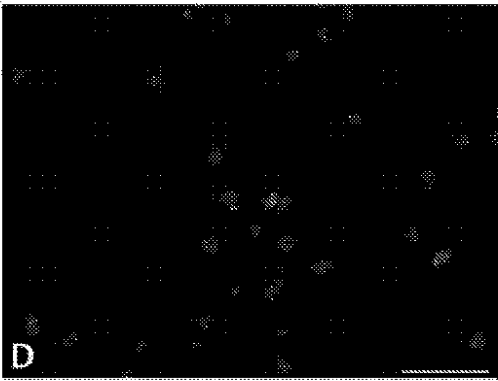
【 図 1 3 B 】



【 図 1 3 C 】

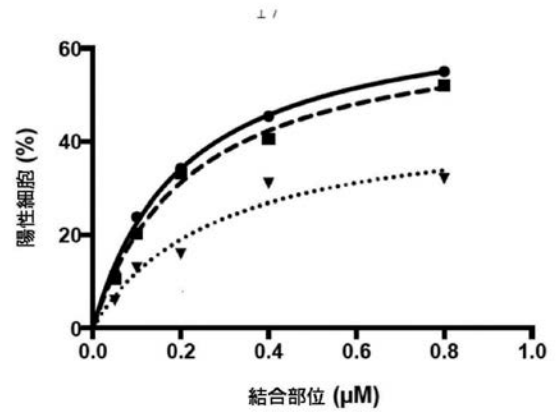


【 図 1 3 D 】



【 図 1 4 】

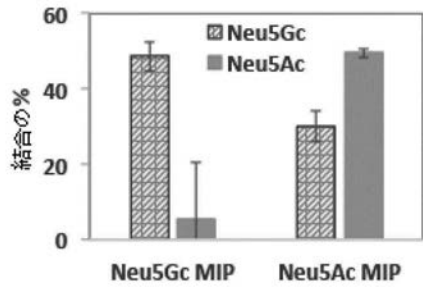
Chart 14



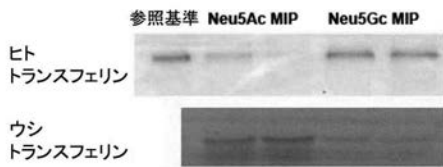
【 図 1 5 】

Chart 15

(A)

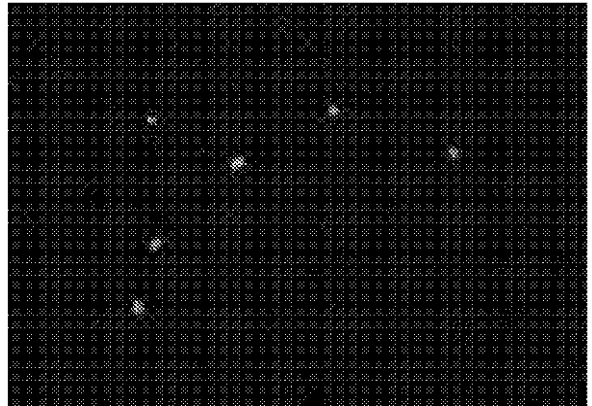


(B)



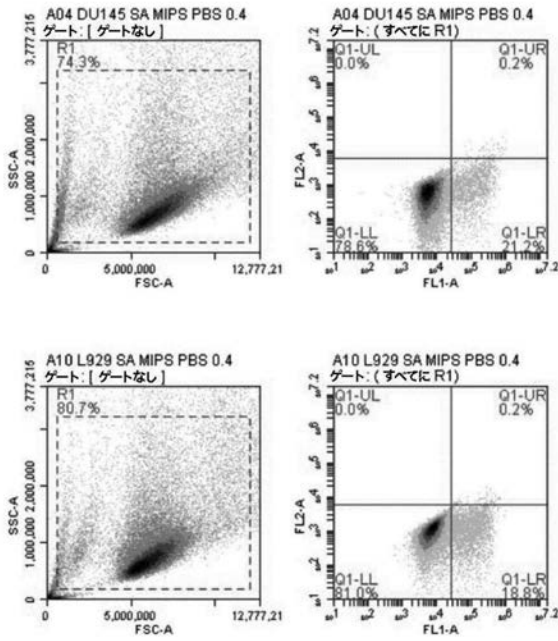
【 図 1 6 - 1 】

Chart 16



【 図 16 - 2 】

Chart 16 continued



【 図 17 】

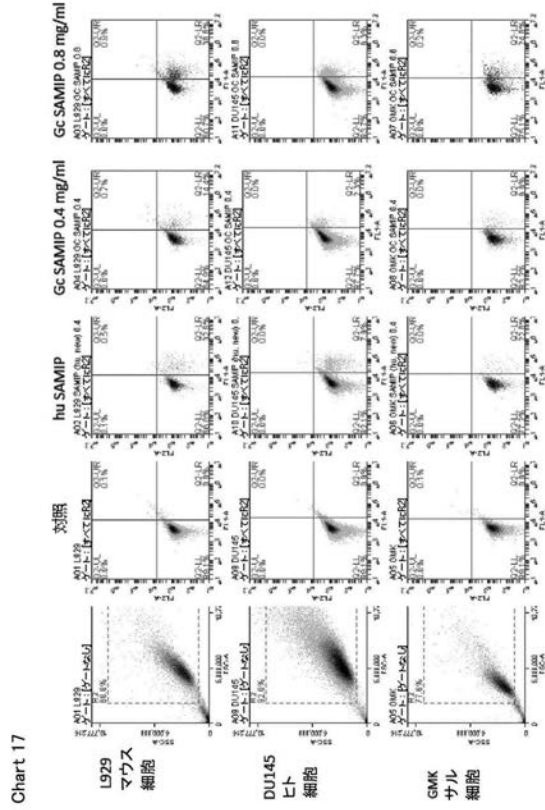
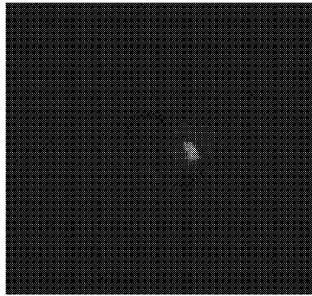


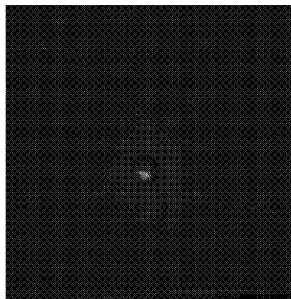
Chart 17

【 図 18 - 1 】

Chart 18



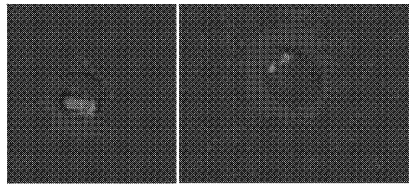
A



B

【 図 18 - 2 】

Chart 18 (continued)

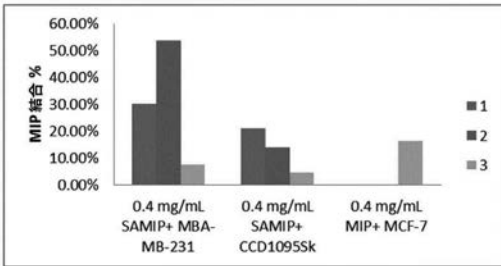
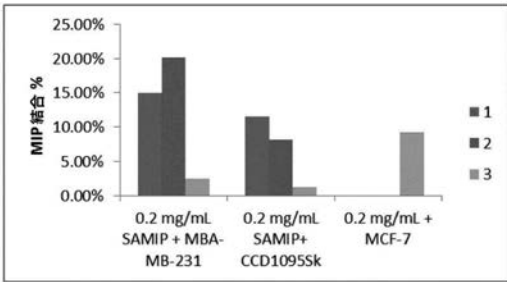


C

D

【 図 19 】

Chart 19



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE2016/050413

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: see extra sheet 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) IPC: A61K, B01D, B01J, C08F  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched SE, DK, FI, NO classes as above  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI data, BIOSIS, CHEM ABS Data, COMPENDEX, EMBASE, PUBCHEM, Biblioteksök, Reaxys		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KUGIMIYA, A., TAKEUCHI, T., "Surface plasmon resonance sensor using molecularly imprinted polymer for detection of sialic acid", In: Biosensors & Bioelectronics, 2001, March, Vol. 16, pp. 1059-1062, ISSN: 0956-5663, DOI: 10.1016/S0956-5663(01)00227-5; abstract; figures 1,2; page 1059, page 1060 paragraphs 2.2-2.3	1-9, 11-12, 15-19, 26, 31, 35
Y	--	10, 13-14, 20-25, 27-30, 32-34
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 21-07-2016		Date of mailing of the international search report 22-07-2016
Name and mailing address of the ISA/SE Patent- och registreringsverket Box 5055 S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. + 46 8 666 02 86		Authorized officer Ingemar Wistrand Telephone No. + 46 8 782 28 00

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2016/050413
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GAO, F.X., et al., "Smart surface imprinting polymer nanospheres for selective recognition and separation of glycoprotein", In: "Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects", 2013, May, Vol. 433, pp. 191-199, ISSN: 0927-7757, DOI: 10.1016/j.colsurfa.2013.05.018; abstract; figure 1; page 192 paragraph 2.3	1, 7, 15-19, 26, 31, 35
Y	--	32-33
X	SHINDE, S., et al., "Sialic acid-imprinted fluorescent core-shell particles for selective labeling of cell surface glycans", In: "J. Am. Chem. Soc.", 2015, Vol. 137, pp. 13908-13912, ISSN: 15205126, DOI: 10.1021/jacs.5b08482; whole document	34-35
P, X	--	1-33
P, X	WO 2015118294 A1 (UNIV BIRMINGHAM), 13 August 2015 (2015-08-13); abstract; page 21, line 12 - page 22, line 9; figure 1	1-3, 7, 16-17, 26, 31, 35
Y	--	
Y	WAN, W., et al., "Fluorescent sensory microparticles that "light-up" consisting of a silica core and a molecularly imprinted (MIP) shell", In: "Angew. Chem. Int. Ed.", 2013, May, Vol. 52, pp. 7023-7027, ISSN: 1433-7851, DOI: 10.1002/anie.201300322; page 7023, column 2, line 22 - line 45; page 7026, column 1, line 18 - line 21; figure 1	1
Y	--	
A	VO-DINH, T., ALLAIN, L., "Chapter 20. Biosensors for Medical Applications", In: "Biomedical Photonics Handbook", CRC Press, 2003, eBook ISBN: 978-0-203-00899-7, DOI: 10.1201/9780203008997.ch20; paragraphs 20.3.1.1-20.3.1.2	23-24
A	--	
A	ADAMCZYK, B. et al., "Glycans as biomarkers", In: Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1820, pp. 1347-1353, ISSN: 0304-4165, DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.12.001; whole document	1-35
A	--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE2016/050413

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PAN, H.H. et al., "Synthesis of molecularly imprinted polymer and its molecular recognition properties of N-acetylneuraminic acid", In: E-Journal of Chemistry, Vol. 4, pp. 611-619, ISSN: 0973-4945; whole document -- -----	1-35

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2016/050413
--

**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.: **32-34**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**Claims 32-34 are considered to partly relate to a method for treatment of the human**  
.../...
2.  Claims Nos.:  
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:
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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2016/050413
--

**Continuation of: Box No. II**

or animal body by surgery or by therapy, as well as diagnostic methods, see PCT rule 39.1(iv). Nevertheless, a search has been made for these claims. The search has been directed to the technical content of the claims.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2016/050413
--

**Continuation of:** second sheet

**International Patent Classification (IPC)**

**B01J 20/26** (2006.01)

**A61K 31/00** (2006.01)

**B01D 15/38** (2006.01)

**B01J 20/285** (2006.01)

**C08F 220/00** (2006.01)

**C08F 292/00** (2006.01)

**C08F 293/00** (2006.01)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/SE2016/050413**

WO 2015118294 A1 13/08/2015 NONE

---

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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

(71) 出願人 517392757

ブンデスレプブリック ドイツランド, ベルトレテン ドゥーヒ ディー ブンデスミニスター  
イン フュル ビルトシャフト ウント エナーギー, ディーズ ベルトレテン ドゥーヒ デン  
プレジデンテン デア ブンデサンシュタルト フュル マテリアルフオルシュング ウント -  
ブリューフング (ベーアーエム)  
ドイツ連邦共和国, 1 2 2 0 5 ベルリン, ウンター デン アイヒェン 8 7

(74) 代理人 100099759

弁理士 青木 篤

(74) 代理人 100123582

弁理士 三橋 真二

(74) 代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74) 代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74) 代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74) 代理人 100182730

弁理士 大島 浩明

(72) 発明者 ボルイエ セルグレン

スウェーデン国, 2 5 4 3 7 ヘルシンボリ, サンクト ペデルスガタ 1 1

(72) 発明者 スディールクマール シンデ

スウェーデン国, 2 1 1 4 9 マルメー, エクセルシスガタン 5

(72) 発明者 アンネッテ ヨーロフ ピングレン

スウェーデン国, 2 4 7 3 2 セードラ サンドビュー, エストークラベーゲン 2 3

(72) 発明者 クヌート ルラック

ドイツ連邦共和国, 1 2 4 8 9 ベルリン, リヒャルト - ビルシュテッター - シュトラーセ 1 1  
, フェデラル インスティテュート フォー マテリアルズ リサーチ

(72) 発明者 ワン ウエイ

ドイツ連邦共和国, 1 2 4 8 9 ベルリン, ビューヒナーベーク 6 7

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA20 QQ08 QQ67 QR41 QR66 QS32 QX01

4C076 AA95 BB11 CC27 EE03 EE12 EE13 EE16

专利名称(译)	分子印记聚合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018516899A</a>	公开(公告)日	2018-06-28
申请号	JP2017559614	申请日	2016-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	相位全息成像PHI有限公司		
申请(专利权)人(译)	FASE全息Imaingu Pehoi动埃沃LARG		
[标]发明人	ボルイエセルグレン スディールクマールシンデ アンネッテヨーロフビングレン クヌートルラック ワンウェイ		
发明人	ボルイエセルグレン スディールクマールシンデ アンネッテヨーロフビングレン クヌートルラック ワンウェイ		
IPC分类号	A61K47/34 G01N33/545 G01N33/574 G01N33/53 C12Q1/02		
CPC分类号	C08F251/00 A61K31/726 A61K47/36 B01D15/3852 B01J20/261 B01J20/267 B01J20/268 B01J20/285 B01J20/3071 B01J20/3085 C08F220/00 C08F292/00 C08F2438/03		
FI分类号	A61K47/34 G01N33/545.Z G01N33/574.D G01N33/53.Y C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QQ67 4B063/QR41 4B063/QR66 4B063/QS32 4B063/ /QX01 4C076/AA95 4C076/BB11 4C076/CC27 4C076/EE03 4C076/EE12 4C076/EE13 4C076/EE16		
代理人(译)	青木 笃 渡边洋一 中岛胜 武井良太郎		
优先权	1530062 2015-05-09 SE		
其他公开文献	JP2018516899A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于连接聚糖的分子印记聚合物，其提供糖模板；至少两个能够与模板协同相互作用的功能单体。制备；制备交联单体；任选地在糖模板存在下将这些单体溶解在溶剂中进行聚合；并从形成的聚合物中除去模板。本发明还涉及分子印记聚合物的生产方法和分子印记聚合物的用途。[选型图]图1

Chart 1

