

(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
2014年8月28日(28.08.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/129446 A1

- (51) 国際特許分類:
C07D 495/04 (2006.01) C07K 14/36 (2006.01)
C07D 497/04 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C07D 498/04 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/053734
- (22) 国際出願日: 2014年2月18日(18.02.2014)
- (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 2013-031038 2013年2月20日(20.02.2013) JP
- (71) 出願人: サヴィッド・セラピューティクス株式会社 (SAVID THERAPEUTICS INC.) [JP/JP]; 〒1040054 東京都中央区勝どき2-1-11 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 杉山 暁(SUGIYAMA Akira); 〒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). 土居 洋文(DOI Hirofumi); 〒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). 児玉 龍彦(KODAMA Tatsuhiko); 〒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). 井上 豪(INOUE Tsuyoshi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘2-1 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 溝端 栄一(MIZOHATA Eiichi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘2-1 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 川戸 達矢(KAWATO Tatsuya); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘2-1 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 飯塚 友洋(MESHIZUKA Tomohiro); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘2-1 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 金井 求(KANAI Motomu); 〒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). 清水 洋平 (SHIMIZU Yohei); 〒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: 特許業務法人特許事務所サイクス(SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 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, LT, 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, 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))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2014/129446 A1

(54) Title: BIOTIN ALTERANT, STREPTAVIDIN MUTANT, AND USES THEREOF

(54) 発明の名称: ビオチン改変体、ストレプトアビジン変異体およびそれらの利用

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a streptavidin mutant having reduced affinity for natural biotin, and to provide a biotin alterant having high affinity for the streptavidin mutant having low affinity for natural biotin. The present invention provides a reagent kit for use in treatment or diagnosis, the reagent kit containing (a) a streptavidin mutant having reduced affinity for natural biotin or biocytin, and (b) a biotin alterant having high affinity for the streptavidin mutant.

(57) 要約: 本発明の課題は、天然ビオチンに対する親和性を低減させたストレプトアビジン変異体を提供し、更にこの天然ビオチンに対する低親和性のストレプトアビジン変異体に対して高い親和性を有するビオチン改変体を提供することである。本発明によれば、(a) 天然ビオチン又はビオシチンとの親和性を低下させたストレプトアビジン変異体、及び (b) 上記ストレプトアビジン変異体に対して高い親和性を有するビオチン改変体を含む、治療又は診断のための試薬キットが提供される。

明 細 書

発明の名称：

ビオチン改変体、ストレプトアビジン変異体およびそれらの利用

技術分野

[0001] 本発明は、ビオチン改変体、ストレプトアビジン変異体およびそれらの利用に関する。より詳細には、本発明は、天然ビオチンとの親和性を低減させたストレプトアビジン変異体、上記ストレプトアビジン変異体と親和性を有するビオチン改変体、並びにそれらの利用に関する。

背景技術

[0002] アビジンとビオチン、あるいはストレプトアビジンとビオチンの間の親和性は非常に高く ($K_d=10^{-15}$ から $10^{-14}M$)、生体二分子間の相互作用としては、最も強い相互作用の一つである。現在、アビジン/ストレプトアビジン - ビオチン相互作用は、生化学、分子生物学、あるいは医学の分野で広く応用されている (Green, (1975), *Adv. Protein Chem.*, 29: 85-133; Green, (1990), *Methods Enzymol.*, 184: 51-67)。アビジンは卵白由来の塩基性糖タンパクで、等電点は10を超える。一方、ストレプトアビジンは放線菌 (*Streptomyces avidinii*) 由来で、等電点は中性付近で糖鎖は含まない。両タンパク質とも、4量体を形成し、1つのサブユニット当たり1分子のビオチンと結合する。分子量は60kDa程度である。

[0003] 近年このアビジン/ストレプトアビジンとビオチンの高い結合能と抗体分子とを組合わせたドラッグデリバリーの方法、プレターゲティング法が考案されている (Hnatowich, (1987), *J. Nucl. Med.*, 28, 1294-1302)。しかしながら、ニワトリ由来のアビジンや微生物由来のストレプトアビジンは人体に対し高い免疫原性を示すため、人体に投与後、早期に抗アビジン/ストレプトアビジン抗体が産生されることが問題となりプレターゲティング法の実用化を妨げている原因の1つとなっている (Paganelli, (1991), *Cancer Res.*, 51, 5960-5966)。上記問題を解決するための低免疫原性ストレプトア

ビジンが報告されている（国際公開WO2010/095455）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開WO2010/095455

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Green, (1975), Adv. Protein Chem., 29: 85-133;

非特許文献2：Green, (1990), Methods Enzymol., 184: 51-67

非特許文献3：Hnatowich, (1987), J. Nucl. Med., 28, 1294-1302

非特許文献4：Paganelli, (1991), Cancer Res., 51, 5960-5966)。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 上記したような低免疫原性ストレプトアビジンは、人体に対する免疫原性が低下しているという特徴を有するものであるが、人体に内在するビオチンに対する親和性を有するため、診断用途の場合にはバックグラウンドが高くなるという問題や、治療用途の場合にも疾患に特異的に薬効を発揮できない可能性があるという懸念がある。そこで、本発明は、天然ビオチンに対する親和性を低減させたストレプトアビジン変異体を提供し、更にこの天然ビオチンに対する低親和性のストレプトアビジン変異体に対して高い親和性を有するビオチン改変体を提供することを解決すべき課題とした。更に本発明は、上記ストレプトアビジン変異体とビオチン改変体との組み合わせを用いた診断薬・治療薬、上記ストレプトアビジン変異体とビオチン改変体との組み合わせを用いた診断キット・治療キットを提供することを解決すべき課題とした。

課題を解決するための手段

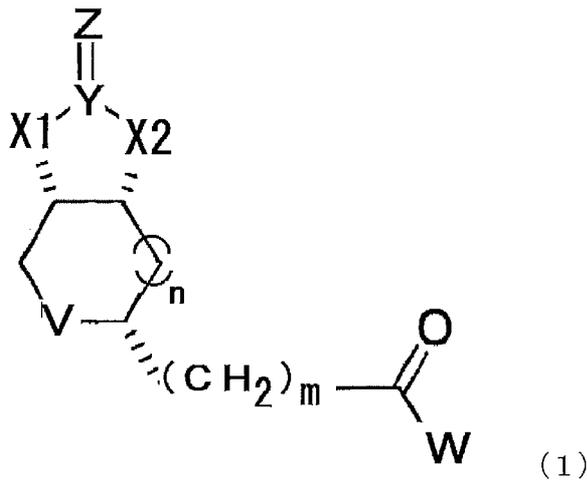
[0007] 本発明者は上記課題を解決するために鋭意検討し、国際公開WO2010/095455に記載された低免疫原性ストレプトアビジン変異体に対して更に所定のアミノ酸変異を導入することにより、天然ビオチンに対する親和

性が低減したストレプトアビジン変異体を得ることに成功した。同時にビオチンの構造の一部を改変することによって各種ビオチン改変体を合成した。そして上記ストレプトアビジン変異体と上記ビオチン改変体の親和性を調べた結果、互いに親和性を有する組み合わせを見出し、本願発明を完成するに至った。

[0008] 即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

[1] 下記式(1)で示される化合物。

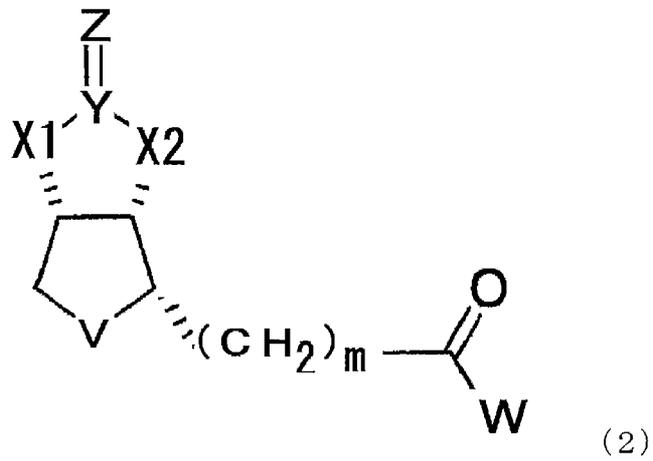
[化1]



(式中、X1及びX2はそれぞれ独立にO又はNHを示し、YはC又はSを示し、ZはO、S又はNHを示し、VはS又は S^+-O^- を示し、nは0又は1の整数を示し、mは1から10の整数を示し、Wは $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_p\text{COOH}$ 、又は $-\text{NH}(\text{CH}_2)_q\text{C}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ を示す。ここでp及びqはそれぞれ独立に1から10の整数を示す)。

[0009] [2] nが0である、下記式(2)で示される、[1]に記載の化合物。

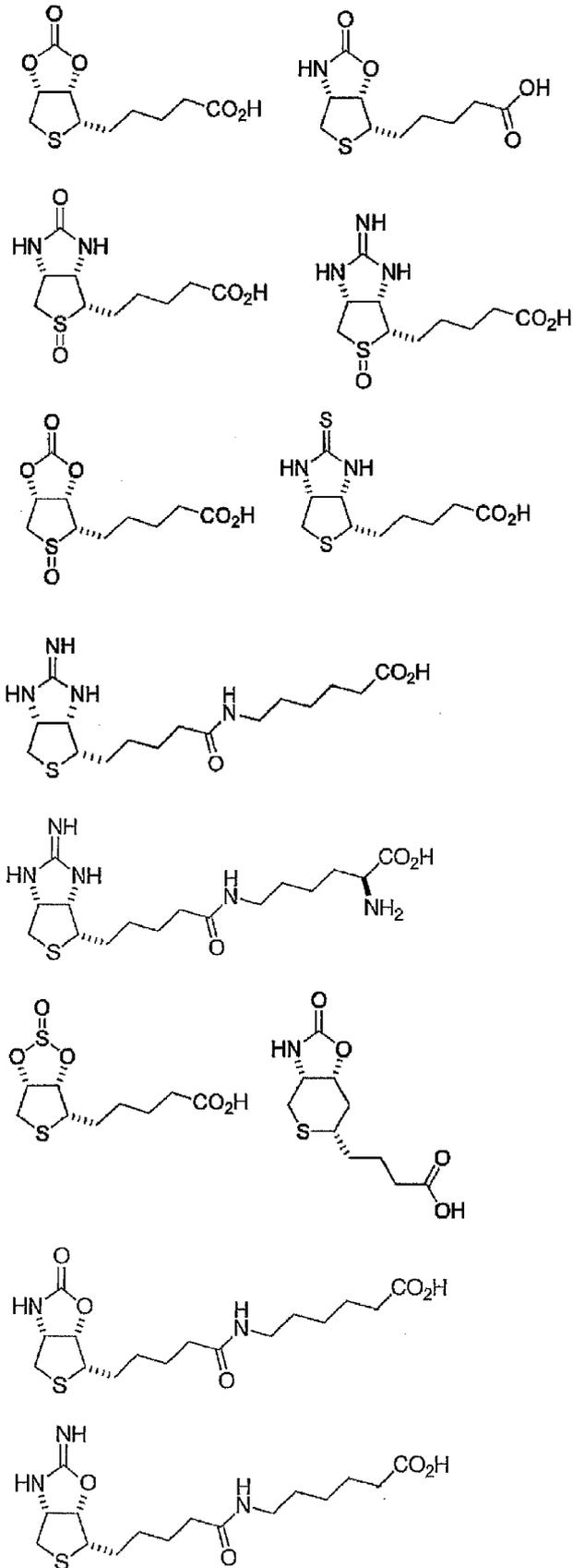
[化2]



(式中、X1、X2、Y、Z、V、m、及びWは[1]と同義である)

[0010] [3] 以下の何れかの化合物。

[化3]



[0011] [4] 配列番号3から12の何れかに記載のアミノ酸配列を含む、ストレプトアビジン変異体。

[5] [4] に記載のストレプトアビジン変異体をコードするDNA。

[6] [4] に記載のストレプトアビジン変異体に分子プローブを結合させることにより得られる、ストレプトアビジン変異体-分子プローブ結合物。

[7] [6] に記載のストレプトアビジン変異体-分子プローブ結合物を含む、治療剤又は体内あるいは体外診断剤。

[8] (a) [6] に記載のストレプトアビジン変異体-分子プローブ結合物；及び (b) [1] から [3] の何れかに記載の化合物で標識した体内あるいは体外診断用又は治療用物質：を含む治療又は体内あるいは体外診断キット。

[0012] [9] (a) 天然ビオチン又はビオシチンとの親和性を低下させたストレプトアビジン変異体、及び；

(b) 上記ストレプトアビジン変異体に対して高い親和性を有するビオチン改変体：

を含む、治療又は体内あるいは体外診断のための試薬キット。

[0013] [10] (a) 天然ビオチン又はビオシチンとの親和性を低下させたストレプトアビジン変異体と分子プローブとの結合物、及び

(b) 上記ストレプトアビジン変異体に対して高い親和性を有するビオチン改変体で標識した体内あるいは体外診断用又は治療用物質：

を含む治療又は体内あるいは体外診断キット。

発明の効果

[0014] 本発明によれば、免疫原性が低減すると同時に天然ビオチンに対する親和性を低減させたストレプトアビジン変異体と、上記ストレプトアビジン変異体に対して高い親和性を有するビオチン改変体の組み合わせが提供される。本発明のストレプトアビジン変異体とビオチン改変体の組み合わせは、プレターゲット法に基づく診断法・治療法において有用である。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図1は、ストレプトアビジン変異体組換えタンパク質の粗精製の結果を示す。

[図2]図2は、ビオチン-HRP標識体との競合解析の結果を示す。

[図3]図3は、シッティングドロップ蒸気拡散法を示す。

[図4]図4は、LISA314およびLISA314-V21の結晶構造を示す。

[図5]図5は、LISA314およびLISA314-V21の結晶構造を示す。(A)LISA314とbiotinの共結晶構造。(B)LISA314-V21とiminobiotin long tailの共結晶構造。サブユニットAおよびCをline ribbon、BおよびDをFlat ribbonで表示した。

[図6]図6は、巻戻しタンパク質の精製の一例を示す。

[図7]図7は、ビオシチンとLISA314 WTとの相互作用をSPR分析した際のセンサーグラムを示す。

[図8]図8は、ビオシチンとLISA314 V21との相互作用をSPR分析した際のセンサーグラムを示す。

[図9]図9は、化合物29とLISA314 V21との相互作用をSPR分析した際のセンサーグラムを示す。

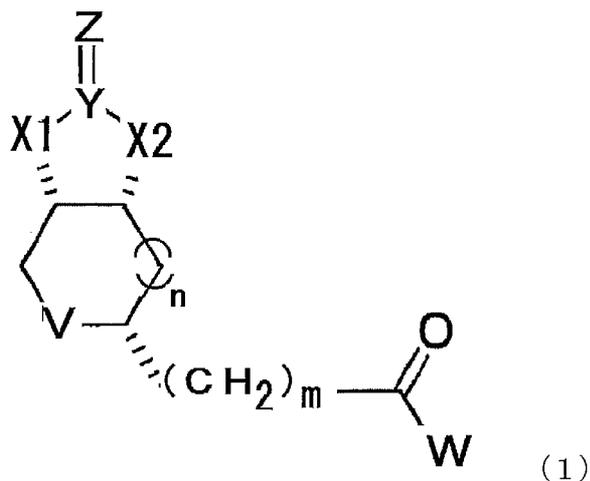
発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明について更に詳細に説明する。

(1) ビオチン改変体

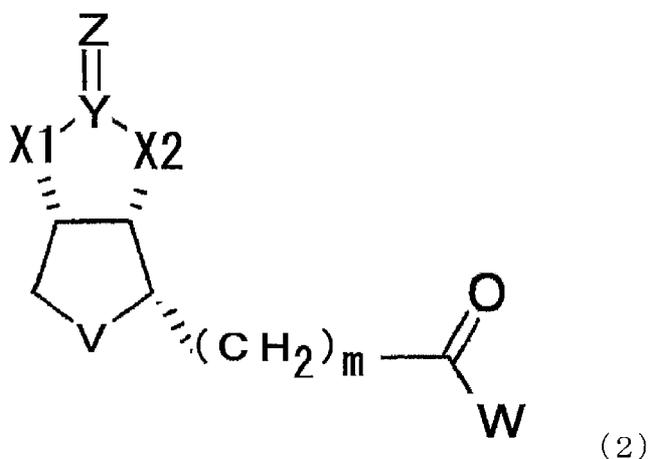
本発明のビオチン改変体は、下記式(1)で示される化合物であり、好ましくは式(1)においてnが0である場合である式(2)で示される化合物である。

[化4]



(1)

[化5]

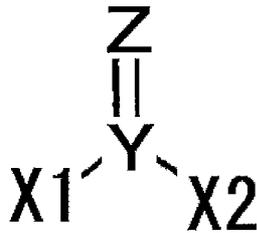


(2)

(式中、X1及びX2はそれぞれ独立にO又はNHを示し、YはC又はSを示し、ZはO、S又はNHを示し、VはS又はS⁺-O⁻を示し、nは0又は1の整数を示し、mは1から10の整数を示し、Wは-OH、-NH(CH₂)_pCOOH、又は-NH(CH₂)_qC(NH₂)COOHを示す。ここでp及びqはそれぞれ独立に1から10の整数を示す)。

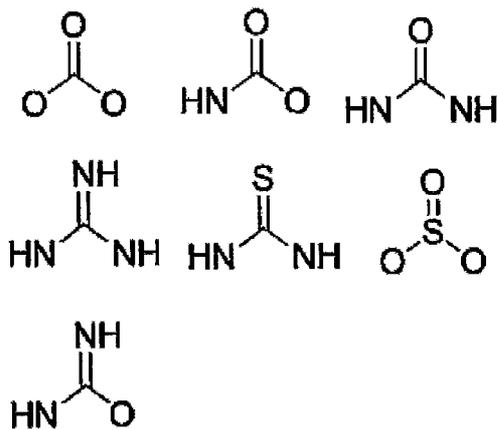
[0017] 式(1)及び式(2)において、下記構造：

[化6]



で示される部分は好ましくは、

[化7]



の何れかであるが、これらに限定はされない。

[0018] mは1から10の整数を示し、好ましくは2から10の整数、より好ましくは2から8の整数、より好ましくは2から6の整数、特に好ましくは4を示す。

p及びqはそれぞれ独立に1から10の整数を示し、好ましくは2から10の整数、より好ましくは2から8の整数、より好ましくは2から6の整数、特に好ましくは4又は5を示す。

[0019] 本発明の式(1)又は式(2)の化合物は、以下の実施例1に記載の合成方法により合成することができる。実施例1における化合物11、19、21、23、24、27、29、31、36、37、46及び47は、本発明の式(1)又は式(2)の化合物である。

[0020] 化合物11の合成方法

先ず、(L)-アラビノース(化合物1)のDMF溶液に2,2-ジメトキシプロパン

とトルエンスルホン酸一水和物を加えることで、(3aS, 7R, 7aR)-2,2-ジメチルテトラヒドロ-3aH-[1,3]ジオキソロ[4,5-c]ピラン-6,7-ジオール(化合物2)を得る。化合物2を水及びヘキサンの混合溶媒に溶かし、過ヨウ素酸ナトリウムを加えて攪拌し、炭酸ナトリウムを加えることで、(3aS, 6aS)-2,2-ジメチルテトラヒドロフロ[3,4-d][1,3]ジオキソール-4-オール(化合物3)を得る。化合物3のDMF溶液に、セライトとニクロム酸ピリジニウムを加えて反応させることにより、(3aS, 6aS)-2,2-ジメチルジヒドロフロ[3,4-d][1,3]ジオキソール-4(3aH)-オン(化合物4)を得る。化合物4のDMF溶液にチオ酢酸カリウムを加えて反応させることにより(3aS, 6aR)-2,2-ジメチルジヒドロチエノ[3,4-d][1,3]ジオキソール-4(3aH)-オン(化合物5)を得る。化合物5のTHF溶液に、3-ブテニル-1-マグネシウム ブロミドを加えて反応させることにより、(3aS, 6aR)-4-(3-ブテン-1-イル)-2,2-ジメチルテトラヒドロチエノ[3,4-d][1,3]ジオキソール-4-オール(化合物6)を得る。化合物6のCH₂Cl₂溶液に、トリエチルシランを加えて攪拌した後、トリフルオロ酢酸(675 μL, 9.05 mmol)を加えて反応させることにより、(2S, 3S, 4R)-2-(3-ブテン-1-イル)テトラヒドロチオフェン-3,4-ジオール(化合物7)を得る。化合物7のCH₂Cl₂溶液に、ピリジン及びトリホスゲンを加えて反応させることにより、(3aS, 4S, 6aR)-4-(3-ブテン-1-イル)テトラヒドロチエノ[3,4-d][1,3]ジオキソール-2-オン(化合物8)を得る。化合物8を含むCH₂Cl₂溶液に、アクリル酸ベンジルと第二世代 Hoveyda-Grubbs 触媒を加えて加熱還流することにより、(E)-ベンジル5-((3aS, 4S, 6aR)-2-オキソテトラヒドロチエノ[3,4-d][1,3]ジオキソール-4-イル)-2-ペンテノエート(化合物9)を得る。化合物9のエタノール溶液に、パラジウム炭素を加え、水素ガス存在下で攪拌して反応させることにより、ベンジル5-((3aS, 4S, 6aR)-2-オキソテトラヒドロチエノ[3,4-d][1,3]ジオキソール-4-イル)ペンタノエート(化合物10)を得る。化合物10を含むCH₂Cl₂溶液に、三臭化ホウ素を加えて反応させることにより、本発明の式(1)で示される((3aS, 4S, 6aR)-2-オキソテトラヒドロチエノ[3,4-d][1,3]ジオキソール-4-イル)ペンタン酸(化合物11)を得る。

[0021] 化合物 19 の合成方法

化合物13の無水 THF 溶液に、*n*-ブチルリチウム溶液 (2.6 M ヘキサン溶液) を滴下して攪拌後、化合物 12と HMPA無水 THF溶液を滴下して攪拌することにより、(R)-*tert*-ブチル4-((R)-1-ヒドロキシ-6-(4-メチル-2,6,7-トリオキサビシクロ [2.2.2]オクタン-1-イル)-2-ヘキサニル-1-イルyl)-2,2-ジメチルチアゾリジン-3-カルボキシレート(化合物14)を得る。化合物14 を含む無水トルエン溶液に、ヘキサメチルジシラザンリチウム溶液を加えて反応させることにより (1*R*, 7*aR*)-5,5-ジメチル-1-(5-(4-メチル-2,6,7-トリオキサビシクロ[2.2.2]オクタン-1-イル)-1-ペンチン-1-イル)ジヒドロ-1*H*-チアゾロ[3,4-*c*]オキサゾール-3(5*H*)-オン(化合物15)を得る。化合物15の CH₃CNと H₂O 混合溶液に、硝酸銀(I)を加えて反応させることにより(E)-3-ヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)-2-メチルプロピル5-((3*aR*, 6*aS*)-2-オキソテトラヒドロチエノ[3,4-*d*]オキサゾール-6(6*aH*)-イリデン)ペンタノエート(化合物16)を得る。化合物16及び酢酸アリルのメタノール溶液に水酸化パラジウム炭素を加え、水素ガス存在下で反応することにより、3-ヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)-2-メチルプロピル 5-((3*aR*, 6*S*, 6*aS*)-2-オキソヘキサヒドロチエノ[3,4-*d*]オキサゾール-6-イル)ペンタノエート(化合物18)を得る。化合物18の CH₃CNと H₂Oの混合溶液に、水酸化リチウムを加えて反応させることにより、5-((3*aR*, 6*S*, 6*aS*)-2-オキサヘキサヒドロチエノ[3,4-*d*]オキサゾール-6-イル)ペンタン酸(化合物19)を得る。

[0022] 化合物 21 の合成方法

ビオチン (化合物20)の酢酸溶液にNaBO₃ · 4H₂Oを室温下加え、攪拌した後、チオ硫酸ナトリウムを加え、減圧下にて溶媒を留去することにより、5-((3*aS*, 4*S*, 6*aR*)-5-オキシド-2-オキソヘキサヒドロ-1*H*-チエノ[3,4-*d*]イミダゾール-4-イル)ペンタン酸(化合物21)を得る。

[0023] 化合物 23 の合成方法

イミノビオチン(化合物22)の1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロパノール溶液にH₂O₂水溶液を加えて反応させることにより、5-((3*aS*, 4*S*, 6*aR*)-2-イミ

ノ-5-オキシドヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペンタン酸(化合物23)を得る。

[0024] 化合物24の合成方法

化合物11の1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロパノール溶液にH₂O₂水溶液を加えて反応させることにより、5-((3aS,4S,6aR)-5-オキシド-2-オキソテトラヒドロチエノ[3,4-d][1,3]ジオキソール-4-イル)ペンタン酸(化合物24)を得る。

[0025] 化合物27の合成方法

ビオチンメチルエステル(化合物25)のトルエン溶液にLawesson's reagentを加えて反応させることにより、メチル5-((3aS,4S,6aR)-2-チオキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペンタノエート(化合物26)を得る。化合物26を含むTHF溶液に水酸化ナトリウム水溶液を添加することにより、5-((3aS,4S,6aR)-2-チオキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペンタン酸(化合物27)を得る。

[0026] 化合物29の合成方法

6-アミノヘキサン酸のdioxaneとH₂Oの混合溶液に、水酸化ナトリウム水溶液を加え、pHが9程度になるよう調整する。化合物28を加えて反応させることにより、5-((3aR,6S,6aS)-2-オキソヘキサヒドロチエノ[3,4-d]オキサゾール-6-イル)ペンタン酸(化合物29)を得る。

[0027] 化合物31の合成方法

化合物28とN α -Boc-L-lysineのジオキサン/水の混合溶媒を攪拌することにより、(S)-2-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)-6-(5-((3aS,4S,6aR,Z)-2-((2,2-トリフルオロアセチル)イミノ)ヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペンタンアミド)ヘキサン酸(化合物30)を得る。化合物30をジオキサンとH₂Oの混合溶液に、塩酸を加え、pHが3程度になるよう調整し5時間攪拌した後、減圧下溶媒を留去して得た固体をdioxaneとH₂Oに溶解してアンモニア水を加えることにより、(S)-2-アミノ-6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-イミ

ノヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペンタンアミド)ヘキサ酸(化合物31)を得る。

[0028] 化合物36の合成方法

化合物32の CH_2Cl_2 溶液に、アクリル酸ベンジルと第二世代 Hoveyda-Grubbs 触媒を加えて反応させることにより、(E)-ベンジル 5-((3aS, 4S, 6aR)-2,2-ジメチルテトラヒドロチエノ[3,4-d][1,3]ジオキソール-4-イル)-2-ペンテノエート(化合物33)を得る。化合物33のエタノール溶液に、パラジウム炭素を加え、水素ガス存在下で反応させることにより、ベンジル5-((3aS, 4S, 6aR)-2,2-ジメチルテトラヒドロチエノ[3,4-d][1,3]ジオキソール-4-イル)ペンタノエート(化合物34)を得る。化合物34の CH_2Cl_2 溶液に三臭化ホウ素を加えて反応させることにより5-((2S, 3S, 4R)-3,4-ジヒドロキテトラヒドロチオフェン-2-イル)ペンタン酸(化合物35)を得る。化合物35の CH_3CN 溶液に、塩化チオニルを加えて反応させることにより5-((3aS, 4S, 6aR)-2-オキシドテトラヒドロチエノ[3,4-d][1,3,2]ジオキサチオール-4-イル)ペンタン酸(化合物36)を得る。

[0029] 化合物37の合成方法

化合物17をMeOHに溶解し触媒量のPd/Cを用いて水素雰囲気化で攪拌することにより2重結合の還元を行う。続いて得られた化合物のエステル部位を CH_3CN 、 H_2O 混合溶媒下にLiOHを用いて加水分解することによって4-((3aR, 6S, 7aR)-2-オキソヘキサヒドロ-2H-チオピラノ[3,4-d]オキサゾール-6-イル)ブタン酸(化合物37)を得る。

[0030] 化合物46の合成方法

化合物15のアセトニトリル及び水の混合溶液に、フッ化銀を加え、室温で反応させることにより化合物38を得る。トリオール体38と2,2-ジメトキシプロパンの無水アセトン溶液にp-トルエンスルホン酸一水和物を加え、混合物を室温で攪拌する。トリエチルアミンを加えた後、溶媒を減圧留去し、得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製することで、化合物39を得る。ジアセトニド体39のメタノール溶液にPearlman触媒(10%パ

ラジウム)を加え、水素ガス(1気圧,風船)で置換し、室温で反応させることにより、二重結合が還元された化合物40及び41の混合物を得る。この粗生成物をアセトニトリルと水の混合溶媒に溶解した後、2規定水酸化リチウム水溶液を加え、室温で反応させることにより化合物42を得る。カルボン酸42とN-ヒドロキシスクシンイミドのN,N-ジメチルホルムアミド溶液に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を加え、混合物を室温で攪拌して反応させることにより活性エステル体43を得る。得られた43をジオキサンと水の混合溶媒に溶解し、6-アミノヘキサン酸を加え、室温で反応させることにより、化合物44を得る。カルボン酸44のジオキサン溶液に3規定塩酸を加え、混合物を室温で反応させることにより化合物45を得る。アンモニウム塩45のテトラヒドロフラン溶液に炭酸カリウムとカルボニルジイミダゾールを加え、混合物を80°Cで反応させ、室温まで冷却した後、2規定水酸化ナトリウム水溶液を加え、室温で2時間反応させ、さらに2規定塩酸で酸性にする(pH 3)ことにより、化合物46を得る。

[0031] 化合物47の合成方法

アンモニウム塩45のメタノール溶液に酢酸ナトリウムと臭化シアンを加え、混合物を室温で攪拌する。2規定水酸化ナトリウム水溶液を加え、室温で攪拌する。水を加え、水層をジエチルエーテルで洗浄した後、2規定塩酸で酸性にする(pH 3)。溶媒を減圧留去した後、ジクロロメタン/メタノール(1:1)の混合溶液を加え、固体をろ過で分離除去する。溶媒を減圧留去し、得られた粗生成物を逆相HPLCで精製することで、化合物47を得る。

[0032] (2) ストレプトアビジン変異体

本発明のストレプトアビジン変異体は、配列番号2に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において、所定のアミノ酸の変異を有し、野生型ストレプトアビジンと比較して免疫原性が低下していると同時に、天然ビオチン又はビオシチンとの親和性を低減していることを特徴とする。

[0033] 野生型(天然)のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列を配列表の配列番号2に示し、これをコードする塩基配列を配列表の配列番号1に示す。

[0034] 本発明のストレプトアビジン変異体としては、具体的には、配列表の配列番号3から12の何れかに記載のアミノ酸配列を有するものである。

[0035] 本発明で言う、野生型ストレプトアビジンと比較して免疫原性が低下しているとは、ストレプトアビジン変異体をヒトなどの哺乳動物に投与した場合における免疫原性が低下していることを言う。免疫原性が低下していることは、例えば、以下の方法で確認することができる。即ち、本発明のストレプトアビジン変異体について、野生型ストレプトアビジンをカニクイサルに免疫して取得した抗ストレプトアビジン抗血清に対する反応性を解析し、上記の抗ストレプトアビジン抗血清に対する反応性が野生型ストレプトアビジンに比べて低下していれば、野生型ストレプトアビジンと比較して免疫原性が低下していると判断することができる。上記した方法で免疫原性の低下を判断した場合、本発明のストレプトアビジン変異体は、野生型ストレプトアビジンと比較して、免疫原性が好ましくは80%以下、さらに好ましくは60%以下、さらに好ましくは20%以下、さらに好ましくは15%以下、さらに好ましくは10%以下、特に好ましくは5%以下に低下している。

[0036] 本発明で言う天然ビオチン又はビオシチンとの親和性を低減しているとは、ストレプトアビジン変異体と天然ビオチン又はビオシチンとの結合性が、ストレプトアビジンと天然ビオチン又はビオシチンとの結合性と比較して低下していることを意味する。ストレプトアビジン変異体と天然ビオチン又はビオシチンとの親和性・結合性は、SPR解析などにより評価することができる。本発明のストレプトアビジン変異体は、野生型ストレプトアビジンと比較して、天然ビオチン又はビオシチンとの親和性が好ましくは80%以下、さらに好ましくは70%以下、さらに好ましくは60%以下、さらに好ましくは50%以下、さらに好ましくは40%以下に低下している。

[0037] 本発明によればさらに、上記した本発明のストレプトアビジン変異体をコードするDNAが提供される。本発明のDNAは、野生型(天然)のストレプトアビジンをコードするDNAに対して部位特異的変異誘発により作製することができる。

[0038] 上記した本発明のストレプトアビジン変異体をコードするDNAは、ベクターに組み込んで使用することができる。特に、本発明のストレプトアビジン変異体を製造するためには、本発明のストレプトアビジン変異体をコードするDNAを発現ベクターに組み込み、この発現ベクターを宿主に形質転換することによって、本発明のストレプトアビジン変異体を発現させることができる。

[0039] 大腸菌を宿主とする場合には、本発明で用いるベクターとしては、複製起点 (ori) を有し、さらに形質転換された宿主を選択するための遺伝子 (例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン又はクロラムフェニコールなどの薬剤に対する薬剤耐性遺伝子など) を有していることが好ましい。また、発現ベクターの場合には、宿主において本発明のストレプトアビジン変異体を効率よく発現させることができるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーターまたはT7プロモーターなどを持っていることが好ましい。このようなベクターとしては、ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Script、pGEX-5X-1 (ファルマシア)、「QIAexpress system」(キアゲン)、pEGFP、またはpET(この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21を使用することが好ましい)などが挙げられる。また、ベクターには、本発明のストレプトアビジン変異体の収量をあげるためのシグナル配列などを付加することもできる。

[0040] 宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。また、可溶性を向上させるためのタグ、例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼやチオレドキシン、マルトース結合蛋白質をコードする配列が付加されていてもよい。また、精製を容易にすることを目的にした設計されたタグ、例えばポリヒスチジンタグ、Mycエピトープ、ヘマグルチニン (HA) エピトープ、T7エピトープ、XpressタグやFLAGペプチドタグ、その他の既知のタグ配列をコードする配列が付加されていてもよい。

[0041] 大腸菌以外にも、哺乳動物由来の発現ベクター (例えば、pcDNA3(インビト

ロゲン社製) や、pEGF-BOS(Nucleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322)、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター(例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(ギブコBRL社製)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター(例えばpMH1、pMH2)、動物ウイルス由来の発現ベクター(例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター(例えば、pZIPneo)、酵母由来の発現ベクター(例えば、「Pichia Expression Kit」(インビトロゲン社製)、pNV11、SP-Q01)、枯草菌由来の発現ベクター(例えば、pPL608、pKTH50)が挙げられる。

[0042] CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター(Mulliganら, Nature (1979) 277, 108)、MMLV-LTRプロモーター、EF1 α プロモーター(Mizushimaら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子(例えば、薬剤(ネオマイシン、G418など)により判別できるような薬剤耐性遺伝子)を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

[0043] ベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、原核生物および真核生物のいずれでもよい。例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。

[0044] 真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO細胞、COS細胞、3T3細胞、HeLa細胞、Vero細胞、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5などを用いることができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリボソームDOTAP(ベーリンガーマンハイム社製)を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

- [0045] 植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞が蛋白質生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えば、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えば、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。
- [0046] 原核細胞を使用する場合は、大腸菌 (*E. coli*)、例えば、JM109、DH5 α 、HB101等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。
- [0047] これらの細胞を、本発明のDNAにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより本発明のストレプトアビジン変異体が得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは、約6~8であるのが好ましい。培養は、通常、約30~40°Cで約15~200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。また、細胞の増殖を促進するための成長因子の添加を行ってもよい。
- [0048] (3) ストレプトアビジン変異体及びビオチン改変体の利用
- さらに本発明によれば、本発明のストレプトアビジン変異体に分子プローブを結合させることにより得られる、ストレプトアビジン変異体一分子プローブ結合物、並びにストレプトアビジン変異体一分子プローブ結合物を含む治療剤又は診断剤が提供される。さらに、上記したストレプトアビジン変異体一分子プローブ結合物は、本発明のストレプトアビジン変異体に親和性を有するビオチン改変体で標識した診断用又は治療用物質と組み合わせて、治療又は診断キットとして提供することができる。分子プローブとしては、例えば抗体、ペプチド、核酸、アプタマー等を挙げることができる。
- [0049] 即ち、本発明においては、癌抗原特異的抗体分子などの分子プローブと本発明のストレプトアビジン変異体との融合体を調製し、患者に投与すること

で、癌細胞に特異的に本発明のストレプトアビジン変異体を集積できることができる。次に、上記ストレプトアビジン変異体に親和性を有するビオチン改変体に結合させた診断用もしくは治療用物質（蛍光色素、化学発光剤、放射性同位元素、金属化合物等からなる増感剤、金属化合物等からなる中性子捕捉剤、低分子化合物、マイクロあるいはナノバブル、タンパク質など）を患者に投与することによって、癌細胞への確に物質を集積させることが可能になる。本発明においては、低免疫原性化により抗体産生が抑制され、抗体による早期の体内からのクリアランス、アナフィラキシーなどのショックを防ぐことができる。また、本発明においては患者から採取した組織、血清等を用いた体外診断薬、臨床検査薬として使用することで、組織、血清等に存在するビオチン或いはビオチン結合タンパク由来のノイズが低減し、よりS/N比の高い診断、検査が可能となる。

[0050] ストレプトアビジン変異体に結合させる抗体は種々の分子を用いることができる。ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体はどちらも使用することができる。抗体のサブクラスは特に問わないが、好ましくはIgG、特にIgG₁が好適に用いられる。また、「抗体」は改変抗体および抗体断片の全てを含む。ヒト化抗体、ヒト型抗体、ヒト抗体、マウス、ウサギ、ラット、モルモット、サル等の各種動物由来抗体、ヒト抗体と各種動物由来抗体とのキメラ抗体、diabody、scFv、Fd、Fab、Fab'、F(ab)₂が挙げられるが、これらに限らない。

[0051] ストレプトアビジン変異体と抗体の結合物は、当業者に公知の方法を用いて得ることができる。例えば、化学的結合方法（US5,608,060）によって得ることもできるし、ストレプトアビジン変異体をコードするDNAと抗体をコードするDNAを連結し、発現ベクター等を用いて宿主細胞に発現させることにより、融合タンパクとして得ることもできる。ストレプトアビジン変異体をコードするDNAと抗体をコードするDNAとの連結は、リンカーと呼ばれる適当なペプチドをコードするDNAを介しても良い。ストレプトアビジン変異体-抗体結合物は、抗体と標的分子との特異的結合力を残して作製

されることが望ましい。

[0052] 本発明によれば、

(a) 天然ビオチン又はビオシチンとの親和性を低下させたストレプトアビジン変異体、及び；

(b) 上記ストレプトアビジン変異体に対して高い親和性を有するビオチン改変体：

を含む、治療又は診断のための試薬キット、並びに、

(a) 天然ビオチン又はビオシチンとの親和性を低下させたストレプトアビジン変異体と分子プローブとの結合物、及び

(b) 上記ストレプトアビジン変異体に対して高い親和性を有するビオチン改変体で標識した診断用又は治療用物質：

を含む治療又は診断キットが提供される。

[0053] 天然ビオチン又はビオシチンとの親和性を低下させたストレプトアビジン変異体の具体例としては、配列番号2に記載したアミノ酸配列を有するストレプトアビジンにおいて、

(1) 10番目のアミノ酸残基のチロシンがセリンに置換している変異：

(2) 71番目のアミノ酸残基のチロシンがセリンに置換している変異：

(3) 72番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異：

(4) 89番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換している変異：

(5) 91番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異；及び

(6) 104番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がアスパラギンに置換している変異：

の全ての変異を有し、それに加えてさらに

(7) 33番目のアミノ酸残基のセリンが他のアミノ酸（例えば、アスパラギン）に置換している変異；及び

(8) 116番目のアスパラギン酸が他のアミノ酸（例えば、アスパラギン

) に置換している変異

を有するストレプトアビジン変異体、又は、

上記(1)～(6)の全ての変異を有し、それに加えてさらに

(7') 11番目のアミノ酸残基のアスパラギンが他のアミノ酸(例えば、アスパラギン酸)に置換している変異；

(8') 15番目のアミノ酸残基のセリンが他のアミノ酸(例えば、アスパラギン酸)に置換している変異；

を有するストレプトアビジン変異体が挙げられる。

[0054] さらに、配列番号2に記載したアミノ酸配列を有するストレプトアビジンにおいて、

(1) 10番目のアミノ酸残基のチロシンがセリンに置換している変異；

(2) 71番目のアミノ酸残基のチロシンがセリンに置換している変異；

(3) 72番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異；

(4) 89番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換している変異；

(5) 91番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異；

(6) 104番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がアスパラギンに置換している変異；

(7') 11番目のアミノ酸残基のアスパラギンが他のアミノ酸(例えば、アスパラギン酸)に置換している変異；及び

(8') 15番目のアミノ酸残基のセリンが他のアミノ酸(例えば、アスパラギン酸)に置換している変異；

の全ての変異を有し、さらに

(9) 33番目のアミノ酸残基のセリンが、他のアミノ酸(例えば、アラニン、グルタミン、ロイシン、イソロイシン、ヒスチジン、トレオニン、バリン及びアスパラギン)に置換している変異；

を有するストレプトアビジン変異体を使用することができる。

[0055] 上記ストレプトアビジン変異体に対して高い親和性を有するビオチン改変

体としては、本明細書に記載した式（１）で示される化合物（好ましくは、式（２）で示される化合物）を使用することができる。

[0056] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

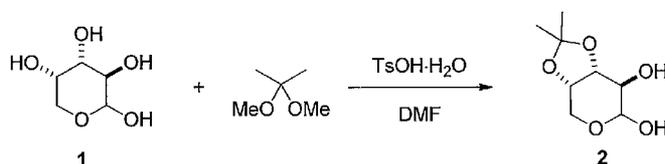
実施例

[0057] 実施例 1 : ビオチン改変体の合成

一般的方法：NMRスペクトルはJEOL JNM-LA500又はECX500スペクトロメータで記録した（ ^1H NMRについては500 MHz、 ^{13}C NMRについては125.65 MHz）。化学シフトは、内部参照としての残存 CHCl_3 （ $\delta = 7.26$ for ^1H NMR、 $\delta = 77.0$ for ^{13}C NMR）に対する δ スケールでppmで報告した。ESI質量スペクトルは、Waters-ZQ4000で測定した。カラムクロマトグラフィは、シリカゲルMerk 60（230-400 mesh ASTM）又はシリカゲル60 N（KANTO CHEMICAL, spherical, neutral, 40-100 μm ）を使用して行った。無水テトラヒドロフラン（THF）はKanto Chemical. Co., Inc.から購入するか、または $\text{Ph}_2\text{CO-Na}$ から新たに蒸留した。他の試薬は、特に明記ない限り市販品をそのまま使用した。

[0058] (3a*S*, 7*R*, 7a*R*)-2,2-ジメチルテトラヒドロ-3a*H*-[1,3]ジオキソロ[4,5-*c*]ピラン-6,7-ジオール (2)

[化8]

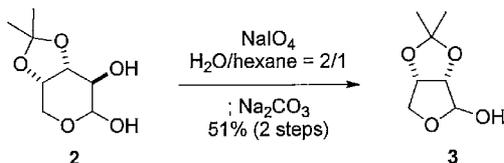


[0059] (L)-アラビノース（4g, 26.6 mmol）のDMF 30 mL 溶液に、2,2-ジメトキシプロパン（10 mL, 81.6 mmol）とトルエンスルホン酸一水和物（60 mg, 0.32 mmol）を室温下加えた。12 時間攪拌した後、炭酸ナトリウムを加え中和した。ろ過後、溶媒を減圧で留去し、2 を含む粗生成物を得た。さらなる精製を行うことなく、次の反応に進んだ。

[0060] (3a*S*, 6a*S*)-2,2-ジメチルテトラヒドロフロ[3,4-*d*][1,3]ジオキソール-4-オー

ル(3)

[化9]

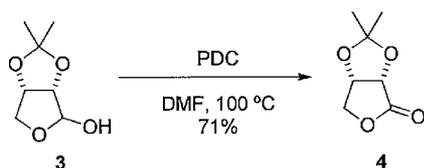


[0061] 2を含む粗生成物を水(40 mL)、ヘキサン(20 mL)の混合溶媒に溶かし、過ヨウ素酸ナトリウム(14.2 g, 66.5 mmol)を加え、2時間攪拌した。炭酸ナトリウムを加え、さらに1時間攪拌を続けた後、水を加え酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し乾燥後、減圧で溶媒を留去した。得られた粗生成物をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー(ジクロロメタン-メタノール)で精製すると、標題化合物 2.17g(二段階収率 51%)で得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.32$ (s, 3H), 1.47 (s, 3H), 4.02 (d, $J = 10$ Hz, 1H), 4.08 (dd, $J = 10, 3.7$ Hz, 1H), 4.58 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H), 4.84 (dd, $J = 5.8, 3.7$ Hz, 1H), 5.42 (s, 1H)

[0062] (3aS, 6aS)-2,2-ジメチルジヒドロフロ[3,4-d][1,3]ジオキソール-4(3aH)-オン(4)

[化10]



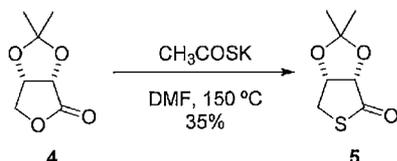
[0063] 3(740 mg, 4.60 mmol)のDMF 20 mL溶液に、セライトとニクロム酸ピリジニウム(5 g, 18.5 mmol)を加え、12時間100 °Cで攪拌した。反応液を冷却し、フロリジルの短いカラムを用い、酢酸エチルで溶出した。減圧で溶媒を留去し、得られた粗生成物をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー(ジクロロメタン-メタノール)で精製すると、標題化合物 520 mg(収率 71%)が得られた。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.40$ (s, 3H), 1.48 (s, 3H), 4.40 (dd, $J = 11, 3.7$

Hz, 1H), 4.46 (d, J= 11 Hz, 1H), 4.74 (d, J= 5.8 Hz, 1H), 4.87 (dd, J = 5.8, 3.7 Hz, 1H)

[0064] (3a*S*, 6a*R*)-2,2-ジメチルジヒドロチエノ[3,4-*d*][1,3]ジオキソール-4(3a*H*)-オン(5)

[化11]

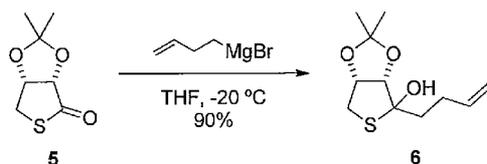


[0065] 4 (1.3 g, 8.22 mmol) の DMF 40 mL 溶液に、チオ酢酸カリウム (1 g, 9.00 mmol) を加え、3 時間 室温にて攪拌した。冷水を加え反応を停止し、エーテルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し乾燥後、減圧で溶媒を留去した。得られた粗生成物をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製すると、標題化合物 500 mg (収率 35%, 褐色固体) が得られた。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.36 (s, 3H), 1.44 (s, 3H), 3.49 (d, J= 13 Hz, 1H), 3.60 (dd, J= 13, 4.6 Hz, 1H), 4.56 (d, J= 4.9 Hz, 1H), 4.81 (dd, J = 4.9, 4.6 Hz, 1H)

[0066] (3a*S*, 6a*R*)-4-(3-ブテン-1-イル)-2,2-ジメチルテトラヒドロチエノ[3,4-*d*][1,3]ジオキソール-4-オール(6)

[化12]

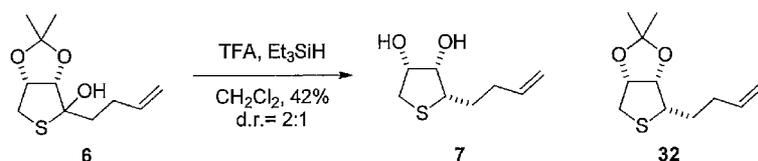


[0067] 5 (350 mg, 2.01 mmol) の THF 40 mL 溶液に、3-ブテニル-1-マグネシウム ブロミド (6.05 mmol) を加え、30 分間 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ にて攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加え反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し乾燥後、減圧で溶媒を留去した。得られた粗生成物をシリ

カゲルのカラムクロマトグラフィー（ヘキサン-酢酸エチル）で精製すると、
 標題化合物 417 mg（収率 90%，薄黄色油状）が得られた。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.31$ (s, 3H), 1.50 (s, 3H), 2.05 (t, $J = 7.3$ Hz, 2 H), 2.05 (m, 2H), 2.90 (d, $J = 13$ Hz, 1H), 3.27 (dd, $J = 13, 4.3$ Hz, 1H), 4.38 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 5.01 (d, $J = 10$ Hz, 1H), 5.12 (d, $J = 17$ Hz, 1H), 5.85–5.94 (m, 1H)

[0068] (2S, 3S, 4R)-2-(3-ブテン-1-イル)テトラヒドロチオフエン-3,4-ジオール(7)
 [化13]



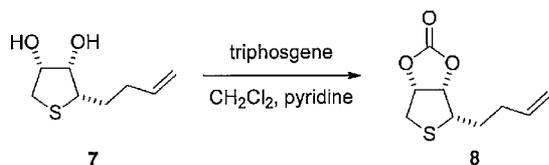
[0069] 6 (417 mg, 1.81 mmol) の CH_2Cl_2 8 mL 溶液に、トリエチルシラン (2.9 mL, 18.1 mmol) を 0°C にて加え、15 分間攪拌した後トリフルオロ酢酸 (675 μL , 9.05 mmol) を加え、12 時間攪拌を続けた。飽和重曹水を加え反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し乾燥後、減圧で溶媒を留去した。得られた粗生成物をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー（ヘキサン-酢酸エチル）で精製すると、標題化合物 130 mg（収率 42%，薄黄色固体）が得られた。また副生成物として32（収率25%）が得られている。

化合物7: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.65$ –1.74 (m, 1H), 1.89–1.96 (m, 1H), 2.05–2.19 (m, 2H), 2.81 (dd, $J = 10, 8.8$ Hz, 1H), 3.03 (dd, $J = 10, 7.1$ Hz, 1H), 3.39–3.45 (m, 1H), 4.10 (t, $J = 3.5$ Hz, 1H), 4.28–4.33 (m, 1H), 5.00 (d, $J = 10$ Hz, 1H), 5.06 (d, $J = 17$ Hz, 1H), 5.75–5.84 (m, 1H)

化合物32: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.32$ (s, 3H), 1.51 (s, 3H), 1.75–1.84 (m, 1H), 1.89–1.97 (m, 1H), 2.15–2.23 (m, 2H), 2.82 (dd, $J = 13, 4.0$ Hz, 1H), 2.86 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 3.10–3.12 (m, 1H), 4.60 (t, $J = 4.3$ Hz, 1H), 4.84 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 5.00 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 5.07 (d, $J = 16$ Hz, 1H), 5.78–5.87 (m, 1H)

[0070] (3a*S*, 4*S*, 6a*R*)-4-(3-ブテン-1-イル)テトラヒドロチエノ[3,4-*d*][1,3]ジオキソール-2-オン(8)

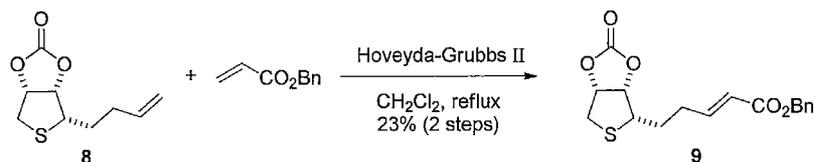
[化14]



[0071] 7 (6 mg, 0.034 mmol) の CH_2Cl_2 600 μL 溶液に、ピリジン (8 μL , 0.10 mmol) とトリホスゲン (15.3 mg, 0.052 mmol) を 0 $^\circ\text{C}$ で加えた。30 分間攪拌した後、飽和重曹水を加え反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し乾燥後、減圧で溶媒を留去した。得られた粗生成物はさらなる精製操作を経ずに次の反応に使用した。

[0072] (E)-ベンジル 5-((3a*S*, 4*S*, 6a*R*)-2-オキソテトラヒドロチエノ[3,4-*d*][1,3]ジオキソール-4-イル)-2-ペンテノエート (9)

[化15]

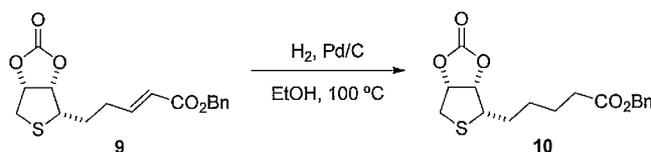


[0073] 8 を含む粗生成物の CH_2Cl_2 600 μL 溶液に、アクリル酸ベンジル (51 μL , 0.34 mmol) と第二世代 Hoveyda-Grubbs 触媒 (2.1 mg, 3.4 μmol) を加え、12 時間加熱還流を行った。減圧で溶媒を留去し、得られた粗生成物をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製すると、標題化合物 2.6 mg (二段階収率 23%, 薄黄色油状) が得られた。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.93–2.02. (m, 1H), 2.03–2.10 (m, 1H), 2.31–2.45 (m, 2H), 2.96 (dd, J = 14, 4.3 Hz, 1H), 3.14 (d, J = 14 Hz, 1H), 3.19–3.23 (m, 1H), 5.03 (dd, J = 6.4, 4 Hz, 1H), 5.18 (s, 2H), 5.27 (dd, J = 6.4, 4.3 Hz, 1H), 5.95 (d, J = 15 Hz, 1H), 6.97 (dt, J = 15, 7 Hz, 1H), 7.32–7.36 (m, 2H), 7.37 (d, J = 4.6 Hz, 3H)

[0074] ベンジル5-((3aS, 4S, 6aR)-2-オキソテトラヒドロチエノ[3,4-d][1,3]ジオキソール-4-イル)ペンタノエート(10)

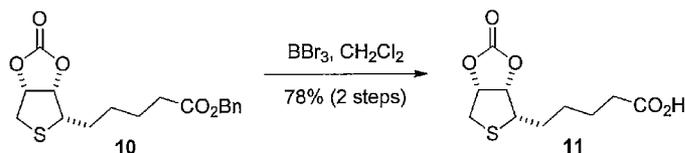
[化16]



[0075] 9の EtOH 1 mL 溶液に、パラジウム炭素 (10 w/w% Pd, 15 mol%, 1.0 mg) を加えた。30 atm の水素ガス存在下、100 °C、3 時間攪拌を続けた。反応液を室温まで冷却し、セライトの短いカラムを用い、エタノールで溶出した。減圧で溶媒を留去し、得られた粗生成物はさらなる精製操作を経ずに次の反応に用いた。

[0076] ((3aS, 4S, 6aR)-2-オキソテトラヒドロチエノ[3,4-d][1,3]ジオキソール-4-イル)ペンタン酸(11)

[化17]



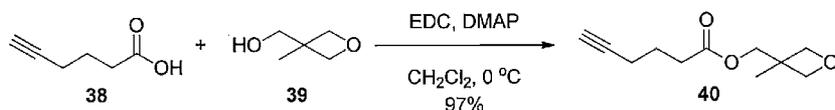
[0077] 10 を含む粗生成物の CH_2Cl_2 600 μL 溶液に、1M の三臭化ホウ素 (50 μL , 0.050 mmol) を -78°C にて加えた。0 °C、3 時間攪拌した後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し乾燥後、減圧で溶媒を留去した。得られた粗生成物をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール) で精製すると、標題化合物 1.5 mg (収率 78%, 白色固体) が得られた。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.50–1.55 (m, 2H), 1.70 (q, J = 7.3 Hz, 2H), 1.74–1.84 (m, 1H), 1.88–1.95 (m, 1H), 2.39 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 2.96 (dd, J = 14, 4.3 Hz, 1H), 3.14 (d, J = 14 Hz, 1H), 3.22 (ddd, J = 8.0, 6.7, 4.0 Hz, 1H), 5.05 (dd, J = 6.4, 4.0 Hz, 1H), 5.28 (dd, J = 6.4, 3.7 Hz, 1

H)

[0078] 3-メチルオキシエタン-3-イル)メチル-5-ヘキシノエート(40)

[化18]

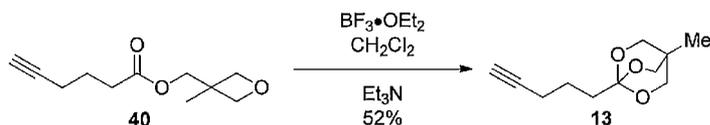


[0079] 5-ヘキシノ酸38(5 mL, 44.6 mmol)と3-メチル-3-オキシエタンメタノール39(4.5 mL, 44.6 mmol)の CH_2Cl_2 20 mL 溶液に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (10.3 g, 53.5 mmol)と N,N-ジメチル-4-アミノピリジン(545 mg, 4.46 mmol)を $0\text{ }^\circ\text{C}$ にて加えた。氷冷下1 時間攪拌した後、水と飽和食塩水を加え、 CH_2Cl_2 で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し乾燥後、減圧で溶媒を留去した。得られた粗生成物をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル)で精製すると、標題化合物 8.5 g (収率 97%, 無色油状)が得られた。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.33$ (s, 3H), 1.83-1.89 (m, 2H), 2.04 (s, 1H), 2.27 (td, $J = 6.9, 2.9$ Hz, 2H), 2.51 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 4.17 (s, 2H), 4.38 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 4.51 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H)

[0080] 4-メチル-1-(4-ペンチル-1-イル)-2,6,7-トリオキサビシクロ[2.2.2]オクタン(13)

[化19]

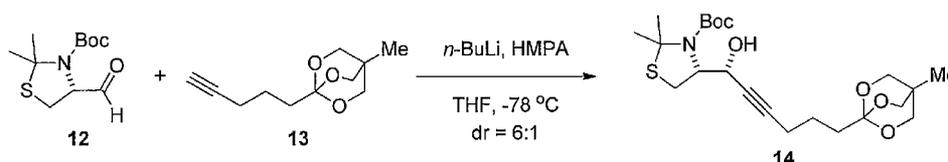


[0081] 40(8.5 g, 43.3 mmol)の CH_2Cl_2 40 mL 溶液に、三フッ化ホウ素エチルエーテル(2.7 mL, 21.7 mmol)を $0\text{ }^\circ\text{C}$ にて滴下した。室温下12 時間攪拌した後、 $0\text{ }^\circ\text{C}$ でトリエチルアミン(8 mL)を滴下し、室温で1時間攪拌後、反応液をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル-トリエチルアミン)で精製すると、標題化合物 4.4 g (収率 52%, 無色油状)が得られた。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.79$ (s, 3H), 1.66–1.72 (m, 2H), 1.77–1.80 (m, 2H), 2.16 (s, 1H), 2.21 (td, $J = 6.9, 2.9$ Hz, 2H), 3.88 (s, 6H)

[0082] (R)-tert-ブチル4-((R)-1-ヒドロキシ-6-(4-メチル-2,6,7-トリオキサビシクロ [2.2.2]オクタン-1-イル)-2-ヘキサニル-1-イルyl)-2,2-ジメチルチアゾリジン-3-カルボキシレート (14)

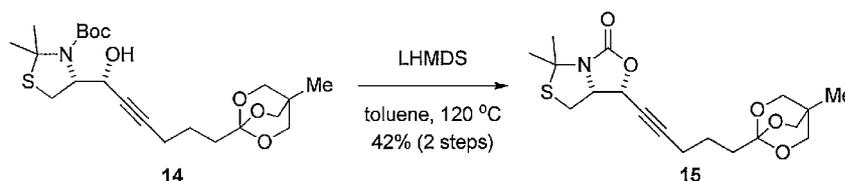
[化20]



[0083] 13 (4.8 g, 24.4 mmol) の無水 THF 50 mL 溶液に、 n -ブチルリチウム溶液 (2.6 M ヘキサン溶液 15 mL, 38.9 mmol) を -78°C にて滴下し、 0°C まで昇温し、1 時間攪拌した。その後 12 (2.9g, 11.8 mmol) (Duthaler, O. D. Angew. Chem. 1991, 103, 729に従って合成したもの) と HMPA (6 mL) の無水 THF 50 mL 溶液を -78°C にて滴下し、2 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加え反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し乾燥後、減圧で溶媒を留去した。得られた粗生成物をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製し、14 を含む粗生成物が得られた。

[0084] (1R, 7aR)-5,5-ジメチル-1-(5-(4-メチル-2,6,7-トリオキサビシクロ[2.2.2]オクタン-1-イル)-1-ペンチン-1-イル)ジヒドロ-1H-チアゾロ[3,4-c]オキサゾール-3(5H)-オン (15)

[化21]



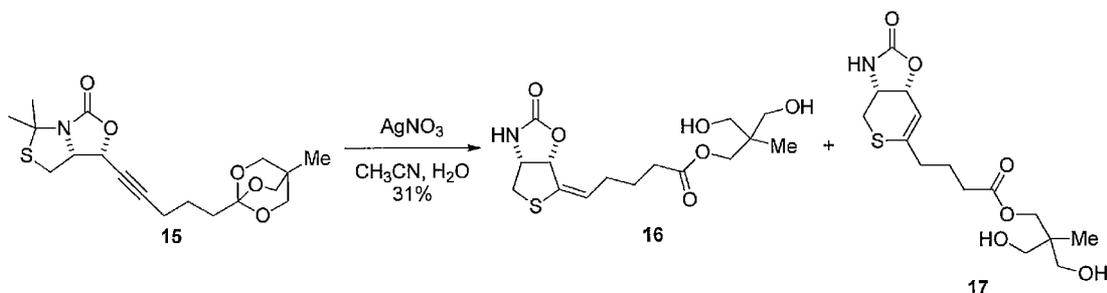
[0085] 14 を含む粗生成物の無水 toluene 40 mL 溶液に、ヘキサメチルジシラゼンリチウム溶液 (1 M THF 溶液 7.88 mmol) を加えた。 120°C 、12 時間攪拌

した後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し乾燥後、減圧で溶媒を留去した。得られた粗生成物をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー（ヘキサン-酢酸エチル）で精製すると、標題化合物 1.82 g（二段階収率 42%、薄黄色油状）が得られた。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.79$ (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.70–1.75 (m, 4H), 1.80 (s, 3H), 2.28 (td, $J = 7.5, 1.7$ Hz, 2H), 2.39 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 2.96 (dd, $J = 14, 4.3$ Hz, 1H), 3.87 (s, 6H), 4.57–4.62 (m, 1H), 5.16 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H)

[0086] (E)-3-ヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)-2-メチルプロピル5-((3aR,6aS)-2-オキソテトラヒドロチエノ[3,4-d]オキサゾール-6(6aH)-イリデン)ペンタノエート(16)

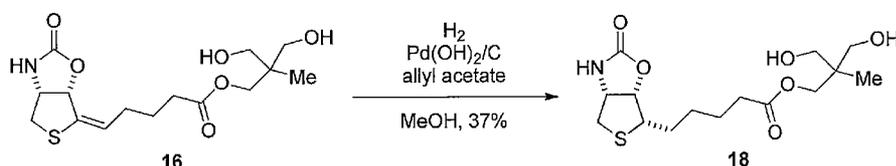
[化22]



[0087] 15 (150 mg, 0.41 mmol) の CH_3CN (2.7 mL) と H_2O (2.7 mL) 混合溶液に、硝酸銀(I) (50 mg, 0.30 mmol) を加えた。9 時間攪拌した後、セライトでろ過し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し乾燥後、減圧で溶媒を留去した。得られた粗生成物をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル）で精製すると、標題化合物 16 が 44 mg（収率 31%、薄黄色油状）得られた。また、副生成物として 17 が 35 mg（収率 25%、薄黄色油状）得られた。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): $\delta = 0.93$ (s, 3H), 1.79 (quin, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.16–2.31 (m, 2H), 2.40 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.02 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 3.25 (dd, $J = 12, 5.2$ Hz, 1H), 3.48 (dd, $J = 18, 11$ Hz, 4H), 4.03 (s, 2H), 4.64

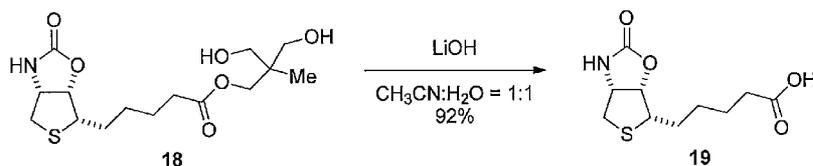
(t, J= 5.2 Hz, 1H), 5.47 (d, J= 10 Hz, 1H), 5.93 (t, J= 7.5 Hz, 1H)
 [0088] 3-ヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)-2-メチルプロピル 5-((3aR,6S,6aS)-2-
 オキソヘキサヒドロチエノ[3,4-d]オキサゾール-6-イル)ペンタノエート(18)
 [化23]



[0089] 16 (11 mg, 0.032 mmol)、酢酸アリル (344 μ L, 3.2 mmol)の MeOH 1 mL
 溶液に水酸化パラジウム炭素 (10 w/w% Pd, 40 mol%, 0.013 mmol) を加えた。
 25 atm の水素ガス存在下、50 $^{\circ}$ C、4 時間攪拌を続けた。反応液を室温まで
 冷却し、セライトの短いカラムを通し、メタノールでセライトを洗浄した。
 減圧で溶媒を留去し、得られた粗生成物をシリカゲルのカラムクロマトグラ
 フィー (ジクロロメタン-メタノール) で精製すると、標題化合物 4.2 mg (収
 率 37%, 無色油状) が得られた。

1 H NMR (CD_3OD): δ = 0.94 (s, 3H), 1.50-1.58 (m, 2H), 1.67-1.80 (m, 4H),
 1.85-1.94 (m, 2H), 2.41 (t, J= 7.2 Hz, 2H), 2.76 (d, J= 13 Hz, 1H),
 2.97 (dd, J= 13, 4.5 Hz, 1H), 3.29-3.32 (m, 1H), 3.48 (dd, J= 18, 1
 1 Hz, 4H), 4.03 (s, 2H), 4.56 (dd, J= 6.7, 4.5 Hz, 1H), 5.09 (dd, J=
 6.7, 4.0 Hz, 1H)

[0090] 5-((3aR,6S,6aS)-2-オキサヘキサヒドロチエノ[3,4-d]オキサゾール-6-イル)
 ペンタン酸(19)
 [化24]



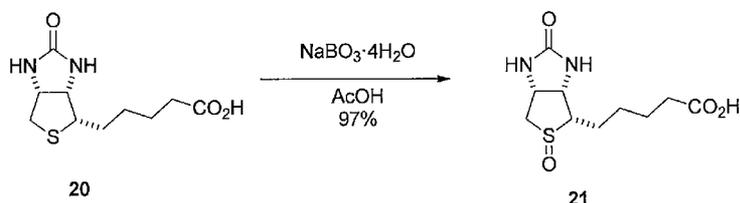
[0091] 18 (1.1 mg, 3.2 μ mol) の CH_3CN (500 μ L) と H_2O (500 μ L) の混合溶液に
 、水酸化リチウム (5 μ mol) を加えた。12 時間攪拌した後、1 M の塩酸で反

応を停止し、シリカゲルのカラムクロマトグラフィーに通し、メタノールで洗淨した。減圧で溶媒を留去し、得られた粗生成物をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン-メタノール）で精製すると、標題化合物 700 μ g（収率 92%、白色固体）が得られた。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): δ =1.47-1.55 (m, 2H), 1.65-1.74 (m, 4H), 1.85-1.94 (m, 2H), 2.38 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.76 (d, J = 13 Hz, 1H), 2.98 (dd, J = 13, 4.6 Hz, 1H), 3.29-3.32 (m, 1H), 4.56 (dd, J = 6.9, 4.6 Hz, 1H), 5.08 (dd, J = 6.9, 4.0 Hz, 1H)

[0092] 5-((3a*S*, 4*S*, 6a*R*)-5-オキシド-2-オキソヘキサヒドロ-1*H*-チエノ[3,4-*d*]イミダゾール-4-イル)ペンタン酸(21)

[化25]

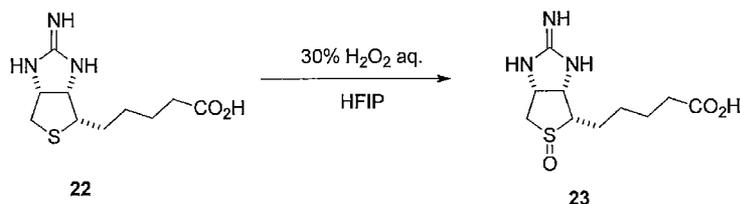


[0093] ビオチン (20) (50 mg, 0.21 mmol)の酢酸1 mL溶液に $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (94.6 mg, 0.62 mmol)を室温下加えた。1時間20分室温で攪拌した後、チオ硫酸ナトリウム(160 mg)を加え、減圧下にて溶媒を留去した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン-メタノール-水）で精製した後、さらに逆相カラムクロマトグラフィー（メタノール）にて精製し標題化合物51.6 mg（収率97%、薄黄色油状）を得た。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): δ =1.49-1.63 (m, 2H), 1.63-1.75 (m, 2H), 1.83-1.95 (m, 2H), 2.26 (m, 2H), 3.06 (dd, J = 13, 2.1 Hz, 1H), 3.12-3.16 (m, 1H), 3.50 (dd, J = 13, 2.1 Hz, 1H), 4.60 (dd, J = 8.9, 5.2 Hz, 1H), 4.67 (d, J = 8.9, 2.1 Hz, 1H)

[0094] 5-((3a*S*, 4*S*, 6a*R*)-2-イミノ-5-オキシドヘキサヒドロ-1*H*-チエノ[3,4-*d*]イミダゾール-4-イル)ペンタン酸 (23)

[化26]

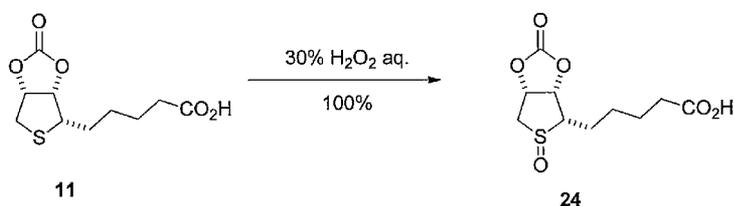


[0095] イミノビオチン(22) (5.0 mg, 0.021 mmol)の1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロパノール100 μL 溶液に30% H_2O_2 水溶液(5 μL)を室温下加えた。20分室温で攪拌した後、溶媒を減圧留去し、標題化合物5.2 mg (収率98%、ジアステレオ混合物 $dr = 1:1.6$ 、白色固体)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): $\delta = 1.55\text{--}1.82$ (m, 10.4H), 1.84–1.93 (m, 3.2H), 2.00–2.11 (m, 2H), 2.19–2.31 (m, 5.2H), 2.96 (dd, $J = 14, 7.5$ Hz, 1H), 3.01 (dd, $J = 16, 6.9$ Hz, 1H), 3.15 (dd, $J = 13, 5.8$ Hz, 1.6H), 3.23–3.28 (m, 1.6H), 3.48 (d, $J = 16$ Hz, 1H), 3.60 (dd, $J = 14, 1.7$ Hz, 1.6H), 4.86–4.91 (m, 2.6H), 4.95 (dd, $J = 8.6, 6.3$ Hz, 1.6H), 5.08 (dd, $J = 8.6, 6.3$ Hz, 1H)

[0096] 5-((3aS, 4S, 6aR)-5-オキシド-2-オキソテトラヒドロチエノ[3,4-d][1,3]ジオキソール-4-イル)ペンタン酸 (24)

[化27]



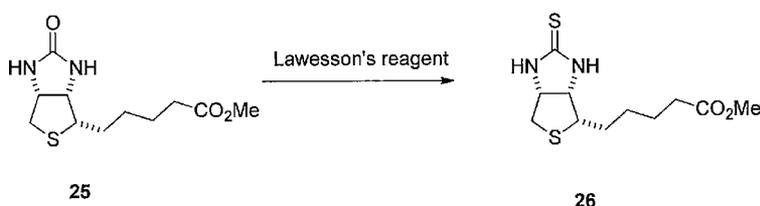
[0097] 11(0.6 mg, 0.002 mmol)の1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロイソプロパノール100 μL 溶液に30% H_2O_2 水溶液(5 μL)を室温下加えた。10分室温で攪拌した後、溶媒を減圧留去し、標題化合物0.6 mg (収率100%、ジアステレオ混合物 $dr = 1:1.1$ 、白色固体)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): $\delta = 1.60\text{--}1.80$ (m, 8.4H), 1.90–2.18 (m, 4.2H), 2.33–2.39 (m, 4.2H), 3.03–3.10 (m, 2.1H), 3.20 (dd, $J = 14, 5.8$ Hz, 1H), 3.30–

3.40 (m, 1.1H), 3.69 (d, J= 16 Hz, 1.1H), 3.96 (dd, J= 14, 1.2 Hz, 1H), 5.47 (dd, J= 7.4, 5.5 Hz, 1H), 5.53–5.58 (m, 2.1H), 5.73 (dd, J= 7.1, 5.5 Hz, 1.1H)

[0098] メチル5-((3a*S*, 4*S*, 6a*R*)-2-チオキソヘキサヒドロ-1*H*-チエノ[3,4-*d*]イミダゾール-4-イル)ペンタノエート (26)

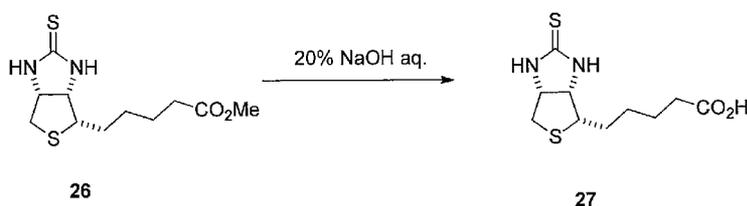
[化28]



[0099] ビオチンメチルエステル (25) (5.0 mg, 0.019 mmol)のトルエン200 μ L溶液にLawesson's reagent (5.3 mg, 0.013 mmol)を加えた。100 $^{\circ}$ Cにて13時間攪拌した後、室温に冷却し溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール) で不溶性化合物を除き粗生成物3.8 mg (白色固体)を得た。

[0100] 5-((3a*S*, 4*S*, 6a*R*)-2-チオキソヘキサヒドロ-1*H*-チエノ[3,4-*d*]イミダゾール-4-イル)ペンタン酸(27)

[化29]



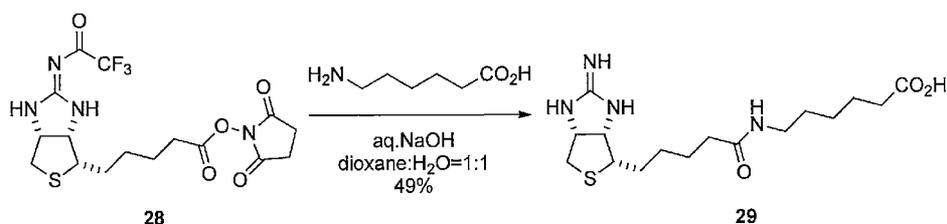
[0101] 26 を含む粗生成物2.4 mgのTHF溶液100 μ Lに20%水酸化ナトリウム水溶液100 μ Lを室温下加えた。60 $^{\circ}$ Cにて1時間攪拌した後、室温まで冷却し1 M塩酸500 μ Lを滴下し、溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール) で精製し、標題化合物0.7 mg (白色固体)を得た。

1 H NMR (CD₃OD): δ =1.42–1.51 (m, 2H), 1.57–1.72 (m, 3H), 1.75–1.82 (m

, 1H), 2.28–2.34 (m, 2H), 2.79 (d, J= 13 Hz, 1H), 2.96 (dd, J= 13, 4.6 Hz, 1H), 3.25–3.28 (m, 1H), 4.48 (dd, J= 8.3, 4.6 Hz, 1H), 4.67 (dd, J= 4.3, 8.3 Hz, 1H)

[0102] 5-((3aR, 6S, 6aS)-2-オキソヘキサヒドロチエノ[3,4-d]オキサゾール-6-イル)ペンタン酸 (29)

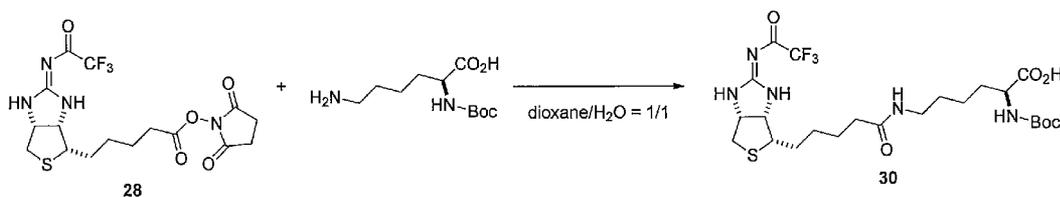
[化30]



[0103] 6-アミノヘキサン酸(3 mg, 0.023 mmol) の dioxane (500 μ L) と H₂O (500 μ L) の混合溶液に、水酸化ナトリウム水溶液を加え、pHが 9 程度になるよう調整した。28 (10 mg, 0.023 mmol) (市販品) を加え12 時間攪拌した後、エーテルを加え有機層を除去した。水層に対し塩酸で中和し、ろ過した。残渣をアセトンで洗浄し、減圧下溶媒を留去した。得られた固体をdioxane (500 μ L) と H₂O (500 μ L)に溶解し、29% アンモニア水を加え、3 時間攪拌した。減圧で溶媒を留去し、得られた結晶をジクロロメタン-メタノールの混合溶媒で洗浄することで、標題化合物 4 mg (収率 49%, 白色固体) を得た。
MS (ESI) m/z 357 (M+H)⁺

[0104] (S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-(5-((3aS, 4S, 6aR, Z)-2-((2,2,2-trifluoroacetyl)imino)hexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanamido)hexanoic acid (30)

[化31]



[0105] 28 (10 mg, 0.023 mmol) と N α -Boc-L-lysine(5 mg, 0.023 mmol)のジオリキ

サン/水の混合溶媒を18時間攪拌した後、エーテルを加え有機層を除去した。減圧で溶媒を留去し、得られた粗生成物はさらなる精製操作を経ずに次の反応に用いた。

[0106] (S)-2-アミノ-6-(5-((3a*S*, 4*S*, 6a*R*)-2-イミノヘキサヒドロ-1*H*-チエノ[3,4-*d*]イミダゾール-4-イル)ペンタンアミド)ヘキサン酸(31)

[化32]

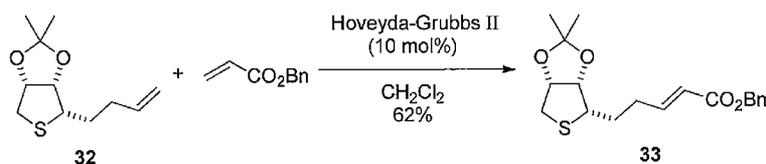


[0107] 30を含む粗生成物の dioxane (500 μ L) と H₂O (500 μ L) の混合溶液に、塩酸を加え、pHが3程度になるよう調整した。5時間攪拌した後、減圧下溶媒を留去した。得られた固体を dioxane (500 μ L) と H₂O (500 μ L) に溶解し、25% アンモニア水を加え、3時間攪拌した。減圧で溶媒を留去し、得られた結晶をジクロロメタン-メタノールの混合溶媒で洗浄することで、標題化合物 3.1 mg (二段階収率 35%, 白色固体) を得た。

MS: 371.80

[0108] (E)-ベンジル 5-((3a*S*, 4*S*, 6a*R*)-2,2-ジメチルテトラヒドロチエノ[3,4-*d*][1,3]ジオキサール-4-イル)-2-ペンテノエート(33)

[化33]



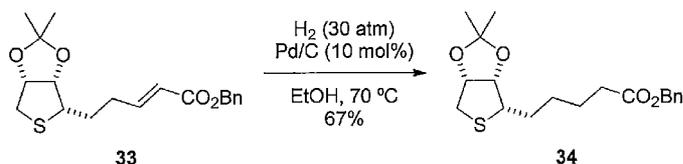
[0109] 32 (10 mg, 0.047 mmol) の CH₂Cl₂ 500 μ L 溶液に、アクリル酸ベンジル (70 μ L, 0.47 mmol) と第二世代 Hoveyda-Grubbs 触媒 (3 mg, 4.7 mmol) を加え、12時間攪拌を続けた。減圧で溶媒を留去し、得られた粗生成物をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製すると、

標題化合物 10 mg (62%, 黄色油状) が得られた。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.31$ (s, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.83–1.92. (m, 1H), 1.96–2.03 (m, 1H), 2.32–2.38 (m, 2H), 2.83 (dd, $J = 13, 4.3$ Hz, 1H), 2.87 (d, $J = 13$ Hz, 1H), 3.06–3.11 (m, 1H), 4.59 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.84 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H), 5.18 (s, 2H), 5.93 (d, $J = 16$ Hz, 1H), 7.01 (dt, $J = 16, 7$ Hz, 1H), 7.32–7.36 (m, 2H), 7.37 (d, $J = 4.6$ Hz, 3H)

[0110] ベンジル5-((3aS, 4S, 6aR)-2,2-ジメチルテトラヒドロチエノ[3,4-d][1,3]ジオキソール-4-イル)ペンタノエート(34)

[化34]

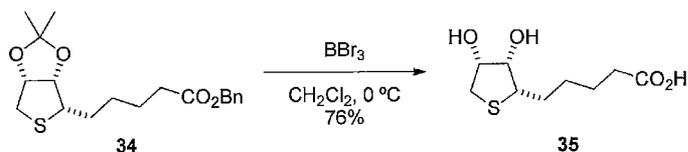


[0111] 33(10 mg, 0.028 mmol)の EtOH 1 mL 溶液に、パラジウム炭素 (10 w/w% Pd, 10 mol%, 5.0 mg) を加えた。30 atm の水素ガス存在下、70 °C、2 時間攪拌を続けた。反応液を室温まで冷却し、セライトの短いカラムを用い、エタノールで溶出した。減圧で溶媒を留去し、得られた粗生成物はさらなる精製操作を経ずに次の反応に用いた。得られた粗生成物をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー (ヘキサン-酢酸エチル) で精製すると、標題化合物 6.5 mg (67%, 薄黄色油状) が得られた。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.31$ (s, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.47–1.50 (m, 2H), 1.65–1.75 (m, 3H), 1.80–1.86 (m, 1H), 2.37 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.80 (dd, $J = 13, 3.5$ Hz, 1H), 2.85 (d, $J = 13$ Hz, 1H), 3.06–3.10 (m, 1H), 4.58 (t, $J = 4.3$ Hz, 1H), 4.88 (t, $J = 4.3$ Hz, 1H), 5.11 (s, 2H), 7.32–7.37 (m, 5H)

[0112] 5-((2S, 3S, 4R)-3,4-ジヒドロキテトラヒドロチオフェン-2-イル)ペンタン酸(35)

[化35]

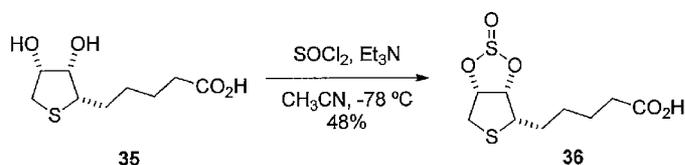


[0113] 34(2.5 mg, 7.1 μmol)の CH_2Cl_2 600 μL 溶液に、1M の三臭化ホウ素 (36 μL , 0.050 mmol)を -78°C にて加えた。 0°C 、3 時間攪拌した後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し乾燥後、減圧で溶媒を留去した。得られた粗生成物をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール) で精製すると、標題化合物 1.2 mg (収率 76%, 無色油状) が得られた。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.43\text{--}1.50$ (m, 2H), 1.65–1.75 (m, 3H), 1.80–1.88 (m, 1H), 2.38 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.81 (t, $J = 11$ Hz, 1H), 3.03 (dd, $J = 11, 7.0$ Hz, 1H), 3.38–3.43 (m, 1H), 4.11 (t, $J = 3.3$ Hz, 1H), 4.31 (t, $J = 9.1, 3.3$ Hz, 1H)

[0114] 5-((3aS, 4S, 6aR)-2-オキシドテトラヒドロチエノ[3,4-d][1,3,2]ジオキサチオール-4-イル)ペンタン酸(36)

[化36]



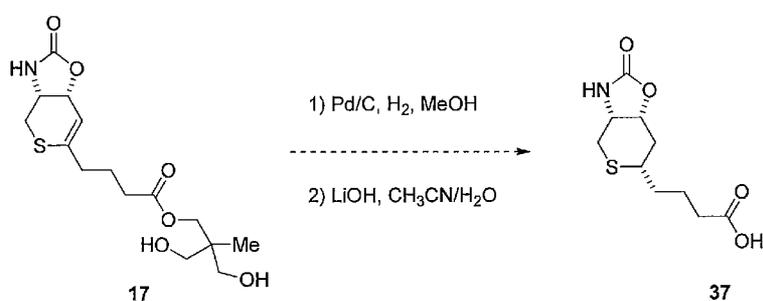
[0115] 35(1.2 mg, 5.4 μmol)の CH_3CN 400 μL 溶液に、塩化チオニル (0.5 μL , 7.2 μmol)を -78°C にて加えた。 0°C 、3 時間攪拌した後、飽和食塩水を加え、 CH_2Cl_2 で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し乾燥後、減圧で溶媒を留去した。得られた粗生成物をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール) で精製すると、標題化合物 700 μg (収率 48%, ジアステレオ混合物, $dr = 2:1$, 白色固体) が得られた。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.50\text{--}1.74$ (m, 12H), 1.85–1.95 (m, 6H), 2.39 (t, J

= 7.4 Hz, 6H), 3.08 (dd, J= 14, 5.8 Hz, 1H), 3.14 (dd, J= 14, 2.1 Hz, 1H), 3.31–3.37 (m, 4H), 3.64 (br, 1H), 4.27–4.31 (m, 2H), 5.19 (dd, J= 5.5, 4.3 Hz, 1H), 5.33–5.36 (m, 1H), 5.36 (dd, J= 5.5, 4.3 Hz, 2H), 5.54–5.57 (m, 2H)

[0116] 4-((3aR, 6S, 7aR)-2-オキソヘキサヒドロ-2H-チオピラノ[3,4-d]オキサゾール-6-イル)ブタン酸 (37)

[化37]



[0117] 化合物17をMeOHに溶解し触媒量のPd/Cを用いて水素雰囲気化で攪拌することにより2重結合の還元を行う。続いて得られた化合物のエステル部位をCH₃CN、H₂O混合溶媒下にLiOHを用いて加水分解することによって37を得る。

[0118] 追加実施例1：ビオチン改変体の合成（追加）

一般的方法

核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは、JEOL ECX500 (¹H NMR: 500MHz)、またはJEOL ECS400(¹H NMR: 400MHz) スペクトロメータを用いて測定した。化学シフトは、内部参照として重溶媒中の残存溶媒ピークに対する値としてppmで記載した (CDCl₃: δ = 7.26 ppm, CD₃OD: δ = 3.31 ppm, D₂O: δ = 4.79 ppm)。低分解能質量スペクトル (LHMS) は、Waters ZQ4000スペクトロメータによりESI-MSを用いて測定した。カラムクロマトグラフィーはシリカゲル Merk 60 (230–400 mesh ASTM) を用いて行った。反応は薄層クロマトグラフィー (TLC)、あるいは低分解能質量分析 (LRMS) によって追跡した。

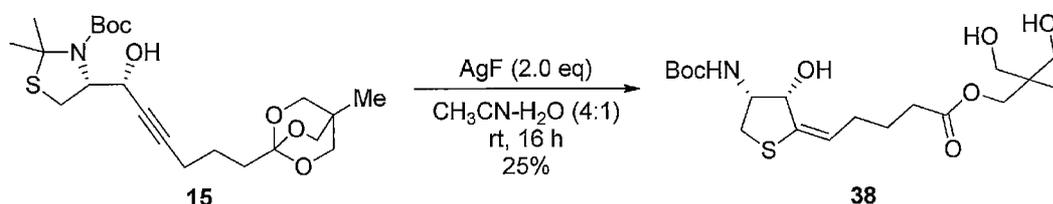
[0119] 逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、JASCO-HPLCシステムを用いて行った。210 nm または 254 nmの紫外光を用いて検出し、移動相はグラ

ジエント溶媒系（アセトニトリル／0.1% トリフルオロ酢酸MQ溶液）を用いた。分析については、YMC-Pack ODS-AM（150×4.6 mL）のカラムを用い、流速1 mL/minで行った。分取については、YMC-Pack ODS-AM（250×20 mL）のカラムを用い、流速8-10 mL/minで行った。

試薬は、Aldrich、東京化成工業株式会社（TCI）、関東化学株式会社（Kanto）、和光純薬工業株式会社、渡辺化学工業株式会社から購入した。全ての試薬及び溶媒は、特に明記が無い限り市販品をそのまま使用した。

[0120] (E)-(3S, 4R)-5-[4-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)-3-ヒドロキシジヒドロチオフェン-2(3H)-イリデン]]ペンタン酸3-ヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)-2-メチルプロピル (38)

[化38]



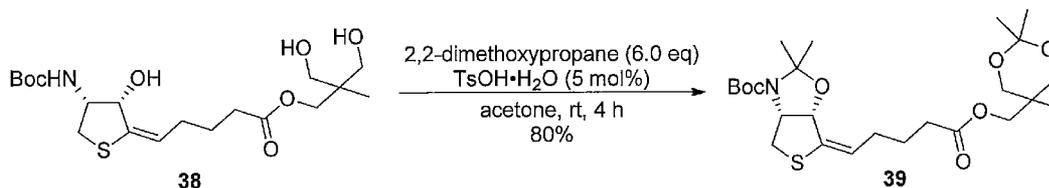
15 (2.0 g, 4.53 mmol)のアセトニトリル (38 mL)、水 (7 mL)の混合溶液に、フッ化銀 (1.15 g, 9.06 mmol) を加え、室温で16時間攪拌した。混合物をシリカゲルショートカラムに通し、酢酸エチルで溶出した。溶媒を減圧留去後、得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン／酢酸エチル＝1：1→1：2）で精製することで、標題化合物38 (0.475 g, 収率25%、黄色高粘性油状) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 0.91 (s, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.75 (quint., 2H, $J = 7.4$ Hz), 2.05 (q, 2H, $J = 7.4$ Hz), 2.38, (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.02 (dd, 1H, $J = 9.2, 10.3$ Hz), 3.08 (1H, dd, $J = 6.3, 10.3$ Hz), 3.45 (dd, 4H, $J = 14.9, 11.5$ Hz), 3.98-4.01 (m, 1H), 4.00 (2H, s), 4.39 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz), 5.66 (t, 1H, $J = 6.9$ Hz); LRMS (ESI): m/z 442 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$.

[0121] (E)-(3aR, 6aS)-2, 2-ジメチル-6-{5-オキソ-5-[(2, 2, 5-トリメチル-1, 3-ジオ

キサン-5-イル)メトキシ]ペンチリデン}テトラヒドロチエノ[3,4-d]オキサゾール-3(2H)-カルボン酸tert-ブチル (39)

[化39]

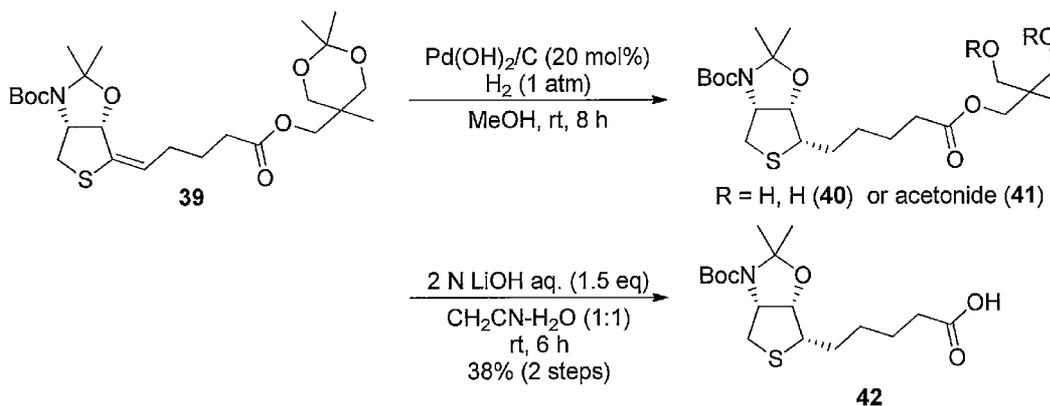


トリオール体38 (0.529 g, 1.26 mmol) と2,2-ジメトキシプロパン (0.93 mL, 7.56 mmol)の無水アセトン (13 mL) 溶液にp-トルエンスルホン酸一水和物 (12 mg, 0.063 mmol) を加え、混合物を室温で4時間攪拌した。トリエチルアミン (53 μ L, 0.378 mmol) を加えた後、溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=4 : 1) で精製することで、標題化合物39 (0.526 g、収率80%、無色油状) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 0.86 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.43 (s, 3H), 1.48 (s, 5H), 1.47-1.53 (m, 12 H), 1.62 (s, 3H), 1.76 (quint., 2H, $J = 7.5$ Hz), 2.11 (q, 2H, $J = 7.5$ Hz), 2.39 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.01 (td, 1H, $J = 11.5, 7.4$ Hz), 3.37 (m, 1H), 3.65 (s, 4H), 4.14 (dd, 2H, $J = 13.8, 10.9$ Hz), 4.50 (sext., 1H, $J = 5.7$ Hz), 4.96 (dd, 1H, $J = 8.0, 5.7$ Hz), 5.75 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz); LRMS (ESI): m/z 522 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

[0122] 5-[(3aR, 6S, 6aS)-3-(tert-ブトキシカルボニル)-2,2-ジメチルヘキサヒドロチエノ[3,4-d]オキサゾール-6-イル]ペンタン酸 (42)

[化40]



ジアセトニド体39 (0.310 g, 0.620 mmol) のメタノール (12 mL) 溶液にPearlman触媒 (10% パラジウム, 174 mg, 0.124 mmol) を加えた。アルゴンガスを封入後、水素ガス (1気圧, 風船) で置換し、室温で8時間攪拌した。混合物をセライトに通し、メタノールで溶出してPearlman触媒を除いた後、溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物をシリカゲルショートカラムに通し、ヘキサン/酢酸エチル=4:1で溶出することで、二重結合が還元された化合物40及び41の混合物を得た。この粗生成物をアセトニトリル (6.2 mL) と水 (6.2 mL) の混合溶媒に溶解した後、2規定水酸化リチウム水溶液 (0.47 mL, 0.93 mmol) を加え、室温で6時間攪拌した。水層をジエチルエーテルで洗浄した後、2規定塩酸を加えて酸性にした (pH < 5)。酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=2:1) で精製することで、標題化合物42 (85 mg, 2段階収率38%, 白色固体) を得た。

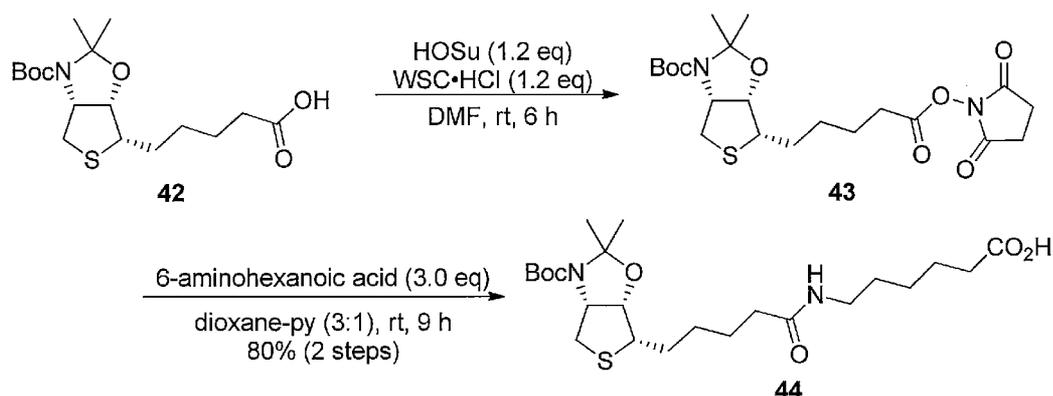
[0123] 40: $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 0.86 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.43 (s, 3H), 1.44–1.50 (m, 14H), 1.60 (s, 3H), 1.64–1.72 (m, 3H), 1.84 (sext., 1H, $J = 6.9$ Hz), 2.38 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 2.81 (t, 1H, $J = 10.9$ Hz), 3.02 (tt, 1H, $J = 12.6, 6.3$ Hz), 3.22–3.29 (m, 1H), 3.66 (s, 4H), 4.14 (s, 2H), 4.48 (ddd, 1H, $J = 18.9, 12.6, 6.3$ Hz), 4.59–4.64 (m, 1H); LRMS (ESI): m/z 524 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

41: $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 0.91 (s, 3H), 1.44–1.50 (m, 14H), 1.60 (s, 3H), 1.63–1.72 (m, 3H), 1.84 (sext., 1H, $J = 6.9$ Hz), 2.37 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 2.81 (t, 1H, $J = 10.9$ Hz), 3.02 (tt, 1H, $J = 12.6, 6.3$ Hz), 3.23–3.29 (m, 1H), 3.45 (dd, 4H, $J = 14.9, 10.9$ Hz), 4.00 (s, 2H), (ddd, 1H, $J = 18.9, 12.6, 6.3$ Hz), 4.59–4.64 (m, 1H); LRMS (ESI): m/z 484 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

42: $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 1.43–1.51 (m, 14H), 1.60 (s, 3H), 1.61–1.72 (m, 3H), 1.84 (sext., 1H, $J = 6.9$ Hz), 2.30 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 2.81 (t, 2H, $J = 10.9$ Hz), 3.03 (tt, 1H, $J = 12.6, 6.3$ Hz), 3.22–3.29 (m, 1H), (ddd, 1H, $J = 18.9, 12.6, 6.3$ Hz), 4.59–4.64 (m, 1H); LRMS (ESI): m/z 382 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

[0124] 6- $\{[(3aR, 6S, 6aS)-3-(\text{tert-ブトキシカルボニル})-2,2\text{-ジメチルヘキサヒドロチエノ}[3,4\text{-}d]\text{オキサゾール-6-イル}\}$ ペンタナミド}ヘキササン酸 (44)

[化41]



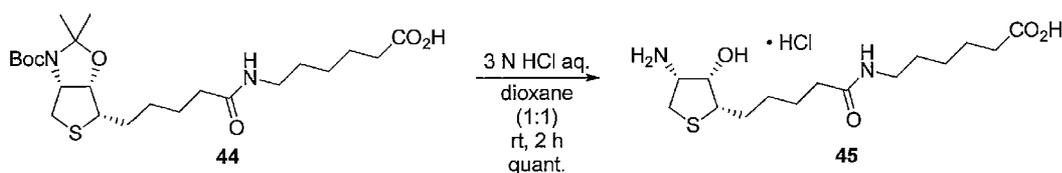
カルボン酸42 (48.5 mg, 0.135 mmol) とN-ヒドロキシスクシンイミド (18.6 mg, 0.162 mmol) のN,N-ジメチルホルムアミド (1.4 mL) 溶液に1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (WSC·HCl, 31.1 mg, 0.162 mmol) を加え、混合物を室温で6時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、酢酸エチルに溶解し、少量の0.5規定塩酸で3度洗浄し、飽和食塩水で洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去することで、活性エステル体43を得た。得られた43をジオキサン (1.6 mL) と水 (0.5 mL) の混合溶媒

に溶解し、6-アミノヘキサン酸 (42.1 mg, 0.321 mmol) を加え、室温で9時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、1規定水酸化ナトリウム水溶液を加え、水層をジエチルエーテルで2度洗浄した。水層に1規定塩酸を加えて酸性にし (pH < 5)、酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した。硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン/メタノール=10:1) で精製することで、標題化合物44 (40 mg, 2段階収率80%, 無色高粘性油状) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 1.35–1.40 (m, 3H), 1.42–1.54 (m, 16H), 1.60 (s, 3H), 1.61–1.72 (m, 4H), 1.84 (sext., 1H, $J = 6.9$ Hz), 2.19 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 2.30 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 2.80 (t, 2H, $J = 10.9$), 3.02 (tt, 1H, 1H, $J = 12.6, 6.3$ Hz), 3.17 (t, 2H, $J = 6.9$ Hz), 3.22–3.29 (m, 1H), (ddd, 1H, $J = 18.9, 12.6, 6.3$ Hz), 4.58–4.64 (m, 1H); LRMS (ESI): m/z 495 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

[0125] (3R, 4S, 5S)-5-[5-(5-カルボキシルペンチルアミノ)-5-オキソペンチル]-4-ヒドロキシテトラヒドロチオフェン-3-アンモニウムクロリド (45)

[化42]



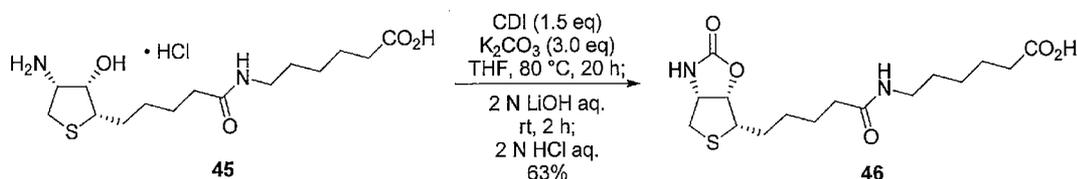
カルボン酸44 (76.9 mg, 0.163 mmol) のジオキサン (5 mL) 溶液に3規定塩酸 (5 mL) を加え、混合物を室温で2時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、ジエチルエーテルで洗浄し、得られた固体を減圧下乾燥することで、標題化合物45を定量的に得た。更に精製が必要な場合は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン/メタノール=1:1) を行うことで、白色固体として得ることができる。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ : 1.27–1.37 (m, 4H), 1.51 (quint., 2H, $J = 7.5$ Hz), 1.55–1.64 (m, 5H), 1.76–1.82 (m, 1H), 2.23 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 2.38 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 2.93 (t, 1H, $J = 10.9$ Hz), 3.14–3.18 (m, 3

H), 3.58 (ddd, 1H, J = 9.2, 6.3, 2.9 Hz), 3.85 (ddd, 1H, J = 10.9, 7.5, 3.5 Hz), 4.39 (t, 1H, J = 2.9 Hz); LRMS (ESI): m/z 334 [M+H]⁺.

[0126] 6-{5-[(3aR, 6S, 6aS)-2-オキソヘキサヒドロチエノ[3,4-d]オキサゾール-6-イル]ペンタナミド}ヘキサン酸 (46)

[化43]



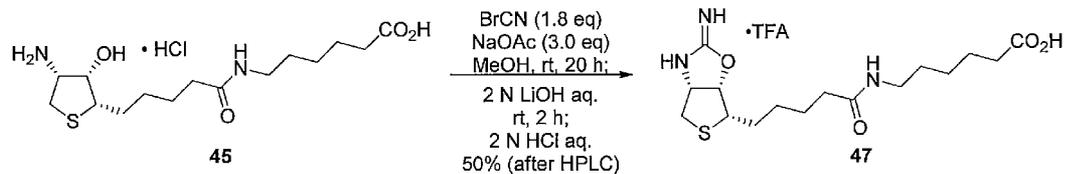
アンモニウム塩45 (15.0 mg, 0.0407 mmol) のテトラヒドロフラン (4 mL) 溶液に炭酸カリウム (16.9 mg, 0.122 mmol) とカルボニルジイミダゾール (CDI, 9.9 mg, 0.0611 mmol) を加え、混合物を80°Cで20時間攪拌した。室温まで冷却した後、2規定水酸化ナトリウム水溶液 (30 μ L) を加え、室温で2時間攪拌した。水 (0.5 mL) を加え、水層をジエチルエーテルと酢酸エチルでそれぞれ2度ずつ洗浄した後、2規定塩酸で酸性にした (pH 3)。溶媒を減圧留去した後、ジクロロメタン/メタノール (1:1) の混合溶液を加え、固体をろ過分離除去した。溶媒を減圧留去し、得られた粗生成物を逆相HPLC (YMC-Pack ODS-AM, グラジエント: 0-10-11-41-42-55 min; 0-0-21-51-100-100% CH₃CN in 0.1% TFA MQ, ramp time 30 min (21-51%), t_R = 30.2 min) で精製することで、標題化合物46 (9.2 mg, 2段階収率63%, 白色固体) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 1.35-1.40 (m, 2H), 1.41-1.55 (m, 4H), 1.58-1.77 (m, 5H), 1.86 (sext., 1H, J = 6.3 Hz), 2.20 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 2.30 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 2.73 (d, 1H, J = 13 Hz), 2.95 (dd, 1H, J = 13.0, 4.5 Hz), 3.17 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 3.28 (dd, 1H, J = 6.7, 3.6 Hz), 4.53 (dd, 1H, J = 6.7, 4.5 Hz), 5.05 (dd, 1H, J = 6.7, 3.6 Hz); LRMS (ESI): m/z 381 [M+Na]⁺.

[0127] (3aR, 6S, 6aS)-6-[5-(5-カルボキシペンチルアミノ)-5-オキソペンチル]テトラヒドロチエノ[3,4-d]オキサゾール-2(3H)-イミニウム 2,2,2-トリフルオ

ロアセテート (47)

[化44]

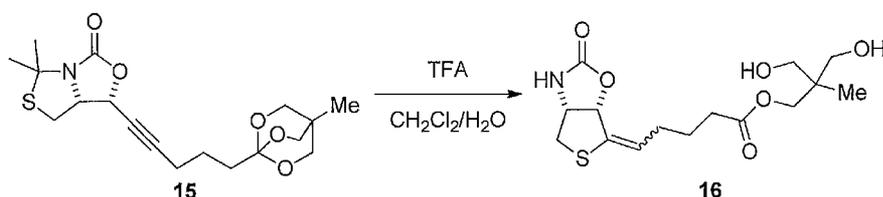


アンモニウム塩45 (14.5 mg, 0.0393 mmol) のメタノール (2 mL) 溶液に酢酸ナトリウム (9.7 mg, 0.118 mmol) と臭化シアン (7.5 mg, 0.0707 mmol) を加え、混合物を室温で20時間攪拌した。2規定水酸化ナトリウム水溶液 (30 μ L) を加え、室温で2時間攪拌した。水 (0.5 mL) を加え、水層をジエチルエーテルで2度洗浄した後、2規定塩酸で酸性にした (pH 3)。溶媒を減圧留去した後、ジクロロメタン/メタノール (1:1) の混合溶液を加え、固体をろ過で分離除去した。溶媒を減圧留去し、得られた粗生成物を逆相HPLC (YMC-Pack ODS-AM, グラジエント: 0-10-11-41-42-55 min; 0-0-18-48-100-100% CH_3CN in 0.1% TFA MQ, ramp time 30 min (18-48%), $t_R = 26.5$ min) で精製することで、標題化合物47 (9.2 mg, 2段階収率50%, 白色固体) を得た。

^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ : 1.31-1.38 (m, 2H), 1.41-1.49 (m, 2H), 1.53 (quint., 2H, $J = 7.5$ Hz), 1.58-1.68 (m, 4H), 1.69-1.76 (m, 2H), 2.26 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 2.39 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.19 (q, 2H, $J = 6.9$ Hz), 3.49 (ddd, 1H, $J = 9.2, 6.3, 2.0$ Hz), 4.94 (dd, 1H, $J = 6.9, 5.2$), 5.55 (dd, 1H, $J = 7.0, 4.0$ Hz); LRMS (ESI): m/z 358 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0128] 3-ヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)-2-メチルプロピル5-(3aR,6aS)-2-オキソテトラヒドロチエノ[3,4-d]オキサゾール-6(6aH)-イリデン)ペンタノエート(16)

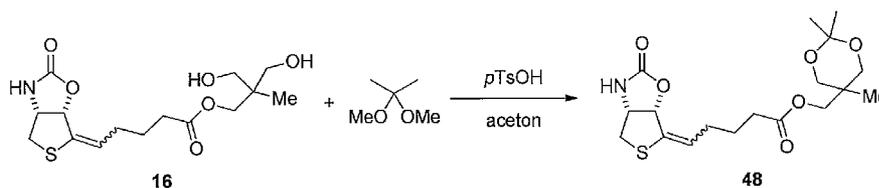
[化45]



15 (78 mg, 0.21 mmol) の CH_2Cl_2 (2 mL) と H_2O (50 μL) 混合溶液に、トリフルオロ酢酸 (2 mL) をゆっくりと滴下した。24 時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し乾燥後、減圧で溶媒を留去した。得られた粗生成物はさらなる精製操作を行わずに、次の操作を行った。

[0129] (2,2,5-トリメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メチル 5-((3aR,6aS)-2-オキソテトラヒドロチエノ[3,4-d]オキサゾール-6(6aH)-イリデン)ペンタノエート (48)

[化46]

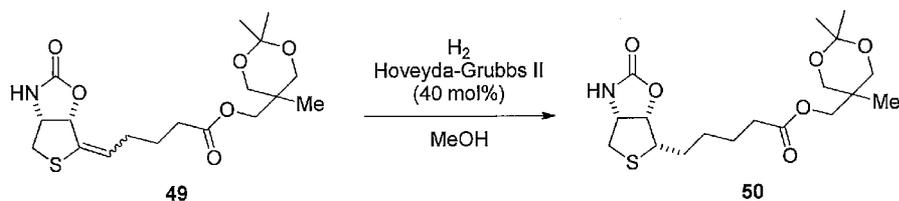


16を含む粗精製物、2,2-ジメトキシプロパン (77 μL , 0.63 mmol) のアセトン 1 mL 溶液に *p*トルエンスルホン酸 (3.2 mg, 0.02 mmol) を加えた。50 °C、10 時間攪拌を続けた後、トリエチルアミンを90 μl 加えた。溶液をシリカの短いカラムに通し、酢酸エチルとトリエチルアミンの混合溶媒で洗浄した。減圧で溶媒を留去し、得られた粗生成物をゲル浸透クロマトグラフィーで精製すると、標題化合物48(40 mg、二段階収率 53%、無色油状) が得られた。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): δ = 0.89 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.76-1.83 (m, 2H), 1.85-1.94 (m, 2H), 2.41 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.02 (d, J = 12 Hz, 1H), 3.24 (dd, J = 12, 5.5 Hz, 1H), 3.68 (s, 4H), 4.17 (s, 2H), 4.64 (m, 1H), 5.47 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 5.92 (t, J = 7.3 Hz, 1H)

[0130] (2,2,5-トリメチル-1,3-ジオキサン-5-イル)メチル 5-((3aR,6S,6aS)-2-オキソテトラヒドロチエノ[3,4-d]オキサゾール-6-イル)ペンタノエート (50)

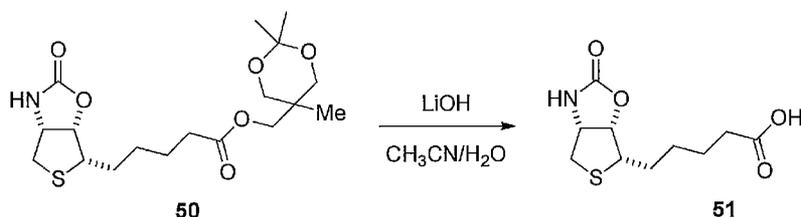
[化47]



49 (1.5 mg, 3.9 μmol) の MeOH (500 μL) 溶液に、第二世代Hoveyda-Grubbs 触媒(0.8 mg, 1.6 μmol) を加えた。30 atm の水素ガス存在下、18 時間 攪拌を続けた。反応液を室温まで冷却し、セライトの短いカラムを通し、メタノールでセライトを洗浄した。減圧で溶媒を留去し、粗生成物を得た。

[0131] 5-((3aR, 6S, 6aS)-2-オキソヘキサヒドロチエノ[3,4-d]オキサゾール-6-イル)ペンタン酸 (51)

[化48]



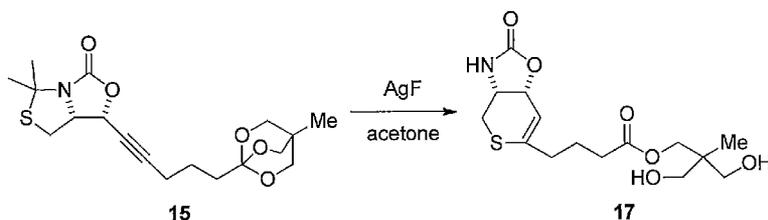
50を含む粗精製物の CH_3CN (500 μL) と H_2O (500 μL) の混合溶液に、水酸化リチウム (10 μmol) を加えた。12 時間攪拌した後、1 M の塩酸で反応を停止し、シリカゲルのカラムクロマトグラフィーに通し、メタノールで洗浄した。減圧で溶媒を留去し、得られた粗生成物をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール) で精製すると、標題化合物51(700 μg 、二段階収率 73%、白色固体) が得られた。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): δ =1.47-1.55 (m, 2H), 1.65-1.74 (m, 2H), 1.85-1.94 (m, 2H), 2.38 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.76 (d, J = 13 Hz, 1H), 2.98 (dd, J = 13, 4.6 Hz, 1H), 3.29-3.32 (m, 1H), 4.56 (dd, J = 6.9, 4.6 Hz, 1H), 5.08 (dd, J = 6.9, 4.0 Hz, 1H)

[0132] 3-ヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)-2-メチルプロピル 4-((3aR, 7aR)-2-オキソ-3, 3a, 4, 7a-テトラヒドロ-2H-チオピラノ[3,4-d]オキサゾール-6-イル)

ブタノエート (17)

[化49]

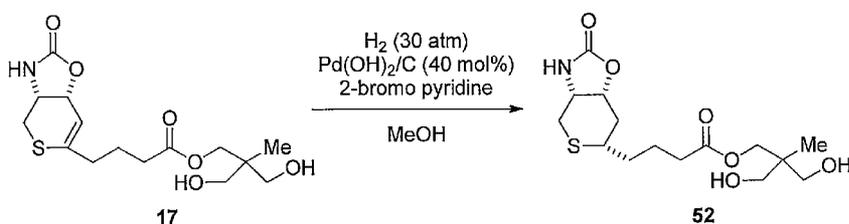


15 (50 mg, 0.13 mmol) のアセトン (1 mL) と H₂O (100 μL) 混合溶液に、フッ化銀(I) (34 mg, 0.26 mmol) を加えた。9 時間攪拌した後、セライトでろ過し、酢酸エチルで溶出した。得られた粗生成物をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル) で精製すると、標題化合物 17 が 38 mg (収率 77%, 白色固体) 得られた。

¹H NMR (CD₃OD): δ = 0.93 (s, 3H), 1.80–1.90 (m, 2H), 2.34 (t, J= 7.8 Hz, 2H), 2.40 (t, J= 7.5 Hz, 2H), 2.66 (dd, J= 13, 11 Hz, 1H), 2.99 (dd, J= 13, 4.1 Hz, 1H), 3.48 (dd, J= 18, 11 Hz, 4H), 4.03 (s, 2H), 4.64 (m, 1H), 4.97 (dd, J= 7.3, 4.6 Hz, 1H), 5.92 (d, J= 4.6 Hz, 1H)

[0133] 3-ヒドロキシ-2-(ヒドロキシメチル)-2-メチルプロピル 4-((3aR, 6S, 7aR)-2-オキソヘキサヒドロ-2H-チオピラノ[3,4-d]オキサゾール-6-イル)ブタノエート (52)

[化50]



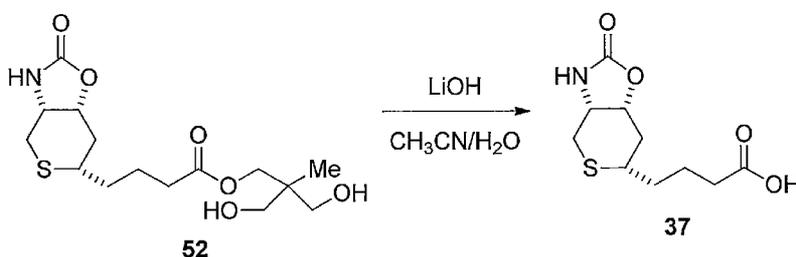
17 (10 mg, 0.029 mmol)、2-ブロモピリジン (28 μL, 0.29 mmol) の MeOH 1 mL 溶液に水酸化パラジウム炭素 (10 w/w% Pd, 40 mol%, 0.011 mmol) を加えた。30 atm の水素ガス存在下、24 時間攪拌を続けた。反応液をセライトの短いカラムに通し、メタノールでセライトを洗浄した。減圧で溶媒を留

去し、得られた粗生成物をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン-メタノール）で精製すると、標題化合物52（7 mg、収率 69%、無色油状）が得られた。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): $\delta = 1.08$ (s, 3H), 1.82-1.91 (m, 2H), 1.95-2.05 (m, 4H), 2.56 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 2.76 (dd, $J = 14, 5.0$ Hz, 1H), 3.00 (dd, $J = 14, 9.2$ Hz, 1H), 3.09-3.16 (m, 1H), 3.48 (dd, $J = 15, 11$ Hz, 4H), 4.18 (s, 2H), 4.24-4.31 (m, 1H), 4.96-5.00 (m, 1H)

[0134] 4-((3aR, 6S, 7aR)-2-オキソヘキサヒドロ-2H-チオピラノ[3,4-d]オキサゾール-6-イル)ブタン酸 (37)

[化51]



52 (2 mg, 5.4 μmol) の CH_3CN (500 μL) と H_2O (500 μL) の混合溶液に、水酸化リチウム (10 μmol) を加えた。12 時間攪拌した後、1 M の塩酸で反応を停止し、シリカゲルのカラムクロマトグラフィーに通し、メタノールで洗浄した。減圧で溶媒を留去し、得られた粗生成物をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン-メタノール）で精製すると、標題化合物37 (1.1 mg、収率 83%、白色固体) が得られた。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): $\delta = 1.79$ -1.88 (m, 2H), 1.95-2.05 (m, 4H), 2.53 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.76 (dd, $J = 14, 5.1$ Hz, 1H), 2.99 (dd, $J = 14, 9.0$ Hz, 1H), 3.07-3.13 (m, 1H), 4.24-4.30 (m, 1H), 4.97-5.00 (m, 1H)

[0135] 実施例 2 : 変異体ストレプトアビジンの製造

(1) 発現ベクターの構築

野生型コアストレプトアビジンをコードする遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号 1 に示す。また、本発明では、低免疫原性（改変体）ストレプトア

ビジンとして国際公開WO2010/09455に記載されているmcSA314（本明細書中、LISA314WT又はLISA314とも称する）を使用した。mcSA314は、配列番号2に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において以下の変異の全てを有する、ストレプトアビジン変異体である。

- (1) 10番目のアミノ酸残基のチロシンがセリンに置換している変異：
 - (2) 71番目のアミノ酸残基のチロシンがセリンに置換している変異：
 - (3) 72番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異：
 - (4) 89番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換している変異：
 - (5) 91番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異：
- 及び
- (6) 104番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がアスパラギンに置換している変異：

[0136] 発現ベクターは、上記の野生型ストレプトアビジンおよび改変体ストレプトアビジンと精製用タグであるズブチリジンプロドメイン部分の融合体タンパク質が発現するように設計を行った。N'末端側にズブチリジンプロドメイン遺伝子配列が組み込まれたベクター、pPAL7ベクター（BIO-RAD社製）を利用しコドンを合わせ野生型ストレプトアビジンもしくは改変体ストレプトアビジンがC末端側に融合するタンパク質を発現するベクターを調製した。

具体的には、上記の配列を鋳型にし、5'端側にHindIIIサイト、3'端側にEcoRIサイトをPCRにより付加する下記のプライマー1及び2を用い、PCR後、制限酵素HindIII、EcoRIにて処理を行った。

プライマー1：GCTCTTCAAAGCTTTGGCCGAAGCTGGTATCACTG（配列番号13）

プライマー2：CTCGAGGAATTCTTAGCTAGCAGCAGAAGGCTTAAC（配列番号14）

[0137] 制限酵素処理をしたサンプルは電気泳動の後、ゲル精製を行った。同様に

pPAL7ベクター（BIO-RAD社製）も酵素処理を実施し、ゲル精製を行った。精製したベクターおよびPCR産物は2xRapid Ligation BufferとT4DNA Polymerase（共にPromega社）を用いて指定の方法でライゲーションを実施した。大腸菌のトランスフォーメーションは50マイクロリットルのDH5 α コンピテントセル（TOYOBO社製）に対し、2マイクロリットルのライゲーション産物を添加し実施した。プラスミドの抽出はMiniprep Kit（QIAGEN社製）を用いて実施し、得られたプラスミドについてシーケンス解析により配列の確認を実施した。

[0138] (2) 変異株の作成

各バリエーション作製に用いたオリゴDNAは5'側が15塩基オーバーラップするように、PrimerSTAR Mutagenesis Basal Kit（タカラバイオ）の説明書に従い設計した。下記のプライマーを使用し、LISA314が挿入されたpColdTFベクターを鋳型とし、Site-Directed Mutagenesis法により塩基配列の置換によるコドン配列の変更を行いアミノ酸配列の変換を行った。その後、制限酵素DpnIにて鋳型プラスミドを切断し、大腸菌の形質転換を行った。

[0139] プライマー：

S45N Fw: TATGAAAACGCCGTGGGTAATGCCGAA （配列番号15）

S45N Rv: CACGGCGTTTTTCATAGGTGCCGGTCAG （配列番号16）

D128N Fw: CGTTGGCGGTGCTGATGCTCGTATCAACAC （配列番号17）

D128N Rv: GGTGCTGATGCTAAGATCAACACTCAGTGG （配列番号18）

[0140] S45Nとは、配列番号2に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において33番目のアミノ酸残基のセリン（S）がアスパラギン（N）に置換している変異を意味する。

D128Nとは、配列番号2に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において116番目のアスパラギン酸（D）がアスパラギン（N）に置換している変異を意味する。

[0141] 上記により、配列番号2に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において、

- (1) 10番目のアミノ酸残基のチロシンがセリンに置換している変異：
 - (2) 71番目のアミノ酸残基のチロシンがセリンに置換している変異：
 - (3) 72番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異：
 - (4) 89番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換している変異：
 - (5) 91番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異：
 - (6) 104番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がアスパラギンに置換している変異：
 - (7) 33番目のアミノ酸残基のセリンがアスパラギンに置換している変異；及び
 - (8) 116番目のアスパラギン酸がアスパラギンに置換している変異
- を有する変異体ストレプトアビジン（本書中、LISA314 N45 N128とも称する）を産生する大腸菌を作成した。配列番号2に記載のアミノ酸配列において上記（1）～（8）の変異を有するアミノ酸配列を配列番号3に示す。

[0142] (3) 組換えタンパク質の発現

変異体ストレプトアビジンの遺伝子配列を組み込んだpPAL7発現ベクターを大腸菌BL21（BIO-RAD社）に常法に従いトランスフェクションを行った。タンパク質の発現は以下のように実施した。すなわち、大腸菌培養液の細胞密度がOD（600nm）0.5-0.7となるまで37度にて培養を行い、最終濃度1mMになるようにIPTG（isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside）を添加し、タンパク質発現を誘導し、10℃～30℃好ましくは16℃にて24時間以上の培養を行った。培養の後、菌体を遠心分離により細胞を集め、タンパク質精製までマイナス20℃で保存した。

[0143] (4) 組換えタンパク質の粗精製

組換えタンパク質（LISA314-V11）の粗精製は、改変ズブチリジンとズブチリジンプロドメインとの結合性を利用したアフィニティークロマトグラフィーを行った。具体的には、改変ズブチリジンをSperflow 6% agarose ビーズに固定したカラム（Bio-Scale Mini Profinity eXact Cartridge, BIO-RAD社）を使用した。

大腸菌の調製は細胞溶解液として10mM sodium phosphate, pH7.2 - 5.6、10xBugBuser reagent (Novagen)、核酸分解酵素 (Benzonase) を添加し細胞の溶解を行った。溶解は室温で行い、溶解した液は35,000xg、30分間の遠心分離をおこなった。遠心分離後上清を総可溶性タンパク質とした。

[0144] 結合バッファー・洗浄バッファー1 : 10 mM リン酸ナトリウム、洗浄バッファー2 : 10 M リン酸ナトリウム, 300 mM、溶出バッファー : 10 M 酢酸ナトリウム, 100 mM フッ化ナトリウム、カラム再生バッファー : 100 mM リン酸、カラム保存バッファー : 10 mM リン酸ナトリウムを精製に使用した。なおバッファーpHについては天然型ストレプトアビジンの精製では、pH6.1、改変体ストレプトアビジンの精製ではpH6.8に調製した。

[0145] 精製は以下の手順でおこなった。

10カラムボリュームのバッファーでカラムを平衡化した。次に、大腸菌の総可溶性タンパク質を2ml/minの流速でカラムへアプライした。カラムへのアプライ後10カラムボリュームの洗浄バッファー1でカラムを洗浄した。次に10カラムボリュームの洗浄バッファー2でカラムの洗浄を行った。その後、1カラムボリュームの溶出バッファーを注入し30分間室温でインキュベーションを行った。インキュベーションの後、溶出バッファー3カラムボリュームでタンパク質の溶出を行った。その後、5カラムボリュームのカラム再生バッファーでカラムの再生を行った。最後に5カラムボリュームのカラム保存バッファーでカラムを洗浄し精製を終了した。

精製の結果を図1に示す。

[0146] (5) 粗精製された組換えタンパク質の高純度化精製

以降、バッファーのpHについては、改変体ストレプトアビジンはpH7.0とす

る。

粗精製された組換えタンパク質は、セラミックハイドロキシアパタイトカラムによる精製の準備として10,000 MWC0の限外ろ過膜を使用し遠心ろ過にて濃縮をした。濃縮後、脱塩カラム用い、5 mM リン酸ナトリウム溶液にバッファを置換した。セラミックハイドロキシアパタイトカラムはCHT2-1(BIO-RAD社)を使用し、すべての作業の流速は2ml/minで行った。初めに10カラムボリュームの5 mMリン酸ナトリウムでカラムの平衡化を行った。次にバッファ置換された粗精製サンプルをアプライシカラムへ吸着させた。洗浄を6カラムボリューム行った後、5mM リン酸ナトリウム、500mM 塩化ナトリウムバッファでタンパク質の溶出を行った。

[0147] 実施例3：ビオチン-HRP標識体との競合解析

ELISA用プレートH（住友ベークライト）に精製された変異体タンパク質を5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 μl 、4°Cオーバーナイトの条件で固相化を行った。固相化の後、SuperBlock Blocking Buffer（サーモサイエンティフィック社）を用いて200 $\mu\text{l}/\text{ウエル}$ 、5分間のブロッキングを行った。その後、10 μM 、100 $\mu\text{l}/\text{ウエル}$ で実施例1に記載の化合物11（即ち、(3aS,4S,6aR)-2-オキソテトラヒドロチエノ[3,4-d][1,3]ジオキサール-4-イル)ペンタン酸）を1時間、室温で反応させた。洗浄の後、12.5 nM、100 $\mu\text{l}/\text{ウエル}$ 、1時間、室温でBiotin-HRP標識体を反応させた。洗浄後、100 $\mu\text{l}/\text{ウエル}$ 、室温、30分で反応させた。発色の度合いを比較した結果（図2）、化合物11と標識体が競合している様子が確認された。

[0148] 実施例4：LISA314バリエーションの製造

(1) LISA314バリエーションの発現ベクターの調製

各バリエーション作製に用いたオリゴDNAは5'側が15塩基オーバーラップするように、PrimerSTAR Mutagenesis Basal Kit（タカラバイオ）の説明書に従い設計した。下記のプライマーを使用し、LISA314が挿入されたpCold TFベクターを鋳型とし、Si

te-Directed Mutagenesis法により塩基配列の置換によるコドン配列の変更を行いアミノ酸配列の変換を行った。その後、制限酵素DpnIにて鋳型プラスミドを切断し、大腸菌の形質転換を行った。

プライマー：

LISA314 V21 Fw: TGGAGCgatCAGCTGGGCgatACCTTT (配列番号19)

LISA314 V21 Rv: CAGCTGatcGCTCCAGGTGCCGGTAAT (配列番号20)

[0149] LISA314バリエーションであるLISA314 V21は、LISA314に対してさらに、N23D、S27Dの変異を有する。N23Dとは、配列番号2に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において11番目のアミノ酸残基のアスパラギン(N)がアスパラギン酸(D)に置換している変異を意味する。S27Dとは、配列番号2に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において15番目のアミノ酸残基のセリン(S)がアスパラギン酸(D)に置換している変異を意味する。

[0150] 即ち、LISA314 V21は、配列番号2に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において、

- (1) 10番目のアミノ酸残基のチロシンがセリンに置換している変異；
- (2) 71番目のアミノ酸残基のチロシンがセリンに置換している変異；
- (3) 72番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異；
- (4) 89番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換している変異；
- (5) 91番目のアミノ酸残基のアルギニンがリジンに置換している変異；
- (6) 104番目のアミノ酸残基のグルタミン酸がアスパラギンに置換している変異；
- (7) 11番目のアミノ酸残基のアスパラギンがアスパラギン酸に置換している変異；
- (8) 15番目のアミノ酸残基のセリンがアスパラギン酸に置換している変異；

を有する変異体ストレプトアビジンであり、このアミノ酸配列を配列番号4

に示す。

[0151] (2) 組換えタンパク質の発現

各ミュータントタンパク質の発現は pCold TFベクター（タカラバイオ）のマニュアルに従い実施した。具体的には、発現ベクターを大腸菌BL21（タカラバイオ）に常法に従いトランスフォーメーションを行い、大腸菌培養液の細胞密度がOD (600nm) = 0.5-0.7となるまで37度で培養を行い、その後15度で1時間静置し最終濃度1mMになるようにIPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) を添加し、タンパク質発現を誘導し、15度で24時間の培養を行った。培養の後、菌体を遠心分離により細胞を集め、タンパク質精製までマイナス20℃で保存した。

[0152] (3) 組換えタンパク質の粗精製

組換えタンパク質の粗精製は、6xHis-tagを使用したアフィニティークロマトグラフィーを行った。具体的にはNi Sepharose 6 Fast Flow (GEヘルスケア) を担体として使用した。

大腸菌の調製は細胞溶解液としてB-PER (Thermo Scientific)、Lisonase Bioprocessing ReagentをB-PER 1mLあたり3mL添加し細胞の溶解を行った。溶解は室温で行い、溶解した液は27,000xg、20分間の遠心分離を行った。遠心分離後、上清を総可溶性タンパク質とした。

10カラムボリュームの結合/洗浄バッファー (20mM Tris-NaCl、500mM NaCl、pH8) でカラムの平衡化およびサンプルアプライ後のカラムの洗浄を行った。また、3カラムボリュームの溶出バッファー (20mM Tris-NaCl、500mM NaCl、400mM イミダゾール、pH8) で結合タンパク質の溶出を行った。

[0153] (4) TFタグの切断および除去

5μgの粗精製タンパク質に対し、5UのHRV 3C Proteaseを使用しタグの切断を行った。4℃で24時間反応後、変性バッファー (

20mM Tris-NaCl、6M Guanidinium chloride、500mM NaCl、pH8) で変性を行い、Ni Sepharose 6 Fast Flow を使用したアフィニティークロマトグラフィーを行った。

[0154] 実施例5：結晶構造解析

(1) 結晶化条件

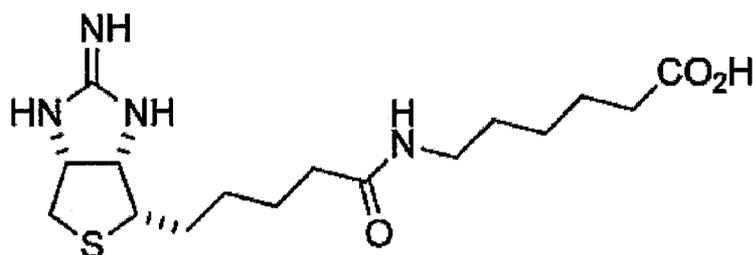
LISA314-ビオチン

シットイングドロップ蒸気拡散法を用いて、20℃で結晶化を行った(図3)。蛋白質溶液は、9 mg/ml LISA314、15 mM tris-HCl pH7.5、150 mM NaClとした。ビオチンは、LISA314精製途中に過剰量添加した。結晶化母液(60 μl)には、0.2 M Ammonium Sulfate、0.1 M Sodium acetate trihydrate pH5.2、22% (w/v) Polyethylene glycol 4000を用い、結晶化内液は蛋白質溶液0.5 μl、結晶化母液0.5 μlを混合したものとした。

[0155] LISA314-V21-iminobiotintail

シットイングドロップ蒸気拡散法を用いて、20℃で結晶化を行った。蛋白質溶液は、10 mg/ml LISA314-V21、20 mM tris-HCl pH7.5、250 mM NaClとした。Iminobiotintail (実施例1の化合物29、以下に構造を示す) は、LISA314-V21精製途中に過剰量添加した。

[0156] [化52]



[0157] 結晶化母液(60 μl)には、0.1 M Sodium acetate trihydrate pH4.5、30% (w/v) Polyethylene glycol 1500を用い、結晶化内液は蛋白質溶液0.5 μl、結晶化母液0.5 μlを混合したものとした。

[0158] (2) 結果

結晶構造の解析結果を図4及び図5に示す。

ストレプトアビジンのビオチンと水素結合を作っている23番目（配列番号2に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において11番目）のアミノ酸Asn23をAlaに置き換えたN23Aの変異型ストレプトアビジンは、ビオチンとの結合力が大きく低下することが報告されている。また、この変異型ストレプトアビジンのビオチンと複合体を形成した結晶構造も報告されている（PDB ID、1N43。1N43の立体構造およびN23Aの近傍を、我々のLISA314の結晶構造を比較すると、LISA314ではAsn23は近傍のGly26と水素結合を形成し相互作用している（図4右上のLISA314のN23とG26を結ぶ点線、白抜き矢印で示されている）。一方、1N43では、Ala23とGly26にはこれに相当する水素結合は存在していない（図4左下の1N43の黒矢印で示された部分）。このため、LISA314と比較して1N43におけるN23Aの変異はN23からS27にかけてのloop構造を不安定化すると考えられ、N23Dの変異を施すことにより、この23番目（配列番号2に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において11番目）のアミノ酸とGly26との水素結合が維持され、N23からS27にかけてのloop構造が安定するのではないかと考えた。実際、図4右下に示すようにN23Dの変異を施したLISA314-V21の結晶構造では、この水素結合が保存されている（白抜き矢印で示された点線）。変異型ストレプトアビジンLISA314-V21はビオチンではなくイミノビオチンとの相互作用が強くなることを期待して作成された。そのため、N23Dの変異に加えてS27Dの変異を施しており、LISA314-V21のAsp27はイミノビオチンのN原子と相互作用している。

[0159] 実施例6：SPRによるアフィニティー解析

(1) 発現ベクターの構築（LISA314 V21；N23D、S27など）

Biacoreによるアフィニティー解析に用いるタンパク質は pET-21a (+) ベクター（ミリポア・メルク社）により発現させ、封入体を巻き戻すことでリコンビナントタンパク質を調整した。具体的には、pET-21a (+) ベクター を制限酵素 BamHI と XhoI を用いて直さかを行った。次に、In-Fusion HD Cloning Kit（クローン

テック社)のマニュアルに従い直鎖化を実施したベクターに合うPCRプライマーを設計し、前述の各バリエーションLISA314 V21発現ベクター (pCold TF) をテンプレートとしてPCRを実施した。増幅された配列はアガロースゲル電気泳動にて目的のバンドを切り出し、DNAを抽出して精製を行った。直鎖化されたベクターと精製されたPCR産物とをIn-Fusion HD Cloning Kitを使用しライゲーションを行った。

プライマー:

For pET21a(+) Fw: AATGGGTCGCGGATCCGCCGAAGCAGGTATTACCGGCAC (配列番号 21)

For pET21a(+) Rv: GGTGGTGGTGTCTCGAGGCTGGCCGCGCTCGGTTAACTTTG (配列番号 22)

[0160] (2) LISA314 V21 バリエーション発現ベクターの構築

LISA314 V21の各種バリエーション作製に用いたオリゴDNAは5'側が15塩基オーバーラップするように、PrimerSTAR Mutagenesis Basal Kit (タカラバイオ)の説明書に従い設計した。以下のプライマーを使用し、上述のLISA314 V21が挿入されたベクターを鋳型とし、Site-Directed Mutagenesis法により塩基配列の置換によるコドン配列の変更を行いアミノ酸配列の変換を行った。その後、制限酵素DpnIにて鋳型プラスミドを切断し、大腸菌の形質転換を行った。

[0161] プライマー

S45A Fw: TATGAAgcaGCCGTGGGTAATGCGGAA (配列番号 23)

S45A Rv: CACGGCtgcTTCATAGGTGCCGGTCAG (配列番号 24)

S45Q Fw: TATGAAcagGCCGTGGGTAATGCGGAA (配列番号 25)

S45Q Rv: CACGGCctgTTCATAGGTGCCGGTCAG (配列番号 26)

S45L Fw: TATGAActgGCCGTGGGTAATGCGGAA (配列番号 27)

S45L Rv: CACGGCcagTTCATAGGTGCCGGTCAG (配列番号 28)

S45I Fw: TATGAAatcGCCGTGGGTAATGCGGAA (配列番号 29)

S45I Rv: CACGGCgatTTCATAGGTGCCGGTCAG (配列番号30)
S45H Fw: TATGAAcatGCCGTGGGTAATGCGGAA (配列番号31)
S45H Rv: CACGGCcatgTTCATAGGTGCCGGTCAG (配列番号32)
S45T Fw: TATGAAaccGCCGTGGGTAATGCGGAA (配列番号33)
S45T Rv: CACGGCggtTTCATAGGTGCCGGTCAG (配列番号34)
S45V Fw: TATGAAgtgGCCGTGGGTAATGCGGAA (配列番号35)
S45V Rv: CACGGCcacTTCATAGGTGCCGGTCAG (配列番号36)
S45N Fw: TATGAAAACGCCGTGGGTAATGCGGAA (配列番号37)
S45N Rv: CACGGCGTTTTTCATAGGTGCCGGTCAG (配列番号38)

[0162] S45A、S45Q、S45L、S45I、S45H、S45T、S45V、及びS45Nはそれぞれ、配列番号2に記載のコアストレプトアビジンのアミノ酸配列において33番目のアミノ酸残基のセリンが、アラニン(A)、グルタミン(Q)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、ヒスチジン(H)、トレオニン(T)、バリン(V)及びアスパラギン(N)に置換していることを示す。即ち、LISA314 V 21に対して更に、上記のS45A、S45Q、S45L、S45I、S45H、S45T、S45V及びS45Nの何れかのアミノ酸変異が導入された変異体が製造される。これらの変異体のアミノ酸配列を配列表の配列番号5~12に示す。

[0163] (3) 組換えタンパク質の発現

各変異体タンパク質の発現は 目的のバリエーション発現遺伝子が挿入された pET-21a (+) ベクターを大腸菌BL21 (DE3) (ミリポア・メルク社) に常法に従いトランスフォーメーションを行い、大腸菌培養液の細胞密度がOD (600nm) = 0.5-0.8となるまで37度で培養を行い、最終濃度1mMになるようにIPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) を添加し、タンパク質発現を誘導した。4-16時間で培養の後、菌体を遠心分離により細胞を集め、タンパク質精製までマイナス20℃で保存した。

[0164] (4) 組換えタンパク質 (封入体) の調整

大腸菌の調製は細胞溶解液としてB-PER (Thermo SCIENTIFIC)

I F I C)、Lisonase Bioprocessing Reagent を B-PER 1 mL あたり 3 mL 添加し細胞の溶解を行った。溶解は室温で行い、溶解した液は 27,000 × g、20 分間の遠心分離を行った。遠心分離後、上清を破棄しペレットを封入体として回収した。回収した封入体は MilliQ 水で 10 倍希釈した B-PER 10 mL にて再懸濁し 27,000 × g、20 分間の遠心分離により再回収する洗浄作業を 3 回行った。最後に界面活性剤の除去のためにミリQにより再懸濁を行い遠心分離により回収を行った。回収した封入体は小分け分注をしマイナス 80 °C にて凍結保存した。

[0165] (5) 封入体の巻戻し

封入体の巻戻しは凍結保存した封入体を変性バッファー (20 mM Tris-HCl、6 M グアニジン塩酸塩、200 mM NaCl、pH 1.5) で可溶化した。ビオチンの除去を行うために 100 倍のボリュームの透析バッファー (変性バッファーと同じ) に対して 4 時間、2 回を実施した。その後、可溶化した液の吸光度 280 nm によるタンパク質濃度が 40–50 mg/mL となるように濃度を透析バッファーで調節した。巻戻しは、希釈法を用いた。具体的にはスターラーで攪拌している 50 mL の希釈バッファー (20 mM Tris-HCl、200 mM NaCl、pH 8.0) に濃度調節したタンパク質溶液 100 マイクロリットルを滴下し希釈することで巻戻しを行った。

[0166] (6) 巻戻したタンパク質の精製

希釈法により巻き戻したタンパク質は、cOmplete His-Tag Purification Resin (ロシュ社) を用いてアフィニティークロマトグラフィーを実施した。これらの精製タンパク質を濃縮しゲル濾過クロマトグラフィーにより 4 量体画分の分取を実施した。

巻戻したタンパク質の精製の一例を図 6 に示す。

[0167] (7) SPR による化合物とのアフィニティー解析

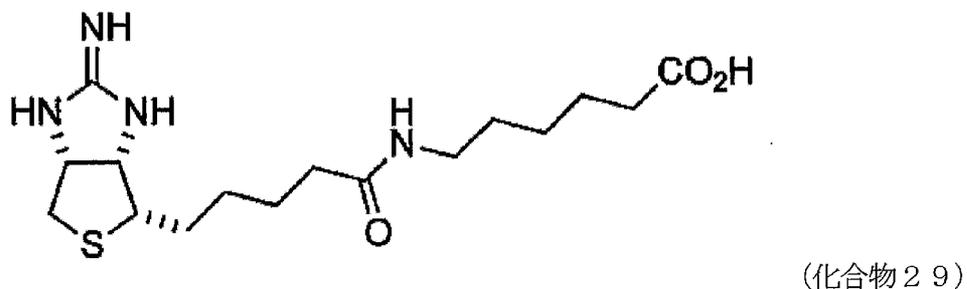
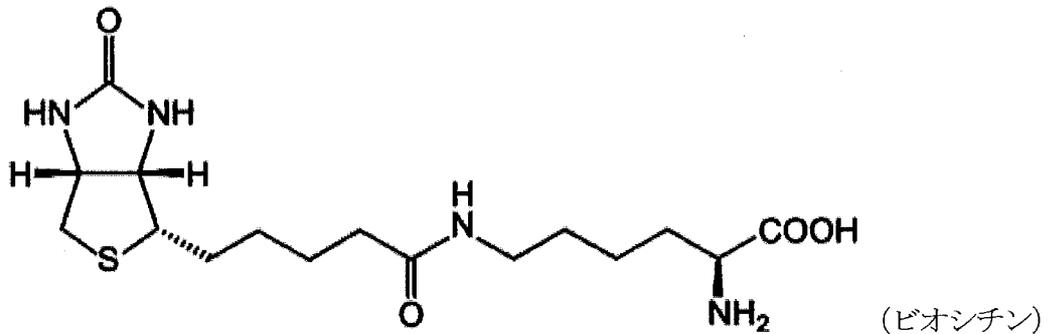
アフィニティー解析には Biacore T100 を用いた。具体的には

、ゲル濾過クロマトグラフィーにより分取してきたタンパク質を Sensor Chip NTAを使用し固定化した。ランニングバッファーは、0.5% Tween 20、HBS-P+を使用した。ニッケルのNTAへの固定化、リガンドのキャプチャーは附属のテンプレートプログラムにより実施した。

[0168] (8) ビアコアアッセイ

センサーチップへのリガンドの固定化量は、マストランスポートリミテーションを抑制するために1608RU~8042RUの範囲に収まるようにした。アナライトにはビオシチンおよび実施例1で合成した化合物29（構造を以下に示す）を使用した。なお、ビオシチンは、ビオチンの主たる存在形態である。

[0169] [化53]



[0170] アナライトの濃度は、ビオシチンの場合1 μ Mから2倍希釈8系列を調製し、化合物29の場合16 μ Mから2倍希釈12系列を調製した。測定は、流速30 μ l/分、コンタクトタイムは120秒、Dissociation timeは600秒で測定を行った。データの解析は、全濃度のセンサーグラ

ムを解析ソフトウェアに取り込み、平衡値解析を行い、解離定数KDの算出を行った。そのグラフを図7～図9に示し、算出されたKD値を表1に示す。その結果、LISA314V21と化合物29との相互作用はビオシチンとの相互作用の約2倍程度強いことが分った。

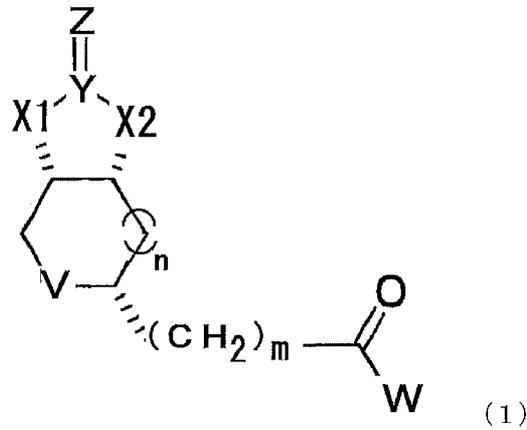
[0171] [表1]

	解離定数 : KD (M)
ビオシチンとLISA314 WT	2. 378E-9
ビオシチンとLISA314 V21	3. 480E-7
化合物29とLISA314 V21	1. 540E-7

請求の範囲

[請求項1] 下記式（1）で示される化合物。

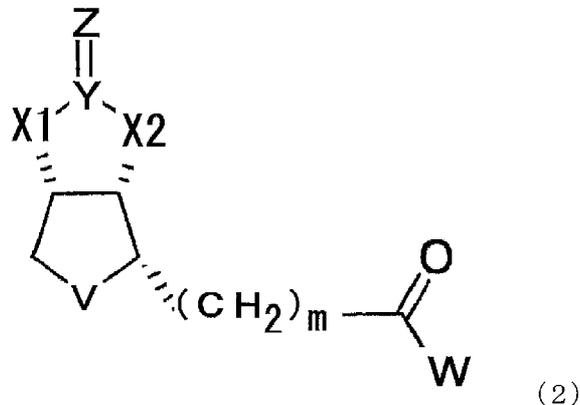
[化1]



（式中、X1及びX2はそれぞれ独立にO又はNHを示し、YはC又はSを示し、ZはO、S又はNHを示し、VはS又はS⁺-O⁻を示し、nは0又は1の整数を示し、mは1から10の整数を示し、Wは-OH、-NH(CH₂)_pCOOH、又は-NH(CH₂)_qC(NH₂)COOHを示す。ここでp及びqはそれぞれ独立に1から10の整数を示す）。

[請求項2] nが0である、下記式（2）で示される、請求項1に記載の化合物。

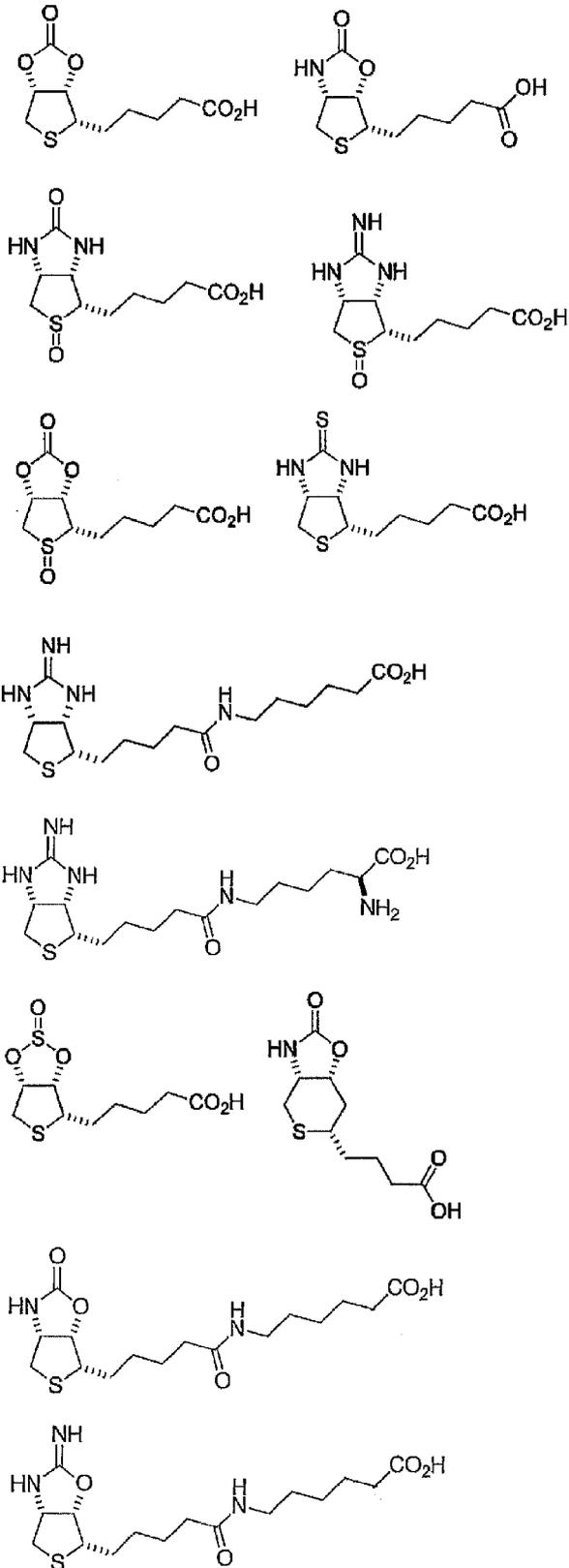
[化2]



（式中、X1、X2、Y、Z、V、m、及びWは請求項1と同義である）

[請求項3] 以下の何れかの化合物。

[化3]



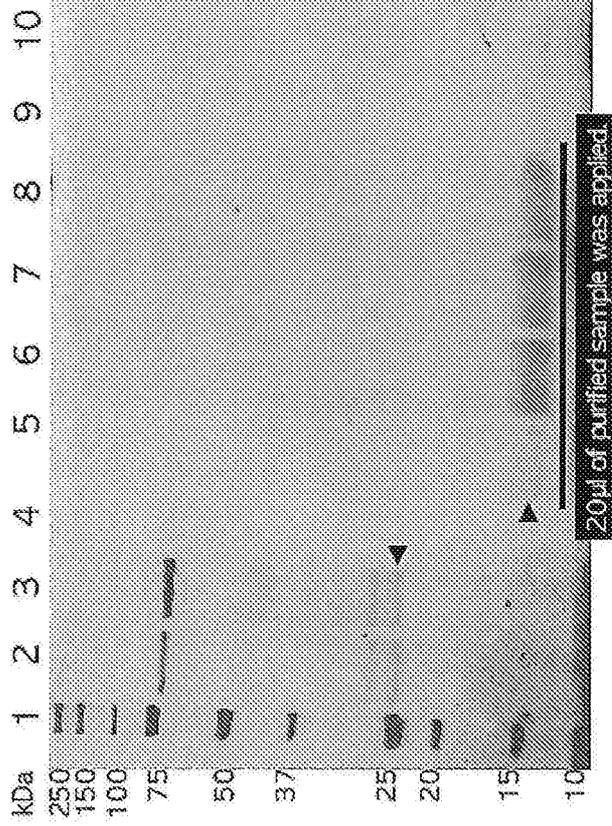
- [請求項4] 配列番号3から12の何れかに記載のアミノ酸配列を含む、ストレプトアビジン変異体。
- [請求項5] 請求項4に記載のストレプトアビジン変異体をコードするDNA。
- [請求項6] 請求項4に記載のストレプトアビジン変異体に分子プローブを結合させることにより得られる、ストレプトアビジン変異体-分子プローブ結合物。
- [請求項7] 請求項6に記載のストレプトアビジン変異体-分子プローブ結合物を含む、治療剤又は体内あるいは体外診断剤。
- [請求項8] (a) 請求項6に記載のストレプトアビジン変異体-分子プローブ結合物；及び (b) 請求項1から3の何れかに記載の化合物で標識した体内あるいは体外診断用又は治療用物質：を含む治療又は体内あるいは体外診断キット。
- [請求項9] (a) 天然ビオチン又はビオシチンとの親和性を低下させたストレプトアビジン変異体、及び；
(b) 上記ストレプトアビジン変異体に対して高い親和性を有するビオチン改変体：
を含む、治療又は体内あるいは体外診断のための試薬キット。
- [請求項10] (a) 天然ビオチン又はビオシチンとの親和性を低下させたストレプトアビジン変異体と分子プローブとの結合物、及び
(b) 上記ストレプトアビジン変異体に対して高い親和性を有するビオチン改変体で標識した体内あるいは体外診断用又は治療用物質：
を含む治療又は体内あるいは体外診断キット。

[X] 1

LISA314

6xHis eXact-tag LISA314

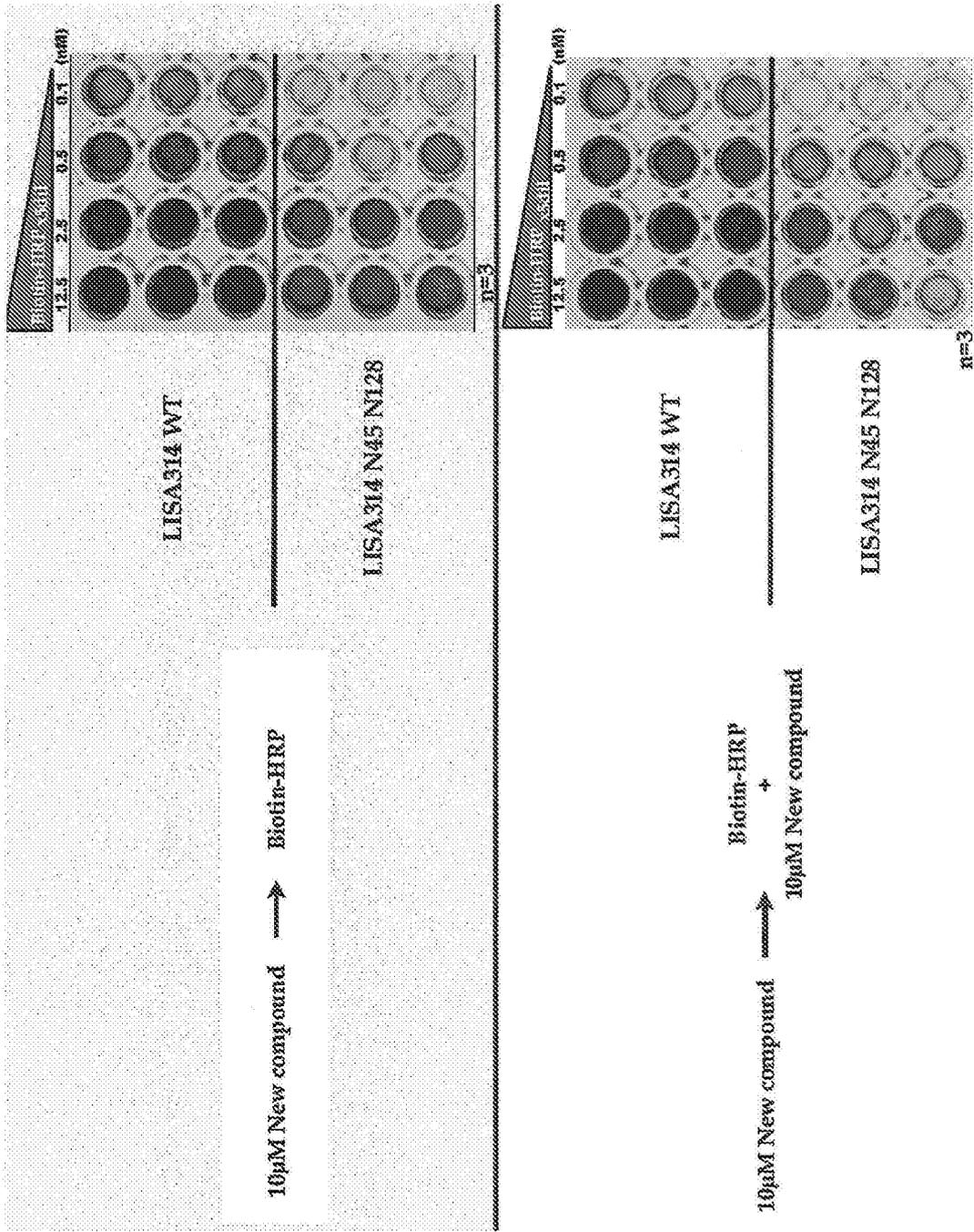
eXact-tag purification



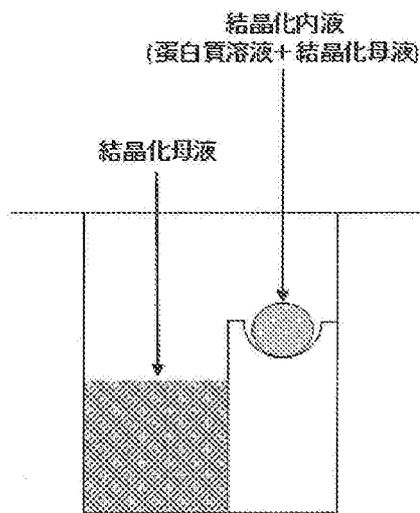
1. Marker
2. His tag purified sample
3. Flow through
4. Wash
5. Elution 0 (pre-incubation 1ml)
6. Elution 1 (post incubation 1ml)
7. Elution 2 (post incubation 1ml)
8. Elution 3 (post incubation 1ml)
9. Regeneration 1st 1ml
10. Regeneration 2nd 1ml

20µl of purified sample was applied.

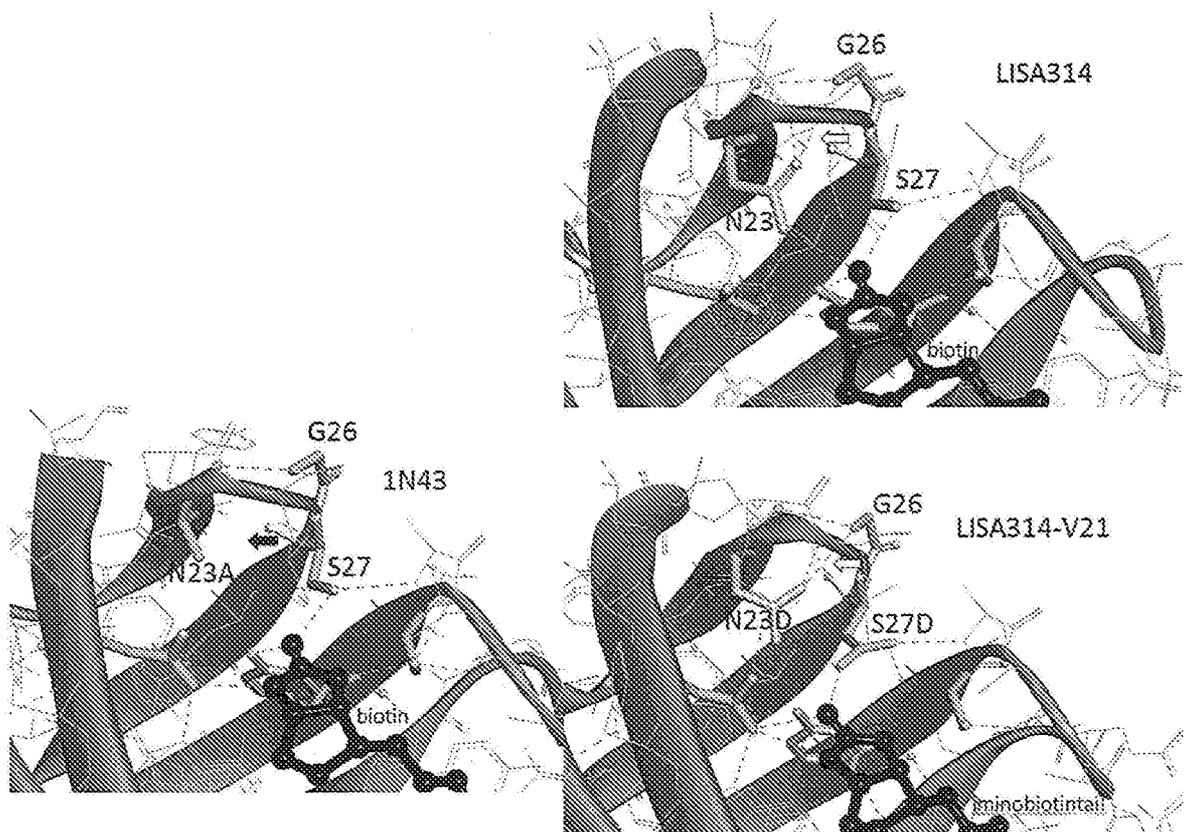
[2]



[図3]

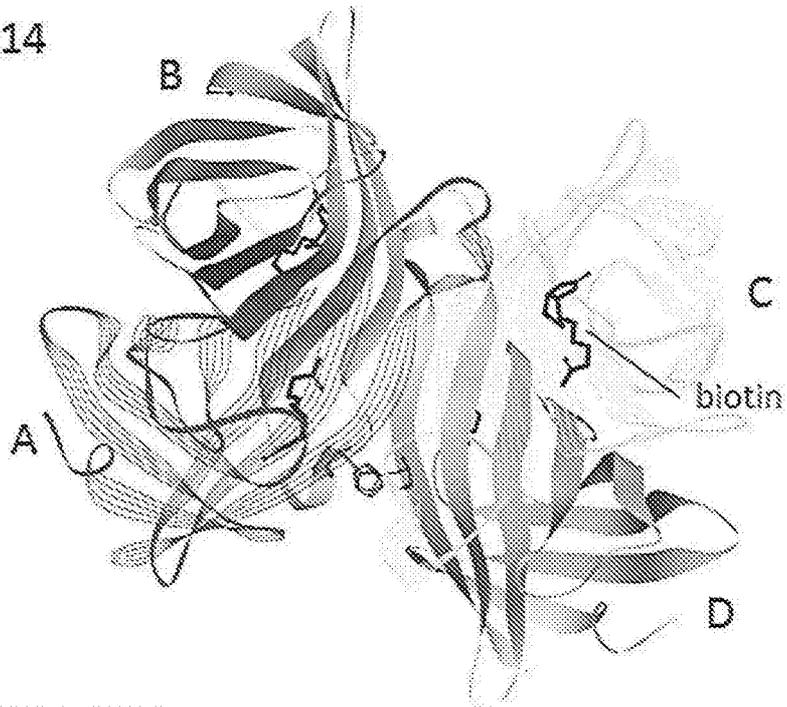


[図4]

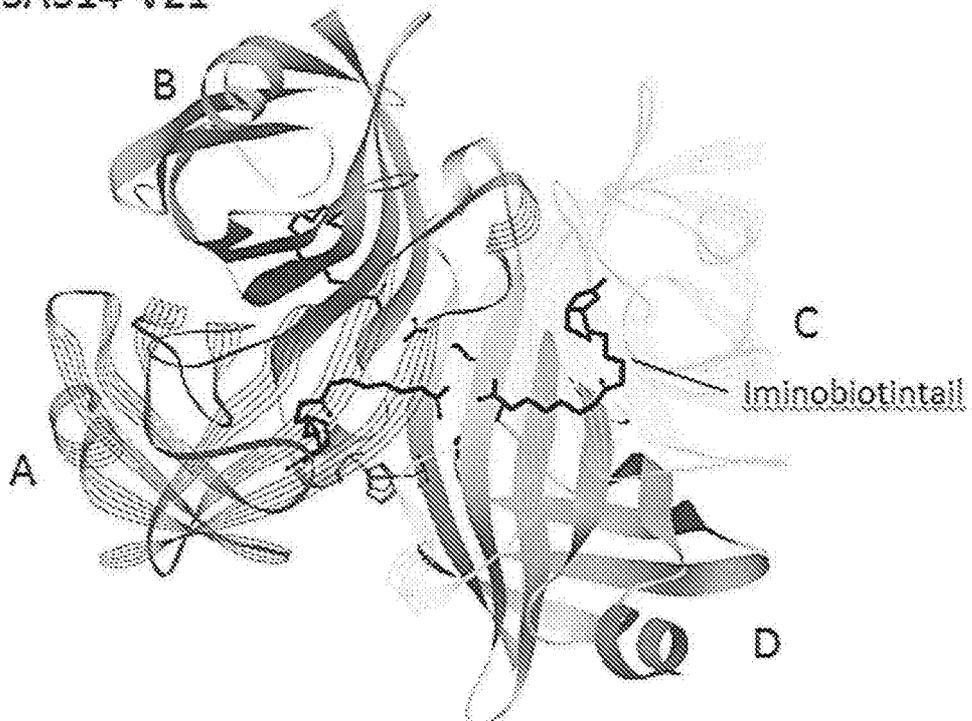


[図5]

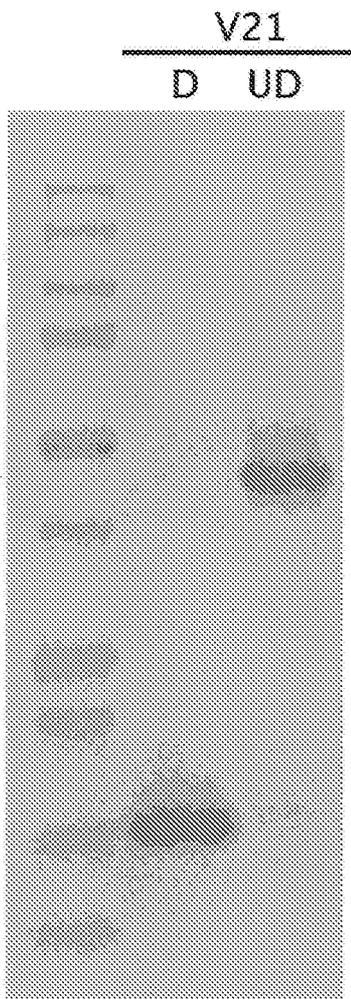
(A) LISA314



(B) LISA314-V21

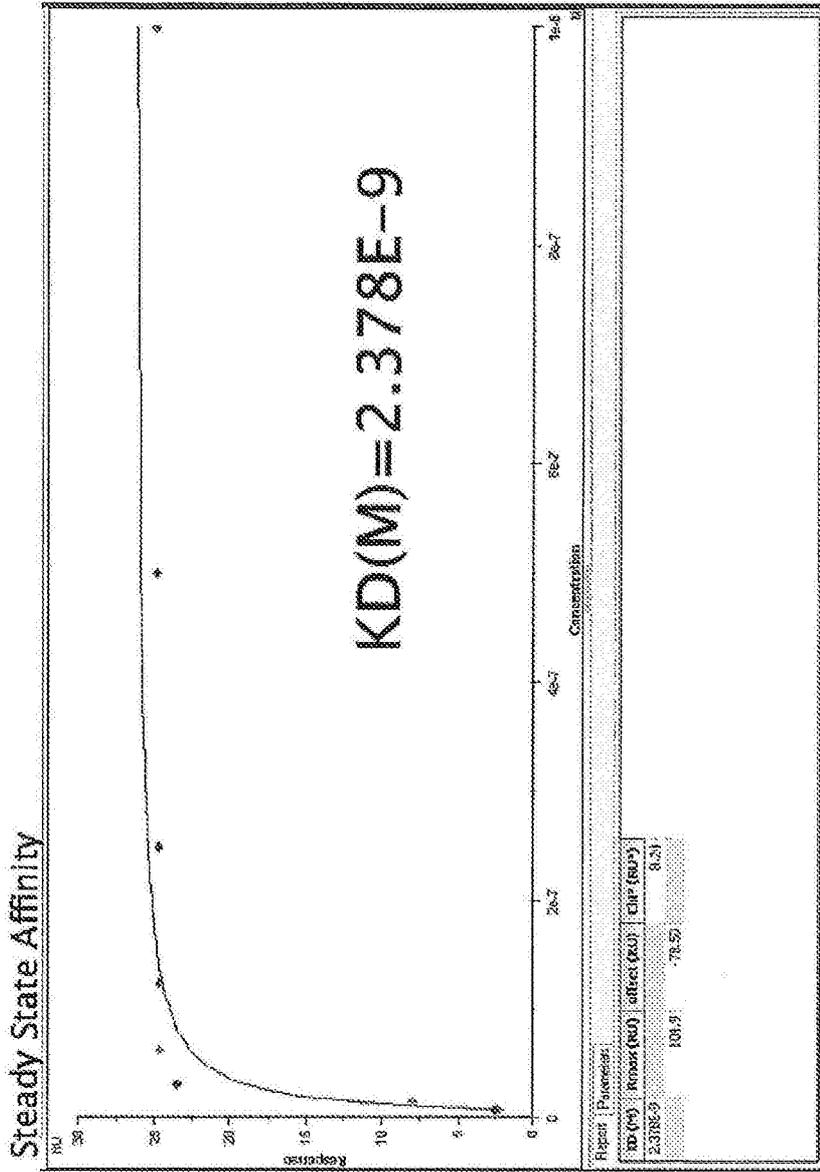


[図6]

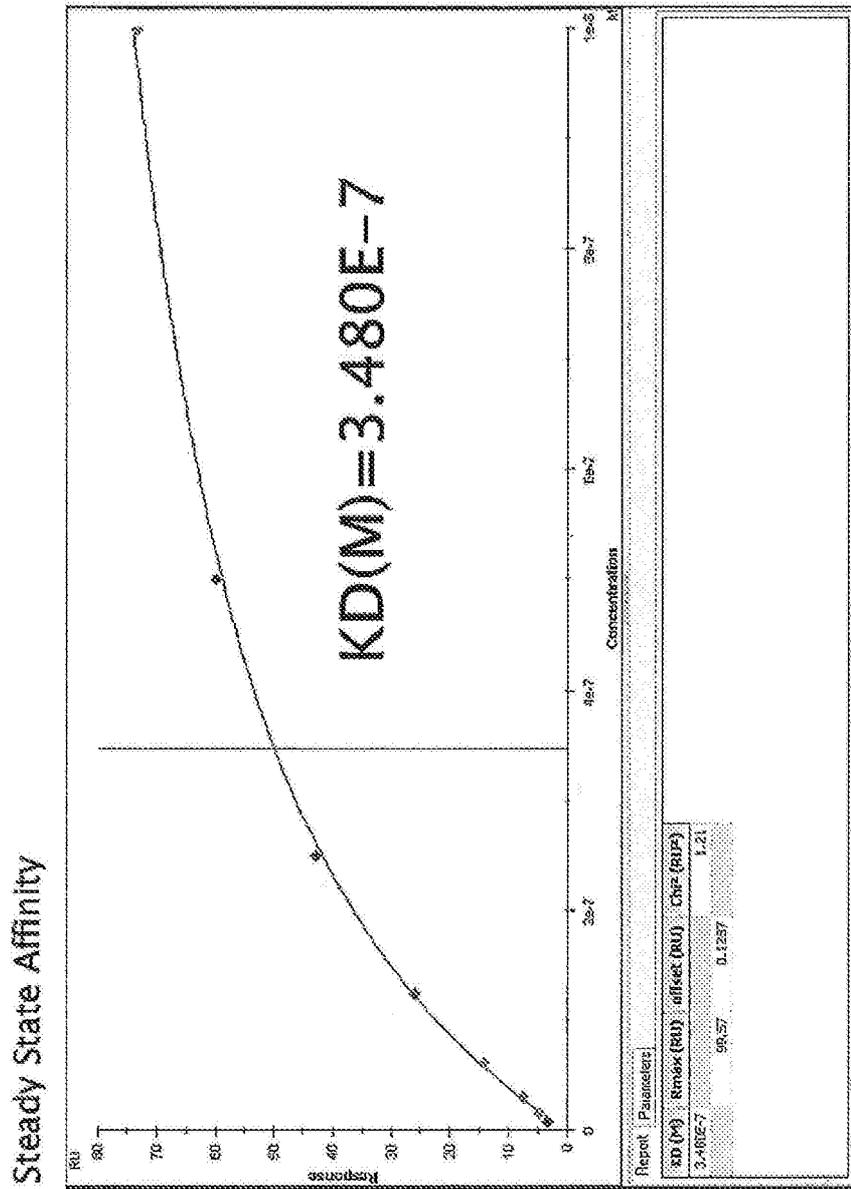


D: Denatured
UD: Undenatured

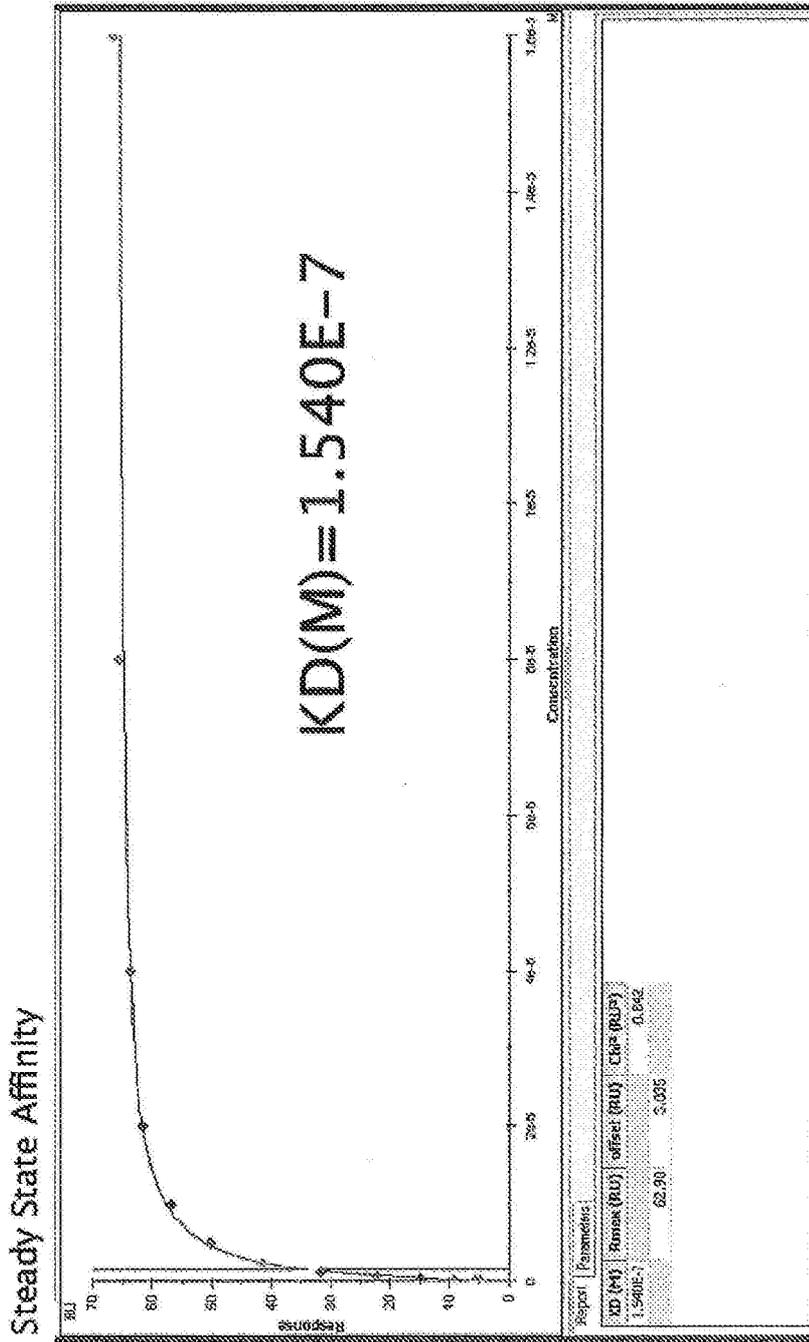
[7]



[8]



[9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/053734

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2008-530565 A (Adlyfe, Inc.), 07 August 2008 (07.08.2008), paragraph [0057] & JP 5048522 B & US 2011/0081660 A1 & EP 1853915 A & WO 2006/088823 A2 & CA 2597912 A & CN 101156068 A & BRA PI0607350 & AU 2006214463 A & MX 2007009819 A & AT 528649 T & HK 1110936 A	1-3 8-10
X Y	DATABASE CAPLUS ON STN, AN 1994:72808, DN 120: 72808, MIYAMOTO, S. ET AL., ABOSLUTE AND RELATIVE BINDING FREE ENERGY CALCULATIONS OF THE INTERACTION OF BIOTIN AND ITS ANALOGS WITH STREPTAVIDIN USING MOLECULAR DYNAMICS/FREE ENERGY PERTURBATION APPROACHES, PROTEINS: STRUCTURE, FUNCTION, AND GENETICS, 1993, 16(3), 226-45, 29117-49-5/RN	1-3 8-10
X	FILE REGISTRY ON STN, RN 66513-70-0, ENTERED STN: 16 NOV 1984	1-3
X	FILE REGISTRY ON STN, RN 76985-52-9, ENTERED STN: 16 NOV 1984	1,2
X	FILE REGISTRY ON STN, RN 39871-28-8, ENTERED STN: 16 NOV 1984	1,2
X	JP 58-154508 A (Unilever N.V.), 14 September 1983 (14.09.1983), page 5 & US 4529587 A & GB 2114886 A & GB 8304383 A0 & EP 88542 A2 & DE 3376524 D & AT 34077 E & AU 1143283 A & PH 21158 A & CA 1208135 A & ZA 8301083 A & AT 34077 T & AU 548324 B	1,2
Y	WO 2010/095455 A1 (The University of Tokyo), 26 August 2010 (26.08.2010), a whole article & US 2012/0039879 A1 & EP 2399993 A1 & CA 2753048 A & CN 102325884 A	4-10
Y	WO 2012/023579 A1 (Molecular Dynamics for Antibody Drug Development Alliance Cooperation), 23 February 2012 (23.02.2012), a whole article (Family: none)	4-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/053734

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-514524 A (Trustees of Boston University), 11 September 2001 (11.09.2001), particularly, page 43 & US 6368813 B1 & US 7249061 B1 & EP 977770 A & WO 1998/040396 A1 & AU 6701498 A & CA 2283716 A	4-10
Y	JP 10-28589 A (Boehringer Mannheim GmbH), 03 February 1998 (03.02.1998), particularly, claims 2, 3 & US 6312916 B1 & US 6417331 B1 & US 6391571 B1 & EP 799890 A3 & DE 19637718 A & DE 59713009 D & DE 19637718 A1 & ES 2325190 T	4-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/053734

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.:
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:

The inventions described in claims 1-3, of which the technical feature resides in the compound represented by formula (1), are deemed as "the first mentioned invention".

In this case, the inventions described in claims 4-7 do not relate to the compound. Therefore, there is not the same or corresponding technical feature between the inventions described in claims 4-7 and "the first mentioned invention".

(Continued to extra sheet)

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/JP2014/053734

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Furthermore, with respect to parts of the inventions described in claims 9 and 10 in which a biotin variant other than the compound represented by formula (1) is used, there is not the same or corresponding technical feature between the parts of the inventions and "the first mentioned invention", either.

Formula (1) recited in claim 1 and formula (2) recited in claim 2 include great many compounds within the scopes thereof.

However, those compounds which are disclosed in the meaning within PCT Article 5 are just some of the compounds represented by formulae (1) and (2) including the compounds mentioned in claim 3. Therefore, these claims are not supported satisfactorily in the meaning within PCT Article 6.

Furthermore, in the inventions described in claims 9 and 10, with respect to "a streptavidin isomer having a reduced affinity for naturally-occurring biotin or biocytin" and "a biotin variant having a high affinity for a streptavidin isomer", only the streptavidin isomer described in claim 4 and the compound described in claim 3 are disclosed in the meaning within PCT Article 5, respectively. Therefore, these claims are not supported satisfactorily in the meaning within PCT Article 6.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07D495/04(2006.01)i, C07D497/04(2006.01)i, C07D498/04(2006.01)i, C07K14/36(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/53(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 (IPC)) Int.Cl. C07D495/04, C07D497/04, C07D498/04, C07K14/36, C12N15/09, G01N33/53		
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 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014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), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
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	八杉龍一 他, 「ビオチン」, 岩波 生物学辞典 第4版, 岩波書店, 1997.04.10, 第1133頁	1, 2
X	FILE REGISTRY ON STN, RN 1134348-37-0, ENTERED STN:14 APR 2009	1-3
X Y	JP 9-506594 A (ネオルクス コーポレーション) 1997.06.30, 第180頁 & US 5976535 A & US 6015897 A & EP 733066 A & EP 1346730 A1 & WO 1995/015979 A1 & DE 69433343 D & CA 2178476 A & AT 254631 T	1-3 8-10
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 17.03.2014	国際調査報告の発送日 25.03.2014	
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) 伊藤 幸司 電話番号 03-3581-1101 内線 3492	4 P 9450

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	JP 2008-530565 A (エイディーライフ インコーポレイティッド)	1-3
Y	2008.08.07, 段落【0057】 & JP 5048522 B & US 2011/0081660 A1 & EP 1853915 A & WO 2006/088823 A2 & CA 2597912 A & CN 101156068 A & BRA PI0607350 & AU 2006214463 A & MX 2007009819 A & AT 528649 T & HK 1110936 A	8-10
X	DATABASE CAPLUS ON STN, AN 1994:72808, DN 120:72808, MIYAMOTO, S. ET AL., ABSOLUTE AND RELATIVE BINDING FREE ENERGY CALCULATIONS OF THE INTERACTION OF BIOTIN AND ITS ANALOGS WITH STREPTAVIDIN USING MOLECULAR DYNAMICS/FREE ENERGY PERTURBATION APPROACHES, PROTEINS: STRUCTURE, FUNCTION, AND GENETICS, 1993, 16(3), 226-45, 29117-49-5/RN	1-3
Y		8-10
X	FILE REGISTRY ON STN, RN 66513-70-0, ENTERED STN: 16 NOV 1984	1-3
X	FILE REGISTRY ON STN, RN 76985-52-9, ENTERED STN: 16 NOV 1984	1, 2
X	FILE REGISTRY ON STN, RN 39871-28-8, ENTERED STN: 16 NOV 1984	1, 2
X	JP 58-154508 A (ユニリーバー・ナームローゼ・ベンノートシャープ) 1983.09.14, 第5頁 & US 4529587 A & GB 2114886 A & GB 8304383 A0 & EP 88542 A2 & DE 3376524 D & AT 34077 E & AU 1143283 A & PH 21158 A & CA 1208135 A & ZA 8301083 A & AT 34077 T & AU 548324 B	1, 2
Y	WO 2010/095455 A1 (国立大学法人 東京大学) 2010.08.26, 全体 & US 2012/0039879 A1 & EP 2399993 A1 & CA 2753048 A & CN 102325884 A	4-10
Y	WO 2012/023579 A1 (分子動力学抗体創薬技術研究組合) 2012.02.23, 全体 (ファミリーなし)	4-10
Y	JP 2001-514524 A (トラスティーズ オブ ボストン ユニバーシティ) 2001.09.11, 特に、第43頁 & US 6368813 B1 & US 7249061 B1 & EP 977770 A & WO 1998/040396 A1 & AU 6701498 A & CA 2283716 A	4-10
Y	JP 10-28589 A (ベーリンガー マンハイム ゲーエムベーハー) 1998.02.03, 特に、請求項2, 3 & US 6312916 B1 & US 6417331 B1 & US 6391571 B1 & EP 799890 A3 & DE 19637718 A & DE 59713009 D	4-10

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
	& DE 19637718 A1 & ES 2325190 T	

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. 請求項 _____ 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. 請求項 _____ 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、
3. 請求項 _____ 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。

式(1)で示される化合物を技術的特徴とする請求項1～3に係る発明を「最初に記載された発明」とする。その場合、請求項4～7に係る発明は、当該化合物に関するものではないから、「最初に記載された発明」との間に、同一の又は対応する技術的特徴が存在しない。また、請求項9及び10に係る発明のうち、式(1)で示される化合物以外のビオチン改変体を用いる発明については、やはり「最初に記載された発明」との間に、同一又は対応する技術的特徴が存在しない。

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項について作成した。
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項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項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項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立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あったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求項1の式(1)及び請求項2の式(2)は、非常に多くの化合物を包含している。しかし、PCT5条の意味において開示されているのは、請求項3に列挙された化合物等、式(1)及び(2)のごくわずかな部分に過ぎず、PCT6条の意味で十分に裏付けられていない。

また、請求項9及び10に係る発明のうち、PCT5条の意味において開示されている「天然ビオチン又はビオシチンとの親和性を低下させたストレプトアビジン異性体」、「ストレプトアビジン異性体に対して高い親和性を有するビオチン改変体」は、それぞれ、請求項4に係るストレプトアビジン異性体、請求項3に係る化合物に止まるものであり、PCT6条の意味で十分に裏付けられていない。