

(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2018-538511

(P2018-538511A)

(43) 公表日 平成30年12月27日(2018.12.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62	2 GO 4 1
	GO 1 N 27/62	Z

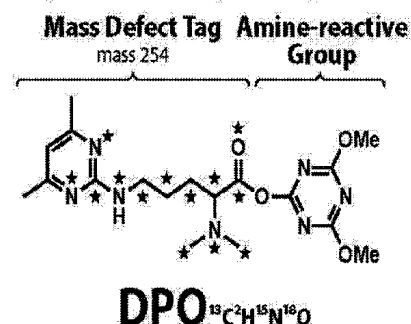
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 72 頁)

(21) 出願番号 特願2018-513641 (P2018-513641) (86) (22) 出願日 平成28年10月14日 (2016.10.14) (85) 翻訳文提出日 平成30年4月23日 (2018.4.23) (86) 国際出願番号 PCT/US2016/057156 (87) 国際公開番号 W02017/066650 (87) 国際公開日 平成29年4月20日 (2017.4.20) (31) 優先権主張番号 62/241,590 (32) 優先日 平成27年10月14日 (2015.10.14) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 390023641 ウィスコンシン アラムナイ リサーチ ファウンデーション WISCONSIN ALUMNI RE SEARCH FOUNDATION アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537 26、マデイソン、ウォルナット ストリ ート 614 (74) 代理人 100107456 弁理士 池田 成人 (74) 代理人 100162352 弁理士 酒巻 順一郎 (74) 代理人 100123995 弁理士 野田 雅一 最終頁に続く
--	---

(54) 【発明の名称】 高スループット定量的プロテオミクス及びペプチドミクスのための質量欠損ベースの多重化ジメチルピリミジニルオルニチン (DIPYRO) タグ

(57) 【要約】

同位体で標識化されたペプチド間のミリダルトン質量差異をMS¹レベルにて与えるための、質量欠損シグネチャーの使用により、多重化定量化が可能となり、質量差分アプローチによって生じる質量スペクトル複雑性の増大はない。本出願で提供されるのは、質量欠損ベースの化学タグ、ジメチルピリミジニルオルニチン (DiPyro) である。これは、コンパクトであり、市販の出発材料を用いてごく少数の工程で高い純度で合成することが容易である。多重化DiPyroタグは、アミン反応性であり、重同位体の置換の計算により、標識化したペプチドに質量差異を与えることができる。DiPyroは、質量スペクトルの複雑性を増大させることなく、現在のOrbitrapプラットフォーム又はFT-ICRプラットフォームでの最大十重化定量化を実現する。DiPyroタグの合成は、酵母抽出物消化物を用いた、複雑なプロテオミクスサンプルを標識化する、DiPyroタグの実行可能性、及び、DiPyroタグの、LC-MS²分析中の標識化ペプチドに及ぼす効果と共に、実現される。DiPyroタグを用いる、グリカン

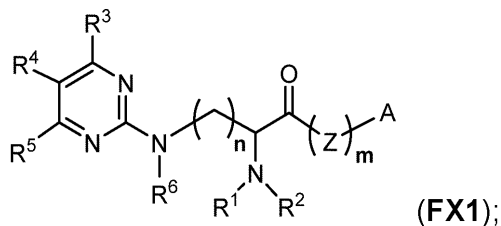
A DiPyro⁶ (6 heavy isotopes)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

質量分析に標識化試薬として用いられる、同位体が濃縮された化合物を含む組成物であって、前記化合物が、式 (F X 1) を有し：

【化 1】



10

式中、A が、アミン反応性基、カルボニル反応性基、又はチオール反応性基であり；

Z が結合基であり；

R³ ~ R⁵ が、それぞれ独立して、水素、C₁ ~ C₄ アルキル若しくは C₁ ~ C₄ アセチルであり、又は R³ ~ R⁵ のうちの少なくとも 2 つが、5 員若しくは 6 員の芳香族若しくは脂環式の環を形成するように結合しており；

R¹、R²、及び R⁶ が、それぞれ独立して、水素、C₁ ~ C₄ アルキル、又は C₁ ~ C₄ アセチルであり；

前記化合物中の任意の数の炭素が、¹²C 又は ¹³C であり；

20

前記化合物中の任意の数の窒素が、¹⁴N 又は ¹⁵N であり；

前記化合物中の任意の数の水素が、¹H 又は ²H であり；

前記化合物中の任意の数の酸素が、¹⁶O 又は ¹⁸O であり；

n が、1 ~ 5 の範囲から選択される整数であり；

m が、0 又は 1 であり；

但し、炭素原子、窒素原子、酸素原子、及び水素原子から独立して選択される、式 (F X 1) のうちの少なくとも 2 つの原子が、独立して重同位体であることを条件とし；同位体が濃縮された前記化合物が、天然の同位体存在量を超える量で存在する、組成物。

【請求項 2】

同位体が濃縮された前記化合物が、

30

少なくとも 2 つの ¹³C 同位体；又は

少なくとも 1 つの ¹³C 同位体及び少なくとも 1 つの ¹⁵N 同位体；又は

少なくとも 1 つの ¹³C 同位体及び少なくとも 1 つの ²H 同位体；又は

少なくとも 1 つの ¹³C 同位体及び少なくとも 1 つの ¹⁸O 同位体；又は

少なくとも 2 つの ¹⁵N 同位体；又は

少なくとも 1 つの ¹⁵N 同位体及び少なくとも 1 つの ²H 同位体；又は

少なくとも 1 つの ¹⁵N 同位体及び少なくとも 1 つの ¹⁸O 同位体；又は

少なくとも 2 つの ²H 同位体；又は

少なくとも 1 つの ²H 同位体及び少なくとも 1 つの ¹⁸O 同位体；少なくとも 2 つの ¹⁸O 同位体；又は

40

少なくとも 1 つの ¹³C 同位体、少なくとも 1 つの ¹⁵N 同位体、及び少なくとも 1 つの ²H 同位体；又は

少なくとも 1 つの ¹³C 同位体、少なくとも 1 つの ¹⁵N 同位体、及び少なくとも 1 つの ¹⁸O 同位体

を有する式 (F X 1) によって特徴付けられる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

同位体が濃縮された前記化合物が、

少なくとも 2 つの ¹³C 同位体；又は

少なくとも 4 つの ¹³C 同位体；又は

少なくとも 6 つの ¹³C 同位体；又は

50

少なくとも4つの ^{13}C 同位体及び少なくとも1つの ^{18}O 同位体；又は
 少なくとも4つの ^{13}C 同位体及び少なくとも2つの ^{15}N 同位体；又は
 少なくとも4つの ^{13}C 同位体及び少なくとも2つの ^2H 同位体；又は
 少なくとも2つの ^{15}N 同位体；又は
 少なくとも4つの ^{15}N 同位体；又は
 少なくとも4つの ^{15}N 同位体及び少なくとも1つの ^{18}O 同位体；又は
 少なくとも4つの ^{15}N 同位体及び少なくとも2つの ^{13}C 同位体；又は
 少なくとも4つの ^{15}N 同位体及び少なくとも2つの ^2H 同位体；又は
 少なくとも2つの ^{15}N 同位体、少なくとも2つの ^2H 同位体、及び少なくとも1つの ^{18}O 同位体；又は
 少なくとも2つの ^{15}N 同位体、少なくとも2つの ^{13}C 同位体、及び少なくとも1つの ^{18}O 同位体；又は
 少なくとも2つの ^{15}N 同位体、少なくとも2つの ^2H 同位体、及び少なくとも2つの ^{13}C 同位体；又は
 少なくとも2つの ^{15}N 同位体及び少なくとも2つの ^2H 同位体；又は
 少なくとも2つの ^2H 同位体及び少なくとも1つの ^{18}O 同位体；又は
 少なくとも2つの ^{13}C 同位体及び少なくとも2つの ^2H 同位体；又は
 少なくとも2つの ^2H 同位体；又は
 少なくとも4つの ^2H 同位体；又は
 少なくとも6つの ^2H 同位体

を有する、請求項1に記載の組成物。

10

20

【請求項4】

式(FX1)のAが、トリアジンエステル、NHSEステル、TFPEステル、イソチオシアネート、イソシアネート、ヒドラジド、アミノオキシ、及びヨードアセチルからなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】

式(FX1)のZが、アミノ酸又はペプチドに対応する基である、請求項1に記載の組成物。

【請求項6】

式(FX1)のZが、ベータアラニン又はグリシンに由来する基である、請求項1に記載の組成物。

30

【請求項7】

R^3 及び R^4 又は R^4 及び R^5 が、6員芳香環を形成するように結合している、請求項1に記載の組成物。

【請求項8】

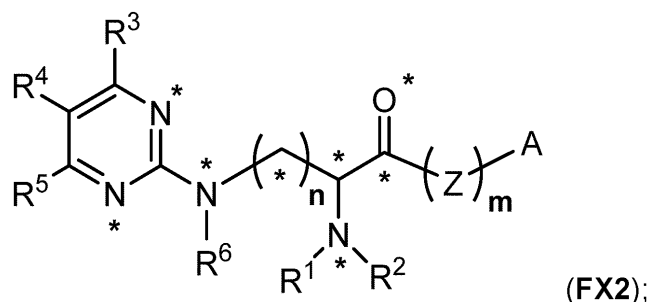
R^3 及び R^4 又は R^4 及び R^5 が、ベンゼンに対応する基を形成するように結合している、請求項1に記載の組成物。

【請求項9】

同位体が濃縮された前記化合物が、式(FX2)によって特徴付けられ：

【化2】

40



式中、符号*が、それぞれ独立して、前記重同位体のうちの1つであってもよい原子を

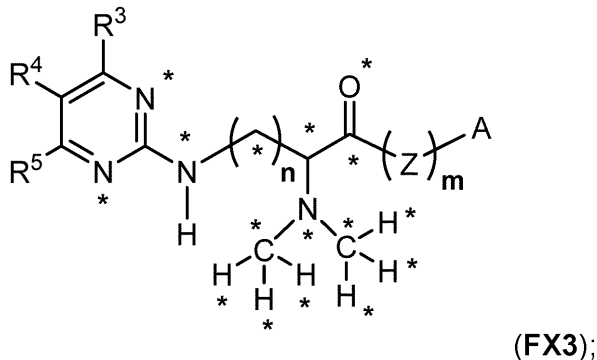
50

示す、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 1 0】

同位体が濃縮された前記化合物が、式 (F X 3) によって特徴付けられ：

【化 3】



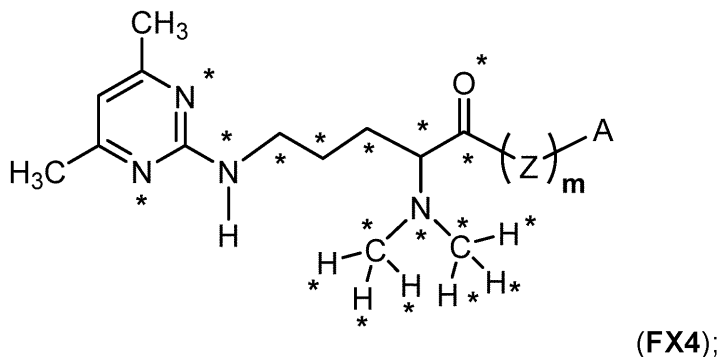
10

式中、符号 * が、それぞれ独立して、前記重同位体のうちの 1 つであってもよい原子を示す、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 1 1】

同位体が濃縮された前記化合物が、式 (F X 4) によって特徴付けられ：

【化 4】



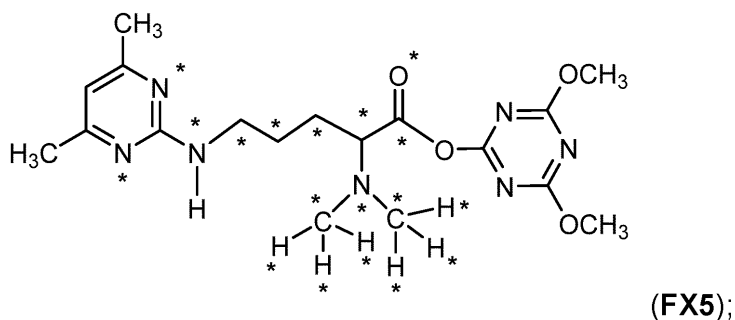
30

式中、符号 * が、それぞれ独立して、前記重同位体のうちの 1 つであってもよい原子を示す、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 1 2】

同位体が濃縮された前記化合物が、式 (F X 5) によって特徴付けられ：

【化 5】



40

式中、符号 * が、それぞれ独立して、前記重同位体のうちの 1 つであってもよい原子を示す、請求項 1 に記載の組成物。

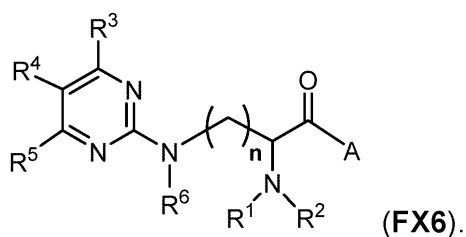
【請求項 1 3】

同位体が濃縮された前記化合物が、式 (F X 6) によって特徴付けられる、請求項 1 に

50

記載の組成物。

【化 6】

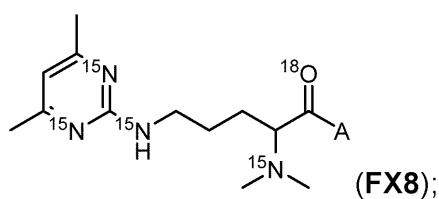
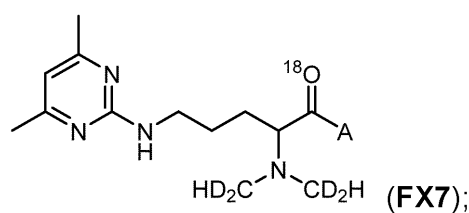


【請求項 14】

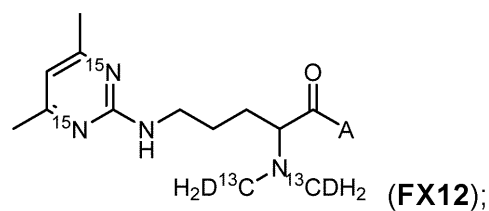
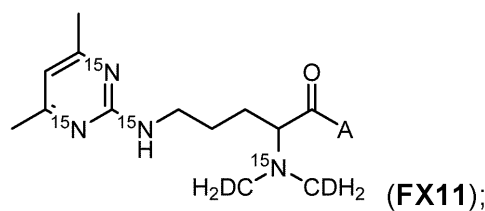
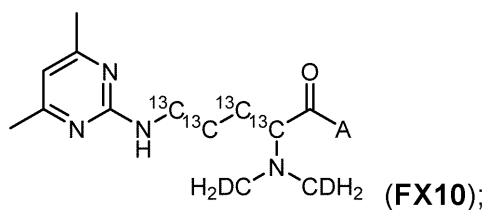
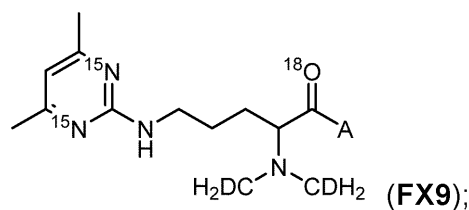
10

同位体が濃縮された前記化合物が、式 (FX7)、(FX8)、(FX9)、(FX10)、(FX11)、(FX12)、(FX13)、(FX14)、(FX15)、(FX16)、又は (FX17) によって特徴付けられる、請求項 13 に記載の組成物：

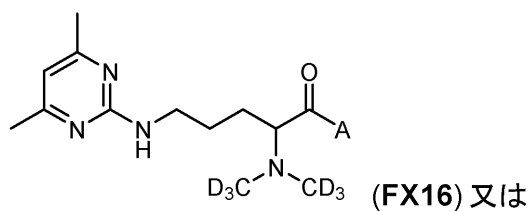
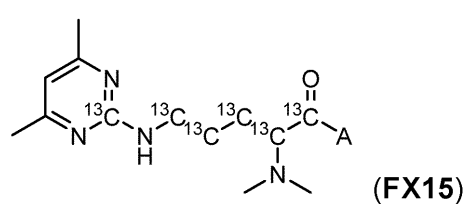
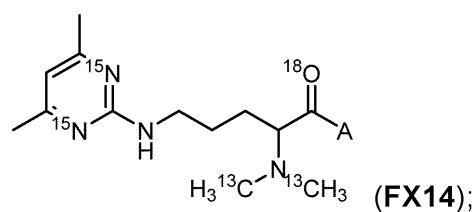
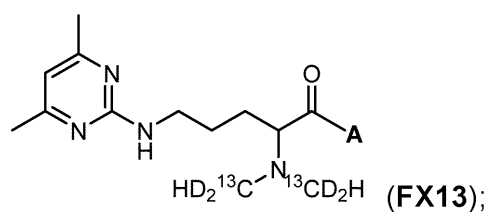
【化 7】



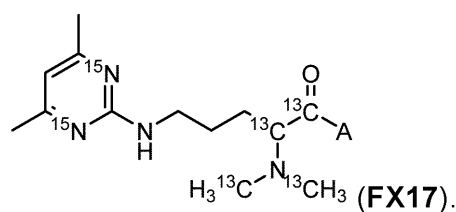
20



30



40

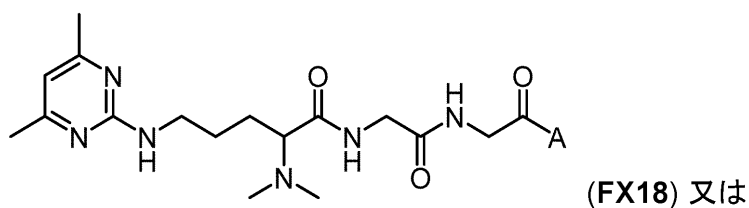


【請求項 15】

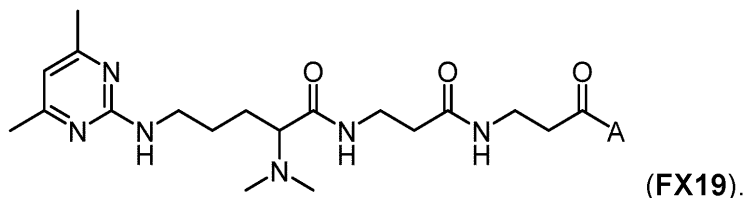
50

同位体が濃縮された前記化合物が、式 (F X 1 8) 又は (F X 1 9) によって特徴付けられる、請求項 1 に記載の組成物：

【化 8】



10

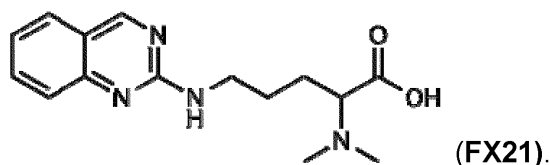
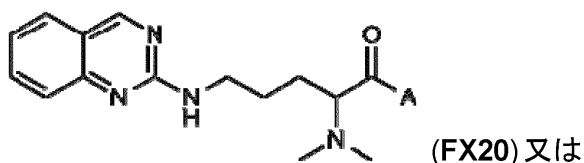


【請求項 1 6】

同位体が濃縮された前記化合物が、式 (F X 2 0) 又は (F X 2 1) によって特徴付けられる、請求項 1 に記載の組成物：

【化 9】

20



【請求項 1 7】

30

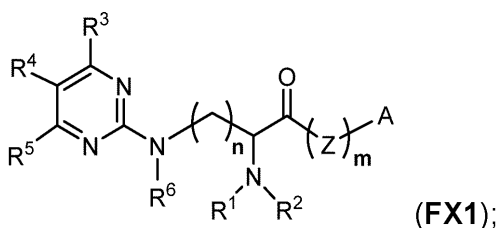
同位体が濃縮された、複数の異なる化合物を含み、同位体が濃縮された、異なる前記化合物が、それぞれ独立して、式 (F X 1) を有し；同位体が濃縮された、異なる前記化合物が、同位体種である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 1 8】

質量分析用の標識化試薬として用いられる、同位体が濃縮された、複数の異なる同位体種を含むキットであって、同位体が濃縮された前記同位体種が、独立して、式 (F X 1) を有し：

【化 1 0】

40



式中、A が、アミン反応性基、カルボニル反応性基、又はチオール反応性基であり；

Z が結合基であり；

R³ ~ R⁵ が、それぞれ独立して、水素、C₁ ~ C₄ アルキル若しくは C₁ ~ C₄ アセチルであり、又は R³ ~ R⁵ のうちの少なくとも 2 つが、5 員若しくは 6 員の芳香族若しくは脂環式の環を形成するように結合しており；

50

R^1 、 R^2 、及び R^6 が、それぞれ独立して、水素、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、又は $C_1 \sim C_4$ アセチルであり；

前記化合物中の任意の数の炭素が、 ^{12}C 又は ^{13}C であり；

前記化合物中の任意の数の窒素が、 ^{14}N 又は ^{15}N であり；

前記化合物中の任意の数の水素が、 1H 又は 2H であり；

前記化合物中の任意の数の酸素が、 ^{16}O 又は ^{18}O であり；

n が、1～5の範囲から選択される整数であり；

m が、0又は1であり；

前記同位体種の少なくとも一部が、55 mDa以下の質量差異によって特徴付けられ；

同位体が濃縮された前記同位体種が、天然の同位体存在量を超える量で存在する、キット。

10

【請求項 19】

同位体が濃縮された、異なる前記同位体種のうちの2、3、4、5、6、7、8、9、10個、又はそれ以上を含む、請求項18に記載のキット。

【請求項 20】

前記同位体種の少なくとも一部が、5 mDa～55 mDaの範囲にわたって選択される質量差異によって特徴付けられる、請求項18に記載のキット。

【請求項 21】

前記同位体種の少なくとも一部が、25 mDa以下の質量差異によって特徴付けられる、請求項18に記載のキット。

20

【請求項 22】

前記同位体種の少なくとも一部が、100,000以上の分解力を実現する質量分析技術を用いて分解可能な質量差異によって特徴付けられる、請求項18に記載のキット。

【請求項 23】

前記質量分析が、MS¹技術である、請求項18に記載のキット。

【請求項 24】

前記質量分析が、多重化技術である、請求項18に記載のキット。

【請求項 25】

前記質量分析が、プロテオミクス分析技術である、請求項18に記載のキット。

【請求項 26】

前記質量分析が、グライコーム分析技術である、請求項18に記載のキット。

30

【請求項 27】

前記質量分析が、メタボロミクス分析技術である、請求項18に記載のキット。

【請求項 28】

前記同位体種の少なくとも一部が、ペプチド、タンパク質、グリカン、又は代謝物質のアミン基と反応性である、請求項18に記載のキット。

【請求項 29】

前記同位体種の少なくとも一部が、ペプチド、タンパク質、グリカン、又は代謝物質のカルボニル基と反応性である、請求項18に記載のキット。

【請求項 30】

前記同位体種の少なくとも一部が、ペプチド、タンパク質、又は代謝物質のチオール基と反応性である、請求項18に記載のキット。

40

【請求項 31】

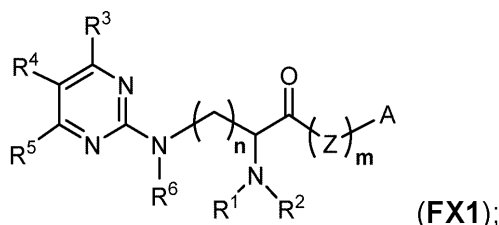
1つ又は複数のアミン基を含有する標的分子を標識化する方法であって、

a) 前記標的分子を用意するステップと；

b) 前記標的分子を、同位体が濃縮された化合物と反応させることによって、同位体で標識化された標的分子を生じさせるステップと

を含み；同位体が濃縮された同位体種が、それぞれ独立して、式(FX1)を有し；

【化 1 1】



式中、A が、アミン反応性基、カルボニル反応性基、又はチオール反応性基であり；

Z が結合基であり；

10

R³ ~ R⁵ が、それぞれ独立して、水素、C₁ ~ C₄ アルキル若しくは C₁ ~ C₄ アセチルであり、又は R³ ~ R⁵ のうちの少なくとも 2 つが、5 員若しくは 6 員の芳香族若しくは脂環式の環を形成するように結合しており；

R¹、R²、及び R⁶ が、それぞれ独立して、水素、C₁ ~ C₄ アルキル、又は C₁ ~ C₄ アセチルであり；

前記化合物中の任意の数の炭素が、¹²C 又は ¹³C であり；

前記化合物中の任意の数の窒素が、¹⁴N 又は ¹⁵N であり；

前記化合物中の任意の数の水素が、¹H 又は ²H であり；

前記化合物中の任意の数の酸素が、¹⁶O 又は ¹⁸O であり；

n が、1 ~ 5 の範囲から選択される整数であり；

20

m が、0 又は 1 であり；

但し、炭素原子、窒素原子、酸素原子、及び水素原子から独立して選択される、式 (FX 1) のうちの少なくとも 2 つの原子が、独立して重同位体であることを条件とする、方法。

【請求項 3 2】

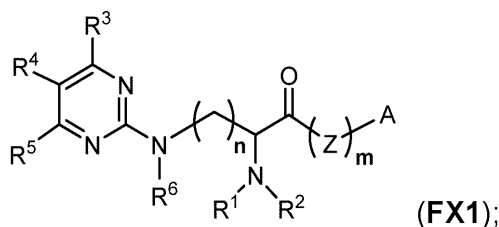
質量分析技術を用いて標的分子を分析する方法であって、

a) 前記標的分子を、複数の異なるサンプル中に与えるステップと；

b) 各サンプル中の前記標的分子を、同位体が濃縮された、異なる同位体種と反応させることによって、同位体で標識化された標的分子を含むサンプルを生じさせるステップであり、同位体が濃縮された、異なる前記同位体種が、それぞれ独立して、式 (FX 1) を有し；

30

【化 1 2】



式中、A が、アミン反応性基、カルボニル反応性基、又はチオール反応性基であり；

40

Z が結合基であり；

R³ ~ R⁵ が、それぞれ独立して、水素、C₁ ~ C₄ アルキル若しくは C₁ ~ C₄ アセチルであり、又は R³ ~ R⁵ のうちの少なくとも 2 つが、5 員若しくは 6 員の芳香族若しくは脂環式の環を形成するように結合しており；

R¹、R²、及び R⁶ が、それぞれ独立して、水素、C₁ ~ C₄ アルキル、又は C₁ ~ C₄ アセチルであり；

前記化合物中の任意の数の炭素が、¹²C 又は ¹³C であり；

前記化合物中の任意の数の窒素が、¹⁴N 又は ¹⁵N であり；

前記化合物中の任意の数の水素が、¹H 又は ²H であり；

前記化合物中の任意の数の酸素が、¹⁶O 又は ¹⁸O であり；

50

n が、1 ~ 5 の範囲から選択される整数であり；

m が、0 又は 1 であり；

但し、炭素原子、窒素原子、酸素原子、及び水素原子から独立して選択される、式 (F X 1) のうちの少なくとも 2 つの原子が、独立して重同位体であることを条件とし；前記同位体種の少なくとも一部が、55 mDa 以下の質量差異によって特徴付けられる、ステップと；

c) 前記質量分析技術を用いて、各サンプルについて、同位体で標識化された前記標的分子を分析するステップとを含む方法。

【請求項 33】

10

2、3、4、5、6、7、8、9、10 個、又はそれ以上の異なるサンプルを、同位体が濃縮された、異なる同位体種と反応させるステップを含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記同位体種の少なくとも一部が、5 mDa ~ 55 mDa の範囲にわたって選択される質量差異によって特徴付けられる、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 35】

前記同位体種の少なくとも一部が、25 mDa 以下の質量差異によって特徴付けられる、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 36】

前記質量分析技術を用いて、各サンプルについて、同位体で標識化された前記分子を分析する前記ステップが、100,000 以上の分解力を実現する質量分析技術を用いて実行される、請求項 32 に記載の方法。

20

【請求項 37】

前記質量分析技術が、MS¹ 技術である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 38】

前記質量分析技術が、二重化、三重化、四重化、五重化、六重化、七重化、八重化、九重化、及び十重化の多重化質量分析技術である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 39】

前記質量分析技術が、プロテオミクス分析技術である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 40】

30

前記質量分析技術が、グライコーム分析技術である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 41】

前記質量分析技術が、メタボロミクス分析技術である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 42】

前記同位体種の少なくとも一部が、ペプチド、タンパク質、グリカン、又は代謝物質のアミン基と反応性である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 43】

前記同位体種の少なくとも一部が、ペプチド、タンパク質、グリカン、又は代謝物質のカルボニル基と反応性である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 44】

40

前記同位体種の少なくとも一部が、ペプチド、タンパク質、又は代謝物質のチオール基と反応性である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 45】

炭素原子、窒素原子、酸素原子、及び水素原子から独立して選択される、式 (F X 1) のうちの少なくとも 5 つの原子が、独立して重同位体である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 46】

同位体が濃縮された前記同位体種が、

少なくとも 2 つの ¹³C 同位体；又は

少なくとも 1 つの ¹³C 同位体及び少なくとも 1 つの ¹⁵N 同位体；又は

少なくとも 1 つの ¹³C 同位体及び少なくとも 1 つの ²H 同位体；又は

50

少なくとも1つの¹³C同位体及び少なくとも1つの¹⁸O同位体；又は
 少なくとも2つの¹⁵N同位体；又は
 少なくとも1つの¹⁵N同位体及び少なくとも1つの²H同位体；又は
 少なくとも1つの¹⁵N同位体及び少なくとも1つの¹⁸O同位体；又は
 少なくとも2つの²H同位体；又は
 少なくとも1つの²H同位体及び少なくとも1つの¹⁸O同位体；少なくとも2つの¹⁸O同位体；又は
 少なくとも1つの¹³C同位体、少なくとも1つの¹⁵N同位体、及び少なくとも1つの²H同位体；又は
 少なくとも1つの¹³C同位体、少なくとも1つの¹⁵N同位体、及び少なくとも1つの¹⁸O同位体

を有する式(FX1)によって独立して特徴付けられる、請求項32に記載の方法。

【請求項47】

同位体が濃縮された前記同位体種が、それぞれ独立して：

少なくとも2つの¹³C同位体；又は
 少なくとも4つの¹³C同位体；又は
 少なくとも6つの¹³C同位体；又は
 少なくとも4つの¹³C同位体及び少なくとも1つの¹⁸O同位体；又は
 少なくとも4つの¹³C同位体及び少なくとも2つの¹⁵N同位体；又は
 少なくとも4つの¹³C同位体及び少なくとも2つの²H同位体；又は
 少なくとも2つの¹⁵N同位体；又は
 少なくとも4つの¹⁵N同位体；又は
 少なくとも4つの¹⁵N同位体及び少なくとも1つの¹⁸O同位体；又は
 少なくとも4つの¹⁵N同位体及び少なくとも2つの¹³C同位体；又は
 少なくとも4つの¹⁵N同位体及び少なくとも2つの²H同位体；又は
 少なくとも2つの¹⁵N同位体、少なくとも2つの²H同位体、及び少なくとも1つの¹⁸O同位体；又は
 少なくとも2つの¹⁵N同位体、少なくとも2つの¹³C同位体、及び少なくとも1つの¹⁸O同位体；又は
 少なくとも2つの¹⁵N同位体、少なくとも2つの²H同位体、及び少なくとも2つの¹³C同位体；又は
 少なくとも2つの¹⁵N同位体及び少なくとも2つの²H同位体；又は
 少なくとも2つの²H同位体及び少なくとも1つの¹⁸O同位体；又は
 少なくとも2つの¹³C同位体及び少なくとも2つの²H同位体；又は
 少なくとも2つの²H同位体；又は
 少なくとも4つの²H同位体；又は
 少なくとも6つの²H同位体

を有する、請求項32に記載の方法。

【請求項48】

式(FX1)のAが、トリアジンエステル、NHSESTER、TFPESTER、イソチオシアネート、イソシアネート、ヒドラジド、アミノオキシ、及びヨードアセチルからなる群から選択される、請求項32に記載の方法。

【請求項49】

式(FX1)のZが、アミノ酸又はペプチドに対応する基である、請求項32に記載の方法。

【請求項50】

式(FX1)のZが、ベータアラニン又はグリシンに由来する基である、請求項32に記載の方法。

【請求項51】

R³及びR⁴又はR⁴及びR⁵が、6員芳香環を形成するように結合している、請求項

3 2 に記載の方法。

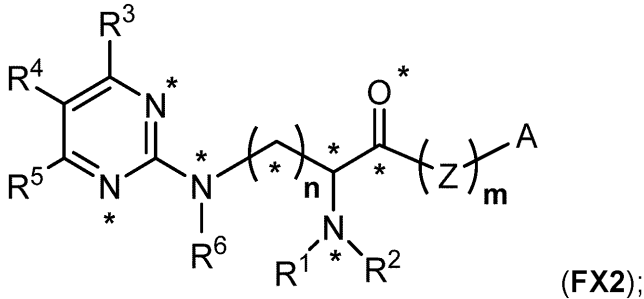
【請求項 5 2】

R³ 及び R⁴ 又は R⁴ 及び R⁵ が、ベンゼンに対応する基を形成するように結合している、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 5 3】

同位体が濃縮された前記同位体種が、それぞれ独立して、式 (F X 2) によって特徴付けられ：

【化 1 3】



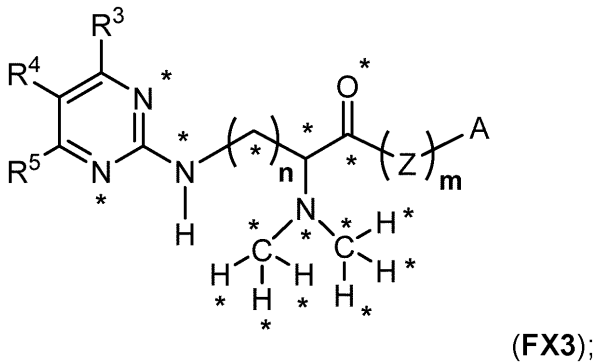
10

式中、符号 * が、それぞれ独立して、前記重同位体のうちの 1 つであってもよい原子を示す、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

同位体が濃縮された前記同位体種が、それぞれ、式 (F X 3) によって特徴付けられ：

【化 1 4】



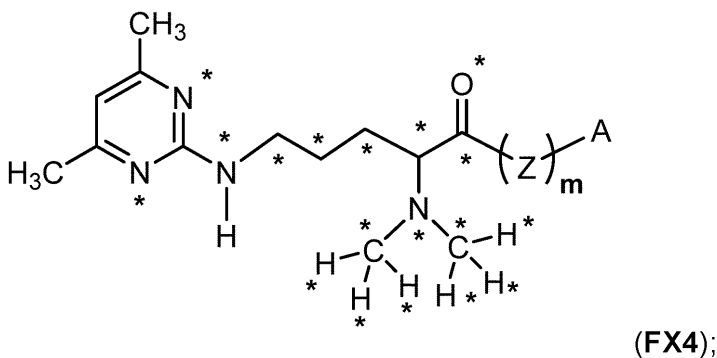
30

式中、符号 * が、それぞれ独立して、前記重同位体のうちの 1 つであってもよい原子を示す、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 5 5】

同位体が濃縮された前記同位体種が、それぞれ独立して、式 (F X 4) によって特徴付けられ：

【化 1 5】



40

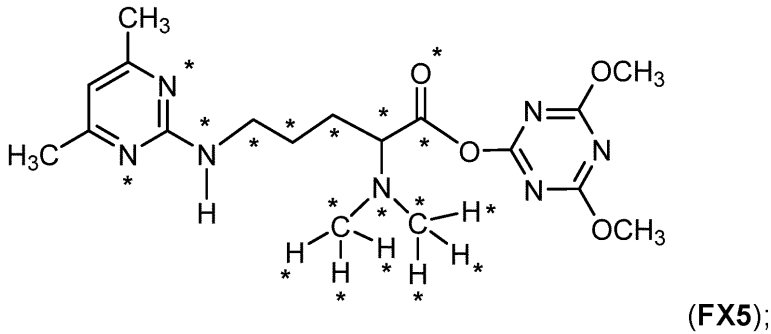
50

式中、符号 * が、それぞれ独立して、前記重同位体のうちの 1 つであってもよい原子を示す、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 5 6】

同位体が濃縮された前記同位体種が、それぞれ独立して、式 (F X 5) によって特徴付けられ：

【化 1 6】



10

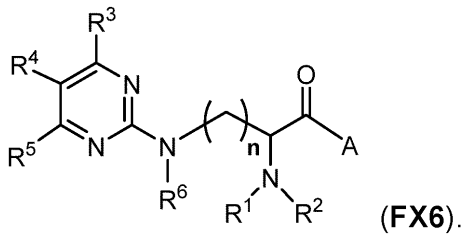
式中、符号 * が、それぞれ独立して、前記重同位体のうちの 1 つであってもよい原子を示す、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 5 7】

同位体が濃縮された前記同位体種が、それぞれ独立して、式 (F X 6) によって特徴付けられる、請求項 3 2 に記載の方法。

20

【化 1 7】

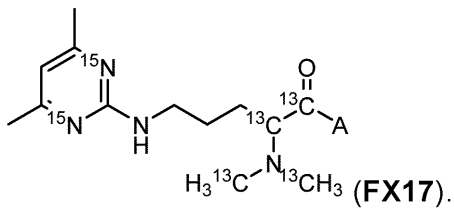
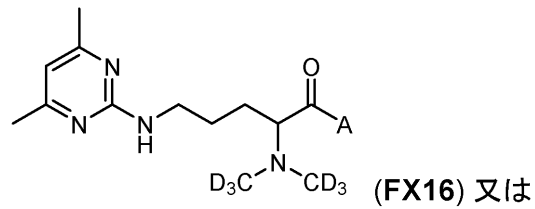
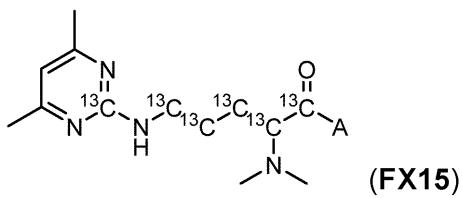
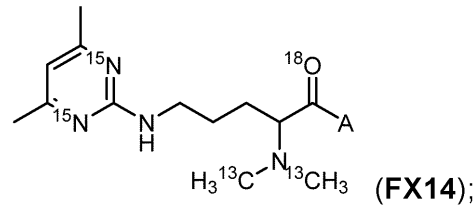
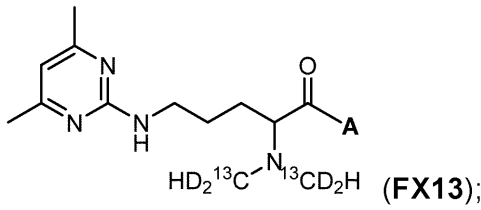
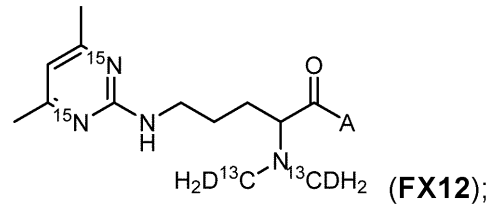
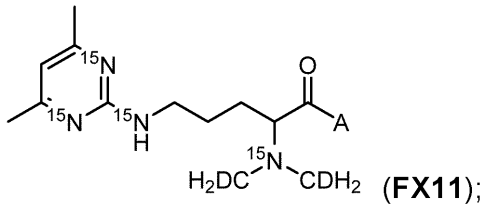
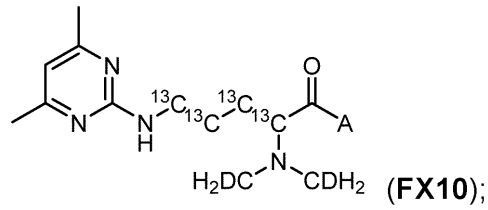
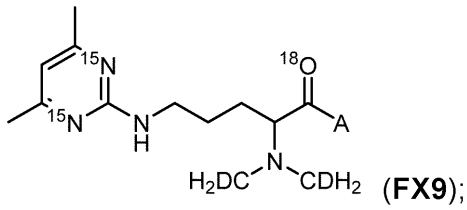
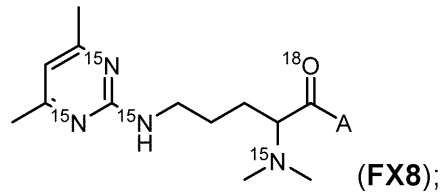
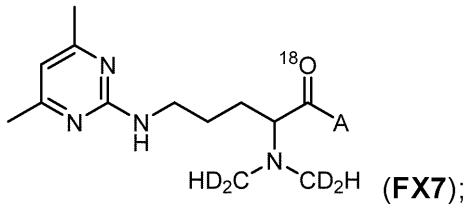


【請求項 5 8】

同位体が濃縮された前記同位体種が、それぞれ独立して、式 (F X 7)、(F X 8)、(F X 9)、(F X 1 0)、(F X 1 1)、(F X 1 2)、(F X 1 3)、(F X 1 4)、(F X 1 5)、(F X 1 6)、又は (F X 1 7) によって特徴付けられる、請求項 3 2 に記載の方法：

30

【化 1 8】



【請求項 5 9】

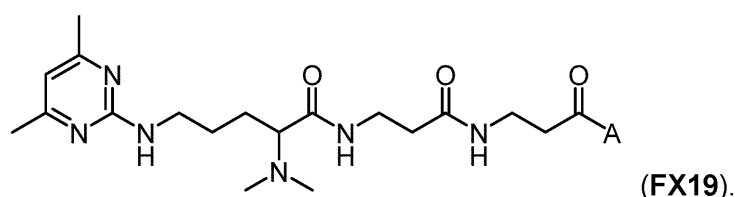
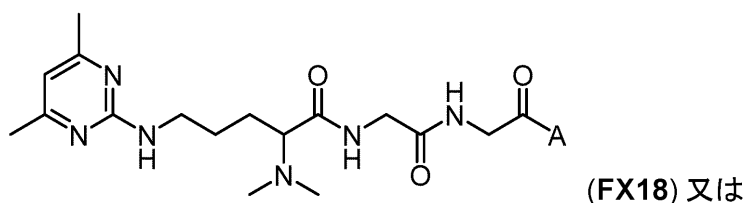
同位体が濃縮された前記同位体種が、それぞれ独立して、式 (F X 1 8) 又は (F X 1 9) によって特徴付けられる、請求項 3 2 に記載の方法：

10

20

30

【化 19】

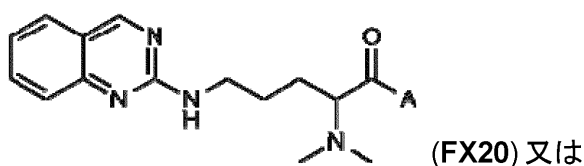


10

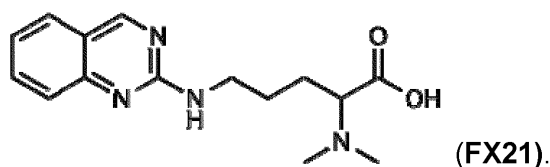
【請求項 60】

同位体が濃縮された前記同位体種が、それぞれ独立して、式 (FX20) 又は (FX21) によって特徴付けられる、請求項 32 に記載の方法：

【化 20】



20



【請求項 61】

前記異なるサンプル中の、標識化された前記標的分子の相対量を定量化するステップをさらに含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 62】

30

前記異なるサンプル中の、標識化された前記標的分子の相対量を定量化する前記ステップが、標識化された前記標的分子からの蛍光を測定することを含む、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

同位体が濃縮された標識化試薬を製造する方法であって、

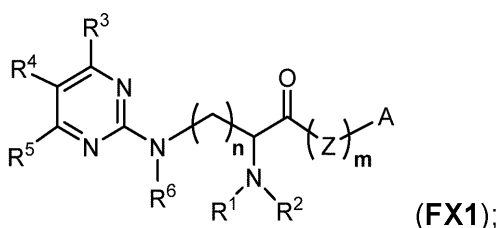
アミノ酸前駆体を用意するステップと；

前記アミノ酸前駆体を、第 1 の試薬と化学反応させて、任意選択で置換されているピリミジン基を用意するステップと；

前記アミノ酸前駆体のカルボン酸基を、第 2 の試薬と化学反応させて、アミン反応性基、カルボニル反応性基、又はチオール反応性基を得て、以下の式を有する、同位体が濃縮された前記標識化試薬を形成するステップとを含み：

40

【化 21】



式中、A が、アミン反応性基、カルボニル反応性基、又はチオール反応性基であり；

50

Z が結合基であり；

R³ ~ R⁵ が、それぞれ独立して、水素、C₁ ~ C₄ アルキル若しくはC₁ ~ C₄ アセチルであり、又はR³ ~ R⁵ のうちの少なくとも2つが、5員若しくは6員の芳香族若しくは脂環式の環を形成するように結合しており；

R¹、R²、及びR⁶ が、それぞれ独立して、水素、C₁ ~ C₄ アルキル、又はC₁ ~ C₄ アセチルであり；

前記化合物中の任意の数の炭素が、¹²C又は¹³Cであり；

前記化合物中の任意の数の窒素が、¹⁴N又は¹⁵Nであり；

前記化合物中の任意の数の水素が、¹H又は²Hであり；

前記化合物中の任意の数の酸素が、¹⁶O又は¹⁸Oであり；

10

n が、1 ~ 5 の範囲から選択される整数であり；

m が、0 又は 1 であり；

但し、炭素原子、窒素原子、酸素原子、及び水素原子から独立して選択される、式(FX 1)のうちの少なくとも2つの原子が、独立して重同位体であることを条件とし；

同位体が濃縮された前記同位体種が、天然の同位体存在量を超える量で存在する、方法。

【請求項 6 4】

前記アミノ酸前駆体が、同位体が濃縮されたアミノ酸前駆体であり、前記アミノ酸前駆体が、重同位体である少なくとも2つの原子を含有することによって特徴付けられ、前記重同位体が、天然の同位体存在量を超える量で存在する、請求項 6 3 に記載の方法。

20

【請求項 6 5】

前記アミノ酸前駆体が、同位体が濃縮されたアルギニンである、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記第 1 の試薬又は前記第 2 の試薬が、同位体が濃縮された試薬であり、前記試薬が、重同位体である少なくとも2つの原子を含有することによって特徴付けられ、前記重同位体が、天然の同位体存在量を超える量で存在する、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記アルギニンのグアニジン基を誘導体化して、任意選択で置換されているピリミジン基を形成するステップを含む、請求項 6 5 に記載の方法。

30

【請求項 6 8】

任意選択で置換されている前記ピリミジン基を形成する前に、ホルムアルデヒドによるパラジウム触媒ジメチル化を前記アミノ酸前駆体に対して実行するステップをさらに含む、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記アミノ酸前駆体のカルボン酸基が反応して、トリアジンエステルが形成される、請求項 6 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

40

[001]本出願は、2015年10月14日出願の米国特許仮出願第62/241590号の優先権を主張する。この出願は、本開示と矛盾しない限り、参照によって本明細書に組み込まれる。

【連邦政府による資金提供を受けた研究又は開発に関する陳述】

【0002】

[002]本発明は、National Institutes of Healthによる認可第DK071801号の下に、政府支援を受けてなされた。政府は、本発明において、一定の権利を有する。

【発明の背景】

【0003】

50

[003]安定同位体標識化は、近年急速な進歩が見られたMSベースの定量的プロテオミクスのコア技術である。重い炭素、水素、窒素、及び酸素の原子が、ペプチドに代謝的に、又は化学的に組み込まれて質量差異がもたらされ、この差異が質量スペクトルで検出されてサンプルを差別化することができ、そして相対的定量化用のイオン強度の比較が可能となる(Odaら、PNAS、1999、96:6591~6596; Ongら、Mol Cell Proteomics、2002、1:376~386; Panら、Anal Chem、2003、75:1316~1324; Wuら、Anal Chem、2004、76:4951~4959; Gygiら、Nat Biotechnol、1999、17:994~999; Thompsonら、Anal Chem、2003、75:1895~1904; Rossら、Mol Cell Proteomics、2004、3:1154~1169; Hsuら、Anal Chem、2003、75:6843~6852; 及びBoersemaら、Nat Protoc、2009、4:484~494)。

10

【0004】

[004]ペプチド中に安定同位体を導入する多数のアプローチ、例えば細胞培養液中のアミノ酸による安定同位体標識化(SILAC)、アイソバリックタギング(TMT/iTRAQ)及びiCATが存在する。しかしながら、ほとんどの従来アプローチにおいて、これらの方法は、重同位体を組み込んで、質量を少なくとも1Da増大させるものである。

20

【0005】

[005]従来法では、MS¹スペクトルにおいてアイソトープクラスタ間の重なりを最小にするには、4Da以上の質量差異が理想的である。特別な考慮下での五重化(5-plex)SILAC及び五重化ジメチル標識化技術が報告されている(Molinaら、J Proteome Res、2009、8:48-58; 及びWuら、Chem Commun、2014、50:1708)ものの、多重化の増大に由来するスペクトルの複雑性の漸次増大により、プロテオミクスの適用範囲が結果的に狭まって、質量差分アプローチ、すなわちSILACは三重比較(triplex comparison)に一般に制限されていた。

【0006】

[006]高いレベルの多重化が、アイソバリック化学標識化アプローチ、例えばiTRAQ、TMT、及びDiLeuアイソバリックタグによって達成されてきた。これらのアプローチは、MS¹スペクトル複雑性を増大させることなく、MS²レベルでの定量化を実現するものである(Rossら、Mol Cell Proteomics、2004、3:1154~1169; Choeら、Proteomics、2007、7:3651~3660; Thompsonら、Anal Chem、2003、75:1895~1904; Dayonら、Anal Chem 2008、80:2921~2931; Xiangら、Anal Chem、2010、82:2817~2825; 及びFrostら、Rapid Commun Mass Spectrom 2015、29:1115~1124)。

30

【0007】

[007]アイソバリック標識化は、MS¹スキャンの定量的情報が見えないようにすることによって、質量スペクトル複雑性の増大の問題に対処することで、従来のSILAC法によって得られるよりも高いレベルの多重化を可能にしている。しかしながら、アイソバリック標識化は、複雑なサンプルにおける前駆体の激しい共単離(co-isolation)(Owら、J Proteome Res、2009、8:5347~5355)、そして前駆体を「精製する」ためにイオン/イオン反応を使用する、提案されている解決策(Quant Mode)(Wengerら、Nat Meth、2011、8:933~935; 及びRensvoldら、Anal Chem、2013、85:2079~2086)又はMS³ベースのレポーターイオン定量化の使用(Tingら、Nat Meth、2011、8:937~940; 及びMcAlisterら、Anal Ch

40

50

em、2014、86:7150~7158)に起因する比率の抑制及び不正確性を欠点としており、双方とも機器のデューティサイクル及び感度を引き下げる結果、同定数及び定量化されるペプチド数が非常に減少する。フラッグシップOrbitrap Fusion トライブリッド質量スペクトロメータは、とりわけこの問題に対処し、感度又は定量化率を著しく損なうことなく正確なレポーターイオンシグナルを与えるために、HCD MS³分析用の複数のMS²フラグメントイオンの同期式前駆体選択(synchronous precursor selection)を備えている。

【0008】

[008]高分解能MSプラットフォームの利用可能性の高まりは、質量欠損を用いることにより、上述の戦略の多重化能力の向上を可能にした。アイソバリック六重化TMT試薬は、¹²C/¹³C同位体間、そして¹⁴N/¹⁵N同位体間の微妙な相対的質量差異を利用することによって(¹⁴N原子の代わりに¹⁵N原子を、そして¹²C原子の代わりに¹³C原子を用いることによって)、八重に増大した。結果として生じたレポーター同位体種は、質量が6.32 mDa異なり、そして(m/z 400にて)30KのMSⁿ分解力(resolving power)で識別され得る。現在、TMT試薬は、4つの質量欠損ベースの同位体種により十重化セットとして提供され、そしてアイソバリックDileu試薬の多重化能力は、8つの質量欠損ベースの同位体種の付加により、四重から十二重へと、3倍になった。偽アイソバリックジメチル標識化(pseudo-isobaric dimethyl labeling: pIDL)は、C及びHの同位体間の質量欠損、及び定量化用の高分解能MS²を用いるものである(Zhouら、Anal Chem, 2013, 85:10658~10663)。中性子コーディング又はNeuCodeは、MS¹レベルでの質量欠損ベースの同位体標識定量化について、Coon及び共同研究者によって作られた用語である(Hebertら、Nat Meth, 2013, 10:332~334)。

【0009】

[009]NeuCode SILACは、8つの同位体を異なる構成で有するリジン同位体種の、C、H、及びNの同位体間の質量欠損を利用して、わずか5.8 mDaから36 mDaにも及ぶ質量差異をもたらす細胞培養代謝標識化戦略である(Hebertら、Nat Meth, 2013, 10:332~334; 及びMerrillら、Mol Cell Proteomics, 2014, 13:2503~2512)。NeuCode リジンを組み込むペプチドのmDa質量欠損シグネチャーは、低いMS¹分解力から中程度のMS¹分解力では認められないが、高分解力(>200K)では明らかになる。ゆえに、上記戦略は、従来のSILACに付随するスペクトル複雑性を増大させることなく多重化を可能にし、そして、定量化がMS¹レベルにてなされるので、アイソバリック標識化がするような前駆体共単離に起因する不十分な定量的精度を欠点としない。MS¹分解能によるNeuCode規模の多重化能力(36 mDaのリジンをを用いる二重化定量化)は、サンプルのプロテオームの>85%の定量化に、240Kの分解力を必要とする一方、18 mDa及び12 mDaのリジンをを用いる三重化定量化及び四重化定量化は、それぞれ480K及び960Kの分解力を必要とする。そのような高分解能は、超高磁場検出器を使用する最も精巧なFT-ICR機器又はOrbitrapプラットフォームを必要とするので、上記技術は大多数の研究者にとって、まだ広く使用可能でない。

【0010】

[0010]NeuCodeリジンがSILAC及びSILAM双方の用途に用いられているが、生物の代謝標識化に限られている(Hebert et al., Nat Meth, 2013, 10:332~334; Merrillら、Mol Cell Proteomics, 2014, 13:2503~2512; Roseら、Anal Chem, 2013, 85:5129~5137; Richardsら、Mol Cell Proteomics, 2013, 12:3812~3823; Rhoadsら、Anal Chem, 2014, 86:2314~2319; 及びRoseら、'NeuCode Mouse: Multiplexed Proteomics Analysis Rev

eals Tissue Specific Effects of Deubiquitinase Deletion」、Baltimore、MD、2014、1～65頁において発表)。

【0011】

[0011] NeuCodeの呼称でCoon及び共同研究者によって報告された質量欠損ベースの化学標識化アプローチとして、カルバミル化(Ulbrichら、J Am Soc Mass Spectrom、2014、25:6～9)及びメチルアミノ化(Ulbrichら、Anal Chem、2014、86:4402～4408)による二重化定量化、そしてアミン反応性タグによる多重化定量化(Hebertら、Mol Cell Proteomics、2013、12:3360～3369)が挙げられる。アミン反応性NeuCodeタグは、異なる構成の6つの重同位体(^{13}C 及び ^{15}N)を使用して、質量が12.6 mDa異なるタグの四重化セットを生じさせている。しかしながら、タグは3つのアミノ酸からなり、結果的に、431 Daと極端に大きい。アミノ酸の1つがアルギニンであり、これは、電荷隔離(charge sequestration)により、主鎖フラグメント化を阻害する(Tangら、Anal Chem、1993、65:2824～2834; 及びDiklerら、J Mass Spectrom、1997、32:1337～1349)。定量的プロテオミクス用の多重化された質量欠損ベースのタグの概念を実証するのに有用である一方、このタグは、上述の制限により、その意図される用途にとって幾分非実用的である可能性がある。

10

【0012】

[0012]したがって、サイズが小さく、且つ、標識化されるペプチドのフラグメント化を損なわない、定量的プロテオミクスワークフローへの組み込み用の質量欠損ベースのタギング試薬の向上が所望されている。

20

【発明の概要】

【0013】

[0013]本発明は、ジメチルピリミジニルオルニチン(DiPyro)及びその誘導体に基づく新規の質量欠損ベースの化学タグを提供する。当該質量欠損タグは、コンパクトであり、標識化したペプチドのフラグメント化を強化し、市販の出発材料を用いてごく少数の工程で高い純度で合成することが一般に容易であるという点で、有益である。

30

【0014】

[0014]本明細書中で一般に用いられる用語「DiPyro質量欠損タグ」及び「DiPyroタグ」は、例えば以下の構造及び式に記載されるような、ジメチルピリミジニルオルニチンに由来する、置換されている構造及び置換されていない構造を含む。DiPyroタグは、非常に小さな質量差異(例えば、一実施形態において、最大45.3 mDa又はわずか5.8 mDa)を標識化したサンプルに与えることによって、標識化したサンプルを高分解能MSによって同時に分析し得、そしてピーク面積同士を比較して、単一のLC-MS実験由来のサンプルの相対的定量化を可能とし得る。サンプル間の数Daの質量差異を与える、類似した質量差異戦略、例えばSILAC標識化又はジメチル標識化では、質量スペクトルの複雑性が、定量的チャンネルの数に比例して増大する結果として、機器効率を下がり、ペプチド及びタンパク質の同定数がより少なくなる。それに対して、本発明の質量欠損ベースの戦略によって用いられるmDa質量差異は、低い分解能から中程度の分解能($< 10 \text{ k} @ m/z \ 400$)では区別がつかず、そして質量スペクトルの複雑性を大幅に増大させずに、高速度の同定を保持する。mDa差異は、高分解能($> 120 \text{ k}$)MS¹スキャンで分解されて、標識化したサンプルピークを明らかとし得る。

40

【0015】

[0015]本明細書中で一般に用いられる、DiPyroタグを記載する用語はまた、DiPyroタグの構造中に組み込まれ得る重い安定同位体の数を示し得る。例えば、用語「DiPyro⁶」は、6つの重い安定同位体(すなわち、 ^{13}C 、 ^2H 、 ^{15}N 、 ^{18}O)が、タグの構造中に組み込まれ得ることを示す。但し、 ^{18}O 同位体は、2つの重同位体として数えられることを条件とする。その理由は、 ^{18}O が ^{16}O よりもおよそ2 D

50

a 重いためである。

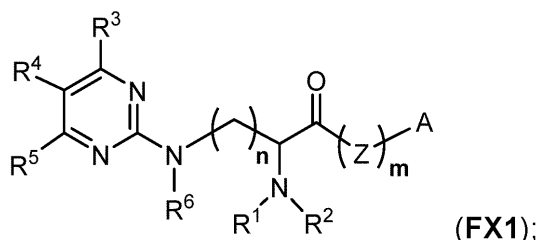
【0016】

[0016] 特定の実施形態において、D i P y r O タグは、ごく少数の工程で、確立され、且つ単純な、化学的性質、並びに市販の試薬及び同位体を用いて、高い純度にて合成される。これにより、短い期間で高収率にて生産するのに手頃な技術となっている。合成経路は、多数の同位体種の変異体を製剤化することを可能にしている。例えば、タグ構造における重同位体の置換の計算により、D i P y r O タグは、質量スペクトルの複雑性を増大させることなく、現在のO r b i t r a p プラットフォームでの十重化定量化を実現する。

【0017】

[0017] 一実施形態において、本発明は、質量分析に標識化試薬として用いられる、同位体が濃縮された化合物を含む組成物を提供し、上記化合物が、式(F X 1)を有し：

【化1】



式中、A が、アミン反応性基、カルボニル反応性基、又はチオール反応性基であり；Z が結合基であり；R³ ~ R⁵ が、それぞれ独立して、水素、C₁ ~ C₄ アルキル若しくはC₁ ~ C₄ アセチルであり、又はR³ ~ R⁵ のうちの少なくとも2つが、5員若しくは6員の芳香族若しくは脂環式の環を形成するように結合しており；R¹、R²、及びR⁶ が、それぞれ独立して、水素、C₁ ~ C₄ アルキル、又はC₁ ~ C₄ アセチルであり；上記化合物中の任意の数の炭素が、¹²C 又は ¹³C であり；上記化合物中の任意の数の窒素が、¹⁴N 又は ¹⁵N であり；上記化合物中の任意の数の水素が、¹H 又は ²H であり；上記化合物中の任意の数の酸素が、¹⁶O 又は ¹⁸O であり；n が、1 ~ 5 の範囲から選択される整数であり；m が、0 又は 1 であり；但し、炭素原子、窒素原子、酸素原子、及び水素原子から独立して選択される、式(F X 1)のうちの少なくとも2つの原子が、独立して重同位体であることを条件とし；同位体が濃縮された上記化合物が、天然の同位体存在量を超える量で存在する。

【0018】

[0018] 一部の実施形態において、式(F X 1)のアミン反応性基、カルボニル反応性基、又はチオール反応性基が、トリアジンエステル、NH S エステル、TF P エステル、イソチオシアネート、イソシアネート、ヒドラジド、アミノオキシ、及びヨードアセチルからなる群から選択される。

【0019】

[0019] 一部の実施形態において、D i P y r O タグは、アミン反応性基を含み、そしてペプチドのN末端及びあらゆるリジン側鎖の双方に結合することができる。例えば、少なくとも1つの実験において、複雑な酵母タンパク質抽出物消化物の、D i P y r O タグによる標識化効率は、1時間の標識化反応を用いて、> 99%の割合(N末端又はリジン)にて観察された。

【0020】

[0020] 本発明の様々な、同位体が濃縮された化合物は、様々な用途のために広範囲にわたって選択される、いくつかの安定な重い安定同位体を有することができる。本明細書中で用いられる、同位体が濃縮された化合物は、同位体標識として機能する1つ又は複数の重い安定同位体を有する化合物を指す。一実施形態において、例えば、同位体が濃縮された化合物は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、及び12個からなる群から

選択される数の重い安定同位体を有する。一実施形態において、例えば、同位体が濃縮された化合物は、1つ以上の重い安定同位体を、任意選択で、一部の用途について、4つ以上の重い安定同位体を、そして任意選択で、一部の用途について、10個以上の重い安定同位体を有する。

【0021】

[0021]任意選択で、本明細書中に記載される、炭素原子、窒素原子、酸素原子、及び水素原子から独立して選択される、式(FX1)のうちの少なくとも5つの原子が、独立して重同位体である。一実施形態において、本明細書中に記載される式(FX1)によって特徴付けられる、同位体が濃縮された上記化合物が、少なくとも2つの ^{13}C 同位体；又は少なくとも1つの ^{13}C 同位体及び少なくとも1つの ^{15}N 同位体；又は少なくとも1つの ^{13}C 同位体及び少なくとも1つの ^2H 同位体；又は少なくとも1つの同位体及び少なくとも1つの ^{18}O 同位体；又は少なくとも2つの ^{15}N 同位体；又は少なくとも1つの ^{15}N 同位体及び少なくとも1つの ^2H 同位体；又は少なくとも1つの ^{15}N 同位体及び少なくとも1つの ^{18}O 同位体；又は少なくとも2つの ^2H 同位体；又は少なくとも1つの ^2H 同位体及び少なくとも1つの ^{18}O 同位体；又は少なくとも2つの ^{18}O 同位体；又は少なくとも1つの ^{13}C 同位体、少なくとも1つの ^{15}N 同位体、及び少なくとも1つの ^2H 同位体；又は少なくとも1つの ^{13}C 同位体、少なくとも1つの ^{15}N 同位体、及び少なくとも1つの ^{18}O 同位体を有する。

10

【0022】

[0022]任意選択で、本明細書中に記載される式(FX1)によって特徴付けられる、同位体が濃縮された上記化合物が、少なくとも2つの ^{13}C 同位体；又は少なくとも4つの ^{13}C 同位体；又は少なくとも6つの ^{13}C 同位体；又は少なくとも4つの ^{13}C 同位体及び少なくとも1つの ^{18}O 同位体；又は少なくとも4つの ^{13}C 同位体及び少なくとも2つの ^{15}N 同位体；又は少なくとも4つの ^{13}C 同位体及び少なくとも2つの ^2H 同位体；又は少なくとも2つの ^{15}N 同位体；又は少なくとも4つの ^{15}N 同位体；又は少なくとも4つの ^{15}N 同位体及び少なくとも1つの ^{18}O 同位体；又は少なくとも4つの ^{15}N 同位体及び少なくとも2つの ^{13}C 同位体；又は少なくとも4つの ^{15}N 同位体及び少なくとも2つの ^2H 同位体；又は少なくとも2つの ^{15}N 同位体、少なくとも2つの ^2H 同位体、及び少なくとも1つの ^{18}O 同位体；又は少なくとも2つの ^{15}N 同位体、少なくとも2つの ^{13}C 同位体、及び少なくとも1つの ^{18}O 同位体；又は少なくとも2つの ^{15}N 同位体、少なくとも2つの ^2H 同位体、及び少なくとも2つの ^{13}C 同位体；又は少なくとも2つの ^{15}N 同位体及び少なくとも2つの ^2H 同位体；又は少なくとも2つの ^2H 同位体及び少なくとも1つの ^{18}O 同位体；又は少なくとも2つの ^{13}C 同位体及び少なくとも2つの ^2H 同位体；又は少なくとも2つの ^2H 同位体；又は少なくとも4つの ^2H 同位体；又は少なくとも6つの ^2H 同位体を有する。

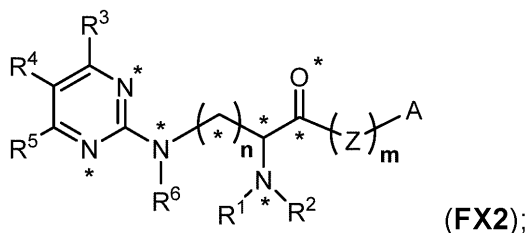
20

30

【0023】

[0023]一実施形態において、同位体が濃縮された上記化合物が、式(FX2)によって特徴付けられ：

【化2】



40

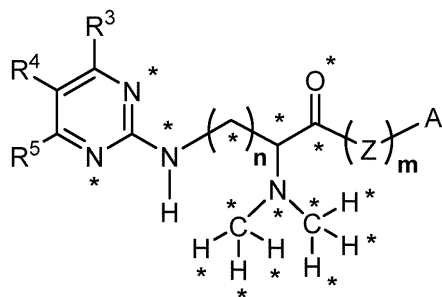
式中、符号*が、それぞれ独立して、上記重同位体のうちの1つであってもよい原子を示す。

【0024】

50

[0024]一実施形態において、同位体が濃縮された上記化合物が、式(FX3)によって特徴付けられ：

【化3】



(FX3);

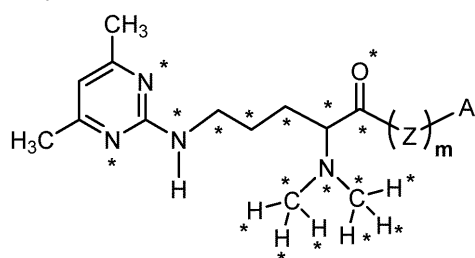
10

式中、符号*が、それぞれ独立して、上記重同位体のうちの1つであってもよい原子を示す。

【0025】

[0025]一実施形態において、同位体が濃縮された上記化合物が、式(FX4)によって特徴付けられ：

【化4】



(FX4);

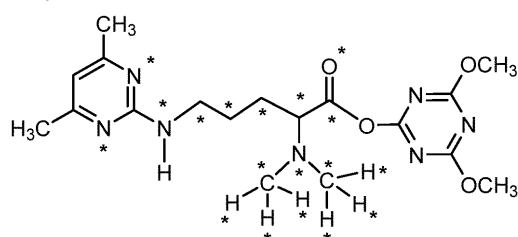
20

式中、符号*が、それぞれ独立して、上記重同位体のうちの1つであってもよい原子を示す。

【0026】

[0026]一実施形態において、同位体が濃縮された上記化合物が、式(FX5)によって特徴付けられ：

【化5】



(FX5);

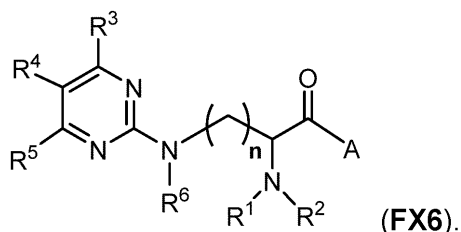
40

式中、符号*が、それぞれ独立して、上記重同位体のうちの1つであってもよい原子を示す。

【0027】

[0027]一実施形態において、同位体が濃縮された上記化合物が、式(FX6)によって特徴付けられる。

【化6】

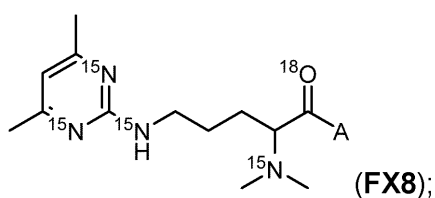
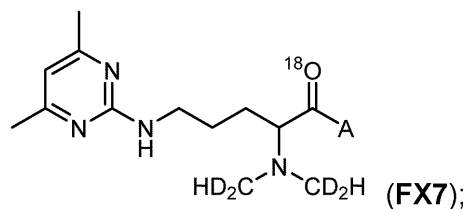


【0028】

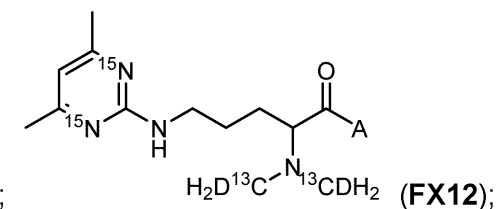
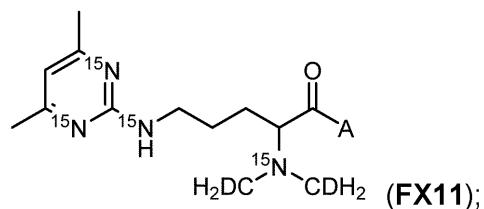
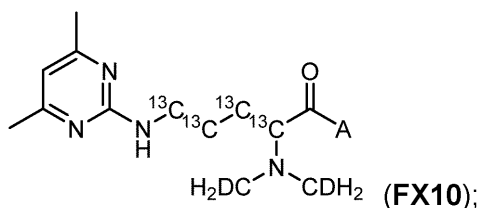
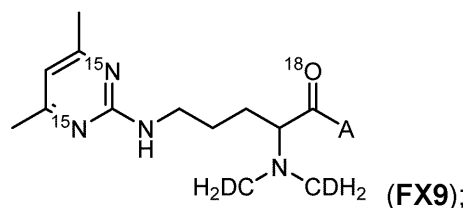
[0028] 更なる実施形態において、同位体が濃縮された上記化合物が、式(FX7)、(FX8)、(FX9)、(FX10)、(FX11)、(FX12)、(FX13)、(FX14)、(FX15)、(FX16)、又は(FX17)によって特徴付けられる：

10

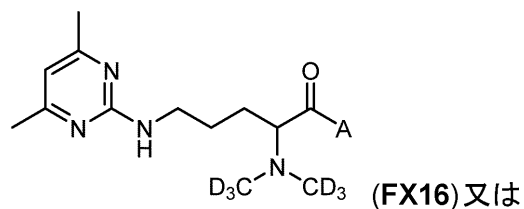
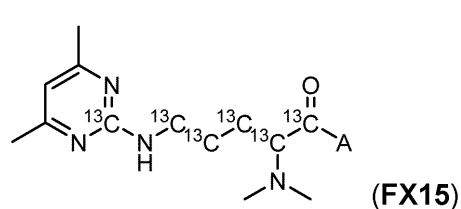
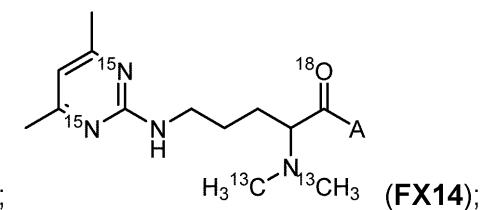
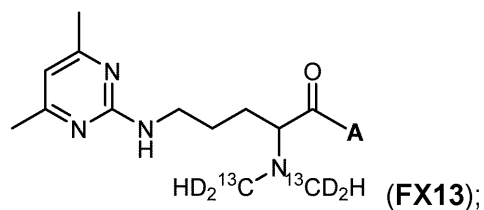
【化7】



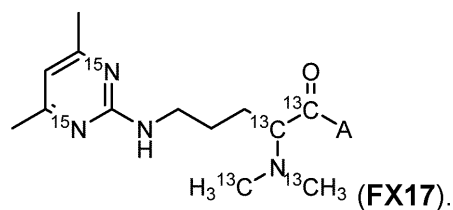
20



30



40

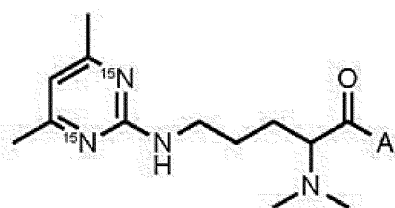


【0029】

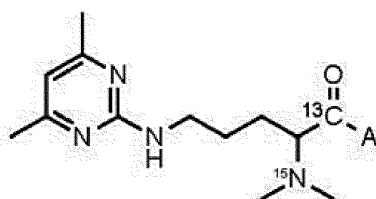
[0029] 一実施形態において、同位体が濃縮された上記化合物が、式(FX22)、(F

50

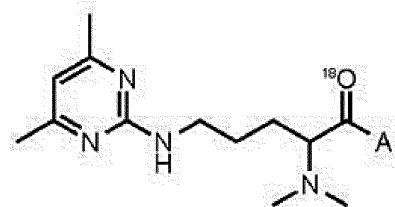
X 2 3)、(F X 2 4)、(F X 2 5)、又は(F X 2 6)によって特徴付けられる：
【化 8】



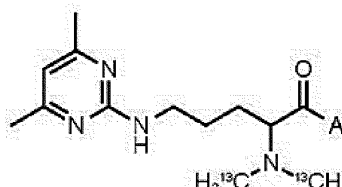
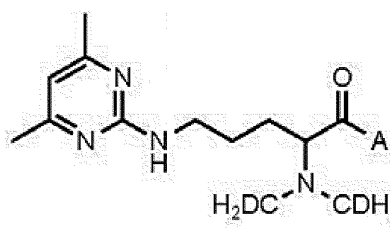
(FX22);



(FX23);



(FX24);

 $\text{H}_3^{13}\text{C}-\text{N}^{15}-^{13}\text{CH}_3$ (FX25); 又は $\text{H}_2\text{DC}-\text{N}^{15}-\text{CDH}_2$ (FX26).

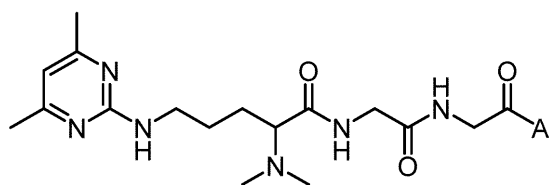
10

20

【 0 0 3 0 】

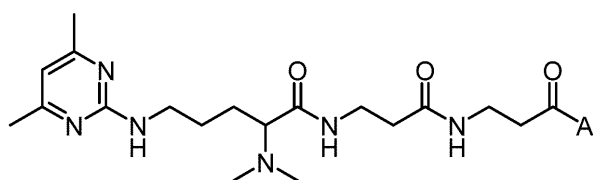
[0030]一実施形態において、同位体が濃縮された上記化合物が、式(F X 1 8)又は(F X 1 9)によって特徴付けられる：

【化 9】



(FX18) 又は

30



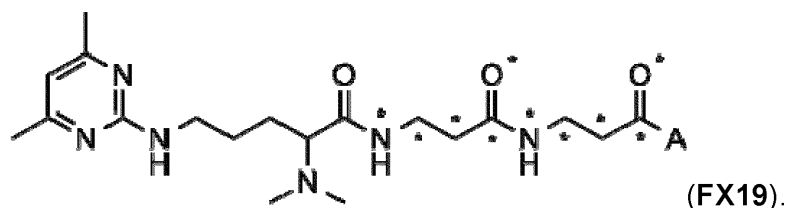
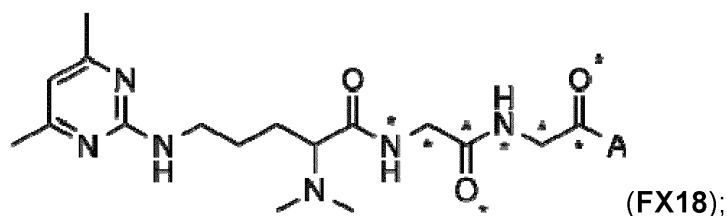
(FX19).

40

【 0 0 3 1 】

[0031]一部の実施形態において、式(F X 1)のZが、存在せず、又は、置換されているアルキレン基及び置換されていないアルキレン基が挙げられるがこれらに限定されない1つ若しくは複数の炭素原子を有する結合基である。特定の実施形態において、式(F X 1)のZが、ベータアラニン又はグリシンが挙げられるがこれらに限定されない、アミノ酸又はペプチドに対応する基である。一部の実施形態において、上記結合基が、例えば式(F X 1 8)及び式(F X 1 9)に示されるような、重同位体標識を組み込むことによって、質量差異による多重化の増大を可能にし得る更なる部位を提供し、式中、符号*が、それぞれ独立して、上記重同位体のうちの1つであってもよい原子を示す：

【化 1 0】



10

【 0 0 3 2】

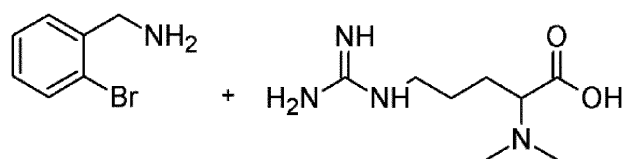
[0032]例えば、式 (F X 1 8) が、C、N、及びOの重同位体を組み込んで、+ 4 D a 及び + 8 D a の質量差異を達成するのに用いられ得るグリシン - グリシンリンカを組み込み、そして式 (F X 1 9) が、C 及び N の重同位体を組み込んで、+ 4 D a 及び + 8 D a の質量差異を達成するのに用いられ得るベータアラニン - ベータアラニンリンカを組み込む。

20

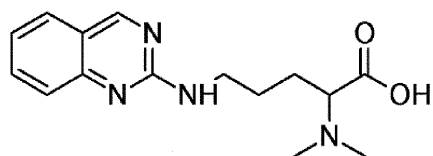
【 0 0 3 3】

[0033]一部の実施形態において、式 (F X 1) の R ³ 及び R ⁴ 又は R ⁴ 及び R ⁵ が、6員芳香環を形成するように結合している。特定の実施形態において、D i P y r O の芳香族誘導体が、標識化された種のより感度の良い蛍光検出を可能とする。例えば、式 (F X 1) の R ³ 及び R ⁴ 又は R ⁴ 及び R ⁵ が、以下のスキームに従って、ベンゼンに対応する基を形成するように結合している：

【化 1 1】



30



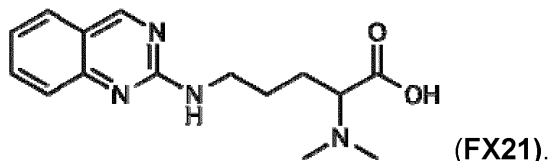
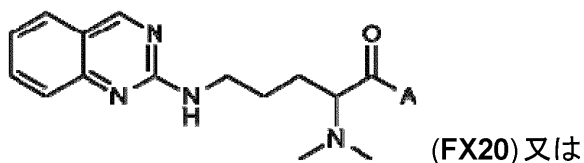
N⁶(2-キノゾリニル)-N⁶,N⁶-ジメチルオルニチン

40

【 0 0 3 4】

[0034]一実施形態において、同位体が濃縮された化合物が、式 (F X 2 0) 又は式 (F X 2 1) によって特徴付けられる：

【化 1 2】



10

【0035】

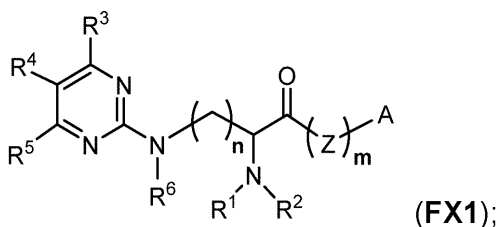
[0035] 本発明の一実施形態は、同位体が濃縮された、複数の異なる化合物を含む組成物を提供し、同位体が濃縮された、異なる上記化合物が、それぞれ独立して、式 (FX1) を有し；同位体が濃縮された、異なる上記化合物が、同位体種である。

【0036】

[0036] 一実施形態において、本発明は、質量分析用の標識化試薬として用いられる、同位体が濃縮された、複数の異なる同位体種を含むキットを提供し、同位体が濃縮された上記同位体種が、独立して、式 (FX1) を有し；

20

【化 1 3】



式中、A が、アミン反応性基、カルボニル反応性基、又はチオール反応性基であり；Z が結合基であり； $R^3 \sim R^5$ が、それぞれ独立して、水素、 $C_1 \sim C_4$ アルキル若しくは $C_1 \sim C_4$ アセチルであり、又は $R^3 \sim R^5$ のうちの少なくとも2つが、5員若しくは6員の芳香族若しくは脂環式の環を形成するように結合しており； R^1 、 R^2 、及び R^6 が、それぞれ独立して、水素、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、又は $C_1 \sim C_4$ アセチルであり；上記化合物中の任意の数の炭素が、 ^{12}C 又は ^{13}C であり；上記化合物中の任意の数の窒素が、 ^{14}N 又は ^{15}N であり；上記化合物中の任意の数の水素が、 1H 又は 2H であり；上記化合物中の任意の数の酸素が、 ^{16}O 又は ^{18}O であり；n が、1～5の範囲から選択される整数であり；m が、0又は1であり；上記同位体種の少なくとも一部が、50 mDa 以下の質量差異によって特徴付けられ；同位体が濃縮された上記同位体種が、天然の同位体存在量を超える量で存在する。

30

【0037】

[0037] 更なる実施形態において、上記キットが、同位体が濃縮された、異なる上記同位体種のうちの2、3、4、5、6、7、8、9、10個、又はそれ以上を含む。任意選択で、上記同位体種の少なくとも一部が、5 mDa～55 mDaの範囲にわたって選択される質量差異によって特徴付けられ、25 mDa以下の質量差異によって特徴付けられることが好ましい。

40

【0038】

[0038] 一実施形態において、上記同位体種の少なくとも一部が、100,000以上の分解力、120,000以上の分解力、240,000以上の分解力、又は480,000以上の分解力を実現する質量分析技術を用いて分解可能な質量差異によって特徴付けられる。上記質量分析が、MS¹技術、多重化技術、プロテオミクス分析技術、グライコム分析技術、又はメタボロミクス分析技術を含む。上記同位体種の少なくとも一部が、ペ

50

プチド、タンパク質、グリカン、又は代謝物質のアミン基、カルボニル基、又はチオール基と反応性である。

【 0 0 3 9 】

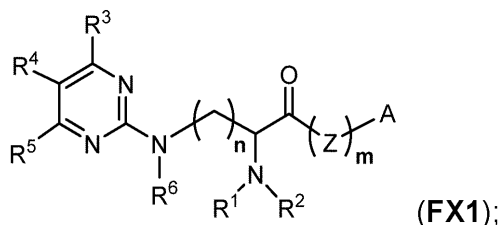
[0039]一実施形態において、本発明は、1つ又は複数のアミン基を含有する標的分子を標識化する方法を提供し、上記方法が、

a) 上記標的分子を用意するステップと；

b) 上記標的分子を、同位体が濃縮された化合物と反応させることによって、同位体で標識化された標的分子を生じさせるステップと

を含み；同位体が濃縮された同位体種が、それぞれ独立して、式 (F X 1) を有し：

【 化 1 4 】



式中、A が、アミン反応性基、カルボニル反応性基、又はチオール反応性基であり；Z が結合基であり；R³ ~ R⁵ が、それぞれ独立して、水素、C₁ ~ C₄ アルキル若しくはC₁ ~ C₄ アセチルであり、又はR³ ~ R⁵ のうちの少なくとも2つが、5員若しくは6員の芳香族若しくは脂環式の環を形成するように結合しており；R¹、R²、及びR⁶ が、それぞれ独立して、水素、C₁ ~ C₄ アルキル、又はC₁ ~ C₄ アセチルであり；上記化合物中の任意の数の炭素が、¹²C又は¹³Cであり；上記化合物中の任意の数の窒素が、¹⁴N又は¹⁵Nであり；上記化合物中の任意の数の水素が、¹H又は²Hであり；上記化合物中の任意の数の酸素が、¹⁶O又は¹⁸Oであり；n が、1 ~ 5 の範囲から選択される整数であり；m が、0 又は 1 であり；但し、炭素原子、窒素原子、酸素原子、及び水素原子から独立して選択される、式 (F X 1) のうちの少なくとも2つの原子が、独立して重同位体であることを条件とする。

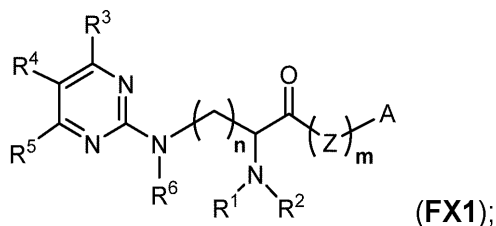
【 0 0 4 0 】

[0040]一部の実施形態において、本発明は、質量分析技術を用いて標的分子を分析する方法を提供し、上記方法が、

a) 上記標的分子を、複数の異なるサンプル中に与えるステップと；

b) 各サンプル中の上記標的分子を、同位体が濃縮された、異なる同位体種と反応させることによって、同位体で標識化された標的分子を含むサンプルを生じさせるステップであって、同位体が濃縮された、異なる上記同位体種が、それぞれ独立して、式 (F X 1) を有し：

【 化 1 5 】



式中、A が、アミン反応性基、カルボニル反応性基、又はチオール反応性基であり；Z が結合基であり；R³ ~ R⁵ が、それぞれ独立して、水素、C₁ ~ C₄ アルキル若しくはC₁ ~ C₄ アセチルであり、又はR³ ~ R⁵ のうちの少なくとも2つが、5員若しくは6員の芳香族若しくは脂環式の環を形成するように結合しており；R¹、R²、及びR⁶ が、それぞれ独立して、水素、C₁ ~ C₄ アルキル、又はC₁ ~ C₄ アセチルであり；上記化合物中の任意の数の炭素が、¹²C又は¹³Cであり；上記化合物中の任意の数の窒素が

、 ^{14}N 又は ^{15}N であり；上記化合物中の任意の数の水素が、 ^1H 又は ^2H であり；上記化合物中の任意の数の酸素が、 ^{16}O 又は ^{18}O であり； n が、1～5の範囲から選択される整数であり； m が、0又は1であり；但し、炭素原子、窒素原子、酸素原子、及び水素原子から独立して選択される、式(FX1)のうちの少なくとも2つの原子が、独立して重同位体であることを条件とし；上記同位体種の少なくとも一部が、50 mDa以下の質量差異によって特徴付けられる、ステップと；

c) 上記質量分析技術を用いて、各サンプルについて、同位体で標識化された上記標的分子を分析するステップとを含む。

【0041】

10

[0041] 2、3、4、5、6、7、8、9、10個、又はそれ以上の異なるサンプルを、同位体が濃縮された、異なる同位体種と反応させることが好ましい。任意選択で、上記同位体種の少なくとも一部が、5 mDa～55 mDaの範囲にわたって選択される質量差異によって特徴付けられ、25 mDa以下の質量差異によって特徴付けられることが好ましい。

【0042】

[0042] 一実施形態において、上記質量分析技術を用いて、各サンプルについて、同位体で標識化された上記分析物を分析する上記ステップが、100,000以上の分解力、120,000以上の分解力、240,000以上の分解力、又は480,000以上の分解力を実現する質量分析技術を用いて実行される。上記質量分析が、MS¹技術、二重化、三重化、四重化、五重化、六重化、七重化、八重化、九重化、又は十重化の多重化質量分析技術を含む。任意選択で、上記質量分析が、プロテオミクス分析技術、グライコム分析技術、又はメタボロミクス分析技術を含む。上記同位体種の少なくとも一部が、ペプチド、タンパク質、グリカン、又は代謝物質のアミン基、カルボニル基、又はチオール基と反応性である。

20

【0043】

[0043] 一実施形態において、上記方法はさらに、上記異なるサンプル中の、標識化された上記標的分子の相対量を定量化するステップを含む。任意選択で、相対的定量化が、標識化された上記標的分子からの蛍光を測定することによって実行される。相対的定量化が、MS¹レベルにて実行され得、そして、定量化がMS²レベルにて実行されるアイソバリック標識化とは異なり、測定される定量的比率が、干渉する前駆イオンの共単離に起因する圧縮の影響を受けない。アイソバリック標識化は、ペプチドをサンプリングして、MS²によって、定量化のためにレポーターイオンを生じさせることを必要とする一方、質量欠損戦略はそうではない。その理由は、定量的情報が、高分解能MS¹スキャンのペプチド前駆体の相対ピーク面積から収集されるためである。

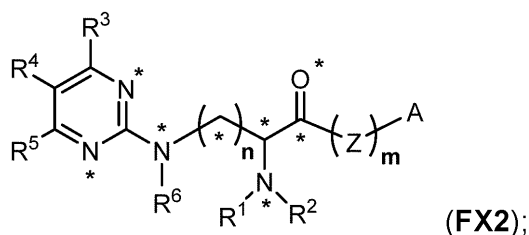
30

【0044】

[0044] 一実施形態において、同位体が濃縮された上記同位体種が、それぞれ独立して、式(FX2)によって特徴付けられ：

【化16】

40



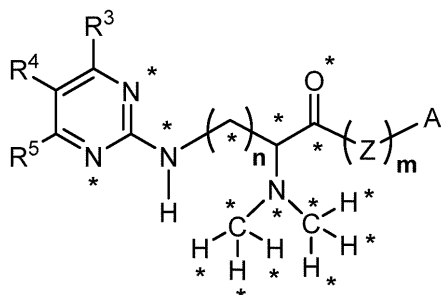
式中、符号*が、それぞれ独立して、上記重同位体のうちの1つであってもよい原子を示す。

【0045】

50

[0045]一実施形態において、同位体が濃縮された上記同位体種が、それぞれ独立して、式(FX3)によって特徴付けられ：

【化17】



(FX3);

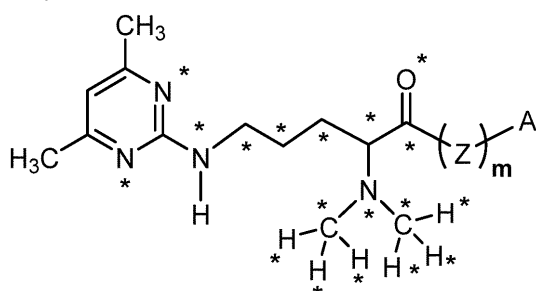
10

式中、符号*が、それぞれ独立して、上記重同位体のうちの1つであってもよい原子を示す。

【0046】

[0046]一実施形態において、同位体が濃縮された上記同位体種が、それぞれ独立して、式(FX4)によって特徴付けられ：

【化18】



(FX4);

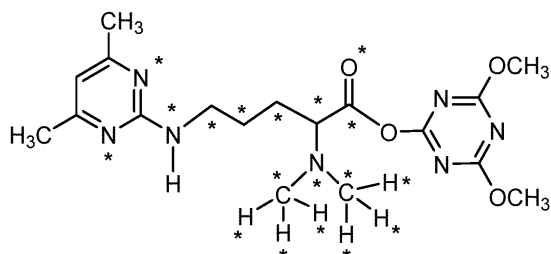
20

式中、符号*が、それぞれ独立して、上記重同位体のうちの1つであってもよい原子を示す。

【0047】

[0047]一実施形態において、同位体が濃縮された上記同位体種が、それぞれ独立して、式(FX5)によって特徴付けられ：

【化19】



(FX5);

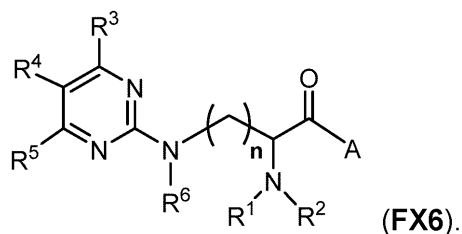
40

式中、符号*が、それぞれ独立して、上記重同位体のうちの1つであってもよい原子を示す。

【0048】

[0048]一実施形態において、同位体が濃縮された上記同位体種が、それぞれ独立して、式(FX6)によって特徴付けられる。

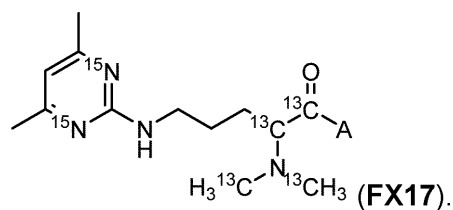
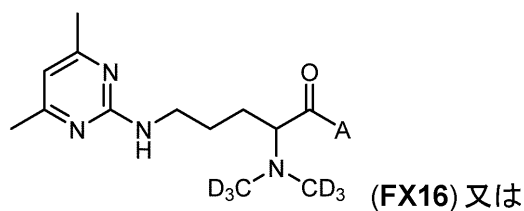
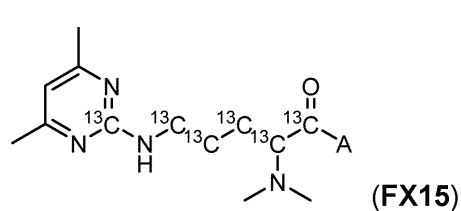
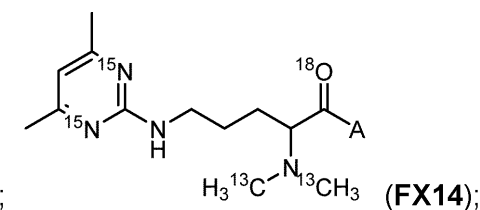
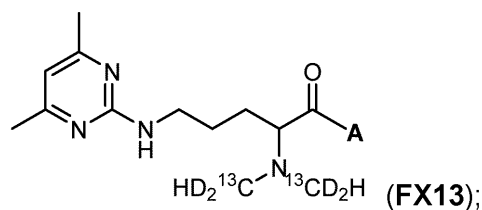
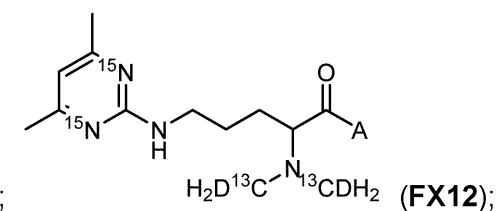
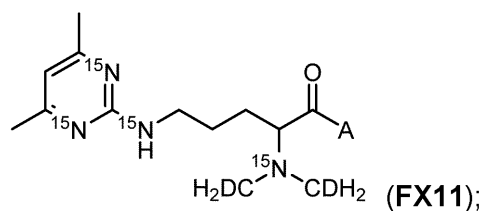
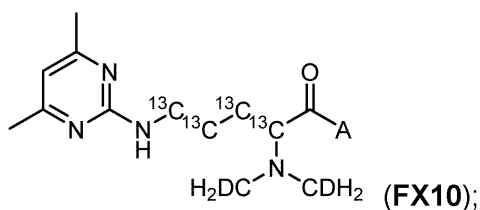
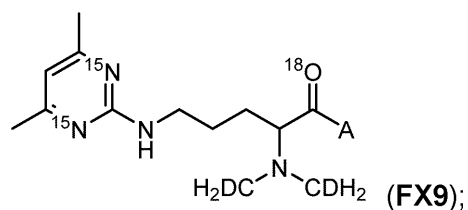
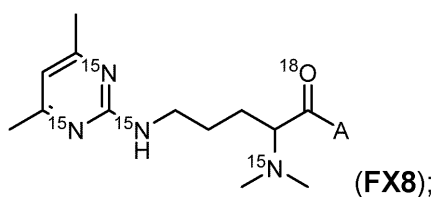
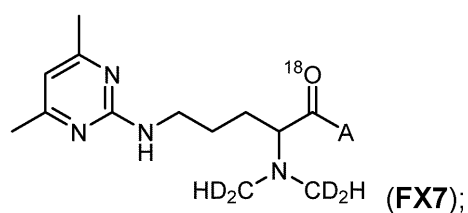
【化 2 0】



【 0 0 4 9】

[0049] 更なる実施形態において、同位体が濃縮された上記同位体種が、それぞれ独立して、式 (FX7)、(FX8)、(FX9)、(FX10)、(FX11)、(FX12)、(FX13)、(FX14)、(FX15)、(FX16)、又は (FX17) によって特徴付けられる：

【化 2 1】



【 0 0 5 0】

10

20

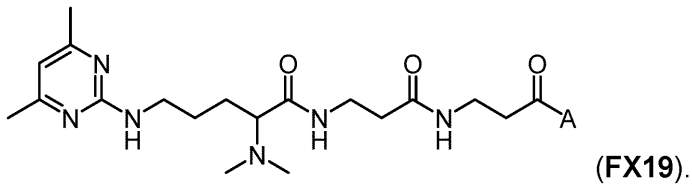
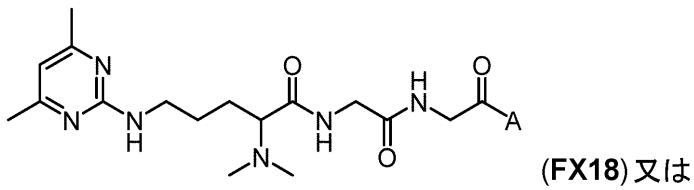
30

40

50

【0050】一実施形態において、同位体が濃縮された上記同位体種が、それぞれ独立して、式(FX18)又は(FX19)によって特徴付けられる：

【化22】

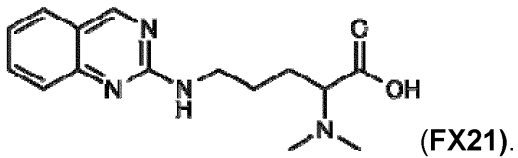
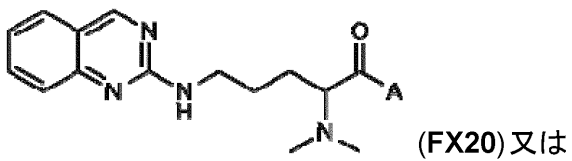


10

【0051】

【0051】一実施形態において、同位体が濃縮された上記同位体種が、それぞれ独立して、式(FX20)又は(FX21)によって特徴付けられる：

【化23】



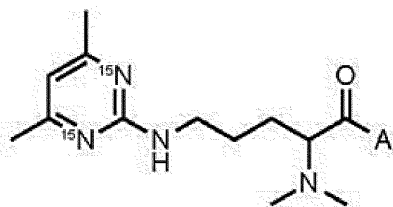
20

【0052】

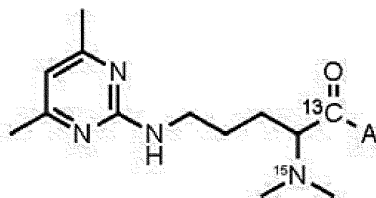
【0052】一実施形態において、同位体が濃縮された上記同位体種が、それぞれ独立して、式(FX22)、(FX23)、(FX24)、(FX25)、又は(FX26)によって特徴付けられる：

30

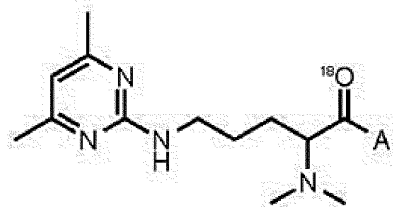
【化 2 4】



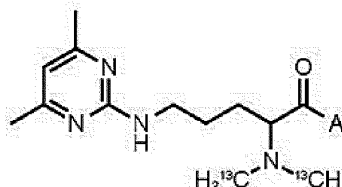
(FX22);



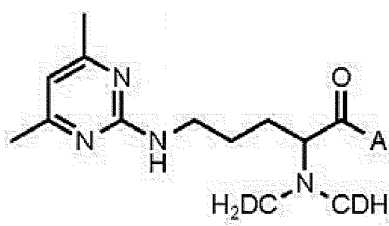
(FX23);



(FX24);



(FX25); 又は



(FX26).

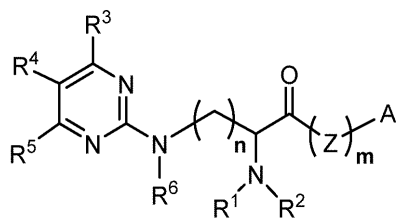
10

20

【 0 0 5 3】

[0053]一実施形態において、本発明は、同位体が濃縮された標識化試薬を製造する方法であって、アミノ酸前駆体を用意するステップと；上記アミノ酸前駆体を、第1の試薬と化学反応させて、任意選択で置換されているピリミジン基を用意するステップと；上記アミノ酸前駆体のカルボン酸基を、第2の試薬と化学反応させて、アミン反応性基、カルボニル反応性基、又はチオール反応性基を得て、以下の式を有する、同位体が濃縮された上記標識化試薬を形成するステップとを含み：

【化 2 5】



(FX1);

30

40

式中、Aが、アミン反応性基、カルボニル反応性基、又はチオール反応性基であり；Zが結合基であり； $R^3 \sim R^5$ が、それぞれ独立して、水素、 $C_1 \sim C_4$ アルキル若しくは $C_1 \sim C_4$ アセチルであり、又は $R^3 \sim R^5$ のうちの少なくとも2つが、5員若しくは6員の芳香族若しくは脂環式の環を形成するように結合しており； R^1 、 R^2 、及び R^6 が、それぞれ独立して、水素、 $C_1 \sim C_4$ アルキル、又は $C_1 \sim C_4$ アセチルであり；上記化合物中の任意の数の炭素が、 ^{12}C 又は ^{13}C であり；上記化合物中の任意の数の窒素が、 ^{14}N 又は ^{15}N であり；上記化合物中の任意の数の水素が、 1H 又は 2H であり；上記化合物中の任意の数の酸素が、 ^{16}O 又は ^{18}O であり；nが、1～5の範囲から選択される整数であり；mが、0又は1であり；但し、炭素原子、窒素原子、酸素原子、及び水素原子から独立して選択される、式(FX1)のうちの少なくとも2つの原子が、独立して重同位体であることを条件とし；同位体が濃縮された上記同位体種が、天然の同位体存在量を超える量で存在する、方法を提供する。

【 0 0 5 4】

50

[0054] 上記アミノ酸前駆体が、同位体が濃縮されたアミノ酸前駆体、例えば同位体が濃縮されたアルギニンであることが好ましく、上記アミノ酸前駆体が、重同位体である少なくとも2つの原子を含有することによって特徴付けられ、上記重同位体が、天然の同位体存在量を超える量で存在する。上記第1の試薬又は上記第2の試薬が、同位体が濃縮された試薬であることが好ましく、上記試薬が、重同位体である少なくとも2つの原子を含有することによって特徴付けられ、上記重同位体が、天然の同位体存在量を超える量で存在する。

【0055】

[0055] 一実施形態において、上記アミノ酸前駆体のカルボン酸基が反応して、トリアジンエステルが形成される。一実施形態において、アミノ酸前駆体がアルギニンであり、そして上記方法がさらに、上記アルギニンのグアニジン基を誘導体化して、任意選択で置換されているピリミジン基を形成するステップを含む。更なる実施形態において、上記方法がさらに、任意選択で置換されている上記ピリミジン基を形成する前に、ホルムアルデヒドによるパラジウム触媒ジメチル化を上記アミノ酸前駆体に対して実行するステップを含む。

10

【0056】

[0056] 一実施形態において、本発明の化合物が、式(FX1)~(FX4)のいずれかによって特徴付けられ、式中、mが1と等しい。一実施形態において、本発明の化合物が、式(FX1)~(FX4)のいずれかによって特徴付けられ、式中、mが0と等しい。本明細書中で用いられる、式(FX1)~(FX4)を有する化合物(式中、mが1と等しい)が、結合基Zを含む化合物を指す。本明細書中で用いられる、式(FX1)~(FX4)を有する化合物(式中、mが0と等しい)が、結合基Zを含まない化合物を指し、例えば、式中、アミン反応性基Aが、主鎖のカルボニル基に直接結合している。

20

【0057】

[0057] 本方法の重要な態様は、100, 000以上の分解力、120, 000以上の分解力、240, 000以上の分解力、又は480, 000以上の分解力を実現する質量分析技術を用いて分解され得る質量差異を有する一連の、同位体が濃縮された化合物の使用である。分子質量差異が小さい(例えば300mDa以下の)、同位体が濃縮された化合物の少なくとも一部の使用が、一部の実施形態において、高い多重化能に接近するのに有益である。一部の実施形態において、例えば、同位体が濃縮された化合物を分析するステップが、同位体が濃縮された化合物の質量対電荷比及び/又は分子質量の差異を分解することを含む。一部の実施形態において、例えば、第1の同位体が濃縮された化合物と第2の同位体が濃縮された化合物との分子質量の差異が、100mDa以下である。一部の用途について、第1の同位体が濃縮された化合物と第2の同位体が濃縮された化合物との分子質量の差異が、50mDa以下であり、任意選択で、一部の用途について、第1の同位体が濃縮された化合物と第2の同位体が濃縮された化合物との分子質量の差異が、10mDa以上である。一部の実施形態において、例えば、第1の同位体が濃縮された化合物と第2の同位体が濃縮された化合物との分子質量の差異が、100mDa~1mDaの範囲にわたって選択され、任意選択で、一部の用途について、第1の同位体が濃縮された化合物と第2の同位体が濃縮された化合物との分子質量の差異が、50mDa~1mDaの範囲にわたって選択され、任意選択で、一部の用途について、第1の同位体が濃縮された化合物と第2の同位体が濃縮された化合物との分子質量の差異が、50mDa~5mDaの範囲にわたって選択され、任意選択で、一部の用途について、第1の同位体が濃縮された化合物と第2の同位体が濃縮された化合物との分子質量の差異が、50mDa~1mDaの範囲にわたって選択される。一部の実施形態において、例えば、同位体が濃縮された化合物がそれぞれ、分子質量が、別の同位体が濃縮された化合物の100mDa~1mDa以内であり、任意選択で、一部の用途について、同位体が濃縮された化合物がそれぞれ、分子質量が、別の同位体が濃縮された化合物の50mDa~1mDa以内であり、任意選択で、一部の用途について、同位体が濃縮された化合物がそれぞれ、分子質量が、別の同位体が濃縮された化合物の10mDa~1mDa以内である。一部の実施形態において、

30

40

50

例えば、同位体が濃縮された化合物の全ての分子質量が、 $1000\text{ mDa} \sim 1\text{ mDa}$ の範囲内であり、任意選択で、一部の用途について、同位体が濃縮された化合物の全ての分子質量が、 $100\text{ mDa} \sim 1\text{ mDa}$ の範囲内であり、任意選択で、一部の用途について、同位体が濃縮された化合物の全ての分子質量が、 $50\text{ mDa} \sim 5\text{ mDa}$ の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】ジメチルピリミジニルオルニチンタグ (254 Da の名目上の質量) 及びアミン反応性トリアジンエステル基を含む、本発明の一実施形態における DiPyro 質量欠損標識化試薬を示す図である。合計最大6つの重い安定同位体 (^{13}C 、 ^2H 、 ^{15}N 、 ^{18}O) を、質量欠損ベースのタグ DiPyro^6 の構造 (図1A) に、異なる構成で組み込んで、最小質量欠損が 45.28 mDa 、 20.95 mDa 、 12.64 mDa 、 8.31 mDa 、及び 5.84 mDa であるそれぞれ二重化セット (図1B)、三重化セット (図1C)、四重化セット (図1D)、六重化セット (図1E)、及び八重化セット (図1F) を生じさせる。

10

【図2A】図1B～図1Fに類似するが、2つの重い安定同位体 (^{13}C 、 ^2H 、 ^{15}N 、 ^{18}O) が、質量欠損ベースのタグの構造に、異なる構成で組み込まれて、名目上のタグ質量が 250 Da (DiPyro^2) 及び 258 Da (DiPyro^{10}) である更なる多重化セットを生じさせる、本発明の一実施形態における DiPyro 質量欠損標識化試薬を示す図である。多重化 DiPyro^2 、 DiPyro^6 、及び DiPyro^{10} セットを、単一の実験に同時に用いて、質量欠損ベースの定量的チャンネルの、 4 Da の間隔が空けられる3つのクラスタによって、多重化を増大させることができる。

20

【図2B】図1B～図1Fに類似するが、10個の重い安定同位体 (^{13}C 、 ^2H 、 ^{15}N 、 ^{18}O) が、質量欠損ベースのタグの構造に、異なる構成で組み込まれて、名目上のタグ質量が 250 Da (DiPyro^2) 及び 258 Da (DiPyro^{10}) である更なる多重化セットを生じさせる、本発明の一実施形態における DiPyro 質量欠損標識化試薬を示す図である。多重化 DiPyro^2 、 DiPyro^6 、及び DiPyro^{10} セットを、単一の実験に同時に用いて、質量欠損ベースの定量的チャンネルの、 4 Da の間隔が空けられる3つのクラスタによって、多重化を増大させることができる。

30

【図3】図1B～図1Fの DiPyro^6 二重化、三重化、四重化、六重化、及び八重化セットの、考えられる重同位体構成を示す図である。

【図4】 NeuCode SILAC に用いることができる同位体標識化リジン (K) の重同位体構成を、そして、 NeuCode 標識化リジンをを用いて、様々な量の酵母プロテオームを同定するのに必須の分解力を示す図である。

【図5】 DiPyro^6 標識化トリプシンペプチドを用いて、様々な量の酵母プロテオームを同定するのに必須の分解力要件を記載する図である。

【図6】 DiPyro^6 標識化酵母トリプシン消化物と NeuCode SILAC 酵母 Lys-C 消化物との分解力の比較を示す図である。

【図7】 DiPyro^6 標識化酵母 Lys-C 消化物と NeuCode SILAC 酵母 Lys-C 消化物との分解力の比較を示す図である。

【図8】本発明の一実施形態における DiPyro 試薬の合成を示す図である。アルギニンは、 H^2 雰囲気中でのホルムアルデヒドによるパラジウム触媒ジメチル化に続いて、グアニジノの、ピリミジンへの誘導体化を受ける。カルボン酸がトリアジンエステルに活性化されて、 DiPyro 標識化試薬が生じる。

40

【図9】合成した DiPyro タギング試薬の直接注入 MS 後の、単離した DiPyro タギング試薬の質量スペクトルを示す図である。フラッシュカラムクロマトグラフィの後、 DiPyro が高い純度で回収された。

【図10】 HCD 標準化衝突エネルギーの最適化を示す図である。 DiPyro 標識化酵母トリプシン消化物サンプル及び BSA トリプシン消化物を、(図10A) CID (酵母用) 及び (図10B) HCD (BSA 用) を用いる Orbitrap Elite の、溶離勾配がそれぞれ 120 分及び 30 分の nano LC-MS^2 により、分析した。 NCE

50

値は24、27、30、33、36、及び39であった。同定したペプチドスペクトルマッチの数値（灰色の下部線）及びメジアンXCorr値（黒色の上部線）を、NCEの関数としてプロットした。高品質MS²スペクトルのより大きな数値に基づいて、29又は30のNCEを、その後の実験に選択した。

【図11】様々な標識対ペプチド比率での、そしてN末端標識化（N）及び／又はリジン標識化（K）についての標識化効率データを示す図である。DiPyroタグは、少なくとも1つのタグでトリプシン生成ペプチド及びLys-C生成ペプチドを標識化し、1時間での50：1（w/w）の標識：ペプチド比にて、>99%の効率であった。リジンを含有するトリプシン生成ペプチド及びLys-C生成ペプチドは、N末端及びリジン残基の双方にて、2つのタグで、それぞれ99%及び94%の効率で標識化された。

【図12】ペプチド同定に及ぼすDiPyro標識化の効果を示す。DiPyroで標識化した、そして標識化していない酵母トリプシン消化物サンプルを、HCDフラグメント化を用いる、Orbitrap EliteのnanoLC-MS²により、分析した（それぞれ29及び35のNCE）図である。標識化サンプル由来の標識化PSMのペプチド電荷状態（図12A）、ペプチド長（図12B）、及びXCorr（図11C）値の分布を、非標識化サンプル由来の数値に対してプロットした。

【図13】HCDフラグメント化後にOrbitrapで得られたDiPyro標識化酵母トリプシンペプチドのMS²スペクトルを示す（29のNCE）図である。多くのy-イオン及びb-イオンを、確信的なペプチド配列同定のために観察した。DiPyroタグのフラグメント化によって生じた低質量領域の典型的なイオンを、菱形によって標示した。

【図14】特徴的なDiPyroフラグメントイオンを示す（図14A）図である。DiPyro標識化ペプチドの衝突誘起解離により、4つの特徴的な「レポーター」イオンが、MS²スペクトルの低質量領域において生じる。イオンの測定した質量に基づいて、電位構造を示す（図14B）図である。理論上のMS²スペクトルは、三重化DiPyro⁶質量欠損同位体種が更なるイオンを生じさせて、イオンの4つのクラスタが得られることを示す。

【図15】本発明の一実施形態の種々の多重化セットを構成する各同位体種のための同位体位置を有する例示的なDiPyro⁶同位体構造を示す図である。これらの例示的な構造は包括的でなく、更なる同位体組合せが利用可能である。

【図16】軽いDiPyro₀₀₄₁（¹⁵N₄¹⁸O）タグ及び重いDiPyro₀₆₀₀（²H₆）タグで二重に標識化して、組み合わせ、Orbitrap Elite系のnanoLC-MS²により、120分の溶離勾配を用いて分析した、酵母トリプシン消化物サンプル由来のデータを示す図である。また、保持時間（RT）=66.4分にて分解力（RP）が120kのOrbitrap質量分析器において得たFT-MSスキンを、m/z 642及び963にて電荷状態2+及び3+により検出した、DiPyroで標識化したペプチドの抽出したイオンクロマトグラムと共に示す。また、軽い、そして重い標識化サンプルについてベースライン分解ピークを示す同位体ピーククラスタを、基準ピークイオン（BPI）クロマトグラムに加えて示す。

【図17】図16で検出した、いくつかの二重化DiPyro⁶標識化ペプチドの抽出したイオンクロマトグラムを、軽い、そして重い標識化サンプルについてベースライン分解ピークを示すペプチドの同位体ピーククラスタと一緒に示す図である。

【図18】軽いDiPyro₀₀₄₁（¹⁵N₄¹⁸O）タグ、中程度のDiPyro₂₂₀（¹³C₂²H₂¹⁵N₂）タグ、及び重いDiPyro₀₆₀₀（²H₆）タグで三重に標識化して、組み合わせ、Orbitrap Elite系のnanoLC-MS²により、120分の溶離勾配を用いて分析した、酵母トリプシン消化物サンプル由来のデータを示す図である。BPIクロマトグラムを、Orbitrap質量分析器で得たFT-MSスキンと共に示す。また、RP 30k及びRP 240kの背向（back-to-back）FT-MSスキンで検出した、m/z 777でのペプチドの同位体ピークのクラスタを示す。別々に標識化したペプチドサンプルは、30kにて区別

10

20

30

40

50

がつかないが、240kにて明らかであり、軽い、中程度の、そして重い、DiPyro⁶で標識化したサンプルから生じた3つのピークの比較による定量化が可能となる。

【図19】m/z 777での図18の三重化DiPyro⁶標識化ペプチドピークを示す図であり、120kではなく240kにてベースライン分解している。このペプチドは、3+電荷状態で検出された。そして、N末端にて単一のDiPyroタグで標識化されている。

【図20】軽いDiPyro₀₀₄₁(¹⁵N₄¹⁸O)タグ、中程度のDiPyro₂₂₀(¹³C₂²H₂¹⁵N₂)タグ、及び重いDiPyro₀₆₀₀(²H₆)タグで、それぞれ2:1:2の比率で三重に標識化して、Orbitrap Elite系のLC-MSにより分析した、酵母サンプル由来のデータを示す図である。RP 30k及びRP 240kの背向FT-MSスキャンで検出した、m/z 471、628、及び942でのペプチドの同位体ピークのクラスタを示す。別々に標識化したペプチドサンプルは、RP 30kにて区別がつかないが、240kにて明らかであり、軽い、中程度の、そして重いDiPyro⁶で標識化したサンプルから生じた3つのピークの比較による定量化が可能となる。同定した酵母プロテオームのタンパク質の76%超及びペプチドの63%超が、三重化DiPyroタグを用いて、うまく定量化された。

【図21】単一のDiPyroタグを有する三重化DiPyro⁶標識化トリプシンペプチドの、2つのDiPyroタグを有するトリプシンペプチドとの比較を示す図である。N末端アミン及びC末端アルギニン(R)残基を有するトリプシンペプチドが、単一のタグを有する一方、N末端アミン及びC末端リジン(K)残基を有し、側鎖アミンを有するペプチドが、2つのタグを有して、240kにてより容易にベースライン分解される。チャンネル間での質量欠損差異を2つのタグで2倍にすることで、より低い分解力でのより高次の多重化分析が可能となり得る。

【図22】RP 240kにて九重化定量化を可能にする二重化DiPyro²、三重化DiPyro⁶、及び四重化DiPyro¹⁰のセットの組合せを示す図である。多重化の増大は、質量欠損ベースの定量的チャンネルの、4Daの間隔が空けられる3つのクラスタによって達成される。

【図23】軽いDiPyro₀₀₄₁(¹⁵N₄¹⁸O; +254.1561)タグ及び重いDiPyro₀₆₀₀(²H₆; +254.20138)タグで、2:1の比率で組み合わせる二重に標識化したアミノ酸フェニルアラニン(165.0790Da)、トリプトファン(204.0899Da)、及びロイシン/イソロイシン(131.0946Da)を含有し、Orbitrap Elite系のnanoLC-MS²により、30分の溶離勾配を用いて分析した、アミン含有代謝物質標準混合物サンプル由来のデータを示す図である。Orbitrap質量分析器でRP 120kにて得たFT-MSスキャンを、電荷状態1+でm/z 420、459、及び386にて検出した各DiPyro標識化アミノ酸の抽出したイオンクロマトグラムと共に示す。同位体ピークのクラスタは、軽い、そして重い標識化サンプルについて、ベースライン分解したピークを示す。

【図24】真空内で乾燥させて、非同位体DiPyroタグ(乾燥DMF中)で、25:1及び50:1のタグ対糖タンパク質の比率(重量)にて標識化して、MALDI Orbitrap LTQ XL系で分析した、PNGaseF放出N-グリコシラミンの標識化効率を示す図である。標識化グリカンピークのシグナル強度を、標識化したグリカンピーク及び標識化していないグリカンピーク(存在する場合)の組合せ強度で割ることによって、標識化効率%を算出した。>98%の標識化効率が、1つのグリカン構造以外の全てについて、50:1の比率で観察される。

【図25】1200~2000m/zの質量範囲において検出した豊富な非標識化グリカン及び(PNGaseFによりオバルブミンから放出された)DiPyro標識化グリカンのMALDI-MSスペクトルを示す図である。

【図26】Orbitrap質量分析器で、RP 240kで、m/z 858.9にて得た、二重化DiPyro⁶標識化グリカンの前駆イオン二重線を、軽い、そして重い標識化種の抽出したイオンクロマトグラムと共に示す図である。同位体ピークのクラスタは

10

20

30

40

50

、軽い、そして重い標識化種について、ベースライン分解ピークを示す。図 2 6 B は、H C D フラグメント化後に、O r b i t r a p で得た、 m/z 8 5 8 . 9 での二重化 D i P y r O ⁶ 標識化グリカンの注釈付き M S ² スペクトルを示す (2 7 の N C E) 。フラグメントイオンの完全なセットを、D i P y r O 標識化グリカンの確信的な構造的同定のために観察する。

【図 2 7】本発明の更なる実施形態の種々の多重化セットを構成する各同位体種のための同位体位置を有する例示的な D i P y r O ² 同位体構造を示す図である。これらの例示的な構造は包括的でなく、更なる同位体組合せが利用可能である。

【図 2 8】本発明の更なる実施形態の種々の多重化セットを構成する各同位体種のための同位体位置を有する例示的な D i P y r O ^{1 0} 同位体構造を示す図である。これらの例示的な構造は包括的でなく、更なる同位体組合せが利用可能である。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 5 9 】

【定義】

【 0 0 6 0 】

[0086] 一般に、本明細書中で用いられる用語及びフレーズは、当該技術で認識される意味を有しており、標準的なテキスト、引用雑誌、及び当業者に知られている状況を参照して知ることができる。以下の定義は、本発明の文脈における用語及びフレーズの具体的な使用を明確にするために記載される。

【 0 0 6 1 】

[0087] 一実施形態において、本発明の組成物又は化合物、例えば同位体が濃縮された化合物 (同位体で標識化された分析物、同位体タギング試薬、同位体で標識化されたアミノ酸、同位体で標識化された標準物質、及び / 又は同位体で標識化されたペプチド若しくはタンパク質が挙げられる) が単離され、又は精製される。一実施形態において、単離又は精製された化合物は、当該技術で理解されるように、少なくとも部分的に単離又は精製されている。一実施形態において、本発明の組成物又は化合物は、化学純度が 9 0 % 、一部の用途について任意選択で 9 5 % 、一部の用途について任意選択で 9 9 % 、一部の用途について任意選択で 9 9 . 9 % 、一部の用途について任意選択で 9 9 . 9 9 % 、そして一部の用途について任意選択で 9 9 . 9 9 9 % である。

【 0 0 6 2 】

[0088] 本明細書中で開示される分子の多くが、1 つ又は複数のイオン性基を含有する。イオン性基として、プロトンが除去され得る基 (例えば - C O O H) 、又はプロトンが加えられ得る基 (例えばアミン) 、及び四級化され得る基 (例えばアミン) が挙げられる。そのような分子の全ての可能なイオン性形態及びそれらの塩が、本明細書中の本開示において個々に含まれることが意図される。本明細書中の化合物の塩に関して、当業者であれば、所定の用途のために、本発明の塩の調製に適した多種多様な利用可能な対イオンの中から選択することができる。特定の用途において、塩の調製のための所定のアニオン又はカチオンの選択により、当該塩の溶解度を上昇させ、又は下降させることができる。

【 0 0 6 3 】

[0089] 本発明の化合物は、1 つ又は複数のキラル中心を含有し得る。したがって、本発明は、ラセミ混合物、ジアステレオ異性体、エナンチオ異性体、互変異性体、及び 1 つ又は複数の立体異性体が濃縮された混合物を含むことが意図される。記載且つ特許請求される本発明の範囲は、化合物のラセミ体、並びに個々のエナンチオ異性体及びそれらの非ラセミ混合物を包含する。

【 0 0 6 4 】

[0090] 本明細書中で用いられる用語「基」は、化合物の官能基を指し得る。本化合物の基は、化合物の一部である原子又は原子の集まりを指す。本発明の基は、1 つ又は複数の共有結合を介して、化合物の他の原子に結合していてもよい。基はまた、基の価数状態に関して特徴付けることもできる。本発明は、一価、二価、三価その他の価数状態で特徴付けられる基を含む。

【 0 0 6 5 】

[0091]本明細書中で用いられる用語「前駆イオン」は、MS / MS分析のMS¹電離段階が挙げられる質量分析の電離段階の間に生産されるイオンを指すのに本明細書中で用いられる。

【 0 0 6 6 】

[0092]本明細書中で用いられる用語「プロダクトイオン」及び「二次イオン」は、本記載中で互換的に用いられ、質量分析中のイオン化及び / 又はフラグメント化のプロセス（複数可）の間に生産されるイオンを指す。本明細書中で用いられる用語「二次プロダクトイオン」は、連続フラグメント化のプロダクトであるイオンを指す。

【 0 0 6 7 】

[0093]本明細書中で用いられる用語「分析」は、分析物の特性を判定するプロセスを指す。分析は、例えば、分析物の物理的特性、例えば、質量、質量電荷比、濃度、絶対存在量、相対存在量、又は原子若しくは置換基の組成を判定することができる。プロテオミクス分析の文脈では、用語分析は、サンプル中のタンパク質又はペプチドの組成（例えば配列）及び / 又は存在量を判定することを指し得る。

【 0 0 6 8 】

[0094]本明細書中で用いられる用語「分析物」は、分析の対象である化合物、化合物の混合物、又は他の組成物を指す。分析物として、タンパク質、修飾タンパク質、ペプチド、修飾ペプチド、小分子、医薬化合物、オリゴヌクレオチド、糖、ポリマー、代謝物質、脂質、及びそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 9 】

[0095]本明細書中で用いられる用語「質量分析」（MS）は、分析物の元素組成、質量電荷比、絶対存在量、及び / 又は相対存在量の判定のための分析技術を指す。質量分析技術は、分析物、例えばタンパク質、ペプチド、及び他の化合物の組成及び / 又は存在量を解明するのに有用である。質量分析は、荷電種又は種フラグメントを生じさせるための分析物のイオン化、荷電種又は種フラグメント、例えばプロダクトイオンへのフラグメント化、及び、荷電種又は種フラグメントの質量電荷比の測定を含み、質量電荷比、更なるフラグメント化プロセッシング、電荷移行プロセスその他に基づく単離の更なるプロセスを任意選択で含むプロセスを含む。分析物の質量分析を行うことで、例えば、分析物及び / 又は分析物フラグメントについての質量電荷比及び対応する強度データを含む、質量分析データが作成される。分析物イオン及び分析物イオンフラグメントに対応する質量分析データは、分析物イオン及び / 又は分析物イオンフラグメントの質量電荷比を表す質量電荷（ m/z ）単位の関数としての強度として、一般的に与えられる。質量分析により、一般的に、差異分析物に対応する強度が、様々な質量電荷比によって分解され得る。タンデム質量分析（MS / MS又はMS²）において、質量分析の複数の配列決定が実行される。例えば、タンパク質及びペプチドの混合物を含有するサンプルがイオン化され、そして結果として生じた前駆イオンが、その質量電荷比に従って分離され得る。次に、選択された前駆イオンが、フラグメント化され、そしてさらに、フラグメントの質量電荷比に従って分析され得る。

【 0 0 7 0 】

[0096]本明細書中で用いられる用語「干渉」は、注目する種又は分析物の検出に干渉する、分析の際に検出される種を指す。干渉は、注目するタンパク質又はタンパク質フラグメントではなく、注目するタンパク質フラグメント又はペプチドフラグメントの正確な検出又は定量化に干渉するタンパク質又はタンパク質フラグメントの検出を指し得る。干渉は、干渉比、例えば干渉シグナルの量の、分析物シグナルの量に対する比として定量化することができる。質量スペクトル分析において、干渉は、注目する分析物ではない種の検出に対応する干渉ピークとして表すことができる。

【 0 0 7 1 】

[0097]本明細書中で記載される「単離」又は「単離ウィンドウ」は、選択的に分離され、且つフラグメント化され、操作され、又は単離される、イオン、例えば前駆イオンの範

10

20

30

40

50

囲を指す。

【0072】

[0098]本明細書中で用いられる用語「種」は、特定の分子、化合物、イオン、アニオン、原子、電子、又はプロトンを指す。種として、同位体で標識化された分析物、同位体タギング試薬、同位体で標識化されたアミノ酸、及び/又は同位体で標識化されたペプチド若しくはタンパク質が挙げられる。

【0073】

[0099]本明細書中で用いられる用語「質量電荷比」は、種の質量の、種の電荷状態に対する比率を指す。用語「 m/z 単位」は、質量電荷比の測定単位を指す。トムソン単位(Th と省略される)は、 m/z 単位の例であり、イオンの質量(ダルトン)の、イオンの電荷(元素電荷)に対する比率の絶対値として定義される。

10

【0074】

[00100]本明細書中で用いられる用語「質量スペクトロメータ」は、サンプルからイオンを生じさせて、質量電荷比に従ってイオンを分離して、イオン、例えば、同位体が濃縮された化合物、同位体タギング試薬、同位体で標識化されたアミノ酸、及び/又は同位体で標識化されたペプチド若しくはタンパク質に由来するプロダクトイオンを検出する装置を指す。質量スペクトロメータとして、単段階質量スペクトロメータ及び多段階質量スペクトロメータが挙げられる。多段階質量スペクトロメータとして、質量分離されたイオンをフラグメント化して、プロダクトイオンを質量によって一度分離するタンデム質量スペクトロメータが挙げられる。

20

【0075】

[00101]用語「ペプチド」及び「ポリペプチド」は、本明細書中で同義的に用いられており、アミド結合(又はペプチド結合)によって互いに化学結合しているアミノ酸残基で構成される化合物のクラスを指す。ペプチド及びポリペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸残基又は修飾アミノ酸残基を含むポリマー化合物である。修飾は、自然に生じても自然に従わずに生じてもよく、例えば、化学合成によって生じる修飾がある。ペプチド中のアミノ酸への修飾として、リン酸化、グリコシル化、脂質化、プレニル化、スルホン化、ヒドロキシル化、アセチル化、メチル化、メチオニン酸化、アルキル化、アシル化、カルバミル化、ヨウ素化、及び補因子の付加が挙げられるが、これらに限定されない。ペプチドとして、タンパク質が挙げられ、そしてさらに、タンパク質の分解によって、例えばタンパク質分解消化によって生じる組成物が挙げられる。ペプチド及びポリペプチドは、タンパク質の実質的に完全な消化によって、又は部分的な消化によって生じ得る。ポリペプチドとして、例えば、2~100アミノ酸単位、一部の実施形態について任意選択で2~50アミノ酸単位、一部の実施形態について任意選択で2~20アミノ酸単位、一部の実施形態について任意選択で2~10アミノ酸単位を含むポリペプチドが挙げられる。

30

【0076】

[00102]「タンパク質」は、1つ又は複数のポリペプチド鎖及び/又は修飾ポリペプチド鎖を含む化合物のクラスを指す。タンパク質は、自然に起こるプロセス、例えば翻訳後修飾又は翻訳時修飾によって修飾され得る。例示的な翻訳後修飾又は翻訳時修飾として、リン酸化、グリコシル化、脂質化、プレニル化、スルホン化、ヒドロキシル化、アセチル化、メチル化、メチオニン酸化、補因子の付加、タンパク質分解、及びタンパク質の、巨大分子複合体への集合が挙げられるが、これらに限定されない。また、修飾したタンパク質として、自然に従わずに生じる、化学合成によって生成される誘導体、類似体、及び機能的模擬物が挙げられ得る。例示的な誘導体は、タンパク質を誘導体化する化学修飾、例えばアルキル化、アシル化、カルバミル化、ヨウ素化、又はあらゆる修飾を含む。

40

【0077】

[00103]化学における定量的分析は、サンプル中に存在する1つ、いくつか、又は全ての特定の物質(複数可)の絶対存在量又は相対存在量の判定である。生体サンプルについて、質量分析を介して実行される定量的分析は、ペプチド及びタンパク質の相対存在量を判定することができる。定量化プロセスは、タンパク質及びペプチドの分析物の同位体標

50

識化、並びに質量分析による分析を典型的に包含する。

【0078】

[00104] サンプルは、別の化合物の物理的特性、例えば質量、長さ、又は親和性に従って、とりわけ、当該技術において周知のクロマトグラフィ技術を用いて、分画することができる。分画は、当該技術において周知の、注目するサンプルを1つ又は複数の物理的特性によって分画するように作用する分離段階で起こり得る。分離段階は、いくつかある技術の中で特に、液体クロマトグラフィ技術及びガスクロマトグラフィ技術を使用することができる。分離段階は、液体クロマトグラフィ分離系、ガスクロマトグラフィ分離系、親和性クロマトグラフィ分離系、及びキャピラリー電気泳動分離系が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0079】

[00105] 「フラグメント」は、分子の一部、例えばペプチドを指す。フラグメントは、一価イオンであっても多価イオンであってもよい。フラグメントは、親ペプチド中のポリペプチド結合の部位特異的切断が挙げられる、親分子中の結合切断に由来してもよい。フラグメントは、複数の切断事象又は切断工程から生じてもよい。フラグメントは、親ペプチドのカルボキシ末端、アミノ末端、又はこれらの双方である先端を切られた (truncated) ペプチドであってもよい。フラグメントは、ポリペプチド結合、C-C結合、C-N結合、C-O結合の切断、又はこれらの切断プロセスの組合せ直後に生じる生成物を指し得る。フラグメントは、アミノ酸の1つ又は複数の側鎖が除去されるプロセス、若しくは修飾が除去されるプロセス、又はこれらのプロセスのあらゆる組合せによって形成される生成物を指し得る。本発明に有用なフラグメントとして、準安定条件下で形成されるフラグメントが挙げられる。或いは、本発明に有用なフラグメントは、衝突誘起解離 (CID)、表面誘起解離 (SID)、レーザー誘起解離 (LID)、電子捕獲解離 (ECD)、電子移動解離 (ETD)、若しくはこれらの方法のあらゆる組合せ、又はタンデム質量分析の技術において知られているあらゆる均等物が挙げられるがこれらに限定されない種々の方法による、前駆体へのエネルギーの導入に由来する。また、本発明に有用なフラグメントとして、x-タイプフラグメント、y-タイプフラグメント、z-タイプフラグメント、a-タイプフラグメント、b-タイプフラグメント、c-タイプフラグメント、内部イオン (又は内部切断イオン)、インモニウムイオン、又はサテライトイオンが挙げられるが、これらに限定されない。分析物、例えば同位体で標識化された分析物、同位体で標識化された標準物質、及び/又は同位体で標識化されたペプチド若しくはタンパク質に由来するフラグメントのタイプは、親の配列、フラグメント化の方法、親前駆イオンの電荷状態、親前駆イオンに導入されるエネルギーの量、及び親前駆イオンにエネルギーを送達する方法によって多くの場合決まる。フラグメントの特性、例えば分子質量は、フラグメント化質量スペクトルの分析によって特徴付けられ得る。

20

30

【0080】

[00106] タギング試薬の「アミン反応性基」、「カルボニル反応性基」、又は「チオール反応性基」は、ペプチド、タンパク質、又は他の分子のアミン基、カルボニル基、及びチオール基とそれぞれ反応することによって、同位体が濃縮された化合物又はタグと、ペプチド、タンパク質、又は他の分子との間で結合を形成することができるあらゆる官能基であってもよい。

40

【0081】

[00107] 「アミノ酸」は、アミノ基 (NH_2)、カルボン酸基 (COOH)、及び種々のあらゆる側鎖基を含有する有機化合物を指す。アミノ酸は、基本式 $\text{NH}_2\text{CHRCOOH}$ (式中、Rは側鎖基である) によって特徴付けられ得る。天然アミノ酸は、自然界で生産されるアミノ酸であり、例えば、イソロイシン、アラニン、ロイシン、アスパラギン、リジン、アスパラギン酸、メチオニン、システイン、フェニルアラニン、グルタミン酸、トレオニン、グルタミン、トリプトファン、グリシン、バリン、プロリン、セリン、チロシン、アルギニン、及びヒスチジン、並びにオルニチン及びセレノシステインがある。

【0082】

50

【00108】本明細書中で用いられる「同位体が濃縮された」及び「同位体で標識化された」は、1つ又は複数の同位体標識、例えば1つ又は複数の重い安定同位体を有する化合物（例えば、同位体で標識化されたアミノ酸、同位体で標識化された標準物質、同位体で標識化された分析物、同位体タギング試薬、及び/又は同位体で標識化されたペプチド若しくはタンパク質）を指す。「同位体標識」は、化合物、例えば同位体で標識化されたアミノ酸、同位体で標識化された標準物質、同位体で標識化された分析物、同位体タギング試薬、及び/又は同位体で標識化されたペプチド若しくはタンパク質に導入される1つ又は複数の重い安定同位体であって、上記化合物が、質量分析を用いて分析された場合に、他の化合物から発せられたシグナルから区別され得るシグナル、例えば、質量電荷比に基づいて他の同位体種から区別され得るシグナルを発する、1つ又は複数の重い安定同位体を指す。「同位体が重い」は、1つ又は複数の高質量の、又は重同位体（例えば重い安定同位体、例えば、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^2H 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{33}S 、 ^{34}S 、 ^{37}Cl 、 ^81Br 、 ^{29}Si 、及び ^{30}Si ）を有する化合物又はそのフラグメント/部分を指す。

10

20

30

40

50

【0083】

【00109】一実施形態において、同位体が濃縮された組成物は、特定の同位体組成を有する本発明の化合物を含み、上記化合物は、天然に存在するサンプル中の、同じ同位体組成を有する同じ化合物の存在量を、少なくとも10倍上回る、一部の実施形態について少なくとも100倍上回る、一部の実施形態について少なくとも1,000倍上回る、一部の実施形態について少なくとも10,000倍上回る存在量で存在する。別の実施形態において、同位体が濃縮された組成物は、特定の同位体組成を有する本発明の化合物に関して、純度が実質的に濃縮されており、例えば、純度が90%以上、一部の実施形態において95%以上、一部の実施形態において99%以上、一部の実施形態において99.9%以上、一部の実施形態において99.99%以上、一部の実施形態において99.999%以上である。別の実施形態において、同位体が濃縮された組成物は、特定の同位体組成を有する本発明の化合物に関して、例えば当該技術において知られている同位体精製法を用いて精製されたサンプルである。

【0084】

【00110】「質量スペクトロメータ分解力」（多くの場合分解能と呼ばれる）は、質量スペクトルの m/z ピークがどれくらい十分に分離される（すなわち分解される）かの定量的測定単位である。分解力を算出する種々の規則が存在する。IUPACの定義は、以下の通りである：分解力（ R ）：

【数1】

$$R = m/\Delta m$$

【概要】

【0085】

【00111】質量分析対応プロテオミクスの分野は、タンパク質及びペプチドの同定の容易さ、及び同定の有用性が増すにつれ、大きくなり続けている。いくつかの方法が現在用いられて、種々のタグを化学的に、又は代謝的に組み込んで、質量スペクトルで検出され得る質量差異を与えてサンプルを差別化して、イオン強度の定量的比較を可能にしている。第一に、細胞培養液中のアミノ酸による安定同位体標識化（SILAC）は、細胞培養中の、タンパク質中への標準的な、又は重いアミノ酸の組込みによっており、質量分析によって分析される場合に、この組込みが、2つの離散的なピーク（ ^{13}C 重原子に起因する）をもたらす。しかしながら、多重化する（複数のサンプルを比較する）試みは、この技術においては限られている。その理由は、結果として生じる質量スペクトルの複雑性が増大し（標識化されたペプチド間で最低3Daの分離）、これが、達成可能なプロテオミクス適用範囲を狭めるためである。第二に、市販のiTRAQ又はTMT等の試薬によるアイソバリックタギングは、分析されることになるペプチドに多成分タグを化学的に加えて、MS²レベルでの定量化を実現する。しかしながら、アイソバリック標識化は、前駆体の共単離に起因する、ペプチドの同定及び定量化を低下させる不正確性を欠点としている

。

【0086】

[00112]より最近開発された方法である質量欠損タグ又は中性子質量タグは、MS¹レベルでの定量化用にm i l l i D a質量差標識化タグをサンプルに加えるものである。この戦略は、従来のS I L A Cに付随するスペクトル複雑性を増すことなく多重化が可能となる。そして、定量化がMS¹レベルにてなされるので、アイソバリック標識化のような前駆体共単離に起因する不十分な定量的精度を欠点としない。

【0087】

[00113]ジメチルピリミジニルオルニチン(D i P y r O)及びその誘導体に基づく新規の質量欠損ベースのタグの設計、合成、及び応用は、この戦略を、サイズがコンパクトであるだけでなく、標識化されるペプチドのフラグメント化を増強するタギング試薬を提供することによって、増強する。多重化されるD i P y r O質量欠損タグは、市販の出発材料を用いてごく少数の工程で合成することが容易である(図8参照)。特に危険な反応条件も試薬も含まれない。以下に記載される実施例において、タグのD i P y r O⁶構造は、6つの重い安定同位体(¹³C、²H、¹⁵N、¹⁸O)を種々の構成で組み込んで、最も軽いタグと最も重いタグとの間で45.3 m D aの質量欠損を、標識化されたペプチドに与える。これ以外にも、D i P y r O¹⁰タグは、10個の重い安定同位体を種々の構成で組み込んで、最も軽いタグと最も重いタグとの間で54.5 m D aの質量欠損を、標識化されたペプチドに与える。例えば、質量が最低でも5.8 m D a異なるD i P y r O¹⁰同位体種変異体を用いて、最大十重化の定量化が可能である。

10

20

【0088】

[00114]ペプチド又はタンパク質の分析物上のこれらのタグによって与えられる質量差異は、単回のLC-MS実験由来の相対的定量化での高分解能MSによる分析が可能となるほど小さい(例えば八重化定量化について、5.8~45.3 m D a)。小さな質量差異は、結果として生じるスペクトルの複雑性を増大させず、他の技術よりも高い標的同一率が可能となる。

【0089】

[00115]以前に報告された質量欠損ベースのアミン反応性タグは、以下が挙げられるいくつかの欠点を有する：a)タグはサイズが非常に大きく(タグあたり+435 D aの質量を、標識化されたペプチドに加える)、このサイズは、とりわけ二重標識化される場合に、標識化されたペプチドのクロマトグラフィ挙動、イオン化、及びフラグメント化に悪影響を及ぼす；b)タグは、標識あたり5つの更なるアミド結合を導入し、アミド結合のフラグメント化は、いくつかの、配列情報のないプロダクトイオンを生成する；c)タグは、アルギニンを含んでもよく、アルギニンは、最も塩基性のアミノ酸として、プロトン分離し、そして配列情報のあるペプチド主鎖フラグメント化を阻害する。本発明の特定の実施形態が、これらの各問題に直接対処する：a)質量欠損ベースのD i P y r Oタグは、サイズがコンパクトであり、タグあたり250~258 D aの適度な質量を、標識化されたペプチドに加える；b)1つの更なるアミド結合のみが導入されるので、配列情報のないフラグメントイオンが最小に保たれる；c)タグは、イオン化、クロマトグラフィ保持/分離に大きな悪影響を与えない；及びd)タグはとりわけ、プロトン分離しないように、且つフラグメント化を妨害しないように設計されている。実際、S e q u e s t H Tデータベースサーチの結果、ペプチド相互相関(X C o r r)スコアの全体的な増大によって明示される、D i P y r O標識化ペプチドのフラグメント化効率の増大が観察された。

30

40

【0090】

[00116]D i P y r Oタグの性能は、非同位体バージョンを用いて評価されて、酵母タンパク質抽出物消化物の高い標識化効率(全ペプチドの>99%)が、標準化衝突エネルギー(N C E)の低下時のフラグメント化の増強、及び、S e q u e s t H Tデータベースサーチ後の、標識化されたペプチドのより高いX C o r rスコアと共に、観察された。D i P y r O標識化ペプチドの衝突誘起解離(C I D)フラグメント化及び高エネルギー

50

ー衝突解離 (HCD) フラグメント化に必要とされる最適 NCE は、正常なペプチドと比較して低い (27 ~ 30 対 35)。同定されたペプチドの XCorr スコアの増大と組み合わせられて、DiPyro 標識化に由来するフラグメント化効率の著しい増大が観察された。加えて、標識は、より小さなペプチド (< 8 アミノ酸) の検出を増強する。

【0091】

[00117] さらに、用いられる合成アプローチは、タグのいくつかの同位体種変異体の製剤化を可能にすることで、タグの二重化、三重化、四重化、五重化、六重化、八重化、九重化、及び十重化セットが、以前のタグ及び技術による多重化の多くの課題を克服することができる。

【実施例】

【0092】

[00118] 化学物質。標識の合成に用いた全ての同位体試薬を、Isotec (Miami, OH) から購入した。質量分析用のグレードのトリプシン / Lys C ミックス、酵母タンパク質抽出物、ジチオスレイトール (DTT) を、Promega (Madison, WI) から購入した。尿素、ACS グレードのメタノール (MeOH)、ACS グレードのジクロロメタン (DCM)、ACS グレードのアセトニトリル (ACN)、Optima UPLC グレードの ACN、Optima UPLC グレードの水、及び Optima LC/MS グレードのギ酸を、Fisher Scientific (Pittsburgh, PA) から購入した。パラジウム活性炭 (Pd/C)、塩化水素ガス (HCl)、重水素ガス (D_2)、L-アルギニン HCl、ホルムアルデヒド (CH_2O)、トリス-HCl、トリエチルアミン (TEA)、アセチルアセトン、ヨードアセトアミド (IAA)、重炭酸トリエチルアンモニウム (TEAB)、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF)、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムテトラフルオロボレート (DMTMM)、N-メチルモルホリン (NMM)、トリフルオロ酢酸 (TFA)、及びジメチルスルホキシド (DMSO) を、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。ヒドロキシルアミン溶液を、Alfa Aesar (Ward Hill, MA) から購入した。

【0093】

[00119] ^{18}O 交換。軽い DiPyro タグ ($^{15}N_4$ ^{18}O) は、Pd/C 触媒ジメチル化の前に、 ^{18}O 交換を必要とする。L-アルギニン HCl を、12N HCl $H_2^{18}O$ 溶液 (pH 1) 中に溶解させて、65 のホットプレート上で4時間攪拌した。過剰 HCl を、真空内で溶液から蒸発させて、 ^{18}O L-アルギニン HCl を得た。

【0094】

[00120] N,N-ジメチルアルギニン。L-アルギニン HCl、L-アルギニン- $^{15}N_4$ HCl、又は L-アルギニン-(グアニジンイミノ- $^{15}N_2$) HCl を、 H_2O 又は D_2O 中に溶解させて、ホルムアルデヒド (CH_2O 、37% w/w) 又は同位体ホルムアルデヒド (CD_2O 又は $^{13}CH_2O$ 、20% w/w) を、2.5 x モル過剰で加えてから、Pd/C を加えた。反応器の空気を抜いて、 H_2 ガス又は D_2 ガスで満たして、100 PSI に加圧して、60 にて4時間攪拌した。スラリーを濾過して、N,N-ジメチルアルギニン生成物を真空内で乾燥させた。

【0095】

[00121] N,N-ジメチルアルギニンの誘導体化。N,N-ジメチルアルギニンを、1:1:2:2 H_2O :TEA:EtOH:アセチルアセトン溶液中に溶解させて、混合液を、60 のホットプレート上で16時間攪拌した。 N_5 (4,6-ジメチル-2-ピリミジニル)-N,N-ジメチルオルニチン (DiPyro) 生成物を、真空内で乾燥させて、フラッシュカラムクロマトグラフィ (MeOH/DCM) によって精製して、真空内で乾燥させた。

【0096】

[00122] DiPyro の活性化。無水 DMF 中の DiPyro を、DMTMM 及び NM

10

20

30

40

50

Mと、DiPyroに対して0.9xのモル比で組み合わせて、室温にて30分間ボルテックスした。混合液を、ペプチド標識化に直ちに用いた。

【0097】

[00123]酵母タンパク質抽出物の酵素消化。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) タンパク質抽出物 (Promega, Madison, WI) を、トリプシン/Lys Cミックス (Promega)、rLys-C (Promega)、又はLys-N (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL) によって消化した。トリプシン/Lys-C消化のために、タンパク質を、7M尿素を有する5mM DTTの80mM重炭酸アンモニウム溶液pH8中で37にて1時間還元してから、15mM IAAの付加、及び暗所にて30分間のインキュベーションによって、遊離チオールをアルキル化した。アルキル化反応を、5mM DTTで停止させて、溶液を、50mMトリスHCl pH8で1M尿素に希釈した。トリプシン/Lys Cミックスの付加及び16時間37でのインキュベーションによって、タンパク質を、1:25の酵素対タンパク質の比率にて、タンパク質分解により消化した。Lys C及びLys Nの消化を同様に実行したが、メーカーのプロトコルによって指図される以下の差異がある：尿素濃度は、Lys C又はLys Nの付加前に希釈せず、そしてLys C及びLys Nによるタンパク質のインキュベーションは、37にてそれぞれ16時間及び4時間であった。消化をTFAで反応停止させて、pH<3にして、Sep Pak C₁₈ SPEカートリッジ (Waters, Milford, MA) を用いてペプチドを脱塩した。消化したペプチドを等しいアリコートに3通りに分けて、真空内で乾燥させて、標識化前に、60:40のACN:0.5M TEAB pH8.5中に溶解させた。

10

20

【0098】

[00124]タンパク質消化物の標識化。19:1、25:1、又は50:1の標識対ペプチド消化物の重量比にて、活性化したDiPyro溶液を加えて、室温にて1時間ボルテックスすることによって、標識化を実行した。ヒドロキシルアミンを0.25%の濃度に加えることによって、標識化反応を停止させて、標識化したペプチドサンプルを、真空内で乾燥させた。標識サンプルを組み合わせて、SCX SpinTips (Protea Biosciences) でクリーニングして、Omix C18ピペットチップ (Agilent Technologies) で脱塩した。

30

【0099】

[00125]LC-MS²-ペプチドサンプル。標識化したペプチドサンプルを、Thermo Scientific Orbitrap Elite質量スペクトロメータ (San Jose, CA) に連結したWaters nanoAcquity UPLC系 (Milford, MA)、又はThermo Scientific Orbitrap Fusion Lumosに連結したDionex Ultimate 3000 UPLC系のいずれかを用いるnanoLC-MS²によって、分析した。サンプルを真空内で乾燥させて、水中3%ACN、0.1%ギ酸中に溶解させた。一体型エミッタチップで製造し、且つBridged Ethylene Hybrid C18粒子 (1.7µm、130、Waters) で15cm充填した75µm内径のマイクロキャピラリカラム上に、ペプチドをロードした。移動相Aを、水及び0.1%ギ酸で構成した。移動相Bを、ACN及び0.1%ギ酸で構成した。5%~35%の移動相Bの勾配溶解を、300nL/分の流量にて120分にわたって用いて、分離を実行した。Orbitrap Eliteで、380~1600m/zのペプチド前駆体の調査スキャンを、120k又は240k (@400m/z) の分解力にて実行した。5×10⁵のAGC標的、そして150ミリ秒の最大射出時間であった。次に、上位15の前駆体を、LTQでのCID MS²分析について、2.0Daの単離幅、30の標準化衝突エネルギー (NCE)、1×10⁴のAGC標的、そして100ミリ秒の最大射出時間の急速スキャンモードで選択した。前駆体を、±0.05m/zの許容差の、20秒間の動的排除に曝した。Orbitrap Fusion Lumosで、350~1500m/z由来のペプチド前

40

50

駆体の調査スキャンを、 $500\text{ k} (@ 200\text{ m/z})$ の分解力にて実行した。 1×10^5 のAGC標的、そして100ミリ秒の最大射出時間であった。次に、上位15の前駆体を、LTQでのHCD MS²分析について、 0.7 Da の単離幅、30のNCE、 1×10^4 のAGC標的、そして35ミリ秒の最大射出時間の急速スキャンモードで、四重極単離によって選択した。前駆体を、 $\pm 0.05\text{ m/z}$ の許容差の、20秒間の動的排除に曝した。

【0100】

[00126]データ分析 - ペプチドサンプル。非同位体DiPyro実験用にProteome Discoverer (バージョン1.4.0.288、Thermo Scientific)、又は三重化DiPyro実験用にMaxQuant (バージョン1.5.5.1)のいずれかを用いて、質量スペクトルを処理した。Sequest HTアルゴリズムを用いるProteome Discovererで、又はAndromedaアルゴリズムを用いるMaxQuantで、UniProt出芽酵母完全データベースに対して生ファイルを検索した。Proteome Discovererにおいて、25 ppmの前駆体質量許容差、及び 0.6 Da のフラグメント質量許容差で、検索を実行した。静的修飾は、ペプチドN末端の非同位体DiPyro標識($+248.16372\text{ Da}$)、及びシステイン残基のカルバミドメチル化($+57.02146\text{ Da}$)からなった。動的修飾は、リジン(K)残基の非同位体DiPyro標識、及びメチオニン残基の酸化($+248.16372\text{ Da}$)からなった。パーコレータを用いて、1%FDRに対するq値に基づいて、ペプチドスペクトルマッチ(PSM)を確認した。MaxQuantにおいて、DiPyro₀₀₄₁($+254.15610\text{ Da}$)、DiPyro₂₂₂₀($+254.17705\text{ Da}$)、及びDiPyro₀₆₀₀($+254.20138\text{ Da}$)についての修飾を、標準的な定量化について、N末端及びK標識として指定した。第1の検索ペプチド許容差を20 ppmに設定して、主要な検索ペプチド許容差を、4.5 ppm(Fusion Lumos)又は10 ppm(Elite)に設定した。システイン残基のカルバミドメチル化の静的修飾及びメチオニン残基の酸化の可変的修飾を選択した。iTMS MS/MSマッチ許容差を、 0.6 Da に設定した。タンパク質及びPSMを、1%FDRまでフィルタリングした(filtered)。全ての他のパラメータをデフォルトに留めた。定量化に、1の最小比率数(minimum ratio count)を指定して、全てのペプチドを用いた。

【0101】

[00127]フィルタ補助N-グリカン分離。糖タンパク質(50 mM TEAB バッファ中に溶解させた $2\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$)を、 $4\text{ }\mu\text{L}$ の 0.5 M TCEP と混合した。サンプル管を、100 ~ 室温のウォーターバスに4回、それぞれ15秒で交互に入れ替えて、タンパク質を熱変性した。次に、混合液を、 30 K MWCO フィルタに加えて、 $200\text{ }\mu\text{L}$ の 50 mM TEAB バッファとバッファ交換して($14,000 \times g$ で20 にて20分間、3回遠心分離した)、PNGaseF($1\text{ }\mu\text{L PNGaseF}/10\text{ }\mu\text{g}$ タンパク質)と37 にて18時間インキュベートした。放出されたグリコシラミンを、 $14,000 \times g$ で20 にて20分間の遠心分離によって、脱グリコシルタンパク質から分離した。次に、結果として生じたN-グリコシラミンを、減圧下で乾燥するまで蒸発させて、標識化に直ちに用いた。

【0102】

[00128]グリカン標識化。活性化したDiPyro溶液を乾燥グリカンに、25:1の標識対元の糖タンパク質質量比(重量)にて加えることによって、標識化を実行して、室温にて1時間ボルテックスした。ヒドロキシルアミンを0.25%の濃度にまで加えることによって標識化反応を停止させて、標識化したグリカンサンプルを組み合わせて、Oasis HLBカートリッジ(Waters)でクリーニングして、真空内で乾燥させた。

【0103】

[00129]LC - MS² - グリカンサンプル。標識化したグリカンサンプルを、Ther

10

20

30

40

50

mo Scientific Orbitrap Q-Exactive HFに連結したDionex Ultimate 3000 UPLC系を用いるnanoHILIC-LC-MS²によって分析した。サンプルを真空内で乾燥させて、水中80%ACN中に溶解させた。一体型エミッタチップで製造し、且つPolyGLYCOPLEX A粒子(PolyLC)で30cm充填した75µm内径のマイクロキャピラリカラム上に、ペプチドをロードした。移動相Aを、ACN及び0.1%ギ酸で構成した。移動相Bを、水及び0.1%ギ酸で構成した。25%~45%の移動相Bの勾配溶離を、300nL/分の流量にて40分にわたって用いて、分離を実行した。Q-Exactive HFで、300~2000m/zの前駆体の調査スキャンを、240k(@200m/z)の分解力にて実行した。1×10⁶のAGC標的、そして100ミリ秒の最大射出時間であった。次に、上位5の前駆体を、HCD MS²分析について選択した。2.0Daの単離幅であり、27の標準化衝突エネルギー(NCE)であった。前駆体を、10秒間の動的排除に曝した。

10

【0104】

[00130] DiPyro質量欠損タグの原理及び設計の考慮。NeuCode SILACは、従来のSILACに勝るいくつかの利点を有する生存MS定量的アプローチとして質量欠損ベースの同位体標識を確立している。しかしながら、上記技術は、代謝組込みに依然として限られている。哺乳類、例えば生理機能又は疾患の研究用のトランスジェニックマウスへのSILACの応用(SILAM)は、組織の収穫以前に、動物の数週間、又は複数世代の、重標識化した食事の給餌を必要とする(Wuら、Anal Chem、2004、76:4951~4959; McClatchyら、J Proteome Res、2007、6:2005~2010; 及びRauniyarら、Methods、2013、61:260~268)。組織中への組込み率は、様々な組織について様々な組込み率にて生じ、そして組込みは完全でない。NeuCodeアプローチをSILAMに統合するには、高価な質量欠損ベースのリジン同位体種を含有する飼料食が、唯一のタンパク源として数週間供給されることが必要とされる。

20

【0105】

[00131]それに対して、化学標識化アプローチは、質量欠損シグネチャーをあらゆる生体サンプル中に、起源に関係なく、高い標識効率で好都合に与えることができる。化学標識化アプローチはまた、哺乳類サンプルについて、対費用効果がより高くなり得る(但し、標識が、容易に利用可能な試薬を用いて容易に合成されることを条件とする)。その理由は、標識化試薬が、タンパク質抽出物の量に比例して、動物を育成するのに必要な食事よりも少量しか必要とされないためである。さらに、化学タグの構造は、単一のアミノ酸に限定されておらず、より多くの同位体を有するようにカスタム設計され得る。ゆえに、NeuCode戦略を化学試薬形式に変換することで、広範囲にわたる種々のサンプルに応用可能となり、且つ多重化能を向上させることが可能となろう。この論理に影響されて、Herbertらは、質量が12.6mDa異なる質量欠損ベースの同位体種を特徴とするアミン反応性NeuCode標識を開発した(Herbertら、Mol Cell Proteomics、2013、12:3360~3369)。タグは、3つのアミノ酸(アセチルアルギニン(AcArg)、アセチルリジン(AcLys)、及びグリシン)及びNHSEステルアミン反応性基からなる。6つの重い炭素同位体及び重窒素同位体の合計を、AcArg基及びAcLys基に4つの構成で組み込んで、37.8mDaに及ぶ四重化セットが生じる。当該標識が上記概念を実証するのに適している一方、合成はやや複雑であり、複数の保護同位体アミノ酸が必要とされ、当該同位体アミノ酸は高価であり、結果として生じるタグは非常に嵩高く、タグあたり431Daの名目上の質量を標識化ペプチドに加える。

30

40

【0106】

[00132]そのような質量欠損シグネチャーを有するペプチド同士をMS¹レベルにて識別するには、精巧なOrbitrap及びFT-ICR MSプラットフォームにのみ利用可能な分解力が必要とされる。Herbertらは、2つの特定のNeuCodeリジン

50

同位体種、 $^1\text{C}_6\text{H}_0^{15}\text{N}_2$ と $^1\text{C}_0\text{H}_8^{15}\text{N}_0$ との間で36 mDaの差異を十分に分解して、典型的なサンプル中のトリプシンペプチドの>85%の定量化を可能にするのに、240 Kの分解力が必要とされると算出している²²。12.6 mDa又は6.3 mDaの間隔が空けられたペプチドを約95%定量化するには、それぞれ480 K及び960 Kの分解力を必然的に伴う；したがって、アミン反応性NeuCode標識は、12.6 mDaの質量差異に制限された(Hebertら、Mol Cell Proteomics、2013、12:3360~3369)。

【0107】

[00133]質量欠損ベースの多重化は、より多くの同位体種変異体を許容することで、分解能に対応する。そして、質量が6.3 mDa異なる同位体種によるアミン反応性NeuCodeタグの十二重化バージョンが報告された(Hebertら、「FTMS enabled neutron-encoded chemical tags: 4, 12, and 36 plexes」、2013、1~79頁に発表)。当該タグは、5つのアミノ酸の全体にわたって広がる12個の窒素原子を有し、最も軽い($^1\text{C}_0\text{H}_{11}^{15}\text{N}_{11}$)変異体と最も重い($^1\text{C}_{11}\text{H}_0^{15}\text{N}_0$)変異体との間で69.5 mDaの質量差異を達成する。理論上の計算に基づいて、6.3 mDaの質量欠損によりペプチド同士を区別するには、960 Kの分解力で十分であるはずである。しかし、コアレスセンスを克服して、m/zが約814の標識化した酵母ペプチドの12ピーク全てを十分に分解するには、1.6 MのFT-ICR分解力が必要とされた。分解能要件は、MS機器類で現在可能なことについての境界を押し動かす。そして、巨大サイズのタグ(>650 Da)から、MS¹レベルにて、高レベルの質量欠損ベースの多重化のためにどれほど極端なことをせねばならないのかが分かる。タグは、範囲を絞った原理実証実験において確かに機能的である一方、実際の定量的プロテオミクス実験について、実用的なツールとして機能するのではなく、質量欠損ベースの定量化の潜在性を示すことを意味するに過ぎない。典型的な定量的プロテオミクスワークフローの妥当な境界内に残るタグが、NeuCode SILACと質量欠損ベースの化学標識とのギャップを埋めて、アプローチをより利用可能にするのに必要である。

【0108】

[00134]化学タグ設計に必須の実用的な考慮に関して、単純性、及び利用可能な合成が重要である。質量欠損ベースの化学タグとなるためには、いくつかの他の基準も満たされなければならない。構造は、コンパクトであり、且つ高密度の窒素原子を供給して、 ^{15}N によるネガティブな質量欠損を与える一方でまた、 ^1C 、 ^2H 、及び ^{18}O の組込みについての単純な手段を提供して、ポジティブな質量欠損を与えるべきである。これらの同位体の組込みもまた、安価であるべきである。出発点として、アミノ酸が良好な候補であり得る。その理由は、同位体アミノ酸の広範囲にわたる利用可能性、及び固有のフラグメント化経路を保持する利点のためである。アルギニンは最良の選択肢である。その理由は、4つの窒素原子を有するためである。N,N-ジメチル化により、最大6つの ^2H 同位体を加えて、+37.662 mDaの質量欠損の実質的な組合せを与えることができ、そしてまた、研究者は、2つの ^1C 同位体により同位体種を調整することができる。 ^{18}O 交換は、2つの同位体を加えるが、中程度の+4.245 mDaの質量欠損に寄与し、この質量欠損は、-11.860 mDaの質量欠損を与える4つの ^{15}N 同位体との相乗効果を十分に生み出す。これらの2つの単純な合成工程により、合計6つの同位体位置の効率的な使用が可能になって、質量が45.277 mDa異なる軽いタグと重いタグが生じる。10個もの同位体位置を用いることによって、質量が54.50 mDa異なる軽いタグと重いタグを生成することができる。なお、 ^2H 同位体の使用は、最も軽い標識と最も重い標識との間で、窒素原子の数を増やすためにいくつかのアミノ酸を結合させる必要なく、十分な質量欠損差異を達成するのに重要である。そして、ホルムアルデヒドジメチル化によって ^2H 同位体を組み込むことで、タグサイズをコンパクトに、合成を単純且つ利用可能に保つことができる。重水素原子は、多くの場合、逆相液体クロマトグラフィ(RPLC)中のクロマトグラフィ保持時間の作用に起因する懸念の理由であるが、研究

によれば、アミノ酸の第2の炭素上の極性アミンの周りに²H原子を置くと、RPLC静止相との相互作用が低下して、重水素作用に起因する保持時間のシフトが最小になることが示された(Zhangら、Anal Chem、2002、74:3662~3669;及びGreerら、J Am Soc Mass Spectrom、2015、26:107~119)。

【0109】

[00135]残念なことに、アルギニンは、その極性、塩基性、及び親水性に基づいて、化学タグとして特に理想的でない。この特性は、側鎖グアニジノ基の直接的な結果である。そして、考慮されなければならない他の基準である、標識の精製及び活性化、並びに標識化したペプチドのクロマトグラフィ保持、イオン化、及びフラグメント化に影響を及ぼす。合成したタグは、容易に単離されて、高収率で回収される必要がある。しかし、保護されていないアミノ酸、とりわけアルギニンのような極性のある親水性のアミノ酸は、従来の小分子精製技術(すなわち、液-液抽出、再結晶、析出、フラッシュカラムクロマトグラフィ)による精製をとりわけ困難にするおそれがある。アルギニンの親水性は、標識化したペプチドの全体的な疎水性を引き下げて、C18 SPEクリーンアップ及びRPLC分離中の保持を低下させる。アルギニンの塩基性は、標識化したペプチドのイオン化を容易にする一方、フラグメント化による配列情報がほとんど与えられなくなろう。その理由は、アルギニンがプロトンを隔離して、ペプチド主鎖の切断を高度に抑制するためである(Tangら、Anal Chem、1993、65:2824~2834;Diklerら、J Mass Spectrom、1997、32:1337~1349;及びSullivanら、Int J Mass Spectrom、2001、210~211:665~676)。加えて、低荷状態のペプチドは、CID/HCDフラグメント化の後に、高電荷状態のペプチドよりもうまく配列決定される(Swaneyら、Nat Meth、2008、5:959~964);1つ又は2つの塩基性アルギニン残基でペプチドを標識化することによって、電荷状態は+1又は+2だけ増大して、フラグメント化及び配列同定は妨げられよう。複雑化のこの長いリストは、グアニジノ基を誘導体化して、塩基性を弱め、且つ疎水性を増大させることによって、対処され得る。そのような戦略が、アルギニン含有ペプチドのフラグメント化及び配列決定を向上させるのに以前に使用された(Diklerら、J Mass Spectrom、1997、32:1337~1349;Sullivanら、Int J Mass Spectrom、2001、210~211:665~676;Morrisら、Biochemical and Biophysical Research Communications 1973、51:247~255;Kuyamaら、2008、22:2063~2072;Foettingerら、J Mass Spectrom、2006、41:623~632;Leitnerら、J Mass Spectrom、2003、38:891~899;Lindnerら、Anal Chim Acta、2005、528:165~173;Leitnerら、J Mass Spectrom、2007、42:950~959;Onofrejovaら、J Sep Sci、2008、31:499~506;及びDongreら、J Am Chem Soc、1996、118:8365~8374)。

【0110】

[00136]詳細には、数人の研究者は、グアニジウムを、アセチルアセトンとの反応によってピリミジンに変換することが有用であることを見出した(Diklerら、J Mass Spectrom、1997、32:1337~1349;Sullivanら、Int J Mass Spectrom、2001、210~211:665~676;Morrisら、Biochemical and Biophysical Research Communications 1973、51:247~255;及びKuyamaら、2008、22:2063~2072)。この特定の戦略を、本願の質量欠損タグの設計に応用することによって、結果として生じるジメチルアルギニン誘導体は、クロマトグラフィ保持を実際に高めることができ、エレクトロスプレーイオン化を向上

させることができ、且つ標識化したペプチドのタンデム質量フラグメント化を強化することができる。

【0111】

[00137]本明細書中に記載される一実施形態のD i P y r O質量欠損タグの一般的な構造は、N₅ (4 , 6 - ジメチル - 2 - ピリミジニル) - N₅ , N₅ - ジメチルオルニチン、及びペプチドのN末端及びリジン側鎖の選択的修飾用のアミン反応性トリアジンエステル基で構成される (図 1 A)。一実施形態において、ジメチルピリミジニルオルニチン構造は、質量が最大45 . 28 mDa異なる特有の質量欠損ベースの同位体種を与える、様々な構成の合計6つの重い安定同位体 (D i P y r O⁶) を特徴とする。このD i P y r O試薬の合成 (図 8) は、ごく少数の工程で達成される：アルギニンのジメチル化、ジメチルアルギニンの、アセチルアセトンによる誘導体化、及びトリアジンエステルを形成するための活性化。不活型D i P y r Oタグは、合成後、高度に純粋であり (図 9)、必要とされるまで保存することができる。必要とされる時点で、DMTMMによる活性化が、標識化の直前に実行される。組み込まれた各D i P y r O⁶タグは、254 Daの中程度の質量を、標識化されたペプチドに加える。市販の同位体出発材料のみを用いて、D i P y r O⁶タグの二重化、三重化セット、四重化セット、及び六重化セットが製剤化され得、タグ間の最小質量欠損は、それぞれ45 . 28 mDa、20 . 95 mDa、12 . 64 mDa、及び8 . 31 mDaである (図 1 B ~ 図 1 E)。質量欠損が5 . 84 mDaである八重化D i P y r O⁶セット (図 1 F) もまた、2つのカスタム同位体アルギニンにより可能である。図 1 5 は、各同位体種のための同位体位置を含む、11個のD i P y r O⁶同位体種を示しており、これらの同位体種は、本発明の一実施形態において、種々の多重化セットを構成することができる。

10

20

【0112】

[00138]加えて、D i P y r O同位体種の、2つの、又は10個の重同位体、D i P y r O²及びD i P y r O¹⁰との使用により、名目上の質量が250 Da及び258 Daであるタグの更なる多重化セットをさらに創出することができる (図 2 A ~ 図 2 B)、当該セットは、ハイブリッド質量差異 / 質量欠損定量化アプローチに、254 Daのタグと併せて用いられて、質量欠損ベースチャンネルの4 Daの質量差異間隔のクラスタにより、多重化を増大させることができる。D i P y r O²変異体の同位体種は、最小質量欠損が18 . 48 mDa、8 . 31 mDa、及び5 . 84 mDaであるそれぞれ二重化、三重化、及び四重化のセットに構成することができる。D i P y r O¹⁰変異体の同位体種は、最小質量欠損が54 . 50 mDa、26 . 79 mDa、17 . 53 mDa、12 . 64 mDa、9 . 22 mDa、5 . 28 mDa、及び5 . 84 mDaであるそれぞれ二重化、三重化、四重化、五重化、六重化、九重化、及び十重化に構成することができる。一実施形態において、同位体が濃縮された化合物 (複数可) は、図 1 5、図 2 7、又は図 2 8 に表される式によって特徴付けられる。

30

【0113】

[00139]図 1 B ~ 図 1 F の考えられる同位体構成、並びに二重化、三重化、四重化、六重化、及び八重化のセットの様々なD i P y r O⁶同位体種間の相対質量欠損を、図 3 にさらに示す。同様に、図 4 は、NeuCode SILACに用いることができる同位体標識化リジン (K) の重同位体構成及び相対質量欠損間隔を示す。また、図 4 に示すのは、異なる質量欠損間隔について、NeuCode標識化リジンをを用いて、様々な量の酵母プロテオームを同定するのに必要とされる分解力である (Merrilら、Mol Cell Proteomics、2014、13 : 2503 ~ 2512 参照)。データ依存性LC - MS / MSによって同定したおおよそ8 , 000の特有のD i P y r O標識化酵母トリプシンペプチドのライブラリを用いて、各多重化セットの多重線を分解するのに必須のOrbitrap分解力を評価した (図 5)。m / z 差異が、10 %の最大ピーク高さの幅よりも広いならば、ペプチドは分解可能であり、ゆえに定量化可能であると考えられる。

40

【0114】

50

【00140】DiPyro⁶ 定量化は、Orbitrap MSプラットフォームで、二重化について120~140k (Orbitrap Fusion、Orbitrap Elite、Q-Exactive HF、Q-Exactive)、三重化について240k (Orbitrap Fusion、Orbitrap Elite、及びQ-Exactive HF)、そして四重化及び六重化について480k (Orbitrap Elite及びOrbitrap Fusion)のそれぞれの分解力にて達成可能である。四重化DiPyro² タグ、八重化DiPyro⁶ タグ、又は十重化DiPyro¹⁰ タグによる定量化は、全ペプチドの>95%を定量化するのに、分解力が100万に近づくことを、今後のOrbitrapプラットフォーム又は現在のFT-ICRプラットフォームに要求するであろう。DiPyro⁶ 標識化酵母消化物とNeuCode SILAC酵母トリプシン消化物及びLys-C消化物との分解力の比較を、図6及び図7にさらに示す。DiPyroタグにより、分解力の増分毎に、NeuCode SILACよりも大きな多重化が可能となる。

10

【0115】

【00141】2つ、6つ、及び10個の重同位体によるDiPyro²、DiPyro⁶、及びDiPyro¹⁰の変異体を、ハイブリッド質量差異/質量欠損定量化戦略において組み合わせて、所定の分解力にて多重化を増大させることができる。例えば、二重化DiPyro²、三重化DiPyro⁶、及び四重化DiPyro¹⁰を組み合わせたことで、RP 240kにて九重化定量化が可能となり(図22)、これは、各クラスタにおけるタグ間の17.53~24.33mDaの質量欠損の分解に十分である。RP 960kが可能な機器があれば、四重化DiPyro²、八重化DiPyro⁶及び十重化DiPyro¹⁰のセットを組み合わせて、二十二重化定量化を達成することができる。図27及び図28はそれぞれ、各同位体種のための同位体位置を含む、5つのDiPyro²同位体種及び18個のDiPyro¹⁰同位体種を示しており、これらの同位体種は、本発明の一実施形態において、種々の多重化セットを構成することができる。十重化DiPyro¹⁰同位体種のうちの3つを除いて、DiPyro²及びDiPyro¹⁰の種々の多重化セットを、市販の同位体出発材料で合成することができる。

20

【0116】

【00142】DiPyro試薬の特徴付け及び応用。質量欠損同位体種の合成の前に、標識化用の軽いバージョンのタグ、及び標識化した複合体タンパク質消化物サンプルのLC-MS²分析を用いて、DiPyro試薬を特徴付けた。DiPyro標識化ペプチドにとって最適な衝突エネルギーを評価するために、標識化した酵母トリプシン消化物を、Orbitrap EliteでのLC-MS²により、24、27、30、33、36及び39のCID NCE値にて分析した。別の実験では、HCD衝突エネルギーを、標識化したBSAトリプシン消化物で、同NCE値にて評価した。同定したPSMの生じた数値及びメジアンXCorr値を、NCEの関数としてプロットした(図10A~図10B)。一般に、DiPyro標識化ペプチドは、良好なフラグメント化のために、衝突エネルギーの引下げを必要とする。2つの実験の間で用いるサンプルの差異は、CIDとHCDの公正な比較を可能としない一方、30のNCE値が、高い数値の高品質スペクトラムを与えて、CID及びHCDの双方に適していることが観察される。

30

40

【0117】

【00143】活性化及び標識化の反応時間を最適化するために、酵母トリプシン消化物を、いくつかの条件下で標識化して、同定したタンパク質及びペプチドの数、並びにDiPyro標識を含有するPSM数に基づいて、評価した。活性化反応を、30分間又は1時間実行して、標識化を、30分間、1時間、2時間、及び4時間実行した。各サンプルについて120分の勾配を用いるOrbitrap EliteでのLC-MS²分析の後(データ示さず)、30分の活性化で十分であったが、60分の活性化では、11%未満のタンパク質群及び15%未満のペプチドしか生じなかったと判定した。30分の標識化で十分であり、1時間の標識化とほとんど同等である一方、2時間及び4時間の標識化では、タンパク質及びペプチドの同定数がわずかに低下した。

50

【 0 1 1 8 】

[00144] 標識化効率を評価するために、酵母消化物（トリプシン、L y s C）を１時間、２５：１又は５０：１の標識対ペプチド比にて標識化して（概して図１１参照）、O r b i t r a p E l i t eで分析し、C I Dフラグメント化による１２０分の溶離勾配にわたって、１２０KのM S¹分解力であった。データを、N末端及びK残基上の動的修飾又は静的修飾として指定されるD i P y r Oタグにより検索して、標識化効率を評価した。同定したタンパク質群、ペプチド、及びP S Mの数値を、以下の表１に要約する。

【 0 1 1 9 】

[00145]

【表１】

表 1-DiPyrO で標識化した酵母タンパク質及びペプチドの同定率及び標識化効率。

	タンパク質	ペプチド	PSMs	w/K	N&K 修飾	K 修飾	N 修飾	N 又は K
トリプシン 50:1、動的 N&K	978	3966	8327	6012	5939	5987	8261	8309
%効率					98.8%	99.6%	99.2%	99.8%
トリプシン 25:1、動的 N&K	1013	4289	11119	7925	4848	7332	8021	10505
%効率					61.2%	92.5%	72.1%	94.5%
トリプシン 50:1、静的 N&K	1007	4135	8625	6136	6136			
%効率					100.0%			
トリプシン 25:1、静的 N&K	927	3642	7596	4763	4763			
%効率					100.0%			
Lys C 50:1、動的 N&K	777	2307	5019	4881	4631	4851	4787	5007
%効率					94.9%	99.4%	95.4%	99.8%
Lys C 25:1、動的 N&K	799	3085	8779	8646	5067	8177	5503	8613
%効率					58.6%	94.6%	62.7%	98.1%
Lys C 50:1、静的 N&K	793	2435	5090	4931	4931			
%効率					100.0%			
Lys C 25:1、静的 N&K	695	2359	5100	4991	4991			
%効率					100.0%			

【 0 1 2 0 】

[00146] D i P y r OをN末端及びKの双方に動的修飾として指定する場合、全体的な標識化効率は、５０：１の標識対ペプチド比にて優れており、ペプチドの９９％超が少なくとも１つのD i P y r Oタグを有している。リジンを含むトリプシンペプチドのほぼ９９％が、２つのタグで標識化されており、そしてリジンを含むL y s Cペプチドのほぼ９５％が、２つのタグで標識化されている。

【 0 1 2 1 】

[00147] 各ペプチド上に２つのD i P y r Oタグを組み込むことによって、チャンネル間で測定される質量欠損シグネチャーは２倍になり、定量化に必要な分解能は引き下げられる。サンプル中の全ペプチドが２つのタグを収容し得ることを確実にするために、C末端側又はN末端側にリジンを有するタンパク質分解ペプチドを生産する消化用の酵素として、それぞれL y s C又はL y s Nを用いてもよい。D i P y r Oタグはサイズが中程度であるので、２つのタグの存在は、標識化ペプチドの分析を大幅に制限しない。平均的なL y s Cペプチド及びL y s Nペプチドは、平均的なトリプシンペプチドよりも長い一方、内部アルギニンに起因して、より高い電荷状態を有する傾向もある。先で表１に要約した、標識化効率実験由来のデータは、トリプシン消化が、L y s C消化よりも約２５％多いタンパク質同定数を、そして同様に、より多いペプチド同定数を実現するこ

10

20

30

40

50

とを示している。1 : 50 の標識対ペプチド比にて、2 つのタグによる標識化が、トリプシンペプチド (98.8%) についてよりも Lys C ペプチド (94.9%) についてわずかに低い比率で起こったが、全体的な標識化 (N 末端又は K) 効率は等しかった (99.8%)。

【0122】

[00148] 次に、CID 及び HCD のフラグメント化モードの同定率を比較した。HCD を用いる Orbitrap Elite でのデータ依存取得中に、Orbitrap で得られるあらゆる MS¹ スキャンを、後の HCD MS² スキャンが得られ得る前に、完了しなければならない。しかしながら、Orbitrap Elite は、Orbitrap (FT) での MS¹ 取得、及びイオントラップ (IT) での CID MS² 取得を並行させることができる。この構成において、時間のかかる、高い分解能 MS¹ トランジェント (MS¹ transient) (120 k について 384 ミリ秒、240 k について 768 ミリ秒、480 k について約 1.6 ミリ秒) は、質量欠損シグネチャーを区別するのに必須であり、Orbitrap で得られる一方、LTQ は、上位の N 前駆体の CID MS² 分析を同時に実行する。これにより、全体的なデューティサイクルに及ぼす高分解能 MS¹ スキャンの影響は大いに引き下げられて、得られるスペクトル数はより多くなる。3 つの分析を実行した：120 k FT - MS¹ 及び HCD 15 k の FT - MS² ; 120 k FT - MS¹ 及び CID の急速スキャン IT - MS² ; 240 k FT - MS¹ 及び CID の急速スキャン IT - MS²。同定したタンパク質群、ペプチド、及び PSM、並びに得られたスペクトルの数を、表 2 に要約する。120 k の MS¹ 分解力にて、並行の CID IT - MS² 取得は、HCD FT - MS² が収集するスペクトルのほぼ 2 倍多いスペクトルを収集し、そして 44% 多いタンパク質群、35% 多いペプチド、及び 48% 多い PSM をもたらす。MS¹ 分解力を 240 k に 2 倍にすると、収集されるスペクトル数が 10% 減り、7% 少ないタンパク質群、5% 少ないペプチド、及び 10% 少ない PSM をもたらす。

【0123】

[00149]

【表 2】

表 2-DiPyrO で標識化した酵母タンパク質及びペプチドの同定率-HCD 対 CID。

	タンパク質	ペプチド	PSMs	DiPyrO 修飾	スペクトル
120k MS¹ 及び HCD	637	2987	5861	5770	15527
%w/修飾				98.4%	
120k MS¹ 及び CID	918	4036	8693	8570	30013
%w/修飾				98.6%	
240k MS¹ 及び CID	851	3824	7810	7689	26969
%w/修飾				98.5%	

【0124】

[00150] ペプチド同定に及ぼす DiPyrO 標識化の影響を評価するために、標識化した、そして標識化していない酵母抽出物消化物サンプルの nano LC - MS² 分析を、HCD フラグメント化を用いて比較した。標識化したサンプルについて 30、そして標識化していないサンプルについて 35 の標準化衝突エネルギー値を指定した一方、他の取得パラメータは等しくした。同定した PSM の全体にわたるペプチド電荷状態、ペプチド長、及び XCorr 値の分布を、ヒストグラムとしてプロットして、サンプル間で比較した (図 12A ~ 図 12C)。DiPyrO 標識化により、中程度の電荷状態の増大が導かれることが観察された (標識化したペプチドは、2 + 電荷状態と 3 + 電荷状態との間でそれ

それ42%と47%に、より均等に分配される一方、標識化していないペプチドは、大部分が2+(77%)であり、4+の電荷状態が、標識化していないペプチド(2%)よりも標識化したペプチド(9%)について、同様に高い)。標識化はまた、6~8個のアミノ酸を有する短いペプチドの検出及び同定を増強する(12.5%の非標識化と比較して、21.6%の標識化)。興味深いことに、標識化は、XCORR値の分布が、より高い値に向けてかなり広がるので、MS²スペクトルの全体の品質を高める(PSMの31%のXCORRが、標識化していないサンプルにおける11%と比較して、標識化したサンプルにおいて3.0以上である一方、標識化したPSMの14%のXCORRが、標識化していないPSMの1%と比較して、4.0以上である)。同定信頼度のこの増大は、DiPyroタグが、配列情報のあるプロダクトイオンへのペプチドのフラグメント化を高めることを示している。b-イオン及びy-イオンの高い適用範囲をもたらすDiPyro酵母トリプシンペプチドのHCD MS²スペクトルの例を示す(図13)。標識化したペプチドは、多数のb-イオンフラグメント及びy-イオンフラグメントを生産して、より確信的なペプチド配列同定を可能にした。

【0125】

[00151] DiPyroで標識化したペプチドのフラグメント化により、アイソバリックタグレポートイオンに類似するHCD MS²スペクトルの低質量領域において、特徴的なフラグメントイオンが生じる(図14A)。非同位体DiPyroタグは、m/z 176.12にて強いイオンを、そしてm/z 204.11、221.18、及び249.17にてより低い強度のイオンを生じさせる。多重化セットは、各タグの異なる同位体構成に起因して、4つのクラスタにおいていくつかのイオンを生じさせることとなる(図14B)。これらのイオンは、アイソバリックタグレポートイオンと同じようにしてMS²レベルの定量化に用いることができる一方、前駆体共単離に起因して生じる同じ、比率のゆがみの影響を受けることとなる。多重化DiPyroで標識化したペプチドは、当該ペプチドのいくつかのピークを生じさせるので、とりわけ当該ペプチドの質量をペプチド主鎖フラグメントイオンの質量と共有するならば、これらのピークが、データベースサーチアルゴリズムを用いたペプチド配列の同定を複雑にする可能性がある。MS²スペクトルのデコンボリューション、及びレポートイオンの除去によって、標識化したペプチドの同定の信頼度を高めることができることが最近報告された(Shengら、Mol Cell Proteomics、2015、14:405~417)。これらのシグネチャーイオンを除去するようにMS²スペクトルを前処理することは、DiPyroで標識化したペプチドの同定におそらく有益であろう。

【0126】

[00152]複雑な酵母消化物サンプルの標識化及び分析への、二重化DiPyro⁶タグ及び三重化DiPyro⁶タグの応用。複雑な酵母消化物サンプルの標識化及び分析に、二重化DiPyro⁶タグ及び三重化DiPyro⁶タグを用いて、データを収集した。酵母トリプシン消化物サンプルを、軽いDiPyro₀₀₄₁(¹⁸O¹⁵N₄)及び重いDiPyro₀₆₀₀(²H₆)のタグで二重に標識化して、組み合わせて、Orbitrap Elite系のnanoLC-MS²により、120分の溶離勾配を用いて分析した(図16)。保持時間(RT)=66.4分にて分解力(RP)が120kのOrbitrap質量分析器において、基準ピークイオン(BPI)クロマトグラムを得て、FT-MSスキャンを得た。また、m/z 642及び963にて電荷状態2+及び3+により検出した、DiPyro⁶で標識化したペプチドの抽出したイオンクロマトグラムを、軽い、そして重い標識化サンプルについてベースライン分解ピークを有する同位体ピーククラスタと共に示す(図16)。上述のサンプルにおいて検出した、いくつかのDiPyro⁶で標識化したペプチドの抽出したイオンクロマトグラムを、軽い、そして重い標識化サンプルについてベースライン分解ピークを示すペプチドの同位体ピーククラスタと一緒に、図17に示す。

【0127】

[00153]酵母トリプシン消化物サンプルを、軽いDiPyro₀₀₄₁(¹⁸O¹⁵N

10

20

30

40

50

4)、中程度のD i P y r O_{2 2 2 0} (^{1 3}C₂²H₂^{1 5}N₂)、及び重いD i P y r O_{0 6 0 0} (²H₆)のタグで三重に標識化して、組み合わせて、O r b i t r a p E l i t e系のL C - M Sにより、1 2 0分の溶離勾配を用いて分析した(図1 8)。O r b i t r a p質量分析器において、B P Iクロマトグラムを得て、F T - M Sスキャンを得た。また、R P 3 0 k及び2 4 0 kの背向F T - M Sスキャンで検出した、m / z 7 7 7でのペプチドの同位体ピークのクラスタを示す。別々に標識化したペプチドサンプルは、R P 3 0 kにて区別がつかないが、2 4 0 kにて明らかであり、軽い、中程度の、そして重い、D i P y r Oで標識化したサンプルから生じた3つのピークの比較による定量化が可能となる。このペプチドは、3 + 電荷状態で検出され、N末端にて単一のD i P y r Oタグで標識化されていた。三重化D i P y r O標識化ペプチドのピークは、1 2 0 kではなく2 4 0 kにて、ベースライン分解した(図1 9)。

【0 1 2 8】

[00154]図2 0は、軽いD i P y r O_{0 0 4 1}タグ、中程度のD i P y r O_{2 2 2 0}タグ、及び重いD i P y r O_{0 6 0 0}タグでそれぞれ2 : 1 : 2の比率で三重に標識化して、O r b i t r a p E l i t e系のL C - M Sにより分析した、酵母サンプル由来の類似のデータを示す。R P 3 0 k及び2 4 0 kでの背向F T - M Sスキャンで検出した、m / z 4 7 1、6 2 8、及び9 4 2でのペプチドの同位体ピークのクラスタを示す。別々に標識化したペプチドサンプルは、R P 3 0 kにて区別がつかないが、2 4 0 kにて明らかであり、軽い、中程度の、そして重いD i P y r O⁶で標識化したサンプルから生じた3つのピークの比較による定量化が可能となる。M a x Q u a n t (バージョン1 . 5 . 5 . 1)ソフトウェアによるプロセッシングの後、同定したタンパク質のおおよそ7 6 %、及び同定したペプチドの6 4 %が、三重化D i P y r O⁶タグを用いて、うまく定量化された。

【0 1 2 9】

[00155]単一のD i P y r Oタグを有するトリプシンペプチドの、2つのD i P y r Oタグを有するトリプシンペプチドとの比較を実行した(図2 1)。N末端アミン及びC末端アルギニン(R)残基を有するトリプシンペプチドは、単一のタグを有した一方、N末端アミン及びC末端リジン(K)残基を有し、側鎖アミンを有するペプチドは、2つのタグを有することによって、与えられる質量欠損を2倍にし、そして、R P 2 4 0 kにて、より容易にベースライン分解された。チャンネル間での質量欠損差異を2倍にすることで、より低い分解力での多重化分析が可能となり得る。

【0 1 3 0】

[00156]代謝物質標準物質の標識化及び分析への、二重化D i P y r O⁶タグの応用。アミン含有代謝物質標準物質(アミノ酸のフェニルアラニン(1 6 5 . 0 7 9 0 D a)、トリプトファン(2 0 4 . 0 8 9 9 D a)、及びロイシン/イソロイシン(1 3 1 . 0 9 4 6 D a))の混合物を含有するサンプルを、0 . 5 M T E A Bバッファ中に溶解させて、軽いD i P y r O_{0 0 4 1} (^{1 5}N₄^{1 8}O; + 2 5 4 . 1 5 6 1)タグ及び重いD i P y r O_{0 6 0 0} (²H₆; + 2 5 4 . 2 0 1 3 8)タグで、2 5 : 1のタグ対代謝物質標準物質の比率(重量)にて1時間、二重に標識化した。標識化したサンプルを、2 : 1の比率で組み合わせて、O r b i t r a p E l i t e系のn a n o L C - M S²により、3 0分の溶離勾配を用いて分析した。図2 3は、O r b i t r a p質量分析器でR P 1 2 0 kにて得たF T - M Sスキャンスペクトルを、電荷状態1 +でm / z 4 2 0、4 5 9、及び3 8 6にて検出した各D i P y r O標識化アミノ酸の抽出したイオンクロマトグラムと共に示す。同位体ピークのクラスタを、軽い、そして重い標識化サンプルについてベースライン分解したピークを示す。

【0 1 3 1】

[00157]グリカンの標識化及び分析への、二重化D i P y r O⁶タグの応用。オバルブミン糖タンパク質標準物質を変性させて、グリカンをP N G a s e Fにより一晚放出させた。放出したN - グリコシラミンを、脱グリコシルしたタンパク質から、1 4 , 0 0 0 x gでの遠心分離によって分離した。適切な標識化条件を判定するために、フレッシュに放

10

20

30

40

50

出させたグリカン、0.5 M TEABバッファ中に溶解させ、又は完全に乾燥させてから、25:1又は50:1のタグ対元の糖タンパク質質量の比率(重量)にて、フレッシュに活性化した非同位体DiPyroタグ(乾燥DMF中)を加えた。乾燥したグリカンの標識化により、1時間以内の効率的な標識化が達成された。図24は、MALDI Orbitrap LTQ XL系のMALDI-MS分析に従う、25:1及び50:1の比率のサンプルについての同定したグリカンの標識化効率を、そして標識化していないグリカンピークと標識化したグリカンピークとのシグナル強度の比較を示す。50:1の比率は、1つの高質量N-グリコシラミン以外の全てについて、ほぼ完全な標識化を実現する。1200~2000 m/zの質量範囲において検出した豊富な非標識化グリカン及び標識化グリカンのMALDI-MSスペクトルを、図25に示す。

10

【0132】

[00158]次に、フレッシュに放出させたグリカンサンプルを乾燥させて、軽いDiPyro₀₀₄₁(¹⁵N₄¹⁸O; +254.1561)タグ及び重いDiPyro₀₆₀(²H₆; +254.20138)タグで二重に標識化して、1:1の比率で組み合わせ、Orbitrap Q-Exactive HF系のnanoHILIC-LC-MS²により、40分の溶離勾配を用いて分析した。図26Aは、Orbitrap質量分析器で、DiPyroで標識化したグリカンダブレットのRP 240kで、m/z 858.9にて得たFT-MSスキャンスペクトル例を、軽い、そして重い標識化サンプルの抽出したイオンクロマトグラムと共に示す。同位体ピークのクラスタは、軽い、そして重い標識化サンプルについて、ベースライン分解ピークを示す。図26Bは、DiPyro₆で標識化したグリカンの確信的な構造的な同定についてのフラグメントイオンの完全なセットを含有する、m/z 858.9での二重線の注釈付きHCD FT-MS²スペクトルを示す。

20

【0133】

[00159]結論。DiPyroタグについての合成反応の工程及び条件を決定して、6つの重同位体を有する同位体種で構成されるいくつかのアイソバリック多重化セットがうまく合成された。複雑な酵母消化物サンプルを標識化して、Orbitrap EliteのnanoLC-MS²によって分析して、標識化ペプチドのフラグメント化を評価した。質量欠損を2倍にし、且つ分析に要求される分解能を引き下げるためにN末端及びリジン側鎖の双方を完全に標識化するための、標識対ペプチド比率の最適化を、トリプシン及びLys C消化物のサンプルについて実行した。トリプシンペプチドサンプル及び二重標識化Lys Cペプチドサンプルの定量化を実行して、分解力要件及びプロテオミクス適用範囲を比較した。質量欠損ベースの二重化DiPyro₆セット及び三重化DiPyro₆セットを用いて、複雑なプロテオーム定量化、アミン含有代謝物質定量化、及びN-グリコシラミン定量化用のタグの性能を、高分解能(RP 240k)Orbitrap MS取得により実証した。これまで達成してきた研究は、見込みのある結果をもたらして、DiPyro質量欠損タグの実行可能性を、ロバストなMS定量化アプローチとして確立した。

30

【0134】

[00160]本出願の全体を通した全ての参照、例えば公布又は取得済みの特許又は均等物; 特許出願公報が挙げられる特許文献; 及び非特許文献又は他のソース材料; は、それらの全体が、参照によって本明細書に組み込まれるが、この組み込みは、各参照が、本出願における本開示と少なくとも部分的に矛盾しない程度に、参照によって個々に組み込まれるかのようになされる(例えば、部分的に矛盾する参照は、参照の部分的に矛盾する部分を除いて、参照によって組み込まれる)。

40

【0135】

[00161]本明細書中で使用された用語及び表現は、限定ではなく説明の用語として用いられており、示され、且つ記載される特徴のあらゆる均等物又はその一部を除外するような用語及び表現の使用は意図されないが、種々の修正が、特許請求する本発明の範囲内で可能であることが認識される。ゆえに、本発明が、好ましい実施形態、例示的な実施形態

50

、及び任意選択の特徴によって詳細に開示されてきたが、本明細書中で開示される概念の修正及び変形が、当業者によって訴えられ得ること、そしてそのような修正及び変形は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲内にあると考えられることを理解すべきである。本明細書中で提供される特定の実施形態は、本発明の有用な実施形態の例であり、本発明は、本記載において示される、装置、装置構成要素、方法工程の多数の変形を用いて実行されてもよいことが、当業者にとって明らかとなろう。当業者にとって明らかのように、本方法に有用な方法及び装置は、多数の任意選択の組成、プロセッシング要素、及び工程を含み得る。

【 0 1 3 6 】

[00162]置換基の一群が本明細書中で開示される場合、その群及び全ての亜群の全ての個々のメンバが、群メンバのあらゆる異性体、エナンチオ異性体、及びジアステレオ異性体を含み、別々に開示されていることが理解される。マーカッシュ群又は他のグループ化が本明細書中で用いられる場合、群の全ての個々のメンバ、並びに当該群の可能な全ての組合せ及び部分的組合せが、本開示において個々に含まれることが意図される。化合物の特定の異性体、エナンチオ異性体、又はジアステレオ異性体が、例えば、式で、又は、化学名で指定されないで、本明細書中で化合物が記載される場合、その記載は、個々の、又はあらゆる組合せの、記載された化合物の各異性体及び各エナンチオ異性体を含むことが意図される。加えて、特に明記されない限り、本明細書中で開示される化合物の全ての同位体変異体が、本開示によって包含されることが意図される。例えば、開示される分子中の1つ又は複数のあらゆる水素が、重水素又は三重水素に置き換えられてもよいことが理解されよう。分子の同位体変異体が、分子のアッセイ、並びに分子又は分子の使用に関する化学研究及び生物学的研究の標準物質として、一般に有用である。そのような同位体変異体を製造する方法が、当該技術において知られている。当業者が同じ化合物を異なって命名し得ることが知られているので、化合物の特定の名前は、例示であることが意図される。

【 0 1 3 7 】

[00163]本明細書中で開示される分子の多くは、1つ又は複数のイオン性基〔プロトンが除去され得る基（例えば -COOH）、若しくは加えられ得る基（例えばアミン）、又は四級化され得る基（例えばアミン）〕を含有する。そのような分子の全ての可能なイオン性形態及びそれらの塩が、本明細書中の本開示において個々に含まれることが意図される。本明細書中の化合物の塩に関して、当業者であれば、所定の用途のために、本発明の塩の調製に適した多種多様な利用可能な対イオンの中から選択することができる。特定の用途において、塩の調製のための所定のアニオン又はカチオンの選択により、当該塩の溶解度を上昇させ、又は下降させることができる。

【 0 1 3 8 】

[00164]本明細書中で記載又は例示されるあらゆる製剤又は構成要素の組合せが、特に明記されない限り、本発明を实践するのに用いられ得る。

【 0 1 3 9 】

[00165]明細書中で範囲、例えば温度範囲、時間範囲、又は組成範囲若しくは濃度範囲が与えられる場合はいつでも、所定の範囲内に含まれる全ての中間域及び部分範囲、並びに個々の値が、本開示に含まれることが意図される。本明細書中の記載に含まれる範囲又は部分範囲内のあらゆる部分範囲又は個々の値が、本出願中の特許請求の範囲から除外され得ることが理解されよう。

【 0 1 4 0 】

[00166]本明細書中で言及した全ての特許及び刊行物は、本発明が属する技術の当業者の技術レベルを示す。本明細書中で引用した文献は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれて、文献の公開日又は出願日時点での当該技術の状態を示し、そしてこの情報は、必要ならば、本明細書中で使用されて、先行技術内の特定の実施形態を除外し得ることが意図される。例えば、物質の組成物が特許請求される場合、出願人の本発明以前に当該技術において知られており、且つ利用可能な化合物（本明細書中の引用文献において効

果的な開示が提供される化合物が挙げられる)が、本明細書中の物質の特許請求の範囲の組成物に含まれることが意図されないことを理解すべきである。

【0141】

[00167]本明細書中で用いられる「含む (comprising)」は、「含む (including)」、「含有する」、又は「によって特徴付けられる」と同義であり、包括的又は開放型であり、そして追加の、記載されていない要素又は方法工程を除外しない。本明細書中で用いられる「からなる」は、特許請求の範囲の要素において指定されていないあらゆる要素、工程、又は成分を除外する。本明細書中で用いられる「から本質的になる」は、特許請求の範囲の基本的な、そして新規の特性に物質的に影響を及ぼさない材料又は工程を除外しない。本明細書中のそれぞれの例において、用語「含む (comprising)」、「から本質的になる」、及び「からなる」はいずれも、他の2つの用語のいずれかと置き換えられてもよい。本明細書中で実例として記載される本発明は、本明細書中で詳細に開示されていないあらゆる要素(複数可)又は限定(複数可)が不在の場合にも、適切に実践され得る。

10

【0142】

[00168]本明細書中で、そして添付の特許請求の範囲で用いられる単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈上明らかに別の意味を示す場合を除き、複数の言及を含むことに留意しなければならない。ゆえに、例えば、「細胞」への言及は、そのような細胞、及び当業者に知られているその均等物その他の複数を含む。同様に、用語「a」(又は「an」)、「1つ又は複数」、及び「少なくとも1つ」は、本明細書中で互換的に用いられ得る。また、用語「含む (comprising)」、「含む (including)」、及び「有する」は、互換的に用いられ得ることに留意すべきである。表現「請求項XX~YYのいずれかの」(XX及びYYは請求項の番号を指す)は、代替形態の複数の従属請求項を与えることが意図されており、一部の実施形態において、表現「請求項XX~YYのいずれか一項に記載の」と互換可能である。

20

【0143】

[00169]当業者であれば、具体的に例示される以外の出発材料、生体材料、試薬、合成法、精製法、分析法、アッセイ法、及び生物学的方法が、過度の実験に頼らずに本発明の実践の際に使用され得ることを理解するであろう。そのようなあらゆる材料及び方法の、当該技術において知られている全ての機能的均等物が、本発明に含まれることが意図される。使用された用語及び表現は、限定ではなく説明の用語として用いられており、そのような用語及び表現の使用において、示され、且つ記載される特徴のあらゆる均等物又はその一部を除外する意図はないが、種々の修正が、特許請求する本発明の範囲内で可能であることが認識される。ゆえに、本発明が、好ましい実施形態及び任意選択の特徴によって詳細に開示されてきたが、本明細書中で開示される概念の修正及び変形が、当業者によって訴えられ得ること、そしてそのような修正及び変形は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲内にあると考えられることを理解すべきである。

30

【引用文献】

【0144】

[00170](1) Oda, Y.; Huang, K.; Cross, F. R.; Cowburn, D.; Chait, B. T. Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999, 96, 6591-6596.

40

[00171](2) Ong, S.-E.; Blagoev, B.; Kratchmarova, I.; Kristensen, D. B.; Steen, H.; Pandey, A.; Mann, M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2002, 1, 376-386.

[00172](3) Pan, S.; Gu, S.; Bradbury, E. M.; Chen, X. Single peptide-based protein identification in human proteome through MALDI-TOF MS coupled with amino acid coded mass tagging. *Anal Chem* 2003, 75, 1316-1324.

[00173](4) Wu, C. C.; MacCoss, M. J.; Howell, K. E.; Matthews, D. E.; Yates, J.

50

R. Metabolic Labeling of Mammalian Organisms with Stable Isotopes for Quantitative Proteomic Analysis. *Anal Chem* 2004, 76, 4951-4959.

[00174](5) Gygi, S. P.; Rist, B.; Gerber, S. A.; Turecek, F.; Gelb, M. H.; Aebersold, R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 1999, 17, 994-999.

[00175](6) Thompson, A.; Schafer, J.; Kuhn, K.; Kienle, S.; Schwarz, J.; Schmidt, G.; Neumann, T.; Hamon, C. Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. *Anal Chem* 2003, 75, 1895-1904.

[00176](7) Ross, P. L.; Huang, Y. N.; Marchese, J. N.; Williamson, B.; Parker, K.; Hattan, S.; Khainovski, N.; Pillai, S.; Dey, S.; Daniels, S.; Purkayastha, S.; Juhasz, P.; Martin, S.; Bartlett-Jones, M.; He, F.; Jacobson, A.; Pappin, D. J. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 2004, 3, 1154-1169.

[00177](8) Hsu, J.-L.; Huang, S.-Y.; Chow, N.-H.; Chen, S.-H. Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Anal Chem* 2003, 75, 6843-6852.

[00178](9) Boersema, P. J.; Raijmakers, R.; Lemeer, S.; Mohammed, S.; Heck, A. J. R. Multiplexed peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat Protoc* 2009, 4, 484-494.

[00179](10) Molina, H.; Yang, Y.; Ruch, T.; Kim, J.-W.; Mortensen, P.; Otto, T.; Nalli, A.; Tang, Q.-Q.; Lane, M. D.; Chaerkady, R.; Pandey, A. Temporal profiling of the adipocyte proteome during differentiation using a five-plex SILAC based strategy. *J Proteome Res* 2009, 8, 48-58.

[00180](11) Wu, Y.; Wang, F.; Liu, Z.; Qin, H.; Song, C.; Huang, J.; Bian, Y.; Wei, X.; Dong, J.; Zou, H. Five-plex isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Chem. Commun.* 2014, 50, 1708.

[00181](12) Choe, L.; D'Ascenzo, M.; Relkin, N. R.; Pappin, D.; Ross, P.; Williamson, B.; Guertin, S.; Pribil, P.; Lee, K. H. 8-plex quantitation of changes in cerebrospinal fluid protein expression in subjects undergoing intravenous immunoglobulin treatment for Alzheimer's disease. *Proteomics* 2007, 7, 3651-3660.

[00182](13) Dayon, L.; Hainard, A.; Licker, V.; Turck, N.; Kuhn, K.; Hochstrasser, D. F.; Burkhard, P. R.; Sanchez, J.-C. Relative Quantification of Proteins in Human Cerebrospinal Fluids by MS/MS Using 6-Plex Isobaric Tags. *Anal Chem* 2008, 80, 2921-2931.

[00183](14) Xiang, F.; Ye, H.; Chen, R.; Fu, Q.; Li, L. N,N-dimethyl leucines as novel isobaric tandem mass tags for quantitative proteomics and peptidomics. *Anal Chem* 2010, 82, 2817-2825.

[00184](15) Frost, D. C.; Greer, T.; Xiang, F.; Liang, Z.; Li, L. Development and characterization of novel 8-plex DiLeu isobaric labels for quantitative proteomics and peptidomics. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2015, 29, 1115-1124.

[00185](16) Ow, S. Y.; Salim, M.; Noirel, J.; Evans, C.; Rehman, I.; Wright, P. C. iTRAQ underestimation in simple and complex mixtures: "the good, the bad and the ugly". *J Proteome Res* 2009, 8, 5347-5355.

[00186](17) Wenger, C. D.; Lee, M. V.; Hebert, A. S.; McAlister, G. C.; Phanstiel, D. H.; Westphall, M. S.; Coon, J. J. Gas-phase purification enables accurate, multiplexed proteome quantification with isobaric tagging. *Nat Meth* 2011, 8, 933-935.

[00187](18) Vincent, C. E.; Rensvold, J. W.; Westphall, M. S.; Pagliarini, D. J.; Coon, J. J. Automated gas-phase purification for accurate, multiplexed quantification on a stand-alone ion-trap mass spectrometer. *Anal Chem* 2013, 85, 2079-208

10

20

30

40

50

6.

[00188](19) Ting, L.; Rad, R.; Gygi, S. P.; Haas, W. MS3 eliminates ratio distortion in isobaric multiplexed quantitative proteomics. *Nat Meth* 2011, 8, 937-940.

[00189](20) McAlister, G. C.; Nusinow, D. P.; Jedrychowski, M. P.; Wuhr, M.; Huttlin, E. L.; Erickson, B. K.; Rad, R.; Haas, W.; Gygi, S. P. MultiNotch MS3 Enables Accurate, Sensitive, and Multiplexed Detection of Differential Expression across Cancer Cell Line Proteomes. *Anal Chem* 2014, 86, 7150-7158.

[00190](21) Zhou, Y.; Shan, Y.; Wu, Q.; Zhang, S.; Zhang, L.; Zhang, Y. Mass defect-based pseudo-isobaric dimethyl labeling for proteome quantification. *Anal Chem* 2013, 85, 10658-10663.

10

[00191](22) Hebert, A. S.; Merrill, A. E.; Bailey, D. J.; Still, A. J.; Westphall, M. S.; Strieter, E. R.; Pagliarini, D. J.; Coon, J. J. Neutron-encoded mass signatures for multiplexed proteome quantification. *Nat Meth* 2013, 10, 332-334.

[00192](23) Merrill, A. E.; Hebert, A. S.; Macgillivray, M. E.; Rose, C. M.; Bailey, D. J.; Bradley, J. C.; Wood, W. W.; Masri, E. M.; Westphall, M. S.; Gasch, A. P.; Coon, J. J. NeuCode labels for relative protein quantification. *Mol Cell Proteomics* 2014, 13, 2503-2512.

[00193](24) Rose, C. M.; Merrill, A. E.; Bailey, D. J.; Hebert, A. S.; Westphall, M. S.; Coon, J. J. Neutron Encoded Labeling for Peptide Identification. *Anal Chem* 2013, 130502121401004.

20

[00194](25) Richards, A. L.; Vincent, C. E.; Guthals, A.; Rose, C. M.; Westphall, M. S.; Bandeira, N.; Coon, J. J. Neutron-encoded signatures enable product ion annotation from tandem mass spectra. *Mol Cell Proteomics* 2013, 12, 3812-3823.

[00195](26) Rhoads, T. W.; Rose, C. M.; Bailey, D. J.; Riley, N. M.; Molden, R. C.; Nestler, A. J.; Merrill, A. E.; Smith, L. M.; Hebert, A. S.; Westphall, M. S.; Pagliarini, D. J.; Garcia, B. A.; Coon, J. J. Neutron-Encoded Mass Signatures for Quantitative Top-Down Proteomics. *Anal Chem* 2014, 86, 2314-2319.

[00196](27) Rose, C. M.; Baughman, J. M.; Rhoads, T. W.; Williams, C. E.; Merrill, A. E.; Stapleton, D. S.; Keller, M. P.; Hebert, A. S.; Westphall, M. S.; Attie, A. D.; Kirkpatrick, D. S.; Dey, A.; Coon, J. J. NeuCode Mouse: Multiplexed Proteomics Analysis Reveals Tissue Specific Effects of Deubiquitinase Deletion. In: Baltimore, MD, 2014; pp. 1-65.

30

[00197](28) Ulbrich, A.; Merrill, A. E.; Hebert, A. S.; Westphall, M. S.; Keller, M. P.; Attie, A. D.; Coon, J. J. Neutron-encoded protein quantification by Peptide carbamylation. *J Am Soc Mass Spectrom* 2014, 25, 6-9.

[00198](29) Ulbrich, A.; Bailey, D. J.; Westphall, M. S.; Coon, J. J. Organic acid quantitation by NeuCode methylation. *Anal Chem* 2014, 86, 4402-4408.

[00199](30) Hebert, A. S.; Merrill, A. E.; Stefely, J. A.; Bailey, D. J.; Wenger, C. D.; Westphall, M. S.; Pagliarini, D. J.; Coon, J. J. Amine-reactive Neutron-encoded Labels for Highly Plexed Proteomic Quantitation. *Mol Cell Proteomics* 2013, 12, 3360-3369.

40

[00200](31) Tang, X. J.; Thibault, P.; Boyd, R. K. Fragmentation reactions of multiply-protonated peptides and implications for sequencing by tandem mass spectrometry with low-energy collision-induced dissociation. 1993.

[00201](32) Dikler, S.; Kelly, J. W.; Russell, D. H. Improving mass spectrometric sequencing of arginine-containing peptides by derivatization with acetylacetone. *J Mass Spectrom* 1997, 32, 1337-1349.

[00202](33) McClatchy, D. B.; Dong, M.-Q.; Wu, C. C.; Venable, J. D.; Yates, J. R. ¹⁵N Metabolic Labeling of Mammalian Tissue with Slow Protein Turnover. *J Proteome Res* 2007, 6, 2005-2010.

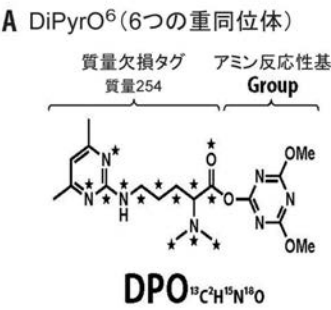
50

- [00203](34) Rauniyar, N.; McClatchy, D. B.; Yates, J. R. Stable isotope labeling of mammals (SILAM) for in vivo quantitative proteomic analysis. *Methods* 2013, 61, 260-268.
- [00204](35) Hebert, A. S.; Merrill, A. E.; Rose, C. M.; Bailey, D. J.; Stefely, J. A.; Vincent, C. E.; He, H.; Young, N.; Pagliarini, D. J.; Canterbury, J.; Zaboroukov, V.; Senko, M.; Denisov, E.; Makarov, A.; Marshall, A. G.; Westphall, M. S.; Coon, J. J. FTMS enabled neuron-encoded chemical tags: 4, 12, and 36 plexes. *In*; 2013; pp. 1-79.
- [00205](36) Zhang, R.; Sioma, C. S.; Thompson, R. A.; Xiong, L.; Regnier, F. E. Controlling deuterium isotope effects in comparative proteomics. *Anal Chem* 2002, 74, 3662-3669. 10
- [00206](37) Greer, T.; Lietz, C. B.; Xiang, F.; Li, L. Novel isotopic N,N-dimethyl leucine (iDiLeu) reagents enable absolute quantification of peptides and proteins using a standard curve approach. *J Am Soc Mass Spectrom* 2015, 26, 107-119.
- [00207](38) Sullivan, A. G.; Brancia, F. L.; Tyldesley, R.; Bateman, R.; Sidhu, K.; Hubbard, S. J.; Oliver, S. G.; Gaskell, S. J. The exploitation of selective cleavage of singly protonated peptide ions adjacent to aspartic acid residues using a quadrupole orthogonal time-of-flight mass spectrometer equipped with a matrix-assisted laser desorption/ionization source. *Int J Mass Spectrom* 2001, 210-211, 665-676. 20
- [00208](39) Swaney, D. L.; McAlister, G. C.; Coon, J. J. Decision tree-driven tandem mass spectrometry for shotgun proteomics. *Nat Meth* 2008, 5, 959-964.
- [00209](40) Morris, H. R.; Dickinson, R. J.; Williams, D. H. Studies towards the complete sequence determination of proteins by mass spectrometry: Derivatization of methionine, cysteine and arginine containing peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1973, 51, 247-255.
- [00210](41) Kuyama, H.; Sonomura, K.; Shima, K.; Nishimura, O.; Tsunasawa, S. An improved method for de novo sequencing of arginine-containing, N α -tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium-acetylated peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008, 22, 2063-2072. 30
- [00211](42) Foettinger, A.; Leitner, A.; Lindner, W. Derivatization of arginine residues with malondialdehyde for the analysis of peptides and protein digests by LC-ESI-MS/MS. *J Mass Spectrom* 2006, 41, 623-632.
- [00212](43) Leitner, A.; Lindner, W. Probing of arginine residues in peptides and proteins using selective tagging and electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2003, 38, 891-899.
- [00213](44) Lindner, W. Effects of an arginine-selective tagging procedure on the fragmentation. *Anal Chim Acta* 2005, 528, 165-173.
- [00214](45) Leitner, A.; Foettinger, A.; Lindner, W. Improving fragmentation of poorly fragmenting peptides and phosphopeptides during collision-induced dissociation by malondialdehyde modification of arginine residues. *J Mass Spectrom* 2007, 42, 950-959. 40
- [00215](46) Onofrejova, L.; Leitner, A.; Lindner, W. Malondialdehyde tagging improves the analysis of arginine oligomers and arginine-containing dendrimers by HPLC-MS. *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 499-506.
- [00216](47) Dongre, A. R.; Jones, J. L.; Somogyi, A.; Wysocki, V. H. Influence of peptide composition, gas-phase basicity, and chemical modification on fragmentation efficiency: Evidence for the mobile proton model. *J Am Chem Soc* 1996, 118, 8365-8374.
- [00217](48) Sheng, Q.; Li, R.; Dai, J.; Li, Q.; Su, Z.; Guo, Y.; Li, C.; Shyr, 50

Y.; Zeng, R.Preprocessing significantly improves the peptide/protein identification sensitivity of high-resolution isobarically labeled tandem mass spectrometry data. Mol Cell Proteomics 2015, 14, 405-417.

【 図 1 A 】

【 図 1 B 】



B

DiPyrO 標識	安定同位体				同位体 質量	Δ mDa
	¹³ C	² H	¹⁵ N	¹⁸ O		
DPO _{COH}	0	0	4	1	5.99238	0
DPO _{COO}	0	6	0	0	6.03766	45.28

Figures 1B

Figures 1A

【 図 1 C 】

C	三重化	DPO ₀₀₄₁	0	0	4	1	5.99238	0
		DPO ₂₇₂₀	2	2	2	0	6.01333	20.95
		DPO ₀₆₀₀	0	6	0	0	6.03766	24.33

Figures 1C

【 図 1 D 】

D	四重化	DiPyrO 標識	安定同位体				同位体 質量	Δ
			¹³ C	² H	¹⁵ N	¹⁸ O		mDa
		DPO ₀₀₄₁	0	0	4	1	5.99238	0
		DPO ₂₀₇₁	2	0	2	1	6.00502	12.64
		DPO ₀₆₀₀	6	0	0	0	6.02013	15.11
		DPO ₀₆₀₀	0	6	0	0	6.03766	17.53

Figures 1D

【 図 1 E 】

E	六重化	DPO ₀₀₄₁	0	0	4	1	5.99238	0
		DPO ₀₂₄₀	0	2	4	0	6.00069	8.31
		DPO ₀₂₇₁	0	2	2	1	6.01087	10.17
		DPO ₀₆₀₀	6	0	0	0	6.02013	9.26
		DPO ₀₄₀₁	0	4	0	1	6.02935	9.22
		DPO ₀₆₀₀	0	6	0	0	6.03766	8.31

Figures 1E

【 図 1 F 】

F	八重化	DPO ₀₀₄₁	0	0	4	1	5.99238	0
		DPO ₀₂₄₀	0	2	4	0	6.00069	8.31
		DPO ₄₀₇₀	4	0	2	0	6.00749	6.80
		DPO ₂₂₂₀	2	2	2	0	6.01333	5.84
		DPO ₀₆₀₀	6	0	0	0	6.02013	6.80
		DPO ₄₂₀₀	4	2	0	0	6.02597	5.84
		DPO ₂₀₀₀	2	4	0	0	6.03182	5.84
		DPO ₀₆₀₀	0	6	0	0	6.03766	5.84

Figures 1F

【 図 2 A 】

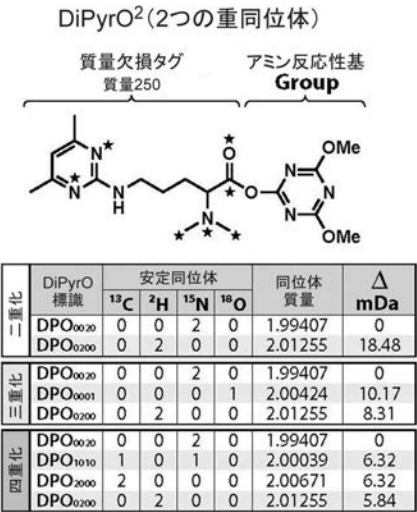


Figure 2A

【 図 2 B 】

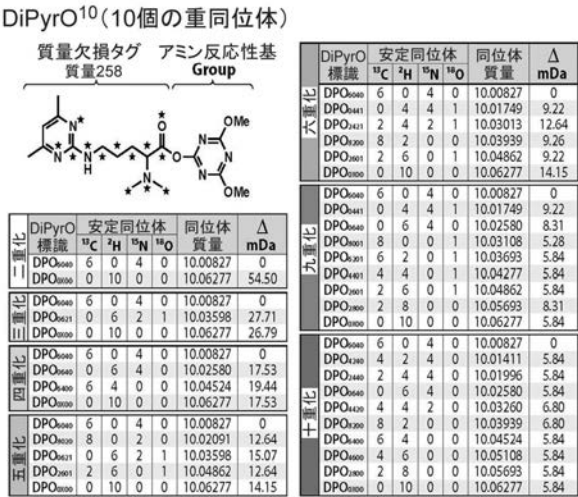


Figure 2B

【 図 3 】

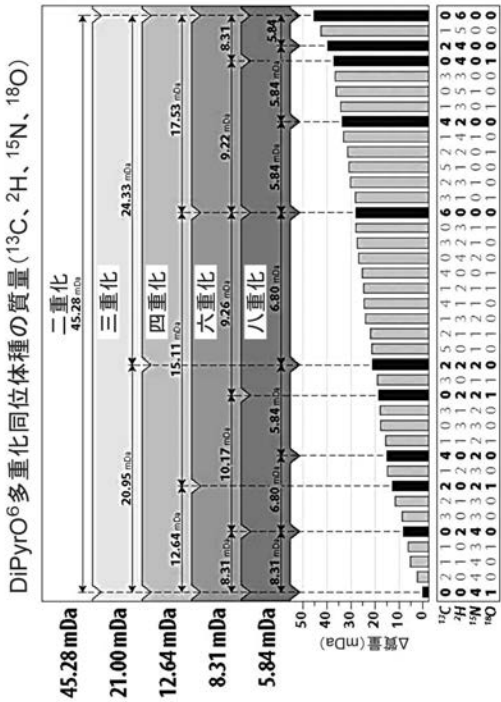


Figure 3

【 図 4 】

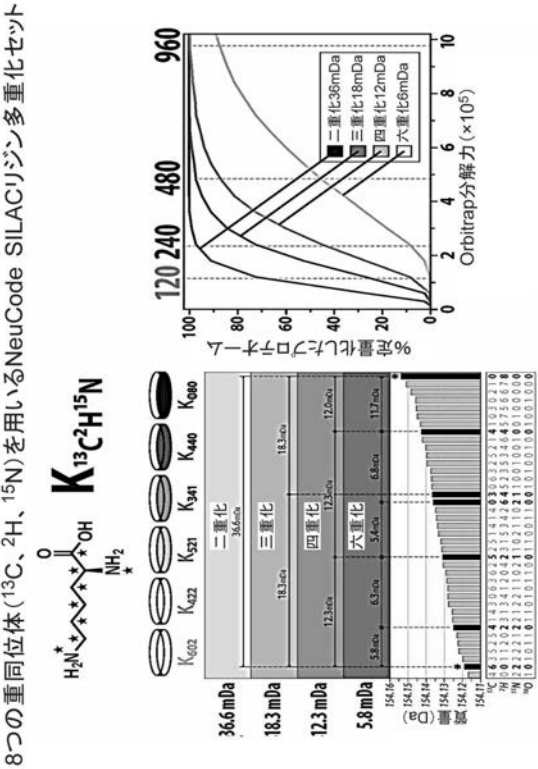


Figure 4

【 図 5 】

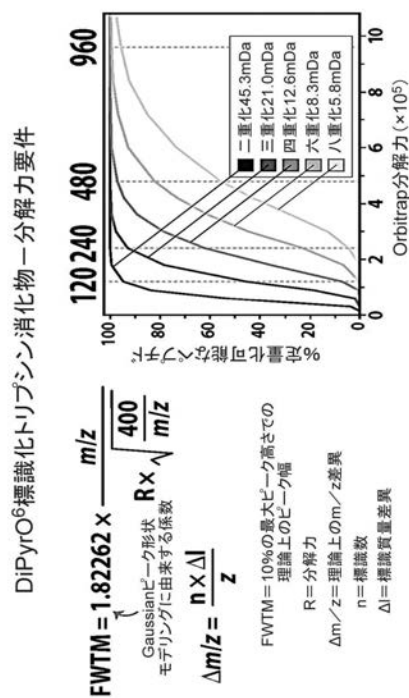


Figure 5

【 図 6 】

標識化した酵母消化物—分解力の比較

DiPyrOタグ
(トリプシン消化物)NeuCode SILAC
(Lys—C消化物)

Figure 6

【 図 7 】

標識化した酵母消化物—分解力の比較

DiPyrOタグ
(Lys—C消化物)NeuCode SILAC
(Lys—C消化物)

Figure 7

【 図 8 】

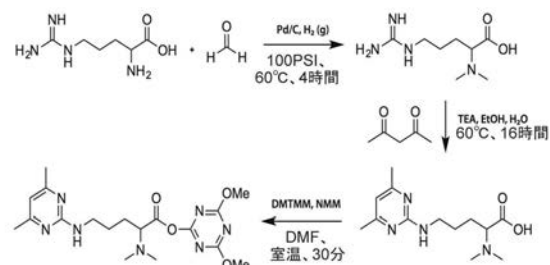


Figure 8

【 図 9 】

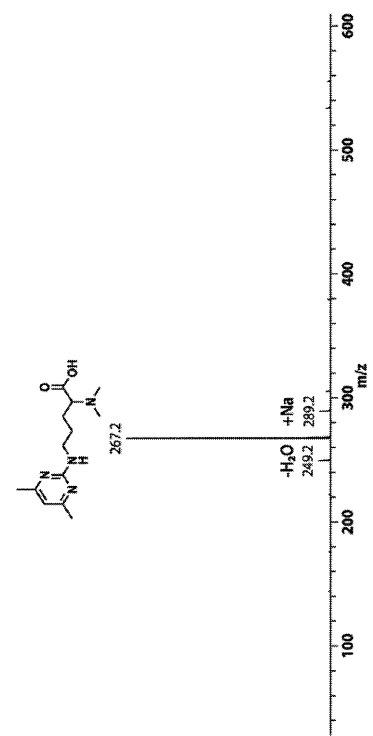
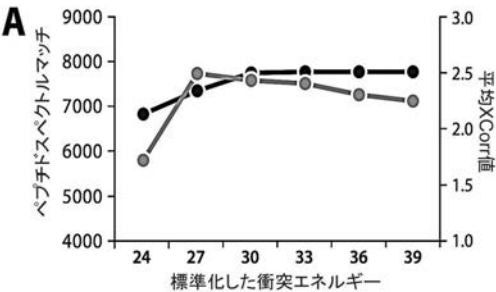


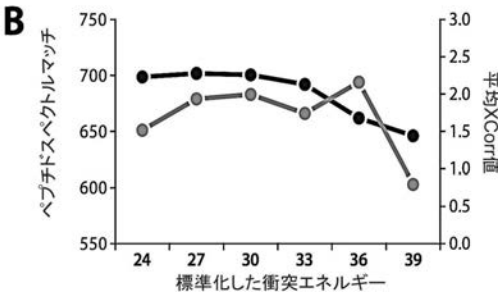
Figure 9

【 図 1 0 A 】



Figures 10A

【 図 1 0 B 】



Figures 10B

【 図 1 1 】

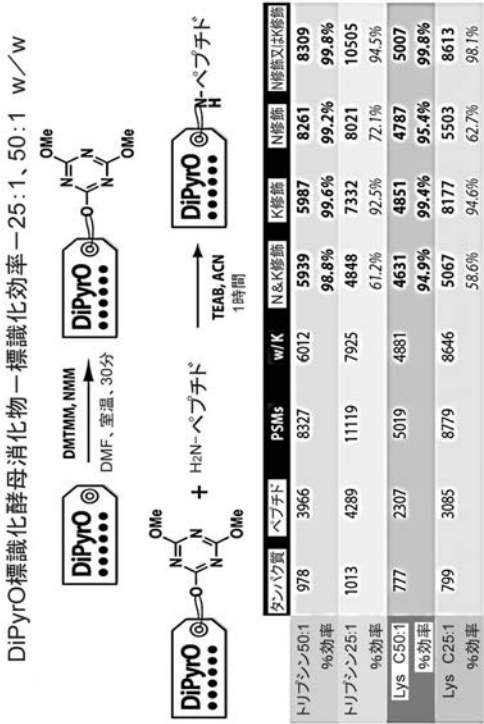
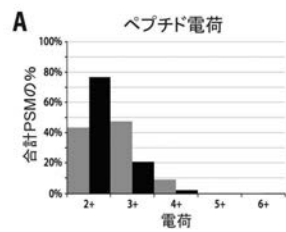


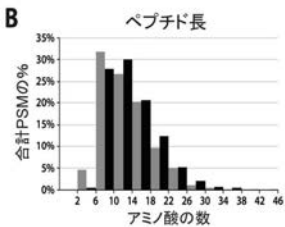
Figure 11

【 図 1 2 A 】



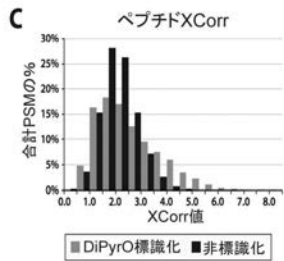
Figures 12A

【 図 1 2 B 】



Figures 12B

【 図 1 2 C 】



Figures 12C

【 図 1 3 】

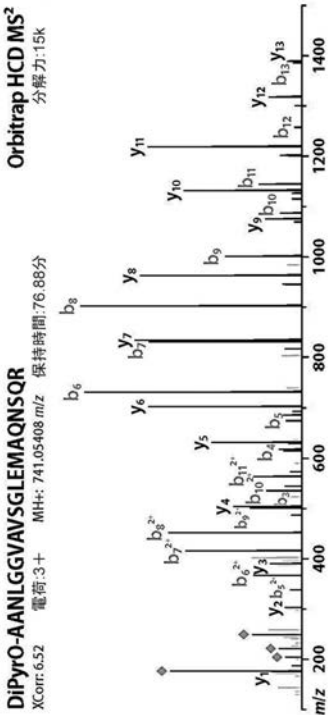
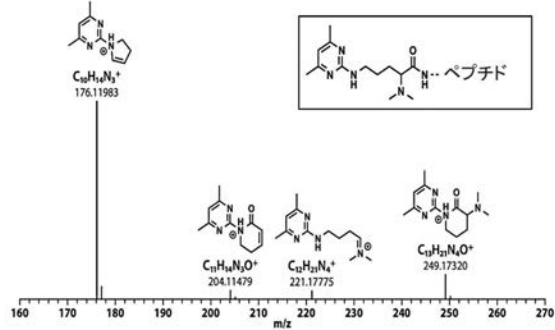


Figure 13

【図 14 A】

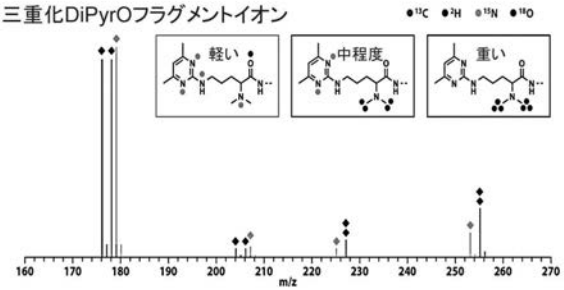
A DiPyrOフラグメントイオン



Figures 14A

【図 14 B】

B 三重化DiPyrOフラグメントイオン



Figures 14B

【図 15】

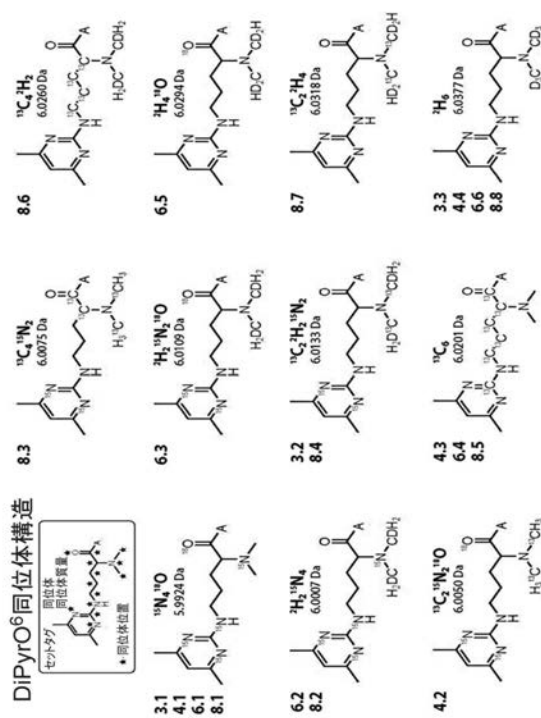


Figure 15

【図 16】

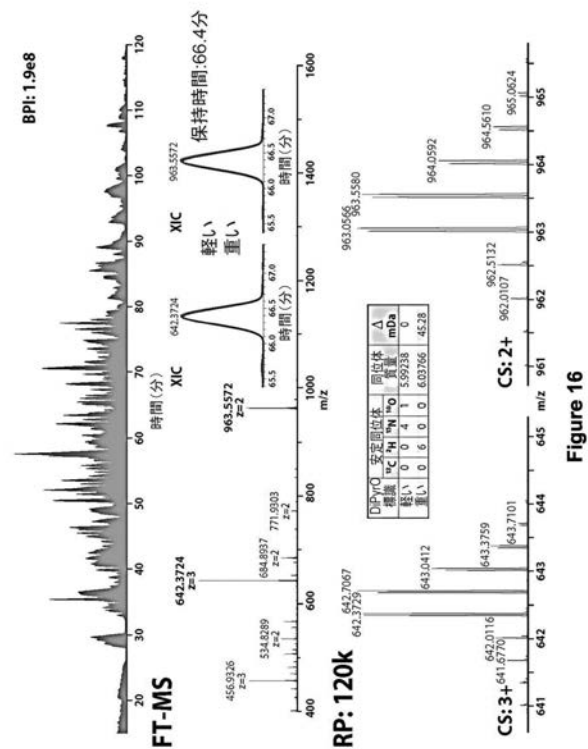


Figure 16

【 図 2 1 】

1つのDiPyrOタグ対2つのDiPyrOタグトリプシンペプチド

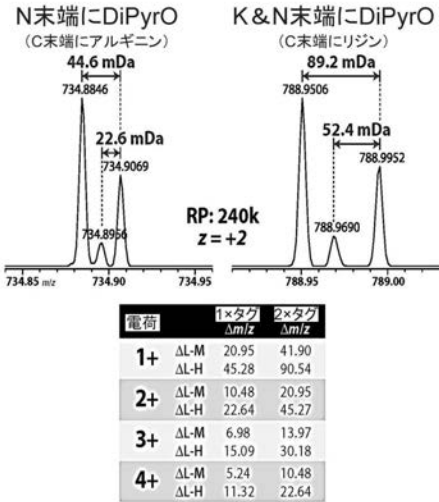


Figure 21

【 図 2 2 】

	DiPyrO 標識	安定同位体				同位体質量	Δ mDa
		¹³ C	² H	¹⁵ N	¹⁸ O		
九重化	DPO ₀₀₂₀	0	0	2	0	1.99407	0
	DPO ₀₂₀₀	0	2	0	0	2.01255	18.48
	DPO ₀₀₄₁	0	0	4	1	5.99238	0
	DPO ₂₂₂₀	2	2	2	0	6.01333	20.95
	DPO ₀₆₀₀	0	6	0	0	6.03766	24.33
	DPO ₆₀₄₀	6	0	4	0	10.00827	0
	DPO ₀₆₄₀	0	6	4	0	10.02580	17.53
	DPO ₆₄₀₀	6	4	0	0	10.04524	19.44
	DPO _{0X00}	0	10	0	0	10.06277	17.53

Figure 22

【 図 2 3 】

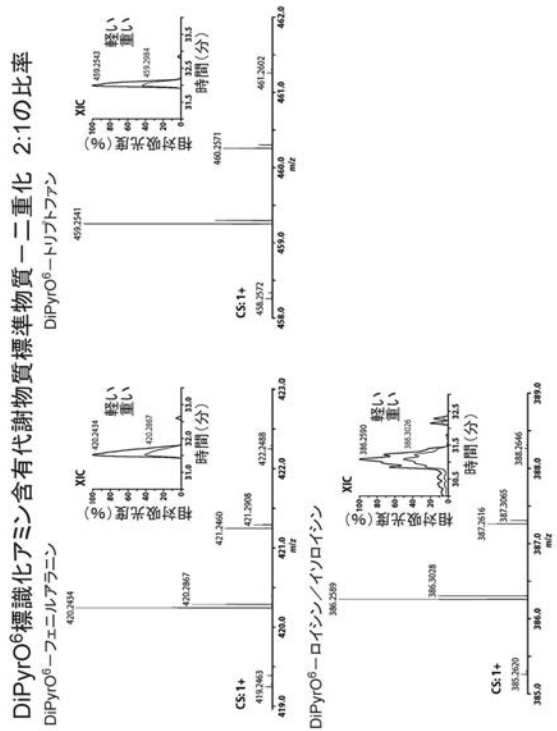


Figure 23

【 図 2 4 】

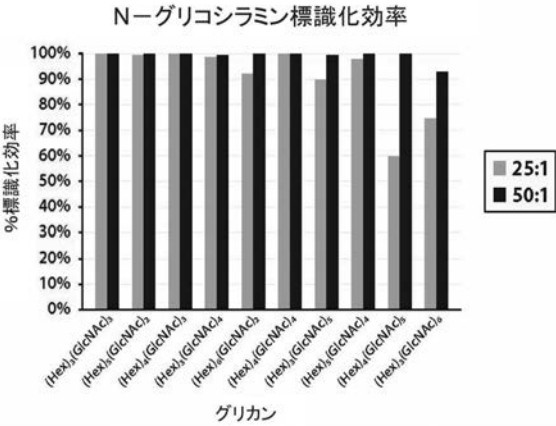


Figure 24

【図 25】

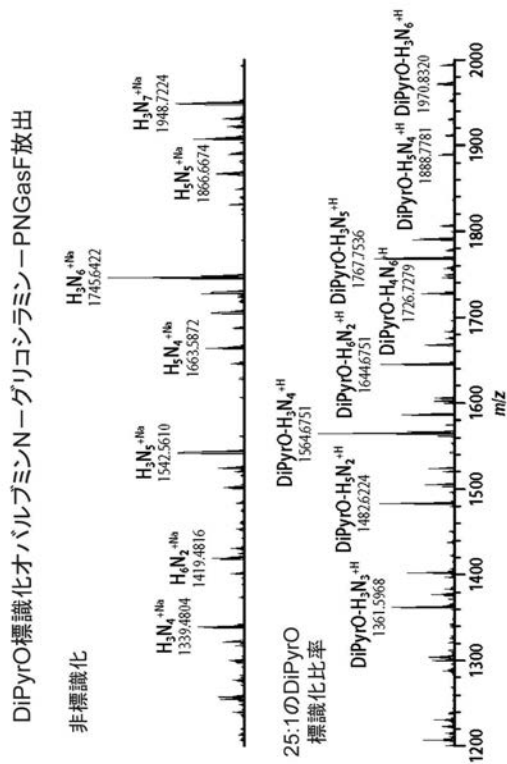
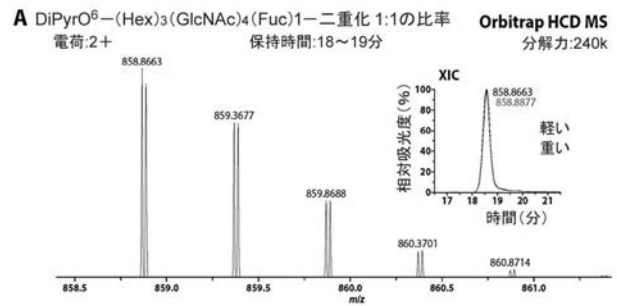


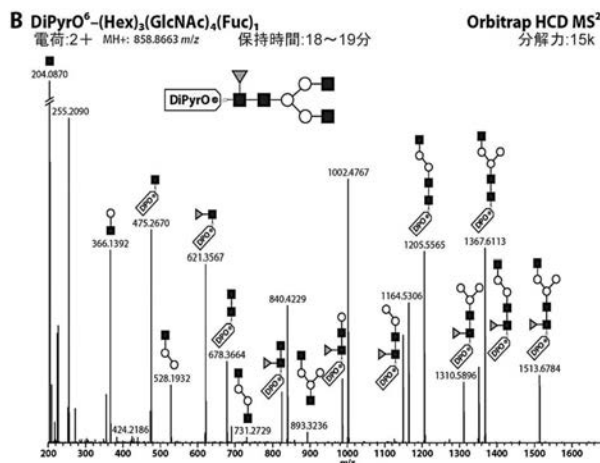
Figure 25

【図 26 A】



Figures 26A

【図 26 B】



Figures 26B

【図 27】

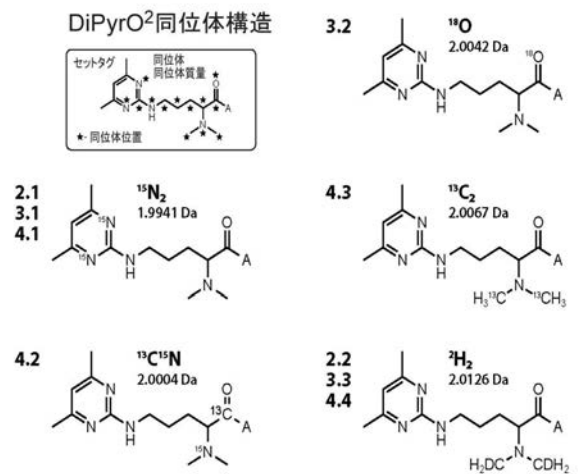


Figure 27

【 図 2 8 】

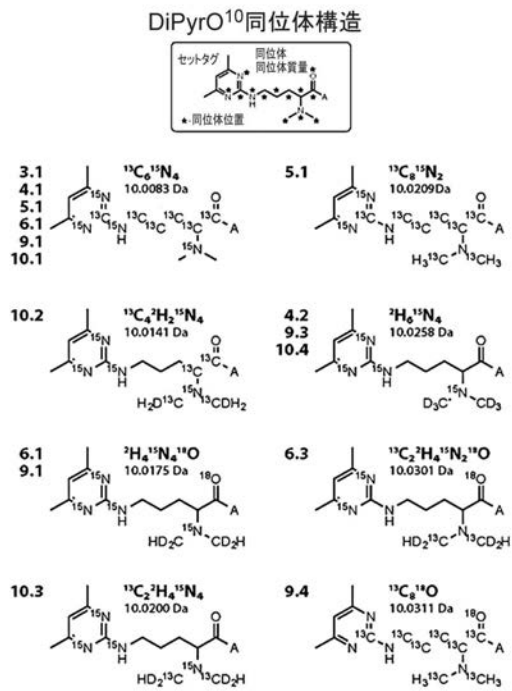


Figure 28

【 図 2 8 - 2 】

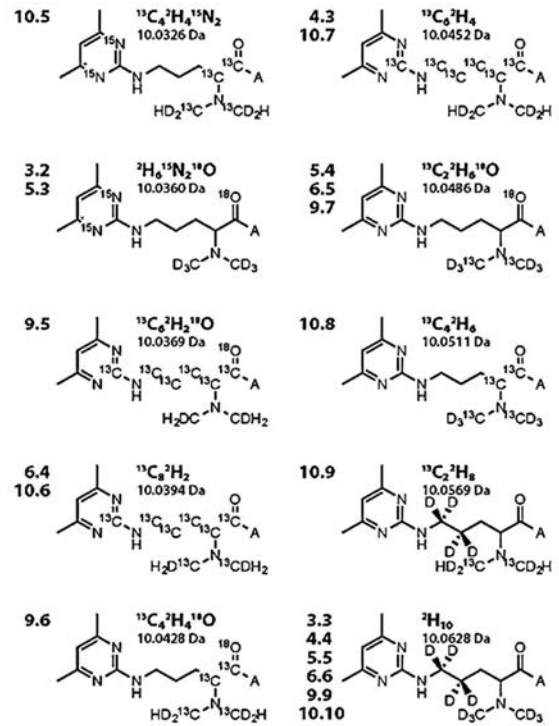


Figure 28 続き

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2016/057156
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07D 239/08; C07D 239/14; G01N 27/62; G01N 33/50; G01N 33/68 (2016.01) CPC - C07D 239/08; C07D 239/14; G01N 27/62; G01N 33/50; G01N 33/68 (2016.11) 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(8) - C07D 239/08; C07D 239/14; G01N 27/62; G01N 33/50; G01N 33/68 (2016.01) CPC - C07D 239/08; C07D 239/14; G01N 27/62; G01N 33/50; G01N 33/68 (2016.11)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 514/256; 514/269; 514/274; IPC(8) - C07D 239/08; C07D 239/14; G01N 27/62; G01N 33/50; G01N 33/68 (2016.01); CPC - C07D 239/08; C07D 239/14; G01N 27/62; G01N 33/50; G01N 33/68 (2016.11) (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, STN, PubChem, Google Patents, Google Scholar, Google Search terms used: 2-aminopyrimidine ornithine mass spectrometry isotopically labeled		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010/0178710 A1 (HAMON et al) 15 July 2010 (15.07.2010) entire document	1-69
A	US 2008/0242838 A1 (PETERS et al) 02 October 2008 (02.10.2008) entire document	1-69
A	US 2006/0172319 A1 (YAN et al) 03 August 2006 (03.08.2006) entire document	1-69
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 November 2016		Date of mailing of the international search report 22 DEC 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

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, DJ, 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, KW, 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

(74)代理人 100148596

弁理士 山口 和弘

(72)発明者 リー, リンジュン

アメリカ合衆国, ウィスコンシン州, マディソン, バッファロー トレイル 5014

(72)発明者 フロスト, ダスティン

アメリカ合衆国, ウィスコンシン州, マディソン, サウス リヴィングストン ストリート
301, ナンバー 213

(72)発明者 ブーフベルガー, アマンダ

アメリカ合衆国, ウィスコンシン州, マディソン, ハイランド アヴェニュー 777

Fターム(参考) 2G041 CA01 FA07 FA10 FA12 FA22 FA23 FA24 FA25 GA05 GA08

GA09

【要約の続き】

及び代謝物質の標識化及び定量化もまた実証される。

【選択図】 図1A