

(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2020-500186

(P2020-500186A)

(43) 公表日 令和2年1月9日 (2020. 1. 9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 K 1/08 (2006. 01)</b>	C 0 7 K 1/08	4 B 0 5 0
<b>C 0 7 D 273/01 (2006. 01)</b>	C 0 7 D 273/01	4 C 0 5 6
<b>A 6 1 K 47/68 (2017. 01)</b>	A 6 1 K 47/68	4 C 0 7 6
<b>A 6 1 K 47/64 (2017. 01)</b>	A 6 1 K 47/64	4 H 0 4 5
<b>C 0 7 K 14/52 (2006. 01)</b>	C 0 7 K 14/52	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-524401 (P2019-524401)	(71) 出願人	507275970
(86) (22) 出願日	平成29年11月13日 (2017. 11. 13)		リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ
(85) 翻訳文提出日	令和1年6月20日 (2019. 6. 20)		ー オブ カリフォルニア
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/061412		アメリカ合衆国 カリフォルニア 946
(87) 国際公開番号	W02018/089951		07-5200, オークランド, フラ
(87) 国際公開日	平成30年5月17日 (2018. 5. 17)		ンクリン ストリート 1111, フィ
(31) 優先権主張番号	62/421, 825		フス フロア
(32) 優先日	平成28年11月14日 (2016. 11. 14)	(74) 代理人	100114188
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 小野 誠
(31) 優先権主張番号	62/583, 517	(74) 代理人	100119253
(32) 優先日	平成29年11月9日 (2017. 11. 9)		弁理士 金山 賢教
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100124855
			弁理士 坪倉 道明
		(74) 代理人	100129713
			弁理士 重森 一輝
		最終頁に続く	

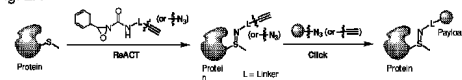
(54) 【発明の名称】 メチオニンの生体共役のためのレドックススペースの試薬

## (57) 【要約】

水性環境中のレドックス反応においてN転移性酸化剤をチオエーテル基質と反応させて共役生成物を形成させることにより、化学選択的な共役がレドックス反応性を通じて達成される。実施形態では、メチオニンベースのタンパク質官能基化のためのレドックス活性化化学的タグ化 (R e A C T) 戦略である。オキサジリジン (Ox) 化合物は、メチオニンに対応するスルフィミド共役生成物に変換することにより、直接的な官能基化のための酸化剤媒介性の試薬として役立つ。

【選択図】 2 A

Fig. 2A



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

化学選択的な共役の方法であって、水性環境中で N 転移性酸化剤をチオエーテル基質と反応させて共役生成物を形成させることを含む、方法。

## 【請求項 2】

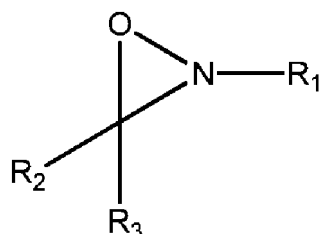
前記 N 転移性酸化剤が反応性オキサジリジン基を含み、且つ、前記共役生成物が、結果として生成したスルフィミドを含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記 N 転移性酸化剤が、式：

## 【化 1】

10



(式中、 $R_1 \sim R_3$  は、ヘテロ原子、及び置換されていてもよい、ヘテロであってもよい、環式であってもよい  $C_1 \sim C_{18}$  のヒドロカルビルから独立して選択され、且つ追加の原子又は部分に共有結合的に又は非共有結合的に連結していてもよい。) を有する、請求項 2 に記載の方法。

20

## 【請求項 4】

$R_1$  が、指し示した N に結合したカルボキシル基又はアミド基を含み、且つ、さらに反応してペイロード分子へのリンカーを形成することができる官能基をさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

$R_1$  が  $-C(O)XR_8$  であり、X が O 又は NH であり、且つ、 $R_8$  が、 $C_2 \sim 6$  のアルキニル、 $C_2 \sim 6$  のアルキニルオキシ、もしくは  $-N_3$  で置換されていてもよい  $C_1 \sim C_6$  のアルキルである、請求項 3 に記載の方法。

30

## 【請求項 6】

$R_2$  が、H、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$  のアルキル、 $C_1 \sim C_6$  のハロアルキル、 $C_1 \sim C_6$  のアルコキシ、又は  $C_1 \sim C_6$  のハロアルコキシであり、且つ、 $R_3$  がフェニル又はヘテロアリールであり、フェニル又はヘテロアリールが、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$  のアルキル、 $C_1 \sim C_6$  のハロアルキル、 $C_1 \sim C_6$  のアルコキシ、及び  $C_1 \sim C_6$  のハロアルコキシからなる群から独立して選択される 1 又は複数の置換基で置換されていてもよい、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 7】

$R_1$  が  $-C(O)XR_8$  であり、X が O 又は NH であり、且つ、 $R_8$  が、 $C_2 \sim 6$  のアルキニル、 $C_2 \sim 6$  のアルキニルオキシ、又は  $-N_3$  で置換されていてもよい  $C_1 \sim C_6$  のアルキルであり、 $R_2$  が H、 $C_1 \sim C_6$  のアルキル、又は  $C_1 \sim C_6$  のハロアルキルであり、且つ、 $R_3$  がフェニルである、請求項 3 に記載の方法。

40

## 【請求項 8】

前記チオエーテル基質がメチオニンである、請求項 1 ～ 7 の 1 つに記載の方法。

## 【請求項 9】

前記メチオニンが、ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質中の残基である、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記タンパク質が、酵素、抗原タンパク質、ケモカイン、サイトカイン、細胞受容体、細胞受容体のリガンド、又は抗体もしくはその活性断片である、請求項 9 に記載の方法。

50

## 【請求項 1 1】

水性環境中でメチオニンを含むペプチド、ポリペプチド又はタンパク質をオキサジリジンと接触させることを含み、前記オキサジリジンが、前記ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質の少なくとも 1 つのメチオニンに対応するスルフィミド共役生成物に変換することにより、前記ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質を直接的に機能化する、請求項 1 0 に記載の方法。

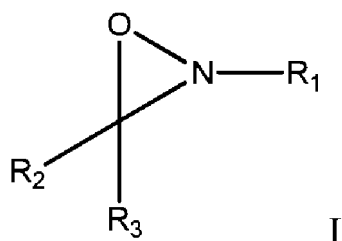
## 【請求項 1 2】

細胞培養中のアミノ酸を用いる安定同位体標識 (S I L A C) 又は同位体コードアフィニティタグ (I C A T) をさらに含む、請求項 1 ~ 1 1 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 1 3】

式 I :

## 【化 2】



10

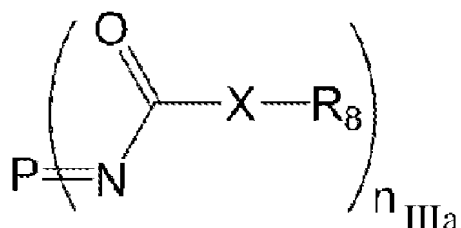
20

(式中、 $R_1$  は  $-C(O)XR_8$  であり、 $X$  は  $O$  又は  $NH$  であり、且つ、 $R_8$  は、 $C_2 \sim 6$  のアルキニル、 $C_2 \sim 6$  のアルキニルオキシ、又は  $-N_3$  で置換された  $C_1 \sim C_6$  のアルキルである。) の化合物。

## 【請求項 1 4】

式 I I I a :

## 【化 3】



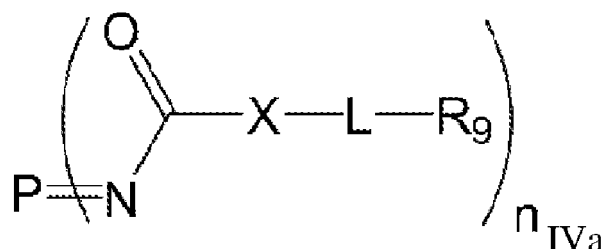
30

(式中、 $P$  は、メチオニンの硫黄とのスルフィミド結合を介して指し示した窒素に連結されたポリペプチド又はタンパク質を表し、前記ポリペプチド又はタンパク質は、 $n$  個のスルフィミド修飾されたメチオニン残基を有し、 $n$  は  $1 \sim 20$  であり、且つ、 $X$  は  $O$  又は  $NH$  であり、且つ、 $R_8$  は、 $C_2 \sim 6$  のアルキニル、 $C_2 \sim 6$  のアルキニルオキシ、又は  $-N_3$  で置換されていてもよい  $C_1 \sim C_6$  のアルキルである。) の化合物。

## 【請求項 1 5】

式 I V a :

## 【化 4】



40

(式中、 $P$  は、メチオニンの硫黄とのスルフィミド結合を介して指し示した窒素に連結

50

されたポリペプチド又はタンパク質を表し、前記ポリペプチド又はタンパク質は、 $n$ 個のスルフィミド修飾されたメチオニン残基を有し、 $n$ は1～20であり、 $X$ はO又はNHであり、 $L$ はリンカー部分であり、且つ、 $R_9$ は活性部分である。)のペプチド、ポリペプチド又はタンパク質コンジュゲート。

#### 【請求項16】

前記活性部分が、小分子製剤、DNA、RNA、脂質、糖、ポリペプチド、タンパク質、検出可能な標識、ポリ(アルキレン酸化物)部分、スルフヒドリル特異的機能性部分、アミン特異的機能性部分、非選択的反応性部分、又はアルギニン特異的機能性部分である、請求項15に記載のペプチド、ポリペプチド又はタンパク質コンジュゲート。

#### 【請求項17】

$P$ が、酵素、抗原タンパク質、ケモカイン、サイトカイン、細胞受容体、細胞受容体のリガンド、又は抗体もしくはその活性断片である、請求項15又は16に記載のペプチド、ポリペプチド又はタンパク質コンジュゲート。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

発明者：Shi Xian Lin、Xiao Yu Yang、F. Dean Toste、Christopher J. Chang、全員カリフォルニア州バークレー

出願人/譲受人：カリフォルニア大学理事会

優先権：米国特許出願第62/421,825号；出願日：2016年11月14日

米国特許出願第62/583,517号；出願日2017年11月9日

本発明は、米国国立衛生研究所により授与された助成金番号GM118190及びGM079465の下で政府の支援により為された。政府は本発明においてある特定の権利を有する。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

##### 序論

硫黄は、その汎用的且つ独特の化学により、生物学において特権的な位置を占める<sup>1</sup>、<sup>2</sup>。実際、システイン及びメチオニンは、タンパク質を構成するただ2つの硫黄含有アミノ酸であるが、硫黄は、金属結合への触媒作用からレドックス調節及び他の翻訳後修飾に及ぶ多様な不可欠な役割を中心的に果たす<sup>3-10</sup>。この文脈において、システイン修飾に基づく選択的なタンパク質共役法は、タンパク質機能のプロープ<sup>9</sup>、<sup>14-18</sup>から共有結合性小分子阻害剤<sup>19-21</sup>及び抗体-薬物コンジュゲート<sup>22</sup>の合成、そして機能的システインの同定<sup>15</sup>、<sup>23</sup>、<sup>24</sup>及び阻害剤の開発<sup>25</sup>のための活性及び反応性ベースのタンパク質プロファイリングまで、広範な基礎的及び応答上の進歩を可能とした<sup>11-13</sup>。システイン生体共役戦略は、典型的に、チオール/チオレート側鎖の本来的に高い求核性を活用し、該戦略としては、マレイミド並びにハロゲン化アルキル及びアリアルなどの求電子性弾頭に基づくエレガントな方法<sup>26-30</sup>、遷移金属媒介性の生体共役<sup>31</sup>及びシステイン・デヒドロアラニン変換<sup>28</sup>、<sup>29</sup>、<sup>32</sup>、<sup>33</sup>が挙げられる。

#### 【0003】

システイン生体共役に関してかなりの量の文献があることとは対照的に、メチオニン標識化のための同様の方法は、その探求について多数の切実な動機付けがあるにもかかわらず、開発が概して充分でない。実際、メチオニンは最も疎水性且つ希少なアミノ酸に含まれ、メチオニン残基の大部分はタンパク質コアの内部に埋もれているという事実<sup>1</sup>、<sup>2</sup>と一緒にあって、表面で接近可能なメチオニンは限られており、そのようなメチオニンは、天然に存在するアミノ酸側鎖を使用して部位選択的なタンパク質修飾をするための潜在的に貴重なハンドルを与える。加えて、酸化及び/又は金属結合によるものなどのメチオニンの翻訳後修飾<sup>3</sup>、<sup>34</sup>、<sup>35</sup>は、細胞及び生物レベルで機能を制御する、シグナル伝達経路における不可欠な中枢として出現してきている。例えば、アクチン内の特定のメチオニン残基の可逆的酸化は、その組立て及び分解を制御して、ナビゲーションシグナルとし

10

20

30

40

50

て役立つことができ<sup>3 6 ~ 3 8</sup>、またメチオニンスルホキシドレダクターゼの酸化防止機能は、寿命の調節に関連付けられている<sup>3 9</sup>。加えて、メチオニンの酸化はまた、タンパク質内の芳香族残基との結合相互作用を増加させることもできることが最近の研究により示唆されている<sup>4 0</sup>。

#### 【0004】

選択的なメチオニン修飾反応の開発における大きな化学的課題はその比較的弱い求核性であり、それが、システイン、リジン、チロシン、又はセリンなどのより強い求核性を持つ競合的なアミノ酸の存在下でその酸 - 塩基生体共役のための適切なメチオニン特異的求電子性パートナーを同定する伝統的なアプローチを不可能にしている<sup>2 8</sup>、<sup>4 1</sup>、<sup>4 2</sup>。

#### 【発明の概要】

10

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0005】

チオエーテル基質への化学選択的なレドックス共役のための方法及び組成物、並びに共役された基質を含む化合物及び組成物を提供することが本発明の目的である。本発明の方法をレドックス活性化化学的タグ化 (Redox Activated Chemical Tagging; ReACT) と称する。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0006】

第1の態様では、本発明は、1又は複数のチオエーテル部分を含む標的分子への化学選択的共役のための方法を提供する。これらの方法は、水性環境中のレドックス反応においてN転移性酸化剤をチオエーテル基質と反応させて共役生成物を形成させることを含む。

20

#### 【0007】

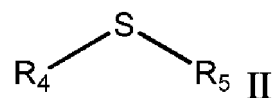
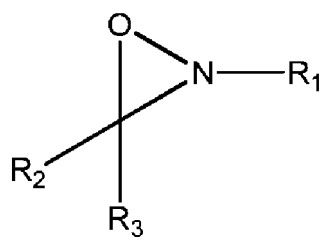
ある特定の実施形態では、N転移性酸化剤は、標的分子上の1又は複数のチオエーテル部分の少なくとも1つと反応する反応性オキサジリジン基を含み、且つ、共役生成物は、標的分子上の結果として生じたスルフィミドを含む。

#### 【0008】

一部の実施形態では、N転移性酸化剤は、水性環境中で標的分子上のチオエーテル部分と反応する。好適なN転移性酸化剤は、N - ハロゲン化物結合、N - O結合、又はN - S結合を含み、好ましくは、オキサジリジン基を含む。好適な基質はチオエーテルを含む。好ましい実施形態では、酸化剤及びチオエーテルは、式I及び式II：

30

#### 【化1】



#### 【0009】

40

(式中、 $R_1 \sim R_5$  は、ヘテロ原子、及び置換されていてもよい、ヘテロであってもよい、環式であってもよいC1～C18のヒドロカルビルから独立して選択され、且つ追加の原子又は部分に共有結合的に又は非共有結合的に連結していてもよい。)により表される。一部の実施形態では、 $R_1$  は、指し示したNに結合したカルボキシル基又はアミド基を含み、且つ官能基(例えば、クリック反応において反応できる官能基、例えば、以下に限定されないが、アジド基又はアルキン基)をさらに含み、該官能基は、さらに反応して、対応する官能基を含むペイロード分子(例えば、クリック反応において反応できる官能基、例えば、以下に限定されないが、アジド基又はアルキン基を含むように修飾されたペイロード分子)へのリンカーを形成することができる。一部の実施形態では、 $R_1$  は - C (O) X  $R_8$  であり、XはO又はNHであり、且つ、 $R_8$  は、C2～6のアルキニル、C2

50

$\sim C_6$  のアルキニルオキシ、又は  $-N_3$  で置換されていてもよい  $C_1 \sim C_6$  のアルキルである。一部の実施形態では、 $R_2$  は、H、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$  のアルキル、 $C_1 \sim C_6$  のハロアルキル、 $C_1 \sim C_6$  のアルコキシ、又は  $C_1 \sim C_6$  のハロアルコキシであり、且つ、 $R_3$  はフェニル又はヘテロアリールであり、フェニル又はヘテロアリールは、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$  のアルキル、 $C_1 \sim C_6$  のハロアルキル、 $C_1 \sim C_6$  のアルコキシ、及び  $C_1 \sim C_6$  のハロアルコキシからなる群から独立して選択される 1 又は複数（例えば、1 個、2 個、3 個、4 個又は 5 個、好ましくは、1 個、2 個又は 3 個）の置換基で置換されていてもよい。一部の実施形態では、式 I の化合物について、 $R_1$  は  $-C(O)XR_8$  であり、X は O 又は NH であり、且つ、 $R_8$  は、 $C_2 \sim C_6$  のアルキニル、 $C_2 \sim C_6$  のアルキニルオキシ、又は  $-N_3$  で置換されていてもよい  $C_1 \sim C_6$  のアルキルであり、 $R_2$  は、H、 $C_1 \sim C_6$  のアルキル、又は  $C_1 \sim C_6$  のハロアルキルであり、且つ、 $R_3$  はフェニルである。式 II の化合物の一部の実施形態では、 $R_4$  は  $C_1 \sim C_6$  のアルキルであり、且つ、 $R_5$  は置換された  $C_1 \sim C_6$  のアルキルであり、それにより、 $R_4-S-R_5$  は、タンパク質又はポリペプチドのアミノ酸残基であり、好ましくは、 $R_4-S-R_5$  は、タンパク質又はポリペプチドのメチオニン残基である。一部の実施形態では、 $R_4-S-R_5$  は、タンパク質又はポリペプチド標的分子のメチオニンチオエーテルを表す。そのようなタンパク質又はポリペプチドとしては、抗体又は抗体断片などの、治療用タンパク質又はポリペプチドが挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、タンパク質又はポリペプチドは、式 I の化合物との反応においてこれも N 転移性酸化剤と反応し得る 1 又は複数の追加のメチオニン残基を含む。一部の実施形態では、式 II の化合物は、1 又は複数のメチオニン残基を有するタンパク質又はポリペプチドであり、メチオニン残基の 1 又は複数は、N 転移性酸化剤と反応する。一部の実施形態では、 $R_4$  はメチルであり、且つ、 $R_5$  は  $-CH_2CH_2CH(NHR_6)C(O)R_7$  であり、 $R_6$  は  $-H$  であり、又は  $NHR_6$  はペプチド結合を形成し、且つ、 $R_7$  は  $-OH$  であり、又は  $C(O)R_7$  はペプチド結合を形成し、但し、 $NHR_6$  及び  $C(O)R_7$  の少なくとも 1 つは、ペプチド結合を形成する。

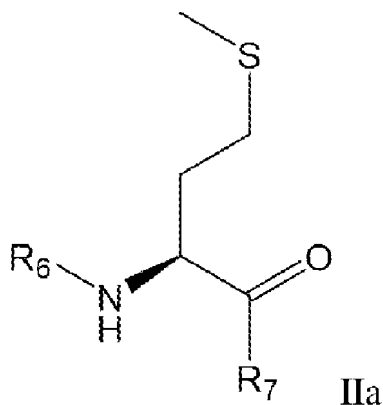
10

20

## 【0010】

一部の実施形態では、式 II の化合物は、式 II a :

## 【化 2】



30

40

## 【0011】

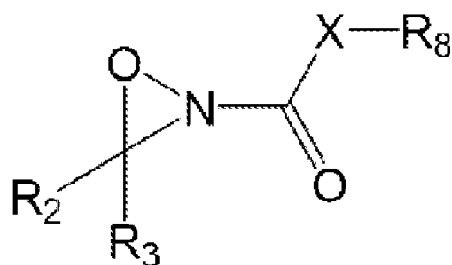
(式中、 $NH-R_6$  及び  $C(O)-R_7$  は、タンパク質又はペプチド内のペプチド結合であり、又は、 $R_6$  は  $-H$  であり、且つ、 $C(O)-R_7$  は、タンパク質又はペプチド内のペプチド結合であり、又は、 $R_7$  は  $-OH$  であり、且つ、 $NHR_6$  は、タンパク質又はペプチド内のペプチド結合である。) の化合物である。

## 【0012】

別の態様では、 $R_1$  が官能基を含み、前記官能基がさらに反応して、活性部分などのペイロード分子へのリンカーを形成できる式 I の化合物が提供される。一部の実施形態では、 $R_1$  は  $-C(O)XR_8$  であり、X は O 又は NH であり、且つ、 $R_8$  は、 $C_2 \sim 6$  のアルキニル、 $C_2 \sim 6$  のアルキニルオキシ、又は  $-N_3$  で置換されていてもよい  $C_1 \sim C_6$

50

のアルキルであり、 $R_2$  は、H、ハロゲン、C 1 ~ C 6 のアルキル、C 1 ~ C 6 のハロアルキル、C 1 ~ C 6 のアルコキシ、又はC 1 ~ C 6 のハロアルコキシであり、且つ、 $R_3$  はフェニル又はヘテロアリールであり、フェニル又はヘテロアリールは、ハロゲン、C 1 ~ C 6 のアルキル、C 1 ~ C 6 のハロアルキル、C 1 ~ C 6 のアルコキシ、及びC 1 ~ C 6 のハロアルコキシからなる群から独立して選択される1又は複数（例えば、1個、2個、3個、4個又は5個、好ましくは、1個、2個又は3個）の置換基で置換されていてもよい。好ましい実施形態では、 $R_2$  はHであり、且つ、 $R_3$  はフェニルである。一部の実施形態では、式 I の化合物は、式 I a :



Ia

10

【 0 0 1 3 】

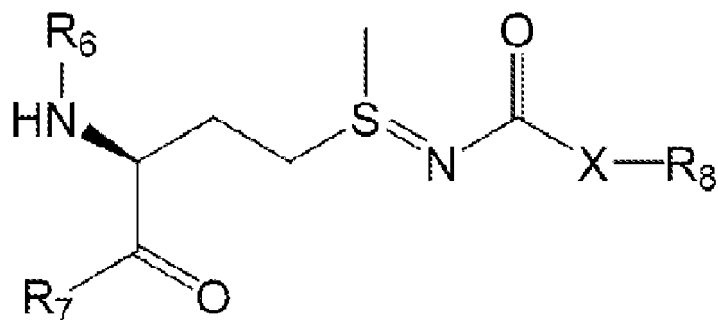
（式中、X、 $R_2$ 、 $R_3$  及び  $R_8$  は、式 I の化合物について定義される通りである。）の化合物である。一部の実施形態では、X はNHである。

20

【 0 0 1 4 】

別の態様では、式 I I I :

【 化 4 】



III

30

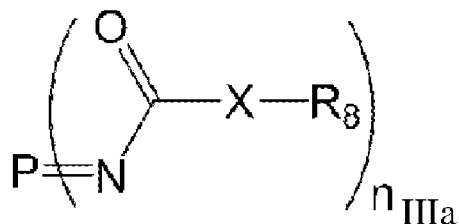
【 0 0 1 5 】

（式中、 $R_6$  及び  $R_7$  は、式 I I の化合物について定義される通りであり、且つ、X 及び  $R_8$  は、式 I の化合物について定義される通りである。）の化合物が提供される。一部の実施形態では、X はNHである。

【 0 0 1 6 】

一部の実施形態では、式 I I I の化合物は、式 I I I a :

【 化 5 】



40

【 0 0 1 7 】

（式中、P は、メチオニンの硫黄とのスルフィミド結合を介して指し示した窒素に連結されたポリペプチド又はタンパク質を表し、ポリペプチド又はタンパク質は、n 個のスル

50

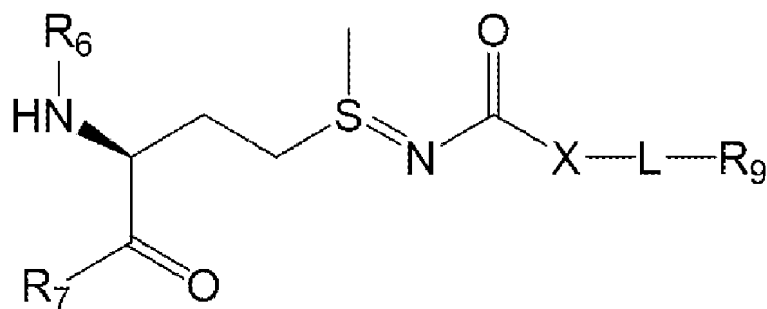
フィミド修飾されたメチオニン残基を有し、 $n$ は、1又は複数、例えば、1～20、1～15、1～10、1～5、1、2、3、4又は5であり、且つ、 $X$ 及び $R_8$ は、式Ⅰの化合物について定義される通りである。)の化合物である。一部の実施形態では、 $X$ はNHである。

【0018】

別の態様では、標的分子コンジュゲートが提供され、標的分子コンジュゲートは、リンカーに結合した少なくとも1つのスルフィミド修飾されたメチオニン残基を含む標的分子を含み、前記リンカーは、ペイロード分子に結合している。一部の実施形態では、ペイロード分子は活性部分である。一部の実施形態では、標的分子はタンパク質又はポリペプチドであり、且つ、コンジュゲートは、式ⅠⅤ：

10

【化6】



IV

20

【0019】

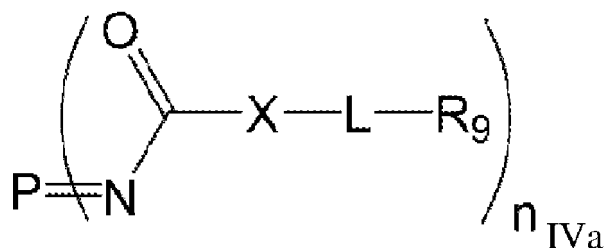
(式中、 $R_6$ 及び $R_7$ は式ⅠⅠにおいて定義される通りであり、 $X$ はO又はNHであり、 $L$ はリンカー部分であり、且つ、 $R_9$ はペイロード分子である。)のタンパク質又はポリペプチドコンジュゲートである。一部の実施形態では、ペイロード分子は活性部分である。一部の実施形態では、 $X$ はNHである。一部の実施形態では、 $L$ は、式ⅠⅠⅠの化合物(式ⅠⅠⅠaの化合物など)及び好適に修飾されたペイロード分子のクリック反応の結果として生じるリンカーである。好適に修飾されたペイロード分子は、クリック反応において反応性の置換基を含有し、例えば、以下に限定されないが、アジド基又はアルキン基を含むように修飾されたペイロード分子である(例えば、図3を参照)。

30

【0020】

一部の実施形態では、式ⅠⅤの化合物は、式ⅠⅤa：

【化7】

n<sub>IVa</sub>

40

【0021】

(式中、 $P$ は、メチオニンの硫黄とのスルフィミド結合を介して指し示した窒素に連結されたポリペプチド又はタンパク質を表し、ポリペプチド又はタンパク質は、 $n$ 個のスルフィミド修飾されたメチオニン残基を有し、 $n$ は、1又は複数、例えば、1～20、1～15、1～10、1～5、1、2、3、4又は5であり、 $X$ はO又はNHであり、且つ、 $L$ 及び $R_9$ は、式ⅠⅤの化合物について定義される通りである。)の化合物である。一部の実施形態では、 $X$ はNHである。一部の実施形態では、 $L$ は、式ⅠⅠⅠの化合物(式ⅠⅠⅠaの化合物など)及び好適に修飾されたペイロード分子のクリック反応の結果として生じるリンカーである。一部の実施形態では、 $L$ は、トリアゾール又はイソオキサゾール

50

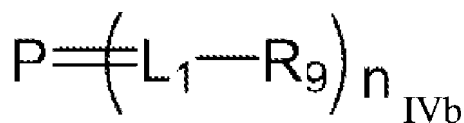


環連結基を含む。

【0022】

一部の実施形態では、式IVの化合物は、式IVb：

【化8】



【0023】

(式中、Pは、 $P = L_1$ がPのメチオニン残基とリンカー $L_1$ との間のスルフィミド結合となるように修飾されたポリペプチド又はタンパク質を表し、ポリペプチド又はタンパク質は、n個のスルフィミド修飾されたメチオニン残基を有し、nは、1又は複数、例えば、1~20、1~15、1~10、1~5、1、2、3、4又は5であり、且つ、各 $L_1$ は、P内のメチオニンの硫黄へのスルフィミド結合における=N-を含むリンカー部分であり、且つ、 $R_9$ は、式IVの化合物について定義される通りである。)の化合物である。一部の実施形態では、 $L_1$ は、トリアゾール又はイソオキサゾール環連結基を含む。一部の実施形態では、Pは、ポリペプチド又はタンパク質、例えば、酵素、抗原タンパク質、ケモカイン、サイトカイン、細胞受容体、細胞受容体のリガンド、又は抗体もしくははその活性断片である。一部の実施形態では、抗体又はその活性断片は、1又は複数の接近可能なメチオニン残基を導入することによる野生型抗体の修飾を含む。

10

20

【0024】

別の態様では、本発明は、メチオニンベースの基質の官能基化のためのレドックス活性化化学的タグ化(ReACT)法を提供し、該方法は、水性環境中でメチオニンを含有する基質をオキサジリジンと接触させることを含み、オキサジリジンは、基質のメチオニンに対応するスルフィミド共役生成物に変換することにより、基質を直接的に官能基化する。一部の実施形態では、本発明は、式Iの化合物(式Iaの化合物など)を式IIの化合物(式IIaの化合物など)と反応させて式IIIの化合物(式IIIaの化合物など)を形成させることを提供する。一部の実施形態では、本発明は、抗体又はその活性断片などのタンパク質を式Iの化合物(式Iaの化合物など)と反応させて式IIIの化合物(式IIIaの化合物など)を提供させることを提供する。一部の実施形態では、本発明は、式IIIの化合物(式IIIaの化合物など)を反応させて式IVの化合物(式IVa又は式IVbの化合物など)を形成させることをさらに提供する。一部の実施形態では、本発明は、式IIIaの化合物を反応させて式IVa又は式IVbの化合物の化合物を形成させることをさらに提供し、好ましくは、Pは抗体又はその活性断片である。

30

40

【0025】

一部の実施形態では、基質はタンパク質であり、且つ、方法は、タンパク質の修飾を結果としてもたらし、抗体-薬物コンジュゲート並びに関連する生物学的治療剤及びイメージング剤の合成及び特徴付け、ケモプロテオミクス及び阻害剤の設計の他に、タンパク質機能、例えば、溶解性、安定性、及び代謝並びに薬物動態を研究し且つ改良するための修飾において応用を有する。

【0026】

主題とする方法及びReACT法は、*in vivo*及び質量分析による*in vitro*でのメチオニン機能の定量的プロテオミクス解析のために、細胞培養中のアミノ酸を用いる安定同位体標識(SILAC)又は同位体コードアフィニティータグ(ICAT)と組み合わせることができ、その応用としては、メチオニン反応性の定量的解析、酸化感受性メチオニンの定量的解析、ストレス感受性メチオニンの定量的解析及びメチオニンスルホキシドレダクターゼ基質の定量的解析が挙げられるがこれらに限定されない。別の態様では、本発明は、レドックス活性化化学的タグ化(ReACT)法において使用するために適した化合物を提供する。一部の実施形態では、本発明は、式Iの化合物(式Iaの

50

化合物など)、式 I I の化合物(式 I I a の化合物など)、又は式 I I I の化合物(式 I I i a の化合物など)を提供する。

【0027】

別の態様では、本発明は、式 I V の構造(式 I V a 又は式 I V b の構造など)を有するポリペプチド又はタンパク質コンジュゲートを提供し、P は、ポリペプチド又はタンパク質、例えば、酵素、抗原タンパク質、ケモカイン、サイトカイン、細胞受容体、又は抗体もしくはその活性断片である。

【0028】

本発明は、本明細書に記載される特定の実施形態の全ての組合せを、各組合せが逐一記載されたかのように包含する。

10

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1A】化学選択的なメチオニンの生体共役のための R e A C T 戦略。左パネル：システインベースのタンパク質官能基化のための酸-塩基共役戦略；右パネル：メチオニンベースのタンパク質官能基化のためのレドックス活性化化学的タグ化(R e A C T)戦略。

【図1B】化学選択的なメチオニンの生体共役のための R e A C T 戦略。共溶媒中での N - アセチル - L - メチオニンメチルエステル(S 1)及び基質としての様々なオキサジリジン化合物によるモデルレドックス共役反応。

【図1C】化学選択的なメチオニンの生体共役のための R e A C T 戦略。M e t、L y s 及び C y s での独特のレドックス共役保有ペプチドの数。

20

【図1D】化学選択的なメチオニンの生体共役のための R e A C T 戦略。共役反応の収率。

【図2A】タンパク質官能基化のための R e A C T 戦略。R e A C T とクリック反応との組合せのメチオニン特異的タンパク質官能基化のための一般的な2ステップ手順。

【図2B】タンパク質官能基化のための R e A C T 戦略。様々なオキサジリジン(O x)化合物との C a M モデルタンパク質のレドックス共役。

【図3】クリック反応を使用する様々なペイロードとの R e A C T 標識カルモジュリンタンパク質の官能基化。クリック化学を使用する共役のために好適な反応性基を含むデスチオビオチン、C y 3 及び P E G ペイロード。

【発明を実施するための形態】

30

【0030】

反対に指し示すか又は別段の注記がなければ、これらの説明において及び本明細書を通じて、「a」及び「an」という用語は1又は複数を意味し、「又は」という用語は及び/又はを意味し、ポリヌクレオチド配列は反対鎖の他に本明細書に記載される代替的な骨格を包含するものと理解される。

【0031】

本明細書に記載される例及び実施形態は例示のみを目的とすること、及びそれを考慮して様々な改良又は変更が当業者に示唆され、且つ本出願の精神及び範囲並びに添付の特許請求の範囲内に包含される。本明細書中の参照文献などの、本明細書において参照される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、参照することによりその全体が全ての目的のために本明細書に組み込まれる。

40

【0032】

メチオニン選択的ライゲーション反応は、その本来的に弱い求核性により依然として理解されていない。本明細書において我々は、広範な生体適合性の反応条件下で高度に選択的な、迅速な、及びロバストなメチオニン標識化を達成するための、オキサジリジンベースの試薬を使用する、レドックス反応性を通じた化学選択的なメチオニンの生体共役のための戦略を開示する。治療的抗体などのタンパク質へのペイロードの精密な付加、抗体-薬物コンジュゲートの合成、及び全プロテオームにおける反応性亢進のメチオニン残基の同定を可能とするこの共役方法の広範な有用性を我々は強調する。

【0033】

50

本発明は、以下のものなどの多くの商業的応用を提供する：

1．メチオニンの生体共役に基づく治療用タンパク質の官能基化、例えば、治療用タンパク質のPEG化、抗体-薬物コンジュゲート、イメージング及び診断のためのタンパク質標識化の他に、他のタンパク質翻訳後修飾。

【0034】

2．メチオニンの生体共役に基づく治療用ポリペプチドの官能基化、例えば、ポリペプチドのPEG化、ポリペプチド-薬物コンジュゲート及び他のポリペプチド翻訳後修飾。

【0035】

3．タンパク質機能の活性化及び/又は阻害のためのメチオニンの生体共役に基づく治療的介入。

【0036】

4．オキサジリジン化合物を使用するチオエーテル生体共役に基づく生体分子の官能基化、例えば、DNA、RNA、脂質及び糖の生体共役。

【0037】

本発明は、システイン、リジン、及びセリンなどのより求核性のアミノ酸の修飾のための酸-塩基共役法の利益を補完する化学選択的メチオニン共役の独特且つ一般的なレドックススペースのアプローチを提供する。本発明の3つの主な有用性の趣旨を以下の通りに列挙する：

1．本発明の1つの有用性は、天然の又は化学修飾もしくは標準的な部位特異的変異生成により容易に導入される天然に存在するメチオニン残基を使用する、タンパク質及びポリペプチド、例えば、抗体及びそれらの断片の他に、他の治療用タンパク質の官能基化を提供することである。この手順は単純且つ直接的であり、全てのタンパク質又はポリペプチドに応用することができ、それにより例えば、ポリ(アルキル酸化物)(例えば、「PEG」)部分、フルオロフォア及び他のペイロードもしくはトレーサーを取り付けるため、又は2つのポリペプチドを共役させて一緒にする(例えば、抗体/タンパク質コンジュゲート)ために使用できる化学的ハンドルを提供することができる。

【0038】

2．より概括的に言えば、本発明は、チオエーテル官能基の導入による、他の生体分子、例えば、以下に限定されないが、DNA、RNA、脂質及び糖への、上記したような様々なペイロードの取付けを提供する。この方法は、単純且つ直接的な手順で任意のチオエーテル含有生体分子の官能基化を可能とする。

【0039】

3．最後に、N転移性酸化剤としてのオキサジリジンの選択性は、全プロテオームにおける機能的メチオニン、及び鍵となる残基としてメチオニンを使用して機能タンパク質を同定し且つ研究するための化学的プラットフォームを与え、反応性メチオニンの活性化及び/又は阻害に基づく治療的介入のための手段を提供する。

【0040】

本発明は、システイン、リジン及びチロシンなどの他の天然に存在するアミノ酸に基づく生体共役方法と比較していくつもの利益を提供することができる。

【0041】

1．本発明は、タンパク質を標識するために求電子剤を使用することなくレドックススペースの反応性を使用して広範な生体適合性の反応条件下で実行可能な高度に選択的な、迅速な、及びロバスタなメチオニン標識化の方法論を提供し、したがって選択性の問題、及びタンパク質薬物における標識化の非一貫性を回避する。

【0042】

2．高度に類似の配列相同性を示す抗体の相補性決定領域(CDR)などの、表面で接近可能な形態のメチオニンの相対的な希少性は、本発明の方法論を使用した時に、一連の治療用タンパク質のバックグラウンドのタンパク質官能基化を大きく低減させる。

【0043】

3．本発明は、よく定義された位置での、及びオキサジリジン基のチオエーテルとの極

10

20

30

40

50

めて高い反応性により優れたペイロード - 標的分子の共役効率での、タンパク質への様々なペイロードの取付けを可能とすることができる。ある特定の実施形態では、本発明のタンパク質官能基化は、中性 pH 及び生体適合性の条件下で 20 分以内に完了することができる。我々の方法の反応速度は、伝統的なタンパク質修飾方法よりもはるかに速い。これは、著しく単純化されたタンパク質官能基化手順を提供する。

#### 【0044】

4. オキサジリジン共役化学の選択性は、全プロテオームにおける機能的メチオニンの同定及び研究のためのプラットフォームの他に、反応性メチオニンの活性化及び / 又は阻害に基づく治療的介入の出発点を提供する。本発明は、新たな薬物設計及び創薬のための新規のタンパク質薬物設計方法を提供する。

10

#### 【0045】

5. 本明細書に記載される生体共役連結は、100%のFBSの存在下で少なくとも14日間安定であり、in vivoの応用のために有益である。タンパク質官能基化は細胞外環境においても安定である。より重要なことに、細胞内などにおいて見られる強いチオール還元条件下で、連結を切断して、取り付けた活性部分（例えば、治療剤）を細胞内に放出させることができる。

#### 【0046】

本発明はまた、非天然のアミノ酸ベースの生体共役方法に対する大きな利点を提供し得る。本方法は、そのような非天然のアミノ酸を通じてタンパク質中に非天然の機能を持つように操作することなく、指向したメチオニン残基において目的のタンパク質の直接的な官能基化を可能とする。

20

#### 【0047】

##### 化学

ヒドロカルビル基は、1 ~ 15 個の炭素原子を含み、その炭素骨格中に1又は複数のヘテロ原子を含んでもよい、置換又は非置換の、直鎖の、分岐した又は環状のアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アシル基、アリール基、アリールアルキル基、アリールアルケニル基、アリールアルキニル基、アルキルアリール基、アルケニルアリール基又はアルキニルアリール基である。

#### 【0048】

本明細書で使用される「ヘテロ原子」という用語は、一般に、炭素又は水素以外の任意の原子を意味する。好ましいヘテロ原子としては、酸素（O）、リン（P）、硫黄（S）、窒素（N）、及びハロゲンが挙げられ、好ましいヘテロ原子の官能基は、ハロホルミル、ヒドロキシル、アルデヒド、アミン、アゾ、カルボキシル、シアニル、トシアニル、カルボニル、ハロ、ヒドロペルオキシル、イミン、アルジミン、イソシアニド、イソシアネート、ニトレート、ニトリル、ニトライト、ニトロ、ニトロソ、ホスフェート、ホスホノ、スルフィド、スルホニル、スルホ、及びスルフヒドリルである。

30

#### 【0049】

「アルキル」という用語は、それ自体で又は別の置換基の一部として、別段の言及がなければ、指定された数の炭素原子（すなわち、C<sub>1-8</sub>は1 ~ 8 個の炭素を意味する）を有する、完全に飽和した、直鎖、分岐鎖、もしくは環状の炭化水素ラジカル、又はこれらの組合せを意味する。アルキル基の例としては、メチル、エチル、n - プロピル、イソプロピル、n - ブチル、t - ブチル、イソブチル、sec - ブチル、シクロヘキシル、（シクロヘキシル）メチル、シクロプロピルメチル、例えば、n - ペンチル、n - ヘキシル、n - ヘプチル、n - オクチルなどのホモログ及び異性体が挙げられる。

40

#### 【0050】

「アルケニル」という用語は、それ自体で又は別の置換基の一部として、指定された数の炭素原子（すなわち、C<sub>2-8</sub>は2 ~ 8 個の炭素を意味する）及び1又は複数の二重結合を有する、一又はポリ不飽和であってもよい、直鎖、分岐鎖、もしくは環状の炭化水素ラジカル、又はこれらの組合せを意味する。アルケニル基の例としては、ビニル、2 - プロペニル、クロチル、2 - イソペンテニル、2 - （ブタジエニル）、2, 4 - ペンタジエ

50

ニル、3 - ( 1 , 4 - ペンタジエニル ) 並びにこれらのより高級のホモログ及び異性体が挙げられる。

#### 【 0 0 5 1 】

「アルキニル」という用語は、それ自体で又は別の置換基の一部として、指定された数の炭素原子（すなわち、 $C_2 \sim 8$  は 2 ～ 8 個の炭素を意味する）及び 1 又は複数の三重結合を有する、一又はポリ不飽和であってもよい、直鎖もしくは分岐鎖の炭化水素ラジカル、又はこれらの組合せを意味する。アルキニル基の例としては、エチニル、1 - 及び 3 - プロピニル、3 - ブチニル並びにこれらのより高級のホモログ及び異性体が挙げられる。

#### 【 0 0 5 2 】

「アルキレン」という用語は、それ自体で又は別の置換基の一部として、 $-CH_2 - CH_2 - CH_2 -$  に例示されるような、アルキルに由来する二価のラジカルを意味する。典型的に、アルキル（又はアルキレン）基は、1 ～ 24 個の炭素原子を有し、10 又はそれより少ない炭素原子を有する基が本発明において好ましい。「低級アルキル」又は「低級アルキレン」は、より短鎖のアルキル基又はアルキレン基であり、一般に、8 又はそれより少ない炭素原子を有する。

10

#### 【 0 0 5 3 】

「アルコキシ」、「アルキルアミノ」及び「アルキルチオ」（又はチオアルキル）という用語は、それらの慣用の意味で使用され、それぞれ酸素原子、アミノ基、又は硫黄原子を介して分子の残りの部分に結合したアルキル基を指す。同様に、例えば、「ハロアルコキシ」は、酸素原子を介して分子の残りの部分に結合したハロアルキル基を指す。

20

#### 【 0 0 5 4 】

「ヘテロアルキル」という用語は、それ自体で又は別の用語と組み合わせて、別段の言及がなければ、記載した数の炭素原子並びに O、N、P、Si 及び S からなる群から選択される 1 ～ 3 個のヘテロ原子からなる、安定な直鎖、分岐鎖、もしくは環状の炭化水素ラジカル、又はこれらの組合せを意味し、窒素原子、硫黄原子、及びリン原子は酸化されていてもよく、窒素ヘテロ原子は四級化されていてもよい。（1 又は複数の）ヘテロ原子 O、N、P 及び S は、ヘテロアルキル基の任意の内部位置にあってよい。ヘテロ原子 Si は、アルキル基が分子の残りの部分に結合した位置などの、ヘテロアルキル基の任意の位置にあってよい。例としては、 $-CH_2 - CH_2 - O - CH_3$ 、 $-CH_2 - CH_2 - NH - CH_3$ 、 $-CH_2 - CH_2 - N(CH_3) - CH_3$ 、 $-CH_2 - S - CH_2 - CH_3$ 、 $-CH_2 - CH_2 - S(O) - CH_3$ 、 $-CH_2 - CH_2 - S(O)_2 - CH_3$ 、 $-CH = CH - O - CH_3$ 、 $-Si(CH_3)_3$ 、 $-CH_2 - CH = N - OCH_3$ 、及び  $-CH = CH - N(CH_3) - CH_3$  が挙げられる。例えば、 $-CH_2 - NH - OCH_3$  及び  $-CH_2 - O - Si(CH_3)_3$  など、最大 2 個のヘテロ原子が連続してもよい。

30

#### 【 0 0 5 5 】

同様に、「ヘテロアルキレン」という用語は、それ自体で又は別の置換基の一部として、 $-CH_2 - CH_2 - S - CH_2 - CH_2 -$  及び  $-CH_2 - S - CH_2 - CH_2 - NH - CH_2 -$  に例示されるような、ヘテロアルキルに由来する二価のラジカルを意味する。ヘテロアルキレン基について、ヘテロ原子はまた、鎖の末端のいずれか又は両方を占めることができる（例えば、アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノなど）。さらにはまた、アルキレン及びヘテロアルキレン連結基について、連結基の方向性は含意されない。

40

#### 【 0 0 5 6 】

「シクロアルキル」及び「ヘテロシクロアルキル」という用語は、それら自体で又は他の用語と組み合わせて、別段の言及がなければ、環状型のそれぞれ「アルキル」及び「ヘテロアルキル」を表す。したがって、シクロアルキル基は、指定された数の炭素原子を有し（すなわち、 $C_3 \sim 8$  は 3 ～ 8 個の炭素を意味する）、1 個又は 2 個の二重結合も有してよい。ヘテロシクロアルキル基は、指定された数の炭素原子並びに O、N、Si 及び S からなる群から選択される 1 ～ 3 個のヘテロ原子からなり、窒素及び硫黄原子は酸化されていてもよく、窒素ヘテロ原子は四級化されていてもよい。さらに、ヘテロシクロアルキ

50

ルについて、ヘテロ原子は、複素環が分子の残りの部分に結合した位置を占めることができる。シクロアルキルの例としては、シクロペンチル、シクロヘキシル、1 - シクロヘキセニル、3 - シクロヘキセニル、シクロヘプチルなどが挙げられる。ヘテロシクロアルキルの例としては、1 - (1, 2, 5, 6 - テトラヒドロピリジル)、1 - ピペリジニル、2 - ピペリジニル、3 - ピペリジニル、4 - モルホリニル、3 - モルホリニル、テトラヒドロフラン - 2 - イル、テトラヒドロフラン - 3 - イル、テトラヒドロチエン - 2 - イル、テトラヒドロチエン - 3 - イル、1 - ピペラジニル、2 - ピペラジニルなどが挙げられる。

#### 【0057】

「ハロ」及び「ハロゲン」という用語は、それら自体で又は別の置換基の一部として、別段の言及がなければ、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子を意味する。さらに、「ハロアルキル」などの用語は、1 ~ (2m' + 1) 個 (m' は、アルキル基中の炭素原子の総数である。) に及ぶ数の、同じであってもよいし、異なってもよいハロゲン原子で置換されたアルキルを含むことが意図される。例えば、「C1 ~ C4 のハロアルキル」という用語は、トリフルオロメチル、2, 2, 2 - トリフルオロエチル、4 - クロロブチル、3 - プロモプロピルなどを含むことが意図される。したがって、「ハロアルキル」という用語は、モノハロアルキル (1 個のハロゲン原子で置換されたアルキル) 及びポリハロアルキル (2 ~ (2m' + 1) 個のハロゲン原子 (m' は、アルキル基中の炭素原子の総数である。) に及ぶ数のハロゲン原子で置換されたアルキル) を含む。「ペルハロアルキル」という用語は、別段の言及がなければ、(2m' + 1) 個のハロゲン原子 (m' は、アルキル基中の炭素原子の総数である。) で置換されたアルキルを意味する。例えば、「C1 ~ 4 のペルハロアルキル」という用語は、トリフルオロメチル、ペンタクロロエチル、1, 1, 1 - トリフルオロ - 2 - プロモ - 2 - クロロエチルなどを含むことが意図される。

#### 【0058】

「アシル」という用語は、酸のヒドロキシ部分を除去することによる有機酸に由来する基を指す。したがって、アシルは、例えば、アセチル、プロピオニル、ブチリル、デカノイル、ピバロイル、ベンゾイルなどを含むことが意図される。

#### 【0059】

「アリール」という用語は、別段の言及がなければ、ポリ不飽和の、典型的に芳香族の、炭化水素の置換基であって、単環又は縮合もしくは共有結合的に連結した多環 (最大で3環) であってもよいものを意味する。アリール基の非限定的な例としては、フェニル、1 - ナフチル、2 - ナフチル、4 - ビフェニル及び1, 2, 3, 4 - テトラヒドロナフタレンが挙げられる。

#### 【0060】

「ヘテロアリール」という用語は、N、O、及びSから選択される0 ~ 4 個のヘテロ原子を含有するアリール基 (又は環) を指し、窒素及び硫黄原子は酸化されていてもよく、窒素ヘテロ原子は四級化されていてもよい。ヘテロアリール基は、ヘテロ原子を通じて分子の残りの部分に結合していてもよい。ヘテロアリール基の非限定的な例としては、1 - ピロリル、2 - ピロリル、3 - ピロリル、3 - ピラゾリル、2 - イミダゾリル、4 - イミダゾリル、ピラジニル、2 - オキサゾリル、4 - オキサゾリル、2 - フェニル - 4 - オキサゾリル、5 - オキサゾリル、3 - イソキサゾリル、4 - イソキサゾリル、5 - イソキサゾリル、2 - チアゾリル、4 - チアゾリル、5 - チアゾリル、2 - フリル、3 - フリル、2 - チエニル、3 - チエニル、2 - ピリジル、3 - ピリジル、4 - ピリジル、2 - ピリミジル、4 - ピリミジル、5 - ベンゾチアゾリル、プリニル、2 - ベンズイミダゾリル、5 - インドリル、1 - イソキノリル、5 - イソキノリル、2 - キノキサリニル、5 - キノキサリニル、3 - キノリル及び6 - キノリルが挙げられる。

#### 【0061】

簡潔性のために、「アリール」という用語は、他の用語 (例えば、アリールオキシ、アリールチオキシ、アリールアルキル) と組み合わせて使用された時に、上記に定義される

アリーール環及びヘテロアリーール環の両方を含む。したがって、「アリーールアルキル」という用語は、炭素原子（例えば、メチレン基）が例えば酸素原子により置換されたアルキル基（例えば、フェノキシメチル、2-ピリジルオキシメチル、3-(1-ナフチルオキシ)プロピルなど）などの、アリーール基がアルキル基に結合したラジカル（例えば、ベンジル、フェネチル、ピリジルメチルなど）を含むことが意図される。

#### 【0062】

上記の用語（例えば、「アルキル」、「ヘテロアルキル」、「アリーール」及び「ヘテロアリーール」）のそれぞれは、指し示したラジカルの置換及び非置換の両方の形態を含むことが意図される。各種類のラジカルの好ましい置換基を以下に提供する。

#### 【0063】

アルキル及びヘテロアルキルラジカル（並びにアルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニル及びヘテロシクロアルケニルと称される基）の置換基は、0～3個に及ぶ数の、 $-OR'$ 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR$ 、ハロゲン、 $-SiR'R''R'''$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-CO_2R$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NRR''$ 、 $-NR''C(O)R$ 、 $-NR'-C(O)NR''R'''$ 、 $-NR'-SO_2NR''R'''$ 、 $-NR''CO_2R$ 、 $-NH-C(NH_2)=NH$ 、 $-NR'C(NH_2)=NH$ 、 $-NH-C(NH_2)=NR$ 、 $-S(O)R$ 、 $-SO_2R$ 、 $-SO_2NRR''$ 、 $-NR''SO_2R$ 、 $-CN$ 及び $-NO_2$ から選択される様々な基であってよく、0、1又は2個の置換基を有する基が特に好ましい。 $R'$ 、 $R''$ 及び $R'''$ は、それぞれ独立して、水素、非置換のC1～C8のアルキル及びヘテロアルキル、非置換のアリーール、1～3個のハロゲンで置換されたアリーール、非置換のアルキル、アルコキシもしくはチオアルコキシ基、又はアリーール-C1～C4のアルキル基を指す。 $R'$ 及び $R''$ が同じ窒素原子に結合している場合、それらは窒素原子と組み合わせさせて5、6又は7員の環を形成してもよい。例えば、 $-NR'R''$ は、1-ピロリジニル及び4-モルホリニルを含むことが意図される。典型的に、アルキル基又はヘテロアルキル基は0～3個の置換基を有し、2又はそれより少ない置換基を有する基が本発明において好ましい。より好ましくは、アルキル又はヘテロアルキルラジカルは、非置換又は一置換されたである。最も好ましくは、アルキル又はヘテロアルキルラジカルは、非置換である。置換基の上記議論から、「アルキル」という用語はトリハロアルキル（例えば、 $-CF_3$ 及び $-CH_2CF_3$ ）などの基を含むことが意図されることを当業者は理解するであろう。

#### 【0064】

アルキル及びヘテロアルキルラジカルの好ましい置換基は、 $-OR'$ 、 $=O$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR$ 、ハロゲン、 $-SiR'R''R'''$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-CO_2R$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR''C(O)R$ 、 $-NR'-CO_2R$ 、 $-NR'-SO_2NR''R'''$ 、 $-S(O)R$ 、 $-SO_2R$ 、 $-SO_2NRR''$ 、 $-NR''SO_2R$ 、 $-CN$ 及び $-NO_2$ （ $R'$ 及び $R''$ は上記に定義される通りである。）から選択される。さらなる好ましい置換基は、 $-OR$ 、 $=O$ 、 $-NR'R''$ 、ハロゲン、 $-OC(O)R$ 、 $-CO_2R$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR''C(O)R$ 、 $-NR'-CO_2R$ 、 $-NR'-SO_2NR''R'''$ 、 $-SO_2R$ 、 $-SO_2NRR''$ 、 $-NR''SO_2R$ 、 $-CN$ 及び $-NO_2$ から選択される。

#### 【0065】

同様に、アリーール基及びヘテロアリーール基の置換基は様々であり、0個から芳香環系の開放原子価の総数までに及ぶ数の、ハロゲン、 $-OR'$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR$ 、 $-R'$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-CO_2R$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR''C(O)R$ 、 $-NR'-CO_2R$ 、 $-NR'-C(O)NR''R'''$ 、 $-NR'-SO_2NR''R'''$ 、 $-NH-C(NH_2)=NH$ 、 $-NR'C(NH_2)=NH$ 、 $-NH-C(NH_2)=NR$ 、 $-S(O)$

10

20

30

40

50

R、 $-SO_2R$ 、 $-SO_2NR'R''$ 、 $-NR'R''SO_2R$ 、 $-N_3$ 、 $-CH(Ph)_2$ 、C1～C4のペルフルオロアルコキシ及びC1～C4のペルフルオロアルキル( $R'$ 、 $R''$ 及び $R'''$ は、水素、C1～C8のアルキル及びヘテロアルキル、非置換のアリール及びヘテロアリール、(非置換のアリール)-C1～C4のアルキル及び(非置換のアリール)オキシ-C1～C4のアルキルから独立して選択される)から選択される。アリール基が1, 2, 3, 4-テトラヒドロナフタレンである場合、それは置換又は非置換のC<sub>3</sub>～<sub>7</sub>のスピロシクロアルキル基で置換されていてもよい。C<sub>3</sub>～<sub>7</sub>のスピロシクロアルキル基は、「シクロアルキル」について本明細書で定義されるものと同じ様式で置換されていてもよい。典型的に、アリール基又はヘテロアリール基は0～3個の置換基を有し、2又はそれより少ない置換基を有する基が本発明において好ましい。本発明の一実施形態では、アリール基又はヘテロアリール基は、非置換又は一置換である。別の実施形態では、アリール基又はヘテロアリール基は、非置換である。

10

## 【0066】

アリール基及びヘテロアリール基の好ましい置換基は、ハロゲン、 $-OR'$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、 $-R$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-CO_2R$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR'R''C(O)R$ 、 $-S(O)R$ 、 $-SO_2R$ 、 $-SO_2NR'R''$ 、 $-NR'R''SO_2R$ 、 $-N_3$ 、 $-CH(Ph)_2$ 、C1～C4のペルフルオロアルコキシ及びC1～C4のペルフルオロアルキル( $R'$ 及び $R''$ は上記に定義される通りである。)から選択される。さらなる好ましい置換基は、ハロゲン、 $-OR$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-R$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-CO_2R$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-NR'R''C(O)R$ 、 $-SO_2R$ 、 $-SO_2NR'R''$ 、 $-NR'R''SO_2R$ 、C1～C4のペルフルオロアルコキシ及びC1～C4のペルフルオロアルキルから選択される。

20

## 【0067】

本明細書で使用される場合、置換基 $-CO_2H$ は、したがって、生物学的等価性置換を含む。例えば、The Practice of Medicinal Chemistry; Wermuth, C.G., Ed.; Academic Press: New York, 1996; p. 203を参照。

## 【0068】

アリール環又はヘテロアリール環の隣接する原子上の置換基の2つは、式 $-T-C(O)-(CH_2)_q-U-$ (式中、T及びUは、独立して、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-CH_2-$ 又は単結合であり、qは0～2の整数である。)の置換基で置換されていてもよい。あるいは、アリール環又はヘテロアリール環の隣接する原子上の置換基の2つは、式 $-A-(CH_2)_r-B-$ (式中、A及びBは、独立して、 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-NH-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NR'$ 又は単結合であり、rは1～3の整数である。)の置換基で置換されていてもよい。そのように形成された新たな環の単結合の1つは、二重結合で置換されていてもよい。あるいは、アリール環又はヘテロアリール環の隣接する原子上の置換基の2つは、式 $-(CH_2)_s-X-(CH_2)_t-$ (式中、s及びtは、独立して、0～3の整数であり、Xは、 $-O-$ 、 $-NR'-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、又は $-S(O)_2NR'$ である。)の置換基で置換されていてもよい。 $-NR'-$ 及び $-S(O)_2NR'$ における置換基 $R'$ は、水素又は非置換のC1～C6のアルキルから選択される。

30

40

## 【0069】

好ましい置換基は本明細書に開示され、表に例示され、構造、実施例、及び特許請求の範囲は、本発明の異なる化合物にわたって適用されてよく、すなわち、任意の所与の化合物の置換基は、他の化合物と組み合わせて使用されてよい。

## 【0070】

具体的な実施形態では、適用可能な置換基は、独立して、置換もしくは非置換のヘテロ原子、置換もしくは非置換の、ヘテロ原子でもよいC1～C6のアルキル、置換もしくは非置換の、ヘテロ原子があってもよいC<sub>2</sub>～<sub>6</sub>のアルケニル、置換もしくは非置換の、ヘ

50



テロ原子があってもよい  $C_{2 \sim 6}$  のアルキニル、又は置換もしくは非置換の、ヘテロ原子があってもよい  $C_{6 \sim 14}$  のアリールであり、各ヘテロ原子は、独立して、酸素、リン、硫黄又は窒素である。

#### 【0071】

より具体的な実施形態では、適用可能な置換基は、独立して、アルデヒド、アルジミン、アルカノイルオキシ、アルコキシ、アルコキシカルボニル、アルキルオキシ、アルキル、アミン、アゾ、ハロゲン、カルバモイル、カルボニル、カルボキサミド、カルボキシル、シアニル、エステル、ハロ、ハロホルミル、ヒドロペルオキシル、ヒドロキシル、イミン、イソシアニド、イソシアネート、N - t e r t - ブトキシカルボニル、ニトレート、ニトリル、ニトライト、ニトロ、ニトロソ、ホスフェート、ホスホノ、スルフィド、スルホニル、スルホ、スルフヒドリル、チオール、チオシアニル、トリフルオロメチル又はトリフルオロメチルエーテル ( $OCF_3$ ) である。

10

#### 【0072】

本明細書で使用される「ペプチド」という用語は、ペプチド結合により連結した少なくとも2つのアミノ酸を指す。「ポリペプチド」は、ペプチド結合により互いに接続された(50未満の)アミノ酸の短鎖配列を指す。ペプチド又はポリペプチドは、遊離して存在してもよいし、又は別の部分、例えば、高分子、脂質、オリゴ糖もしくは多糖、及び/もしくはポリペプチドに結合していてもよい。ペプチドがポリペプチド鎖に組み込まれている場合であっても、アミノ酸の短鎖配列を具体的に指すために「ペプチド」という用語が使用されることがある。ペプチド又はポリペプチドは、ペプチド結合又は何らかの他の種類の連結により別の部分に接続することができる。ポリペプチドは、2アミノ酸より長く、一般に約25アミノ酸未満の長さである。「ペプチド」及び「オリゴペプチド」という用語は、交換可能に使用されることがある。

20

#### 【0073】

「タンパク質」は、一般に、50アミノ酸より長いポリペプチド鎖を含むアミノ酸の配列を指す。タンパク質はまた、ポリペプチドの三次元構造を指すこともある。「変性タンパク質」は、一部の残留の三次元構造を有する部分的に変性したポリペプチド、又は本質的にランダムな三次元構造、すなわち完全に変成したものを指す。本発明は、ポリペプチドのバリエーション、例えば、グリコシル化、リン酸化、硫酸化、ジスルフィド結合形成、脱アミド、異性化、シグナル又はリーダー配列のプロセッシングにおける開裂点、共有結合及び非共有結合的に結合した補因子、酸化されたバリエーションなどが関与する試薬、又は該バリエーションを使用する方法を包含する。ジスルフィド連結タンパク質の形成が記載されている(例えば、Woycechowsky and Raines (2000) Curr. Opin. Chem. Biol. 4: 533 - 539; Creighton, et al. (1995) Trends Biotechnol. 13: 18 - 23を参照)。

30

#### 【0074】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、抗原又はエピトープに特異的に結合することができる、(1又は複数の)免疫グロブリン遺伝子又はその断片に由来する、それに倣って作られた又は実質的にそれによってコードされるペプチド又はポリペプチドを指す。例えば、Fundamental Immunology, 3rd Edition, W. E. Paul, ed., Raven Press, N. Y. (1993); Wilson (1994); J. Immunol. Methods 175: 267 - 273; Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25: 85 - 97を参照。抗体という用語は、抗原結合部分、すなわち、抗原に結合する能力を保持した「抗原結合部位」(例えば、断片、部分配列、相補性決定領域(CDR))を含み、該部分としては、(i) VL、VH、CL及びCH1ドメインからなる一価の断片であるFab断片；(ii) ヒンジ領域においてジスルフィド架橋により連結された2つのFab断片を含む二価の断片であるF(ab')<sub>2</sub>断片；(iii) VHドメイン及びCH1ドメインからなるFd断片；(iv) 抗体の単一アームのVLドメイン及びVHドメインからなるFv断片、(v) VHドメインからなるdAb断片(Ward et al

40

50

., (1989) Nature 341: 544 - 546); 及び(vi) 単離された相補性決定領域(CDR)が挙げられる。単鎖抗体もまた、参照することにより「抗体」という用語に含まれる。

#### 【0075】

本明細書で使用される「サイトカイン」という用語は、細胞の機能に影響し、免疫、炎症又は造血応答において細胞間の相互作用をモジュレートする分子である、任意の分泌されるポリペプチドを意味する。サイトカインとしては、いずれの細胞がそれらを産生するかにかかわらず、モノカイン及びリンホカインが挙げられるがこれらに限定されない。サイトカインの例としては、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-6(IL-6)、インターロイキン-8(IL-8)、腫瘍壊死因子-アルファ(TNF-a)及び腫瘍壊死因子-ベータ(TNF-b)が挙げられるがこれらに限定されない。

10

#### 【0076】

本明細書で使用される「受容体」という用語は、典型的に、コグネイトリガンドに結合し、細胞、通常は1又は複数の種類の細胞膜に結合し、又は由来し、且つその主な生物学的機能として特定のリガンド又はリガンドの基に結合する能力を有し、リガンドの結合により直接的又は間接的に細胞中にシグナル伝達を媒介する、主にタンパク質から構成される分子を指す。1つの種類の受容体は、3つの部分又はドメイン、すなわち、細胞内ドメイン、細胞外ドメイン、及び膜貫通ドメインを有する。加えて、受容体は、典型的に、受容体を適切な膜に標的化するために役立つ約5~25アミノ酸の配列をそのアミノ末端に有する。これらのドメインは、受容体ごとに大きさ及び機能が様々である。典型的に、細胞外ドメインは1又は複数のリガンドに結合し、膜貫通ドメインは受容体を膜に固着させ、細胞内ドメインは、リガンドの結合を感知してシグナルを細胞の内部(細胞内環境)に伝達する。

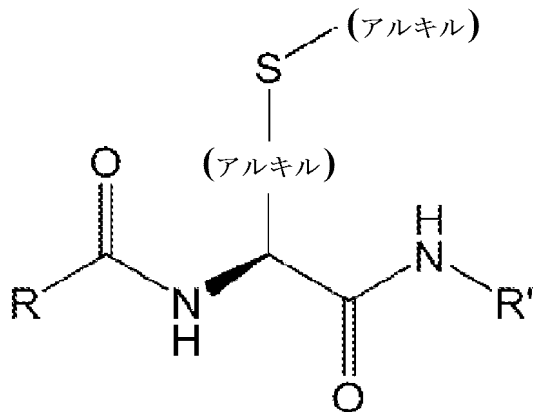
20

#### 【0077】

本明細書で使用される「ケモカイン」という用語は、少なくとも17の異なる受容体と相互作用する50を超えるリガンドを含む、4つの異なる構造ファミリーの1つのメンバーを指す。これらのケモカインファミリーは、保存されたシステイン含有モチーフの構造にしたがって名付けられており、タンパク質のアミノ末端におけるC、CC、CXC、又はC'Cのいずれかの存在により定義される。例えば、式IIの化合物(式IIaの化合物など)の記載において使用されるような、「アミノ酸ペプチド」という用語は、タンパク質又はポリペプチド内の結合であって、基質を含有するチオエーテルがアミノ酸ペプチドを含み、例えば、ポリペプチド又はタンパク質のアミノ酸残基の一部であり、好ましい実施形態では、チオエーテルがポリペプチド又はタンパク質のメチオニン残基内にあるものを指す。そのため、基質 $R_4-S-R_5$ は、例えば、 $R_4$ 及び $R_5$ がアルキル基であり、且つ $R_5$ のアルキル基が1つの炭素においてポリペプチド又はタンパク質内の $-NH-C(O)R$ 基及び $-C(O)NHR'$ 基(例えば、 $R$ は追加のペプチド鎖又はカルボキシル末端OHであり、 $R'$ は追加のペプチド鎖又はアミノ末端Hである。)の両方で置換されているチオエーテルを表す。そのため、例えばアミノ酸ペプチドで置換されている $R_5$ のアルキル基は、

30

【化 9】

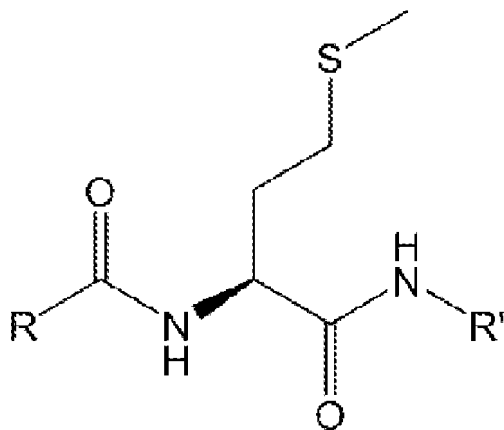


10

【0078】

として表すことができ、又は基質  $R_4 - S - R_5$  がタンパク質又はポリペプチド内のメチオニン残基を表す好ましい実施形態では、

【化 10】



20

【0079】

として表すことができる。

30

【0080】

基質は、追加の修飾を有するポリペプチド又はタンパク質を含んでよく、又は本明細書に記載される発明の方法により反応させることができる追加のメチオニン残基を有していてもよいことも理解される。

【0081】

「活性部分」は、本発明において説明される通りのペイロード分子であって、例えばタンパク質又はポリペプチドに共役した前記部分は、何らかの活性を提供する。該部分の活性としては、生物学的活性（例えば、薬学活性部分、例えば、小分子製剤又は生体分子、例えば、DNA、RNA、脂質又は糖）、検出可能な標識（例えば、フルオロフォア、イメージング標識など）、特性修飾部分（例えば、PEG化部分）、スルフヒドリル特異的機能性部分、例えば、マレイミド、ハロゲン化アルキルもしくはアリール、ハロアシル、又はピリジジルスルフィド、アミン特異的機能性部分、例えばカルボジイミド、非選択的反応性部分、例えば、光親和性基、アルギニン特異的機能性部分、例えばグリオキサルなどが挙げられるがこれらに限定されない。

40

【0082】

「クリック化学」又は「クリック反応」という用語は、共役の周知の選択的な方法であって、クリック反応性官能基を含む2つの成分を反応させて2つの成分を連結させることを指す。例えば、本明細書に記載されるスルフィド修飾されたペプチド、ポリペプチド又はタンパク質について、修飾された基は第1のクリック反応性官能基をさらに含み、ペ

50

イロード分子は、好適には、第1のクリック反応性官能基と反応性の第2のクリック反応性官能基を含むように修飾される。クリック反応性官能基としては、アジド基、ニトロソ基又はアルキン基が挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、クリック化学は、アジド基をアルキン基と反応させて2つの成分を連結するトリアゾール基を形成させること、又はニトロソ基をアルキン基と反応させて2つの成分を連結するイソキサゾリン基を形成させることを含む。一部の実施形態では、アルキン基は、ジベンゾシクロオクチン(DBCO)基又はジフルオロオクチン(DIFO)基である。一部の実施形態では、クリック化学は、銅(I)触媒によるアジド-アルキン付加環化(CuAAC)、歪み促進型アジド-アルキン付加環化(SPAAC)又は歪み促進型アルキン-ニトロソ付加環化(SPANC)である。Jewett, John C. and Bertozzi, Carolyn, R., Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. Chem Soc Rev. 39(4), 1272-1279(2010); Agard et al., A Comparative Study of Bioorthogonal Reactions with Azides. ACS Chem. Biol., 1(10), 644-648(2006); MacKenzie et al., Strain-promoted cycloadditions involving nitrones and alkynes - rapid tunable reactions for bioorthogonal labeling. Current Opinion in Chemical Biology 21, 81-88(2014)(これらの開示は、参照することによりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)も参照。

10

20

#### 【0083】

実施例；設計：

基質変換及び所望のN転移生成物(NTP、スルフィミド)と所望しないO転移生成物(OTP、スルホキシド)との間の反応選択性の<sup>1</sup>H NMR解析を使用して、1:1のd-MeOD/D<sub>2</sub>O溶媒中、モデル基質としてメチオニン誘導体S1を用いる様々な硫黄イミド化反応をスクリーニングした(図1B)。硫黄イミド化試薬としてオキサジリジン1(Ox1)を使用するメチオニンの歪み促進型硫黄イミド化は、追加の触媒なしで2.5分以内に、5:1のNTP:OTP比でS1の95%の変換を与えた(図1B)。これを出発点として、カルバメートから尿素にプローブの連結を変化させたところ(Ox2)、同等の変換と共に増進された選択性(NTP:OTP=12:1)が結果としてもたらされ、電子求引性CF<sub>3</sub>基(Ox3)によるOx2のベンジル水素のさらなる置換は、はるかに低い選択性(NTP:OTP=2:1)及び反応変換(58%)を結果としてもたらした。興味深いことに、溶媒中の水のパーセンテージを0%から95%に増加させることにより、6:1から18:1へのNTP:OTP選択性の顕著な向上が観察され(図1B)、生物学的環境におけるこのライゲーション反応の有用性を予感させた。

30

40

50

#### 【0084】

他の生物学的に関連するアミノ酸競合物とのオキサジリジンプローブの反応性を評価した。全ての場合に、試験した他のアミノ酸のいずれとも共役生成物は観察されず、メチオニンのみがReACT試薬とのライゲート生成物を与える。メチオニン共役についてのReACTの高い選択性のさらなる実証として、LC-MS/MS分析を使用して全プロテオーム内のプローブ標識化の部位を同定した。HeLa細胞溶解液をOx4で処理し、トリプシン消化した後、X!Tandemプログラム<sup>43</sup>を使用して全ての求核性アミノ酸でのプローブ修飾についてLC-MS/MSにより分析した。235のメチオニン残基及び単一のリジン残基の標識化が見出され、システイン側鎖又は他の求核性アミノ酸において他の修飾は検出されなかった(図1C)。これらの実験は、穏やかな生体適合性の条件下でのReACT戦略の迅速な反応速度の他に、単一のタンパク質から全プロテオームレベルまでのメチオニン残基についての完璧に近い選択性を実証する。最後に、スルフィミドメチオニン共役生成物の化学的安定性を試験したところ、この連結は、酸性及び塩基性条件、温度上昇の他に、トリス(2-カルボキシエチル)ホフィン(phosphine)

(TCEP)などの強いタンパク質ジスルフィド還元剤での処理に耐性であることが発見された。

#### 【0085】

図1A左パネル：システインベースのタンパク質官能基化のための酸-塩基共役戦略；右パネル：メチオニンベースのタンパク質官能基化のためのレドックス活性化化学的タグ化(ReACT)戦略。オキサジリジン(Ox)化合物は、メチオニンを対応するスルフィミド共役生成物に変換することにより、直接的な官能基化のための酸化剤媒介性の試薬として役立つ。(B)共溶媒中での25 μMのN-アセチル-L-メチオニンメチルエステル(S1)及び基質としての27.5 μMの様々なオキサジリジン化合物によるモデルレドックス共役反応。(C)1 mMの最終濃度のOx4でHeLa細胞溶解液を10分間標識することによる、代表的なアミノ酸、すなわちMet、Lys及びCysでの独特のレドックス共役保有ペプチドの数。(D)共役反応の収率は、ゲル内蛍光イメージングによる測定で、指し示した時点において、タンパク質当たり4つのメチオニンを持つ15 μMのBSA及び100 μMのOx4を用いて行った。

10

#### 【0086】

応用：

##### 1. タンパク質へのペイロードの精密な付加

ReACTをタンパク質の部位選択的なメチオニン共役のための方法として評価した。2ステップの標識化プロトコルを使用し、モデルタンパク質としてウシ血清アルブミン(BSA)から開始し、BSAを最初に、生体直交型のアルキン基を持つオキサジリジンプローブOx4で処理した後、銅触媒によるアジド-アルキン付加環化(CuAAC)反応を通じてCy3-アジドに連結させた。BSAに対する得られたレドックス共役の収率をゲル内蛍光イメージングにより解析した。ReACTは迅速に進行し、1~2分以内に95%を超える収率で完了することができ、標識化の50%は、標準的な反応条件下でOx4をタンパク質に付加した後の最初の5秒以内に起こった(図1D)。これは、ReACT法は目的のタンパク質上の定義されたメチオニン部位において様々なペイロードを取り付けることを可能として、天然に存在するアミノ酸を使用する官能基化のための独特の方法として役立つ可能性があることを示す(図2A)。CaMモデルタンパク質との様々なアルキン含有及びアジド含有オキサジリジンプローブの反応性を評価した(図2B)。LC-MSの結果は、ReACTは室温での10分間の標識時間内に9つ全ての天然のメチオニン残基へのこれらの生体直交型のハンドルのほぼ定量的な取付けを可能とすることを示し、8個のスルフィド修飾(NTP)及び1個のスルホキシド修飾(OTP)を持つ軽微なCaM生成物が他に唯一観察されたのに対し、25:1の選択性であった(図2B)。

20

30

#### 【0087】

図2A. ReACTとクリック反応との組合せのメチオニン特異的タンパク質官能基化のための一般的な2ステップ手順。所与のタンパク質上の指向した位置においてメチオニン共役を通じて様々なペイロードを取り付けることができる。(B)様々なオキサジリジン(Ox)化合物(1 mM)とのCaMモデルタンパク質(100 μM)のレドックス共役。オキサジリジンプローブの化学構造を、対応する修飾について列記した分子量変化(M)と共に示す。全タンパク質ピークのデコンボリューションしたMSデータを同じ図中にプロットしている。Ox2標識化タンパク質：予測される質量17,564 Da、検出17,565 Da；Ox4標識化タンパク質：予測される質量17,654 Da、検出17,654 Da；Ox5標識化タンパク質：予測される質量18,050 Da、検出18,051 Da；Ox6標識化タンパク質：予測される質量18,059 Da、検出18,060 Da。

40

【0088】  
 ビオチン、フルオロフォア及びポリエチレングリコール(PEG)ペイロードを用いるさらなる官能基化は順調に進行する。図3. デスチオビオチン-アジド、Cy3-アジド及びジベンゾシクロオクチル(DBCO)-PEG(10 kDa)の化学構造。CuAAC

50

C反応を使用してOx4標識化CaMTanパク質(40 μM)をデスチオピオチン-アジド(100 μM)(B)及びCy3-アジド(100 μM)(C)と反応させた。BCS(1 mM)を加えることにより反応を停止させ、3回脱塩し、タンパク質MSにより分析した。デコンボリューションしたMSは、React-クリックを使用するCamTanパク質への1~3個のピオチン又はCy3の共役を指し示し、また、Ox6標識化CaMTanパク質(40 μM)を指し示した濃度のDBCO-PEG(10 kDa)と室温で8時間反応させた。タンパク質ゲルにより反応を解析した。クリック反応パートナーの入手容易性と連結したReactの高いメチオニン反応性及び特異性は、この天然に存在するアミノ酸に基づく精密なタンパク質官能基化のための直接的な方法を提供する。

【0089】

10

## 2. 抗体-薬物コンジュゲート

出発モデルとして抗緑色蛍光タンパク質抗体断片(GFP-Fab)を使用して抗体-薬物コンジュゲート(ADC)の合成を試験した。Fabスキャフォールドは軽鎖に1つの天然のメチオニン残基及び重鎖に2つの天然のメチオニン残基を持つが、これらの側鎖のいずれも表面で接近可能でなく、したがって高いオキサジリジンプローブ負荷を用いてさえ、Reactによって標識することはできない。そのため、Reactは抗体の生体共役のための潜在的に価値のある戦略を与え、これは、これらの天然のメチオニンは疎水性内部コア内に埋もれているので、野生型抗体のバックグラウンド標識化がなく、表面で接近可能なメチオニン部位のその後の操作により、指向した場所での精密な抗体官能基化を可能とし得るためである。THIOMabプラットフォーム<sup>44</sup>を使用して、重鎖(HQ-A114残基又は軽鎖(LQ-V205残基をメチオニンで置換することによりこのアプローチの実証を行ったところ、Reactによる効率的な標識化が示された。加えて、C末端メチオニンを持つGFP-Fab(GFP-Fab-CM)に対するReactでの迅速な、ほぼ定量的な、及び部位特異的なC末端標識化が実証された。重要なことに、結果として得られたアジド保有GFP-Fab(GFP-Fab-NS)は、野生型Fabと比較してGFPリガンドに対する類似の結合親和性を保持した。クリック反応は、ピオチン、フルオロフォア及び薬物ペイロードによるGFP-Fab-N3のさらなる官能基化を可能とする。さらに、結果として得られるコンジュゲートは、生物学的環境と適合性である。例えば、ドキシサイクリン(Dox)処理が細胞表面に局在したGFPの発現を結果としてもたらす、Dox誘導性細胞表面GFP発現系を有するHEK-293T細胞株を使用した。Doxの事前付加とその後のReactにより作られたCy3標識化GFP-Fabとのインキュベーションにより、HEK-293T生細胞においてCy3及びGFPシグナルの優れた共同在性が観察された。対照的に、Doxを加えない対照細胞ではCy3シグナルは観察されなかった。さらには、Cy3シグナルの強度は、100%のウシ胎児血清(FBS)の存在下で少なくとも14日間にわたって安定であることが分かった。以上を合わせると、これらのデータは、Reactは、多様なペイロードを用いて指向した位置での抗体官能基化を可能とすると同時に、リガンド結合のためのそれらの機能を保持できることを実証する。

20

30

【0090】

Reactを治療用コンジュゲートであるハーセプチン-Fab(Her-Fab)にも適用した。野生型Her-Fabは表面で接近可能なメチオニンを欠くため、Reactは野生型Her-Fabを標識しない。C末端に1個又は2個のメチオニン残基を持つようにHer-Fabプラットフォームを操作することにより、Reactはそれぞれ1個又は2個のレドックス修飾による定量的な共役を与える。Reactは、システイン又はリジンライゲーションを用いる生体共役方法について依然として大きな課題である、優れた純度での定義された薬物対抗体比(DAR)でのADCの合成を可能とし得ることをデータは確立する。さらに、メチオニン共役により導入される生体直交型のアジド又はアルキンハンドルは、追加のペイロードを用いて容易に官能基化することができる。実際、モノメチルアウリスチンE(MMAE)をHer-Fabに連結させることにより合成されるADCは、野生型Her-Fab又は野生型Her-Fabと遊離MMAEとの混

40

50

合物のいずれかと比較してH e r 2 陽性B T 4 7 4 乳がん細胞に対する毒性の5 倍の増加を呈し、生物学的背景におけるその有用性を実証する(L i n e t a l . , R e d o x - b a s e d r e a g e n t s f o r c h e m o s e l e c t i v e m e t h i o n i n e b i o c o n j u g a t i o n . S c i e n c e 3 5 5 , 5 9 7 - 6 0 2 ( 2 0 1 7 ) を参照；その開示は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる)。

#### 【0091】

##### 3 . 反応性メチオニンのプロファイリング

R e A C T は、その高い特異性及び反応性の他に、広範なタンパク質に接近するためのその小ささにより、ケモプロテオミクスへの応用のための独特のメチオニン標的化弾頭として使用することができる。この目的のために、タンデム直交型タンパク質加水分解 - 活性ベースのタンパク質プロファイリング(T O P - A B P P )<sup>4 5</sup>を通じてプロテオームにおけるプローブ反応性メチオニンにR e A C T を適用した。低レベル、中レベル、及び高レベルのR e A C T プローブO x 4 による細胞の用量依存的な処理を通じて、低反応性メチオニン部位と共に低用量の標識化で濃縮されるべき反応性亢進のメチオニンを同定することを試みた。H e L a 細胞溶解液において並行のT O P - A B P P ( 3 つ全ての群についてn = 2 ) を行うことにより、所望のR e A C T e メチオニン修飾を持つ1 1 6 ( 低用量 )、4 5 8 ( 中用量 ) 及び1 1 1 8 ( 高用量 ) のペプチドが同定された。

#### 【0092】

反応性亢進のメチオニン標的は特に興味深く、それらはメチオニン調節性のタンパク質機能の部位を予測することができる。偏りのないこのR e A C T アプローチは、全プロテオーム環境における以前に研究されたレドックス感受性メチオニンの特徴付けを可能とするだけでなく、より重要なことに新たな機能的メチオニン部位も同定する。陽性対照として、アクチン内に3 つの反応性亢進のメチオニンが同定され、それらにはM e t 4 4 及びM e t 4 6 が含まれ、これらのレドックス活性は、生細胞におけるアクチン重合の制御において中心的役割を果たすことが以前に示されている<sup>3 6 ~ 3 8</sup>。検討中のR e A C T 法を検証するこれらのデータを用いて、メチオニン依存的な機能を有する新たな標的を同定し且つ特徴付けることを試みた。1 つの代表的な例として、ワールブルグ効果を介してがんなどの疾患を調節するのに重要な<sup>4 7</sup>、解糖における古くからの保存された代謝経路における中心的酵素であるエノラーゼ<sup>4 6</sup>において3 つの反応性亢進のメチオニン残基が発見された。これには、酵母から哺乳動物まで高度に保存されたM e t 1 6 9 残基(酵母エノラーゼ1におけるM e t 1 7 1 に対応する。)が含まれる。M e t 1 6 9 は酵素活性部位に近く、酸化剤処理により哺乳動物のタンパク質中の他のメチオニン残基と共に酸化させることができる。

#### 【0093】

エノラーゼ中のこの酸化感受性のメチオニンの機能的重要性をより詳細に特徴付けるために、i n v i t r o での生化学研究のための酵母ホモログをクローニングし、精製した。次亜塩素酸による野生型酵母エノラーゼ1の処理は、タンパク質上のM e t 1 7 1 などのメチオニン残基の随伴的な酸化と共に酵素活性の減少を結果としてもたらした。M 3 7 1 L 変異体の酸化によりタンパク質活性の類似の減少が観察された。対照的に、M 1 7 1 L 変異体の活性は、同じ条件下で酸化剤処理により影響されず、この高度に保存された残基はエノラーゼ機能のレドックス調節のために不可欠であることを示唆する。酸化剤処理のあり及びなしでの野生型及びM 1 7 1 L 変異体の速度論的測定は、 $k_{cat}$  及び $K_m$  の両方が野生型において酸化により影響されるが、M 1 7 1 L 変異体についてこれらの値は同じままであることを明らかにする。細胞レベルでのこのメチオニンベースのレドックス調節の生理学的帰結を示すために、エノラーゼ1及びエノラーゼ2をダブルノックアウトバックグラウンド4 8 し、野生型エノラーゼ1又はM 1 7 1 L 変異体のいずれかを再導入した酵母株を生成した。M 1 7 1 L 変異を持つ株は、野生型エノラーゼ1を有する株と比較して酸化ストレス誘導性の細胞死に対してより耐性であることが分かり、このメチオニン残基は実際にi n v i v o において機能的なレドックス活性の役割に役立つことを

確立する。

#### 【0094】

参考文献としては、生物学的プロセスにおける硫黄の中心的役割(52~56)、システムに基づく選択的なタンパク質共役法及びそれらの応用(57~64)、酸-塩基の機構による既存のメチオニン標識化法(65~67)、及びオキサジリジン化学の総説(68~69)が挙げられる。

#### 【0095】

詳細な方法

タンパク質及び細胞溶解液の R e A C T 標識化。タンパク質試料(B S A、カルモジュリン及び F a b)を P B S (p H = 7.4)中の 1 m g / m L の溶液になるように希釈した。試料を 1.1 ~ 10 当量のオキサジリジンプロープ(D M F 中の 100 x ストック)で標識した。R e A C T 標識化反応は、室温で撹拌と共に 10 分間行い、B i o - S p i n C h r o m a t o g r a p h y C o l u m n (B i o - R a d)を用いて 2 回脱塩することにより直ちに停止させた。標識化タンパク質を S D S - P A G E 及び L C - M S 分析に供した。放射性免疫沈降アッセイ緩衝液(R I P A)中のプロテオーム試料をモデルタンパク質試料のために使用されたものと同じプロトコールで標識した。その後、冷メタノールでのタンパク質沈殿により試料を急冷した。冷メタノールでペレットを 2 回洗浄し、空気乾燥し、2 %の S D S / P B S で可溶化した。

#### 【0096】

クリック反応のための手順。P B S 中の 1 m g / m L の濃度のアルキンハンドルを持つオキサジリジン標識化タンパク質又はプロテオーム試料を C u A A C 反応で標識した。反応は、1 m M の C u S O<sub>4</sub> (水中の 100 x ストック)、100 μ M のトリス(ベンジルトリアゾリルメチル)アミン(T B T A、D M S O 中の 100 x ストック)、100 μ M のアジド- P E G 3 - ビオチン又はアジド- C y 3 (D M S O 中の 100 x ストック、C l i c k C h e m i s t r y T o o l s)及び 2 m M のアスコルビン酸ナトリウム(水中の 100 x ストック)を加えることにより行った。次に、反応液を室温で 1 時間撹拌した後、5 m M のバソクプロインジスルホン酸二ナトリウム(B C S、水中の 100 x ストック)で停止させた。P B S 中の 1 m g / m L の濃度のアジドハンドルを持つタンパク質試料を、銅なしのクリック反応を使用してジベンゾシクロオクチン(D B C O)含有化合物で標識した。反応は、2 ~ 10 当量の D B C O - ビオチン、D B C O - C y 3、D B C O - P E G - 10 k D a 又は D B C O - M M A E を加えることにより行い、室温で 8 時間反応させた後、タンパク質の脱塩により停止させた。

#### 【0097】

タンパク質修飾の L C - M S 分析。C a M 及び H e r - F a b の質量分析測定は、カリフォルニア大学バークレー校の Q B 3 / C h e m i s t r y M a s s S p e c t r o m e t r y F a c i l i t y で得た。エレクトロスプレーイオン化(E S I)供給源を備えた L T Q F T 質量分光計(T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c)で C a M 修飾を分析した。ポジティブイオンモードで E S I を使用して、5 μ L / 分の速度の溶液(1 : 1 のアセトニトリル : 水、1 % のギ酸、V / V)中にタンパク質試料を直接的に注ぎ込んだ。X c a l i b u r ソフトウェア(バージョン 2.0.7、T h e r m o)を使用してデータ取得を制御し、P r o M a s s ソフトウェア(バージョン 2.5 S R - 1、N o v a t i a)を使用して質量スペクトルのデコンボリューションを行った。i o n K e y E S I 供給源及び C 4 i o n K e y (150 μ m の内径、50 mm の長さ、300 の孔径、1.7 μ m の粒径)を備え、A c q u i t y M - クラス液体クロマトグラフ(W a t e r s)に接続された S y n a p t G 2 - S i 質量分光計でポジティブイオンモードにおいて H e r - F a b 修飾を分析した。G F P - F a b の質量分析測定はカリフォルニア大学サンフランシスコ校で得た。L o c k S p r a y (E S I)供給源及び A c q u i t y I - クラス液体クロマトグラフ(W a t e r s)に接続された A c q u i t y P r o t e i n B E H C 4 カラム(2.1 mm の内径、50 mm の長さ、300 の孔径、1.7 μ m の粒径)を備えた X e v o G 2 - X S 質量分光計



でポジティブイオンモードにおいてGFP-Fab修飾を分析した。質量スペクトルのデコンボリューションは、MassLynxソフトウェア(バージョン4.1、Waters)の最大エントロピー(MaxEnt)アルゴリズムを使用して行った。

#### 【0098】

反応性メチオニンのプロファイリング。RIPA緩衝液(各1mL)中の1mg/mLの濃度のHeLa細胞溶解液を10μM(低用量、DMF中の200×ストック)、50μM(中用量、DMF中の200×ストック)又は250μM(高用量、DMF中の200×ストック)のOx4プローブで標識した。ゲル内蛍光イメージングアッセイにより、反応は250μMのプローブで飽和に近かったので、250μMを高用量群として使用し、また先行する文献において反応性亢進のシステインプロファイリングのために10μMのプローブが適用されたので、10μMのプローブを低用量群として使用した。

10

#### 【0099】

ReACT標識化反応は室温で10分間行い、2回脱塩して遊離のオキサジリジンプローブを除去することにより停止させた。CuAAC反応は、200μMの酸切断性ピオチンアジドプローブ(DMSO中の200×ストック)を使用して上述の方法で標識化タンパク質に対して行った(40、41)。試料を沈殿させ、冷メタノールで洗浄し、250μLの2%のSDS/PBS中に溶解させた。1%のtriton X-100/PBSで溶液を5mLに希釈した。次に、溶液に2mgのストレプトアビジン被覆磁気ビーズ(Promega Corporation)を加え、4で終夜撹拌した。磁気ビーズを1%のtriton X-100/PBS(5mL)、PBS(5mL)、6Mの尿素(5mL)及びPBS(5mL)で洗浄した。

20

#### 【0100】

次に、洗浄したビーズを5mMのTCEPで15分間65で還元し、10mMのヨードアセトアミド(IAA)で30分間37でアルキル化した。オンビーズでのトリプシン(2μgの各試料)消化を37で16時間行った。次に、ビーズをペレット化し、PBS(2×2mL)、水(2×2mL)で洗浄した。磁気ビーズ上の修飾ペプチドを1%のギ酸/水(2×500μL)を使用して室温で30分間切断した後、30分間の撹拌と共に1%のギ酸+50%のアセトニトリル/水(2×500μL)で切断した。溶出液を合わせ、真空濃縮機で濃縮した。Pierce(商標)C18 Spin Column(Thermo Fisher Scientific)によりペプチド試料を脱塩し、分析まで-20に保った。

30

#### 【0101】

硫黄イミド化の速度論的速度定数の決定。UV-vis(Agilent Technologies)の反応速度モデルの下、250nmでのベンズアルデヒドのUV吸光度の経時的な指数関数的増加に従うことにより、PBS緩衝液中の5~40倍過剰のN-アセチル-L-メチオニンを用いて擬一次条件下でOx2の速度定数kを測定した。PBS緩衝液中のOx2(200μM)及びN-アセチル-L-メチオニン(1mM、2mM、4mM、及び8mM)のストック溶液を調製し、水浴により25に保った。等しい体積の調製したストック溶液を混合し、これは5~40当量のN-アセチル-L-メチオニンに対応する。以下の機器パラメーター: 250nm; 1秒当たり10のデータポイントを使用してスペクトルを記録した。反応速度モデルの下でUV-visによりUV吸光度をモニターした。データに単一指数方程式をフィットさせて、指し示した濃度のN-アセチル-L-メチオニンの下での観察された速度k'を得た。異なる濃度のN-アセチル-L-メチオニンから算出された観察された速度k'をN-アセチル-L-メチオニンの濃度に対してプロットしてプロットの傾きから速度定数kを得た。

40

#### 【0102】

ペプチド修飾のLC-MS/MS分析。Proxeon Easy-nLC II HPLC(Thermo Fisher Scientific)及びProxeonナノスプレー供給源と組み合わせたThermo Scientific Q Exactive Orbitrap質量分光計でのLC-MS/MSにより、トリプシン消化したペ

50

プチドを分析した。消化したペプチドを100ミクロン×25mmのMagic C18 100 5 U逆相トラップに入れ、そこでペプチドをオンライン脱塩した後、75ミクロン×150mmのMagic C18 200 3 U逆相カラムで分離した。300 nL / 分の流速で120分の勾配を使用してペプチドを溶出させた。300 ~ 1600のm/z範囲についてMSサーベイスキャンを得、MSスペクトルにおける上位15のイオンを高エネルギー衝突解離(HCD)に供するトップ15法を使用してMS/MSスペクトルを取得した。1.6 m/zのアイソレーション質量ウインドウを前駆体イオン選択のために使用し、27%の正規化された衝突エネルギーをフラグメンテーションのために使用した。5秒の継続時間をダイナミックエクスクルージョンのために使用した。

#### 【0103】

ペプチド修飾の同定。タンデム質量スペクトルを抽出し、荷電状態をProteome Discoverer (Thermo Fisher Scientific)によりデコンボリューションした。X! Tandem (The GPM, thegpm.org; バージョンTORNADO (2013.02.01.1))を使用して全てのMS/MS試料を分析した。Uniprotのヒトデータベース(バージョン11/14/2015、140248エントリー)、一般的な実験室汚染物のcRAPデータベース(www.thegpm.org/crap; 114エントリー)に加えて、消化酵素がトリプシンであると仮定して同数の反転タンパク質配列を検索するようにX! Tandemを設定した。X! Tandemは、20PPMのフラグメントイオン質量許容及び20PPMのパARENTイオン許容で検索した。システインのIAA誘導体は、X! Tandemにおいて固定的修飾として特定された。メチオニン及び他の求核性アミノ酸上の+197.0913の修飾は、X! Tandemにおいて可変的修飾として特定された。Scaffold (バージョンScaffold\_4.0.6.1、Proteome Software Inc.)を使用してMS/MSベースのペプチド及びタンパク質の同定を検証した。ペプチドの同定は、それらが特定のデータベース検索エンジンの閾値を超えている場合に許容した。X! Tandemでの同定は、5ppmの質量の正確性で1.2より大きい少なくとも-Log(予想スコア)のスコアを必要とした。タンパク質の同定は、それらが少なくとも2つの同定されたペプチドを含有した場合に許容した。上記のパラメーターを使用して、デコイ偽発見率(FDR)をタンパク質レベルで1.1%、スペクトルレベルで0.0%と算出した(42)。類似のペプチドを含有し、MS/MS分析のみに基づいて分離できなかったタンパク質を最節約原理を満たすように分類した。

#### 【0104】

共同実験。共同実験を誘導性細胞表面GFP発現系を有するHEK293T生細胞において行った。HEK293T細胞をポリ-リジン被覆チャンバースライド上にプレートした。約25%の密集度で24時間1μM/mLのDox(水中の1000×ストック)を加えて細胞表面にGFPを発現するように細胞を誘導した。次に、細胞を100ng/mLのGFP-Fab-Cy3(PBS中の100×ストック)で1時間処理した。標識した細胞を10%のFBS/DMEM(フェノールレッド非含有)で2回洗浄し、Zen 2009ソフトウェア(Carl Zeiss)を使用して63×油浸対物レンズを有するZeissレーザー走査型顕微鏡710を使用してイメージングを行った。543nmのHeNeレーザーを使用してCy3を励起し、488nmのArレーザーを使用してGFPを励起した。実験の経過全体を通じて37℃で細胞をイメージングした。画像解析及び定量化はImageJ(米国国立衛生研究所)を使用して行った。

#### 【0105】

in vitro ADC細胞毒性アッセイ。1ウェル当たり90μLの増殖培地を有する黒い側面の透明底96ウェルプレートにBT474細胞をプレートした。WT-Fab、WT-Fab+遊離薬物及びADCの10×濃度のワーキングストックを調製した後、5倍の段階希釈として滴定して8ポイントの用量反応曲線を生成した。約50%の密集度の各ウェルにタンパク質試料(10μL)を二連で加えた。細胞をさらに72時間インキュベートした。製造者の使用説明書にしたがってOne Solution Cell

10

20

30

40

50

Proliferation MTS Assay (Promega Corporation) を用いて細胞毒性を測定した。OriginPro (OriginLab Corporation) を用いて細胞生存曲線をプロットした。

#### 【0106】

エノラーゼ活性アッセイ。Synergy (商標) Mx Microplate Reader (BioTek) を用いてWT酵母ENO1及びそのバリエーションの酵素活性を測定した。50 mMのトリス - 酢酸緩衝液 (pH = 7.8) 中のタンパク質試料 (0.2 mg/mL) を二連で100 µMのNaClOで1時間、室温で処理した。Bio-Spin Chromatography Column (Bio-Rad) を用いて2回脱塩することにより、酸化反応を停止させた。酸化処理あり又はなしでのタンパク質試料の活性を製造者の使用説明書にしたがってEnolase Activity Assay Kit (BioVision) により測定した。

10

#### 【0107】

酵母ゲノムの編集。ゲノム編集のためのWT株としてS. cerevisiae株BY4741 (201388; ATCC) を使用した。ノックアウト及び変異株は、報告された通りにCRISPR-Cas9媒介性のゲノム編集プロトコルにより生成した (43)。簡潔に述べれば、ENO2ノックアウト株のために、製造者のプロトコルにしたがってFrozen-EZ Yeast Transformation II (商標) Kit (Zymo Research) を使用して酵母コンピテント細胞 (50 µL) を1.0 µgのpCASプラスミド及び2.0 µgの線状修復DNAで形質転換した。抗生物質を含むYPGプレートに形質転換細胞をプレートした。細胞を37 °Cで終夜、その後30 °Cでさらに48時間生育させた。DNAシーケンシングにより陽性コロニーを確認した。ENO1-M171L (ENO2ヌル) 株について、その後のエノラーゼ1変異のための母株としてENO2ノックアウト株 (pCAS9プラスミドを欠く) を使用した。

20

#### 【0108】

酵母増殖曲線の測定。反応速度モデルを使用して30 °Cでの振とうと共にSynergy (商標) Mx Microplate Reader (BioTek) を用いて酵母増殖曲線を測定した。合成完全 (synthetic complete) を含む酵母窒素基礎培地中で酵母株を静止期まで生育させた。次に、二連で100 µMのNaClOの処理と共に又はそれを伴わずに細胞を新鮮な酵母窒素基礎培地中に1:50に希釈した。600 nmでの吸光度を30分ごとに測定した。

30

#### 【0109】

タンパク質の発現及び精製。GFP-Fabsの生成：ファージディスプレイ法を使用してGFP-Fabsを生成し、以前に記載された通りにpSFV4発現ベクター中に構築した (44)。重鎖A114M、軽鎖V205M、及び鎖間ジスルフィド後に直接的に軽鎖のC末端に部位特異的変異生成によりメチオニン点変異を組み込んだ。以前に記載された通りにC43 (DE3) Pro+細胞中で組換えFabsを生成した (44)。簡潔に述べれば、培養物をOD約0.6まで生育させ、0.2 mMのIPTGを用いて30 °Cで終夜誘導した。プロテインAクロマトグラフィーによりFabsを精製し、その後の貯蔵及び検証アッセイのために緩衝液をPBSに交換した。生細胞への応用のために、組換えFabs溶液中のエンドトキシンをHigh Capacity Endotoxin Removal Spin Column (Thermal Fisher Scientific) により除去した。

40

#### 【0110】

Her-Fabsの生成：Her-Fabの軽鎖及び重鎖をコドン最適化し (45)、以前に記載された通りにpComb3XSS発現ベクター中に構築した (46)。

#### 【0111】

軽鎖のC末端におけるメチオニンノックイン変異は、鎖間ジスルフィド後に直接的に組み込んだ。組換えHer-Fabsを生成し、これもプロテインAクロマトグラフィーに

50

より精製した。ADCへの応用のために、組換えFab s溶液中のエンドトキシンをHigh Capacity Endotoxin Removal Spin Column (Thermal Fisher Scientific)により除去した。

#### 【0112】

酵母エノラーゼ1の生成：酵母エノラーゼ1を酵母(S288C)ゲノムDNAから増幅し、N末端に6×Hisタグを有するpET28a発現ベクターに挿入した。部位特異的変異生成を使用してMet171又は371をLeuに変換した。先行する論文にしたがって組換えタンパク質をBL21(DE3)pLysS(Invitrogen)株中で発現させ、精製した(47、48)。エノラーゼファミリータンパク質の配列アライメントはClustal Omegaプログラムにより行った(49)。

10

#### 【0113】

Octetバイオレイヤー干渉法結合アッセイ。精製したGFP-Fab sを0.05%のTween 20+0.2%のBSA/PBSで300nMの濃度に希釈した。ヒトFabのCH1領域に結合する抗Fabセンサー(ForteBio)にFab試料を固定化した。Octet RED 384システム中の段階希釈した濃度の組換えGFPリガンド(BioVision)を用いて、固定化したセンサーをサンプリングした。得られた結果を、製造者により提供されるプロトコールにしたがってフィッティングした。

#### 【0114】

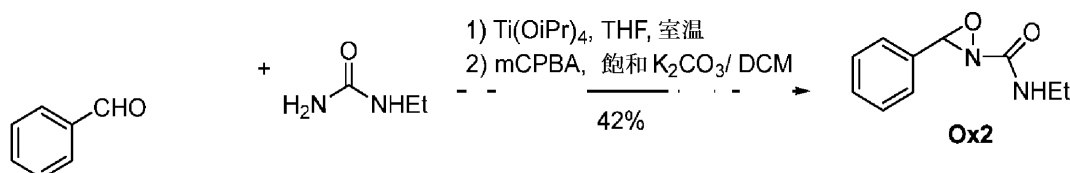
オキサジリジンプローブの化学合成。

#### 【0115】

20

N-エチル-3-フェニル-1,2-オキサジリジン-2-カルボキサミド(Ox2)

#### 【化11】



#### 【0116】

THF(20mL)中のベンズアルデヒド(1.21mL、12mmol)及び1-エチル尿素(880mg、10mmol)の溶液に室温でTi(OiPr)<sub>4</sub>(3.2mL、11mL)を加えた。終夜の攪拌後、混合物を真空下で濃縮して残留物を得た。飽和K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(30mL)及びDCM(30mL)の混合溶液に室温でメタクロロペルオキシ安息香酸(mCPBA、6.9g、純度76%、30mmol)を加えた。10分間の攪拌後、DCM(30mL)中の上記残留物の溶液を室温で混合物中にゆっくりと加えた。さらに6時間攪拌した後、水(100mL)を加え、混合物をDCMで3回抽出した。次に、合わせた有機層を食塩水で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させ、濾過し、真空下で濃縮して残留物を得、これをカラムクロマトグラフィー(DCM/Et<sub>2</sub>O、100:1)により精製して白色固体(802mg、42%)としてOx2を得た。<sup>3</sup>/4 NMR(400MHz、CDCl<sub>3</sub>) 7.52-7.37(m、5H)、6.14(br s、1H)、4.99(s、1H)、3.40-3.23(m、2H)、1.19(t、J=7.3Hz、3H)。<sup>13</sup>C NMR(101MHz、CDCl<sub>3</sub>) 162.23、132.48、131.06、128.69、128.03、79.42、35.45、14.79。m/z HRMS(ESI)検出[M+H]<sup>+</sup>193.0972、C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub><sup>+</sup>は193.0972を必要とする。

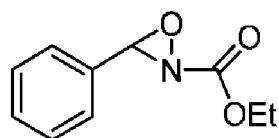
30

40

#### 【0117】

エチル3-フェニル-1,2-オキサジリジン-2-カルボキシレート(Ox1)

## 【化 1 2】



Ox1

## 【0 1 1 8】

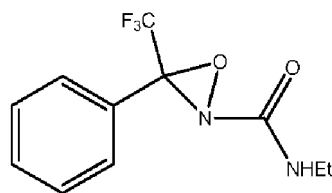
1 - エチル尿素の代わりにエチルカルバメートを使用して O x 2 の作製に使用したのと同じ手順で O x 1 を 20 % の収率で合成した。3 / 4 NMR ( 400 MHz、CDCl<sub>3</sub> ) 7.52

7.38 ( m、5 H )、5.10 ( s、1 H )、4.43 - 4.24 ( m、2 H )、1.36 ( t、J = 7.2 Hz、3 H )。 <sup>13</sup>C NMR ( 101 MHz、CDCl<sub>3</sub> ) 162.23、132.07、131.26、128.78、128.06、78.29、64.78、14.19。 m/z HRMS ( ESI ) 検出 [ M + H ]<sup>+</sup> 216.0631、C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>NNa<sup>+</sup> は 216.0631 を必要とする。

## 【0 1 1 9】

N - エチル - 3 - フェニル - 3 - ( トリフルオロメチル ) - 1,2 - オキサジリジン - 2 - カルボキサミド ( O x 3 )

## 【化 1 3】



## 【0 1 2 0】

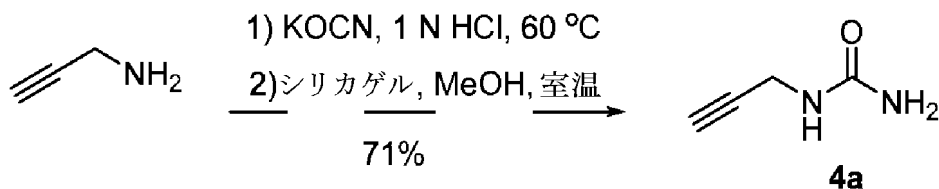
ベンズアルデヒドの代わりに 2,2,2 - トリフルオロ - 1 - フェニルエタン - 1 - オンを使用して O x 2 の作製に使用したのと同じ手順で O x 3 を 10 % の収率で合成した。

3 / 4 NMR ( 400 MHz、CDCl<sub>3</sub> ) 7.58 ( d、J = 7.6 Hz、2 H )、7.50 ( t、J = 7.4 Hz、1 H )、7.42 ( t、J = 7.5 Hz、2 H )、5.82 ( br s、1 H )、3.07 - 2.93 ( m、1 H )、2.93 - 2.80 ( m、1 H )、0.62 ( t、J = 7.2 Hz、3 H )。 <sup>13</sup>C NMR ( 101 MHz、CDCl<sub>3</sub> ) 157.78、131.51、128.57、128.25、124.91、120.90 ( q、J = 281.4 Hz )、82.29 ( q、J = 38.7 Hz )、35.10、14.13。 <sup>19</sup>F NMR ( 376 MHz、CDCl<sub>3</sub> ) - 76.82。 m/z HRMS ( ESI ) 検出 [ M + H ]<sup>+</sup> 261.0846、C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>F<sub>3</sub><sup>+</sup> は 261.0845 を必要とする。

## 【0 1 2 1】

3 - フェニル - N - ( プロパ - 2 - イン - 1 - イル ) - 1,2 - オキサジリジン - 2 - カルボキサミド ( O x 4 )

## 【化 1 4】



## 【0 1 2 2】

水性 HCl 溶液 ( solution ) ( 1.0 N、50 mL ) 中のプロパルギルアミ

10

20

30

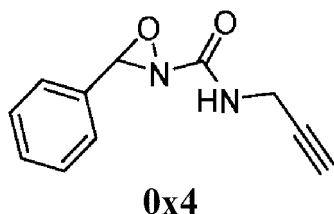
40

50

ン ( 3 . 2 m L 、 5 0 m m o l ) の溶液に室温で K O C N ( 1 6 g 、 2 0 0 m m o l ) を加えた。6 0 での終夜の攪拌後、混合物を 0 に冷却して白色沈殿を得た。濾過後、固体を M e O H ( 1 5 0 m l ) に溶解させ、シリカゲル ( 2 5 g ) と共に 6 時間攪拌した。次に、混合物を濾過し、真空下で濃縮して、さらなる精製なしで所望の尿素 4 a を白色固体 ( 3 . 5 g 、 7 1 % ) として得た。3 / 4 N M R ( 4 0 0 M H z 、 M e O D ) 3 . 8 8 ( d 、 J = 2 . 5 H z 、 2 H ) 、 2 . 5 4 ( t 、 J = 2 . 5 H z 、 1 H ) . <sup>13</sup> C N M R ( 1 2 6 M H z 、 M e O D ) 1 6 1 . 5 5 、 8 1 . 6 3 、 7 1 . 8 0 、 3 0 . 1 8 . m / z H R M S ( E S I ) 検出 [ M + H ] <sup>+</sup> 9 9 . 0 5 5 2 、 C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O <sup>+</sup> は 9 9 . 0 5 5 3 を必要とする。

【化 1 5】

10



【 0 1 2 3】

1 - エチル尿素の代わりに基質として 4 a を使用して O x 2 の作製に使用したのと同じ手順で O x 4 を 2 1 % の収率で合成した。3 / 4 N M R ( 4 0 0 M H z 、 C D C b ) 7 . 5 2 - 7 . 3 5 ( m 、 5 H ) 、 6 . 2 6 ( s 、 1 H ) 、 5 . 0 4 ( s 、 1 H ) 、 4 . 0 9 ( d t 、 J = 5 . 4 、 2 . 7 H z 、 2 H ) 、 2 . 3 1 ( t 、 J = 2 . 6 H z 、 1 H ) . <sup>13</sup> C N M R ( 1 0 1 M H z 、 C D C b ) 1 6 2 . 0 5 、 1 3 2 . 0 8 、 1 3 1 . 1 4 、 1 2 8 . 6 8 、 1 2 8 . 0 2 、 7 9 . 4 4 、 7 8 . 4 2 、 7 2 . 5 4 、 3 0 . 2 1 . m / z H R M S ( E S I ) 検出 [ M + H ] <sup>+</sup> 2 0 3 . 0 8 1 3 、 C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> は 2 0 3 . 0 8 1 5 を必要とする。

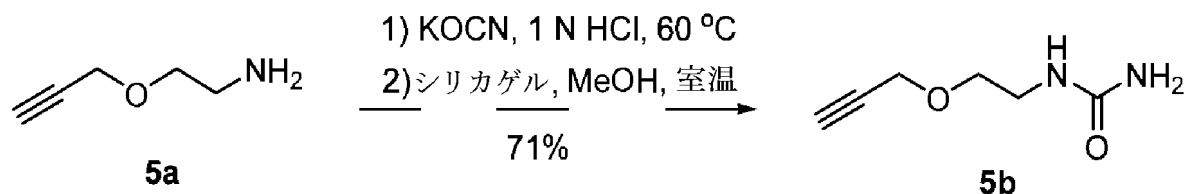
20

【 0 1 2 4】

3 - フェニル - N - ( 2 - ( プロパ - 2 - イン - 1 - イルオキシ ) エチル ) - 1 , 2 - オキサジリジン - 2 - カルボキサミド ( O x 5 )

【化 1 6】

30



【 0 1 2 5】

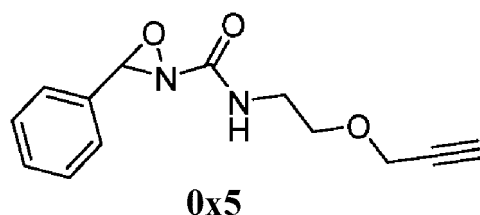
文献にしたがってアミン 5 a を合成した ( 5 0 ) 。水性 H C l 溶液 ( s o l u t i o n ) ( 1 . 0 N 、 1 9 m L ) 中のアミン 5 a ( 1 . 9 g 、 1 8 . 8 m m o l ) の溶液に室温で K O C N ( 7 . 6 g 、 9 4 m m o l ) を加えた。6 0 での終夜の攪拌後、混合物を 0 に冷却した。混合物を、T L C 分析により決定される完全な抽出まで繰り返し酢酸エチルで抽出した。有機層を N a <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> で乾燥させ、濾過し、真空下で濃縮して残留物を得た。M e O H ( 5 0 m L ) 中の残留物の溶液に室温でシリカゲル ( 1 0 g ) を加えた。6 時間の攪拌後、混合物を濾過し、真空下で濃縮して所望の尿素 5 b を油 ( 1 . 9 g 、 7 1 % ) として得た。3 / 4 N M R ( 4 0 0 M H z 、 M e O D ) 4 . 1 9 ( s 、 2 H ) 、 3 . 5 8 ( t 、 J = 5 . 4 H z 、 2 H ) 、 3 . 3 5 - 3 . 2 9 ( m 、 2 H ) 、 2 . 8 7 ( s 、 1 H ) . <sup>13</sup> C N M R ( 1 2 6 M H z 、 C D C h ) 1 6 2 . 1 9 、 8 0 . 5 3 、 7 5 . 9 5 、 7 0 . 1 5 、 5 8 . 9 0 、 4 0 . 7 0 . m / z H R M S ( E S I ) 検出 [ M + H ] <sup>+</sup> 1 4 3 . 0 8 1 5 、 C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> は 1 4 3 . 0 8 1 5 を必要と

40

50

する。

【化 17】



【0126】

1-エチル尿素の代わりに基質として5bを使用してOx2の作製に使用したのと同じ手順でOx5を33%の収率で合成した。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 7.48 - 7.32 (m, 5H), 5.00 (s, 1H), 4.15 (d,  $J = 2.4$  Hz, 2H), 3.67 - 3.57 (m, 2H), 3.52 - 3.42 (m, 2H), 2.48 (t,  $J = 2.5$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 162.44, 132.38, 131.01, 128.63, 127.98, 79.36, 79.30, 75.11, 68.08, 58.36, 40.14. m/z HRMS (ESI) 検出  $[\text{M} + \text{Na}]^+ 269.0893$ ,  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}^+$  は 269.0897 を必要とする。

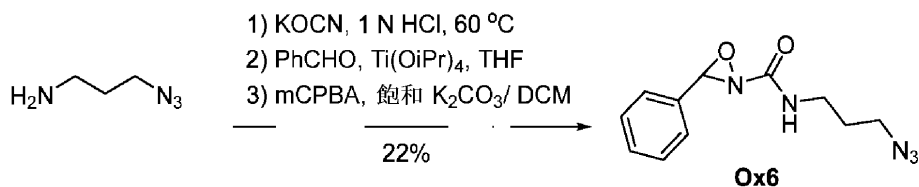
10

【0127】

N-(3-アジドプロピル)-3-フェニル-1,2-オキサジリジン-2-カルボキサミド (Ox6)

20

【化 18】



【0128】

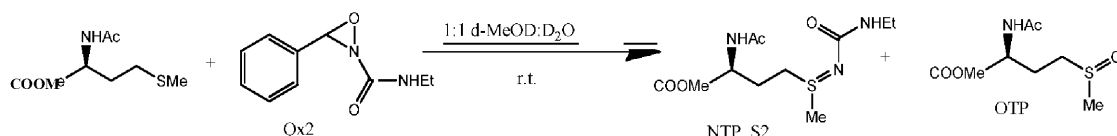
1 N の  $\text{HCl}$  (3 mL) 中のアミン (250 mg, 2.5 mmol) の溶液に  $\text{KOCN}$  (810 mg, 10.0 mmol) を加えた。60 °C での 18 時間の攪拌後、混合物を室温に冷却し、TLC 分析により決定される完全な抽出まで  $\text{DCM}$  で抽出した。合わせた有機層を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させ、濾過し、真空下で濃縮して白色固体として尿素を得た。THF (10 mL) 中のベンズアルデヒド (303  $\mu\text{L}$ , 3.0 mmol) 及び上記尿素の溶液に室温で  $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$  (1.0 mL, 3.5 mmol) を加えた。4 時間の攪拌後、混合物を真空下で濃縮して残留物を得た。飽和  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (15 mL) 及び  $\text{DCM}$  (15 mL) の混合溶液に室温で  $\text{mCPBA}$  (2.6 g, 純度 55%, 7.5 mmol) を加えた。10 分間の攪拌後、 $\text{DCM}$  (15 mL) 中の上記残留物の溶液を室温で混合物中にゆっくりと加えた。15 時間攪拌した後、水 (100 mL) を加え、混合物を  $\text{DCM}$  で 3 回抽出した。次に、合わせた有機層を食塩水で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させ、濾過し、真空下で濃縮して残留物を得、これをカラムクロマトグラフィー ( $\text{DCM} / \text{Et}_2\text{O}$ , 50 : 1) により精製してオキサジリジン Ox6 を油 (138 mg, 22%) として得た。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 7.52 - 7.31 (m, 5H), 6.46 (s, 1H), 4.99 (s, 1H), 3.41 - 3.25 (m, 4H), 1.85 - 1.73 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 162.50, 132.28, 131.06, 128.64, 127.94, 79.37, 49.06, 38.03, 28.55.

30

40

メチオニン及びオキサジリジンのカップリングのための一般的手順

## 【化 19】



## 【0129】

d-MeOD/D<sub>2</sub>O (0.25 mL / 0.25 mL) 中のメチルアセチル-L-メチオニネート (S1、10.3 mg、0.05 mmol) の溶液に室温でオキサジリジン Ox2 (10.6 mg、0.055 mmol) を加えた。NTP (S2) と OTP との間の変換及び比を <sup>1</sup>H NMR によりモニターした。10 分後、溶媒を真空下で除去して残留物を得、これをカラムクロマトグラフィー (DCM/MeOH、5:1) により精製して S2 (13.2 mg、91%) を油として得た。3/4 NMR (400 MHz、MeOD) 4.55 (td、J = 8.5、4.9 Hz、1H)、4.55 (td、J = 8.5、4.9 Hz、1H)、3.14 (q、J = 7.2 Hz、2H)、3.07 - 2.92 (m、2H)、2.66 (s、3H)、2.33 - 2.21 (m、1H)、2.12 - 2.03 (m、1H)、2.01 (s、1.5H)、2.00 (s、1.5H)、1.08 (t、J = 7.2 Hz、3H)。<sup>13</sup>C NMR (101 MHz、MeOD) 173.45、172.84、168.47、53.00、52.82、52.47、45.96、45.74、32.17、31.97、26.36、26.28、22.42、22.38、15.82。m/z HRMS (ESI) 検出 [M+H]<sup>+</sup> 292.1320、C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S<sup>+</sup> は 292.1326 を必要とする。

10

20

## 【0130】

レドックス共役生成物 - スルフィミドの安定性

5 mM の TCEP によるスルフィミド S2 の処理又は 1 N の HCl、1 N の NaOH もしくは共溶媒 (d-MeOD/D<sub>2</sub>O = 1:1) 中 80 によるスルフィミド S3 の処理によりスルフィミドの安定性を試験した。1 時間後及び 18 時間後に NMR により反応をモニターし、NMR データに基づいて反応変換を算出した。スルフィミド S3 は、強い酸性条件下でその塩形態 S4 にプロトン化されることができ、S4 は水溶液中で安定である。

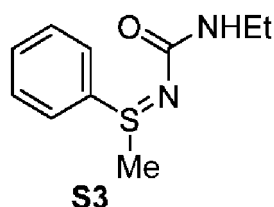
。

## 【0131】

N-エチルカルバミル-S-メチル-S-フェニル硫黄イミン (S3)

30

## 【化 20】



S3

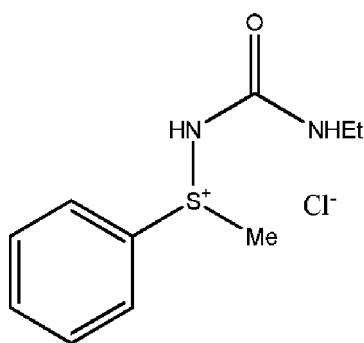
## 【0132】

3/4 NMR (500 MHz、MeOD) 7.81 - 7.75 (m、2H)、7.62 - 7.54 (m、3H)、3.18 (q、J = 7.2、5.9 Hz、2H)、2.86 (s、3H)、1.10 (t、J = 7.2 Hz、3H)。<sup>13</sup>C NMR (126 MHz、MeOD) 168.01、139.36、133.01、130.91、126.97、36.78、35.44、15.89。m/z HRMS (ESI) 検出 [M+H]<sup>+</sup> 211.0987、C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>OS<sup>+</sup> は 211.0900 を必要とする。

40



## 【化 2 1】



10

## 【0 1 3 3】

3 / 4 NMR (400 MHz, MeOD / D<sub>2</sub>O) 8.02 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.84 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.75 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 3.60 (s, 3H), 3.17 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.08 (t, J = 7.2 Hz, 3H).

## 参考文献

1 Stipanuk, M. H. Sulfur Amino Acid Metabolism: Pathways for Production and Removal of Homocysteine and Cysteine. Annual Review of Nutrition 24, 539 - 577, (2004).

20

2 Lehninger, A., Nelson, D. & Cox, M. Lehninger Principles of Biochemistry. (W. H. Freeman, 2008).

3 Levine, R. L., Mosconi, L., Berlett, B. S. & Stadtman, E. R. Methionine Residues as Endogenous Antioxidants in Proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences 93, 15036 - 15040, (1996).

4 Giles, N. M. et al. Metal and Redox Modulation of Cysteine Protein Function. Chemistry & Biology 10, 677 - 693, (2003).

30

5 Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S.-O., Marshall, H. E. & Stamler, J. S. Protein S-Nitrosylation: Purview and Parameters. Nature Reviews Molecular Cell Biology 6, 150 - 166, (2005).

6 D'Autreaux, B. & Toledano, M. B. ROS as Signaling Molecules: Mechanisms That Generate Specificity in ROS Homeostasis. Nature Reviews Molecular Cell Biology 8, 813 - 824, (2007).

40

7 Dickinson, B. C. & Chang, C. J. Chemistry and Biology of Reactive Oxygen Species in Signaling or Stress Responses. Nature Chemical Biology 7, 504 - 511, (2011).

8 Hang, H. C. & Linder, M. E. Exploring Protein Lipidation with Chemical Biology. Chemical Reviews 111, 6341 - 6358, (2011).

9 Paulsen, C. E. & Carroll, K. S. Cysteine-Mediated Redox Signaling: Chemistry, Biology,

50

and Tools for Discovery. Chemical Reviews 113, 4633 - 4679, (2013).

10 Kabil, O., Vitvitsky, V. & Banerjee, R. Sulfur as a Signaling Nutrient Through Hydrogen Sulfide. Annual Review of Nutrition 34, 171 - 205, (2014).

11 Stephanopoulos, N. & Francis, M. B. Choosing an Effective Protein Bioconjugation Strategy. Nature Chemical Biology 7, 876 - 884, (2011).

10

12 Spicer, C. D. & Davis, B. G. Selective Chemical Protein Modification. Nature Communications 5, (2014).

13 Krall, N., da Cruz, F. P., Boutureira, O. & Bernardes, G. J. L. Site-Selective Protein-Modification Chemistry for Basic Biology and Drug Development. Nature Chemistry 8, 103 - 113, (2016).

14 Volgraf, M. et al. Allosteric Control of an Ionotropic Glutamate Receptor with an Optical Switch. Nature Chemical Biology 2, 47 - 52, (2006).

20

15 Weerapana, E. et al. Quantitative Reactivity Profiling Predicts Functional Cysteines in Proteomes. Nature 468, 790 - 795, (2010).

16 Hubbell, W. L., Lopez, C. J., Altenbach, C. & Yang, Z. Technological Advances in Site-Directed Spin Labeling of Proteins. Current Opinion in Structural Biology 23, 725 - 733, (2013).

30

17 Mizukami, S., Hori, Y. & Kikuchi, K. Small-Molecule-Based Protein-Labeling Technology in Live Cell Studies: Probe-Design Concepts and Applications. Accounts of Chemical Research 47, 247 - 256, (2014).

18 Brewer, T. F., Garcia, F. J., Onak, C. S., Carroll, K. S. & Chang, C. J. Chemical Approaches to Discovery and Study of Sources and Targets of Hydrogen Peroxide Redox Signaling Through NADPH Oxidase Proteins. Annual Review of Biochemistry 84, 765 - 790, (2015).

40

19 Serafimova, I. M. et al. Reversible Targeting of Noncatalytic Cysteines with Chemically Tuned Electrophiles. Nature Chemical Biology 8, 471 - 476, (2012).

20 Ostrem, J. M., Peters, U., Sos, M. L., Wells, J. A. & Shokat, K. M. K-Ras (G12C) Inhibitors Allosterically Control GTP Affinity and E

50

ffector Interactions. Nature 503, 548 - 551, (2013).

21 Liu, Q. et al. Developing Irreversible Inhibitors of the Protein Kinase Cysteine. Chemistry & Biology 20, 146 - 159, (2013).

22 Agarwal, P. & Bertozzi, C. R. Site-Specific Antibody-Drug Conjugates: The Nexus of Bioorthogonal Chemistry, Protein Engineering, and Drug Development. Bioconjugate Chemistry 26, 176 - 192, (2015).

10

23 Nomura, D. K., Dix, M. M. & Cravatt, B. F. Activity-Based Protein Profiling for Biochemical Pathway discovery in Cancer. Nature Review Cancer 10, 630 - 638, (2010).

24 Sanman, L. E. & Bogyo, M. Activity-Based Profiling of Proteases. Annual Review of Biochemistry 83, 249 - 273, (2014).

25 Leung, D., Hardouin, C., Boger, D. L. & Cravatt, B. F. Discovering Potent and Selective Reversible Inhibitors of Enzymes in Complex Proteomes. Nature Biotechnology 21, 687 - 691, (2003).

20

26 Johnson, J. A., Lu, Y. Y., Van Deventer, J. A. & Tirrell, D. A. Residue-Specific Incorporation of Non-Canonical Amino Acids into Proteins: Recent Developments and Applications. Current Opinion in Chemical Biology 14, 774 - 780, (2010).

27 McKay, Craig S. & Finn, M. G. Click Chemistry in Complex Mixtures: Bioorthogonal Bioconjugation. Chemistry & Biology 21, 1075 - 1101, (2014).

30

28 Boutureira, O. & Bernardes, G. J. L. Advances in Chemical Protein Modification. Chemical Reviews 115, 2174 - 2195, (2015).

29 Koniev, O. & Wagner, A. Developments and Recent Advancements in the Field of Endogenous Amino Acid Selective Bond Forming Reactions for Bioconjugation. Chemical Society Reviews 44, 5495 - 5551, (2015).

40

30 Zhang, C. et al. - Clamp-Mediated Cysteine Conjugation. Nature Chemistry 8, 120 - 128, (2016).

31 Vinogradova, E. V., Zhang, C., Spokoiny, A. M., Pentelute, B. L. & Buchwald, S. L. Organometallic Palladium Reagents for Cysteine Bioconjugation. Nature 526, 687 - 691, (2015).

32 Wright, T. H. et al. Posttranslational Mutagenesis: A Chemical Strategy for Exploring Protein Side-Chain Diversity. Science

50

e , ( 2 0 1 6 ) .

33 Yang , A . et al . A Chemical Biology Route to Site - Specific Authentic Protein Modifications . Science , ( 2 0 1 6 ) .

34 Gladyshev , V . N . Symposium 6 : Trace Elements S6 - 1 - Selenium and Methionine Sulfoxide Reduction . Free Radical Biology and Medicine 75 , Supplement 1 , S8 - S9 , ( 2 0 1 4 ) .

35 Kaya , A . , Lee , B . C . & Gladyshev , V . N . Regulation of Protein Function by Reversible Methionine Oxidation and the Role of Selenoprotein MsrB1 . Antioxidants & Redox Signaling 23 , 814 - 822 , ( 2 0 1 5 ) .

10

36 Hung , R . - J . et al . Mical Links Semaphorins to F - Actin Disassembly . Nature 463 , 823 - 827 , ( 2 0 1 0 ) .

37 Hung , R . - J . , Pak , C . W . & Terman , J . R . Direct Redox Regulation of F - Actin Assembly and Disassembly by Mical . Science 334 , 1710 - 1713 , ( 2 0 1 1 ) .

20

38 Lee , Byung C . et al . MsrB1 and MICALs Regulate Actin Assembly and Macrophage Function via Reversible Stereoselective Methionine Oxidation . Molecular Cell 51 , 397 - 404 , ( 2 0 1 3 ) .

39 Moskovitz , J . et al . Methionine Sulfoxide Reductase ( MsrA ) is a Regulator of Antioxidant Defense and Lifespan in Mammals . Proceedings of the National Academy of Sciences 98 , 12920 - 12925 , ( 2 0 0 1 ) .

30

40 Lewis , A . K . et al . Oxidation Increases the Strength of the Methionine - Aromatic Interaction . Nature Chemical Biology 12 , 860 - 866 , ( 2 0 1 6 ) .

41 Kramer , J . R . & Deming , T . J . Reversible Chemoselective Tagging and Functionalization of Methionine Containing Peptides . Chemical Communications 49 , 5144 - 5146 , ( 2 0 1 3 ) .

42 Shannon , D . A . & Weerapana , E . Covalent Protein Modification : The Current Landscape of Residue - Specific Electrophiles . Current Opinion in Chemical Biology 24 , 18 - 26 , ( 2 0 1 5 ) .

40

43 Craig , R . & Beavis , R . C . TANDEM : Matching Proteins with Tandem Mass Spectra . Bioinformatics 20 , 1466 - 1467 , ( 2 0 0 4 ) .

44 Junutula , J . R . et al . Site - Specific Conjugation of A Cytotoxic Drug to An Antibody Improves The Therapeutic Index . Nature

50

e Biotechnology 26, 925 - 932, (2008).

45 Speers, A. E. & Cravatt, B. F. A Tandem Orthogonal Proteolysis Strategy for High-Content Chemical Proteomics. Journal of the American Chemical Society 127, 10018 - 10019, (2005).

46 Fothergill - Gilmore, L. A. & Michels, P. A. M. Evolution of Glycolysis. Progress in Biophysics and Molecular Biology 59, 105 - 235, (1993).

10

47 Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. Science 324, 1029 - 1033, (2009).

48 Leonard, P. G. et al. SF2312 is a Natural Phosphonate Inhibitor of Enolase. Nature Chemical Biology advance online publication, (2016).

49 Szychowski, J. et al. Cleavable Biotin Probes for Labeling of Biomolecules via Azide-Alkyne Cycloaddition. Journal of the American Chemical Society 132, 18351 - 18360, (2010).

20

50 Woo, C. M., Iavarone, A. T., Spicciarich, D. R., Palaniappan, K. K. & Bertozzi, C. R. Isotope-Targeted Glycoproteomics (IsoTaG): A Mass-Independent Platform for Intact N- and O-glycopeptide Discovery and Analysis. Nature Methods 12, 561 - 567, (2015).

51 Ryan, O. W. et al. Selection of Chromosomal DNA Libraries Using a Multiplex CRISPR System. eLife 3, e03703, (2014).

30

52. D. T. Hess, A. Matsumoto, S. - O. Kim, H. E. Marshall, J. S. Stamler, Protein S-nitrosylation: Purview and parameters. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6, 150 - 166 (2005).

53. B. D'Autreaux, M. B. Toledano, ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8, 813 - 824 (2007).

40

54. B. C. Dickinson, C. J. Chang, Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. Nat. Chem. Biol. 7, 504 - 511 (2011).

55. H. C. Hang, M. E. Linder, Exploring protein lipidation with chemical biology. Chem. Rev.

111, 6341 - 6358 (2011).

56. O. Kabil, V. Vitvitsky, R. Banerjee, Sulfur as a signaling nutrient through hydrog

50

en sulfide. *Annu. Rev. Nutr.* 34, 171 - 205 (2014).

57. M. Volgraf, P. Gorostiza, R. Numan, R. H. Kramer, E. Y. Isacoff, D. Trauner, Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. *Nat. Chem. Biol.* 2, 47 - 52 (2006).

58. J. A. Johnson, Y. Y. Lu, J. A. Van Deventer, D. A. Tirrell, Residue-specific incorporation of non-canonical amino acids into proteins: Recent developments and applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14, 774 - 780 (2010).

10

59. N. Stephanopoulos, M. B. Francis, Choosing an effective protein bioconjugation strategy. *Nat. Chem. Biol.* 7, 876 - 884 (2011).

60. W. L. Hubbell, C. J. Lopez, C. Altenbach, Z. Yang, Technological advances in site-directed spin labeling of proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23, 725 - 733 (2013).

61. Q. Liu, Y. Sabnis, Z. Zhao, T. Zhang, S. J. Bhurlage, L. H. Jones, N. S. Gray, Developing irreversible inhibitors of the protein kinase cystinome. *Chem. Biol.* 20, 146 - 159 (2013).

20

62. C. S. McKay, M. G. Finn, Click chemistry in complex mixtures: Bioorthogonal bioconjugation. *Chem. Biol.* 21, 1075 - 1101 (2014).

63. O. Koniev, A. Wagner, Developments and recent advancements in the field of endogenous amino acid selective bond forming reactions for bioconjugation. *Chem. Soc. Rev.* 44, 5495 - 5551 (2015). 64. N. Krall, F. P. da Cruz, O. Boutureira, G. J. L. Bernardes, Site-selective protein-modification chemistry for basic biology and drug development. *Nat. Chem.* 8, 103 - 113 (2016).

30

65. P. J. Vithayathil, F. M. Richards, Modification of the methionine residue in the peptide component of ribonuclease - S. J. *Biol. Chem.* 235, 2343 - 2351 (1960).

40

66. C. Kleanthous, J. R. Coggins, Reversible alkylation of an active site methionine residue in dehydroquinase. *J. Biol. Chem.* 265, 10935 - 10939 (1990). Medline

67. J. R. Kramer, T. J. Deming, Preparation of multifunctional and multireactive polypeptides via methionine alkylation. *Biomacromolecules* 13, 1719 - 1723 (2012).

68. T. L. Gilchrist, C. J. Moody, The chemistry of sulfilimines. *Chem. Rev.* 77, 409 - 435 (19

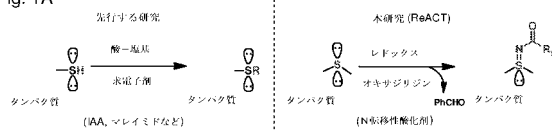
50

77) .

69. K. S. Williamson, D. J. Michaelis, T. P. Yoon, Advances in the chemistry of oxaziridines. Chem. Rev. 114, 8016 - 8036 (2014) .

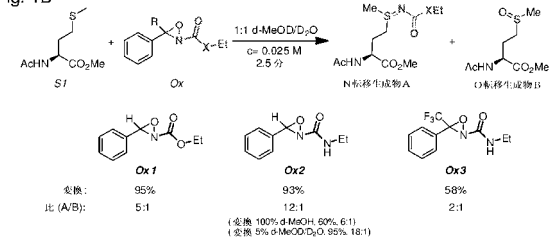
【図 1 A】

Fig. 1A



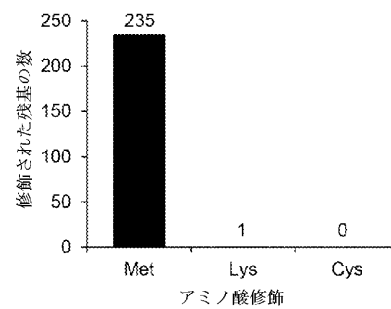
【図 1 B】

Fig. 1B



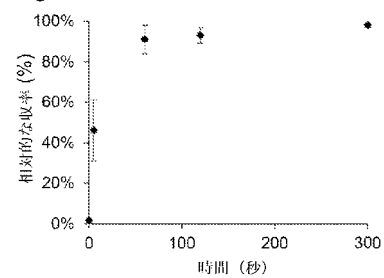
【図 1 C】

Fig. 1C



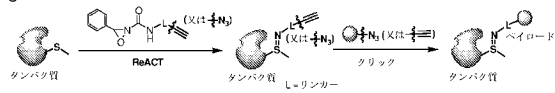
【図 1 D】

Fig. 1D



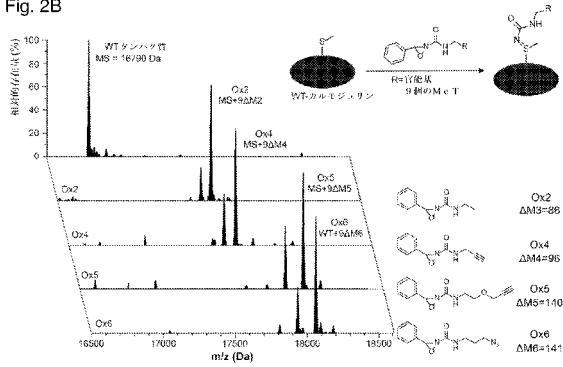
## 【 図 2 A 】

Fig. 2A



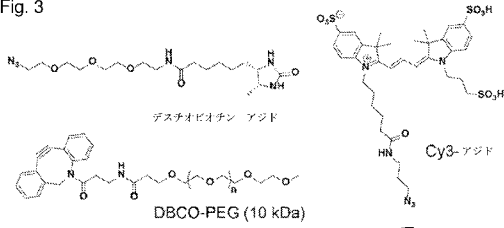
## 【 図 2 B 】

Fig. 2B



## 【 図 3 】

Fig. 3





## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/61412

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

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☒ Claims Nos.: 12  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

See Supplemental Box

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-11, 13

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 17/61412

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC(8) - A61K 31/33, C07D 273/00 (2018.01)  
CPC - C07D 491/044, C07D 498/04

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)

See Search History Document

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

See Search History Document

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

See Search History Document

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Armstrong et al. 'Efficient nitrogen transfer from aldehyde-derived N-acyloxaziridines', Tetrahedron Letters, 14 June 2003 (14.06.2003), Vol.44, pages5335-5338; p5335, p5336	1-3, 5-7, 13
Y		4, 8-11
Y	Vinogradova et al. 'Organometallic palladium reagents for cysteine bioconjugation', Nature, 28 October 2015 (28.10.2015), Vol.526, pages687-691; p689 p690	4, 8-11
A	US 2008/0214393 A1 (Jeanguenat et al.) 04 September 2008 (04.09.2008); entire document	1-11, 13
A	Gnamm et al. 'Novel diamide insecticides: Sulfoximines, sulfonimidamides and other new sulfonimidoyl derivatives', Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 12 April 2012 (12.04.2012), Vol.22, pages3800-3806; entire document	1-11, 13

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

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 February 2018

Date of mailing of the international search report

05 MAR 2018

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450  
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300  
PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/61412

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-11 and 13, drawn to a method of chemoselective conjugation comprising reacting an N-transfer oxidant with a thioether substrate in an aqueous environment to form a conjugation product or the compound of formula I

Group II: Claims 14-17, drawn to a compound of formula IIIa or IVa

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

**Special Technical Features**

Group I does not require a compound of formula IIIa or IVa, as required by Group II

Group II does not require a method of chemoselective conjugation comprising reacting an N-transfer oxidant with a thioether substrate in an aqueous environment to form a conjugation product or the compound of formula I, as required by Group I

**Shared Common Features**

There is no shared technical feature between groups I and II.

Groups I and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

**Note Re: Item 4:**

Claim 12 is determined unsearchable because it is a dependent claim and is not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	
C 1 2 N 9/00 (2006.01)	C 1 2 N 9/00 1 0 1	

(81)指定国・地域 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, JO, JP, KE, KG, KH, 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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1 . T R I T O N

2 . T W E E N

(74)代理人 100137213

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823

弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100151448

弁理士 青木 孝博

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川崎 洋祐

(74)代理人 100203035

弁理士 五味渕 琢也

(74)代理人 100185959

弁理士 今藤 敏和

(74)代理人 100160749

弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255

弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100202267

弁理士 森山 正浩

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 リン, シーシャン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 4 7 0 4、パークリー、シャタック・アベニュー・2 1 5 0、スイート・5 1 0

(72)発明者 ヤン, シャオユウ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 4 7 0 4、パークリー、シャタック・アベニュー・2 1 5 0、スイート・5 1 0

(72)発明者 トーステ, エフ.・ディー・ン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４７０４、バークリー、シャタック・アベニュー・２１５０  
、スイート・５１０

(72)発明者 チャン, クリストファー・ジェー.

アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４７０４、バークリー、シャタック・アベニュー・２１５０  
、スイート・５１０

F ターム(参考) 4B050 CC10

4C056 AA10 AB01 AC01 AD01 AE01 AF01 FA04 FB01 FC07

4C076 CC41 DD48 EE41 EE59 FF70 GG22

4H045 AA10 AA20 BA50 CA40 DA01 DA50 DA75 DA86 DA89 EA60