

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5886324号
(P5886324)

(45) 発行日 平成28年3月16日 (2016. 3. 16)

(24) 登録日 平成28年2月19日 (2016. 2. 19)

(51) Int. Cl.	F I
CO7D 495/04 (2006.01)	CO7D 495/04 I O 3
GO1N 33/53 (2006.01)	CO7D 495/04 C S P
GO1N 33/566 (2006.01)	GO1N 33/53 D
GO1N 27/62 (2006.01)	GO1N 33/53 U
CO7K 14/705 (2006.01)	GO1N 33/566

請求項の数 14 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-552130 (P2013-552130)
 (86) (22) 出願日 平成24年1月30日 (2012. 1. 30)
 (65) 公表番号 特表2014-506879 (P2014-506879A)
 (43) 公表日 平成26年3月20日 (2014. 3. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/000392
 (87) 国際公開番号 W02012/104051
 (87) 国際公開日 平成24年8月9日 (2012. 8. 9)
 審査請求日 平成27年1月21日 (2015. 1. 21)
 (31) 優先権主張番号 11000731.7
 (32) 優先日 平成23年1月31日 (2011. 1. 31)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 500466913
 アイトゲネシッシェ テヒニッシェ ホー
 ホシューレ チューリッヒ
 Eidgenoessische Tec
 hnische Hochschule
 Zuerich
 スイス国 チューリッヒ レーミシュトラ
 ーセ 101
 Raemistrasse 101, C
 H-8092 Zuerich, Swi
 tzerland
 (74) 復代理人 100118072
 弁理士 醍醐 美知子

最終頁に続く

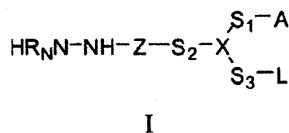
(54) 【発明の名称】 三官能性架橋剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式 I の三官能性架橋剤であって、

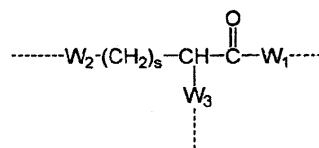
【化 1】



前記式中、

X は、下記式 II のコア構造であり、

【化 2】



前記式中、

点線は、基 S_1 、 S_2 、 S_3 への W_1 、 W_2 、 W_3 の結合を表し、
 W_1 は、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ であり、かつ
 W_2 、 W_3 は、互いに独立に $-COO-$ 、 $-OOC-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ から選択される官能基であり、かつ
 s は 1 ~ 12 であり、

A は、アフィニティー基であり、当該アフィニティー基は、特定の結合相手に対する結合アフィニティーにより、アフィニティー精製法を用いて三官能性架橋剤の分離及び単離を可能にするものであり、

S_1 、 S_2 、 S_3 は、互いに独立に、

(i) 単結合、又は

(ii) 直鎖又は分枝、置換又は非置換の C (1 ~ 24) アルキレン

から選択されるスペーサー基であり、

ここで 1 個又は複数の $-CH_2-$ 基は、互いに独立に 1 個又は複数の架橋基により、及び/又は非置換の又は置換シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリールにより置換されていてもよい；但し、ヘテロ原子は、互いに直接に結合しておらず、

L は、 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、及び $-CH=CH-COOH$ から成る群から選択される 反応性官能基と、アリール若しくはアルキル活性化カルボン酸エステルのうち以下に示される N-ヒドロキシスクシンイミドエステルであるアミン反応基と、から選択される リガンド反応基 であり、

【化 3】



Z は、アリール又はヘテロアリールであり、かつ

HR_N-NH- はヒドラゾニルであるヒドラジン保護基か、 HR_N-NH- 中の R_N は、トリフルオロアセチル、*t*-ブトキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニル、及びフルオレニルメチルオキシカルボニルから選択されるヒドラジン保護基である、前記三官能性架橋剤。

【請求項 2】

W_1 及び W_3 は、 $-NH-$ であり、かつ W_2 は、 $-CONH-$ である、請求項 1 に記載の三官能性架橋剤。

【請求項 3】

L は、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルである、請求項 1 から 2 までのいずれか 1 項に記載の三官能性架橋剤。

【請求項 4】

S_1 、 S_2 、 S_3 は、互いに独立に直鎖又は分枝、置換又は非置換の C (1 ~ 24) アルキレンであり、

ここで 1 個又は複数の $-CH_2-$ 基は、互いに独立に 1 個又は複数の架橋基により、及び/又は非置換若しくは置換シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリールにより置換されていてもよい；但し、ヘテロ原子は、互いに直接に結合していない、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項に記載の三官能性架橋剤。

【請求項 5】

S_1 、 S_2 、 S_3 は、互いに独立に、式 (a) 及び/又は (b) :

(a) $-[Y_1-(CH_2)_n]_p-$

(b) $-[Y_2-(CH_2)_m-Y_3]_q-$

の 1 つ又は複数の繰り返し単位、又はそれらの組合せを有する直鎖であり、前記式中、

Y_1 、 Y_2 、 Y_3 は互いに独立に、 $-O-$ 、 $-CO-$ 、 $COO-$ 、 $-OCO-$ 、 $-O-CO-O-$ 、 $-OCH_2-$ 、 $-CH_2O-$ 、 $-NR_1-$ 、 $-NR_1-CO-$ 、 $-CO-NR_1-$

10

20

30

40

50

から選択される基であり、

ここで R_1 は、H 又は C (1 ~ 6) - アルキルを表し、かつ
n、m、p 及び q は、互いに独立に 1 ~ 10 の整数である、
請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項に記載の三官能性架橋剤。

【請求項 6】

$H R_N - NH -$ がヒドラゾニルか、 $H R_N - NH -$ 中の R_N がトリフルオロアセチルである、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項に記載の三官能性架橋剤。

【請求項 7】

Z は、非置換若しくは置換フェニル、ナフチル、及びアントラセニルから選択されるアリール基、又は非置換若しくは置換ピリジル、フリル、イミダゾリル、ベンズイミダゾリル、ピリミジニル、チエニル、キノリニル、インドリル、及びチアゾリルから選択されるヘテロアリール基である、請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項に記載の三官能性架橋剤。

10

【請求項 8】

A は、ピオチンであり、かつ / 又は
 $H R_N - NH -$ がヒドラゾニルであるか、 $H R_N - NH -$ 中の R_N がトリフルオロアセチルであり、かつ / 又は

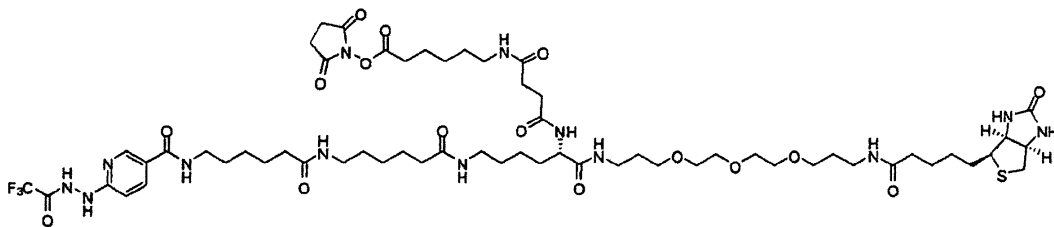
L は、N - ヒドロキシスクシンイミドエステルである、
請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項に記載の三官能性架橋剤。

【請求項 9】

下記式：

20

【化 4】



を有する、請求項 1 から 8 までのいずれか 1 項に記載の三官能性架橋剤。

30

【請求項 10】

請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の三官能性架橋剤を有するキット。

【請求項 11】

リガンドと標的の糖タンパク質レセプターとの相互作用を特徴付け、かつ分析するための、請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の三官能性架橋剤、又は請求項 10 に記載のキットの使用。

【請求項 12】

標的の糖タンパク質レセプターは、細胞表面又は分泌された糖タンパク質である、請求項 11 に記載の使用。

【請求項 13】

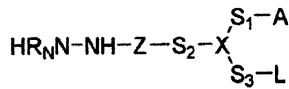
40

リガンドと、試料中の少なくとも 1 つの炭水化物残基を有する標的の糖タンパク質レセプターとの間の特異的相互作用を同定する方法であって、ここで、リガンドは標的の糖タンパク質レセプター上のリガンド - 特異的ドメインを認識し、次の工程：

i) 標的の糖タンパク質レセプターを有する試料を用意する工程、
i i) 標的の糖タンパク質レセプターを酸化処理し、少なくとも 1 つの炭水化物残基上にアルデヒド官能基を生じさせることにより、酸化された標的の糖タンパク質レセプターを得る工程、

i i i) 請求項 1 による下記式 I

【化5】



I

の三官能性架橋剤を用意し、前記式中、置換基は請求項1から9のいずれか1項で規定した通りであり、かつリガンド反応基を前記リガンドに共役させて、リガンド-架橋剤-複合体を得る工程、

10

i v) (a) リガンドが標的の糖タンパク質レセプター上のリガンド特異的ドメインに結合でき、及び(b) 保護されたヒドラジン基がその遊離型に変換され、かつ酸化された標的の糖タンパク質レセプターと反応できる条件下に、試料とリガンド-架橋剤-複合体を接触させ、ペプチド結合二重複合体を得る工程、

v) ペプチド結合二重複合体を試料から単離し、かつ精製する工程、

v i) ペプチドを工程(i v)で得られた精製ペプチド結合二重複合体から遊離し、遊離ペプチドを得る工程、及び

v i i) 工程v)で得られた遊離ペプチドを高い質量精度の質量分析法により分析及び定量化する工程、及び

v i i i) コントロール反応との定量的比較により、リガンドと標的の糖タンパク質レセプターの間の相互作用を同定する工程

20

を有する、前記方法。

【請求項14】

請求項13に記載の方法であって、

(a) 糖タンパク質は、溶液中又は細胞の表面上にあり、かつ/又は

(c) 工程(v)が、初めに試料を酵素消化し、処理された細胞試料を得て、引き続き処理された細胞試料のアフィニティー精製を行うことによる、試料からのペプチド結合二重複合体の単離及び精製を含み、かつ/又は

(d) 工程(v i)が、グリコシダーゼ処理を行い、遊離ペプチドを得ることによる、工程(v)で得られた精製されたペプチド結合二重複合体からのペプチドの遊離を含む、

30

前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、(i) 標的の糖タンパク質レセプター上に少なくとも1つの結合部位を有する対象のリガンドに共役するリガンド反応基、(i i) 酸化されたレセプター-グリコペプチドを獲得する、場合により保護された芳香族ヒドラジン基、(i i i) 獲得したグリコペプチドを検出、単離及び精製するアフィニティー基を有する三官能性架橋剤、該製法ならびにリガンドと、生細胞上及び生体液中のそれらの相応する糖タンパク質標的レセプターとの間で検出、同定及び特徴付けするための方法におけるそれらの使用に関する。

40

【0002】

本発明の背景

グリコシル化は、最も卓越したタンパク質変性のうちの1つであり、殆どでは無いにしても、ホ乳動物細胞により生産される分泌性かつ膜結合性のタンパク質の多くは、共有結合したグリカンを有する(Varki, A.等、Essentials of Glycobiology, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009)。複合生物の構築では、このようなオリゴ糖タンパク質は、分泌されたタンパク質及び細胞表面タンパク質のフォールディング、細胞内局在、ターンオーバー、活性及び相互作用の様々な構造及び機能的役割に役立つ。

【0003】

50

分泌された糖タンパク質には、例えば、サイトカイン、ホルモン、増殖分化因子、酵素、神経ペプチド、血管拡張神経、抗原認識分子、免疫制御分子、構造的糖タンパク質及びその他の生理活性分子が含まれる。それらのタンパク質は、多くの認識事象、例えば、細胞から細胞へのシグナリング、免疫応答、アポトーシス、宿主-病原体相互作用及び多くの疾患の病原で重要である。それにより、特定の標的レセプターにとって、このような糖タンパク質の特異性は、細胞から細胞への伝達の制御において重要である。よって、分泌された糖タンパク質とそれらの標的のリガンド結合相互作用の同定及び特徴付けは、生物学的情報伝達の分子レベルの理解にとって重要である。

【0004】

同様に、タンパク質、ペプチド、ホルモン、化学分子、医薬品又は毒物のようなりガンドによる細胞表面糖タンパク質レセプター(CSRs)の会合は、細胞微小環境から細胞への情報の伝送を可能にする。この細胞表面情報の出入り口は、細胞応答に重要であるにもかかわらず、多くの機能的リガンドに関するレセプターは未知のままである。これは、主に疎水性の膜レセプタータンパク質の同定の科学技術的限界ならびにそれらの相応するCSRsとのリガンドの一時的な低い親和性相互作用による。従って、多くのシグナルタンパク質及び分子は、公知の一次分子標的の無いオフターゲット作用又は疾病関連シグナルネットワークの個々のメカニズムの分子レベルの詳細な理解にとって、現在は存在しない計り知れないほど貴重な情報である。

【0005】

生物学的システムにおける一時的なりガンド-レセプター相互作用を同定する有望なアプローチは、相互作用する分子の化学架橋に続く、相互作用する相手の質量分析による同定である。現在公知で市販されている架橋剤は、一般的に溶液中の単離タンパク質と接触するタンパク質のマッピングでそれらを使用するために設計されてきた。例えば、ホモ二官能性又はヘテロ二官能性架橋剤(切断可能な又はアイソトープコード化誘導体を含む)は、タンパク質の化学架橋、続いて架橋ペプチドの酵素消化及びタンパク質及びタンパク質複合体の三次元構造をマッピングするために質量分析による同定に使用されてきた(JMS(2003)第38巻、(12)1225~37頁)。しかし、このような分子で得られた架橋ペプチド種は、一般的に極めて低い相対存在度であり、及び架橋ペプチドにより生産されるマススペクトルのバイオフィオルマティック解析は困難な課題のままである。これは複雑な生物学的試料において架橋部位の同定、特にリガンドとそれらの相応するレセプターの一般的な一時的相互作用の検出を妨害する。

【0006】

複合試料から架橋ペプチドを特異的に富化するために、相互作用するタンパク質を獲得するための2つの反応部位(一般的にアミン反応性、スルフヒドリル-反応性又は光反応性)と、引き続き獲得したペプチドを富化するアフィニティー基(通常はビオチン)の組み合わせを有する三官能性架橋剤が開示されている(J Am Soc Mass Spectrom(2005)第16巻(12)1921~31頁)。これらの架橋剤が単離タンパク質及びタンパク質複合体の位相構造のマッピングに首尾よく使用されてきたのに対して、それらの化学的性質は、生細胞から由来する複合試料における一時的なタンパク質-タンパク質相互作用の検出にはそれらの架橋剤を不適切なものにする。

【0007】

これは、生体液のような生物学的微小環境又は生細胞の原形質膜との会合において、標的の糖タンパク質レセプターと相互作用するリガンドのプロベリング、同定及び特徴付けを特異的に補助できる適切な試薬の必要性を強調する。出願者の知り得る限りでは、現在のところ公知のどの架橋剤も、公知のリガンドと、複合体及び生細胞の表面のような自然環境における未知の糖タンパク質レセプター結合相手の間の特異的相互作用の共有結合安定化を可能にする構造的必要条件ならびに引き続く質量分析法による同定を満たすことができない。

【0008】

10

20

30

40

50

出願者は、三官能性架橋剤の新規クラス（以後、本発明の架橋剤とも称される）が、従来技術の標的レセプターのリガンドベースの同定に特有の問題を克服できることを見出した。本発明の架橋剤は、リガンドと、生細胞上又は近い生理学的条件が当てはまる生体液中の高い感度及び特異性を有する標的の糖タンパク質レセプターとの間のリガンド-レセプター相互作用を不偏検出、及び特徴付けするために使用できる。従って、この方法はオーファンリガンド、例えば、タンパク質、ペプチド、脂肪、エンジニアード・アフィニティー結合剤、化学分子、薬剤、ウイルス又は細菌のような未知の標的レセプターを同定するために利用できる。従って、新規架橋剤は複雑な情報の入り口としてヒトのサーフェソーム及びセクレトームの理解に科学技術的基礎ならびにそれらの固有の微小環境内で殆ど全ての記述のオーファンリガンドに関する標的の糖タンパク質レセプターを同定する方法を提供する。

10

【0009】

本発明の要約

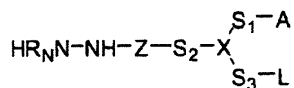
本発明は、第一の態様では3個の分枝を有するコア構造を有する三官能性架橋剤に関し、その際、各分枝は種々の官能基を有する（よって、前記架橋剤はヘテロ三官能性とも称される）。第一の分枝は、酸化された糖タンパク質と反応できる保護された又は保護されていない芳香族ヒドラジンを含む。第二の分枝は、選択したリガンドに共役してもよいリガンド反応基を含む。第三の分枝は、精製する目的のアフィニティー基を含み、有利には、第一と第二の官能性により獲得されたペプチドをアフィニティー精製する目的がある。これらのリガンドには特に関心がある。それというのも、1つの分子内での異なる3つの官能基の組合せがユニークであり、及び様々なバイオメディカル用途、例えば、リガンドと標的の糖タンパク質レセプターとの間の相互作用の検出及び特徴付けで使用できるからである。

20

【0010】

より具体的には、本発明は式 I :

【化1】



30

I

[式中、

X は、コア構造であり、

A は、アフィニティー基であり、

S₁、S₂、S₃は、互いに独立にスペーサー基であり、

L は、リガンド反応基であり、

Z は、アリアル又はヘテロアリアルであり、及び

HR_N-NH- がヒドラゾニルであるか、HR_N-NH- 中の R_N が H 又はヒドラジン保護基である]

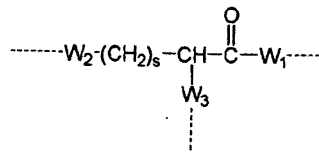
40

の三官能性の架橋剤に関する。

【0011】

有利な実施態様では、X は、式 I I

【化2】



II

[式中、

点線は、基 S_1 、 S_2 、 S_3 への W_1 、 W_2 、 W_3 の結合を表し、 W_1 は、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 及び W_2 、 W_3 は、互いに独立に $-\text{COO}-$ 、 $-\text{OOC}-$ 、 $-\text{CONH}-$ 、 $-\text{NHCO}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ から選択される官能基であり、及び s は 1 ~ 12 である]

の基である。

【0012】

幾つかの実施態様では、 L は、(i) 反応性官能基、有利には $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、及び $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ から成る群から選択される反応性官能基であり、又は

(ii) アミン反応基、ヒドロキシル反応基、チオール反応基、アルデヒド反応基又はケト反応基及びカルボキシ反応基から成る群から選択される活性化された官能基である。

【0013】

他の実施態様では、 A はビオチンのようなアフィニティー基である。

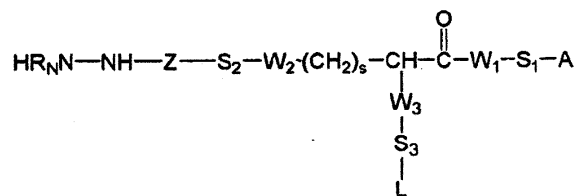
【0014】

更なる実施態様では、スペーサー基 S_1 、 S_2 、 S_3 は、互いに独立に (i) 単結合又は (ii) 直鎖又は分枝、置換又は非置換の $\text{C}(1 \sim 24)$ アルキレンであり、その際、1 個又は複数の、有利には隣接しない $-\text{CH}_2-$ 基は、互いに独立に 1 個又は複数の架橋基により置換されていてもよい及び/又は非置換若しくは置換シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリアル、ヘテロアリアルにより置換されていてもよい；但し、 O 及び N のようなヘテロ原子は、互いに直接に結合していない。

【0015】

特定の実施態様では、本発明の三官能性架橋剤は式 III

【化3】



III

[式中、

 A は、アフィニティー基であり、 L は、リガンド反応基であり、 S_1 、 S_2 、 S_3 は、互いに独立にスペーサー基であり、 Z は、アリアル又はヘテロアリアルであり、

$\text{HR}_N\text{-NH-}$ はヒドラゾニルであるか、 $\text{HR}_N\text{-NH-}$ 中の R_N は H 又はヒドラジン保護基であり、

 W_1 は、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ であり、

10

20

30

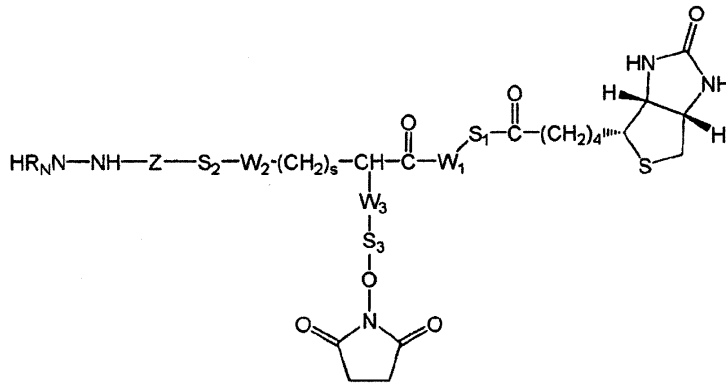
40

50

W_2 、 W_3 は、互いに独立に、 $-COO-$ 、 $-OOC-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ から選択される官能基であり、及び
 s は、1～12である]
 の構造を有する。

【0016】

有利な実施態様では、本発明の三官能性架橋剤は式VII
 【化4】



VII

[式中、

S_1 、 S_2 、 S_3 は、互いに独立にスペーサー基であり、

W_1 は、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ であり、

W_2 、 W_3 は、互いに独立に、 $-COO-$ 、 $-OOC-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ から選択される官能基であり、

Z は、アリール又はヘテロアリールであり、

HR_N-NH- はヒドラゾニルであるか、 HR_N-NH- 中の R_N はH又はヒドラジン保護基であり、及び

s は、1～12である]
 の構造を有する。

【0017】

他の実施態様では、本発明はリガンドと標的の糖タンパク質レセプター（例えば、細胞表面又は分泌された糖タンパク質レセプター）の間の相互作用を特徴付け及び分析するための、本発明の三官能性架橋剤の使用にも関する。

【0018】

もう1つの態様では、本発明はリガンドと、試料中の少なくとも1つの炭水化物残基を有する標的の糖タンパク質レセプターの間の特定の相互作用を同定する方法にも関し、その際、リガンドは標的の糖タンパク質レセプターにおいてリガンドに特異的なドメインを認識し、次の工程を有する：

i) 前記の標的の糖タンパク質レセプターを有する試料を用意する工程、

ii) 標的の糖タンパク質レセプターを酸化処理し、少なくとも1つの炭水化物残基上にアルデヒド官能性を生じさせることにより、酸化された標的の糖タンパク質レセプターを得る工程、

iii) 3個の異なる分枝、(保護)ヒドラジン基、リガンド反応基、アフィニティー基を有する本発明による三官能性架橋剤（例えば、式I、III、V、VI, VII、VIII、IXによる三官能性架橋剤）を用意し、かつリガンド反応基を前記リガンドに共役できるようにし、リガンド-架橋剤-複合体を得る工程、

iv) (a) リガンドが、標的の糖タンパク質レセプター上のリガンドに特異的なドメインに結合でき、及び(b) 保護されたヒドラジン基がその遊離型に変換され、かつ酸化された標的の糖タンパク質レセプターと反応できる条件下に、試料とリガンド-架橋剤-複合体を接触させ、ペプチド結合二重複合体を得る工程、

- v) ペプチド結合二重複合体を試料から単離かつ精製する工程、
v i) ペプチドを工程 i v) で得られた精製ペプチド結合二重複合体から遊離し、遊離ペプチドを得る工程、及び
v i i) 工程 v) で得られた遊離ペプチドを高い質量精度の質量分析法により分析及び定量する工程、
v i i i) コントロール反応との定量比較により、リガンドと標的の糖タンパク質レセプターとの相互作用を同定する工程。

【0019】

本発明の更なる実施態様では、3つの異なる分枝上に、(保護)ヒドラジン基、リガンド反応基及びアフィニティー基を有する本発明による三官能性架橋剤(例えば、本明細書中で定義したような三官能性架橋剤)を有するキットに関する。

10

【0020】

本発明の詳細な説明

特記されない限り、説明を通して以下の定義を使用することにする：

本明細書中で使用されているような"1つの"という用語は、特記されない限り少なくとも1つを意味する。本明細書中で使用されているような"含む"とは、制限のない包含を意味する。"複数"という用語は、2つ又はそれより多い数を意味する。

【0021】

"三官能性"という用語は、"3個の官能基を有する"ことを意味する。従って、三官能性(架橋)剤とは、3個の官能基を有する(架橋)剤を意味する。"ヘテロ三官能性"とは、

20

"3個の異なる官能基を有する"ことを意味する。

【0022】

"(相互)結合"又は"相互作用"という用語は、相互親和性又は結合能力を示す相応の分子対(例えば、リガンド/標的の糖タンパク質レセプター)の間の相互関係のいずれかのタイプを意味する。相互関係は、例えば、相互反応性を示す化学的反応基(ドナー/アクセプター、酸/塩基など)の相応する対の間で生じてよい。模範的な結合事象には、これらに限定されるわけではないが、疎水性相互作用、親水相互作用、水素結合、ファンデルワールス力、イオン性相互作用、非イオン性相互作用、静電相互作用、共有結合及びそのようなものが含まれる。結合事象の性質により、相互作用は異なるレベル、すなわち、一時的又は永久的、弱い又は強い結合であってもよいことが解釈される。

30

【0023】

本発明は、新規ヘテロ三官能性架橋剤ならびに標的の糖タンパク質レセプター(生細胞又は分泌された糖タンパク質上の原形質膜糖タンパク質を含む)とのリガンド相互作用を不偏検出するための、ダイレクトな定量的質量分析法によるワークフローにおけるそれらの使用にも関する。

【0024】

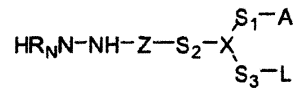
従って、第一の態様では本発明は、3個の分枝を有するコア構造を有する三官能性架橋剤にも関し、その際、それぞれの分枝は、種々の官能基を有する(従って、該架橋剤はヘテロ三官能性とも称される)。第一の分枝は、酸化された糖タンパク質と反応できる保護された又は保護されていない芳香族ヒドラジンを含む。第二の分枝は、選択したリガンドに共役してもよいリガンド反応基を含む。第三の分枝は、精製目的のアフィニティー基を含み、有利には、第一と第二の官能基により獲得されたペプチドのアフィニティー精製の目的がある。1つの分子中でのこれらの3つの異なる官能基の組合せが独特であり、及びリガンドと標的タンパク質レセプターの間での検出及び特徴付けのような様々なバイオメディカルの用途で使用されているので、これらの試薬には特に関心がある。

40

【0025】

より具体的には、本発明は式I：

【化5】



I

[式中、

Xは、コア構造であり、 S_1 、 S_2 、 S_3 は互いに独立に、スペーサー基であり、Lは、リガンド反応基であり、Aはアフィニティー基であり、Zはアリーール又はヘテロアリーールであり、及び R_1 は、H又はヒドラジン保護基である]

の三官能性架橋剤を提供する。

【0026】

本明細書中で使用されているような"アルキル"という用語は、1~24個、有利には1~12個の炭素原子を有する直鎖又は分枝の炭化水素を意味する。アルキル基の例には、メチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、i-ブチル及びt-ブチル、ペンチル、ヘキシルが含まれるが、これらに限定されるわけではない。"アルコキシ"という用語は、-o-アルキル基を意味する。

【0027】

本明細書中で使用されているような"アルキレン"という用語は、例えば、-CHR-(CHR)_n- (Rは、H又は選択された置換基である)のような炭化水素から誘導される二価のラジカルを意味する。通常は、アルキレン基は1~24個の炭素原子(すなわち、n=24)、有利には10~24個の炭素原子を有する。本明細書中で使用されているような"ヘテロアルキレン"という用語は、アルキルラジカル中に挿入された1個又は複数のヘテロ原子、例えば、O、N又はS、有利にはO又はNを有するアルキレンを意味する。

【0028】

本明細書中で使用されているような"アリーール"という用語は、6炭素-単環芳香族環系、10炭素-二環芳香族環系、14炭素-三環芳香族環系を意味し、その際、各環は非置換であるか又は1~4個の置換基を有していてもよい。アリーール基の例には、フェニル、ナフチル及びアントラセニルが含まれるが、これらに限定されるわけではない。本明細書中で使用されているような"フェニレン"という用語は、有利には1,2-,1,3-又は1,4-フェニレン基を意味し、これは場合により置換されている。

【0029】

"シクロアルキル"という用語は、3~12個の炭素を有する飽和の及び部分的に不飽和の環式炭化水素基を意味する。シクロアルキル基の例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペンテニル、シクロヘキシル、シクロヘキセニル、シクロヘプチル及びシクロオクチルが含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0030】

"ヘテロアリーール"という用語は、1個又は複数のヘテロ原子(例えば、O、N又はS)を有する芳香族5~8員-単環系、8~12員-二環系、又は11~14員-三環系を意味する。ヘテロアリーール基の例には、ピリジル、フリル、イミダゾリル、ベンズイミダゾリル、ピリミジニル、チエニル、キノリニル、インドリル及びチアゾリルが含まれる。ピリジルには、2-ピリジル、3-ピリジル及び4-ピリジル、有利には2-ピリジルが含まれる。"ヘテロアラルキル"という用語は、1個のヘテロアリーール基で置換されたアルキル基を意味する。

【0031】

"ヘテロシクロアルキル"という用語は、1個又は複数のヘテロ原子(例えば、O、N又はS)を有する非芳香族の5~8員-単環系、8~12員-二環系、又は11~14員-

10

20

30

40

50

三環系を意味する。

【0032】

ヘテロシクロアルキル基の例には、ピペラジニル、ピロリジニル、ジオキサニル、モルホリニル及びテロヒドロフラニル、グルコシルが含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0033】

シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリール、ヘテロアリールは、非置換であるか、又は1～4個の置換基を有していてもよい。

【0034】

置換基の例には、少なくとも1つのハロ、ヒドロキシル、アミノ、シアノ、ニトロ、メルカプト、カルボキシ、又はアルキル、アルケニル、アルキルアミノ、ジアルキルアミノから選択されるヒドロカルビル基、又は1～6個の炭素原子を有するアルコキシ基が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

10

【0035】

模範的なヒドロカルビル置換シクロアルキル基には、2-メチルシクロプロピル、2-エチルシクロプロピル、2-メチルシクロブチル、3-メチルシクロブチル、2-メチルシクロペンチル、2,3-ジメチルシクロペンチル、3-イソ-プロピルシクロペンチル、2,6-ジメチルシクロヘキシル、4-(t-ブチル)シクロヘキシル、2-ビニルシクロヘキシル、3-アリルシクロペンチル、3,4-ジアリルシクロペンチル、1-(4-ピリジニル)ピペリジニル、1-(4-ピリジニルメチル)ピペリジニル、4-(4-ピリジニル)ピペリジニル、4-(4-ピリジニル)ピペラジン-1-イル、及びビシクロヘキシル基が含まれる。

20

【0036】

模範的なヒドロカルビル置換シクロアルケニル基には、3-メチル-3-シクロペンテン-1-イル、3,4-ジメチル-3-シクロペンテン-1-イル、2-イソ-プロピル-2-シクロペンテン-1-イル、2,3-ジエチル-2-シクロペンテン-1-イル、4-ビニル-1-シクロヘキセン-1-イル、3,4-ジエチル-3-シクロペンテン-1-イル及び3,4-ジアリル-3-シクロペンテン-1-イル基が含まれる。

【0037】

模範的なヘテロカルビル置換アリール基には、トリル、メシチル、キシリル、クメニル、シメニル、3,5-ジ(t-ブチル)フェニル、2-メチルナフチル、2-ビニルフェニル、2-ビニルベンジル、2-ビニルナフチル、4-シクロヘキシルフェニル、ピフェニル、4-(4-ピペリジニル)ピリジニル及びp-テルフェニル基が含まれる。

30

【0038】

模範的なヒドロカルビル置換ヘテロアリール基には、2-メチルピリジン-1-イル、2-エチルピリジン-1-イル、3-ビニルイミダゾール-1-イル、2-メチルイミダゾール-1-イル、2-メチルキノキサリン-1-イル、1-アリルベンゾトリアゾリル、2,2'-ビピリジル、4,4'-ビピリジル、4-メチルピラジニル、4-(ピリジニルメチル)-ピリジニル、4-ベンジルピテジニル、ニコチンアミジル、2-メチルフラニル、5-メチルフルフリルアミノ、2-メチルチオフェニル、4-メチルオキサゾリル、2,5-ジフェニル-4-メチルオキサゾリル及び4-メチルチアゾリル基が含まれる。

40

【0039】

"ハロゲン"という用語は、クロロ、フルオロ、ブロモ又はヨード置換基、有利にはクロロ又はフルオロ置換基を意味する。

【0040】

本明細書中で使用されているような"場合により置換された"という用語は、Hal、-OR、-CN、-NO₂、-COOR、C(1~8)アルキル、C(1~8)アルキレン、C(1~8)アルコキシ(ここで、Rは1~8個の炭素原子である)による置換を意味する。

50

【0041】

有利な実施態様では、架橋剤は水溶性であり、及び生物相溶性である。

【0042】

"水溶性"という用語は、一般的に24での材料と水の全質量に対する、1質量%よりも多い水中での材料の溶解度を意味する。水溶解性は、本発明の架橋剤の親水性の性質により、より具体的には、A、L、X、Z、S₁、S₂、S₃及びR_Nの1つ又は複数の基の親水基の性質により与えられると解釈される。当業者は、どの化学基を選択すれば十分な親水性の架橋剤が得られるのかが分かるであろう。有利な実施態様では、スペーサー基S₁、S₂及びS₃の1つ又は複数が、より親水性の特徴の官能基を有し、結果として得られる架橋剤の親水性を増してもよい。

10

【0043】

"生物相溶性"という用語は、ヒト細胞、組織又は体液に関する化学的不活性さならびに生命体に対する架橋剤の最小毒性効果を意味する。

【0044】

コア構造Xは、スペーサー基S₁、S₂及びS₃ならびに官能基A、L及び芳香族ヒドラジン基から成る3個の分枝上に形成することができるどの構造であってもよい。従って、コア構造は有利には以後定義するような、有利には、カルボキシル、アミノ、ヒドロキシル、チオールのような3個の反応性官能基、又は3個のスペーサー基の結合部位のようなものを有する。

【0045】

通常は、コア構造及びスペーサー基は、3個の分枝の間(よって3個の官能基A、L及び芳香族ヒドラジン基の間)で無視できるか又は立体干渉性が無いように設計される。

20

【0046】

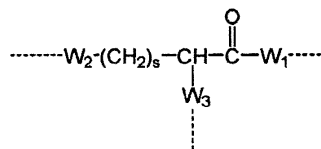
幾つかの実施態様では、コア構造Xは置換された炭化水素、例えば、置換されたアルキル基、例えば、トリ-又はテトラ-置換された炭素原子、例えば、 $\text{-NH-CH(R}_{AA}\text{)-COOH}$ (R_{AA}は、アミノ酸側鎖である)の炭素である。従って、Xは反応基を有する側鎖R_{AA}を有する天然又は非天然のアミノ酸であってもよい。天然アミノ酸の例には、例えば、リジン、セリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システインなどが含まれる。非天然アミノ酸の例には、例えば、相応するD-アミノ酸、ホモセリン及びそのようなものが含まれる。これらの実施態様では、3つのスペーサー基S₁、S₂、S₃は

30

【0047】

従って、特定の実施態様では、Xは式I I

【化6】



II

40

[式中、

点線は、基S₁、S₂、S₃へのW₁、W₂、W₃の結合を表し、

W₁は、 -NH- 、 -O- 、 -S- であり、及び

W₂、W₃は、互いに独立に -COO- 、 -OOC- 、 -CONH- 、 -NHCO- 、 -NH- 、 -O- 、 -S- から選択される官能基であり、及びsは1~12である]

の基であってもよい。

【0048】

有利な1実施態様では、W₁とW₃は、 -NH- であり、及びW₂は、 -CONH- である。式I Vの基の中で、3つの官能基のいずれか1つは、3個のリンカーS₁、S₂、S₃

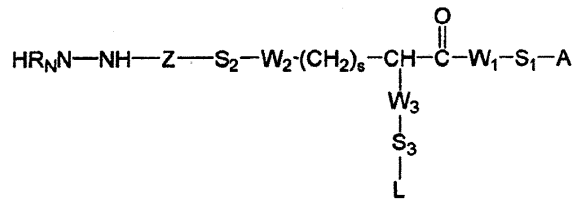
50

のいずれかに結合することができることが解釈される。有利な実施態様では、 W_1 は、 S_1 に結合し、 W_2 は S_2 に結合し、及び W_3 は S_3 に結合する。

【0049】

従って、他の特定の実施態様では、本発明の三官能性架橋剤は式 I I I

【化7】



10

III

[式中、

A はアフィニティー基であり、

L はリガンド反応基であり、

S_1 、 S_2 、 S_3 は、互いに独立にスペーサー基であり、

Z は、アリール又はヘテロアリールであり、

$\text{HR}_N-\text{NH}-$ はヒドラゾニルであるか、 $\text{HR}_N-\text{NH}-$ 中の R_N は H 又はヒドラジン - 保護基であり、

W_1 は、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ であり、

W_2 、 W_3 は、互いに独立に $-\text{COO}-$ 、 $-\text{OOC}-$ 、 $-\text{CONH}-$ 、 $-\text{NHCO}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ から選択される官能基であり、及び

s は 1 ~ 12 である]

の化合物である。

【0050】

有利な実施態様では、s はメチル、エチル、n - プロピル、イソ - プロピル、n - ブチル、イソ - ブチル、sec - ブチル、tert - ブチル、n - ペンチル、イソ - ペンチル、sec - ペンチル、ネオ - ペンチル、1, 2 - ジメチルプロピル、n - ヘキシル、イソ - ヘキシル、n - ヘプチル、n - オクチルである。

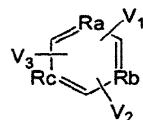
20

30

【0051】

他の実施態様では、コア構造は置換アリール又はヘテロアリール基であることができ、これは少なくとも三回置換されている、有利には式 I V

【化8】



40

IV

[式中、

V_1 、 V_2 、 V_3 は、互いに独立に官能基、例えば、カルボキシ、アミン、ヒドロキシル、チオールであり、及び R_a 、 R_b 、 R_c は、互いに独立に O 又は N である]

の三官能性 6 員環アリール又はヘテロアリール基である。

【0052】

更に他の実施態様では、コア構造は線状又は環状グリセロールから、又は糖部分から誘導されていてもよい。本明細書に記載されている三官能性架橋剤の製造で使用できる選択

50

的（及び特異的に除去可能な）保護基を有する様々な糖が入手可能である。

【0053】

当業者は、他の様々なコア構造がスペーサー基及び官能基にとって必要な足場を提供できることに気付くであろう。

【0054】

本発明の三官能性架橋剤の官能基Lは、リガンド反応基、例えば、反応性官能基又は活性化された官能基であり、これはスペーサーを選択したリガンドに結合するために使用され、かつこのように三官能性架橋剤を特定の標的の糖タンパク質レセプターに向ける。

【0055】

本明細書中で使用されているような“反応性官能基”という用語は、本明細書では保護されていない遊離官能基を意味する（特記されない限り）。特定の実施態様では、反応性官能基は、-COOH、-NH₂、-OH、-SH、及び-CH=CH-COOHから成る群から選択される。

10

【0056】

本明細書中で使用されているような“活性化された官能基”という用語は、架橋剤を用いる標準の化学技術により相応の活性化された反応性官能基が得られる反応性官能基を意味する。反応性官能基又は活性化された官能基は、リガンド上に存在するそれらの対の反応基と反応できる。

【0057】

活性化された官能基は、それらの特異的な反応性によって下位群に分けることができる。従って、特定の実施態様では、活性化された官能基は、アミン反応基、ヒドロキシル反応基、チオール反応基、アルデヒド反応基又はケト反応基ならびにカルボキシ反応基から成る群から選択される。

20

【0058】

“アミン反応基”は、（第一又は第二）アミンと反応する活性化された官能基である。通常のアミン反応基には、例えば、アリール又はアルキル活性化カルボン酸エステル-COOR、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル又はその誘導体（例えば、スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）、フェノールエステル又はその誘導体（例えば、ここでRはフェノール、p-ニトロフェノール、テトラフルオロフェノールである）が含まれる。他のアミン反応基には、アシルクロリド（-COCl）、アリール及びアルキルイミデート-C(NH)OMeならびにアルキル又はアリールイソシアネート-NCO又はイソチオシアネート-NCsが含まれる。

30

【0059】

“ヒドロキシル反応基”は、ヒドロキシルと反応する活性化された官能基である。通常ヒドロキシル反応基には、例えば、アルキル又はアリールイソシアネート-NCO、及びアリール又はアルキル活性化カルボン酸エステル-COORが含まれる。

【0060】

“チオール反応基”は、チオールと反応する活性化反応基である。通常チオール反応基には、例えば、マレイミド又はハロアミド（-NH-CO-CH₂-Hal）が含まれる。

40

【0061】

“アルデヒド反応基又はケト反応基”は、（第一又は第二）アルデヒド又はケトンと反応する活性化された官能基である。通常アルデヒド反応基又はケト反応基には、例えば、アリール又はアルキルヒドラジン（-NHNH₂）、アリール又はアルキルアシルヒドラジン（-CO-NHNH₂）、アルキル又はアリールヒドロキシルアミン（-ONH₂）が含まれる。

【0062】

“カルボキシ反応基”は、カルボキシル基と反応する活性化された官能基である。通常カルボキシ反応基には、例えば、ハロゲン、アルキル-又はアリールスルホネート、ヒドロキシル、エポキシ、メルカプト、アミノ、イソシアナト及びカルボジイミド基が含まれ

50

る。

【 0 0 6 3 】

反応性官能基を活性化するために使用される活性化剤の例には、1 - ヒドロキシベンゾ
 トリアゾール (H O B t)、3 - ヒドロキシ - 3, 4 - ジヒドロ - 1, 2, 3 - ベンゾト
 リアジン - 4 - オン (H O O B t)、N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S)、ジシク
 ロヘキシルカルボジイミド (D C C)、ジイソプロピルカルボジイミド (D I C)、1 -
 エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド (E D A C)、2 - (1
 H - 7 - アザベンズトリアゾール - 1 - イル) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウロニウ
 ムヘキサフルオロホスフェート (H A T U)、2 - (1 H - ベンゾトリアゾール - 1 - イ
 ル) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (H B T U) 10
)、3, 4 - ジヒドロ - 1, 2, 3 - ベンゾトリアジン - 4 - オン - 3 - オキシテトラメ
 チルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (H D T U)、ベンゾチアゾール - 1 - イル
 オキシトリス (ジメチルアミノ) ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (B O P)、
 ベンゾトリアゾール - 1 - イルオキシトリス - (ピロリジノ) - ホスホニウムヘキサフル
 オロホスフェート (P y B o p)、(3, 4 - ジヒドロ - 1, 2, 3 - ベンゾトリアジン
 - 4 - オン - 3 - オキシ) ジエチルホスフェート (D E P B t)、3, 4 - ジヒドロ - 1
 , 2, 3 - ベンゾトリアジン - 4 - オン - 3 - オキシトリス (ピロリジノ) - ホスホニウ
 ムヘキサフルオロホスフェート (P D O P)、2 - (ベンゾトリアゾール - 1 - イルオキ
 シ) - 1, 3 - ジメチル - 2 - ピロリジン - 1 - イル - 1, 3, 2 - ジアザホスホリジニ
 ウムヘキサフルオロホスホネート (B O M P)、5 - (1 H - 7 - アザベンズトリアゾー
 ル - 1 - イルオキシ) - 3, 4 - ジヒドロ - 1 - メチル 2 H - ピロリウムヘキサクロロア
 ンチモネート (A O M P)、(1 H - 7 - アザベンズトリアゾール - 1 - イルオキシ) ト
 リス (ジメチルアミノ) ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (A O P)、5 - (1
 H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 3, 4 - ジヒドロ - 1 - メチル 2 H - ピロリウム
 ヘキサクロロアンチモネート : N - オキシド (B D M P)、2 - ブロモ - 3 - エチル - 4
 - メチルチアゾリウムテトラフルオロボレート (B E M T)、2 - ブロモ - 1 - エチルピ
 リジニウムテトラフルオロボレート (B E P)、2 - ブロモ - 1 - エチルピリジニウムヘ
 キサククロロアンチモネート (B E P H)、N - (1 H - ベンゾトリアゾール - 1 - イルメ
 チレン) - N - メチルメタンアミニウムヘキサクロロアンチモネート N - オキシド (B O
 M I)、N, N' - ビス (2 - オキソ - 3 - オキサゾリジニル) ホスフィンクロリド (B 30
 O P - C l)、1 - (1 H - ベンゾトリアゾール - 1 - イルオキシ) フェニルメチレンピ
 ロリジニウムヘキサクロロアンチモネート (B P M P)、1, 1, 3, 3 - ビス (テトラ
 メチレン) フルオロウロニウムヘキサフルオロホスフェート (B T F F H)、クロロ (4
 - モルホリノ) メチレンモルホリニウムヘキサフルオロホスフェート (C M M M)、2 -
 クロロ - 1, 3 - ジメチル - 1 H - ベンズイミダゾリウムヘキサフルオロホスフェート (C
 M B I)、2 - フルオロ - 1 - エチルピリジニウムテトラフルオロボレート (F E P)
 、2 - フルオロ - 1 - エチルピリジニウムヘキサクロロアンチモネート (F E P H)、1
 - (1 - ピロリジニル - 1 H - 1, 2, 3 - トリアゾロ [4, 5 - b] ピリジン - 1 - イ
 ルメチレン) ピロリジニウムヘキサフルオロホスフェート N - オキシド (H A P y U)、
 O - (1 H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - N, N, N', N; - ビス (ペンタメチ
 レン) ウロニウムヘキサフルオロホスフェート (H B P i p U)、O - (1 H - ベンゾ
 トリアゾール - 1 - イル) - N, N, N O, N O - ビス (テトラメチレン) ウロニウムヘキ
 サフルオロホスフェート (H B P y U)、(1 H - 7 - アザベンズトリアゾール - 1 - イ
 ルオキシ) トリス (ピロリジノ) ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (P y A O P)
)、プロモトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (P y B r O p)、
 クロロトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (P y C l O P)、1,
 1, 3, 3 - ビス (テトラメチレン) クロロウロニウムヘキサフルオロホスフェート (P
 y C l U)、テトラメチルフルオロマニジウムヘキサフルオロホスフェート (T F F H)
 、トリホスゲン、トリアジンベース剤 [シアヌル酸クロリド、シアヌル酸フルオリド、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 50

10

20

30

40

50

ウムクロリド (DMT-MM)、2-クロロ-4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン (CDMT)]、ビス(2-クロロフェニル)ホスホクロリデート、ジフェニルホスホクロリデート、ジフェニルホスホアジド (DPPA) 及びこれらのいずれかの組合せが含まれるが、しかしこれらに限定されるわけではない。

【0064】

リガンド反応基と、リガンド上の反応基の多くの組合せは変化可能であることが理解され、かつ当業者は、どのリガンド反応基を選択して選択したリガンドと結合させるのか分かるであろう。

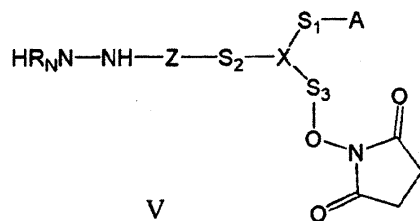
【0065】

特定の実施態様では、活性化された官能基は有利にはアミン反応基であり、有利にはアリール又はアルキル活性化カルボン酸エステル-COORであり、最も有利にはN-ヒドロキシスクシンイミドエステルである。

【0066】

従って、特定の実施態様では本発明の三官能性架橋剤は式V

【化9】



[式中、

Xは、コア構造であり、

S₁、S₂、S₃は、互いに独立にスペーサー基であり、

Aは、アフィニティー基であり、

Zは、アリール又はヘテロアリールであり、及び

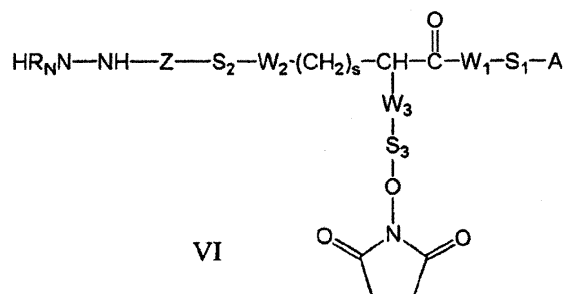
HR_N-NH-はヒドラゾニルであるか、HR_N-NH-中のR_NはH又はヒドラジン保護基である]

の化合物である。

【0067】

コアXが -アミノ酸である場合には、本発明の三官能性架橋剤は式VI

【化10】



[式中、

Aは、アフィニティー基であり、

S₁、S₂、S₃は、互いに独立にスペーサー基であり、

Zは、アリール又はヘテロアリールであり、

HR_N-NH-はヒドラゾニルであるか、HR_N-NH-中のR_NはH又はヒドラジン保護基であり、

W₁は、-NH-、-O-、-S-であり、

10

20

30

40

50

W_2 、 W_3 は、互いに独立に $-COO-$ 、 $-OOC-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ から選択される官能基であり、及び s は 1 ~ 12 である]
の化合物であってもよい。

【0068】

本発明の三官能性架橋剤の官能基 A は、獲得したペプチドを検出、同定及び精製するための、有利にはアフィニティー精製するためのアフィニティー基である。

【0069】

本明細書で使用されているような"アフィニティー基"という用語は、検出、同定及び精製する目的の他の組成物（場合により固体担体、例えばビーズ、フィルター、プレート、膜、クロマトグラフ樹脂等のようなものに結合又はリンクしている）により特異的に結合できる同定可能なタグ、基、又は部分を意味する。多くの様々な種類のアフィニティー基が当業者に周知であり、及び本発明の方法で個々に又は 1 つ又は複数の種々のアフィニティー基の組合せで使用されてもよいことが理解される。模範的なアフィニティー基には、発蛍光団、ラジオアイソトープ、色原体、酵素、抗原（エピトープタグを含むが、これに限定されるわけではない）、重金属、染料、燐光性基、化学発光基、電気化学的検出部分、結合タンパク質、リン光体、希土類金属キレート、近赤外染料、電気化学発光基及びそのようなものが含まれるが、これらに限定されるわけではない。

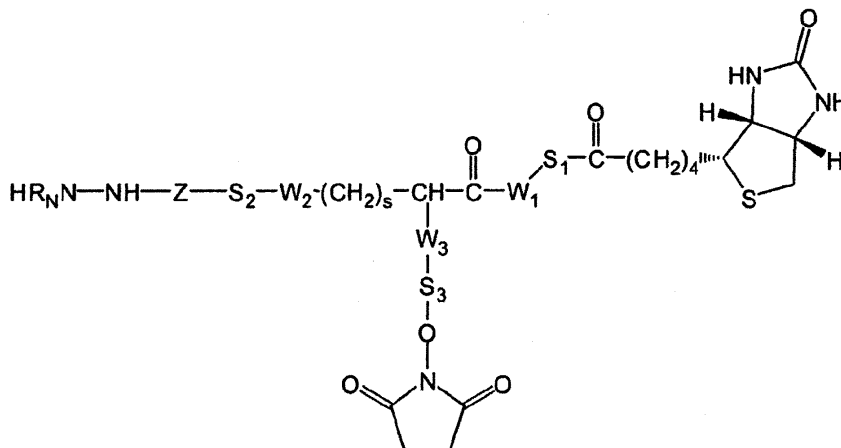
【0070】

本発明の三官能性架橋剤で使用するために特に適切なアフィニティー基には、特定の結合相手（通常は固体担体、例えばビーズ、クロマトグラフ樹脂及びそのような物の上で不動態化される）に対する（可逆性）結合アフィニティーにより、アフィニティー精製法を用いて三官能性架橋剤の分離及び単離を可能にするアフィニティー基が含まれる。このようなアフィニティー基の例には、例えば、小さな化学化合物（例えば、ビオチン/アビジンならびにこれらの誘導体、グルタチオン/GST）及び短鎖アミノ酸配列、通常は 2 ~ 20 アミノ酸長さ、及び有利には 4 ~ 12 アミノ酸長さ（例えば、抗体断片又は（ヒスチジン）₆タグ、（ロイシン）₃タグ、FLAGタグ又は c-Mycタグ）、核酸配列（例えば、DNA、RNA 又は PNA）、又は蛍光タグが含まれる。これらの全てのアフィニティータグは、当該分野ではよく確立していて、かつ市販されている。有利な実施態様では、アフィニティー基はビオチン及びそれらの誘導体、炭水化物及びグリカンから成る群から、最も有利にはビオチン及びその誘導体から選択される。

【0071】

従って、更なる特定の実施態様では、本発明の三官能性架橋剤は式 VII

【化11】



VII

[式中、

10

20

30

40

50

S_1 、 S_2 、 S_3 は、互いに独立にスペーサー基であり、
 W_1 は、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ であり、
 W_2 、 W_3 は、互いに独立に $-COO-$ 、 $-OOC-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ から選択される官能基であり、
 Z は、アリアル又はヘテロアリアルであり、
 HR_N-NH- がヒドラゾニルであるか、 HR_N-NH- 中の R_N が、 H 又はヒドラジン-
 保護基であり、及び
 s は1~12である]
 の化合物である。

【0072】

10

コア構造へ結合するのは3個のスペーサー基 S_1 、 S_2 、 S_3 であり、これらはコア構造を式Iの化合物による個々の官能基 L 、 A 及び芳香族ヒドラジン基に結合する。

【0073】

上記のように、3つのスペーサー基は、立体的クラウディングが最小化されるように及び3つの官能基 A 、 L 及び芳香族ヒドラジン基の反応性が妥協しないように選択されてもよい。芳香族ヒドラジン基及びリガンド反応基 L を有するリンカー S_2 及び \backslash 又は S_3 のバリエーションは、結合部位の近接度を走査できるようにし、かつ対象の標的レセプタータンパク質上もしくは隣接する分子上に存在し得る種々の糖タンパク質を獲得できるようにする。

【0074】

20

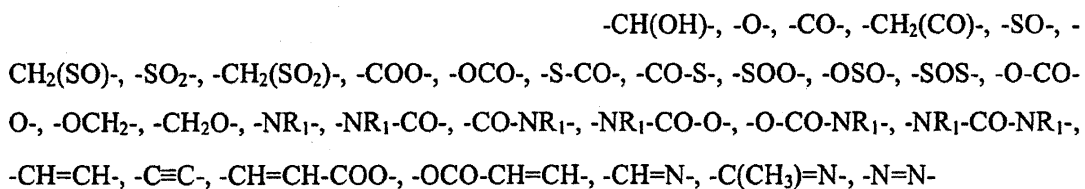
本明細書中で使用されているような"スペーサー"という用語は、通常は単結合又は直鎖又は分枝鎖、置換又は非置換の $C(1\sim 24)$ アルキレンであり、その際、1個又は複数の、有利には隣接しない $-CH_2-$ 基は、互いに独立に1個又は複数の架橋基及び \backslash 又は非置換若しくは置換シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、アリアル、ヘテロアリアルにより置換されていてもよい；但し、 O 及び N のようなヘテロ原子は、互いに直接結合していない。架橋基は、アルキレン鎖中の $-CH_2-$ 基又は末端の $-CH_2-$ 基を置換してもよい。

【0075】

本明細書中で使用されているような"架橋基"は、次のもの：

【化12】

30



[式中、

R_1 は、水素原子又は $C(1\sim 6)$ アルキル、又はそれらの組合せを表す]
 から選択される。有利な架橋基には、 $-CH(OH)-$ 、 $-O-$ 、 $-CO-$ 、 $-CH_2(CO)-$ 、 $-COO-$ 、 $-OCO-$ 、 $-O-CO-O-$ 、 $-OCH_2-$ 、 $-CH_2O-$ 、 $-NR_1-$ 、 $-NR_1-CO-$ 、 $-CO-NR_1-$ 、 $-NR_1-CO-O-$ 、 $-O-CO-NR_1-$ 、 $-NR_1-CO-NR_1-$ 、 $-CH=CH-$ 、 $-CH=N-$ 、 $-C(CH_3)=N-$ (式中、 R_1 は H 又は $C(1\sim 6)$ アルキル、又はそれらの組合せを表す)が含まれる。より有利な架橋基には、 $-CH(OH)-$ 、 $-O-$ 、 $-CO-$ 、 $-CH_2(CO)-$ 、 $-COO-$ 、 $-OCO-$ 、 $-O-CO-O-$ 、 $-OCH_2-$ 、 $-CH_2O-$ 、 $-NR_1-$ 、 $-NR_1-CO-$ 、 $-CO-NR_1-$ (式中、 R_1 は H 又は $C(1\sim 6)$ アルキル、又はそれらの組合せを表す)が含まれる。

40

【0076】

特定の実施態様では、スペーサー基は、6~30個の炭素原子を有する置換又は非置換

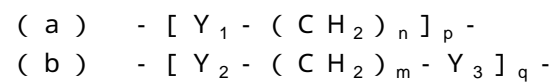
50

ヘテロアルキレン基、有利にはポリエチレングリコール基（線状の配置で2～24個のエチレングリコールモノマーを有する）、ポリアルコール基、ポリアミン基（例えば、スペルミン、スペルミジン及びそれらのポリマー誘導体）、ポリエステル基（例えば、線状の配置で3～15個のエチルアクリレートモノマーを有するポリ（エチルアクリレート）、ポリアミノ酸基又はそれらの組合せであってもよい。

【0077】

より有利には、スペーサー基は、1～8個のアミノ酸を有するポリアミノ酸（すなわち、アミノ酸又はジ-、トリ-、テトラ-、ペンタ-、ヘキサ-、ヘプタ-又はオクタペプチド）、又はジ-、トリ-、テトラ-、ペンタ-、ヘキサエチレングリコールであるポリエチレングリコール基、又はこのようなポリアミノ酸とポリエチレングリコールの組合せ

10



[式中、

Y_1 、 Y_2 、 Y_3 は、互いに独立に -O-、-CO-、COO-、-OCO-、-O-CO-O-、-OCH₂-、-CH₂O-、-NR₁-、-NR₁-CO-、-CO-NR₁-（式中、R₁は、H又はC（1～6）アルキルを表す）から選択される基であり、n、m、p及びqは、互いに独立に1～10の整数である]

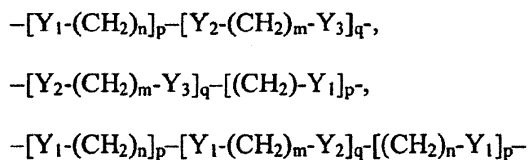
又はこれらの組合せを有する直鎖を表す。

20

【0078】

上記の基の組合せ（“combination thereof”という語により示されるように）には、交互の形又はブロックの形の（a）と（b）の組合せが含まれ、従って次の式のうちの1つを有していてもよい：

【化13】



30

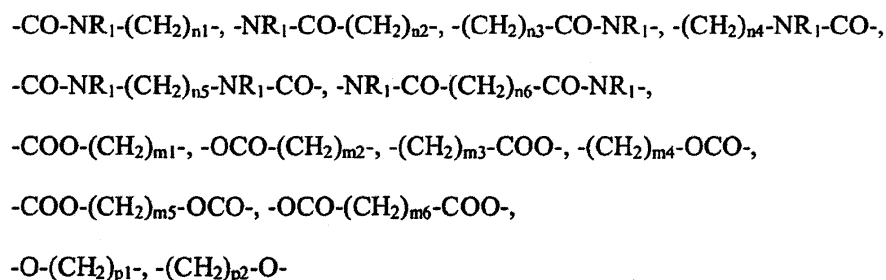
[式中、

Y_1 、 Y_2 、 Y_3 は、互いに独立に -O-、-CO-、COO-、-OCO-、-O-CO-O-、-OCH₂-、-CH₂O-、-NR₁-、-NR₁-CO-、-CO-NR₁-（式中、R₁はH又はC（1～6）アルキルを表す）から選択される基であり、n、m、p及びqは、互いに独立に1～10の整数である]。

【0079】

従って、有利な繰り返し単位には次のもの：

【化14】



40

[式中、

R₁はH又はC（1～6）アルキルを表し、及び

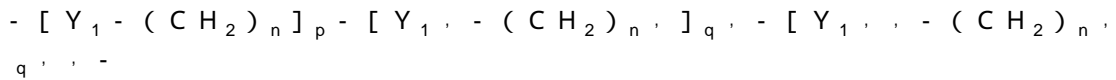
n₁、n₂、n₃、n₄、n₅、n₆、m₁、m₂、m₃、m₄、m₅、m₆、p₁及びp₂は、互いに独立に1～10の整数であり、有利には1、2、3、4、5又は6である

50

]
が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0080】

上記の基の他の組合せも、例えば、以下の式を有する様々な繰り返し単位 (a) の組合せを含んでもよい：



[式中、

Y_1 、 Y_1' 、 Y_1'' は互いに独立に、 $-O-$ 、 $-CO-$ 、 $COO-$ 、 $-OCO-$ 、 $-O-CO-O-$ 、 $-OCH_2-$ 、 $-CH_2O-$ 、 $-NR_1-$ 、 $-NR_1-CO-$ 、 $-CO-NR_1-$ (ここで、 R_1 は、H又はC(1~6)アルキルである) から選択される基であり、及び n 、 n' 、 n'' は、互いに独立に 1~10の整数である]。

10

【0081】

従って、本発明の特定の実施態様は、

Aがアフィニティー基であり、

Zがアリール又はヘテロアリールであり、

S_1 、 S_2 、 S_3 が互いに独立に、式 (a) $- [Y_1 - (CH_2)_n]_p -$ 、(b) $- [Y_2 - (CH_2)_m - Y_3]_q -$

[式中、 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 は、互いに独立に $-O-$ 、 $-CO-$ 、 $COO-$ 、 $-OCO-$ 、 $-O-CO-O-$ 、 $-OCH_2-$ 、 $-CH_2O-$ 、 $-NR_1-$ 、 $-NR_1-CO-$ 、 $-CO-NR_1-$ (式中、 R_1 はH又はC(1~6)アルキルを表す) から選択される基であり、及び n 、 m 、 p 及び q は互いに独立に 1~10の整数である]

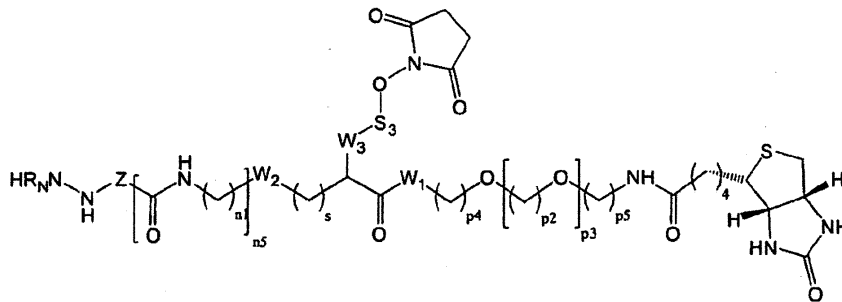
20

の少なくとも1つの繰り返し単位、又はこれらの組合せを有する直鎖である、式 I、II、III、IV、V、VI、VIIの化合物に関する。

【0082】

最も有利な実施態様では、本発明は式 VIII

【化15】



VIII

30

[式中、

W_1 は、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ であり、

W_2 、 W_3 は、互いに独立に $-COO-$ 、 $-OOC-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ から選択される官能基であり、

40

Zは、アリール又はヘテロアリールであり、

HR_N-NH- がヒドラゾニルであるか、 HR_N-NH- 中の R_N が、H又はヒドラジン保護基であり、

n_1 、 n_5 、 p_2 、 p_3 、 p_4 、 p_5 は、互いに独立に 1、2、3、4、5又は6である]

の三官能性架橋剤に関する。

【0083】

本発明の三官能性架橋剤の製造で使用するために、スペーサー基は、X又は官能基 A、L及び芳香族ヒドラジン基のうちの一つへの結合を選択的に保護又は活性化できる末端の

50

官能基と一緒に有利に提供されることが理解される。従って、幾つかの実施態様では、スペーサー基は、架橋基を介して、有利には $-COO-$ 、 $-CO-NR_1-$ 、 $-O-$ 、 $-NR_1-$ 、 $-NR_1-COO-$ 及び $-S-S-$ 結合から選択される基を介して X 及び個々の官能基 (A、L 又は芳香族ヒドラジン基) に結合してもよい。更に、コア構造、スペーサー及び 3 つの官能基 A、L 及び芳香族ヒドラジン基のうち 1 つを組み立てる有利な順番は無いことが理解される。当業者は、様々な基の性質に応じて、ある 1 つの順番の組み立てが有利であることに気付くであろう。

【0084】

本発明の三官能性架橋剤の更なる官能基は、保護された又は保護されていない芳香族ヒドラジン基であり、これは (その保護されていない形で)、細胞表面上又は分泌された糖タンパク質上のグリコペプチドの酸化された炭水化物基との共有結合を選択的に形成できる。前記の酸化グリコペプチドは、細胞表面上又はその分泌された糖タンパク質自体の上に存在するか、又は標的の糖タンパク質レセプターと相互作用する空間的に近い分子上に存在していてもよい。スペーサー S_2 と S_3 の長さは、リガンド結合部位と前記酸化グリコペプチドの間の距離を決定する。従って、様々な長さのスペーサー S_2 と S_3 は、リガンド結合部位の直接の又は広がった環境を走査又は試験することができる。

【0085】

芳香族ヒドラジン基は、保護されているか又は保護されていなくてもよい。一般的に、どのアミン保護基もヒドラジン基を保護するために使用でき、かつこれらの保護基で保護及び脱保護するために適切である条件は、ヒドラジンで使用するためにも適切である。アミンの保護基ならびにこれらの保護基でアミン保護及び脱保護するための条件は当業者に公知であり、及び例えば、Greene and Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons (1991) に開示されている。適切なヒドラジン保護基の特定の例は、水素、置換 (C1 ~ C6) アルキル、置換アリール及び置換ヘテロアリールから選択される置換基を有するアルデヒド又はケトンヒドラゾンであることができるヒドラゾン ($R'R''C=NNH_2$) である。本発明で使用するための保護基の選択は、意図する架橋剤の使用による。生細胞上の標的細胞表面糖タンパク質、又は標的の分泌糖タンパク質に架橋剤を使用する際に適切な保護基は、*in situ* の置き換えに従うべきである。すなわち、これらはいずれかの副反応を回避できる限り、ヒドラジン基を保護し、かつ温和な条件下、例えば、*in vivo* - 又はタンパク質 - 両立性の条件下に除去可能でなくてはならない。更に、他の用途 (例えば、*in vitro*) では、ヒドラジンは、グリコペプチド捕獲剤として三官能性架橋剤を使用する前に置き換えることができる保護基を有していてもよいことが理解される。

【0086】

有利なヒドラジン保護基には、トリフルオロアセチル、t-ブトキシカルボニル (Boc)、ベンジルオキシカルボニル (Cbz) 及びフルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc)、sulfmoc (Fmoc-SO₃H)、より有利にはトリフルオロアセチルが含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0087】

従って、より有利な実施態様では本発明は HR_N-NH- 中の R_N がトリフルオロアセチルである式 I、III、V、VI、VII の化合物に関する。

【0088】

他の実施態様では、Z は、非置換若しくは置換フェニル、ナフチル及びアントラセニルから選択されるアリール基、又は非置換若しくは置換ピリジル、フリル、イミダゾリル、ベンズイミダゾリル、ピリミジニル、チエニル、キノリニル、インドリル及びチアゾリルから選択されるヘテロアリール基、有利には、ピリジル、フリル、イミダゾリル、ベンズイミダゾリル、ピリミジニル、ニコチンアミジルである。

【0089】

従って、保護された芳香族ヒドラジン基は有利にはトリフルオロアセチル - 保護ヘテロ

10

20

30

40

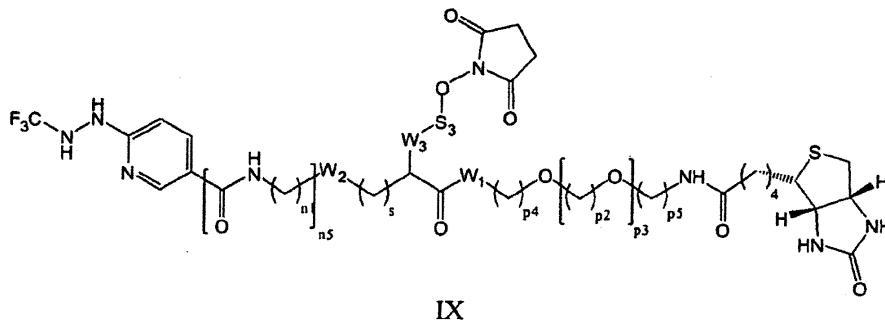
50

アリール - ヒドラジン、より有利にはトリフルオロアセチルニコチンアミドヒドラジン基である。

【0090】

最も有利には、式 I の化合物は式 I X

【化16】



10

[式中、

W_1 は、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ であり、

W_2 、 W_3 は、互いに独立に $-COO-$ 、 $-OOC-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ から選択される官能基であり、

n_1 、 n_5 、 p_2 、 p_3 、 p_4 、 p_5 、 s は、互いに独立に 1、2、3、4、5 又は 6 である]

20

の三官能性架橋剤であってもよい。

【0091】

更なる態様では、本発明は、リガンドと標的の糖タンパク質レセプターの相互作用を特徴付け及び分析するための本発明の三官能性架橋剤の使用に関する。

【0092】

簡単に言えば、上記のように本発明の架橋剤は三官能性分子中で、2つの異なる化学反応基とアフィニティー基を組合せる。第一の化学反応基は、リガンド反応基、有利にはN-ヒドロキシスクシンイミドであり、架橋剤を対象のリガンドに結合するために使用され、これが次に対象の(細胞表面又は分泌した)標的の糖タンパク質レセプターに結合する。第二の化学反応基は、芳香族ヒドラジン、有利には酸化レセプターであるグリコペプチドを獲得するためのトリフルオロアセチル化芳香族ヒドラジンである。対象のリガンドに共役すると、本発明のアフィニティータグ化された架橋剤は、酸化した生細胞又は溶液中で相互作用する標的の糖タンパク質レセプターを炭水化物に向けて獲得することができ、及び引き続き、アフィニティー基、有利にはビオチンを介して獲得されたグリコペプチドの2工程のアフィニティー精製、引き続き質量分析による分析を可能にする。方向性のないコントロール試料との定量比較により、リガンドとそれらの相応する標的の糖タンパク質レセプターとの相互作用から生じるアフィニティータグ化事象(例えば、ビオチニル化)は、ランダムな(細胞表面又は分泌された)タンパク質の非特異的で確率的なアフィニティータグ化事象(例えば、ビオチニル化)とは明らかに区別できる。これは、より低いアフィニティー及び一時的なリガンドと標的の糖タンパク質レセプター相互作用の検出ならびに、それらの元の細胞環境中で膜結合した形で又は生液中に分泌された形で存在する低含量の糖タンパク質でリガンドのオフターゲット効果の検出を可能にする。

30

40

【0093】

この事は細胞表面の標的糖タンパク質の場合を用いて、図1に図式的に説明されている：対象のリガンド(黒丸で示されている)をタンパク質両立性の緩衝液中で三官能性架橋剤と結合させる。別々のコントロール反応では、等モル量の架橋剤がコントロールタンパク質に結合するか、又は純粋な緩衝液中でクエンチされる(図1A)。細胞表面の炭水化物上にアルデヒド基を生じるために、生細胞が酸化される(図1B)。次に、予め結合したリガンドを酸化細胞に添加し、酸化細胞表面の糖鎖構造の獲得を可能にする(工程2及

50

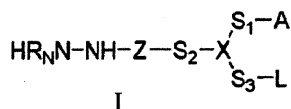
び図1C)。これにより、ランダムな細胞表面糖タンパク質は、確率的事象によりラベルされ、かつ対象のリガンドへの標的細胞表面糖タンパク質レセプターは、ダイレクトなりガンド-レセプターの相互作用により、より効率的に獲得される。平行して、コントロール試料は、確率的ラベリング事象だけを生じる等しい数の細胞に添加される。全ての以下の工程では、両方の試料は平行して処理される。ラベリング反応の後に、細胞は溶解され、かつ核のフラクションが廃棄される(工程3)。残りのフラクションを洗浄し、還元し、アルキル化し、かつ引き続きトリプシンで消化する(工程3、図1D)。試料を完全に消化した後に、ビオチニル化された細胞表面糖タンパク質を、様々な緩衝液でよく洗浄することによりステレプトアビジンビーズ上でアフィニティー精製する(工程4、図1E)。洗浄後に、オリゴ糖構造の最内側の成分と、ペプチドのN-X-S/Tグリコシル化モチーフ(ここで、Nはアスパラギン、Xはプロリンを除くアミノ酸、及びS/Tはそれぞれセリン又はトレオミンをから成る)中のグリコペプチドのアスパラギンの中で切断するPNGaseFを用いる酵素工程により、N-グリコペプチドをビーズから特異的に遊離する。そのようにすることにより、PNGaseFはアスパラギンを脱アミド化し、かつ予めグリコシル化されたペプチド中の特定のN115-X-S/Tサインが導入される(工程5、図1F)。遊離されたペプチドを脱塩し、かつ高い質量精度の質量分析計で分析するために適切な緩衝液中に再懸濁させる。分析に関しては、質量分析計はデータ依存モードで運転され、その際、所定の閾値より上のイオンシグナルは、装置をMSから、ペプチドの衝突誘起解離(CID)スペクトルを生じるMS/MSモードに自動的に切り替える(工程6、図1G)。全てのMS/MSスペクトルを標準のタンパク質データベースに対して調査し、かつ同定されたペプチドはN115-X-S/Tモチーフの存在に関してフィルターされる(工程7、図1H)。細胞表面レセプターの特定の富化を検出するためにリガンド試料中の細胞表面ペプチドの濃度を、コントロール試料と定量的に比較する。細胞表面タンパク質から確率的にタグされたペプチドに関して、この割合は約1であるべきであり、及びリガンドベースのやり方で特異的に獲得された糖タンパク質レセプターペプチドは、リガンド試料:コントロールにおいてより高い値を取る。タンパク質が1つより多いペプチドで同定される場合には、存在度の情報を組合せることができる(工程8、図H)。

【0094】

従って、更なる態様では、本発明はリガンドと、試料中の少なくとも1つの炭水化物残基を有する標的の糖タンパク質レセプターの間の特異的相互作用を同定する方法に関し、その際、リガンドは標的の糖タンパク質レセプター上のリガンド-特異的ペプチドドメインを認識し、次の工程:

- i) 前記の標的糖タンパク質レセプターを有する試料を用意する工程、
- ii) 標的の糖タンパク質レセプターを酸化処理し、少なくとも1つの炭水化物残基上にアルデヒド官能基を生じさせることにより、酸化された標的の糖タンパク質レセプターを得る工程、
- iii) 請求項1による式I

【化17】



- [式中、
 Xは、コア構造であり、
 S₁、S₂、S₃は、互いに独立にスパーサー基であり、
 Lは、リガンド反応基であり、
 Aは、アフィニティー基であり、
 Zは、アリアル又はヘテロアリアルであり、及び

10

20

30

40

50

HR_N-NH- 又は、 HR_N-NH- 中の R_N が、ヒドラジン保護基である]

の三官能性架橋剤を用意し、かつリガンド反応基を前記リガンドに共役させて、リガンド-架橋剤-複合体を得る工程、

iv) (a) リガンドが標的の糖タンパク質レセプター上のリガンド特異的タンパク質ドメインに結合でき、及び (b) 保護されたヒドラジン基がその遊離型に変換され、かつ酸化された標的の糖タンパク質レセプターと反応できる条件下に、試料とリガンド-架橋剤-複合体を接触させ、ペプチド結合二重複合体を得る工程、

v) ペプチド結合二重複合体を試料から単離し、かつ精製する工程、

vi) ペプチドを工程 (iv) で得られた精製ペプチド結合二重複合体から遊離し、遊離ペプチドを得る工程、及び

vii) 工程 v) で得られた遊離ペプチドを高い質量精度の質量分析法により分析及び定量化する工程、及び

viii) 方向性のないコントロール反応との定量的比較により、リガンドと標的の糖タンパク質レセプターの間の相互作用を同定する工程、

を有する。

【0095】

上記のように、標的の糖タンパク質レセプターは、溶液中又は細胞の表面上のどちらかにおいて良いことが理解される。

【0096】

コア構造 X ; スペーサー基 S_1 、 S_2 、 S_3 ; リガンド-反応基 L ; アフィニティー基 A ; HR_N-NH- または HR_N-NH- 中の R_N ならびに (ヘテロ) アリール Z の特定の実施態様は、先に定義した通りである。従って、有利な実施態様では、本発明の上記の方法は式 III、V、VI、VII、VIII 又は IX の化合物を用いて実施される。

【0097】

従って、幾つかの実施態様では本発明は、リガンドと、細胞の集団を含む試料中で少なくとも1つの炭水化物残基を有する細胞表面レセプターの間の特定の相互作用を同定する方法に関し、その際、前記リガンドは標的の糖タンパク質レセプター上のリガンド-特異的ペプチドドメインを認識し、次の工程:

i) 細胞の集団 (その1つ又は複数は少なくとも1つの糖タンパク質レセプターを示す) を有する試料を用意する工程、

ii) 細胞表面レセプターを酸化処理し、少なくとも1つの炭水化物残基上にアルデヒド官能性を生じさせることにより、酸化された細胞表面レセプターを得る工程、

iii) 本発明の三官能性架橋剤を用意し、より具体的には式 I、III、V、VI、VII、VIII 又は IX の三官能性架橋剤を用意し、かつ試薬を前記リガンドに共役できるようにし、リガンド-架橋剤-複合体を得る工程、

iv) (a) リガンドが細胞表面レセプター上のリガンド特異的ペプチドドメインに結合でき、及び (b) 保護されたヒドラジン基がその遊離型に変換され、かつ酸化された細胞表面レセプターと反応できる条件下に試料とリガンド-架橋剤-複合体を接触させ、ペプチド結合二重複合体を得る工程、

v) ペプチド結合二重複合体を試料から単離し、かつ精製する工程、

vi) ペプチドを工程 (iv) で得られた精製ペプチド結合二重複合体から遊離し、遊離ペプチドを得る工程、及び

vii) 工程 v) で得られた遊離ペプチドを高い質量精度の質量分析法より分析及び定量化する工程、及び

viii) コントロール反応との定量的比較により、リガンドと細胞表面レセプターの間の相互作用を同定する工程、

を有する。

【0098】

他の実施態様では、本発明はリガンドと、生体液中に含有される少なくとも1つの炭水化物残基を有する分泌された糖タンパク質レセプターの間の特異的相互作用を同定する方

10

20

30

40

50

法に関し、その際、前記リガンドは、分泌された糖タンパク質レセプター上のリガンド - 特異的ペプチドドメインを認識し、次の工程：

i) 分泌された糖タンパク質レセプターを含有する生体液から濃縮試料を用意する工程、
ii) 分泌された糖タンパク質レセプターを酸化処理し、少なくとも1つの炭水化物残基上にアルデヒド官能性を生じさせることにより、酸化された分泌された糖タンパク質レセプターを得る工程、

iii) 本発明の三官能性架橋剤、より具体的には、式I、III、V、VI、VII、VIII又はIXの三官能性架橋剤を用意し、かつ試薬を前記リガンドに共役できるようにし、リガンド - 架橋剤 - 複合体を得る工程、

iv) (a) リガンドが分泌された糖タンパク質レセプター上のリガンド特異的ペプチドドメインに結合でき、及び(b) 保護されたヒドラジン基がその遊離型に変換され、かつ酸化された分泌糖タンパク質レセプターと反応できる条件下に、試料をリガンド - 架橋剤 - 複合体と接触させ、ペプチド結合二重複合体を得る工程、

v) ペプチド結合二重複合体を試料から単離し、かつ精製する工程、

vi) ペプチドを工程(iv)で得られた精製ペプチド結合二重複合体から遊離し、遊離ペプチドを得る工程、及び

vii) 工程(v)で得られた遊離ペプチドを高い質量精度の質量分析法により分析及び定量化する工程、及び

viii) コントロール反応との定量的比較により、リガンドと分泌された糖タンパク質レセプターの間の相互作用を同定する工程、

を有する。

【0099】

他の有利な実施態様では、リガンド反応基は有利には活性化された官能基、より有利にはアミン反応基、最も有利にはN - ヒドロキシスクシンイミド基又はN - ヒドロキシルホスクシンイミド基である(水溶性が増す)。

【0100】

本明細書中で使用されているような"試料"又は"生物学的試料"とは、生細胞又は生物により抽出又は分泌されて得られる、組織培養、バイオリアクター、ヒト又は動物組織、植物、果物、野菜、単細胞微生物(例えば、細菌及び酵母)及び多細胞生物を含む固体又は液体試料を意味するがこれらに限定されるわけではない。例えば、生物学的試料は、例えば、血液、血漿、血清、尿、胆汁、精液、骨髓液、水性又はガラス体液、又は体分泌物、濾出液、浸出液(例えば、膿瘍又は感染もしくは炎症の他の部分から得られる液体)、又は関節から得られる液体(例えば、正常関節又はリウマチ性関節炎、骨粗しょう症、痛風又は化膿性関節炎のような疾患に冒された関節)から得られる生液体であることができる。生物学的試料は、例えば、いずれかの器官又は組織(生検又は検死試料を含む)から得られる試料であってもよく、細胞(一次細胞又は培養細胞)、いずれかの細胞によりコンディショニングされた培地、組織又は器官、組織培養を含むことができる。

【0101】

本明細書中で使用されているような"糖タンパク質"(又は"グリコペプチド")という用語は、1つ又は複数の共有結合した炭水化物基又はオリゴ糖基を含有するタンパク質(又はペプチド)を意味する。炭水化物基は、通常は1つのアミン側鎖基、通常はアスパラギンアミノ酸のものを介して結合する(N - 結合した炭水化物を生じる)か、又はヒドロキシル側鎖基、通常はセリン又はトレオニンアミノ酸のものを介して結合する(O - 結合した炭水化物基を生じる)。酸化された糖タンパク質又はグリコペプチドとは、適切な酸化剤で処理を行い、それにより結合した炭水化物のピシナルジオール部分を切断し、アルデヒド基を生じる糖タンパク質又はグリコペプチドを意味する。このような(ジアルデヒド炭水化物を生じる)炭水化物の酸化は、通常の方法により、例えば、過ヨウ素酸又は過ヨウ素酸塩、鉛(IV)塩又は過マンガン酸塩、有利にはメタ過ヨウ素酸ナトリウムを用いて行ってもよい。二者択一的に、化学的アプローチは、バイオ直交型の基(例えば、アジド、アルキン、ケトン又はアルデヒド)を有するグリカン前駆体の類似体を用いて、糖タ

10

20

30

40

50

ンパク質レセプター上の架橋剤にとって結合部位を生じる細胞のメタボリックラベリングを駆使できる (Current opinion in chemical biology (2007)、第11巻、52~8頁)。

【0102】

本明細書中で使用されているような"タンパク質"、"ポリペプチド"、"オリゴペプチド"及び"ペプチド"という用語は、同じ意味を有し、かついずれかの長さを有するアミノ酸ポリマーを意味する(通常、ペプチドはタンパク質の断片とも称される)。このポリマーは、直鎖、分子又は環状鎖であってもよい。アミノ酸は、天然に生じるか、又は天然に生じないアミノ酸、又は変異体アミノ酸であってもよい。ポリペプチド又はポリヌクレオチドに関する"断片"という用語は、参照のポリペプチド又はポリヌクレオチド(長さn)の全長に対して、1からn-1の範囲の配列長さを有するポリペプチド又はポリヌクレオチドを意味する。断片の長さは、目的に応じて適切に変えることができる。

10

【0103】

本発明に関して、糖タンパク質は、天然に生じる糖タンパク質であってもよく、又は二者択一的に合成処理された配列を有していてもよい(但し、処理された糖タンパク質は、グリコシル化部位として作用する少なくとも1つのペプチド配列を有する)。糖タンパク質は、細胞内糖タンパク質、細胞表面糖タンパク質(すなわち、細胞の表面に結合した糖タンパク質)又は溶液中の糖タンパク質(すなわち、培地中に分泌された糖タンパク質)であってもよい。

【0104】

本発明の方法で使用される糖タンパク質は、有利な又は有効な生物活性又は化学活性を有する薬剤学的に又は商業的に関連のある糖タンパク質、例えば、レセプター、抗体、酵素、ホルモン、調節因子、抗原、結合剤などであってもよい。本発明の方法で使用してもよい以下の糖タンパク質のリストは、単に例示的なものであって列挙を制限する目的はない。当業者は、どの糖タンパク質も本方法で使用でき、かつ特定の糖タンパク質を各人の固有の必要に基づいて選択できることを理解するであろう。

20

【0105】

"標的の糖タンパク質レセプター"又は"糖タンパク質レセプター"という用語は、1つ又は複数の特定の種類のリガンド又はシグナル分子が結合してもよい糖タンパク質を意味する。このような(標的)糖タンパク質レセプターは、生液体中又は、いずれかの対象物から、有利には哺乳類の対象物、例えば、ヒト又は動物から誘導される細胞上に存在していてもよい。従って、"細胞表面"という用語(すなわち、細胞表面糖タンパク質レセプター)と組合せて使用される場合には、これは、1つ又は複数の特殊な種類のリガンド又はシグナル分子が結合していてもよい細胞の原形質膜と会合している糖タンパク質を意味する。"酸化された"という用語と組合せて使用される場合には、これは適切な酸化処理により、その炭水化物部分が酸化されてアルデヒド基を形成する糖タンパク質を意味する。

30

【0106】

糖タンパク質レセプターには、Varki, A等、Essentials of Glycobiology, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009及びwww.uniprot.orgに開示されているような、いずれかの細胞表面レセプター又は分泌されたレセプターが含まれる。糖タンパク質レセプターの非限定例には、例えば次のものを有するレセプターが含まれる：

40

線維芽細胞増殖因子レセプター1 (FGFR1) (Swiss-Prot受託番号: Q9QZM7、Q99AW7、Q9UD50、Q63827)、

線維芽細胞増殖因子レセプター2 (FGFR2) (Swiss-Prot受託番号: Q96KM2、P21802、Q63241)、

線維芽細胞増殖因子レセプター3 (FGFR3) (Swiss-Prot受託番号: Q95M13、AF487554、Q99052)、

線維芽細胞増殖因子レセプター4 (FGFR4) (Swiss-Prot受託番号: Q91742)、

50

ニューロトロフィンチロシンキナーゼタイプ - 2 (N T R K T - 2) (S w i s s - P r o t 受託番号 : Q 8 W X J 5)、
 ロイコサイト抗原関連タンパク質 - チロシンホスファターゼ (L A R - P T P R F) (S w i s s - P r o t 受託番号 : Q 9 E Q 1 7、Q 6 4 6 0 5、Q 6 4 6 0 4、Q 9 Q W 6 7、Q 9 V I S 8 P 1 0 5 8 6)、
 ネフリン (S w i s s - P r o t 受託番号 : Q 9 2 5 S 5、Q 9 J I X 2、Q 9 E T 5 9、Q 9 R 0 4 4、Q 9 Q Z S 7、Q 0 6 5 0 0)、
 タンパク質 - チロシンホスファターゼレセプタータイプ S (P T R S) (S w i s s - P r o t 受託番号 : Q 6 4 6 9 9、Q 1 3 3 3 2、O 7 5 8 7 0)、
 タンパク質 - チロシンホスファターゼレセプタータイプ (R - P T P -) (S w i s s - P r o t 受託番号 : Q 1 5 2 6 2)、
 タンパク質 - チロシンホスファターゼレセプタータイプ D (P T P R D) (S w i s s - P r o t 受託番号 : Q B W X 6 5、Q 9 I A J 1、P 2 3 4 6 8、Q 6 4 4 8 7)、
 エフリンタイプ A レセプター - 8 (E P H A 8 / チロシン - タンパク質キナーゼレセプター E E K) (S w i s s - P r o t 受託番号 : O 0 9 1 2 7、P 2 9 3 2 2)、
 エフリンタイプ A レセプター - 3 (E P H A 8 / チロシン - タンパク質キナーゼレセプター E T K - 1 / G E K 4) (S w i s s - P r o t 受託番号 : P 2 9 3 1 8)、
 エフリンタイプ A レセプター - 2 (S w i s s - P r o t 受託番号 : Q 8 N 3 Z 2)、
 インスリンレセプター (I R) (S w i s s - P r o t 受託番号 : Q 9 P W N 6)、
 インスリン様成長因子 - 1 レセプター (I G F - 1) (S w i s s - P r o t 受託番号 : Q 9 Q V W 4、P 0 8 0 6 9、P 2 4 0 6 2、Q 6 0 7 5 1、P 1 5 1 2 7、P 1 5 2 0 8)、
 インスリン関連レセプター (I R R) (S w i s s - P r o t 受託番号 : P 1 4 6 1 6)、
 チロシン - タンパク質キナーゼレセプター Tie - 1 (S w i s s - P r o t 受託番号 : 0 6 8 0 5、P 3 5 5 9 0、Q 0 6 8 0 6)、
 ラウンドアウトレセプター - 1 (r o b o - 1) (S w i s s - P r o t 受託番号 : O 4 4 9 2 4、A F 0 4 1 0 8 2、Q 9 Y 6 N 7)、
 神経性ニコチンアセチルコリンレセプター 3 サブユニット (C H R N A 3) (S w i s s - P r o t 受託番号 : Q 8 V H H 6、P 0 4 7 5 7、Q 8 R 4 G 9、P 3 2 2 9 7)、
 神経性アセチルコリンレセプター 6 サブユニット (S w i s s - P r o t 受託番号 : Q 1 5 8 2 5、Q 9 R 0 W 9)、
 血小板由来増殖因子 レセプター (P D G F R B) (S w i s s - P r o t 受託番号 : Q 8 R 4 0 6、Q 0 5 0 3 0)、
 インターロイキン - 6 レセプター (I L - 6 R) (S w i s s - P r o t 受託番号 : Q 0 0 5 6 0)、
 インターロイキン - 2 3 レセプター (I L - 2 3 R) (S w i s s - P r o t 受託番号 : A F 4 6 1 4 2 2)、
 I L - 3、I L - 5 及び G m C s f の - 共通サイトカインレセプター (S w i s s - P r o t 受託番号 : P 3 2 9 2 7)、
 サイトカインレセプター様分子 3 (C R L F 1) (S w i s s - P r o t 受託番号 : Q 9 J M 5 8)、
 クラス I サイトカインレセプター (Z C Y T O R 5) (S w i s s - P r o t 受託番号 : Q 9 U H H 5)、
 ネットリン - 1 レセプター D C C (S w i s s - P r o t 受託番号 : P 4 3 1 4 6)、
 ロイコサイト F c レセプター様タンパク質 (I F G P 2) (S w i s s - P r o t 受託番号 : Q 9 6 P J 6、Q 9 6 K M 2)、
 マクロファージスカベンジャーレセプター - 2 (M S R 2) (S w i s s - P r o t 受託番号 : Q 9 1 Y K 7)、又は
 顆粒状コロニー刺激因子レセプター (G - C S F - R) (S w i s s - P r o t 受託番号 : Q 9 9 0 6 2)、又はその断片、又はその変異体。

10

20

30

40

50

【0107】

他の実施態様では、糖タンパク質レセプターはプロテオグリカンの群から選択される。より有利には、プロテオグリカンは、ヘパリンスルフェートプロテオグリカンを有する群から選択される。最も有利な実施態様では、プロテオグリカンはペルレカン (Swiss - Prot 受託番号: P98160)、又はその断片、又はその変異体である。

【0108】

その他の実施態様では、糖タンパク質レセプターは、膜固着細胞表面酵素の群から選択されるレセプターである。例えば、細胞表面レセプターは、メタロプロテイナーゼのピトリリジンファミリー又はディスインテグリンのファミリー及びメタロプロテアーゼ (ADAMs) から成る群から選択され、前記メタロプロテアーゼは、ADAM - 8 (Swiss - Prot 受託番号: Q05910)、ADAM - 19 (Swiss - Prot 受託番号: Q9H013、Q35674)、ADAM - 8 (Swiss - Prot 受託番号: P78325)、ADAM - 12 (Swiss - Prot 受託番号: O43184、Q61824)、ADAM - 28 (Swiss - Prot 受託番号: Q9JLN6、Q61824、Q9XSL6、Q9UKQ2)、ADAM - 33 前駆体 (Swiss - Prot 受託番号: Q8R533、Q923W9)、ADAM - 9 (Swiss - Prot 受託番号: Q13433、Q61072)、ADAM - 7 (Swiss - Prot 受託番号: Q9H2U9、O35227、Q63180)、ADAM - 1A フェルチリンアルファ (Swiss - Prot 受託番号: Q8R533)、ADAM - 15 (Swiss - Prot 受託番号: Q9QYV0、O88839、Q13444)、メタロプロテイナーゼ - ディスインテグリンドメイン含有タンパク質 (TECAM) (Swiss - Prot 受託番号: AF163291)、メタロプロテイナーゼ1 (Swiss - Prot 受託番号: O95204、Q9BSI6)、又はその断片、又はその変異体を含む。

【0109】

幾つかの実施態様では、糖タンパク質レセプターは、酵素、例えば、加水分解酵素、転移酵素、イソメラーゼ、リアーゼ、リガーゼ、トランスフェラーゼ及び酸化還元酵素であってもよい。加水分解酵素の例には、リパーゼ、コリンエステラーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -アミラーゼデオキシリボヌクレアーゼ、グルコアミラーゼA及びB、 β -ガラクトシダーゼI及びII、 β -フルクトフラノシダーゼ、 β -グルコウロニダーゼ、N-アセチル- β -グルコサミニダーゼ、ヒアルロニダーゼ、オキシトシナーゼ、カリクレイン、プロメライン、エンテロキナーゼ、プロテイナーゼa、b及びc、ペプシノゲン及びペプシンが含まれる。酸化還元酵素の例には、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ及びクロロペルオキシダーゼが含まれる。トランスフェラーゼの例には、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ及びリボヌクレアーゼが含まれる。当業者は本発明の方法に従い使用できる他の公知の酵素の例にも気付くであろう。

【0110】

更なる実施態様では、糖タンパク質レセプターは成長因子又は他のシグナル分子であってもよい。成長因子は、通常は細胞により分泌される糖タンパク質であり、及び他の細胞上のレセプターに結合し、かつ活性化し、レセプター細胞内で代謝又は成長上の変化を開始する。哺乳類の成長因子及び他のシグナル分子の非限定例には、サイトカイン、上皮成長因子 (EGF)、血小板由来成長因子 (PDGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGFs)、例えば、FGF - 5、インスリン様成長因子 - T及びII (IGF - I及びIGF - II)、des (1~3) - IGF - I (IGF - Iブレイン)、インスリン様成長因子結合タンパク質、CDタンパク質、例えば、CD - 3、CD - 4、CD - 8及びCD - I9; エリスロポイエチン、骨誘導因子、免疫毒素、骨形成タンパク質 (BMPs)、インターフェロン、例えば、インターフェロン - α 、 β 、及び γ 、コロニー刺激因子 (CSFs)、例えば、M-CSF、GM-CSF及びG-CSF、殆どのインターロイキン、腫瘍壊死因子 (TNF)、卵胞刺激ホルモン (CSFs)、カルシトニン、黄体形成ホルモン、抗凝血因子、例えば、プロテインC、心房性ナトリウム利尿因子、肺表面活性物質、プラスミノゲン活性化因子、例えば、ウロキナーゼ又は人尿又は組織プラスミノゲ

ン活性化因子 (t - P A)、造血成長因子及びエンケファリナーゼが含まれる。通常の当業者のうち一人は、本発明の方法に従って使用できる他の成長因子又はシグナル分子にも気付くであろう。

【 0 1 1 1 】

特定の標的の糖タンパク質レセプターに特異的な"リガンド"という用語は、本明細書中で広く使用され、かつ膜結合し、かつ細胞表面上に又は分泌された形で存在する標的の糖タンパク質レセプターと相互作用できる又は結合するいずれかの化合物を意味する。それぞれの標的の糖タンパク質レセプターは、1つ又は複数の特異的リガンド結合部位を有していてもよく、これは同じ又は異なるか又は種々のリガンドを重複することができ、かつこれはリガンド結合が起こる全体の標的の糖タンパク質レセプター内の特異的ペプチドメイン(すなわち、タンパク質の特定の部分)である。

10

【 0 1 1 2 】

リガンドとペプチドドメインの間の認識は、リガンド又は標的の糖タンパク質レセプターの配列特異性、三次元構造、又は翻訳後変性による。リガンドの例には、グリコペプチド、ポリペプチドを含むペプチド、糖タンパク質又はリンタンパク質を含むタンパク質、炭水化物、糖脂質、リン脂質、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、アプタマー、ビタミン、抗原及びその断片、ハプテン、レセプターアゴニスト、部分的アゴニスト、混合アゴニスト、アンタゴニスト、薬剤、ケモカイン、ホルモン(例えば、LH、FSH、TRH、TSH、ACTH、CRH、PRH、MRH、MSH、グルカゴン及びプロラクチン、トランスフェリン、ラクトフェリン、アンジオテンシン、ヒスタミン、インスリン、レクチン)、トランスミッター、オータコイド、成長因子(例えば、PDGF、VEGF、EGF、TGF α 、TGF β 、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、FGF、IGF、ボンベシン、トロンボポイエチン、エリスロポイエチン、オンコスタチン及びエンドセリン1)、インターロイキン(例えば、インターロイキン1~15)、リンホカインを含むサイトカイン及び細胞シグナル分子、例えば、腫瘍壊死因子(例えば、腫瘍壊死因子及び γ)ならびにインターフェロン(例えば、インターフェロン α 、 β 、 γ)、補欠分子族、コエンザイム、コファクター、制御因子、又はレセプターに特異的に結合するその他の天然に存在する有機分子、又は合成有機分子(その断片、類似体ならびに同じ結合特性を有するその誘導体を含む)が含まれるが、これらに限定されるわけではない。特定の細胞表面の標的糖タンパク質レセプターに特異的なリガンドは、幅広い細胞のタイプ又は特異的な細胞タイプを標的にしてもよい。

20

30

【 0 1 1 3 】

幾つかの実施態様では、リガンドは、ペプチド、炭水化物、脂質又はヌクレオチドを含む群から選択される。ヌクレオチドという用語には、天然ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、ヌクレオチド誘導体、ジ-、オリゴ-、又はポリ-ヌクレオチド、又はヌクレオチドを有する物質が含まれる。ヌクレオチド類似体は、ヌクレオチドベース又は変性ヌクレオチドベース、糖残基又は変性糖残基ならびにモノエステル、ジエステル、トリエステル、クアドラエステル又はペンタエステル基を有する分子として定義される。例えば、タンパク質の断片、すなわちペプチドが使用される場合には、これはいずれかの適切な長さであってよい。ペプチドの(最小)長さ及び組成物、すなわちアミノ酸の数及び種類は、結合相互作用の性質により決定づけられることが理解される。通常は、ペプチドは例えば3~100個のアミノ酸残基を有していてもよい。

40

【 0 1 1 4 】

幾つかの実施態様では、リガンドは抗体であってもよい。抗体は、それらのアミノ酸残基の幾つかに加えられるオリゴ糖鎖を有する重い(~150kDa)球状血漿タンパク質である。これらは、特定の抗原に特異的に結合する能力がある。現在のところ使用されているか、又は製剤又は他の市販薬として研究下にある多数の抗体を用いて、本発明の方法による特定のリガンドとの結合相互作用の分析には特に関心がある。幾つかの実施態様では、抗体は治療抗体であるトランスツズマブ及びベバシズマブのようなモノクローナル抗体であってもよい。幾つかの実施態様では、モノクローナル抗体はヒト化抗体である。他

50

の実施態様では、抗体はポリクロナールであることができる。

【0115】

幾つかの実施態様では、エンジニアード・アフィニティー結合剤、例えば、アンキリンリピート結合剤、ファージディスプレイにより生じるアフィニティー結合剤、又はオリゴ核酸又はペプチドアプタマーを用いることができる。

【0116】

幾つかの実施態様では、リガンドは糖タンパク質、例えば、上記のような糖タンパク質レセプターであってもよい。幾つかの実施態様では、リガンドは細胞表面タンパク質のドメイン、例えば、上記の細胞表面糖タンパク質レセプターであってもよい。

【0117】

本発明によれば、リガンドはその結合部位を介して標的の糖タンパク質レセプターと相互作用し、前記結合部位は、標的の糖タンパク質レセプターの特異的ペプチド断片、例えば、特定のアミノ酸配列であるか、又は結合部位と称される標的の糖タンパク質レセプターの断片の三次元構造である。

【0118】

その（細胞表面又は分泌された）標的の糖タンパク質レセプター結合部位へのリガンド結合に関する"相互作用する"又は"相互作用"という用語には、（細胞表面又は分泌された）標的の糖タンパク質レセプターと、リガンドの間の一時的又は永久的な直接の又は間接的な接触が含まれ、かつその結合親和性、すなわちその解離平衡定数 K_d により特徴付けられてもよい。リガンドの、その標的の糖タンパク質レセプターへの通常の結合親和性は、少なくとも $10^{-5} M$ 、有利には $10^{-7} M$ 及びそれ以上、例えば、約 $10^{-8} M \sim 10^{-12} M$ である。本発明の方法は、通常の結合アフィニティーならびに例えば $10^{-7} M$ 未満の値を有する K_d により特徴付けられる（細胞表面又は分泌された）標的の糖タンパク質レセプターとリガンドの間の低い親和性相互作用の検出の両方を可能にする。

【0119】

従って、発明の通常の方法では以下の工程が行われる：

第1の工程では、本発明の架橋剤のリガンド反応基、有利には活性化された官能基、より有利にはN-ヒドロスクシンイミド基は、タンパク質両立性の条件下に、かつヒドラジン機能を損失することなく、第一級アミンを介してリガンドへの十分なカップリングを可能にし、リガンド-架橋剤複合体を得る。別々のコントロール反応では、等モル量の架橋剤は、コントロールタンパク質に結合されるか、又は活性化された官能基、例えば、NHSEステルを加水分解するための純粋な緩衝液中でインキュベートされる。

【0120】

第2の工程では、リガンド-架橋剤複合体が細胞、組織を有する試料、又は標的の糖タンパク質レセプターを有する溶液に添加されるが、これらは、例えば、過ヨウ素酸塩（例えば、 $1 \sim 2 \text{ mM NaIO}_4$ ）を用いて酸化処理し、リガンド-架橋剤複合体中のリガンドが、その特異的結合部位に結合できる条件下に、標的の糖タンパク質レセプター上に存在する炭水化物上にアルデヒド基を生じるようにしておいたものである。

【0121】

上記に定義してあるように、細胞表面糖タンパク質レセプターの場合には、試料は細胞の集団を有し、そのうち少なくとも1つは、このような細胞表面糖タンパク質レセプターを示す。上記に定義したような分泌された糖タンパク質の場合には、試料は少なくとも1つの分泌された糖タンパク質を含んでいる生体液を有する。

【0122】

従って、本発明の方法の特定の実施態様では、上記の開示方法の工程(iii)で参照した酸化糖ペプチドは、標的の糖タンパク質レセプターの集団を有する試料（工程(i)による）に、前記試料とリガンド-架橋剤複合体（工程(iii)による）を接触させる前に酸化処理を行い、レセプターペプチド側鎖上に存在する炭水化物を酸化することにより得られる。リガンド結合の際に、ヒドラジン基は、（その保護されていない形で）これらの酸化部位と反応することになる。グリコペプチド上の炭水化物の酸化は、通常は幾つ

10

20

30

40

50

かの潜在的な酸化結合部位を生じ、リガンド - 架橋剤複合体のヒドラジン基により獲得されるグリコペプチドは同じままである。

【 0 1 2 3 】

よって、上記の方法の工程 (i) には、有利には (a) 分泌された形又は細胞表面上の少なくとも1つの標的の糖タンパク質レセプターを有する試料を用意し、及び (b) 試料に酸化処理を行い、少なくとも1つの酸化された標的の糖タンパク質レセプター、すなわち、少なくとも1つの酸化された炭水化物基を有する少なくとも1つの標的糖タンパク質レセプターを有する試料を得る工程が含まれる。

【 0 1 2 4 】

第3の工程では、ヒドラジンの保護基を除去してもよい条件を試料に課す。トリフルオロアセチル基が芳香族ヒドラジンの保護基として使用される場合には、炭水化物を酸化する条件は、その除去にも作用し、かつ遊離ヒドラジンは酸化グリコペプチドのアルデヒド基を効率的に獲得し得る。ランダムな糖タンパク質が確率的な事象により獲得されるのに対して、レセプター上のリガンド結合部位に近いアルデヒド基は、リガンドと標的の糖タンパク質レセプターの直接的な相互作用により生じる局所的な富化によって、より効率的に獲得される。三官能性架橋剤あたりの二重ラベリング事象は、ペプチド結合二重複合体を生じる。同様に、コントロール試料 (例えば、クエンチされた架橋剤、又は非特異的分子と共役する架橋剤、又は独自のレセプター特異性を有するリガンド分子と共役する架橋剤) は、等しい数の細胞に添加され、確率的なラベリング事象だけを生じる (以下の全ての工程に関して、コントロール試料を平行して加工してもよい) 。

【 0 1 2 5 】

第4の工程では、試料を加工し、かつ標準の方法により酵素消化を行う (W o l l s c h e i d 等、N a t B i o t e c h (2 0 0 9) 、第27巻 (4) 、378 ~ 86頁) 。

【 0 1 2 6 】

リガンドと、標的の糖タンパク質レセプターの間の特異的相互作用を同定する方法 (その際、この標的の糖タンパク質レセプターは、細胞表面糖タンパク質、例えば、細胞表面レセプターである) の場合には、まず該細胞を有する試料に溶解工程を行い、かつ引き続き細胞タンパク質をトリプシンのような酵素を用いて消化し、ペプチド結合二重複合体を有する加工された細胞試料が得られる。

【 0 1 2 7 】

リガンドと、標的の糖タンパク質レセプターの間の特異的相互作用を同定する方法 (その際、この標的の糖タンパク質レセプターは、分泌された糖タンパク質である) の場合には、生体液中に分泌された糖タンパク質を有する試料をトリプシンのような酵素を用いて消化し、ペプチド結合二重複合体を有する加工された細胞試料が得られる。

【 0 1 2 8 】

次に、ペプチド結合二重複合体は、アフィニティー基であるその三番目の官能基を用いてアフィニティー精製される。例えば、ビオチンがアフィニティー基として使用される場合には、ペプチド結合二重複合体は、通常の方法によりストレプトアビジンビーズを用いてアフィニティー精製される (W o l l s c h e i d 等、i b i d) 。

【 0 1 2 9 】

上記の方法の工程 (i v) には、初めに試料に酵素消化を行い、処理された試料を得て、引き続き獲得したペプチドを加工試料からアフィニティー精製することによる、ペプチド結合二重複合体を試料から単離及び精製することが含まれる。

【 0 1 3 0 】

第5の工程では、N - グリコペプチドをプロテアーゼ又はグリカナーゼ処理することにより、例えば、P N G a s e F、P N G a s e A など、有利にはP N G a s e F に曝すことにより、特異的にビーズから遊離される。P N G a s e F 処理は、オリゴ糖構造の最も内側の成分と、ペプチドのN - X - S / T グリコシル化モチーフ中のグリコペプチドのアスパラギンの中で切断される (その際、N は、アスパラギンであり、X は、プロリンを除

10

20

30

40

50

くアミノ酸であり、及びS/Tは、それぞれセリン又はトレオニンである)。それにより、ペプチドの遊離に作用する(及び同時にアスパラギンを脱アミノ化する)。

【0131】

N-結合したグリコシル化部位を用いて例示したが、本発明の方法は他のタイプの確実に同定されたグリコシル化部位、例えば、O-結合したグリコシル化部位又は可能性としては他のタイプの翻訳後修飾(例えば、グリコシルホスファチジルイノシトールのペプチドのC-末端への結合)を用いて、又はタンパク質以外の、例えば糖脂質などのグリコシル化有機化合物を用いて使用できることが理解される。

【0132】

従って、上記の工程(v)は、グリコシダーゼ処理、有利には種々のエンドグリコシダーゼ及びエキソグリコシダーゼで処理し、遊離ペプチドを得ることによる、工程(iv)で得られた精製されたペプチド結合二重複合体から獲得したペプチドを分離することを有利に含む。二者択一的に、切断可能なリンカー、例えば、それぞれ還元剤又は過ヨウ素酸塩で切断できるジスルフィド結合又はシスジオール含有リンカーを使用できる。

【0133】

第6の工程では、このように得られた遊離ペプチドを有利には質量分析法により分析する。質量分析の方法は当業者に周知である(例えば、Yates, J. Mass Spect. 33:1~19(1988); Kinter and Sherman, Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry, John Wiley and Sons, New York(2000); Aebersold and Goodlett, Chem. Rev. 101:269~295(2001)参照)。高解像度ペプチド断片分離には、液体クロマトグラフィーESI-MS/MS又は自動化LC-MS/MS(キャピラリー逆相クロマトグラフィーを分離法として利用する)を使用できる(Yates等、Methods Mol. Biol. 112:553~569(1999))。有利には、動的排除を用いるデータに依存した衝突誘起解離(CID)は、選択的な質量分析法として使用されるであろう(Goodlett等、Anal. Chem. 72:1112~1118(2000))。このような分析には、質量分析計は一般的にデータ依存法で運転され、その際、所定の閾値より上のイオンシグナルは、装置をMSから、ペプチドの衝突誘起解離(CID)スペクトルを生じるMS/MSモードに自動的に切り替える。

【0134】

全てのMS/MSスペクトルは、標準のアリゴリズム(SEQUEST, Mascot, X!tandem, OMSSA, ...)を使用して標準のタンパク質データベースに対して調査され、かつ通常は偽陽性タンパク質同定率が1%を下回るように制限するためにフィルターされる。更に、全てのペプチドは予めグリコシル化されたペプチドのN15-X-S/Tモチーフについてフィルターされる。

【0135】

従って、上記の方法の工程(vi)は、リガンドと標的の糖タンパク質レセプターの間相互作用を同定する定量的質量分析法による、工程(v)で得られた遊離ペプチドの分析を有利に含む。

【0136】

リガンド試料中の糖タンパク質の濃度をコントロール試料と定量的に比較し、標的の糖タンパク質レセプターの特異的な富化を検出することができる。このラベルフリーの質量分析による定量に関しては、質量分析法の直前に逆相クロマトグラフィーをMS特徴マップとして表示でき、その際、特徴の滞留時間は、それらの質量/電荷比に対してプロットされる。質量分析計により検出されるように、このようなマップ中のペプチドは、規定の時間にわたり固有のアイソトープパターン及び試料中のそれらの存在度により規定のイオン電流密度を示す。断片化及びMS/MS分析によりペプチドが一度同定されると、この情報をMSマップ中の特定のペプチドの特徴に割り当てることができ、かつオープンソー

10

20

30

40

50

スのアルゴリズム又は市販のアルゴリズム、例えば、Superhirn (Mueller等、Proteomics (2007) 第7巻、(19)3470~3480頁)、又はProgenesis LC-MS (非線形ダイナミックス)を用いて、半定量的データと組合せることができる。次に、種々の試料(例えば、試料対コントロール)のMS特徴マップを重ね、かつ比較してペプチド存在度の比を得ることができる。糖タンパク質から確率的にタグされたペプチドに関しては、これらの比は約1であるべきであり、及びリガンドベースの方法で特異的に獲得された糖タンパク質レセプターペプチドは、リガンド対試料でより高い値を取る。タンパク質を1つ又は複数のペプチドで同定する場合には、存在度の情報を合わせることができる。

【0137】

他の実施態様では、二者択一的な質量分析法に基づく定量化法は、このような単反応モニタリング(SRM)及び細胞培養液中のアミノ酸を用いた安定な同位体ラベリング(SILAC)を使用できる(Nilsson等、Mass spectrometry in high throughput proteomics: ready for the big time. Nat. Methods (2010)、第7巻、681~5頁)。

【0138】

もう1つの態様では、本発明は3つの異なる分枝上に(保護された)ヒドラジン基、リガンド反応基、アフィニティー基を有する本発明による三官能性架橋剤、例えば、本明細書中で定義した三官能性架橋剤を有するキットにも関する。

【0139】

更に、本発明は以下の非限定例により説明される。

【図面の簡単な説明】

【0140】

【図1】図1は、細胞表面の標的の糖タンパク質レセプターのリガンドベースのレセプター獲得ワークフローを表す図である。

【図2】図2は、インスリンで獲得したリガンドベースのレセプターの相対定量による評価を表す図である。

【図3】図3は、CD44抗体で獲得したリガンドベースのレセプターの相対定量による評価を表す図である。

【0141】

実施例：

材料及び方法

反応は、乾燥アルゴンの雰囲気下にフレイム乾燥したガラス器具中で実施した。全ての化学物質はFluka, Acros, Aldrich, Merck and Lancasterから購入し、かつ更に精製せずに使用した。無水トリエチルアミン(TEA)をCaH₂上で蒸留し、かつジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)をKOHから蒸留し、かつメタノール(MeOH)を酸化マグネシウム上で蒸留した。N,N'-ジメチルホルムアミド(DMF)を分子篩上で乾燥させた。アルゴン雰囲気(H₂O含有量<30ppm、カールフィッシャー滴定)下に活性アルミナを通すことによりCH₂Cl₂を乾燥させた。反応物を磁気攪拌し、かつMerck Silica Gel 60 F₂₅₄プレートを用いて薄層クロマトグラフィー(TLC)によりモニターし、かつUV光下の蛍光クエンチングにより視覚化した。更に、ニンヒドリン(n-ブタノール及び10%硫酸中)及び過マンガン酸カリウムを用いてTLCプレートを染色した。生成物のクロマトグラフィーによる精製は、E. Merck Silica Gel 60 (230~400メッシュ)又はセファデックスLH-20(Aldrich)において実施した。減圧下での濃縮は、(特記されない限り)40で適切な圧力下に回転エバポレーションにより実施した。NMRスペクトルをVarian Mercury 300分光計、Bruker DRX 400及びBruker DRX 600分光計において記録した。内部標準物として溶媒共鳴を用いて化学シフトをppmで表示してある。データは以下のように表

10

20

30

40

50

示してある：s = シングレット、b r s = ブロードシングレット、d = ダブレット、t = トリプレット、q = クアトレット、m = マルチプレット；Hzでのカップリング定数。IRスペクトルはPerkin Elmer Spectrum RXI FT-IR分光光度計において記録した。吸光度は、波数(cm^{-1})で示されている。正確なマススペクトルは、チューリッヒ工業大学のLOC MSサービスによるUltima 4.7分光計MALDI-FTのIon Specで得られた。ピークはパーセント(m/z)で得られる。

【0142】

略語について：Boc：ブトキシカルボニル；DMAP：4-ジメチルアミノピリジン；EDCI：1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミドヒドロクロリド；Et₂O：ジエチルエーテル；EtOH：エタノール；Fmoc：9-フルオレニルメトキシカルボニル；HBTU：N,N,N',N'-テトラメチル-O-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)ウロニウムヘキサフルオロホスフェート；NHS：N-ヒドロキシスクシンイミド；TFA：トリフルオロ酢酸；TFAA：無水トリフルオロ酢酸；DMSO：ジメチルスルホキシド；i-PrOH：イソプロパノール；DCC：N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド；Hex：ヘキサン。

10

【0143】

定量アッセイ：分析に関して質量分析計をデータ依存法で運転し、その際、所定の閾値より上のイオンシグナルは、装置をMSから、ペプチドの衝突誘起解離(CID)スペクトルを生じるMS/MSモードに自動的に切り替える。全てのMS/MSスペクトルを標準のタンパク質データベースに対して調査し、かつ同定したペプチドをN115-X-S/Tモチーフの存在に関してフィルターした。リガンド試料中の(細胞表面又は分泌された)ペプチドの濃度は、標的レセプターの特異的富化を検出するためにコントロール試料と定量的に比較した。(細胞表面又は分泌された)タンパク質から確率的にタグされたペプチドに関しては、割合は約1であるべきであり、及び特にリガンドベースのやり方で獲得された糖タンパク質レセプターペプチドは、リガンド試料：コントロールにおいてより高い値を取る。タンパク質が、1つよりも多いペプチドで同定される場合には、存在量の情報を合わせることができる。更なる詳細は、特定の実施例で見出すことができる。

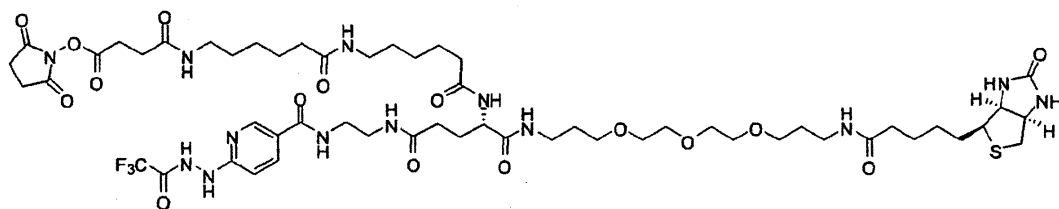
20

【0144】

例1：架橋剤Joy-06-16の合成

30

【化18】

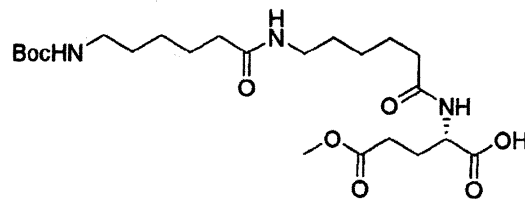


40

【0145】

(a) (2S)-2-[6-(6-{[(tert-ブトキシ)カルボニル]アミノ}ヘキサンアミド)ヘキサンアミド]-5-メトキシ-5-オキソペンタン酸の合成：

【化19】



1

10

【0146】

メタノール(130 mL)中の(2S)-2-アミノ-5-メトキシ-5-オキソペンタン酸(9.8 g、22 mmol; Glenn, M. P.等、J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 640により合成)の溶液に、2,5-ジオキソピロリジン-1-イル-6-(6-{[(tert-ブトキシ)カルボニル]アミノ}ヘキサナムド)ヘキサノエート(5.7 g、29 mmol; Srinivasan, B. and Huang, X. Chirality 2008, 20, 265により合成)を添加し、かつ次に該溶液にTEA(9.4 g、67 mmol)を添加した。室温で30分間攪拌した後に、反応混合物を減圧下に濃縮し、かつEtOAc(200 mL)中に溶かし、かつ次に1 N HCl(100 mL)で洗浄し、かつ塩水で洗浄し、かつMgSO₄上で乾燥させ、かつ減圧下に濃縮し、かつフラッシュクロマトグラフィー(CH₂Cl₂:MeOH=10:1~CHCl₃:MeOH:H₂O=85:15:1~CHCl₃:MeOH:H₂O=65:25:4)により精製し、白色の泡立つ固体として所望の化合物が得られた(9.5 g、87%)。

20

【0147】

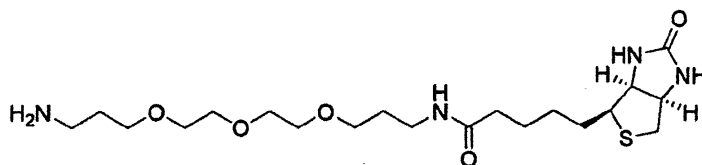
【化20】

TLC(CHCl₃:MeOH:H₂O, 85:15:1 v/v): R_f=0.8; m.p. 49-51°C; ¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD): δ 4.36(dd, J=8.6, 5.1 Hz, 1H), 3.68(s, 3H), 3.17(t, J=7.0 Hz, 2H), 3.03(t, J=7.0 Hz, 2H), 2.43(t, J=7.2 Hz, 2H), 2.26(t, J=7.4 Hz, 2H), 2.12-2.15(m, 2H), 2.00-1.90(m, 1H), 1.69-1.28(m, 22H).

30

(b) 5-[(3aS, 4S, 6aR)-2-オキソ-ヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾリジン-4-イル]-N-(3-{2-[2-(3-アミノプロポキシ)エトキシ]エトキシ}プロピル)ペンタンアミド(2)の合成:

【化21】



2

40

【0148】

ビオチン(6.3 g、18 mmol)をDMF(150 mL)中に溶かし、かつ次に該溶液にDIPEA(3.2 mL、18 mmol)及びHBTH(7.0 g、18 mmol)を添加し、室温で10分間攪拌した。この反応混合物に、N-Boc-4,7,10-ト

50

リオキサトリデカン - 1, 13 - ジアミン (5 . 9 g、18 mmol) を添加し、かつ次に室温で 1 時間撹拌した。該混合物を減圧下に濃縮し、残留物を CH_2Cl_2 (500 mL) 中に取り、かつ洗浄 (1 N $\text{HCl} \times 2$ 、飽和 NaHCO_3) し、 MgSO_4 上で乾燥させ、かつ濾過した。濾液を減圧下に濃縮し、N - Boc - N' - ピオチニル - 4, 7, 10 - トリオキサ - トリデカン - 1, 13 - ジアミンが茶色い油として得られた。N - Boc - N' - ピオチニル - 4, 7, 10 - トリオキサトリデカン - 1, 13 - ジアミンを水 (一滴) と一緒に TFA (200 mL) 中で撹拌した。次に 1 時間後に、減圧下に蒸発させ、かつフラッシュクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 : MeOH = 10 : 1 ~ CHCl_3 : MeOH : H_2O = 10 : 6 : 1 + TEA) により精製し、所望の化合物が僅かに茶色い油として得られた (7 . 4 g、90%)。

10

【 0 1 4 9 】

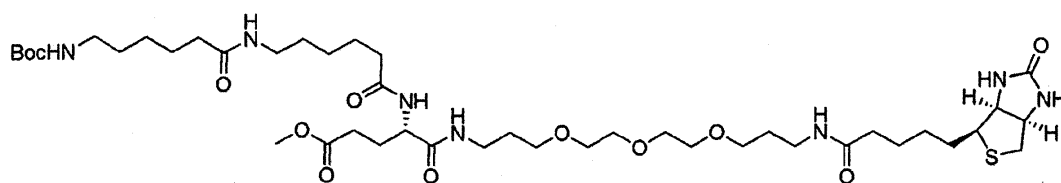
【 化 2 2 】

TLC (CHCl_3 :MeOH, 3:1 v/v): R_f = 0.2; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 4.57 (dd, J = 7.7, 4.7 Hz, 1H), 4.38 (dd, J = 7.8, 4.5 Hz, 1H), 3.80-3.65 (m, 12H), 3.58 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 3.33-3.25 (m, 5H), 3.16 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.00 (dd, J = 12.8, 5.0 Hz, 1H), 2.77 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 2.27 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.05-1.95 (m, 2H), 1.85-1.61 (m, 4H), 1.54-1.46 (m, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): δ 176.0, 166.1, 71.4, 71.2, 71.1, 70.3, 69.8, 63.4, 61.7, 57.0, 41.1, 40.0, 37.7, 36.9, 30.5, 29.8, 29.6, 28.1, 26.9; HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$, 446.26; found 447.2; IR (neat): 3289, 2928, 2873, 1673, 1551, 1463, 1431, 1200, 1177, 1126 cm^{-1} .

20

(c) メチル (4 S) - 4 - [(3 - { 2 - [2 - ({ 9 - [(3 a S , 4 S , 6 a R) - 2 - オキシ - ヘキサヒドロ - 1 H - チエノ [3 , 4 - d] イミダゾリジン - 4 - イル] - 5 - オキシノニル } オキシ) エトキシ] エトキシ } プロピル) カルバモイル) - 4 - [6 - (6 - { [tert - ブトキシ] カルボニル } アミノ } ヘキサンアミド) ヘキサンアミド] ブタノエート (3) の合成 :

【 化 2 3 】



3

30

【 0 1 5 0 】

化合物 1 (9 . 4 g、19 mmol)、HBTU (7 . 3 g、19 mmol) 及び DIPEA (3 . 4 mL、19 mmol) を無水 DMF (90 mL) 中に溶かし、かつ室温で撹拌した。10 分後に、化合物 2 (6 . 6 g、15 mmol) を添加し、かつ該混合物を 1 時間撹拌した。粗混合物を減圧下に濃縮し、かつカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 : MeOH = 10 : 1 ~ CHCl_3 : MeOH : H_2O = 10 : 6 : 1) により精製し、所望の化合物が白色の粘性の泡として得られた (7 . 5 g、55%)。

40

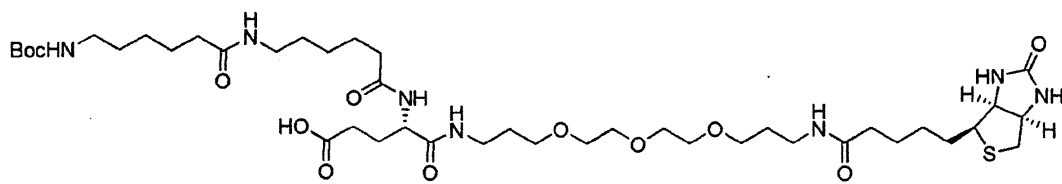
【 0 1 5 1 】

【化24】

TLC (CHCl₃:MeOH:H₂O, 65:25:4 v/v): R_F= 0.8; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 4.57 (ddd, J= 7.9, 5.0, 0.9 Hz, 1H), 4.39 (dt, J= 8.0, 4.8 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.73-3.58 (m, 12H), 3.39-3.22 (m, 7H), 3.10 (t, J= 7.0 Hz, 2H), 3.01 (dd, J= 12.7, 5.0 Hz, 1H), 2.79 (d, J= 12.7 Hz, 1H), 2.47 (t, J= 7.6 Hz, 2H), 2.35-2.23 (m, 6H), 2.21-2.11 (m, 1H), 2.03-1.93 (m, 1H), 1.87-1.36 (m, 31H).

(d) (4S) - 4 - [(3 - { 2 - [2 - ({ 9 - [(3 a S , 4 S , 6 a R) - 2 - オキソ - ヘキサヒドロ - 1 H - チエノ [3 , 4 - d] イミダゾリジン - 4 - イル] - 5 - オキソノニル } オキシ) エトキシ] エトキシ } プロピル) カルバモイル] - 4 - [6 - (6 - { [tert - ブトキシ] カルボニル } アミノ } ヘキサナムイド) ヘキサナムイド] ブタン酸 (4) の合成 :

【化25】



4

【0152】

エステル化合物 3 (0 . 6 2 g 、 0 . 6 8 m m o l) を i - P r O H : H ₂ O (7 : 3) (1 3 . 4 m L) 中 の C a C l ₂ (0 . 8 M) 中 に 溶 か し 、 次 に 0 . 5 M N a O H (1 . 6 m L) を 室 温 で 添 加 し た 。 2 時 間 後 に 、 反 応 混 合 物 を 5 M H C l で 中 和 し 、 次 に こ れ を C H C l ₃ で 3 回 抽 出 し (1 0 0 m L) 、 次 に N a ₂ S O ₄ 上 で 乾 燥 さ せ 、 次 に 減 圧 下 に 濃 縮 し 、 フ ラ ッ シ ュ ク ロ マ ト グ ラ フ ィ ー (C H C l ₃ : M e O H : H ₂ O = 8 5 : 1 5 : 1 ~ 6 5 : 2 5 : 4) に よ り 精 製 し 、 所 望 の 化 合 物 が 無 色 の 粘 性 の 泡 と し て 得 ら れ た (0 . 2 4 g 、 3 9 %) 。

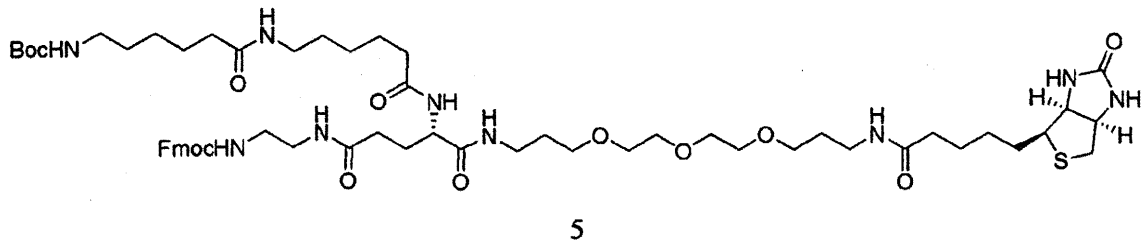
【0153】

【化26】

TLC (CHCl₃:MeOH:H₂O, 10:6:1 v/v): R_F= 0.4; ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 8.00 (t, J= 4.9 Hz, 1H), 7.93 (m, 1H), 4.51 (ddd, J= 5.0, 0.8, 7.9 Hz, 1H), 4.35-4.31 (m, 2H), 3.67-3.53 (m, 12H), 3.31-3.21 (m, 5H), 3.18 (t, J= 7.0 Hz, 2H), 3.04 (t, J= 7.0 Hz, 2H), 2.95 (dd, J= 12.7, 5.0 Hz, 1H), 2.73 (d, J= 12.7 Hz, 1H), 2.38 (t, J= 7.6 Hz, 2H), 2.28 (t, J= 7.5 Hz, 2H), 2.23-2.18 (m, 4H), 2.11-2.05 (m, 1H), 1.95-1.89 (m, 1H), 1.80-1.32 (m, 31H).

(e) tert - ブチル N - { 5 - [(5 - { [(1 S) - 1 - [(3 - { 2 - [2 - (3 - { 5 - [(3 a S , 4 S , 6 a R) - 2 - オキソ - ヘキサヒドロ - 1 H - チエノ [3 , 4 - d] イミダゾリジン - 4 - イル] ペンタンアמיד } プロポキシ) エトキシ] エトキシ } プロピル) カルバモイル] - 3 - [(2 - { [(9 H - フルオレン - 9 - イルメトキシ) カルボニル] アミノ } エチル) カルバモイル] プロピル] カルバモイル } ペンチル) カルバモイル] ペンチル } カルバメート (5) の合成 :

【化27】



10

【0154】

DMF (50 mL) 中の4の溶液 (3.4 g、3.8 mmol) に、HBTU (1.7 g、4.6 mmol) 及びDIPEA (0.80 mL、4.6 mmol) を添加した。室温で10分間攪拌した後に、この反応混合物に、N-1-Fmoc-1,2-ジアミノエタンヒドロクロリド (1.3 g、4.6 mmol) を添加し、かつ次に30分間攪拌した。溶剤を減圧下に蒸発させ、かつフラッシュクロマトグラフィー (CH₂Cl₂:MeOH = 10:1 ~ CHCl₃:MeOH:H₂O = 65:25:4) により精製し、所望の化合物が無色の粘性の泡として得られた (4.3 g、97%)。

【0155】

【化28】

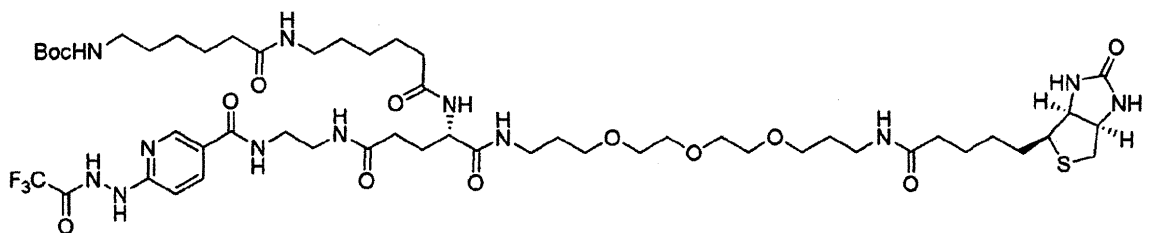
20

TLC (CHCl₃:MeOH:H₂O, 65:25:4 v/v): R_F = 0.8; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.82 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.67 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.41 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.33 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 4.49 (dd, J = 7.5, 4.8 Hz, 1H), 4.35-4.30 (m, 3H), 4.22 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 3.66-3.48 (m, 12H), 3.28-3.14 (m, 10H), 3.05 (dd, J = 6.9, 4.2 Hz, 2H), 2.93 (dd, J = 12.7, 5.0 Hz, 1H), 2.72 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 2.29-2.16 (m, 8H), 2.12-2.05 (m, 1H), 1.94-1.89 (m, 1H), 1.78-1.61 (m, 12H), 1.48-1.29 (m, 21H).

(f) tert-ブチルN- {5 - [(5 - { [(1S) - 1 - [(3 - { 2 - [2 - ({ 9 - [(3aS, 4S, 6aR) - 2 - オキソ - ヘキサヒドロ - 1H - チエノ [3, 4 - d] イミダゾリジン - 4 - イル] - 5 - オキソノニル } オキシ) エトキシ] エトキシ } プロピル) カルバモイル] - 3 - [(2 - { [6 - (2, 2, 2 - トリフルオロアセトヒドラジド) ピリジン - 3 イル] ホルムアミド } エチル) カルバモイル] プロピル] カルバモイル } ペンチル) カルバモイル] ペンチル } カルバメート (6) の合成:

30

【化29】



40

【0156】

DMF (40 mL) 中の5の溶液 (4.4 g、3.8 mmol) に、ピペリジン (溶剤の20%、8 mL) を添加し、かつ反応混合物を室温で20分間攪拌し、かつEt₂O (500 mL) に添加した。ジエチルエーテルをデカントし、かつ粗化合物にジエチルエーテル (250 mL) を2回注ぎ、かつ次にシロップ化合物をMeOH (100 mL) 中に溶かし、かつ減圧下に濃縮し、かつ生成物の2.4 gを更に精製せずに繰り越した。この

50

生成物 (2 . 4 g 、 2 . 6 m m o l) 及び 6 - (2 , 2 , 2 - トリフルオロアセトヒドラジド) ピリジン - 3 - カルボン酸 (1 . 3 g 、 5 . 2 m m o l ; A b r a m s , M . J . 等 , J . N u c l . M e d . 1 9 9 0 . 3 1 , 2 0 2 2 により合成) を D M F (3 0 m l) 中に溶かし、かつ E D C l (1 . 1 g 、 5 . 2 m m o l) 及び D M A P (6 3 m g 、 0 . 5 2 m m o l) を該反応混合物に添加し、かつ室温で 3 時間攪拌した。溶剤を減圧下に蒸発させ、かつフラッシュクロマトグラフィー (C H ₂ C l ₂ : M e O H = 1 0 : 1 ~ C H C l ₃ : M e O H : H ₂ O = 6 5 : 2 5 : 4) により精製し、所望の化合物が黄色の粘性の泡として得られた (1 . 6 g 、 5 3 %) 。

【 0 1 5 7 】

【 化 3 0 】

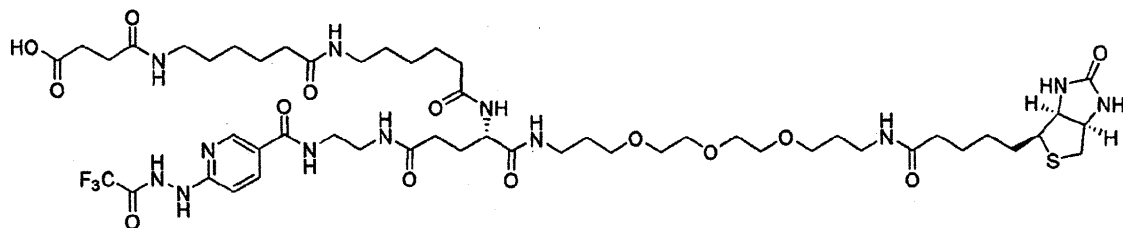
10

TLC (CHCl₃:MeOH:H₂O, 10:6:1 v/v): R_F= 0.7; ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 10.10 (dd, J = 2.3, 0.6 Hz, 1H), 10.05 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 9.98 (t, J = 6.1 Hz, 1H), 9.76 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 9.70 (dd, J = 13.5, 6.8 Hz, 1H), 9.64 (dd, J = 7.7, 3.5 Hz, 1H), 9.59-9.55 (m, 2H), 9.50-9.46 (m, 2H), 8.34 (d, J = 8.8, 1H), 8.13-8.09 (m, 2H), 7.99 (s, 1H), 6.04 (dd, J = 7.8, 5.0 Hz, 1H), 5.86-5.77 (m, 2H), 5.19-4.96 (m, 16H), 4.80-4.68 (m, 7H), 4.57 (dd, J = 13.0, 7.0 Hz, 2H), 4.48 (dd, J = 12.7, 5.0 Hz, 1H), 4.25 (d, J = 12.6 Hz, 1H), 3.83-3.78 (m, 4H), 3.75-3.69 (m, 4H), 3.64-3.56 (m, 1H), 3.48-3.38 (m, 1H), 3.32-2.84 (m, 31H).

20

(g) 3 - ({ 5 - [(5 - { [(1 S) - 1 - [(3 - { 2 - [2 - (3 - { 5 - [(3 a S , 4 S , 6 a R) - 2 - オキソ - ヘキサヒドロ - 1 H - チエノ [3 , 4 - d] イミダゾリジン - 4 - イル] ペンタンアミド } プロポキシ) エトキシ] エトキシ } プロピル) カルバモイル] - 3 - [(2 - { [6 - (2 , 2 , 2 - トリフルオロアセトヒドラジド) ピリジン - 3 イル] ホルムアミド } エチル) カルバモイル] プロピル] カルバモイル } ペンチル) カルバモイル] ペンチル } カルバモイル) プロピオン酸 (7) の合成 :

【 化 3 1 】



7

30

【 0 1 5 8 】

化合物 6 (2 0 m g 、 1 8 μ m o l) を T F A (0 . 5 m l) 中に溶かし、かつ蒸発させ、真空中で乾燥させた。更に精製せずに、生成物 (1 8 m g 、 1 8 μ m o l) を D M F (1 m l) 中に溶かし、次に D I P E A (4 . 3 μ l 、 1 9 μ m o l) 及び無水コハク酸 (2 . 2 m g 、 1 9 μ m o l) を添加し、かつ室温で攪拌し、3 時間後に粗混合物を減圧下に蒸発させ、フラッシュクロマトグラフィー (C H ₂ C l ₂ : M e O H = 1 0 : 1 ~ C H C l ₃ : M e O H : H ₂ O = 1 0 : 6 : 1) により精製し、所望の酸化合物が黄色の粘性の泡として得られた (定量的収率 2 0 m g) 。

40

【 0 1 5 9 】

【化32】

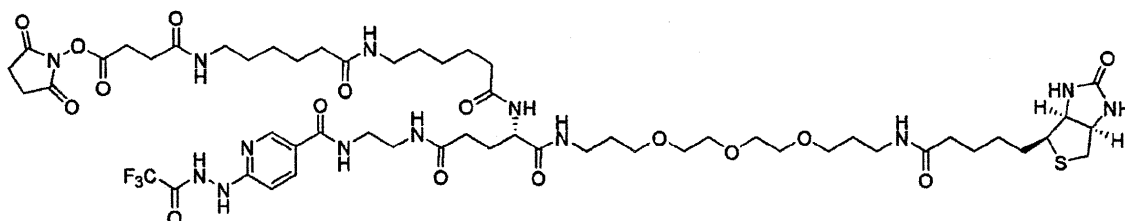
TLC (CHCl₃:MeOH:H₂O, 10:6:1 v/v): $R_F=0.5$; ¹H-NMR (600 MHz, DMF-d₇): δ 11.96 (brs, 1H), 9.30 (brs, 1H), 8.67 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 8.42 (t, $J=5.4$ Hz, 1H), 8.11-8.07 (m, 2H), 7.97 (dd, $J=8.0, 3.6$ Hz, 1H), 7.92 (td, $J=5.6, 2.8$ Hz, 1H), 7.82 (t, $J=5.4$ Hz, 1H), 7.75 (dd, $J=12.9, 5.5$ Hz, 2H), 6.86 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 6.45 (brs, 1H), 6.36 (s, 1H), 4.49-4.47 (m, 1H), 4.35 (td, $J=8.5, 5.2$ Hz, 1H), 4.30 (ddd, $J=6.7, 4.4, 1.9$ Hz, 1H), 3.82-3.75 (m, 1H), 3.37 (m, 17H), 3.33-3.329 (m, 2H), 3.25-3.19 (m, 5H), 3.13 (dd, $J=12.9, 6.9$ Hz, 4H), 2.94 (d, $J=7.4$ Hz, 1H), 2.72 (d, $J=12.4$ Hz, 1H), 2.56 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 2.45 (t, $J=7.0$ Hz, 2H), 2.27-2.22 (dt, $J=10.5, 5.0$ Hz, 4H), 2.18-2.13 (m, 4H), 2.10-2.06 (m, 1H), 1.89-1.83 (m, 1H), 1.79-1.68 (m, 5H), 1.64-1.54 (m, 7H), 1.48-1.28 (m, 12H).

10

(h) 2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル-3-({ 5-[(5-{ [(1S) - 1-[(3-{ 2-[2-({ 9-[(3 a S , 4 S , 6 a R) - 2-オキソ-ヘキサヒドロ-1H-チエノ[3, 4-d]イミダゾリジン-4-イル] - 5-オキソノニル } オキシ) エトキシ] エトキシ } プロピル) カルバモイル] - 3-[(2-{ [6-(2, 2, 2-トリフルオロアセトヒドラジド) ピリジン-3-イル]] ホルムアミド } エチル) カルバモイル] プロピル] カルバモイル } ペンチル) カルバモイル] ペンチル } カルバモイル) プロピオネート (8) の合成 :

20

【化33】



8

30

【0160】

生成物7 (84 mg、71 μmol)、EDCI (34 mg、18 μmol) 及び N H S (19 mg、16 μmol) を DMF (1 ml) 中に溶かし、かつ次に反応混合物を室温で一晩攪拌した。得られた混合物を減圧下に蒸発させ、かつフラッシュクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH:H₂O = 10:6:1) により精製し、所望の化合物が黄色の粘性の泡として得られた (51 mg、56%)。

【0161】

【化34】

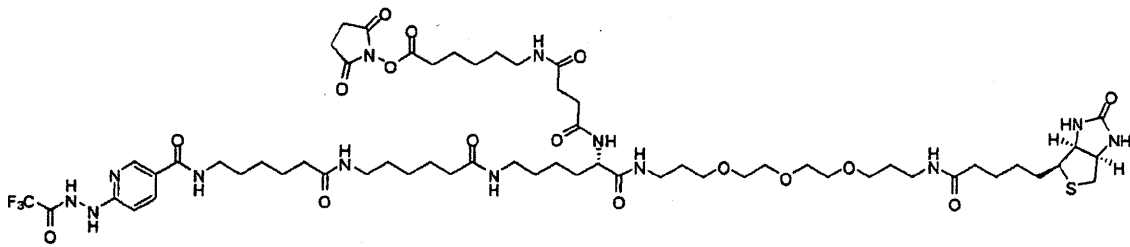
TLC (CHCl₃:MeOH:H₂O, 10:6:1 v/v): $R_F=0.7$; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.63 (d, $J=1.9$ Hz, 1H), 8.10 (dd, $J=8.8, 2.3$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 4.55 (dd, $J=7.6, 4.7$ Hz, 1H), 4.38-4.34 (m, 2H), 3.75-3.48 (m, 16H), 3.35-3.20 (m, 12H), 3.01-3.297 (m, 2H), 2.89 (s, 3H), 2.74 (s, 3H), 2.64 (t, $J=7.0$ Hz, 2H), 2.35-2.21 (m, 6H), 2.17-2.05 (m, 1H), 1.98-1.91 (m, 1H), 1.67 (m, 22H).

40

【0162】

例2: 架橋剤 Joy-05-125 の合成

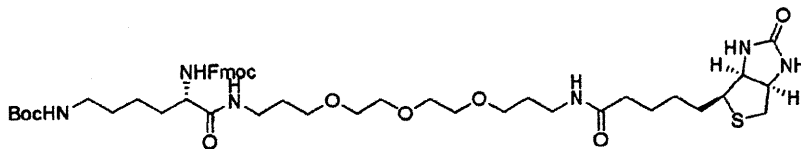
【化35】



(a) tert - ブチル N - [(5 S) - 5 - [(3 - { 2 - [2 - ({ 9 - [(3 a S , 4 S , 6 a R) - 2 - オキソ - ヘキサヒドロ - 1 H - チエノ [3 , 4 - d] イミダゾリジン - 4 - イル] - 5 - オキソノニル } オキシ) エトキシ] エトキシ } プロピル) カルバモイル] - 5 - { [(9 H - フルオレン - 9 - イルメトキシ) カルボニル] アミノ } ペンチル] カルバメート (9) の合成 :

10

【化36】



20

9

【0163】

Fmoc - N - Boc - L - リジン (1 . 7 g , 3 . 7 mmol) を DMF (20 mL) 中に溶かし、かつ次に該溶液に DIPEA (0 . 63 mL , 3 . 7 mmol) と HBTU (1 . 7 g , 4 . 4 mmol) を添加し、かつ10分後に該反応混合物に DMF (5 mL) 中の 1 - N - ビオチニル - 4 , 7 , 10 - トリオキサトリデカン - 1 , 13 - ジアミン (1 . 8 g , 4 . 1 mmol) の溶液を添加し、かつ室温で1時間攪拌し、かつ次に溶剤を減圧下に蒸発させ、かつフラッシュクロマトグラフィー (CHCl₃ : MeOH : H₂O = 10 : 6 : 1) により精製し、所望の化合物が白い粘性の泡として得られた (2 . 6 g , 78%) 。

30

【0164】

【化37】

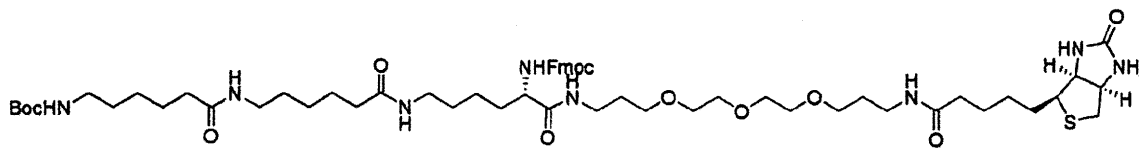
TLC (CH₂Cl₂:MeOH, 10:1 v/v): R_F= 0.2; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.86 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.73 (dd, J = 6.5, 4.7 Hz, 2H), 7.48-7.36 (m, 4H), 4.53 (dd, J = 7.8, 4.3 Hz, 1H), 4.46 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 4.33 (dd, J = 7.9, 4.5 Hz, 1H), 4.28 (t, J = 6.7 Hz, 1H), 4.09 (dd, J = 8.3, 5.3 Hz, 1H), 3.66-3.53 (m, 12H), 3.36-3.29 (m, 4H), 3.27-3.20 (m, 1H), 3.10 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.96 (dd, J = 12.7, 5.0 Hz, 1H), 2.76 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 2.24 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.85-1.41 (m, 25H); HRMS (m/z): [M+Na]⁺ calcd for C₄₆H₆₈N₆O₁₀S, 896.47; found 919; IR (neat): 3283, 2929, 2866, 1690, 1652, 1529, 1365, 1247, 1166, 1102, 1042, 843, 741 cm⁻¹.

40

(b) tert - ブチル N - { 5 - [(5 - { [(5 S) - 5 - [(3 - { 2 - [2 - ({ 9 - [(3 a S , 4 S , 6 a R) - 2 - オキソ - ヘキサヒドロ - 1 H - チエノ [3 , 4 - d] イミダゾリジン - 4 - イル] - 5 - オキソノニル } オキシ) エトキシ] エトキシ } プロピル) カルバモイル] - 5 - { [(9 H - フルオレン - 9 - イルメトキシ) カルボニル] アミノ } ペンチル] カルバモイル } ペンチル) カルバモイル] ペンチル } カルバメート (10) の合成 :

50

【化38】



10

10

【0165】

化合物9 (2.6 g、2.9 mmol) を CH_2Cl_2 : TFA (1 : 1、20 mL) の混合物中に撹拌して入れ、かつ次に0 で30分間撹拌し、かつ蒸発させ及び高真空下に乾燥させた。粗生成物 (2.4 g、30 mmol) 及び2,5-ジオキソピロリジン-1-イル6-(6-{[(tert-ブトキシ)カルボニル]アミノ}ヘキサンアミド)ヘキサノエート (1.5 g、3.5 mmol; Srinivasan, B. and Huang, X. Chirality 2008, 20, 265により合成) を MeOH (6 mL) 中に溶かし、かつ次に該混合物にTEA (0.83 mL、5.9 mmol) を添加し、かつ室温で20分間撹拌し、かつ次に溶剤を減圧下に蒸発させ、かつフラッシュクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1 ~ CHCl_3 : MeOH : H_2O = 85 : 15 : 1) により精製し、所望の化合物が白い粘性の泡として得られた (2.8 g、84%)。

20

【0166】

【化39】

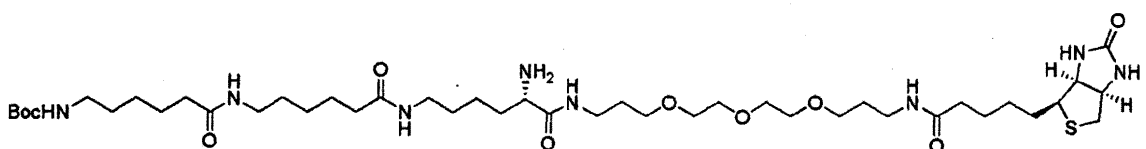
TLC (CH_2Cl_2 :MeOH, 10:1 v/v): R_F = 0.8; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 7.85 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.72 (dd, J = 6.7, 4.1 Hz, 2H), 7.45 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.37 (td, J = 7.5, 1.0 Hz, 2H), 4.52 (dd, J = 7.5, 4.6 Hz, 1H), 4.45 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 4.30 (m, 2H), 4.07 (dd, J = 8.3, 5.2 Hz, 1H), 3.63-3.52 (m, 12H), 3.34-3.18 (m, 9H), 3.09-3.05 (m, 2H), 2.95 (dd, J = 5.0, 12.7, 1H), 2.77 (d, J = 5.7, 1H), 2.26-2.19 (m, 6H), 1.83-1.34 (m, 37H); HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{58}\text{H}_{90}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{S}$, 1122.64; found 1146; IR (neat): 3320, 2933, 2864, 2476, 2426, 1705, 1636, 1538, 1426, 1214, 1077, 742 cm^{-1} .

30

(c) tert-ブチルN-{5-[(5-{ [(5S)-5-[(3-{ 2-[2-((9-[(3aS, 4S, 6aR)-2-オキソ-ヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾリジン-4-イル]-5-オキソノニル}オキシ)エトキシ]エトキシ}プロピル)カルバモイル]-5-{ [(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル]アミノ}ペンチル]カルバモイル}ペンチル)カルバモイル]ペンチル}カルバメート(11)の合成:

40

【化40】



【0167】

50

化合物 10 (0.39 g, 0.35 mmol) を DMF (3 mL) 中に溶かし、かつ次に該溶液にピペリジン (0.2 mL) を室温で 5 分間添加し、かつ次に該反応混合物に Et₂O (100 mL) を添加し、かつ次にエーテル層をデカントし、かつ次に油性の粗混合物を MeOH 中に溶かし、かつ減圧下に濃縮し、かつフラッシュクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH:H₂O = 65:25:4 ~ 10:6:1) により精製し、所望の化合物が白い粘性の泡として得られた (0.21 g, 67%)。

【0168】

【化41】

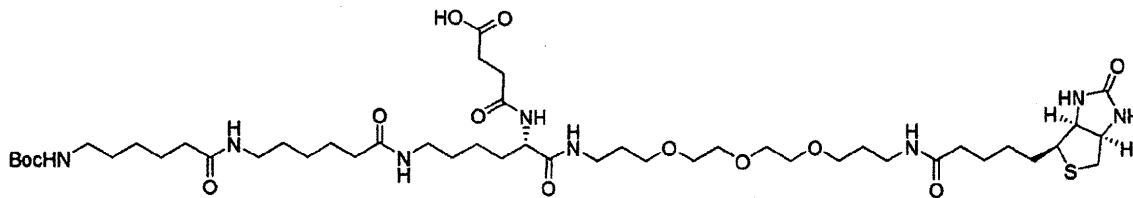
TLC (CH₂Cl₂:MeOH:H₂O, 65:25:4 v/v): R_F = 0.2; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 4.57 (dd, J = 7.8, 4.5 Hz, 1H), 4.38 (dd, J = 7.9, 4.5 Hz, 1H), 3.72-3.58 (m, 12H), 3.48 (brs, 1H), 3.33-3.21 (m, 9H), 3.10 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.00 (dd, J = 12.7, 5.0 Hz, 1H), 2.78 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 2.29-2.23 (m, 6H), 1.87-1.38 (m, 37H).

10

(d) 3 - { [(1S) - 1 - [(3 - { 2 - [2 - ({ 9 - [(3aS, 4S, 6aR) - 2 - オキソ - ヘキサヒドロ - 1H - チエノ [3 , 4 - d] イミダゾリジン - 4 - イル] - 5 - オキソノニル } オキシ) エトキシ] エトキシ } プロピル) カルバモイル] - 5 - [6 - (6 - { [tert - ブトキシ) カルボニル] アミノ } ヘキサンアミド) ヘキサンアミド] ペンチル] カルバモイル } プロピオン酸 (12) の合成 :

20

【化42】



12

30

【0169】

化合物 11 (2.1 g, 2.3 mmol) を DMF (1 mL) 中に溶かし、次に該溶液に DIPEA (0.48 mL, 2.8 mmol) 及び無水コハク酸 (0.28 g, 2.8 mmol) を室温で 1.5 時間添加し、かつ次に溶剤を減圧下に蒸発させ、フラッシュクロマトグラフィー (CH₂Cl₂:MeOH = 10:1 ~ CHCl₃:MeOH:H₂O = 65:25:4 ~ 10:6:1) により精製し、所望の化合物が白い粘性の泡として得られた (1.4 g, 61%)。

【0170】

【化43】

TLC (CH₂Cl₂:MeOH:H₂O with 2 drops of acetic acid, 65:25:4 v/v): R_F = 0.25; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 4.56 (dd, J = 7.8, 4.7 Hz, 1H), 4.37 (dd, J = 7.9, 4.5 Hz, 1H), 4.31 (dd, J = 9.2, 4.9 Hz, 1H), 3.72-3.64 (m, 12H), 3.35-3.20 (m, 9H), 3.09 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.00 (dd, J = 12.7, 4.9 Hz, 1H), 2.77 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 2.69 (dd, J = 12.9, 6.0 Hz, 2H), 2.58 (dd, J = 13.8, 7.2 Hz, 2H), 2.28-2.22 (m, 6H), 1.94-1.35 (m, 37H).

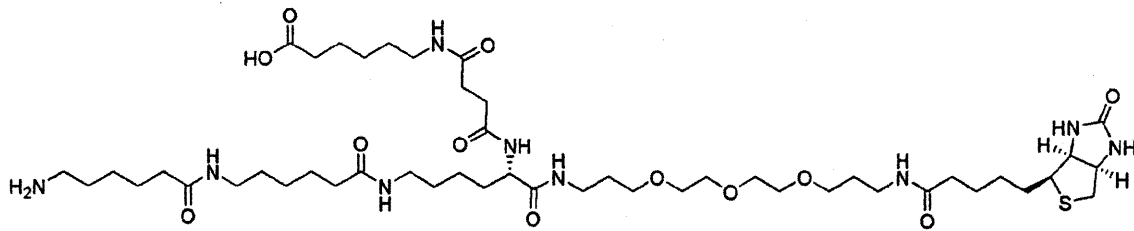
40

【0171】

(e) 6 - (3 - { [(1S) - 1 - [(3 - { 2 - [2 - ({ 9 - [(3aS, 4S, 6aR) - 2 - オキソ - ヘキサヒドロ - 1H - チエノ [3 , 4 - d] イミダゾリジン -

50

4 - イル] - 5 - オキソノニル } オキシ) エトキシ] エトキシ } プロピル) カルバモイル] - 5 - [6 - (6 - アミノヘキサンアミド) ヘキサンアミド] ペンチル] カルバモイル } プロパンアミド) ヘキサン酸 (13) の合成 :
【化 4 4】



13

10

【 0 1 7 2 】

化合物 12 (1 . 3 g、1 . 3 m m o l)、D I P E A (0 . 2 7 m L、1 . 6 m m o l) 及び H B T U (0 . 6 1 g、1 . 6 m m o l) を D M F (1 5 m L) 中に溶かし、かつ 5 分後に該溶液に 6 - アミノカプロン酸 (0 . 2 1 g、1 . 6 m m o l) を室温で添加し、かつ 1 . 5 時間攪拌し、かつ次に減圧下に蒸発させ、かつフラッシュクロマトグラフィー (C H C l ₃ : M e O H : H ₂O = 8 5 : 1 5 : 1 ~ 6 5 : 2 5 : 4) により精製し、
所望の化合物が白い粘性の泡として得られた (1 . 5 g、定量的)。

20

【 0 1 7 3 】

【化 4 5】

TLC (CH₂Cl₂:MeOH:H₂O with 2 drops of acetic acid, 65:25:4 v/v): R_F= 0.25; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 4.49 (dd, J = 7.7, 4.8 Hz, 1H), 4.30 (dd, J = 7.8, 4.4 Hz, 1H), 4.26-4.19 (m, 1H), 3.63-3.45 (m, 12H), 3.31-3.12 (m, 11H), 3.03-2.91 (m, 3H), 2.90 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 2.70 (d, J = 13.5 Hz, 1H), 2.28 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.22-2.11 (m, 6H), 2.19-1.31 (m, 38H); HRMS (m/z): [M+H]⁺ calcd for C₄₈H₈₇N₉O₁₂S, 1013.62; found 1015.

30

【 0 1 7 4 】

生成物 (1 . 5 g、1 . 3 m m o l) を C H ₂ C l ₂ : T F A (1 : 1、2 0 m L) の混合物中に攪拌して入れ、かつ次に 0 で 1 0 分間攪拌し、かつ次に蒸発させ、フラッシュクロマトグラフィー (C H ₂ C l ₂ : M e O H = 1 0 : 1 ~ C H C l ₃ / M e O H / H ₂O = 1 0 : 6 : 1) により精製し、所望の化合物 1 3 が白い粘性の泡として得られた (1 . 4 g、6 1 %)。

【 0 1 7 5 】

【化 4 6】

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 4.56 (dd, J = 7.9, 4.2 Hz, 1H), 4.37 (dd, J = 7.9, 4.5 Hz, 1H), 4.29 (dd, J = 9.2, 4.8 Hz, 1H), 3.71-3.55 (m, 12H), 3.34-3.21 (m, 11H), 3.02-2.97 (m, 3H), 2.77 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 2.64-2.51 (m, 4H), 2.36 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.29-2.22 (m, 6H), 1.95-1.38 (m, 34H).

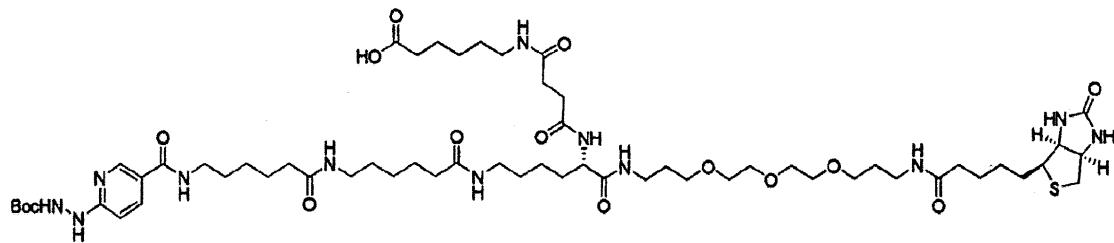
40

(f) 6 - (3 - { [(1 S) - 1 - [(3 - { 2 - [2 - ({ 9 - [(3 a S , 4 S , 6 a R) - 2 - オキソ - ヘキサヒドロ - 1 H - チエノ [3 , 4 - d] イミダゾリジン - 4 - イル] - 5 - オキソノニル } オキシ) エトキシ] エトキシ } プロピル) カルバモイル] - 5 - [6 - (6 - { [6 - ({ [(t e r t - ブトキシ) カルボニル] アミノ } アミノ) ピリジン - 3 - イル] ホルムアミド } ヘキサンアミド) ヘキサンアミド] ペンチル] カ

50

ルバモイル } プロパンアミド) ヘキサン酸 (14) の合成 :

【化 47】



14

10

【 0 1 7 6 】

6 - ({ [(tert - ブトキシ) カルボニル] アミノ } アミノ) ピリジン - 3 - カルボン酸 (0.43 g, 1.7 mmol, Abrams, M. J. 等, J. Nucl. Med. 1990, 31, 2022 により合成)、HBTU (0.51 g, 1.4 mmol) 及び DIPEA (0.23 mL, 1.4 mmol) を DMF (10 mL) 中に室温で 5 分間溶かし、かつ次に該混合物に DMF (10 mL) 中の化合物 13 の溶液 (1.1 g, 1.1 mmol) を添加し、かつ次に室温で 40 分間攪拌し、次に減圧下に蒸発させ、かつフラッシュクロマトグラフィー (CH₂Cl₂ : MeOH = 10 : 1 ~ CHCl₃ : MeOH : H₂O = 65 : 25 : 4) により精製し、所望の化合物が僅かに黄色い粘性の泡として得られた (0.96 g, 68%)。

20

【 0 1 7 7 】

【化 48】

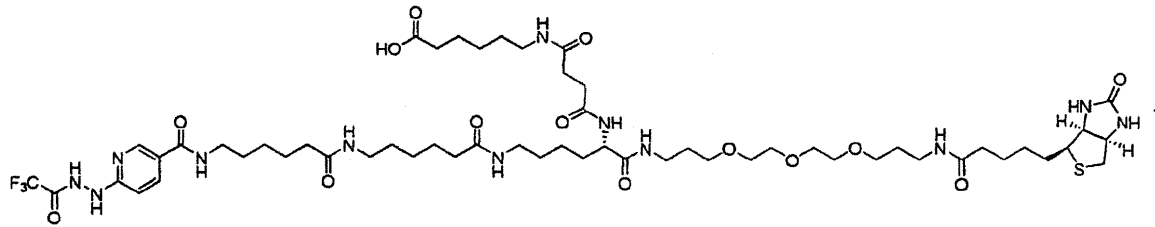
TLC (CH₂Cl₂:MeOH:H₂O, 65:25:4 v/v): R_F= 0.4; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.60 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 8.06 (dd, J = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 6.76 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 4.55 (dd, J = 7.8, 5.0 Hz, 1H), 4.37 (dd, J = 7.9, 4.5 Hz, 1H), 4.29 (dd, J = 9.2, 4.9 Hz, 1H), 3.71-3.55 (m, 12H), 3.44-3.40 (m, 2H), 3.29-3.19 (m, 11H), 2.99 (dd, J = 12.7, 5.0 Hz, 1H), 2.77 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 2.63-2.50 (m, 4H), 2.35 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.27-2.22 (m, 6H), 1.94-1.35 (m, 43H); HRMS (m/z): [M+Na]⁺ calcd for C₅₉H₁₀₀N₁₂O₁₅S, 1248.72; found 1271.7; IR (neat): 3249, 3079, 2933, 2863, 1635, 1546, 1459, 1367, 1251, 1160, 1101 cm⁻¹.

30

(f) 6 - (3 - { [(1 S) - 1 - [(3 - { 2 - [2 - ({ 9 - [(3 a S , 4 S , 6 a R) - 2 - オキソ - ヘキサヒドロ - 1 H - チエノ [3 , 4 - d] イミダゾリジン - 4 - イル] - 5 - オキソノニル } オキシ) エトキシ] エトキシ } プロピル) カルバモイル] - 5 - [6 - (6 - { [(6 - (2 , 2 , 2 - トリフルオロアセトヒドラジド) ピリジン - 3 - イル] ホルムアミド } ヘキサンアミド) ヘキサンアミド] ペンチル] カルバモイル } プロパンアミド) ヘキサン酸 (15) の合成 :

40

【化49】



15

10

【0178】

化合物14 (0.16 g, 0.14 mmol) を TFA (4 mL) 中に溶かし、かつ次に室温で30分間攪拌し、かつ次に蒸発させ、かつセファデックス LH-20 を通して濾過し、かつ真空下に乾燥させた (紫色)。紫色の非晶質固体を DMF (1.5 mL) 中に溶かし、かつ次に該溶液に TFAA (21 μ l, 0.15 mmol) を添加し、かつ次に該混合物を室温で30分間攪拌した (紫 → 黄緑)。粗混合物を減圧下に蒸発させ、かつセファデックス LH-20 (CHCl₃/MeOH = 95:5) により精製し、所望の化合物が僅かに黄色い粘性の泡として得られた (0.14 g, 90%)。

【0179】

【化50】

20

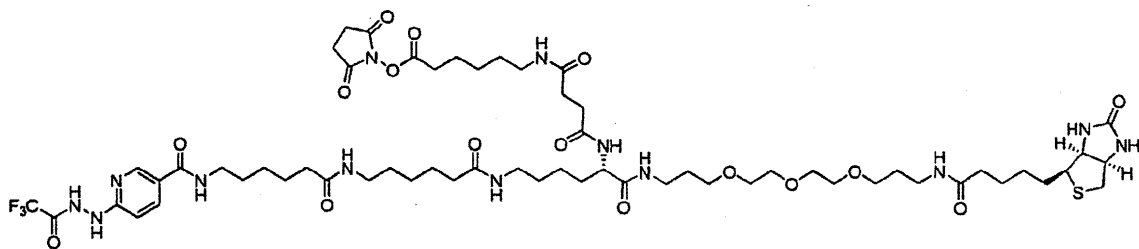
TLC (CH₂Cl₂:MeOH:H₂O, 65:25:4 v/v): R_f = 0.6; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.60 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 8.06 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 7.97 (dd, J = 11.5, 5.9 Hz, 2H), 7.19 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 4.55 (dd, J = 7.7, 5.0 Hz, 1H), 4.36 (dd, J = 7.8, 4.5 Hz, 1H), 4.29 (dd, J = 9.2, 4.8 Hz, 1H), 3.69-3.54 (m, 12H), 3.44-3.40 (m, 2H), 3.33-3.22 (m, 11H), 2.98 (dd, J = 12.7, 5.0 Hz, 1H), 2.77 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 2.63-2.50 (m, 4H), 2.34 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.24 (dd, J = 16.8, 7.6 Hz, 6H), 1.86-1.38 (m, 34H); ¹⁹F-NMR (282 MHz, CD₃OD): δ -76.88, -76.93; HRMS (m/z): [M-2H]⁺ calcd for C₅₉H₁₀₀F₃N₁₂O₁₅S, 1244.65; found 1242; IR (neat): 3293, 3084, 1626, 1547, 1461, 1364, 1256, 1116 cm⁻¹.

30

(g) 2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル - 6 - (3 - { [(1S) - 1 - [(3 - { 2 - [2 - ({ 9 - [(3aS, 4S, 6aR) - 2 - オキソ - ヘキサヒドロ - 1H - チエノ [3, 4 - d] イミダゾリジン - 4 - イル] - 5 - オキソノニル } オキシ) エトキシ] エトキシ } プロピル) カルバモイル] - 5 - [6 - (6 - { [(6 - (2, 2, 2 - トリフルオロアセトヒドラジド) ピリジン - 3 - イル] ホルムアミド } ヘキサノアミド) カルバモイル } プロパンアミド) ヘキサノエート (16) の合成 :

【化51】

40



16

【0180】

50

化合物 15 (28 mg、23 μmol)、NHS (3.1 mg、27 μmol) 及び EDCI (5.6 mg、27 μmol) を DMF (0.3 mL) 中に溶かし、かつ次に反応混合物を一晩攪拌し、かつ粗混合物を減圧下に濃縮し、かつセファデックス LH-20 (CHCl₃/MeOH = 95:5) により精製し、所望の化合物が僅かに緑色の粘性の泡として得られた (19 mg、62%)。

【0181】

【化52】

TLC (CH₂Cl₂:MeOH:H₂O, 65:25:4 v/v): R_f = 0.8; ¹H-NMR (600 MHz, DMF-*d*₇): δ 9.46 (brs, 1H), 8.70 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 8.33-8.25 (m, 1H), 8.14 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 8.01-7.99 (m, 2H), 7.95-7.93 (m, 1H), 7.91-7.85 (m, 1H), 7.78-7.71 (m, 3H), 7.15 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.41 (brs, 1H), 6.32 (brs, 1H), 4.47 (dd, J = 6.9, 5.8 Hz, 1H), 4.31-4.29 (m, 1H), 4.27-4.23 (m, 1H), 3.59-3.45 (m, 12H), 3.336-3.32 (m, 2H), 3.24-3.12 (m, 11H), 2.93 (s, 4H), 2.73-2.69 (m, 2H), 2.54-2.42 (m, 4H), 2.18-2.13 (m, 8H), 1.86-1.29 (m, 34H); ¹⁹F-NMR (282 MHz, CD₃OD): δ -70.52, -75.60; HRMS (m/z): [M+Na+2H]⁺ calcd for C₆₀H₉₄F₃N₁₃O₁₆S, 1341.66; found 1366; LCMS found 1343.3 [M+2H]⁺; IR (neat): 3390, 3283, 2932, 2865, 1633, 1551, 1459, 1365, 1073 cm⁻¹.

10

【0182】

20

例3：インスリンで獲得したリガンド-ベースのレセプター

(a) 三官能性架橋剤 Joy-05-125 (例2により得られたもの) へのリガンドカップリング

Joy-05-125 (DMSO中100 mM) 50 μg を、HEPES (pH 8.2) 10 μl 中のインスリン (I9278, Sigma-Aldrich) 100 μg に加え、架橋剤：リガンド = 約 2 : 1 の割合が得られた。コントロール試料には、Joy-05-125 (DMSO中100 mM) 50 μg をクエンチング溶液 (HEPES (pH 8.2) 10 μl 中の10 mM グリシン) に添加した。反応を室温で約1時間実施した。

(b) 細胞の回収及び細胞表面糖タンパク質の酸化

2×10^8 細胞 (Jurkat T) を 50 mL 試験管中に回収し、かつリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) で洗浄した。引き続き、ラベリング緩衝液 (PBS, pH 6.5) 中、1.5 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム (Thermo Scientific) で細胞を暗所にて 4 で 15 分間酸化した。細胞ペレットを 50 mL ラベリング緩衝液で一回洗浄し、殆どのメタ過ヨウ素酸ナトリウムを除去し、かつ死細胞/断片を減らした。

30

(c) リガンド-ベースのレセプターの獲得

細胞ペレットを2つの分離管中のラベリング緩衝液中に再懸濁させた (全ての後続の工程は、それぞれリガンド及びコントロール反応に平行して実施した)。Joy-05-125 及びクエチ剤に結合したインスリンを、ラベリング緩衝液 10 mL 中の 10^8 細胞に添加し、かつ 4 で遅い回転機中で 60 分間インキュベートした。獲得に際し、細胞ペレットを 50 mL PBS で洗浄した。

40

(d) 細胞分解及びトリプシン消化

細胞ペレットを 50 mM 炭酸水素アンモニウム 1 mL 中に再懸濁させた。間接的なソニケーション (100% 振幅 / 0.8 サイクル) により、Vial Tweeter (Hielscher) 中に細胞を溶かし、かつ溶解物を 4、25000 g で 10 分間遠心分離し、細胞核をペレットにした。上澄み液を新たな管に移し、かつ酸に不安定な界面活性剤 Rapi Gest (Waters) を添加して、0.1% の最終濃度にし、続いて 5 分間の間接的な超音波処理により、透明な溶液を得た。試料を 5 mM TCEP (Thermo Scientific) で 30 分間室温で還元し、続いて 10 mM ヨードアセトアミド (Thermo Scientific) でアルキル化した。トリプシン (ウシの

50

脾臓から、Sigma Aldrich) 200 µg を添加し、かつ試料を遅い回転機で一晩消化させた。消化の際に、ペプチド混合物を 96 で 10 分間加熱し、プロテアーゼを不活性化し、かつ未消化の粒子を 13000 g で 10 分間の遠心分離により除去した。

(e) グリコペプチドの獲得と遊離

UltraLink ストレプトアビジン・プラス・ビーズ (Thermo Scientific) 2 × 50 µl をモビコール (Bocascientific) 中で、50 mM 炭酸水素アンモニウムで 2 回洗浄した。洗浄したストレプトアビジンビーズをペプチド溶液に添加し、かつ遅い回転機上で 1 時間インキュベートした。獲得したグリコペプチドを 5 M の塩化ナトリウム 10 ml でよく洗浄し、続いて 50 mM 炭酸水素アンモニウム中の 1% トリトン X-100 (Sigma) 10 ml で、続いて 50 mM 炭酸水素アンモニウム 10 ml で、続いて 100 mM 炭酸ナトリウム 10 ml (pH 11) で、続いて 60 に加熱しておいた 100 mM 炭酸水素アンモニウム 10 ml で洗浄した。洗浄は、Vac-Man Laboratory Vacuum Manifold (Promega) に連結されたモビコール中で実施された。洗浄したビーズを 2 µl PNGase F (NEB) 含有の炭酸水素アンモニウム 400 µl 中で、37 で遅い回転機中、一晩インキュベートした。インキュベーションの際に、ビーズを 50 mM 炭酸水素アンモニウム 500 µl で一度洗浄し、かつ溶出液を合わせ、かつ引き続く LC-MS/MS 分析用にスピードバック (speedvac) 中で乾燥させた。

10

(f) LC-MS データ獲得

ペプチドを 2% アセトニトリル、0.1% ギ酸中で再可溶化し、かつクロマトグラフにより分離するための Nano LC UltraID Plus (Eksigent) 系に連結したナノエレクトロスプレーイオン源を備えた LTQ-Orbitrap XL 質量分析計 (Thermo Scientific) において分析した。ペプチドをキャピラリー逆相 C18 カラム上に載せた (内径 75 µm 及び床長さ 10 cm; 200 Å, 3 µm C18 ビーズ, Michrom Bio Resources)。逆相クロマトグラフィーを 300 nl / 分の流量で実施し、かつ B2 ~ 40% の直線勾配溶出を 40 分間行った。(A) 0.1% ギ酸、2% アセトニトリル、及び (B) 0.1% ギ酸、98% アセトニトリル。MS 装置をデータ依存法で運転し、それにより 5 つの衝突誘起解離 (CID) MS/MS スペクトルが FT-MS スキャン当たりリニアイオントラップで獲得され、後者は 60000 FWHM 解像設定で獲得された。MS/MS アテンプトを引き起こす全ての多価帯電イオンを含み、単一に帯電した全ての前駆イオンならびに電荷状態を決定できないイオンを除く電荷状態スクリーニングを用いた。250 イオンカウントの閾値を超えるペプチドイオンだけが MS/MS - スキャンを引き起こすことができ、引き続いて 5 秒間の動的排除を行った。

20

30

【0183】

(g) データベースの検索及びペプチド/タンパク質の定量化

SEQUEST アルゴリズムを用いて全ての MS/MS スペクトルを UniProtKB/Swiss-Prot データベース (Version 57.15) に対して検索した。ISB オープンソースソフトウェアツール (Peptide Prophet, Protein Prophet (<http://tools.proteomecenter.org/software.php>)) の組合せを用いてデータの統計的分析を実施し、かつ少なくとも 0.8 の Peptide Prophet の傾向スコアを使用して、データをフィルターした。コンセンサス N115-X-S/T グリコシル化モチーフを含むペプチドに関しては、Progenesis LC-MS ソフトウェア (非線形ダイナミック) を用いてラベルフリー定量データ分析を行った。自動的保持時間アライメントを手動で確認し、かつ試料の間で正確な相対定量を保証する必要がある場合には、予めグリコシル化したペプチドの特徴的概要を修正した。予めグリコシル化したペプチドの未処理の存在度を抽出及び標準化し、それぞれリガンド中とコントロール試料中で全体のグリコペプチドの特徴的強さに等しい量が得られた。

40

【0184】

50

データの相対量評価(図2(a)と(b)参照)は、インスリンレセプターだけが、タンパク質レベル(a)とペプチドレベル(b)それぞれにおけるJurkat細胞上のインスリンにとって特定のレセプターとして同定されるタンパク質であることが明らかになった。図2(a)と(b)では、タンパク質又はペプチド存在度がy軸に沿って、より高い存在度のlog10として示されている(インスリン試料又はコントロール試料)。x次元では、インスリン試料:コントロール試料の存在度の比のlog2は、特定の富化を明らかにした(インスリンレセプタータンパク質/ペプチドは、黒く塗りつぶされたデータ要素で、他のタンパク質/ペプチドは空のデータ要素で示されている)。それにより、ペプチド存在度は、所定のグリコペプチド特徴のアイソトープ境界内のピーク面積の合計である。タンパク質存在度は、同じタンパク質から由来することが同定された全ての糖タンパク質イオンの存在度の合計である。とりわけ、インスリンレセプターは、3つの異なるペプチドで同定され、これは平均化した高いタンパク質の富化比に多くの信頼度を与える。

10

【0185】

例4:CD44抗体でのリガンド-ベースのレセプター獲得

(a)三官能性架橋剤Joy-05-125(例2により得られた)へのリガンドカップリング

Joy-05-125(DMSO中100mM)50µgをHEPES(pH8.2)50µl中のモノクローナルCD44抗体(マウスIgG1、クローンDB105、Miltenyi Biotec)100µgに加え、約50:1の架橋剤:リガンドの比が得られた。コントロール試料には、Joy-05-125(DMSO中100mM)50µgをクエンチング溶液(HEPES(pH8.2)50µl中グリシン10mM)に添加した。反応を室温で約1時間実施した。

20

(b)細胞の回収及び細胞表面糖タンパク質の酸化

U-2OS細胞を6個のペトリ皿(140×20mm)で培養し、約50%の培養密度を達成し、かつPBSで洗浄した。引き続き、細胞を暗所で4にて、ラベリング緩衝液(PBS、pH6.5)中、1.5mMメタ過ヨウ素酸ナトリウム(Thermo Scientific)で15分間酸化した。1プレート当たり、細胞を20mlラベリング緩衝液で洗浄し、殆どのメタ過ヨウ素酸ナトリウムを除去し、かつ死細胞/断片を減らした。

30

(c)リガンドベースのレセプター獲得

細胞ペレットを2つの分離管内のラベリング緩衝液中で再懸濁させた(全ての後続の工程は、それぞれリガンド及びコントロール反応に平行して実施した)。Joy-05-125に結合したCD44及びクエンチング剤を、1枚の皿当たり5mlのラベリング緩衝液の入った3枚の皿にそれぞれ添加し、かつ遅い振盪器中、4で60分間インキュベートした。獲得に関して、細胞を1プレート当たりPBS20mlで洗浄した。

(d)細胞分解及びトリプシン消化

PBS中10mMEDTAを有するペトリ皿から細胞を外し、かつPBSで一度洗浄した。細胞ペレットを50mM炭酸水素アンモニウム1ml中に再懸濁させた。間接的な超音波処理(100%振幅/0.8サイクル)により、Vial Tweeter(Hielscher)中に細胞を溶かし、かつ溶解物を4、25000gで10分間遠心分離し、細胞核をペレットにした。上澄み液を新たな管に移し、かつ酸に不安定な界面活性剤RapiGest(Waters)を添加して、0.1%の最終濃度にし、続いて5分間の超音波処理により、半透明の溶液が得られた。試料を5mMTCEP(Thermo Scientific)で30分間室温で還元し、続いて10mMヨードアセトアミド(Thermo Scientific)でアルキル化した。トリプシン(ウシの膵臓から、Sigma Aldrich)200µgを添加し、かつ試料を遅い回転機で一晩消化させた。消化の際に、ペプチド混合物を96で10分間加熱し、プロテアーゼを不活性化し、かつ未消化の粒子を13000gで10分間の遠心分離により除去した。

40

【0186】

50

プロトコルの残りの工程は、例3に記載したように実施した。

【0187】

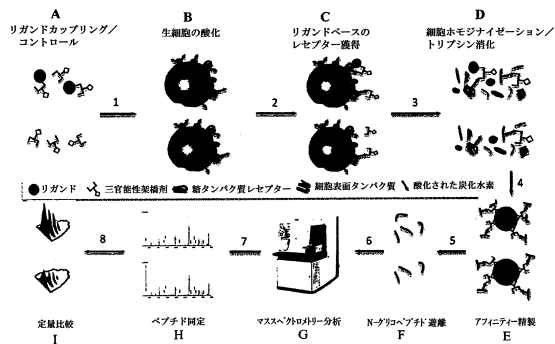
また、データの相対定量評価(図3参照)は、CD44細胞表面の糖タンパク質だけが、U-2OS細胞上のCD44抗体にとって特異的な標的として同定されたタンパク質であったことを明らかにした。

【0188】

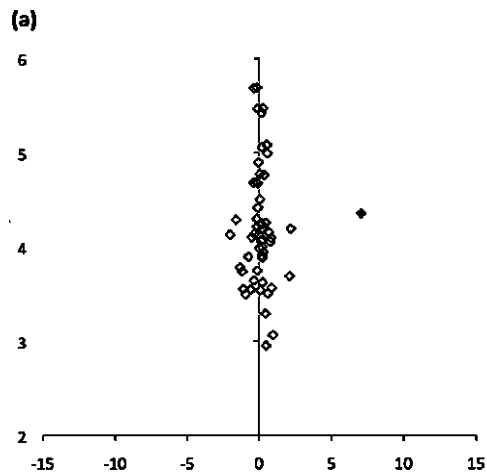
結果を図3に記載したが、その際ペプチド存在度はy軸に沿って、より高い存在度のlog10として示されている(CD44抗体試料:コントロール試料)。x次元では、抗体試料:コントロール試料存在度の比のlog2は、特異的な富化を明らかにしている(CD44ペプチドは、黒く塗りつぶされたデータ要素で、他のタンパク質から誘導されるペプチドは空のデータ要素で示されている)。よって、ペプチド存在度は、所定のグリコペプチド特徴のアイソトープ境界内のピーク面積の合計である。とりわけ、CD44を3つの異なるペプチドで同定し、これは平均化された高いタンパク質の富化比に多くの信頼度を与える。

10

【図1】

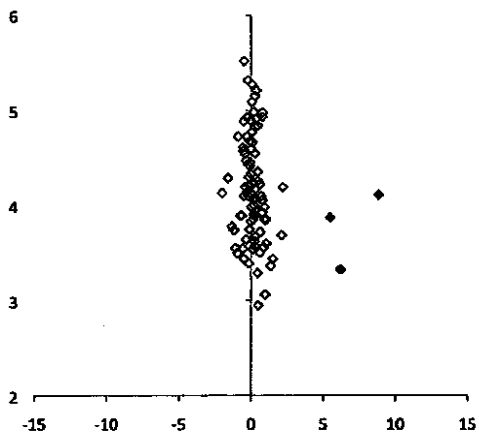


【図2(a)】



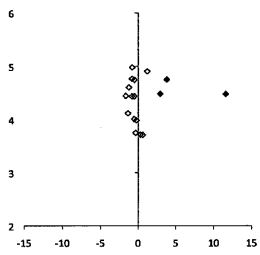
【 図 2 (b) 】

(b)



【 図 3 】

Figure 3:



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 G 0 1 N 27/62 V
 C 0 7 K 14/705

(74)代理人 100114890
 弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト
 (74)代理人 100099483
 弁理士 久野 琢也
 (72)発明者 アンドレアス フライ
 スイス国 チューリッヒ エーリコナーシュトラーセ 5
 (72)発明者 ベアント ヴォルシャイト
 スイス国 チューリッヒ イム オーベレン ボーデン 130
 (72)発明者 オック・ユーム ジェオン
 スイス国 チューリッヒ リマートタールシュトラーセ 265
 (72)発明者 エリック カレイラ
 スイス国 ツミコン シャブフシュトラーセ 73

審査官 小川 由美

(56)参考文献 特表2002-519440(JP,A)
 国際公開第2010/009246(WO,A1)
 米国特許出願公開第2011/0237775(US,A1)
 特表2002-510705(JP,A)
 特開昭58-222035(JP,A)
 特表平08-502744(JP,A)
 Mass Spectrometry Reviews, 2006年, 25, 663-682
 Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2005年, 16, 1921-1931
 STEPHANIE PFANDER, REVERSIBLE SITE-SPECIFIC TAGGING OF ENZYMATICALLY SYNTHESIZED RNAS
 以下備考, NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 2007年 1月26日, V35 N4 E25, P1-8, USING ALDEHYDE-HYDRAZINE CHEMISTRY AND PROTEASE-CLEAVABLE LINKERS
 STEPHANIE PFANDER, SUPPLEMENTARY DATA: REVERSIBLE SITE-SPECIFIC TAGGING OF ENZYMATICALLY SYNTHESIZED RNAS 以下備考, NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 2007年, P S1-S7, USING ALDEHYDE-HYDRAZINE CHEMISTRY AND PROTEASE-CLEAVABLE LINKERS
 Angewandte Chemie International Edition, 2010年, 49, 2023-2027
 Journal of Medicinal Chemistry, 2007年, 50(6), 1418-1422
 Tetrahedron, 2010年, 66, 2037-2043
 International Journal of Peptide & Protein Research, 1995年, 45, 78-85
 Bioconjugate Chemistry, 2010年, 21, 1788-1793

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 0 7 D , G 0 1 N
 C A p l u s (S T N)
 R E G I S T R Y (S T N)
 J a p i o - G P G / F X