

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号  
特許第4741458号  
(P4741458)

(45) 発行日 平成23年8月3日 (2011.8.3)

(24) 登録日 平成23年5月13日 (2011.5.13)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 27/62 (2006.01) GO 1 N 27/62 Z N A V

C 1 2 N 15/09 (2006.01) GO 1 N 27/62 F

GO 1 N 30/72 (2006.01) GO 1 N 27/62 K

GO 1 N 33/15 (2006.01) GO 1 N 27/62 X

GO 1 N 33/50 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 11 (全 194 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-500969 (P2006-500969)	(73) 特許権者	508210767
(86) (22) 出願日	平成16年1月16日 (2004.1.16)		カプロテック・バイオアナリティクス・ゲ
(65) 公表番号	特表2006-518450 (P2006-518450A)		ゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル
(43) 公表日	平成18年8月10日 (2006.8.10)		・ハフツング
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/001037		caprotec bioanalyti
(87) 国際公開番号	W02004/064972		cs GmbH
(87) 国際公開日	平成16年8月5日 (2004.8.5)		ドイツ連邦共和国12489ベルリン、ヴ
審査請求日	平成18年2月1日 (2006.2.1)		オルマーシュトラッセ5番
審査番号	不服2008-32469 (P2008-32469/J1)	(74) 代理人	100094318
審査請求日	平成20年12月24日 (2008.12.24)		弁理士 山田 行一
(31) 優先権主張番号	60/441,398	(74) 代理人	100128381
(32) 優先日	平成15年1月16日 (2003.1.16)		弁理士 清水 義憲
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100123995
早期審査対象出願			弁理士 野田 雅一
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 捕獲化合物、その収集物ならびにプロテオームおよび複合組成物を分析するための方法

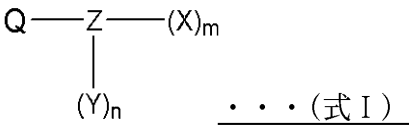
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の工程を含み、薬物を再設計するために、該薬物またはその断片、合成中間体、代謝産物もしくはプロドラッグと、前記薬物の標的となるタンパク質以外の非標的タンパク質と、の相互作用を評価する方法：

i) 前記薬物を決定し、該薬物またはその断片、合成中間体、代謝産物もしくはプロドラッグを呈示する捕獲化合物を調製すること、ここで、前記捕獲化合物は以下の式 I を有する：

【化1】



X は、タンパク質と共有結合するように選択され、タンパク質と接触した後に、共有結合のために光による活性化を必要とする反応性官能基であり、

Y は、前記薬物またはその断片、合成中間体、代謝産物もしくはプロドラッグであり、

Q は、ビオチン、(His)<sub>6</sub>、BODIPY(4,4-ジフルオロ-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン)、オリゴヌクレオチド、抗体、免疫毒素結合体、接着ペプチド、レクチン、PNA(ペプチド核酸)、活性化デキストランおよびペプチドからなる群より選択される選別官能基であり、

Zは、Y、XおよびQが存在する上記式Iに示した三官能部分であり、

mは1であり、

nは1である、

i i ) タンパク質混合物を含むサンプルと前記捕獲化合物とを接触させ、前記サンプル中のYと相互作用するタンパク質の捕獲を行うこと、ここで前記接触は、前記捕獲化合物とYと相互作用するタンパク質との相互作用が平衡に達するまで十分な時間行う、

i i i ) 前記接触後、前記捕獲化合物中のXを光により活性化して、Yと相互作用するタンパク質と、Xと、の間に共有結合を形成させ、Yと相互作用するタンパク質の捕獲を行うこと、および

i v ) 捕獲したタンパク質を分離および同定し、それによって前記薬物またはその断片、合成中間体、代謝産物もしくはプロドラッグと相互作用する前記サンプル中の非標的タンパク質を同定すること、ここで前記分離は、固体支持体の表面に固定されたQのレシビエント分子と、Qとの結合により行う、

ここで、前記薬物の再設計は、前記薬物またはその断片、合成中間体、代謝産物もしくはプロドラッグと、前記非標的タンパク質との相互作用を消失させる、または減少させることによって行う。

【請求項2】

Xが、アジドまたはジアジリンを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

Yが、Y上の種々の結合点を介し異なる向きでZに連結する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

Yとして、再設計した薬物またはその断片、合成中間体、代謝産物もしくはプロドラッグを用い、前記工程i)～iv)を繰り返し行う、請求項1～3の何れか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記捕獲したタンパク質を、質量スペクトル分析により同定する、請求項1～4の何れか一項に記載の方法。

【請求項6】

質量分析計形式が、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)、連続またはパルスエレクトロスプレー(ES)イオン化、イオンスプレー、サーモスプレーまたはマッシュクラスター衝撃質量分析計であり、

検出形式が、直線型飛行時間型(TOF)、反射飛行時間型、シングル四重極、多重四重極、シングル磁場型、多重磁場型、フーリエ変換、イオンサイクロトン共鳴(ICR)、またはイオントラップである、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記サンプルが、生物学的サンプルである体組織もしくは体液または細胞溶解物を含む、請求項1～6の何れか一項に記載の方法。

【請求項8】

Yが、

10

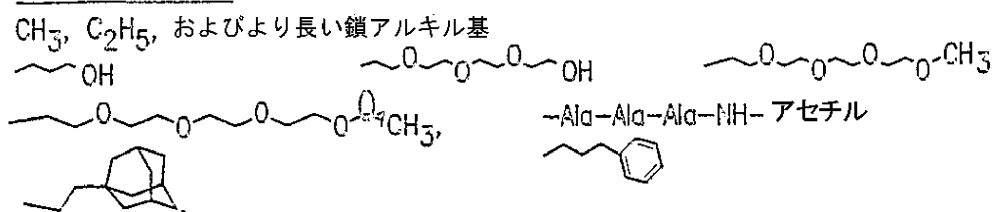
20

30

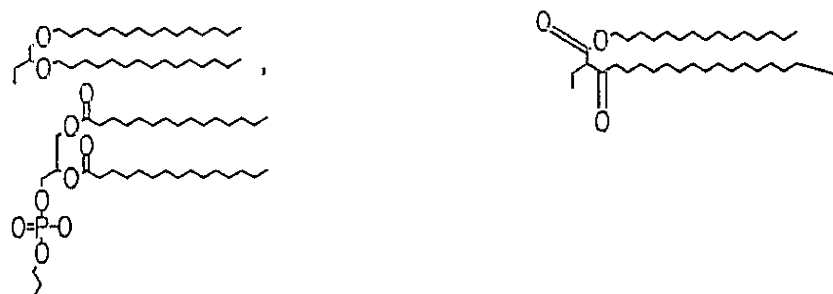
40

## 【化 2】

## 小分子



## 天然産物



コレステロール、ステロイド、アルカロイド、フラボノイド、プロスタグランジン、  
ペプチド、EGF、ラバマイシン

## タンパク質アゴニストおよびアンタゴニスト

1, 1, 1-トリフルオロ-6Z, 9Z, 12Z, 15Z-ヘンエイコサテラエン-2-オン、

トランス-4-[3-メチル-6-(1-メチルエチル)-2-シクロヘキセン-1-イル]-5-ペンチル-1,  
3-ベンゼンジオール、

アラキドニル-2'-クロロエチルアミド /  
(all Z)-N-(2-シクロエチル)-5, 8, 11, 14-エイコサテトラエンアミド、

アラキドニルシクロプロピルアミド / (all Z)-N-(シクロプロピル)  
-5, 8, 11, 14-エイコサテトラエンアミド、

N-(ピペリジン-1-イル)-5-(4-ヨードフェニル)-1-(2, 4-ジクロロフェニル)  
-4-メチル-1H-ピラゾール-3-カルボキサミド、

1-(2, 4-ジクロロフェニル)-5-(4-ヨードフェニル)-4-メチル-N-4-モルホリニル-1H-  
ピラゾール-3-カルボキサミド、

(all Z)-N-(4-ヒドロキシフェニル)-5, 8, 11, 14-エイコサテトラエンアミド、

6-ヨード-2-メチル-1-[2-(4-モルホリニル)エチル]-1H-インドール-3-イル]  
(4-メトキシフェニル)メタノン、

アラキドニルエタノールアミド / (all Z)-N-(2-ヒドロキシエチル)  
-5, 8, 11, 14-エイコサテトラエンアミド、

10

20

30

40

## 【化 3】

アラキドニルエタノールアミド / (all Z)-N-(2-ヒドロキシエチル)-5, 8, 11, 14-  
エイコサテトラエンアミド、

N-(2-ヒドロキシエチル)-[3, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15-H]-5Z, 8Z, 11Z, 14Z-  
エイコサテトラエンアミド、

2-AG/(5Z, 8Z, 11Z, 14Z)-5, 8, 11, 14-エイコサテトラエン酸、2-ヒドロキシ-1-  
(ヒドロキシメチル)エチルエステル、

(-)-cis-3-[2-ヒドロキシ-4-(1, 1-ジメチルヘプチル)フェニル]  
-trans-4-(3-ヒドロキシプロピル)シクロヘキサノール、

10

ドコサテトラエニルエタノールアミド / N-(2-ヒドロキシエチル)-  
7Z, 10Z, 13Z, 16Z-ドコサテトラエンアミド、

(6aR)-trans-3-(1, 1-ジメチルヘプチル)-6a, 7, 10, 10a-テトラヒドロ-1-  
ヒドロキシ-6, 6-ジメチル-6H-ジベンゾ [b, d] ピラン-9-メタノール、

[6aR-(6a $\alpha$ , 9 $\alpha$ , 10 $\alpha$   $\beta$ )]-3-(1, 1-ジメチルヘプチル)-6a, 7, 8, 9, 10, 10a-  
ヘキサヒドロ-1-ヒドロキシ-6, 6-ジメチル-6H-ジベンゾ [b, d] ピラン-  
[7, 8-H]-9-メタノール、

20

(2-メチル-1-プロピル-1H-インドール-3-イル)-1-ナフタレニルメタノン、

(6aR, 10aR)-3-(1, 1-ジメチルブチル)-6a, 7, 10, 10a-テトラヒドロ-6, 6, 9-  
トリメチル-6H-ジベンゾ [b, d] ピラン、

メチルアラキドニルフルオロホスホネート / (5Z, 8Z, 11Z, 14Z)-5, 8, 11, 14-  
エイコサテトラエニル-メチルエステルホスホノフルオリド酸、

[R-(all-Z)]-N-(2-ヒドロキシ-1-メチルエチル)-5, 8, 11, 14-  
エイコサテトラエンアミド、2-[(5Z, 8Z, 11Z, 14Z)-エイコサテトラエニルオキシ]  
-1, 3-プロパンジオール、

30

N-(ビス-3-クロロ-4-ヒドロキシベンジル)-5Z, 8Z, 11Z, 14Z-  
エイコサテトラエンアミド、

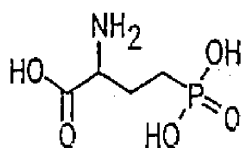
(9Z)-N-(2-ヒドロキシエチル)-9-オクタデセンアミド、

N-(2-ヒドロキシエチル)ヘキサデカンアミド、

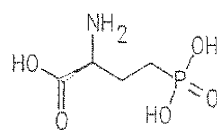
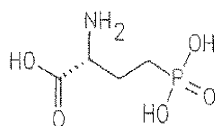
(5Z, 8Z, 11Z, 14Z)-N-(4-ヒドロキシ-2-メチルフェニル)-5, 8, 11, 14-  
エイコサテトラエンアミド、

(R)-(+)-[2, 3-ジヒドロ-5-メチル-3-(4-モルホリニルメチル)  
ピロロ [1, 2, 3-de]-1, 4-ベンゾキサジン-6-イル]-1-ナフタレニルメタノン、

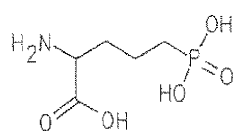
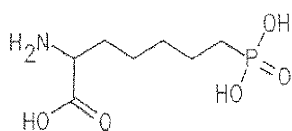
40



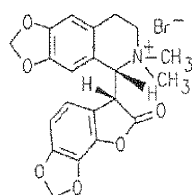
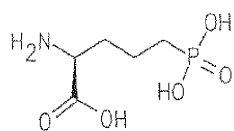
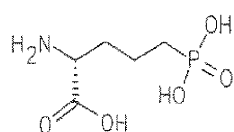
## 【化 4】



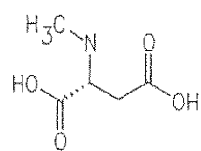
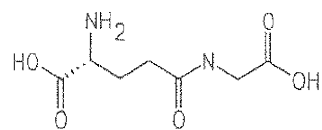
10



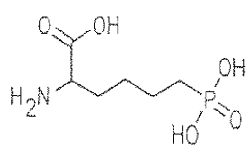
20



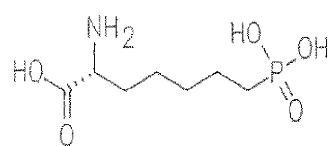
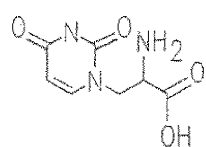
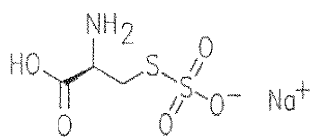
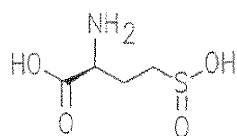
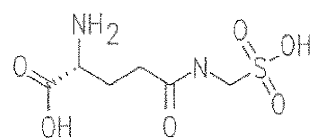
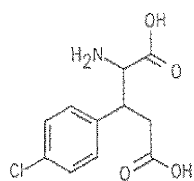
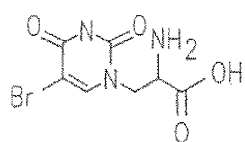
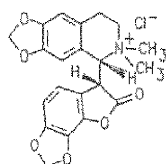
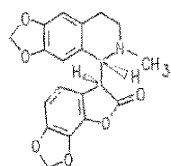
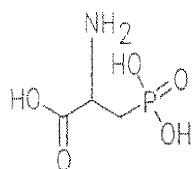
30



40



## 【化 5】



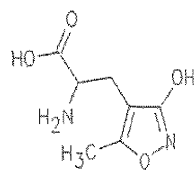
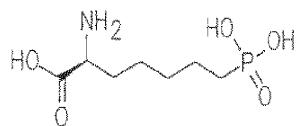
10

20

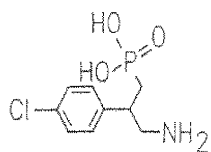
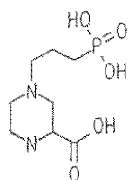
30

40

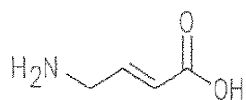
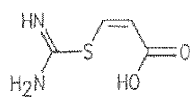
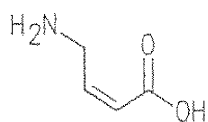
## 【化 6】



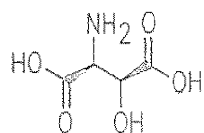
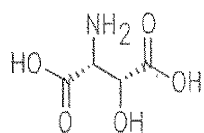
10



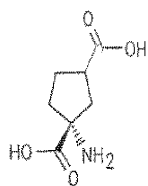
20



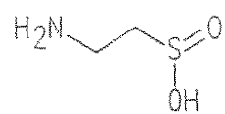
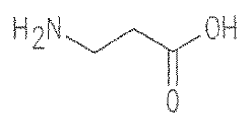
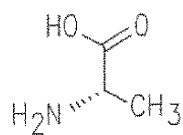
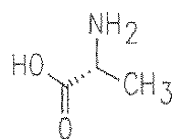
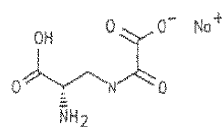
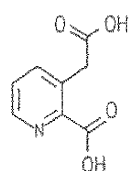
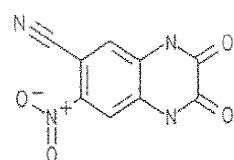
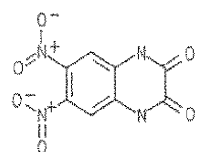
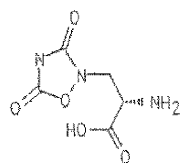
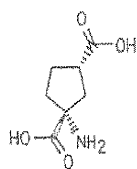
30



40



## 【化 7】



10

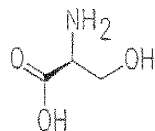
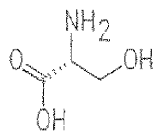
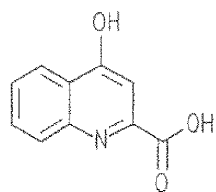
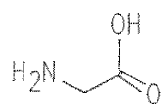
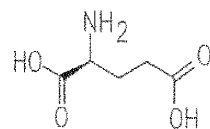
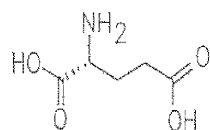
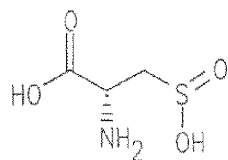
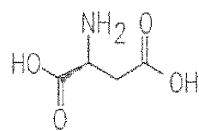
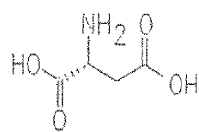
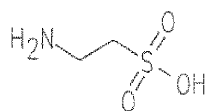
20

30

40



## 【化 8】



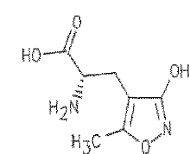
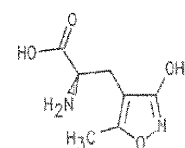
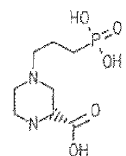
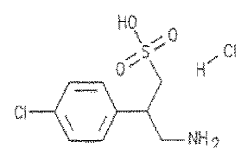
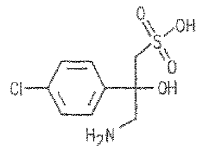
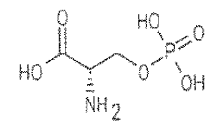
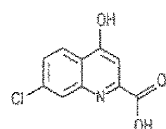
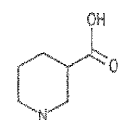
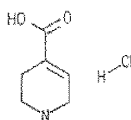
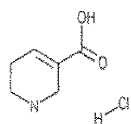
10

20

30

40

## 【化 9】



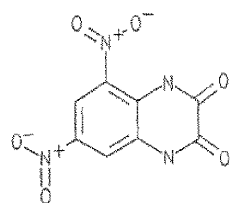
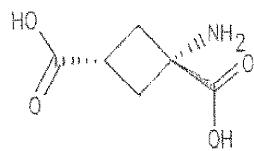
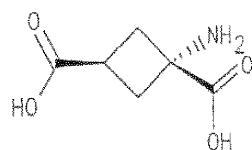
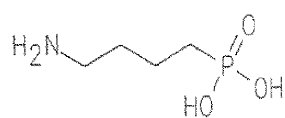
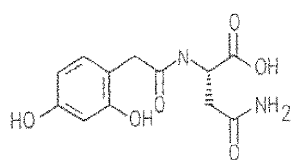
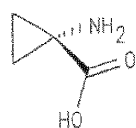
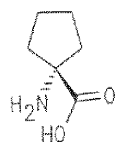
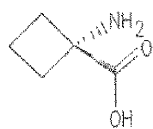
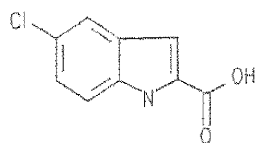
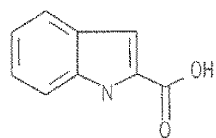
10

20

30

40

## 【化 10】



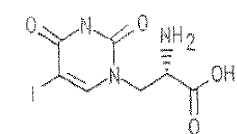
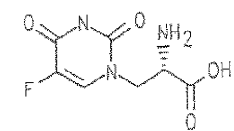
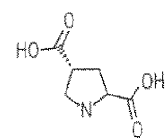
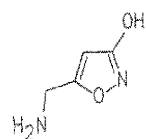
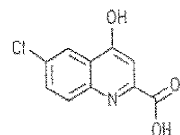
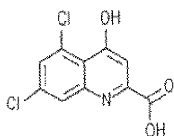
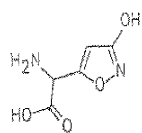
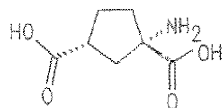
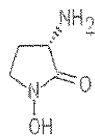
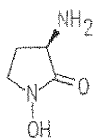
10

20

30

40

## 【化 1 1】



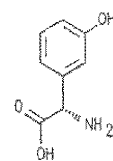
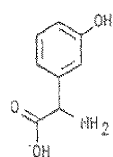
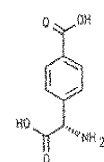
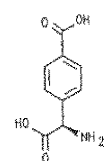
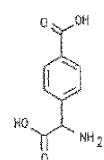
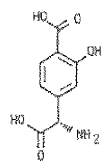
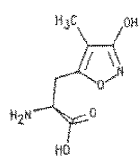
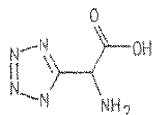
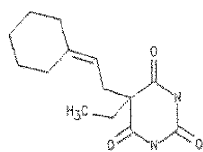
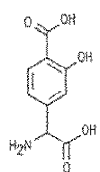
10

20

30

40

## 【化 1 2】



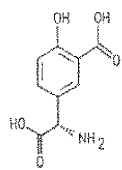
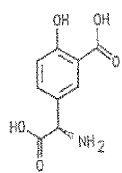
10

20

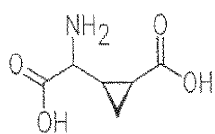
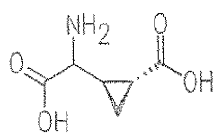
30

40

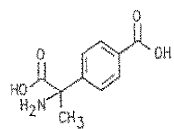
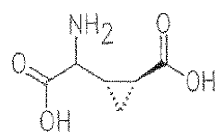
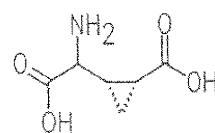
## 【化 1 3】



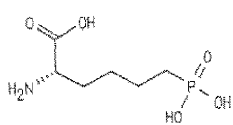
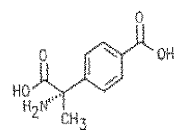
10



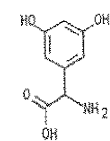
20



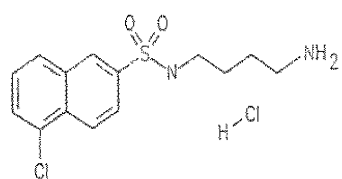
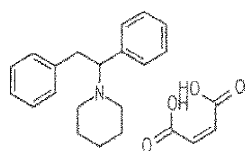
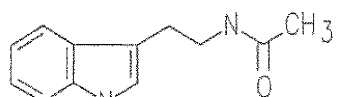
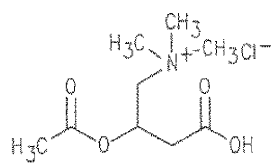
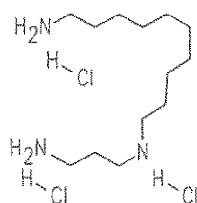
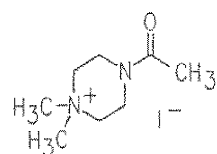
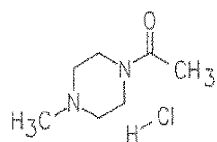
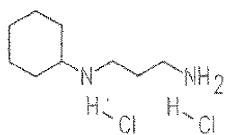
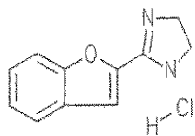
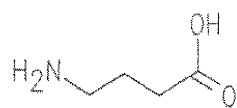
30



40



## 【化 1 4】



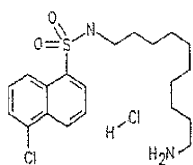
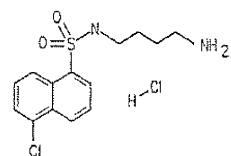
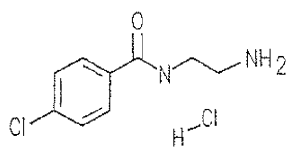
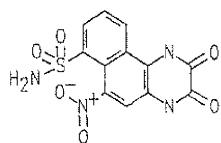
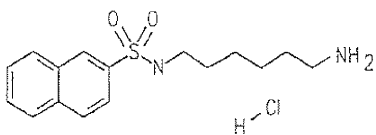
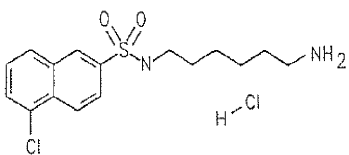
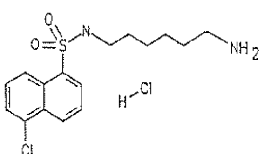
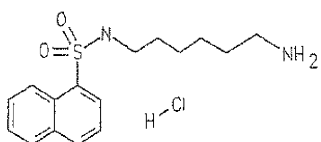
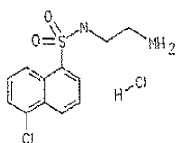
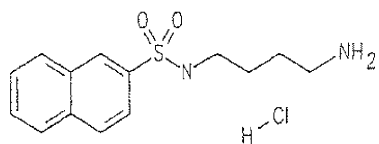
10

20

30

40

## 【化 15】



10

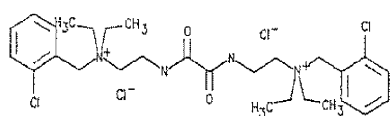
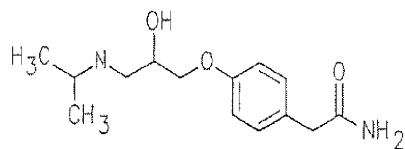
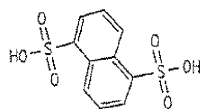
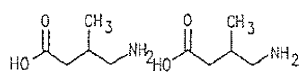
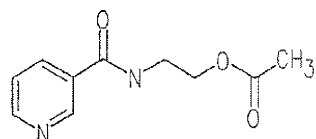
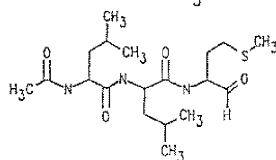
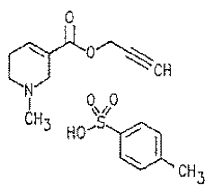
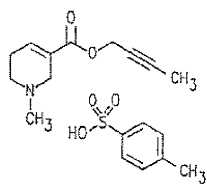
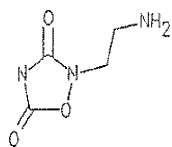
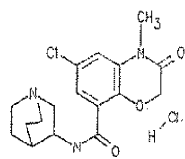
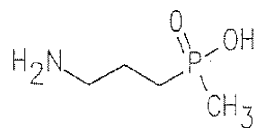
20

30

40



## 【化 16】



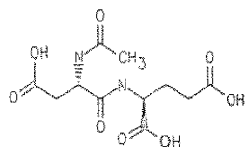
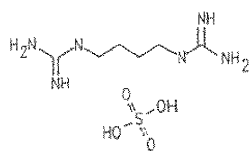
10

20

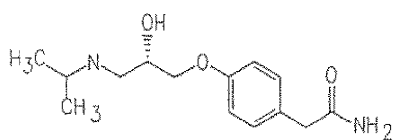
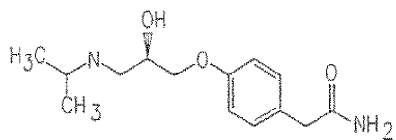
30

40

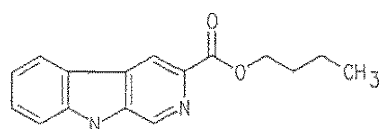
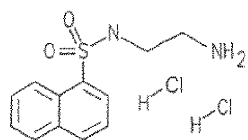
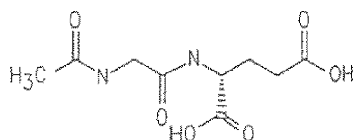
## 【化 17】



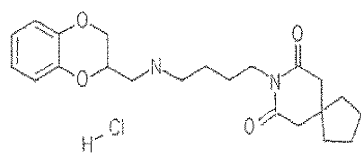
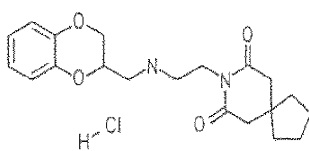
10



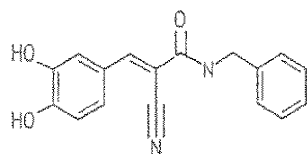
20



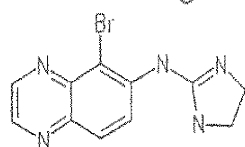
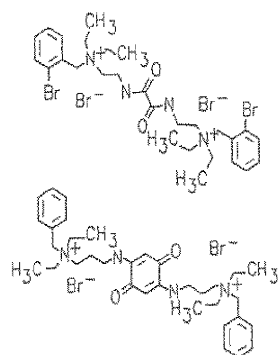
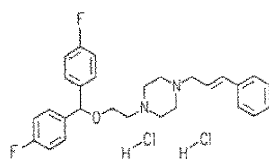
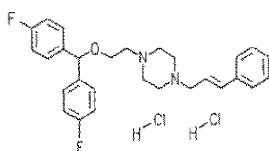
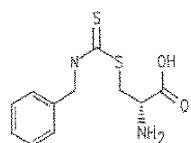
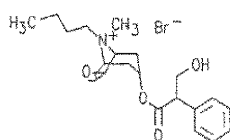
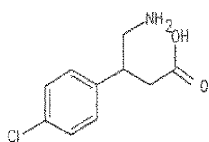
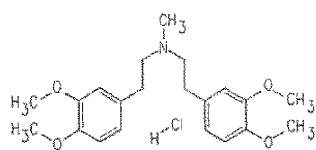
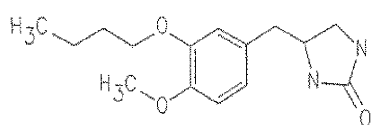
30



40



## 【化 1 8】



10

20

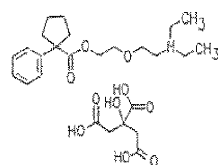
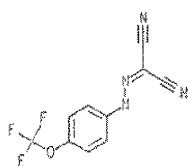
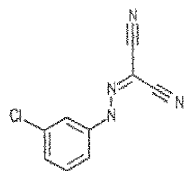
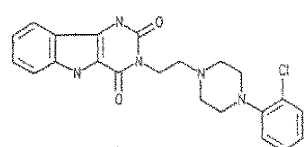
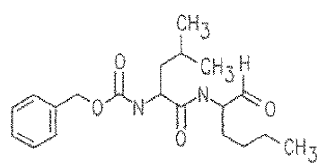
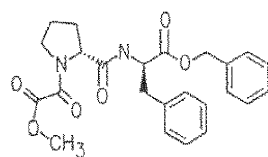
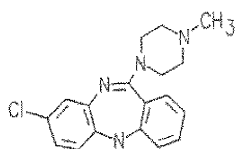
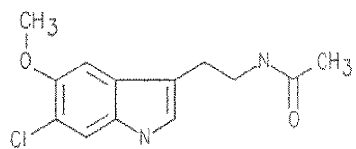
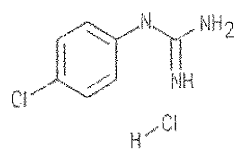
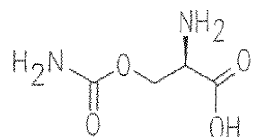
30

40

【化 1 9】



## 【化 20】



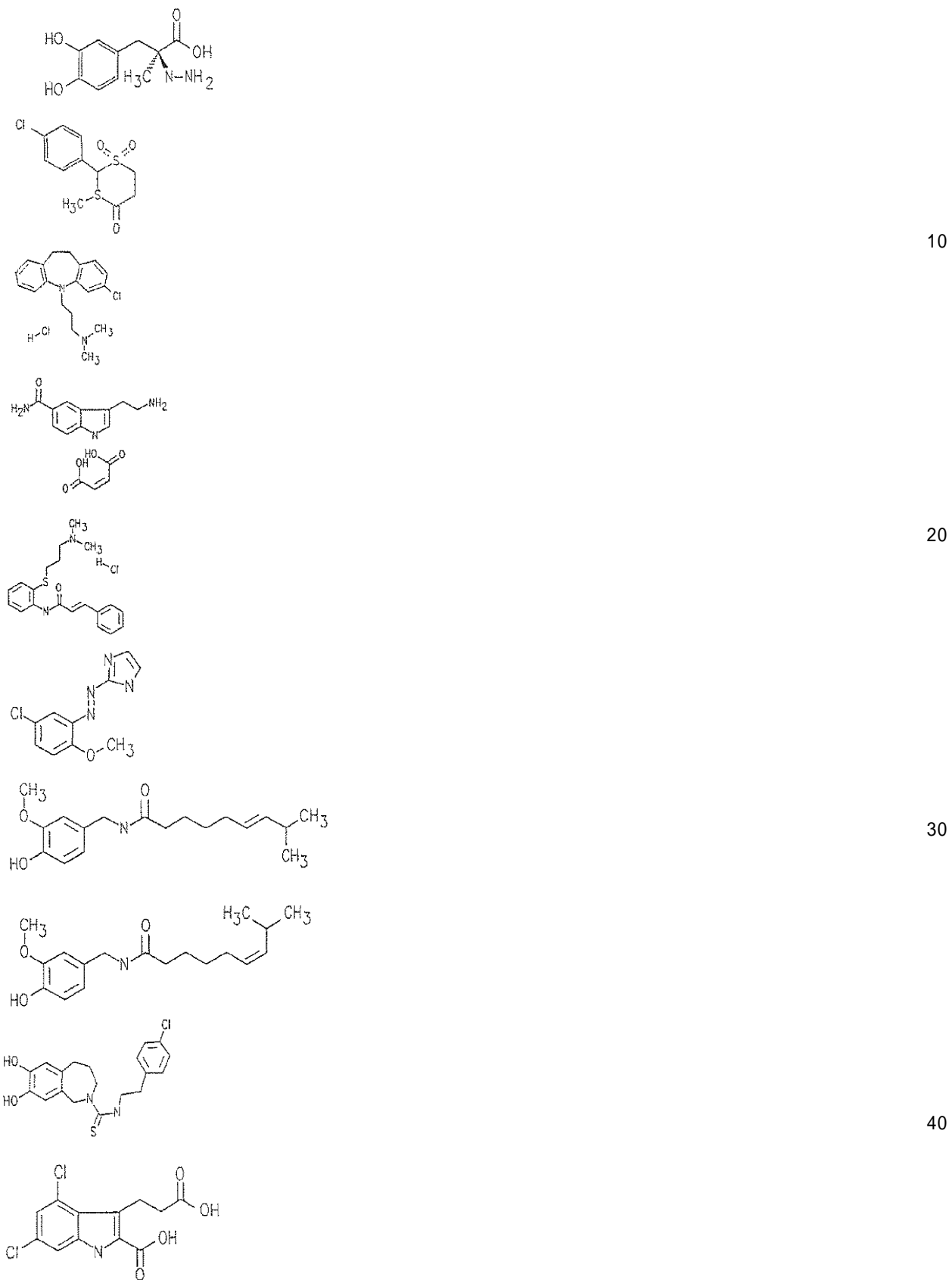
10

20

30

40

## 【化 2 1】



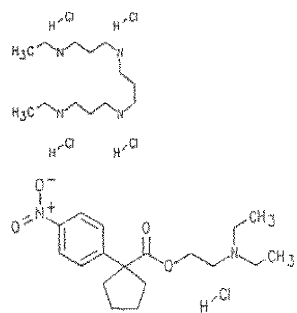
10

20

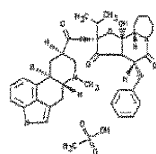
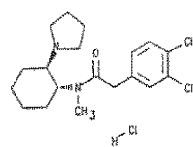
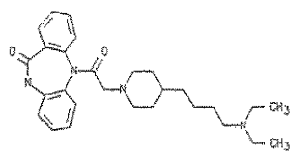
30

40

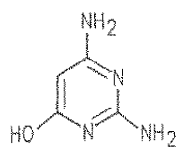
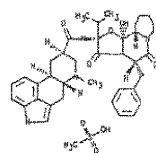
## 【化 2 2】



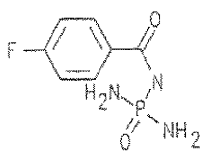
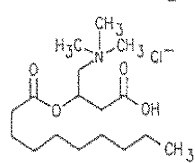
10



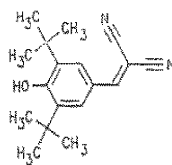
20



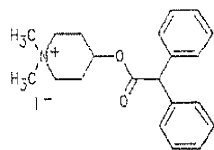
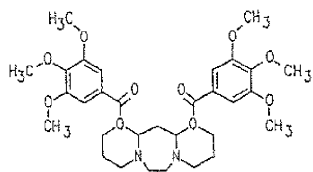
30



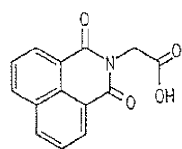
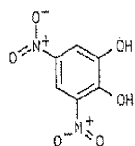
40



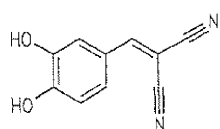
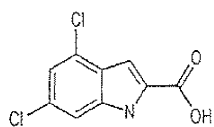
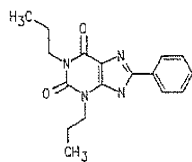
## 【化 2 3】



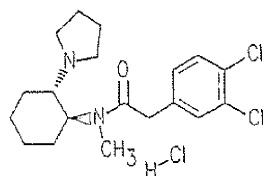
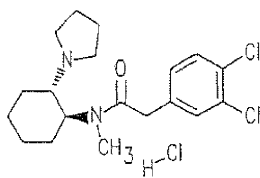
10



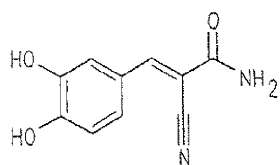
20



30

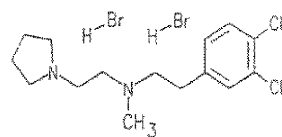
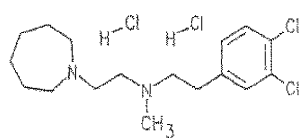
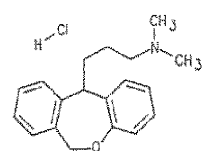
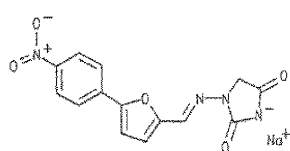
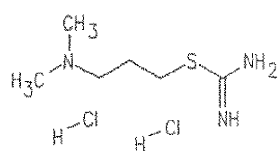
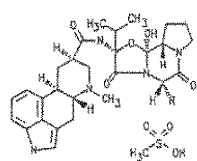
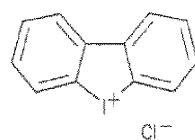
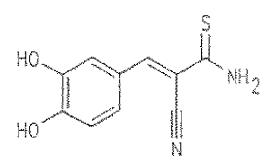
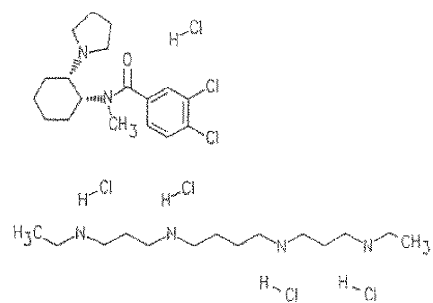


40





## 【化 2 4】

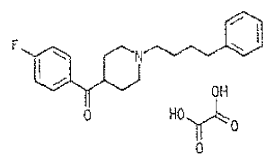
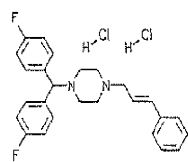
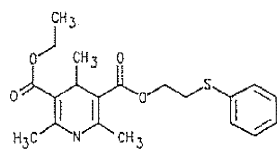
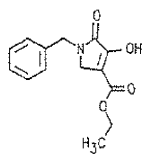
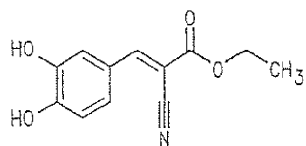
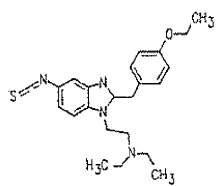
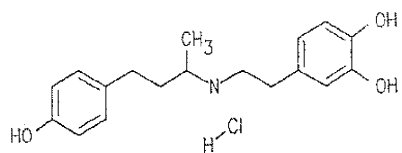
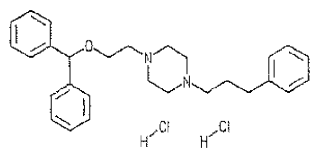
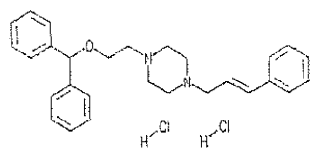


10

20

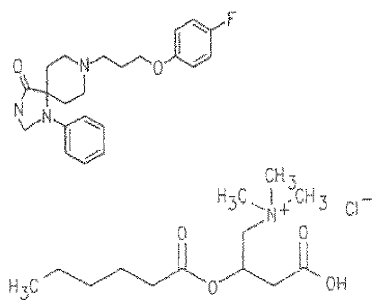
30

40

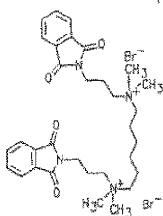
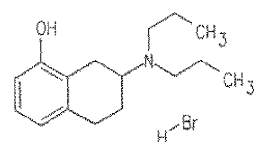
CN(C)CCCCSC(=N)N

40

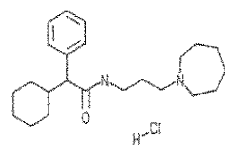
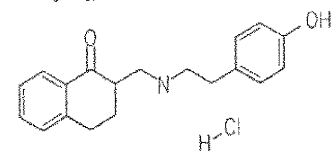
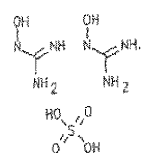
## 【化 26】



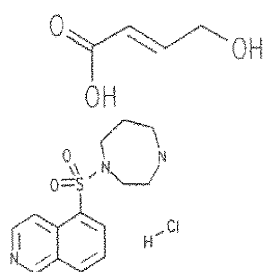
10



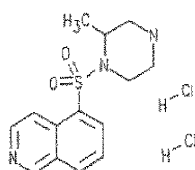
20



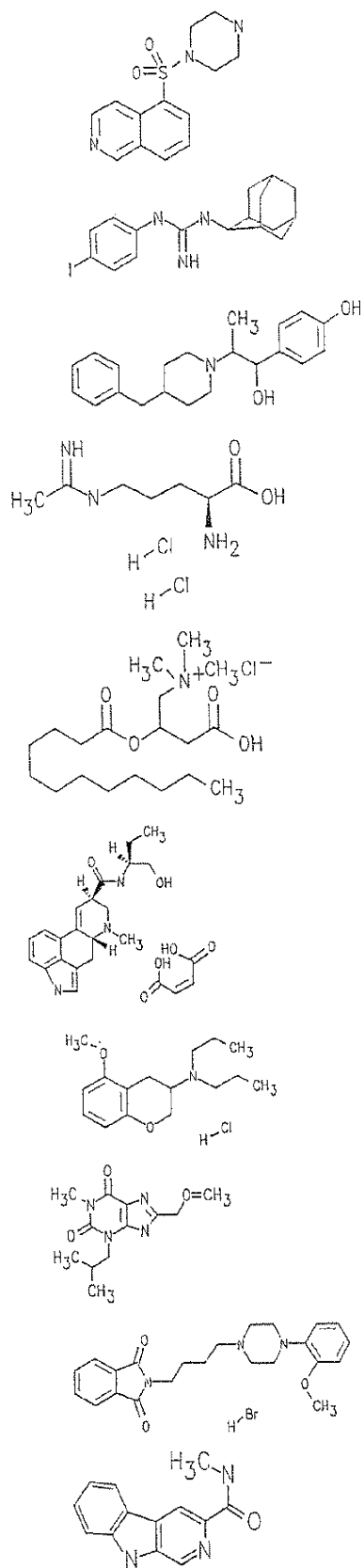
30



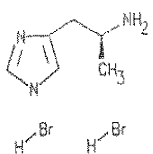
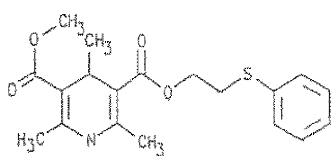
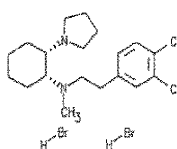
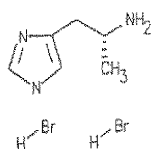
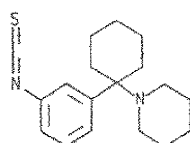
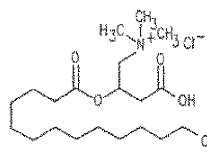
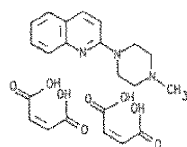
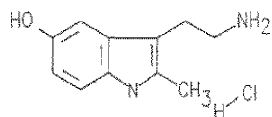
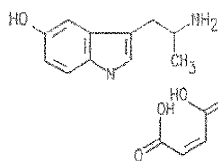
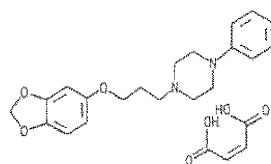
40



## 【化 27】



## 【化 28】



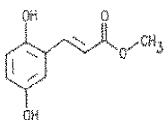
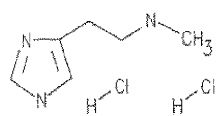
10

20

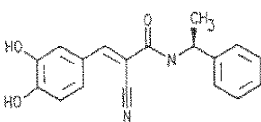
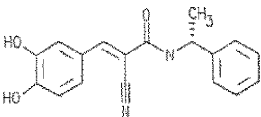
30

40

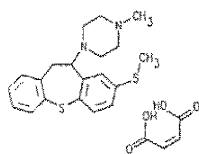
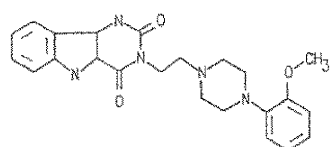
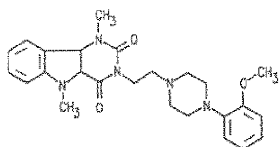
## 【化 2 9】



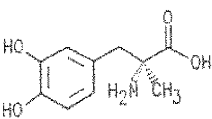
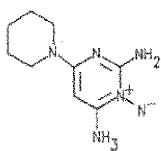
10



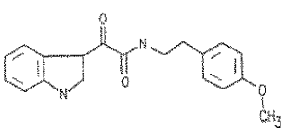
20



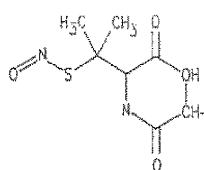
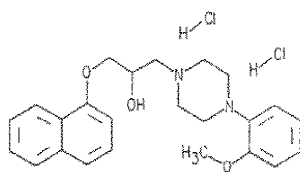
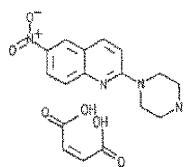
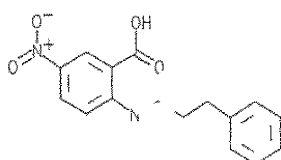
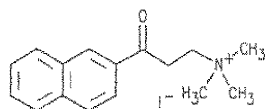
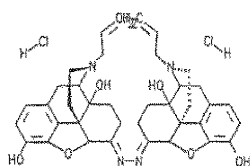
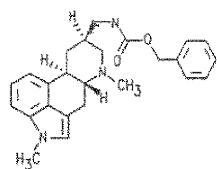
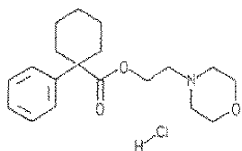
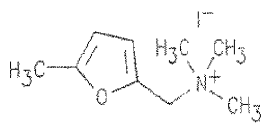
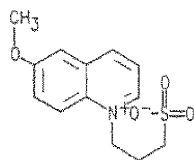
30



40



## 【化 30】



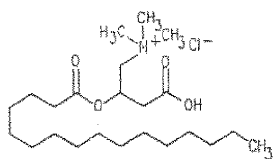
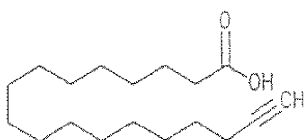
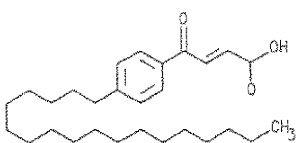
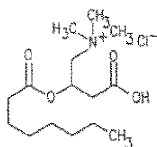
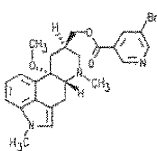
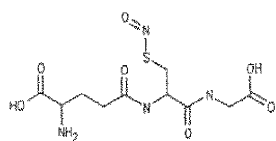
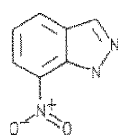
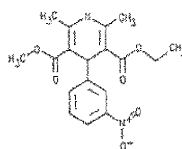
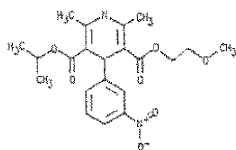
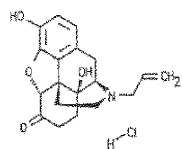
10

20

30

40

【化 3 1】



10

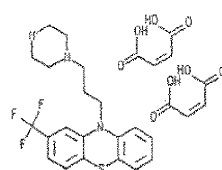
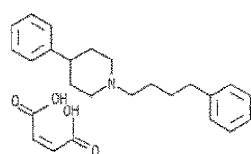
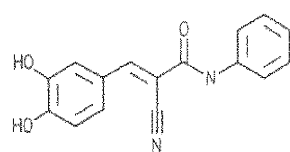
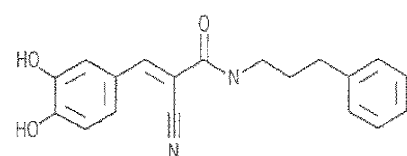
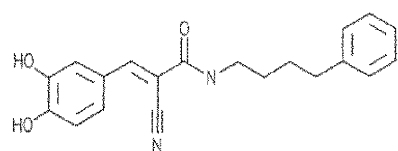
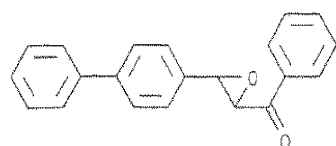
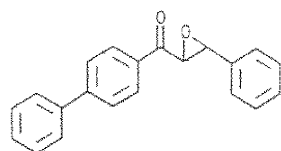
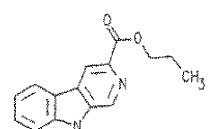
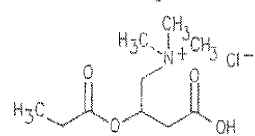
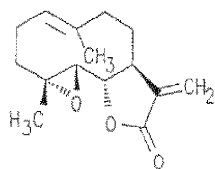
20

30

40



## 【化 3 2】



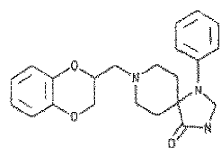
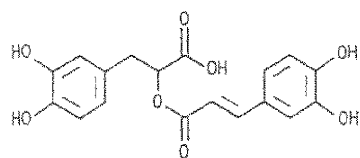
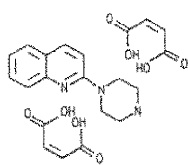
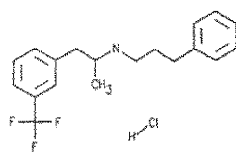
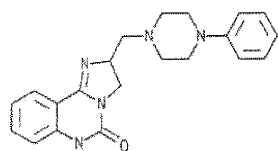
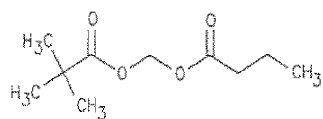
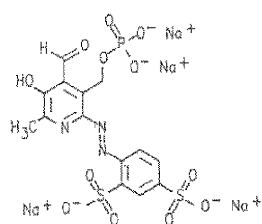
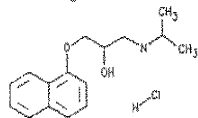
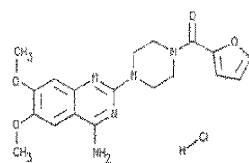
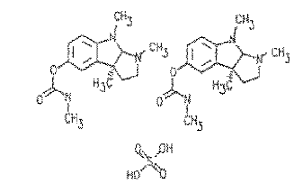
10

20

30

40

## 【化 3 3】



10

20

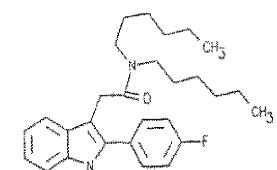
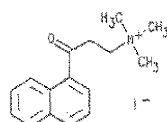
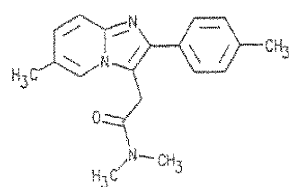
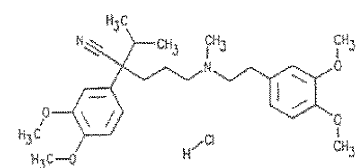
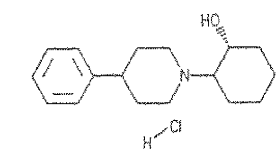
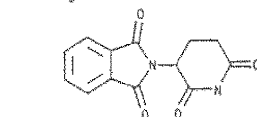
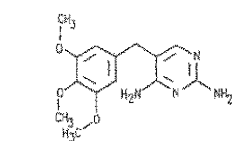
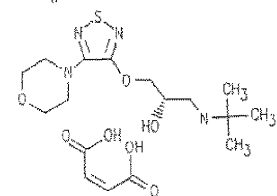
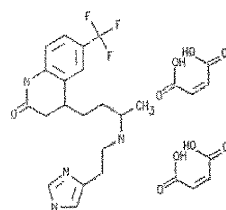
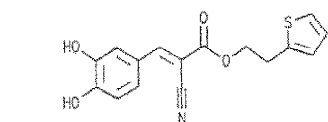
30

40

[illegible]

40

## 【化 3 5】



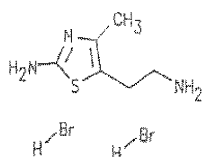
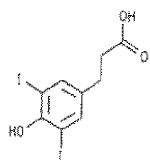
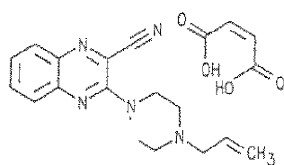
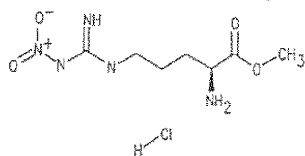
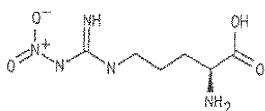
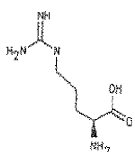
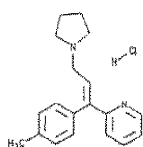
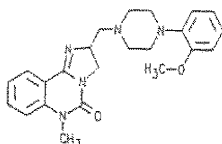
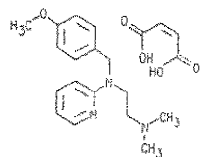
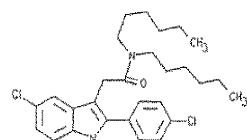
10

20

30

40

## 【化 3 6】



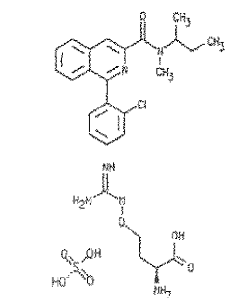
10

20

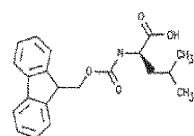
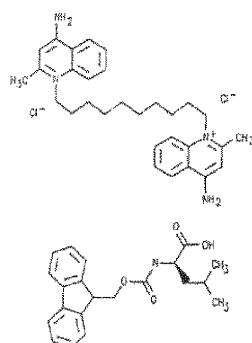
30

40

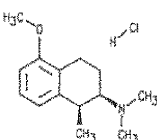
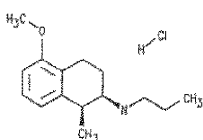
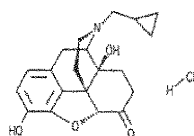
## 【化 3 7】



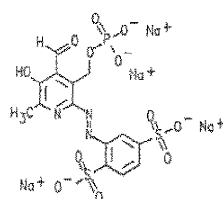
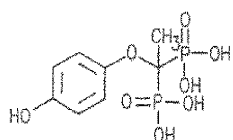
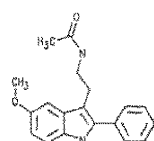
10



20

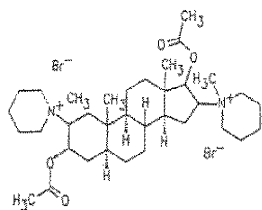


30



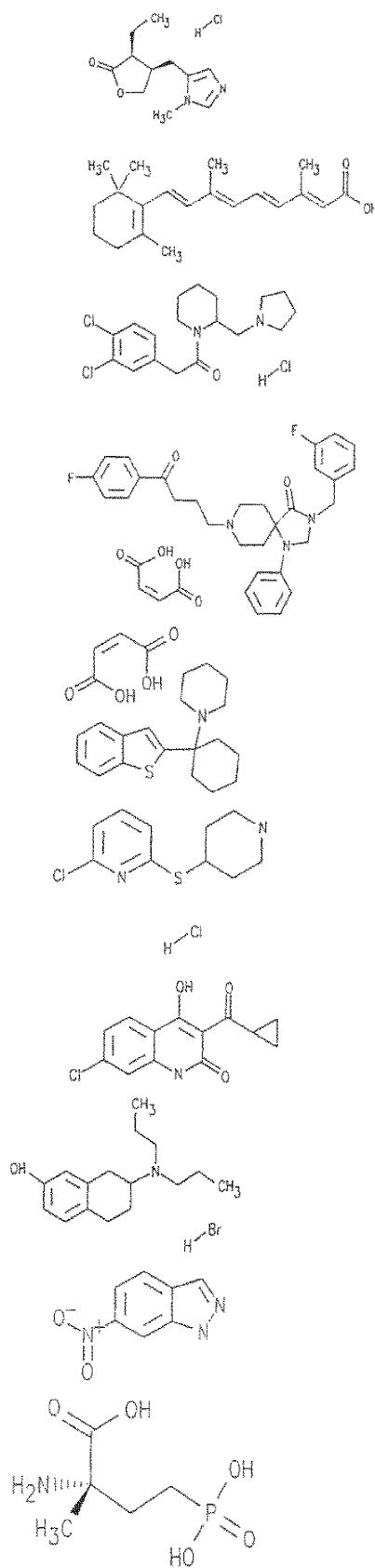
40

【化 3 8】



40

## 【化 3 9】



10

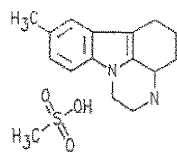
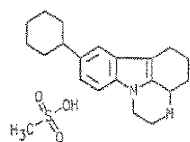
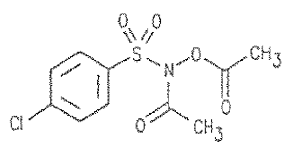
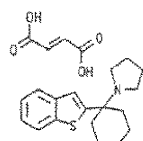
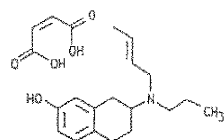
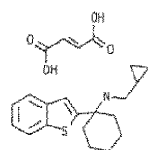
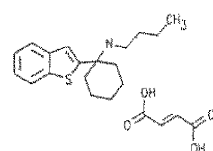
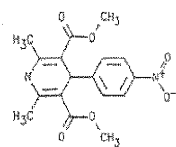
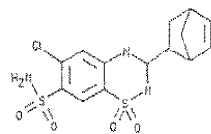
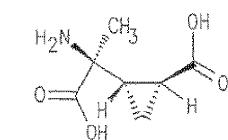
20

30

40



## 【化 40】



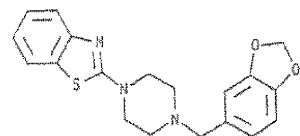
10

20

30

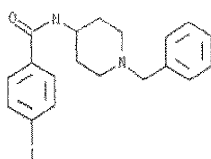
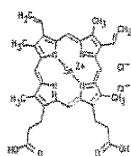
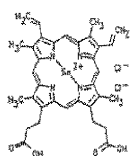
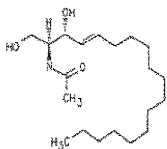
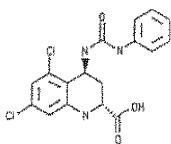
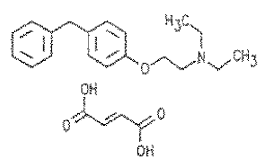
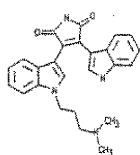
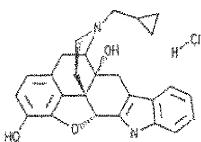
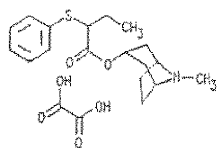
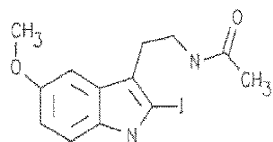
40

【化 4 1】



40

## 【化 4 2】



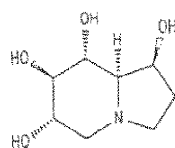
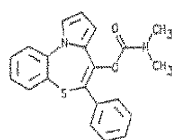
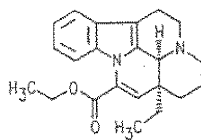
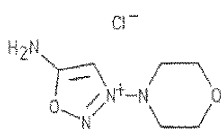
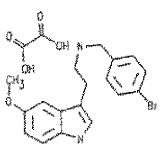
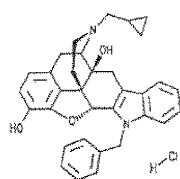
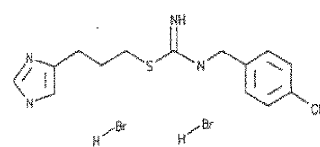
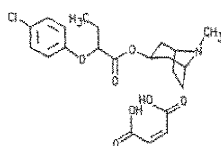
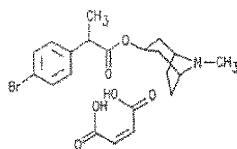
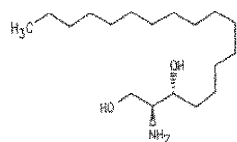
10

20

30

40

## 【化 4 3】



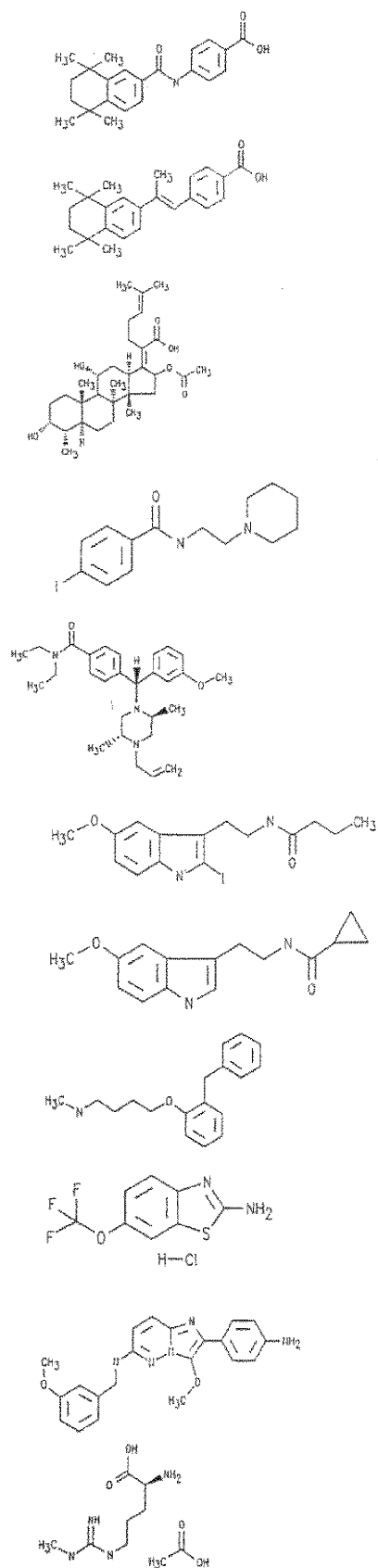
10

20

30

40

## 【化 4 4】



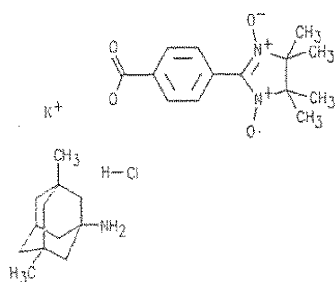
10

20

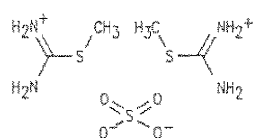
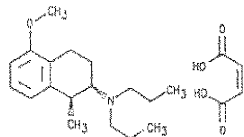
30

40

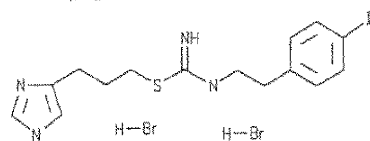
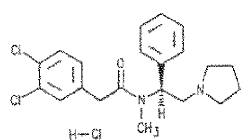
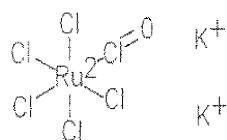
## 【化 4 5】



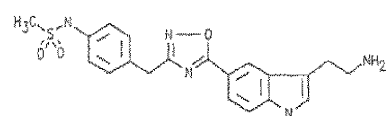
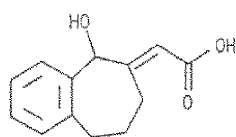
10



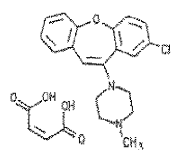
20



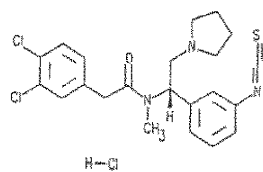
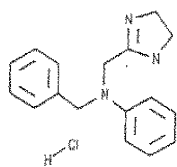
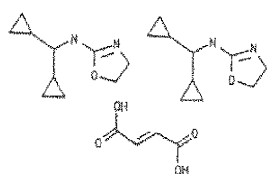
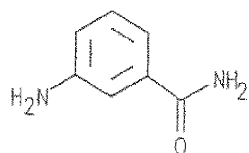
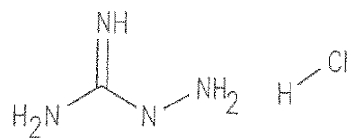
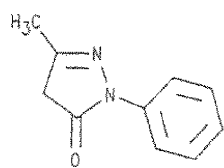
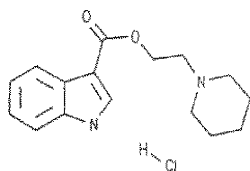
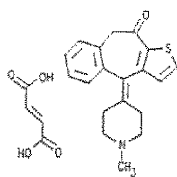
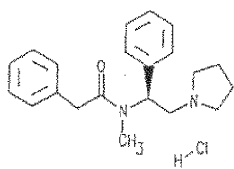
30



40



## 【化 4 6】



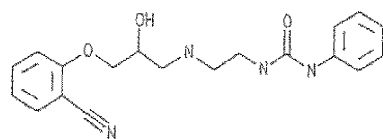
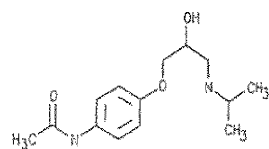
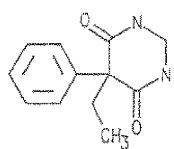
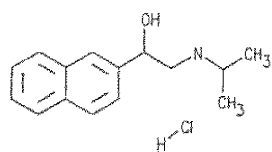
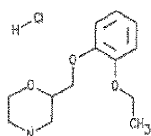
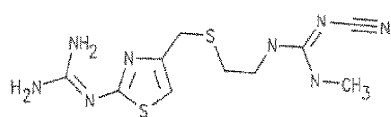
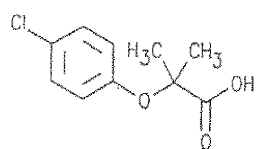
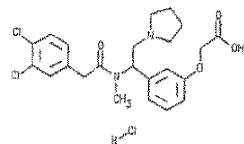
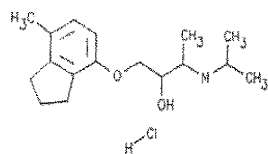
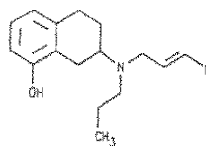
10

20

30

40

## 【化 4 7】



10

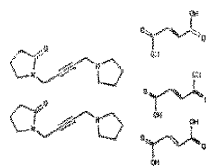
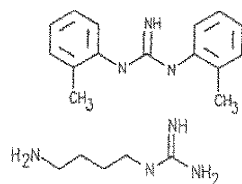
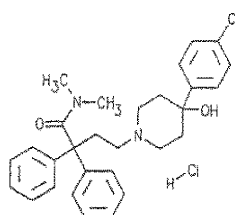
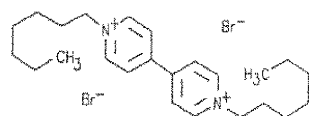
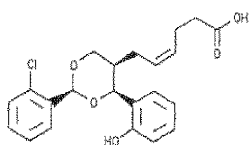
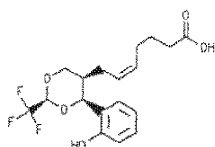
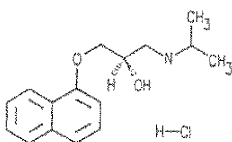
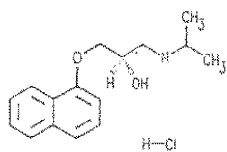
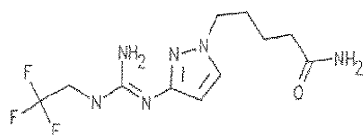
20

30

40



## 【化 48】



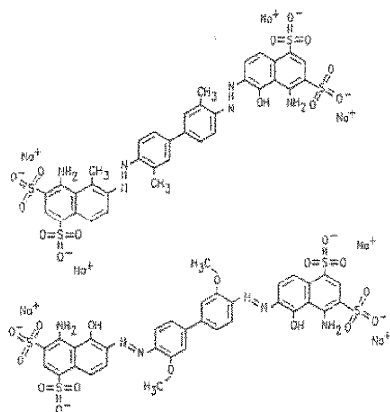
10

20

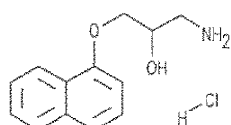
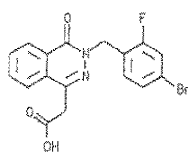
30

40

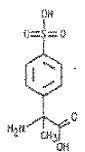
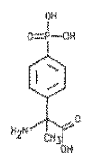
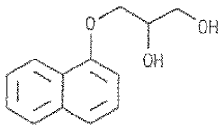
## 【化 49】



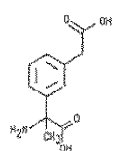
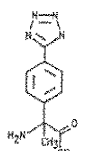
10



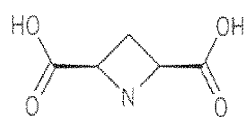
20



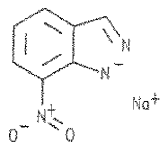
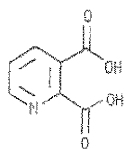
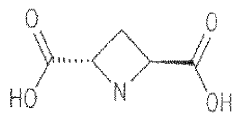
30



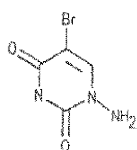
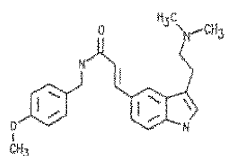
40



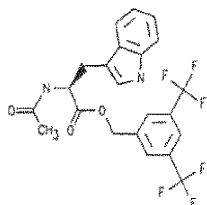
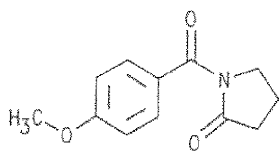
## 【化 5 0】



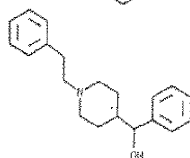
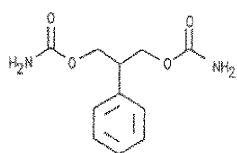
10



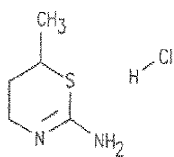
20



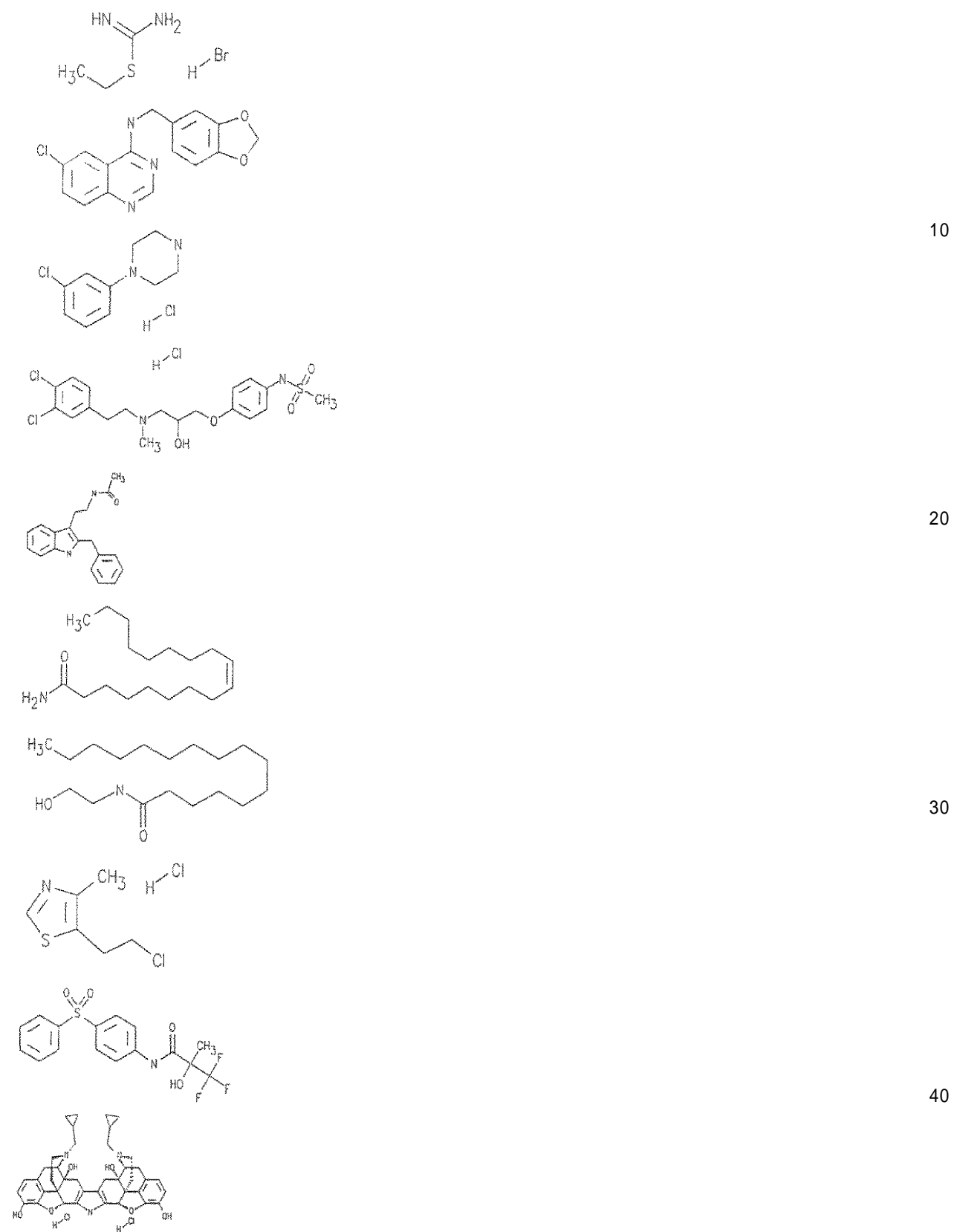
30



40



## 【化 5 1】



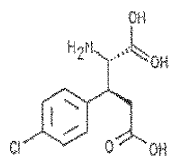
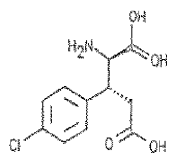
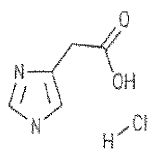
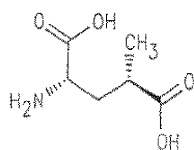
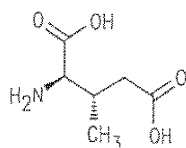
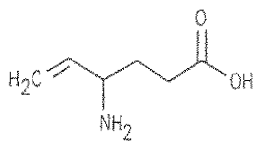
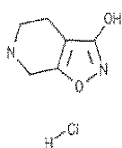
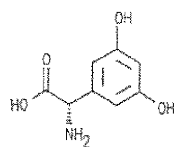
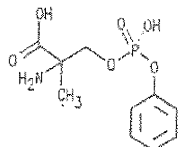
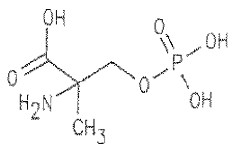
10

20

30

40

## 【化 5 2】



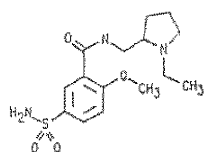
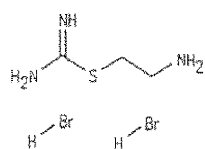
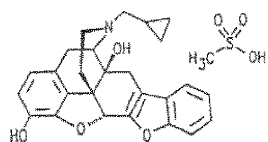
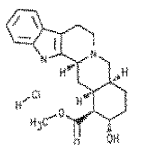
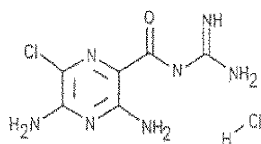
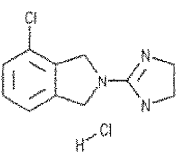
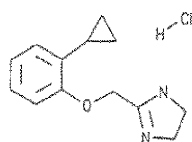
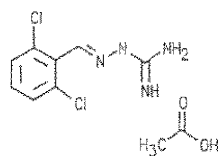
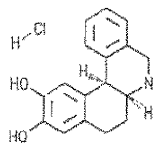
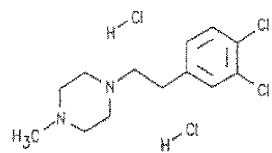
10

20

30

40

## 【化 5 3】



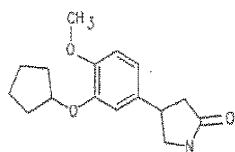
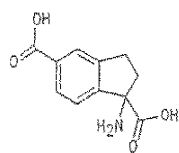
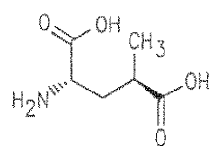
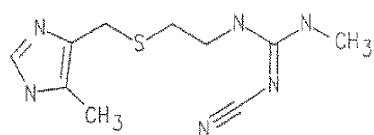
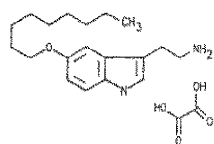
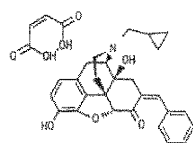
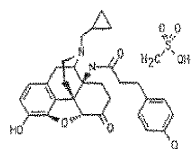
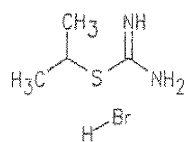
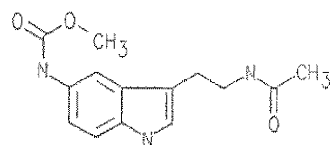
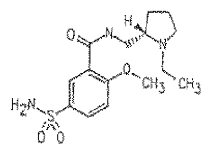
10

20

30

40

## 【化 5 4】



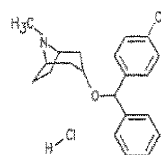
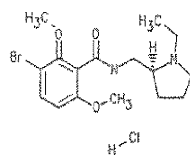
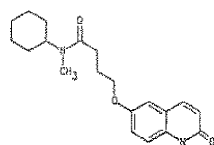
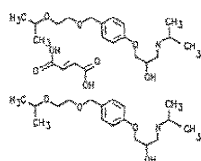
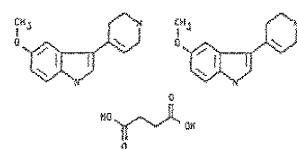
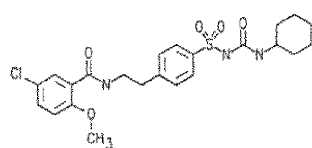
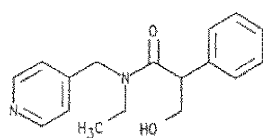
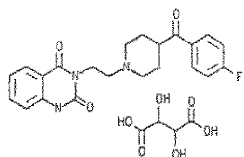
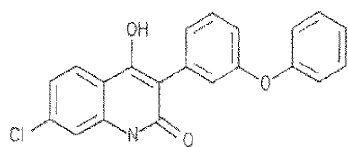
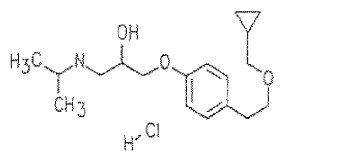
10

20

30

40

## 【化 5 5】



10

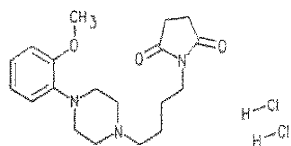
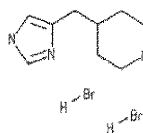
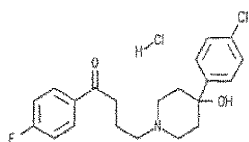
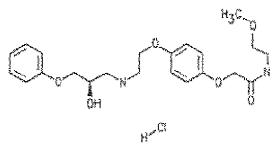
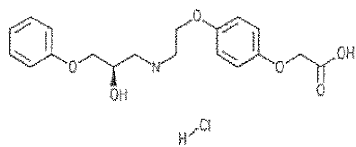
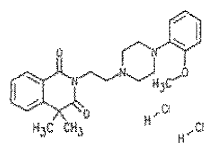
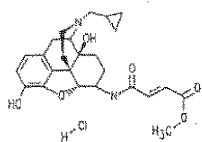
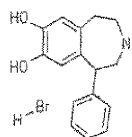
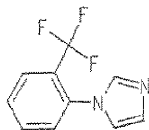
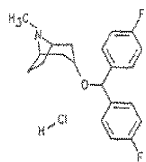
20

30

40



【化 5 6】



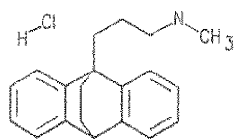
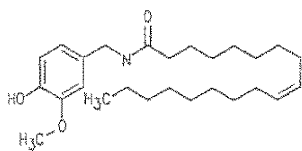
10

20

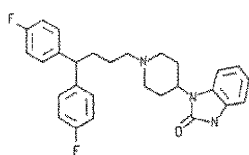
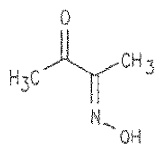
30

40

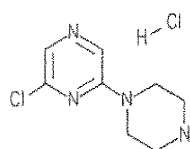
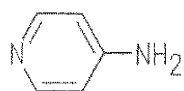
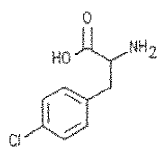
## 【化 5 7】



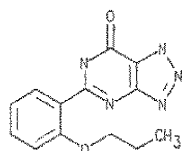
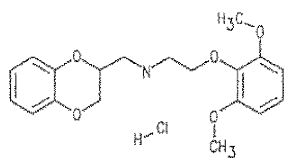
10



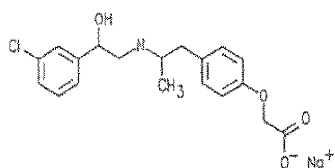
20



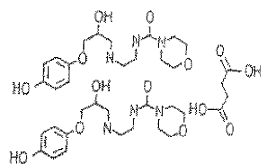
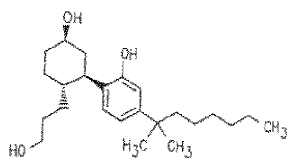
30



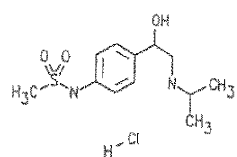
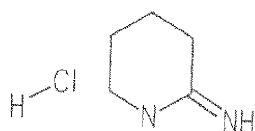
40



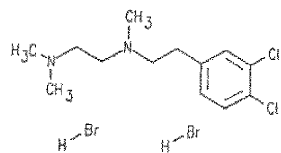
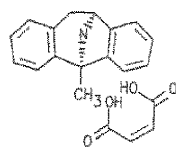
## 【化 5 8】



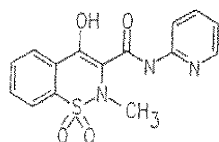
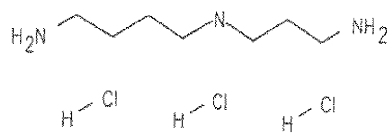
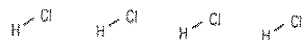
10



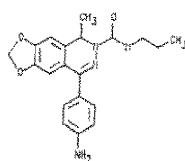
20



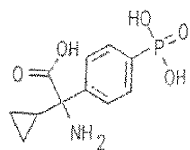
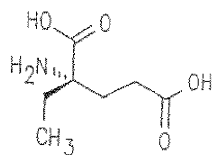
30



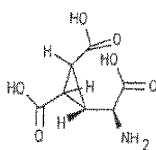
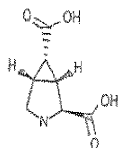
40



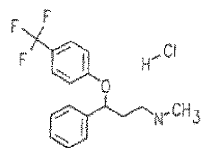
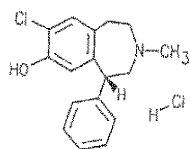
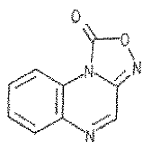
## 【化 5 9】



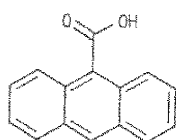
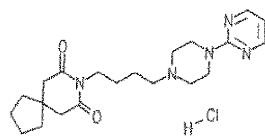
10



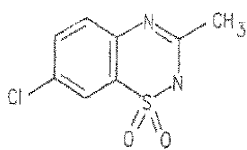
20



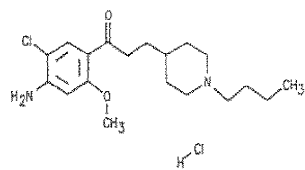
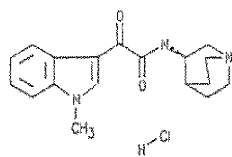
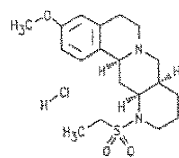
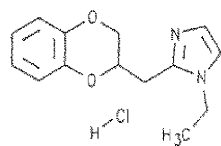
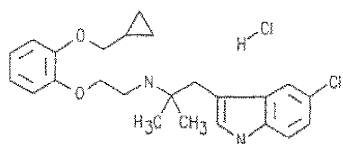
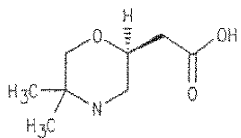
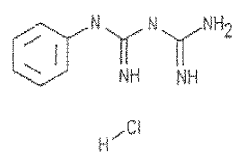
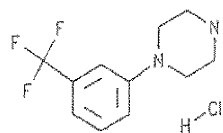
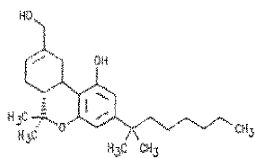
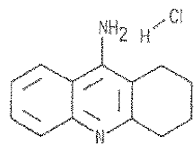
30



40



【化 6 0】



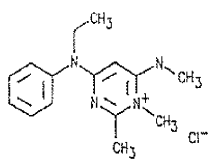
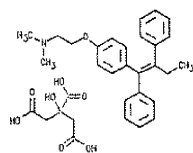
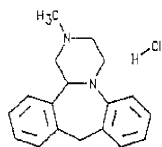
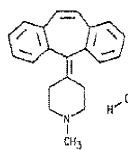
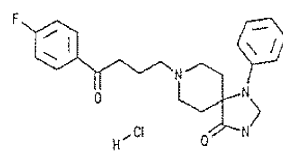
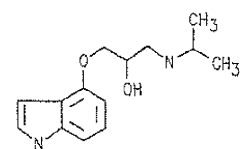
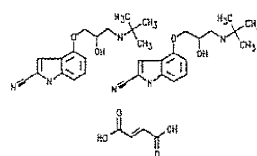
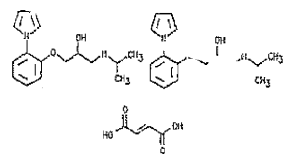
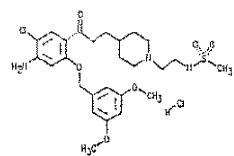
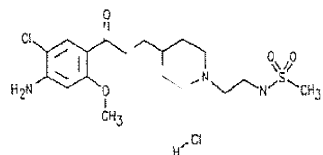
10

20

30

40

## 【化 6 1】



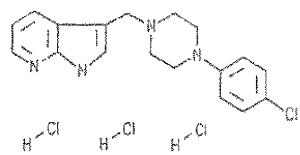
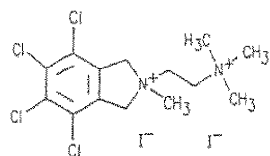
10

20

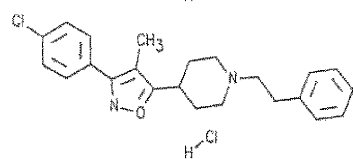
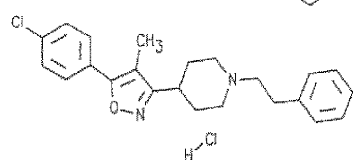
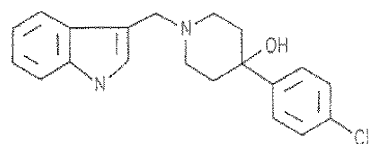
30

40

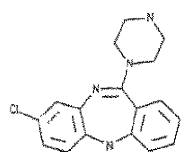
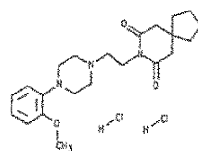
## 【化 6 2】



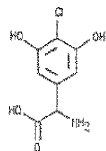
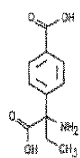
10



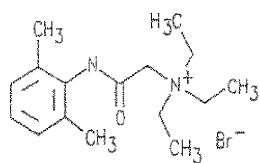
20



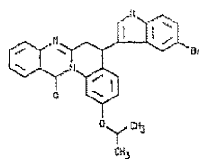
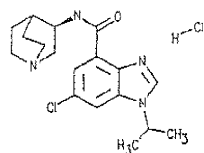
30



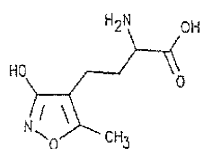
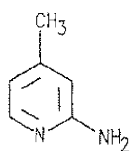
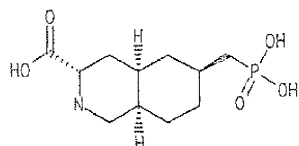
40



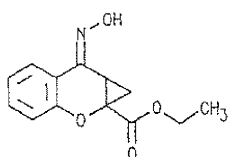
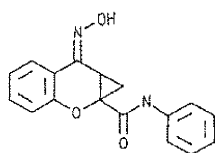
## 【化 6 3】



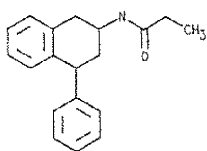
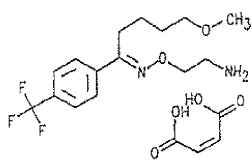
10



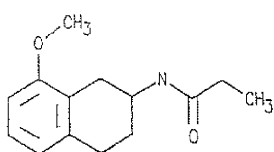
20



30

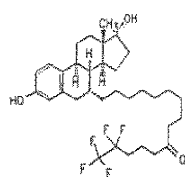
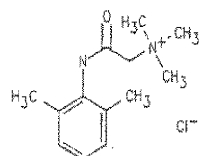
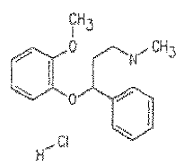
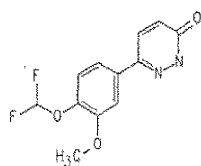
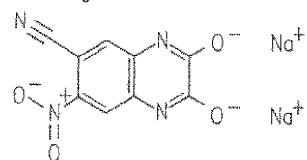
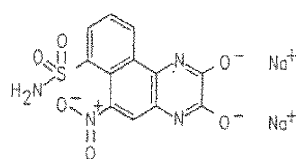
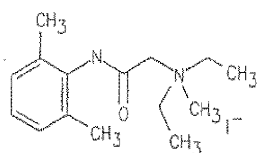
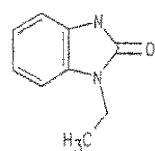
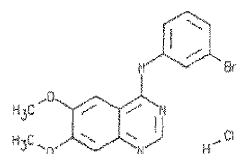
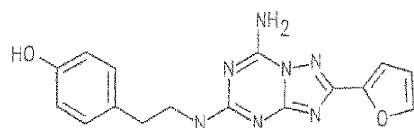


40





## 【化 6 4】



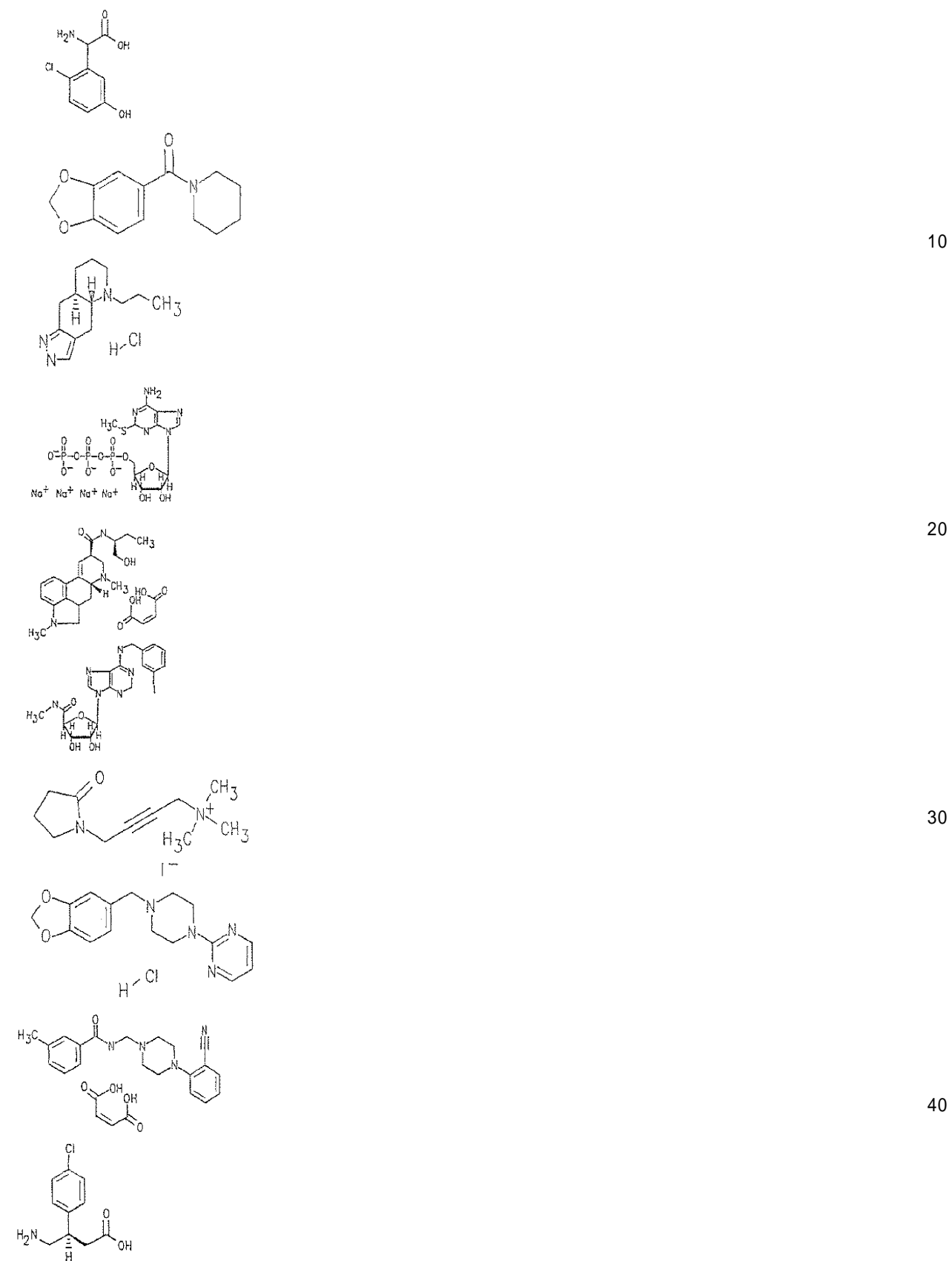
10

20

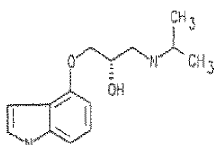
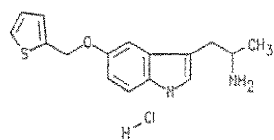
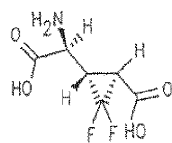
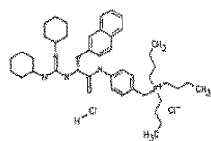
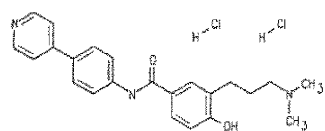
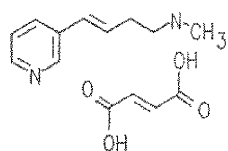
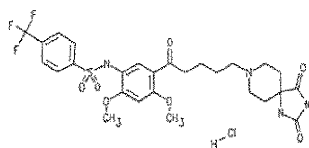
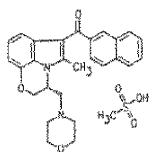
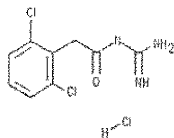
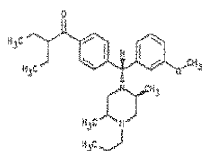
30

40

## 【化 6 5】



## 【化 6 6】



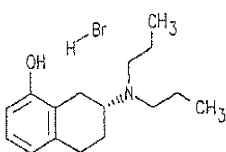
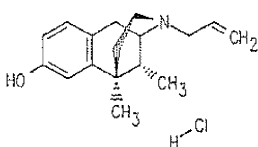
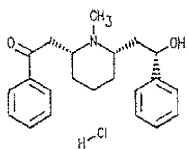
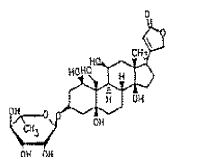
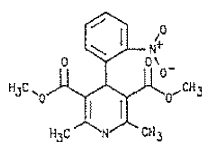
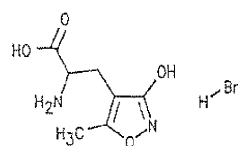
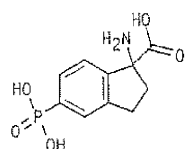
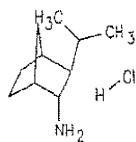
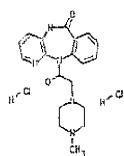
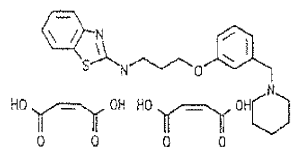
10

20

30

40

## 【化 67】



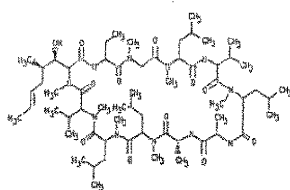
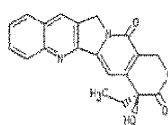
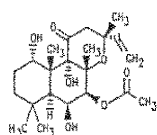
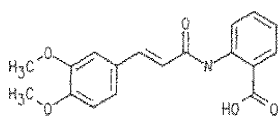
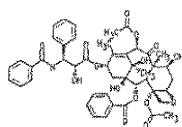
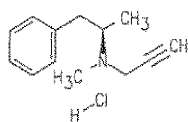
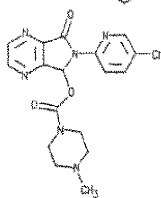
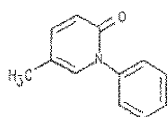
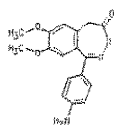
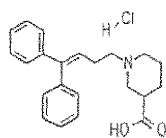
10

20

30

40

## 【化 6 8】



10

20

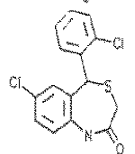
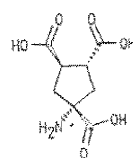
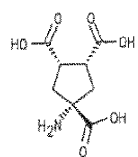
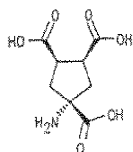
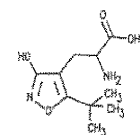
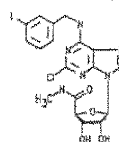
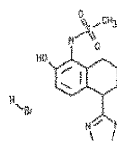
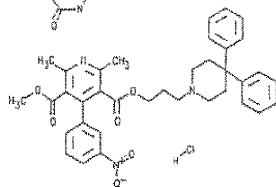
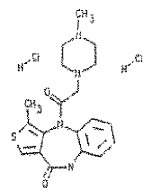
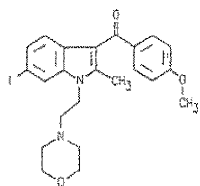
30

40

【化 6 9】



## 【化 7 0】



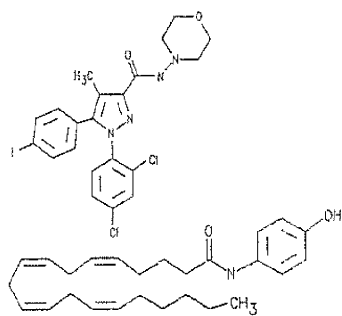
10

20

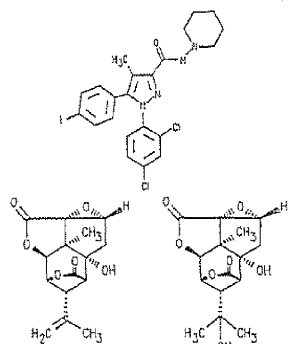
30

40

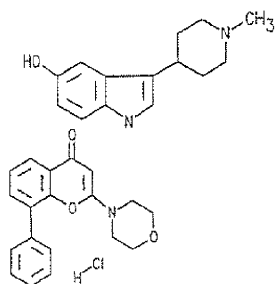
## 【化 7 1】



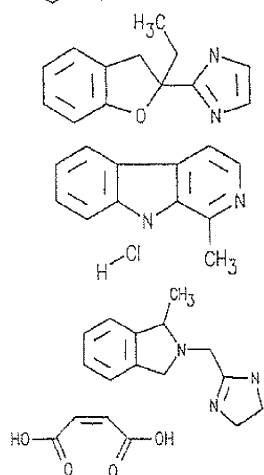
10



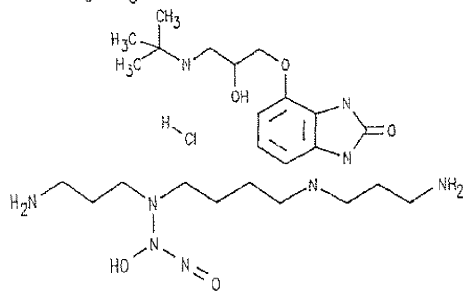
20



30

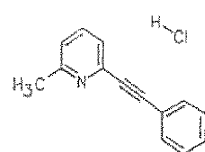
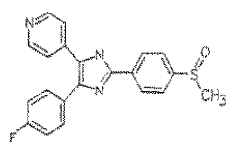
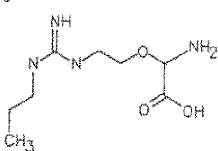
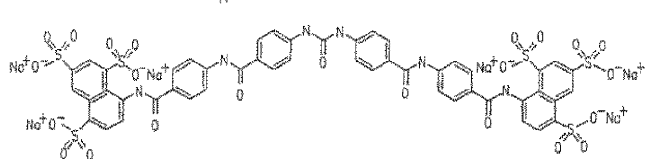
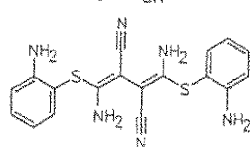
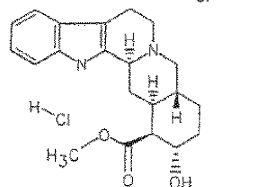
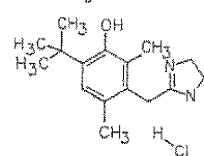
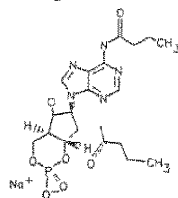
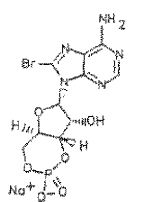
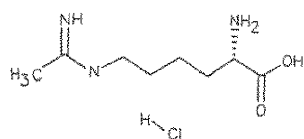


40





## 【化 7 2】



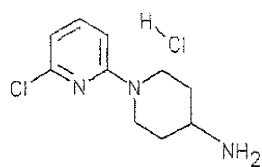
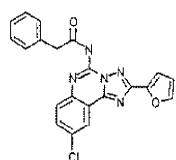
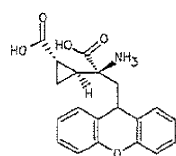
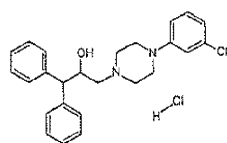
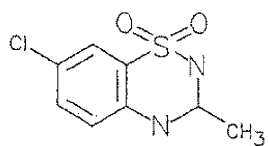
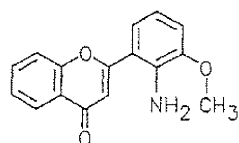
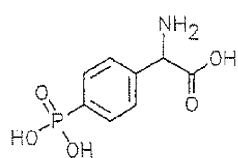
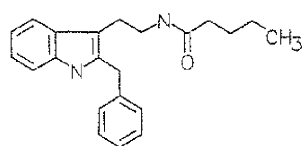
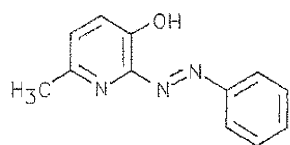
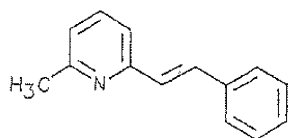
10

20

30

40

## 【化 7 3】



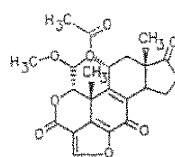
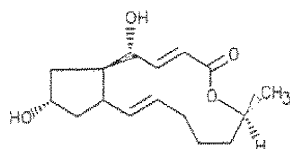
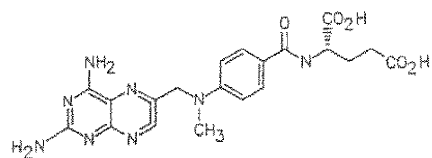
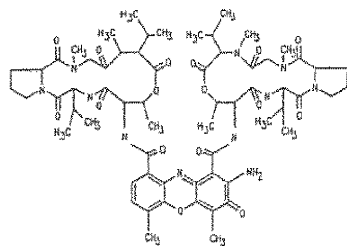
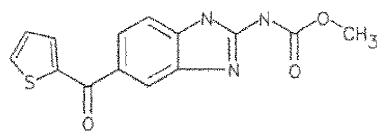
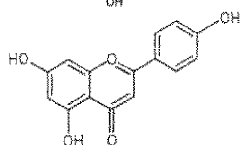
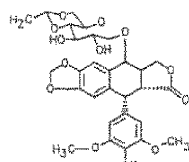
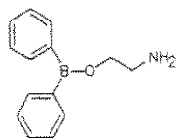
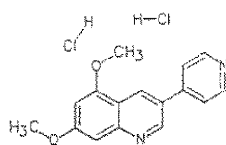
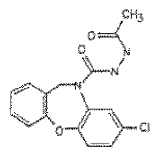
10

20

30

40

## 【化 7 4】



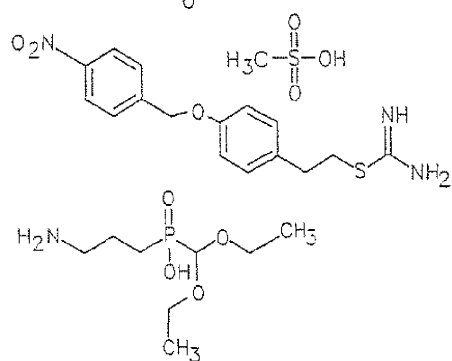
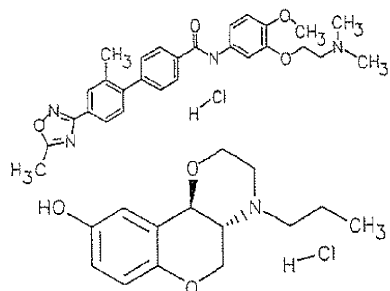
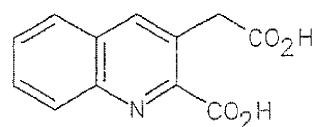
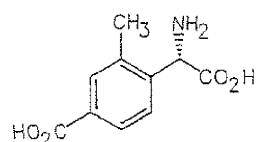
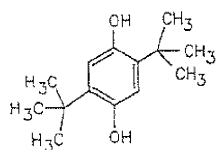
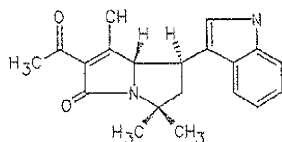
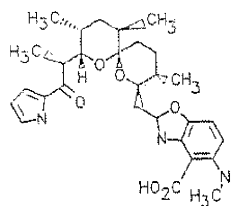
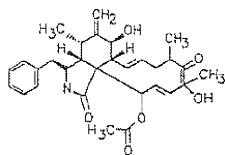
10

20

30

40

## 【化 7 5】



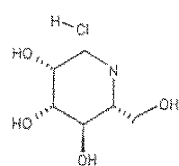
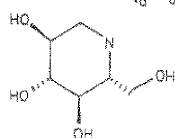
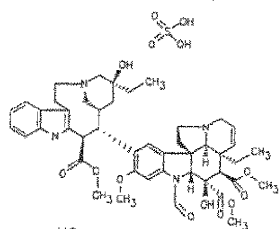
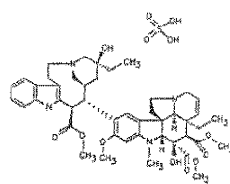
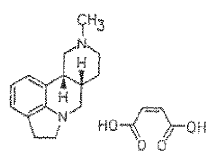
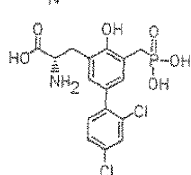
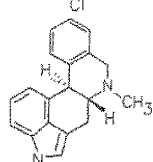
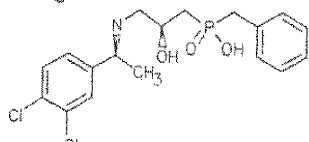
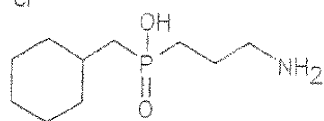
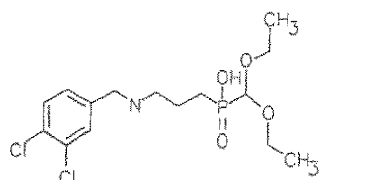
10

20

30

40

## 【化 7 6】



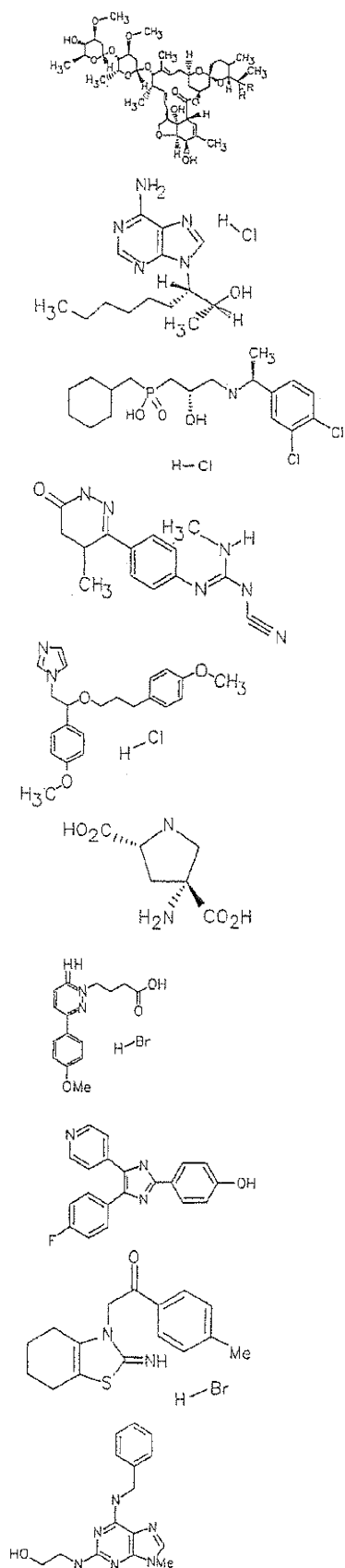
10

20

30

40

## 【化 77】



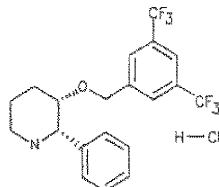
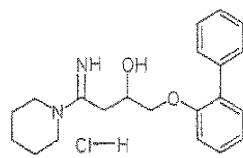
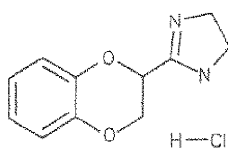
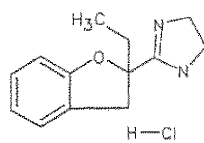
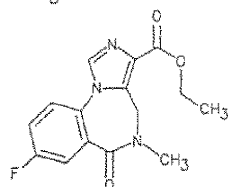
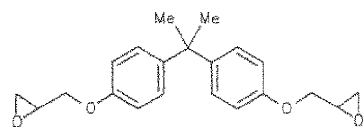
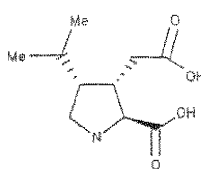
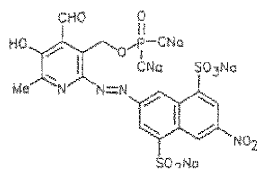
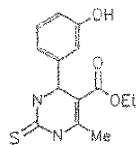
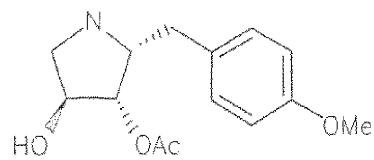
10

20

30

40

## 【化 78】



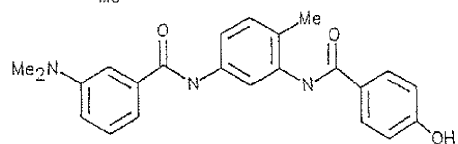
10

20

30

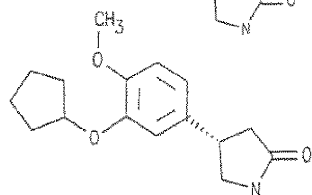
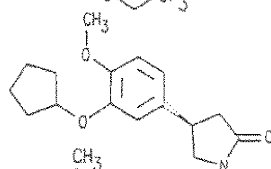
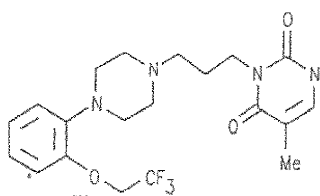
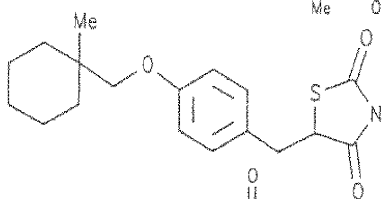
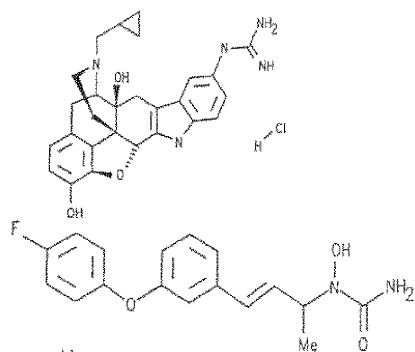
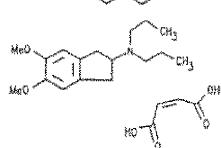
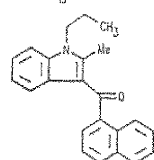
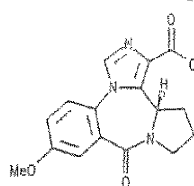
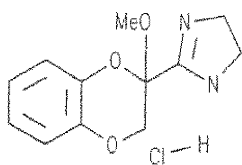
40

【化 7 9】





## 【化 80】



10

20

30

40

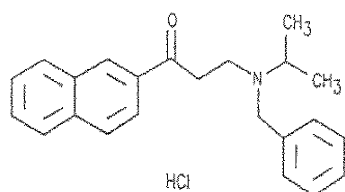
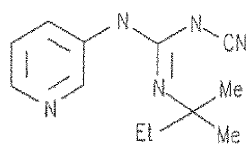
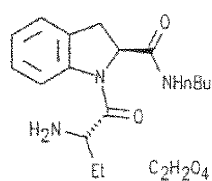
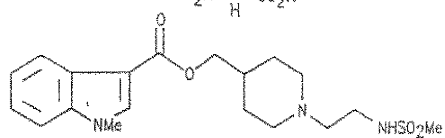
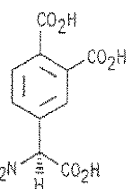
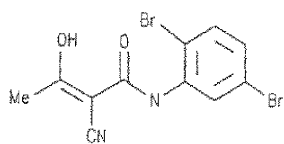
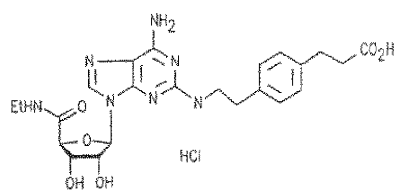
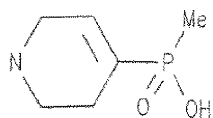
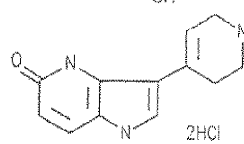
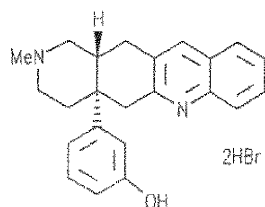
[illegible]

20

30

40

## 【化 8 2】



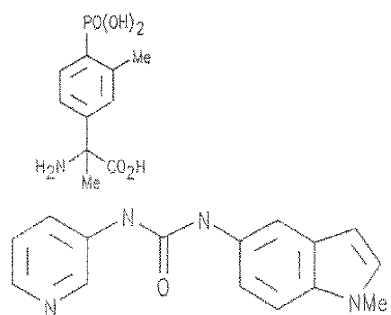
10

20

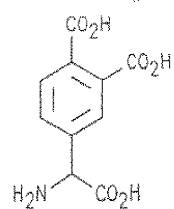
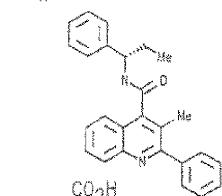
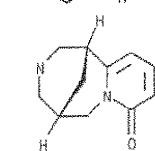
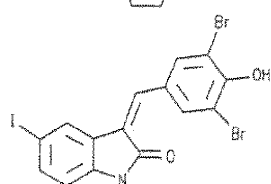
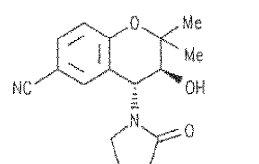
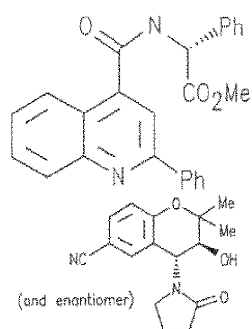
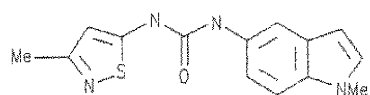
30

40

## 【化 8 3】



HCl



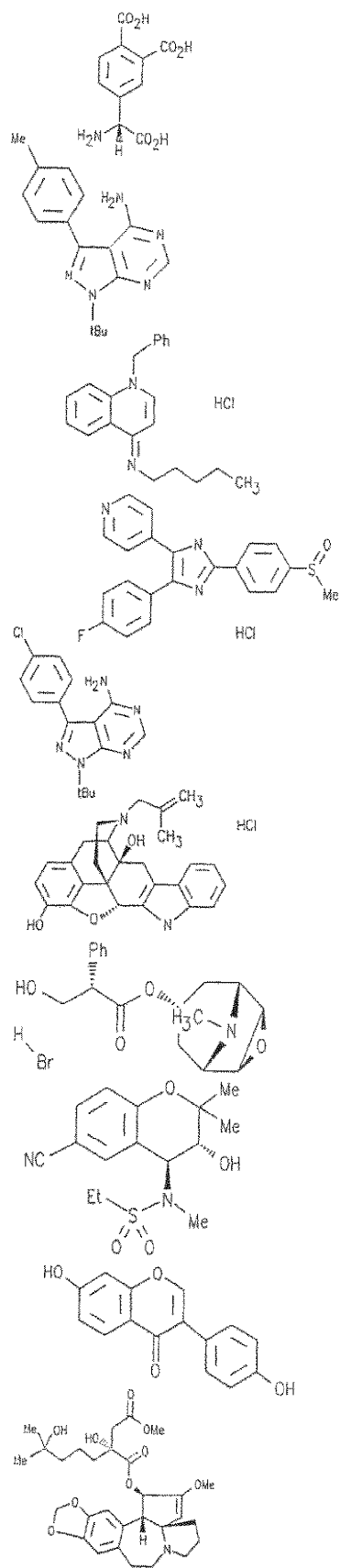
10

20

30

40

## 【化 8 4】



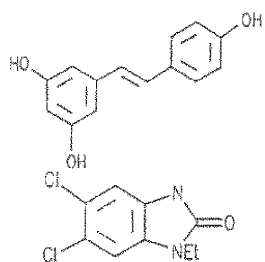
10

20

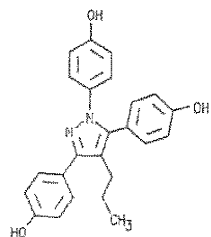
30

40

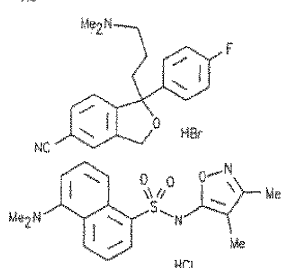
## 【化 8 5】



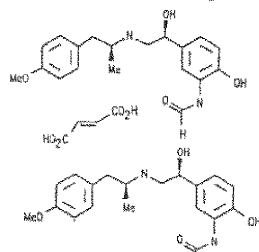
10



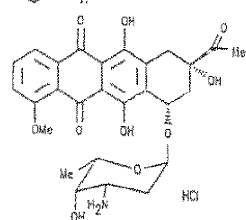
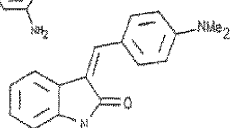
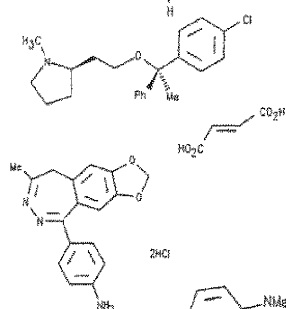
20



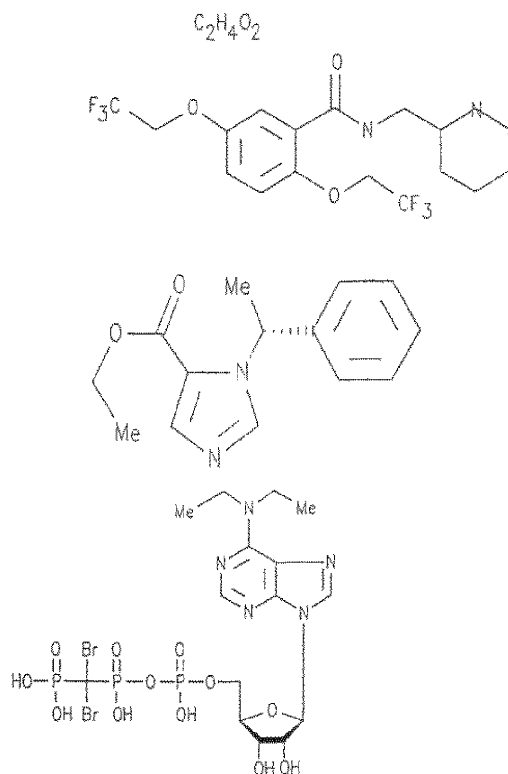
30



40



## 【化 8 6】



10

20

## 【化 8 7】

中枢神経系疾患のためのペプチドおよび抗体プローブ

β-アミロイド前駆体タンパク質  
β-セクレターゼインヒビター III  
γ-セクレターゼインヒビター XII  
(±)-イブプロフェン  
(S)-(+)-イブプロフェン  
抗-β-アミロイド (1-43)  
抗-BACE1、C-末端 (485-501)  
抗-ニカストリン、C-末端  
抗-ニカストリン、N-末端  
抗-Reelin

30

血管形成のためのペプチド

MT1-MMp ヘモペキシンドメイン、His-Tag<sup>®</sup>、ヒト、組み換え体  
MT2-MMp ヘモペキシンドメイン、His-Tag<sup>®</sup>、ヒト、組み換え体  
VEGF インヒビター

上記薬物またはその合成中間体もしくは断片から選択される、請求項 1 - 7 のいずれか一項に記載の方法。

40

## 【請求項 9】

Y が、トログリタゾン、ロシグリタゾン、ピオグリタゾン、メトトレキサート、アトルバスタチン、セレコキシブ、レフェコキシブおよびセリバスタチンからなる群より選択される、請求項 1 - 8 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 10】

Q が**ピオチン**である、請求項 1 - 9 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 11】

Z が、側鎖に官能基を有するアミノ酸である、請求項 1 - 10 の何れか一項に記載の方法。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 技術分野

本明細書では生体分子を特異的かつ選択的に分析するための化合物およびその化合物の使用方法が提供される。詳細には、化合物および方法はプロテオームの分析に有用である。

## 【背景技術】

## 【0002】

ゲノム科学は、この戦略を用いて、正常および疾病患者集団または集団間の相違を含む、定義された表現型に関連して集団を層別化できるであろうという最初の予想には達していない。ゲノム情報は、所定の疾病、薬剤副作用または他の標的表現型との個体集団を層別化するには十分でない場合がある。細胞の代謝活性は、mRNAによっては果たされず、むしろ翻訳されたタンパク質ならびにアルキル化、グリコシル化およびリン酸化産物のような翻訳後修飾された産物によって行われる。

## 【0003】

種々のタンパク質スポットのパターン（構造変化）または強度の変化を同定するには、複合タンパク質混合物を二次元（2D）ゲル電気泳動およびそれに続く画像処理によって分析する。二次元ゲル電気泳動は煩雑で間違いが生じやすい再現性の低い方法であり、効率的に自動化することができない。このゲル技術では膜タンパク質を効率的に分析することができない。さらに2Dゲルの分解能は混合物中に存在するすべてのタンパク質のプロフィールを分析するには不十分である。

## 【0004】

タンパク質は、細胞の重要な構造的および機能的機構を形成し、今日、上市されているほぼすべての薬物が相互作用する分子である。それ故、タンパク質は薬物の標的である。更には、薬物が相互作用し副作用を引き起こす「非標的」タンパク質の同定は特に判りにくい。多くの薬物の副作用は、標的および非標的タンパク質を含む作用機構をより理解することで少なくなり得ると考えられる。

## 【0005】

そのため、

- (a) 副作用を生ずるような当たり（hit）を取り除くことによるhit-to-drug選択工程を加速させること、および
- (b) 薬物-標的および薬物-非標的の相互作用の知識に基づき薬物の化学的構造を再設計し、望ましくない相互作用を少なくするかまたは取り除くことにより薬物開発の期間を短縮し、コストを少なくする必要がある。

## 【0006】

産業レベルへのスケールアップをし得るプロテオームの分析技術を開発する必要もある。この技術は下記の特性：高い精度、再現性および順応性をもち、ハイスループットとなり、自動化可能であり、そして費用効率がよい。それ故、自動化プロトコールおよびそのシステムを用い天然の立体構造のタンパク質および他の生体分子の厳密な調査および同定を行い得る技術を開発する必要がある。特に、生理学的条件下の疎水性タンパク質の同定および特性解析のための戦略および技術を開発する必要がある。

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0007】

本明細書ではプロテオームをハイスループット形式で工業レベルで分析するための方法、捕獲化合物（本明細書では捕獲剤とも呼ぶ）、およびその収集物を提供する。この方法、捕獲化合物および収集物により、生体分子の複合混合物を選別することができる。さらに、それらにより、疾病状態などの特定の表現型を予測するかまたはその指標であるタンパク質構造を同定することができ、それによってランダムSNP分析、発現プロファイリ



ングおよびタンパク質分析法の必要性がなくなる。捕獲化合物、収集物および方法は種々の異なる捕獲剤を提供することによって複合混合物を選別する。さらに、それらを使用して、特定の疾病状態のマーカーとして作用する構造「エピトープ」を同定すること、特定の表現型に関連して個体集団を層別化すること、分子の機能の基礎をなすタンパク質をより詳細に理解すること、および薬剤開発のための標的を提供することができる。標的タンパク質についての理解が増せば、より効率のよい治療薬の設計が可能となる。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本明細書で提供する捕獲化合物、収集物および方法はまた、生理学的条件で医薬品と相互作用する、本明細書に定義のような、薬物の標的および非標的である、受容体タンパク質および酵素（これらに限らない）を含む生体分子をスクリーニングすることができる。生体分子のスクリーニングは、医薬品または薬物の断片、代謝物または薬物合成における合成中間体の作用機構の理解を促進し、それにより、より標的特異的な薬物の設計に寄与する。その方法はまた、医薬品と相互作用し、それにより、副作用および他の望ましくない治療効果を生ずる、受容体および酵素（これらに限らない）を含むタンパク質のような非標的生体分子の同定に供される。1つの実施態様では、薬物または薬物の断片、代謝物または薬物合成における合成中間体による、捕獲化合物への種々の結合を用い、薬物または薬物の断片、代謝物または薬物合成における合成中間体のどの官能基（functionalities）が標的および非標的生体分子と相互作用するかを決定する。次いで、1つの実施態様では、非標的の官能基（functionalities）は薬物から除去され、その結果、より僅かな副作用が見られる薬物に改善される。他の実施態様では、薬物は捕獲化合物中に含まれており、該薬物と相互作用するタンパク質が単離され、同定され、該タンパク質は機能と関係し、該薬物は再設計され非標的タンパク質との相互作用が減少するかまたは無くなる。該方法は、望ましい場合には、再設計された薬物において繰り返される。

【0009】

本明細書で提供する、捕獲化合物、化合物の収集物、および単一でまたは収集物で化合物を用いる方法が設計され、生体分子を捕獲し、分離し、分析する。その生体分子には、以下に限らないが、生物ポリマーおよび高分子を含む生体分子の混合物、各タンパク質または膜タンパク質を含むタンパク質のような個々の生体分子が含まれる。

【0010】

本明細書で提供する化合物の収集物は、複数、一般的に少なくとも2、3、典型的には少なくとも10、50、100、1000以上の種々の捕獲化合物を含む。その化合物および収集物は、三次元立体配置を保存する条件下で、収集物中の捕獲化合物と混合物成分との相互作用により生体分子の混合物の精査が可能となるように設計する。

収集物の各メンバーは、

1) 混合物中のすべてより少ないものとの、疎水性条件を含む生理学的条件下で、混合物の複雑度および多様性によって、典型的に約5~20種以上の構成要素生体分子との結合が不可逆であるか安定であるように、共有結合で結合し、

2) 形態学的特性に基づいて生体分子間を識別するように設計する。さらに、捕獲化合物は一般に、一本鎖オリゴヌクレオチドまたは部分的な一本鎖オリゴヌクレオチドなどの基を含み、これによって捕獲化合物の各セットの分離が可能となる。

【0011】

捕獲化合物および収集物は種々の方法に用いるが、特に、生物ポリマー、生物学的サンプル由来の混合物中の構成要素である生体分子を評価するために設計される。

【0012】

捕獲化合物は、これによって共有または高結合親和性（高 $K_a$ ）結合を達成する化学反応基X（本明細書では官能基または官能性とも呼ぶ）および3個の他の基（本明細書では官能基または官能性とも呼ぶ）のうちの少なくとも1個を含む。他の基は、生体分子の反応性官能基との相互作用を調節する選択性官能基Y、収集物の構成要素をアドレス指定す

10

20

30

40

50

る選別官能基Q、および細胞膜の疎水条件をはじめとする種々の生理学的条件などの選択された条件下で捕獲化合物の溶解性を高めることなどによって、捕獲化合物の溶解性を変更する溶解性官能基Wの中から選択される。したがって、例えば、膜タンパク質を標的とする場合には、収集物中の捕獲化合物は、そのような環境における溶解性を高めるか提供する溶解性官能基を含むように設計される。

#### 【0013】

例えば、反応基（反応性官能基）としては、ヒドロキシル、アミン、アミド、スルフィドおよびカルボン酸基などのタンパク質表面の官能基と特異的に反応するかもしくは相互作用する基、または抗体、レクチン、もしくは受容体特異的リガンドなどの特定の表面領域を認識する基、または酵素の活性部位と相互作用する基が挙げられる。当業者であれば、この相互作用を達成するように官能基のライブラリーから選択することができる。この相互作用は高度に反応特異的であるが、これらの化合物は、表面の利用可能な官能基数にしたがって、同一タンパク質分子内で複数回反応することができる。反応条件を変えることによって、異なる反応性を有する表面の利用可能な官能基の同定が可能であり、それによって、個々のタンパク質を混合物から分離するために用いられる1以上の高度に反応性である部位の同定が可能となる。利用可能な技術では得られる反応混合物中の種は分離されない。本明細書で提供される収集物および化合物は、反応基と生体分子の結合を改変する、第2の官能基、選択基によってその問題を解決する。

#### 【0014】

選択性官能基は、種々の基、ならびに第2の官能基の幾何的間隔、一本鎖の保護されていないか、または適切に保護されたオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体を含む。例えば、選択性官能基は標的タンパク質と非共有結合的に相互作用して反応性官能基の特異性または結合を改変する。そのような官能基としては、特定の大きさのタンパク質、疎水性化合物またはタンパク質（例えば、PEG）を立体的に妨害することができる化学基および生体分子、疎水性化合物またはタンパク質（例えば、極性芳香族、脂質、糖脂質、ホスホトリエステル、オリゴ糖）、正または負に帯電した基、既定の二次または三次構造を生じる基または生体分子が挙げられる。

#### 【0015】

捕獲化合物はまた、各捕獲化合物をその構造によって分離またはアドレス指定するための選別官能基を含むことができる。選別官能基は、例えば、一本鎖の（または部分的に一本鎖の）保護されていないか、または適切に保護されたオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体であり得、通常、少なくとも約5個～最大25、35、50、100個のヌクレオチド、あるいは任意の所望の数のヌクレオチド（またはその類似体）を含み、順序が変わっている配列領域と、必要に応じて隣接配列を含む。そのようなブロックの各々は、多数の配列並べ替えを有し、隣接する保存領域配列を含む場合も含まない場合もあり、塩基相補的な一本鎖核酸分子または核酸類似体とハイブリダイズできる。選別官能基はまた、バーコード、特に、機械によって読み取り可能なバーコード、その色によって選別され得る小さな着色ビーズなどのカラーコード標識をはじめとするコードなどの標識、高周波数タグまたは他の電子標識または化学標識であってもよい。結合した生体分子の個別の分析を可能にするために、捕獲化合物の各セットの選別を可能にするあらゆる官能性が考慮される。

#### 【0016】

捕獲化合物は収集物として、通常、すべての官能性が異なる種々の化合物のセットの収集物として提供される。生物ポリマーの複合混合物の選別のためには、収集物は多様な捕獲化合物メンバーを含み、その結果、例えば、それらを整列させると、アレイの各位置が0～100、一般に、5～50および望ましくは1～20、通常5～20種の、種々の生体分子をアレイの各位置に含む。

#### 【0017】

1つの実施形態の実施においては、捕獲化合物の収集物を生体分子混合物と接触させ、結合した分子を、例えば、質量分析を用い、次いで、必要に応じて、整列後に少量のタン

10

20

30

40

50

パク質を同定するための蛍光タギングなどのタギングを行って評価する。他の実施形態では、単一の捕獲化合物を1種または複数の生体分子と接触させ、結合した分子を評価する。

【0018】

1種または複数の捕獲化合物の、タンパク質の混合物を含むがこれに限定されない生体分子の混合物への曝露前、その間またはその後に、これらの化合物のオリゴヌクレオチド部分またはその類似体を固定化したオリゴヌクレオチド（単数または複数）またはその類似体（単数または複数）の相補鎖にハイブリダイズさせて、例えば、マトリックス支援レーザー脱離イオン化・飛行時間型（MALDI-TOF）質量分析計などの質量分析、比色分析、蛍光または化学発光タギングによる、タンパク質などの結合した生体分子の分離、単離およびその後の分析を可能にするか、あるいはMALDI-TOF質量分析をはじめとする質量分析による分解能の向上を可能にする。

10

【0019】

分析用サンプルとしてはあらゆる生体分子が挙げられ、特に、限定されるものではないが、天然および合成供給源をはじめとするタンパク質混合物などのタンパク質含有サンプルが挙げられる。タンパク質は単離された染色体、遺伝子、cDNAおよびゲノムライブラリーからの翻訳によって調製することができる。タンパク質は細胞および他の供給源から単離することもできる。特定の実施形態では、本明細書で提供される捕獲化合物は、同一のタンパク質の異なる翻訳後修飾（すなわち、リン酸化パターン（例えば、発癌遺伝子）、グリコシル化および他の翻訳後修飾）を選択的に捕獲するよう設計される。

20

【0020】

収集物を用いる他の方法も提供される。一方法では、収集物または1以上のメンバー捕獲化合物を、タンパク質の種々のコンホメーション間で識別するために用い、例えば、診断などのための表現型による同定に用いることもできる。例えば、アミロイド症などの、コンホメーションが変化したタンパク質が関与している疾病である、タンパク質凝集の疾病では、収集物によって疾病関与型のタンパク質と正常タンパク質とを識別できるので、サンプルにおいて疾病を診断することができる。

【0021】

図面の簡単な説明

図1は、タンパク質の混合物のハイブリダイゼーション、分離および質量スペクトル分析を示す図である。

30

【0022】

図2は、本明細書で提供される装置の1つの実施形態を示す模式図を提供する図である。

【0023】

図3a~3h h h hは、本明細書で提供される捕獲試薬に用いる例示的な選択性官能基を提供する図である。

【0024】

図4a~4fは、生体分子捕獲アッセイの概略図ならびに例示的な捕獲化合物およびタンパク質を用いた結果を示す図である。

40

【0025】

図5は、捕獲化合物の選択性官能基における、バイアスのかかったおよびバイアスのかかっていない選択基の例示的な特徴を示す。

【0026】

図6は、捕獲化合物を用いるタンパク質同定のための例示的なプロトコールを示す。

【0027】

図7は、タンパク質捕獲に含まれる工程および捕獲化合物を用いる同定の概略図を示す。その図は、捕獲化合物が、タンパク質の混合物を含むサンプルと混合されることを示す。選択性官能基（例えば、薬物）との親和性を有するタンパク質は、選択性官能基と平衡となり得る。次いで、該捕獲化合物は活性化され（例えば、hにより）、短命であり、

50

親和性のあるタンパク質を共有結合的に捕獲するラジカルを形成する。該捕獲化合物が、選択性官能基とタンパク質との平衡のために非常に近接していなかった場合には、他のタンパク質は捕獲されない。その捕獲されたタンパク質はビオチンで単離され、質量分析を用い同定される。

【0028】

図8は、捕獲化合物を用いる選択的タンパク質捕獲を示す。スルホンアミドを含む捕獲化合物AおよびBはカルボニックアンヒドラーゼと相互作用する。(文献によると、そのCAIIイソ型のKdは $\sim 10\text{ nM}$ であり、CAIでは $\sim 1\text{ }\mu\text{M}$ である(その両方の値は活性アッセイを用い独立に確認した)。精製したタンパク質を用いると、親和性および捕獲効率はCarbonic IIで最も高くなり、CAIでは低くなり、他の精製し試験したタンパク質は無視される。

10

【0029】

図9は、捕獲化合物Bの既知リガンドに対するタンパク質イソ型の相対的結合強度を示す。

【0030】

図10は、捕獲化合物Aを用いる、複雑なタンパク質混合物由来のカルボニックアンヒドラーゼの単離を示す。CAIIを、ヒト腎臓細胞系HEK293由来のFPLC精製タンパク質混合物中にドープした。ドープしたCAIIを、アビジン被覆化(SoftLink)樹脂を用い他のタンパク質すべてから取り出した。他のタンパク質は破棄し、更なる分析用に用意した精製タンパク質を得た。

20

【0031】

図11は、捕獲化合物Aを用いる、かなり複雑なタンパク質混合物由来のカルボニックアンヒドラーゼの単離を示す。CAIIを、ヒト腎臓細胞系HEK293由来のサイトソル抽出物すべてにドープした。ドープしたCAIIを、アビジン被覆化(SoftLink)樹脂を用い他のタンパク質すべてから取り出した。他のタンパク質を破棄し、更なる分析用に用意した精製タンパク質を得た。

【0032】

図12は、溶解した赤血球由来のカルボニックアンヒドラーゼの捕獲および単離を示す。図の上部のスペクトルは、溶解した赤血球(精製なし)の直接のMALDIを示し、他のすべてのタンパク質よりも非常に過剰であるヘモグロビンのシグナルが見られ得る。および鎖に関してシグナルが見られ、また非特異的なダイマーに関してシグナルが見られる( $\sim 30\text{ キロダルトン}$ )。図の下部のスペクトルは、カルボニックアンヒドラーゼと親和性を有するスルホンアミド薬物を含む捕獲化合物Aを、溶解した赤血球と混合した後に、入手した。該捕獲化合物は、カルボニックアンヒドラーゼイソ型IおよびIIを共有結合的に捕獲する。2-3対数過剰( $2-3\text{ log excess}$ )であるほぼすべてのヘモグロビンを含む、共有結合的に捕獲されていない他のすべてのタンパク質をMALDI分析前に洗い流した。ゲルがなく、クロマトグラフィーによる浄化が、このスペクトルを得るために必要である。CAIIピークの強度はCAIよりも高く(RBCにおいて、より高く、 $\sim 100\times$ である)、それは、スルホンアミド薬物がCAIIに対しより親和性が高いからである。

30

40

【0033】

図13は、事前に細胞を溶解することのない、赤血球由来のカルボニックアンヒドラーゼの直接の捕獲を示す。

【0034】

図14は、カルボニックアンヒドラーゼを含む非ビオチニル化タンパク質が過剰にあるときの、赤血球ライゼート由来のカルボニックアンヒドラーゼの捕獲を示す。

【0035】

図15は、非常に高濃度の捕獲化合物Aを用いる、より低い親和性を有するタンパク質の捕獲を示す。

【発明を実施するための形態】

50

## 【 0 0 3 6 】

詳細な説明

## A . 定義

本明細書において用語に複数の定義が存在する場合には、この節における定義が優先する。

## 【 0 0 3 7 】

本明細書においてオリゴヌクレオチドとは、リン酸ジエステル結合によって結合されている最大約 2 0、約 5 0 または約 1 0 0 個のヌクレオチドの直鎖配列を意味する。この長さよりも長いものには、ポリヌクレオチドという用語を使用する。

## 【 0 0 3 8 】

本明細書においてオリゴヌクレオチド類似体とは、最大約 2 0、約 5 0 または約 1 0 0 個のヌクレオチド類似体の直鎖配列、またはリン酸ジエステル結合以外の「主鎖」結合、例えば、リン酸トリエステル結合、ホスホルアミデート結合、ホスホロチオエート結合、メチルホスホネートジエステル結合、チオエステル結合またはペプチド結合（ペプチド核酸）によって結合している最大約 2 0、約 5 0 または約 1 0 0 個までのヌクレオチドの直鎖配列を意味する。

## 【 0 0 3 9 】

本明細書においてプロテオームとは、細胞内に存在するすべてのタンパク質を意味する。

## 【 0 0 4 0 】

本明細書において生体分子とは、自然界に見ることができるあらゆる化合物またはその誘導体である。生体分子としては、限定されるものではないが、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、ステロイド、オリゴ糖および単糖が挙げられる。

## 【 0 0 4 1 】

本明細書においてMALDI-TOFとは、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 - 飛行時間型質量分析計を指す。

## 【 0 0 4 2 】

本明細書において「調整された」または「調整」とは、タンパク質に関連して用いる場合に、ポリペプチドブチドが、タンパク質のフラグメンテーションの尤度を最小にするよう、またはタンパク質もしくは構成要素アミノ酸の質量分析の分解能を高めるよう修飾されていることを意味する。タンパク質の質量分析の分解能は、質量分析を実施する前にタンパク質を調整することによって高めてもよい。調整は質量分析の前のどの段階で実施してもよく、1つの実施形態では、タンパク質を固定化する間に実施する。タンパク質は、例えば、陽イオン交換物質または陰イオン交換物質で処理することによって調整することができ、これはタンパク質の荷電不均一性を低下させ、それによって、集団中の種々のタンパク質と結合している陽イオン（または陰イオン）数の不均一性によるピークの広がりをなくすることができる。1つの実施形態では、イオン交換によって、H<sup>+</sup>およびアンモニウムイオンを除くすべての陽イオンの除去が行われる。ポリペプチドブチドをアルキルヨード、ヨードアセトアミド、ヨードエタノールまたは2,3-エポキシ-1-プロパノールなどのアルキル化剤と接触させることにより、例えば、タンパク質中でのジスルフィド結合の形成を防ぐことができる。同様に、塩化トリアルキルシリルを用いて、荷電アミノ酸側鎖を無電荷の誘導体へ変換することもできる。

## 【 0 0 4 3 】

本明細書において、捕獲効率は、HPLC分析により測定したときの、捕獲した生体分子のピーク面積 / (捕獲した生体分子のピーク面積 + 捕獲していない生体分子のピーク面積) である。

## 【 0 0 4 4 】

本明細書において薬剤とは、治療薬としてもしくは治療薬を設計するためのリード化合物として用いるための候補であるか、または既知の医薬品であるあらゆる化合物を指す。

そのような化合物は、有機小分子、ペプチド、ペプチドミメティックス、アンチセンス分子、抗体、抗体の断片、または組換え抗体をはじめとする小分子であり得る。特に注目されるものは、特異的結合特性を有し、その結果、それらを選択基として使用できるか、または捕獲化合物の選別のために、支持体上の標的と結合するか、選別官能基が薬剤標的である場合に、固体支持体に連結されている選別官能基のいずれかとして使用できる「薬剤」である。

【 0 0 4 5 】

本明細書において薬物代謝産物とは、体内の代謝後の薬物の変換で形成される任意の化合物を指し、この化合物は、親薬物 ( p a r e n t   d r u g ) よりも活性が大または小であり得る種々の分子となる。

10

【 0 0 4 6 】

本明細書において薬物の断片とは、薬物の一部または一部分である分子を指す。

【 0 0 4 7 】

本明細書において薬物である合成中間体は、薬物の化学合成における中間体として使用される化合物である。

【 0 0 4 8 】

本明細書において単数の用語「 a 」は単数または複数である。

【 0 0 4 9 】

本明細書において「薬物の標的」は、その薬物がインビボで相互作用し、相互作用により望ましい治療効果を発揮する、受容体および酵素を含み、それらに限定されないタンパク質である。

20

【 0 0 5 0 】

本明細書において「薬物の非標的」は、その薬物がインビボで相互作用することを目的としない、受容体および酵素を含み、それらに限定されないタンパク質などである。薬物と薬物の非標的との相互作用は、副作用のような望ましくない治療効果を生じ得る。

【 0 0 5 1 】

本明細書において「核酸」とは、デオキシリボ核酸 ( D N A ) およびリボ核酸 ( R N A ) ならびに R N A もしくは D N A いずれかの類似体もしくは誘導体などの一本鎖および / または二本鎖ポリヌクレオチドを指す。「核酸」にはまた、ペプチド核酸 ( P N A ) 、ホスホロチオエート D N A などの核酸の類似体および他のそのような類似体および誘導体またはそれらの組み合わせも含まれる。

30

【 0 0 5 2 】

本明細書において「ポリヌクレオチド」とは、デオキシリボ核酸 ( D N A ) 、リボ核酸 ( R N A ) 、および例えば、ヌクレオチド類似体またはホスホジエステル結合以外の「主鎖」結合、例えば、ホスホトリエステル結合、ホスホリアミデート結合、メチルホスホネートジエステル結合、ホスホロチオエート結合、チオエステル結合またはペプチド結合 ( ペプチド核酸 ) を含む D N A または R N A 誘導体をはじめとする少なくとも 2 個の連結しているヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体を含むオリゴマーまたはポリマーを指す。「オリゴヌクレオチド」もまた、本明細書では「ポリヌクレオチド」と本質的に同義に用いるが、当業者は、オリゴヌクレオチド、例えば、P C R プライマーを、一般に、約 5 0 ~ 1 0 0 個未満のヌクレオチドの長さであると認識する。

40

【 0 0 5 3 】

本明細書において、質量分析計で分析される生体分子に関して「質量改変」とは、質量スペクトル分析によって検出することができる既定された増分で、得られる分子の分子量を変更する、成分原子または基の変化を含むことを指す。

【 0 0 5 4 】

本明細書において「ポリペプチド」とは、少なくとも 2 個のアミノ酸またはアミノ酸誘導体を意味し、これには、質量が改変されたアミノ酸およびアミノ酸アナログが含まれる。これらはペプチド結合によって連結されているもの、および改変されたペプチド結合を行うことができるものであり得る。「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質

50

」は本明細書では本質的に同義に用いるが、当業者は、ペプチドが、一般に、約 50 ~ 100 個より少ないアミノ酸残基を含み、タンパク質は天然の供給源から得られることが多く、例えば、翻訳後修飾を含み得ると認識する。

【0055】

本明細書において「結合した」とは、通常、イオンおよび/または共有結合をはじめとする化学的相互作用による安定な結合を指す。結合手段の中には、ストレプトアビジンまたはアビジンとビオチン相互作用、疎水性相互作用、磁性相互作用（例えば、Dynal, Inc. Great Neck, N.Y. および Oslo Norway によって販売されているストレプトアビジンコーティングした磁性ビーズである DYNABEADS などの官能基をもたせた磁性ビーズを用いる）、2つの極性面間またはオリゴ/ポリエチレングリコール間の「湿潤」会合などの極性相互作用、アミド結合、ジスルフィド結合、チオエーテル結合などの、または架橋剤による共有結合の形成、および酸不安定性または光切断可能なリンカーによるものがある。

10

【0056】

本明細書において「サンプル」とは、検出される物質を含有する組成物を指す。目的上、サンプルとは、生体分子を含み得るいずれのものも指す。

【0057】

したがって、サンプルは生物学的サンプル（例えば、生物（例えば、ヒト、動物、植物、細菌、真菌、原生生物、ウイルス）由来の供給源から得られたいずれかの物質）を含む。生物学的サンプルは固体物質（例えば、組織、細胞ペレットおよび組織診、死体の組織）および体液（例えば、尿、血液、唾液、羊水および口洗浄液（頬側細胞を含む））をはじめ、いずれの形態であってもよい。

20

【0058】

本明細書において「固体支持体」とは、気体でなく液体でもない、表面を有する物質を意味する。したがって、固体支持体は、例えば、ガラス、シリコン、金属、プラスチックまたは複合材料から構築された平坦な表面であってもよく、シリカゲル、制御された細孔性ガラス、磁性またはセルロースビーズなどのビーズの形態であってもよく、コンビナトリアル合成または分析に適したピンのアレイといったピンであってもよい。

【0059】

本明細書において収集物とは、2以上のメンバー、通常、3、5、10、50、100、500、1000以上のメンバーの組み合わせを指す。特に、収集物とは、本明細書で提供される捕獲化合物のそのような組み合わせを指す。

30

【0060】

本明細書においてアレイとは、3以上のメンバーを含む、捕獲化合物などの要素の収集物を指す。アドレス可能なアレイとは、アレイのメンバーが、通常、固相支持体上の位置によって、また識別子または検出可能標識によって同定可能なものである。したがって、一般に、アレイのメンバーは固相表面の別個の同定可能な位置に固定されている。複数の化合物が支持体と、通常は、選別官能基の支持体表面の基または化合物との結合によって、例えば、シリコンチップまたは他の表面などの支持体表面のアレイ（すなわち、2以上のパターン）と連結されている。アドレス指定は各メンバーを高周波（RF）タグなどで電子工学的に標識することによって、カラーコードビーズまたは他のそのように識別可能なカラーコード標識を用いることによって、および分子量によって達成すればよい。アドレス指定のためのこれらの標識は選別官能基「Q」として働く。したがって、一般に、アレイのメンバーを、固相表面の別個の同定可能な位置に固定化するか、あるいは同定可能な標識に直接もしくは間接的に連結させるか、別の方法で結合させる、例えば、微粒子または他の粒状支持体（本明細書ではビーズと呼ぶ）に取り付け、そして溶液に懸濁するかまたは表面上に広げる。

40

【0061】

本明細書において「基質」とは、その上にサンプルおよび/またはマトリックスを付着させる不溶性支持体を指す。支持体は実質的にどのような不溶性または固体物質から調製

50

されていてもよい。例えば、シリカゲル、ガラス（例えば、細孔性ガラス（CPG））、ナイロン、Wang樹脂、Merrifield樹脂、エピクロロヒドリンで架橋されたデキストラン（例えば、Sephadex（登録商標））、アガロース（例えば、Sepharose（登録商標））、セルロース、磁性ビーズ、Dynaビーズ、金属表面（例えば、鋼鉄、金、銀、アルミニウム、シリコンおよび銅）、プラスチック材料（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリエステル、ポリビニリデンジフルオライド（PVDF））。1つの実施形態では、平坦な表面としてサンプルを受容、含有または結合するための親水性位置の周囲に疎水性領域を含むものを含む。

#### 【0062】

支持体は粒子であってもよいし、またはマイクロタイターディッシュもしくはウェル、スライドガラス、シリコンチップ、ニトロセルロースシート、ナイロンメッシュ、または他のそのような物質などの連続表面の形態であってもよい。粒子状の場合には、通常、粒子の少なくとも一方向の寸法は5～10mmの範囲またはそれより小さい。本明細書でまとめて「ビーズ」と呼ぶそのような粒子は、必ずしもそうではないが、球形であることが多い。しかし、「ビーズ」については、マトリックの形状を制約するものではなく、ランダムな形、ニードル、ファイバーおよび細長いものをはじめ、どのような形であってもよい。「ビーズ」、特に、液相中で用いるのに十分に小さいものである微粒子も考慮される。「ビーズ」は、さらなる構成要素が本明細書の方法および分析を干渉しない限りは、磁石を用いる分離のための、磁性または常磁性粒子などのさらなる構成要素を含み得る（例えば、Dynaビーズ（Dyna1、Oslo、Norway）参照）。

#### 【0063】

「相補鎖」とは本明細書では「補体」と同じ意味で用いられる。核酸鎖の補体はコード鎖の補体または非コード鎖の補体であり得る。

#### 【0064】

本明細書において、本明細書に挙げる種々のアミノ酸配列中に存在する「アミノ酸」はその十分に公知の三文字または一文字略語によって特定される。種々のDNA断片中に存在するヌクレオチドは、当技術分野で慣例的に用いられる標準的な一文字表記で示す。

#### 【0065】

式によって本明細書で示されるすべてのアミノ酸残基配列は、アミノ末端からカルボキシ末端への慣習的な方向で左から右向きであることに注意。さらに、「アミノ酸残基」とは改変されたアミノ酸および普通は存在しないアミノ酸を含むよう広く定義される。さらに、アミノ酸残基配列の先頭と最後のダッシュ記号は1個以上のアミノ酸残基のさらなる配列との、またはNH<sub>2</sub>などのアミノ末端基との、またはCOOHなどのカルボキシル末端基とのペプチド結合を示すことに注意。

#### 【0066】

本明細書において切断可能な結合または部分とは、特定の条件下で、化学的に、酵素によってまたは光分解によって切断されるかまたは切断することができる結合または部分を指す。本明細書において、特に断りのない限り、そのような結合はMALDI-MS分析の条件下で、UVまたはIRレーザーなどによって切断することができる。

#### 【0067】

本明細書において「選択的に切断することができる」部分とは、目的の化合物の他の部分の組成に影響を及ぼしたり変更したりすることなく選択的に切断され得る部分である。例えば、本明細書に提供される化合物の切断可能部分Lは、化学的切断、酵素的切断、光分解的切断または他の手段によって、タンパク質をはじめとする結合している生体分子の組成（例えば、化学組成）に影響を及ぼしたり変更したりすることなく切断され得るものである。「切断できない」部分とは、目的の化合物の他の部分の組成に影響を及ぼしたり変更したりすることなく選択的に切断することができないものである。

#### 【0068】

本明細書において高親和性での結合とは、少なくとも10<sup>-9</sup>の、一般に、10<sup>-10</sup>、10<sup>-11</sup>リットル/1モル以上の会合定数K<sub>a</sub>または10<sup>-10</sup>、10<sup>-11</sup>、10<sup>-12</sup>以上の

10

20

30

40

50



$K_{eq}$  を有する結合を指す。本明細書における目的上、反応基によって形成される高親和性結合は、MALDI-MS分析で用いられるレーザー（UVおよびIR）に対して安定なものである。

【0069】

本明細書において「アルキル」、「アルケニル」および「アルキニル」は、特に断りのない限り、1～20個の炭素、または1～16個の炭素を含み、直鎖または分枝炭素鎖である。アルケニル炭素鎖は2～20個の炭素であり、特定の実施形態では、1～8の二重結合を含む。1～16個の炭素のアルケニル炭素鎖は、特定の実施形態では、1～5の二重結合を含む。アルキニル炭素鎖は2～20個の炭素であり、1つの実施形態では、1～8の三重結合を含む。2～16個の炭素のアルキニル炭素鎖は、特定の実施形態では、1～5の三重結合を含む。アルキル、アルケニルおよびアルキニル基の例としては、限定されるものではないが、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、イソブチル、n-ブチル、s-ブチル、t-ブチル、イソペンチル、ネオペンチル、t-ペンチルおよびイソヘキシルを含む。アルキル、アルケニルおよびアルキニル基は、特に断りのない限り、同一であっても異なってもよいアルキル基置換基をはじめとする1以上の基で必要に応じて置換することができる。

10

【0070】

本明細書において「低級アルキル」、「低級アルケニル」および「低級アルキニル」とは、約6個未満の炭素を含む炭素鎖を指す。

【0071】

本明細書において「アルケ（キ）ニル」とは、少なくとも1つの二重結合と少なくとも1つの三重結合を含むアルキル基を指す。

20

【0072】

本明細書において「アルキル基置換基」としては、限定されるものではないが、ハロ、ハロ低級アルキルを含むハロアルキル、アリール、ヒドロキシ、アルコキシ、アリールオキシ、アルキルオキシ、アルキルチオ、アリールチオ、アラルキルオキシ、アラルキルチオ、カルボキシアルコキシカルボニル、オキソおよびシクロアルキルが挙げられる。

【0073】

本明細書において「アリール」とは、5～20個の炭素原子を含む芳香族基を指し、単環、多環または縮合環系であってもよい。アリール基としては、限定されるものではないが、フェニル、ナフチル、ビフェニル、フルオレニルおよび非置換であってもよく、また1以上の置換基で置換されていてもよい他の基を挙げることができる。

30

【0074】

本明細書において「アリール」とはまた、限定されるものではないが、アリールオキシ、アリールチオ、アリールカルボニルおよびアリールアミノ基をはじめとするアリールを含有している基を指す。

【0075】

本明細書において「アリール基置換基」としては、限定されるものではないが、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、アリール、1～3を含む1以上のハロ、ハロアルキルおよびアルキルから選択される置換基で必要に応じて置換されたヘテロアリール、アラルキル、ヘテロアラルキル、1～2個の二重結合を含むアルケニル、1～2個の三重結合を含むアルキニル、アルケ（キ）ニル基、ハロ、シュードハロ、シアノ、ヒドロキシ、ハロ低級アルキル、特にトリフルオロメチルを含むハロアルキルおよびポリハロアルキル、ホルミル、アルキルカルボニル、1～3を含む1以上の、ハロ、ハロアルキルおよびアルキルから選択される置換基で必要に応じて置換されたアリールカルボニル、ヘテロアリールカルボニル、カルボキシ、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、アミノカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アリールアミノカルボニル、ジアリールアミノカルボニル、アラルキルアミノカルボニル、アルコキシ、アリールオキシ、ペルフルオロアルコキシ、アルケニルオキシ、アルキニルオキシ、アリールアルコキシ、アミノアルキル、アルキルアミノ

40

50

アルキル、ジアルキルアミノアルキル、アリールアミノアルキル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、アルキルアリールアミノ、アルキルカルボニルアミノ、アリールカルボニルアミノ、アジド、ニトロ、メルカプト、アルキルチオ、アリールチオ、ペルフルオロアルキルチオ、チオシアノ、イソチオシアノ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、アリールスルフィニル、アリールスルホニル、アミノスルホニル、アルキルアミノスルホニル、ジアルキルアミノスルホニルおよびアリールアミノスルホニルが挙げられる。

【 0 0 7 6 】

本明細書において「アラルキル」とは、アルキルの水素原子のうちの 1 個がアリール基で置換されているアルキル基を指す。

【 0 0 7 7 】

本明細書において「ヘテロアラルキル」とは、アルキルの水素原子のうちの 1 個がヘテロアリール基で置換されているアルキル基を指す。

【 0 0 7 8 】

本明細書において「シクロアルキル」とは、飽和単環または多環式環系を指し、1つの実施形態では、3～10個の炭素原子、または3～6個の炭素原子からなり、シクロアルケニルおよびシクロアルキニルとは、それぞれ少なくとも1つの二重結合および少なくとも1つの三重結合を含む単環または多環式環系を指す。シクロアルケニルおよびシクロアルキニル基は、1つの実施形態では、3～10個の炭素原子を含み、シクロアルケニル基は、他の実施形態で4～7個の炭素原子を含み、シクロアルキニル基は、他の実施形態で8～10個の炭素原子を含む場合もある。シクロアルキル、シクロアルケニルおよびシクロアルキニル基の環系は1つの環または縮合、架橋またはスピロ結合様式で結合されているもよい2以上の環からなっているもよく、また必要に応じて1以上のアルキル基置換基で置換されているもよい。「シクロアルケ(キ)ニル」とは、少なくとも1つの二重結合および少なくとも1つの三重結合を含むシクロアルキル基を指す。

【 0 0 7 9 】

本明細書において「ヘテロアリール」とは、単環または多環式環系を指し、1つの実施形態では、環系の1個以上の、または1～3個の原子が、炭素以外の元素、例えば、窒素、酸素および硫黄原子であるヘテロ原子である、約5～約15員からなる。ヘテロアリールは、必要に応じて、1～3個を含む1個以上のアリール基置換基で置換しているもよい。ヘテロアリール基は、必要に応じて、ベンゼン環に縮合させることもできる。例示的なヘテロアリール基としては、限定されるものではないが、ピロール、ポルフィリン、フラン、チオフェン、セレノフェン、ピラゾール、イミダゾール、トリアゾール、テトラゾール、オキサゾール、オキサジアゾール、チアゾール、チアジアゾール、インドール、カルバゾール、ベンゾフラン、ベンゾチオフェン、インダゾール、ベンズイミダゾール、ベンゾトリアゾール、ベンゾキサトリアゾール、ベンゾチアゾール、ベンゾセレノゾール、ベンゾチアジアゾール、ベンゾセレナジアゾール、プリン、ピリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、ピラジン、トリアジン、キノリン、アクリジン、イソキノリン、シノリン、フタラジン、キナゾリン、キノキサリン、フェナジン、フェナントロリン、イミダジニル、ピロリジニル、ピリミジニル、テトラゾリル、チエニル、ピリジル、ピロリル、N-メチルピロリル、キノリニルおよびイソキノリニルが挙げられる。

【 0 0 8 0 】

本明細書において「ヘテロアリール」とはまた、限定されるものではないが、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールチオ、ヘテロアリールカルボニルおよびヘテロアリールアミノをはじめとするヘテロアリールを含有している基をも指す。

【 0 0 8 1 】

本明細書において「複素環」とは、単環または多環式環系を指し、1つの実施形態では、1～3個を含む1個以上の環系の原子が、炭素以外の元素、例えば、窒素、酸素および硫黄原子であるヘテロ原子である、3～10員からなり、別の実施形態では、5～6員をはじめ、4～7員からなる。複素環は、必要に応じて、1個以上、または1～3個のアリ

10

20

30

40

50

ール基置換基で置換されていてもよい。特定の実施形態では、複素環基の置換基としては、ヒドロキシ、アミノ、1～4個の炭素原子を含有するアルコキシ、トリフルオロメチルなどのトリハロメチルをはじめとするハロ低級アルキル、およびハロゲンが挙げられる。本明細書において複素環とは、ヘテロアリールについての言及も含み得る。

【0082】

本明細書においてアルキル、アルコキシ、カルボニルなどの名称は、当業者に一般に理解されるように用いられる。例えば、本明細書においてアルキルとは、直鎖もしくは分枝鎖であり得るか、または環状部分を含むかもしくは環状であり得る1個以上の炭素を含む飽和炭素鎖を指す。

【0083】

任意の所定の置換基の数に特に断りのない限り（例えば、「ハロアルキル」）、1個以上の置換基が存在し得る。例えば、「ハロアルキル」は1個以上の同一または異なるハロゲンを含み得る。別の例として、「C1-3アルコキシフェニル」とは、1、2または3個の炭素を含有する、1個以上の同一または異なるアルコキシ基を含み得る。

【0084】

カルボキシのような名づけられた置換基またはWなどの記号によって表される置換基が別個に括弧内に含まれており、さらに括弧の外側の数値を示す下付き文字を含まず、括弧内にはない置換基に続く場合、例えば、「C1-4アルキル(W)(カルボキシ)」では、「W」および「カルボキシ」は各々はC1-4アルキルに直接連結されている。

【0085】

本明細書において「ハロゲン」または「ハライド」とは、F、Cl、BrまたはIを指す。

【0086】

本明細書においてシュードハライドとは、ハライドと実質的に同様に挙動する化合物である。そのような化合物はハライド(XがClまたはBrなどのハロゲンであるX-)と同様に用いることができ、そして同様に処理することができる。シュードハライドとしては、限定されるものではないが、シアニド、シアネート、イソシアネート、チオシアネート、イソチオシアネート、セレノシアネート、トリフルオロメトキシおよびアジドが挙げられる。

【0087】

本明細書において「ハロアルキル」とは、1個以上の水素原子が、ハロゲンと置換されている低級アルキルラジカルを指す。

【0088】

本明細書において「ハロアルコキシ」とは、Rがハロアルキル基であるRO-を指す。

【0089】

本明細書において「スルフィニル」または「チオニル」とは、-S(O)-を指す。本明細書において「スルホニル」または「スルフルル」とは、-S(O)<sub>2</sub>-を指す。本明細書において「スルホ」とは、-S(O)<sub>2</sub>O-を指す。

【0090】

本明細書において「カルボキシ」とは、二価のラジカル、-C(O)O-を指す。

【0091】

本明細書において「アミノカルボニル」とは、-C(O)NH<sub>2</sub>-を指す。

【0092】

本明細書において「アルキルアミノカルボニル」とは、Rが水素または低級アルキルをはじめとするアルキルである-C(O)NHRを指す。

【0093】

本明細書において「ジアルキルアミノカルボニル」とは、本明細書においてR'およびRが水素または低級アルキルをはじめとするアルキルから独立に選択される-C(O)NR'Rを指す。

【0094】

10

20

30

40

50

本明細書において「カルボキサミド」とは、次式 -  $\text{NR}'\text{COR}$  の基を指す。

【0095】

本明細書において「ジアリールアミノカルボニル」とは、R および R' がフェニルなどの低級アリールをはじめとするアリールから独立に選択される -  $\text{C}(\text{O})\text{NRR}'$  を指す。

【0096】

本明細書において「アラルキルアミノカルボニル」とは、R および R' のうちの一方がフェニルなどの低級アリールをはじめとするアリールであり、かつ、R および R' のうちのもう一方が低級アルキルをはじめとするアルキルである -  $\text{C}(\text{O})\text{NRR}'$  を指す。

【0097】

本明細書において「アリールアミノカルボニル」とは、R がフェニルなどの低級アリールをはじめとするアリールである -  $\text{C}(\text{O})\text{NHR}$  を指す。

【0098】

本明細書において「アルコキシカルボニル」とは、R が低級アルキルをはじめとするアルキルである -  $\text{C}(\text{O})\text{OR}$  を指す。

【0099】

本明細書において「アリールオキシカルボニル」とは、R がフェニルなどの低級アリールをはじめとするアリールである -  $\text{C}(\text{O})\text{OR}$  を指す。

【0100】

本明細書において「アルコキシ」および「アルキルチオ」とは、R が低級アルキルをはじめとするアルキルである  $\text{RO}-$  および  $\text{RS}-$  を指す。

【0101】

本明細書において「アリールオキシ」および「アリールチオ」とは、R がフェニルなどの低級アリールをはじめとするアリールである  $\text{RO}-$  および  $\text{RS}-$  を指す。

【0102】

本明細書において「アルキレン」とは、直鎖、分枝鎖または環を指し、1つの実施形態では、直鎖または分枝鎖の、二価の脂肪族炭化水素基を指し、特定の実施形態では1から約20個の炭素原子を含み、他の実施形態では、低級アルキレンをはじめとする1~12個の炭素を含む。アルキレン基は、必要に応じて1個以上の「アルキル基置換基」で置換されていてもよい。アルキレン基には、必要に応じて1個以上の酸素、硫黄または置換もしくは非置換窒素原子が挿入されていてもよく、ここで、窒素置換基は先に記載されたようなアルキルである。例示的なアルキレン基としては、メチレン ( $\text{CH}_2$ )、エチレン ( $\text{CH}_2\text{CH}_2$ )、プロピレン ( $-(\text{CH}_2)_3-$ )、シクロヘキシレン ( $\text{C}_6\text{H}_{10}$ )、メチレンジオキシ ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ) およびエチレンジオキシ ( $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}$ ) が挙げられる。「低級アルキレン」とは、1~6個の炭素を含むアルキレン基を指す。特定の実施形態では、アルキレン基は1~3個の炭素原子のアルキレンをはじめとする低級アルキレンである。

【0103】

本明細書において「アルケニレン」とは、直鎖、分枝鎖または環を指し、1つの実施形態では、直鎖または分枝鎖の、脂肪族炭化水素基を指し、特定の実施形態では2から約20個の炭素原子と少なくとも1つの二重結合を含み、他の実施形態では、低級アルケニレンをはじめとする1~12個の炭素を含む。アルケニレン基は、必要に応じて1個以上の「アルキル基置換基」で置換されていてもよい。アルケニレン基には、必要に応じて、1個以上の酸素、硫黄または置換もしくは非置換窒素原子が挿入されていてもよく、ここで、窒素置換基は先に記載されたようなアルキルである。例示的なアルケニレン基としては、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$  および  $\text{CH}=\text{CHCH}_2$  が挙げられる。「低級アルケニレン」とは、2~6個の炭素を含むアルケニレン基を指す。特定の実施形態では、アルケニレン基は3~4個の炭素原子のアルケニレンをはじめとする低級アルケニレンである。

【0104】

本明細書において「アルキニレン」とは、直鎖、分枝鎖または環を指し、1つの実施形

10

20

30

40

50

態では、直鎖または分枝鎖の、二価の脂肪族炭化水素基を指し、特定の実施形態では、2から約20個の炭素原子と少なくとも1つの三重結合を含み、他の実施形態では、低級アルキニレンをはじめとする1~12個の炭素を含む。アルキニレン基は、必要に応じて1個以上の「アルキル基置換基」で置換されていてもよい。アルキニレン基には、必要に応じて1個以上の酸素、硫黄または置換もしくは非置換窒素原子が挿入されていてもよく、ここで、窒素置換基は先に記載されたようなアルキルである。例示的なアルキニレン基としては、 $-C \equiv C-C \equiv C-$ 、 $C \equiv C$  および  $C \equiv CCH_2$  が挙げられる。「低級アルキニレン」とは、2~6個の炭素を含むアルキニレン基を指す。特定の実施形態では、アルキニレン基は3~4個の炭素原子のアルキニレンをはじめとする低級アルキニレンである。

【0105】

10

本明細書において「アルケ(キ)ニレン」とは、直鎖、分枝鎖または環を指し、1つの実施形態では、直鎖または分枝鎖の、二価の脂肪族炭化水素基を指し、特定の実施形態では、2から約20個の炭素原子と少なくとも1つの三重結合と少なくとも1つの二重結合を含み、他の実施形態では、低級アルケ(キ)ニレンをはじめとする1~12個の炭素原子を含む。アルケ(キ)ニレン基は、必要に応じて1個以上の「アルキル基置換基」で置換されていてもよい。アルキニレン基には、必要に応じて、1個以上の酸素、硫黄または置換もしくは非置換窒素原子が挿入されていてもよく、ここで、窒素置換基は先に記載されたようなアルキルである。例示的なアルケ(キ)ニレン基としては、 $-C=C-(CH_2)_n C \equiv C-$  (ここで、 $n$ は1または2である) が挙げられる。「低級アルケ(キ)ニレン」とは、最大6個の炭素を含むアルケ(キ)ニレン基を指す。特定の実施形態では、アルケ(キ)ニレン基は4個の炭素原子のアルケ(キ)ニレンをはじめとする低級アルケ(キ)ニレンである。

【0106】

20

本明細書において「アリーレン」とは、単環式または多環式を指し、1つの実施形態では、単環式の、二価の芳香族基を指し、特定の実施形態では、5から約20個の炭素原子と少なくとも1つの芳香族環を含み、他の実施形態では、低級アリーレンを含む5~20個の炭素を含む。アリーレン基は、必要に応じて1個以上の「アルキル基置換基」で置換されていてもよい。アリーレン基の周囲には、必要に応じて、1個以上の酸素、硫黄または置換もしくは非置換窒素原子が挿入されていてもよく、ここで、窒素置換基は先に記載されたようなアルキルである。例示的なアリーレン基としては、1,2-、1,3- および 1,4-フェニレンが挙げられる。「低級アリーレン」とは、5または6個の炭素を含むアリーレン基を指す。特定の実施形態では、アリーレン基は低級アリーレンである。

【0107】

30

本明細書において「ヘテロアリーレン」とは、二価の単環式または多環式環系を指し、1つの実施形態では、環系の1個以上または1~3個の原子が、炭素以外の元素、例えば、窒素、酸素および硫黄原子であるヘテロ原子である、約5~約15員からなる。ヘテロアリーレン基は、必要に応じて、1個以上、または1~3個のアリール基置換基で置換されていてもよい。

【0108】

本明細書において「アルキリデン」とは、二重結合の形成により別の基の1つの原子に連結されている、 $=CR'R''$  などの二価の基を指す。例示的なアルキリデン基には、メチリデン( $=CH_2$ ) およびエチリデン( $=CHCH_3$ )がある。本明細書において「アラルキリデン」とは、 $R'$  または  $R''$  のいずれかがアリール基であるアルキリデン基を指す。

40

【0109】

本明細書において「アミド」とは、二価の基  $C(O)NH$  を指す。「チオアミド」とは、二価の基  $C(S)NH$  を指す。「オキシアミド」とは、二価の基  $OC(O)NH$  を指す。「チアアミド」とは、二価の基  $SC(O)NH$  を指す。「ジチアアミド」とは、二価の基  $SC(S)NH$  を指す。「ウレイド」とは、二価の基  $HNC(O)NH$  を指す。「チオウレイド」とは、二価の基  $HNC(S)NH$  を指す。

50

## 【0110】

本明細書において「セミカルバジド」とは、 $\text{NHC}(\text{O})\text{NHNH}$ を指す。「カルバゼート」とは、二価の基 $\text{OC}(\text{O})\text{NHNH}$ を指す。「イソチオカルバゼート」とは、二価の基 $\text{SC}(\text{O})\text{NHNH}$ を指す。「チオカルバゼート」とは、二価の基 $\text{OC}(\text{S})\text{NHNH}$ を指す。「スルホニルヒドラジド」とは、基 $\text{SO}_2\text{NHNH}$ を指す。「ヒドラジド」とは、二価の基 $\text{C}(\text{O})\text{NHNH}$ を指す。「アゾ」とは、二価の基 $\text{N}=\text{N}$ を指す。「ヒドラジニル」とは、二価の基 $\text{NHNH}$ を指す。

## 【0111】

本明細書において、フェニルまたはピリジルなどのいずれかの特定の基が明記されている場合には、これは、その基が非置換であるか、または置換されているということを意味する。置換基としては、特に断りのない限り、ハロ、ハロ低級アルキル、および低級アルキルがある。

10

## 【0112】

本明細書において、高次構造が変更されているタンパク質病（またはタンパク質凝集の疾病）とは、疾病に関連しているコンホメーションを有するタンパク質またはポリペプチドが関係している疾病を指す。本明細書に提供される方法および収集物により、検出される疾病と関連している配座異性体の検出が可能となる。2以上の異なるコンホメーションを示し、そのうちの少なくとも1つのコンホメーションが高次構造が変更されたタンパク質である、タンパク質が関係している疾病としては、限定されるものではないが、アミロイド病、および当業者に公知であり、以下に示す他の神経変性疾患が挙げられる。

20

## 【0113】

B. 捕獲化合物の収集物

## 【0114】

以下により詳細に記載するように、本明細書で提供する化合物は多機能的な合成小分子であり、それは、特有の表面特徴に基づき、タンパク質を選択し、共有結合（「捕獲」）し、単離し得る。該化合物の溶解性は化学合成過程で修飾され得、それにより、水溶解性（サイトソルの）または不溶性（膜）タンパク質混合物が分析され得る。その化合物は3つの重要な官能基を用いる：（1）反応性官能基；（2）選択性官能基；および（3）選別官能基。

## 【0115】

30

図5に示すように、選択性官能基は、例えば、酵素の活性部位または受容体のリガンド結合部位において（例えば、非標的固定のための「バイアスのかかったアプローチ」）、または結合部位の外側の表面親和性モチーフ（SAM）において（例えば、標的発見のための「バイアスのかからないアプローチ」）、タンパク質との非共有結合的相互作用を介し相互作用する。バイアスのかかった選択性基は、複合混合物から特定タンパク質の単離を可能とする。1つの実施態様では、選択性官能基は副作用を生ずることが知られる薬物（またはその代謝物）であり、それは、タンパク質に接近可能な分子の種々の部分を形成するべく幾つかの異なる方向で結合している。バイアスのかかっていない選択性官能基は、タンパク質表面との親和性相互作用を基礎とする化学的特徴を用いる。バイアスのかかっていない選択性官能基はバイアスのかかっているものよりも特異性が低い傾向があり、それは、タンパク質のより広範のセットと相互作用するように設計されているためである。バイアスのかかっていない捕獲化合物を使用し、正常細胞と病的細胞との間の全体的タンパク質プロファイルの相違についてスクリーニングするには、プロテオーム中のタンパク質の大部分とセットとして相互作用する捕獲化合物のライブラリーの開発が必要となる。このアプローチは、薬物分子の影響により生ずるタンパク質プロファイルの相違のモニタリング、または健康細胞および疾患細胞との間のその相違に基づく新規の可能性ある薬物の標的または生体マーカーを発見することを可能とする。

40

## 【0116】

1つの実施態様では、反応性官能基は、選択されたタンパク質を共有結合的に「捕獲する」かまたはそれと結合する。選択性官能基は、エサとしての役割をし、その一方、反応

50

性官能基は釣針としての役割をする。このように捕獲されたタンパク質は、下流の精製および分析工程で残ることができるであろう。用いる反応性官能基は、特定のタンパク質鎖と化学的に反応（例えば、NHS はリジンアミノ官能基との結合を形成する）するか、または共有結合の形成（例えば、ナイトレン（nitrene）ラジカルを形成するアジドのような光活性化部分）前に活性化ステップ（すなわち、光）を必要とする。

#### 【0117】

他の実施態様では、選別（取り出す（pull-out））作用物は、固体支持体（例えば、磁性ビーズ、DNAチップ）を用い、複雑な細胞性環境から特定のタンパク質を単離し、その後、構造的および機能的特性解析を可能とする。

#### 【0118】

他の実施態様では、分析工程（図7）は簡単であり、自動化に非常に適用しやすい。第一に、目的の細胞由来のタンパク質混合物を、タンパク質の天然構造の特徴を保持する緩衝液条件で捕獲化合物と共にインキュベートする。選択性官能基は可逆的に相互作用し、親和性を有するタンパク質と平衡となる。次いで、反応性官能基は、親和性のあるタンパク質に化合物を可逆的に結合する共有結合を形成する。我々のデータは、タンパク質と捕獲化合物との間の親和性が高くなればなるほど、共有結合的に捕獲した割合が高くなることを示している。次に、共有結合的に捕獲したタンパク質は、固体支持体上で単離し、捕獲されていない細胞性成分およびタンパク質を洗い流した。選択された選別官能基がビオチンならば、アビジンまたはストレプトアビジンビーズを固体支持体として使用する。質量分析（MS）を用い、捕獲したタンパク質を検出する。

#### 【0119】

特定の実施態様では、そのスピードおよび精度（0.01% - 0.10%で測定される $M_r$ ）、分離能（非常に小さな構造変化により質量シフトが生ずる）および複合化能（多くのタンパク質が同時にスキャンされる）により、MSはタンパク質同定に使用する。この最初の質量スペクトルは、捕獲したすべてのタンパク質の分子量を提供する。それぞれの同一性は、通常の方法により決定し得る（例えば、消化および分析またはペプチドフラグメントおよびゲノム/プロテオームデータベースサーチ）。捕獲化合物の使用により、研究者は、更なる分析が可能となり、タンパク質の特性解析が可能となる。それは、他のすべてのものから物理的に単離されているためである（例えば、質量スペクトル同定、またはビーズから取り除いた後のx-線結晶）。そうするために、タンパク質は、固体支持体（例えば、アビジン/ストレプトアビジンビーズを用いるならば、ビオチンによるビーズの処理により捕獲したタンパク質が置換される）から洗浄されるか、または組み込まれた光切断可能なリンカー、または酵素学的もしくは化学的に切断可能なリンカーを使用し、それにより、固体支持体から捕獲した精製タンパク質を放出する。

#### 【0120】

本収集物は、翻訳後修飾されたタンパク質を含むプロテオームおよび他の生体分子の分析のためのトップダウン全体論的アプローチを可能にする。核酸およびゲノム（ボトムアップ）ではなく、タンパク質および他の生体分子パターンがこれらの収集物を用いる分析の出発点である。本収集物を用いて、生物学的サンプルなどのサンプルの生体分子構成要素を評価すること、病状などの特定の表現型に特異的な構成要素を同定すること、構造的機能、生化学経路および作用機構を同定することができる。有用な本収集物および方法により、生体分子の不偏的分析が可能となる。本収集物は、生体分子の複合混合物（すなわち、50、100、500、1000、2000種以上の混合物）の構成要素が、減少した数、通常、複雑性が10%、50%、またはそれ以上減少した別個の位置に、またはアレイ中の位置当たり約1~50種の異なる生体分子に選別されるのを可能にし、その結果、各スポットの構成要素を質量スペクトル分析だけで、または他の分析と組み合わせ分析することができる。表現型分析の場合などの一部の実施形態においては、細胞などの出発サンプルの均一性が重要である。均一性を提供するためには、病変対健常などの、同一個体由来の種々の表現型の細胞を比較する。これを実施する方法を本明細書中で提供する。

#### 【0121】

収集物中の化合物の構造によって、収集物を使用して、タンパク質の翻訳後プロセシングに由来する変化などの構造変化を検出することが可能であり、また収集物を使用して、シグナル伝達、イオンチャンネル、リガンド相互作用の受容体および細胞間相互作用などのほとんどの基礎的なプロセスに参与している膜タンパク質の変化を検出することもできる。細胞が罹患すると、変形などの疾病に伴う変化が、多くの場合は膜タンパク質に生じる。

#### 【0122】

収集物はメンバー捕獲化合物のセットを含む。一般に、各セットのメンバーは少なくとも1つ、通常、2つまたは3つの官能基が他のセットのメンバーと異なっている。したがって、例えば、化合物が反応性官能基、選択性官能基および選別官能基を含む場合には、各セットは少なくとも選別官能基が、典型的には、少なくとも選別官能基と選択性官能基が、通常、3種すべての官能基が異なる。選択された環境におけるアッセイを可能にするよう選択される、溶解性官能基が存在する場合には、それは化合物間で異なってもよいし、またはすべてのセットの間で同一であってもよい。

#### 【0123】

本方法を実施する際は、収集物をサンプルまたは部分精製もしくは精製したその構成要素と接触させて、生体分子と収集物中の捕獲化合物とを結合させる。捕獲化合物は、接触させる前に固体支持体に結合させたもののようなアドレス可能なアレイ中であってもよいし、またはサンプルと接触させた後に整列させることもできる。得られるアレイを、必要に応じてプロテアーゼなどの、結合しているポリマーを特異的に切断する試薬で処理し、そして分析、特に質量スペクトル分析に付して、各位置に結合した生体分子の構成要素を同定する。ひと度、目的のタンパク質またはその一部などの生体分子の分子量を決定すれば、生体分子を同定することができる。同定方法としては、データベース、例えば、プロテアーゼ断片およびその分子量を含むタンパク質データベースとの分子量の比較が挙げられる。

#### 【0124】

捕獲化合物は、必要な分離および分析の特異性（分析される混合物の複雑性によって異なる）にしたがって、反応性、選択性および分離性を付与する官能基を含む。一般に、本明細書に提供される化合物は、生物ポリマーと共有結合によって結合する反応性官能基；非共有相互作用によって反応性官能基の特異性を高める選択性官能基；化合物が捕獲化合物の構造にしたがってアドレス指定される（整列させられるかもしくは別の方法で分離される）ことを可能にする選別官能基；および反応が実施される環境によって化合物の溶解性を変更するよう選択する際、条件が生理学的条件をシミュレートするのを可能にする溶解性官能基から選択される官能基（官能基）を含む。一般に、共有結合によってタンパク質またはその一部などと特異的に相互作用する反応基である反応性官能基と、他の官能基である選択性官能基は、反応性官能基の特異性を高めるように変更する。一般に、反応性官能基は共有結合によって特定の生体分子上の基、例えば、タンパク質表面のアミン基と相互作用する。反応性官能基は生体分子と相互作用して、共有結合を形成する。分析条件としては、限定されるものではないが、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 - 飛行時間型（MALDI-TOF）質量分析計などの質量分光光度計による分析が挙げられる。選択性官能基は非共有相互作用によって反応性官能基と相互作用することができる種類の生体分子に影響を及ぼす。選択性官能基は特定の基の特異性を変化させ、一般的には、反応性官能基が反応する基の数を減少させる。1つの目標は1つの位置に結合されるタンパク質または生体分子数を減少させることであり、その結果、タンパク質が質量分析などによって分離され得る。

#### 【0125】

本明細書に提供される捕獲化合物の中には、少なくとも2つのセット：一方は水溶液中での反应用のもの（例えば、親水性生体分子との反応のためのもの）および他方は有機溶媒（例えば、クロロホルム）中での反応のためのもの（例えば、疎水性生体分子との反応のためのもの）に分類することができる。したがって、特定の実施形態では、本明細書に



提供される化合物は、親水性および疎水性タンパク質を識別し、両クラスのタンパク質の分析が可能となる。

【0126】

C. 捕獲化合物

捕獲化合物（捕獲剤とも呼ぶ）を提供する。捕獲化合物は1以上の反応性官能基「X」と、必要に応じて少なくとも選択性官能基「Y」および/または選別官能基「Q」および/または、必要に応じて1以上の溶解性官能基「W」を提示するコア「Z」を含む。分子には、さらに、切断可能なリンカーおよび他の官能基も含まれる。官能基がコアまたは足場上に提示される特定の様式が設計選択の重大事であるが、得られる分子が生体分子、特にタンパク質を十分な特異性で、かつ、共有結合が十分な安定性もしくは親和性の結合のいずれかで捕獲し、MALDI質量スペクトル分析をはじめとする質量分析計などによる分析を可能にし、その結果、結合した生体分子の少なくとも一部が結合したままにする（一般に、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、リットル/モル以上の結合親和性、または $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 以上の $K_{eq}$ ）という特性を有するよう選択される。

10

【0127】

反応性官能基Xは、共有結合を形成する任意のものであるように選択する。選択性官能基Yは、反応性結合部位の周囲のタンパク質のトポロジーを「捉えて」反応性官能基が相互作用する基の環境を選択する。

【0128】

Qは整列させることなどによって、捕獲化合物の各セットを他のものから分離するための手段を提供すればどのようなものであってもよい選別官能基であり、これにはビオチン、一般的には、整列させられている表面のアビジンと結合するスパーサー（またはその逆）、オリゴヌクレオチドアレイと結合するためのオリゴヌクレオチドなどの基が挙げられ、MALDI-MS分析などの質量スペクトル分析に耐えられる十分な親和性で結合する同族結合パートナーを有する任意の分子を選択すればよい。いずれの収集物についても、種々の異なる選別基を使用することができ、捕獲化合物の各セットは他のセットと比べて独特のQを有するべきである。さらに、RFタグ、蛍光タグ、カラーコードタグまたはビーズ、バーコードまたは他のシンボロジー標識されたタグなどの標識、および他のそのような標識によって選別することができる標識手段を用いることもできる。例えば、捕獲化合物またはX、Y、Z、W官能基は、RFタグまたは着色タグと連結されて表面上に存在することもできる。これらは反応後に容易に選別でき、その結果、各セットを個別に分析して結合した生体分子を同定することができる。したがって、収集物は種々の選別基を有している捕獲化合物を含むことができる。

20

30

【0129】

溶解性官能基、Wは収集物の捕獲化合物構成要素の特性の変更を可能にする。例えば、Wを捕獲化合物が特定の反応媒体もしくは疎水性環境などの環境において可溶性であるか、またはそうでないよう選択し、それによって膜構成要素との反応を可能にすることができる。収集物は捕獲化合物セットを含み、そのセットの各々はQが異なり、XおよびYの少なくとも一方もしくは両方が異なっている。

【0130】

選別官能基は選択的に切断されてその除去が可能となり得る。

40

【0131】

それぞれの官能性についてのさらに詳細な説明および議論、ならびに限定するものではない例示的な実施形態を以下に続ける。

【0132】

1. Z、コア

一般に、すべての化合物は、炭素などの1個の原子であっても、官能基を提示するための官能基を含む。本明細書における特定の実施形態では、本明細書に提供される方法に用いる捕獲化合物に関しては、Zは、限定されるものではないがタンパク質をはじめとする生体分子の化学構造を変更することなく、生体分子の質量スペクトル分析をはじめとする

50

分析の前またはその間に切断することができる部分である。

【0133】

Zは3つの官能基を含有する三官能性部分であり、これらの各官能基は他の2つの官能基の存在下で選択的に各々誘導され得る。非限定的なその三官能基部分の例には、側鎖に官能基を有するアミノ酸（例えば、チロシン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、トレオニン、セリンなど）が含まれる。そのアミノ酸には、天然および非天然のアミノ酸が含まれる。

【0134】

例えば、一部の実施形態においては、本明細書に提供される方法は、アドレス可能な形式で提示されているタンパク質の質量スペクトル分析のステップを含む。特定の実施形態では、次いで、化合物を、捕獲化合物のオリゴヌクレオチド部分またはオリゴヌクレオチド類似体部分（Q、選別官能基）と相補的である一本鎖部分（または一本鎖となり得る部分）を含む一本鎖オリゴヌクレオチドのアレイと結合させる。これらの実施形態では、Zは（i）本明細書に提供される化合物との、生体分子、例えば、タンパク質との反応に必要な反応条件に対して安定であり、（ii）Q部分との一本鎖オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに必要な条件に対して安定であり、かつ、（iii）生体分子の分析の前またはその間に切断可能である基であるように選択することができる。

10

【0135】

別の実施形態では、官能基が連結されているZは、Q、X、Wおよび/またはYとともに細胞膜の脂質二重層に溶解させて、XおよびY官能基によって細胞膜タンパク質の内部と接触するように設計することができる。この実施形態では、支持体が、細胞膜内のタンパク質をはじめとする膜タンパク質およびオルガネラタンパク質などのタンパク質を捕獲する。捕獲化合物および官能基は、得られる捕獲化合物が選択された生理学的条件下で機能するように選択することができる。したがって、Z、Q、X、Wおよび/またはYを選択することによって、細胞膜および他の生物学的膜を模倣する表面および支持体の設計が可能となる。

20

【0136】

一部の実施形態においては、膜タンパク質の構造を維持する1つの方法として、支持体の表面にリボソームおよび他のミセルの形成に使用される脂質二重層が与えられ、これによって表面上に脂質二重層が作成される。これは支持体が「Z」官能基であり、他の官能基がそれに連結されている場合に、または化合物がQ基を介して、例えば、二本鎖オリゴヌクレオチドによって支持体に連結されている場合に用いることができる。得られる固定化された捕獲化合物は脂質被膜でコーティングしてもよいしその中に溶解させてもよい。結果として、本明細書に提供される化合物および収集物を、人工膜とすることができ、多孔性支持体上で自己組織化して極薄有機膜を形成することがる両親媒性デンドリマーまたは多分岐ブロック共重合体の合成による、一定の空隙寸法および膜厚を有する膜の制御合成のためには、デンドリマーポリマー化学を用いてもよい。1つの実施形態では、有機膜は直鎖状ポリエチレンオキシド（PEO）ブロックの一方の末端と結合しているポリアミドアミン（PAMAM）デンドリマーからなる直鎖状樹状ジブロック共重合体からなる。

30

【0137】

Zは質量スペクトル分析の条件下で切断できる

そのような1つの実施形態では、ZはMALDI-TOF質量分析計に用いられるレーザーによって切断される光切断が可能な基である。別の実施形態では、Zはハイブリダイズされるなどによって整列させられた化合物-生体分子結合体への質量スペクトル分析のためのマトリックスの適用の際に、または分析の前に蒸気または液体の形態の酸（例えば、トリフルオロ酢酸または塩酸）に曝露することによって切断される酸不安定性基である。この実施形態では、マトリックスがアレイの空間的完全性を維持し、このことによってアレイのアドレス可能な分析が可能となる。

40

【0138】

Zは質量スペクトル分析の条件下で切断できない

50

特定の実施形態では、本明細書で提供する方法に用いる捕獲化合物は生体分子の、限定されるものではないが、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 - 飛行時間型 (MALDI-TOF) 質量スペクトルなどの質量分析計をはじめとする分析に用いられる条件下で切断されない Z 部分を含む。これらの実施形態の捕獲化合物は、例えば、その混合物中の生体分子を同定するための、タンパク質 - タンパク質をはじめとする生体分子 - 生体分子相互作用を調べるための、およびタンパク質 - 薬剤またはタンパク質 - 薬剤候補をはじめとする生体分子 - 小分子相互作用を決定するための本明細書で提供する方法に用いることができる。これらの実施形態では、Z 基は分析のために必ずしも切断されるわけではない。

#### 【0139】

したがって、上記のように、Z は実質的には結合 (選択性および反応性官能基) および溶解性官能基および選別官能基を提示するコアとなるどのような部分であってもよい。

#### 【0140】

a. 多価または二価の Z 部分

1 つの実施形態では、Z は、切断できるか切断できない多価または二価の基であり、一般に、50 以下の、または 20 未満のメンバーを含み、直鎖または分枝鎖アルキレン、直鎖または分枝鎖アルケニレン、直鎖または分枝鎖アルキニレン、直鎖または分枝鎖アルキレンオキシ、直鎖または分枝鎖アルキレンチオ、直鎖または分枝鎖アルキレンカルボニル、直鎖または分枝鎖アルキレンアミノ、シクロアルキレン、シクロアルケニレン、シクロアルキニレン、シクロアルキレンオキシ、シクロアルキレンチオ、シクロアルキレンカルボニル、シクロアルキレンアミノ、ヘテロシクリレン、アリーレン、アリーレンオキシ、アリーレンチオ、アリーレンカルボニル、アリーレンアミノ、ヘテロアリーレン、ヘテロアリーレンオキシ、ヘテロアリーレンチオ、ヘテロアリーレンカルボニル、ヘテロアリーレンアミノ、オキシ、チオ、カルボニル、カルボニルオキシ、エステル、アミノ、アミド、ホスフィノ、ホスフィンオキシド、ホスホルアミダート、ホスフィンアミダート、スルホンアミド、スルホニル、スルホキシド、カルバマート、ウレイドおよびこれらの組み合わせから選択され、必要に応じて、1、2、3 または 4 個を含む 1 個以上の、本明細書の別の場所に記載した Y から選択される置換基で各々独立に置換されていてもよい。

#### 【0141】

他の実施形態では、Z は直鎖または分枝鎖アルキル、直鎖または分枝鎖アルケニル、直鎖または分枝鎖アルキニル、 $(C(R^{15})_2)_d$ 、O、S、 $(CH_2)_d$ 、 $(CH_2)_dO$ 、 $(CH_2)_dS$ 、 $>N(R^{15})$ 、 $(S(O)_u)$ 、 $(S(O)_2)_w$ 、 $>C(O)$ 、 $(C(O))_w$ 、 $(C(S(O)_u))_w$ 、 $(C(O)O)_w$ 、 $(C(R^{15})_2)_dO$ 、 $(C(R^{15})_2)_dS(O)_u$ 、 $O(C(R^{15})_2)_d$ 、 $S(O)_u(C(R^{15})_2)_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_dO(C(R^{15})_2)_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_dS(O)_u(C(R^{15})_2)_d$ 、 $N(R^{15})(C(R^{15})_2)_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_dN(R^{15})$ 、 $(C(R^{15})_2)_dN(R^{15})(C(R^{15})_2)_d$ 、 $-(CH_2)_dC(O)N(CH_2)_d$ 、 $-(CH_2)_dC(O)N(CH_2)_dC(O)N(CH_2)_d$ 、 $-(S(R^{15})(O)_u)_w$ 、 $(C(R^{15})_2)_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_dO(C(R^{15})_2)_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_d(C(O)O)_w(C(R^{15})_2)_d$ 、 $(C(O)O)_w(C(R^{15})_2)_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_d(C(O)O)_w$ 、 $(C(S)(R^{15})_w)$ 、 $(C(O))_w(C(R^{15})_2)_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_d(C(O))_w$ 、 $(C(R^{15})_2)_d(C(O))_w$ 、 $N(R^{15})(C(R^{15})_2)_w$ 、 $OC(R^{15})_2C(O)$ 、 $O(R^{15})_2C(O)N(R^{15})$ 、 $(C(R^{15})_2)_wN(R^{15})(C(R^{15})_2)_w$ 、 $(C(R^{15})_2)_wN(R^{15})$ 、 $>P(O)_v(R^{15})_x$ 、 $>R(O)_u(R^{15})_3$ 、 $>P(O)_u(C(R^{15})_2)_d$ 、 $>S_i(R^{15})_2$ 、およびこれらの基のいずれかの組み合わせから選択される、多価または二価の切断可能であるか、または切断できない基であり、

式中、u、v および x は各々独立に 0 ~ 5 であり、

各 d は独立に 1 ~ 20 または 1 ~ 12 または 1 ~ 6 または 1 ~ 3 の整数であり、

10

20

30

40

50

各  $w$  は独立に 1 ~ 6 または 1 ~ 3 または 1 ~ 2 から選択される整数であり、そして

各  $R^{15}$  は独立に直鎖または分枝鎖アルキル、直鎖または分枝鎖アルケニル、直鎖または分枝鎖アルキニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、ヘテロシクリル、直鎖または分枝鎖ヘテロシクリルアルキル、直鎖または分枝鎖ヘテロシクリルアルケニル、直鎖または分枝鎖ヘテロシクリルアルキニル、アリール、直鎖または分枝鎖アリールアルキル、直鎖または分枝鎖アリールアルケニル、直鎖または分枝鎖アリールアルキニル、ヘテロアリール、直鎖または分枝鎖ヘテロアリールアルキル、直鎖または分枝鎖ヘテロアリールアルケニル、直鎖または分枝鎖ヘテロアリールアルキニル、ハロ、直鎖または分枝鎖ハロアルキル、シュードハロ、アジド、シアノ、ニトロ、 $OR^{60}$ 、 $NR^{60}$ 、 $R^{61}$ 、 $COOR^{60}$ 、 $C(O)R^{60}$ 、 $C(O)NR^{60}R^{61}$ 、 $S(O)_qR^{60}$ 、 $S(O)_qOR^{60}$ 、 $S(O)_qNR^{60}R^{61}$ 、 $NR^{60}C(O)R^{61}$ 、 $NR^{60}C(O)NR^{60}R^{61}$ 、 $NR^{60}S(O)_qR^{60}$ 、 $SiR^{60}R^{61}R^{62}$ 、 $P(R^{60})_2$ 、 $P(O)(R^{60})_2$ 、 $P(OR^{60})_2$ 、 $P(O)(OR^{60})_2$ 、 $P(O)(OR^{60})(R^{61})$  および  $P(O)NR^{60}R^{61}$  から選択される一価の基であり、 $q$  は 0 ~ 2 の整数であり、

$R^{60}$ 、 $R^{61}$ 、 $R^{62}$  は各々独立に水素、直鎖または分枝鎖アルキル、直鎖または分枝鎖アルケニル、直鎖または分枝鎖アルキニル、アリール、直鎖または分枝鎖アラルキル、直鎖または分枝鎖アラルケニル、直鎖または分枝鎖アラルキニル、ヘテロアリール、直鎖または分枝鎖ヘテロアラルキル、直鎖または分枝鎖ヘテロアラルケニル、直鎖または分枝鎖ヘテロアラルキニル、ヘテロシクリル、直鎖または分枝鎖ヘテロシクリルアルキル、直鎖または分枝鎖ヘテロシクリルアルケニルまたは直鎖または分枝鎖ヘテロシクリルアルキニルである。

#### 【0142】

他の実施形態では、 $Z$  は以下の基：アリーレン、ヘテロアリーレン、シクロアルキレン、 $>C(R^{15})_2$ 、 $C(R^{15})=C(R^{15})$ 、 $>C=C(R^{23})(R^{24})$ 、 $>C(R^{23})(R^{24})$ 、 $C-C$ 、 $O$ 、 $>S(A)_u$ 、 $>P(D)_v(R^{15})$ 、 $>P(D)_v(ER^{15})$ 、 $>N(R^{15})$ 、 $>N^+(R^{23})(R^{24})$ 、 $>Si(R^{15})_2$  または  $>C(E)$  のいずれかの組み合わせを含む切断可能であるか、または切断できない多価または二価の基であり（式中、 $u$  は 0、1 または 2 であり、 $v$  は 0、1、2 または 3 であり、 $A$  は  $O$  または  $NR^{15}$  であり、 $D$  は  $S$  または  $O$  であり、 $E$  は  $S$ 、 $O$  または  $NR^{15}$  である）、その群はどの順序で組み合わせてもよく、

各  $R^{15}$  は水素および  $VR^{18}$  からなる群から独立に選択される一価の基であり、

各  $V$  は独立に以下の群：直接結合、アリーレン、ヘテロアリーレン、シクロアルキレン、 $>C(R^{17})_2$ 、 $C(R^{17})=C(R^{17})$ 、 $>C=C(R^{23})(R^{24})$ 、 $>C(R^{23})(R^{24})$ 、 $C-C$ 、 $O$ 、 $>S(A)_u$ 、 $>P(D)_v(R^{17})$ 、 $>P(D)_v(ER^{17})$ 、 $>N(R^{17})$ 、 $>N(COR^{17})$ 、 $>N^+(R^{23})(R^{24})$ 、 $>Si(R^{17})_2$  および  $>C(E)$  のいずれかの組み合わせを有する二価の基であり（式中、 $u$  は 0、1 または 2 であり、 $v$  は 0、1、2 または 3 であり、 $A$  は  $O$  または  $NR^{17}$  であり、 $D$  は  $S$  または  $O$  であり、 $E$  は  $S$ 、 $O$  または  $NR^{17}$  である）、その群はどの順序で組み合わせてもよく、

$R^{17}$  および  $R^{18}$  は各々独立に水素、ハロ、シュードハロ、シアノ、アジド、ニトロ、 $SiR^{27}R^{28}R^{25}$ 、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロアルキル、ハロアルコキシ、アリール、アラルキル、アラルケニル、アラルキニル、ヘテロアリール、ヘテロアラルキル、ヘテロアラルケニル、ヘテロアラルキニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキニル、ヒドロキシ、アルコキシ、アリールオキシ、アラルコキシ、ヘテロアラルコキシおよび  $NR^{19}R^{20}$  からなる群から選択され、

$R^{19}$  および  $R^{20}$  は各々独立に水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアラルキルおよびヘテロシクリルから選択され、

$R^{23}$  および  $R^{24}$  は以下の (i) または (ii) から選択され、

(i)  $R^{23}$  および  $R^{24}$  は独立に水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリーールおよびヘテロアリーールからなる群から選択されるか、または

(ii)  $R^{23}$  および  $R^{24}$  はともにアルキレン、アルケニレンまたはシクロアルキレンを形成し、

$R^{25}$ 、 $R^{27}$  および  $R^{28}$  は各々独立に水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロアルキル、ハロアルコキシ、アリーール、アラルキル、アラルケニル、アラルキニル、ヘテロアリーール、ヘテロアラルキル、ヘテロアラルケニル、ヘテロアラルキニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキニル、ヒドロキシ、アルコキシ、アリーールオキシ、アラルコキシ、ヘテロアラルコキシおよび  $NR^{19}R^{20}$  から選択される一価の基であり、

$R^{15}$ 、 $R^{17}$ 、 $R^{18}$ 、 $R^{19}$ 、 $R^{20}$ 、 $R^{23}$ 、 $R^{24}$ 、 $R^{25}$ 、 $R^{27}$  および  $R^{28}$  は、 $Z^2$  から各々独立に選択される 1 以上の置換基で置換されていてもよく、 $Z^2$  はアルキル、アルケニル、アルキニル、アリーール、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヒドロキシ、 $S(O)_hR^{35}$  (ここで、 $h$  は 0、1 または 2 である)、 $NR^{35}R^{36}$ 、 $COOR^{35}$ 、 $COR^{35}$ 、 $CONR^{35}R^{36}$ 、 $OC(O)NR^{35}R^{36}$ 、 $N(R^{35})C(O)R^{36}$ 、アルコキシ、アリーールオキシ、ヘテロアリーール、ヘテロシクリル、ヘテロアリーールオキシ、ヘテロシクリルオキシ、アラルキル、アラルケニル、アラルキニル、ヘテロアラルキル、ヘテロアラルケニル、ヘテロアラルキニル、アラルコキシ、ヘテロアラルコキシ、アルコキシカルボニル、カルバモイル、チオカルバモイル、アルコキシカルボニル、カルボキシアリーール、ハロ、シュードハロ、ハロアルキルおよびカルボキサミドから選択され、

$R^{35}$  および  $R^{36}$  は各々独立に水素、ハロ、シュードハロ、シアノ、アジド、ニトロ、トリアルキルシリル、ジアルキルアリーールシリル、アルキルジアリールシリル、トリアリールシリル、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロアルキル、ハロアルコキシ、アリーール、アラルキル、アラルケニル、アラルキニル、ヘテロアリーール、ヘテロアラルキル、ヘテロアラルケニル、ヘテロアラルキニル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロシクリルアルケニル、ヘテロシクリルアルキニル、ヒドロキシ、アルコキシ、アリーールオキシ、アラルコキシ、ヘテロアラルコキシ、アミノ、アミド、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルアリーールアミノ、ジアリールアミノおよびアリーールアミノの中から選択される。

#### 【0143】

本明細書における特定の実施形態では、化合物は、 $Z$  が生体分子の、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 - 飛行時間型 (MALDI-TOF) 質量分析などの質量スペクトル分析の前またはその間に切断可能であるという条件で選択される。

#### 【0144】

特定の実施形態では、 $Z$  は本明細書に開示された二価部分から少なくとも 1 個の水素がないものから選択される少なくとも三価部分である。本明細書に提供された収集物中の捕獲化合物は種々の結合価を有するコア  $Z$  を含む。捕獲化合物の中には  $Z$  が少なくとも三価であるものもある。

#### 【0145】

(i) 切断可能な多価の  $Z$  部分

1 つの実施形態では、 $Z$  は切断可能な多価または二価部分であり、かつ、次式： $(S^1)_t M(R^{15})_a (S^2)_b L$  を有し、

式中、 $S^1$  および  $S^2$  はスペーサー部分であり、 $t$  および  $b$  は各々独立に 0 または 1 であり、 $M$  は 2 以上の結合点 (すなわち、二価以上の結合価)、特定の実施形態では、2 ~ 6 の結合点 (すなわち、二価 ~ 六価)、他の実施形態では 2、3、4 または 5 の結合点 (すなわち、二価、三価、四価または五価) を含む中心部分であり、 $R^{15}$  は上記のとおりであり、 $a$  は 0 ~ 4、特定の実施形態では、0、1 または 2 であり、 $L$  はタンパク質などの生体分子の化学構造を変更することなく、生体分子の、質量スペクトル分析をはじめと

10

20

30

40

50

する分析の前またはその間に切断可能な結合である。

【 0 1 4 6 】

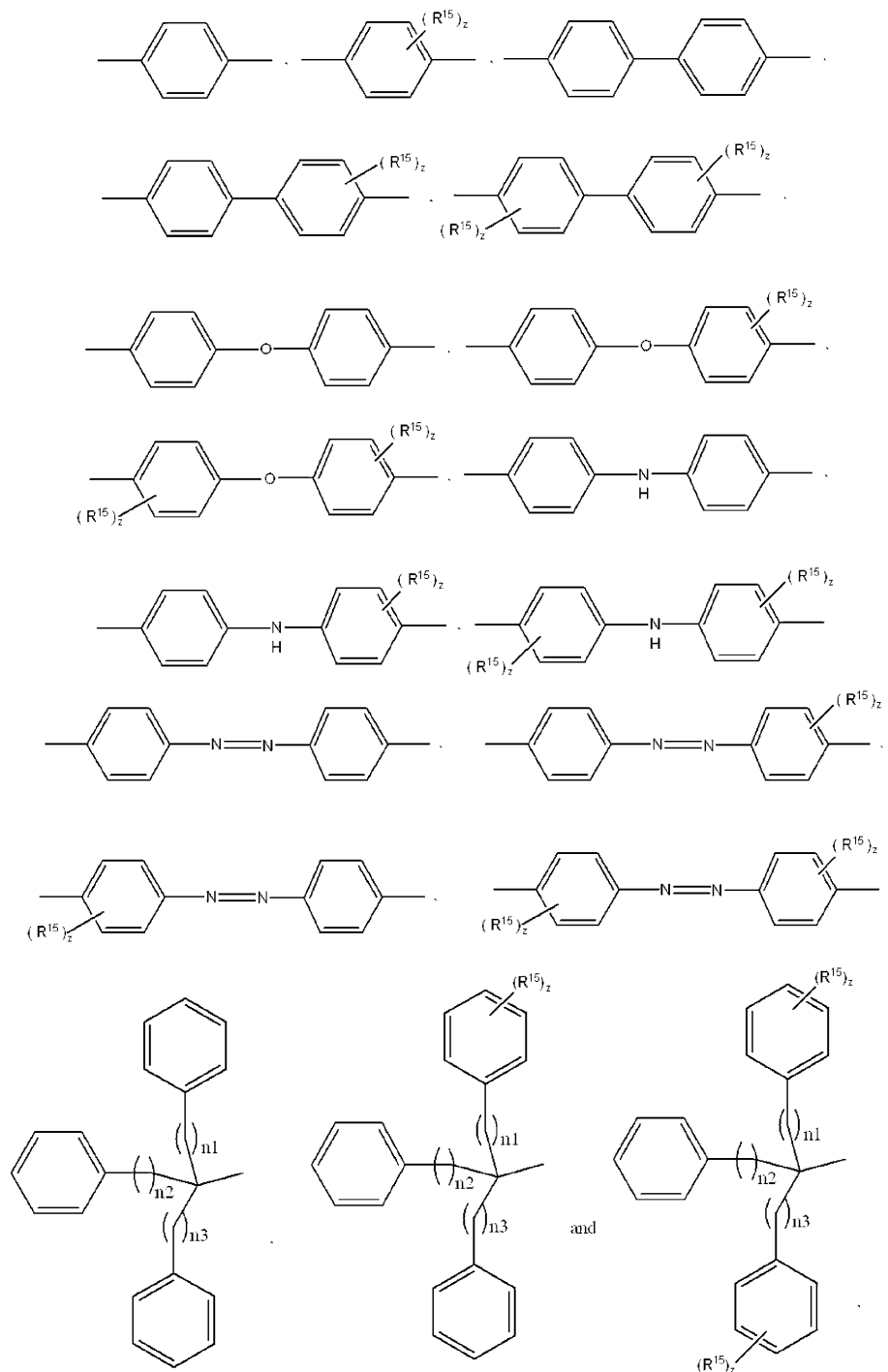
( a ) M

特定の実施形態では、Mはアルキレン、フェニレン、ビフェニレンまたは多価または二価のヘテロ二官能性トリチル誘導体である。Mは非置換であるか、または各々独立に  $R^{15}$  から選択される 1 ~ 4 個の基で置換されている。

【 0 1 4 7 】

他の実施形態では、Mは  $(CH_2)_r$ 、 $(CH_2O)_r$ 、 $(CH_2CH_2O)_r$ 、 $(NH(CH_2)_rC(=O))_s$ 、 $(NHCH(R^{52})C(=O))_r$ 、 $(O(CH)_rC(=O))_s$ 、

【 化 1 】



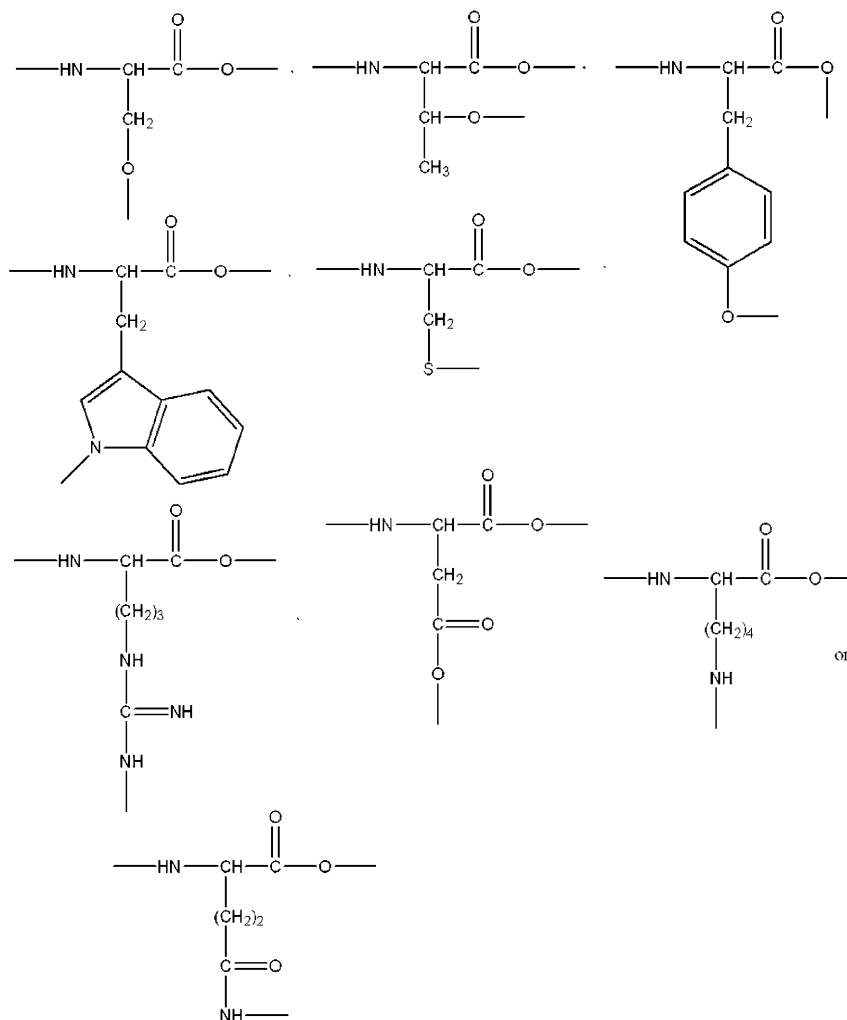
{ 式中、 $R^{15}$  は上記で定義した通りであり、 $r$  および  $s$  は各々独立に 1 ~ 10 の整数であり、 $R^{52}$  は天然または非天然の  $\alpha$ -アミノ酸の側鎖であり、 $z$  は 1 ~ 4 の整数である

｝から選択される。ある実施態様では、 $n_1$ 、 $n_2$ 、 $n_3$ は各々独立に0～4の整数である。他の実施態様では、 $n_1$ 、 $n_2$ および $n_3$ は、 $n_1 + n_2 + n_3 = 0$ となるように選択される。他の実施態様では、 $n_1$ 、 $n_2$ および $n_3$ は1～3である。他の実施態様では、 $n_1$ および $n_2$ は0である。他の実施態様では、 $n_3$ は2である。1つの実施形態では、 $z$ は1である。

【0148】

他の実施形態では、Mは、

【化2】



10

20

30

直鎖または分枝鎖アルキル、直鎖または分枝鎖アルケニル、直鎖または分枝鎖アルキニル、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、ヘテロシクリル、直鎖または分枝鎖アラールキル、直鎖または分枝鎖アラルケニル、直鎖または分枝鎖アラルキニル、直鎖または分枝鎖ヘテロアラールキル、直鎖または分枝鎖ヘテロアラルケニル、直鎖または分枝鎖ヘテロアラルキニル、直鎖または分枝鎖シクロアルキルアルキル、直鎖または分枝鎖シクロアルキルアルケニル、直鎖または分枝鎖シクロアルキルアルキニル、直鎖または分枝鎖ヘテロシクリルアルキル、直鎖または分枝鎖ヘテロシクリルアルケニルまたは直鎖または分枝鎖ヘテロシクリルアルキニルである。

40

【0149】

(b)  $S^1$  および  $S^2$

必要に応じて、スペーサー領域  $S^1$  および/または  $S^2$  は、例えば、大きな生体分子の表面との反応における立体障害を減少させるため、および/または、選別を容易にするために、化合物の中心部分M ( $Z$  に連結されている) の片側または両側に存在させることができる。これらは、通常、捕獲化合物の、および/または捕獲化合物/生体分子複合体の所望の官能特性を変更することなく、間隔を提供するあらゆる基であることができる。当

50

業者は、本明細書の開示内容を考慮して、適切なスペーサーを容易に選択することができる。例示的なスペーサーを以下に示す。

【0150】

実施形態については、例えば、生体分子および選別官能基が低度の立体障害を有する場合には、スペーサーが任意選択される。他の実施態様では、該スペーサー基は、選択性官能基（例えば、薬物）が標的または非標的タンパク質の結合ポケットに到達するように選択される。スペーサー基は疎水性または親水性であり得る；その長さは効率的な選別または選択または捕獲を行うために変え得る；それは硬くてもよい（例えば、トランスオレフィン）。そのスペーサー基は、分析する生体分子の混合物の性質（疎水性／親水性、大きさなど）に基づき選択され得る。

10

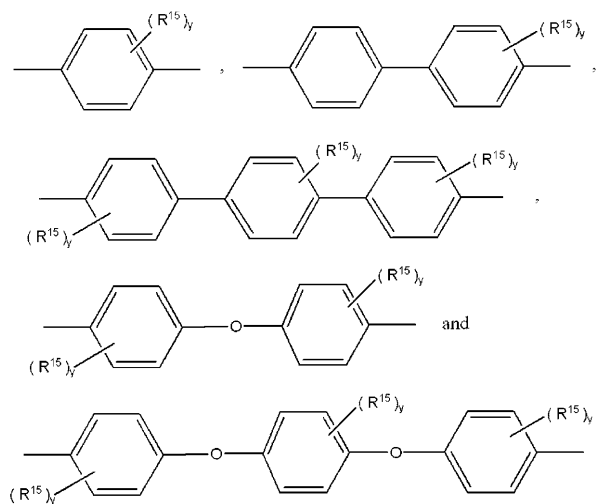
【0151】

$S^2$  が必要でない場合には、切断可能な結合 L の反応性は 1 以上の置換している官能基（例えば、M 上の  $R^{15}$ ）によって影響され得る。切断可能な結合 L の安定性を調節するために、電子的（例えば、メソメリー、誘導）および／または立体効果を用いることができる。

【0152】

特定の実施形態では、 $S^1$  および  $S^2$  は各々独立に  $(CH_2)_r$ 、 $(CH_2O)$ 、 $(CH_2CH_2O)_r$ 、 $(NH(CH_2)_rC(=O))_s$ 、 $(NHCH(R^{52})C(=O))_s$ 、 $(O(CH)_rC(=O))_s$ 、

【化3】



20

30

{ 式中、 $R^{15}$  は上記のように選択され、 $r$  および  $s$  は各々独立に 1 ~ 10 の整数であり、 $R^{52}$  は天然 - アミノ酸の側鎖であり、 $y$  は 0 ~ 4 の整数である } から選択される。1 つの実施形態では、 $y$  は 0 または 1 である。

【0153】

特定の実施形態では、 $R^{15}$  は - H、- OH、-  $OR^{51}$ 、- SH、-  $SR^{51}$ 、-  $NH_2$ 、-  $NHR^{51}$ 、-  $NR^{51}_2$ 、- F、- Cl、- Br、- I、-  $SO_3H$ 、-  $PO_2$ 、 $CH_3$ 、-  $CH_2CH_3$ 、-  $CH(CH_3)_2$  または -  $C(CH_3)_3$  であり、式中、 $R^{51}$  は直鎖または分枝鎖アルキル、直鎖または分枝鎖アルケニル、直鎖または分枝鎖アルキニル、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、ヘテロシクリル、直鎖または分枝鎖アラルキル、直鎖または分枝鎖アラルケニル、直鎖または分枝鎖アラルキニル、直鎖または分枝鎖ヘテロアラルキル、直鎖または分枝鎖ヘテロアラルケニル、直鎖または分枝鎖ヘテロアラルキニル、直鎖または分枝鎖シクロアルキルアルキル、直鎖または分枝鎖シクロアルキルアルケニル、直鎖または分枝鎖シクロアルキルアルキニル、直鎖または分枝鎖ヘテロシクリルアルキル、直鎖または分枝鎖ヘテロシクリルアルケニル、あるいは直鎖または分枝鎖ヘテロシクリルアルキニルである。

40

【0154】

50



## (c) L

特定の実施形態では、切断可能な基 L をタンパク質などの生体分子の分析の前またはその間のいずれかで切断する。分析は質量スペクトル分析、例えば、MALDI-TOF 質量スペクトル分析を含み得る。切断可能な基 L は、基が、生体分子への結合および選別、例えば、一本鎖オリゴヌクレオチド Q 部分の相補鎖とのハイブリダイゼーションおよびハイブリッドの洗浄の間は安定であるが、限定されるものではないが、質量スペクトル分析、例えば、MALDI-TOF 分析をはじめとする生体分子の分析条件下での切断に敏感であるよう選択する。特定の実施形態では、切断可能な基 L は、化合物（ここで、X は S H である）の、タンパク質の表面のシステイン残基のチオール側鎖との反応によって生じたジスルフィド部分であり得る。得られるジスルフィド結合は、限定されるものではないが、ジチオスレートおよび 2-メルカプトエタノールでの処理をはじめとする種々の還元条件下で切断され得る。

10

## 【0155】

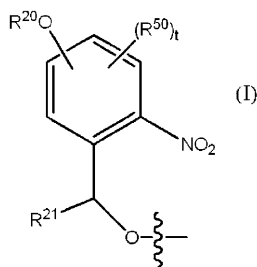
別の実施形態では、L は、質量分析の前またはその間のいずれかに適切な波長の UV 光での短時間処理によって切断され得る光切断可能な基である。MALDI-TOF 質量分析の際にレーザービームの作用によって切断され得る結合をはじめとする光切断可能な基を用いることができる。例えば、トリチルエーテルまたはベンジル基をはじめとするオルトニトロ置換アラルキルは、MALDI-TOF 質量分析の際のレーザー誘起結合切断に敏感である。他の有用な光切断可能な基としては、限定されるものではないが、o-ニトロベンジル、フェナシルおよびニトロフェニルスルフェニル基が挙げられる。

20

## 【0156】

本明細書で用いる他の光切断可能な基としては、国際特許出願公開番号 WO 98 / 20166 に開示されているものを挙げるができる。1つの実施形態では、光切断可能な基は次式 I を有し、

## 【化4】



30

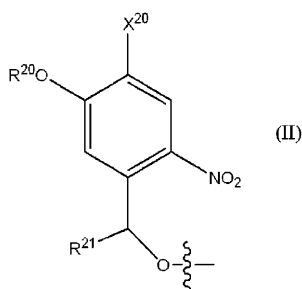
式中、 $R^{20}$  は O アルキレンであり、 $R^{21}$  は水素、アルキル、アリール、アルコシカルボニル、アリールオシカルボニルおよびカルボキシから選択され、 $t$  は 0 ~ 3 であり、 $R^{50}$  はアルキル、アルコシ、アリールまたはアリールオキシである。1つの実施形態では、Q は  $(S^1)_t M(R^{15})_a (S^2)_b$  を介して  $R^{20}$  と結合しており、目的の生体分子は酸素の反応性誘導体（例えば、X）によって  $R^{21}CHO$  部分上に捕獲される。

## 【0157】

40

別の実施形態では、光切断可能な基は次式 II を有し：

## 【化5】



50

式中、 $R^{20}$ はOアルキレンまたはアルキレンであり、 $R^{21}$ は水素、アルキル、アリール、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニルおよびカルボキシから選択され、 $X^{20}$ は水素、アルキルまたは $OR^{21}$ である。1つの実施形態では、 $Q$ は $(S^1)_t M(R^{15})_a (S^2)_b$ を介して $R^{20}$ と結合しており、目的の生体分子は酸素の反応性誘導体（例えば、 $X$ ）によって $R^{21}CHO$ 部分上に捕獲される。

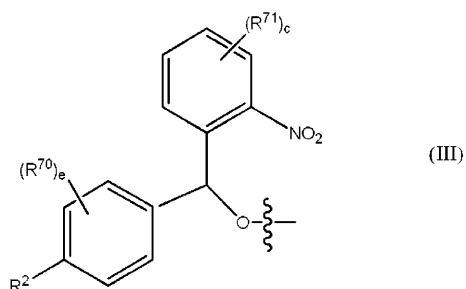
【0158】

さらなる実施形態では、 $R^{20}$ は $O(CH_2)_3$ またはメチレンであり、 $R^{21}$ は水素、メチルおよびカルボキシから選択され、 $X^{20}$ は水素、メチルまたは $OR^{21}$ である。別の実施形態では、 $R^{21}$ はメチルであり、 $X^{20}$ は水素である。特定の実施形態においては、 $R^{20}$ はメチレンであり、 $R^{21}$ はメチルであり、 $X^{20}$ は3-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロポキシである。

【0159】

別の実施形態では、光切断可能な基は次式IIIを有し：

【化6】

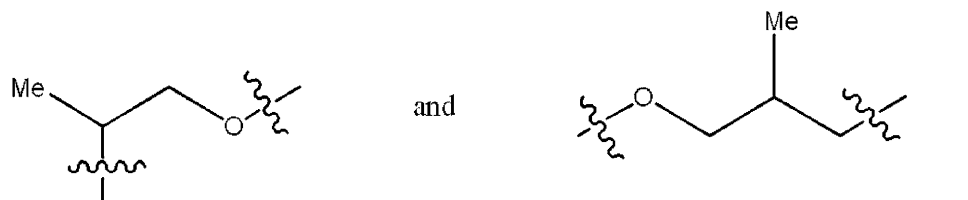


式中、 $R^2$ はOアルキレンOおよびOアルキレンであり、かつ、非置換であるかまたはアルキレン鎖が1個以上のアルキル基で置換されており、 $c$ および $e$ は各々独立に0~4であり、 $R^{70}$ および $R^{71}$ は各々独立にアルキル、アルコキシ、アリールまたはアリールオキシである。特定の実施形態では、 $R^2$ はOアルキレンであり、かつ、アルキレン鎖がメチル基で置換されている。1つの実施形態では、 $Q$ は $(S^1)_t M(R^{15})_a (S^2)_b$ を介して $R^2$ と結合しており、目的の生体分子は酸素の反応性誘導体（例えば、 $X$ ）によって $Ar_2CHO$ 部分上に捕獲される。

【0160】

さらなる実施形態では、 $R^2$ は $3O(CH_2)_3O$ 、 $4O(CH_2)_4$ 、 $3O(CH_2)_3$ 、 $2OCH_2CH_2$ 、 $OCH_2$ 、

【化7】



から選択される。

【0161】

他の実施形態では、 $c$ および $e$ は0である。

【0162】

他の切断可能な基 $L$ としては、弱酸~強酸に曝露されると陽イオンを形成することによって結合切断が促進される酸感受性基を挙げることができる。これらの酸不安定基については、基 $L$ の切断は、質量スペクトル分析をはじめとする分析の前またはその間のいずれかで、マトリックス分子の酸度によって、またはトリフルオロ酢酸の蒸気などの酸でアレイを短時間処理することによって達成することができる。トリチル基の酢酸またはトリフルオロ酢酸への曝露によって、MALDI-TOF質量分析の前またはその間のいずれかでエーテル結合の切断が生じる。

## 【0163】

捕獲化合物 - 生体分子アレイは、切断を行うために、限定されるものではないが、臭化シアンをはじめ化学的に、または限定されるものではないが、生体分子がタンパク質である実施形態においては、トリプシン、キモトリプシン、エキソペプチダーゼ（例えば、アミノペプチダーゼおよびカルボキシペプチダーゼ）試薬をはじめ酵素的に処理することができる。後者については、消化が定量的である場合には、1つを除いてすべてのペプチド断片はハイブリダイズしたままである。アレイから脱離させた後にタンパク質を同定および特性決定するには、部分消化も有利であり得る。切断したタンパク質/ペプチド断片を脱着させ、分析し、そのそれぞれの分子量によって特性決定する。

## 【0164】

本明細書における特定の実施形態では、LはSS、OP(=O)(OR<sup>51</sup>)NH、OC(=O){式中、R<sup>51</sup>は上記で定義した通り}から選択される。特定の実施形態では、R<sup>51</sup>は直鎖または分枝鎖アルキル、直鎖または分枝鎖アルケニル、直鎖または分枝鎖アルキニル、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、ヘテロシクリル、直鎖または分枝鎖アラルキル、直鎖または分枝鎖アラルケニル、直鎖または分枝鎖アラルキニル、直鎖または分枝鎖ヘテロアラルキル、直鎖または分枝鎖ヘテロアラルケニル、直鎖または分枝鎖ヘテロアラルキニル、直鎖または分枝鎖シクロアルキルアルキル、直鎖または分枝鎖シクロアルキルアルケニル、直鎖または分枝鎖シクロアルキルアルキニル、直鎖または分枝鎖ヘテロシクリルアルキル、直鎖または分枝鎖ヘテロシクリルアルケニル、あるいは直鎖または分枝鎖ヘテロシクリルアルキニルである。

## 【0165】

(ii) 切断できない二価のZ部分

別の実施形態では、Zは切断できない二価部分であり、式： $(S^1)_t M(R^{15})_a (S^2)_b$ を有する。式中、S<sup>1</sup>、M、R<sup>15</sup>、S<sup>2</sup>、t、aおよびbは上記で定義した通りである。

## 【0166】

c. Zは不溶性支持体または基質である

他の実施形態では、Zは、表面が官能基(X、Y、Qおよび必要に応じてW)を提示するような、シリコンまたは他の「ビーズ」または微粒子などの粒状の固体支持体または固体表面などの不溶性支持体または基質であってもよい。これらの実施形態では、Zはその1つまたは複数の(通常は1~100個、一般的には1~10個)X部分と、場合によっては少なくとも1個のQおよび/またはY部分、ならびに必要に応じて1個以上のW部分とも結合している。これらの実施形態では、Zは、その表面に10~100、1000、百万、またはそれ以上の官能性部分(基)を含む場合もある。例えば、捕獲化合物は、その上に基が提示されている、シリコン粒子またはアガロースまたは他の粒子であってもよい。以下で論じるように、さらに、脂質二重層または、例えば、リボソームを作製するために用いられる他の脂質などの疎水性物質でコーティングしてもよい。そのような実施形態では、疎水性表面および必要に応じて疎水性W基を有する得られた粒子を、細胞膜環境および他の細胞内環境をプローブする方法に用いる。細胞を穏やかに溶解させることによって、細胞内区画およびオルガネラを露出させ、こういった疎水性捕獲化合物をそれらと反応させ、そして結合した生体分子を、例えば、質量分析によって評価することができ、あるいは、区画およびオルガネラの内容物を放出するようにさらに処理して、この捕獲化合物または他の捕獲化合物と反応させることもできる。

## 【0167】

Zが不溶性支持体である実施形態では、不溶性支持体または基質部分Zは、例えば、ガラス、シリコン、金属、プラスチックまたは複合材料から構築された平坦な表面、あるいは他の適切な表面をベースにしたものであってもよいし、あるいはシリカゲル、細孔性ガラス、磁性またはセルロースビーズなどの「ビーズ」または粒子の形態であってもよいしあるいは、コンビナトリアル合成もしくは分析に適したピンのアレイをはじめとするピンであってもよい。基質は実質的に全ての不溶性または固体物質から加工することができる

。固体支持体は、限定されるものではないが、ビーズ、キャピラリー、プレート、メンブ  
ラン、ウエハー、コーム、ピン、ピットを備えたウエハー、ピットまたはナノリットルウ  
ェルのアレイならびに当業者に公知の他の形状および形態を含む、所望されるあらゆる形  
態であってよい。支持体としては、別個の位置でサンプルを受容または結合するよう設計  
された平坦な表面が挙げられる。

#### 【 0 1 6 8 】

1つの実施形態では、固体支持体または基質Zは、限定されるものではないが、ポリマ  
ー、磁性、着色、R f タグをつけたものおよび他のそのようなビーズをはじめとする「ビ  
ーズ」（すなわち、通常、その最大直径が200 μm未満または50 μm未満の範囲の粒  
子）である。ビーズは、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレンもしくはテフロン  
（登録商標）をはじめとする疎水性材料、または限定されるものではないが、セルロース  
、エピクロロヒドリンで架橋されたデキストラン、アガロース、ポリアクリルアミド、シ  
リカゲルおよび細孔性ガラスビーズもしくはビーズをはじめとする親水性材料から製造さ  
れていてもよい。これらの種類の捕獲化合物を懸濁状態で液相で反応させ、反応媒体から  
遠沈させるかまたは別の方法で取り出し、そして得られた複合体を質量分析などによって  
分析することができる。これらは、固体支持体上の別個の位置に結合するQ官能基を用い  
て選別してもよいし、あるいはこれらは、アドレス指定を可能にするための、高周波タグ  
または着色標識またはバーコードまたはその表面にインプリントされた他のコードなどの  
標識を含んでいてもよい。これらは、「Q」官能基として働く標識にしたがって選別し、  
次いで質量分析計によって分析することができる。

#### 【 0 1 6 9 】

さらなる実施形態において、またはZが切断可能な結合Lである実施形態については、  
不溶性支持体または基質Z部分は、必要に応じて、スパーサー基S<sup>1</sup>および/またはS<sup>2</sup>  
を含むことができる。S<sup>1</sup>、S<sup>2</sup>および/またはL部分は不溶性支持体または基質の表面  
に結合させる。

#### 【 0 1 7 0 】

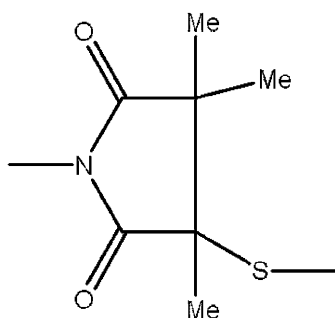
これらの実施形態では、分析される生体分子の密度、ひいては続く分析のシグナル強度  
は、Zが二価の基である実施形態と比べて高まっている。特定の実施形態では、一本鎖オ  
リゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体である選別官能基Qと相補的な、一本  
鎖オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体の適切なアレイを、本明細書に提  
供する方法に用いる。

#### 【 0 1 7 1 】

##### d . 質量改変Z部分

Zが切断可能な部分である実施形態をはじめとする他の実施形態では、Zは質量改変タ  
グを含む。特定の実施形態では、質量改変タグを切断可能なリンカーLに結合させる。1  
つの実施形態では、質量が改変されたZ部分は式： $(S^1)_t M(R^{15})_a (S^2)_b$   
LTを有する。ここで、S<sup>1</sup>、t、M、R<sup>15</sup>、a、S<sup>2</sup>、bおよびLは上記のように選  
択され、Tは質量改変タグである。本明細書で用いる質量改変タグとして、限定されるも  
のではないが、式 $X^1 R^{10}$ で表される基が挙げられる。ここで、X<sup>1</sup>はO、OC(O)  
(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>C(O)O、NHC(O)、C(O)NH、NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>C(O)  
O、NHC(S)NH、OP(O-アルキル)O、OSO<sub>2</sub>O、OC(O)CH<sub>2</sub>S  
、S、NHおよび

## 【化 8】



10

などの二価の基であり、 $R^{10}$ は $(CH_2CH_2O)_zCH_2CH_2O$ 、 $(CH_2CH_2O)_zCH_2CH_2O$ アルキレン、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリーレン、ヘテロアリーレン、 $(CH_2)_zCH_2O$ 、 $(CH_2)_zCH_2O$ アルキレン、 $(CH_2CH_2NH)_zCH_2CH_2NH$ 、 $CH_2CH(OH)CH_2O$ 、 $Si(R^{12})(R^{13})$ 、 $CHF$ および $CF_2$ をはじめとする二価の基であり、 $y$ は1～20の整数であり、 $z$ は0～200の整数であり、 $R^{11}$ はアミノ酸の側鎖であり、 $R^{12}$ および $R^{13}$ は各々独立にアルキル、アリールおよびアラルキルから選択される。

## 【0172】

他の実施形態では、 $X^1R^{10}$ は $SS$ 、 $S$ 、 $(NH(CH_2)_yNHC(O)(CH_2)_yC(O))_zNH(CH_2)_yNHC(O)(CH_2)_yC(O)O$ 、 $(NH(CH_2)_yC(O))_zNH(CH_2)_yC(O)O$ 、 $(NHCH(R^{11})C(O))_zNHCH(R^{11})C(O)O$ および $(O(CH_2)_yC(O))_zNH(CH_2)_yC(O)O$ から選択される。

20

## 【0173】

上記の実施形態では、 $R^{10}$ がオリゴ-/ポリエチレングリコール誘導体である場合には、質量改変増分は44であり、すなわち、 $z$ を0から4まで変化させることによって、5つの種々に質量を改変された種を作成する、したがって、45( $z=0$ )、89( $z=1$ )、133( $z=2$ )、177( $z=3$ )および221( $z=4$ )の質量ユニットを化合物に付加することができる。オリゴ/ポリエチレングリコールはまた、低級アルキル、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、 $t$ -ブチルなどによってモノアルキル化することもできる。

30

## 【0174】

他の質量改変タグとしては、限定されるものではないが、 $CHF$ 、 $CF_2$ 、 $Si(CH_3)_2$ 、 $Si(CH_3)(C_2H_5)$ および $Si(C_2H_5)_2$ が挙げられる。他の実施形態では、質量改変タグとしては、ホモまたはヘテロペプチドを含む。57の質量増分を有している質量改変種を作製する限定的ではない例はオリゴグリシンであり、これは、例えば、74( $y=1$ 、 $z=0$ )、131( $y=1$ 、 $z=2$ )、188( $y=1$ 、 $z=3$ )または245( $y=1$ 、 $z=4$ )の質量改変を生じる。オリゴアミドもまた使用することができ、例えば、74( $y=1$ 、 $z=0$ )、88( $y=2$ 、 $z=0$ )、102( $y=3$ 、 $z=0$ )、116( $y=4$ 、 $z=0$ )などの質量改変が得られる。当業者であれば、予め決定された方法で本明細書中に提供する化合物に対して多種の質量改変を導入するためには、本明細書で例示したものの他にも多数の可能性があるということを理解するであろう。

40

## 【0175】

他の実施形態では、 $R^{15}$ および/または $S^2$ に、質量改変タグとなるように、 $X^1R^{10}H$ または $X^1R^{10}$ アルキル(ここで、 $X^1$ および $R^{10}$ は上記で定義した通りである)を用いて官能性を持たせることもできる。

## 【0176】

## 2. 反応性官能基「X」

反応性官能基(「X」)は、その表面に翻訳後に付加された基をはじめとする官能基を

50

含むタンパク質に対して、共有結合する能力を化合物に付与する。更なる基には、活性化されるまで、タンパク質のような生体分子との反応に対し不活性である基が含まれる。その基には光活性化可能な基が含まれ、以下に限らないが、アジドおよびジアジリン基が含まれる。

#### 【0177】

本明細書で提供する化合物において、Xは、アミノ酸側鎖もしくは酵素（タンパク質）の活性部位をはじめとするタンパク質の表面、または脂質および多糖をはじめとする他の生体分子の官能基と結合するかまたは相互作用する部分である。

#### 【0178】

したがって、例えば、Xはタンパク質の表面上の官能基と反応するかまたは相互作用して共有結合または高親和性を有する非共有結合を形成する基である。タンパク質との相互作用のために、Xには種々の官能基を広く選択できる。例えばXは、タンパク質の表面のアミノ酸残基との反応で求核試薬または求電子試薬のいずれかとして作用して共有結合を形成することができる。アミノ酸側鎖と共有結合する例示的な試薬としては、限定されるものではないが、光反応基、D i e l s A l d e r 対（すなわち、一方の側のジエンと他方の側の単一の二重結合）をはじめとするヒドロキシル、カルボキシル、アミノ、アミドおよびチオール部分の保護基が挙げられる。

#### 【0179】

Xの反応性はコア（すなわち、特に $S^2$ が存在しない場合には上記の式中のM）にある1以上の選択性官能基Yの影響を受け得る。

#### 【0180】

以下で論じるY官能基は、Xの反応性および得られたX - 生体分子結合の安定性を調節する電子的（例えば、メソメリー、誘導）および/または立体効果のために用いる。これらの実施形態では、タンパク質混合物は、Xの電子または立体特性を変化させ、したがってXの生体分子との反応の選択性を高めるYによる調節により、反応させそして分析することができる。

#### 【0181】

特定の実施形態では、Xは $C(=O)OPhpNO_2$ 、 $C(=O)OC_6F_5$ または $C(=O)O(N$ スクシンイミジル)などの活性エステル、限定するものではないが、 $OC_6H_5I$ 、 $OC_6H_5Br$ 、 $OC_6H_5Cl$ 、 $C(O)CH_2I$ 、 $C(O)CH_2Br$ および $C(O)CH_2Cl$ をはじめとする - ハロエーテルまたは - ハロカルボニル基などの活性ハロ部分、マレイミド（システインについて）、金または水銀（システインまたはメチオニンについて）をはじめとする金属錯体、エキスポキシドもしくはイソチオシアネート（アルギニンまたはリジンについて）などのアミノ酸側鎖特異的官能基、限定されるものではないが、遷移状態類似体をはじめとする酵素の活性部位に結合する試薬、例えばリン酸化ペプチドに対する、抗体、ファージディスプレイライブラリーなどの抗原、ハプテン、ピオチン、アビジン、またはストレプトアビジンである。

#### 【0182】

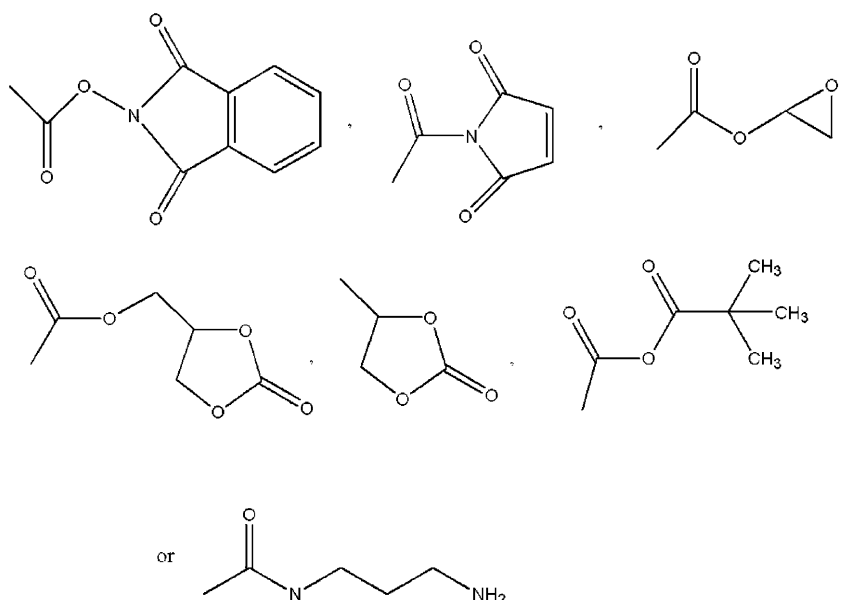
特定の実施態様ではXはN - ヒドロキシスクシンイミジルエステルであるか、または

10

20

30

## 【化 9】



10

である。

## 【0183】

他の実施態様では、Xは光活性化可能な基である。これらの実施態様では、捕獲化合物は選択性官能基を含み、例えば、平衡に到達するまで生体分子の混合物と相互作用し得る。次いで、X基が、適当な波長の光にさらされることにより活性化され、これによって、次いでX基は生体分子の表面基と反応し、それを捕獲する。1つの実施態様では、光活性化可能な基はフェニルアジドのようなアリールアジドである。光にさらされた後、生ずるナイトレンは例えばチロシンの側鎖と反応し、タンパク質を捕獲するだろう。他の実施態様では、光活性化可能な基は3-トリフルオロメチルジアジリンのようなジアジリン基である。

20

## 【0184】

他の実施態様では、反応性官能基Xは、スペーサーSを介して中心コアZに連結する。スペーサーは、間隔をあけるために提供される任意の基であり得るが、典型的に、捕獲化合物および/または捕獲化合物/生体分子複合体の望ましい機能性を変化させることはない。スペーサーと連結する反応性官能基Xは中心コアZから延び、タンパク質のような生体分子の表面の活性部位に到達し得る。本明細書の開示を考慮すれば当業者ならば容易に適当なスペーサーを選択し得る。

30

## 【0185】

特定の実施態様では、Sは $(CH_2)_r$ 、 $(CH_2O)$ 、 $(CH_2CH_2O)_r$ 、 $(NH(CH_2)_rC(=O))_s$ 、 $(O(CH_2)_rC(=O))_s$ 、 $-(CH_2)_{r1}-C(O)NH-(CH_2)_{r2})_s$  - および  $-(C(O)NH-(CH_2)_r)_s$  - から選択され、ここで、r、r1、r2およびsはそれぞれ独立した1から10の整数である。

40

## 【0186】

## 3. 選択性官能基「Y」

選択性官能基(「Y」)は、反応性官能基が結合する基の数を減少させることによって反応性官能基を調節するように働く。選択性官能基は、反応基の選択性を高め、その結果、選択性官能基が存在しない場合よりも少数の種々の生体分子に結合するか、またはそれが存在しない場合よりも大きな親和性で生体分子に結合する。本明細書で提供する捕獲化合物において、Yは、達成されるべき目標にしたがって、広い範囲で変化させることが可能である。選択性官能基は、化合物が、それが分子の一部である場合には、それが存在しない場合よりも少数の種々の生体分子に結合するかまたは(反応性官能基を介して)それと反応するような化合物、および/または、化合物がより大きな特異性およびより高い親

50

和性で結合する化合物である。選択性官能基は化合物に直接結合することができるか、あるいは、 $\text{CH}_2\text{CO}_2$  または  $\text{CH}_2 - \text{O} - (\text{CH}_2)_n - \text{O}$  (ここで、 $n$  は 1 ~ 12、または 1 ~ 6、または 2 ~ 4 の整数である) などのリンカーを介して結合することができる。例示的な選択性官能基については、例えば、図 3 a ~ 3 h h h h および以下の議論を参照。特定の実施態様では、リンカーは、選択性官能基が標的または非標的タンパク質の結合ポケットに到達し得るように選択される。他の実施態様では、選択性官能基はキラル基であり、それによって、生体分子の立体選択的捕獲を可能とする。

#### 【 0 1 8 7 】

例えば、特定の実施形態では、 $Y$  は ATP 類似体およびインヒビター、ペプチドおよびペプチド類似体、単離されたかまたはペプチド内アミノ酸の活性化エステルから選択する

10

#### 【 0 1 8 8 】

別の実施形態では、 $Y$  は小分子部分、天然産物、タンパク質アゴニストまたはアンタゴニスト、ペプチドである (図 3 a ~ 3 h h h h 参照)。別の実施形態では、 $Y$  は親水性化合物または疎水性化合物 (例えば、脂質、糖脂質、ホスホトリエステル、オリゴ糖)、正または負電荷を有する基、小分子、医薬品化合物または既定の二次または三次構造を生じる生体分子である。

#### 【 0 1 8 9 】

特定の実施態様では、 $Y$  は酵素インヒビター、酵素アゴニストまたはアンタゴニスト、医薬品または薬物の断片、プロドラッグまたは薬物代謝産物であり、それは、捕獲化合物またはその収集物の選択性を修飾し、それによって生体分子またはその混合物 (特異的受容体を含むがこれに限らない) と相互作用し、共有結合を形成する。1 つの実施態様では、捕獲化合物 / その収集物は選択性官能基を有し、それは、 $\text{cox} - 2$  インヒビターであり、生体分子の混合物は、他の生体分子中に  $\text{cox}$  受容体を含む。

20

#### 【 0 1 9 0 】

特定の実施態様では、選択性官能基は以下に示す医薬品または薬物の断片から選択され、ここで、中心コアに対する例示的な医薬品の結合を以下に示す。他の実施態様では、選択性官能基は薬物、薬物の断片、薬物代謝産物、または薬物合成中間体である。

#### 【 0 1 9 1 】

医薬品または薬物の断片は、種々の結合点を介して別の向きで中心コア  $Z$  に結合され得、それにより、捕獲化合物の選択性を修飾する。薬物 / 薬物の断片による中心コアへの結合は当業者に既知の方法により行い得る。幾つかの例示的な医薬品の、種々の点における、中心コア  $Z$  への結合を以下に開示する。

30

#### 【 0 1 9 2 】

他の実施態様では、本明細書で提供する捕獲化合物には、選択性官能基が薬物、薬物の断片、薬物代謝産物またはプロドラッグであるようなものが含まれる。これらの実施態様では、捕獲化合物はまた、本明細書の他の部分で定義のように、反応性官能基を含む。更なる実施態様では、捕獲化合物はまた、本明細書の他の部分で定義のように、選別官能基を含む。

#### 【 0 1 9 3 】

特定の実施態様では、薬物、薬物の断片、薬物代謝産物またはプロドラッグ選択性官能基を含む捕獲化合物は、アミノ酸コアを含む。

40

#### 【 0 1 9 4 】

他の実施態様では、アミノ酸コアは第三の官能基の結合のための官能基を側鎖に保有するアミノ酸であり得る。アミノ酸コアには、以下に限らないが、セリン、トレオニン、リジン、チロシンおよびシステインが含まれる。これらの実施態様では、捕獲化合物は反応性官能基、選別官能基および選択性官能基を含み、それは、アミノ酸のアミノ、カルボキシおよび側鎖官能基と結合する。

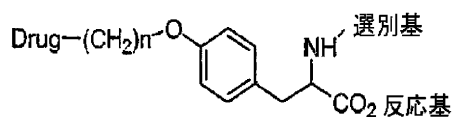
#### 【 0 1 9 5 】

1 つの実施態様では、コアはチロシンであり、捕獲化合物は以下の式を有する：

50



## 【化 10】



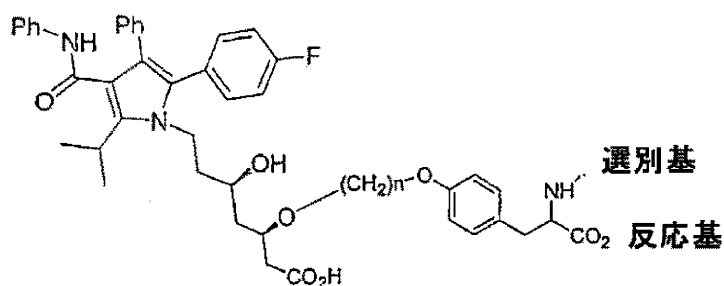
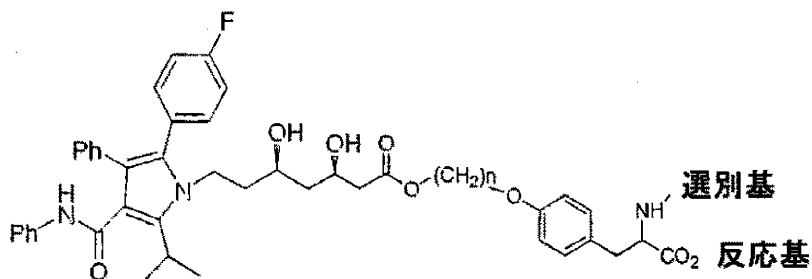
式中、“drug”は薬物、薬物の断片、薬物代謝産物またはプロドラッグを指す。

## 【0196】

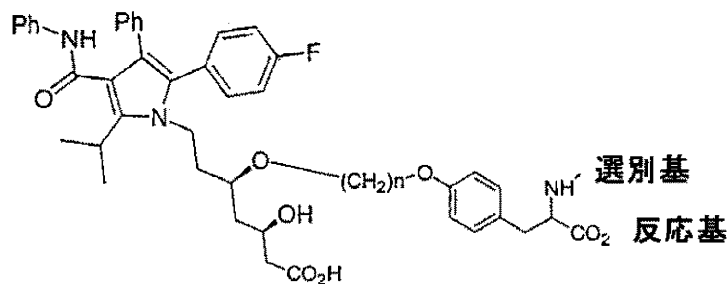
1つの実施態様では、薬物はLIPITOR（登録商標）（アトルバスタチンカルシウム）であり、捕獲化合物は以下の式を有する：

## 【化 11】

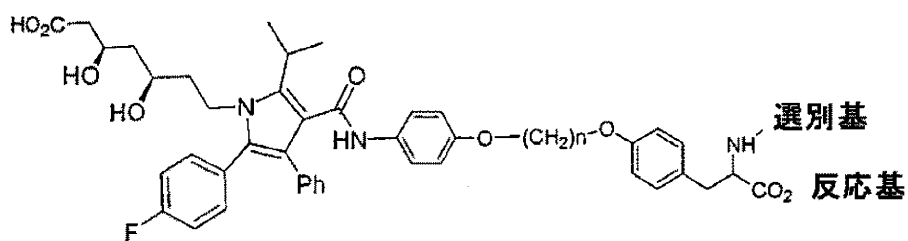
10



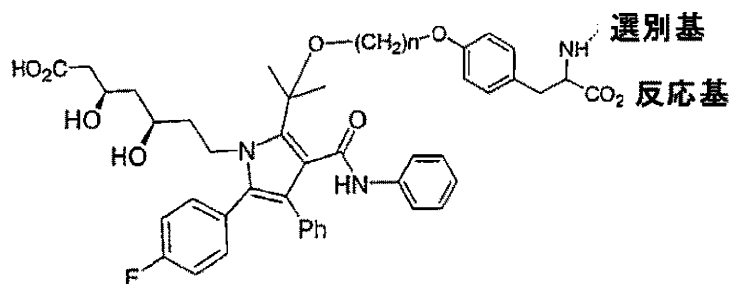
20



30



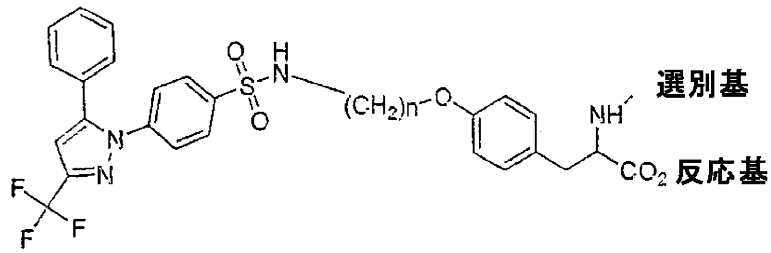
40



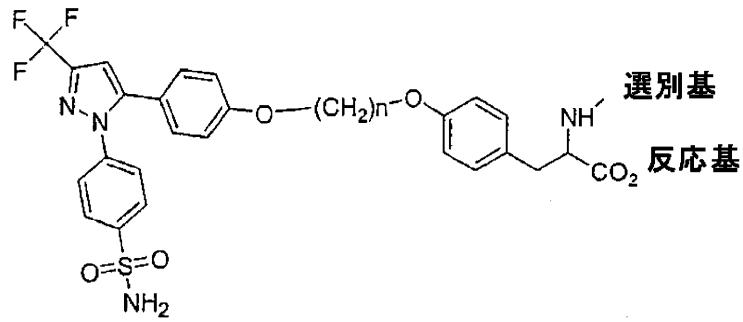
他の実施態様では、薬物はCELEBREX（登録商標）（セレコキシブ）であり、捕獲化合物は以下の式を有する：

50

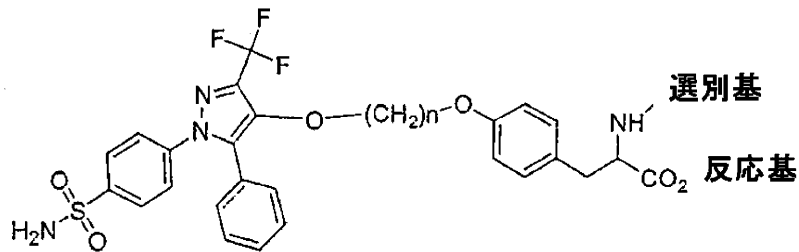
## 【化 1 2】



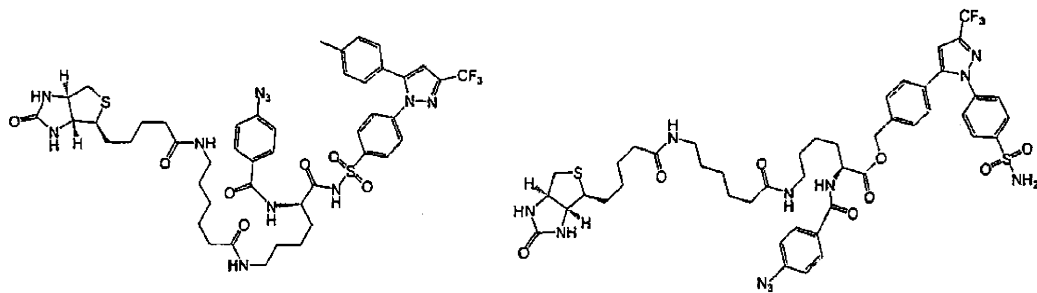
10



20

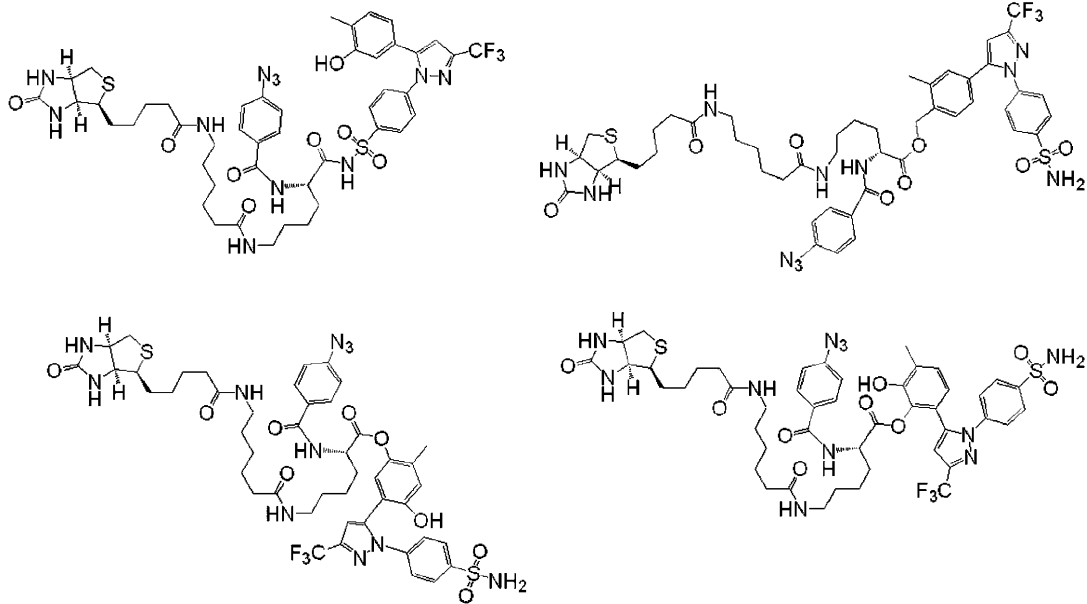


30



40

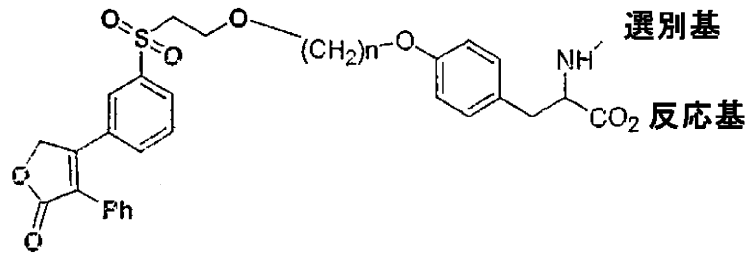
## 【化 1 3】



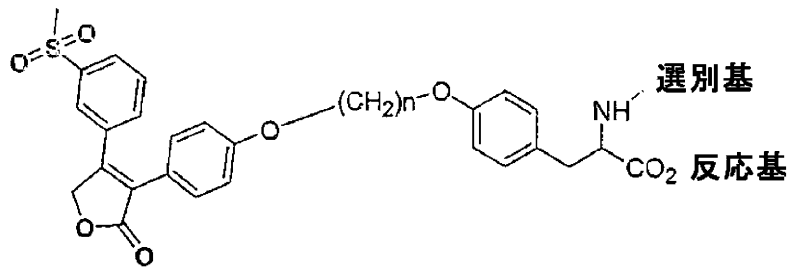
10

他の実施態様では、薬物はV I O X X（登録商標）（rofecoxib）であり、捕獲化合物は以下の式を有する：

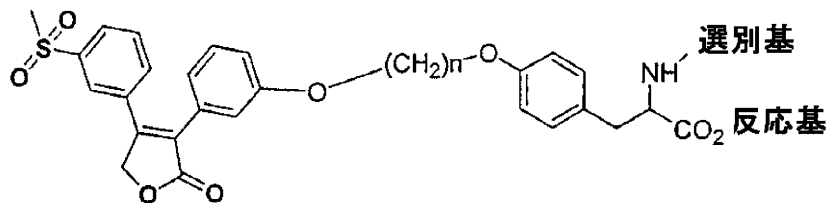
## 【化 1 4】



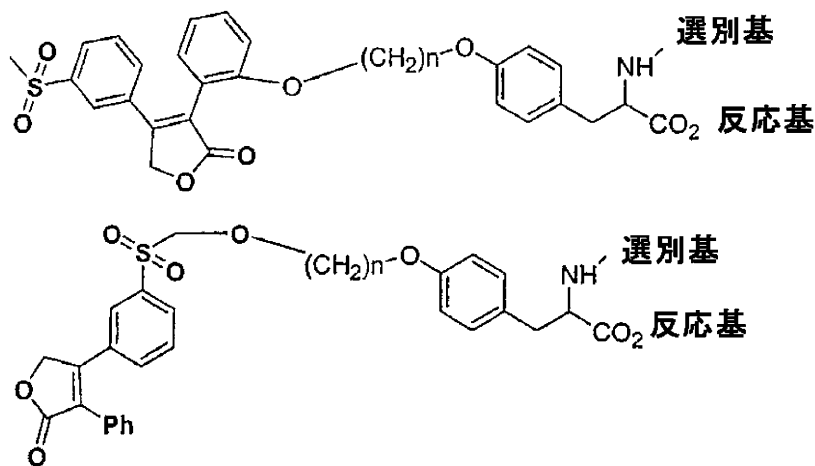
10



20



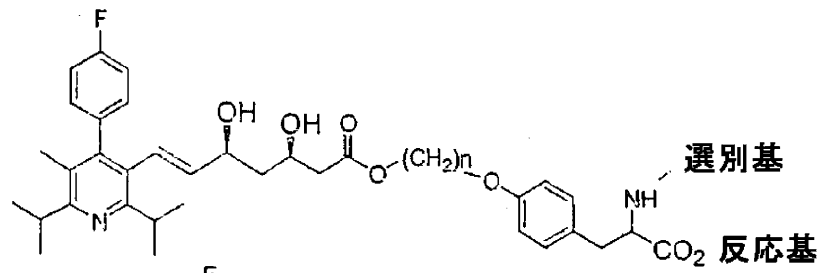
30



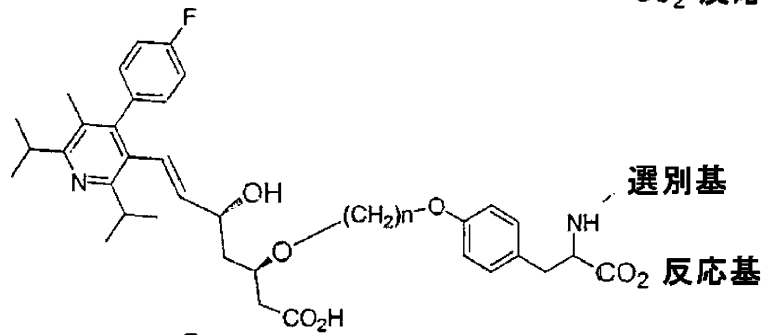
他の実施態様では、薬物はBAYCOL（登録商標）（セリバスタチン ナトリウム）であり、捕獲化合物は以下の式を有する：

40

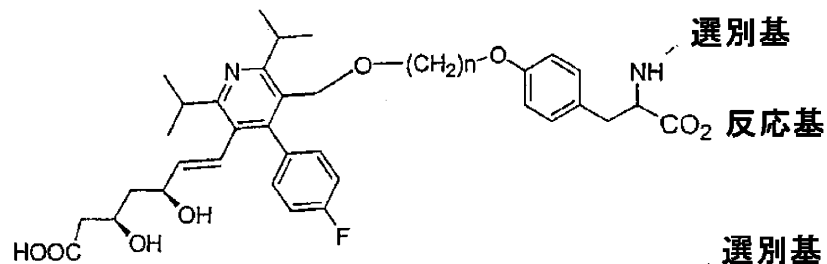
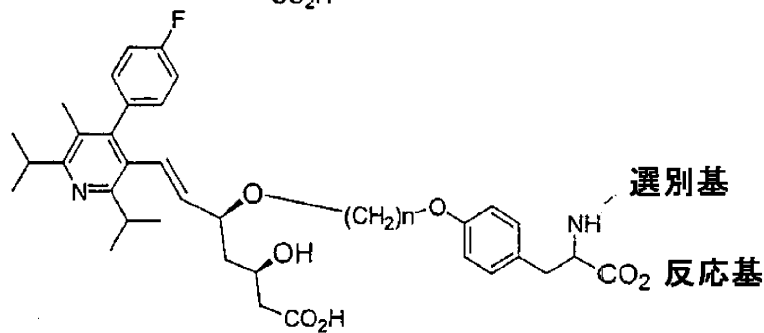
## 【化 15】



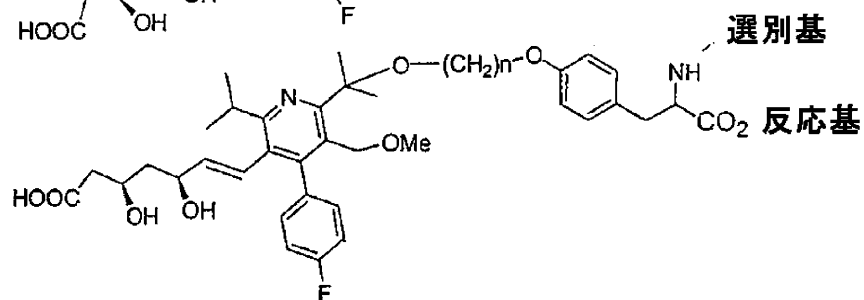
10



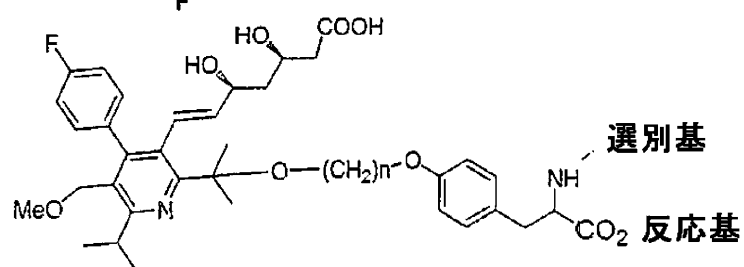
20



30

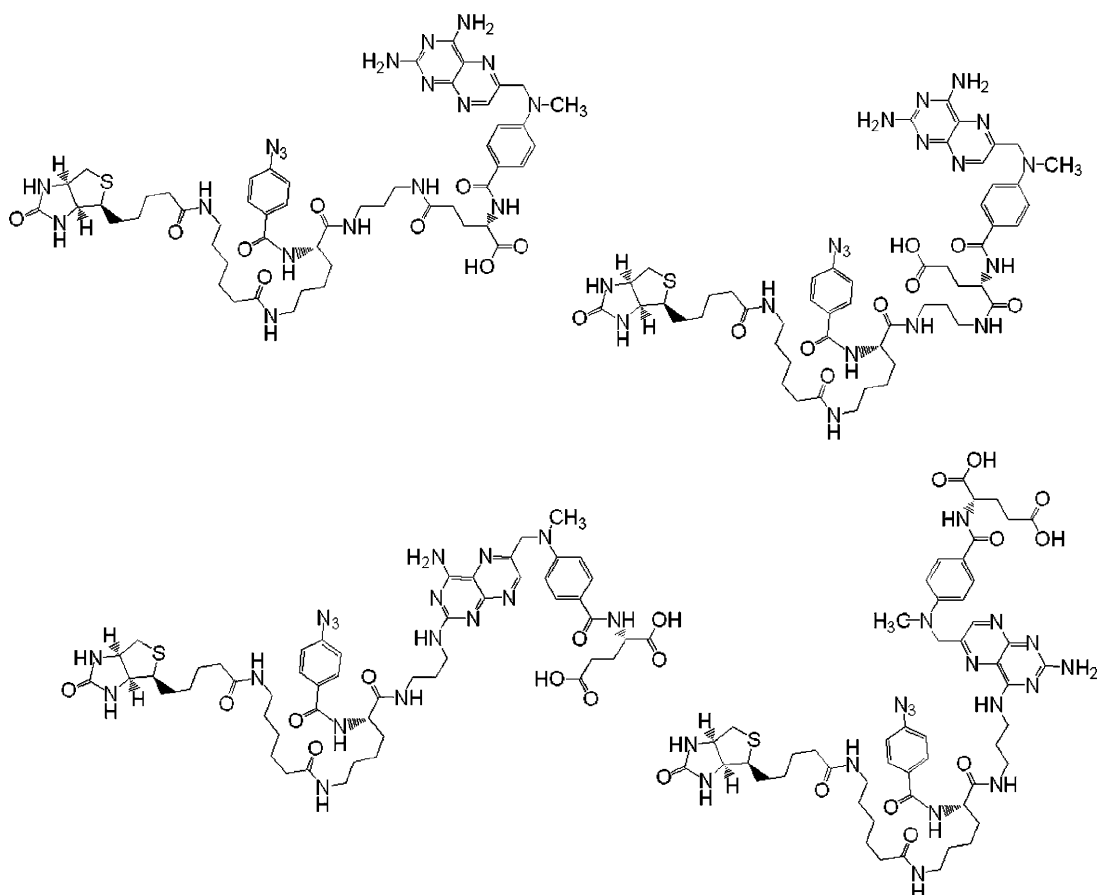


40



他の実施態様では、薬物はメトトレキサートであり、捕獲化合物は以下の式を有する：

## 【化 1 6】



10

20

## 【0197】

例示的な選択性官能基としては、限定されるものではないが、インスリンのような受容体および他の受容体に結合するリガンド（例えば、以下のリガンドの表を参照）、シクロデキストリン、酵素基質、脂質構造、プロスタグランジン、抗生物質、ステロイド、治療薬、酵素阻害剤、遷移状態類似体、生体分子表面に結合する特異的ペプチド、例えば、接合ペプチド、レクチン（例えば、マンノース型、ラクトース型）、ペプチドミメティックス、スタチン、タンパク質精製およびアフィニティークロマトグラフィーに用いられる、色素および他の化合物および部分などの官能基が挙げられる。例えば、図3 a ~ 3 h h hおよび以下のペプチドリガンドの表を参照。

30

【表 1】

例示的なペプチドリガンド		
命名	配列	配列番号
副腎皮質刺激ホルモン	SYSMEHFRWG KPVGKKRRPV KVYPNGAEDE SAEAFPLEF	1
アドレノメデュリン	YRQSMNNFQG LRSFGCRFGT CTVQKLAHQI YQFTDKDKDN VAPRSKISPO GY	2
アラトスタチン I - I V	APSGAQRLYGFGL	3
アルファ MSH	WGKPV(ac)SYSMEHFR	4
アルファ-バグセル(Bag Cell)ペプチド	APRERFYSE	5
アルファ-エンドルフィン	YGGFLRKYPK	6
アリテシン	E*GRLGTQWAV GHLM-NH <sub>2</sub>	7
アミリン	KCNTATCATN RLANFLVHSS NNFGAILSST NVGSNTY	8
アンギオテンシン-1	DRVYIHPFHL	9
アンギオテンシン-2	DRVYIHPF	10
アンギオテンシン-3	RVYIHPF	11
アペリン-13	NRPRLSHLGMPF	12
アストレシン(Astressin)	*FHLLREVLE*IAAEQLAQEAHKNRL*IEII	13
心房性ナトリウム利尿ペプチド	SLRRSSCFGG RMDRIGAQSG LGCNSFRY	14
オートカムタイド2	KKALRRQETV DAL	15
BAM12	YGGFMRRVGR PE	16
BAM18	YGGFMRRVGR PEWW	17
BAM22	YGGFMRRVGR PE	18
ベータ-エンドルフィン ("44")	YGGFMTSEKS QTPLVTLFKN AIKNAYKKG E	19
ベータMSH	AEKKDEGPYR MEHFRWGSPP KD	20
ベータ-ネオ-エンドルフィン	YGGFLRKYP	21
ベータアミロイド	DAEFRHASGYE VHHQKLVEFAE DVGSNLGAIIG LMVGGVVIAT	22
ベータ-バグセルペプチド	RLRFH	23

10

20

30

【表 2】

BNP	SPKMVQGGSGC FGRKMDRISS SSGLGCKVLR RH	24
ブラジキニン	RPPGFSPFR	25
ブッカリン (buccalin)	GMDSLAFSGG L-NH <sub>2</sub>	26
ブルシン (Bursin)	KHG-NH <sub>2</sub>	27
C3 (ウンデカペプチド)	ASKKPKRNIKA	28
セルレイン	*EQDY(SO3H)TGWMDF	29
カルシニューリン	AIP ITSFEEAKGL DRINERMPPR RDAMP	30
カルシトニン	CGNLSTCMLG TYTODFNKFKH TFPQTAIGVG AP	31
カルバイン阻害剤 ("42")	DPMSSTYIEE LGKREVTIPP KYRELLA	32
CAP-37	NOGRHFCGGA EIARFVMTA ASCFN	33
カルジオジラチン (Gardiodilatin)	* NPMYNAVSNA DLMDFKNLLD HLEEKMPLED	34
CD36ペプチド (139-155)	CNLAVAAASH IYQNQFVQ	35
セクロピンB	KWKVFKKIEK MGRNIRNGIV KAGPAIAVLG EAKAL	36
セレベリン (cerebellin)	SGSAKVAFSA IRSTNH	37
CGRP-1	ACDTATCVTH RLAGLLSRSG GVVKNNFVPT NVGSKAF	38
CGRP-2	ACNTATCVTH RLAGLLSRSG GMVKSNNFVPT NVGSKAF	39
CKS17	LQNRRLDLL FLKEGGL	40
コルチスタチン	QEGAPQQA RDRMPCRNF FWKTFSSCK	41
クリスタリン	WG	42
デフェンシン 1 HNP1	ACYCRIPACI AGERRYGTCT YOGRLWAFCC	43
デフェンシン HNP2	CYCRIPACIA GERRYGTCTY QGRLWAFCC	44
デルマセプチン (Dermaseptin)	ALWKTMLKKL GTMALHAGKA ALGAAADTIS QTQ	45
ダイルフィン -A	YGGFLRRIRP KLKWDNQ	46
ダイルフィン -B	YGGFLRRQFK VVT	47
エレドイシン	E*PSKDAFIGLM-NH <sub>2</sub>	48
イントモフィン -1	YPWF	49
イントモフィン -2	YPFF	50
イントレリン -1	CSCSSLMDKE CVYFCHLDII W	51
イクセンティン-4	HSDGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS(NH <sub>2</sub> )	52
繊維素ペプチド	AADSGEGDFLA EGGGVR	53
繊維素ペプチド	BQGVNDNEEGF FSAR	54
フィブリンゲン CST	EILDVPST	55
FMRF	FMRF	56
ガラニン	GWTLNSAGYL LGPHAVGNHR SFSDKNGLTS	57
ガラントイド (Galantide)	GWTLNSAGYL LGPQOFFGLM(NH <sub>2</sub> )	58
ガンマーヘキサケタペプチド	RLRFD	59
ガストリン	EGPWLEEEEE AYGWMDF	60
ガストリン放出	VPLPAGGGTV LTKMYPRGNH WAVGHLM	61

10

20

30

40



【表 3】

グレリン	GSSFLSPEHQ RVOQRKESKK PPAKLQPR	62
GIP	YAEGTFISDY SIAMDKIHQQ DFNWLLAQK GKKNDWKHNI TQ	63
グルカゴン	HSQGTFTSDY SKYLSRRAQ DFVDWLMNT	64
Grb-7 SH2ドメイン-1	RRFA C DPDG YDN YFH C VPGG	65
Grb-7 SH2ドメイン-10	TGSW C GLMH YDN AWL C NTQG	66
Grb-7 SH2ドメイン-11	RSKW C RDGY YAN YPQ C WTQG	67
Grb-7 SH2ドメイン-18	RSTL C WFEG YDN TFP C KYFR	68
Grb-7 SH2ドメイン-2	RVQE C KYLY YDN DYI C KDDG	69
Grb-7 SH2ドメイン-23	GLRR C LYGP YDN AWV C NIHE	70
Grb-7 SH2ドメイン-3	KLFW C TYED YAN EWP C PGYS	71
Grb-7 SH2ドメイン-34	FCAV C NEEL YEN CGG C SCGK	72
Grb-7 SH2ドメイン-46	RTSP C GYIG YDN IFE C TYLG	73
Grb-7 SH2ドメイン-5	TGEW C AOSV YAN YDN C KSAW	74
Grb-7 SH2ドメイン-6	NVSR C TYIH YDN WSL C GVEV	75
Grb-7 SH2ドメイン-8	GVSN C VFWG YAN DWL C SDYS	76
成長ホルモン放出因子	YADAIFTNSY RKLVLGQLSAR KLLQDIMSRO QGESNQERGA RARL	77
グアニリン	PGTCEICAYA ACTGC	78
ヘロデルミン	HSDAIFTEEY SKLLAKLALQ KYLASILGSR TSPPP-NH <sub>2</sub>	79
ヘラスチン -1	HSDATFTAAY SKLLAKLALQ KYLESILGSS TSPPPPSS	80
ヘラスチン -2	HSDATFTAAY SKLLAKLALQ KYLESILGSS TSPPPPSS	81
ヒスチン 5	DSHAKRHHGY KRKFHEKHHS HRGY	82
ICE 阻害剤 (III)	ac-YVAD-フルオロアシルオキシメチルケトン	83
免疫賦活性ペプチド	VEPIPY	84
インスリン (A-鎖)	GIVEQCCTSI CSLYQLENYC N	85
インスリン (B-鎖)	FVNQHLCGSH LVEALYLVCG ERGFFYTPKT	86
インスリン (全分子)	上記参照	87
キネテンシン(Kinetensin)	IARRHPYFL	88
Leu-エンケファリン	YGGFL	89
リトリン(Litorin)	E*QWAVGHFM-NH <sub>2</sub>	90
マランチド	RTKRSGSVYE PLKI	91
Met-エンケファリン	YGGFM	92
メトルファミド(Metorphamide)	YGGGFMRV-NH <sub>2</sub>	93
モチリン	FVPIFTYGEL QRMQEKERNK GQ	94
ミオモジュリン(Myomodulin)	PMSMLRL-NH <sub>2</sub>	95
ミオシンキナーゼ	IPKKRAARATS-NH <sub>2</sub>	96
ネクロフィブリン(Necrofibrin)	GAVSTA	97
ニューロキニン A	HKTDSFVGLM-NH <sub>2</sub>	98
ニューロキニン B	DMHDFVGLM-NH <sub>2</sub>	99
ニューロメディン B	GNLWATGHFM-NH <sub>2</sub>	100

10

20

30

40

【表 4】

ニューロペプチド	YPSKPDNPGÉ DAPAÉDMARY YSAKRHYINL ITRQRY-NH <sub>2</sub>	101
ニューロテンシン	E*LYENKPRRPUIL	102
ノシセプチン	FGGFTGARKS ARKLANQ	103
ノシセプチン/オルファン FQ	FAEPLPSEEE GESYSKEVPE MEKRYGGFMR F	104
ノシスタチン	EQKQLQ	105
オキシン A	E*PLPDCCROKTCSCRLYELLHGAGNHAAGI LTL-NH <sub>2</sub>	106
オキシン B	RSGPPGLQGR LQRLLOASGN HAAGILTM- NH <sub>2</sub>	107
オステオカルシン	YLYQWLGA PV PYPDPLEPRR EVCELNPDCD ELADHIGFQE AYRRFYGPV	108
オキシトシン	CYIQNCPLG-NH <sub>2</sub>	109
PACAP	HSDGIFTDSY SRYRKQMAVK KYLA AVL	110
PACAP-RP	DVAHGILNEA YRKVLDQLSA GKHLQSLVA	111
膵臓ポリペプチド	APLEPVYPGD NATPEQMAQY AADLRRYINM LTRPRY-NH <sub>2</sub>	112
パバイン阻害剤	GGYR	113
ペプチド E	YGGFMRRVGR PE	114
ペプチド YY	YPIKPEAPGE DASPEELNRY YASLRHYLNL VTRQRY-NH <sub>2</sub>	115
リン酸受容体	RRKASGPPV	116
フィザレミン	E*ADPNKFYGLM-NH <sub>2</sub>	117
ラナテンシン	E*VPQWAVGHFM-NH <sub>2</sub>	118
RGD ペプチド	X-RGD-X	119
リジン (Rigin)	GQPR	120
RR-SRC	RRLIEDAEYA ARG	121
シゾフレニア	RPTVL	122
セクレチン	HSDGTFTSEL SRLREGARLQ RLQGLV	123
血清胸腺因子	E*AKSQGGSN	124
構造部位亜鉛リガンドーアルファ	PQCGKCRICK NPESNYCLK	125
構造部位亜鉛リガンドーベータ	PQCGKCRVCK NPESNYCLK	126
構造部位亜鉛リガンドーガンマ	PQCGKCRICK NPESNYCLK	127
構造部位亜鉛リガンドーパイ	PLCRKCKFCLSPNLNLCGK	128
構造部位亜鉛リガンドー X	PQGECKFCLNPKTNLCQK	129
サブスタンス P	RPKPOQFFGL M-NH <sub>2</sub>	130
シンチド (Syntide) 2	PLARTLSVAG LPGKK	131
システミン	AVQSKPPSKR DPPKMOTD	132
トロニン軽鎖	TFGSGEADCG LRPLFEKKSL EDKTERELLE SYIDGR	133
チモペンチン	RKDVY	134
胸腺因子	QAKSQGGSN	135

10

20

30

40

【表 5】

TRH	E*HP	136
タフトシン	TKPR	137
ウペロレイン	E*PDPNAFYGLM-NH <sub>2</sub>	138
尿毒症ペンタペプチド	DLWQK	139
ウロコルチン	DNPSLSIDLT FHLRLTLEL ARTQSQRERA EQNRHFDVS	140
ウログアニリン	NDDCELCVNV ACTGCL	141
バソナトリン(Vasonatrin)	GLSKGCFGLK LDRIGSMSGL GCNSFRY	142
バソプレッシン	CYFQNCPRG	143
バソトシン	CYQNCPRG	144
VIP	HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN	145
キセニン(Xenin)	MLTKFETKSA RVKGLSFHPK RPWIL	146
YXNモチーフ	Tyr-X-Asn	147
炭酸脱水素酵素 I の亜鉛 リガンド	FQFHFWGS	148
炭酸脱水素酵素の亜鉛 リガンド	IIIQFHFWGS	149

10

## 【0198】

## 4. 選別官能基「Q」

本明細書で提供される化合物は、化合物が 2 - D アレイにおける捕獲などによってアドレス指定されることを可能にする選別官能基（「Q」）を含むことができる。特定の実施態様では、選別官能基は、サンプル中の生体分子（例えば、標的および非標的タンパク質）と相互作用しないように選択される。選別官能基とは、化合物を適切な結合条件下で固体支持体、例えば、ビーズ、チップに連結させた相補的なオリゴヌクレオチドのアレイ上に浴びせると、そのオリゴヌクレオチドがハイブリダイズするオリゴヌクレオチドタグのような「タグ」である。捕獲化合物の実体はアレイ中のその位置によって知ることができる。他の選別官能基は、分離することができるカラーコードまたはバーコードをつけたビーズとしてなど、光学的にコードしてもよいし、電子タグをつけたマイクロリアクター支持体またはバーコードをつけた支持体を提供することによるなど電子工学的にタグをつけてもよいし、あるいは物理的にアドレス指定可能なアレイに代えて使用できる化学タグまたは着色タグまたは他のそのようなアドレス指定法であってもよい。選別官能基は、分析、特に、MALDIをはじめとする質量スペクトル分析に適切な物理的アレイまたは他のアドレス指定可能な分離法が可能となるように選択する。

20

30

## 【0199】

本明細書で提供される化合物中に用いるための他の選別官能基としては、ビオチン、(His)<sub>6</sub>、BODIPY(4, 4 - ジフルオロ - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン)、オリゴヌクレオチド、ヌクレオシド、ヌクレオチド、抗体、免疫毒素結合体、接着ペプチド、レクチン、リボソーム、PNA(ペプチド核酸)、活性化デキストランおよびペプチドが挙げられる。1つの実施形態では、選別官能基は、固体支持体上の相補オリゴヌクレオチドの一本鎖領域とのハイブリダイゼーションを可能にするオリゴヌクレオチド、特に、一本鎖のオリゴヌクレオチドまたは部分的に一本鎖であるオリゴヌクレオチドのいずれかである。

40

## 【0200】

本明細書に提供される捕獲化合物の1つの実施形態では、Qは、塩基相補的な一本鎖核酸分子とハイブリダイズできる、最大50単位からなる、一本鎖の保護されていないかまたは適切に保護されているオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体（例えば、PNA）である。特定の実施形態では、Qは約5～約10、15、25、30、35、40、45または50単位を含む。

## 【0201】

タンパク質混合物は、本明細書で提供される化合物とは異なる疎水性（溶解性）を有することができる。特定の実施形態では、本明細書で提供される化合物の官能基Xとタンバ

50

ク質表面との間での高い反応率を達成するために、反応を溶液中で実施する。他の実施形態では、反応を固体 / 液体または液体 / 液体界面で行う。特定の実施形態では、本明細書で提供される化合物の溶解特性はQ部分によって支配されている。これらの実施形態では、Qの構造の変化によって種々の溶解性が提供される。例えば、タンパク質混合物が極めて水溶性である場合には、Qは天然のホスホジエステル結合を含むことができ、生体分子混合物が極めて疎水性（脂質、糖脂質、膜タンパク質、リポタンパク質）である場合には、Qのホスホジエステル結合をホスホトリエステルとして保護することができ、あるいはこれらの結合はメチルホスホネートジエステルまたはペプチド核酸（PNA）であってもよい。生体分子混合物が中程度の疎水性のものである場合には、例えば、ホスホチオエートジエステル結合を用いて溶解性を得る。中程度の溶解性はまた、ホスホジエステルをホスホトリエステル結合と混合することによっても得ることができる。当業者であれば、この目的を達するための他の手段を容易に想定でき、これらとしては、限定されるものではないが、本明細書の他の場所に記載したようなZへの置換基の付加、またはZへの、限定されるものではないが、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレンもしくはテフロン（登録商標）をはじめとする疎水性であるビーズ、または限定されるものではないが、セルロース、エピクロロヒドリンで架橋されたデキストラン、アガロース、レクチン、接着ポリペプチドおよびポリアクリルアミドをはじめとする親水性であるビーズの使用が挙げられる。

#### 【0202】

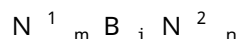
化合物の溶解性を変化させることができる柔軟性は本方法全体の大きな利点である。対照的に、2Dゲル電気泳動は水溶性タンパク質の分析のみに有用であり、その結果、細胞膜中にあるものなど全細胞タンパク質の約30～35%はこの方法では分析できない。限定されるものではないが、組織特異的細胞-細胞接触、シグナル伝達、イオンチャネルおよび受容体に関与するものをはじめとする多数のタンパク質は細胞膜中に局在するので、このことは2Dゲル電気泳動の厳しい限界である。

#### 【0203】

1つの実施形態では、本明細書で提供される化合物を、限定されるものではないが、タンパク質をはじめとする生体分子と反応させるかまたは複合体を形成させた後、化合物をハイブリダイゼーション条件下で、平坦な支持体、ビーズまたはマイクロタイタープレート上で空間的に分離された相補配列のセットと接触させる。

#### 【0204】

特定の実施形態では、Qは支持体上の相補オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションのために、少なくとも部分的に一本鎖であるかまたは一本鎖となり得る領域を含む、一価のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体の基である。Qは式



を有する場合がある。式中、 $N^1$  および  $N^2$  は保存された配列の領域であり、Bは配列並べ替えの領域であり、m、i および n はそれぞれ  $N^1$ 、B および  $N^2$  の単位数であり、m、n および i の合計は、相補核酸配列とハイブリダイズして安定なハイブリッドを形成できる単位数である。したがって、Bが一本鎖DNAまたはRNAである実施形態では、配列並べ替えの数  $4^i$  と等しい。1つの実施形態では、m、n および i の合計は約5～約10、15、25、30、35、40、45または50である。特定の実施形態では、m および n は各々独立に0～約48であるか、または各々独立に約1～約25または約1～約10もしくは15、または約1～約5である。他の実施形態では、i は約2～約25であるか、または約3～約12であるか、または約3～約5、6、7もしくは8である。

#### 【0205】

化合物 ( $N^1{}_m B_i N^2{}_n$ ) のオリゴヌクレオチド部分またはオリゴヌクレオチド類似体部分は、結合および配列認識に最適な大きさとするために変更することができる。配列並べ替え領域Bの多様性は、タンパク質混合物の複雑性が低い場合には、相対的に低いものであり得る。混合物の複雑性が高い場合には、配列領域Bはすべての種を分離するのに十分な分離能を提供するためには、多様性が高くなければならない。隣接する保存領域N

$N^1_m$  および  $N^2_n$  については、効率的で安定なハイブリッド形成を提供するのに十分な長さであることのみが必要とされる。しかし、これらの領域の設計には柔軟性があり、 $N^1_m$  および  $N^2_n$  は同一の長さで同一の配列であるもの、同一の長さで異なる配列のもの、または異なる長さで異なる配列のものであることもできる。特定の実施形態では、B が安定なハイブリッド形成を提供するのに十分な長さであるものを含むことにより、 $N^1_m$  および  $N^2_n$  は存在しない。これらの実施形態では、化合物のオリゴヌクレオチド部分、または化合物のオリゴヌクレオチド類似体部分は次式  $N^1_m B_i$ 、または  $B_i N^2_n$  または  $B_i$  を有する。

#### 【0206】

1つの例示的な実施形態では（例えば、実施例1．aを参照）、Bは11量体のオリゴヌクレオチド配列内にはめ込まれているトリヌクレオチド配列を有し、ここで、 $N^1_m$  および  $N^2_n$  テトラヌクレオチド配列は隣接している同一（保存）領域を提供する。 $N^1_m B_i N^2_n$  のこの配置により、各化合物が同一の反応性官能基Xを保有している64種の異なる化合物が得られる。さらなる例示的な実施形態では（例えば、実施例1．cを参照）、Bは23量体のオリゴヌクレオチド配列内にはめ込まれているオクタヌクレオチドを有し、ここで、 $N^1_m$  および  $N^2_n$  オリゴヌクレオチド配列は隣接しているが同一でないオクタヌクレオチド配列を提供する。 $N^1_m B_i N^2_n$  のこの配置により、各々が同一の反応性官能基Xを保有しており、ヒトプロテオームの推定複雑性（例えば、30,000～35,000種の異なるタンパク質）を超える、65,536種の異なる化合物が得られる。特定の実施形態では、ミスマッチを減少させるために、最良のハイブリダイゼーション特性を有するオリゴヌクレオチドとして、タンパク質混合物の複雑性について過度の並べ替えを含むBの使用を分析に用いることもできる。

#### 【0207】

##### 5．溶解性官能基「W」

本明細書で提供される化合物は、所望の溶解性、例えば、疎水性環境または親水性環境における溶解性を付与して、膜などの生理学的環境において生体分子をプローブすることを可能にする溶解性官能基Wを含むことができる。本明細書で提供される化合物において用いるための例示的な溶解性官能基としては、ポリエチレングリコール、スルフェート、ポリスルフェート、ホスフェート、スルホネート、ポリスルホネート、カルボヒドレート、デキストリン、ポリホスフェート、ポリカルボン酸、トリエタノールアミン、アルコール、水溶性ポリマー、アルキルおよびアリールカルボン酸塩、ならびにグリコールが挙げられる。

#### 【0208】

第四級アンモニウム塩（すなわち、ベタイン、コリン、スフィンゴミエリン、テトラメチル（またはテトラブチル）アルキルアンモニウム塩）などの両親媒性化合物、陽イオン性、イオン性および中性テンシド（t e n s i d e）を溶解性官能基Wとして使用することができる場合もある。

#### 【0209】

他の実施形態では、Wはまた、必要に応じて、タンパク質混合物と反応させた際に、均質な溶液を生じるように化合物の溶解性を調節するために使用することができる。特定の実施形態では、Wは化合物をより水溶性にするために用いることができる極性官能基のスルホネートである。他の実施形態では、Wは低級アルキル（例えば、t - ブチル、t - アミル、イソアミル、イソプロピル、n - ヘキシル、s e c - ヘキシル、イソヘキシル、n - ブチル、s e c - ブチル、i s o - ブチルおよびn - アミル）またはフェニルまたはナフチルといったアリール基をはじめとする疎水性基である。

#### 【0210】

##### 6．例示的な実施形態

#### 【0211】

##### a．例示的な実施形態1

1つの実施形態では、本明細書で提供される方法に用いるための化合物は次式：

Q Z XまたはQ - Z - Y

を有する。式中、Qは、塩基相補的一本鎖核酸分子とハイブリダイズできる、最大50単位からなる、一本鎖の、保護されていないかまたは適切に保護されたオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体（例えば、ペプチド核酸（PNA））であり、Zは、限定されるものではないが、タンパク質をはじめとする生体分子の構造を変化させることなく、質量スペクトル分析をはじめとする生体分子の分析の前またはその間に切断可能である部分であり、Xは、タンパク質の表面上の官能基と相互作用および／または反応して、共有結合または質量スペクトル分析、特にMALDI分析の条件下で安定である結合を形成する官能基であり、そしてYは、標的タンパク質と非共有的に相互作用する官能基を導入することによって特有の選択性を与えることにより、相互作用および／または反応する官能基である。

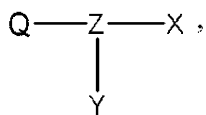
10

【0212】

c. 例示的な実施形態3

別の実施形態では、本明細書で提供される方法に用いるための化合物は式：

【化17】



を有する。式中、Qは、既知の化合物と特異的に非共有的に結合し強固に結合した捕獲化合物を生じることができる、化合物である選別官能基であり、

20

Zは、タンパク質の構造を変化させることなく、質量スペクトル分析をはじめとする生体分子の分析の前またはその間に切断可能である部分であり、

Xは、タンパク質の表面上の官能基と相互作用および／または反応して、共有結合を形成する官能基であり、そして

Yは、標的タンパク質と非共有的に相互作用する官能基を導入することによって特有の選択性を与えることにより、相互作用および／または反応する官能基である。

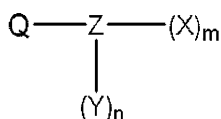
【0213】

d. 例示的な実施形態4

別の実施形態では、本明細書で提供される方法に用いるための化合物は式：

30

【化18】



またはQ - Z - (X)<sub>m</sub>またはQ - Z - (Y)<sub>n</sub>

を有する。式中、Q、Z、XおよびYは上記で定義した通りであり、mは1～100、1つの実施形態では1～10、別の実施形態では1～3、4または5の整数であり、nは1～100、1つの実施形態では1～10、別の実施形態では1～3、4または5の整数である。

40

【0214】

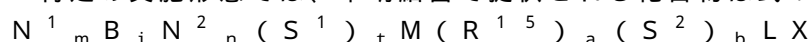
e. 例示的な実施形態5

他の実施形態では、Xは医薬品である。これらの実施形態の化合物は、医薬品に結合する、限定されるものではないがタンパク質をはじめとする生体分子を捕獲することによる薬剤スクリーニングに用いることができる。医薬品への結合を妨害する生体分子中の突然変異を同定し、それにより可能性ある薬剤耐性機構が決定される。

【0215】

f. 他の実施形態

特定の実施形態では、本明細書で提供される化合物は式：



50

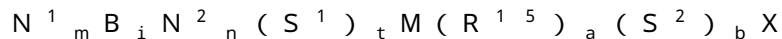
を有する。式中、 $N^1$ 、 $B$ 、 $N^2$ 、 $S^1$ 、 $M$ 、 $S^2$ 、 $L$ 、 $X$ 、 $m$ 、 $i$ 、 $n$ 、 $t$ 、 $a$ および $b$ は上記で定義した通りである。さらなる実施形態では、本明細書で提供する方法に用いるための化合物は質量改変タグを含み、式：



を有する。式中、 $N^1$ 、 $B$ 、 $N^2$ 、 $S^1$ 、 $M$ 、 $S^2$ 、 $L$ 、 $T$ 、 $X$ 、 $m$ 、 $i$ 、 $n$ 、 $t$ 、 $a$ および $b$ は上記で定義した通りである。

【0216】

他の実施形態では、 $Z$ が切断可能なリンカーではないものを含むことによって、本明細書で提供される化合物は式：

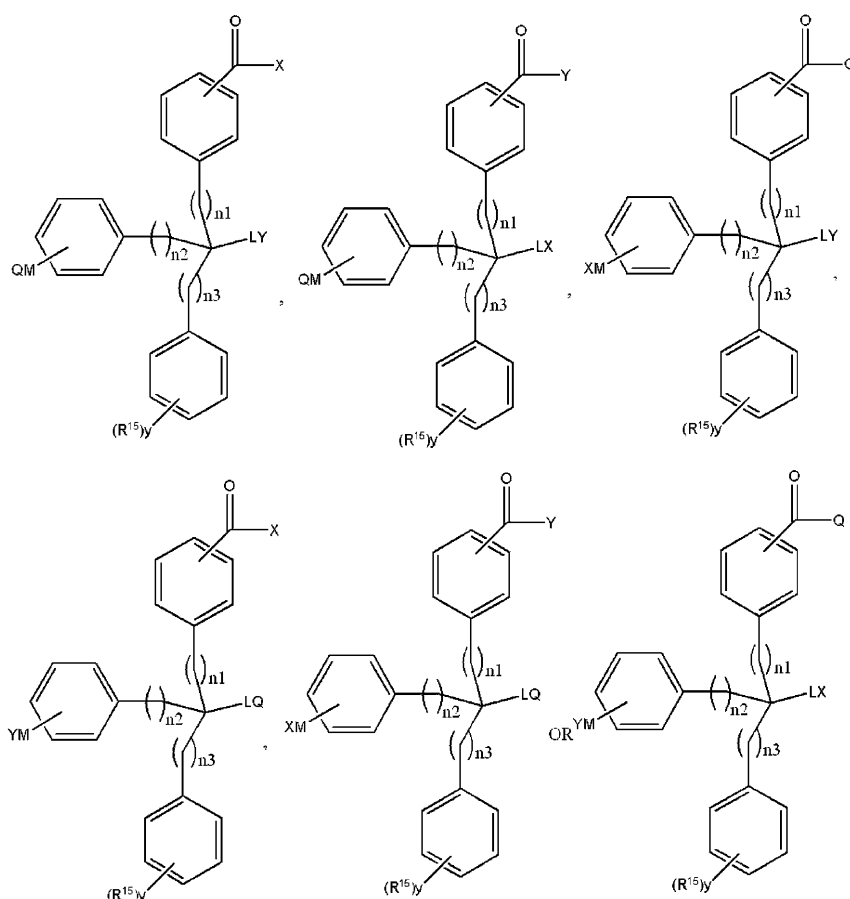


を有する。式中、 $N^1$ 、 $B$ 、 $N^2$ 、 $S^1$ 、 $M$ 、 $S^2$ 、 $X$ 、 $m$ 、 $i$ 、 $n$ 、 $t$ 、 $a$ および $b$ は上記で定義した通りである。

【0217】

別の実施形態では、本明細書で提供される捕獲化合物は式：

【化19】



を有する。式中、 $L$ 、 $M$ 、 $X$ 、 $Y$ および $Q$ は上記で定義した通りである。別の実施形態では、 $n1$ 、 $n2$ および $n3$ は、 $n1$ 、 $n2$ および $n3$ がすべて0とならないように選択される。

【0218】

別の実施形態では、本明細書で提供される捕獲化合物は式：

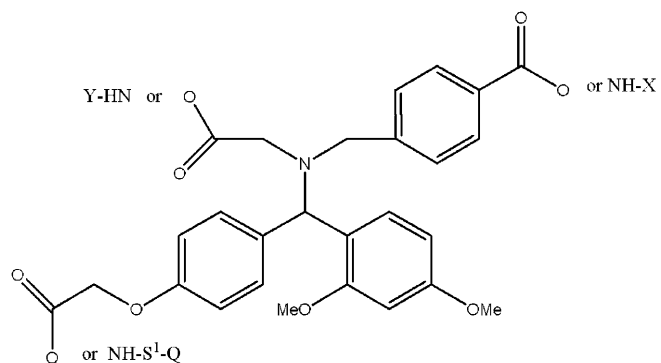
10

20

30

40

## 【化 2 0】



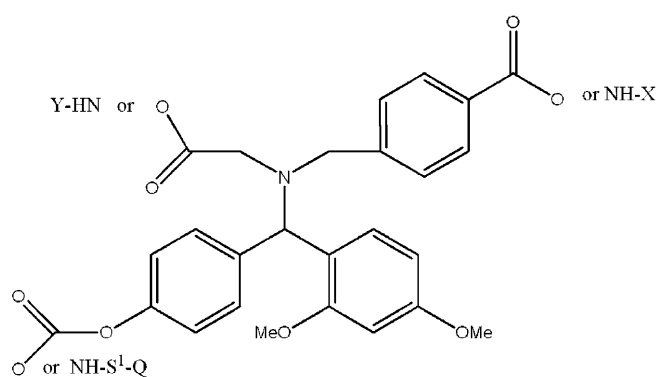
10

を有する。式中、X、Y、QおよびS<sup>1</sup>は上記で定義した通りである。

## 【 0 2 1 9】

別の実施形態では、本明細書で提供される捕獲化合物は式：

## 【化 2 1】



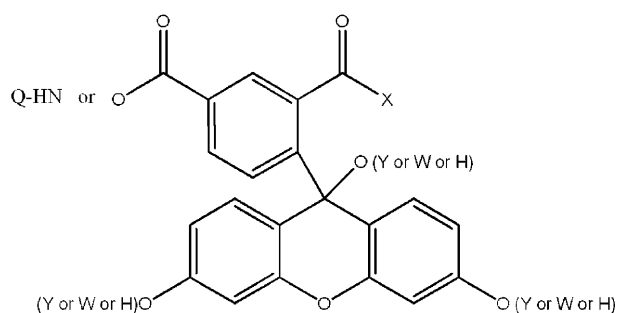
20

を有する。式中、Q、Y、XおよびS<sup>1</sup>は上記で定義した通りである。

## 【 0 2 2 0】

別の実施形態では、本明細書で提供される捕獲化合物は式：

## 【化 2 2】



30

を有する。式中、X、Y、QおよびWは上記で定義した通りである。

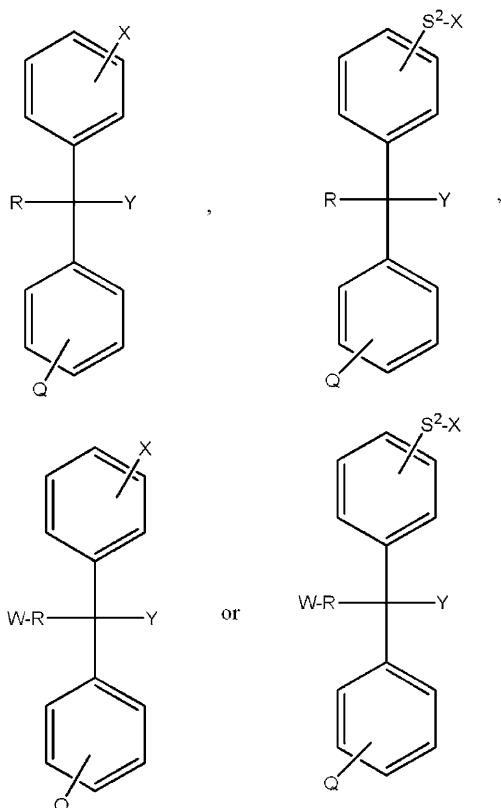
40

## 【 0 2 2 1】

別の実施形態では、本明細書で提供される方法に用いるための捕獲化合物は式：



## 【化 2 3】



10

20

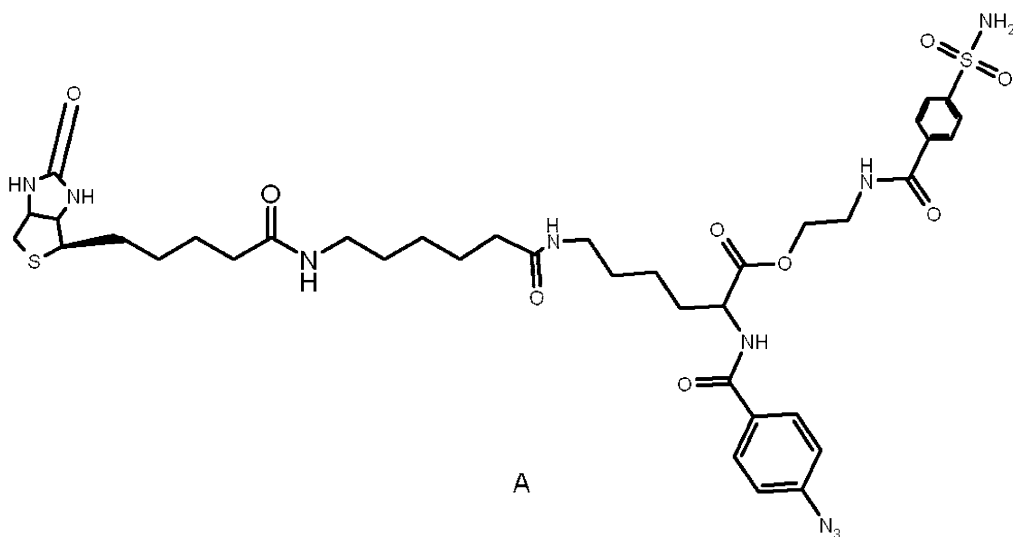
を有する。式中、X、Y、QおよびWは上記のように選択され、Rは置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキルアルキル、または置換もしくは非置換アラルキルである。別の実施形態では、Rはシクロヘキシル、シクロヘキシル - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>、イソプロピルおよびフェニル - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> から選択され、ここで、nは1、2または3である。上記の式で示されるように、Rは必要に応じてWで置換される。

## 【0 2 2 2】

30

他の実施形態では、本明細書で提供される方法に用いるための化合物には

## 【化 2 4】



40

が含まれる。

## 【0 2 2 3】

これらの実施形態に含まれるの特定の化合物は、この式に含まれる変数が上記で列挙さ

50

れた基のすべての組み合わせにより生じるものであり、すべてのものがQ基を含むことができる。本明細書では、これらの特定の化合物の各々は本明細書の開示内容の範囲内にあるものとする。

#### 【0224】

##### D. 捕獲化合物の調製

#### 【0225】

例示的な捕獲化合物の調製を以下に記載する。任意の捕獲化合物または類似の捕獲化合物を、以下の一般的に論ずる方法にしたがって、または適切な出発材料を選択することによって多少変更した方法によって、または当業者に公知の方法によって合成することができる。

10

#### 【0226】

一般的には、捕獲化合物は中心部分Zから出発して調製することができる。特定の実施形態では、Zは $(S^1)_t M(R^{15})_a (S^2)_b L$ である。これらの実施形態では、捕獲化合物は(例えば、1個以上の $R^{15}$ 基で)適切に置換されたM基から出発して調製することができる。 $M(R^{15})_a$ は、必要に応じて、 $S^1$ および/または $S^2$ と場合によって結合させ、続いて切断可能なリンカーLと連結させる。あるいは、L基は、必要に応じて $S^2$ と結合させ、続いて $M(R^{15})_a$ さらに必要に応じて $S^1$ と反応させる。次いで、このZ基をその $S^1$ または $(M(R^{15})_a)$ 末端で誘導体化して、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体Qとのカップリングのための官能基(例えば、ホスホルアミダイト(phosphoramidite)、H-ホスホネートまたはリン酸トリエステル基)を持たせる。Q基は一般的には、X部分の導入の際の競合反応を避けるために塩基がN保護される。1つの実施形態では、Z基をオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドQのすべての可能性ある並べ替え(例えば、 $4^i$ の並べ替え(ここで、iはB中のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体の数))を含む混合物と反応させる。次いで、得られたQZ捕獲化合物または捕獲化合物類をL末端を介して、生体分子、例えば、タンパク質との反応のためのX基を保持するよう誘導体化する。必要に応じて、Q部分のN保護基を除去する。あるいは、N保護基は、タンパク質をはじめとする生体分子との捕獲化合物の反応後に除去することができる。Zが不溶性支持体または基質、例えば、ビーズである実施形態を含む他の実施形態では、QをZ上で合成することができる。さらなる実施形態では、Qを標準的な固層技術によって予め合成し、次いでMに連結させる。あるいは、QをM部分の上にて段階的に合成することもできる。

20

30

#### 【0227】

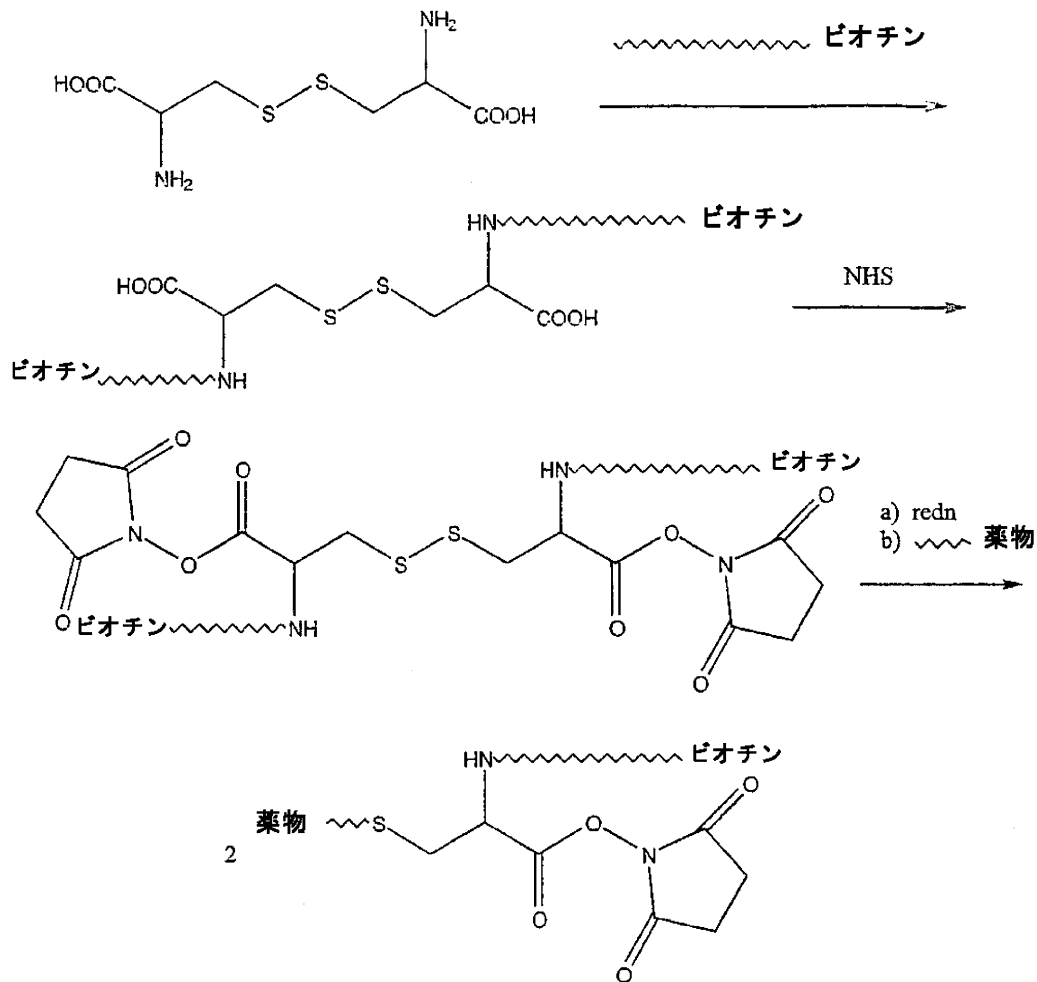
アルカリ不安定性および光切断可能なリンカーを含む、本明細書で提供される捕獲化合物の合成の実施例を以下に提供する。当業者であれば、本明細書に提示された方法に日常的に行われる変更を加えることによって、または当業者に公知の他の方法によって、開示するもの意外の捕獲化合物を調製することができるであろう。

#### 【0228】

他の実施態様では、本明細書で提供する捕獲化合物を以下に示す方法により調製する。端的に、シスチンとピオチン-リンカー部分との反応により、アミノ官能性の誘導を生ずる。生ずる化合物とN-ヒドロキシスクシンイミドおよび例えばジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)との反応により、対応するジ-NHSエステルが形成される。ジスルフィド結合の還元、その後の薬物-リンカー部分との反応により、2当量の望ましい捕獲化合物が形成される。

40

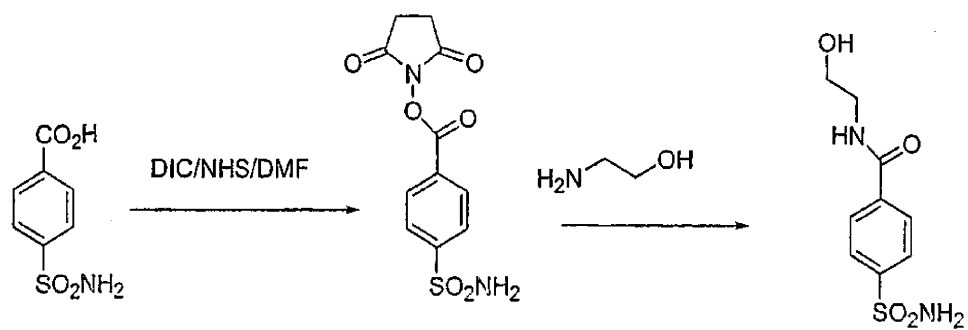
## 【化 2 5】



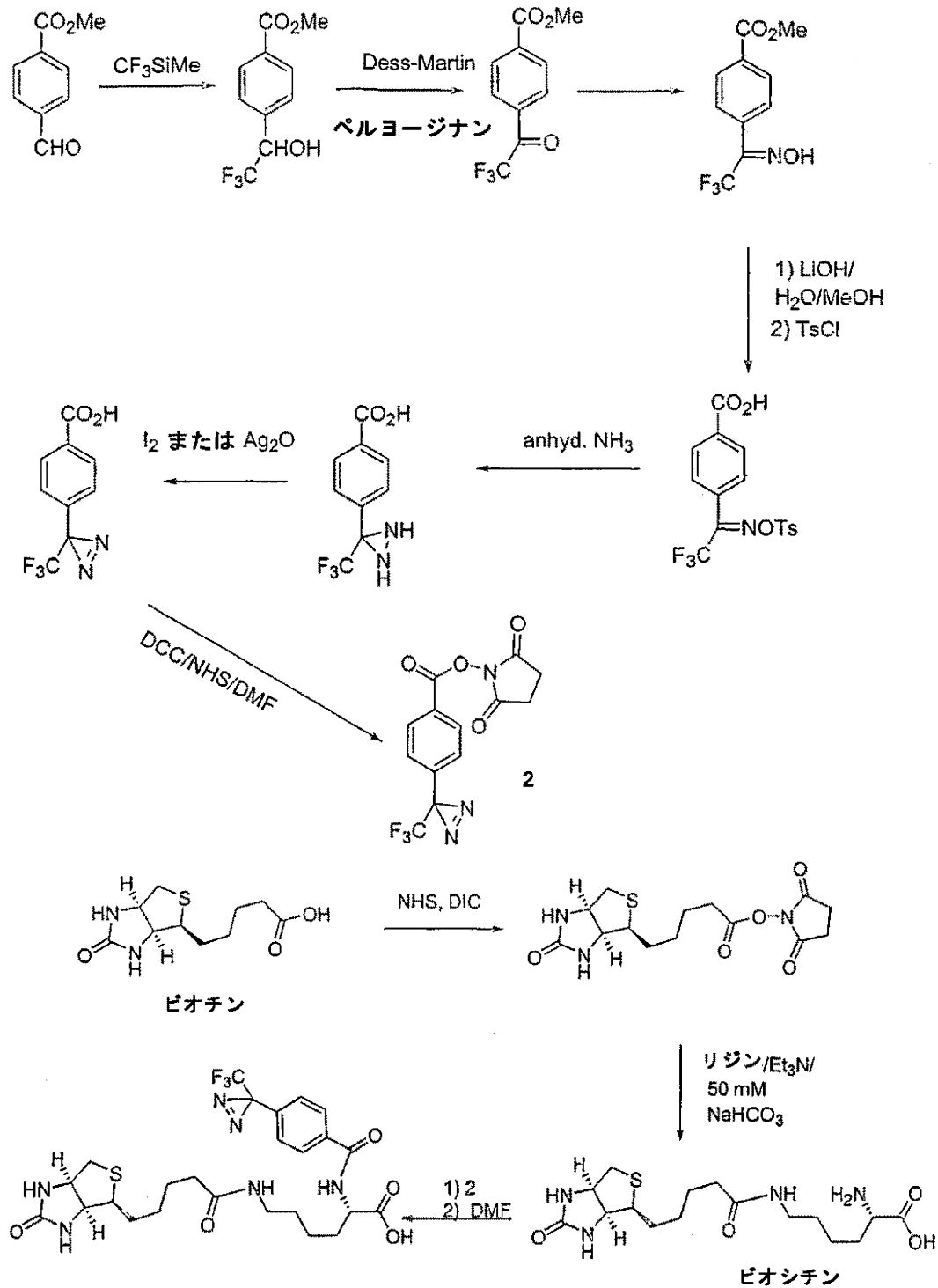
## 【 0 2 2 9 】

例示的な光活性化可能な捕獲化合物は以下の方法により調製し得る：

## 【化 2 6】



## 【化 27】



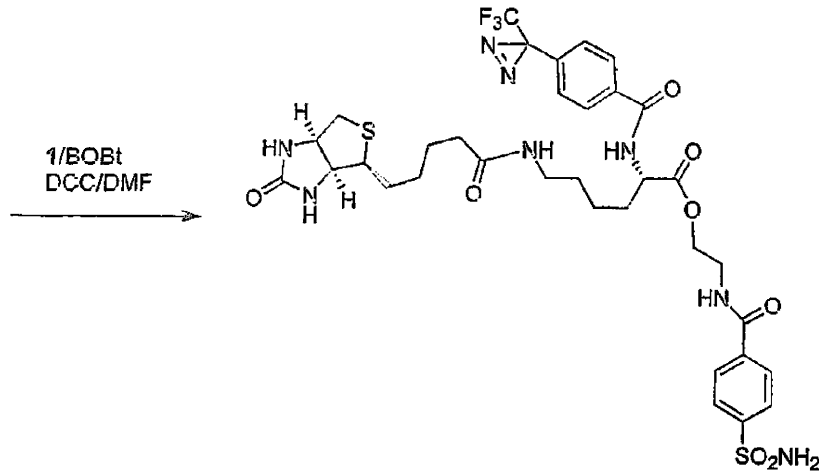
10

20

30

40

## 【化 2 8】

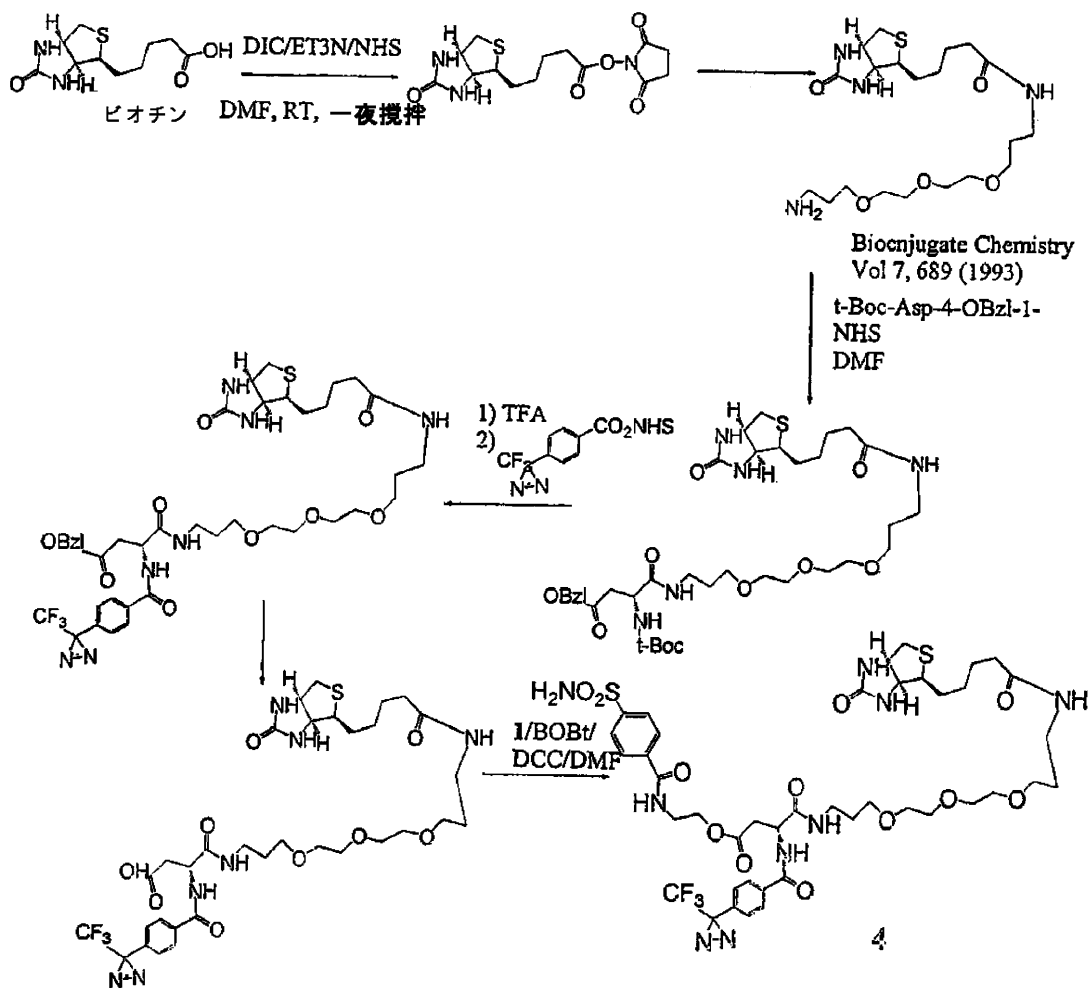


10

## 【 0 2 3 0】

他の光活性化可能な捕獲化合物は以下のように調製し得る：

## 【化 2 9】



20

30

40

## 【 0 2 3 1】

## E. 化合物の使用方法

本明細書で提供される捕獲化合物は、タンパク質混合物の構成要素の分析、定量、精製および/または同定に用いることができる。これらは、薬剤候補を同定するための小分子のライブラリーのスクリーニングに用いることが可能であり、またこれらは、生体分子 - 生体分子相互作用を評価するため、ならびに生体分子複合体および中間体（例えば、生

50

学経路の中にあるものおよび他の生物学的中間体)を同定するために用いることもできる。

#### 【0232】

分析プロセスを開始するために、生体分子の混合物を入手するかまたは準備する。次いで、これらを、必要に応じて、標準的な手順にしたがって予備精製または部分精製してもよい。生体分子は標準的な方法を用いてサンプルから単離する。図4aは、捕獲化合物が生体分子に結合しており、MALDI-TOF MSによって分析される、例示的な捕獲アッセイを示す。

#### 【0233】

##### 1. 一般法

本明細書で提供される収集物には、収集物を混合物と接触させて混合物中の分子を共有結合させることによって、分子、特に生体分子の混合物の複雑性を低下させることをはじめ、広範な種々の用途がある。捕獲化合物は、接触の前、その間またはその後のいずれかに選別官能基によって整列させることができる。接触および整列の後、アレイの位置は各々、混合物中の分子のサブセットを含んでいる。次いで、アレイを、例えば質量スペクトル計を用いて分析することができる。

#### 【0234】

例えば、タンパク質は、細胞溶解とそれに続く、例えば、沈殿法(例えば、硫酸アンモニウム)または核酸および炭水化物(必要に応じて)の酵素的分解のいずれかにより、体液および/または組織から単離し、そして低分子量物質を分子篩によって除去する。タンパク質はまた発現ライブラリーから得ることもできる。タンパク質混合物のアリコートをついて捕獲化合物の収集物と反応させ、一般的には、収集物のメンバーは異なる官能基、例えば、異なる反応性および/または選択性を有し、選択されたXの反応性または反応性官能基および選択性官能基によって混合物を別個のタンパク質ファミリーに分離する。選別官能基Qについて選択される多様性(相違数)は、タンパク質の標的混合物の複雑性によって異なる。したがって、例えば、XおよびY、溶解性官能基が異なっており、かつ、Qがオリゴヌクレオチドである化合物セットがある場合には、得られるアレイ中に十分な数の位置を提供し、その結果、最終的にアレイ上の各「スポット」が特定の捕獲化合物に結合した約5~50種程度の生体分子を有するために適切な長さのBを選択する。必ずしもそうではないが、一般的には、特定の「Q」を含むすべての捕獲化合物は同じであり、その結果、得られるアレイ上の各「スポット」が同様の捕獲化合物を含む。しかし、複数の異なる捕獲化合物が同じQ官能基を含むことができる実施形態もある。

#### 【0235】

記載したように、アレイは、固体支持体上の2-Dアレイだけでなく、着色ビーズまたはビーズ上のRFタグまたは化学タグまたはコードを用いてタグをつけることなどによって、アドレス指定可能であるか、メンバーを同定することができるあらゆる収集物を含む。「スポット」はアレイ上の位置であり、捕獲化合物がその「Q」官能基によって選別される収集物は分離されている。

#### 【0236】

特定の実施形態では、分析は混合物を完全に分析するために必要な可能な限り最少の数の反応を用いて実施する。したがって、このような実施形態では、Qの多様性の選択および異なる反応性のXおよびX/Y基の数の選択が、分析される生体分子混合物の複雑性の関数となる。Bの多様性ならびにXおよび/またはX/Y基の数を最小にすることで、最小の複雑性を有する混合物の完全な分析が可能となる。

#### 【0237】

複合混合物からのタンパク質の分離は、収集物の異なるメンバーに結合した化合物-タンパク質産物によって達成される。捕獲化合物-タンパク質産物を含む上清を、支持体上のオリゴヌクレオチドなどのレシピエント分子に結合させたかまたは別の方法で標識もしくはアドレス指定した支持体と接触させて、ハイブリダイゼーションなどによって相補オリゴヌクレオチドのアレイに結合させる。1つの実施形態では、選択した $N^1_m B_i N^2$

10

20

30

40

50

<sub>n</sub> オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体と相補的であるオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体のアレイを空間的に別個の位置に有している平坦な固体支持体を、捕獲化合物 - 生体分子産物とハイブリダイズさせる。

【0238】

Z が不溶性支持体または基質、例えば、ビーズである実施形態では、化合物 - タンパク質産物のアドレス指定可能なアレイへの分離は、マイクロウェルもしくはマイクロタイタープレートのアレイ、または他の微小容器アレイに選別することによって、あるいは同定可能なタグで標識することによって行い得る。マイクロウェルまたはマイクロタイタープレート、または微小容器は、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体 Q と相補的である一本鎖オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体を含むことができる。

10

【0239】

化合物とタンパク質を反応または複合体形成させた後、過剰な化合物のすべてを、「捕獲剤」として作用するよう設計された試薬を加えることによって除去し得る。例えば、選択した X と反応させたものと同一または類似の官能基を有するビオチニル化した小分子を、過剰な化合物のすべてと反応させる。この混合物を磁性ビーズに結合させたストレプトアビジンに曝露することにより、過剰の化合物を除去し得る。

【0240】

化合物 - タンパク質産物の相補配列へのハイブリダイゼーションは、標準的な条件（例えば、種々のハイブリッドの T<sub>m</sub> 値を平衡化するためのカオトロピック塩の存在下で）にしたがって行う。ハイブリダイズしていない全ての物質を洗い流し、ハイブリダイズした物質を分析し得る。

20

【0241】

さらなる実施形態では、本明細書の方法は、化合物との反応後の生体分子の選別を達成するために、Q 基が並べ替えられている、本明細書で提供される化合物の混合物を用いる。化合物のこれらの混合物は、特定の実施形態では、Q における  $4^i$ （ここで、 $i$  は Q の B 部分に含まれるヌクレオチドまたはその類似体の数）の並べ替え（例えば、 $i = 8$  については 65, 536 種の並べ替え）のうちの異なる X 試薬のサブセット（例えば、64 または 256 または 1024）を含む。サブセットを分析される生体分子混合物のアリコートと個別に反応させると、結合体混合物が得られ、これは例えば、マイクロタイタープレート形式で並べることができる（例えば、96、384、1536 など）。化合物混合物のこれらのサブセットを用いる分析により、分析前の生体分子のさらなる選別を提供する。

30

【0242】

分析するタンパク質を、化合物との反応の前（または後）でハイブリダイゼーションの前に蛍光標識すると、これらの標識したタンパク質をアレイ上で検出することも可能である。この方法によれば、MALDI - TOF 質量分析計を用いてアレイ全体をスキャンする前にハイブリッドを保持している位置を検出することができ、アレイを分析する時間が最小となる。様々な種類の質量分析計（例えば、直線型または反射型、遅延引き出しの有無、TOF、Q - TOF 型または種々の波長のレーザーおよび x y サンプルステージを備えるフーリエ変換分析装置）を適用してタンパク質を分析することができる。

40

【0243】

本明細書に用いる質量分析形式としては、限定されるものではないが、マトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）、連続またはパルスエレクトロスプレー（ES）イオン化、イオンスプレー、サーモスプレーまたはマッシュクラスター衝撃質量分析計、および直線型飛行時間型（TOF）、反射飛行時間型、シングル四重極、多重四重極、シングル磁場型、多重磁場型、フーリエ変換、イオンサイクロトン共鳴（ICR）、イオントラップなどの検出形式、ならびにそれらの組み合わせ、例えば、MALDI - TOF が挙げられる。例えば、ES には、水または揮発性バッファー中に溶解させたサンプルを、連続的にまたは断続的にのいずれかで大気圧イオン化インターフェース（API）に注入

50

し、次いで、四重極によって質量を分析する。ES質量分析計を用いて得ることができる複数のイオンピークの作成により、質量決定の精度を高めることができる。MS/MS四重極構成を用いれば、特異的な構造についてのなおさらに詳細な情報を得ることができる。

#### 【0244】

MALDI質量分析(MALDI-MS)では、種々の質量分析装置、例えば、質量分析の技術分野では公知である、シングルまたはトリプル四重極モード(MS/MS)での磁場/磁気偏向機器、フーリエ変換および直交飛行時間型(OTOF)をはじめとする飛行時間型(TOF)を用いることができる。脱離/イオン化プロセスには、多数のマトリック/レーザーの組み合わせを用いることができる。また、イオントラップおよびリフレクトロン構成も用いることができる。

10

#### 【0245】

MALDI-MSでは、生体分子がマトリックス中に取り込まれていることが必要である。これは、固体(すなわち、結晶)マトリックス中に混合されたポリペプチドおよび核酸に対して行われている。マトリックスはレーザー照射を吸収するよう選択する。これらの方法では、レーザー、例えば、UVまたはIRレーザーを用いて、プローブチップまたは他の適切な支持体上で結晶化している生体分子/マトリックス混合物に当て、これにより、生体分子の脱離およびイオン化を達成する。さらにMALDI-MSは、ポリペプチド、グリセロールおよび他の液体をマトリックスとして実施されている。

#### 【0246】

20

タンパク質-タンパク質相互作用およびタンパク質-小分子(例えば、薬剤)相互作用は、化合物-タンパク質アレイを目的の分子の混合物と接触させることによって調べることができる。この場合には、切断可能な結合Lを含まない化合物またはMALDI-TOF MS条件下で安定である結合Lを含む化合物を用いる。その後の質量分析計でのアレイのスキャンにより、タンパク質アレイのハイブリダイズしたタンパク質が目的のタンパク質または小分子混合物と効果的に相互作用していることを証明する。

#### 【0247】

Zが切断可能な結合を含むものをはじめとする上記の実施形態では、化合物は質量改変タグを含むことができる。これらの実施形態では、質量改変タグは、タンパク質をはじめとする生体分子の構造の相違(例えば、リン酸化または脱リン酸化などの側鎖修飾)および/または発現レベルを分析するために用いる。1つの実施形態では、質量改変タグの有無だけが異なっている(または適切な質量相違のある2種の質量タグを含む)2種の化合物(または同一の順序のB部分を含む2セットの化合物)を用いる。一方の化合物(または1セットの化合物)を「健常」組織と反応させ、質量の改変された化合物(単数または複数)を、それ以外は同一条件下で「疾病」組織と反応させる。2つの反応物をプールし、二連の様式で分析する。質量相違により、疾病組織において構造が変化しているかまたは異なる量で発現されるタンパク質が明らかとなる。別個の反応に3種以上の質量改変タグを用い、疾病進行の種々の段階の間の相違を追跡するための(すなわち、時点1で質量改変タグ1、時点2で質量改変タグ2、など)、または腫瘍サンプルなどの疾病組織の種々の組織切片を分析するための多重分析のためにプールすることもできる。

30

40

#### 【0248】

本明細書で提供される化合物との生体分子、例えば、タンパク質混合物との反応の選択性はまた、反応を速度支配下で実施することによって、および種々の時間間隔でアリコート回収することによって達成できる。あるいは、種々の並行反応を行うことができ(例えば、すべて、Q基のB部分が異なっている)、さらに種々の化学量論比を用いて実施するか、または種々の時間間隔で停止させ、別々に分析するかのをいずれかを行うこともできる。

#### 【0249】

本明細書で提供される捕獲化合物が発光または比色基を保有している実施形態では、分析前に固定化された化合物-生体分子結合体を不溶性支持体上で観察することができる。

50



結合体の観察により、どこで結合体がハイブリダイズしているかについての情報（その後のMALDI-TOF質量スペクトル分析などのための）が提供される。選択した試薬を用いる特定の実施形態では、分光光度により識別することができる色素を用いることによって、別個の実験（例えば、健常対疾病、時点1対時点2など）から所定のタンパク質の量を求めることができる。

#### 【0250】

本明細書で提供される方法に用いるための化合物が水または水性バッファーに不溶性であるか低溶解性である実施形態では、バッファーに有機溶媒を加えて溶解性を向上させる。1つの実施形態では、バッファー：有機溶媒の比は生体分子の変性が起こらないような比である。別の実施形態では、用いる有機溶媒としては、限定されるものではないが、アセトニトリル、ホルムアミドおよびピリジンが挙げられる。別の実施形態では、バッファー：有機溶媒の比は約4：1である。

10

#### 【0251】

##### 2. 表現型分析

捕獲の収集物は、プロテオームおよび他の生体分子を分析するためのトップダウン全体論的アプローチを可能にする。上記のように、有用な収集物および方法は生体分子を分析するための不偏的(unbiased)方法を提供するが、これは本方法が必ずしも特定のクラスの標的を評価するのではない。同定される変化としては、一次配列および翻訳後修飾をはじめとする修飾と関連している構造変化が挙げられる。さらに、捕獲化合物は、疎水条件での反応のために設計することもできる溶解性官能基を含むことができるので、膜結合型および膜会合型分子、特に、タンパク質の分析が可能となる。

20

#### 【0252】

プロテオーム分析に関する問題は、標的表現型とは無関係な遺伝的変異、性別、年齢、代謝状態、標的組織の細胞の複合混合物および細胞周期段階に起因する変化などの相違によるプロテオーム変化から生じる。したがって、組織および細胞の生体分子構成要素の中から変化、例えば、疾病に関係している変化を同定または検出するためには、サンプルの均一性が重要となり得る。均一性を提供するには、同一個体由来の疾病対健常などの種々の表現型を有する細胞を比較する。結果として、生体分子のパターンの相違は、個体間の相違に起因するのではなく表現型の相違に起因するものであると考えることができる。したがって、サンプルは単一の個体から得ることができ、種々の表現型、例えば、健常対疾病のおよびレスポnder対ノンレスポnderを有する細胞を分離する。さらに、バックグラウンド相違をさらに減少させるために、細胞を同調化するか、またはある代謝段階で凍結させることもできる。

30

#### 【0253】

したがって、捕獲化合物の収集物は、表現型特異的タンパク質もしくはその修飾、または他の表現型特異的生体分子およびそのパターンを同定するために用いることもできる。これは同等細胞についてある表現型を有する細胞または組織由来の生体分子サンプルを、別の表現型を有する細胞または組織由来の生体分子サンプルと比較することによって行うことができる。同一個体および細胞種由来の細胞の表現型を比較する。特に、一次細胞、一次細胞培養物および/または同調化した細胞を比較する。細胞由来の生体分子の、収集物の捕獲化合物メンバーに対する結合パターンを同定し、疾病または健常状態または他の表現型のサインまたはプロフィールとして用いることもできる。特定の結合したタンパク質などの生体分子を同定することもでき、特定のタンパク質またはその構造などの新規疾病関連マーカーを同定することもできる。

40

#### 【0254】

比較のための表現型としては、限定されるものではないが、以下を挙げる：

1) 疾病に関係しているか疾病のマーカーである、タンパク質または他の生体分子を同定するための、病変対健常細胞または組織由来のサンプル、

2) 応答を示す生体分子を同定するための、薬剤レスポnderおよびノンレスポnder（すなわち、悪性メラノーマ患者の20～30%に関してはインターフェロンに応答す

50

るが、他は応答しない)由来のサンプル、

3) 応答と関連している生体分子または応答のマーカーを同定するための、薬剤または環境条件に対する毒性プロフィールを有する細胞または組織由来のサンプル、および

4) 応答または表現型と関連しているか、またはそのマーカーであるタンパク質などの生体分子を同定するための、いずれかの条件に曝されたかまたはいずれか表現型を示す細胞または組織由来のサンプル。

#### 【0255】

一般的には、各表現型のサンプルは、細胞が本質的に適合しており、いずれの変化も細胞の供給源ではなく表現型による変化を反映しているよう、同一の生物、例えば、同一の哺乳類から得る。サンプルは一次細胞(または組織)から得ることもできる。すべての例において、表現型に関連している生体分子の同定を可能にするために、サンプルは曝露または処理前または健常な病変していない組織のいずれかである同一個体から得ることもできる。

10

#### 【0256】

細胞は特定の表現型の同定、次いでそれに基づく細胞の分離を可能にする任意の適切な方法によって分離することができる。例えば、生存している細胞を回収するパニングまたはネガティブパニング(望まない細胞を捕獲し所望する細胞を上清中に残す)などの任意の方法を用いることができる。これらの方法としては、限定されるものではないが、以下を挙げる:

1) フローサイトメトリー、

20

2) 特異的捕獲、

3) 望まない細胞を捕獲し、標的細胞を上清中に残し、生存している細胞を分析のために回収するネガティブパニング、および

4) Laser Capture Microdissection (LCM) (Arcturus, Inc Mountain View, CA)。

#### 【0257】

したがって、選別基準としては、限定されるものではないが、膜電位、イオン流出、酵素活性、細胞表面マーカー、疾病マーカーおよび表現型に基づく個体からの細胞の分離を可能にする他のそのような基準が挙げられる。

#### 【0258】

30

#### 3. 低量タンパク質の分析

重要な疾病関連マーカーおよび標的が、質量分析計によって検出されない可能性がある低量タンパク質である場合もある。確実に検出するために、第1の捕獲化合物提示実験を行うことができる。得られた捕獲されたタンパク質のアレイを、光を発する、すなわちアレイ上のより多くのタンパク質を可視的にする蛍光色素などの非選択性色素と反応させる。色素はタンパク質量の半定量的推定値を提供し得る。色素によって検出された種々のタンパク質の数を決定し、次いで、質量スペクトル分析によって検出された数と比較することができる。色素を用いた場合により多くのタンパク質が検出される場合には、質量スペクトル分析によって低量タンパク質を検出および同定できるように、より多数の出発細胞を用いて実験を繰り返すことができる。

40

#### 【0259】

例えば、ハウスキーピングタンパク質、例えば、アクチンおよび他のそのようなタンパク質は多量で存在しており、低量タンパク質をマスクしている可能性がある。捕獲化合物または他の精製化合物は、収集物を混合物の構成要素を評価するために用いる前に、多量タンパク質または生体分子を混合物から捕獲または除去するよう選択または設計される。多量タンパク質を除去した後、低量タンパク質は効果的なより高い濃度を有し、検出することができる。したがって、これらの方法は2段階: 生体分子混合物の多量構成要素、例えば、アクチンを捕獲する第1段階を含む。

#### 【0260】

また、上記で論じたように、捕獲化合物を、ゆっくりと溶解させたかまたは別の方法で

50

あるいはオルガネラおよび内膜に到達できるよう処理した細胞中の無傷のオルガネラと完全なまま相互作用させ、その後にそれを破壊するようにWを適切に選択することなどによって、設計することができる。次いで、オルガネラタンパク質および他の生体分子をそれらの三次元構造を保つ環境下で捕獲するために、脂質二重層またはミセルコーティングなどの人工膜を含むことができるものなど、捕獲したオルガネラを破壊することができる。これらの捕獲したタンパク質を分析することができる。このことにより捕獲化合物が、その天然の三次構造の状態の捕獲されたタンパク質および他の生体分子と相互作用することが可能となる。

#### 【 0 2 6 1 】

##### 4. 疾病の指標としてのタンパク質コンホメーションのモニタリング

収集物および/またはそのメンバーは、タンパク質の特異的な配座異性体を検出または識別するために用いることができる。したがって、例えば、タンパク質の特定のコンホメーションが疾病と（または健常状態と）関係している場合には、収集物またはそのメンバーは、収集物中の捕獲化合物との結合パターンに基づいて1つの配座異性体を検出または識別することができる。したがって、収集物および/またはそのメンバーを、疾病に関係しているタンパク質またはポリペプチドが疾病に関係しているコンホメーションを有する、高次構造が変化しているタンパク質病（またはタンパク質凝集の疾病）を検出するために用いることができる。本明細書に提供される方法および収集物により、検出される疾病に関係している配座異性体の検出が可能となる。これらの疾病としては、限定されるものではないが、アミロイド病および神経変性疾病が挙げられる。他の疾病、および2以上の異なるコンホメーションを示し、そのうちの少なくとも1種のコンホメーションが疾病に関係している関連タンパク質としては、以下の表に示されるものが挙げられる。

【表 6】

疾病	不溶性タンパク質
アルツハイマー病 (AD)	APP、A $\alpha$ 、 $\alpha$ 1-抗キモトリプシン、tau、非A $\alpha$ 構成要素、プレセネリン1、プレセネリン2、apo E
限定されるものではないが、クロイツフェルトヤコブ病、羊海綿状脳症、ウシ海綿状脳症をはじめとするプリオン病	PrP <sup>Sc</sup>
筋萎縮性側索硬化症 (ALS)	スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) および神経フィラメント
ピック病	ピック小体
パーキンソン病	レビ小体中の $\alpha$ -シヌクレイン
前頭側頭骨の痴呆	原線維中のtau
II型糖尿病	アミリン
多発性骨髄腫	IgGL鎖
血漿細胞悪液質	
家族性アミロイド性多発神経障害	トランスサイレチン
甲状腺の髄様癌	プロカルシトニン
慢性腎不全	$\alpha$ 2-ミクログロブリン (microgloblin)
うっ血性心不全	心房性ナトリウム利尿因子
老人性心臓および全身性アミロイド症	トランスサイレチン
慢性炎症	血清アミロイドA
アテローム性動脈硬化症	Apo A1
家族性アミロイド病	ゲルソリン
ハンチントン舞蹈病	ハンチントン

#### 【 0 2 6 2 】

本収集物を配座異性体の混合物と接触させることもでき、それぞれの型に結合するかまたはそれを保持するメンバーを同定し、そのようにして、パターンをそれぞれの配座異性体と関連付けることができる。あるいは、1種の配座異性体、例えば、疾病と関係している配座異性体とのみ結合するものを同定することができ、1種以上のそのような捕獲化合物

物からなる小収集物を疾病の診断試薬として用いることができる。

【0263】

5. 小分子の同定および生体分子 - 生体分子相互作用の研究

生体分子、例えば、タンパク質を、固定化した捕獲化合物との共有的または非共有的相互作用を用いて選別する。次いで、収集物、例えば、細胞溶解物由来のものなどの生体分子に結合した捕獲化合物のアレイを、薬剤候補のライブラリーまたは他の混合物をスクリーニングするために、あるいは結合した生体分子に結合するものを探すために生体分子の混合物をさらにスクリーニングするために用いることができる。捕獲生体分子 - 生体分子複合体または生体分子 - 薬剤候補複合体を分析して、生化学経路を同定すること、また候補薬剤を用いて標的を同定することもできる。

10

【0264】

例えば、タンパク質 - タンパク質またはタンパク質 - 生体分子相互作用を試験化合物（通常は、有機小分子、ペプチド、ペプチドミメティックス、アンチセンス分子または dsRNA、抗体、抗体の断片、組換えおよび合成抗体ならびにそれらの断片、ならびに薬剤候補またはリード化合物として働き得る他のそのような化合物をはじめとする小分子）に曝露する。結合した小分子を質量分析計または他の分析方法によって同定する。

【0265】

6. 非標的生体分子の同定

多くの医薬品が、生理学的条件下、薬物の非標的生体分子と、薬物、薬物の断片、薬物代謝産物またはプロドラッグとの相互作用から生じ得る副作用を有する。

20

【0266】

例えば、アスピリンは、非標的の Cox - 1 受容体と反応し、胃腸内の毒性、潰瘍、出血、胃の孔、肝臓壊死、肝不全、腎臓壊死、およびあるいは発作および心臓発作のような副作用を生ずる。選択性 Cox - 2 インヒビター、Cox - 2 インヒビターなど、4 - (5 - (4 - メチルフェニル) - 3 - (トリフルオロメチル) - 1H - ピラゾール - 1 - イル)ベンゼンスルホンアミド (Celebrex (登録商標)) または 4 - (4 - (メチルスルホニル)フェニル) - 3 - フェニル - 2 (5H) - フラノンなどは、非標的生体分子と薬物との相互作用の結果であり得る副作用を有する。他の例のように、チアゾリジンジオン (thiazolidinedione) (TDZ) クラスの抗糖尿病性薬物は PPAR - アクチベーターである。PPAR - タンパク質は、グルコースおよび脂質の代謝に含まれる遺伝子の調節に重要な受容体である。TDZ は、血糖 (グルコース) が適当に代謝されない糖尿病患者に処方する。しかし、TDZ ではまた、PPAR - 、トリグリセリドの合成経路に含まれる同様の構造を有するタンパク質と相互作用することも知られ、心臓血管疾患と関係することも知られている。TDZ リズリンは肝臓毒性のため市場から回収され、最近、Actos および Avandia は心臓血管性の副作用があることが Mayo Clinic の研究で報告された。

30

【0267】

薬物代謝産物もまた毒性の原因となり得る。薬物代謝に応答する幾つかの酵素系がある。1つのそのような重要な系は、主に肝臓に位置するシトクロム P450 ファミリーである。これらのタンパク質は、(通常、脂肪親和性の) 薬物分子に官能基を結合させることにより、機能する。その後、これらの官能基は、代謝物の部分 (例えば、グルクロン酸化、硫酸化など) に他の酵素を結合させることができ、それによって、それらは水溶性となり、それ故、排泄を促進する。代謝異常に関与する酵素の多形相または代謝産物が、不可逆的にシトクロム p450 (自殺阻止) を不活性化し、その排泄を妥協して処理し、可能性として肝臓に毒性が蓄積するならば、毒性が生じ得る。例えば、腎臓、肺、または心臓において代謝するこれらの代謝系の存在により、同様の薬物毒性がそれらの臓器で観察され得る。

40

【0268】

本明細書で提供するその捕獲化合物 / 収集物を用い、受容体および酵素 (これらに限らず) を含む医薬品 / 薬物の断片、薬物代謝産物またはプロドラッグと相互作用する薬物の

50

非標的生体分子を同定し得る。薬物相互作用するタンパク質の同定および特性解析はまた、予測できない別の薬理学的な利点を導き得る。予測できない他の生物学的経路において、薬物の標的が発見され、それにより、他の疾患を治療する薬物の適用が可能となることがある。ある疾患に対しては効能のない（または毒性がきつすぎる）失敗の薬物は、他の疾患に対しては大ヒット商品となるかもしれない。

#### 【0269】

1つの実施態様では、捕獲化合物/収集物は、選択性官能基および適当な反応性および選別官能基として医薬品/薬物の断片、薬物代謝産物またはプロドラッグを含むように設計する。本明細書で提供する方法では、その捕獲化合物/収集物は、受容体タンパク質（これに限らない）を含む、薬物の標的および非標的生体分子の混合物と相互作用することができる。次いで、捕獲した生体分子が分析され、薬物の標的および非標的生体分子を同定する。薬物の非標的生体分子のスクリーニングおよび同定は、医薬品の副作用理解の助けとなり、薬物構造を修飾してその副作用を排除または最小化する一方、効力は維持することができる。本明細書で提供する方法および収集物に使用し得る例示的な薬物分子は、本明細書の他の部分でも開示しており、そして、以下を含むが、これらに限らない：アトルバスタチンカルシウム、セレコキシブ、コキシブ（refecoxib）およびセリバスタチンナトリウム。

#### 【0270】

一旦、タンパク質が、薬物と相互作用すると同定されると、多くのタンパク質の機能に注釈を付けている公のデータベースで検索し、その構造が、観察されている副作用または治療反応と関連するようであるかどうか決定する。タンパク質の機能が不明の場合には、バイオインフォマティクスおよび機能的ゲノムツールを利用できる。これらには、配列アライメント、薬理作用団、相同モデルおよびタンパク質モチーフ相関を含むインシリコ（*in silico*）アプローチ（バイオインフォマティクス）；肝臓ミクロソーム代謝経路（例えば、P450）、cDNA-発現酵素、酵母経路に対するシグナル経路およびバック-マッピング、刺激および取り出したタンパク質のタンパク質/タンパク質相互作用を含むインビトロアプローチ；天然の多形性、ノックアウト/ノックイン、フローサイトメトリー、薬物の治療活性（すなわち、治療プロファイルおよび実験的な毒性、および予測遺伝子型決定および予測表現型決定を含むインビボアプローチが含まれる。細胞に基づくアッセイおよびリボザイムに基づくノックイン/ノックアウト技術と関連する上記アプローチを用い、上記同定した何れのタンパク質が治療または毒性効果と関連するか決定し得る。

#### 【0271】

##### 7. 薬物の再設計

殆どの薬物開発プロジェクトの重要な目的は、良好（*positive*）な治療結果をもたらす薬物とその標的との相互作用を最大限とし、その一方、他のタンパク質との相互作用を最小限とすることである。目的とする標的以外のタンパク質との相互作用は、副作用を生ずる細胞性イベントのカスケードを誘発する。本明細書で提供するのは、目的の標的と相互作用するが他の相互作用は最小限とする薬物の設計が可能な方法である。ここで、捕獲化合物の選択性官能基は、薬物分子またはその代謝物のうちの1つであり、それは、化学的に関連する異なる向きで結合する。上記の手順後、薬物と相互作用するタンパク質（標的および非標的）およびそのそれぞれの推定機能が同定され、治療または副作用関連経路に含まれる可能性のあるすべての細胞型についてスクリーニングする。以前に患者で観察された薬物の治療効果および副作用の知識は、どの捕獲タンパク質が望ましい治療効果を生じ、どれがその副作用に関与するかについての仮定の形成を容易にする。

#### 【0272】

これらの方法を用い、薬物の化学的構造を反復して最適化するか、設計し直すことができ、それは、望ましい標的タンパク質相互作用を維持するかまたは促進し、非標的相互作用を生ずる構造的特徴を排除しつつ行う。このプロセスは臨床前試験で行うことができるため、コストおよび時間の飛躍的な節約を行うことができる。その結果は、種々のおよび

10

20

30

40

50

特許性のある新規化学物質（NCE）であり、それは、臨床試験に再導入され得る。臨床試験時間の短縮が予想される。なぜなら、関連する親薬物分子からの効力データが既に利用可能であるからであり、NCEは、臨床試験プロセスに入る前に副作用の低減化の最適化を構造的に行うことができるからである。臨床試験の成功率の増加は、薬物開発の時間および特にコストを削減に非常に効果がある。

#### 【0273】

これらの方法を用い、分析を行い、薬物と相互作用するすべてのタンパク質のセットを同定し、下流域の細胞性（機能性）アッセイを用い、どのタンパク質相互作用が副作用に最も応答するようであるかを確認する。薬物化合物は、タンパク質との相互作用を維持する、疾患分野で試験されたすべての薬物由来のデータを考慮して再設計し、良好な治療効果を生ずるが他のタンパク質相互作用を最小限とする。

10

#### 【0274】

これらの方法を用い研究され得る例示的な疾患には、以下が含まれる：

##### （1）糖尿病

糖尿病およびその主な危険要因の肥満は、今後十年間、欧米人が直面する、増大する健康危機となろう。リズリン（Rezulin）（トログリタゾン（Troglitazone））は市場から回収され、MK-767は、最近、フェーズIII試験から撤退し、他の薬物（例えば、アクトス（Actos）、アバンディア（Avandia））の販売は、全部、副作用のために、障害となっている。

20

#### 【0275】

##### （2）心臓血管

ほぼ100万人のアメリカ人が、血流中のコレステロールのレベルの上昇が原因の動脈の閉塞により、毎年、心臓血管疾患で、心臓発作および発作ではより多くが死亡している。しかし、Lipitorを含むスタチンの処方の割合は副作用に影響される：これらの薬物を服用する患者に、肝臓の損傷といった毒性の効果が生じていないことを医師が監視すべきである。

#### 【0276】

##### （3）関節炎 / 疼痛 / 炎症

胃腸およびある場合には冠状動脈での副作用の報告が、抗-炎症性COX-2インヒビター、ピオックスおよびセレブレックスの販売を制限している。なぜなら、多くの医師が、イブプロフェンのような遙かに効果の低い薬物を軽い炎症徴候に処方することを除き、患者により安全な策を講じるように進めるためである。

30

#### 【0277】

##### F. システム

さらなる実施形態では、本明細書に記載された化合物および方法を、以下の処理ステップを標準化し、自動化する総合的なシステムの中に位置付けられるよう設計する：

- ・細胞溶解物からのタンパク質の単離をはじめとする、生体分子の生物学的供給源からの単離（溶解、酵素消化、沈殿、洗浄）

- ・必要に応じて、低分子量物質の除去

- ・必要に応じて、生体分子混合物、例えば、タンパク質混合物のアリコート作製

40

- ・生体分子混合物、例えば、タンパク質混合物の、本明細書で提供する種々の化学反応性（X）および配列多様性（B）の化合物との反応（このステップは生体分子混合物のアリコートをを用いて並行して実施することができる）

- ・必要に応じて、過剰の化合物の除去

- ・化合物 - 生体分子結合体、例えば、化合物 - タンパク質結合体の、化合物のQ部分に相補的である一本鎖オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体とのハイブリダイゼーション；一本鎖オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体は必要に応じてアレイ形式で提示されていてもよいし、必要に応じて不溶性支持体上に固定化されていてもよい

- ・必要に応じて、続いて、タンパク質アレイの化学的または酵素的処理

50

・限定されるものではないが、( i )マトリックスの脱離、および( i i )アレイ質量分析計(較正および定量のための内部分子量標準、例えば、オンチップ分子량標準を含むかまたは含まない)を用いるスポット毎( s p o t - b y - s p o t )のMALDI - T O F質量分析というステップを含む、生体分子アレイの分析。

【 0 2 7 8 】

さらなる実施形態では、本明細書に記載された化合物および方法を、以下の処理ステップを標準化し、自動化する総合的なシステムの中に位置付けられるよう設計する：

細胞溶解物からのタンパク質の単離をはじめとする、生体分子の生物学的供給源からの単離(溶解、酵素消化、沈殿、洗浄)

必要に応じて、低分子量物質の除去

必要に応じて、生体分子混合物、例えば、タンパク質混合物のアリコート作製

生体分子混合物、例えば、タンパク質混合物の、本明細書で提供する種々の化学反応性( X )および配列多様性( B )の化合物との反応(このステップは生体分子混合物のアリコートを用いて並行して実施することができる)

必要に応じて、過剰の化合物の除去

タンパク質アレイの化学的または酵素的処理

続いて、化合物 - 生体分子結合体、例えば、化合物 - タンパク質結合体の、化合物のQ部分に相補的である一本鎖オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体とのハイブリダイゼーション；一本鎖オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体は必要に応じてアレイ形式で提示されていてもよいし、必要に応じて不溶性支持体上に固定化されていてもよい

限定されるものではないが、( i )マトリックスの脱離、および( i i )アレイ質量分析計(較正および定量のための内部分子量標準、例えば、オンチップ分子量標準を含むかまたは含まない)を用いるスポット毎( s p o t - b y - s p o t )のMALDI - T O F質量分析というステップを含む、生体分子アレイの分析。

【 0 2 7 9 】

このシステムは本明細書で提供される収集物、必要に応じてはそのような収集物のアレイ、サンプル調製および機器分析のプロセスを制御するための、および得られたデータを分析するためのソフトウェア、ならびに生体分子の分析のための質量分析計のような機器を含む。このシステムはタンパク質混合物が少なくとも部分的に分離されるような、他の装置、例えば、液体クロマトグラフィー装置も含む。溶出液をアリコートの連続系列で、例えば、マイクロタイタープレート中に回収し、それぞれのアリコートを提供される捕獲化合物と反応させる。

【 0 2 8 0 】

複合反応では、各ウェルのアリコートを同時に、例えば、各々Xが異なっており(すなわち、アミノ、チオール、レクチン特異的官能基)、特異的かつ識別可能な選択性部分Yを含み、Q基が異なっている、本明細書で提供される1種以上の捕獲化合物と反応させることができる。水性または有機性媒体中でクロマトグラフィーを行うことができる。得られた反応混合物をプールし、直接分析する。あるいは、その後、質量スペクトル分析をはじめとする分析の前に、二次反応または分子相互作用研究を実施する。

【 0 2 8 1 】

本明細書で提供されるシステムは、x yステージ上のピペッティングロボットなどのアセンブリラインを含むことができ、試薬供給/洗浄モジュールが中心分離装置ならびに分析およびデータ解釈のための末端の質量分析計と接続されている。このシステムは、例えば、以下をはじめとする処理ステップを実施するようにプログラムすることができる(例えば、図2参照)。

【 0 2 8 2 】

1)細胞培養物(または組織サンプル)を、1、2・・・i個のウェルを有するマイクロタイタープレート(MTP)中に準備する。各ウェルに、細胞の溶解のための溶液を加えて、タンパク質を遊離させる。一部の実施形態では、適切な洗浄ステップ、ならびに、

核酸および他の非タンパク質成分を消化するための酵素を添加するステップが含まれる。さらなる実施形態では、通常のMTPの代わりに、ウェルの底部にフィルタープレートを備えたMTPを用いる。細胞細片を濾過または遠心分離のいずれかによって除去する。適切な分離処理のためのコンディショニング溶液を添加し、各ウェル由来の物質を別々に分離装置に入れる。

【0283】

2) 分離には電荷、分子の大きさ決定、吸着、イオン交換および分子排除原理などの種々の分離原理を活用する。サンプルの大きさによって、適切な寸法のもの、例えば、マイクロボア高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いる。特定の実施形態では連続フロープロセスを用い、流出液をMTP 1、2・・・n中に連続的にアリコートとする。

10

【0284】

3) プロテオーム試薬との反応。次いで、各MTPを、オリゴヌクレオチド配列部分(すなわち、Q)のみか、またはノかつ、タンパク質と反応する官能基(すなわちX)の化学的性質が異なっている、1、2・・・m種の試薬を含有しているプロテオーム試薬ステーションに移す。1種の組織サンプルに由来する1以上のMTPが存在する場合には、それぞれのMTP 1、2・・・nの同一ウェル、すなわち、ウェルA1に試薬1を加え、試薬2をウェルA2というように加える。MTPが96ウェルを有する( $i = 96$ )実施形態では、96種の種々のプロテオーム試薬(すなわち、96種の種々の本明細書で提供される化合物 $m = 1 \sim 96$ )を、相互汚染を防ぐためにプロテオーム試薬ステーションから96の異なるノズルを通して供給する。

20

【0285】

4) プールする：過剰のプロテオーム試薬を不活化し、1種の同一組織サンプルに属する各ウェル由来のアリコートをプールし、残存する物質を、無傷のタンパク質の構造(および必要に応じてコンホメーション)を保存する条件で保存して、その後の実験のマスターMTPとして用いる。

【0286】

5) プールしたサンプル中の過剰のプロテオーム試薬を、例えば、磁性ビーズを用いるピオチン/ストレプトアビジン系を用いて除去し、次いで、上清を濃縮し、ハイブリダイゼーションのためにコンディショニングする。

【0287】

30

6) オリゴヌクレオチドチップへのトランスファー。ハイブリダイズしていない物質および他の低分子量物質を除去するための洗浄ステップの後、マトリックスを加える。あるいは、マトリックス添加の前に、例えば、トリプシンまたはノおよびキモトリプシンでの消化を行う。酵素および消化産物を洗い流した後、マトリックスを加える。

【0288】

7) チップの質量分析計への移動。1つの実施形態では、MALDI-TOF質量分析を実施する。タンパク質分析に適切な他の質量分析構成を適用することもできる。質量分析計はxyステージを有しており、それにより分析のためのスポットの各位置上をラスターする。プロテオーム試薬は試薬部分のほとんど(オリゴヌクレオチドチップアレイとハイブリダイズする部分を含む)が、質量分析の前またはその間に切断され、したがってスペクトルの低分子量領域で検出される、これにより質量スペクトルにおいてペプチド(酵素消化の場合には)またはタンパク質分子量シグナルからうまく分離されるように設計することができる。

40

【0289】

8) 最後に、分子量シグナルは、ノイズ減少、バックグラウンド減算および他のそのような処理ステップのために処理することができる。得られたデータを保存し、解釈することができる。タンパク質(または酵素消化後に得られたペプチド)の分子量値をヒトDNA配列情報およびタンパク質コード領域から導かれたタンパク質配列情報と関連付ける。利用できるデータベースとの相互関係によって、タンパク質およびその機能が既に知られているかどうかは明らかになる。機能が未知である場合には、その機能およびそれに続く

50



て、健常な個体においてまたは疾病を患う個体の疾病経路においてどこでその代謝的役割を果たすかという生化学的経路内での位置を解明するために、標準的な方法を用いて既知のDNA配列からタンパク質を十分な規模で発現させることができる。

#### 【0290】

所定の組織サンプル内の種々のタンパク質由来のアリコートを含むマスタープレートが保存されており、利用可能であるので、その後の実験はここで予め選んだ方法で実施することができる。例えば、標的確認のためのタンパク質 - タンパク質（生体分子）相互作用研究のために、またはノおよび薬剤候補選抜のために小分子のコンビナトリアルライブラリーとの相互作用を研究するために、タンパク質をチップ表面に提示する。

#### 【0291】

##### G. バイオインフォマティクス

化合物 - タンパク質種の質量スペクトル分析のような分析により得られた生データをバックグラウンド減算、ノイズ減少、分子量校正およびピークリファインメント（例えば、ピーク積分）によって処理する。切断されたタンパク質または消化産物の分子量値を解釈し、既存のタンパク質データベースと比較して当該タンパク質が既に知られているかどうか、またそうである場合には、どんな修飾が存在するか（グリコシル化されているかグリコシル化されていないか、リン酸化されているかリン酸化されていないかなど）を決定する。化合物の1つのセットに属する実験の種々のセットを構成し、比較し、解釈する。

#### 【実施例】

#### 【0292】

市販等級の溶媒および試薬を、特記しない限りは精製せずに用いた。 $^1\text{H}$  NMRスペクトルデータは溶媒として $\text{CDCl}_3$ を用いて500 MHz NMR分光光度計から得た。質量スペクトルデータはエレクトロスプレー法を用いて分析した。

#### 【0293】

##### 実施例 1

##### $N^1_m B_i N^2_n$ の実施例

- a. 同一の四量体としての $N^1$ および $N^2$ 、三量体としての $B$   
 $N^1 = N^2$ 、 $m = n = 4$ 、 $i = 3$ 、 $B = 64$ 通りの配列並べ替え

#### 【化30】

GTGC ATG GTGC

AAG

ACG

#### 【化31】

AGG

TTG

CTG

GTG

...

...

...

GGG

#### 【0294】

- b. 同一でない四量体としての $N^1$ および $N^2$ 、四量体としての $B$   
 $N^1 \neq N^2$ 、 $m = n = 4$ 、 $i = 4$ 、 $B = 256$ 通りの配列並べ替え

## 【化 3 2】

GTCC ATCG CTAC

AACG

ACCG

AGCG

....

....

....

GGGG

## 【 0 2 9 5】

c. 七量体としての  $N^1$ 、八量体としての  $N^2$ 、八量体としての B $N^1 \pm N^2$ 、 $m = 7$ 、 $n = 8$ 、 $i = 8$ 、 $B = 65$ 、536通りの配列並べ替え

## 【化 3 3】

GCTGCCC ATTCGTAC GCCTGCCC

$N^1$	B	$N^2$

## 【 0 2 9 6】

## 実施例 2

DNA アレイ上でのタンパク質の分離

 $N^1_m B_i N^2_n (S^1)_t M(R^{15})_a (S^2)_b L X$  タンパク質 (ここで、B は三量体)、 $m = n = 4$ 、 $i = 3$ 、 $t = b = 1$ 、下線を引いた配列は  $N^1$  および  $N^2$  である

## 【化 3 4】

/	<u>CTGC</u> ATG <u>GTGC</u> - $S_1$ - $M(R^{15})_a$ - $S_2$ - L - X - タンパク質 1
/	-- <u>CACG</u> TAC <u>CACG</u>
/	
/	<u>CTGC</u> AAG <u>GTGC</u> - $S_1$ - $M(R^{15})_a$ - $S_2$ - L - X - タンパク質 2
/	-- <u>CACG</u> TTC <u>CACG</u>
/	
/	<u>CTGC</u> ACG <u>GTGC</u> - $S_1$ - $M(R^{15})_a$ - $S_2$ - L - X - タンパク質 3
/	-- <u>CACG</u> TGC <u>CACG</u>
/	...
/	...
/	...
/	<u>CTGC</u> GGG <u>GTGC</u> - $S_1$ - $M(R^{15})_a$ - $S_2$ - L - X - タンパク質 64
/	-- <u>CACG</u> CCC <u>CACG</u>

## 【 0 2 9 7】

## 実施例 3

ドープしたカルボニックアンヒドラーゼ II を伴う HEK 293 細胞性画分からの標的タンパク質の捕獲およびプルダウン (pull-down)

## 【 0 2 9 8】

## 必要な物質:

20 mM Hepes 緩衝液、pH 7.2.

200  $\mu$ l 20 mM Hepes、pH 7.2 を加え、凍結乾燥化カルボニックアンヒドラーゼ II (Sigma) を元に戻す。エッペンドルフ (登録商標) チューブに移す。

ワーキングストックの濃度を算出し (以下のプロトコール参照)、同じ緩衝液を用いスト

10

20

30

40

50

ックを作成し、マスターストックを作成する。マスターストックを長期保存のため凍結させる。

【0299】

HEK293細胞性画分をFPLC分画し、塩勾配により複数画分を回収する。

【0300】

10 mM DMSOストック中に捕獲化合物を溶解する。メタノール中の捕獲化合物Aのワーキングストックを作成する。毎週新しいストックを作成し、氷上でアルミホイルで遮光して保持する。

【0301】

スピンカラム（約500  $\mu$ l ベッド体積）に通す。ごく少量、20  $\mu$ l および100  $\mu$ l までのサンプルを扱う。

【0302】

Soft-Link（アビジン）樹脂：樹脂を、3 x 1 ml（100  $\mu$ l 樹脂アリコートの場合）の20 mM Hepes、pH 7.2 で洗浄する。プルダウン実験で用いる樹脂の量と一致させるため、洗浄の最後に、固体/液体の比を正確に維持するように注意すべきである。

【0303】

プルダウン用の洗浄緩衝液：Hepes / NaCl / TX100 / EDTA / DTT。最初の4つの成分を有する緩衝液ストックを正確な濃度およびpHで最初に作成し、次いで、別々に1 M DTTストックを作成し、そして使用するまで少量のアリコートで凍結する。プルダウン実験の洗浄手順（工程H）の直前にDTTストックチューブを融解し、必要な最終物にDTTストックを加える。各プルダウンチューブには、~ 1 ml の洗浄緩衝液が必要である。

Sigma mass quality water

【0304】

実験プロトコール：

A. 反応プレート上のウェルに、25  $\mu$ l FT293、x  $\mu$ l のカルボニックアンヒドラーゼIIストック、y  $\mu$ l の化合物ストック溶液、および25 - x - y  $\mu$ l の20 mM Hepes 緩衝液、pH 7.2 をピペットする。50  $\mu$ l の反応ではyの値は2.5  $\mu$ l 以内とする。混合物中のFT画分を最終混合物で2倍に希釈する。S100では、3倍を超える希釈を必要とする。特定の実施態様では、50  $\mu$ l 反応のS100では15  $\mu$ l を用い、従って、緩衝液体積を変える。

【0305】

B. それら3つを3回ピペットアップおよびダウンを行うことにより完全に混合する。

【0306】

C. 反応混合物を暗室にて30分間、インキュベートする

【0307】

D. そのインキュベーション後、光反応を行う。高輝度で広帯域の写真用フラッシュランプ（Alien BeesのB1600）によるフラッシュでマイクロタイタープレートが過剰に加熱されないように注意しなければならない。合計~ 20 - 40 ショットを用いる。

【0308】

E. 光反応後のサンプルのスピンカラム処理は、約1  $\mu$ Mの捕獲化合物を有する混合物には必要がない。10  $\mu$ Mを超える化合物を用いる反応の場合、結合前のスピンカラム処理によりプルダウンの標的シグナルが改善し得る。

【0309】

F. 捕獲したタンパク質を、ビオチン/アビジンを用い単離する。上記のようにSoft-Link樹脂を洗浄する；ビオチンでは事前に処理しない。結合およびプルダウン、それぞれの場合、ストリップ上の1つのPCRチューブ中へ、上部で完全に樹脂および液体を混合した後に樹脂のスラリー5  $\mu$ l を加え、次いで、光反応またはスピンカラムの後

10

20

30

40

50

に反応混合物 20  $\mu$ l を加える。内容物の放出前にチューブの下部にチップが確実にあるように注意すべきであり、ピペットマンチップはチューブの内側の壁、特に上部部分にふれないようにすべきである。30 分間、室温で結合チューブを回転させる。

【0310】

G. 2 分間、遠心分離でチューブをスピンする。上清を注意深く取り去る。可能な限り樹脂を全く喪失することなく液体を取り出すように努めるべきである。

【0311】

H. 200  $\mu$ l の洗浄緩衝液を各チューブに加え、4 分間同じ設定で回転させる。その工程の間、樹脂および液体が十分に混合するようにする。

【0312】

I. スピンし、工程 G に記載のように上清を取り除く。

【0313】

J. 洗浄緩衝液による 4 回の洗浄の後、水を置換し、更に 4 回洗浄を行う。水での最後の洗浄後、完全に上清を取り去り、上部に水 2  $\mu$ l を加える。

【0314】

K. 樹脂および水を十分に混合し、1  $\mu$ l をマスプレートスポットに乗せ、1 または 2 分間、風を当て、スポットを少し乾燥させ（完全に乾燥させない）、マトリックス 1  $\mu$ l を加え、4 回ピペットアップおよびダウンする。

【0315】

L. SDS - PAGE がサンプルに必要なものであるなら、銀染色 (Invitrogen の Silver Quest kit) を用い、プルダウンのタンパク質を検出し得る。通常、半分のプルダウン樹脂が、この目的のために、SDS - PAGE サンプル緩衝液で溶出する。

【0316】

#### 実施例 4

##### 結合強度の決定（解離定数）

このアプローチは、光分解は、共有結合架橋に対する活性化により、非常に早い時間スケールで生ずるという観察に基づいている（ナノ秒からミリ秒、光活性化部分に依存）。それ故、平衡での酵素 - 基質複合混合物のスナップショットを生ずる光分解を用いることが考えられ得る。共有結合的に架橋した酵素 - 基質の量は、平衡での酵素 - 結合基質（捕獲化合物）の量に直接比例する。最も重要なことに、開始酵素の僅かな量ぐらいのこの量は、プルダウン工程後に off - the - shelf Maldi Machine を用いることにより、非常に容易で信頼のある測定が可能となる。

【0317】

##### 平衡分析

分析の始めは解離定数の定義である。

$$K_d = [S][E] / [SE]$$

式中、[S]、[E] および [SE] は、遊離基質、遊離酵素および基質 - 酵素複合体のそれぞれの濃度である。この等式をより有用にするために、以下のようなより直ちに測定可能である変数を用いる等式で書き換えることができる：

[S<sub>0</sub>] = 基質の初期濃度

[E<sub>0</sub>] = 酵素の初期濃度

【0318】

それ故、以下の等式が得られる。

$$K_d = ([S_0] - [SE])([E_0] - [SE]) / [SE]$$

【0319】

これは、K<sub>d</sub>、S<sub>0</sub> および E<sub>0</sub> の単純な関数として複合体の濃度が得られる単純な二次方程式である。

【0320】

$$[SE] = 1 / 2 (S_0 + E_0 + K_d - \text{Sqrt}((S_0 + E_0 + K_d)^2 - 4S_0E_0))$$

10

20

30

40

50

$E_0$  ) )

基質濃度が複合体濃度よりも遙かに高くなる、すなわち、 $([S_0] \gg [SE])$  という仮定により等式を更に単純化し得る。この場合、以下のように単純化する。

$$[SE] = E_0 / (1 + K_d / [S_0])$$

【0321】

光分解後

中心となる仮定は、光分解工程が非常に迅速な工程であり、そのため、共有結合的に架橋した基質酵素複合体が平衡にある複合体の量と直接比例するというものである。すなわち、我々は平衡濃度のスナップショットを実際にとっているのである。

【0322】

を共有結合的架橋複合体への結合複合体の変換効率とすると、共有結合的架橋複合体の濃度は、 $[SE]$  となる。

【0323】

プルダウン後

基質がバイオチニル化合物であるならば、プルダウン実験で、共有結合的に捕獲した複合体が単離されるだろう。プルダウン効率を  $\eta$  とする。Maldi 内のこの複合体のピーク面積、 $A$  により、プルダウン複合体の直接の測定濃度が得られる。

$$A = \eta * E_0 / (1 + K_d / [S_0])$$

【0324】

完全  $K_d$  測定

上記等式から、 $A$  と基質の初期濃度との間には非常に単純な関係がある：

$$\ln(A) = \ln(\eta) + \ln(E_0) - \ln(1 + K_d / [S_0])$$

【0325】

更に、 $K_d \ll [S_0]$  と仮定すると、最終的に以下の等式が得られる。

$$\ln(A) = \ln(\eta) + \ln(E_0) - K_d / [S_0]$$

【0326】

そのため、 $1/[S_0]$  に対して  $\ln(A)$  をプロットすることにより、直線近似の勾配から  $K_d$  を得ることができる。

【0327】

N.B. 外部標準が、 $[S_0]$  の種々の値を有するサンプルから取得したスペクトルの正規化に必要となるかもしれない。

【0328】

$K_d$  差測定

外部標準の使用ができず、または望ましくない場合、 $K_d$  の差を測定することもできる。捕獲され、プルダウンされ、およびマスマスペクトルされる2種の酵素があると想定する。非常に選択的な化合物の場合、光分解およびプルダウン効率も非常に似ていると見なされるのは理にかなっている。その解離定数が  $K_d^1$  および  $K_d^2$  であるとする、それぞれ、初期酵素濃度は  $E_0^1$  および  $E_0^2$  であり、それぞれの Maldi ピーク面積は  $A^1$  および  $A^2$  である。以下の等式が得られる。

$$\ln(A^1 / A^2) = \ln(E_0^1 / E_0^2) - (K_d^1 - K_d^2) / [S_0]$$

【0329】

このため、 $1/[S_0]$  に対し、相対面積の自然対数をプロットすることにより、解離定数の差、 $(K_d^1 - K_d^2)$  が、直線近似の勾配から直接決定され得る。この分析の魅力的な特徴は、相対面積を扱うため、種々のスペクトルからの面積を正規化する必要がないことである。

【0330】

実施例 5

経口血糖降下薬 / 抗糖尿病薬：

チアゾリジンジオン（グリタゾン（Glitazone））：トログリタゾン（リズリン（商標））ロシグリタゾン（アバンディア（商標））およびピオグリタゾン（Pioglitazone）

10

20

30

40

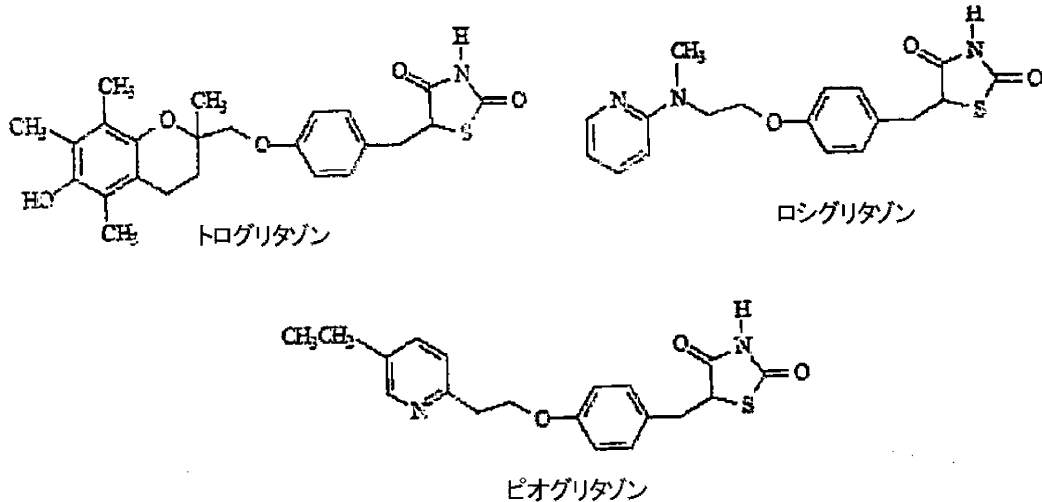
50

itazone) (アクトス (商標))

# I. 開発および薬理学

トログリタゾン (リズリン (商標)) は、上市された最初のチアゾリジンジオンであり、インスリンを受けている、また、単剤療法として受けているインスリン - 耐性患者の治療に適応された。トログリタゾンは、肝障害への関与から市場から回収されるまで、用いられていた。しかし、2つの新しい「グリタゾン」が近年認可され、これらの薬物は特にインスリン耐性を標的とする。これら新しいグリタゾン、それぞれはまた、副作用を有している。

## 【化35】



## 【0331】

チアゾリジンジオンは、作用についてはインスリンの存在に依存する。しかし、それらは、インスリン分泌に影響を与えない。チアゾリジンジオンは選択性が高く、多数のインスリン応答遺伝子の転写を調節するペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) の強力なアゴニストである。PPAR受容体は、脂肪組織、骨格筋および肝臓のようなインスリン作用の、鍵となる標的組織内で発見され得る。PPAR - 受容体の作用は、グルコース生成、輸送、および利用の制御に含まれるインスリン - 応答遺伝子の転写物を調節する。例えば、これら受容体の刺激は、GLUT1およびGLUT4受容体の産生を増大し得る。更に、PPAR - 応答遺伝子はまた、脂肪酸代謝の調節の役割をもする。経口用のスルホニル尿素とは異なり、ロシグリタゾンは、インスリン分泌を刺激する以外にインスリンに対する組織感度を促進する。また、このメカニズムに基づくと、これらの薬物では、その作用を十分に発揮するのに (そのため、その可能性を評価するのに) 数週間かかり得る。

## 【0332】

前臨床研究では、これらの薬物は、肝臓グルコース排出が減少し、骨格筋のインスリン - 依存グルコース処理を増大することが示された。糖尿病の動物モデルでは、これらの薬物は、NIDDMのようなインスリン耐性状態に特徴的な高血糖症、高インスリン血およびトリグリセリド過剰血を減少する。

## 【0333】

### II. 副作用:

最小限の低血糖症: 今日、低血糖症は、比較的少数のグリタゾン - 治療患者で観察された。グリタゾンと組み合わせる積極的なインスリン投薬は、更なるHbA1cの減少と関係するが、低血糖症のリスクの増大とも関係する。

## 【0334】

トログリタゾン (troglitazone) とは対照的に、薬物誘導性肝細胞毒性の証明は、ピオグリタゾン (pioglitazone) またはロシグリタゾン (rosiglitazone) の臨床試験では示されていなかった。しかし、FDAは、グリタゾ

10

20

30

40

50

ン治療の開始より、治療一年目の間、2ヶ月おきに肝機能のモニタリングを推奨している。患者はまた、吐き気、嘔吐、腹痛、疲労、食欲不振、暗色尿、または黄疸のような肝機能異常を示唆する徴候および症状をモニターすることをアドバイスされるべきである。

【0335】

浮腫、低血糖症、知覚異常、およびクレアチニンホスホキナーゼ（CPK）の上昇が、幾人かのピオグリタゾン - 治療患者で生じた。ヘモグロビンおよびヘマトクリットの減少もまた観察された。

【0336】

チアゾリジンジオンは、前糖尿病者と糖尿病患者の両方でインスリン耐性を減少する薬理的化合物である。チアゾリジンジオンはPPAR-2のリガンドである。PPAR-2は、含脂肪細胞、腸、およびマクロファージにおいて優性的に発現する。低レベルの発現がまた、筋細胞で生じ得る証明が幾つかある。PPAR-受容体は、多くの遺伝子の発現を調整する転写因子である。インスリン感受性におけるチアゾリジンジオンの効果が、PPAR-2 - 依存遺伝子の発現の変化を介すると考えられる。

【0337】

上記考察のように、抗糖尿病薬としてのチアドリジンジオン（thiadolidinedione）は明らかに毒性および望ましくない副作用を示す。チアゾリジンジオン（グリタゾン）：トログリタゾン（リズリン（商標））ロシグリタゾン（アバンディア（商標））およびピオグリタゾン（アクトス（商標））は「捕獲化合物（CC）」に結合するだろう。CC - チアゾリジンジオンは、腎臓、肝臓、膵臓、結腸上皮および筋細胞と共にインキュベートされる。リズリン、アバンディアおよびアクトスはPPAR-、PPAR- および非標的タンパク質を捕獲する。これら3つの薬物は、異なる代謝および薬物動力学を有しており、それ故、それらは、種々の非標的タンパク質を捕獲すると予測される。上記考察のように、チアゾリジンジオンの抗糖尿病性作用は、PPAR- タンパク質に結合することにより生ずる。チアゾリジンジオンの構造活性相関（SAR）および結晶構造およびチアゾリジンジオンと共に共結晶したPPAR- は文献中で知られている。

【0338】

チアゾリジンジオンの望ましくなく、毒性の副作用は、PPAR- および 非標的タンパク質との相互作用に起因し得る。CCMSのToxPro応用を用い、各薬物に結合するすべてのタンパク質、およびそれら各々の結合定数を同定する。CCMS技術による非標的タンパク質の同定の後、反復工程によりチアゾリジンジオンを化学的に再設計し、PPAR- および非標的タンパク質への結合を阻止しつつ、標的タンパク質PPAR- との相互作用を保持する。

【0339】

リズリン：

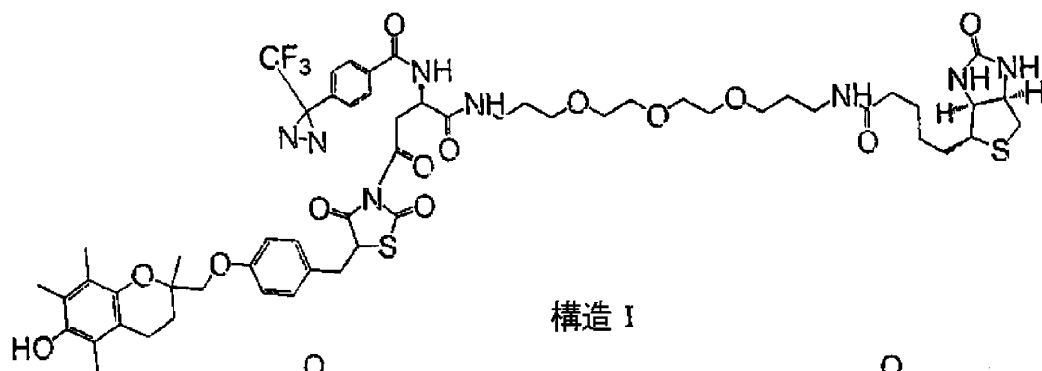
リズリンは、以下に示すように捕獲化合物に結合する：

10

20

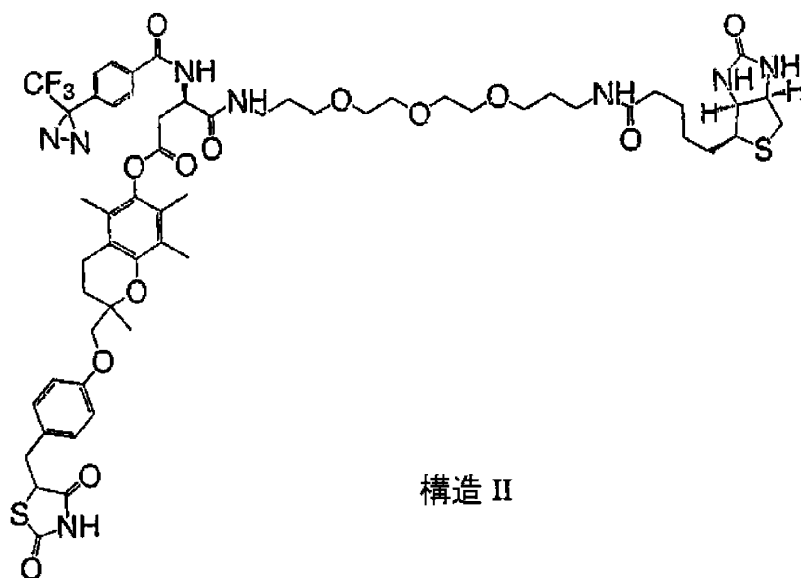
30

## 【化 3 6】



構造 I

10



構造 II

20

リズリンは、肝臓で p - ヒドロキシグルコースおよび硫酸塩複合体に代謝される。それにより構造 I I が考えられる。

## 【 0 3 4 0】

リズリン捕獲化合物構造 I および I I を腎臓、肝臓、脾臓、結腸上皮、および筋細胞と共にインキュベートする。標的タンパク質 P P A R - および非標的タンパク質 P P A R - およびタンパク質 A、B および C を捕獲する。

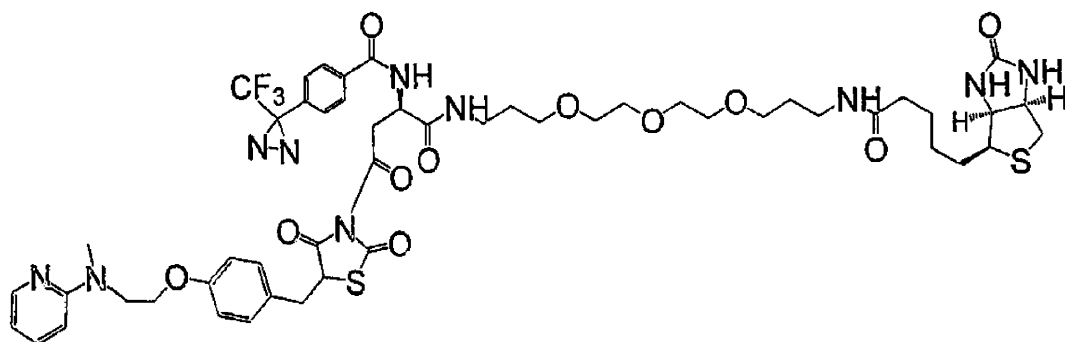
30

## 【 0 3 4 1】

アバンディアおよびその代謝産物：

アバンディアは、以下に示すように捕獲化合物に結合する：

## 【化 3 7】



40

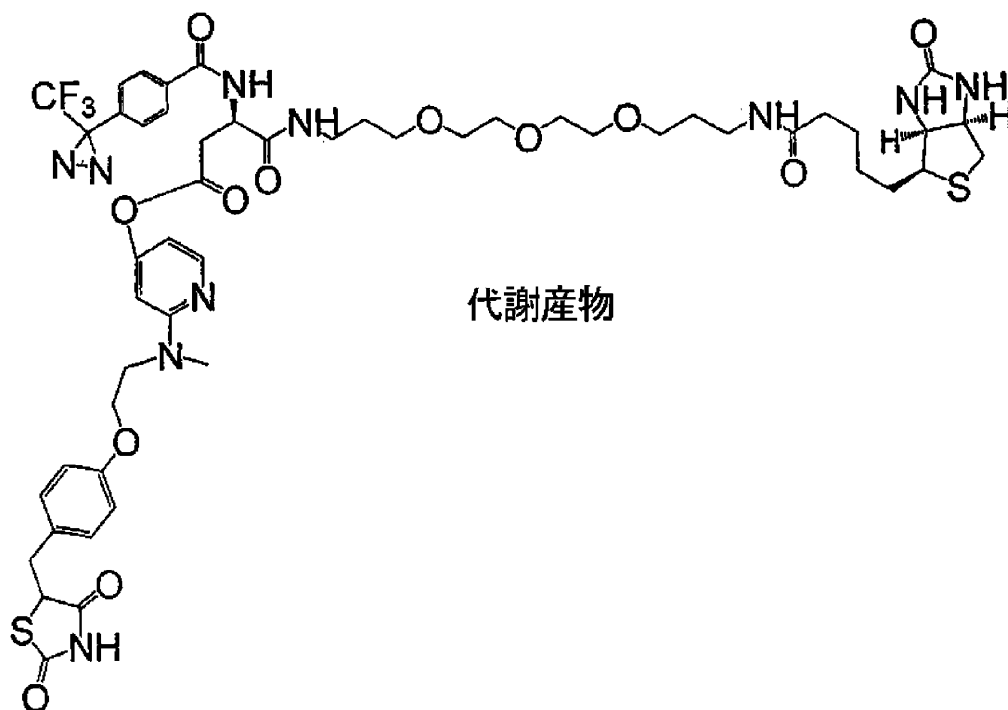
## 【 0 3 4 2】

アバンディアは芳香族性ヒドロキシ代謝物に代謝される。それ故、2つの可能性ある代謝物が、以下に示すように捕獲化合物に結合する：



[illegible]

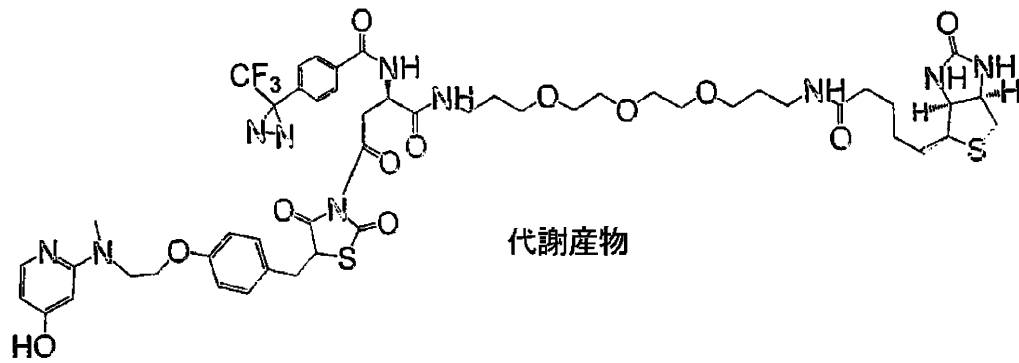
20



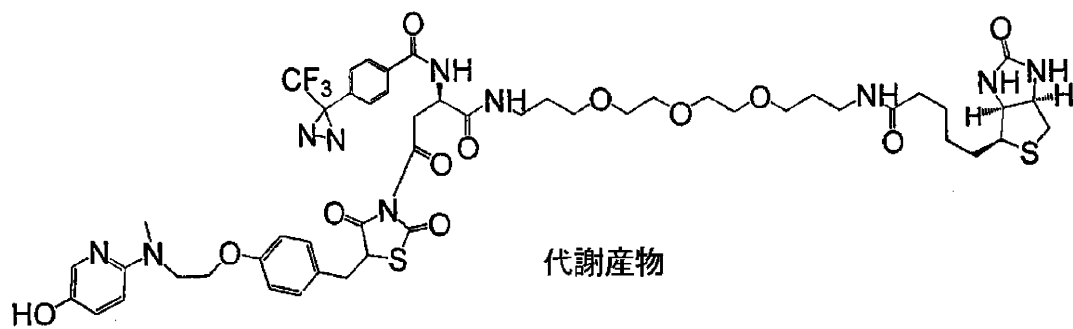
代謝産物

40

## 【化 3 9】



10



20

## 【0343】

捕獲化合物に結合するアバンディアおよびその代謝物を、腎臓、肝臓、脾臓、結腸上皮、および筋細胞と共にインキュベートする。標的タンパク質 PPAR - および非標的タンパク質 PPAR - およびタンパク質 A、B および C が捕獲される。

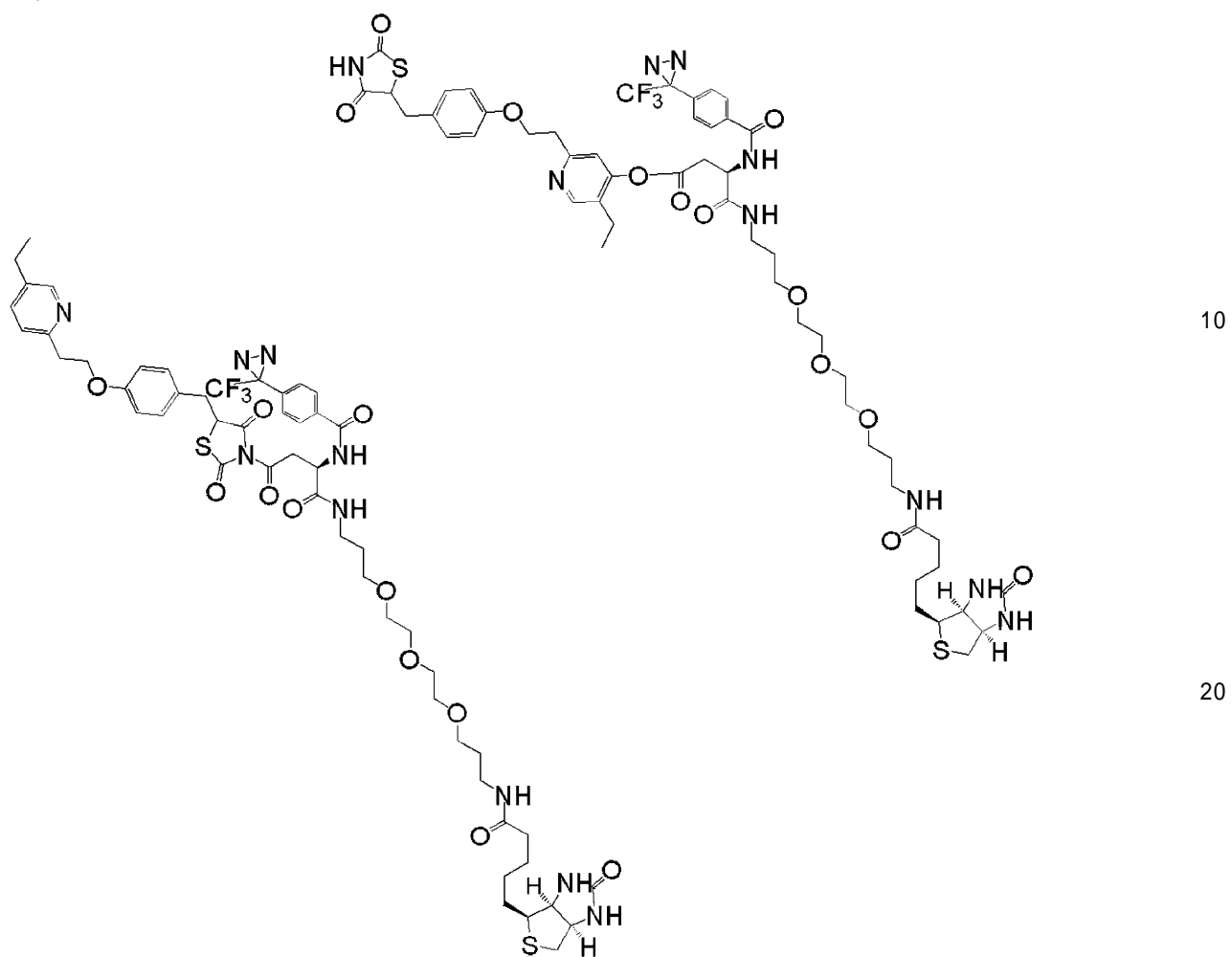
## 【0344】

アクトスおよびその代謝物：

アクトスは、以下に示すように捕獲化合物に結合する：

30

【化 4 0】

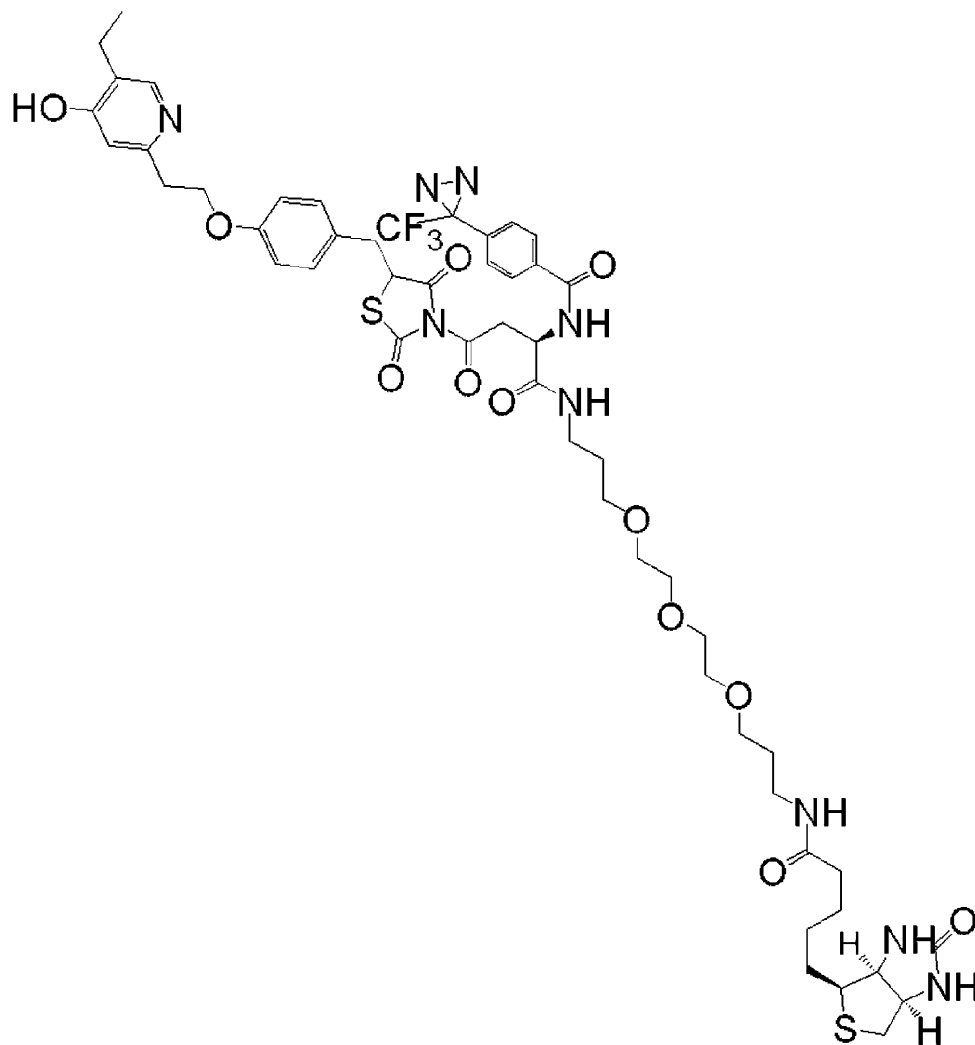


【 0 3 4 5】

アクトスの可能な代謝産物は、以下に示すように捕獲化合物に結合する：

30

## 【化 4 1】



## 【 0 3 4 6】

捕獲化合物に結合するアクトスおよびその代謝物は、腎臓、肝臓、脾臓、結腸上皮、および筋細胞と共にインキュベートする。標的タンパク質 P P A R - および非標的タンパク質 P P A R - およびタンパク質 A、B および C を捕獲する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 3 4 7】

【図 1】タンパク質の混合物のハイブリダイゼーション、分離および質量スペクトル分析を示す図である。

【図 2】本明細書で提供される装置の 1 つの実施形態を示す模式図を提供する図である。

【図 3 a - 3 h h h h】本明細書で提供される捕獲試薬に用いる例示的な選択性官能基を提供する図である。

【図 4 a - 4 f】生体分子捕獲アッセイの概略図ならびに例示的な捕獲化合物およびタンパク質を用いた結果を示す図である。

【図 5】捕獲化合物の選択性官能基における、バイアスのかかったおよびバイアスのかかっていない選択基の例示的な特徴を示す。

【図 6】捕獲化合物を用いるタンパク質同定のための例示的なプロトコールを示す。

【図 7】タンパク質捕獲に含まれる工程および捕獲化合物を用いる同定の概略図を示す。

【図 8】捕獲化合物を用いる選択的タンパク質捕獲を示す。

【図 9】捕獲化合物 B の既知リガンドに対するタンパク質イソ型の相対的結合強度を示す。

【図 10】捕獲化合物 A を用いる、複雑なタンパク質混合物由来のカルボニックアンヒドラーゼの単離を示す。

【図 11】捕獲化合物 A を用いる、かなり複雑なタンパク質混合物由来のカルボニックアンヒドラーゼの単離を示す。

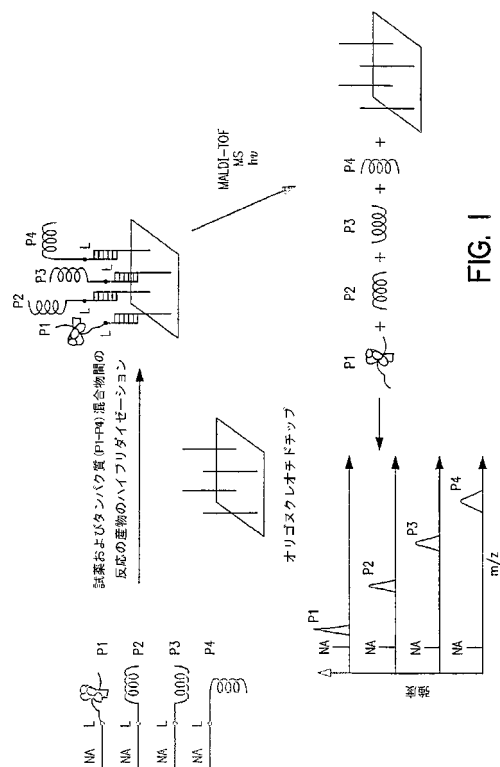
【図 12】溶解した赤血球由来のカルボニックアンヒドラーゼの捕獲および単離を示す。

【図 13】事前に細胞を溶解することのない、赤血球由来のカルボニックアンヒドラーゼの直接の捕獲を示す。

【図 14】カルボニックアンヒドラーゼを含む非ビオチニル化タンパク質が過剰にあるときの、赤血球ライゼート由来のカルボニックアンヒドラーゼの捕獲を示す。

【図 15】非常に高濃度の捕獲化合物 A を用いる、より低い親和性を有するタンパク質の捕獲を示す。

【圖 1】



【圖 2】

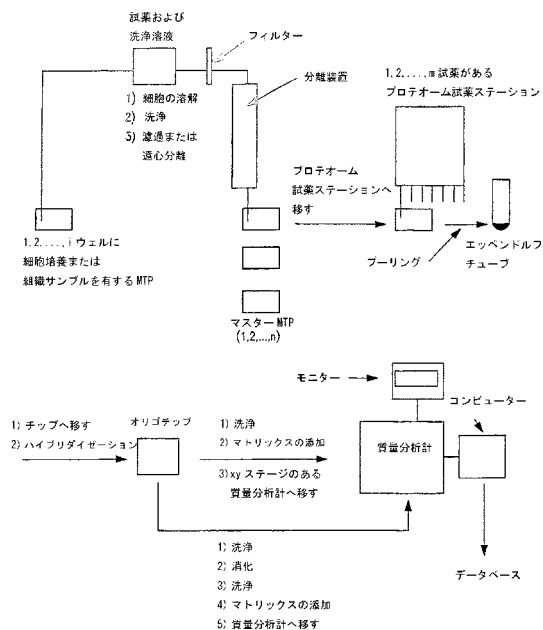
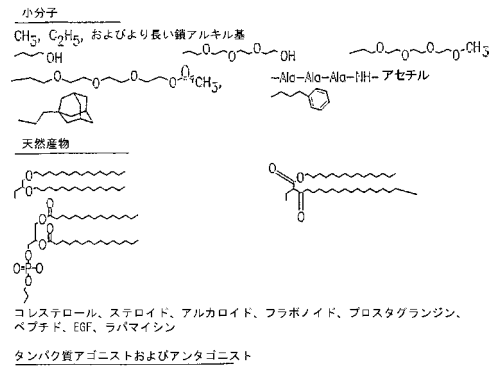


FIG. 2

## 【図 3 a】



1, 1, 1-トリフルオロ-6Z, 8Z, 12Z, 15Z-ヘンエイコサテラエン-2-オン、

トランス-4-[3-メチル-6-(1-メチルエチル)-2-シクロヘキセン-1-イル]-5-ペンチル-1, 3-ベンゼンジオール、

アラキドニル-2'-クロロエチルアミド / (all Z)-N-(2-シクロエチル)-5, 8, 11, 14-エイコサテトラエンアミド、

アラキドニルシクロプロピルアミド / (all Z)-N-(シクロプロピル)-5, 8, 11, 14-エイコサテトラエンアミド、

N-(ピベリジン-1-イル)-5-(4-ヨードフェニル)-1-(2, 4-ジクロロフェニル)-4-メチル-1H-ピラゾール-3-カルボキサミド、

1-(2, 4-ジクロロフェニル)-5-(4-ヨードフェニル)-4-メチル-N-4-モルホリル-1H-ピラゾール-3-カルボキサミド、

(all Z)-N-(4-ヒドロキシフェニル)-5, 8, 11, 14-エイコサテトラエンアミド、

6-ヨード-2-メチル-1-[2-(4-モルホリル)エチル]-1H-インドール-3-イル] (4-メトキシフェニル)メタノン、

アラキドニルエタノールアミド / (all Z)-N-(2-ヒドロキシエチル)-5, 8, 11, 14-エイコサテトラエンアミド、

## 【図 3 b】

アラキドニルエタノールアミド / (all Z)-N-(2-ヒドロキシエチル)-5, 8, 11, 14-エイコサテトラエンアミド、

N-(2-ヒドロキシエチル)-[3, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15-H]-5Z, 8Z, 11Z, 14Z-エイコサテトラエンアミド、

2-AG / (5Z, 8Z, 11Z, 14Z)-5, 8, 11, 14-エイコサテトラエン酸、2-ヒドロキシ-1-(ヒドロキシメチル)エチルエステル、

(-)-cis-3-[2-ヒドロキシ-4-(1, 1-ジメチルヘプチル)フェニル]-trans-4-(3-ヒドロキシプロピル)シクロヘキサノール、

ドコサテラニルエタノールアミド / N-(2-ヒドロキシエチル)-7Z, 10Z, 13Z, 16Z-ドコサテトラエンアミド、

(6aR)-trans-3-(1, 1-ジメチルヘプチル)-6a, 7, 10, 10a-テトラヒドロ-1-ヒドロキシ-6, 6-ジメチル-6H-ジベンゾ [b, d] ピラン-9-メタノール、

[6aR-(6a $\alpha$ , 9 $\alpha$ , 10 $\alpha$ )-3-(1, 1-ジメチルヘプチル)-6a, 7, 8, 9, 10, 10a-ヘキサヒドロ-1-ヒドロキシ-6, 6-ジメチル-6H-ジベンゾ [b, d] ピラン-[7, 8-H]-9-メタノール、

(2-メチル-1-プロピル-1H-インドール-3-イル)-1-ナフタレニルメタノン、

(6aR, 10aR)-3-(1, 1-ジメチルヘプチル)-6a, 7, 10, 10a-テトラヒドロ-6, 6, 9-トリメチル-6H-ジベンゾ [b, d] ピラン、

メチルアラキドニルフルオロホスホネート / (5Z, 8Z, 11Z, 14Z)-5, 8, 11, 14-エイコサテトラエニル-メチルエステルホスホフルオリド酸、

[R-(all Z)]-N-(2-ヒドロキシ-1-メチルエチル)-5, 8, 11, 14-エイコサテトラエンアミド、2-[(5Z, 8Z, 11Z, 14Z)-エイコサテトラエニルオキシ]-1, 3-プロパンジオール、

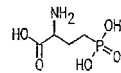
N-(ビス-3-クロロ-4-ヒドロキシベンジル)-5Z, 8Z, 11Z, 14Z-エイコサテトラエンアミド、

(9Z)-N-(2-ヒドロキシエチル)-9-オクタデセンアミド、

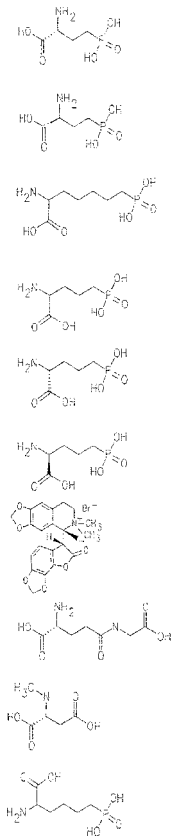
N-(2-ヒドロキシエチル)ヘキサデカンアミド、

(5Z, 8Z, 11Z, 14Z)-N-(4-ヒドロキシ-2-メチルフェニル)-5, 8, 11, 14-エイコサテトラエンアミド、

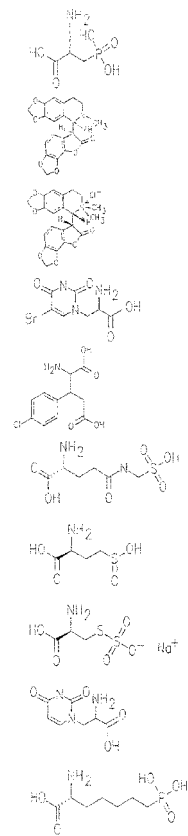
(R)-(+)-[2, 3-ジヒドロ-5-メチル-3-(4-モルホリルメチル)ピロロ [1, 2, 3-de]-1, 4-ベンゾキサジン-6-イル]-1-ナフタレニルメタノン、



## 【図 3 c】



## 【図 3 d】

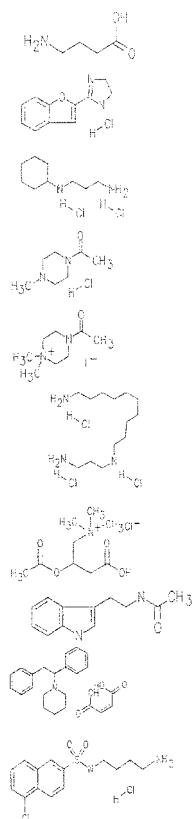




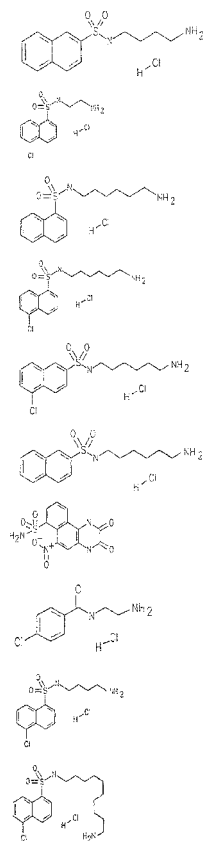




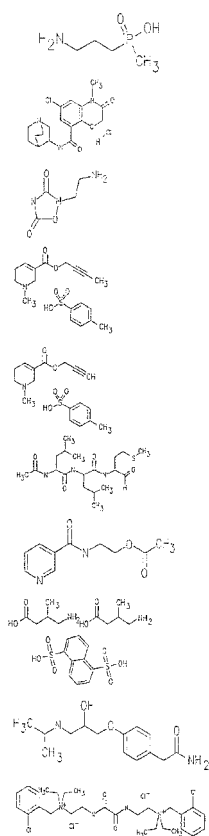
## 【図 3 m】



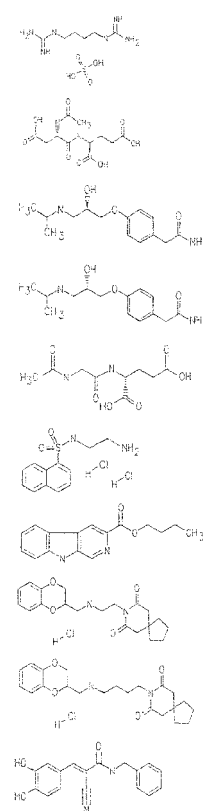
## 【図 3 n】



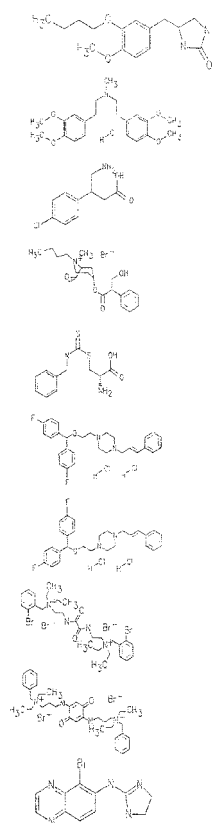
## 【図 3 o】



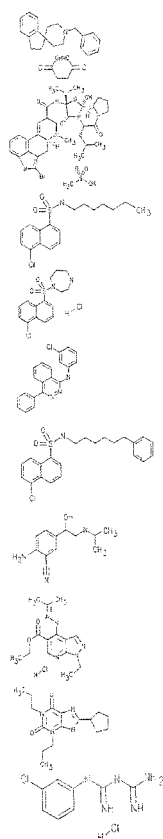
## 【図 3 p】



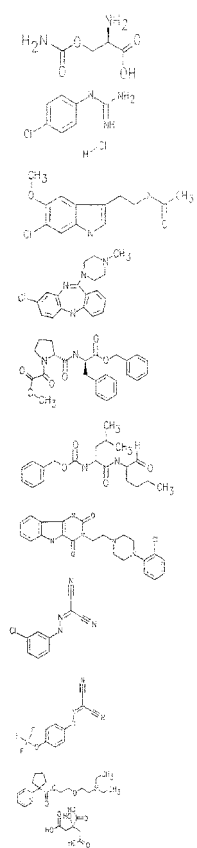
【図 3 q】



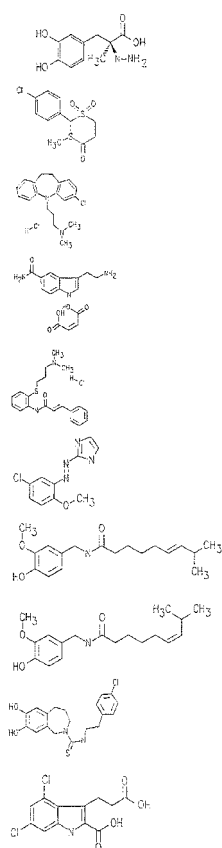
【図 3 r】



【図 3 s】

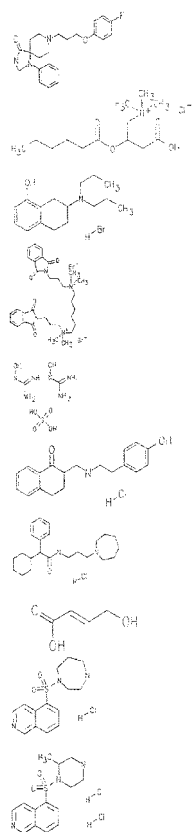


【図 3 t】

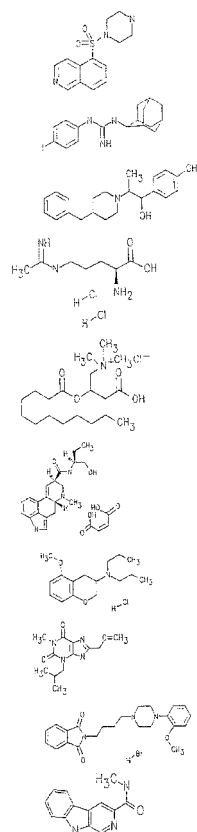




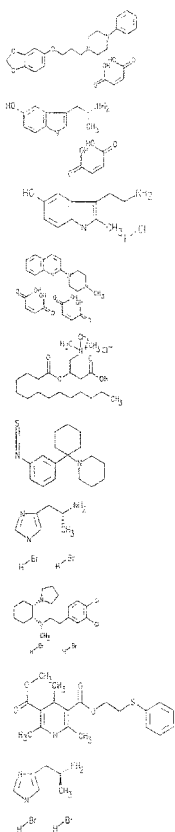
## 【図 3 y】



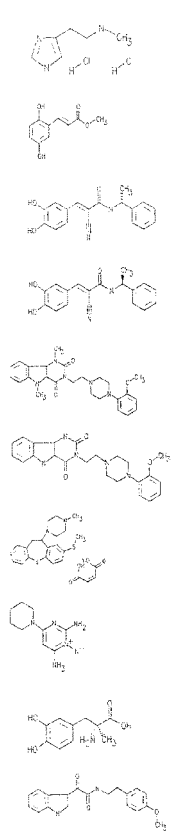
## 【図 3 z】



## 【図 3 a a】

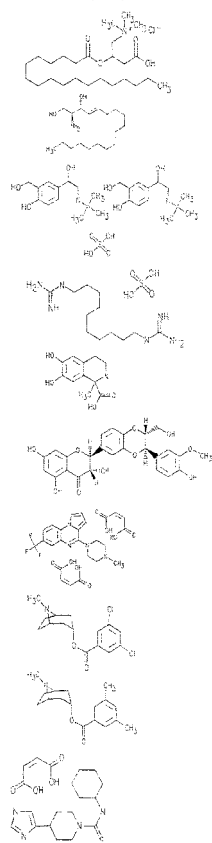


## 【図 3 b b】

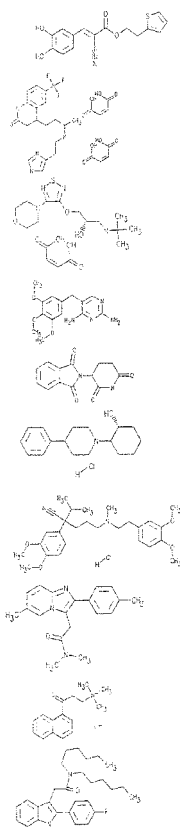




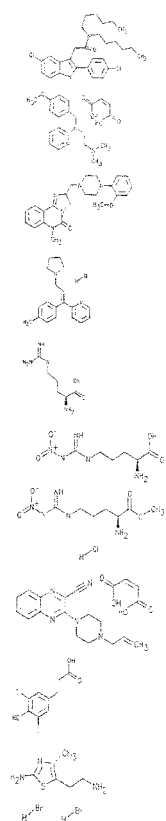
【図 3 g g】



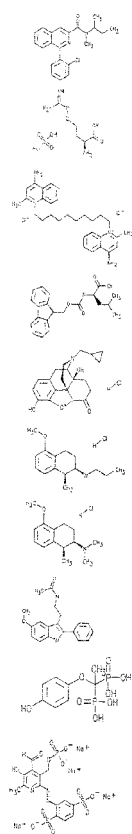
【図 3 h h】



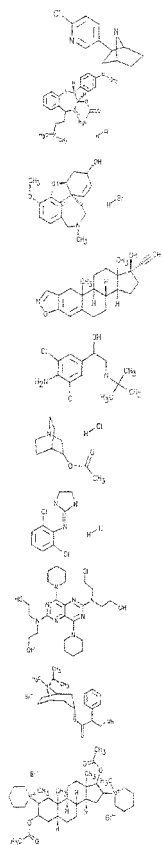
【図 3 i i】



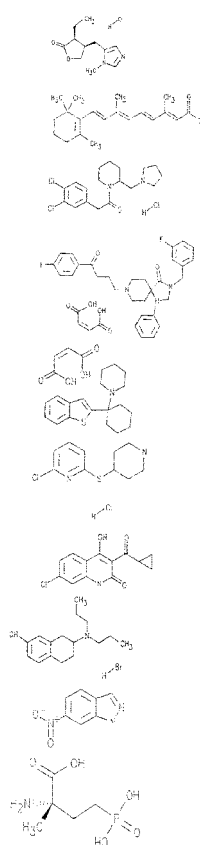
【図 3 j j】



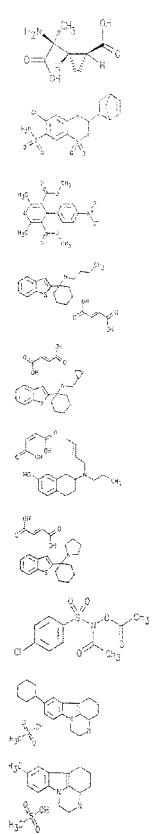
## 【図 3 k k】



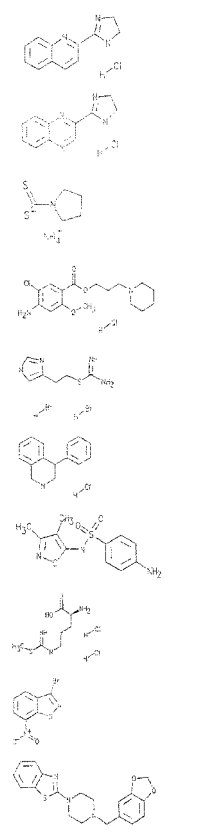
## 【図 3 l l】



## 【図 3 m m】



## 【図 3 n n】

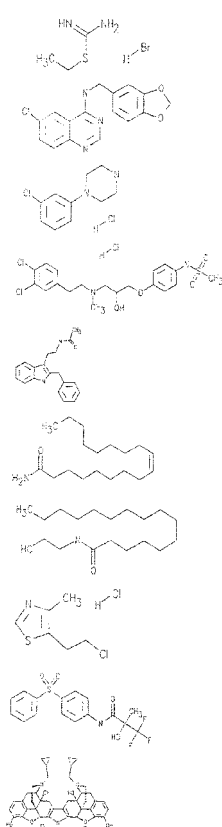




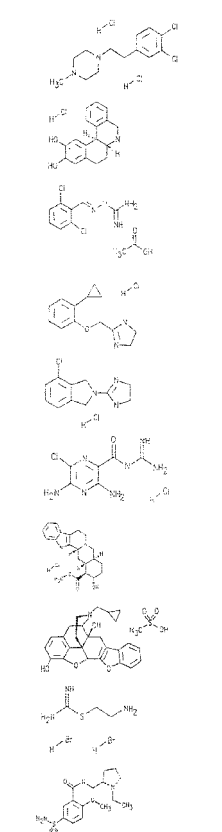




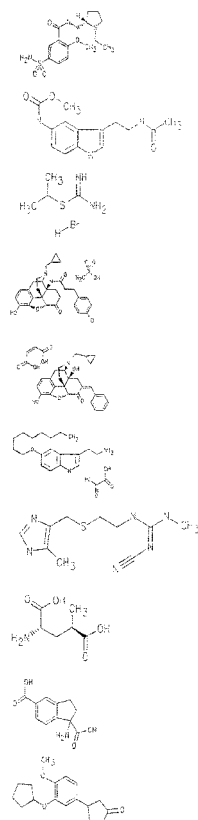
【 図 3 x x 】



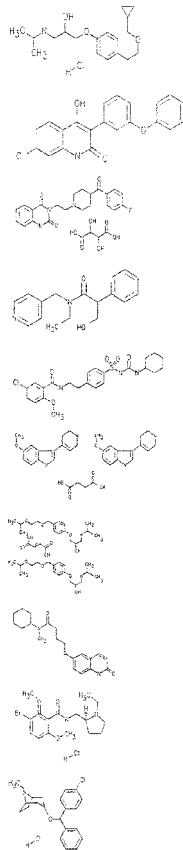
【 ㄨ 3 z z 】



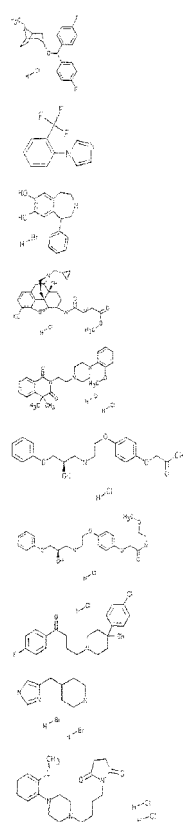
## 【図 3 a a a】



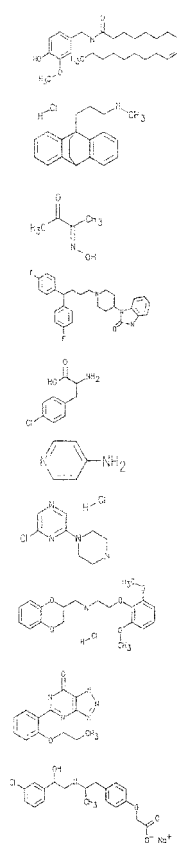
## 【図 3 b b b】



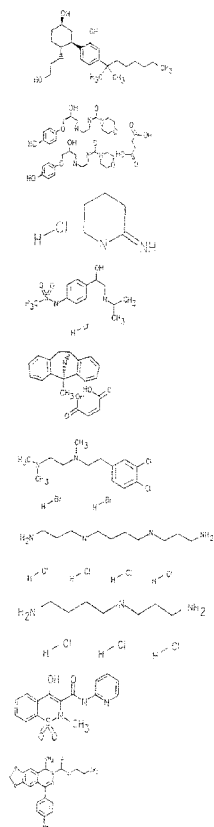
## 【図 3 c c c】



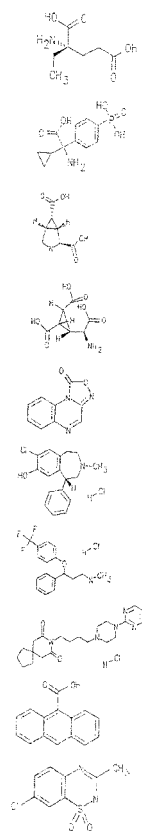
## 【図 3 d d d】



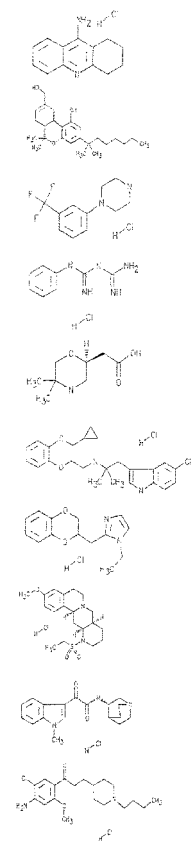
【 図 3 e e e 】



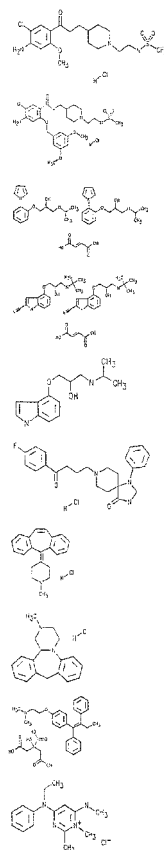
【 図 3 f f f 】



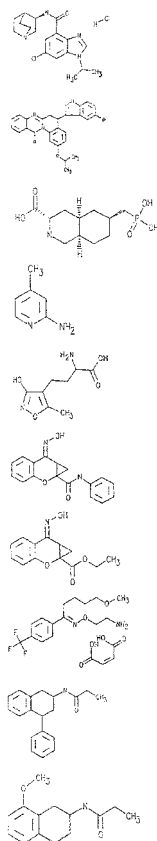
【 図 3 g g g 】



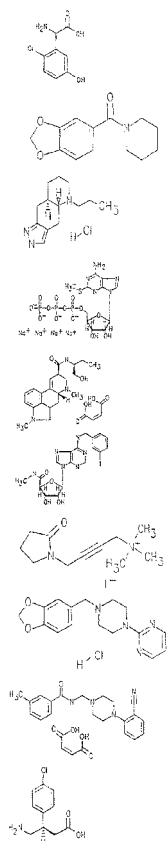
【 図 3 h h h 】



【 図 3 j j j 】

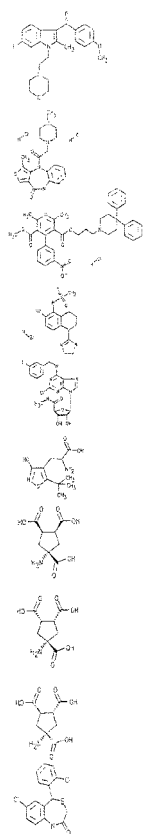


【 図 3 1 1 1 】

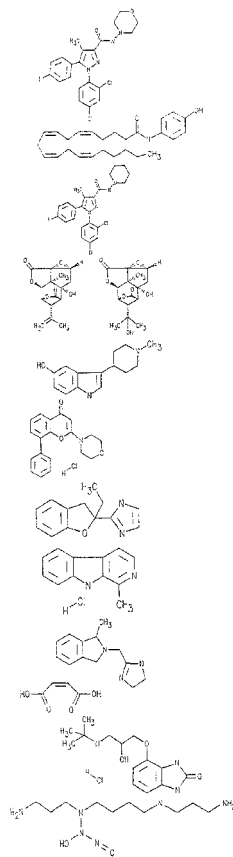




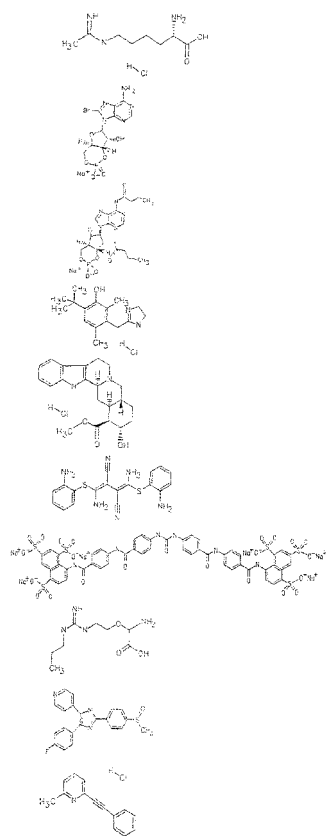
## 【図 3 q q q】



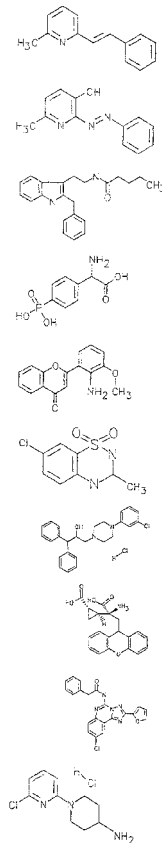
## 【図 3 r r r】



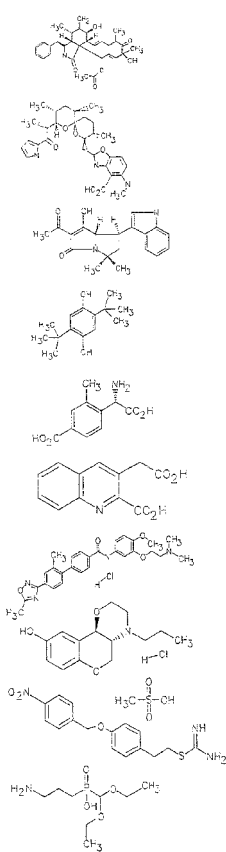
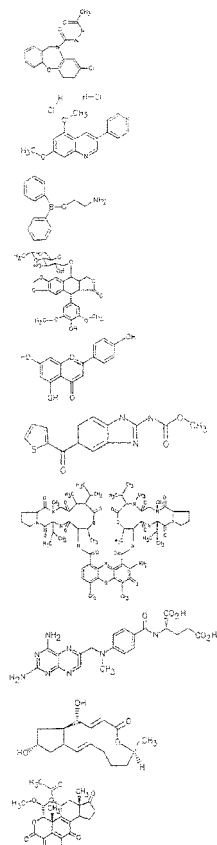
## 【図 3 s s s】



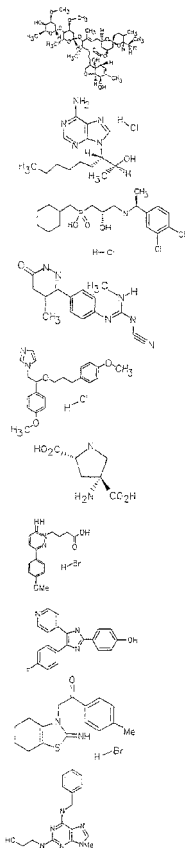
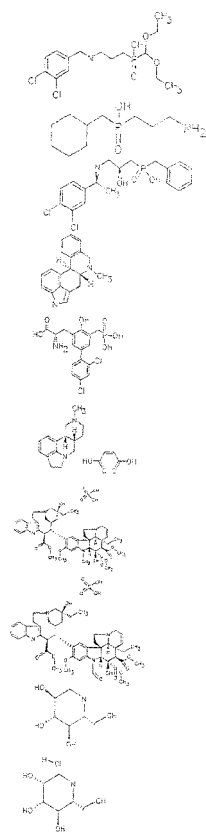
## 【図 3 t t t】



【 図 3 v v v 】

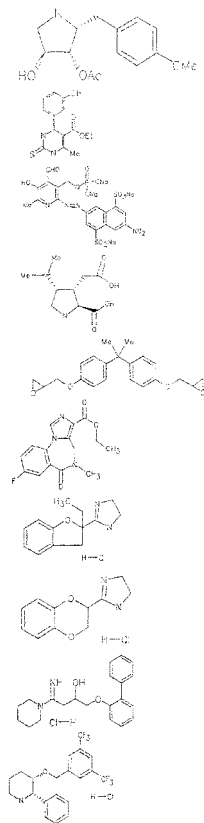


【 図 3 x x x 】

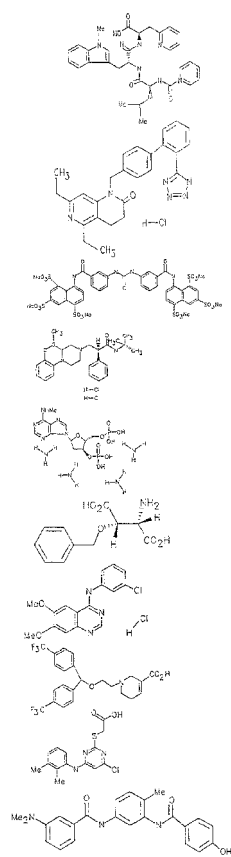




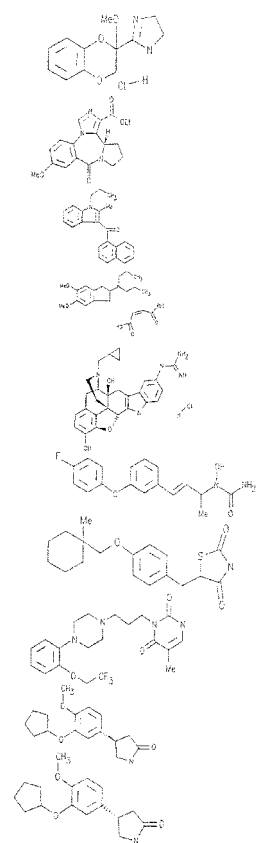
## 【図 3 y y y】



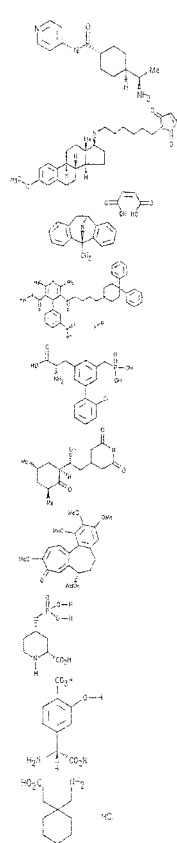
## 【図 3 z z z】



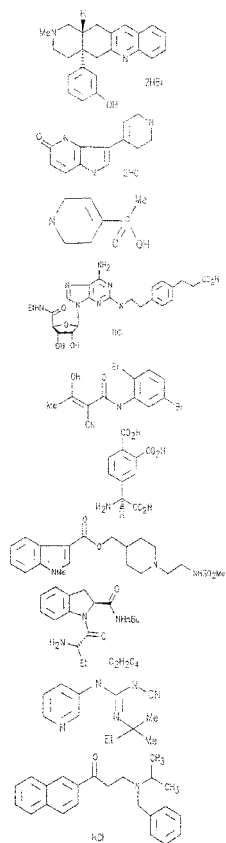
## 【図 3 a a a a】



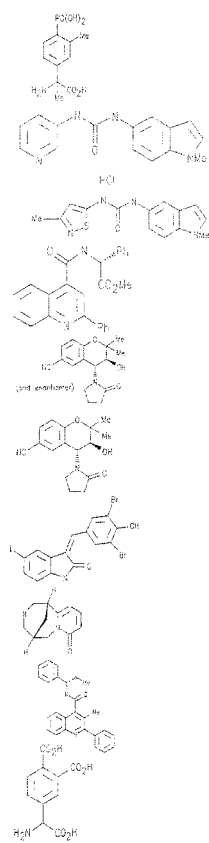
## 【図 3 b b b b】



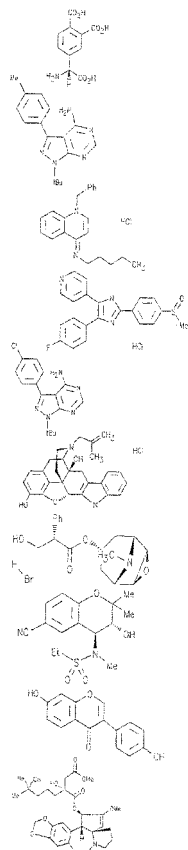
## 【図 3 c c c c c】



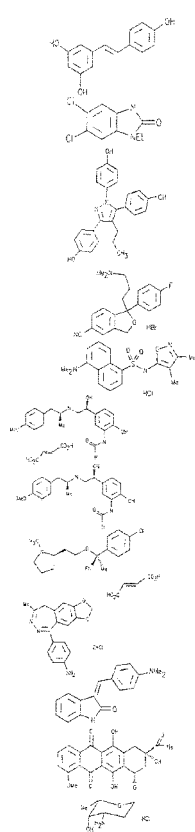
## 【図 3 d d d d d】



## 【図 3 e e e e e】

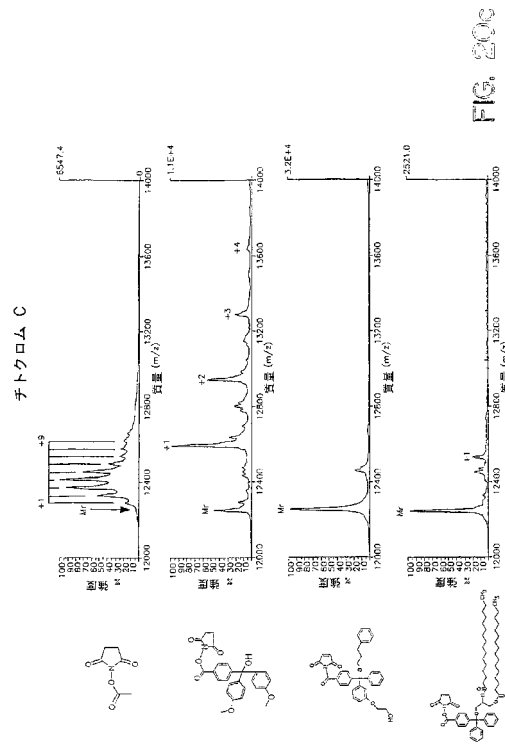


## 【図 3 f f f f f】

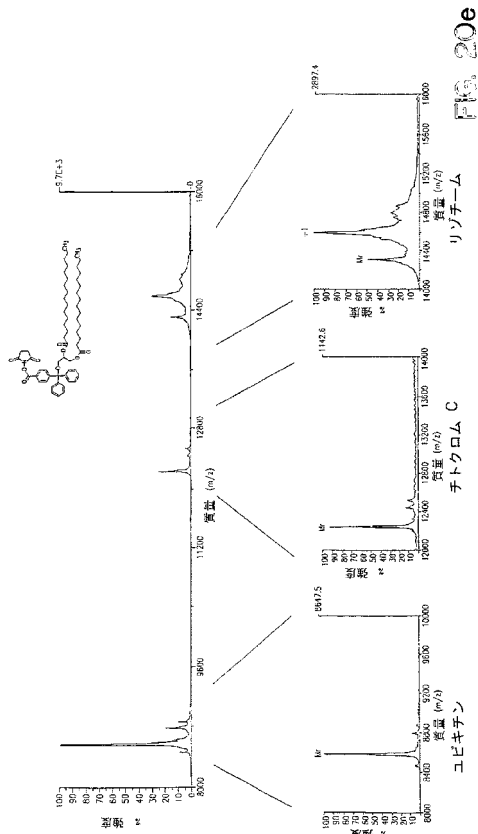




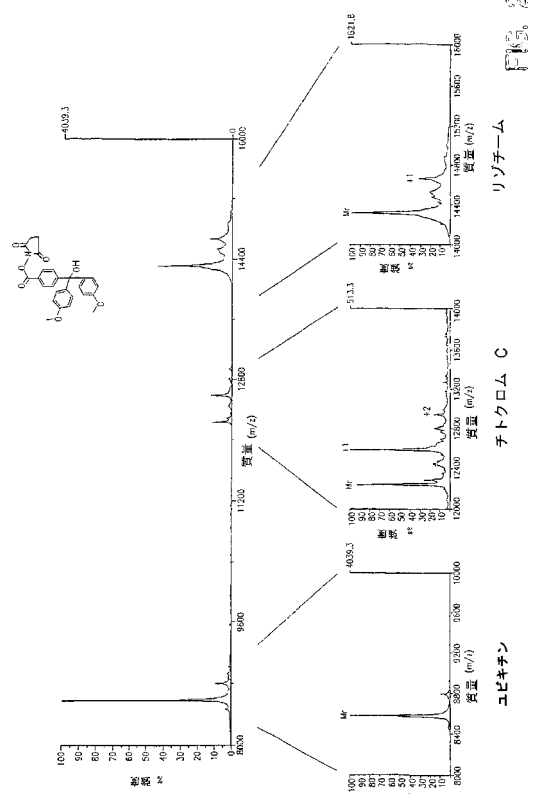
【図 4 c】



【図 4 e】



【図 4 d】

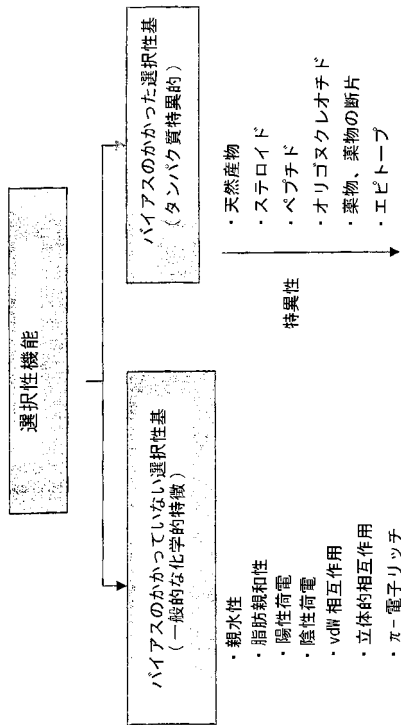


【図 4 f】

非特異的化合物とのチトクロム C (18 Lys) 反応



【 図 5 】



**FIG. 27**

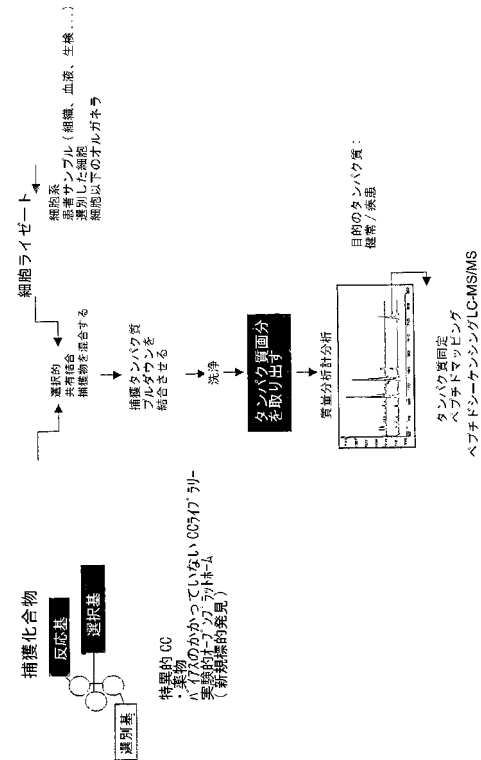
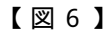
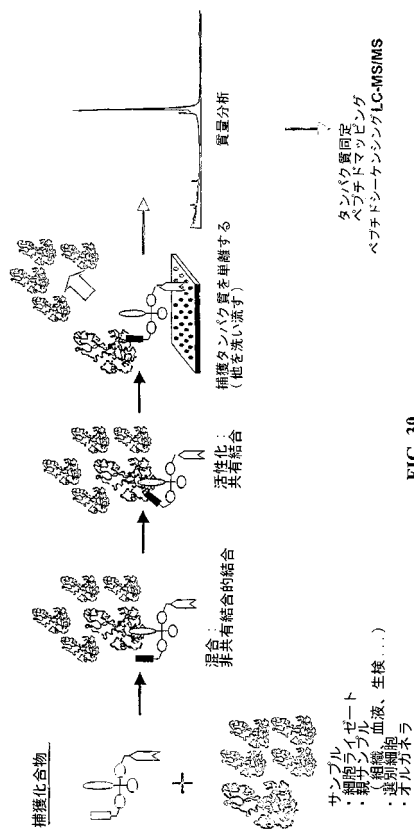


FIG. 28

【圖 7】



**FIG. 30**

【 図 8 】

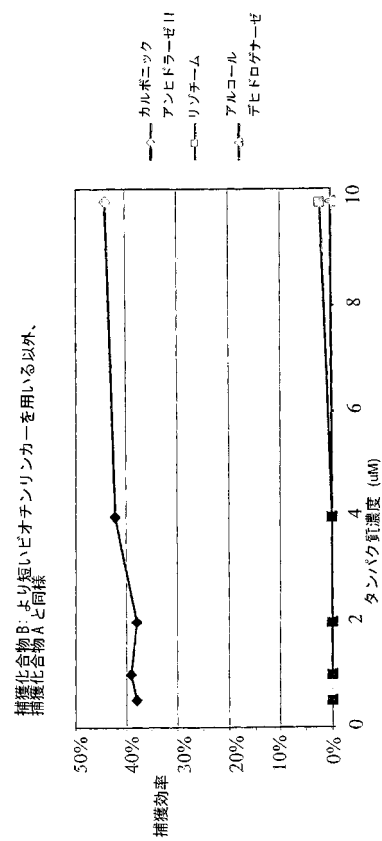


FIG. 31

【図 9】

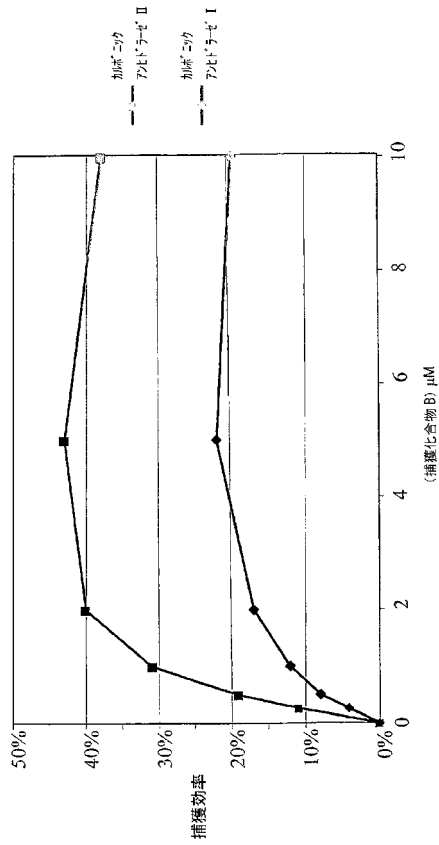


FIG. 32

【図 10】

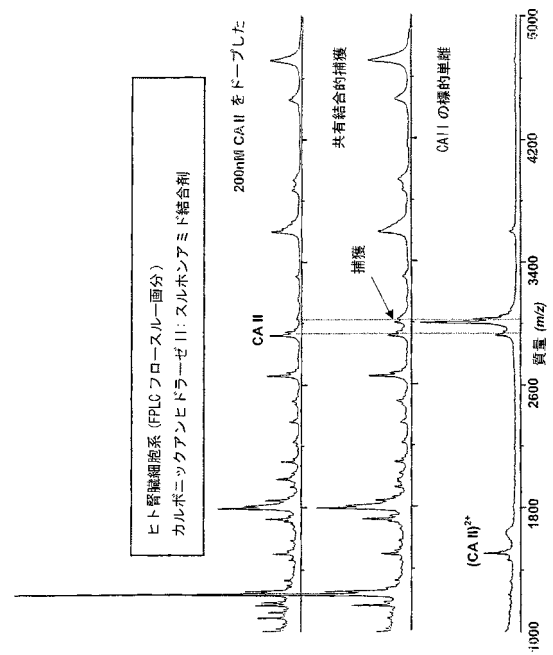


FIG. 33

【図 11】

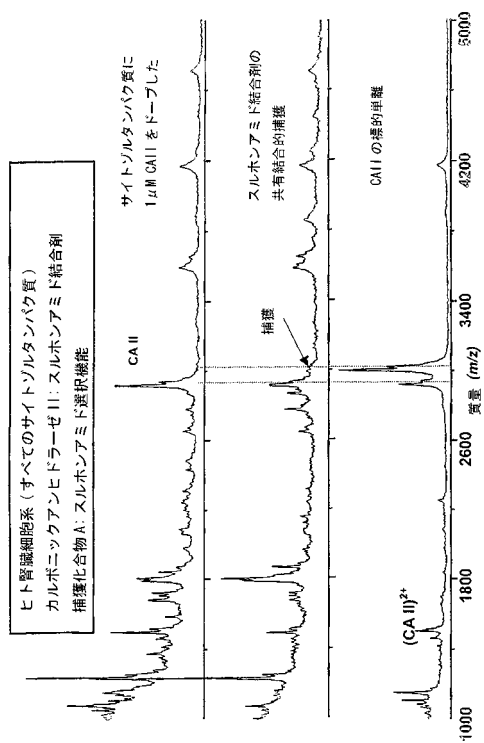


FIG. 34

【図 12】

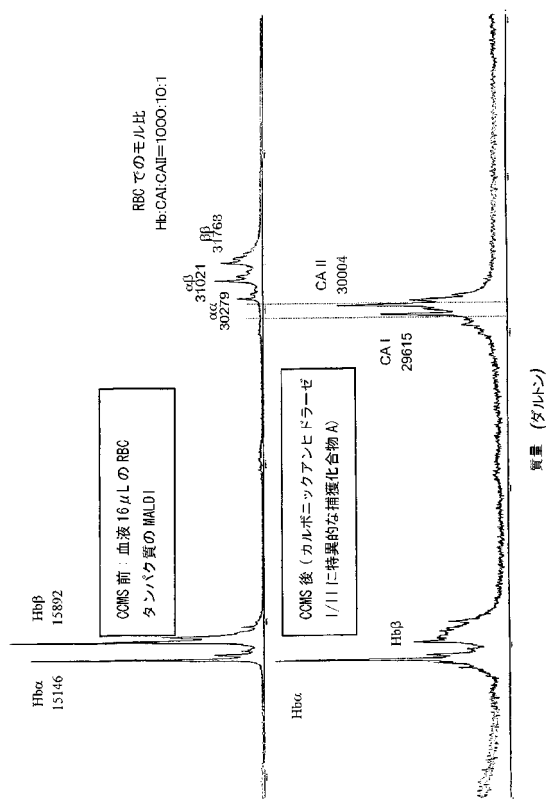


FIG. 35

【図 13】

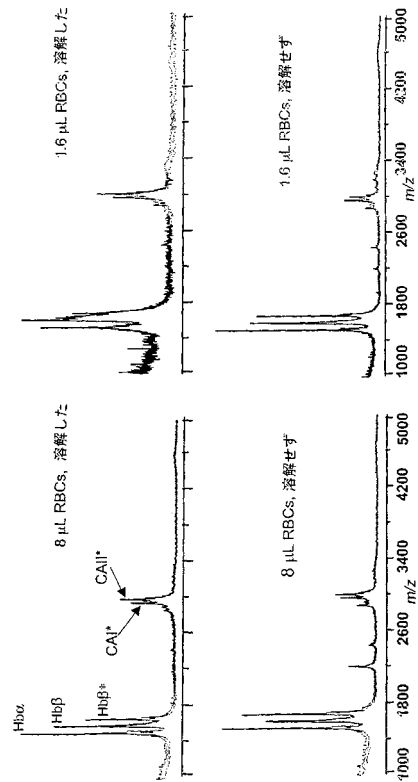


FIG. 36

【図 14】

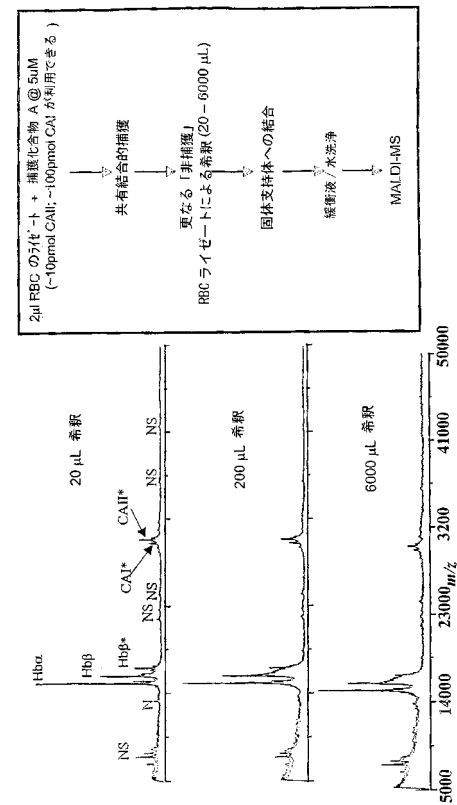


FIG. 37

【図 15】

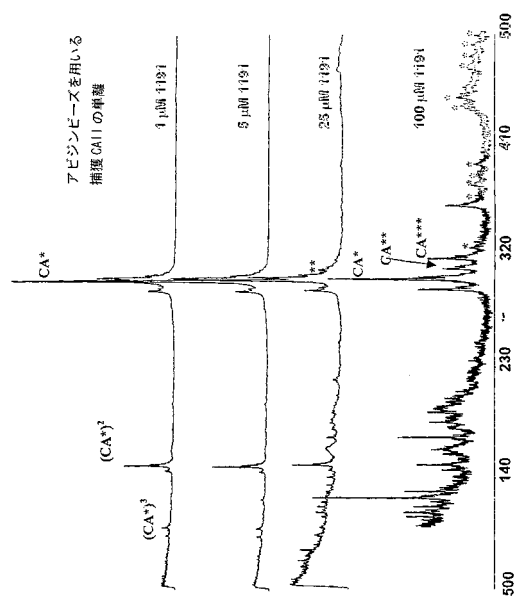


FIG. 38

【配列表】

0004741458000001.app



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

**G 0 1 N 33/53 (2006.01)**

G 0 1 N 30/72 C

**G 0 1 N 37/00 (2006.01)**

G 0 1 N 33/15 Z

G 0 1 N 33/50 Z

G 0 1 N 33/53 D

G 0 1 N 37/00 1 0 2

(74)代理人 100107456

弁理士 池田 成人

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74)代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(74)代理人 100106518

弁理士 松谷 道子

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(74)代理人 100146259

弁理士 橋本 諭志

(72)発明者 フーベルト・ケスター

スイス、ツェーハー - 6 9 1 8 フィジーノ、ヴィーア・カントナーレ 8 4 番、ヴィラ・ウェリントニア

(72)発明者 ダニエル・ポール・リトル

アメリカ合衆国 0 1 8 9 0 マサチューセッツ州ウィンチェスター、チャーチ・ストリート 6 2 番

(72)発明者 スハイブ・マームード・シディキ

アメリカ合衆国 0 1 8 0 3 マサチューセッツ州バーリントン、ユニバーシティ・ドライブ 3 7 番

(72)発明者 マシュー・ピーター・グリーリッシュ

アメリカ合衆国 9 5 6 1 0 カリフォルニア州シトラス・ハイツ、シカモア・ドライブ 7 6 9 4 番

(72)発明者 スブラマニアン・マラッパン

アメリカ合衆国 9 2 1 2 9 カリフォルニア州サンディエゴ、キカ・コート・ナンバー 2 4 1 4、9 9 2 4 番

(72)発明者 チェスター・フレデリック・ハスマン・ザ・サード

アメリカ合衆国 4 7 6 3 0 - 2 9 1 8 インディアナ州ニューバーグ、ウエスト・エシュ・ドライブ 5 3 2 2 番

(72)発明者 ピン・イップ

アメリカ合衆国 9 2 1 1 6 カリフォルニア州サンディエゴ、コップリー・アベニュー 3 6 4 1 番

## 合議体

審判長 郡山 順

審判官 竹中 靖典

審判官 岡田 孝博

(56)参考文献 特開平 6 - 2 2 2 0 5 8 ( J P , A )

国際公開第 2 0 0 2 / 0 5 8 5 3 3 ( W O , A 1 )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N27/62, G01N33/00