

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成18年3月9日(2006.3.9)

【公表番号】特表2005-529186(P2005-529186A)

【公表日】平成17年9月29日(2005.9.29)

【年通号数】公開・登録公報2005-038

【出願番号】特願2004-513428(P2004-513428)

【国際特許分類】

C 0 7 K 14/47 (2006.01)

C 0 7 K 1/08 (2006.01)

C 0 7 K 7/04 (2006.01)

【F I】

C 0 7 K 14/47 Z N A

C 0 7 K 1/08

C 0 7 K 7/04

【手続補正書】

【提出日】平成18年1月16日(2006.1.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

アミノ酸残基は、それらの標準的一文字記号または三文字表記によって本明細書中で言及される：A、アラニン；C、システイン；D、アスパラギン酸；E、グルタミン酸；F、フェニルアラニン；G、グリシン；H、ヒスチジン；I、イソロイシン；K、リジン；L、ロイシン；M、メチオニン；N、アスパラギン；P、プロリン；Q、グルタミン；R、アルギニン；S、セリン；T、スレオニン；V、バリン；W、トリプトファン；およびY、チロシンである。本明細書中で示されるアミノ酸配列、例えば「DKLLM」(配列番号：12)は、他に文脈から示されない限り、左から右の様式でN末端からC末端のアミノ酸の順番となっている。当業者は、非天然アミノ酸もまた、本発明において有用であることを認識している。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0051

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0051】

本発明のすべてのY基は、0からSへのアシルシフトを可能にするためにカルボキシエステルを効率的に活性化するのに十分に電子吸引性である。しかし、Y基のバリエーションは、連結の間に効果を有し得る。例えば、配列LYRAF-COO-CH(CH<sub>2</sub>-SH)-Yの2つのペプチドモデル：ペプチドA(配列番号：13)(Y=CONH<sub>2</sub>(カルボキシアミド))およびペプチドB(配列番号：14)(Y=COO-CH<sub>2</sub>-COONH<sub>2</sub>(カルボキシエステル))が合成され得る。同一の連結条件下で、ペプチドAは約20%の加水分解されたカルボキシエステルを生成するのに対して、ペプチドB(そのエステル部分はカルボキシアミドよりも強い電子吸引効果を有する)は、約30%の加水分解されたカルボキシエステルを産生する。それゆえに、本発明のすべてのY基はカルボキシエステルの安定性を増強するのに対して、いくつかのY基は、本発明の他のY基よりもカルボキシエステルに対するより高い安定化効果を有する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書  
 【補正対象項目名】0109  
 【補正方法】変更  
 【補正の内容】  
 【0109】

実施例7：多段階連結 - LYRAN-COSR<sup>6</sup> (配列番号：16) + CLYRAF00CH(-CH<sub>2</sub>-S-S-t-But)CONH<sub>2</sub> (配列番号：17) + CYAKYAKL (図8a~図8d)

0.30mgのLYRAN-COSR<sup>6</sup> (配列番号：16) (MW=822、0.36 $\mu$ mol) および0.35mgのCLYRAF00CH(CH<sub>2</sub>-S-S-t-But)CONH<sub>2</sub> (配列番号：17) (MW=963、0.36 $\mu$ mol) を連結緩衝液 (6M塩酸グアニジン、0.2Mリン酸ナトリウム、pH=7.5) に溶解した (図8a)。

【手続補正4】  
 【補正対象書類名】明細書  
 【補正対象項目名】0111  
 【補正方法】変更  
 【補正の内容】  
 【0111】

1.5当量のCYAKYAKL (配列番号：5) (MW=958、0.51mg) および0.9 $\mu$ lのチオフェノール (全体で2%) を連結混合物に加え、pHを6.5に調整した (図8d、第2の連結の時間経過 (1時間、4時間、および一晩) を重ねて表示した、1時間後の第1の連結を示す)。

【手続補正5】  
 【補正対象書類名】明細書  
 【補正対象項目名】0112  
 【補正方法】変更  
 【補正の内容】  
 【0112】

実施例8：LYRAF00-CH(-CH<sub>2</sub>-S-S-t-But)-CONH<sub>2</sub> (配列番号：4) + CYAKYAKL (配列番号：5) の連結 (図11) およびLYRAG(-S-S-t-But) (配列番号：9) + CYAKYAKL (配列番号：5) の連結 (図12)

これらの2つのさらなる例示的な連結反応を、図11 (LYRAF00-CH(CH<sub>2</sub>-SStbut)-CONH<sub>2</sub> (配列番号：4) + CYAKYAKL (配列番号：5) について、T=0および一晩反応後) および図12 (LYRAG(-S-S-t-Bu) (配列番号：9) + CYAKYAKL (配列番号：5) について、T=0、ならびに、2%チオフェノールpH 6.5、2%チオフェノール + 1%ベンジルメルカプタンpH 6.5、および2%チオフェノール + 2%トリブチルホスフィンpH 6.5を用いた4時間反応後および一晩反応後) に示す。

【手続補正6】  
 【補正対象書類名】明細書  
 【補正対象項目名】0113  
 【補正方法】変更  
 【補正の内容】  
 【0113】

実施例9：LYRAF(-S-S-t-But) (配列番号：3) の開裂の粗HPLC (図9)

モデルペプチドLYRAF-COO-CH(CH<sub>2</sub>-S-STbut)-CO-NH<sub>2</sub> (配列番号：4) の合成により、異なる相対的な豊富さを有する2つのピークの分離が可能になった：ピーク1 (ジアステレオマー1) は、同一のMsを有する所望の物質の68.5%、およびピーク2 (ジアステレオマー2) はその31.5%であった (図9)。各ジアステレオマーを精製し、同じ条件下でN末端システインペプチドと連結した。ジアステレオマー1は17.5%の加水分解産物を与えたのに対して、ジアステレオマー2 (豊富さが低い異性体) は13.8%の加水分解産物を与えた。それゆえに、より不安定な生成物は優勢な方 (ジアステレオマー1) である。これは、副反応を減少させるために、ラセミ化合物よりもエナンチオマー的に純粋な化合物の使用の有用性を実証する。実際、連結が一般的に非常に速い小さなモデルペプチドに対する適度な

改善でさえ、より大きな断片上でのより遅い連結の間により有意な違いをもたらし得る。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0116

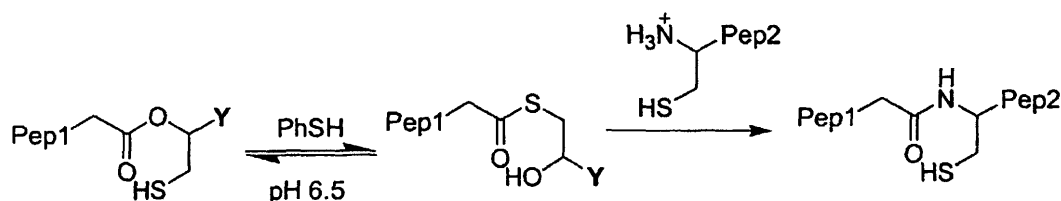
【補正方法】変更

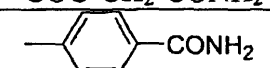

【補正の内容】

【0116】

#### 実施例 11：種々の電子吸引基の評価

多数の代替的な電子吸引基を、連結反応の収率を増加させるそれらの能力について試験した。代表的には、その収率は連結生成物に対する加水分解産物 (Pep1COOH) の比として、パーセンテージで測定した。副反応を最小化するために、最小の比を提供する基を選択する。



Y <sup>1</sup>	加水分解の% (Pep1COOH) <sup>2</sup>
-CONH <sub>2</sub> (ラセミ体)	+++
-CONH <sub>2</sub> (ピークA)	+++
-CONH <sub>2</sub> (ピークB)	+++
-CONH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -CONH <sub>2</sub> (ピークA)	+++
-CONH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -CONH <sub>2</sub> (ピークB)	++
-CONH-SO <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CONH <sub>2</sub>	+
-COOH <sup>3</sup>	+
-COO-CH <sub>2</sub> -CONH <sub>2</sub>	++
	+
	+

<sup>1</sup> ペプチド1=LYRAF (配列番号: 7); ペプチド2=CYAKYAKL (配列番号: 5)、1.5当量で使用。連結条件: pH 6.5リン酸緩衝液、2%チオフェノール (v/v)。

<sup>2</sup> 214nmのUV検出を用いたHPLCによって測定した、連結生成物に対する加水分解 (Pep1COOH) 比の%。<100%の加水分解を+、<50%を++、および<25%を+++とする。

<sup>3</sup> 使用したモデルペプチドはLYRAK (配列番号: 18) である。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0117

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0117】

#### 実施例 12：リン酸化された精子細胞核変遷タンパク質1の合成

精子細胞核変遷タンパク質1 (SPT1、Swiss Protアクセッション番号P22613) は、ヒツジ精子に存在する54残基のタンパク質であり、リン酸化されることが報告されている。リン酸化部位の1つは8位のセリンである。全長タンパク質を得るために、以下の配列

STSRKLKS(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)QGTRRGKNRTPHKGVKRGCSKRKYRKSSLKSRKRCDDANRNFRSHL

(配列番号: 19) を用いて、標準的なFmoc化学および保護を使用して、0.1mmolスケール

で、実施例5と同様に調製されるPEGA樹脂から出発して、断片1を合成した。リンカーの後の樹脂上の最初のアミノ酸、グリシンを、樹脂置換に対して10当量であり、0.1当量のDMA Pの存在下で、HBTU/DIAE活性化させたエステルとして導入した。8位のセリンを、リン酸化保護残基FmocSer(P(0(0Bzl)OH)OH(市販されている))として導入した。樹脂からの開裂を、TFA/TIS/H<sub>2</sub>O(95/2.5/2.5)中で行った。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0118

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0118】

中間体断片1

STSRKLLKS(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)QGTRRGKNRTPHKGVKRG-C<sup>o</sup>OOCH(CH<sub>2</sub>-S-S-*t*-butyl)-CONH<sub>2</sub>

(配列番号:20)を調製的RP-HPLCによって精製した。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0119

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0119】

断片2

CSKRKYRKSSLKSRKRCDDANRNFRL

(配列番号:21)を標準的なBoc化学によって調製し、HF開裂後、調製的RP-HPLCによって精製した。断片1および断片2を以下のように連結した。0.5mgの断片1(MW 3192.71、0.015 μmol)および1.6mgの断片2(MW 3440.98、0.045 μmol)を200 μlの連結緩衝液(6M塩酸グアニジン、0.2Mリン酸ナトリウム、pH=7.5)に溶解した。2%(4 μl)のチオフェノールをこの混合物に加え、pHを6.5に調整した。12時間後、連結溶液をRP-HPLCおよびサイズ排除クロマトグラフィーによって分析した。RP-HPLCは断片1の消失を確認した。主要なピークの収集および質量分析スペクトルによる分析は、断片2および連結生成物の同時溶出を確認した。加水分解した断片1は最初のエステル型の12.5%を表すと推定された(図15)。サイズ排除クロマトグラフィーを、全長物質から未反応断片2を分離するために、および最終物質の精製のために使用した(図16)。質量分析スペクトル法は2つの生成物の性質を確認した(図17)。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図面の簡単な説明】

【0121】

【図1】本発明のカルボキシチオエステル保護基(図1a、ここでn=1およびR'=H)、本発明の、ジスルフィド保護カルボキシルチオエステル保護基(図1b、ここでn=1およびR'=S-R')、および本発明の一般的な保護形態(図1c、ここでn=1およびR'=PG)を示す。

【図2】オリゴペプチド生成物またはポリペプチド生成物を作製するための収束性合成スキームにおける本発明のオリゴペプチドの使用を示す。

【図3】本発明の、複素環保護チオエステル修飾オリゴペプチド中間体を使用する補助基(「拡張された天然の化学連結」)の使用を伴う、天然の化学連結を示す。

【図4】本発明の、複素環保護チオエステル修飾オリゴペプチドを合成するための第

1のスキームを示す。

【図5】本発明の、複素環保護チオエステル修飾オリゴペプチドを合成するための第2のスキームを示す。

【図6】本発明の、複素環保護チオエステル修飾オリゴペプチドを合成するための第3のスキームを示す。

【図7】4-置換-1,3-チアゾリジン保護オリゴペプチドチオエステルを作製するための合成スキームを示す。

【図8】オリゴペプチド生成物またはポリペプチド生成物(配列番号:2)を作製するための収束性合成スキームにおける本発明のオリゴペプチド(配列番号:1)の使用の例を示す。図8a~図8dは、反応の際の異なる時間におけるHPLC装置の出力での吸収シグナルを示す。

【図9】本発明のカルボキシチオエステル(配列番号:3)のC-1位における2つのジアステレオマーの粗物質開裂の分離を示す。

【図10】異なる合成ストラテジーに従う本発明のジスルフィド保護カルボキシチオエステル基の調製を図示する(図10A~図10D)。

【図11】時間=0および一晩反応後でのモデルペプチドLYRAF-COO-CH(CH<sub>2</sub>-S-S-t-But)-CONH<sub>2</sub>(配列番号:4)の連結を示す。CYAKYAKL=配列番号:5; LYRAF-CYAKYAKL=配列番号:6; LYRAF=配列番号:7。

【図12】2つの異なる時点(t=0(図12a)および一晩反応後(図12b))において、および、同様に異なる条件下(図12c~図12e)での、モデルペプチドLYRAG-COO-CH(CH<sub>2</sub>-S-S-t-But)-CONH<sub>2</sub>(配列番号:8)の連結を示す。LYRAG(SSStBut)=配列番号:9; CYAKYAKL=配列番号:5; LYRAG-CYAKYAKL=配列番号:10; LYRAG=配列番号:11。

【図13】NNY-Rantes 1-68合成後のHPLCクロマトグラムを示す。

【図14】合成されたNNY-Rantes 1-68のMSデータを示す。

【図15】SPT1 1-54を形成するための化学連結のRP-HPLC分析を図示する(実施例12を参照されたい)。

【図16】SPT1 1-54の化学連結のサイズ排除クロマトグラフィー分析を示す(実施例12を参照されたい)。

【図17】精製されたセリン8-リン酸化SPT1のMS分析を示す。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

[2005529186000001.app](#)