

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5951613号

(P5951613)

(45) 発行日 平成28年7月13日 (2016. 7. 13)

(24) 登録日 平成28年6月17日 (2016. 6. 17)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 4/00 (2006. 01)

C O 7 K 4/00

C O 7 K 7/06 (2006. 01)

C O 7 K 7/06

C O 7 K 5/08 (2006. 01)

C O 7 K 5/08

C O 7 K 5/10 (2006. 01)

C O 7 K 5/10

C 1 2 Q 1/37 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/37

請求項の数 19 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-528317 (P2013-528317)
 (86) (22) 出願日 平成23年9月9日 (2011. 9. 9)
 (65) 公表番号 特表2013-542184 (P2013-542184A)
 (43) 公表日 平成25年11月21日 (2013. 11. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/050954
 (87) 国際公開番号 W02012/033993
 (87) 国際公開日 平成24年3月15日 (2012. 3. 15)
 審査請求日 平成26年9月9日 (2014. 9. 9)
 (31) 優先権主張番号 61/381, 675
 (32) 優先日 平成22年9月10日 (2010. 9. 10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 593089149
 プロメガ コーポレーション
 Promega Corporation
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537
 11-5399 マディソン ウッズ ホ
 ロー ロード 2800番地
 (74) 代理人 100092093
 弁理士 辻居 幸一
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 箱田 篤
 (74) 代理人 100093300
 弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

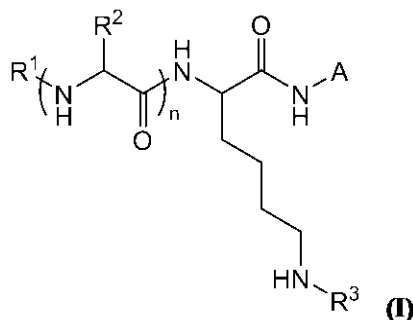
(54) 【発明の名称】 酵素活性をアッセイするための方法

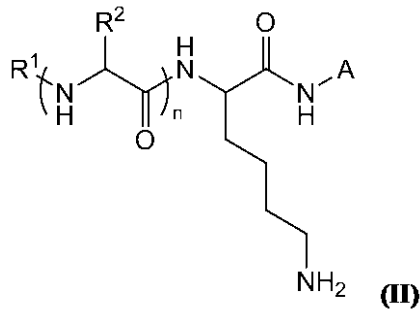
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I) 又は (I I)

【化 1】





の化合物であって、式中、

Aは、リポーター部分であり、Aはアミノルシフェリンであり、

R^1 は、式(I)の化合物の場合、アミノ封鎖基であり、

R^1 は、式(II)の化合物の場合、H、アミノ保護基、およびアミノ封鎖基から選択され、

nは、1～20の整数であり、

各 R^2 は、独立して、アミノ酸側鎖であり、少なくとも1つの R^2 は、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NR^{4a}R^{4b}$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N^+R^{4a}R^{4b}R^{4c}$ 、および $-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(=NR^{5a})NR^{5b}R^{5c}$ から選択され、

R^3 は、アシルであり、

各 R^{4a} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各 R^{4b} は、独立して、アルキルおよびアリールから選択され、

各 R^{4c} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各 R^{5a} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各 R^{5b} は、独立して、アルキルおよびアリールから選択され、かつ

各 R^{5c} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

R^2 が、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N^+R^{4a}R^{4b}R^{4c}$ であるとき、前記化合物は、対アニオンをさらに含む、化合物。

【請求項2】

式(I)において、 R^1 は、アセチルおよびスクシニルからなる群から選択されるアミノ封鎖基であり、式(II)において、 R^1 は、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)、カルボベンジルオキシ(Cbz)およびtertブチルオキシ(Boc)からなる群から選択されるアミノ保護基である、請求項1に記載の化合物。

【請求項3】

nは、2、3、4、または5である、請求項1又は2に記載の化合物。

【請求項4】

少なくとも1つの R^2 は、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NR^{4a}R^{4b}$ である、請求項1～3のいずれかに記載の化合物。

【請求項5】

R^{4a} および R^{4b} は、それぞれメチルである、請求項1～4のいずれかに記載の化合物。

【請求項6】

少なくとも1つの R^2 は、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N^+R^{4a}R^{4b}R^{4c}$ である、請求項1～5のいずれかに記載の化合物。

【請求項7】

少なくとも1つの R^2 は、 $-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(=NR^{5a})NR^{5b}R^{5c}$ である、請求項1～6のいずれかに記載の化合物。

【請求項8】

R^3 は、アシルである、請求項1～7のいずれかに記載の化合物。

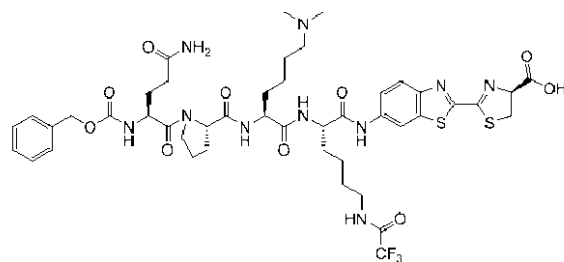
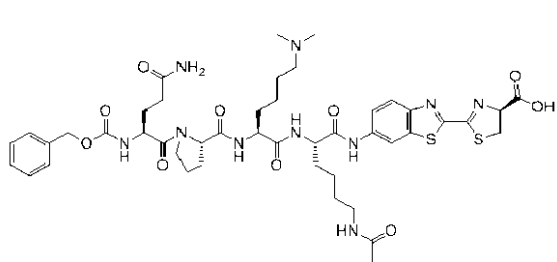
【請求項9】

R^3 は、アセチル又はトリフルオロアセチルである、請求項1～8のいずれかに記載の化合物。

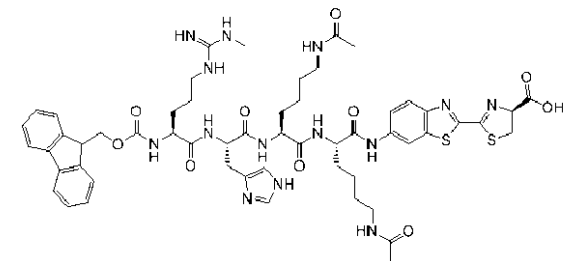
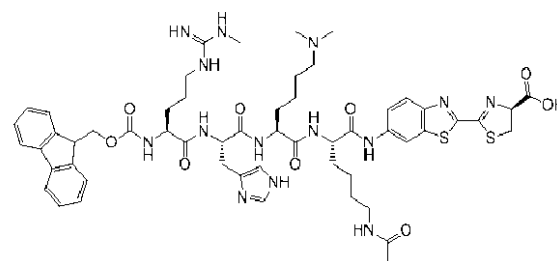
【請求項 10】

前記化合物は、

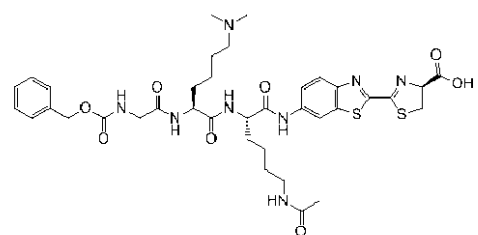
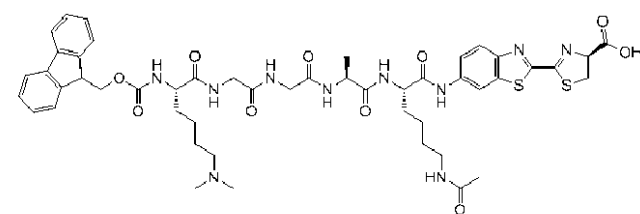
【化 2】



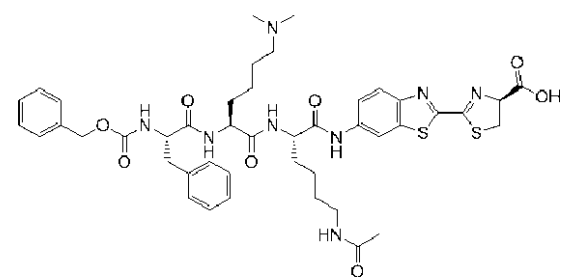
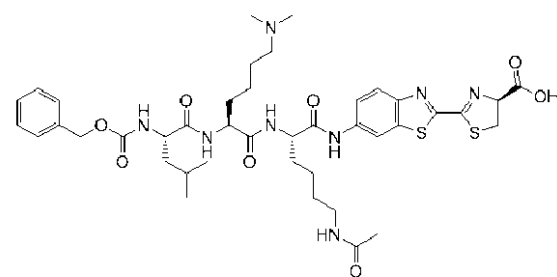
10

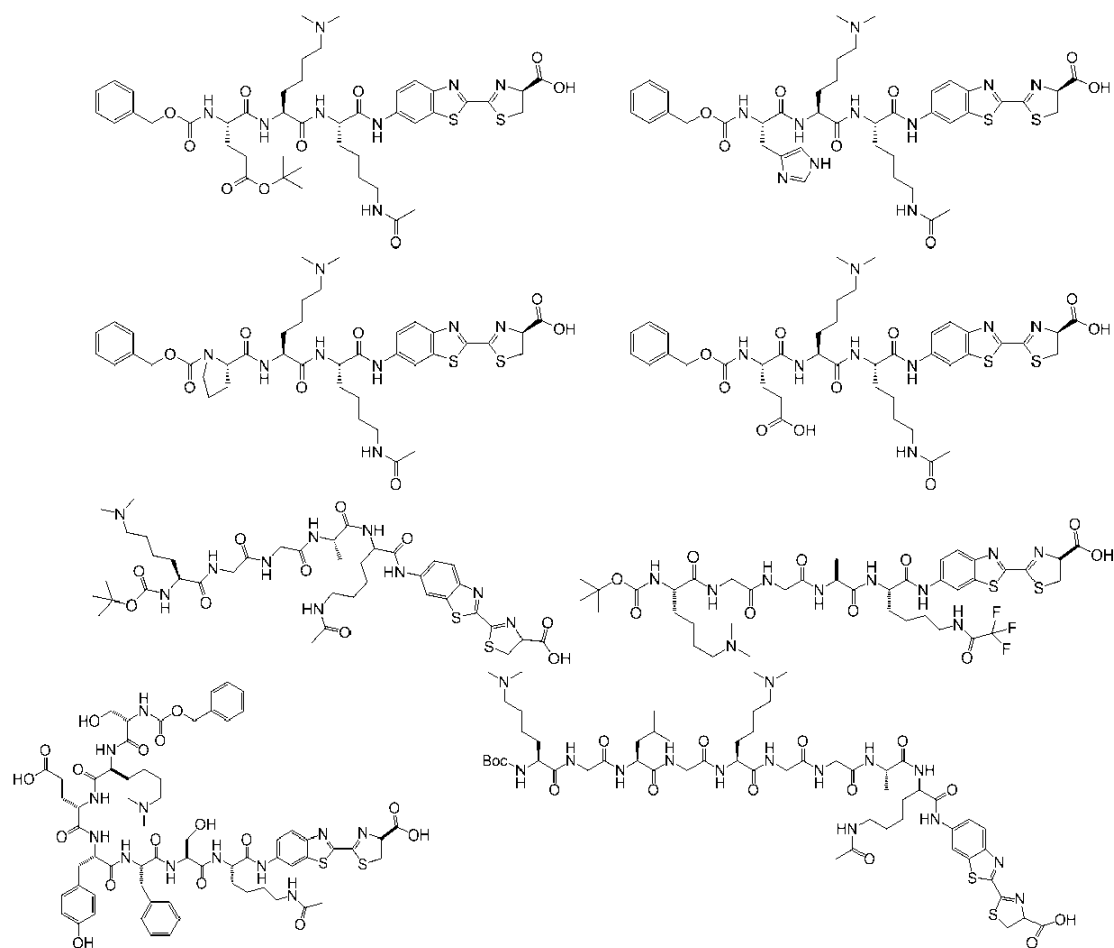


20

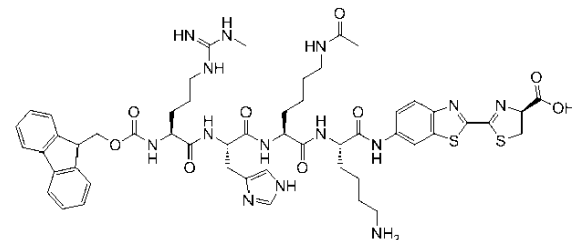
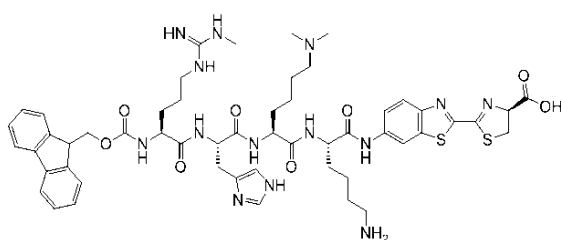
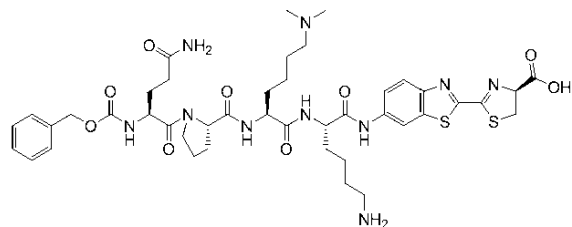
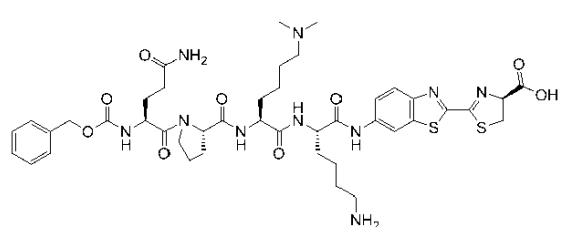


30

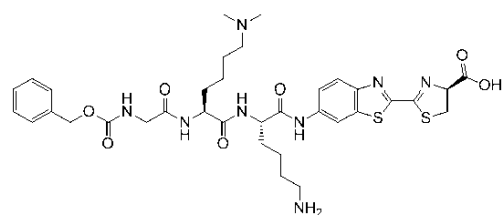
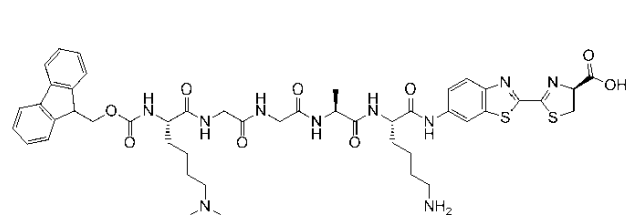




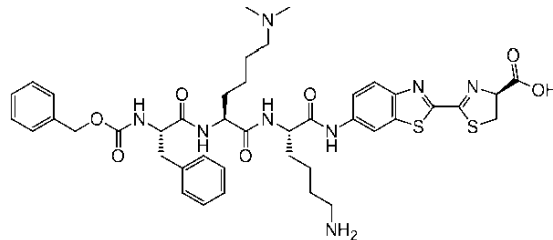
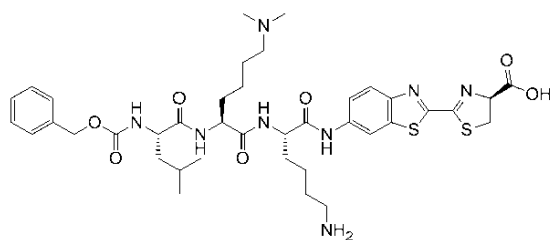
【化 3】



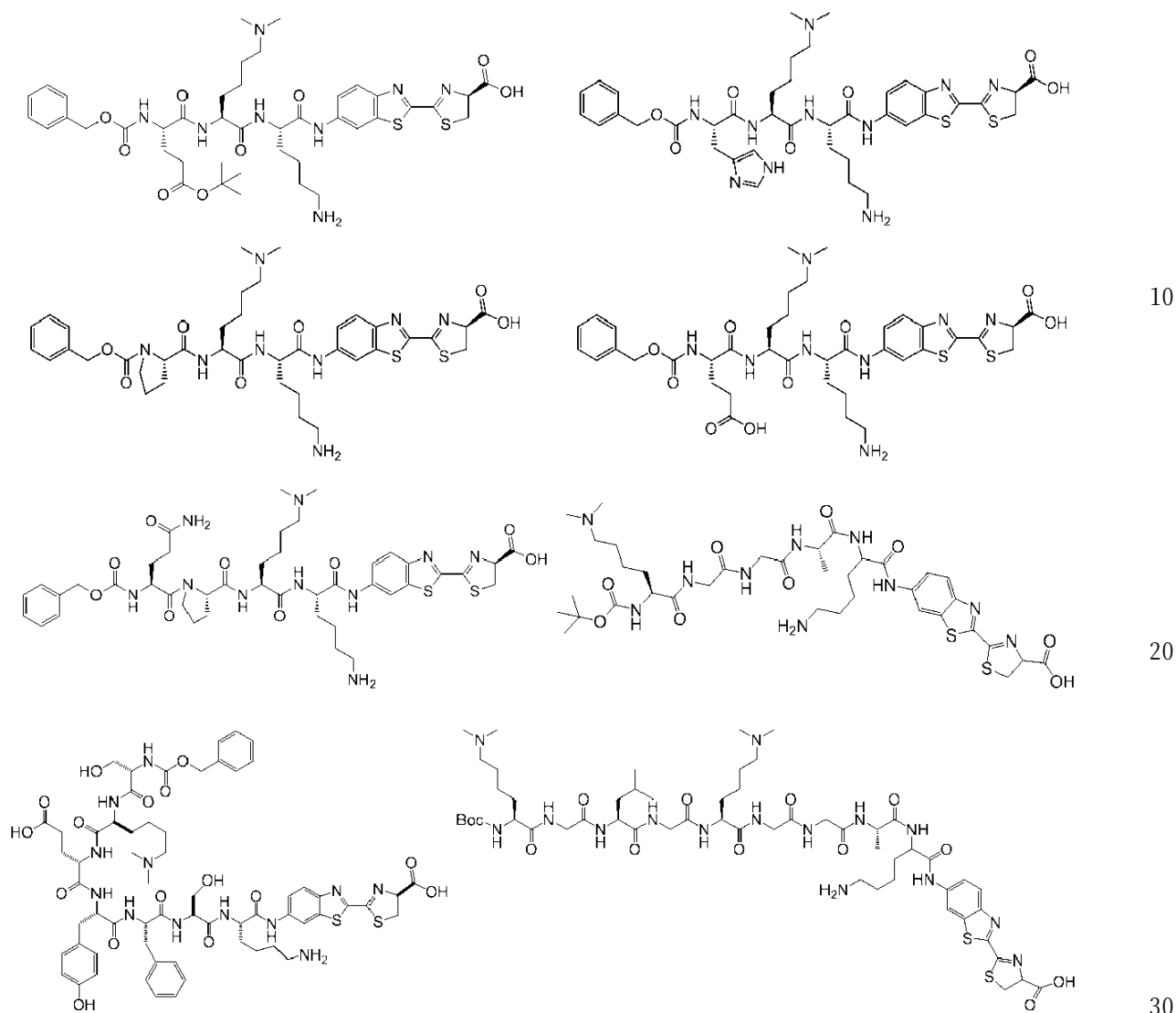
10



20



【化 4】



から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 1 1】

ヒストンデアセチラーゼ酵素の活性を検出する方法であって、

a) 請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の式 (I) の化合物を、ヒストンデアセチラーゼ酵素、および塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼと、前記ヒストンデアセチラーゼ酵素を前記式 (I) の化合物と反応させて生成物を形成し、前記エンドペプチダーゼを前記生成物と反応させて化合物 $A-NH_2$ を放出させるのに十分な条件下で、反応させることと、

b) 前記化合物 $A-NH_2$ を検出することと、を含む、方法。

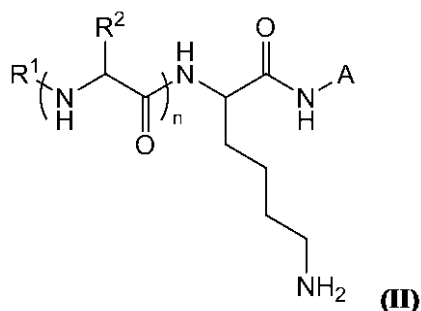
【請求項 1 2】

前記エンドペプチダーゼは、前記式 (I) の化合物と反応しない、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記生成物は、以下の式 (I I)

【化 5】



10

を有する、請求項 1 1 又は 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

ヒストンアセチルトランスフェラーゼ酵素の活性を検出する方法であって、

- a) 請求項 1 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の式 (I I) の化合物を、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ酵素と、前記ヒストンアセチルトランスフェラーゼ酵素を前記式 (I I) の化合物と反応させて生成物を形成するのに十分な条件下で、反応させることと、
- b) 塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼを添加して、前記エンドペプチダーゼが前記式 (I I) の化合物と反応し、化合物 A-NH₂を放出するようにすることと、
- c) 前記化合物 A-NH₂を検出することと、を含む、方法。

20

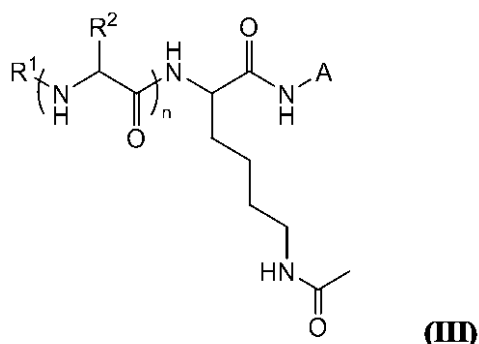
【請求項 1 5】

前記エンドペプチダーゼは、前記生成物と反応しない、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記生成物は以下の式 (I I I) の化合物と反応しない、請求項 1 4 に記載の方法。

【化 6】



30

を有する、請求項 1 4 又は 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

- a. 請求項 1 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の式 (I) または式 (I I) の化合物と、
 - b. 塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼと、
- を含む、組成物。

【請求項 1 8】

- a. 請求項 1 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の式 (I) または式 (I I) の化合物と、
 - b. 塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼと、
- を含む、キット。

40

【請求項 1 9】

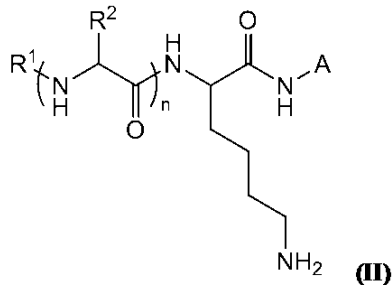
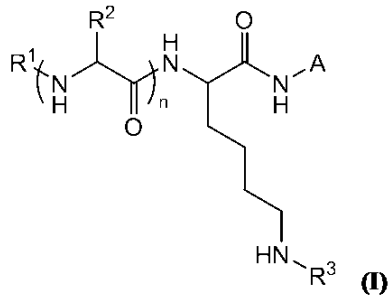
標的酵素の活性を検出する方法であって、

- a) 少なくとも 1 つの封鎖アルギニンまたはリジン残基を含む化合物を、標的酵素、および塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼと反応させて、前記反応が化合物 A-NH₂の形成をもたらすことと、
- b) 前記化合物 A-NH₂を検出することと、を含む、方法であって、
A はアミノルシフェリンであり、

50

前記化合物が、式 (I) 又は (II) の化合物からなる、前記方法：

【化 7】



式中、

A は、リポーター部分であり、A はアミノルシフェリンであり、

R^1 は、式 (I) の化合物の場合、アミノ封鎖基であり、

R^1 は、式 (II) の化合物の場合、H、アミノ保護基、およびアミノ封鎖基から選択され、

n は、1 ~ 20 の整数であり、

各 R^2 は、独立して、アミノ酸側鎖であり、少なくとも 1 つの R^2 は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^{4a}\text{R}^{4b}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{R}^{4a}\text{R}^{4b}\text{R}^{4c}$ 、および $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{NR}^{5a})\text{NR}^{5b}\text{R}^{5c}$ から選択され、

R^3 は、アシルであり、

各 R^{4a} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各 R^{4b} は、独立して、アルキルおよびアリールから選択され、

各 R^{4c} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各 R^{5a} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各 R^{5b} は、独立して、アルキルおよびアリールから選択され、かつ

各 R^{5c} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

R^2 が、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{R}^{4a}\text{R}^{4b}\text{R}^{4c}$ であるとき、前記化合物は、対アニオンをさらに含む。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2010年9月10日に出願された米国仮出願第61/381,675号に対して優先権を主張し、その全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

多くのアッセイ技術において、最適なアッセイを達成するためには複数の酵素を使用することが必要である。そのようなアッセイの目標は、基質上の1つの酵素（標的酵素）の活性を排他的に測定することである。しかし、標的酵素が目的とする反応を触媒すると、容易に定量可能であるか、少量で測定することができるか、または酵素の活性とともに直線的に増加もしくは減少するシグナルを生成するために、追加の酵素または複数の酵素が

使用され得る。

【0003】

理想的なアッセイは、全ての基質および酵素を単一の反応混合物に混合することを可能にするだろう。しかしながら、望ましくない副反応を防止し、アッセイが標的酵素の活性を排他的に監視できるようにするために、追加の酵素は、目的とする基質とのみ、かつ目的とする基質上の所定の位置でのみ反応しなければならない。

【発明の概要】

【0004】

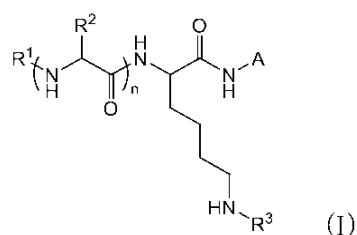
本発明は、ヒストンデアセチラーゼおよびヒストンアセチルトランスフェラーゼ等の酵素の活性をアッセイするための化合物および方法を提供する。一部の実施形態では、アッセイは、単一のステップで、即ち同種アッセイで実施され得る。

10

【0005】

したがって、一態様において、本発明は、式 (I)

【化1】



20

の化合物を特徴とし、式中、

A は、リポーター部分であり、

R^1 は、H、アミノ保護基、およびアミノ封鎖基から選択され、

n は、1～20の整数であり、

各 R^2 は、独立して、アミノ酸側鎖であり、少なくとも1つの R^2 は、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NR^{4a}R^{4b}$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N^+R^{4a}R^{4b}R^{4c}$ 、および $-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(=NR^{5a})NR^{5b}R^{5c}$ から選択され、

R^3 は、アシルおよびスルホニルから選択され、

各 R^{4a} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

30

各 R^{4b} は、独立して、アルキルおよびアリールから選択され、

各 R^{4c} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各 R^{5a} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各 R^{5b} は、独立して、アルキルおよびアリールから選択され、かつ

各 R^{5c} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

R^2 が、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N^+R^{4a}R^{4b}R^{4c}$ であるとき、化合物は、対アニオンをさらに含む。

【0006】

別の態様において、本発明は、ヒストンデアセチラーゼ酵素の活性を検出する方法を特徴とし、

40

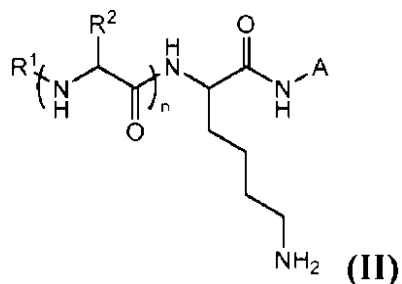
a) 式 (I) の化合物と、ヒストンデアセチラーゼ酵素、および塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼとを、ヒストンデアセチラーゼ酵素が式 (I) の化合物と反応して生成物を形成し、エンドペプチダーゼが生成物と反応して化合物 $A-NH_2$ を放出するのに十分な条件下で、反応させることと、

b) 化合物 $A-NH_2$ を検出することと、を含む。

【0007】

別の態様において、本発明は、式 (II)

【化 2】



の化合物を特徴とし、式中、

A は、リポーター部分であり、

R^1 は、H、アミノ保護基、およびアミノ封鎖基から選択され、

n は、1 ～ 20 の整数であり、

各 R^2 は、独立して、アミノ酸側鎖であり、少なくとも 1 つの R^2 は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^{4a}\text{R}^{4b}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{R}^{4a}\text{R}^{4b}\text{R}^{4c}$ 、および $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{NR}^{5a})\text{NR}^{5b}\text{R}^{5c}$ から選択され、

各 R^{4a} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各 R^{4b} は、独立して、アルキルおよびアリールから選択され、

各 R^{4c} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各 R^{5a} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各 R^{5b} は、独立して、アルキルおよびアリールから選択され、かつ

各 R^{5c} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

R^2 が、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{R}^{4a}\text{R}^{4b}\text{R}^{4c}$ であるとき、化合物は、対アニオンをさらに含む。

【0008】

別の態様において、本発明は、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ酵素の活性を検出する方法を特徴とし、

a) 式 (I I) の化合物と、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ酵素とを、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ酵素が式 (I I) の化合物と反応して生成物を形成するのに十分な条件下で、反応させることと、

b) 塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼを添加して、エンドペプチダーゼが式 (I I) の化合物と反応し、化合物 $\text{A}-\text{NH}_2$ を放出するようにすることと、

c) 化合物 $\text{A}-\text{NH}_2$ を検出することと、を含む。

【0009】

別の態様において、本発明は、

a. 式 (I) または式 (I I) の化合物と、

b. 塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼと、

c. 任意に検出試薬と、を含む組成物を特徴とする。

【0010】

別の態様において、本発明は、

a. 式 (I) または式 (I I) の化合物と、

b. 塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼと、

c. 任意に検出試薬と、を含むキットを特徴とする。

【0011】

別の態様において、本発明は、標的酵素の活性を検出する方法であって、

a) 少なくとも 1 つの封鎖アルギニンまたはリジン残基を含む化合物を標的酵素、および塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼと反応させて、反応が化合物 $\text{A}-\text{NH}_2$ の形成をもたらすことと、

b) 化合物 $\text{A}-\text{NH}_2$ を検出することと、を含む方法を特徴とする。

【0012】

10

20

30

40

50

本発明の他の態様および実施形態は、以下の説明および添付の図面から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】本発明の方法を使用して実行された酵素アッセイの図である。

【図2】本発明の代表的な方法を使用した、阻害剤であるニコチンアミドを使用した酵素 SIRT1 (Biomol) の阻害アッセイの結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明は、ヒストンデアセチラーゼおよびヒストンアセチルトランスフェラーゼ等の酵素の活性をアッセイするための化合物および方法を提供する。一部の実施形態では、アッセイは、単一のステップで、即ち同種アッセイで実施され得る。本明細書に記載される化合物は、ペプチド系であり、ペプチド鎖に少なくとも1つの封鎖リジンまたはアルギニン残基を有する。これらの化合物のペプチド鎖は、リポーター部分に直接結合される、潜在的に修飾されたりジン残基により終結される。この末端リジンは、ヒストンデアセチラーゼ酵素またはヒストンアセチルトランスフェラーゼ酵素等の測定される酵素の活性部位である。本明細書に記載される方法は、本明細書に記載される化合物をヒストンデアセチラーゼまたはヒストンアセチルトランスフェラーゼ等の酵素、およびトリプシンまたは Lys-C 等の塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼと反応させて、後に検出され得るリポーター部分を放出させることを伴う。

【0015】

定義

本明細書で使用される「アシル」という用語は、式 $-C(=O)R$ の基を指し、式中、Rは、アシル基の置換基、例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、もしくはヘプチル基等の、 C_{1-7} 、 C_{1-6} 、 C_{1-5} 、もしくは C_{1-4} 分枝状または非分枝状アルキル基（アルキルアシルまたはアルカノイル基とも称される）、 C_{3-20} 、 C_{3-10} 、もしくは C_{3-6} ヘテロシクリル基（ヘテロシクリルアシル基とも称される）、または C_{6-30} 、 C_{5-20} もしくは C_{6-14} アリール基（アリールアシル基とも称される）である。アシル基の例としては、 $-C(=O)CH_3$ （アセチル）、 $-C(=O)CH_2CH_3$ （プロピオニル）、 $-C(=O)C(CH_3)_3$ （ブチリル）、および $-C(=O)Ph$ （ベンゾイル）が挙げられるが、これらに限定されない。Rは、例えば1つ以上のハロ基、オキソ基、またはヒドロキシ基でさらに置換され得る。例えば、Rは、トリフルオロメチル等のハロアルキルであってもよい。

【0016】

本明細書で使用される「アルキル」という用語は、例えば、1～30個の炭素原子、多くの場合、1～12個、1～10個、1～8個、1～7個、1～6個、1～5個、または1～4個の炭素原子を有する分枝状、非分枝状、または環状炭化水素を指す。例としては、メチル、エチル、1-プロピル、2-プロピル、1-ブチル、2-メチル-1-プロピル、2-ブチル、2-メチル-2-プロピル（*t*-ブチル）、1-ペンチル、2-ペンチル、3-ペンチル、2-メチル-2-ブチル、3-メチル-2-ブチル、3-メチル-1-ブチル、2-メチル-1-ブチル、1-ヘキシル、2-ヘキシル、3-ヘキシル、2-メチル-2-ペンチル、3-メチル-2-ペンチル、4-メチル-2-ペンチル、3-メチル-3-ペンチル、2-メチル-3-ペンチル、2, 3-ジメチル-2-ブチル、3, 3-ジメチル-2-ブチル、ヘキシル、オクチル、デシル、ドデシル等が挙げられるが、これらに限定されない。アルキルは、非置換または置換であり得る。アルキルはまた、任意に、部分的または完全に不飽和であり得る。

【0017】

本明細書で使用される「アリール」という用語は、1個の水素原子を親芳香族環系の単一炭素原子から除去することから生じる芳香族炭化水素基を指す。ラジカルは、親環系の飽和または不飽和炭素原子にあってもよい。アリール基は、6～30個の炭素原子、例え

ば6～20個の炭素原子または6～14個の炭素原子を有することができる。例えば、アリール基は、 C_6 、 C_{10} 、 C_{12} 、 C_{13} 、または C_{14} のアリール基であってもよい。アリール基は、単環（例えばフェニル）または複数の圧縮（縮合）環を有することができ、少なくとも1つの環は、芳香族（例えば、ナフチル、ジヒドロフェナントレニル、フルオレニル、またはアントリル）である。典型的なアリール基としては、ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ビフェニル等に由来するラジカルが挙げられるが、これらに限定されない。アリールは、アルキル基について上述されたように、非置換であるか、または任意に置換されていてもよい。

【0018】

本明細書で使用される「ハロ」または「ハロゲン」とは、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素を指す。

10

【0019】

本明細書で使用される「スルホン」または「スルホニル」という用語は、式 $-S(=O)_2R$ の基を指し、式中、Rは、スルホンの置換基、例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、またはヘプチル基等の C_{1-12} 、 C_{1-10} 、 C_{1-8} 、 C_{1-7} 、 C_{1-6} 、 C_{1-5} 、もしくは C_{1-4} アルキル基、 C_{3-20} 、 C_{3-10} 、もしくは C_{3-6} ヘテロシクリル基、または C_{6-30} 、 C_{5-20} 、もしくは C_{6-14} アリール基である。スルホン基の例としては、 $-S(=O)_2CH_3$ （メタンスルホニル、メシル）、 $-S(=O)_2CF_3$ （トリフルリル）、 $-S(=O)_2CH_2CH_3$ 、 $-S(=O)_2C_4F_9$ （ノナフルリル）、 $-S(=O)_2CH_2CF_3$ （トレシル）、 $-S(=O)_2Ph$ （フェニルスルホニル）、4-メチルフェニルスルホニル（トシル）、4-ブロモフェニルスルホニル（ブロシル）、および4-ニトロフェニルスルホニル（ノシル）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0020】

本明細書で使用される「対アニオン」という用語は、正荷電されたアミノ酸側鎖の電荷を平衡するために存在する形式負電荷を有する原子または基を指す。対アニオンは、ハロゲン化物（例えば、フッ化物、塩化物、臭化物、およびヨウ化物）、 N_3^- 、 PO_4^{3-} 、 HPO_4^{2-} 、 $H_2PO_4^-$ 、 SO_4^{2-} 、 HSO_4^- 、 NO_3^- 、 ClO_4^- 、 CO_3^{2-} 、 HCO_3^- 、 CrO_4^{2-} 、 $Cr_2O_7^{2-}$ 、 CN^- 、 OH^- 、 $C_2O_4^{2-}$ 、 MnO_4^- 、 BF_4^- 、 PF_6^- 、 $HCOO^-$ 、 CH_3COO^- 、 CF_3COO^- 等を含むが、これらに限定されない。

【0021】

本明細書で使用される「天然のアミノ酸」という用語は、グリシン（Gly）、アラニン（Ala）、バリン（Val）、ロイシン（Leu）、イソロイシン（Ile）、リジン（Lys）、アルギニン（Arg）、ヒスチジン（His）、プロリン（Pro）、セリン（Ser）、スレオニン（Thr）、フェニルアラニン（Phe）、チロシン（Tyr）、トリプトファン（Trp）、アスパラギン酸（Asp）、グルタミン酸（Glu）、アスパラギン（Asn）、グルタミン（Gln）、システイン（Cys）、およびメチオニン（Met）をはじめ、タンパク質に存在する一般的で天然に生じるL-アミノ酸のうちのいずれか1つを指す。

30

【0022】

本明細書で使用される「非天然アミノ酸」という用語は、上述の天然のアミノ酸ではない全てのアミノ酸を指す。そのようなアミノ酸は、上述の20の天然に生じるアミノ酸のいずれかのD-アイソマーを含む。非天然アミノ酸は、ホモセリン、オルニチン、ノルロイシン、およびチロキシンも含む。さらなる非天然アミノ酸は、当業者に周知である。非天然アミノ酸は、D-またはL-アイソマーであってもよい。非天然アミノ酸はまた、 α アミノ酸または β アミノ酸であってもよい。非天然アミノ酸はまた、リン酸化セリン、スレオニンもしくはチロシン、アシル化リジン、またはアルキル化リジンもしくはアルギニン等の、翻訳後に修飾されたアミノ酸であってもよい。翻訳後に修飾されたアミノ酸の多くの形態が公知である。

40

【0023】

本明細書で使用される「保護されたアミノ酸」という用語は、保護された官能基を追加

50

で含有する上述のアミノ酸側鎖を指す。保護基は、当該技術分野において周知であり、合成手順中の望ましくない反応に対してアミノ、ヒドロキシ、チオ、またはカルボキシ等の官能基を保護することが意図される。保護基は、合成後に化学反応によって除去され得る。保護されたアミノ酸側鎖の例としては、セリンに由来するベンジルオキシメチル、チロシンに由来する(4-メトキシフェニル)メチル、およびグルタメートに由来するtert-ブチルプロパノエートが挙げられる。

【0024】

より一般的には、本明細書で使用される「アミノ酸」という用語は、天然のアミノ酸、非天然アミノ酸、および保護されたアミノ酸を包含する。

【0025】

本明細書で使用される「アミノ酸側鎖」という用語は、アミノ酸の α 炭素に結合される基を指す。それは、アミノ酸の特徴部分であり、 $\text{NH}_2\text{CHC}(\text{O})\text{OH}$ 部分を除去することにより対応するアミノ酸から得られる。例えば、アラニンのアミノ酸側鎖はメチルであり、フェニルアラニンのアミノ酸側鎖はフェニルメチルである。アミノ酸側鎖は、天然のアミノ酸側鎖または非天然のアミノ酸側鎖であってもよい。一部の実施形態では、アミノ酸側鎖は、保護されたアミノ酸側鎖であってもよい。

【0026】

本明細書で使用される「アミノ保護基」とは、その保護基が結合する窒素原子上で化学反応が生じるのを防止する部分を指す。アミノ保護基はまた、化学反応によって除去可能でなければならない。そのような基は、当該技術分野において周知であり、Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd edition, John Wiley & Sons, 1999に詳細に記載されているものを含み、その全体は、参照により本明細書に組み込まれる。適切なアミノ保護基は、カルボベンジルオキシ($-\text{NHCO}-\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ または $-\text{NH}-\text{Cbz}$)、tert-ブチルオキシカルボニル($-\text{NHCO}-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ または $-\text{NH}-\text{Boc}$)、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル($-\text{NH}-\text{Fmoc}$)、2, 2, 2-トリクロロエチルオキシカルボニル($-\text{NH}-\text{Trt}$)、およびアリルオキシカルボニル($-\text{NH}-\text{Alloc}$)を含むが、これらに限定されない。(上記のそれぞれにおいて、 $-\text{NH}-$ は、保護されるアミノ基からの窒素を表す。)

【0027】

本明細書に使用される「アミノ封鎖基」とは、その封鎖基が結合される窒素原子上で化学反応が生じるのを防止する部分を指す。アミノ保護基とは対照的に、アミノ封鎖基は、化学反応によって除去されることが意図されない。そのような基は、例えばアセチル($-\text{NHCO}-\text{CH}_3$)およびスクシニル($-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^-$)等のアシル基を含む。(上記のそれぞれにおいて、 $-\text{NH}-$ は、封鎖されるアミノ基からの窒素を表す。)

【0028】

本明細書で使用される「アミノルシフェリン」という用語は、(4S)-2-(6-アミノ-1, 3-ベンゾチアゾール-2-イル)-4, 5-ジヒドロチアゾール-4-カルボン酸、またはこの分子の置換された類似体を指す。

【0029】

本明細書に記載されるあらゆる数値は、下方値から上方値の全ての値を含む、即ち列挙される最低値と最高値との間の全ての可能な数値の組み合わせが本願において明確に示されていると考えるべきであることを具体的に理解する。例えば、濃度範囲または有益作用範囲が1%~50%と記載される場合、2%~40%、10%~30%、または1%~3%等の値が本明細書において明確に列挙されていると意図される。これらは、何が具体的に意図されるかの単なる例である。

【0030】

また、本明細書で使用される表現および用語は、説明の目的のためであり、制限するものと見なされるべきではないことを理解しなければならない。本明細書における「備える

10

20

30

40

50

」、「含む」、「有する」、およびそれらの変形の使用は、その後に列挙される項目およびそれらの等価物ならびに追加項目を包含することが意図される。

【0031】

ヒストンデアセチラーゼおよびヒストンアセチルトランスフェラーゼ

ヒストンは、真核細胞核に存在するタンパク質であり、DNAのヌクレオソームと呼ばれる構造単位へのパッケージングおよび順序付けを伴う。これらは、DNAが巻きつくスプールとして作用するクロマチンの主タンパク質成分である。ヒストン尾部は、リジンおよびアルギニンのアミノ酸上のアミン基のプロトン化により、通常、正に荷電される。これらの正の電荷は、ヒストン尾部がDNA骨格上の負に荷電されたリン酸基と相互作用し、それに結合するのを補助する。ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（HAT）によってもたらされるリジン残基のε-アミノ基のアセチル化は、アミノ基をアミドに変換し、正の電荷を排除し、それによってDNAに対する親和性を低下させる。親和性の減少は、クロマチンの伸長を可能にし、DNAの遺伝的転写が生じるのを可能にする。ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）は、ヒストン上のリジン残基からアセチル基を除去し、ヒストン尾部の正の電荷を増加させ、ヒストンとDNA骨格との間の結合を助長する。DNA結合の増加は、DNA構造を圧縮し、転写を防止する。したがって、ヒストンアセチル化および脱アセチル化は、遺伝子発現の制御において重要な役割を果たす（Cell Research, 17, 195-211 (2007)）。HATおよびHDACがヒストンの修飾に果たす役割に加えて、これらが他にも多数のタンパク質をアセチル化および脱アセチル化することも分かっている（Science, 325, 834-840 (2009)）。アセチル化は、細胞生化学におけるその重要性に関してリン酸化と対抗すると言われている（EMBO, 19, 1176-1179 (2000)）。

【0032】

HDACは、それらの機能、DNA配列の類似性、および酵母ヒストンデアセチラーゼに対する相同性にに基づき4つの群に分類される（Chem. Biol. 9, 3-16 (2002)）：

HDAC 1、-2、-3、および-8を含むクラスIは、酵母RPD3遺伝子に関連する。

HDAC 4、-5、-6、-7、-9、および-10を含むクラスIIは、酵母Hda1遺伝子に関連する。

サーチュインとしても知られるクラスIIIは、Sir2遺伝子に関連し、SIRT1-7を含む。

HDAC 11を含むクラスIVは、クラスIとIIの両方の特徴を有する。

【0033】

クラスIおよびIIは、亜鉛含有触媒ドメインに結合することによってトリコスタチンA（TSA）により活性が阻害される「古典的な」HDACと見なされる。クラスIIIは、TSAの影響を受けないNAD⁺依存性タンパク質のファミリーである。クラスIVは、クラスIおよびIIのものに対するDNA配列の類似性に基づくハイブリッドカテゴリーである。

【0034】

HDACは、多様なヒト疾患に対して潜在的に有用な治療標的として認識されている（Nat. Rev. Drug Discovery, 5, 769-784 (2006)、J. Neuroscience, 29, 11451-11460 (2009)）。HDAC阻害剤は、一部のものが細胞増殖を阻害し、腫瘍細胞の分化および／またはアポトーシスを誘発することが分かっているため、癌治療のために開発されている（Cancer Lett., 277, 8-21 (2009)）。HDACは、糖尿病および他の代謝疾患ならびに加齢性の疾患においても役割を果たす場合がある（Mol. Endocrin., 21, 1745-1755 (2007)）。

【0035】

よって、異なるクラス間の生物学的関係の継続的な特徴付けを補助するためだけでなく

、新しいHDAC阻害剤の開発を補助するための研究ツールとしても、HDAC活性についてのアッセイが極めて望ましい(Methods, 36, 332-337 (2005))。同様に、HAT活性についてのアッセイも望ましい(Methods 26, 245-253 (2002))。

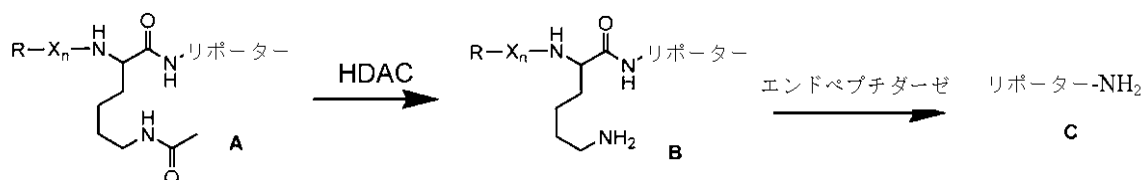
アッセイ

【0036】

HDAC活性についての代表的なアッセイをスキーム1に図示する。基質化合物Aにおいて、Xは、任意のアミノ酸であり、nは、1～約20の整数であり、Rは、水素、アミノ保護基、またはアミノ封鎖基である。HDAC酵素の活性は、化合物Aからアセチル基を除去し、化合物Bを生成する。

スキーム1

【化3】



【0037】

シグナルを生成するために、ペプチドとリポーター部分との間のアミド結合は、後に検出され得る化合物Cを生成するために切断されなければならない。化合物Bを化合物Cに変換するために、トリプシン等の塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼがアッセイ系に添加される。未修飾のリジンに対するエンドペプチダーゼの特異性は、それが化合物Aを切断するのを防止し、結果として、アッセイにおいて生成されたシグナルの全てがHDAC活性に依存する。

【0038】

リポーター部分は、それがまだペプチドに結合しているときにシグナルを生成しないように選択され得る。例えば、フルオロフォアは、ペプチドに結合されるとき急冷され得るが、放出されるときに検出可能であってもよい。適切なリポーター部分の別の例は、アミノルシフェリンであり、これは、ペプチドに結合されるとき、ルシフェラーゼの基質ではないが、ルシフェラーゼと反応して、放出されるときに発光を生成する。化合物Cの蛍光または発光は、後に標的酵素の活性を判定するために使用される、存在する化合物Cの量を判定するために定量化され得る。上述のアッセイは、完全に単一ステップ、即ち同種アッセイで行うことができるため、HDAC活性は、即時に検出され得る。

【0039】

上述のアッセイを最適化するために、化合物Aに追加のアミノ酸(X)_nが組み込まれ得る。このアミノ酸配列の最適化が、HDACによる基質のより良好な認識を可能にし、アッセイの全体的な性能を改善する可能性がある。アミノ酸の慎重な選択も、異なるHDACアイソザイム間の選択性を可能にすることがある。1つのHDACアイソザイムの活性を他のものに対して選択的に検出するアッセイは、非常に有用な研究ツールであろう。しかしながら、スキーム1に図示されるアッセイ設計は、特に、アッセイが単一ステップで実施される場合に、認識配列(X)_nにおけるリジンまたはアルギニン残基の使用を排除する。アルギニンまたはリジンが含まれる場合、それは、トリプシン等の塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼによって認識され得る。よって、エンドペプチダーゼが初期の反応混合物に含まれる場合、化合物Aは、HDAC酵素との反応前に切断され得る。

【0040】

この認識配列にリジンまたはアルギニン残基を含むことが、そのような認識および選択性に重要な場合もある。そのため、本発明の化合物および方法は、塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼによる認識を防止する一方で、認識配列(X)_nにおけるアミノ

10

20

30

40

50

酸としてのリジンおよびアルギニンの使用を可能にするように設計された。本化合物および方法は、エンドペプチダーゼによる認識を封鎖するように修飾されたリジンまたはアルギニン残基を使用しながらも、標的酵素による認識をなお可能とするものである。したがって、基質は、標的酵素に作用されるまで切断されず、リポーター部分からのいずれのシグナルもH D A C等の標的酵素の活性によるものであることを確実にする。このことが、アッセイが単一ステップで容易に実施されることを可能にする。

【0041】

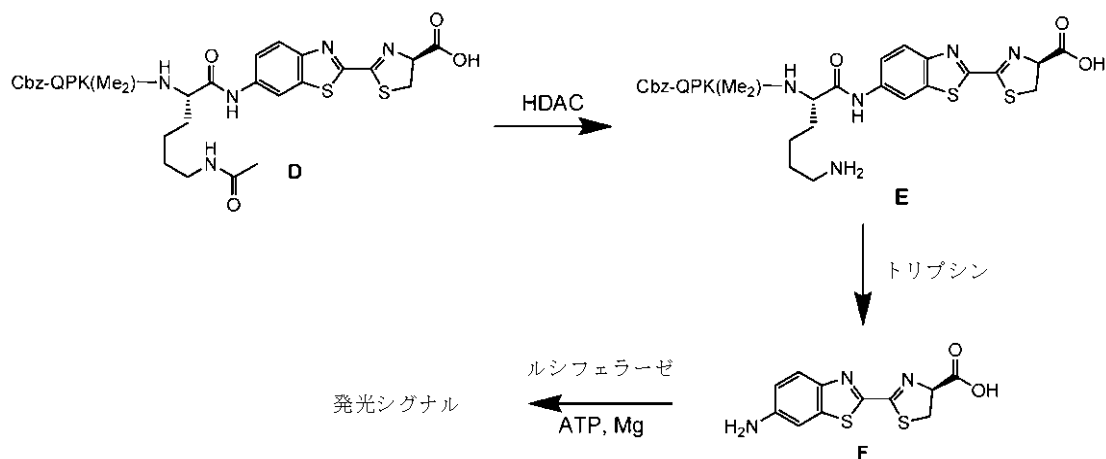
リジンおよびアルギニン残基がトリプシン等の塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼによって認識されるのを防止する封鎖基は、アルキル基およびアリール基を含む。アルキル化またはアリール化されたリジンおよびアルギニン残基は合成してもよく、また商業的な供給源から購入してもよい。

【0042】

基質の認識配列に修飾されたリジン残基を使用する特定の代表的なアッセイをスキーム2に図示する。この例において、ジメチル化リジン残基が認識配列に存在する。メチル基の存在は、トリプシン等のエンドペプチダーゼによる認識を封鎖し、それによってジメチル化されたリジン残基とアセチル化されたリジン残基との間の切断を防止する。基質Dは、H D A C酵素によって脱アセチル化され、生成物Eを生成する。トリプシンは、脱アセチル化されたリジン残基を認識し、隣接するアミド結合を切断して、アミノルシフェリンFを放出する。その後、ルシフェラーゼは、Fと反応して、発光シグナルを生成する。化合物Dまたは化合物Eのいずれも、ルシフェラーゼによって認識されない。

スキーム2

【化4】



【0043】

上述のアッセイは、例えば、最初に基質DをH D A Cとインキュベートし、その後、後続のステップまたは複数のステップでトリプシンおよびルシフェラーゼを添加して、発光シグナルを生成することにより、複数のステップで実施され得るが、本アッセイは、単一のステップで実施され得る。基質D、H D A C、トリプシン、ルシフェラーゼ、および必要なあらゆる補因子は、共役するほぼ同時の反応をもたらすことができる単一の反応混合物へと混合され得る。単一ステップでアッセイを実施する能力は、迅速なデータの取得をもたらす、N A D依存性デアセチラーゼ活性に比例し得るシグナルを伴う。単一ステップ反応を図示する概略図を図1に図示する。

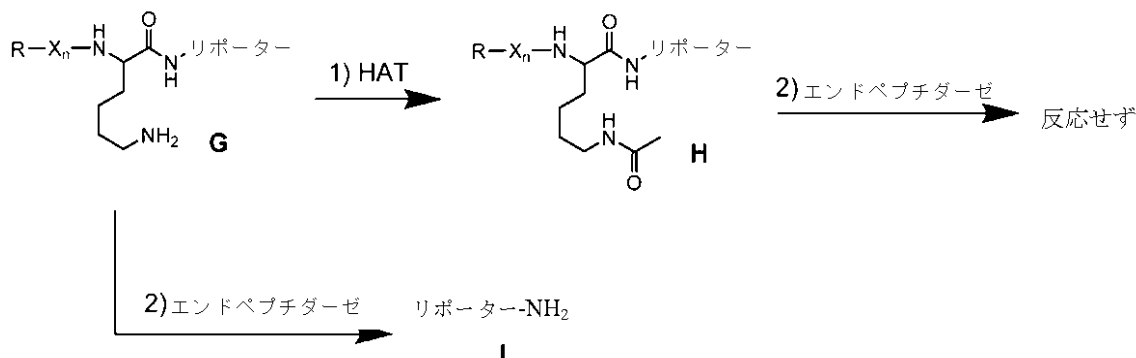
【0044】

H A T活性についての代表的なアッセイをスキーム3に図示する。変動要因はスキーム1で上記に定義される通りである。この場合、H A Tの活性は、化合物Gのリジン残基のアセチル化をもたらす、エンドペプチダーゼと反応しない化合物Hを形成する。基質Gは、エンドペプチダーゼによって認識され、リポーター化合物Iを生成する。したがって、この場合、H A T活性は、リポーターからのシグナルの定量的減少により監視される。こ

のアッセイにおいて、化合物 G は、最初に H A T（ステップ 1）とプレインキュベートされ、初期反応後に得られる混合物にエンドペプチダーゼが添加される（ステップ 2）。これは、H A T およびエンドペプチダーゼが化合物 G において競合せず、かつリポーターからの全てのシグナル出力が H A T によって H に変換されない G の量のみを正確に反映することを確実にする。

スキーム 3

【化 5】



【0045】

認識配列 X_n における封鎖リジンおよびアルギニン残基の使用は、化合物 G がリポーター部分に抱合される C 末端リジン以外の位置でエンドペプチダーゼによって切断されるのを防止する一方で、目的とする H A T による認識の最適化を可能にする。認識におけるエンドペプチダーゼ切断部位の除去に対する潜在的な利点は、共役酵素反応の簡略化された速度論、必要とされるエンドペプチダーゼの量の減少、およびリポーターからペプチドを切断するために必要とされる時間の短縮を含む。

【0046】

ペプチド基質

一態様において、本発明は、本明細書に記載されるアッセイ等の同種アッセイに使用され得る新規化合物を特徴とする。本化合物は、塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼによる認識を防止する、少なくとも 1 つの封鎖（例えば、メチル化、ジメチル化、またはアリール化）されたリジンまたはアルギニン残基を特徴とする。

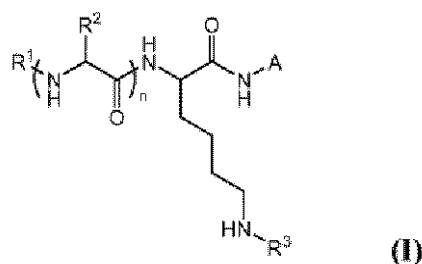
【0047】

一部の実施形態では、化合物は、保護（例えばアシル化またはスルホニル化）され、リポーター部分に抱合され得る C 末端リジン残基を特徴とする。そのような化合物は、標的酵素、例えば H D A C の活性を検出するために、アッセイに使用され得る。例えば、アセチル化リジン残基は、リジン残基を脱アセチル化して、その天然の遊離アミノ基を有するリジンを含む生成物をもたらす H D A C 酵素によって認識される。生成物は、エンドペプチダーゼによって認識され、かつ切断され得、後に検出され得るリポーター部分を放出する。H D A C 酵素の活性は、検出されたリポーター部分の量に基づき計算され得る。

【0048】

本発明の代表的なペプチド基質は、式 (I)

【化 6】



の化合物を含み、式中、

Aは、リポーター部分であり、
 R^1 は、H、アミノ保護基、およびアミノ封鎖基から選択され、
 n は、1～20の整数であり、
 各 R^2 は、独立して、アミノ酸側鎖であり、少なくとも1つの R^2 は、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NR^{4a}R^{4b}$ 、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N^+R^{4a}R^{4b}R^{4c}$ 、および
 $-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(=NR^{5a})NR^{5b}R^{5c}$ から選択され、
 R^3 は、アシルおよびスルホニルから選択され、
 各 R^{4a} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、
 各 R^{4b} は、独立して、アルキルおよびアリールから選択され、
 各 R^{4c} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、
 各 R^{5a} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、
 各 R^{5b} は、独立して、アルキルおよびアリールから選択され、かつ
 各 R^{5c} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、
 R^2 が、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N^+R^{4a}R^{4b}R^{4c}$ であるとき、化合物は、対アニオンをさらに含む。

10

【0049】

一部の実施形態では、Aは、アミノルシフェリン、クマリン、ローダミン、セレンテラジン、レゾルフィン、およびクレシルバイオレットから選択される。

【0050】

一部の実施形態では、 R^1 は、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc)、カルボベンジルオキシ (Cbz)、tertブチルオキシ (Boc)、アセチル、およびスクシニルからなる群から選択されるアミノ保護基またはアミノ封鎖基である。

20

【0051】

一部の実施形態では、 n は、2、3、4、または5である。

【0052】

一部の実施形態では、少なくとも1つの R^2 は、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NR^{4a}R^{4b}$ である。一部の実施形態では、 R^{4a} は水素であり、 R^{4b} はメチルである。一部の実施形態では、 R^{4a} および R^{4b} は、それぞれメチルである。

【0053】

一部の実施形態では、少なくとも1つの R^2 は、 $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-N^+R^{4a}R^{4b}R^{4c}$ である。一部の実施形態では、 R^{4a} 、 R^{4b} 、および R^{4c} は、それぞれメチルである。

30

【0054】

一部の実施形態では、少なくとも1つの R^2 は、 $-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(=NR^{5a})NR^{5b}R^{5c}$ である。一部の実施形態では、 R^{5a} および R^{5b} は水素であり、 R^{5c} はメチルである。

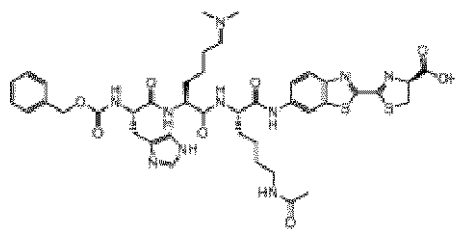
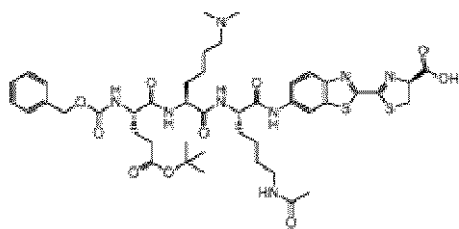
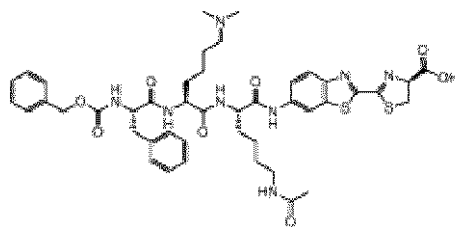
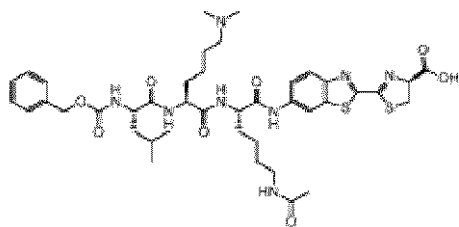
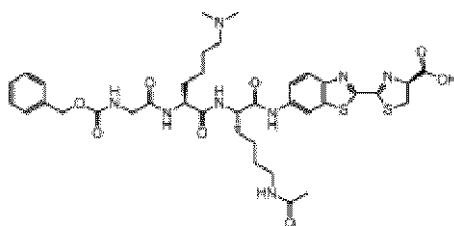
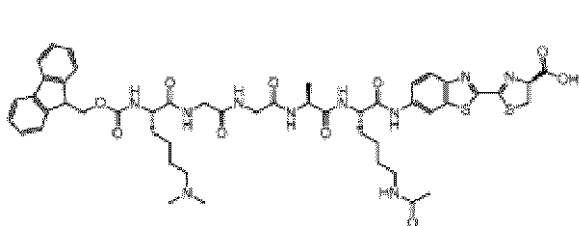
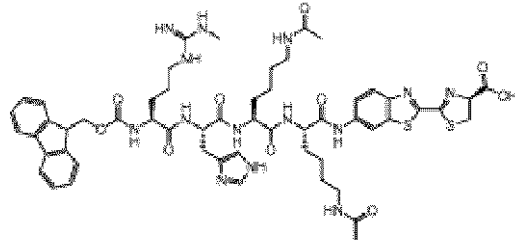
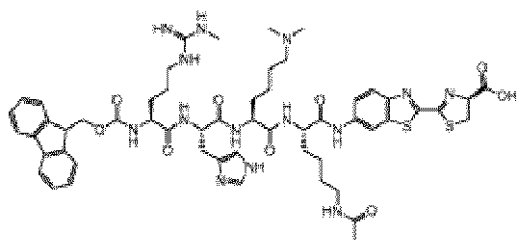
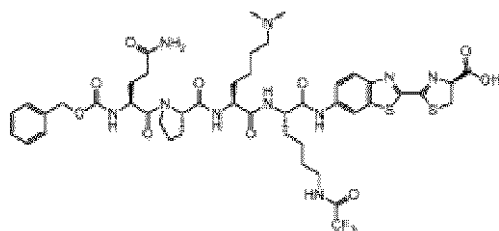
【0055】

一部の実施形態では、 R^3 は、アシル (例えば、アセチルまたはトリフルオロアセチル) である。

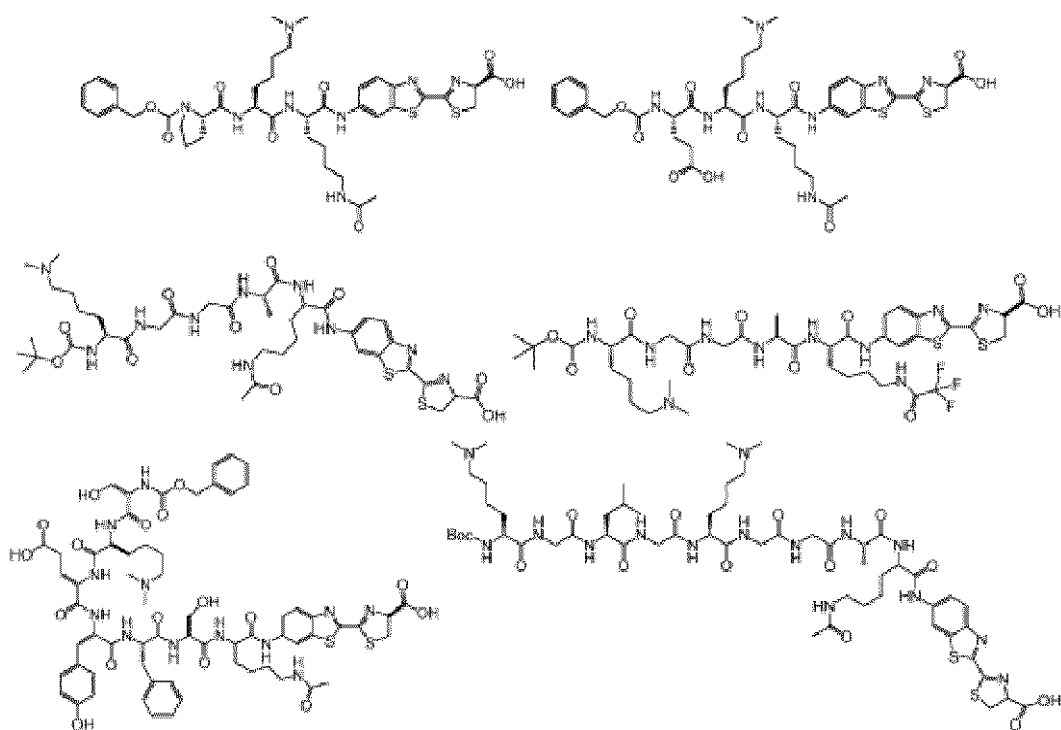
【0056】

本発明の代表的な化合物は、以下を含む。

40

[illegible]

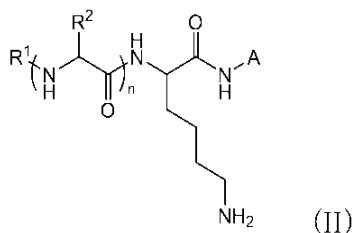
30



【0057】

式（I）の化合物がいったんHDAC酵素と反応すると、生成物は、式（II）

【化8】



の化合物であってもよく、式中、

Aは、リポーター部分であり、

R^1 は、H、アミノ保護基、およびアミノ封鎖基から選択され、

nは、1～20の整数であり、

各 R^2 は、独立して、アミノ酸側鎖であり、少なくとも1つの R^2 は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^{4a}\text{R}^{4b}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{R}^{4a}\text{R}^{4b}\text{R}^{4c}$ 、および $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{NR}^{5a})\text{NR}^{5b}\text{R}^{5c}$ から選択され、

各 R^{4a} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各 R^{4b} は、独立して、アルキルおよびアリールから選択され、

各 R^{4c} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各 R^{5a} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各 R^{5b} は、独立して、アルキルおよびアリールから選択され、かつ

各 R^{5c} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

R^2 が、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{R}^{4a}\text{R}^{4b}\text{R}^{4c}$ であるとき、化合物は、対アニオンをさらに含む。

【0058】

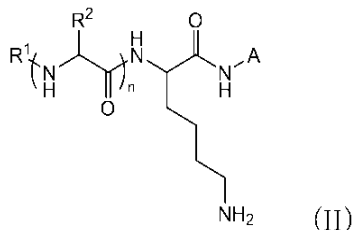
一部の実施形態では、化合物は、リポーターに結合された非置換のC末端リジン残基を特徴とする。そのような化合物は、例えばHAT酵素の活性を検出するために使用され得る。C末端リジン残基は、HAT酵素によってアセチル化される。エンドペプチダーゼは、アセチル化された化合物を認識または切断しないが、未反応化合物を切断して、後に検出され得るリポーター部分を放出する。HAT酵素の活性は、未反応の化合物および反応

した化合物の量を比較した後に計算され得る。

【0059】

したがって、本発明の代表的なペプチド基質は、(II)

【化9】



10

の化合物を含み、式中、

Aは、リポーター部分であり、

R¹は、H、アミノ保護基、およびアミノ封鎖基から選択され、

nは、1～20の整数であり、

各R²は、独立して、アミノ酸側鎖であり、少なくとも1つのR²は、-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NR^{4a}R^{4b}、-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-N⁺R^{4a}R^{4b}R^{4c}、および-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C(=NR^{5a})NR^{5b}R^{5c}から選択され、

各R^{4a}は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各R^{4b}は、独立して、アルキルおよびアリールから選択され、

20

各R^{4c}は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各R^{5a}は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各R^{5b}は、独立して、アルキルおよびアリールから選択され、かつ

各R^{5c}は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

R²が、-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-N⁺R^{4a}R^{4b}R^{4c}であるとき、化合物は、対アニオンをさらに含む。

【0060】

一部の実施形態では、Aは、アミノルシフェリン、クマリン、ローダミン、セレンテラジン、レゾルフィン、およびクレシルバイオレットから選択される。

【0061】

30

一部の実施形態では、R¹は、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)、カルボベンジルオキシ(Cbz)、tertブチルオキシ(Boc)、アセチル、およびスクシニルからなる群から選択されるアミノ保護基またはアミノ封鎖基である。

【0062】

一部の実施形態では、nは、2、3、4、または5である。

【0063】

一部の実施形態では、少なくとも1つのR²は、-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NR^{4a}R^{4b}である。一部の実施形態では、R^{4a}は水素であり、R^{4b}はメチルである。一部の実施形態では、R^{4a}およびR^{4b}は、それぞれメチルである。

【0064】

40

一部の実施形態では、少なくとも1つのR²は、-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-N⁺R^{4a}R^{4b}R^{4c}である。一部の実施形態では、R^{4a}、R^{4b}、およびR^{4c}は、それぞれメチルである。

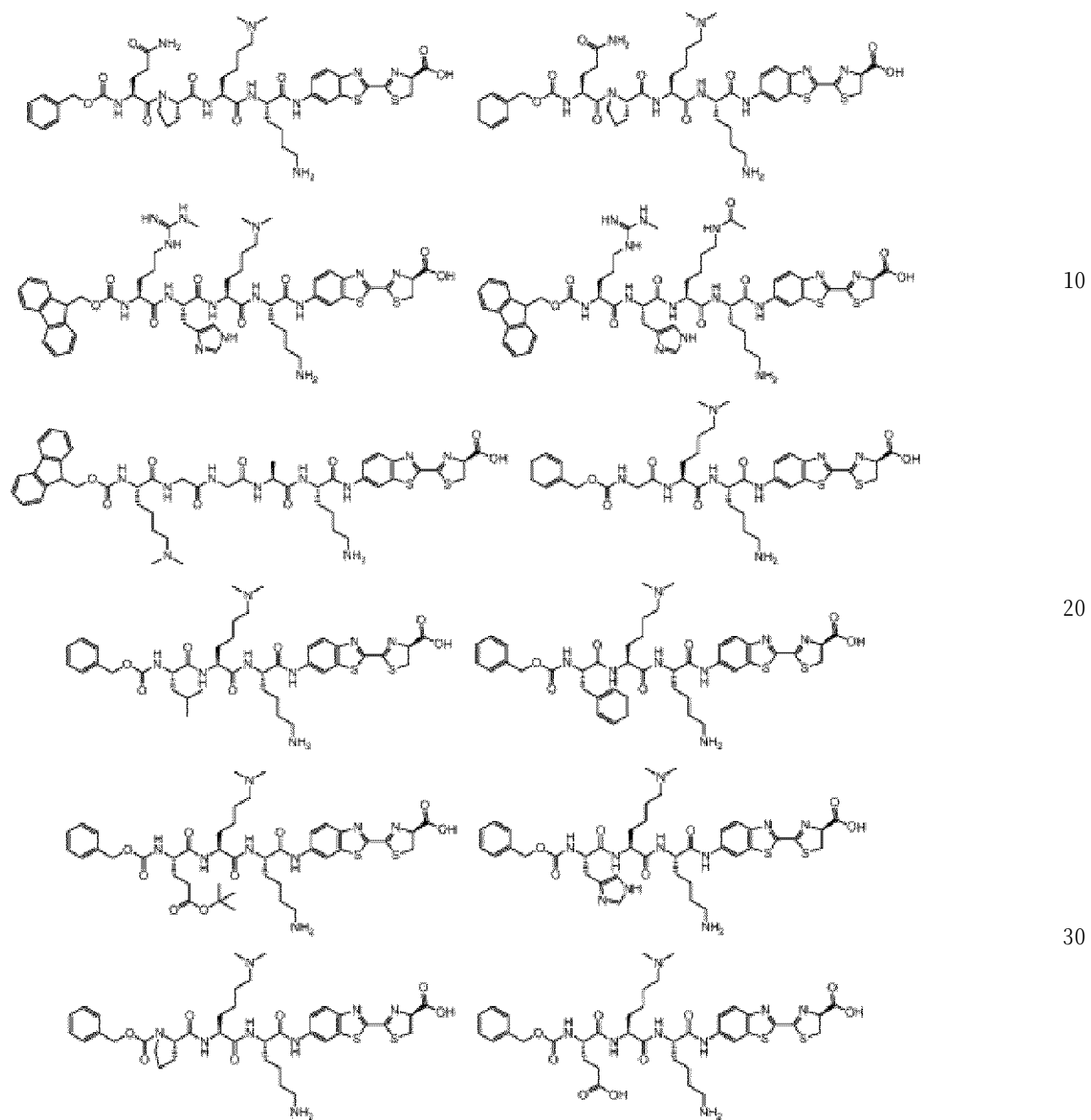
【0065】

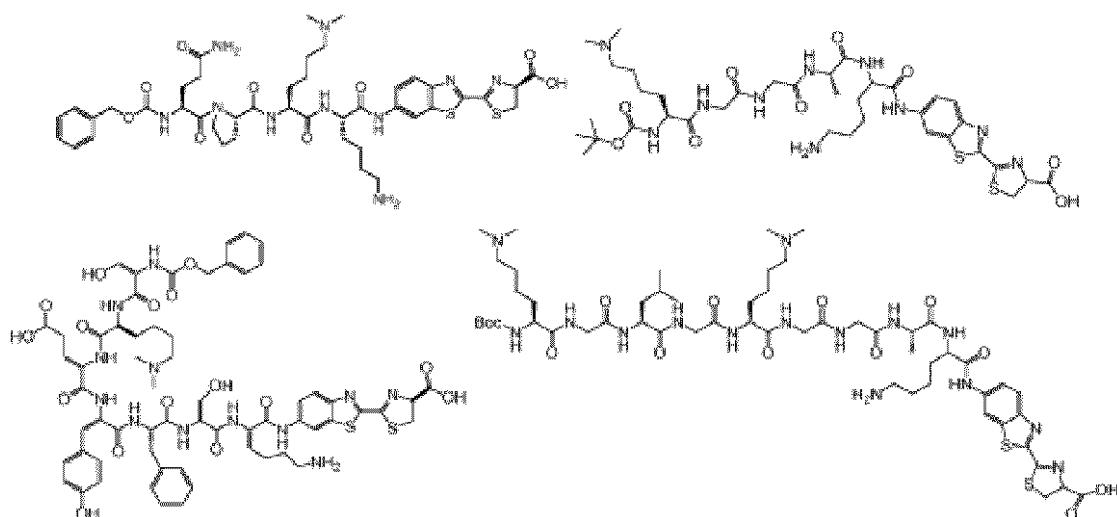
一部の実施形態では、少なくとも1つのR²は、-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C(=NR^{5a})NR^{5b}R^{5c}である。一部の実施形態では、R^{5a}およびR^{5b}は水素であり、R^{5c}はメチルである。

【0066】

本発明の代表的な化合物は、以下を含む。

【化 10】





10

【0067】

本明細書に記載されるペプチド基質は、当技術分野において公知のペプチド合成におけるいずれかの技法を使用して合成または製造され得る。例えば、ペプチドは、Merri-
field (1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154) によ
って最初に説明された固体相合成法を使用して調製され得る。他のペプチド合成法は、B
odanszky et al, Peptide Synthesis, John Wil-
ley & Sons, 2d Ed., (1976)、Stuart and Young,
Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Che-
mical Company, Rockford, Ill., (1984)、および当業
者に容易に利用可能である他の参考文献に見出すことができる。ペプチドは、The Pr
oteins. Vol. II, 3d Ed., Neurath et al, Eds.,
p. 105-237, Academic Press, New York, N. Y. (1
976) に記載される溶液法によっても合成され得る。さまざまなペプチド合成に使用す
るための適切な保護基は、上述の本文ならびにGreene and Wuts, Pro
tecting Groups In Organic Synthesis, 3rd
edition, John Wiley & Sons, Inc., New York (19
99) に記載されている。

20

30

【0068】

ペプチド基質は、カルボキシ末端で、リポーター部分に抱合される。抱合は、例えば、
カップリング試薬を使用して、遊離カルボキシ末端をアミン含有リポーター基で抱合す
ることにより達成され得る。そのような試薬としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボ
ジイミド (DCC) およびジイソプロピルカルボジイミド (DIC) 等のカルボジイミド、
1-ヒドロキシーベンゾトリアゾール (HOBt) および1-ヒドロキシー7-アザ-
ベンゾトリアゾール (HOAt) 等のトリアゾール、ならびにHBTU、HATU、HCT
U、TBTUおよびPyBOP等のウロニウムおよびホスホニウム塩が挙げられる。一部
の実施形態では、リポーター部分またはリポーター部分の前駆体は、後にペプチド基質の
残部に抱合され得るアミノ酸に結合され得る。

40

【0069】

リポーター部分

本明細書に記載される化合物および方法は、適切な条件下で、直接的または間接的に検
出可能なシグナルを生成するリポーター部分の特徴とするペプチド系基質を使用する。代
表的なリポーター部分としては、フルオロフォア、発光分子、放射標識物質、およびルシ
フェラーゼ等の酵素の基質が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では
、リポーター部分は、例えば、リポーター部分が酵素の基質であるとき、間接的に検出可
能なシグナルを生成してもよい。次いで、酵素の基質との反応は、蛍光または発光等の検
出可能なシグナルを生成する。

50

【0070】

一部の実施形態では、リポーター部分は、ルシフェラーゼとの反応時に発光シグナルを生成してもよいアミノルシフェリンであってもよい。ルシフェラーゼは、アミノルシフェリン抱合ペプチド基質と反応しない。アッセイは、アミノルシフェリンがペプチド基質から放出されたときにのみ発光シグナルを生成する。生成された発光シグナルは照度計を使用して検出され得る。

【0071】

他の実施形態では、リポーター部分は、蛍光分子、例えば、クマリン、ローダミン、セレンテラジン、レゾルフィン、またはクレシルバイオレットであってもよい。リポーター部分の蛍光は、ペプチド基質に抱合されるとき、急冷され得、そのような場合、アッセイは、蛍光分子がペプチド基質から放出されたときにのみシグナルを生成する。代替的に、蛍光リポーター部分は、ペプチド基質に抱合されるとき、異なる放射波長を有してもよく、ペプチド基質からのその放出時の放射の変化が検出され得る。蛍光は、蛍光光度計を使用して検出され得る。

10

【0072】

他の実施形態では、リポーター部分は、吸収特性がペプチド基質からのその放出時に変化する色素であってもよい。そのような変化は、分光光度計を使用して検出され得る。

【0073】

一部の実施形態では、リポーター部分がローダミンまたはクレシルバイオレットであるとき等、リポーター部分はさらに官能化され得る。例えば、リポーター部分が2つのアミノ基を有するローダミンまたはクレシルバイオレットであるとき、1つのアミノ基は、ペプチド鎖に結合する部位であってもよく、一方、他方のアミノ基は、封鎖基（例えばアセチル等のアシル基）で官能化され得る。代替的に、両方のアミノ基がペプチド鎖に結合され得る。

20

【0074】

エンドペプチダーゼ

本明細書に記載される方法で使用されるエンドペプチダーゼは、塩基性アミノ酸を認識するものを含む。これらは、例えば、リジンおよびアルギニン残基のカルボキシル側で基質を切断するセリンプロテアーゼであるトリプシンを含む。別の代表的なエンドペプチダーゼは、リジン残基のカルボキシル側で切断するセリンプロテアーゼであるLys-Cである。これらの酵素は、例えば、リジンまたはアルギニン残基が保護基または封鎖基で修飾されるとき、修飾されたリジンおよびアルギニン残基のカルボキシル側で切断しない。

30

【0075】

組成物

一部の実施形態では、本発明は、式（I）または式（II）の化合物等の本明細書に記載される化合物、トリプシンまたはLys-C等の塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼ、および任意に検出試薬を含む組成物も提供する。組成物は、緩衝液、NAD⁺等の酵素補因子、および／またはHDACもしくはHAT等の標的酵素も含んでもよい。好ましい実施形態では、組成物は、式（I）または（II）の化合物、トリプシンまたはLys-C等の塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼ、およびルシフェリン検出試薬を含む。

40

【0076】

キット

一部の実施形態では、本発明は、本明細書に記載するもの等の酵素活性をアッセイするための方法に使用するためのキットも提供する。キットは、式（I）または式（II）の化合物等の本明細書に記載される化合物、トリプシンまたはLys-C等の塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼ、および任意に検出試薬を含んでもよい。キットは、緩衝液、NAD⁺等の酵素補因子、HDACもしくはHAT酵素（例えばHDACを含むHeLa細胞からの核抽出物）の供給源等の対照基質、酵素阻害剤（例えばニコチンアミド）、または酵素活性化剤をさらに含んでもよい。キットは、本明細書に記載される方法を

50

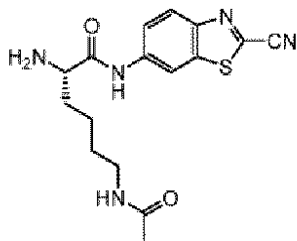
実行するための説明書も含んでもよい。好ましい実施形態では、キットは、式（I）または（I I）の化合物、トリプシンまたはLys-C等の塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼ、およびルシフェリン検出試薬を含む。

【実施例】

【0077】

実施例1. H-Lys (Ac) -アミノシアノベンゾチアゾール、トリフルオロ酢酸塩の合成

【化11】



10

乾燥THF（410mL）中のBoc-Lys-(Ac)-OH（20.5g、71mmol）の攪拌溶液に、N₂雰囲気下で、N-メチルモルホリン（7.8mL、71mmol）を添加した。反応槽を20分間4℃に冷却し、その時にイソブチルクロロホルメート（9.3mL、71mmol）を滴下により添加した。約60分間、氷浴で反応物を攪拌し、その時に6-アミノ-2-シアノベンゾチアゾール（10g、57mM）を添加した。氷浴で約30分間、反応物を攪拌し、取り出し、反応混合物を一晩かけて室温に戻した。次いで、ブフナー漏斗を通して反応物を濾過し、濾過物を固体泡状物に濃縮した。この固体泡状物をジクロロメタン（1L）に溶解し、NaHCO₃（飽和水溶液、300mL）で2X洗浄した。有機相をNa₂SO₄上で乾燥させ、濾過し、濃縮して、固体泡状物を得た。次いで、この固体泡状物を、ヘプタン／酢酸エチル（EtOAc）（80分にわたり40%EtOAcから100%EtOAcの段階濃度）の勾配で、シリカゲルクロマトグラフィーによって精製し、泡状固体として24.7gのBoc-Lys-(Ac)-アミノシアノベンゾチアゾールを得た。

20

【0078】

泡状固体に、N₂の雰囲気下で、予め冷却した（-20℃）チオアニソール（48mL）およびトリフルオロ酢酸（270mL）の混合物を添加した。逆相HPLCにより経過を監視した。開始材料が消費された時点で、高真空下で反応物を高粘度シロップに濃縮した。次いで、これを、ジクロロメタン（DCM）／メタノール（MeOH）（45分にわたり5%MeOHから30%MeOHの段階濃度）の勾配で、シリカゲルクロマトグラフィーによって精製し、22.4g（85%）の標記化合物を得た：¹H NMR（DMSO-d₆）δ10.97（s, 1H）、8.71（s, 1H）、8.29（s, 3H）、8.24（d, 1H）、7.79-7.76（m, 1H）、3.98（s, 1H）、2.99（q, 2H）、1.82（q, 2H）、1.72（s, 3H）、1.40-1.33（m, 4H）；MS予測値346（C₁₆H₁₉N₅O₂S, M+1）、実測値346。

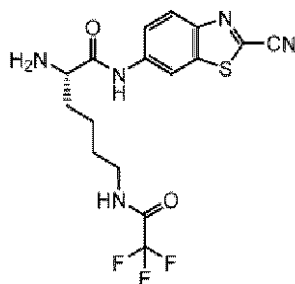
30

【0079】

実施例2. H-Lys (TFA) -アミノシアノベンゾチアゾール、トリフルオロ酢酸塩の合成

40

【化 1 2】

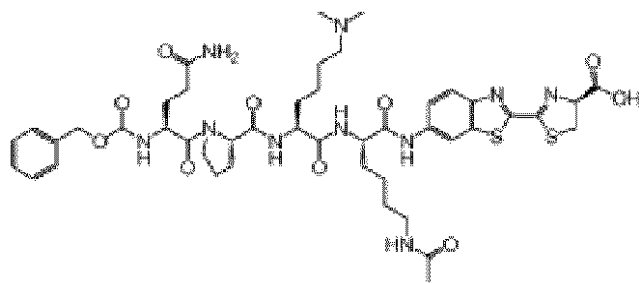


この材料は、H-Lys(Ac)-アミノシアノベンゾチアゾール(実施例1)を合成するために使用された手順に従い、Boc-Lys(TFA)-OHから合成された：¹H NMR(DMSO-d₆) δ 11.00(s, 1H)、9.39(t, 1H)、8.70(d, 1H)、8.32(s, 3H)、8.24(d, 1H)、7.78(dd, 1H)、4.00(t, 1H)、3.16(q, 2H)、1.84(q, 2H)、1.55-1.46(m, 2H)、1.41-1.33(m, 2H)；¹⁹F NMR(DMSO-d₆) δ -73.6, -74.4。

【0080】

実施例3. Cbz-GlnProLys(Me₂)Lys(Ac)-アミノルシフェリン(1)の合成

【化 1 3】



(I)

ステップ1. Cbz-Gln(Trt)ProLys(Me₂)-OHの合成

Aaptecモデル#90ペプチド合成機の500mLの反応槽に2-Cl-Trt樹脂(12.5g)を入れた。樹脂をN-メチルピロリジノン(NMP)で膨潤させた。別の容器中で、Fmoc-Lys-(Me₂)-OH HCl(5g、11.5mmol)をジメチルホルムアミド(DMF、100mL)に溶解した。この溶液を樹脂に添加し、続いてジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)(8mL)を添加し、機械的に4時間攪拌した。この時点で、樹脂をDMFおよびNMPで順次洗浄し、次いで、各キャッピングステップ間にDCMですすぎながら、MeOHで3Xキャッピングした。次いで、完全真空下で樹脂を一晩乾燥させ、Fmoc-Lys-(Me₂)-2-Cl Trt樹脂を得た。

【0081】

Fmoc-Lys-(Me₂)-2-Cl Trt樹脂を合成機上に設置し、DMF中の25%のピペリジン(塩基対樹脂は10:1)からなる2回の洗浄を使用して、Fmocを除去した。次いで、NMP(100mL)中のFmoc-Pro-OH(5.9g、17.5mmol)、1-ヒドロキシベンゾチアゾール(HOBt、3.1g、23mmol)、O-ベンゾトリアゾール-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウム-ヘキサフルオロリン酸(HBTU、7.6g、19.9mmol)、およびDIPEA(6.9mL、39.6mmol)の溶液をこの樹脂に添加し、120分間、機械的に混合させた。一級アミンについてのKaiser試験は、陰性であった。次いで、試薬溶液を樹脂から分離した。このプロトコルを繰り返し、Fmocを除去し、Cbz-Gln(Trt)-OHを樹脂に結合させた。

【0082】

次いで、樹脂をMeOH、続いてDCMで洗浄し、この手順を3回繰り返した後、最後にMeOHで洗浄した。次いで、樹脂をDCM/酢酸/トリフルオロエタノール(100 mL、8/1/1)の溶液で処理し、3時間、磁気的に攪拌した。樹脂を濾取りし、DCMですすぎ、得られた溶液を濃縮して、油状物を得た。ヘプタンを添加し、溶液を3回濃縮した。これにより、泡状固体(11.97 g、87%)としてCbz-Gln(Trt)ProLys(Me₂)-OHを得、これは、さらに精製することなく使用された。

【0083】

ステップ2. Cbz-Gln(Trt)ProLys(Me₂)Lys(Ac)-アミノシアノベンゾチアゾールの合成

N₂雰囲気下で、乾燥THF(100 mL)中のCbz-Gln(Trt)ProLys(Me₂)-OH(7.4 g、9.5 mmol)の攪拌溶液に、H-Lys(Ac)-アミノシアノベンゾチアゾール(4.37 g、9.5 mmol)、1-ヒドロキシアザベンゾトリアゾール(HOAt、1.3 g、9.5 mmol)、およびDIPEA(1.6 mL、9.5 mmol)を添加した。最後に、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド(EDAC、1.8 g、9.5 mmol)を添加し、反応混合物を室温で30分間攪拌させた。逆相HPLC(Agilent 1100 HPLC、カラム: Phenomenex Synergi、4 μm 80 Å、250×4.6 mm、方法: 15分にわたり30% ACNから55% ACN、1 mL/分、水性緩衝液は0.1%のTFA v/vを含有する)により反応が完了したことを判定した時点で、それを濃縮した。得られた固体泡状物をDCM(250 mL)に溶解し、NaHCO₃(飽和水溶液、250 mL)で洗浄した。有機層をNa₂SO₄上で乾燥させ、濃縮した。DCM/MeOH(20分にわたり段階濃度で0% MeOHから15% MeOH)を使用して、シリカゲルクロマトグラフィーによりこの材料を精製し、Cbz-Gln(Trt)ProLys(Me₂)Lys(Ac)-アミノシアノベンゾチアゾール(5.26 g、51%)を泡状固体として得た。

【0084】

ステップ3. Cbz-GlnProLys(Me₂)Lys(Ac)-アミノシアノベンゾチアゾールの合成

TFA/DCM(40 mL、1/1)中のCbz-Gln(Trt)ProLys(Me₂)Lys(Ac)-アミノシアノベンゾチアゾール(5.26)およびトリイソプロピルシラン(4 mL)の溶液を、-20度のN₂雰囲気下で1時間攪拌した。逆相HPLC(Agilent 1100 HPLC、カラム: Phenomenex Synergi、4 μm 80 Å、250×4.6 mm。方法: 15分にわたり20% ACNから55% ACN、1 mL/分、水性緩衝液は0.1% TFA v/vを含有する)により、開始材料が新しい種に変換されたことが確認された後、反応混合物を濃縮した。次いで、得られた粘稠なスラッジをジエチルエーテル(200 mL)で覆い、5分間攪拌し、遠心分離を介して固体を回収し、完全真空下で乾燥させ、粗Cbz-GlnProLys(Me₂)Lys(Ac)-アミノシアノベンゾチアゾール(4.4 g)を得た。

【0085】

ステップ4. Cbz-GlnProLys(Me₂)Lys(Ac)-アミノルシフェリンの合成

粗Cbz-GlnProLys(Me₂)Lys(Ac)-アミノシアノベンゾチアゾールを、THF(100 mL)および緩やかなN₂流で約5分間ガス抜きされたH₂O(50 mL)中に溶解した。この溶液に、同様にガス抜きしたH₂O(20 mL)中のD-システイン(0.90 g、5.1 mmol)およびNa₂CO₃(0.54 g、5.1 mmol)の溶液を添加し、反応物を30分間攪拌した。逆相HPLC(Agilent 1100 HPLC、カラム: Phenomenex Synergi、4 μm 80 Å、250×4.6 mm。方法: 15分にわたり20% ACNから55% ACN、1 mL/分、水性緩衝液は0.1% TFA v/vを含有する)により、開始材料が新しい種に変換されたことが確認された後、反応物を固体に濃縮した。20 mMのNH₄OAc中のアセトニトリ

ル (ACN) の勾配 (60分にわたり15% ACNから50% ACN) を使用した分取HPLCにより、逆相シリカゲルを使用して、粗固体を精製し、白色固体として標記化合物 (2.75 g、56%) を得た：¹H NMR (CD₃OD) δ 8.46 (dd, 1H)、7.95 (dd, 1H)、7.63–7.59 (m, 1H)、7.35–7.29 (m, 5H)、5.21 (dt, 2H)、5.06 (s, 2H)、4.47–4.38 (m, 3H)、3.73 (d, 3H)、3.14–3.01 (m, 4H)、2.79 (s, 3H)、2.75 (t, 2H)、2.35 (t, 2H)、2.23–1.71 (m, 18H)、1.54–1.46 (m, 4H)；MS予測値966 (C₄₅H₆₀N₁₀O₁₀S₂, M+1)、実測値966。

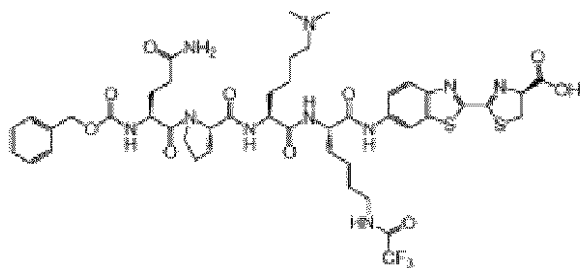
【0086】

10

実施例4. 追加化合物の合成

Cbz-GlnProLys (Me₂) Lys (TFA) - アミノルシフェリン (2)

【化14】



(2)

20

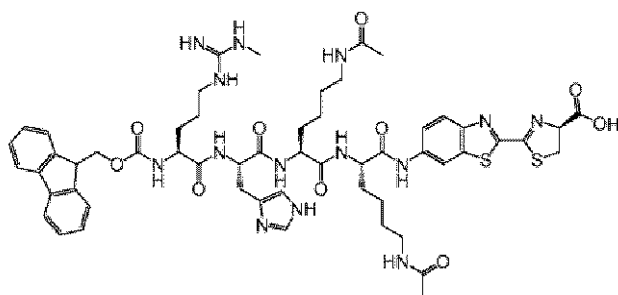
この化合物は、Cbz-GlnProLys (Me₂) Lys (Ac) - アミノルシフェリン (実施例3) を合成するために使用した手順に従い、Cbz-Gln (Trt) ProLys (Me₂) -OHおよびH-Lys (TFA) - アミノシアノベンゾチアゾールから合成された：¹H NMR (DMSO-d₆) δ 10.64 (d, 1H)、9.47 (s, 1H)、8.64 (s, 1H)、8.49 (d, 1H)、8.07–7.98 (m, 2H)、7.77 (dd, 1H)、7.51 (d, 1H)、7.34–7.29 (m, 5H)、6.78 (s, 1H)、5.18 (t, 1H)、4.98 (s, 2H)、4.34–4.22 (m, 4H)、3.75 (q, 1H)、3.67–3.58 (m, 3H)、3.15 (q, 2H)、2.43–2.38 (m, 2H)、2.28 (d, 6H)、2.21 (t, 2H)、2.12 (t, 2H)、2.05–1.94 (m, 2H)、1.87–1.63 (m, 8H)、1.51–1.28 (m, 10H)。

30

【0087】

Fmoc-Arg (Me) His Lys (Ac) Lys (Ac) - アミノルシフェリン (3)

【化15】



(3)

40

この化合物は、Cbz-GlnProLys (Me₂) Lys (Ac) - アミノルシフェリン (実施例3) を合成するために使用された手順に従い、Fmoc-Arg (Me) (Pbf) His (Trt) Lys (Ac) -OHおよびH-Lys (Ac) - アミノシアノベンゾチアゾールから合成された。Fmoc-Arg (Me) (Pbf) His (Trt) Lys (Ac) -OHは、固体支持体上でCbz-GlnProLys (Me₂)

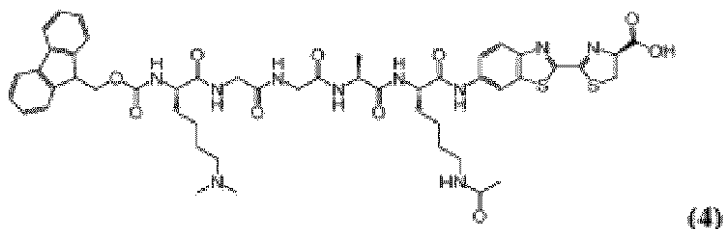
50

－OH（実施例3）を合成するために使用された手順に従い、Fmoc－Arg（Me）（Pbf）－OH、Fmoc－His（Trt）－OH、およびFmoc－Lys（Ac）－OHを使用して合成された：¹H NMR（DMSO－d₆およびD₂O）δ 8.40（d, 1H）、7.99（t, 1H）、7.84（d, 4H）、7.66（d, 2H）、7.40（d, 2H）、7.36－7.26（m, 2H）、5.03（t, 1H）、4.35－4.26（m, 2H）、4.22－4.19（m, 2H）、4.03－3.97（m, 1H）、3.56－3.53（m, 2H）、3.04－2.87（m, 8H）、2.68－2.63（m, 3H）、1.83（s, 3H）、1.74（s, 3H）、1.67－1.48（m, 6H）、1.36－1.14（m, 6H）。

【0088】

Fmoc－Lys（Me₂）GlyGlyAlaLys（Ac）－アミノルシフェリン（4）

【化16】



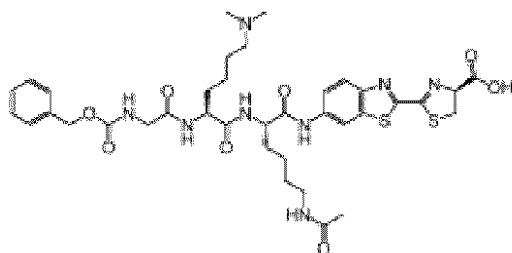
(4)

この化合物は、Cbz－GlnProLys（Me₂）Lys（Ac）－アミノルシフェリン（実施例3）を合成するために使用された手順に従い、Fmoc－Lys（Me₂）GlyGlyAla－OHおよびH－Lys（Ac）－アミノシアノベンゾチアゾールから合成された。Fmoc－Lys（Me₂）GlyGlyAla－OHは、固体支持体上でCbz－GlnProLys（Me₂）－OH（実施例3）を合成するために使用された手順に従い、Fmoc－Lys（Me₂）－OH、Fmoc－Gly－OH、およびFmoc－Ala－OHを使用して合成された：¹H NMR（CD₃OD）δ 7.92（dd, 1H）、7.85（dd, 1H）、7.79－7.71（m, 2H）、7.67－7.57（m, 3H）、7.40－7.20（m, 4H）、5.20（td, 1H）、4.45－4.10（m, 5H）、4.00－3.67（m, 7H）、3.14（dt, 2H）、3.07－2.95（m, 3H）、2.81（s, 3H）、2.80（d, 2H）、1.95（s, 6H）、1.89（d, 3H）、1.87－1.62（m, 4H）、1.48－1.34（m, 6H）；MS予測値1014（C₄₉H₆₀N₁₀O₁₀S₂, M+1）、実測値1014。

【0089】

Cbz－GlyLys（Me₂）Lys（Ac）－アミノルシフェリン（5）

【化17】



(5)

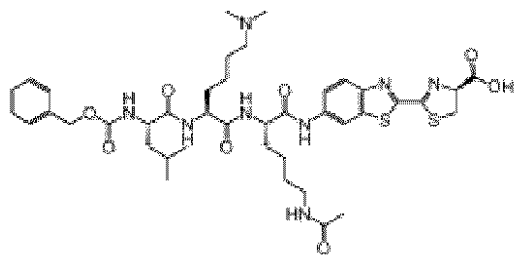
この化合物は、Cbz－GlnProLys（Me₂）Lys（Ac）－アミノルシフェリン（実施例3）を合成するために使用された手順のステップ1、2、および4に従い、Cbz－GlyLys（Me₂）－OHおよびH－Lys（Ac）－アミノシアノベンゾチアゾールから合成された。ステップ1において、Cbz－GlyLys（Me₂）－OHは、Cbz－GlnProLys（Me₂）－OH（実施例3）を合成するために使用された手順に従い、固体支持体上でCbz－Gly－OHおよびFmoc－Lys（M

e₂) -OHを使用して合成された：MS予測値 798 (C₃₇H₄₈N₈O₈S₂, M+1)、実測値 798。

【0090】

Cbz-LeuLys(Me₂)Lys(Ac)-アミノルシフェリン(6)

【化18】



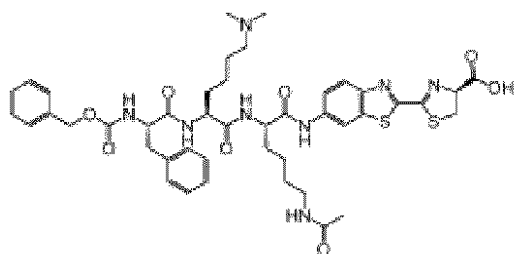
(6)

この化合物は、Cbz-GlnProLys(Me₂)Lys(Ac)-アミノルシフェリン(実施例3)を合成するために使用された手順のステップ1、2、および4に従い、Cbz-LeuLys(Me₂)-OHおよびH-Lys(Ac)-アミノシアノベンゾチアゾールから合成された。ステップ1において、Cbz-LeuLys(Me₂)-OHは、固体支持体上でCbz-GlnProLys(Me₂)-OH(実施例3)を合成するために使用された手順に従い、Cbz-Leu-OHおよびFmoc-Lys(Me₂)-OHを使用して合成された：MS予測値 854 (C₄₁H₅₆N₈O₈S₂, M+1)、実測値 854。

【0091】

Cbz-PheLys(Me₂)Lys(Ac)-アミノルシフェリン(7)

【化19】



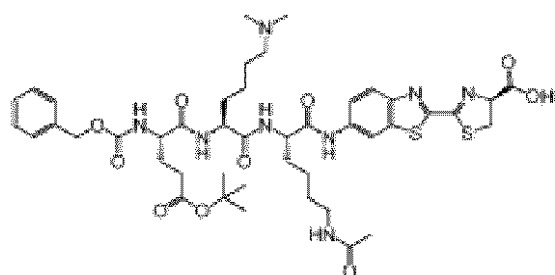
(7)

この化合物は、Cbz-GlnProLys(Me₂)Lys(Ac)-アミノルシフェリン(実施例3)を合成するために使用された手順のステップ1、2、および4に従い、Cbz-PheLys(Me₂)-OHおよびH-Lys(Ac)-アミノシアノベンゾチアゾールから合成された。ステップ1において、Cbz-PheLys(Me₂)-OHは、固体支持体上でCbz-GlnProLys(Me₂)-OH(実施例3)を合成するために使用された手順に従い、Cbz-Phe-OHおよびFmoc-Lys(Me₂)-OHを使用して合成された：MS予測値 888 (C₄₄H₅₄N₈O₈S₂, M+1)、実測値 888。

【0092】

Cbz-Glu(tBu)Lys(Me₂)Lys(Ac)-アミノルシフェリン(8)

【化20】



(8)

この化合物は、Cbz-GlnProLys(Me₂)Lys(Ac)-アミノルシ

10

20

30

40

50

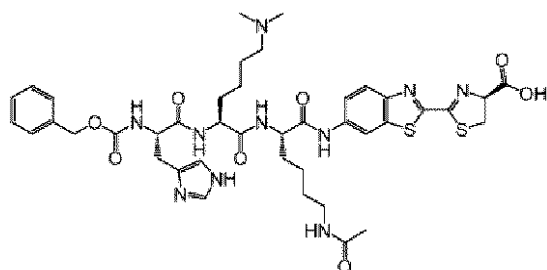
ェリン（実施例 3）を合成するために使用された手順のステップ 1、2、および 4 に従い、 $\text{Cbz-Glu(tBu)Lys(Me}_2\text{)-OH}$ および $\text{H-Lys(Ac)-アミノシアノベンゾチアゾール}$ から合成された。ステップ 1 において、 $\text{Cbz-Glu(tBu)Lys(Me}_2\text{)-OH}$ は、 $\text{Cbz-GlnProLys(Me}_2\text{)-OH}$ （実施例 3）を合成するために使用された手順に従い、固体支持体上で Cbz-Glu(tBu)-OH および $\text{Fmoc-Lys(Me}_2\text{)-OH}$ を使用して合成された：MS 予測値 926 ($\text{C}_{44}\text{H}_{60}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{S}_2$, $M+1$)、実測値 926。

【0093】

$\text{Cbz-HisLys(Me}_2\text{)Lys(Ac)-アミノルシフェリン(9)}$

【化 21】

10



(9)

この化合物は、 $\text{Cbz-GlnProLys(Me}_2\text{)Lys(Ac)-アミノルシフェリン}$ （実施例 3）を合成するために使用された手順のステップ 1、2、および 4 に従い、 $\text{Cbz-HisLys(Me}_2\text{)-OH}$ および $\text{H-Lys(Ac)-アミノシアノベンゾチアゾール}$ から合成された。ステップ 1 において、 $\text{Cbz-HisLys(Me}_2\text{)-OH}$ は、 $\text{Cbz-GlnProLys(Me}_2\text{)-OH}$ （実施例 3）を合成するために使用された手順に従い、固体支持体上で Cbz-His-OH および $\text{Fmoc-Lys(Me}_2\text{)-OH}$ を使用して合成された：MS 予測値 878 ($\text{C}_{41}\text{H}_{52}\text{N}_{10}\text{O}_8\text{S}_2$, $M+1$)、実測値 878。

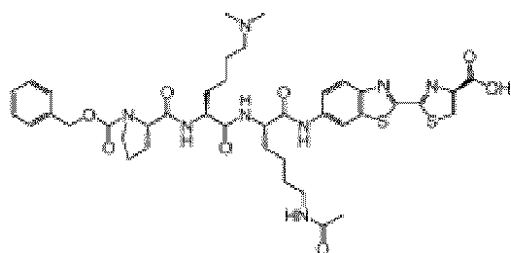
20

【0094】

$\text{Cbz-ProLys(Me}_2\text{)Lys(Ac)-アミノルシフェリン(10)}$

【化 22】

30



(10)

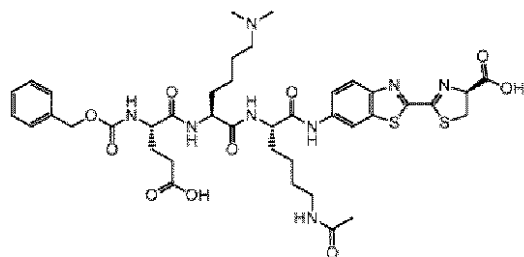
この化合物は、 $\text{Cbz-GlnProLys(Me}_2\text{)Lys(Ac)-アミノルシフェリン}$ （実施例 3）を合成するために使用された手順のステップ 1、2、および 4 に従い、 $\text{Cbz-ProLys(Me}_2\text{)-OH}$ および $\text{H-Lys(Ac)-アミノシアノベンゾチアゾール}$ から合成された。ステップ 1 において、 $\text{Cbz-ProLys(Me}_2\text{)-OH}$ は、 $\text{Cbz-GlnProLys(Me}_2\text{)-OH}$ （実施例 3）を合成するために使用された手順に従い、固体支持体上で Cbz-Pro-OH および $\text{Fmoc-Lys(Me}_2\text{)-OH}$ を使用して合成された：MS 予測値 838 ($\text{C}_{40}\text{H}_{52}\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_2$, $M+1$)、実測値 838。

40

【0095】

$\text{Cbz-GluLys(Me}_2\text{)Lys(Ac)-アミノルシフェリン(11)}$

【化 2 3】



(11)

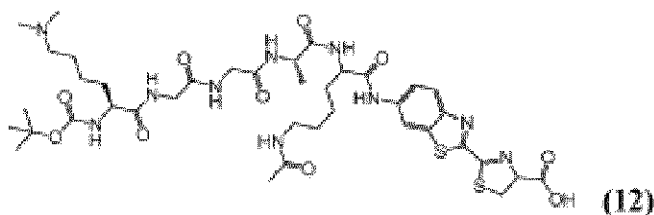
この化合物は、Cbz-GlnProLys(Me₂)Lys(Ac)-アミノルシフェリン(実施例3)を合成するために使用された手順のステップ3に従い、Cbz-Glu(tBu)Lys(Me₂)Lys(Ac)-アミノルシフェリンから合成された：MS予測値870(C₄₀H₅₂N₈O₁₀S₂, M+1)、実測値870。

10

【0096】

Boc-Lys(Me₂)GlyGlyAlaLys(Ac)-アミノルシフェリン(12)

【化 2 4】



(12)

20

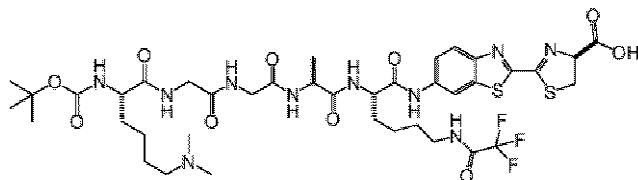
この化合物は、Cbz-GlnProLys(Me₂)Lys(Ac)-アミノルシフェリン(実施例3)を合成するために使用された手順に従い、Boc-Lys(Me₂)GlyGlyAla-OHおよびH-Lys(Ac)-アミノシアノベンゾチアゾールから合成された。Boc-Lys(Me₂)GlyGlyAla-OHは、固体支持体上でCbz-GlnProLys(Me₂)-OH(実施例3)を合成するために使用された手順に従い、Boc-Lys(Me₂)-OH、Fmoc-Gly-OH、およびFmoc-Ala-OHを使用して合成された：MS予測値892(C₃₉H₅₉N₁₀O₁₀S₂, M+1)、実測値892。

30

【0097】

Boc-Lys(Me₂)GlyGlyAlaLys(TFA)-アミノルシフェリン(13)

【化 2 5】



(13)

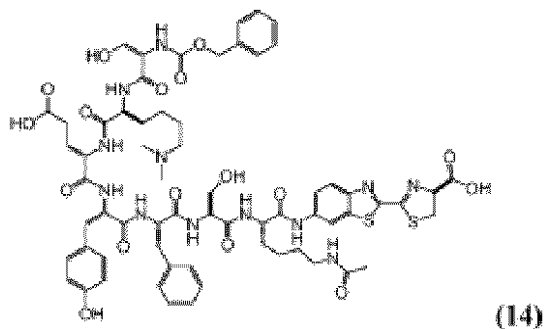
40

この化合物は、Cbz-GlnProLys(Me₂)Lys(Ac)-アミノルシフェリン(実施例3)を合成するために使用した手順に従い、Boc-Lys(Me₂)GlyGlyAla-OHおよびH-Lys(TFA)-アミノシアノベンゾチアゾールから合成された：MS予測値945(C₃₉H₅₆F₃N₁₀O₁₀S₂, M+1)、実測値945。

【0098】

Cbz-SerLys(Me₂)GluTyrPheSerLys(Ac)-アミノルシフェリン(14)

【化 2 6】



10

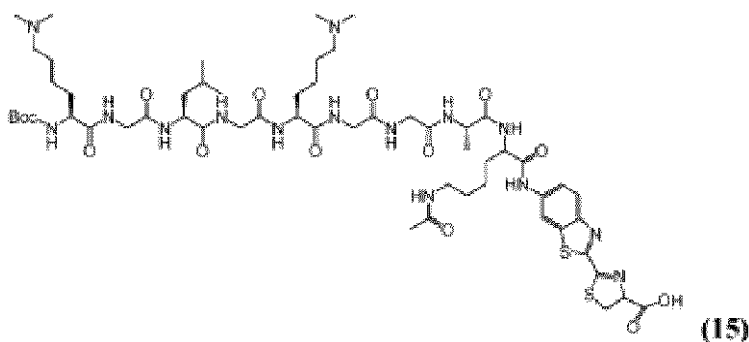
この化合物は、Cbz-GlnProLys (Me₂) Lys (Ac) - アミノルシフェリン (実施例 3) を合成するために使用された手順に従い、Cbz-SerLys (Me₂) GluTyrPheSer-OH および H-Lys (Ac) - アミノシアノベンゾチアゾールから合成された。Cbz-SerLys (Me₂) GluTyrPheSer-OH は、固体支持体上で Cbz-GlnProLys (Me₂) -OH (実施例 3) を合成するために使用された手順に従い合成された：MS 予測値 1354 (C₆₄H₈₁N₁₂O₁₇S₂, M+1)、実測値 1354。

【0099】

Boc-Lys (Me₂) GlyLeuGlyLys (Me₂) GlyGlyAlaLys (Ac) - アミノルシフェリン (15)

20

【化 2 7】



30

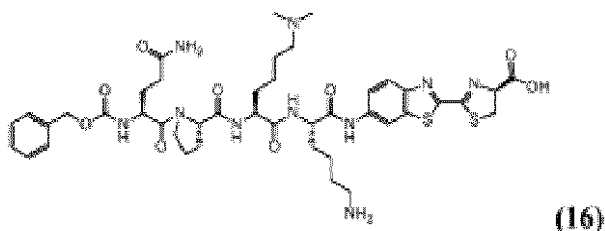
この化合物は、Cbz-GlnProLys (Me₂) Lys (Ac) - アミノルシフェリン (実施例 3) を合成するために使用された手順に従い、Boc-Lys (Me₂) GlyLeuGlyLys (Me₂) GlyGlyAla-OH および H-Lys (Ac) - アミノシアノベンゾチアゾールから合成された。Boc-Lys (Me₂) GlyLeuGlyLys (Me₂) GlyGlyAla-OH は、Cbz-GlnProLys (Me₂) -OH (実施例 3) を合成するために使用された手順に従い、固体支持体上で合成された：MS 予測値 638 (C₅₇H₉₃N₁₅O₁₄S₂, (M+2)/2)、実測値 638。

【0100】

Cbz-GlnProLys (Me₂) Lys - アミノルシフェリン (16)

40

【化 2 8】



この化合物は、Cbz-GlnProLys (Me₂) Lys (Ac) - アミノルシフェリン (実施例 3) を合成するために使用された手順を使用して、Cbz-Gln (Tr

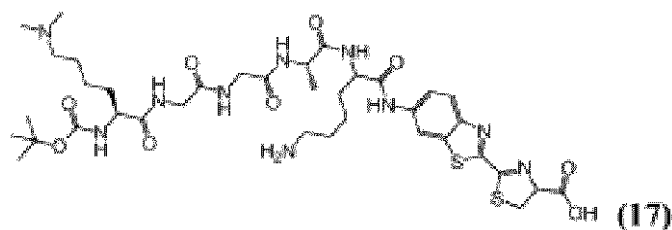
50

t) Pro Lys (Me₂) -OHおよびH-Lys (Boc) -アミノシアノベンゾチアゾールをカップリングすることにより合成された。H-Lys (Boc) -アミノシアノベンゾチアゾールは、Boc-Lys (Ac) -OH (実施例1) の手順を使用して Fmoc-Lys (Boc) -OHおよびアミノシアノベンゾチアゾールをカップリングし、続いて Cbz-Gln (Trt) Pro Lys (Me₂) -OH (実施例3) の合成において記載される Fmoc を脱保護することにより合成された：¹H NMR (DMSO-d₆) δ 11.09 (s, 1H)、9.00 (s, 1H)、8.71 (s, 1H)、8.33 (s, 1H)、8.20 (s, 1H)、8.07-8.01 (m, 1H)、7.89 (t, 2H)、7.58 (d, 1H)、7.38-7.28 (m, 5H)、6.79 (s, 2H)、5.21-5.11 (m, 1H)、4.98 (s, 2H)、4.38-4.20 (m, 3H)、3.85-3.76 (m, 1H)、3.67-3.56 (m, 2H)、2.84-2.70 (m, 1H)、2.17-2.07 (m, 4H)、2.05-1.90 (m, 14H)、1.84 (s, 6H)、1.69-1.50 (m, 7H)、1.43-1.20 (m, 4H)。

【0101】

Boc-Lys (Me₂) Gly Gly Ala Lys -アミノルシフェリン (17)

【化29】

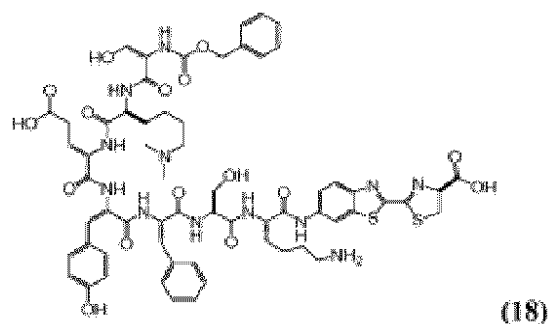


この化合物は、化合物12に類似する様式で合成される。

【0102】

Cbz-Ser Lys (Me₂) Glu Tyr Phe Ser Lys -アミノルシフェリン (18)

【化30】



この化合物は、化合物14に類似する様式で合成される。

【0103】

Boc-Lys (Me₂) Gly Leu Gly Lys (Me₂) Gly Gly Ala Lys -アミノルシフェリン (19)

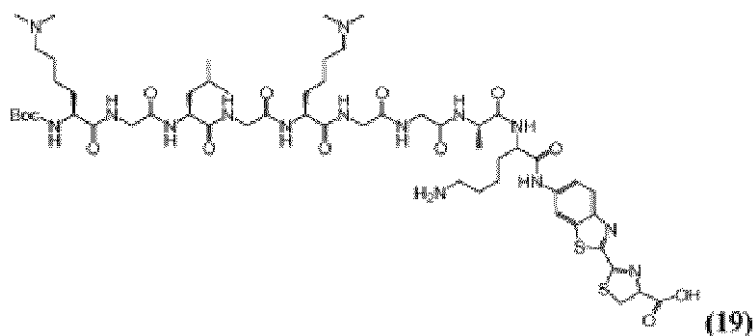
10

20

30

40

【化 3 1】



10

この化合物は、化合物 15 に類似する様式で合成される。

【0104】

実施例 5. SIRT1 阻害剤の有効性の判定

ニコチンアミドを連続的に SIRT-Glo (商標) 緩衝液 (Promega) に 2 倍希釈し、50 μ L を白色の 96 ウェルプレートに添加した。50 μ L の SIRT-Glo (商標) 緩衝液を、「非阻害」および「酵素なし」対照となるウェルに添加した。SIRT1 酵素 (Biomol) を SIRT-Glo (商標) 緩衝液に希釈し、全てのウェルに等容量 (50 μ L) で添加した。次いで、試料の均質性を確実にするために、プレートを 500~700 rpm の回転振とう器上に設置し、室温で 30 分間インキュベートした。インキュベーション後、全てのウェルに 100 μ L の化合物 1 (実施例 6 のように可溶化される) を添加した。反応を酵素の定常状態に到達させるように振とうさせながら、プレートを室温で 15~30 分間インキュベートし、BMG Labtech PolarStar Optima 照度計上で発光を検出した。図 2 は、GraphPad の Prism (商標) ソフトウェアにより判定されたニコチンアミドの IC₅₀ 値を示す。

20

【0105】

実施例 6. Lys-C エンドペプチダーゼを使用したヒストンデアセチラーゼ活性のアクセ

10 mM の溶液を作製するために、最初に 1/2 容量 (518 μ L) の DMSO、続いて 1/2 容量 (518 μ L) の水を添加することにより、10 mg の化合物 1 を可溶化した。ルシフェリン検出試薬 (Promega; 凍結乾燥されたルシフェリンケーキを 9.8 mL の緩衝液で再水和することにより調製された) と 200 μ L の 10 mM 化合物 1 (最終濃度 200 μ M) を混合することにより、部分デアセチラーゼ試薬を調製した。化合物 1 と同時精製された可能性があるいくつかの残留アミノルシフェリンを消散させるために、試薬を 37 $^{\circ}$ C の水浴で 1 時間インキュベートした。HeLa 核抽出物を含有する 100 μ L の緩衝液中に、Lys-C (500 ng/mL) を連続的に 2 倍希釈し (1:3000 に希釈)、96 ウェルプレートに添加した。部分デアセチラーゼ試薬を室温に平衡化し、100 μ L をプレートのウェルに添加した。回転振とう器上でプレートを短時間混合し、BMG PolarStar 照度計を使用して発光を検出した。

30

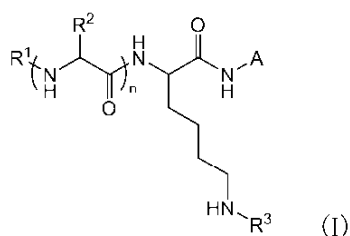
【0106】

本明細書に引用される全ての特許、刊行物、および参考文献は、参照により本明細書に完全に組み込まれる。本開示と組み込まれた特許、刊行物、および参考文献との間に矛盾がある場合、本開示が優先するものとする。

40

本発明の態様として、例えば以下のものがある。

〔1〕式 (I)



の化合物であって、式中、

Aは、リポーター部分であり、

R^1 は、H、アミノ保護基、およびアミノ封鎖基から選択され、

nは、1～20の整数であり、

各 R^2 は、独立して、アミノ酸側鎖であり、少なくとも1つの R^2 は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^{4a}\text{R}^{4b}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{R}^{4a}\text{R}^{4b}\text{R}^{4c}$ 、および $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{NR}^{5a})\text{NR}^{5b}\text{R}^{5c}$ から選択され、

R^3 は、アシルおよびスルホニルから選択され、

各 R^{4a} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各 R^{4b} は、独立して、アルキルおよびアリールから選択され、

各 R^{4c} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各 R^{5a} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各 R^{5b} は、独立して、アルキルおよびアリールから選択され、かつ

各 R^{5c} は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

R^2 が、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{R}^{4a}\text{R}^{4b}\text{R}^{4c}$ であるとき、前記化合物は、対アニオンをさらに含む、化合物。

〔2〕 Aは、アミノルシフェリン、クマリン、ローダミン、セレンテラジン、レゾルフィン、およびクレシルバイオレットから選択される、前記〔1〕に記載の化合物。

〔3〕 Aは、封鎖基またはペプチド鎖でさらに官能化されるローダミンまたはクレシルバイオレットである、前記〔1〕～〔2〕のいずれかに記載の化合物。

〔4〕 R^1 は、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc)、カルボベンジルオキシ (Cbz)、tertブチルオキシ (Boc)、アセチル、およびスクシニルからなる群から選択されるアミノ保護基またはアミノ封鎖基である、前記〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の化合物。

〔5〕 nは、2、3、4、または5である、前記〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の化合物。

〔6〕 少なくとも1つの R^2 は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^{4a}\text{R}^{4b}$ である、前記〔1〕～〔5〕のいずれかに記載の化合物。

〔7〕 R^{4a} は水素であり、 R^{4b} はメチルである、前記〔6〕に記載の化合物。

〔8〕 R^{4a} および R^{4b} は、それぞれメチルである、前記〔6〕に記載の化合物。

〔9〕 少なくとも1つの R^2 は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{R}^{4a}\text{R}^{4b}\text{R}^{4c}$ である、前記〔1〕～〔8〕のいずれかに記載の化合物。

〔10〕 R^{4a} 、 R^{4b} 、および R^{4c} は、それぞれメチルである、前記〔9〕に記載の化合物

。〔11〕 少なくとも1つの R^2 は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{NR}^{5a})\text{NR}^{5b}\text{R}^{5c}$ である、前記〔1〕～〔10〕のいずれかに記載の化合物。

〔12〕 R^{5a} および R^{5b} は水素であり、 R^{5c} はメチルである、前記〔12〕に記載の化合物。

〔13〕 R^3 は、アシルである、前記〔1〕～〔12〕のいずれかに記載の化合物。

〔14〕 R^3 は、アセチルおよびトリフルオロアセチルから選択される、前記〔1〕～〔13〕のいずれかに記載の化合物。

〔15〕 前記化合物は、

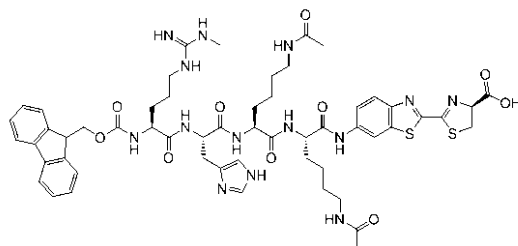
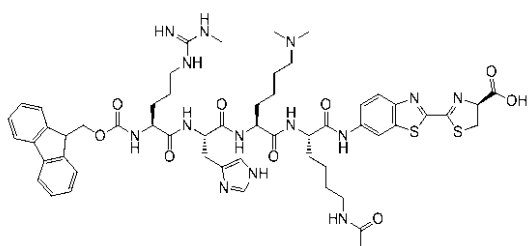
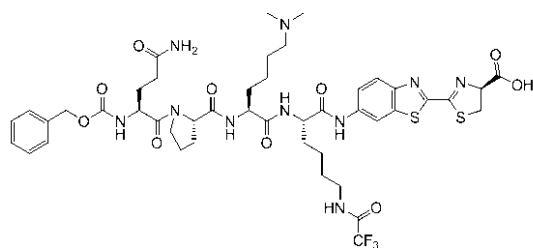
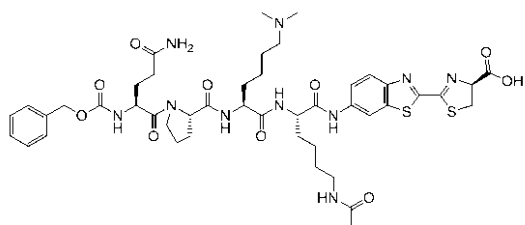
10

20

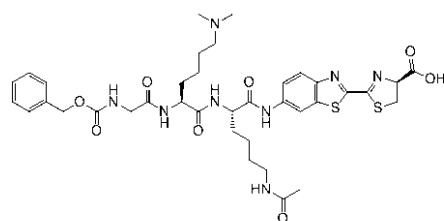
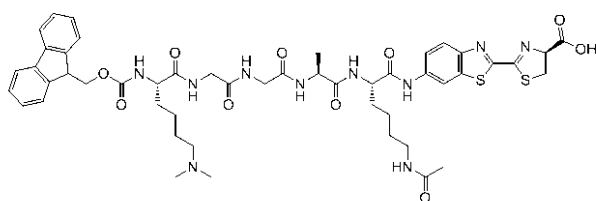
30

40

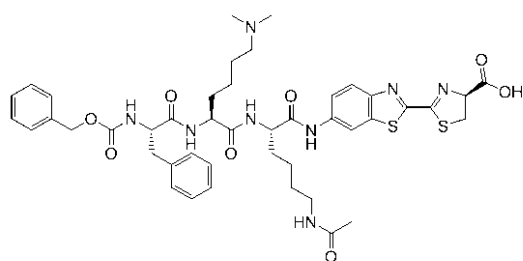
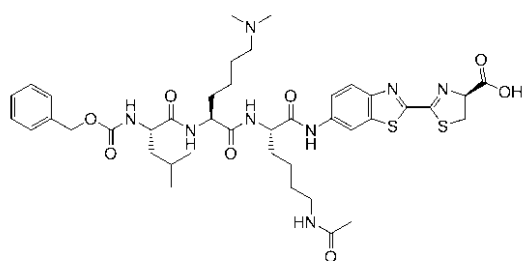
50



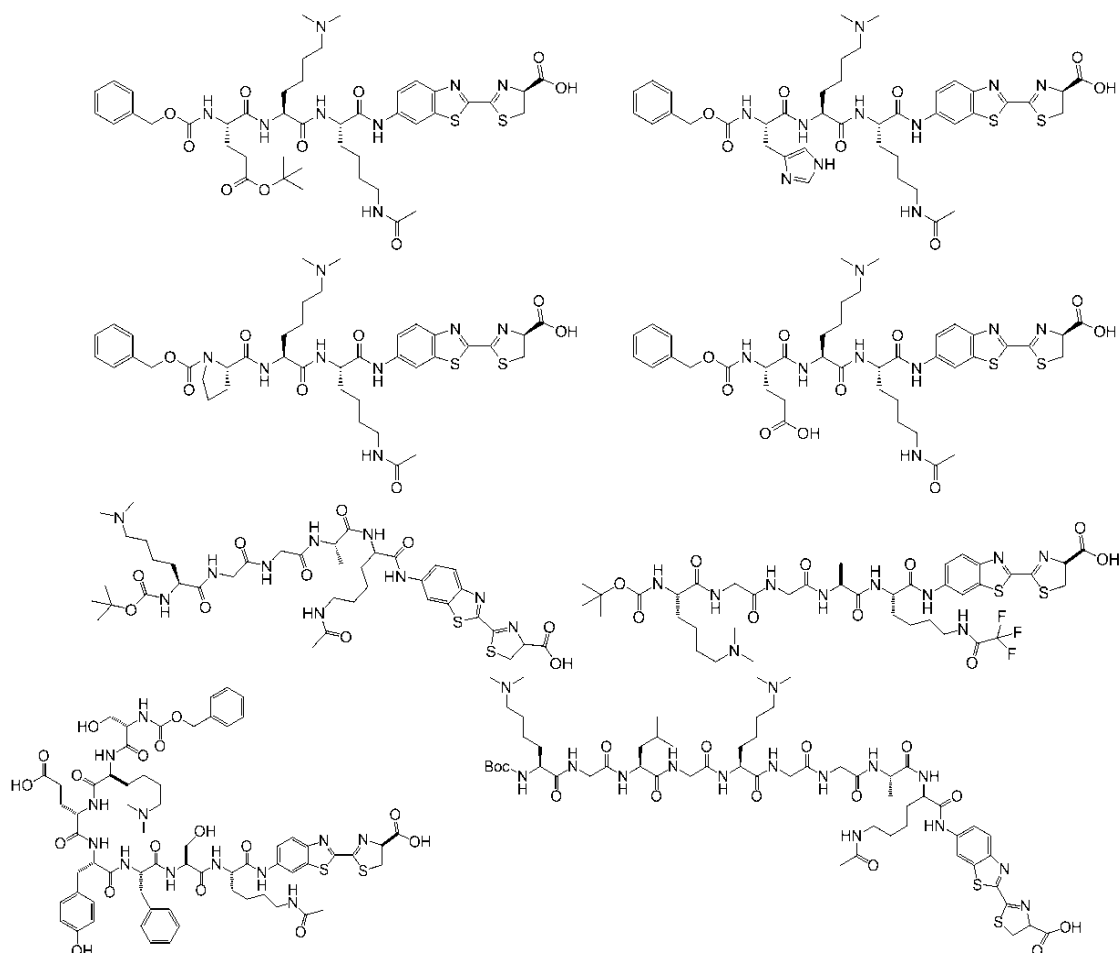
10



20



30



10

20

から選択される、前記〔1〕に記載の化合物。

〔16〕ヒストンデアセチラーゼ酵素の活性を検出する方法であって、

a) 前記〔1〕～〔15〕のいずれか1項に記載の化合物を、ヒストンデアセチラーゼ酵素、および塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼと、前記ヒストンデアセチラーゼ酵素を前記式(I)の化合物と反応させて生成物を形成し、前記エンドペプチダーゼを前記生成物と反応させて化合物A-NH₂を放出させるのに十分な条件下で、反応させることと、

30

b) 前記化合物A-NH₂を検出することと、を含む、方法。

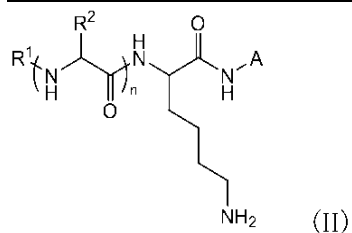
〔17〕前記化合物A-NH₂の前記検出を前記ヒストンデアセチラーゼ酵素の活性と関連させることをさらに含む、前記〔16〕に記載の方法。

〔18〕前記ヒストンデアセチラーゼ酵素の活性は、定量化される、前記〔17〕に記載の方法。

〔19〕前記エンドペプチダーゼは、前記式(I)の化合物と反応しない、前記〔16〕～〔18〕のいずれかに記載の方法。

〔20〕前記生成物は、以下の式(II)

40



(II)

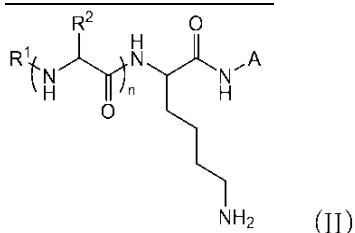
を有する、前記〔16〕～〔19〕のいずれかに記載の方法。

〔21〕nの値および各R²部分の特定は、前記ヒストンデアセチラーゼ酵素に対する特異性を付与するように選択される、前記〔16〕～〔19〕のいずれかに記載の方法。

50

〔22〕塩基性アミノ酸を認識する前記エンドペプチダーゼは、トリプシンである、前記〔16〕～〔21〕のいずれかに記載の方法。

〔23〕式(II)



10

の化合物であって、式中、

Aは、リポーター部分であり、

R¹は、H、アミノ保護基、およびアミノ封鎖基から選択され、

nは、1～20の整数であり、

各R²は、独立して、アミノ酸側鎖であり、少なくとも1つのR²は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^{4a}\text{R}^{4b}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{R}^{4a}\text{R}^{4b}\text{R}^{4c}$ 、および $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{NR}^{5a})\text{NR}^{5b}\text{R}^{5c}$ から選択され、

各R^{4a}は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各R^{4b}は、独立して、アルキルおよびアリールから選択され、

各R^{4c}は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各R^{5a}は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

各R^{5b}は、独立して、アルキルおよびアリールから選択され、かつ

各R^{5c}は、独立して、水素、アルキル、およびアリールから選択され、

R²が、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{R}^{4a}\text{R}^{4b}\text{R}^{4c}$ であるとき、前記化合物は、対アニオンをさらに含む、化合物。

20

〔24〕Aは、アミノルシフェリン、クマリン、ローダミン、セレンテラジン、レゾルフィン、およびクレシルバイオレットから選択される、前記〔23〕に記載の化合物。

〔25〕Aは、封鎖基またはペプチド鎖でさらに官能化されるローダミンまたはクレシルバイオレットである、前記〔23〕～〔24〕のいずれかに記載の化合物。

〔26〕R¹は、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)、カルボベンジルオキシ(Cbz)、tertブチルオキシ(Boc)、アセチル、およびスクシニルからなる群から選択されるアミノ保護基またはアミノ封鎖基である、前記〔23〕～〔25〕のいずれかに記載の化合物。

30

〔27〕nは、2、3、4、または5である、前記〔23〕～〔26〕のいずれかに記載の化合物。

〔28〕少なくとも1つのR²は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^{4a}\text{R}^{4b}$ である、前記〔23〕～〔27〕のいずれかに記載の化合物。

〔29〕R^{4a}は水素であり、R^{4b}はメチルである、前記〔28〕に記載の化合物。

〔30〕R^{4a}およびR^{4b}は、それぞれメチルである、前記〔28〕に記載の化合物。

〔31〕少なくとも1つのR²は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{R}^{4a}\text{R}^{4b}\text{R}^{4c}$ である、前記〔23〕～〔30〕のいずれかに記載の化合物。

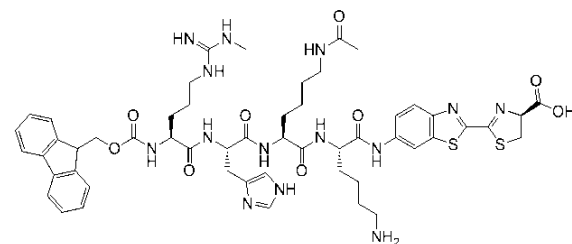
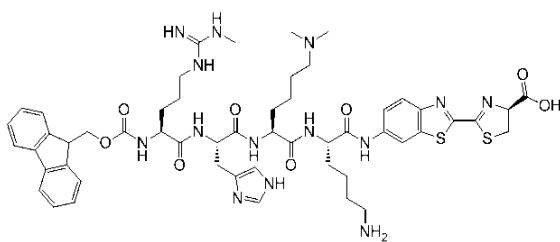
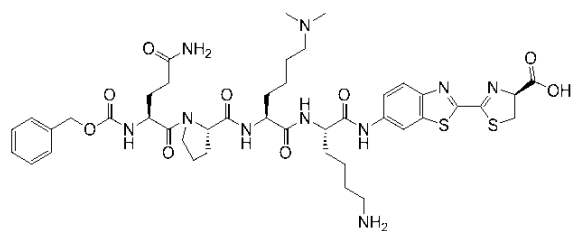
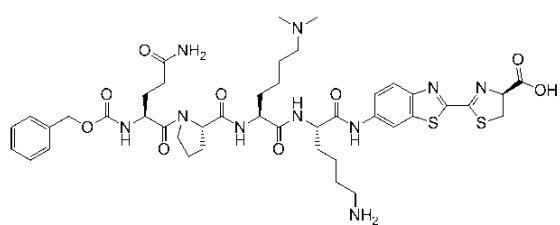
40

〔32〕R^{4a}、R^{4b}、およびR^{4c}は、それぞれメチルである、前記〔31〕に記載の化合物。

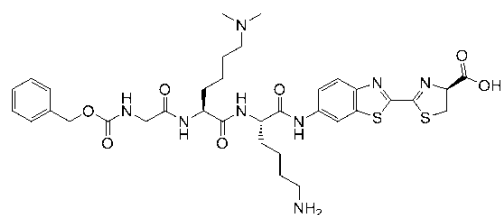
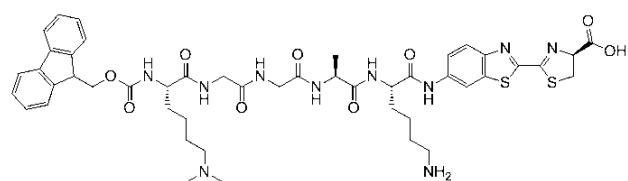
〔33〕少なくとも1つのR²は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{NR}^{5a})\text{NR}^{5b}\text{R}^{5c}$ である、前記〔23〕～〔32〕のいずれかに記載の化合物。

〔34〕R^{5a}およびR^{5b}は水素であり、R^{5c}はメチルである、前記〔33〕に記載の化合物。

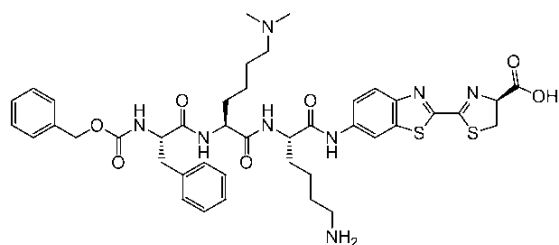
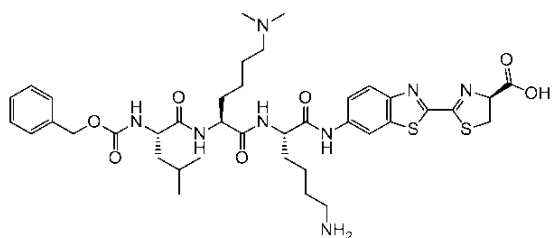
〔35〕前記化合物は、

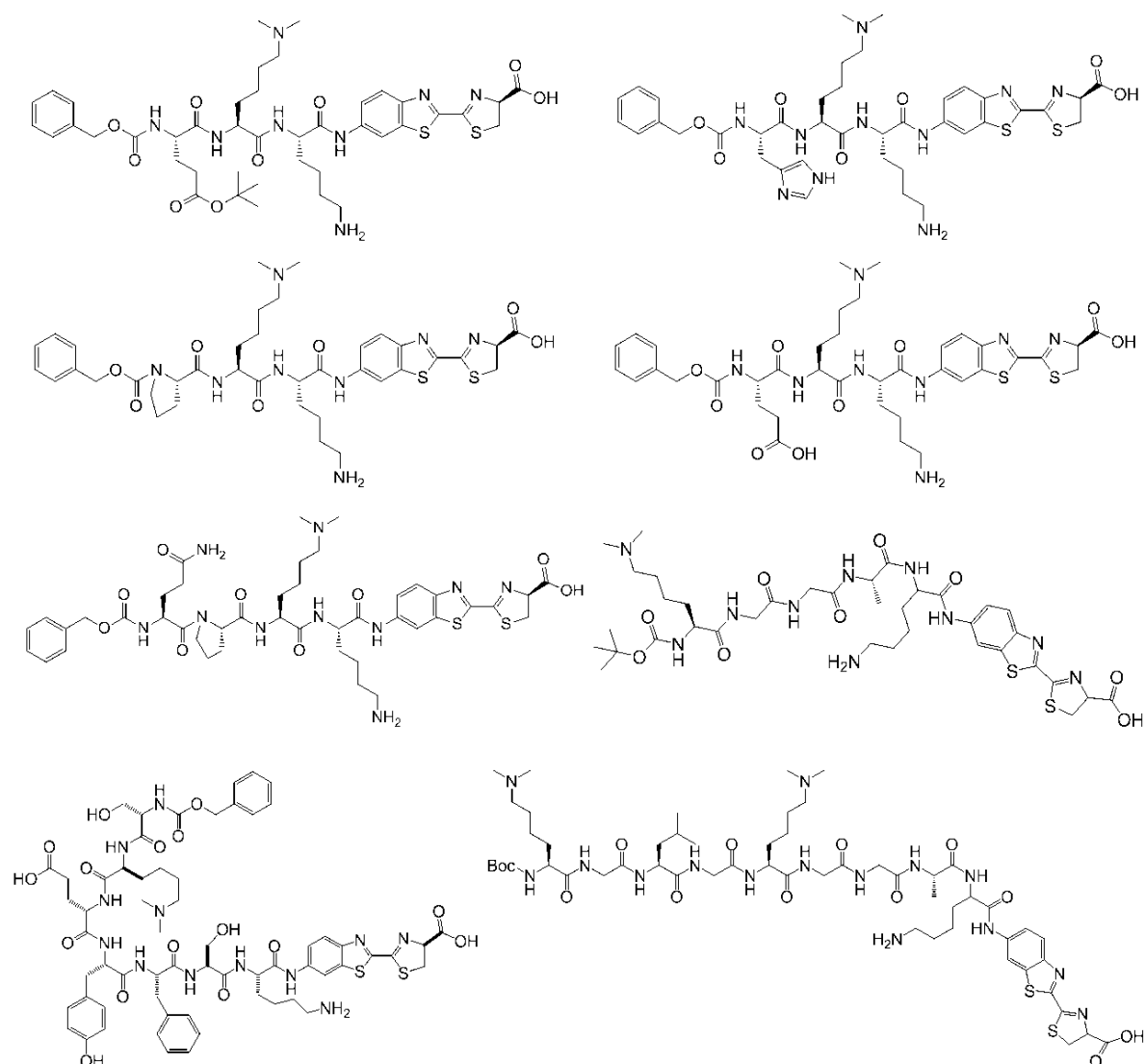


10



20





10

20

30

から選択される、前記〔23〕に記載の化合物。

〔36〕ヒストンアセチルトランスフェラーゼ酵素の活性を検出する方法であって、

a) 前記〔23〕～〔35〕のいずれか1項に記載の化合物を、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ酵素と、前記ヒストンアセチルトランスフェラーゼ酵素を前記式(I I)の化合物と反応させて生成物を形成するのに十分な条件下で、反応させることと、

b) 塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼを添加して、前記エンドペプチダーゼが前記式(I I)の化合物と反応し、化合物A-NH₂を放出するようにすることと、

c) 前記化合物A-NH₂を検出することと、を含む、方法。

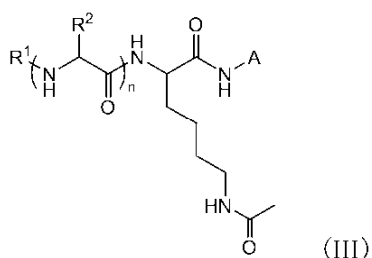
〔37〕前記化合物A-NH₂の前記検出を前記ヒストンアセチルトランスフェラーゼ酵素の活性と相関させることをさらに含む、前記〔36〕に記載の方法。

〔38〕前記ヒストンアセチルトランスフェラーゼ酵素の活性は、定量化される、前記〔37〕に記載の方法。

〔39〕前記エンドペプチダーゼは、前記生成物と反応しない、前記〔36〕～〔38〕のいずれかに記載の方法。

〔40〕前記生成物は以下の式(I I I)

40



を有する、前記〔36〕～〔39〕のいずれかに記載の方法。

〔41〕nの値および各R²部分の特定は、前記ヒストンアセチルトランスフェラーゼ酵素に対する特異性を付与するように選択される、前記〔36〕～〔39〕のいずれかに記載の方法。

10

〔42〕塩基性アミノ酸を認識する前記エンドペプチダーゼは、トリプシンである、前記〔36〕～〔41〕のいずれかに記載の方法。

〔43〕a. 式(I)または式(II)の化合物と、

b. 塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼと、

c. 任意に検出試薬と、を含む、組成物。

〔44〕緩衝液、酵素補因子、および標的酵素からなる群から選択される1つ以上をさらに含む、前記〔43〕に記載の組成物。

〔45〕前記標的酵素は、ヒストンデアセチラーゼまたはヒストンアセチルトランスフェラーゼである、前記〔44〕に記載の組成物。

20

〔46〕前記検出試薬は、ルシフェリン検出試薬を含む、前記〔43〕に記載の組成物。

〔47〕a. 式(I)または式(II)の化合物と、

b. 塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼと、

c. 任意に検出試薬と、を含む、キット。

〔48〕緩衝液、酵素補因子、標的酵素、対照基質、および酵素阻害剤または活性化剤からなる群から選択される1つ以上をさらに含む、前記〔47〕に記載のキット。

〔49〕前記標的酵素は、ヒストンデアセチラーゼまたはヒストンアセチルトランスフェラーゼである、前記〔48〕に記載のキット。

〔50〕前記検出試薬は、ルシフェリン検出試薬を含む、前記〔47〕に記載のキット。

〔51〕標的酵素の活性を検出する方法であって、

30

a) 少なくとも1つの封鎖アルギニンまたはリジン残基を含む化合物を、標的酵素、および塩基性アミノ酸を認識するエンドペプチダーゼと反応させて、前記反応が化合物A-NH₂の形成をもたらすことと、

b) 前記化合物A-NH₂を検出することと、を含む、方法。

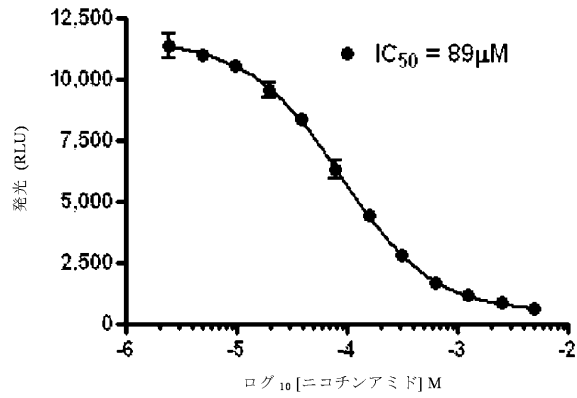
〔52〕少なくとも1つの封鎖アルギニンまたはリジン残基を含む前記化合物は、前記〔1〕～〔15〕のいずれか1項に記載の化合物である、前記〔51〕に記載の方法。

〔53〕少なくとも1つの封鎖アルギニンまたはリジン残基を含む前記化合物は、前記〔23〕～〔35〕のいずれか1項に記載の化合物である、前記〔51〕に記載の方法。

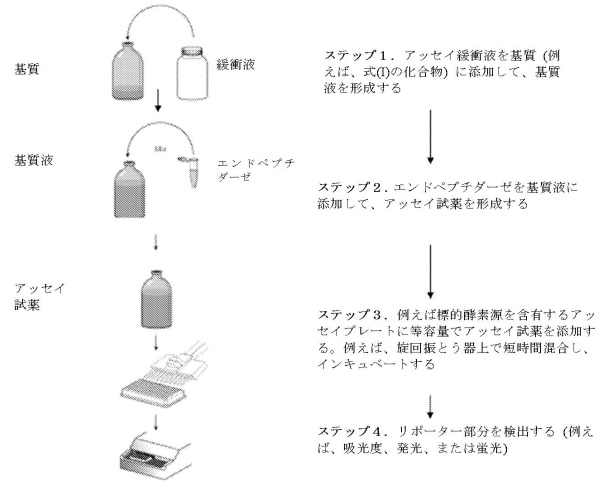
〔54〕前記標的酵素は、ヒストンデアセチラーゼまたはヒストンアセチルトランスフェラーゼ酵素である、前記〔51〕～〔53〕のいずれかに記載の方法。

40

【図 2】



【図 1】



フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
 C 1 2 Q 1/34 (2006.01) C 1 2 Q 1/34
 C 1 2 Q 1/48 (2006.01) C 1 2 Q 1/48 Z
- (74)代理人 100119013
 弁理士 山崎 一夫
- (74)代理人 100123777
 弁理士 市川 さつき
- (74)代理人 100162422
 弁理士 志村 将
- (72)発明者 カークランド トーマス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 3 4 2 2 アタスカデロ サン アントニオ ロード 1
 3 3 5 0
- (72)発明者 ナイルズ アンドリュー エル
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 1 1 マディソン リチャードソン サークル 5 7
 1 6
- (72)発明者 オブライエン マーサ
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 7 0 4 マディソン イースト ミフリン ストリート
 2 1 1 7
- (72)発明者 ウッドルーフ ヒトコ キャロリン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 3 4 3 3 グローヴァービーチ ローズコート 9 5
 0

審査官 松波 由美子

- (56)参考文献 特開2003-221398 (JP, A)
 Thomas Monsees et al., Analytical Biochemistry, 1994年, Vol.221, p.329-334

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 0 7 K 4 / 0 0
 C 0 7 K 5 / 0 8
 C 0 7 K 5 / 1 0
 C 0 7 K 7 / 0 6
 C 1 2 Q 1 / 3 4
 C 1 2 Q 1 / 3 7
 C 1 2 Q 1 / 4 8
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)