

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-518450

(P2006-518450A)

(43) 公表日 平成18年8月10日(2006.8.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 Z N A V	2 G O 4 1
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2 G O 4 5
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 O 2	4 B O 2 4
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 248 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-500969 (P2006-500969)	(71) 出願人 504018149 フーベルト・ケスター Hubert KOESTER スイス、ツェーハー6918フィジーノ 、ヴィア・カントナーレ84番、ヴィラ・ ウェリントニア
(86) (22) 出願日 平成16年1月16日 (2004.1.16)	
(85) 翻訳文提出日 平成17年9月13日 (2005.9.13)	
(86) 国際出願番号 PCT/US2004/001037	
(87) 国際公開番号 W02004/064972	
(87) 国際公開日 平成16年8月5日 (2004.8.5)	
(31) 優先権主張番号 60/441,398	(71) 出願人 504018046 エイチケイ・ファーマシューティカルズ・ インコーポレイテッド HK PHARMACEUTICALS, INC. アメリカ合衆国02139マサチューセッ ツ州ケンブリッジ、メモリアル・ドライブ 840番
(32) 優先日 平成15年1月16日 (2003.1.16)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	
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) 【要約】

捕獲化合物およびその収集物、および生体分子の分析にその化合物を用いる方法を提供する。特に、収集物、化合物および方法を、プロテオームのような複合体タンパク質混合物の分析に供する。その化合物は、複合体タンパク質混合物の分離および単離に供される多機能試薬である。その方法を行うための自動化システムも提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体分子の混合物中の薬物の非標的生体分子を同定する方法であって、生体分子の混合物と捕獲化合物の収集物とを接触させることを含む該方法、ここで、該収集物は、捕獲化合物のセットを含む複数の捕獲化合物を含有しており、捕獲化合物の各セットが、得られる生体分子/捕獲化合物の複合体が質量スペクトル分析の条件下で安定であるように生体分子と共有結合するかまたは十分に高い親和性を有して結合するように選択された部分X、捕獲化合物が、選択性部分が存在する場合にそれが存在しない場合よりも少ない生体分子と結合するようXによる結合の選択性を高める部分Y、ならびにXおよびYを提示する部分Zとを含む。

10

【請求項 2】

生体分子の混合物中の薬物の非標的生体分子を同定する方法であって、生体分子の混合物と捕獲化合物とを接触させること、ここで、該捕獲化合物が、得られる生体分子/捕獲化合物の複合体が質量スペクトル分析の条件下で安定であるように生体分子と共有結合するかまたは十分に高い親和性を有して結合するように選択された部分X、捕獲化合物が、選択性部分が存在する場合にそれが存在しない場合よりも少ない生体分子と結合するようXによる結合の選択性を高める部分Y、ならびにXおよびYを提示する部分Zとを含む；および

捕獲した生体分子を分析し、薬物の非標的物を同定すること、を含む、該方法。

20

【請求項 3】

捕獲化合物の各セットが更に部分Z上に部分Qを含み、それによって、各セットは異なるQを含む、ここでQは各セットを分離する、請求項1の方法。

【請求項 4】

部分Yが医薬品、薬物の断片、薬物代謝産物またはプロドラッグである、請求項1-3の何れかの方法。

【請求項 5】

部分Yが、Z部分の種々の連結点を介し異なる向きで該部分に連結する、請求項1-4の何れかの方法。

【請求項 6】

生体分子がタンパク質である、請求項1-5の方法。

30

【請求項 7】

生体分子が受容体である、請求項1-6の何れかの方法。

【請求項 8】

(なし)

【請求項 9】

生体分子が酵素である、請求項1-8の何れかの方法。

【請求項 10】

Qが、固体支持体上で、その表面またはその上にある分子と結合することによって捕獲化合物を整列させることによって分離を可能にする、請求項3-9の何れかの方法。

40

【請求項 11】

捕獲化合物のセットが少なくとも10種の異なる捕獲化合物を含む、請求項1、3-10の何れかの方法。

【請求項 12】

捕獲化合物のセットが少なくとも50種の異なる捕獲化合物を含む、請求項1、3-10の方法。

【請求項 13】

捕獲化合物のセットが少なくとも100種の異なる捕獲化合物を含む、請求項1、3-10の何れかの方法。

【請求項 14】

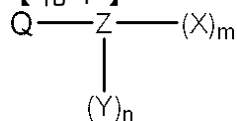
50

Qが、固体支持体上のアドレス可能な位置に整列させるための化学基である、請求項3 - 13の何れかの方法。

【請求項15】

構成要素である捕獲化合物が次式

【化1】



Q-Z-(X)_mおよびQ-Z-(Y)_n；

{Zは捕獲化合物と結合した生体分子を質量スペクトル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り、

mは1~100の整数であり、かつ

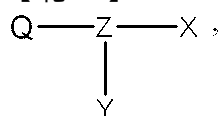
nは1~100の整数である}

を有する化合物からなる群より選択される、請求項3 - 14の何れかの方法。請求項1~10の何れかの収集物。

【請求項16】

構成要素である捕獲化合物が次式

【化2】



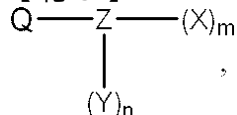
QZXおよびQ-Z-Y

の化合物からなる群より選択される、請求項15の方法。

【請求項17】

捕獲化合物が次式

【化3】



Q-Z-(X)_mおよびQ-Z-(Y)_n；

{Zは捕獲化合物と結合した生体分子を質量スペクトル分析の前またはその間に切断されない部分であり、

mは1~100の整数であり、かつ

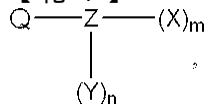
nは1~100の整数である}

を有する化合物からなる群より選択される、請求項3 - 16の何れかの方法。

【請求項18】

構成要素である捕獲化合物が次式

【化4】



Q-Z-(X)_mおよびQ-Z-(Y)_n；

{mは1~100の整数であり、

nは1~100の整数であり、かつ

Qは塩基相補的な一本鎖核酸分子または類似体と安定なハイブリッドを形成するために十分な長さ「j」の一本鎖部分を含む、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}

を有する化合物からなる群より選択される、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

構成要素である捕獲化合物が

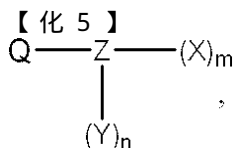
10

20

30

40

50

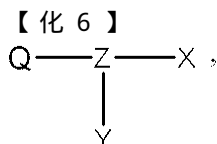


{ mは1~100の整数であり、
nは1~100の整数である }

からなる群より選択される、請求項3~18の何れかの方法。

【請求項20】

構成要素である捕獲化合物が次式



Q-Z-XおよびQ-Z-Y

{ Qは塩基相補的な一本鎖核酸分子または類似体と安定なハイブリッドを形成するために十分な長さ「j」の一本鎖部分を含む、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 }

の化合物からなる群より選択される、請求項3~19の何れかの方法。

【請求項21】

Qが塩基相補的な一本鎖核酸分子または類似体と安定なハイブリッドを形成するために十分な長さの一本鎖部分を含む、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、請求項3~20の何れかの方法。

【請求項22】

Qが次式 $N^1_s B_i N^2_u$ 、

{ 式中、 N^1 、Bおよび N^2 はそれぞれs、tおよびu個のメンバーを含む、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、

Bは少なくとも2個の塩基を含む、配列並べ替え領域であり、かつ

s、iおよびuの合計が少なくとも5である }

を有する、請求項3~21の何れかの方法。

【請求項23】

s、iおよびuの合計が約5から約50までである、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

N^1 、Bおよび N^2 の各メンバーがデオキシリボ核酸、リボ核酸、タンパク質核酸およびその類似体の単量体構築ブロックの中から独立に選択される、請求項22または請求項23に記載の方法。

【請求項25】

Zが光切断可能な、酸切断可能な、アルカリ切断可能な、酸化的に切断可能なまたは還元的に切断可能な基である、請求項1~24の何れかの方法。

【請求項26】

Zが不溶性支持体を含んでなり、それにX、YおよびQ各々が直接またはリンカーを介してのいずれかで結合している、請求項1~25の何れかの方法。

【請求項27】

不溶性支持体がビーズ、キャピラリー、プレート、メンブラン、ウエハー、コーム、ピン、ピンを備えたウエハー、ピットまたはナノリットルウェルのアレイ、および別々の位置でサンプルを受容するかそれと結合する平坦な表面からなる群より選択される、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

支持体がシリコン、シリカゲル、ガラス、ナイロン、ワング(Wang)樹脂、メリフィールド(Merrifield)樹脂、エピクロロヒドリンと架橋しているデキストラン、アガロース、セルロース、磁性ビーズ、ダイナビーズ(Dynaビーズ)、金属表面またはプラスチック材料を

10

20

30

40

50

含む、請求項 26 または請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

Z 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)を含む疎水性ビーズ、またはセルロース、エピクロロヒドリンと架橋しているデキストラン、アガロース、ポリアクリルアミド、シリカゲルおよび制御された細孔性ガラスを含む親水性ビーズを含む、請求項 26 ~ 28 の何れかの方法。

【請求項 30】

Z 部分がスパーサー基 S^1 および/または S^2 、ならびに切断可能な結合を含み、 S^1 および/または S^2 部分は不溶性支持体に連結されており、かつ、切断可能な結合は、存在する場合には S^2 に、そうでない場合には不溶性支持体に連結されている、請求項 26 ~ 29 の何れかの方法。

10

【請求項 31】

Z が少なくとも三価部分であり、かつ、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、

20

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(phosphoramidato)、ホスフィンアミダート(phosphinamidato)、スルホンアミド、スルホニル、スルホキシド、カルバマート(carbamato)、ウレイドおよびこれらの組み合わせから選択され、かつ、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 個以上の置換基で置換されており、

30

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、

40

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

(ただし、Z は生体分子の分析の前またはその間に切断することができる)、請求項 1 ~ 25 の何れかの方法。

【請求項 32】

Z が少なくとも三価部分であり、かつ、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、 $(C(R^{15})_2)_d$ 、0、S、 $(CH_2)_d$ 、 $(CH_2)_dO$ 、 $(CH_2)_dS$ 、 $>N(R^{15})$ 、 $(S(O)_u)$ 、 $(S(O)_2)_w$ 、 $>C(O)$ 、 $(C(O))_w$ 、 $(C(S(O)_u))_w$ 、 $(C(O)O)_w$ 、 $(C(R^{15}))$

50

$(R^{15})_2)_d O$ 、 $(C(R^{15})_2)_d S(O)_u$ 、 $O(C(R^{15})_2)_d$ 、 $S(O)_u(C(R^{15})_2)_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_d O(C(R^{15})_2)_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_d S(O)_u(C(R^{15})_2)_d$ 、 $N(R^{15})(C(R^{15})_2)_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_d NR^{15}$ 、 $(C(R^{15})_2)_d N(R^{15})(C(R^{15})_2)_d$ 、 $-(CH_2)_d C(O)N(CH_2)_d -$ 、 $-(CH_2)_d C(O)N(CH_2)_d C(O)N(CH_2)_d -$ 、 $(S(R^{15})(O)_u)_w$ 、 $(C(R^{15})_2)_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_d O(C(R^{15})_2)_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_d (C(O)O)_w (C(R^{15})_2)_d$ 、 $(C(O)O)_w (C(R^{15})_2)_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_d (C(O)O)_w$ 、 $(C(S)(R^{15}))_w$ 、 $(C(O))_w (CR^{15})_2)_d$ 、 $(CR^{15})_d (C(O))_w (CR^{15})_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_d (C(O))_w$ 、 $N(R^{15})(C(R^{15})_2)_w$ 、 $OC(R^{15})_2 C(O)$ 、 $O(R^{15})_2 C(O)N(R^{15})$ 、 $(C(R^{15})_2)_w N(R^{15})(C(R^{15})_2)_w$ 、 $(C(R^{15})_2)_w NR^{15}$ 、 $>P(O)_v (R^{15})_x$ 、 $>P(O)_u (R^{15})_3$ 、 $>P(O)_u (C(R^{15})_2)_d$ 、 $>Si(R^{15})_2$ 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

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、

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る

10

(ただし、Z は生体分子の分析の前またはその間に切断することができる)、請求項 1~25 および 31 の何れかの方法。

【請求項 33】

Z がアリーレン、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 、 $>S(A)_u$ 、 $>P(D)_v (R^{15})$ 、 $>P(D)_v (ER^{15})$ 、 $>Si(R^{15})_2$ 、 $>N(R^{15})$ 、 $>N^+(R^{23})(R^{24})$ および $>C(E)$; (ここで、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 0 または NR^{15} であり、D は S または O であり、かつ、E は S、O または NR^{15} である)、からなる群より選択される基のいずれかの組み合わせを含む三価部分であり、その基はどの順序で組み合わせてもよく、

20

各 R^{15} は水素および $Y^1 R^{18}$ からなる群より独立に選択される一価の基であり、

各 Y^1 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 $>C(E)$; (ここで、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 0 または NR^{17} であり、D は S または O であり、かつ、E は S、O または NR^{17} である)のいずれかの組み合わせを有する二価の基であり、その基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、アリーロキシ、アラルコキシ、ヘテロアラルコキシおよび $NR^{19}R^{20}$ からなる群より選択され、

30

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);

(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、アリールおよびヘテロアリールからなる群より選択される、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する

40

から選択され、

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、アリーロキシ、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、

50

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、

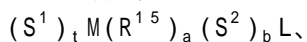
10

(ただし、 Z は、当該化合物の質量スペクトル分析を含む分析の前またはその間に切断することができる)、請求項1~25および31~32の何れかの方法。

【請求項34】

20

Z が次式



{ 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、

a は0~4の整数であり、

M は3以上の結合点を含む中心部分であり、

各 R^{15} は Y^2R^{18} から独立に選択される一価の基であり、

各 Y^2 は以下の基：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 $>C(E)$ ；(ここで、 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0または NR^{17} であり、 D は S または O であり、かつ、 E は S 、 O または NR^{17} であり、その基はどの順序で組み合わせてもよい)のいずれかの組み合わせを独立に含む二価の基であり、

30

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 $NR^{19}R^{20}$ からなる群より選択され、

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、アリーール、アラルキル、ヘテロアリーール、ヘテロアラルキルおよびヘテロシクリルから選択され、

40

R^{23} および R^{24} は以下の(i)または(ii)；

(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より選択される、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する

から選択され、

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

50

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、アリーロキシ、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、アリーロキシ、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、ヘテロアリーロキシ、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、アリーロキシ、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、アルキルアリールアミノ、ジアリールアミノおよびアリールアミノの中から選択され、かつ

Lは化合物の質量スペクトル分析の前またはその間に切断可能な基である }
を有する、請求項1～25および31～33の何れかの方法。

【請求項35】

Mが四価アルキレン、四価フェニレン、四価ビフェニレンまたは四価ヘテロ二官能性トリチル誘導体であり、かつ、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、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

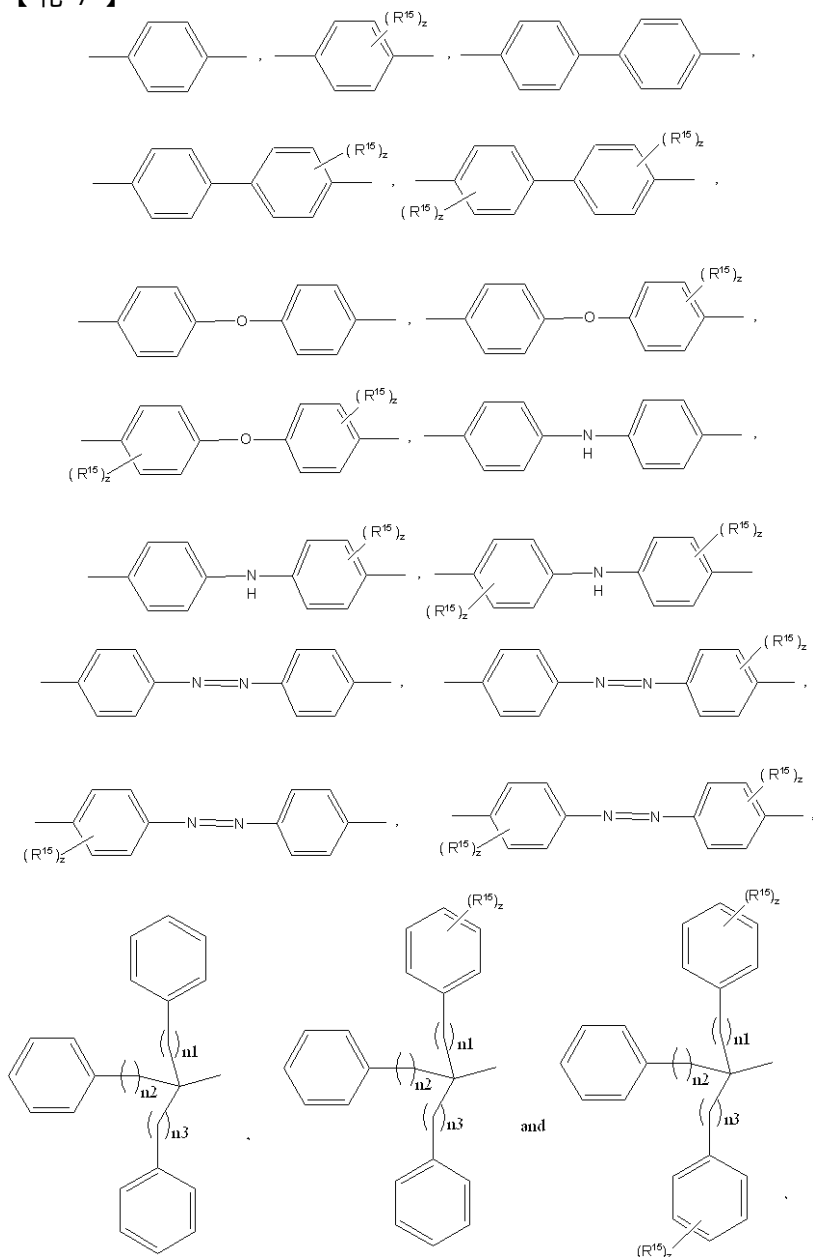
Mが以下の基から水素原子を除いた基： $(CH_2)_r$ 、 $(CH_2O)_r$ 、 $(CH_2CH_2O)_r$ 、 $(NH(CH_2))_rC(=O)$ 、 $(NHCH(R^{52}))C(=O)$ 、 $(O(CH))_rC(=O)$ 、

10

20

30

【化7】



10

20

30

{ 式中、 r および s は各々独立に1~10の整数であり、 $R^{5,2}$ は天然または非天然 アミノ酸の側鎖であり、 z は1~4の整数であり、かつ、 $n1$ 、 $n2$ および $n3$ は各々独立に0~4の整数である }

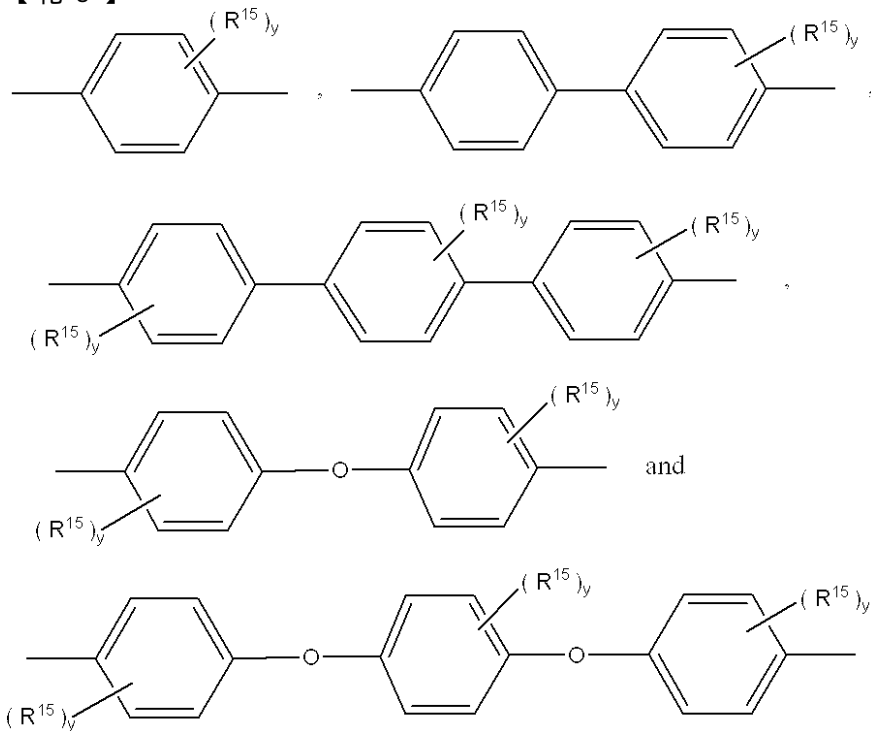
から選択される少なくとも三価の基である、請求項34または請求項35に記載の方法。

【請求項37】

S^1 および S^2 が各々独立に $(CH_2)_r$ 、 (CH_2O) 、 $(CH_2CH_2O)_r$ 、 $(NH(CH_2)_rC(=O))_s$ 、 $(NHCH(R^{5,2})C(=O))_s$ 、 $(O(CH)_rC(=O))_s$ 、

40

【化 8】



10

20

{ 式中、 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 アミノ酸の側鎖であり、かつ、 y は0~4の整数である }
から選択される、請求項34~36の何れかの方法。

【請求項38】

Lがジスルフィド部分、光切断可能な基、酸切断可能な基、アルカリ切断可能な基、酸化的に切断可能な基、または還元的に切断可能な基である、請求項34~37の何れかの方法。

【請求項39】

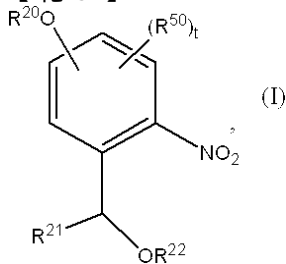
Lがトリチルエーテル、オルトニトロ置換されたアリール基、*o*-ニトロベンジル、フェナシル、ニトロフェニルスルフェニル基である、請求項34~38の何れかの方法。

30

【請求項40】

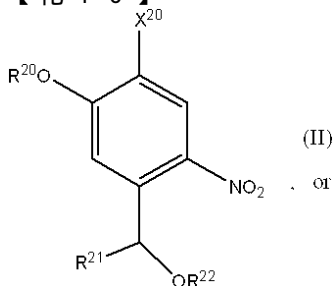
Lが以下の式I、IIまたはIII

【化 9】

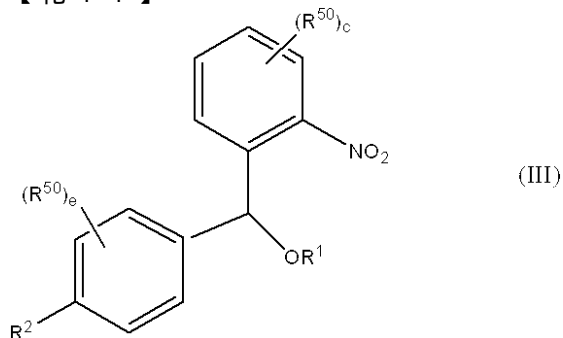


40

【化 10】



【化 1 1】



10

{ 式中、 R^{20} は (4,4'-ジメトキシトリチルオキシ)アルキルまたは ヒドロキシアルキルであり、 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、

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、

R^{22} は水素であり、 t は 0 ~ 3 であり、

R^{50} はアルキル、アルコキシ、アリールまたはアリールオキシであり、

X^{20} は水素、アルキルまたは OR^{20} であり、

R^1 は水素であり、

R^2 は -ヒドロキシアルコキシ、 -(4,4'-ジメトキシトリチルオキシ)アルコキシ、 -ヒドロキシアルキルおよび -(4,4'-ジメトキシトリチルオキシ)アルキルの中から選択され、かつ、非置換であるかまたはアルキルまたはアルコキシ鎖が 1 以上のアルキル基で置換されており、かつ

20

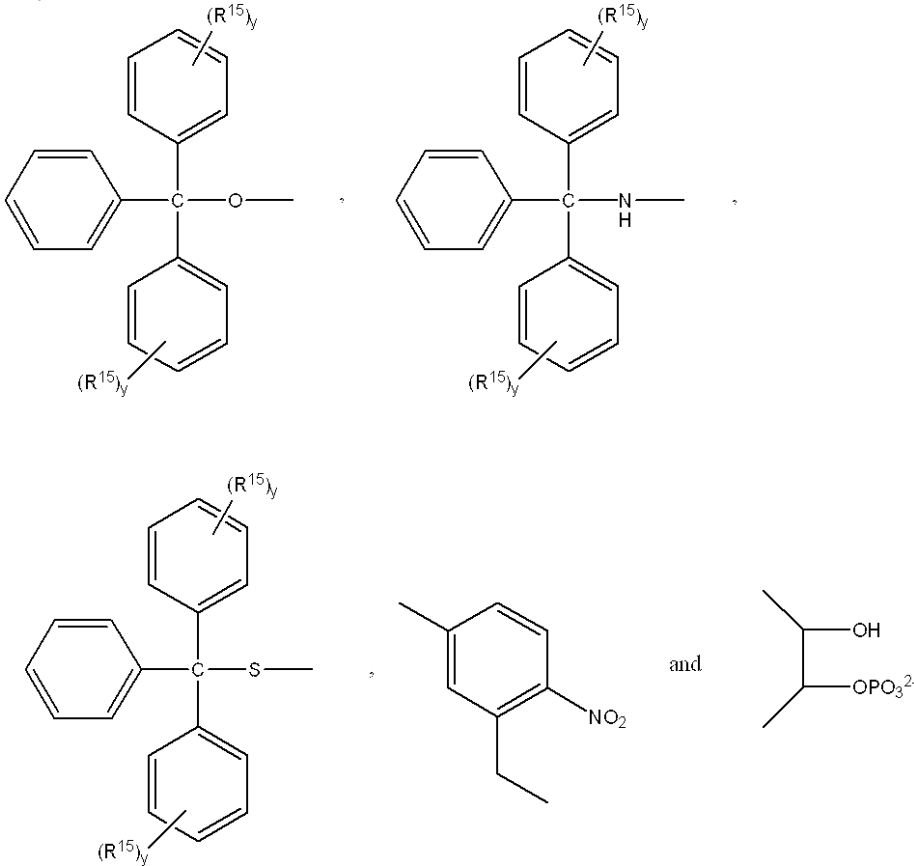
c および e は各々独立に 0 ~ 4 である }

を有する、請求項 34 ~ 39 の何れかの方法。

【請求項 41】

L が SS、 $OP(=O)(OR^{51})NH$ 、 $pMeoNO_2PhCH_2$ 、 $OC(=O)$ 、および

【化 1 2】



10

20

30

40

50

{ 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り、かつ

y は 0 ~ 4 の整数である }

の中から選択される、請求項 34 ~ 40 の何れかの方法。

【請求項 4 2】

R^{51} が H 、 OH 、 OR^{51} 、 SH 、 SR^{51} 、 NH_2 、 NHR^{51} 、 $N(R^{51})_2$ 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 SO_3H 、 PO_4^{2-} 、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 $CH(CH_3)_2$ または $C(CH_3)_3$ であり、 R^{51} が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、請求項 34 ~ 41 の何れかの方法。

【請求項 4 3】

各 X が活性エステル、活性ハロ部分、アミノ酸側鎖特異的官能基、酵素の活性部位と結合する試薬、受容体と結合するリガンド、生体分子表面に結合する特異的ペプチド、レクチン、抗体、抗原、ビオチン；ストレプトアビジンからなる群より選択される、請求項 1 ~ 42 の何れかの方法。

【請求項 4 4】

Xが -ハロエーテル、 -ハロカルボニル基、マレイミド、金属錯体、エクスポキシド、イソチオシアネートまたはリン酸化されたかまたはグリコシル化されたペプチド/タンパク質に対する抗体である、請求項 1 ~ 4 3 の何れかの方法。

【請求項 4 5】

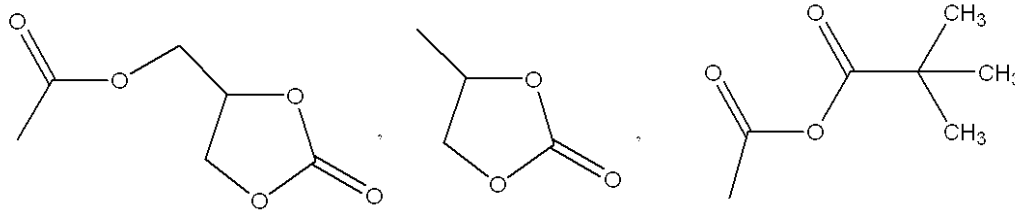
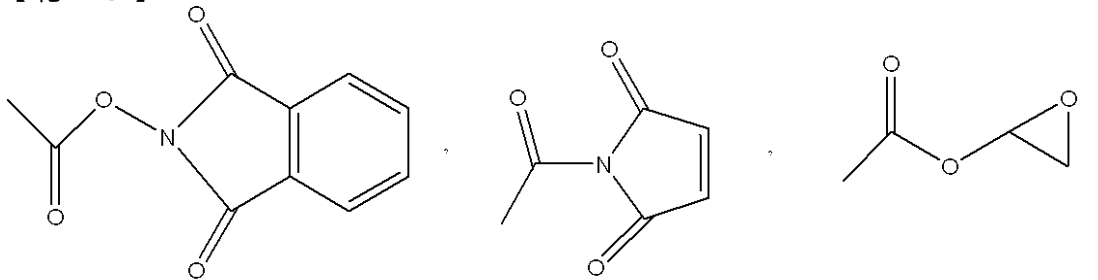
XがC(=O)OPhNO₂、C(=O)OC₆F₅、C(=O)O(Nスクシンイミジル)、OCH₂I、OCH₂Br、OCH₂Cl、C(O)CH₂I、C(O)CH₂BrまたはC(O)CH₂Clである、請求項 1 ~ 4 4 の何れかの方法。

【請求項 4 6】

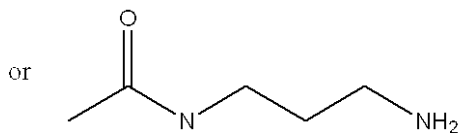
Xが

【化 1 3】

10



20



30

である、請求項 1 ~ 4 3 の何れかの方法。

【請求項 4 7】

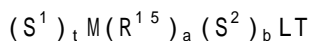
メンバーである化合物がZに連結された質量改変タグを含む、請求項 1 ~ 4 6 の何れかの方法。

【請求項 4 8】

メンバーである化合物が質量改変タグを含み、かつ、その質量改変タグがZに連結されているか、またはS²である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 4 9】

質量改変されたZ部分が次式



を有し、かつ、

Tは質量改変タグである、

請求項 3 4 ~ 4 8 の何れかの方法。

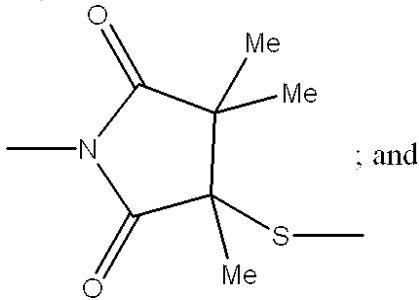
【請求項 5 0】

質量改変タグが次式X¹R¹⁰を有する二価の基であり、かつ、以下の(i)~(vii):

(i)X¹はO、OC(O)(CH₂)_yC(O)O、NHC(O)、C(O)NH、NHC(O)(CH₂)_yC(O)O、NHC(S)NH、OP(O-アルキル)O、OSO₂O、OC(O)CH₂S、S、NHおよび

40

【化 1 4】



から選択される二価の基であり、かつ

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 から選択される二価の基であり、 y は1~20の整数であり、 z は0~200の整数であり、 R^{11} は天然に生ずるアミノ酸の側鎖であり、かつ、 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、

(ii)SS、

(iii)S、

(iv) $(NH(CH_2)_yNHC(O)(CH_2)_zC(O))_zNH(CH_2)_yNHC(O)-(CH_2)_yC(O)O$ (ここで、 y および z は(i)と同様に選択される)、

(v) $(NH(CH_2)_yC(O))_zNH(CH_2)_yC(O)O$ (ここで、 y および z は(i)と同様に選択される)、

(vi) $(NHCH(R^{11})C(O))_zNHCH(R^{11})C(O)O$ (ここで、 R^{11} および z は(i)と同様に選択される)

、あるいは

(vii) $(O(CH_2)_yC(O))_zNH(CH_2)_yC(O)O$ (ここで、 y および z は(i)と同様に選択される)

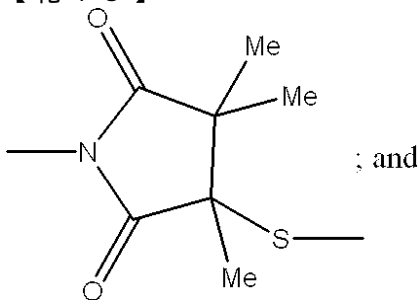
から選択される、請求項47~49の何れかの方法。

【請求項51】

S^2 が次式 X^1R^{10} を有し、 X^1R^{10} が以下の(i)~(vii)：

(i) X^1 はO、 $OC(O)(CH_2)_yC(O)O$ 、 $NHC(O)$ 、 $C(O)NH$ 、 $NHC(O)(CH_2)_yC(O)O$ 、 $NHC(S)NH$ 、 $OP(O-アルキル)O$ 、 OSO_2O 、 $OC(O)CH_2S$ 、S、NHおよび

【化 1 5】



から選択される二価の基であり、かつ

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 から選択される二価の基であり、 y は1~20の整数であり、 z は0~200の整数であり、 R^{11} は天然に生ずるアミノ酸の側鎖であり、かつ、 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、

(ii)SS、

(iii)S、

(iv) $(NH(CH_2)_yNHC(O)(CH_2)_zC(O))_zNH(CH_2)_yNHC(O)-(CH_2)_yC(O)O$ (ここで、 y および z は(i)と同様に選択される)、

(v) $(NH(CH_2)_yC(O))_zNH(CH_2)_yC(O)O$ (ここで、 y および z は(i)と同様に選択される)、

$(vi)(NHCH(R^{11})C(O))_zNHCH(R^{11})C(O)O$ (ここで、 R^{11} および z は (i) と同様に選択される)、あるいは

$(vii)(O(CH_2)_yC(O))_zNH(CH_2)_yC(O)O$ (ここで、 y および z は (i) と同様に選択される)から選択される、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 2】

Qが少なくとも「j」個のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドであり、かつ、収集物が、約 $10 \sim 4^j$ 種(jはオリゴヌクレオチドの一本鎖部分の塩基数である)の化合物を含む、請求項 1 ~ 5 1 の何れかの方法。

【請求項 5 3】

Zが化合物の質量スペクトル分析の間に切断することができる部分である、請求項 5 2 に記載の方法。 10

【請求項 5 4】

Zが化合物の質量スペクトル分析の間に切断できない部分である、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 5】

捕獲化合物の収集物を含む組成物が、各Qと相補的であるオリゴヌクレオチドを含む、複数のオリゴヌクレオチドまたはその類似体とハイブリダイズする、請求項 3 ~ 5 5 の何れかの収集物を含む方法。

【請求項 5 6】

Qと相補的であるオリゴヌクレオチドまたはその類似体がアレイとして固体支持体上に固定化されている、請求項 5 5 に記載の方法。 20

【請求項 5 7】

支持体がアドレス可能なアレイである、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

生体分子が捕獲化合物と共有結合する、請求項 1 ~ 5 7 の何れかの方法。

【請求項 5 9】

生体分子にはタンパク質が含まれる、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

生体分子には受容体が含まれる、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 1】

生体分子には酵素が含まれる、請求項 5 8 に記載の方法。 30

【請求項 6 2】

捕獲化合物が、

反応機能的 Xおよび選択性官能基 Yに連結する中心コアZ、それにより、捕獲化合物は、混合物中の生体分子と共有結合を形成するか、または高い安定性で相互作用し、そのため、選択性官能基の存在下での、反応性官能基による、捕獲化合物の生体分子との結合親和性が、選択性官能基が存在しない場合よりも少なくとも10倍高い、を含む、請求項 1 ~ 6 1 の何れかの方法。

【請求項 6 3】

収集物中の化合物が、発光アッセイの試薬または比色アッセイで検出される基および一本鎖オリゴヌクレオチドを有している選別基Qを含有しているZを含む、請求項 3 ~ 6 2 の何れかの方法。 40

【請求項 6 4】

Zが固体支持体である、請求項 1 9 の方法。

【請求項 6 5】

Zが粒子性の支持体である、請求項 1 9 の方法。

【請求項 6 6】

捕獲化合物が、捕獲化合物の溶解性に影響を及ぼす溶解性基Wをさらに含む、請求項 1 ~ 6 5 の何れかの方法。

【請求項 6 7】

選択性官能基Yが図17に示されるものから選択され、および/または反応性官能基Xが図16に示されるものから選択される、請求項1~3および5~66の何れかの方法。

【請求項68】

選択性官能基Yが図21に示されるものから選択され、および/または反応性官能基Xが図16に示されるものから選択される、請求項1~3および5~66の何れかの方法。

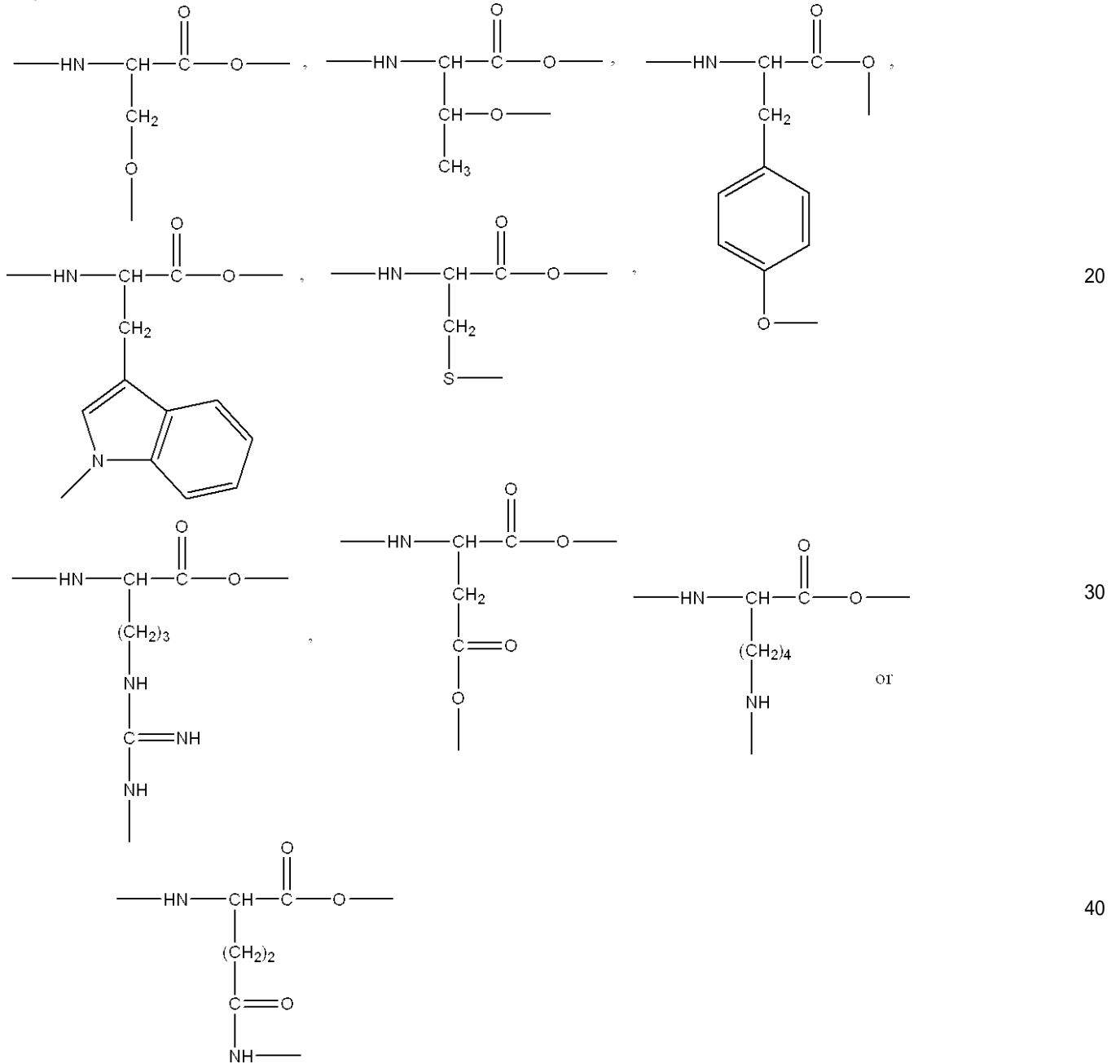
【請求項69】

選択性官能基Yがアトルバスタチン、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選択される医薬品である、請求項1~66の何れかの方法。

【請求項70】

Mが、

【化16】



である、請求項36の方法。

【請求項71】

n3が2である、請求項36の方法。

【請求項72】

X部分がスペーサーを介しZ部分に連結する、請求項1~71の何れかの方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7 3】

スペーサーが $(\text{CH}_2)_r$ 、 (CH_2O) 、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ 、 $(\text{NH}(\text{CH}_2)_r\text{C}(=\text{O}))_s$ 、 $(\text{O}(\text{CH})_r\text{C}(=\text{O}))_s$ 、 $-\text{C}(\text{H}_2)_{r_1}-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_{r_2}-$ または $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_r-$ であり、ここで、 r 、 r_1 、 r_2 および s は各々独立しており、1から10の整数である、請求項 7 2 の方法。

【請求項 7 4】

Qがビオチン、6-His、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、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、タンパク質核酸、活性化デキストランまたはペプチドである、請求項 3 ~ 1 4 および 2 5 ~ 7 3 の何れかの方法。

【請求項 7 5】

Qがビオチンである、3、1 0、1 4、1 5 ~ 2 4 および 7 4 の何れかの方法。

【請求項 7 6】

生体分子の混合物において薬物の非標的分子を同定する方法であって、

生体分子の混合物を捕獲化合物と相互作用させること、ここで、該捕獲化合物は、得られる生体分子/捕獲化合物の複合体が質量スペクトル分析の条件下で安定であるように生体分子と共有結合するかまたは十分に高い親和性を有して結合するように選択される部分 X; 選択性部分が存在する場合にそれが存在しない場合よりも捕獲化合物が少ない生体分子と結合するよう X による結合の選択性を高める部分 Y; 部分 Q、ここで、Qは選別を可能とする; および X、Y および Q を提示するための部分 Z を含む、ならびに

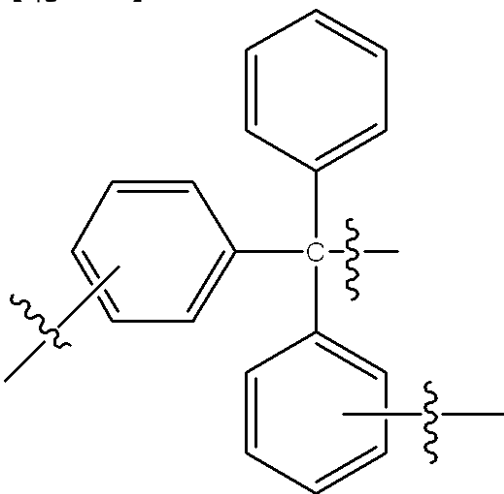
捕獲した生体分子を分析し、薬物の非標的物を同定すること、

を含む、該方法。

【請求項 7 7】

Zは式:

【化 1 7】



を有する、請求項 7 6 の方法。

【請求項 7 8】

Xは図 1 6 に示される群から選択される、請求項 7 6 または請求項 7 7 の方法。

【請求項 7 9】

Yは図 1 7 に示される群から選択される、請求項 7 6 ~ 7 8 の何れかの方法。

【請求項 8 0】

Qは塩基相補的な一本鎖核酸分子または類似体と安定なハイブリッドを形成するために十分な長さ「j」の一本鎖部分を含む、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、請求項 7 6 ~ 7 9 の何れかの方法。

【請求項 8 1】

捕獲化合物のセットを含む複数の捕獲化合物を含有する捕獲化合物の収集物、ここで、捕獲化合物の各セットは、得られる生体分子/捕獲化合物の複合体が質量スペクトル分析の条件下で安定であるように生体分子と共有結合するかまたは十分に高い親和性を有して

10

20

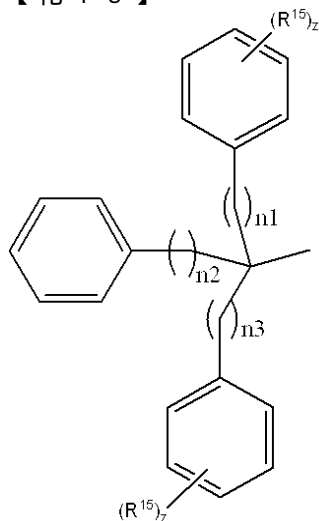
30

40

50

結合するように選択された部分X、捕獲化合物が、選択性部分が存在する場合にそれが存在しない場合よりも少ない生体分子と結合するようXによる結合の選択性を高める部分Y、ならびにXおよびYを提示する部分Zとを含み、ここで、該部分Zは、

【化18】



10

[式中、 R^{15} は上記の通りであり、 n_1 、 n_2 、 n_3 は0~4であり、但し、 n_1 、 n_2 、 n_3 のすべてが同時に0となることはない]

20

である。

【請求項82】

図23から選択される、捕獲化合物。

【請求項83】

生体分子を分析するための方法であって、

a)生体分子を含む組成物を、請求項81または請求項82の捕獲化合物または捕獲化合物の収集物と接触させ、捕獲化合物-生体分子複合体を形成すること；および

b)結合した生体分子を同定または検出すること

を含む、該方法。

【請求項84】

生体分子がタンパク質である、請求項83の方法。

30

【請求項85】

捕獲化合物にはビオチン部分が含まれる、請求項83または請求項84の方法。

【請求項86】

捕獲化合物がアドレス可能なアレイ中にあり、アレイ中の各位置が異なる捕獲化合物のセットを含む、請求項83~85の何れかの方法。

【請求項87】

同定が結合した生体分子の質量スペクトル分析を含む、請求項83~86の何れかの方法。

【請求項88】

生体分子がタンパク質である、請求項83~86の何れかの方法。

40

【請求項89】

生体分子が受容体である、請求項88の方法。

【請求項90】

生体分子が酵素である、請求項88の方法。

【請求項91】

捕獲化合物に結合した生体分子を、質量スペクトル分析の前にプロテアーゼで処理する、請求項87~90の何れかの方法。

【請求項92】

収集物中の化合物の各セットが同一の反応性官能基を含むが、選択性官能基とは異なっ

50

ている、請求項 87 ~ 91 の何れかの方法。

【請求項 93】

収集物中の化合物の各セットが異なる反応性官能基、選択性官能基および選別官能基を含む、請求項 87 ~ 92 の何れかの方法。

【請求項 94】

収集物中の化合物の各セットが異なる反応性官能基および選択性官能基を含む、請求項 87 ~ 93 の何れかの方法。

【請求項 95】

タンパク質配座異性体を分離する方法であって、生体分子を含む組成物を、請求項 81 または請求項 82 の何れかの捕獲化合物の収集物と接触させること、

10

収集物のメンバーを分離すること、および

結合したタンパク質を混合物から同定し、これにより各配座異性体が収集物のメンバーに対して異なる結合特異性を有すること

を含む方法。

【請求項 96】

同定を質量分析計によって行う、請求項 95 に記載の方法。

【請求項 97】

少なくとも1種の配座異性体が疾病に関係している、請求項 95 または請求項 96 に記載の方法。

【請求項 98】

20

生体分子の複合体混合物の多様性を減少させる方法であって、

混合物を、請求項 81 または 82 の捕獲化合物の収集物と接触させて捕獲化合物と結合生体分子との複合体を形成すること、および接触の前、その間または後のいずれかに、

捕獲化合物と生体分子との複合体の各セットを他のセットから分離すること

を含む方法。

【請求項 99】

表現型特異的生体分子を同定する方法であって、

所定の表現型によって細胞を単一の対象から選別して少なくとも2つの異なる細胞セットを作製すること、

選別された細胞の各セット由来の生体分子の混合物を、請求項 81 または請求項 82 の捕獲化合物の収集物と接触させること、および

30

各セット由来の生体分子の結合パターンを比較して、各セットで異なる生体分子を同定し、それによって表現型特異的生体分子を同定すること

を含む方法。

【請求項 100】

選別前および/または選別後に、細胞を同調化するかまたはある代謝状態で凍結する、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 101】

生体分子がタンパク質を含む、請求項 99 または請求項 100 に記載の方法。

【請求項 102】

40

結合した生体分子を質量分析計によって同定する、請求項 99 ~ 101 の何れかの方法。

【請求項 103】

各捕獲化合物がタンパク質と共有結合する選択性官能基、捕獲化合物が、選択性部分が存在する場合にはそれが存在しない場合よりも少ないタンパク質と結合するように結合の選択性を高める部分を含む、請求項 99 ~ 102 の何れかの方法。

【請求項 104】

各捕獲化合物が捕獲化合物を固体支持体上の異なる位置に整列させるための選別官能基をさらに含む、請求項 99 ~ 103 の何れかの方法。

【請求項 105】

50

捕獲化合物がタンパク質と共有結合する反応性官能基、および表面またはその上にある分子と結合することによって、捕獲化合物を固体支持体上に整列させることを可能にする選別官能基を含む、請求項 99 ~ 104 の何れかの方法。

【請求項 106】

表現型が疾病表現型および健常表現型である、請求項 99 ~ 105 の何れかの方法。

【請求項 107】

細胞の疾病表現型が腫瘍であり、かつ、健常表現型が非腫瘍である、請求項 106 に記載の方法。

【請求項 108】

接触ステップを水性媒体中で行い、かつ、生体分子が親水性である、請求項 83 ~ 107 の何れかの方法。 10

【請求項 109】

接触ステップを疎水性媒体中で行い、かつ、生体分子が疎水性である、請求項 83 ~ 107 の何れかの方法。

【請求項 110】

同定または検出を生体分子-捕獲化合物複合体の質量スペクトル分析によって行う、請求項 83 ~ 109 の何れかの方法。

【請求項 111】

質量分析計の形式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) 質量分析計である、請求項 110 の方法。 20

【請求項 112】

生体分子にはタンパク質が含まれる、請求項 83 ~ 111 の何れかの方法。

【請求項 113】

結合した生体分子の質量スペクトル分析が

(i) 生体分子-捕獲剤複合体にマトリックスを加えること、

(ii) スポット毎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

を含む、請求項 110 に記載の方法。

【請求項 114】

一部を除去または切断するための、生体分子-捕獲化合物複合体の化学的または酵素的 30
処理

をさらに含む、請求項 83 ~ 113 の何れかの方法。

【請求項 115】

結合した生体分子の質量スペクトル分析が

(i) 生体分子-捕獲剤複合体のセットにマトリックスを加えること、および

(ii) 生体分子-捕獲剤複合体の各セットの、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

を含む、請求項 87、96、102 および 105 の何れかの方法。

【請求項 116】

生体分子を含む組成物が細胞溶解物である、請求項 83 ~ 115 の何れかの方法。 40

【請求項 117】

溶解物が得られた細胞が同調化されているか、またはある代謝状態で凍結されている、請求項 116 に記載の方法。

【請求項 118】

生体分子の混合物を分析するシステムであって、

請求項 81 または請求項 82 の捕獲化合物の収集物、

収集物を用いる生体分子の分析を制御および行うための指令がプログラムされたコンピューター、

質量分析計、および

質量分析計によって得られたデータの分析のためのソフトウェア 50

を含むシステム。

【請求項 1 1 9】

自動化システムである、請求項 1 1 8 に記載のシステム。

【請求項 1 2 0】

液体クロマトグラフィー装置をさらに含む、請求項 1 1 3 または請求項 1 1 4 に記載のシステム。

【請求項 1 2 1】

請求項 8 2 ~ 8 5 および 9 1、9 7 および 1 0 5 の何れかの方法によって得られた質量分析データを処理する方法であって、

- (a) あらゆるバックグラウンドも差し引くこと、
- (b) ノイズを減少させること、
- (c) 分子量を校正すること、および
- (d) ピークをリファインすること

10

を含む方法。

【請求項 1 2 2】

ステップ(d)がピーク積分を含む、請求項 1 2 2 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

(e) 処理したデータを既存のタンパク質データベースまたはオープンリーディングフレームを含むDNAデータベースと比較してタンパク質が既知のものであるかどうかを調べる

20

こと、および

(f) タンパク質が既知である場合には、修飾を同定すること

【請求項 1 2 4】

をさらに含む、請求項 1 2 1 または請求項 1 2 2 に記載の方法。

健康および病気の個体の組織による、あるいは種々の生理学的または発達段階による、あるいは組織の種々の部分によるデータを比較すること

【請求項 1 2 5】

をさらに含む、請求項 1 2 1 ~ 1 2 3 の何れかの方法。

【請求項 1 2 6】

分析が直交飛行時間型(O-TOF)質量分析である、請求項 8 7、9 6、1 0 2 および 1 1 0 の何れかの方法。

30

【請求項 1 2 7】

分析がエレクトロスプレー(ES)質量分析である、請求項 8 7、9 6、1 0 2 および 1 1 0 の何れかの方法。

生体分子相互作用を分析する方法であって、

a) 生体分子の混合物を、請求項 8 1 または請求項 8 2 の捕獲化合物の収集物と接触させて化合物-生体分子複合体を形成させること、

(ここで、中心コアは捕獲化合物に結合した生体分子の質量スペクトル分析の前またはその間に切断できない部分であり、かつ

40

複合体は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)質量分析条件に対して安定である)、

b) 捕獲化合物-生体分子複合体を、生体分子と小分子試験化合物の混合物からなる群より選択される化合物を含む混合物と接触させること(ここで、混合物中の化合物は複合体中の生体分子に結合する)、

c) ステップb)の前または後に、捕獲化合物の各セットの選別基を介して、捕獲化合物を固体支持体上に固定化すること、

d) 結合した化合物を質量分析計によって分析すること

【請求項 1 2 8】

を含む方法。

【請求項 1 2 8】

小分子試験化合物が候補薬であり、かつ、有機小分子、ペプチド、ペプチドミメティクス、アンチセンス分子またはdsRNA、抗体、抗体の断片および組換えまたは合成抗体お

50

よびその断片からなる群より選択され、そして

方法が生体分子に結合する候補薬を同定するための方法である、請求項 1 2 7 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

ステップ a) で捕獲化合物-生体分子複合体を、生体分子の混合物と接触させて生体分子複合体の構成要素または生化学的経路を同定する、請求項 1 2 7 または請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

生体分子がタンパク質である、請求項 1 2 7 ~ 1 2 9 の何れかの方法。

【請求項 1 3 1】

生体分子の分析の方法であって、

a) 捕獲化合物のセットを含む複数の、収集物である捕獲化合物と、生体分子を含む組成物とを接触させること、ここで、各捕獲化合物のセットが、得られる生体分子/捕獲化合物の複合体が質量スペクトル分析の条件下で安定であるように生体分子と共有結合するかまたは十分に高い親和性を有して結合するように選択された部分 X; 捕獲化合物が、選択性部分が存在する場合にそれが存在しない場合よりも少ない生体分子と結合するよう X による結合の選択性を高める部分 Y; 部分 Q、ここで、各セットが異なる Q を含み、Q は各セットの分離を可能とする; ならびに X、Y および Q を提示するための部分 Z を含む、

b) 捕獲した生体分子を化学的または酵素学的処理により消化すること、

c) 捕獲した化合物の各セットを選別部分 Q に基づき分離すること、および

d) 捕獲化合物の各セットを分析し、該生体分子を同定すること

を含む、該方法。

【請求項 1 3 2】

生体分子の分析の方法であって、

a) 収集物である捕獲化合物と、生体分子を含む組成物とを接触させること、ここで、各捕獲化合物が、得られる生体分子/捕獲化合物の複合体が質量スペクトル分析の条件下で安定であるように生体分子と共有結合するかまたは十分に高い親和性を有して結合するよう X による結合の選択性を高める部分 Y; 部分 Q、ここで Q は選別を可能とする; ならびに X、Y および Q を提示するための部分 Z を含む、

b) 捕獲した化合物の各セットを選別部分 Q に基づき分離すること、

c) 捕獲した生体分子を化学的または酵素学的処理により消化すること、および

d) 捕獲化合物の各セットを分析し、該生体分子を同定すること

を含む該方法。

【請求項 1 3 3】

捕獲化合物が、化合物を固体支持体上に整列させるための選別官能基を含み、

接触ステップの前、その間または後に捕獲化合物を固体支持体上に整列させることをさらに含む方法であって、

得られる生体分子-捕獲化合物複合体が固体支持体上の別々のスポットにある、

請求項 8 3 ~ 1 3 2 の何れかの方法。

【請求項 1 3 4】

結合した生体分子の質量スペクトル分析が

(i) 生体分子-捕獲剤複合体にマトリックスを加えること、

(ii) スポット毎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

を含む、請求項 1 3 3 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

化合物の各セットが単一の位置に整列させられる、請求項 8 1 または請求項 8 2 の化合物の収集物を含む固体支持体。

【請求項 1 3 6】

10

20

30

40

50

アレイがアドレス可能なアレイである、請求項 1 3 5 の固体支持体。

【請求項 1 3 7】

Zが次式

$$(S^1)_t M(R^{15})_a (S^2)_b L,$$

{ 式中、 S^1 および S^2 はスパーサー部分であり、

tおよびbは各々独立に0または1であり、

aは0~4の整数であり、

Mは3以上の結合点を含む中心部分であり、

各 R^{15} は $Y^2 R^{18}$ から独立に選択される一価の基であり、

各 Y^2 は以下の基：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 $>C(E)$ ；(ここで、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0または NR^{17} であり、DはSまたはOであり、かつ、EはS、Oまたは NR^{17} であり、その基はどの順序で組み合わせてもよい)のいずれかの組み合わせを独立に含む二価の基であり、

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 $NR^{19}R^{20}$ からなる群より選択され、

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)；

(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、アリールおよびヘテロアリールからなる群より選択される、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する

から選択され、

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、アリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヒドロキシ、 $S(O)_h R^{35}$ (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、アリールオキシ、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、ヘテロアリールオキシ、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

10

20

30

40

50

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、アリーロキシ、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、アルキルアリールアミノ、ジアリールアミノおよびアリールアミノの中から選択され、かつ

Lは化合物の質量スペクトル分析の前またはその間に切断可能な基である}

を有する、請求項1～25および31～33の何れかの方法。

【請求項138】

生体分子の混合物において薬物の非標的生体分子を同定する方法であって、

生体分子の混合物を、請求項1の捕獲化合物の収集物と相互作用させること、および

捕獲した生体分子を分析し、薬物の非標的物を同定すること、

を含む該方法。

10

【請求項139】

Xが光活性化可能な基である、請求項1～80および83～138の何れかの方法。

【請求項140】

捕獲化合物が、光活性化可能な基の活性化前に生体分子混合物と相互作用する、請求項139の方法。

【請求項141】

光活性化可能な基がアリールアジドである、請求項139または請求項140の方法。

【請求項142】

光活性化可能な基がフェニルアジドである、請求項139～141の何れかの方法。

20

【請求項143】

薬物を含む捕獲化合物を、生体分子を含むサンプルと接触させ、該サンプル中の生体分子の捕獲すること、

その捕獲した生体分子を単離し、同定すること、および

捕獲した生体分子との結合相互作用を取り除くか変化させる薬物を再設計すること

を含む、方法。

【請求項144】

捕獲した生体分子の機能を同定することを更に含む請求項143の方法。

【請求項145】

結合の変化が結合の増大である、請求項143～144の何れかの方法。

30

【請求項146】

結合の変化が結合の減少である、請求項143～144の何れかの方法。

【請求項147】

結合が変化した生体分子が非標的生体分子である、請求項143～146の何れかの方法。

【請求項148】

生体分子にはタンパク質が含まれる、請求項143～147の何れかの方法。

【請求項149】

サンプルには体組織または体液が含まれる、請求項143～148の何れかの方法。

40

【請求項150】

捕獲化合物が、得られる生体分子/捕獲化合物の複合体が質量スペクトル分析の条件下で安定であるように生体分子と共有結合するかまたは十分に高い親和性を有して結合するように選択された部分X、薬物である部分Y、部分Q、ここでQは選別を可能とする；ならびにX、YおよびQを提示するための部分Zを含み、

ここで、Xには、生体分子との接触後の活性化が潜在的に必要であり、それによって、該生体分子と反応し得る、

請求項143～149の何れかの方法。

【請求項151】

サンプルが捕獲化合物の収集物と接触する、請求項143～150の何れかの方法。

50

- 【請求項 1 5 2】
化合物がアジド、ジアジリン、または活性化後、生体分子のヒドロキシ、アミノ、チオールまたはカルボキシ基と反応する基を含み、請求項 1 4 3 ~ 1 5 1 の何れかの方法。
- 【請求項 1 5 3】
捕獲化合物に連結した再設計薬物を用い、方法を繰り返し、更にその修飾を行う、請求項 1 4 3 ~ 1 5 2 の方法。
- 【請求項 1 5 4】
捕獲化合物が複数部位で薬物と結合する、請求項 1 4 3 ~ 1 5 3 の何れかの方法。
- 【請求項 1 5 5】
捕獲したタンパク質が、薬物である標的タンパク質である、請求項 1 4 3 ~ 1 5 4 の何れかの方法。 10
- 【請求項 1 5 6】
捕獲タンパク質が、非薬物である標的タンパク質である、請求項 1 4 3 ~ 1 5 4 の何れかの方法。
- 【請求項 1 5 7】
サンプルとの平衡においてタンパク質と薬物との相互作用による条件下で接触ステップを行う、請求項 1 4 3 ~ 1 5 6 の何れかの方法。
- 【請求項 1 5 8】
平衡後、混合物を処理し、捕獲剤とタンパク質との間に共有結合を形成する、請求項 1 5 7 の方法。 20
- 【請求項 1 5 9】
処理に、捕獲化合物の活性化が含まれ、ここで、該捕獲化合物には、活性化前の不活性反応基が含まれている、請求項 1 5 8 の方法。
- 【請求項 1 6 0】
捕獲化合物の濃度が複数の種々の反応によって変わる、請求項 1 4 3 ~ 1 5 9 の何れかの方法。
- 【請求項 1 6 1】
Kd値が決定されている、請求項 1 6 0 の方法。
- 【請求項 1 6 2】
生体分子の構造決定または同定を質量スペクトル分析により行う、請求項 1 4 3 ~ 1 6 1 の何れかの方法。 30
- 【請求項 1 6 3】
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、サーモスプレーおよびマッシュブクラーター衝撃質量分析計から選択される、請求項 1 6 2 の方法。
- 【請求項 1 6 4】
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 1 6 3 の方法。
- 【請求項 1 6 5】
生体分子の機能を、コンピューター内、インビトロ、またはインビボの方法により決定する、請求項 1 4 3 ~ 1 6 4 の何れかの方法。 40
- 【請求項 1 6 6】
生体分子の機能を、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、肝臓ミトソーム代謝経路、cDNA-発現した酵素、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、取り出したタンパク質の刺激およびタンパク質/タンパク質相互作用、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、または予測遺伝子型決定および予測表現型決定により決定する、請求項 1 6 5 の方法。
- 【請求項 1 6 7】
50

薬物の再設計により、第一の薬物と比較すると、副作用がより少ないか、治療指数が増大する第二の薬物を生ずる、請求項 1 4 3 ~ 1 6 6 の何れかの方法。

【請求項 1 6 8】

薬物がトログリタゾン、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選択される、請求項 1 4 3 ~ 1 6 7 の何れかの方法。

【請求項 1 6 9】

化合物が活性化エステル基、アルキル化剤、活性化ハロゲン化物または活性化偽ハロゲン化物を含む、請求項 1 5 2 の方法。

【請求項 1 7 0】

処理にpHの変化が含まれる、請求項 1 5 8 の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

関連出願

本明細書では、Kosterらによる2003年1月16日出願の標題「CAPTURE COMPOUNDS, COLLECTIONS THEREOF AND METHODS FOR ANALYZING THE PROTEOME AND COMPLEX COMPOSITIONS.」、米国仮特許出願番号60/441,398の優先権を主張する。米国の国内段階のため、および適切な場合には、上記引用出願は引用により本願明細書にすべて含める。

【0 0 0 2】

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。

【0 0 0 3】

背景技術

疾病機序の理解ならびに治療的および予防的処置の開発は、今世紀の間に、経験的な知見および実験法からゲノムの広範な突然変異スクニングへと発展してきた。ゲノムの変化は、疾病のゲノム機序を探るツールを研究者に提供してきた。ヒトゲノムへの取り組みによって、30億塩基対のヒトゲノムの生の配列が得られ、約35,000個の遺伝子が明らかにされた。異なる個体間および集団内および集団間での遺伝子差異が、疾病の素因との関連または薬効および/または副作用との相関を調べるために研究されている。遺伝子マーカーのパネルに基づく個別的な医薬という期待は、医療界をじらしてきたが、医療提供者および患者に診断および治療の選択肢を提供することに重きをおくものには重要な目標を提供している。

【0 0 0 4】

核の増幅法、クローニングおよび発現システムおよび方法などの分子生物学における種々のツールの開発によって、疾病の分析は、ゲノム科学的アプローチまたはボトムアップアプローチに基づいて行われている。これは、ゲノム変化または変化セットが、mRNA転写またはタンパク質構造および機能に影響を及ぼすことによって、タンパク質機能に対する長く到達の作用を有することを推定するアプローチである。

【0 0 0 5】

工業的規模で一塩基多型(SNP)を分析するための技術(例えば、MassARRAY(商標)およびMassARRAY(登録商標)システム、Sequenom, Inc., San Diego, CA)、ならびに、プールされたサンプル中で、種々の性別、民族、年齢および健康状態の集団におけるSNP頻度を研究するための技術が開発されている。こういった取り組みの最終的な目標は疾病の原因を分子レベルで(例えば、遺伝子の差異に基づいて(薬理ゲノミクス))理解すること、診断アッセイおよび副作用が少ないかもしくは全くない有効な医薬品を開発することである。

【0 0 0 6】

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

10

20

30

40

50

、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。単一の遺伝子マーカーが特定の疾病状態と関連しているか、引き起こすか、それを予測することが見出されているが、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SNP(またはSNP類)の関連によって個体集団を層別化するには十分でない場合がある。タンパク質翻訳に影響を及ぼす標的および調節シグナルが多数存在する可能性により、発現DNAチップ(例えば、GeneChip(商標)技術、Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA; LifeArray(商標)技術、Incyte Genomics, Inc., Palo Alto, CA)を用いる分析のような、健常および疾病状態などの表現型または集団の比較においてメッセンジャーRNAの分別的発現プロファイルを確立することは十分ではない。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。

【0007】

プロテオミクスの研究は個々のタンパク質および生化学経路内でこれらのタンパク質がどのように機能するかについての研究を含む。プロテオミクスはまた、タンパク質が生細胞を構成する構造をどのように形成するかをはじめとする、タンパク質相互作用についての研究を含む。癌、アルツハイマー病、糖尿病などの多数のヒト疾病ならびに感染性疾病に対する宿主応答では、疾病を引き起こし得る、調節タンパク質間の複合体相互作用の解明が効果的な処置を見出すための重要なステップである。SNPおよび他の核酸突然変異は、多くの場合、その産物が(1)成長関連ホルモン、(2)成長ホルモンの膜受容体、(3)膜貫通シグナル経路の構成要素および(4)疾病の発症を招く、サプレッサー遺伝子(例えば、p53)の転写および不活化に作用するDNA結合タンパク質のようなタンパク質である遺伝子中に生じる。

【0008】

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。

【0009】

利用可能なタンパク質チップは、薬剤開発の標的であることが多い、疎水性の膜タンパク質を特異的に捕獲するその能力によって限定される。ひと度チップに結合されると、タンパク質は極めて不安定であり、その構造が生理学的条件下で見られる真のコンホメーションを反映しないことも多い。

【0010】

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。殆どの製薬会社が、遺伝子に基づくアプローチによる、多くの未確認標的からの本当に有望な薬物標的の抽出に相当に投資している。概して、どのような薬物が標的に作用するかを決定づける作用機構は殆ど理解されていない; 幾つかの上市された薬物では、標的さえ知られていない。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。

【0011】

医薬の開発計画は多くの理由(例えば、プラシーボと比較して効力がないこと)のため中止されるが、その終了の約半分は、臨床的安全性および毒性に関係する。結果として、選択の誤りで生ずる多くの薬物化合物の開発は、数年および数百万ドルを投じた後の臨床試験において停滞し、遅延する。毒性により生ずる財政上の問題と合わせると、長期間の薬物開発はまた、実質的に、特許による保護期間を短縮することとなる。

【0012】

10

20

30

40

50

薬物の不都合な副作用は、毎年、二百万を超える入院および100,000を超える死亡を生じている。多くの主要な薬物には重篤な毒性の副作用がある。

【0013】

広く処方されている乾癬の薬物、メトトレキサートおよびシクロスポリンは、重い肝臓および腎臓の障害を起こすことがあり、このため、1年を超えて処方されることはほとんどない。

【0014】

およそ130億ドルが、製造物被害およびフェン・フェンダイエット混合薬の回収に関連する共同訴訟に投じられている。

【0015】

実質的な責任はまた、糖尿病薬リズリン(Rezulin)(トログリタゾン(Troglitazone))の肝細胞毒性と関係し、それは、2百万回処方され、市場からのその回収前では398人の死者を出した；8700の訴訟が提起されている。

【0016】

700,000人のアメリカ人が服用するベイコール(Baycol)、コレステロール-低下スタチンは、時折の致命的な筋肉関連の副作用(横紋筋融解)および米国で31人の死亡が報告され、市場から回収された。回収前の、見積もられた年間のベイコールの収入はおよそ10億ドルであった。

【0017】

関節炎の治療のための大型商品であるセレブレックス(Celebrex)およびビオックス(Vioxx)の販売増加もまた、心臓での問題との可能性ある関連についての報告によって負の影響を受けた。

【0018】

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。

【0019】

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。

【0020】

要約

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。

【0021】

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

10

20

30

40

50

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・生体分子の官能基(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。

10

20

30

40

50

【0022】

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。本明細書で提供する方法における捕獲および分離は、生体分子またはその混合物の特有の表面特性に基づいており、それには、タンパク質またはタンパク質の混合物の表面上の化学的・反応性アミノ酸残基が含まれるがこれらに限らない。これ故、本明細書で提供する捕獲化合物は、任意の特定生体分子を標的とはせず、生体分子またはその混合物の表面上に存在する反応基により生体分子を捕獲することが望ましい。

【0023】

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)質量スペクトル分析の条件下で、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、共有結合または高い結合親和性(K_a)の他の化学的相互作用のいずれかで結合し、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。

【0024】

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。収集物は、翻訳後構造変化をはじめとする構造変化を評価するトップダウン・不偏的方法に用い、例えば、一次細胞由来、通常は同一個体由来の疾病細胞対健康細胞において、パターン、特に、翻訳後タンパク質パターンを比較するために用いる。生体分子の供給源として用いる細胞は、直接比較および疾病・特異的生体分子、通常はタンパク質などの表現型・特異的なものの同定を可能にするために、選択した代謝状態で凍結することができ、また同調化することもできる。

【0025】

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。

【0026】

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。

10

【0027】

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。選択性官能基は化合物から分離され、固体または半固体の支持体を含んでもよい。本実施形態の選択性官能基は、多孔性、疎水性、電荷および他の化学的特性を有している物質であってもよい。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およびトリチル)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。

20

【0028】

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。

30

40

【0029】

特定の実施形態では、捕獲される各生体分子を本明細書で提供される1以上の捕獲化合物で誘導体化し、これでは、タグをつけた化合物の各々によってさらなるレベルの選別が可能が提供される。他の実施形態では、単一の生体分子を誘導体化する複数の化合物の各々が異なり、それによって生体分子混合物の特異的かつ効率的選別が可能となる(例えば、図3参照)。捕獲化合物はまた、生体分子混合物の複雑度を低下させるために使用できる他の官能性を有する多官能性であってもよい。

50

【0030】

捕獲化合物のいくつかは少なくとも1つの反応性官能基と1つの選択性官能基とを含む。これらの捕獲化合物は、必要に応じて、共有結合または非共有結合のいずれかによって特定の分子と結合して、固体支持体上の別個の位置での分離によるような化合物のアドレス指定、別個の位置での化合物の分離を可能にする1以上のさらなる部分である選別官能基を含む。これらの捕獲化合物はまた、必要に応じて、得られる化合物の溶解性に影響を及ぼし、化合物の疎水性/親水性(溶解性官能基)を減弱するかまたは変更する部分である、1以上の溶解性官能基を含む。

【0031】

別の捕獲化合物(または捕獲剤)は少なくとも2つの官能部分: 反応性官能基および選別官能基を含む。タンパク質または他の生体分子と特異的に相互作用するものが反応基(反応性官能基)であり、もう一方は共有的または非共有的のいずれかで特定の分子に結合する基(選別官能基)である。この基は、相補的な一本鎖オリゴヌクレオチドまたはその類似体に特異的にハイブリダイズすることができる一本鎖領域を含む核酸部分または核酸類似体部分であってもよい。

10

【0032】

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。

20

【0033】

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。

【0034】

本明細書ではまた、定義された表現型に基づいて選択されるタンパク質を発見および同定する方法も提供する。この方法では、生理学的条件下で、標的の正確な二次および三次コンホメーションを維持しながら、タンパク質を標的分子に結合させる。この方法は、定義された表現型に基づいて選択される、膜タンパク質をはじめとする生物学的に重要なタンパク質の発見を可能にする、生理学的および他の条件下で実施することができる。

30

【0035】

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。

40

【0036】

捕獲化合物の収集物を用いて、核およびミトコンドリアの膜貫通構造、人工膜または無傷の細胞壁などの生物学的構造を模倣することができる、標的とするタンパク質またはタンパク質と関連している基を捕獲するための化合物アレイを作製することができる。したがって、本明細書で提供される化合物および化合物アレイは生物学的物質および生物の表面を模倣することが可能であり、それゆえに、細胞の膜貫通領域中に見られるものなど、捕獲することが困難であるか、または不可能であったはずの、タンパク質を含むがこれに限定されない生体分子の捕獲を可能にする。

50

【0037】

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。

【0038】

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もしくはそれらの中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。

10

【0039】

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。

【0040】

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。

20

【0041】

図3は、本明細書で提供される4種の化合物でタグをつけ、それによってタンパク質の特異的選別が可能となるタンパク質を例示する図である。

【0042】

図4は、2以上のオリゴヌクレオチドタグの使用に起因するハイブリダイゼーションの増加および特異的ハイブリダイゼーションを示す図である。

【0043】

図5は、1つの反応における、2種の異なるオリゴヌクレオチドでの単一タンパク質のタギングを示す図である。

30

【0044】

図6は、組換えタンパク質生産の流れ図である。

【0045】

図7は、アダプターをつけたオリゴヌクレオチドdTをプライマーとしたcDNAライブラリーの作製を示す図である。

【0046】

図8は、アダプターをつけた配列モチーフ特異的cDNAライブラリーの作製を示す図である。

【0047】

図9は、アダプターをつけた遺伝子特異的cDNAの作製を示す図である。

40

【0048】

図10は、鋳型ライブラリーからの増幅産物の精製を例示する図である。

【0049】

図11は、遺伝子小集団の増幅のためのユニバーサル・テンプレートとしての、アダプターをつけたオリゴヌクレオチドdTをプライマーとするcDNAライブラリーを示す図である。

【0050】

図12は、PCR増幅の際の複雑性の低下を示す図である。

【0051】

50

図13は、二官能性分子の固体表面への結合を示す図である。

【0052】

図14は、化合物のスクリーニングおよび抗体の作製により精製されたタンパク質の分析を示す図である。

【0053】

図15a - 15bは、本明細書で提供される例示的な捕獲試薬の合成の合成図式を提供する図である(例えば、実施例4参照)。

【0054】

図16a - 16bは、本明細書で提供される捕獲試薬に用いる例示的な反応性官能基を提供する図である。

10

【0055】

図17a - 17h 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。

【0056】

図18は、細胞同調化のための代謝制御メカニズムの調節のための例示的な点を示す図である。

【0057】

図19a - 19cは、細胞の分離および同調化法を示す図である；図19aは、単一の患者由来の血液から細胞を分離しそれらを表現型によって分離する方法を示す図である；図19bは、標識していない血液細胞のフローサイトメトリー分離の結果を示す図である；図19cは、同調化された培養細胞を、細胞周期の時期によって細胞を分離する方法としてDNA含量によって選別する例を示す図である。

20

【0058】

図20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。

【0059】

図21は、本明細書で提供する捕獲化合物で使用するための例示的な選択性官能基を示す。

【0060】

図22a - 22bは、本明細書で提供する2つの捕獲化合物とヘモグロビンとの反応の質量スペクトルの結果を示す。図に示すように、より疎水性の捕獲化合物、すなわち、より疎水性の選択性機能を有する捕獲化合物は、化学量論的に α -ヘモグロビンと反応し、 β -ヘモグロビンと反応するが、あまり疎水性でない捕獲化合物は、 α -ヘモグロビンとは不完全な反応であり、 β -ヘモグロビンとは反応しない。

30

【0061】

図23a - 23dは、本明細書で提供する例示的な捕獲化合物を示す。

【0062】

図24は、本明細書で提供する捕獲化合物と、U937リンパ腫血液細胞から得たタンパク質混合物との反応の質量スペクトルの結果を示す。その図は、捕獲化合物による、示されたタンパク質の選択的な捕獲を示す。

40

【0063】

図25は、本明細書で提供する捕獲化合物とパーキットリンパ腫サイトソルとの反応の質量スペクトルの結果を示す。その図に示すように、標識したタンパク質A-Eは、示された捕獲化合物により捕獲される。

【0064】

図26は、本明細書で提供する捕獲化合物と、パーキットリンパ腫リンパ芽球由来の全サイトソルとの反応の質量スペクトルの結果を示し、年齢および性別の同じ健常者のリンパ芽球と比較している。タンパク質A、B、CおよびEは両方のサンプルで見られる。タンパク質Dは、パーキットリンパ腫サンプルでのみ発現する。標識したタンパク質(H)は、健常者サンプルでのみ発現する。その図に示すように、本明細書で提供する捕獲化合物とパー

50

キットリンパ腫サンプルとの反応は、タンパク質Dの完全な捕獲を生じ、それにより、そのタンパク質の分析および同定が可能となる。

【0065】

図27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。

【0066】

図28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。

【0067】

図29は、トリチルスカホールド、ビオチン、NHS反応性官能基、OH選択性官能基を有する捕獲化合物と、急性リンパ性白血病の5歳の男の子(sup B ALL)および年齢/性別の同一の対照(wil2)由来の細胞系のサイトソル画分との反応の質量スペクトルの結果を示す。その図は、捕獲化合物が、存在量が類似している多くのタンパク質を共有結合的に捕獲することを示す。しかし、主要なタンパク質は、対照では存在しない疾患細胞系において~22kDaで検出される。そのタンパク質は、トリプシン消化およびペプチドデータベースマッチングによりHSP-27(熱ショックタンパク質)として同定され、それは、文字どおり他の癌と関係する。

10

【0068】

図30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、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。

20

【0069】

図31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CA IIイソ型のKdは~10nMであり、CA Iでは~1uM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、CA I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。

30

【0070】

図32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。

【0071】

図33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。CA II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CA II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。

40

【0072】

図34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。CA II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CA II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。

【0073】

図35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

50

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(～30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 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。CA I Iピークの強度はCAIよりも高く(RBCにおいて、より高く、～100x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。

【0074】

10

図36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。

【0075】

図37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。

【0076】

図38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。

【0077】

詳細な説明

20

A. 定義

特に断りのない限り、本明細書で用いたすべての技術および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に通常理解されるもの同一の意味を有する。本明細書の全開示内容を通じて参照された、すべての特許、特許出願、公開出願および出版物、Genbank配列、ウェブサイトおよび他の公開材料は、特に断りのない限り、その全体を参照により組み入れる。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。URLまたは他のそのような識別子またはアドレスを参照する場合には、そのような識別子の変化していたり、インターネット上で特定の情報が定まらないこともあるが、インターネットを検索することによって同等の情報を見出すことはできるということは理解されよう。それを参照することによって、そのような情報の利用の可能性および公に対する普及が証明される。

30

【0078】

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20、約50または約100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。

【0079】

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20、約50または約100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20、約50または約100個までのヌクレオチドの直鎖配列を意味する。

40

【0080】

本明細書においてペプチド核酸(PNA)とは、リボース-リン酸塩主鎖がアミド結合によって結合されている主鎖で置換されている核酸類似体を指す。

【0081】

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。

【0082】

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

50

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、ペプチド核酸(PNA)、オリゴ糖および単糖が挙げられる。

【0083】

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。

【0084】

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、タンパク質を飛行させるのに必要なレーザーエネルギーが減少するよう、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^+ 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。

10

20

【0085】

捕獲化合物はタンパク質および核酸部分を含むので、一方または両部分に適した調整も考慮される。したがって、分析される生体分子を濃縮するための予備精製およびイオン交換によるなど、 H^+ およびアンモニウムを除くすべての陽イオンの除去、または分解能を向上させるための他の調整処理が核酸部分ならびにタンパク質部分の分析に有利である。

【0086】

一般には、タンパク質の調整は不必要であるが、これはタンパク質が酸性、高エネルギー条件下で比較的安定であり、その結果、タンパク質は質量スペクトル分析のための調整を必要としないからである。しかし、1つの実施形態では、より短いペプチドのために、対応する未改変の残基よりも塩基性である改変されたアミノ酸を組み込むことによるなどの分解能を改善する手段が存在する。そのような改変は一般に、質量スペクトル分析の際のポリペプチドブチドの安定性を高める。また、陽イオン交換クロマトグラフィー、ならびに、タンパク質および他の反応混合物構成要素をタンパク質から除去する一般的な洗浄および精製手順を用いて、タンパク質の質量スペクトル分析によって得られるスペクトルの分解能を向上させることもできる。

30

【0087】

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。

40

【0088】

本明細書において、「マトリックス」とは、捕獲化合物生体分子結合体がMALDI質量スペクトル分析のために混合される物質を指す。3-ヒドロキシピコリン酸をはじめとする固体の酸、グリセロールなどの液体マトリックスなどの、当業者に公知の、核酸および/またはタンパク質分析用のあらゆるマトリックス物質が考慮される。化合物生体分子結合体は核酸およびタンパク質を含むので、マトリックス分子の混合物(核酸およびタンパク質にとって最適な)を用いることができる。

【0089】

50

本明細書において高分子とは、分子量が数百から数百万までのあらゆる分子を指す。高分子としては、限定されるものではないが、ペプチド、タンパク質、ヌクレオチド、核酸、炭水化物および通常、生体によって合成されるが、合成によって、または組換え分子生物学法を用いて調製することもできるような他の分子が挙げられる。

【0090】

本明細書において「生物ポリマー」とは、2以上の単量体サブユニットからなる、高分子をはじめとする生物学的分子、または結合もしくは高分子によって結びついているその誘導体を指す。生物ポリマーは、例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、炭水化物もしくは脂質またはそれらの誘導体もしくは組み合わせ、例えば、ペプチド核酸部分または糖タンパク質を含む核酸分子であり得る。本明細書の方法および収集物は生物ポリマーに 10

【0091】

本明細書において生体分子とは、生物ポリマーおよび高分子、ならびに限定されるものではないが、細胞、組織、プリオン、動物、植物、ウイルス、細菌および他の生物をはじめとする生物およびウイルスから単離することができるすべての分子を含む。

【0092】

本明細書において生物学的粒子とは、ウイルスベクターまたは核酸がパッケージされているかもしくはされていないウイルスキャプシドなどのウイルス、ファージベクターまたは核酸がカプセル化されているかもしくはされていないファージキャプシドをはじめとする 20

【0093】

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。 30

【0094】

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 (parent drug) よりも活性が大または小であり得る種々の分子となる。

【0095】

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。 40

【0096】

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。

【0097】

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。

【0098】

本明細書において「薬物の標的」は、その薬物がインピボで相互作用することを目的とし、相互作用により望ましい治療効果を発揮する生体分子であり、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。

【0099】

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生体分子であり、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。

【0100】

本明細書において「核酸」とは、デオキシリボ核酸(DNA)およびリボ核酸(RNA)ならびにRNAもしくはDNA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。核酸分子は3'、5'リン酸ジエステル結合によって連結された、ヌクレオチドの直鎖ポリマーである。DNA、デオキシリボ核酸では、糖基はデオキシリボースであり、そしてヌクレオチドの塩基はアデニン、グアニン、チミンおよびシトシンである。RNA、リボ核酸は糖としてリボースを含み、ウラシルがチミンに置き換わっている。「核酸」にはまた、ペプチド核酸(PNA)、ホスホロチオエートDNA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。

10

【0101】

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(DNA)、リボ核酸(RNA)、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、ホスホルアミデート結合、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DNAまたはRNA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、PCRプライマーを、一般に、約50~100個未満のヌクレオチドの長さであると認識する。

20

【0102】

ポリヌクレオチド中に含まれるヌクレオチド類似体は、例えば、ポリヌクレオチドの質量区別が可能であるように質量を改変されたヌクレオチド、ポリヌクレオチドの検出が可能であるように蛍光、放射性、比色、発光または化学発光標識などの検出可能な標識を含有するヌクレオチド、またはポリヌクレオチドの固体支持体への固定化を容易にするピオチンもしくはチオール基などの反応基を含有するヌクレオチドであり得る。ポリヌクレオチドはまた、例えば、化学的に、酵素によってまたは光分解によって選択的に切断され得る1以上の主鎖結合を含んでもよい。例えば、ポリヌクレオチドは1個以上のデオキシリボヌクレオチドとそれに続く1個以上のリボヌクレオチド含んでもよく、これに1個以上のデオキシリボヌクレオチドが続いてもよく、そのような配列は塩基加水分解によってリボヌクレオチド配列で切断され得る。ポリヌクレオチドはまた、切断に比較的抵抗性のある1以上の結合を含んでもよく、これは、例えば、ペプチド核酸結合によって3'末端の少なくとも1つのヌクレオチドで連結されたヌクレオチドを含むことができ、ホスホジエステル結合などによって結合され、そしてポリメラーゼによって伸長することができるキメラオリゴヌクレオチドプライマーである。ペプチド核酸配列は十分に公知の方法を用いて調製することができる(例えば、Weiler et al. (1997) *Nucleic acids Res.* 25: 2792-2799 頁参照)。

30

40

【0103】

ポリヌクレオチドは大きな核酸分子の一部、例えば、多型領域を含み得る遺伝子の一部、または染色体の遺伝子外領域の一部、例えば、ショート・タンDEM・リピート(STR)遺伝子座、可変数のタンDEM・リピート(VNTR)遺伝子座、マイクロサテライト遺伝子座またはミニサテライト遺伝子座などのヌクレオチドリピート領域の一部であってもよい。ポリヌクレオチドはまた、例えば、DNA-RNAハイブリッドを含む一本鎖であっても二本鎖であってもよく、または三本鎖または四本鎖であってもよい。ポリヌクレオチドが二本鎖DNAである場合には、A、B、LまたはZ立体配座にあってもよく、単一のポリヌクレオチドがそのような立体配座の組み合わせを含んでもよい。

【0104】

50

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。質量改変には、同位元素標識などの放射標識や蛍光基、または通常は質量分析計以外の手段による検出に用いられる他のそのようなタグは用いない。

【0105】

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。ポリペプチドは、例えば、コード配列の少なくとも一部を含むことができ、あるいはそれがコードフレーム以外のリーディングフレームに位置すること、またはそれをイントロン配列、3'もしくは5'非翻訳配列、プロモーターなどの調節配列とすることに起因して、天然には翻訳されないヌクレオチド配列の一部を含むことができる。ポリペプチドはまた、化学合成してもよいし、翻訳または化学合成後に化学または酵素法によって修飾してもよい。「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」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。ポリペプチドはまた、翻訳後修飾、例えば、リン酸化(リンタンパク質)またはグリコシル化(糖タンパク質、プロテオグリカン)されていてもよく、これらは細胞内でまたはインビトロ反応で実施することができる。

10

20

【0106】

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。

30

【0107】

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。サンプルはいずれかの生物から得た体液または生体組織などの生物学的サンプルまたは生物もしくはウイルス粒子のもしくはそれ由来の細胞またはその一部であってもよい。体液の例としては、尿、血液、血漿、血清、唾液、精液、便、痰、脳脊髄液、涙、粘液、精子、羊水などが挙げられる。生体組織とは、通常、その細胞内物質とともに、結合、上皮、筋肉および神経組織をはじめとする、ヒト、動物、植物、細菌、真菌またはウイルス構造の構造物質の1つを形成する、特定の種類の細胞の集合体である。生体組織の例としては、器官、腫瘍、リンパ節、動脈および個々の細胞が挙げられる。

40

【0108】

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。特定の実施形態では、固体物質を液体と混合する。本明細書の実施形態では、質量スペクトル分析用のサンプルとしては、質量スペクトル分析に用いるマトリックスの混合物および捕獲化合物/生体分子複合体を含むサンプルが挙げられる。

【0109】

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

50

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。

【0110】

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。

【0111】

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。

【0112】

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、Sephacrose(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))。例示的な基質としては、限定されるものではないが、ビーズ(例えば、シリカゲル、細孔性ガラス、磁性、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、Sephacrose(登録商標))、セルロース)、キャピラリー、ガラスファイバーフィルターなどの平面支持体、ガラス表面、金属表面(鋼鉄、金、銀、アルミニウム、銅およびシリコン)、マルチウェルプレートまたはメンブラン(例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリビニリデンジフルオライド製の)をはじめとするプラスチック材料、ピン(例えば、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)またはフィルタープレートを含むかもしくは含まないウエハー(例えば、シリコンウエハー)などの平坦な表面のピット中のビーズが挙げられる。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はじめ、所望のいずれの形態であってもよい。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。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。

【0113】

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(Dynal、Oslo、Norway)参照)。

【0114】

10

本明細書において「多型」とは、遺伝子またはその一部の1より多い形態の共存を指す。少なくとも2種の異なる型、例えば、2種の異なるヌクレオチド配列が存在する遺伝子の一部を「遺伝子の多型領域」と呼ぶ。多型領域は単一のヌクレオチド、例えば一塩基多型(SNP)である場合があり、その同一性は異なる対立遺伝子で異なっている。多型領域はまた数個のヌクレオチドの長さである場合もある。

【0115】

本明細書において「多型遺伝子」とは、少なくとも1つの多型領域を含む遺伝子を指す。

【0116】

20

本明細書において「対立遺伝子」とは、本明細書では「対立遺伝子変異体」と同じ意味で用いられ、遺伝子またはその一部の別の形態を指す。対立遺伝子は相同染色体上の同一の遺伝子座または位置を占める。被検体が遺伝子の2つの同一の対立遺伝子を有する場合には、被検体はその遺伝子または対立遺伝子についてホモ接合性であるといわれる。被検体が遺伝子の2つの異なる対立遺伝子を有する場合には、被検体はその遺伝子についてヘテロ接合性であるといわれる。特定の遺伝子の対立遺伝子は、単一のヌクレオチドで、または数個のヌクレオチドで互いに異なっている場合があり、ヌクレオチドの置換、欠失および挿入を含み得る。遺伝子の対立遺伝子はまた、突然変異を含む遺伝子型である場合もある。

【0117】

30

本明細書において「優性対立遺伝子」とは、所定の集団について最大頻度で示される対立遺伝子を指す。より低い頻度で存在する単数もしくは複数の対立遺伝子を対立遺伝子変異体と呼ぶ。

【0118】

本明細書において「関連する」とは、疾病、症状または表現型の発症または発現との一致を指す。関連は、限定されるものではないが、その変化が種々の疾病および症状の基礎を提供し得るハウスキーピング機能を担う遺伝子、特定の疾病、症状または表現型に關与している経路の一部であるもの、疾病、症状または表現型の発現に間接的に寄与するものに起因することがある。

【0119】

40

本明細書において「被検体」とは、哺乳類、植物、真菌、無脊椎動物、魚、昆虫、ウイルスまたは細菌などの病原性生物といった生物を指し、ヒトおよび他の哺乳類を含む。

【0120】

本明細書において「遺伝子」または「組換え遺伝子」とは、オープンリーディングフレームを含み、かつ、少なくとも1つのエクソンと(必要に応じて)イントロン配列を含む核酸分子を指す。遺伝子はRNAまたはDNAのいずれかあり得る。遺伝子はコード領域の前およびその後の領域を含み得る。

【0121】

本明細書において「イントロン」とは、所定の遺伝子中に存在する、mRNA成熟の際にスプライシングされるDNA断片を指す。

【0122】

50

本明細書において「配列番号xで示されるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列」とは、配列番号xの核酸鎖の相補鎖のヌクレオチド配列を指す。「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。二本鎖核酸に関する場合には、配列番号xの核酸の補体とは、配列番号xの鎖の相補鎖または配列番号xの相補鎖のヌクレオチド配列を含むいずれかの核酸を指す。ヌクレオチド配列である配列番号xを有している一本鎖核酸に関する場合には、この核酸の補体は配列番号xのものと相補的であるヌクレオチド配列を有している核酸である。

【0123】

本明細書において「コード配列」とは、ポリペプチドまたはタンパク質を構成するアミノ酸をコードする遺伝子の一部を指す。 10

【0124】

本明細書において「センス鎖」とは、二本鎖核酸分子によってコードされるアミノ酸配列をコードするmRNAの配列を有している二本鎖核酸分子の鎖を指す。

【0125】

本明細書において「アンチセンス鎖」とは、二本鎖核酸分子によってコードされるアミノ酸配列をコードするmRNAの配列の補体である二本鎖核酸分子の鎖を指す。

【0126】

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(表1参照)。 20

【0127】

本明細書においてアミノ酸残基とは、そのペプチド結合でのポリペプチドの化学的消化(加水分解)により形成されるアミノ酸を指す。本明細書に記載されるアミノ酸残基は、特定の実施形態では、「L」異性体型のものである。「D」異性体型の残基は、所望の機能特性がポリペプチドによって保持される限りは、任意のLアミノ酸残基と置換されてもよい。NH₂とは、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離型アミノ基を指す。COOHとは、ポリペプチドのカルボキシル末端に存在する遊離型カルボキシ基を指す。J. Biol. Chem., 243: 3552~59頁(1969)に記載されたおよび米国特許法施行規則1.821~1.822で採用された標準的なポリペプチド命名法を踏まえて、アミノ酸残基の略語を以下の表に示す。 30

表1
対応表

【表1】

記号		
1文字	3文字	アミノ酸
Y	Tyr	チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	フェニルアラニン
M	Met	メチオニン
A	Ala	アラニン
S	Ser	セリン
I	Ile	イソロイシン
L	Leu	ロイシン
T	Thr	スレオニン
V	Val	バリン
P	Pro	プロリン
K	Lys	リジン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
E	Glu	グルタミン酸
Z	Glx	Gluおよび/またはGln
W	Trp	トリプトファン
R	Arg	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Asn	アスパラギン
B	Asx	Asnおよび/またはAsp
C	Cys	システイン
X	Xaa	未知または他

10

20

【0128】

30

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」とは対応表に列挙されたアミノ酸および米国特許法施行規則1.821 - 1.822に参照され、参照により本明細書に組み込まれるものなどの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NH₂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。

【0129】

ペプチドまたはタンパク質では、アミノ酸の適切な保存的置換は当業者には公知であり、通常、得られる分子の生物学的活性を変更することなく行うことができる。当業者であれば、通常は、ポリペプチドの非必須領域での単一アミノ酸置換によっては生物学的活性が実質的に変更されないことを明確に理解している(例えば、Watsonら、Molecular Biology of the Gene、第4版、1987年、The Benjamin/Cummings Pub. co.、224頁参照)。

40

【0130】

そのような置換は以下の表2に示すものにしたがって行うことができる。

表2

【表 2】

もとの残基	同類置換	
Ala(A)	Gly ; Ser	
Arg(R)	Lys	
Asn(N)	Gln ; His	
Asp(D)	Glu	
Cys(C)	Ser	
Gln(Q)	Asn	
Glu(E)	Asp	
Gly(G)	Ala ; Pro	10
His(H)	Asn ; Gln	
Ile(I)	Leu ; Val	
Leu(L)	Ile ; Val	
Lys(K)	Arg ; Gln	
Met(M)	Leu ; Tyr ; Ile	
Phe(F)	Met ; Leu ; Tyr	
Ser(S)	Thr	
Thr(T)	Ser	
Trp(W)	Tyr	
Tyr(Y)	Trp ; Phe	20
Val(V)	Ile ; Leu	

【0131】

他の置換も許容され、経験的にまたは既知の保存的置換を踏まえて決定することができる。

【0132】

本明細書においてDNAまたは核酸相同体とは、治療用ポリペプチドをコードする配列などの予め選択された保存されたヌクレオチド配列を含む核酸を指す。「実質的に相同な」とは、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%の相同性を有するか、相同性または同一性がより少ないパーセンテージであっても生物学的活性または機能が保存されていることを意味する。 30

【0133】

「相同性」および「同一性」は同じ意味で用いられることが多い。この関連で、相同性または同一性パーセントは、例えば、GAPコンピュータープログラムを用いて配列情報を比較することによって求めればよい。GAPプログラムではSmithおよびWaterman(Adv. Appl. Math. 2 : 482頁(1981))によって修正された、NeedlemanおよびWunsch(J. Mol. Biol. 48 : 443頁(1970))のアラインメント法を用いる。便宜には、GAPプログラムは、2つの配列のうちの短いほうの記号の総数で割り算された、類似している整列させられた記号(例えば、ヌクレオチドまたはアミノ酸)の数として類似性を定義する。GAPプログラムのデフォルトパラメーターは、(1)単項比較マトリクス(同一の場合には1および同一でない場合には0という値を含む)およびSchwartzおよびDayhoff編、ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE、National Biomedical Research Foundation、353~358頁(1979))によって記載されたものと同様の、GribskovおよびBurgess、Nucl. Acids Res. 14 : 6745頁(1986))の加重比較マトリクス、(2)各ギャップに3.0のペナルティーおよびさらに各ギャップ中の各記号につき0.10のペナルティーおよび(3)最後のギャップにはペナルティーはなし、を含む。 40

【0134】

任意の2つの核酸分子が少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%「同一である」ヌクレオチド配列を有するかどうかは、「FAST A」プログラムなどの既知のコンピューターアルゴリズムを用い、例えば、PearsonおよびLipman、Proc. Natl. 50

Acad. Sci. USA 85 : 2444頁(1988)と同様のデフォルトパラメーターを用いて決定することができる。あるいは、米国バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information)データベースのBLAST関数を用いて同一性を決定することもできる。

【 0 1 3 5 】

一般に、配列は、最大のマッチングを得るように整列させる。「同一性」自体は当技術分野で認識されている意味を有し、公開された技術を用いて計算することができる(例えば、Computational Molecular Biology、Lesk, A. M.編、Oxford University Press、New York、1988年；Biocomputing：Informatics and Genome Projects、Smith, D. W.編、Academic Press、New York、1993年；Computer Analysis of Sequence Data、Part I、Griffin, A. M.およびGriffin, H. G.編、Humana Press、New Jersey、1994年；Sequence Analysis in Molecular Biology、von Heinje, G.、Academic Press、1987年；およびSequence Analysis Primer、Gribskov, M.およびDevereux, J.編、M Stockton Press、New York、1991年参照)。2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列間の同一性を評価するための方法は数多く存在し、「同一性」は当業者には十分に公知である(Carillo, H.およびLipton, D.、SIAM J Applied Math 48 : 1073頁 (1988))。2つの配列間の同一性または類似性を調べるために通常用いられる方法としては、限定されるものではないが、Guide to Huge Computers、Martin J. Bishop編、Academic Press、San Diego、1994年およびCarillo, H.およびLipton, D.、SIAM J Applied Math 48 : 1073頁(1988)に開示されるものを挙げることができる。同一性および類似性を調べる方法はコンピュータープログラムに体系化されている。2つの配列間の同一性および類似性を調べるためのコンピュータープログラム法としては、限定されるものではないが、GCGプログラムパッケージ(Devereux, J.ら、Nucleic Acids Research 12(1) : 387頁 (1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA (Atschul, S. F.ら、J Molec Biol 215 : 403頁(1990))を挙げることができる。

【 0 1 3 6 】

したがって、本明細書において「同一性」とは、試験および参照ポリペプチドまたはポリヌクレオチド間の比較を表す。例えば、試験ポリペプチドを参照ポリペプチドと90%以上同一である任意のポリペプチドと定義してもよい。

【 0 1 3 7 】

本明細書において少なくとも「90%同一」とは、参照ポリペプチドに対して90~99.99の同一性パーセントを指す。90%以上のレベルの同一性は、例証的な目的で考えて、100個のアミノ酸の長さの試験ポリペプチドと参照ポリペプチドを比較するという事実を示す。試験ポリペプチド中の10%(例えば、100個のうちの10個)のみのアミノ酸が参照ポリペプチドのものと異なっている。同様の比較を、試験ポリヌクレオチドと参照ポリヌクレオチドの間でも行うことができる。そのような相違はアミノ酸配列の全長にわたってランダムに分布する点突然変異として表れるがあり、また、最大許容、例えば、10/100個のアミノ酸相違(約90%の同一性)までの種々の長さの1以上の位置に密集して表れる場合もある。相違は核酸またはアミノ酸の置換または欠失として定義される。

【 0 1 3 8 】

本明細書において、パーセンテージミスマッチを求める際のハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは以下のとおりである：

- 1)高ストリンジェンシー：0.1×SSPE、0.1% SDS、65
- 2)中程度のストリンジェンシー：0.2×SSPE、0.1% SDS、50
- 3)低ストリンジェンシー：1.0×SSPE、0.1% SDS、50

【 0 1 3 9 】

当業者には、洗浄ステップを安定なハイブリッドについて選択するということは周知であり、SSPEの成分もまた周知である(例えば、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)、第3巻、B.13頁のSambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis参照、また、一般的に用いられる実験用溶液を記載する多数のカタログも参照)。SSPEはpH7.4のリン酸緩衝された0.18M NaClである。さらに、当業者は、ハイ

ブリッドの安定性は、ナトリウムイオン濃度および温度の関数である T_m ($T_m = 81.5 - 16.6(\log_{10} [Na^+]) + 0.41(\%G+C) - 600/l$)) によって定まり、その結果、ハイブリッド安定性に重要な洗浄条件中の唯一のパラメーターはSSPE(またはSSC)中のナトリウムイオン濃度および温度であるということを確認している。

【0140】

同等のストリンジェンシーを、別のバッファー、塩および温度を用いて達成することができることが理解されよう。例として、限定するものではないが、低いストリンジェンシーの条件を用いる手順は以下のとおりである(ShiloおよびWeinberg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6789~6792頁 (1981)も参照)。DNAを含有するフィルターを、35%のホルムアミド、5×SSC、50mM Tris-HCl(pH 7.5)、5 mM EDTA、0.1% PVP、0.1% フィコール、1% BSAおよび500 μg/ml 変性サケ精子DNA(10×SSCは、pH7に調整した、1.5Mの塩化ナトリウムおよび0.15Mのクエン酸ナトリウムである)含有する溶液中で40℃にて6時間前処理する。

【0141】

ハイブリダイゼーションは以下の改変を含む同一溶液で実施する：0.02% PVP、0.02% フィコール、0.2% BSA、100 μg/ml サケ精子DNA、10% (wt/vol)硫酸デキストランおよび5~20×10⁶ cpm ³²P標識プローブを用いる。フィルターをハイブリダイゼーション混合物中で40℃にて18~20時間インキュベートし、次いで、55℃にて2×SSC、25mM Tris-HCl(pH7.4)、5mM EDTAおよび0.1% SDSを含有する溶液で1.5時間洗浄する。洗浄溶液を新しい溶液と取り換え、60℃にてさらに1.5時間インキュベートする。フィルターの水分を吸い取って乾燥させ、オートラジオグラフィーに供する。必要に応じて、フィルターを65~68℃で第3回目洗浄を行い、フィルムに再度曝露する。使用できる低ストリンジェンシーの他の条件は当技術分野では十分に公知である(例えば、異種間ハイブリダイゼーションに用いられるような)。

【0142】

例として、限定されるものではないが、中程度のストリンジェンシーの条件を用いる手順として、例えば、限定されるものではないが、以下の中程度のストリンジェンシーのそのような条件を用いる手順が挙げられる。DNAを含有するフィルターを55℃にて6×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDSおよび100 μg/ml 変性サケ精子DNAを含有する溶液中で6時間前処理する。ハイブリダイゼーションを同一の溶液で行い、5~20×10⁶ cpm ³²P標識プローブを用いる。フィルターをハイブリダイゼーション混合物中で55℃にて18~20時間インキュベーションし、次いで、1×SSCおよび0.1% SDS含有する溶液で60℃にて30分間2回洗浄する。フィルターの水分を吸い取って乾燥させ、オートラジオグラフィーに供する。使用できる中程度のストリンジェンシーの他の条件は当技術分野では十分に公知である。フィルターの洗浄は、2×SSC、0.1% SDSを含有する溶液中で37℃にて1時間実施する。

【0143】

例として、限定するものではないが、高ストリンジェンシーの条件を用いる手順は以下のとおりである。DNAを含有するフィルターのプレハイブリダイゼーションを、6×SSC、50mM Tris-HCl(pH7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% フィコール、0.02% BSAおよび500 μg/ml 変性サケ精子DNAからなるバッファー中で65℃にて8時間から一晩実施する。フィルターを100 μg/ml 変性サケ精子DNAおよび5~20×10⁶ cpmの³²P標識プローブを含有するプレハイブリダイゼーション混合物中で65℃にて48時間ハイブリダイズさせる。フィルターの洗浄は2×SSC、0.01% PVP、0.01% フィコールおよび0.01% BSAを含有する溶液中で37℃にて1時間実施する。この後、0.1×SSC中で50℃にて45分間洗浄し、次いでオートラジオグラフィーに供する。使用できる高ストリンジェンシーの他の条件は当技術分野では十分に公知である。

【0144】

実質的に同一または実質的に相同または類似とは、当業者によって理解されるように状況に応じて異なるが、一般には、少なくとも60%または70%を意味し、好ましくは少なくとも80%、85%、またはより好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%

同一であることを意味する。

【0145】

本明細書に提供される化合物はキラル中心を含み得るということは理解されよう。そのようなキラル中心は(R)または(S)立体配置のいずれか、またはそれらの混合物のものであり得る。したがって、本明細書に提供される化合物は鏡像異性的に純粋である場合もあり、または立体異性体またはジアステレオマーの混合物である場合もある。アミノ酸残基の場合には、そのような残基はLまたはD型のいずれかであり得る。1つの実施形態では、自然界に存在しているアミノ酸残基の立体配置はLである。

【0146】

本明細書において実質的に純粋とは、そのような純度を評価するために当業者によって用いられる、薄層クロマトグラフィー(TLC)、ゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)および質量分析法(MS)などの標準的な分析法によって調べたときに、容易に検出することができる不純物は明らかに含まないほど十分に均質であること、またはさらに精製しても、酵素活性および生物学的活性のような物質の物理的および化学的特性を検出可能には変更しないほど十分に純粋であることを意味する。実質的に化学的に純粋な化合物を得るための化合物の精製法は当業者には公知である。しかし、実質的に化学的に純粋な化合物は立体異性体の混合物でもあり得る。このような場合には、さらなる精製により化合物の特定の活性を高めることができる場合もある。

10

【0147】

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。

20

【0148】

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。

30

【0149】

本明細書において高親和性での結合とは、少なくとも 10^9 の、一般に、 10^{10} 、 10^{11} リットル/1モル以上の会合定数 K_a または 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 以上の 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。

【0150】

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。

40

【0151】

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

50

は、約6個未満の炭素を含む炭素鎖を指す。

【0152】

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。

【0153】

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、八口、八口低級アルキルを含む八口アルキル、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。

【0154】

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、ピフェニル、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。

【0155】

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。

【0156】

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以上の八口、八口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、八口、シュード八口、シアノ、ヒドロキシ、八口低級アルキル、特にトリフルオロメチルを含む八口アルキルおよびポリ八口アルキル、ホルミル、アルキルカルボニル、1~3を含む1以上の、八口、八口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。

【0157】

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。

【0158】

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。

【0159】

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

10

20

30

40

50

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ていもよい2以上の環からなっていてよく、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てよい。「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。

【0160】

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てもよい。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。

10

20

【0161】

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。

【0162】

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個のアリール基置換基で置換されていてよい。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。

30

【0163】

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。

40

【0164】

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有する。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有する。

【0165】

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」

50

および「カルボキシ」は各々は C_{1-4} アルキルに直接連結されている。

【0166】

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。

【0167】

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。

【0168】

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、限定されるものではないが、クロロメチル、トリフルオロメチル、1-クロロ-2-フルオロエチルなどをはじめとする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。

【0169】

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。

【0170】

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「スルフリル」とは、 $-S(O)_2-$ を指す。本明細書において「スルホ」とは、 $-S(O)_2O-$ を指す。

【0171】

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。

【0172】

本明細書において「アミノカルボニル」とは、 $-C(O)NH_2-$ を指す。

【0173】

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。

【0174】

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。

【0175】

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

【0176】

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 $-C(O)NRR'$ を指す。

【0177】

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 $-C(O)NRR'$ を指す。

【0178】

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 $-C(O)NHR$ を指す。

【0179】

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 $-C(O)OR$ を指す。

【0180】

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 $-C(O)OR$ を指す。

【0181】

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

10

20

30

40

50

じめとするアルキルであるR0 - およびRS - を指す。

【0182】

本明細書において「アリアルオキシ」および「アリアルチオ」とは、Rがフェニルなどの低級アリアルをはじめとするアリアルであるR0 - およびRS - を指す。

【0183】

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(CH₂)、エチレン(CH₂CH₂)、プロピレン(- (CH₂)₃)、シクロヘキシレン(C₆H₁₀)、メチレンジオキシ(OCH₂O)およびエチレンジオキシ(O(CH₂)₂O)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。

10

【0184】

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、-CH=CH-CH=CH- およびCH=CHCH₂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。

20

【0185】

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≡C-C≡C-、C≡CおよびC≡CCH₂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。

30

【0186】

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-(CH₂)_nC≡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。

40

50

【0187】

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。

10

【0188】

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個のアリーレン基置換基で置換されていてもよい。

【0189】

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レン基であるアルキリデン基を指す。

20

【0190】

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。

【0191】

本明細書において「セミカルバジド」とは、 $NHC(O)NHNH$ を指す。「カルバゼート」とは、二価の基 $OC(O)NHNH$ を指す。「イソチオカルバゼート」とは、二価の基 $SC(O)NHNH$ を指す。「チオカルバゼート」とは、二価の基 $OC(S)NHNH$ を指す。「スルホニルヒドラジド」とは、基 SO_2NHNH を指す。「ヒドラジド」とは、二価の基 $C(O)NHNH$ を指す。「アゾ」とは、二価の基 $N=N$ を指す。「ヒドラジニル」とは、二価の基 $NHNH$ を指す。

30

【0192】

本明細書において「アミノ酸」とは、ラセミ体であるか、またはD-もしくはL-立体配置のいずれかの - アミノ酸を指す。アミノ酸記号の前にある「d」(例えば、dAla、dSer、dValなど)は、アミノ酸のD-異性体を指す。アミノ酸記号の前にある「dl」(例えば、dlAla)は、アミノ酸のL-およびD-異性体の混合物を指す。

【0193】

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、八口、八口低級アルキル、および低級アルキルがある。

40

【0194】

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。

50

【0195】

本明細書において細胞選別とは、フローサイトメトリー分析において測定された特性に基づいて懸濁液から細胞を分離し、回収するアッセイを指す。分析に用いるほとんどのアッセイは、選別される小集団を定義するゲートおよび領域が論理的に重複しない限りは、選別実験の基準とすることができる。最大処理速度は、通常、5000細胞/秒(18×10^6 個細胞/時間)である。分離された集団の回収速度は主に細胞状態および反応率によって異なる。

【0196】

本明細書においては、全ての保護基、アミノ酸および他の化合物の略語は、特に断りのない限り、その通常の使用法、認識されている略語、またはIUPAC - IUB Commision on Biochemical Nomenclature(Biochem, 1972, 11: 942参照)に従う。例えば、DMF = N,N - ジメチルホルムアミド、DMAc = N,N - ジメチルアセトアミド、THF = テトラヒドロフラン、TRIS = トリス(ヒドロキシメチル) - アミノメタン、SSPE = 生理食塩水 - リン酸ナトリウム - EDTAバッファー、EDTA = エチレンジアミンテトラ酢酸、SDS = ドデシル硫酸ナトリウム。

10

【0197】

B. 捕獲化合物の収集物

生体分子、特に、限定するものではないが、細胞溶解物または細胞溶解物からインビトロ翻訳されたポリペプチドなどのサンプル中の生体分子と選択的に結合する捕獲化合物の収集物を提供する。収集物中の各捕獲化合物は特定の群またはクラスの生物ポリマーに結合することができ、サンプル中の全生体分子のサブセットと共有結合または強固に(例えば、質量スペクトル分析による分析に耐えるのに十分に)結合するように設計されている。例えば、サンプルは1000種のメンバー、例えば、細胞溶解物を含み得る。化合物の収集物は十分な選択性を可能にし、その結果、サンプルのうちの約10~20種の構成要素が収集物の各メンバーと結合する。正確な数はそれらを同定するための、通常は一段階の、日常的に行われている分析(例えば、質量スペクトル分析)に十分に少ない数である。

20

【0198】

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。1つの実施態様では、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。

30

【0199】

図27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、非標的的同定のための「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

50

【0200】

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、特定のタンパク質側鎖と化学的に反応(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。

【0201】

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、構造のおよび機能的特性解析を可能とする。 10

【0202】

他の実施態様では、分析工程(図30)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。選別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。 20

【0203】

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。 30

【0204】

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。なぜなら、この方法は、必ずしも特定のクラスの標的を評価するわけではなく、サンプル中に挿入された変化が検出されるか同定されるからである。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、 40 50

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。

【0205】

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。

10

【0206】

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。

【0207】

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。

20

30

【0208】

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。化合物にさらに官能基を付加すると、化合物はさらに選択性を示すことができ、抗体の抗原(Ag)結合部位と同様に標的分子に対するサインを発することができる。一般に、本明細書に提供される化合物は、4種の官能基：生物ポリマーと共有結合によってか、または高い K_a で(一般に、約 10^9 、 10^{10} 、 10^{12} リットル/モルより大きく、および/または、その結果、結合がMALDI-MS条件のような質量スペクトル分析の条件下で実質的に不可逆であるか、もしくは安定である)のいずれかで結合する反応性官能基；非共有的相互作用によって反応性官能基の特異性を変化させる(一般的には、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少なくとも2種の官能基(官能基)を含む。一般に、通常、共有結合によってまたは高結合親和性(K_a)で、特定の生体分子(例えば、プロテインスム(proteinsm)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、他の官能基である反応性官能基は、通常は、選択性官能基の特異性を高めてるように変更する。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ノ基と相互作用する。反応性官能基は生体分子と相互作用して、分析条件下で安定である、一般に、 10^9 リットル/モルより高い、または 10^{10} リットル/モルより高い K_a を有する共有

40

50

結合または非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的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变化させ、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。

【0209】

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作用のもの (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、本明細書の方法で用いる化合物が含まれ得る。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、限定されるものではないが、タンパク質を含む親水性および疎水性生体分子間を識別し、両クラスの生体分子の分析が可能となる。

10

【0210】

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、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、共有結合か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 $K_{e,q}$) という特性を有するよう選択される。

20

【0211】

反応性官能基Xは、質量分析計による分析、特にMALDI分析の条件下で安定である、そのような共有結合または高親和性の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」、反応基がそれと共有結合 (または高親和性結合) を形成することができるものの中から生体分子上の特定の基を選択するよう機能する基である。例えば、選択基は立体障害を引き起こしたり、エピトープとの特定の結合を可能にするか、その間の何らかのものである場合もある。薬剤、脂質、ペプチドの基質であってもよい。これにより、反応基が相互作用する基の環境を選択する。選択性官能基Yは、選択性官能基の存在下での、反応性官能基による、捕獲化合物の生体分子との結合親和性が、選択性官能基が存在しない場合よりも少なくとも10倍または100倍高いように、それによって捕獲化合物が混合物中の生体分子と共有結合を形成するか、または高安定性で相互作用するものであり得る。

30

【0212】

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、これにはピオチン、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ペーサー (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

40

50

、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。

【0213】

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に選択し、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。

10

【0214】

上記のように、提供する捕獲化合物の中には少なくとも3種の官能性：反応性、選別および溶解性を含むものがある。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。これらの化合物はまた、反応性官能基の結合範囲を変更し、共有結合するかまたは高親和性(生体分子に対して 10^9 よりも高い k_a を有する)で結合するかのいずれかである選択性官能基、および必要に応じて、選別および溶解性官能基の一方または両方を含み得る。

【0215】

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。

【0216】

20

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。

【0217】

特定の実施形態では、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、以下に限らないが、三官能化トリチル基および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。

30

【0218】

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をはじめとする生体分子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。

40

【0219】

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

50

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。

【0220】

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、支持体の表面にリポ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あ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。

10

【0221】

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。

20

【0222】

Zは質量スペクトル分析の条件下で切断できない

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。

30

【0223】

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。本明細書には種々のものが例示されるが、他のものと置き換えるてもよい。正確な性質は、本明細書の開示内容および当業者の技量を考慮してなされる設計選択の問題であり得る。

【0224】

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

40

50

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。

【0225】

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、 $(CH_2)_d$ 、 $(CH_2)_dO$ 、 $(CH_2)_dS$ 、 $>N(R^{15})$ 、 $(S(O)_u)$ 、 $(S(O)_2)_w$ 、 $>C(O)$ 、 $(C(O))_w$ 、 $(C(S(O)_u))_w$ 、 $(C(O)O)_w$ 、 $(C(R^{15})_2)_dO$ 、 $(C(R^{15})_2)_dS(O)_u$ 、 $O(C(R^{15})_2)_d$ 、 $S(O)_u(C(R^{15})_2)_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_dO(C(R^{15})_2)_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_dS(O)_u(C(R^{15})_2)_d$ 、 $N(R^{15})(C(R^{15})_2)_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_dNR^{15}$ 、 $(C(R^{15})_2)_dN(R^{15})(C(R^{15})_2)_d$ 、 $-(CH_2)_dC(O)N(CH_2)_d-$ 、 $-(CH_2)_dC(O)N(CH_2)_dC(O)N(CH_2)_d-$ 、 $(S(R^{15})(O)_u)_w$ 、 $(C(R^{15})_2)_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_dO(C(R^{15})_2)_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_d(C(O)O)_w(CR^{15})_2)_d$ 、 $(C(O)O)_w(CR^{15})_2)_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_d(C(O)O)_w$ 、 $(C(S)(R^{15})_w)$ 、 $(C(O))_w(CR^{15})_2)_d$ 、 $(CR^{15})_d(C(O))_w(CR^{15})_d$ 、 $(C(R^{15})_2)_d(C(O))_w$ 、 $N(R^{15})(C(R^{15})_2)_w$ 、 $OC(R^{15})_2C(O)$ 、 $O(R^{15})_2C(O)N(R^{15})$ 、 $(C(R^{15})_2)_wN(R^{15})(C(R^{15})_2)_w$ 、 $(C(R^{15})_2)_wN(R^{15})$ 、 $>P(O)_v(R^{15})_x$ 、 $>R(O)_u(R^{15})_3$ 、 $>P(O)_u(C(R^{15})_2)_d$ 、 $>Si(R^{15})_2$ 、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、

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。

【0226】

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 0 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 $NR^{19}R^{20}$ からなる群から選択され、

10

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、アリーール、アラルキル、ヘテロアリーール、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、

20

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、

30

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。

40

【0227】

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、マトリックスマトリックス支障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。

【0228】

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

50

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。また、収集物中の化合物の中にはZが二価であり、かつ、QおよびX、またはQおよびY、またはXおよびYのいずれか、あるいは本明細書で提供する官能性の他の組み合わせに連結されているものもある。

【0229】

(i) 切断可能な多価または二価の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： $(S^1)_t M(R^{1.5})_a (S^2)_b L$ 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、 $R^{1.5}$ 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する分析の前またはその間に切断可能な結合である。

10

【0230】

(a) M

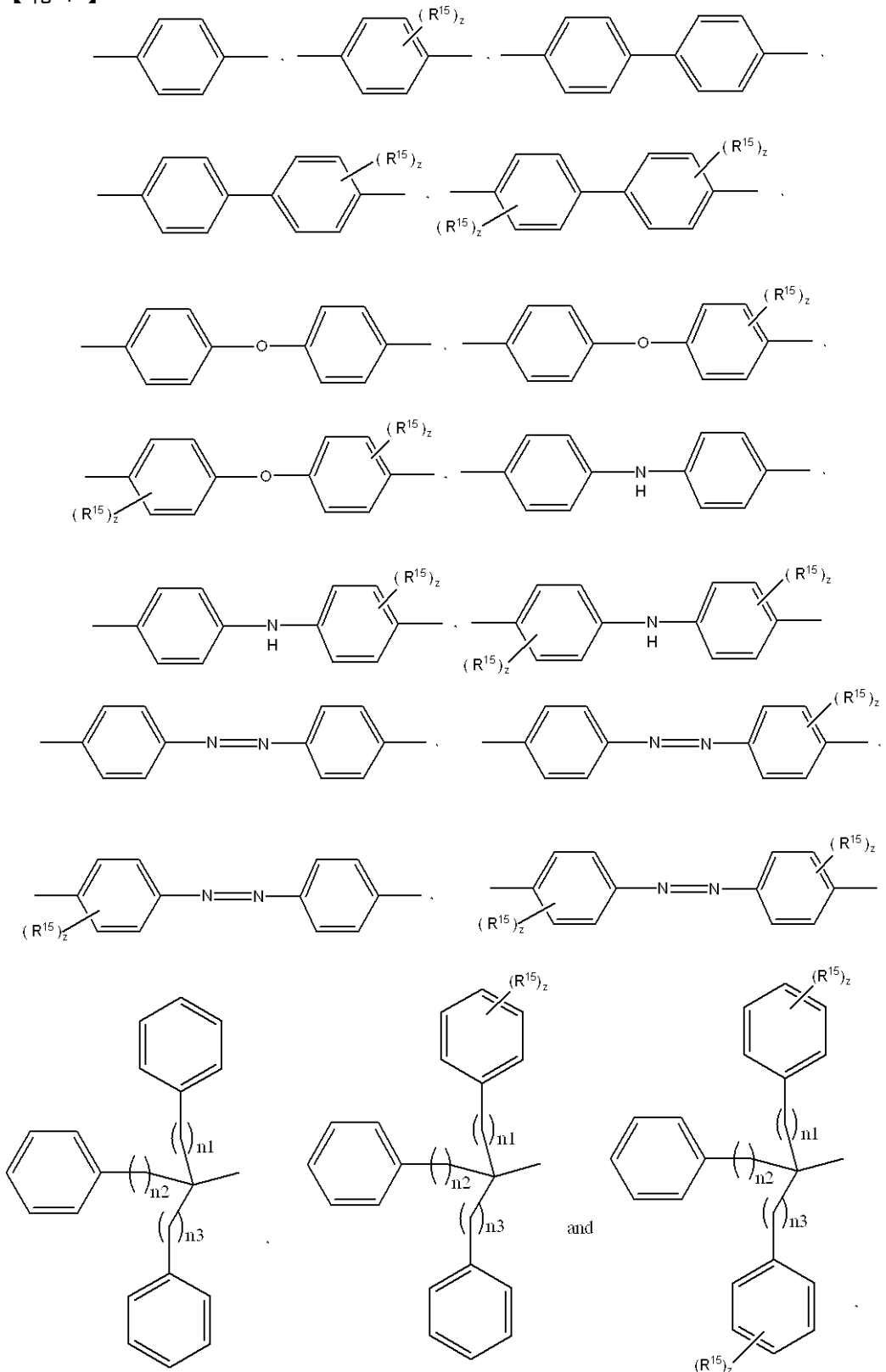
特定の実施形態では、Mはアルキレン、フェニレン、ピフェニレンまたは多価または二価のヘテロ二官能性トリチル誘導体である。Mは非置換であるか、または各々独立に $R^{1.5}$ から選択される1~4個の基で置換されている。

20

【0231】

他の実施形態では、Mは $(CH_2)_r$ 、 $(CH_2O)_r$ 、 $(CH_2CH_2O)_r$ 、 $(NH(CH_2)_r C(=O))_s$ 、 $(NHCH(R^{5.2})C(=O))_r$ 、 $(O(CH)_r C(=O))_s$ 、

【化 1】



10

20

30

40

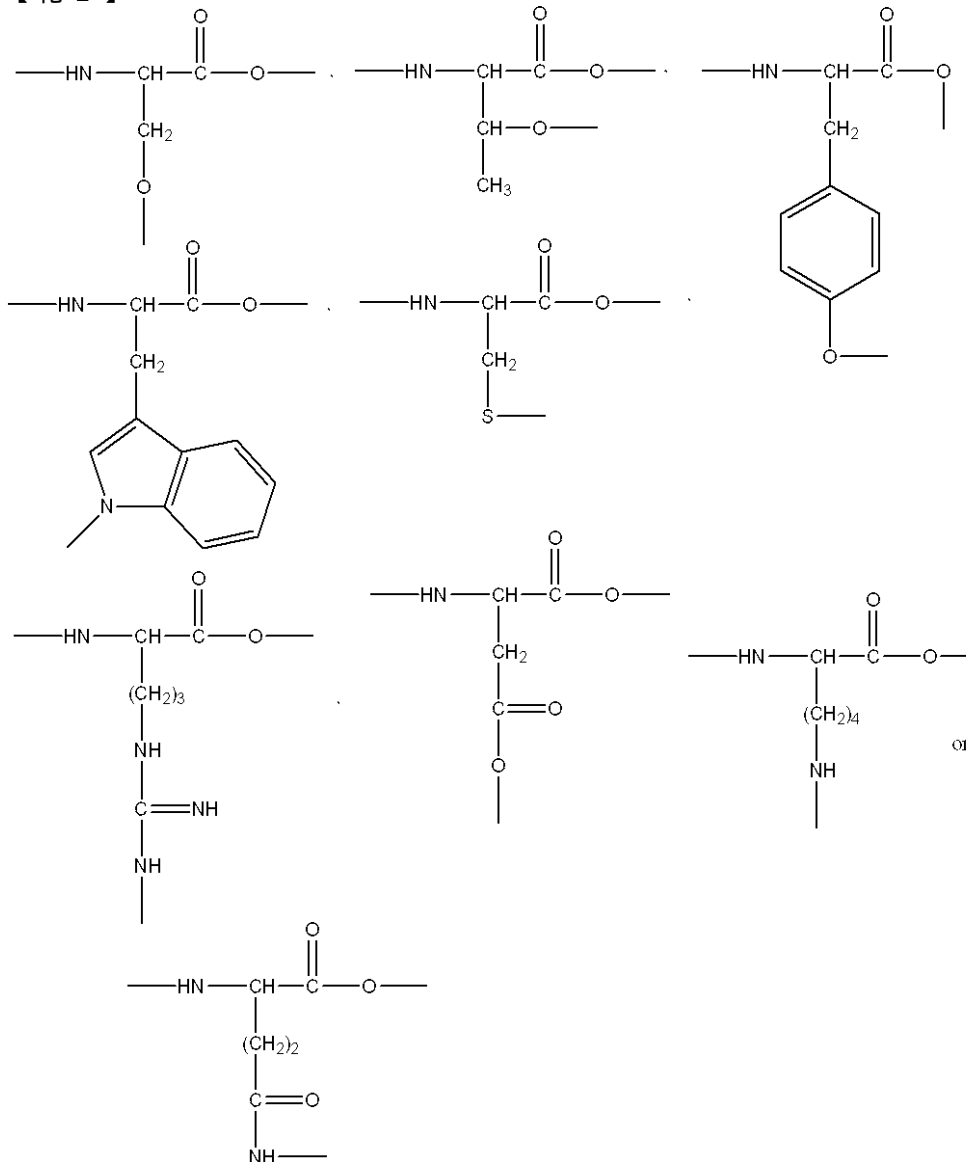
{ 式中、 R^{15} は上記で定義した通りであり、 r および s は各々独立に 1~10 の整数であり、 R^{52} は天然または非天然の α -アミノ酸の側鎖であり、 z は 1~4 の整数である } から選択される。ある実施態様では、 n_1 、 n_2 、 n_3 は各々独立に 0~4 の整数である。他の実施態様では、 n_1 、 n_2 および n_3 は、 $n_1+n_2+n_3 = 0$ となるように選択される。他の実施態様では、 n_1 、 n_2 および n_3 は 1~3 である。他の実施態様では、 n_1 および n_2 は 0 である。他の実施態様では、 n_3 は 2 である。1 つの実施形態では、 z は 1 である。

【 0 2 3 2 】

50

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

【0233】

(b) S^1 および S^2

必要に応じて、スパーサー領域 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。当業者は、本明細書の開示内容を考慮して、適切なスパーサーを容易に選択することができる。例示的なスパーサーを以下に示す。

【0234】

50

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。特定の実施形態では、立体障害はまた、Yとの関連で(またはYが存在しない場合に)選択性を増強することができる。この選択性の増強は、Mに連結されている選択性官能基Yの存在によって、あるいは S^1 および/または S^2 についての適切なスペーサー分子の選択のいずれかにより達成することができる。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(例えば、アルキルまたはホスホトリエステル)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

【0235】

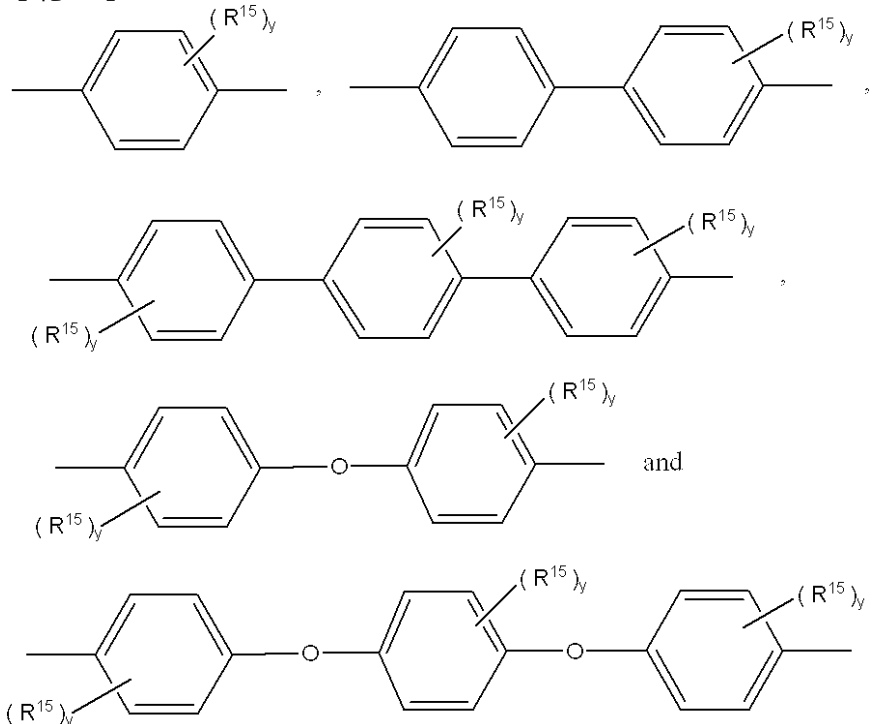
S^2 が必要でない場合には、切断可能な結合Lの反応性は1以上の置換している官能基(例えば、M上の R^{15})によって影響され得る。切断可能な結合Lの安定性を調節するために、電子的(例えば、メソメリー、誘導)および/または立体効果を用いることができる。例えば、Mがトリチル誘導体である場合には、限定されるものではないが、タンパク質をはじめとする生体分子への結合は、1つの実施形態では、トリチルエーテル結合である。酢酸またはトリフルオロ酢酸の蒸気などの弱酸に対するこの結合の感度は、 R^{15} として、限定されるものではないが、メトキシ基などのアルコキシ基を含む1または2個以上の電子供与基をアリール環のパラ位に有することによって大幅に増強することができる。あるいは、トリチルエーテル結合は、限定されるものではないが、プロモおよびクロロ基といったハロゲン、ニトロ基またはエステル部分のいずれかを含む電子吸引基の、芳香族環のパラおよび/またはオルト位への導入によって安定化することもできる。

20

【0236】

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】



30

40

{ 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。

【0237】

50

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_4^{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。

10

【0238】

(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SHである)の、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、ジチオスレイトールおよび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。

20

【0239】

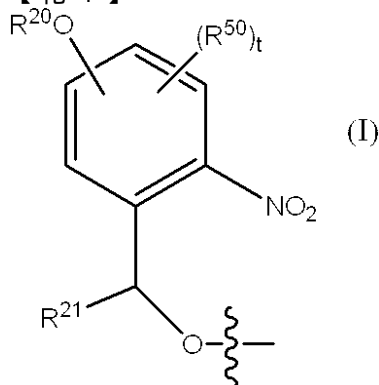
別の実施形態では、Lは、質量分析の前またはその間のいずれかに適切な波長のUV光での短時間処理によって切断され得る光切断可能な基である。MALDI-TOF質量分析の際にレーザービームの作用によって切断され得る結合をはじめとする光切断可能な基を用いることができる。例えば、トリチルエーテルまたはベンジル基をはじめとするオルトニトロ置換アラルキルは、MALDI-TOF質量分析の際のレーザー誘起結合切断に敏感である。他の有用な光切断可能な基としては、限定されるものではないが、*o*-ニトロベンジル、フェナ

30

【0240】

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W098/20166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】



40

式中、 R^{20} は 0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、 t は0~3であり、 R^{50} はアルキル、アルコキシ、アリールまたはアリールオキシである。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(

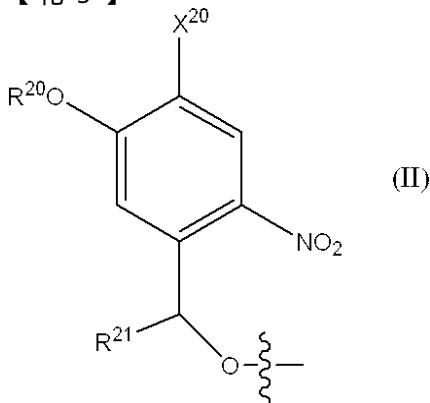
50

例えば、X)によって $R^{21}CHO$ 部分上に捕獲される。

【0241】

別の実施形態では、光切断可能な基は次式IIを有し：

【化5】



10

式中、 R^{20} は0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、 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。

20

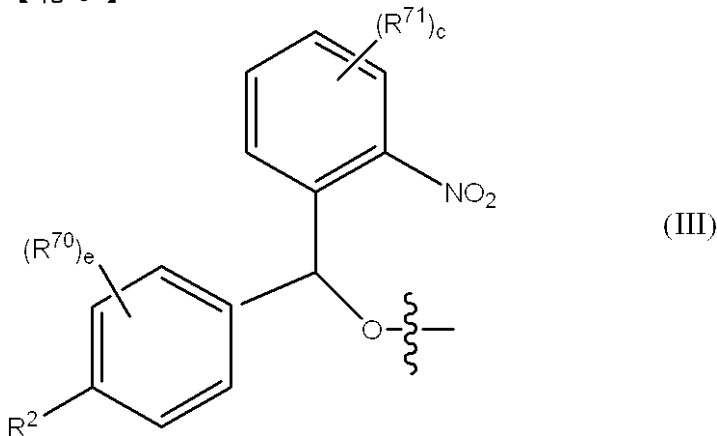
【0242】

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。

【0243】

別の実施形態では、光切断可能な基は次式IIIを有し：

【化6】



30

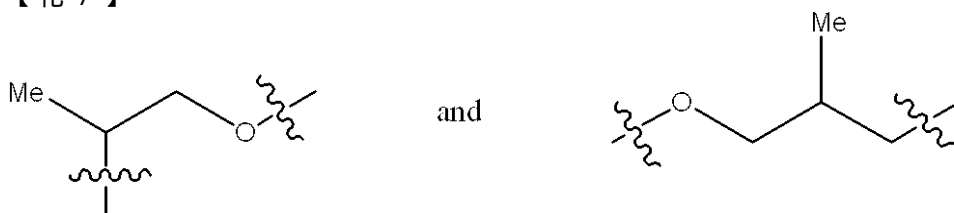
式中、 R^2 は0アルキレンおよび0アルキレンであり、かつ、非置換であるかまたはアルキレン鎖が1個以上のアルキル基で置換されており、cおよびeは各々独立に0~4であり、 R^{70} および R^{71} は各々独立にアルキル、アルコキシ、アリールまたはアリールオキシである。特定の実施形態では、 R^2 は0アルキレンであり、かつ、アルキレン鎖がメチル基で置換されている。1つの実施形態では、Qは $(S^1)_t M(R^{15})_a (S^2)_b$ を介して R^2 と結合しており、目的の生体分子は酸素の反応性誘導体(例えば、X)によって Ar_2CHO 部分上に捕獲される。

40

【0244】

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。

【0245】

他の実施形態では、cおよびeは0である。

10

【0246】

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。

【0247】

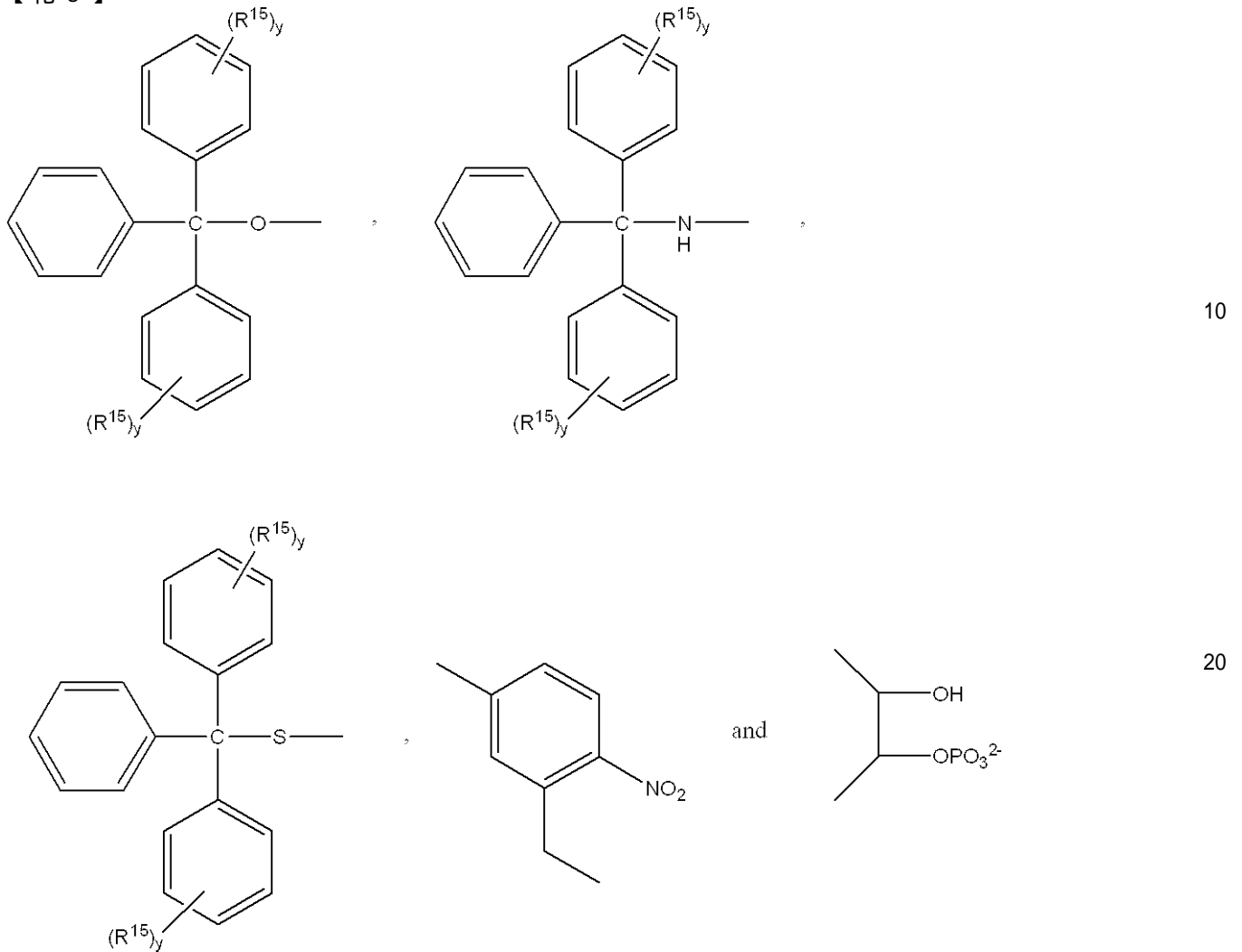
捕獲化合物 - 生体分子アレイは、切断を行うために、限定されるものではないが、臭化シアンをはじめ化学的に、または限定されるものではないが、生体分子がタンパク質である実施形態においては、トリプシン、キモトリプシン、エキソペプチダーゼ(例えば、アミノペプチダーゼおよびカルボキシペプチダーゼ)試薬をはじめ酵素的に処理することができる。後者については、消化が定量的である場合には、1つを除いてすべてのペプチド断片はハイブリダイズしたままである。アレイから脱離させた後にタンパク質を同定および特性決定するには、部分消化も有利であり得る。切断したタンパク質/ペプチド断片を脱着させ、分析し、そのそれぞれの分子量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

20

【0248】

本明細書における特定の実施形態では、LはSS、OP(=O)(OR⁵¹)NH、OC(=O)、

【化8】



{ 式中、 R^{15} 、 R^{51} および y 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^{15} は H、OH、 OR^{51} 、SH、 SR^{51} 、 NH_2 、 NHR^{51} 、 $N(R^{51})_2$ 、F、Cl、Br、I、 SO_3H 、 PO_4^{2-} 、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 $CH(CH_3)_2$ または $C(CH_3)_3$ であり、ここで、 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。

【0249】

(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^1 、M、 R^{15} 、 S^2 、t、a および b は上記で定義した通りである。

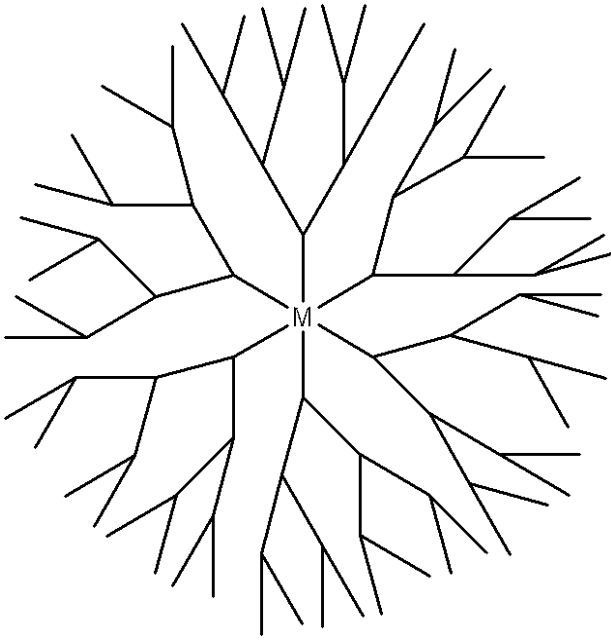
【0250】

b. Zは dendrimer 構造を有する

別の実施形態では、Zは、複数のQおよびX部分と結合している樹状構造を有する(すなわち、Zは多価 dendrimer である)。特定の実施形態では、Zは約4~約6、約8、約10、約20、約40、約60以上の結合点を含む(すなわち、Zは四価から六価、八価、十価、二十価、四十価、六十価などである)。これらの実施形態では、樹状部分Zは、上記で定義したような多価のコアMをベースとする。M上の結合点の数は約2から約4、約6、約8、またはそれ以上

にまで変動し得る。したがって、1つの実施形態では、Zは以下の構造を有する：

【化9】



10

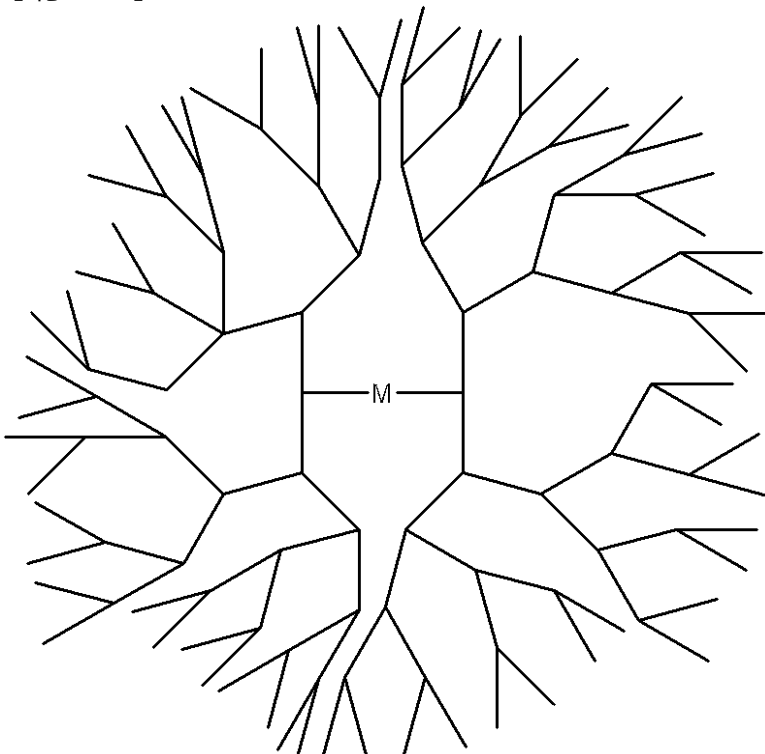
ここで、Mは上記で定義した通りであり、複数のQ、Y、WおよびX部分と結合している。

20

【0251】

別の実施形態では、Zは以下の構造を有する：

【化10】



30

40

ここで、Mは上記で定義した通りであり、複数のQ、Y、WおよびX部分と結合している。

【0252】

他の実施形態では、樹状Z部分は複数のスペーサー基 S^1 および/または S^2 を有するか、あるいは、Zが切断可能な結合である実施形態については、複数のL基を有していてもよい。

S^1 、 S^2 および/またはL部分は、樹状鎖(単数または複数)の末端と結合している。

【0253】

これらの実施形態では、分析される生物ポリマーの密度、ひいては続く分析のシグナル

50

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。

【0254】

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、リポ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。

10

【0255】

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。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、Merri field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、Sephrose(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))。例示的な基質としては、限定されるものではないが、ビーズ(例えば、シリカゲル、細孔性ガラス(controlled pore glass)、磁性、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、Sephrose(登録商標))、セルロース、キャピラリー、ガラスファイバーフィルターなどの平面支持体、ガラス表面、金属表面(鋼鉄、金、銀、アルミニウム、銅およびシリコン)、マルチウェルプレートまたはメンブラン(例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリビニリデンジフルオライド製の)をはじめとするプラスチック材料、ピン(例えば、コンビナトリアル合成または分析に適切なピンのアレイ)またはプレートを含むか含まないウエハー(例えば、シリコンウエハー)などの平坦な表面のピット中のビーズが挙げられる。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もよい。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。

20

30

40

【0256】

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、Rf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 μ m未満または50 μ m未満の範囲の粒子)である。ビーズは、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

50

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(例えば、Sephadex(登録商標))、アガロース(例えば、Sephacrose(登録商標))、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。

10

【0257】

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^1 および/または S^2 を含むことができる。 S^1 、 S^2 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。

【0258】

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。

20

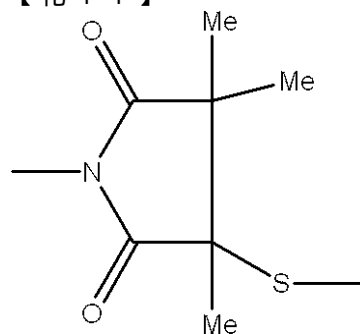
【0259】

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^1 、 t 、 M 、 R^{15} 、 a 、 S^2 、 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^1 は O 、 $OC(O)(CH_2)_y C(O)O$ 、 $NHC(O)$ 、 $C(O)NH$ 、 $NHC(O)(CH_2)_y C(O)O$ 、 $NHC(S)NH$ 、 $OP(O-アルキル)O$ 、 OSO_2O 、 $OC(O)CH_2S$ 、 S 、 NH および

30

【化11】



40

などの二価の基であり、 R^{10} は $(CH_2CH_2O)_z CH_2CH_2O$ 、 $(CH_2CH_2O)_z CH_2CH_2O$ 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、 $(CH_2)_z CH_2O$ 、 $(CH_2)_z CH_2O$ アルキレン、 $(CH_2CH_2NH)_z CH_2CH_2NH$ 、 $CH_2CH(OH)CH_2O$ 、 $Si(R^{12})(R^{13})$ 、 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。

【0260】

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

50

【0261】

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。

【0262】

他の質量増分タグとしては、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、質量増分タグとしては、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増分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($y=1$ 、 $z=4$)の質量増分を生じる。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($y=4$ 、 $z=0$)などの質量増分が得られる。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増分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することを理解するであろう。

【0263】

他の実施形態では、 R^{15} および/または S^2 に、質量増分タグとなるように、 $X^1R^{10}H$ 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。

【0264】

2. 反応性官能基「X」

反応性官能基(「X」)は、生体分子、特に、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含むタンパク質に対して、共有結合するかまたは高い親和性(10^9 より大きい、一般的には 10^{10} または 10^{11} リットル/モルよりも大きい、通常はモノクローナル抗体よりも大きく、通常はMALDI-TOFなどの質量スペクトル分析について安定である)で結合する能力を化合物に付与する。一般的には、結合は共有結合であるか、MALDI-TOFをはじめとする質量スペクトル分析などの分析条件下で安定であるような親和性のものである。例示的な基を本明細書に示す(例えば、図16および以下の議論を参照)。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。他の実施態様では、活性エステル(例えば、NHS)は、酸性条件下、反応性基として使用される。活性エステルは、これらの条件下、アミン基との反応に対し不活性であるが、pHを上昇させることにより反応する。

【0265】

本明細書で提供する化合物において、Xは、限定されるものではないが、タンパク質の表面、タンパク質の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生体分子の表面、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。

【0266】

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、例えば、T. W. GreeneおよびP. G. M. Wuts、「Protective Groups in Organic Synthesis」、第3版(1999, Wiley Interscience)に開示されているもの、光反応基、Diels Alder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

10

20

30

40

50

れる。

【0267】

本明細書中でX基として用るヒドロキシル保護基としては、限定するものではないが以下を挙げるができる：

(i)メチル、置換メチル(メトキシメチル、メチルチオメチル、(フェニルジメチルシリル)メトキシメチル、ベンジルオキシメチル、p-メトキシベンジルオキシメチル、p-ニトロベンジルオキシメチル、o-ニトロベンジルオキシメチル、(4-メトキシフェノキシ)メチル、グアヤコールメチル、t-ブトキシメチル、4-ペンテニルオキシメチル、シロキシメチル、2-メトキシエトキシメチル、2,2,2,-トリクロロエトキシメチル、ビス(2-クロロエトキシメチル)、2-(トリメチルシリル)エトキシメチル、メントキシメチル、テトラヒドロピラニル、3-プロモテトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、1-メトキシシクロヘキシル、4-メトキシテトラヒドロピラニル、4-メトキシテトラヒドロチオピラニル、4-メトキシテトラヒドロチオピラニルS,S-ジオキサイド、1-[(2-クロロ-4-メチル)フェニル] -4-メトキシピペリジン-4-イル、1-(2-フルオロフェニル)-4-メトキシピペリジン-4-イル、1,4-ジオキササン-2-イル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフラニル、2,3,3a,4,5,6,7,7a-オクタヒドロ-7,8,8-トリメチル-4,7-メタノベンゾフラン-2-イル)、置換エチル(1-エトキシエチル、1-(2-クロロエトキシ)エチル、1-[2-(トリメチルシリル)エトキシ]エチル、1-メチル-1-メトキシエチル、1-メチル-1-ベンジルオキシエチル、1-メチル-1-ベンジルオキシ-2-フルオロエチル、1-メチル-1-フェノキシエチル、2,2,2-トリクロロエチル、1,1-ジアニル-2,2,2-トリクロロエチル、1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-フェニルイソプロピル、2-トリメチルシリルエチル、2-(ベンジルチオ)エチル、2-(フェニルセレニル)エチル)、t-ブチル、アリル、プロパルギル、p-クロロフェニル、p-メトキシフェニル、p-ニトロフェニル、2,4-ジニトロフェニル、2,3,5,6-テトラフルオロ-4-(トリフルオロメチル)フェニル、ベンジル、置換ベンジル(p-メトキシベンジル、3,4-ジメトキシベンジル、o-ニトロベンジル、p-ニトロベンジル、p-ハロベンジル、2,6-ジクロロベンジル、p-フェニルベンジル、p-フェニレンジル、2,6-ジフルオロベンジル、p-アシルアミノベンジル、p-アジドベンジル、4-アジド-3-クロロベンジル、2-トリフルオロメチルベンジル、p-(メチルスルフィニル)ベンジル)、2-および4-ピコリル、3-メチル-2-ピコリルN-オキサイド、2-キノリニルメチル、1-ピレニルメチル、ジフェニルメチル、p,p'-ジニトロベンズヒドリル、5-ジベンゾスベリル、トリフェニルメチル、-ナフチルジフェニルメチル、p-メトキシフェニルジフェニルメチル、ジ(p-メトキシフェニル)フェニルメチル、トリ(p-メトキシフェニル)メチル、4-(4'-プロモフェナシルオキシ)フェニルジフェニルメチル、4,4',4''-トリス(4,5-ジクロロフタルイミドフェニル)メチル、4,4',4''-トリス(レプリノイルオキシフェニル)メチル、4,4',4''-トリス(ベンゾイルオキシフェニル)メチル、4,4'-ジメトキシ-3''-[N-(イミダゾリルメチル)]トリチル、4,4'-ジメトキシ-3''-[N-(イミダゾリルエチル)カルバモイル]トリチル、1,1-ビス(4-メトキシフェニル-1'-ピレニルメチル、4-(17-テトラベンゾ[a,c,g,i]フルオレニルメチル)-4,4''-ジメトキシトリチル、9-アントリル、9-(9-フェニル)キサントニル、9-(9-フェニル-10-オキソ)アントリル、1,3-ベンゾジチオラン-2-イル、ベンズイソチアゾリルs,s-ジオキサイド、シリルエーテル(トリメチルシリル、トリエチルシリル、トリイソプロピルシリル、ジメチルイソプロピルシリル、ジエチルイソプロピルシリル、ジメチルテキシルシリル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリル、トリベンジルシリル、トリ-p-キシリルシリル、トリフェニルシリル、ジフェニルメチルシリル、ジ-t-ブチルメチルシリル、トリス(トリメチルシリル)シリル(シシル)、(2-ヒドロキシスチリル)ジメチルシリル、(2-ヒドロキシスチリル)ジイソプロピルシリル、t-ブチルメトキシフェニルシリル、t-ブトキシジフェニルシリル)などのエーテル、

(ii)ホルメート、ベンゾイルホルメート、アセテート、置換アセテート(クロロアセテート、ジクロロアセテート、トリクロロアセテート、トリフルオロアセテート、メトキシ

アセテート、トリフェニルメトキシアセテート、フェノキシアセテート、p-クロロフェノキシアセテート、フェニルアセテート、p-P-フェニルアセテート、ジフェニルアセテート)、ニコチネート、3-フェニルプロピオネート、4-ペンテノエート、4-オキソペンタノエート(レプリネート)、4,4-(エチレンジチオ)ペンタノエート、5-[3-ビス(4-メトキシフェニル)ヒドロキシメチルフェノキシ]レプリネート、ピバロエート、1-アダマントエート、クロトネート、4-メトキシクロトネート、ベンゾエート、p-フェニルベンゾエート、2,4,6-トリメチルベンゾエート(メシトエート)、カルボネート(メチル、メトキシメチル、9-フルオレニルメチル、エチル、2,2,2-トリクロロエチル、1,1,1-ジメチル-2,2,2-トリクロロエチル、2-(トリメチルシリル)エチル、2-(フェニルスルホニル)エチル、2-(トリフェニルホスホニオ)エチル、イソブチル、ビニル、アリル、p-ニトロフェニル、ベンジル、p-メトキシベンジル、3,4-ジメトキシベンジル、o-ニトロベンジル、p-ニトロベンジル、2-ダンシルエチル、2-(4-ニトロフェニル)エチル、2-(2,4-ジニトロフェニル)エチル、2-シアノ-1-フェニルエチル、S-ベンジルチオカルボネート、4-エトキシ-1-ナフチル、メチルジチオカルボネート)、2-ヨードベンゾエート、4-アジドブチレート、4-ニトロ-4-メチルペンタノエート、o-(ジプロモメチル)ベンゾエート、2-ホルミルベンゼンスルホネート、2-(メチルチオメトキシ)エチルカルボネート、4-(メチルチオメトキシ)ブチレート、2-(メチルチオメトキシメチル)ベンゾエート、2-(クロロアセトキシメチル)ベンゾエート、2-[(2-クロロアセトキシ)エチル]ベンゾエート、2-[2-(ベンジルオキシ)エチル]ベンゾエート、2-[2-(4-メトキシベンジルオキシ)エチル]ベンゾエート、2,6-ジクロロ-4-メチルフェノキシアセトエート、2,6-ジクロロ-4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノキシアセテート、2,4-ビス(1,1-ジメチルプロピル)フェノキシアセテート、クロロジフェニルアセテート、イソブチレート、モノスクシオノエート、(E)-2-メチル-2-プテノエート(チグロエート)、o-(メトキシカルボニル)ベンゾエート、p-P-ベンゾエート、-ナフトエート、ニトレート、アルキルN,N,N',N'-テトラメチルホスホロジアミデート、2-クロロベンゾエート、4-プロモベンゾエート、4-ニトロベンゾエート、3'5'-ジメトキシベンゾイン、粗製の感光性蛍光エステル、N-フェニルカルバメート、ボレート、ジメチルホスフィノチオイル、2,4-ジニトロフェニルスルフェネートなどのエステル、および

(iii)スルホネート(スルフェート、アリルスルホネート、メタンスルホネート(メシレート)、ベンジルスルホネート、トシレート、2-[4-ニトロフェニル]エチル]スルホネート)。

10

20

30

【0268】

本明細書中でX基として用いるカルボキシ保護基としては、限定するものではないが、以下を挙げる：

(i)酵素で切断可能なエステル(ヘプチル、2-N-(モルホリノ)エチル、コリン、(メトキシエトキシ)エチル、メトキシエチル)、メチル、置換メチル(9-フルオレニルメチル、メトキシメチル、メチルチオメチル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロフラニル、メトキシエトキシメチル、2-(トリメチルシリル)エトキシメチル、ベンジルオキシメチル、ピバロイルオキシメチル、フェニルアセトキシメチル、トリイソプロピルシリルメチル、シアノメチル、アセトール、フェナシル、p-プロモフェナシル、-メチルフェナシル、p-メトキシフェナシル、デシル、カルボキサミドメチル、p-アゾベンゼンカルボキサミドメチル、N-フタルイミドメチル)、2-置換エチル(2,2,2-トリクロロエチル、2-ハロエチル、-クロロアルキル、2-(トリメチルシリル)エチル、2-メチルチオエチル、1,3-ジシアニル-2-メチル、2-(p-ニトロフェニルスルフェニル)エチル、2-(p-トルエンスルホニル)エチル、2-(2'-ピリジル)エチル、2-(p-メトキシフェニル)エチル、2-(ジフェニルホスフィノ)エチル、1-メチル-1-フェニルエチル、2-(4-アセチル-2-ニトロフェニル)エチル、2-シアノエチル)、t-ブチル、3-メチル-3-ペンチル、ジシクロプロピルメチル、2,4-ジメチル-3-ペンチル、ジシクロプロピルメチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、アリル、メタリル、2-メチルブト-3-エン-2-イル、3-メチルブタ-2-(プレニル)、3-ブテン-1-イル、4-(トリメチルシリル)-2-

40

50

ブテン - 1 - イル、シンナミル、 - メチルシンナミル、プロブ - 2 - イニル(プロパルギル)、フェニル、2,6 - ジアルキルフェニル(2,6, - ジメチルフェニル、2,6,ジイソプロピルフェニル、2,6 - ジ - t - ブチル - 4 - メチルフェニル、2,6 - ジ - t - ブチル - 4 - メトキシフェニル、p - (メチルチオ)フェニル、ペンタフルオロフェニル、ベンジル、置換ベンジル(トリフェニルメチル、ジフェニルメチル、ビス(o - ニトロフェニル)メチル、9 - アントリルメチル、2 - (9,10 - ジオキソ)アントリルメチル、5 - ジベンゾスベリル、1 - ピレニルメチル、2 - (トリフルオロメチル) - 6 - クロモニルメチル、2,4,6 - トリメチルベンジル、p - プロモベンジル、o - ニトロベンジル、p - ニトロベンジル、p - メトキシベンジル、2,6 - ジメトキシベンジル、4 - (メチルスルフィニル)ベンジル、4 - スルホベンジル、4 - アジドメトキシベンジル、4 - {N - [1 - (4,4, - ジメチル - 2,6 - ジオキソシクロヘキシリデン) - 3 - メチルブチル]アミノ}ベンジル、ピペロニル、4 - ピコリル、p - P - ベンジル)、シリル(トリメチルシリル、トリエチルシリル、t - ブチルジメチルシリル、i - プロピルジメチルシリル、フェニルジメチルシリル、ジ - t - ブチルメチルシリル、トリイソプロピルシリル)、活性化(チオール)、オキサゾール、2 - アルキル - 1,3 - オキサゾリン、4 - アルキル - 5 - オキソ - 1,3 - オキサゾリジン、2,2, - ビストリフルオロメチル - 4 - アルキル - 5 - オキソ - 1,3 - オキサゾリジン、5 - アルキル - 4 - オキソ - 1,3 - ジオキソラン、ジオキサノン、オルトエステル、ブラウンオルトエステル、ペンタアミノコバルト(iii)複合体、スタンニル(トリエチルスタンニル、トリ - N - ブチルスタンニル)などのエステル、

(ii)アミド(N,N - ジメチル、ピロリジニル、ピペリジニル、5,6 - ジヒドロフェナントリジニル、o - ニトロアニリド、N - 7 - ニトロインドリル、N - 8 - ニトロ - 1,2,3,4 - テトラヒドロキノリル、2 - (2 - アミノフェニル)アセトアルデヒドジメチルアセタールアミド、p - P - ベンゼンスルホンアミド)、

(iii)ヒドラジド(N - フェニル、N,N' - ジイソプロピル)、および

(iv)テトラアルキルアンモニウム塩。

【0269】

本明細書中でX基として用いるチオール保護基としては、限定するものではないが、以下を挙げる：

(i)チオエーテル(S - アルキル、S - ベンジル、S - p - メトキシベンジル、S - o - またはp - ヒドロキシ - またはアセトキシベンジル、S - p - ニトロベンジル、S - 2,4,6 - トリメチルベンジル、S - 2,4,6 - トリメトキシベンジル、S - 4 - ピコリル、S - 2 - キノリニルメチル、S - 2 - ピコリルN - オキサイド、S - 9 - アントリルメチル、S - 9 - フルオレニルメチル、S - キサンテニル、S - フェロセニルメチル)、S - ジフェニルメチル、置換S - ジフェニルメチルおよびS - トリフェニルメチル(S - ジフェニルメチル、S - ビス(4 - メトキシフェニル)メチル、S - 5 - ジベンゾスベリル、S - トリフェニルメチル、S - ジフェニル - 4 - ピリジルメチル)、S - フェニル、S - 2,4 - ジニトロフェニル、S - t - ブチル、S - 1 - アダマンチル、モノチオ、ジチオおよびアミノチオアセタール(S - メトキシメチル、S - イソプトキシメチル、S - ベンジルオキシメチル、S - 2 - テトラヒドロピラニル、S - ベンジルチオメチル、S - フェニルチオメチル、チアゾリジン、S - アセトアミドメチル、S - トリメチルアセトアミドメチル、S - ベンズアミドメチル、S - アリルオキシカルボニルアミノメチル、S - フェニルアセトアミドメチル、S - フタルイミドメチル、S - アセチル - 、S - カルボキシル - 、およびS - シアノメチル)をはじめとする置換S - メチル、置換S - エチル(S - (2 - ニトロ - 1 - フェニル)エチル、S - 2 - (2,4 - ジニトロフェニル)エチル、S - 2 - (4' - ピリジル)エチル、S - 2 - シアノエチル、S - 2 - (トリメチルシリル)エチル、S - (1 - m - ニトロフェニル - 2 - ベンゾイル)エチル、S - 2 - フェニルスルホニルエチル、S - 1 - (4 - メチルフェニルスルホニル) - 2 - メチルプロブ - 2 - イル、シリル)、

(ii)チオエステル(S - アセチル、S - ベンゾイル、S - トリフルオロアセチル、S - N - [[(p - ビフェニルイル)イソプロポキシ] カルボニル] - N - メチル - - アミノチオブチレート、S - N - (t - ブトキシカルボニル - N - メチル - - アミノチオブチレート)、チオカルボネート(S - 2,2,2 - トリクロロエトキシカルボニル、S - t - ブトキシカルボニル、S

- ベンジルオキシカルボニル、S - p - メトキシベンジルオキシカルボニル)、チオカルバメート(S - (N - エチル)、S - (N - メトキシメチル))、

(iii)非対称ジスルフィド(S - エチル、S - t - ブチル、置換S - フェニルジスルフィド)

(iv)スルフェニル誘導体(S - スルホネート、S - スルフェニルチオカルボネート、S - 3 - ニトロ - 2 - ピリジンスルフェニルスルフィド、S - [トリカルボニル[1,2,3,4,5 - S] - 2,4 - シクロヘキサジエン - 1 - イル] - 鉄(1+)、オキサチオロン)、および

(v)S - メチルスルホニウム塩、S - ベンジル - およびS - 4 - メトキシベンジルスルホニウム塩、S - 1 - (4 - フタルイミドブチル)スルホニウム塩、S - (ジメチルホスフィノール)チオイル、S - (ジフェニルホスフィノ)チオイル。

【0270】

本明細書中でX基として用いるアミノ保護基としては、限定するものではないが、以下を挙げる：

(i)カルバメート(メチル、エチル、9 - フルオレニルメチル、9 - (2 - スルホ)フルオレニルメチル、9 - (2,7 - ジブromo)フルオレニルメチル、17 - テトラベンゾ[a,c,g,i]フルオレニルメチル、2 - クロロ - 3 - インデニルメチル、ベンズ[f]インデン - 3 - イルメチル、2,7 - ジ - t - ブチル - [9 - (10,10 - ジオキソ - 10,10,10,10 - テトラヒドロチオックス、1,1 - ジオキソベンゾ[b]チオフエン - 2 - イルメチル、置換エチル(2,2,2 - トリクロロエチル、2 - トリメチルシリルエチル、2 - フェニルエチル、1 - (1 - アダマンチル) - 1 - メチルエチル、2 - クロロエチル、1,1 - ジメチル - 2 - ハロエチル、1,1 - ジメチル - 2,2 - ジブromoエチル、1,1 - ジメチル - 2,2,2 - トリクロロエチル、1 - メチル - 1 - (4 - ビフェニルイル)エチル、1 - (3,5 - ジ - t - ブチルフェニル) - 1 - メチルエチル、2 - (2' - および4' - ピリジル)エチル、2,2 - ビス(4' - ニトロフェニル)エチル、N - (2 - ピバロイルアミノ) - 1,1 - ジメチルエチル、2 - [(2 - ニトロフェニル)ジチオ] - 1 - フェニルエチル、2 - (N,N - ジシクロヘキシルカルボキサミド)エチル)、t - ブチル、1 - アダマンチル、2 - アダマンチル、ビニル、アリル、1 - イソプロピルアリル、シンナミル、4 - ニトロシンナミル、3 - (3'ピリジル)プロプ - 2 - エニル、8 - キノリル、N - ヒドロキシピペリジニル、アルキルジチオ、ベンジル、p - メトキシベンジル、p - ニトロベンジル、p - ブromoベンジル、p - クロロベンジル、2,4 - ジクロロベンジル、4 - メチルスルフィニルベンジル、9 - アントリルメチル、ジフェニルメチル、2 - メチルチオエチル、2 - メチルスルホニルエチル、2 - (p - トルエンスルホニル)エチル、[2 - (1,3 - ジチアニル)メチル、4 - メチルチオフエニル、2,4 - ジメチルチオフエニル、2 - ホスホニオエチル、1 - メチル - 1 - (トリフェニルホスホニオ)エチル、1,1 - ジメチル - 2 - シアノエチル、2 - ダンシルエチル、2 - (4 - ニトロフェニル)エチル、4 - フェニルアセトキシベンジル、4 - アジドベンジル、4 - アジドメトキシベンジル、m - クロロ - p - アシルオキシベンジル、p - (ジヒドロキシボリル)ベンジル、5 - ベンズイソオキサゾリルメチル、2 - (トリフルオロメチル) - 6 - クロモニルメチル、m - ニトロフェニル、3,5 - ジメトキシベンジル、1 - メチル - 1 - (3,5 - ジメトキシフェニル)エチル、 - メチルニトロピペロニル、o - ニトロベンジル、3,4 - ジメトキシ - 6 - ニトロベンジル、フェニル(o - ニトロフェニル)メチル、2 - (2 - ニトロフェニル)エチル、6 - ニトロベラトリル、4 - メトキシフェナシル、3',5' - ジメトキシベンゾイン、尿素(フェノチアジニル - (10) - カルボニル誘導体、N' - p - トルエンスルホニルアミノカルボニル、N' - フェニルアミノチオカルボニル)、t - アミル、S - ベンジルチオカルバメート、ブチニル、p - シアノベンジル、シクロブチル、シクロヘキシル、シクロペンチル、シクロプロピルメチル、p - デシルオキシベンジル、ジイソプロピルメチル、2,2 - ジメトキシカルボニルビニル、o - (N' - N' - ジメチルカルボキサミド)ベンジル、1,1 - ジメチル - 3 - (N',N' - ジメチルカルボキサミド)プロピル、1,1 - ジメチルプロピニル、ジ(2 - ピリジル)メチル)、2 - フラニルメチル、2 - ヨードエチル、イソボルニル、イソブチル、イソニコチニル、p - (p' - メトキシフェニルアゾ)ベンジル、1 - メチルシクロブチル、1 - メチルシクロヘキシル、1 - メチル - 1 - シクロプロピルメチル - 1 - メチル - 1 - (p - フェニルアゾフェニル)エチル、1 - メチル1 - フェニルエチル、1 -

10

20

30

40

50

メチル - 1 - (4' - ピリジル)エチル、フェニル、p - (フェニルアゾ)ベンジル、2,4,6 - トリ - t - ブチルフェニル、4 - (トリメチルアンモニウム)ベンジル、2,4,6 - トリメチルベンジル)、

(ii)アミド(N - ホルミル、N - アセチル、N - クロロアセチル、N - トリクロロアセチル、N - トリフルオロアセチル、N - フェニルアセチル、N - 3 - フェニルプロピオニル、N - 4 - ペンテノイル、N - ピコリノイル、n - 3 - ピリジルカルボキサミド、N - ベンゾイルフェニルアラニル誘導体、N - ベンゾイル、N - p - フェニルベンゾイル、N - o - ニトロフェニルアセチル、N - o - ニトロフェノキシアセチル、N - 3 - (o - ニトロフェニル)プロピオニル、N - 2 - メチル - 2 - (o - ニトロフェノキシ)プロピオニル、N - 3 - メチル - 3 - ニトロブチリル、N - o - ニトロシンナモイル、N - o - ニトロベンゾイル、N - 3 - (4 - t - ブチル - 2,6 - ジニトロフェニル - 2, - 2 - ジメチルプロピオニル、N - o - (ベンゾイルオキシメチル)ベンゾイル、N - (2 - アセトキシメチル)ベンゾイル、N - 2 - [(t - ブチルジフェニルシロキシ)メチル]ベンゾイル、N - 3 - (3',6' - ジオキソ - 2',4',5' - トリメチルシクロヘキサ - 1',4' - ジエン) - 3,3 - ジメチルプロピオニル、N - o - ヒドロキシ - トランス - シンナモイル、N - 2 - メチル - 2 - (o - フェニルアゾフェノキシ)プロピオニル、N - 4 - クロロブチリル、N - アセトアセチル、N - 3 - (p - ヒドロキシフェニル)プロピオニル、(N' - ジチオベンジルオキシカルボニルアミノ)アセチル、N - アセチルメチオニン誘導体、4,5 - ジフェニル - 3 - オキサゾリン - 2 - オン)、環状イミド(N - フタロイル、N - テトラクロロフタロイル、N - 4 - ニトロフタロイル、N - ジチアスクシノイル、N - 2,3 - ジフェニルマレオイル、N - 2,5 - ジメチルピロリル、N - 2,5 - ビス(トリイソプロピルシロキシ)ピロリル、N - 1,1,4,4 - テトラメチルジシリルアザシクロペンタン付加物、N - 1,1,3,3 - テトラメチル - 1,3 - ジシライソインドリル、5 - 置換1,3 - ジメチル - 1,3,5 - トリアザシクロヘキサン - 2 - オン、5 - 置換1,3 - ジベンジル - 1,3,5 - トリアザシクロヘキサン - 2 - オン、1 - 置換3,5 - ジニトロ - 4 - ピリドニル、1,3,5 - ジオキサジニル)、

10

20

(iii)N - アルキルおよびN - アリールアミン(N - メチル、N - t - ブチル、N - アリル、N - [2 - (トリメチルシリル)エトキシ]メチル、N - 3 - アセトキシプロピル、N - シアノメチル、N - (1 - イソプロピル - 4 - ニトロ - 2 - オキソ - 3 - ピロリン - 3 - イル)、N - 2,4 - ジメトキシベンジル、N - 2 - アザノルボルネニル、N - 2,4 - ジニトロフェニル、第四級アンモニウム塩、N - ベンジル、N - 4 - メトキシベンジル、N - 2,4 - ジメトキシベンジル、N - 2 - ヒドロキシベンジル、N - ジフェニルメチル、N - ビス(4 - メトキシフェニル)メチル、N - 5 - ジベンゾスベリル、N - トリフェニルメチル、N - (4 - メトキシフェニル)ジフェニルメチル、N - 9 - フェニルフルオレニル、N - フェロセニルメチル、N - 2 - ピコリルアミンN' - オキサイド)、

30

(iv)イミン(N - 1,1 - ジメチルチオメチレン、N - ベンジリジン、N - p - メトキシベンジリデン、N - ジフェニルメチレン、N - [(2 - ピリジル)メシチル]メチレン、N - (N',N' - ジメチルアミノメチレン)、N - (N',N' - ジベンジルアミノメチレン)、N - (N' - t - ブチルアミノメチレン)、N,N' - イソプロピリデン、N - p - ニトロベンジリデン、N - サリチリデン、N - 5 - クロロサリチリデン、N - (5 - クロロ - 2 - ヒドロキシフェニル)フェニルメチレン、N - シクロヘキシリデン、N - t - ブチリデン)、

40

(v)エナミン(N - (5,5 - ジメチル - 3 - オキソ - 1 - シクロヘキセニル、N - 2,7 - ジクロロ - 9 - フルオレニルメチレン、n - 2 - (4,4 - ジメチル - 2,6 - ジオキソシクロヘキシリデン)エチル、N - 4,4,4 - トリフルオロ - 3 - オキソ - 1 - ブテリル、N - 1 - イソプロピル - 4 - ニトロ - 2 - オキソ - 3 - ピロリン - 3 - イル)、

(vi)N - ヘテロ原子誘導体(N - ボラン誘導体、N - ジフェニルボリン酸誘導体、N - ジエチルボリン酸誘導体、N - ジフルオロボリン酸誘導体、N,N' - 3,5 - ビス(トリフルオロメチル)フェニルボロン酸誘導体、N - [フェニル(ペンタカルボニルクロミウムまたはタングステン)]カルベニル、N - 銅またはN - 亜鉛キレート、18 - クラウン - 6誘導体、N - ニトロ、N - ニトロソ、N - オキサイド、トリアゼン誘導体、N - ジフェニルホスフィニル、N - ジメチル - およびジフェニルチオホスフィニル、N - ジアルキルホスホリル、N - ジベンジルおよびジフェニルホスホリル、イミノトリフェニルホスホラン誘導体、N - ベンゼン

50

スルフェニル、N - o - ニトロベンゼンスルフェニル、N - 2,4 - ジニトロベンゼンスルフェニル、N - ペンタククロロベンゼンスルフェニル、N - 2 - ニトロ - 4 - メトキシベンゼンスルフェニル、N - トリフェニルメチルスルフェニル、N - 1 - (2,2,2 - トリフルオロ - 1,1 - ジフェニル)エチルスルフェニル、N - 3 - ニトロ - 2 - ピリジンスルフェニル、N - p - トルエンスルホニル、N - ベンゼンスルホニル、N - 2,3 - 6 - トリメチル - 4 - メトキシベンゼンスルホニル、N - 2,4,6 - トリメトキシベンゼンスルホニル、N - 2,6 - ジメチル - 4 - メトキシベンゼンスルホニル、N - ペンタメチルベンゼンスルホニル、N - 2,3,5,6 - テトラメチル - 4 - メトキシベンゼンスルホニル、N - 4 - メトキシベンゼンスルホニル、N - 2,4,6 - トリメチルベンゼンスルホニル、N - 2,6 - ジメトキシ - 4 - メチルベンゼンスルホニル、N - 3 - メトキシ - 4 - t - ブチルベンゼンスルホニル、N - 2,2,5,7,8 - ペンタメチルクロマン - 6 - スルホニル、N - 2 - および4 - ニトロベンゼンスルホニル、N - 2,4 - ジニトロベンゼンスルホニル、N - ベンゾチアゾール - 2 - スルホニル、N - ピリジン - 2 - スルホニル、N - メタンスルホニル、N - 2 - (トリメチルシリル)エタンスルホニル、N - 9 - アントラセンスルホニル、N - 4 - (4',8' - ジメトキシナフチルメチル)ベンゼンスルホニル、N - ベンジルスルホニル、N - トリフルオロメチルスルホニル、N - フェナシルスルホニル、N - t - ブチルスルホニル)、

(vii)N - スルホニル誘導体 (N,N - ジメチルスルホニル、N - メシチレンスルホニル、N - p - メトキシフェニルスルホニル、N - ベンゼンスルホニル、N - p - トルエンスルホニル)、カルバメート (2,2,2 - トリクロロエチル、2 - (トリメチルシリル)エチル、t - ブチル、2,4 - ジメチルペント - 3 - イル、シクロヘキシル、1,1 - ジメチル - 2,2,2 - トリクロロエチル、1 - アダマンチル、2 - アダマンチル)、N - アルキルおよびN - アリール誘導体 (N - ビニル、N - 2 - クロロエチル、N - (1 - エトキシ)エチル、N - 2 - (2' - ピリジル)エチル、N - 2 - (4' - ピリジル)エチル、N - 2 - (4' - ニトロフェニル)エチル)、N - トリアルキルシリル誘導体 (N - t - ブチルジメチルシリル、N - トリイソプロピルシリル)、N - アリル、N - ベンジル、N - p - メトキシベンジル、N - 3,4 - ジメトキシベンジル、N - 3 - メトキシベンジル、N - 3,5 - ジメトキシベンジル、N - 2 - ニトロベンジル、N - 4 - ニトロベンジル、N - 2,4 - ジニトロフェニル、N - ピフェナシル、N - トリフェニルメチル、N - ジフェニルメチル、N - (ジフェニル - 4 - ピリジルメチル)、N - (n',n' - ジメチルアミノ)、アミノアセタール誘導体 (N - ヒドロキシメチル、N - メトキシメチル、N - ジエトキシメチル、N - エトキシメチル、N - (2 - クロロエトキシ)メチル、N - [2 - (トリメチルシリル)エトキシ]メチル、N - t - ブトキシメチル、N - t - ブチルジメチルシロキシメチル、N - ピバロイルオキシメチル、N - ベンジルオキシメチル、N - ジメチルアミノメチル、N - 2 - テトラヒドロピラニル)、アミド (二酸化炭素付加物、N - ホルミル、N - (n',n' - ジエチルウレイジル)、N - ジクロロアセチル、N - ピバロイル、N - ジフェニルチオホスフィニル)をはじめとするイミダゾール保護基、および

(viii)アミド (N - アリル、N - t - ブチル、N - ジシクロプロピルメチル、N - メトキシメチル、N - メチルチオメチル、N - ベンジルオキシメチル、N - 2,2,2 - トリクロロエトキシメチル、N - t - ブチルジメチルシロキシメチル、N - ピバロイルオキシメチル、N - シアノメチル、N - ピロリジノメチル、N - メトキシ、N - ベンジルオキシ、N - メチルチオ、N - トリフェニルメチルチオ、N - t - ブチルジメチルシリル、N - トリイソプロピルシリル、N - 4 - メトキシフェニル、N - 3,4 - ジメトキシフェニル、N - 4 - (メトキシメトキシ)フェニル、N - 2 - メトキシ - 1 - ナフチル、N - ベンジル、N - 4 - メトキシベンジル、N - 2,4 - ジメトキシベンジル、N - 3,4 - ジメトキシベンジル、N - o - ニトロベンジル、N - ビス (4 - メトキシフェニル)メチル、N - ビス (4 - メトキシフェニル)フェニルメチル、N - ビス (4 - メチルスルフィニルフェニル)メチル、N - トリフェニルメチル、N - 9 - フェニルフルオレニル、N - ビス (トリメチルシリル)メチル、N - t - ブトキシカルボニル、N - ベンジルオキシカルボニル、N - メトキシカルボニル、N - エトキシカルボニル、N - p - トルエンスルホニル、N,0 - イソプロピリデンケタール、N,0 - ベンジリデンアセタール、N,0 - ホルミリデンアセタール、N - プテニル、N - エテニル、N - [(e) - (2 - メトキシカルボニル)ビニル]、N - ジエトキシメチル、N - (1 - メトキシ - 2,2 - ジメチルプロピル)、N - 2 - (4 -

メチルフェニルスルホニル)エチル)をはじめとするアミドNH保護基。

【0271】

これらの保護基はヒドロキシル(セリン、スレオニン、チロシン)、アミノ(リジン、アルギニン、ヒスタジン、プロリン)、アミド(グルタミン、アスパラギン)、カルボン酸(アスパラギン酸、グルタミン酸)および硫黄誘導体(システイン、メチオニン)などのアミノ酸側鎖と反応し、また反応性部分Xとしての捕獲化合物中での使用に容易に適合させることができる。

【0272】

当業者に公知である広範な基特異的な試薬の他にも、天然産物化学の分野で公知の試薬を共有結合の形成におけるXの基礎とすることもできる。

【0273】

Xについての他の選択肢としては、特定のタンパク質と強力な親和性を有する、アクリジンまたはメチレンブルーなどのタンパク質精製色素が挙げられる。

【0274】

あるいは、Xは電子供与体または電子受容体として作用して、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非共有結合または電荷移動錯体などの複合体を形成することができる。その結果、得られる結合は高い安定性を有する(すなわち、上記で定義したような、MALDI-TOFなどの質量スペクトル分析の条件下で安定である)。これらの試薬としては、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と、相補的な親和性表面の相互作用を介して共有結合を形成することなく、強力かつ高い特異性で相互作用するものが挙げられる。例えば、ビオチンおよびストレプトアビジン、抗体および抗原、受容体およびリガンド、レシチンおよび炭水化物または他の同様の種類の試薬などの、十分に公知の結合対を、結合対のもう一方のメンバーと類似または同一の表面を有する生体分子と高い親和性で反応する反応性部分Xとしてこれらの化合物中で用いるために容易に適用させることができる。これらの部分は、得られた結合体(本明細書では、複合体とも呼ぶ)が、限定されるものではないが、タンパク質をはじめとする結合していない生体分子の、複合型生物学的混合物からの適切な洗浄に対して十分に安定である強力な相互作用を有するように選択する。

【0275】

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。

【0276】

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、限定されるものではないが、タンパク質混合物をはじめとする生体分子混合物は、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。

【0277】

特定の実施形態では、Xは $C(=O)O\text{Ph}NO_2$ 、 $C(=O)OC_6F_5$ または $C(=O)O(\text{Nスクシンイミジル})$ などの活性エステル、限定されるものではないが、 OCH_2I 、 OCH_2Br 、 OCH_2Cl 、 $C(O)CH_2I$ 、 $C(O)CH_2Br$ 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、ビオチン、アビジン、またはストレプトアビジンである。

【0278】

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

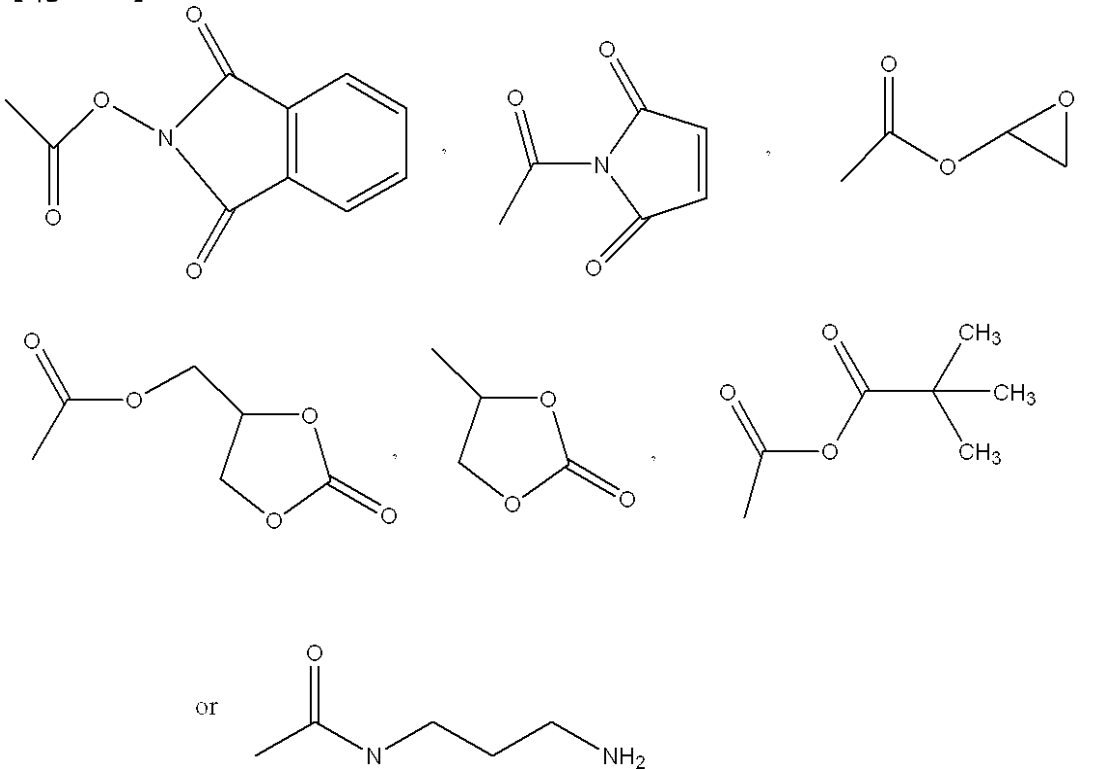
10

20

30

40

【化12】



10

20

である。

【0279】

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。

30

【0280】

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、間隔をあげ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切なスペーサーを選択し得る。

【0281】

特定の実施態様では、Sは $(\text{CH}_2)_r$ 、 (CH_2O) 、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ 、 $(\text{NH}(\text{CH}_2)_r\text{C}(=\text{O}))_s$ 、 $(\text{O}(\text{CH})_r\text{C}(=\text{O}))_s$ 、 $-((\text{CH}_2)_{r1}-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_{r2})_s-$ および $-(\text{C}(=\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_r)_s-$ 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

【0282】

3. 選択性官能基「Y」

選択性官能基(「Y」)は、例えば、立体障害または他の相互作用によって、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。それは捕獲化合物の立体的および/または電子的(例えば、メソメリー、誘導効果)特性ならびに得られる親和性を改変する基である。選択性官能基としては、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、任意の官能基が含

50

まれる。本明細書で提供する捕獲化合物において、Yは、存在する場合には、切断可能な結合Lと反応性官能基Xの反応性の調節に係るような立体障害および電子的因子に関して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。例えば、反応性官能基Xは、タンパク質上のアミン基と結合するよう選択することができる。選択性官能基は、表面上に露出されている基のみが接触され得ることを確実にするよう選択することができる。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、 CH_2CO_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17および図21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。

【0283】

特定の実施形態では、Yはそれぞれ独立に、得られる捕獲化合物の親和性特性および/または立体的および/もしくは電子的(例えば、メソメリー、誘導効果)特性を改変する基である。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、ポリエチレングリコール(PEG)、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、チトクロムC、および疎水性トリチル基から選択する。

【0284】

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、ペプチドまたは抗体である(図17参照)。別の実施形態では、Yは親水性化合物またはタンパク質(例えば、PEGまたはトリチルエーテル)、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。

【0285】

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、高い親和性で共有結合または非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、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cox受容体を含む。

【0286】

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。

【0287】

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。

【0288】

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。

【0289】

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。1つの実施態様では、アミノ酸コアは、第三の官能基の結合のための官能基が側鎖にはないアミノ酸であり得る。そのアミノ酸コアには、以下に限らないが、グリシン、アラニン、フェニルアラニンおよびロイシンが含まれる。これらの実施態様では、捕獲化合物は反応性官能基および選択性官能基を含み、それは、アミノ酸のアミノおよびカルボキシ基と結合する。

【0290】

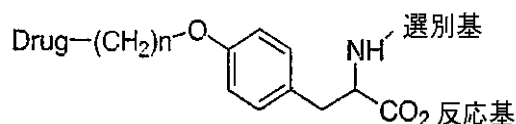
他の実施態様では、アミノ酸コアは第三の官能基の結合のための官能基を側鎖に保有するアミノ酸であり得る。アミノ酸コアには、以下に限らないが、セリン、トレオニン、リジン、チロシンおよびシステインが含まれる。これらの実施態様では、捕獲化合物は反応性官能基、選別官能基および選択性官能基を含み、それは、アミノ酸のアミノ、カルボキシおよび側鎖官能基と結合する。

10

【0291】

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：

【化13】



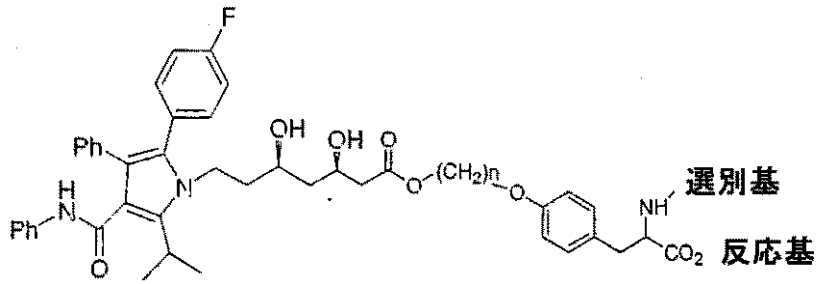
20

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。

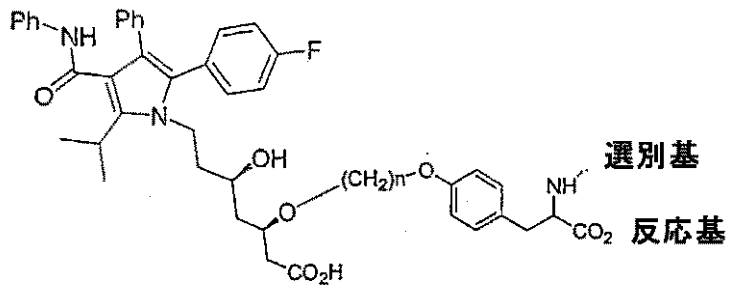
【0292】

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：

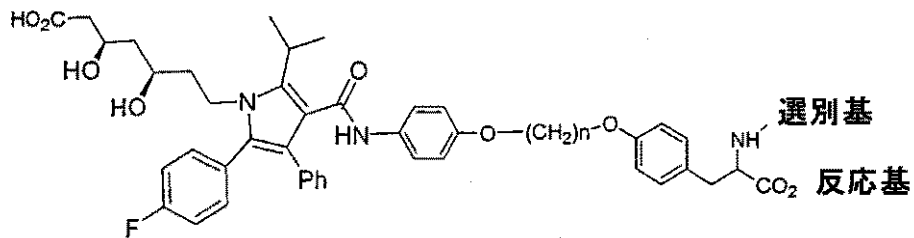
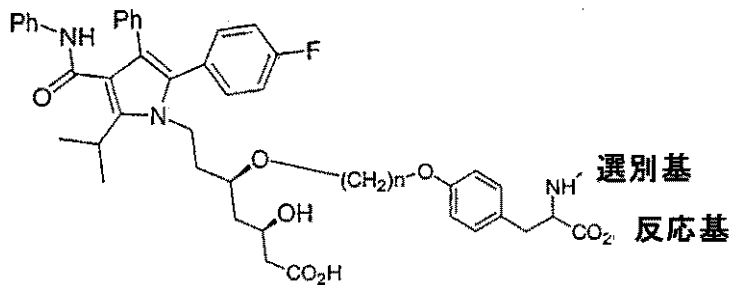
【化 1 4】



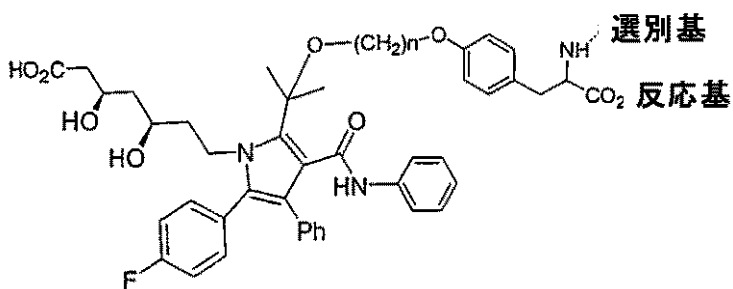
10



20



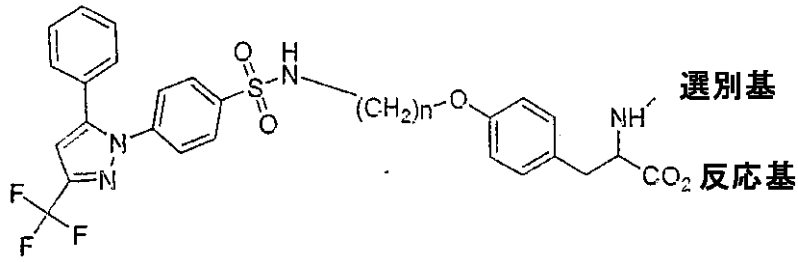
30



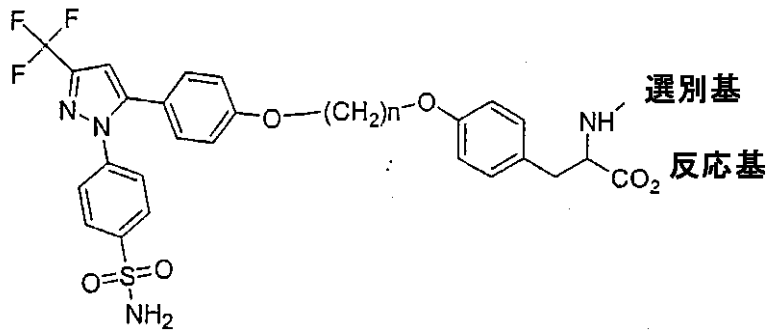
40

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：

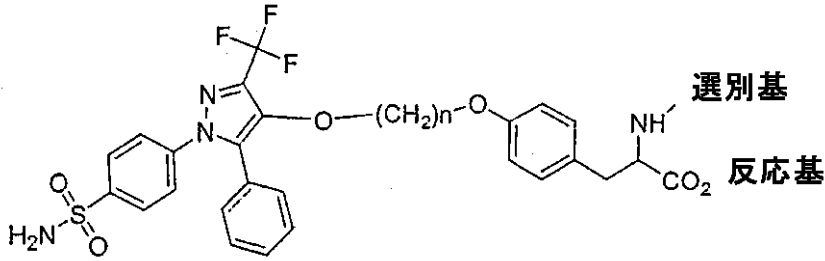
【化 15】



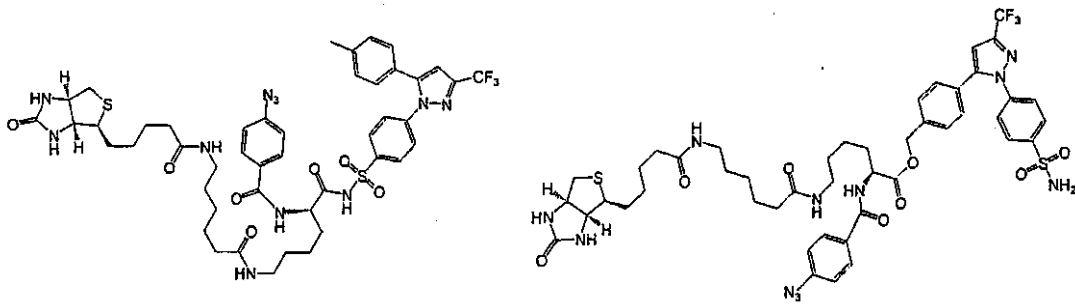
10



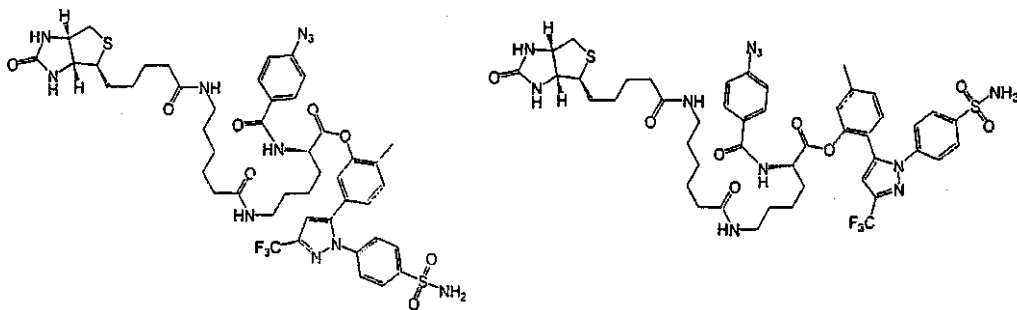
20



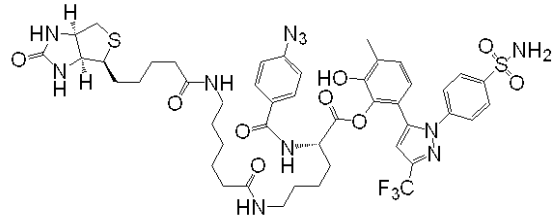
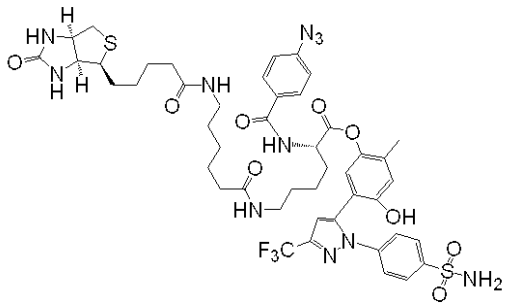
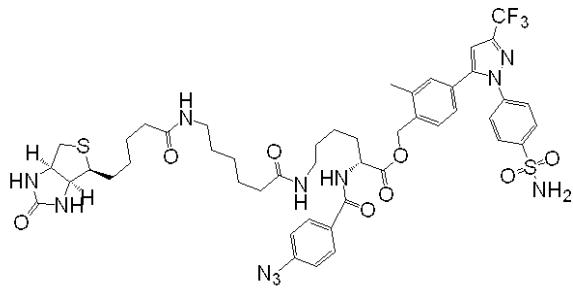
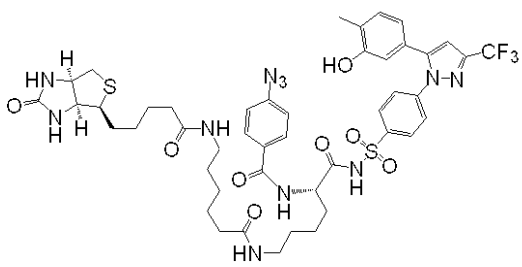
30



40



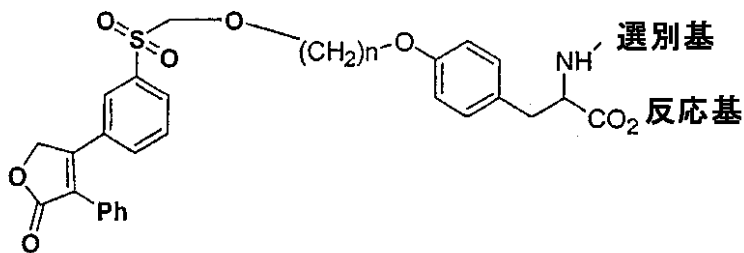
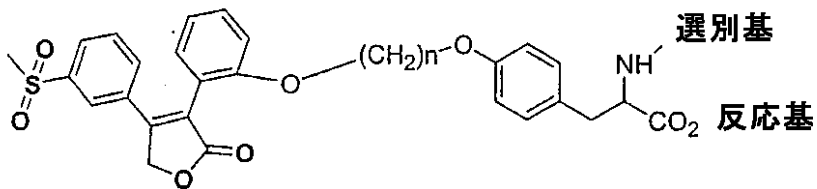
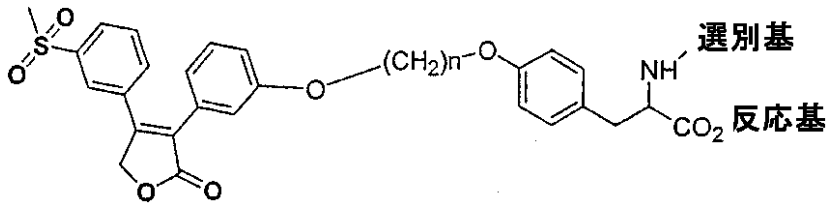
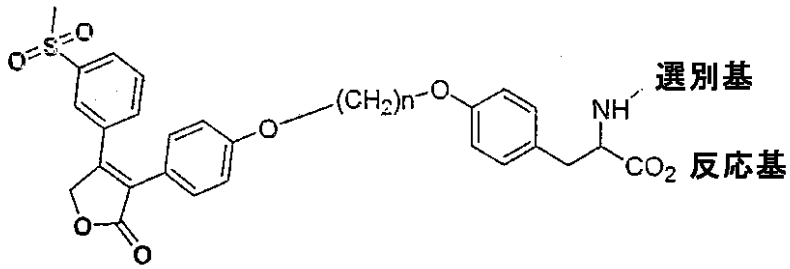
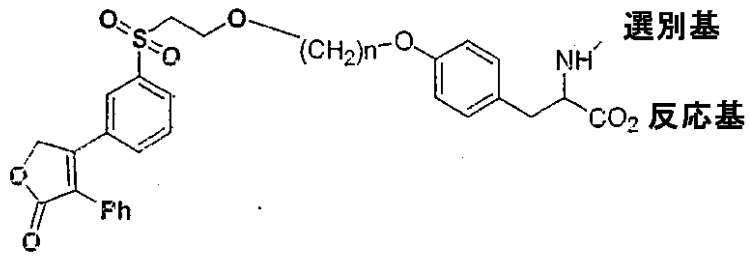
【化 1 6】



10

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

【化17】



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：

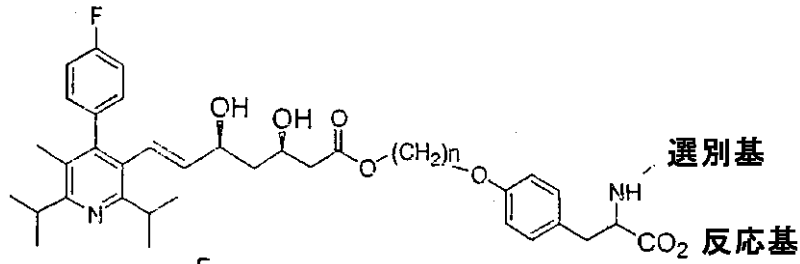
10

20

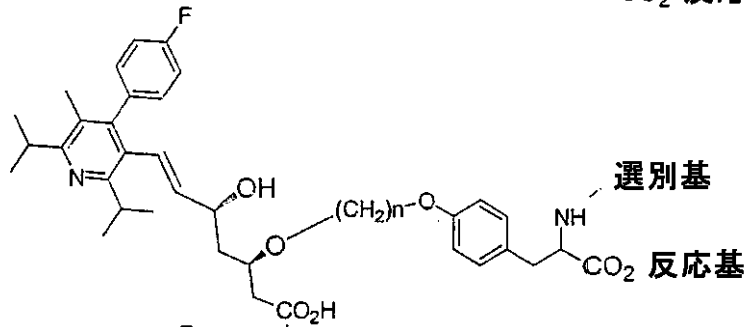
30

40

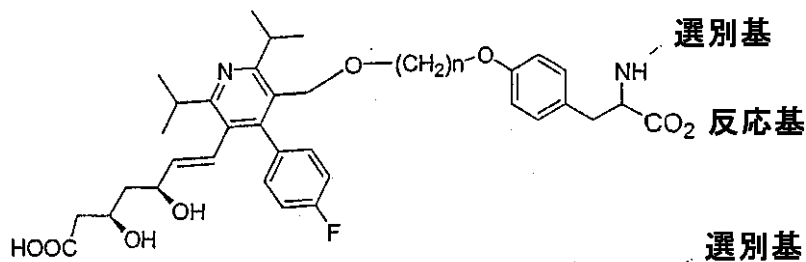
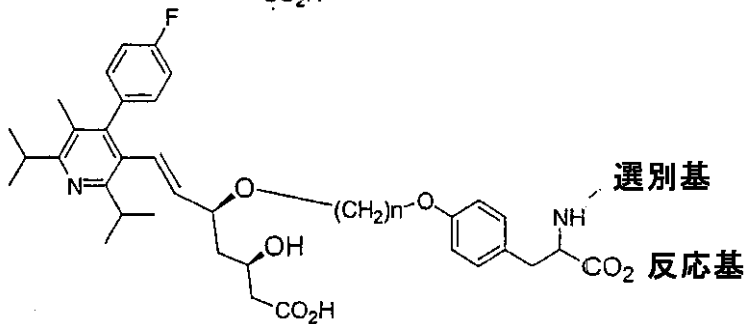
【化18】



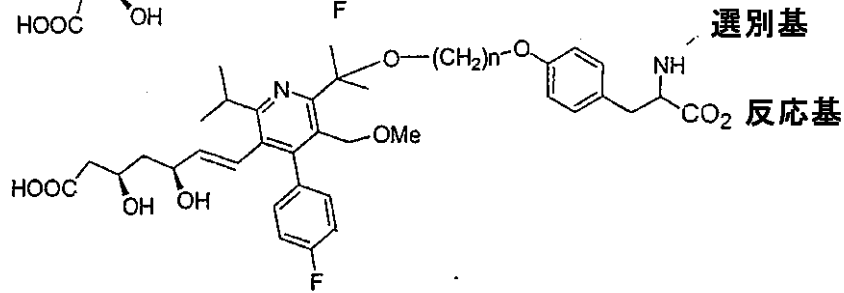
10



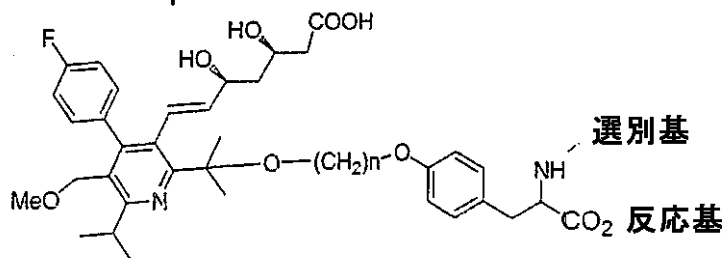
20



30

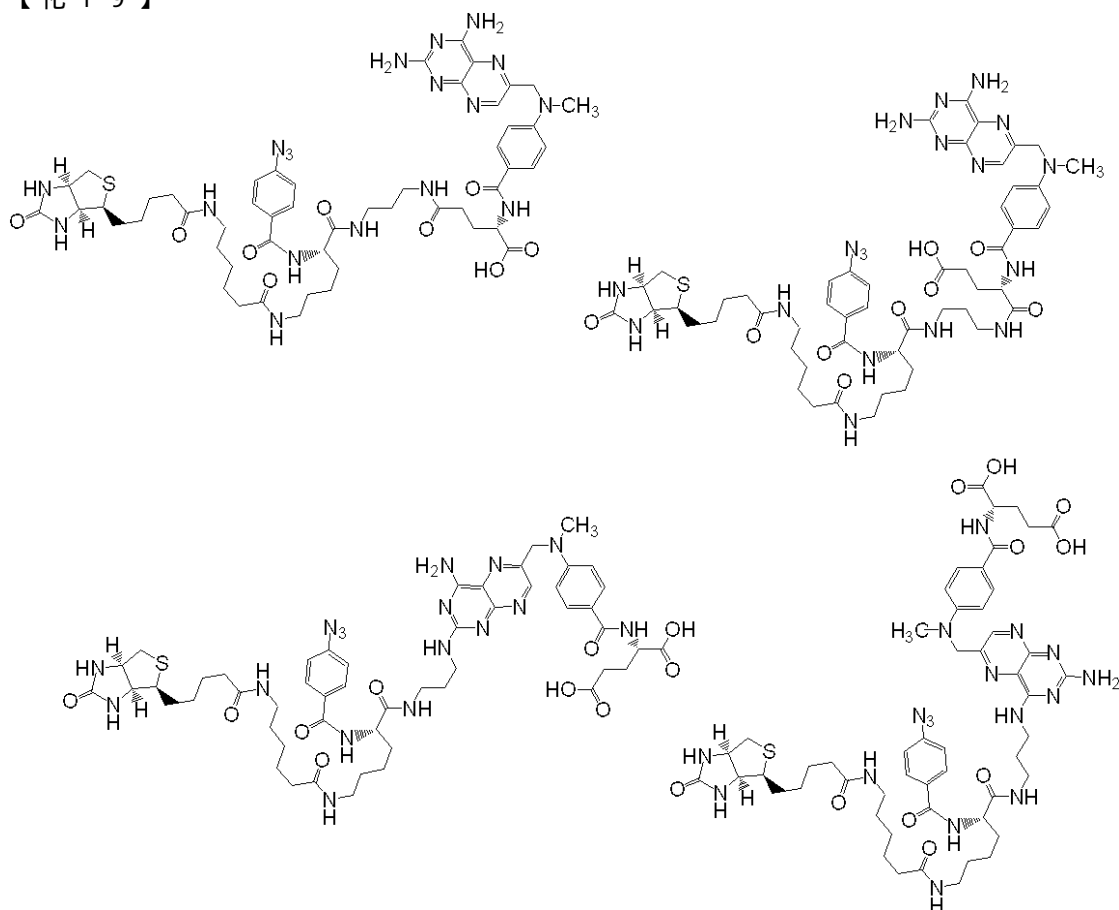


40



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19】



10

20

【0293】

他の実施形態では、Yは蛍光、リン光、化学発光および生物発光系をはじめとする発光の構成要素である基であるか、または比色アッセイで検出できる基である。特定の実施形態では、Y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、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、OR⁶⁰、NR⁶⁰R⁶¹、COOR⁶⁰、C(O)R⁶⁰、C(O)NR⁶⁰R⁶¹、S(O)_qR⁶⁰、S(O)_qOR⁶⁰、S(O)_qNR⁶⁰R⁶¹、NR⁶⁰C(O)R⁶¹、NR⁶⁰C(O)NR⁶⁰R⁶¹、NR⁶⁰S(O)_qR⁶⁰、SiR⁶⁰R⁶¹R⁶²、P(R⁶⁰)₂、P(O)(R⁶⁰)₂、P(OR⁶⁰)₂、P(O)(OR⁶⁰)₂、P(O)(OR⁶⁰)(R⁶¹)およびP(O)NR⁶⁰R⁶¹から選択される一価の基であり、ここで、qは0~2の整数であり、

30

40

R⁶⁰、R⁶¹、R⁶²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、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。

【0294】

蛍光、比色およびリン光基は当業者には十分に公知である(例えば、米国特許第6,274,337号; Sapanら(1999)Biotechnol. Appl. Biochem. 29(Pt.2): 99~108頁; Sittampalamら

50

(1997)Curr. Opin. Chem. Biol. 1(3) : 384~91頁 ; Lakowicz, J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York: Plenum Press(1983) ; Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture, Part B, Methods in Cell Biology, 30巻, Taylor, D. L. およびWang, Y. - L.編、San DiegoにおけるHerman, B., Resonance Energy Transfer Microscopy: Academic Press(1989)、219~243頁 ; Turro, N. J., Modern Molecular Photochemistry, Menlo Park: Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc.(1978)、296~361頁 およびthe Molecular Probes Catalog(1997), OR, USA参照)。蛍光部分としては、限定するものではないが、1- および2- アミノナフタレン、p,p'-ジアミノスチルベン、ピレン、第四級フェナントリジニン塩、9-アミノアクリジン、p,p'-ジアミノベンゾフェノンイミン、アントラセン、オキサカルボシアニン、メロシアニン、3-アミノエキレニン、ペリレン、ビス-ベンズオキサゾール、ビス-p-オキサゾリルベンゼン、1,2-ベンゾフェナジン、レチノール、ビス-3-アミノピリジニウム塩、ヘレブリゲニン、テトラサイクリン、ステロフェノール、ベンズイミダゾリルフェニルアミン、2-オキソ-3-クロメン、インドール、キサテン、7-ヒドロキシクマリン、フェノキサジン、カリシレート(calicylate)、ストロファンチジン、ポルフィリン、トリアリールメタンおよびフラビンが挙げられる。本明細書で提供される化合物との結合のための官能基を有するか、またはそのような官能基を組み込むよう改変できる蛍光化合物としては、例えば、以下が挙げられる：ダンシルクロライド、3,6-ジヒドロキシ-9-フェニルキサントヒドロールなどのフルオレセイン、ローダミネイソチオシアネート、N-フェニル1-アミノ-8-スルホネートナフタレン、N-フェニル2-アミノ-6-スルホネートナフタレン、4-アセトアミド-4-イソチオシアネート-スチルベン-2,2'-ジスルホン酸、ピレン-3-スルホン酸、2-トルイジノナフタレン-6-スルホネート、N-フェニル-N-メチル-2-アミノアフタレン(aminoaphthalene)-6-スルホネート、エチジウムプロマイド、ステブリン、オーロミン-0,2-(9'-アントロイル)パルミテート、ダンシルホスファチジルエタノールアミン、N,N'-ジオクタデシルオキサカルボシアニン、N,N'-ジヘキシルオキサカルボシアニン、メロシアニン、4-(3'ピレニル)ステアレート、d-3-アミノデスオキシ-エキレニン、12-(9'-アントロイル)ステアレート、2-メチルアントラセン、9-ビニルアントラセン、2,2'(ピニレン-p-フェニレン)ビスベンズオキサゾール、p-ビス(2-(4-メチル-5-フェニル-オキサゾリル))ベンゼン、6-ジメチルアミノ-1,2-ベンゾフェナジン、レチノール、ビス(3'-アミノピリジニウム)1,10-デカンジイルジヨーダイド、ヘリブリエニン(hellibrienin)のスルホナフチルヒドラゾン、クロロテトラシクリン、N-(7-ジメチルアミノ4-メチル-2-オキソ-3-クロメン)マレイミド、N-(p-(2-ベンズイミダゾリル)-フェニル)マレイミド、N-(4-フルオランチル)マレイミド、ビス(ホモバニリン酸)、レサザリン、4-クロロ-7-ニトロ-2,1,3-ベンゾオキサジアゾール、メロシアニン540、レゾルフィン、ローズベンガルおよび2,4-ジフェニル-3(2H)-フラノンが挙げられる。多数の蛍光タグがSIGMA chemical company(Saint Louis, Mo.)、Molecular Probes, R&D systems(Minneapolis, Minn.)、Pharmacia LKB Biotechnology.(Piscataway, N.J.)、CLONTECH Laboratories, Inc.(Palo Alto, Calif.)、Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company(Milwaukee, Wis.)、Glen Research, Inc.、GIBCO BRL Life Technologies, Inc.(Gaithersburg, Md.)、Fluka Chemica-Biochemika Analytika(Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)およびApplied Biosystems(Foster City, Calif.)、ならびに当業者に公知の他の商業的供給元から市販されている。

10

20

30

40

50

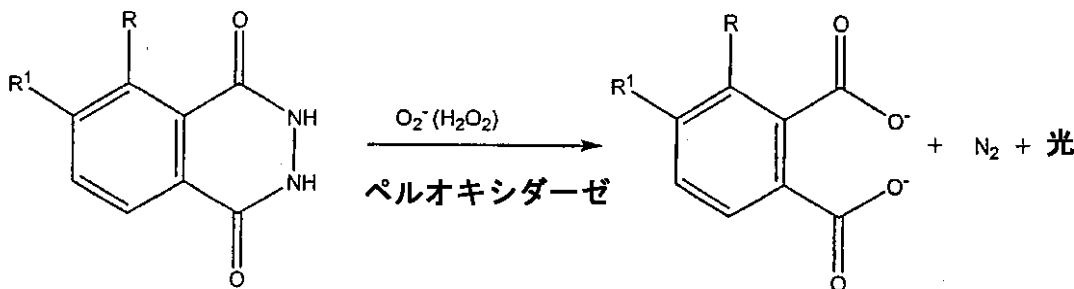
【0295】

本明細書中での使用が意図される化学発光基には、ペルオキシダーゼによって触媒され、スーパーオキシド陰イオン(O_2^-) (および/または過酸化水素(H_2O_2))を必要とする光発生系のあらゆる構成要素が含まれる(例えば、Musianiら(1998)Histol. Histopathol. 13(1) : 243~8頁参照)。光発生系としては、限定するものではないが、ルミノール、イソルミノール、ペルオキシオキサレート-フルオロフォア、アクリジニウムエステル、ルシゲニン、ジオキセタン、オキサレートエステル、アクリダン、ヘミン、3-0-インドキシルエステルをはじめとするインドキシルエステル、7-ジメチルアミノ-ナフタレン-1,2-

ジカルボン酸ヒドラジドなどのナフタレン誘導体および2-メチル-6-[p-メトキシフェニル]-3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2-]ピラジン-3-オン、2-メチル-6-フェニル-3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2-]ピラジン-3-オンおよび2-メチル-6-[p-[2-[ナトリウム3-カルボキラト-4-(6-ヒドロキシ-3-キサンテノン-9-イル)フェニルチオウレイレン]エチレンオキシ]フェニル]-3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2-]ピラジン-3-オンをはじめとするシプリジナルシフェリン類似体が挙げられる。他の実施形態では、本明細書中での使用が意図される化学発光部分としては、限定されるものではないが、ルミノール、イソルミノール、N-(4-アミノブチル)-N-エチルイソルミノール(ABEI)、N-(4-アミノブチル)-N-メチルイソルミノール(ABMI)が挙げられ、これらは以下の構造を有しており、そして、以下の反応に参与する：

10

【化20】



20

ここでは、RがNH₂でありR¹がHである場合にはルミノールが表され、RがHでありR¹がNH₂である場合にはイソルミノール、ABEI((6-[N-(4-アミノブチル)-N-エチルアミノ]-2,3-ジヒドロフタラジン-1,4-ジオン)については、RはHでありR¹はC₂H₅-N-(CH₂)₄NH₂であり、ABMI((6-[N-(4-アミノブチル)-N-メチルアミノ]-2,3-ジヒドロフタラジン-1,4-ジオン)については、RはHでありR¹はCH₃-N-(CH₂)₄NH₂である。

【0296】

本明細書で用いる生物発光基としては、ホタル[Photinus pyralis]ルシフェラーゼをはじめとするルシフェラーゼ/ルシフェリン対、エクオリン系(すなわち、精製されたクラゲ発光タンパク質、エクオリン)が挙げられる。多数のルシフェラーゼおよび基質が研究されており、十分に特性決定されており、市販されている(例えば、ホタルルシフェラーゼはSigma, St. Louis, MO.およびBoehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, INから入手でき、組換え生産されたホタルルシフェラーゼおよびこの遺伝子を基にした他の試薬またはこのタンパク質とともに用いるための他の試薬はPromega Corporation, Madison, WIから入手でき、クラゲ由来のエクオリン発光タンパク質ルシフェラーゼおよびRenilla由来のルシフェラーゼはSealite Sciences, Bogart, GA.から市販されており、これらのルシフェラーゼの天然基質であるセレンテラジンはMolecular Probes, Eugene, ORから入手できる)。他の生物発光系としては、以下が挙げられる：Cyrpidina(Vargula)系などの甲殻類、ホタル、コメツキムシおよび他の昆虫系をはじめとする昆虫生物発光発生系、細菌系、渦鞭毛藻類生物発光発生系、LatiaおよびPholasなどの軟体動物由来の系、ミミズおよび他の環形動物、ツチボタル、海洋多毛類系、南アメリカレイルウェイビートル(railway beetle)、魚類(すなわち、A. sintillans(例えば、O'Dayら(1974)Vision Res. 14:545~550頁参照)などのアゴヌケホシエソ属、クレナイホシエソ属、およびM.nigerなどのオオクチホシエソ属の種と分かっているもの)、シクルトン(cyclthone)、ハダカイワシ科魚類(myctophids)、ムネエソ魚類(hatchet fish)(アギロペレカス(agryropelecus))、ウキエソ属(vinciguerria)、クシスミクイウオ属(howellia)、フロレンシエラ(florenciella)およびホウライエソ属(Chauliodus)をはじめとする青/緑エミッター、および緑(すなわち、ウミシイタケ(Renilla)由来のものおよびプチロサルカス(Ptilosarcus)由来のものを)をはじめとするGFP)、赤および青(すなわち、ビブリオ・フィシェリ(Vibrio fischeri)、ビブリオ・ハーベイ(Vibrio harveyi)またはフォトバクテリウム・フォスフォレウム(Photo bacterium phosphoreum)由来のものを)をはじめとするBFP)蛍光タンパク質をはじめとする(

30

40

50

レニラ・ムレリ (Renilla mulleri) ルシフェラーゼ、ガウシア (Gaussia) 種ルシフェラーゼおよびプレウロマンマ (Pleuromamma) 種ルシフェラーゼを含む) 蛍光タンパク質およびフィコビリタンパク質。

【0297】

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、接着ペプチド、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17および以下のペプチドリガンドの表を参照。

10

【表3】

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	YRQSMNFFQG LRSFGCRFGT CTVQKLAHQI YQFTDKDKDN VAPRSKISPO GY	2
アラトスタチンI-IV	APSGAQRLYGFGL	3
アルファMSH	WGKPV(ac)SYSMEHFR	4
アルファ-バッグセル(Bag Cell)ペプチド	APRERFYSE	5
アルファ-ネオ-エンドルフィン	YGGFLRKYPK	6
アリテシン	E*GRLGTQWAV GHLM-NH ₂	7
アミリン	KCNTATCATN RLANFLVHSS NNFGAILSST NVGSNTY	8
アンジオテンシン-1	DRVYIHPFHL	9
アンジオテンシン-2	DRVYIHPF	10
アンジオテンシン-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-ネオ-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 VHHQKLVFFAE DVGSNLGAIIIG LMVGGVVIAT	22
ベータ-バッグセルペプチド	RLRFH	23

20

30

40

【表4】

BNP	SPKMVOGSGC FGRKMDRISS SSGLGCKVLR RH	24
ブラジキニン	RPPGFSPFR	25
ブッカリン (buccalin)	GMDSLAFSGG L-NH ₂	26
ブルシン (Bursin)	KHG-NH ₂	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 TYTQDFNKFH TFPQTAIGVG AP	31
カルバイン阻害剤 ("42")	DPMSSTYIEE LGKREVTIPP KYRELLA	32
CAP-37	NOGRHFCGGA EIHFVMTA ASCFN	33
カルジオジラチン (Cardiodilatin)	* NPMYNAVSNA DLMDFKNLLD HLEEKMPLED	34
CD36 (ウンデカペプチド (139-155))	CNLAVAAASH IYQNFVQ	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 GVVKNFVPT NVGSKAF	38
CGRP-2	ACNTATCVTH RLAGLLSRSG GMVKS NFVPT NVGSKAF	39
CKS17	LQNRRLDLL FLKEGGL	40
コルチスタチン	QEGAPQOSA RRDRMPCRN FFWKTFSSCK	41
クリスタリン	WG	42
デフェンシ 1 HNP1	ACYCRIPACI AGERRYGTIC YQRLWAFCC	43
デフェンシ HNP2	CYCRIPACIA GERRYGTIC YQRLWAFCC	44
デルマセプチン (Dermaseptin)	ALWKTMLKKL GTMALHAGKA ALGAAADTIS QTQ	45
ダイノフィン -A	YGGFLRRIRP KLKWDNQ	46
ダイノフィン -B	YGGFLRRQFK VVT	47
エレドイシン	E*PSKDAFIGLM-NH ₂	48
インドモフィン -1	YPWF	49
インドモフィン -2	YPFF	50
インドセリン -1	CSCSSLMDKE CVYFCHLDII W	51
イクセチン-4	HSDGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPS(NH ₂)	52
繊維素ペプチド	AADSGEGDFLA EGGGVR	53
繊維素ペプチド	BOGVNDNEEGF FSAR	54
フィブリン CS1	EILDVPST	55
FMRF	FMRF	56
ガラニン	GWTLNSAGYL LGPHAVGNHR SFSDKNGLTS	57
ガラチド (Galantide)	GWTLNSAGYL LGPQQFFGLM(NH ₂)	58
ガンマバクセルペプチド	RLRFD	59
ガストリン	EGPWLEEEEE AYGWMDF	60
ガストリン放出	VLPAGGGTV LTKMYPRGNH WAVGHLM	61

10

20

30

40

【表 5】

グレリン	GSSFLSPEHQ RVOQRKESKK PPAKLQPR	62
GIP	YAEGTFISDY SIAMDKIHQQ DFVNWLLAQK GKKNDWKHNI TQ	63
グルカゴン	HSQGTFTSDY SKYLDSRRAQ 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 AQSV 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 RKVLGQLSAR KLLQDIMSRO QGESNQERGA RARL	77
グアニリン	PGTCEICAYA ACTGC	78
ヘロデルミン	HSDAIFTEEY SKLLAKLALQ KYLASILGSR TSPPP-NH ₂	79
ヘロデルミン -1	HSDATFTAÉY SKLLAKLALQ KYLESILGSS TSPRPPSS	80
ヘロデルミン -2	HSDATFTAÉY SKLLAKLALQ KYLESILGSS TSPRPPSS	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)	FVNQHLGSH 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 ₂	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)	YGGGFMRRV-NH ₂	93
モチリン	FVPIFTYGEL QRMQEKERNK GQ	94
ミオモジュリン (Myomodulin)	PMSMLRL-NH ₂	95
ミオシンキナーゼ	IPKKRAARATS-NH ₂	96
ネクロフィブリン (Necrofibrin)	GAVSTA	97
ニューロキニン A	HKTDSFVGLM-NH ₂	98
ニューロキニン B	DMHDFVGLM-NH ₂	99
ニューロメチン B	GNLWATGHFM-NH ₂	100

10

20

30

40

【表 6】

ニューロペプチド Y	YPSKPDNPGE DAPAEDMARY YSAKRHYINL ITRQRY-NH ₂	101
ニューロテンシン	E*LYENKPRRPUII	102
ノシセプチン	FGGFTGARKS ARKLANQ	103
ノシセプチン/オキソノシセプチン FQ	FAEPLPSEEE GESYSKEVPE MEKRYGGFMR F	104
ノシスタチン	EQKQLQ	105
オキソノシスタチン A	E*PLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGI LTL-NH ₂	106
オキソノシスタチン B	RSGPPGLQGR LQRLLOASGN HAAGILTM- NH ₂	107
オステオカルシン	YLYQWLGAPV PYPDPLEPRR EVCELNPDCD ELADHIGFQE AYRRFYGPV	108
オキシトシン	CYIQNCPLG-NH ₂	109
PACAP	HSDGIFTDSY SRYRKQMAVK KYLAAVL	110
PACAP-RP	DVAHGILNEA YRKVLDQLSA GKHLQSLVA	111
膵臓ポリペプチド	APLEPVYPGD NATPEQMAQY AADLRRYINM LTRPRY-NH ₂	112
パパイン阻害剤	GGYR	113
ペプチド E	YGGFMRRVGR PE	114
ペプチド YY	YPIKPEAPGE DASPEELNRY YASLRHYLNL VTRQRY-NH ₂	115
リン酸受容体	RRKASGPPV	116
フィザレミン	E*ADPNKFYGLM-NH ₂	117
ラナテンシン	E*VPQWAVGHFM-NH ₂	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 RLLQGLV	123
血清胸腺因子	E*AKSQGGSN	124
構造部位亜鉛リガンド-α	PQCGKCRICK NPESNYCLK	125
構造部位亜鉛リガンド-β	PQCGKCRVCK NPESNYCLK	126
構造部位亜鉛リガンド-γ	PQCGKCRICK NPESNYCLK	127
構造部位亜鉛リガンド-δ	PLCRKCKFCLSPLTNLCGK	128
構造部位亜鉛リガンド-ε	POGECKFCLNPKTNLCQK	129
サブスタンス P	RPKPQQFFGL M-NH ₂	130
シンチド (Syntide) 2	PLARTLSVAG LPGKK	131
システミン	AVQSKPPSKR DPPKMOTD	132
トロンビン軽鎖	TFGSGEADCG LRPLFEKSL EDKTERELLE SYIDGR	133
チモペンチン	RKDVI	134
胸腺因子	QAKSQGGSN	135

10

20

30

40

【表 7】

TRH	E*HP	136
タフトシン	TKPR	137
ウベロレイン	E*PDPNAFYGLM-NH ₂	138
尿毒症ペントペプチド	DLWQK	139
ウロコルチン	DNPSLSIDLT FHLRLTLEL ARTQSQRERA EQNRHIFDSV	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	CYIQNCPRG	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	FQFHFHWGS	148
炭酸脱水素酵素の亜鉛 リガンド	IIIQFHFHWGS	149

10

【 0 2 9 8 】

Y についての他の選択肢は当業者によって同定することができ、これらとしては、例えば、Techniques in Protein Chemistry、第1巻(1989)T. Hugli編(Academic Press)、Techniques in Protein Chemistry、第5巻(1994)J. W. Crabb編(Academic Press)、Lundblad Techniques in Protein Modification(1995)(CRC Press, Boca Raton, FL)、Glazerら(1976)Chemical Modification of Proteins(North Holland(Amsterdam))(American Elsevier, New York)およびHermanson(1996)Bioconjugate Techniques(Academic Press, San Diego, CA)に開示されているものが挙げられる。

20

【 0 2 9 9 】

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(例えば、米国特許第6,025,129号、同6,017,496号、同5,972,639号、同5,961,923号、同5,925,562号、同5,874,214号、同5,751,629号、同5,741,462号参照)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(例えば、米国特許第5,432,018号、同5,741,462号、同5,547,839号参照)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。

30

40

【 0 3 0 0 】

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)₆、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、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、リポソーム、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

50

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。

【0301】

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。

【0302】

限定されるものではないが、タンパク質混合物をはじめとする生体分子混合物は、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とタンパ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(例えば、Sephadex(登録商標))、アガロース(例えば、Sephacrose(登録商標))、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。

【0303】

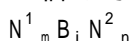
化合物の溶解性を変化させることができる柔軟性は本方法全体の大きな利点である。対照的に、2Dゲル電気泳動は水溶性タンパク質の分析のみに有用であり、その結果、細胞膜中にあるものなど全細胞タンパク質の約30~35%はこの方法では分析できない。限定されるものではないが、組織特異的細胞-細胞接触、シグナル伝達、イオンチャンネルおよび受容体に関与するものをはじめとする多数のタンパク質は細胞膜中に局在するので、このことは2Dゲル電気泳動の厳しい限界である。

【0304】

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。

【0305】

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

10

20

30

40

50

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、配列並べ替えの数は 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。

【0306】

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、限定されるものではないが、タンパク質混合物をはじめとする生体分子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^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。

【0307】

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。別の例示的な実施形態では(例えば、実施例1.bを参照)、Bは12量体のオリゴヌクレオチド配列内にはめ込まれているテトラヌクレオチド配列を有し、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を保有している256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。

【0308】

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。

【0309】

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

10

20

30

40

50

、イオン性および中性テンスド(tenside)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。

【0310】

他の実施形態では、Wはまた、必要に応じて、限定されるものではないが、タンパク質混合物をはじめとする生体分子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、sec-ヘキシル、イソヘキシル、n-ブチル、sec-ブチル、iso-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。

10

【0311】

6. 例示的な実施形態

以下は上記の特性を示す例示的な捕獲化合物を提供する。これらは単なる例であり、生体分子と共有結合により、または分析条件、例えば、質量スペクトル分析条件に対して安定な他の高度に安定な相互作用によって反応することができ、そして選別され得るか、又は別の方法で同定することができるあらゆる化合物が収集物に用いることが意図されることが理解される。

【0312】

a. 例示的な実施形態1

20

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：

QZX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))を含む選別官能基であり、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、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反応性官能基であり、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/または反応する選択性官能基である。

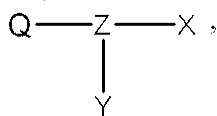
30

【0313】

b. 例示的な実施形態2

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21】



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))を含む選別官能基であり、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、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。

40

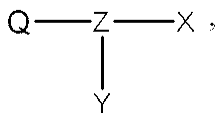
【0314】

50

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22】



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、化合物または1以上の生体分子(例えば、医薬品製剤、生体分子、薬剤または基質に固着して標的分子を捕獲する他の化合物)である選別官能基であり、

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、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

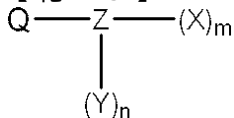
Yは、標的タンパク質と非共有的に相互作用する官能基を導入することによって特有の選択性を与えることにより、相互作用および/または反応する官能基である。

【0315】

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：

【化23】



またはQ - Z - (X)_mまたはQ - Z - (Y)_n

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。

【0316】

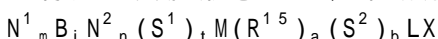
e. 例示的な実施形態5

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。例えば、Hesslerら(2001年11月9~11日)Ninth Foresight Conference on Molecular Nanotechnology(要約)(<http://www.foresight.org/Conferences/MNT9/Abstracts/Hessler/>)を参照。

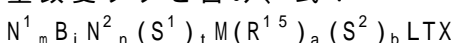
【0317】

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：



を有する。式中、N¹、B、N²、S¹、M、S²、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、N¹、B、N²、S¹、M、S²、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。

【0318】

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：

10

20

30

40

50

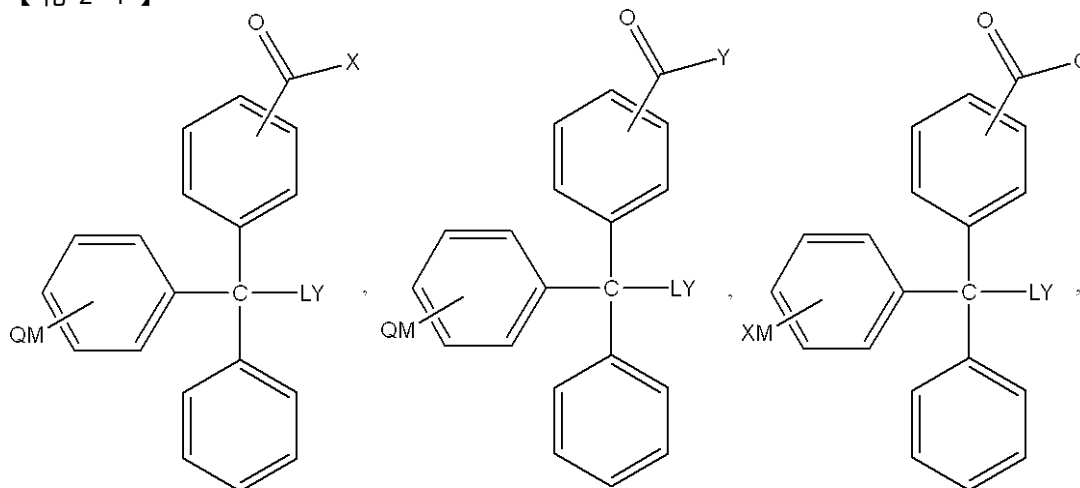


を有する。式中、 N^1 、 B 、 N^2 、 S^1 、 M 、 S^2 、 X 、 m 、 i 、 n 、 t 、 a および b は上記で定義した通りである。

【0319】

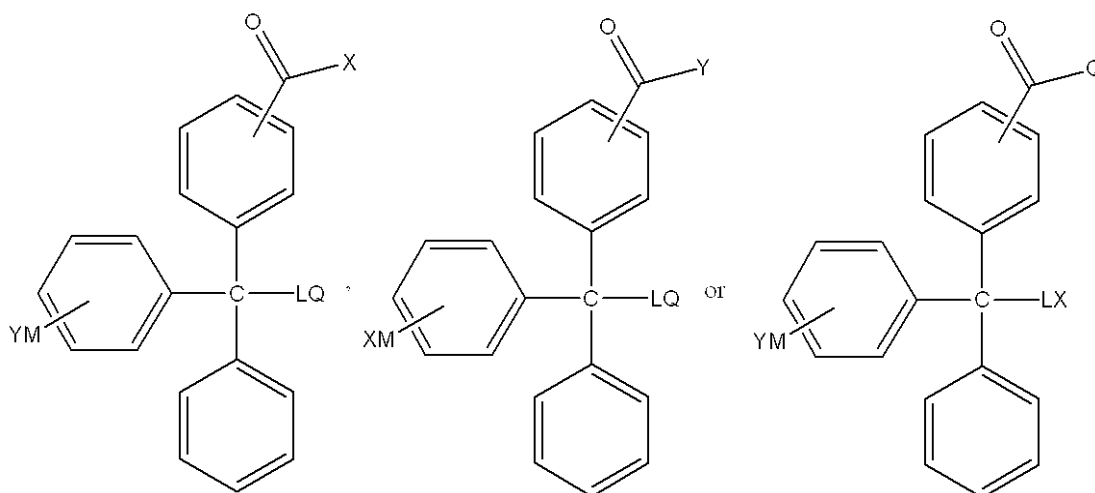
別の実施形態では、本明細書に提供される方法に用いるための化合物には、式：

【化24】



10

20



30

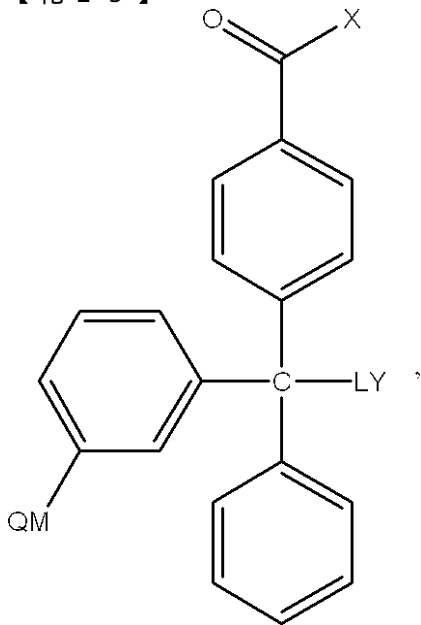
で表されるものが含まれる。式中、 L および M は各々独立に、 O 、 S または NR^3 であり、 X は上記のような反応性官能基であり、 Y は上記のような選択性官能基であり、 Q は上記のような選別官能基であり、 R^3 はそれぞれ独立に、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換アルケニル、置換もしくは非置換アルキニル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクリル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換アラルキル、または置換もしくは非置換ヘテロアラルキルである。

40

【0320】

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 5】



10

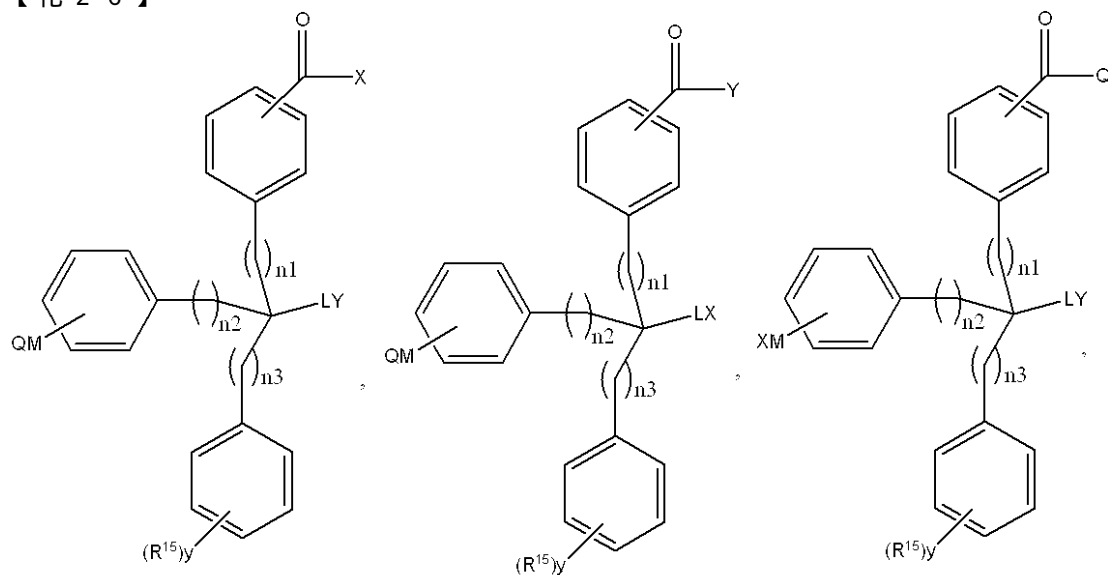
を有する。式中、L、M、X、YおよびQは上記で定義した通りである。

【 0 3 2 1】

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：

20

【化 2 6】



10

20

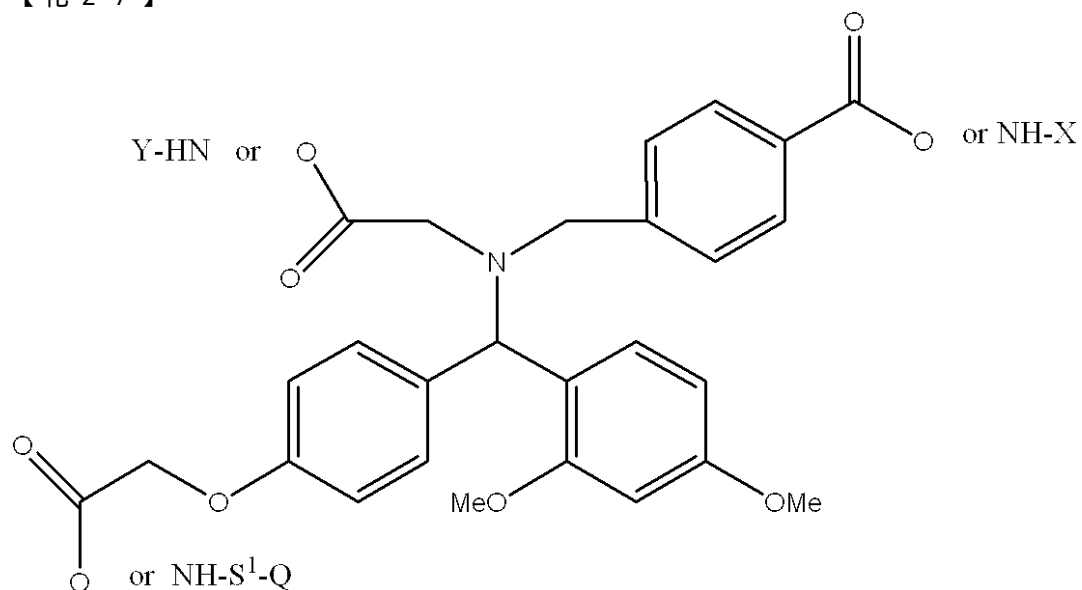
30

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り、 n_1 、 n_2 および n_3 は0から5である。別の実施形態では、 n_1 、 n_2 および n_3 は、 n_1 、 n_2 および n_3 がすべて0とならないように選択される。

【0322】

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 7】



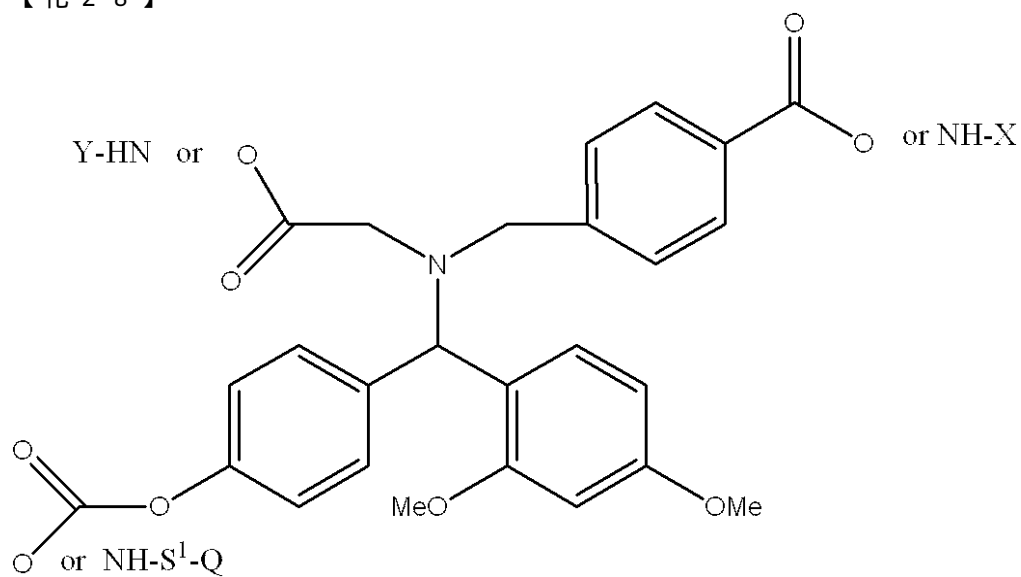
10

を有する。式中、X、Y、QおよびS¹は上記で定義した通りである。

【0323】

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 8】



20

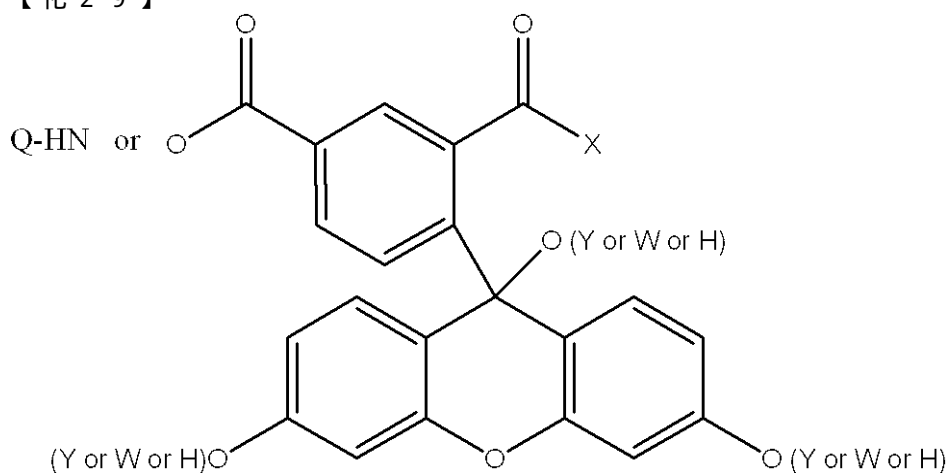
30

を有する。式中、Q、Y、XおよびS¹は上記で定義した通りである。

【0324】

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29】



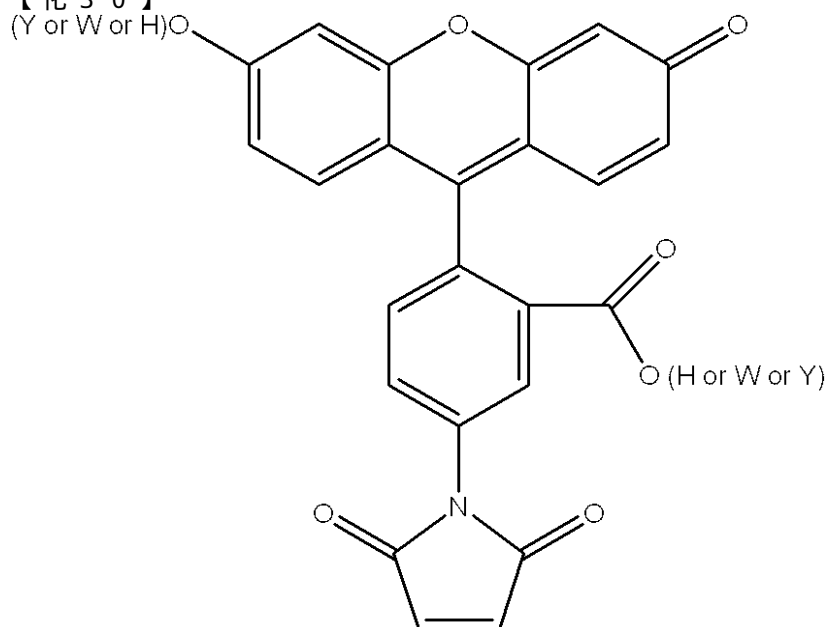
10

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。

【0325】

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30】



20

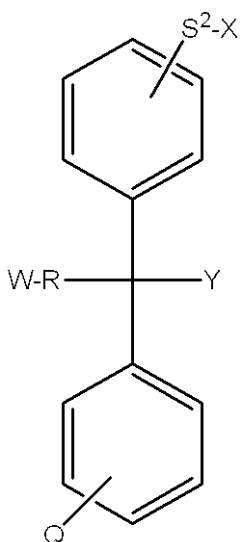
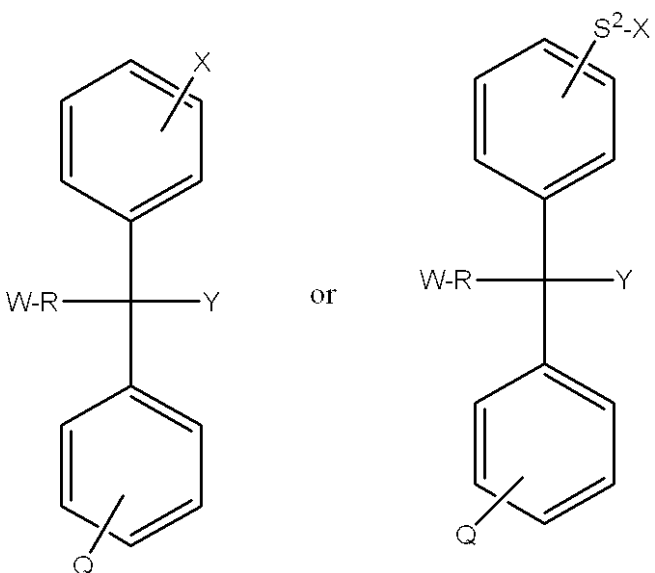
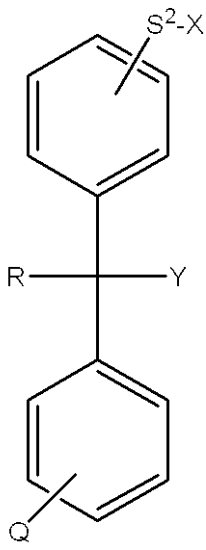
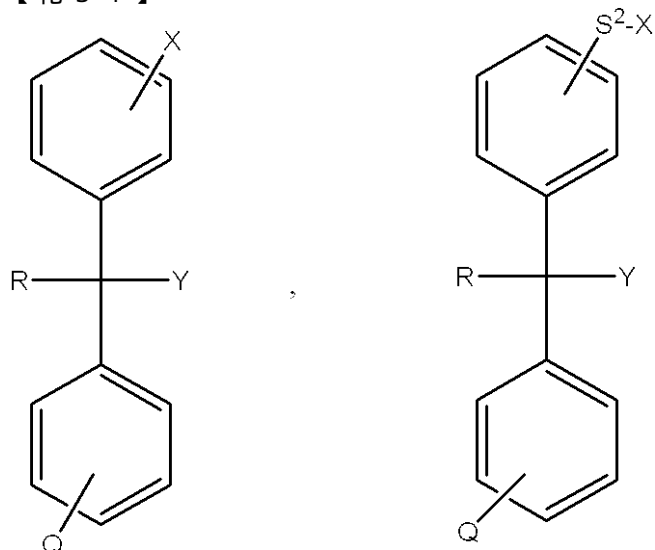
を有する。式中、 X 、 Y 、 Q および W は上記で定義した通りである。

【0326】

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：

30

【化31】



or

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-(CH₂)_n、イソプロピルおよびフェニル-(CH₂)_n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。

【0327】

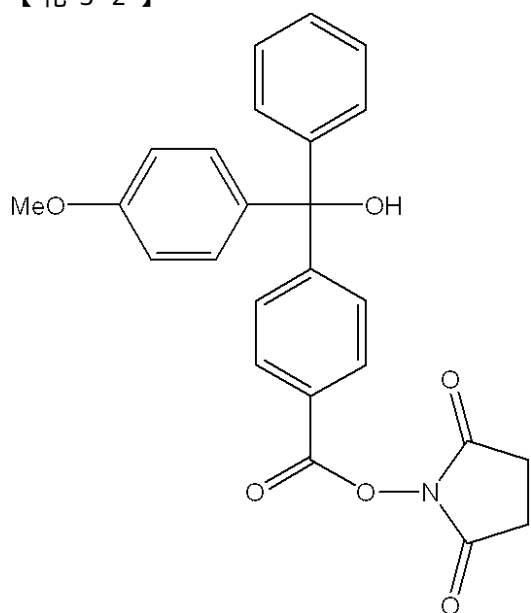
他の実施形態では、本明細書で提供される方法に用いるための化合物には

10

20

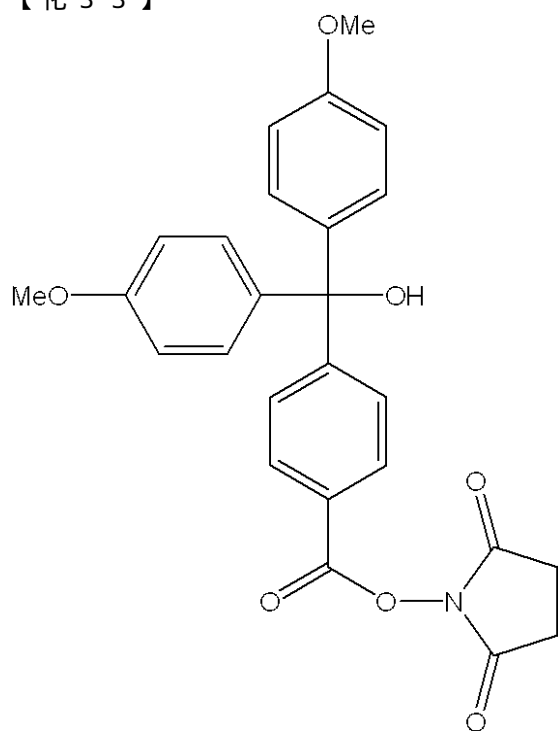
30

【化 3 2】



10

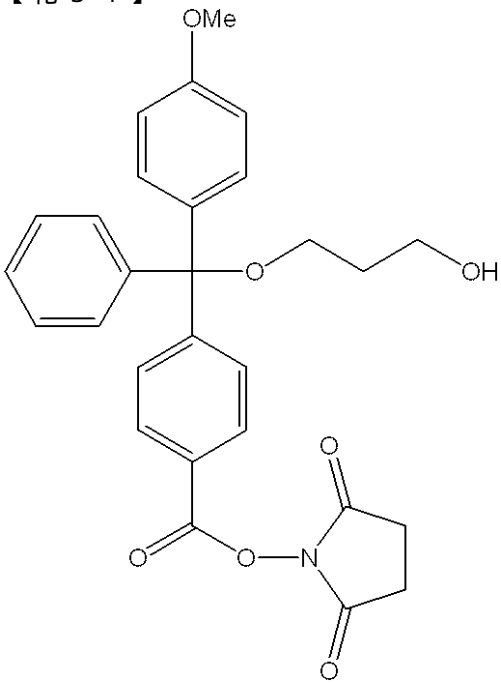
【化 3 3】



20

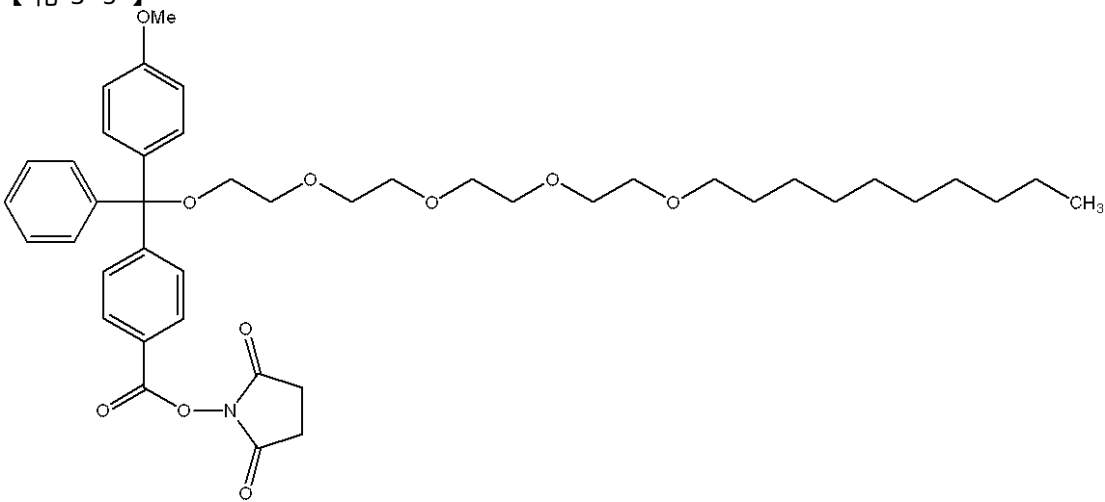
30

【化 3 4】



10

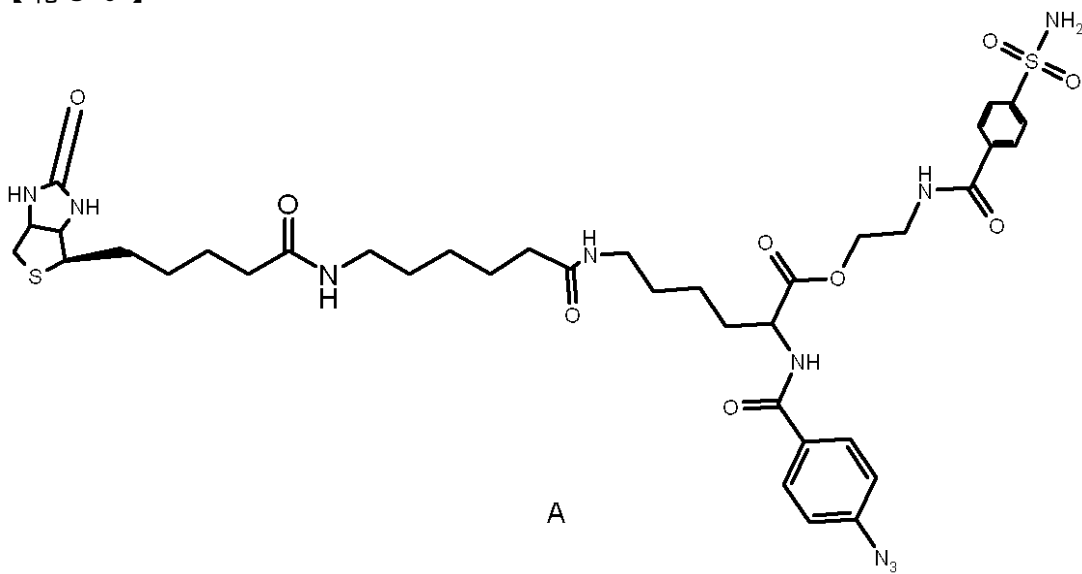
【化 3 5】



20

30

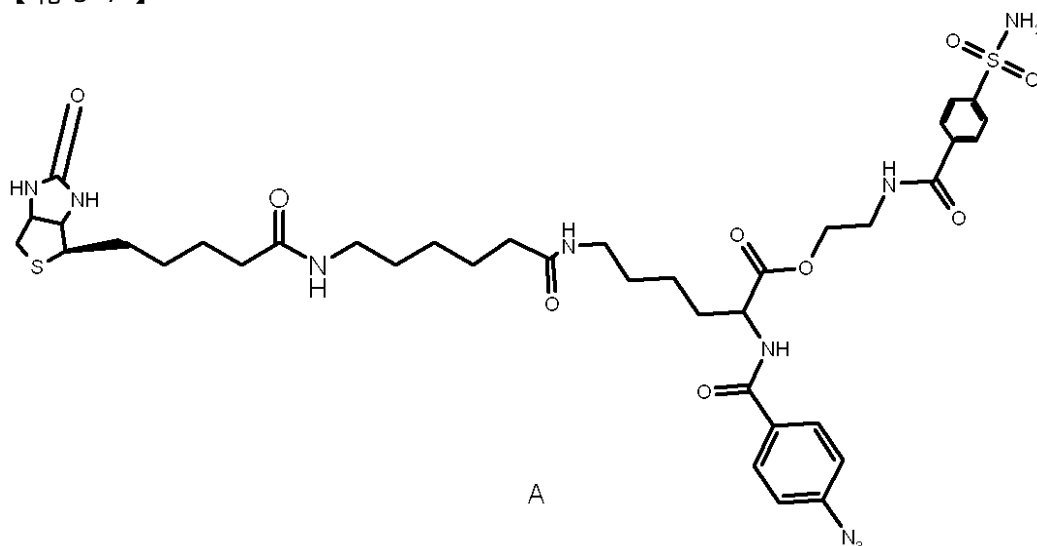
【化 3 6】



40

A

【化 3 7】



10

が含まれる。

【0328】

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。

20

【0329】

D. 捕獲化合物の調製

捕獲化合物は標的生体分子および反応条件を評価することによって設計する。例えば、標的生体分子がタンパク質である場合には、タンパク質に共有結合するかまたはタンパク質へ高い親和性で結合するために適切なX官能基を選択する。Yは標的混合物の複雑性およびXによる結合の所望の特異性にしたがって選択する。Qは望まれる混合物の分割数にしたがって選択し、Wはプローブされる生体分子の環境に基づいて選択する。種々の捕獲化合物をこのような基準にしたがって設計する。

30

【0330】

捕獲化合物は、設計した後、当業者が利用可能な方法によって合成することができる。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。

【0331】

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 $(S^1)_i M(R^{15})_a (S^2)_b L$ 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

40

50

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。

【0332】

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。

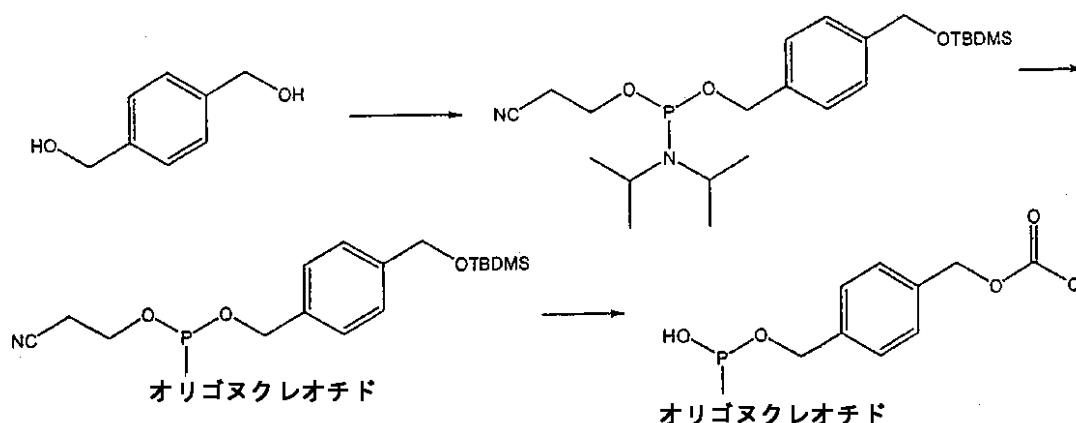
10

【0333】

アルカリ不安定性リンカーを含む、本明細書で提供される化合物の合成のためには、1,4-ジ(ヒドロキシメチル)ベンゼン(すなわち、M)を、例えば、対応するモノ-tert-ブチルジメチルシリルエーテルのようにモノ保護する。残存する遊離アルコールを、2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルクロロホスホルアミダイトとの反応によって、対応する2-シアノ-エチル-N,N-ジイソプロピルホスホルアミダイトのように誘導体化する。このアミダイトのオリゴヌクレオチド(すなわち、Q)との反応後、保護基を除去して対応するアルコールを得る。例えば、トリクロロメチルクロロホルメートとの反応により、以下に示すクロロホルメート(すなわち、X)が得られる。

20

【化38】



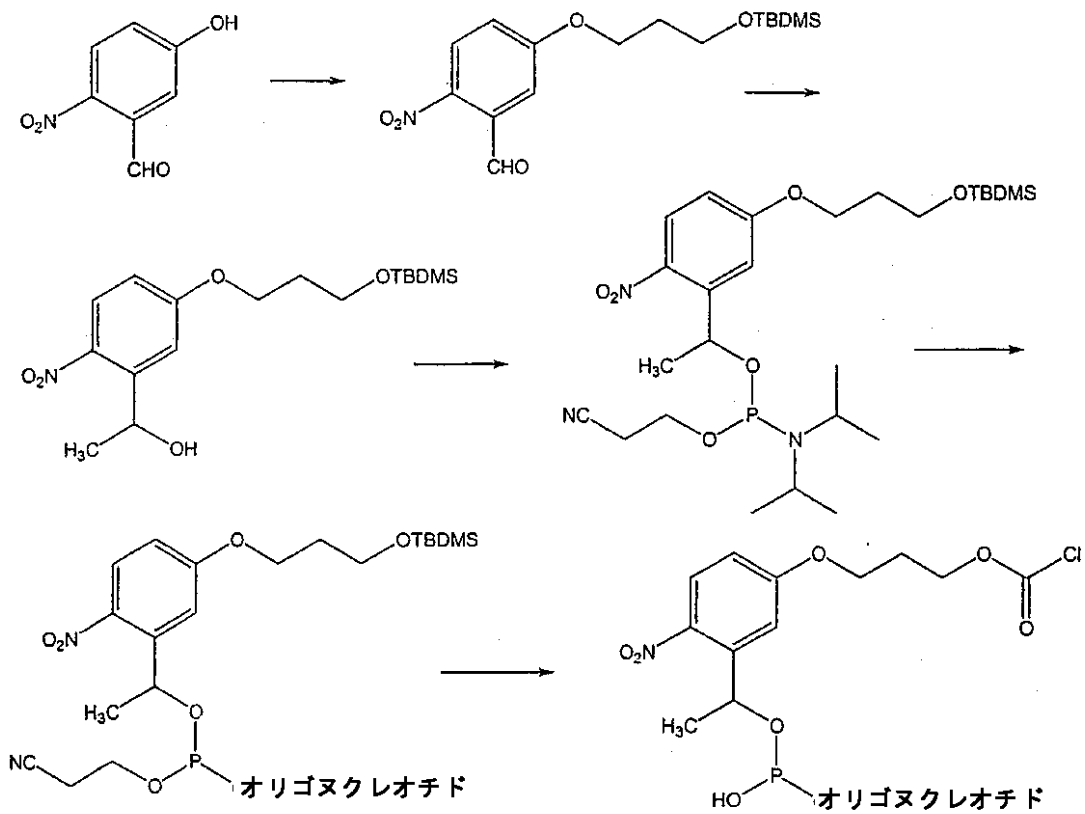
30

【0334】

光切断性可能なリンカーを含む本明細書で提供される化合物の合成のためには、2-ニトロ-5-ヒドロキシベンズアルデヒド(すなわち、Lの前駆体)を、例えば、3-プロモ-1-プロパノールと反応させて対応するエーテル-アルコールを得る。次いで、このアルコールを例えば、対応するtert-ブチルジメチルシリルエーテルのように保護する。この化合物のトリメチルアルミニウムとの反応により、対応するベンジルアルコールを得、これを上記の手順を用いてそのホスホルアミダイトへと誘導体化する。このアミダイトをオリゴヌクレオチド(すなわち、Q)と反応させた後、保護基を除去し、得られたアルコールを対応するクロロホルメート(すなわち、X)へと誘導体化する。

40

【化39】



10

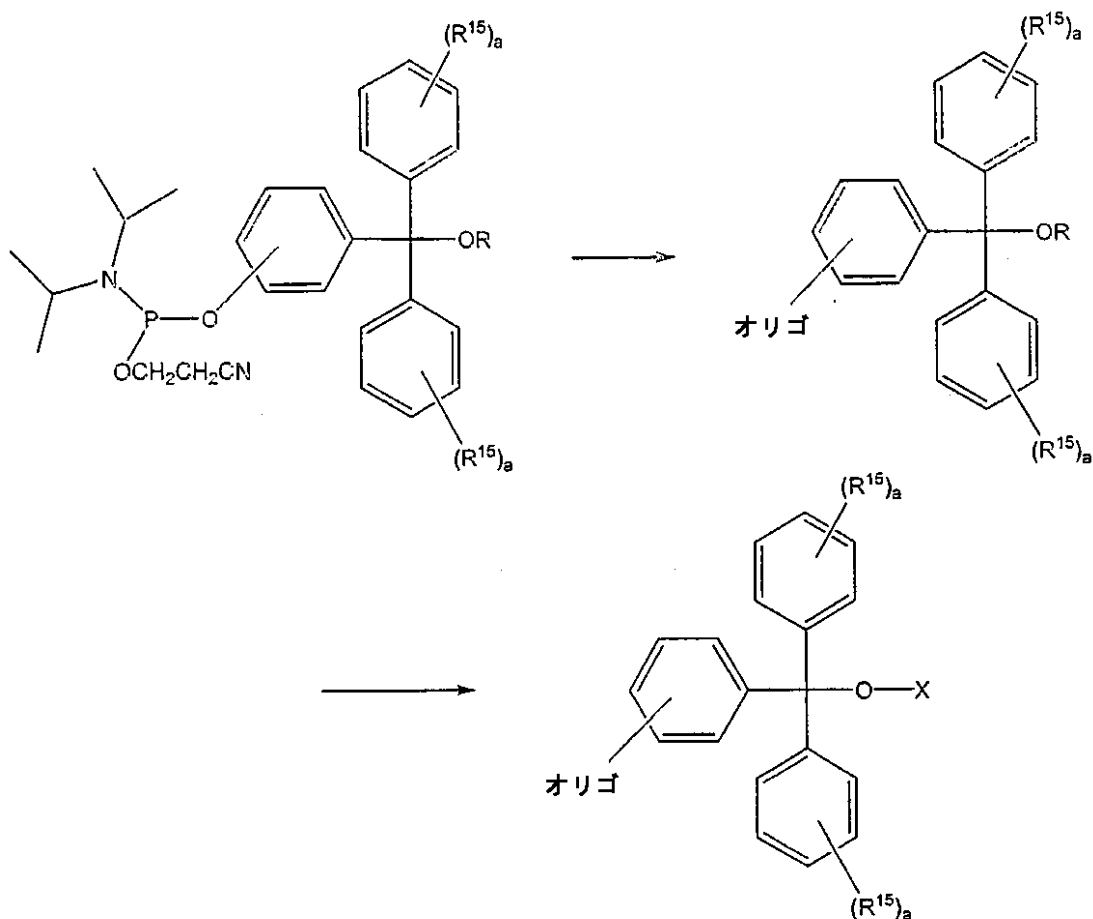
20

【0335】

酸不安定性リンカー、例えば、ヘテロ二官能性トリチルエーテルを含む、本明細書で提供される化合物の合成のためには、必要なホスホルアミダイトトリチルエーテルを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と反応させた後、トリチルエーテルを脱保護し、上記のように、生体分子(例えば、タンパク質)をアルコール(X)の反応性誘導体によってアルコールで捕獲する。

30

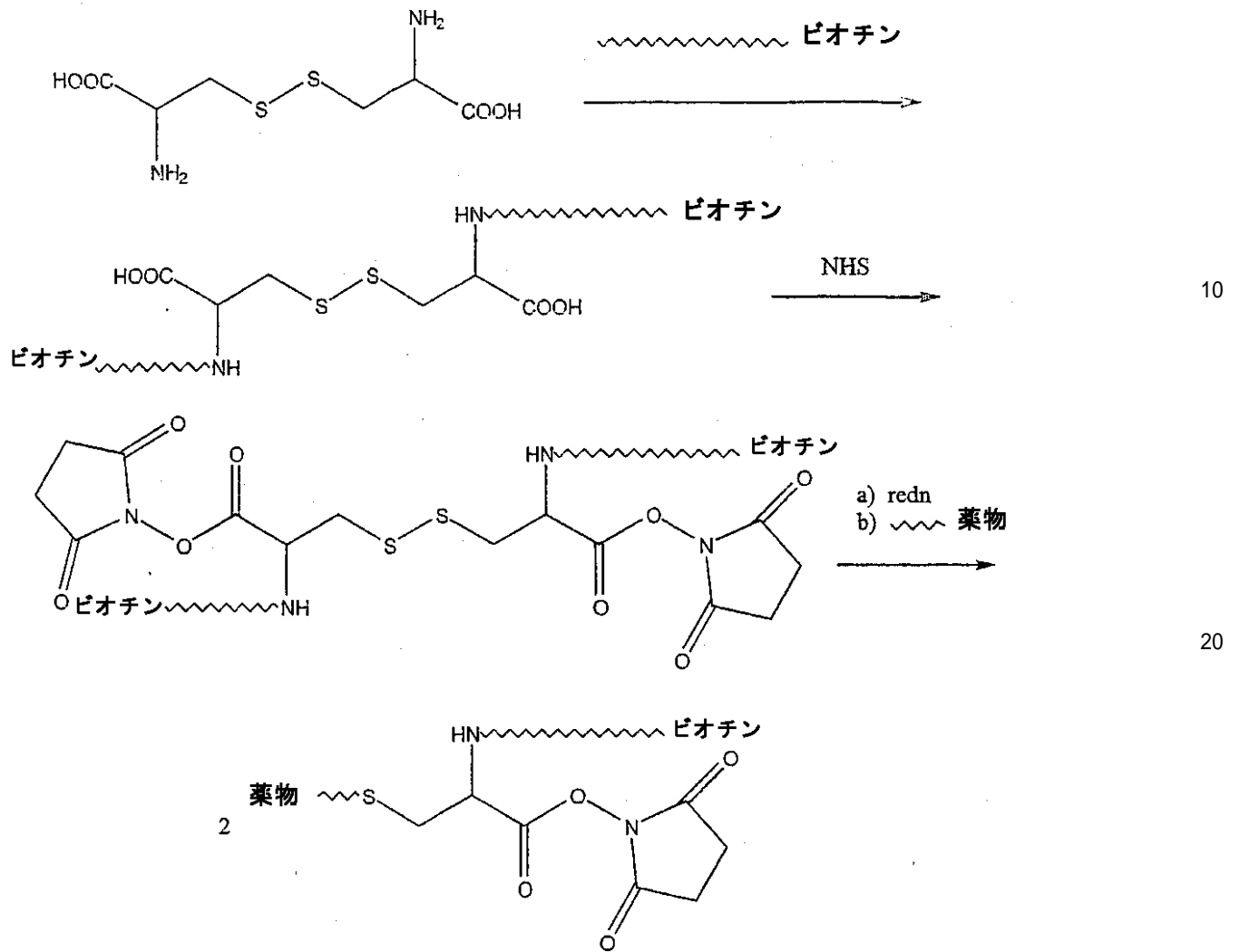
【化40】



【0336】

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、シスチンとビオチン-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。

【化41】



10

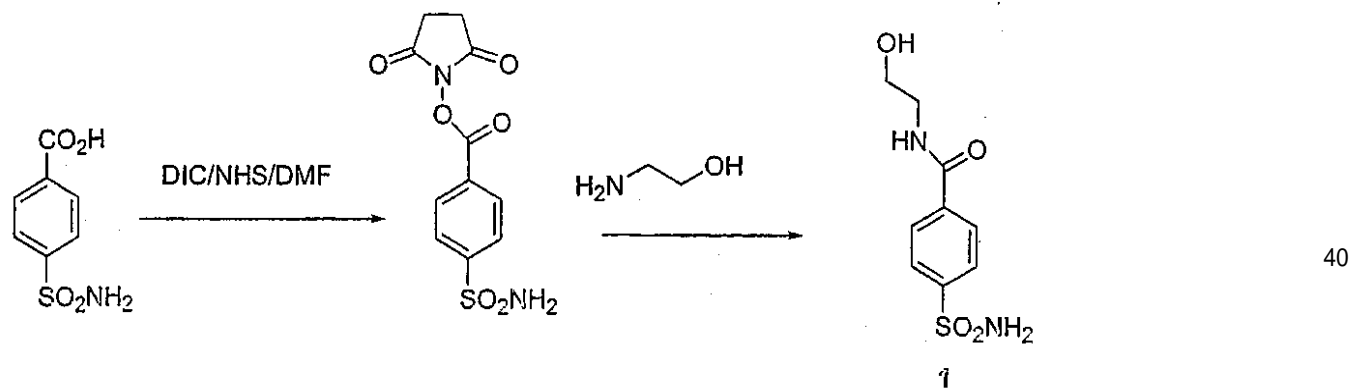
20

30

【0337】

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：

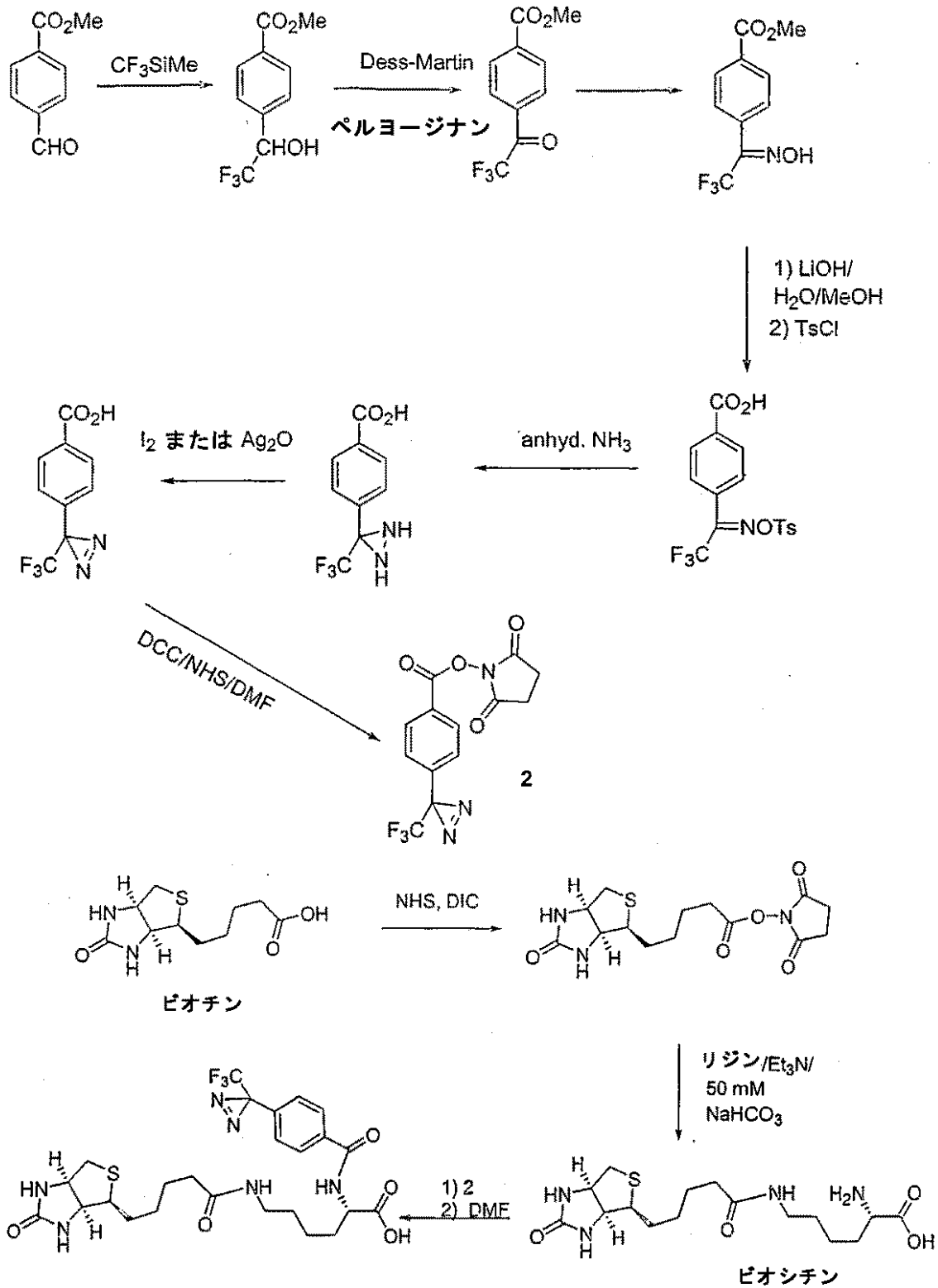
【化42】



40

1

【化43】



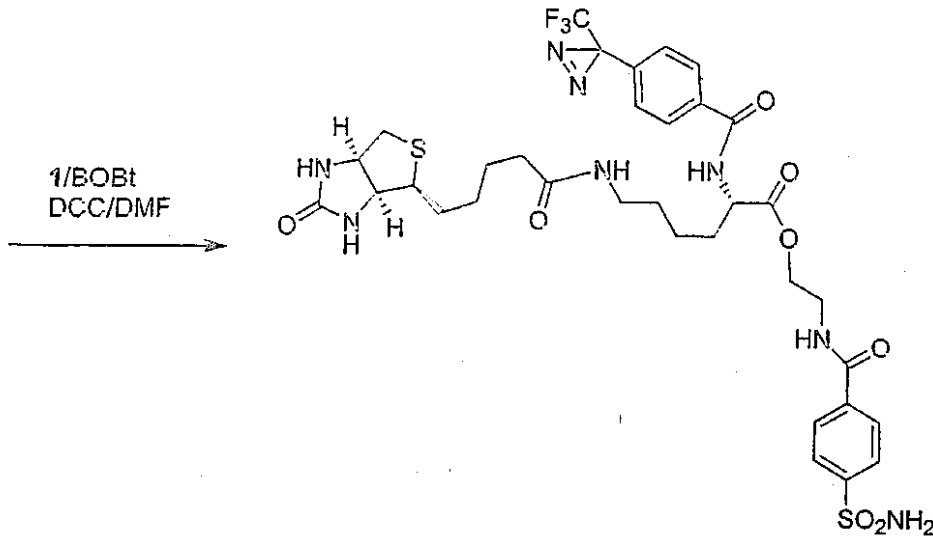
10

20

30

40

【化44】

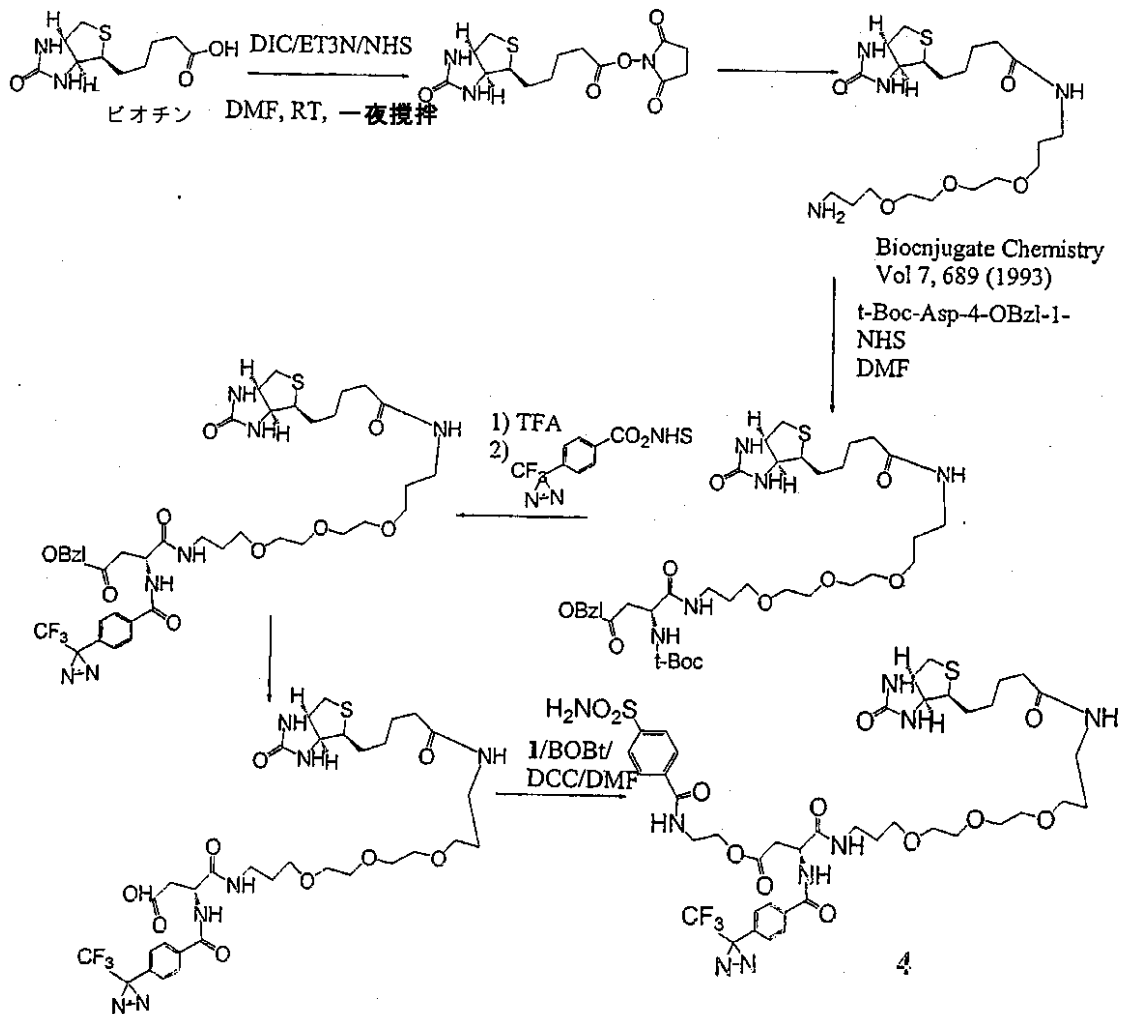


10

【0338】

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45】



20

30

40

【0339】

50

上記の合成は単なる例である。当業者であれば本開示内容の範囲内の他の化合物を合成するために上記の合成を日常的に行われる様式で変更できるであろう。本明細書で提供される捕獲化合物の合成は当業者の技量の範囲内である。

【0340】

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、限定されるものではないが、タンパク質混合物をはじめとする生体分子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、生化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。

10

【0341】

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20a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。実施例9および図20b~fは種々の捕獲化合物および既知のタンパク質を用いる例示的なアッセイの結果を示す。

【0342】

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。

20

【0343】

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得る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、タンパク質のような生体分子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。

30

40

【0344】

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。

【0345】

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

50

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。

【0346】

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 $N^1_m B_i N^2_n$ 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。

10

【0347】

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。

20

【0348】

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じまたは類似の官能基を有するピオチニル化した小分子を、過剰な化合物野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。

【0349】

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_m 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。

30

【0350】

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替えることができる(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。

40

【0351】

他の実施形態では、異なるX部分を含有している試薬(例えば、アミノ - およびチオール反応性X基、抗体およびアミノ反応性X基、抗体およびレクチンX基など)の産物の選択的プールについて、一回のアッセイで(例えば、単一チップ上での)複合分析を行うことができる。

【0352】

図1は、MALDI - TOF質量分析計の使用によるタンパク質の複合混合物の選別および分析の例示的な方法を示す。本明細書に記載するような化合物を、限定するものではないがタ

50

ンパク質(P1~P4)を含む生体分子の混合物に曝露することにより、化合物 - タンパク質アレイが得られる(NA=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、L=切断可能なリンカー、P=タンパク質)。アレイの分離は、アレイのQ部分を、支持体に結合した相補配列、例えば、オリゴヌクレオチドチップへハイブリダイゼーションさせることによって行う。次いで、タンパク質(P1~P4)をMALDI - TOF質量分析計によって分析する。

【0353】

限定するものではないがタンパク質を含む生体分子の混合物の複雑性が低い場合には、アフィニティークロマトグラフィーまたはアフィニティー濾過法を適用してタンパク質混合物から化合物 - タンパク質産物を分離することができる。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xy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。

10

【0354】

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。

20

【0355】

MALDIを実施する方法は当業者には公知である。分解能を向上させる多数の方法もまた知られている。例えば、MALDI TOF質量分析計の分解能は、イオン抽出の際の高エネルギー衝突の回数を減少させることによって向上させることができる(例えば、Juhaszら(1996) Analysis, Anal. Chem. 68: 941~946頁参照、また、MALDIおよび遅延引き出しプロトコルの説明については、例えば、米国特許第5,777,325号、同5,742,049号、同5,654,545号、同5,641,959号、同5,654,545号、同5,760,393号および同5,760,393号も参照)。分析前に、分析する分子の、または捕獲化合物が結合した生体分子のコンディショニングを行ってもよい。

30

【0356】

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(O - TOF)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、多数のマトリックス/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。

40

【0357】

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

50

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。

【0358】

複合タンパク質混合物は選択的に分析することができ、種々の官能基Xを有する化合物を用いて、すべてのデータをあわせて取ることで完全に分析することができる。生物学的起源の混合物中に存在するタンパク質は、すべてのタンパク質がその表面に存在する反応性官能基を有しているので検出することができる。化合物-タンパク質アレイ上の各位置に、固体支持体には共有結合しないが内部分子量標準となる、Lと同じ条件下に切断可能な同一のタンパク質が存在するか、またはそれを加えると、各タンパク質(またはタンパク質アレイが酵素によって消化された場合にはペプチド)の相対量を求めることができる。この方法により、健常および疾病個体由来の組織を比較する場合に、または同一組織を異なる生理学的条件下で比較した際に(例えば、時間依存性研究)、発現されたタンパク質の変化を検出することができる。この方法によるとまた、例えば、レーザーバイオプシーによって得ることができる、組織の種々の切片(例えば、腫瘍)を比較した際にも、発現されたタンパク質の変化を検出することができる。

10

【0359】

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。

20

【0360】

周知のツーハイブリッド法を用いる分析も可能であり、質量分析計によって検出することができる。例えば、米国特許第5,512,473号、同5,580,721号、同5,580,736号、同5,955,280号、同5,695,941号を参照。また、Brentら(1996)Nucleic Acids Res. 24(17):3341~3347頁も参照。

【0361】

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

【0362】

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いずれかを行うこともできる。

【0363】

50

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。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、個別の実験(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。

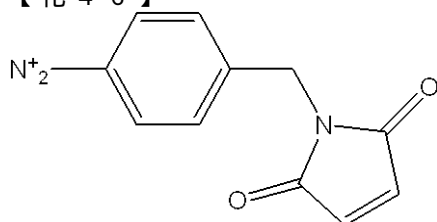
【0364】

他の実施形態では、本方法は、限定されるものではないが、タンパク質をはじめとする、分析される生体分子に、1種以上(1つの実施形態では3~5種)の本明細書で提供された化合物を用いてタグをつけることによって実施する。そのような化合物は、高分子特徴ではなく生体分子のより小さな化学的特徴を標的とするよう設計された官能基を有する。例えば、図3参照。そのようなより小さな化学的特徴としては、限定されるものではないが、 NH_2 、SH、SS(SH、SSをキャップした後、例えば、金によって標的とされ得る)およびOHが挙げられる。1つの限定するものではない例では、ジアゾ化合物、例えば、アリアルジアゾニウム塩を用いてチロシンのフェノール性OHを選択的に捕獲する。この実施形態では、反応を水中で行うことができる。例えば、官能性を持たせたジアゾニウム塩を用いてもよく、これでは官能基がその後の本明細書で提供された化合物の捕獲を可能にすることによって、オリゴヌクレオチド標識された生体分子が提供される。1つのそのような官能性を持たせたジアゾニウム塩は

10

20

【化46】



である。

【0365】

次いで、この試薬で修飾された生体分子を、ジエン残基を保有しているオリゴヌクレオチドで標識する。当業者には、ジエノフィル/ジエン以外の多数の試薬対をこれらの実施形態で用いることができることは明らかである。ジエノフィル/ジエンの場合には、ジエノフィルのジエンとの反応は、 NH_2 基と反応するN - ヒドロキシスクシンイミド活性化オリゴヌクレオチドをはじめとする多数の他の官能基の存在下で行うこともできる。したがって、これらの2標識特異的反応を1つの反応において行うことができる。例えば、図5参照。

30

【0366】

続いて、多重にタグをつけられた生体分子をアンチセンスオリゴヌクレオチドのアレイ、1つの実施形態では、アンチセンスオリゴヌクレオチドのアレイを含有するチップ上にハイブリダイズさせる。そのような多重にタグをつけられた生体分子は、単一のタグをつけられた生体分子よりも大きな選択性で選別することができる。例えば、図4参照。

40

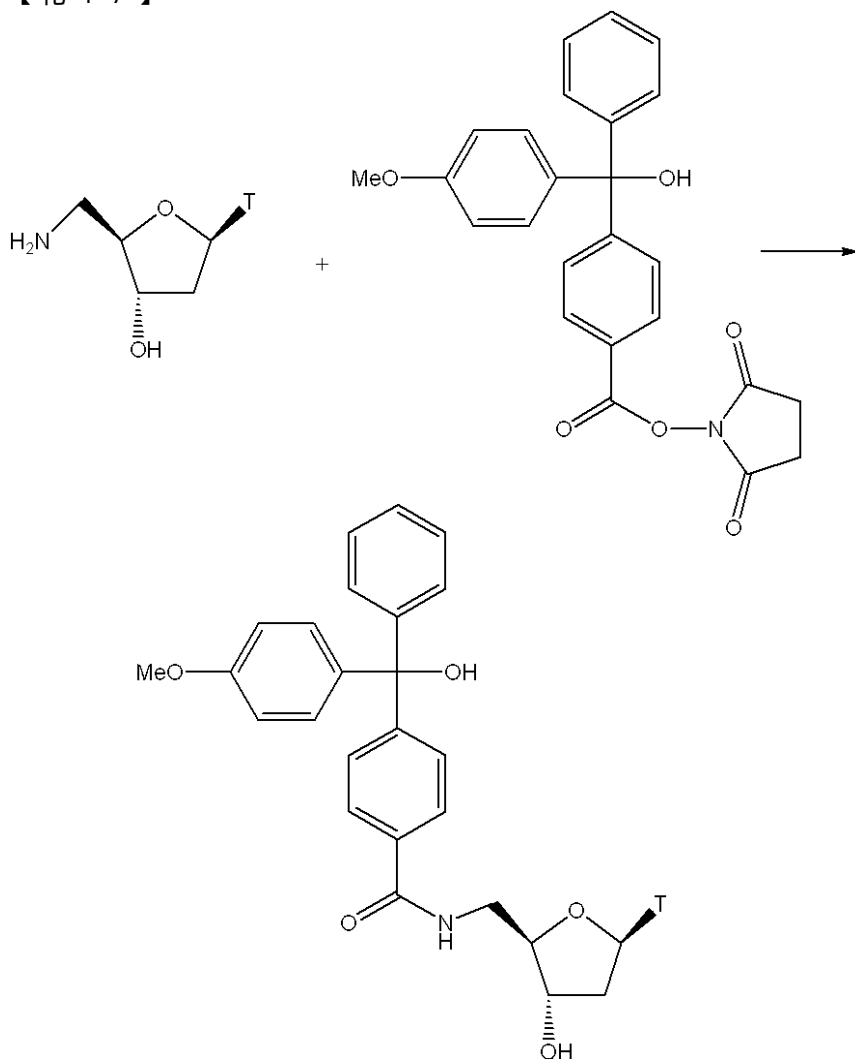
【0367】

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。有機共溶媒が必要であるかどうかを調べるには、本明細書で提供される化合物の水溶性アミン、例えば、5' - アミノチミジンとの反応速度を測定する。例えば、当業者に周知の種々の溶媒混合物を用いて以下の反応を実施して、その

50

後の生体分子のタギングおよび分析に最適な条件を決定する。

【化 4 7】



10

20

30

【0368】

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く、むしろサンプル中の変化を検出または同定するからである。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。

40

【0369】

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onder対ノンレスポonderを有する細胞を分離する。さらに、バックグ

50

ラ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。

【0370】

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。実施例6は細胞が分離される例示的な実施形態を提供する。図19も参照。

10

【0371】

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、薬剤レスポンドーおよびノンレスポンドー(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るが、

20

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。

【0372】

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、表現型に関係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。

30

【0373】

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、

40

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)。

【0374】

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。

【0375】

a) 例示的な分離法

50

1) Laser Capture Microdissection

Laser Capture Microdissection(LCM)(Arcturus, Inc Mountain View, CA)では、目的の選択した細胞上でプラスチックキャプチャーフィルムを活性化するための低エネルギーIRレーザーと組み合わせた顕微鏡プラットフォームを用いる。次いで、細胞を周囲の組織からゆっくりと持ち上げる。このアプローチはマイクロダイセクションされた細胞または周囲の組織によるあらゆるレーザー照射の吸収を防ぐことによって、下流での分析のためにマイクロダイセクションされたサンプルから調製された、RNA、DNAおよびタンパク質の完全性を確実なものとする。

【0376】

2)分離のためのフローサイトメトリー

フローサイトメトリーは蛍光顕微鏡観察と幾分か類似している方法であり、ここでは、最大1秒当たり数千粒子までの速度で、集束レーザービームを通して一度に1個が流れる液体懸濁液中の粒子(細胞)について測定を実施する。粒子(細胞)による光の散乱および発生する蛍光を集め、フィルターに通し、デジタル化し、分析のためにコンピューターに送る。通常は、フローサイトメトリーは蛍光色素標識したプローブの細胞への結合を測定し、得られた蛍光を染色されていない細胞のバックグラウンド蛍光と比較する。細胞はフローサイトメトリーの変法、フローソーティングを用いて分離することもでき、ここでは、粒子(細胞)を、懸濁液からフロー中で測定された特性に基づいて分離回収する。フローソーティングによって回収される細胞は生存可能であり、滅菌条件下で回収することができる。通常は、回収される小集団は99.5%を超えて純粋である(図19aおよび19b参照)。

10

20

【0377】

フローサイトメトリーでは、細胞に関連する物理的および/または化学的特徴または細胞が関係している試薬もしくはプローブの特性をはじめとする種々のパラメーターを用いて細胞を区別することが可能であり、そのいずれもが機器センサーによって測定される。分離：細胞集団の予備同定およびゲーティングのために生存対死前方および側方散乱を用いる。散乱パラメーターは細片、死細胞および望ましくない凝集塊を除くために用いる。末梢血または骨髓サンプルでは、前方および側方散乱に基づいて、リンパ球、単球および顆粒球集団を既定し、別個にゲーティングし、分析することができる。フローソーティングによって回収される細胞は生存可能であり、滅菌条件下で集めることができる。通常、回収される小集団は99.5%を超えて純粋である。

30

【0378】

一般的な細胞ソーティング実験は、通常、免疫蛍光アッセイ、すなわち、抗原を検出するための、細胞の、蛍光色素に結合させた抗体での染色を含む。さらに、ソーティングは、所定の遺伝子/構築物を発現する細胞の純粋な集団を単離するためにGFPレポーター構築物を用いて行うことができる。

【0379】

a. 蛍光

蛍光パラメーター測定では、直接染色、蛍光色素標識したプローブ(例えば、抗体)との反応、または蛍光タンパク質の発現に基づいて細胞構造および機能を調べることができる。蛍光シグナルは、異なるレーザー励起および蛍光発光波長に相当する単一のパラメーターとして測定してもよいし、複数のパラメーターとして測定することもできる。異なる蛍光色素を同時に用いる場合には、蛍光チャンネルの間に単一の溢流が生じ得る。これは補償によって補正する。蛍光色素の特定の組み合わせは同時に用いることができないが、当業者であればそのような組み合わせは特定できる。

40

【0380】

b. 免疫蛍光

免疫蛍光は、FITC(フルオレセイン)、PE(フィコエリトリン)、APC(アロフィコシアニン)およびPEベースのタンデム結合体(R670、CyChromeなど)などの蛍光色素に結合した抗体での細胞の染色を含む。細胞表面抗原がこのアッセイの通常標的であるが、抗体を、同様に、細胞質中の抗原またはサイトカインに対して指向させることもできる。

50

【0381】

DNA染色は、本来は細胞周期プロファイリングのために、またはアポトーシスを測定するための1つの方法として用いる。ヨウ化プロピジウム(PI)は最も一般的に用いられるDNA染色剤であり、生細胞に侵入することができないので、パイアピリティーアッセイに用いることができる。PIを用いる細胞周期またはアポトーシスアッセイについては、染色を行うために細胞をまず固定しなければならない(プロトコール参照)。PI-DNA染色の相対量は、G0/G1、SおよびG2/M期の細胞の割合に対応し、染色量が少ないということはアポトーシス/壊死細胞を示す。PI染色は、アポトーシスまたは遺伝子発現をさらに特性決定するためのアッセイでは、特定の蛍光色素、例えば、FITCおよびGFPと同時に行うことができる。

10

【0382】

遺伝子発現およびトランスフェクションは、構築物中にレポーター遺伝子を用いることによって間接的に測定することができる。例えば、遺伝子/構築物を発現する細胞の集団を定量するためには、例えば、緑色蛍光タンパク質型構築物(EGFP、赤色および青色蛍光タンパク質)および β -ガラクトシダーゼを用いることができる。現在は、通常の周波数では励起できないが、異なる波長で蛍光を発するGFPの突然変異体も利用できる。これにより同時トランスフェクションの測定、ならびに遺伝子と抗体発現の同時検出が可能である。GFP型構築物に関する実験のための適切な負の(バックグラウンド)対照も含まれるべきである。対照としては、例えば、GFP型構築物を抜いた遺伝子インサートを用いる同一細胞種が挙げられる。

20

【0383】

3)代謝研究および他の研究

アポトーシスの初期段階にある細胞を同定するために、アネキシン-Vを種々の蛍光色素で標識することができる。CFSEは細胞膜に結合し、細胞が分裂する際に均等に分配される。その結果、一定時間内に細胞が受ける分裂数を計数することができる。CFSEは免疫蛍光のための特定の蛍光色素と組み合わせて用いることができる。ヨード-1マーカールを用いてカルシウム流入を測定することができる。これは免疫蛍光染色と組み合わせることもできる。カルセイン(calcein)またはヒドロエチジン(hydroethidine)などの色素の組み合わせを用いて細胞間結合アッセイを行うこともできる。

【0384】

b)細胞周期の同調化

選別した細胞または分離した細胞を得た後、これらを培養し、そして同調化または特定の代謝状態で凍結することができる。これによって、表現型特異的生体分子を同定する能力が増強される。そのような細胞はフローサイトメトリーによってをはじめとする上記の方法によって分離することができる。さらに、同一の細胞周期、同一の代謝状態、または他の同調化された状態にある細胞をフローサイトメトリーを用いてグループ分けすることもできる(図19c参照)。

30

【0385】

細胞周期は、限定されるものではないが、マグネシウム、亜鉛、マンガン、コバルトおよび/またはEDTAもしくは他のキレート剤によって特異的な機能を果たす他のイオンの除去などによる重要なイオンの細胞キレート化をはじめとする種々の方法によって同調化または凍結することができる(例えば、実施例参照)。他の方法としては、種々の代謝または生化学経路の制御が挙げられる。図18は細胞同調化のための代謝制御メカニズムの例示的な調節点を示す。同調化または細胞を同調化するための「凍結」代謝制御の例としては、限定するものではないが、以下を挙げる：

40

- 1) 遺伝子発現の制御、
- 2) 酵素反応の調節、
- 3) 負の制御：フィードバック阻害または最終産物抑制および酵素誘導がタンパク質の転写の減少をもたらす負の制御のメカニズムである、
- 4) 正の制御：代謝産物の抑制が、タンパク質の転写の増加に影響を及ぼすために、正の

50

制御の一形態と考えられている、

5) 個々のタンパク質翻訳の制御、

a) 5' キャップ部位にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドが mRNA とリボソーム 40S サブユニット間の最初の相互作用を阻害することによってタンパク質合成を阻害する、

b) 翻訳開始コドンを含む 5' UTR までとハイブリダイズするオリゴヌクレオチドが、40S (または 30S) サブユニットのスキャニングまたは全リボソーム (真核細胞については 80S もしくは細菌系については 70S) の組み立てを阻害する、

6) 翻訳後修飾の制御、

7) 活性部位が酵素の基質と結合し、産物に変換する、アロステリック酵素の制御。アロステリック部位が、基質ではないいくつかの小分子によって占有される。タンパク質が酵素である場合には、アロステリック部位が占有されると、酵素は不活性である、すなわち、エフェクター分子が酵素の活性を低下させる。数箇所の部位が、条件範囲にわたって酵素活性を調節する種々のエフェクター分子によって占有される多成分性アロステリック酵素もある。

10

【0386】

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。

20

【0387】

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。例えば、細胞溶解物を、ビオチンなどの反応基または選別基に連結させられた他の一般的な反応基を含む捕獲分子と接触させてそのような多量タンパク質を除去し、次いで、溶解物中に残存する低量化合物を同定するために適切な捕獲化合物の収集物を用いることができる。

30

【0388】

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。

40

【0389】

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

50

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。

10

【表 8】

疾病	不溶性タンパク質
アルツハイマー病(AD)	APP、A α 、 α 1-抗キモトリプシン、tau、非A α 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 ^{Sc}
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 α -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	β_2 -ミクログロブリン(microglobulin)
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
ハンチントン舞踏病	ハンチントン

20

【0390】

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。

30

【0391】

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る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。

40

【0392】

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。

50

【0393】

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。

【0394】

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(VI0 XX(登録商標))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。

10

【0395】

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。

20

【0396】

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。

30

【0397】

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の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: LIPI TOR(登録商標)(アトルバスタチンカルシウム)、CELEBREX(登録商標)(セレコキシブ)、VI0 XX(登録商標)(コキシブ(refecoxib))およびBAYCOL(登録商標)(セリバスタチンナトリウム)。

40

50

【0398】

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、ロックアウト/ロックイン、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ロックイン/ロ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。

10

【0399】

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。

20

【0400】

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。

30

【0401】

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かどうかを確認する。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。

40

【0402】

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る。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。

50

【0403】

(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。

【0404】

(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。

【0405】

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

・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

・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

・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(ii)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、オンチップ分子質量標準を含むかまたは含まない)を用いるスポット毎(spot-by-spot)のMALDI - TOF質量分析というステップを含む、生体分子アレイの分析。

【0406】

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

10

20

30

40

50

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(ii)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(spot-by-spot)のMALDI - TOF質量分析というステップを含む、生体分子アレイの分析。

【0407】

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。

10

【0408】

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。

20

【0409】

本明細書で提供されるシステムは、xy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)。

【0410】

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。

30

【0411】

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MTP1、2...n中に連続的にアリコートとする。

40

【0412】

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/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MTP1、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=1~96)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。

【0413】

50

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。

【0414】

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。

【0415】

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/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。

【0416】

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。

【0417】

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いて、健全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。

【0418】

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/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。

【0419】

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、分子量較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。例えば、1セットの実験では1種のX部分および種々のQ部分を含む1セットの化合物を用いる。このセットの実験からはプロテオームの一部のデータが得られるが、これはプロテオーム中のすべてのタンパク質が所定のX部分と反応するわけではないからである。このセッ

10

20

30

40

50

トの実験によるデータを、異なるX部分を用いた他のセットの実験によるデータと重ね合わせることで完全なプロテオームについてのデータが得られる。

【0420】

健常および疾病個体の組織または種々の生理学的もしくは発達段階(例えば、腫瘍進行、治療結果をモニターするための薬剤治療の依存性、ウイルスもしくは細菌感染に対する免疫応答)に由来する組織、あるいは種々の組織領域(例えば、腫瘍の)を比較するセットの実験を調べ、最終データを保存する。

【0421】

以下の実施例は例示の目的のためだけに含まれるものであって本発明の範囲を限定しようとするものではない。

10

【0422】

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、また以下の製造供給元から購入した：無水THF(Aldrich)、 CH_2Cl_2 (Aldrich, Acros, EM Science)、 CHCl_3 (Aldrich, Mallinckrodt)、ヘキサン(Acros, EM science)、酢酸エチル(Aldrich, Acros)、アセトン(Aldrich, EM science)、メチルアルコール(Aldrich)、ジエチルエーテル(Fisher scientific)、4-プロモ安息香酸(Aldrich)、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール(Acros)、1,3-ジシクロカルボジイミド(Aldrich)、N-ヒドロキシスクシンイミド(Aldrich)、マレイミド(Aldrich)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミドヒドロクロリド(Acros)、塩化チオニル(Aldrich)、ピリジン(Aldrich)、マグネシウム粉(Acros)、4-(ジフェニルヒドロキシメチル)安息香酸(Fluka)、ナトリウム・エトキシド(Acros)、炭酸カリウム、ヨウ化ナトリウム、四塩化炭素、ヨウ化メチル、RED-Al(Aldrich)、無水 Na_2SO_4 (Acros)、酢酸(EM science)、水酸化ナトリウム(Acros)、Molecular sieves $\text{A}^\circ 4$ (Aldrich)および塩化アセチル(Aldrich)。 ^1H NMRスペクトルデータは溶媒として CDCl_3 を用いて500MHz 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。

20

【実施例】

【0423】

実施例1

$\text{N}^1_m \text{B}_i \text{N}^2_n$ 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

$\text{N}^1 = \text{N}^2$ 、 $m = n = 4$ 、 $i = 3$ 、 $B = 64$ 通りの配列並べ替え

30

【化48】

GTGC ATG GTGC

AAG

ACG

【化 4 9】

AGG

TTG

CTG

GTG

...

...

...

GGG

10

【0 4 2 4】

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
 $N^1 \pm N^2$ 、 $m = n = 4$ 、 $i = 4$ 、 $B = 256$ 通りの配列並べ替え

【化 5 0】

GTCC ATCG CTAC

AACG

ACCG

AGCG

....

....

....

GGGG

20

30

【0 4 2 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 5 1】

GCTGCC ATTCGTAC GCCTGCC

 N^1

 B

 N^2

40

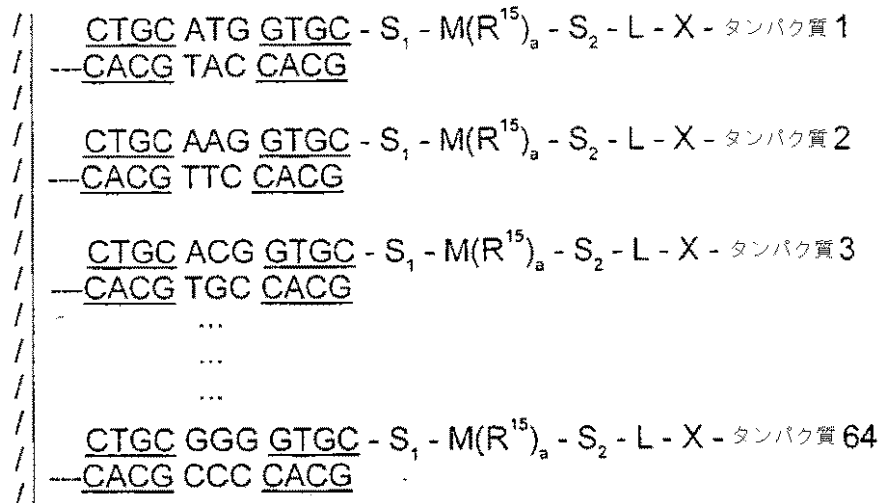
【0 4 2 6】

実施例 2

DNAアレイ上でのタンパク質の分離

$N^1_m B_i N^2_n (S^1)_t M (R^{15})_a (S^2)_b$ LX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52】



10

【0427】

実施例3

1. 細胞からの、または細胞もしくは組織から調製されたcDNAライブラリーのタンパク質翻訳によるタンパク質混合物の調製

20

タンパク質混合物は物理的または生化学的分離技術によって選択的に分離することができる。

1. 細胞培養物または組織を用いる、複雑度が限定されたタンパク質プールの調製

タンパク質は当業者に周知の方法に従って細胞培養物または組織から単離することができる。単離したタンパク質は、当業者に周知の方法(例えば、TPAE、示差的タンパク質沈殿(塩、pHおよびイオン性ポリマーによる沈殿)、示差的タンパク質結晶バルク分画、電気泳動(PAGE、等電点電気泳動、キャピラリー)およびクロマトグラフィー(イムノアフィニティー、HPLC、LC))を用いて精製する。複雑性が限定されたタンパク質混合物を含有する個々のカラム画分を抗原として用いるために回収する。

【0428】

30

2. cDNA発現ライブラリーを用いる複雑性が限定されたタンパク質プールの調製(図6)

a. RNA単離

i. 全RNAの単離

培養細胞または組織を、4Mのグアニジンチオシアネートを含む変性溶液中でホモジナイズする。次いで、ホモジネートを順に、2Mの酢酸ナトリウム(pH4)、フェノールおよび最後にクロロホルム/イソアミルアルコールまたはプロモクロロプロパンと混合する。得られた混合物を遠心分離し、全RNAを含む上側の水層を得る。イソプロパノール沈殿の後、RNAペレットを変性溶液(4Mのグアニジンチオシアネートを含む)に溶解させ、イソプロパノールで沈殿させ、75%エタノールで洗浄する。

【0429】

40

ii. 細胞質RNAの単離

細胞を氷冷リン酸緩衝化生理食塩水で洗浄し、その後のすべての操作のために氷上に維持する。回収した細胞のペレットを、非イオン性界面活性剤Nonidet P-40を含む溶解バッファーに再懸濁する。原形質膜の溶解がほぼ瞬時に生じる。短時間微量遠心機で回転させることによって無傷の核を除去し、細胞質上清にドデシル硫酸ナトリウムを加えてタンパク質を変性させる。タンパク質をプロテアーゼで消化し、フェノール/クロロホルムおよびクロロホルム抽出によって除去する。細胞質RNAをエタノール沈殿によって回収する。

【0430】

b. mRNA精製

50

メッセンジャーRNAを、標準的な手順を用いて全RNAまたは細胞質RNA沈殿から精製する。mRNAのポリ(A)テールへのオリゴ(dT)結合によってポリ(A)+RNAを全RNAから分離することができる。ポリ(A)(ポリアデニル化)テールを露出させるために全RNAを変性させる。次いで、ポリ(A)を含有しているRNAをオリゴ(dT)でコーティングされている磁性ビーズに結合させ、磁力によって全RNAまたは細胞質RNAから分離する(spirited)。mRNA集団は、5'キャップを含有しているmRNA種の選択によって全長分子の存在についてさらに濃縮することができる。

【0431】

c. cDNA合成

種々の種類のプライマーを、単離したmRNAから全長または5'末端を含有しているcDNAライブラリーを合成するために用いることができる。 10

i. オリゴ(dT)プライマー、これにより全mRNA種についてのcDNAが得られる(図7)

適応させたオリゴdTをプライマーとするcDNAライブラリーの作製の一例を図7に提供する。

【0432】

ii. 官能性タンパク質モチーフ特異的変性オリゴヌクレオチド、これらのプライマーにより、数が限定された、同一タンパク質ファミリーに属するか、官能基関連性タンパク質の遺伝子が得られる(図8)

適応させた配列モチーフ特異的cDNAライブラリーの作製の一例を図8に提供する。

【0433】

iii. 遺伝子特異的オリゴヌクレオチドからは1種のmRNA種のみ得られる(図9) cDNA作製に用いるオリゴヌクレオチドはさらなる配列、1)組換えタンパク質の精製を容易にするためのタンパク質タグ特異的配列(6×His)、2)制限酵素部位、3)cDNA精製またはDNA構築の目的のために改変された5'末端(図10)を含むことができる。

【0434】

ベクターへ挿入するためにmRNAの二本鎖cDNAへの変換を2段階で実施する。最初に、オリゴヌクレオチドプライマーとハイブリダイズさせた無傷のmRNAを逆転写酵素によってコピーし、産物をフェノール抽出およびエタノール沈殿によって単離する。RNA-DNAハイブリッド中のRNAをRnase Hを用いて除去し、同時に大腸菌(E. coli)DNAポリメラーゼIによってギャップを埋める。このようにして得た、第2の鎖断片を大腸菌DNAリガーゼによって連結する。RNアーゼ H、RNアーゼ A、T4DNAポリメラーゼおよび大腸菌DNAリガーゼを用いて、第2の鎖合成を完了し、残存するRNAを分解し、cDNAを平滑末端とする。 30

【0435】

d. アダプター連結

アダプター分子を平滑末端化した二本鎖cDNAの両末端に、またはこのcDNAの一方の末端にのみ連結することができる。部位特異的なアダプター連結は、cDNA合成の際に、cDNAの3'末端とのアダプター連結を妨げる、5'修飾(例えば、ピオチン化、アミノ化)されたオリゴヌクレオチドにより行うこともできる。得られるcDNA分子は5'非翻訳領域、メチオニンをコードする翻訳開始コドンAUG、次いで、遺伝子(単数または複数)のコード領域からなる5'末端cDNAライブラリーを含む。cDNA分子には、その5'および3'末端に既知のDNA配列が隣接している(図14、15および16)。 40

【0436】

e. cDNA増幅

既知の5'および3'末端配列または既知の内部配列に対するPCRプライマーを合成し、伸長した5'または3'増幅プライマーをcDNA分子の反対側に位置するプライマーと組み合わせるcDNAの完全ライブラリーまたは特定の小集団のいずれかの増幅に用いることができる(図11)。

【0437】

f. 遺伝子小集団の増幅用のプライマー設計

小集団プライマーは2つの部分(図12)を含む。プライマーの5'部分は既知配列の配列に 50

対して相補的であり、その3'末端は未知のcDNA配列へと伸びている。ライブラリーのcDNA部分のそれぞれのヌクレオチドはアデノシン、シチジン、グアノシンまたはチミジン残基を含むことができるので、各ヌクレオチド位置には4種の異なるヌクレオチドが存在する可能性がある。各々が同一の既知配列を含み、1個のヌクレオチドがライブラリーのcDNA領域へと伸びている、4種の異なる増幅プライマーを合成することができる。4種のプライマーはその3'末端ヌクレオチドのみが異なっており、A、C、GまたはTのいずれかである。各ヌクレオチド(A、C、G、T)がDNAのひと続きの中に等しく現れると考えると、4種の増幅プライマーの各々はcDNAライブラリー中に提示される全遺伝子の四分の1を増幅することとなる。増幅プライマー配列をさらに伸ばし、増幅プライマーの数を増加させることにより、増幅産物の複雑性をさらに低下させることができる。配列を2ヌクレオチド伸ばすためは16種のプライマーの合成が必要であり、これにより複雑性は16倍低下し、3ヌクレオチドには64種のプライマーが必要であり、ヌクレオチドの伸長には n^4 種の異なるプライマーが必要である。

10

【0438】

g. PCR増幅

PCR増幅には、鋳型DNAを2種の適切なオリゴヌクレオチドプライマー(相補的な方向に向けられた、既知の付加配列中に位置する5'および3'末端プライマー)、Tagまたは他の熱安定性DNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオシド三リン酸(dNTP)およびバッファーを混合することが必要である。PCR産物を、サイクリング後に、DNAゲル上でまたはジーンスキャン分析ソフトウェアを用いるABI377での分析によって分析する。これらの分析法により、増幅されたcDNAプールの複雑度を決定することができる。

20

【0439】

h. タンパク質発現ライブラリーの作製

それぞれの増幅されたcDNAライブラリー小集団を細菌(*E. coli*など)または真核生物(バキュロウイルス、酵母、哺乳類)タンパク質発現系に5'から3'の方向でクローニングする。遺伝子を、3つのフレーム全てに、その自身の翻訳開始シグナルおよび6×Hisタグとともに導入する。例えば、cDNAを2種の異なる、レアカッピング制限酵素(5'末端BgIIIおよび3'末端NotI)で処理し、バキュロウイルストランスファーベクターpVL1393の、多角体プロモーターの直接制御下に5'から3'方向にクローニングする。

30

【0440】

i. タンパク質の発現

直鎖状にしたバキュロウイルスDNAおよび組換えトランスファーベクターDNAを、リン酸カルシウムを用いて感受性Sf9昆虫細胞に同時トランスフェクトする。同時トランスフェクションのために、10 μ gの精製プラスミドDNAを準備する。最初の組換えバキュロウイルスストックを準備し、組換えタンパク質の生産のためにSf9細胞を感染させる。

【0441】

j. タンパク質の精製

発現された組換えタンパク質はアフィニティータグ(例としては6×Hisタグがある)を含む。これらをNi-NTAアガロース上で精製する。通常は、1リットルの昆虫細胞培養液当たり、約1~2mgの6×His組換え融合タンパク質を得る。

40

【0442】

k. 精製タグの除去

発現ベクターまたは増幅プライマーがトロンビンのタンパク質分解性切断部位を含むように構築されている場合には、タンパク質のアフィニティー精製ステップの後に組換えタンパク質から精製タグを除去することができる。

【0443】

11. 個々のタンパク質混合物での種々の動物の免疫化による抗体の作製

3. 抗体タンパク質捕獲試薬の調製

cDNAのプールから翻訳された精製タンパク質調製物を、アジュバントの存在下で、選択した種の動物(ウサギ)に筋内、皮内または皮下注射する。追加免疫を初回免疫の4~8週間

50

後に開始し、2~3週間間隔で続ける。ポリクローナル抗血清を当業者に公知の標準法を用いて精製する。

【0444】

精製した抗体バッチを修飾せずに、タンパク質捕獲試薬として直接用いることができる。この場合には、種々の動物由来の抗体バッチは別々に維持しなくてはならない(それぞれのバッチが1種の捕獲試薬である)。

【0445】

III. 抗体タンパク質を単離し、最初の抗原調製物に対応する核酸配列と結合させて、抗体捕獲試薬を得る

複合タンパク質混合物を固相上で選別するための二官能性捕獲/選別分子の作製。

ポリクローナル抗体のグリコシル化 C_H^2 ドメインを標準的な結合法を用いて5'修飾オリゴヌクレオチドに結合させる。得られた分子は1つのタンパク質捕獲部分(抗体)と1つの核酸部分(オリゴヌクレオチド)を含む(図13)。

【0446】

動物を複雑性の低いタンパク質プールで免疫化した後、抗体バッチを1種のオリゴヌクレオチド配列に結合させる。種々のタンパク質プールでの複数の免疫化事象により生じた抗体を異なる配列を含むオリゴヌクレオチドに結合させる(図13)。

【0447】

4. 反応性官能基およびオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションによる選別を用いる標的タンパク質の捕獲

固体支持体に結合させたオリゴヌクレオチドを作製するために、2種の異なる方法が開発されている。これらは、*in situ*で合成することができ、また予め合成し、支持体に結合させることもできる。いずれの場合でも、二本鎖を形成させるために、液相中でのオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション反応に支持体に結合させたオリゴヌクレオチドを用いることができ、次いで、溶液中の過剰のオリゴヌクレオチドを洗い流すことができる。

【0448】

支持体は粒子、例えば、ガラス球または磁性ビーズの形態であることができる。この場合には、反応はチューブ内、マイクロタイタープレートのウェル内で行うことができる。オリゴヌクレオチドを合成する方法および予め合成したオリゴヌクレオチドをこれらの物質と結合させる方法は公知である(例えば、Stahlら(1988)*Nucleic Acids Research* 16(7): 3025~3039頁参照)。

【0449】

a. アミン官能性をもたせた固体支持体の調製

アミン官能性を持たせたガラス支持体上で既定の配列のオリゴヌクレオチドを合成する。アミン官能基を、10mlの95%エタノール中の700 μ lの $H_2N(CH_2)_3Si(OCH_2CH_3)_3$ の溶液を用いて、室温にて3時間スライドガラス上の別個の位置に結合させた。処理した支持体をメタノールで1回、次いで、エチルエーテルで1回洗浄する。支持体を室温で乾燥させ、次いで110 $^{\circ}C$ にて15時間ベーキングした。次いで、水、メタノールと水で洗浄し、さらに乾燥させた。

【0450】

スライドガラスを2mlの無水ピリジンおよび61mgの4-ジメチルアミノピリジンの存在下で250mg(1ミリモル)の無水フタル酸と室温にて30分間反応させた。

【0451】

生成物を二塩化メチレン、エチルアルコールおよびエーテルでかるくすすぎ、次いで乾燥させた。スライド上のこの生成物を330mgのジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)と室温にて30分間反応させた。溶液をデカントし、2mlの二塩化メチレンに溶かした117mgの6-アミノ-1-ヘキサノールの溶液で置換し、次いで、室温にて約8時間静置した。

【0452】

b. 固体支持体上でのオリゴヌクレオチドの合成

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチド合成のために、3mlの無水ピリジンに溶かした400mgの無水コハク酸および244mgの4-ジメチルアミノピリジンで室温にて18時間処理することによってアミン官能性を持たせた固体支持体を調製した。この固体支持体を3ミリモル(330mg)のDCCおよび3ミリモル(420mg)のp-ニトロフェノールを含有する2mlのDMFで室温にて一晩処理した。このスライドをDMF、CH₃CN、CH₂Cl₂およびエチルエーテルで洗浄した。2mlのDMFに溶かした2ミリモル(234mg)のH₂N(CH₂)₆OHの溶液をスライドと一晩反応させた。この反応の生成物を支持体、-O(CH₂)₃NHCO(CH₂)₂CONH(CH₂)₅CH₂OHとした。このスライドをDMF、CH₃CN、メタノールおよびエチルエーテルで洗浄した。

【0453】

ガラス支持体の調製によって得られた官能性のあるエステルをオリゴヌクレオチド配列の合成に用いた。ヌクレオチド残基のそれぞれを、既知の手順にしたがってホスホルアミダイトとして加えた(例えば、米国特許第4,725,677号および同5,198,540号およびRE34,069参照、Caruthersら、米国特許第4,415,732号も参照)。

10

【0454】

5. 捕獲されたタンパク質のタンパク質分析および複合タンパク質サンプルの比較

精製抗体バッチは1)固体支持体に直接結合させられており、タンパク質サンプルとともにインキュベートしてもよいし、2)サンプルとともにインキュベートし、次いで捕獲化合物を用いずに固体支持体に結合させてもよいし、または3)捕獲化合物を用いてサンプル中のその対応するタンパク質を捕獲し、次いで、特異的ヌクレオチドハイブリダイゼーションによって捕獲されたタンパク質を選別するのいずれであってもよい(図14)。

20

【0455】

IV. アンチセンスオリゴヌクレオチド捕獲試薬を、固体表面の別の既知の位置に固定化して抗体捕獲アレイを作製する

6. 捕獲アレイ表面の調製

5'アミノ化オリゴヌクレオチドをホスホルアミデート化学を用いて合成し、N-オキシスシンイミド(N-oxysuccinimide)エステルに結合させる。結合させたオリゴヌクレオチド配列は二官能性抗体分子の選別オリゴヌクレオチドと相補的である(図13)。タンパク質を、固体表面上に結合させた相補配列オリゴヌクレオチドへのこれらの選別オリゴヌクレオチドの核酸ハイブリダイゼーションによって捕獲する。

30

【0456】

V. 抗体捕獲試薬を全タンパク質混合物に加える(反応性ステップ)。次いで、この反応混合物をオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを可能にする条件下で固体表面アレイに加える(選別ステップ)。

7. 捕獲化合物/タンパク質捕獲および選別

抗体がその対応する抗原に結合することを可能にする条件下で二官能性抗体をタンパク質サンプルとともにインキュベートする。捕獲されたタンパク質を含む二官能性抗体分子をオリゴヌクレオチドを調製した捕獲アレイに加える。抗原-抗体結合を変化させない標準的なDNAアニリング条件下では、二官能性抗体はその核酸部分で相補オリゴヌクレオチドにハイブリダイズする。

40

【0457】

VI. 捕獲されたタンパク質をMALDI質量分析計を用いて同定する

8. 捕獲タンパク質の分析

結合したタンパク質を標準的なタンパク質分析法、例えば、質量分析を用いて分析する。

【0458】

実施例4

トリチルをベースとするタンパク質捕獲化合物の合成(図15参照)

A. 2-(4-プロモフェニル)-4,4-ジメチル-1,3-オキサゾリン、1の合成

還流冷却器をつけた500mLの丸底フラスコに入れた4-プロモ安息香酸(50g、0.25M)に150mLの塩化チオニルをを加え、8時間還流した。真空下で過剰の塩化チオニルを除去し、得

50

られた白色固体を100mlの無水 CH_2Cl_2 に溶解し、氷浴中で維持した。塩化プロモベンゾイルのこの氷冷溶液に別の100mLの無水 CH_2Cl_2 中に溶解させた45gの2-アミノ-2-メチルプロパン-1-オールを、攪拌しながら1時間かけて滴下した。氷浴を取り去り、反応混合物を室温にて一晩攪拌した。沈殿した白色固体を濾過し、 CH_2Cl_2 (4×100mL)で数回洗浄した。混合した CH_2Cl_2 を回転式エバポレーター下で除去し、得られた固体を150mLの塩化チオニルにゆっくりと溶解させ、3時間還流した。過剰の SOCl_2 を蒸発させて1/6容積とし、氷浴中で冷却した500mLの無水エーテルに注ぎ入れ、冷蔵庫で一晩維持した。エーテルを除去し、沈殿した塩酸塩を500mLの冷水に溶解させた。水溶液を冷条件で(氷浴)20% KOH溶液を用いて注意深く中和し、分離した褐色の油性残渣を CH_2Cl_2 (3×200mL)で抽出し、無水 Na_2SO_4 上で乾燥させた。溶媒を除去すると、黄色のオイルとして42g(67%)の2-(4-プロモフェニル)-4,4-ジメチル-1,3-オキサゾリンが得られた。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) ppm: 1.36(s, 6H), 4.08(s, 2H), 7.52(d, 2H), 7.79(d, 2H)。質量: 254.3(M^+)。 10

【0459】

B. フェニル-{3-[2-(テトラヒドロピラン-2-イルオキシ)-エトキシ]}-フェニル}-メタノン、2の合成

1. 方法A: アルゴン雰囲気下、20mLの乾燥DMFに溶かした550mg(8mM)の NaOEt を入れた100mLの二首丸底フラスコに3-ヒドロキシベンゾフェノン(1g, 5mM)を加えた。反応物を室温にて10分間攪拌し、5mLの乾燥DMF中に溶解させた2-プロモエトキシテトラヒドロピラン(1g, 5mM)を滴下した。この反応混合物を60 にて一晩加熱し、冷却し、氷水に注ぎ入れ、 CH_2Cl_2 (2×50mL)で抽出した。混合した溶媒を無水 Na_2SO_4 上で乾燥させ、蒸発させた。得られた粗残渣を、溶出剤としてヘキサン/ EtOAc (9:1)混合物を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製した。収量: 680mg(42%)。 20

【0460】

2. 方法B: 乾燥アセトン(40mL)中に溶かした3-ヒドロキシベンゾフェノン(1g, 5mM)、無水 K_2CO_3 (3g, 23mM)および NaI (500mg)の攪拌混合物に、10mLの乾燥アセトン中に溶解させた2-プロモエトキシテトラヒドロピラン(1g, 5mM)を加え、20時間還流した。沈殿を濾去し、アセトン(3×20mL)で洗浄した。混合した濾液を蒸発させ、得られた帯黄色の残渣を、溶出剤としてヘキサン/ EtOAc (9:1)混合物を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製した。収率: 55~60%。 $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) ppm: 1.5-1.63(m, 4H), 1.72(m, 1H), 1.82(m, 1H), 3.52(m, 1H), 3.8-3.9(m, 2H), 4.07(m, 1H), 4.21(m, 2H), 4.70(t, 1H), 7.15(d, 1H), 7.37(m, 3H), (7.47(t, 2H), 7.58(t, 1H), 7.80(d, 1H)。質量: 327.2(M^+)、349.3($\text{M} + \text{Na}^+$)。 30

【0461】

C. グリニャール反応: 2-{4'-(3-(2-テトラヒドロピラン-2-イルオキシ)エトキシ)フェニル-4''フェニル}}-4,4-ジメチル-1,3-オキサゾリン、3の合成

還流冷却器をつけた100mLの二首丸底フラスコに、活性化したMg粉(720mg, 30mM)、 I_2 の結晶および少量のモレキュラーシーブ(molecular sieves)(A4)を、アルゴン下で入れた。この混合物に10mLのTHFを加えた。混合物を50 に加熱し、攪拌しながら15mLの乾燥THF中に溶解させた2-(4-プロモフェニル)-4,4-ジメチル-1,3-オキサゾリン(6.5g, 26mM)、触媒量の CH_3I 、RED-Alおよび CCl_4 を加え、3時間還流した。その後、反応混合物を室温まで冷却し、15mLの乾燥THF中に溶解させたフェニル-{3-[2-(テトラヒドロピラン-2-イルオキシ)-エトキシ]}-フェニル}-メタノン(5.1g, 15.6mM)を加え、再度3時間還流し、冷却し、3mLの水を加えた。回転式エバポレーター下で溶媒を除去し、 CHCl_3 (3×100mL)で抽出し、無水 Na_2SO_4 上で乾燥させた。溶媒を除去して得られた残渣を、溶出剤としてヘキサン/ EtOAc (7:3)を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって分離した。カラム画分を蒸発させると、黄色の結晶性固体(1.4g, 18%)として2-{4'-(3-(2-テトラヒドロピラン-2-イルオキシ)エトキシ)フェニル-4''-フェニル}}-4,4-ジメチル-1,3-オキサゾリン(3)が得られた。 $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3) ppm: 1.37(s, 6H), 1.5-1.63(m, 4H), 1.68(m, 1H), 1.80(m, 1H), 2.85(s, 1H, -OH), 3.49(m, 1H), 3.75(m, 1H), 3.85(m, 1H), 3.97(m, 1H), 4.09(m, 4H), 4.66(t, 1H), 6.80(d, 1H), 6.84 40

(d, 1H), 6.88(s, 1H), 7.18 - 7.31(m, 6H), 7.34(d, 2H), 7.87(d, 2H)。質量 : 502.6(M + 1)、524.5(M + Na⁺)。

【0462】

D. 4,4-ジメチル-2-[4-(フェニル-[2-(テトラヒドロピラン-2-イルオキシ)-エトキシ]-{3-[2-(テトラヒドロピラン-2-イルオキシ)-エトキシ]-フェニル}-メチル)-フェニル]-4,5-ジヒドロオキサゾール、4

室温にて、3mLの乾燥DMFに溶かした2-{4'-(3-(2-テトラヒドロピラン-2-イルオキシ)エトキシ)フェニル-4''-フェニル}-4,4-ジメチル-1,3-オキサゾリン(3、200mg、0.4mM)およびNaH(100mg、4mM)の攪拌混合物に、2-(2-プロモエトキシ)テトラヒドロ-2H-ピラン(500mg、2.4mM)を加え、この反応物を室温にて2時間攪拌した。次いで、反応混合物を氷水に注ぎ入れ、CH₂Cl₂(3×20mL)で抽出し、無水Na₂SO₄上で乾燥させた。溶媒を蒸発させると黄色の油状残渣として4が定量的収率で得られた。

10

【0463】

E. 4-{(2-ヒドロキシ-エトキシ)-[3-(2-ヒドロキシ-エトキシ)-フェニル]-フェニル-メチル}-安息香酸、5

3mLの80%酢酸水溶液に溶かした4(360mg)の溶液を75℃にて12時間加熱した。次いで、この溶液を蒸発させ、得られた残渣を20%のNaOH/EtOH(1:1、v/v、3mL)とともに2時間還流した。溶媒を除去し、残渣に10mLの氷冷水を加え、水溶液を1NのHClで酸性化した。沈殿した黄色固体を濾別し、水で数回洗浄し、高真空下で乾燥させた。収量: 270mg(100%、定量的)。

20

【0464】

F. 4-{(2-ヒドロキシ-エトキシ)-[3-(2-ヒドロキシ-エトキシ)-フェニル]-フェニル-メチル}-安息香酸2,5-ジオキソ-ピロリジン-1-イルエステル、6

1. 方法A: 乾燥1,4-ジオキサン(2mL)に溶かしたトリチル酸5(110mg、0.26mM)およびN-ヒドロキシスクシンイミド(80mg、0.7mM)の攪拌溶液に、2mLの水に溶解させた1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリド(EDC、105mg、0.5mM)を加えた。この反応混合物を室温にて12時間攪拌し、CHCl₃(3×10mL)で抽出し、無水Na₂SO₄上で乾燥させた。溶媒を蒸発させて得られた固体を分取TLCプレートによって精製した。収量5mg。

【0465】

2. 方法B: 乾燥THF(4mL)に溶かしたトリチル酸5(12mg、0.03mM)の攪拌溶液にジシクロヘキシルカルボジイミド(DDC、10mg、0.05mM)を加えた。この反応混合物を室温にて30分間攪拌し、N-ヒドロキシスクシンイミド(11.5mg、0.1mM)および触媒量のDMAPを加え、一晚攪拌した。回転式エバポレーター下で溶媒を除去し、得られた固体を乾燥エーテル中に溶解させた。沈殿したDCUを濾別し、溶媒であるエーテルを蒸発させた、得られた粗固体を分取TLCプレートによって精製した。収量7mg(50%)。¹H-NMR(500MHz、CDCl₃) ppm: 2.90(s, 4H), 3.92(t, 4H), 4.02(t, 4H), 6.83(m, 2H), 7.25(m, 3H), 7.34(m, 4H), 7.50(d, 2H), 8.0(d, 2H)。

30

【0466】

G. 4,4-ジメチル-2-[4-(フェニル-(3-フェニル-プロポキシ)-{3-[2-(テトラヒドロピラン-2-イルオキシ)-エトキシ]-フェニル}-メチル)-フェニル]-4,5-ジヒドロ-オキサゾール、7

40

室温にて、3mLの乾燥DMFに溶かした2-{4'-(3-(2-テトラヒドロピラン-2-イルオキシ)エトキシ)フェニル-4''-フェニル}-4,4-ジメチル-1,3-オキサゾリン(3、300mg、0.6mM)およびNaH(100mg、4mM)の攪拌混合物に3-プロモ-1-フェニルプロパン(250mg、1.2mM)を加え、反応物を室温にて2時間攪拌した。次いで、反応混合物を氷水に注ぎ入れ、CH₂Cl₂(3×20mL)で抽出し、無水Na₂SO₄上で乾燥させた。溶媒を蒸発させると黄色の残渣として7が定量的収率で得られた。

【0467】

H. 4-[[3-(2-ヒドロキシ-エトキシ)-フェニル]-フェニル-(3-フェニル-

50

プロポキシ)-メチル]-安息香酸、8

3mLの80%酢酸水溶液に溶かした7(550mg)の溶液を75 にて一晩加熱した。次いで、溶液を蒸発させ、得られた残渣を20%のNaOH/EtOH(1:1、v/v、3mL)とともに2時間還流した。溶媒を除去し、残渣に10mLの氷冷水を加え、水溶液を1NのHClで酸性化し、CH₂Cl₂(60 mL)で抽出し、無水Na₂SO₄上で乾燥させた。溶媒を蒸発させると黄色の固体が得られた。収量：485mg(定量的)。

【0468】

I. 4-[[3-(2-ヒドロキシ-エトキシ)-フェニル]-フェニル-(3-フェニル-プロポキシ)-メチル]-安息香酸2,5-ジオキソ-ピロリジン-1-イルエステル、9

乾燥THF(6mL)に溶かしたトリチル酸8(200mg、0.42mM)の攪拌溶液にジシクロヘキシルカルボジイミド(DDC、206mg、1mM)を加えた。この反応混合物を室温にて30分間攪拌し、N-ヒドロキシスクシンイミド(70mg、0.6mM)および触媒量のDMAPを加え一晩攪拌した。回転式エバポレーター下で溶媒を除去し、得られた固体を乾燥エーテル中に溶解させた。沈殿したDCUを濾別し、溶媒であるエーテルを蒸発させた。得られた粗固体をCH₂Cl₂を用いるシリカカラムクロマトグラフィーによって分離した。収量：約120mg。¹H-NMR(500MHz, CDCl₃) ppm: 1.70(m, 2H), 1.9(t, 2H), 2.9(s, 4H), 3.5(m, 2H), 3.9(t, 2H), 4.0(t, 2H), 6.85(m, 4H), 7.25(m, 4H), 7.32(m, 5H), 7.51(m, 3H), 8.09(d, 2H)。 10

【0469】

J. 1-{4-[[3-(2-ヒドロキシ-エトキシ)-フェニル]-フェニル-(3-フェニル-プロポキシ)-メチル]-ベンゾイル}-ピロール-2,5-ジオン、10

乾燥THF(6mL)に溶かしたトリチル酸8(280mg、0.42mM)の攪拌溶液にジシクロヘキシルカルボジイミド(DDC、400mg、1.95mM)を加えた。この反応混合物を室温にて30分間攪拌し、マレイミド(100mg、1.1mM)および触媒量のDMAPを加え、一晩攪拌した。回転式エバポレーター下で溶媒を除去し、得られた固体を乾燥エーテル中に溶解させた。沈殿したDCUを濾別し、溶媒であるエーテルを蒸発させた。生成物の一部を分取TLCによって精製した。収量：12mg。¹H-NMR(500MHz, CDCl₃) ppm: 1.78(m, 2H), 1.95(m, 2H), 2.9(s, 4H), 3.51(m, 2H), 3.93(t, 2H), 4.02(t, 2H), 6.8(m, 5H), 7.25(m, 5H), 7.29(m, 5H), 7.37(m, 3H), 7.48(d, 2H)。質量：561.3(M⁺)。 20

【0470】

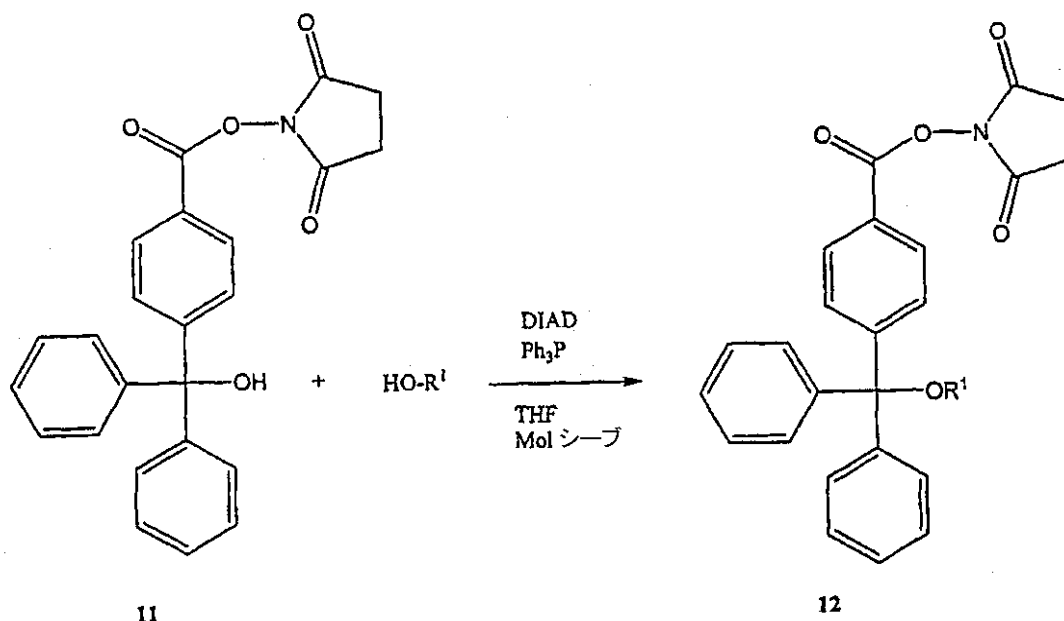
実施例 5

この実施例は、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル反応性官能基を保有している捕獲化合物への選択性官能基の付加を示す。選別基を有する化合物は、以下の化合物11の適切な類似体を用いて調製することができる。 30

【0471】

トリチル捕獲試薬の光延(Mitsunobu)反応の手順

【化53】



10

反応バイアルに1.1当量のトリフェニルホスフィンを加え、1.0mlのTHF中に溶解させる。この溶液に1.1当量のジイソプロピルアジドジカルボキシレートを加え、5分間混合する。1当量の11を加え、5分間攪拌する。求核試薬(R₁-OH)を加え、50℃にて一晩攪拌する。生成物を分取TLCで精製する。

20

【0472】

実施例6

細胞の同調化

癌細胞集団をG₀/G₁に濃縮することができる、シムバスタチンおよびロバスタチン(HMG-CoAレダクターゼ阻害剤)を用いてH460肺癌およびSW480大腸癌細胞をG₀/G₁に同調化した。G₂/M期で停止した細胞をノコダゾールでの処理によって得た。

【0473】

細胞培養および試薬

SW480細胞株をダルベッコの改変イーグル培地(DMEM)で培養し、H460細胞株(ATCC Manassas, VA)をRPMI 1640で培養し、FK101は5%のCO₂を用いて37℃にて血清を含まない培地(SFM)で培養した。細胞培養培地には10%のウシ胎児血清(FBS)、2mMのL-グルタミン、ペニシリン(100U/ml)およびストレプトマイシン(100U/ml)を補充した。

30

【0474】

細胞の同調化

血清を含まない培地を用いて48時間インキュベーションした後、またはU026、ロバスタチンもしくはシムバスタチンでの処理後に、G₁期に濃縮されたH460およびSW480細胞が得られた。S期の細胞を、血清を含まない培地で細胞を24時間インキュベートし、次いで、20時間アフィディコリン処理(2μg/ml)し、細胞をアフィディコリンから3時間解放することによって同調化した。G₂/M期で停止した細胞を、ノコダゾール(0.4~0.8mg/ml)で16~20時間処理することによって得た。

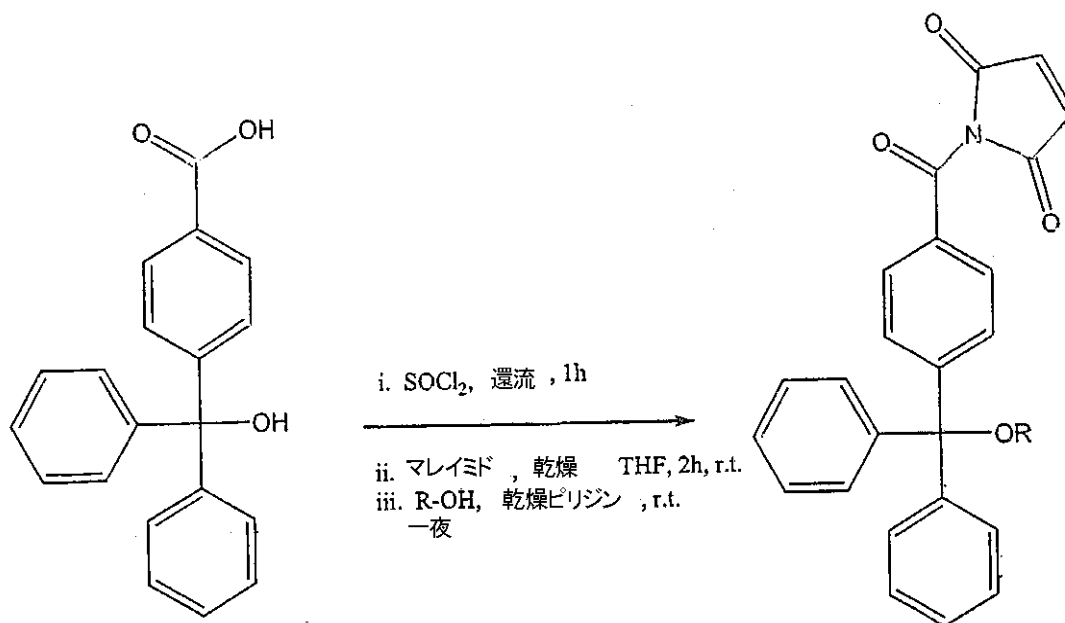
40

【0475】

実施例7

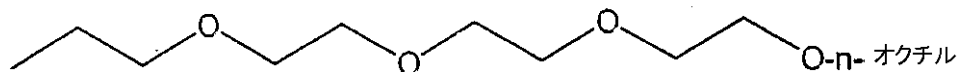
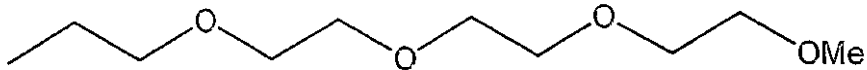
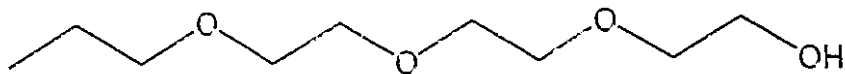
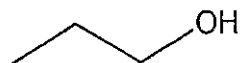
(4,4'-ビスフェニル-ヒドロキシメチル)ベンゾイルマレイミド誘導体の合成

【化 5 4】

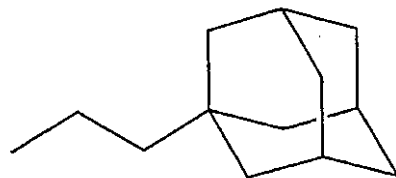
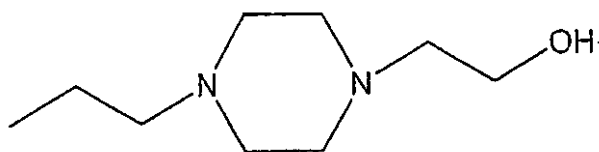


【化55】

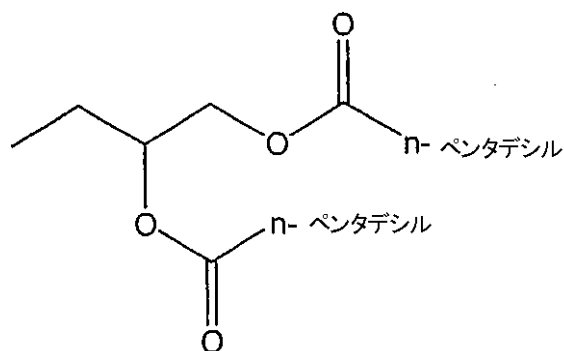
R =



10



20



30

一般的手順：1mLの SOCl_2 に溶かした4-(ジフェニルヒドロキシメチル)安息香酸(0.04 mM)の溶液を1時間還流し、高真空下で過剰の SOCl_2 を除去した。得られたこの黄色固体残渣に、新たに蒸留した乾燥THF(1mL)に溶解させたマレイミド(0.045mM)を加え、室温で2時間攪拌した。溶媒を除去し、攪拌しながら乾燥ピリジン(1mL)中に溶解させた相当するアルコール(ROH、2~5倍過剰)を加えた。反応混合物を室温にて一晩攪拌した後、溶液を CH_2Cl_2 (5×3mL)で抽出し、無水 Na_2SO_4 上で乾燥させた。溶媒を蒸発させて得られた残渣を分取TLC(Silica Gel、500 μm プレート)で分離すると、生成物1が50~60%の収率で得られた。トリチル誘導体1を ^1H NMRおよび質量スペクトルデータによって十分に特性決定した。

40

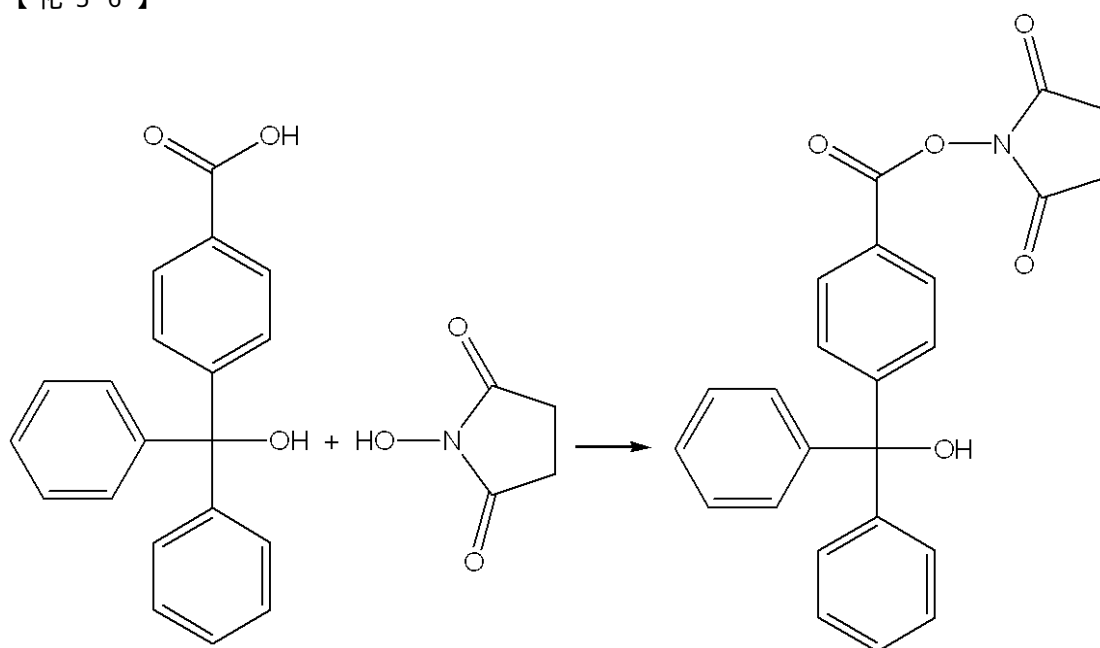
【0476】

実施例 8

スクシンイミジルエステルトリチル捕獲化合物の合成

手順 1

【化56】



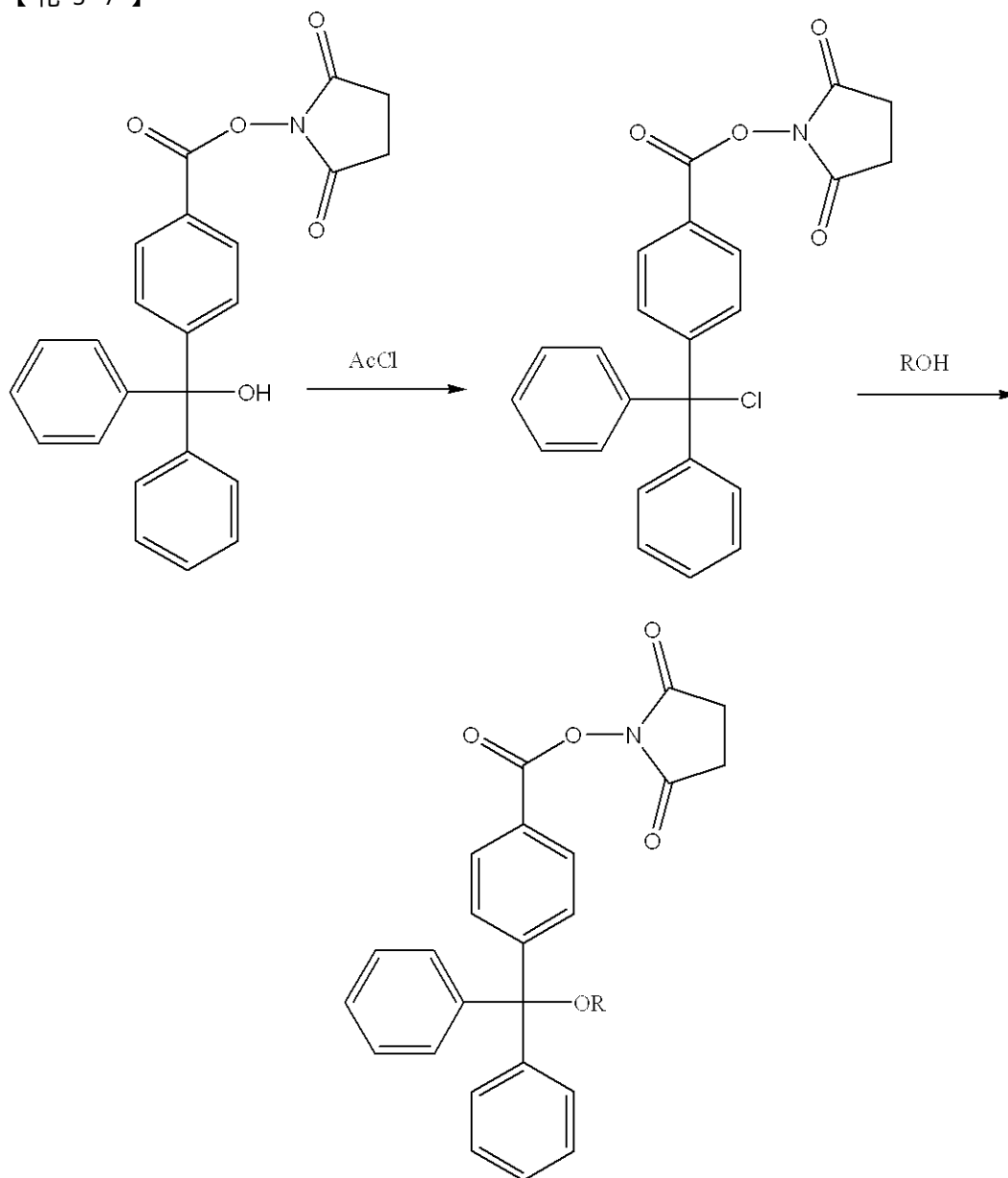
10

4 - (ジフェニルヒドロキシメチル)安息香酸を、1.2当量のジイソプロピルカルボジイミドを用いて2当量のN - ヒドロキシスクシンイミドと反応させた。所望の生成物をフラッシュ

20

ユシリカクロマトグラフィーによって精製し、ESI質量分析計によって特性決定した。

【化57】



10

20

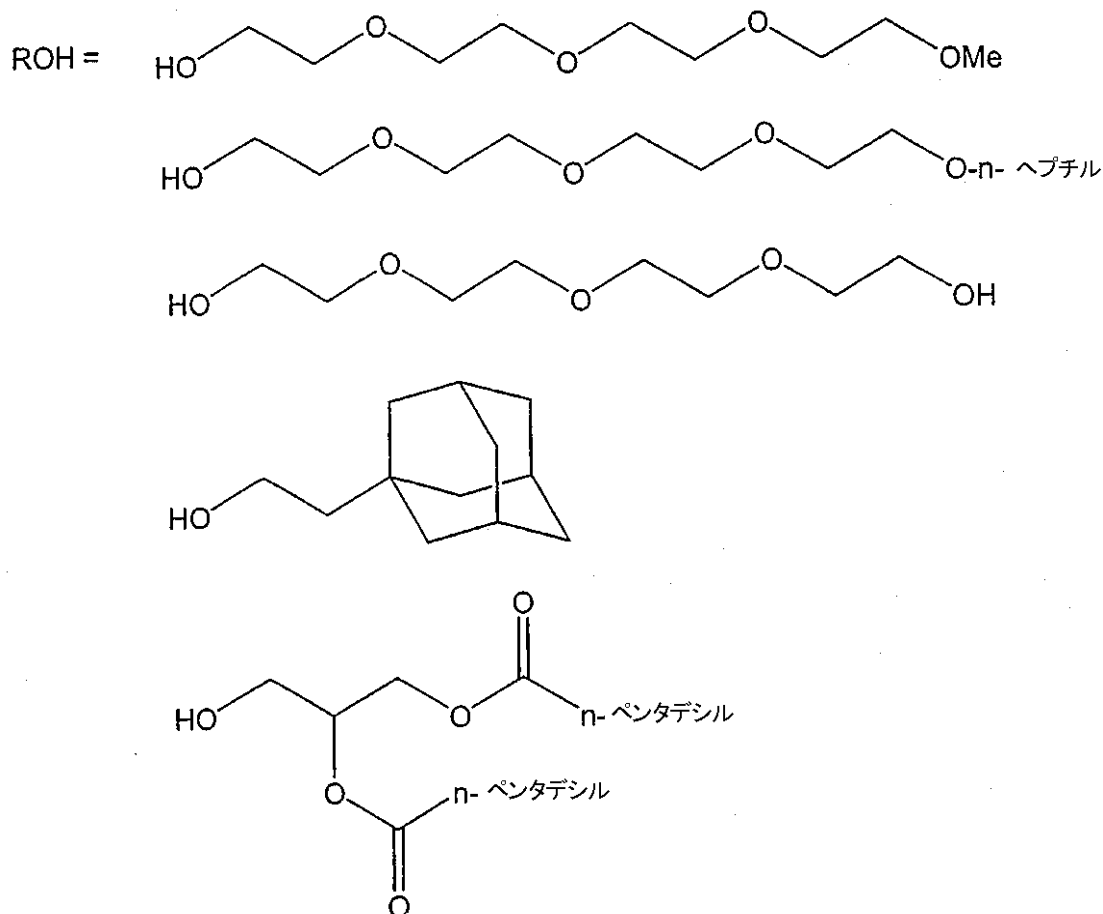
30

【0477】

1.0mlの塩化アセチルに125マイクロモルの上記の生成物を加えた。この反応混合物を室温にて1時間攪拌し、トルエンを用いて3回蒸発させて過剰の塩化アセチルを除去した。1.0Mのピリジン/THF中に溶解させた求核試薬(以下参照)に等容量の反応混合物を加えた。これらの反応混合物を60℃にて2時間混合した。得られた生成物を CHCl_3 および10% HOAcから抽出した。生成物を分取TLC(エーテル)によって精製した。MSおよびNMRによって精製した生成物を特性決定した。

40

【化58】



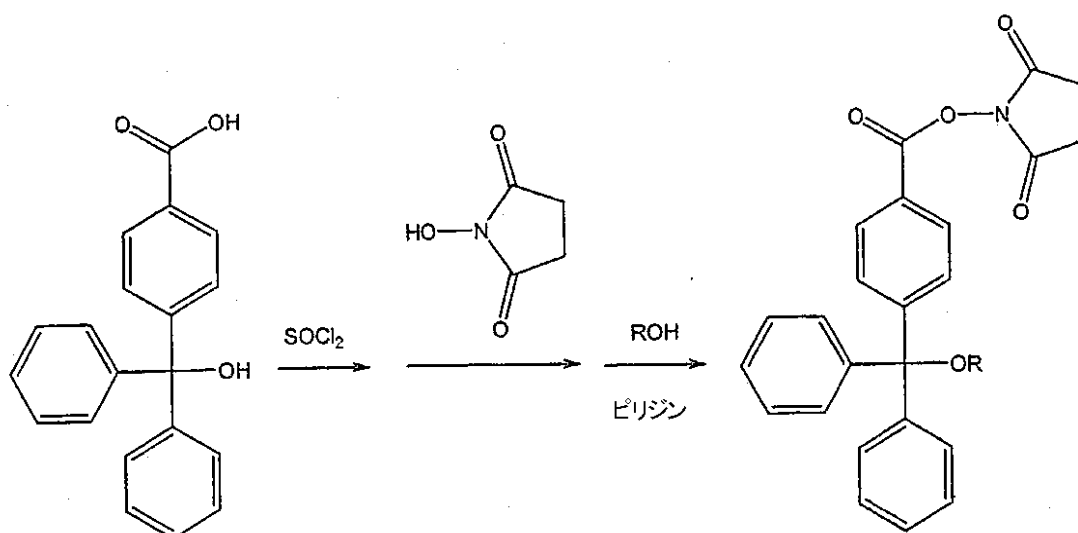
10

20

【0478】

手順2

【化59】



30

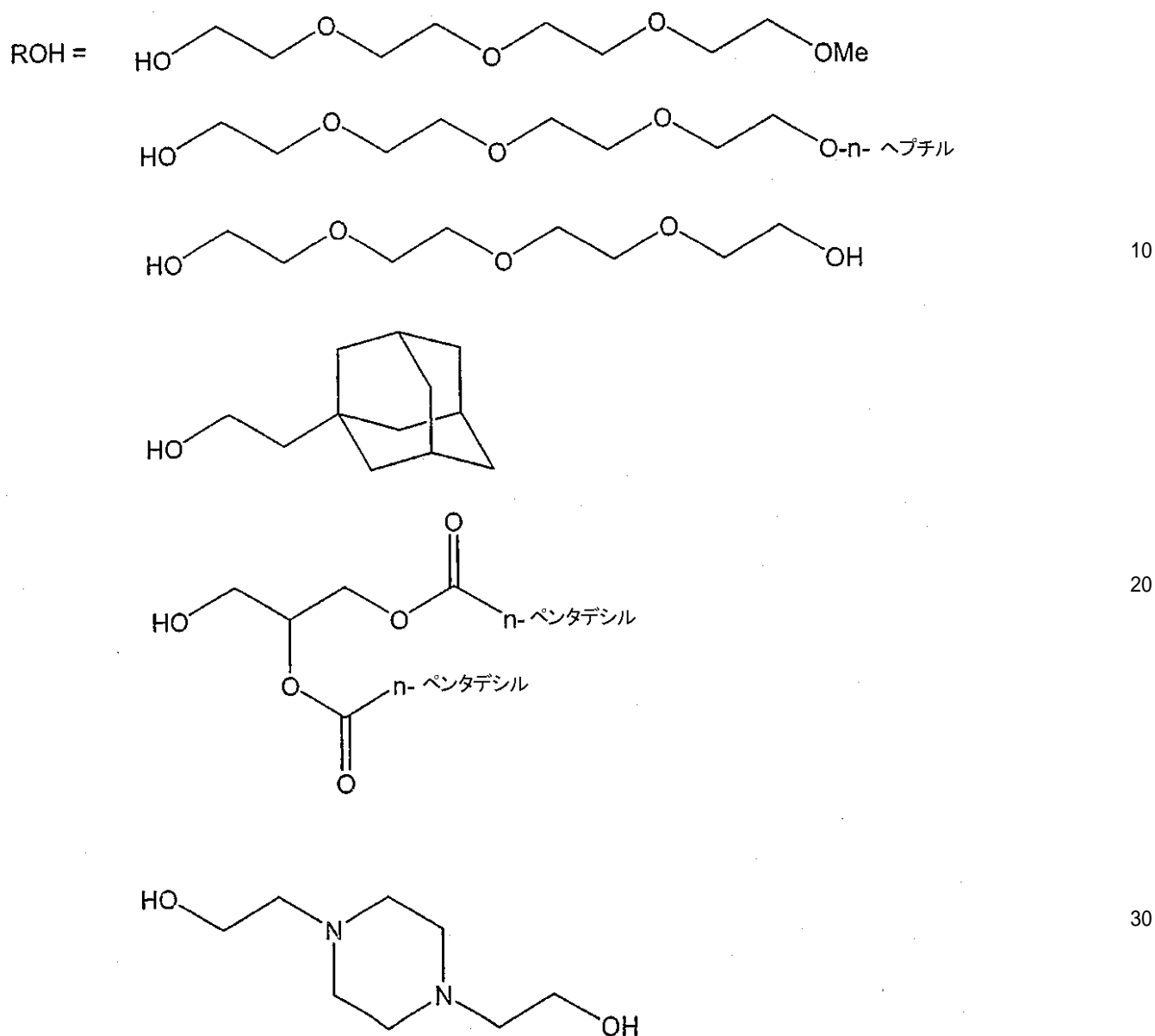
40

5mlの塩化チオニルに1.64ミリモルの4-(ジフェニルヒドロキシメチル)安息香酸を溶解させた。この反応混合物を79 に加熱し、75分間攪拌する。N₂(g)気流下で塩化チオニルを除去する。この乾燥させた反応混合物に、乾燥THF中に溶解させた1.3当量のN-ヒドロキシスクシニミドを加え、1時間攪拌する。N₂(g)気流下でTHF溶媒を除去する。生成物を乾燥ピリジン中に溶解させる。ピリジン中に溶解させた求核試薬(以下参照)に等容量のこの溶液を加える。得られた生成物をCHCl₃および10% HOAcから抽出する。生成物を分取T

50

LC(エーテル)によって精製する。MSおよびNMRによって精製した生成物を特性決定する。

【化60】



【0479】

実施例9

この実施例は例示的捕獲結合アッセイ、結合に対する選択性官能基の作用を示す。この実施例は、選択性を変化させることによって捕獲化合物の反応性を変更することができ、それによって収集物を用いて生体分子の構造をプローブし選別するか、または多様性を減少させるための手段を提供することができることを示す。この実施例では、捕獲化合物のコア基はトリチル基であり、反応基は、第一級アミンと相互作用するスクシンイミドである。化合物1341は、反応基を含むが選択基を含まない非選択性化合物である。化合物1343 (図20参照)は選択基が-OHである化合物の例である。選択基を変更すると、標的タンパク質(リゾチーム、チトクロムCおよびユビキチン)に対する反応性に相違が表れる。

40

【0480】

リゾチーム

3種の異なる捕獲化合物(HKC1343、1349、1365と命名したもの；各化合物の化学構造は化合物名の下に記載されている)をリゾチーム(受託番号P00698；図20b)と個別に反応させた。捕獲実験はMALDI-TOF質量分析計を用いて分析した。結合は20 μLのサンプル容量で

50

、25mM HEPESバッファ溶液 (pH7.0) 中で5 μ M のリゾチーム濃度を用いて実施した。タンパク質溶液にトリチルをベースとする捕獲化合物を10 μ M の濃度で加えた。結合反応物を室温にて30分間インキュベートした。反応を1 μ L の100mM TRIZMA base溶液を用いて停止させた。

【0481】

捕獲化合物 - タンパク質結合混合物を、1 μ L のアリコート of 結合反応物を1 μ L の30% アセトニトリルに溶かした10mg/mL のシナピン酸水溶液と混合することによって質量分析のために準備した。このサンプルを500nL のスポットとして質量標的プレートの表面にデポジットし、質量スペクトル分析による分析の前に風乾させた。図20bに示す質量スペクトル分析の結果は、化合物へ選択基を付加することにより捕獲化合物の結合特異性を変更することができることを証明している。

10

【0482】

チトクロムC

4種の異なる捕獲化合物 (HKC 1341、1343、1349、1365と命名したもの；各化合物の化学構造は化合物名の下に記載されている) をチトクロムC (受託番号：P00006、図20c) と個別に反応させた。捕獲実験はMALDI - TOF質量分析計を用いて分析した。結合は20 μ L のサンプル容量で、25mM HEPESバッファ溶液 (pH7.0) 中で5 μ M のチトクロムC濃度を用いて実施した。タンパク質溶液にトリチルをベースとする捕獲化合物を10 μ M の濃度で加えた。結合反応物を室温にて30分間インキュベートした。反応を、1 μ L の100mM TRIZMA base溶液を用いて停止させた。捕獲化合物 - タンパク質結合混合物を、1 μ L のアリコート of 結合反応物を1 μ L の30% アセトニトリルに溶かした10mg/mL のシナピン酸水溶液と混合することによって質量分析のために準備した。このサンプルを500nL のスポットとして質量標的プレートの表面にデポジットし、続いて、質量スペクトル分析の前に風乾させた。図20cに示す質量スペクトル分析の結果は、化合物に選択基を付加することにより捕獲化合物の結合特異性を変更することができることを証明している。

20

【0483】

HKC1343

例示的捕獲化合物の1種 (HKC1343) を3種の異なるタンパク質 (ユビキチン [P02248]、チトクロムC [P00006] およびリゾチーム [P00698]) の混合物とともにインキュベートした (図20d参照)。捕獲実験はMALDI - TOF質量分析計を用いて分析した。結合反応は20 μ L のサンプル容量で、25mM HEPESバッファ溶液 (pH7.0) 中で3種すべてのタンパク質を5 μ M の濃度で用いて実施した。タンパク質溶液にトリチルをベースとする捕獲化合物を25 μ M の濃度で加えた。結合反応物を室温にて30分間インキュベートし、反応を、1 μ L の100mM TRIZMA base溶液を用いて停止させた。捕獲化合物 - タンパク質結合混合物を、1 μ L のアリコート of 結合反応物を1 μ L の30% アセトニトリルに溶かした10mg/mL のシナピン酸水溶液と混合することによって質量分析のために準備した。このサンプルを500nL のスポットとして質量標的プレートの表面にデポジットし、質量スペクトル分析の前に風乾させた。図20dに示す質量スペクトル分析の結果は、選択的である単一の捕獲剤に結合した複数の化合物を質量スペクトル分析によって同定できることを証明している。

30

【0484】

HKC 1365

別の例示的な捕獲化合物 (HKC 1365) を3種の異なるタンパク質 (ユビキチン [P02248]、チトクロムC [P00006] およびリゾチーム [P00698]) の混合物とともにインキュベートした (図20d参照)。捕獲実験はMALDI - TOF質量分析計を用いて分析した。結合反応は20 μ L のサンプル容量で、25mM HEPESバッファ溶液 (pH7.0) 中で3種すべてのタンパク質を5 μ M の濃度で用いて実施した。タンパク質溶液にトリチルをベースとする捕獲化合物を15 μ M の濃度で加えた。結合反応物を室温にて30分間インキュベートし、反応を、1 μ L の100mM TRIZMA base溶液を用いて停止させた。捕獲化合物 - タンパク質結合混合物を、1 μ L のアリコート of 結合反応物を1 μ L の30% アセトニトリルに溶かした10mg/mL のシナピン酸水溶液と混合することによって質量分析のために準備した。このサンプルを500nL のスポットと

40

50

して質量標的プレートの表面にデポジットし、質量スペクトル分析の前に風乾させた。図20eに示す質量スペクトル分析の結果は、選択的である単一の捕獲剤に結合した複数の化合物を質量スペクトル分析によって同定できることを証明している。

【0485】

チトクロムCの非特異的化合物との反応

図20fはチトクロムCと非特異的化合物(HKC 1341)との経時的な反応の質量スペクトルを示す。スクシンアミド反応基はチトクロムCのリジンと特異性および反応性を示す。上段のスペクトルは0時点で修飾がないということを示し、中段のスペクトルは30分後のHKC1341の結合により生じた1~9の修飾を示し、下部のスペクトルは24時間後の17および18の修飾を示し、これはチトクロムC中のリジンの数(18)に相当する。

10

【0486】

実施例10

この実施例は、捕獲化合物の混合物およびタンパク質の混合物と反応する捕獲化合物の選択性を示す

材料：

反応バッファー： 25mM HEPES、pH7.0

タンパク質： ユビキチン、チトクロムcおよびリゾチーム(モル比は1/5/6)、タンパク質ストックは反応バッファー中の5mg/ml(全タンパク質)として作製する。

捕獲化合物： HKC 1343およびHKC 1365、ストック溶液はアセトニトリル中の1mMである。

20

【0487】

捕獲反応

タンパク質希釈液(混合物)を反応バッファー中でユビキチン、チトクロムcおよびリゾチームそれぞれについて0.5、2.5および3 μ Mの濃度で調製する。19.5 μ lを1つの捕獲反応に用いる。各反応は0.5 μ lの1mM化合物ストック溶液を加えることによって開始する(最終25 μ M)。反応混合物を室温にて30分間インキュベートし、その後、5mM TRIZMAを加えることによって反応を停止する。

【0488】

3種の異なる反応を行う。第1の2つの試験管はHKC 1343およびHKC 1365を個別に含み、第3の試験管では化合物HKC 1343および1365を加えることによって開始する(各化合物につき最終濃度25 μ M)。反応後、1 μ lの各サンプルを等容量のマトリックスと混合し、MALDI分析に付す。結果の統計的有意性は各反応サンプルを3連でとることによって確実なものとする。

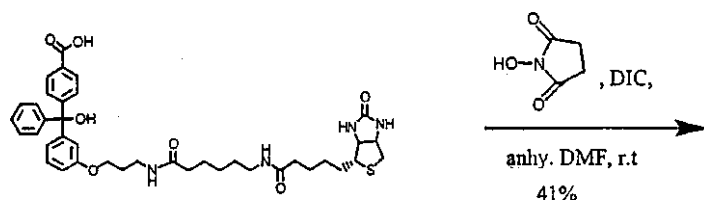
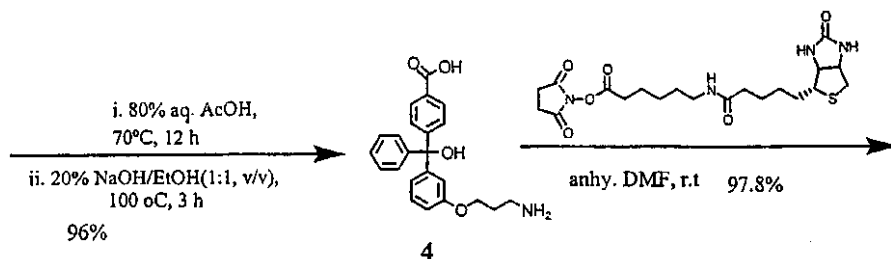
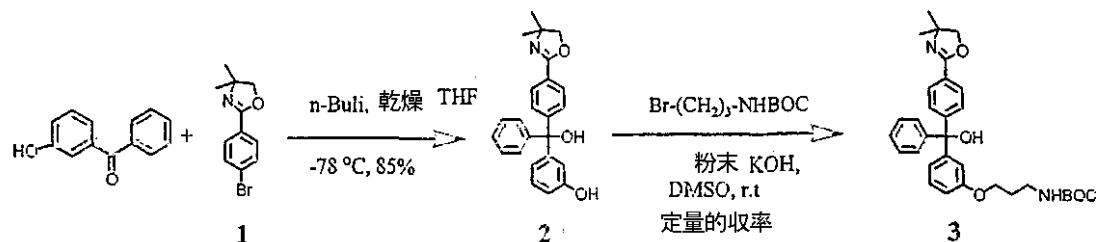
30

【0489】

実施例11

4-{ヒドロキシ-[3-(3-{6-[5-(2-オキソ-ヘキサヒドロ-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)-ペンタノイルアミノ]-ヘキサノイルアミノ}-プロポキシ)-フェニル]-フェニル-メチル}-安息香酸スクシンイミジルエステル(6)の合成

【化 6 1】



5

6

3-{[4-(4,4-ジメチル-4,5-ジヒドロ-オキサゾール-2-イル)-フェニル]-ヒドロキシ-フェニル-メチル}-フェノール(2)の合成

2-(4-プロモフェニル)-4,4-ジメチル-1,3-オキサゾリン 1は実施例 4 に記載のように調製した。-78 の無水 THF (10 mL)中の2-(4-プロモフェニル)-4,4-ジメチル-1,3-オキサゾリン (1.5 g, 6 mM)の攪拌した溶液に、ヘキサン中のn-BuLi (384 mg, 6 mM)を20分かけてゆっくりと加えた。その後、反応混合物を-78 で更に30分間攪拌した。この攪拌した溶液に、anhy. THF (10 mL)に溶解した3-ヒドロキシベンゾフェノン (534 mg, 2.7 mM)を、-78 で滴下し、室温にて一夜攪拌し得る。この反応混合物に水20 mLを加え、反応物をクエンチし、CH₂Cl₂ (3x50 mL)で抽出し、合わせた抽出物を無水 Mg₂SO₄で乾燥させた。溶媒の蒸発で得られた油性の残渣を、ヘキサン/EtOAc (1:1)混合物を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、無色結晶固体として3-{[4-(4,4-ジメチル-4,5-ジヒドロ-オキサゾール-2-イル)-フェニル]-ヒドロキシ-フェニル-メチル}-フェノール (2)を得た。収量: 0.855 g (85%)。質量: 374 (MH⁺), 372 (M-H)。

【0490】

[3-(3-{[4-(4,4-ジメチル-4,5-ジヒドロ-オキサゾール-2-イル)-フェニル]-ヒドロキシ-フェニル-メチル}-フェノキシ)-プロピル]-カルバミン酸tert-ブチルエステル(3)の合成

室温の無水DMSO (2.5 mL)中の粉末KOH (45 mg, 0.8 mM)の溶液に、3-{[4-(4,4-ジメチル-4,5-ジヒドロ-オキサゾール-2-イル)-フェニル]-ヒドロキシ-フェニル-メチル}-フェノール (2, 150 mg, 0.4 mM)および(3-プロモ-プロピル)-カルバミン酸tert-ブチルエス

10

20

30

40

50

テル(96 mg, 0.4 mM)を加えた。その反応混合物を室温で3時間攪拌した。次いで、該反応混合物を酢酸エチル(3x25 mL)で抽出し、合わせた抽出物を無水Mg₂SO₄で乾燥させた。溶媒の蒸発により得られた残渣を、溶出液としてヘキサン/EtOAc (1:1)を用いるシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。溶媒の蒸発により、3を得た。収量: >220 mg (定量的収量)。質量: 531 (MH⁺)。

【0491】

4-{{3-(3-アミノ-プロポキシ)-フェニル}-ヒドロキシ-フェニル-メチル}-安息香酸(4)の合成

10
[3-(3-{{4-(4,4-ジメチル-4,5-ジヒドロ-オキサゾール-2-イル)-フェニル}-ヒドロキシ-フェニル-メチル}-フェノキシ)-プロピル]-カルバミン酸tert-ブチルエステル(3, 220 mg)を入れた50 mL丸底フラスコに、80% 水性 AcOH 3 mLを加え、反応混合物を75 で一夜加熱した。次いで、反応混合物を濃縮し、乾燥させ、20% NaOH/EtOH (1:1, v/v) 3 mLを加え、三時間還流した。溶媒の蒸発で得られた残渣をCH₃OH/CHCl₃ 混合物に溶解し、シリカゲルに吸着させ、乾燥させた。乾燥した化合物を有するシリカゲルを、Et₂O 溶液中の1% NH₄OHで既にフラッシュしたシリカゲルカラムにより精製した。50% CH₃OH/CH₂Cl₂でのカラムの溶出により、無色のゲル固体として4-{{3-(3-アミノ-プロポキシ)-フェニル}-ヒドロキシ-フェニル-メチル}-安息香酸、4を得た。収量: 96%。質量: 378 (MH⁺), 376 (M-H), 360(M-OH)。

【0492】

20
4-{{ヒドロキシ-[3-(3-{{6-[5-(2-オキソ-ヘキサヒドロ-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)-ペンタノイルアミノ]-ヘキサノイルアミノ}-プロポキシ)-フェニル]-フェニル-メチル}-安息香酸(5)の合成

トリチルアミノ酸(4, 100 mg, 0.26 mM)およびピオチン-X-NHS(113mg, 0.25 mM)の混合物を、無水DMF 3 mL中、室温で一夜攪拌した。その後、DMFを高真空で除去し、得られた残渣を、溶媒として50% CH₃OH/CHCl₃を用いシリカゲルカラムに通過させた。溶媒の蒸発により、ピオチニル化トリチル酸 5を得た。(97.8%)。質量: 739(M Na⁺), 715 (M-H)。

【0493】

30
4-{{ヒドロキシ-[3-(3-{{6-[5-(2-オキソ-ヘキサヒドロ-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)-ペンタノイルアミノ]-ヘキサノイルアミノ}-プロポキシ)-フェニル]-フェニル-メチル}-安息香酸スクシンイミジルエステル(6)の合成

無水DMF(3 mL)中のピオチニル化トリチル酸 (5, 175 mg, 0.244 mM)の溶液に、1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(4 mg, 0.35 mM)を加え、5 分間、反応混合物を攪拌させた。この反応混合物に、N-ヒドロキシスクシンイミド(40mg, 0.32 mM)を加え、室温で一夜攪拌した。溶媒を高真空で除去し、得られた残渣を、溶媒系としてCH₃OH/CH₂Cl₂, 3:7)混合物を用いシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。溶媒の蒸発により、白色結晶固体として6を得た。収量: 80 mg (41%)。¹H-NMR (CD₃OD) ppm:

1.29-1.71 (m, 12H), 1.90-1.93 (m, 2H), 2.15 (q, 4H), 2.49 (t, 1H), 2.8-2.91 (m 2H), 2.90 (s, 4H), 3.17(m, 4H), 3.94 (q, 3H), 4.27 (dd, 1H), 4.46 (d of d, 2H), 4.59 (br. s, 4H), 6.77(s, 1H), 6.86 (m, 2H), 7.18-7.39 (m, 5H), 7.51 (d, 2H), 8.05 (m, 2H)。質量: 836.6(Mn⁺), 812.4 (M-H)。

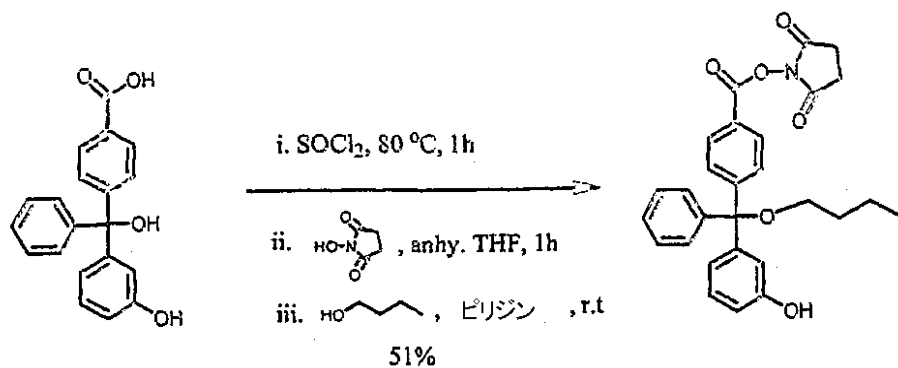
40

【0494】

実施例 1 2

4-[[ブトキシ-(3-ヒドロキシ-フェニル)-フェニル-メチル]-安息香酸2,5-ジオキソ-ピロリジン-1-イルエステルの合成

【化62】



10

25 mL丸底フラスコ中に置いた4-[ヒドロキシ-(3-ヒドロキシ-フェニル)-フェニル-メチル]-安息香酸 (0.31 mM) 100 mgに、塩化チオニル (1 mL)を加え、80 で1時間、還流した。次いで、過剰の SOCl_2 を高真空で除去し、乾燥させた。この乾燥した固体残渣に、新しい蒸留化無水THF(4 mL)をアルゴン気流下に加え、その後、N-ヒドロキシスクシンイミド(38 mg, 0.33 mM)を加え、室温で1時間攪拌した。溶媒を高真空で除去し、乾燥させた。次いで、得られた残渣を乾燥ピリジン (1.5 mL)に溶解し、n-ブタノール0.2 mLに加え、反応混合物を3時間攪拌した。ピリジンを高真空で除去し、得られた固体を、溶出液としてヘキサン/EtOAc (7:3)を用いるシリカゲルカラムで精製した。溶媒の蒸発により、4-[ブトキシ-(3-ヒドロキシ-フェニル)-フェニル-メチル]-安息香酸2,5-ジオキソ-ピロリジン-1-イルエステル(6)を得た。収量: 50 -52%。 $^1\text{H-NMR}$, CDCl_3 (ppm): 0.88 (t, 3 H), 1.38 (m, 2H), 1.61 (m, 2H), 2.87 (br. s, 4H), 3.05 (t, 2H), 6.7 (dd, 1H), 6.9 (dd, 2H), 7.16 (t, 1H), 7.3 (m, 5H), 7.64 (d, 2H), 8.04 (d, 2H)。質量: 496 (M na⁺), 472(M-H), 400.3。

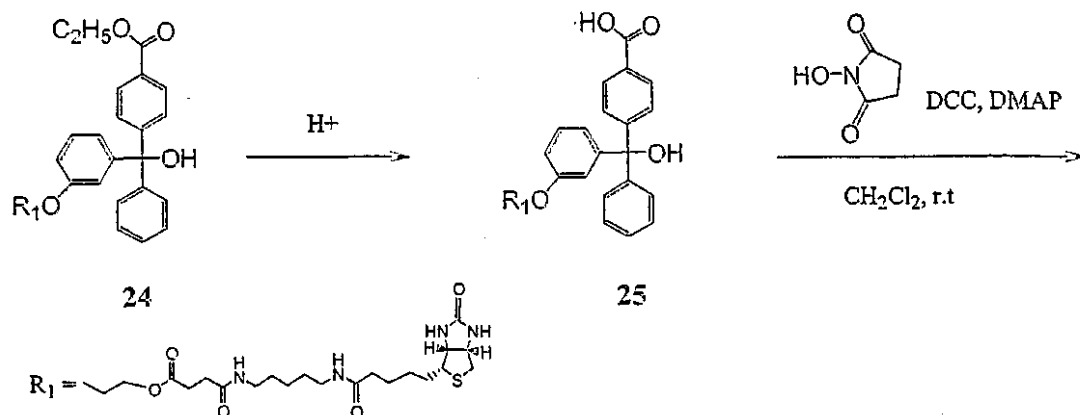
20

【0495】

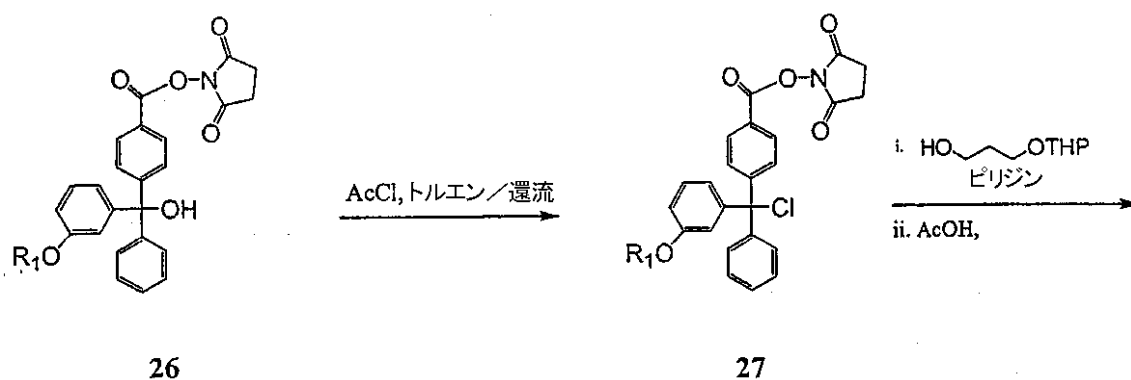
実施例13

この実施例は、捕獲化合物への、選別官能基としてのビオチンの付加を示す。

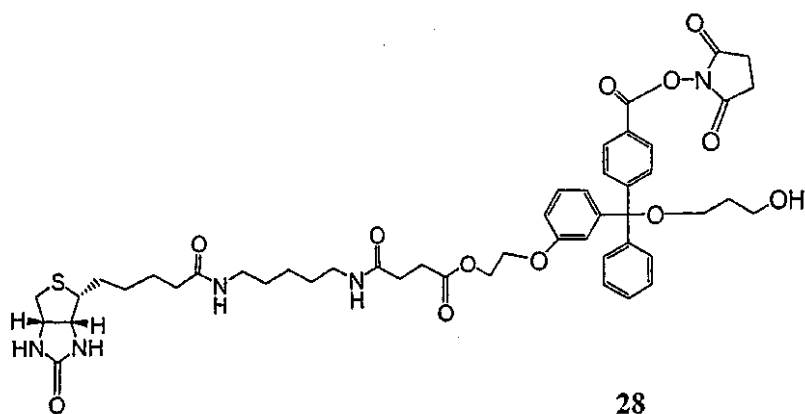
【化63】



10



20



30

【0496】

実施例14

ドーブしたカルボニックアンヒドラーゼ IIを伴うHEK293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)

【0497】

必要な物質:

20 mM HEPES 緩衝液、pH 7.2.

200 μ 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。

【0498】

40

50

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。

【0499】

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。

【0500】

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

【0501】

Soft-Link(アビジン)樹脂: 樹脂を、3x1ml(100 μ l 樹脂アリコートの場合)の20 mM H 10
epes、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。

【0502】

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1M 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、~1mlの洗浄緩衝液が必要である。

Sigma mass quality water

【0503】

実験プロトコール:

A. 反応プレート上のウェルに、25 μ l FT293、x μ l のカルボニックアンヒドラーゼ II
ストック、y μ l の化合物ストック溶液、および25-x-y μ l の20 mM Hepes 緩衝液、pH 7.
2をピペットする。50 μ l の反応ではyの値は2.5 μ 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 μ l 反応のS100では15 μ l を用い、従って、緩衝液体積を変える。

【0504】

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。

【0505】

C. 反応混合物を暗室にて30分間、インキュベートする

【0506】

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。

【0507】

E. 光反応後のサンプルのスピンカラム処理は、約1 μ Mの捕獲化合物を有する混合物に
は必要がない。10 μ 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。

【0508】

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 40
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 μ l を加え、次いで、光反応またはスピンカラムの後に反応混合物20 μ
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。

【0509】

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。

【0510】

H. 200 μ 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。

【0511】

I. スピンし、工程Gに記載のように上清を取り除く。

【0512】

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 μ lを加える。

【0513】

K. 樹脂および水を十分に混合し、1 μ 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 μ lを加え、4回ピペットアップおよびダウンする。

10

【0514】

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。

【0515】

実施例15

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ゐのこの量は、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。

20

【0516】

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：

30

[S₀] = 基質の初期濃度

[E₀] = 酵素の初期濃度

【0517】

それ故、以下の等式が得られる。

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

【0518】

これは、K_d、S₀およびE₀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。

40

【0519】

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

基質濃度が複合体濃度よりも遙かに高くなる、すなわち、([S₀] >> [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。

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

【0520】

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。

50

【0521】

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。

【0522】

プルダウン後

基質がピ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 η 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。

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

【0523】

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：

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

【0524】

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。

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

【0525】

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。

【0526】

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。

【0527】

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 であるとすると、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。

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

【0528】

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。

【0529】

実施例 16

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)(アクトス(商標))

1. 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。

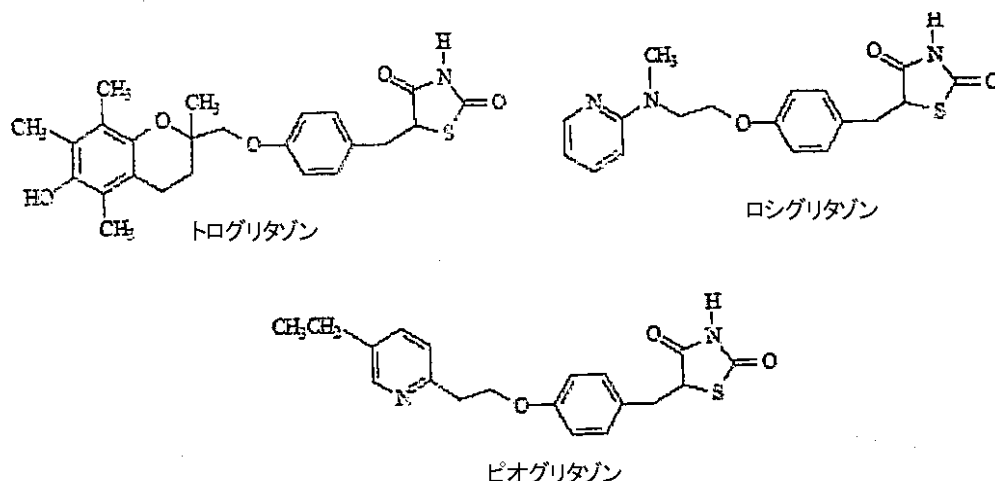
10

20

30

40

【化 6 4】



10

【0530】

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 GLUT 4 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。

20

【0531】

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。

30

【0532】

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。

【0533】

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い。しかし、FDAは、グリタゾン治療の開始より、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。

40

【0534】

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。グリタゾン治療は、Class III および IV CHF患者には推奨されず、Class I および II患者の体液の状態を緊密にモニタリングする必要がある。

【0535】

50

グリタゾン-治療患者は、おそらくグルコース制御により改善が生じ得るため、1から4 kgの範囲の体重増加を経験し得る。グリタゾンは、低密度リポタンパク質-コレステロール(LDL-C)、高密度リポタンパク質-コレステロール(HDL-C)、および全コレステロールの増加を生ずると報告されている。LDL-Cはピオグリタゾンにより僅かに増加する。ロシグリタゾンでは、HDL-CがLDL-Cに比例して上昇する前に数ヶ月の時間のずれがあるが、LDL/HDL比は保たれる。トリグリセリドはトログリタゾンおよびピオグリタゾンにより減少するが、ロシグリタゾンの効果は変わりやすい。

【0536】

II型糖尿病の治療に用いるアバンディア(登録商標)およびアクトス(登録商標)は、幾人かの患者では、体液増加(fluid buildup)および心不全の要因となり得る。2003年9月9日、米国医師が発表している(ロイター)

10

心臓および腎臓の機能が弱い6人の男性患者において、アバンディア(登録商標)およびアクトス(登録商標)が、心不全の要因であった。

【0537】

低血糖症の発生はグリタゾンをスルホニル尿素と共に用いるときに増加し得ることが研究により示されている。現在、ピグアニドまたは α -グルコシダーゼインヒビターを伴うトログリタゾンの低血糖症効果について公表されている管理された研究はない。

【0538】

経口避妊薬: ピオグリタゾンは、代謝を誘導し、OCの効力を減少することがある(この相互作用における幾つかの議論)。追加的保護の使用、またはOCクリアランスを変更しないロシグリタゾンへの切り換え。

20

【0539】

ToxPro目的

構造的な分類(すなわち、チアゾリジンジオン)および下位分類(すなわち、生成物)

薬理的/治療的プロファイルおよび構造的な下位分類内での活性の差異に關与する鍵となる構造的な特長の同定(すなわち、チアゾリジンジオン)

各薬物/薬物クラスの作用機構の詳細な理解

【0540】

- 膵臓および/または膵臓外機構か?

- インスリン依存または非依存作用

30

- 機構に関する種々の構造クラスの薬物の比較

構造シリーズ(すなわち、チアゾリジンジオン)内での、およびシリーズを通じた相対的効力

鍵となる素質要因(タンパク質結合)

機構または他の要因への作用および関係の相対的開始

代謝工程および代謝物の活性(治療作用への関与)

排泄プロファイル: 親薬物および/または代謝物として腎性および/または非腎性か?

非標的タンパク質結合が原因の腎臓または肝臓に障害のある患者での使用/注意

副作用:

- 作用などの間の、低血糖症の相対的発生および作用機構との関係

40

- 体重増加

- GI 効果

- 腎臓生理機能に対する効果

- 他の鍵となる薬剤: すなわち、乳酸アシドーシス

- シリーズ(すなわち、チアゾリジンジオン)内での、および鍵となる副作用における構造的シリーズ間での類似および差異

効力を含み得る重要な薬物相互作用:

- 薬物動力学に基づく相互作用: 吸収による障害、

代謝/シトクロムに基づく相互作用、排泄の競争など

- 薬理学: 低血糖または高血糖作用を有する他の薬物との使用

50

- 鍵となる薬物相互作用についての、シリーズ(すなわち、チアゾリジンジオン)内での、および構造的シリーズ間での類似および差異

【0541】

ToxPro 応用

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体- (PPAR-): インスリン耐性および -細胞機能の可能性ある役割

チアゾリジンジオンは、前糖尿病患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。

10

【0542】

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。

20

【0543】

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。

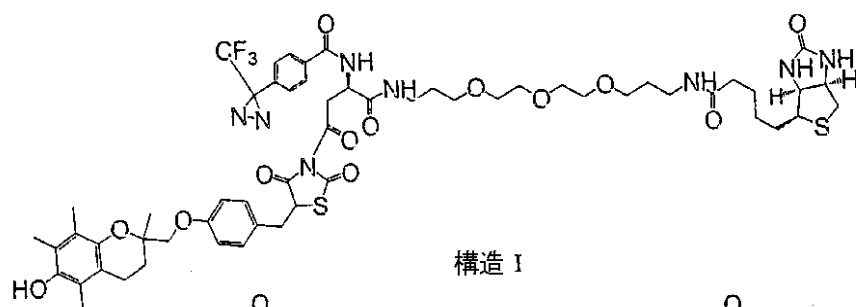
30

【0544】

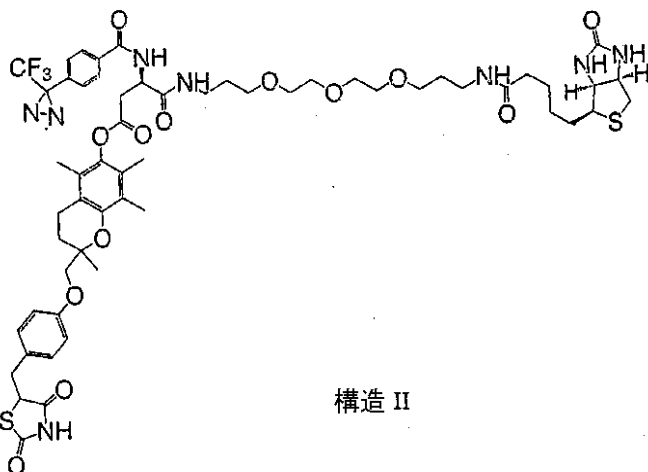
リズリン:

リズリンは、以下に示すように捕獲化合物に結合する:

【化65】



10



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IIが考えられる。

【0545】

リズリン捕獲化合物構造IおよびII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を捕獲する。

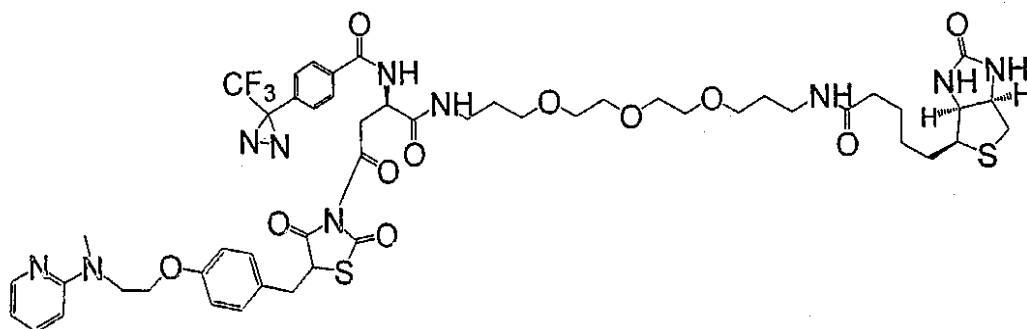
【0546】

アバンディアおよびその代謝産物：

30

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66】

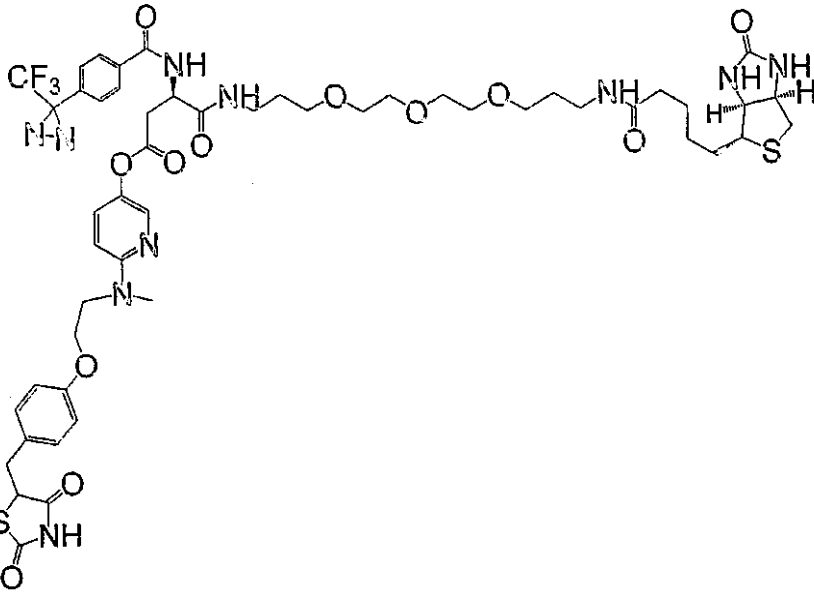


40

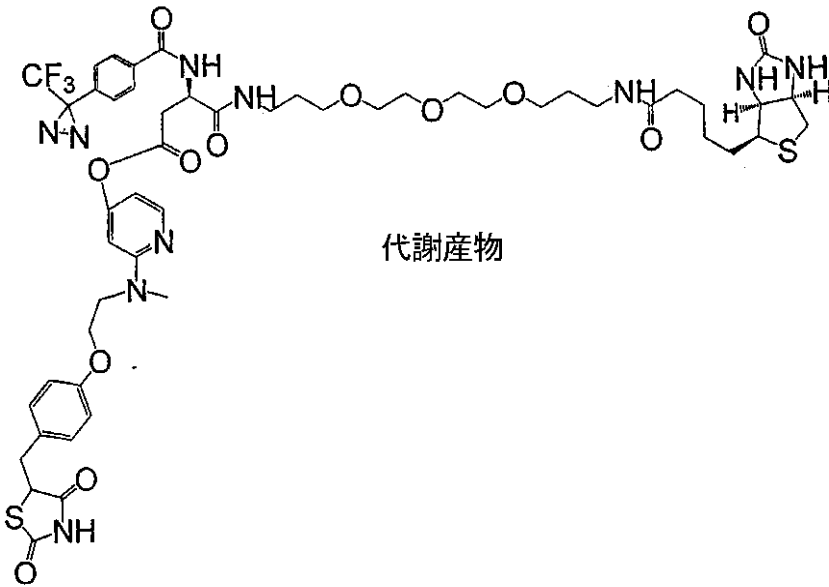
【0547】

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：

【化 6 7】



10

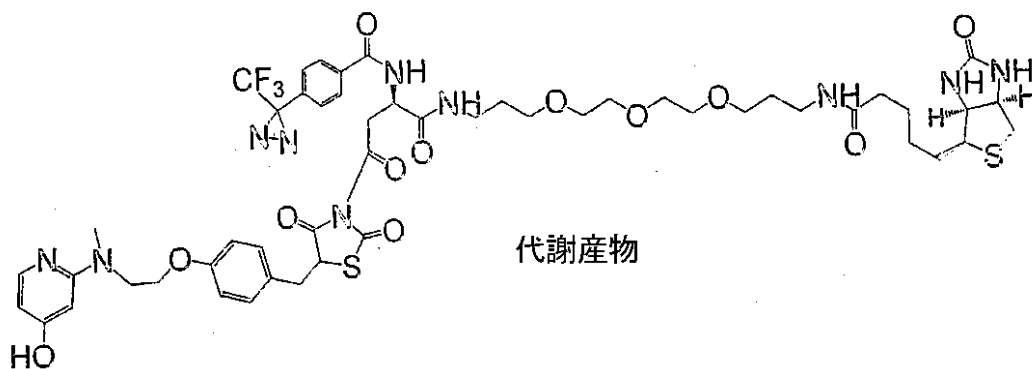


代謝産物

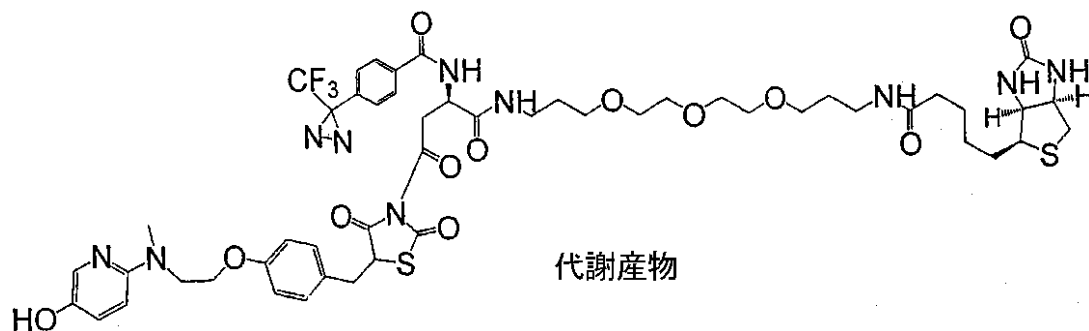
20

30

【化 6 8】



10



20

【0548】

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、膵臓、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。

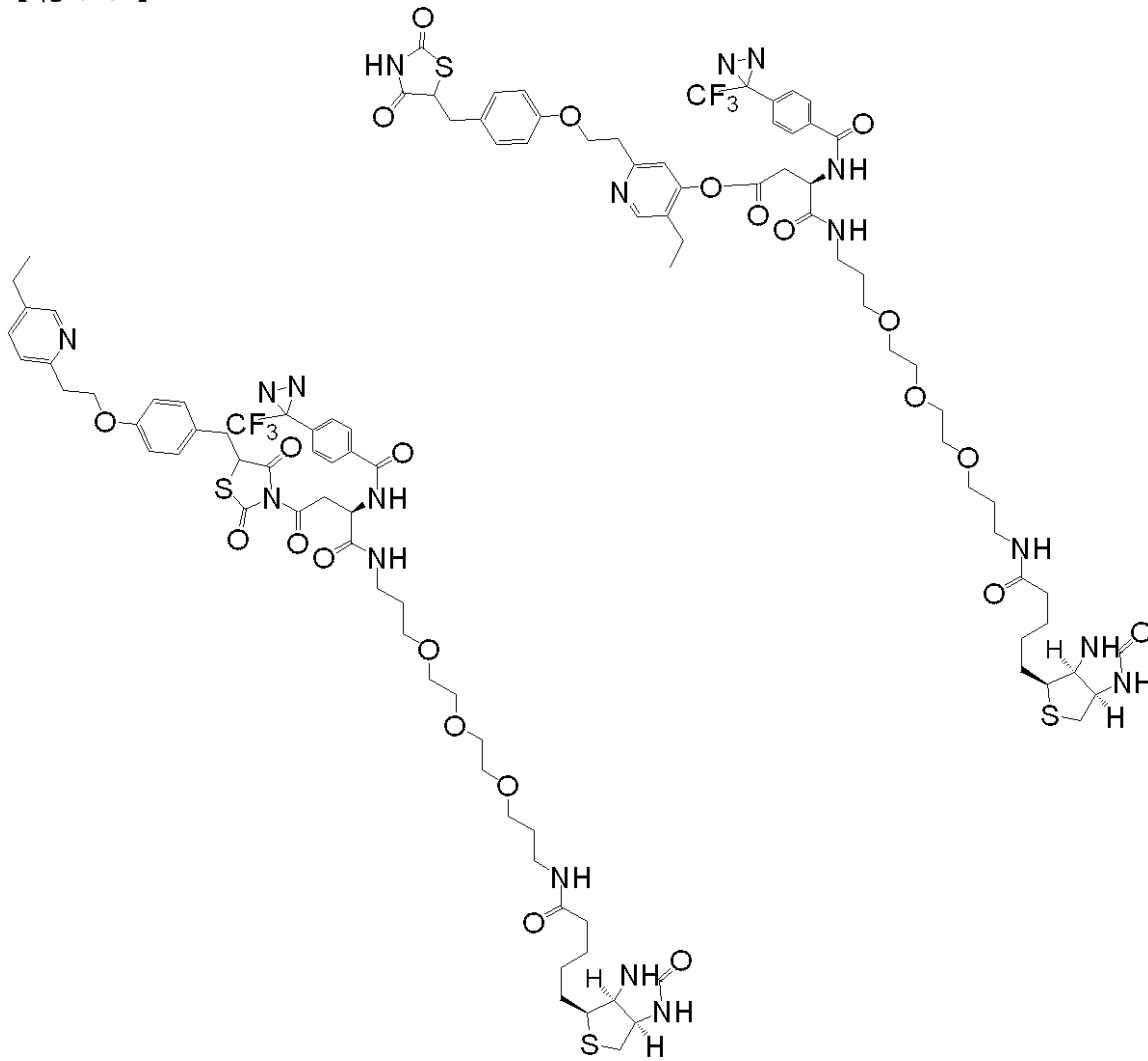
30

【0549】

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：

【化 6 9】



10

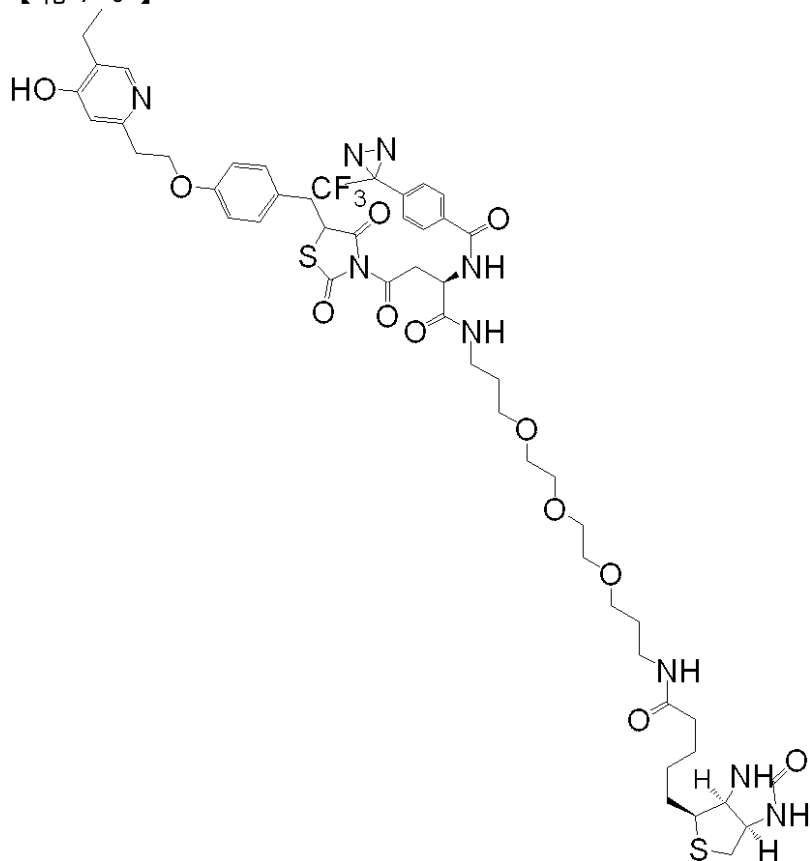
20

【 0 5 5 0】

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70】



10

20

【0551】

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、膵臓、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を捕獲する。

【0552】

当業者にとって修飾が明かであるから、この発明は添付の特許請求の範囲の範囲によってのみ限定されることを意図する。

30

【図面の簡単な説明】

【0553】

【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】本明細書で提供される4種の化合物でタグをつけ、それによってタンパク質の特異的選別が可能となるタンパク質を例示する図である。

【図4】2以上のオリゴヌクレオチドタグの使用に起因するハイブリダイゼーションの増加および特異的ハイブリダイゼーションを示す図である。

【図5】1つの反応における、2種の異なるオリゴヌクレオチドでの単一タンパク質のタグgingを示す図である。

40

【図6】組換えタンパク質生産の流れ図である。

【図7】アダプターをつけたオリゴヌクレオチドdTをプライマーとしたcDNAライブラリーの作製を示す図である。

【図8】アダプターをつけた配列モチーフ特異的cDNAライブラリーの作製を示す図である。

【図9】アダプターをつけた遺伝子特異的cDNAの作製を示す図である。

【図10】鋳型ライブラリーからの増幅産物の精製を例示する図である。

【図11】遺伝子小集団の増幅のためのユニバーサル・テンプレートとしての、アダプターをつけたオリゴヌクレオチドdTをプライマーとするcDNAライブラリーを示す図である。

50

【図12】PCR増幅の際の複雑性の低下を示す図である。

【図13】二官能性分子の固体表面への結合を示す図である。

【図14】化合物のスクリーニングおよび抗体の作製により精製されたタンパク質の分析を示す図である。

【図15a - 15b】本明細書で提供される例示的な捕獲試薬の合成の合成図式を提供する図である。

【図16a - 16b】本明細書で提供される捕獲試薬に用いる例示的な反応性官能基を提供する図である。

【図17a - 17h 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18】細胞同調化のための代謝制御メカニズムの調節のための例示的な点を示す図である。

【図19a - 19c】細胞の分離および同調化法を示す図である。

【図20】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21】本明細書で提供する捕獲化合物で使用するための例示的な選択性官能基を示す。

【図22a - 22b】本明細書で提供する2つの捕獲化合物とヘモグロビンとの反応の質量スペクトルの結果を示す。

【図23a - 23d】本明細書で提供する例示的な捕獲化合物を示す。

【図24】本明細書で提供する捕獲化合物と、U937リンパ腫血液細胞から得たタンパク質混合物との反応の質量スペクトルの結果を示す。その図は、捕獲化合物による、示されたタンパク質の選択的な捕獲を示す。

【図25】本明細書で提供する捕獲化合物とパーキットリンパ腫サイトソルとの反応の質量スペクトルの結果を示す。

【図26】本明細書で提供する捕獲化合物と、パーキットリンパ腫リンパ芽球由来の全サイトソルとの反応の質量スペクトルの結果を示し、年齢および性別の同じ健康者のリンパ芽球と比較している。

【図27】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28】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29】トリチルスカホルド、ピオチン、NHS反応性官能基、OH選択性官能基を有する捕獲化合物と、急性リンパ性白血病の5歳の男の子(sup B ALL)および年齢/性別の同一の対照(wil2)由来の細胞系のサイトソル画分との反応の質量スペクトルの結果を示す。

【図30】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31】捕獲化合物を用いる選択的タンパク質捕獲を示す。

【図32】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33】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34】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35】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36】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37】カルボニックアンヒドラーゼを含む非ピ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38】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。

10

20

30

40

50

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Hubert Köster
 Daniel Paul Little
 Suhaib Mahmood Siddiqi
 Matthew Peter Grealish
 Subramaniam Marappan
 Chester Frederick Hassman III
 Ping Yip

<120> Capture Compounds, Collections Thereof
 And Methods For Analyzing The Proteome And Complex
 Compositions

10

<130> 24743-2309PC

<140> Not Yet Assigned
 <141> Herewith

<150> 60/441,398
 <151> 2003-01-16

<160> 149

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0.

<210> 1
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

20

<400> 1
 Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val Gly Lys Lys
 1 5 10 15
 Arg Arg Pro Val Lys Val Tyr Pro Asn Gly Ala Glu Asp Glu Ser Ala
 20 25 30
 Glu Ala Phe Pro Leu Glu Phe
 35

<210> 2
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 2
 Tyr Arg Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys
 1 5 10 15
 Arg Phe Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln
 20 25 30
 Phe Thr Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser
 35 40 45
 Pro Gln Gly Tyr
 50

30

<210> 3
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 3
Ala Pro Ser Gly Ala Gln Arg Leu Tyr Gly Phe Gly Leu
1 5 10

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 4
Trp Gly Lys Pro Val Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg
1 5 10

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapien

10

<400> 5
Ala Pro Arg Glu Arg Phe Tyr Ser Glu
1 5

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 6
Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Lys Tyr Pro Lys
1 5 10

20

<210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<220>

<221> AMIDATION
<222> 14

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> Xaa is pyroglutamic acid

<400> 7
Xaa Gly Arg Leu Gly Thr Gln Trp Ala Val Gly His Leu Met
1 5 10

30

<210> 8
<211> 37
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 8
Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Asn Arg Leu Ala Asn Phe Leu

```

1           5           10           15
Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val
                20           25           30
Gly Ser Asn Thr Tyr
                35

```

```

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo Sapien

```

```

<400> 9
Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe His Leu
1           5           10

```

10

```

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapien

```

```

<400> 10
Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe
1           5

```

```

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo Sapien

```

```

<400> 11
Arg Val Tyr Ile His Pro Phe
1           5

```

20

```

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo Sapien

```

```

<400> 12
Asn Arg Pro Arg Leu Ser His Leu Gly Pro Met Pro Phe
1           5           10

```

```

<210> 13
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo Sapien

```

30

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> 1
<223> Xaa is D-Phe

<221> MOD_RES
<222> 10
<223> Nle

```

<221> MOD_RES
 <222> 26
 <223> Nle

<400> 13
 Xaa His Leu Leu Arg Glu Val Leu Glu Xaa Ala Arg Ala Glu Gln Leu
 1 5 10 15
 Ala Gln Glu Ala His Lys Asn Arg Leu Xaa Glu Ile Ile
 20 25

<210> 14
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 14
 Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly
 1 5 10 15
 Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr
 20 25

10

<210> 15
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 15
 Lys Lys Ala Leu Arg Arg Gln Glu Thr Val Asp Ala Leu
 1 5 10

<210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

20

<400> 16
 Tyr Gly Gly Phe Met Arg Arg Val Gly Arg Pro Glu
 1 5 10

<210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 17
 Tyr Gly Gly Phe Met Arg Arg Val Gly Arg Pro Glu Trp Trp
 1 5 10

30

<210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 18
 Tyr Gly Gly Phe Met Arg Arg Val Gly Arg Pro Glu
 1 5 10

<210> 19
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 19
 Tyr Gly Gly Phe Met Thr Ser Glu Lys Ser Gln Thr Pro Leu Val Thr
 1 5 10 15
 Leu Phe Lys Asn Ala Ile Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Glu
 20 25 30

<210> 20
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

10

<400> 20
 Ala Glu Lys Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg Trp
 1 5 10 15
 Gly Ser Pro Pro Lys Asp
 20

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 21
 Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Lys Tyr Pro
 1 5

20

<210> 22
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 22
 Asp Ala Glu Phe Arg His Ala Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Leu Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
 35 40

<210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

30

<400> 23
 Arg Leu Arg Phe His
 1 5

<210> 24
 <211> 32

<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 24
Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp
1 5 10 15
Arg Ile Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
20 25 30

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 25
Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
1 5

10

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<220>

<221> AMIDATION
<222> 11

<400> 26
Gly Met Asp Ser Leu Ala Phe Ser Gly Gly Leu
1 5 10

20

<210> 27
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<220>

<221> AMIDATION
<222> 3

<400> 27
Lys His Gly
1

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo Sapien

30

<400> 28
Ala Ser Lys Lys Pro Lys Arg Asn Ile Lys Ala
1 5 10

<210> 29

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<220>

<221> MOD_RES
 <222> 4
 <223> Tyrosine-SO3H

<221> MOD_RES
 <222> 1
 <223> Xaa is pyroglutamic acid

<400> 29
 Xaa Gln Asp Xaa Thr Gly Trp Met Asp Phe
 1 5 10

10

<210> 30
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 30
 Ala Ile Pro Ile Thr Ser Phe Glu Glu Ala Lys Gly Leu Asp Arg Ile
 1 5 10 15
 Asn Glu Arg Met Pro Pro Arg Arg Asp Ala Met Pro
 20 25

<210> 31
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

20

<400> 31
 Cys Gly Asn Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe
 1 5 10 15
 Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro
 20 25 30

<210> 32
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 32
 Asp Pro Met Ser Ser Thr Tyr Ile Glu Glu Leu Gly Lys Arg Glu Val
 1 5 10 15
 Thr Ile Pro Pro Lys Tyr Arg Glu Leu Leu Ala
 20 25

30

<210> 33
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 33

Asn Gln Gly Arg His Phe Cys Gly Gly Ala Glu Ile His Ala Arg Phe
 1 5 10 15
 Val Met Thr Ala Ala Ser Cys Phe Asn
 20 25

<210> 34
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 34
 Asn Pro Met Tyr Asn Ala Val Ser Asn Ala Asp Leu Met Asp Phe Lys
 1 5 10 15
 Asn Leu Leu Asp His Leu Glu Glu Lys Met Pro Leu Glu Asp
 20 25 30

10

<210> 35
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 35
 Cys Asn Leu Ala Val Ala Ala Ala Ser His Ile Tyr Gln Asn Gln Phe
 1 5 10 15
 Val Gln

<210> 36
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

20

<400> 36
 Lys Trp Lys Val Phe Lys Lys Ile Glu Lys Met Gly Arg Asn Ile Arg
 1 5 10 15
 Asn Gly Ile Val Lys Ala Gly Pro Ala Ile Ala Val Leu Gly Glu Ala
 20 25 30
 Lys Ala Leu
 35

<210> 37
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 37
 Ser Gly Ser Ala Lys Val Ala Phe Ser Ala Ile Arg Ser Thr Asn His
 1 5 10 15

30

<210> 38
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 38
 Ala Cys Asp Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu

1 5 10 15
 Ser Arg Ser Gly Gly Val Val Lys Asn Asn Phe Val Pro Thr Asn Val
 20 25 30
 Gly Ser Lys Ala Phe
 35

<210> 39
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 39
 Ala Cys Asn Thr Ala Thr Cys Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Arg Ser Gly Gly Met Val Lys Ser Asn Phe Val Pro Thr Asn Val
 20 25 30
 Gly Ser Lys Ala Phe
 35

10

<210> 40
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 40
 Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe Leu Lys Glu Gly Gly
 1 5 10 15
 Leu

<210> 41
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

20

<400> 41
 Gln Glu Gly Ala Pro Pro Gln Gln Ser Ala Arg Arg Asp Arg Met Pro
 1 5 10 15
 Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys Lys
 20 25

<210> 42
 <211> 2
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 42
 Trp Gly
 1

30

<210> 43
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 43

1

Ala Cys Tyr Cys Arg Ile Pro Ala Cys Ile Ala Gly Glu Arg Arg Tyr
 1 5 10 15
 Gly Thr Cys Ile Tyr Gln Gly Arg Leu Trp Ala Phe Cys Cys
 20 25 30

<210> 44
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 44
 Cys Tyr Cys Arg Ile Pro Ala Cys Ile Ala Gly Glu Arg Arg Tyr Gly
 1 5 10 15
 Thr Cys Ile Tyr Gln Gly Arg Leu Trp Ala Phe Cys Cys
 20 25

10

<210> 45
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 45
 Ala Leu Trp Lys Thr Met Leu Lys Lys Leu Gly Thr Met Ala Leu His
 1 5 10 15
 Ala Gly Lys Ala Ala Leu Gly Ala Ala Asp Thr Ile Ser Gln Thr
 20 25 30
 Gln

<210> 46
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

20

<400> 46
 Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Ile Arg Pro Lys Leu Lys Trp Asp Asn
 1 5 10 15
 Gln

<210> 47
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 47
 Tyr Gly Gly Phe Leu Arg Arg Gln Phe Lys Val Val Thr
 1 5 10

30

<210> 48
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<220>

<221> AMIDATION
<222> 11

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> Xaa is pyroglutamic acid

<400> 48
Xaa Pro Ser Lys Asp Ala Phe Ile Gly Leu Met
1 5 10

<210> 49
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo Sapien

10

<400> 49
Tyr Pro Trp Phe
1

<210> 50
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 50
Tyr Pro Phe Phe
1

<210> 51
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo Sapien

20

<400> 51
Cys Ser Cys Ser Ser Leu Met Asp Lys Glu Cys Val Tyr Phe Cys His
1 5 10 15
Leu Asp Ile Ile Trp
20

<210> 52
<211> 39
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<220>

<221> AMIDATION
<222> 39

30

<400> 52
His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 53
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 53
Ala Ala Asp Ser Gly Glu Gly Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Val
1 5 10 15
Arg

<210> 54
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo Sapien

10

<400> 54
Asx Gln Gly Val Asn Asp Asn Glu Glu Gly Phe Phe Ser Ala Arg
1 5 10 15

<210> 55
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 55
Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr
1 5

<210> 56
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo Sapien

20

<400> 56
Phe Met Arg Phe
1

<210> 57
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 57
Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Pro His Ala Val
1 5 10 15
Gly Asn His Arg Ser Phe Ser Asp Lys Asn Gly Leu Thr Ser
20 25 30

30

<210> 58
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<220>

<221> AMIDATION
<222> 20

<400> 58
Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Pro Gln Gln Phe
1 5 10 15
Phe Gly Leu Met
20

<210> 59
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 59
Arg Leu Arg Phe Asp
1 5

10

<210> 60
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 60
Glu Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp
1 5 10 15
Phe

<210> 61
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo Sapien

20

<400> 61
Val Pro Leu Pro Ala Gly Gly Gly Thr Val Leu Thr Lys Met Tyr Pro
1 5 10 15
Arg Gly Asn His Trp Ala Val Gly His Leu Met
20 25

<210> 62
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 62
Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys
1 5 10 15
Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25

30

<210> 63
<211> 42
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 63
 Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys
 1 5 10 15
 Ile His Gln Gln Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln Lys Gly Lys
 20 25 30
 Lys Asn Asp Trp Lys His Asn Ile Thr Gln
 35 40

<210> 64
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 64
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Asp Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

10

<210> 65
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 65
 Arg Arg Phe Ala Cys Asp Pro Asp Gly Tyr Asp Asn Tyr Phe His Cys
 1 5 10 15
 Val Pro Gly Gly
 20

<210> 66
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

20

<400> 66
 Thr Gly Ser Trp Cys Gly Leu Met His Tyr Asp Asn Ala Trp Leu Cys
 1 5 10 15
 Asn Thr Gln Gly
 20

<210> 67
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 67
 Arg Ser Lys Trp Cys Arg Asp Gly Tyr Tyr Ala Asn Tyr Pro Gln Cys
 1 5 10 15
 Trp Thr Gln Gly
 20

30

<210> 68
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 68
 Arg Ser Thr Leu Cys Trp Phe Glu Gly Tyr Asp Asn Thr Phe Pro Cys
 1 5 10 15
 Lys Tyr Phe Arg
 20

<210> 69
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 69
 Arg Val Gln Glu Cys Lys Tyr Leu Tyr Tyr Asp Asn Asp Tyr Leu Cys
 1 5 10 15
 Lys Asp Asp Gly
 20

10

<210> 70
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 70
 Gly Leu Arg Arg Cys Leu Tyr Gly Pro Tyr Asp Asn Ala Trp Val Cys
 1 5 10 15
 Asn Ile His Glu
 20

<210> 71
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

20

<400> 71
 Lys Leu Phe Trp Cys Thr Tyr Glu Asp Tyr Ala Asn Glu Trp Pro Cys
 1 5 10 15
 Pro Gly Tyr Ser
 20

<210> 72
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 72
 Phe Cys Ala Val Cys Asn Glu Glu Leu Tyr Glu Asn Cys Gly Gly Cys
 1 5 10 15
 Ser Cys Gly Lys
 20

30

<210> 73
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 73

Arg Thr Ser Pro Cys Gly Tyr Ile Gly Tyr Asp Asn Ile Phe Glu Cys
 1 5 10 15
 Thr Tyr Leu Gly
 20

<210> 74
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 74
 Thr Gly Glu Trp Cys Ala Gln Ser Val Tyr Ala Asn Tyr Asp Asn Cys
 1 5 10 15
 Lys Ser Ala Trp
 20

10

<210> 75
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 75
 Asn Val Ser Arg Cys Thr Tyr Ile His Tyr Asp Asn Trp Ser Leu Cys
 1 5 10 15
 Gly Val Glu Val
 20

<210> 76
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

20

<400> 76
 Gly Val Ser Asn Cys Val Phe Trp Gly Tyr Ala Asn Asp Trp Leu Cys
 1 5 10 15
 Ser Asp Tyr Ser
 20

<210> 77
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 77
 Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg Gln Gln Gly
 20 25 30
 Glu Ser Asn Gln Glu Arg Gly Ala Arg Ala Arg Leu
 35 40

30

<210> 78
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 78

Pro Gly Thr Cys Glu Ile Cys Ala Tyr Ala Ala Cys Thr Gly Cys
 1 5 10 15

<210> 79

<211> 35

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<220>

<221> AMIDATION

<222> 35

<400> 79

His Ser Asp Ala Ile Phe Thr Glu Glu Tyr Ser Lys Leu Leu Ala Lys
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Gln Lys Tyr Leu Ala Ser Ile Leu Gly Ser Arg Thr Ser
 20 25 30
 Pro Pro Pro
 35

10

<210> 80

<211> 38

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 80

His Ser Asp Ala Thr Phe Thr Ala Glu Tyr Ser Lys Leu Leu Ala Lys
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Gln Lys Tyr Leu Glu Ser Ile Leu Gly Ser Ser Thr Ser
 20 25 30
 Pro Arg Pro Pro Ser Ser
 35

20

<210> 81

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 81

His Ser Asp Ala Thr Phe Thr Ala Glu Tyr Ser Lys Leu Leu Ala Lys
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Gln Lys Tyr Leu Glu Ser Ile Leu Gly Ser Ser Thr Ser
 20 25 30
 Pro Arg Pro Pro Ser
 35

<210> 82

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 82

Asp Ser His Ala Lys Arg His His Gly Tyr Lys Arg Lys Phe His Glu
 1 5 10 15
 Lys His His Ser His Arg Gly Tyr

30

20

<210> 83
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<220>

<221> ACETYLATION
 <222> 1

<221> MOD_RES
 <222> 4
 <223> Xaa is Aspartic acid-fluoroacetylmethylketone

10

<400> 83
 Tyr Val Ala Xaa
 1

<210> 84
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 84
 Val Glu Pro Ile Pro Tyr
 1 5

<210> 85
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

20

<400> 85
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Asn Tyr Cys Asn
 20

<210> 86
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 86
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
 20 25 30

30

<210> 87
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 87
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Asn Tyr Cys Asn Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu
 20 25 30
 Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr
 35 40 45
 Pro Lys Thr
 50

<210> 88
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 88
 Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Leu
 1 5

10

<210> 89
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 89
 Tyr Gly Gly Phe Leu
 1 5

<210> 90
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

20

<220>

<221> AMIDATION
 <222> 9

<221> MOD_RES
 <222> 1
 <223> Xaa is pyroglutamic acid

<400> 90
 Xaa Gln Trp Ala Val Gly His Phe Met
 1 5

<210> 91
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

30

<400> 91
 Arg Thr Lys Arg Ser Gly Ser Val Tyr Glu Pro Leu Lys Ile
 1 5 10

<210> 92

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 92
 Tyr Gly Gly Phe Met
 1 5

<210> 93
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<220>

<221> AMIDATION
 <222> 9

10

<400> 93
 Tyr Gly Gly Gly Phe Met Arg Arg Val
 1 5

<210> 94
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 94
 Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys
 1 5 10 15
 Glu Arg Asn Lys Gly Gln
 20

20

<210> 95
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 95
 Pro Met Ser Met Leu Arg Leu Asn His
 1 5

<210> 96
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 96
 Ile Pro Lys Lys Arg Ala Ala Arg Ala Thr Ser Asn His
 1 5 10

30

<210> 97
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 97
 Gly Ala Val Ser Thr Ala
 1 5

<210> 98
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<220>

<221> AMIDATION
 <222> 10

<400> 98
 His Lys Thr Asp Ser Phe Val Gly Leu Met
 1 5 10

10

<210> 99
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<220>

<221> AMIDATION
 <222> 10

<400> 99
 Asp Met His Asp Phe Phe Val Gly Leu Met
 1 5 10

20

<210> 100
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<220>

<221> AMIDATION
 <222> 10

<400> 100
 Gly Asn Leu Trp Ala Thr Gly His Phe Met
 1 5 10

<210> 101
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

30

<220>

<221> AMIDATION
 <222> 36

<400> 101

Tyr Pro Ser Lys Pro Asp Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp
 1 5 10 15
 Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Lys Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr
 20 25 30
 Arg Gln Arg Tyr
 35

<210> 102
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<220>

<221> MOD_RES
 <222> 1
 <223> Xaa is pyroglutamic acid

10

<400> 102
 Xaa Leu Tyr Glu Asn Lys Pro Arg Arg Pro Ile Leu
 1 5 10

<210> 103
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 103
 Phe Gly Gly Phe Thr Gly Ala Arg Lys Ser Ala Arg Lys Leu Ala Asn
 1 5 10 15
 Gln

20

<210> 104
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 104
 Phe Ala Glu Pro Leu Pro Ser Glu Glu Glu Gly Glu Ser Tyr Ser Lys
 1 5 10 15
 Glu Val Pro Glu Met Glu Lys Arg Tyr Gly Gly Phe Met Arg Phe
 20 25 30

<210> 105
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

30

<400> 105
 Glu Gln Lys Gln Leu Gln
 1 5

<210> 106
 <211> 33
 <212> PRT

<213> Homo Sapien

<220>

<221> AMIDATION

<222> 33

<221> MOD_RES

<222> 1

<223> Xaa is pyroglutamic acid

<400> 106

Xaa Pro Leu Pro Asp Cys Cys Arg Gln Lys Thr Cys Ser Cys Arg Leu
 1 5 10 15
 Tyr Glu Leu Leu His Gly Ala Gly Asn His Ala Ala Gly Ile Leu Thr
 20 25 30
 Leu

10

<210> 107

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<220>

<221> AMIDATION

<222> 28

<400> 107

Arg Ser Gly Pro Pro Gly Leu Gln Gly Arg Leu Gln Arg Leu Leu Gln
 1 5 10 15
 Ala Ser Gly Asn His Ala Ala Gly Ile Leu Thr Met
 20 25

20

<210> 108

<211> 49

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 108

Tyr Leu Tyr Gln Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu
 1 5 10 15
 Glu Pro Arg Arg Glu Val Cys Glu Leu Asn Pro Asp Cys Asp Glu Leu
 20 25 30
 Ala Asp His Ile Gly Phe Gln Glu Ala Tyr Arg Arg Phe Tyr Gly Pro
 35 40 45
 Val

30

<210> 109

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapien

<400> 109

Cys Tyr Ile Gln Asn Cys Pro Leu Gly Asn His
 1 5 10

<210> 110
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 110
His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
1 5 10 15
Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu
20 25

<210> 111
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo Sapien

10

<400> 111
Asp Val Ala His Gly Ile Leu Asn Glu Ala Tyr Arg Lys Val Leu Asp
1 5 10 15
Gln Leu Ser Ala Gly Lys His Leu Gln Ser Leu Val Ala
20 25

<210> 112
<211> 38
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 112
Ala Pro Leu Glu Pro Val Tyr Pro Gly Asp Asn Ala Thr Pro Glu Gln
1 5 10 15
Met Ala Gln Tyr Ala Ala Asp Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr
20 25 30
Arg Pro Arg Tyr Asn His
35

20

<210> 113
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 113
Gly Gly Tyr Arg
1

<210> 114
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo Sapien

30

<400> 114
Tyr Gly Gly Phe Met Arg Arg Val Gly Arg Pro Glu
1 5 10

<210> 115
<211> 36

<212> PRT
<213> Homo Sapien

<220>

<221> AMIDATION
<222> 36

<400> 115

Tyr	Pro	Ile	Lys	Pro	Glu	Ala	Pro	Gly	Glu	Asp	Ala	Ser	Pro	Glu	Glu
1				5					10					15	
Leu	Asn	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Leu	Arg	His	Tyr	Leu	Asn	Leu	Val	Thr
			20					25					30		
Arg	Gln	Arg	Tyr												
			35												

10

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 116
Arg Arg Lys Ala Ser Gly Pro Pro Val
1 5

<210> 117
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<220>

<221> AMIDATION
<222> 11

20

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> Xaa is pyroglutamic acid

<400> 117
Xaa Ala Asp Pro Asn Lys Phe Tyr Gly Leu Met
1 5 10

<210> 118
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<220>

30

<221> AMIDATION
<222> 11

<221> MOD_RES
<222> 1
<223> Xaa is pyroglutamic acid

<400> 118

Xaa Val Pro Gln Trp Ala Val Gly His Phe Met
 1 5 10

<210> 119
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<220>

<221> UNSURE
 <222> 1,5
 <223> Xaa is a variable

<400> 119
 Xaa Arg Gly Asp Xaa
 1 5

10

<210> 120
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 120
 Gly Gln Pro Arg
 1

<210> 121
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

20

<400> 121
 Arg Arg Leu Ile Glu Asp Ala Glu Tyr Ala Ala Arg Gly
 1 5 10

<210> 122
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 122
 Arg Pro Thr Val Leu
 1 5

<210> 123
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

30

<400> 123
 His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Glu Leu Ser Arg Leu Arg Glu Gly
 1 5 10 15
 Ala Arg Leu Gln Arg Leu Leu Gln Gly Leu Val
 20 25

<210> 124
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<220>

<221> MOD_RES
 <222> 1
 <223> Xaa is pyroglutamic acid

<400> 124
 Xaa Ala Lys Ser Gln Gly Gly Ser Asn
 1 5

<210> 125
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 125
 Pro Gln Cys Gly Lys Cys Arg Ile Cys Lys Asn Pro Glu Ser Asn Tyr
 1 5 10 15
 Cys Leu Lys

10

<210> 126
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 126
 Pro Gln Cys Gly Lys Cys Arg Val Cys Lys Asn Pro Glu Ser Asn Tyr
 1 5 10 15
 Cys Leu Lys

20

<210> 127
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 127
 Pro Gln Cys Gly Lys Cys Arg Ile Cys Lys Asn Pro Glu Ser Asn Tyr
 1 5 10 15
 Cys Leu Lys

<210> 128
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 128
 Pro Leu Cys Arg Lys Cys Lys Phe Cys Leu Ser Pro Leu Thr Asn Leu
 1 5 10 15
 Cys Gly Lys

30

<210> 129
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 129
 Pro Gln Gly Glu Cys Lys Phe Cys Leu Asn Pro Lys Thr Asn Leu Cys
 1 5 10 15
 Gln Lys

<210> 130
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

10

<220>
 <221> AMIDATION
 <222> 11

<400> 130
 Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met
 1 5 10

<210> 131
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

20

<400> 131
 Pro Leu Ala Arg Thr Leu Ser Val Ala Gly Leu Pro Gly Lys Lys
 1 5 10 15

<210> 132
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 132
 Ala Val Gln Ser Lys Pro Pro Ser Lys Arg Asp Pro Pro Lys Met Gln
 1 5 10 15
 Thr Asp

<210> 133
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

30

<400> 133
 Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp Cys Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu
 1 5 10 15
 Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr Glu Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr

Ile Asp Gly Arg	20	25	30	
35				
<210> 134 <211> 5 <212> PRT <213> Homo Sapien <400> 134 Arg Lys Asp Val Tyr 1 5				
<210> 135 <211> 9 <212> PRT <213> Homo Sapien <400> 135 Gln Ala Lys Ser Gln Gly Gly Ser Asn 1 5				10
<210> 136 <211> 3 <212> PRT <213> Homo Sapien <220> <221> MOD_RES <222> 1 <223> Xaa is pyroglutamic acid <400> 136 Xaa His Pro 1				20
<210> 137 <211> 4 <212> PRT <213> Homo Sapien <400> 137 Thr Lys Pro Arg 1				
<210> 138 <211> 11 <212> PRT <213> Homo Sapien <220> <221> AMIDATION <222> 11				30

<221> MOD_RES
 <222> 1
 <223> Xaa is pyroglutamic acid
 <400> 138
 Xaa Pro Asp Pro Asn Ala Phe Tyr Gly Leu Met
 1 5 10

<210> 139
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 139
 Asp Leu Trp Gln Lys
 1 5

10

<210> 140
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 140
 Asp Asn Pro Ser Leu Ser Ile Asp Leu Thr Phe His Leu Leu Arg Thr
 1 5 10 15
 Leu Leu Glu Leu Ala Arg Thr Gln Ser Gln Arg Glu Arg Ala Glu Gln
 20 25 30
 Asn Arg Ile Ile Phe Asp Ser Val
 35 40

<210> 141
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

20

<400> 141
 Asn Asp Asp Cys Glu Leu Cys Val Asn Val Ala Cys Thr Gly Cys Leu
 1 5 10 15

<210> 142
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 142
 Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
 1 5 10 15
 Met Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr
 20 25

30

<210> 143
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

<400> 143

Cys Tyr Phe Gln Asn Cys Pro Arg Gly
1 5

<210> 144
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 144
Cys Tyr Ile Gln Asn Cys Pro Arg Gly
1 5

<210> 145
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo Sapien

10

<400> 145
His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15
Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
20 25

<210> 146
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 146
Met Leu Thr Lys Phe Glu Thr Lys Ser Ala Arg Val Lys Gly Leu Ser
1 5 10 15
Phe His Pro Lys Arg Pro Trp Ile Leu
20 25

20

<210> 147
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<220>

<221> UNSURE
<222> 2
<223> Xaa is a variable

<400> 147
Tyr Xaa Asn
1

30

<210> 148
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapien

<400> 148
Phe Gln Phe His Phe His Trp Gly Ser

1 5

<210> 149
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo Sapien

40

<400> 149
Ile Ile Ile Gln Phe His Phe His Trp Gly Ser
1 5 10

【 図 1 】

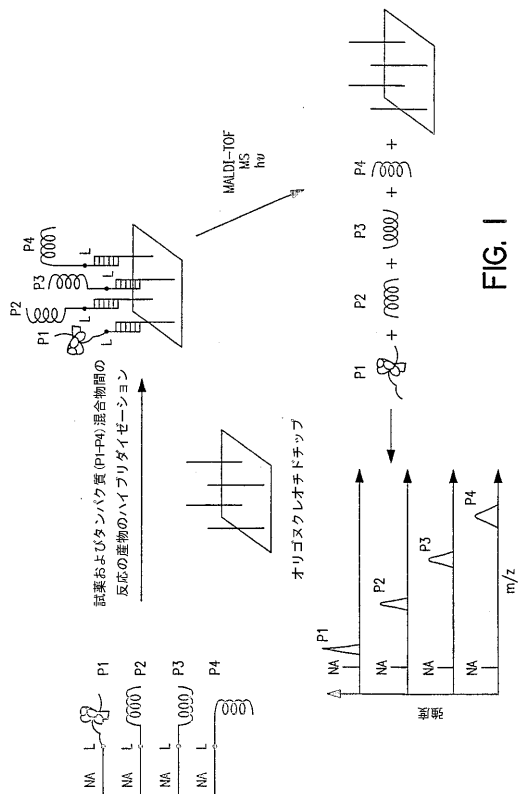


FIG. 1

【 図 2 】

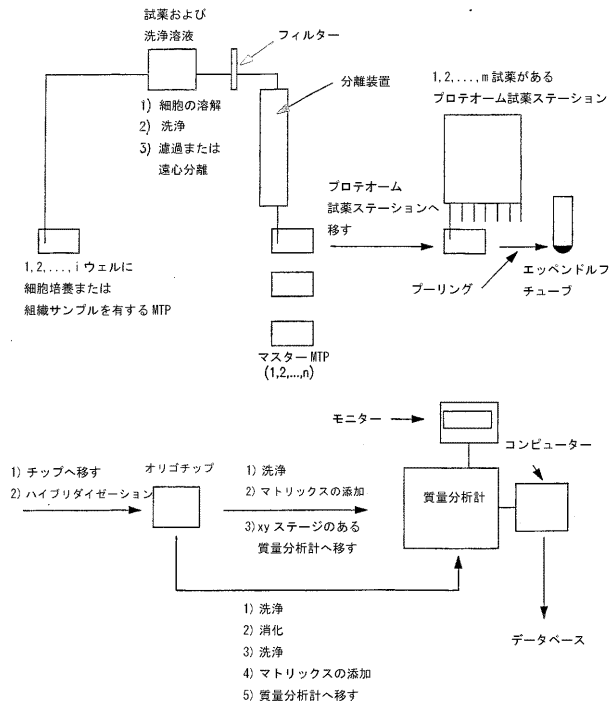


FIG. 2

【 図 3 】

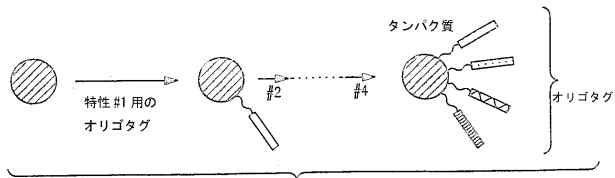


FIG. 3

【 図 5 】

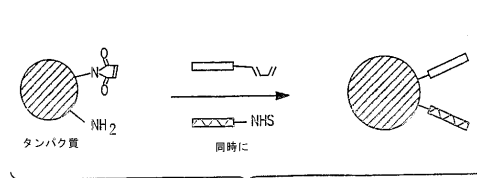


FIG. 5

【 図 4 】

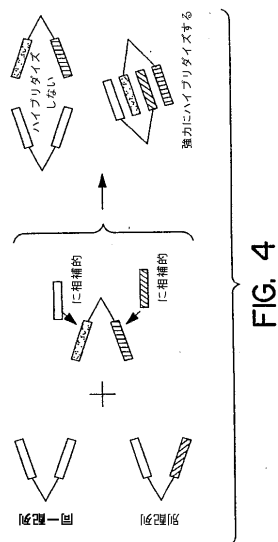


FIG. 4

【 図 6 】

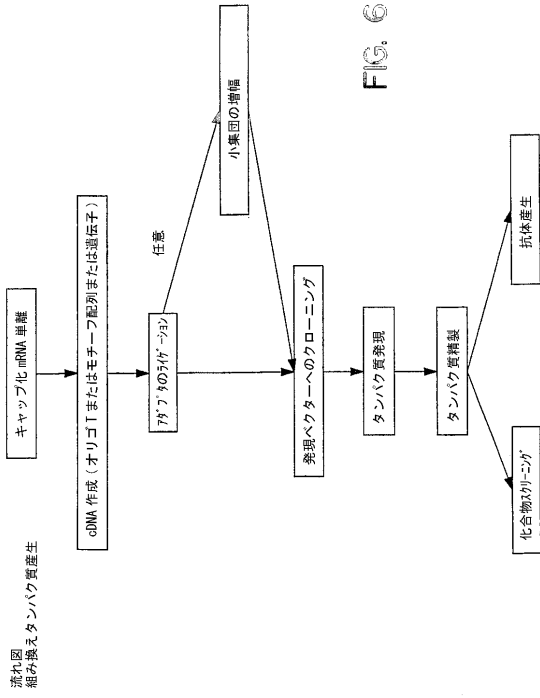


FIG. 6

【 図 7 】

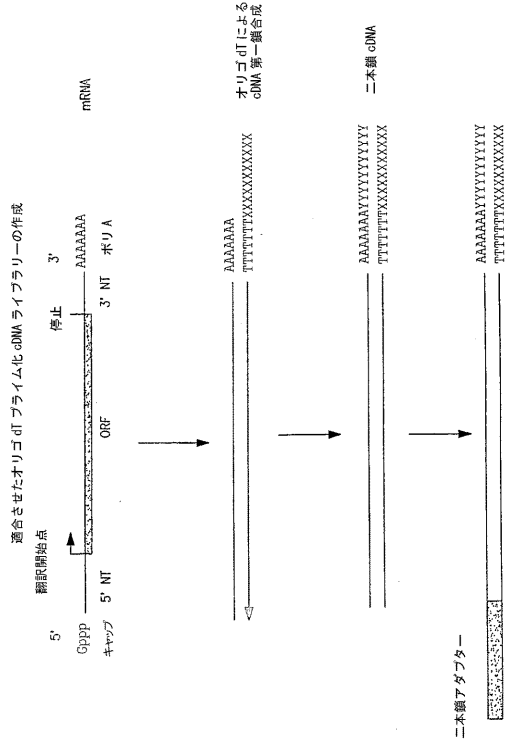


FIG. 7

【 図 8 】

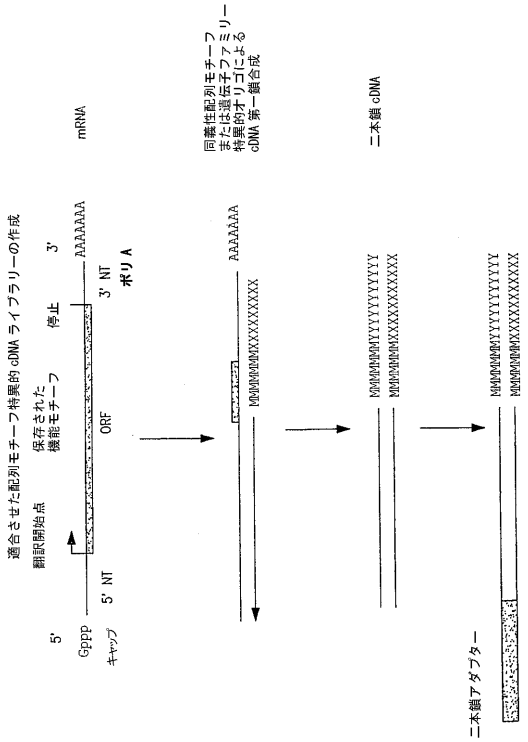


FIG. 8

【 図 9 】

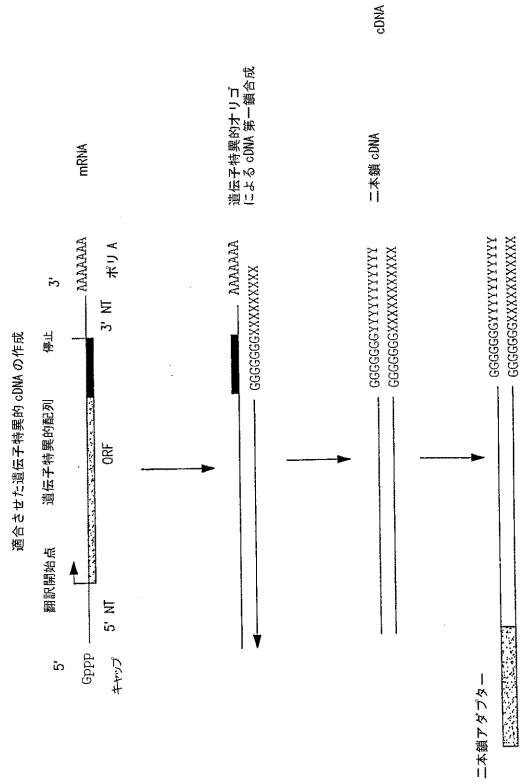


FIG. 9

【 図 1 0 】

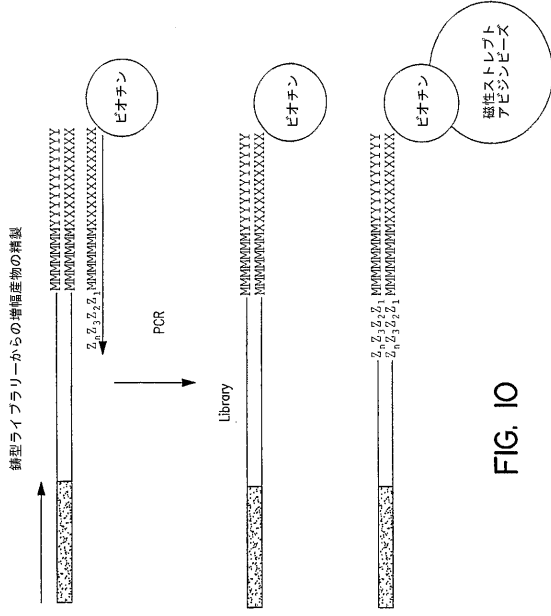
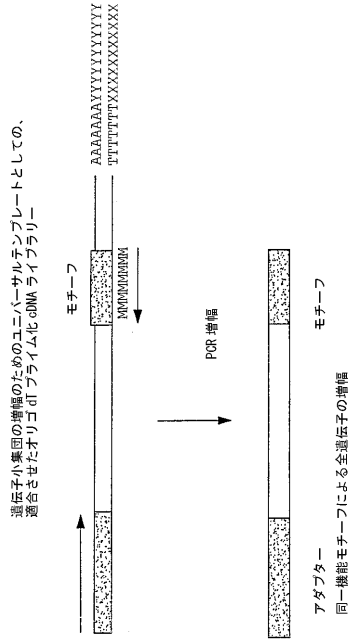


FIG. 10

【 図 1 1 】



【 図 1 2 】

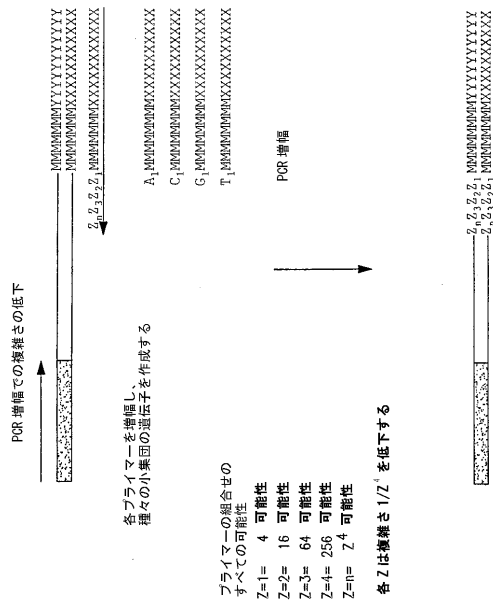
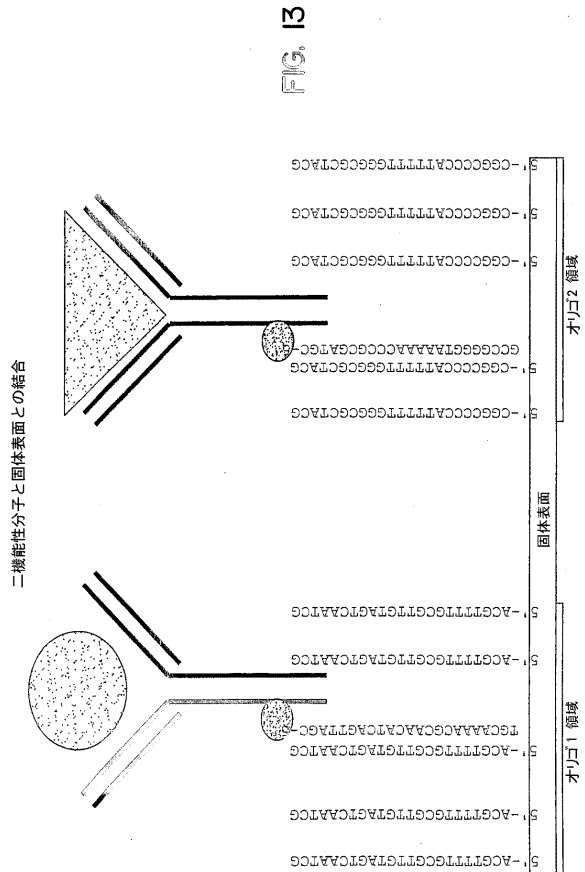


FIG. 12

【 図 1 3 】



【 17 p 】

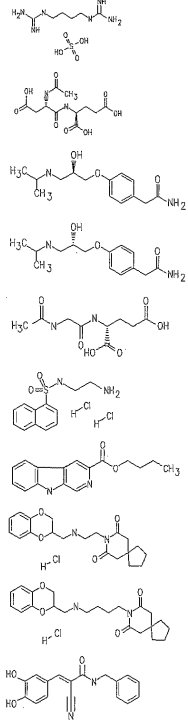


FIG. 17p

【 17 q 】

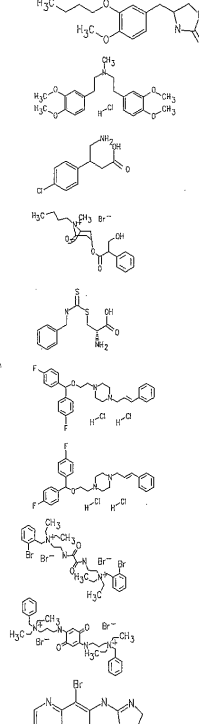


FIG. 17q

【 17 r 】

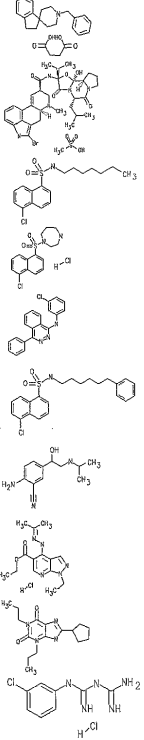


FIG. 17r

【 17 s 】

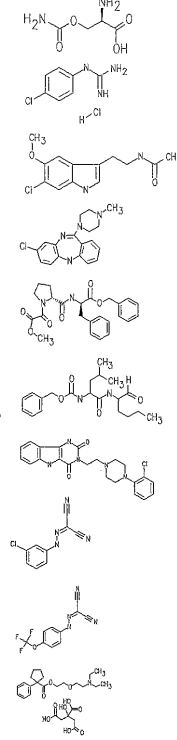


FIG. 17s

【 17 t 】

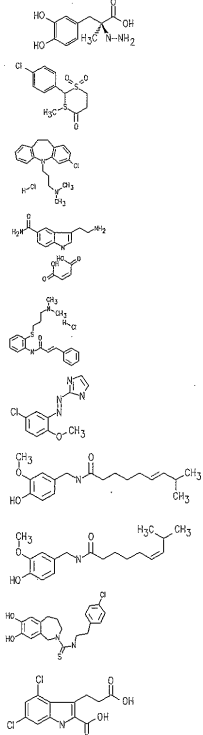


FIG. 17t

【 17 u 】

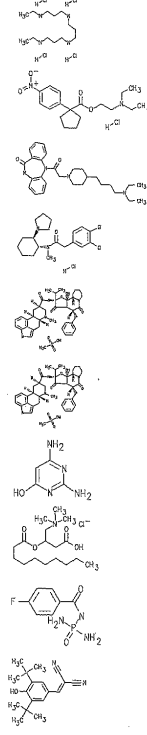


FIG. 17u

【 17 v 】

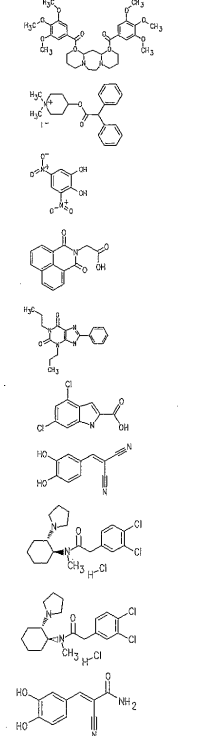


FIG. 17v

【 17 w 】

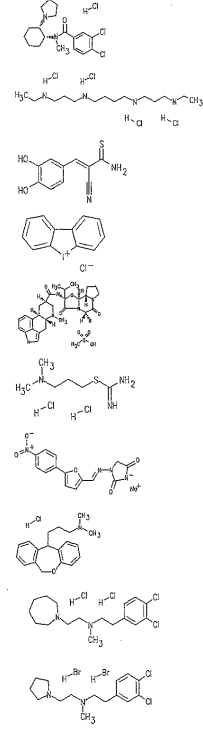


FIG. 17w

【 17 x 】

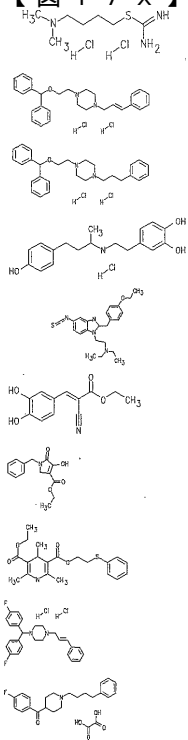


FIG. 17x

【 17 y 】

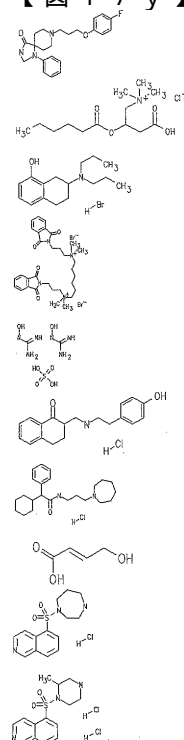


FIG. 17y

【 17 z 】

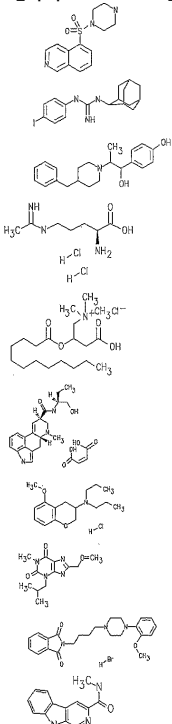


FIG. 17z

【 17 a a 】

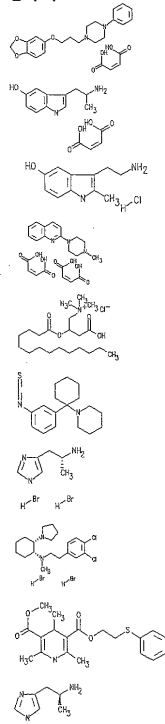


FIG. 17aa

【 17 b b 】

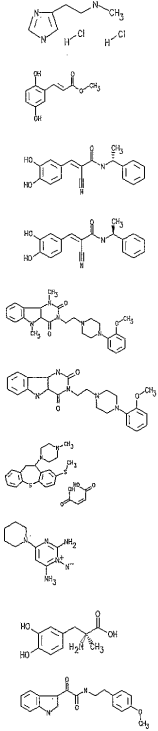


FIG. 17bb

【 17 c c 】

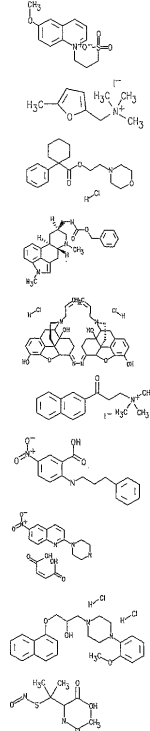


FIG. 17cc

【 17 d d 】

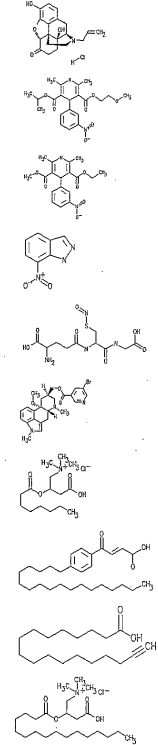


FIG. 17dd

【 17 e e 】

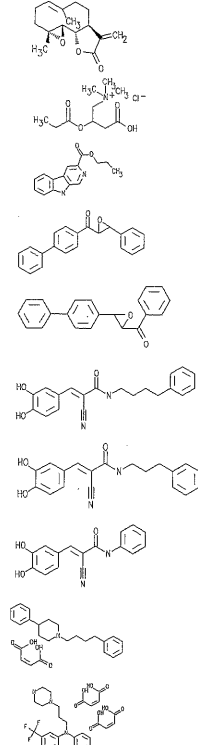
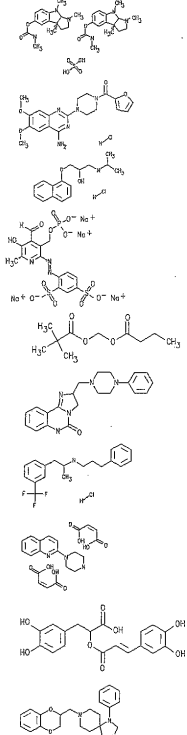
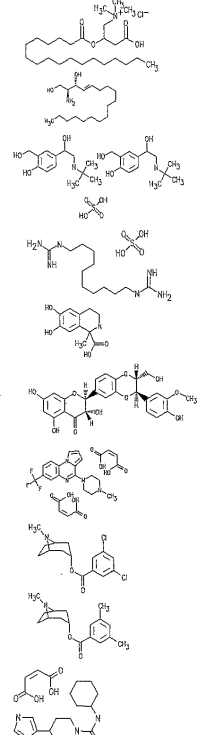


FIG. 17ee

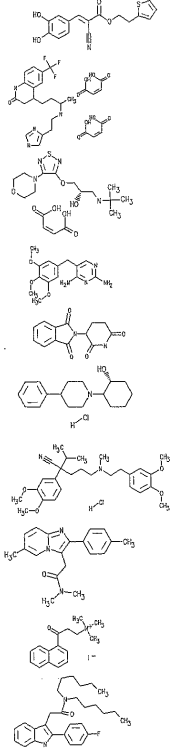
【 17 f f 】



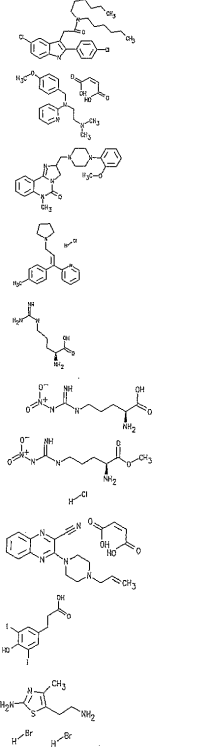
【 17 g g 】



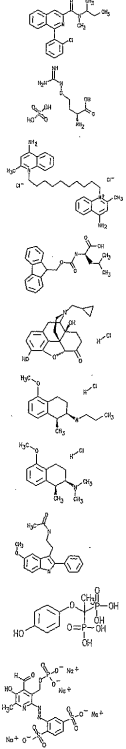
【 17 h h 】



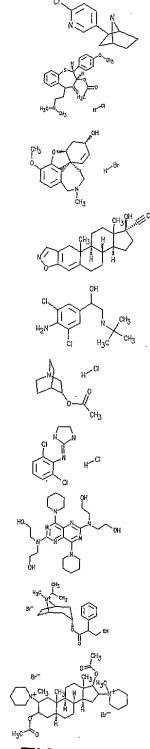
【 17 i i 】



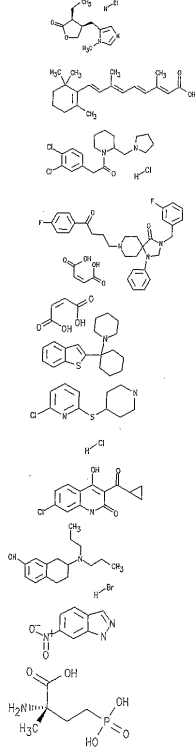
【 17 j j 】



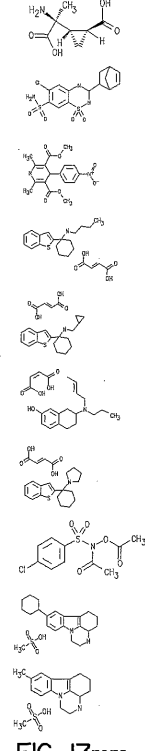
【 17 k k 】



【 17 l l 】



【 17 m m 】



【 17 n n 】

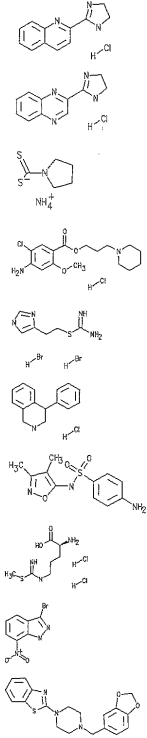


FIG. 17nn

【 17 o o 】

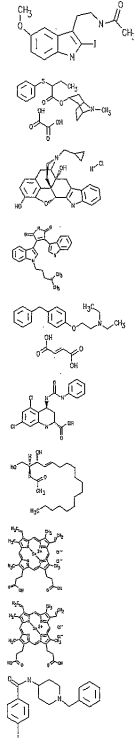


FIG. 17oo

【 17 p p 】

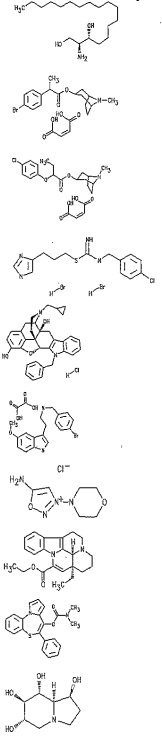


FIG. 17pp

【 17 q q 】

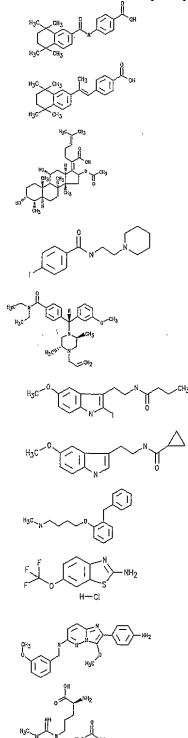


FIG. 17qq

【 17 v v 】

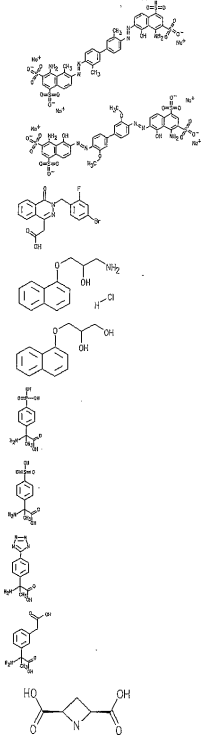


FIG. 17vv

【 17 w w 】

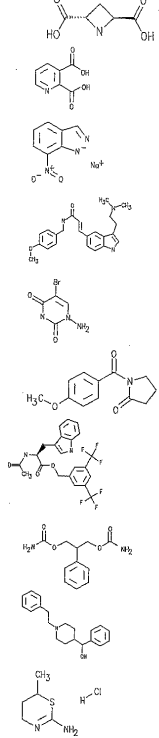


FIG. 17ww

【 17 x x 】

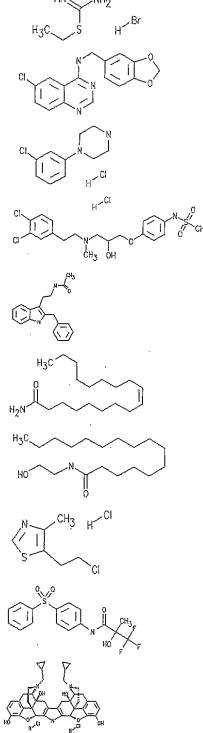


FIG. 17xx

【 17 y y 】

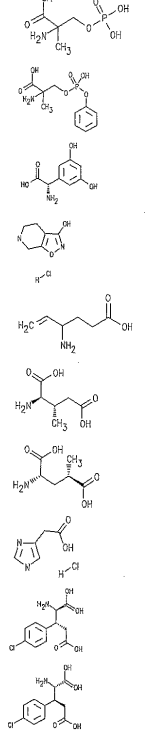


FIG. 17yy

【 17 z z 】

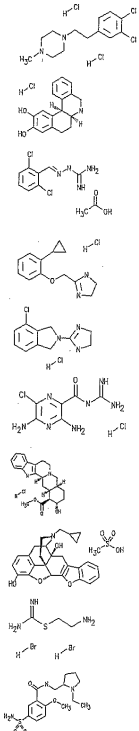


FIG. 17zz

【 17 a a a 】

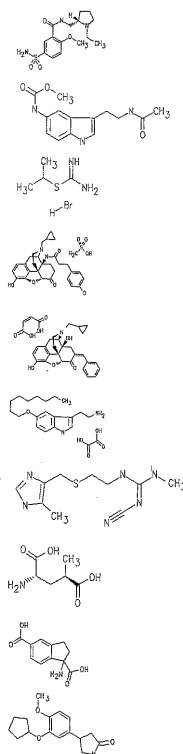


FIG. 17aaa

【 17 b b b 】

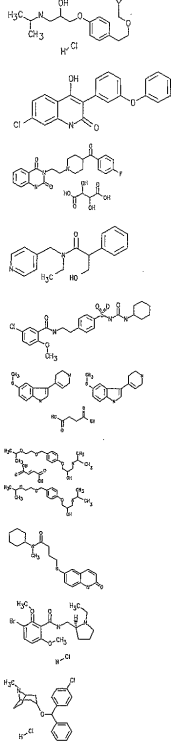


FIG. 17bbb

【 17 c c c 】

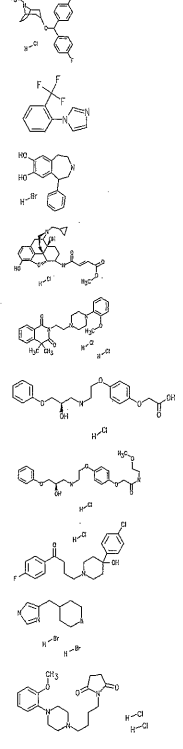
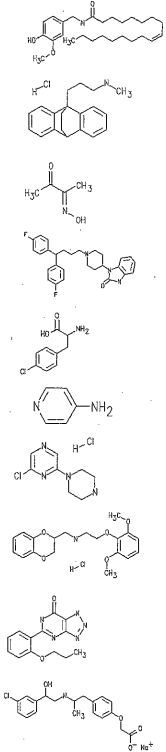
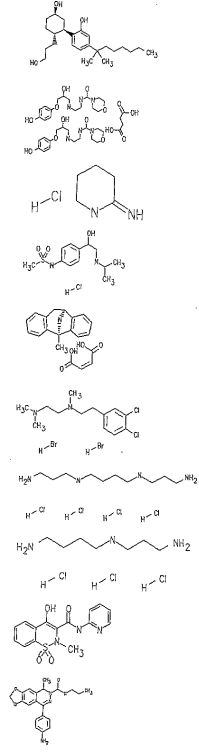


FIG. 17ccc

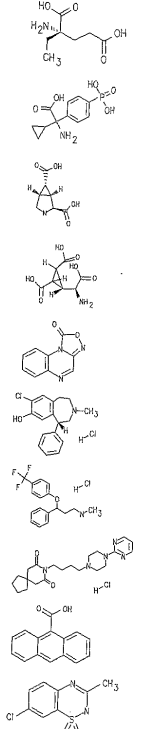
【 17 d d d 】



【 17 e e e 】



【 17 f f f 】



【 17 g g g 】

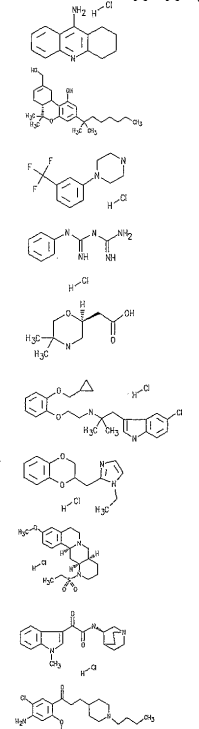
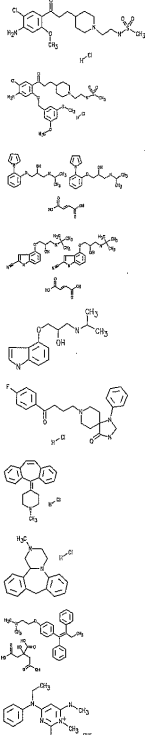


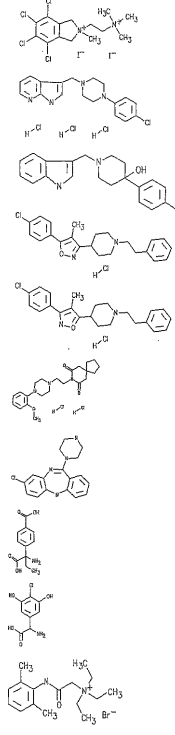
FIG. 17fff

FIG. 17ggg

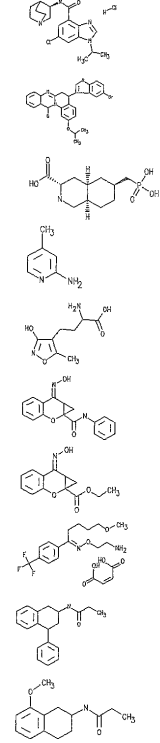
【 17 h h h 】



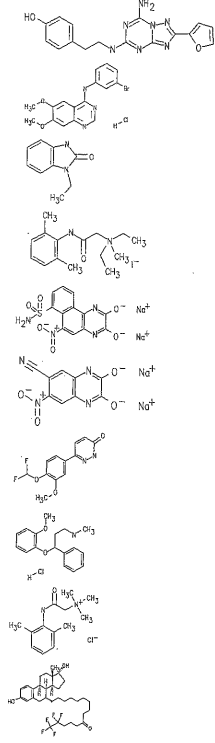
【 17 i i i 】



【 17 i j j 】



【 17 k k k 】



【 17111 】

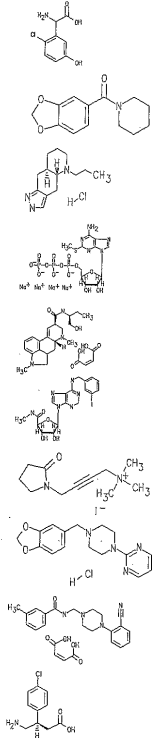


FIG. 17111

【 17mmm 】

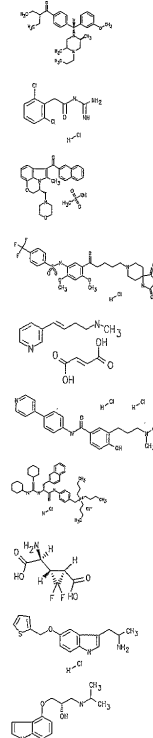


FIG. 17mmm

【 17nnn 】

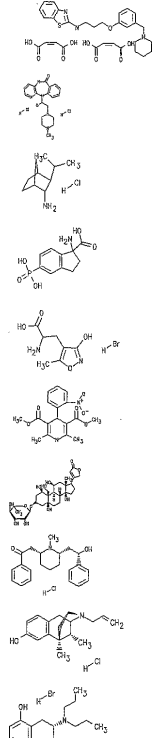


FIG. 17nnn

【 17ooo 】

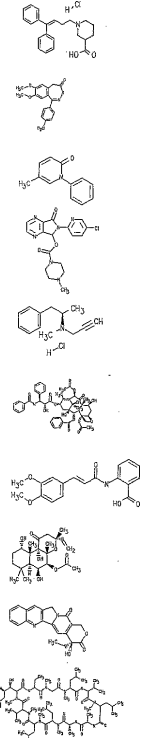


FIG. 17ooo

【 17 p p p 】

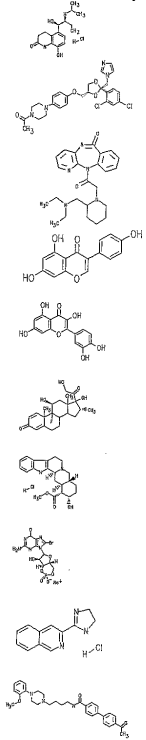


FIG. 17ppp

【 17 q q q 】

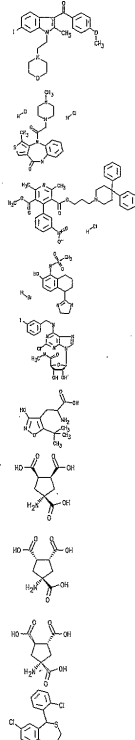


FIG. 17qqq

【 17 r r r 】

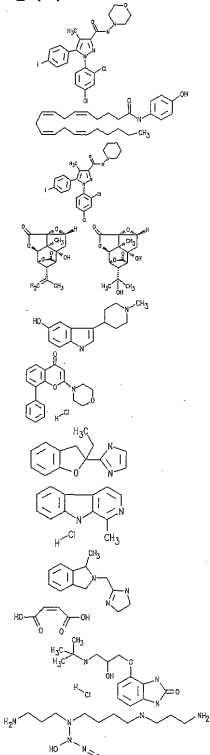


FIG. 17rrr

【 17 s s s 】

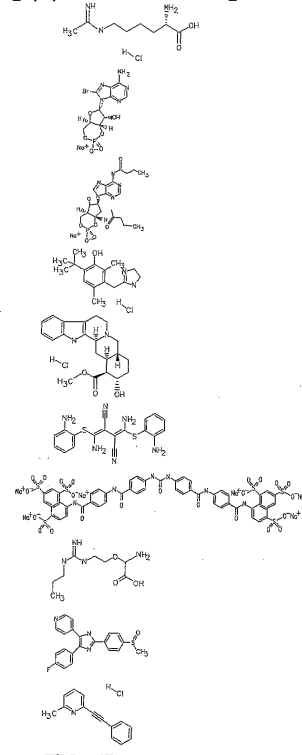
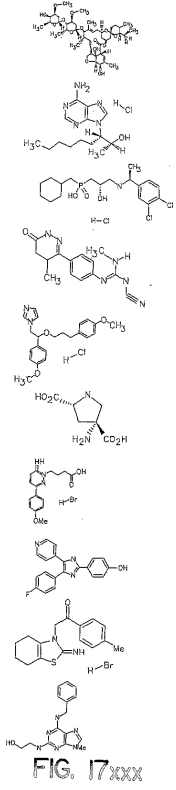
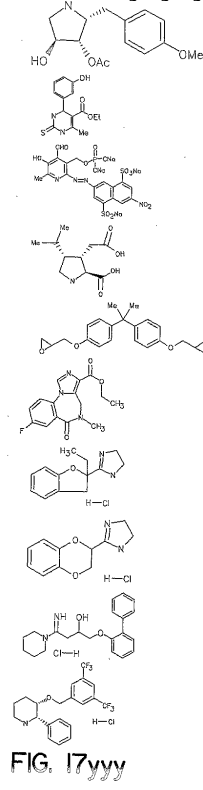


FIG. 17sss

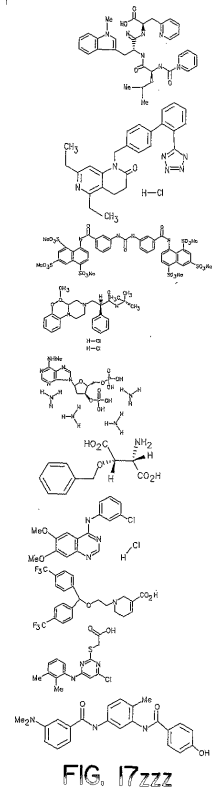
【 17 x x x 】



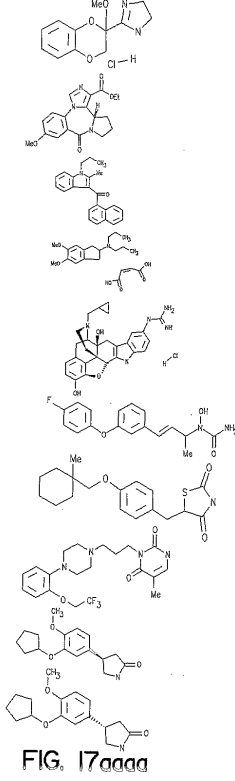
【 17 y y y 】



【 17 z z z 】



【 17 a a a a 】



【 17 b b b b 】

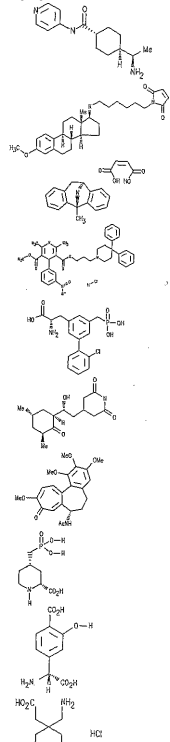


FIG. 17bbbb

【 17 c c c c 】

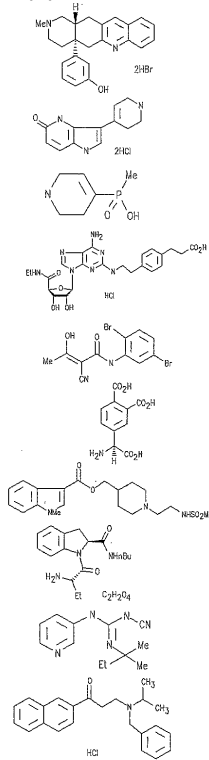


FIG. 17cccc

【 17 d d d d 】

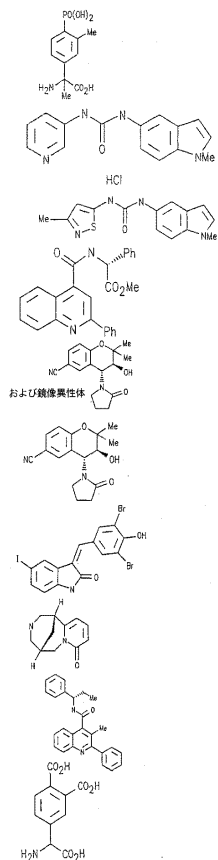


FIG. 17dddd

【 17 e e e e 】

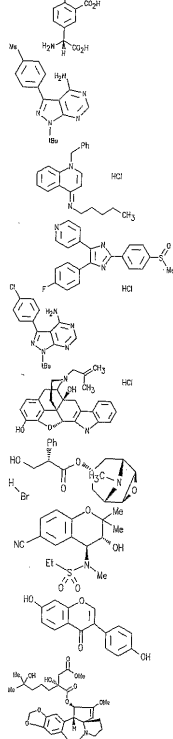
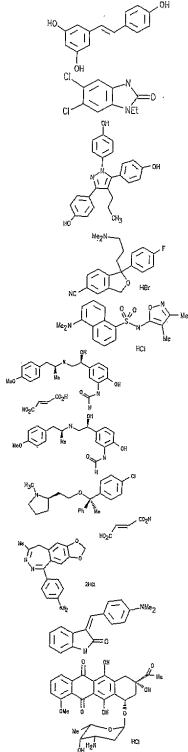
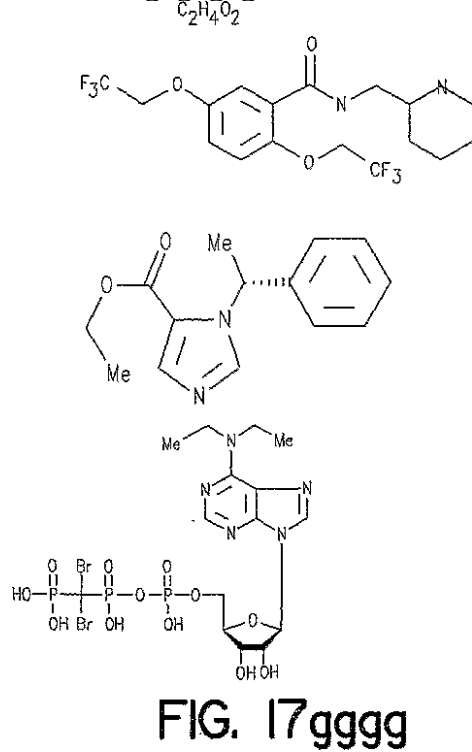


FIG. 17eeee

【 図 17 f f f f f f 】



【 図 17 g g g g g g 】



【 図 17 h h h h h h 】

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uproフェン
- (S)-(+)-イブuproフェン
- 抗-β-アミロイド (1-43)
- 抗-BACE1、C-末端 (489-501)
- 抗-ニカストリン、C-末端
- 抗-ニカストリン、N-末端
- 抗-Reelin

血管形成のためのペプチド

- MT1-MMp ヘモベキシンドメイン、His-Tag[®]、ヒト、組み換え体
- MT2-MMp ヘモベキシンドメイン、His-Tag[®]、ヒト、組み換え体
- VEGF インヒビター

FIG. 17hhhh

【 図 18 】

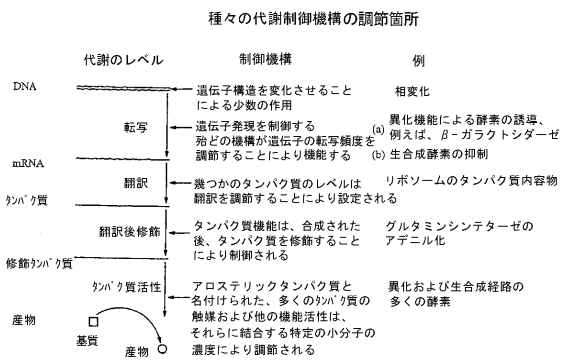


FIG. 18

【 図 1 9 a 】

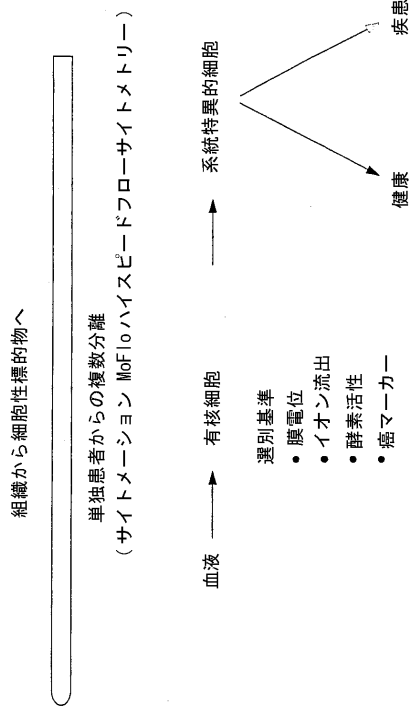


FIG. 19a

【 図 1 9 b 】

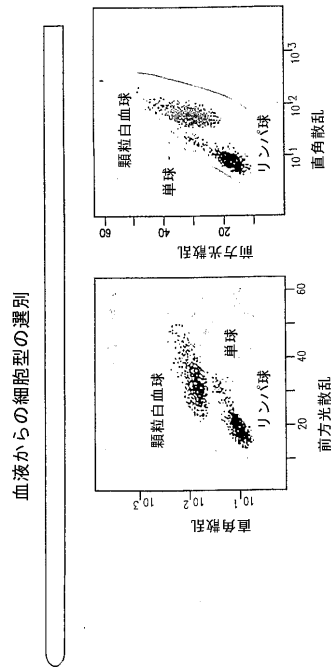


FIG. 19b

末梢血の細胞型は、標識することなく分離できる再現可能な方法で光散乱を生ずる。

【 図 1 9 c 】

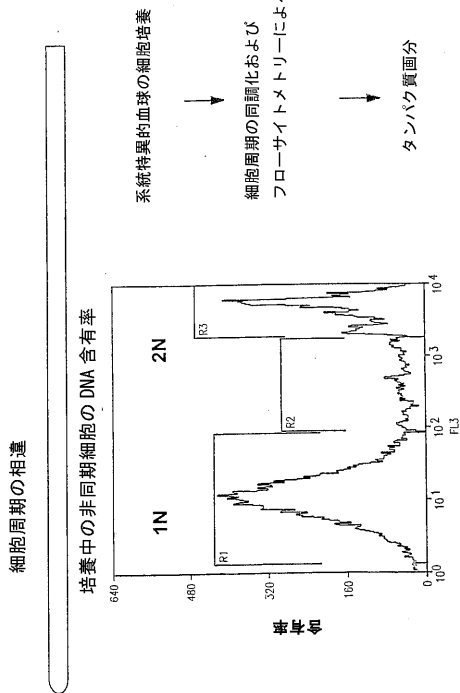


FIG. 19c

【 図 2 0 a 】

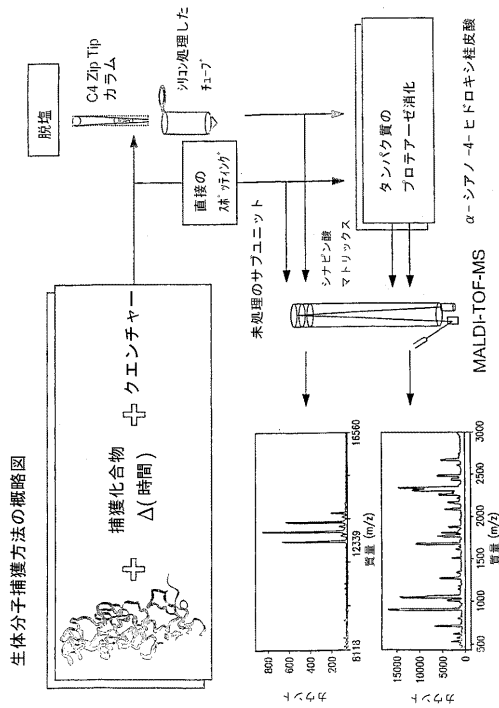
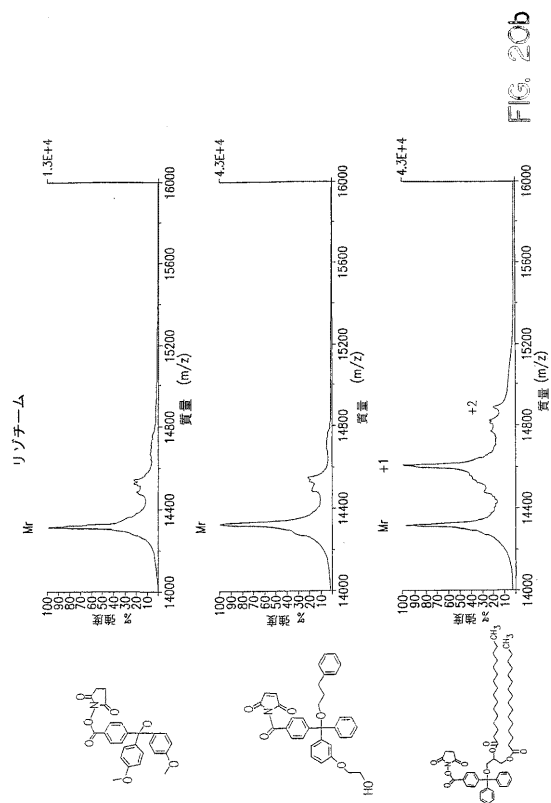
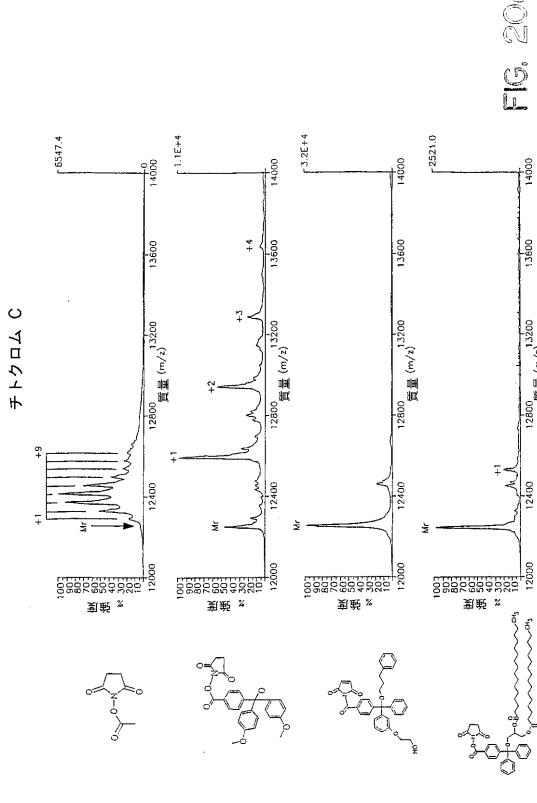


FIG. 20a

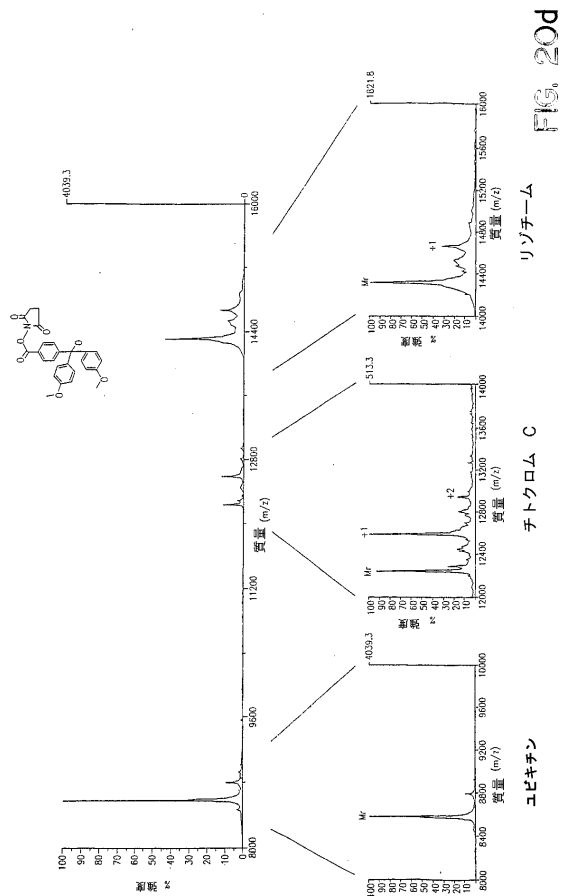
【図 20 b】



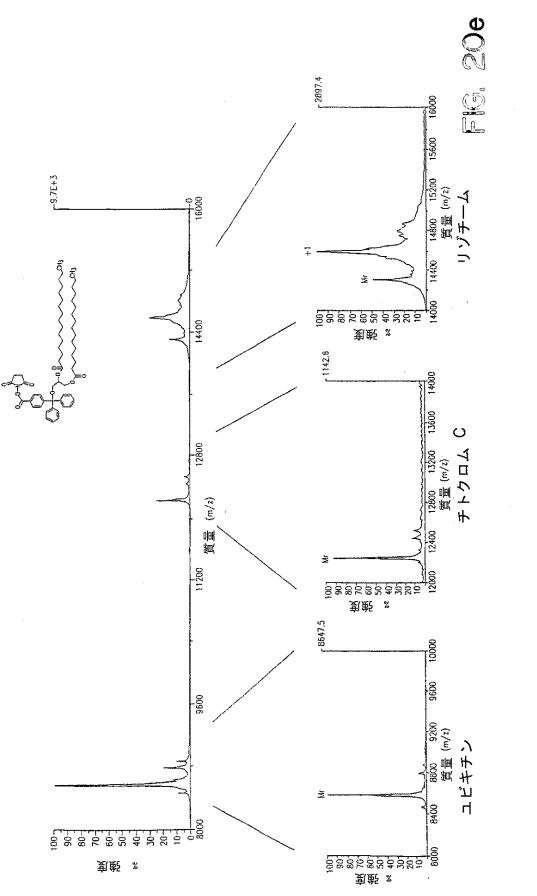
【図 20 c】



【図 20 d】



【図 20 e】



【 図 2 0 f 】

非特異的化合物とのチトクロムC(18 Lys) 反応

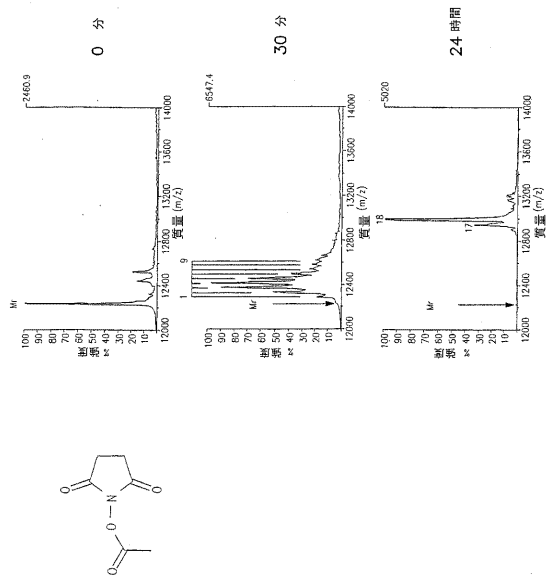
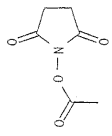


FIG. 20f



【 図 2 1 A 】

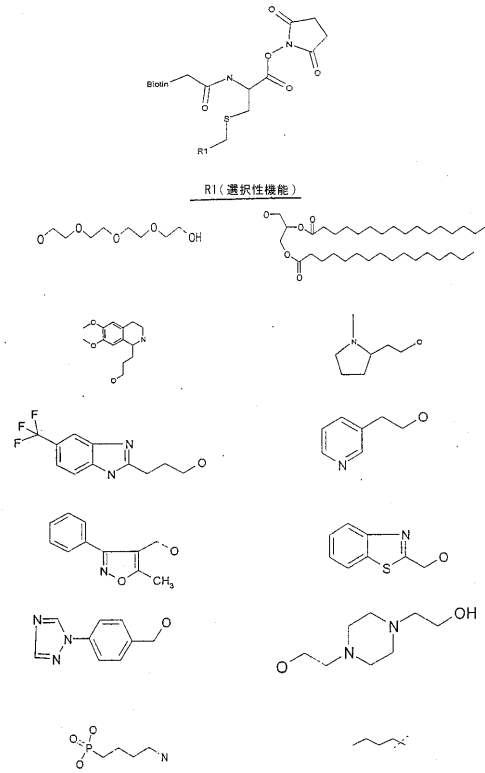


FIG. 21A

【 図 2 1 B 】

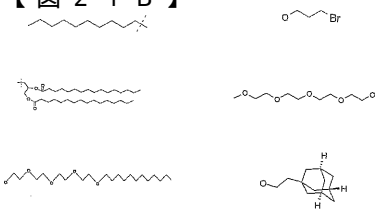


FIG. 21B

【 図 2 2 】

ヘモグロビン

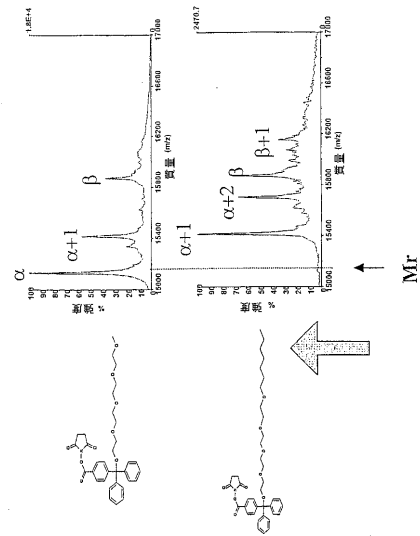


FIG. 22

【 2 3 A 】

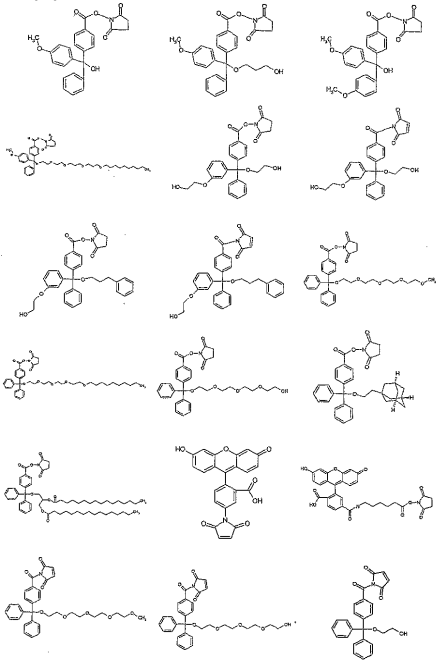


FIG. 23A

【 2 3 B 】

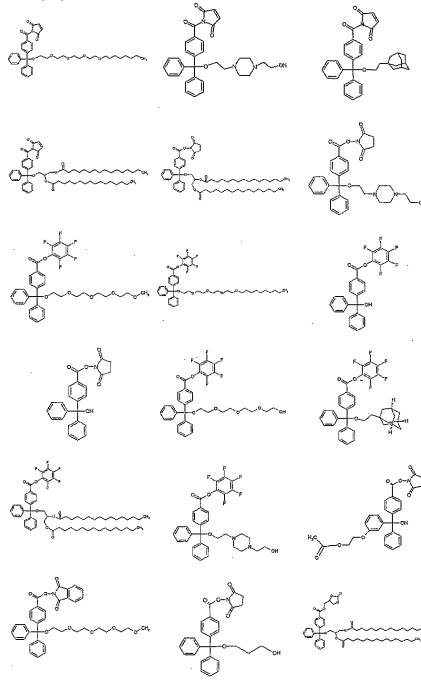


FIG. 23B

【 2 3 C 】

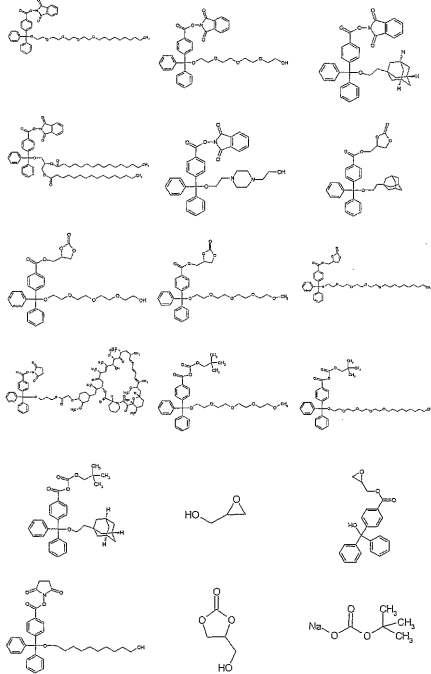


FIG. 23C

【 2 3 D 】

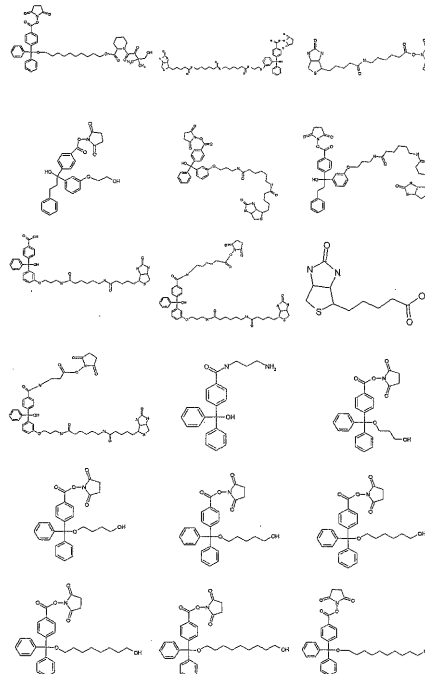


FIG. 23D

【 図 2 4 】

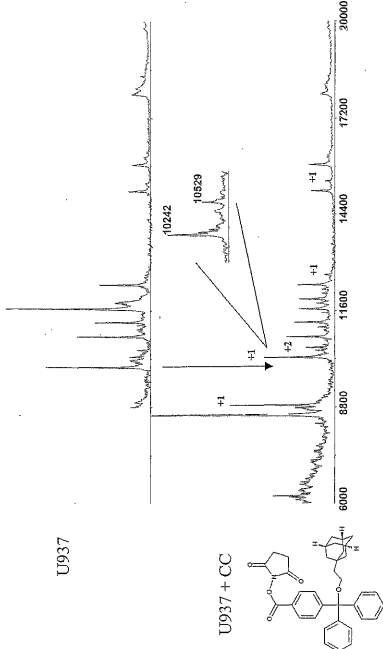


FIG. 24

【 図 2 5 】

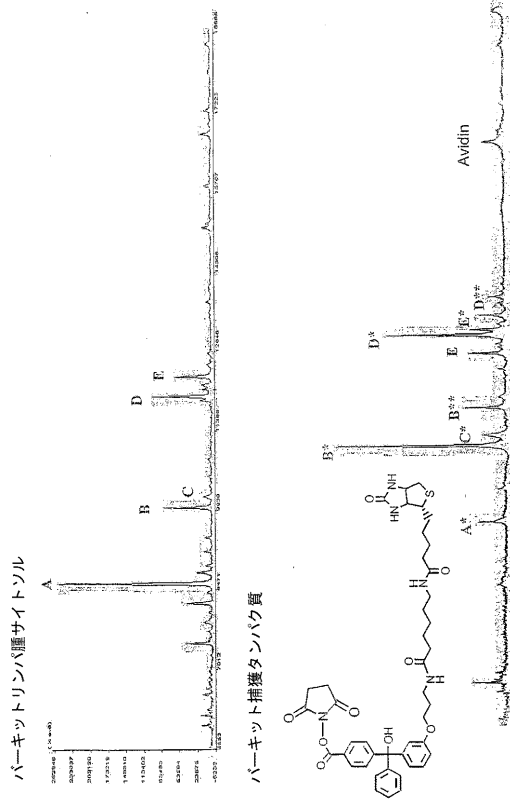


FIG. 25

【 図 2 6 】

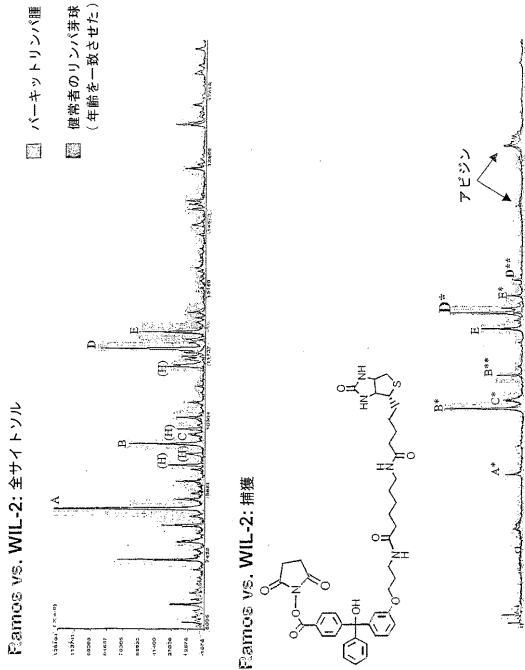


FIG. 26

【 図 2 7 】

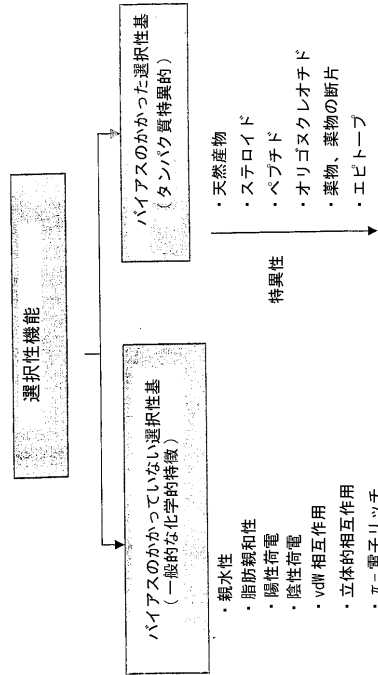


FIG. 27

【 図 28 】

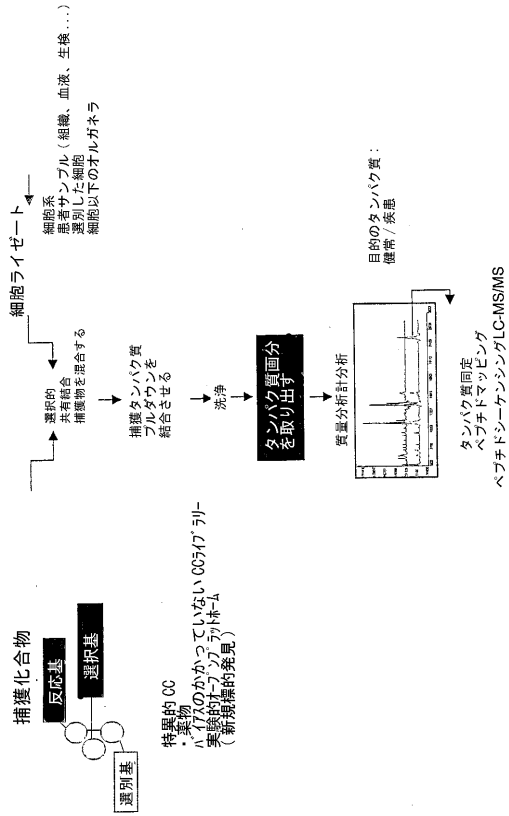


FIG. 28

【 図 29 】

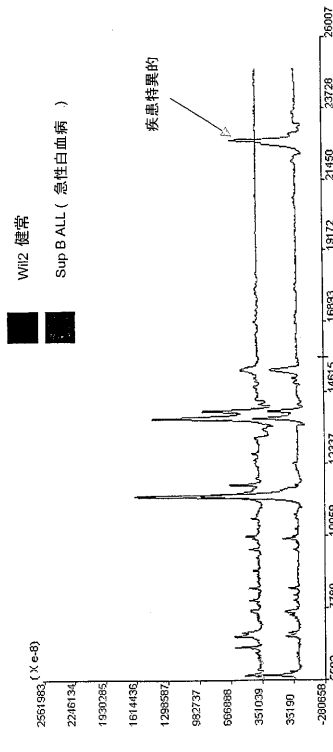


FIG. 29

【 図 30 】

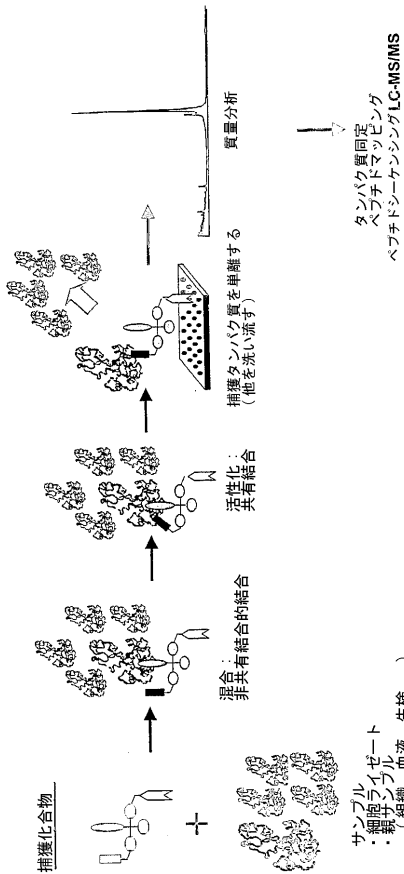


FIG. 30

【 図 31 】

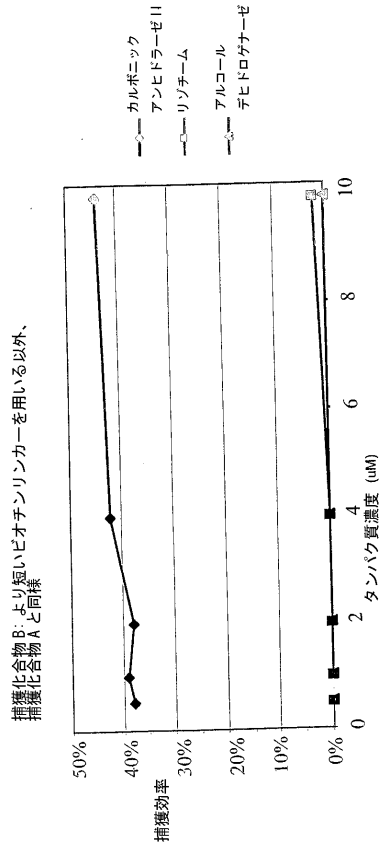


FIG. 31

【 図 3 2 】

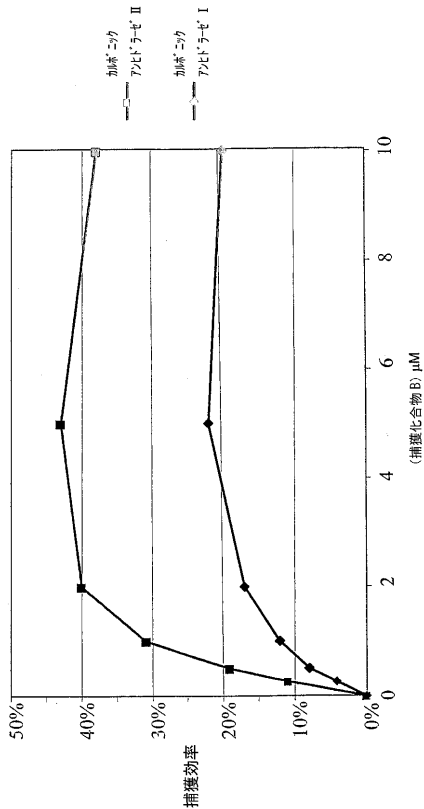


FIG. 32

【 図 3 3 】

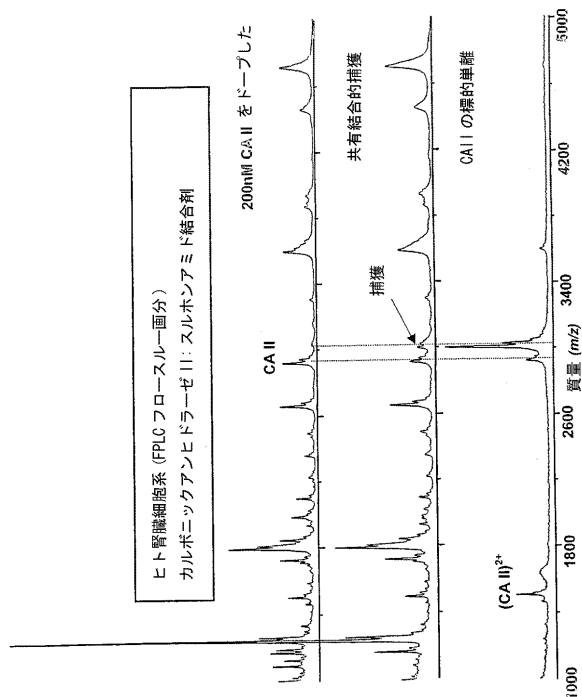


FIG. 33

【 図 3 4 】

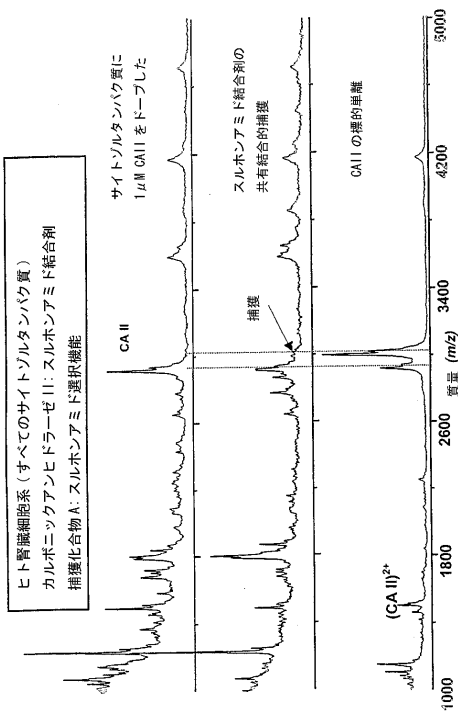


FIG. 34

【 図 3 5 】

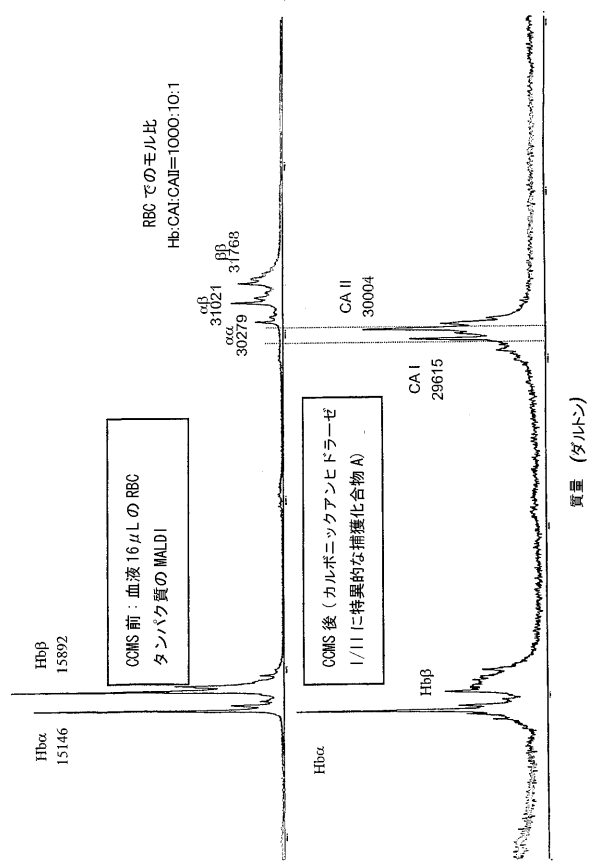


FIG. 35

【 図 3 6 】

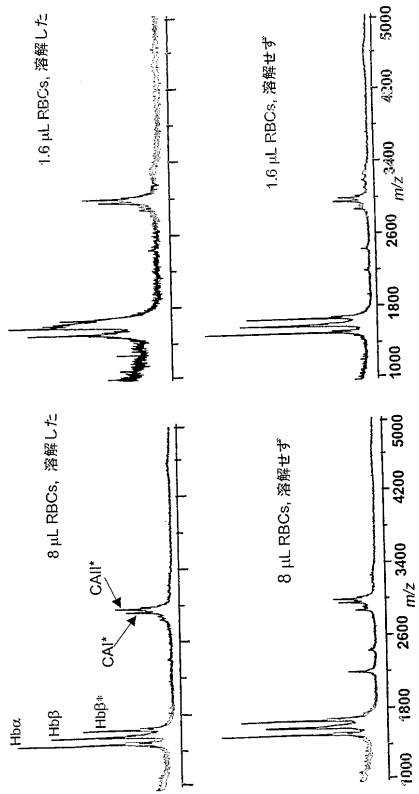


FIG. 36

【 図 3 7 】

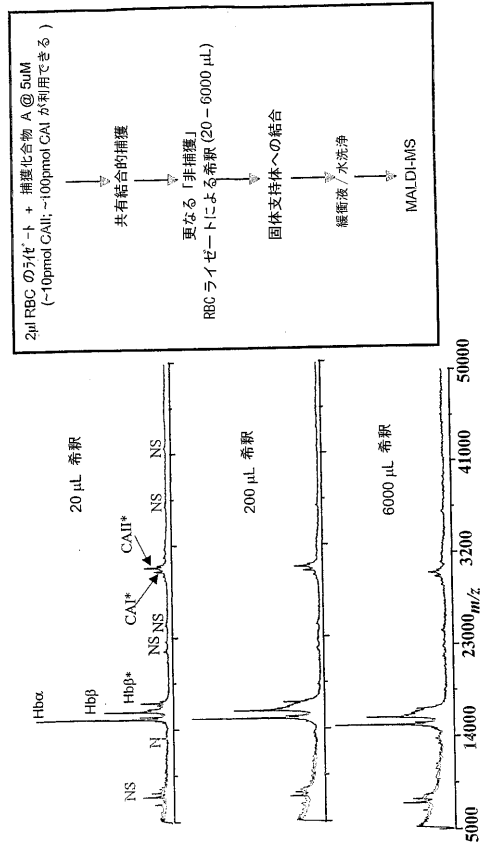


FIG. 37

【 図 3 8 】

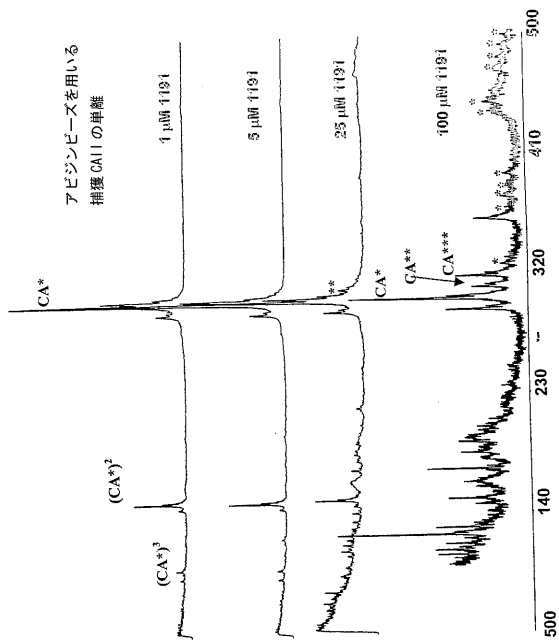


FIG. 38

【手続補正書】

【提出日】平成17年9月13日(2005.9.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

[2006518450000001.app](#)

【手続補正書】

【提出日】平成18年2月1日(2006.2.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

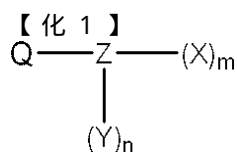
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下を含む方法：

i) 生体分子を含むサンプルと捕獲化合物を接触させ、サンプル中の生体分子の捕獲を行うこと、ここで、捕獲化合物は以下の式を有する：



Xは、得られる生体分子/捕獲化合物の複合体が質量スペクトル分析の条件下で安定であるように、生体分子と共有結合するかまたは十分に高い親和性を有して結合するように選択され、

Yは、選択性部分Yが存在する場合に存在しない場合よりも少ない生体分子と捕獲化合物が結合するように、Xによる結合の選択性を高めるように選択した医薬薬物、薬物の断片、薬物中間体、薬物代謝物またはプロドラッグであり、

Qは選別官能基であり、

mは1から100の整数であり、

nは1から100の整数である、および

ii) 捕獲した生体分子を単離し同定すること。

【請求項2】

Xは、生体分子との接触後に活性化が必要となる、生体分子と反応し得る潜在的反応基である、請求項1の方法。

【請求項3】

捕獲化合物の部分Xが、アジド、ジアジリン、または活性化後に、生体分子と反応する基を含む、請求項1-2の何れかの方法。

【請求項4】

各々のXが、活性エステル、活性ハロ部分、アミノ酸側鎖-特異的官能基、生体分子表面に結合する特定ペプチド、-ハロエーテル、-ハロカルボニル基、マレイミド、金属錯体、エクスポキシド、イソチオシアネートからなる群から選択される、請求項1-2の何れかの方法。

【請求項5】

生体分子はタンパク質を含む、請求項1-4の何れかの方法。

【請求項6】

サンプルとの平衡においてタンパク質と捕獲化合物の部分Yとが相互作用する条件下で

接触ステップを行う、請求項 5 の方法。

【請求項 7】

平衡後、混合物を処理し、捕獲化合物とタンパク質との間に共有結合を形成する、請求項 6 の方法。

【請求項 8】

処理は、光による活性化を含む、請求項 7 の方法。

【請求項 9】

処理は、pHの変化を含む、請求項 7 の方法。

【請求項 10】

捕獲化合物の濃度が、複数の種々の反応物において変化する、請求項 1 - 9 の何れかの方法。

【請求項 11】

Kd値が決定されている、請求項 1 - 10 の何れかの方法。

【請求項 12】

サンプル中におけるタンパク質と捕獲化合物の部分Yとの相互作用が動力学的にコントロールされている条件下で接触ステップを行う、請求項 5 の方法。

【請求項 13】

薬物が、該薬物分子上の種々の結合点を介し異なる向きで部分Zに連結する、請求項 1 - 12 の何れかの方法。

【請求項 14】

捕獲した生体分子との結合相互作用を取り除くか変化させる薬物を再設計することを更に含む、請求項 1 - 13 の何れかの方法。

【請求項 15】

捕獲化合物に連結した再設計薬物を用い、方法を繰り返し、更にその修飾を行う、請求項 14 の方法。

【請求項 16】

サンプルを、捕獲化合物の収集物と接触させる、請求項 1 - 15 の何れかの方法。

【請求項 17】

捕獲した生体分子を、質量スペクトル分析により検出するかまたは同定することを更に含む、請求項 1 - 16 の何れかの方法。

【請求項 18】

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、サーモスプレーおよびマッシュプクラスター衝撃質量分析計から選択される、請求項 17 の方法。

【請求項 19】

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 18 の方法。

【請求項 20】

捕獲した生体分子の機能を同定することを更に含む、請求項 1 - 19 の方法。

【請求項 21】

生体分子の機能を、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、肝臓ミドロソーム代謝経路、cDNA-発現した酵素、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、取り出したタンパク質の刺激およびタンパク質/タンパク質相互作用、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、または予測遺伝子型決定および予測表現型決定により決定する、請求項 20 の方法。

【請求項 22】

サンプルは、生物学的サンプルである、体組織または体液または細胞ライゼートを含む、請求項 1 - 21 の何れかの方法。

【請求項 2 3】

結合が変化している捕獲した生体分子が、薬物の標的タンパク質である、請求項 1 4 の方法。

【請求項 2 4】

結合が変化した捕獲した生体分子が、薬物の非標的タンパク質である、請求項 1 4 の方法。

【請求項 2 5】

薬物の再設計により、第一の薬物と比較して、副作用がより少ないか、治療指数が増大する第二の薬物を作成する、請求項 1 4 - 2 4 の何れかの方法。

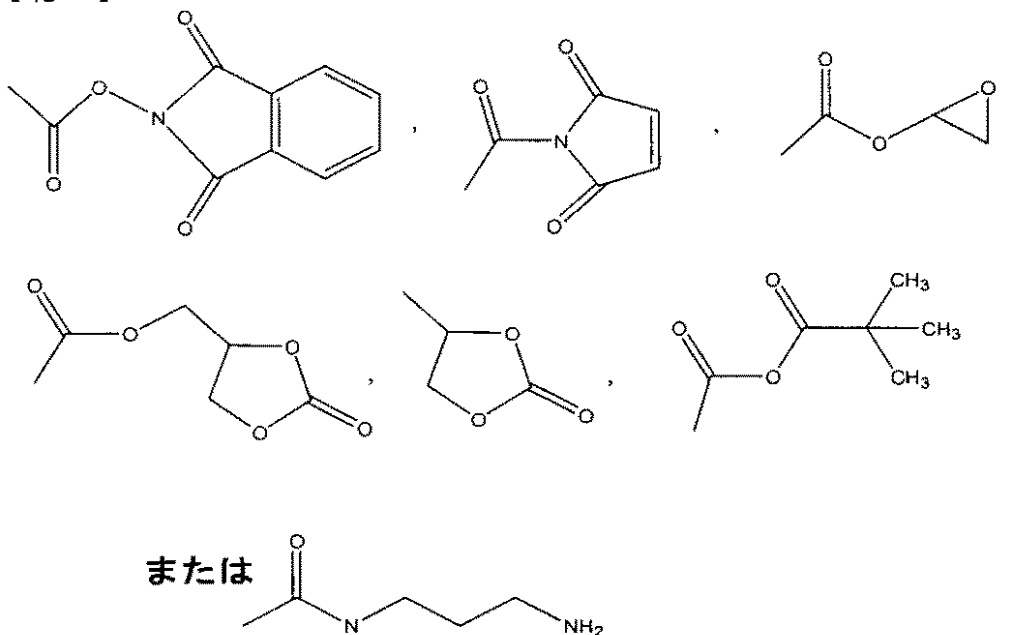
【請求項 2 6】

Xが光活性化可能な基である、請求項 1 - 2 5 の何れかの方法。

【請求項 2 7】

Xが図 1 6 に列挙のものから選択されるか、またはXが

【化 2】



である、請求項 1 - 2 6 の何れかの方法。

【請求項 2 8】

Yが図 1 7 に示される薬物または薬物中間体 / 断片から選択される、請求項 1 - 2 7 の方法。

【請求項 2 9】

部分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ラバスタチンから選択される、請求項 1 - 2 7 の何れかの方法。

【請求項 3 0】

Qは塩基相補的な一本鎖核酸分子または類似体と安定なハイブリッドを形成するために十分な長さ「j」の一本鎖部分を含む、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、請求項 1 - 2 9 の何れかの方法。

【請求項 3 1】

Qは次式 $N^1_s B_i N^2_u$ 、

{ 式中、 N^1 、Bおよび N^2 はそれぞれs、iおよびu個のメンバーを含む、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、

Bは少なくとも2個の塩基を含む、配列並べ替え領域であり、かつ

s、iおよびuの合計が少なくとも5である }

を有する、請求項 1 - 3 0 の何れかの方法。

【請求項 3 2】

Bは一本鎖DNAまたはRNAであり、配列並べ替えの数は 4^i と等しく、そしてiは約2から約25である、請求項 3 1の方法。

【請求項 3 3】

iが約3から約5、6、7または8である、請求項 3 1または 3 2の方法。

【請求項 3 4】

Qがピオチンである、請求項 1 - 3 3の何れかの方法。

【請求項 3 5】

Zが、捕獲化合物と結合した生体分子を質量スペクトル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、請求項 1 - 3 4の何れかの方法。

【請求項 3 6】

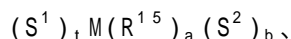
Zが、捕獲化合物と結合した生体分子の質量スペクトル分析の前またはその間に切断できない部分である、請求項 1 - 3 4の何れかの方法。

【請求項 3 7】

Zが、光切断可能な、酸切断可能な、アルカリ切断可能な、酸化的に切断可能なまたは還元的に切断可能な基である、請求項 1 - 3 5の何れかの方法。

【請求項 3 8】

Zが次式



{ 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、

aは0~4の整数であり、

Mは3以上の結合点を含む中心部分であり、

各 R^{15} は Y^2R^{18} から独立に選択される一価の基であり、

各 Y^2 は以下の基：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 $>C(E)$ ；(ここで、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0または NR^{17} であり、DはSまたはOであり、かつ、EはS、Oまたは NR^{17} であり、その基はどの順序で組み合わせてもよい)のいずれかの組み合わせを独立に含む二価の基であり、

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 $NR^{19}R^{20}$ からなる群より選択され、

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)；

(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、アリールおよびヘテロアリールからなる群より選択される、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する

から選択され、

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、

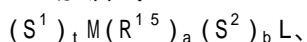
R^{15} 、 R^{17} 、 R^{18} 、 R^{19} 、 R^{20} 、 R^{23} 、 R^{24} 、 R^{25} 、 R^{27} および R^{28} は、 Z^2 から各々独立に選択される1以上の置換基で置換されていてもよく、 Z^2 はアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヒドロキシ、 $S(O)_h R^{35}$ (ここで、 h は0、1または2である)、 $NR^{35}R^{36}$ 、 $COOR^{35}$ 、 COR^{35} 、 $CONR^{35}R^{36}$ 、 $OC(O)NR^{35}R^{36}$ 、 $N(R^{35})C(O)R^{36}$ 、アルコキシ、アリールオキシ、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、ヘテロアリールオキシ、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、アミノ、アミド、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルアリールアミノ、ジアリールアミノおよびアリールアミノの中から選択される}

を有する、請求項1 - 34および36の何れかの方法。

【請求項39】

Zが次式



{ 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、

a は0~4の整数であり、

M は3以上の結合点を含む中心部分であり、

各 R^{15} は $Y^2 R^{18}$ から独立に選択される一価の基であり、

各 Y^2 は以下の基：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 $>C(E)$ ；(ここで、 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0または NR^{17} であり、 D は S または O であり、かつ、 E は S 、 O または NR^{17} であり、その基はどの順序で組み合わせてもよい)のいずれかの組み合わせを独立に含む二価の基であり、

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 $NR^{19}R^{20}$ からなる群より選択され、

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)；

(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、アリールおよびヘテロアリールからなる群より選択される、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するから選択され、

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、アリールオキシ、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、ヘテロアリールオキシ、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、アミノ、アミド、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルアリールアミノ、ジアリールアミノおよびアリールアミノの中から選択され、かつ

Lは化合物の質量スペクトル分析の前またはその間に切断可能な基である }
を有する、請求項1 - 35および37の何れかの方法。

【請求項40】

捕獲化合物が、捕獲化合物の溶解性に影響を及ぼす溶解性官能基Wをさらに含む、請求項1 - 39の何れかの方法。

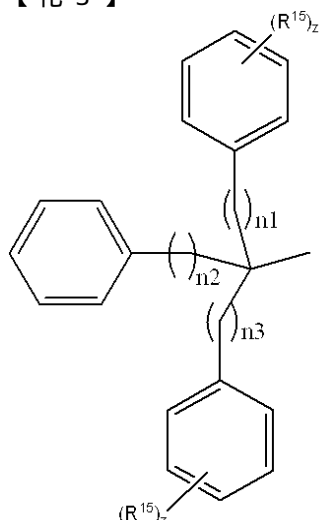
【請求項41】

捕獲化合物が、発光、蛍光、化学発光または比色特性を供与する官能基を含有するZを含む、請求項1 - 40の何れかの方法。

【請求項42】

捕獲化合物のセットを含む、複数の捕獲化合物を含む、捕獲化合物の収集物、ここで、各捕獲化合物のセットは、得られる生体分子/捕獲化合物の複合体が質量スペクトル分析の条件下で安定であるように、生体分子と共有結合するかまたは十分に高い親和性を有して結合するように選択された部分X; 選択性部分が存在する場合にそれが存在しない場合よりも少ない生体分子と捕獲化合物が結合するように、Xによる結合の選択性を高める部分Y; ならびにXおよびYを提示する部分Zとを含み、ここで、該部分Zは以下の通りであり、

【化 3】



ここで、 R^{15} は、H、OH、 $OR^{5'1}$ 、SH、 $SR^{5'1}$ 、 NH_2 、 $NHR^{5'1}$ 、 $N(R^{5'1})_2$ 、F、Cl、Br、I、 SO_3H 、 PO_4^{2-} 、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 $CH(CH_3)_2$ または $C(CH_3)_3$ である；ここで $R^{5'1}$ 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り、

z は 1 から 4 の整数であり、

n_1 、 n_2 、 n_3 は 0 から 4 であるが、但し、 n_1 、 n_2 および n_3 のすべて同時に 0 となることはなく、そして

捕獲化合物の各セットが更に部分 Z 上に部分 Q を含み、それによって、各セットは異なる Q を含む、ここで Q は各セットを分離することができる。

【請求項 4 3】

タンパク質配座異性体を分離する方法であって、

生体分子を含む組成物を、請求項 4 2 の捕獲化合物の収集物と接触させること、

収集物のメンバーを分離すること、および

結合したタンパク質を混合物から同定し、これにより各配座異性体が収集物のメンバーに対して異なる結合特異性を有すること

を含む方法。

【請求項 4 4】

表現型特異的生体分子を同定する方法であって、

所定の表現型によって細胞を単一の対象から選別して少なくとも 2 つの分離した細胞セットを作製すること、

選別された細胞の各セット由来の生体分子の混合物を、請求項 4 2 の捕獲化合物の収集物と接触させること、および

各セット由来の生体分子の結合パターンを比較して、各セットで異なる生体分子を同定し、それによって表現型特異的生体分子を同定すること

を含む方法。

【請求項 4 5】

生体分子相互作用を分析する方法であって、

a) 生体分子の混合物を、請求項 4 2 の捕獲化合物の収集物と接触させて化合物-生体分子複合体を形成させること、

ここで、中心コアは捕獲化合物に結合した生体分子の質量スペクトル分析の前またはその間に切断できない部分であり、かつ

複合体は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)質量分析条件に対して安定である、

b)捕獲化合物-生体分子複合体を、生体分子および/または小分子の混合物からなる群より選択される化合物を含む混合物と接触させること(ここで、該混合物中の化合物は親和性により複合体中の生体分子に結合する)、

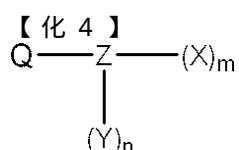
c)ステップb)の前または後に、捕獲化合物の各セットの選別基を介して、捕獲化合物を固体支持体上に固定化すること、

d)結合した化合物を質量分析計によって分析することを含む、該方法。

【請求項46】

生体分子の分析の方法であって、

a)捕獲化合物のセットを含む複数の、収集物である捕獲化合物と、生体分子を含む組成物とを接触させること、ここで、各セットが、式：



の捕獲化合物を含み、

ここで、

Xは、得られる生体分子/捕獲化合物の複合体が質量スペクトル分析の条件下で安定であるように生体分子と共有結合するかまたは十分に高い親和性を有して結合するように選択され、

Yは、選択性部分が存在する場合に存在しない場合よりも少ない生体分子と捕獲化合物が結合するように、Xによる結合の選択性を高める部分であり、

Qは、各セットが異なるQを含むようなものであり、ここで、Qは各セットの分離を可能とし、

mは1から100の整数であり、そして

nは1から100の整数である、

b)捕獲した生体分子を化学的または酵素学的処理により消化すること、

c)捕獲した化合物の各セットを部分Qに基づき分離すること、および

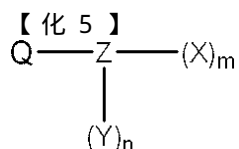
d)捕獲化合物の各セットを分析し、該生体分子を同定すること

を含む、該方法。

【請求項47】

生体分子の分析の方法であって、

a)捕獲化合物のセットを含む、捕獲化合物の収集物と、生体分子を含む組成物とを接触させること、ここで、各セットが、式：



の捕獲化合物を含み、

ここで、

Xは、得られる生体分子/捕獲化合物の複合体が質量スペクトル分析の条件下で安定であるように生体分子と共有結合するかまたは十分に高い親和性を有して結合するように選択され、

Yは、捕獲化合物が、選択性部分が存在する場合にそれが存在しない場合よりも少ない生体分子と結合するようXによる結合の選択性を高める部分であり、かつ、Yは、医薬薬物、薬物の断片、薬物中間体、薬物代謝物またはプロドラッグから選択され、

Qは、各セットが異なるQを含むようなものであり、ここで、Qは各セットの分離を可能とし、

mは1から100の整数であり、そして

nは1から100の整数である、

b)捕獲した化合物の各セットを選別部分Qに基づき分離すること、

c)捕獲した生体分子を化学的または酵素学的処理により消化すること、および

d)捕獲化合物の各セットを分析し、該生体分子を同定すること

を含む、該方法。

【請求項48】

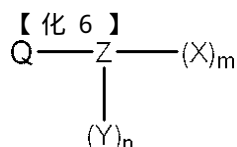
同定または検出を質量スペクトル分析によって行う、請求項43 - 47の何れかの方法

。

【請求項49】

生体分子の混合物中の薬物標的および薬物非標的生体分子を同定する方法であって、

i)捕獲化合物を、生体分子を含むサンプルと接触させ、サンプル中の生体分子の捕獲を行うこと、ここで、捕獲化合物は以下の式を有する：



Xは、得られる生体分子/捕獲化合物の複合体が質量スペクトル分析の条件下で安定であるように生体分子と共有結合するかまたは十分に高い親和性を有して結合するように選択され、

部分Yは、捕獲化合物が、選択性部分Yが存在する場合にそれが存在しない場合よりも少ない生体分子と結合するようXによる結合の選択性を高め、

Qは選別官能基であり、

mは1から100の整数であり、

nは1から100の整数である、および

ii)捕獲した生体分子を分析し、薬物標的および薬物非標的を同定すること

を含む、該方法。

【請求項50】

部分Yが、捕獲化合物が、選択性部分Yが存在する場合にそれが存在しない場合よりも少ない生体分子と結合するようXによる結合の選択性を高めるように選択された、酵素基質または阻害剤、補因子、受容体リガンド、遷移状態類似体、ペプチドである、請求項49の方法。

【請求項51】

Yは図17および21に列挙の群から選択される、請求項43 - 50何れかの方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図21A

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 2 1 A】

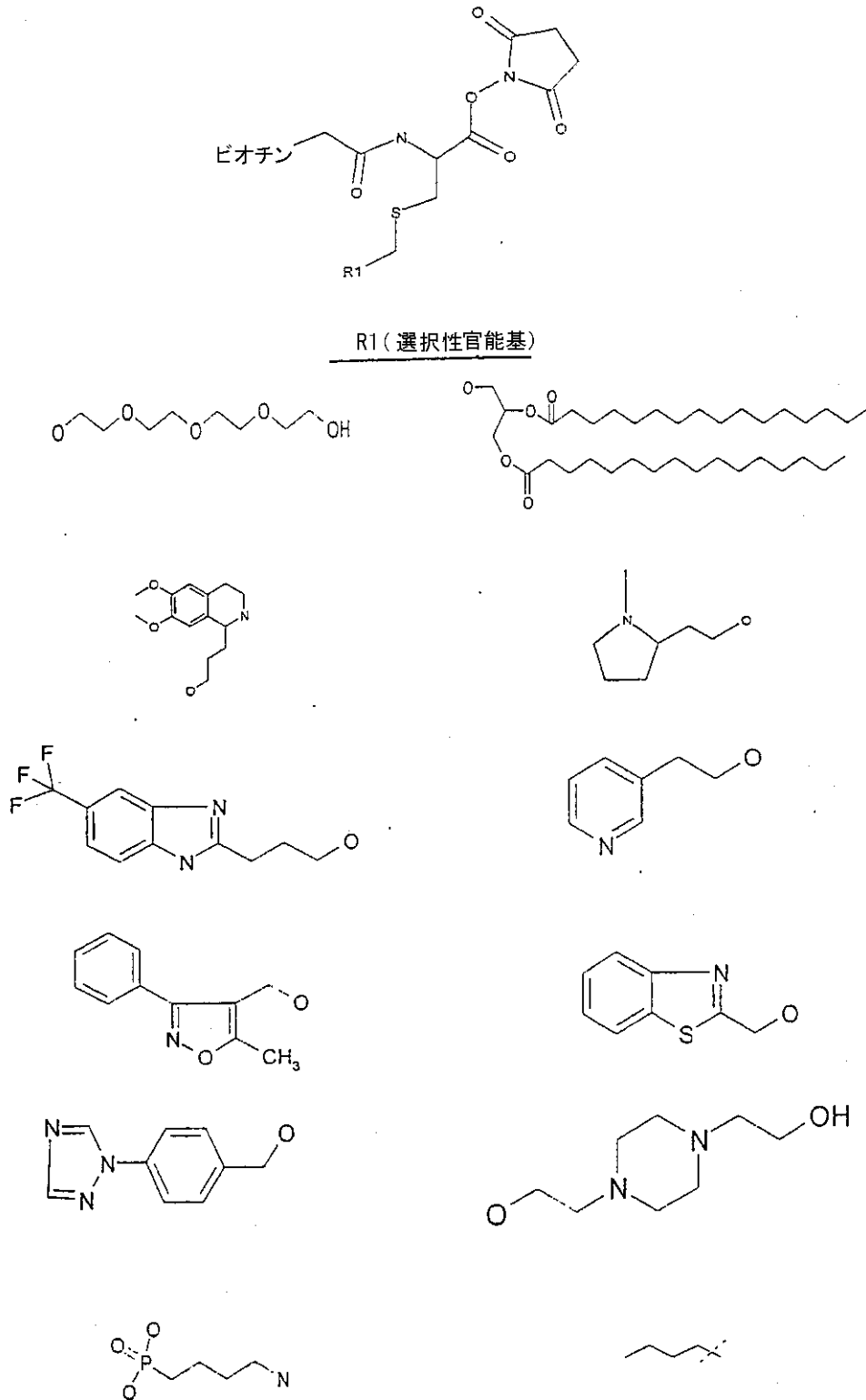


FIG. 21A

【手続補正 3】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】 図 2 7
【補正方法】 変更
【補正の内容】
【図 2 7】

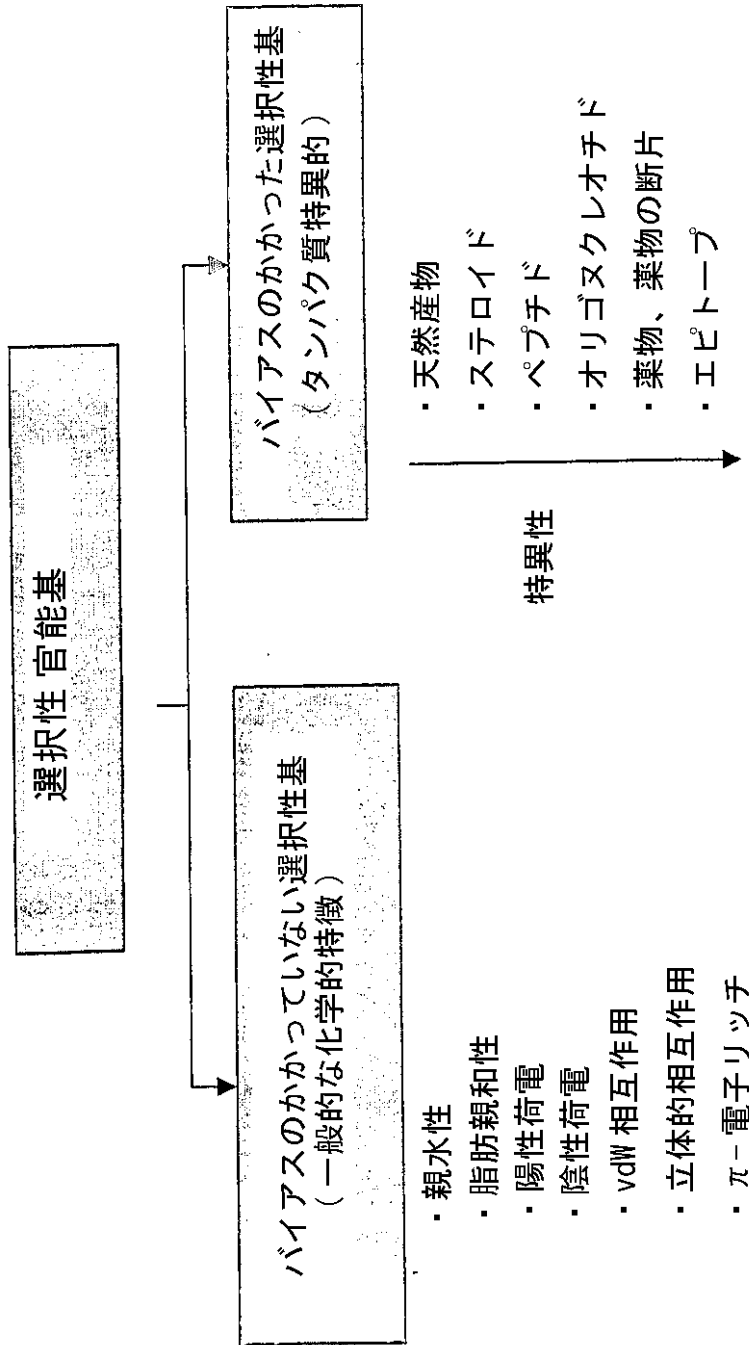


FIG. 27

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 P IS2004/001037

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 7	G01N33/68	G01N33/94	C07D303/14	C07D303/16	C07D207/40
	C07D207/44	C07D311/82	C07D317/36	C07D295/02	C07D209/48
	C07D495/04	C07D231/10	C07D207/32	C07C69/76	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC					
B. FIELDS SEARCHED					
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)					
IPC 7	G01N	C07D	C07C		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched					
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)					
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages				Relevant to claim No.
A	WO 02/063271 A (ACTIVX BIOSCIENCES INC ;PATRICELLI MATTHEW P (US)) 15 August 2002 (2002-08-15) paragraphs '0008!', '0011!' - '0018!', '0027!' - '0029!'; claims page 8, line 10 - line 15 paragraphs '0046!' - '0185!				1-80, 131-134, 137-142
A	WO 98/06874 A (UNIV CALIFORNIA) 19 February 1998 (1998-02-19) page 2, line 17 - page 3, line 14 examples ----- -/-				1-80, 131-134, 137-142
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.					
* Special categories of cited documents:					
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance			*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
E earlier document but published on or after the international filing date			*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)			*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.		
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means			*Z* document member of the same patent family		
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed					
Date of the actual completion of the international search			Date of mailing of the international search report		
8 October 2004			03.11.04		
Name and mailing address of the ISA			Authorized officer		
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-8016			Döpfer, K-P		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 P 2004/001037

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WO 03/064704 A (HOSFILED CHRISTOPHER MARK ;MCBROOM LINDA D B (CA); CLIMIE SHANE (C) 7 August 2003 (2003-08-07) page 56, line 21 - page 68, line 7; claims 1-25,37,38; figures; table 2	1-80, 131-134, 137-142
A	WO 02/071066 A (ACTIVX BIOSCIENCES INC ;PETRICELLI MATTHEW (US)) 12 September 2002 (2002-09-12) paragraphs '0009! - '0018!, '0033!, '0049! - '0109!; claims; examples	1-80, 131-134, 137-142
A	WO 01/18234 A (UNIV YALE) 15 March 2001 (2001-03-15) the whole document	1-80, 131-134, 137-142
A	WO 99/02733 A (UNIV FLORIDA STATE) 21 January 1999 (1999-01-21) the whole document	1-80, 131-134, 137-142
A	WO 01/18627 A (CHEN YU ZONG ;UNIV SINGAPORE (SG)) 15 March 2001 (2001-03-15)	
X	SUSAN BUDAVARI ET AL: "The Merck Index, 11th edition" 1989, MERCK & CO., INC., RAHWAY, NJ, US , XP002287204 Compound 4385. Glycido1 CAS-RN: '556-52-5! page 706 Compound 1244. Biotin CAS-RN '58-85-5! page 192	82

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No.
PCT/US2004/001037

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-80, 131, 132, 133-134 (both part), 137-142

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2004/001037

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: Claims 1-80, 131, 132, 133-134 (both part), 137-142

Method for identifying targets of drugs exhibiting side effects (non-target biomolecules) by means of capture compounds comprising the moieties X, Y, and Z

2. claim: 81

Collection of capture compounds with a moiety Z having three phenyl rings with the exclusion of trityl moieties

3. claim: 82 (part)

Capture compounds comprising biotin

4. claim: 82 (part)

Capture compounds comprising glycidol moieties

5. claim: 82 (part)

Capture compounds comprising tritylether and cyclic imides

6. claim: 82 (part)

Capture compounds comprising alcohols with three phenyl moieties

7. claim: 82 (part)

Capture compounds comprising carbonate moieties

8. claims: 83-94; 133-134 (both part)

A method for analysing biomolecules by contacting a composition comprising a biomolecul with a capture compound or a collection of capture compounds of claims 81 or 82

9. claims: 95-97, 133-134 (both part)

A method for separating protein conformers

10. claims: 98, 133-134 (both part)

International Application No. PCT/US2004 /001037

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A method for reducing diversity of a complex mixture of biomolecules

11. claims: 99-126, 133-134 (both part)

A method for identification of phenotype specific molecules

12. claims: 127-130, 133-134 (both part)

A method for analysing biomolecule interactions

13. claims: 135-136

Solid support comprising capture compounds of claims 81 and 82

14. claims: 143-170

Method for re-designing drugs to eliminate or alter its binding interaction with a captured biomolecule

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
Int. Patent Application No P 2004/001037					
WO 02063271	A	15-08-2002	EP	1364209 A2	26-11-2003
			WO	02063271 A2	15-08-2002
			WO	03050248 A2	19-06-2003
			US	2003134303 A1	17-07-2003
WO 9806874	A	19-02-1998	CA	2202152 A1	13-02-1998
			US	5777888 A	07-07-1998
			WO	9806874 A1	19-02-1998
			AT	216431 T	15-05-2002
			AU	720427 B2	01-06-2000
			AU	6771596 A	06-03-1998
			DE	69620783 D1	23-05-2002
			DE	69620783 T2	28-11-2002
			DK	862649 T3	12-08-2002
			EP	0862649 A1	09-09-1998
			ES	2183006 T3	16-03-2003
			JP	11512603 T	02-11-1999
			US	2002064797 A1	30-05-2002
			US	2002016682 A1	07-02-2002
			US	6326140 B1	04-12-2001
WO 03064704	A	07-08-2003	WO	03064704 A1	07-08-2003
			US	2003157575 A1	21-08-2003
			US	2003166007 A1	04-09-2003
WO 02071066	A	12-09-2002	EP	1370867 A1	17-12-2003
			WO	02071066 A1	12-09-2002
			US	2002182651 A1	05-12-2002
WO 0118234	A	15-03-2001	AU	7343700 A	10-04-2001
			CA	2383186 A1	15-03-2001
			EP	1212453 A1	12-06-2002
			JP	2003508078 T	04-03-2003
			WO	0118234 A1	15-03-2001
WO 9902733	A	21-01-1999	EP	0990051 A1	05-04-2000
			JP	2003524364 T	19-08-2003
			WO	9902733 A1	21-01-1999
WO 0118627	A	15-03-2001	WO	0118627 A2	15-03-2001
			US	2003131015 A1	10-07-2003
			US	6519611 B1	11-02-2003

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 30/72 (2006.01)	G 0 1 N 27/62	F
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N 27/62	X
	G 0 1 N 27/62	K
	G 0 1 N 30/72	C
	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74) 代理人 100072730

弁理士 小島 一晃

(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

(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

F ターム(参考) 2G041 CA01 FA11 FA12 GA06 JA03 JA06 JA09

2G045 DA12 DA36

4B024 AA11 BA80 CA01 CA12 HA12 HA20

专利名称(译)	捕获化合物，其收集和分析蛋白质组和复合组合物方法		
公开(公告)号	JP2006518450A	公开(公告)日	2006-08-10
申请号	JP2006500969	申请日	2004-01-16
[标]申请(专利权)人(译)	富带斯科斯特 HUBERT KOESTER 香港PHARM		
申请(专利权)人(译)	休伯特·凯斯特 Eichikei制药公司		
[标]发明人	フーベルトケスター ダニエルポールリトル スハイブマームードシディキ マシューピーターグリーリッシュ スブラマニアンマラッパン チェスターフレデリックハスマンザサード ピンイップ		
发明人	フーベルト・ケスター ダニエル・ポール・リトル スハイブ・マームード・シディキ マシュー・ピーター・グリーリッシュ スブラマニアン・マラッパン チェスター・フレデリック・ハスマン・ザ・サード ピン・イップ		
IPC分类号	G01N27/62 G01N33/53 G01N37/00 G01N33/50 G01N33/15 G01N30/72 C12N15/09 C07C69/76 C07C69/96 C07D207/40 C07D207/404 C07D207/46 C07D209/48 C07D211/60 C07D211/78 C07D213 /79 C07D215/48 C07D239/54 C07D239/545 C07D241/44 C07D261/12 C07D271/06 C07D271/07 C07D303/14 C07D303/16 C07D317/36 C07D401/12 C07D405/10 C07D405/12 C07D495/04 C07D498 /18 C07D519/00 G01N33/68		
CPC分类号	C07D495/04 C07C69/76 C07C69/96 C07C2603/74 C07D207/404 C07D207/46 C07D209/48 C07D211 /60 C07D211/78 C07D213/79 C07D215/48 C07D239/54 C07D239/545 C07D241/44 C07D261/12 C07D271/07 C07D303/14 C07D303/16 C07D317/36 C07D401/12 C07D405/10 C07D405/12 C07D417 /12 C07D417/14 C07D519/00 G01N33/6803 G01N33/6842 G01N33/6845 G01N33/6848		
FI分类号	G01N27/62.ZNA.V G01N33/53.D G01N37/00.102 G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N27/62.F G01N27 /62.X G01N27/62.K G01N30/72.C C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/FA11 2G041/FA12 2G041/GA06 2G041/JA03 2G041/JA06 2G041/JA09 2G045 /DA12 2G045/DA36 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA12 4B024/HA12 4B024/HA20		
代理人(译)	田中，三夫 小島 一晃 櫻井洋子		
优先权	60/441398 2003-01-16 US		
其他公开文献	JP2006518450A5 JP4741458B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了捕获化合物和在蛋白质混合物中鉴定药物靶非目标蛋白质的方法，包括使混合物与式QZ-(X_m)-Y_n的捕获化合物相互作用的步骤，其中Z是三价部分用于呈现X，Y和Q;选择部分X以共价结合蛋白质;部分Y是药物，药物片段，药物代谢物，前药，酶底物，酶抑制剂，过渡态类似物或受体的配体; Q是被选择以允许适于分析的物理排列或其他可寻址分离方法的分选功能，Q包括生物素部分，(His) 6部分，BODIPY部分(4,4-二氟-4-硼-3a，二氮杂 - 不对称 - 引达省)，寡核苷酸或PNA (肽核酸)，抗体，免疫毒素缀合物，粘附肽，凝集素，活化葡聚糖或肽;和分析捕获的蛋白质以鉴定药物靶标或药物非靶标。

構成要素で

