

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3935487号

(P3935487)

(45) 発行日 平成19年6月20日(2007.6.20)

(24) 登録日 平成19年3月30日(2007.3.30)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/547 (2006.01)

GO 1 N 33/547

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

GO 1 N 27/62 (2006.01)

GO 1 N 27/62

F

GO 1 N 30/72 (2006.01)

GO 1 N 27/62

V

GO 1 N 33/566 (2006.01)

GO 1 N 30/72

C

請求項の数 116 (全 137 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-500766 (P2004-500766)
 (86) (22) 出願日 平成14年7月16日(2002.7.16)
 (65) 公表番号 特表2005-520176 (P2005-520176A)
 (43) 公表日 平成17年7月7日(2005.7.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/022821
 (87) 国際公開番号 W02003/092581
 (87) 国際公開日 平成15年11月13日(2003.11.13)
 審査請求日 平成17年4月21日(2005.4.21)
 (31) 優先権主張番号 60/306,019
 (32) 優先日 平成13年7月16日(2001.7.16)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/314,123
 (32) 優先日 平成13年8月21日(2001.8.21)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 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
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 稔
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子
 (74) 代理人 100127638
 弁理士 志賀 美苗
 (74) 代理人 100138911
 弁理士 櫻井 陽子
 (74) 代理人 100067035
 弁理士 岩崎 光隆

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の分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

複数の捕獲化合物を含有している捕獲化合物の収集物であって、ここで、各捕獲化合物は、以下を含む：

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によっ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、ここで、Yは、該捕獲化合物の親和性、立体的特性および電子的特性のうちの1以上を修飾する、

該収集物中の捕獲化合物の分離または固定化を可能にする部分Q、ならびに

X、Y、およびQを提示する部分Z、ここで、Zは三価部分であり、かつ、50未満のメンバーを有する。

【請求項2】

Zが、非置換であるかまたは各々独立にR¹⁵から選択される1個以上の置換基で置換されている、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

10

20

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、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、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なる群から選択される二価部分において1つの水素が存在しないことにより三価となっている部分であり、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、

請求項1に記載の収集物。

【請求項3】

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1または請求項2に記載の収集物。

【請求項4】

少なくとも10種の異なる捕獲化合物を含む、請求項1または請求項2に記載の収集物。

【請求項5】

少なくとも10種の異なる捕獲化合物を含む、請求項3に記載の収集物。

【請求項6】

少なくとも50種の異なる捕獲化合物を含む、請求項1または請求項2に記載の収集物。

【請求項7】

少なくとも50種の異なる捕獲化合物を含む、請求項3に記載の収集物。

【請求項8】

少なくとも100種の異なる捕獲化合物を含む、請求項1または請求項2に記載の収集物。

【請求項9】

少なくとも100種の異なる捕獲化合物を含む、請求項3に記載の収集物。

【請求項10】

Q が固体支持体上のアドレス可能位置に捕獲化合物を固定化するように選択される請求項1~9のいずれか1項に記載の収集物。

【請求項11】

収集物の捕獲化合物が固体支持体上のアドレス可能位置に整列している、請求項1~10のいずれか1項に記載の化合物の収集物を含む固体支持体。

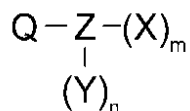
【請求項 1 2】

収集物の捕獲化合物が固体支持体上のアドレス可能位置に整列している、請求項 3 に記載の化合物の収集物を含む固体支持体。

【請求項 1 3】

構成要素である捕獲化合物が次式

【化 1】



10

{ mは1～100の整数であり、かつ

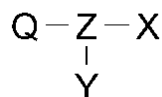
nは1～100の整数である }

を有する、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の収集物。

【請求項 1 4】

構成要素である捕獲化合物が次式

【化 2】



20

を有する、請求項 1 3 に記載の収集物。

【請求項 1 5】

Qが、ビオチン、6-His、ボロンジピロメテンジフルオリド、オリゴヌクレオチド、接着ペプチド、ペプチド核酸(PNA)およびペプチドから選択される、請求項 1 3 に記載の収集物。

【請求項 1 6】

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 3 に記載の収集物。

30

【請求項 1 7】

Qが次式 $\text{N}^1_s - \text{B}_i - \text{N}^2_u -$ 、

{ 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 ～ 1 0 および 1 3 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の収集物。

【請求項 1 8】

s、i および u の合計が5から50までである、請求項 1 7 に記載の収集物。

【請求項 1 9】

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、ペプチド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 1 7 または請求項 1 8 に記載の収集物。

40

【請求項 2 0】

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 ～ 1 0 および 1 3 ～ 1 9 のいずれか 1 項に記載の収集物。

【請求項 2 1】

Zは生体分子の分析の前または分析の間に切断することができる、請求項 1 ～ 1 0 および 1 3 ～ 2 0 のいずれか 1 項に記載の収集物。

50

【請求項 2 2】

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、および金属錯体からなる群より選択される、請求項 1 ~ 1 0 および 1 3 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の収集物。

【請求項 2 3】

Xが α -ハロエーテル、 α -ハロカルボニル基、マレイミド、金錯体、水銀錯体、エクスボキシドまたはイソチオシアネートである、請求項 1 ~ 1 0 および 1 3 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の収集物。

【請求項 2 4】

Xが $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{Ph}-\text{pNO}_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{C}_6\text{F}_5$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-(\text{N}-\text{スクシンイミジル})$ 、 $-\text{OCH}_2-\text{I}$ 、 $-\text{OCH}_2-\text{Br}$ 、 $-\text{OCH}_2-\text{Cl}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{I}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Br}$ または $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{Cl}$ である、請求項 1 ~ 1 0 および 1 3 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の収集物。 10

【請求項 2 5】

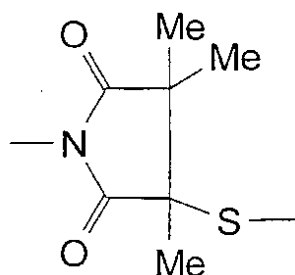
収集物のメンバー化合物が質量改変タグを含む、請求項 1 ~ 1 0 および 1 3 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の収集物。

【請求項 2 6】

質量改変タグが以下の(i)~(vii)から選択される請求項 2 5 記載の収集物：

(i) 次式 $-\text{X}^1\text{R}^{10}$ -を有する質量改変タグ、ここで、 X^1 は $-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_y-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_y-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{S})-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O}-\text{アルキル})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{SO}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NH}-$ および

【化 3】



から選択される二価の基であり、かつ

R^{10} は $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_z-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_z-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{アルキレン}$ 、 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 、 $-(\text{CH}_2)_z-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_z-\text{CH}_2-\text{O}-\text{アルキレン}$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_z-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $-\text{Si}(\text{R}^{12})(\text{R}^{13})-$ 、 $-\text{CHF}-$ および $-\text{CF}_2-$ 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、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る、 30

(ii) $-\text{S}-\text{S}-$ である質量改変タグ、

(iii) $-\text{S}-$ である質量改変タグ、

(iv) $-(\text{NH}-(\text{CH}_2)_y-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_y-\text{C}(\text{O}))_z-\text{NH}-(\text{CH}_2)_y-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_y-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ である質量改変タグ、ここで、 y および z は(i)と同様に選択される、

(v) $-(\text{NH}-(\text{CH}_2)_y-\text{C}(\text{O}))_z-\text{NH}-(\text{CH}_2)_y-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ である質量改変タグ、ここで、 y および z は(i)と同様に選択される、 40

(vi) $-(\text{NH}-\text{CH}(\text{R}^{11})-\text{C}(\text{O}))_z-\text{NH}-\text{CH}(\text{R}^{11})-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ である質量改変タグ、ここで、 z は(i)と同様に選択され、かつ、 R^{11} は天然に生ずる α アミノ酸の側鎖である、および、

(vii) $-(\text{O}-(\text{CH}_2)_y-\text{C}(\text{O}))_z-\text{NH}-(\text{CH}_2)_y-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ である質量改変タグ、ここで、 y および z は(i)と同様に選択される。

【請求項 2 7】

各Qはオリゴヌクレオチドであり、捕獲化合物は各Qと相補的である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している請求項 1 ~ 1 0 および 1 3 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の収集物。

【請求項 2 8】

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 27 に記載の収集物。

【請求項 29】

収集物中の1以上の捕獲化合物と共有結合された生体分子をさらに含む、請求項 1 ~ 10 および 13 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の収集物。

【請求項 30】

生体分子がタンパク質を含む、請求項 29 に記載の収集物。

【請求項 31】

捕獲化合物が、該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 ~ 10 および 13 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の収集物。

10

【請求項 32】

選択性官能基Yが図 17 a- 17 hhhh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 a-bに示されるものから選択される、請求項 1 ~ 10 および 13 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の収集物。

【請求項 33】

Yが発光、蛍光、化学発光または比色官能基である、請求項 1 に記載の捕獲化合物の収集物。

【請求項 34】

発光基が蛍光系、リン光系、化学発光系および生物発光系から選択される、請求項 33 に記載の捕獲化合物の収集物。

20

【請求項 35】

Yが受容体リガンド、酵素基質、酵素阻害剤、遷移状態類似体、接着ペプチド、ペプチドミメティックスおよびスタチンから選択される、請求項 1 に記載の収集物。

【請求項 36】

Yが配列番号 1 から配列番号 149 として本明細書で開示するペプチドリガンドから選択される該ペプチドリガンドである、請求項 1 に記載の収集物。

【請求項 37】

Xが光反応基である、請求項 1 に記載の収集物。

【請求項 38】

収集物中の各捕獲化合物が同一のX部分を含むが、Y部分は異なっている、請求項 1 に記載の収集物。

30

【請求項 39】

生体分子がタンパク質である、請求項 1 に記載の収集物。

【請求項 40】

生体分子の分析法であって、

a)生体分子を含むサンプル組成物を、請求項 1 ~ 10 および 13 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の捕獲化合物の収集物と接触させて捕獲化合物-生体分子複合体を形成させること、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方法。

40

【請求項 41】

収集物中の捕獲化合物が、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 40 に記載の方法。

【請求項 42】

生体分子がタンパク質である、請求項 40 または請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

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を含む、請求項 40 ~ 42 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 44】

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 40 ~ 42 のいずれか

50

1 項に記載の方法。

【請求項 4 5】

質量スペクトル分析前に、生体分子-捕獲化合物複合体の一部を除去または切断するための、該複合体の化学的または酵素的処理をさらに含む、請求項 4 0 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 6】

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 4 0 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 7】

収集物中の各捕獲化合物が同一のX部分を含むが、Y部分は異なっている、請求項 4 0 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 4 8】

収集物中の各捕獲化合物が異なるYおよびQ部分を含む、請求項 4 0 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 9】

収集物中の各捕獲化合物が異なるXおよびY部分を含む、請求項 4 0 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 0】

各選別官能基Qが、相補的なオリゴヌクレオチドとハイブリダイズする、長さ「j」の一本鎖部分を含むオリゴヌクレオチドであり、jが少なくとも5塩基であり、かつ、方法が捕獲化合物を、固体支持体に連結させた相補的なオリゴヌクレオチドのセットとハイブリダイズさせ、ここでは、ハイブリダイズはステップa)の前または後に行い、それによって、捕獲化合物または捕獲化合物生体分子複合体を固体支持体上に固定すること 20
をさらに含む、請求項 4 0 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 1】

捕獲化合物のQ部分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が固体支持体上に固定化されている、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

Q部分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がアドレス可能なアレイを含む、請求項 5 0 または請求項 5 1 に記載の方法。 30

【請求項 5 3】

収集物が少なくとも3、5、10、50、100、500または1000種の捕獲化合物を含む、請求項 4 0 ~ 5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 4】

ステップa)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 4 0 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 5】

ステップa)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 4 0 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 6】

同定または検出を、捕獲化合物に結合した生体分子の質量スペクトル分析によって行う、請求項 4 0 ~ 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

【請求項 5 7】

質量分析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)質量分析である、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

選別官能基Qが化合物を固体支持体上に整列させ得る、請求項 4 0 ~ 5 7 のいずれか 1 項に記載の方法であって、

その方法は、ステップa)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み、ここで、

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 59】

結合した生体分子の質量スペクトル分析が

(i)生体分子-捕獲化合物複合体にマトリックスを加えること、および、

(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 58 に記載の方法。

【請求項 60】

結合した生体分子の質量スペクトル分析が

(i)捕獲化合物に結合した生体分子にマトリックスを加えること、および

(ii)捕獲化合物に結合した生体分子のマトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析

を含む、請求項 44 ~ 59 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 61】

生体分子を含むサンプル組成物が細胞溶解物である、請求項 40 ~ 60 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 62】

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 61 に記載の方法。

【請求項 63】

請求項 40 ~ 62 のいずれか 1 項に記載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

を含む方法。

【請求項 64】

ステップ(d)がピーク積分を含む、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 65】

(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

をさらに含む、請求項 63 または請求項 64 に記載の方法。

【請求項 66】

健常および病気の個体の組織から、あるいは種々の生理学的または発達段階から、あるいは組織の種々の部分からのデータを比較すること

をさらに含む、請求項 63 ~ 65 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 67】

分析が直交飛行時間型(O-TOF)質量分析である、請求項 40 ~ 56 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 68】

分析がエレクトロスプレー(ES)質量分析である、請求項 40 ~ 56 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 69】

生体分子がタンパク質であり、および

タンパク質と捕獲化合物の部分Yとの相互作用の選択性が反応速度支配下にある条件下でステップa)を行う、

請求項 40 の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7 0】

タンパク質配座異性体を分離する方法であって、生体分子を含むサンプル組成物を、請求項 1 ~ 1 0 および 1 3 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の捕獲化合物の収集物と接触させること、

収集物中の捕獲化合物を分離すること、および

各配座異性体が収集物中の各捕獲化合物に対して異なる結合特異性を有することにより、結合したタンパク質を混合物から同定すること
を含む方法。

【請求項 7 1】

同定を質量分析によって行う、請求項 7 0 に記載の方法。

10

【請求項 7 2】

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 7 0 または請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

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 1 ~ 1 0 および 1 3 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の捕獲化合物の収集物と接触させて、生体分子と結合した捕獲化合物を形成すること、および接触の後、

生体分子と結合した捕獲化合物を分離すること

を含む方法。

【請求項 7 4】

20

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 1 ~ 1 0 および 1 3 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の捕獲化合物の収集物と接触させること、および

捕獲化合物に結合した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 7 5】

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 7 4 に記載の方法。

30

【請求項 7 6】

生体分子がタンパク質を含む、請求項 7 4 または請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

結合した生体分子を質量分析によって同定する、請求項 7 4 ~ 7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 8】

表現型が疾病表現型および健常表現型である、請求項 7 4 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 9】

40

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 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

生体分子の混合物を分析するシステムであって、

請求項 1 に記載の収集物、

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
を含むシステム。

50

【請求項 8 1】

自動化システムである、請求項 8 0 に記載のシステム。

【請求項 8 2】

液体クロマトグラフィー装置をさらに含む、請求項 8 0 または請求項 8 1 に記載のシステム。

【請求項 8 3】

生体分子を分析する方法であって、

(a)生体分子の第 1 の混合物を、請求項 1 に記載の捕獲化合物の収集物と反応させて、捕獲化合物-結合生体分子の混合物を形成すること、ここで、第 1 の混合物を含む捕獲化合物は第 1 の質量改変タグを含む、

10

(b)生体分子の第 2 の混合物を、請求項 1 ~ 1 0 および 1 3 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の捕獲化合物の収集物と反応させて、捕獲化合物-結合生体分子の第 2 の混合物を形成すること、ここで、捕獲化合物-結合分子の第 2 の混合物を含む化合物は(i)質量改変タグを含まないか、または(ii)第 2 の質量改変タグを含むいずれかである、

(c)ステップ(a)および(b)の生成物をプールしてその混合物を得ること、

(d)ステップ(c)の混合物中の異なるようにタグ化した捕獲化合物-結合生体分子を、Q部分によって選別して、選別された複合体のアレイを作製すること、および

(e)各位置の複合体を分析することを含む方法。

【請求項 8 4】

20

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 1 ~ 1 0 および 1 3 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の捕獲化合物の収集物と接触させて、捕獲化合物-結合生体分子複合体を形成させること、ここで、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-結合生体分子複合体を、生体分子と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捕獲化合物に結合した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Q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、

30

d)結合した化合物を質量分析によって分析することを含む方法。

【請求項 8 5】

小分子が候補薬であり、有機小分子、ペプチド、ペプチドミメティックス、抗体、抗体の断片および組換えまたは合成抗体お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 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 6】

ステップa)で形成した捕獲化合物-生体分子複合体を、ステップb)において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 8 4 または請求項 8 5 に記載の方法。

40

【請求項 8 7】

生体分子がタンパク質である、請求項 8 4 ~ 8 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 8】

生体分子の混合物がタンパク質混合物を含む、請求項 8 4 の方法であって、該方法は、生体分子-タンパク質相互作用または生体分子-小分子相互作用を測定するためのものである。

【請求項 8 9】

官能性部分X、YおよびQを提示するための三価トリチルである部分Zを含んでなり、ここで、部分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

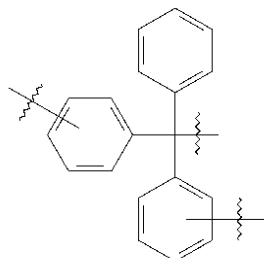
50

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によって結合するように選択され；部分Yは、Y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、ここで、Yは、該捕獲化合物の親和性、立体的特性および電子的特性のうちの1以上を修飾する；そして部分Qは捕獲化合物の分離を可能にする、捕獲化合物。

【請求項90】

Zが次式

【化4】



10

を有する、請求項89に記載の捕獲化合物。

【請求項91】

Xが図16a-bに示される基から選択される、請求項89または請求項90に記載の捕獲化合物。

20

【請求項92】

Yが図17a-hhhhに示される基から選択される、請求項89～91のいずれか1項に記載の捕獲化合物。

【請求項93】

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「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89～92のいずれか1項に記載の捕獲化合物。

【請求項94】

Qが、ピオチン、6-His、ボロンジピロメテンジフルオリド、オリゴヌクレオチド、接着ペプチド、ペプチド核酸(PNA)およびペプチドから選択される、請求項89に記載の捕獲化合物。

30

【請求項95】

捕獲化合物が、該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89に記載の捕獲化合物。

【請求項96】

Yが発光、蛍光、化学発光または比色官能基である、請求項89に記載の捕獲化合物。

【請求項97】

生体分子の分析法であって、

a)生体分子を含む組成物を、請求項89に記載の捕獲化合物と接触させて、捕獲化合物-生体分子複合体を形成させること、および

40

b)結合した生体分子を同定または検出すること

を含む方法。

【請求項98】

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89に記載の捕獲化合物と接触させて、生体分子と結合した捕獲化合物を形成すること、および接触の後、

生体分子と結合した捕獲化合物を分離すること

を含む方法。

【請求項99】

50

生体分子を分析する方法であって、

(a)生体分子の第1の混合物を、請求項89に記載の捕獲化合物と反応させて、第1の捕獲化合物-結合分子を形成すること、ここで、捕獲化合物は第1の質量改変タグを含む、

(b)生体分子の第2の混合物を、請求項89の捕獲化合物と反応させて、第2の捕獲化合物-結合分子を形成すること、ここで、捕獲化合物は(i)質量改変タグを含まないか、または(ii)第2の質量改変タグを含むかいずれかである、

(c)ステップ(a)および(b)の生成物をプールしてその混合物を得ること、および

(d)該混合物を分析すること

を含む方法。

10

【請求項100】

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89に記載の捕獲化合物と接触させて、捕獲化合物-結合生体分子を形成させること、

b)捕獲化合物-結合生体分子を、生体分子の混合物または小分子の混合物から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捕獲化合物に結合した生体分子と結合する、および、

c)結合した化合物を質量分析によって分析すること

を含む方法。

【請求項101】

20

官能性部分X、YおよびQを提示するための三価トリチル誘導体である部分Zを含んでなり、

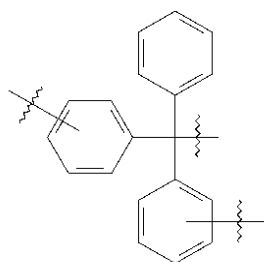
ここで、部分Xは、得られる生体分子/捕獲化合物の複合体が質量スペクトル分析の条件下で安定であるように生体分子と共有結合するかまたは十分に高い親和性によって結合するように選択され；部分Yは、Yが存在する場合にそれが存在しない場合よりも捕獲化合物が少ない生体分子と結合するようXによる結合の選択性を高め、ここで、Yは、該捕獲化合物の親和性、立体的特性および電子的特性のうちの1以上を修飾する；そして部分Qは捕獲化合物の分離または固定化を可能にする、複数の捕獲化合物を含む、捕獲化合物の収集物。

【請求項102】

30

Zが次式

【化5】



40

を有する、請求項101に記載の収集物。

【請求項103】

Xが図16a-bに示される基から選択される、請求項101に記載の収集物。

【請求項104】

Yが図17a-hhhhに示される基から選択される、請求項101に記載の収集物。

【請求項105】

Qが、ビオチン、6-His、ボロンジピロメテンジフルオリド、オリゴヌクレオチド、接着ペプチド、ペプチド核酸(PNA)およびペプチドから選択される、請求項101に記載の収集物。

50

【請求項 1 0 6】

収集物中の捕獲化合物が同一のX部分を含むが、Y部分は異なっている、請求項 1 0 1 に記載の収集物。

【請求項 1 0 7】

生体分子がタンパク質である、請求項 1 0 1 に記載の収集物。

【請求項 1 0 8】

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 1 0 1 に記載の収集物。

【請求項 1 0 9】

少なくとも10種の異なる捕獲化合物を含む、請求項 1 0 1 に記載の収集物。

10

【請求項 1 1 0】

少なくとも50種の異なる捕獲化合物を含む、請求項 1 0 1 に記載の収集物。

【請求項 1 1 1】

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、および金属錯体からなる群より選択される、請求項 1 0 1 に記載の収集物。

【請求項 1 1 2】

Xが $-C(=O)O-Ph-pNO_2$ 、 $-C(=O)O-C_6F_5$ 、 $-C(=O)-O-(N-スクシンイミジル)$ 、 $-OCH_2-I$ 、 $-OCH_2-Br$ 、 $-OCH_2-Cl$ 、 $-C(O)CH_2I$ 、 $-C(O)CH_2Br$ または $-C(O)CH_2Cl$ である、請求項 1 1 1 に記載の収集物。

【請求項 1 1 3】

捕獲化合物が質量改変タグを含む、請求項 1 0 1 に記載の収集物。

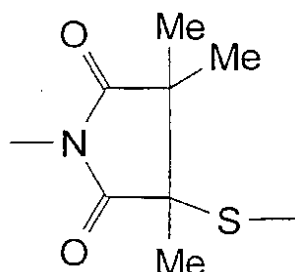
20

【請求項 1 1 4】

質量改変タグが以下の(i)~(vii)から選択される、請求項 1 0 1 に記載の収集物：

(i)次式 $-X^1R^{10}$ -を有する質量改変タグ、ここで、 X^1 は $-O-$ 、 $-O-C(O)-(CH_2)_y-C(O)O-$ 、 $-NH-C(O)-$ 、 $-C(O)-NH-$ 、 $-NH-C(O)-(CH_2)_y-C(O)O-$ 、 $-NH-C(S)-NH-$ 、 $-O-P(O-アルキル)-O-$ 、 $-O-SO_2-O-$ 、 $-O-C(O)-CH_2-S-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ および

【化 6】



30

から選択される二価の基であり、かつ

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、 $-(CH_2)_z-CH_2-O-$ 、 $-(CH_2)_z-CH_2-O-$ アルキレン、 $-(CH_2CH_2NH)_z-CH_2CH_2NH-$ 、 $-CH_2-CH(OH)-CH_2O-$ 、 $-Si(R^{12})(R^{13})-$ 、 $-CHF-$ 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、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る、

40

(ii) $-S-S-$ である質量改変タグ、

(iii) $-S-$ である質量改変タグ、

(iv) $-(NH-(CH_2)_y-NH-C(O)-(CH_2)_y-C(O))_z-NH-(CH_2)_y-NH-C(O)-(CH_2)_y-C(O)O-$ である質量改変タグ、ここで、 y および z は(i)と同様に選択される、

(v) $-(NH-(CH_2)_y-C(O))_z-NH-(CH_2)_y-C(O)O-$ である質量改変タグ、ここで、 y および z は(i)と同様に選択される、

(vi) $-(NH-CH(R^{11})-C(O))_z-NH-CH(R^{11})-C(O)O-$ である質量改変タグ、ここで、 R^{11} は天然に生ずる α アミノ酸の側鎖であり、 z は(i)と同様に選択される、および、

50

(vii) $-(O-(CH_2)_y-C(O))_z-NH-(CH_2)_y-C(O)O-$ である質量改変タグ、ここで、yおよびzは(i)と同様に選択される。

【請求項 1 1 5】

収集物中の1以上の捕獲化合物と共有結合された生体分子をさらに含む、請求項 1 0 1 に記載の収集物。

【請求項 1 1 6】

捕獲化合物が、該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 0 1 に記載の収集物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0 0 0 1】

(関連出願)

2001年7月16日に出願された、「COMPOUNDS AND METHODS FOR ANALYZING THE PROTEOME」と題された、Koesterの米国仮出願出願番号第60/306,019号に対して、2001年8月21日に出願された、「COMPOUNDS AND METHODS FOR ANALYZING THE PROTEOME」と題された、Koesterの米国仮出願出願番号第60/314,123号に対して、および2002年3月11日に出願された、「COMPOUNDS AND METHODS FOR ANALYZING THE PROTEOME」と題された、Koesterらの米国仮出願出願番号第60/363,433号に対しても優先権の利益が主張される。本願はまた、2002年7月16日に出願された、米国特許出願番号(代理人整理番号24743-2305)にも関する。

【0 0 0 2】

20

上記の仮出願および米国特許出願の各々の開示内容はその全体を参照により本明細書に組み入れる。

【0 0 0 3】

(技術分野)

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

【背景技術】

【0 0 0 4】

疾病の機序を理解することおよび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ー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す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独自の医薬という期待は、医療団体をじらしてきたが、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。

30

【0 0 0 5】

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、タンパク質機能に対して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長く到達する作用を有するという仮定するアプローチである。

40

【0 0 0 6】

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

50

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。

【0007】

ゲノム科学は、この戦略を用いて、正常および疾病患者集団または集団間の相違を含む、定義された表現型に関連して集団を層別化できるであろうという最初の予想には達していない。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の示差的発現プロフィールを確立することは十分

10

【0008】

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、それら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、複合体相互作用調節タンパク質の解明が効果

20

【0009】

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面倒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

30

【0010】

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。

【0011】

したがって、工業的プロセスの特徴(そのプロセスがハイスループットで、自動化可能であり、かつ、対費用効果の高いものであるという点での高い精度、再現性および柔軟性)を備えた工業的レベルへのスケールアップを可能にする、プロテオームの分析技術を開発する必要がある。自動化プロトコールおよびそのためのシステムを用いて、それらの天然のコンホメーションのタンパク質および他の生体分子のプロープおよび同定を可能にする技術を開発する必要がある。詳細には、生理学的条件下で疎水性タンパク質を同定および特性決定するための方法論および技術を開発する必要がある。したがって、本明細書の目的の中でも、そのような技術を提供することが本明細書中での1つの目的である。

40

【0012】

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、

50

捕獲化合物および収集物により、生体分子の複合混合物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を排除する。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。

【0013】

限定されるものではないが、タンパク質などの生体高分子および高分子、個々のまたは膜タンパク質をはじめとするタンパク質などの個々の生体分子を含む生体分子の混合物をはじめとする生体分子を、捕獲、分離および分析するための、捕獲化合物、この化合物の収集物およびこの化合物を単独でまたはその収集物として用いる方法を提供する。収集物は複数の、一般に、少なくとも2、3、通常、少なくとも、10、50、100、1000種以上の異なる捕獲化合物を含む。化合物および収集物は、生体分子の混合物を、その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の混合物の構成要素との相互作用によってプローブすることを可能にするよう設計する。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、通常、疎水性条件をはじめとする生理学的条件下で、混合物の複雑度および多様性によって、約5~20種以上の構成要素 20
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される。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。

【0014】

捕獲化合物および収集物は種々の方法に用いるが、特に、生体高分子、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法に用い、例えば、通常、同一個体由来の一次細胞由来の疾病細胞対健常細胞において、パターン、特に、翻訳 30
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。

【0015】

捕獲化合物は、これによって共有または高結合親和性(高 K_a)結合を達成する化学反応基X(本明細書では官能基または官能性とも呼ぶ)および3個の他の基(本明細書では官能基または官能性とも呼ぶ)のうちの少なくとも1個を含む。他の基は、生体分子の反応性官能基との相互作用を調節する選択性官能基Y、収集物の構成要素をアドレス指定する選別官能基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 40
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。

【0016】

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 50

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の官能性、選択基によってその問題を解決する。

【0017】

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。

【0018】

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個の間のヌクレオチド、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。

【0019】

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っており、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。

【0020】

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が可能にする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。

【0021】

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

10

20

30

40

50

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。

【0022】

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。生体高分子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。

10

【0023】

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。

【0024】

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。

20

【0025】

1種または複数の捕獲化合物の、タンパク質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、カラロメトリック(colorimetric)、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。

30

【0026】

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

【0027】

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。

40

【0028】

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

50

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。

【0029】

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。

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。

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。

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。

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。

図6は、組換えタンパク質生産の流れ図である。

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。

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。

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。

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。

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。

図12は、PCR増幅の際の複雑性の低下を示す図である。

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。

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。

図15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)。

図16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。

図17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。

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。

図19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。

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。

【0030】

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と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、

10

20

30

40

50

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られる。本明細書において用語に複数の定義が存在するという事象では、この節のものが優先する。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、そのような識別子が変化していたり、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。

【0031】

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。

10

【0032】

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。

【0033】

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。

20

【0034】

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。

【0035】

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

【0036】

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。

30

【0037】

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は、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で、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。

40

【0038】

50

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。

【0039】

一般には、タンパク質の調整は不必であるが、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。

10

【0040】

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。

20

【0041】

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他のそのような分子が挙げられる。

【0042】

本明細書において「生体高分子」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。生体高分子は、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体高分子に関して記載されているが、医薬品の有機合成、または固体支持体上でもしくはナノリットルもしくはより少量でウェル中で実施される、無機および任意の他の反応またはアッセイなどの他の合成図式およびアッセイとともに用いるよう適合させることもできる。

30

【0043】

本明細書において生体分子とは、生体高分子および高分子、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。

【0044】

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れているかもしくは包ま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ファージ、真核および原核細胞をはじめとする単一の細胞またはその断片、リボソームまたはミセル剤または他のパッケージング粒子、および他のそのような生物学的物質を指す。本明細書の目的のためには、生物学的粒子は、通常は合成されないが、細胞およびウイルスから誘導されることに起因して、通常は高分子とは見なされない分子を含む。

40

【0045】

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。

50

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、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は、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は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。

【0046】

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その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。

【0047】

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プライマーは、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。

【0048】

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ビ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ら(1997)Nucleic acids Res. 25: 2792-2799頁参照)。

【0049】

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座の一部、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立体配座であってもよく、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。

10

20

30

40

50

【0050】

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。

【0051】

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ることもできる。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、当業者はペプチドは、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)、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in vitro反応で実施することができる。

【0052】

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、Dyna1, 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つの極性面間のまたはオリゴ/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。

【0053】

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。

【0054】

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、細胞ベ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。

【0055】

10

20

30

40

50

本明細書において「固体支持体」とは、気体でなく液体でもない、表面を有する物質を意味する。したがって、固体支持体は、例えば、ガラス、シリコン、金属、プラスチックまたは複合材料から構築された平坦な表面であってもよく、シリカゲル、制御された細孔性ガラス、磁性またはセルロースビーズなどのビーズの形態であってもよく、コンピ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。

【0056】

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。詳しくは、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。

【0057】

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であるものである。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。

【0058】

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、Sepharese(登録商標))、セルロース、磁性ビーズ、Dynabeads、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、Sepharese(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、コンピ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。

【0059】

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、

10

20

30

40

50

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 beads(Dynal、Oslo、Norway)参照)。

10

【0060】

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。

【0061】

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。

【0062】

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。

20

【0063】

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に対立遺伝子変異体と呼ぶ。

30

【0064】

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。

【0065】

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。

40

【0066】

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のおよびその後の領域を含み得る。

【0067】

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。

50

【 0 0 6 8 】

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。

【 0 0 6 9 】

10

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。

【 0 0 7 0 】

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。

【 0 0 7 1 】

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。

【 0 0 7 2 】

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

【 0 0 7 3 】

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

【 0 0 7 4 】

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

【0075】

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は注記すべきであろう。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ということは注記すべきであろう。

30

【0076】

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は実質的に変更されないと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

【0077】

そのような置換は以下の表2に示すものにしながら行うことができる。

【0078】

【表 2】

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
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
Val(V)	Ile ; Leu

10

20

【0079】

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。

【0080】

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%、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

【0081】

「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 STRU 40
CTURE、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。

【0082】

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. 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 Bio 50

technology 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。

【0083】

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。

【0084】

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。

【0085】

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置換または欠失として定義される。

【0086】

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

【0087】

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0.18NaCl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認識している。

【0088】

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。

10

【0089】

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)。

20

【0090】

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。

30

【0091】

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。

40

【0092】

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。

【0093】

50

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。

【0094】

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10
することができ、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。

【0095】

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20
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。

【0096】

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。

【0097】

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} のような結合を指す。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。

【0098】

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。40
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。

【0099】

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

【0100】

10

20

30

40

50

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。

【0101】

本明細書において「アルキル基置換基」としては、限定されるものではないが、ハロ、ハロ低級アルキルを含むハロアルキル、アリアル、ヒドロキシ、アルコキシ、アリアルオキシ、アルキルオキシ、アルキルチオ、アリアルチオ、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。

【0102】

本明細書において「アリアル」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。アリアル基としては、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。

【0103】

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

【0104】

本明細書において「アリアル基置換基」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、アリアル、1~3を含む1以上のハロ、ハロアルキルおよびアルキルから選択される置換基で必要に応じて置換されたヘテロアリアル、アラルキル、ヘテロアラルキル、1~2個の二重結合を含むアルケニル、1~2個の三重結合を含むアルキニル、アルケ(キ)ニル基、ハロ、シュードハロ、シアノ、ヒドロキシ、ハロ低級アルキル、特にトリフルオロメチルを含むハロアルキルおよびポリハロアルキル、ホルミル、アルキルカルボニル、1~3を含む1以上の、ハロ、ハロアルキルおよびアルキルから選択される置換基で必要に応じて置換されたアリアルカルボニル、ヘテロアリアルカルボニル、カルボキシ、アルコキシカルボニル、アリア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、アリアルアミノカルボニル、ジアリア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、アリアルオキシ、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、アリアルアルコキシ、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、アリアルアミノアルキル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリアルアミノ、アルキルアリアルアミノ、アルキルカルボニルアミノ、アリア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、アリアルチオ、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、アリアルスルフィニル、アリアルスルホニル、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アルアミノスルホニルが挙げられる。

【0105】

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個がアリアル基で置換されているアルキル基を指す。

【0106】

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個がヘテロアリアル基で置換されているアルキル基を指す。

【0107】

本明細書において「シクロアルキル」とは、飽和単環または多環式環系を指し、1つの実施形態では、3~10個の炭素原子、または3~6個の炭素原子からなり、シクロアルケニルおよびシクロアルキニルとは、それぞれ少なくとも1つの二重結合および少なくとも1つの三重結合を含む単環または多環式環系を指す。シクロアルケニルおよびシクロアルキニル基は、1つの実施形態では、3~10個の炭素原子を含み、シクロアルケニル基は、他の実施形態で4~7個の炭素原子を含み、シクロアルキニル基は、他の実施形態で8~10個の炭

10

20

30

40

50

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もよい。「シクロアルケ(キ)ニル」とは、少なくとも1つの二重結合および少なくとも1つの三重結合を含むシクロアルキル基を指す。

【0108】

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。

【0109】

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。

【0110】

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

【0111】

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。

【0112】

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

【0113】

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

【0114】

10

20

30

40

50

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。

【0115】

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。

【0116】

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。

10

【0117】

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R₀-を指す。

【0118】

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。

【0119】

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。

【0120】

20

本明細書において「アミノカルボニル」とは、-C(O)NH₂-を指す。

【0121】

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。

【0122】

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。

【0123】

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。

30

【0124】

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。

【0125】

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。

【0126】

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。

40

【0127】

本明細書において「アルコシカルボニル」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。

【0128】

本明細書において「アリールオシカルボニル」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。

【0129】

本明細書において「アルコキシ」および「アルキルチオ」とは、Rが低級アルキルをはじめとするアルキルであるR₀-およびRS-を指す。

【0130】

50

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。

【0131】

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(-O-CH₂-O-)およびエチレンジオキシ(-O-(CH₂)₂-O-)が挙げられる。「低級アルキレン」とは、1~6個の炭素を含むアルキレン基を指す。特定の実施形態では、アルキレン基は1~3個の炭素原子のアルキレンをはじめとする低級アルキレンである。

【0132】

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、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=CH-CH₂- 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。

【0133】

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≡C-CH₂- 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。

【0134】

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)_n-C≡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。

【0135】

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

10

20

30

40

50

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。

【0136】

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

10

【0137】

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

【0138】

20

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。

【0139】

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 - $NH-NH-$ を指す。

30

【0140】

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 α -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。

【0141】

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

40

【0142】

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

【0143】

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。

【0144】

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。

【0145】

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 *in vitro* 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が生体高分子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。

【0146】

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、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。

【0147】

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関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。

【0148】

10

20

30

40

50

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いてよいし、またはすべてのセットの間で同一であってもよい。

【0149】

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。

【0150】

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：生体高分子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；および化合物の溶解性を、反応が実施される環境によって変更し、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よう選択され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ン基と相互作用する。反応性官能基は生体分子と相互作用して、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高度計による分析が挙げられる。選択性官能基は非共有相互作用によって反応性官能基と相互作用することができる種類の生体分子に影響を及ぼす。選択性官能基は特定の基の特異性を変化させ、一般的には、反応性官能基が反応する基の数を減少させる。1つの目標は1つの位置に結合されるタンパク質または生体分子数を減少させることであり、その結果、タンパク質が質量分析などによって分離され得る。

【0151】

本明細書に提供される捕獲化合物の中には、少なくとも2つのセット：一方は水溶液中での反应用のもの(例えば、親水性生体分子との反応のためのもの)および他方は有機溶媒(例えば、クロロホルム)中での反応のためのもの(例えば、疎水性生体分子との反応のためのもの)に分類することができる、本明細書の方法で用いる化合物が含まれ得る。した

10

20

30

40

50

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。

【0152】

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、共有結合が十分な安定性もしくは親和性の結合のいずれかで捕獲し、MALDI質量スペクトル分析をはじめとする質量分析計などによる分析を可能にし、その結果、結合した生体分子の少なくとも一部が結合したままにする(一般に、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、リットル/モル以上の結合親和性、または 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 以上の K_{eq})という特性を有するよう選択される。

10

【0153】

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。

20

【0154】

Qは整列させることなどによって、捕獲化合物の各セットを他のものから分離するための手段を提供すればどのようなものであってもよい選別官能基であり、これにはビオチン、一般的には、整列させられている表面のアビジンと結合するスペーサー(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ビー(symboloby)標識されたタグなどの標識、および他のそのような標識によって選別することができる標識手段を用いることもできる。例えば、捕獲化合物またはX、Y、Z、W官能基は、RFタグまたは着色タグと連結されて表面上に存在することもできる。これらは反応後に容易に選別でき、その結果、各セットを個別に分析して結合した生体分子を同定することができる。したがって、収集物は種々の選別基を有している捕獲化合物を含むことができる。

30

40

【0155】

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、そのセットの各々のQと、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捕獲化合物セットを含む。

【0156】

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：反応性および選

50

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別性官能基、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。

【0157】

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。

【0158】

1. Z、コア

一般に、すべての化合物は、それが炭素などの1個の原子であるとしても、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。

【0159】

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。

【0160】

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

【0161】

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る両親媒性 dendritic 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、dendritic 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)dendritic からなる直鎖状樹状ジブロック共重合体からなる。

【0162】

Zは質量スペクトル分析の条件下で切断可能である

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

10

20

30

40

50

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。

【0163】

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。

【0164】

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。本明細書の開示内容および当業者の技量を考慮して正確な性質が設計選択の重要事であり得る。

【0165】

a. 二価のZ部分

1つの実施形態では、Zは、切断可能であるか切断できない二価の基であり、一般に、50以下の、または20未満のメンバーを含み、直鎖または分枝鎖アルキレン、直鎖または分枝鎖アルケニレン、直鎖または分枝鎖アルキニレン、直鎖または分枝鎖アルキレンオキシ、直鎖または分枝鎖アルキレンチオ、直鎖または分枝鎖アルキレンカルボニル、直鎖または分枝鎖アルキレンアミノ、シクロアルキレン、シクロアルケニレン、シクロアルキニレン、シクロアルキレンオキシ、シクロアルキレンチオ、シクロアルキレンカルボニル、シクロアルキレンアミノ、ヘテロシクリレン、アリーレン、アリーレンオキシ、アリーレンチオ、アリーレンカルボニル、アリーレンアミノ、ヘテロアリーレン、ヘテロアリーレンオキシ、ヘテロアリーレンチオ、ヘテロアリーレンカルボニル、ヘテロアリーレンアミノ、オキシ、チオ、カルボニル、カルボニルオキシ、エステル、アミノ、アミド、ホスフィノ、ホスフィンオキシド、ホスホルアミダート、ホスフィンアミダート、スルホンアミド、スルホニル、スルホキシド、カルバマート、ウレイドおよびこれらの組み合わせから選択され、必要に応じて、1、2、3または4個を含む1個以上の、本明細書の別の場所に記載したYから選択される置換基で各々独立に置換されていてもよい。

【0166】

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、 $-(C(R^{15})_2)_d-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-(CH_2)_d-$ 、 $-(CH_2)_dO-$ 、 $-(CH_2)_dS-$ 、 $>N(R^{15})$ 、 $-(S(O)_u)-$ 、 $-(S(O)_2)_w-$ 、 $>C(O)$ 、 $-(C(O))_w-$ 、 $-(C(S(O)_u))_w-$ 、 $-(C(O)O)_w-$ 、 $-(C(R^{15})_2)_dO-$ 、 $-(C(R^{15})_2)_dS(O)_u-$ 、 $-O(C(R^{15})_2)_d-$ 、 $-S(O)_u(C(R^{15})_2)_d-$ 、 $-(C(R^{15})_2)_dO(C(R^{15})_2)_d-$ 、 $-(C(R^{15})_2)_dS(O)_u(C(R^{15})_2)_d-$ 、 $-N(R^{15})(C(R^{15})_2)_d-$ 、 $-(C(R^{15})_2)_dNR^{15}-$ 、 $-(C(R^{15})_2)_dN(R^{15})(C(R^{15})_2)_d-$ 、 $-(S(R^{15})(O)_u)_w-$ 、 $-(C(R^{15})_2)_d-$ 、 $-(C(R^{15})_2)_dO(C(R^{15})_2)_d-$ 、 $-(C(R^{15})_2)_d(C(O)O)_w(CR^{15})_2)_d-$ 、 $-(C(O)O)_w(CR^{15})_2)_d-$ 、 $-(C(R^{15})_2)_d(C(O)O)_w-$ 、 $-(C(S)(R^{15})_w-$ 、 $-(C(O))_w(CR^{15})_2)_d-$ 、 $-(CR^{15})_d(C(O))_w(CR^{15})_d-$ 、 $-(C(R^{15})_2)_d(C(O))_w-$ 、 $-N(R^{15})(C(R^{15})_2)_w-$ 、 $-OC(R^{15})_2C(O)-$ 、 $-O(R^{15})_2C(O)N(R^{15})-$ 、 $-(C(R^{15})_2)_wN(R^{15})(C(R^{15})_2)_w-$ 、 $-(C(R^{15})_2)_wN(R^{15})-$ 、 $>P(O)_v(R^{15})_x$ 、 $>R(O)_u(R^{15})_3$ 、 $>P(O)_u(C(R^{15})_2)_d$ 、 $>Si(R^{15})_2$ 、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、二価の切断可能であるか

10

20

30

40

50

、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。

【0167】

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、 $>C(R^{15})_2$ 、 $-C(R^{15})=C(R^{15})-$ 、 $>C=C(R^{23})(R^{24})$ 、 $>C(R^{23})(R^{24})$ 、 $-C\equiv C-$ 、 $-O-$ 、 $>S(A)_u$ 、 $>P(D)_v(R^{15})$ 、 $>P(D)_v(ER^{15})$ 、 $>N(R^{15})$ 、 $>N^+(R^{23})(R^{24})$ 、 $>Si(R^{15})_2$ 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V- R^{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、 $>C(R^{17})_2$ 、 $-C(R^{17})=C(R^{17})-$ 、 $>C=C(R^{23})(R^{24})$ 、 $>C(R^{23})(R^{24})$ 、 $-C\equiv C-$ 、 $-O-$ 、 $>S(A)_u$ 、 $>P(D)_v(R^{17})$ 、 $>P(D)_v(ER^{17})$ 、 $>N(R^{17})$ 、 $>N(COR^{17})$ 、 $>N^+(R^{23})(R^{24})$ 、 $>Si(R^{17})_2$ および $>C(E)$ のいずれかの組み合わせを有する二価の基であり(式中、uは0、1または2であり、vは0、1、2または3であり、Aは $-O-$ または $-NR^{17}$ であり、Dは $-S-$ または $-O-$ であり、Eは $-S-$ 、 $-O-$ または $-NR^{17}$ である)、その群はどの順序で組み合わせてもよく、

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

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

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

10

20

30

40

50

(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 - NR¹⁹R²⁰ から選択される一価の基であり、

R^{15} 、 R^{17} 、 R^{18} 、 R^{19} 、 R^{20} 、 R^{23} 、 R^{24} 、 R^{25} 、 R^{27} および R^{28} は、 Z^2 から各々独立に選択される1以上の置換基で置換されていてもよく、 Z^2 はアルキル、アルケニル、アルキニル、アリーール、シクロアルキル、シクロアルケニル、ヒドロキシ、- S(O)_hR³⁵ (ここで、hは0、1または2である)、- NR³⁵R³⁶、- COOR³⁵、- COR³⁵、- CONR³⁵R³⁶、- OC(O)NR³⁵R³⁶、- N(R³⁵)C(O)R³⁶、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、アルキルジアリーールシリル、トリアリーールシリル、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。

【0168】

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

【0169】

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

【0170】

(i) 切断可能な二価のZ部分

1つの実施形態では、Zは切断可能な二価部分であり、かつ、次式：- (S¹)_t - M(R¹⁵)_a - (S²)_b - L - を有し、

式中、S¹ および S² 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、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、R¹⁵ 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

10

20

30

40

50

可能な結合である。

【0171】

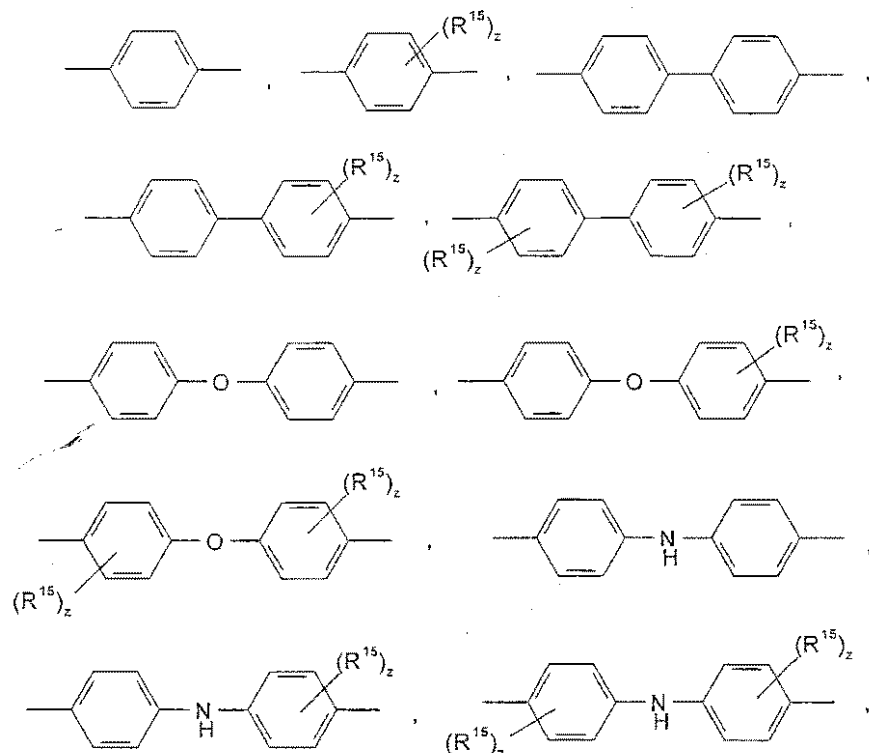
(a) M

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二価のヘテロ二官能性トリチル誘導体である。Mは非置換であるか、または各々独立に R^{15} から選択される1~4個の基で置換されている。

【0172】

他の実施形態では、Mは $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2-O)_r-$ 、 $-(NH-(CH_2)_r-C(=O))_s-$ 、 $-(NH-CH(R^{52})-C(=O))_r-$ 、 $-(O-(CH)_r-C(=O))_s-$ 、

【化1】



{ 式中、 R^{15} は上記で定義した通りであり、 r および s は各々独立に1~10の整数であり、 R^{52} は天然 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。1つの実施形態では、 z は1である。

【0173】

特定の実施形態では、 R^{15} は $-H$ 、 $-OH$ 、 $-OR^{51}$ 、 $-SH$ 、 $-SR^{51}$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^{51}$ 、 $-N(R^{51})_2$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-SO_3H$ 、 $-PO^{2-}_4$ 、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH(CH_3)_2$ 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。

【0174】

(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

10

20

30

40

50

、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、適切なスペーサーを容易に選択することができる。例示的なスペーサーを以下に示す。

【0175】

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

10

【0176】

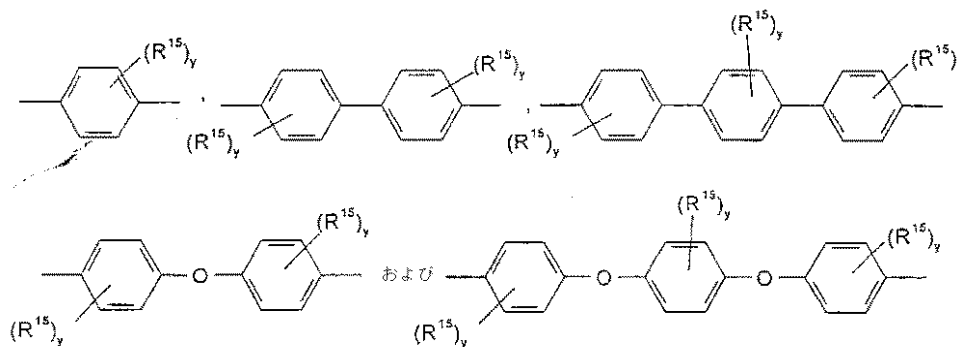
S^2 が必要でない場合には、切断可能な結合Lの反応性は1以上の置換している官能基(例えば、M上の R^{15})によって影響され得る。切断可能な結合Lの安定性を調節するために、電子的(例えば、メソメリー、誘導)および/または立体効果を用いることができる。例えば、Mがトリチル誘導体である場合には、限定されるものではないが、タンパク質をはじめとする生体分子への結合は、1つの実施形態では、トリチルエーテル結合である。酢酸またはトリフルオロ酢酸の蒸気などの弱酸に対するこの結合の感度は、 R^{15} として、限定されるものではないが、メトキシ基などのアルコキシ基を含む1または2個以上の電子供与基をア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

20

【0177】

特定の実施形態では、 S^1 および S^2 は各々独立に $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2O)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2-O)_r-$ 、 $-(NH-(CH_2)_r-C(=O))_s-$ 、 $-(NH-CH(R^{52})-C(=O))_s-$ 、 $-(O-(CH)_r-C(=O))_s-$ 、

【化2】



30

{ 式中、 R^{15} は上記のように選択され、 r および s は各々独立に1~10の整数であり、 R^{52} は天然 α -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。

40

【0178】

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、直鎖または分枝鎖シクロアルキルアルキル、

50

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。

【0179】

(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。

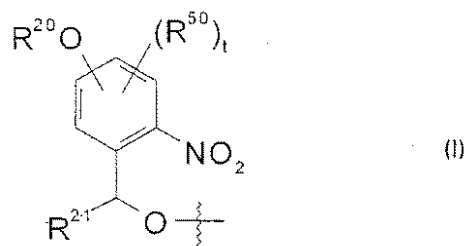
【0180】

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

【0181】

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ことができる。1つの実施形態では、光切断可能な基は次式Iを有し、

【化3】

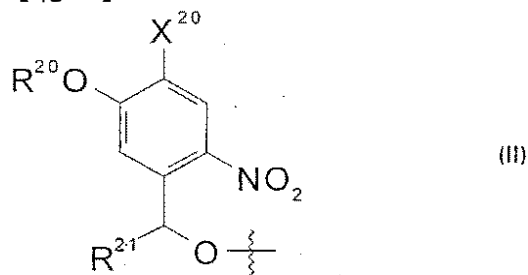


式中、 R^{20} は ω -O-アルキレン-であり、 R^{21} は水素、アルキル、アリール、アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニルおよびカルボキシから選択され、 t は0~3であり、 R^{50} はアルキル、アルコキシ、アリールまたはアリールオキシである。1つの実施形態では、Qは $(S^1)_t - M(R^{15})_a - (S^2)_b$ を介して R^{20} と結合しており、目的の生体分子は酸素の反応性誘導体(例えば、X)によって $R^{21}CH-O$ -部分上に捕獲される。

【0182】

別の実施形態では、光切断可能な基は次式IIを有し：

【化4】



10

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

【0183】

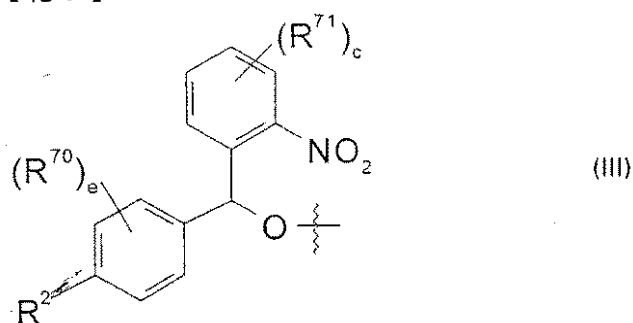
さらなる実施形態では、 R^{20} は $-O-(CH_2)_3-$ またはメチレンであり、 R^{21} は水素、メチルおよびカルボキシから選択され、 X^{20} は水素、メチルまたは OR^{21} である。別の実施形態では、 R^{21} はメチルであり、 X^{20} は水素である。特定の実施形態においては、 R^{20} はメチレンであり、 R^{21} はメチルであり、 X^{20} は3-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロポキシ

20

【0184】

別の実施形態では、光切断可能な基は次式IIIを有し：

【化5】



30

式中、 R^2 は ω -O-アルキレン-Oおよび ω -O-アルキレン-であり、かつ、非置換であるかまたはアルキレン鎖が1個以上のアルキル基で置換されており、cおよびeは各々独立に0~4であり、 R^{70} および R^{71} は各々独立にアルキル、アルコキシ、アリールまたはアリールオキシである。特定の実施形態では、 R^2 は ω -O-アルキレン-であり、かつ、アルキレン鎖がメチル基で置換されている。1つの実施形態では、Qは $(S^1)_t - M(R^{15})_a - (S^2)_b$ を介して R^2 と結合しており、目的の生体分子は酸素の反応性誘導体(例えば、X)によって Ar_2CH-O -部分上に捕獲される。

40

【0185】

さらなる実施形態では、 R^2 は3-O-(CH_2)₃-O-、4-O-(CH_2)₄-、3-O-(CH_2)₃-、2-O- CH_2CH_2 -、- OCH_2 -、

【化6】



50

から選択される。

【0186】

他の実施形態では、cおよびeは0である。

【0187】

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

10

【0188】

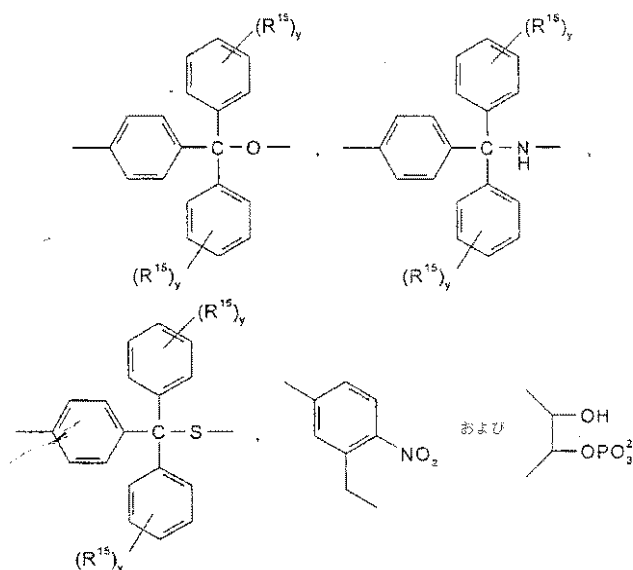
捕獲化合物 - 生体分子アレイは、切断を行うために、限定されるものではないが、臭化シアンをはじめ化学的に、または限定されるものではないが、生体分子がタンパク質である実施形態においては、トリプシン、キモトリプシン、エキソペプチダーゼ(例えば、アミノペプチダーゼおよびカルボキシペプチダーゼ)試薬をはじめ酵素的に処理することができる。後者については、消化が定量的である場合には、1つを除いてすべてのペプチド断片はハイブリダイズしたままである。アレイから脱離させた後にタンパク質を同定および特性決定するには、部分消化も有利であり得る。切断したタンパク質/ペプチド断片を脱着させ、分析し、そのそれぞれの分子量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

20

【0189】

本明細書における特定の実施形態では、Lは - S - S - 、 - O - P(=O)(OR⁵¹) - NH - 、 - O - C(=O) - 、

【化7】



30

40

{ 式中、R¹⁵、R⁵¹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、R¹⁵は - H、 - OH、 - OR⁵¹、 - SH、 - SR⁵¹、 - NH₂、 - NHR⁵¹、 - N(R⁵¹)₂、 - F、 - Cl、 - Br、 - I、 - SO₃H、 - PO₄²⁻、 - CH₃、 - CH₂CH₃、 - CH(CH₃)₂または - C(CH₃)₃であり、ここで、R⁵¹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

50

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。

【0190】

(ii)切断できない二価のZ部分

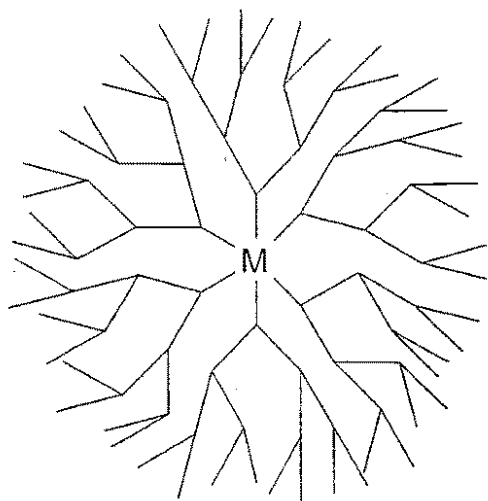
別の実施形態では、Zは切断できない二価部分であり、式： $-(S^1)_t - M(R^{15})_a - (S^2)_b -$ を有する。式中、 S^1 、M、 R^{15} 、 S^2 、t、aおよびbは上記で定義した通りである。

【0191】

b. Zはデンドリマー構造を有する

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は多価デンドリマーである)。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8】

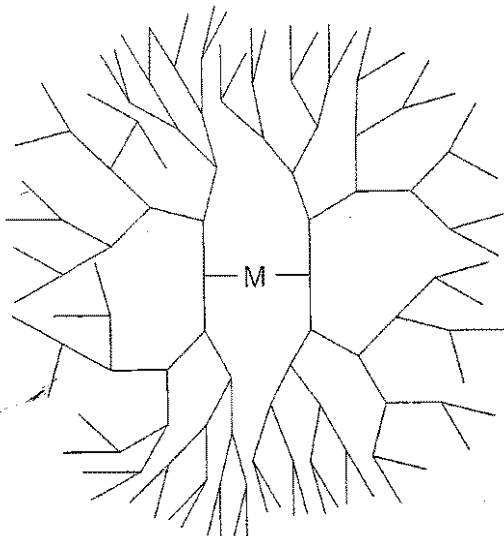


ここで、Mは上記で定義した通りであり、複数のQ、Y、WおよびX部分と結合している。

【0192】

別の実施形態では、Zは以下の構造を有する：

【化9】



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。

【0193】

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。

【0194】

これらの実施形態では、分析される生体高分子の密度、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。

【0195】

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

【0196】

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、Dynabeads、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

10

20

30

40

50

形態であってよい。支持体としては、別個の位置でサンプルを受容または結合するように設計された平坦な表面が挙げられる。

【0197】

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、Sepharose(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。

【0198】

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、スペーサー基 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。

【0199】

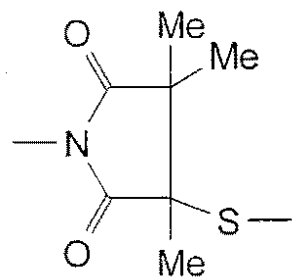
これらの実施形態では、分析される生体分子の密度、ひいては続く分析のシグナル強度は、Zが二価の基である実施形態と比べて高まっている。特定の実施形態では、一本鎖オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体である選別官能基Qと相補的な、一本鎖オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体の適切なアレイを、本明細書に提供する方法に用いる。

【0200】

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： $-(S^1)_t - M(R^{15})_a - (S^2)_b - L - T -$ 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 $-X^1R^{10}-$ で表される基が挙げられる。ここで、 X^1 は $-O-$ 、 $-O-C(O)-(CH_2)_y-C(O)O-$ 、 $-NH-C(O)-$ 、 $-C(O)-NH-$ 、 $-NH-C(O)-(CH_2)_y-C(O)O-$ 、 $-NH-C(S)-NH-$ 、 $-O-P(O-アルキル)-O-$ 、 $-O-SO_2-O-$ 、 $-O-C(O)-CH_2-S-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ および

【化10】



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、-

$(\text{CH}_2)_z - \text{CH}_2 - \text{O} -$ 、 $-(\text{CH}_2)_z - \text{CH}_2 - \text{O} -$ アルキレン、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_z - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH} -$ 、 $-\text{CH}_2 - \text{CH}(\text{OH}) - \text{CH}_2\text{O} -$ 、 $-\text{Si}(\text{R}^{12})(\text{R}^{13}) -$ 、 $-\text{CHF} -$ および $-\text{CF}_2 -$ 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 α 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。

【0201】

他の実施形態では、 $-\text{X}^1\text{R}^{10} -$ は $-\text{S} - \text{S} -$ 、 $-\text{S} -$ 、 $-(\text{NH} - (\text{CH}_2)_y - \text{NH} - \text{C}(\text{O}) - (\text{CH}_2)_y - \text{C}(\text{O}))_z - \text{NH} - (\text{CH}_2)_y - \text{NH} - \text{C}(\text{O}) - (\text{CH}_2)_y - \text{C}(\text{O})\text{O} -$ 、 $-(\text{NH} - (\text{CH}_2)_y - \text{C}(\text{O}))_z - \text{NH} - (\text{CH}_2)_y - \text{C}(\text{O})\text{O} -$ 、 $-(\text{NH} - \text{CH}(\text{R}^{11}) - \text{C}(\text{O}))_z - \text{NH} - \text{CH}(\text{R}^{11}) - \text{C}(\text{O})\text{O} -$ および $-(\text{O} - (\text{CH}_2)_y - \text{C}(\text{O}))_z - \text{NH} - (\text{CH}_2)_y - \text{C}(\text{O})\text{O} -$ から選択される。

【0202】

上記の実施形態では、 R^{10} がオリゴ- / ポリエチレングリコール誘導体である場合には、質量改変増分は44であり、すなわち、 z を0から4まで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。

【0203】

他の質量改変タグとしては、限定されるものではないが、 $-\text{CHF} -$ 、 $-\text{CF}_2 -$ 、 $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2 -$ 、 $-\text{Si}(\text{CH}_3)(\text{C}_2\text{H}_5) -$ および $-\text{Si}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ が挙げられる。他の実施形態では、質量改変タグとしては、ホモまたはヘテロペプチドを含む。57の質量増分を有している質量改変種を作製する限定的ではない例はオリゴグリシンであり、これは、例えば、74($y=1$, $z=0$)、131($y=1$, $z=2$)、188($y=1$, $z=3$) または 245($y=1$, $z=4$)の質量改変を生じる。オリゴアミドもまた使用することができ、例えば、74($y=1$, $z=0$)、88($y=2$, $z=0$)、102($y=3$, $z=0$)、116($y=4$, $z=0$)などの質量改変が得られる。当業者であれば、予め決定された方法で本明細書中に提供する化合物に対して多種の質量改変を導入するためには、本明細書で例示したものの他にも多数の可能性があるということを理解するであろう。

【0204】

他の実施形態では、 R^{15} および / または S^2 に、質量改変タグとなるように、 $-\text{X}^1\text{R}^{10}\text{H}$ または $-\text{X}^1\text{R}^{10} -$ 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。

【0205】

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)。

【0206】

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。

【0207】

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

10

20

30

40

50

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れる。

【0208】

本明細書中でX基として用い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ことができる：

(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、 α -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)キサンテニル、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-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-ブテノエート(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、 α -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)。

【0209】

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(ヘブチル、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、 α -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、 ω -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-ジチアニル-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

10

20

30

40

50

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 - メチルプロ - 3 - エン - 2 - イル、3 - メチルプロ - 2 - (プレニル)、3 - プテン - 1 - イル、4 - (トリメチルシリル) - 2 - プテン - 1 - イル、シンナミル、 α - 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。

【0210】

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 - イソプロトキシメチル、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 - 、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)イソプロポキシ] カルボニル] - N - メチル - γ - 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 - γ - 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 - η] - 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。

【 0 2 1 1 】

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)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、α - 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ピニル、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

10

20

30

40

50

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-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)、

(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)、

(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)、

(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

10

20

30

40

50

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)、

10

20

(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 - ジメチルペンタ - 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 - ピパ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 - ピパロイル、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

30

(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 - ピパ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

40

50

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 - トルエンシルホニル、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 - ブテニル、N - エテニル、N - [(e) - (2 - メトキシカルボニル)ピニル]、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 - メチルフェニルシルホニル)エチル)をはじめとするアミド - NH保護基。

【 0 2 1 2 】

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。

10

【 0 2 1 3 】

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。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。

【 0 2 1 4 】

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、ビオチンまたはストレプトアビジン、抗体または抗原、受容体またはリガンド、レシチンまたは炭水化物および他の同様の種類の試薬などの結合対の十分に公知の一方を、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。

20

30

【 0 2 1 5 】

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。

【 0 2 1 6 】

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。

40

【 0 2 1 7 】

特定の実施形態では、Xは - C(=O)O - Ph - pNO₂、 - C(=O)O - C₆F₅、 - C(=O) - O - (N - スクシンイミジル)などの活性エステル、限定するものではないが、 - OCH₂ - I、 - OCH₂ - Br、 - OCH₂ - Cl、 - C(O)CH₂I、 - C(O)CH₂Brおよび - C(O)CH₂Clをはじめとするα - ハロエーテルまたはα - 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、エク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な官能基、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

50

ンである。

【0218】

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(メソメリー、誘導効果)特性ならびに得られる親和性特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ノ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)それと反応するような化合物、および/または、化合物がより大きな特異性およびより高い親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および以下の議論を参照。

【0219】

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、および親水性トリチル基から選択する。

【0220】

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。

【0221】

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、 OR^{60} 、 $\text{NR}^{60}\text{R}^{61}$ 、 COOR^{60} 、 $\text{C}(\text{O})\text{R}^{60}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{NR}^{60}\text{R}^{61}$ 、 $\text{S}(\text{O})_q\text{R}^{60}$ 、 $\text{S}(\text{O})_q\text{OR}^{60}$ 、 $\text{S}(\text{O})_q\text{NR}^{60}\text{R}^{61}$ 、 $\text{NR}^{60}\text{C}(\text{O})\text{R}^{61}$ 、 $\text{NR}^{60}\text{C}(\text{O})\text{NR}^{60}\text{R}^{61}$ 、 $\text{NR}^{60}\text{S}(\text{O})_q\text{R}^{60}$ 、 $\text{SiR}^{60}\text{R}^{61}\text{R}^{62}$ 、 $\text{P}(\text{R}^{60})_2$ 、 $\text{P}(\text{O})(\text{R}^{60})_2$ 、 $\text{P}(\text{OR}^{60})_2$ 、 $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{60})_2$ 、 $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{60})(\text{R}^{61})$ および $\text{P}(\text{O})\text{NR}^{60}\text{R}^{61}$ 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、

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、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。

【 0 2 2 2 】

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(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、キサントゲン、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、エチジウムブロマイド、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)ビスベンゾオキサゾール、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、ヘレブリエニン(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 - クロメニル)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

10

20

30

40

50

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。

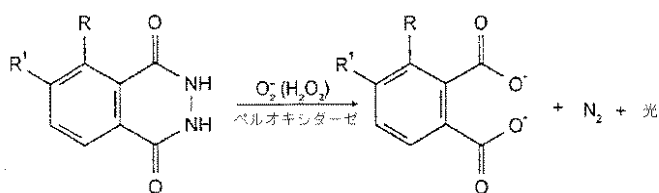
【 0 2 2 3 】

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- α]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- α]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- α]ピラジン-3-オンをはじめとするシブ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)が挙げられる。これらは以下の構造を有しており、そして、以下の反応に関与する：

10

【化 1 1】

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。

が挙げられる。

30

【 0 2 2 4 】

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: Cypridina(*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

40

50

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(cyclitone)、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(agyrolepecus))、ウキエソ属(vinciguerria)、クシスミクイウオ属(howella)、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)由来のものをはじめとするBFP)蛍光タンパク質をはじめとする(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リューロマンマ(Pleuromamma)種ルシフェラーゼ含む)蛍光タンパク質およびフィコピリタンパク質。

10

【0225】

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)、シクロデキストロリン(cyclodextrins)、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。

20

【0226】

【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 SAEAPLEF	1
アドレノメデュリン	YRQSMNNFQG LRSFGCRFGT CTVQKLAHQI YQFTDKDKDN VAPRSKISPO GY	2
アラトスタチンI-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
アンギオテンシン-1	DRVYIHPFHL	9
アンギオテンシン-2	DRVYIHPF	10
アンギオテンシン-3	RVYIHPF	11
アペリン-13	NRPRLSHLGMPF	12
アストレシン(Astressin)	*FHLLREVLE*IAAEQLAQEAHKNRL*IEII	13
心房性ナトリウム利尿ペプチド	SLRRSSCFGG RMDRIGAQSG LGCNSFRY	14
オートカムタイド2	KKALRRQETV DAL	15
BAM12	YGGFMRRVGR PE	16
BAM18	YGGFMRRVGR PEWW	17
BAM22	YGGFMRRVGR PE	18
ベータ-ネオ-エンドルフィン ("44")	YGGFMTSEKS QTPLVTLFKN AIKNAYKKG E	19
ベータMSH	AEKKDEGPYR MEHFRWGSPD 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 DVGSNLGAIIG LMVGGVVIAT	22
ベータ-バッグセルペプチド	RLRFH	23

30

40

50

【表4】

BNP	SPKMVGSGC 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 (ウデカバチド)	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 EIHARFVMTA ASCFN	33
カルジオジラチン (Gardiodilatin)	* NPMYNAVSNA DLMDFKNLLD HLEEKMPLED	34
CD36 (ウデカバチド) (139-155)	CNLAVAAASH IYQNQFVQ	35
セクロビンB	KWKVFKKIEK MGRNIRNGIV KAGPAIAVLG EAKAL	36
セレベリン (cerebellin)	SGSAKVAFSA IRSTNH	37
CGRP-1	ACDTATCVTH RLAGLLSRSG GVVKNNFVPT NVGSKAF	38
CGRP-2	ACNTATCVTH RLAGLLSRSG GMVKS NFVPT NVGSKAF	39
CKS17	LQNRRLDLL FLKEGGL	40
コルチスタチン	QEGAPQQA RRDRMPCRN FWKTFSSCK	41
クリスタリン	WG	42
デフェンシン 1 HNP1	ACYCRIPACI AGERRYGTCT YQRLWAFCC	43
デフェンシン HNP2	CYCRIPACIA GERRYGTCT YQRLWAFCC	44
デルマセプチン (Dermaseptin)	ALWKTMLKKL GTMALHAGKA ALGAAADTIS QTQ	45
ディルフィン -A	YGGFLRRIRP KLKWDNQ	46
ディルフィン -B	YGGFLRRQFK VVT	47
エレドイシン	E*PSKDAFIGLM-NH ₂	48
イントモルフィン -1	YPWF	49
イントモルフィン -2	YPFF	50
イントセリン -1	CSCSSLMDKE CVYFCHLDII W	51
イクセンデイン-4	HSDGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS(NH ₂)	52
繊維素ペプチド	AADSGEGDFLA EGGGVV	53
繊維素ペプチド	BQGVNDNEEGF FSAR	54
フィロネクチン CS1	EILDVPST	55
FMRF	FMRF	56
ガラニン	GWTLSAGYL LGPHAVGNHR SFSDKNGLTS	57
ガラントイド (Galantide)	GWTLSAGYL LGPQQFFGLM(NH ₂)	58
ガンマーバグセルカバチド	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 RVQQRKESKK PPAKLQPR	62
GIP	YAEGTFISDY SIAMDKIHQQ DFVNWLLAQK GKKNDWKHNI TQ	63
グルカゴン	HSQGTFTSDY SKYLDSSRAQ 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 DYL 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	HSDATFTAAY SKLLAKLALQ KYLESILGSS TSPRPPSS	80
ヘロデルミン -2	HSDATFTAAY 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)	FVNQHLCGSH LVEALYLVCG ERGFFYTPKT	86
インスリン (全分子)	上記参照	87
キネテンシン(Kinetensin)	IARRHPYFL	88
Leu-エンケファリン	YGGFL	89
リトリン(Litorin)	E*QWAVGHFM-NH 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
ニューロキニン 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*LYENKPRRPUIL	102
ノシセプチン	FGGFTGARKS ARKLANQ	103
ノシセプチン/ホルファニン FQ	FAEPLPSEEE GESYSKEVPE MEKRYGGFMR F	104
ノシスタチン	EQKQLQ	105
ホルフィン A	E*PLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGI LTL-NH ₂	106
ホルフィン B	RSGPPGLQGR LQRLLOQASGN HAAGILTM- NH ₂	107
オステオカルシン	YLYQWLGA PV PYPDPLEPRR EVCELNPDCD ELADHIGFQE AYRRFYGPV	108
オキシトシン	CYIONCPLG-NH ₂	109
PACAP	HSDGIFTDSY SRYRKQMAVK KYLA AVL	110
PACAP-RP	DVAHGILNEA YRKVLDQLSA GKHLOSLVA	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 RLLOGLV	123
血清胸腺因子	E*AKSQGGSN	124
構造部位亜鉛リガンドー アルファ	PQCGKCRICK NPESNYCLK	125
構造部位亜鉛リガンドー ベータ	PQCGKCRVCK NPESNYCLK	126
構造部位亜鉛リガンドー ガンマ	PQCGKCRICK NPESNYCLK	127
構造部位亜鉛リガンドー デルタ	PLCRKCKFCLSPLTNLCGK	128
構造部位亜鉛リガンドー X	PQGECKFCLNPKTNLCQK	129
サブスタンス P	RPKPOQFFGL M-NH 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 LRPLFEKKSL EDKTERELLE SYIDGR	133
チモペンチン	RKDVY	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
尿毒症ペンタペプチド	DLWQK	139
ウロコルチン	DNPSLSIDLT FHLLRTLLEL 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	IIQFHFHWGS	149

10

【 0 2 2 7 】

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 2 8 】

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。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 2 2 9 】

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、6-His、BODIPY、オリゴヌクレオチド、ヌクレオシド、ヌクレオチド、抗体、免疫毒素結合体、接着ペプチド、レクチン、リボソーム、PNA、活性化デキストランおよびペプチドが挙げられる。1つの実施形態では、選別官能基は、固体支持体上の相補オリゴヌクレオチドの一本鎖領域とのハイブリダイゼーションを可能にするオリゴヌクレオチド、特に、一本鎖のオリゴヌクレオチドまたは部分的に一本鎖であるオリゴヌクレオチドのいずれかである。

50

【0230】

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。

【0231】

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。

【0232】

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。

【0233】

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。

【0234】

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

$$N^1_m - B_i - N^2_n -$$

を有する場合がある。式中、 N^1 および N^2 は保存された配列の領域であり、Bは配列並べ替えの領域であり、m、iおよびnはそれぞれ N^1 、Bおよび N^2 の単位数であり、m、nおよびiの合計は、相補核酸配列とハイブリダイズして安定なハイブリッドを形成できる単位数である。したがって、Bが一本鎖DNAまたはRNAである実施形態では、配列並べ替えの数は 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

10

20

30

40

50

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。

【0235】

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。

【0236】

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マー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マー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マー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。

【0237】

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、スルホメート(sulfonamtes)、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。

【0238】

第四級アンモニウム塩(すなわち、ベタイン、コリン、スピングミエリン、テトラメチル(またはテトラブチル)アルキルアンモニウム塩)などの両親媒性化合物、陽イオン性、イオン性および中性テンシド(tenside)を溶解性官能基Wとして使用することができる場合

10

20

30

40

50

もある。

【0239】

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

【0240】

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。

【0241】

a. 例示的な実施形態1

1つの実施形態では、本明細書で提供される方法に用いるための化合物は次式：

20

Q-Z-XまたはQ-Z-Y

を有する。式中、Qは、塩基相補的一本鎖核酸分子とハイブリダイズできる、最大50単位からなる、一本鎖の、保護されていないかまたは適切に保護されたオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体(例えば、ペプチド核酸(PNA))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。

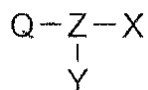
30

【0242】

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12】



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。

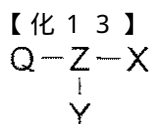
40

【0243】

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：

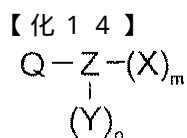


を有する。式中、Qは、既知の化合物と特異的に非共有的に結合し強固に結合した捕獲化合物を生じることができる、化合物または1以上の生体分子(例えば、医薬品製剤、生体分子、薬剤または基質に固着して標的生体分子を捕獲する他の化合物)である選別官能基であり、Zは、限定されるものではないが、タンパク質をはじめとする生体分子の構造を変化させることなく、質量スペクトル分析をはじめとする生体分子の分析の前またはその間に切断可能である部分であり、Xは、限定されるものではないが、タンパク質をはじめとする生体分子の表面上の官能基と相互作用および/または反応して、共有結合または質量スペクトル分析、特にMALDI分析の条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。

【0 2 4 4】

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：



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。

【0 2 4 5】

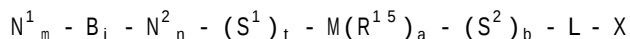
e. 他の例示的な実施形態

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。

【0 2 4 6】

f. 他の実施形態

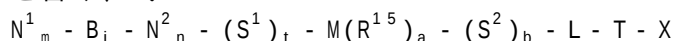
特定の実施形態では、本明細書で提供される化合物は式：



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。

【0 2 4 7】

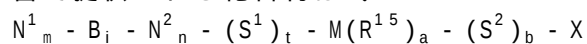
さらなる実施形態では、本明細書で提供する方法に用いるための化合物は質量改変タグを含み、式：



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。

【0 2 4 8】

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

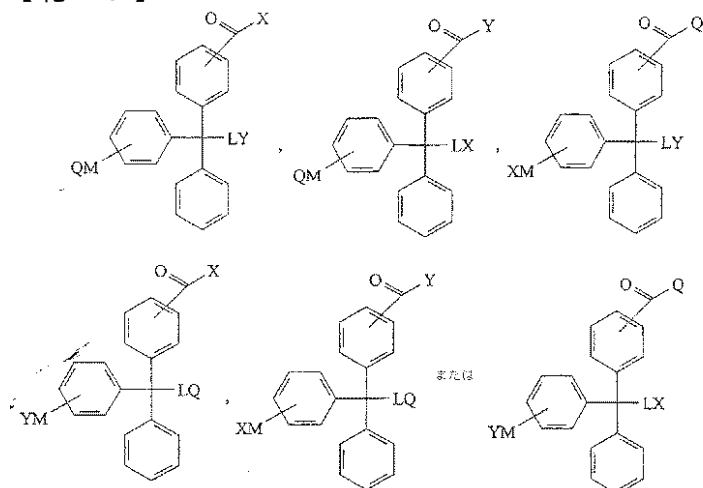


を有する。式中、 N^1 、 B 、 N^2 、 S^1 、 M 、 S^2 、 X 、 m 、 i 、 n 、 t 、 a および b は上記で定義した通りである。

【0249】

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15】



10

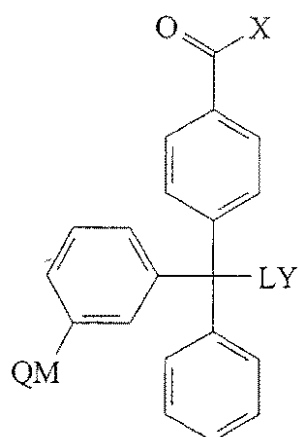
20

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。

【0250】

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16】



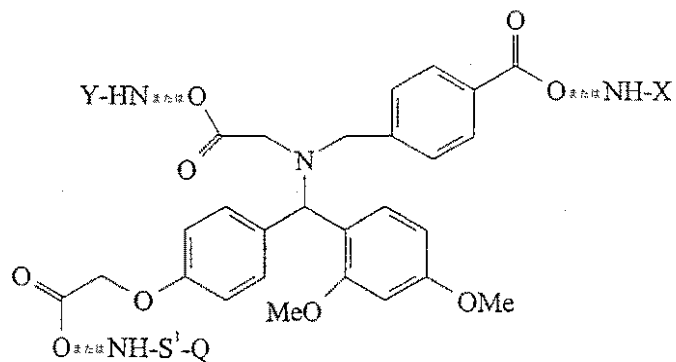
40

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。

【0251】

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 17】



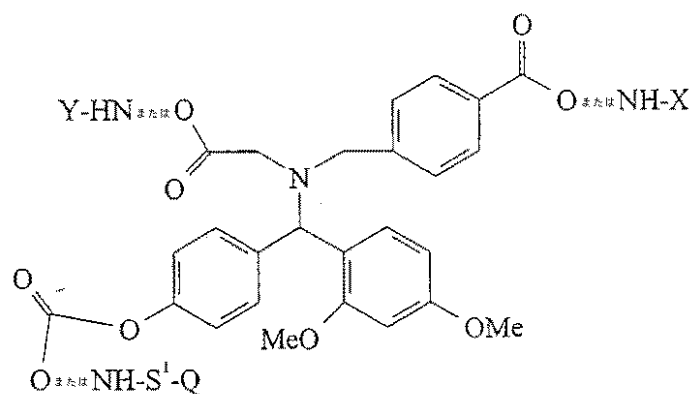
10

を有する。式中、X、Y、Qおよび S^1 は上記で定義した通りである。

【0252】

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 18】



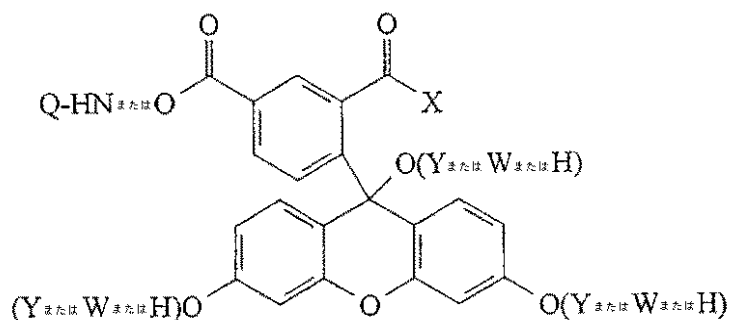
20

を有する。式中、Q、Y、Xおよび S^1 は上記で定義した通りである。

【0253】

別の実施形態では、本明細書で提供される捕獲化合物は式：

【化 19】



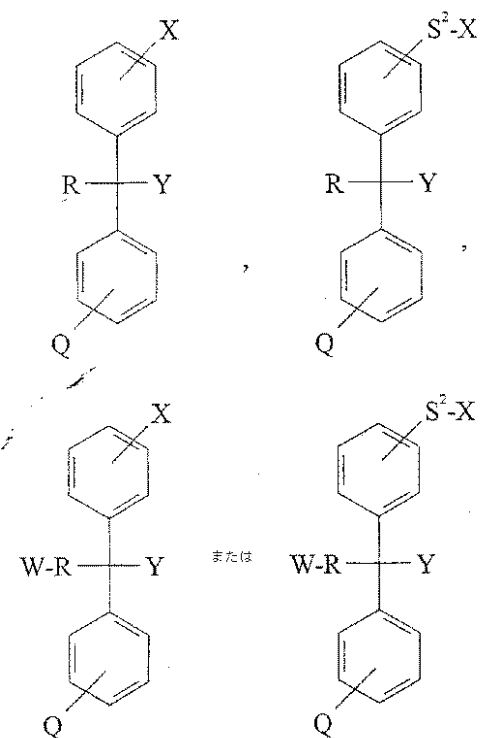
40

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。

【0254】

別の実施形態では、本明細書で提供される方法に用いるための捕獲化合物は式：

【化 2 0】



10

20

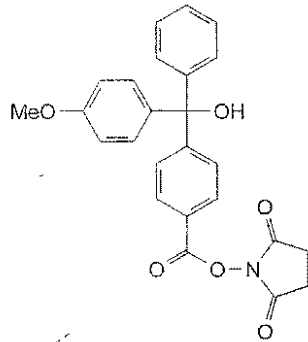
を有する。式中、X、Y、QおよびWは上記のように選択され、Rは置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキルアルキル、または置換もしくは非置換アラルキルである。別の実施形態では、Rはシクロヘキシル、シクロヘキシル - $(CH_2)_n$ - 、イソプロピルおよびフェニル - $(CH_2)_n$ - から選択され、ここで、nは1、2または3である。上記の式で示されるように、Rは必要に応じてWで置換される。

【 0 2 5 5 】

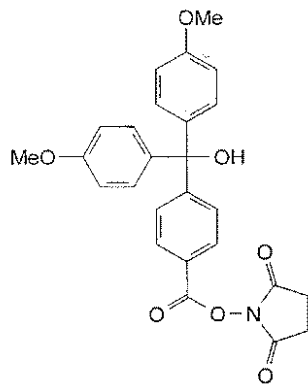
他の実施形態では、本明細書で提供される方法に用いるための化合物には

30

【化 2 1】

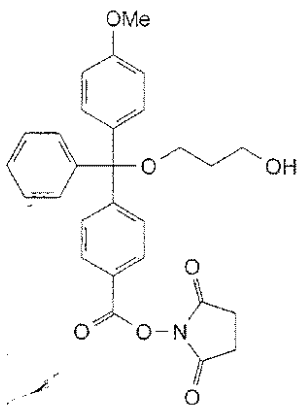


10

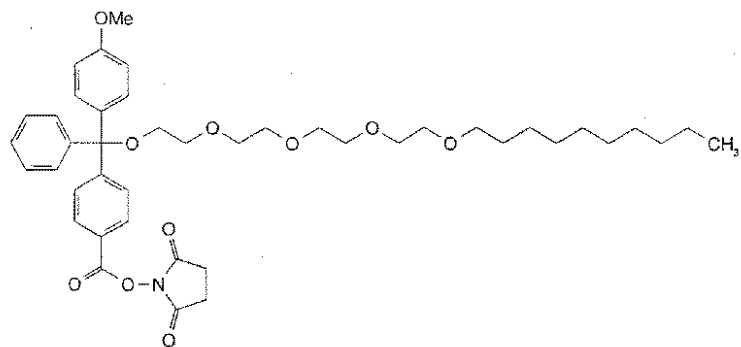


20

【化 2 2】



30



40

が含まれる。

【 0 2 5 6 】

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

50

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

【0257】

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。

10

【0258】

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。

【0259】

一般的には、捕獲化合物は中心部分Zから出発して調製することができる。特定の実施形態では、Zは $-(S^1)_t - M(R^{15})_a - (S^2)_b - L -$ である。これらの実施形態では、捕獲化合物は(例えば、1個以上の R^{15} 基で)適切に置換されたM基から出発して調製することができる。 $M(R^{15})_a$ は、必要に応じて、 S^1 および/または S^2 と場合によって結合させ、続いて切断可能なリンカーLと連結させる。あるいは、L基は、必要に応じて S^2 と結合させ、続いて $M(R^{15})_a$ さらに必要に応じて S^1 と反応させる。次いで、このZ基をその S^1 または $(M(R^{15})_a)$ 末端で誘導体化して、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド類似体Qとのカップリングのための官能基(例えば、ホスホロアミダイト(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Q-Z捕獲化合物または捕獲化合物類をL末端を介して、生体分子、例えば、タンパク質との反応のためのX基を保持するよう誘導体化する。必要に応じて、Q部分のN保護基を除去する。あるいは、N保護基は、タンパク質をはじめとする生体分子との捕獲化合物の反応後に除去することができる。Zが不溶性支持体または基質、例えば、ビーズである実施形態を含む他の実施形態では、QをZ上で合成することができる。さらなる実施形態では、Qを標準的な固層技術によって予め合成し、次いでMに連結させる。あるいは、QをM部分の上にて段階的に合成することもできる。

20

30

【0260】

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。

40

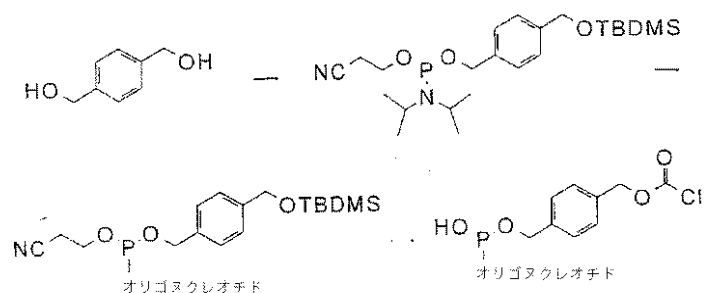
【0261】

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ロ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ロ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

50

に示すクロロホルメート(すなわち、X)が得られる。

【化23】



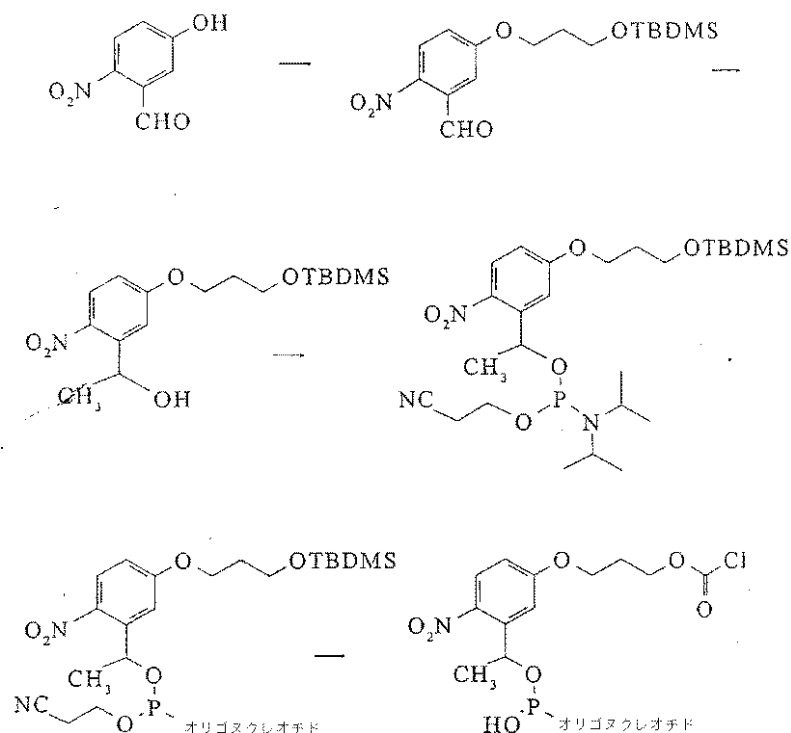
10

【0262】

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-ブロモ-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。

20

【化24】



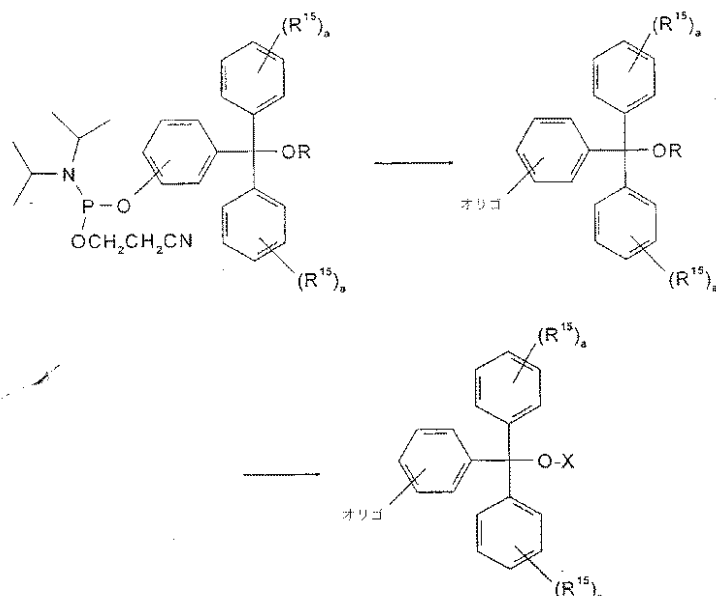
30

【0263】

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。

40

【化 2 5】



10

【 0 2 6 4 】

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。

20

【 0 2 6 5 】

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。

【 0 2 6 6 】

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。

30

【 0 2 6 7 】

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。

40

【 0 2 6 8 】

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、

50

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。

10

【0269】

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。捕獲化合物がその「Q」官能基によって選別される、アレイ、収集物上の「スポット」または位置は分離されている。

【0270】

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

20

【0271】

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。

30

【0272】

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うことができる。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。

【0273】

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することができる。例えば、選択したXと反応させたものと同一または類似の官能基を有するビオチニル化した小分子を、過剰な化合物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することができる。

40

【0274】

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することができる。

50

【0275】

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

10

【0276】

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。

【0277】

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。

20

【0278】

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 - T
OF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。

30

【0279】

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

40

【0280】

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

50

一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ー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。

【0281】

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

10

【0282】

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

20

【0283】

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(bioposy)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。

30

【0284】

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。

40

【0285】

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。

【0286】

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

50

/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。

10

【0287】

本明細書で提供される化合物の生体分子、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、または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することができる。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。

【0288】

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、別個の実験(例えば、健常対疾病、時点1対時点2など)から所定のタンパク質の量を求めることができる。

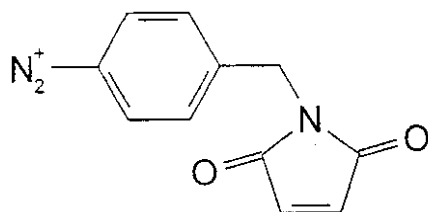
20

【0289】

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

30

【化26】



40

である。

【0290】

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

50

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。

【0291】

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。

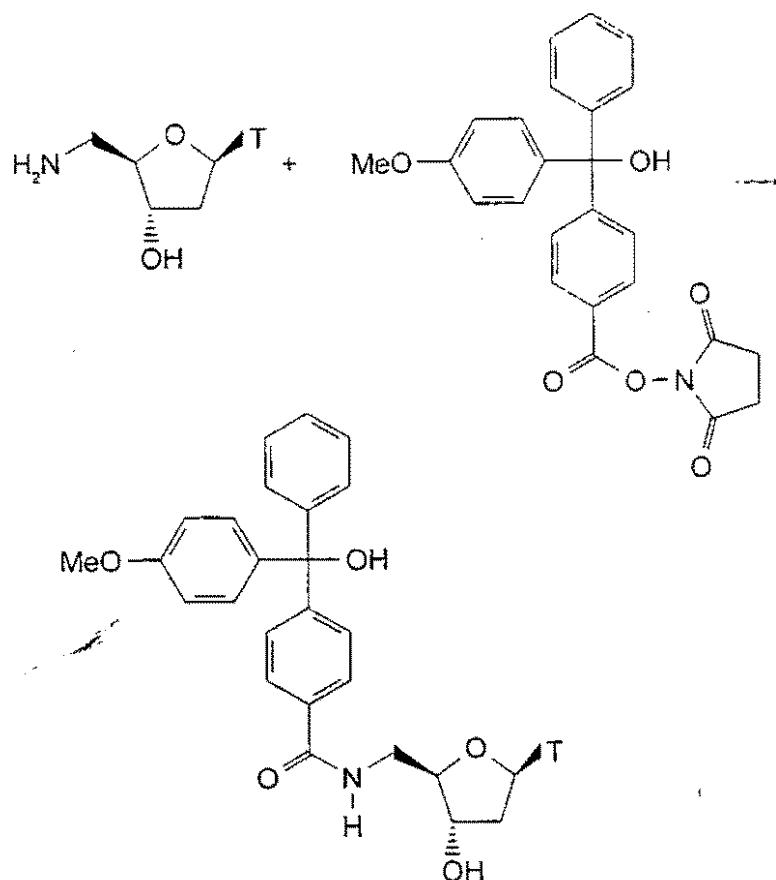
10

【0292】

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。

20

【化27】



30

40

【0293】

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

50

するための不偏法を提供するが、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。

【0294】

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、疾病に関連している変化を同定または検出するためには、サンプルの均一性が重要となり得る。均一性を提供するには、同一個体由来の疾病対健常などの種々の表現型を有する細胞を比較する。結果として、生体分子のパターンの相違は、個体間の相違に起因するのではなく表現型の相違に起因するものであると考えることができる。したがって、サンプルは単一の個体から得ることができ、種々の表現型、例えば、健常対疾病のおよびレスポnder対ノンレスポnderを有する細胞を分離する。さらに、バックグラウンド相違をさらに減少させるために、細胞を同調化するか、またはある代謝段階で凍結させることもできる。

【0295】

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ァイ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。

【0296】

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

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

3) 応答と関連している生体分子または応答のマーカーを同定するための、薬剤または環境条件に対する毒性プロファイ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。

【0297】

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

【0298】

10

20

30

40

50

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、望まない細胞を捕獲し、所望する細胞を上清中に残すネガティブパニング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、
- 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)。

10

【0299】

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、イオン流束、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。

【0300】

a) 例示的な分離法

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。

20

【0301】

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)。

30

【0302】

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。末梢血または骨髄サンプルでは、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。

40

【0303】

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

50

物を用いて行うことができる。

【0304】

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。

10

【0305】

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の標的であるが、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。

【0306】

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、バイアビ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。

20

【0307】

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。

30

【0308】

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。

40

【0309】

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

50

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)。

【0310】

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(cobal)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：

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、

5)翻訳後修飾の制御、

6)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。

【0311】

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。

【0312】

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、ピ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。

【0313】

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、その後にそれを破壊するようにWを適切に選択することなどによって、設計することができる。次いで、オルガネラタンパク質および他の生体分子をそれらの三次元構造を保つ環境下で捕獲するために、脂質二重層またはミセルコーティングなどの人工膜を含むことができるものなどの上で、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。

【0314】

4. 疾病の指標としてのタンパク質コンホメーションのモニタリング

収集物および/またはそのメンバーは、タンパク質の特異的な配座異性体を検出または識別するために用いることができる。したがって、例えば、タンパク質の特定のコンホメーションが疾病と(または健常状態と)関係している場合には、収集物またはそのメンバーは、収集物中の捕獲化合物との結合パターンに基づいて1つの配座異性体を検出または識別することができる。したがって、収集物および/またはそのメンバーを、疾病にしているタンパク質またはポリペプチドが疾病に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。

【0315】

【表8】

疾病	不溶性タンパク質
アルツハイマー病(AD)	APP、A β 、 α 1-抗キモトリプシン、tau、非A β 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 -ミクログブリン(microglobulin)
うつ血性心不全	心房性ナトリウム利尿因子
老人性心臓および全身性アミロイド症	トランスサイレチン
慢性炎症	血清アミロイドA
アテローム性動脈硬化症	Apo A1
家族性アミロイド病	ゲルソリン
ハンチントン舞蹈病	ハンチントン

10

20

30

40

50

【0316】

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。

【0317】

5. 小分子の同定および生体分子 - 生体分子相互作用の研究

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

10

【0318】

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。

20

【0319】

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を用いて並行して実施することができる)

30

- ・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(校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。

40

【0320】

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

50

化合物と反応させる。

【0321】

複合反応では、各ウェルのアリコートと同時に、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。

【0322】

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)。

1)細胞培養物(または組織サンプル)を、1、2...i個のウェルを有するマイクロタイタープレート(MTP)中に準備する。各ウェルに、細胞の溶解のための溶液を加えて、タンパク質を遊離させる。一部の実施形態では、適切な洗浄ステップ、ならびに、核酸および他の非タンパク質成分を消化するための酵素を添加するステップが含まれる。さらなる実施形態では、通常のMTPの代わりに、ウェルの底部にフィルタープレートを備えたMTPを用いる。細胞細片を濾過または遠心分離のいずれかによって除去する。適切な分離処理のためのコンディショニング溶液を添加し、各ウェル由来の物質を別々に分離装置に入れる。

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。

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I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。

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

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。

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I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。

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

10

20

30

40

50

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。

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、健康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。

10

【0323】

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。

【0324】

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。

20

30

【0325】

健康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。

【0326】

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。

【0327】

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)、ナトリウムエタオキシド(ethaoxide)(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(

40

50

Aldrich)、無水 Na_2SO_4 (Acros)、酢酸 (EM science)、水酸化ナトリウム (Acros)、Molecular sieves A^04 (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スペクトル光度計から得た。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。

【実施例】

【0328】

実施例1

$N^1_m - B_i - N^2_n$ の実施例

a. 同一の四量体としての N^1 および N^2 、三量体としてのB

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

10

【化28】

GTGC ATG GTGC

AAG

ACG

【化29】

AGG

TTG

CTG

GTG

...

...

...

GGG

20

30

【0329】

b. 同一でない四量体としての N^1 および N^2 、四量体としてのB

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

【化30】

GTCC ATCG CTAC

AACG

ACCG

AGCG

....

....

....

GGGG

40

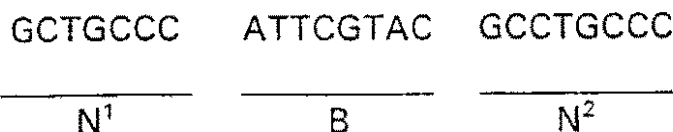
【0330】

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

50

$N^1 \neq N^2$ 、 $m = 7$ 、 $n = 8$ 、 $i = 8$ 、 $B = 65,536$ 通りの配列並べ替え

【化 3 1】



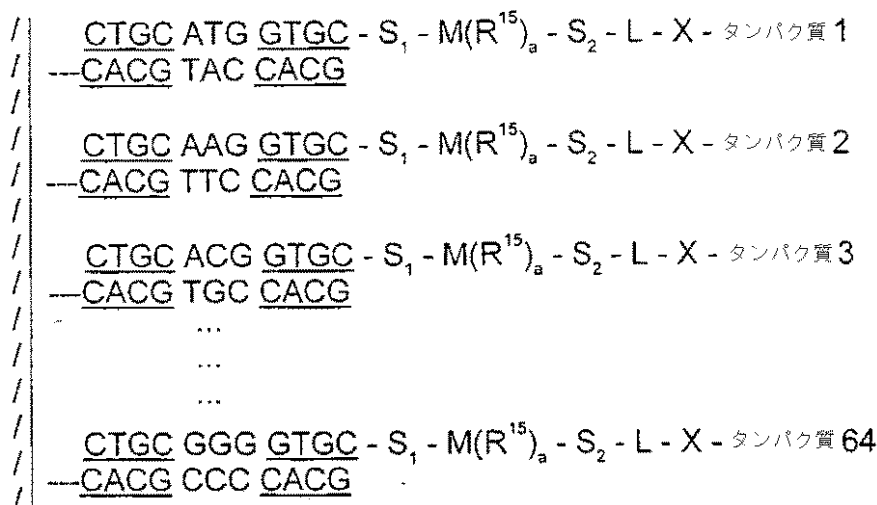
【 0 3 3 1 】

実施例 2

DNAアレイ上でのタンパク質の分離

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

【化 3 2】



【 0 3 3 2 】

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

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。

【 0 3 3 3 】

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)、差示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、HPLC、LC)) を用いて精製する。複雑度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。

【 0 3 3 4 】

2. 図6に関する、cDNA発現ライブラリーを用いる複雑度が限定されたタンパク質プールの調製

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ブロモクロロプロパンと混合する。得

10

20

30

40

50

られた混合物を遠心分離し、全RNAを含有する上側の水層を得る。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。

【0335】

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。

10

【0336】

b. mRNA精製

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。

20

【0337】

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。

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。

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)

30

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。

iii. 遺伝子特異的オリゴヌクレオチドからは1種のmRNA種のためのcDNAが得られる(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。

【0338】

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。

40

【0339】

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、ビオチン化、アミノ化)されたオリ

50

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)。

【0340】

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用いる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)。

10

【0341】

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には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。

20

【0342】

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。

30

【0343】

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、レアカッティング制限酵素(5'末端BglII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。

40

【0344】

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、10μg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。

【0345】

j. タンパク質の精製

50

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が得られる。

【0346】

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。

【0347】

II. 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

10

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。

【0348】

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)。

【0349】

20

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_{H2} 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)。

【0350】

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)。

30

【0351】

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。

【0352】

40

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)。

【0353】

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

50

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℃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。

【0354】

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。

【0355】

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。

【0356】

b. 固体支持体上でのオリゴヌクレオチドの合成

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ドで室温にて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で室温にて一晚処理した。このスライドをDMF、 CH_3CN 、 CH_2Cl_2 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 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ の溶液をスライドと一晚反応させた。この反応の生成物を支持体、 $-\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{OH}$ とした。このスライドをDMF、 CH_3CN 、メタノールおよびエチルエーテルで洗浄した。

【0357】

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)。

【0358】

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、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)。

【0359】

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。

【0360】

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

10

20

30

40

50

準的なDNAアニーリング条件下では、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。

【0361】

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。

【0362】

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)

10

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8時間かけて加えた。真空下で過剰の塩化チオニルを除去し、得られた白色固体を100mLの無水CH₂Cl₂に溶解し、氷浴中で維持した。プロモベンゾイルクロリドのこの氷冷溶液に別の100mLの無水CH₂Cl₂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、CH₂Cl₂ (4 × 100mL) で数回洗浄した。混合したCH₂Cl₂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SOCl₂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CH₂Cl₂ (3 × 200mL) で抽出し、無水Na₂SO₄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。¹H - NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 1.36 (s, 6H), 4.08 (s, 2H), 7.52 (d, 2H), 7.79 (d, 2H)。質量: 254.3 (M⁺)。 20

【0363】

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、CH₂Cl₂ (2 × 50mL) で抽出した。混合した溶媒を無水Na₂SO₄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%)。 30

【0364】

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K₂CO₃ (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) を用いた。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%。¹H - NMR (500MHz, CDCl₃) δ 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 (M + Na⁺)。 40

【0365】

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)、I₂ の結晶および少量のmolecular sieves (A4) を、アルゴン下に入れた。この混合物に10mLのT 50

HF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 - ブロモフェニル) - 4,4 - ジメチル - 1,3 - オキサゾリン(6.5g、26mM)、触媒量のCH₃I、RED - AlおよびCCl₄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、CHCl₃(3×100mL)で抽出し、無水Na₂SO₄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。¹H - NMR(500MHz, CDCl₃) δ 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(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⁺)。

10

【0366】

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 - ブロモエトキシ)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。

20

【0367】

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)。

30

【0368】

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。

40

【0369】

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) δ 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),

50

7.50(d, 2H), 8.0(d, 2H)。

【0370】

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

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。

10

【0371】

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 - 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で酸性化した。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)。

【0372】

20

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) δ 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)。

30

【0373】

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) δ 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⁺)。

40

【0374】

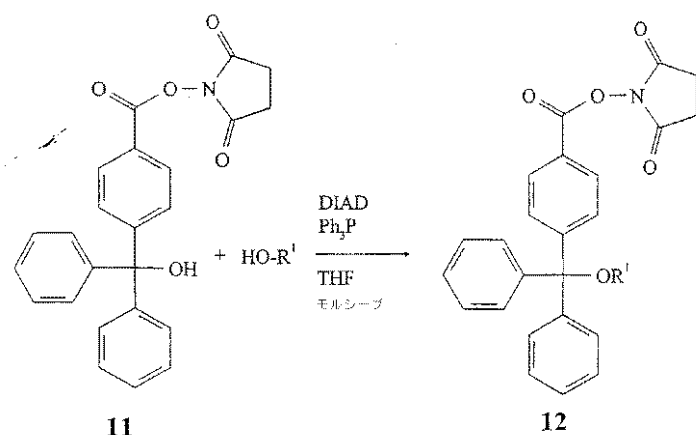
実施例 5

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。

【0375】

トリチル捕獲試薬の光延(Mitsunobu)反応の手順

【化 3 3】



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。

【 0 3 7 6 】

実施例6

20

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。

【 0 3 7 7 】

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

【 0 3 7 8 】

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。

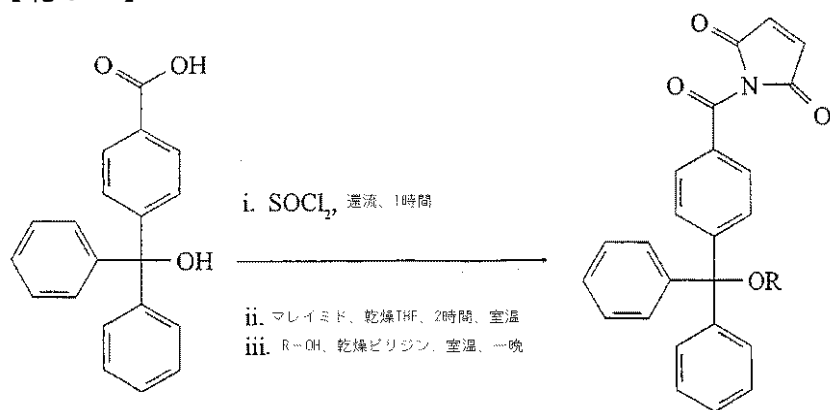
【 0 3 7 9 】

実施例7

40

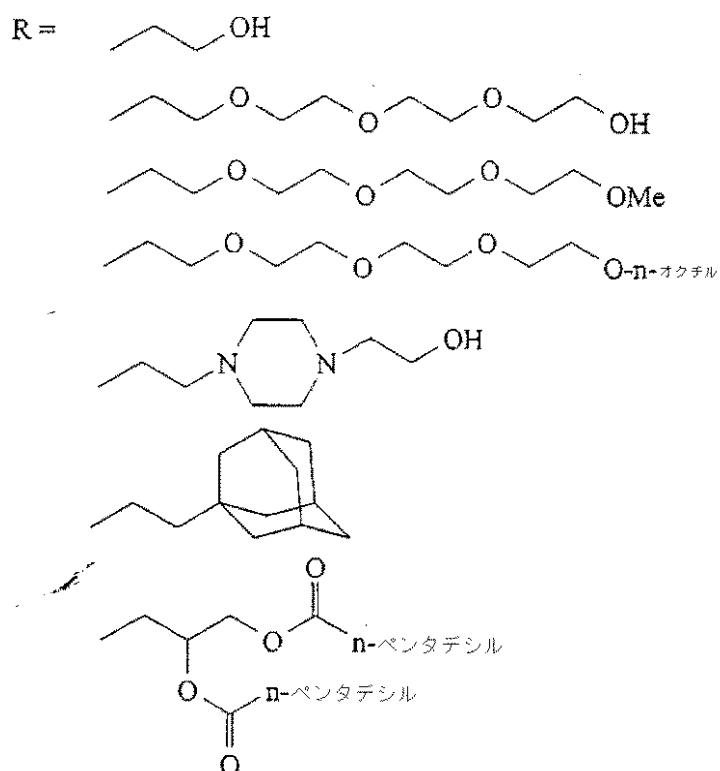
(4,4'-ビスフェニル-ヒドロキシメチル)ベンゾイルマレイミド誘導体の合成

【化 3 4】



10

【化 3 5】



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 m M)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

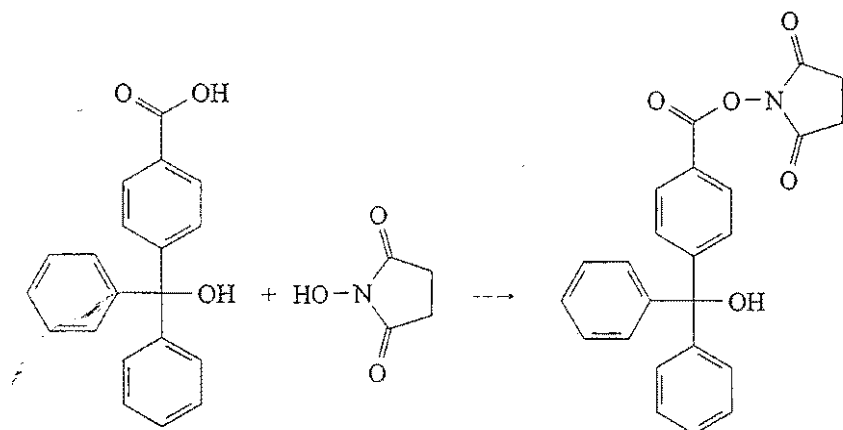
【0380】

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

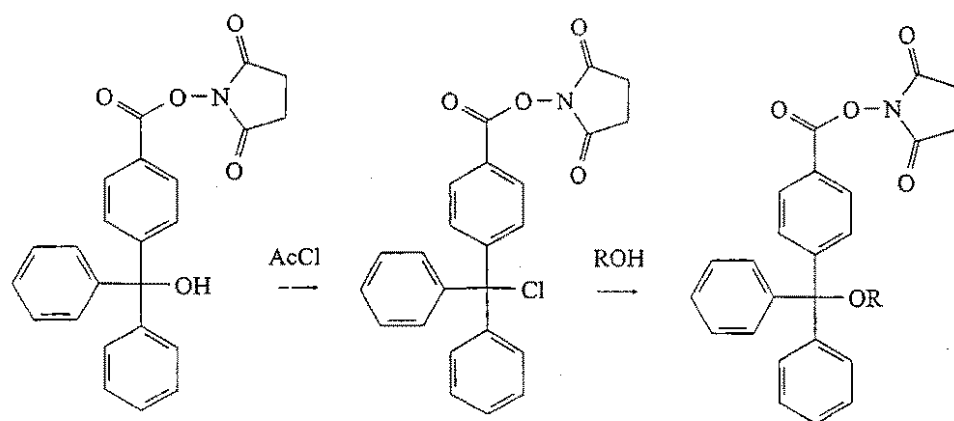
【化 3 6】



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 3 7】



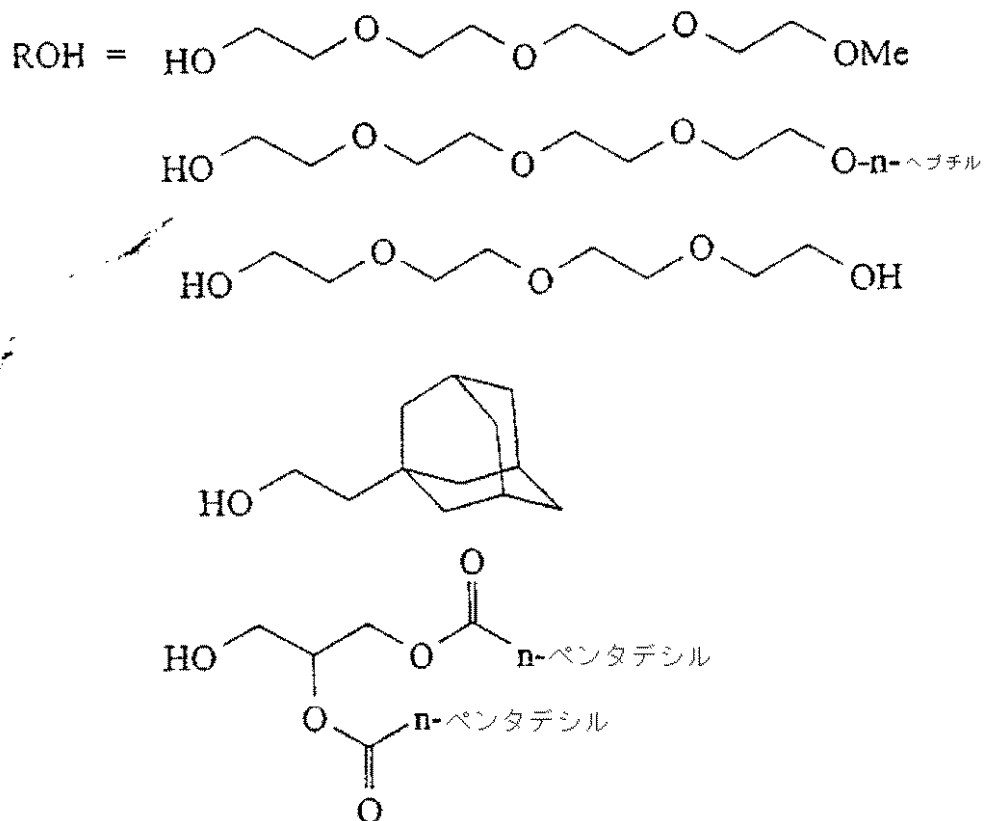
20

30

【 0 3 8 1】

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CHCl₃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。

【化 3 8】



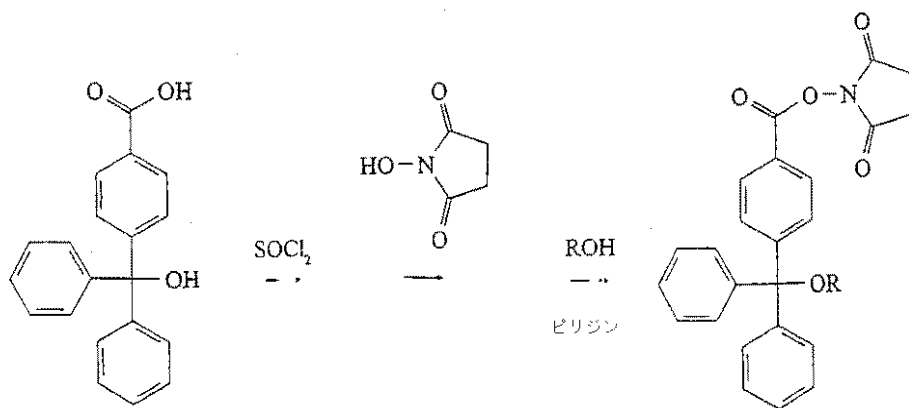
10

20

【 0 3 8 2】

手順2

【化 3 9】

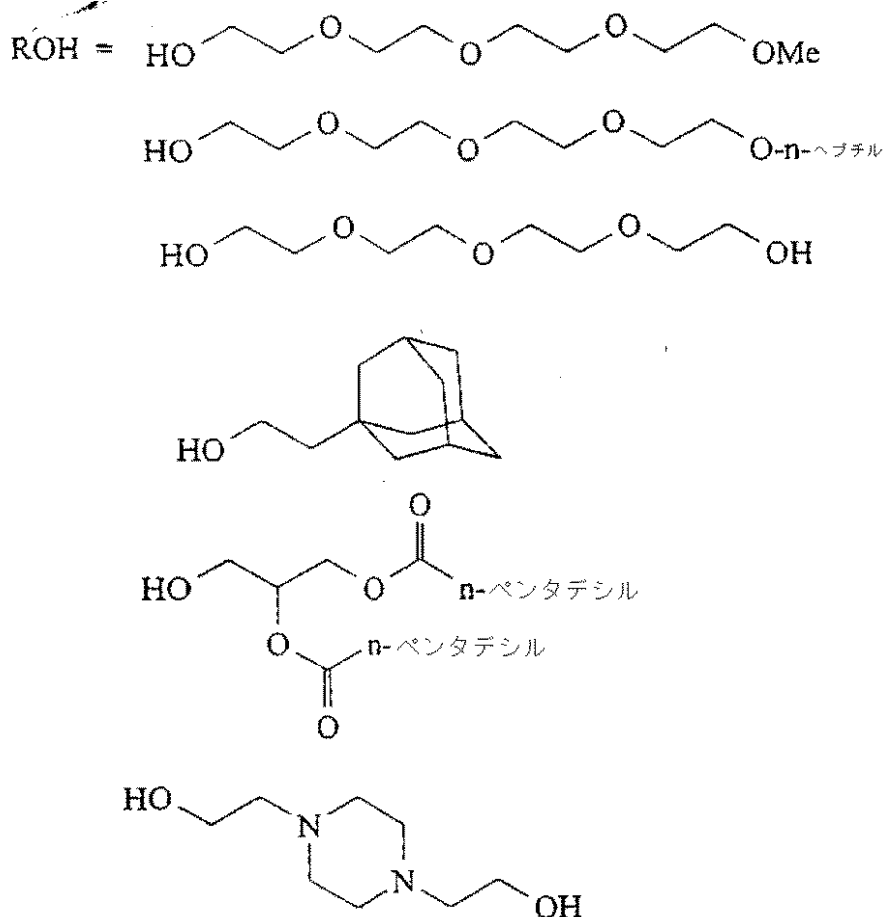


30

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-ヒドロキシスクシンイミドを加え、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TLC(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 40】



10

20

【0383】

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。

30

【0384】

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 μ Lのサンプル容量で、25mM HEPESバッファー溶液(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。

40

【0385】

捕獲化合物-タンパク質結合混合物を、1 μ Lのアリコートの結合反応物を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

50

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。

【0386】

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バッファー溶液(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

10

の結合反応物を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。

【0387】

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バッファー溶液(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のアリコートの結合反応物を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。

20

30

【0388】

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バッファー溶液(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のアリコートの結合反応物を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。

40

【0389】

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

50

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。

【0390】

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。 10

【0391】

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3μMの濃度で調製する。19.5μlを1つの捕獲反応に用いる。各反応は0.5μl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25μM)。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。

【0392】

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25μM)。反応後、1μl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。 20

【0393】

改変は当業者には明らかであるので、本発明は添付の特許請求の範囲の範囲によってのみ制限されるよう意図される。

【図面の簡単な説明】

【0394】

【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。 30

【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リングを示す図である。

【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。 40

【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。

【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 50

を示す図である。

【図 1 5】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 1 6】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 1 7】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。

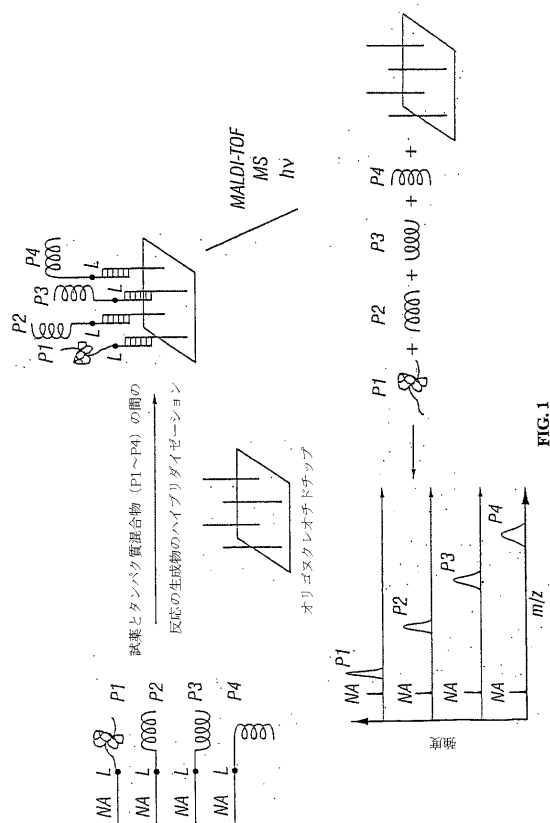
【図 1 8】細胞同調化のための代謝制御メカニズムの調節のための例示的な点を示す図である。

【図 1 9】細胞の分離および同調化法を示す図である。

10

【図 2 0】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 1】



【図 2】

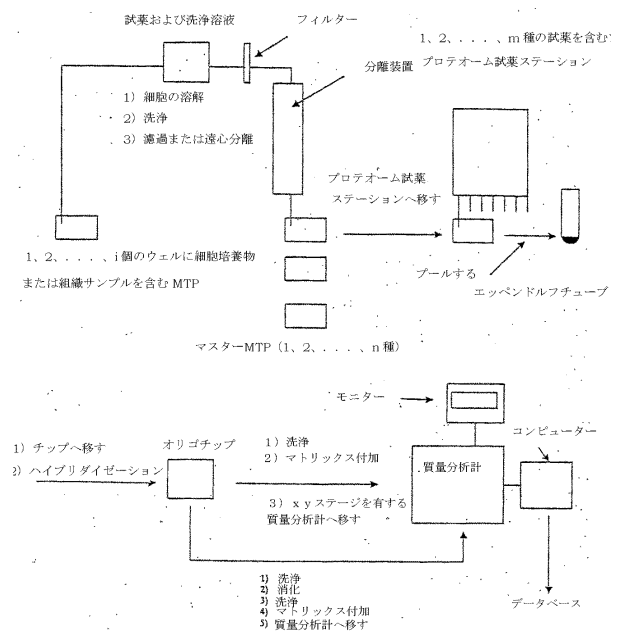


FIG. 2

【図 3】

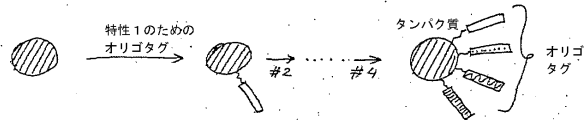


FIG. 3

【図 4】

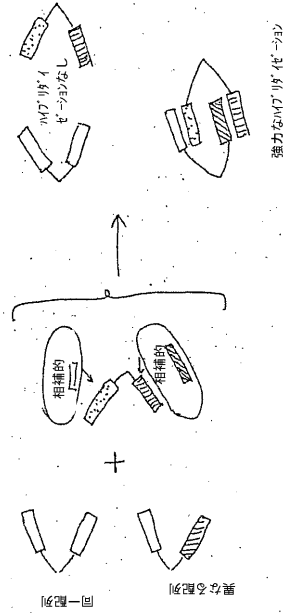


FIG. 4

【図 5】

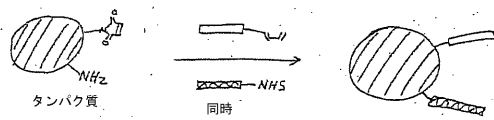


FIG. 5

【図 6】

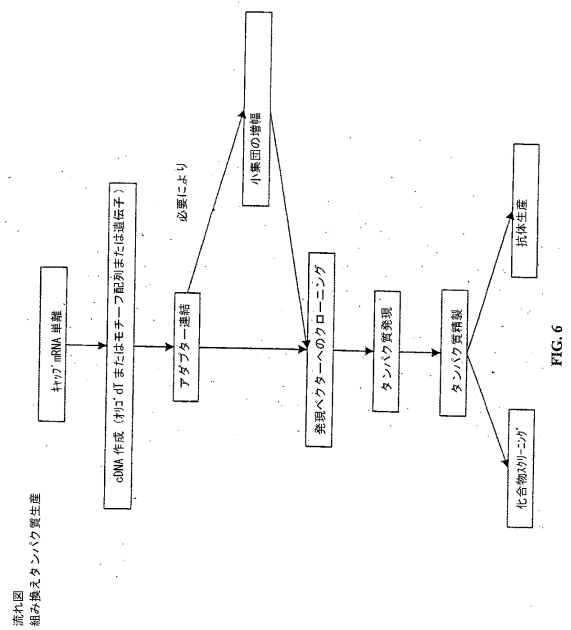
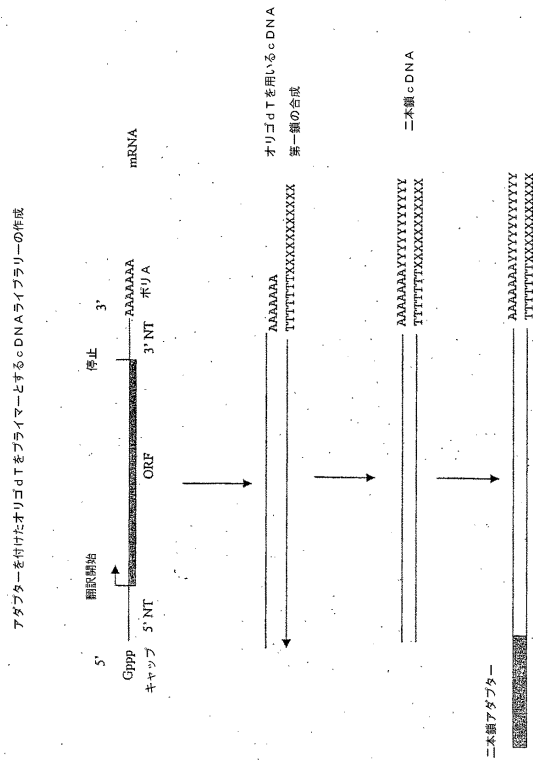


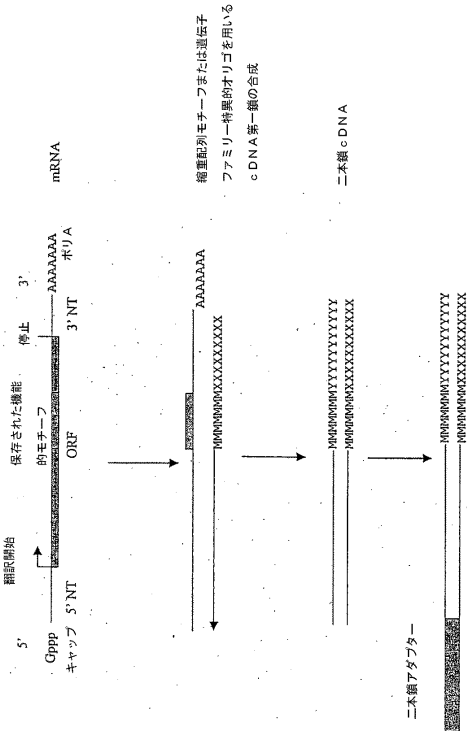
FIG. 6

【 図 7 】

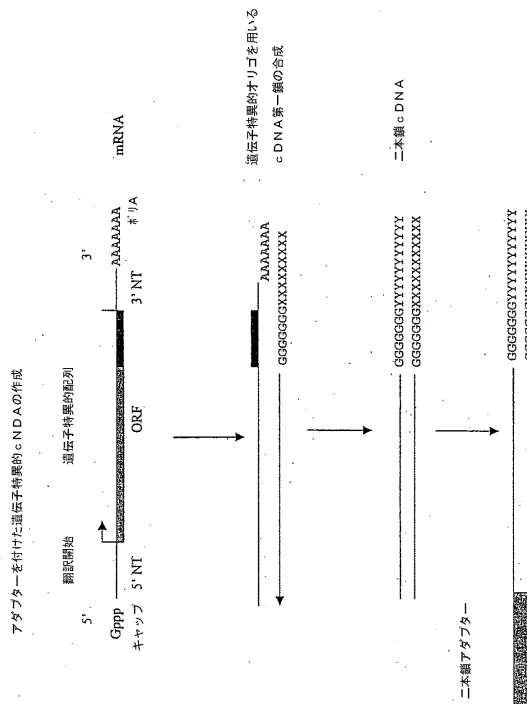


【 図 8 】

アダプターを付けた配列モチーフ特異的cDNAライブラリーの作成

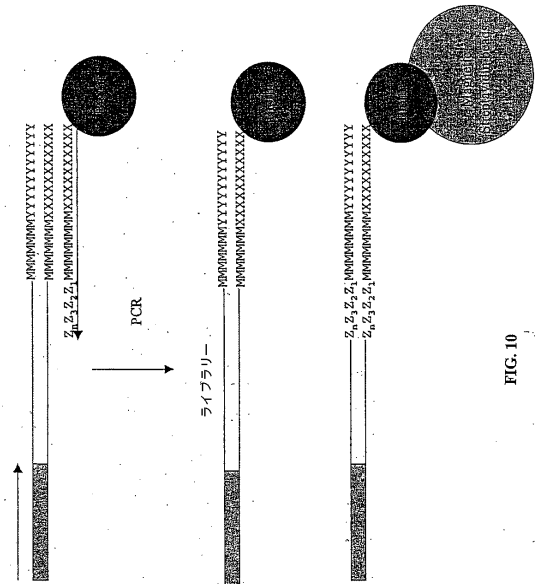


【 図 9 】



【 図 10 】

録型ライブラリーからの増幅産物の精製



【 図 1 1 】

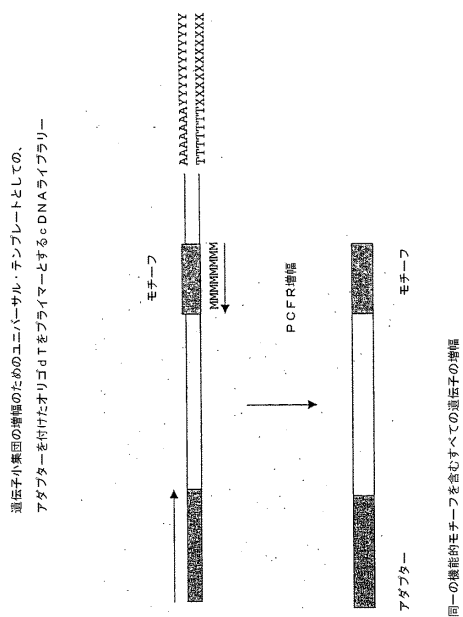


FIG. 11

【 図 1 2 】

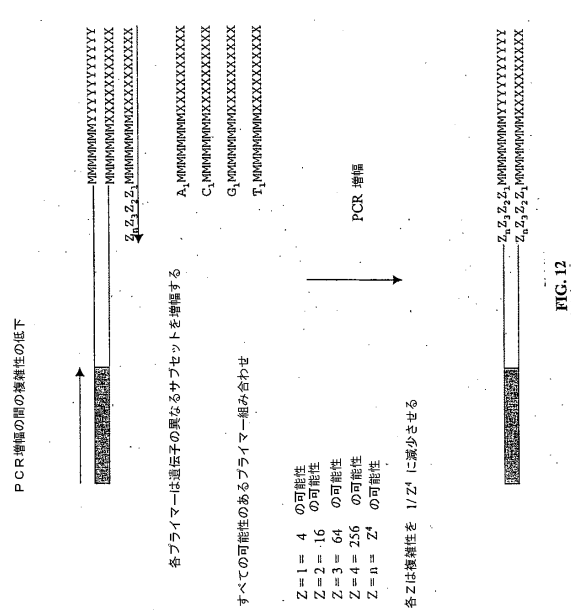


FIG. 12

【 図 1 3 】

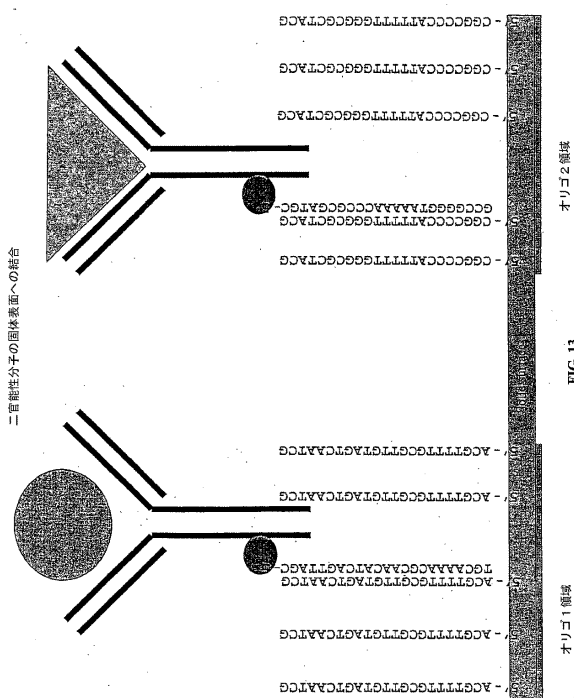


FIG. 13

【 図 1 4 】

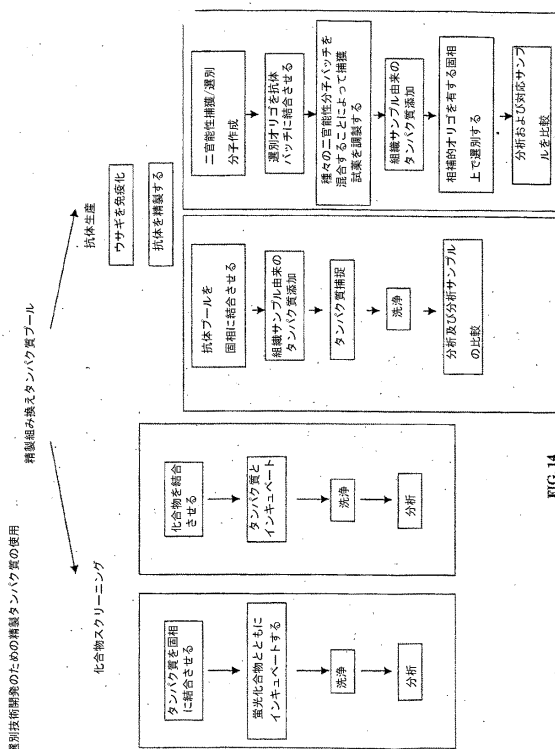


FIG. 14

【 図 1 5 b 】

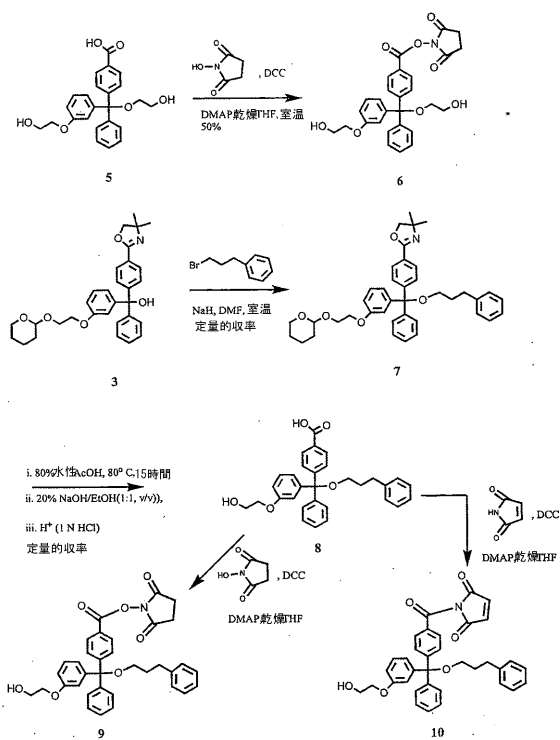


FIG. 15b

【 図 1 6 b 】

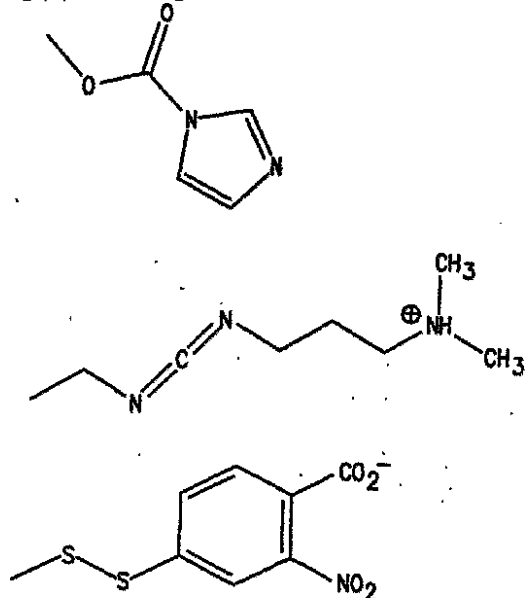


FIG. 16b

【図 17 a】

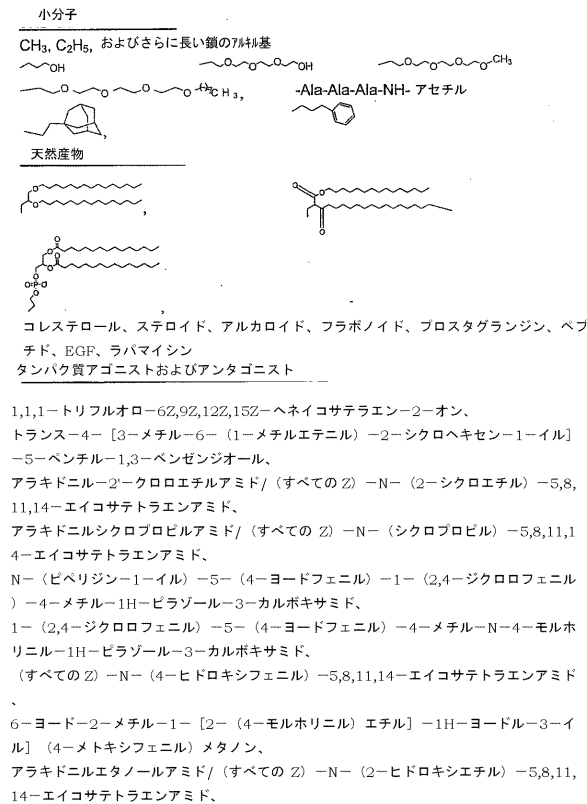


FIG. 17a

【図 17 b】

アラキドニルエタノールアミド / (すべてのZ) -N-(2-ヒドロキシエチル) -5,8,11,
14-エイコサテトラエンアミド、
N-(2-ヒドロキシエチル) -[5,6,8,9,11,12,14,15-H] -5Z,8Z,11Z,14Z-エイ
コサテトラエンアミド、
2-AG / (5Z,8Z,11Z,14Z) -5,8,11,14-エイコサテトラエン酸、2-ヒドロキシ-1-(
ヒドロキシメチル) エチルエステル、
(-) -シス-3-[2-ヒドロキシ-4-(1,1-ジメチルヘプチル) フェニル] -トラン
ス-4-(3-) ヒドロキシプロピル] シクロヘキサノール、
ドコサテトラエニルエタノールアミド / N-(2-ヒドロキシエチル) -7Z,10Z,13Z,16Z
-ドコサテトラエンアミド、
(6aR) -トランス-3-(1,1-ジメチルヘプチル) -6a,7,10,10a-テトラヒドロ-1-
ヒドロキシ-6,6-ジメチル-6H-ジベンゾ [b,d] ピラン-9-メタノール、
[6aR- (6a α ,9 α ,10 α β)] -3-(1,1-ジメチルヘプチル) -6a,7,8,9,10,10a-ヘ
キサヒドロ-1-ヒドロキシ-6,6-ジメチル-6H-ジベンゾ [b,d] ピラン- [7,8-H]
-9-メタノール、
(2-メチル-1-プロピル-1H-インドール-3-イル) -1-ナフタレニルメタノン、
(6aR,10aR) -3-(1,1-ジメチルヘプチル) -6a,7,10,10a-テトラヒドロ-6,6,9-ト
リメチル-6H-ジベンゾ [b,d] ピラン、
メチルアラキドニルフルオロホスホネート / (5Z,8Z,11Z,14Z) -5,8,11,14-エイコサテ
トラエニル-メチルエステルホスホノフルオリジン酸、
[R- (すべてのZ)] -N-(2-ヒドロキシ-1-メチルエチル) -5,8,11,14-エイコ
サテトラエンアミド、2-[(5Z,8Z,11Z,14Z) -エイコサテトラエニルオキシ] -1,3-
プロパンジオール、
N-(ビス-3-クロロ-4-ヒドロキシベンジル) -5Z,8Z,11Z,14Z-エイコサテトラエ
ンアミド、
(9Z) -N-(2-ヒドロキシエチル) -9-オクタデセンアミド、
N-(2-ヒドロキシエチル) ヘキサデカンアミド、
(5Z,8Z,11Z,14Z) -N-(4-ヒドロキシ-2-メチルフェニル) -5,8,11,14-エイコサ
テトラエンアミド、
(R) - (+) - [2,3-ジヒドロ-5-メチル-3-(4-モルホリニルメチル) ピロロ [1,2,3
-デ] -1,4-ベンゾキサジン-6-イル] -1-ナフタレニルメタノン

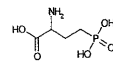


FIG. 17b

【図 17 c】

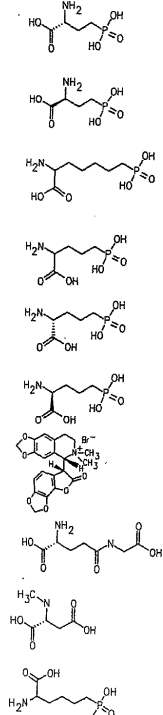


FIG. 17c

【図 17 d】

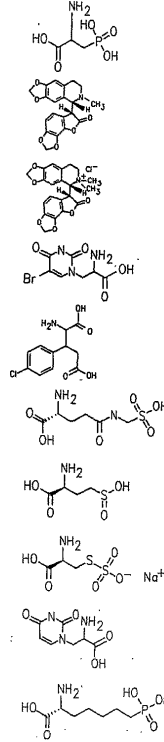


FIG. 17d

【 17 e 】

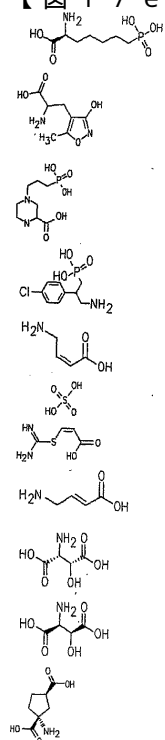


FIG. 17e

【 17 f 】

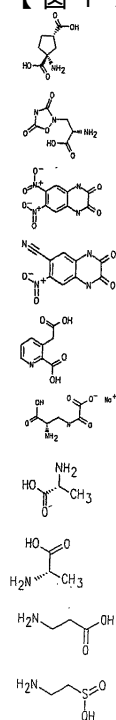


FIG. 17f

【 17 g 】

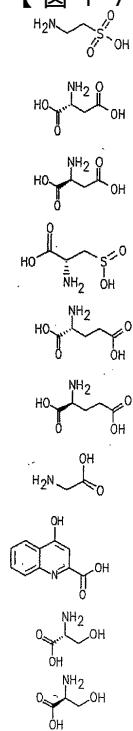


FIG. 17g

【 17 h 】

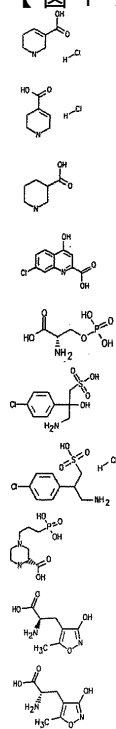


FIG. 17h

【 17 i 】

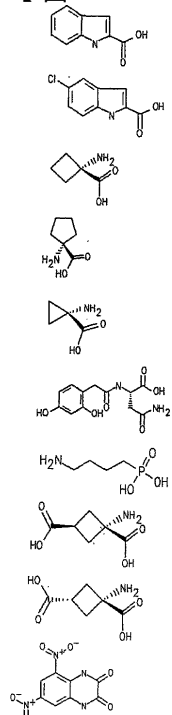


FIG. 17i

【 17 j 】

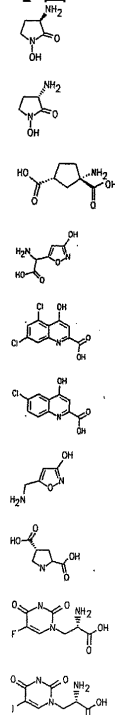


FIG. 17j

【 17 k 】

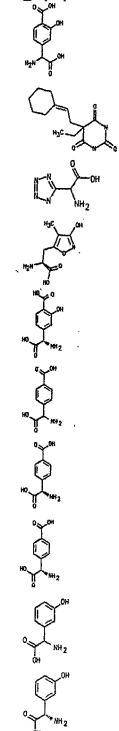


FIG. 17k

【 17 l 】

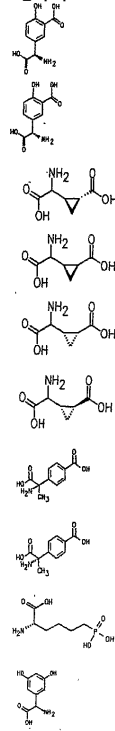


FIG. 17l

【 17 m 】

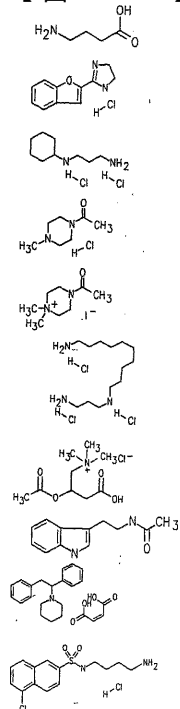


FIG. 17m

【 17 n 】

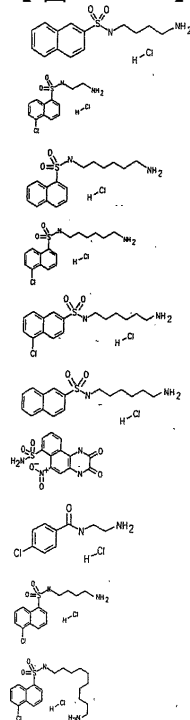


FIG. 17n

【 17 o 】

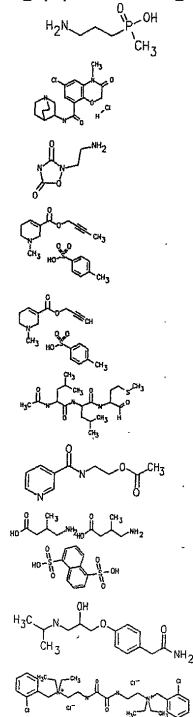


FIG. 17o

【 17 p 】

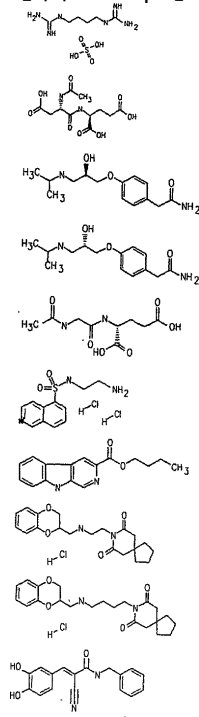


FIG. 17p

【 17 q 】

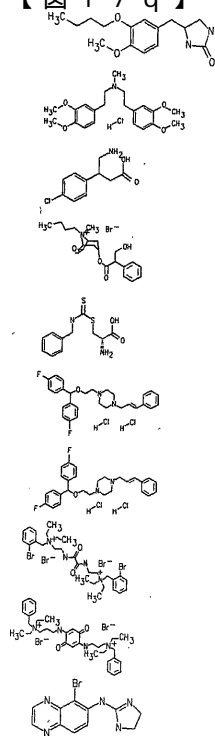


FIG. 17q

【 17 r 】

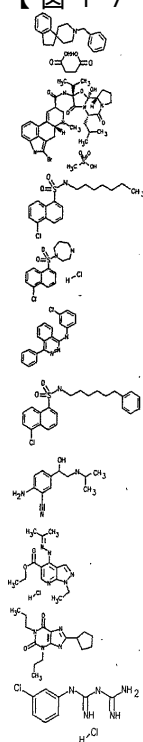


FIG. 17r

【 17 s 】

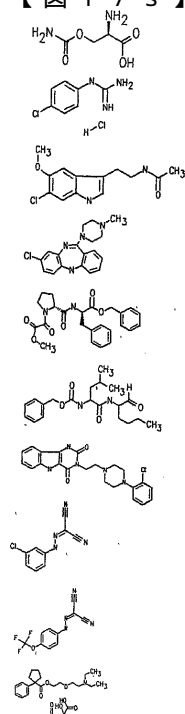


FIG. 17s

【 17 t 】

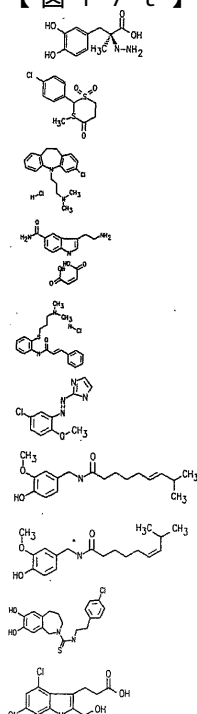


FIG. 17t

【 図 1 7 y 】

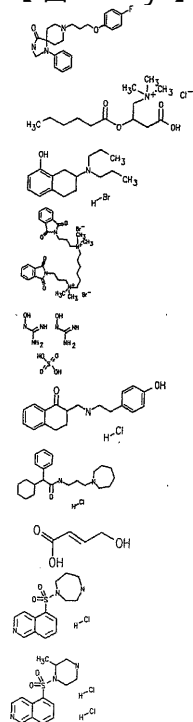


FIG. 17y

【 図 1 7 z 】

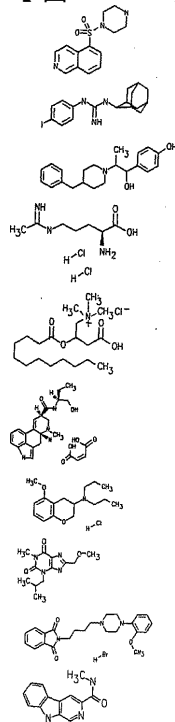


FIG. 17z

【 図 1 7 a a 】

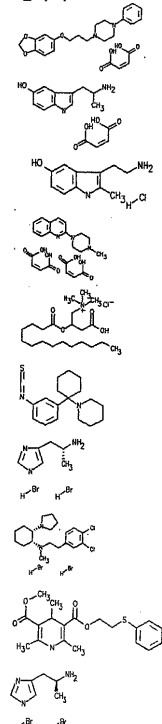


FIG. 17aa

【 図 1 7 b b 】

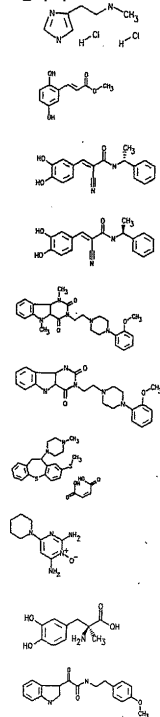


FIG. 17bb

【 図 1 7 d d 】

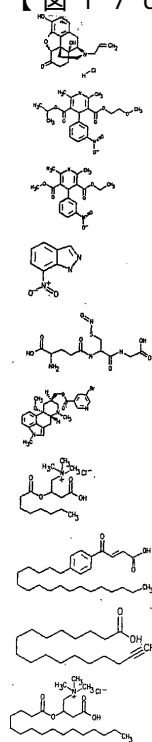


FIG. 17dd

【 図 1 7 f f 】

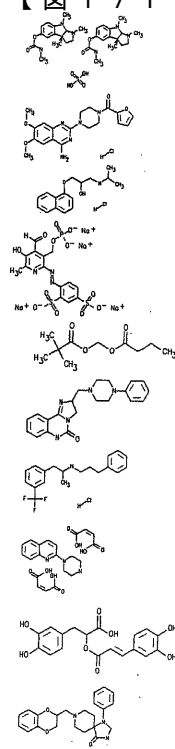


FIG. 17ff

【 17 g g 】

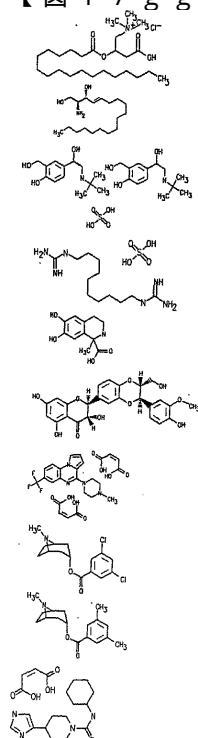


FIG. 17gg

【 17 h h 】

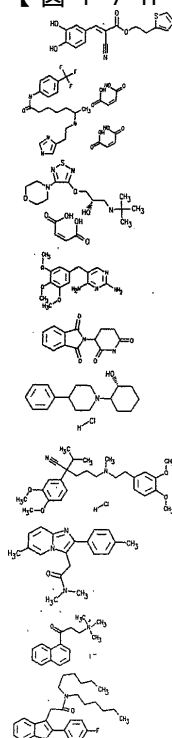


FIG. 17hh

【 17 i i 】

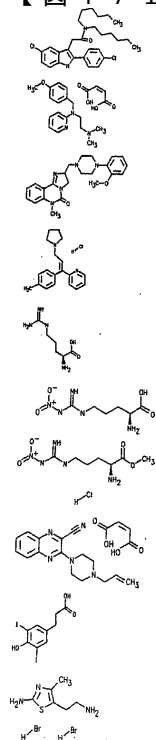


FIG. 17ii

【 17 j j 】

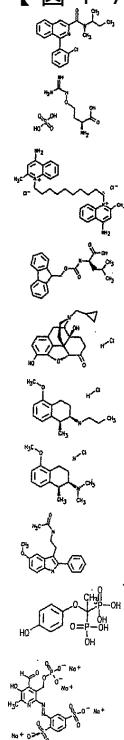


FIG. 17jj

【 17 k k 】

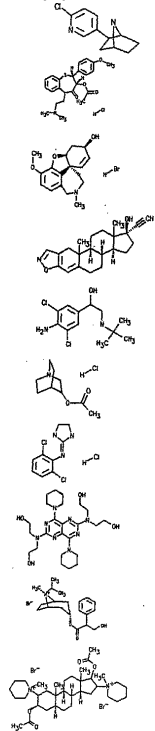


FIG. 17kk

【 17 l l 】

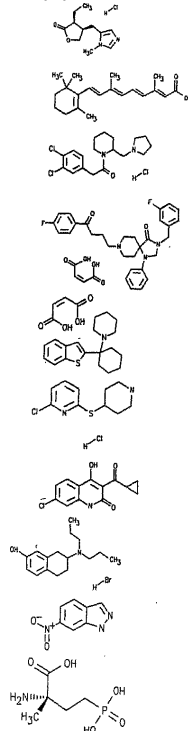


FIG. 17ll

【 17 m m 】

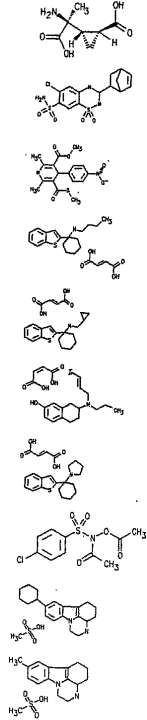


FIG. 17mm

【 17 n n 】

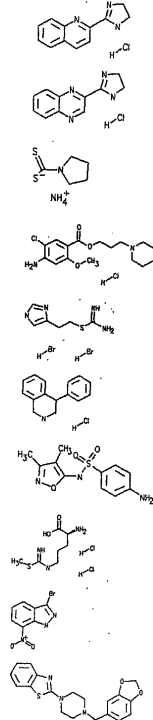


FIG. 17nn

【 17 o o 】

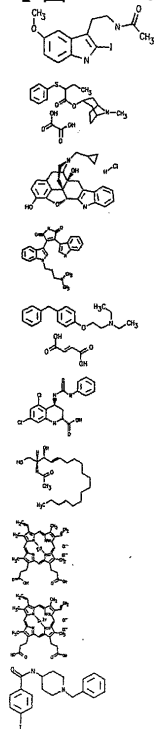


FIG. 17oo

【 17 p p 】

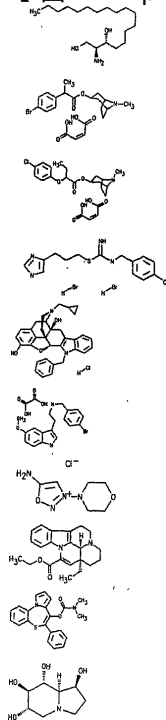


FIG. 17pp

【 17 q q 】

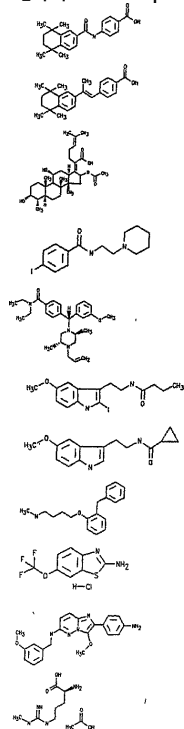


FIG. 17qq

【 17 r r 】

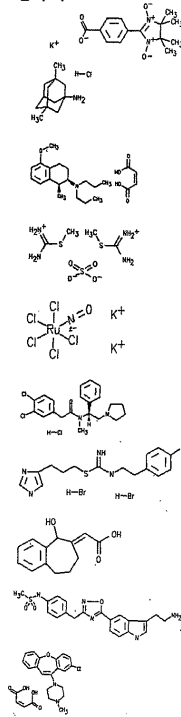


FIG. 17rr

【 17 s s 】

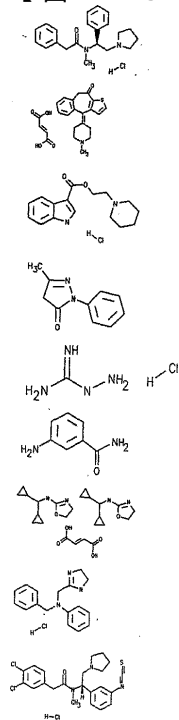


FIG. 17ss

【 17 t t 】

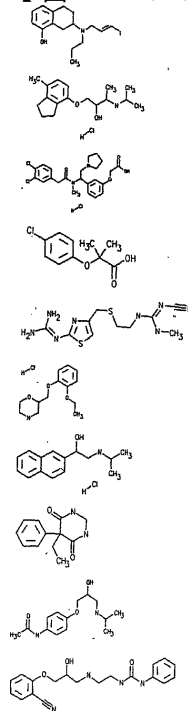


FIG. 17tt

【 17 u u 】

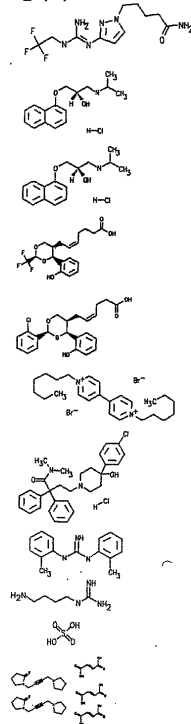


FIG. 17uu

【 17 v v 】

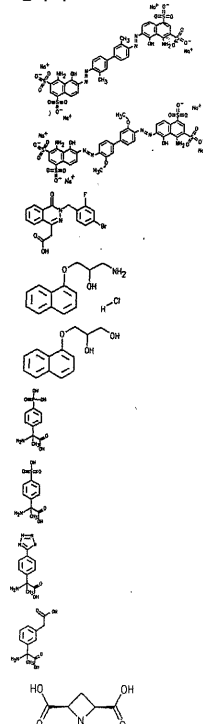


FIG. 17vv

【 17 a a a 】

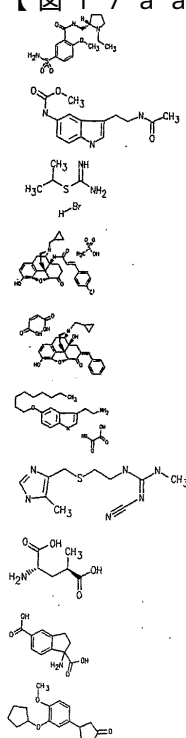


FIG. 17aaa

【 17 b b b 】

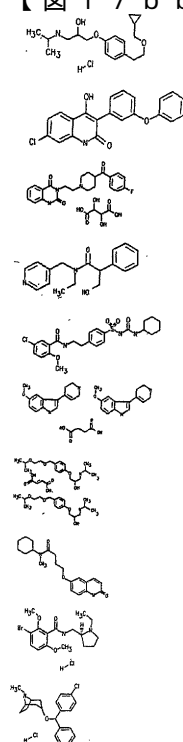


FIG. 17bbb

【 17 c c c 】

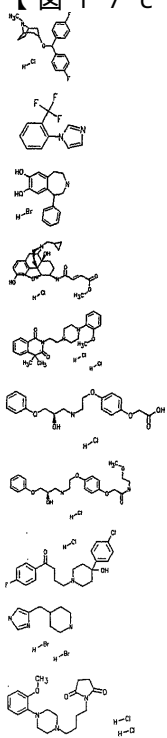


FIG. 17ccc

【 17 d d d 】

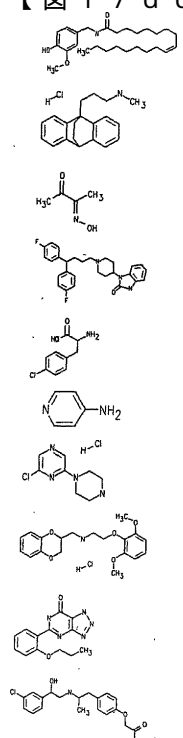


FIG. 17ddd

【 図 1 7 e e e 】

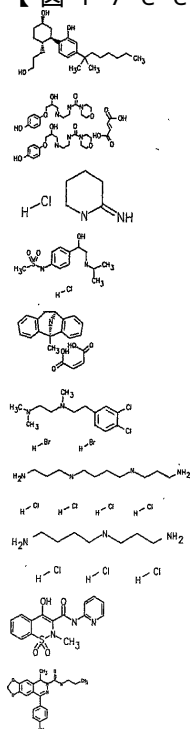


FIG. 17eee

【 図 1 7 f f f 】

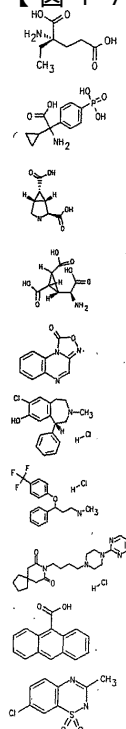


FIG. 17fff

【 図 1 7 g g g 】

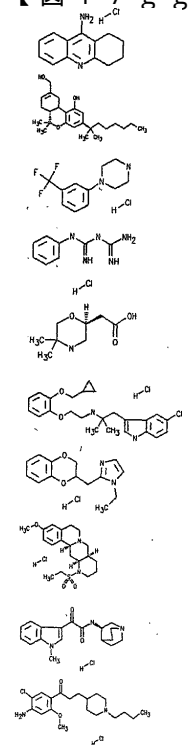


FIG. 17 ggg

【 図 1 7 h h h 】

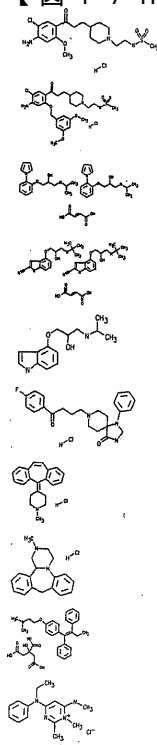


FIG. 17hhh

【 17 i i i 】

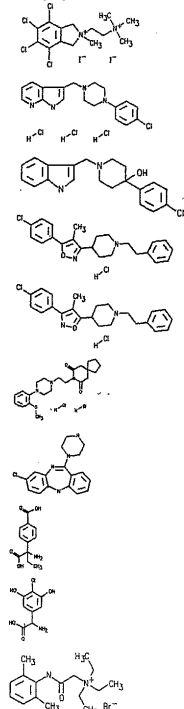


FIG. 17iii

【 17 j j j 】

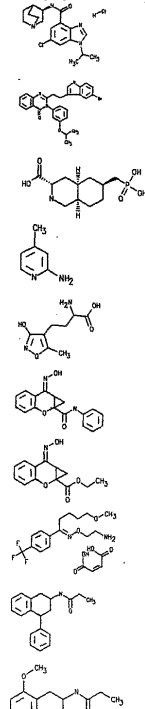


FIG. 17jjj

【 17 k k k 】

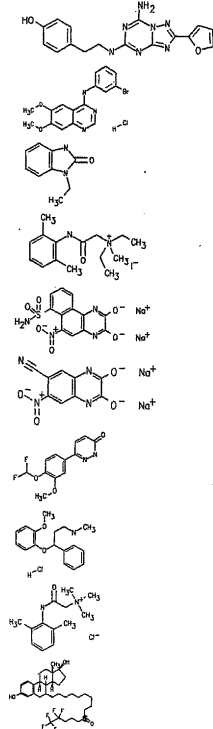


FIG. 17kkk

【 17 l l l 】

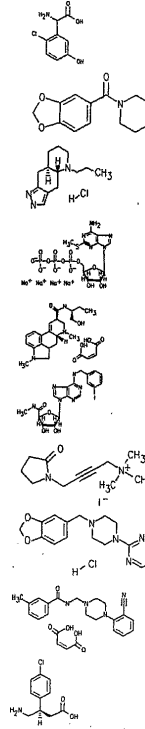


FIG. 17lll

【 17 m m m 】

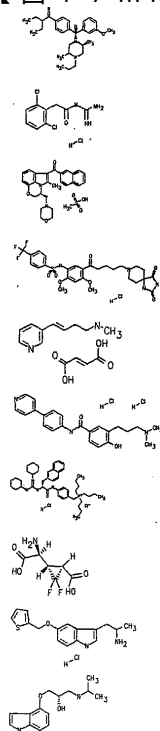


FIG. 17mmm

【 17 n n n 】

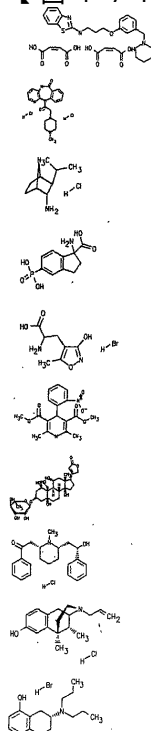


FIG. 17nnn

【 17 o o o 】

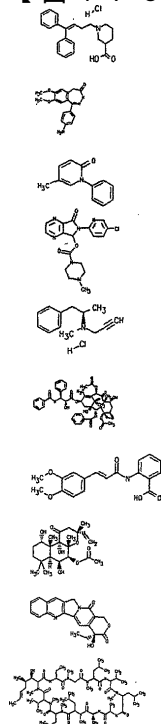


FIG. 17ooo

【 17 p p p 】

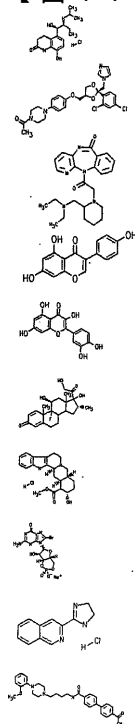


FIG. 17ppp

【 17 q q q 】

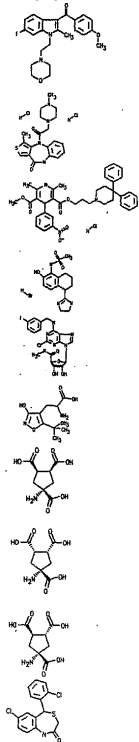


FIG. 17qqq

【 17 r r r 】

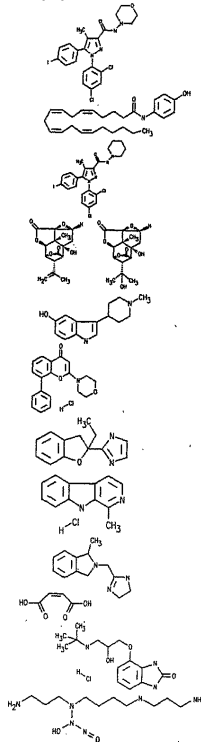


FIG. 17rrr

【 17 s s s 】

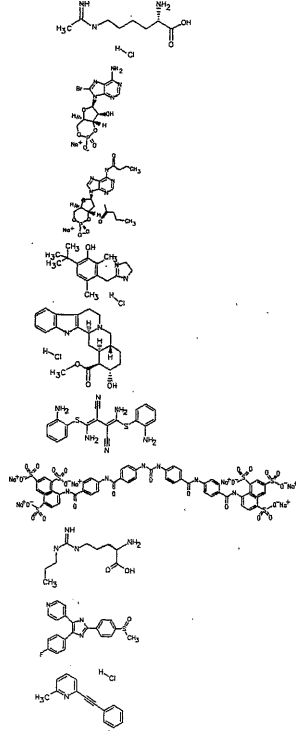


FIG. 17sss

【 17 t t t 】

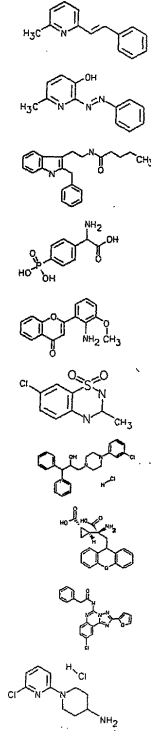
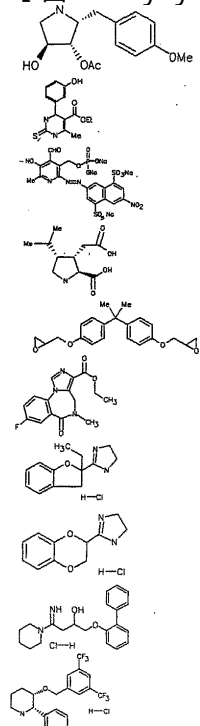
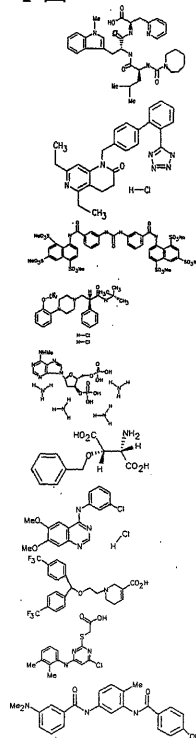


FIG. 17ttt

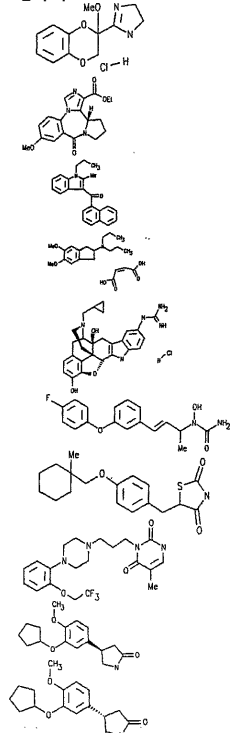
【 1 7 y y y 】



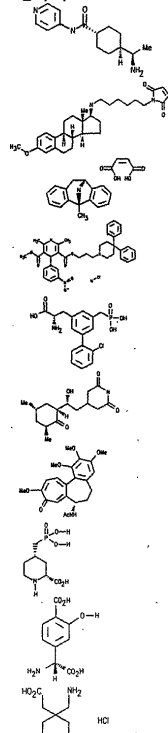
【 1 7 z z z 】



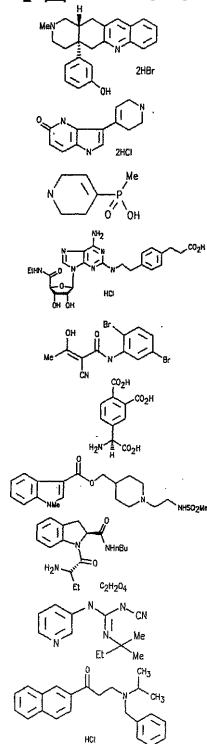
【 1 7 a a a a 】



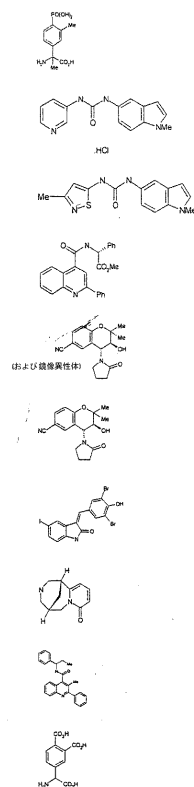
【 1 7 b b b b 】



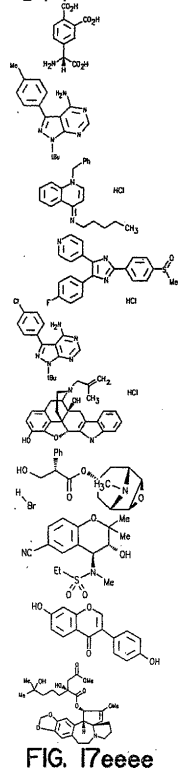
【 17 c c c c c 】



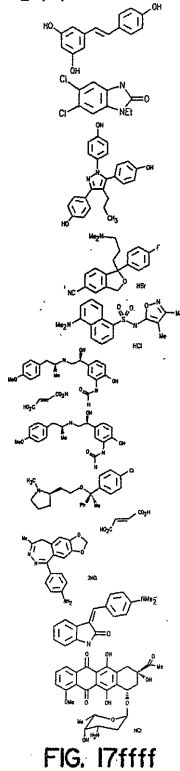
【 17 d d d d d 】



【 17 e e e e e 】



【 17 f f f f f 】



【図 17 g g g g】

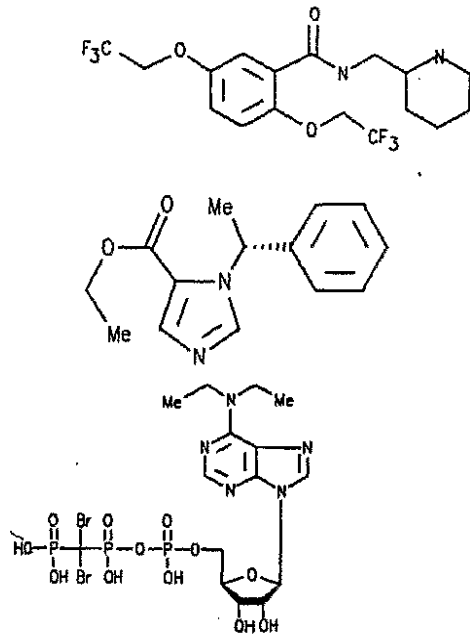


FIG. 17gggg

【図 17 h h h h】

中枢神経系疾病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 -セクレターゼ阻害剤 III

γ -セクレターゼ阻害剤 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 (485~501)

抗ニカストリン (Nicastrin)、C-末端

抗ニカストリン、N-末端

抗リリーリン

血管形成のためのペプチド

MT1-MMPヘモペキシン (Hemopexin) ドメイン、His-Tag (登録商標)、ヒト組み換え

MT2-MMPヘモペキシンドメイン、His-Tag (登録商標)、ヒト、組換え VEGF阻害剤

FIG. 17hhhh

【図 18】

種々の代謝制御メカニズムの調節点

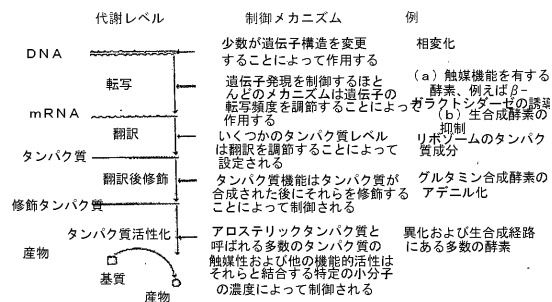


FIG. 18

【図 19 a】

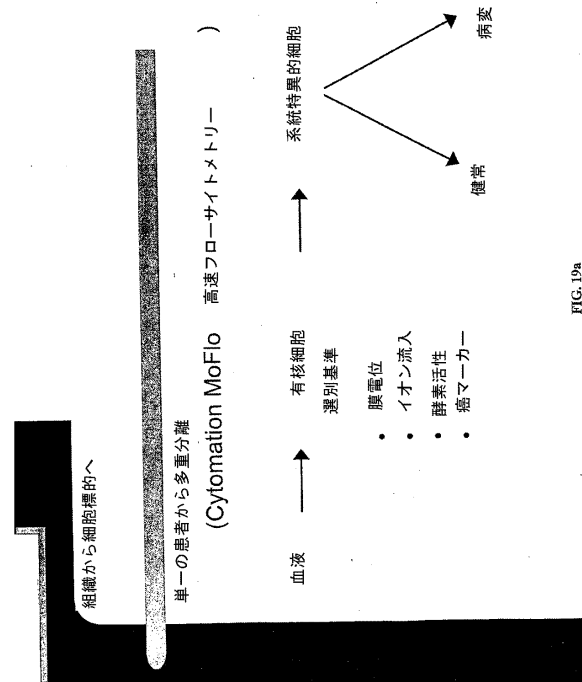
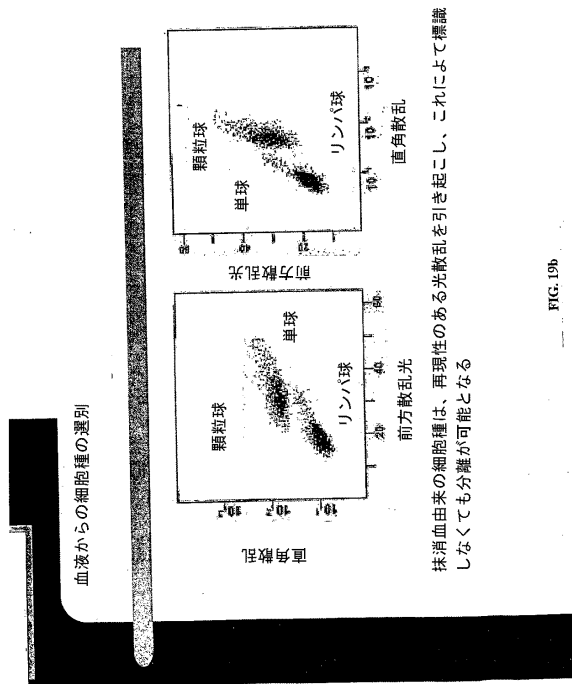
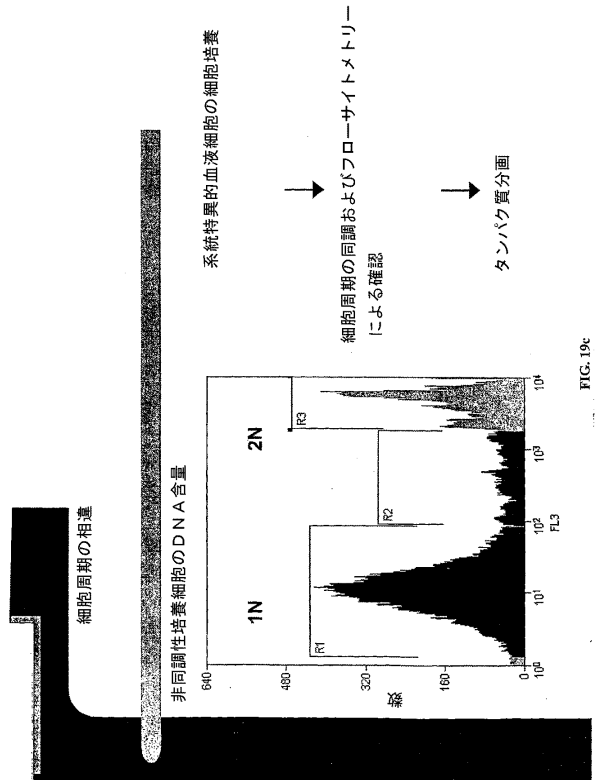


FIG. 19a

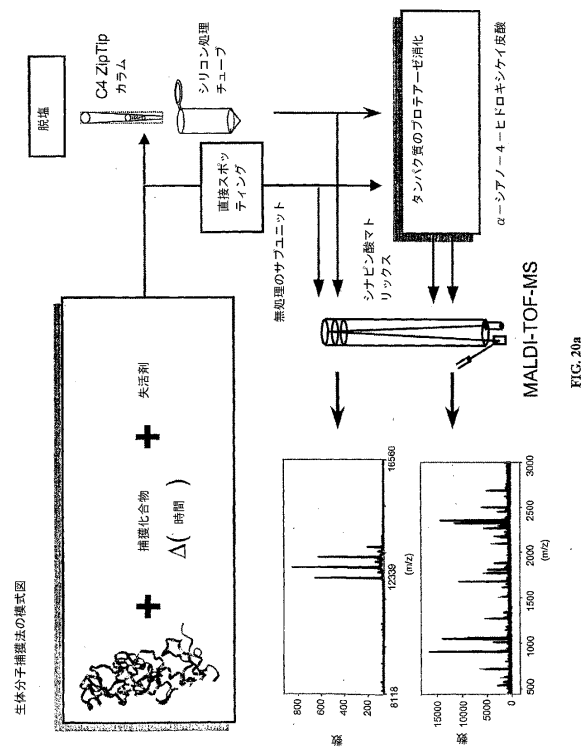
【図19b】



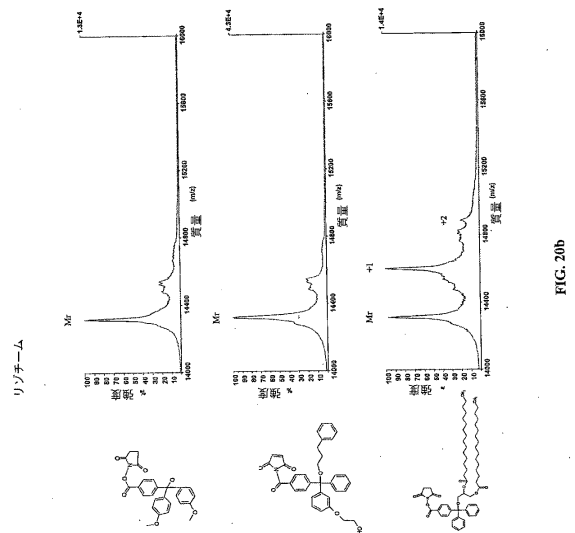
【図19c】



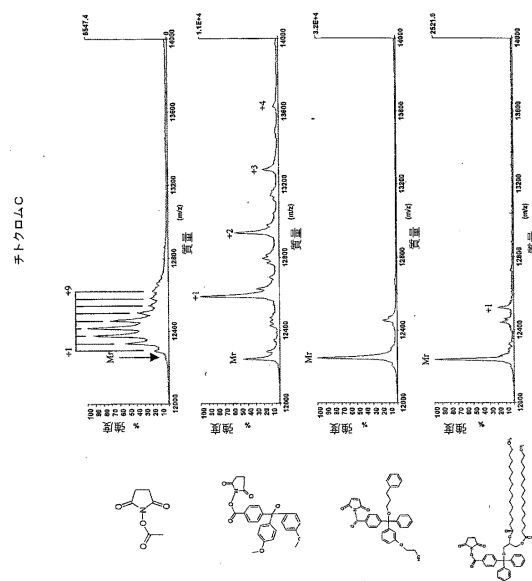
【図20a】



【図20b】



【図 20c】



【図 20d】

FIG. 20c

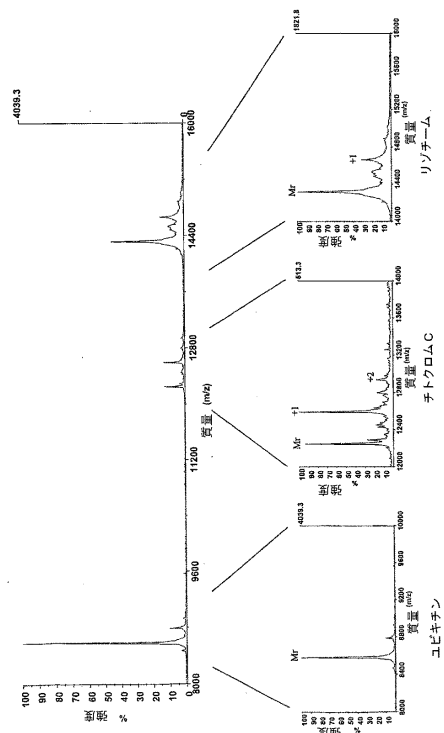
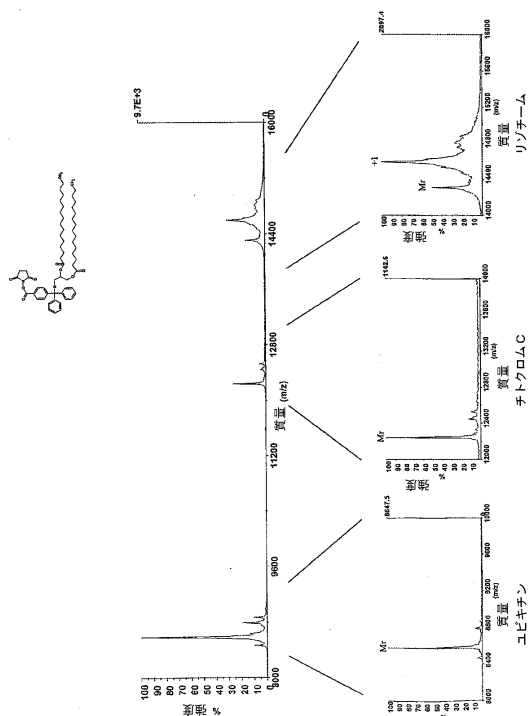


FIG. 20d

【図 20e】



【図 20f】

FIG. 20e

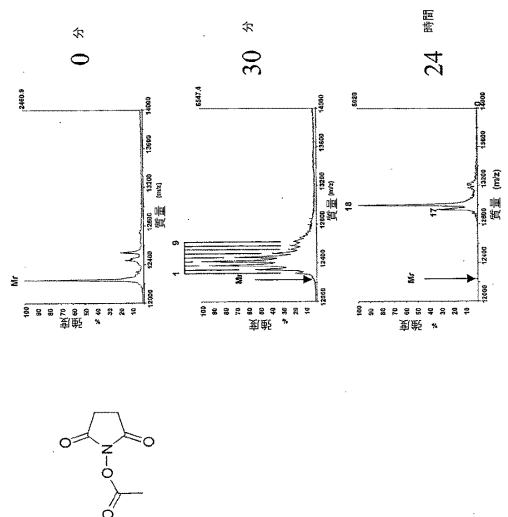


FIG. 20f

【配列表】

0003935487000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/566	Z N A
G 0 1 N 33/545 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	U
G 0 1 N 33/552 (2006.01)	G 0 1 N 33/545	Z
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/552	
	G 0 1 N 37/00	1 0 2

(31)優先権主張番号 60/363,433

(32)優先日 平成14年3月11日(2002.3.11)

(33)優先権主張国 米国(US)

早期審査対象出願

(74)代理人 100064610

弁理士 中嶋 正二

(74)代理人 100072730

弁理士 小島 一晃

(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、ヴィア・カントナーレ 8 4 番、ヴィラ・ウェリントニア

(72)発明者 スハイブ・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 ダニエル・ピー・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

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 特開平 1 1 - 0 4 4 6 4 7 (J P , A)

国際公開第 9 9 / 0 5 1 7 7 3 (W O , A 1)

Gygi, S.P. et al., "Quantitative analysis of complex protein mixture using isotope-coded affinity tags", *Nature Biotechnology*, 英国, 1 9 9 9 年, 1 7 , 9 9 4 - 9 9 9Niemeyer, C.M. et al., "Oligonucleotide-directed self-assembly of proteins: semisynthetic DNA-streptavidin hybrid molecules", *Nucleic Acids Research*, 1 9 9 4 年, 22(25), 5530 - 5539Geysen, H.M. et al., "Isotope or mass encoding of combinatorial libraries", *Chemistry & Biology*, 1 9 9 6 年, 679-688

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/547

G01N 27/62

G01N 30/72

G01N 33/566

C12Q 1/02

G01N 37/00

G01N 33/543

专利名称(译)	捕获化合物，其收集和蛋白质组和复合组合物的分析方法		
公开(公告)号	JP3935487B2	公开(公告)日	2007-06-20
申请号	JP2004500766	申请日	2002-07-16
[标]申请(专利权)人(译)	香港PHARM 富带斯科斯特 HUBERT KOESTER		
申请(专利权)人(译)	Eichikei制药公司 休伯特·凯斯特		
当前申请(专利权)人(译)	休伯特·凯斯特		
[标]发明人	フーベルトケスター スハイブシディキ ダニエルピーリトル		
发明人	フーベルト・ケスター スハイブ・シディキ ダニエル・ピー・リトル		
IPC分类号	G01N33/547 C12Q1/02 G01N27/62 G01N30/72 G01N33/566 G01N33/53 G01N33/545 G01N33/552 G01N37/00 C12Q1/68 C40B40/06 C40B40/10 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6803 B01J2219/00576 B01J2219/00581 B01J2219/00605 B01J2219/0061 B01J2219/00612 B01J2219/0072 B01J2219/00722 B01J2219/00725 C12Q1/6834 C40B40/06 C40B40/10 G01N33/6842 G01N33/6848 G01N33/6851		
FI分类号	G01N33/547 C12Q1/02 G01N27/62.F G01N27/62.V G01N30/72.C G01N33/566.ZNA G01N33/53.U G01N33/545.Z G01N33/552 G01N37/00.102		
代理人(译)	櫻井洋子 小島 一晃		
审查员(译)	白形 由美子		
优先权	60/306019 2001-07-16 US 60/314123 2001-08-21 US 60/363433 2002-03-11 US		
其他公开文献	JP2005520176A JP2005520176A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

捕获化合物及其集合，以及使用本发明化合物分析生物分子的方法。更具体地，它提供了可收集的化合物，化合物和分析复杂蛋白质混合物的方法，例如蛋白质组。该化合物是一种多功能试剂，可分离和分离复杂的蛋白质混合物。还提供了一种用于执行该方法的自动化系统。

(i) 次式 $-X^1R^{10}-$ を有
 $H-C(O)-$ 、 $-C(O)-NH-$ 、
 $O-SO_2-O-$ 、 $-O-C(O)-Cl$
 【化 3】

