

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-501766

(P2013-501766A)

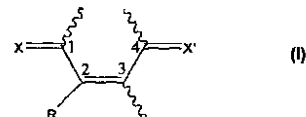
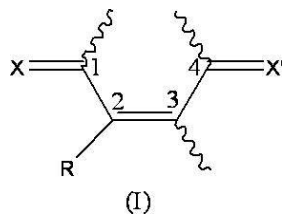
(43) 公表日 平成25年1月17日 (2013.1.17)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 D 207/416 (2006.01)	C O 7 D 207/416 C S P	4 C O 3 7
C O 7 D 207/456 (2006.01)	C O 7 D 207/456	4 C O 5 0
C O 7 D 401/14 (2006.01)	C O 7 D 401/14	4 C O 6 3
C O 7 D 307/60 (2006.01)	C O 7 D 307/60 Z	4 C O 6 9
C O 7 D 495/04 (2006.01)	C O 7 D 495/04 1 O 3	4 C O 7 1
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 155 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-524274 (P2012-524274)	(71) 出願人	506417186
(86) (22) 出願日	平成22年8月9日 (2010.8.9)		ユーシーエル ビジネス パブリック リ
(85) 翻訳文提出日	平成24年4月10日 (2012.4.10)		ミテッド カンパニー
(86) 国際出願番号	PCT/GB2010/001504		イギリス国、ダブリュエ1ティー 4ティー
(87) 国際公開番号	W02011/018613		ビー、ロンドン、トッテナム コート ロ
(87) 国際公開日	平成23年2月17日 (2011.2.17)		ード 97、ザ ネットワーク ビルディ
(31) 優先権主張番号	0913965.0		ング
(32) 優先日	平成21年8月10日 (2009.8.10)	(74) 代理人	100080791
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 高島 一
(31) 優先権主張番号	0913967.6	(74) 代理人	100125070
(32) 優先日	平成21年8月10日 (2009.8.10)		弁理士 土井 京子
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100136629
(31) 優先権主張番号	0914321.5		弁理士 鎌田 光宜
(32) 優先日	平成21年8月14日 (2009.8.14)	(74) 代理人	100121212
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 田村 弥栄子
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 固体基材の官能化

(57) 【要約】



本発明は、固体基材及びそれに連結された式 (I) の部分を含む生成物に関し、式中、X、X' 及び R は本明細書中に記載したとおりである。この生成物は、多数の適用 (例えば、アフィニティクロマトグラフィー、E L I S A、バイオテクノロジーアッセイ技術及び固相ペプチド合成) のために、標的分子 (生化学的に興味深い分子など) を固体基材に固定化するために有用である。

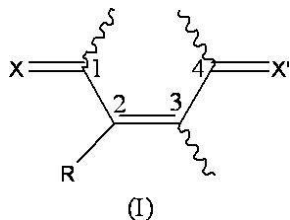
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 固体基材及び (b) それに連結された式 (I) の部分を含む、生成物：

【化 1】



10

式中、

X 及び X' は、同じ又は異なって、それぞれ酸素、硫黄又は式 = N Q の基を示し、Q は、水素、ヒドロキシル、C₁ - 6 アルキル又はフェニルであり；

以下のいずれかであり：

(i) R は、求電子性脱離基 Y を示し、固体基材は、式 (I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結されており、機能的部分が、式 (I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結されている；又は

(i i) 固体基材はチオール部分を有し、R は、該チオール部分の硫黄原子への結合を示し、機能的部分が、式 (I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結されている；又は

(i i i) 固体基材は、式 (I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結されており、R は、式 - S - F₁ 又は - S - L - F₂ の基を示し、式中 L はリンカー基を示し、- S - F₁ 及び - F₂ は機能的部分を示す；

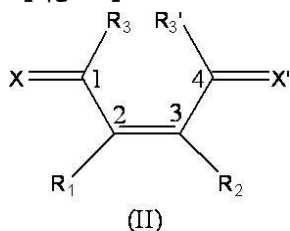
機能的部分は、検出可能部分、酵素活性部分、アフィニティタグ、ハブテン、免疫原性担体、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド又はリガンド候補、生物活性部分、リボソーム、ポリマー部分、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、炭水化物、DNA 及び RNA から選択される。

20

【請求項 2】

式 (II) を有する、請求項 1 に記載の生成物：

【化 2】



30

式中、

X 及び X' は、同じ又は異なって、それぞれ酸素、硫黄又は式 = N Q の基を示し、Q は、水素、ヒドロキシル、C₁ - 6 アルキル又はフェニルであり；

R₁ は以下を示し：

(i) 求電子性脱離基 Y；又は

(i i) チオール部分を有し、該チオール部分の硫黄原子を介して式 (II) の 2 位に結合している、固体基材；又は

(i i i) - S - F₁ 若しくは - S - L - F₂；

R₂ は、水素原子、Sol、- L - Sol、F₃、Y、Nu、- L (F₃)_m (Z)_n -_m 又は IG を示し；

以下のいずれかであり：

R₃ 及び R₃' は、同じ又は異なって、それぞれ水素原子、Sol、- L - Sol、F₃、E、Nu、- L (F₃)_m (Z)_n -_m 又は IG を示す；又は

R₃ 及び R₃' は一緒になって、式 - O - 又は - N (R₃₃ ·) - の基を形成し、R₃₃ · は、水素原子、Sol、- L - Sol、F₃、Y、Nu、- L (F₃)_m (Z)_n

40

50

$-m$ 又は I G を示す；又は

R_3 及び R_3' は一緒になって、式 $-N(R_3)_3-N(R_3)_3-$ の基を形成し、各 R_3 は、同じ又は異なって、水素原子、 SO_2 、 $-L-SO_2$ 、 F_3 、 Y 、 Nu 、 $-L(F_3)_m(Z)_n-m$ 又は I G を示す；

SO_2 は固体基材を示し；

$-S-F_1$ 、 F_2 及び F_3 のそれぞれは、同じ又は異なって、検出可能部分、酵素活性部分、アフィニティタグ、ハプテン、免疫原性担体、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド又はリガンド候補、生物活性部分、リボソーム、ポリマー部分、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、炭水化物、DNA 及び RNA から選択される機能的部分を示し；

E 及び Y のそれぞれは、同じ又は異なって、求電子性脱離基を示し；

各 Nu は、同じ又は異なって、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 及び $-NH(C_1-6 \text{ アルキル})$ から選択される求核剤を示し；

各 L は、同じ又は異なって、リンカー基を示し；

各 Z は、同じ又は異なって、部分 L に結合した反応性基を示し；

各 n は、同じ又は異なって、1、2 又は 3 であり；

各 m は、同じ又は異なって、0 から n までの値を有する整数であり；

各 I G は、同じ又は異なって、非置換であるか又は 1 個以上のハロゲン原子置換基で置換されている、 C_1-20 アルキル基、 C_2-20 アルケニル基又は C_2-20 アルキニル基である部分を示し、式中、(a) 0、1 又は 2 個の炭素原子は、 C_6-10 アリーレン、5 ~ 10 員のヘテロアリーレン、 C_3-7 カルボシクリレン及び 5 ~ 10 員のヘテロシクリレン基から選択される基によって置換されており、かつ (b) 0、1 又は 2 個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(O)-$ 及び $-N(C_1-6 \text{ アルキル})-$ 基から選択される基によって置換されており、式中、

(i) 該アリーレン、ヘテロアリーレン、カルボシクリレン及びヘテロシクリレン基は、非置換であるか又はハロゲン原子並びに C_1-6 アルキル、 C_1-6 アルコキシ、 C_1-6 アルキルチオール、 $-N(C_1-6 \text{ アルキル})(C_1-6 \text{ アルキル})$ 及びニトロ基から選択される 1 個以上の置換基によって置換されており；

(ii) 該カルボシクリレン及びヘテロシクリレン基中の 0、1 又は 2 個の炭素原子は、 $-C(O)-$ 基によって置換されており；

ただし、該生成物は、1 つの固体基材及び少なくとも 1 個の機能的部分を含む。

【請求項 3】

Y が、ハロゲン原子又はトリフレート、トシレート、メシレート、 N -ヒドロキシスクシンイミジル、 N -ヒドロキシスルホスクシンイミジル、 C_1-6 アルキルチオール、5 ~ 10 員のヘテロシクリルチオール、 C_6-10 アリールチオール、 C_3-7 カルボシクリルチオール、 $-OC(O)CH_3$ 、 $-OC(O)CF_3$ 、フェニルオキシ、 $-NR_xR_yR_z^+$ 若しくは $-PR_xR_yR_z^+$ 基であり、式中、 R_x 、 R_y 及び R_z は、同じ又は異なって、水素原子並びに C_1-6 アルキル及びフェニル基から選択される、請求項 2 に記載の生成物。

【請求項 4】

E が、ハロゲン原子又は C_1-6 アルコキシ、チオール、 C_1-6 アルキルチオール、 $-N(C_1-6 \text{ アルキル})(C_1-6 \text{ アルキル})$ 、トリフレート、トシレート、メシレート、 N -ヒドロキシスクシンイミジル、 N -ヒドロキシスルホスクシンイミジル、イミダゾリル、フェニルオキシ若しくはニトロフェニルオキシ基である、請求項 2 又は 3 に記載の生成物。

【請求項 5】

L が、非置換であるか又は 1 個以上のハロゲン原子置換基で置換されている、 C_1-20 アルキレン基、 C_2-20 アルケニレン基又は C_2-20 アルキニレン基である部分を示し、式中、(a) 0、1 又は 2 個の炭素原子は、 C_6-10 アリーレン、5 ~ 10 員のヘテロアリーレン、 C_3-7 カルボシクリレン及び 5 ~ 10 員のヘテロシクリレン基から選択される基によって置換されており、かつ (b) 0、1 又は 2 個の $-CH_2-$ 基は、-

O -、- S -、- S - S -、- C (O) - 及び - N (C₁ - 6 アルキル) - 基から選択される基によって置換されており、式中、

(i) 該アリーレン、ヘテロアリーレン、カルボシクリレン及びヘテロシクリレン基は、非置換であるか又はハロゲン原子並びに C₁ - 6 アルキル、C₁ - 6 アルコキシ、C₁ - 6 アルキルチオール、- N (C₁ - 6 アルキル) (C₁ - 6 アルキル) 及びニトロ基から選択される 1 個以上の置換基によって置換されており；

(i i) 該カルボシクリレン及びヘテロシクリレン基中の 0、1 又は 2 個の炭素原子は、- C (O) - 基によって置換されている、請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の生成物。

【請求項 6】

L が、非置換の C₁ - 6 アルキレン基、C₂ - 6 アルケニレン基又は C₂ - 6 アルキニレン基である部分を示し、式中、(a) 0 又は 1 個の炭素原子は、フェニレン、5 ~ 6 員のヘテロアリーレン、C₅ - 6 カルボシクリレン及び 5 ~ 6 員のヘテロシクリレン基から選択される基によって置換されており、該フェニレン、ヘテロアリーレン、カルボシクリレン及びヘテロシクリレン基は、非置換であるか又はハロゲン原子並びに C₁ - 4 アルキル及び C₁ - 4 アルコキシ基から選択される 1 又は 2 個の置換基によって置換されており、かつ (b) 0、1 又は 2 個の - C H₂ - 基は、- O -、- S - 及び - C (O) - 基から選択される基によって置換されている、請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の生成物。

【請求項 7】

Z が、

(a) 式 - L G、- C (O) - L G、- C (S) - L G 又は - C (N H) - L G の基 (式中、L G は求電子性脱離基である) ；

(b) - O H、- S H、- N H₂、- N H (C₁ - 6 アルキル) 及び - C (O) N H N H₂ 基から選択される求核剤 N u ' ；

(c) 求核剤と開環求電子反応し得る環式部分 C y c ；

(d) 式 - S (O₂) (H a l) の基 (式中、H a l はハロゲン原子である) ；

(e) 式 - N = C = O 又は - N = C = S の基 ；

(f) 式 - S - S (I G ') の基 (式中、I G ' は、請求項 2 に記載の式 I G の基を示す) ；

(g) 1 個以上のハロゲン原子によって置換された C₆ - 1₀ アリール基である、基 A H ；

(h) 紫外線光への曝露によって活性化され得る光反応性基 ；

(i) 式 - C (O) H 又は - C (O) (C₁ - 6 アルキル) の基 ；

(j) マレイミド基 ；

(k) 式 - C (O) C H C H₂ の基 ；

(l) 式 - C (O) C (N₂) H 又は - P h N₂⁺ の基 (式中、P h はフェニル基を示す) ；又は

(m) エポキシド基、

を示す、請求項 2 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の生成物。

【請求項 8】

L G が、ハロゲン原子並びに - O (I G ')、- S H、- S (I G ')、- N H₂、- N H (I G ')、- N (I G ') (I G ")、- N₃、トリフレート、トシレート、メシレート、N - ヒドロキシスクシンイミジル、N - ヒドロキシスルホスクシンイミジル、イミダゾリル及びアジド基から選択され、I G ' 及び I G " が、同じ又は異なって、それぞれ請求項 2 に記載の式 I G の基を示し；かつ / 又は

N u ' が、- O H、- S H 及び - N H₂ 基から選択され；かつ / 又は

C y c が、基

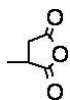
10

20

30

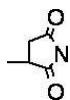
40

【化 3】



及び

【化 4】



から選択され；かつ／又は

H a 1 が塩素原子であり；かつ／又は

A H が、少なくとも 1 個のフッ素原子で置換されたフェニル基であり；かつ／又は
光反応性基が、(a) 少なくとも 1 個の式 - N₃ の基によって置換されており、1 個以上のハロゲン
原子によって更に置換されていてもよい、C₆ - 1₀ アリール基；

(b) ベンゾフェノン基；

(c) 式 - C (O) C (N₂) C F₃ の基；及び(d) 式 - P h C (N₂) C F₃ の基（式中、P h はフェニル基を示す）

から選択される、

請求項 7 に記載の生成物。

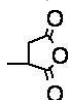
【請求項 9】

Z が、

(a) 式 - L G、- C (O) - L G 及び - C (S) - L G の基（式中、L G は、ハロ
ゲン原子並びに - O (C₁ - 6 アルキル)、- S H、- S (C₁ - 6 アルキル)、トリフ
レート、トシレート、メシレート、N - ヒドロキシスクシンイミジル及び N - ヒドロキシ
スルホスクシンイミジル基から選択される）；(b) 式 - O H、- S H 及び - N H₂ の基；

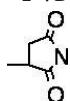
(c) 式

【化 5】



又は

【化 6】



の基；及び

(d) マレイミド基

から選択される、

請求項 2 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の生成物。

【請求項 10】

I G が、非置換の C₁ - 6 アルキル基、C₂ - 6 アルケニル基又は C₂ - 6 アルキニル
基である部分を示し、式中、(a) 0 又は 1 個の炭素原子は、フェニレン、5 ～ 6 員のヘ
テロアリーレン、C₅ - 6 カルボシクリレン及び 5 ～ 6 員のヘテロシクリレン基から選択
される基によって置換されており、該フェニレン、ヘテロアリーレン、カルボシクリレン
及びヘテロシクリレン基は、非置換であるか又はハロゲン原子並びに C₁ - 4 アルキル及
び C₁ - 4 アルコキシ基から選択される 1 又は 2 個の置換基によって置換されており、か
つ (b) 0、1 又は 2 個の - C H₂ - 基は、- O -、- S - 及び - C (O) - 基から選択
される基によって置換されている、

10

20

30

40

50

請求項 2 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の生成物。

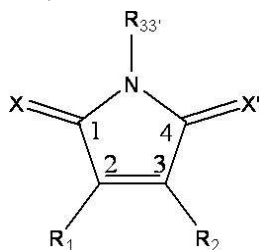
【請求項 1 1】

n が 1 である、請求項 2 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の生成物。

【請求項 1 2】

式 (I I) の生成物が式 (I I a) の生成物

【化 7】



(IIa)

10

(式中、X、X'、R₁、R₂ 及び R_{33'} は全て、請求項 2 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載したとおりである)

である、請求項 2 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の生成物。

【請求項 1 3】

X 及び X' がそれぞれ酸素を示し；

R₁ が以下を示し；

(i) ハロゲン原子；又は

(i i) チオール部分を有し、該チオール部分の硫黄原子を介して式 (I I) の 2 位に結合している、固体基材；又は

(i i i) - S - F₁ ；

R₂ は、水素若しくはハロゲン原子、固体基材、F₃ 又は C₁ - 6 アルキル基を示し；

R₃ 及び R_{3'} は一緒になって、式 - N (R_{33'}) の基を形成し、R_{33'} は、水素原子、固体基材、F₃ 又は C₁ - 6 アルキル基を示し；

- S₁ - F₁ 及び F₃ は、同じ又は異なって、検出可能部分、酵素活性部分、アフィニティタグ、ハプテン、免疫原性担体、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド又はリガンド候補、生物活性部分、リポソーム、ポリマー部分、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、炭水化物、DNA 及び RNA から選択される機能的部分を示し；

30

ただし、該生成物は、1 つの固体基材及び少なくとも 1 個の機能的部分を含む、請求項 2 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の生成物。

【請求項 1 4】

1 個の機能的部分 - S - F₁、F₂ 又は F₃ を含む、請求項 2 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の生成物。

【請求項 1 5】

前記機能的部分が機能的部分 - S - F₁ である、請求項 1 4 に記載の生成物。

【請求項 1 6】

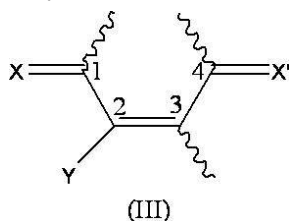
R₃ 及び R_{3'} が一緒になって、式 - N (R_{33'}) の基を形成し、R_{33'} が固体基材を示す、請求項 2 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の生成物。

40

【請求項 1 7】

機能的部分に固体基材を連結するための試薬としての、式 (I I I) の部分を含む化合物の使用；

【化 8】



式中、

X 及び X' は、同じ又は異なって、それぞれ酸素、硫黄又は式 = N Q の基を示し、Q は、水素、ヒドロキシル、C₁ - 6 アルキル又はフェニルであり；

10

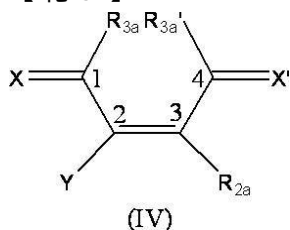
Y は求電子性脱離基であり；

機能的部分は、検出可能部分、酵素活性部分、アフィニティタグ、ハブテン、免疫原性担体、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド又はリガンド候補、生物活性部分、リボソーム、ポリマー部分、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、炭水化物、DNA 又は RNA である。

【請求項 18】

式 (III) の部分を含む化合物が、式 (IV) の化合物である、請求項 18 に記載の使用；

【化 9】



20

式中、

R_{2a} は、水素原子、Y、Nu、- L (Z')_n 又は I G を示し；

以下のいずれかであり；

R_{3a} 及び R_{3a'} は、同じ又は異なって、それぞれ水素原子、E、Nu、- L (Z')_n 又は I G を示す；又は

30

R_{3a} 及び R_{3a'} は一緒になって、式 - O - 又は - N (R_{33a}) の基を形成し、R_{33a} は、水素原子、Y、Nu、- L (Z')_n 又は I G を示す；又は

R_{3a} 及び R_{3a'} は一緒になって、式 - N (R_{33a}) - N (R_{33a}) - の基を形成し、各 R_{33a} は、同じ又は異なって、水素原子、Y、Nu、- L (Z')_n 又は I G を示す；

Z' は、Z 又は式 - Si (O (C₁ - 6 アルキル) (G₁) (G₂)) の基を示し、G₁ 及び G₂ は、同じ又は異なって、H、C₁ - 6 アルキル又は O (C₁ - 6 アルキル) を示し；

X、X'、Y、Nu、L、Z、n、I G 及び E は全て、請求項 2 ~ 13 のいずれか 1 項に記載したとおりである。

40

【請求項 19】

請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の生成物を提供する工程であって、以下のいずれかである；

(i) チオール部分を有する固体基材が、該チオール部分の硫黄原子を介して式 (I) の 2 位に結合している；又は

(ii) 基 - S - F₁ 又は - S - L - F₂ が、式 (I) の 2 位に結合している、工程；及び

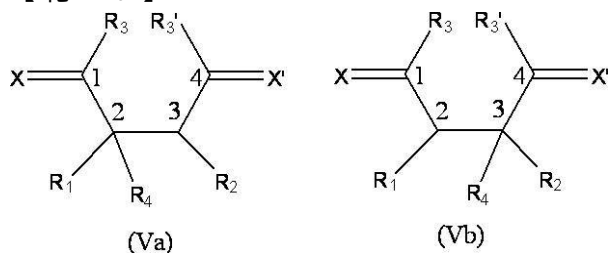
式 (I) の 2 位でチオール結合を切断する工程、を含む、プロセス。

【請求項 20】

50

式 (V a) 又は (V b) の生成物 :

【化 1 0】



式中、

R₁ は以下を示し :

(i) チオール部分を有し、該チオール部分の硫黄原子を介して式 (V a) 又は (V b) の 2 位に結合している、固体基材 ; 又は

(i i) - S - F₁ 若しくは - S - L - F₂ ;

X、X'、- S - F₁、F₂、R₂、R₃ 及び R₃' は、請求項 2 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載したとおりであり ;

R₄ は、ハロゲン原子、ヒドロキシル、C₁ - 6 アルコキシ、チオール、C₁ - 6 アルキルチオ若しくは C₁ - 6 アルキルカルボニルオキシ基、又は請求項 2 に記載の式 F₃ の基であり ;

基 R₂ 及び R₄ のうち少なくとも 1 個が式 F₃ の基を含み、

ただし、該生成物は、1 つの固体基材を含む。

【請求項 2 1】

アレイに整列された、請求項 1 ~ 1 6 及び 2 0 のいずれか 1 項に記載の複数の生成物。

【請求項 2 2】

各生成物が、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド又はリガンド候補、ペプチド、タンパク質、細胞、DNA 及び RNA から選択される機能的部分を含む、請求項 2 1 に記載の複数の生成物。

【請求項 2 3】

(a) 各生成物が異なる抗体又は抗体断片を含む ; 又は

(b) 各生成物が異なる抗原を含む ; 又は

(c) 各生成物が異なるリガンド又はリガンド候補を含む ; 又は

(d) 各生成物が異なるペプチドを含む ; 又は

(e) 各生成物が異なるタンパク質を含む ; 又は

(f) 各生成物が異なる細胞を含む ; 又は

(g) 各生成物が異なる DNA を含む ; 又は

(h) 各生成物が異なる RNA を含む、

請求項 2 2 に記載の複数の生成物。

【請求項 2 4】

請求項 2 2 又は 2 3 に記載の複数の生成物を提供する工程 ;

該複数の生成物を、試験物質を含むサンプルとインキュベートする工程 ; 及び

試験物質のいずれかが、複数の生成物のいずれかと結合しているか否かを検出する工程

を含む、アッセイプロセス。

【請求項 2 5】

(i) 請求項 1 ~ 1 5、1 6 及び 2 0 のいずれか 1 項に記載の生成物を提供する工程であって、該生成物は、抗体又は抗原を含む、工程 ;

(i i) 該生成物をサンプルとインキュベートする工程 ;

(i i i) 抗体又は抗原に結合していない任意の材料を除去する工程 ; 及び

(i v) 抗体又は抗原に結合した任意の物質を検出する工程、

を含む、検出プロセス。

【請求項 26】

サンプルから特定の物質を精製するためのプロセスであって、

(i) 請求項 1 ~ 15、16 及び 20 のいずれか 1 項に記載の生成物を提供する工程であって、該生成物は、該物質に選択的に結合できる機能的部分を含む、工程；

(ii) 該生成物を該サンプルとインキュベートする工程；

(iii) 機能的部分に結合していない任意の材料を除去する工程；及び

(iv) 該生成物から該物質を分離する工程、を含む、プロセス。

【請求項 27】

特定の物質がバイト物質 S_b であり、サンプルが、 S_b に結合できる 1 種以上のプレイ物質 S_p をさらに含んでいてもよい、請求項 26 に記載のプロセス。

10

【請求項 28】

(i) 請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の生成物を提供する工程；

(ii) アミノ酸を該生成物に結合させる工程；及び

(iii) 該アミノ酸に 1 個以上のさらなるアミノ酸を結合させて、固体基材に連結されたペプチド又はタンパク質部分を産生する工程；及び

(iv) 該ペプチド又はタンパク質部分を該固体基材から切断する工程、を含む、ペプチド又はタンパク質を産生するためのプロセス。

【請求項 29】

工程 (i) が、その硫黄原子を介して式 (I) の 2 位に結合したシステイン残基を含む生成物を提供することを含む、請求項 28 に記載のプロセス。

20

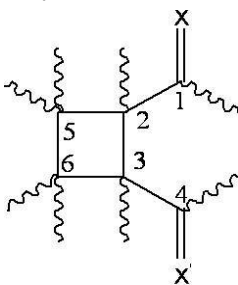
【請求項 30】

請求項 17 又は 18 に記載の使用であって、式 (III) の部分を含む化合物を使用して機能的部分に固体基材を連結することによって得られた生成物が、マレイミド環を含み、該使用が、該マレイミド環の開環をもたらすことをさらに含む、使用。

【請求項 31】

(a) 機能的部分及び (b) それに連結された固体基材を有する式 (VI) の部分を含む生成物；

【化 11】



30

(VI)

式中、

X 及び X' は、同じ又は異なって、それぞれ酸素、硫黄又は式 $=NQ$ の基を示し、Q は、水素、ヒドロキシル、 C_{1-6} アルキル又はフェニルであり；

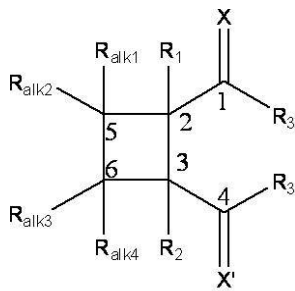
40

機能的部分は、検出可能部分、酵素活性部分、アフィニティタグ、ハプテン、免疫原性担体、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド、生物活性部分、リボソーム、ポリマー部分、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、炭水化物、DNA 及び RNA から選択される。

【請求項 32】

式 (VIa) を有する、請求項 31 に記載の生成物；

【化 1 2】



(VIa)

10

式中、

X、X'、R₁、R₂、R₃ 及び R_{3'} はそれぞれ、請求項 2～13 のいずれか 1 項に記載されたとおりであり；

R_{alk1}、R_{alk2}、R_{alk3} 及び R_{alk4} のそれぞれは、同じ又は異なって、請求項 2～13 のいずれか 1 項に記載された式 R₂ の基であり；

各機能的部分は、同じ又は異なって、検出可能部分、酵素活性部分、アフィニティタグ、ハプテン、免疫原性担体、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド、生物活性部分、リボソーム、ポリマー部分、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、炭水化物、DNA 及び RNA から選択され；

20

ただし、該生成物は、1 つの固体基材及び少なくとも 1 個の機能的部分を含む。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

(導入)

広範な種々の分子を固体基材に連結することが望ましい場合があることが周知である。例えば、表面上への生体分子（例えば、抗体、抗原及びタンパク質）の固定化は、多数の高感度かつ選択的な検出及び精製の技術（例えば、酵素結合免疫吸着検定法、ブルダウンアッセイ及びアフィニティークロマトグラフィー法）の基礎を提供する。マイクロアレイ技術（基材上の別個の点に連結した複数の生体分子又は合成分子が、試験物質に対するその結合能力について同時にスクリーニングされる）は、バイオテクノロジー及び医薬品の分野における、革命的なスクリーニング技術である。一方、ノーベル賞受賞者 R. B. Merrifield が先駆けて開発した固相ペプチド合成（SPPS）（ペプチド鎖が、固相に結合したままで段階的な様式で成長する）は、実験室スケールで合成ペプチドを産生するのに、群を抜いて最も簡便で高収率の方法である。

30

【0002】

多くの基本的な固体基材材料が、かかる固定化方法を実施するために使用されてきた。これらには、ガラス、シリカ、マイカ、並びに天然ポリマー及び合成ポリマーの両方が挙げられる。固体基材はまた、具体的な適用のために適合させた種々の異なる形態で慣用的に使用され、例えば単一のチップ又はメンブランとして、ビーズ状にした材料として、又はカーボンナノチューブの特徴を示す中空の管状形態で存在する。

40

【0003】

固体基材が特定の標的分子に連結されたコンジュゲートを設計する際の重要な検討事項には、基材と標的分子との間の結合の特徴、並びにこの結合が形成される容易さ及び特異性が挙げられる。

【0004】

固体基材と目的分子との間で形成されるコンジュゲートの一体性を保つために、それらの成分は、（静電相互作用などのより弱い結合ではなく）共有結合で連結されることが望ましい場合が多い。明らかに、これを達成するためには、固体基材は、標的分子上の対応する官能基と反応できる官能基を少なくとも 1 個保有する必要がある。幸いにも、表面ア

50

クセス可能な官能基を提供するための固体基材材料の官能化は、周知技術である。従って、適切に官能化された固体基材は、慣用的に入手可能であり、市販されている。典型的には不活性のリンカー部分を介して固体基材材料に結合した官能基としては、標的分子上のアミン、カルボキシル、チオール、アルデヒド及び活性水素官能基に結合できる基が挙げられる。

【0005】

反応性チオール基を介して標的分子に固体基材をカップリングすることは、チオール部分の独自の求核性の特徴と、これらの官能基が、固定化技術でしばしば標的化される生体分子中に豊富でないという事実とに起因して、特に目的とされ得る。これらの特徴は、チオール反応に基づく高度に選択的な固定化手順の可能性を開拓する。

10

【0006】

従来、ヨードアセチル活性化固体基材が、タンパク質などのチオール含有分子を固定化するための試薬として使用されてきた。例えば、ヨードアセチル活性化アガロース又はアクリルアミドベースの樹脂が、Thermo Fisherから市販されている。しかしながら、ハロアセチル官能基の反応は、必ずしもチオール化合物に選択的とは限らないことが知られている。例えば、ハロアセチル基は、タンパク質内に存在する種々の官能基：ヒスチジンのイミダゾリル側鎖窒素、メチオニンのチオエステル、及びリジン残基の第一級ε-アミン基、及びN末端α-アミン、と反応できる。固体基材上のヨードアセチル基とチオール（例えば、タンパク質中のシステイン残基）との間の反応は、不可逆的でもある。これは、例えば、発現が困難なタンパク質（例えば、多くのGPCR（Gタンパク質共役型レセプター））に関連する手順を実施する場合などに、その実用性に対する厳しい制限となり得る。明らかに、これは、固体基材と標的分子との間の結合の不安定性が重要である分野（例えば、固体基材が固相タンパク質合成に関連して使用されている場合）における、チオール固定化方法論の開発も不可能にしている

20

【0007】

チオール含有生体分子を二次的分子（典型的には別の生体分子）に連結するための試薬として使用されてきた他の化合物には、1, 2-ジカルボニルエテン誘導体及びチオスルホネートが挙げられる。1, 2-ジカルボニルエテン誘導体（例えばマレイミド）は一般に、チオール及び特にシステイン部分との反応のための最も選択的な試薬であると認識されている。しかし不幸にも、この反応（チオールとヨードアセチル化合物との反応など）もまた、化学的に不可逆的である。

30

【0008】

本発明は、1, 2-ジカルボニルエテン架橋試薬のC=C二重結合に求電子性脱離基を組み込むことが有利であるという、驚くべき知見に基づいている。その化学的修飾により、C=C二重結合を保持したまま、チオール含有標的分子が架橋試薬を介して固体基材に容易に結合することが可能となる。同様に、これにより、C=C二重結合を保持したまま、チオール含有固体基材が架橋試薬を介して標的分子に結合することが可能となる。これには以下の利点がある：

【0009】

- ・クロスリンカーとチオールとの間の反応が、実質的に化学量論的な量のみのクロスリンカーを使用して、迅速かつ高収率で実施できることが多い。
- ・クロスリンカーとチオールとの間のチオエーテル結合が、容易に逆転可能であり、特に、当業者によって選択された時間で、制御された様式で切断できる。
- ・クロスリンカーにチオールを連結した後に得られる生成物中の二重結合の保持が、さらなる機能的化合物への連結のための反応部位を構成する。したがって、固体基材-標的分子コンジュゲートに余分な機能的に活性な分子を付加することが容易である。

40

【0010】

新規架橋方法論は、標的分子の固体基材材料へのコンジュゲート化を含む公知の方法の全範囲にわたって容易に適用可能である。

【発明の概要】

50

【課題を解決するための手段】

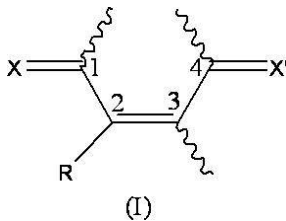
【 0 0 1 1 】

(発明の要旨)

本発明は、(a) 固体基材及び (b) それに連結された式 (I) の部分を含む、生成物を提供する：

【 0 0 1 2 】

【 化 1 】



10

【 0 0 1 3 】

式中、

X 及び X' は、同じ又は異なって、それぞれ酸素、硫黄又は式 $=N-Q$ の基を示し、Q は、水素、ヒドロキシル、 $C_1 - 6$ アルキル又はフェニルであり；

以下のいずれかであり：

(i) R は、求電子性脱離基 Y を示し、固体基材は、式 (I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結されており、機能的部分が、式 (I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結されている；又は

20

(i i) 固体基材はチオール部分を有し、R は、該チオール部分の硫黄原子への結合を示し、機能的部分が、式 (I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結されている；又は

(i i i) 固体基材は、式 (I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結されており、R は、式 $-S-F_1$ 又は $-S-L-F_2$ の基を示し、式中 L はリンカー基を示し、 $-S-F_1$ 及び $-F_2$ は機能的部分を示す；

機能的部分は、検出可能部分、酵素活性部分、アフィニティタグ、ハプテン、免疫原性担体、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド又はリガンド候補、生物活性部分、リボソーム、ポリマー部分、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、炭水化物、DNA 及び RNA から選択される。

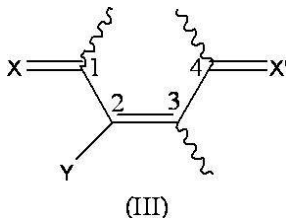
30

【 0 0 1 4 】

本発明はまた、機能的部分に固体基材を連結するための試薬としての、式 (I I I) の部分を含む化合物の使用も提供する：

【 0 0 1 5 】

【 化 2 】



40

【 0 0 1 6 】

式中、

X 及び X' は、同じ又は異なって、それぞれ酸素、硫黄又は式 $=N-Q$ の基を示し、Q は、水素、ヒドロキシル、 $C_1 - 6$ アルキル又はフェニルであり；

Y は求電子性脱離基であり；

機能的部分は、検出可能部分、酵素活性部分、アフィニティタグ、ハプテン、免疫原性担体、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド又はリガンド候補、生物活性部分、リボソーム、ポリマー部分、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、炭水化物、DNA 又は RNA である。

50

【 0 0 1 7 】

本発明はさらに、

本発明の生成物を提供する工程であって、以下のいずれかである：

(i) チオール部分を有する固体基材が、該チオール部分の硫黄原子を介して式 (I) の 2 位に結合している；又は

(i i) 基 - S - F₁ 又は - S - L - F₂ が、式 (I) の 2 位に結合している、
工程；及び

式 (I) の 2 位でチオール結合を切断する工程、
を含む、プロセスを提供する。

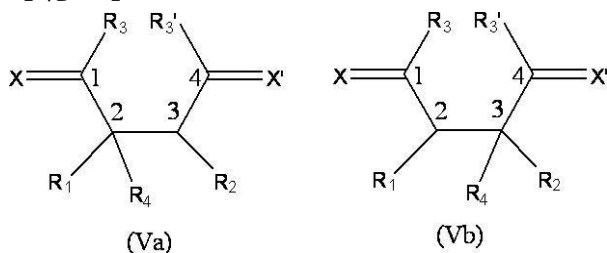
【 0 0 1 8 】

10

本発明は、式 (V a) 又は (V b) の生成物もまた提供する：

【 0 0 1 9 】

【 化 3 】



20

【 0 0 2 0 】

式中、

R₁ は以下を示し：

(i) チオール部分を有し、該チオール部分の硫黄原子を介して式 (V a) 又は (V b) の 2 位に結合している、固体基材；又は

(i i) - S - F₁ 若しくは - S - L - F₂ ；

X 及び X' は、同じ又は異なって、それぞれ酸素、硫黄又は式 = N Q の基を示し、Q は、水素、ヒドロキシル、C₁ - 6 アルキル又はフェニルであり；

R₂ は、水素原子、S o l、- L - S o l、F₃、Y、Nu、- L (F₃)_m (Z)_n -_m 又は I G を示し；

30

以下のいずれかであり：

R₃ 及び R₃' は、同じ又は異なって、それぞれ水素原子、S o l、- L - S o l、F₃、E、Nu、- L (F₃)_m (Z)_n -_m 又は I G を示す；又は

R₃ 及び R₃' は一緒になって、式 - O - 又は - N (R_{3 3}) - の基を形成し、R_{3 3} は、水素原子、S o l、- L - S o l、F₃、Y、Nu、- L (F₃)_m (Z)_n -_m 又は I G を示す；又は

R₃ 及び R₃' は一緒になって、式 - N (R_{3 3}) - N (R_{3 3}) - の基を形成し、各 R_{3 3} は、同じ又は異なって、水素原子、S o l、- L - S o l、F₃、Y、Nu、- L (F₃)_m (Z)_n -_m 又は I G を示す；

R₄ は、ハロゲン原子、ヒドロキシル、C₁ - 6 アルコキシ、チオール、C₁ - 6 アルキルチオ若しくは C₁ - 6 アルキルカルボニルオキシ基、又は式 F₃ の基であり；

40

S o l は固体基材を示し；

- S - F₁、F₂ 及び F₃ のそれぞれは、同じ又は異なって、検出可能部分、酵素活性部分、アフィニティタグ、ハプテン、免疫原性担体、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド又はリガンド候補、生物活性部分、リポソーム、ポリマー部分、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、炭水化物、DNA 及び RNA から選択される機能的部分を示し；

E 及び Y のそれぞれは、同じ又は異なって、求電子性脱離基を示し；

各 Nu は、同じ又は異なって、- O H、- S H、- N H₂ 及び - N H (C₁ - 6 アルキル) から選択される求核剤を示し；

各 L は、同じ又は異なって、リンカー基を示し；

50

各 Z は、同じ又は異なって、部分 L に結合した反応性基を示し；

各 n は、同じ又は異なって、1、2 又は 3 であり；

各 m は、同じ又は異なって、0 から n までの値を有する整数であり；

各 I G は、同じ又は異なって、非置換であるか又は 1 個以上のハロゲン原子置換基で置換されている、 C_{1-20} アルキル基、 C_{2-20} アルケニル基又は C_{2-20} アルキニル基である部分を示し、式中、(a) 0、1 又は 2 個の炭素原子は、 C_{6-10} アリーレン、5 ~ 10 員のヘテロアリーレン、 C_{3-7} カルボシクリレン (carbocyclylene) 及び 5 ~ 10 員のヘテロシクリレン (heterocyclylene) 基から選択される基によって置換されており、かつ (b) 0、1 又は 2 個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(O)-$ 及び $-N(C_{1-6} \text{アルキル})-$ 基から選択される基によって置換されており、式中、

(i) 該アリーレン、ヘテロアリーレン、カルボシクリレン及びヘテロシクリレン基は、非置換であるか又はハロゲン原子並びに C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、 C_{1-6} アルキルチオール、 $-N(C_{1-6} \text{アルキル})(C_{1-6} \text{アルキル})$ 及びニトロ基から選択される 1 個以上の置換基によって置換されており；

(ii) 該カルボシクリレン及びヘテロシクリレン基中の 0、1 又は 2 個の炭素原子は、 $-C(O)-$ 基によって置換されており；

基 R_2 及び R_4 のうち少なくとも 1 個が式 F_3 の基を含み、

ただし、該生成物は、1 つの固体基材を含む。

【0021】

本発明はさらに、アレイに整列された、本発明の複数の生成物を提供する。

【0022】

なおさらに、本発明は、

本発明の複数の生成物を提供する工程（各生成物は、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド又はリガンド候補、ペプチド、タンパク質、細胞、DNA 及び RNA から選択される機能的部分を含む）；

該複数の生成物を、試験物質を含むサンプルとインキュベートする工程；及び

試験物質のいずれかが、複数の生成物のいずれかと結合しているか否かを検出する工程、

、

を含むアッセイプロセスを提供する。

【0023】

本発明は、

(i) 本発明の生成物を提供する工程であって、該生成物は、抗体又は抗原を含む、工程；

(ii) 該生成物をサンプルとインキュベートする工程；

(iii) 抗体又は抗原に結合していない任意の材料を除去する工程；及び

(iv) 抗体又は抗原に結合した任意の物質を検出する工程、

を含む検出プロセスを提供する。

【0024】

本発明は、サンプルから特定の物質を精製するためのプロセスもまた提供し、このプロセスは、

(i) 本発明の生成物を提供する工程であって、該生成物は、該物質に選択的に結合できる機能的部分を含む、工程；

(ii) 該生成物を該サンプルとインキュベートする工程；

(iii) 機能的部分に結合していない任意の材料を除去する工程；及び

(iv) 該生成物から該物質を分離する工程、

を含む。

【0025】

本発明はさらに、

(i) 本発明の生成物を提供する工程；

10

20

30

40

50

(i i) アミノ酸を該生成物に結合させる工程 ; 及び

(i i i) 該アミノ酸に 1 個以上のさらなるアミノ酸を結合させて、固体基材に連結されたペプチド又はタンパク質部分を産生する工程 ; 及び

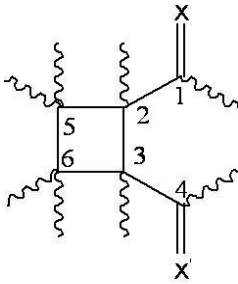
(i v) 該ペプチド又はタンパク質部分を該固体基材から切断する工程、を含む、ペプチド又はタンパク質を産生するためのプロセスを提供する。

【 0 0 2 6 】

本発明は、(a) 機能的部分及び (b) それに連結された固体基材を有する式 (V I) の部分を含む生成物もまた提供する :

【 0 0 2 7 】

【 化 4 】



(VI)

【 0 0 2 8 】

式中、

X 及び X' は、同じ又は異なって、それぞれ酸素、硫黄又は式 = N Q の基を示し、Q は、水素、ヒドロキシル、C₁ - 6 アルキル又はフェニルであり ;

機能的部分は、検出可能部分、酵素活性部分、アフィニティタグ、ハブテン、免疫原性担体、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド、生物活性部分、リボソーム、ポリマー部分、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、炭水化物、DNA 及び RNA から選択される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 9 】

【 図 1 】 図 1 は、実施例 1 に記載されるプロトコルの結果を示し、該実施例では、タンパク質 / ビオチン - P E G - プロモレイミド付加物及び未修飾のモデルタンパク質溶液 (I n) を、ニュートラアビジン被覆したアガロースビーズに添加し、遠心分離し、フロースルー (F T) 収集し、ビーズを P B S で洗浄し、両方の洗浄画分を収集し (W 1 及び W 2)、タンパク質を、β - メルカプトエタノールを含む P B S 中でインキュベートすることによりビーズから放出させ、サンプルを遠心分離し、切断されたタンパク質を含む溶解液 (E 1) を収集した。

【 図 2 】 図 2 は、L C - M S (y 軸 = シグナル % ; x 軸 = 時間 / m i n) によって測定される、参考例 1 1 6 に記載されるプロトコルに従った、ハロマレイミドからのソマトスタチン - マレイミド付加物の生成を示す。左上 : ジクロロマレイミド (丸)、ジプロモマレイミド (四角) 及びジヨードマレイミド (三角) からのソマトスタチン付加物の生成。右上 : モノプロモマレイミド (丸)、N - メチルモノプロモマレイミド (四角) 及び N - メチルジプロモマレイミド (三角) からのソマトスタチン付加物の生成。左下 : N - フルオレセイン - ジプロモマレイミド (丸)、N - ビオチン - ジプロモマレイミド (四角)、N - P E G 5 0 0 0 - ジプロモマレイミド (三角)、N - P E G - 5 0 0 0 - ジチオフェノールマレイミド (菱形) 及び N - P E G 3 0 0 - ジプロモマレイミド (卵型) からのソマトスタチン付加物の生成。

【 図 3 】 図 3 は、L C - M S (y 軸 = シグナル % ; x 軸 = 時間 / m i n) によって測定される、参考例 1 1 6 に記載されるプロトコルに従った、ジチオマレイミドからのソマトスタチン - マレイミド付加物の生成を示す。左上 : 当量 (丸)、5 当量 (四角) 及び 1 0 当量 (三角) における、ジ - 2 - メルカプトエタノールマレイミドからのソマトスタチン付加物の生成。右上 : 1 当量 (丸)、5 当量 (四角) 及び 1 0 当量 (三角) における、ジシ

10

20

30

40

50

ステインマレイミドからのソマトスタチン付加物の生成。左下：1当量（丸）、5当量（四角）及び10当量（三角）における、ジチオフェノールマレイミドからのソマトスタチン付加物の生成。右下：1当量（丸）、5当量（四角）及び10当量（三角）における、ジ-2-メルカプトピリジンマレイミドからのソマトスタチン付加物の生成。

【図4】図4は、LC-MS（y軸=シグナル%；x軸=分（min）、時間（h）及び日（d）で示される時間）によって測定される、参考例116に記載されるプロトコルに従った、種々の還元剤によるマレイミド架橋ソマトスタチンの切断を示す。左上：DTTによる総修飾ソマトスタチン-マレイミド（白丸）及び副産物の総量（黒丸）。上中：2-メルカプトエタノールによる総修飾ソマトスタチン-マレイミド（白丸）及び副産物の総量（黒丸）。右上：GSHによる総修飾ソマトスタチン-マレイミド（白丸）及び副産物の総量（黒丸）。左下：TCEPによる総修飾ソマトスタチン-マレイミド（白丸）及び副産物の総量（黒丸）。右下：1,2-エタンジチオールによる総修飾ソマトスタチン-マレイミド（白丸）及び副産物の総量（黒丸）。

10

【図5】図5は、LC-MS（y軸=シグナル%；x軸=時間/min）によって測定される、参考例116に記載されるプロトコルに従った、種々の量のDTT及び2-メルカプトエタノールによるマレイミド架橋ソマトスタチンの切断を示す。左：50当量（白丸）、20当量（白三角）及び10当量（白四角）のDTTによるソマトスタチンの再生。右：50当量（白丸）、20当量（白三角）及び10当量（白四角）の2-メルカプトエタノールによるソマトスタチンの再生、並びに50当量（黒丸）、20当量（黒三角）及び10当量（黒四角）での副産物の総量。

20

【図6】図6は、LC-MS（y軸=シグナル%；x軸=時間/min）によって測定される、参考例116に記載されるプロトコルに従った、架橋ソマトスタチンの触媒された切断を示す。図に示すのは、2-メルカプトエタノール（白丸）、2-メルカプトエタノールと共にNaI（白四角）、及び2-メルカプトエタノールと共にベンゼンセレノール（白三角）による、ソマトスタチンの再生、並びに2-メルカプトエタノール（黒丸）、2-メルカプトエタノールと共にNaI（黒四角）、及び2-メルカプトエタノールと共にベンゼンセレノール（黒三角）を使用したときの、総副産物である。

【図7】図7は、LC-MS（y軸=シグナル%；x軸=分（min）、時間（h）及び日（d）で示される時間）によって測定される、参考例116に記載されるプロトコルに従った、2-メルカプトエタノールによるN-官能化マレイミド架橋ソマトスタチンの切断を示す。左上：N-メチルマレイミドソマトスタチン付加物の切断により、ソマトスタチン（白丸）及び総副産物（黒丸）が生じる。上中：N-ピオチンマレイミドソマトスタチン付加物の切断により、ソマトスタチン（白丸）及び総副産物（黒丸）が生じる。右上：N-フルオレseinマレイミドソマトスタチン付加物の切断により、ソマトスタチン（白丸）及び総副産物（黒丸）が生じる。左下：N-PEG 5000マレイミドソマトスタチン付加物の切断により、ソマトスタチン（白丸）及び総副産物（黒丸）が生じる。下中：N-PEG 300マレイミドソマトスタチン付加物の切断により、ソマトスタチン（白丸）及び総副産物（黒丸）が生じる。

30

【図8】図8は、LC-MS（y軸=シグナル%；x軸=時間/hours）によって測定される、参考例116に記載されるプロトコルに従った、モノプロモマレイミドとソマトスタチンとのジ付加生成物の切断を示す。左上：2-メルカプトエタノールを使用した、ソマトスタチン-マレイミド（白丸）、ソマトスタチン-ビス-マレイミド（黒丸）及び総副産物（三角）。右上：DTTを使用した、ソマトスタチン-マレイミド（白丸）、ソマトスタチン-ビス-マレイミド（黒丸）及び総副産物（三角）。左下：TCEPを使用した、ソマトスタチン-マレイミド（白丸）、ソマトスタチン-ビス-マレイミド（黒丸）及び総副産物（三角）。

40

【図9】図9は、LC-MS（y軸=シグナル%；x軸=時間/min）によって測定される、参考例116に記載されるプロトコルに従った、種々の量のジチオマレイミドによるソマトスタチンの比較上のinsitu架橋を示す。本図は、3:5の比率のTCEP開始剤及びチオフェノール（丸）、5:10の比率のセレノール開始剤とチオフェノール

50

ル（四角）、及び 10 : 20 の比率のセレノール開始剤と 2 - メルカプトエタノール（三角）、を使用した架橋ソマトスタチンの生成を示す。

【図 10】図 10 は、LC - MS（y 軸 = シグナル % ; x 軸 = 時間 / min）によって測定される、参考例 116 に記載されるプロトコルに従った、ソマトスタチンの in situ PEG 化を示す。本図は、5 当量の N - PEG 5000 - ジチオフェノールマレイミド及び 3 当量の TCEP を使用した（丸）、並びに 10 当量の N - PEG 5000 - ジチオフェノールマレイミド及び 5 当量のベンゼンセレノールを使用した（四角）、PEG 化ソマトスタチンの生成を示す。

【図 11】図 11 は、参考例 116 に記載されたパッチクランプアッセイで得られたホールセルパッチクランプ電流記録を示す。本図は、SSTR2 を発現する GIRK 1 / 2 A 株化細胞から記録された、代表的な出力波形を示す。細胞を - 60 mV でクランプし、20 μ M のソマトスタチン又はその誘導体を 20 秒間適用した。左上：ソマトスタチン（示された軸において、垂直線は 1000 pA を示し、水平線は 20 ms を示す）。右上：ジプロモマレイミド架橋ソマトスタチン（示された軸において、垂直線は 1000 pA を示し、水平線は 20 ms を示す）。左下：フルオレセインジプロモマレイミド架橋ソマトスタチン（示された軸において、垂直線は 1000 pA を示し、水平線は 20 ms を示す）。右下：PEG 化ジプロモマレイミド架橋ソマトスタチン（示された軸において、垂直線は 1000 pA を示し、水平線は 20 ms を示す）。

【図 12】図 12 は、参考例 116 に記載されたパッチクランプアッセイにおける、ソマトスタチン及びそのアナログにより活性化された電流の振幅を示す。x 軸は、電流の振幅を pA / pF で示す。上の 2 本のバーはフルオレセインジプロモマレイミド架橋ソマトスタチンに由来し（黒のバーは、百日咳毒素による 24 時間にわたる細胞の前処理後であり；灰色のバーは前処理なしである）、次の 2 本のバーは PEG 化ジプロモマレイミド架橋ソマトスタチンに由来し（黒のバーは、百日咳毒素による 24 時間にわたる細胞の前処理後であり；灰色のバーは前処理なしである）、次の 3 本のバーはジプロモマレイミド架橋ソマトスタチンに由来し（白のバーは、GIRK 阻害剤 Tertiapin Q（100 nM）との 5 分間のプレインキュベーション後であり；黒のバーは、百日咳毒素による 24 時間にわたる細胞の前処理後であり；灰色のバーは前処理なしである）、下の 2 本のバーはソマトスタチンに由来する（黒のバーは、百日咳毒素による 24 時間にわたる細胞の前処理後であり；灰色のバーは前処理なしである）。

【発明を実施するための形態】

【0030】

本明細書中で使用する場合、用語「固体基材」とは、標準的条件（約 20 の温度及び約 100 kPa の圧力）下で固体であり、リンカーを任意選択で介して機能的部分と相互作用して、固体基材及び機能的部分の両方を含む生成物を形成できる、物体を意味する。本発明において使用される固体基材は、微視的寸法でも巨視的寸法でもよいが、典型的には、0.001 μ m 以上、好ましくは 0.1 μ m、最も好ましくは 1 μ m である少なくとも 1 つの寸法を有する。本発明の固体基材は、任意の形状を有することができ、これには、少なくとも 1 つの実質的に平らな表面を有する基材（例えば、「スライド」、「メンブラン」又は「チップ」状の基材）及び曲面を有する基材（例えば、ビーズ状の基材及びチューブ状の基材）が挙げられる。

【0031】

当業者であれば、当該分野で慣用的に使用される固体基材の種々の材料、形状及びサイズに精通しているであろう。典型的には、本発明において使用される固体基材は、生体分子又は生物学的に興味深い他の分子を固定化するのに適切な固体基材であり、従って、かかる目的に適していることが当該分野で公知の任意の固体基材が挙げられる。かかる材料の供給業者には、Pierce、Invitrogen 及び Sigma Aldrich が挙げられる。

【0032】

本発明の固体基材としては、ナノチューブ、金属基材、金属酸化物基材、ガラス基材、

シリコン基材、シリカ基材、マイカ基材及びポリマー基材が挙げられる。好ましい金属基材としては、金、銀、銅、白金、鉄及び／又はニッケル基材が挙げられ、金基材が特に好ましい。

【0033】

ポリマー基材には、天然ポリマー及び合成ポリマーが含まれる。明らかに、「ポリマー基材」は、複数のポリマー分子を含む基材である。好ましいポリマー基材としては、ポリスチレン基材、ポリプロピレン基材、ポリカーボネート基材、シクロ－オレフィンポリマー基材、架橋ポリエチレングリコール基材、多糖基材（例えば、アガロース基材）及びアクリルアミドベースの樹脂基材（例えば、ポリアクリルアミド基材及びポリアクリルアミン／アズラクトンコポリマー基材）が挙げられる。好ましい基材としては、金基材、ガラス基材、シリコン基材、シリカ基材及びポリマー基材、特に、本明細書中で特定したポリマー基材が挙げられる。特に好ましい基材は、ガラス基材、シリコン基材、シリカ基材、ポリスチレン基材、架橋ポリエチレングリコール基材、多糖基材（例えば、アガロース基材）及びアクリルアミドベースの樹脂基材である。別の好ましい実施形態では、固体基材は、ナノチューブ、特にカーボンナノチューブである。

10

【0034】

本明細書中で使用する場合、用語「ナノチューブ」とは、チューブの幅がナノメートルオーダー（典型的には最大10ナノメートル）である、チューブ状の構造を意味する。ナノチューブは、カーボンナノチューブ又は無機ナノチューブであり得る。カーボンナノチューブは、単層ナノチューブ（SWNT）又は多層ナノチューブ（MWNT）であり得る。無機ナノチューブは、シリコン、銅、ビスマス、金属酸化物（例えば、二酸化チタン、二酸化バナジウム及び二酸化マンガン）、硫化物（例えば、二硫化タングステン及び二硫化モリブデン）、窒化物（例えば、窒化ホウ素及び窒化ガリウム）及びセレン化物（例えば、セレン化タングステン及びセレン化モリブデン）などの、炭素以外の元素で製造されたナノチューブである。好ましくは、ナノチューブはカーボンナノチューブである。

20

【0035】

本発明の1つの好ましい実施形態において、固体基材は、移植可能なデバイス（即ち、ヒト又は動物、好ましくはヒトの身体への移植に適したデバイス）である。好ましい移植可能なデバイスには、プロテゼ、移植可能な薬物送達デバイス及びステントが挙げられ、ステントが特に好ましい。

30

【0036】

本発明の生成物において、基材は、式（I）の部分に連結され、従って明らかに、固体基材は、そこに固定化された物質に対し強い（例えば共有）結合を形成することが必要である。従って、固体基材は典型的に、反応性基を含む。特定の固体基材は、その表面の活性化を実施する必要性のない、適切な反応性基を含み得る（例えば、ポリマー基材内の個々のポリマー鎖の末端基が、反応性基を構成し得る）。或いは、反応性基は、固体基材の化学的活性化によって提供され得る。

【0037】

固体基材に表面活性を付与する固体基材の化学的活性化は、当該分野で周知である。例えば、少なくとも1個のアルコキシシリコン結合を有するシラン化合物が、金属酸化物基材、ガラス基材、マイカ基材、シリコン基材及びシリカ基材を活性化するために一般に使用される。これらの化合物は、固体表面上の遊離のヒドロキシル基と反応して、強力なシリコン－酸素結合の形成を生じると考えられる。当然、シラン化合物は、それ自体が1個以上のさらなる機能的部分を保有し、目的の特定の標的分子と反応するように適合されたリンカー基を保有し得る。かかるリンカー基を保有するチオール化合物又はチオエーテル化合物は、強力な金－硫黄結合の形成によって金表面を活性化するために使用されることが多い。明らかに、ポリマー基材は、反応性基を有するように特に設計されてもよく（例えば、モノマーの賢明な選択によって）、或いは、重合完了後に活性化されてもよい。これらの技術は全て完全に慣用であり、標的分子上の事実上任意の一般的官能基（例えば、アミン、カルボキシル、チオール、アルデヒド及び活性水素官能基）と反応できる反応性

40

50

基を有する活性化された固体基材が現在市販されている。

【0038】

疑義を回避するため、用語「固体基材」には、本明細書中で使用する場合、元々反応性基を含む固体基材が含まれ、化学的に活性化された固体基材（即ち、上記表面活性化技術によって提供されるような反応性基を保有する固体基材）も含まれる。例えば、固体基材は、アフィニティタグ（又はパートナー）（例えば、ビオチン又は（ストレプト）アビジンタグ）を有する基材であり得る。

【0039】

当業者が理解するように、そこに固定化された物質に共有結合する能力を固体基材に付与するのに、固体基材の化学的活性化が必要な場合、これは、固体基材を1, 2-ジカルボニルエテン架橋試薬に結合させるための少なくとも2つの戦略の可能性を開く。第一の戦略において、特定の反応性基を保有する化学的に活性化された固体基材（例えば、市販の化学的に活性化された基材）が提供され得、架橋試薬上の対応する反応性基と反応され得る。代替の可能性では、架橋試薬は、基材の事前の活性化なしに、固体基材に直接結合され得る。明らかに、これは、標的固体基材を活性化できる反応性基を保有するように架橋試薬を設計することによって達成され得る。例えば、固体基材がガラス基材である場合、架橋試薬はアルコキシシラン基を保有し得る。これらの状況において、固体基材の活性化及び架橋基の付加は、同時に起こる。

10

【0040】

固体基材を式（I）の部分に連結するための別の有用な技術は、相補的なアフィニティタグパートナーを介したものであり、即ち、ここで、基材及び式（I）の部分のうち一方がアフィニティタグを含み、もう一方が関連するアフィニティパートナーを含む。ここで、「アフィニティタグ」及び「アフィニティパートナー」は本明細書中に記載するとおりである。この戦略は、固体基材を式（I）の部分に連結するための、代替的な、典型的には非共有結合性の手段を提供する。例えば、ビオチン/（ストレプト）アビジン対は、2つの種を結合させるための基礎として使用され得る：固体基材及び式（I）の部分のうち一方がビオチン基を含み、固体基材及び式（I）の部分のうちもう一方が（ストレプト）アビジン基を含む。

20

【0041】

本明細書中で使用する場合、用語「機能的部分」とは、本発明の生成物の一部を形成する部分であって、検出可能部分、酵素活性部分、アフィニティタグ、ハプテン、免疫原性担体、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド又はリガンド候補、生物活性部分、リボソーム、ポリマー部分、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、炭水化物、DNA及びRNAのうちの1つであるものを意味する。

30

【0042】

当業者が容易に理解するように、生成物内（例えば、固体基材及びそれに結合したリンカー基を含む生成物内）に含まれる機能的部分は、対応する「機能的化合物」をそれに結合させることによって得られ得る。機能的化合物が固体基材上の反応性基又は架橋試薬に結合する場合、新たな結合が二次的化合物に形成できるように、その機能的化合物中のいずれかの場所の結合が破壊される必要がある。かかるプロセスの例としては、それが固体基材又はクロスリンカーに結合した機能的部分になる場合には機能的化合物からの脱離基の喪失、機能的化合物が水素原子含有求核基（例えば、-OH又は-SH基）を介して反応する場合にはプロトンの喪失、又は機能的化合物中の二重結合の単結合への変換、が挙げられる。従って、当業者であれば、例えば「タンパク質」である機能的部分が、対応するタンパク質化合物と比較した内部結合の喪失（例えば、-OH、-SH又は-NH₂部分からのプロトンの喪失）を伴った、固体基材上の反応性基又はクロスリンカー試薬へのタンパク質化合物の結合によって形成される部分を意味することを理解するであろう。

40

【0043】

機能的部分は典型的に、そのネイティブな形態（即ち、バイオコンジュゲートの一部でないとき）で別個の生物学的重要性を有する部分である。好ましくは、本発明で使用され

50

る任意の機能的部分は、少なくとも200、より好ましくは少なくとも500、最も好ましくは少なくとも1000の相対分子量を有する。好ましくは、本明細書中に記載される機能的部分は生体分子である。

【0044】

本明細書中で使用する場合、用語「検出可能部分」とは、試験サンプルにおいて検出可能なシグナルを生成し得る部分を意味する。明らかに、検出可能部分は、対応する「検出可能化合物」に由来する、本発明の生成物においてクロスリンカーを介して別の物質に連結された場合に検出可能なシグナルを生成する能力を保持した部分であると理解され得る。検出可能部分はまた、「タグ」、「プローブ」及び「標識」としても当該分野で一般に公知である。検出可能部分の例としては、発色性部分、蛍光性部分、放射性部分及び電気化学的に活性な部分が挙げられる。本発明では、好ましい検出可能部分は、発色性部分及び蛍光性部分である。蛍光性部分が最も好ましい。

10

【0045】

発色性部分は着色する部分であり、本発明の生成物中に組み込まれたときに着色するか、或いは本発明の生成物中に組み込まれ、この生成物が次に二次的標的種と相互作用したとき（例えば、本発明の生成物がタンパク質を含む場合、これが次に別の標的分子と相互作用する）に着色するものである。

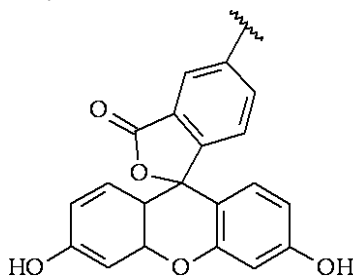
【0046】

典型的には、用語「発色性部分」とは、少なくとも2つのエネルギー状態（比較的低いエネルギーの基底状態と、放射線スペクトルの特定の領域からの光エネルギーの吸収によって上昇し得る励起状態）で存在し得る、会合した（associated）原子の基をいう。しばしば、会合した原子の基は、非局在化電子を含む。本発明での使用に適した発色性部分には、 π 系及び金属錯体を含むコンジュゲート化部分が挙げられる。例としては、ポルフィリン、ポリエン、ポリイン及びポリアリールが挙げられる。好ましい発色性部分は以下である：

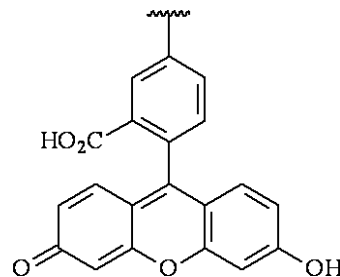
20

【0047】

【化5】



及び



30

【0048】

蛍光性部分は、蛍光性の化学的部分であるフルオロフォアを含む部分である。本発明の生成物中に蛍光性部分として一般に組み込まれる蛍光性化合物の例には、以下が挙げられる：

【0049】

Invitrogenから入手可能なAlexa Fluor（登録商標）色素系；
シアニン及びメロシアニン；
Invitrogenから入手可能なBODIPY（ハウ素 - ジピロメテン）色素系；
ATTO - TEC GmbHが製造するATTO色素系；
フルオレセイン及びその誘導体；
ローダミン及びその誘導体；
ナフタレン誘導体（例えば、そのダンシル誘導体及びプロダン誘導体）；
ピリジルオキサゾール、ニトロベンゾオキサジアゾール及びベンゾオキサジアゾール誘導体；
クマリン及びその誘導体；
ピレン誘導体；並びに

40

50

Invitrogenから入手可能な、オレゴングリーン、エオシン、テキサスレッド、カスケードブルー及びナイルレッド。

【0050】

本発明での使用に好ましい蛍光性部分としては、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、スルホローダミン101酸塩化物(テキサスレッド)及びダンシルが挙げられる。フルオレセイン及びダンシルが特に好ましい。

【0051】

放射性部分は、放射性核種を含む部分である。放射性核種の例としては、ヨウ素-131、ヨウ素-125、ビスマス-212、イットリウム-90、イットリウム-88、テクネチウム-99m、銅-67、レニウム-188、レニウム-186、ガリウム-66、ガリウム-67、インジウム-111、インジウム-114m、インジウム-114、ホウ素-10、トリチウム(水素-3)、炭素-11、炭素-14、硫黄-35及びフッ素-18が挙げられる。

10

【0052】

1実施形態において、放射性部分は、放射性核種単独からなり得る。別の実施形態において、放射性核種は、例えば、リンカー基(例えばチオール基含有リンカー)に直接共有結合することにより、又はキレート剤と配位錯体を形成することにより、より大きな放射性部分に組み込まれ得る。当該分野で公知の適切なキレート剤としては、DTPA(ジエチレントリアミン-五酢酸無水物)、NOTA(1,4,7-トリアザシクロノナン-N,N',N''-三酢酸)、DOTA(1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸)、TETA(1,4,8,11-テトラアザシクロテトラ-デカン-N,N',N'',N'''-四酢酸)、DTTA(N¹-(p-イソチオシアナトベンジル)-ジエチレン-トリアミン-N¹,N²,N³-四酢酸)及びDFA(N'-[5-[5-[5-[5-アセチルヒドロキシアミノ)ペンチル]アミノ]-1,4-ジオキソブチル]ヒドロキシアミノ]ペンチル]-N-(5-アミノペンチル)-N-ヒドロキシブタンジアミド)が挙げられる。

20

【0053】

電気化学的に活性な部分は、電流測定法又はボルタメトリ法などの電気化学的方法において、電気化学的シグナルを生成し得る基を含む部分である。典型的には、電気化学的に活性な部分は、少なくとも2つの別個の酸化還元状態で存在することができる。

30

【0054】

慣用的に入手可能な非常に多数の検出可能化合物から、本発明に従う使用に適するであろう検出可能化合物を当業者が容易に選択できることは当然である。従って、本発明の方法論は、検出可能部分を含む生成物を産生するために使用され得、この生成物は次いで、かかる種の検出を含む任意の慣用の生化学的技術で使用され得る。例えば、1つのかかる技術では、検出可能部分は、FRET分析法での使用に適したドナー発色団/アクセプター発色団対の一方のメンバーであり得る。

【0055】

本明細書中で使用する場合、用語「酵素活性部分」とは、酵素、酵素基質又は酵素の補因子を意味する。好ましくは、酵素活性部分は酵素である。

40

【0056】

本明細書中で使用する場合、用語「アフィニティタグ」とは、アフィニティタグとアフィニティパートナーの両方が単一のサンプル中に存在する場合に、第二の化学的部分である「アフィニティパートナー」と相互作用し得る化学的部分を意味する。典型的には、アフィニティタグは、アフィニティパートナーとの特異的結合相互作用を形成することができる。特異的結合相互作用は、サンプル中に存在するアフィニティパートナーと任意の他の化学物質との間で生じ得る任意の結合相互作用よりも強い結合相互作用である。特異的結合相互作用は、例えば、酵素とその基質との間で生じ得る。

【0057】

アフィニティタグは、タンパク質などの生体分子の検出又は精製などの適用において有

50

用であり得る。かかる適用において、固体基材及びアフィニティタグを含む生成物は、アフィニティタグとそのアフィニティパートナーとの間での特異的結合相互作用を利用することによって、生体分子及び対応するアフィニティパートナーを含むバイオコンジュゲートを検出又は精製するために使用され得る。

【0058】

生化学で特に広く使用される1つのアフィニティタグ/アフィニティパートナー対は、ビオチン/(ストレプト)アビジン対である。アビジン及びストレプトアビジンは、ビオチン(5-[(3aS, 4S, 6aR) - 2 - オキソヘキサヒドロ - 1H - チエノ[3, 4-d]イミダゾール - 4 - イル]ペンタン酸)由来のアフィニティタグに対し高い親和性及び特異性で結合するアフィニティパートナーとして使用され得るタンパク質である。当該分野で一般に使用される他のアフィニティタグ/アフィニティパートナー対としては、アミラーゼ/マルトース結合タンパク質、グルタチオン/グルタチオン-S-トランスフェラーゼ及び金属(例えば、ニッケル又はコバルト)/ポリ(His)が挙げられる。当業者であれば、各対のいずれかのメンバーが「アフィニティタグ」として機能し得、対のもう一方のメンバーが「アフィニティパートナー」として機能することを理解するであろう。従って、用語「アフィニティタグ」及び「アフィニティパートナー」は相互交換可能である。

10

【0059】

当業者は、生化学、及び特にバイオコンジュゲート技術の背景におけるアフィニティタグ/アフィニティパートナー相互作用の慣用的な使用を認識しているであろう。従って当業者には、本発明に従う使用のためにアフィニティタグを選択するにあたり何らの困難もないであろう。従って、本発明の方法論は、アフィニティタグ/アフィニティパートナー相互作用を使用する慣用的な生化学的技術での使用に適応させた生成物を産生するために使用され得る。本発明の生成物において使用するのに特に好ましいアフィニティタグは、アビジン、ストレプトアビジン、アミラーゼ及びグルタチオンである。

20

【0060】

本明細書中で使用する場合、用語、用語「ハプテン」とは、そのネイティブ形態では *in vivo* の免疫応答を刺激できないが、免疫原性担体分子に連結されると *in vivo* の免疫応答を刺激できる、エピトープを含む部分を意味する。典型的には、ハプテンは、比較的低い分子量(例えば1000未満の分子量)の非タンパク質性部分である。エピトープは、免疫系によって認識され、免疫応答を刺激する、分子又は部分の一部である。

30

【0061】

本明細書中で使用する場合、用語「免疫原性担体」とは、*in vivo* で投与されたときに免疫応答を促進できる、ハプテンにカップリングされ得る抗原を意味する。免疫原性担体の例としては、タンパク質、リボソーム、合成又は天然のポリマー部分(例えば、デキストラン、アガロース、ポリリジン及びポリグルタミン酸部分)、及び合成により設計された有機部分が挙げられる。一般に使用されるタンパク質免疫原性担体としては、キーホールリンペットヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、アミノエチル化又はカチオン化されたウシ血清アルブミン、サイログロブリン、オボアルブミン及び種々のトキシイドタンパク質(例えば、破傷風トキシイド及びジフテリヤトキシイド)が挙げられる。合成により設計された周知の有機分子担体には、多抗原性ペプチド(MAP)が挙げられる。

40

【0062】

生化学の当業者が認識するように、ハプテン-免疫原性担体コンジュゲートは、例えば免疫学及びプロテオミクスにおいて広く使用される。当業者は、本発明の方法論が、ハプテン及び免疫原性担体を含むコンジュゲートを産生するために容易に適用でき、次いでこのコンジュゲートが固体基材に固定化されることを、認識するであろう。

【0063】

本明細書中で使用する場合、用語「抗体又は抗体断片」とは、特異的抗原上のエピトープを介してその抗原に結合可能なタンパク質、又はかかるタンパク質の断片を意味する。

50

抗体には、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体が含まれる。モノクローナル抗体が好ましい。

【0064】

本明細書中で使用する場合、用語「抗原」とは、*in vivo*で投与されたときに免疫応答を刺激でき、その免疫応答の間に産生される抗体に結合できる物質を意味する。

【0065】

本明細書中で使用する場合、用語「リガンド」とは、生体分子の機能的特性を修飾するような方法で生体分子（例えばタンパク質）と相互作用できる部分を意味する。典型的には、リガンドは、標的タンパク質上の部位に結合する部分である。リガンドと生体分子との間の相互作用は、典型的には非共有結合である。例えば、相互作用は、イオン結合、水素結合又はファンデルワールス相互作用を介した相互作用であり得る。しかしながら、ある種のリガンドについては生体分子と共有結合を形成する可能性もある。しばしば、リガンドは、相互作用したときに生体分子の化学的コンフォメーションを変更することができる。

10

【0066】

タンパク質と相互作用することができるリガンドの例としては、基質（例えば、酵素により触媒される化学反応に参加することにより、結合に際し酵素によって作用される）、阻害剤（結合に際しタンパク質活性を阻害する）、活性化因子（結合に際しタンパク質の活性を増加させる）及び神経伝達物質が挙げられる。

【0067】

本明細書中で使用する場合、リガンド候補は、特定の生体分子に対するリガンドであると疑われる部分である。リガンド候補は、スクリーニング技術を実施するために、生化学において慣用的に使用される。典型的には、かかる技術では、複数のリガンド候補が提供され、次いで、それらが目的の生体分子（例えばタンパク質）と相互作用できるか否かを立証するためにアッセイされる。当業者が理解するように、特定のリガンド候補は、リガンドを構成する場合もあるし（生体分子と相互作用する場合）、リガンドを構成しない場合もある（生体分子と相互作用することが見出されない場合）。典型的には、特定の生体分子に対してアッセイされる複数のリガンド候補は、特定の共通の構造的特徴を共有するが、それらの構造の少なくとも1つの局面において互いに異なるように、意図的に選択される。

20

30

【0068】

典型的には、リガンド候補は、低分子（例えば、1000未満、又は500未満の分子量を有する分子）である。好ましい実施形態において、複数のリガンド候補は、同時にスクリーニングできるように、アレイ（即ち、単一のアレイ構造）に整列された本発明の複数の生成物上に提示される。かかるアレイシステムは、「化合物マイクロアレイ（chemical compound microarray）」又は「低分子アレイ（small molecule array）」として当該分野で一般に知られている。かかるシステムにおいて、複数のリガンド候補が、例えば、いわゆる「多様性指向型合成（diversity-oriented synthesis）」（DOS）アプローチを使用して、選択され得る。アッセイ技術のこの分野における、固定化されたりリガンド候補の適用の包括的な総説は、Uttamchandani et al. (Current Opinion in Chemical Biology 2005, 9: 4-13)（その内容は、本明細書中でその全体が参照により組み込まれる）中に見出すことができる。

40

【0069】

本明細書中で使用する場合、用語「生物活性部分」とは、*in vivo*で投与されたときに生化学的応答を誘導することができる部分を意味する。

【0070】

生物活性部分は薬物であり得る。薬物には、細胞傷害剤（例えば、ドキソルビシン、メトトレキサート及びそれらの誘導体）、*in vivo*で代謝されて細胞傷害剤を生じ得

50

る細胞毒前駆体、抗悪性腫瘍剤、降圧薬、心保護剤、抗不整脈薬、ACE阻害剤、抗炎症薬、利尿薬、筋弛緩薬、局所麻酔薬、ホルモン、コレステロール降下薬、抗凝固薬、抗うつ薬、精神安定薬、神経遮断薬、鎮痛薬（例えば、麻薬性鎮痛薬又は解熱鎮痛薬）、抗ウイルス薬、抗菌薬、抗真菌薬、静菌薬（*bacteriostat*）、CNS活性薬剤、抗痙攣薬、抗不安薬、制酸薬、麻薬、抗生物質、呼吸器薬剤（*respiratory agent*）、抗ヒスタミン剤、免疫抑制剤、免疫活性化剤（*immunoactivating agent*）、栄養添加物、鎮咳薬、診断剤、催吐薬及び制吐薬、炭水化物、グリコサミノグリカン、糖タンパク質及び多糖、脂質、例えば、ホスファチジル-エタノールアミン、ホスファチジルセリン（*phosphatidylserine*）及びその誘導体、スフィンゴシン、ステロイド、ビタミン、抗生物質（ランチビオティク剤、静菌（*bacteriostatic*）剤及び殺菌剤を含む）、抗真菌薬、駆虫剤、及び単細胞病原体を含む感染性因子に対する他の有効な薬剤、低分子エフェクター分子、例えば、ノルアドレナリン、 α アドレナリンレセプターリガンド、ドパミンレセプターリガンド、ヒスタミンレセプターリガンド、GABA/ベンゾジアゼピンレセプターリガンド、セロトニンレセプターリガンド、ロイコトリエン及びトリヨードサイロニン（*triiodothyronine*）、並びにそれらの誘導体が含まれる。

10

【0071】

本発明の好ましい実施形態において、生物活性部分は薬物である。この実施形態において、固体基材は典型的には、ステントなどの移植可能なデバイスである。

20

【0072】

本明細書中で使用する場合、用語「リポソーム」とは、両親媒性の特性を有するリン脂質二重層からなる構造を意味する。本発明に従う使用に適したリポソームには、単層小胞及び多重層小胞が挙げられる。

【0073】

本明細書中で使用する場合、用語「ポリマー部分」とは、対応する単一のポリマー分子から誘導される、単一のポリマー鎖（分枝又は非分枝）を意味する。ポリマー部分は、天然ポリマーでも合成ポリマーでもよい。しかし典型的には、ポリマー分子はポリヌクレオチドではない。当該分野で周知のように、ポリマー部分は、固体基材の表面特性を修飾するために使用され得る。例えば、固体基材が *in vivo* で投与される場合（例えば、ステントのような移植可能なデバイスとして）、ポリマー部分は、生じる生物学的相互作用（例えば、生物学的安定性、血液適合性、及び異物に対して免疫系によって引き起こされる免疫応答）を修飾できる。

30

【0074】

従って当業者であれば、固体基材及びポリマー部分を含む生成物を調製するために本発明の方法論が使用できることを認識するであろう。当業者であれば、当該分野で慣用的に使用されるポリマー部分に基づいて、本発明に従う使用に適したポリマー部分を容易に選択できるであろう。明らかに、ポリマー部分の性質は、本発明の生成物の意図した使用に依存するであろう。本発明に従う使用のための例示的なポリマー部分としては、多糖、ポリエーテル、ポリアミノ酸（例えばポリリジン）、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ（メタ）アクリル酸及びその誘導体、ポリウレタン並びにポリホスファゼンが挙げられる。典型的には、かかるポリマーは、少なくとも10個のモノマー単位を含む。従って、例えば、多糖は、少なくとも10個の単糖単位を典型的に含む。

40

【0075】

2つの特に好ましいポリマー分子は、デキストラン及びポリエチレングリコール（「PEG」）、並びにこれらの分子の誘導体（例えば、モノメトキシポリエチレングリコール、「mPEG」）である。好ましくは、PEG又はその誘導体は、20,000未満の分子量を有する。好ましくは、デキストラン又はその誘導体は、10,000~500,000の分子量を有する。

【0076】

本明細書中で使用する場合、用語「アミノ酸」とは、アミン官能基及びカルボキシル官

50

能基の両方を含む部分を意味する。しかしながら、好ましいアミノ酸は α -アミノ酸である。好ましくは、アミノ酸は、タンパク新生アミノ酸、即ち、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、プロリン、フェニルアラニン、ピロリジン、セレノシステイン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン及びバリンから選択されるアミノ酸である。しかしながら、アミノ酸は、非タンパク新生アミノ酸であってもよい。非タンパク新生アミノ酸の例としては、ランチオニン、2-アミノイソ酪酸、デヒドロアラニン、 γ -アミノ酪酸、オルニチン、シトルリン、カナバリン及びミモシンが挙げられる。本発明に従う特に好ましいアミノ酸は、システインである。

【0077】

本明細書中で使用する場合、用語「ペプチド」及び「タンパク質」とは、アミノ酸残基からなるポリマー部分を意味する。当業者が認識するように、用語「ペプチド」は典型的に、比較的短い長さのポリマーを示すために当該分野で使用され、用語「タンパク質」は典型的に、比較的長い長さのポリマーを示すために当該分野で使用される。本明細書中で使用する場合、ペプチドは最大50アミノ酸残基を含み、対してタンパク質は50アミノ酸より多くを含むことが慣用である。しかしながら、本出願で同定される機能的部分は、ペプチド又はタンパク質のいずれかを典型的に示し得るので、この区別は重要ではないことが理解されよう。

【0078】

本明細書中で使用する場合、用語「ポリペプチド」は、「タンパク質」と相互交換可能に使用される。

【0079】

本明細書中で使用する場合、ペプチド又はタンパク質は、任意の天然又は非天然のアミノ酸を含み得る。例えば、ペプチド又はタンパク質は、例えば天然の α -アミノ酸に対応する、 α -アミノ酸残基のみを含んでいてもよい。或いは、ペプチド又はタンパク質はさらに、1以上の化学的修飾を含んでいてもよい。例えば、化学的修飾は、その翻訳後にタンパク質に *in vivo* で生じる修飾である翻訳後修飾に対応し得、例えば、アシル化（例えば、アセチル化）、アルキル化（例えば、メチル化）、アミド化、ビオチン化、ホルミル化、グリコシル化、糖化、ヒドロキシル化、ヨウ素化、酸化、硫酸化又はリン酸化である。当業者は当然、かかる翻訳後修飾されたペプチド又はタンパク質が、依然として本発明の意味の範囲内の「ペプチド」又は「タンパク質」を構成することを認識するであろう。例えば、糖タンパク質（1以上のオリゴ糖側鎖を有するタンパク質）がタンパク質の一種であることは当該分野で十分確立されている。

【0080】

本明細書中で使用する場合、用語「細胞」は、生きた生物の単一の細胞を意味する。

【0081】

本明細書中で使用する場合、用語「炭水化物」には、単糖類及びオリゴ糖類が含まれる。典型的には、オリゴ糖は、2～9個の単糖単位を含む。従って、本明細書中で使用する場合、多糖は、炭水化物としてではなく「ポリマー部分」として分類される。しかしながら、本発明に従って使用される機能的部分は、「炭水化物」及び「多糖」のいずれかを典型的に構成するので、当業者はこの区別が重要ではないことを理解するであろう。

【0082】

本明細書中で使用する場合、用語「DNA」は、1以上のヌクレオチドから構成されるデオキシリボ核酸を意味する。DNAは、一本鎖でも二本鎖でもよい。好ましくは、DNAは1より多いヌクレオチドを含む。

【0083】

本明細書中で使用する場合、用語「RNA」は、1以上のヌクレオチドを含むリボ核酸を意味する。好ましくは、RNAは1より多いヌクレオチドを含む。

【0084】

好ましい機能的部分は、検出可能部分、酵素活性部分（好ましくは酵素）、アフィニテ

10

20

30

40

50

ィタグ、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド又はリガンド候補、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、DNA及びRNAである。特に好ましい機能的部分は、酵素活性部分（好ましくは酵素）、アフィニティタグ、抗体又は抗体断片、抗原、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、DNA及びRNAである。

【0085】

本明細書中で使用する場合、「コンジュゲート」とは、本明細書中に記載するような機能的部分及び少なくとも1つの固体基材及びさらなる機能的部分を含む分子を意味する。従って、本発明の生成物（固体基材を必ず含む）が機能的部分を含む場合、これはコンジュゲートを構成する。次いで、機能的部分及び固体基材は、本明細書中に記載されるように、クロスリンカー部分を介して互いに共有結合される。

10

【0086】

本明細書中で使用する場合、用語「基」及び「部分」は相互交換可能に使用される。

【0087】

本明細書中で使用する場合、用語「求電子性脱離基」とは、その炭素原子における求核攻撃後に求核剤により置換され得る、飽和又は不飽和の炭素原子に結合した置換基を意味する。当業者は、特定の化合物上に位置付けるため及び特定の求核剤と反応するために適した求電子性脱離基を、慣用的に選択できる。

【0088】

本明細書中で使用する場合、用語「求核剤」とは、電子対を提供することによって化学結合を形成することができる官能基又は化合物を意味する。

20

【0089】

本明細書中で使用する場合、用語「リンカー基」とは、ある化学的部分を別の化学的部分に連結することができる基を意味する。本発明に従って使用されるリンカー基の性質は、重要ではない。当業者であれば、リンカー基がコンジュゲート分子の構築に慣用的に使用されることを認識するであろう。典型的には、本発明で使用するためのリンカー基は有機基である。典型的には、かかるリンカー基は、50～1000、好ましくは100～500の分子量を有する。本発明に従う使用に適切なリンカー基の例は、当該分野の共通の一般的知識であり、「*Bioconjugate Techniques*」（Greg T. Hermanson, Academic Press Inc., 1996）（その内容は本明細書中で参照によりその全体が組み込まれる）などの標準的な参考教科書に記載されている。

30

【0090】

本明細書中で使用する場合、「反応性基」とは、第一の物質と第二の物質との間に共有結合が形成するように第二の物質上の官能基との化学反応に参加することができる、第一の物質上の官能基を意味する。反応性基には、脱離基、求核基及び本明細書中に記載される他の反応性基が挙げられる。

【0091】

本明細書中で使用する場合、用語「アルキル」には、直鎖及び分枝鎖の両方の飽和アルキル基が含まれる。好ましくは、アルキル基は、 C_{1-20} アルキル基、より好ましくは C_{1-15} 、なおより好ましくは C_{1-12} アルキル基、なおより好ましくは C_{1-6} アルキル基であり、最も好ましくは C_{1-4} アルキル基である。特に好ましいアルキル基には、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、tert-ブチル、ペンチル及びヘキシルが挙げられる。用語「アルキレン」は、しかるべく解釈されるべきである。

40

【0092】

本明細書中で使用する場合、用語「アルケニル」とは、分枝鎖でも非分枝鎖でもよい、1個以上の炭素-炭素二重結合を含む基をいう。好ましくは、アルケニル基は、 C_{2-20} アルケニル基、より好ましくは C_{2-15} アルケニル基、なおより好ましくは C_{2-12} アルケニル基、又は好ましくは C_{2-6} アルケニル基であり、最も好ましくは C_{2-4} アルケニル基である。用語「アルケニレン」は、しかるべく解釈されるべきである。

50

【0093】

本明細書中で使用する場合、用語「アルキニル」とは、分枝鎖でも非分枝鎖でもよい、1個以上の三重結合を含む炭素鎖をいう。好ましくは、アルキニル基は、 C_{2-20} アルキニル基、より好ましくは C_{2-15} アルキニル基、なおより好ましくは C_{2-12} アルキニル基、又は好ましくは C_{2-6} アルキニル基であり、最も好ましくは C_{2-4} アルキニル基である。用語「アルキニレン」は、しかるべく解釈されるべきである。

【0094】

特に指定しない場合、アルキル、アルケニル又はアルキニル基は、典型的には非置換である。しかしながら、かかる基が非置換又は置換であると示されている場合、1個以上の水素原子が、ハロゲン原子置換基で置換されていてもよい。好ましくは、置換されたアルキル、アルケニル又はアルキニル基は、1～10個の置換基、より好ましくは1～5個の置換基、なおより好ましくは1、2又は3個の置換基、最も好ましくは1又は2個の置換基、例えば1個の置換基を有する。しかし好ましくは、アルキル、アルケニル又はアルキニル基は、非置換である。

10

【0095】

アルキル、アルケニル若しくはアルキニル基、又はアルキレン、アルケニレン若しくはアルキニレン基である部分において、(a) 0、1又は2個の炭素原子は、 C_{6-10} アリーレン、5～10員のヘテロアリーレン、 C_{3-7} カルボシクリレン及び5～10員のヘテロシクリレン基から選択される基によって置換されていてもよく、かつ(b) 0、1又は2個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(O)-$ 及び $-N(C_{1-6}$ アルキル)-基から選択される基によって置換されていてもよく、合計で0、1又は2個の該炭素原子及び $-CH_2-$ 基が置換されていることが好ましく、合計で0又は1個がより好ましい。最も好ましくは、炭素原子又は $-CH_2-$ 基のいずれも置換されていない。

20

【0096】

$-CH_2-$ 基を置換するための好ましい基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 及び $-C(O)-$ 基である。炭素原子を置換するための好ましい基は、フェニレン、5～6員のヘテロアリーレン、 C_{5-6} カルボシクリレン及び5～6員のヘテロシクリレン基である。本明細書中で使用する場合、「0、1又は2個の炭素原子」への言及は、アルキル、アルケニル又はアルキニル鎖中の任意の末端又は非末端炭素原子（その炭素原子に結合した任意の水素原子を含む）を意味する。本明細書中で使用する場合、「0、1又は2個の $-CH_2-$ 基」への言及は、アルキル、アルケニル又はアルキニル鎖中の末端炭素原子に対応しない基をいう。

30

【0097】

本明細書中で使用する場合、 C_{6-10} アリール基は、6～10個の炭素原子を有する、単環式又は多環式の6～10員の芳香族炭化水素環系である。フェニルが好ましい。用語「アリーレン」は、しかるべく解釈されるべきである。

【0098】

本明細書中で使用する場合、5～10員のヘテロアリール基は、O、S及びNから選択される少なくとも1個のヘテロ原子、例えば、1、2、3又は4個のヘテロ原子を含む、単環式又は多環式の5～10員の芳香族環系（例えば、5～6員環）である。環が4個のヘテロ原子を含む場合、これらは好ましくは全てが窒素原子である。用語「ヘテロアリーレン」は、しかるべく解釈されるべきである。

40

【0099】

単環式ヘテロアリール基の例としては、チエニル、フリル、ピロリル、イミダゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、ピラゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、トリアゾリル、チアジアゾリル、オキサジアゾリル、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、トリアジニル及びテトラゾリル基が挙げられる。

【0100】

多環式ヘテロアリール基の例としては、ベンゾチエニル、ベンゾフリル、ベンズイミダ

50

ゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾイソチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾイソオキサゾリル、ベンゾトリアゾリル、インドリル、イソインドリル及びインダゾリル基が挙げられる。好ましい多環式基としては、インドリル、イソインドリル、ベンズイミダゾリル、インダゾリル、ベンゾフリル、ベンゾチエニル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾイソオキサゾリル、ベンゾチアゾリル及びベンゾイソチアゾリル基が挙げられ、より好ましくはベンズイミダゾリル、ベンゾオキサゾリル及びベンゾチアゾリルであり、最も好ましくはベンゾチアゾリルである。しかしながら、単環式ヘテロアリアル基が好ましい。

【0101】

好ましくは、ヘテロアリアル基は、5～6員のヘテロアリアル基である。特に好ましいヘテロアリアル基は、チエニル、ピロリル、イミダゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、ピラゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、トリアゾリル、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル及びピラジニル基である。より好ましい基は、チエニル、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、ピロリル及びトリアジニルであり、最も好ましくはピリジニルである。

10

【0102】

本明細書中で使用する場合、5～10員のヘテロシクリル基は、1個以上の炭素原子、例えば1、2、3又は4個の炭素原子が、N、O、S、S(O)及びS(O)₂から選択される部分で置換されている、非芳香族の、飽和又は不飽和の、単環式又は多環式のC₅ - ₁₀炭素環式環系である。好ましくは、5～10員のヘテロシクリル基は5～6員環である。用語「ヘテロシクリエン(heterocyclene)」は、しかるべく解釈されるべきである。

20

【0103】

ヘテロシクリル基の例としては、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル(thietanyl)、ピロリジニル、イミダゾリジニル、オキサゾリジニル、イソオキサゾリジニル、チアゾリジニル、イソチアゾリジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、ジチオラニル(dithiolanyl)、ジオキサラニル、ピラゾリジニル、ペリジニル、ペラジニル、ヘキサヒドロピリミジニル、メチレンジオキシフェニル、エチレンジオキシフェニル、チオモルホリニル、S-オキソ-チオモルホリニル、S,S-ジオキソ-チオモルホリニル、モルホリニル、1,3-ジオキサラニル、1,4-ジオキサラニル、トリオキサラニル(trioxolanyl)、トリチアニル(trithianyl)、イミダゾリニル、ピラニル、ピラゾリニル、チオキサラニル(thioxolanyl)、チオキソチアゾリジニル、1H-ピラゾール-5-(4H)-オニル、1,3,4-チアジアゾール-2(3H)-チオニル、オキソピロリジニル、オキソチアゾリジニル、オキソピラゾリジニル、スクシンイミド(succinimido)及びマレイミド基及び部分が挙げられる。好ましいヘテロシクリル基は、ピロリジニル、イミダゾリジニル、オキサゾリジニル、イソオキサゾリジニル、チアゾリジニル、イソチアゾリジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、ジチオラニル、ジオキサラニル、ピラゾリジニル、ペリジニル、ペラジニル、ヘキサヒドロピリミジニル、チオモルホリニル及びモルホリニル基及び部分である。より好ましいヘテロシクリル基は、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、チオモルホリニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、ペリジニル、モルホリニル及びピロリジニル基である。

30

40

【0104】

疑義を回避するため、ヘテロアリアル基及びヘテロシクリル基の上記定義は、環中に存在し得る「N」部分をいうが、熟練の化学者に明らかなように、N原子は、単結合を介して隣接する環原子のそれぞれに結合した場合、プロトン化される(又は以下に規定する置換基を有する)であろう。

【0105】

本明細書中で使用する場合、C₃ - ₇カルボシクリル基は、3～7個の炭素原子を有す

50

る、非芳香族の、飽和又は不飽和の炭化水素環である。好ましくは、 $C_3 \sim 7$ カルボシクリル基は、3～7個の炭素原子、より好ましくは5～6個の炭素原子を有する、飽和又はモノ不飽和の炭化水素環（即ち、シクロアルキル部分又はシクロアルケニル部分）である。例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル及びシクロヘキシル、並びにそれらのモノ不飽和バリエーションが挙げられる。特に好ましい炭素環式基は、シクロペンチル及びシクロヘキシルである。用語「カルボシクリレン」は、しかるべく解釈されるべきである。

【0106】

具体的には、カルボシクリル又はヘテロシクリル基中の0、1又は2個の炭素原子は、 $-C(O)-$ 基で置換され得る。本明細書中で使用する場合、置換される「炭素原子」は、それらが結合する水素原子を含むことが理解される。1又は2個の炭素原子が置換される場合、2個のかかる炭素原子が置換されることが好ましい。好ましいかかるカルボシクリル基としてはベンゾキノ基が挙げられ、好ましいかかるヘテロシクリル基としてはスクシニミド及びマレイミド基が挙げられる。

【0107】

特に指定しない場合、アリール、ヘテロアリール、カルボシクリル又はヘテロシクリル基は、典型的には非置換である。しかしながら、かかる基が非置換又は置換であると示されている場合、1個以上の水素原子が、ハロゲン原子又は $C_1 \sim 6$ アルキル、 $C_1 \sim 6$ アルコキシ、 $C_1 \sim 6$ アルキルチオール、 $-N(C_1 \sim 6 \text{アルキル})(C_1 \sim 6 \text{アルキル})$ 若しくはニトロ基で置換されていてもよい。好ましくは、置換されたアリール、ヘテロアリール、カルボシクリル又はヘテロシクリル基は、1～4個の置換、より好ましくは1～2個の置換基、最も好ましくは1個の置換基を有する。好ましくは、置換されたアリール、ヘテロアリール、カルボシクリル又はヘテロシクリル基は、2個以下のニトロ置換基を有する。好ましい置換基は、ハロゲン原子並びに $C_1 \sim 4$ アルキル及び $C_1 \sim 4$ アルコキシ基である。特に好ましい置換基はハロゲン原子である。しかし好ましくは、アリール、ヘテロアリール、カルボシクリル又はヘテロシクリル基は、非置換である。

【0108】

本明細書中で使用する場合、ハロゲン原子は、典型的にはF、Cl、Br又はI原子であり、好ましくはBr又はCl原子であり、より好ましくはBr原子である。

【0109】

本明細書中で使用する場合、 $C_1 \sim 6$ アルコキシ基は、酸素原子に結合した $C_1 \sim 6$ アルキル（例えば、 $C_1 \sim 4$ アルキル）基である。

【0110】

本明細書中で使用する場合、 $C_1 \sim 6$ アルキルチオール基は、硫黄原子に結合した $C_1 \sim 6$ アルキル（例えば、 $C_1 \sim 4$ アルキル）基である。

【0111】

本明細書中で使用する場合、5～10員のヘテロシクリルチオールは、硫黄原子に結合した5～10員の（例えば、5～6員の）ヘテロシクリル基である。

【0112】

本明細書中で使用する場合、 $C_6 \sim 10$ アリールチオールは、硫黄原子に結合した $C_6 \sim 10$ アリール（例えば、フェニル）基である。

【0113】

本明細書中で使用する場合、 $C_3 \sim 7$ カルボシクリルチオールは、硫黄原子に結合した $C_3 \sim 7$ カルボシクリル（例えば、 $C_5 \sim 6$ カルボシクリル）基である。

【0114】

本発明の生成物は、少なくとも1個の機能的部分と共に、固体基材及び式(I)の部分を必ず含む。この式(I)の部分は、さらなる機能的部分に固体基材を連結できる架橋反応性部分を構成する。

【0115】

好ましくは、X及びX'は、同じ又は異なって、それぞれ酸素、硫黄又は式 $=NH$ の基

10

20

30

40

50

を示す。より好ましくは、 X 及び X' は、同じ又は異なって、それぞれ酸素又は硫黄を示す。好ましくは、 X 及び X' の少なくとも一方は酸素を示す。最も好ましくは、 X 及び X' は共に酸素である。

【0116】

Y は、好ましくは、ハロゲン原子又はトリフレート、トシレート、メシレート、 N -ヒドロキシスクシンイミジル、 N -ヒドロキシスルホスクシンイミジル、 $C_1 - 6$ アルキルチオール、 $5 \sim 10$ 員のヘテロシクリルチオール、 $C_6 - 10$ アリールチオール、 $C_3 - 7$ カルボシクリルチオール、 $-OC(O)CH_3$ 、 $-OC(O)CF_3$ 、フェニルオキシ、 $-NR_xR_yR_z^+$ 若しくは $-PR_xR_yR_z^+$ 基である。より好ましくは、 Y は、ハロゲン原子又はトリフレート、トシレート、メシレート、 N -ヒドロキシスクシンイミジル、 N -ヒドロキシスルホスクシンイミジル、 $C_1 - 6$ アルキルチオール、 $5 \sim 10$ 員のヘテロシクリルチオール、 $C_6 - 10$ アリールチオール若しくは $C_3 - 7$ カルボシクリルチオールである。なおより好ましくは、 Y は、ハロゲン原子又は $C_1 - 6$ アルキルチオール、 $5 \sim 10$ 員のヘテロシクリルチオール、 $C_6 - 10$ アリールチオール若しくは $C_3 - 7$ カルボシクリルチオールである。最も好ましくは、 Y は、ハロゲン原子、特に臭素原子である。

10

【0117】

R_x 、 R_y 及び R_z はそれぞれ、好ましくは、水素原子及び $C_1 - 6$ アルキル基から選択される。より好ましくは、 R_x 、 R_y 及び R_z はそれぞれ、好ましくは、水素原子並びにメチル及びエチル基から選択される。好ましくは、特定の $-NR_xR_yR_z^+$ 又は $-PR_xR_yR_z^+$ 基では、 R_x 、 R_y 及び R_z は同じである。

20

【0118】

第一の実施形態 (i) において、 R は、求電子性脱離基を示し、固体基材は、式 (I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結されている。実施形態 (i) の生成物は、チオール基を有する機能的部分と反応でき、その結果、機能的部分は、該チオール基の硫黄原子を介して、即ち、求電子性脱離基 Y を置換することによって、式 (I) の 2 位に結合する。実施形態 (i) の生成物は、式 (I) の 1 位、3 位及び / 又は 4 位に連結された、1 個以上のさらなる機能的部分を既に有している (即ちこれは、固体基材を構成する)。

【0119】

第二の実施形態 (ii) において、固体基材はチオール部分を有し、 R は、該チオール部分の硫黄原子への結合を示す。実施形態 (ii) の生成物は、式 (I) の 1 位、3 位及び / 又は 4 位に連結された、1 個以上のさらなる機能的部分を含む (即ちこれは、固体基材及び 1 個以上の機能的分子の両方を含むコンジュゲートを構成する)。この生成物はまた、機能的部分と反応するように「準備された (primed)」固体基材試薬を構成する。当業者が理解するように、かかる反応は、式 (I) の部分上に存在する任意の反応性官能基を介して生じ得、式 (I) の 2 位と 3 位との間の炭素 - 炭素二重結合への付加が含まれる。

30

【0120】

第三の実施形態 (iii) において、固体基材は、式 (I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結されており、 R は、式 $-S-F_1$ 又は $-S-L-F_2$ の基を示し、式中 L はリンカー基を示し、 $-S-F_1$ 及び $-F_2$ は機能的部分を示す。従って、この実施形態においても、生成物はコンジュゲートを構成する。

40

【0121】

疑義を回避するため、部分 $-S-F_1$ は、硫黄原子 S を介して第二の部分に結合した機能的部分を構成する。同様に、 $-S-L-$ は、硫黄原子に結合した本発明のリンカー基を示し、次いでこの硫黄原子が第二の部分に結合される。

【0122】

式 (I) の部分は、本発明に従ってチオール含有機能的部分を固体基材にコンジュゲート化させる、又はチオール含有固体基材を機能的部分にコンジュゲート化させる、重要な反応性部分を示すことが明らかであろう。式 (I) の部分 (及び式 (III) の部分、別

50

の箇所で詳細に記載される) において、記号

【 0 1 2 3 】

【 化 6 】



【 0 1 2 4 】

は、別の基への結合点を意味する。これらの結合点を介して結合した基の正体は、本発明には重要でないことが理解されよう。当業者であれば、特定の目的に合うように、これらの結合点を介して結合した基を、例えば、一緒に連結される機能的部分及び固体基材の具体的な正体に基づいて、選択することが可能であることが容易に理解できよう。当業者に周知のように、機能的部分及び特定の反応性基を有する固体基材と反応するように適応された官能基を保有し、かつリンカー基（典型的には、反応中に重要な役割を果たさない）によって間隔を空けられた架橋試薬が、慣用的に設計される。当業者であれば、式（ I ）の部分、例えば、チオール基と反応するように設計された従来の部分（例えば、マレイミド基又はヨードアセチル基）を置換することによって、慣用のクロスリンカー試薬中に容易に組み込まれ得ることを、即座に理解するであろう。この様式での適応に適したクロスリンカー試薬の設計についての詳細な情報は、例えば、「Bioconjugate Techniques」（Greg T. Hermanson, Academic Press Inc., 1996）（その内容は、その全体が本明細書中で参照により組み込まれる）中に見出すことができる。

10

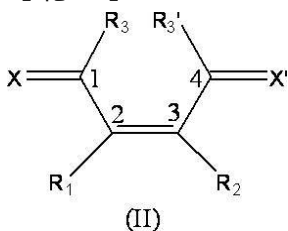
【 0 1 2 5 】

好ましくは、本発明の生成物は、式（ I I ）を有する：

20

【 0 1 2 6 】

【 化 7 】



【 0 1 2 7 】

30

式中、

X 及び X' は、同じ又は異なって、それぞれ酸素、硫黄又は式 = N Q の基を示し、Q は、水素、ヒドロキシル、C₁ - 6 アルキル又はフェニルであり；

R₁ は以下を示し：

(i) 求電子性脱離基 Y ；又は

(i i) チオール部分を有し、該チオール部分の硫黄原子を介して式（ I I ）の 2 位に結合している、固体基材；又は

(i i i) - S - F₁ 若しくは - S - L - F₂ ；

R₂ は、水素原子、S o l、- L - S o l、F₃、Y、N u、- L (F₃)_m (Z)_n -_m 又は I G を示し；

40

以下のいずれかであり：

R₃ 及び R₃' は、同じ又は異なって、それぞれ水素原子、S o l、- L - S o l、F₃、E、N u、- L (F₃)_m (Z)_n -_m 又は I G を示す；又は

R₃ 及び R₃' は一緒になって、式 - O - 又は - N (R_{3 3}) - の基を形成し、R_{3 3} は、水素原子、S o l、- L - S o l、F₃、Y、N u、- L (F₃)_m (Z)_n -_m 又は I G を示す；又は

R₃ 及び R₃' は一緒になって、式 - N (R_{3 3}) - N (R_{3 3}) - の基を形成し、各 R_{3 3} は、同じ又は異なって、水素原子、S o l、- L - S o l、F₃、Y、N u、- L (F₃)_m (Z)_n -_m 又は I G を示す；

S o l は固体基材を示し；

50

- S - F₁、F₂ 及び F₃ のそれぞれは、同じ又は異なって、検出可能部分、酵素活性部分、アフィニティタグ、ハプテン、免疫原性担体、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド又はリガンド候補、生物活性部分、リボソーム、ポリマー部分、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、炭水化物、DNA 及び RNA から選択される機能的部分を示し；

E 及び Y のそれぞれは、同じ又は異なって、求電子性脱離基を示し；

各 Nu は、同じ又は異なって、- OH、- SH、- NH₂ 及び - NH (C₁ - 6 アルキル) から選択される求核剤を示し；

各 L は、同じ又は異なって、リンカー基を示し；

各 Z は、同じ又は異なって、部分 L に結合した反応性基を示し；

各 n は、同じ又は異なって、1、2 又は 3 であり；

10

各 m は、同じ又は異なって、0 から n までの値を有する整数であり；

各 IG は、同じ又は異なって、非置換であるか又は 1 個以上のハロゲン原子置換基で置換されている、C₁ - 20 アルキル基、C₂ - 20 アルケニル基又は C₂ - 20 アルキニル基である部分を示し、式中、(a) 0、1 又は 2 個の炭素原子は、C₆ - 10 アリーレン、5 ~ 10 員のヘテロアリーレン、C₃ - 7 カルボシクリレン及び 5 ~ 10 員のヘテロシクリレン基から選択される基によって置換されており、かつ (b) 0、1 又は 2 個の - CH₂ - 基は、- O -、- S -、- S - S -、- C (O) - 及び - N (C₁ - 6 アルキル) - 基から選択される基によって置換されており、式中、

(i) 該アリーレン、ヘテロアリーレン、カルボシクリレン及びヘテロシクリレン基は、非置換であるか又はハロゲン原子並びに C₁ - 6 アルキル、C₁ - 6 アルコキシ、C₁ - 6 アルキルチオール、- N (C₁ - 6 アルキル) (C₁ - 6 アルキル) 及びニトロ基から選択される 1 個以上の置換基によって置換されており；

20

(ii) 該カルボシクリレン及びヘテロシクリレン基中の 0、1 又は 2 個の炭素原子は、- C (O) - 基によって置換されており；

ただし、該生成物は、1 つの固体基材及び少なくとも 1 個の機能的部分を含む。

【0128】

好ましくは、R₁ は、(a) 求電子性脱離基 Y 又は (b) - S - F₁ 若しくは - S - L - F₂ を示す。

【0129】

R₂ は好ましくは、水素原子、Sol、- L - Sol、F₃、Y、- L (F₃)_m (Z)_{n-m} 又は IG である。より好ましくは、R₂ は、水素原子、Sol、F₃、Y、- L (Z)_n 又は IG であり、なおより好ましくは、水素若しくはハロゲン原子、Sol、F₃ 又は C₁ - 6 アルキル基である。最も好ましくは、R₂ は、水素若しくはハロゲン原子又は C₁ - 6 アルキル基である。

30

【0130】

R₃ 及び R₃' が、同じ又は異なって、それぞれ水素原子、Sol、- L - Sol、F₃、E、Nu、- L (F₃)_m (Z)_{n-m} 又は IG を示す場合、好ましくは、R₃ 及び R₃' は、同じ又は異なって、それぞれ Sol、- L - Sol、F₃、E、Nu、- L (F₃)_m (Z)_{n-m} 又は IG を示す。より好ましくは、この実施形態では、R₃ 及び R₃' のうち少なくとも 1 個が、Sol 又は - L - Sol を示し、最も好ましくは Sol を示す。

40

【0131】

好ましくは、R₃ 及び R₃' は、同じ又は異なって、それぞれ水素原子、Sol、- L - Sol、F₃、E、Nu、- L (F₃)_m (Z)_{n-m} 又は IG を示すか；又は R₃ 及び R₃' は一緒になって、式 - N (R₃₃) の基を形成し、R₃₃ は、水素原子、Sol、- L - Sol、F₃、Y、Nu、- L (F₃)_m (Z)_{n-m} 又は IG を示す。より好ましくは、R₃ 及び R₃' は一緒になって、式 - N (R₃₃) の基を形成する。

【0132】

R₃₃ は好ましくは、水素原子、Sol、- L - Sol、F₃、- L (F₃)_m (Z)_{n-m} 又は IG を示す。より好ましくは、R₃₃ は、水素原子、Sol、F₃ 又は I

50

Gを示す。なおより好ましくは、 R_{33} は、水素原子、Sol、 F_3 又は C_{1-6} アルキル基を示す。最も好ましくは、 R_{33} はSolを示す。

【0133】

Eは好ましくは、ハロゲン原子、又は C_{1-6} アルコキシ、チオール、 C_{1-6} アルキルチオール、 $-N(C_{1-6}アルキル)(C_{1-6}アルキル)$ 、トリフレート、トシレート、メシレート、N-ヒドロキシスクシンイミジル、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル、イミダゾリル、フェニルオキシ若しくはニトロフェニルオキシ基である。より好ましい式Eの基は、ハロゲン原子並びにトリフレート、トシレート及びメシレート基である。

【0134】

式(II)中の好ましい基X、X'及びYは、上述のとおりである。

【0135】

Nuは好ましくは、式 $-OH$ 又は $-SH$ の基である。別の実施形態において、Nuは好ましくは、式 $-OH$ 、 $-NH_2$ 又は $-SH$ の基であり、より好ましくは $-NH_2$ 又は $-SH$ である。

【0136】

リンカー部分Lは、本発明の生成物中の2つの他の部分を一緒に連結する(即ち、これは少なくとも2個の部分である)。しかしながら、いくつかの実施形態において、特定のリンカー部分Lは、2個より多い他の部分を一緒に連結し得(例えば、 R_2 、 R_3 、 R_3' 又は R_{33} が $-L(F_3)_m(Z)_n-m$ (nは2又は3である)を示す場合)、この場合、3つ目の他の部分及び任意のさらなる他の部分のそれぞれが、対応する2個のリンカー部分L上の水素原子を置換することが理解されよう。

【0137】

Lは好ましくは、非置換であるか又は1個以上のハロゲン原子置換基で置換されている、 C_{1-20} アルキレン基、 C_{2-20} アルケニレン基又は C_{2-20} アルキニレン基である部分を示し、式中、(a)0、1、又は2個の炭素原子は、 C_{6-10} アリーレン、5~10員のヘテロアリーレン、 C_{3-7} カルボシクリレン及び5~10員のヘテロシクリレン基から選択される基によって置換されており、かつ(b)0、1又は2個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(O)-$ 及び $-N(C_{1-6}アルキル)-$ 基から選択される基によって置換されており、式中、

(i)該アリーレン、ヘテロアリーレン、カルボシクリレン及びヘテロシクリレン基は、非置換であるか又はハロゲン原子並びに C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、 C_{1-6} アルキルチオール、 $-N(C_{1-6}アルキル)(C_{1-6}アルキル)$ 及びニトロ基から選択される1個以上の置換基によって置換されており；

(ii)該カルボシクリレン及びヘテロシクリレン基中の0、1又は2個の炭素原子は、 $-C(O)-$ 基によって置換されている。

【0138】

より好ましくは、Lは、非置換の C_{1-6} アルキレン基、 C_{2-6} アルケニレン基又は C_{2-6} アルキニレン基である部分を示し、式中、(a)0又は1個の炭素原子は、フェニレン、5~6員のヘテロアリーレン、 C_{5-6} カルボシクリレン及び5~6員のヘテロシクリレン基から選択される基によって置換されており、該フェニレン、ヘテロアリーレン、カルボシクリレン及びヘテロシクリレン基は、非置換であるか又はハロゲン原子並びに C_{1-4} アルキル及び C_{1-4} アルコキシ基から選択される1又は2個の置換基によって置換されており、かつ(b)0、1又は2個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 及び $-C(O)-$ 基から選択される基によって置換されている。

【0139】

最も好ましくは、Lは非置換の C_{1-4} アルキレン基である部分であり、式中、0又は1個の炭素原子は、非置換のフェニレン基によって置換されている。

【0140】

Zは、式Lの基に結合した反応性基を示す。反応性基Zは、機能的部分をクロスリンカ

10

20

30

40

50

ーに接続する（即ち、機能的部分を固体基材に連結する）ように選択される。当業者が理解するように、反応性基自体の性質は重要ではない。非常に広範な反応性基が、機能的部分をクロスリンカー試薬に接続するために、当該分野で現在慣用的に使用されている。かかる反応性基は、例えば、アミン化合物、チオール化合物、カルボキシル化合物、ヒドロキシル化合物、カルボニル化合物、又は反応性水素を含む化合物を、クロスリンカーに結合できるものであり得る。当業者であれば当然、任意のかかる反応性基が、本発明に従う使用に適切であることを即座に認識するであろう。従って、当業者は、「Bioconjugate Techniques」（Greg T. Hermanson, Academic Press Inc., 1996）（その内容は、その全体が参照によって本明細書中に組み込まれる）などの標準的教科書を参照して、共通の一般知識から、適切な反応性基を選択することができるであろう。

10

【0141】

Zは好ましくは以下である：

(a) 式 - LG、- C(O) - LG、- C(S) - LG又は - C(NH) - LGの基（式中、LGは求電子性脱離基である）；

(b) - OH、- SH、- NH₂、- NH(C₁ - 6 アルキル)及び - C(O)NHNH₂基から選択される求核剤Nu'；

(c) 求核剤と開環求電子反応し得る環式部分Cyc；

(d) 式 - S(O₂)(Hal)の基（式中、Halはハロゲン原子である）；

(e) 式 - N = C = O又は - N = C = Sの基；

20

(f) 式 - S - S(IG')の基（式中、IG'は、本明細書中に記載したとおりの式IGの基を示す）；

(g) 1個以上のハロゲン原子によって置換されたC₆ - 1₀アリール基である、基AH；

(h) 紫外線光への曝露によって活性化され得る光反応性基；

(i) 式 - C(O)H又は - C(O)(C₁ - 6 アルキル)の基；

(j) マレイミド基；

(k) 式 - C(O)CHCH₂の基；

(l) 式 - C(O)C(N₂)H又は - PhN₂⁺の基（式中、Phはフェニル基を示す）；又は

30

(m) エポキシド基。

【0142】

最も好ましくは、Zは以下から選択される：

(a) 式 - LG、- C(O) - LG及び - C(S) - LGの基（式中、LGは、ハロゲン原子並びに - O(C₁ - 6 アルキル)、- SH、- S(C₁ - 6 アルキル)、トリフレート、トシレート、メシレート、N - ヒドロキシスクシンイミジル及びN - ヒドロキシルホスクシンイミジル基から選択される）；

(b) 式 - OH、- SH及び - NH₂の基；

(c) 式

40

【0143】

【化8】



【0144】

又は式

【0145】

【化 9】



【0146】

の基；及び

(d) マレイミド基。

【0147】

L G は好ましくは、ハロゲン原子並びに $-O(I G')$ 、 $-SH$ 、 $-S(I G')$ 、 $-NH_2$ 、 $NH(I G')$ 、 $-N(I G')$ ($I G''$)、 $-N_3$ 、トリフレート、トシレート、メシレート、N-ヒドロキシスクシンイミジル、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル、イミダゾリル及びアジド基から選択され、式中、 $I G'$ 及び $I G''$ は、同じ又は異なって、それぞれ式 $I G$ の基を示す。

10

【0148】

Nu' は好ましくは、 $-OH$ 、 $-SH$ 及び $-NH_2$ 基から選択される。

【0149】

C y c は好ましくは、基

【0150】

【化 10】



20

【0151】

及び

【0152】

【化 11】



【0153】

から選択される。

30

【0154】

H a l は好ましくは塩素原子である。

【0155】

A H は好ましくは、少なくとも 1 個のフッ素原子で置換されたフェニル基である。

【0156】

光反応性基は、好ましくは以下から選択される：

(a) 少なくとも 1 個の式 $-N_3$ の基によって置換されており、1 個以上のハロゲン原子によって更に置換されていてもよい、 C_{6-10} アリール基；

(b) ベンゾフェノン基；

40

(c) 式 $-C(O)C(N_2)CF_3$ の基；及び

(d) 式 $-PhC(N_2)CF_3$ の基 (式中、Ph はフェニル基を示す)。

【0157】

n は好ましくは 1 又は 2 であり、最も好ましくは 1 である。

【0158】

I G は好ましくは、非置換の C_{1-6} アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基又は C_{2-6} アルキニル基である部分を示し、式中、(a) 0 又は 1 個の炭素原子は、フェニレン、5 ~ 6 員のヘテロアリーレン、 C_{5-6} カルボシクリレン及び 5 ~ 6 員のヘテロシクリレン基から選択される基によって置換されており、該フェニレン、ヘテロアリーレン、カルボシクリレン及びヘテロシクリレン基は、非置換であるか又はハロゲン原子並びに C_{1-4}

50

アルキル及び C_{1-4} アルコキシ基から選択される 1 又は 2 個の置換基によって置換されており、かつ (b) 0、1 又は 2 個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 及び $-C(O)-$ 基から選択される基によって置換されている。

【0159】

より好ましくは、IG は、非置換の C_{1-6} アルキル基である部分を示し、式中、(a) 0 又は 1 個の炭素原子は、非置換のフェニレン、5～6 員のヘテロアリーレン、 C_{5-6} カルボシクリレン及び 5～6 員のヘテロシクリレン基から選択される基によって置換されている。

【0160】

最も好ましくは、IG は、非置換の C_{1-6} アルキル基を示す。

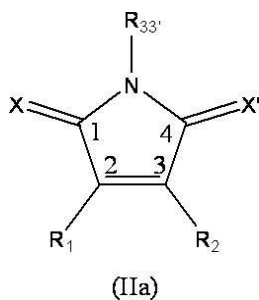
10

【0161】

好ましくは、式 (II) の生成物は、式 (IIa) の生成物：

【0162】

【化 12】



20

【0163】

であり、式中、 X 、 X' 、 R_1 、 R_2 及び $R_{33'}$ は全て、本明細書中に記載したとおりである。

【0164】

式 (II) の生成物において、特に好ましくは、

X 及び X' はそれぞれ酸素を示し；

R_1 は以下を示し：

(i) ハロゲン原子；又は

(ii) チオール部分を有し、該チオール部分の硫黄原子を介して式 (II) の 2 位に結合している、固体基材；又は

(iii) $-S-F_1$ ；

R_2 は、水素若しくはハロゲン原子、固体基材、 F_3 又は C_{1-6} アルキル基を示し；

R_3 及び $R_{33'}$ は一緒になって、式 $-N(R_{33'})$ の基を形成し、 $R_{33'}$ は、水素原子、固体基材、 F_3 又は C_{1-6} アルキル基を示し；

$-S_1-F_1$ 及び F_3 は、同じ又は異なって、検出可能部分、酵素活性部分、アフィニティタグ、ハプテン、免疫原性担体、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド又はリガンド候補、生物活性部分、リボソーム、ポリマー部分、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、炭水化物、DNA 及び RNA から選択される機能的部分を示し；

ただし、該生成物は、1 つの固体基材及び少なくとも 1 個の機能的部分を含む。

40

【0165】

好ましい実施形態において、式 (II) の生成物は、1 個の機能的部分 $-S-F_1$ 、 F_2 又は F_3 を含み、この機能的部分は好ましくは、機能的部分 $-S-F_1$ である。

【0166】

特に好ましい実施形態において、式 (II) の生成物中、 R_3 及び $R_{33'}$ は一緒になって、式 $-N(R_{33'})$ の基を形成し、 $R_{33'}$ は固体基材を示す。

【0167】

好ましくは、固体基材又は少なくとも 1 個の機能的部分のいずれかが、式 (I) 又は式 (II) の 2 位に結合する。

50

【 0 1 6 8 】

いくつかの実施形態において、本発明の生成物がマレイミド環を含むことが理解されるであろう。具体的には、これは、式 (I) の部分において、1 位及び 4 位の炭素原子が基 - N (R₃₃) - を介して一緒に連結される場合に起こる。この場合、本発明はさらに、本発明の生成物中のマレイミド環の開環をもたらす工程を含むプロセスを提供する。マレイミド環の開環は、当該分野で公知の加水分解反応によってもたらされ得る。マレイミドの開環をもたらすことは、機能的部分及び / 又は固体基材をコンジュゲートに不可逆的に結合させることができるので、特定の適用で有利な場合がある。

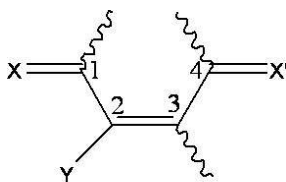
【 0 1 6 9 】

本発明の生成物は、式 (I I I) の部分を含む化合物である試薬を使用して、得ることが

10

【 0 1 7 0 】

【 化 1 3 】



(III)

【 0 1 7 1 】

式中、

X 及び X' は、同じ又は異なって、それぞれ酸素、硫黄又は式 = N Q の基を示し、Q は、水素、ヒドロキシル、C₁ - 6 アルキル又はフェニルであり；

Y は求電子性脱離基である。

20

【 0 1 7 2 】

明らかに、本発明の生成物を産生するためのプロセスの正確な詳細は、所望の生成物の性質に依存する。

【 0 1 7 3 】

式 (I I I) の部分が機能的部分を既に含んでいる場合、式 (I I I) の部分を含む試薬は、生成物を得るために固体基材と直接反応させることができる。従って、このプロセスは、固体基材を式 (I I I) の部分を含む化合物と反応させて、(a) 固体基材及び (b) それに連結された式 (I) の部分を含む生成物を得る工程を含み、以下のいずれかである：

30

(i) R は、求電子性脱離基 Y を示し、固体基材は、式 (I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結されており、機能的部分が、式 (I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結されている；又は

(i i) 固体基材はチオール部分を有し、R は、該チオール部分の硫黄原子への結合を示し、機能的部分が、式 (I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結されている。

【 0 1 7 4 】

所望の生成物が、式 (I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結された固体基材を有する場合、その反応は、固体基材上の反応性基を、式 (I I I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結された反応性基と反応させることによって、実施される。固体基材は、化学的に活性化された固体基材 (例えば、それ自体が反応性基を有するリンカー部分を有する固体基材) であり得る。次いで、その反応性基は、直接又はさらなるリンカー基 (例えば、本明細書中に記載されるリンカー基) を介してのいずれかで、式 (I) の 1 位、3 位又は 4 位に結合され得る。例えば、活性化ガラス基材 (例えば、それ自体が別の反応性基を有するアルコキシシラン保有リンカー化合物で処理されたガラス基材) が、固体基材として使用され得る。或いは、固体基材は、式 (I I I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結された適切な反応性基と直接反応できる表面基を含むだけでよい。例えば、ガラス基材は、アルコキシシラン保有反応性基が式 (I I I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結されると、式 (I I I) の部分を含む

40

50

試薬と直接反応できる。なおさらなる代替法では、固体基材及び式 (I I I) の部分のそれぞれが、アフィニティタグ及びそのそれぞれのアフィニティパートナーのうち一方を保有し、この反応は、そのアフィニティパートナーへのアフィニティタグの結合を含む。

【 0 1 7 5 】

所望の生成物が、チオール部分を有する固体基材を含み、該チオール部分の硫黄原子が式 (I) の 2 位に結合している場合、実施される反応は、固体基材上のチオール基に式 (I I I) の 2 位を攻撃させ、従って求電子性脱離基 Y を置換させることを含む。固体基材上のチオール部分は、特定の実施形態において、表面上に元々存在していてもよい (例えば、固体基材が、末端チオール基を有するポリマーを含むポリマー基材である場合)。或いは、チオール基は、固体基材を適切なクロスリンカー試薬で活性化することによって、容易に供給できる。例えば、ガラス基材は、アルコキシシラン末端 (ガラス表面と反応する) 及びチオール末端の両方を含むクロスリンカーを使用して、活性化できる。従って、具体的な例では、固体基材は、チオール含有リンカーに結合したガラス表面であるだろう。

【 0 1 7 6 】

式 (I I I) の部分が機能的部分をまだ保有していない場合、これは、最初に固体基材と、二番目に機能的部分と、又は最初に機能的部分と、二番目に固体基材と、又は固体基材及び機能的部分の両方と同時に、反応させることができる。明らかに、固体基材、機能的部分及び試薬の具体的選択が、反応を実施する最適な方法を決定し得る。かかる検討事項は、当業者の技術範囲内である。

【 0 1 7 7 】

1 つの例示的な産生プロセスは、以下を含む：

a) 固体基材を式 (I I I) の部分を含む化合物と反応させて、(a) 固体基材及び (b) それに連結した式 (I) の部分を含む生成物を得る工程であって、以下のいずれかである：

(i) R は、求電子性脱離基 Y を示し、固体基材は、式 (I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結されている；又は

(i i) 固体基材はチオール部分を有し、R は、該チオール部分の硫黄原子への結合を示す、

工程；及び

b) 該生成物を機能的部分と反応させる工程。

【 0 1 7 8 】

第二の例示的産生プロセスは、以下を含む：

a) 機能的部分を式 (I I I) の部分を含む化合物と反応させる工程；及び

b) 工程 a) で得られた化合物を固体基材と反応させて、本発明の生成物を得る工程。

【 0 1 7 9 】

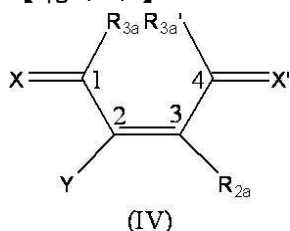
明らかに、上記第一及び第二の例示的産生プロセスの両方において、式 (I I I) の部分を含む化合物は、1 位、3 位又は 4 位に連結した少なくとも 1 個の反応性基を有さなければならない。これにより、固体基材及び機能的部分の両方が適応してコンジュゲート生成物になれることが確実になる。

【 0 1 8 0 】

好ましくは、式 (I I I) の部分を含む化合物は、式 (I V) の化合物：

【 0 1 8 1 】

【 化 1 4 】



10

20

30

40

50

【0182】

であり、式中、

R_{2a} は、水素原子、 Y 、 Nu 、 $-L(Z')$ _n 又は IG を示し；

以下のいずれかであり；

R_{3a} 及び R_{3a}' は、同じ又は異なって、それぞれ水素原子、 E 、 Nu 、 $-L(Z')$ _n 又は IG を示す；又は

R_{3a} 及び R_{3a}' は一緒になって、式 $-O-$ 又は $-N(R_{33a})-$ の基を形成し、 R_{33a} は、水素原子、 Y 、 Nu 、 $-L(Z')$ _n 又は IG を示す；又は

R_{3a} 及び R_{3a}' は一緒になって、式 $-N(R_{33a})-N(R_{33a})-$ の基を形成し、各 R_{33a} は、同じ又は異なって、水素原子、 Y 、 Nu 、 $-L(Z')$ _n 又は IG を示す；

Z' は、 Z 又は式 $-Si(O(C_{1-6} \text{ アルキル}))(G_1)(G_2)$ の基を示し、 G_1 及び G_2 は、同じ又は異なって、 H 、 C_{1-6} アルキル又は $O(C_{1-6} \text{ アルキル})$ を示し；

X 、 X' 、 Y 、 Nu 、 L 、 Z 、 n 、 IG 及び E は全て、本明細書中に記載したとおりである。

【0183】

好ましくは、 R_{3a} 及び R_{3a}' は、同じ又は異なって、それぞれ水素原子、 E 、 Nu 、 $-L(Z')$ _n 又は IG を示すか；或いは R_{3a} 及び R_{3a}' は一緒になって、式 $-N(R_{33a})-$ の基を形成し、 R_{33a} は水素原子、 Y 、 Nu 、 $-L(Z')$ _n 又は IG を示す。

【0184】

式 $-Si(O(C_{1-6} \text{ アルキル}))(G_1)(G_2)$ の基はアルコキシシラン基であり、ガラス基材、マイカ基材、シリカ基材及びシリコン基材などの基材を活性化するための優れた反応性基であることが知られている。従って、典型的には、式 (IV) の化合物が、ガラス基材、マイカ基材、シリカ基材又はシリコン基材と反応する又はそれらに結合することが意図される場合、式 $-Si(O(C_{1-6} \text{ アルキル}))(G_1)(G_2)$ の基が式 (IV) の化合物に導入される。典型的には、1 個以下のかかる基が、式 (IV) の化合物上に存在する。好ましくは、式 $-Si(O(C_{1-6} \text{ アルキル}))(G_1)(G_2)$ の基は、式 $-Si(O(C_{1-4} \text{ アルキル}))(G_1)(G_2)$ の基であり、式中、 G_1 及び G_2 は、同じ又は異なって、 C_{1-4} アルキル又は $O(C_{1-4} \text{ アルキル})$ を示し、より好ましくは $O(C_{1-4} \text{ アルキル})$ を示す。例示的な式 $-Si(O(C_{1-6} \text{ アルキル}))(G_1)(G_2)$ の基は、 $-Si(OEt)_3$ 、 $-Si(OEt)_2(OMe)$ 、 $-Si(OEt)(OMe)_2$ 及び $-Si(OMe)_3$ であり、 $-Si(OEt)_3$ 及び $-Si(OMe)_3$ が特に好ましい。

【0185】

さらなる実施形態において、本発明は、機能的部分に固体基材を連結するための試薬としての、式 (III) の部分を含む化合物の使用に関する。この使用は、当業者が本発明の生成物を得るのを可能にする。この使用は、典型的には、式 (III) の部分を含む化合物を、(a) 固体基材及び (b) 機能的部分と反応させて、機能的部分を含む本発明の生成物を得るプロセスを含む。例えば、この使用は、本発明の生成物を得るために本明細書中に記載される産生プロセスを実施することを含み得る。本発明の使用において、式 (III) の部分を含む化合物は、好ましくは式 (IV) の化合物である。

【0186】

代替的实施形態において、この使用は、その代わりに、アルケン部分を含む機能的部分又は固体基材のいずれかが、式 (III) の部分の 2 位と 3 位との間の炭素 - 炭素二重結合との光触媒的 [2 + 2] 環化付加に参加することによって、式 (III) の部分に結合される工程を含み得る。この手順は、式 (III) の部分由来の 2 - 炭素原子及び 3 - 炭素原子を含むシクロブタン環部分を生じ、環中、炭素 - 炭素二重結合は飽和されている。

【0187】

10

20

30

40

50

なおさらなる実施形態において、 R_{3a} 及び R_{3a}' が一緒になって式 - O - の基を形成し、固体基材又は機能的部分が求核基（例えば、第一級又は第二級アミン基）を保有する場合、この求核基は、求核開環反応及び次いで求核閉環反応に参加することによって、式 (IV) の部分に連結し得る。例えば、X 及び / 又は X' が O であり、 R_{3a} 及び R_{3a}' が一緒になって式 - O - の基を形成する場合、式 (IV) の部分は環式酸無水物である。従って、アミン基などの求核基は、求核開環及び次いで求核閉環に参加し得、基 - O - が求核基によって置換されるという全体的効果が生じることが理解できる。

【0188】

いくつかの実施形態において、本発明の使用は、マレイミド環を含む生成物を產生することが理解されよう。この場合、本発明の使用は、マレイミド環の開環をもたらすことをさらに含み得る。マレイミド環の開環は、当該分野で公知の加水分解反応によってもたらされ得る。マレイミドの開環をもたらすことは、機能的部分及び / 又は固体基材をコンジュゲートに不可逆的に結合させることができるので、特定の適用で有利な場合がある。

【0189】

当業者が理解するように、試薬（例えば、機能的部分を保有する化合物又はクロスリンカー試薬）が 1 個より多い反応性基を保有する場合、反応に関与することが意図されない反応性基の化学的保護をもたらすことが望ましい場合がある。例えば、基（例えば、ヒドロキシル、アミノ及びカルボキシ基）が最終生成物中に望まれる場合、これらの基を保護して、反応への望ましくない関与を回避することが必要な場合がある（例えば、Greene, T. W., 「Protecting Groups in Organic Synthesis」, John Wiley and Sons, 1999 を参照のこと）。従来の保護基が標準的な慣例と合わせて使用され得る。ある場合には、脱保護は、本明細書中に記載される産生プロセス及び使用において、中間又は最終の工程で使用され得る。

【0190】

本発明の生成物が、式 (I)（又は式 (II)）の 2 位に結合した固体基材又は機能的部分のいずれかを有する場合、その位置のチオール結合は、それぞれ固体基材又は機能的部分を放出するために、容易に切断できる。従って本発明は、このチオール結合を切断することを含むプロセスもまた提供する。

【0191】

切断は、不飽和炭素中心でチオール結合を切断するための慣用的な方法を使用して、特に、電子不足型アルケンに結合したチオールを切断するための慣用的な方法を使用して、もたらすことができる。従って、好ましくはこの切断は、Michael 反応において求核剤として作用できる試薬と共に生成物をインキュベートすることによってもたらされる。Michael 反応において求核剤として作用できることが周知の試薬の例としては、ホスフィン化合物、亜リン酸塩化合物、チオール、セレノール、アミン及びソフトカーボン求核化合物が挙げられる。ホスフィン化合物及び亜リン酸塩化合物は共に、3 価のリン原子を含む。ホスフィンでは、このリン原子は水素又は炭素原子に結合されるが、亜リン酸塩では、このリン原子は酸素原子に結合される（炭素原子及び酸素原子自体は、それぞれの化合物中の他の基にさらに結合されることが理解される）。チオールは、チオール基 - SH を含む有機化合物である。セレノールは、- SeH 基を含む有機化合物である。アミンは、アミン官能基を含む化合物である。ソフトカーボン求核剤は、ソフトな求核炭素中心を含む化合物である。例示的なソフトカーボン求核剤は、米国特許第 5,414,074 号に開示されており、その内容は、その全体が参照によって本明細書中に組み込まれる。当業者であれば当然、慣用として、例えば、本明細書中に記載される試薬のクラスの例示的リストのなかから適切な試薬を慣用的に選択することによって、Michael 反応において求核剤として作用できる適切な試薬を選択することができるであろう。

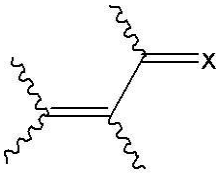
【0192】

疑義を回避するために、本明細書中で使用する場合、用語「Michael 反応において求核剤として作用できる試薬」とは、化合物中の α , β - 不飽和部分、特に式 (IV)

の部分

【 0 1 9 3 】

【 化 1 5 】



(IV)

【 0 1 9 4 】

と反応できる試薬を意味し、式中、Xは本明細書中に記載したとおりである。かかる試薬は、ある場合には「コンジュゲート付加反応において求核剤として作用できる試薬」としても知られる。明らかに、これらの試薬は、求核炭素中心を介して反応する試薬（例えば、ソフトカーボン求核剤）に限定されず、求核非炭素中心を介して反応する試薬（例えば、本明細書中に記載される例示的試薬）も含む。

【 0 1 9 5 】

本明細書中で好ましい試薬は、ホスフィン化合物及びチオールである。特に好ましいホスフィンは、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィンであり、これは、「TCEP」としても知られ、化合物（例えばタンパク質）中のジスルフィド結合を還元するために、当該分野において一般に使用される。トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィンはまた、その塩酸塩などの塩の形態でも供給され得る。特に好ましいチオールはグルタチオンである。さらに好ましいチオールは、２－メルカプトエタノール及びジチオスレイトール（即ち、 $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{SH}$ 、DTTとして一般に知られる）である。試薬の好ましい群は、１，２－エタンジチオール、２－メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、グルタチオン及びトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィンである。

【 0 1 9 6 】

典型的には、生成物が、チオール部分を含む固体基材がそのチオール部分の硫黄原子を介して式（Ⅰ）の２位に結合した生成物である場合、チオール結合を切断する工程が固体基材を生じる。典型的には、生成物が、基－ $\text{S}-\text{F}_1$ 又は－ $\text{S}-\text{L}-\text{F}_2$ が（Ⅰ）の２位に結合した生成物である場合、チオール結合を切断する工程は、式 $\text{HS}-\text{F}_1$ 又は $\text{HS}-\text{L}-\text{F}_2$ の機能的化合物を生じる。好ましい実施形態において、この生成物は、基－ $\text{S}-\text{F}_1$ 又は－ $\text{S}-\text{L}-\text{F}_2$ が（Ⅰ）の２位に結合した生成物である。

【 0 1 9 7 】

さらなる実施形態において、本発明は、式（Va）又は（Vb）の生成物もまた提供する。固体基材及び少なくとも１個の機能的部分を含むので、これらの生成物は、コンジュゲート分子を構成することが理解されよう。さらに、これらの生成物は、２位と３位との間に炭素－炭素二重結合ではなく炭素－炭素単結合を含む。しかしながら、例えば従来のマレイミド試薬を使用して調製できる生成物とは異なり、式（Va）及び（Vb）の化合物は、２位及び３位に固体基材及び機能的部分の少なくともいずれかを含むか、又は２位及び３位に少なくとも２個の機能的部分を含む（当業者が認識するように、従来のマレイミド試薬は、単一のチオール含有の固体基材又は機能的部分と反応できるに過ぎず、２位と３位との間の二重結合に付加する）。

【 0 1 9 8 】

式（Va）及び（Vb）の生成物は、簡単な方法を使用して調製できる。第一の方法では、式（Va）及び（Vb）の生成物は、式（Ⅰ）の部分及び式（Ⅰ）の２位に結合した固体基材又は機能的部分のいずれかを含むが３位に機能的部分を含まない、本発明の生成物から調製される。その場合、式（Va）及び（Vb）の生成物は、式（Ⅰ）の２位と３位との間の炭素－炭素二重結合への、それぞれ機能的部分 F_3 又は固体基材の求電子付加反応によって調製できる。第二の方法では、式（Va）及び（Vb）の生成物は、式（Ⅰ

10

20

30

40

50

）の部分及び式（Ⅰ）の２位及び３位の両方に結合した固体基材又は機能的部分のいずれかを含む、本発明の生成物から調製される。その場合、式（Ⅴa）及び（Ⅴb）の生成物は、二重結合を飽和するための求電子付加反応を実施することによって調製できる。この求電子付加反応は、さらなる機能的部分又は固体基材（例えば、チオールを含有するさらなる機能的部分又はチオール含有固体基材）の付加を含み得る。或いは、これは、不飽和の炭素 - 炭素中心において求電子付加反応を実施するために慣用的に使用される任意の他の試薬を含み得る。例えば、この試薬は、ハロゲン化水素、ジハロゲン、硫酸、水、アルコール、 H_2S 、メルカプタン又はカルボン酸であり得る。

【０１９９】

特定の試薬に属する基が２位と３位との間の二重結合に付加する位置は、それぞれの試薬の正確な構造及び反応が実施される反応条件に依存することが理解されよう。例えば、付加の位置は通常、Markovnikov則に従って最も安定なカチオン性中間体が形成できるようなものになると予測され得る。当業者であれば、特定の位置が二重結合への特定の基の付加に望ましい場合に、反応条件の慣用的選択及びそれぞれの試薬上の種々の基の正体が、かかる位置選択性を達成可能であり得ることを理解するであろう。

【０２００】

当業者に明らかなように、本発明の方法論は、固体基材への機能的部分のコンジュゲート化を含む公知の生成物、プロセス及び方法に広く適用可能である。典型的には、このタイプの従来の生成物、プロセス及び方法は、固体基材及び機能的分子と一緒に連結する架橋分子上の従来の公知のチオール反応性基（例えばマレイミド基又はヨードアセチル基）を、本発明の式（ⅠⅠⅠ）の部分によって置換することによって、簡単に改変することができる。

【０２０１】

かかる慣用の生成物、プロセス及び方法の例としては、アレイ製品及び関連の多重アッセイ、ELISA法などの検出方法、ブルダウンアッセイを含むアフィニティ精製技術、及び固相ペプチド若しくはオリゴヌクレオチド合成が挙げられる。

【０２０２】

従って本発明は、アレイに整列された、本発明の複数の生成物もまた提供する。本明細書中で使用する場合、「アレイに整列された複数の生成物」とは、典型的に、複数の領域（そのそれぞれが本発明の生成物として同定され得る）を有する単一の連続アレイを意味する。従って、典型的には複数の生成物のそれぞれが、単一のアレイ固体基材の一部を形成する固体基材を含む。しかしながら、複数の生成物のそれぞれは、式（Ⅰ）の別個の部分を含む。

【０２０３】

好ましくは、本発明の複数の生成物において、各生成物は、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド又はリガンド候補、ペプチド、タンパク質、細胞、DNA及びRNAから選択される機能的部分を含む。

【０２０４】

より好ましくは、複数の生成物において、

- （a）各生成物は異なる抗体又は抗体断片を含む；又は
- （b）各生成物は異なる抗原を含む；又は
- （c）各生成物は異なるリガンド又はリガンド候補を含む；又は
- （d）各生成物は異なるペプチドを含む；又は
- （e）各生成物は異なるタンパク質を含む；又は
- （f）各生成物は異なる細胞を含む；又は
- （g）各生成物は異なるDNAを含む；又は
- （h）各生成物は異なるRNAを含む。

【０２０５】

本発明のアレイシステムは、特定の機能的部分（及び特に、上記（a）～（h）に列挙されたものなどの特定の機能的部分）と相互作用するその能力について試験物質がアッセ

10

20

30

40

50

イされる方法に適用するのに有用であり得る。従って本発明は、試験物質を含むサンプルが本発明の複数の生成物であるアレイと共にインキュベートされるアッセイプロセスもまた提供する。次にこのプロセスは、試験物質のいずれかが、複数の生成物のいずれかと結合しているか否かを検出する工程を含む。一般的な検出ストラテジーは、例えばフルオロフォアで標的物質を標識することを使用する。他の検出ストラテジーとしては、熱量測定検出、化学発光検出及び表面プラズモン共鳴検出が挙げられる。

【0206】

このタイプのアッセイはしばしば、「多重アッセイ」として知られる。なぜなら、これらは、複数の別個のアッセイ（即ち、試験物質が本発明の単一の生成物と相互作用するかどうかを検出するために実施されるアッセイ）を、単一の実験的試験へと組み合わせるからである。かかるアッセイは、マイクロアッセイと一般に呼ばれることもあるが、アレイの物理的規模及び本発明のアッセイ技術に対しては何の制限もないことが強調される。例えば、単一のアレイ基材上の複数のタンパク質、DNA又はRNAの固定化を含む多数のアレイシステムが周知であり、市販されている。より小さい分子（例えば、基礎研究目的又は応用治療目的の両方のリガンド候補種）を含むアレイもまた、例えば Uttamchandani et al. (Current Opinion in Chemical Biology 2005, 9: 4 - 13)（この内容は、本明細書中で参照によりその全体が組み込まれる）で概説されるように、当該分野で現在一般に知られている。当業者であれば、本発明の技術が、これら公知のシステムを改変するために慣用的に適用され得ることを即座に理解するであろう。

10

20

【0207】

本発明の技術を本明細書中に記載したようなアレイアッセイに適用することの重要な利点は、クロスリンカーに対して形成されたチオール結合が、本明細書中に記載される方法を使用して容易に切断できるということである。クロスリンカーへのチオール結合が固体基材に結合した硫黄原子からなる場合、この可逆性により、アッセイを実施した後に固体基材が完全に再生されるようになる。クロスリンカーへのチオール結合が機能的部分に結合した硫黄原子（例えば、タンパク質のシステイン残基中の硫黄原子）からなる場合、その可逆性により、機能的部分自体がアレイから容易に切断されるようになる。これは、例えば特定の検出方法論において、又はアッセイが完了した後に価値ある機能的部分を回収するために、有利であり得る。

30

【0208】

本発明はまた、抗体又は抗原を含む本発明の生成物を使用する、検出プロセスを提供する。この生成物はサンプルとインキュベートされ、抗体又は抗原に結合していない任意の材料が除去される。未結合の材料の除去は、例えば、当該分野で慣用的に使用される洗浄技術を使用して、実施できる。最後に、抗体又は抗原に結合したままの任意の物質が、例えば、発色性又は蛍光発生性の標識を使用して、検出される。

【0209】

本発明の好ましい実施形態において、検出プロセスはELISAアッセイである。ELISAアッセイの例は、間接的ELISA、サンドイッチ（又は「捕捉（capture）」）ELISA、競合的ELISA及び逆（reverse）ELISAである。これらのアッセイプロセスは全て、慣用的なイムノアッセイプロセスであり、当業者に知られている。

40

【0210】

典型的には、ELISAプロセスでは、検出工程は、酵素を含むコンジュゲート化合物及び抗体又は抗原に結合した物質に特異的に結合し得る抗体を添加することによって、また、酵素によって変換されると検出可能なシグナルを生成する（例えば、着色産物又は蛍光性産物を生じる）酵素基質を添加することによって、実施される。好ましい酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ及びグルコースオキシダーゼが挙げられる。

【0211】

50

本発明はまた、サンプルから特定の物質を精製するためのプロセスを提供する。このプロセスは、サンプルを、その物質に選択的に結合できる機能的部分を含む本発明の生成物と共にインキュベートする工程を含む。

【0212】

本明細書中で使用する場合、「物質に選択的に結合できる機能的部分」とは、他の物質に結合した任意の機能的部分を単離することを実質的に伴わずに、結合した機能的部分 - 物質実体がサンプルから単離されるのを可能にする、任意の他の物質（特に、関連する物質中に典型的に見出される任意の他の物質）への結合強度よりも十分に高い強度で、機能的部分がその物質に結合することを意味する。

【0213】

本発明での使用に適した機能的部分としては、特定の物質が対応するアフィニティパートナー又はアフィニティタグを含む場合にはアフィニティタグ又はアフィニティパートナーが、特定の物質が酵素基質である場合には酵素が、物質が対応する抗原である場合には抗体が、挙げられる。

【0214】

特定の物質を精製するためのプロセスは、機能的部分に結合していない任意の材料を除去する工程をさらに含む。未結合の材料の除去は、例えば、当該分野で慣用的に使用される洗浄技術を使用して、実施できる。最後に、物質は、慣用の溶出技術を使用して生成物から分離される。

【0215】

好ましい実施形態において、特定の物質は、バイト（b a i t）物質 S_b を構成し、サンプルは、 S_b に結合できる1種以上のプレイ（p r e y）物質 S_p をさらに含んでいてもよい。当業者が理解するように、この特定の実施形態は、当該分野で「ブルダウンアッセイ」として一般に知られるプロセスを構成する。ブルダウンアッセイは、それら（プレイ）が結合する別の物質（バイト）を精製することによって、物質（プレイ）を間接的に精製するために慣用的に使用される。好ましくは、バイト物質はタンパク質であり、プレイ物質もタンパク質である。

【0216】

別の実施形態では、本発明は、ペプチド又はタンパク質を産生するためのプロセスに関する。このプロセスは、本発明の生成物にアミノ酸を結合させ、次いでそのアミノ酸に1個以上のさらなるアミノ酸を結合させて、固体基材に連結されたペプチド又はタンパク質部分を産生する工程を含む。最後に、ペプチド又はタンパク質部分は固体基材から切断される。

【0217】

固相合成の技術又はペプチド及びタンパク質は、当該分野で周知である。広範な反応性基で活性化された多数の固相支持体が、Sigma Aldrichなどから市販されている。従って、当業者には、ペプチド又はタンパク質を産生するためのプロセスを実施するために本発明の方法論を適用するにあたり、何らの困難もないであろう。ペプチドを合成するために当該分野で現在使用されている種々の慣用技術を考察した1つの一般的な参考教科書は、「Amino Acid and Peptide Synthesis」（John Jones, Oxford Scientific Publications, 1992）（その内容は、その全体が参照によって本明細書中に組み込まれる）である。

【0218】

特に好ましい実施形態において、このプロセスで使用される本発明の生成物は、（a）式（I）の2位に求電子性脱離基Yを有する生成物又は（b）式（I）の2位にアミノ酸システインを有する生成物（このシステインは、硫黄原子を介して2位に結合している）である。生成物が2位に求電子性脱離基Yを有する場合、生成物に結合されるアミノ酸は、典型的には、求電子性脱離基Yを置換することによって2位に結合するシステイン原子である。次いで、1個以上のさらなるアミノ酸が、慣用の固相ペプチド合成反応方法論を

10

20

30

40

50

使用して、固定化されたシステイン残基に結合される。

【 0 2 1 9 】

当業者が即座に理解するように、この様式で固定化されたシステイン残基からペプチド又はタンパク質の鎖を成長させることに関連する顕著な利点は、最終的なペプチド又はタンパク質が、本明細書中に記載される切断プロセスを使用して、固体支持体から非常に容易に切断できるということである。

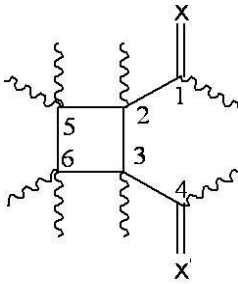
【 0 2 2 0 】

本発明はさらに、(a) 機能的部分及び (b) それに連結された固体基材を有する式 (V I) の部分を含む生成物を提供する：

【 0 2 2 1 】

10

【 化 1 6 】



(VI)

20

【 0 2 2 2 】

式中、

X 及び X ' は、同じ又は異なって、それぞれ酸素、硫黄又は式 = N Q の基を示し、Q は、水素、ヒドロキシル、C₁ - 6 アルキル又はフェニルであり；

機能的部分は、検出可能部分、酵素活性部分、アフィニティタグ、ハプテン、免疫原性担体、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド、生物活性部分、リボソーム、ポリマー部分、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、炭水化物、DNA 及び RNA から選択される。

【 0 2 2 3 】

この生成物は、典型的には 1 つの固体基材を含む。

【 0 2 2 4 】

30

好ましくは、以下のいずれかである：

機能的部分はチオール部分を有し、そのチオール部分の硫黄原子を介して式 (V I) の部分の 2 位に連結されており、固体基材は、式 (V I) の部分の 5 位又は 6 位のいずれかに結合している；又は

固体基材はチオール部分を有し、そのチオール部分の硫黄原子を介して式 (V I) の部分の 2 位に連結されており、機能的部分は、式 (V I) の部分の 5 位又は 6 位のいずれかに結合している。

【 0 2 2 5 】

好ましくは、固体基材が、式 (V I) の部分の 5 位又は 6 位のいずれかに結合している。

40

【 0 2 2 6 】

この生成物は、1 個以上の機能的部分を含み得、その場合、各機能的部分は、検出可能部分、酵素活性部分、アフィニティタグ、ハプテン、免疫原性担体、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド、生物活性部分、リボソーム、ポリマー部分、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、炭水化物、DNA 及び RNA から独立して選択される。

【 0 2 2 7 】

この生成物を産生するための 1 つのプロセスは、以下を含む：

式 (I I I) の部分を含む化合物を、チオールを有する固体基材又は機能的部分と反応させて、式 (I I I) の部分中の求電子性脱離基 Y がその固体基材又は機能的部分で置換された中間体生成物を得る工程 (連結は、このチオール基を介したものである) ；及び

50

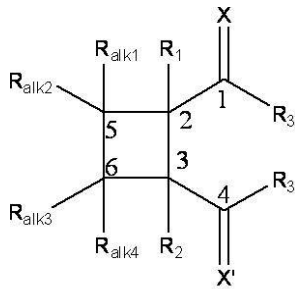
この中間体生成物を、アルケン部分を含む機能的部分又は固体基材と反応させて、該アルケン部分と、中間体生成物の2位と3位との間の炭素-炭素二重結合との間の光触媒的[2+2]環化付加反応をもたらす工程。

【0228】

好ましくは、(a)機能的部分及び(b)それに連結された固体基材を有する式(VI)の部分を含む生成物は、式(VIa)を有する：

【0229】

【化17】



(VIa)

10

【0230】

X、X'、R₁、R₂、R₃及びR_{3'}はそれぞれ、式(II)の生成物に関連して記載されたとおりであり；

20

R_{alk1}、R_{alk2}、R_{alk3}及びR_{alk4}のそれぞれは、同じ又は異なって、式(II)の生成物に関連して記載されたとおりの式R₂の基であり；

各機能的部分は、同じ又は異なって、検出可能部分、酵素活性部分、アフィニティタグ、ハプテン、免疫原性担体、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド、生物活性部分、リボソーム、ポリマー部分、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、炭水化物、DNA及びRNAから選択され；

ただし、該生成物は、1つの固体基材及び少なくとも1個の機能的部分を含む。

【0231】

好ましくは、R_{alk1}、R_{alk2}、R_{alk3}及びR_{alk4}のうち1個は、Sol又は-L-Solを示し、好ましくはR₁は、-S-F₁又は-S-L-F₂を示す。

30

【実施例】

【0232】

以下の実施例は、本発明の根底をなす科学原理を説明する。実施例の多くは、固体基材への機能的部分の連結を含まないため、参考例である。しかしながら、広範な機能的部分及び連結基について、タンパク質などの多数の大きい機能的部分を含む二次的部分への機能的部分の連結が実証されており、本発明の広い適用可能性を証明している。

【0233】

A) 予備的实施例

¹H及び¹³C NMRスペクトルは、¹Hについては500MHz、¹³Cについては125MHzの周波数で作動するBruker Avance 500機器で、室温で記録した。¹H NMRスペクトルは、CDCl₃(7.26ppm)シグナルを参照とした。¹³C NMRスペクトルは、CDCl₃(77.67ppm)シグナルを参照とした。

40

赤外線スペクトルは、センチメートルの逆数(cm⁻¹)で与えられる周波数で、ATRモードで作動するPerkinElmer Spectrum 100 FT-IRスペクトロメータで実行した。

質量スペクトル及び高分解能質量データは、VG70-SE質量分析計(EIモード及びCIモード)で記録した。

融点(m.p.)はGallenkamp加熱ブロックで取得したものであり、未補正

50

である。

旋光度測定は、10 cmのセル長さでPerkinElmer 343 旋光計を使用して実施した。

【0234】

略号

B o c	T e r t - ブチルオキシカルボニル基
C y s	システイン
M a l	マレイミド
D M F	ジメチルホルムアミド
T C E P	(トリス(2 - カルボキシエチル)ホスフィン)
L C - E S I - M S	液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化質量分析

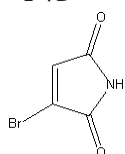
10

【0235】

参考例1：ブロモマレイミド(化合物1)の調製

【0236】

【化18】



【0237】

20

クロロホルム(15 mL)中のマレイミド(2.00 g、0.02 mol)に、クロロホルム(15 mL)の臭素(1.16 mL、0.02 mol)を滴下した。反応混合物を2時間還流し、1時間かけて室温まで冷却した。固体の黄色沈殿物を濾去し、冷クロロホルム(2 x 50 mL)で洗浄して、粗製2,3-ジブロモスクシンイミド(4.09 g、0.016 mol)の白色結晶を得た。粗製スクシンイミドをテトラヒドロフラン(50 mL)中に溶解し、テトラヒドロフラン(10 mL)中のトリエチルアミン(2.4 mL、0.017 mol)を、0 で5分間かけて添加した。反応混合物を室温まで温め、48時間攪拌した。固体を濾去し、テトラヒドロフラン(50 mL)で洗浄して、淡黄色(pale yellow)粉末(2.14 g、0.012 mol)を59%の収率で得た。

30

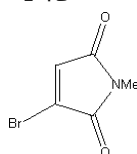
^1H NMR (500MHz, CDCl_3): δ = 7.67 (br s, 1H, NH), 6.89 (s, 1H, C=CH); ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3): δ = 173.8 (C=O), 170.5 (C=O), 136.9 (-(Br)C=C-), 135.4 (-C=CH-); IR (固体, cm^{-1}): 3235 (s), 1709 (s); MS (CI+) m/z, (%): 178 ($^{81}\text{M}^+$, 32), 176 ($^{79}\text{M}^+$, 32), 125 (25), 86 (100); $\text{C}_4\text{H}_3\text{O}_2\text{N}^{79}\text{Br}$ について計算した質量: 175.93472. 実測値: 175.93493; m.p. 148 - 151 .

【0238】

参考例2：N-メチルブロモマレイミド(化合物2)の調製

【0239】

【化19】



【0240】

40

メタノール(22.5 mL)中のN-メチルマレイミド(0.5 g、4.5 mmol)に、臭素(0.52 mL、10 mmol)を滴下した。反応混合物を室温で24時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、反応塊をテトラヒドロフラン(20 mL)中に溶解し、トリエチルアミン(0.8 mL、5.85 mmol)を添加し、次いで室温で24時間攪拌した。この物質をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー(石油エーテル:酢酸エチル、7:3)で精製して、青白い(pale white)粉末(0.761 g、4.5 mmol)を得た。

50

0 mmol) を 89 % の収率で得た。

^1H NMR (500MHz, CDCl_3): δ = 6.90 (s, 1H, C=CH), 3.09 (s, 3H, N-CH₃); ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3): δ = 168.6 (C=O), 165.4 (C=O), 131.9 (-C=CH-), 131.4 ((Br)C=C-), 24.7 (-N-CH₃); IR (固体, cm^{-1}): 3106 (s), 1708 (s); MS (CI) m/z, (%): 192 ($^{81}\text{M}^+$, 99), 190 ($^{79}\text{M}^+$, 100); $\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_2\text{N}^{79}\text{Br}$ について計算した質量: 189.95037. 実測値: 189.95052; m.p: 77-79

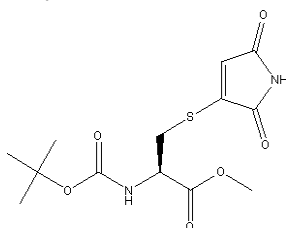
【0241】

参考例 3 : N - B o c - C y s (M a l) - O M e (化合物 4) の調製

【0242】

【化20】

10



【0243】

N - B o c - C y s - O M e (化合物 3) (36 mg、0.153 mmol) 及び酢酸ナトリウム (13 mg、0.153 mmol) のメタノール (3 mL) 中撹拌溶液に、メタノール (3 mL) 中のプロモマレイミド (30 mg、0.169 mmol) を添加した。1 分後、溶媒を真空中で除去した。この物質をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー (石油エーテル : 酢酸エチル、9 : 1 から 7 : 3 の勾配溶出) で精製して、淡黄色粉末 (51 mg、0.153 mmol) を 100 % の収率で得た。

20

^1H NMR (500MHz, CDCl_3): δ = 7.63 (s, 1H, NH), 6.27 (s, 1H, C=CH), 5.40 (d, 1H, J = 6.8, NH), 4.67 (ddd, 1H, J = 6.8, 5.4 及び 5.1, -HN-CH-C(O)-), 3.80 (s, 3H, O-CH₃), 3.48 (dd, 1H, J = 13.8 及び 5.1, -S-CHH-), 3.62 (dd, 1H, J = 14.1 及び 5.4, -S-CHH-) 1.45 (s, 9H, 3 x CH₃); ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3): δ = 170.2 (C=O), 168.9 (C=O), 167.6 (C=O), 155.2 (C=O), 155.9 (-C=CH-), 119.7 (-C=CH-), 81.1 ((CH₃)CO-), 53.3 (O-CH₃), 52.7 (CH), 34.0 (CH₂), 28.3 (3 x CH₃); IR (固体, cm^{-1}) 3236 (w), 1715 (s); MS (CI+) m/z, (%): 331 (M+H, 5), 275 (20), 231 (100); [$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{N}_2\text{S}$]+H について計算した質量: 331.09638. 実測値: 331.09684; $^{20}\alpha_D$: -41.9° (c = 1.0, メタノール); m.p. 145-147 .

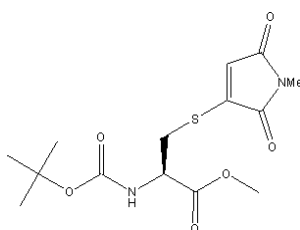
30

【0244】

参考例 4 : N - B o c - C y s (N - M e - M a l) - O M e (化合物 5) の調製

【0245】

【化21】



40

【0246】

N - B o c - C y s - O M e (32 mg、0.136 mmol) のメタノール (4 mL) 中撹拌溶液に、酢酸ナトリウム (82 mg、0.408 mmol) を添加した。メタノール (4 mL) 中の N - メチルプロモマレイミド (25.8 mg、0.136 mmol) を 10 分間かけてこれに添加した。この反応は淡黄色 (light yellow) に変化した。溶媒を真空中で除去し、残渣をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー (石油エーテル : 酢酸エチル、9 : 1 から 7 : 3 の勾配溶出) で精製して、青白い粉末 (39.3 mg、0.114 mmol) を 84 % の収率で得た。

50

^1H NMR (500MHz, CDCl_3): δ = 6.26 (s, 1H, C=CH), 5.36 (d, 1H, J = 6.3, NH), 4.66 (m, 1H, -HN-CH-), 3.79 (s, 3H, O-CH₃), 3.46 (dd, 1H, J = 5.2及び5.0, -S-CHH-), 3.35 (dd, 1H, J = 13.7及び5.1, -S-CHH-), 3.00 (s, 3H, -N-CH₃), 1.44 (s, 9H, 3 x CH₃); ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3): δ = 170.2 (C=O), 169.5 (C=O), 167.9 (C=O), 155.0 (C=O), 149.9 (-C=CH-), 118.7 (-C=CH-), 80.9 ((CH₃)₃CO-), 53.1 (O-CH₃), 52.7 (CH), 33.8 (CH₂), 28.3 (3 x CH₃), 24.1 (-N-CH₃); IR (固体, cm^{-1}) 3367.8, 2977.1, 1694.7; MS (ES+) m/z, (%): 367(46), 311 (M, 100); $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6\text{NaS}$ について計算した質量: 367.0940. 実測値: 367.0931; $^{20}\alpha_{\text{D}}$: -18.55° (c = 1.0, メタノール); m.p. 101-103

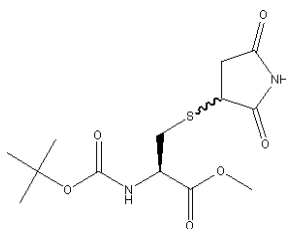
【 0 2 4 7 】

10

参考例 5 : N - B o c - C y s (S u c c) - O M e (化合物 6) の調製

【 0 2 4 8 】

【 化 2 2 】



【 0 2 4 9 】

20

N - B o c - C y s - O M e (3 6 m g 、 0 . 1 5 3 m m o l) のメタノール (3 m L) 中撹拌溶液に、メタノール (3 m L) のマレイミド (1 7 m g 、 0 . 1 6 9 m m o l) を添加した。1分後、溶媒を真空中で除去した。この物質をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー (ジクロロメタン : メタノール、99 : 1 から 7 : 3 の勾配溶出) で精製して、無色油状物 (5 1 m g 、 0 . 1 5 3 m m o l) を 1 0 0 % の収率で得た。これは、ジアステレオマーの 1 : 1 混合物であった。

^1H NMR (500MHz, CDCl_3): δ = 9.00 (s, 1H, NH), 8.95 (s, 1H, NH), 5.59 (1H, d, J = 7.6, NH), 5.41 (d, 1H, J = 7.6, NH), 4.65 - 4.56 (m, 2H, 2 x -HN-HC-C(O)-) C=C HH), 3.93 (dd, 1H, J = 9.3及び3.9, CH), 3.86 (dd, 1H, J = 9.2及び4.2, CH), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.51 (dd, 1H, J = 13.8及び4.6, -CHH-), 3.36 (d, 1H, J = 14.1及び6.0, -CHH-), 3.19-3.11 (m, 3H, 3 x -CHH-), 2.96 (dd, 1H, J = 13.1及び7.1, -CHH-), 2.54-2.02 (m, 2H, -CHH-) 1.43 (s, 18H, 9 x CH₃); ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3): δ = 177.2 (C=O), 177.1 (C=O), 175.1 (C=O), 175.0 (C=O), 172.0 (C=O), 171.5 (C=O), 155.5 (C=O), 155.3 (C=O), 80.6 (2 x -OCCH₃), 53.6 (CH), 52.91 (OCH₃), 52.85 (OCH₃), 50.8 (CH), 40.6 (CH), 40.0 (CH), 37.3 (CH₂), 37.0 (CH₂), 34.6 (CH₂), 34.1 (CH₂), 28.3 (6 x CH₃); IR (油, cm^{-1}) 3233 (w), 2980 (w), 1783 (w), 1709 (s); MS (CI+) m/z, (%): 333 (M+H, 15), 277 (50), 233 (100); $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{N}_2\text{S}$ について計算した質量: 332.10420. 実測値: 332.10475;

30

【 0 2 5 0 】

参考例 6 : マレイミドが N - B o c - C y s (M a l) - O M e のチオールを置換しないこと及びプロモマレイミドが N - B o c - C y s (S u c c) - O M e のチオールを置換しないことの実証

40

【 0 2 5 1 】

N - B o c - C y s - O M e (3 6 m g 、 0 . 1 5 3 m m o l) 及び酢酸ナトリウム (1 3 m g 、 0 . 1 5 3 m m o l) のメタノール (3 m L) 中撹拌溶液に、メタノール (3 m L) 中のプロモマレイミド (3 0 m g 、 0 . 1 6 9 m m o l) を添加した。10分後、マレイミド (1 7 m g 、 0 . 1 6 9 m m o l) を添加した。溶媒を真空中で除去した。 ^1H NMR分析は化合物 4 及び未反応のマレイミドのみを示した。

【 0 2 5 2 】

N - B o c - C y s - O M e (3 6 m g 、 0 . 1 5 3 m m o l) 及び酢酸ナトリウム (

50

13 mg、0.153 mmol) のメタノール (3 mL) 中撹拌溶液に、メタノール (3 mL) 中のマレイミド (17 mg、0.169 mmol) を添加した。10 分後、プロモマレイミド (30 mg、0.169 mmol) を添加した。溶媒を真空中で除去した。¹H NMR 分析は、化合物 6 及び未反応のプロモマレイミドのみを示した。

【0253】

参考例 7：プロモマレイミドとマレイミドとの間での、N - Boc - Cys - Ome をめぐる競合反応

N - Boc - Cys - OMe (36 mg、0.153 mmol) 及び酢酸ナトリウム (13 mg、0.153 mmol) のメタノール (3 mL) 中撹拌溶液に、プロモマレイミド (30 mg、0.169 mmol) 及びマレイミド (17 mg、0.169 mmol) のメタノール (3 mL) 中混合物を添加した。1 分後、溶媒を真空中で除去した。この物質をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー (石油エーテル：酢酸エチル、9：1 から 7：3 の勾配溶出) で精製して、70% の収率で淡黄色粉末 4 (36 mg、0.108 mmol) を得、30% の収率で無色油状物 6 (15 mg、0.045 mmol) を得た。

【0254】

参考例 5 により、一旦スクシンイミド又はマレイミド部分に結合すると、システイン部分はこれらの試薬の存在下で脱離できなくなることが実証された。従って、参考例 6 は、システイン試薬が、マレイミドとよりもプロモマレイミドとより迅速に反応することを実証している (即ち、反応速度論は、化合物 4 の形成に、より好都合である)。

【0255】

参考例 8：プロピルアミンと比較した、N - Boc - Cys - Ome に対するプロモマレイミド試薬の選択性の実証

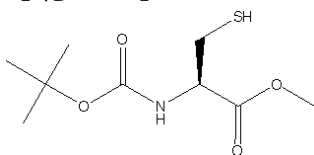
N - Boc - Cys - OMe (36 mg、0.153 mmol) 及びプロピルアミン (10 µL、0.153 mmol) のメタノール (3 mL) 中撹拌溶液に、メタノール (3 mL) 中のプロモマレイミド (30 mg、0.169 mmol) を添加した。1 分後、溶媒を真空中で除去した。この物質をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー (石油エーテル：酢酸エチル、9：1 から 7：3 の勾配溶出) で精製して、淡黄色粉末 (51 mg、0.153 mmol) を 100% で得た。データは、N - Boc - Cys (Mal) - OMe 4 について上記で得たものと一致した。

【0256】

参考例 9：N - Boc - Cys - OMe を再生するための N - Boc - Cys (Mal) - OMe の切断

【0257】

【化 23】



【0258】

4 (50 mg、0.151 mmol) のジメチルホルムアミド (2 mL) 中撹拌溶液に、20 mL の水性緩衝液 (150 mM NaCl、100 mM NaH₂PO₄、pH 8.0) を添加した。水性緩衝液 (150 mM NaCl、100 mM NaH₂PO₄、pH 8.0) 20 mL 中のトリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン (430 mg、1.51 mmol) を、この溶液に添加した。5 分後、この水溶液を酢酸エチル (3 x 25 mL) で抽出し、飽和塩化リチウム溶液 (5 x 25 mL)、水 (25 mL) 及びブライン (25 mL) で洗浄し、MgSO₄ で乾燥させた。溶媒を真空中で除去して、無色油状物 (34.5 mg、0.148 mmol) を 98% の収率で得た。この油状物の¹H NMR 及び¹³C NMR は、これが市販の N - Boc - システイン メチルエステル 3であることを示した。

【0259】

参考例 10 : 2, 3 - ジブロモマレイミドとソマトスタチンとの反応

ソマトスタチンは、分子内の 2 つのシステイン残基がジスルフィド結合で結合した形態で存在することが知られたペプチドホルモンである。

【0260】

1 mg の凍結乾燥ソマトスタチン (Sigma - Aldrich) を、2 ml の 50 mM NaHPO_4^- 、pH 6.2、40% MeCN、2.5% DMF 中に再可溶化した。500 μl を、Eppendorf 反応チューブに移し、同緩衝液中で希釈して最終濃度 0.25 mg/ml (152.6 μM) にした。2.0 当量の TCEP (50 mM NaHPO_4^- 、pH 6.2、40% MeCN 中 100 x ストック溶液) を添加し、反応を周囲温度で 1 時間インキュベートした。ジスルフィド結合の還元後、1.4 当量の 2, 3 - ジブロモマレイミド (Sigma - Aldrich、50 mM NaHPO_4^- 、pH 6.2、40% MeCN、2.5% DMF 中 100 x ストック溶液) を添加し、溶液を穏やかに混合して、4 分でさらに 12 時間インキュベートした。

【0261】

マレイミド架橋されたソマトスタチンが、LC - ESI - MS ($\text{ES}^+ / \text{ES}^-$) によって検出された。コントロールには、未処理のペプチド、及び 2, 3 - ジブロモマレイミド又は TCEP のみで処理したソマトスタチンを含めた。完全な還元は、TCEP 処理したペプチドとマレイミド (Sigma - Aldrich、50 mM NaHPO_4^- 、pH 6.2、40% MeCN、2.5% DMF 中の 100 x ストック溶液) との反応によって検出された。

【0262】

実験データ：

未処理のソマトスタチン：[ES+]1638.04 (m/z 1), 819.82 (m/z 2), 546.95 (m/z 3).

マレイミド架橋されたソマトスタチン：[ES+] 1734.14 Da (m/z 1), 867.40 Da (m/z 2), 578.73 (m/z 3).

【0263】

参考例 11 : GrB2 - SH2 ドメイン L111C の発現

【0264】

【化 24】



【0265】

タンパク質 GrB2 - SH2 ドメイン L111C をモデルタンパク質として使用した。このモデルタンパク質は単一のシステイン残基を含む。

【0266】

LC - MS は、Waters Acquity Single Quad Detector (SQD) に接続した Waters Acquity uPLC で実施した。カラム：Acquity uPLC BEH C18 1.7 μm 2.1 x 50 mm。波長：254 nm。移動相：95 : 5 水 (0.1% ギ酸) : MeCN (0.1% ギ酸)、4 分間にわたる勾配 (5 : 95 水 (0.1% ギ酸) : MeCN (0.1% ギ酸) まで。流速：0.6 mL / 分。MS モード：ES+。スキャン範囲：m/z = 85 - 2000。スキャン時間：0.25 秒。データは連続体モードで得た。MS のエレクトロスプレー供給源は、3.5 kV のキャピラリー電圧及び 50 V のコーン電圧で操作した。窒素を、総流量 600 L / h で、ネブライザー及び脱溶媒和ガスとして使用した。総質量スペクトルを、Mass Lynx ソフトウェアにプレインストールされた MaxEnt 1 アルゴリズムを使用して、イオンシリーズから再構築した。

【0267】

モデルタンパク質を E. coli 中で過剰発現させ、6 His タグ化タンパク質を、標準的な技術によって、Ni - アフィニティークロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグ

ラフィーの両方を使用して精製した。LC - MSを用いた分析により、所望のタンパク質に対応する質量 14169 の単一のタンパク質種が示された。

【0268】

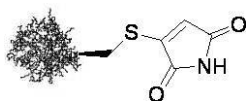
0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、Ellman 試薬 (5 μ L、H₂O 中 282 mM 溶液) を 0 で添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、10 分間 0 で維持し、その後、混合物を LC - MS で分析した。分析により、単一の反応が生じて 14366 の質量を有する単一の生成物が得られたことが示され、C111 が官能化に利用可能であることが示された。

【0269】

参考例 12 : GrB2 - SH2 ドメイン L111C とプロモレイミドとの反応

【0270】

【化25】



【0271】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、プロモレイミド (5 μ L、DMF 中 2.82 mM 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 0 で 1 時間維持した。LC - MS を使用した分析により、所望のタンパク質に対応する質量 14265 の単一のタンパク質種が示された。

【0272】

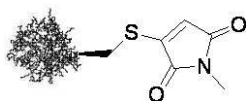
この混合物を、0 にて Ellman 試薬 (5 μ L、H₂O 中 282 mM 溶液) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、0 で 10 分間維持し、その後、混合物を LC - MS で分析した。分析により、Ellman 試薬との明白な反応がなかったことが示され、これは、プロモレイミドの官能化が C111 で生じたことを強調する。

【0273】

参考例 13 : GrB2 - SH2 ドメイン L111C と N - メチルプロモレイミドとの反応

【0274】

【化26】



【0275】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、N - メチルプロモレイミド (5 μ L、DMF 中 2.82 mM 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 0 で 1 時間維持した。LC - MS を使用した分析により、所望のタンパク質に対応する質量 14278 の単一のタンパク質種が示された。

【0276】

この混合物を、0 にて Ellman 試薬 (5 μ L、H₂O 中 282 mM 溶液) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、00 で 10 分間維持し、その後、混合物を LC - MS で分析した。分析により、Ellman 試薬との明白な反応がなかったことが示され、これは、N - メチルプロモレイミドの官能化が C111 で生じたことを強調する。

【0277】

参考例 14 : GrB2 - SH2 ドメイン L111C / プロモレイミド付加物のホスフィン媒介性の還元的切断

10

20

30

40

50

【 0 2 7 8 】

【 化 2 7 】



【 0 2 7 9 】

0 のモデルタンパク質溶液 (1 0 0 μ L、[タンパク質] 2 . 0 m g / m L、1 0 0 m M リン酸ナトリウム、1 5 0 m M N a C l、p H 8 . 0) に、プロモレイミド (5 μ L、DMF 中 2 . 8 2 m M 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 0 で 1 時間維持した。LC - MS を使用した分析により、タンパク質 / プロモレイミド付加物に対応する質量 1 4 2 6 5 の単一のタンパク質種が示された。

10

【 0 2 8 0 】

この混合物を、0 にて T C E P . H C l (5 μ L、H₂O 中 2 8 2 m M 溶液) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、0 で 3 時間維持し、その後、混合物を LC - MS で分析した。分析により、タンパク質 / プロモレイミド付加物が明らかに切断されて、Gr B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C (質量 = 1 4 1 6 8) を 8 5 % の収率で生じたことが示された。残りの物質は、未反応のタンパク質 / プロモレイミド付加物であった。

【 0 2 8 1 】

参考例 1 5 : Gr B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C / N - メチルプロモレイミド付加物のホスフィン媒介性の還元的切断

20

【 0 2 8 2 】

【 化 2 8 】



【 0 2 8 3 】

0 のモデルタンパク質溶液 (1 0 0 μ L、[タンパク質] 2 . 0 m g / m L、1 0 0 m M リン酸ナトリウム、1 5 0 m M N a C l、p H 8 . 0) に、N - メチルプロモレイミド (5 μ L、DMF 中の 2 . 8 2 m M 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 0 で 1 時間維持した。LC - MS を使用した分析により、タンパク質 / N - メチルプロモレイミド付加物に対応する質量 1 4 2 7 8 の単一のタンパク質種が示された。

30

【 0 2 8 4 】

この混合物を、0 にて T C E P . H C l (5 μ L、H₂O 中の 2 8 2 m M 溶液) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、0 で 3 時間維持し、その後、混合物を LC - MS で分析した。分析により、タンパク質 / N - メチルプロモレイミド付加物が明らかに切断されて、Gr B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C (質量 = 1 4 1 6 8) を 8 5 % の収率で生じたことが示された。残りの物質は、未反応のタンパク質 / N - メチルプロモレイミド付加物であった。

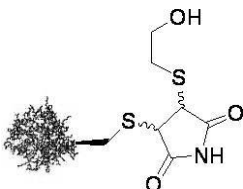
40

【 0 2 8 5 】

参考例 1 6 : Gr B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C / プロモレイミド / 2 - メルカプトエタノール付加物の合成

【 0 2 8 6 】

【 化 2 9 】



50

【 0 2 8 7 】

0 のモデルタンパク質溶液 (1 0 0 μ L、[タンパク質] 2 . 0 m g / m L、1 0 0 m M リン酸ナトリウム、1 5 0 m M N a C l、p H 8 . 0) に、プロモレイミド (5 μ L、DMF 中の 2 . 8 2 m M 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 0 で 1 時間維持した。LC - MS を使用した分析により、タンパク質 / プロモレイミド付加物に対応する質量 1 4 2 6 5 の単一のタンパク質種が示された。

【 0 2 8 8 】

この混合物を、0 にて 2 - メルカプトエタノール (5 μ L、H₂O 中の 2 . 8 2 m M 溶液) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、0 で 3 時間維持し、その後、混合物を LC - MS で分析した。分析により、タンパク質 / プロモレイミド / 2 - メルカプトエタノール付加物 (質量 = 1 4 3 3 9) が 5 5 % の収率で形成されたことが示された。残りの物質は Gr B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C であった。

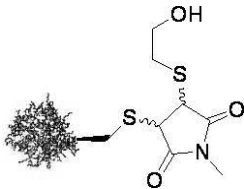
10

【 0 2 8 9 】

参考例 1 7 : Gr B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C / N - メチルプロモレイミド / 2 - メルカプトエタノール付加物の合成

【 0 2 9 0 】

【 化 3 0 】



20

【 0 2 9 1 】

0 のモデルタンパク質溶液 (1 0 0 μ L、[タンパク質] 2 . 0 m g / m L、1 0 0 m M リン酸ナトリウム、1 5 0 m M N a C l、p H 8 . 0) に、N - メチルプロモレイミド (5 μ L、DMF 中の 2 . 8 2 m M 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 0 で 1 時間維持した。LC - MS を使用した分析により、タンパク質 / N - メチルプロモレイミド付加物に対応する質量 1 4 2 7 8 の単一のタンパク質種が示された。

【 0 2 9 2 】

この混合物を、0 にて 2 - メルカプトエタノール (5 μ L、H₂O 中の 2 . 8 2 m M 溶液) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、0 で 3 時間維持し、その後、混合物を LC - MS で分析した。分析により、タンパク質 / N - メチルプロモレイミド / 2 - メルカプトエタノール付加物 (質量 = 1 4 3 5 6) が 6 1 % の収率で形成されたことが示された。残りの物質は、Gr B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C であった。

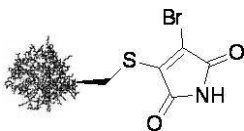
30

【 0 2 9 3 】

参考例 1 8 : Gr B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C / ジプロモレイミド付加物の合成

【 0 2 9 4 】

【 化 3 1 】



40

【 0 2 9 5 】

0 のモデルタンパク質溶液 (1 0 0 μ L、[タンパク質] 2 . 0 m g / m L、1 0 0 m M リン酸ナトリウム、1 5 0 m M N a C l、p H 8 . 0) に、ジプロモレイミド (5 μ L、DMF 中の 2 . 8 2 m M 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 0 で 4 時間維持した。LC - MS を使用した分析により、タンパク質 / ジプロモレイミド付加物に対応する質量 1 4 3 4 6 の単一のタンパク質種が示された。

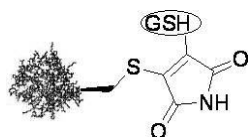
【 0 2 9 6 】

50

参考例 19 : GrB2 - SH2ドメイン L111C / ジプロモレイミド / グルタチオン
付加物の合成

【0297】

【化32】



【0298】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、ジプロモレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で4時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/ジプロモレイミド付加物に対応する質量14346の単一のタンパク質種が示された。

10

【0299】

この混合物を、0 にてグルタチオン (5 μ L、H₂O中の2.82 mM溶液) で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で2時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、タンパク質/ジプロモレイミド/グルタチオン付加物が、唯一の存在したタンパク質種 (質量 = 14572) であることが示された。

20

【0300】

参考例 20 : 生理学的に適当なグルタチオン濃度 (5 mM) での、GrB2 - SH2ドメイン L111C / ジプロモレイミド / グルタチオン付加物のグルタチオン媒介性の切断

【0301】

【化33】



【0302】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、ジプロモレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で4時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/ジプロモレイミド付加物に対応する質量14346の単一のタンパク質種が示された。

30

【0303】

この混合物を、0 にてグルタチオン (5 μ L、H₂O中の2.82 mM溶液) で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で2時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、タンパク質/ジプロモレイミド/グルタチオン付加物が、存在する唯一のタンパク質種 (質量 = 14572) であることが示された。

【0304】

この混合物を、0 にてグルタチオン (5 μ L、H₂O中の100 mM溶液) で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で4時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、GrB2 - SH2ドメイン L111C が、存在する唯一のタンパク質種 (質量 = 14173) であることが示された。

40

【0305】

B) さらなる実施例

一般的手順

¹H NMR及び¹³C NMRスペクトルは、¹Hについては500 MHz、¹³Cについては125 MHzの周波数で作動するBruker Avance 500機器で、室温で記録した。¹H NMRスペクトルは、CDCl₃ (7.26 ppm) シグナルを参照とした。¹³C NMRスペクトルは、CDCl₃ (77.67 ppm) シグナル

50

を参照とした。赤外線スペクトルは、センチメートルの逆数 (cm^{-1}) で与えられる周波数で、ATRモードで作動するPerkinElmer Spectrum 100 FT-IRスペクトロメータで実行した。低分子に関する質量スペクトル及び高分解能質量データは、VG70-SE質量分析計(EIモード及びCIモード)で記録した。融点はGallenkamp加熱ブロックで取得したものであり、未補正である。3,4-ジブロモマレイミド、凍結乾燥ソマトスタチン、PEG5000、TCEP及びベンゼンセレノールは、Sigma-Aldrichから購入し、さらなる精製なしに使用した。

【0306】

タンパク質及びペプチドの質量分析

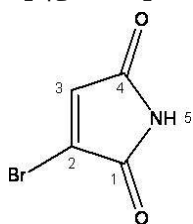
タンパク質サンプルに対するLC-MSは、Waters Acquity Single Quad Detector (SQD) に接続したWaters Acquity uPLCを使用して実施した。カラム: Acquity uPLC BEH C18 $1.7\mu\text{m}$ $2.1 \times 50\text{mm}$ 。波長: 254nm 。移動相: 95:5 水(0.1%ギ酸): MeCN(0.1%ギ酸)、4分間にわたる勾配(5:95 水(0.1%ギ酸): MeCN(0.1%ギ酸)まで。流速: $0.6\text{mL}/\text{分}$ 。MSモード: ES+。スキャン範囲: $m/z = 85 - 2000$ 。スキャン時間: 0.25秒。データは連続体モードで得た。MSのエレクトロスプレー供給源は、 3.5kV のキャピラリー電圧及び 50V のコーン電圧で操作した。窒素を、総流量 $600\text{L}/\text{h}$ で、ネブライザー及び脱溶媒和ガスとして使用した。総質量スペクトルを、MassLynxソフトウェアにブレインストールされたMaxEnt 1アルゴリズムを使用して、イオンシリーズから再構築した。MALDI-TOF分析は、MALDI micro MX (Micromass) で実施した。データは、 337nm のレーザー波長で、 12kV のソース電圧及び 5kV のリフレクション電圧で、リフレクトロン陽イオンモードで得た。サンプルは以下に概説したように調製し、ペプチドを含むサンプルを、脱イオン H_2O 中で24時間透析した。ペプチド及びその誘導体($0.1 \sim 0.3\text{mg}/\text{mL}$)を、トリフルオロ酢酸($10\text{mg}/\text{mL}$)を予めスポットした後に、 $2\mu\text{L}$ シナピン酸($10\text{mg}/\text{mL}$)中でMALDIプレート上にスポットした。ACTH($10\text{ng}/\text{mL}$)を質量較正に使用した。

【0307】

参考例21: ブロモマレイミドの調製

【0308】

【化34】



【0309】

クロロホルム(15mL)中のマレイミド(2.00g 、 0.02mol)に、クロロホルム(15mL)中の臭素(1.16mL 、 0.02mol)を滴下した。反応混合物を2時間還流し、1時間かけて室温まで冷却した。固体の黄色沈殿物を濾去し、冷クロロホルム($2 \times 50\text{mL}$)で洗浄して、粗製2,3-ジブロモスクシンイミド(4.09g 、 0.016mol)のオフホワイトの結晶を得た。粗製スクシンイミドをテトラヒドロフラン(50mL)中に溶解し、テトラヒドロフラン(10mL)中のトリエチルアミン(2.4mL 、 0.017mol)を5分間かけて0 で添加した。反応混合物を室温まで温め、48時間攪拌した。固体を濾去し、テトラヒドロフラン(50mL)で洗浄した。フラッシュクロマトグラフィーによる精製(石油エーテル中5%の酢酸エチル)で、所望の化合物(2.14g 、 0.012mol)が淡黄色粉末として59%の収率で得られた。

δ_{H} (500MHz , CDCl_3) 7.67 (br s, 1H , NH), 6.89 (s, 1H , H-3); δ_{C} (125MHz , CDCl_3)

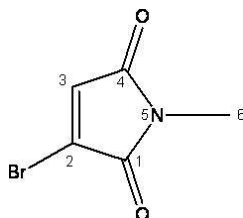
173.8 (C=O), 170.5 (C=O), 136.9 (C2), 135.4 (C3); IR (固体, cm^{-1}) 3235 (s), 1709 (s); MS (CI+) m/z, (相対強度): 178 ($[\text{M}^{\text{H}}]$, 32), 176 ($[\text{M}^{\text{H}}]$, 32), 125 (25), 86 (100); $[\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_2\text{N}^7\text{Br}] + \text{H}$ について計算した質量: 175.9347 実測値 175.9349 (CI+); m.p. 148 - 151°C; UV (アセトニトリル) $\epsilon_{242} = 13800$ 及び $\epsilon_{276} = 1700 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}\text{d}^3$.

【0310】

参考例 22 : N - メチルプロモマレイミドの調製

【0311】

【化35】



10

【0312】

メタノール (10 mL) 中の N - メチルマレイミド (0.5 g、4.5 mmol) に、メタノール (5 mL) 中の臭素 (232 μL 、4.5 mmol) を滴下した。反応混合物を室温で12時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、テトラヒドロフラン (20 mL) 中に溶解した。テトラヒドロフラン (5 mL) 中のトリエチルアミン (815 μL 、5.9 mmol) を5分間かけて添加したところ、沈殿が形成された。反応混合物を24時間攪拌した。固体を濾去し、テトラヒドロフラン (50 mL) で洗浄した。フラッシュクロマトグラフィーによる精製 (石油エーテル中10%の酢酸エチル) で、所望の化合物 (563 mg、2.96 mmol) が淡黄色粉末として66%の収率で得られた。 δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 6.90 (s, 1H, H-3), 3.09 (s, 3H, H₃-6); δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 168.6 (C=O), 165.4 (C=O), 131.9 (C3), 131.4 (C2), 24.7 (C6); IR (固体, cm^{-1}) 3106 (s), 1708 (s); MS (CI+) m/z, (相対強度): 192 ($[\text{M}^{\text{H}}]$, 99), 190 ($[\text{M}^{\text{H}}]$, 100); $[\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_2\text{N}^7\text{Br}] + \text{H}$ について計算した正確な質量は、189.9504を要する。実測値189.9505 (CI+); m.p.: 77-79 ; UV (アセトニトリル) $\epsilon_{209} = 17100$, $\epsilon_{238} = 13200$, $\epsilon_{299} = 290 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}\text{d}^3$.

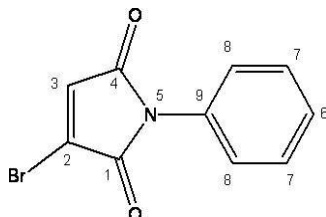
20

【0313】

参考例 23 : N - フェニルプロモマレイミドの調製

【0314】

【化36】



30

【0315】

クロロホルム (15 mL) 中の N - フェニルマレイミド (2 g、11.50 mmol) に、クロロホルム (5 mL) 中の臭素 (0.65 mL、12.70 mmol) を滴下した。反応混合物を1時間還流し、次いで室温まで冷却した。沈殿物を濾去し、クロロホルム (50 mL) で洗浄した。この固体 (2.70 g、8.10 mmol) をテトラヒドロフラン (50 mL) 中に溶解し、トリエチルアミン (1.2 mL、8.9 mmol) のテトラヒドロフラン (10 mL) 中溶液を0 でこれに滴下し、混合物を2時間攪拌した。混合物を室温まで温め、溶媒を真空中で除去した。残渣を酢酸エチル中に溶解し、 H_2O (50 mL) ブライン (50 mL) で洗浄し、乾燥させた (Na_2SO_4)。溶媒を真空中で除去して、所望の化合物 (1.80 g、7.14 mmol) を淡黄色固体として62%の収率で得た。データは文献: Sahoo et al., Synthesis, 20

40

50

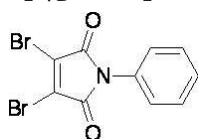
03, 346 と一致した。

【0316】

参考例 24: N-フェニルジブロモマレイミドの調製

【0317】

【化37】



【0318】

10

アニリン (72 μ L、0.788 mmol) を、ジブロモマレイン酸無水物 (200 mg、0.788 mmol) の AcOH (10 mL) 溶液に添加した。混合物を室温で3時間攪拌し、130 で90分間攪拌した。冷却後、混合物を乾燥するまで濃縮し、微量の AcOH をトルエンとの共沸混合物によって除去した。黄褐色 (tan) の残渣を、シリカフラッシュクロマトグラフィー (5% EtOAc / 95% 石油エーテル) を使用して精製して、所望の化合物を淡黄色固体として得た (166 mg、60%)。 δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 7.48 (m, 2H, ArH), 7.41 (tt, 1H, $J = 7.4$ 及び 1.1 Hz, ArH), 7.33 (m, 2H, ArH).; δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 163.0, 131.0, 130.0, 129.5, 128.8, 126.2.

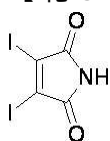
【0319】

参考例 25: 3, 4-ジヨード-ピロール-2, 5-ジオンの調製

20

【0320】

【化38】



【0321】

酢酸 (50 mL) 中のジブロモマレイミド (500.0 mg、2.0 mmol) に、ヨウ化ナトリウム (886.5 mg、5.9 mmol) を添加した。反応混合物を120 に加熱し、2時間還流した。反応を室温まで冷却し、 H_2O (50 mL) を添加し、4 で15時間維持した。黄色沈殿物を濾去し、風乾し、所望の化合物をオレンジ色の結晶性粉末として得た (415 mg、60%)。 1H NMR (500MHz, MeOD): シグナルなし; ^{13}C NMR (125MHz, MeOD): $\delta = 169.3$ (C), 119.5 (C); IR (固体, cm^{-1}): 3244 (s), 2944 (m), 2833 (m); MS (EI) m/z , (%): 349 (M, 83), 179 (100); $C_4H_2I_2O_2N$ について計算した質量: 348.80912. 実測値: 348.81026. m.p. 238-241 (文献値: 254-255).

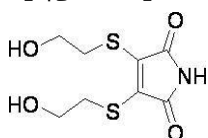
30

【0322】

参考例 26: 3, 4-ビス-(2-ヒドロキシ-エチルスルファニル)-ピロール-2, 5-ジオンの調製

【0323】

【化39】



【0324】

緩衝液 (100 mL、150 mM NaCl、100 mM リン酸ナトリウム、pH 8.0、5.0% DMF) 中の2-メルカプトエタノール (683.8 μ L、9.8 mmol) に、DMF (2.5 mL、最終濃度 DMF 7.5%) 中のジブロモマレイミド (1 g、3.9 mmol) を添加した。反応を室温で30分間攪拌し、塩化リチウム (20 g) を添加した。水性反応混合物を酢酸エチル (7 x 150 mL) で抽出した。有機層を合わ

50

せ、溶媒を真空中で除去し、残留物質をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー（石油エーテル：酢酸エチル、1：1から1：9の勾配溶出）で精製した。生成物を含む画分を収集し、溶媒を真空中で除去した。なお不純な生成物を、シリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー（メタノール：ジクロロメタン、0.5から10.0%のメタノールの勾配溶出）で精製して、所望の化合物を黄色固体として得た（518mg、53%）。

$\lambda_{\max}$ (50 mM リン酸ナトリウム, pH 6.2, 40 % MeCN, 2.5 % DMF) / 318 nm (ϵ / $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 1855); ^1H NMR (500MHz, MeOD): δ = 3.74 (t, 4H, J = 6.4, 2x HO-CH₂), 3.41 (t, 4H, J = 6.3, 2x S-CH₂) ^{13}C NMR (125MHz, MeOD): δ = 168.5 (C), 137.2 (C), 62.3 (CH₂), 34.4 (CH₂); IR (固体, cm^{-1}): 3344 (s), 2500 (m), 2078 (w); MS (EI) m/z , (%): 250 (M, 43), 232 (100), 161 (37); C₈H₁₁O₄NS₂について計算した質量: 250.02077. 実測値: 250.02126; m.p. 46-50 .

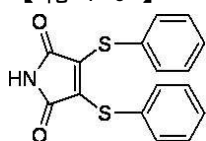
10

【0325】

参考例 27：3, 4 - ビス - フェニルスルファニル - ピロール - 2, 5 - ジオンの調製

【0326】

【化40】



【0327】

20

メタノール（6ml）中のジプロモマレイミド（80.0mg、0.3mmol）及び炭酸水素ナトリウム（130.2mg、1.6mmol）に、メタノール（1ml）のベンゼンチオール（66.6 μ l、0.7mmol）をゆっくりと添加した。反応を室温で15分間撹拌した。溶媒を真空中で除去し、残留物質をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー（石油エーテル：酢酸エチル、9：1から7：3の勾配溶出）で精製して、所望の生成物を、鮮黄色の結晶として得た（73mg、75%）。 $\lambda_{\max}$ (50 mM リン酸ナトリウム, pH 6.2, 40 % MeCN, 2.5 % DMF) / 412 nm (ϵ / $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 2245); ^1H NMR (500MHz, MeOD): δ = 7.27-7.22 (m, 6H, Ar-H), 7.16-7.14 (m, 4H, Ar-H); ^{13}C NMR (125MHz, MeOD): δ = 169.3 (C), 137.6 (C), 135.4 (C), 132.4 (CH), 130.1 (CH), 129.1 (CH); IR (固体, cm^{-1}): 3285 (m), 3059 (w), 2924 (w), 1774 (m), 1715 (s); MS (CI) m/z , (%): 314 (M+H, 100), 206 (13), 111 (12); C₁₆H₁₁O₂NS₂[+H]について計算した質量: 314.0231. 実測値: 314.0309; m.p. 102-104 (文献値: 123-126).

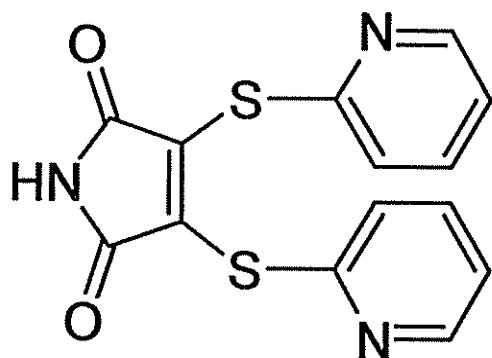
30

【0328】

参考例 28：3, 4 - ビス - (ピリジン - 2 - イルスルファニル) - ピロール - 2, 5 - ジオンの調製

【0329】

【化41】



40

【0330】

50

メタノール (1 5 m l) 中のジブロモマレイミド (3 0 0 . 0 m g 、 1 . 2 m m o l) 及び酢酸ナトリウム (4 8 0 . 0 m g 、 5 . 9 m m o l) に、メタノール (4 m l) の 1 H - ピリジン - 2 - チオン (2 7 5 . 8 m g 、 2 . 5 m m o l) をゆっくりと添加した。反応を室温で 1 5 分間撹拌した。溶媒を真空中で除去し、残留物質をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー (メタノール : ジクロロメタン、0 . 5 ~ 3 . 0 % の勾配溶出) で精製して、所望の生成物を暗黄色粉末として得た (1 9 0 m g 、 5 1 %) 。 $\lambda_{\max}$ (5 0 m M リン酸ナトリウム、pH 6.2, 40 % MeCN, 2.5 % DMF) / 395 nm (ϵ / $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 3508) ; ^1H NMR (500MHz, MeOD) : δ = 8.37 (d, 2H, J = 3.8, 2x N-CH), 7.70 (t, 2H, J = 6.9, 2x C-CH-CH), 7.38 (d, 2H, J = 7.9, 2x C-CH), 7.26 (t, 2H, J = 6.5, 2x N-CH-CH); ^{13}C NMR (125MHz, MeOD) : δ = 168.5 (C), 154.7 (C), 150.9 (CH), 140.0 (C), 139.0 (CH), 126.8 (CH), 123.7 (CH); IR (固体, cm^{-1}) : 2926 (m), 2734 (w), 1771 (w), 1726 (s), 1619 (m); MS (CI) m/z, (%) : 316 (M+H, 5), 152 (10), 126 (34), 112 (100); $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{O}_2\text{N}_3\text{S}_2$ [+H] について計算した質量 : 316.0214 . 実測値 : 316.0223 . ; m.p. 70-72 .

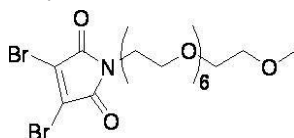
10

【 0 3 3 1 】

参考例 2 9 : N - P E G 3 0 0 ジブロモマレイミドの調製

【 0 3 3 2 】

【 化 4 2 】



20

【 0 3 3 3 】

反応は、完全に乾燥した条件下で実施した。THF (5 m L) 中のトリフェニルホスフィン (1 9 3 . 9 m g 、 0 . 7 m m o l) に、ジイソプロピルアゾジカルボキシレート (1 4 5 . 6 μ l 、 0 . 7 m m o l) を - 7 8 で滴下した。反応を 5 分間撹拌し、THF (4 m L) 中の P E G 3 0 0 (2 0 0 . 0 m g 、 0 . 6 m m o l) を滴下した。反応を 5 分間撹拌し、THF (1 m l) 中のネオペンチルアルコール (4 5 . 8 m g 、 0 . 5 m m o l) を添加した。反応を 5 分間撹拌し、THF (2 m l) 中の 3 , 4 - ジブロモマレイミド (1 8 9 . 4 m g 、 0 . 7 m m o l) を添加した。反応を 1 0 分間撹拌し、冷浴を取り除き、周囲温度で 2 0 時間撹拌した。溶媒を真空中で除去し、残留物質をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー (メタノール : ジクロロメタン、0 . 5 ~ 5 . 0 % メタノールの勾配溶出) で精製した。生成物を含む画分を収集し、溶媒を真空中で除去した。なお不純な生成物を、シリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー (石油エーテル : 酢酸エチル、7 : 3 から 2 : 8 の勾配溶出) で精製して、所望の化合物 (1 3 7 m g 、 4 0 %) を黄色油状物として 9 7 . 5 % の純度で得た。 ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) : δ = 3.76 (t, 2H, J = 5.6, N- CH_2), 3.64-3.52 (m, 24H, 12x CH_2 -O), 3.49 (t, 2H, J = 4.4, N- CH_2 - CH_2), 3.32 (s, 3H, O- CH_3); ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) : δ = 163.8 (2x C), 129.5 (2x C), 72.0 (CH_2), 70.7-70.5 (9x CH_2), 70.1 (2x CH_2), 67.5 (CH_2), 59.1 (CH_3), 39.0 (CH_2); IR (固体, cm^{-1}) : 3496 (w), 2869 (m), 1786 (m), 1720 (s), 1594 (m); MS (CI) m/z, (%) : 580 ($^{81}\text{M}+\text{H}$, 12), 578 ($^{81}, ^{79}\text{M}+\text{H}$, 23), 576 ($^{79}\text{M}+\text{H}$, 12), 279 (100), 84 (61); $\text{C}_{19}\text{H}_{31}^{79}\text{Br}_2\text{O}_9\text{N}$ [+H] について計算した質量 : 576.0444 . 実測値 : 576.0437 .

30

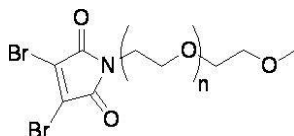
40

【 0 3 3 4 】

参考例 3 0 : N - P E G 5 0 0 0 ジブロモマレイミドの調製

【 0 3 3 5 】

【化 4 3】



【0336】

反応は、完全に乾燥した条件下で実施した。THF (8 mL) 及び DCM (3 mL) の混合物中のトリフェニルホスフィン (154.6 mg、0.6 mmol) に、ジイソプロピルアゾジカルボキシレート (116.0 μ l、0.6 mmol) を -78 で滴下した。反応を5分間攪拌し、ジクロロメタン (7 mL) 中のPEG5000 (2950.0 mg、0.6 mmol) を滴下した。反応を5分間攪拌し、THF (1 mL) 及び DCM (1 mL) の混合物中のネオペンチルアルコール (26.5 mg、0.3 mmol) を添加した。反応を5分間攪拌し、THF (2 mL) 中の3,4-ジブロモマレイミド (150.0 mg、0.6 mmol) を添加した。反応を5分間攪拌し、冷浴を取り除き、周囲温度で20時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、残留物質をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー (メタノール：ジクロロメタン、0.5 ~ 5.0 %メタノールの勾配溶出) で精製した。生成物を含む画分を収集し、溶媒を真空中で除去した。なお不純な生成物を、非常にゆっくりとしたシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー (メタノール：ジクロロメタン、0.5 ~ 6.0 %メタノールの勾配溶出) で精製して、所望の化合物を淡緑色の結晶性粉末として得た (417 mg、13%)。¹H NMR (500MHz, CDCl₃): δ = 3.58 (s, 4x n H, CH₂); ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃): δ = 163.8 (C), 129.5 (C), 70.6 (CH₂); IR (固体, cm⁻¹): 3517 (w), 2872 (s), 1977 (w), 1727 (m), 1641 (w); m.p. 51-55 .

10

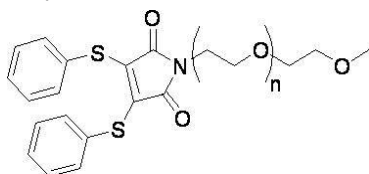
20

【0337】

参考例 3 1 : N - PEG5000 ジチオフェノールマレイミドの調製

【0338】

【化 4 4】



30

【0339】

反応は、完全に乾燥した条件下で実施した。THF (8 mL) 及び DCM (3 mL) の混合物中のトリフェニルホスフィン (167.7 mg、0.6 mmol) に、ジイソプロピルアゾジカルボキシレート (125.9 μ l、0.6 mmol) を -78 で滴下した。反応を5分間攪拌し、DCM (7 mL) 中のPEG5000 (1600.0 mg、0.3 mmol) を滴下した。反応を5分間攪拌し、THF (1 mL) 及び DCM (1 mL) の混合物中のネオペンチルアルコール (56.3 mg、0.6 mmol) を添加した。反応を5分間攪拌し、THF (3 mL) 中の3,4-ジチオフェノールマレイミド (200.0 mg、0.6 mmol) を添加した。反応を5分間攪拌し、冷浴を取り除き、周囲温度で20時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、残留物質をシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー (メタノール：ジクロロメタン、0.5 ~ 10.0 %メタノールの勾配溶出) で精製した。生成物を含む画分を収集し、溶媒を真空中で除去した。なお不純な生成物を、TLCグレードのシリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィー (メタノール：ジクロロメタン、0.0 ~ 10.0 %メタノールの勾配溶出) で精製して、所望の化合物を鮮黄色の結晶性粉末として得た (1.24 g、73%)。¹H NMR (500MHz, CDCl₃): δ = 7.26 (dd, H, J = 7.7, J = 4.5, CH), 7.23 (dd, 2H, J = 8.4, J = 6.6, CH), 7.19 (dd, 2H, J = 8.4, J = 6.8, CH), 3.63 (s, 4x n H, CH₂); ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃): δ = 166.7 (C), 135.7 (C), 131.9 (CH), 129.1 (C), 129.0 (CH), 128.4 (CH), 70.6

40

50

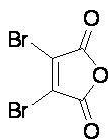
(CH₂); IR (固体, cm⁻¹): 3498 (w), 2881 (s), 1959 (w), 1711 (m); m.p. 57-59 .

【 0 3 4 0 】

参考例 3 2 : 2 , 3 - ジブロモマレイン酸無水物の調製

【 0 3 4 1 】

【 化 4 5 】



【 0 3 4 2 】

不活性雰囲気下で、無水マレイン酸 (1 . 5 0 g 、 1 5 . 3 m m o l 、 1 当量) 、 三塩化アルミニウム (3 0 0 m g 、 0 . 2 1 m m o l 、 触媒) 及び臭素 (4 . 9 5 g 、 3 0 . 6 m m o l 、 2 当量) の溶液を、密封アンプル (注意 - プラストシールド) 中で 1 6 0 で 1 6 時間加熱した。 2 1 まで冷却し、反応混合物をさらに 2 4 時間攪拌し、注意深く開放した。 E t O A c を添加し、固体を濾去し、さらなる E t O A c で繰り返し洗浄した。最後に濾液を真空中で濃縮して、表題化合物を黄色固体として得、これをさらなる精製なしに使用した (3 . 0 5 g 、 1 1 . 9 m m o l 、 7 8 % 収率) 。 m . p 107-110 ; ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ 163.33 (s), 125.28 (s); IR (MeOH) 1769, 1706, 1590 cm⁻¹; C₄O₃Br₂ [M]⁺ について計算したHRMS (CI) 253.82087, 実測値253.82082.

10

【 0 3 4 3 】

参考例 3 3 : t e r t - ブチル N - (2 - (2 - (2 - アミノエトキシ) エトキシ) エチル) カルバメートの調製

【 0 3 4 4 】

【 化 4 6 】



【 0 3 4 5 】

ジ - t e r t - ブチル - ジカーボネート (1 . 1 0 g 、 5 . 0 0 m m o l 、 1 当量) の C H ₂ C l ₂ (5 m L) 中溶液を、 2 - [2 - (2 - アミノエトキシ) エトキシ] エタンアミン (7 . 3 2 m L 、 5 0 . 0 m m o l 、 1 0 当量) の C H ₂ C l ₂ (1 5 m L) 中溶液に滴下した。得られた反応混合物を、 2 1 で 2 4 時間攪拌した。次いで C H ₂ C l ₂ を真空中で除去して、無色の残渣を得た。 E t O A c (1 2 5 m L) の添加により、白色沈殿物の形成が起こり、これを N a ₂ C O ₃ の飽和溶液 (3 x 5 0 m L) で洗浄し、 M g S O ₄ で乾燥させ、真空中で濃縮した。カラムクロマトグラフィー (8 : 2 C H ₂ C l ₂ / M e O H) によるさらなる精製で、所望のモノ保護されたアミンが無色油状物として得られた (0 . 6 9 g 、 2 . 8 0 m m o l 、 5 6 % 収率) 。 ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.27 (bs, 1H, NH), 3.54-3.52 (m, 4H, OCH₂), 3.47-3.42 (m, 4H, OCH₂), 3.23-3.22 (m, 2H, NCH₂), 2.80 (t, J = 5.0, 2H, NCH₂), 2.05 (bs, 2H, NH), 1.35 (s, 9H, CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 156.08 (s), 79.09 (s), 73.19 (t), 70.21 (t), 70.16 (t), 41.59 (t), 40.32 (t), 28.40 (q), * 1 t 欠落; IR (ニート) 3344, 2869, 1692 cm⁻¹; C₁₁H₂₅N₂O₄ [M + H]⁺ について計算したHRMS (CI) 249.18143, 実測値249.18251.

30

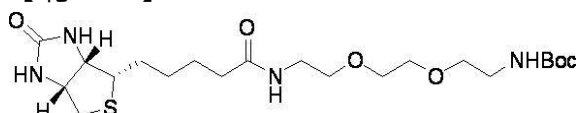
40

【 0 3 4 6 】

参考例 3 4 : t e r t - ブチル - N - (2 - (2 - (2 - (5 - (2 - オキソ - 1 , 3 , 3 a , 4 , 6 , 6 a - ヘキサヒドロチエノ (3 , 4 - d) イミダゾール - 6 - イル) ペンタノイルアミノ) エトキシ) エトキシ) エチル) カルバメートの調製

【 0 3 4 7 】

【 化 4 7 】



【 0 3 4 8 】

50

ビオチン (0.59 g、2.42 mmol、1.5 当量)、HBTU (0.79 g、2.10 mmol、1.3 当量) 及び DIEA (0.45 mL、2.60 mmol、1.6 当量) の DMF (15 mL) 溶液を、21 で 20 分間攪拌し、その後、tert-ブチル-N-(2-(2-(2-アミノエトキシ)エトキシ)エチル)カルバメート (400 mg、1.61 mmol、1 当量) の DMF (10 mL) 溶液に滴下した。反応混合物を 21 で 2 時間攪拌し、その後、DMF を真空中で除去して黄色残渣を得た。粗製生成物をカラムクロマトグラフィー (勾配 2 ~ 10 % の MeOH / CH₂Cl₂) で精製して、所望の化合物を白色固体として得た (0.61 g、1.29 mmol、80 % 収率)。m.p. 106-108 ; $[\alpha]_D^{20.0} +23.0$ (c 0.6, CH₂Cl₂); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.55 (dd, J = 5.0, 7.5 Hz, 1H, NHC(O)NHCH), 4.36 (dd, J = 5.0, 7.5 Hz, 1H, NHC(O)NHC H), 3.62 (bs, 6H, OCH₂), 3.59-3.55 (m, 2H, OCH₂), 3.46 (m, 2H, NCH₂), 3.31 (m, 2 H, NCH₂), 3.17 (dt, 3.0, 5.0 Hz, 1H, SCH), 2.92 (dd, J = 5.0, 13.0 Hz, 1H, SCHH), 2.79 (d, J = 13.0 Hz, 1H, SCHH), 2.27 (t, J = 7.0 Hz, 2H, NHC(O)CH₂CH₂CH₂), 1.71 (m, 4H, NHC(O)CH₂CH₂CH₂CH₂), 1.47 (br, 11H, C(CH₃)₃ & NHC(O)CH₂CH₂CH₂CH₂); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 173.69 (s), 163.92 (s), 155.99 (s), 79.14 (s), 70.03 (t), 69.69 (br t), 61.58 (d), 60.06 (d), 55.19 (d), 40.16 (t), 39.96 (t), 38.91 (t), 35.44 (t), 28.09 (q), 27.80 (t), 27.67 (t), 25.23 (t), * 2 t 非存在; IR (ニート) 3307, 2933, 1691 cm⁻¹; C₂₁H₃₈N₄O₆NaS [M+Na]⁺ について計算した HRMS (ES) 497.2410, 実測値 497.2423.

10

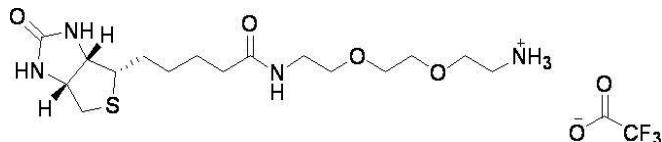
20

【0349】

参考例 35: 2-(2-(2-(5-(2-オキソ-1,3,3a,4,6,6a-ヘキサヒドロチエノ(3,4-d)イミダゾール-6-イル)ペンタノイルアミノ)エトキシ)エトキシ)エチルアンモニウム; 2,2,2-トリフルオロアセテートの調製

【0350】

【化48】



30

【0351】

tert-ブチル N-(2-(2-(2-(5-(2-オキソ-1,3,3a,4,6,6a-ヘキサヒドロチエノ(3,4-d)イミダゾール-6-イル)ペンタノイルアミノ)エトキシ)エトキシ)エチル)カルバメート (0.61 g、1.29 mmol) の CH₂Cl₂ (5 mL) 及び TFA (5 mL) 中溶液を、21 で 24 時間攪拌した。次いでトルエンを添加し (x 2)、溶媒を真空中で除去して、所望の化合物を油状物として得た (0.63 g、1.29 mmol、100 % 収率)。 $[\alpha]_D^{20.0} +41.0$ (c 0.49, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.53 (dd, J = 5.0, 7.5 Hz, 1H, NHC(O)NHCH), 4.33 (dd, J = 5.0, 7.5 Hz, 1H, NHC(O)NHCH), 3.71 (t, J = 5.0 Hz, 2H, OCH₂CH₂NH₃), 3.65 (br, 4H, OCH₂), 3.57 (t, J = 5.0 Hz, 2H, OCH₂), 3.38 (t, J = 5.0 Hz, 2H, OCH₂), 3.22 (dt, J = 5.0, 8.5 Hz, 1H, SCH), 3.13 (t, J = 5.0 Hz, 2H, C(O)NHCH₂CH₂O), 2.94 (dd, J = 5.0, 13.0 Hz, 1H, SCHH), 2.74 (d, J = 13.0 Hz, 1H, SCHH), 2.24 (t, J = 7.5 Hz, 2H, NHC(O)CH₂CH₂CH₂), 1.76-1.43 (m, 6H, NHC(O)CH₂CH₂CH₂CH₂); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 174.98 (s), 164.76 (s), 69.92 (t), 69.83 (t), 69.22 (t), 66.46 (t), 62.08 (d), 60.36 (d), 55.59 (d), 39.65 (t), 39.24 (t), 38.77 (t), 35.29 (t), 28.29 (t), 28.06 (t), 25.44 (t); IR (MeOH) 3300, 2941, 1686 cm⁻¹; C₁₆H₃₁N₄O₄S [M+H]⁺ について計算した HRMS (ES) 375.2066, 実測値 375.2060.

40

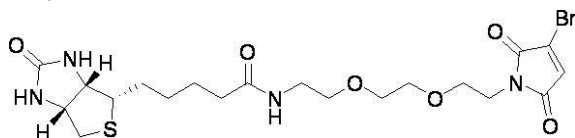
【0352】

参考例 36: N-(2-(2-(2-(3-プロモ-2,5-ジオキソ-ピロール-1-イル)エトキシ)エトキシ)エチル)-5-(2-オキソ-1,3,3a,4,6,6a-ヘキサヒドロチエノ(3,4-d)イミダゾール-6-イル)ペンタンアミドの調製

50

【 0 3 5 3 】

【 化 4 9 】



【 0 3 5 4 】

モノブロモマレイン酸無水物 (4 5 . 0 m g 、 0 . 2 5 m m o l 、 1 当量) を、 2 - (2 - (2 - (5 - (2 - オキソ - 1 , 3 , 3 a , 4 , 6 , 6 a - ヘキサヒドロチエノ (3 , 4 - d) イミダゾール - 6 - イル) ペンタノイルアミノ) エトキシ) エトキシ) エチルアンモニウム 2 , 2 , 2 - トリフルオロアセテート (1 2 4 m g 、 0 . 2 5 m m o l 、 1 当量) の A c O H (1 0 m L) 溶液に一度に添加し、反応混合物を 1 7 0 で 3 時間加熱した。 2 1 まで冷却してトルエンを添加し、A c O H を共沸により真空中で除去して (x 2) 、粗製生成物を得た。カラムクロマトグラフィー (勾配 2 ~ 1 0 % の M e O H / C H ₂ C l ₂) により、所望の化合物を白色固体として得た (7 0 . 0 m g 、 0 . 1 3 m m o l 、 5 2 % 収率) 。 m . p . 95-98 ; [α] _D^{20.0} +65.1 (c 0.15, MeOH) ; ¹H NMR (600 MHz, C D ₃ O D) δ 7.17 (s , 1 H , C H C B r) , 4.51 (d d , J = 5.0 , 8.0 H z , 1 H , N H C (O) N H C H) , 4.33 (d d , J = 5.0 , 8.0 H z , 1 H , N H C (O) N H C H) , 3.77 (t , J = 5.5 H z , 2 H , O C H ₂) , 3.68 (t , J = 5.5 H z , 2 H , O C H ₂) , 3.63 (m , 2 H , O C H ₂) , 3.58 (m , 2 H , O C H ₂) , 3.53 (t , J = 5.5 H z , 2 H , N C H ₂) , 3.37 (t , J = 5.5 H z , 2 H , N C H ₂) , 3.24 (t d , J = 5.0 , 8.0 H z , 1 H , S C H) , 2.95 (d d , J = 5.0 , 12.5 H z , 1 H , S C H H) , 2.73 (d , J = 12.5 H z , 1 H , S C H H) , 2.26 (t , J = 7.0 H z , 2 H , N H C (O) C H ₂ C H ₂ C H ₂) , 1.69 (m , 4 H , C H ₂ C H ₂ C H ₂) , 1.47 (クインテット , J = 7.0 H z , 2 H , C H ₂ C H ₂ C H ₂) ; ¹³C NMR (150 MHz, C D ₃ O D) δ 176.12 (s) , 170.13 (s) , 166.97 (s) , 166.08 (s) , 133.63 (s) , 132.05 (d) , 71.22 (t) , 71.11 (t) , 70.61 (t) , 68.69 (t) , 63.35 (d) , 61.61 (d) , 57.03 (d) , 41.09 (t) , 40.31 (t) , 39.09 (t) , 36.75 (t) , 29.78 (t) , 29.50 (t) , 26.87 (t) ; IR (MeOH) 3355 , 2970 , 1737 c m ⁻¹ ; C ₂₀ H ₂₉ N ₄ O ₆ Na S B r [M + N a] ⁺ について計算した HRMS (ES) 555.0889 , 実測値 555.0905 .

10

20

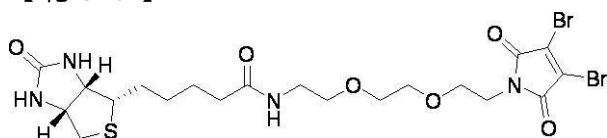
【 0 3 5 5 】

参考例 3 7 : N - (2 - (2 - (2 - (3 , 4 - ジブロモ - 2 , 5 - ジオキソ - ピロール - 1 - イル) エトキシ) エトキシ) エチル) - 5 - (2 - オキソ - 1 , 3 , 3 a , 4 , 6 , 6 a - ヘキサヒドロチエノ (3 , 4 - d) イミダゾール - 6 - イル) ペンタンアミドの調製

30

【 0 3 5 6 】

【 化 5 0 】



【 0 3 5 7 】

ジブロモマレイン酸無水物 (1 0 8 m g 、 0 . 4 2 m m o l 、 1 当量) を、 2 - (2 - (2 - (5 - (2 - オキソ - 1 , 3 , 3 a , 4 , 6 , 6 a - ヘキサヒドロチエノ (3 , 4 - d) イミダゾール - 6 - イル) ペンタノイルアミノ) エトキシ) エトキシ) エチルアンモニウム 2 , 2 , 2 - トリフルオロアセテート (2 0 5 m g 、 0 . 4 2 m m o l 、 1 当量) の A c O H (1 0 m L) 溶液に一度に添加し、反応混合物を 1 7 0 で 2 時間加熱した。 2 1 まで冷却してトルエンを添加し、A c O H を共沸により真空中で除去して (x 2) 、粗製生成物を得た。カラムクロマトグラフィー (勾配 2 ~ 7 % の M e O H / C H ₂ C l ₂) により、所望の化合物を白色固体として得た (1 2 3 m g 、 0 . 2 0 m m o l 、 4 8 % 収率) 。 m . p . 100-102 ; [α] _D^{20.0} +71.0 (c 0.15, MeOH) ; ¹H NMR (600 MHz, C D ₃ O D) δ 4.53 (d d , J = 5.0 , 8.0 H z , 1 H , N H C (O) N H C H) , 4.34 (d d , J = 5.0 , 8.0 H

40

50

z, 1H, NHC(O)NHCH), 3.82 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH₂), 3.70 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH₂), 3.63 (m, 2H, OCH₂), 3.59 (m, 2H, OCH₂), 3.53 (t, J = 5.5 Hz, 2H, NCH₂), 3.37 (t, J = 5.5 Hz, 2H, NCH₂), 3.24 (dt, J = 5.0, 8.0 Hz, 1H, SCH), 2.96 (dd, J = 5.0, 13.0 Hz, 1H, SCHH), 2.73 (d, J = 13.0 Hz, 1H, SCHH), 2.26 (t, J = 7.5 Hz, 2H, NHC(O)CH₂CH₂CH₂), 1.74 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂), 1.49 (クインテット, J = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ 174.83 (s), 164.71 (s), 164.06 (s), 129.00 (s), 69.80 (t), 69.72 (t), 69.24 (t), 67.19 (t), 61.97 (d), 60.22 (d), 55.64 (d), 39.67 (t), 39.03 (t), 38.56 (t), 35.42 (t), 28.39 (t), 28.11 (t), 25.47 (t); IR (MeOH) 2970, 1724, 1365, 1217 cm⁻¹; C₂₀H₂₈N₄O₆NaSBr₂[M+Na]⁺について計算したHRMS (ES) 631.9916, 実測値631.9937.

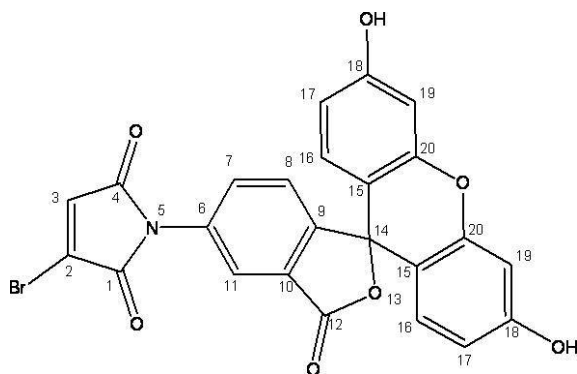
10

【 0 3 5 8 】

参考例 3 8 : N - フルオレセインプロモレイミドの調製

【 0 3 5 9 】

【 化 5 1 】



20

【 0 3 6 0 】

ジプロモマレイン酸無水物 (3.46 mg、1.95 mmol) を、フルオレセインアミン異性体 1 (6.78 mg、1.95 mmol) の酢酸 (6.5 mL) 溶液に一度に添加し、反応混合物を密封管中で室温で 12 時間撹拌した。次いで、反応混合物を 150 °C で 3 時間加熱した。室温まで冷却して固体を濾過し、乾燥させて (トルエン共沸混合物)、所望の化合物をオレンジ色の固体として得た (7.22 mg、1.43 mmol、73% 収率)。¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 7.99 (d, 1H, J = 1.7, 1H, H-11), 7.77 (dd, 1H, J = 1.9 及び 8.2, 1H, H-7), 7.73 (s, 1H, H-3), 7.43 (d, J = 8.2, 1H, H-8), 6.69 (m, 6H, 2 x H-16, 2 x H-17, 2 x H-18); ¹³C NMR (175 MHz, DMSO) δ 167.93 (C=O), 167.63 (C=O), 164.48 (C=O), 159.62 (2 x C18), 151.79 (2 x C20), 151.52 (C6), 133.68 (C7), 133.02 (Ar), 132.90 (C3), 131.23 (C), 129.15 (2 x Ar-H), 126.73 (C), 124.82 (C11), 122.29 (C8), 112.77 (2 x Ar-H), 109.08 (2 x Ar), 102.30 (2 x Ar-H), 83.36 (C14); IR (固体, cm⁻¹) 3064 (w), 1726 (s); MS (ES+) m/z, (相対強度): 508 ([⁸¹M], 95), 506 ([⁷⁹M], 100); [C₂₄H₁₃O₇N⁷⁹Br] について計算した正確な質量は 505.9875 を要求、実測値 505.9833 (ES+).

30

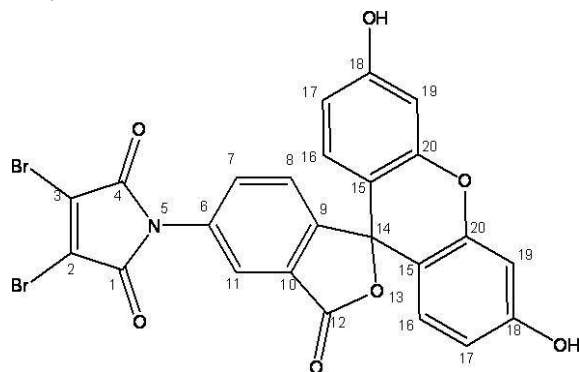
【 0 3 6 1 】

参考例 3 9 : N - フルオレセインジプロモレイミドの調製

【 0 3 6 2 】

40

【化 5 2】



10

【 0 3 6 3】

ジプロモマレイン酸無水物 (77.0 mg、0.30 mmol) を、フルオレセインアミン異性体 1 (105 mg、0.30 mmol) の酢酸 (10 mL) 溶液に一度に添加し、反応混合物を室温で 6 時間撹拌した。次いで固体を濾去し、酢酸エチルで洗浄し、酢酸 (10 mL) 中に再溶解した。次いで反応混合物を 3 時間加熱還流した。室温まで冷却してトルエン (10 mL) を添加し、溶媒を真空中で除去し、所望の化合物をオレンジ色の固体として得た (148 mg、0.25 mmol、84% 収率)。 δ ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.07 (d, 1H, $J = 1.5$, H-11), 7.81 (dd, 1H, $J = 1.5$ 及び 8.0, H-7), 7.34 (d, 1H, $J = 8.5$, H-8), 6.71-6.58 (m, 6H, 6 x Ar-H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 170.23 (C=O), 164.34 (2 x C=O), 161.63 (2 x C), 154.18 (2 x C), 152.93 (C), 134.59 (C), 134.19 (Ar-H), 131.01 (C), 130.35 (Ar-H), 129.25 (2 x C), 126.25 (2 x Ar-H), 123.63 (Ar-H), 113.84 (2 x Ar-H), 111.02 (2 x C), 103.55 (2 x Ar-H); IR (固体, cm^{-1}) 3064 (w), 1732 (s); MS (ES+) m/z , (相対強度): 586 ($[\text{M}^{81+81}]$, 30), 584 ($[\text{M}^{79+81}]$, 100), 582 ($[\text{M}^{79+79}]$, 100); $[\text{C}_{24}\text{H}_{10}\text{O}_7\text{N}^{79}\text{Br}_2]$ について計算した正確な質量は 581.8824 を要求、実測値 581.8824 (ES+).

20

【 0 3 6 4】

参考例 40: *tert*-ブチル 2-アミノエチルカルバメートの調製

【 0 3 6 5】

【化 5 3】



30

【 0 3 6 6】

DCM (30 mL) 中のジ-*tert*-ブチルジカーボネート (3.26 g、15 mmol、1 当量) を、オートインジェクターを使用して 2 時間かけて、アルゴン雰囲気下でエチレンジアミン (10 mL、150 mmol、10 当量) の DCM (30 mL) 溶液に滴下した。TLC 分析 (溶離液: 90% EtOAc: 10% MeOH $R_f(8) = 0.23$) に基づけば、添加終了の 30 分後に反応は完了した。DCM を、Buechi を使用して減圧下で除去した。得られた残渣を EtOAc (40 mL) 中に取り、飽和 Na_2CO_3 (3 x 20 mL) で洗浄し、 MgSO_4 で乾燥させ、真空中で濃縮して、所望の生成物を白色泡状物として得た (2.08 g; 12.98 mmol、87%)。mp (104-106), δ_{H} ^1H NMR (300MHz CDCl_3): 4.95 (ブロードシングレット, 1H, NH), 3.12 (q, $J=6.4$ Hz, 2H, CH_2), 2.78 (t, $J=5.9$ Hz, 2H, CH_2), 1.42 (s, 9H, 3CH_3). ^{13}C NMR (CDCl_3): 28.06, 41.51, 43.02, 78.82, 155.9 IR: 3354.9cm^{-1} , $[\text{M} + \text{H}]^+$: 161.00

40

【 0 3 6 7】

参考例 41: *tert*-ブチル 2-(5-(ジメチルアミノ)ナフタレン-1-スルホンアミド)エチルカルバメートの調製

【 0 3 6 8】

【化 5 4】



【0369】

丸底フラスコを火炎乾燥させ、スターラーバー及びアミン（0.57 g、3.6 mmol、1 当量）の乾燥 DCM（150 mL）溶液をアルゴン雰囲気下で投入した。乾燥 DCM（150 mL）及びトリエチルアミン（1.3 mL、9.29 mmol、2.5 当量）中のダンシルクロリド（1.05 g、3.92 mmol、1.1 当量）を、隔壁を介して一度に添加した。反応を TLC（溶離液：35% EtOAc：65% 石油エーテル $R_f(9) = 0.27$ ，長波 UV 下での緑色蛍光）でモニタリングしたところ、反応は 4 時間後に完了した。カラムクロマトグラフィー（溶離液：35% EtOAc：65% 石油エーテル）での精製後、所望の化合物が粘着性の透明な緑色油状物として形成された（1.24 g、3.15 mmol、88%）。

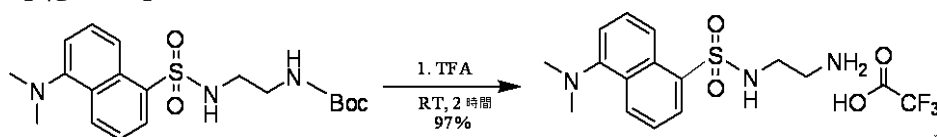
δ_H 1H NMR (CDCl₃): 8.55(d, J=8.55Hz, 1H, CH), 8.46(d, J=8.51Hz, 1H, CH), 8.33(d, J=8.67Hz, 1H, CH), 7.57(m, 2H, 2xCH), 7.26(d, J=7.08Hz, 1H, CH), 3.07(カルテット, J=6.58Hz, 2H, CH₂), 2.89(m, 2H, CH₂), 2.85(s, 6H, 2xCH₃), 1.35(s, 9H, 3xCH₃). ^{13}C NMR (CDCl₃): 158.01, 153.05, 136.5, 131.49, 131.09, 130.02, 129.54, 124.48, 120.59, 116.41, 80.41, 45.9, 43.81, 41.5, 28.5. MS: [M + H]⁺: 393.16.

【0370】

参考例 42: 5 - (3 - アミノプロピルスルホニル) - N, N - ジメチルナフタレン - 1 - アミン 2, 2, 2 - トリフルオロアセテートの調製

【0371】

【化 5 5】



【0372】

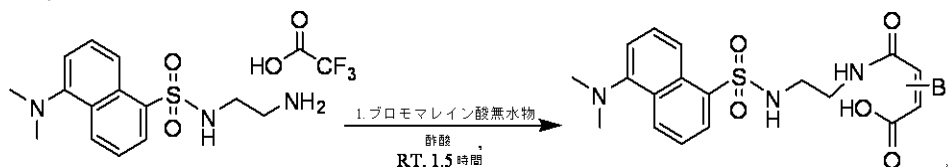
Boc - カルバメート（1.24 g、3.15 mmol）を含むフラスコに、TFA（40 mL）を一度に添加した。得られた灰色溶液を室温（約 25℃）で 2 時間撹拌した。完了に際し、溶液を真空中で濃縮し、トルエンと共沸混合した（5 x 10 mL）。次いで、得られた粗製生成物を、カラムクロマトグラフィー（溶離液：EtOAc 1：2 石油エーテル $R_f(10) = 0.20$ ）で精製した。適切な画分を真空中で濃縮後、得られた黄色油状物に DCM（100 mL）を添加し、溶液を氷浴中に 2 時間配置したところ、この溶液は、長波 UV 下で蛍光性であった。所望の化合物（1.25 g、3.10 mmol、97%）は、白色固体として溶液から析出し（crashed）、これを濾去して、重力下でジエチルエーテルで洗浄した。Mp (114-116℃); δ_H 1H NMR (500MHz MeOD): 8.64(d, J=8.3Hz, 1H, CH), 8.35(d, J=8.45Hz, 1H, CH), 8.32(d, J=8.65Hz, 1H, CH), 7.67(m, 2H, 2xCH), 7.34(d, J=7.3Hz, 1H, CH), 3.03(カルテット, 4H, 2 xCH₂), 2.84(s, 6H, 2 x CH₃). δ_C ^{13}C NMR (500 MHz MeOD): 153.41, 135.78, 131.69, 131.32, 130.81, 130.56, 129.48, 124.29, 120.07, 116.635, 66.91, 45.79, 41.27, 40.78, 15.45. ^{19}F NMR (300 MHz CDCl₃): -76.89; IR: 3092cm⁻¹, 2901.5cm⁻¹, MS: [M + H]⁺: 294.

【0373】

参考例 43: (E) - 2 - ブロモ - 4 - (2 - (5 - (ジメチルアミノ)ナフタレン - 1 - スルホンアミド)エチルアミノ) - 4 - オキシブト - 2 - エン酸の調製

【0374】

【化 5 6】



【0375】

オープン乾燥した500mlの丸底フラスコにスターラーバーを投入した。アミン塩(1.09g、)を25ml酢酸中に溶解し、フラスコに添加した。得られた淡黄色(light yellow)の溶液に、プロモマレイン酸無水物を添加し、反応をTLC(溶離液; 10%メタノール: 90%EtOAc、 $R_f(11) = 0.7$)でモニタリングした。室温(25)で1.5時間撹拌した後、酢酸を真空中で除去した。所望の化合物を、さらなる精製なしに使用した。 $^1\text{H NMR}$ (500MHz CDCl_3 (粗製)): δ_{H} 8.6(d, $J=8.56\text{Hz}$, 1H, CH), 8.35(d, 1H, $J=8.27\text{Hz}$, CH), 8.22(d, 1H, $J=8.57\text{Hz}$, CH), 7.64(m, 2H, 2 x CH), 7.30(d, $J=7.60\text{Hz}$, 1H, CH), 5.48(s, 1H, CH)/5.03(s, 1H, CH), 3.00(m, 4H, 2 x CH_2), 2.88(s, 9H, 2 x CH_3)

10

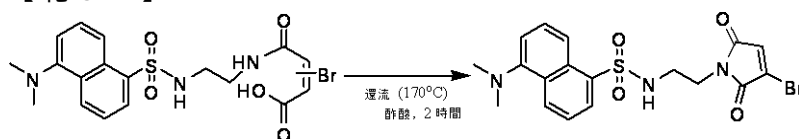
【0376】

参考例44: N-(2-((3-プロモ-2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)エチル)-5-(ジメチルアミノ)ナフタレン-1-スルホンアミドの調製

20

【0377】

【化 5 7】



【0378】

この酸を酢酸(25ml)中に溶解し、オープン乾燥した500mlの丸底フラスコに投入した。コンデンサーを取り付け、反応を2時間還流(170)下に置いた。次いで酢酸を、真空中で粗製混合物から除去し、得られた油状物をトルエンと共沸混合した(5 x 10ml)。得られた油状物をカラムクロマトグラフィー(溶離液: 30%酢酸エチル: 70%石油エーテル、上記溶離液系において $R_f(12) = 0.2$)で精製した。非常にゆっくりとしたカラムが完了したところで、さらなる移動画分を収集し、溶媒を除去した。得られた褐色油状物を、氷浴中で1時間、ニート酢酸エチル(50ml)中に静置した。所望の生成物(0.961g、80%)は、褐色固体として溶液から析出し(粉末様のテクスチャ)、これを重力下で濾過し、ジエチルエーテル(20ml)で洗浄した。mp (166-170); $^1\text{H NMR}$ (600 MHz DMSO): δ_{H} 8.53(d, $J=8.46\text{Hz}$, 1H, CH), 8.21(d, 1H, $J=8.40\text{Hz}$, CH), 8.17(d, 1H, $J=8.58\text{Hz}$, CH), 7.56(m, 2H, 2 x CH), 7.18(d, $J=7.50\text{Hz}$, 1H, CH), 6.46 (s, 1H, マレイミドオレフィン C-H), 5.11(t, $J=6.24$, 1H, NH), 3.56(m, 2H, CH_2), 3.2(m, 2H, CH_2), 3.91(s, 6H, 2 x CH_3). δ_{C} $^{13}\text{C NMR}$ (600 MHz DMSO): 168.62, 165.33, 151.38, 151.38, 135.62, 132.33, 130.13, 129.60, 129.09, 128.85, 128.30, 127.96, 123.61, 118.99, 115.22, 45.11, 40.05, 39.37, 38.47.

30

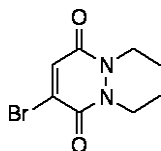
40

【0379】

参考例45: 4-プロモ-1,2-ジエチル-1,2-ジヒドロ-ピリダジン-3,6-ジオン(BrDDPD)の調製

【0380】

【化 5 8】



【0381】

モノプロモマレイン酸無水物 (177 mg、1.0 mmol) 及び N, N' - ジエチルヒドラジン (88 mg、1.0 mmol) の氷 AcOH (3 mL) 中混合物を、130 で 16 時間加熱した。溶媒を真空中で除去し、粗製残渣をカラムクロマトグラフィー (ニート CH₂Cl₂ ~ 5% MeOH / CH₂Cl₂) で精製して、4 - プロモ - 1, 2 - ジエチル - 1, 2 - ジヒドロ - ピリダジン - 3, 6 - ジオンを黄色固体として得た (159 mg、0.64 mmol、64%) : ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.31 (s, 1H), 4.14 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 4.07 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 1.26 (t, J = 7.0 Hz, 3H), 1.22 (t, J = 7.0 Hz, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 156.2 (s), 154.3 (s), 136.0 (d), 133.7 (s), 41.9 (t), 40.7 (t), 13.3 (q), 13.3 (q); IR (固体) 3058, 2979, 2938, 1631, 1595 cm⁻¹; LRMS (CI) 249 (100, [M⁸¹Br+H]⁺), 247 (100, [M⁷⁹Br+H]⁺); C₈H₁₂BrN₂O₂[M+H]⁺ について計算した HRMS (CI) 249.0082, 実測値 249.0086.

10

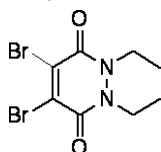
【0382】

参考例 46 : 4, 5 - ジプロモ - 1, 2 - ジエチル - 1, 2 - ジヒドロ - ピリダジン - 3, 6 - ジオン (DiBrDDPD) の調製

20

【0383】

【化 5 9】



【0384】

ジプロモマレイン酸無水物 (256 mg、1.0 mmol) 及び N, N' - ジエチルヒドラジン (88 mg、1.0 mmol) の氷 AcOH (3 mL) 中の混合物を、130 で 16 時間撹拌した。溶媒を真空中で除去し、粗製残渣をカラムクロマトグラフィー (ニート CH₂Cl₂ ~ 5% MeOH / CH₂Cl₂) で精製して、4, 5 - ジプロモ - 1, 2 - ジエチル - 1, 2 - ジヒドロ - ピリダジン - 3, 6 - ジオンを黄色固体として得た (202 mg、0.62 mmol、62%) : ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 4.17 (q, J = 7.0 Hz, 4H), 1.28 (t, J = 7.0 Hz, 6H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 153.3 (s), 136.1 (s), 42.4 (t), 13.2 (q); IR (固体) 2979, 2937, 1630, 1574 cm⁻¹; LRMS (EI) 328 (50, [M⁸¹Br⁸¹Br]⁺), 326 (100, [M⁸¹Br⁷⁹Br]⁺), 324 (50, [M⁷⁹Br⁷⁹Br]⁺); C₈H₁₀Br₂N₂O₂ [M⁷⁹Br⁷⁹Br]⁺ について計算した HRMS (EI) 323.9104, 実測値 323.9097.

30

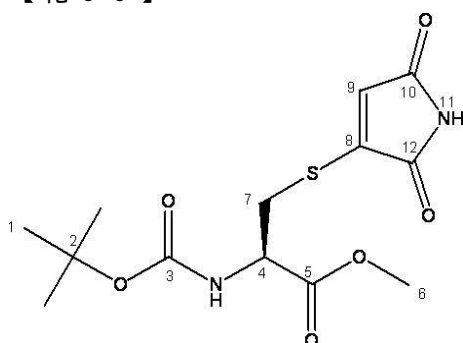
【0385】

参考例 47 : N - Boc - Cys (Mal) - OMe の調製

【0386】

40

【化 6 0】



50

【 0 3 8 7 】

N - B o c - C y s - O M e (3 6 m g 、 0 . 1 5 m m o l) 及び酢酸ナトリウム (1 3 m g 、 0 . 1 5 m m o l) のメタノール (3 m L) 中攪拌溶液に、メタノール (3 m L) 中のプロモマレイミド (3 0 m g 、 0 . 1 7 m m o l) を添加した。1 分後、溶媒を真空中で除去した。フラッシュクロマトグラフィーによる精製 (石油エーテル中 5 0 % の酢酸エチルから酢酸エチルでの勾配溶出) により、淡黄色粉末 N - B o c - C y s (M a l) - O M e (5 1 m g 、 0 . 1 5 m m o l) が 1 0 0 % で得られた。 δ_H (500 MHz, $CDCl_3$) 7.63 (s, 1H, mal-NH), 6.27 (s, 1H, 9-H), 5.40 (d, 1H, J = 6.8, NH), 4.67 (dd, 1H, J = 5.1, 5.4 及び 6.8, H-4), 3.80 (s, 3H, H_3 -6), 3.48 (dd, 1H, J = 5.1 及び 3.8, HH-7), 3.62 (dd, 1H, J = 5.4 及び 14.1, HH-7) 1.45 (s, 9H, 3 x H_3 -1-); δ_C (125 MHz, $CDCl_3$) 170.2 (C=O), 168.9 (C=O), 167.6 (C=O), 155.2 (C=O), 155.9 (C8), 119.7 (C9), 81.1 (C2), 53.3 (C6), 52.7 (C4), 34.0 (C7), 28.3 (3 x C1); IR (固体, cm^{-1}) 3236 (w), 1715 (s); MS (Cl+) m/z, (相対強度): 331 ([M+H], 5), 275 (20), 231 (100); $[C_{13}H_{18}O_6N_2S]+H$ について計算した質量は 331.0964 を要求、実測値 331.0968 (Cl+); $^{20}\alpha_D$: -41.9° (c = 1.0, メタノール); m.p. 145-147 ; UV (アセトニトリル) $\epsilon_{245} = 14200$ 及び $\epsilon_{339} = 8600 cm^{-1}M^{-1}d^3$.

10

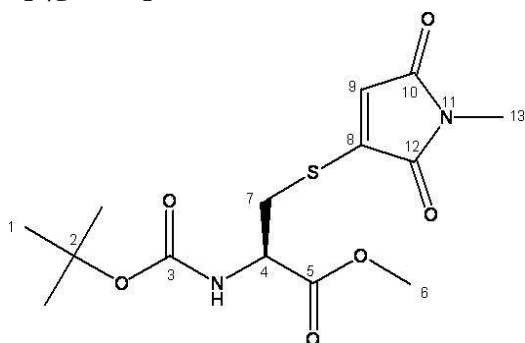
【 0 3 8 8 】

参考例 4 8 : N - B o c - C y s (N' - M e - M a l) - O M e の調製

【 0 3 8 9 】

【 化 6 1 】

20



【 0 3 9 0 】

30

N - B o c - C y s - O M e (3 2 m g 、 0 . 1 3 6 m m o l) のメタノール (4 m L) 中攪拌溶液に、酢酸ナトリウム (8 2 m g 、 0 . 4 0 8 m m o l) を添加した。これに、メタノール (4 m L) 中の N - メチルプロモマレイミド (2 5 . 8 m g 、 0 . 1 3 6 m m o l) を、1 0 分間かけて添加した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィーによる精製 (石油エーテル中 1 0 % の酢酸エチルから石油エーテル中 3 0 % の酢酸エチルでの勾配溶出) により、所望の化合物 (3 9 . 3 m g 、 0 . 1 1 4 m m o l) を青白い粉末として 8 4 % の収率で得た。 δ_H (500MHz, $CDCl_3$) 6.26 (s, 1H, H-9), 5.36 (d, 1H, J = 6.3, 'Boc' NH), 4.66 (m, 1H, H-4), 3.79 (s, 3H, H_3 -6), 3.46 (dd, 1H, J = 5.0 及び 5.2, HH-7), 3.35 (dd, 1H, J = 5.1 及び 13.7, HH-7), 3.00 (s, 3H, H_3 -13), 1.44 (s, 9H, 3 x H_3 -1-); δ_C (125MHz, $CDCl_3$) 170.2 (C=O), 169.5 (C=O), 167.9 (C=O), 155.0 (C=O), 149.9 (C8), 118.7 (C9), 80.9 (C2), 53.1 (C6), 52.7 (C4), 33.8 (C7), 28.3 (3 x C1), 24.1 (C13); IR (固体, cm^{-1}) 3368 (m), 2977 (m), 1695 (s); MS (ES+) m/z, (相対強度): 311 (M+, 100); $C_{14}H_{20}N_2O_6NaS$ について計算した質量は 367.0940 を要求。実測値: 367.0931; $^{20}\alpha_D$: -18.55° (c = 1.0, メタノール); m.p. 101-103 .

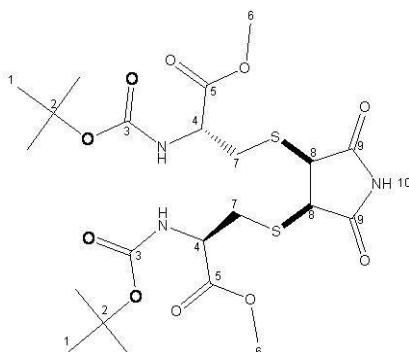
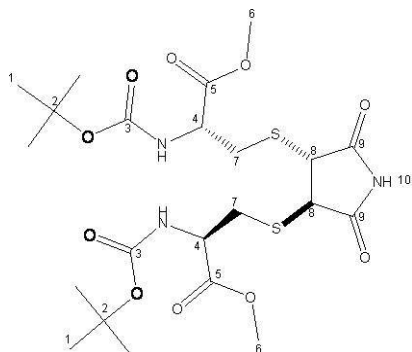
40

【 0 3 9 1 】

実施例 4 9 : 2 , 3 - ジ (N - B o c - C y s - O M e) スクシンイミド (ジアステレオマーの混合物) の調製

【 0 3 9 2 】

【化 6 2】



10

【 0 3 9 3】

プロモレイミド (50 mg、0.28 mmol) の水性緩衝液 (100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) : DMF、95 : 5 (9.25 mL) 中
 攪拌溶液に、DMF (0.25 mL) 中の N-Boc-Cys-OMe (660 mg、2.81 mmol) を添加した。5 分後、水性反応混合物を酢酸エチル (3 x 25 mL) で
 抽出し、合わせた有機層を飽和塩化リチウム水溶液 (5 x 25 mL)、水 (25 mL) 及
 びブライン (25 mL) で洗浄し、乾燥させ (MgSO₄)、濾過し、溶媒を真空中で除
 去した。カラムクロマトグラフィー (石油エーテル中 10 ~ 40 % の酢酸エチル) による
 精製により、2, 3 - ジ (N-Boc-Cys-OMe) スクシンイミド (ジアステレオ
 マーの混合物) を、黄色ワックス状油状物 (150 mg、0.27 mmol、94 % 収率
) (2 つの対称なジアステレオマーの分離不能な 1 : 1 混合物) として得た; δ_H (400 MHz, CDCl₃) 8.62 (s, 1H, 1 つの対称なジアステレオマーからのマレイミド NH), 8.66 (s, 1H, 1 つの対称なジアステレオマーからのマレイミド NH), 5.62 (d, 2H, J = 8.4, 1 つの対称なジアステレオマーからの 2 x 'Boc' NH), 5.51 (d, 2H, J = 8.0, 1 つの対称なジアステレオマーからの 2 x 'Boc' NH), 4.72-4.58 (m, 両方のジアステレオマーからの 4 x H-4), 3.80 (s, 6H, 1 つの対称なジアステレオマーからの 2 x H₃-6), 3.79 (s, 6H, 1 つの対称なジアステレオマーからの 2 x H₃-6), 3.68 (s, 2H, 1 つの対称なジアステレオマーからの 2 x H-8), 3.64 (s, 2H, 1 つの対称なジアステレオマーからの 2 x H-8), 3.46 (dd, 2H, J = 4.8 及び 12.0 Hz, 1 つの対称なジアステレオマーからの 2 x HH-7⁺), 3.37 (dd, 2H, J = 6.0 及び 14.4, 1 つの対称なジアステレオマーからの 2 x H-7⁺), 3.21 (dd, 2H, J = 4.8 及び 14.0 Hz, 1 つの対称なジアステレオマーからの 2 x HH-7⁺), 3.11 (dd, 2H, J = 6.4 及び 14.0 Hz, 1 つの対称なジアステレオマーからの 2 x HH-7⁺), 1.463 (s, 18H, 1 つの対称なジアステレオマーからの 6 x H₃-1), 14.460 (s, 18H, 1 つの対称なジアステレオマーからの 6 x H₃-1);

20

30

40

* -HMQC データにより同じ AB システムの一部として示されるシグナル

[†] -HMQC データにより同じ AB システムの一部として示されるシグナル

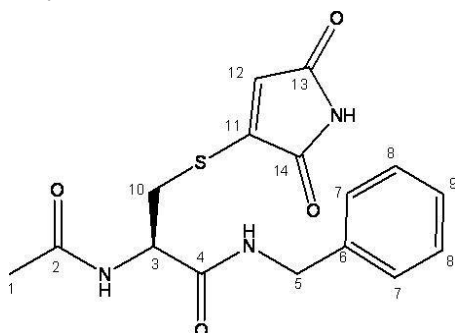
δ_C (125 MHz, CDCl₃) 174.32 (2 x C=O), 171.25 (2 x C=O), 155.33 (2 x C=O), 80.61 (2 x C2), 80.58 (2 x C2), 53.51 (2 x C4), 53.18 (2 x C4), 52.91 (2 x C6), 52.90 (2 x C6), 48.45 (2 x C8), 47.89 (2 x C8), 34.66 (2 x C7), 34.59 (2 x C7), 28.37 (6 x C1), 28.36 (6 x C1) いくつかの炭素シグナルは、ジアステレオマーの重複に起因して欠落している; IR (薄膜、ニート) 3348, 2978, 1719 cm⁻¹; MS (EI) m/z (相対強度): 566 ([M+H], 20), 564 ([M-H], 100); [C₂₂H₃₅N₃O₁₀S₂]-H について計算した正確な質量は 564.1669 を要求、実測値 564.1686.

【 0 3 9 4】

参考例 50 : N-Ac-Cys(Mal) - ベンジルアミンの調製

【 0 3 9 5】

【化 6 3】



10

【 0 3 9 6 】

メタノール (4 2 m L) 中の N - A c - C y s - ベンジルアミン (1 . 0 0 g 、 4 . 0 0 m m o l) 上記) に、メタノール (4 2 m L) 中のプロモレイミド (7 7 7 m g 、 4 . 3 7 m m o l) を 5 分間かけて滴下した。10 分後、溶媒を真空中で除去し、残渣を、石油エーテル中 10 % の酢酸エチルを使用するフラッシュクロマトグラフィーに供して、所望の化合物 (4 2 9 m g 、 1 . 2 m m o l) をオフホワイトの固体として、プロモレイミドの 6 9 % の回収率に基づき 1 0 0 % の収率で得た。 δ_H (500 MHz, MeOD) 7.32-7.20 (m, 5H, 5 x Ar-H), 6.45 (s, 1H, H-12), 4.71 (t, 1H, J = 7.3, H-3), 4.38 (d, 2H, J = 2.7, H₂-5), 3.40 (dd, 1H, J = 7.0 及び 13.6, HH-10), 3.25 (dd, 1H, J = 7.2 及び 13.6, HH-10), 1.99 (s, 3H, H₃-1); δ_C (125 MHz, MeOD) 173.51 (C=O), 172.22 (C=O), 171.44 (C=O), 170.51 (C=O), 151.58 (C11), 139.48 (C6), 129.54 (2 x Ar-H), 128.51 (2 x Ar-H), 128.26 (C9), 121.01 (C12) 53.04 (C3), 44.25 (C5), 33.72 (C10), 22.42 (C1); IR (薄膜, cm^{-1}) 3187 (w), 1717 (s), 1646 (s); MS (ES+) m/z (相対強度): 370 ([M+Na], 20), 337 (50), 325 (90), 309(100); [C₁₆H₁₇N₃O₄SN]+Na について計算した正確な質量は m/z 370.0873 を要求、実測値 370.0852 (ES+); UV (アセトニトリル) $\epsilon_{213} = 19400$, $\epsilon_{247} = 4800$ 及び $\epsilon_{337} = 2700$ $cm^{-1}M^{-1}d^3$; 白色固体は 180 ° で分解する。

20

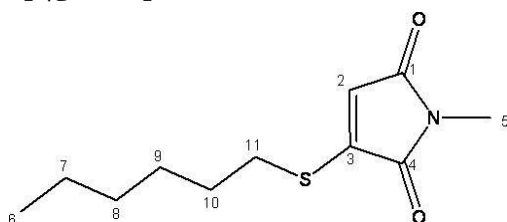
【 0 3 9 7 】

参考例 5 1 : N - メチルヘキシルスルファニルマレイミドの調製

【 0 3 9 8 】

30

【化 6 4】



【 0 3 9 9 】

メタノール (1 5 m L) 中の N - メチルプロモレイミド (1 0 0 m g 、 0 . 5 3 m m o l) 及び酢酸ナトリウム三水和物 (7 0 m g 、 0 . 5 3 m m o l) に、メタノール (1 0 0 m L) 中のヘキサチオール (7 4 μ L 、 0 . 5 8 m m o l) を、激しく攪拌しながら 1 時間かけて滴下した。5 分後、溶媒を真空中で除去した。カラムクロマトグラフィー (石油エーテル中 10 % の酢酸エチルから石油エーテル中 30 % の酢酸エチルでの勾配溶出) での精製により、所望の化合物 (9 9 m g 、 0 . 4 4 m m o l) を、鮮黄色の固体として、83 % の収率で得た。 δ_H (600 MHz, CDCl₃) 6.03 (s, 1H, H-2), 3.01 (s, 3H, H₃-5), 2.89 (t, 2H, J = 7.6, 2H, H₂-11), 1.76-1.71 (m, 2H, H₂-10), 1.46-1.41 (m, 2H, H₂-9), 1.33-1.27 (m, 4H, H₂-7 及び CH₂-8), 0.89 (t, 3H, J = 6.5, H₃-6); δ_C (125 MHz, CDCl₃) 171.47 (C=O), 169.94 (C=O), 151.84 (C3), 117.27 (C2), 31.92 (C11), 31.31 (CH₂), 28.64 (CH₂), 27.75 (CH₂), 24.10 (C5), 24.10 (C7), 14.09 (C6); IR (油, cm^{-1}) 2727 (w), 1708 (s); MS (FAB+) m/z (相対強度): 250 ([M+Na], 40), 228

40

50

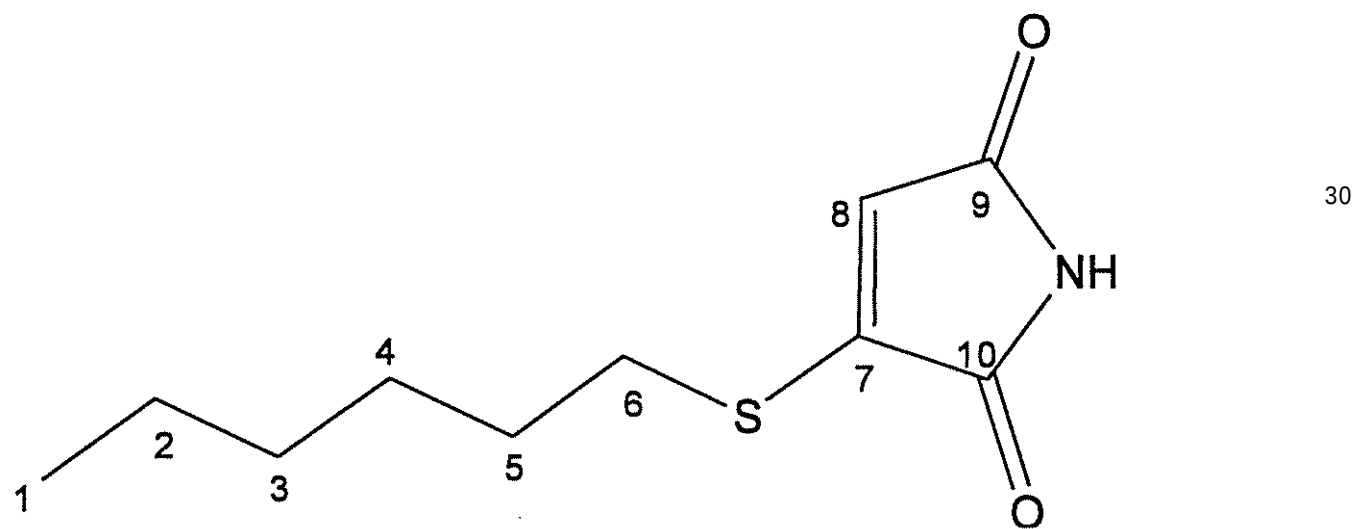
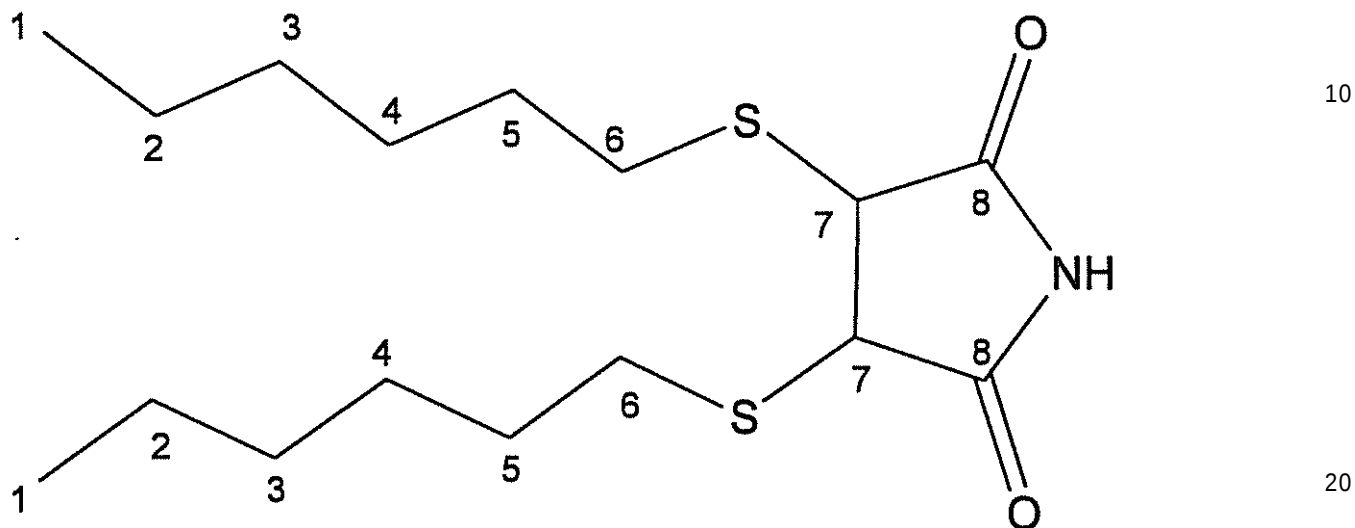
(35), 199 (30), 176 (100); $[C_{11}H_{17}NO_2S]+Na$ について計算した正確な質量は m/z 250.0878を要求、実測値 250.0880 (FAB+)

【0400】

参考例 5 2 : 2, 3 ジヘキシルスルファニルスクシンイミド及びヘキシルスルファニルマレイミドの調製

【0401】

【化65】



【0402】

方法 A

メタノール (60 mL) 中のプロモマレイミド (300 mg、1.69 mmol) 及び酢酸ナトリウム (138 mg、1.69 mmol) に、ヘキサントール (356 μ L、2.50 mmol) を添加した。5 分後、溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィー (石油エーテル中 10 % の酢酸エチル) による精製により、2, 3 ジヘキサントスクシンイミド (13 mg、0.04 mmol) を鮮黄色のペーストとして 2 % の収率で得、ヘキシルスルファニルマレイミド (アルケン 310 mg、1.46 mmol) をクリーム色の粉末として 86 % の収率で得た。

【0403】

2, 3 ジヘキシルスルファニルスクシンイミド

50

δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 8.21 (s, 1H, NH), 3.49 (s, 2H, 2 x H-7), 2.89-2.83 (m, 2H, 2 x HH-6), 2.79-2.83 (m, 2H, 2 x HH-6), 1.71-1.57 (m, 4H, 2 x CH_2), 1.44-1.37 (m, 4H, 2 x CH_2), 1.34-1.26 (m, 8H, 4 x CH_2), 0.89 (t, 6H, J = 6.8, 2 x H_3 -1); δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 174.60 (2 x C=O), 48.23 (2 x C7), 32.34 (2 x CH_2), 31.26 (2 x CH_2), 28.99 (2 x CH_2), 28.46 (2 x CH_2), 22.56 (2 x CH_2), 14.27 (2 x C1-); IR (固体, cm^{-1}) 3198 (m), 2928 (m), 1703 (s); 質量イオンは見出されず。

【 0 4 0 4 】

ヘキシルスルファニルマレイミド

δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 7.35 (s, 1H, NH), 6.04 (s, 1H, H-8), 2.91 (t, 2H, H_2 -6), 1.78-1.72 (m, 2H, H_2 -5), 1.48-1.42 (m, 2H, CH_2), 1.33-1.30 (m, 4H, 2 x CH_2), 0.90 (t, 3H, J = 6.9, H_3 -1); δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 169.06 (C=O), 167.69 (C=O), 152.74 (C7), 118.24 (C8), 32.06 (C6), 31.26 (CH_2), 28.58 (CH_2), 27.70 (CH_2), 22.52 (CH_2), 14.03 (C1); IR (固体, cm^{-1}) 3200 (m), 2918 (m), 1703 (s); MS (ES-) m/z (相対強度): 212 ([M-H], 100); [$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$]-Hについて計算した正確な質量はm/z 212.0745を要求、実測値 212.0753 (ES-); m.p. 99-101°C; UV (アセトニトリル) $\epsilon_{247} = 12000$ 及び $\epsilon_{347} = 9500 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}\text{d}^3$.

10

【 0 4 0 5 】

方法 B

メタノール (100 mL) 中のプロモマレイミド (300 mg、1.69 mmol) 及び酢酸ナトリウム (138 mg、1.69 mmol) に、ヘキサンチオール (237 μL 、1.69 mmol) を添加した。5分後、溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィー (石油エーテル中10%の酢酸エチル) による精製により、ヘキシルスルファニルマレイミド (362 mg、1.69 mmol) をクリーム色の粉末として100%の収率で得た。

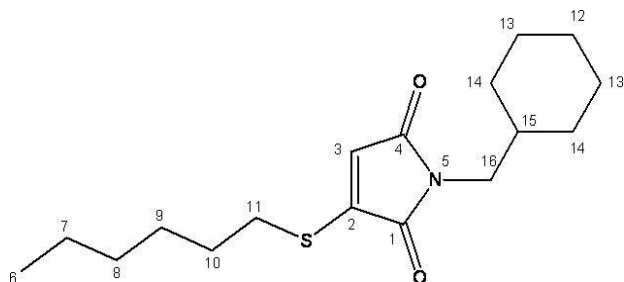
20

【 0 4 0 6 】

参考例 53 : N - メチレンシクロヘキサンヘキシルスルファニルマレイミドの調製

【 0 4 0 7 】

【 化 6 6 】



30

【 0 4 0 8 】

メタノール (50 mL) 中の N - メチレンシクロヘキサンプロモマレイミド (50 mg、0.19 mmol) に、メタノール (50 mL) 中のヘキサンチオール (52 μL 、0.37 mmol) 及び酢酸ナトリウム (50 mg、0.37 mmol) を、5分間かけて滴下した。10分後、溶媒を真空中で除去し、残渣をフラッシュクロマトグラフィー (石油エーテル) に供して、所望の化合物 (29 mg、0.09 mmol) をオフホワイトの固体として84%の収率で得た。 δ_{H} (600 MHz, CDCl_3) 6.01 (s, 1H, H-3), 6.27 (s, 1H, 9-H), 3.42 (d, 1H, J = 6.8, NH), 4.67 (dddd, 1H, J = 5.1, 5.4及び6.8, H-4), 3.80 (s, 3H, H_3 -6), 3.48 (dd, 1H, J = 5.1及び13.8, HH-7), 3.62 (dd, 1H, J = 5.4及び14.1, HH-7) 1.45 (s, 9H, 3 x H_3 -1); δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 170.23 (C=O), 168.44 (C=O), 151.49 (C2), 117.08 (C3), 44.36 (C16), 37.00 (C15), 31.91 (2 x CH_2), 31.32 (2 x CH_2), 30.73 (CH_2), 28.66 (CH_2), 27.78 (CH_2), 26.33 (CH_2), 25.73 (2 x CH_2), 22.58 (CH_2), 14.10 (C6); IR (固体, cm^{-1}) 2927 (m), 1700 (s); MS (ES+) m/z, (相対強度): 310 ([M+H], 100), 180 (40); [$\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{O}_2\text{NS}$]+Hについて計算した質量は310.184

40

50

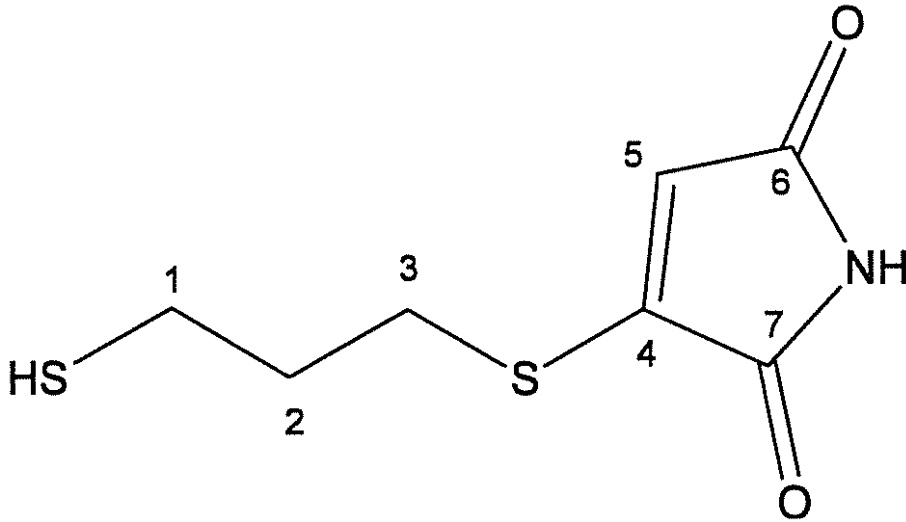
1 を要求、実測値 310.1828 (ES+).

【 0 4 0 9 】

参考例 5 4 : 3 - メルカプトプロピルチオマレイミド及び 1 , 5 - ジチオ - 8 - アザ - ビシクロ [5 , 3 , 0] デカン - 7 , 9 - ジオンの調製

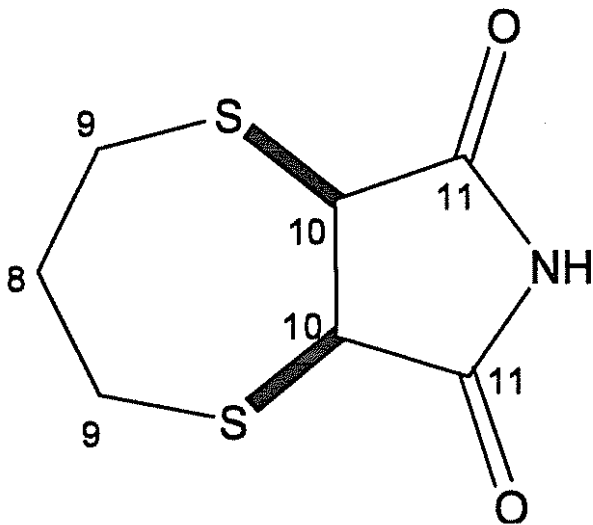
【 0 4 1 0 】

【 化 6 7 】



10

20



30

【 0 4 1 1 】

メタノール (6 m L) 中のプロモマレイミド (3 0 m g 、 0 . 1 7 m m o l) 及び酢酸ナトリウム (1 4 m g 、 0 . 1 7 m m o l) に、 1 , 3 - プロパンジチオール (1 7 μ l 、 0 . 1 7 m m o l) を添加した。 5 分後、溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィー (石油エーテル中 1 0 % の酢酸エチル) による精製により、 3 - メルカプトプロピルチオマレイミド及び 1 , 5 - ジチオ , 8 - アザ - ビシクロ [5 , 3 , 0] デカン - 7 , 9 - ジオンを、 2 つの分離不能な異性体の混合物である淡黄色粉末として、 3 - メルカプトプロピルチオマレイミド (7 m g 、 0 . 0 3 m m o l) を 2 1 % の収率で、 1 , 5 - ジチオ , 8 - アザ - ビシクロ [5 , 3 , 0] デカン - 7 , 9 - ジオン (1 2 m g 、 0 . 0 6 m m o l) を 3 4 % の収率で得た。 δ_H (500 MHz, MeOD) 6.28 (s , 1H, H-5) , 4.41 (s , 3.2H, 2 x H-10) , 3.15 (t , 2H, J = 7.3, H₂-3) , 2.82-2.77 (m , 3.2H, CH₂) , 2.35 (t , 3.2H, J = 13.1, CH₂) , 2.30-2.25 (m , 2H, CH₂) , 2.20-2.13 (m , 2H, CH₂) , 1.91-

40

50

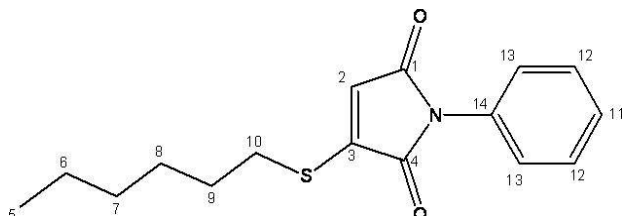
1.83 (m, 3.2H, CH₂); δ_c (125 MHz, MeOD) 177.79 (2 x C11), 172.33 (C=O), 170.56 (C=O), 152.37 (C4), 120.30 (C5), 54.52 (2 x C10), 34.94 (2 x C9), 32.16 (CH₂), 31.10 (CH₂) 30.96 (CH₂), 27.49 (CH₂); IR (固体, cm⁻¹) 3246 (m), 1703 (s); MS (ES-) m/z (相対強度): 202 ([M-H], 100); [C₇H₉NO₂S₂]-H について計算した正確な質量はm/z 201.9996を要求、実測値 201.9996 (ES-).

【0412】

参考例 55 : N - フェニルヘキシルスルファニルマレイミドの調製

【0413】

【化68】



10

【0414】

メタノール (60 mL) 中のヘキサントール (111 μ L、0.79 mmol) 及び酢酸ナトリウム三水和物 (108 mg、0.79 mmol) に、メタノール (60 mL) 中の N - フェニルモノプロモマレイミド (200 mg、0.79 mmol) を、激しく攪拌しながら 1 時間かけて滴下した。5 分後、溶媒を真空中で除去した。カラムクロマトグラフィー (石油エーテル中 10 % の酢酸エチルから石油エーテル中 30 % の酢酸エチルでの勾配溶出) での精製により、所望の化合物 (109 mg、0.38 mmol) を淡黄色固体として 48 % の収率で得た。 δ_H (600 MHz, CDCl₃) 7.45 (dd, 2H, J = 7.1 及び 8.0, 2 x H-12), 7.36 (d, 2H, J = 6.0, H-11), 7.35 (d, 2H, J = 8.1, 2 x H-13), 6.19 (s, 1H, H-2), 2.96 (t, 2H, J = 7.9, H₂-10), 1.81-1.76 (m, 2H, H₂-9), 1.50-1.45 (m, 2H, H₂-8), 1.34-1.32 (m, 4H, H₂-6 及び H₂-7), 0.91 (t, 3H, J = 6.9, H₃-5); δ_c (125 MHz, CDCl₃) 168.59 (C=O), 166.96 (C=O), 152.20 (C3), 131.53 (C14), 129.21 (2 x Ar-H), 127.93 (C11), 126.09 (2 x Ar-H), 117.24 (C2), 32.03 (C10), 31.33 (CH₂), 28.68 (CH₂), 27.78 (CH₂), 22.59 (CH₂), 14.11 (C5); IR (油, cm⁻¹) 2931 (w), 1703 (s); MS (CI+) m/z (相対強度): 290 ([M+H], 100); [C₁₆H₂₀NO₂S]+H について計算した正確な質量はm/z 290.1215を要求、実測値 290.1224 (CI+);

20

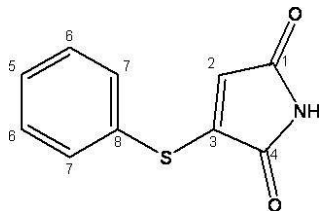
30

【0415】

参考例 56 : フェニルチオマレイミドの調製

【0416】

【化69】



40

【0417】

メタノール (30 mL) 中のチオフェノール (57 μ L、0.56 mmol) 及び酢酸ナトリウム三水和物 (136 mg、0.56 mmol) に、メタノール (30 mL) 中のモノプロモマレイミド (100 mg、0.56 mmol) を、激しく攪拌しながら 1 時間かけて滴下した。5 分後、溶媒を真空中で除去した。カラムクロマトグラフィー (石油エーテル中 10 % の酢酸エチルから石油エーテル中 30 % の酢酸エチルでの勾配溶出) での精製により、所望の化合物 (22 mg、0.11 mmol) を淡黄色固体として 19 % の収率で得た。 δ_H (600 MHz, CDCl₃) 7.56 (dd, 2H, J = 1.6 及び 7.8, 2 x H-7), 7.50-7.48 (m, 3H, 3 x Ar), 5.63 (s, 1H, H-2); δ_c (125 MHz, CDCl₃) 169.42 (C=O), 167.9

50

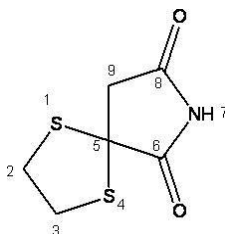
8 (C=O), 153.60 (C3), 134.45 (2 x Ar-H), 130.68 (C5), 130.42 (2 x Ar-H), 127.27 (C8), 119.91 (C2); IR (油, cm^{-1}) 3265 (m), 1770 (m), 1701 (s); MS (CI+) m/z (相対強度): 206 ([M+H], 100), 111 (40); $[\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}]+\text{H}$ について計算した正確な質量はm/z 206.0276を要求、実測値 206.0273 (CI+);

【0418】

参考例57: 1, 4 - ジチア - 7 - アザ - スピロ [4 . 4] ノナン - 6 , 8 - ジオンの調製

【0419】

【化70】



【0420】

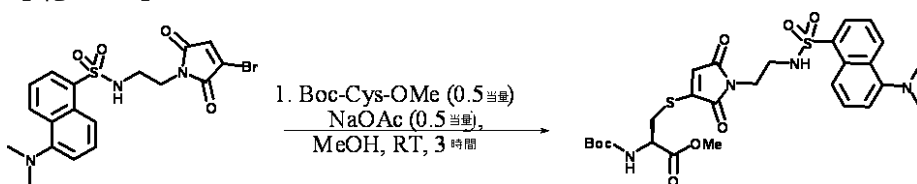
メタノール (6 m L) 中のプロモマレイミド (3 0 m g 、 0 . 1 7 m m o l) 及び酢酸ナトリウム (1 4 m g 、 0 . 1 7 m m o l) に、1 , 2 - エタンジチオール (1 7 μ l 、 0 . 1 7 m m o l) を添加した。5 分後、溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィー (石油エーテル中 1 0 % の酢酸エチル) による精製により、所望の化合物 (1 3 m g 、 0 . 0 7 m m o l) を淡黄色粉末として 4 1 % の収率で得た。 δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 8.39 (s, 1H, NH), 3.75-3.69 (m, 2H, HH-2 及び HH-3), 3.60-3.53 (m, 2H, HH-2 及び HH-3), 3.30 (s, 2H, H_2 -9); δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 177.93 (C=O), 172.76 (C=O), 61.23 (C5), 43.12 (C9), 41.05 (C2 及び C3); IR (固体, cm^{-1}) 3290 (m), 1703 (m), 1629 (s); MS (ES-) m/z (相対強度): 188 ([M-H], 100); $[\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}_2]-\text{H}$ について計算した正確な質量は m/z 187.9840 を要求、実測値 187.9839 (ES-); m.p. 112-115 .

【0421】

参考例58: (S) - メチル 2 - (t e r t - ブトキシカルボニルアミノ) - 3 - (1 - (2 - (5 - (ジメチルアミノ) ナフタレン - 1 - スルホンアミド) エチル) - 2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 3 - イルチオ) プロパノアートの調製

【0422】

【化71】



【0423】

ヒートガンを使用して攪拌溶液を短時間加熱することにより、ダンシル - プロモマレイミド (1 0 0 m g) をメタノール (2 0 0 m l) 中に溶解した。得られた淡黄色溶液に、N - B o c - C y s - O M e (2 2 μ l 、 0 . 1 m m o l 、 0 . 5 当量) 及び酢酸ナトリウム (1 4 . 5 m g 、 0 . 1 m m o l 、 0 . 5 当量) を、3 時間かけて添加した。反応を T L C (溶離液 : 4 0 % E t O A c : 6 0 % 石油エーテル) でモニタリングした。添加が完了したところでメタノールを真空中で除去して、黄色油状物を得た。カラムクロマトグラフィーでの精製により、所望の生成物を得た (4 8 . 2 9 m g 、 0 . 0 8 m m o l 、 7 9 . 7 %) 。 ^1H NMR (600MHz CDCl_3) : δ_{H} 8.54 (d, J=8.56Hz, 1H, CH), 8.21 (d, 1H, J=8.27Hz, CH), 8.13 (d, 1H, J=8.57Hz, CH), 7.55 (m, 2H, 2 x CH), 7.25 (d, J=7.60Hz, 1H, CH), 5.92 (s, 1H, CH), 4.44 (m, 1H, HN-CH-CO), 3.77 (s, 3H, OMe), 3.48 (m, 2H, CH_2), 3.44 (m, 2H, CH_2), 3.38 (s, 6H, 2 x CH_3), 3.13 (t, J=5.79, 2H, S- CH_2), 2.88 (s, 9H, 3 x CH_3). ^{13}C NMR (600MHz CDCl_3) : 173.08, 170.52, 169.69, 168.96 (4x C=O),

157.73 (-C=CH), 153.16, 150.71, 136.48, 131.39, 131.25, 131.18, 130.74, 130.65, 129.31, 124.35, 120.61, 119.22, 81.12, 53.58, 52.95, 45.89, 41.53, 33.98, 28.66.

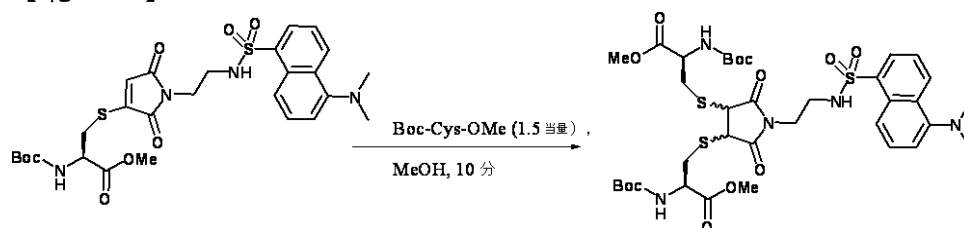
IR: 3324.7 cm^{-1} , 1775 cm^{-1} . [M + H]⁺: 605.1756, 計算値; 605.1740

【0424】

参考例 59: (2R, 2'R) - ジメチル 3, 3' - (1 - (2 - (5 - (ジメチルアミノ)ナフタレン - 1 - スルホンアミド)エチル) - 2, 5 - ジオキソピロリジン - 3, 4 - ジイル)ビス(スルファンジイル)ビス(2 - (tert-ブトキシカルボニルアミノ)プロパノート)の調製

【0425】

【化72】



10

【0426】

ダンシル/マレイミド/システイン付加物(15 mg、0.0247 mmol、1当量)をメタノール(100 ml)中に溶解した。得られた透明溶液に、N-Boc-Cys-OMe(3.1 μl 、0.0247 mmol、1当量)を1時間かけて添加した。反応をTLC(溶離液: 40% EtOAc: 60% 石油エーテル)でモニタリングした。反応が完了したところで、メタノールを真空中で除去し、所望の生成物を得た(12.51 mg、0.08 mmol、60%)。¹H NMR (600MHz CDCl₃): δ_{H} 8.44(d, J=8.56Hz, 1H, CH), 8.13(m, 2H, 2 x CH), 7.49(m, 2H, 2x CH), 7.17(m, 2H, 2 x CH), 4.49(bs, 1H, HN-CH-CO), 3.77(s, 3H, OMe), 3.48(m, 2H, CH₂), 3.44(m, 2H, CH₂), 3.38(s, 6H, 2 x CH₃), 3.13(t, J=5.79, 2H, S-CH₂) 2.88(s, 9H, 3 x CH₃).

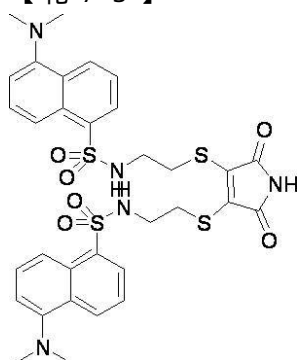
20

【0427】

参考例 60: ジ - ダンシル - シスタミン - マレイミドの調製

【0428】

【化73】



30

【0429】

丸底フラスコに、ジ - ダンシルシスタミン(100 mg、0.16 mmol)、TCPEP(46 mg、1当量)及びMeOH(10 ml)を投入した。反応混合物をアルゴン下周囲温度で3時間撹拌した。次いで、MeOH(5 ml)中のジプロモマレイミド(36 mg、0.9当量)を反応混合物に添加した。30分後、NaOAc(56 mg、4当量)を反応混合物に添加し、溶媒を真空中で留去した。残渣をDCM及びブラインでワークアップした。有機層を合わせ、乾燥させ(MgSO₄)、濾過し、真空中で濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー(シリカゲル、0~20%のEtOAc-DCM)による精製により、所望の化合物を黄色ゴムとして得た(40 mg、40%)。¹H NMR (CDCl₃, 600MHz), δ 8.5 (2H, d J 8.5 Hz 芳香族H), δ 8.2 (4H, m 芳香族H), δ 7.53 (1H, s CONH), δ 7.46 (4H, m, 芳香族H), δ 7.1 (2H, d, J 7.4 Hz 芳香族H), δ 5.65 (2H, t, J 6

40

50

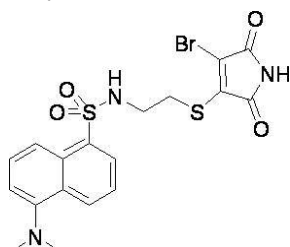
.27 SO₂NH), δ 3.3 (4H, t, J 6.0 SCH₂), δ 3.17 (4H, q, J 6.0 NHCH₂), δ 2.8 (12H, s NCH₃); ¹³CNMR (CDCl₃, 150MHz), δ 165.9, 152.0, 136.5, 134.7, 130.7, 129.94, 129.85, 129.62, 129.57, 128.63, 123.3, 118.8, 115.4, 45.5, 43.6, 31.8; IR (cm⁻¹) 3288 (br) 1720 (s) MS (Na+) m/z 相対強度: 736 (M, 100); [C₃₂H₃₅N₅O₆NaS₄]について計算した正確な質量はm/z 736.1368を要求、実測値 736.1390 (Na+).

【 0 4 3 0 】

参考例 6 1 : プロモ - ダンシル - シスタミン - マレイミドの調製

【 0 4 3 1 】

【 化 7 4 】



10

【 0 4 3 2 】

丸底フラスコに、ジ - ダンシルシスタミン (4 8 m g 、 0 . 0 8 m m o l) 、 T C E P (2 3 m g 、 1 当量) 及び M e O H (1 0 m l) を投入した。反応混合物を、アルゴン下周囲温度で3時間撹拌した。M e O H (1 0 m l) 中のジプロモマレイミド (4 1 m g 、 2 当量) を反応混合物に添加した。1 6 時間後、反応混合物を真空中で濃縮した。残渣を D C M 及びブラインでワークアップした。有機層を合わせ、乾燥させ (M g S O ₄) 、フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、0 ~ 1 5 % の E t O A C - D C M) で精製して、所望の化合物を得た (1 7 m g 、 2 2 %) 。 ¹HNMR (CDCl₃, 600MHz), δ 8.5 (1H, d J 8.5 Hz 芳香族H), δ 8.2 (2H, m 芳香族H), δ 7.6 (1H, s CONH), δ 7.53 (2H, m, 芳香族H), δ 7.15 (1H, d, J 7.4 Hz 芳香族H), δ 5.30 (1H, t, J 5.6 SO₂NH), δ 3.38 (2H, t, J 6.3 SCH₂), δ 3.26 (2H, q, J 6.3 NHCH₂), δ 2.88 (6H, s NCH₃); ¹³CNMR (CDCl₃, 150MHz), δ 165.5, 162.9, 152.2, 142.5, 134.5, 130.95, 129.94, 129.92, 129.5, 128.7, 123.3, 119.0, 118.5, 115.4, 45.5, 43.7, 30.5; IR (cm⁻¹) 3295 (br) 1726 (s) MS (ES+) m/z 相対強度: 485 (M, 100); [C₁₈H₁₉N₃O₄S₂Br]について計算した正確な質量はm/z 484.0000を要求、実測値 783.9982.

20

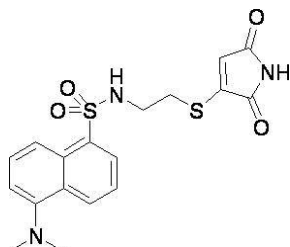
30

【 0 4 3 3 】

参考例 6 2 : ダンシル - シスタミン - マレイミドの調製

【 0 4 3 4 】

【 化 7 5 】



40

【 0 4 3 5 】

丸底フラスコに、ジ - ダンシルシスタミン (1 0 0 m g 、 0 . 1 6 m m o l) 、 T C E P (4 6 m g 、 1 当量) 及び M e O H (1 0 m l) を投入した。反応混合物を、アルゴン下周囲温度で3時間撹拌した。M e O H (5 m l) 中のジプロモマレイミド (5 6 m g 、 2 当量) を反応混合物に添加した。1 6 時間後、反応混合物を真空中で濃縮した。残渣を D C M 及びブラインでワークアップした。有機層を合わせ、乾燥させ (M g S O ₄) 、フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、0 ~ 3 0 % の E t O A C - C H C l ₃) で精製して、所望の化合物 (7 3 m g 、 5 5 %) を得た。 ¹HNMR (CDCl₃, 600MHz), δ 8.5 (1H,

50

d J 8.5 Hz 芳香族H), δ 8.2 (2H, m 芳香族H), δ 8.1 (1H, s CONH), δ 7.5 (2H, m, 芳香族H), δ 7.15 (1H, d, J 7.5 Hz 芳香族H), δ 6.0 (1H, s, CO₂CH) δ 5.89 (1H, t, J 6.4 SO₂NH), δ 3.20 (2H, q, J 6.7 NHCH₂), δ 3.99 (2H, t, J 6.9 SCH₂), δ 2.86 (6 H, s NCH₃); ¹³CNMR (CDCl₃, 150MHz), δ 169.6, 168.0, 152.0, 150.7, 134.4, 131.0, 129.9, 129.7, 129.5, 128.8, 123.4, 119.3, 118.7, 115.6, 45.5, 41.0, 31.8; IR (cm⁻¹) 3277 (br) 1720 (s) MS (ES-) m/z 相対強度: 404 (M, 100); [C₁₈H₁₈N₃O₄S₂] について計算した正確な質量はm/z 404.0739を要求、実測値 404.0733.

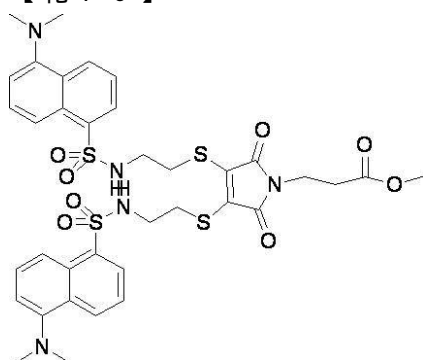
【 0 4 3 6 】

参考例 6 3 : N - プロピオン酸 - メチル - エステル - ジ - ダンシル - シスタミン - マレイミドの調製

10

【 0 4 3 7 】

【 化 7 6 】



20

【 0 4 3 8 】

丸底フラスコに、ジ - ダンシルシスタミン (1 3 2 m g 、 0 . 2 1 4 m m o l) 、 T C E P (6 1 m g 、 1 当量) 及び M e O H (1 0 m l) を投入した。反応混合物を、アルゴン下周囲温度で 3 時間攪拌した。次いで、M e O H (5 m l) 中のジプロモマレイミド (7 0 m g 、 1 当量) を反応混合物に添加した。3 0 分後、N a O A c (8 8 m g 、 5 当量) を反応混合物に添加し、溶媒を真空中で留去した。残渣を D C M 及びブラインでワークアップした。有機層を合わせ、乾燥させ (M g S O 4) 、濾過し、真空中で濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、0 ~ 2 0 % の E t O A c - D C M) による精製により、所望の化合物を黄色ゴムとして得た (3 2 m g 、 2 0 %) 。¹HNMR (CDCl₃, 300MHz), δ 8.5 (2H, d J 8.5 Hz 芳香族H), δ 8.2 (4H, m 芳香族H), δ 7.53 (1H, s CONH), δ 7.45 (4H, m, 芳香族H), δ 7.1 (2H, d, J 7.5 Hz 芳香族H), δ 5.7 (2H, t, J 6.1 SO₂NH), δ 3.75 (2H, t, J 7.0 CONCH₂), δ 3.6 (3H, s, OCH₃), δ 3.2 (4H, m, SCH₂), δ 3.18 (4H, m, NHCH₂), δ 2.9 (12H, s, NCH₃), δ 2.6 (2H, t, J 7.1 NHCH₂); ¹³CNMR (CDCl₃, 75MHz), δ 171.3, 165.9, 135.8, 134.8, 130.5, 129.8, 129.5, 129.4, 128.4, 123.3, 119.0, 115.3, 51.9, 45.5, 43.5, 34.3, 32.6 31.9; IR (cm⁻¹) 3295 (br) 2948 (br) 1702 (s) MS (ES-) m/z 相対強度: 798 (M, 100); [C₃₆H₄₀N₅O₈S₄] について計算した正確な質量はm/z 798.1760を要求、実測値 798.1715.

30

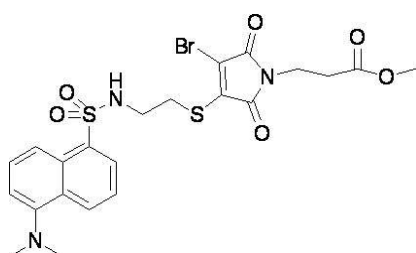
【 0 4 3 9 】

参考例 6 4 : N - プロピオン酸 - メチル - エステル - プロモ - ダンシル - シスタミン - マレイミドの調製

40

【 0 4 4 0 】

【 化 7 7 】



50

【 0 4 4 1 】

丸底フラスコに、ジ - ダンシルシスタミン (6 6 m g 、 0 . 1 0 7 m m o l) 、 T C E P (3 1 m g 、 1 当量) 及び M e O H (1 0 m l) を投入した。反応混合物を、アルゴン下周囲温度で 3 時間撹拌した。次いで、M e O H (5 m l) 中のジプロモマレイミド (7 0 m g 、 0 . 5 当量) を反応混合物に添加した。1 6 時間後、N a O A c (8 8 m g 、 5 当量) を反応混合物に添加し、溶媒を真空中で留去した。残渣を D C M 及びブラインでワークアップした。有機層を合わせ、乾燥させ (M g S O ₄) 、濾過し、真空中で濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、0 ~ 2 % の M e O H - C H C l ₃) による精製により、所望の化合物を黄色ゴムとして得た (2 0 m g 、 1 6 %) 。 ¹H NMR (C D C l ₃ , 300MHz), δ 8.5 (1H, m, 芳香族H), δ 8.2 (2H, m 芳香族H), δ 7.5 (2H, m, 芳香族H), δ 7.2 (1H, d, J 7.5 Hz 芳香族H), δ 5.2 (1H, t, J 6.1 SO₂NH), δ 3.8 (2H, t, J 7.0 CONCH₂), δ 3.7 (3H, s, OCH₃), δ 3.4 (2H, m, SCH₂), δ 3.3 (2H, m, NHCH₂), δ 2.9 (6H, s, NCH₃), δ 2.6 (2H, t, J 7.1 NHCH₂) ; ¹³C NMR (C D C l ₃ , 75MHz), δ 170.95, 165.5, 163.3, 141.6, 134.5, 130.8, 129.8, 129.5, 128.5, 123.2, 118.6, 115.3, 52.0, 45.4, 43.6, 34.8, 32.5 30.6; IR (c m ⁻¹) 3296 (br) 2948 (br) 1713 (s)

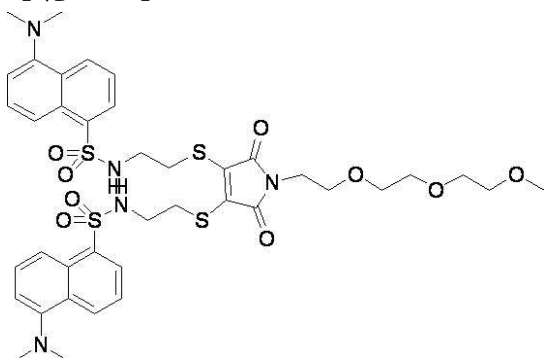
10

【 0 4 4 2 】

参考例 6 5 : N - ジエチレン - グリコール - モノメチル - エーテル - ジ - ダンシル - シスタミン - マレイミドの調製

【 0 4 4 3 】

【 化 7 8 】



20

【 0 4 4 4 】

丸底フラスコに、ジ - ダンシルシスタミン (1 5 5 m g 、 0 . 2 5 m m o l) 、 T C E P (7 2 m g 、 1 当量) 及び M e O H (1 0 m l) を投入した。反応混合物を、アルゴン下周囲温度で 3 時間撹拌した。次いで、M e O H (5 m l) 中の P E G - ジプロモマレイミド (1 0 0 m g 、 1 当量) を反応混合物に添加した。1 6 時間後、N a O A c (1 0 2 m g 、 5 当量) を反応混合物に添加し、溶媒を真空中で留去した。残渣を D C M 及びブラインでワークアップした。有機層を合わせ、乾燥させ (M g S O ₄) 、濾過し、真空中で濃縮した。フラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、0 ~ 1 0 % の T H F - D C M) による精製により、所望の化合物を黄色ゴムとして得た (1 3 m g 、 6 %) 。 ¹H NMR (M e O H , 300MHz), δ 8.5 (2H, m, 芳香族H), δ 8.3 (2H, m 芳香族H), δ 8.13 (2H, m, 芳香族H), δ 7.5 (4H, m, 芳香族H), δ 7.2 (2H, m, 芳香族H), δ 3.5 (12H, m, CONCH₂, OCH₂), δ 3.3 (3H, s, OCH₃), δ 3.1 (8H, m, SCH₂, NHCH₂), δ 2.8 (12H, s, NCH₃) ; ¹³C NMR (C D C l ₃ , 150MHz), δ 167.4, 153.2, 136.9, 136.2, 131.3, 131.2, 130.9, 130.2, 129.6, 124.3, 120.5, 116.4, 72.9, 71.4, 71.3, 71.1, 68.7, 59.1, 45.8, 44.5, 38.98, 36.97; IR (c m ⁻¹) 3323 (br) 2946 (br) 2946 (s) 1017 (s) MS (Na⁺) m/z 相対強度: 882 (M, 100); [C₃₉H₄₉N₅O₉NaS₄] について計算した正確な質量は m/z 882.2311 を要求、実測値 882.2294 (Na⁺) .

30

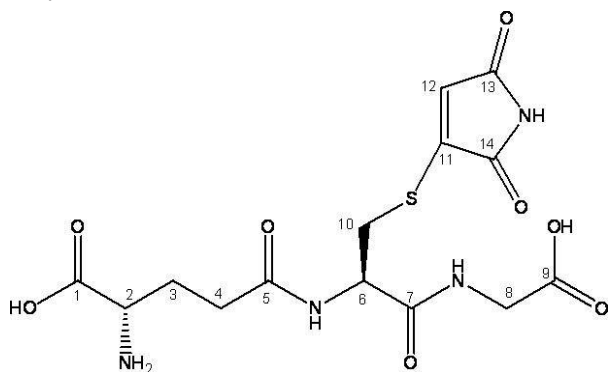
40

【 0 4 4 5 】

参考例 6 6 : G l u - C y s (M a l) - G l y の調製

【 0 4 4 6 】

【化 7 9】



10

【 0 4 4 7】

メタノール (3 m L) 中のグルタチオン (4 7 m g 、 0 . 1 5 m m o l) に、メタノール (3 m L) 中のプロモマレイミド (3 0 m g 、 0 . 1 5 m m o l) を添加した。5 分後、溶媒を真空中で除去して、所望の化合物 (6 2 m g 、 0 . 1 5 m m o l) を粘度のある無色油状物として 1 0 0 % の収率で得た。 δ_H (500 MHz, MeOD) 6.47 (s, 1H, H-12), 4.79 (dd, 1H, J = 5.7 及び 8.2, H-6), 4.06 (t, 1H, J = 6.5, H-2), 3.95 (s, 2H, H₂-8), 3.49 (dd, 1H, J = 5.8 及び 13.9, HH-10), 3.29 (dd, 1H, J = 8.3 及び 13.6, HH-10), 2.61 (t, 2H, J = 7.1, H₂-4), 2.29-2.15 (m, 2H, H₂-3); δ_C (125 MHz, MeOD) 174.68 (C=O), 172.81 (C=O), 172.39 (C=O), 171.89 (C=O), 171.62 (C=O), 170.59 (C=O), 151.75 (C11), 120.91 (C12), 53.79 (C6), 52.76 (C2), 42.01 (C8), 33.92 (C10) 32.42 (C4), 27.03 (C3); IR (油, cm⁻¹) 3259 (m), 2928 (m), 1717 (s); MS (ES-) m/z (相対強度): 401 ([M-H], 100), 272 (30); [C₁₄H₁₈N₄O₈S]-H について計算した正確な質量は m/z 401.0767 を要求、実測値 401.0773 (ES-); UV (アセトニトリル) $\epsilon_{204} = 8100$, $\epsilon_{253} = 5600$ 及び $\epsilon_{342} = 1900$ cm⁻¹M⁻¹d³.

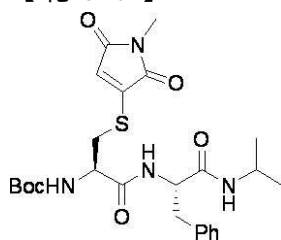
20

【 0 4 4 8】

参考例 6 7 : B o c - C y s (M e M a l) - P h e - ⁱ P r の調製の調製

【 0 4 4 9】

【化 8 0】



30

【 0 4 5 0】

O - (ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - N , N , N ' , N ' - テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスフェート (3 4 4 m g 、 0 . 8 2 m m o l) を、(2 R) - 2 - [(t e r t - ブトキシカルボニル) アミノ] - 3 - [(1 - メチル - 2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 3 - イル) スルファニル] プロパン酸 (3 1 3 m g 、 0 . 9 5 m m o l) 及び 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (1 3 9 m g) の DMF (2 m L) 中撹拌溶液に添加し、反応を 2 1 で 3 分間撹拌した。(2 S) - 1 - オキソ - 3 - フェニル - 1 - (プロパン - 2 - イルアミノ) プロパン - 2 - アンモニウム トリフルオロアセテート (2 6 2 m g 、 0 . 8 2 m m o l) の DMF (1 . 5 m L) 中溶液を反応混合物に添加し、その後、N , N - ジイソプロピルエチルアミン (2 9 4 μ L 、 1 . 6 4 m m o l) を添加し、反応を 2 1 で 4 時間撹拌した。溶媒を真空中で除去し、残渣を E t O A c (6 0 m L) 中に溶解し、1 M H C l (x 3) 、 H₂ O (x 1) 、飽和 N a H C O₃ (x 3) 、 1 0 % L i C l (x 1) 及び飽和 N a C l (x 1) で洗浄し、乾燥させ (M g S O₄) 、濾過し、溶媒を真空中で除去した。沈殿 (C H C l₃ / 石油エーテル 4 0 ~ 6 0) での精製により、所望の化合物を淡褐色固体として得た (3 5 9

40

50

mg、0.69 mmol、84%収率): ^1H NMR (600 MHz, CD_3CN , 25 $^\circ\text{C}$) δ 7.32-7.28 (m, 2H), 7.25-7.21 (m, 3H), 7.11 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 6.42 (s, 1H), 4.46 (td, $J = 7.6, 6.5$ Hz, 1H), 4.31 (td, $J = 7.3, 6.4$ Hz), 3.88 (ダブルットのセプテット, $J = 6.6, 6.3$ Hz, 1H), 3.30 (dd, $J = 13.7, 5.8$ Hz, 1H), 3.16 (dd, $J = 13.7, 7.4$ Hz, 1H), 2.95 (dd, $J = 13.8, 7.5$ Hz, 1H), 2.93 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.07 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.02 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, CD_3CN , 25 $^\circ\text{C}$) δ 169.39, 168.84, 168.77, 167.85, 155.17, 149.33, 136.77, 129.10, 127.98, 126.30, 118.57, 79.49, 54.10, 52.62, 40.91, 37.44, 32.43, 27.15, 22.95, 21.24, 21.17; IR (薄膜) 3301, 2973, 1770, 1701, 1674, 1641, 1525 cm^{-1} ; LRMS (EI) 518 (24%, $[\text{M}]^+$), 432 (23), 219 (33), 149 (21), 110 (27), 86 (37), 84 (100); $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$ $[\text{M}]^+$ について計算したHRMS (EI) 518.2194, 実測値518.2199.

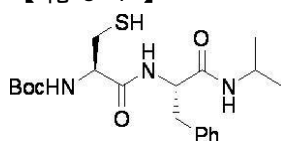
10

【0451】

参考例68: Boc-Cys(MeMal)-Phe- i Prの脱保護

【0452】

【化81】



【0453】

150 mM ホスフェート緩衝液 (pH 8、25 mL) 中のトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩 (138 mg、0.48 mmol) を、Boc-Cys(MeMal)-Phe- i Pr (50 mg、97 μmol) の MeCN (25 mL) 中攪拌溶液に添加し、反応を 21 $^\circ\text{C}$ で 10 分間攪拌した。Boc-Cys-Phe- i Pr の合成は LCMS (ESI $^-$) 408.7 (100%) で確認した。

20

【0454】

参考例69: Grb2-SH2 L111C変異体のクローニング及び発現

【0455】

【化82】



30

【0456】

Grb2-SH2 L111C の配列 (残基 53 - 163): M G I E M K P H P W F F G K I P R A K A E E M L S K Q R H D G A F L I R E S E S A P G D F S L S V K F G N D V Q H F K V C R D G A G K Y F L W V V K F N S L N E L V D Y H R S T S V S R N Q Q I F L R D I E Q V P Q Q P T Y V Q A G S R S H H H H H H 終止。質量計算値 = 14171

【0457】

Grb2-SH2 ドメインのための DNA 構築物は、1 次アミノ酸配列 53 - 163 を含んでおり、プラスミド QE-60 (Qiagen) にクローニングした。Grb2-SH2 L111C 変異体は、変異残基をコードするオリゴヌクレオチドを使用した部位特異的変異誘発 (Stratagene Kit) によって構築した。両方の構築物を、T5 プロモーターを使用して Escherichia coli (M15 [pREP4]、Qiagen) 中で発現させ、C 末端に 6-His Tag を精製のために組み込んだ。培養物 (1 L) を、シングルコロニーから T.B. 中で 37 $^\circ\text{C}$ で増殖させ、0.9 の OD $_{600}$ に達した時点で 1.0 mM IPTG によって発現を誘導した。培養物に、ほぼ 3 時間にわたってタンパク質を発現させ、その後細胞をペレット化した。ペレットを、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) を含む 0.1 M リン酸ナトリウム、300 mM NaCl、50 mM イミダゾール、pH 7.2 中で溶解させた。溶解物を遠心分離

40

50

し、上清をNi-NTAカラム(Qiagen)にアプライした。Grb2-SH2 L111Cを、0.1Mリン酸ナトリウム、300mM NaCl、200mMイミダゾール(pH7.2)によってNi-NTAカラムから溶出させた。収集したGrb2-SH2 L111Cは、クマシー染色したSDS-PAGEで可視化したとき、約95%の純度であった。ドメインスワッピングによるGrb2-SH2ドメインの二量体化は、以前に観察されている。二量体及び単量体のGrb2-SH2を、0.1Mリン酸ナトリウム及び150mM NaCl(pH8.0)で予め平衡化したSephacryl S-100カラム(320mL)で分離した。単量体Grb2-SH2の分子量(約14kDa)及び二量体Grb2-SH2の分子量(約28kDa)に対応する2つのピークが溶出した。Grb2-SH2 L111Cドメインのほぼ60%が、カラムから単量体として溶出した。4で数ヶ月の過程にわたって相互変換が殆ど認められなかったことから、分離された単量体及び二量体は、驚くべきことに動力学的に安定であることが見出された。単量体を、Amicon(登録商標)Ultra-4遠心フィルターユニット(Millipore)を使用して濃縮し、タンパク質の最終濃度を、McNemar及び共同研究者が得た吸光係数(15,600M⁻¹)を用い、280nmでの吸光度によって決定した。タンパク質を、100mLアリコートに2mg/mLの濃度で凍結させ、これを実験の際に必要な応じて解凍した。単量体タンパク質の質量(質量14170)はESI-MSを使用して得た。

10

【0458】

0のモデルタンパク質溶液(100μL、[タンパク質]2.0mg/mL、100mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl、pH8.0)に、0でEllman試薬(5μL、H₂O中の282mM溶液)を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0で10分間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、単一の反応が起こって、14370の質量を有する単一の生成物が生じたことが示され、これは、C111が官能化に利用可能であることを示す。

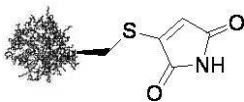
20

【0459】

参考例70: GrB2-SH2ドメインL111C / プロモレイミド付加物の調製

【0460】

【化83】



30

【0461】

0のモデルタンパク質溶液(100μL、[タンパク質]2.0mg/mL、100mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl、pH8.0)に、プロモレイミド(5μL、DMF中の2.82mM溶液)を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、所望の生成物が定量的変換で形成されたことが示された(質量14266)。

【0462】

混合物を、0でEllman試薬(5μL、H₂O中の282mM溶液)で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0で10分間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、Ellman試薬との反応は明白には表れないことが示され、これは、プロモレイミド官能化がC111で生じたことを強調する。

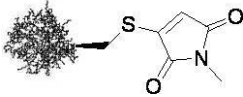
40

【0463】

参考例71: GrB2-SH2ドメインL111C / N-メチルプロモレイミド付加物の調製

【0464】

【化 8 4】



【0 4 6 5】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、N-メチルプロモレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で1時間維持した、LC-MSを使用した分析により、所望の生成物が定量的変換で形成されたことが示された (質量14280)。

10

【0 4 6 6】

混合物を、0 でEllman試薬 (5 μ L、H₂O中の2.82 mM溶液) で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で10分間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、Ellman試薬との反応は明白には表れないことが示され、これは、N-メチルプロモレイミド官能化がC111で生じたことを強調している。

【0 4 6 7】

参考例 7 2 : GrB2-SH2ドメイン L111C / プロモレイミド付加物のホスフィン媒介性の還元的切断

【0 4 6 8】

20

【化 8 5】



【0 4 6 9】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、プロモレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質 / プロモレイミド付加物に対応する質量14265の単一のタンパク質種が示された。

30

【0 4 7 0】

混合物を、0 でTCEP・HCl (5 μ L、H₂O中の2.82 mM溶液) で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で3時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、タンパク質 / プロモレイミド付加物が明らかに切断されて、所望の生成物 (質量 = 14169) が80%の変換で得られたことが示された。

【0 4 7 1】

参考例 7 3 : GrB2-SH2ドメイン L111C / プロモレイミド付加物の β -メルカプトエタノール媒介性の還元的切断

【0 4 7 2】

40

【化 8 6】



【0 4 7 3】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、プロモレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質 / プロモレイミド付加物に対応する質量14265の単一のタンパク質種が示された。

【0 4 7 4】

50

混合物を、 β -メルカプトエタノール（5 μ L、 H_2O 中の282 mM溶液）で処理し、1秒間ボルテックスし、37 で4時間維持した。分析により、タンパク質/プロモマレイミド付加物が明らかに切断されて、所望の生成物（質量 = 14173）が定量的変換で得られたことが示された。

【0475】

参考例74：GrB2-SH2ドメインL111C / プロモマレイミド付加物のグルタチオン媒介性の切断

【0476】

【化87】



10

【0477】

0 のモデルタンパク質溶液（100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0）に、プロモマレイミド（5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液）を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/プロモマレイミド付加物に対応する質量14265の単一のタンパク質種が示された。

【0478】

混合物をグルタチオン（5 μ L、 H_2O 中の282 mM溶液）で処理し、1秒間ボルテックスし、37 で4時間維持した。分析により、タンパク質/プロモマレイミド付加物が明らかに切断されて、所望の生成物（質量 = 14173）が定量的変換で得られたことが示された。

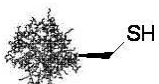
20

【0479】

参考例75：GrB2-SH2ドメインL111C / N-メチルプロモマレイミド付加物のホスフィン媒介性の還元的切断

【0480】

【化88】



30

【0481】

0 のモデルタンパク質溶液（100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0）に、N-メチルプロモマレイミド（5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液）を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/N-メチルプロモマレイミド付加物に対応する質量14278の単一のタンパク質種が示された。

【0482】

混合物を、0 でTCEP・HCl（5 μ L、 H_2O 中の282 mM溶液）で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で3時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、タンパク質/N-メチルプロモマレイミド付加物が明らかに切断されて、所望の生成物（質量 = 14168）が85%の変換で得られたことが示された。

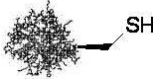
40

【0483】

参考例76：GrB2-SH2ドメインL111C / N-メチルプロモマレイミド付加物の β -メルカプトエタノール媒介性の還元的切断

【0484】

【化 8 9】



【0 4 8 5】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、N-メチルプロモレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/N-メチルプロモレイミド付加物に対応する質量14280の単一のタンパク質種が示された。

10

【0 4 8 6】

混合物を、 β -メルカプトエタノール (5 μ L、H₂O中の282 mM溶液) で処理し、1秒間ボルテックスし、37 で4時間維持した。分析により、タンパク質/N-メチルプロモレイミド付加物が明らかに切断されて、所望の生成物 (質量 = 14173) が定量的変換で得られたことが示された。

【0 4 8 7】

参考例 77 : GrB2-SH2ドメイン L111C / N-メチルプロモレイミド付加物のグルタチオン媒介性の切断

【0 4 8 8】

20

【化 9 0】



【0 4 8 9】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、N-メチルプロモレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/N-メチルプロモレイミド付加物に対応する質量14280の単一のタンパク質種が示された。

30

【0 4 9 0】

混合物を、グルタチオン (5 μ L、H₂O中の282 mM溶液) で処理し、1秒間ボルテックスし、37 で4時間維持した。分析により、タンパク質/N-メチルプロモレイミド付加物が明らかに切断されて、所望の生成物 (質量 = 14173) が定量的変換で得られたことが示された。

【0 4 9 1】

参考例 78 : GrB2-SH2ドメイン L111C / プロモレイミド付加物のエタンジチオール媒介性の切断

【0 4 9 2】

40

【化 9 1】



【0 4 9 3】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、プロモレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/プロモレイミド付加物に対応する質量14265の単一のタンパク質種が示された。

50

【 0 4 9 4 】

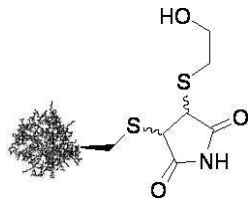
混合物を、エタンジチオール（ $5\ \mu\text{L}$ 、 H_2O 中の $2.82\ \text{mM}$ 溶液）で処理し、1秒間ボルテックスし、 37°C で4時間維持した。分析により、タンパク質/プロモレイミド付加物が明らかに切断されて、所望の生成物（質量 = 14173 ）が定量的変換で得られたことが示された。

【 0 4 9 5 】

参考例 79 : GrB2-SH2ドメイン L111C / プロモレイミド / 2 -メルカプトエタノール付加物の調製

【 0 4 9 6 】

【 化 9 2 】



10

【 0 4 9 7 】

0 のモデルタンパク質溶液（ $100\ \mu\text{L}$ 、[タンパク質] $2.0\ \text{mg/mL}$ 、 $100\ \text{mM}$ リン酸ナトリウム、 $150\ \text{mM}$ NaCl、 $\text{pH } 8.0$ ）に、プロモレイミド（ $5\ \mu\text{L}$ 、DMF中の $2.82\ \text{mM}$ 溶液）を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/プロモレイミド付加物に対応する質量 14265 の単一のタンパク質種が示された。

20

【 0 4 9 8 】

混合物を、0 で2 -メルカプトエタノール（ $5\ \mu\text{L}$ 、 H_2O 中の $2.82\ \text{mM}$ 溶液）で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で3時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、タンパク質/プロモレイミド/2 -メルカプトエタノール付加物（質量 = 14345 ）が54%の収率で形成されたことが示された。残りの物質はGrB2-SH2ドメイン L111Cであった。

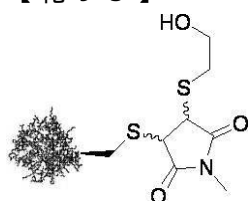
【 0 4 9 9 】

参考例 80 : GrB2-SH2ドメイン L111C / N -メチルプロモレイミド / 2 -メルカプトエタノール付加物の調製

30

【 0 5 0 0 】

【 化 9 3 】



【 0 5 0 1 】

0 のモデルタンパク質溶液（ $100\ \mu\text{L}$ 、[タンパク質] $2.0\ \text{mg/mL}$ 、 $100\ \text{mM}$ リン酸ナトリウム、 $150\ \text{mM}$ NaCl、 $\text{pH } 8.0$ ）に、N -メチルプロモレイミド（ $5\ \mu\text{L}$ 、DMF中の $2.82\ \text{mM}$ 溶液）を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/N -メチルプロモレイミド付加物に対応する質量 14278 の単一のタンパク質種が示された。

40

【 0 5 0 2 】

混合物を、0 で2 -メルカプトエタノール（ $5\ \mu\text{L}$ 、 H_2O 中の $2.82\ \text{mM}$ 溶液）で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で3時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、所望の生成物（質量 = 14359 ）が90%の収率で形成されたことが示された。残りの物質はGrB2-SH2ドメイン L111Cであった。

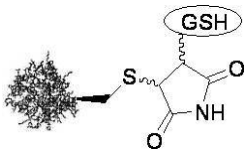
50

【 0 5 0 3 】

参考例 8 1 : Gr B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C / プロモマレイミド / グルタチオン付加物の調製

【 0 5 0 4 】

【 化 9 4 】



【 0 5 0 5 】

0 のモデルタンパク質溶液 (1 0 0 μ L、[タンパク質] 2 . 0 m g / m L、1 0 0 m M リン酸ナトリウム、1 5 0 m M N a C l、p H 8 . 0) に、プロモマレイミド (5 μ L、DMF 中の 2 . 8 2 m M 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 0 で 1 時間維持した。LC - MS を使用した分析により、タンパク質 / プロモマレイミド付加物に対応する質量 1 4 2 6 5 の単一のタンパク質種が示された。

10

【 0 5 0 6 】

混合物を、0 でグルタチオン (5 μ L、H₂O 中の 2 . 8 2 m M 溶液) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、0 で 3 時間維持し、その後、混合物を LC - MS で分析した。分析により、タンパク質 / プロモマレイミド / グルタチオン付加物 (質量 = 1 4 5 7 4) が 4 4 % の変換で形成されたことが示された。残りの物質は Gr B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C であった。

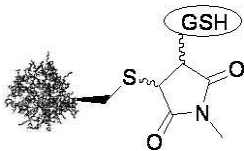
20

【 0 5 0 7 】

参考例 8 2 : Gr B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C / N - メチルプロモマレイミド / グルタチオン付加物の調製

【 0 5 0 8 】

【 化 9 5 】



30

【 0 5 0 9 】

0 のモデルタンパク質溶液 (1 0 0 μ L、[タンパク質] 2 . 0 m g / m L、1 0 0 m M リン酸ナトリウム、1 5 0 m M N a C l、p H 8 . 0) に、N - メチルプロモマレイミド (5 μ L、DMF 中の 2 . 8 2 m M 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 0 で 1 時間維持した。LC - MS を使用した分析により、タンパク質 / N - メチルプロモマレイミド付加物に対応する質量 1 4 2 7 8 の単一のタンパク質種が示された。

【 0 5 1 0 】

混合物を、0 で 2 - メルカプトエタノール (5 μ L、H₂O 中の 2 . 8 2 m M 溶液) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、0 で 3 時間維持し、その後、混合物を LC - MS で分析した。分析により、タンパク質 / N - メチルプロモマレイミド / グルタチオン付加物 (質量 = 1 4 5 8 8) が 9 5 % の変換で形成されたことが示された。残りの物質は Gr B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C であった。

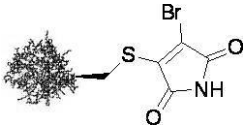
40

【 0 5 1 1 】

参考例 8 3 : Gr B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C / ジプロモマレイミド付加物の調製

【 0 5 1 2 】

【化 9 6】



【0 5 1 3】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、ジプロモマレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で4時間維持した。LC-MSを使用した分析により、所望の生成物が定量的収率で形成されたことが示された (質量14345)。

10

【0 5 1 4】

参考例 8 4 : Gr B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C / ジプロモマレイミド付加物の 2 - メルカプトエタノール媒介性の還元的切断

【0 5 1 5】

【化 9 7】



【0 5 1 6】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、ジプロモマレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で4時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/ジプロモマレイミド付加物に対応する質量14346の単一のタンパク質種が示された。

20

【0 5 1 7】

混合物を、0 で2-メルカプトエタノール (5 μ L、H₂O中の2.82 mM溶液) で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で4時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、タンパク質/ジプロモマレイミド付加物が明らかに切断されて、所望の生成物 (質量 = 14171) が定量的収率の収率で得られたことが示された。

30

【0 5 1 8】

参考例 8 5 : Gr B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C / ジプロモマレイミド付加物のグルタチオン媒介性の還元的切断

【0 5 1 9】

【化 9 8】



【0 5 2 0】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、ジプロモマレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で4時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/ジプロモマレイミド付加物に対応する質量14346の単一のタンパク質種が示された。

40

【0 5 2 1】

混合物を、0 でグルタチオン (5 μ L、H₂O中の2.82 mM溶液) で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で4時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、タンパク質/ジプロモマレイミド付加物が明らかに切断されて、所望の生成物 (質量 = 14170) が定量的収率で得られたことが示された。

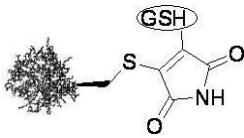
50

【 0 5 2 2 】

参考例 8 6 : G r B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C / ジブロモマレイミド / グルタチオン
付加物の調製

【 0 5 2 3 】

【 化 9 9 】



【 0 5 2 4 】

0 のモデルタンパク質溶液 (1 0 0 μ L、[タンパク質] 2 . 0 m g / m L、1 0 0 m M リン酸ナトリウム、1 5 0 m M N a C l、p H 8 . 0) に、ジブロモマレイミド (5 μ L、DMF 中の 2 . 8 2 m M 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 0 で 4 時間維持した。LC - MS を使用した分析により、タンパク質 / ジブロモマレイミド付加物に対応する質量 1 4 3 4 6 の単一のタンパク質種が示された。

10

【 0 5 2 5 】

混合物を、0 でグルタチオン (5 μ L、H₂O 中の 2 . 8 2 m M 溶液) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、0 で 2 時間維持し、その後、混合物を LC - MS で分析した。分析により、所望の生成物 (質量 = 1 4 5 7 3) が定量的変換で形成されたことが示された。

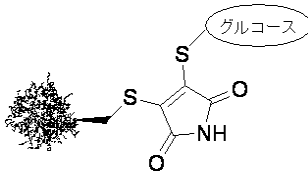
20

【 0 5 2 6 】

参考例 8 7 : G r B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C / ジブロモマレイミド / β - 1 - チオ
グルコース付加物の調製

【 0 5 2 7 】

【 化 1 0 0 】



30

【 0 5 2 8 】

0 のモデルタンパク質溶液 (1 0 0 μ L、[タンパク質] 2 . 0 m g / m L、1 0 0 m M リン酸ナトリウム、1 5 0 m M N a C l、p H 8 . 0) に、ジブロモマレイミド (5 μ L、DMF 中の 2 . 8 2 m M 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 0 で 4 時間維持した。LC - MS を使用した分析により、タンパク質 / ジブロモマレイミド付加物に対応する質量 1 4 3 4 6 の単一のタンパク質種が示された。

【 0 5 2 9 】

混合物を、0 で β - 1 - チオグルコース、ナトリウム塩 (5 μ L、H₂O 中の 2 . 8 2 m M 溶液) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、0 で 2 時間維持し、その後、混合物を LC - MS で分析した。分析により、所望の生成物 (質量 = 1 4 4 6 1) がほぼ定量的収率で形成されたことが示された。

40

【 0 5 3 0 】

参考例 8 8 : G r B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C / ジブロモマレイミド / グルタチオン
付加物のグルタチオン媒介性の切断

【 0 5 3 1 】

【 化 1 0 1 】



【 0 5 3 2 】

50

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、ジプロモマレイミド (5 μ L、DMF 中の 2.82 mM 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 0 で 4 時間維持した。LC-MS を使用した分析により、タンパク質 / ジプロモマレイミド付加物に対応する質量 14346 の単一のタンパク質種が示された。

【0533】

混合物を、0 でグルタチオン (5 μ L、H₂O 中の 2.82 mM 溶液) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、0 で 2 時間維持し、その後、混合物を LC-MS で分析した。分析により、タンパク質 / ジプロモマレイミド / グルタチオン付加物が、唯一の存在するタンパク質種であることが示された (質量 = 14573)。

10

【0534】

混合物を、0 でグルタチオン (5 μ L、H₂O 中の 2.82 mM 溶液) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、0 で 4 時間維持し、その後、混合物を LC-MS で分析した。分析により、所望の生成物 (質量 = 14173) が、定量的収率で形成されたことが示された。

【0535】

参考例 89 : 生理学的に適切なグルタチオン濃度 (5 mM) での、GrB2-SH2ドメイン L111C / ジプロモマレイミド / グルタチオン付加物のグルタチオン媒介性の切断

【0536】

【化102】

20



【0537】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、ジプロモマレイミド (5 μ L、DMF 中の 2.82 mM 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 0 で 4 時間維持した。LC-MS を使用した分析により、タンパク質 / ジプロモマレイミド付加物に対応する質量 14346 の単一のタンパク質種が示された。

【0538】

混合物を、0 でグルタチオン (5 μ L、H₂O 中の 2.82 mM 溶液) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、0 で 2 時間維持し、その後、混合物を LC-MS で分析した。分析により、タンパク質 / ジプロモマレイミド / グルタチオン付加物が存在する唯一のタンパク質種であることが示された (質量 = 14573)。

30

【0539】

混合物を、0 でグルタチオン (5 μ L、H₂O 中の 100 mM 溶液) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、0 で 4 時間維持し、その後、混合物を LC-MS で分析した。分析により、所望の生成物 (質量 = 14173) が定量的収率で形成されたことが示された。

【0540】

参考例 90 : 生理学的に適切なグルタチオン濃度 (1 mM) での、GrB2-SH2ドメイン L111C / ジプロモマレイミド / グルタチオン付加物のグルタチオン媒介性の切断

【0541】

【化103】

40



【0542】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、ジプロモマレイミド (

50

5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液)を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で4時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/ジブロモレイミド付加物に対応する質量14346の単一のタンパク質種が示された。

【0543】

混合物を、0 でグルタチオン(5 μ L、H₂O中の2.82 mM溶液)で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で2時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、タンパク質/ジブロモレイミド/グルタチオン付加物が存在する唯一のタンパク質種であることが示された(質量=14573)。

【0544】

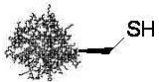
タンパク質/ジブロモレイミド/グルタチオン付加物の溶液を、緩衝液交換(Micro Bio-Spin 6 Chromatography Column、Bio-Rad)に供して、付加物(95 μ L、[付加物]0.2 mg/mL、20 mM HEPES、100 mM KCl、1 mM MgCl₂、1 mM EDTA、pH 7.4)を得た。これに、グルタチオン(5 μ L、20 mM HEPES、100 mM KCl、1 mM MgCl₂、1 mM EDTA、pH 7.4中20 mM溶液)を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで37 で4時間維持した。分析により、Grb2-SH2(L111C)(質量)14170)が定量的変換で形成されたことが示された。

【0545】

参考例91: GrB2-SH2ドメインL111C/ジブロモレイミド/グルタチオン付加物の β -メルカプトエタノール媒介性の切断

【0546】

【化104】



【0547】

0 のモデルタンパク質溶液(100 μ L、[タンパク質]2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0)に、ジブロモレイミド(5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液)を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で4時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/ジブロモレイミド付加物に対応する質量14346の単一のタンパク質種が示された。

【0548】

混合物を、0 でグルタチオン(5 μ L、H₂O中の2.82 mM溶液)で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で2時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、タンパク質/ジブロモレイミド/グルタチオン付加物が存在する唯一のタンパク質種であることが示された(質量=14573)。

【0549】

混合物を、0 で β -メルカプトエタノール(5 μ L、H₂O中2.82 mM溶液)で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で4時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、所望の生成物(質量=14172)が定量的変換で形成されたことが示された。

【0550】

参考例92: GrB2-SH2ドメインL111C/ジブロモレイミド/ β -1-チオグルコース付加物のグルタチオン媒介性の切断

【0551】

【化105】



【0552】

10

20

30

40

50

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、ジプロモマレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で4時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/ジプロモマレイミド付加物に対応する質量14346の単一のタンパク質種が示された。

【0553】

混合物を、0 で β -1-チオグルコース (5 μ L、H₂O中の2.82 mM溶液) で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で2時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、タンパク質/ジプロモマレイミド/ β -1-チオグルコース付加物が存在する唯一のタンパク質種であることが示された (質量 = 14461)。

10

【0554】

混合物を、0 でグルタチオン (5 μ L、H₂O中の2.82 mM溶液) で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で4時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、所望の生成物 (質量 = 14173) が定量的変換で形成されたことが示された。

【0555】

参考例 93 : GrB2-SH2ドメイン L111C / ジプロモマレイミド / β -1-チオグルコース付加物の β -メルカプトエタノール媒介性の切断

【0556】

20

【化106】



【0557】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、ジプロモマレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で4時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/ジプロモマレイミド付加物に対応する質量14346の単一のタンパク質種が示された。

30

【0558】

混合物を、0 で β -1-チオグルコース (5 μ L、H₂O中の2.82 mM溶液) で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で2時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、タンパク質/ジプロモマレイミド/ β -1-チオグルコース付加物が存在する唯一のタンパク質種であることが示された (質量 = 14461)。

【0559】

混合物を、0 で β -メルカプトエタノール (5 μ L、H₂O中2.82 mM溶液) で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で4時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、所望の生成物 (質量 = 14172) が定量的変換で形成されたことが示された。

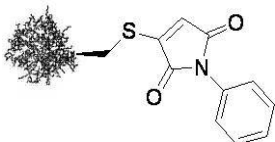
40

【0560】

参考例 94 : GrB2-SH2ドメイン L111C / N-フェニルプロモマレイミド付加物の調製

【0561】

【化107】



50

【 0 5 6 2 】

0 のモデルタンパク質溶液 (1 0 0 μ L、[タンパク質] 2 . 0 m g / m L、1 0 0 m M リン酸ナトリウム、1 5 0 m M N a C l、p H 8 . 0) に、N - フェニルプロモレイミド (5 μ L、DMF 中の 2 . 8 2 m M 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 0 で 1 時間維持した。LC - MS を使用した分析により、所望の生成物が定量的収率で形成されたことが示された (質量 1 4 3 5 1)。

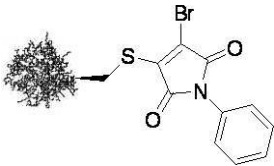
【 0 5 6 3 】

参考例 9 5 : G r B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C / N - フェニルジプロモレイミド付加物の調製

【 0 5 6 4 】

10

【 化 1 0 8 】



【 0 5 6 5 】

0 のモデルタンパク質溶液 (1 0 0 μ L、[タンパク質] 2 . 0 m g / m L、2 0 m M M E S、1 5 0 m M N a C l、p H 6) に、N - フェニルプロモレイミド (5 μ L、DMF 中の 2 . 8 2 m M 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 0 で 1 時間維持した。LC - MS を使用した分析により、所望の生成物が定量的収率で形成されたことが示された (質量 1 4 4 3 1)。

20

【 0 5 6 6 】

参考例 9 6 : G r B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C / N - フェニルジプロモレイミド付加物の β - メルカプトエタノール媒介性の切断

【 0 5 6 7 】

【 化 1 0 9 】



30

【 0 5 6 8 】

0 のモデルタンパク質溶液 (1 0 0 μ L、[タンパク質] 2 . 0 m g / m L、2 0 m M M E S、1 5 0 m M N a C l、p H 6) に、N - フェニルプロモレイミド (5 μ L、DMF 中の 2 . 8 2 m M 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 0 で 1 時間維持した。LC - MS を使用した分析により、タンパク質 / N - フェニルジプロモレイミド付加物が定量的収率で形成されたことが示された (質量 1 4 4 3 1)。

【 0 5 6 9 】

混合物を、0 で β - メルカプトエタノール (5 μ L、H₂O 中の 2 8 2 m M 溶液) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、0 で 4 時間維持し、その後、混合物を LC - MS で分析した。分析により、所望の生成物 (質量 = 1 4 1 7 9) が定量的変換で形成されたことが示された。

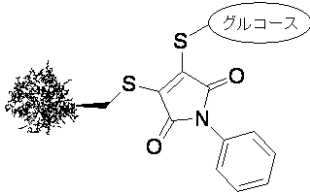
40

【 0 5 7 0 】

参考例 9 7 : G r B 2 - S H 2 ドメイン L 1 1 1 C / N - フェニルジプロモレイミド / β - 1 - チオグルコース付加物の調製

【 0 5 7 1 】

【化 1 1 0】



【 0 5 7 2】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、20 mM MES、150 mM NaCl、pH 6) に、N-フェニルジプロモレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/N-フェニルジプロモレイミド付加物が定量的収率で形成されたことが示された (質量 14431)。

10

【 0 5 7 3】

混合物を、0 で β -1-チオグルコース (5 μ L、 H_2O 中の2.82 mM溶液) で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で2時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、タンパク質/N-フェニルジプロモレイミド/ β -1-チオグルコース付加物が存在する唯一のタンパク質種であることが示された (質量 = 14547)。

【 0 5 7 4】

参考例 98 : GrB2-SH2ドメイン L111C / N-フェニルジプロモレイミド / β -1-チオグルコース付加物の β -メルカプトエタノール媒介性の切断

20

【 0 5 7 5】

【化 1 1 1】



【 0 5 7 6】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、20 mM MES、150 mM NaCl、pH 6) に、N-フェニルジプロモレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/N-フェニルジプロモレイミド付加物が定量的収率で形成されたことが示された (質量 14431)。

30

【 0 5 7 7】

混合物を、0 で β -1-チオグルコース (5 μ L、 H_2O 中の2.82 mM溶液) で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で2時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、タンパク質/N-フェニルジプロモレイミド/ β -1-チオグルコース付加物が存在する唯一のタンパク質種であることが示された (質量 = 14547)。

40

【 0 5 7 8】

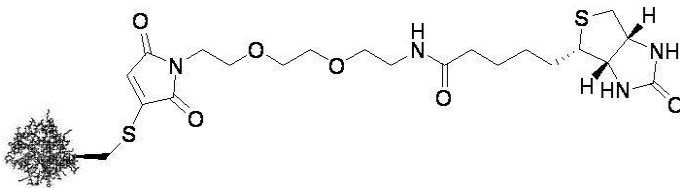
混合物を、0 で β -メルカプトエタノール (5 μ L、 H_2O 中の2.82 mM溶液) で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で4時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、所望の生成物 (質量 = 14178) が定量的変換で形成されたことが示された。

【 0 5 7 9】

参考例 99 : GrB2-SH2ドメイン L111C / ビオチン-PEG-プロモレイミド付加物の調製

【 0 5 8 0】

【化 1 1 2】



【0 5 8 1】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、ビオチン-PEG-プロモレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、所望の生成物が定量的収率で形成されることが示された (質量14634)。

10

【0 5 8 2】

参考例 100 : GrB2-SH2ドメイン L111C / ビオチン-PEG-プロモレイミド付加物の β -メルカプトエタノール媒介性の切断

【0 5 8 3】

【化 1 1 3】



20

【0 5 8 4】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、ビオチン-PEG-プロモレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/ビオチン-PEG-プロモレイミド付加物が定量的収率で形成されることが示された (質量14634)。

【0 5 8 5】

混合物を、37 で β -メルカプトエタノール (5 μ L、 H_2O 中の2.82 mM溶液) で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、37 で4時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、所望の生成物 (質量 = 14180) が定量的変換で形成されることが示された。

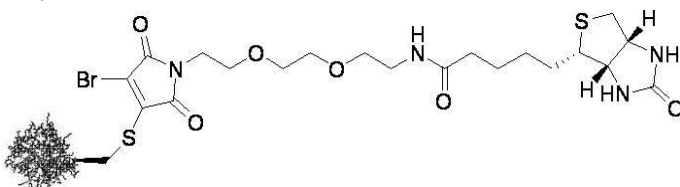
30

【0 5 8 6】

参考例 101 : GrB2-SH2ドメイン L111C / ビオチン-PEG-ジプロモレイミド付加物の調製

【0 5 8 7】

【化 1 1 4】



40

【0 5 8 8】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、ビオチン-PEG-ジプロモレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で2時間維持した。LC-MSを使用した分析により、所望の生成物が > 80% の収率で形成されることが示された (質量14701)。

【0 5 8 9】

参考例 102 : GrB2-SH2ドメイン L111C / ビオチン-PEG-ジプロモレイ

50

イミド付加物の β -メルカプトエタノール媒介性の切断

【0590】

【化115】



【0591】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、ビオチン-PEG-ジプロモレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/ビオチン-PEG-ジプロモレイミド付加物が > 80%の変換で形成されたことが示された (質量14701)。

10

【0592】

混合物を、0 で β -メルカプトエタノール (5 μ L、H₂O中の2.82 mM溶液) で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、0 で4時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、所望の生成物 (質量 = 14171) が > 80%の変換で形成されたことが示された。

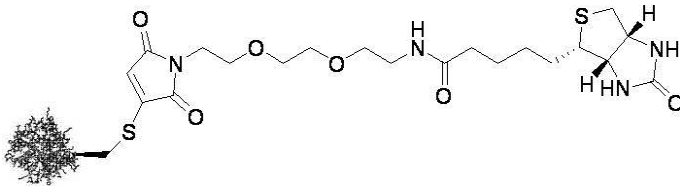
【0593】

実施例1：ニュートラアビジン被覆したアガロースビーズ上へのGrB2-SH2ドメインL111C/ビオチン-PEG-ジプロモレイミド付加物のブルダウン及び放出

20

【0594】

【化116】



【0595】

0 のモデルタンパク質溶液 (200 μ L、[タンパク質] 1.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、ビオチン-PEG-ジプロモレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、所望の生成物が定量的収率で形成されたことが示された (質量14634)。

30

【0596】

タンパク質/ビオチン-PEG-ジプロモレイミド付加物 (200 μ L) 及び非修飾モデルタンパク質 (200 μ L) を、濃縮器 (Vivaspin、カットオフ10k) 中でPBS緩衝液 (3 x 500 μ L) で独立して洗浄し、タンパク質溶液 (300 μ L) (In) を得た。得られたタンパク質溶液のそれぞれについて、ニュートラアビジン被覆したアガロースビーズ (50%水性スラリー750 μ L) を、PBS (2 x 500 μ L) で洗浄した。次いで、タンパク質溶液 (300 μ L) をビーズに添加し、混合物を4 で30分間インキュベートした。混合物を遠心分離し、フロースルー (FT) を収集した。ビーズをPBS (2 x 500 μ L) で洗浄し、両方の洗浄画分を収集した (W1及びW2)。タンパク質を、 β -メルカプトエタノール (25 mM) を含むPBS (300 μ L) 中で37 で2時間インキュベートすることにより、ビーズから放出させた。サンプルを遠心分離し、切断されたGrB2-SH2ドメインL111Cを含む溶離液 (E1) を収集した。結果を図1に示す。

40

【0597】

回収されたタンパク質の量は、デンストメトリーによるタンパク質希釈系列との比較により、44%と決定された。しかしながら、不可逆的に物理吸着されたタンパク質 (未修

50

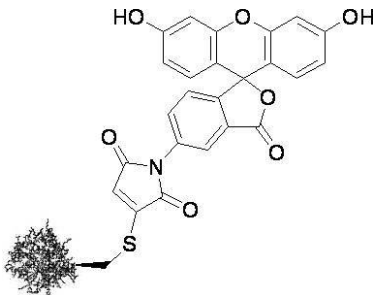
飾のタンパク質コントロールを使用して決定した) に対して補正すると、補正された回収率は71%であった。

【0598】

参考例103: GrB2-SH2ドメインL111C/N-フルオレセインプロモレイミド付加物の調製

【0599】

【化117】



10

【0600】

0 のモデルタンパク質溶液(100 μL、[タンパク質]2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH7.0)に、N-フルオレセインプロモレイミド(5 μL、DMF中の2.82 mM溶液)を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、所望の生成物が90%の変換で形成されたことが示された(質量14597)。

20

【0601】

参考例104: GrB2-SH2ドメインL111C/N-フルオレセインプロモレイミド付加物のβ-メルカプトエタノール媒介性の切断

【0602】

【化118】



【0603】

0 のモデルタンパク質溶液(100 μL、[タンパク質]2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH7.0)に、N-フルオレセインプロモレイミド(5 μL、DMF中の2.82 mM溶液)を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/フルオレセインプロモレイミド付加物が90%の変換で形成されたことが示された(質量14597)。

30

【0604】

混合物を、37 でβ-メルカプトエタノール(5 μL、H₂O中の2.82 mM溶液)で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、37 で4時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、所望の生成物(質量=14171)が87%の変換で形成されたことが示された。

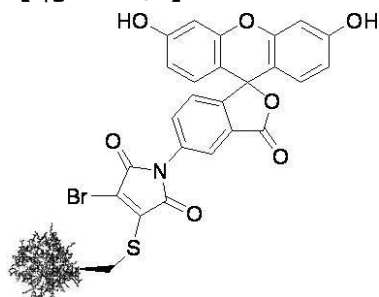
40

【0605】

参考例105: GrB2-SH2ドメインL111C/N-フルオレセインジプロモレイミド付加物の調製

【0606】

【化 1 1 9】



【0 6 0 7】

10

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、N-フルオレセインジプロモレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、所望の生成物が61%の変換で形成されたことが示された (質量14675)。

【0 6 0 8】

参考例 106 : GrB2-SH2ドメイン L111C / N-フルオレセインジプロモレイミド付加物の β -メルカプトエタノール媒介性の切断

【0 6 0 9】

【化 1 2 0】

20



【0 6 1 0】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 7.0) に、N-フルオレセインジプロモレイミド (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで0 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/フルオレセインジプロモレイミド付加物が61%の変換で形成されたことが示された (質量14597)。

30

【0 6 1 1】

混合物を、37 で β -メルカプトエタノール (5 μ L、H₂O中の2.82 mM溶液) で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、37 で4時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、所望の生成物 (質量 = 14171) が85%の変換で形成されたことが示された。

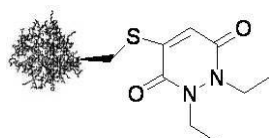
【0 6 1 2】

参考例 107 : GrB2-SH2ドメイン L111C / BrDDPD付加物の調製

【0 6 1 3】

【化 1 2 1】

40



【0 6 1 4】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、BrDDPD (5 μ L、DMF中の2.82 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで37 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、所望の生成物が定量的収率で形成されたことが示された (質量14348)。

【0 6 1 5】

50

参考例 108 : GrB2 - SH2ドメイン L111C / BrDDPD付加物の β -メルカ
プトエタノール媒介性の切断

【0616】

【化122】



【0617】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、BrDDPD (5 μ L、DMF中の282 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで37 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/BrDDPD付加物が定量的収率で形成されたことが示された (質量14348)。

10

【0618】

混合物を、4 で40時間透析し (100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0)、37 で β -メルカプトエタノール (5 μ L、H₂O中の2.82 mM溶液) で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、37 で2時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、所望の生成物 (質量=14180) が定量的変換で形成されたことが示された。

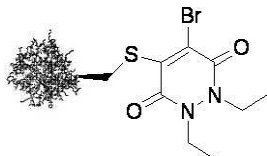
20

【0619】

参考例 109 : GrB2 - SH2ドメイン L111C / DiBrDDPD付加物の調製

【0620】

【化123】



【0621】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、DiBrDDPD (5 μ L、DMF中の282 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで37 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、所望の生成物が定量的収率で形成されたことが示された (質量14427)。

30

【0622】

参考例 110 : GrB2 - SH2ドメイン L111C / DiBrDDPD付加物の β -メルカ
プトエタノール媒介性の切断

【0623】

【化124】



40

【0624】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、DiBrDDPD (5 μ L、DMF中の282 mM溶液) を添加した。この混合物を1秒間ボルテックスし、次いで37 で1時間維持した。LC-MSを使用した分析により、タンパク質/DiBrDDPD付加物が定量的収率で形成されたことが示された (質量14427)。

【0625】

混合物を、4 で40時間透析し (100 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0)、次いで37 で β -メルカプトエタノール (5 μ L、H₂O中の2.82 mM溶液) で処理した。この混合物を1秒間ボルテックスし、37 で2時間維持し、その後、混合物をLC-MSで分析した。分析により、所望の生成物 (質量=14180) が定量的変換で形成されたことが示された。

50

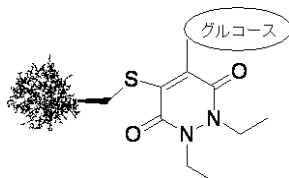
82 M 溶液) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、37 で 2 時間維持し、その後、混合物を LC-MS で分析した。分析により、所望の生成物 (質量 = 14180) が定量的変換で形成されたことが示された。

【0626】

参考例 111: GrB2-SH2 ドメイン L111C / DiBrDDPD / β -1-チオグルコース付加物の調製

【0627】

【化125】



10

【0628】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、DiBrDDPD (5 μ L、DMF 中の 282 mM 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 37 で 1 時間維持した。LC-MS を使用した分析により、タンパク質 / DiBrDDPD 付加物が定量的収率で形成されたことが示された (質量 14427)。

【0629】

混合物を、4 で 40 時間透析し (100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0)、次いで 0 で β -1-チオグルコース (5 μ L、H₂O 中の 28.2 mM) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、室温で 1 時間維持し、その後、混合物を LC-MS で分析した。分析により、タンパク質 / DiBrDDPD / β -1-チオグルコース付加物が存在する唯一のタンパク質種であることが示された (質量 = 14543)。

20

【0630】

参考例 112: GrB2-SH2 ドメイン L111C / DiBrDDPD / β -1-チオグルコース付加物の β -メルカプトエタノール媒介性の切断

【0631】

【化126】



30

【0632】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、DiBrDDPD (5 μ L、DMF 中の 282 mM 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 37 で 1 時間維持した。LC-MS を使用した分析により、タンパク質 / DiBrDDPD 付加物が定量的収率で形成されたことが示された (質量 14427)。

40

【0633】

混合物を、4 で 40 時間透析し (100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0)、次いで 0 で β -1-チオグルコース (5 μ L、H₂O 中の 28.2 mM 溶液) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、室温で 1 時間維持し、その後、混合物を LC-MS で分析した。分析により、タンパク質 / DiBrDDPD / β -1-チオグルコース付加物が存在する唯一のタンパク質種であることが示された (質量 = 14543)。

【0634】

混合物を、室温で β -メルカプトエタノール (5 μ L、H₂O 中の 2.82 M 溶液) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、室温で 30 分間維持し、その後、混合物

50

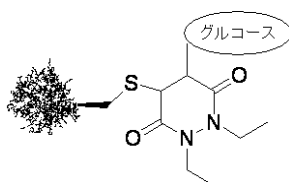
を LC - MS で分析した。分析により、所望の生成物 (質量 = 14180) が定量的変換で形成されたことが示された。

【0635】

参考例 113 : GrB2 - SH2 ドメイン L111C / BrDDPD / β - 1 - チオグルコース付加物の調製

【0636】

【化127】



10

【0637】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、BrDDPD (5 μ L、DMF 中の 282 mM 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 37 で 1 時間維持した。LC - MS を使用した分析により、タンパク質 / BrDDPD 付加物が定量的収率で形成されたことが示された (質量 14348)。

【0638】

混合物を、4 で 40 時間透析し (100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0)、次いで 0 で β - 1 - チオグルコース (5 μ L、H₂O 中の 28.2 mM 溶液) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、37 で 1 時間維持し、その後、混合物を LC - MS で分析した。分析により、タンパク質 / BrDDPD / β - 1 - チオグルコース付加物が 17 % の変換で形成されたことが示された (質量 = 14543)。

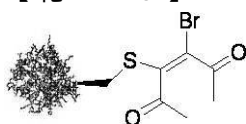
20

【0639】

参考例 114 : GrB2 - SH2 ドメイン L111C / Z - 2, 3 - ジブロモ - ブタ - 2 - エン二酸ジメチルエステル付加物の調製

【0640】

【化128】



30

【0641】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、Z - 2, 3 - ジブロモ - ブタ - 2 - エン二酸ジメチルエステル (5 μ L、DMF 中の 282 mM 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 37 で 1 時間維持した。LC - MS を使用した分析により、所望の生成物が形成されたことが示された (質量 14440)。

【0642】

参考例 115 : GrB2 - SH2 ドメイン L111C / Z - 2, 3 - ジブロモ - ブタ - 2 - エン二酸ジメチルエステル付加物の β - メルカプトエタノール媒介性の切断

40

【0643】

【化129】



【0644】

0 のモデルタンパク質溶液 (100 μ L、[タンパク質] 2.0 mg/mL、100 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH 8.0) に、Z - 2, 3 - ジブロモ

50

- ブタ - 2 - エン二酸ジメチルエステル (5 μ L、DMF 中の 282 mM 溶液) を添加した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、次いで 37 で 1 時間維持した。LC - MS を使用した分析により、所望の生成物が定量的収率で形成されたことが示された (質量 14370)。

【0645】

混合物を、37 で β - メルカプトエタノール (5 μ L、H₂O 中の 2.82 M 溶液) で処理した。この混合物を 1 秒間ボルテックスし、37 で 2 時間維持し、その後、混合物を LC - MS で分析した。分析により、所望の生成物 (質量 = 14180) が定量的変換で形成されたことが示された。

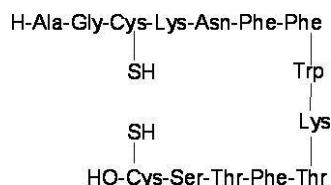
【0646】

参考例 116 : ソマトスタチンの修飾及び再生

還元型ソマトスタチンの調製

【0647】

【化130】



【0648】

凍結乾燥したソマトスタチン (質量 = 1638) を、緩衝液 (50 mM リン酸ナトリウム、pH 6.2、40% MeCN、2.5% DMF) 中に可溶化して、152.6 μ M の濃度 (0.25 mg / ml) とし、1.1 当量の TCEP で、周囲温度で 1 時間還元した。還元の完了は、4 当量のジプロモマレイミドをサンプルアリコートに添加し、LC - MS で分析して確認した。

【0649】

ハロマレイミド及び誘導体によるソマトスタチンの架橋

還元型ソマトスタチンは記載したとおりに生成した。1.1 当量のハロマレイミド又はジプロモマレイミド誘導体 (50 mM リン酸ナトリウム、pH 6.2、40% MeCN、2.5 ~ 15.0% DMF 中 100 x ストック) を周囲温度で添加し、生成物の生成を LC - MS で 1 時間にわたりモニタリングした。結果を図 2 に示す。

【0650】

ジチオマレイミドによるソマトスタチンの架橋

還元型ソマトスタチンは記載したとおりに生成した。種々の量のジチオマレイミド (50 mM リン酸ナトリウム、pH 6.2、40% MeCN、2.5 ~ 7.5% DMF 中 100 x ストック) を周囲温度で添加し、生成物の生成を LC - MS で 1 時間にわたりモニタリングした。結果を図 3 に示す。

【0651】

プロモマレイミドによるソマトスタチンの修飾

【0652】

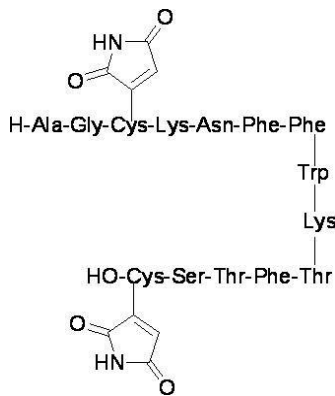
10

20

30

40

【化 1 3 1】



10

【 0 6 5 3】

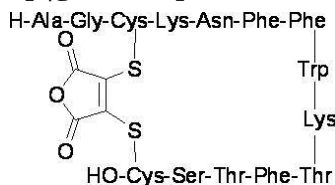
還元型ソマトスタチンは記載したとおりに生成した。2.1当量のプロモマレイミド(50mMリン酸ナトリウム、pH6.2、40%MeCN、7.5%DMF中100xストック)を周囲温度で添加したところ、ジ-付加生成物への完全な変換がLC-MSによって1時間以内に観察された。

【 0 6 5 4】

ジプロモマレイン酸無水物によるソマトスタチンの修飾

【 0 6 5 5】

【化 1 3 2】



20

【 0 6 5 6】

還元型ソマトスタチンは記載したとおりに生成した。5当量のジプロモマレイン酸無水物(DMF中)を添加し、生成物の生成をLC-MSでモニタリングした。17.3%の架橋ソマトスタチンが90分以内に生成した。

【 0 6 5 7】

種々の還元剤による架橋ソマトスタチンの切断

マレイミド架橋ソマトスタチンは、記載したように調製した。100当量の種々の還元剤(50mMリン酸ナトリウム、pH6.2、40%MeCN、2.5%DMF中1000xストック)を添加し、未修飾ペプチド及び副産物(還元剤と遊離ペプチド-システインとの混合型ジスルフィド)の生成を、LC-MSによって4で2日間モニタリングした。ソマトスタチンとGSHとの混合型ジスルフィドは、MALDI-TOF MSでのみ検出できた。結果を図4に示す。

30

【 0 6 5 8】

種々の量のDTT及び2-メルカプトエタノールによる、架橋ソマトスタチンの切断

マレイミド架橋ソマトスタチンは、記載したように調製した。種々の量のDTT又は2-メルカプトエタノール(50mMリン酸ナトリウム、pH6.2、40%MeCN、2.5%DMF中1000xストック)を添加し、未修飾ペプチド及び副産物(還元剤と遊離ペプチド-システインとの混合型ジスルフィド)の生成を、LC-MSによって4で6時間モニタリングした。結果を図5に示す。

40

【 0 6 5 9】

架橋ソマトスタチンの触媒された切断

マレイミド架橋ソマトスタチンは、記載したように調製した。20当量の2-メルカプトエタノール(50mMリン酸ナトリウム、pH6.2、40%MeCN、2.5%DMF中1000xストック)を添加し、その後、緩衝液又は5当量のヨウ化ナトリウム若しくはベンゼンセレノール(50mMリン酸ナトリウム、pH6.2、40%MeCN、7

50

． 5 % D M F 中 1 0 0 x ストック) のいずれかを添加し、未修飾ペプチド及び副産物 (2 - メルカプトエタノール又はベンゼンセレノールと遊離ペプチド - システインとの混合型ジスルフィド) の生成を、L C - M S によって周囲温度で 2 0 分間モニタリングした。結果を図 6 に示す。

【 0 6 6 0 】

N - 官能化マレイミド架橋ソマトスタチンの切断

ソマトスタチンを、記載したとおりに還元し、N - 官能化マレイミド誘導体で架橋した。1 0 0 当量の 2 - メルカプトエタノール (5 0 m M リン酸ナトリウム、p H 6 . 2 、 4 0 % M e C N 、 2 . 5 % D M F 中 1 0 0 0 x ストック) を添加し、未修飾ペプチド及び副産物 (2 - メルカプトエタノールと遊離ペプチド - システインとの混合型ジスルフィド) の生成を L C - M S により 4 で 2 日間モニタリングした。結果を図 7 に示す。

10

【 0 6 6 1 】

ソマトスタチンへのモノプロモマレイミドのジ - 付加生成物の切断

還元型ソマトスタチンを、2 . 1 当量のモノプロモマレイミドと反応させて、ジ - 付加生成物を得た。次に、1 0 0 当量の 2 - メルカプトエタノール (5 0 m M リン酸ナトリウム、p H 6 . 2 、 4 0 % M e C N 、 2 . 5 % D M F 中 1 0 0 0 x ストック) を添加し、モノ - 付加生成物、未修飾ペプチド及び副産物 (2 - メルカプトエタノールと遊離ペプチド - システインとの混合型ジスルフィド) の生成を、L C - M S により周囲温度で 2 . 5 時間モニタリングした。結果を図 8 に示す。

20

【 0 6 6 2 】

ソマトスタチンの比較上の *i n s i t u* 架橋

ソマトスタチンに、種々の量のジチオマレイミド (5 0 m M リン酸ナトリウム、p H 6 . 2 、 4 0 % M e C N 、 2 . 5 - 7 . 5 % D M F 中 1 0 0 x ストック) を添加し、反応を周囲温度で 1 0 分間インキュベートした。次に、種々の量の T C E P 又はベンゼンセレノール (1 0 0 x ストック、5 0 m M リン酸ナトリウム、p H 6 . 2 、 4 0 % M e C N 、 2 . 5 ~ 7 . 5 % D M F 中で新たに調製した) を添加し、架橋ソマトスタチンの生成を、L C - M S により周囲温度で 1 時間にわたりモニタリングした。結果を図 9 に示す。

【 0 6 6 3 】

ソマトスタチンの *i n s i t u* P E G 化

ソマトスタチンに、5 当量の N - P E G 5 0 0 0 - ジチオフエノールマレイミド又は 1 0 当量の N - P E G 5 0 0 0 - ジチオフエノールマレイミド (5 0 m M リン酸ナトリウム、p H 6 . 2 、 4 0 % M e C N 、 2 . 5 % D M F 中 1 0 0 x ストック) のいずれかを添加し、反応を周囲温度で 1 0 分間インキュベートした。次に、3 当量の T C E P それぞれ 5 当量のベンゼンセレノール (1 0 0 x ストック、5 0 m M リン酸ナトリウム、p H 6 . 2 、 4 0 % M e C N 、 2 . 5 - 7 . 5 % D M F 中に新たに調製) を添加し、P E G 化ソマトスタチンの生成を、L C - M S によって周囲温度で 2 時間にわたってモニタリングした。結果を図 1 0 に示す。

30

【 0 6 6 4 】

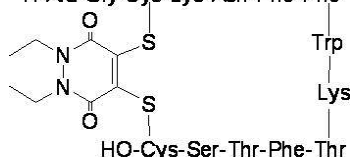
D i B r D D P D によるソマトスタチンの修飾

【 0 6 6 5 】

40

【 化 1 3 3 】

H-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe



【 0 6 6 6 】

凍結乾燥ソマトスタチン (質量 = 1 6 3 8) を、緩衝液 (5 0 m M リン酸ナトリウム、p H 6 . 2 、 4 0 % M e C N 、 2 . 5 % D M F) 中に可溶化して、1 5 2 . 6 μ M の濃度 (0 . 2 5 m g / m L) にし、1 . 1 当量の T C E P で 2 1 で 1 時間還元した。還元の

50

完了はLCMSによって確認した(質量=1640)。DiBrDDPD(100mol当量)を添加し、反応を21で10分間維持した。ソマトスタチン/DiBrDDPD付加物が定量的変換で形成したことが観察された(質量=1803)。

【0667】

パッチクランプを使用した、架橋ソマトスタチンの生物活性保持の実証

得られたソマトスタチンアナログの活性に対して架橋修飾が有害な影響を有するか否かを試験するために、本発明者らは、ジブロモマレイミド架橋アナログ、PEG化ジブロモマレイミド架橋アナログ及びフルオレセインジブロモマレイミド架橋アナログを、パッチクランプアッセイによって試験した。HKIR3.1/3.2チャンネル及びヒトソマトスタチンレセプター2を発現するHEK293細胞をこれらの化合物で処理し、ホールセルパッチクランプ電流記録を採取した。3つ全てのアナログが、ソマトスタチン自体と匹敵する振幅で、GIRK電流の強い活性化を誘導した。コントロールとして細胞を百日咳毒素又はGIRK阻害剤Tertiapin Qで処理したとき、電流は大きく阻害された。このデータにより、架橋ソマトスタチンアナログが、ソマトスタチンレセプター2のアゴニズムに関して、ソマトスタチンの生物活性を保持していることが確認される。

【0668】

細胞培養

細胞培養方法及び安定細胞株の生成は、J Biol Chem 275, 921-9 (2000)に記載のとおり実施した。Kir3.1チャンネル及びKir3.2Aチャンネルを安定に発現するHEK293細胞(ヒト胚性腎細胞株)を、10%胎仔ウシ血清及び727µgのG418(Invitrogen)を補充した最小必須培地中で、加湿雰囲気(95%O₂、5%CO₂)中37で維持した。細胞を、落射蛍光を使用したトランスフェクト細胞の可視化のためのpEGFP-N1(Clontech)と共に、SSTR2 DNA(Missouri S&T cDNA Resource Center)で一過的にトランスフェクトした。トランスフェクションは、細胞培養培地(血清も抗生物質も含まない)97µl当たり、5µlのFugene HD(Roche)並びに800ngのSSTR2-DNA及び40ngのEGFP-DNAで実施した。

【0669】

パッチクランプ実験のためのソマトスタチン及びアナログの調製

架橋ソマトスタチンは上記のように調製した。ソマトスタチン及びそのアナログを、緩衝液(50mMリン酸ナトリウム、pH6.2)中で4で24時間透析して、有機溶媒を除去した。透析後、濃度を決定し、ペプチドを4で保存した。最終濃度20µMのソマトスタチン及びアナログを使用した(希釈は、細胞外パッチクランプ緩衝液中で行った)。

【0670】

電気生理学

ホールセルパッチクランプ電流記録を、フィラメント化ホウケイ酸ガラスキャピラリー(Harvard Apparatus、1.5mm ODx1.17mm ID)から引き出される3-4MΩの抵抗を有するファイアポリッシュピペットを使用して、Axopatch 200B増幅器(Axon Instruments)で実施した。データを取得し、Digidata 1322Aインターフェイス(Axon Instruments)及びpCLAMPソフトウェア(バージョン8.1、Axon Instruments)で分析した。速い灌流システムを使用して、ソマトスタチン及びアナログをアプライした(Rapid Solution Changer、RSC-160、Bio-Logic France)。細胞を-60mVでクランプした。細胞外溶液は以下であった(mM): NaCl 80、KCl 60、CaCl₂ 2、MgCl₂ 1、HEPES 10、NaH₂PO₄ 0.33、グルコース 10、pH7.4;一方、細胞内溶液は以下であった(mM): グルコン酸K 110、KCl 20、NaCl 10、MgCl₂ 1、MgATP 2、EGTA 2 GTP 0.3、pH7.4。アゴニストの適用後、電流は、遅延「ラグ」とその後のピーク振幅への迅速な上昇「ピー

10

20

30

40

50

クまでの時間」で活性化した。アゴニストの除去後、電流は、減衰してベースラインに戻った。各細胞について、薬物適用の圧力から生じたフローアーチファクト (flow artifact) が存在するか否かを評価した。これは、記録の開始時に、排水管の1つからの浴溶液を適用することによって行った。GIRK電流の阻害剤 Tertiapin (Alomone) を、最終濃度 100 nM で使用した。細胞を、Giノタンパク質の阻害剤である百日咳毒素 (Sigma、100 ng/ml) と共に一晩インキュベートした。薬物は濃ストック溶液として調製し、-20 で維持した。

【0671】

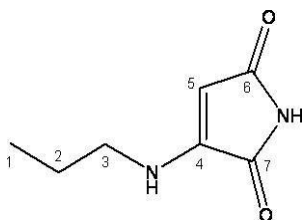
結果を図11及び図12に示す。

【0672】

参考例117：プロピルアミノマレイミドの調製

【0673】

【化134】



【0674】

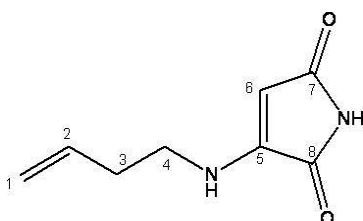
メタノール (15 mL) 中のプロピルアミン (75 μ L、1.09 mmol) 及び酢酸ナトリウム (92 mg、1.12 mmol) に、メタノール (15 mL) 中のプロモマレイミド (200 mg、1.12 mmol) を滴下した。10分後、溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィー (石油エーテル中10%の酢酸エチル) による精製により、所望の化合物 (82 mg、0.53 mmol) を鮮黄色のワックス状固体として49%の収率で得た。 δ_H (500 MHz, $CDCl_3$) 7.36 (s, 1H, NH), 5.45 (s, 1H, NH), 4.80 (d, 1H, $J = 1.3$, H-5), 3.14 (dt, 2H, $J = 6.2$ 及び7.2, H_2 -3), 1.71-1.63 (m, 2H, H_2 -2), 0.99 (t, 3H, $J = 7.4$, H_3 -1); δ_C (125 MHz, $CDCl_3$) 172.31 (C=O), 167.73 (C=O), 149.83 (C4), 85.29 (C5), 46.16 (C3), 21.91 (C2), 11.42 (C1); IR (固体, cm^{-1}) 3190 (m), 2962 (m), 1693 (m), 1627 (s); MS (EI) m/z (相対強度): 154 (M^+ , 60), 125 (98), 84 (100); $[C_7H_{10}N_2O_2]^+$ について計算した正確な質量は m/z 154.0737を要求、実測値 154.0734 (EI); UV (アセトニトリル) $\epsilon_{240} = 7400$ 及び $\epsilon_{348} = 5700$ $cm^{-1}M^{-1}d^3$.

【0675】

参考例118：ブト-3-エニルアミノマレイミドの調製

【0676】

【化135】



【0677】

メタノール (15 mL) 中の3-ブテニルアミン塩酸塩 (200 mg、1.12 mmol) 及び酢酸ナトリウム (184 mg、2.24 mmol) に、メタノール (15 mL) 中のプロモマレイミド (200 mg、1.12 mmol) を滴下した。10分後、溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィー (石油エーテル中10%の酢酸エチル) による精製により、所望の化合物 (142 mg、0.85 mmol) を鮮黄色のワックス状固体として76%の収率で得た。 δ_H (500 MHz, $CDCl_3$) 7.10 (s, 1H, NH), 5.77 (tdd, 1H, $J = 6.9$, 10.7及び17.4, H-2), 5.38 (s, 1H, NH), 5.18-5.15 (m, 2H, H_2 -1), 4.

83 (d, 1H, J = 1.3, H-6), 3.24 (t, 2H, J = 6.7, H₂-4), 2.40 (dtd, 2H, J = 1.2, 6.8及び6.9, H₂-3); δ_c (125 MHz, CDCl₃) 171.94 (C=O), 167.45 (C=O), 149.53 (C5), 133.89 (C2), 118.51 (C1), 85.80 (C6), 43.30 (C4), 32.68 (C3); IR (固体, cm⁻¹) 3290 (m), 1703 (m), 1629 (s); MS (ES-) m/z (相対強度): 165 ([M-H], 100); [C₈H₁₀N₂O₂]-Hについて計算した正確な質量はm/z 165.0659を要求、実測値165.0664 (ES-); m.p. 68-76°C; UV (アセトニトリル) $\epsilon_{241} = 8300$ 及び $\epsilon_{348} = 6100$ cm⁻¹M⁻¹d³.

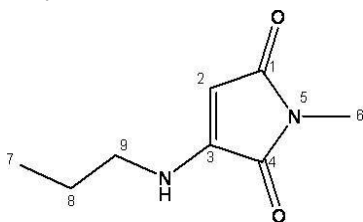
【0678】

参考例 119: N - メチルプロピルアミノマレイミドの調製

【0679】

【化136】

10



【0680】

メタノール (30 mL) 中のプロピルアミン (52 μ L, 0.78 mmol) 及び酢酸ナトリウム (64 mg, 0.78 mmol) に、メタノール (30 mL) 中の N - メチルモノプロモマレイミド (150 mg, 0.78 mmol) を滴下した。10分後、溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィー (石油エーテル中10%の酢酸エチル) による精製により、所望の化合物 (41 mg, 0.24 mmol) を鮮黄色のワックス状固体として31%の収率で得た。 δ_H (500 MHz, CDCl₃) 5.43 (s, 1H, NH), 4.80 (s, 1H, H-2), 3.16-3.13 (m, 2H, H₂-9), 2.98 (s, 3H, H₃-6), 1.71-1.64 (m, 2H, H₂-8), 0.99 (t, J = 7.5, H₃-7); δ_c (125 MHz, CDCl₃) 172.71 (C=O), 167.66 (C=O), 149.51 (C3), 83.84 (C2), 46.01 (C9), 23.44 (C6), 21.87 (C8), 11.38 (C7); IR (薄膜, cm⁻¹) 3317 (m), 2944 (w), 1698 (s), 1651 (s); MS (EI) m/z (相対強度): 168 (M⁺, 70), 139 (100), 111 (40); [C₈H₁₂N₂O₂]⁺について計算した正確な質量はm/z 168.0893を要求、実測値168.0887 (EI); UV (アセトニトリル) $\epsilon_{210} = 15900$, $\epsilon_{240} = 2800$, $\epsilon_{283} = 500$ 及び $\epsilon_{368} = 500$ cm⁻¹M⁻¹d³.

20

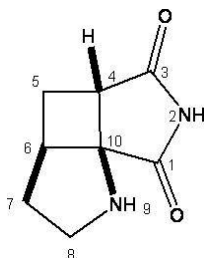
30

【0681】

参考例 120: 2, 9 - アザトリシクロ [5, 3, 0, 0¹⁰-4] デカン - 1, 3 - ジオンの調製

【0682】

【化137】



40

【0683】

ブト - 3 - エニルアミノマレイミド (42 mg, 0.25 mmol) をアセトニトリル (25 mL) 中に溶解して、0.01 M 溶液を提供した。得られた溶液を30分間脱気し、攪拌しながら4分間、パイレックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィーによる精製 (酢酸エチルから酢酸エチル中5%メタノールでの勾配溶出) により、所望の化合物 (39 mg, 0.23 mmol) をオフホワイトの固体として93%の収率で得た。 δ_H (500 MHz, CDCl₃) 3.50 (ddd, 1H, J = 2.6, 4.8及び11.8, HH-8), 3.18-3.12 (m, 2H, HH-8及びH-6), 2.98 (dd, 1H, J = 3.9及び10.7, H-

50

4), 2.21 (ddd, 1H, $J = 4.0, 8.6$ 及び 13.2 , HH-5), 2.01 (ddd, 1H, 5.8, 10.5及び 13.4 , HH-5), 1.79 (m, 2H, H_2 -7); δ_c (125 MHz, $CDCl_3$) 179.04 (C=O), 178.95 (C=O), 70.85 (C10), 48.43 (C8), 44.25 (C4), 43.82 (C6), 32.93 (C7) 24.96 (C5); IR (固体, cm^{-1}) 3198 (m), 2944 (m), 1701 (s); MS (EI) m/z (相対強度): 166 (M^+ , 45), 125 (100); $[C_8H_{10}N_2O_2]^+$ について計算した正確な質量は m/z 166.07387を要求、実測値166.07386 (EI); m.p. 110-113 .

【 0 6 8 4 】

参考例 1 2 1 : (4 S R , 6 R S , 7 S R) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 6 - カルボニトリル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン及び (4 R S , 5 R S , 7 R S) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - カルボニトリル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオンの調製

10

【 0 6 8 5 】

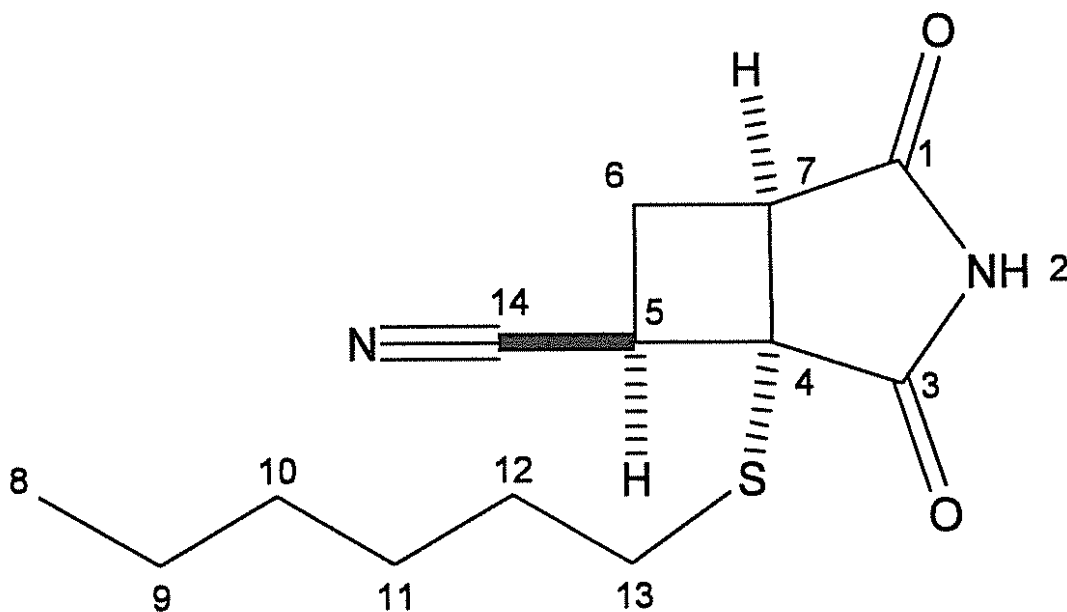
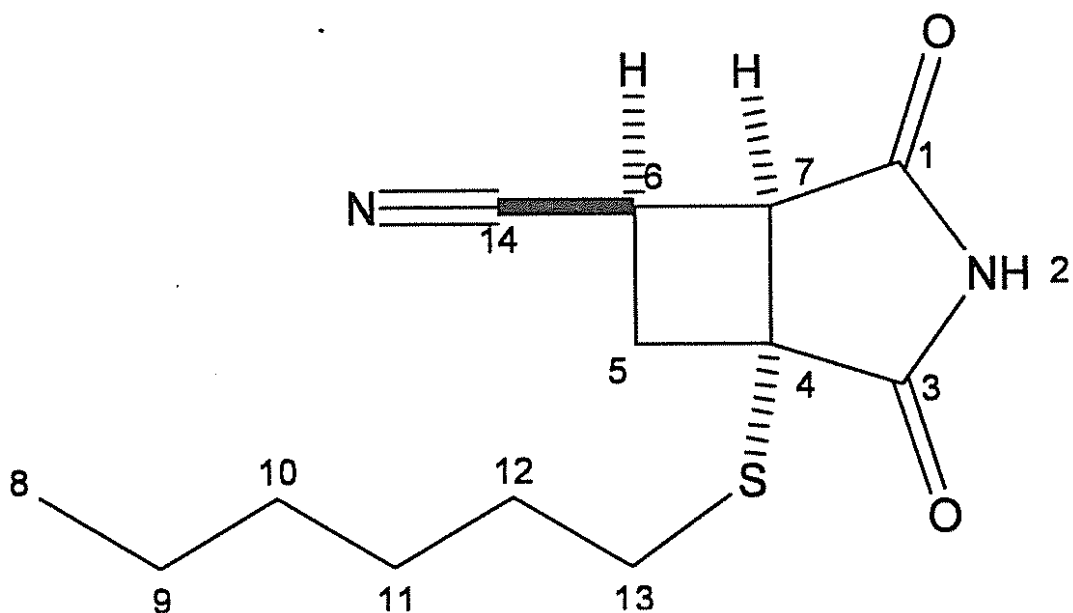
【 化 1 3 8 】

20

30

40

50



【 0 6 8 6 】

ヘキシルスルファニルマレイミド (2 5 m g 、 0 . 1 2 m m o l) を、アセトニトリル (2 2 . 5 m L) 及びアクリロニトリル (2 . 5 m L) 中に溶解して、0 . 0 0 5 M 溶液を提供した。得られた溶液を 3 0 分間脱気し、攪拌しながら 5 分間、パイレックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィーによる精製 (勾配溶出、石油エーテル中 1 0 % の酢酸エチルから石油エーテル中 5 0 % の酢酸エチル) により、(4 S R , 6 R S , 7 S R) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 6 - カルボニトリル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン (9 m g 、 0 . 0 3 4 m m o l) を粘度のある無色油状物として 2 9 % の収率で得、(4 R S , 7 R S , 5 R S) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - カルボニトリル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン (1 2 m g 、 0 . 0 4 5 m m o l) を粘度のある無色油状物として 3 9 % の収率で得た。

10

【 0 6 8 7 】

(4 S R , 6 R S , 7 S R) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 6 - カルボニトリル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン δ_H (500 MHz, $CDCl_3$) 3.53 (d t , 1H, J = 1.4 及び 8.1, H-6), 3.16-3.10 (m , 2H, HH-5 及び H-7), 2.89-2.80 (m , 2H, H₂-13), 2.56-2.50 (m , 1H, HH-5), 1.67-1.55 (m , 4H, H₂-12 及び H₂-11), 1.42-1.37 (m , 2H, H₂-10), 1.33-1.27 (m , 2H, H₂-9), 0.89 (t , 3H, J = 6.9, H₃-8); δ_C (125 MHz, $CDCl_3$) 174.49 (C=O), 172.91 (C=O), 116.82 (C4), 52.38 (C14), 44.16 (C6), 31.33 (C13), 30.87 (C7), 30.29 (CH₂), 29.26 (CH₂), 28.64 (CH₂), 25.92 (CH₂), 22.82 (C 5), 14.11 (C8); IR (油, cm^{-1}) 3223 (w), 2926 (w), 1778 (w), 1714 (s); MS (Cl⁺) m / z (相対強度): 267 ([M + H] , 40), 213 (70), 180 (100); [C₁₃H₁₈N₂O₂S] + H について計算した正確な質量は m / z 267.1167 を要求、実測値 267.1175 (Cl⁺) .

20

【 0 6 8 8 】

(4 R S , 7 R S , 5 R S) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - カルボニトリル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン δ_H (500 MHz, $CDCl_3$) 3.66 (d d , 1H, J = 6.0 及び 9.5, H-5), 3.23 (dd , 1H, J = 5.2 及び 10.9, H-7), 3.01-2.82 (m , 3H, HH-6 及び H₂-13), 2.67 (ddd , 1H, J = 5.3, 9.6 及び 14.7, HH-6), 1.65-1.60 (m , 2H, H₂-12), 1.42-1.36 (m , 2H, H₂-11), 1.32-1.27 (m , 4H, H₂-9 及び H₂-10), 0.88 (t , 3H, J = 6.8, H₃-8); δ_C (125 MHz, $CDCl_3$) 175.08 (C=O), 174.82 (C=O), 117.13 (C4), 51.24 (C14), 44.26 (C5), 31.36 (C13), 30.96 (C7), 29.82 (CH₂), 29.19 (CH₂), 28.62 (CH₂), 25.72 (C6), 22.58 (CH₂), 14.26 (C8); IR (油, cm^{-1}) 3247 (w), 2927 (w), 1717 (s); MS (Cl) m / z (相対強度): 267 ([M + H] , 75), 214 (100), 180 (70); [C₁₃H₁₈N₂O₂S] + H について計算した正確な質量は m / z 267.1167 を要求、実測値 267.1158 (Cl) .

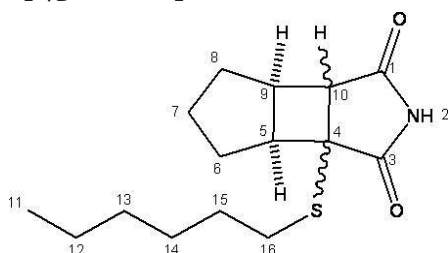
30

【 0 6 8 9 】

参考例 1 1 2 : (5 R S , 9 S R) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 2 - アザ - トリシロ (t r i c y l o) [3 . 5 . 0 ⁵ , ⁹] ジ - 1 , 3 - オン の調製

【 0 6 9 0 】

【 化 1 3 9 】



40

【 0 6 9 1 】

ヘキシルスルファニルマレイミド (2 5 m g 、 0 . 1 2 m m o l) を、アセトニトリル (2 2 . 5 m L) 及びシクロペンテン (3 m L 、 3 6 m m o l) 中に溶解して、0 . 0 0 5 M 溶液を得た。得られた溶液を 3 0 分間脱気し、攪拌しながら 5 分間、パイレックスガ

50

ラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィー（勾配溶出、石油エーテル中 10 % の酢酸エチルから石油エーテル中 50 % の酢酸エチル）による精製により、所望の化合物（12 mg、0.045 mmol）を粘度のある無色油状物（2 つの分離不能なジアステレオマーの 1 : 1 混合物）として 77 % の収率で得た。CO₂Y 分析は、特定のシグナル（下付の「a」及び「b」で示す）が同じ化合物から生じるが、各ジアステレオマーの具体的な正体が未知であることを示している。シグナルの重複が NO_e 分析を妨げている。δ_H (500 MHz, CDCl₃) 3.15-3.07 (m, 2H, H-5_a 及び H-10_a), 3.00 (t, 1H, J = 6.8, H-5_b), 2.94 (td, 1H, J = 3.9 及び 6.6, H-9_b), 2.87-2.82 (m, 2H, H-9_a 及び HH-16_a), 2.64-2.59 (m, 1H, HH-16_b), 2.52-2.47 (m, 3H, H-10_b, HH-16_a 及び HH-16_b), 2.07 (dd, 2H, J = 6.3 及び 6.9, HH-15_a 及び HH-15_b), 1.96-1.89 (m, 2H, HH-15_a 及び HH-15_b) 1.88-1.82 (m, 4H, H₂-7_a 及び H₂-7_b) 1.64-1.50 (m, 8H, H₂-6_a, H₂-6_b, H₂-8_a 及び H₂-8_b), 1.38-1.25 (m, 12H, H₂-12_a, H₂-12_b, H₂-13_a, H₂-13_b, H₂-14_a 及び H₂-14_b), 0.89-0.86 (m, 6H, H₃-11_a 及び H₃-11_b); δ_C (125 MHz, CDCl₃) 179.09 (C=O), 177.12 (C=O), 176.93 (C=O), 171.83 (C=O), 51.31 (C4), 51.33 (C4), 50.68 (C10), 45.32 (C10), 43.26 (C9), 41.70 (C5), 32.38 (CH₂), 30.98 (CH₂), 30.95 (CH₂), 30.78 (CH₂), 28.92 (CH₂), 28.50 (CH₂), 28.30 (CH₂), 28.22 (CH₂), 28.10 (CH₂), 28.13 (CH₂), 25.09 (CH₂), 22.14 (CH₂), 22.11 (CH₂), 13.66 (2 x C11) いくつかの炭素 シグナルは、ジアステレオマーの重複に起因して欠落している; IR (油, cm⁻¹) 3120 (w), 2927 (m), 1711 (s), 1627 (s); MS (ES-) m/z (相対強度): 280 ([M-H], 50), 212 (100); [C₁₅H₂₃NO₂S]-H について計算した正確な質量は m/z 280.1371 を要求、実測値 280.1382 (ES-).

10

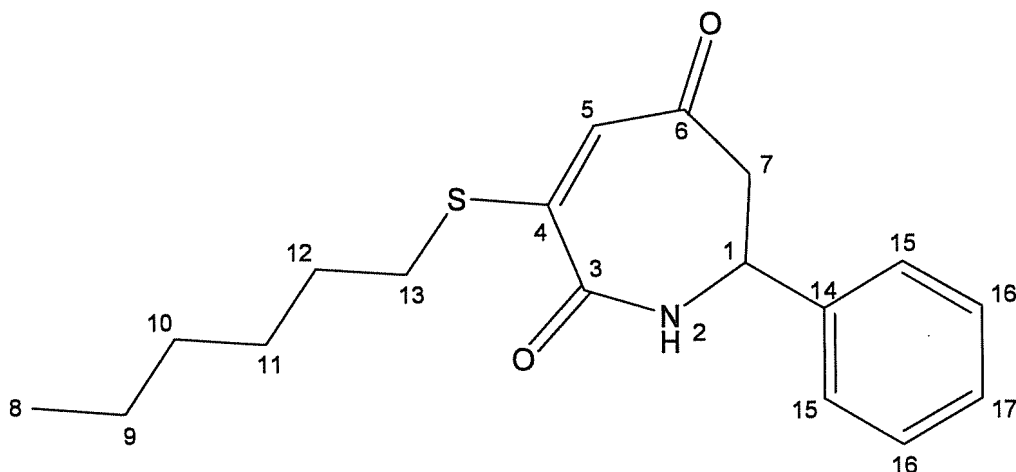
20

【0692】

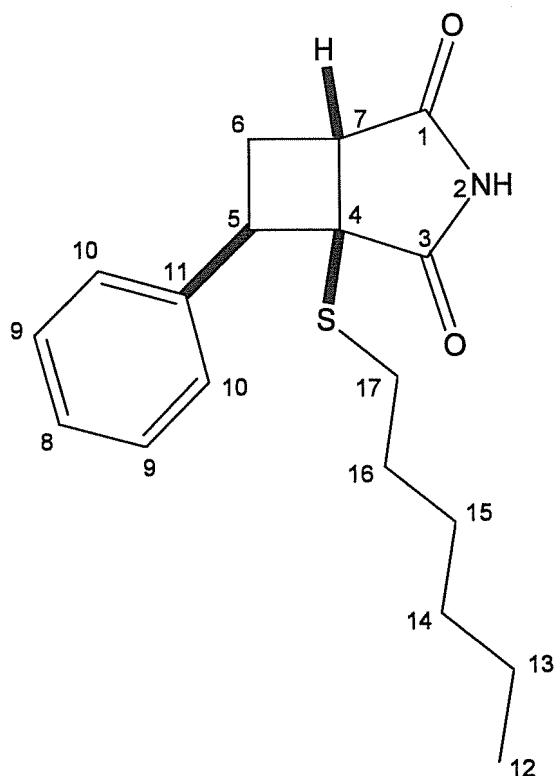
参考例 123 : 4 - ヘキシルスルファニル - 1 - フェニル - 1, 7 - ジヒドロ - 2 H - アゼピン - 3, 6 - ジオン 及び (4RS, 5SR, 7RS) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - ビシクロ [3.2.0] ヘプタン - 1, 3 - ジオンの調製

【0693】

【化 1 4 0】



10



20

30

【 0 6 9 4】

ヘキシルスルファニルマレイミド (25 mg、0.12 mmol) をアセトニトリル (25 mL) 中に溶解して、0.005 M 溶液を提供した。得られた溶液を30分間脱気し、スチレン (133 μ L、1.2 mmol) を添加し、溶液を攪拌しながら5分間、パイ
 レックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィー
 による精製 (石油エーテルから石油エーテル中30%の酢酸エチルでの勾配溶出) により
 、4 - ヘキシルスルファニル - 1 - フェニル - 1, 7 - ジヒドロ - 2 H - アゼピン - 3 ,
 6 - ジオン (11 mg、0.034 mmol) を粘度のある無色油状物として30%の収
 率で得、(4RS, 5SR, 7RS) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニ
 ル - ビシクロ [3.2.0] ヘプタン - 1, 3 - ジオン (26 mg、0.082 mmol)
) を粘度のある無色油状物として70%の収率で得た。

40

【 0 6 9 5】

4 - ヘキシルスルファニル - 1 - フェニル - 1, 7 - ジヒドロ - 2 H - アゼピン - 3 ,
 6 - ジオン

50

δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 7.34-7.24 (m, 5H, 5 x Ar-H), 6.15 (d, 1H, $J = 1.5$, H-5), 4.11 (t, 1H, $J = 7.7$, H-1), 3.01 (ddd, 1H, $J = 1.5$, 7.8及び15.8, HH-7), 2.96 (dd, 1H, $J = 7.8$ 及び15.6, HH-7), 2.36-2.26 (m, 2H, H_2 -13), 1.50-1.41 (m, 2H, H_2 -12), 1.35-1.33 (m, 6H, H_2 -9, H_2 -10及び H_2 -11), 0.85 (t, 3H, $J = 7.0$, H_3 -8); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 170.96 (C=O), 169.95 (C=O), 147.26 (C4), 141.10 (C14), 129.41 (C5), 128.89 (2 x Ar-H), 127.86 (C17), 127.71 (2 x Ar-H), 47.24 (C1), 32.47 (C13), 31.43 (CH_2), 29.19 (CH_2), 28.61 (CH_2), 22.60 (CH_2), 14.10 (C8); IR (油, cm^{-1}) 3288 (w), 2928 (w), 1775 (w), 1717 (s); MS (FAB+) m/z (相対強度): 340 ([M+Na], 20), 329 (35), 207 (20), 176 (100); $[C_{16}H_{23}NO_2S]+Na$ について計算した正確な質量は m/z 340.1347を要求、実測値340.1351 (FAB+).

10

【0696】

(4RS, 5SR, 7RS) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン

δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 8.77 (s, 1H, NH), 7.39-7.31 (m, 5H, 5 x Ar-H), 4.05 (t, 1H, $J = 8.8$, H-5), 3.17 (dd, 1H, $J = 3.4$ 及び10.9, H-7), 3.04 (ddd, 1H, $J = 8.4$, 11.1及び12.7, HH-6), 2.63 (ddd, 1H, $J = 3.6$, 9.0及び12.8, HH-6), 2.43 (ddd, 1H, $J = 6.7$, 7.9及び11.3, HH-17), 2.13 (ddd, 1H, $J = 6.6$, 8.0及び11.3, HH-17), 1.30-1.08 (m, 8H, H_2 -13, H_2 -14及び H_2 -15及び H_2 -16), 0.83 (t, 3H, $J = 7.3$, H_3 -12); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 178.76 (C=O), 177.62 (C=O), 136.51 (C11), 128.77 (2 x Ar-H), 128.70 (2 x Ar-H), 128.03 (C8), 57.17 (C4), 45.70 (C5), 43.87 (C7), 31.26 (C17), 28.70 (CH_2), 28.65 (CH_2), 28.52 (CH_2), 26.22 (C6), 22.46 (CH_2), 14.10 (C12); IR (油, cm^{-1}) 3218 (w), 2926 (w) 1771 (m), 1703 (s); MS (FAB+) m/z (相対強度): 340 ([M+Na], 20), 199 (25), 176 (100); $[C_{16}H_{23}NO_2S]+Na$ について計算した正確な質量は m/z 340.1347を要求、実測値 340.1357 (FAB+).

20

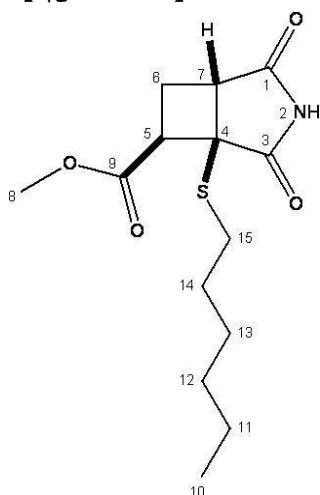
【0697】

参考例 1 2 4 : (4RS, 7SR, 5RS) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - カルボン酸メチルエステル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオンの調製

【0698】

【化141】

30



40

【0699】

ヘキシルスルファニルマレイミド (25 mg、0.12 mmol) をアセトニトリル (21.9 mL) 及びメチルアクリレート (3.1 mL、36 mmol) 中に溶解して、0.005 M 溶液を提供した。得られた溶液を30分間脱気し、攪拌しながら5分間、パイレックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィーによる精製 (石油エーテル中10%の酢酸エチルから石油エーテル中50%の酢酸エチルでの勾配溶出) により、所望の化合物 (17 mg、0.056 mmol) を粘度のある無色油状物として48%の収率で得た。 δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 8.50 (s, 1H, NH), 3.81 (

50

s, 3H, H₃-8), 3.57 (dd, 1H, J = 5.8及び8.5, H-5), 3.18 (dd, 1H, J = 5.0及び10.7, H-7), 3.11 (ddd, 1H, J = 5.5, 11.0及び12.9, HH-6), 2.73 (dt, 1H, J = 7.5及び11.5, HH-15), 2.64 (dt, 1H, J = 7.5及び11.5, HH-15), 2.29 (ddd, 1H, J = 5.2, 8.5及び13.2, HH-6), 1.52-1.47 (m, 2H, H₂-14), 1.35-1.30 (m, 2H, H₂-13), 1.29-1.21 (m, 4H, H₂-11及びH₂-12), 0.87 (t, 3H, J = 6.7, H₃-10); δ_c (150 MHz, CDCl₃) 176.65 (C=O), 171.13 (C=O), 170.48 (C=O), 52.59 (C8), 52.39 (C4), 44.56 (C7), 44.06 (C5), 31.41 (C15), 29.73 (CH₂), 29.16 (CH₂), 28.68 (CH₂), 23.57 (C12), 22.57 (C11), 14.11 (C10); IR (油, cm⁻¹) 3244 (w), 2928 (w) 1778 (w), 1714 (s); MS (FAB+) m/z (相対強度): 322 ([M+Na], 100), 300 (30), 214 (25); [C₁₄H₂₁NO₄SN]+Na について計算した正確な質量はm/z 322.1089を要求、実測値 322.1082 (FAB+).

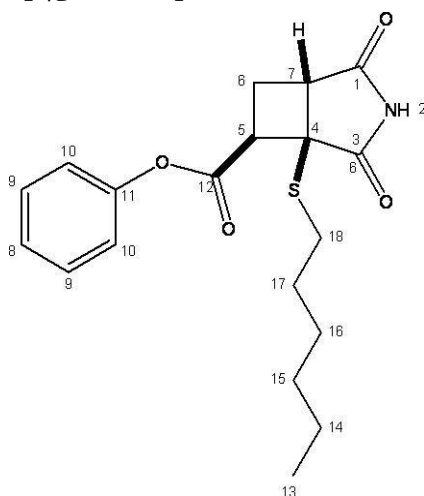
10

【 0 7 0 0 】

参考例 1 2 5 : (4 R S , 5 S R , 7 R S) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - カルボン酸フェニルエステル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオンの調製

【 0 7 0 1 】

【 化 1 4 2 】



20

【 0 7 0 2 】

ヘキシルスルファニルマレイミド (2 5 m g 、 0 . 1 2 m m o l) をアセトニトリル (2 5 m L) 中に溶解して、 0 . 0 0 5 M 溶液を得た。得られた溶液を 3 0 分間脱気し、フェニルアクリレート (1 6 0 μ L 、 1 . 2 0 m m o l) を添加し、攪拌しながら 5 分間、パイレックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィーによる精製 (石油エーテルから石油エーテル中 3 0 % の酢酸エチルでの勾配溶出) により、所望の化合物 (2 1 m g 、 0 . 0 5 8 m m o l) を粘度のある無色油状物として 4 8 % の収率で得、ヘキシルスルファニルマレイミド二量体 (1 2 m g 、 0 . 0 2 8 m m o l) を 4 7 % の収率で得た。 δ_H (600 MHz, CDCl₃) 8.41 (s, 1H, NH), 7.41-7.39 (m, 2H, 2 x Ar-H), 7.27-7.25 (m, 1H, H-8), 7.20 (d, 1H, J = 7.8, 2 x Ar-H), 3.80 (dd, 1H, J = 5.1及び8.5, H-5), 3.29 (dd, 1H, J = 5.1及び10.7, H-7), 3.20 (ddd, 1H, J = 5.5, 10.9及び13.0, HH-6), 2.62 (dt, 1H, J = 7.5及び11.5, HH-18), 2.73 (dt, 1H, J = 7.5及び11.5, HH-18), 2.40 (ddd, 1H, J = 5.6, 8.8及び13.5, HH-6), 1.54-1.48 (m, 2H, H₂-17), 1.33-1.16 (m, 6H, H₂-14, H₂-15及びH₂-16), 0.84 (t, 3H, J = 6.9, H₃-13); δ_c (150 MHz, CDCl₃) 176.35 (C=O), 176.19 (C=O), 168.85 (C=O), 150.66 (C11), 129.64 (2 x Ar-H), 126.34 (C8), 121.54 (2 x Ar-H), 52.59 (C4), 44.78 (C7), 44.17 (C5), 31.36 (CH₂), 29.94 (C18), 29.09 (CH₂), 28.68 (CH₂), 23.83 (C6), 22.56 (CH₂), 14.08 (C13); IR (油, cm⁻¹) 3213 (w), 2927 (w) 1757 (m), 1715 (s); MS (CI+) m/z (相対強度): 362 ([M+H], 35), 268 (100), 149 (25); [C₁₉H₂₃NO₄S]+H について計算した正確な質量はm/z 362.1426を要求、実測値362.1431 (CI+).

30

40

【 0 7 0 3 】

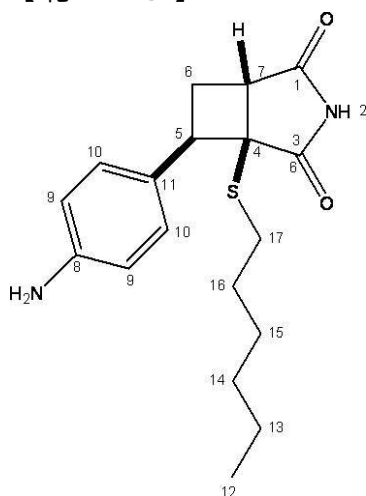
参考例 1 2 6 : (4 R S , 5 S R , 7 R S) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 -

50

(p - アミノ) フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオンの調製

【 0 7 0 4 】

【 化 1 4 3 】



10

【 0 7 0 5 】

ヘキシルスルファニルマレイミド (2 5 m g 、 0 . 1 2 m m o l) をアセトニトリル (2 5 m L) 中に溶解して、 0 . 0 0 5 M 溶液を得た。得られた溶液を 3 0 分間脱気し、 4 - ビニルアニリン (1 3 6 μ L 、 1 . 2 m m o l) を添加し、攪拌しながら 5 分間、パイ
 レックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィー
 による精製 (石油エーテルから石油エーテル中 3 0 % の酢酸エチルでの勾配溶出) により
 、所望の化合物 (7 m g 、 0 . 0 2 1 m m o l) を粘度のある無色油状物として 1 7 % の
 収率で得た。 δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 8.17 (s, 1H, NH), 7.10 (d, 2H, J = 8.5, 2 x Ar-H), 6.67 (d, 2H, J = 8.5, 2 x Ar-H), 3.94 (t, 1H, J = 9.0, H-5), 3.13 (dd, 1H, J = 3.7 及び 11.1, H-7), 2.98 (ddd, 1H, J = 8.8, 11.2 及び 12.9, HH-6), 2.58 (ddd, 1H, J = 3.5, 9.1 及び 12.8, HH-6), 2.42 (dt, 1H, J = 7.5 及び 11.5, HH-17), 2.17 (dt, 1H, J = 7.5 及び 11.5, HH-17), 1.34-1.29 (m, 2H, H₂-16), 1.25-1.11 (m, 6H, H₂-13, H₂-14 及び H₂-15), 0.80 (t, 3H, J = 7.4, H₃-12); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 178.64 (C=O), 177.48 (C=O), 146.28 (C8), 129.81 (2 x Ar-H), 126.20 (C11), 114.81 (2 x Ar-H), 57.97 (C4), 45.48 (C5), 43.79 (C7), 31.35 (CH₂), 29.07 (CH₂), 28.65 (C17), 26.41 (C6), 22.54 (CH₂), 14.12 (C12); IR (油, cm^{-1}) 3214 (w), 2928 (w) 1769 (m), 1715 (s); MS (CI+) m/z (相対強度): 333 ([M+H], 55), 119 (100); [C₁₈H₂₄N₂O₂S]+H について計算した正確な質量は m/z 333.1637 を要求、実測値 333.1642 (CI+).

20

30

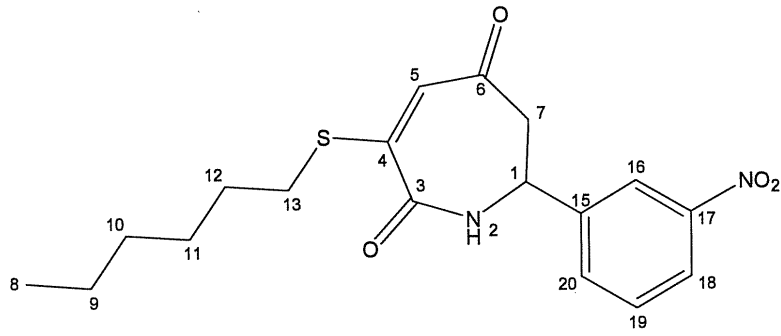
【 0 7 0 6 】

参考例 1 2 7 : 4 - ヘキシルスルファニル - 1 - (m - ニトロ) フェニル - 1 , 7 - ジヒドロ - 2 H - アゼピン - 3 , 6 - ジオン、 (4 R S , 5 S R , 7 R S) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - (m - ニトロ) フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン及び (4 R S , 5 R S , 7 R S) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - (m - ニトロ) フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオンの調製

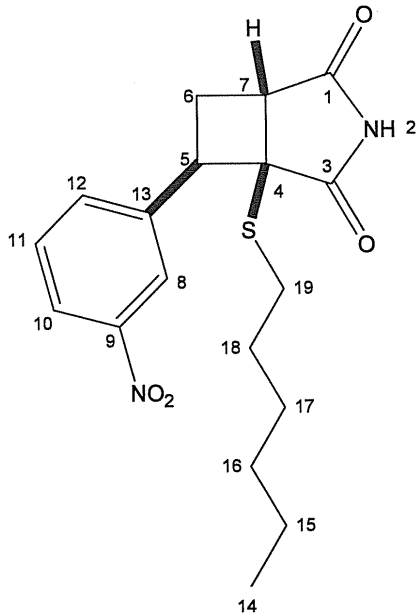
40

【 0 7 0 7 】

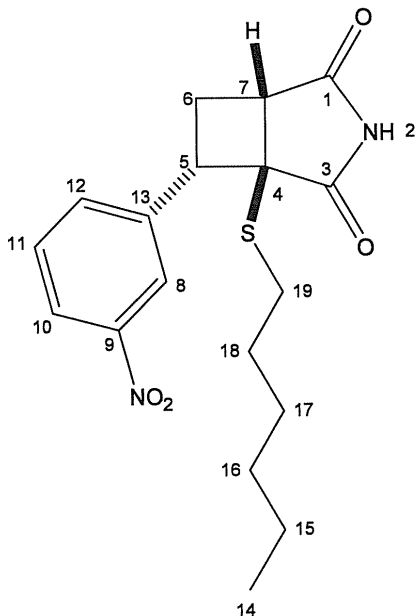
【化 1 4 4】



10



20



30

40

【 0 7 0 8】

ヘキシルスルファニルマレイミド (25 mg、0.12 mmol) をアセトニトリル (25 mL) 中に溶解して、0.005 M 溶液を得た。得られた溶液を30分間脱気し、3-ニトロスチレン (136 μ L、1.2 mmol) を添加し、攪拌しながら5分間、パイレックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィーによる精製 (石油エーテルから石油エーテル中30%の酢酸エチルでの勾配溶出) により

50

、4 - ヘキシルスルファニル - 1 - (m - ニトロ) フェニル - 1 , 7 - ジヒドロ - 2 H - アゼピン - 3 , 6 - ジオン (23 mg、0.063 mmol) を粘度のある無色油状物として55%の収率で得、(4RS , 5SR , 7RS) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - (m - ニトロ) フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン (0.5 mg、0.001 mmol) を粘度のある無色油状物として1%の収率で得 (4 - ヘキシルスルファニル - 1 - (m - ニトロ) フェニル - 1 , 7 - ジヒドロ - 2 H - アゼピン - 3 , 6 - ジオンと同時に)、(4RS , 5RS , 7RS) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - (m - ニトロ) フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン (12 mg、0.33 mmol) を粘度のある無色油状物として21%の収率で得た (二量体と同時に)。

10

【 0709 】

2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 1 - (m - ニトロ) フェニル - 1 , 7 - ジヒドロ - 2 H - アゼピン - 3 , 6 - ジオン

δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 8.22 (s, 1H, H-16), 8.14 (d, 1H, J = 8.5, Ar-H), 7.68 (t, 1H, J = 7.6, Ar-H), 7.53 (t, 1H, J = 7.8, H-19), 7.20 (s, 1H, NH), 6.29 (s, 1H, H-5), 4.25 (t, 1H, J = 7.9, H-1), 3.03 (dd, 1H, J = 8.4及び15.4, HH-7), 2.98 (dd, 1H, J = 7.4及び15.2, HH-7), 2.37-2.26 (m, 2H, H₂-13), 1.30-1.24 (m, 2H, H₂-12), 1.21-1.08 (m, 6H, 3 x CH₂), 0.81 (t, 3H, J = 7.1, H₃-8); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 170.70 (C=O), 169.54 (C=O), 148.60 (C16), 146.35 (C4), 143.94 (C14), 133.83 (Ar-H), 129.96 (Ar-H), 129.86 (C5), 122.96 (Ar-H), 122.59 (Ar-H), 46.78 (C1), 32.52 (C7), 31.56 (CH₂), 31.37 (C13), 29.03 (CH₂), 28.52 (CH₂), 22.57 (CH₂), 14.11 (C8); IR (油, cm^{-1}) 3282 (w), 2928 (m) 1775 (w), 1717 (s); 質量イオンは見出されず。

20

【 0710 】

(4RS , 5SR , 7RS) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - (m - ニトロ) フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオンのシグナルは太字である。

【 0711 】

【化 1 4 5】

δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 8.59 (s, 0.2H, NH), 8.22-8.16 (m, 0.4H, 2 x Ar-H), **8.15 (d, 1H, J = 8.4, H-10)**, **8.07 (s, 1H, H-8)**, **7.84 (s, 1H, NH)**, 7.66 (d, 0.2H, J = 7.5, Ar-H), **7.62 (d, 1H, J = 7.6, H-12)**, 7.56 (t, 0.2H, J = 8.0, H-11), **7.53 (t, 1H, J = 8.0, H-11)**, 4.14 (t, 0.2H, J = 8.6, H-5), **4.10 (t, 1H, J = 9.4, H-5)**, **3.30 (dd, 1H, J = 6.1 及び 10.4, H-7)**, 3.23 (dd, 0.2H, J = 3.0 及び 11.6, H-7), **3.17 (dt, 1H, J = 10.3 及び 13.3, HH-6)**, 3.05 (ddd, 0.2H, J = 8.5, 11.1 及び 13.1, HH-6), 2.73 (ddd, 0.2H, J = 3.6, 9.0 及び 12.9, HH-6), **2.68-2.56 (m, 3H, HH-6 及び H₂-19)**, 2.45 (ddd, 0.2H, J = 6.7, 8.1 及び 11.4, HH-19), 2.13 (ddd, 0.2H, J = 6.8, 8.0 及び 11.3, HH-19), **1.40-1.35 (m, 2.4H, H₂-18 及び H₂-18)**, **1.31-1.23 (m, 6H, H₂-15, H₂-16 及び H₂-17)**, 1.21-1.08 (m, 1.2H, H₂-15, H₂-16 及び H₂-17), **0.87 (t, 3H, J = 6.9, H₃-14)**, 0.81 (t, 0.6H, J = 7.1, H₃-14); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 176.25 (C=O), 174.16 (C=O), 148.44 (C9), 139.02 (C13), 133.88 (Ar-H), 129.69 (Ar-H), 123.07 (Ar-H), 121.92 (Ar-H), 57.34 (C4), 46.76 (C5), 44.18 (C7), 31.36 (CH₂), 30.21 (CH₂), 29.33 (C19), 28.68 (CH₂), 26.07 (C6), 22.57 (CH₂) 14.11 (C14); IR (油, cm^{-1}) 2934 (w), 1719 (s); MS (CI+) m/z (相対強度): 363 ([M+H], 65), 214 (90), 180 (100); [C₁₈H₂₂N₂O₄S]+H について計算した正確な質量は m/z 363.1379 を要求、実測値 363.1397 (CI+).

10

20

【0 7 1 2】

(4 R S, 5 R S, 7 R S) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - (m - ニトロ) フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1, 3 - ジオン
 δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 8.59 (s, 1H, NH), 8.22-8.16 (m, 2H, 2 x Ar-H), 7.66 (d, 1H, J = 7.5, Ar-H), 7.56 (t, 1H, J = 8.0, H-11), 4.14 (t, 1H, J = 8.6, H-5), 3.23 (dd, 1H, J = 3.0 及び 11.6, H-7), 3.05 (ddd, 1H, J = 8.5, 11.1 及び 13.1, HH-6), 2.73 (ddd, 1H, J = 3.6, 9.0 及び 12.9, HH-6), 2.45 (ddd, 1H, J = 6.7, 8.1 及び 11.4, HH-19), 2.13 (ddd, 1H, J = 6.8, 8.0 及び 11.3, HH-19), 1.30-1.24 (m, 2H, H₂-18), 1.21-1.08 (m, 6H, H₂-15, H₂-16 及び H₂-17), 0.81 (t, 3H, J = 7.1, H₃-14); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 177.94 (C=O), 176.84 (C=O), 148.14 (C9), 138.76 (C13), 135.29 (Ar-H), 129.24 (Ar-H), 123.39 (Ar-H), 123.16 (Ar-H), 56.71 (C4), 45.09 (C5), 43.69 (C7), 31.26 (CH₂), 28.88 (CH₂), 28.84 (C19), 28.51 (C6), 26.33 (CH₂), 22.57 (CH₂), 14.06 (C14); IR (油, cm^{-1}) 3214 (w), 2928 (w) 1773 (m), 1709 (s); MS (CI+) m/z (相対強度): 363 ([M+H], 10), 214 (15), 84 (100); [C₁₈H₂₂N₂O₄S]+H について計算した正確な質量は m/z 363.1379 を要求、実測値 363.1394 (CI+).

30

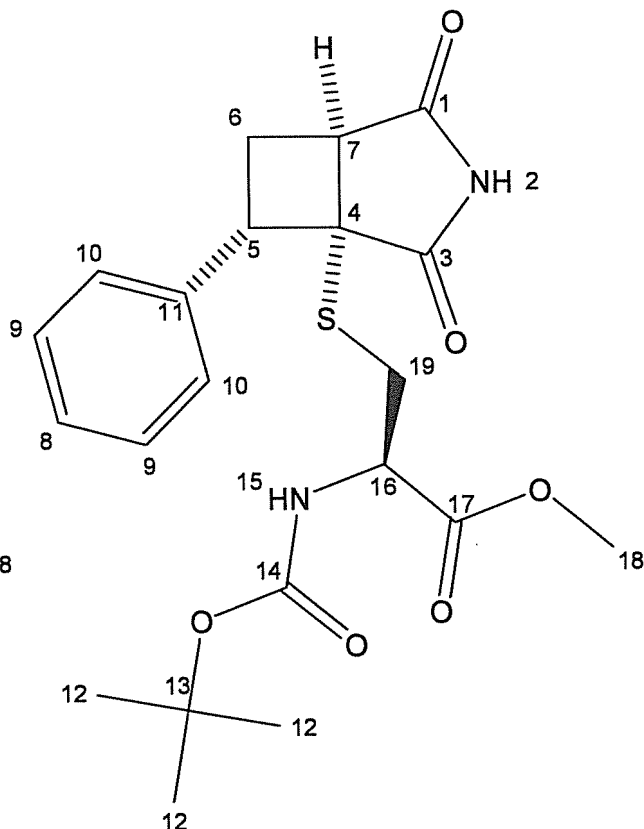
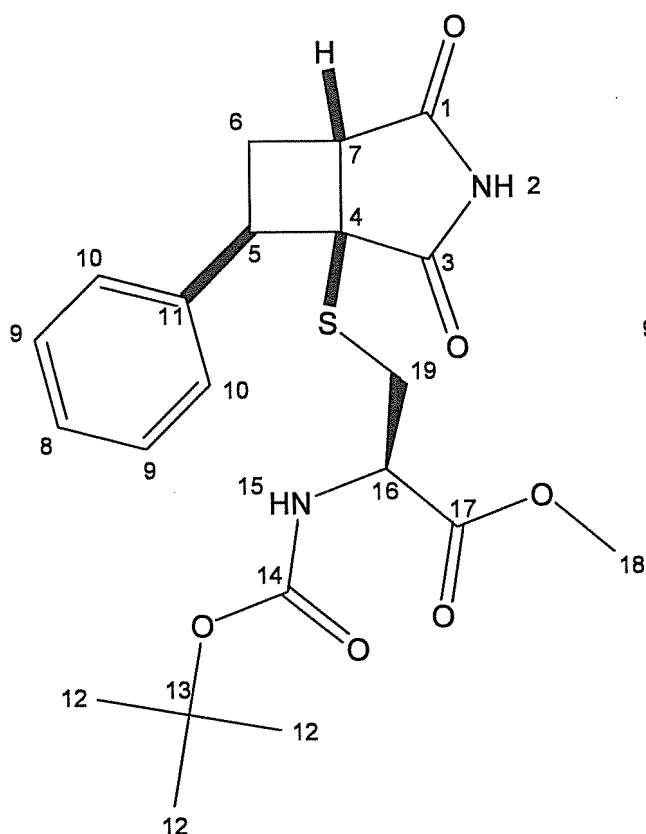
40

【0 7 1 3】

参考例 1 2 8 : (4 R S, 5 S R, 7 R S) 2 - アザ - 4 - (N - B o c - L - C y s - O M e) - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1, 3 - ジオンの調製

【0 7 1 4】

【化 1 4 6】



10

20

【 0 7 1 5】

N - Boc - Cys (Mal) - OMe (50 mg、0.15 mmol) をアセトニトリル (30 mL) 中に溶解して、0.005 M 溶液を得た。得られた溶液を 30 分間脱気し、スチレン (136 μ L、1.2 mmol) を添加し、攪拌しながら 5 分間、パイレックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィーによる精製 (石油エーテルから石油エーテル中 30 % の酢酸エチルでの勾配溶出) により、所望の化合物 (16 mg、0.037 mmol) を、粘度のある無色油状物として 24 % の収率で、2 つの主要なジアステレオマーの混合物として得た (小さいシグナルは、おそらくスチレンの付加に関して位置異性体の、2 つの他のジアステレオマーを示唆する)。粗製物の再分析は、この反応が少なくとも 80 % 達成できたことを示唆する。 δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 8.08 (s, 2H, 2 x H-2), 7.40-7.31 (m, 10H, 10 x Ar-H), 5.0 (d, 1H, J = 8.2, H-15), 4.9 (d, 1H, J = 7.5, H-15), 4.26-4.23 (m, 1H, H-16), 4.18-4.12 (m, 1H, H-16), 4.06 (t, 2H, J = 8.5, 2 x H-5), 3.669 (s, 3H, H₃-18), 3.674 (s, 3H, H₃-18), 3.19 (ddd, 1H, J = 2.4 及び 11.0, H-7), 3.11 (dd, 1H, J = 3.2 及び 11.0, H-7) 3.04-2.93 (m, 3H, 2 x HH-6 及び HH-19), 2.91 (dd, 1H, J = 6.6 及び 12.8, HH-19), 2.64-2.60 (m, 2H, 2 x HH-6), 2.51 (dd, 1H, J = 4.6 及び 12.8, HH-19), 2.43 (dd, 1H, J = 7.3 及び 13.0, HH-19), 1.45 (s, 9H, 3 x H₃-12), 1.43 (s, 9H, 3 x H₃-12); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 178.41 (C=O), 177.25 (C=O), 177.20 (C=O), 171.40 (C=O), 171.10 (C=O), 170.98 (C=O), 155.28 (C=O), 155.18 (C=O), 136.28 (C11), 136.25 (C11), 128.94 (2 x Ar-H), 128.93 (2 x Ar-H), 128.49 (2 x Ar-H), 128.46 (2 x Ar-H), 128.38 (C8), 128.33 (C8), 80.44 (2 x C13), 56.71 (C4), 56.48 (C4), 53.03 (C16), 52.87 (C16), 52.78 (C18), 52.75 (C18), 45.92 (C5), 45.82 (C5), 43.76 (C7), 43.61 (C7), 31.28 (C6), 31.09 (C6), 28.38 (6 x C12), 26.33 (C19), 26.21 (C19); IR (油, cm^{-1}) 3215 (w), 2971 (w) 1738 (s), 1715 (s); MS (CI+) m/z (相対強度): 435 ([M+H], 10), 379 (30), 335 (100); $[C_{21}H_{27}N_2O_6S]+H$ について計算した正確な質量は m/z 435.1590 を要求、実測値 435.1576 (CI+).

30

40

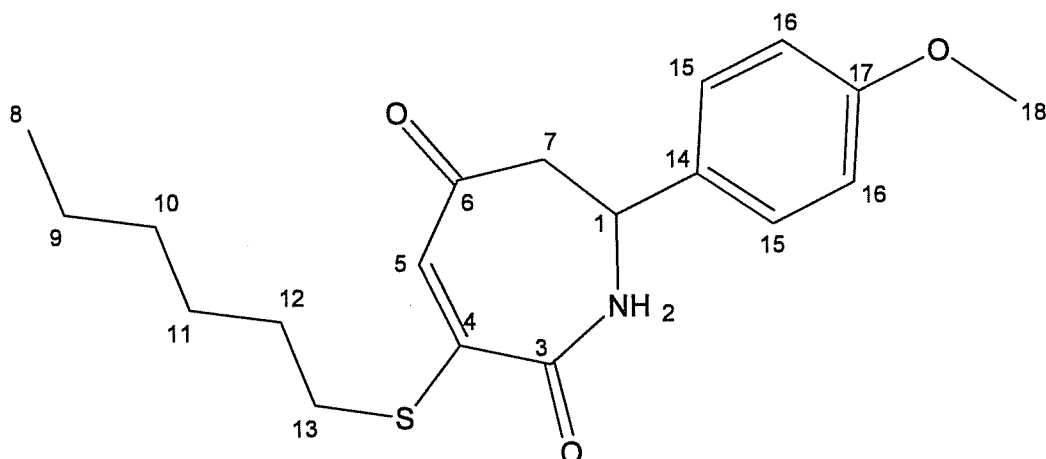
【 0 7 1 6】

50

参考例 129 : 1 - (p - メトキシ) フェニル - 4 - ヘキシルスルファニル - 1 , 7 - ジ
ヒドロ - 2 H - アゼピン - 3 , 6 - ジオン、(4 R S , 5 R S , 7 R S) 2 - アザ - 4 -
ヘキシルスルファニル - 5 - (p - メトキシ) フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタ
ン - 1 , 3 - ジオン及び (4 R S , 5 S R , 7 R S) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニ
ル - 5 - (p - メトキシ) フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン
の調製

【 0 7 1 7 】

【 化 1 4 7 】

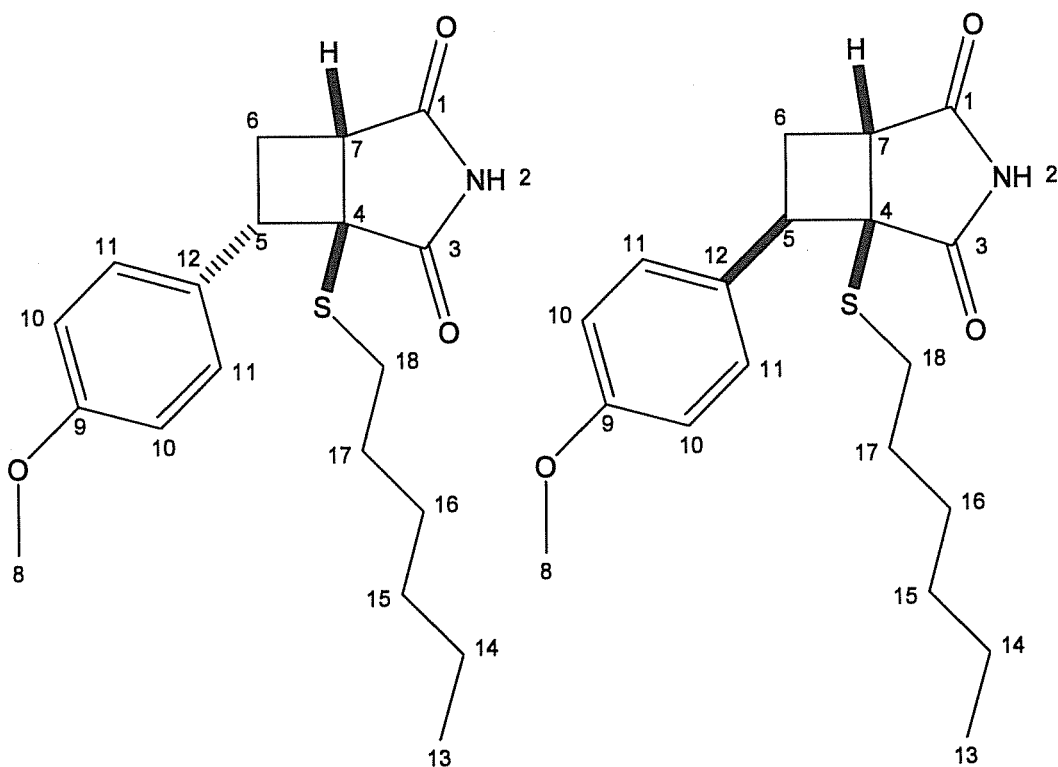


10

20

30

40



【 0 7 1 8 】

ヘキシルスルファニルマレイミド (25 mg、0.12 mmol) をアセトニトリル (25 mL) 中に溶解して、0.005 M 溶液を得た。得られた溶液を 30 分間脱気し、4 - メトキシスチレン (154 μ L、1.20 mmol) を添加し、攪拌しながら 5 分間、パイレックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィーによる精製 (石油エーテルから石油エーテル中 30 % の酢酸エチルでの勾配溶出) により、1 - (p - メトキシ) フェニル - 4 - ヘキシルスルファニル - 1 , 7 - ジヒドロ - 2 H - アゼピン - 3 , 6 - ジオン (10 mg、0.037 mmol) を無色油状物として 25 % の収率で得、(4 R S , 5 R S , 7 R S) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル -

50

5 - (p - メトキシ) フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン (メジャー) 及び (4 R S , 5 S R , 7 R S) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - (p - メトキシ) フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン (マイナー) (27 mg、0.77 mmol) を、無色油状物として 67 % の収率で、ジアステレオマー混合物 (10 : 1) として得た。

【 0 7 1 9 】

4 - ヘキシルスルファニル - 1 - (p - メトキシ) フェニル - 1 , 7 - ジヒドロ - 2 H - アゼピン - 3 , 6 - ジオン δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 7.21 (d, 2H, $J = 8.5$, 2 x Ar-H), 7.18 (s, 1H, NH), 6.84 (d, 2H, $J = 9.0$, 2 x Ar-H), 6.13 (s, 1H, H-5), 4.08 (t, 1H, $J = 7.9$, H-1), 3.80 (s, 3H, H_3 -18), 2.99 (dd, 1H, $J = 7.2$ 及び 15.7, HH-7), 2.91 (dd, 1H, $J = 8.7$ 及び 15.7, HH-7), 2.35-2.26 (m, 2H, H_2 -13), 1.51-1.43 (m, 2H, H_2 -12), 1.33-1.16 (m, 6H, H_2 -9 H_2 -10 及び H_2 -11), 0.85 (t, 3H, $J = 7.0$, H_3 -8); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 171.03 (C=O), 170.05 (C=O), 159.06 (C17), 147.37 (C4), 132.92 (C14), 129.37 (C5), 128.79 (2 x Ar-H), 114.18 (2 x Ar-H), 55.38 (C18), 46.61 (C1), 32.59 (C7), 31.45 (C13), 31.38 (CH_2), 29.22 (CH_2), 28.64 (CH_2), 22.61 (CH_2), 14.14 (C8); IR (油, cm^{-1}) 3275 (w), 2927 (m) 1774 (w), 1717 (s); MS (Cl+) m/z (相対強度): 347 ([M+], 15), 237 (70), 230 (100), 202 (60); $[C_{19}H_{25}NO_3S]^+$ について計算した正確な質量は m/z 347.1550 を要求、実測値 363.1553 (Cl+).

10

【 0 7 2 0 】

(4 R S , 5 R S , 7 R S) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - (p - メトキシ) フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン (太字) 及び (4 R S , 5 S R , 7 R S) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - (p - メトキシ) フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン

20

【 0 7 2 1 】

【 化 1 4 8 】

δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) **8.71 (s, 1H, NH)**, 8.45 (s, 0.1H, NH), **7.24 (d, 2H, $J = 7.86$ 2 x Ar-H)**, 7.15 (d, 0.2H, $J = 8.7$, 2 x Ar-H), **6.90 (d, 1H, $J = 8.6$, 2 x Ar-H)**, 6.86 (d, 0.2H, $J = 8.6$, 2 x Ar-H), **3.99 (t, 1H, $J = 8.8$, H-5)**, 3.94 (dd, 0.1H, $J = 8.4$ 及び 10.1, H-5), **3.81 (s, 3H, H_3 -8)**, 3.77 (s, 0.3H, H_3 -8), 3.20 (dd, 0.1H, $J = 4.5$ 及び 11.9, H-7), **3.13 (dd, 1H, $J = 3.4$ 及び 11.0, H-7)**, 3.09 (dt, 0.1H, $J = 10.6$ 及び 13.2, HH-6), **2.98 (ddd, 1H, $J = 8.7$, 11.2 及び 12.9, HH-6)**, 2.67 (dt, 0.1H, $J = 7.3$ 及び 11.5, HH-18), **2.63-2.53 (m, 1.1H, HH-6 及び HH-18)**, 2.54 (ddd, 1H, $J = 4.5$, 8.4 及び 11.9, HH-6), **2.43 (ddd, 1H, $J = 6.7$, 8.2 及び 11.3, HH-18)**, **2.15 (ddd, 1H, $J = 6.7$, 8.4 及び 11.4, HH-18)**, 1.56-1.52 (m, 0.2H, H_2 -17), 1.39-1.33 (m, 0.2H, CH_2), **1.31-1.09 (m, 8.4H, H_2 -14, H_2 -15, H_2 -16, H_2 -17 及び 2 x CH_2)** 0.87 (t, 0.3H, $J = 7.1$, H_3 -13), **0.83 (t, 3H, $J = 7.1$, H_3 -13)**;

30

40

【 0 7 2 2 】

メジャーなジアステレオマー のシグナルのみが以下を示した : δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 177.81 (C=O), 175.48 (C=O), 159.39 (C9), 129.94 (2 x Ar-H), 128.56 (C12), 113.65 (2 x Ar-H), 57.63 (C4), 55.38 (C8), 45.25 (C5), 43.78 (C7), 31.33 (CH_2), 29.23 (CH_2), 29.01 (CH_2), 28.62 (CH_2), 26.53 (C18), 22.52 (C6), 14.10 (C13); IR (油, cm^{-1}) 3216 (w), 2928 (m) 1771 (m), 1707 (s); MS (Cl+) m/z (相対強度): 348 ([M+H], 20), 135 (20), 134 (100); $[C_{19}H_{25}NO_3S]^+H$ について計算した正確な質量は m/z 348.1633 を要求、実測値 363.1642 (Cl+).

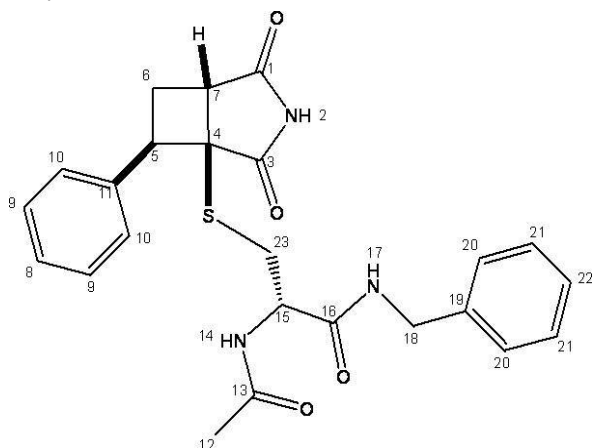
50

【 0 7 2 3 】

参考例 1 3 0 : (4 R S , 5 S R , 7 R S) 2 - アザ - 4 - (N - A c - L - C y s - ベンジルアミン) - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオンの調製

【 0 7 2 4 】

【 化 1 4 9 】



10

【 0 7 2 5 】

N - A c - C y s (M a l) - ベンジルアミン (2 9 m g 、 0 . 0 8 4 m m o l) をアセトニトリル (5 0 m L) 中に溶解して、 0 . 0 0 2 M 溶液を得た。得られた溶液を 3 0 分間脱気し、スチレン (1 0 μ L 、 0 . 0 8 4 m m o l) を添加し、攪拌しながら 5 分間、パイレックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィーによる精製 (石油エーテル中 3 0 % の酢酸エチルから酢酸エチル中 1 0 % のメタノールでの勾配溶出) により、所望の化合物 (3 3 m g 、 0 . 0 7 3 m m o l) を無色油状物として、 [2 + 2] 反応のジアステレオマー混合物として 8 7 % で得た。粗製物の再分析は、この反応がほぼ 7 0 % 達成できたことを示唆する。

20

【 0 7 2 6 】

N - A c - C y s (M a l) - ベンジルアミン (5 8 m g 、 0 . 1 7 m m o l) をアセトニトリル (8 0 m L) 中に溶解して、 0 . 0 0 2 M 溶液を得た。得られた溶液を 3 0 分間脱気し、スチレン (1 9 1 μ L 、 1 . 7 0 m m o l) を添加し、攪拌しながら 5 分間、パイレックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィーによる精製 (石油エーテル中 3 0 % の酢酸エチルから酢酸エチル中 1 0 % のメタノールでの勾配溶出) により、所望の化合物 (1 4 m g 、 0 . 0 3 1 m m o l) を無色油状物として 1 9 % の収率で得た。粗製物の再分析は、この反応が少なくとも 7 5 % 達成できたことを示唆する。

30

δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 8.69 (s, 1H, H-2), 7.36-7.26 (m, 8H, 8 x Ar-H), 7.18 (d, 2H, J = 7.0, 2 x Ar-H), 6.65 (t, 1H, J = 5.6, H-17), 6.51 (d, 1H, J = 7.4, H-14), 4.33 (d, 2H, J = 6.0, H₂-18), 4.30 (td, 1H, J = 1.2 及び 5.4, H-15), 4.05 (t, 1H, J = 8.9, H-5), 3.16 (dd, 1H, J = 3.1 及び 11.1, H-7), 3.04 (ddd, 1H, J = 8.9, 11.1 及び 12.8, HH-23), 2.94 (dd, 1H, J = 6.6 及び 13.3, HH-6), 2.59 (ddd, 1H, J = 3.4, 8.9 及び 12.5, HH-23), 2.31 (dd, 1H, J = 5.3 及び 13.6, HH-6), 1.98 (s, 3H, H₃-12); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 179.07 (C=O), 176.97 (C=O), 171.10 (C=O), 169.67 (C=O), 137.67 (Ar), 136.16 (Ar), 129.02 (2 x Ar-H), 128.80 (2 x Ar-H), 128.55 (2 x Ar-H), 128.35 (Ar-H), 128.78 (2 x Ar-H), 127.66 (Ar-H), 57.44 (C4), 52.61 (C15), 46.09 (C5), 43.68 (C7), 43.66 (C18), 30.58 (C6), 26.15 (C23), 23.17 (C12); IR (油, cm^{-1}) 3437 (w), 1726 (s); MS (FAB+) m/z (相対強度): 695 ([M+H], 10), 439 (10), 286 (100); $[C_{32}H_{34}N_6O_8S_2]+H$ について計算した正確な質量は m/z 695.1958 を要求、実測値 695.1964 (FAB+).

40

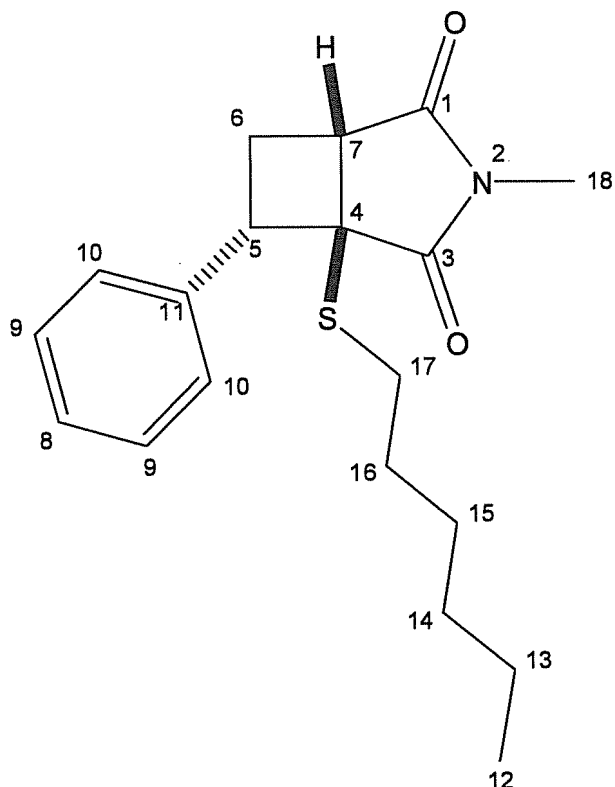
【 0 7 2 7 】

50

参考例 131 : (4 R S , 5 R S , 7 R S) 2 - アザ - 2 - メチル - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン及び (4 R S , 5 S R , 7 R S) 2 - アザ - 2 - メチル - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオンの調製

【 0 7 2 8 】

【 化 1 5 0 】



10

20

30

40

50

【 0 7 2 9 】

N - メチルヘキシルスルファニルマレイミド (2 7 m g 、 0 . 1 1 9 m m o l) をアセトニトリル (2 5 m L) 中に溶解して、 0 . 0 0 5 M 溶液を得た。得られた溶液を 3 0 分間脱気し、スチレン (1 3 6 μ L 、 1 . 1 9 m m o l) を添加し、攪拌しながら 5 分間、パイレックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィーによる精製 (石油エーテルから石油エーテル中 3 0 % の酢酸エチルでの勾配溶出) により、 (4 R S , 5 R S , 7 R S) 2 - アザ - 2 - メチル - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン (5 m g 、 0 . 0 1 5 m m o l) を無色油状物として 1 3 % の収率で得、 (4 R S , 5 S R , 7 R S) 2 - アザ - 2 - メチル - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン (2 3 m g 、 0 . 0 6 9 m m o l) を無色油状物として 5 8 % の収率で得た。

10

【 0 7 3 0 】

(4 R S , 5 R S , 7 R S) 2 - アザ - 2 - メチル - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン

δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 7.32-7.30 (m, 3H, 3 x Ar-H), 7.13 (d, 2H, J = 7.9, 2 x H-10), 3.99 (dd, 1H, J = 7.8 及び 10.2, H-5), 3.20 (dd, 1H, J = 4.8 及び 10.3, H-7), 3.13-3.07 (m, 1H, HH-6), 2.93 (s, 3H, H₃-18), 2.65 (td, 1H, J = 7.5 及び 11.4, HH-17), 2.58 (td, 1H, J = 7.5 及び 11.8, HH-17), 2.46 (ddd, 1H, J = 4.9, 7.7 及び 12.0, HH-6), 1.55-1.25 (m, 8H, H₂-13, H₂-14, H₂-15 及び H₂-16), 0.87 (t, 3H, J = 7.0, H₃-12); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 177.78 (C=O), 175.17 (C=O), 137.21 (C11), 128.71 (2 x Ar-H), 127.93 (C8), 127.24 (2 x Ar-H), 48.23 (C5), 42.71 (C7), 31.42 (CH₂), 30.07 (C17), 29.33 (CH₂), 28.69 (CH₂), 25.71 (CH₂), 25.25 (C18), 22.58 (CH₂), 14.12 (C12); IR (油, cm^{-1}) 2927 (w) 1715 (s); MS (CI+) m/z (相対強度): 332 ([M+H], 40), 228 (40), 86 (70), 84 (100); [C₁₉H₂₅NO₂S]+H について計算した正確な質量は m/z 332.1684 を要求、実測値 333.1697 (CI+).

20

【 0 7 3 1 】

(4 R S , 5 S R , 7 R S) 2 - アザ - 2 - メチル - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン

δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 7.39-7.30 (m, 5H, 5 x Ar-H), 3.90 (t, 1H, J = 8.7, H-5) 3.13-3.11 (m, 4H, H₃-18 及び H-7), 3.00 (ddd, 1H, J = 8.5, 11.0 及び 12.8, HH-6), 2.53 (ddd, 1H, J = 3.7, 9.1 及び 12.8, HH-6), 2.40 (ddd, 1H, J = 6.4, 8.1 及び 11.3, HH-17), 2.06 (ddd, 1H, J = 6.5, 8.3 及び 11.3, HH-17), 1.25-1.08 (m, 8H, H₂-13, H₂-14, H₂-15 及び H₂-16), 0.82 (t, 3H, J = 7.4, H₃-12); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 178.73 (C=O), 177.70 (C=O), 136.77 (C11), 128.89 (2 x Ar-H), 128.27 (2 x Ar-H), 127.99 (C8), 55.69 (C4), 45.62 (C5), 42.61 (C7), 31.29 (CH₂), 28.94 (CH₂), 28.68 (CH₂), 28.55 (C17), 26.26 (C6), 25.70 (C18), 22.58 (CH₂), 14.09 (C12); IR (油, cm^{-1}) 2927 (w) 1703 (s); MS (CI+) m/z (相対強度): 332 ([M+H], 100); [C₁₉H₂₅NO₂S]+H について計算した正確な質量は m/z 332.1684 を要求、実測値 332.1680 (CI+).

30

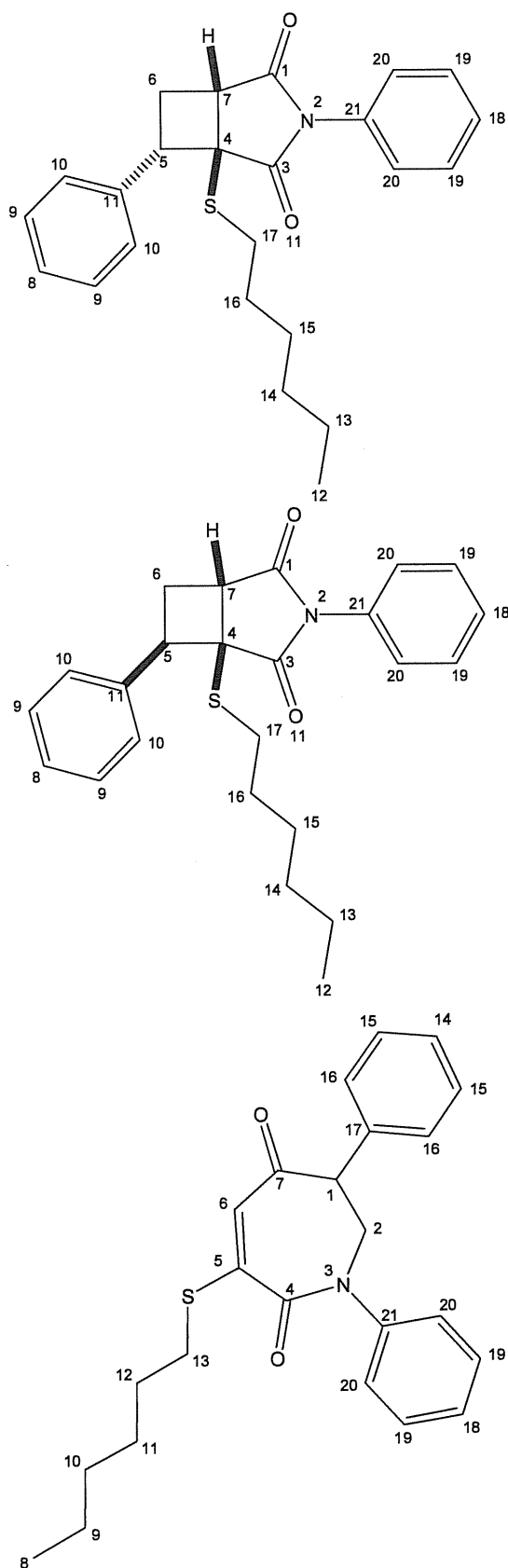
【 0 7 3 2 】

参考例 1 3 2 : (4 R S , 5 R S , 7 R S) 2 - アザ - 2 - フェニル - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン、(4 R S , 5 S R , 7 R S) 2 - アザ - 2 - フェニル - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン及び 1 - フェニル - 3 - フェニル - 4 - ヘキシルスルファニル - 1 , 7 - ジヒドロ - 2 H - アゼピン - 3 , 6 - ジオンの調製

40

【 0 7 3 3 】

【化 1 5 1】



10

20

30

40

【 0 7 3 4】

N - フェニルヘキシルスルファニルマレイミド (34 mg、0.12 mmol) をアセトニトリル (25 mL) 中に溶解して、0.005 M 溶液を得た。得られた溶液を30分間脱気し、スチレン (135 μ L、1.18 mmol) を添加し、攪拌しながら5分間、パイレックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフ

50

イーによる精製（石油エーテルから石油エーテル中 30 % の酢酸エチルでの勾配溶出）により、（4RS, 5RS, 7RS）2 - アザ - 2 - フェニル - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン及び（4RS, 5SR, 7RS）2 - アザ - 2 - フェニル - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン（37mg、0.94mmol）を無色油状物として 80 % の収率で、ジアステレオマー混合物（11 : 2）として得、1 - フェニル - 3 - フェニル - 4 - ヘキシルスルファニル - 1 , 7 - ジヒドロ - 2 H - アゼピン - 3 , 6 - ジオン（0.5mg、0.001mmol）を無色油状物として 1 % の収率で得た。（4RS, 5RS, 7RS）2 - アザ - 2 - フェニル - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン及び（4RS, 5SR, 7RS）2 - アザ - 2 - フェニル - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン

10

【0735】

（4RS, 5RS, 7RS）2 - アザ - 2 - フェニル - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン（太字）

【0736】

【化152】

δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) **7.54-7.52 (m, 11H, 2 x Ar-H)**, 7.46-7.42 (m, 4H, 4 x Ar-H), **7.41-7.37 (m, 46H, 8 x Ar-H 及び 2 x Ar-H)**, 7.27-7.26 (m, 2H, 2 x Ar-H), 7.06-7.05 (m, 2H, 2 x Ar-H), 4.09 (t, 1H, $J = 8.5$, H-5), **4.08 (t, 5.5H, $J = 8.5$, H-5)**, 3.35 (dd, 1H, $J = 4.7$ 及び 10.5, H-7), **3.29 (dd, 5.5H, $J = 4.0$ 及び 10.9, H-7)**, 3.20 (td, 1H, $J = 10.3$ 及び 13.3, HH-6), **3.09 (ddd, 5.5H, $J = 8.2$, 11.0 及び 13.0, HH-6)**, 2.78 (td, 1H, $J = 7.4$ 及び 11.7, HH-17), **2.72-2.68 (m, 6.5H, HH-6 及び HH-6)**, 2.66 (dd, 1H, $J = 4.8$ 及び 7.4, HH-17), **2.52 (ddd, 5.5H, $J = 6.5$, 8.2 及び 11.4, HH-17)**, **2.16 (ddd, 5.5H, $J = 6.6$, 8.4 及び 11.4, HH-17)**, 1.63-1.58 (m, 2H, H₂-16), 1.42-1.37 (m, 2H, H₂-15), **1.36-1.09 (m, 24H, 4 x CH₂ 及び 2 x CH₂)**, 0.88 (t, 3H, $J = 6.7$, H₃-12), **0.83 (t, 16.5H, $J = 7.3$, H₃-12)**; δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) **177.65 (C=O)**, 176.82 (C=O), **176.67 (C=O)**, 174.08 (C=O), 136.96 (C11), **136.82 (C11)**, **132.06 (C21)**, 131.86 (C21), **129.40 (2 x Ar-H)**, 129.22 (Ar-H), **128.96 (2 x Ar-H)**, 128.84 (Ar-H), 128.79 (Ar-H), **128.34 (2 x Ar-H)**, **128.08 (Ar-H)**, 127.51 (Ar-H), **126.56 (2 x Ar-H)**, 126.34 (Ar-H), 55.57 (C4), **55.47 (C4)**, 48.78 (C5), **45.87 (C5)**, 44.88 (C7), **42.79 (C7)**, 31.45 (C17), **31.31 (C17)**, 30.27 (CH₂), 29.46 (CH₂), **29.08 (CH₂)**, 28.75 (CH₂), **28.56 (CH₂)**, **26.95 (CH₂)**, 22.60 (CH₂), **22.52 (CH₂)**, 14.14 (C12), **14.10 (C12)** いくつかの炭素 シグナルは、ジアステレオマーの重複に起因して欠落している;

IR (油, cm^{-1}) 2926 (w) 1709 (s); MS (CI+) m/z (相対強度): 394 ([M+H], 70), 290 (100), 105 (100); [C₂₄H₂₇NO₂S]+H について計算した正確な質量は m/z 394.1841

20

30

40

を要求、実測値 394.1834 (CI+).

【0737】

1 - フェニル - 3 - フェニル - 4 - ヘキシルスルファニル - 1 , 7 - ジヒドロ - 2 H - アゼピン - 3 , 6 - ジオン

50

δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 7.54-7.27 (m, 10H, 10 x Ar-H), 6.32 (s, 1H, H-6), 4.19 (t, 1H, $J = 88.0$, H-1), 3.14-3.03 (m, 2H, H_2 -2), 2.39-2.29 (m, 2H, H_2 -13), 1.61-1.10 (m, 8H, 4 x CH_2), 0.89-0.81 (m, 3H, H_3 -8); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 146.31 (C=O), 141.19 (C=O), 130.19 (Ar), 129.41 (Ar), 129.20 (Ar-H), 128.93 (2 x Ar-H), 128.49 (2 x Ar-H), 127.90 (Ar-H), 127.76 (2 x Ar-H), 126.03 (2 x Ar-H), 47.19 (C1), 32.70 (CH_2), 31.43 (CH_2), 29.83 (CH_2), 29.20 (CH_2), 28.63 (CH_2), 22.61 (CH_2), 14.13 (C8); IR (油, cm^{-1}) 2926 (m) 1715 (s); MS (CI+) m/z (相対強度): 394 ([M+H], 40), 278 (100); $[C_{24}H_{27}NO_2S]+H$ について計算した正確な質量は m/z 394.1841を要求、実測値394.1829 (CI+).

【 0 7 3 8 】

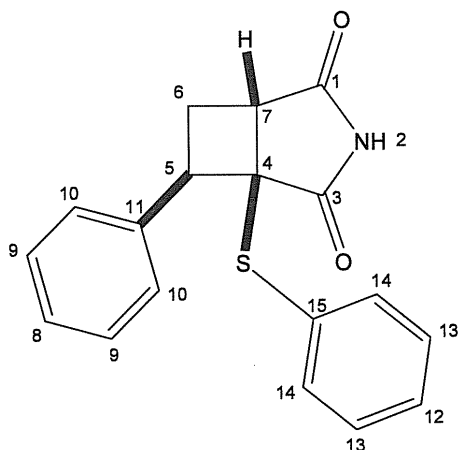
10

参考例 1 3 3 : (4 R S , 5 S R , 7 R S) 2 - アザ - 4 - フェニルチオ - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン及び (4 R S , 5 R S , 7 R S) 2 - アザ - 4 - フェニルチオ - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオンの調製

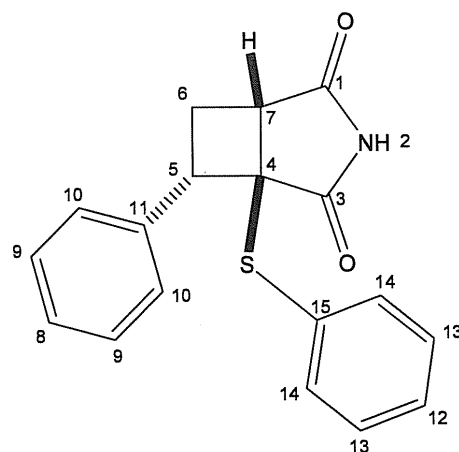
【 0 7 3 9 】

【 化 1 5 3 】

20



30



40

【 0 7 4 0 】

フェニルチオマレイミド (1 7 m g 、 0 . 0 8 2 m m o l) をアセトニトリル (2 5 m L) 中に溶解して、 0 . 0 0 3 M 溶液を得た。得られた溶液を 3 0 分間脱気し、スチレン (1 1 1 μ L 、 0 . 8 2 m m o l) を添加し、攪拌しながら 5 分間、パイレックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィーによる精製 (石油エーテルから石油エーテル中 3 0 % の酢酸エチルでの勾配溶出) により、 (4 R S , 5 S R , 7 R S) 2 - アザ - 4 - フェニルチオ - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン (1 . 5 m g 、 0 . 0 0 5 m m o l) を無色油状物として 6 % の収率で得、 (4 R S , 5 R S , 7 R S) 2 - アザ - 4 - フェニルチオ - 5 - フェニル - ビ

50

シクロ[3.2.0]ヘプタン-1,3-ジオン(17.5mg、0.056mmol)を無色油状物として69%の収率で得た。

【0741】

(4RS, 5SR, 7RS)2-アザ-4-フェニルチオ-5-フェニル-ビスシクロ[3.2.0]ヘプタン-1,3-ジオン

δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 8.05 (s, 1H, NH), 7.42-7.41 (m, 2H, 2 x Ar-H), 7.35-7.17 (m, 8H, 8 x Ar-H), 4.05 (t, 1H, J = 10.1, H-5), 3.29 (dd, 1H, J = 5.5及び13.0, H-7), 3.01 (dt, 1H, J = 10.3及び13.0, HH-6), 2.56 (ddd, 1H, J = 5.6, 10.1及び13.4, HH-6); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 176.69 (C=O), 174.10 (C=O), 136.56 (C11), 136.01 (2 x Ar-H), 130.13 (Ar-H), 129.66 (2 x Ar-H), 129.28 (C15), 128.72 (2 x Ar-H), 128.01 (Ar-H), 127.32 (2 x Ar-H), 60.59 (C4), 46.32 (C5), 43.70 (C7), 25.51 (C6); IR (油, cm^{-1}) 3226 (w), 2925 (w) 1715 (s); MS (CI+) m/z (相対強度): 310 ([M+H], 10), 206 (30), 111 (100); $[C_{18}H_{15}NO_2S]+H$ について計算した正確な質量はm/z 310.0902を要求、実測値310.0901 (CI+).

10

【0742】

(4RS, 5RS, 7RS)2-アザ-4-フェニルチオ-5-フェニル-ビスシクロ[3.2.0]ヘプタン-1,3-ジオン

δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 8.24 (s, 1H, NH), 7.43-7.30 (m, 6H, 8 x Ar-H), 7.27-7.24 (m, 2H, 2 x Ar-H), 4.13 (t, 1H, J = 9.0, H-5), 3.20-3.13 (m, 2H, HH-6及びH-7), 2.55 (ddd, 1H, J = 5.6, 8.3及び13.4, HH-6); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 177.99 (C=O), 177.17 (C=O), 135.80 (C11), 135.80 (2 x Ar-H), 129.64 (Ar-H), 129.54 (2 x Ar-H), 128.95 (C15), 128.51 (2 x Ar-H), 128.45 (2 x Ar-H), 128.22 (Ar-H), 60.72 (C4), 45.80 (C5), 43.39 (C7), 25.20 (C6); IR (油, cm^{-1}) 3211 (w), 1772 (w) 1707 (s); MS (CI+) m/z (相対強度): 310 ([M+H], 50), 206 (100), 104 (40); $[C_{18}H_{15}NO_2S]+H$ について計算した正確な質量はm/z 310.0902を要求、実測値310.0905 (CI+).

20

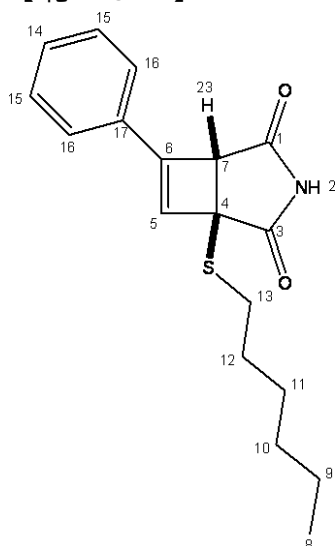
【0743】

参考例134: (4RS, 7RS)2-アザ-4-ヘキシルスルファニル-ビスシクロ[3.2.0]ヘプト-5-エン-1,3-ジオンの調製

【0744】

【化154】

30



40

【0745】

ヘキシルスルファニルマレイミド(25mg、0.12mmol)をアセトニトリル(25mL)中に溶解して、0.005M溶液を得た。得られた溶液を30分間脱気し、フェニルアセチレン(128 μ L、1.16mmol)を添加し、攪拌しながら30分間、パイレックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィーによる精製(石油エーテルから石油エーテル中30%の酢酸エチルでの勾配溶出)に

50

より、所望の化合物 (4 . 5 m g 、 0 . 0 1 4 m m o l) を無色油状物として 1 8 % の収率 (回収された S M に基づく) で得、同時に S M (1 . 5 m g 、 0 . 0 0 7 m m o l) を 6 % の収率で得た。 δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 7.86 (s, 1H, NH), 7.68 (d, 2H, $J = 7.86$, 2 x Ar-H), 7.40-7.34 (m, 3H, 3 x Ar-H), 6.58 (s, 1H, H-5), 3.73 (s, 1H, H-7), 2.57 (dt, 1H, $J = 2.3$ 及び 7.4, H_2 -13), 1.77-1.19 (m, 8H, 4 x CH_2), 0.85 (t, 3H, $J = 7.3$, H_3 -8); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 173.46 (C=O), 173.28 (C=O), 149.72 (C17), 130.25 (C6), 130.02 (C14), 128.85 (2 x Ar-H), 126.32 (2 x Ar-H), 125.76 (C5), 53.78 (C7), 31.33 (CH_2), 29.70 (CH_2), 29.32 (CH_2), 28.61 (CH_2), 22.55 (CH_2), 14.11 (C8); IR (油, cm^{-1}) 3228 (w), 2925 (m), 1770 (w) 1709 (s); MS (CI+) m/z (相対強度) : 316 ([M+H], 100), 214 (30); $[C_{18}H_{22}NO_2S]+H$ について計算した正確な質量は m/z 316.0371 を要求、実測値 316.1365 (CI+).

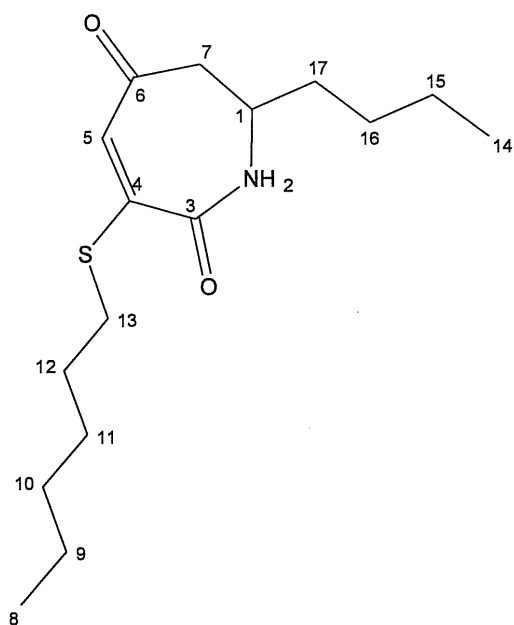
10

【 0 7 4 6 】

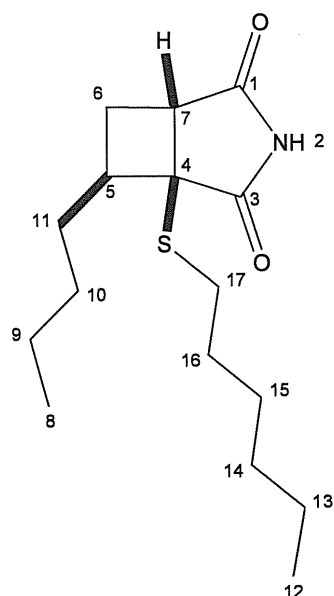
参考例 1 3 5 : 1 - ブチル - 4 - ヘキシルスルファニル - 1 , 7 - ジヒドロ - 2 H - アゼピン - 3 , 6 - ジオン及び (4 R S , 5 S R , 7 R S) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - ブチル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオンの調製

【 0 7 4 7 】

【 化 1 5 5 】



20



40

50

【 0 7 4 8 】

ヘキシルスルファニルマレイミド (2 5 m g 、 0 . 1 1 6 m m o l) をアセトニトリル (2 0 . 7 m L) 及びヘキサ - 1 - エン (4 . 3 m L 、 1 1 . 6 m m o l) 中に溶解して、0 . 0 0 5 M 溶液を得た。得られた溶液を 3 0 分間脱気し、攪拌しながら 5 分間、パイレックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィーによる精製 (石油エーテルから石油エーテル中 3 0 % の酢酸エチルでの勾配溶出) により、1 - ブチル - 4 - ヘキシルスルファニル - 1 , 7 - ジヒドロ - 2 H - アゼピン - 3 , 6 - ジオン (4 m g 、 0 . 0 1 3 m m o l) を無色油状物として 1 2 % の収率で得 ((4 R S , 5 S R , 7 R S) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - ブチル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオンと同時に) 及び (4 R S , 5 S R , 7 R S) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - ブチル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン (1 6 m g 、 0 . 0 5 4 m m o l) を無色油状物として 4 7 % の収率で得た。

10

【 0 7 4 9 】

1 - ブチル - 4 - ヘキシルスルファニル - 1 , 7 - ジヒドロ - 2 H - アゼピン - 3 , 6 - ジオン

δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 7.29 (s, 1H, NH), 6.43 (s, 1H, H-5), 2.91-2.76 (m, 3H, H-1 及び H₂-17), 2.70 (dd, 1H, J = 1.4 及び 5.8, HH-7), 2.64 (dd, 1H, J = 1.4 及び 7.9, HH-7), 2.49 (t, 1H, J = 7.4, H₂-13), 1.81-1.25 (m, 12H, 6 x CH₂), 0.93-0.85 (m, 6H, H₃-8 及び H₃-14); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 174.39 (C=O), 171.40 (C=O), 148.19 (C4), 129.28 (C5), 43.90 (C1), 34.97 (CH₂), 31.53 (CH₂), 30.60 (CH₂), 29.70 (CH₂), 29.07 (CH₂), 28.76 (CH₂), 28.51 (CH₂), 22.66 (CH₂), 22.65 (CH₂), 14.16 (CH₃), 14.13 (CH₃); IR (油, cm^{-1}) 3226 (w), 2927 (m) 1715 (s); MS (CI+) m/z (相対強度): 298 ([M+H], 80), 187 (100); [C₁₆H₂₇NO₂S]+H について計算した正確な質量は m/z 298.1841 を要求、実測値 298.1841 (CI+).

20

【 0 7 5 0 】

(4 R S , 5 S R , 7 R S) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - ブチル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン

δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 8.19 (s, 1H, NH), 3.09 (dd, 1H, J = 4.5 及び 10.2, H-7), 2.70 - 2.64 (m, 1H, H-5), 2.53-2.45 (m, 2H, H₂-17), 2.37-2.28 (m, 2H, H₂-6), 1.80-1.73 (m, 1H, HH-11), 1.59-1.50 (m, 2H, HH-11 及び HH-10), 1.38-1.20 (m, 11H, HH-10 及び 5 x CH₂), 0.90 (t, 3H, J = 7.1, CH₃), 0.87 (t, 3H, J = 7.3, CH₃); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 178.73 (C=O), 177.81 (C=O), 56.10 (C4), 44.29 (C7), 40.99 (C5), 31.42 (C17), 29.24 (CH₂), 28.99 (CH₂), 28.90 (CH₂), 28.74 (CH₂), 28.73 (CH₂), 27.92 (CH₂), 22.59 (CH₂), 22.58 (CH₂), 14.12 (CH₃), 14.09 (CH₃); IR (油, cm^{-1}) 3209 (w), 2927 (m) 1774 (w), 1711 (s); MS (CI+) m/z (相対強度): 298 ([M+H], 100); [C₁₆H₂₇NO₂S]+H について計算した正確な質量は m/z 298.1841 を要求、実測値 298.1845 (CI+).

30

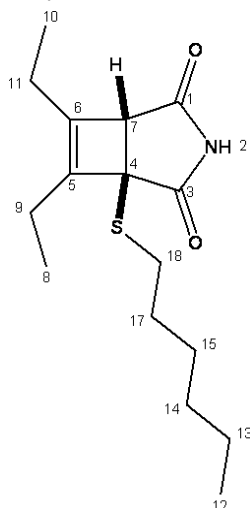
【 0 7 5 1 】

参考例 1 3 6 : (4 R S , 7 R S) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - エチル - 6 - エチル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプト - 5 - エン - 1 , 3 - ジオンの調製

【 0 7 5 2 】

40

【化 1 5 6】



10

【 0 7 5 3】

ヘキシルスルファニルマレイミド (25 mg、0.116 mmol) をアセトニトリル (21.1 mL) 及びヘキシ-3-イン (3.9 mL、11.6 mmol) 中に溶解して、0.005 M 溶液を得た。得られた溶液を30分間脱気し、攪拌しながら5分間、パイレックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィーによる精製 (石油エーテルから石油エーテル中30%の酢酸エチルでの勾配溶出) により、所望の化合物 (17 mg、0.057 mmol) を無色油状物として49%の収率で得た。 δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 8.26 (s, 1H, NH), 3.88 (s, 1H, H-7), 2.99 (ddd, 1H, J = 7.5, 9.1及び12.8, HH-18), 2.87 (ddd, 1H, J = 5.1, 8.7及び12.9, HH-18), 2.39-2.20 (m, 2H, HH-9及びHH-11), 1.95-1.75 (m, 2H, HH-9及びHH-11), 1.56-1.10 (m, 8H, 4 x CH_2), 0.90-0.86 (m, 9H, H_3 -8, H_3 -10及び H_3 -12); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 172.66 (C=O), 171.34 (C=O), 148.84 (C=C), 142.53 (C=C), 70.45 (C4), 48.86 (C18), 48.09 (C7), 31.45 (CH_2), 28.51 (CH_2), 23.53 (CH_2), 22.50 (CH_2), 21.89 (CH_2), 21.62 (CH_2) 14.09 (C12), 12.03 (CH_3), 11.84 (CH_3); IR (油, cm^{-1}) 2931 (m) 1717 (s); MS (CI+) m/z (相対強度): 312 ([M+OH], 100), 178 (100); $[C_{16}H_{25}NO_2S]+OH$ について計算した正確な質量はm/z 312.1633を要求、実測値312.1648 (CI+).

20

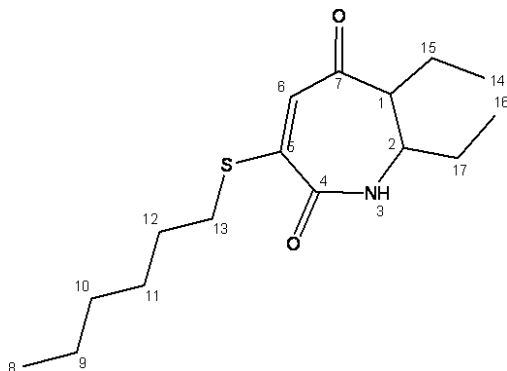
30

【 0 7 5 4】

参考例 1 3 7 : 1 - エチル - 2 - エチル - 6 - ヘキシルスルファニル - 1, 2 - ジヒドロ - 3 H - アゼピン - 4, 7 - ジオンの調製

【 0 7 5 5】

【化 1 5 7】



40

【 0 7 5 6】

ヘキシルスルファニルマレイミド (25 mg、0.116 mmol) をアセトニトリル (21.1 mL) 及び trans - ヘキサ - 3 - エン (3.9 mL、11.6 mmol) 中に溶解して、0.005 M 溶液を得た。得られた溶液を30分間脱気し、攪拌しながら5分間、パイレックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマ

50

トグラフィーによる精製（石油エーテルから石油エーテル中 30 % の酢酸エチルでの勾配溶出）により、所望の化合物（2 mg、0.007 mmol）を無色油状物として 6 % の収率で得た。 δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 7.32 (s, 1H, NH), 6.49 (s, 1H, H-6), 2.92 (ddd, 1H, J = 4.6, 6.3 及び 10.8, H-1), 2.83 (ddd, 1H, J = 5.2, 9.4 及び 12.8, HH-13), 2.75 (dd, 1H, J = 5.9 及び 10.9, H-2), 2.62 (ddd, 1H, J = 6.7, 9.6 及び 12.7 HH-13), 2.07-2.00 (m, 1H, HH-17), 1.89-1.83 (m, 1H, HH-15), 1.79-1.40 (m, 6H, HH-15, HH-17 及び 2 x CH_2), 1.33-1.30 (m, 4H, 2 x CH_2), 1.10 (t, 3H, J = 7.5, H_3 -16), 0.92 (t, 3H, J = 7.4, CH_3), 0.89 (t, 3H, J = 7.0, CH_3); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 171.00 (C=O), 169.53 (C=O), 149.76 (C5), 129.27 (C6), 62.54 (C2), 51.16 (C13), 40.42 (C1), 31.48 (CH_2), 28.65 (CH_2), 23.65 (CH_2), 23.32 (CH_2), 22.52 (CH_2), 17.23 (C17) 14.11 (CH_3), 13.96 (CH_3), 12.33 (CH_3); IR (油, cm^{-1}) 2962 (m) 1717 (s); MS (CI+) m/z (相対強度): 314 ([M+OH], 75), 180 (100); $[C_{16}H_{26}NO_2S]+OH$ について計算した正確な質量は m/z 314.1790 を要求、実測値 314.1799 (CI+).

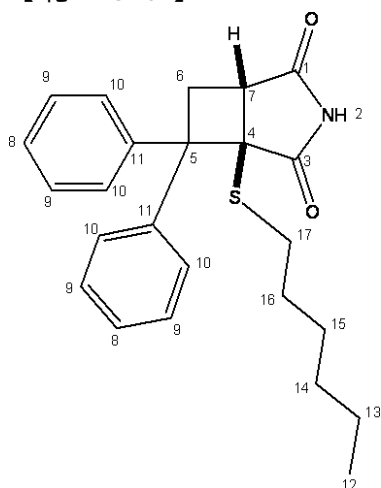
10

【0757】

参考例 138: (4RS, 7RS) 2-アザ-4-ヘキシルスルファニル-5, 5-ジフェニル-ピシクロ[3.2.0]ヘプタン-1, 3-ジオンの調製

【0758】

【化158】



20

30

【0759】

ヘキシルスルファニルマレイミド（25 mg、0.116 mmol）をアセトニトリル（21 mL）及び 1, 1-ジフェニルエチレン（203 μ L、1.16 mmol）中に溶解して、0.005 M 溶液を得た。得られた溶液を 30 分間脱気し、攪拌しながら 5 分間、パイレックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィーによる精製（石油エーテルから石油エーテル中 30 % の酢酸エチルでの勾配溶出）により、所望の化合物（30 mg、0.075 mmol）を無色油状物として 64 % の収率で得た。 δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 8.15 (s, 1H, NH), 7.42 (m, 2H, 2 x H-8), 7.36-7.21 (m, 8H, 8 x Ar-H), 3.54 (dd, 1H, J = 10.3 及び 12.9, HH-6), 3.34 (dd, 1H, J = 5.7 及び 10.3, H-7), 3.18 (dd, 1H, J = 5.8 及び 12.9, HH-6), 2.43 (dt, 1H, J = 7.3 及び 11.0, HH-17), 2.34 (dt, 1H, J = 7.4 及び 11.0, HH-17), 1.40-1.34 (m, 2H, H_2 -16), 1.26-1.20 (m, 4H, H_2 -14 及び H_2 -15), 1.18-1.13 (m, 2H, H_2 -13), 0.84 (t, 3H, J = 7.5, H_3 -12); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 177.16 (C=O), 175.87 (C=O), 142.09 (2 x Ar), 141.80 (2 x Ar), 128.17 (2 x Ar-H), 128.13 (2 x Ar-H), 128.10 (2 x Ar-H), 128.06 (2 x Ar-H), 127.44 (Ar-H), 127.32 (Ar-H), 63.03 (C5), 57.20 (C4), 44.38 (C7), 35.17 (C6), 31.35 (CH_2), 30.07 (C17), 28.77 (CH_2), 28.71 (CH_2), 22.53 (CH_2), 14.11 (C12); IR (油, cm^{-1}) 2927 (m) 1772 (w), 1709 (s); MS (ES-) m/z (相対強度): 392 ([M], 10), 212 (100); $[C_{24}H_{26}NO_2S]$ について計算した正確な質量は m/z 392.1684 を要求、実測値 392.1674 (ES-)

40

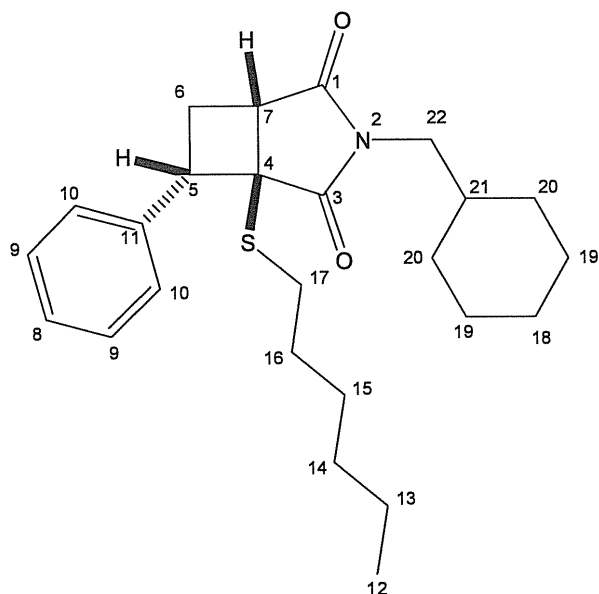
50

【 0 7 6 0 】

参考例 1 3 9 : (4 R S , 5 R S , 7 R S) 2 - アザ - 2 - メチレンシクロヘキサン - 4 -
 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジ
 オン及び (4 R S , 5 S R , 7 R S) 2 - アザ - 2 - メチレンシクロヘキサン - 4 - ヘキ
 シルスルファニル - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオンの
 調製

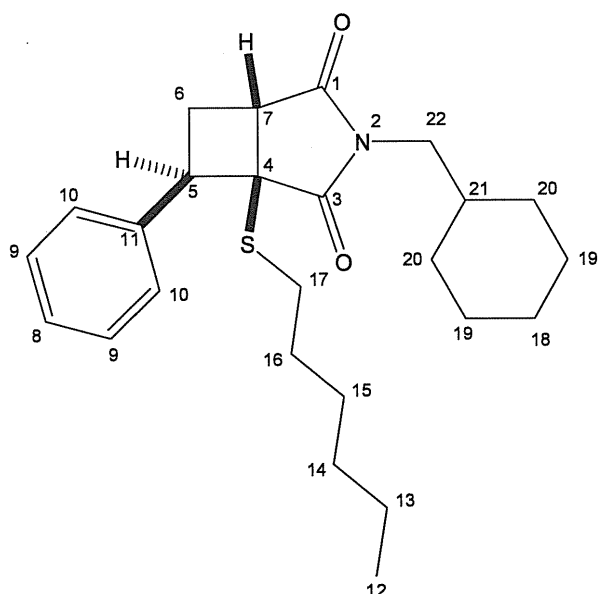
【 0 7 6 1 】

【 化 1 5 9 】



10

20



30

40

【 0 7 6 2 】

N - メチレンヘキシルスルファニルマレイミド (2 5 m g 、 0 . 1 1 6 m m o l) をア
 セトニトリル (2 1 m L) 及び 1 , 1 - ジフェニルエチレン (2 0 3 μ L 、 1 . 1 6 m m
 o l) 中に溶解して、 0 . 0 0 5 M 溶液を得た。得られた溶液を 3 0 分間脱気し、攪拌し
 ながら 5 分間、パイレックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュ
 クロマトグラフィーによる精製 (石油エーテルから石油エーテル中 3 0 % の酢酸エチルで
 の勾配溶出) により、 (4 R S , 5 R S , 7 R S) 2 - アザ - 2 - メチレンシクロヘキサ
 ン - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 ,
 3 - ジオン及び (4 R S , 5 S R , 7 R S) 2 - アザ - 2 - メチレンシクロヘキサン - 4

50

- ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン (3 0 m g 、 0 . 0 7 5 m m o l) を無色油状物として、ジアステレオマー混合物 (1 0 : 1) として 6 4 % の収率で得た。

【 0 7 6 3 】

(4 R S , 5 R S , 7 R S) 2 - アザ - 2 - メチレンシクロヘキサン - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン (太字)

【 0 7 6 4 】

【 化 1 6 0 】

δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) **7.39-7.29 (m, 5.2H, 5 x Ar-H** 及び 0.2 x Ar-H), **7.24 (d, 0.1H,**

10

J = 7.4, H-8), 7.16 (d, 2H, J = 7.4, 0.2 x H-10), 4.00 (dd, 0.1H, J = 8.2 及び 9.9, H-5),

3.89 (t, 1H, J = 8.7, H-5), 3.46 (d, 2.2H, J = 7.5, H₂-22 及び H₂-22), 3.19 (dd, 0.1H,

J = 5.1 及び 10.5, H-7), 3.12 (dd, 1H, J = 3.5 及び 10.9, H-7), 3.07 (td, 0.1H, J =

10.5 及び 13.1, HH-6), 3.00 (ddd, 1H, J = 8.5, 11.5 及び 12.6, HH-6), 2.64 (ddd,

0.1H, J = 6.9, 11.4 及び 14.8, HH-17), 2.56 (td, 0.1H, J = 6.9 及び 11.6, HH-6), 2.53

(ddd, 1H, J = 3.3, 9.1 及び 12.9, HH-6), 2.48 (ddd, 0.1H, J = 5.4, 8.0 及び 13.2, HH-

20

17), 2.39 (td, 1H, J = 7.4 及び 11.4, HH-17), 2.08 (td, 1H, J = 7.7 及び 11.4, HH-

17), 1.83-0.99 (m, 2H, 20.9H), 0.87 (t, 3H, J = 7.0, H₃-12), 0.82 (t, 3H, J = 7.5, H₃-

12); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 179.12 (C=O), 178.35 (C=O), 178.15 (C=O), 175.41

(C=O), 137.23 (C11), 137.12 (C11), 129.08 (2 x Ar-H), 128.76 (2 x Ar-H), 128.47 (2

x Ar-H), 128.16 (C8), 127.99 (C8), 127.51 (2 x Ar-H), 55.84 (C4), 55.69 (C4), 48.06

(C5), 45.97 (C5), 45.63 (C22), 45.48 (C22), 42.94 (C7), 42.83 (C7), 36.67 (C21),

36.58 (C21), 31.64 (CH₂), 31.49 (CH₂), 31.08 (CH₂), 31.01 (CH₂), 30.96 (CH₂),

30

30.34 (CH₂), 30.04 (CH₂), 29.67 (CH₂), 29.28 (CH₂), 28.98 (CH₂), 28.82 (CH₂),

26.76 (CH₂), 26.63 (CH₂), 26.52 (CH₂), 26.45 (CH₂), 25.96 (CH₂), 25.94 (CH₂),

25.82 (CH₂), 14.34 (C12), 14.31 (C12) いくつかの炭素シグナルは、ジアステレ

オマーの重複に起因して欠落している; IR (油, cm^{-1}) 2925 (m) 1703 (s); MS

(CI+) m/z (相対強度): 414 ([M+H], 100), 309 (20); [C₂₅H₃₅NO₂S]+H について計算

した正確な質量は m/z 414.2461 を要求、実測値 414.2452 (CI+)

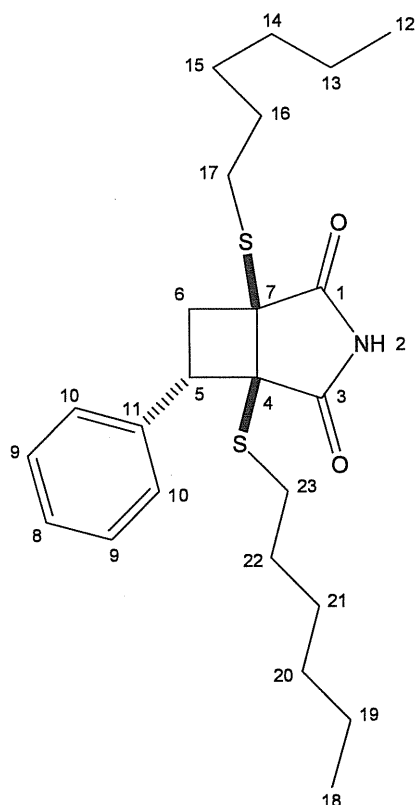
【 0 7 6 5 】

参考例 1 4 0 : (4 R S , 5 S R , 7 S R) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - 7 - ヘキシルスルファニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン及び (4 R S , 5 R S , 7 S R) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - 7 - ヘキシルスルファニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオンの調製

40

【 0 7 6 6 】

【化 1 6 1】



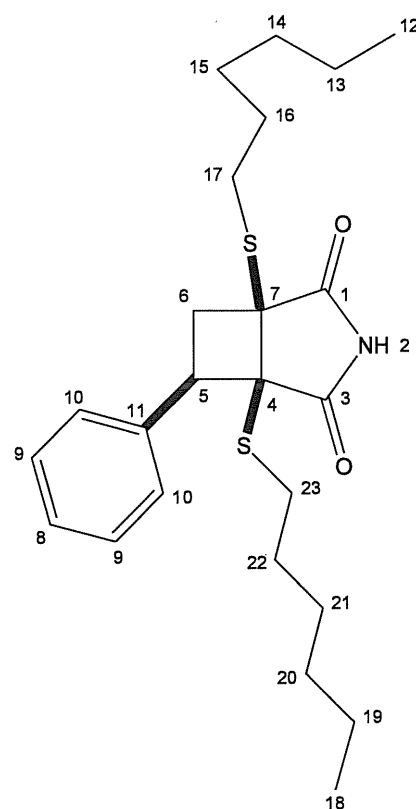
10

20

30

40

50



【 0 7 6 7】

2,3-ジヘキシルスルファニルマレイミド(38mg、0.115mmol)をアセトニトリル(25mL)中に溶解して、0.005M溶液を得た。得られた溶液を30分間脱気し、スチレン(133μL、1.2mmol)を添加し、攪拌しながら20分間、パイレックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィーによる精製(石油エーテルから石油エーテル中30%の酢酸エチルでの勾配溶出)に

より、(4RS, 5SR, 7SR) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - 7 - ヘキシルスルファニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン (3 mg、0 . 007 mmol) を無色油状物として6%の収率で得、(4RS, 5RS, 7SR) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - 7 - ヘキシルスルファニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン (3 mg、0 . 007 mmol) を無色油状物として6%の収率で得た。

【 0 7 6 8 】

(4RS, 5SR, 7SR) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - 7 - ヘキシルスルファニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン

δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 7.96 (s, 1H, NH), 7.33 (d, 2H, $J = 7.0$, 2 x Ar-H), 7.28 (t, 1H, $J = 7.0$, H-8), 7.21 (d, 2H, $J = 7.5$, 2 x Ar-H), 4.02 (t, 1H, $J = 10.0$, H-5), 2.98-2.92 (m, 2H, HH-6及び-S-CHH-), 2.87 (dd, 1H, $J = 10.8$ 及び13.6, HH-6), 2.83-2.72 (m, 2H, -S-CHH-及び-S-CHH-), 2.69 (dt, 1H, $J = 7.4$ 及び10.8, -S-CHH-) 1.68-1.57 (m, 4H, H_2 -16及び H_2 -22), 1.45-1.31 (m, 4H, H_2 -15及び H_2 -21), 1.31-1.25 (m, 8H, H_2 -13, H_2 -14, H_2 -19及び H_2 -20), 0.86 (t, 6H, $J = 7.0$, H_3 -12及び H_3 -18); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 176.91 (C=O), 172.96 (C=O), 136.09 (C11), 128.83 (2 x Ar-H), 128.13 (C8), 127.41 (2 x Ar-H), 62.86 (C4), 54.36 (C7), 46.49 (C5), 33.28 (C6), 31.51 (CH₂), 31.47 (CH₂), 30.65 (SCH₂), 30.09 (SCH₂), 29.22 (CH₂), 28.96 (CH₂), 28.80 (CH₂), 28.74 (CH₂), 22.63 (CH₂), 22.60 (CH₂), 14.17 (CH₃), 14.15 (CH₃); IR (油, cm^{-1}) 3194 (w), 2928 (m) 1774 (w), 1722 (s); MS (CI+) m/z (相対強度): 432 ([M-H], 5), 332 (50), 316 (95), 207 (100); $[C_{24}H_{35}NO_2S_2]$ -Hについて計算した正確な質量は m/z 432.2026を要求、実測値432.2029 (CI+).

10

20

【 0 7 6 9 】

(4RS, 5RS, 7SR) 2 - アザ - 4 - ヘキシルスルファニル - 5 - フェニル - 7 - ヘキシルスルファニル - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン

δ_H (600 MHz, $CDCl_3$) 8.10 (s, 1H, NH), 7.41 (d, 2H, $J = 6.9$, 2 x Ar-H), 7.37 (t, 1H, $J = 6.9$, H-8), 7.33 (d, 2H, $J = 6.9$, 2 x Ar-H), 3.92 (t, 1H, $J = 8.9$, H-5), 2.95 (dd, 1H, $J = 8.9$ 及び12.9, HH-6), 2.86 (dt, 1H, $J = 6.9$ 及び14.2, -S-CHH-), 2.78-2.66 (m, 2H, HH-6及び-S-CHH-), 2.60 (ddd, 1H, $J = 6.3$, 8.3及び10.9, -S-CHH-) 2.00 (ddd, 1H, $J = 5.6$, 8.6及び10.7, -S-CHH-), 1.65-1.60 (m, 2H, HH-16及びHH-22), 1.43-1.06 (m, 14H, HH-16, HH-22, H_2 -13, H_2 -14, H_2 -15, H_2 -19, H_2 -20及び H_2 -21), 0.88 (t, 3H, $J = 6.7$, CH₃), 0.82 (t, 3H, $J = 7.1$, CH₃); δ_C (150 MHz, $CDCl_3$) 176.59 (C=O), 176.44 (C=O), 136.03 (C11), 129.50 (2 x Ar-H), 128.83 (C8), 128.29 (2 x Ar-H), 62.32 (C4), 54.58 (C7), 45.33 (C5), 34.85 (C6), 31.48 (CH₂), 31.33 (CH₂), 30.51 (CH₂), 29.21 (CH₂), 29.06 (CH₂), 28.90 (CH₂), 28.76 (CH₂), 28.53 (CH₂), 22.62 (CH₂), 22.50 (CH₂), 14.16 (CH₃), 14.11 (CH₃); IR (油, cm^{-1}) 3215 (w), 2926 (m) 1774 (w), 1715 (s); MS (CI+) m/z (相対強度): 432 ([M-H], 5), 329 (60), 207 (100), 161 (60); $[C_{24}H_{35}NO_2S_2]$ -Hについて計算した正確な質量は m/z 432.2026 を要求、実測値 432.2034 (CI+).

30

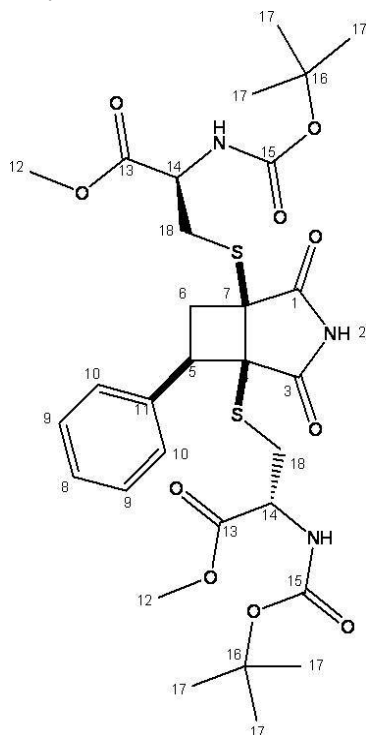
【 0 7 7 0 】

参考例 1 4 1 : (4RS, 5RS, 7SR) 2 - アザ - 4 - (N - Boc - Cys - OMe) - 5 - フェニル - 7 - (N - Boc - Cys - OMe) - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオンの調製

40

【 0 7 7 1 】

【化 1 6 2】



10

20

【 0 7 7 2】

2, 3 - ジ - (N - B o c - C y s - O M e) - マレイミド (7 6 m g 、 0 . 1 3 5 m m o l) をアセトニトリル (2 9 m L) 中に溶解して、0 . 0 0 5 M 溶液を得た。得られた溶液を30分間脱気し、スチレン (1 4 8 μ L 、 1 . 3 5 m m o l) を添加し、撹拌しながら30分間、パイレックスガラス器中で照射した。溶媒を真空中で除去し、フラッシュクロマトグラフィーによる精製 (石油エーテル中10%の酢酸エチルから石油エーテル中30%の酢酸エチルでの勾配溶出) により、(4 R S , 5 R S , 7 S R) 2 - アザ - 4 - (N - B o c - C y s - O M e) - 5 - フェニル - 7 - (N - B o c - C y s - O M e) - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオンと (4 R S , 5 S R , 7 S R) 2 - アザ - 4 - (N - B o c - C y s - O M e) - 5 - フェニル - 7 - (N - B o c - C y s - O M e) - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオンとの混合物 (2 8 m g 、 0 . 0 4 2 m m o l) を、無色油状物として36%の収率で得た。この混合物からのスペクトルは非常に複雑であったが、全てが同じ質量を有するので、MSにより、化合物の正体が確認された。4 R S , 5 R S , 7 S R) 2 - アザ - 4 - (N - B o c - C y s - O M e) - 5 - フェニル - 7 - (N - B o c - C y s - O M e) - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオン及び (4 R S , 5 S R , 7 S R) 2 - アザ - 4 - (N - B o c - C y s - O M e) - 5 - フェニル - 7 - (N - B o c - C y s - O M e) - ビシクロ [3 . 2 . 0] ヘプタン - 1 , 3 - ジオンもまた、無色油状物 (4 6 m g) として [5 + 2] 生成物と同時に単離された。¹ H N M R 及び M S のデータは、このうち40% (質量) が、所望のコンジュゲーション生成物 (1 8 m g 、 0 . 0 2 8 m m o l) (2 0 % の収率) であることを示唆する。δ_H (600 MHz, C D C l ₃) 8.32 (d, 4.7H, J = 8.7, N-H), 8.05 (s, 1.2H, N-H), 7.79 (s, 1H, N-H), 7.40-7.20 (m, 60H, Ar-H), 5.65 (d, 1H, J = 7.2, H-N), 5.57 (d, 5.2H, J = 8.2, H-N), 5.45 (d, 4.9H, J = 7.3, H-N), 5.40 (d, 1.9H, J = 7.8, H-N), 4.92 (d, 2.5H, J = 7.3, H-14), 4.74 (d, 3.7H, J = 7.8, H-14), 4.62-4.54 (m, 8H, H-14), 4.16-4.11 (m, 2.7H), 4.09-4.06 (m, 3.9H), 3.97-3.9 (m, 7.8H), 3.80-3.75 (m, 50.5H, H₃-12), 3.66 (s, 22.6H, H₃-12) 3.47-3.04 (m, 41.4, H₂-18), 2.99-2.94 (m, 9.5H, H₂-18), 2.82-2.73 (m, 9.5H, H₂-18), 1.46-1.42 (m, 240H, H₃-17); δ_C (150 MHz, C D C l ₃) 175.94 (C=O), 175.84 (C=O), 175.82 (C=O), 171.10 (C=O), 171.04 (C=O), 170.95 (C=O), 155.28 (Ar), 129.63 (Ar-H), 129.50 (Ar-H), 128.96 (Ar-H), 128.88 (Ar-H), 128.80 (Ar-H), 128.75 (Ar-H), 128.59 (Ar-H), 12

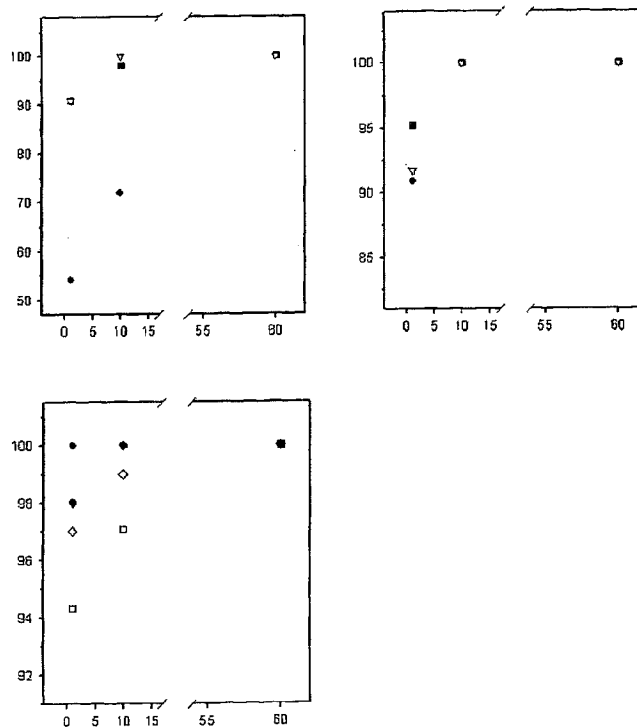
30

40

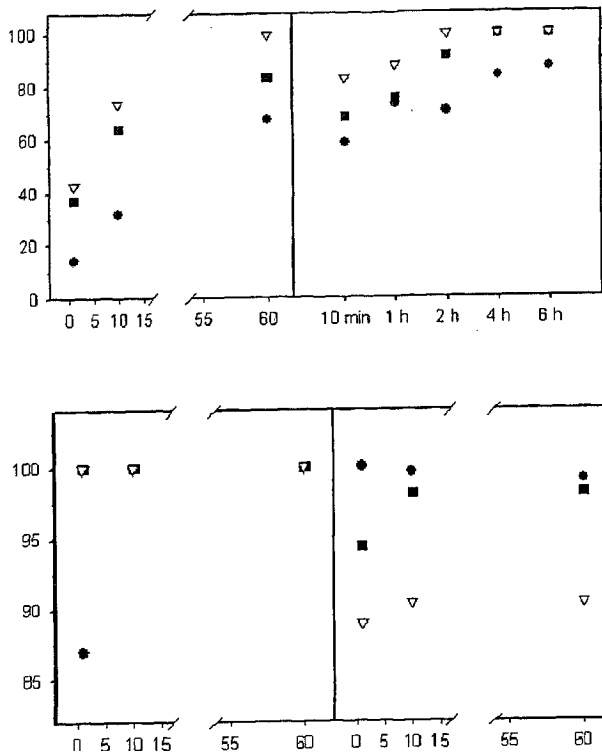
50

重複に起因して欠落している； IR (油, cm^{-1}) 2924 (m), 1712 (s); MS (CI+) m/z (相対強度): 666 ([M-H], 100); $[\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{S}_2]\text{-H}$ について計算した正確な質量はm/z 666.2155を要求、実測値 666.2188 (CI+).

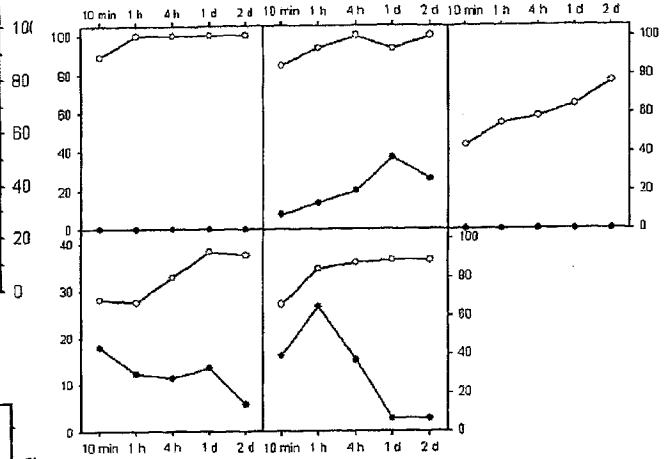
【圖 2】



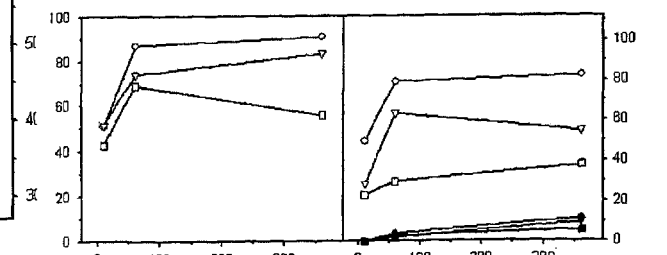
【図 3】



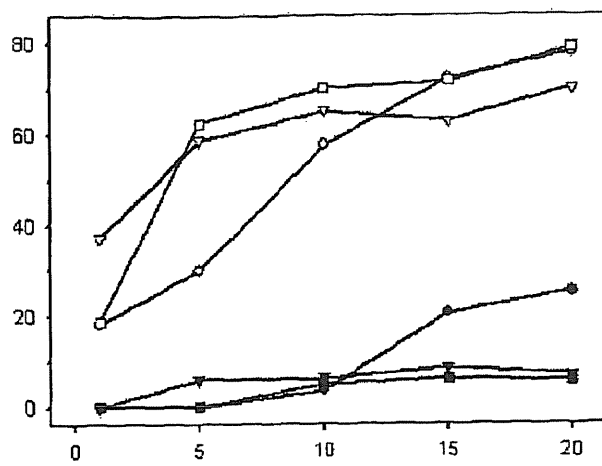
【図 4】



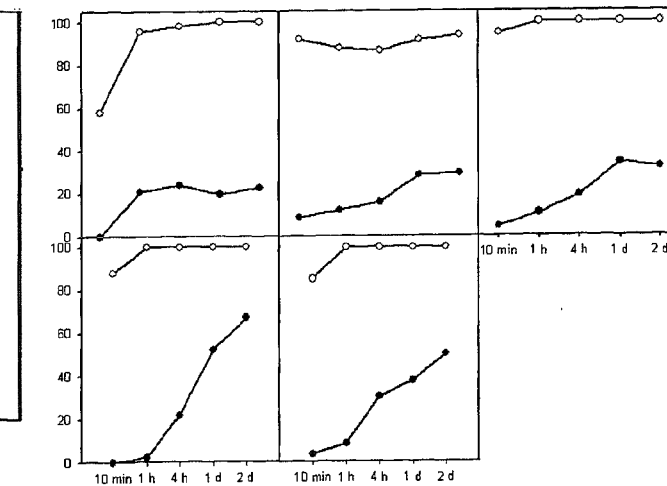
【図 5】



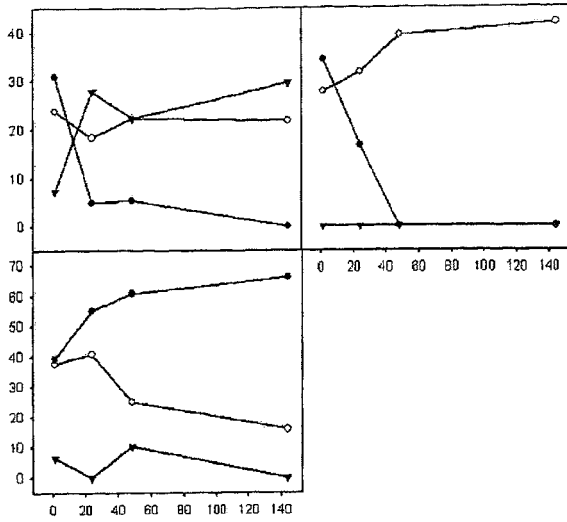
【図 6】



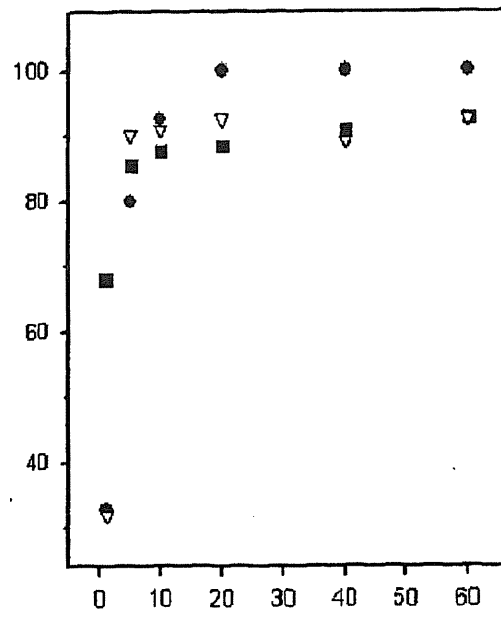
【図 7】



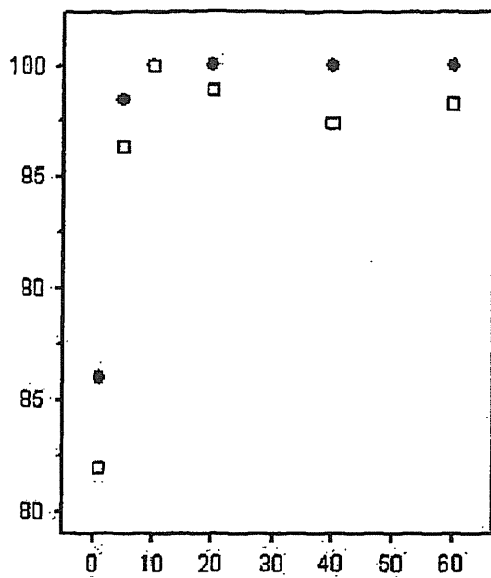
【図 8】



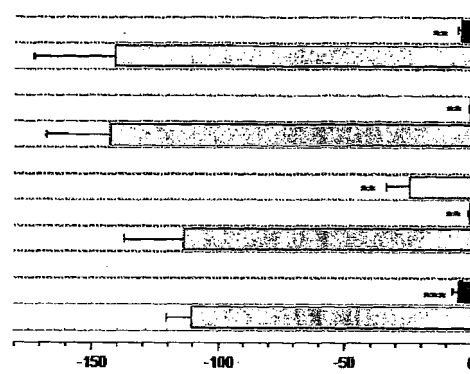
【図 9】



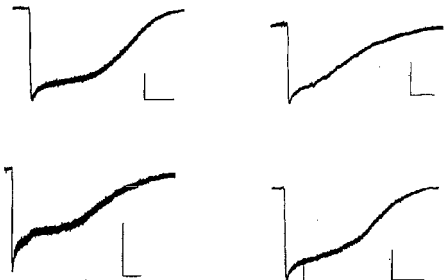
【図 10】



【図 12】



【図 11】



【手続補正書】

【提出日】平成24年4月11日(2012.4.11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

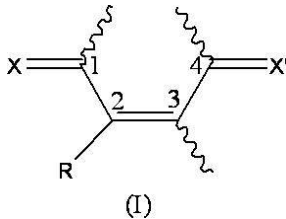
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 固体基材及び (b) それに連結された式 (I) の部分を含む、生成物：

【化1】



式中、

X 及び X' は、同じ又は異なって、それぞれ酸素、硫黄又は式 = N Q の基を示し、Q は、水素、ヒドロキシル、C₁ - 6 アルキル又はフェニルであり；

以下のいずれかであり：

(i) R は、求電子性脱離基 Y を示し、固体基材は、式 (I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結されており、機能的部分が、式 (I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結されている；又は

(ii) 固体基材はチオール部分を有し、R は、該チオール部分の硫黄原子への結合を示し、機能的部分が、式 (I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結されている；又は

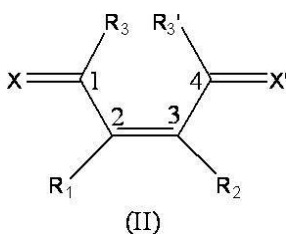
(iii) 固体基材は、式 (I) の 1 位、3 位又は 4 位に連結されており、R は、式 - S - F₁ 又は - S - L - F₂ の基を示し、式中 L はリンカー基を示し、- S - F₁ 及び - F₂ は機能的部分を示す；

機能的部分は、検出可能部分、酵素活性部分、アフィニティタグ、ハブテン、免疫原性担体、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド又はリガンド候補、生物活性部分、リボソーム、ポリマー部分、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、炭水化物、DNA 及び RNA から選択される。

【請求項2】

式 (II) を有する、請求項 1 に記載の生成物：

【化2】



式中、

X 及び X' は、同じ又は異なって、それぞれ酸素、硫黄又は式 = N Q の基を示し、Q は、水素、ヒドロキシル、C₁ - 6 アルキル又はフェニルであり；

R₁ は以下を示し：

(i) 求電子性脱離基 Y；又は

(ii) チオール部分を有し、該チオール部分の硫黄原子を介して式 (II) の 2 位に結合している、固体基材；又は

(iii) - S - F₁ 若しくは - S - L - F₂；

R_2 は、水素原子、 $So1$ 、 $-L-So1$ 、 F_3 、 Y 、 Nu 、 $-L(F_3)_m(Z)_n$ 、 $-m$ 又は IG を示し；

以下のいずれかであり：

R_3 及び R_3' は、同じ又は異なって、それぞれ水素原子、 $So1$ 、 $-L-So1$ 、 F_3 、 E 、 Nu 、 $-L(F_3)_m(Z)_n$ 、 $-m$ 又は IG を示す；又は

R_3 及び R_3' は一緒になって、式 $-O-$ 又は $-N(R_{33})-$ の基を形成し、 R_{33} は、水素原子、 $So1$ 、 $-L-So1$ 、 F_3 、 Y 、 Nu 、 $-L(F_3)_m(Z)_n$ 、 $-m$ 又は IG を示す；又は

R_3 及び R_3' は一緒になって、式 $-N(R_{33})-N(R_{33})-$ の基を形成し、各 R_{33} は、同じ又は異なって、水素原子、 $So1$ 、 $-L-So1$ 、 F_3 、 Y 、 Nu 、 $-L(F_3)_m(Z)_n$ 、 $-m$ 又は IG を示す；

$So1$ は固体基材を示し；

$-S-F_1$ 、 F_2 及び F_3 のそれぞれは、同じ又は異なって、検出可能部分、酵素活性部分、アフィニティタグ、ハプテン、免疫原性担体、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド又はリガンド候補、生物活性部分、リボソーム、ポリマー部分、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、炭水化物、DNA 及び RNA から選択される機能的部分を示し；

E 及び Y のそれぞれは、同じ又は異なって、求電子性脱離基を示し；

各 Nu は、同じ又は異なって、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 及び $-NH(C_{1-6} \text{アルキル})$ から選択される求核剤を示し；

各 L は、同じ又は異なって、リンカー基を示し；

各 Z は、同じ又は異なって、部分 L に結合した反応性基を示し；

各 n は、同じ又は異なって、1、2 又は 3 であり；

各 m は、同じ又は異なって、0 から n までの値を有する整数であり；

各 IG は、同じ又は異なって、非置換であるか又は 1 個以上のハロゲン原子置換基で置換されている、 C_{1-20} アルキル基、 C_{2-20} アルケニル基又は C_{2-20} アルキニル基である部分を示し、式中、 (a) 0、1 又は 2 個の炭素原子は、 C_{6-10} アリーレン、5 ~ 10 員のヘテロアリーレン、 C_{3-7} カルボシクリレン及び 5 ~ 10 員のヘテロシクリレン基から選択される基によって置換されており、かつ (b) 0、1 又は 2 個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(O)-$ 及び $-N(C_{1-6} \text{アルキル})-$ 基から選択される基によって置換されており、式中、

(i) 該アリーレン、ヘテロアリーレン、カルボシクリレン及びヘテロシクリレン基は、非置換であるか又はハロゲン原子並びに C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、 C_{1-6} アルキルチオール、 $-N(C_{1-6} \text{アルキル})(C_{1-6} \text{アルキル})$ 及びニトロ基から選択される 1 個以上の置換基によって置換されており；

(ii) 該カルボシクリレン及びヘテロシクリレン基中の 0、1 又は 2 個の炭素原子は、 $-C(O)-$ 基によって置換されており；

ただし、該生成物は、1 つの固体基材及び少なくとも 1 個の機能的部分を含む。

【請求項 3】

(A)：

Y が、ハロゲン原子又はトリフレート、トシレート、メシレート、 N -ヒドロキシスクシンイミジル、 N -ヒドロキシスルホスクシンイミジル、 C_{1-6} アルキルチオール、5 ~ 10 員のヘテロシクリルチオール、 C_{6-10} アリールチオール、 C_{3-7} カルボシクリルチオール、 $-OC(O)CH_3$ 、 $-OC(O)CF_3$ 、フェニルオキシ、 $-NR_xR_yR_z$ 若しくは $-PR_xR_yR_z$ 基であり、式中、 R_x 、 R_y 及び R_z は、同じ又は異なって、水素原子並びに C_{1-6} アルキル及びフェニル基から選択される；及び / 又は

(B)：

E が、ハロゲン原子又は C_{1-6} アルコキシ、チオール、 C_{1-6} アルキルチオール、 $-N(C_{1-6} \text{アルキル})(C_{1-6} \text{アルキル})$ 、トリフレート、トシレート、メシレート、 N -ヒドロキシスクシンイミジル、 N -ヒドロキシスルホスクシンイミジル、イミダゾリル、フェニルオキシ若しくはニトロフェニルオキシ基である；及び / 又は

(C) :

L が、非置換であるか又は 1 個以上のハロゲン原子置換基で置換されている、 C_{1-20} アルキレン基、 C_{2-20} アルケニレン基又は C_{2-20} アルキニレン基である部分を示し、式中、(a) 0、1 又は 2 個の炭素原子は、 C_{6-10} アリーレン、5 ~ 10 員のヘテロアリーレン、 C_{3-7} カルボシクリレン及び 5 ~ 10 員のヘテロシクリレン基から選択される基によって置換されており、かつ (b) 0、1 又は 2 個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(O)-$ 及び $-N(C_{1-6} \text{ アルキル})-$ 基から選択される基によって置換されており、式中、

(i) 該アリーレン、ヘテロアリーレン、カルボシクリレン及びヘテロシクリレン基は、非置換であるか又はハロゲン原子並びに C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、 C_{1-6} アルキルチオール、 $-N(C_{1-6} \text{ アルキル})(C_{1-6} \text{ アルキル})$ 及びニトロ基から選択される 1 個以上の置換基によって置換されており；

(ii) 該カルボシクリレン及びヘテロシクリレン基中の 0、1 又は 2 個の炭素原子は、 $-C(O)-$ 基によって置換されている；及び / 又は

(D) :

Z が、

(a) 式 $-LG$ 、 $-C(O)-LG$ 、 $-C(S)-LG$ 又は $-C(NH)-LG$ の基 (式中、LG は求電子性脱離基である)；

(b) $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_{1-6} \text{ アルキル})$ 及び $-C(O)NHNH_2$ 基から選択される求核剤 Nu'；

(c) 求核剤と開環求電子反応し得る環式部分 Cy c；

(d) 式 $-S(O_2)(Hal)$ の基 (式中、Hal はハロゲン原子である)；

(e) 式 $-N=C=O$ 又は $-N=C=S$ の基；

(f) 式 $-S-S(IG')$ の基 (式中、 IG' は、請求項 2 に記載の式 IG の基を示す)；

(g) 1 個以上のハロゲン原子によって置換された C_{6-10} アリール基である、基 AH；

(h) 紫外線光への曝露によって活性化され得る光反応性基；

(i) 式 $-C(O)H$ 又は $-C(O)(C_{1-6} \text{ アルキル})$ の基；

(j) マレイミド基；

(k) 式 $-C(O)CHCH_2$ の基；

(l) 式 $-C(O)C(N_2)H$ 又は $-PhN_2^+$ の基 (式中、Ph はフェニル基を示す)；若しくは

(m) エポキシド基、
を示す；及び / 又は

(E) :

IG が、非置換の C_{1-6} アルキル基、 C_{2-6} アルケニル基又は C_{2-6} アルキニル基である部分を示し、式中、(a) 0 又は 1 個の炭素原子は、フェニレン、5 ~ 6 員のヘテロアリーレン、 C_{5-6} カルボシクリレン及び 5 ~ 6 員のヘテロシクリレン基から選択される基によって置換されており、該フェニレン、ヘテロアリーレン、カルボシクリレン及びヘテロシクリレン基は、非置換であるか又はハロゲン原子並びに C_{1-4} アルキル及び C_{1-4} アルコキシ基から選択される 1 又は 2 個の置換基によって置換されており、かつ (b) 0、1 又は 2 個の $-CH_2-$ 基は、 $-O-$ 、 $-S-$ 及び $-C(O)-$ 基から選択される基によって置換されている；及び / 又は

(F) :

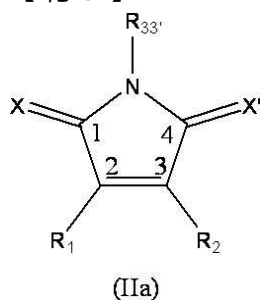
n が 1 である、

請求項 2 に記載の生成物。

【請求項 4】

式 (II) の生成物が式 (IIa) の生成物

【化 3】



(式中、X、X'、R₁、R₂及びR_{33'}は全て、請求項2又は3に記載したとおりである)

である、請求項2又は3に記載の生成物。

【請求項5】

X及びX'がそれぞれ酸素を示し；

R₁が以下を示し：

(i) ハロゲン原子；又は

(ii) チオール部分を有し、該チオール部分の硫黄原子を介して式(II)の2位に結合している、固体基材；又は

(iii) -S-F₁；

R₂は、水素若しくはハロゲン原子、固体基材、F₃又はC₁₋₆アルキル基を示し；

R₃及びR_{3'}は一緒になって、式-N(R_{33'})の基を形成し、R_{33'}は、水素原子、固体基材、F₃又はC₁₋₆アルキル基を示し；

-S₁-F₁及びF₃は、同じ又は異なって、検出可能部分、酵素活性部分、アフィニティタグ、ハプテン、免疫原性担体、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド又はリガンド候補、生物活性部分、リボソーム、ポリマー部分、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、炭水化物、DNA及びRNAから選択される機能的部分を示し；

ただし、該生成物は、1つの固体基材及び少なくとも1個の機能的部分を含み、該生成物は、好ましくは、1個の機能的部分-S-F₁、F₂又はF₃を含み、好ましくは、該機能的部分は機能的部分-S-F₁である、

請求項2～4のいずれか1項に記載の生成物。

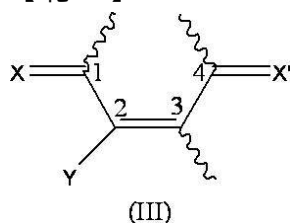
【請求項6】

R₃及びR_{3'}が一緒になって、式-N(R_{33'})の基を形成し、R_{33'}が固体基材を示す、請求項2～5のいずれか1項に記載の生成物。

【請求項7】

機能的部分に固体基材を連結するための試薬としての、式(III)の部分を含む化合物の使用：

【化 4】



式中、

X及びX'は、同じ又は異なって、それぞれ酸素、硫黄又は式=NQの基を示し、Qは、水素、ヒドロキシル、C₁₋₆アルキル又はフェニルであり；

Yは求電子性脱離基であり；

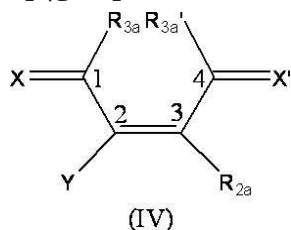
機能的部分は、検出可能部分、酵素活性部分、アフィニティタグ、ハプテン、免疫原性担体、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド又はリガンド候補、生物活性部分、リボソーム、ポリマー部分、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、細胞、炭水化物、DNA又はRNA

である。

【請求項 8】

式 (I I I) の部分を含む化合物が、式 (I V) の化合物である、請求項 7 に記載の使用；

【化 5】



式中、

R_{2a} は、水素原子、Y、Nu、 $-L(Z')$ _n 又は I G を示し；

以下のいずれかであり；

R_{3a} 及び $R_{3a'}$ は、同じ又は異なって、それぞれ水素原子、E、Nu、 $-L(Z')$ _n 又は I G を示す；又は

R_{3a} 及び $R_{3a'}$ は一緒になって、式 $-O-$ 又は $-N(R_{33a})$ の基を形成し、 R_{33a} は、水素原子、Y、Nu、 $-L(Z')$ _n 又は I G を示す；又は

R_{3a} 及び $R_{3a'}$ は一緒になって、式 $-N(R_{33a})-N(R_{33a})-$ の基を形成し、各 R_{33a} は、同じ又は異なって、水素原子、Y、Nu、 $-L(Z')$ _n 又は I G を示す；

Z' は、Z 又は式 $-Si(O(C_{1-6} \text{ アルキル}))(G_1)(G_2)$ の基を示し、 G_1 及び G_2 は、同じ又は異なって、H、 C_{1-6} アルキル又は $O(C_{1-6} \text{ アルキル})$ を示し；

X、X'、Y、Nu、L、Z、n、I G 及び E は全て、請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載したとおりである。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の生成物を提供する工程であって、以下のいずれかである；

(i) チオール部分を有する固体基材が、該チオール部分の硫黄原子を介して式 (I) の 2 位に結合している；又は

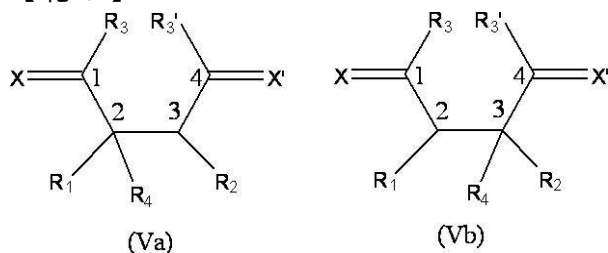
(i i) 基 $-S-F_1$ 又は $-S-L-F_2$ が、式 (I) の 2 位に結合している、工程；及び

式 (I) の 2 位でチオール結合を切断する工程、を含む、プロセス。

【請求項 10】

式 (V a) 又は (V b) の生成物；

【化 6】



式中、

R_1 は以下を示し；

(i) チオール部分を有し、該チオール部分の硫黄原子を介して式 (V a) 又は (V b) の 2 位に結合している、固体基材；又は

(i i) $-S-F_1$ 若しくは $-S-L-F_2$ ；

X 、 X' 、 $-S-F_1$ 、 F_2 、 R_2 、 R_3 及び R_3' は、請求項 2 ～ 5 のいずれか 1 項に記載したとおりであり；

R_4 は、ハロゲン原子、ヒドロキシル、 C_{1-6} アルコキシ、チオール、 C_{1-6} アルキルチオ若しくは C_{1-6} アルキルカルボニルオキシ基、又は請求項 2 に記載の式 F_3 の基であり；

基 R_2 及び R_4 のうち少なくとも 1 個が式 F_3 の基を含み、

ただし、該生成物は、1 つの固体基材を含む。

【請求項 11】

アレイに整列された、請求項 1 ～ 6 及び 10 のいずれか 1 項に記載の複数の生成物であって、各生成物は、抗体又は抗体断片、抗原、リガンド又はリガンド候補、ペプチド、タンパク質、細胞、DNA 及び RNA から選択される機能的部分を含み、好ましくは、

(a) 各生成物が異なる抗体又は抗体断片を含む；又は

(b) 各生成物が異なる抗原を含む；又は

(c) 各生成物が異なるリガンド又はリガンド候補を含む；又は

(d) 各生成物が異なるペプチドを含む；又は

(e) 各生成物が異なるタンパク質を含む；又は

(f) 各生成物が異なる細胞を含む；又は

(g) 各生成物が異なる DNA を含む；又は

(h) 各生成物が異なる RNA を含む。

【請求項 12】

(i) 請求項 1 ～ 6 及び 10 のいずれか 1 項に記載の生成物を提供する工程であって、該生成物は、抗体又は抗原を含む、工程；

(ii) 該生成物をサンプルとインキュベートする工程；

(iii) 抗体又は抗原に結合していない任意の材料を除去する工程；及び

(iv) 抗体又は抗原に結合した任意の物質を検出する工程、を含む、検出プロセス。

【請求項 13】

サンプルから特定の物質を精製するためのプロセスであって、

(i) 請求項 1 ～ 6 及び 10 のいずれか 1 項に記載の生成物を提供する工程であって、該生成物は、該物質に選択的に結合できる機能的部分を含む、工程；

(ii) 該生成物を該サンプルとインキュベートする工程；

(iii) 機能的部分に結合していない任意の材料を除去する工程；及び

(iv) 該生成物から該物質を分離する工程、を含む、プロセス。

【請求項 14】

(i) 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の生成物を提供する工程；

(ii) アミノ酸を該生成物に結合させる工程；及び

(iii) 該アミノ酸に 1 個以上のさらなるアミノ酸を結合させて、固体基材に連結されたペプチド又はタンパク質部分を産生する工程；及び

(iv) 該ペプチド又はタンパク質部分を該固体基材から切断する工程、を含む、ペプチド又はタンパク質を産生するためのプロセス。

【請求項 15】

請求項 7 又は 8 に記載の使用であって、式 (III) の部分を含む化合物を使用して機能的部分に固体基材を連結することによって得られた生成物が、マレイミド環を含み、該使用が、該マレイミド環の開環をもたらすことをさらに含む、使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/GB2010/001504
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/543 A61L27/28		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N A61L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARCHAND J ET AL: "Activatable quantum dots for mouse non invasive fluorescence imaging." PROCEEDINGS OF SPIE, vol. 6626, 2007, pages E1-E9, XP002602390 figure 1	1-16, 21-23
A	LOREY S ET AL: "Transcellular proteolysis demonstrated by novel cell surface-associated substrates of dipeptidyl peptidase IV (CD26)" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 36, 2002, pages 33170-33177, XP002601595 page 33174, right-hand column, paragraph 4; figures 2,3 -/-	1-16, 21-23
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 September 2010		Date of mailing of the international search report 05/01/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gunster, Marco

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
PCT/GB2010/001504
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This international Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-16, 21-23(all partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/GB2010/001504

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	-& LOREY S ET AL: "Additions and Corrections: Transcellular proteolysis demonstrated by novel cell surface-associated substrates of dipeptidyl peptidase IV (CD26)" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 43, 25 October 2002 (2002-10-25), page 41294, XP002604986 the whole document	
A	----- AUGUSTIN M ET AL: "SYNTHESE VON N-DICHLORMALEOYL-AMINOSAEUREN UND -PEPTIDEN" JOURNAL FÜR PRAKTISCHE CHEMIE, vol. 327, no. 5, 1985, pages 857-864, XP000671367 the whole document	1-16, 21-23
A	----- US 5 519 142 A (HOESS EVA [DE] ET AL) 21 May 1996 (1996-05-21) the whole document	1-16, 21-23
A	----- US 2007/248950 A1 (REPPY MARY A [US] ET AL) 25 October 2007 (2007-10-25) figure 1	1-16, 21-23
A,P	----- SMITH M E B ET AL: "Protein modification, bioconjugation, and disulfide bridging using bromomaleimides." JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 132, no. 6, 17 February 2010 (2010-02-17), pages 1960-1965, XP002601596 the whole document	1-16, 21-23
A,P	----- TEDALDI L M ET AL: "Bromomaleimides: new reagents for the selective and reversible modification of cysteine." CHEMICAL COMMUNICATIONS, no. 43, 21 November 2009 (2009-11-21), pages 6583-6585, XP002601597 the whole document	1-16, 21-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2010/001504

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5519142	A	21-05-1996	AT 171163 T 15-10-1998
		DE 4310141 A1	06-10-1994
		EP 0618192 A1	05-10-1994
		ES 2123677 T3	16-01-1999
US 2007248950	A1	25-10-2007	NONE

International Application No. PCT/GB2010 /001504

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-16, 21-23(all partially)

A product which comprises a solid substrate linked to a moiety of formula (I), wherein X and X' are the same and represent oxygen and R is a leaving group, or a plurality of such products in the form of an array.

2. claims: 1-16, 21-23(all partially)

A product which comprises a solid substrate linked to a moiety of formula (I), wherein X and X' are the same and represent oxygen and R represents the solid substrate linked via a sulfur atom, or a plurality of such products in the form of an array.

3. claims: 1-16, 21-23(all partially)

A product which comprises a solid substrate linked to a moiety of formula (I), wherein X and X' are the same and represent oxygen and R represents a functional moiety linked via a sulfur atom, or a plurality of such products in the form of an array.

4. claims: 1-16, 21-23(all partially)

A product which comprises a solid substrate linked to a moiety of formula (I), wherein X and X' are the same and represent sulfur, or a plurality of such products in the form of an array.

5. claims: 1-16, 21-23(all partially)

A product which comprises a solid substrate linked to a moiety of formula (I), wherein X and X' are the same and represent a group of formula =NQ, or a plurality of such products in the form of an array.

6. claims: 1-16, 21-23(all partially)

A product which comprises a solid substrate linked to a moiety of formula (I), wherein X and X' are different and represent oxygen, sulfur or a group of formula =NQ, or a plurality of such products in the form of an array.

7. claims: 17, 18, 30

International Application No. PCT/GB2010 /001504

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

The use of a compound of formula (III) as a reagent for linking a solid substrate to a functional moiety.

8. claim: 19

A process of cleaving a product having a solid substrate and a compound of formula (I) comprising cleaving the thiol bond at the 2-position.

9. claims: 20(completely); 21-23(partially)

A product of formula (Va) or (Vb), or a plurality of such products in the form of an array.

10. claim: 24

An assay process using an array of products comprising a solid substrate linked to a compound of formula (I).

11. claim: 25

A detection process using a product comprising a solid substrate linked to a compound of formula (I).

12. claims: 26, 27

A purification process using a product comprising a solid substrate linked to a compound of formula (I).

13. claims: 28, 29

A peptide production process using a product comprising a solid substrate linked to a compound of formula (I).

14. claims: 31, 32

A product of formula (VI) or (VIa).

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 0 7 D 493/10	(2006.01)	C 0 7 D 493/10	E	4 C 2 0 4
C 0 7 D 237/16	(2006.01)	C 0 7 D 237/16		
C 0 7 D 495/10	(2006.01)	C 0 7 D 495/04	1 1 6	
C 0 7 D 487/04	(2006.01)	C 0 7 D 495/10		
C 0 7 D 223/08	(2006.01)	C 0 7 D 487/04	1 3 7	
C 0 7 D 209/02	(2006.01)	C 0 7 D 223/08		
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	C 0 7 D 209/02		
G 0 1 N 37/00	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D	
		G 0 1 N 37/00	1 0 2	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, S E, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, I L, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ , OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

１．パイレックス

- (74) 代理人 100122688
弁理士 山本 健二
- (74) 代理人 100117743
弁理士 村田 美由紀
- (74) 代理人 100163658
弁理士 小池 順造
- (74) 代理人 100174296
弁理士 當麻 博文
- (72) 発明者 スミス、マーク
イギリス国、ダブリュ 1 ティー 4 ティーピー、ロンドン、トッテナム コート ロード 97、
ザ ネットワーク ビルディング、ユーシーエル ビジネス パブリック リミテッド カンパニ
ー
- (72) 発明者 キャディック、ステファン
イギリス国、ダブリュ 1 ティー 4 ティーピー、ロンドン、トッテナム コート ロード 97、
ザ ネットワーク ビルディング、ユーシーエル ビジネス パブリック リミテッド カンパニ
ー
- (72) 発明者 ベイカー、ジェイムズ
イギリス国、ダブリュ 1 ティー 4 ティーピー、ロンドン、トッテナム コート ロード 97、
ザ ネットワーク ビルディング、ユーシーエル ビジネス パブリック リミテッド カンパニ
ー

F ターム(参考) 4C037 KA10

4C050 AA01 AA08 BB04 CC04 EE02 FF01 GG03 HH01
4C063 AA03 BB08 CC12 DD04 EE10
4C069 AC40 AD06 BC01 BC16
4C071 AA01 AA04 AA07 BB01 BB07 CC01 CC02 CC12 CC21 CC22
DD19 DD40 EE05 EE12 EE13 EE16 FF03 FF04 FF17 GG06

HH08 JJ05
4C204 CB01 DB30 EB03 FB01 GB07 GB17 GB23

专利名称(译)	固体基质的功能化		
公开(公告)号	JP2013501766A	公开(公告)日	2013-01-17
申请号	JP2012524274	申请日	2010-08-09
[标]申请(专利权)人(译)	UCL商业有限公司		
申请(专利权)人(译)	Yushieru商务公共有限公司		
[标]发明人	スミスマーク キャディックステファン ベイカージェイムズ		
发明人	スミス、マーク キャディック、ステファン ベイカー、ジェイムズ		
IPC分类号	C07D207/416 C07D207/456 C07D401/14 C07D307/60 C07D495/04 C07D493/10 C07D237/16 C07D495/10 C07D487/04 C07D223/08 C07D209/02 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	A61K47/551 A61K47/60 A61K47/62 A61K49/0017 A61P1/04 A61P1/08 A61P3/06 A61P5/00 A61P7/02 A61P9/06 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/14 A61P13/00 A61P21/02 A61P23/02 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/08 A61P25/22 A61P25/24 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P35/00 A61P37 /04 A61P37/06 A61P43/00 C07D207/416 C07D207/456 C07D209/52 C07K14/655 Y02P20/55 A61K47 /545 C07K14/435 G01N33/58		
FI分类号	C07D207/416.CSP C07D207/456 C07D401/14 C07D307/60.Z C07D495/04.103 C07D493/10.E C07D237/16 C07D495/04.116 C07D495/10 C07D487/04.137 C07D223/08 C07D209/02 G01N33/53.D G01N37/00.102		
F-TERM分类号	4C037/KA10 4C050/AA01 4C050/AA08 4C050/BB04 4C050/CC04 4C050/EE02 4C050/FF01 4C050 /GG03 4C050/HH01 4C063/AA03 4C063/BB08 4C063/CC12 4C063/DD04 4C063/EE10 4C069/AC40 4C069/AD06 4C069/BC01 4C069/BC16 4C071/AA01 4C071/AA04 4C071/AA07 4C071/BB01 4C071 /BB07 4C071/CC01 4C071/CC02 4C071/CC12 4C071/CC21 4C071/CC22 4C071/DD19 4C071/DD40 4C071/EE05 4C071/EE12 4C071/EE13 4C071/EE16 4C071/FF03 4C071/FF04 4C071/FF17 4C071 /GG06 4C071/HH08 4C071/JJ05 4C204/CB01 4C204/DB30 4C204/EB03 4C204/FB01 4C204/GB07 4C204/GB17 4C204/GB23		
代理人(译)	高岛肇 山本健二 当麻 博文		
优先权	2009013965 2009-08-10 GB 2009013967 2009-08-10 GB 2009014321 2009-08-14 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及式 (Ia) 化合物作为将式R 1 -H化合物 (其包含式F 1的第一官能部分) 与式F 2的第二官能部分 (其中X) 连接的试剂的用途 , X' , Y , R 1 , R 2 , R 3 , R 3' , F 1和F 2如本文所定义。本发明还提供了相关的方法和产品。本发明可用于产生功能性缀合物化合物 , 特别是其中至少一种组成分子带有硫醇基团的缀合物。

