

(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2016-510413****(P2016-510413A)**(43) 公表日 **平成28年4月7日(2016.4.7)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/532 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/532 Z N A Z	2 G O 4 1
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 Y	
<b>GO 1 N 33/536 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/536 Z	
<b>GO 1 N 27/62 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 2 5 E	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-557458 (P2015-557458)  
 (86) (22) 出願日 平成26年2月17日 (2014.2.17)  
 (85) 翻訳文提出日 平成27年10月15日 (2015.10.15)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/053047  
 (87) 国際公開番号 W02014/125112  
 (87) 国際公開日 平成26年8月21日 (2014.8.21)  
 (31) 優先権主張番号 13305183.9  
 (32) 優先日 平成25年2月18日 (2013.2.18)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 515224980  
 イーエムアビオテック  
 I M A B I O T E C H  
 フランス国 エフ-59120 ロス ア  
 ヴェニュー・ウージェーン・アヴィネ 8  
 85  
 (71) 出願人 513144844  
 ユニヴェルシテ ド シアンス エ テク  
 ノロジー ド リール 1  
 フランス エフ-59655 ヴァルヌー  
 ヴ ダスク セダー シテ シャンテフィ  
 ック

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分子の検出のための光又は化学解離性コンジュゲート

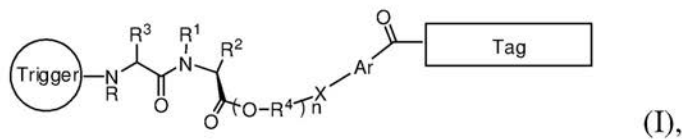
## (57) 【要約】

本発明は、好ましくは質量分析法によるサンプル中における目的の分子の検出の分野に関する。本発明は、ラベル化合物、該化合物によりラベルされた分子（コンジュゲート）、該コンジュゲートを用いてサンプル中における目的の分子（標的分子）を検出する方法、該方法を行うためのキット、及び前記ラベルの調製のためのプロセスに関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

化学式 ( I ) の化合物であって、



10

該化学式 ( I ) において、

Tag ( タグ ) は、分析の技術により同定及び / 又は検出可能な原子団であり、

Trigger ( トリガー ) は、刺激を受けた際に切断される化学基であり、

n は 0 又は 1 であり、

Ar は芳香族基であり、

R は、水素原子と、任意に酸素 ( O )、窒素 ( N ) 及び硫黄 ( S ) 原子からなる群から選択される少なくとも 1 つのヘテロ原子が挿入され、任意にヒドロキシ基、アルコキシ基、アミノ基 ( NH<sub>2</sub> )、ニトロ基 ( NO<sub>2</sub> ) 及びカルボキシル基 ( COOH ) からなる群から選択される少なくとも 1 つで置換された飽和型又は不飽和型の直鎖又は分枝鎖アルキル基とからなる群から選択され、

R<sup>1</sup> は水素原子であり、R<sup>2</sup> は水素原子と、任意にフェニル基で置換された C 1 - C 4 アルキル基とからなる群から選択され、又は、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は窒素及び炭素原子と共にそれぞれ結合して 5 員環を形成し、

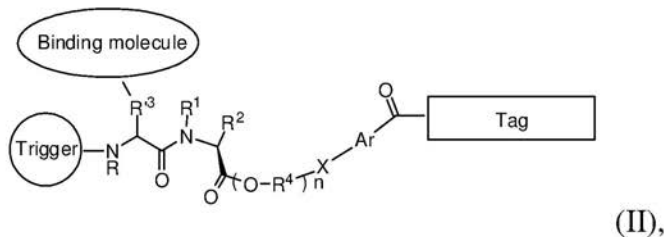
R<sup>3</sup> は、- ( CH<sub>2</sub> )<sub>m</sub> - CH<sub>2</sub> - FG で示される化学基であり、m は 0、1、2 又は 3 であり、FG は結合分子の化学基と反応できる官能基であり、

R<sup>4</sup> は、C 1 - C 4 アルキル基であり、

X は、酸素 ( O )、NH 及び硫黄 ( S ) からなる群から選択される、化合物。

## 【請求項 2】

化学式 ( II ) のコンジュゲートであって、



30

該化学式 ( II ) において、

前記 Tag ( タグ )、Trigger ( トリガー )、R、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>4</sup>、Ar、X 及び n は、請求項 1 に記載の定義と同一であり、

Binding molecule ( 結合分子 ) は、請求項 1 に記載の R<sup>3</sup> に結合可能な分子であり、

R<sup>3</sup> は、- ( CH<sub>2</sub> )<sub>m</sub> - CH<sub>2</sub> - FG' の化学基であり、m は 0、1、2 又は 3 であり、FG' は請求項 1 に記載の FG 基と結合分子との反応から得られる官能基である、コンジュゲート。

## 【請求項 3】

前記結合分子は、抗体、抗原、アプタマー、タンパク質、ペプチド、オリゴ糖、多糖類、ペプチドグリカン、脂質及び DNA 又は RNA 等の核酸からなる群から選択される、請求項 2 に記載のコンジュゲート

50

## 【請求項 4】

前記タグは、既知の質量のタグ、又はペプチド、好ましくは、Gly-Arg-Aa-Phe-Arg-Gly-Aa-Glyである配列番号 1 の配列のペプチドであり、前記 A a のそれぞれは、独立してアラニン、セリン、バリン、アスパラギン、グルタミン、ロイシン及びプロリンからなる群から選択される、請求項 1 に記載の化合物又は請求項 2 若しくは 3 に記載のコンジュゲート。

## 【請求項 5】

前記 A r は 7 - ヒドロキシクマリン誘導体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の化合物又はコンジュゲート。

## 【請求項 6】

請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートを調製する方法であって、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの化合物と前記結合分子とを、好ましくは約 4 で接触させることと、それにより得られたコンジュゲートを好ましくは約 4 で精製することを含む、方法。

## 【請求項 7】

サンプル中において少なくとも 1 つの標的分子を検出するための方法であって、少なくとも 1 つの請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートと前記サンプルとを接触させるステップ ( a ) と、前記サンプルから非結合性コンジュゲートを除去するステップ ( b ) と、前記ステップ ( b ) の後に得られたサンプルに対して少なくとも 1 つの刺激を与えて前記コンジュゲートを活性化させるステップ ( c ) と、適切な分析技術、好ましくは M A L D I 質量分析法により T a g - C ( = O ) - A r - X - ( R <sup>4</sup> - O ) <sub>n</sub> - H 化合物の放出を検出するステップ ( d ) と、を備え、前記 T a g - C ( = O ) - A r - X - ( R <sup>4</sup> - O ) <sub>n</sub> - H 化合物は、前記サンプル中において対応する標的分子の存在を示し、前記 T a g ( タグ ) 、 A r 、 X 、 R <sup>4</sup> 及び n は、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の定義と同一である、方法。

## 【請求項 8】

対象における特定の症状のリスクの測定、該症状の素因の検出、又は該症状の存在の検出をする方法であって、少なくとも 1 つの請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートを用いて前記症状に係る特定の標的分子を検出することを含む、方法。

## 【請求項 9】

組織切片において標的分子マップを決定する方法であって、前記標的分子を結合するのに適する少なくとも 1 つの請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートと前記組織切片とをハイブリダイズするステップ ( a ) と、マトリクスをスプレーするステップ ( b ) と、前記組織切片表面をスキャンし、M A L D I 質量分析法を用いて隣接するスポットをそれぞれ分析し、この分析において、M A L D I レーザは、好ましくは T a g - C ( = O ) - A r - X - ( R <sup>4</sup> - O ) <sub>n</sub> - H 化合物を放出するために、及び前記サンプルのイオン化を誘導するために用いられ、その後、前記分析により得られた各スポットのデータが保存されるステップ ( c ) と、それぞれ別個の T a g - C ( = O ) - A r - X - ( R <sup>4</sup> - O ) <sub>n</sub> - H 化合物の分子質量ウィンドウにおいて得られたデータを分析して、調査対象である別個の標的分子の数と同一の組織切片のマップを作製するステップ ( d ) とを含む、方法。

## 【請求項 10】

免疫センシングアッセイにおいてサンプル中の少なくとも 1 つの標的分子を検出する方法であって、前記少なくとも 1 つの標的分子を結合できる少なくとも 1 つの化合物が付けられた固体基質と前記サンプルとを、該サンプル中に前記化合物が存在するならば前記化合物が前記

10

20

30

40

50

標的分子に結合できる条件下で接触させるステップ ( a ) と、

前記固体基質から非結合性の前記サンプルを除去するステップ ( b ) と、

ステップ ( a ) で得られた固体基質と、少なくとも 1 つの請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートとを、前記標的分子が前記固体基質上に存在するならば該コンジュゲートが前記標的分子に結合できる条件下で接触させるステップ ( c ) と、

非結合性の前記コンジュゲートを除去するステップ ( d ) と、

ステップ ( c ) で得られた前記サンプルに刺激を与えて前記コンジュゲートを活性化させるステップ ( e ) と、

適切な分析技術、好ましくは M A L D I 質量分析法により T a g - C ( = O ) - A r - X - ( R <sup>4</sup> - O ) <sub>n</sub> - H 化合物の放出を検出するステップ ( f ) と、を備え、

前記 T a g - C ( = O ) - A r - X - ( R <sup>4</sup> - O ) <sub>n</sub> - H 化合物の存在は、前記サンプル中における対応する標的分子の存在を示す、方法。

【請求項 1 1】

前記標的分子のそれぞれの検出のために、

前記ステップ ( a ) の固体基質に付けられた標的分子を結合可能な少なくとも 1 つの化合物と、

前記標的分子を結合できる化合物と共に前記標的分子に結合する請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つのコンジュゲートと、が用いられ、

少なくとも 1 つのコンジュゲートの前記タグは、他の標的分子を結合するコンジュゲートのタグとは異なる検出信号、特に質量を有する、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

免疫センシングアッセイにおいてサンプル中の少なくとも 1 つの標的分子を検出する方法であって、

前記標的分子に結合する固体基質と前記サンプルとを、前記サンプル中に前記標的分子が存在するならば前記固体基質が前記標的分子に結合できる条件下で接触させるステップ ( a ) と、

前記固体基質から非結合性サンプルを除去するステップ ( b ) と、

前記固体基質と共に前記標的分子に結合する請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つのコンジュゲートとステップ ( a ) で得られた前記固体基質とを、該固体基質上に前記標的分子が存在するならば前記コンジュゲートが前記標的分子に結合できる条件下で接触させるステップ ( c ) と、

非結合性の前記コンジュゲートを除去するステップ ( d ) と、

ステップ ( d ) で得られた前記サンプルに刺激を与えて前記コンジュゲートを活性化させるステップ ( e ) と、

適切な分析技術、好ましくは M A L D I 質量分析法により T a g - C ( = O ) - A r - X - ( R <sup>4</sup> - O ) <sub>n</sub> - H 化合物の放出を検出するステップ ( f ) と、を備え、

前記 T a g - C ( = O ) - A r - X - ( R <sup>4</sup> - O ) <sub>n</sub> - H 化合物の存在は、前記サンプル中における対応する標的分子の存在を示す、方法。

【請求項 1 3】

前記ステップ ( a ) の固体基質は、複数の標的分子に結合し、

前記標的分子のそれぞれに対して、前記固体基質と共に前記標的分子のいずれかに結合する請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つのコンジュゲートが用いられ、前記少なくとも 1 つのコンジュゲートの前記タグは、他の標的分子を結合するコンジュゲートのタグとは異なる検出信号、特に異なる質量を有する、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

( a ) 固体基質と、

( b ) 前記固体基質に結合された、少なくとも 1 つの標的分子に結合可能な化合物と、

( c ) 前記化合物に結合された標的分子と、

( d ) 前記化合物と共に前記標的分子に結合する請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートと、を備えた組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 15】

サンプル中における標的分子を検出するためのキットであって、

- (a) 固体基質と、
- (b) 前記固体基質に付けるための標的分子を結合可能な化合物と、
- (c) 前記化合物と共に前記標的分子を結合する請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートと、
- (d) 前記サンプル中における前記標的分子を検出するために前記キットを使用するための説明書と、を備えたキット。

## 【請求項 16】

サンプル中における標的分子を検出するためのキットであって、

- (a) 前記標的分子を結合できる化合物が付けられた固体基質と、
- (b) 前記標的分子に結合する請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートと、
- (c) 前記サンプル中における前記標的分子を検出するために前記キットを使用するための説明書と、を備えたキット。

10

## 【請求項 17】

サンプル中における標的分子を検出するためのキットであって、

- (a) 前記標的分子と結合する固体基質と、
- (b) 前記標的分子と結合する請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートと、
- (c) 前記サンプル中における前記標的分子を検出するために前記キットを使用するための説明書とを、備えたキット。

20

## 【請求項 18】

サンプル中における少なくとも 1 つの標的分子を検出するためのキットであって、

- (a) 固体基質と、
- (b) 前記固体基質に付けるための標的分子を結合可能な複数の化合物と、
- (c) 請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の複数のコンジュゲートと、
- (d) 前記サンプル中における少なくとも 1 つの標的分子を検出するために前記キットを使用するための説明書と、を備え、

前記標的分子のそれぞれに対して、前記化合物と共に前記標的分子のいずれかに結合する少なくとも 1 つのコンジュゲートが用いられ、

前記コンジュゲートのそれぞれのタグは、他の標的分子と結合するコンジュゲートのタグとは異なる検出信号、特に異なる質量を有する、キット。

30

## 【請求項 19】

サンプル中における少なくとも 1 つの標的分子を検出するためのキットであって、

- (a) 前記標的分子に結合可能な複数の化合物が付けられている固体基質と、
- (b) 請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の複数のコンジュゲートと、
- (c) 前記サンプル中における少なくとも 1 つの標的分子を検出するために前記キットを使用するための説明書と、を備え、

前記標的分子のそれぞれに対して、該標的分子のいずれかに結合する少なくとも 1 つの化合が用いられ、

前記標的分子のそれぞれに対して、前記化合物と共に該標的分子のいずれかに結合する少なくとも 1 つのコンジュゲートが用いられ、

前記コンジュゲートのそれぞれのタグは、他の標的分子と結合するコンジュゲートのタグとは異なる検出信号、特に異なる質量を有する、キット。

40

## 【請求項 20】

サンプル中における少なくとも 1 つの標的分子を検出するためのキットであって、

- (a) 前記標的分子のそれぞれに結合する固体基質と、
- (b) 請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の複数のコンジュゲートと、
- (c) 前記サンプル中における少なくとも 1 つの標的分子を検出するために前記キット

50

を使用するための説明書と、を備え、

前記標的分子のそれぞれに対して、該標的分子のいずれかに結合する少なくとも1つのコンジュゲートが用いられ、

前記コンジュゲートのそれぞれのタグは、他の標的分子と結合するコンジュゲートのタグとは異なる検出信号、特に異なる質量を有する、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、好ましくは質量分析によるサンプルにおける目的の分子の検出の分野に関する。本発明は、ラベル化合物、該化合物でラベルされた分子（コンジュゲート）、該コンジュゲートを含むサンプルにおける目的の分子（標的分子）の検出の方法、該方法を実施するためのキット、及び前記ラベルの調製のためのプロセスに関する。

10

【背景技術】

【0002】

サンプル、例えば生物学的サンプルにおける分子の検出は、特に分析及び医学分野において非常に大きい関心ごとである。サンプルにおける分子の存在を検出するための種々の方法が既に開発されている。いくつかの方法は、分子をタグにより標識し、適切な技術で前記タグの放出を検出することを含む。例えば、タグの放出は、測色、蛍光分析及び/又は質量分析により検出され得る。タグの放出は、生化学的プロセス、化学的活性化又は特定の波長での照射等の種々の活性化型又は刺激により引き起こされ得る。

20

【0003】

これに関して、種々の方法が、以下の結合を可能とするために開発されてきた。

- 目的の分子に結合する、特に特異的に結合する成分、
- 少なくとも1つの刺激により活性化され得る、例えば少なくとも1つの刺激により切断され得る又は反応し得る自壊トリガー成分、
- トリガー分子が適切な刺激を受けるときに媒体に放出されるタグ成分。

【0004】

2つの主の方法は、図22からわかる。第1の方法において、タグ及びトリガー成分は同一である。刺激は、トリガーを活性化すると同時にタグを放出する。第2の方法において、トリガー成分は、タグ成分と目的の分子を結合可能な成分との間に配置される。刺激によるトリガーの活性化は、トリガー分子のレベルで化合物の分裂を引き起こし、次に、タグ成分の放出を起こす。上記方法は、化合物に結合された分子を検出するために、刺激が適用された後にタグを放出及び検出することの可能性を与える。化合物、特にトリガー成分の化学的構造は、それを活性化するのに用いる刺激の型に依存する。その結果、トリガーは、刺激の一特定の型に適する。タグの放出のための種々の刺激の使用を可能とするために、トリガー成分の修飾は、全体として（トリガーのみならずリンカー及びタグ）化合物の変更を引き起こす重要な化学修飾を必要とする。

30

【0005】

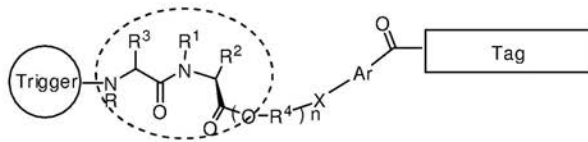
出願人は、今般、化合物の3つの成分（目的の分子を結合できる成分、トリガー及びタグ）を結合するための新規の方法を開発した。この方法において、トリガー成分は、化合物の側鎖に挿入される。当該方法は、化合物、特にタグの残部に独立してトリガー成分の性質及び/又は構造を容易に修飾する可能性を提供する。得られる化合物は、種々の刺激に容易に適合され得る。

40

【発明の概要】

【0006】

本発明の第1の対象は、以下の化学式のラベル化合物（ラベル）であり：



(I),

上記化学式中、

- タグ (Tag) 及びトリガー (Trigger) 成分は以下のように定義され、

- n は 0 又は 1 であり、

- Ar は芳香族基であり、

- R は水素原子、並びに、任意に酸素 O、窒素 N 及び硫黄 S 原子からなる群から選択される少なくとも 1 つのヘテロ原子が組み込まれ、任意にヒドロキシ基、アルコキシ基、NH<sub>2</sub> アミノ基、NO<sub>2</sub> ニトロ基、COOH カルボキシル基からなる群から選択される少なくとも 1 つの基により置換された飽和又は不飽和である直鎖又は分枝鎖アルキル基からなる群から選択され、

- R<sup>1</sup> は水素原子であり、R<sup>2</sup> は水素原子、及び任意にフェニル基で置換された C1 - C4 アルキル基からなる群から選択され、代替的に、R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は窒素原子及び炭素原子と共にそれぞれ結合して 5 員環を形成し、特に - R<sup>1</sup> - R<sup>2</sup> - は - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> - 基となり得て、

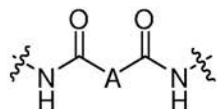
- R<sup>3</sup> は結合分子に結合可能、好ましくは共有結合可能な化学基であり、好ましくは、R<sup>3</sup> は化学式 - (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub> - CH<sub>2</sub> - FG であり、該式において m は 0、1、2 又は 3 であり、FG は結合分子の化学基と反応可能な官能基であり、

- R<sup>4</sup> は C1 - C4 アルキル基であり、

- X は酸素 O、NH 及び硫黄 S からなる群から選択される。

#### 【0007】

好ましくは、FG は、アミノ基 (NH<sub>2</sub>)、カルボキシル基 (COOH)、エステル、ハロゲン化アシル基、塩化アシル基 (COCl)、無水物基及びその活性化又は保護化誘導体等の誘導体からなる群から選択される。第 1 の実施形態において、FG はアミノ基であり、例えば N - スクシンイミジルカルバメート (NSC) に変換し、結合分子のアミノ基と反応することにより、尿素リンカーを介して結合分子に結合し得る。第 2 の実施形態において、FG は活性化エステルであり、例えば分子のアミノ基と反応することにより、アミドリリンカーを介して結合分子に結合し得る。第 3 の実施形態において、FG はカルボキシル基 (COOH)、エステル、塩化アシル基 (COCl) 等のハロゲン化アシル基又は無水物基であり、例えば N - スクシンイミジルカルボキシルエステルに変換し、分子のアミノ基と反応することにより、アルキルジアミドリリンカーを介して結合分子に結合し得る。アルキルジアミドリリンカーは、以下の化学式のリンカーであり、



上記化学式において、A はアルキル基であり、ジグザグ形に分断されている結合は、ラベル及び結合分子へのリンカーに結合する結合である。

#### 【0008】

化学的官能基の活性化誘導体は、良い脱離基である前記官能基の誘導体である。例えば、活性化エステルは、ヒドロキシスクシンイミド又はヒドロキシベンゾトリアゾールとカルボン酸との反応により生成され得る。化学的官能基の保護化誘導体は、保護基を含む前

10

20

30

40

50

記官能基の誘導体である。

【0009】

アミノ官能基の保護基は、2 - トリメチルシリルエチルカルバメート (Teoc)、1 - (1 - アダマンチル) - 1 - メチルエチルカルバメート (Adpoc)、1 - メチル - 1 - (4 - ビフェニル) エチルカルバメート (Bpoc)、tert-ブチルオキシカルボニル (Boc)、1 - (3, 5 - ジ - t - ブチルフェニル) - 1 - メチルエチルカルバメート (t-Bumeoc)、1 - アダマンチルカルバメート (Adoc)、p - メトキシベンジルカルバメート (MeOZ)、9 - アンスリルメチルカルバメート、ジフェニルメチルカルバメート、9 - フルオレニルメチルカルバメート (Fmoc)、9 - (2 - スルホ) フルオロエニルメチルカルバメート、9 - (2, 7 - ジブromo) フルオレニルメチルカルバメート、2, 7 - ジ - t - ブチル - [9 - (10, 10 - ジオキソ - 10, 10, 10, 10 - テトラヒドロチオキサチル)] メチルカルバメート (DBD-Tmoc)、2 - (N, N - ジシクロヘキシルカルボキサミド) エチルカルバメート、2 - ホスホニオエチルカルバメート (Peoc)、2 - フェニルエチルカルバメート、ベンジルカルバメート (Cbz)、アリルカルバメート (Alloc)、1 - イソプロピルアリルカルバメート (Ipaoc)、4 - ニトロシナミルカルバメート (Noc) 等のカルバメート、8 - キノリルカルバメート、アセチル (Ac) 基、ベンゾイル (Bz) 基、ベンジル (Bn) 基、p - メトキシベンジル (PMB) 基、3, 4 - ジメトキシベンジル (DMPM) 基、p - メトキシフェニル (PMP) 基、N - フタルイミド基、及びトシル (Ts) 基が挙げられ得る。

10

20

【0010】

カルボキシル官能基の保護基としては、メチルエステル、ベンジルエステル、tert-ブチルエステル、シリルエステル、オルトエステル及びオキサゾリンが挙げられ得る。

【0011】

当業者は、ラベル及び結合分子の構造に依存して、適切な官能基の活性化及び / 又は保護化誘導体を選択できる。

【0012】

構造 (I) における卵形の点線内の原子は、ジペプチド成分を生成する。

【0013】

本発明において、目的の分子 (又は標的分子) の「検出」は、その存在の検出、及び / 又はサンプル中の目的の分子の (絶対又は相対) 量の定量化を意味する。好ましくは、分子の「検出」は、サンプル中の分子の量の定量化を含む。本発明において、「刺激」は、光化学的ストレス、化学的反応、及び / 又は生化学的プロセス等のトリガーを活性化するのに適する事象を意味する。例えば、刺激は、照射又は酵素による分解であってもよい。

30

【0014】

本発明において、「アルキル」基は、1 ~ 8 つの炭素原子を含む (C1 - C8) 飽和型又は不飽和型、好ましくは飽和型の直鎖又は分枝鎖炭化水素基を意味する。好ましくは、アルキル基は、1 ~ 4 つの炭素原子を含む (C1 - C4 アルキル)。C1 - C4 アルキル基は、特にメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル又はtert-ブチル基であってもよい。特定の実施形態において、n は 1 であり、R<sup>4</sup> はエチル、プロピル及びブチル基から選択される。本発明において、アルキル基は、置換されていないことが好ましい。一実施形態において、アルキル基は、フェニル基により置換され得る。特に、アルキル基は、ベンジル基 (Bn) であってもよい。「アルコキシ」基は、酸素 O 原子を介して分子の残部に結合される上記のようなアルキル基を意味する。

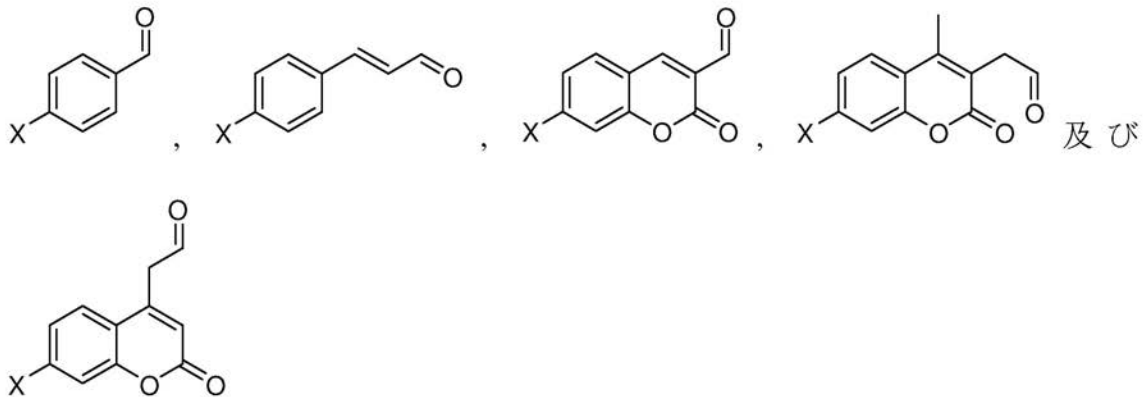
40

【0015】

「芳香族」基は、任意に酸素 O、窒素 N 又は硫黄 S 等の少なくとも 1 つのヘテロ原子、好ましくは一つの酸素原子が挿入された炭化水素の芳香環を含む炭化水素基を意味する。芳香環は、単環又は多環であってもよく、例えばフェニル、ナフタレニル、アントラセニル又はベンゾピラニル基であってもよい。Ar は、例えば 4 - ヒドロキシ安息香酸若しくは 4 - ヒドロキシけい皮酸といったフェノール誘導体、又は、例えば 7 - ヒドロキシクマ

50

リン - 3 - カルボン酸、7 - ヒドロキシ - 4 - メチル - 3 - クマリニル酢酸若しくは7 - ヒドロキシクマリニル - 4 - 酢酸といった7 - ヒドロキシクマリニル誘導体から生成され得る。従って、X - Ar - C(=O)成分は、



10

から選択され得る。

【0016】

本発明のラベルは、以下に説明するようなラベル化分子（又はコンジュゲート）を生成するために、R<sup>3</sup>成分を介して結合分子と結合、特に共有結合するのに適切なものである。一実施形態において、結合分子は、複数の、例えば2、3又はそれ以上のラベルに同時に結合する。

20

【0017】

結合分子は、分子のアミノ成分、特にリジンのアミノ側鎖を介してラベルに結合されることが好ましい。代替的に、分子は、結合分子のヒドロキシルOH又はチオールSH成分等の非アミノ成分を介してコンジュゲートに結合され得る。

【0018】

トリガー成分の側位は、その化学的構造を、好ましくはラベル構造の残部、特にタグ成分に影響を与えることなく容易に修飾できるようにし、従って、タグ成分を放出することに関する刺激を容易に変更できるようにする。

30

【0019】

本発明において、ラベルのトリガーの活性化、及びトリガーとトリガー成分がラベルの残部に結合される際に介するNR基との間の切断は、タグ - C(=O) - Ar - X - (R<sup>4</sup> - O)<sub>n</sub> - H化合物の放出で終わる、ジペプチド成分の分子内環化をジケトピペラジン内に誘導する。

【0020】

本発明の他の対象は、本発明に係るラベルの調製のためのプロセスである。

【0021】

本発明の他の対象は、本発明に係るラベルでラベル化された分子、及びそのコンジュゲートを調製する方法である。

40

【0022】

本発明の他の対象は、本発明に係るコンジュゲートを用いたサンプル中の目的の標的分子の検出方法である。

【0023】

本発明の他の対象は、少なくとも1つの本発明に係るコンジュゲートを用いた特定の症状の特定標的分子を検出することを含む、対象における該症状のリスクを測定する、該症状の素因を検出する又は該症状の存在を検出する方法である。

【0024】

本発明の他の対象は、少なくとも1つの本発明に係るラベル又はコンジュゲートの使用を含む、標的分子マップの決定のための方法である。

50

## 【 0 0 2 5 】

本発明の他の対象は、少なくとも1つの本発明に係るラベル又はコンジュゲートの使用を含む、免疫センシングアッセイにおいてサンプル中の少なくとも1つの標的分子を検出する方法である。

## 【 0 0 2 6 】

本発明の他の対象は、固体基質を含む組成物、該固体基質に結合され、少なくとも1つの標的分子に結合可能な化合物、該化合物に結合された標的分子、及び該化合物と共に該標的分子に結合する本発明のコンジュゲートである。

## 【 0 0 2 7 】

本発明の他の対象は、サンプル中における少なくとも1つの標的分子を検出するためのキットである。

10

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 2 8 】

【 図 1 】 図 1 は、化合物 5 の特徴を示す。a) は、MALDI-TOF スペクトル - MALDI-TOF マトリクスを示す： $\text{CHCA} - \text{C}_{70}\text{H}_{97}\text{N}_{19}\text{O}_{20} [\text{M}+\text{H}]^+$  計算値1524.7、測定値1524.8； $[\text{M}+\text{Na}]^+$  計算値1546.7、測定値1546.8。b) は、RP-HPLC 分析、 $\text{RT}=20.9$  min を示す。Buffer A  $\text{H}_2\text{O}-0.05\%$ TFA / Buffer B  $0.05\%$  TFA  $\text{CH}_3\text{CN}/$ 水 (4/1) カラム C18 Nucleosil 100 A  $5 \mu\text{m}$  (2.1x250 mm)、30 分で線形勾配 0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nm で検出)。

【 図 2 】 図 2 は、化合物 6 の特徴を示す。a) は、MALDI-TOF スペクトル - MALDI-TOF マトリクスを示す： $\text{CHCA} - \text{C}_{65}\text{H}_{89}\text{N}_{19}\text{O}_{18} [\text{M}+\text{H}]^+$  計算値1424.7、測定値1424.8； $[\text{M}+\text{H}-\text{O}]^+$  計算値1408.7、測定値1408.8。b) は、RP-HPLC 分析、 $\text{RT}=16.1$  min を示す。Buffer A  $\text{H}_2\text{O}-0.05\%$ TFA / Buffer B  $0.05\%$  TFA  $\text{CH}_3\text{CN}/$ 水 (4/1) カラム C18 Nucleosil 100 A  $5 \mu\text{m}$  (2.1x250 mm)、30 分で線形勾配 0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nm で検出)。

20

【 図 3 】 図 3 は、化合物 7 の特徴を示す。a) は、MALDI-TOF スペクトル - MALDI-TOF マトリクスを示す： $\text{CHCA} - \text{C}_{70}\text{H}_{92}\text{N}_{20}\text{O}_{22} [\text{M}+\text{H}-\text{NHS}]^+$  計算値1450.7、測定値1450.6。b) は、RP-HPLC 分析、 $\text{RT}=18.8$  min を示す。Buffer A  $\text{H}_2\text{O}-0.05\%$ TFA / Buffer B  $0.05\%$  TFA  $\text{CH}_3\text{CN}/$ 水 (4/1) カラム C18 Nucleosil 100 A  $5 \mu\text{m}$  (2.1x250 mm)、30 分で線形勾配 0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nm で検出)。

【 図 4 】 図 4 は、化合物 8 の特徴を示す。a) は、MALDI-TOF スペクトル - MALDI-TOF マトリクスを示す：3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシけい皮酸。b) は、RP-HPLC 分析を示し、ラベルされたリゾチーム、 $\text{RT}=16.9$  min である。Buffer A  $\text{H}_2\text{O}-0.05\%$  TFA / Buffer B  $0.05\%$  TFA  $\text{CH}_3\text{CN}/$ 水 (4/1) カラム C18 Nucleosil 100 A  $5 \mu\text{m}$  (2.1x250 mm)、30 分で線形勾配 0-100% B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nm で検出)。

30

【 図 5 】 図 5 は、化合物 8 a の特徴を示す。a) は、MALDI-TOF スペクトル - MALDI-TOF マトリクスを示す：3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシけい皮酸。b) は、RP-HPLC 分析を示し、リゾチーム  $\text{RT}=16.6$  min、ラベルされたリゾチーム  $\text{RT}=16.9$  min である。Buffer A  $\text{H}_2\text{O}-0.05\%$  TFA / Buffer B  $0.05\%$  TFA  $\text{CH}_3\text{CN}/$ 水 (4/1) カラム C18 Nucleosil 100 A  $5 \mu\text{m}$  (2.1x250 mm)、30 分で線形勾配 0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nm で検出)。

【 図 6 】 図 6 は、化合物 1 a 及び 9 の特徴を示す。a) は、物質 9 の ESI 分析を示す ( $\text{RT}=14.4$  min)  $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4 [\text{M}+\text{H}-\text{Boc}]^+$  計算値226.2、測定値226.2、 $[\text{M}+\text{Na}]^+$  計算値348.2、測定値348.3。b) は RP-HPLC 分析を示し、1 a は  $\text{RT}=11.7$  min であり、9 は  $\text{RT}=14.4$  min である。Buffer A  $\text{H}_2\text{O}-0.05\%$  TFA / Buffer B  $0.05\%$  TFA  $\text{CH}_3\text{CN}/$ 水 (4/1) カラム C18 Nucleosil 100 A  $5 \mu\text{m}$  (2.1x250 mm)、30 分で線形勾配 0-100% B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nm で検出)。c) は タグペプチド 1 a の MALDI-TOF マトリクスを示す： $\text{CHCA} - \text{C}_{44}\text{H}_{61}\text{N}_{15}\text{O}_{12} [\text{M}+\text{H}]^+$  計算値992.5、測定値992.1、 $[\text{M}+\text{Na}]^+$  計算値1014.4、測定値1013.9。d) は ペプチド 1 a の ESI 分析を示す ( $\text{RT}=11.7$  min)。  $\text{C}_{44}\text{H}_{61}\text{N}_{15}\text{O}_{12} [\text{M}+\text{H}]^+$  計算値992.5、測定値992.7。

40

【 図 7 】 図 7 は、化合物 1 a 及び 10 の特徴を示す。a) は タグペプチド 1 a の MALDI-TOF - MALDI-TOF マトリクスを示す：3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシけい皮酸。b) は、RP-HPLC 分析を示し、1 a の  $\text{RT}=11.7$  min であり、10 の  $\text{RT}=17.1$  min である。Buffer A  $\text{H}_2\text{O}-0.$

50

0.05% TFA / Buffer B 0.05% TFA CH<sub>3</sub>CN/水 (4/1)、カラム C18 Nucleosil 100 A 5 μm (2.1x250 mm)、30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210~400 nmで検出)。

【図8】図8は、化合物16aの特徴を示す。a)はMALDI-TOFスペクトル - MALDI-TOFマトリクスを示す：CHCA -C<sub>72</sub>H<sub>101</sub>N<sub>19</sub>O<sub>21</sub>[M+H]<sup>+</sup> 計算値1568.7, 測定値1568.9。b)はRP-HPLC分析、RT=19.2 minを示す。Buffer A H<sub>2</sub>O-0.05%TFA / Buffer B 0.05% TFA CH<sub>3</sub>CN/水 (4/1) カラム C18 Nucleosil 100 A 5 μm (2.1x250 mm)、30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210~400 nmで検出)。c)はESIスペクトルを示す、[M+2H]<sup>+</sup>/2計算値784.8, 測定値785.5, [M+H]<sup>+</sup> 計算値1568.7, 測定値1569.5。

【図9】図9は、化合物16bの特徴を示す。a)はMALDI-TOFスペクトル - MALDI-TOFマトリクスを示す：CHCA -C<sub>73</sub>H<sub>103</sub>N<sub>19</sub>O<sub>21</sub>[M+H]<sup>+</sup> 計算値1582.8, 測定値1582.8。b)はRP-HPLC分析、RT=19.6 minを示す。Buffer A H<sub>2</sub>O-0.05%TFA / Buffer B 0.05% TFA CH<sub>3</sub>CN/水 (4/1) カラム C18 Nucleosil 100 A 5 μm (2.1x250 mm)、30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210~400 nmで検出)。c)はESIスペクトルを示す、[M+2H]<sup>+</sup>/2計算値791.9, 測定値792.5。

【図10】図10は、化合物16cの特徴を示す。a)はMALDI-TOFスペクトル - MALDI-TOFマトリクスを示す：CHCA -C<sub>74</sub>H<sub>105</sub>N<sub>19</sub>O<sub>21</sub>[M+H]<sup>+</sup> 計算値1596.8, 測定値1596.8。b)はRP-HPLC分析、RT=20.0 minを示す。Buffer A H<sub>2</sub>O-0.05%TFA / Buffer B 0.05% TFA CH<sub>3</sub>CN/水 (4/1) カラム C18 Nucleosil 100 A 5 μm (2.1x250 mm)、30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210~400 nmで検出)。c)はESIスペクトルを示す、[M+2H]<sup>+</sup>/2計算値798.9, 測定値799.5。

【図11】図11は、化合物16dの特徴を示す。a)はMALDI-TOFスペクトル - MALDI-TOFマトリクスを示す：CHCA -C<sub>72</sub>H<sub>101</sub>N<sub>19</sub>O<sub>21</sub>[M+H]<sup>+</sup> 計算値1568.7, 測定値1568.7。b)はRP-HPLC分析、RT=19.2 minを示す。Buffer A H<sub>2</sub>O-0.05%TFA / Buffer B 0.05% TFA CH<sub>3</sub>CN/水 (4/1) カラム C18 Nucleosil 100 A 5 μm (2.1x250 mm)、30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210~400 nmで検出)。c)はESIスペクトルを示す、[M+2H]<sup>+</sup>/2計算値784.8, 測定値785.5。

【図12】図12は、化合物17の特徴を示す。a)はMALDI-TOFスペクトル - MALDI-TOFマトリクスを示す：CHCA - 計算値C<sub>67</sub>H<sub>93</sub>N<sub>19</sub>O<sub>19</sub>[M+H]<sup>+</sup> 1468.7, 測定値1468.7。b)はRP-HPLC分析、RT=14.4 minを示す。Buffer A H<sub>2</sub>O-0.05% TFA / Buffer B 0.05% TFA CH<sub>3</sub>CN/水 (4/1) カラム C18 Nucleosil 100 A 5 μm (2.1x250 mm)、30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210~400 nmで検出)。c)はESIスペクトルを示す、[M+2H]<sup>+</sup>/2計算値734.8, 測定値735.4。

【図13】図13は、化合物18の特徴を示す。a)はMALDI-TOFスペクトル - MALDI-TOFマトリクスを示す：CHCA -C<sub>68</sub>H<sub>91</sub>N<sub>19</sub>O<sub>20</sub>[M+H-NHS]<sup>+</sup> 計算値1494.7, 測定値1494.7。b)はRP-HPLC分析、RT=16.9 minを示す。Buffer A H<sub>2</sub>O-0.05%TFA / Buffer B 0.05% TFA CH<sub>3</sub>CN/水 (4/1) カラム C18 Nucleosil 100 A 5 μm (2.1x250 mm)、30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210~400 nmで検出)。c)はESIスペクトルを示す、C<sub>72</sub>H<sub>96</sub>N<sub>20</sub>O<sub>23</sub>[M+2H]<sup>+</sup>/2 計算値805.3, 測定値806.1。

【図14】図14は、化合物19の特徴を示す。a)はMALDI-TOFスペクトル - MALDI-TOFマトリクスを示す：3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシけい皮酸。b)は、RP-HPLC分析を示し、リゾチームはRT=16.6 minであり、ラベルされたリゾチームは RT=17.1 minである。Buffer A H<sub>2</sub>O-0.05% TFA / Buffer B 0.05% TFA CH<sub>3</sub>CN/水 (4/1)、カラム C18 Nucleosil 100 A 5 μm (2.1x250 mm)、30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210~400 nmで検出)。c)は19のESIスペクトルである。

【図15】図15は、化合物20の特徴を示す。a)はMALDI-TOFスペクトル - MALDI-TOFマトリクスを示す：3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシけい皮酸。b)は、RP-HPLC分析を示し、ラベルされたニュートラアビジンは 15.6 minである。Buffer A H<sub>2</sub>O-0.05% Formic Acid / Buffer B 0.05% Formic Acid CH<sub>3</sub>CN/水(4/1)、カラム C3 Zorbax 300 SB, 3.5 μm (4.6x150 mm)、50、30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210~400 nmで検出)。c)は20のESIスペクトルである。

10

20

30

40

50

【図16】図16は、化合物9a及び21aの特徴を示す。a)は21aのMALDI-TOFスペクトル - MALDI-TOFマトリクスを示す：CHCA -  $C_{46}H_{65}N_{15}O_{13}[M+H]^+$  計算値1036.5, 測定値1035.8。b)は、RP-HPLC分析を示し、21aはRT=10.3 minであり、9aはRT= 12.3 minである。Buffer A H<sub>2</sub>O-0.05% TFA / Buffer B 0.05% TFA CH<sub>3</sub>CN/水 (4/1)、カラム C18 Nucleosil 100 A 5 μm(2.1x250 mm)、30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nmで検出)。c)は9aのESIスペクトルを示し、 $C_{16}H_{27}N_3O_4 [M+Na]^+$ 計算値348.2, 測定値348.3;  $[M+H-Boc]^+$  計算値226.1, 測定値226.3である。d)は21aのESIスペクトルを示し、 $C_{46}H_{65}N_{15}O_{13}[M+H]^+$  計算値1036.5, 測定値1037.1 ;  $[M+2H]^+/2$  計算値518.7, 測定値519.2である。

【図17】図17は、化合物9a及び21bの特徴を示す。a)は21bのMALDI-TOFスペクトル - MALDI-TOFマトリクスを示す：CHCA -  $C_{47}H_{67}N_{15}O_{13}[M+H]^+$  計算値1050.5, 測定値1050.5。b)は、RP-HPLC分析を示し、21bはRT=11.0 minであり、9aはRT= 12.3 minである。Buffer A H<sub>2</sub>O-0.05% TFA / Buffer B 0.05% TFA CH<sub>3</sub>CN/水 (4/1)、カラム C18 Nucleosil 100 A 5 μm (2.1x250mm)、30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nmで検出)。c)は9aのESIスペクトルを示し、 $C_{16}H_{27}N_3O_4 [M+Na]^+$ 計算値348.2, 測定値348.3;  $[M+H-Boc]^+$  計算値226.1, 測定値226.2である。d)は21bのESIスペクトルを示し、 $C_{47}H_{67}N_{15}O_{13}[M+H]^+$  計算値1050.5, 測定値1051.0 ;  $[M+2H]^+/2$  計算値525.7, 測定値526.0である。

【図18】図18は、化合物9a及び21cの特徴を示す。a)は21cのMALDI-TOFスペクトル - MALDI-TOFマトリクスを示す：CHCA -  $C_{48}H_{69}N_{15}O_{13}[M+H]^+$  計算値1064.5, 測定値1064.4。b)は、RP-HPLC分析を示し、21cはRT=11.2 minであり、9aはRT= 12.3 minである。Buffer A H<sub>2</sub>O-0.05% TFA / Buffer B 0.05% TFA CH<sub>3</sub>CN/水 (4/1)、カラム C18 Nucleosil 100 A 5 μm(2.1x250 mm)、30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nmで検出)。c)は9aのESIスペクトルを示し、 $C_{16}H_{27}N_3O_4 [M+Na]^+$ 計算値348.2, 測定値348.3;  $[M+H-Boc]^+$  計算値226.1, 測定値226.2である。d)は21cのESIスペクトルを示し、 $C_{48}H_{69}N_{15}O_{13}[M+H]^+$  計算値1064.5, 測定値1065.0 ;  $[M+2H]^+/2$  計算値532.7, 測定値533.1である。

【図19】図19は、化合物9b及び21aの特徴を示す。a)は21aのMALDI-TOFスペクトル - MALDI-TOFマトリクスを示す：CHCA -  $C_{46}H_{65}N_{15}O_{13}[M+H]^+$  計算値1036.5, 測定値1035.8。b)は、RP-HPLC分析を示し、21aはRT=10.1 minであり、9bはRT= 12.1 minである。Buffer A H<sub>2</sub>O-0.05% TFA / Buffer B 0.05% TFA CH<sub>3</sub>CN/水 (4/1)、カラム C18 Nucleosil 100 A 5 μm(2.1x250 mm)、30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nmで検出)。c)は9bのESIスペクトルを示し、 $C_{16}H_{27}N_3O_4 [M+Na]^+$ 計算値348.2, 測定値348.3;  $[M+H-Boc]^+$  計算値226.1, 測定値226.2である。d)は21aのESIスペクトルを示し、 $C_{46}H_{65}N_{15}O_{13}[M+H]^+$  計算値1036.5, 測定値1037.0 ;  $[M+2H]^+/2$  計算値518.7, 測定値519.0である。

【図20】図20は、化合物10及び21aの特徴を示す。a)は10のMALDI-TOFスペクトル - MALDI-TOFマトリクスを示す：DHB。b)は21aのMALDI-TOFスペクトル - MALDI-TOFマトリクスを示す：CHCA -  $C_{46}H_{65}N_{15}O_{13}[M+H]^+$  計算値1036.5, 測定値1035.8。c)は、RP-HPLC分析を示し、21aはRT=10.3 minであり、10はRT= 16.0 minである。Buffer A H<sub>2</sub>O-0.05% TFA / Buffer B 0.05% TFA CH<sub>3</sub>CN/水 (4/1)、カラム C18 Nucleosil 100 A 5 μm(2.1x250 mm)、30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nmで検出)。d)は10のESIスペクトルを示す。e)は21aのESIスペクトルを示し、 $C_{46}H_{65}N_{15}O_{13}[M+H]^+$  計算値1036.5, 測定値1037.1 ;  $[M+2H]^+/2$  計算値518.7, 測定値519.2である。

【図21】図21は、化合物22及び21aの特徴を示す。a)は10のMALDI-TOFスペクトル - MALDI-TOFマトリクスを示す：DHB。b)は21aのMALDI-TOFスペクトル - MALDI-TOFマトリクスを示す：CHCA -  $C_{46}H_{65}N_{15}O_{13}[M+H]^+$  計算値1036.5, 測定値1035.8。c)は、RP-HPLC分析を示し、21aはRT=10.1 minであり、22はRT= 19.5 minである。Buffer A H<sub>2</sub>O-0.05% TFA / Buffer B 0.05% TFA CH<sub>3</sub>CN/水 (4/1)、カラム C3 Zorbax

10

20

30

40

50

300 SB, 3.5  $\mu\text{m}$ (4.6x150 mm)、50、30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210~400 nmで検出)。d)は21aのESIスペクトルを示し、 $\text{C}_{46}\text{H}_{65}\text{N}_{15}\text{O}_{13}$  [M+H]<sup>+</sup>計算値1036.5, 測定値1037.1; [M+2H]<sup>+</sup>/2 計算値518.7, 測定値519.2である。

【図22】図22は、従来の結合分子のラベル化のための方法を示す図である。

【図23】図23は、化合物5、16a、16b、16c及び16dのタグ放出速度を示すグラフである。

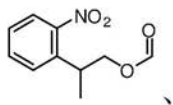
【発明を実施するための形態】

【0029】

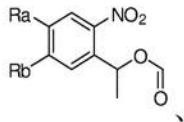
(ラベルの構成の説明)

トリガー成分は、刺激を受けた際に切断される化学基である。刺激は、例えば光化学的ストレス、化学反応(酸、塩基又は金属)、又は生化学的プロセスであってもよい。特に、トリガーは、適切な刺激が光照射の場合、光分解性成分であってもよく、本発明で用いられる光分解成分は、3'-ニトロフェニルプロピルオキシカルボニル(NPPOC)

10



及び、2-ニトロベンジル基



20

であってもよい。当該基は、保護基のC=Oの炭素原子とアミン基との間の結合を介してアミンの保護基として用いられ得る。当該保護基は、ジペプチドのN末端に導入されることが好ましい。Raは、水素原子、及びメトキシ基等のアルコキシ基からなる群から選択される。Rbは、塩素原子等のハロゲン原子、ヒドロキシ基、メトキシ基等のアルコキシ基、アミノ基(NH<sub>2</sub>)及びピペラジン、

30



からなる群から選択される。NPPOCトリガーは、約365nmの波長で光分解され得る。2-ニトロベンジルトリガーは、Ra及びRb置換基に依存して、約270~約370nmの波長で光分解され得る。刺激によるトリガー成分の活性化は、中間体、一級(RがHの場合)又は二級アミンを生じる。該アミンは、求核性であることが好ましい。該アミンは、ジケトピペラジン基に至る分子内環化、及びTag-C(=O)-Ar-X-(R<sup>4</sup>-O)<sub>n</sub>-H化合物の放出を進める。本発明において、「約」の用語は示した値の±10%の範囲を意味する。

40

【0030】

タグは、コンジュゲートからの放出後、任意に該タグを含む化合物の形態で、分析技術により同定及び/又は検出される感受性原子団である。トリガーの活性化及びジケトピペラジンの分子内環化後に放出される化合物は、好ましくはTag-C(=O)-Ar-X-(R<sup>4</sup>-O)<sub>n</sub>-Hである。

【0031】

例えば、タグは、ペプチド、蛍光及び/若しくは燐光剤でマークされた分子、脂質、タンパク質、薬剤、DNA若しくはRNA等の核酸、金属化合物、又はリガンドであってもよい。

50

## 【0032】

タグの検出又は該タグを含む化合物の検出は、例えばスキャナ、ラマン分光計、質量分析計、共焦点分析計、紫外線（UV）若しくは赤外線（IR）分光計、NMR（核磁気共鳴）分析計、液体若しくはガスクロマトグラフィ、又はキャピラリー電気泳動による技術によって果たされ得る。好ましくは、タグは質量が既知のタグである。質量が既知のタグ又はコンジュゲートから放出された該タグを含む化合物は、質量分析法、特にMALDI（マトリクス支援レーザー脱離イオン化法）若しくはESI（エレクトロスプレーイオン化）質量分析法、又は液体クロマトグラフィーにより検出され得る。

## 【0033】

特定の実施形態において、タグは、既知の質量のペプチド、特に配列番号1Gly-Arg-Aa-Phe-Arg-Gly-Aa-Glyの配列のペプチドである。Glyはグリシン（G）であり、Argはアルギニン（R）であり、Pheはフェニルアラニン（F）である。前記ペプチド成分のC末端基は一級アミドであることが好ましい。主鎖を完成させるアミノ酸Aaは、互いに独立して、アラニン（Ala、A）、セリン（Ser、S）、バリン（Val、V）、アスパラギン（Asn、N）、グルタミン（Gln、Q）、ロイシン（Leu、L）及びプロリン（Pro、P）からなる群から選択される。この配列内の3つのグリシンは、独立して、分析の際に同位体滴定が可能な例えば2,2-d<sub>2</sub>グリシンである重水素ラベル化グリシンに置換され得る。この特定の実施形態のTag-C(=O)-Ar-X-(R<sup>4</sup>-O)<sub>n</sub>-H化合物の質量は既知であり、800~3000Da、好ましくは800~1500Daである。

10

20

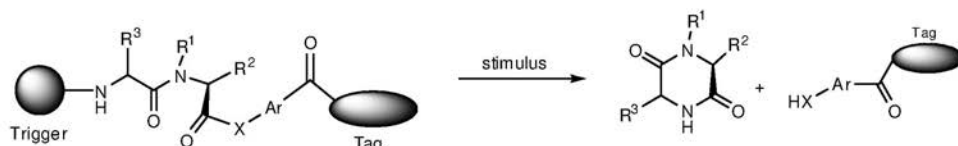
## 【0034】

ジペプチドは、第1のアミノ酸及び第2のアミノ酸の2つのアミノ酸からなる。第1のアミノ酸は、天然若しくは非天然アミノ酸、又はその誘導体であってもよい。第1のアミノ酸は、バイオ分子と結合、特に特異的結合が可能な調整可能側鎖（R<sup>3</sup>）であることが好ましい。第1のアミノ酸は、リジン（m=3）等のアミノ基（NH<sub>2</sub>）を有する側鎖を含む天然アミノ酸であることが好ましい。アスパラギン酸（Asp）又はグルタミン酸（Glu）の側鎖から生じる酸機能の変換は、バイオ分子誘導体を許容し得る。2,3-ジアミノプロピオン酸（m=0）又は2,3-ジアミノブチル酸（m=1）等の非天然アミノ酸も考えられ得る。第2のアミノ酸は、グリシン（Gly、R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H）、アラニン（Ala、R<sup>1</sup>=H、R<sup>2</sup>=Me）、バリン（Val、R<sup>1</sup>=H、R<sup>2</sup>=i-Pr）、ロイシン（Leu、R<sup>1</sup>=H、R<sup>2</sup>=i-Bu）、イソロイシン（Ile、R<sup>1</sup>=H、R<sup>2</sup>=s-Bu）又はプロリン（Pro、R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-）等の天然疎水性脂肪族アミノ酸、及びフェニルアラニン（Phe、R<sup>1</sup>=H、R<sup>2</sup>=Bn）等の芳香族アミノ酸から選択される。

30

## 【0035】

トリガー成分の切断において、ジペプチドの遊離第1又は第2のNHR末端は、Xが酸素原子の場合はエステル基等であるC(=O)X官能基と反応し、分子内環化、ジケトピペラジンの生成及びTag-C(=O)-Ar-X-(R<sup>4</sup>-O)<sub>n</sub>-H化合物の放出を引き起こす。以下のスキームは、n=0及びR=Hの場合の環化を示す。



40

## 【0036】

ジペプチドとtag-C(=O)成分との間の結合は、Xが酸素原子の場合にアリアルエステル（n=0）、Xが窒素原子の場合にアリアルアミド（n=0）、又はXが硫黄原子の場合にチオエステル（n=0）であってもよい。Arは、例えば4-ヒドロキシ安息香酸若しくは4-ヒドロキシけい皮酸といったフェノール誘導体、又は例えば7-ヒドロキシクマリン-3-カルボン酸、7-ヒドロキシ-4-メチル-3-クマリニル酢酸若し

50

くは7-ヒドロキシクマリニル-4-酢酸といった7-ヒドロキシクマリニル誘導体から生成され得る。ヒドロキシクマリニル成分は、強い離隔性を示し、MALDI及び/又はESI質量分析法においてペプチドの検出率を増大するため、本発明に特に有用である。

【0037】

ラベルが結合され得る結合分子は、 $R^3$ 、好ましくは上記のような $R^3$ に含まれるFG基を結合可能な分子である。結合分子は、好ましくは、少なくとも1つのアミノ基( $NH_2$ )を含む。結合分子は、特定の標的分子に結合するオリゴ核酸又はペプチド分子を含むアプタマーであってもよい。結合分子は、例えばモノクローナル抗体、ネイティブポリクローナル抗体及び組換え型ポリクローナル抗体等の抗体、ネイティブ抗原及び組換え型抗原等の抗原、ハプテン、特にリガンド及びレセプターといったタンパク質、糖タンパク質、膜タンパク質、ペプチド、糖類、オリゴ糖類、多糖類、ペプチドグリカン、脂質、DNA又はRNA等の核酸、オリゴヌクレオチド、アプタマー、単層を含む細胞等の細胞、並びに薬物又はホルモン等の有機化合物からなる群から選択され得る。当業者は、検出のための標的分子に結合分子を容易に適合し得る。好ましくは、結合分子は、抗体又は抗原であり、特に抗体である。

10

【0038】

本発明において、「抗体」の用語は、以下に限定されないが、(a)2つの重鎖及び2つの軽鎖を含み、抗原を認識するイムノグロブリン分子、(b)ポリクローナル又はモノクローナルイムノグロブリン分子、並びに(c)それらの一価又は二価断片を含む。イムノグロブリン分子は、以下のものに限定されないが、IgA1、分泌性IgA、IgG、IgE及びIgMを含む一般に既知の分類のいずれか由来であってもよい。IgGサブクラスは、当業者に周知であり、以下のものに限定されないが、ヒトIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4を含む。抗体は、天然起源及び非天然起源の両方あり得る。さらに、抗体は、キメラ抗体、完全合成抗体、単鎖抗体、二重特異性抗体、単鎖抗体及びそれらの断片を含む。抗体は、ヒト若しくは非ヒト抗体、又はヒト化若しくは非ヒト化抗体であってもよい。抗体断片は、以下のものに限定されないが、Fab断片、Fv断片及び他の抗原結合断片を含む。

20

【0039】

(本発明に係るラベルの調製)

本発明に係るラベルは、 $n = 0$ 又は $n = 1$ に依存して異なるプロセスによって調製され得る。

30

【0040】

$n = 0$ の場合、ラベル化合物は、以下のステップに従って調製され得る。

ステップ1：ジペプチド(化学式(I)の卵形の点線内の原子により示される)の調製、ここで、側鎖 $R^3$ の末端官能基は、該官能基がアミン成分の場合に例えばtert-ブチルオキシカルボニル(Boc)保護基で保護され得る、

ステップ2：上記のようなトリガーと上記ジペプチドの結合、

ステップ3：Tag-C(=O)-Ar-X-Hとステップ2で得られた化合物の結合、

ステップ4：ジペプチドの側鎖の官能基の任意の脱保護、

ステップ5：ジペプチド側鎖の官能基の任意の化学的活性化又は修飾

(ステップ1)

40

ステップ1は、本技術分野において周知の方法に従って2つのアミノ酸をペプチド結合することにより行われることが好ましい。より具体的に、ジペプチドは、標準的な固相合成アプローチ(Fmoc/t-butyl又はBoc/benzyl化学合成, Merrifield R.B. Science 1986 232, 341-347)により、ペプチド合成装置を用いて生成され得る。好ましくは、その結合は、結合試薬としてのジイソプロピルカルボジイミド(DIC)(特に1当量)と、活性剤としてのN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)(特に1当量)と、塩基としてのN,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)(特に2当量)とを用いて行われる。結合は、少なくとも部分的にアミノ酸で保護され、例えば末端 $NH^2$ 成分がFmoc(フルオ

50

レニルメチルオキシカルボニル)基で保護され得る。そのような場合、ステップ1は、ピペリジンによるFmocの脱保護を含み得る。

【0041】

(ステップ2)

ステップ2は、トリガー成分を含む試薬と、ステップ1で得られたジペプチドのN末端アミン基とを反応させて、ジペプチドとトリガー成分との間に結合を生成することからなる。反応は、その結合を生成するための本技術分野において周知の方法により行われ得る。好ましくは、その反応は、トリガーハロゲン化アシルと、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)とを0でジクロロメタン/ピリジン混合液中で例えば1時間、第1接触させることにより行われ、トリガー成分を含む活性化された試薬を生成する。得られた試薬は、ジクロロメタン(DCM)等の有機溶媒中で、ステップ1で得られたジペプチドの溶液に加えられることが好ましい。

10

【0042】

(ステップ3)

ステップ2で得られたトリガー-ジペプチドと、Tag-C(=O)-Ar-X-H化合物との間の結合は、本技術分野において周知の方法により行われ得る。ステップ3は、活性化剤としてのN,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)(特に1.5当量)と、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)(特に1.5当量)とを用い、塩基としてのDIEA(特に5当量)を用いて、ジメチルホルムアミド(DMF)等の有機溶媒中で行われることが好ましい。Tag-C(=O)-Ar-X-H試薬は、本技術分野において周知の方法により調製され得る。それは、以下のプロセスに従って調製されることが好ましい：タグは、例えばINTAVIS合成装置においてNovasynTGRレジンでFmoc/tert-ブチルストラテジーを用いた固相合成によって調製される。ペプチド伸長は、例えば5当量のアミノ酸、4.5当量の結合試薬O-ベンゾトリアゾール-N,N,N',N'-テトラメチル-ウロニウム-ヘキサフルオロ-リン酸塩(HBTU)、及び10当量の塩基としてのDIEAを用いて行われる。任意に固相レジんに結合したN末端のペプチド(タグ)は、7-ヒドロキシクマリン-4-酢酸等のHOOC-Ar-X-H化合物と反応する。その反応は、5当量のHOOC-Ar-X-H、5当量のHOBt、及び結合試薬としての5当量のDICの存在中で行われ得る。必要であれば、最後に、例えばトリフルオロ酢酸TFAを用いて脱保護、及び/又はレジン分離が行われる。

20

30

【0043】

(ステップ4)

ステップ4は、ジペプチドの側鎖の官能基(FG)の任意の脱保護である。ステップ4の条件は、その化合物の保護基及び構造に依存して当業者により適合される。例えば、保護された官能基がtert-ブチルオキシカルボニル(Boc)保護基を用いて保護されたアミン基である場合、ステップ4はジクロロメタン(DCM)-トリフルオロ酢酸(TFA)(1:1)混合物中で、0で2時間行われ得る。

【0044】

(ステップ5)

ステップ5は、結合分子との更なる反応を可能にする又は促進するために、ジペプチドの側鎖の官能基(FG)の化学的修飾又は活性化をすることからなる。官能基(FG)が一級又は二級アミンである場合、結合分子の尿素成分のリジンアミノ酸で生成するために後者は例えばN-ヒドロキシスクシンイミジルカルボニルに変換され得る。ステップ5は、当業者に周知の従来の化学反応を行うことにより実施され得る。

40

【0045】

n = 1の場合、ラベル化合物は、以下のステップに従って調製され得る：

ステップ1：HOOC-Ar-X-R<sup>4</sup>-OH化合物の調製、ここで、Ar、X及びR<sup>4</sup>は上記の定義通りである、

ステップ2：上記のようなトリガーとアミノ酸との結合、ここで、側鎖R<sup>3</sup>の末端官能

50

基は、例えば該官能基がアミン成分である場合に *tert*-ブチルオキシカルボニル (Boc) 保護基で保護され得る、

ステップ 3 : アミンラベル化合物である Tag - C(=O) - Ar - X - R<sup>4</sup> - O - ジペプチド - トリガーの調製、

ステップ 4 : 任意の、ジペプチド側鎖の官能基の化学的活性化又は修飾。

【0046】

本実施形態において、ステップ 3 は、以下のステップ 3' に置換され得る。ステップ 3' は以下を含む。

ステップ 3' a : Tag - C(=O) - Ar - X - R<sup>4</sup> - O - Pro の調製、ここで R<sup>4</sup> はエチル、プロピル又はブチル基であることが好ましく、Pro はプロリンである、

ステップ 3' b : ステップ 2 で得られた分子とステップ 3' で得られた Tag - C(=O) - Ar - X - R<sup>4</sup> - O - Pro との結合、及び、

ステップ 3' c : 任意のジペプチドの側鎖の官能基の脱保護。

【0047】

(ステップ 1)

ステップ 1 は、スペーサ R<sup>4</sup> で修飾された芳香族基を調製することからなり、R<sup>4</sup> は好ましくはエチル、プロピル又はブチル基である。その調製は、本技術分野において周知の適切な方法により行われ得る。好ましくは、その調製は、開始の芳香族化合物に存在するヒドロキシル基のアルキル化、例えば 7 - ヒドロキシクマリン - 4 - 酢酸のヒドロキシル基のアルキル化のステップを含み得る。

【0048】

(ステップ 2)

ステップ 2 は、アミノ酸、好ましくは保護されたアミノ酸、典型的に N - Boc - L - リジンの N 末端アミン基と、トリガー成分を含む試薬とを反応することからなる。その反応は、前記結合を生成するための本技術分野において周知の方法により行われ得る。好ましくは、その反応は、トリガーのハロゲン化アシルと N - ヒドロキシスクシンイミド (NHS) とをジクロロメタン - ピリジン混合物内で、0 で、例えば 1 時間、第 1 の接触をさせることで行われて、トリガー成分を含む活性化試薬を生成する。その後、得られた試薬は、ジクロロメタン (DCM) 等の有機溶媒中にアミノ酸を含む溶液に加えられ得ることが好ましい。

【0049】

(ステップ 3)

ステップ 3 は、Boc - プロリンの代わりに Fmoc - プロリンが用いられること以外、以下に記載のステップ 3' a と同様に行われることが好ましい。プロリンの Fmoc 塩基脱保護は、固体基質において、ピペリジン (20%) 含有 DMF を用いて行われることが好ましい。その後、ステップ 2 において得られたトリガー アミノ酸と、支持された遊離アミン化合物との間の結合は、本技術分野において周知の方法により、好ましくはジメチルホルムアミド等の有機溶媒に含まれる活性化剤としての DIC (特に 4.0 当量) 及び N - ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT) (特に 4.0 当量) を用いて、行われ得る。最後に、脱保護及びレジン分離が、例えば Tag - C(=O) - Ar - X - R<sup>4</sup> - O - ジペプチド - トリガー化合物に接近できるトリフルオロ酢酸を用いて達成され得る。

【0050】

(ステップ 4)

ステップ 4 は、結合分子との更なる反応を可能にする又は促進するために、ジペプチドの側鎖の官能基 (FG) を化学的修飾又は活性化することからなる。官能基 (FG) は、一級又は二級アミンである場合、結合分子の尿素成分のリジンアミノ酸で生成するために、後者は例えば N - ヒドロキシスクシンイミジルカルボニルに変換され得る。ステップ 4 は、当業者により周知の従来 of 化学反応を実施することにより行われ得る。

【0051】

(ステップ 3 a')

タグは、本技術分野において周知の方法により調製され得る。タグがペプチドの場合、それは、例えば I N T A V I S 合成装置又は C . E . M . 合成装置により N o v a s y n T G R レジンで F m o c / t e r t - ブチルストラテジーを用いて固相合成により調製されることが好ましい。ペプチド伸長は、例えば 5 当量のアミノ酸、4 . 5 当量の結合試薬の O - ベンゾトリアゾール - N , N , N ' , N ' - テトラメチル - ウロニウム - ヘキサフルオロ - リン酸 ( H B T U )、および 10 当量の塩基としての D I E A を用いて行われる。H O O C - A r - X - R <sup>4</sup> - O H とタグとの結合は、ペプチドタグの N 末端等のタグのアミノ成分と前記化合物との結合により行われることが好ましい。その結合は、例えば 5 当量の H O O C - A r - X - R <sup>4</sup> - O H、5 当量の H O B t、及び 5 当量の結合試薬としての D I C の存在下で行われ得る。プロリンと H O O C - A r - X - R <sup>4</sup> - O H との結合は、B o c - プロリン等のプロリンの誘導体を用いたヒドロキシル基のアシル化により行われ、そのプロリンは L 又は D 型である。前記結合は、例えば 8 当量の B o c - プロリン、4 当量の結合試薬である D I C、及び触媒量の D M A P を用いて行われ得る。必要であれば、脱保護及びレジン分離が、例えばトリフルオロ酢酸 ( T F A ) を用いて行われ得る。

10

20

30

40

50

## 【0052】

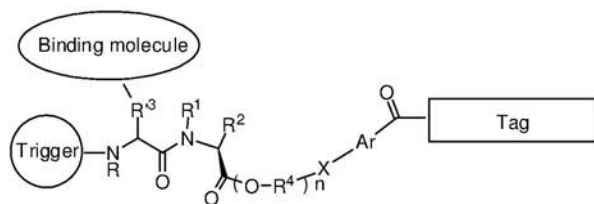
(ステップ 3' b 及び 3' c)

ステップ 2 で得られたトリガー アミノ酸と、ステップ 3' a で得られた T a g - C ( = O ) - A r - X - R <sup>4</sup> - O - P r o との間での結合は、本技術分野において周知の方法により行われ得る。ステップ 3' b は、活性化剤としての E D C ( 特に 1 . 3 当量 ) 及び N ヒドロキシベンゾトリアゾール ( H O B t ) ( 特に 1 . 3 当量 ) を用い、ジメチルホルムアミド ジクロロメタン ( D M F - D C M ) 等の有機溶媒混合液に含まれた塩基としての D I E A ( 特に 4 当量 ) を用いて行われることが好ましい。必要であれば、最終の脱保護 ( ステップ 3' c ) 及び / 又はレジン分離は、例えばトリフルオロ酢酸 ( T F A ) を用いて行われる。

## 【0053】

(コンジュゲート)

本発明の他の対象は、本発明に係るラベルに結合された分子であり、コンジュゲートとも呼ばれる。該コンジュゲートは、特に化学式 ( I I ) で示される：



(II),

T a g ( タグ )、T r i g e r ( トリガー )、B i n d i n g m o l e c u l e ( 結合分子 )、R、R <sup>1</sup>、R <sup>2</sup>、R <sup>4</sup>、X 及び n は上述の通りであり、R ' <sup>3</sup> は、ラベルの R ' <sup>3</sup> 基と結合分子との反応から得られる化学基である。特に R ' <sup>3</sup> は、式 - ( C H <sub>2</sub> ) <sub>m</sub> - C H <sub>2</sub> - F G ' であり、F G ' はラベルの F G 基と結合分子との反応から得られた化学基である。R ' <sup>3</sup> は、結合分子と結合するような、尿素、アミド又はアルキルジアミド基を含むことが好ましい。特に R ' <sup>3</sup> は、尿素基を含む。特に F G ' は尿素、アミド又はアルキルアミド基、好ましくは尿素基である。

## 【0054】

本発明の他の対象は、本発明に係るコンジュゲートを調製する方法である。

## 【0055】

本発明のコンジュゲートを調製する方法は、上記のような結合分子と少なくとも 1 つの本発明のラベルとを接触することを含む。一実施形態において、本発明のコンジュゲートを調製する方法は、結合分子を含むサンプル、特に結合分子を含む生物学的サンプルと本

発明の少なくとも1つのラベルとを接触することを含む。

【0056】

ラベルと結合分子とを接触させることは、好ましくは約0 ~ 約10、より好ましくは約2 ~ 約5、特に約4で行われる。コンジュゲートを調製する方法は、好ましくは、コンジュゲートの精製の追加ステップを含む。その精製は、好ましくは約0 ~ 約10、より好ましくは約2 ~ 約5、特に約4で行われる。

【0057】

(適用)

本発明のコンジュゲートは、サンプル、特に生物学的サンプル中で該コンジュゲートに結合する標的分子の検出に特に有用である。

10

【0058】

標的分子は、目的の分子である。それは、実施される試験条件でコンジュゲートと標的分子とを結合、好ましくは特異的結合させる化学的構造を示し得る。標的分子は、例えば薬剤、モノクローナル抗体、ネイティブポリクローナル抗体及び組換え型ポリクローナル抗体等の抗体、ネイティブ抗原及び組換え型抗原等の抗原、ハプテン、特にリガンド及びレセプターといったタンパク質、糖タンパク質、膜タンパク質、ペプチド、糖類、オリゴ糖類、多糖類、ペプチドグリカン、脂質、DNA又はRNA等の核酸、オリゴヌクレオチド、アプタマー、単層を含む細胞等の細胞、並びに薬物又はホルモン等の有機化合物からなる群から選択され得る。好ましくは、標的分子は、抗体、タンパク質又は抗原であり、特にタンパク質又は抗体である。標的分子は、好ましくは、本発明のコンジュゲートと結合又は相互作用、特に特異的結合又は特異的相互作用をする。特に、標的分子は、コンジュゲートの結合分子と結合する。

20

【0059】

一実施形態において、生物学的サンプル中に存在する因子である標的分子は、症状のリスク、素因又は存在を示す。

【0060】

本発明の対象は、サンプル、好ましくは生物学的サンプル中における少なくとも1つの標的分子を検出する方法であり、以下のステップを含む：

- (a) 本発明の少なくとも1つのコンジュゲートとサンプルとを接触する、
  - (b) 前記サンプルから非結合性コンジュゲートを除去する、
  - (c) 少なくとも1つの適切な刺激をステップ(b)後に得られたサンプルに与えてコンジュゲートを活性化する、
  - (d) 適切な分析技術、好ましくはMALDI質量分析法により、Tag - C(=O) - Ar - X - (R<sup>4</sup> - O)<sub>n</sub> - H化合物の放出を検出する、
- ここで、Tag - C(=O) - Ar - X - (R<sup>4</sup> - O)<sub>n</sub> - H化合物の存在は、サンプル中における対応する標的分子の存在を示す。

30

【0061】

少なくとも1つの標的分子を検出する方法は、ステップ(a)前に、上記のコンジュゲートを調製するステップ(a')を含み得る。

【0062】

一実施形態において、少なくとも1つの標的分子を検出する方法は、本発明の少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、より好ましくは5 ~ 25の、好ましくはTag - C(=O) - Ar - X - (R<sup>4</sup> - O)<sub>n</sub>成分を含むコンジュゲートの使用を含み、サンプル中における少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、より好ましくは5 ~ 25の標的分子を検出する。一実施形態において、本発明の、好ましくは種々の好ましくは、Tag - C(=O) - Ar - X - (R<sup>4</sup> - O)<sub>n</sub>成分を含むコンジュゲートの数は、サンプル中における検出するための標的分子の数と同一である。

40

【0063】

種々のトリガーを含む複数のコンジュゲートが用いられる場合、適切な刺激による種々のコンジュゲートの活性化は、同時及び/又は連続的になされ得る。ステップ(c)又は

50

少なくとも1つのコンジュゲートの活性化、及びステップ(d)は、同時に行われ得る。例えば、Tag-C(=O)-Ar-X-(R<sup>4</sup>-O)<sub>n</sub>-H化合物の放出を検出するのに用いられる分析技術がLASERMALDIである場合、MALDIのLASER照射が少なくとも1つのコンジュゲートを活性化するために適切な刺激となり得る。

【0064】

好ましくは、サンプル中におけるTag-C(=O)-Ar-X-(R<sup>4</sup>-O)<sub>n</sub>-H化合物の存在は、MALDI若しくはESI質量分析法当の質量分析法、又は液体クロマトグラフィーにより検出され得る。マトリクス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)質量分析法は、生物学的研究の分野で強力なツールとなっており、複合混合物から核酸、ペプチド及びタンパク質を検出、同定及び特徴付けするのに用いられる。

10

【0065】

一実施形態において、トリガーは、NPPOC基であり、照射波長は約365nmである。他の実施形態において、トリガーは、ニトロベンジル基であり、照射波長は約270nm~370nmである。

【0066】

好ましい実施形態において、サンプル中における少なくとも1つの標的分子を検出する方法は、7~9、好ましくは約8のpHで行われる。

【0067】

生物学的サンプル及び/又は本発明のコンジュゲートにおける少なくとも1つの標的分子を検出する方法は、医療診断及び/又は臨床生物学において用いられ得る。本発明において、生物学的サンプルは、血液、血漿、血清、唾液、尿等の生物学的流体、生物学的組織若しくはそれらの一部、又は細胞を意味する。有利には、本発明の検出方法は、組織切片に直接に適用され得る。適用分野は、遺伝子検査、生物化学、免疫化学、感染免疫学、微生物学及び血液学が挙げられ得る。例えば、本発明は、種々の生物学的サンプル中における薬物等の目的の分子の分布及び/又は薬物動態の研究に用いられ得る。

20

【0068】

本発明の他の対象は、本発明に係る少なくとも1つのコンジュゲートを用いて症状特異的標的分子を検出することを含む、対象における特定の症状のリスクの測定、又は素因若しくは存在の検出の方法である。特に、症状特異的標的分子の検出は、上記生物学的サンプル中における少なくとも1つの標的分子を検出する方法を用いて行われ得る。症状の例は、癌、自己免疫疾患、先天性甲状腺機能低下症、心臓疾患、リン酸カルシウム代謝疾患、細菌性疾患及び新生児疾患である。癌は、特に神経膠芽腫、(前骨髄球)白血病、前立腺癌、卵巣癌、肺癌、乳癌、特に肝臓といった消化器癌、膵臓癌、頭部及び頸部癌、結腸癌、膀胱癌、非ホジキンリンパ腫、及び黒色腫が挙げられ得る。

30

【0069】

上記標的分子を検出する方法は、組織切片における少なくとも1つの標的分子マップ(すなわち分布)の決定、及び/又は複合免疫センシングアッセイでのサンプル中における少なくとも1つの標的分子の検出のために適用され得る。

【0070】

(標的分子マップの決定)

本発明のコンジュゲートは、好ましくは組織切片、例えばWO 2007/000669又はLemair e et al. J. Prot.Res. 2007, 6, 2057に記載されるようなサンプル、好ましくは切片組織における少なくとも1つの標的分子マップの決定の方法に用いられ得る。

40

【0071】

好ましくは、標的分子マップの決定の方法は、光分解性成分を含む少なくとも1つのコンジュゲートの使用を含み、好ましくは該方法に含まれるすべてのコンジュゲートは光分解性トリガー成分を含む。

【0072】

本発明において、「組織切片」は、以下の特性を有することが好ましい：それは、凍結又はパラフィン包埋であってもよく、その厚さは哺乳動物細胞の径のオーダーであること

50

が好ましく、従って5～20 μmである。クライオスタットを用いて凍結組織から得られた凍結切片の場合、好ましくはOCT（最適切削温度ポリマー）が組織の固定にのみ用いられるが、凍結組織はOCTで包埋はされず、組織切片はOCTと接触されない。組織切片は、金属、金、鉄、ガラス、繊維、ガラス、ナイロン6/6、シリコン、プラスチック、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリビニリデンジフルオリド、又はニッケル若しくはITO（酸化インジウムスズ）等の透明特性を維持する導電性金属でコーティングされたガラス断片等の無機若しくは有機材料を含む更なるMALDI分析に適する材料で構成されたMALDIプレートに移され得る。

#### 【0073】

一実施形態において、本発明に係る組織切片における標的分子マップの決定方法は、以下のステップを含む：

(a) 標的分子の結合に適する本発明に係る少なくとも1つのコンジュゲートと組織切片をハイブリダイズする、

(b) マトリクスをスプレーする、

(c) MALDI質量分析法を用いて、組織切片表面をスキャンする、ここで、MALDIレーザーは、Tag-C(=O)-Ar-X-(R<sup>4</sup>-O)<sub>n</sub>-H化合物を放出する、及びサンプルのイオン化を誘導するのに用いられることが好ましく、得られた結果が保存される、

(d) それぞれ別個のTag-C(=O)-Ar-X-(R<sup>4</sup>-O)<sub>n</sub>-H化合物の分子質量ウィンドウ中で得られたデータを分析して、別個の対象標的分子の数と同一の組織切片のマップを生成する。

#### 【0074】

本発明において、「少なくとも1つのコンジュゲートと組織切片とのハイブリダイズ」は、組織切片とコンジュゲートとが、コンジュゲートが組織切片内の標的分子に特異的に結合可能な条件で接触される反応を意味する。コンジュゲート及び標的分子の性質に依存して、周知のハイブリダイゼーションのプロトコールが当業者に利用され得る。「マトリクス」は、分析物と混合された場合、レーザー照射によって良好に脱離され、固相結晶から気体又は蒸気相へイオン化され、及び分子イオンに促進させる結晶性マトリクス包埋分析物分子を生成する材料を意味する。一般に用いられるMALDI-MSのマトリクスは、通常、小さく、レーザー波長を吸収する酸性化学物質であり、ニコチン酸、けい皮酸、2,5-ジヒドロキシ安息香酸(2,5-DHB)、-シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸(CHCA)、3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシけい皮酸(シナピン酸又はSA)、3-メトキシ-4-ヒドロキシけい皮酸(フェルラ酸)、3,4-ジヒドロキシけい皮酸(コーヒー酸)、2-(4-ヒドロキシフェニラゾ)安息香酸(HABA)、3-ヒドロキシピコリン酸(HPA)、2,4,6-トリヒドロキシアセトフェノン(THAP)及び2-アミノ-4-メチル-5-ニトロピリジンを含む。これらのマトリクスの調製のためのプロトコールは、本技術分野において周知であり、これらのマトリクスのほとんどは商業的に入手可能である。ペプチド/タンパク質分析に一般に用いられるマトリクスは、-シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸(CHCA)、2,5-ジヒドロキシ安息香酸(2,5-DHB)及びシナピン酸(SA)を含む。DNPHは2,4-ジニトロフェニルヒドラジンであり、アルデヒド及びケトンの検出に用いられる。

#### 【0075】

(複合免疫センシングアッセイ)

本発明のコンジュゲートは、例えばWO 2007/062105に記載されるような免疫センシングアッセイにおいて、サンプル中における少なくとも1つの標的分子を検出するための方法に用いられ得る。

#### 【0076】

本発明の対象は、本発明に係る少なくとも1つのラベル又はコンジュゲートの使用を含む、免疫センシングアッセイにおいてサンプル中における少なくとも1つの標的分子を検出する方法である。

10

20

30

40

50

## 【0077】

免疫センシングアッセイは、間接、直接（サンドイッチ）又は競合免疫センシングアッセイであってもよい。例えば、本発明の少なくとも1つの標的分子を検出する方法は、好ましくはTSHに対するモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ直接免疫センシングアッセイ、及びT4の競合法を介して、TSH（チロイド刺激ホルモン）及びT4（チロキシンT4）ホルモンの投与に用いられ得る。増大したTSH及び減少したT4は、先天性甲状腺機能低下症の明確な指標である。

## 【0078】

第1の実施形態において、免疫センシングアッセイでサンプル中の少なくとも1つの標的分子を検出する方法は、以下のステップを含む：

10

(a) サンプルと、少なくとも1つの標的分子に結合可能な少なくとも1つの化合物が付けられた固体基質とを接触する、ここで、当該接触は、サンプルに標的分子が存在するならば、該標的分子と化合物とが結合できる条件下で行われる、

(b) 固体基質から非結合性サンプルを除去する、

(c) 本発明の少なくとも1つのコンジュゲートと、ステップ(a)で得られた固体基質とを接触する、ここで、当該接触は、固体基質に標的分子が存在するならば、該標的分子とコンジュゲートとが結合できる条件下で行われる、

(d) 非結合性コンジュゲートを除去する、

20

(e) ステップ(c)で得られたサンプルに適切な複数の(単数の)刺激を与えて、コンジュゲートを活性化する、及び、

(f) 適切な分析技術、好ましくはMALDI質量分析法によりTag-C(=O)-Ar-X-(R<sup>4</sup>-O)<sub>n</sub>-H化合物の放出を検出する、ここで、Tag-C(=O)-Ar-X-(R<sup>4</sup>-O)<sub>n</sub>-H化合物の存在は、サンプル中における対応する標的分子の存在を示す。

## 【0079】

他の実施形態において、各標的分子に対して、

ステップ(a)の固体基質に付けられた標的分子に結合可能な少なくとも1つの化合物、及び、

30

標的分子に結合可能な化合物と共に標的分子に結合する少なくとも1つのコンジュゲートがあり、

少なくとも1つのコンジュゲートのタグは、他の標的分子に結合するコンジュゲートのタグとは異なる検出信号、特に異なる質量を有する。

## 【0080】

本発明において、異なる検出信号を有するということは、好ましくは適切な検出及び/又は分析技術を用いた場合に検出信号が区別可能であるように十分に異なることを意味する。

## 【0081】

第3の実施形態において、免疫センシングアッセイでサンプル中における少なくとも1つの標的分子を検出する方法は、以下のステップを含む：

40

(a) 標的分子に結合する固体基質とサンプルとを接触させる、ここで、当該接触は、サンプル中に標的分子が存在するならば、該標的分子とその固体基質とが結合できる条件下で行われる、

(b) 固体基質から非結合性サンプルを除去する、

(c) ステップ(a)で得られた固体基質と、当該固体基質と共に標的分子に結合する本発明の少なくとも1つのコンジュゲートとを接触させる、ここで、当該接触は、固体基質に標的分子が存在するならば、該標的分子にコンジュゲートが結合できる条件下で行われる、

(d) 非結合性コンジュゲートを除去する、

(e) ステップ(d)で得られたサンプルに適切な複数(単数)の刺激を与えて、コンジュゲートを活性化する、

50

(f) 適切な分析技術、好ましくはMALDI質量分析法によりTag-C(=O)-Ar-X-(R<sup>4</sup>-O)<sub>n</sub>-H化合物の放出を検出する、ここで、Tag-C(=O)-Ar-X-(R<sup>4</sup>-O)<sub>n</sub>-H化合物の存在は、サンプル中における対応する標的分子の存在を示す。

【0082】

第4の実施形態において、ステップ(a)の固体基質は複数の標的分子に結合し、各標的分子に対して、固体基質と共に標的分子のいずれかに結合する少なくとも1つのコンジュゲートがあり、少なくとも1つのコンジュゲートのタグは、他の標的分子に結合するコンジュゲートのタグとは異なる検出信号、特に異なる質量を有する。

【0083】

本発明の対象は、以下を含む組成物である：

- (a) 固体基質、
- (b) 少なくとも1つの標的分子と結合可能な、前記固体基質に結合された化合物、
- (c) 前記化合物に結合された標的分子、及び、
- (d) 前記化合物と共に標的分子に結合する本発明のコンジュゲート、ここで、該コンジュゲートは標的分子に結合される。

【0084】

本発明において、「固体基質」は、少なくとも1つの標的分子と結合可能な化合物が付けられ得る固相に存在する適切な媒体を意味する。一実施形態において、固体基質は、ガラス、石英、シリコン、プラスチック又は金である。他の実施形態において、固体基質は、少なくとも1つのアガロースゲル又はポリスチレン等の不溶性ポリマーを含む、好ましくは不溶性ポリマーからなる。固体基質は、例えばビーズ、チップ又はウェルの形態であってもよい。「少なくとも1つの標的分子と結合可能な化合物」は、該標的分子に特異的に結合可能、好ましくは共有結合可能な化合物である。該化合物は、好ましくは抗原又は抗体であり、特に抗原である。該化合物は、例えばストレプトアビジン ビオチン結合又は1,3-双極子環状付加を介して固体基質に付けられ得る。

【0085】

本発明の対象は、サンプル中における標的分子を検出するためのキットであり、以下を含むキットである：

- (a) 固体基質、
- (b) 該固体基質に付けるための標的分子に結合可能な化合物、
- (c) 該化合物と共に標的分子に結合する本発明のコンジュゲート、及び、
- (d) サンプル中における標的分子を検出するためにキットを使用するための説明書。

【0086】

本発明の対象は、サンプル中における標的分子を検出するためのキットであり、以下を含むキットである：

- (a) 標的分子に結合可能な化合物が付けられた固体基質、
- (b) 標的分子に結合する本発明のコンジュゲート、及び、
- (c) サンプル中における標的分子を検出するためにキットを使用するための説明書。

【0087】

本発明の対象は、サンプル中における標的分子を検出するためのキットであり、以下を含むキットである：

- (a) 標的分子に結合する固体基質、
- (b) 標的分子に結合する本発明のコンジュゲート、及び、
- (c) サンプル中における標的分子を検出するためにキットを使用するための説明書。

【0088】

本発明の対象は、サンプル中における少なくとも1つの標的分子を検出するためのキットであり、以下を含むキットである：

- (a) 固体基質、
- (b) 該固体基質に付けるための標的分子に結合可能な複数の化合物、ここで、各標的分子

10

20

30

40

50

子に対して、該標的分子と結合可能な少なくとも1つの化合物がある、

(c) 本発明の複数のコンジュゲート、ここで、各標的分子に対して、前記化合物と共に標的分子と結合する少なくとも1つの化合物があり、各コンジュゲートのタグは、他の標的分子と結合するコンジュゲートのタグとは異なる検出信号、特に異なる質量を有する、及び、

(d) サンプル中における少なくとも1つの標的分子を検出するためにキットを使用するための説明書。

【0089】

本発明の対象は、サンプル中における少なくとも1つの標的分子を検出するためのキットであり、以下を含むキットである：

(a) 標的分子と結合可能な複数の化合物が取り付けられた固体基質、ここで、各標的分子に対して、該標的分子と結合可能な少なくとも1つの化合物がある、

(b) 本発明の複数のコンジュゲート、ここで、各標的分子に対して、前記化合物と共に該標的分子のいずれかと結合する少なくとも1つのコンジュゲートがあり、各コンジュゲートのタグは、他の標的分子と結合するコンジュゲートのタグとは異なる検出信号、特に異なる質量を有する、及び、

(c) サンプル中における少なくとも1つの標的分子を検出するためにキットを使用するための説明書。

【0090】

本発明の最後の対象は、サンプル中における少なくとも1つの標的分子を検出するためのキットであり、以下を含むキットである：

(a) 各標的分子に結合する固体基質、

(b) 本発明の複数のコンジュゲート、ここで、各標的分子に対して、該標的分子のいずれかと結合する少なくとも1つのコンジュゲートがあり、各コンジュゲートのタグは、他の標的分子と結合するコンジュゲートのタグとは異なる検出信号、特に異なる質量を有する、及び、

(c) サンプル中における少なくとも1つの標的分子を検出するためにキットを使用するための説明書。

【0091】

以下の実施例は、単に本発明の説明のためのものであり、本発明を限定するものではない。

【実施例】

【0092】

・ n = 0 の場合

(実施例1：本発明に係るコンジュゲートの調製)

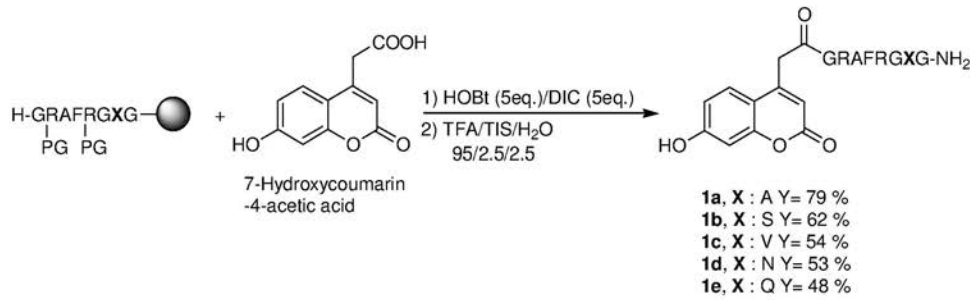
固相合成は、INTAVIS合成装置によりNovasynTGRレジンでFmoc/tert-ブチルストラテジーを用いて達成された。ペプチド伸長は、5当量のアミノ酸、4.5当量の結合試薬O-ベンゾトリアゾール-N,N,N',N'-テトラメチル-ウロニウム-ヘキサフルオロ-リン酸(HBTU)、及び10当量の塩基としてのDIEAを用いて行った。ペプチドレジンのN末端は、7-ヒドロキシクマリン-4-酢酸(5当量)と、結合試薬としてのヒドロキシベンゾトリアゾール(5当量)及びジイソプロピルカルボジイミド(5当量)と反応する。最後の脱保護及びレジン分離は、トリフルオロ酢酸(TFA)により行われ、タグペプチド(1a~e)は、48~79%の収率で精製された後に得られる(ステップ1)。そのプロセスの全ての化合物は、0.05% TFAを含む線形勾配水/アセトニトリルを用いたNucleosil C18カラムでの逆相液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)により精製された。化合物の純度は、RP-HPLCにより95%を超える値が測定された。全ての合成構造は、MALDI-TOF質量分析法により確認された。ペプチド1aのNMR分析も行われた(PG = 保護基)。

10

20

30

40

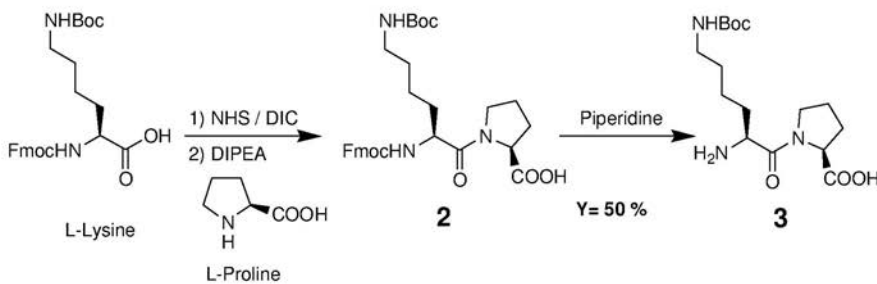


10

## 【 0 0 9 3 】

## (ステップ 1)

N - Fmoc - N - Boc - L - リジン ( L y s ) は、結合試薬としての D I C ( 1 当量 )、活性化剤としての N H S ( 1 当量 ) 及び塩基としての D I E A ( 2 当量 ) を用いて、L - プロリン ( P r o ) に結合される。ジペプチドの 2 である Fmoc L y s ( B o c ) P r o は、次のステップのために更なる精製をすることなく用いられる。ピペリジンを用いた Fmoc 脱保護で、2 つのステップでの精製後に 5 0 % の収率でジペプチド L y s ( B o c ) P r o である 3 が得られる。



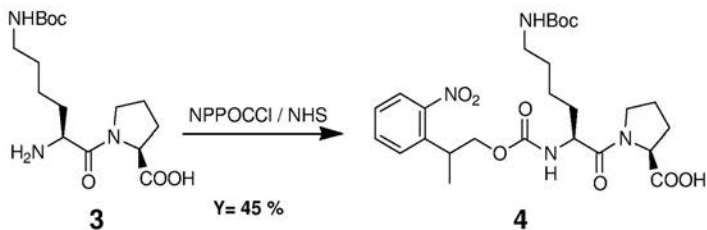
20

## 【 0 0 9 4 】

## (ステップ 2)

次のステップは、2 - ( ニトロフェニル ) プロピルオキシカルボニル基でジペプチド L y s ( B o c ) P r o である 3 の N 末端アミン基を保護することからなる。まず、2 - ( ニトロフェニル ) プロピルオキシカルボニル塩化物 ( N P P O C ) は、ジクロロメタン - ピリジン混合物中において 0 で 1 時間、N H S と反応する。対応する N P P O C - O S u は、ジクロロメタン ( D C M ) に含まれるジペプチド L y s ( B o c ) P r o である 3 の溶液に 1 滴ずつ加えられ、室温で 1 8 時間攪拌される。予備的 R P - H P L C 精製の後、ジペプチド N P P O C L y s ( B o c ) P r o である 4 が 4 5 % の収率で単離される。

30



40

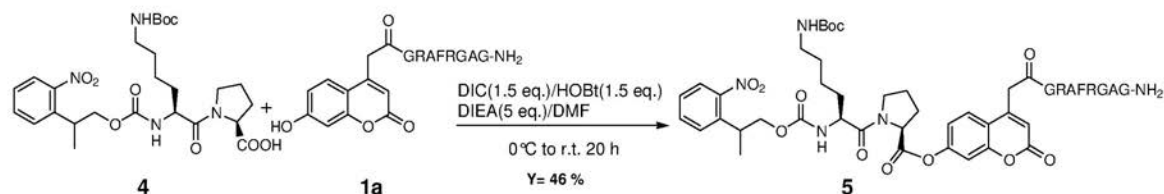
## 【 0 0 9 5 】

## (ステップ 3)

N P P O C L y s ( B o c ) P r o である 4 と、タグペプチドである 1 a との間の結合は、活性化剤としての D I C ( 1 . 5 当量 ) 及び H O B t ( 1 . 5 当量 ) と塩基としての D I E A ( 5 当量 ) を用いて、ジメチルホルムアミド ( D M F ) 内で 2 0 時間行われる。

50

エステルである 5 は、46% の収率で精製後に単離された。



【0096】

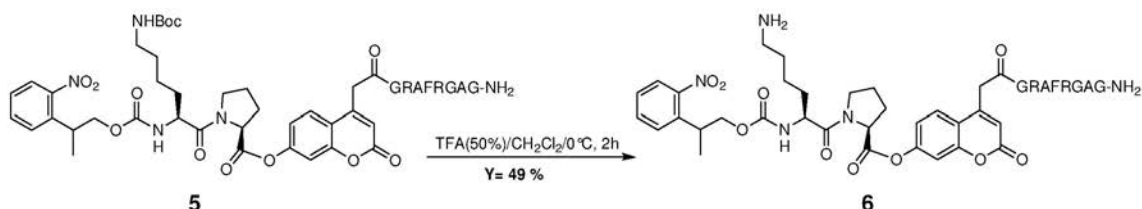
5 は、MALDI-TOF 及び RP-HPLC により特徴付けられ、その結果を図 1 に示す。

10

【0097】

(ステップ 4)

ジペプチドエステルである 5 の tert-ブチルオキシカルボニル Boc 保護基の除去は、ジクロロメタン (DCM) とトリフルオロ酢酸 (TFA) の混合液 (1 : 1) 内において 0°C で 2 時間行われる。精製により 49% の収率でジペプチドアミンエステルである 6 が得られる。光分解性の副反応を防止するために、N-末端において保護基の NPPOC を生じる化合物との全ての反応は、暗所で行われる。



20

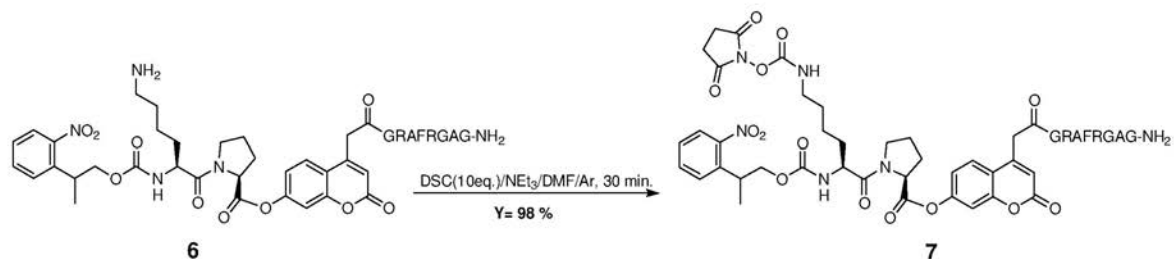
【0098】

6 は、MALDI-TOF 及び RP-HPLC により特徴付けられ、その結果を図 2 に示す。

【0099】

(ステップ 5)

アミンエステルジペプチドである 6 は、室温の暗所で 30 分間、DMF 内でジ (N-スクシンイミジル) カルボネート (DSC) (10 当量) 及び触媒量のトリエチルアミン (0.5 当量) と反応する。N-ヒドロキシスクシンイミジルカルボニルジペプチドである 7 は、精製後に 98% の収率で単離される。



40

【0100】

7 は、MALDI-TOF 及び RP-HPLC により特徴付けられ、その結果を図 3 に示す。

【0101】

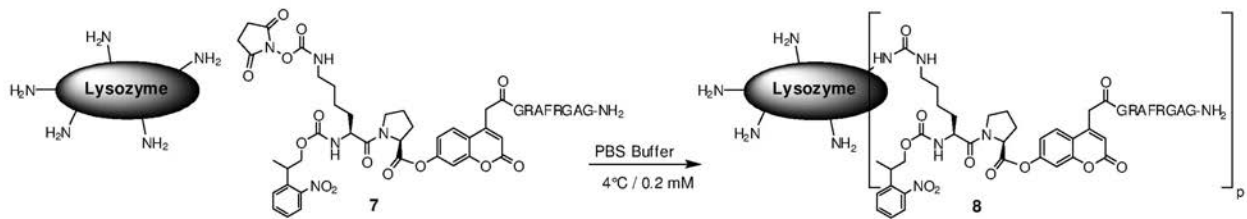
イソシアネート形態が現れる MALDI-TOF 質量分析法での化合物 7 の分析は、NSC 形態と比較してまさっていた。

【0102】

50

## (実施例2：本発明に係るバイオ分子ラベリング)

光分解性タグペプチドNSCである7を用いたラベリングに関する概念実証の方法を確認するために、リゾチームが結合分子として選択された。リゾチームは、14.3 kDaの分子量を有する129のアミノ酸で構成された球状タンパク質であり、7つの一級アミノ基、より正確には6つのリジン及びN末端アミノ基を有する。光分解性タグペプチドNSCである7によるリゾチームのラベリングは、Mhidia et al. Bioconjugate Chem.2010, 21, 219-228に記載されたプロトコールに従って調べられた。pH 7.4のPBSバッファを溶媒とする0.2 mMリゾチーム溶液は、暗所において4 で、光分解性タグペプチドNSCである7が加えられた。RP-HPLC動態分析は、2時間後にさらなる変換が無いことを示した。反応媒体分析は、80%のリゾチームが1つ又は複数の光分解性タグペプチドである7によりラベル化されたことを示した。それにもかかわらず、クロマトグラムは、まず、全てではないNSCである7の化合物が消費され(RT = 18.8 minでピーク)、第2に、アミンエステルジペプチドである6を生じる加水分解副反応(RT = 16.1 minでピーク)が起きたことを示した。MALDI-TOF質量分析法は、それらの結果を確認した。実際に、わずかに少ない量のリゾチームが検出された、 $[M+H]^+$  14296 Da。主要な生成物は、ラベル8 (p = 1) でラベルされたリゾチームであり、 $[M+H]^+$ 質量15760 Daで特徴付けられる。リゾチームは、 $[M+H]^+$ 質量17213 Daで定義される2つのラベル7 (p = 2)、及び $[M+H]^+$ 質量18662 Daで同定される3つのラベル7 (p = 3) を用いてラベル化されている。



## 【0103】

少量の加水分解されたアミンエステルジペプチドである6及び未反応の光分解性タグペプチドNSCである7を除去するために、ラベル化されたリゾチームが、Vivaspinカートリッジ(カットオフ10000)で、4 で4時間の遠心分離下で(RCF = 3000)、リン酸バッファを用いて3度洗浄することにより精製される。

## 【0104】

8は、MALDI-TOF及びRP-HPLCにより特徴付けられ、その結果を図4に示す。

## 【0105】

同一の反応は、光分解性タグペプチドNSCである7の1当量のみを用いて達成され、得られた生成物は8aである。速度決定で現れた全ての化合物7が30分後に消費され、40%のリゾチームがラベルされた。MALDI-TOF質量分析は、リゾチームが、 $[M+H]^+$ 質量15742 Daにより特徴付けられた1つの光分解性タグペプチド(p = 1)により部分的にラベル化されていることを示した。

## 【0106】

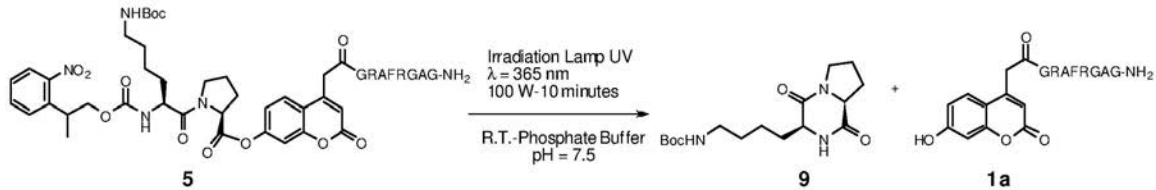
## (実施例3：化合物5の光分解及びタグ1aの放出)

光解離性NPPOC保護基は、100ワットのUVランプ( = 365 nm)を用いて室温で10分間、リン酸バッファを溶媒とするタグペプチドエステル5の1 mM溶液を照射することにより分離された。RP-HPLC分析は、照射曝露が開始物質であるNPPOCタグペプチドエステル5の完全な消失(RT = 20.9 min、ステップ4)、並びにRT = 11.7 min及びRT = 14.4 minの保持時間を有する2つの主要な生成物の出現を引き起こすことを証明した。エレクトロスプレーイオン化(ESI)による質量分析法は、 $[M+Na]^+$ 質量348.3を有するジケトピペラジンである9に対応するRT =

14.4 minを有する生成物を確認した。ESI及びMALDI-TOF分析は、RT = 11.7 minにより特徴付けられた生成物がタグペプチド1aであることも確認した。

【0107】

本発明の概念実証、すなわちタグペプチド5の光解離性保護基NPPOCのUV照射による分離を確認した以下の光分解ステップは、対応する一級アミンを生成し、それはジケトピペラジン9及び上記タグペプチド1aの全ての放出を引き起こす分子内環化反応を直ぐに誘導する。



10

【0108】

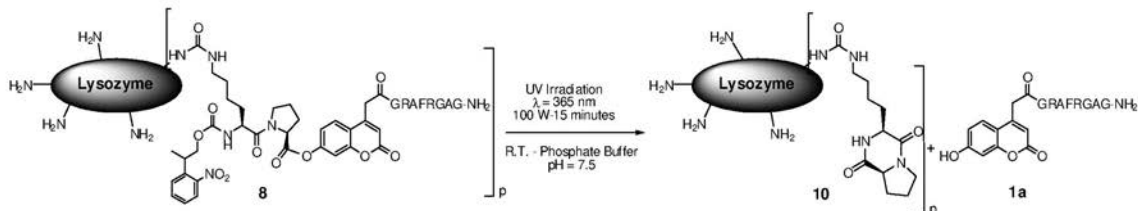
1a及び9は、RP-HPLC、ESI及びMALDI-TOF(1a)により特徴付けられる。結果は図6に示す。

【0109】

(実施例4：化合物8の光分解及びタグ1aの放出)

光分解性タグペプチドラベル化リゾチーム8に対する100ワットのUVランプ(λ = 365 nm)を用いたpH7.5、室温で15分間の照射は、RP-HPLCにおけるクロマトグラフィープロファイルの変化を引き起こす。実際にRT = 11.7 minの保持時間を有する生成物が現れた。この生成物は、MALDI-TOF分析後にタグペプチド1aであることが確認された。RT = 17.1 minでの第2の生成物のMALDI-TOF質量分析は、ジケトピペラジンリゾチーム10に合う[M+H]<sup>+</sup>主要質量14557.7 Daを示した。この結果は、分子内環化及びタグペプチド1の放出を引き起こす光解離性ラベル化リゾチーム8の照射の概念実証を確認する。

20



30

【0110】

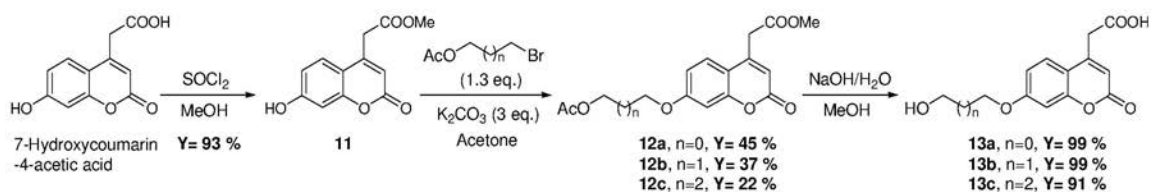
1a及び10は、RP-HPLC及びMALDI-TOF(1a)により特徴付けられる。結果は図7に示す。

・ n = 1 の場合

(実施例5：本発明に係るコンジュゲートの調製)

(ステップ1)

40



【0111】

ヒドロキシアルキル酸13a~cは、7-ヒドロキシクマリン-4-酢酸から開始する3つのステップで合成された。開始材料である7-ヒドロキシクマリン-4-酢酸は、メ

50

タノールを溶媒とするチオニル塩化物を用いた反応により、93%の収率でメチルエステル11への第1の修飾がなされる。メチルエステル11のフェノール成分は、アセトンに含まれる炭酸カリウム(3当量)により脱プロトン化され、プロモアルキル(1.3当量)( $n = 0, 1, 2$ )と反応することによりフェノールアルキルエーテルを生成する。対応するフェノールアルキルエーテル12a~cは、22~45%の収率で精製後に得られた。次に、メタノールを溶媒とする水酸化ナトリウムを用いた12a~cの鹼化は、91~99%の収率で水酸化アルキル酸13a~cを生成する。

【0112】

11 :  $C_{12}H_{10}O_5 [M+H]^+$  235.1, 測定値235.1 ; RP-HPLC分析, RT=11.5 min. バッファ-A  $H_2O-0.05\% TFA$  / バッファ-B 0.05% TFA  $CH_3CN/水 (4/1)$  カラム C18 Nucleosil 100 A 5  $\mu m (2.1 \times 250 mm)$  30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nmで検出)。

10

【0113】

12a :  $C_{16}H_{16}O_7 [M+H]^+$  321.1, 測定値321.2 ; RP-HPLC Analysis, RT=15.7 min. バッファ-A  $H_2O-0.05\% TFA$  / バッファ-B 0.05% TFA  $CH_3CN/水 (4/1)$  カラム C18 Nucleosil 100 A 5  $\mu m (2.1 \times 250 mm)$  30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nmで検出)。

【0114】

12b :  $C_{17}H_{18}O_7 [M+H]^+$  335.1, 測定値335.3 ; RP-HPLC 分析, RT=17.6 min. バッファ-A  $H_2O-0.05\% TFA$  / バッファ-B 0.05% TFA  $CH_3CN/水 (4/1)$  カラム C18 Nucleosil 100 A 5  $\mu m (2.1 \times 250 mm)$  30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nmで検出)。

20

【0115】

12c :  $C_{18}H_{20}O_7 [M+H]^+$  349.1, 測定値349.2 ; RP-HPLC 分析, RT=19.2 min. バッファ-A  $H_2O-0.05\% TFA$  / バッファ-B 0.05% TFA  $CH_3CN/水 (4/1)$  カラム C18 Nucleosil 100 A 5  $\mu m (2.1 \times 250 mm)$  30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nmで検出)。

【0116】

13a : MALDI-TOF: マトリクス DHB -  $C_{13}H_{12}O_6 [M+H]^+$  計算値265.1, 測定値265.0 ;  $[M+Na]^+$  計算値287.0, 測定値287.0. RP-HPLC分析, RT=9.4 min. バッファ-A  $H_2O-0.05\% TFA$  / バッファ-B 0.05% TFA  $CH_3CN/水 (4/1)$  カラム C18 Nucleosil 100 A 5  $\mu m (2.1 \times 250 mm)$  30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nmで検出)。 $^1H$  NMR (300 MHz, DMF) 7.7 (d,  $J = 9.4$  Hz, 1H), 7.1 - 6.9 (m, 2H), 6.4 (s, 1H), 4.2 (t,  $J = 4.5$  Hz, 2H), 4.0 (s, 2H), 3.9 (t,  $J = 4.5$  Hz, 2H), 3.6 (s, 2H). D)  $^{13}C$  NMR (75 MHz, DMF) 171.2, 136.1, 161.0, 156.1, 150.9, 127.3, 113.7, 113.4, 113.3, 102.0, 71.3, 60.6, 38.1。

30

【0117】

13b : MALDI-TOF: マトリクス DHB -  $C_{14}H_{14}O_6 [M+H]^+$  計算値279.1, 測定値279.1 ;  $[M+Na]^+$  計算値301.1, 測定値301.1. RP-HPLC分析, RT=10.8 min. バッファ-A  $H_2O-0.05\% TFA$  / バッファ-B 0.05% TFA  $CH_3CN/水 (4/1)$  カラム C18 Nucleosil 100 A 5  $\mu m (2.1 \times 250 mm)$  30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nmで検出)。 $^1H$  NMR (300 MHz, DMF) 7.7 (d,  $J = 9.4$  Hz, 1H), 7.1 - 6.9 (m, 2H), 6.4 (s, 1H), 4.2 (t,  $J = 4.5$  Hz, 2H), 4.0 (s, 2H), 3.9 (t,  $J = 4.5$  Hz, 2H), 3.6 (s, 2H). D)  $^{13}C$  NMR (75 MHz, DMF) 171.2, 163.0, 161.0, 156.1, 150.9, 127.3, 113.7, 113.4, 113.3, 102.0, 71.3, 60.6, 38.1; 37.7。

40

【0118】

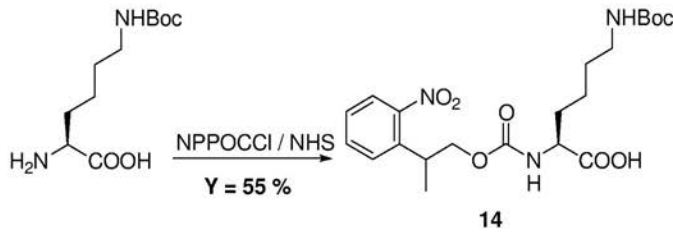
13c : MALDI-TOF: マトリクス DHB -  $C_{15}H_{16}O_6 [M+H]^+$  計算値293.1, 測定値293.1 ;  $[M+Na]^+$  計算値315.1, 測定値315.1. RP-HPLC 分析, RT=11.7 min. バッファ-A  $H_2O-0.05\% TFA$  / バッファ-B 0.05% TFA  $CH_3CN/水 (4/1)$  カラム C18 Nucleosil 100 A 5  $\mu m (2.1 \times 250 mm)$  30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nmで検出)。 $^1H$  NMR (300 MHz, DMF) 7.8 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.1 - 6.9 (m, 2H), 6.4 (s, 1H), 4.2 (t,  $J$

50

= 6.4 Hz, 2H), 3.6 (t, J= 6.3 Hz, 3H), 2.0 - 1.8 (m, 2H), 1.8 - 1.6 (m, 2H). D)  
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMF) 171.2, 163.2, 161.0, 156.2, 151.0, 127.3, 113.7, 113.4,  
 113.3, 101.9, 69.3, 61.5, 38.0, 29.8, 26.3.

【 0 1 1 9 】

(ステップ 2)



10

【 0 1 2 0 】

N - Boc - L - リジン ( L y s ) は、トリガー成分を導入するために修飾される。  
 2 - ( ニトロフェニル ) プロピルオキシカルボニル塩化物 N P P O C C l は、反応性 N P  
 P O C - O S u 中間物を生成するために、0 で N H S により活性化され、反応性 N P P  
 O C - O S u 中間物は L y s アミノ酸に一滴ずつ加えられ、室温で 5 時間攪拌される。N  
 P P O C L y s ( B o c ) は、予備的 R P - H P L C 精製後に 5 5 % の収率で単離される  
 。

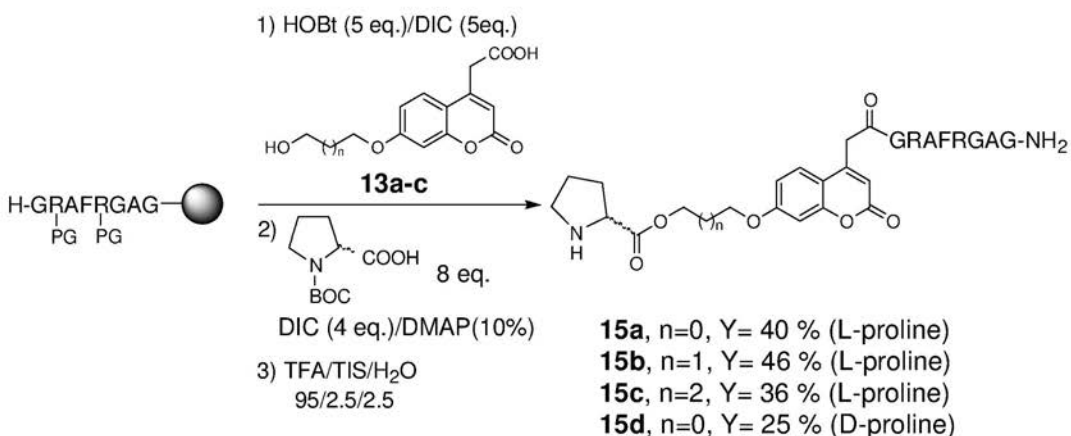
20

【 0 1 2 1 】

1 4 : MALDI-TOF: マトリクス CHCA - C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 計算値 476.2, 測定値 475.8  
 ; [M+K]<sup>+</sup> 計算値 492.2, 測定値 491.8。RP-HPLC 分析, RT=21.1 min. バッファー-AH<sub>2</sub>O-0.0  
 5% TFA / バッファー-B 0.05% TFA CH<sub>3</sub>CN/水 (4/1) カラム C18 Nucleosil 100 A 5 μm ( 2.1x250 mm ) 3 0 分  
 で線形勾配 0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nm で検出)。ESI スペクトル C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 計算値 454.2, 測定値 454.4, [M-Boc]<sup>+</sup> 計算値 354.2, 測定値 354.  
 3。

【 0 1 2 2 】

(ステップ 3 ' a )



30

40

【 0 1 2 3 】

プロリンエステル 1 5 a ~ d は、オクタペプチドレジン N o v a s y n T G R から開始  
 する 3 つのステップで合成された。F m o c / tert - ブチルストラテジーを用いた従来の  
 固相ペプチド合成から得られた保護されたオクタペプチドレジン G R A F R G A G は、結  
 合試薬としての H O B t ( 5 当量 ) 及び D I C ( 5 当量 ) を用いてヒドロキシアルキル酸  
 1 3 a ~ c ( 5 当量 ) によって N 末端を第 1 の修飾がなされる。D C M ( 5 × 1 m i n )  
 及び D M F ( 5 × 1 m i n ) による複数回の洗浄後、クマリンレジンにおける遊離ヒドロ

50

キシ基は、L-プロリン又はD-プロリンのいずれか(8当量)、DIC(4当量)及びジメチルアミノピリジン(DMAP)(10%)を混合することにより予め調製された対称無水物と室温で4時間反応する。次に、プロリンは、室温で16時間、下記同一の方法で再結合された。ペプチジルレジン、補足剤としてのTIS(トリイソプロピルシラン)を含むTFA溶液により処理され、残りの粗ペプチドは、予備的RP-HPLCにより精製された。プロリンエステル15a~dは、25~46%の収率で単離された。

## 【0124】

15a: MALDI-TOF: マトリクス CHCA -  $C_{51}H_{72}N_{16}O_{14}$  [M+H]<sup>+</sup> 計算値1133.5, 測定値1133.6; [M+Na]<sup>+</sup> 計算値1155.5, 測定値1155.5. RP-HPLC 分析, RT=9.8 min. バッファー A H<sub>2</sub>O-0.05% TFA / バッファー B 0.05% TFA CH<sub>3</sub>CN/水 (4/1) カラム C18 Nucleosil 100 A 5 μm (2.1x250 mm) 30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nmで検出)。ESIスペクトル  $C_{12}H_{10}O_5$  [M+H]<sup>+</sup> 計算値1133.5, 測定値1134.1, [M+2H]<sup>+</sup>/2 計算値567.2, 測定値567.6。

10

## 【0125】

15b: MALDI-TOF: マトリクス CHCA -  $C_{52}H_{74}N_{16}O_{14}$  [M+H]<sup>+</sup> 計算値1147.6, 測定値1147.6. RP-HPLC 分析, RT=10.4 min. バッファー A H<sub>2</sub>O-0.05% TFA / バッファー B 0.05% TFA CH<sub>3</sub>CN/水 (4/1) カラム C18 Nucleosil 100 A 5 μm (2.1x250 mm) 30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nmで検出)。ESIスペクトル [M+2H]<sup>+</sup>/2 計算値 574.3, 測定値574.7。

20

## 【0126】

15c: MALDI-TOF: マトリクス CHCA -  $C_{53}H_{76}N_{16}O_{14}$  [M+H]<sup>+</sup> 計算値1161.6, 測定値1161.5. RP-HPLC 分析, RT=11.0 min. バッファー A H<sub>2</sub>O-0.05% TFA / バッファー B 0.05% TFA CH<sub>3</sub>CN/水 (4/1) カラム C18 Nucleosil 100 A 5 μm (2.1x250 mm) 30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nmで検出)。ESIスペクトル [M+2H]<sup>+</sup>/2 計算値581.3, 測定値581.7。

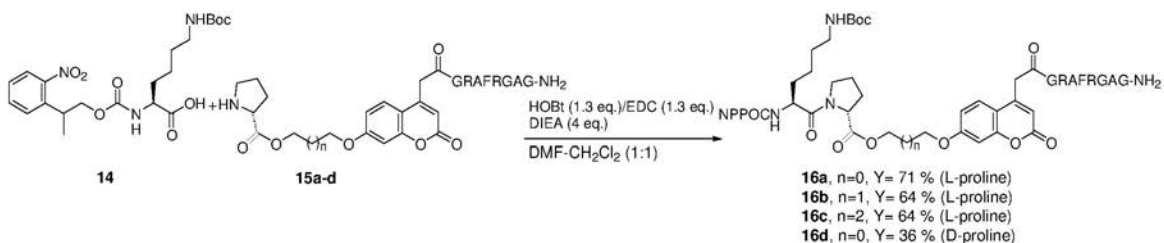
## 【0127】

15d: MALDI-TOF: マトリクス CHCA -  $C_{51}H_{72}N_{16}O_{14}$  [M+H]<sup>+</sup> 計算値1133.5, 測定値1133.5. RP-HPLC 分析, RT=9.9 min. バッファー A H<sub>2</sub>O-0.05% TFA / バッファー B 0.05% TFA CH<sub>3</sub>CN/水 (4/1) カラム C18 Nucleosil 100 A 5 μm (2.1x250 mm) 30分で線形勾配0-100%B (1.0 mL/min, 210 ~ 400 nmで検出)。ESI スペクトル [M+2H]<sup>+</sup>/2 計算値 567.2, 測定値567.6, [M+H]<sup>+</sup> 計算値 1133.5, 測定値 1134.9。

30

## 【0128】

(ステップ3'b)



40

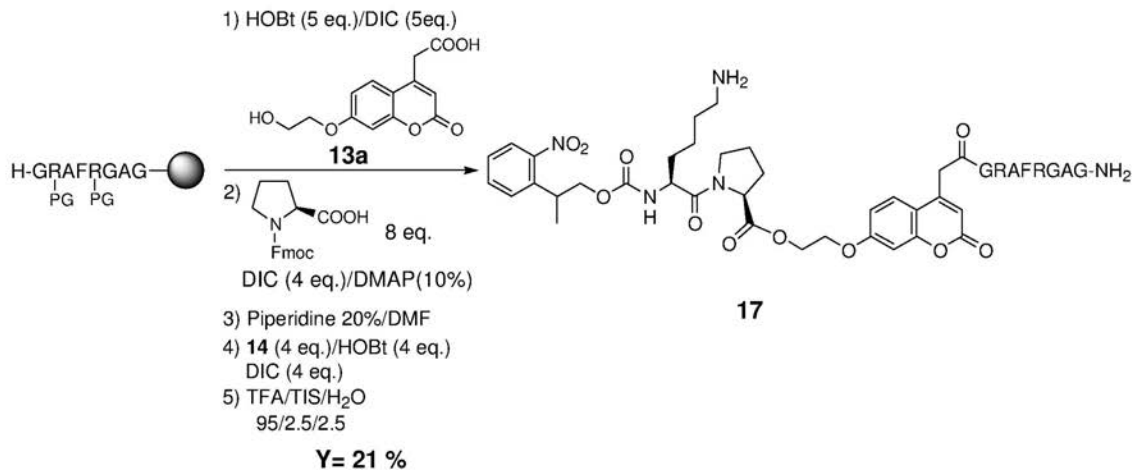
## 【0129】

NPPOCLys(Boc)14とプロリンエステル16a~dとの間の結合は、結合試薬としてのN-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド(EDC)(1.3当量)、活性化剤としてのHOBt(1.3当量)、及び塩基としてのDIEA(4当量)を用いてDMF-DCM混合液(1:1)中で20時間行われる。エステル16a~bは、36~71%の収率で精製後に得られた。16a、16b、16c及び16dは、MALDI-TOF、RP-HPLC及びESIにより特徴付けられる。結果を図8~11に示す。

## 【0130】

50

(ステップ3)



10

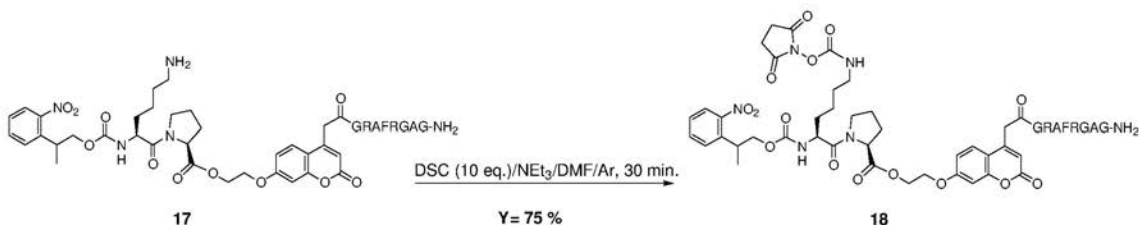
【0131】

アミン17の調製は、16a~dのために説明されたものと同じの固相ストラテジーを用いて行われる。Boc-プロリンの代わりに、Fmoc-L-プロリンは、クマリンレジンにおける遊離ヒドロキシル基に導入される。20%ピペリジンを用いた二重Fmoc脱保護は、レジン上で現れる。DCM (5 × 1分) 及びDMF (5 × 1分) を用いた複数回の洗浄後、NPPOCLys (Boc) (4当量) は、DMF中において室温で4時間、DIC (4当量) 及びHOBT (4当量) を用いてプロリンアミンに導入される。TFA/TIS/H<sub>2</sub>Oでの最終の脱保護は、予備的RP-HPLC精製後に21%でアミン17を得る。17はMALDI-TOF、RP-HPLC及びESIにより特徴付けられる。結果を図12に示す。

20

【0132】

(ステップ4)



30

【0133】

アミンエステル17は、化合物6について上記説明したのと同様に、室温でDMFに含まれるDSC (10当量) と反応する。NHC18は、精製後に75%の収率で単離される。18は、MALDI-TOF、RP-HPLC及びESIにより特徴付けられる。結果を図13に示す。

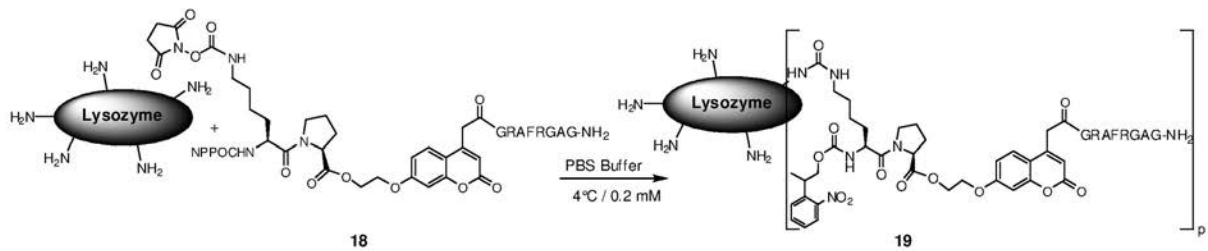
40

【0134】

(実施例6: 本発明に係るバイオ分子のラベリング)

リゾチームのラベリングは、化合物8について上記説明したのと同様に、タグペプチドNSC18を用いてなされた。MALDI-TOF及びLC-MS分析で現れた約70~80%のリゾチームは、1つ又は複数の光分解性タグペプチド18によりラベル化された。主要な生成物は、[M+H]<sup>+</sup> 質量15797 Daにより同定されるラベル19 (p = 1) でラベル化されたリゾチームであった。2回ラベル化されたリゾチーム (p = 2) は、[M+H]<sup>+</sup> 質量17240 Daにより特徴付けられる。ラベル化されたリゾチームは、Vivaspinカートリッジ (カットオフ10000) で、8の遠心分離 (RCF = 3000) でのリン酸バッファーによる3回の洗浄により精製された。

50

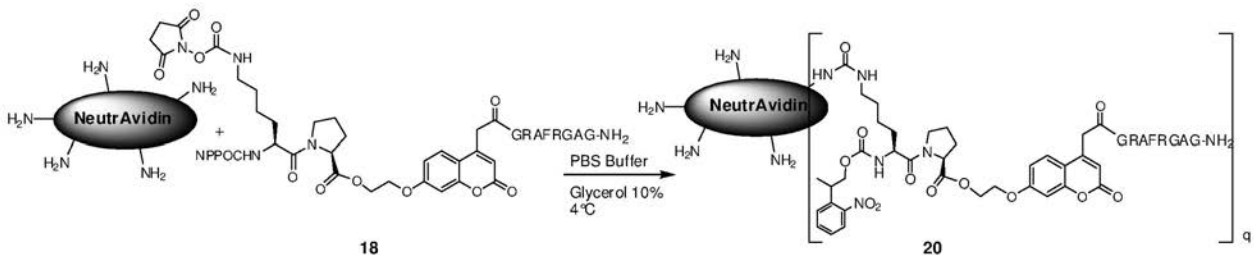


## 【0135】

19は、MALDI-TOF、RP-HPLC及びESIにより特徴付けられる。結果を図14に示す。 10

## 【0136】

この方法は、ニュートラアビジンのラベリングにも適用された。ニュートラアビジンは、卵白からのネイティブアビジンを脱糖化したものである。そのタンパク質は、より中性の等電点  $pI = 6.3$  を有し、非特異的結合特性がほとんどない。ニュートラアビジンは、60000ダルトンの総質量を有する4つの等しいサブユニットを含み、各サブユニットは、127アミノ酸で構成され、より具体的に9つのリジンを含む10個の一級アミンで構成される。ラベリングのプロトコールは、ラベル化ニュートラアビジン20が沈殿するのを避けるために、10~20%のグリセロールを加えることにより少し変更された。pH7.4であるリン酸緩衝生理食塩水(PBS)及びグリセロール(10%)を含む16  $\mu M$ のニュートラアビジン溶液(1当量)は、4 で光分解性タグペプチドNSC18(4当量)に加えられ、その溶液は4 で2時間撹拌された。反応媒体のRP-HPLC分析は、80~90%のニュートラアビジンがラベル化されたことを示した。質量分析法は、 $[M+H]^+$  質量14840 Daにより特徴付けられるラベル化されていない最初の単量体ニュートラアビジンを含む5つのタンパク質種を示した。主要な生成物は、 $[M+H]=16291$  Daで同定された1つのラベル20 ( $q = 1$ )でラベル化されたニュートラアビジンであった。2、3及び4度ラベル化されたタンパク質は、それぞれ $[M+H]^+$  質量17705 Da, 19147 Da及び20578 Daで同定された。ラベル化されたニュートラアビジンタンパク質は、PBS-グリセロール(10%)溶液中において、4 で20時間、透析カセット(カットオフ3500 Da)により精製された。 20 30



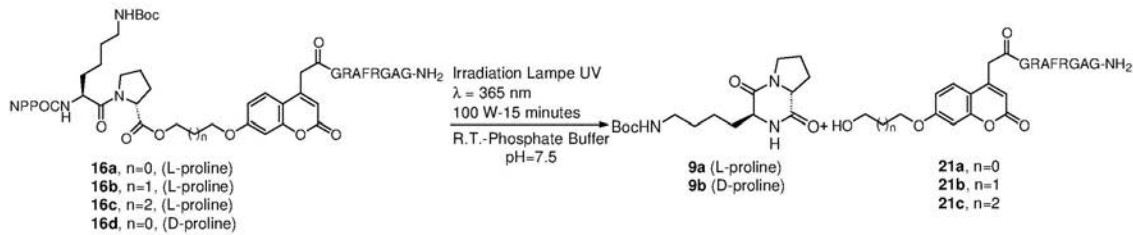
## 【0137】

20は、MALDI-TOF、RP-HPLC及びESIにより特徴付けられる。結果を図15に示す。 40

## 【0138】

(実施例7：化合物16a~dの光分解及びタグ21a~cの放出)

100ワットのUVランプ( $\lambda = 365$  nm)を用いた室温で15分間のリン酸バッファを溶媒とするタグペプチドエステル16a~dの1 mM溶液の照射による光解離性NPPOC保護基の分離を評価した。



## 【 0 1 3 9 】

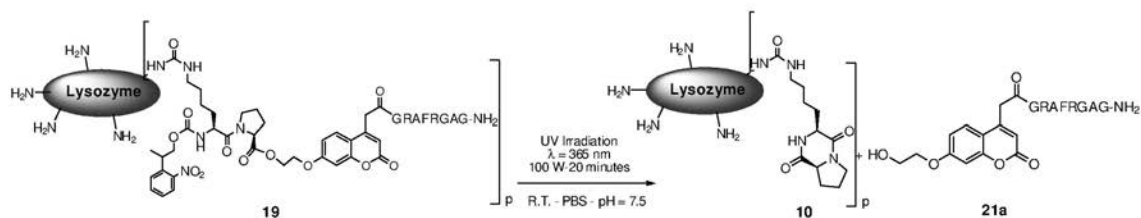
タグペプチドエステル 16 a、16 b 及び 16 c の照射は、L - プロリン由来のジケトピペラジン 9 a の出現、及び対応するタグペプチド 21 a、21 b 及び 21 c の放出を引き起こす。ジケトピペラジン 9 a は、エレクトロスプレーイオン化 E S I 質量分析法により  $[M+Na]^+$  質量 348.3 Da で、RT = 12.3 min で確認された。各タグペプチド 21 a ~ c は E S I 及び M A L D I - T O F 分析により確認され、それぞれ RT=10.3, 11.0, 11.2 min、 $[M+H]^+=1035.8, 1050.5, 1064.4$  Da であった。タグペプチドエステル 16 d に関して、UV 照射曝露は、タグペプチド 21 a と、E S I 質量分析法による RT=10.1 min. 及び  $[M+Na]^+$  質量 348.3 Da によって特徴付けられた D - プロリンから生じるジケトピペラジン 9 b の出現を引き起こす。9 a、9 b、21 a、21 b 及び 21 c は、M A L D I - T O F、R P - H P L C 及び E S I により特徴付けられる。結果を図 16 ~ 19 に示す。

## 【 0 1 4 0 】

タグペプチドエステル 5、16 a、16 b、16 c 及び 16 d の UV 照射曝露の動態研究は、図 23 に要約され、タグペプチド 1 a、21 a、21 b 及び 21 c の放出の速度と比較可能である。P B S 溶液中の 1 m M タグペプチドエステルの 15 分間の UV 曝露の後、タグペプチドの放出は、R P - H P L C 分析により検出及び測定された。100% のタグペプチド 1 a は 15 分で放出されたので、タグペプチドエステル 5 は速い環化速度を示す。D - プロリン成分に起因して、100% のタグペプチド 21 a が 4 時間後に検出されたので、タグペプチドエステル 16 d は速い放出速度を示す。タグペプチド 21 a のわずかに低い放出速度は、5 時間で 100% が観察された。タグペプチドエステル 16 b 及び 16 c に関して、たった 50% のタグペプチド 21 b 及び 21 c が 6 時間後に検出されたので、環化速度がとても低いことを示した。図 23 は、タグペプチドエステル 5、16 a

## 【 0 1 4 1 】

( 実施例 8 : 化合物 19 ~ 20 の光分解及びタグ 21 a の放出 )



## 【 0 1 4 2 】

タグペプチド 19 への室温での照射は、RT=10.3 min でタグペプチド 21 a の放出を引き起こす。タグペプチド 21 a は、M A L D I - T O F 質量分析により  $[M+H]^+=1035.8$  Da と確認された。10 及び 21 a は、M A L D I - T O F、R P - H P L C 及び E S I により特徴付けられる。結果を図 20 に示す。

## 【 0 1 4 3 】

タグペプチドラベル化ニュートラアピジン 20 の UV 照射は、タグペプチド 21 a の放出を引き起こす。タグペプチド 20 からジケトピペラジンニュートラアピジン 22 への総変換は、M A L D I - T O F 質量分析により  $[M+H]^+=15015$  Da の質量で確認され、複数ラ

10

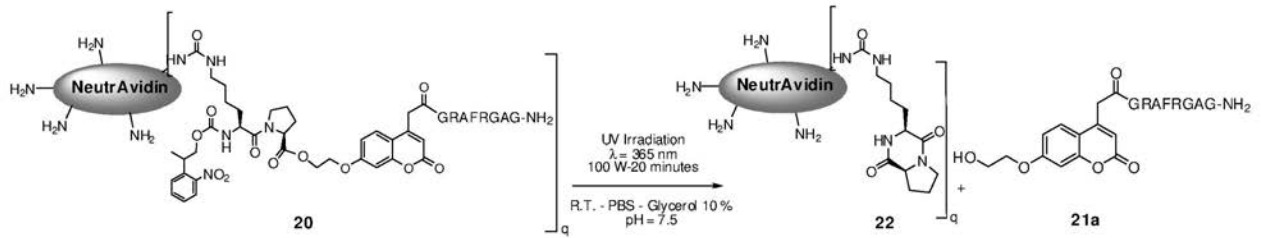
20

30

40

50

ベル化タグペプチドニュートラアビジン 20 の消失が確認された。



【 0 1 4 4 】

22 及び 21 a は、MALDI - TOF、RP - HPLC 及び ESI により特徴付けられる。結果を図 21 に示す。

【 0 1 4 5 】

( 実施例 9 : 異なるペプチドタグの調製 )

以下の表 1 に示されたペプチドは、実施例 1 で示されるように合成されて、本発明に係るラベルにおいてタグとして用いられた。

【 0 1 4 6 】

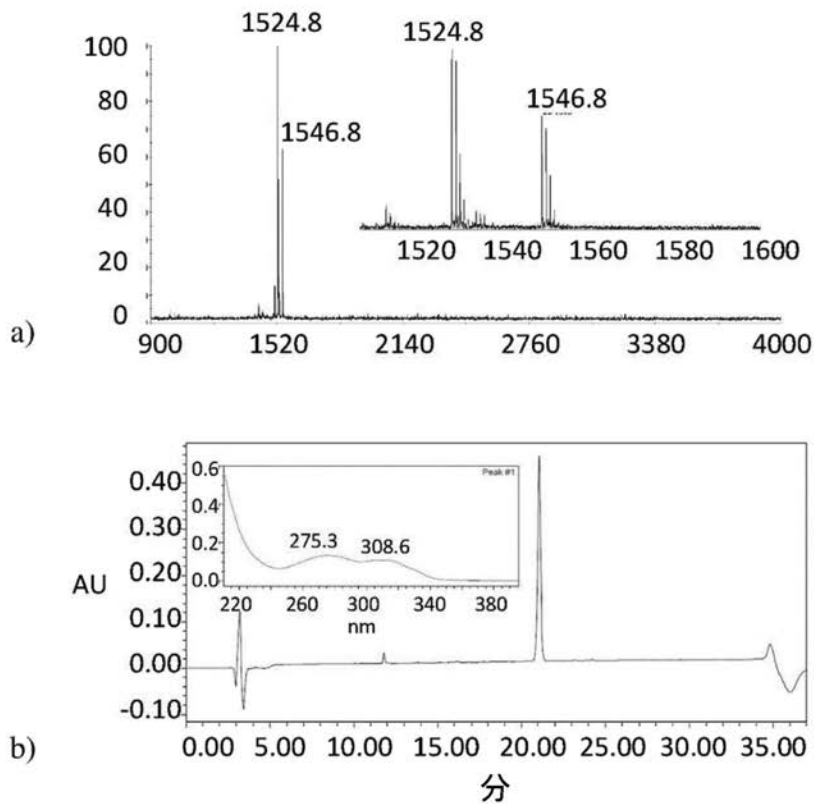
【 表 1 】

Peptide	Peptidic Sequence	Molecular Formula	m/z	Peptide D6	m/z
1	GRAFRGAG-NH <sub>2</sub>	C35H57N15O9	831.45	C35H51D6N15O9	837.48
2	GRAFRGSG-NH <sub>2</sub>	C35H57N15O10	847.44	C35H51D6N15O10	853.48
3	GRAFRGVG-NH <sub>2</sub>	C37H61N15O9	859.48	C37H55D6N15O9	865.51
4	GRAFRGNG-NH <sub>2</sub>	C36H58N16O10	874.45	C36H52D6N16O10	880.49
5	GRAFRGQG-NH <sub>2</sub>	C37H60N16O10	888.47	C37H54D6N16O10	894.50
6	GRPFRLG-NH <sub>2</sub>	C40H65N15O9	899.51	C40H59D6N15O9	905.55
7	GRNFRGNG-NH <sub>2</sub>	C37H59N17O11	917.46	C37H53D6N17O11	923.5
8	GRQFRGNG-NH <sub>2</sub>	C38H61N17O11	931.47	C38H55D6N17O11	937.51
9	GRQFRGQG-NH <sub>2</sub>	C39H63N17O11	945.49	C39H57D6N17O11	951.53
10	GRQFRFG-NH <sub>2</sub>	C43H64N16O10	964.5	C43H58D6N16O10	970.54

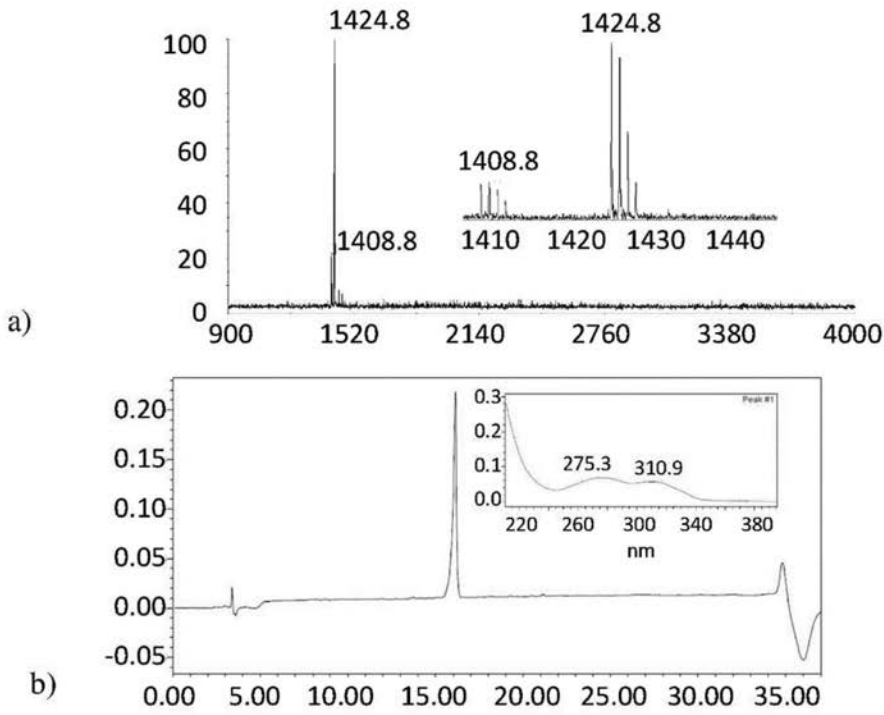
【 0 1 4 7 】

ペプチド 1 ~ 10 のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10 及び配列番号 11 の配列と同一である。

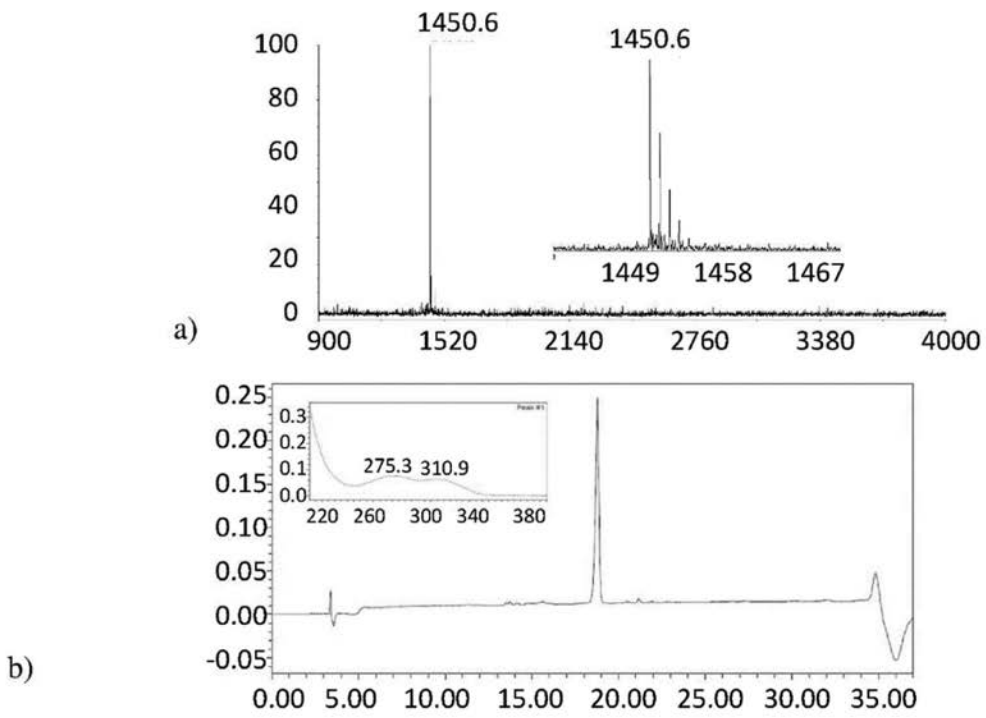
【 図 1 】



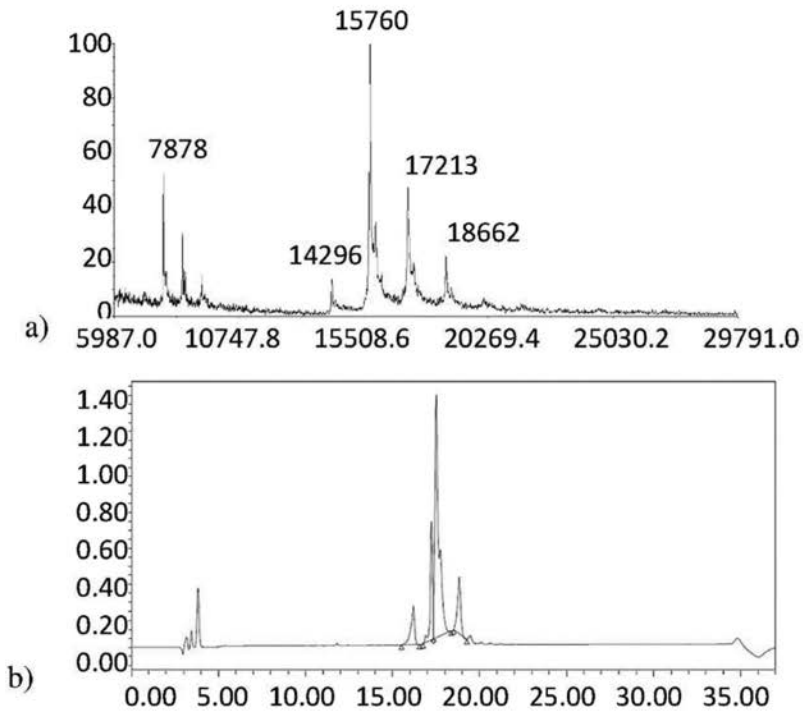
【 図 2 】



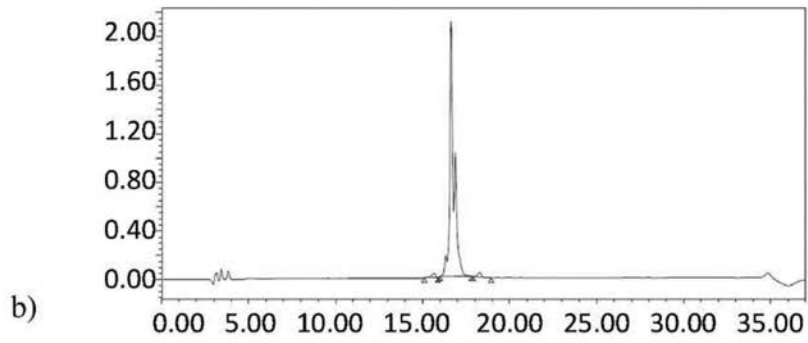
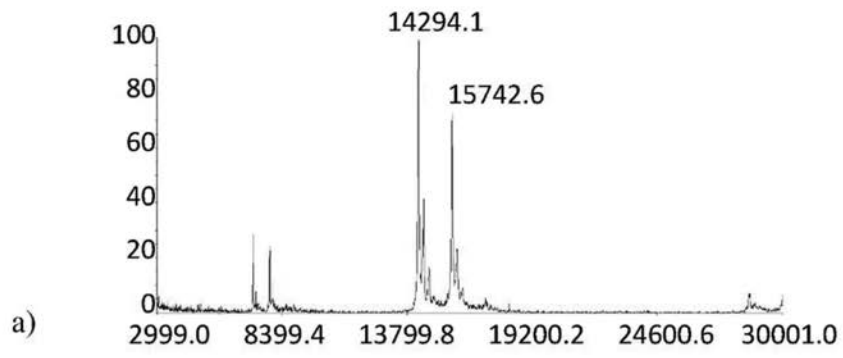
【 図 3 】



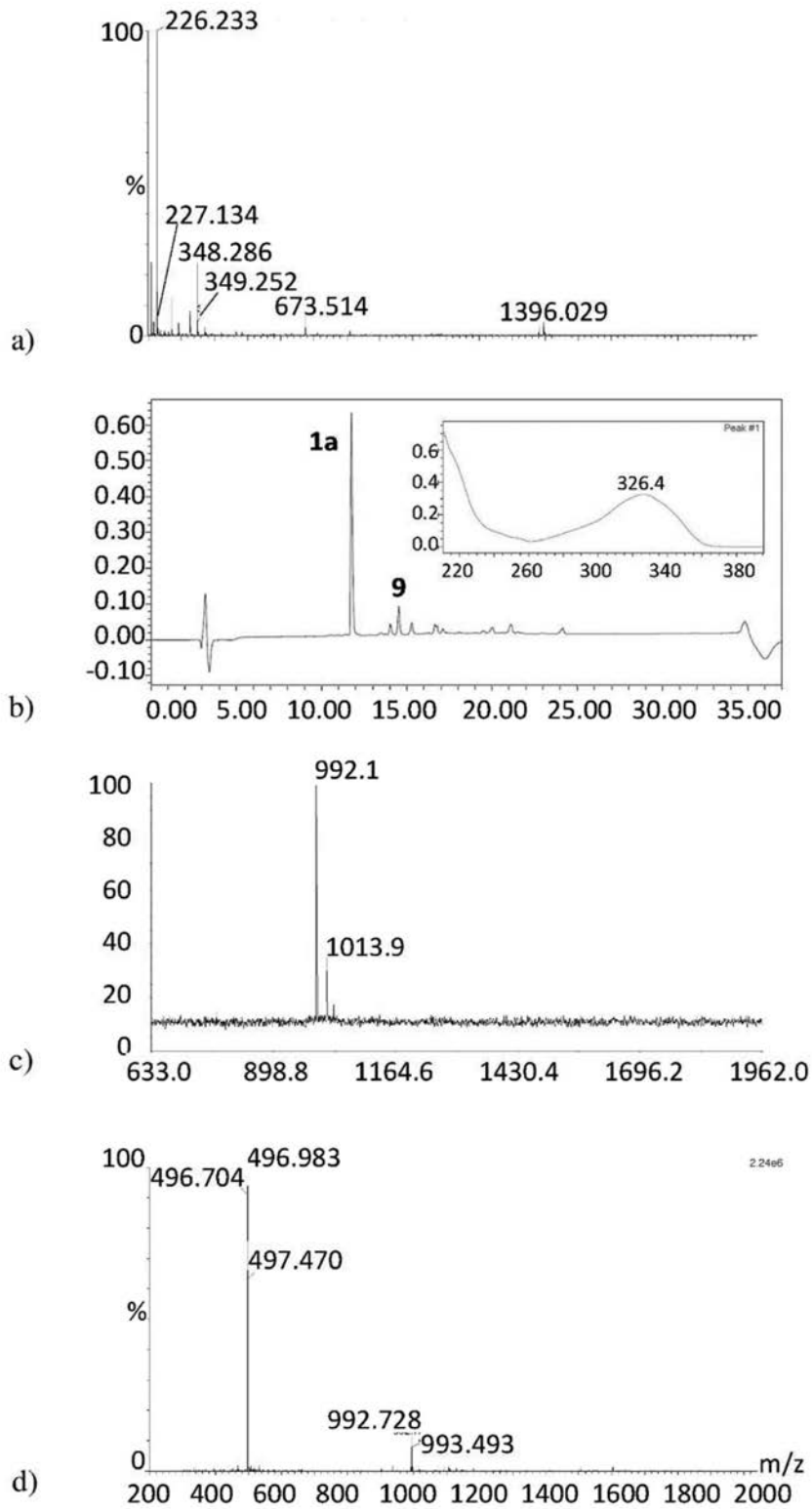
【 図 4 】



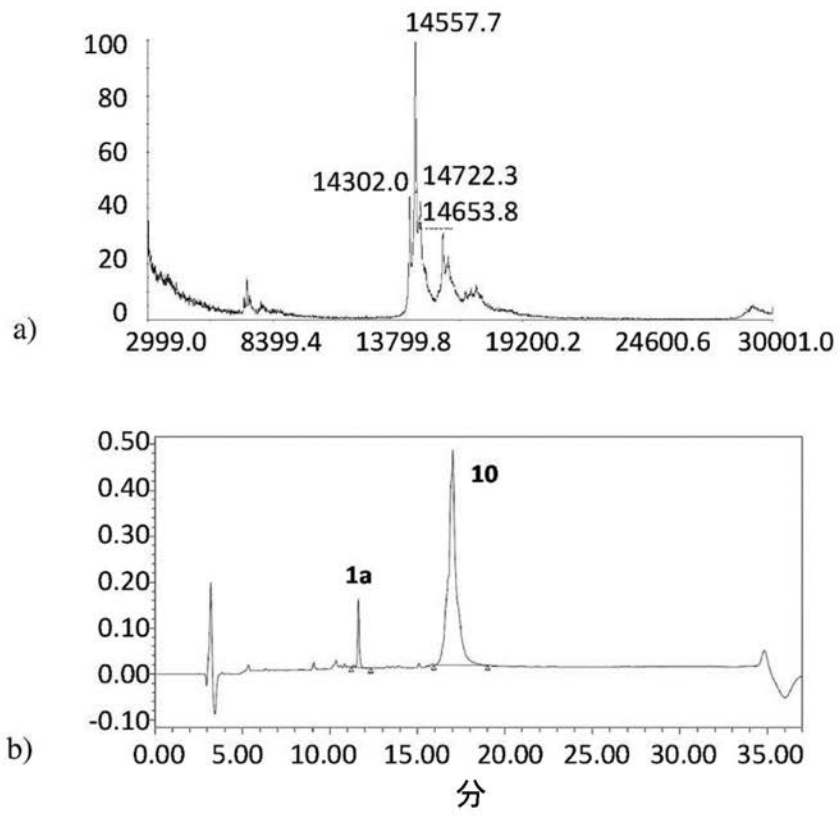
【 図 5 】



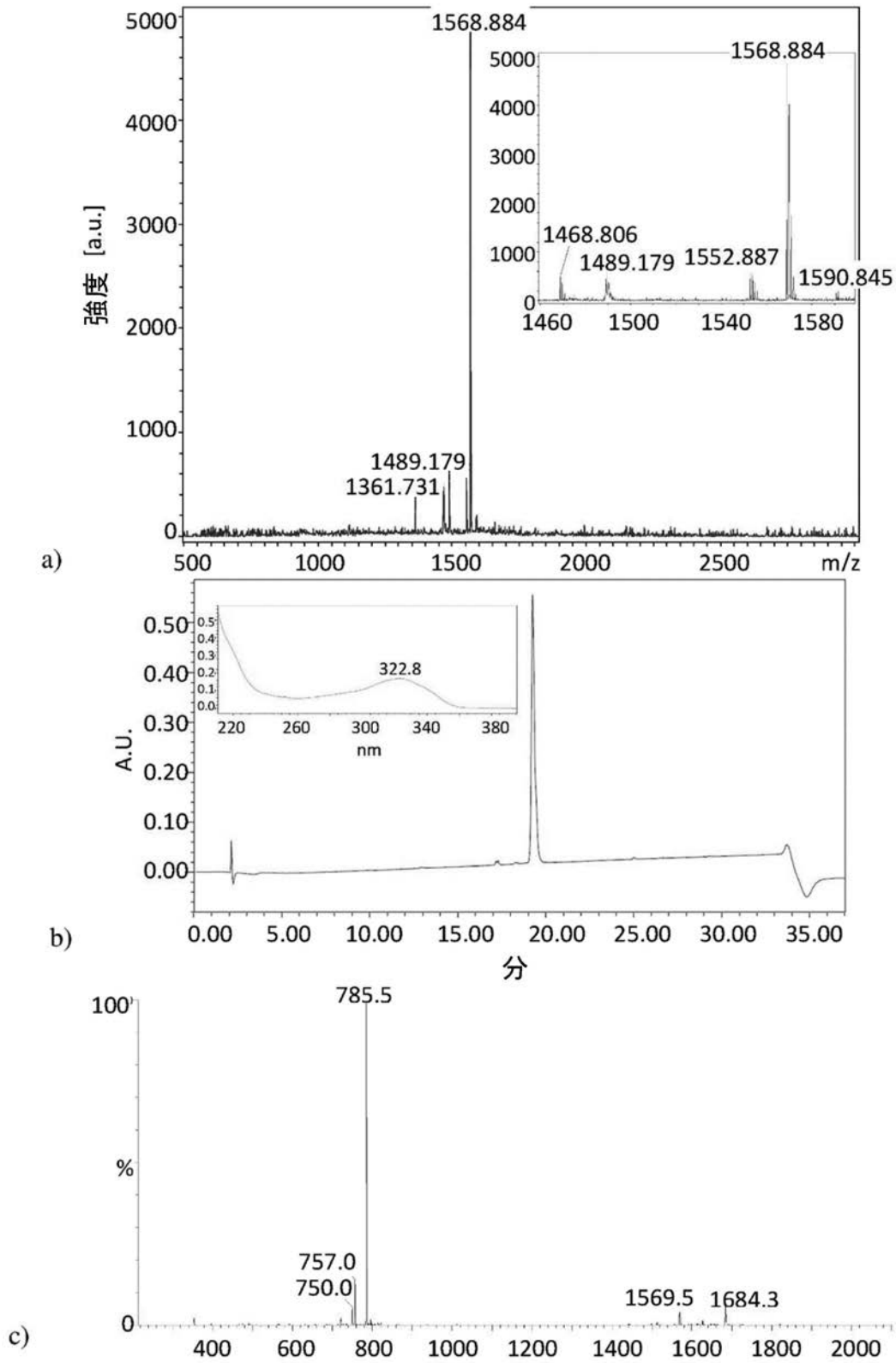
【 図 6 】



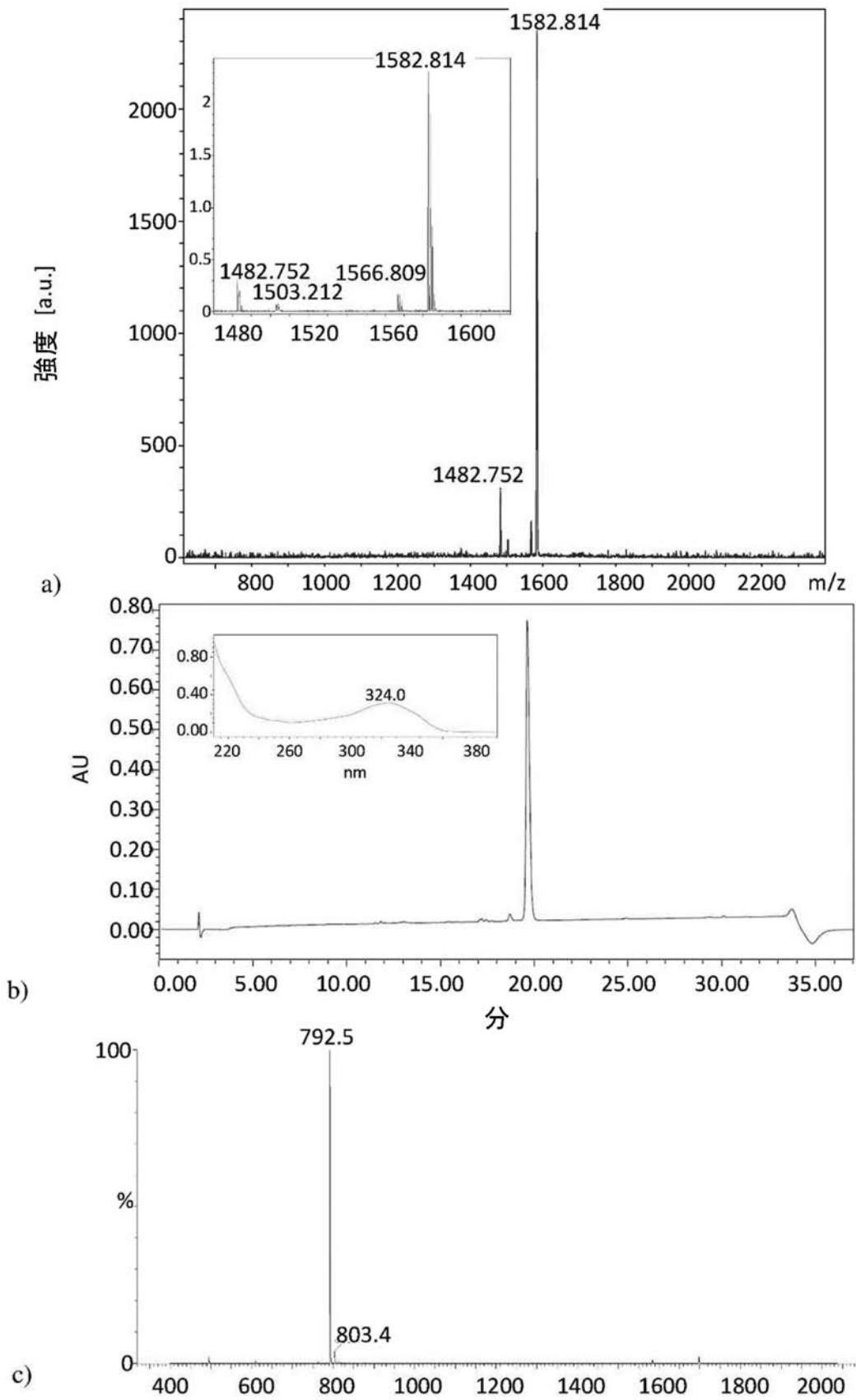
【 図 7 】



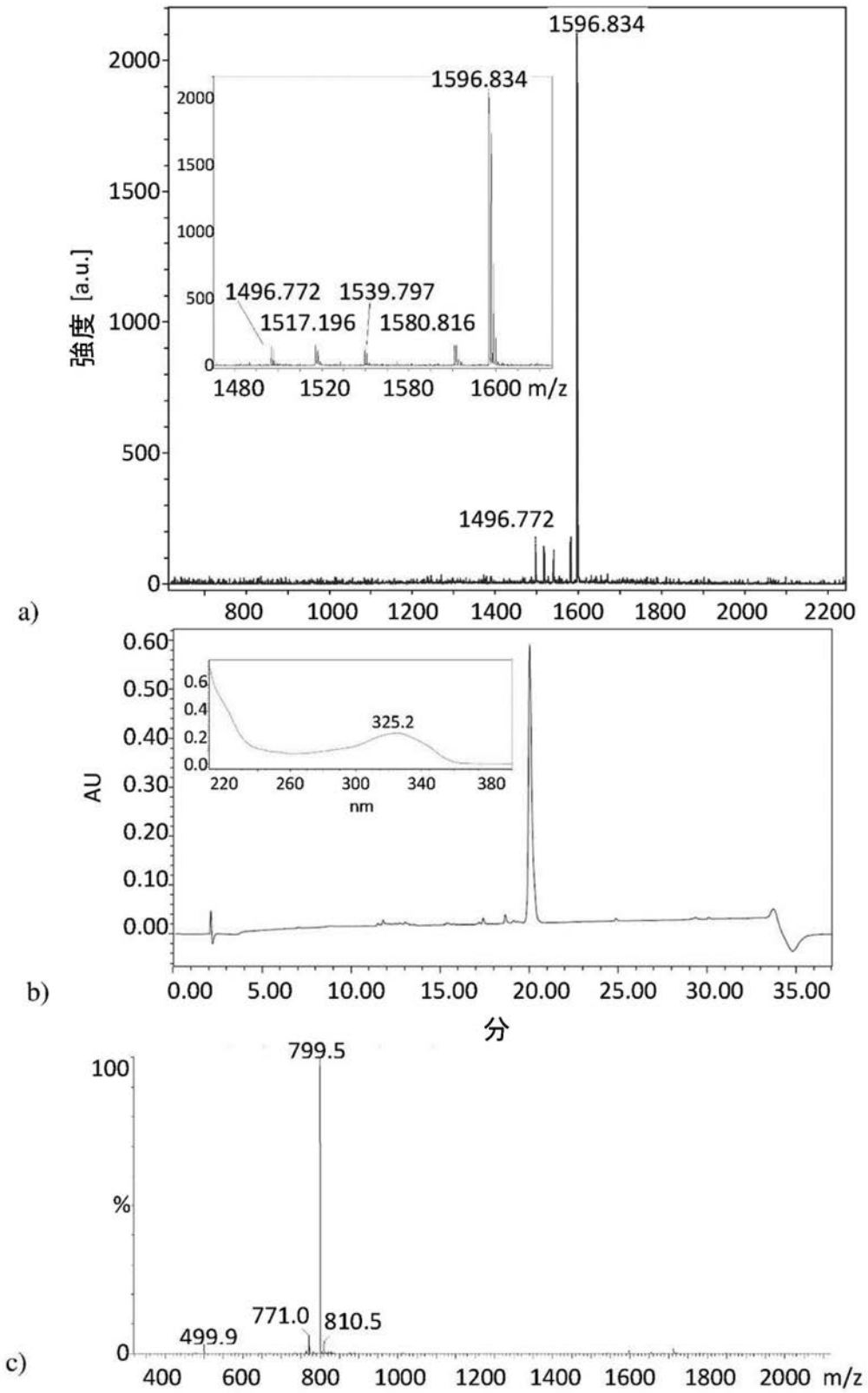
【 図 8 】



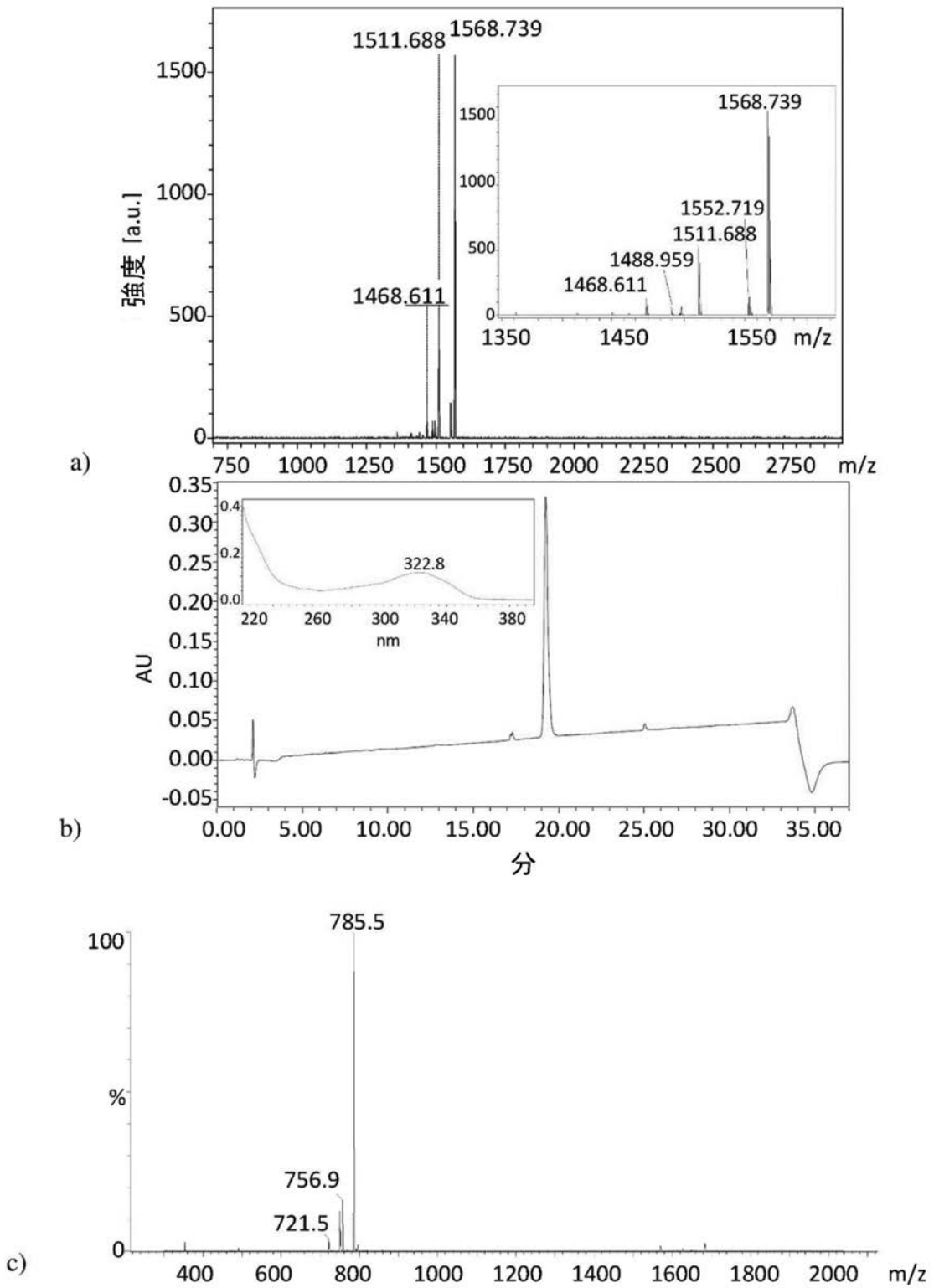
【 図 9 】



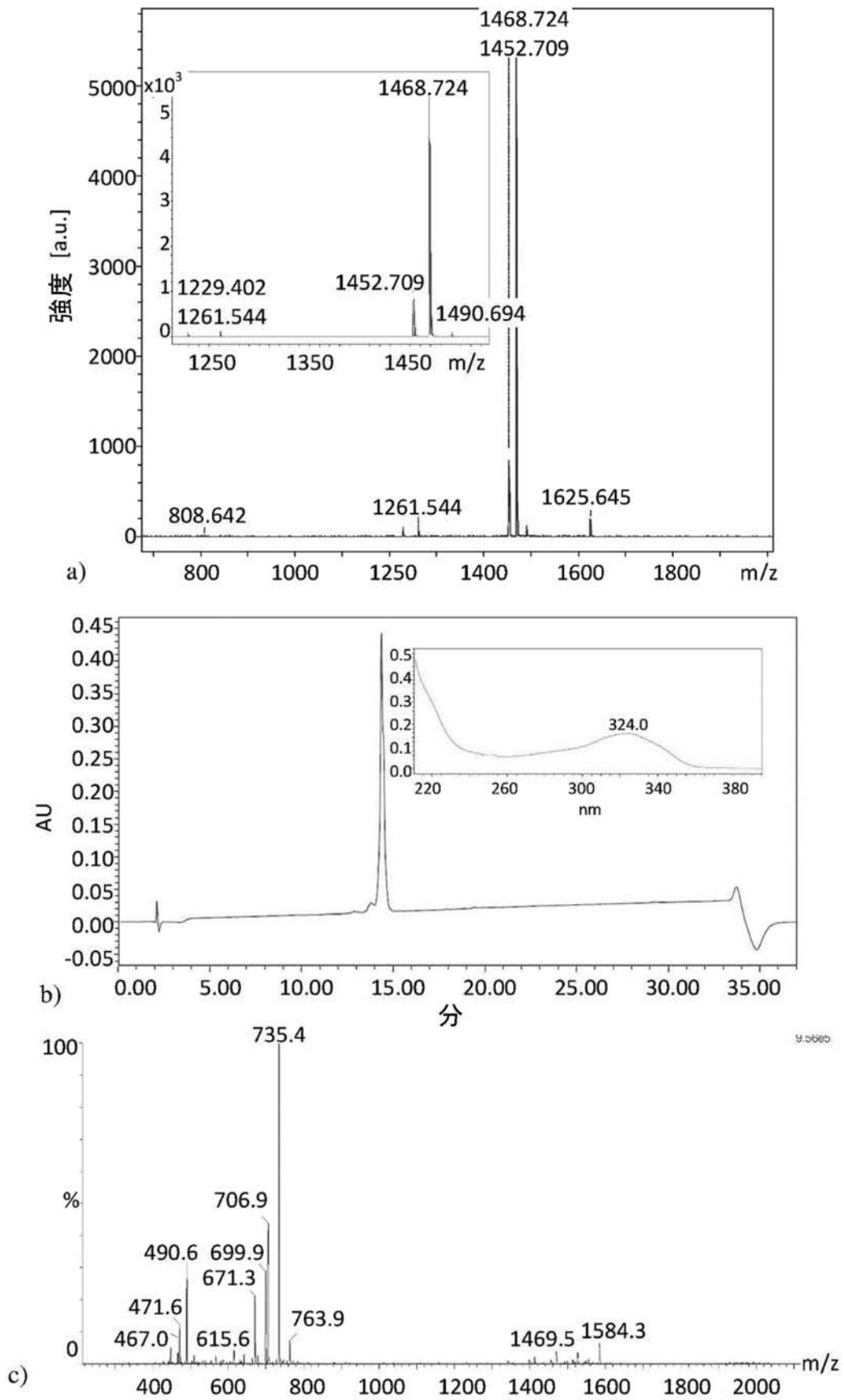
【 図 1 0 】



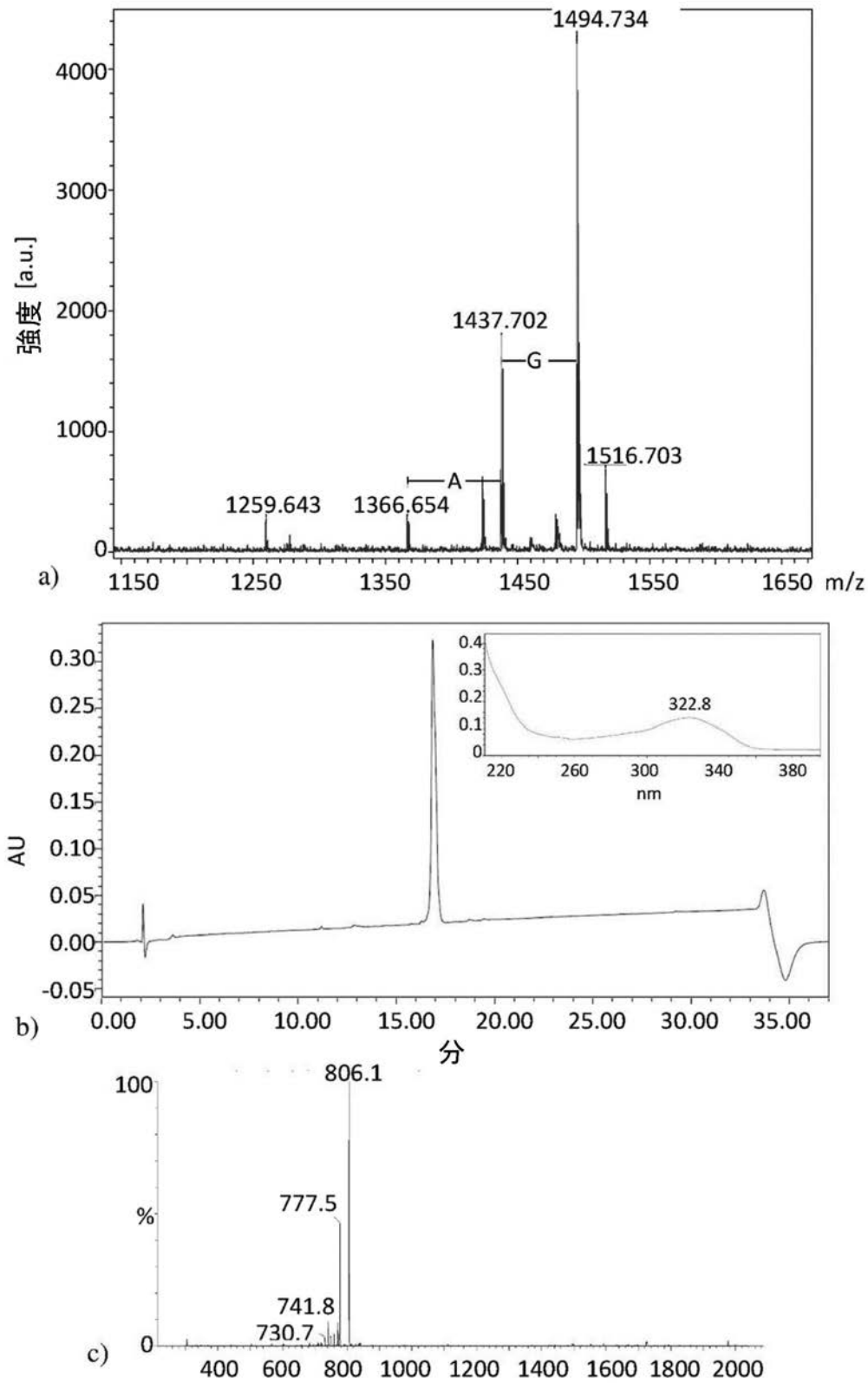
【 図 1 1 】



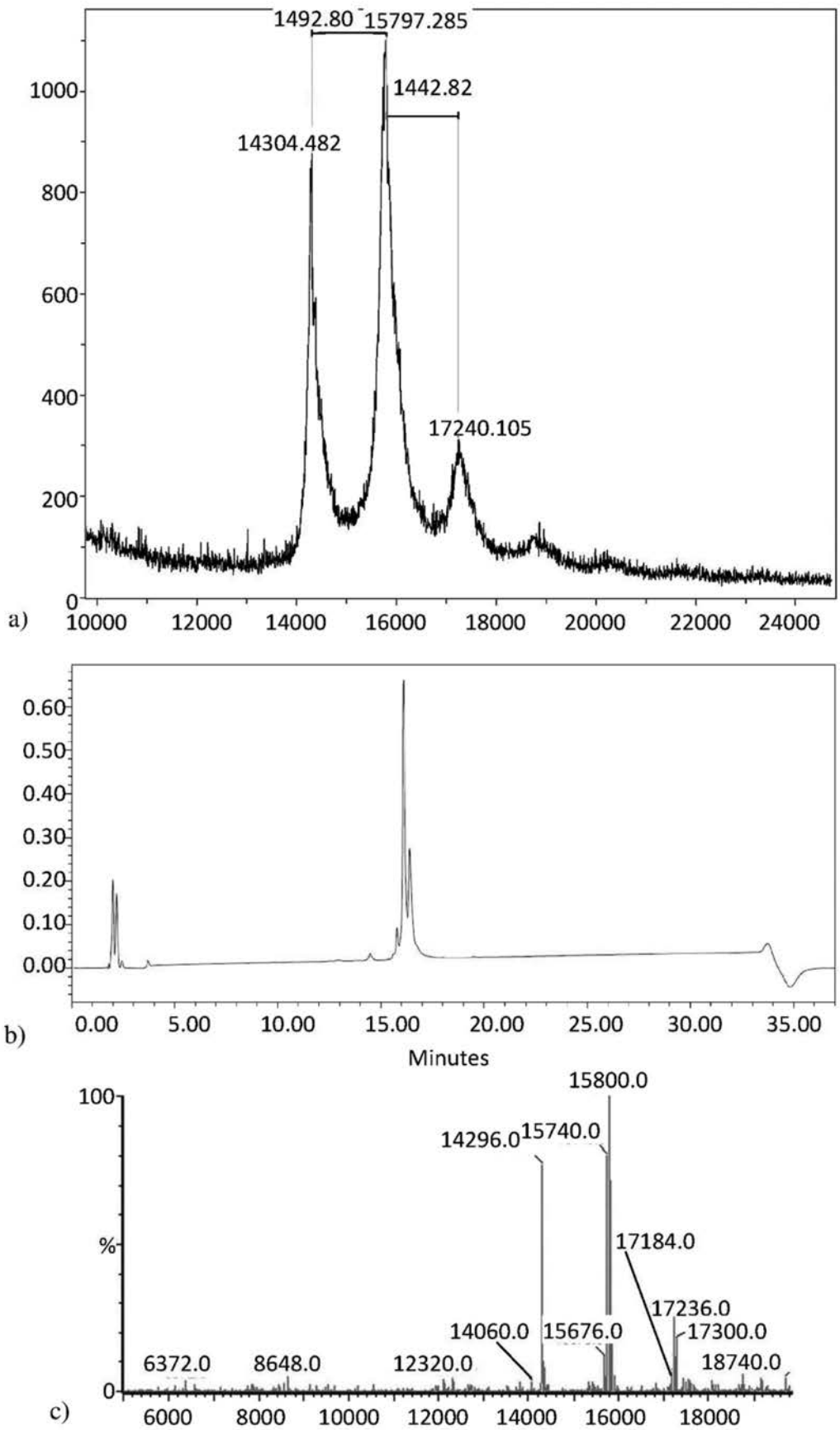
【 図 1 2 】



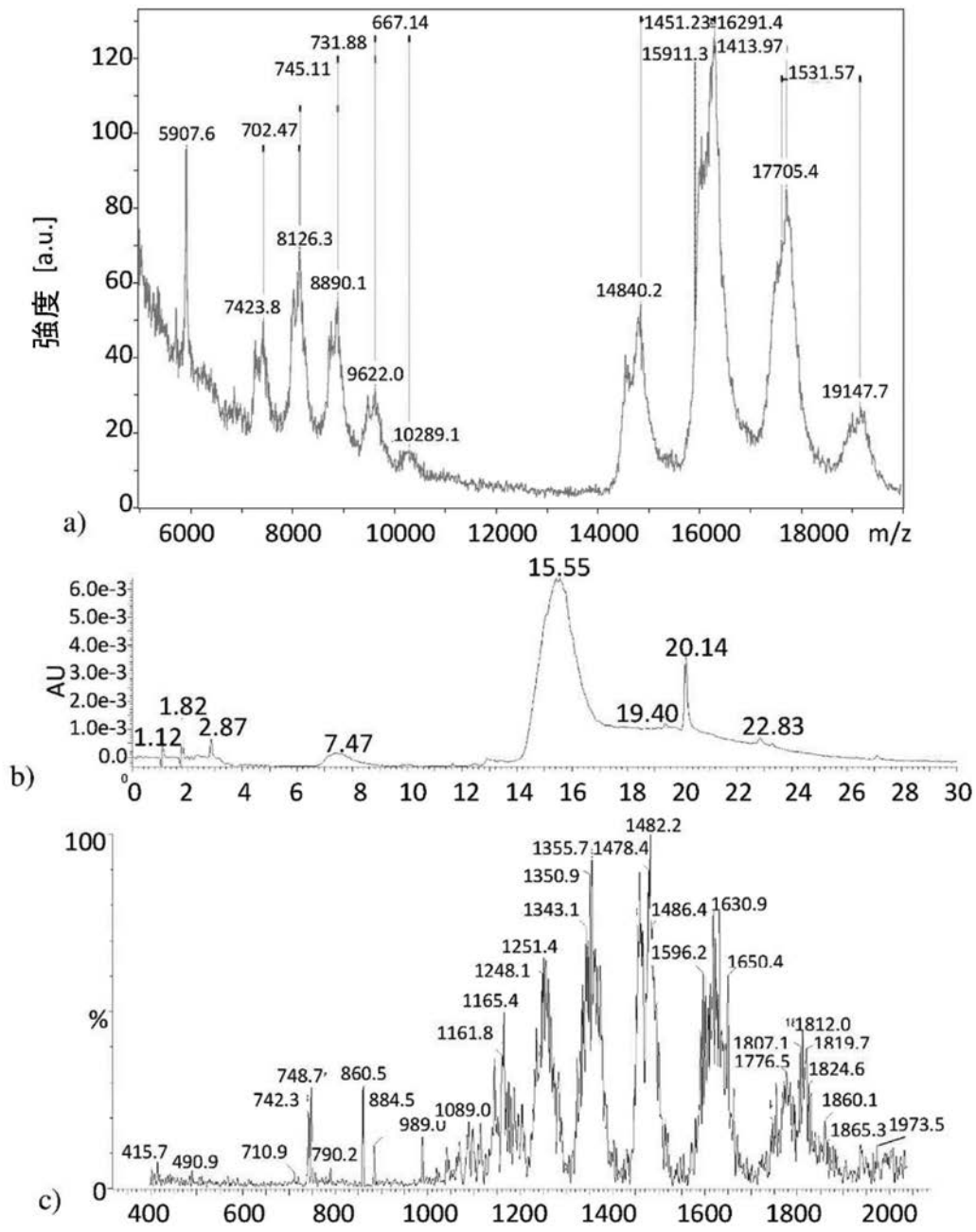
【 図 1 3 】



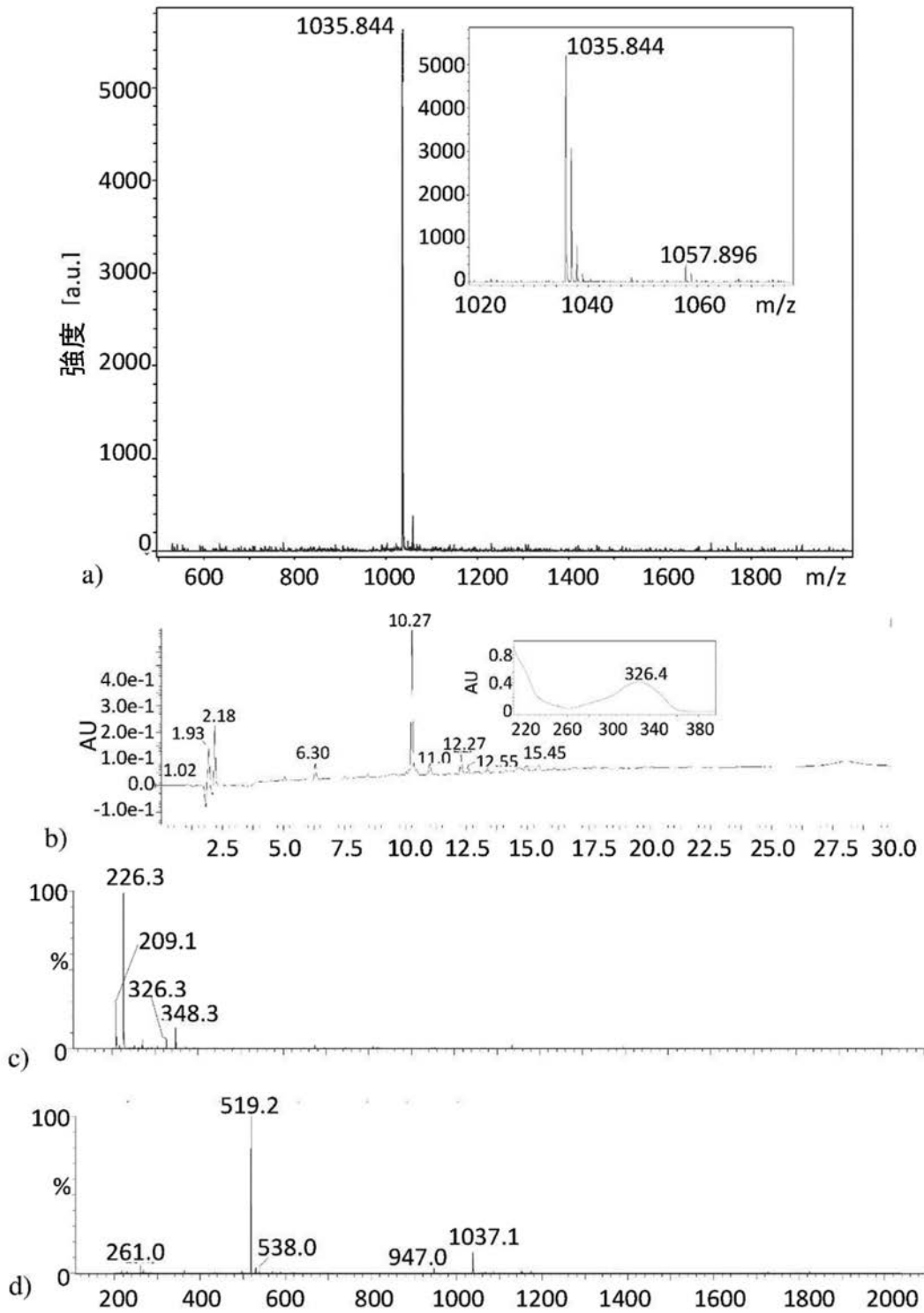
【 図 1 4 】



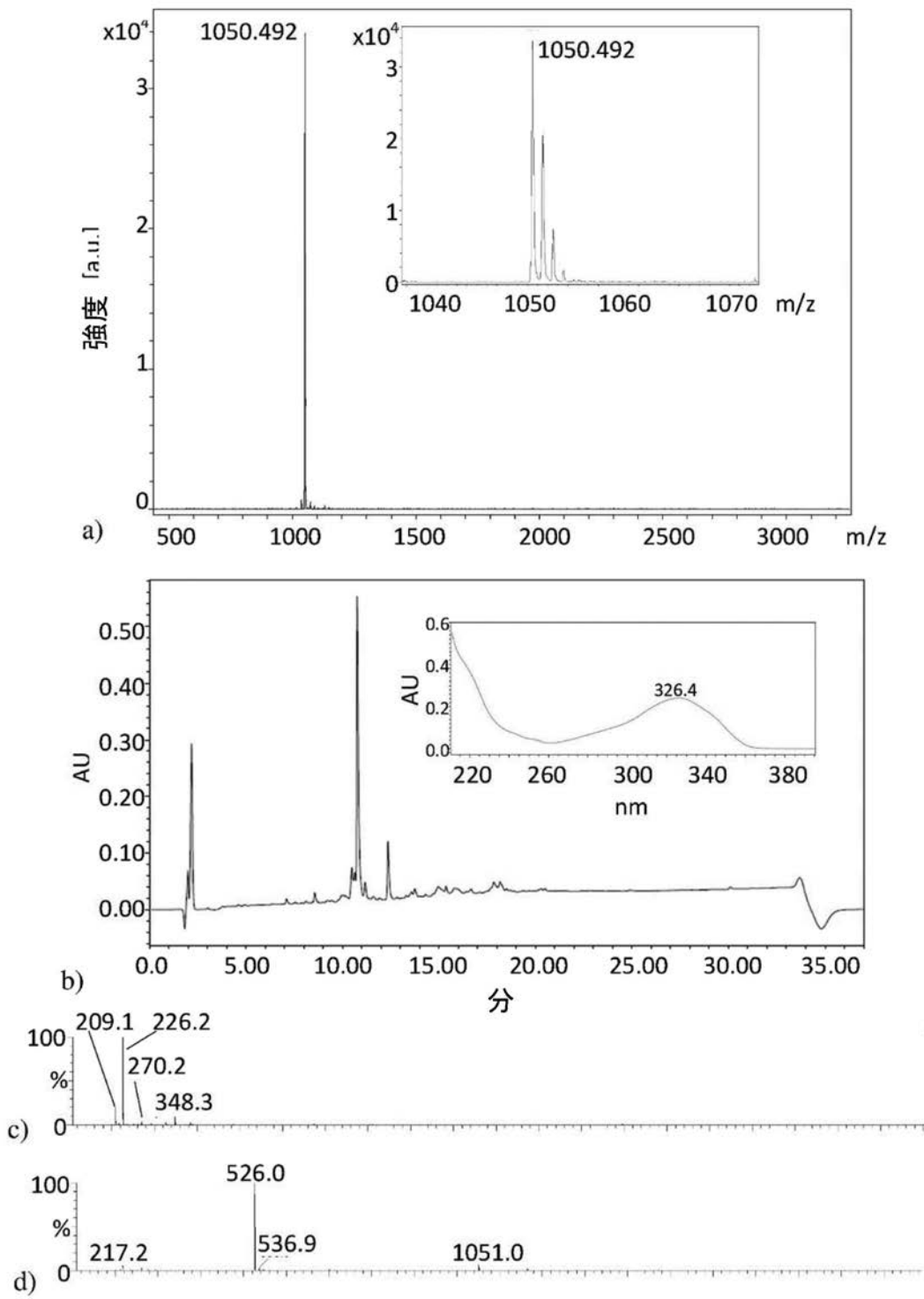
【 図 1 5 】



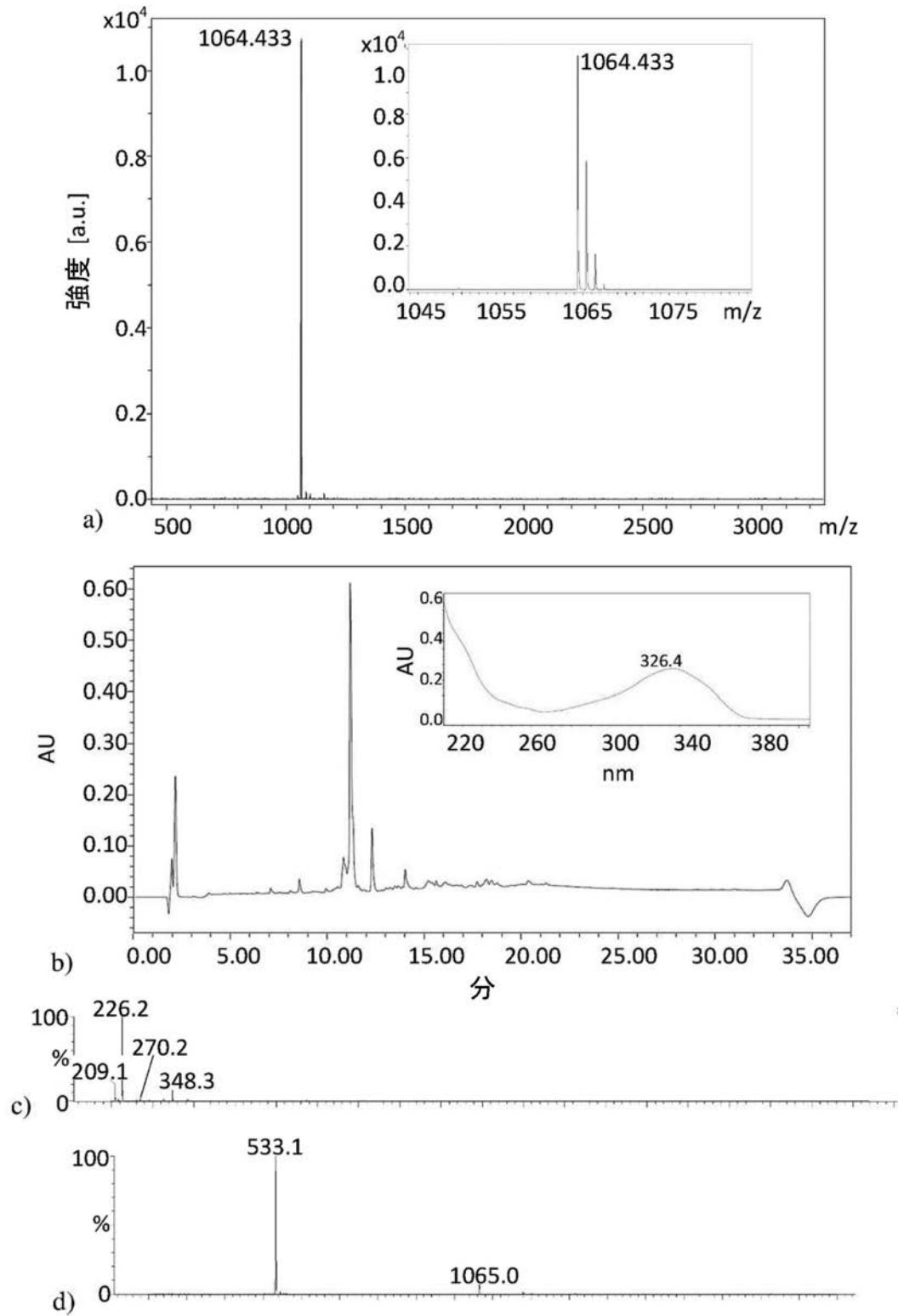
【 図 1 6 】



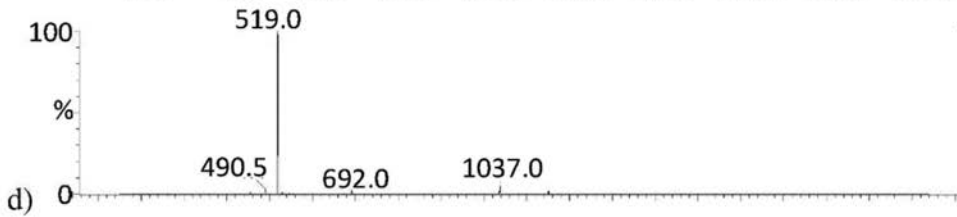
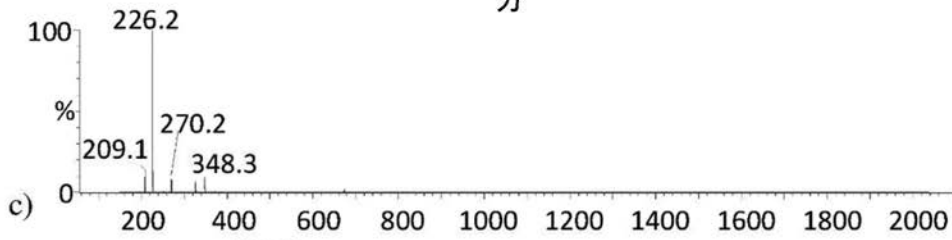
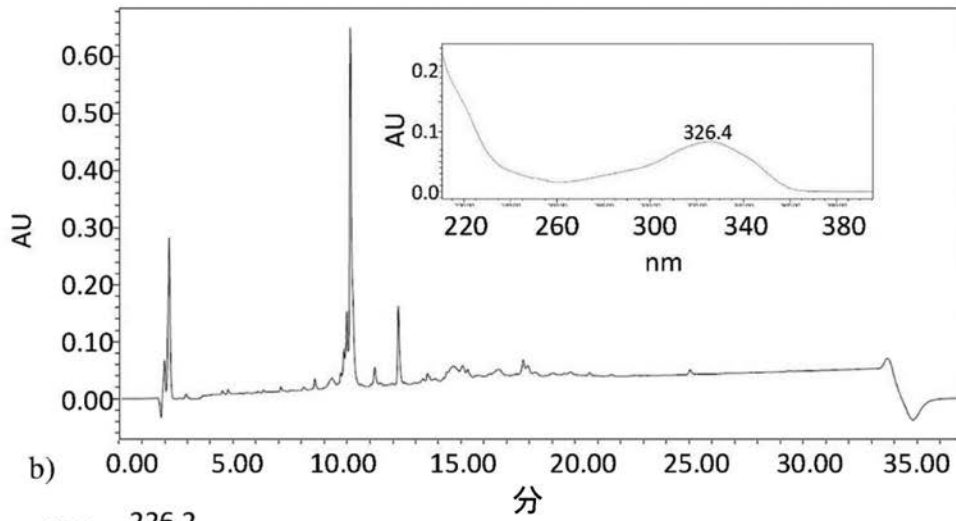
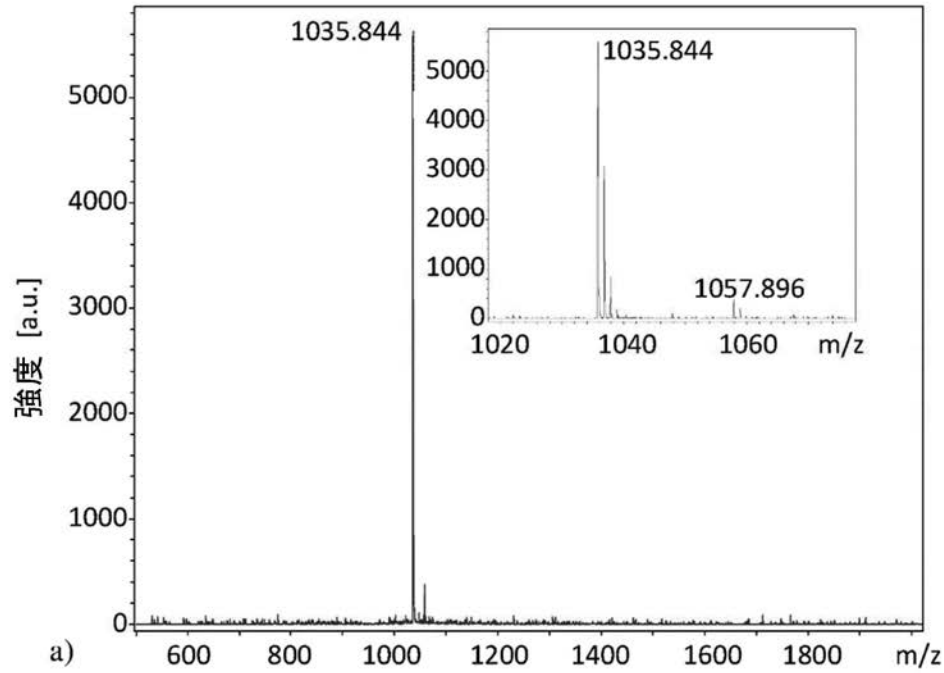
【 図 1 7 】



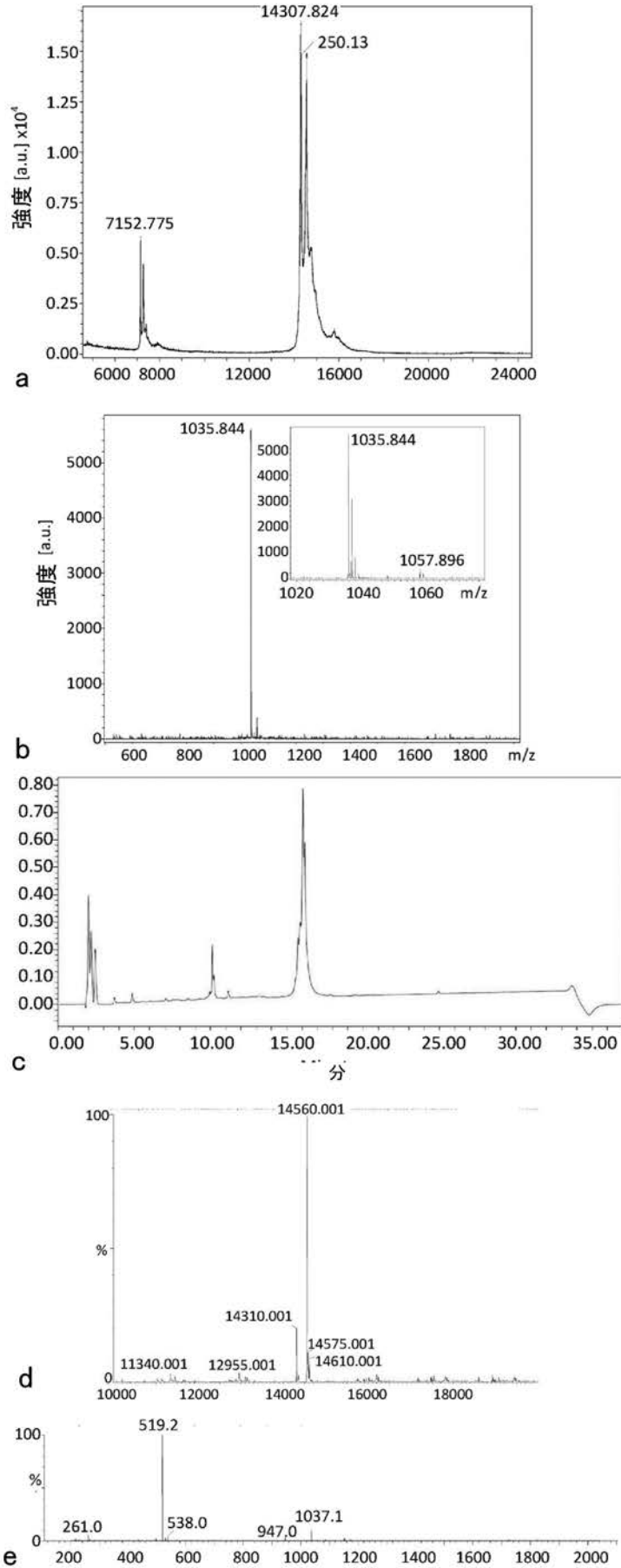
【 図 1 8 】



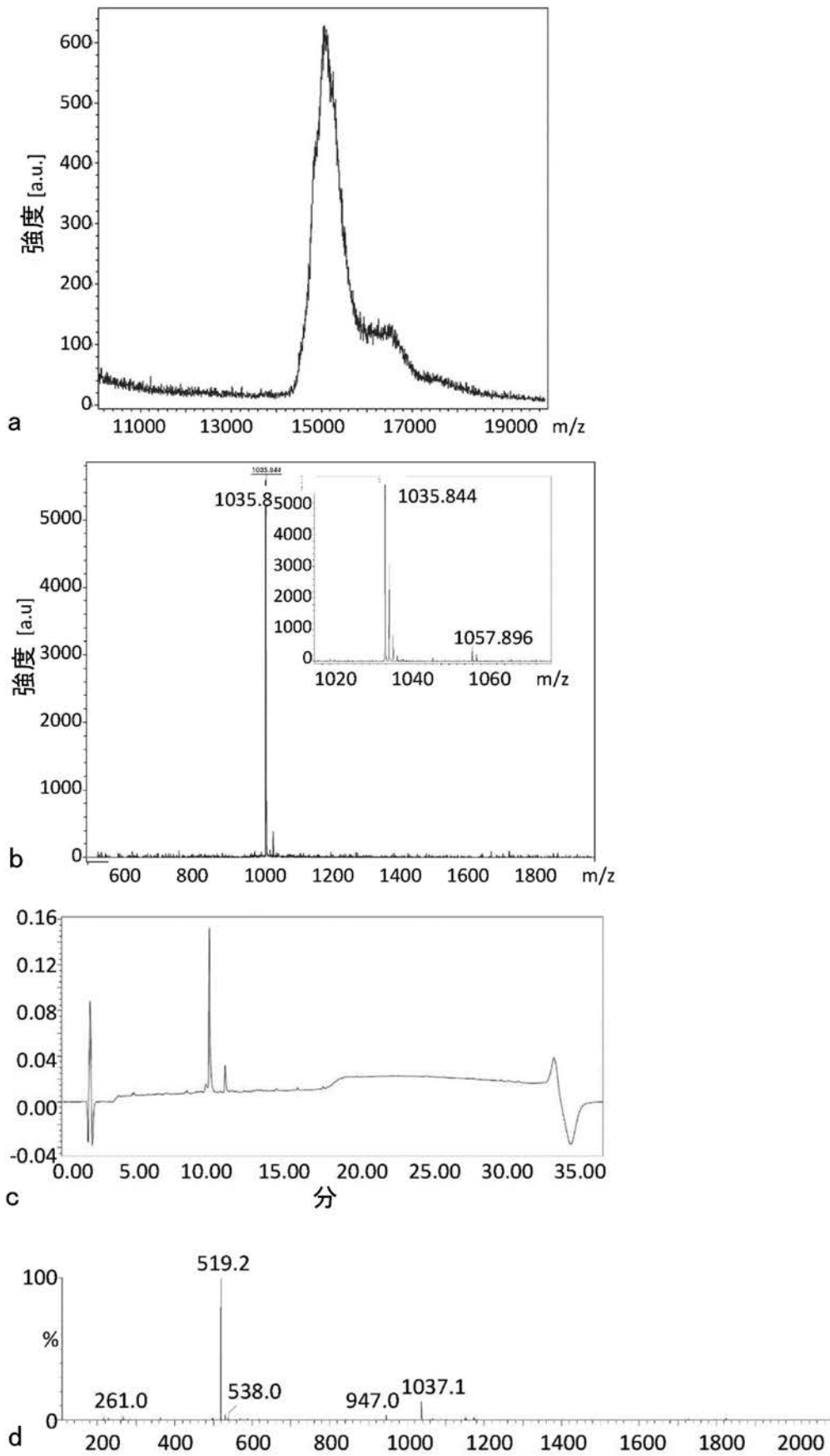
【 図 1 9 】



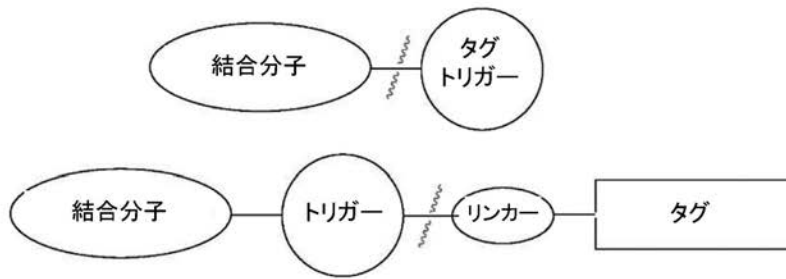
【 図 2 0 】



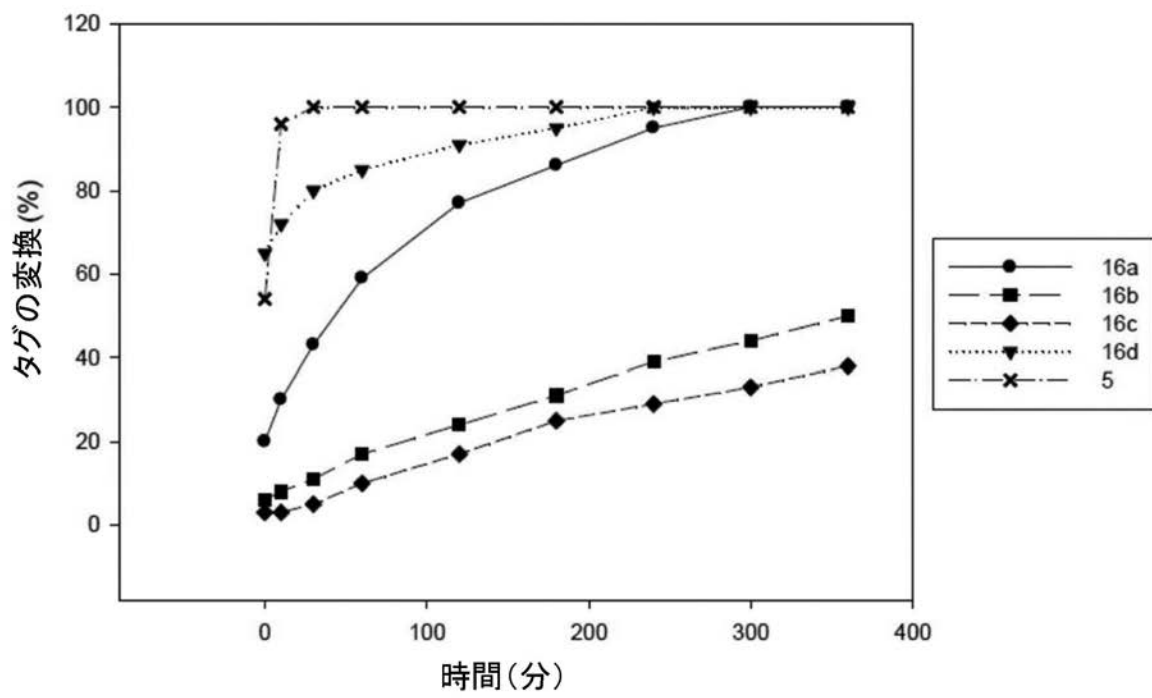
【 図 2 1 】



【 図 2 2 】



【 図 2 3 】



【 配列表 】

2016510413000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2014/053047

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/68 H01J49/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N H01J		
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 practicable, search terms used) EPO-Internal		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEMAIRE R ET AL: "Tag-mass: Specific molecular imaging of transcriptome and proteome by mass spectrometry based on photocleavable tag", JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 6, no. 6, 1 June 2007 (2007-06-01), pages 2057-2067, XP009113669, ISSN: 1535-3893, DOI: 10.1021/PR0700044 [retrieved on 2007-05-04] whole doc, in particular fig. 7	1-20
X	WO 2007/000669 A2 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; UNIV LILLE SCIENCES TECH [FR]; EUROGENTEC) 4 January 2007 (2007-01-04) whole doc, in particular fig. 10 ----- -/--	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 application or patent 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 9 April 2014		Date of mailing of the international search report 16/04/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lüdemann, Susanna

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/053047

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 2 163 900 A1 (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]) 17 March 2010 (2010-03-17)  the whole document	1,2, 6-12, 14-20
A	----- STAUBER JONATHAN ET AL: "Specific MALDI-MSI: TAG-MASS", 1 January 2010 (2010-01-01), MASS SPECTROMETRY IMAGING: PRINCIPLES AND PROTOCOLS, HUMANA PRESS, PAGE(S) 339 - 361, XP009171038, ISBN: 978-1-60761-745-7 the whole document -----	1,2, 6-12, 14-20

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/053047

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007000669	A2	04-01-2007	AT 520022 T 15-08-2011
			AT 528644 T 15-10-2011
			CA 2611266 A1 04-01-2007
			CA 2611297 A1 18-01-2007
			EP 1889047 A2 20-02-2008
			EP 1891426 A1 27-02-2008
			EP 2287602 A1 23-02-2011
			EP 2322920 A1 18-05-2011
			EP 2322921 A1 18-05-2011
			EP 2325631 A1 25-05-2011
			ES 2371203 T3 28-12-2011
			JP 5220593 B2 26-06-2013
			JP 2008542783 A 27-11-2008
			JP 2008542784 A 27-11-2008
			US 2008203289 A1 28-08-2008
			US 2011151451 A1 23-06-2011
			WO 2007000669 A2 04-01-2007
WO 2007007192 A1 18-01-2007			
EP 2163900	A1	17-03-2010	EP 2163900 A1 17-03-2010
			EP 2335077 A1 22-06-2011
			US 2011223613 A1 15-09-2011
			WO 2010026225 A1 11-03-2010

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
G 0 1 N 27/62 V

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(71)出願人 502205846  
サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェルシュ シアンティフィク  
フランス国 パリ セデックス 16 リュ ミシェル-アンジュ 3

(74)代理人 100121728  
弁理士 井関 勝守

(74)代理人 100165803  
弁理士 金子 修平

(72)発明者 ストゥバー, ジョナソン  
フランス国 エフ-59320 オーブールダン リュ・デュ・マレシャル・ルクレール 16

(72)発明者 イブラン, ジャン・フィリーブ  
フランス国 エフ-59000 リール リュ・バザンギアン 9 アパートメント14 ラ・ク  
ローザハエ・サン・マルタン

(72)発明者 メルニーク, オレグ  
フランス国 エフ-59112 アノーリン アンパッサ・ドルクール 13

Fターム(参考) 2G041 CA01 DA04 EA01 FA12 GA06 JA07 LA07

专利名称(译)	用于检测分子的轻或化学可切割的缀合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016510413A</a>	公开(公告)日	2016-04-07
申请号	JP2015557458	申请日	2014-02-17
[标]申请(专利权)人(译)	EM技术阿维奥 IMABIOTECH 单威赛引用和青苏技术里尔1 法国国家科学研究中心		
申请(专利权)人(译)	EM技术阿维奥 Université de Shiansu 等技术里尔1 中心法国国家 Shiantifiku		
[标]发明人	ストゥバー・ジョナソン イブラン・ジャン・フィリップ メルニーク・オレグ		
发明人	ストゥバー, ジョナソン イブラン, ジャン・フィリップ メルニーク, オレグ		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/543 G01N33/53 G01N33/536 G01N27/62		
CPC分类号	G01N33/58 G01N33/6848 G01N2560/00 H01J49/00 H01J49/0027 H01J49/164 H01J49/40		
FI分类号	G01N33/532.ZNA.Z G01N33/543.541.Z G01N33/53.Y G01N33/536.Z G01N33/543.525.E G01N27/62.V		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA04 2G041/EA01 2G041/FA12 2G041/GA06 2G041/JA07 2G041/LA07		
代理人(译)	金子修平		
优先权	2013305183 2013-02-18 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

<b>摘要(译)</b> 本发明涉及优选通过质谱法检测样品中目标分子的领域。本发明提供了标记的化合物，用该化合物（缀合物）标记的分子，使用该缀合物检测样品中的目标分子（靶分子）的方法，用于执行该方法的试剂盒以及它涉及标签的制备方法。	(21) 出願番号 特願2015-557458 (P2015-557458) (86) (22) 出願日 平成26年2月17日 (2014. 2. 17) (85) 翻訳文提出日 平成27年10月15日 (2015. 10. 15) (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/053047 (87) 国際公開番号 WO2014/125112 (87) 国際公開日 平成26年8月21日 (2014. 8. 21) (31) 優先権主張番号 13305183. 9 (32) 優先日 平成25年2月18日 (2013. 2. 18) (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	(71) 出願人 515224980 イー・エム・アビオテック IMABIOTECH フランス国 エフ-59120 ロス・ア ヴェニュー・ウージェーヌ・アヴィネ 8 85 (71) 出願人 513144844 エニヴェルシテ・ド・シアン・エ・テ ノロジー・ド・リール 1 フランス エフ-59655 ヴァルヌー ヴ・ダスク・セダー・シテ・シャンテ フィック
	最終頁に続く	