

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013年10月3日(03.10.2013)



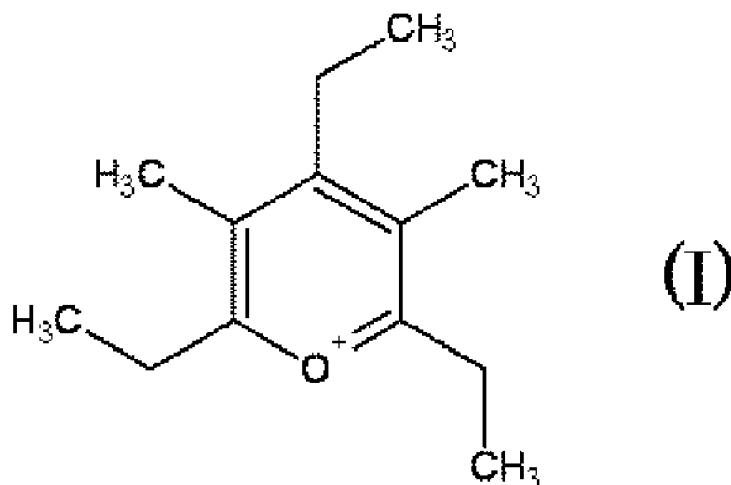
(10) 国際公開番号
WO 2013/147096 A1

- (51) 国際特許分類:
C07D 309/34 (2006.01) G01N 27/62 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/059405
- (22) 国際出願日: 2013年3月28日(28.03.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-079110 2012年3月30日(30.03.2012) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人福井大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION UNIVERSITY OF FUKUI) [JP/JP]; 〒9108507 福井県福井市文京3丁目9番1号 Fukui (JP). 学校法人北陸大学(HOKURIKU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9201180 石川県金沢市太陽が丘1丁目1番地 Ishikawa (JP). 大陽日酸株式会社(TAIYO NIPPON SANSO CORPORATION) [JP/JP]; 〒1428558 東京都品川区小山一丁目3番26号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 松川 茂(MATSUKAWA, Shigeru); 〒9101193 福井県吉田郡永平寺町松岡下合月23-3 国立大学法人福井大学内 Fukui (JP). 成田和巳(NARITA, Kazumi); 〒9101193 福井県吉田郡永平寺町松岡下合月23-3 国立大学法人福井大学内 Fukui (JP). 荒川 靖(ARAKAWA, Yasushi); 〒9201181 石川県金沢市金川町ホ-3 北陸大学内 Ishikawa (JP). 下平 晴記(SHIMODAIRA, Haruki); 〒1428558 東京都品川区小山一丁目3番26号 大陽日酸株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 高島 一(TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI

[続葉有]

(54) Title: ISOTOPE-LABELED PYRYLIUM COMPOUND

(54) 発明の名称: 同位体標識ピリリウム化合物



(57) Abstract: The present invention provides: a compound represented by formula (I) or a salt thereof; a method for quantitatively analyzing a target substance containing an amino group, which comprises labeling the target substance in at least two samples by the isotopic labeling respectively using, as labeling compounds, at least two types of the compounds or salts thereof that have different masses from each other so that the mass of the target substance in one of the samples can be different from the mass of the target substance in the other of the samples; and others.

(57) 要約: 本発明は、式 (I) : で表される化合物またはその塩; および、2以上の試料間で標的物質に質量差を与えるように、同位体標識により互いに質量差を有する2つ以上の該化合物またはその塩を標識化合物として用いて試料中の標的物質を標識することを含むアミノ基含有標的物質の定量分析方法、等を提供する。

WO 2013/147096 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： 同位体標識ピリリウム化合物

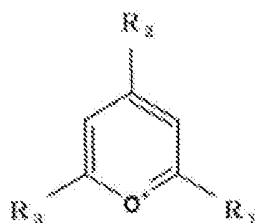
技術分野

[0001] 本発明は、概しては、生体試料分析に関する。より詳細には、本発明は、新規の同位体標識ピリリウム化合物、および、該化合物を用いて、質量分析により2以上の試料中のアミノ基含有化合物を定量分析する方法等に関する。

背景技術

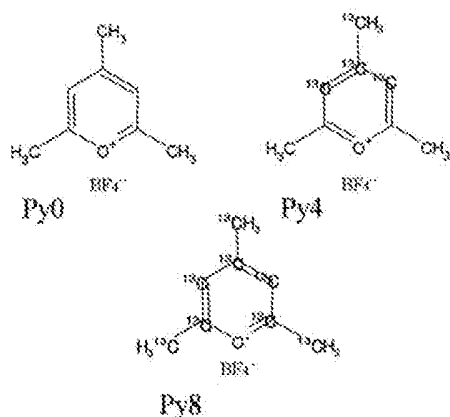
[0002] タンパク質の分析においては、本発明者等の一人により、下記式：

[0003] [化1]



[0004] (式中、R₁、R₂およびR₃はそれぞれ同一または異なって、水素、ハロゲンまたはアルキルを示す)で表される化合物またはその塩を標識化合物として用いる方法が報告されている(特許文献1)。具体的には、下記式：

[0005] [化2]



[0006] で表される、同位体標識により互いに質量差を有する3つの化合物(これら

を総称してP y化合物と呼ぶ)が合成されている。該文献に記載の方法では、2以上の分析試料中のタンパク質をP y化合物のいずれかで標識することにより試料間で同一タンパク質に質量差を与えた後、試料を混合し、タンパク質を加水分解する。得られた標識ペプチドを質量分析に供して、ペプチドの構造解析から由来するタンパク質を同定し、更に質量スペクトルに基づいて、同定されたタンパク質の試料間での存在比が算定される。

[0007] 一方、アミノ酸の分析では、20種以上の生体アミノ酸を1回的高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析で相互分離した後でニンヒドリンと反応させ、その生成物の吸光度に基づいて、アミノ酸を定量する方法が一般的である。しかしながら、この方法は感度が低く、低濃度のアミノ酸の分析には適していない。

そのため、より高い感度を実現するために、蛍光標識の使用が提案されており、それにより、約10倍以上の高感度化が実現されている。

更に、それでも検出できない低濃度のアミノ酸に対しては、液体クロマト分離した後に質量分析して検出する方法が採用されている。この場合、分離したアミノ酸をイオン化し易くするために、アミノ基と反応する試薬を用いてアミノ酸を誘導体化してから、それを液体クロマト分離および質量分析に供する方法が採用されてきた。しかしながら、この方法論に従った場合でも、従来の技術では高感度分析には限界があった。

[0008] ところで、特許文献2には種々のピリリウム化合物を製造する方法が記載されている。該文献に記載の一般式では2種類の異性体が形成されるが、両者の分離は容易でないので、検出はアンモニアと反応してできるピリジン体のNMR分析に依存すること、反応に使う酸としてH_oが-10~-5のものが利用できることが述べられている。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開第2008/156139号パンフレット

特許文献2：米国特許第4,642,359号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] タンパク質の分析において、質量分析に供されるペプチドの分子量は500～3000Daの範囲にあることが多い。そのため、これらのペプチドの質量スペクトルは、天然に存在する同位体に起因して、単一ピークではなく互いに質量差を有する複数ピークとして観察される。各ピークの大きさはペプチドの分子量に依存するが、モノアイソトピックピークが主ピークであり、それより質量が1～3大きい位置のピークは大きく、以後のピークは次第に小さくなる。従って、上記特許文献1の方法のように、同位体標識により互いに質量差を有する2以上の標識化合物を用いて同一ペプチドに質量差を与える場合、該質量差が小さいと異なるピーク同士で干渉が生じてしまい、分析が複雑になる。本発明者等は、経験的に、モノアイソトピックピークと質量差4のピークとの間では干渉が無視できず、質量差6になると相互干渉は無視できることを見出している。このように、タンパク質の分析のためには、出来るだけ質量差の大きな同位体試薬を開発することが望まれている。

[0011] 一方、アミンやアミノ酸の分析技術の現状から、生体試料中のアミンやアミノ酸をより高感度に定量し得る方法が求められている。また、複数の生体試料を多重定量して、各試料中に存在するアミンやアミノ酸等を網羅的に分析できる技術が望まれている。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者等は上記課題を解決するために鋭意検討を行った。そのために、本発明者等は先ず、Py化合物をリード化合物としてタンパク質標識のためにより良い化合物を探索した。その結果、2位、4位および6位にエチル基を、更に3位および5位にメチル基を有するピリリウム化合物がタンパク質との反応性や水溶性等において優れた特性を持つことを見出した。そこで、同位体標識された該化合物の合成を更に試み、互いに質量差6を有する3種の化合物（後述のPyII-0、PyII-6およびPyII-12）を高純度で合成することに成功した。得られた同位体標識化合物、具体的にはP

Py 11-0、Py 11-6およびPy 11-12を用いて、上記特許文献1と同様にタンパク質の定量分析を試みたところ、これらの同位体標識化合物を用いて高感度で多重定量分析を行い得ること、および該化合物間で質量差が6であるため質量スペクトルにおけるピーク間のオーバーラップが少なく、定量精度が格段に向上し得ることが確認された。

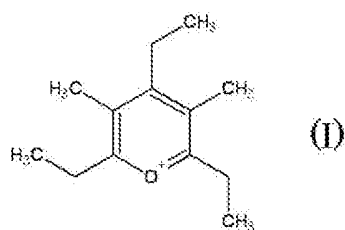
本発明者等は更に、該化合物をアミンやアミノ酸等のアミノ基含有非ペプチド化合物の分析に適用することを試みた。アミノ基含有非ペプチド化合物の分析のためには、標識化合物間に2の質量差があればピーク間の干渉を回避できるので、互いに2の質量差を有して、なるべく多種類の同位体標識化合物を用意できることが分析効率の点で有益である。そこで更に合成実験を重ねた結果、上記Py 11-0に対して質量差2、4、8または10を有する化合物（後述のPy 11-2、Py 11-4、Py 11-8、Py 11-10）を高純度で合成することに成功した。これらの同位体標識化合物を用いて分析を行うことで、生体試料中のアミノ基含有非ペプチド化合物を高感度に検出し得るのみならず、複数試料を同時に定量して、各試料中に含まれるアミノ基含有非ペプチド化合物を網羅的に分析できることを見出した。また、アミノ基含有非ペプチド化合物のPy誘導体は、ナノ液体クロマトグラフィシステムにおいて必須である、分析カラムへの導入前に一旦導入されるトラップカラム（ODSカラム）への結合性が低いため、オートサンプラーを用いた高感度自動分析に繋げることは容易でないことが本発明者等により確認されていた。しかし、Py 11化合物は、Py化合物と比べて環の側鎖の疎水性が高く、疎水性吸着能の向上に寄与するため、トラップカラムとしてODSカラムを利用して、アミノ基含有非ペプチド化合物の高感度分析を自動化する可能性を拓くことが分かった。

本発明者等は上記の知見に基づき更に検討を進めた結果、本発明を完成するに至った。

[0013] 本発明は即ち、以下を提供する。

[1] 式(1)：

[0014] [化3]

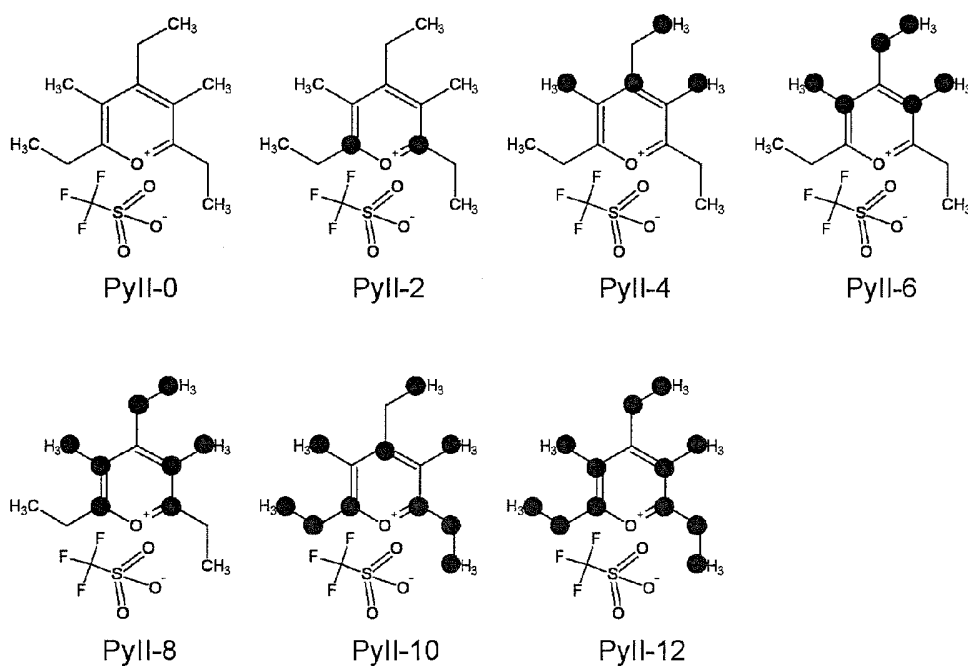


[0015] で表される化合物またはその塩。

[2] 式 (I) において質量数 13 の炭素を 1 つ以上有する、上記 [1] 記載の化合物またはその塩。

[3] 式 (II) :

[0016] [化4]

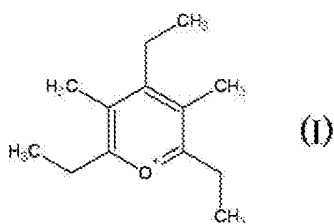


[0017] (式中、黒丸で示された原子は、質量数 13 の炭素原子を示す。) で表される PyII-0、PyII-2、PyII-4、PyII-6、PyII-8、PyII-10 および PyII-12 からなる群から選択される 1 つの化合物である、上記 [1] 記載の化合物またはその塩。

[4] 同位体標識により互いに異なる質量を有する 2 つ以上の式 (I) :

[0018]

[化5]



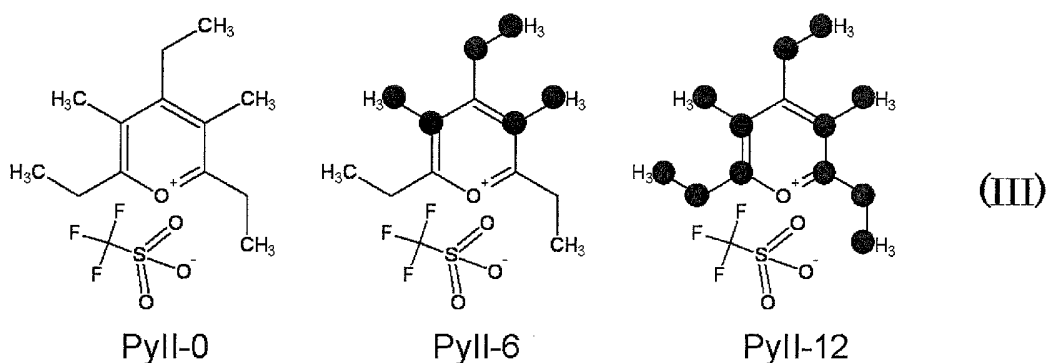
[0019] で表される化合物またはそれらの塩を標識化合物として含む、質量分析計を用いた生体試料中のアミノ基を含有する標的物質の定量用キット。

[5] 質量差が6以上である2つ以上の式(1)で表される化合物またはそれらの塩を含み、かつ標的物質がタンパク質である、上記[4]記載のキット。

[6] 質量数13の炭素原子を含まない式(1)で表される化合物、質量数13の炭素原子を6個有する式(1)で表される化合物、および質量数13の炭素原子を12個有する式(1)で表される化合物またはそれらの塩を含む、上記[5]記載のキット。

[7] 式(III) :

[0020] [化6]



[0021] (式中、黒丸で示された原子は、質量数13の炭素原子を示す。)で表されるPyll-0、Pyll-6およびPyll-12を含む、上記[6]記載のキット。

[8] 質量差が2以上である2つ以上の式(1)で表される化合物またはそれらの塩を含み、かつ標的物質がアミノ基含有非ペプチド化合物である、上