

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02014/010700

発行日 平成28年6月23日 (2016. 6. 23)

(43) 国際公開日 平成26年1月16日 (2014. 1. 16)

|                                   |                       |             |
|-----------------------------------|-----------------------|-------------|
| (51) Int. Cl.                     | F I                   | テーマコード (参考) |
| <b>GO 1 N 27/62 (2006.01)</b>     | GO 1 N 27/62 V        | 2 GO 4 1    |
| <b>CO 7 D 239/47 (2006.01)</b>    | CO 7 D 239/47 C S P Z | 2 GO 4 5    |
| <b>CO 7 D 233/88 (2006.01)</b>    | CO 7 D 233/88         | 4 HO 4 5    |
| <b>GO 1 N 33/68 (2006.01)</b>     | GO 1 N 33/68          |             |
| <b>GO 1 N 33/66 (2006.01)</b>     | GO 1 N 33/66 Z        |             |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 89 頁) 最終頁に続く |                       |             |

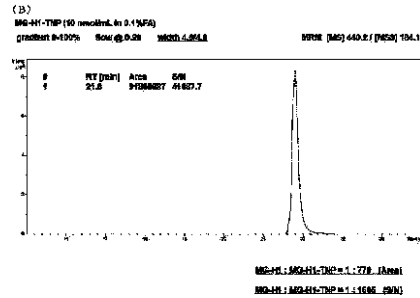
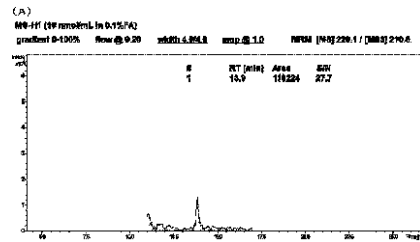
|   |                     |
|---|---------------------|
| 出願番号 特願2014-524880 (P2014-524880)         | (71) 出願人 504145342  |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP2013/069038             | 国立大学法人九州大学          |
| (22) 国際出願日 平成25年7月11日 (2013. 7. 11)       | 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号  |
| (31) 優先権主張番号 特願2012-156746 (P2012-156746) | (71) 出願人 598015084  |
| (32) 優先日 平成24年7月12日 (2012. 7. 12)         | 学校法人福岡大学            |
| (33) 優先権主張国 日本国 (JP)                      | 福岡県福岡市城南区七隈8丁目19番1号 |
|   | (74) 代理人 100099508  |
|   | 弁理士 加藤 久            |
|   | (74) 代理人 100093285  |
|   | 弁理士 久保山 隆           |
|   | (74) 代理人 100182567  |
|   | 弁理士 遠坂 啓太           |
|   | (72) 発明者 松井 利郎      |
|   | 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号  |
|   | 国立大学法人九州大学内         |
|   | 最終頁に続く              |

(54) 【発明の名称】 アミノ化合物およびその高感度質量分析方法ならびにバイオマーカーのアッセイ方法

(57) 【要約】

耐糖能異常の診断に有用な、最終糖化産物を始めとする糖化タンパク質分解物誘導体の誘導体化されたアミノ酸誘導体およびペプチド等のアミノ化合物、ならびにその迅速、高感度かつ高精度な定量が可能な質量分析方法およびそれを用いたバイオマーカーのアッセイ方法を提供すること。

本発明は、特に、質量分析に好適な誘導体化された新規な糖化タンパク質分解物誘導体を提供する。また、本発明に係るアミノ酸誘導体およびペプチド等のアミノ化合物の高感度質量分析方法は、アミノ酸誘導体またはペプチドのN末端アミノ基とトリニトロフェニル化剤またはその他の誘導体化剤とを反応させ、前記N末端アミノ基を誘導体化する工程と、N末端アミノ基が誘導体化されたアミノ酸誘導体またはペプチドを質量分析する工程を有する。さらに、本発明は、得られた質量スペクトルの強度データを用いて、生体試料中のバイオマーカー濃度の定量を行う工程を有するバイオマーカーのアッセイ方法を提供する。

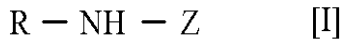


## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

一般式 [ I ] で表されることを特徴とするアミノ化合物またはその塩。

## 【化 1】



(式中、R はアミノ置換基を意味し、Z はニトロフェニル基を意味する。)

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記アミノ置換基がアミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基または複数の該アミノ酸残基ならびにノもしくは置換アミノ酸残基がペプチド結合したペプチド残基であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩。

10

## 【請求項 3】

請求項 2 に記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、プロリン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファンもしくはチロシンまたはそれらの置換体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩。

## 【請求項 4】

請求項 2 または 3 に記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アルギニン、リジン、バリン、チロシン、メチオニン、グリシン、ヒスチジン、グルタミン酸もしくはトリプトファンまたはそれらの置換体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩。

20

## 【請求項 5】

請求項 2 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記置換アミノ酸残基が、最終糖化産物 ( AGE ) の残基であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩。

## 【請求項 6】

請求項 5 に記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記最終糖化産物 ( AGE ) が、アルギニン誘導体またはリジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩。

30

## 【請求項 7】

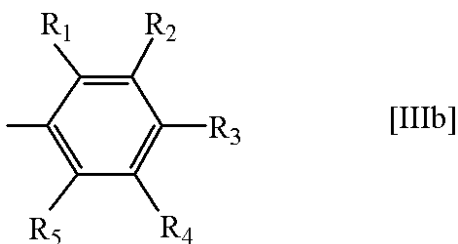
請求項 2 に記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記ペプチド残基のペプチドが、2 個ないし 10 個のアミノ酸がペプチド結合していることを特徴とするアミノ化合物またはその塩。

## 【請求項 8】

請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記ニトロフェニル基が、一般式 [ IIIb ] で表されることを特徴とするアミノ化合物またはその塩。

40

## 【化 2】



(式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はそれぞれ同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および

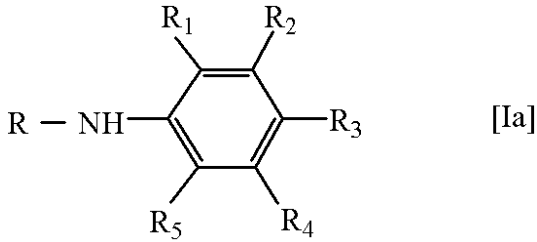
50

R<sub>5</sub> の少なくとも 1 個はニトロ基を意味する。)

【請求項 9】

請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記アミノ化合物が、一般式 [Ia] で表されることを特徴とするアミノ化合物またはその塩。

【化 3】



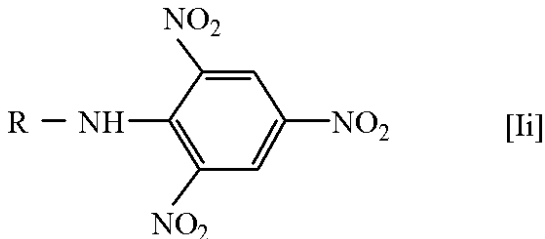
10

(式中、R、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はいずれも前記と同じ意味を有する。)

【請求項 10】

請求項 9 に記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記アミノ化合物が、一般式 [Ii] で表されることを特徴とするアミノ化合物またはその塩。

【化 4】



20

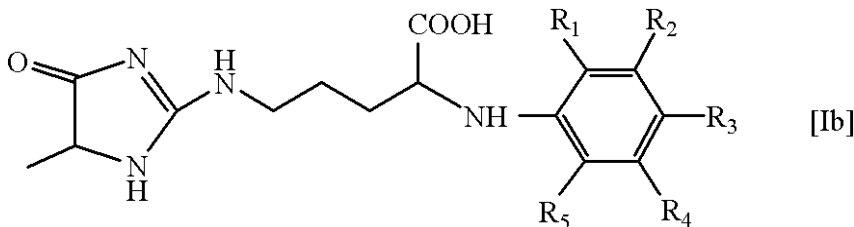
(式中、R は前記と同じ意味を有する。)

【請求項 11】

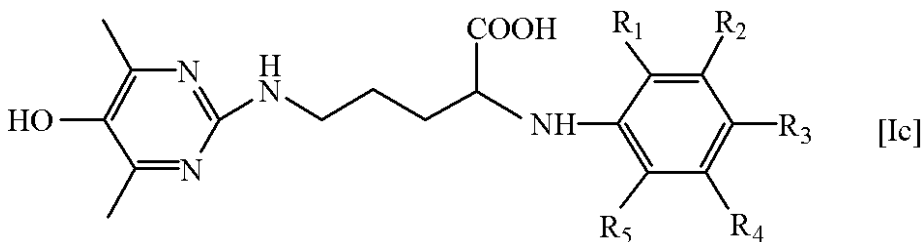
請求項 1 ないし 10 のいずれか 1 項に記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記アミノ化合物が、一般式 [Ib] で表されるニトロフェニル化メチルグリオキサル由来ヒドロイミダゾロン誘導体または一般式 [Ic] で表されるニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩。

30

【化 5】



【化 6】



40

(式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はいずれも前記と同じ意味を有する。)

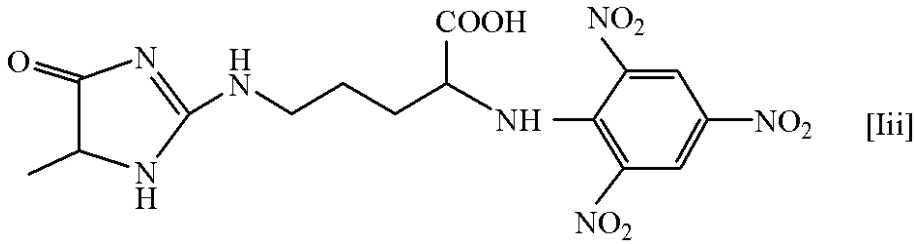
【請求項 12】

請求項 11 に記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記アミノ化合物が、構造式 [Iii] で表されるトリニトロフェニル化メチルグリオキサル由来ヒドロイミダゾロン

50

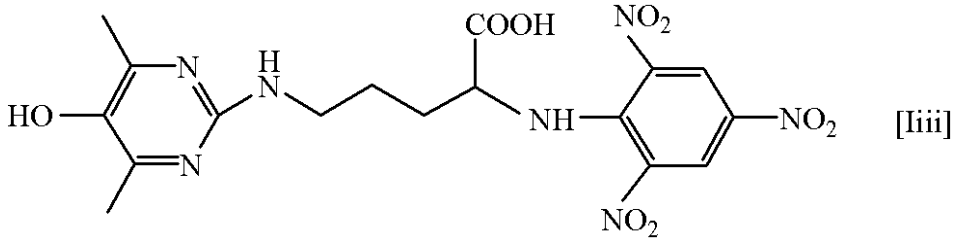
誘導体または構造式 [Iiii] で表されるトリニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩。

【化 7】



10

【化 8】

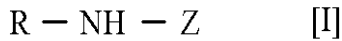


【請求項 1 3】

一般式 [I] で表されるアミノ化合物またはその塩を質量分析で測定することを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

20

【化 9】



(式中、R はアミノ置換基を意味し、Z はニトロフェニル基を意味する。)

【請求項 1 4】

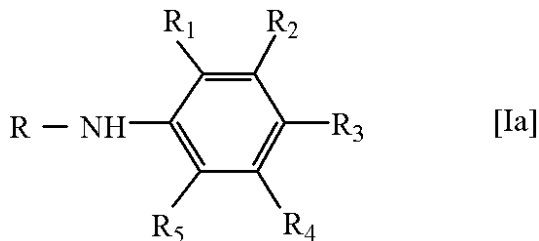
請求項 1 3 に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ置換基が、アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基またはペプチド残基であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 3 または 1 4 に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ化合物が、一般式 [Ia] で表されることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

30

【化 1 0】



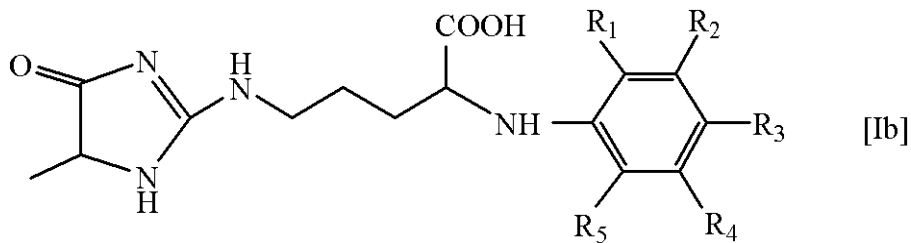
40

(式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はそれぞれ同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> の少なくとも 1 個はニトロ基を意味し、R は前記と同じ意味を有する。)

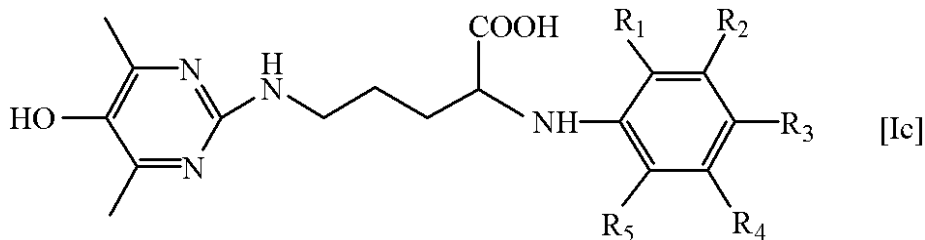
【請求項 1 6】

請求項 1 3 ないし 1 5 のいずれか 1 項に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ化合物が、一般式 [Ib] で表されるニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または一般式 [Ic] で表されるニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

## 【化 1 1】



## 【化 1 2】



10

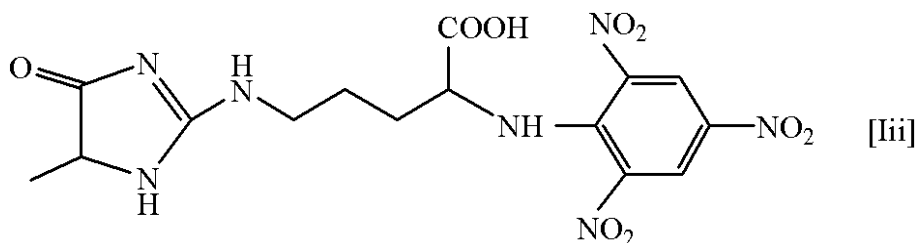
(式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  はいずれも前記と同じ意味を有する。)

## 【請求項 1 7】

請求項 1 3 ないし 1 6 のいずれか 1 項に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ化合物が、  
 構造式 [Iii] で表されるトリニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または構造式 [Iiii] で表されるトリニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

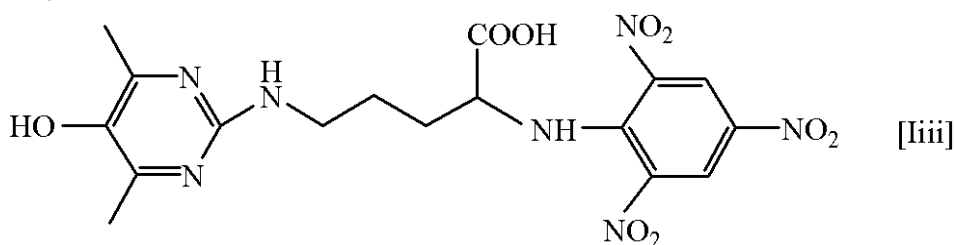
20

## 【化 1 3】



30

## 【化 1 4】

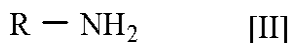


## 【請求項 1 8】

一般式 [II] で表されるアミノ酸誘導体またはその塩と、一般式 [III] で表されるニトロベンゼン化合物を反応させて一般式 [I] で表されるアミノ化合物またはその塩を得る工程と、  
 上記工程で得られたアミノ化合物またはその塩を質量分析する工程を有することを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

40

## 【化 1 5】



(式中、R はアミノ置換基を意味する。)

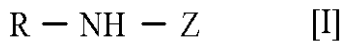
## 【化 1 6】



50

(式中、Xはアミノ基反応性官能基を意味し、Zはニトロフェニル基を意味する。)

【化17】



(式中、RおよびZは、前記と同じ意味を有する。)

【請求項19】

前記一般式 [I] で表されるアミノ酸誘導体またはその塩と、一般式 [III] で表されるニトロベンゼン化合物の反応を、アルカリ性水溶液または水と有機溶媒の混合溶液であり、かつ前記溶液のpHが8~10でおこなうことを特徴とする請求項18に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

【請求項20】

請求項18または19に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ置換基がアミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基またはペプチド残基であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

【請求項21】

請求項18ないし20のいずれか1項に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記反応が試料中で行われることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

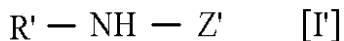
【請求項22】

請求項18ないし21のいずれか1項に記載の質量分析方法であって、前記アミノ酸誘導体またはその塩がバイオマーカーであることを特徴とするアミノ化合物の質量分析方法。

【請求項23】

一般式 [I'] で表されるアミノ化合物またはその塩を質量分析することを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

【化18】



(式中、R'は、置換アミノ酸残基またはペプチド残基を意味し、Z'は誘導体化残基を意味する。)

【請求項24】

請求項23に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記誘導体化残基の誘導体化剤が、

1 - ピレンスルホニルクロライド (PSC)、ダンシルクロライド (DNS-Cl) 等のスルホニル化合物；

9 - フルオレニルメチルクロロホルメート (FMOC)、4 - ジメチルアミノスルホニル - 7 - フルオロベンゾキサジアゾール (DBD-F)、4 - フルオロ - 7 - ニトロベンゾフラザン (NBD-F)、2、3 - ナフタレンジアルデヒド (NDA)；

3 - アミノピリジル - N - ヒドロキシサクシニミジルカルバメート (APDS) 等のカルバメート化合物；

3 - クロロカルボニル - 6、7 - ジメトキシ - 1 - メチル - 2 - キノキサリノン (DMEQ-Cl)；

3 - ニトロフェニルイソチオシアネート、3 - ピリジルイソチオシアネート、4 - (ジメチルアミノ)フェニルイソチオシアネート、フルオレセイン - 5 - イソチオシアネート (FITC) 等のイソチオシアネート化合物；

ジエチルエトキシメチレンマロネート等のマロネート化合物；

(5 - サクシニミドキシ - 5 - オキソペンチル)トリフェニルホスホニウムブロミド (SPTPP) 等のホスホニウム化合物；

または2 - クロロ - 1 - メチルピリジニウム塩等のピリジニウム化合物から選択された少なくとも1以上の誘導体化剤であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

【請求項25】

10

20

30

40

50

請求項 1 3 ないし 2 4 のいずれか 1 項に記載のアミノ化合物の質量分析方法により得られる質量スペクトルの強度データを用いて、生体試料中のバイオマーカー濃度の定量を行うことを特徴とするバイオマーカーのアッセイ方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アミノ化合物およびその高感度質量分析方法ならびにバイオマーカーのアッセイ方法に関する。更に詳しくは、最終糖化産物を始めとするアミノ酸誘導体とニトロベンゼン系化合物との誘導体化で得られるアミノ化合物およびその塩、ならびにこのアミノ化合物を迅速に高感度かつ高精度で定量が可能な質量分析方法、およびそれを用いたバイオマーカーのアッセイ方法に関するものである。

10

【背景技術】

【0002】

糖尿病は、血糖値が病的に高い状態をいうが、血糖値の異常に起因する急性症状以外に、高血糖状態が長期間継続することに伴い、種々の臓器が障害を受け、糖尿病慢性期合併症を発症すると、治療が非常に困難になるため、早期に発症を診断し、生活習慣の改善、経口血糖降下薬の投与、インスリン注射等の処置を開始することが重要である。

【0003】

しかし、生活習慣病を主因とする糖尿病患者数は年々増加の一途を辿っており、厚生労働省の推計では900万人を超えるのはもはや時間の問題と言われている。その糖尿病患者数に加えて、いわゆる糖尿病予備軍が1000万人以上いると推定されることから、糖尿病疾患患者数は近い将来激増することは想像に難くない。しかしながら、実際に糖尿病の治療を受けている患者はわずか300万人足らずであり、また十分な診断を受けずに放置して治療が遅れたために腎症に至る患者が、毎年1万人ずつ増加し続けているのが現状である。その上、糖尿病の患者の約半数は心筋梗塞や脳梗塞等の虚血性疾患で死亡していることを考え合わせると、糖尿病とその合併症、ならびにいわゆる隠れ糖尿病（糖尿病前症）に対する対策は、医療経済からしても極めて重要である。とりわけ、健康診断の血糖値測定のみでは判定が極めて困難な潜在的糖尿病予備軍である糖尿病前症に対する対策、つまり早期診断方法と治療システムの確立は急務である。

20

【0004】

しかも、近年、糖尿病前症の中でも、空腹時血糖値（FPG）は正常であるのに、耐糖能障害（IGT）のために食後血糖値が極端に高くなり、これにより心血管障害を引き起こす患者が増加していることが指摘されている。このため、米国糖尿病学会や世界保健機構は、糖尿病前症をれっきとした疾患と定め、生活習慣の質的改善と薬物治療による糖尿病前症のIGT改善の重要性を唱えている。前述したように、このような糖尿病前症といわれる患者は、日本でも、推定1000万人を超えていると考えられるところから、糖尿病前症に対する予防ならびに治療対策は極めて重要である。

30

【0005】

日本糖尿病学会では、糖尿病前症や糖尿病の診断基準として、一次健康診断では空腹時血糖値（FPG）、また二次健康診断では経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）の実施を指導してきた。糖尿病前症患者の耐糖能障害は、一次健康診断のFPG検査やグリコヘモグロビン（HbA1c）検査だけでは正確に診断することが困難であるところから、一次健康診断で糖尿病前症が疑われる被検者に対しては、OGTTの二次健康診断の受診を勧められている。しかしながら、このOGTTは、被験者の長い拘束時間や簡便性に欠ける上に、糖（グルコース）負荷という身体的負担を課するとともに急激な血糖値上昇等の危険が伴う等の問題があり、一般の健康診断での血液検査による血糖値検査法のように普及していないのが実情である。その結果、潜在的な糖尿病前症の多くが、OGTTの二次健康診断の受診を怠ってしまい、糖尿病やその合併症を自覚することなく未治療のまま真性の糖尿病に進行し、さらに重篤な合併症を発症するか、または腎透析を余儀なくされるに至っている。

40

50

## 【0006】

一次健康診断では、通常、空腹時血糖（FPG）、随時血糖あるいはグリコヘモグロビン（HbA1c）を判定指標とした検査が実施されていて、FPG値が100mg/dL以上、またはHbA1c値が5.2%以上であれば、インスリン抵抗性もしくはそれによるIGTの疑いありと診断されている。しかし、インスリン抵抗性によるIGTは、食後高血糖が主たる初期変化として現れてくることから、従来的一次健康診断で使用されているいずれの指標も精度の点で不十分と言わざるを得ず、従来的一次健康診断法は、糖尿病前症の早期診断としては利用することができない。

## 【0007】

そこで、現実的には、一次健康診断において、これらの指標を用いてインスリン抵抗性あるいはIGTが疑われる被検者に対して、二次健康診断あるいはそれ以降の健康診断で75g経口ブドウ糖負荷試験（75g OGTT）、血中インスリン、HOMA-R等の検査により、インスリン抵抗性もしくはIGTが陽性であるかどうかを検査して、糖尿病前症の確定診断がなされている。これらの検査は、当然のことながら費用も手間もかかることになる。

10

## 【0008】

そこで、もし一次健康診断で用いた同じ血糖測定用採血サンプルでOGTTと同等の精度で糖尿病前症の診断を確定できる方法があれば、糖尿病前症患者の検出率は飛躍的に向上するとともに、二次健康診断でのOGTT検査は不要となり、世界保健機構等が提唱する糖尿病前症の早期診断ならびに治療による糖尿病化阻止戦略を強力に推し進めることが可能となる。

20

## 【0009】

他方、近年、糖尿病慢性期合併症のリスクファクターとして、種々の最終糖化産物が注目を集めている。最終糖化産物（AGE類）は、糖化タンパク質、メイラード反応産物等とも呼ばれ、グルコース等の還元糖とタンパク質のアミノ基との非酵素的な反応により生成する種々の構造を有するタンパク質誘導体である。AGE類は、細胞外マトリックスタンパク質、膜タンパク質および細胞内タンパク質の糖化修飾に起因するこれらのタンパク質の機能及びそれに依存する細胞機能の破綻、あるいはAGE類をリガンドとするレセプターが引き起こす細胞応答の結果として、種々の病変の発症及び増悪に関与している。例えば、AGE類レセプターの1つであるRAGE類によってAGE類が認識されると、細胞内NADPHオキシダーゼによる細胞内酸化ストレス物質の産生が亢進し、これが上皮細胞における遺伝子発現を変化させることにより、種々の糖尿病性血管障害が発症すると考えられている（非特許文献1参照）。

30

## 【0010】

AGE類の中でも、解糖系の中間体または副産物として産生されるグリセルアルデヒドやメチルグリオキサル（MG）に由来するものは、糖尿病および耐糖能異常の発症および予後予測等に関する診断マーカーとして期待を集めている（非特許文献2、3、4、5）。

## 【0011】

非特許文献2には、2型糖尿病患者の血清について、メチルグリオキサル由来ヒドロイミダゾールのポリクロナル抗体を用いたELISA系で測定した結果、メチルグリオキサル由来ヒドロイミダゾールの血清レベルが同齡健常人に比較して増加しているとの報告がなされている。同非特許文献2は、メチルグリオキサル由来ヒドロイミダゾールの血清レベルと、AGE類の1種であるN<sup>ε</sup>-（カルボニルメチル）リジンの血清レベルとの間には、同様に有意な相関関係があるが、メチルグリオキサル由来ヒドロイミダゾールの血清レベルは、空腹時血糖の血漿レベルやヘモグロビンレベルとは関連性はなかったと報告している。

40

## 【0012】

非特許文献3は、LC/MS/MSを用いて1型糖尿病患者の血漿を測定した結果、タンパク質の糖化または酸化による付加生成物の濃度ならびにその遊離残基（free adduct

50



)の濃度が増加していることを示している。例えば、メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロンやグリオキサール由来ヒドロイミダゾロンあるいはその他のAGE類であるN-(カルボニルメチル)リジン、N-(カルボニルエチル)リジン、ならびにこれらの遊離付加物(free adduct)が増加していることが報告されている。

【0013】

非特許文献4は、1型糖尿病患者の血漿をタンデム質量分析した結果、メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン遊離付加物が糖尿病患者のマーカーとして優れていることを示唆している。

【0014】

非特許文献5は、1型糖尿病患者の血漿ならびに尿サンプルをLC-MS/MSで測定した結果、糖負荷後の血糖値とインスリン値の上昇に加えて、メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾール遊離付加物を初めとして、N-(カルボニルメチル)リジン、N-(カルボニルエチル)リジン、グリオキサール由来ヒドロイミダゾロン、N-[5-(2,3,4-トリヒドロキシブチル)-5-ヒドロ4-イミダゾロン2-イル]-オルニチン(3DG-H1)等のfree adductも増加することを報告している。即ち、この論文は、食後には高血糖になるだけでなく、高カルボニルストレス状態も誘発されることを示している。さらに、この文献には、メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン遊離付加物の他、アルグピリミジンを含む多くのAGE類、ならびにアミノ酸(アルギニン、リジン、メチオニン、チロシンおよびトリプトファン)についてのタンデム質量分析結果が記載されている。

【0015】

上述したように、これらのAGE類をタンデム質量(MS/MS)分析する手法が報告されている。しかしながら、これらのAGE類についての測定は、ELISA法等の免疫化学的手法を用いた総量評価以外に有効な手法が存在しないのが現状であり(特許文献1)、個別のAGE類およびその分解産物について確立した測定法は殆ど存在しておらず、ましてや臨床に応用可能な測定法は存在してないと言わざるを得ない。これらの個別のAGE類の定量は、糖尿病および耐糖能異常の診断のみならず、メタボローム解析等においても有用であることから、AGE類についてより迅速に高感度かつ高精度に個別の化合物を測定できるアッセイ法が強く望まれている。

【0016】

AGE類分析の他に、アミノ酸分析も、臨床分野、例えば先天的な代謝障害のアッセイにとって非常に重要であり、また診断のバイオマーカー検索に使用できる可能性を持っている。アミノ酸分析は、例えば、先天性アミノ酸症の診断や、肝臓機能障害の重症度や治療の指針等として使用されている。また、最近の報告では、アミノ酸のプロファイルが、慢性C型肝炎患者の進行型線維症等の診断に応用されている。さらに、アミノ酸のプロファイルを指標として用いて、生物の健康度合いの分析の可能性までも報告されている(非特許文献6)。

【0017】

上述したようなアミノ酸分析のために、アミノ酸自動分析装置が開発された。この装置はニンヒドリン試薬を用いたアミノ酸の比色を測定するものであり、分析には非常に時間を要するものである。

【0018】

上記のような比色測定方法の他に、プレカラム誘導体化法が開発され、このプレカラム誘導体化法に使用する誘導体化剤も様々なものが開発されている(非特許文献6)。しかし、この誘導体化法は複雑で時間を要する技術である。さらに、この誘導体化法と質量分析方法を組み合わせた自動アミノ酸分析方法も開発されているが、この方法にしても更なる改良が求められていた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0019】

10

20

30

40

50

【特許文献1】特開2008-224453号公報

【非特許文献】

【0020】

【非特許文献1】Marie-Paule Wautier他著、「Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE」、American Journal of Physiology -Endocrinology and Metabolism、(米国)、アメリカ生理学会(American Physiological Society)、2001年5月、第280巻、E685 - E694

【非特許文献2】Kilhovd, B.K., et al. Metabolism, Vol 52, No 2 (February), 2003: pp. 163-167

【非特許文献3】Rabbani, N., and Thornalley, P.J. Amino Acids DOI 10.1007/s00726-010-0783-0 10

【非特許文献4】Ahmed, N., et al. Diabetologia (2005) 48: 1590-1603

【非特許文献5】Ahmed, N., et al. Diabetes Care, Vol. 28, No. 10, October 2005, pp. 2465-2471

【非特許文献6】Shimbo, K., et al. Biomed. Chromatogr. 2010; 24: 683-691.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

そこで、本発明者らは、かかる事情に鑑みて鋭意検討を重ねた結果、AGE類のメチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体(MG-H1)ならびにアルグピリミジン(AP)の末端アミノ基をニトロベンゼン系化合物で誘導体化することによって、質量分析における感度が大幅に向上する上に、AGE類に加えて、その他のアミノ酸誘導体またはペプチド等のアミノ化合物にも応用できることを見いだして、本発明を完成するに至った。 20

【0022】

したがって、本発明は、特に最終糖化産物を始めとするアミノ酸誘導体とニトロベンゼン系化合物との誘導体化で得られるアミノ化合物およびその塩、ならびにこのアミノ化合物を迅速に高感度かつ高精度で定量が可能な質量分析方法、およびそれを用いたバイオマーカーのアッセイ方法を提供することを目的とする。

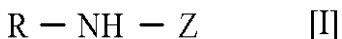
【課題を解決するための手段】 30

【0023】

上記目的を達成するために、本発明は、一般式[I]で表されるアミノ化合物またはその塩を提供する。

【0024】

【化1】



【0025】

式[I]において、Rはアミノ置換基を意味し、Zはニトロフェニル基を意味する。

【0026】

本発明は、その好ましい態様として、上記アミノ置換基が、アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基または該アミノ酸残基ならびに/もしくは置換アミノ酸残基がペプチド結合したペプチド残基であるアミノ化合物またはその塩を提供する。 40

【0027】

本発明は、その好ましい態様として、上記アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、プロリン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファンもしくはチロシンまたはそれらの置換体、好ましくはアルギニン、リジン、バリン、チロシン、メチオニン、グリシン、ヒスチジン、グルタミン酸もしくはトリプトファンまたはそれらの置換体であるアミノ化合物またはその塩を提 50

供する。

【0028】

本発明は、その好ましい別の態様として、上記置換アミノ酸残基が、最終糖化産物（AGE）、好ましくはアルギニン誘導体またはリジン誘導体の残基であるアミノ化合物またはその塩を提供する。

【0029】

本発明は、その好ましい別の態様として、上記ペプチド残基のペプチドが、2個ないし10個のアミノ酸がペプチド結合しているアミノ化合物またはその塩を提供する。

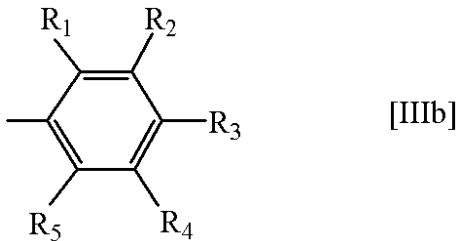
【0030】

本発明は、その好ましい別の態様として、上記ニトロフェニル基が、一般式 [IIIb] で表されるアミノ化合物またはその塩を提供する。

10

【0031】

【化2】



20

【0032】

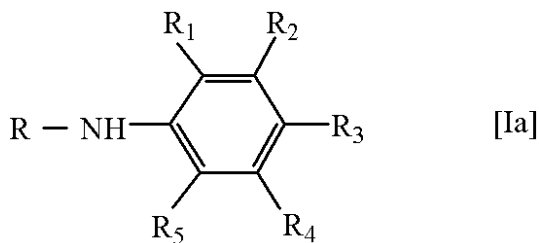
式 [IIIb] において、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  はいずれも同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  の少なくとも1個はニトロ基を意味する。

【0033】

本発明は、そのより好ましい態様として、上記アミノ化合物が、一般式 [Ia] で表されるアミノ化合物またはその塩を提供する。

【0034】

【化3】



30

【0035】

式 [Ia] において、 $R$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  はそれぞれ前記と同じ意味を有する。

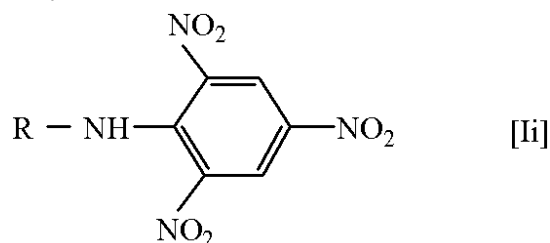
【0036】

本発明は、そのより好ましい別の態様として、上記アミノ化合物が、一般式 [Ii] で表されるアミノ化合物またはその塩を提供する。

40

【0037】

【化4】



【0038】

式 [Ii] において、R は前記と同じ意味を有する。

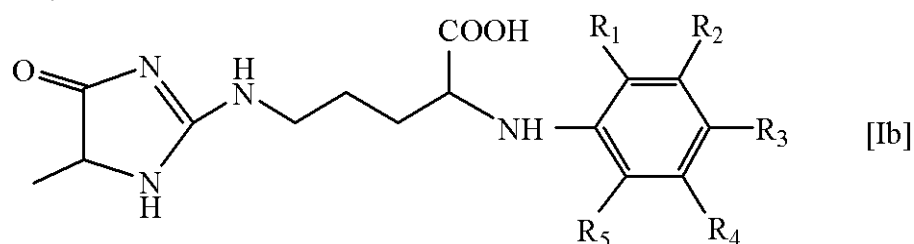
10

【0039】

本発明は、そのより好ましい態様として、上記アミノ化合物が、一般式 [Ib] で表されるニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または一般式 [Ic] で表されるニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であるアミノ化合物またはその塩を提供する。

【0040】

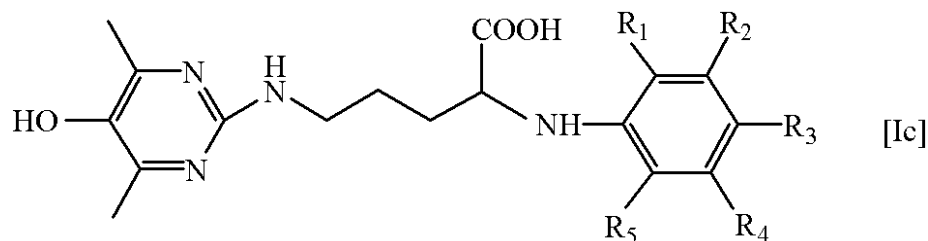
【化5】



20

【0041】

【化6】



30

【0042】

式 [Ib] 及び [Ic] において、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はいずれも前記と同じ意味を有する。

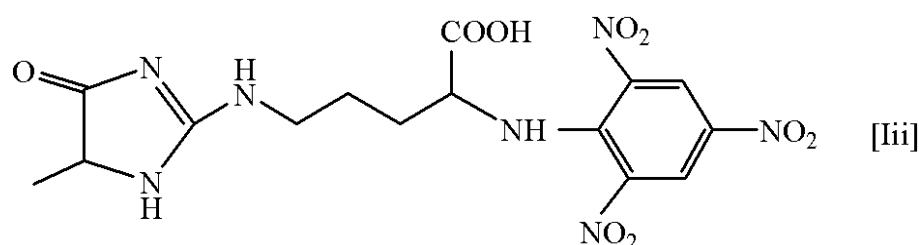
【0043】

本発明は、そのより好ましい態様として、上記アミノ化合物が、構造式 [Iii] で表されるトリニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または構造式 [Iiii] で表されるトリニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であるアミノ化合物またはその塩を提供する。

40

【0044】

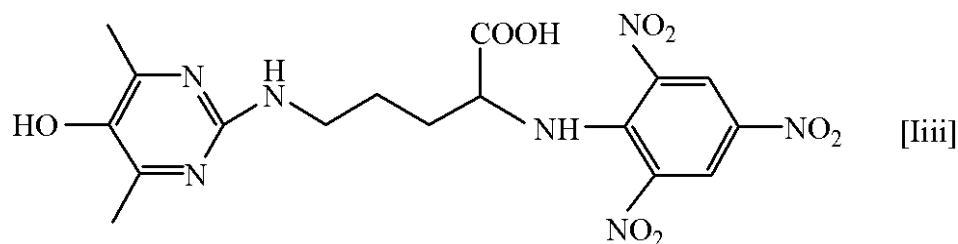
【化7】



50

【 0 0 4 5 】

【 化 8 】



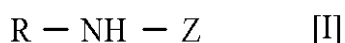
【 0 0 4 6 】

10

本発明は、その別の形態として、一般式 [ I ] で表されるアミノ化合物またはその塩を質量分析で測定するアミノ化合物またはその塩の質量分析方法を提供する。

【 0 0 4 7 】

【 化 9 】



【 0 0 4 8 】

式 [ I ] において、R はアミノ置換基、例えば、アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基またはペプチド残基を意味し、Z はニトロフェニル基を意味する。

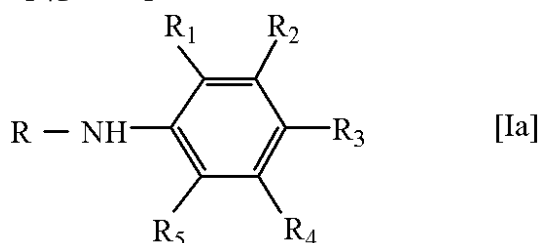
【 0 0 4 9 】

本発明は、その好ましい態様として、上記アミノ化合物が、一般式 [ Ia ] で表されるアミノ化合物またはその塩の質量分析方法を提供する。

20

【 0 0 5 0 】

【 化 1 0 】



30

【 0 0 5 1 】

式 [ Ia ] において、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はいずれも同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> の少なくとも 1 個はニトロ基を意味し、R は前記と同じ意味を有する。

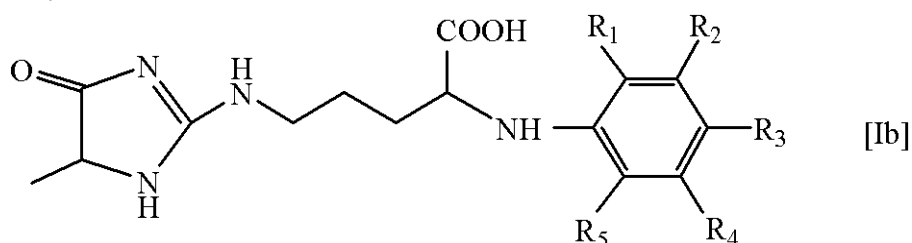
【 0 0 5 2 】

本発明は、そのより好ましい態様として、上記アミノ化合物が、一般式 [ Ib ] で表されるニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または一般式 [ Ic ] で表されるニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であるアミノ化合物またはその塩の質量分析方法を提供する。

【 0 0 5 3 】

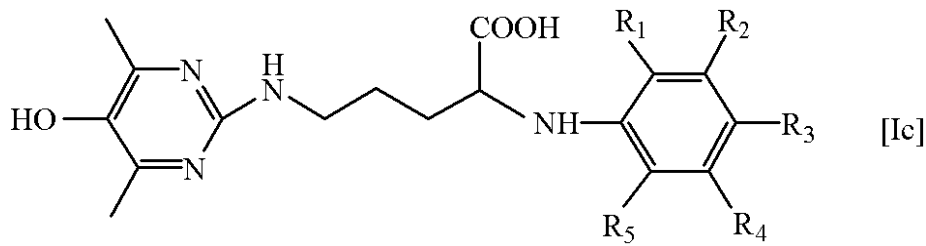
40

【 化 1 1 】



【 0 0 5 4 】

## 【化12】



## 【0055】

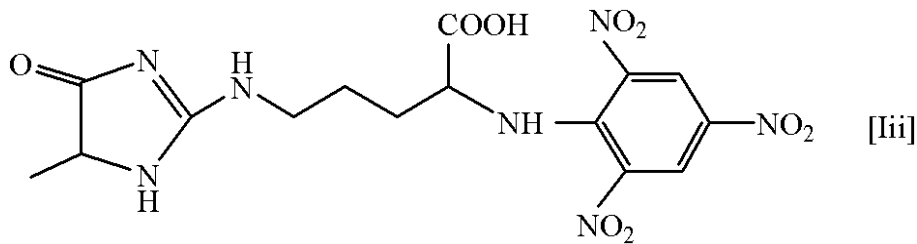
式 [Ib] 及び [Ic] において、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  はいずれも前記と同じ意味を有する。 10

## 【0056】

本発明は、そのより好ましい態様として、上記アミノ化合物が、構造式 [Iii] で表されるトリニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または構造式 [Iiii] で表されるアミノ化合物またはその塩の質量分析方法を提供する。

## 【0057】

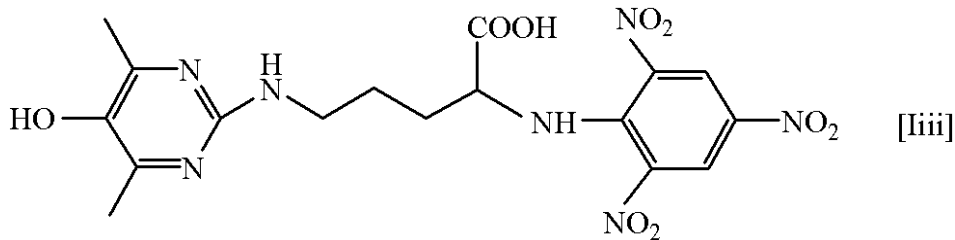
## 【化13】



20

## 【0058】

## 【化14】



30

## 【0059】

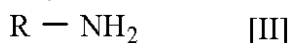
本発明は、その別の形態として、一般式 [II] で表されるアミノ酸誘導体またはその塩と、一般式 [III] で表されるニトロベンゼン化合物を反応させて一般式 [I] で表されるアミノ化合物またはその塩を得る工程と、

上記工程で得られたアミノ化合物またはその塩を質量分析する工程を有するアミノ化合物またはその塩の質量分析方法を提供する。

## 【0060】

40

## 【化15】



## 【0061】

式 [II] において、 $R$  は、アミノ置換基、例えば、アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基またはペプチド残基を意味する。

## 【0062】

## 【化16】



## 【0063】

式 [III] において、 $X$  はアミノ基反応性官能基を意味し、 $Z$  はニトロフェニル基を意 50

味する。

【0064】

【化17】

$R-NH-Z$  [I]

【0065】

式 [ I ] において、 R および Z は、前記と同じ意味を有する。

【0066】

本発明は、そのより好ましい態様として、前記一般式 [ II ] で表されるアミノ酸誘導体またはその塩と、一般式 [ III ] で表されるニトロベンゼン化合物の反応を、アルカリ性水溶液または水と有機溶媒の混合溶液であり、かつ前記溶液の pH が 8 ~ 10 でおこなうことを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法を提供する。

10

【0067】

本発明は、その好ましい態様として、上記反応が試料中で行われるアミノ化合物またはその塩の質量分析方法を提供する。

【0068】

本発明は、そのより好ましい態様として、上記アミノ酸誘導体またはその塩がバイオマーカであるアミノ化合物の質量分析方法を提供する。

【0069】

本発明は、さらに別の形態として、一般式 [ I' ] で表されるアミノ化合物またはその塩を質量分析するアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、上記誘導体化残基の誘導体化剤が、1-ピレンスルホニルクロライド ( P S C )、ダンシルクロライド ( D N S - C 1 ) 等のスルホニル化合物；9-フルオレニルメチルクロロホルメート ( F M O C )、4-ジメチルアミノスルホニル-7-フルオロベンゾキサジアゾール ( D B D - F )、4-フルオロ-7-ニトロベンゾフラザン ( N B D - F )、2、3-ナフタレンジアルデヒド ( N D A )；3-アミノピリジル-N-ヒドロキシサクシニミジルカルバメート ( A P D S ) 等のカルバメート化合物；3-クロロカルボニル-6、7-ジメトキシ-1-メチル-2-キノキサリノン ( D M E Q - C O C 1 )、3-ニトロフェニルイソチオシアネート、3-ピリジルイソチオシアネート、4-(ジメチルアミノ)フェニルイソチオシアネート、フルオレセイン-5-イソチオシアネート ( F I T C ) 等のイソチオシアネート化合物；ジエチルエトキシメチレンマロネート等のマロネート化合物、(5-サクシニミドキシ-5-オキソペンチル)トリフェニルホスホニウムプロミド ( S P T P P ) 等のホスホニウム化合物；または2-クロロ-1-メチルピリジニウム塩等のピリジニウム化合物であるアミノ化合物またはその塩の質量分析方法を提供する。

20

30

【0070】

【化18】

$R'-NH-Z'$  [I']

【0071】

式 [ I' ] において、 R ' は、前記 R と同じ意味を有する置換アミノ酸残基またはペプチド残基を意味し、 Z ' は誘導体化残基を意味する。

【0072】

本発明は、さらに別の形態として、上記のアミノ化合物の質量分析方法により得られる質量スペクトルの強度データを用いて、生体試料中のバイオマーカ濃度の定量を行うバイオマーカのアッセイ方法を提供する。

40

【発明の効果】

【0073】

本発明によって、アミノ酸誘導体の N 末端アミノ基を誘導体化することにより、質量分析におけるイオン化効率が向上し、試料中に少量しか存在しない最終糖化産物等の分子バイオマーカやペプチドホルモンについても、質量分析方法を用いて迅速、高感度かつ高精度な定量分析が可能になる。したがって、本発明は、アミノ酸誘導体とニトロベンゼン化合物等の誘導体化剤との誘導体化生成物である新規なアミノ化合物、好ましくはタンバ

50

ク質の解糖等の反応中間産物である糖化タンパク質分解物がニトロベンゼン化合物等の誘導体化剤で誘導体化された、耐糖能異常の診断に有用な新規な糖化タンパク質分解物誘導体を提供する。また、本発明は、そのアミノ化合物についての迅速、高感度かつ高精度な定量が可能な質量分析方法およびそれを用いたバイオマーカーのアッセイ方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0074】

【図1】メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体(MG-H1)の質量スペクトル(MS、MS/MS)である。

【図2】MG-H1の2,4,6-トリニトロフェニル誘導体(MG-H1-TNP)の質量スペクトル(MS、MS/MS)である。

【図3】アルグピリミジン(AP)の質量スペクトル(MS、MS/MS)である。

【図4】APの2,4,6-トリニトロフェニル誘導体(AP-TNP)の質量スペクトル(MS、MS/MS)である。

【図5】質量スペクトルより予測されるMG-H1の2,4,6-トリニトロフェニル誘導体(MG-H1-TNP)のフラグメンテーションパターンを示す図である。

【図6】質量スペクトルより予測されるAPの2,4,6-トリニトロフェニル誘導体(AP-TNP)のフラグメンテーションパターンを示す図である。

【図7】(A)はMG-H1の、(B)はMG-H1の2,4,6-トリニトロフェニル誘導体(MG-H1-TNP)のLC-MS分析の結果を示すマスクロマトグラムである。

【図8】(A)はAPの、(B)はAPの2,4,6-トリニトロフェニル誘導体(AP-TNP)のLC-MS分析の結果を示すマスクロマトグラムである。

【図9】MG-H1-TNPの濃度と質量スペクトルのピーク強度について、内部標準法を用いて作製した検量線である。

【図10】AP-H1-TNPの濃度と質量スペクトルのピーク強度について、内部標準法を用いて作製した検量線である。

【図11】MG-H1の2,4,6-トリニトロフェニル化に及ぼすpHの影響を示すグラフである。

【図12】APの2,4,6-トリニトロフェニル化に及ぼすpHの影響を示すグラフである。

【図13】ラット血漿の前処理のプロトコールを示す図表である。

【発明を実施するための形態】

【0075】

以下、本発明の実施形態について説明する。ただし、本発明は、下記の実施形態に限定されるものではなく、下記の実施形態は、本発明を具体的に詳細に説明するために例示的に記載するものである。したがって、下記の実施形態から想到される形態もまた、本発明の範囲に包含されるものと理解されるべきである。

【0076】

なお、本明細書においては、説明を簡潔にするために、誘導体化剤としてはニトロベンゼン化合物を例に挙げて説明するが、本発明においては、誘導体化剤はニトロベンゼン化合物に一切限定されるものではなく、その他の誘導体化剤も本発明の範囲に当然包含されるものとして理解されるべきである。したがって、本明細書においては、誘導体化剤でアミノ酸誘導体の末端アミノ基を誘導体化した残基についても、ニトロベンゼン化合物の残基であるニトロフェニル基について説明するが、これについても一切限定されるものではなく、その他の誘導体化剤の残基も同様に包含されるものと理解されるべきである。

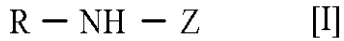
【0077】

本発明に係るアミノ化合物は、一般式[I]で表すことができる。

【0078】



【化19】



【0079】

式 [ I ] において、R はアミノ置換基を意味し、Z はニトロフェニル基を意味する。

【0080】

上記一般式において、用語「アミノ置換基」は、アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基またはペプチド残基を意味する。

ここで、用語「アミノ酸残基」とは、非置換アミノ酸からアミノ基を除外した残基を意味している。例えば、アラニンの場合には、2 - アミノプロパン酸と別称されるので、2 - アミノプロパン酸からアミノ基を除外したアミノ酸残基は、カルボキシエチル基である。同様に、リジンの場合のアミノ酸残基は1 - カルボキシル - 5 - アミノペンチル基である。

10

【0081】

また、上記一般式において、用語「置換アミノ酸残基」とは、上記アミノ酸からアミノ基を除外したアミノ酸残基であって、該アミノ酸を構成するカルボキシル基以外の残基、つまり原子団が置換基で置換されて形成された原子団、つまり置換部分 (moiety) を有するアミノ酸残基を意味している。置換アミノ酸残基の例としては、上記リジン残基の5 - アミノ基にカルボキシルメチル基が置換した1 - カルボキシル - 5 - (カルボキシルメチル) アミノペンチル基が挙げられる。また別の例として、例えば、アルギニン残基のアミノ - イミノメチル基が2 - ピリミジニル基に変換した置換アミノ酸残基等も挙げることができる。

20

【0082】

さらに、上記一般式において、用語「ペプチド残基」とは、上記アミノ酸および/または置換アミノ酸がペプチド結合して形成されたペプチドの末端アミノ酸から末端アミノ基が除外された残基を意味している。例えば、ペプチド Val - Tyr の場合、ペプチド残基とは、末端アミノ酸のバリンからアミノ基が除外された残基を意味する。

【0083】

本発明において、用語「アミノ酸誘導体」とは、特段の定めがない限り、非置換アミノ酸誘導体、もしくはN末端アミノ基以外のアミノ酸部分が置換基等で修飾されている置換アミノ酸誘導体、またはペプチドを意味している。

30

【0084】

したがって、本発明において使用する用語「アミノ化合物」は、特段の定めがない限り、アミノ酸誘導体 [ II ] またはその塩のN末端アミノ基が、ニトロベンゼン化合物 [ III ] によりニトロフェニル化されたニトロフェニル化アミノ化合物を意味している。

【0085】

本発明において、アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基のアミノ酸、またはペプチド残基のペプチド構成アミノ酸のアミノ酸は、広義には、アミノ基とカルボキシ基の両方の官能基を有する化合物であれば、特に限定されるものではないが、狭義には、例えば、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、プロリン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファンおよびチロシン、好ましくはアルギニンおよびリジン等のタンパク質の構成成分であるアミノ酸およびそれらを構成するカルボキシル基以外の残基が置換基で置換されて形成された置換部分を有する置換アミノ酸残基が挙げられる。

40

【0086】

好ましいアミノ酸としては、例えば、好ましくはアルギニン、リジン、バリン、チロシン、メチオニン、グリシン、ヒスチジン、グルタミン酸またはトリプトファンが挙げられる。

【0087】

また、本発明において使用する用語「置換アミノ酸残基」は、上記アミノ酸の末端アミ

50

ノ基以外の残基に任意の置換基が結合して形成された別の原子団を有する置換アミノ酸誘導体の残基を意味している。かかるアミノ酸誘導体としては、本発明の目的を逸脱しない限り、特に限定されるものではなく、例えば、アミノ酸等の生体成分の分解生成物や中間生成物、または代謝産物等が挙げられ、例えば、タンパク質の糖化反応によって生成される各種最終糖化産物（AGE類）、アルギニンの分解生成物であるオルニチン、筋肉へのエネルギー供給源のクレアチニンリン酸の代謝産物であるクレアチニン、肝臓中のグルタチオン欠乏を示すバイオマーカーであるオフタルミン酸生合成の中間体の  $\gamma$ -アミノ酪酸（AABA）、主に神経伝達物質として作用する  $\gamma$ -アミノ酪酸（GABA）等の他、各種疾患の診断および予後予測等に用いられる分子バイオマーカーや、馬尿酸等も挙げられる。これらアミノ酸のうち、上記AGE類等が好ましい。より好ましいのは、例えば、アルギニンの側鎖のグアニシル基とメチルグリオキサール、またはリジンのアミノ基とグリオキサールもしくはメチルグリオキサール等の脂質過酸化、メイラード反応、解糖等の反応中間産物との反応により生成されるAGE類等が挙げられる。かかるAGE類等のうち、好ましいものとしては、置換アルギニン誘導体や置換リジン誘導体等が挙げられる。

10

## 【0088】

置換アルギニン誘導体としては、例えば、アルギニンのグアニジノ基がカルボキシルメチル基、カルボキシルエチル基等の置換基で修飾されたアルキル置換アルギニン誘導体、イミダゾロン類、ピリミジン類、イミダゾピリジン類等のグアニジノ基が環状構造になっている環状アルギニン誘導体等が挙げられる。

20

## 【0089】

更に具体的には、アルキル置換アルギニン誘導体としては、例えば、カルボキシルメチルアルギニン（CMA）等が挙げられる。また、環状アルギニン誘導体のイミダゾロン類としては、例えば、イミダゾロン、グリオキサールヒドロイミダゾロン（G-H）、メチルグリオキサールヒドロイミダゾロン（MG-H）、N-[5-(2,3,4-トリヒドロキシブチル)-5-ヒドロ-4-イミダゾロン2-イル]-オルニチン（3-DG-H）等が挙げられる。ピリミジン類としては、例えば、アルグピリミジン、テトラヒドロピリミジン等が挙げられる。イミダゾピリジン類としては、例えば、ペントシジン等が挙げられる。

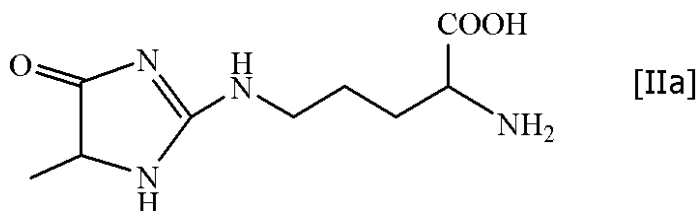
## 【0090】

これら置換アルギニン誘導体のうち、特に好ましいのは、例えば、構造式 [IIa] で表されるメチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体（MG-H1：N-(5-ヒドロ-5-メチル-4-イミダゾロン2-イル)-オルニチン）、または構造式 [IIb] で表されるアルグピリミジン（AP）が挙げられる。

30

## 【0091】

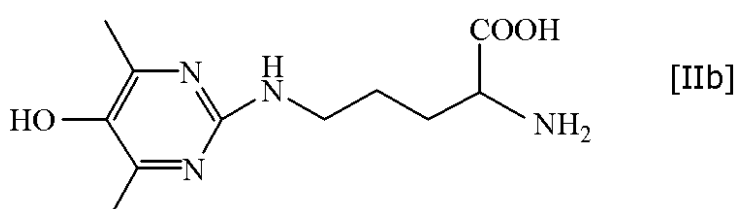
## 【化20】



40

## 【0092】

## 【化21】



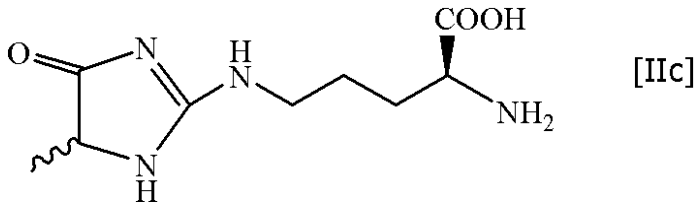
## 【0093】

50

更に具体的には、上記アミノ酸誘導体は、立体構造を有し、構造式 [IIC] または構造式 [IIId] でそれぞれ表すことができる。

【0094】

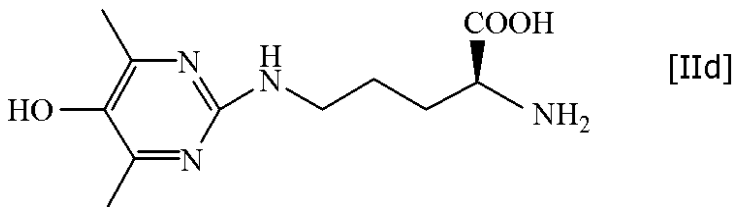
【化22】



10

【0095】

【化23】



【0096】

また、上記AGE類のうち、置換リジン誘導体としては、例えば、リジンのアミノ基がカルボキシルメチル基、カルボキシルエチル基等の置換基で修飾されたアルキル置換リジン誘導体、リジンのアミノ基が環状構造を有している環状リジン誘導体等が挙げられる。

20

【0097】

アルキル置換リジン誘導体としては、例えば、カルボキシメチルリジン (CML)、カルボキシエチルリジン (CEL) 等が挙げられる。また、環状リジン誘導体としては、例えば、ピラリン、FTP (Formyl Therosyl Pyrrole) 等のピロール誘導体、GOLD (グリオキサール由来リジン二量体)、MOLD (メチルグリオキサール由来リジン二量体)、DOLD (3-デオキシグルコソ由来リジン二量体) 等のイミダゾール誘導体、GLAP (Glyceraldehyde-derived pyridinium)、GA-ピリジン (glycolaldehyde-ピリジン) 等のピリジン誘導体、ペントシジン等のイミダゾピリジン誘導体等が挙げられる。

30

【0098】

さらに、上記一般式 [I] において、置換基 R で表されるペプチド残基のペプチドとしては、そのペプチドを構成する上記アミノ酸の数は特に限定されないが、上記アミノ酸が2個~10個、好ましくは2個~6個、より好ましくは2個~4個ペプチド結合して構成されているペプチドであるのがよい。かかるペプチドとしては、例えば、バリルチロシン、リシルチロシン、メチオニルチロシン、グリシルチロシン、ヒスチジルチロシン、グルタミルチロシン、トリプトファンチロシン、ヒスチジニルトリプトファン、カルノシン、アンセリン等のジペプチド、グルタチオン等のトリペプチド等が挙げられる。その他に、エンケファリン、カキシトシン、パソプレッシン等を挙げることができる。これらペプチドのうち、バリルチロシン、リシルチロシン、メチオニルチロシン、グリシルチロシン、ヒスチジルチロシン、グルタミルチロシン、トリプトファンチロシンならびにヒスチジニルトリプトファン等のジペプチドが好ましい。また、ペプチドは、タンパク質の消化物、最終糖化産物等の代謝産物、ペプチドホルモン等の生理活性ペプチドのいずれであってもよく、各種疾患の診断および予後予測等に用いられる分子バイオマーカーであってもよい。

40

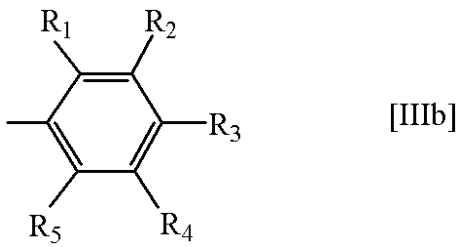
【0099】

一方、上記一般式 [I] において、置換基 Z は、アミノ酸誘導体 [II] の末端アミノ基をニトロフェニル化したニトロベンゼン化合物の残基であって、一般式 [IIIb] で表すことができる。

50

【 0 1 0 0 】

【 化 2 4 】



【 0 1 0 1 】

式 [ IIIb ] において、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  はいずれも、同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  の少なくとも 1 個はニトロ基を意味する。

10

【 0 1 0 2 】

ここで、ニトロフェニル基としては、例えば、モノ -、ジ - またはトリ - ニトロフェニル基、好ましくはトリ - ニトロフェニル基、特に好ましくは 2、4、6 - ニトロフェニル基が挙げられる。ニトロ置換基の位置にしても、特に限定はないが、1 個の場合は 2 - 位、2 個の場合は 2 - 位と 4 - 位、3 個の場合に 2 - 位、4 - 位ならびに 6 - 位であるのがよい。

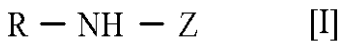
【 0 1 0 3 】

したがって、本発明に係るアミノ化合物は、一般的には、一般式 [ I ] で表され、より具体的には、一般式 [ Ia ] で表すことができる。

20

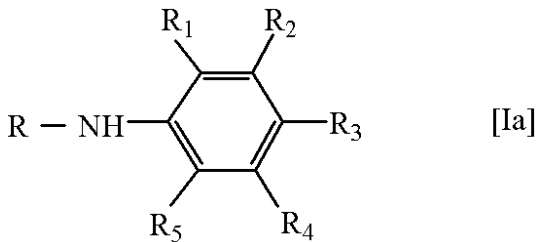
【 0 1 0 4 】

【 化 2 5 】



【 0 1 0 5 】

【 化 2 6 】



30

【 0 1 0 6 】

式 [ Ia ] において、 $R$ 、 $Z$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  はいずれも前記と同じ意味を有する。

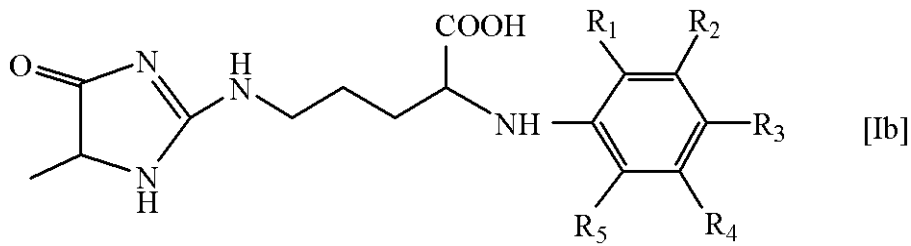
【 0 1 0 7 】

本発明において、構造式 [ Ia ] で表されるアミノ化合物の好ましい例としては、例えば、構造式 [ Ib ] で表されるニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体、または構造式 [ Ic ] で表されるニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体が挙げられる。

40

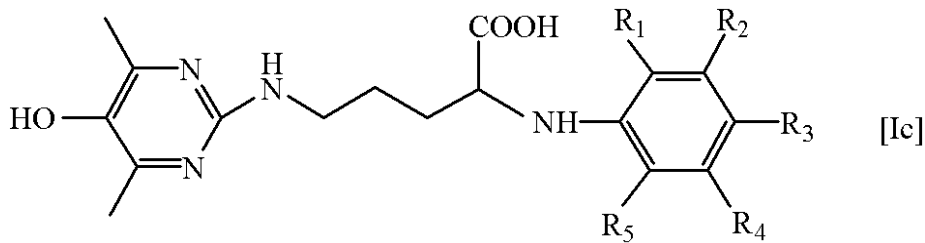
【 0 1 0 8 】

【化27】



【0109】

【化28】



10

【0110】

式 [Ib] および [Ic] において、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  はいずれも前記と同じ意味を有する。

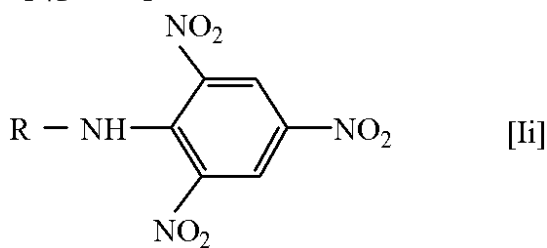
20

【0111】

さらに好ましいアミノ化合物は、例えば、一般式 [Ii] で表すことができる。

【0112】

【化29】



30

【0113】

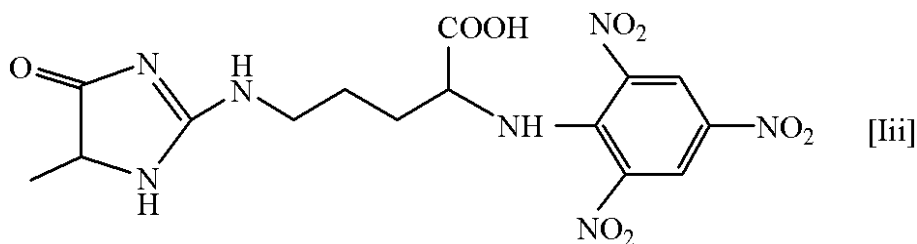
式 [Ii] において、R は前記と同じ意味を有する。

【0114】

したがって、アミノ化合物としては、例えば、構造式 [Iii] で表されるニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体、または一般式 [Iiii] で表されるニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体がさらに好ましい。

【0115】

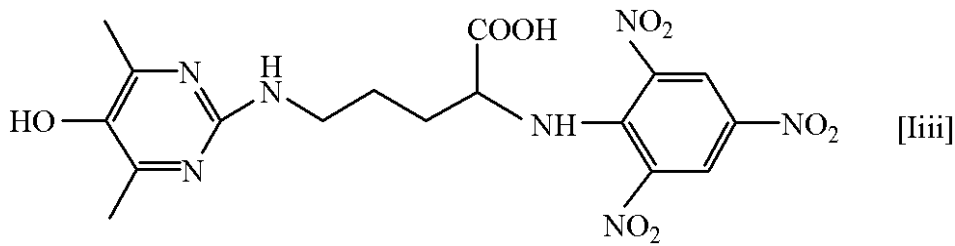
【化30】



40

【0116】

【化 3 1】

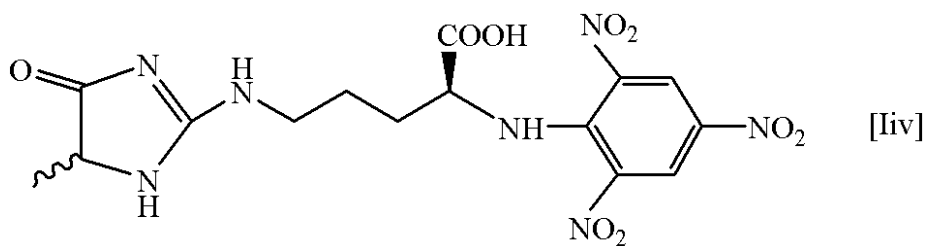


【 0 1 1 7】

上記のトリニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体およびトリニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体の立体構造式（[liv]および[iv]）はそれぞれ次のように表すことができる。

【 0 1 1 8】

【化 3 2】

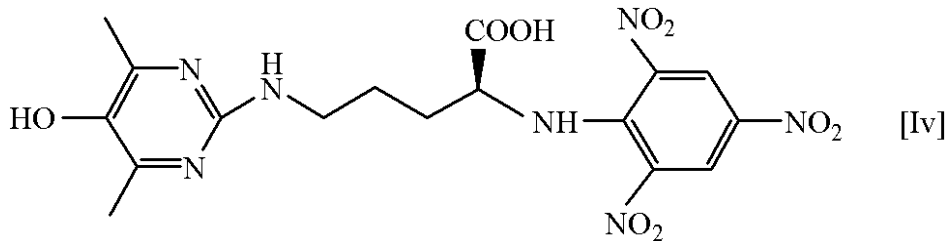


10

20

【 0 1 1 9】

【化 3 3】



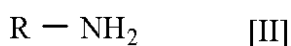
30

【 0 1 2 0】

本発明に係るアミノ化合物 [ I ] は、一般式 [ II ] で表されるアミノ酸誘導体またはその塩を、一般式 [ III ] で表されるニトロベンゼン化合物で誘導体化反応することにより得ることができる。

【 0 1 2 1】

【化 3 4】



【 0 1 2 2】

式 [ II ] において、R は前記と同じ意味を有する。

【 0 1 2 3】

【化 3 5】



【 0 1 2 4】

式 [ III ] において、X はアミノ基反応性官能基を意味し、Z は上記と同じ意味を有する。

【 0 1 2 5】

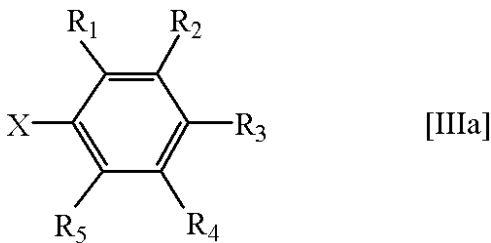
より具体的には、本発明のアミノ化合物 [ Ia ] は、アミノ酸誘導体 [ II ] またはその塩と、一般式 [ IIIa ] で表されるニトロベンゼン化合物との誘導体化反応により得ることができる。

【 0 1 2 6】

40

50

## 【化 3 6】



## 【0 1 2 7】

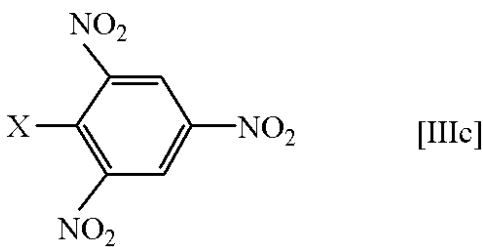
式 [IIIa] において、X、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はいずれも前記と同じ意味を有する。

## 【0 1 2 8】

更に具体的には、本発明のアミノ化合物 [Ii] は、アミノ酸誘導体 [II] またはその塩と、一般式 [IIIc] で表されるトリニトロベンゼン化合物との誘導体化反応により得ることができる。

## 【0 1 2 9】

## 【化 3 7】



## 【0 1 3 0】

式 [IIIc] において、X は前記と同じ意味を有する。

## 【0 1 3 1】

ここで、X で表されるアミノ基反応性官能基としては、アミノ酸または置換アミノ酸 ([II]) をニトロフェニル誘導体化する反応性官能基であれば特に限定されないが、例えば、塩素原子、フッ素原子、臭素原子もしくはヨウ素原子から選ばれるハロゲン原子、またはスルホン酸またはスルホン酸塩、アルキルスルホン酸エステル基、アリールスルホン酸エステル基、パーフルオロアルキルスルホン酸エステル基等の、ニトロベンゼン誘導体の芳香族求核置換反応において脱離基となり得る任意の官能基が挙げられる。

## 【0 1 3 2】

そこで、好ましいニトロベンゼン化合物としては、例えば、2, 4, 6 - トリニトロフルオロベンゼン、2, 4, 6 - トリニトロクロロベンゼン、2, 4, 6 - トリニトロブロモベンゼン、2, 4, 6 - トリニトロヨードベンゼンおよび 2, 4, 6 - トリニトロベンゼンスルホン酸またはその塩等が挙げられ、これらのうち特に好ましいのは、2, 4, 6 - トリニトロベンゼンスルホン酸またはその塩である。塩としては、例えば、ナトリウム塩等のアルカリ金属塩、カリウム塩等のアルカリ土類金属塩等が挙げられる。

## 【0 1 3 3】

本発明において、上記アミノ酸誘導体の N 末端アミノ基をニトロベンゼン化合物で誘導体化するには、上記アミノ酸誘導体とニトロベンゼン化合物とを、アルカリ性の水溶液または、水と有機溶媒の混合溶液中にて室温で数十分間混合することにより行うことができる。好ましくはアルカリ性水溶液中で行われる。また、水と有機溶媒との混合溶液を用いる場合、有機溶媒としてはエタノール等の水との親和性が高い有機溶媒が好ましく用いられる。これらの溶液の pH は 8 ~ 10 であることが好ましく、より好ましくは 8.5 ~ 9.5 であるのがよい。溶液の pH が高すぎると、分析対象のアミノ酸誘導体またはこの化合物が分解する可能性が増大し、低すぎるとニトロフェニル化反応が迅速に進行しなくなる。ここで pH とは、pH メータにより直接測定される値である。なお、室温とは 15

10

20

30

40

50

から40程度の温度であり、30前後で反応を行うことが好ましい。また、混合はいかなる方法であってもよく、1分以上1時間以下、好ましくは5分から40分間の混合が行われる。通常は30分間の混合で十分である。

【0134】

本発明の特徴の一つは、かかる温和な条件下で、ニトロフェニル化反応を行うことができることである。試料中の分析対象となる物質を単離してニトロフェニル化を行ってもよいが、夾雑物等を含むような試料中でそのままニトロフェニル化を行ってもよい。本発明はこのような試料中でそのままニトロフェニル化を行うことができるため、単離によるロス等を低減することができ、分析対象となる物質が少量しか含まれないような場合であっても測定することができるという優れた方法である。また、複雑な操作を行う必要が無く、簡便に測定することができる。特に対象試料が生体試料等の場合は、分析対象となる物質が少なく、かつ、夾雑物が多い状態であることが多いため有効である。

10

【0135】

また、例えば、試料中のアミノ酸誘導体を測定するに当たっては、生体試料に、ニトロベンゼン化合物を添加することにより、試料中のバイオマーカーとしてのアミノ酸誘導体をニトロベンゼン化合物で誘導体化することも可能であるとともに、かかる誘導体化したアミノ酸誘導体をバイオマーカーとして測定できることは当然のことである。

本発明において試料となるものは、測定対象となる最終糖化産物等の、本発明によってアミノ酸誘導体とニトロベンゼン系化合物との誘導体化で得られるアミノ化合物となるものを含有するものであればよい。また、生体由来の試料を生体試料とよぶ。

20

【0136】

さらに、アミノ酸誘導体の塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、リチウム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩等を使用することができる。

【0137】

本発明においては、誘導体化剤として、上記ニトロベンゼン化合物の他に、その他のアミノ基を誘導体化する誘導体化剤も使用できることは当然のことである。かかる誘導体化剤としては、例えば、ニトロベンゼンスルホン酸化合物、フルオロ-ニトロベンゼン等のニトロベンゼン化合物の他に、1-ピレンスルホニルクロライド(PSCL)、ダンシルクロライド(DNS-CL)等のスルホニル化合物、9-フルオレニルメチルクロロホルメート(FMOC)、4-ジメチルアミノスルホニル-7-フルオロベンゾキサジアゾール(DBD-F)、4-フルオロ-7-ニトロベンゾフラザン(NBD-F)、2、3-ナフタレンジアルデヒド(NDAL)、3-アミノピリジル-N-ヒドロキシサクシニミジカルバメート(APDS)等のカルバメート化合物、3-クロロカルボニル-6、7-ジメトキシ-1-メチル-2-キノキサリノン(DMEQ-COCL)、3-ニトロフェニルイソチオシアネート、3-ピリジルイソチオシアネート、4-(ジメチルアミノ)フェニルイソチオシアネート、フルオレセイン-5-イソチオシアネート(FITC)等のイソチオシアネート化合物、ジエチルエトキシメチレンマロネート等のマロネート化合物、(5-サクシニミドキシ-5-オキソペンチル)トリフェニルホスホニウムプロミド(SPTPP)等のホスホニウム化合物、または2-クロロ-1-メチルピリジニウム塩等のピリジニウム化合物等を挙げることができる。これらの誘導体化剤も、上記ニトロベンゼン化合物と実質的に同様に使用することができる。

30

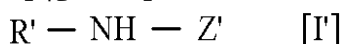
40

【0138】

つまり、本発明において、上記誘導体化剤を使用する場合は、本発明に係るアミノ化合物は、一般式[I']で表される。

【0139】

【化38】



【0140】

式[I']において、R'は上記Rと同じ意味を有するアミノ酸残基もしくは置換アミノ

50



酸残基またはペプチド残基を意味し、Z' は誘導体化残基を意味する。

【0141】

ここで、誘導体化残基は、上記誘導体化剤が、置換アミノ酸誘導体 ( $R' - NH_2$ ) のアミノ基を誘導体化した残基を意味している。例えば、誘導体化剤としてダンシルクロライドを使用した場合、置換アミノ酸誘導体 ( $R' - NH_2$ ) のアミノ基がダンシル化、つまり、ジメチルアミノナフタレンスルホニル化されるので、このダンシル基が誘導体化残基ということができる。

【0142】

したがって、この場合も、本明細書において、ニトロベンゼンスルホン酸を誘導体化剤として用いた場合についての記載を実質的に同様に適用することができる。

10

【0143】

本発明において、質量分析に用いられる試料のイオン化法については、特に制限はないが、生体分子の検出および定量に広く用いられているMALDI法、ESI法、APCI法等用いられるのが好ましい。分離技術と組み合わせたLC/MSやGC/MS等においては、試料のイオン化法としてはESI法やAPCI法を用いられるのがよい。分析には、MS/MS、MS<sup>3</sup>等のタンデム質量分析方法を用いることができる。この場合、プロダクトイオンの検出には、例えば、夾雑物の影響を排除し高感度な検出が可能な多重反応モニタリング(MRM)を用いるのが好ましい。

【0144】

次に、本発明に係る質量分析方法を用いたバイオマーカーのアッセイ方法について説明する。

20

本発明は、分析対象としてバイオマーカーを選択することにより、バイオマーカーを、迅速に、高感度かつ高精度に検出および定量できるアッセイ方法を提供することができる。すなわち、本発明のバイオマーカーのアッセイ方法は、アミノ酸誘導体であるバイオマーカーのN末端アミノ基とニトロベンゼン化合物等の誘導体化剤とを反応させ、N末端アミノ基をニトロフェニル化等の誘導体化する工程と、N末端アミノ基がニトロフェニル化等の誘導体化されたアミノ酸誘導体またはその塩を質量分析する工程と、質量分析方法を用いて得られた質量スペクトルの強度データを用いて、生体試料中のバイオマーカー濃度の定量を行う工程を有している。

【0145】

本発明において、バイオマーカーとしては、アミノ基を有するアミン化合物である限り、特に制限はないが、本発明のアッセイ方法が特に好ましく適用できるものとしては、例えば、アミノ酸誘導体と糖の代謝産物との反応により生成される最終糖化産物(AGE類)等や、生体アミンであるカテコールアミン(ドパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン)、インドールアミン(セロトニン、メラトニン)、イミダゾールアミン(ヒスタミン)、アセチルコリン、ポリアミン(プトレシン、スペルミジン、スペルミン)等が挙げられる。

30

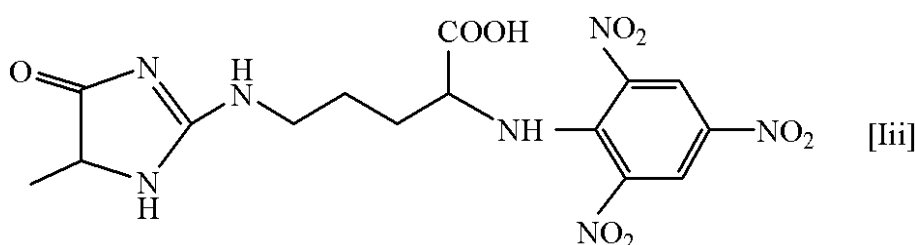
【0146】

本発明のアッセイ方法による分析対象のバイオマーカーとして特に好ましいAGE類としては、例えば、構造式 [Iii] で表されるトリニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体(MG-H1)、および構造式 [Iiii] で表されるトリニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体(AP)を挙げることができる。

40

【0147】

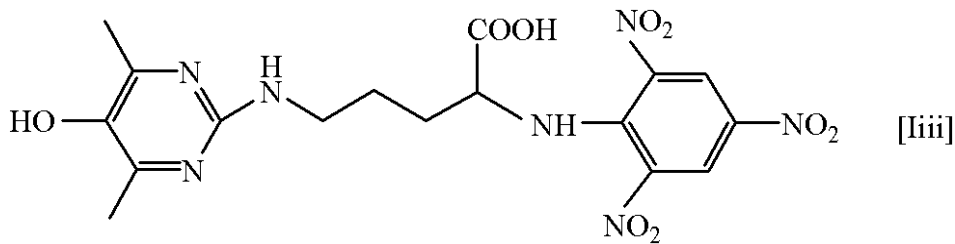
【化39】



50

【 0 1 4 8 】

【 化 4 0 】



【 0 1 4 9 】

10

これらはそれぞれ、MG - H 1 および AP の N - 2 , 4 , 6 - トリニトロフェニル誘導体であり、質量分析方法により高感度で検出および定量が可能な AGE であり、耐糖能異常の診断指標として有用である。

【 0 1 5 0 】

本発明において、アッセイ対象となるアミノ酸誘導体またはペプチドの濃度をマススペクトルの面積強度から定量するためには、例えば、検量線法または同位体希釈法が用いられる。質量分析において、分析対象物質を定量分析する手法の一つに検量線法が挙げられる。検量線法は、既知量の標準物質を含み、濃度の異なるいくつかの標準試料と、これらの標準試料から得られる信号強度との関係（検量線）が理論的には線形関係になることを利用し、未知試料から得られた信号強度からその試料の濃度を定量する方法である。標準とする試料の調製法により、検量線法は、外部標準法、内部標準法、標準添加法に大別されるが、本アッセイ方法ではいずれの方法を用いてもよい。同位体希釈法は、測定対象化合物を構成する特定の元素の同位体比に着目し、同位体比が既知のスパイクを一定量添加して測定対象化合物の同位体組成を平衡に到達させた後、スパイク添加前後の試料の同位体比を測定し、同位体組成の変化から試料の元素濃度を求める方法であり、検出限界が 1 pg 程度と低いことが利点として挙げられる。

20

【 0 1 5 1 】

上記の様にして得られたバイオマーカの定量データは、疾患の発症、進行度、予後等の予測や診断に用いることができる。すなわち、本発明の一実施形態としては、アミノ酸誘導体またはペプチドであるバイオマーカの N 末端アミノ基とトリニトロフェニル化剤等の誘導体化剤とを反応させ、N 末端アミノ基をトリニトロフェニル化等の誘導体化する工程と、N 末端アミノ基がトリニトロフェニル化等の誘導体化されたアミノ酸誘導体またはペプチドを質量分析する工程と、質量分析方法を用いて得られた質量スペクトルの強度データを用いて、生体試料中のバイオマーカ濃度の定量を行う工程と、このようにして得られるバイオマーカの濃度データを元に、疾患の発症、進行度、予後等に関する診断を行う工程を有する疾患の診断方法に関するものである。

30

【 0 1 5 2 】

本発明の診断方法は、複数種の AGE 類を同時に測定、定量できることからも有用である。すなわち、本発明は、試料中でニトロフェニル化を行うことができる方法であり、また質量分析により分析するものであるから、質量数が異なる対象物質を測定する場合、質量分析法と組み合わせることで同時に測定（定量）することができる優れた方法を提供するものである。本発明により、従来の早期診断法に比べて、費用および手間を大幅に削減することができる。

40

【 実施例 】

【 0 1 5 3 】

以下、本発明の実施例に基づいて、本発明の特徴、作用効果についてより具体的に説明する。これらの実施例はあくまでも例示であり、本発明の範囲を限定するものではない。

【 実施例 1 】

【 0 1 5 4 】

トリニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体 ( MG - H

50

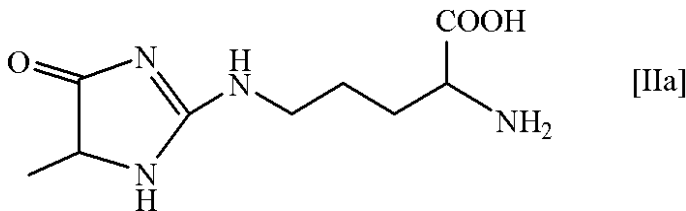
1 - T N P ) [ I i i ] を次のようにして製造した。

メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体 ( M G - H 1 ) [ I I a ] を 0 . 1 M ホウ酸溶液 ( p H 9 . 3 ) に溶解させ、 3 0 m M 2 , 4 , 6 - トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム塩 ( T N B S ) - 0 . 1 M ホウ酸溶液 ( p H 9 . 3 ) を 1 0 μ L 添加後、十分に混和した。得られた混合物を 3 0 にて 2 0 分間インキュベートして、誘導体化を行った。誘導体化した M G - H 1 ( M G - H 1 - T N P ) を、それぞれ、 1 0 0 % C H <sub>3</sub> C N / 0 . 1 % ギ酸 ( 3 m L ) 及び 0 . 1 % ギ酸 ( 3 m L ) で平衡化した S e p - P a k P l u s C <sub>18</sub> カートリッジ ( W a t e r s ) に負荷し、 0 . 1 % F A ( 3 m L ) で洗浄後、 1 0 0 % C H <sub>3</sub> C N / 0 . 1 % ギ酸 ( 3 m L ) にて溶出した画分を遠心エバポレータで乾固した。画分乾固物は脱イオン水 1 . 5 m L で再溶解し、凍結乾燥後、 - 4 0 で保存した。

10

【 0 1 5 5 】

【 化 4 1 】



【 実施例 2 】

20

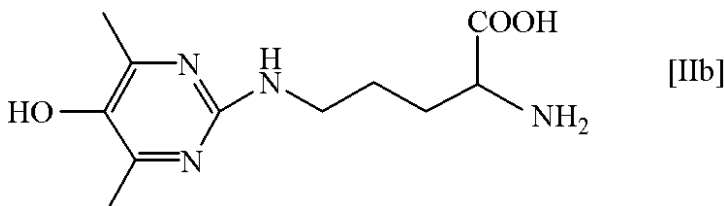
【 0 1 5 6 】

トリニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体 ( A P - T N P ) [ I i i i ] を次のようにして製造した。

アルグピリミジン [ I I b ] を、実施例 1 と実質的に同様に処理してトリニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体 ( A P - T N P ) [ I i i i ] を得た。

【 0 1 5 7 】

【 化 4 2 】



30

【 実施例 3 】

【 0 1 5 8 】

質量スペクトルの測定

M G - H 1 および A P、ならびに上記の様にして調製した M G - H 1 および A P の N - 2 , 4 , 6 - トリニトロフェニル誘導体 (それぞれ「 M G - H 1 - T N P 」および「 A P - T N P 」) を 0 . 1 % ギ酸に溶解させ、質量スペクトルの測定を行った。測定条件は下記のとおりである。

40

- ・イオン化モード E S I - p o s i t i v e
- ・スキャン範囲 1 0 0 ~ 5 0 0 m / z
- ・ドライガス 3 3 0 、 8 . 0 L / 分
- ・ネブライザーガス 2 7 6 k P a
- ・キャピラリー電圧 - 2 7 5 0 V
- ・スキマー電圧 4 0 V
- ・キャピラリー出口電圧 1 2 4 V

【 0 1 5 9 】

M G - H 1、A P、M G - H 1 - T N P および A P - T N P の質量スペクトル ( M S および M S / M S ) を、それぞれ、図 1、2、3、4 に示す。なお、図 2、4 において、M

50

G - H 1 および A P の N - 2 , 4 , 6 - トリニトロフェニル誘導体は、それぞれ、「M G - H 1 - T N P」、「A P - T N P」と表記されている。M S / M S の測定に用いたプリカーサーイオンは、それぞれの化合物についての  $[M + H]^+$  イオンである。得られた質量スペクトルのうち、ピーク強度の最も大きなものを、後述する L C - M R M - M S / M S 分析においてモニターの対象となるイオンピークとして選択した。

【0160】

また、図3、図4に示すM SスペクトルおよびM S / M Sスペクトルより予測されるM G - H 1 - T N P および A P - T N P のフラグメンテーションパターンを、それぞれ図5および図6に示す。

【実施例4】

【0161】

L C - M R M - M S / M S 分析

下記の条件下で、M G - H 1、A P、M G - H 1 - T N P および A P - T N P の L C - M R M - M S / M S 分析を行った。サンプル濃度はいずれも  $10 \text{ nmol/L}$  とし、いずれも  $0.1\%$  ギ酸水溶液に溶解させた。

< H P L C 条件 >

- ・移動相 MeOH -  $0.1\%$  ギ酸水溶液
- ・流速  $0.20 \text{ mL/分}$
- ・グラジエント  $0 \sim 100\%$  (25分)
- ・固定相 Waters Atlantis T3 ( $2.1 \times 100 \text{ mm}$ )
- ・カラムオープン温度  $40$

【0162】

< M S 条件 >

- ・イオン化モード ESI - positive
- ・スキャン範囲  $100 \sim 500 \text{ m/z}$
- ・ドライガス  $330$ 、 $8.0 \text{ L/分}$
- ・ネブライザーガス  $276 \text{ kPa}$
- ・キャピラリー電圧  $-2750 \text{ V}$
- ・スキマー電圧  $40 \text{ V}$
- ・キャピラリー出口電圧  $124 \text{ V}$
- ・インジェクション体積  $25 \mu\text{L}$

【0163】

M G - H 1、A P、M G - H 1 - T N P および A P - T N P のマスクロマトグラムを、それぞれ、図7、8に示す。図7の結果より、M G - H 1 の N 末端アミノ基を2, 4, 6 - トリニトロフェニル化することにより、ピーク強度が  $1500$  倍程度に増大することが確認された。

【実施例5】

【0164】

検量線の作製ならびに検出限界および定量限界の決定

内部標準としてM G - H 1 - T N P の重水素化体 (M G - H 1 - d 3 - T N P) を用いて、M G - H 1 - T N P および A P - T N P の検量線を作製した。酸による分解の影響を避けるために、インジェクション直前に  $0.1\%$  ギ酸水溶液を添加する手順 (表1参照) で希釈を行い、高濃度側から測定を行った。まず、原液として、M G - H 1 - T N P および A P - T N P の  $1 \mu\text{mol/mL}$  水溶液を調製し、終濃度が  $400$ 、 $200$ 、 $40$ 、 $20$ 、 $4$ 、 $2 \text{ pmol/mL}$  となるように水で希釈した。各濃度について、これらの等モル混合物  $25 \mu\text{L}$  に、M G - H 1 - d 3 - T N P の  $400 \text{ pmol/mL}$  水溶液  $25 \mu\text{L}$  を加え、 $0.2\%$  ギ酸水溶液  $50 \mu\text{L}$  を加えて十分混和し、うち  $25 \mu\text{L}$  を L C - M S 分析に用いた。

【0165】

10

20

30

40

【表 1】

| MG-H1-TNP + AP-TNP mixture | + | MG-H1-d3-TNP | + | 0.2% FA    | ⇒ | injection   |
|----------------------------|---|--------------|---|------------|---|-------------|
| 25 $\mu$ L                 |   | 25 $\mu$ L   |   | 50 $\mu$ L |   | 25 $\mu$ L  |
| 400 pmol/mL                |   | 400 pmol/mL  |   |            |   | 100 pmol/mL |
| 200 pmol/mL                |   | 400 pmol/mL  |   |            |   | 50 pmol/mL  |
| 40 pmol/mL                 |   | 400 pmol/mL  |   |            |   | 10 pmol/mL  |
| 20 pmol/mL                 |   | 400 pmol/mL  |   |            |   | 5 pmol/mL   |
| 4 pmol/mL                  |   | 400 pmol/mL  |   |            |   | 1 pmol/mL   |
| 2 pmol/mL                  |   | 400 pmol/mL  |   |            |   | 0.5 pmol/mL |

10

## 【0166】

得られた質量スペクトルにおけるMG-H1-TNPまたはAP-TNPと、MG-H1-d3-TNPとのピーク強度比をMG-H1-TNPまたはAP-TNPの濃度に対しプロットすることにより、図9および10に示す検量線が得られた。これらより、MG-H1-TNPについて、検出限界2.05 pmol/mL、定量限界6.20 pmol/mL、AP-TNPについて、検出限界0.11 pmol/mL、定量限界0.33 pmol/mLという結果が得られた。同様にCML-TNPについて検量線を作製し濃度換算すると、検出限界5.3 nmol/L、定量限界16 nmol/Lであった。また、CEL-TNPについては、検出限界2.7 nmol/L、定量限界8.0 nmol/Lであった。検量線については、相関係数0.996以上の良好な直線性が得られると共に、それぞれについてpmolレベル（濃度としてnM/Lレベル）での定量分析が可能であることが確認された。これらの数値は、従来より用いられている誘導体化剤であるダンシルクロリドやNDA（2,3-ナフタレンジアルデヒド）における検出限界の1/100~1/200であり、2,4,6-トリニトロフェニル化により大幅な感度向上が可能であることを示している。

20

## 【実施例6】

## 【0167】

2,4,6-トリニトロフェニル化におけるpHの影響

30

実施例1および2においてMG-H1-TNPおよびAP-TNPのそれぞれの調製において、反応液のpHを7.5、8.0、8.5にした場合における誘導体化率を、LC-MS分析を用いて算出した。遠心エバポレータ処理により得られた乾固物を0.2%ギ酸水溶液100  $\mu$ Lに溶解し、内部標準としてMG-H1-d3-TNPの200 pmol/mL水溶液50  $\mu$ Lを加え、十分に混和した後、25  $\mu$ LをLC-MS分析に供し、検量線法により2,4,6-トリニトロフェニル体の濃度を決定した。結果は、図11、12に示すとおりであり、MG-H1-TNPまたはAP-TNPのいずれの場合についても、pH8.5~9.3で、定量的に誘導体化が可能であることが確認された。

## 【実施例7】

## 【0168】

40

ラット血漿スパイク試験

SDラットのコントロール血漿に対し、MG-H1、APおよび内部標準であるMG-H1-d3をスパイクし、回収後、2,4,6-トリニトロフェニル化を行った。血漿に対する前処理は、図13に示すプロトコール(E.M.N. Nakashima et al., Anal. Biochem., 414, 109-116 (2011) 参照)に準拠して行い、スパイクしたMG-H1、APおよびMG-H1-d3の同時検出を試みた。標準添加法により作製した検量線を用いたLC-MS分析により、MG-H1およびAPについて、血漿中濃度の定量が可能であることが確認された。

## 【実施例8】

## 【0169】

50

## Val-Tyrを用いた検討

AGE類であるMG-H1およびAPの代わりにジペプチドVal-Tyrを用いて、上記と同様の手順により、2, 4, 6-トリニトロフェニル化による検出感度の変化を検討した結果、MG-H1の場合と同様、2, 4, 6-トリニトロフェニル化によりピーク強度が約50倍に増大することが確認された(表2)。

【実施例9】

【0170】

## ジペプチドを用いた検討

実施例8と実質的に同様にして下記ジペプチドを調製し、検出感度の変化を検討した。その結果を表2に示す。

10

【0171】

【表2】

| ペプチド    | PA-untreat | SN-untreated | PA-TNP | SN-TNP |
|---------|------------|--------------|--------|--------|
| Val-Tyr | 1          | 1            | 20.06  | 16.57  |
| Lys-Tyr | 1          | 1            | 14.87  | 48.03  |
| Met-Tyr | 1          | 1            | 29.04  | 18.91  |
| Gly-Tyr | 1          | 1            | 18.48  | 55.16  |
| His-Tyr | 1          | 1            | 1.07   | 18.11  |
| Glu-Tyr | 1          | 1            | 0.25   | 2.87   |
| Trp-His | 1          | 1            | 1.32   | 2.52   |
| His-Trp | 1          | 1            | 0.30   | 3.06   |

20

注: PA-untreat: TNBS未処理ペプチドをLC-MS検出したときのピーク面積

SN-untreated: TNBS未処理ペプチドをLC-MS検出したときのシグナル/ノイズ比(S/N比)

PA-TNP: TNBS誘導体化ペプチドをLC-MS検出したときのピーク面積

SN-TNP: TNBS誘導体化ペプチドをLC-MS検出したときのシグナル/ノイズ比(S/N比)

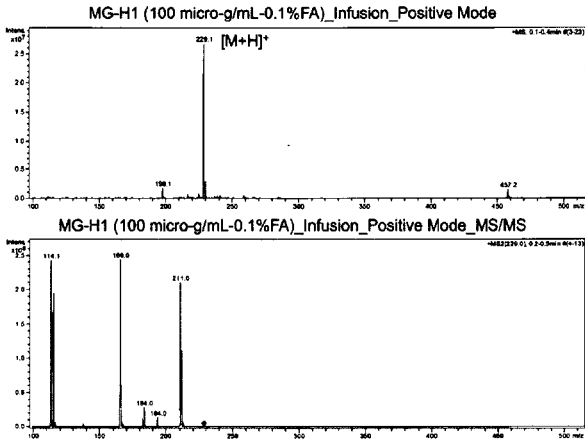
30

【産業上の利用可能性】

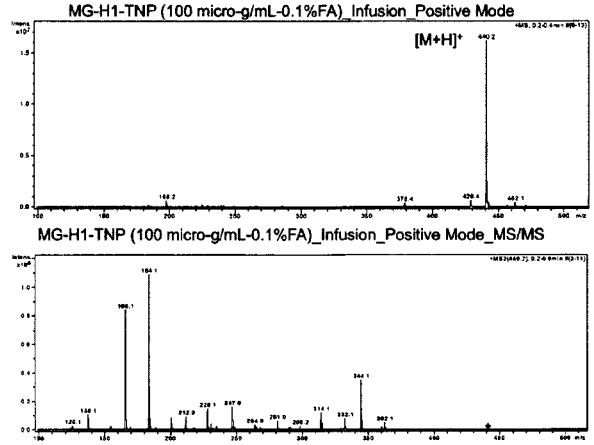
【0172】

この発明は、例えば、生体内成分であるタンパク質が代謝過程で糖化等された最終糖化産物や中間産物等の代謝産物を始めとするアミノ酸誘導体をニトロベンゼン化合物等の誘導体化剤により誘導体化したアミノ化合物であって、特に耐糖能異常の診断に有用な化合物であるところから、これらの化合物を迅速、高感度かつ高精度に定量することが可能である質量分析方法である。したがって、これらのアミノ化合物をバイオマーカーとしてアッセイすることにより様々な疾患の予防や診断に役立ち、これによりその疾患の予防薬や治療薬の開発に役に立つことが期待できる。

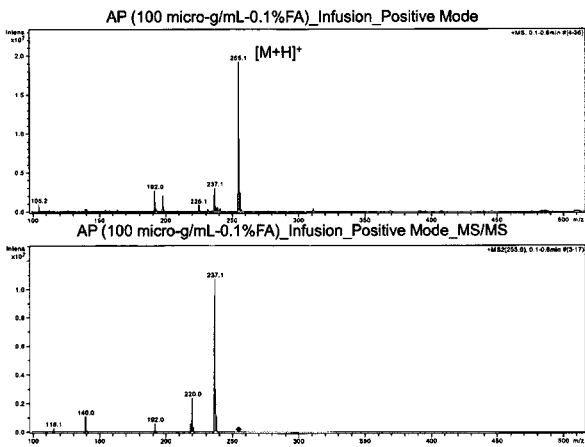
【 図 1 】



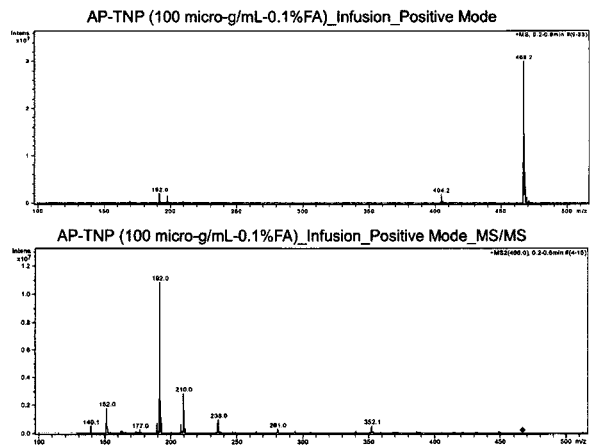
【 図 2 】



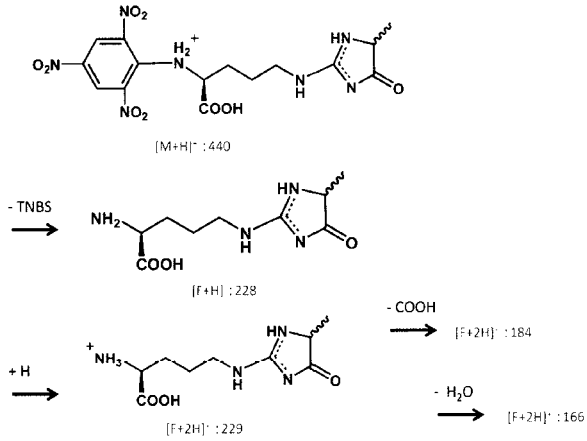
【 図 3 】



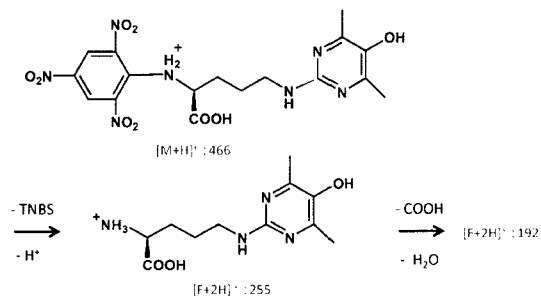
【 図 4 】



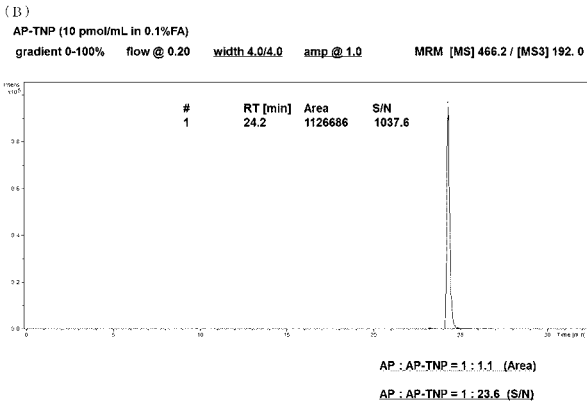
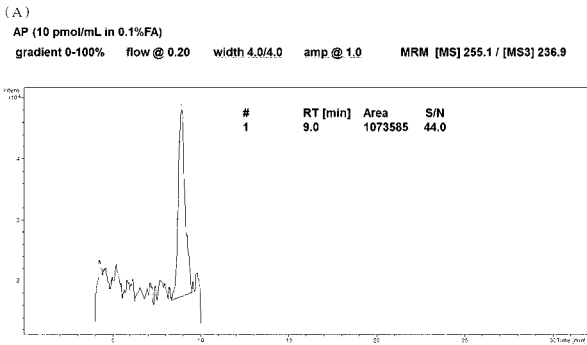
【 5 】



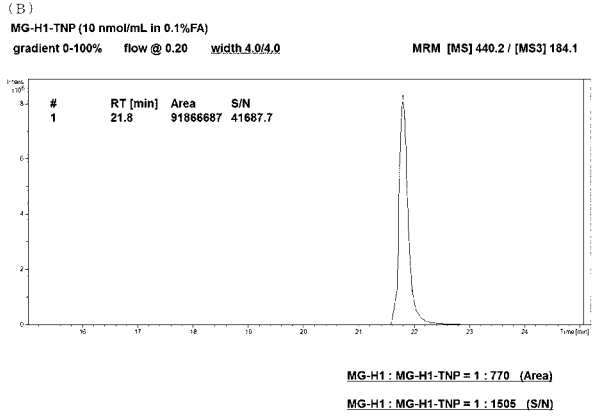
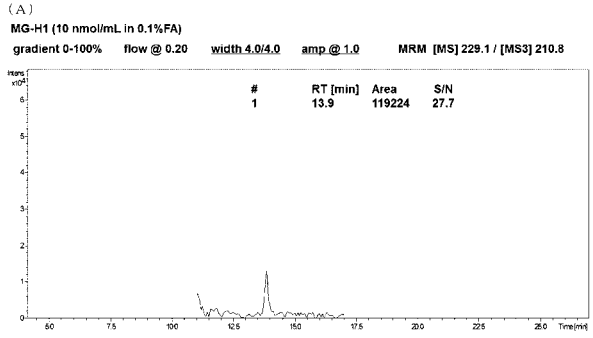
【 6 】



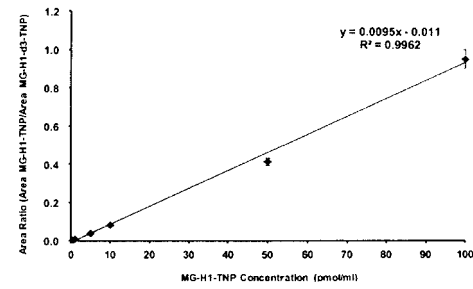
【 8 】



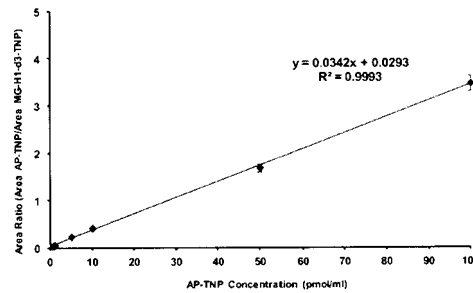
【 7 】



【 9 】

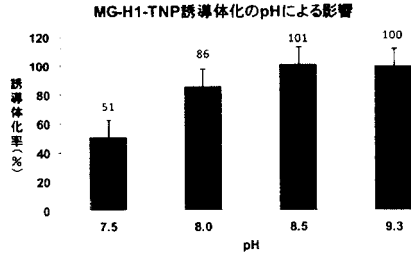


【 10 】

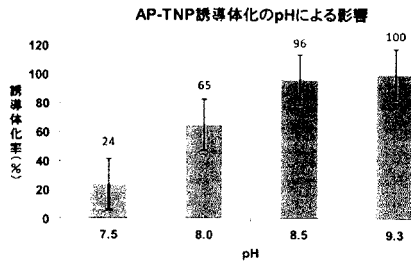




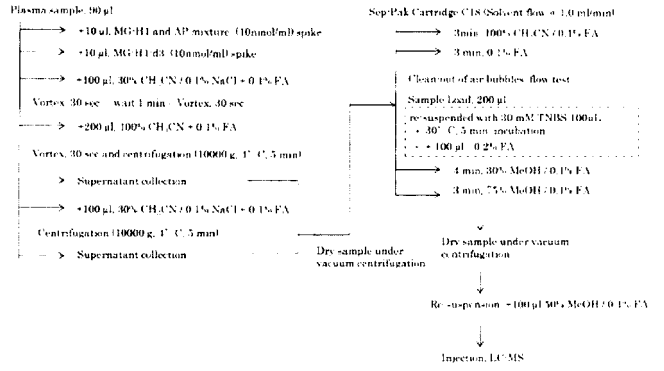
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 手続 補正書 】

【 提出日 】 平成 26 年 3 月 20 日 (2014.3.20)

【 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 】

( 削除 )

【 請求 項 2 】

( 削除 )

【 請求 項 3 】

( 削除 )

【 請求 項 4 】

( 削除 )

【 請求 項 5 】

( 削除 )

【 請求 項 6 】

( 削除 )

【 請求 項 7 】

( 削除 )

【 請求 項 8 】

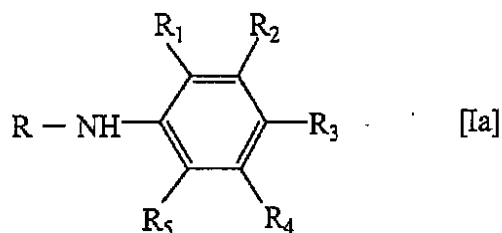
( 削除 )

【 請求 項 9 】

- (削除)  
 【請求項 1 0】  
 (削除)  
 【請求項 1 1】  
 (削除)  
 【請求項 1 2】  
 (削除)  
 【請求項 1 3】  
 (削除)  
 【請求項 1 4】  
 (削除)  
 【請求項 1 5】  
 (削除)  
 【請求項 1 6】  
 (削除)  
 【請求項 1 7】  
 (削除)  
 【請求項 1 8】  
 (削除)  
 【請求項 1 9】  
 (削除)  
 【請求項 2 0】  
 (削除)  
 【請求項 2 1】  
 (削除)  
 【請求項 2 2】  
 (削除)  
 【請求項 2 3】  
 (削除)  
 【請求項 2 4】  
 (削除)  
 【請求項 2 5】  
 (削除)  
 【請求項 2 6】

一般式 [ I a ] で表されるアミノ化合物またはその塩を質量分析で測定するアミノ化合物またはその塩の質量分析方法において、

【化 1】



(式中、R はアミノ置換基を意味し、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はそれぞれ同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> の少なくとも 1 個はニトロ基を意味する。)

式 [ I a ] で表されるアミノ化合物またはその塩におけるアミノ置換基が、アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基またはペプチド残基であり、

前記アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、プロリン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファンもしくはチロシンまたはそれらの置換体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

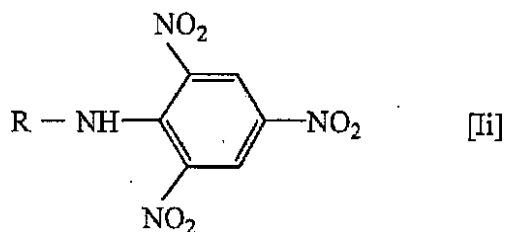
【請求項 27】

請求項 26 に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アルギニン、リジン、バリン、チロシン、メチオニン、グリシン、ヒスチジン、グルタミン酸もしくはトリプトファンまたはそれらの置換体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

【請求項 28】

請求項 26 に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ化合物が、一般式 [ I i ] で表されることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

【化 2】

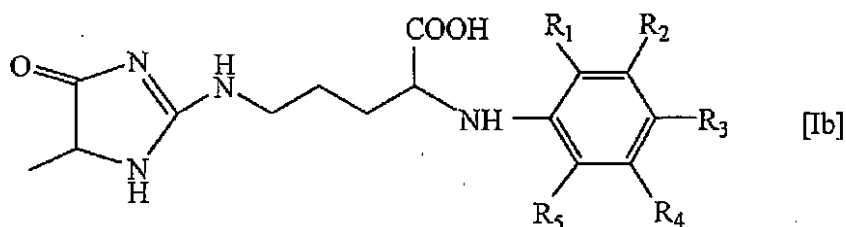


(式中、R は前記と同じ意味を有する。)

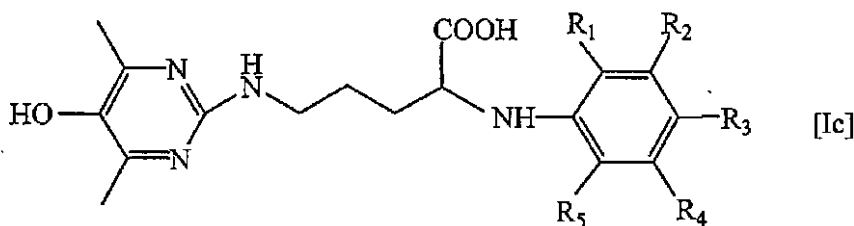
【請求項 29】

請求項 26 に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ化合物が、一般式 [ I b ] で表されるニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または一般式 [ I c ] で表されるニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

【化 3】



【化 4】



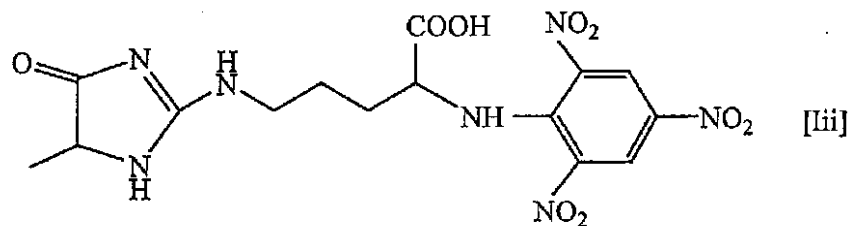
(式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はいずれも前記と同じ意味を有する。)

【請求項 30】

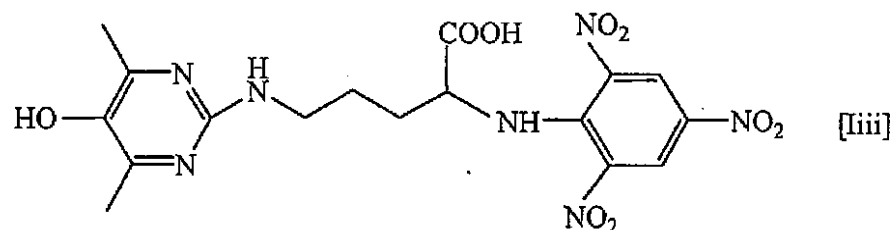
請求項 26 に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ化合物が、

構造式 [ I i i ] で表されるトリニトロフェニル化メチルグリオキサル由来ヒドロイミダゾロン誘導体または構造式 [ I i i i ] で表されるトリニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

【化 5】



【化 6】



【請求項 31】

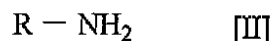
一般式 [ I I ] で表されるアミノ酸誘導体またはその塩において、アミノ置換基がアミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基またはペプチド残基であり、

前記アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、プロリン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファンもしくはチロシンまたはそれらの置換体であるアミノ酸誘導体またはその塩と、

一般式 [ I I I a ] で表されるニトロベンゼン化合物と、を反応させて一般式 [ I a ] で表されるアミノ化合物またはその塩を得る工程と、

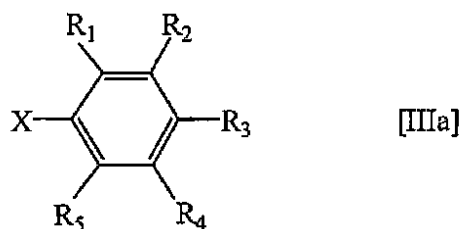
上記工程で得られたアミノ化合物またはその塩を質量分析する工程を有することを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

【化 7】



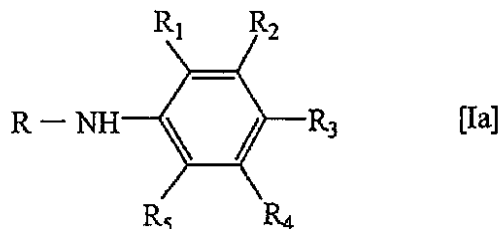
(式中、Rはアミノ置換基を意味する。)

【化 8】



(式中、Xはアミノ基反応性官能基を意味し、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>はそれぞれ同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>の少なくとも1個はニトロ基を意味する。)

## 【化 9】



(式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  はそれぞれ同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  の少なくとも 1 個はニトロ基を意味し、 $R$  は前記と同じ意味を有する。)

## 【請求項 3 2】

前記一般式 [ I I ] で表されるアミノ酸誘導体またはその塩と、一般式 [ I I I a ] で表されるニトロベンゼン化合物の反応を、アルカリ性水溶液または水と有機溶媒の混合溶液であり、かつ前記溶液の pH が 8 ~ 10 でおこなうことを特徴とする請求項 3 1 に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

## 【請求項 3 3】

請求項 3 1 に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記反応が試料中で行われることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

## 【請求項 3 4】

請求項 3 1 に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ酸誘導体またはその塩がバイオマーカーであることを特徴とするアミノ化合物の質量分析方法。

## 【請求項 3 5】

請求項 2 6 または 3 1 に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法により得られる質量スペクトルの強度データを用いて、生体試料中のバイオマーカー濃度の定量を行うことを特徴とするバイオマーカーのアッセイ方法。

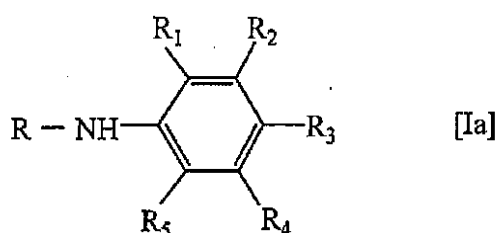
## 【請求項 3 6】

一般式 [ I a ] で表されるアミノ化合物またはその塩であって、

式 [ I a ] におけるアミノ置換基が、アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基またはペプチド残基であり、

前記アミノ酸残基もしくは前記置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、プロリン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファンもしくはチロシンまたはそれらの置換体である質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

## 【化 1 0】



(式中、 $R$  はアミノ置換基を意味し、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  はそれぞれ同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  の少なくとも 1 個はニトロ基を意味する。)

## 【請求項 3 7】

請求項 3 6 に記載のアミノ化合物またはその塩であって、

前記アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アルギニン、リジン、バリン、チロシン、メチオニン、グリシン、ヒスチジン、グルタミン酸もしくはトリプトファンまたはそれらの置換体であることを特徴とする質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

【請求項 38】

請求項 36 に記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記置換アミノ酸残基が、最終糖化産物 (AGE) の残基であることを特徴とする質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

【請求項 39】

請求項 38 に記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記最終糖化産物 (AGE) が、アルギニン誘導体またはリジン誘導体であることを特徴とする質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

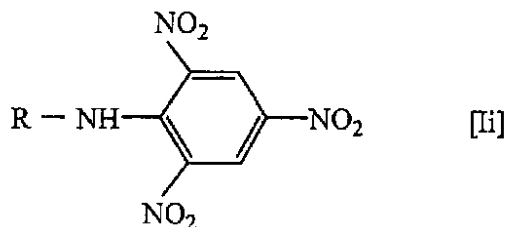
【請求項 40】

請求項 36 に記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記ペプチド残基のペプチドが、2 個ないし 10 個のアミノ酸がペプチド結合していることを特徴とする質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

【請求項 41】

請求項 36 に記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記アミノ化合物が、一般式 [I i] で表されることを特徴とする質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

【化 1 1】

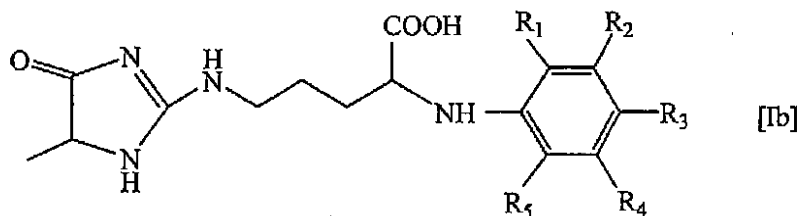


(式中、R は前記と同じ意味を有する。)

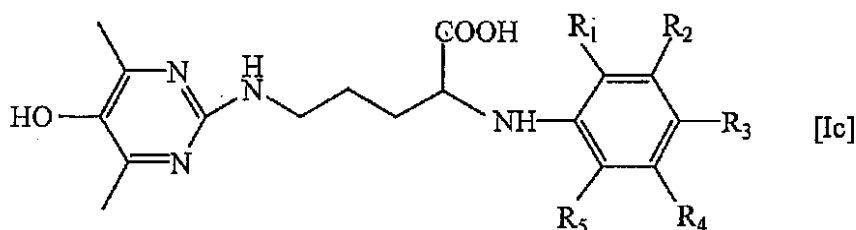
【請求項 42】

一般式 [I b] で表されるニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または一般式 [I c] で表されるニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩。

【化 1 2】



【化 1 3】



(式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はそれぞれ同じであってもまたは異なって

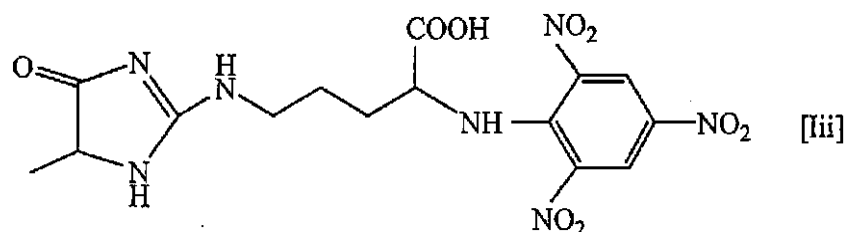
いてもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  の少なくとも 1 個はニトロ基を意味する。)

【請求項 4 3】

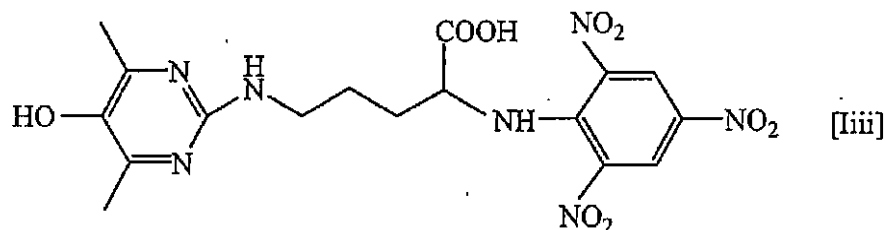
請求項 4 2 に記載のアミノ化合物またはその塩であって、

前記アミノ化合物が、構造式 [ I i i ] で表されるトリニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または構造式 [ I i i i ] で表されるトリニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩。

【化 1 4】



【化 1 5】



【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 4】

[ 0 0 7 1 ]

式 [ I ' ] において、 $R'$  は、前記  $R$  と同じ意味を有する置換アミノ酸残基またはペプチド残基を意味し、 $Z'$  は誘導体化残基を意味する。

[ 0 0 7 2 ]

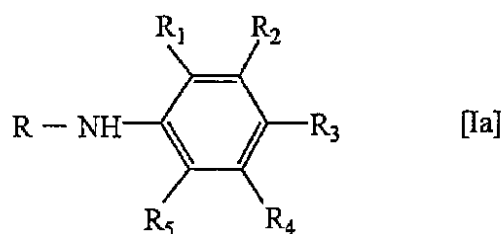
本発明は、さらに別の形態として、上記のアミノ化合物の質量分析方法により得られる質量スペクトルの強度データを用いて、生体試料中のバイオマーカー濃度の定量を行うバイオマーカーのアッセイ方法を提供する。式 [ I ' ] において、 $R'$  は、前記  $R$  と同じ意味を有する置換アミノ酸残基またはペプチド残基を意味し、 $Z'$  は誘導体化残基を意味する。

[ 0 0 7 2 - 1 ]

本発明は、下記のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法およびバイオマーカーのアッセイ方法、ならびにアミノ化合物またはその塩を提供する。

[ 1 ] 一般式 [ I a ] で表されるアミノ化合物またはその塩を質量分析で測定するアミノ化合物またはその塩の質量分析方法において、

[ 化 1 8 - 1 ]



式中、Rはアミノ置換基を意味し、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>はそれぞれ同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>の少なくとも1個はニトロ基を意味する。

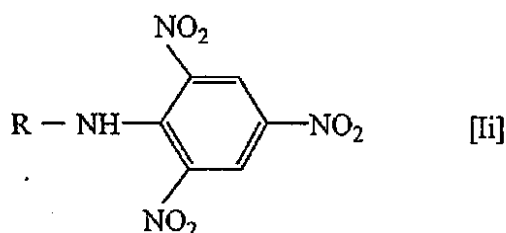
前記一般式 [ I a ] で表されるアミノ化合物またはその塩のアミノ置換基が、アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基またはペプチド残基であり、

前記アミノ酸残基もしくは前記置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、プロリン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファンもしくはチロシンまたはそれらの置換体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

[ 2 ] 前記 [ 1 ] に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アルギニン、リジン、バリン、チロシン、メチオニン、グリシン、ヒスチジン、グルタミン酸もしくはトリプトファンまたはそれらの置換体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

[ 3 ] 前記 [ 1 ] または [ 2 ] に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ化合物が、一般式 [ I i ] で表されることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

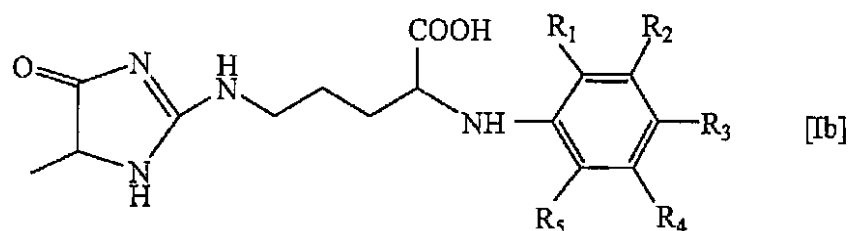
[ 化 1 8 - 2 ]



式中、Rは前記と同じ意味を有する。

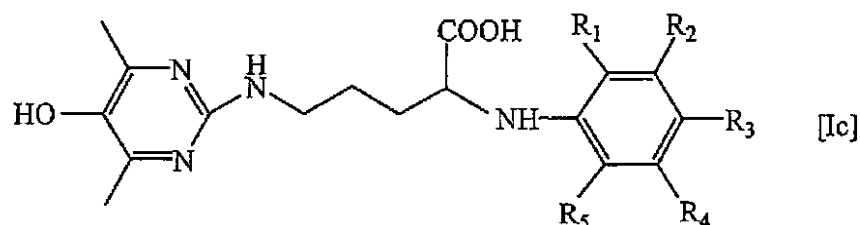
[ 4 ] 前記 [ 1 ] ~ [ 3 ] のいずれかに記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ化合物が、一般式 [ I b ] で表されるニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または一般式 [ I c ] で表されるニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

[ 化 1 8 - 3 ]



[ 化 1 8 - 4 ]

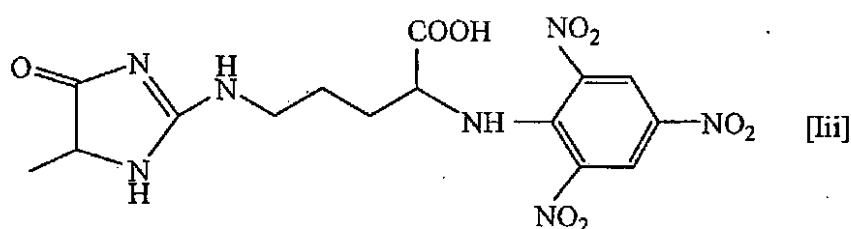




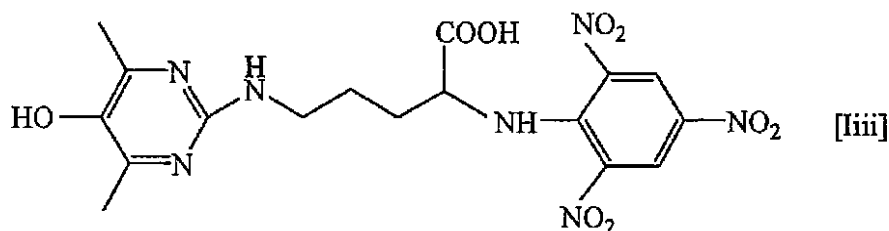
式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  はいずれも前記と同じ意味を有する。

[5] 前記 [1] ~ [4] のいずれかに記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ化合物が、構造式 [Iii] で表されるトリニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または構造式 [Iiii] で表されるトリニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

[化18-5]



[化18-6]

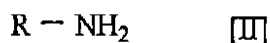


[0072-2]

[6] 一般式 [II] で表されるアミノ酸誘導体またはその塩において、アミノ置換基がアミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基またはペプチド残基であり、前記アミノ酸残基もしくは前記置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、プロリン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファンもしくはチロシンまたはそれらの置換体であるアミノ酸誘導体またはその塩と、一般式 [IIIa] で表されるニトロベンゼン化合物を反応させて一般式 [Ia] で表されるアミノ化合物またはその塩を得る工程と、

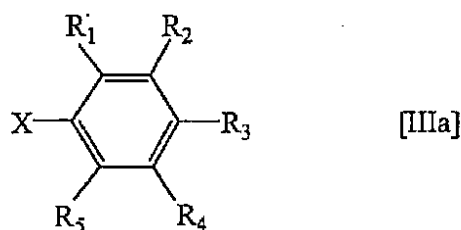
上記工程で得られたアミノ化合物またはその塩を質量分析する工程を有することを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

[化18-7]



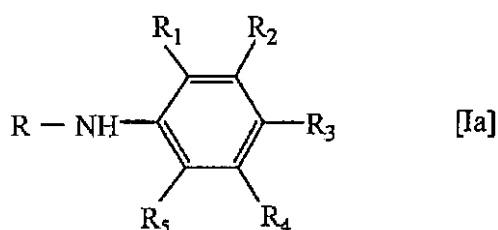
式中、 $R$  はアミノ置換基を意味する。

[化18-8]



式中、Xはアミノ基反応性官能基を意味し、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>はそれぞれ同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>の少なくとも1個はニトロ基を意味する。

[化18-9]



式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>はそれぞれ同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>の少なくとも1個はニトロ基を意味し、Rは前記と同じ意味を有する。

[7] 前記一般式[II]で表されるアミノ酸誘導体またはその塩と、一般式[IIIa]で表されるニトロベンゼン化合物の反応を、アルカリ性水溶液または水と有機溶媒の混合溶液であり、かつ前記溶液のpHが8~10でおこなうことを特徴とする前記[6]に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

[8] 前記[6]または[7]に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記反応が試料中で行われることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

[9] 前記[6]~[8]のいずれかに記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ酸誘導体またはその塩がバイオマーカーであることを特徴とするアミノ化合物の質量分析方法。

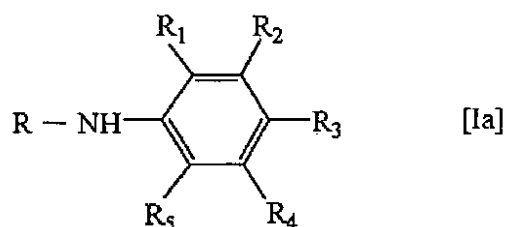
[0072-3]

[10] 前記[1]~[9]のいずれかに記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法により得られる質量スペクトルの強度データを用いて、生体試料中のバイオマーカー濃度の定量を行うことを特徴とするバイオマーカーのアッセイ方法。

[0072-4]

[11] 一般式[Ia]で表されるアミノ化合物またはその塩であって、式[Ia]におけるアミノ置換基が、アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基またはペプチド残基であり、アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、プロリン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファンもしくはテロシンまたはそれらの置換体である質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

[化18-10]



式中、Rはアミノ置換基を意味し、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>はそれぞれ同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>の少なくとも1個はニトロ基を意味する。

[12] 前記[11]に記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アルギニン、リジン、バリン、チロシン、メチオニン、グリシン、ヒスチジン、グルタミン酸もしくはトリプトファンまたはそれらの置換体であることを特徴とする質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

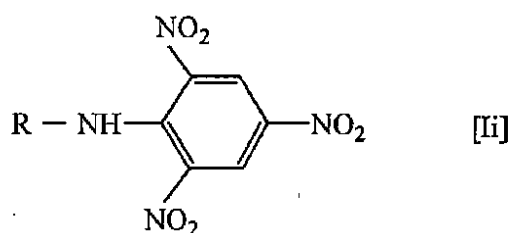
[13] 前記[11]または[12]に記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記置換アミノ酸残基が、最終糖化産物(AGE)の残基であることを特徴とする質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

[14] 前記[13]に記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記最終糖化産物(AGE)が、アルギニン誘導体またはリジン誘導体であることを特徴とする質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

[15] 前記[11]または[12]に記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記ペプチド残基のペプチドが、2個ないし10個のアミノ酸がペプチド結合していることを特徴とする質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

[16] 前記[11]~[15]のいずれかに記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記アミノ化合物が、一般式[Ii]で表されることを特徴とする質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

[化18-11]

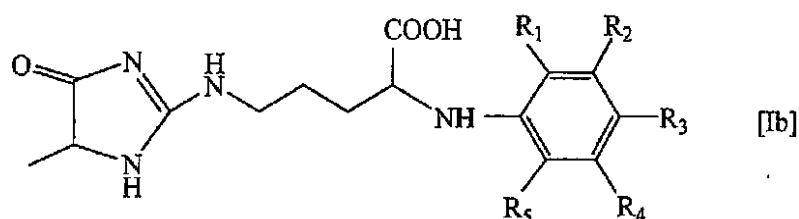


式中、Rは前記と同じ意味を有する。

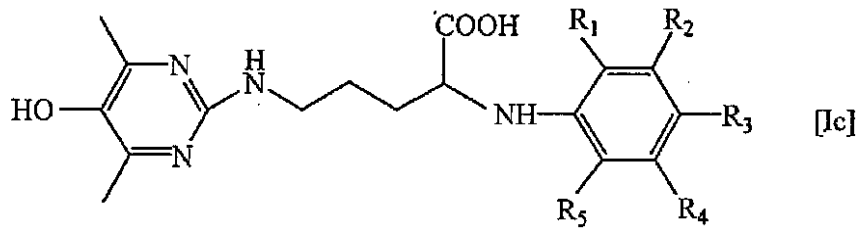
[0072-5]

[17] 一般式[Ib]で表されるニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または一般式[Ic]で表されるニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩。

[化18-12]



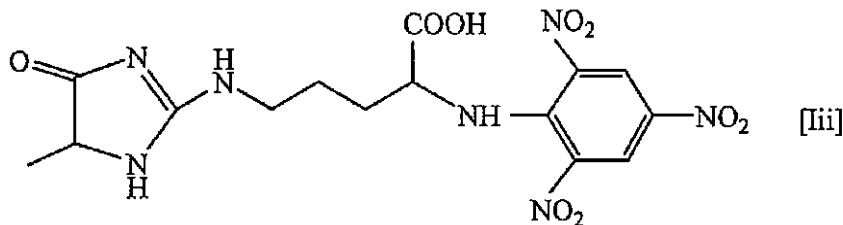
[化18-13]



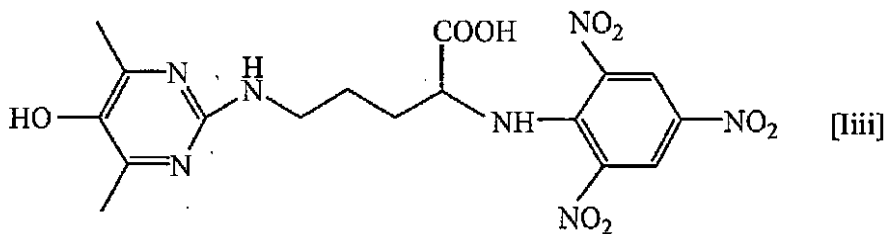
式中、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  はいずれも前記と同じ意味を有する。

[18] 前記 [17] に記載のアミノ化合物またはその塩であって、前記アミノ化合物が、構造式 [Iii] で表されるトリニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または構造式 [Iiii] で表されるトリニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩。

[化18-14]



[化18-15]



#### 発明の効果

[0073]

本発明によって、アミノ酸誘導体のN末端アミノ基を誘導体化することにより、質量分析におけるイオン化効率が向上し、試料中に少量しか存在しない最終糖化産物等の分子バイオマーカーやペプチドホルモンについても、質量分析方法を用いて迅速、高感度かつ高精度な定量分析が可能になる。したがって、本発明は、アミノ酸誘導体とニトロベンゼン化合物等の誘導体化剤との誘導体化生成物である新規なアミノ化合物、好ましくはタンパク質の解糖等の反応中間産物である糖化タンパク質分解物がニトロベンゼン化合物等の誘導体化剤で誘導体化された、耐糖能異常の診断に有用な新規な糖化タンパク質分解物誘導体を提供する。また、本発明は、そのアミノ化合物についての迅速、高感度かつ高精度な定量が可能な質量分析方法およびそれを用いたバイオマーカーのアッセイ方法を提供する。

#### 図面の簡単な説明

[0074]

[図1] メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体 (MG-H1) の質量スペクトル (MS、MS/MS) である。

[図2] MG-H1の2,4,6-トリニトロフェニル誘導体 (MG-H1-TNP) の質量スペクトル (MS、MS/MS) である。

[図3] アルグピリミジン (AP) の質量スペクトル (MS、MS/MS) である。

[図4] APの2,4,6-トリニトロフェニル誘導体 (AP-TNP) の質量スペクトル (MS、MS/MS) である。

[図5] 質量スペクトルより予測されるMG-H1の2,4,6-トリニトロフェニル誘

導体 (MG-H1-TNP) のフラグメンテーションパターンを示す

【手続補正書】

【提出日】平成27年1月13日(2015.1.13)

【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

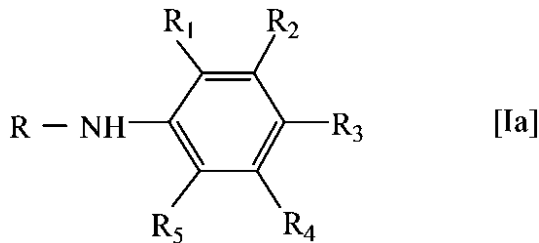
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

一般式 [Ia] で表されるアミノ化合物またはその塩を質量分析で測定するアミノ化合物またはその塩の質量分析方法において、

【化1】



(式中、Rはアミノ置換基を意味し、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>はそれぞれ同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>の少なくとも1個はニトロ基を意味する。)

式 [Ia] で表されるアミノ化合物またはその塩におけるアミノ置換基が、置換アミノ酸残基またはペプチド残基であり、

前記置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、プロリン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファンもしくはチロシンまたはそれらの置換体であり、

かつ、前記置換アミノ酸残基が、最終糖化産物 (AGE) の残基である、または前記ペプチド残基のペプチドが、2個ないし10個のアミノ酸がペプチド結合しているペプチドであることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

【請求項2】

請求項1に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、

前記最終糖化産物 (AGE) が、置換アルギニン誘導体または置換リジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

【請求項3】

請求項1に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、

前記最終糖化産物 (AGE) が、グリオキサールヒドロイミダゾロン、メチルグリオキサールヒドロイミダゾロン、アルグピリミジン、カルボキシメチルリジン、カルボキシエチルリジンからなる群から選択されるいずれかの最終糖化産物 (AGE) であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

【請求項4】

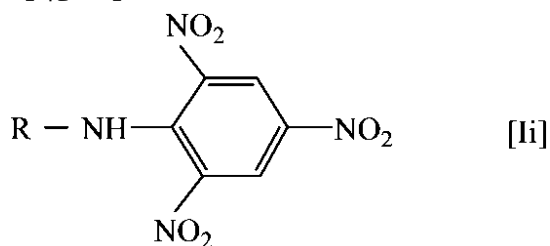
請求項1に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、

前記置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アルギニン、リジン、バリン、チロシン、メチオニン、グリシン、ヒスチジン、グルタミン酸もしくはトリプトファンまたはそれらの置換体であることを特徴とする質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

## 【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ化合物が、一般式 [Ii] で表されることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

## 【化 2】

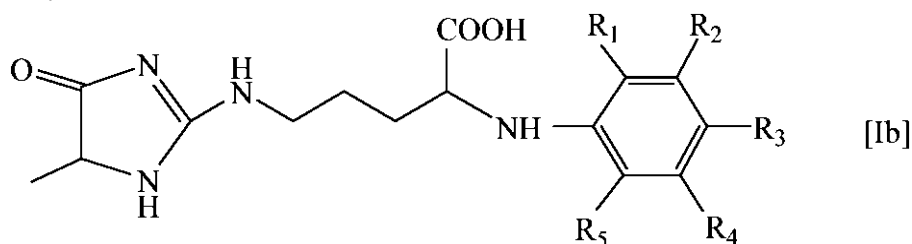


(式中、R は前記と同じ意味を有する。)

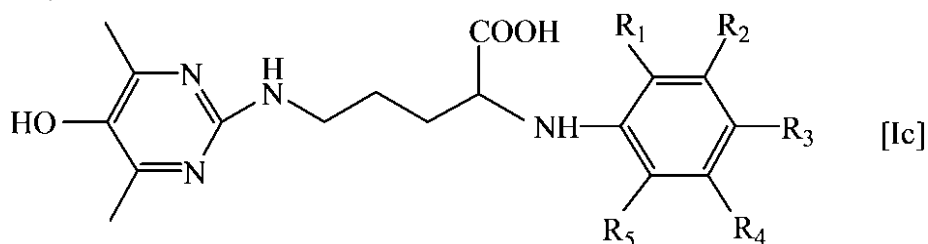
## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ化合物が、一般式 [Ib] で表されるニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または一般式 [Ic] で表されるニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

## 【化 3】



## 【化 4】



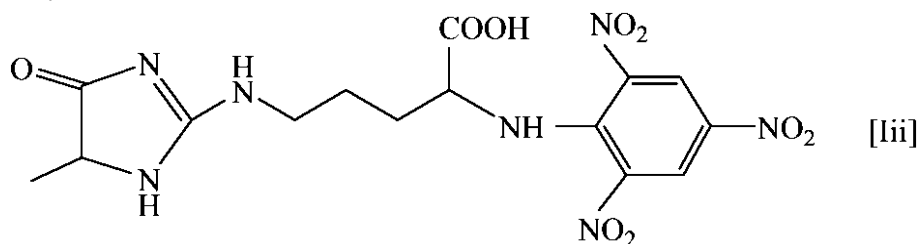
(式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はいずれも前記と同じ意味を有する。)

## 【請求項 7】

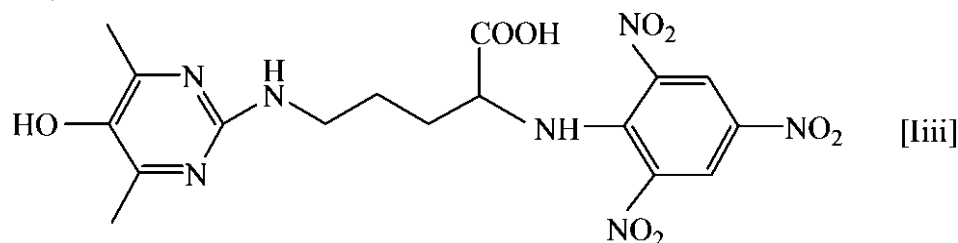
請求項 6 に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ化合物が、

構造式 [Iii] で表されるトリニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または構造式 [Iiii] で表されるトリニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

## 【化 5】



## 【化 6】



## 【請求項 8】

一般式 [II] で表されるアミノ酸誘導体またはその塩において、アミノ置換基が置換アミノ酸残基またはペプチド残基であり、

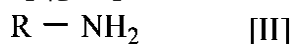
前記置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、プロリン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファンもしくはチロシンまたはそれらの置換体であり、

かつ、前記置換アミノ酸残基が、最終糖化産物 (AGE) の残基である、または前記ペプチド残基のペプチドが、2 個ないし 10 個のアミノ酸がペプチド結合しているペプチドであるアミノ酸誘導体またはその塩と、

一般式 [IIIa] で表されるニトロベンゼン化合物と、を反応させて一般式 [Ia] で表されるアミノ化合物またはその塩を得る工程と、

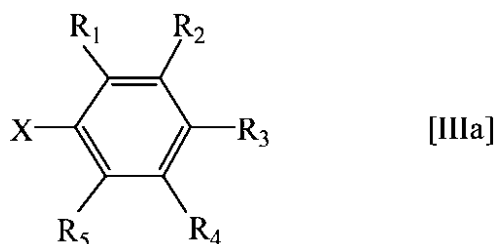
上記工程で得られたアミノ化合物またはその塩を質量分析する工程を有することを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

## 【化 7】



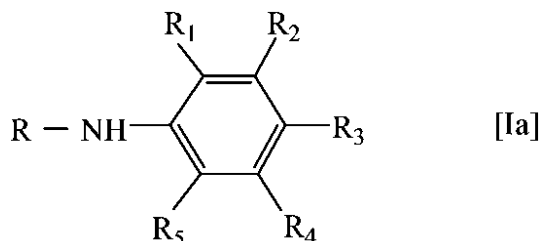
(式中、R はアミノ置換基を意味する。)

## 【化 8】



(式中、X はアミノ基反応性官能基を意味し、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はそれぞれ同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> の少なくとも 1 個はニトロ基を意味する。)

## 【化 9】



(式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はそれぞれ同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> の少なくとも 1 個はニトロ基を意味し、R は前記と同じ意味を有する。)

## 【請求項 9】

前記一般式 [II] で表されるアミノ酸誘導体またはその塩と、一般式 [IIIa] で表されるニトロベンゼン化合物の反応を、アルカリ性水溶液または水と有機溶媒の混合溶液であり、かつ前記溶液の pH が 8 ~ 10 でおこなうことを特徴とする請求項 8 に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

## 【請求項 10】

請求項 8 または 9 に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記反応が試料中で行われることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

## 【請求項 11】

請求項 8 ~ 10 のいずれかに記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ酸誘導体またはその塩がバイオマーカーであることを特徴とするアミノ化合物の質量分析方法。

## 【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法により得られる質量スペクトルの強度データを用いて、生体試料中のバイオマーカー濃度の定量を行うことを特徴とするバイオマーカーのアッセイ方法。

## 【請求項 13】

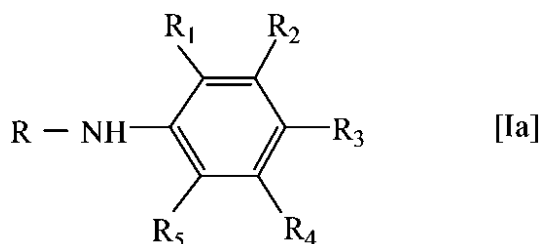
一般式 [Ia] で表されるアミノ化合物またはその塩であって、

式 [Ia] におけるアミノ置換基が、置換アミノ酸残基またはペプチド残基であり、

前記置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、プロリン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファンもしくはチロシンまたはそれらの置換体であり、

かつ、前記置換アミノ酸残基が、最終糖化産物 (AGE) の残基である、または前記ペプチド残基のペプチドが、2 個ないし 10 個のアミノ酸がペプチド結合しているペプチドである質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

## 【化 10】



(式中、R はアミノ置換基を意味し、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はそれぞれ同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> の少なくとも 1 個はニトロ基を意味する。)

## 【請求項 14】

請求項 13 に記載のアミノ化合物またはその塩であって、

前記最終糖化産物 (AGE) が、置換アルギニン誘導体または置換リジン誘導体であることを特徴とする質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

## 【請求項 15】

請求項 13 に記載のアミノ化合物またはその塩であって、

前記置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アルギニン、リジン、バリン、チロシン、メチオニン、グリシン、ヒスチジン、グルタミン酸もしくはトリプトファンまたはそれらの置換体であることを特徴とする質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

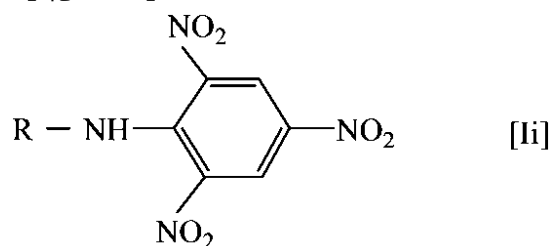
## 【請求項 16】

請求項 13 ~ 15 のいずれかに記載のアミノ化合物またはその塩であって、



前記アミノ化合物が、一般式 [Ii] で表されることを特徴とする質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

【化 1 1】

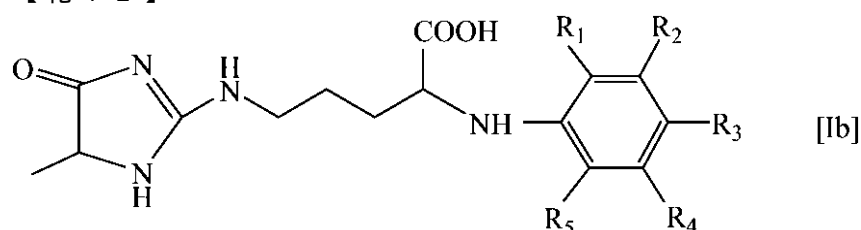


(式中、R は前記と同じ意味を有する。)

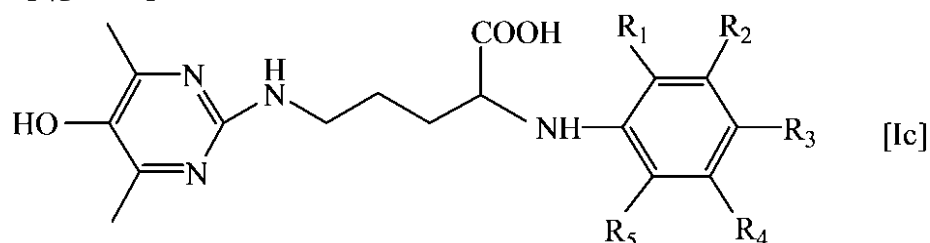
【請求項 1 7】

一般式 [Ib] で表されるニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または一般式 [Ic] で表されるニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩。

【化 1 2】



【化 1 3】



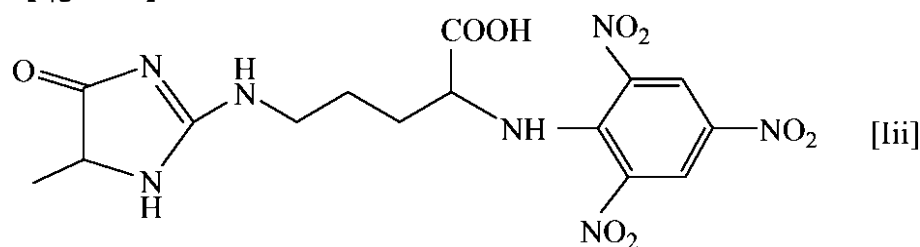
(式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はそれぞれ同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> の少なくとも 1 個はニトロ基を意味する。)

【請求項 1 8】

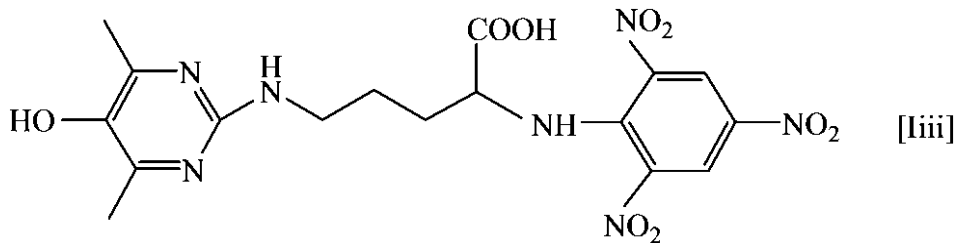
請求項 1 7 に記載のアミノ化合物またはその塩であって、

前記アミノ化合物が、構造式 [Iii] で表されるトリニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または構造式 [Iiii] で表されるトリニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩。

【化 1 4】



【化 1 5】



【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アミノ化合物およびその高感度質量分析方法ならびにバイオマーカーのアッセイ方法に関する。更に詳しくは、最終糖化産物を始めとするアミノ酸誘導体とニトロベンゼン系化合物との誘導体化で得られるアミノ化合物およびその塩、ならびにこのアミノ化合物を迅速に高感度かつ高精度で定量可能な質量分析方法、およびそれを用いたバイオマーカーのアッセイ方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

糖尿病は、血糖値が病的に高い状態をいうが、血糖値の異常に起因する急性症状以外に、高血糖状態が長期間継続することに伴い、種々の臓器が障害を受け、糖尿病慢性期合併症を発症すると、治療が非常に困難になるため、早期に発症を診断し、生活習慣の改善、経口血糖降下薬の投与、インスリン注射等の処置を開始することが重要である。

【0003】

しかし、生活習慣病を主因とする糖尿病患者数は年々増加の一途を辿っており、厚生労働省の推計では900万人を超えるのはもはや時間の問題と言われている。その糖尿病患者数に加えて、いわゆる糖尿病予備軍が1000万人以上いると推定されることから、糖尿病疾患患者数は近い将来激増することは想像に難くない。しかしながら、実際に糖尿病の治療を受けている患者はわずか300万人足らずであり、また十分な診断を受けずに放置して治療が遅れたために腎症に至る患者が、毎年1万人ずつ増加し続けているのが現状である。その上、糖尿病の患者の約半数は心筋梗塞や脳梗塞等の虚血性疾患で死亡していることを考え合わせると、糖尿病とその合併症、ならびにいわゆる隠れ糖尿病（糖尿病前症）に対する対策は、医療経済からしても極めて重要である。とりわけ、健康診断の血糖値測定のみでは判定が極めて困難な潜在的糖尿病予備軍である糖尿病前症に対する対策、つまり早期診断方法と治療システムの確立は急務である。

【0004】

しかも、近年、糖尿病前症の中でも、空腹時血糖値（FPG）は正常であるのに、耐糖能障害（IGT）のために食後血糖値が極端に高くなり、これにより心血管障害を引き起こす患者が増加していることが指摘されている。このため、米国糖尿病学会や世界保健機構は、糖尿病前症をれっきとした疾患と定め、生活習慣の質的改善と薬物治療による糖尿病前症のIGT改善の重要性を唱えている。前述したように、このような糖尿病前症といわれる患者は、日本でも、推定1000万人を超えていると考えられるところから、糖尿病前症に対する予防ならびに治療対策は極めて重要である。

【0005】

日本糖尿病学会では、糖尿病前症や糖尿病の診断基準として、一次健康診断では空腹時血糖値（FPG）、また二次健康診断では経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）の実施を指

導してきた。糖尿病前症患者の耐糖能障害は、一次健康診断のFPG検査やグリコヘモグロビン(HbA1c)検査だけでは正確に診断することが困難であるところから、一次健康診断で糖尿病前症が疑われる被検者に対しては、OGTTの二次健康診断の受診を勧められている。しかしながら、このOGTTは、被験者の長い拘束時間や簡便性に欠けている上に、糖(グルコース)負荷という身体的負担を課するとともに急激な血糖値上昇等の危険が伴う等の問題があり、一般の健康診断での血液検査による血糖値検査法のように普及していないのが実情である。その結果、潜在的な糖尿病前症の多くが、OGTTの二次健康診断の受診を怠ってしまい、糖尿病やその合併症を自覚することなく未治療のまま真性の糖尿病に進行し、さらに重篤な合併症を発症するか、または腎透析を余儀なくされるに至っている。

#### 【0006】

一次健康診断では、通常、空腹時血糖(FPG)、随時血糖あるいはグリコヘモグロビン(HbA1c)を判定指標とした検査が実施されていて、FPG値が100mg/dL以上、またはHbA1c値が5.2%以上であれば、インスリン抵抗性もしくはそれによるIGTの疑いありと診断されている。しかし、インスリン抵抗性によるIGTは、食後高血糖が主たる初期変化として現れてくることから、従来的一次健康診断で使用されているいずれの指標も精度の点で不十分と言わざるを得ず、従来的一次健康診断法は、糖尿病前症の早期診断としては利用することができない。

#### 【0007】

そこで、現実的には、一次健康診断において、これらの指標を用いてインスリン抵抗性あるいはIGTが疑われる被検者に対して、二次健康診断あるいはそれ以降の健康診断で75g経口ブドウ糖負荷試験(75g OGTT)、血中インスリン、HOMA-R等の検査により、インスリン抵抗性もしくはIGTが陽性であるかどうかを検査して、糖尿病前症の確定診断がなされている。これらの検査は、当然のことながら費用も手間もかかることになる。

#### 【0008】

そこで、もし一次健康診断で用いた同じ血糖測定用採血サンプルでOGTTと同等の精度で糖尿病前症の診断を確定できる方法があれば、糖尿病前症患者の検出率は飛躍的に向上するとともに、二次健康診断でのOGTT検査は不要となり、世界保健機構等が提唱する糖尿病前症の早期診断ならびに治療による糖尿病化阻止戦略を強力に推し進めることが可能となる。

#### 【0009】

他方、近年、糖尿病慢性期合併症のリスクファクターとして、種々の最終糖化産物が注目を集めている。最終糖化産物(AGE類)は、糖化タンパク質、メイラード反応産物等とも呼ばれ、グルコース等の還元糖とタンパク質のアミノ基との非酵素的な反応により生成する種々の構造を有するタンパク質誘導体である。AGE類は、細胞外マトリックスタンパク質、膜タンパク質および細胞内タンパク質の糖化修飾に起因するこれらのタンパク質の機能及びそれに依存する細胞機能の破綻、あるいはAGE類をリガンドとするレセプターが引き起こす細胞応答の結果として、種々の病変の発症及び増悪に関与している。例えば、AGE類レセプターの1つであるRAGE類によってAGE類が認識されると、細胞内NADPHオキシダーゼによる細胞内酸化ストレス物質の産生が亢進し、これが上皮細胞における遺伝子発現を変化させることにより、種々の糖尿病性血管障害が発症すると考えられている(非特許文献1参照)。

#### 【0010】

AGE類の中でも、解糖系の中間体または副産物として産生されるグリセルアルデヒドやメチルグリオキサル(MG)に由来するものは、糖尿病および耐糖能異常の発症および予後予測等に関する診断マーカーとして期待を集めている(非特許文献2、3、4、5)。

#### 【0011】

非特許文献2には、2型糖尿病患者の血清について、メチルグリオキサル由来ヒドロ

イミダゾールのポリクロナル抗体を用いたELISA系で測定した結果、メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾールの血清レベルが同齡健常人に比較して増加しているとの報告がなされている。同非特許文献2は、メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾールの血清レベルと、AGE類の1種であるN<sup>-</sup>(カルボニルメチル)リジンの血清レベルとの間には、同様に有意な相関関係があるが、メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾールの血清レベルは、空腹時血糖の血漿レベルやヘモグロビンレベルとは関連性はなかったと報告している。

【0012】

非特許文献3は、LC/MS/MSを用いて1型糖尿病患者の血漿を測定した結果、タンパク質の糖化または酸化による付加生成物の濃度ならびにその遊離残基(free adduct)の濃度が増加していることを示している。例えば、メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロンやグリオキサール由来ヒドロイミダゾロンあるいはその他のAGE類であるN<sup>-</sup>(カルボニルメチル)リジン、N<sup>-</sup>(カルボニルエチル)リジン、ならびにこれらの遊離付加物(free adduct)が増加していることが報告されている。

【0013】

非特許文献4は、1型糖尿病患者の血漿をタンデム質量分析した結果、メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン遊離付加物が糖尿病患者のマーカーとして優れていることを示唆している。

【0014】

非特許文献5は、1型糖尿病患者の血漿ならびに尿サンプルをLC-MS/MSで測定した結果、糖負荷後の血糖値とインスリン値の上昇に加えて、メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾール遊離付加物を初めとして、N<sup>-</sup>(カルボニルメチル)リジン、N<sup>-</sup>(カルボニルエチル)リジン、グリオキサール由来ヒドロイミダゾロン、N<sup>-</sup>[5-(2,3,4-トリヒドロキシブチル)-5-ヒドロ4-イミダゾロン2-イル]-オルニチン(3DG-H1)等のfree adductも増加することを報告している。即ち、この論文は、食後には高血糖になるだけでなく、高カルボニルストレス状態も誘発されることを示している。さらに、この文献には、メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン遊離付加物の他、アルグピリミジンを含む多くのAGE類、ならびにアミノ酸(アルギニン、リジン、メチオニン、チロシンおよびトリプトファン)についてのタンデム質量分析結果が記載されている。

【0015】

上述したように、これらのAGE類をタンデム質量(MS/MS)分析する手法が報告されている。しかしながら、これらのAGE類についての測定は、ELISA法等の免疫化学的手法を用いた総量評価以外に有効な手法が存在しないのが現状であり(特許文献1)、個別のAGE類およびその分解産物について確立した測定法は殆ど存在しておらず、ましてや臨床に応用可能な測定法は存在してないと言わざるを得ない。これらの個別のAGE類の定量は、糖尿病および耐糖能異常の診断のみならず、メタボローム解析等においても有用であることから、AGE類についてより迅速に高感度かつ高精度に個別の化合物を測定できるアッセイ法が強く望まれている。

【0016】

AGE類分析の他に、アミノ酸分析も、臨床分野、例えば先天的な代謝障害のアッセイにとって非常に重要であり、また診断のバイオマーカー検索に使用できる可能性を持っている。アミノ酸分析は、例えば、先天性アミノ酸症の診断や、肝臓機能障害の重症度や治療の指針等として使用されている。また、最近の報告では、アミノ酸のプロファイルが、慢性C型肝炎患者の進行型線維症等の診断に応用されている。さらに、アミノ酸のプロファイルを指標として用いて、生物の健康度合いの分析の可能性までも報告されている(非特許文献6)。

【0017】

上述したようなアミノ酸分析のために、アミノ酸自動分析装置が開発された。この装置はニンヒドリン試薬を用いたアミノ酸の比色を測定するものであり、分析には非常に時間

を要するものである。

【 0 0 1 8 】

上記のような比色測定方法の他に、プレカラム誘導体化法が開発され、このプレカラム誘導体化法に使用する誘導体化剤も様々なものが開発されている（非特許文献6）。しかし、この誘導体化法は複雑で時間を要する技術である。さらに、この誘導体化法と質量分析方法を組み合わせた自動アミノ酸分析方法も開発されているが、この方法にしても更なる改良が求められていた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 1 9 】

【特許文献1】特開2008-224453号公報

【非特許文献】

【 0 0 2 0 】

【非特許文献1】Marie-Paule Wautier他著、「Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE」、American Journal of Physiology -Endocrinology and Metabolism、(米国)、アメリカ生理学会(American Physiological Society)、2001年5月、第280巻、E685 - E694

【非特許文献2】Kilhovd, B.K., et al. Metabolism, Vol 52, No 2 (February), 2003: pp. 163-167

【非特許文献3】Rabbani, N., and Thornalley, P.J. Amino Acids DOI 10.1007/s00726-010-0783-0

【非特許文献4】Ahmed, N., et al. Diabetologia (2005) 48: 1590-1603

【非特許文献5】Ahmed, N., et al. Diabetes Care, Vol. 28, No. 10, October 2005, pp. 2465-2471

【非特許文献6】Shimbo, K., et al. Biomed. Chromatogr. 2010; 24: 683-691.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 2 1 】

そこで、本発明者らは、かかる事情に鑑みて鋭意検討を重ねた結果、AGE類のメチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体(MG-H1)ならびにアルグピリミジン(AP)の末端アミノ基をニトロベンゼン系化合物で誘導体化することによって、質量分析における感度が大幅に向上する上に、AGE類に加えて、その他のアミノ酸誘導体またはペプチド等のアミノ化合物にも応用できることを見いだして、本発明を完成するに至った。

【 0 0 2 2 】

したがって、本発明は、特に最終糖化産物を始めとするアミノ酸誘導体とニトロベンゼン系化合物との誘導体化で得られるアミノ化合物およびその塩、ならびにこのアミノ化合物を迅速に高感度かつ高精度で定量が可能な質量分析方法、およびそれを用いたバイオマーカーのアッセイ方法を提供することを目的とする。

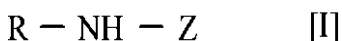
【課題を解決するための手段】

【 0 0 2 3 】

上記目的を達成するために、本発明は、一般式[I]で表されるアミノ化合物またはその塩を提供する。

【 0 0 2 4 】

【化1】



【 0 0 2 5 】

式[I]において、Rはアミノ置換基を意味し、Zはニトロフェニル基を意味する。

【 0 0 2 6 】

本発明は、その好ましい態様として、上記アミノ置換基が、アミノ酸残基もしくは置換

アミノ酸残基または該アミノ酸残基ならびにノもしくは置換アミノ酸残基がペプチド結合したペプチド残基であるアミノ化合物またはその塩を提供する。

【0027】

本発明は、その好ましい態様として、上記アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、プロリン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファンもしくはチロシンまたはそれらの置換体、好ましくはアルギニン、リジン、バリン、チロシン、メチオニン、グリシン、ヒスチジン、グルタミン酸もしくはトリプトファンまたはそれらの置換体であるアミノ化合物またはその塩を提供する。

【0028】

本発明は、その好ましい別の態様として、上記置換アミノ酸残基が、最終糖化産物 (AGE)、好ましくはアルギニン誘導体またはリジン誘導体の残基であるアミノ化合物またはその塩を提供する。

【0029】

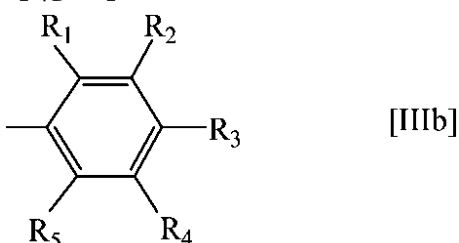
本発明は、その好ましい別の態様として、上記ペプチド残基のペプチドが、2個ないし10個のアミノ酸がペプチド結合しているアミノ化合物またはその塩を提供する。

【0030】

本発明は、その好ましい別の態様として、上記ニトロフェニル基が、一般式 [IIIb] で表されるアミノ化合物またはその塩を提供する。

【0031】

【化2】



【0032】

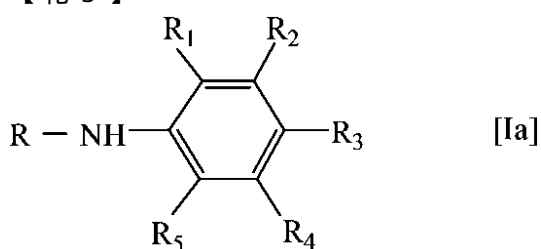
式 [IIIb] において、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  はいずれも同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  の少なくとも1個はニトロ基を意味する。

【0033】

本発明は、そのより好ましい態様として、上記アミノ化合物が、一般式 [Ia] で表されるアミノ化合物またはその塩を提供する。

【0034】

【化3】



【0035】

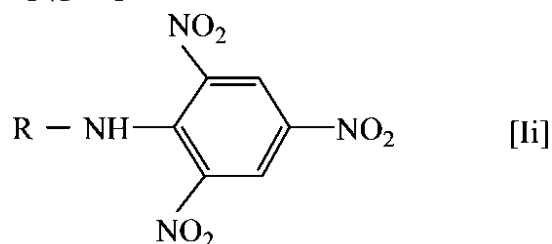
式 [Ia] において、 $R$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  はそれぞれ前記と同じ意味を有する。

【0036】

本発明は、そのより好ましい別の態様として、上記アミノ化合物が、一般式 [Ii] で表されるアミノ化合物またはその塩を提供する。

【0037】

【化4】



【0038】

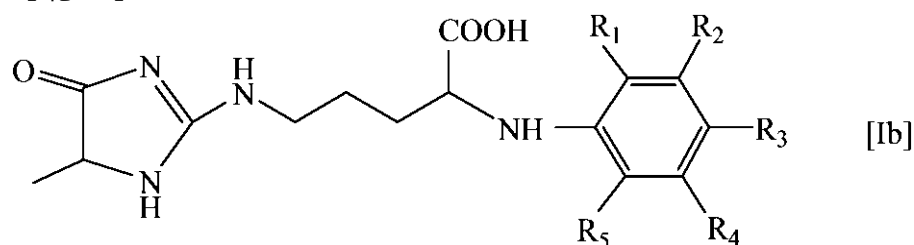
式 [Ii] において、R は前記と同じ意味を有する。

【0039】

本発明は、そのより好ましい態様として、上記アミノ化合物が、一般式 [Ib] で表されるニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または一般式 [Ic] で表されるニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であるアミノ化合物またはその塩を提供する。

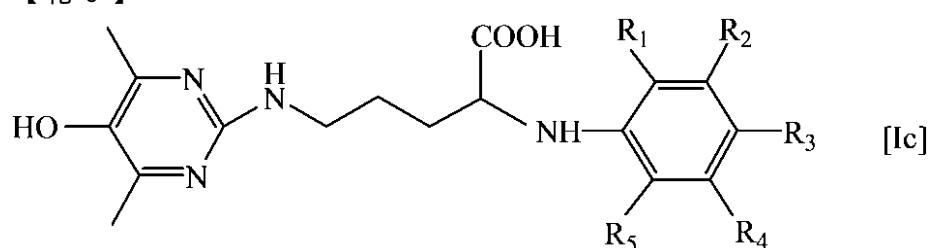
【0040】

【化5】



【0041】

【化6】



【0042】

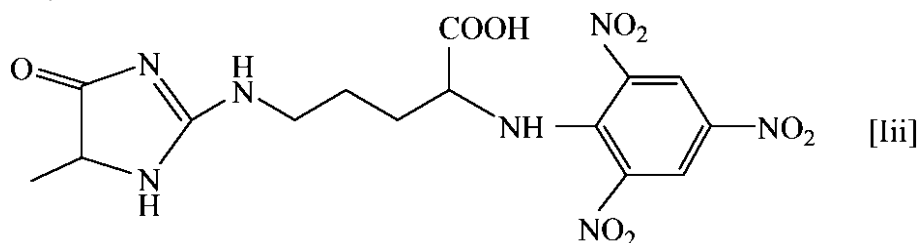
式 [Ib] 及び [Ic] において、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はいずれも前記と同じ意味を有する。

【0043】

本発明は、そのより好ましい態様として、上記アミノ化合物が、構造式 [Iii] で表されるトリニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または構造式 [Iiii] で表されるトリニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であるアミノ化合物またはその塩を提供する。

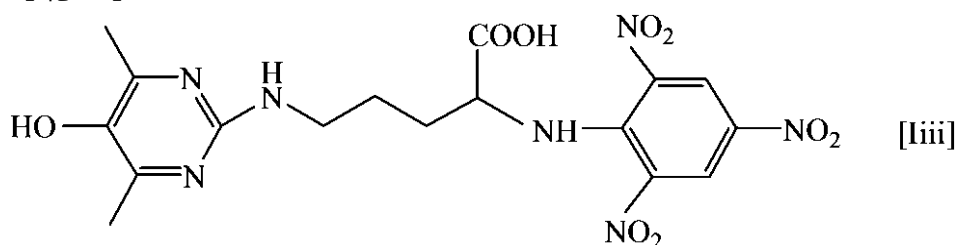
【0044】

【化 7】



【0045】

【化 8】

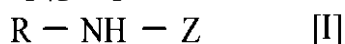


【0046】

本発明は、その別の形態として、一般式 [ I ] で表されるアミノ化合物またはその塩を質量分析で測定するアミノ化合物またはその塩の質量分析方法を提供する。

【0047】

【化 9】



【0048】

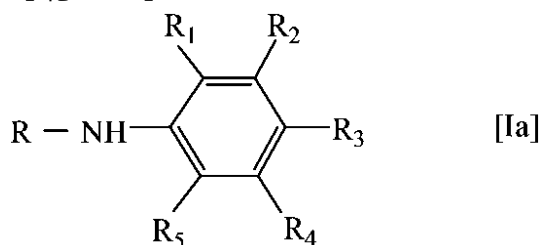
式 [ I ] において、R はアミノ置換基、例えば、アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基またはペプチド残基を意味し、Z はニトロフェニル基を意味する。

【0049】

本発明は、その好ましい態様として、上記アミノ化合物が、一般式 [ Ia ] で表されるアミノ化合物またはその塩の質量分析方法を提供する。

【0050】

【化 10】



【0051】

式 [ Ia ] において、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はいずれも同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> の少なくとも 1 個はニトロ基を意味し、R は前記と同じ意味を有する。

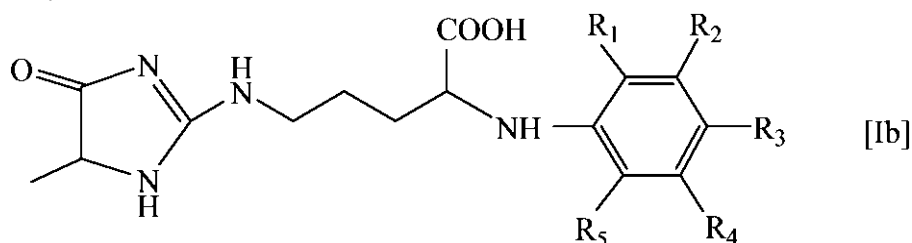
【0052】

本発明は、そのより好ましい態様として、上記アミノ化合物が、一般式 [ Ib ] で表されるニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または一般式 [ Ic ] で表されるニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であるアミノ化合物またはその塩の質量分析方法を提供する。

【0053】

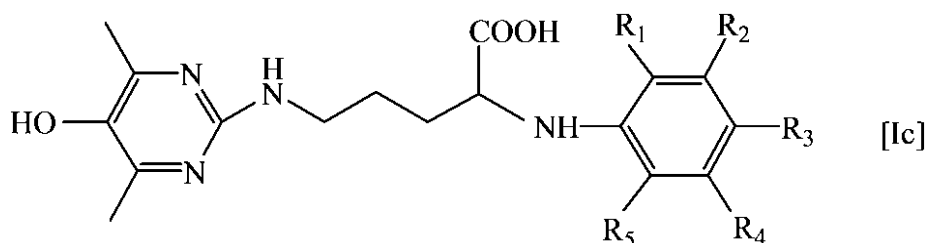


【化 1 1】



【0054】

【化 1 2】



【0055】

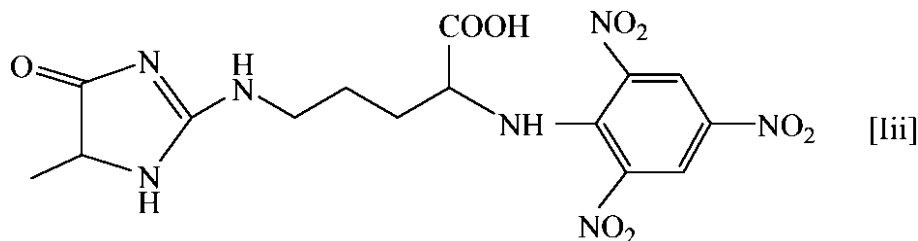
式 [Ib] 及び [Ic] において、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  はいずれも前記と同じ意味を有する。

【0056】

本発明は、そのより好ましい態様として、上記アミノ化合物が、構造式 [Iii] で表されるトリニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または構造式 [Iiii] で表されるアミノ化合物またはその塩の質量分析方法を提供する。

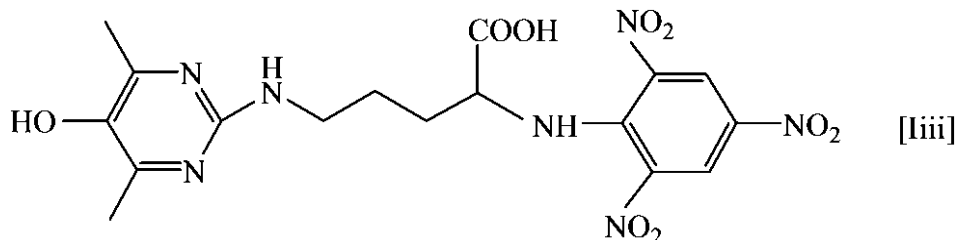
【0057】

【化 1 3】



【0058】

【化 1 4】



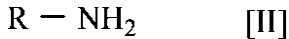
【0059】

本発明は、その別の形態として、一般式 [II] で表されるアミノ酸誘導体またはその塩と、一般式 [III] で表されるニトロベンゼン化合物を反応させて一般式 [I] で表されるアミノ化合物またはその塩を得る工程と、

上記工程で得られたアミノ化合物またはその塩を質量分析する工程を有するアミノ化合物またはその塩の質量分析方法を提供する。

【0060】

【化 15】



【0061】

式 [II] において、R は、アミノ置換基、例えば、アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基またはペプチド残基を意味する。

【0062】

【化 16】

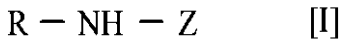


【0063】

式 [III] において、X はアミノ基反応性官能基を意味し、Z はニトロフェニル基を意味する。

【0064】

【化 17】



【0065】

式 [I] において、R および Z は、前記と同じ意味を有する。

【0066】

本発明は、そのより好ましい態様として、前記一般式 [II] で表されるアミノ酸誘導体またはその塩と、一般式 [III] で表されるニトロベンゼン化合物の反応を、アルカリ性水溶液または水と有機溶媒の混合溶液であり、かつ前記溶液の pH が 8 ~ 10 でおこなうことを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法を提供する。

【0067】

本発明は、その好ましい態様として、上記反応が試料中で行われるアミノ化合物またはその塩の質量分析方法を提供する。

【0068】

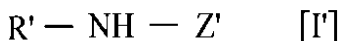
本発明は、そのより好ましい態様として、上記アミノ酸誘導体またはその塩がバイオマーカーであるアミノ化合物の質量分析方法を提供する。

【0069】

本発明は、さらに別の形態として、一般式 [I'] で表されるアミノ化合物またはその塩を質量分析するアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、上記誘導体化残基の誘導体化剤が、1-ピレンスルホニルクロライド (PSC)、ダンシルクロライド (DNS-Cl) 等のスルホニル化合物；9-フルオレニルメチルクロロホルメート (FMOC)、4-ジメチルアミノスルホニル-7-フルオロベンゾキサジアゾール (DBD-F)、4-フルオロ-7-ニトロベンゾフラザン (NBD-F)、2、3-ナフタレンジアルデヒド (NDA)；3-アミノピリジル-N-ヒドロキシサクシニミジルカルバメート (APDS) 等のカルバメート化合物；3-クロロカルボニル-6、7-ジメトキシ-1-メチル-2-キノキサリノン (DMEQ-CONCl)、3-ニトロフェニルイソチオシアネート、3-ピリジルイソチオシアネート、4-(ジメチルアミノ)フェニルイソチオシアネート、フルオレセイン-5-イソチオシアネート (FITC) 等のイソチオシアネート化合物；ジエチルエトキシメチレンマロネート等のマロネート化合物、(5-サクシニミドキシ-5-オキソペンチル)トリフェニルホスホニウムブロミド (SPTPP) 等のホスホニウム化合物；または2-クロロ-1-メチルピリジニウム塩等のピリジニウム化合物であるアミノ化合物またはその塩の質量分析方法を提供する。

【0070】

【化 18】



【0071】

式 [I'] において、R' は、前記 R と同じ意味を有する置換アミノ酸残基またはペプチド残基を意味し、Z' は誘導体化残基を意味する。

【0072】

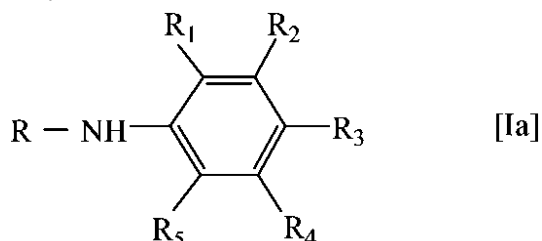
本発明は、さらに別の形態として、上記のアミノ化合物の質量分析方法により得られる質量スペクトルの強度データを用いて、生体試料中のバイオマーカ濃度の定量を行うバイオマーカのアッセイ方法を提供する。

【0073】

すなわち、本発明は、以下の発明に係るものである。

[1] 一般式 [1a] で表されるアミノ化合物またはその塩を質量分析で測定するアミノ化合物またはその塩の質量分析方法において、

【化18-1】



(式中、Rはアミノ置換基を意味し、

R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はそれぞれ同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> の少なくとも1個はニトロ基を意味する。)

式 [1a] で表されるアミノ化合物またはその塩におけるアミノ置換基が、置換アミノ酸残基またはペプチド残基であり、

前記置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、プロリン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファンもしくはチロシンまたはそれらの置換体であり、

かつ、前記置換アミノ酸残基が、最終糖化産物 (AGE) の残基である、または前記ペプチド残基のペプチドが、2個ないし10個のアミノ酸がペプチド結合しているペプチドであることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

[2] 前記 [1] に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、

前記最終糖化産物 (AGE) が、置換アルギニン誘導体または置換リジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

[3] 前記 [1] に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、

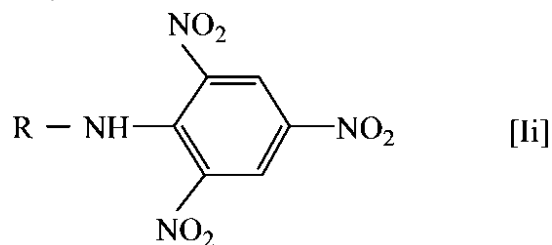
前記最終糖化産物 (AGE) が、グリオキサールヒドロイミダゾロン、メチルグリオキサールヒドロイミダゾロン、アルグピリミジン、カルボキシメチルリジン、カルボキシエチルリジンからなる群から選択されるいずれかの最終糖化産物 (AGE) であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

[4] 前記 [1] に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、

前記置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アルギニン、リジン、バリン、チロシン、メチオニン、グリシン、ヒスチジン、グルタミン酸もしくはトリプトファンまたはそれらの置換体であることを特徴とする質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

[5] 前記 [1] ~ [4] のいずれかに記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ化合物が、一般式 [1i] で表されることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

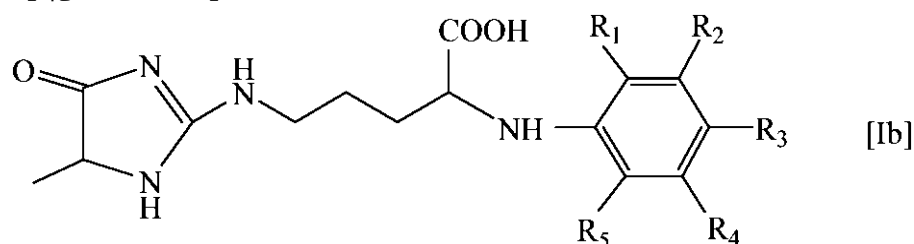
【化 1 8 - 2】



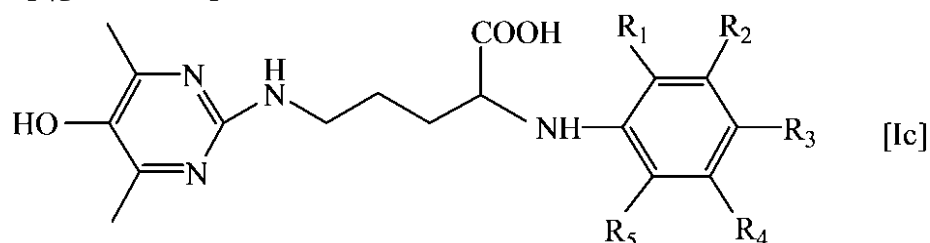
(式中、Rは前記と同じ意味を有する。)

[ 6 ] 前記 [ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれかに記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ化合物が、一般式 [ 1b ] で表されるニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または一般式 [ 1c ] で表されるニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

【化 1 8 - 3】



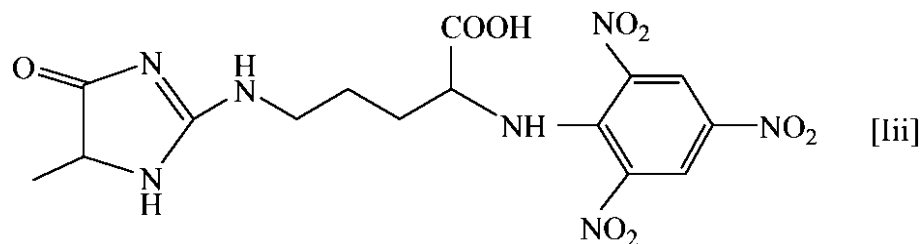
【化 1 8 - 4】

(式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はいずれも前記と同じ意味を有する。)

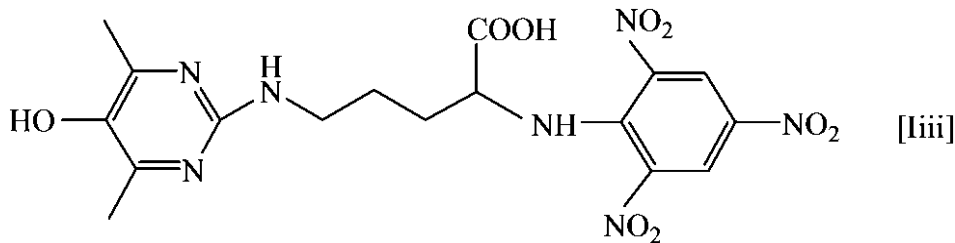
[ 7 ] 前記 [ 1 ] ~ [ 6 ] のいずれかに記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ化合物が、

構造式 [ 1ii ] で表されるトリニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または構造式 [ 1iii ] で表されるトリニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

【化 1 8 - 5】



【化 18 - 6】



【0074】

[ 8 ] 一般式 [ II ] で表されるアミノ酸誘導体またはその塩において、アミノ置換基が置換アミノ酸残基またはペプチド残基であり、

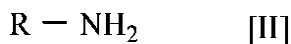
前記置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、プロリン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファンもしくはチロシンまたはそれらの置換体であり、

かつ、前記置換アミノ酸残基が、最終糖化産物 ( AGE ) の残基である、または前記ペプチド残基のペプチドが、2 個ないし 10 個のアミノ酸がペプチド結合しているペプチドであるアミノ酸誘導体またはその塩と、

一般式 [ IIIa ] で表されるニトロベンゼン化合物と、を反応させて一般式 [ Ia ] で表されるアミノ化合物またはその塩を得る工程と、

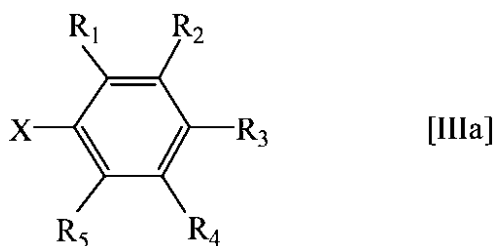
上記工程で得られたアミノ化合物またはその塩を質量分析する工程を有することを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

【化 18 - 7】



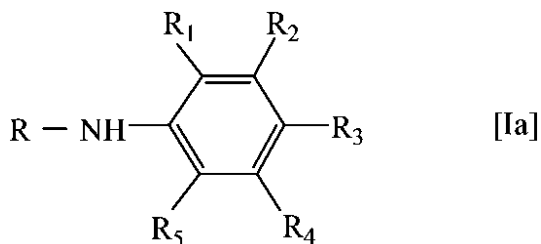
( 式中、R はアミノ置換基を意味する。 )

【化 18 - 8】



( 式中、X はアミノ基反応性官能基を意味し、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はそれぞれ同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> の少なくとも 1 個はニトロ基を意味する。 )

【化 18 - 9】



( 式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はそれぞれ同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> の少なくとも 1 個はニトロ基を意味し、R は前記と同じ意味を有する。 )

[ 9 ] 前記一般式 [ 11 ] で表されるアミノ酸誘導体またはその塩と、一般式 [ 111a ] で表されるニトロベンゼン化合物の反応を、アルカリ性水溶液または水と有機溶媒の混合溶液であり、かつ前記溶液の pH が 8 ~ 10 でおこなうことを特徴とする前記 [ 8 ] に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

[ 10 ] 前記 [ 8 ] または [ 9 ] に記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記反応が試料中で行われることを特徴とするアミノ化合物またはその塩の質量分析方法。

[ 11 ] 前記 [ 8 ] ~ [ 10 ] のいずれかに記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法であって、前記アミノ酸誘導体またはその塩がバイオマーカーであることを特徴とするアミノ化合物の質量分析方法。

【 0075 】

[ 12 ] 前記 [ 1 ] ~ [ 11 ] のいずれかに記載のアミノ化合物またはその塩の質量分析方法により得られる質量スペクトルの強度データを用いて、生体試料中のバイオマーカー濃度の定量を行うことを特徴とするバイオマーカーのアッセイ方法。

【 0076 】

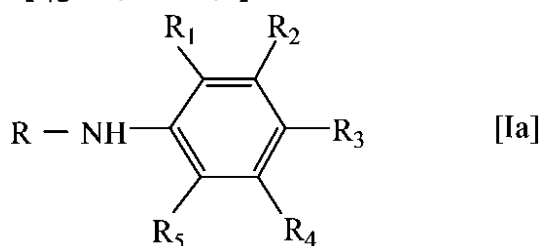
[ 13 ] 一般式 [ 1a ] で表されるアミノ化合物またはその塩であって、

式 [ 1a ] におけるアミノ置換基が、置換アミノ酸残基またはペプチド残基であり、

前記置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、プロリン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファンもしくはチロシンまたはそれらの置換体であり、

かつ、前記置換アミノ酸残基が、最終糖化産物 ( AGE ) の残基である、または前記ペプチド残基のペプチドが、2 個ないし 10 個のアミノ酸がペプチド結合しているペプチドである質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

【 化 18 - 10 】



( 式中、R はアミノ置換基を意味し、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はそれぞれ同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> の少なくとも 1 個はニトロ基を意味する。 )

[ 14 ] 前記 [ 13 ] に記載のアミノ化合物またはその塩であって、

前記最終糖化産物 ( AGE ) が、置換アルギニン誘導体または置換リジン誘導体であることを特徴とする質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

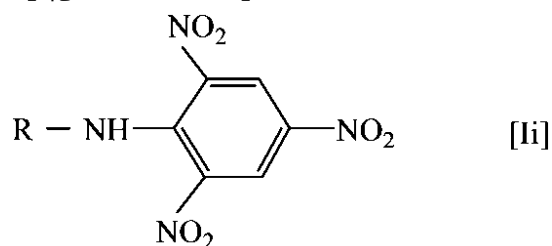
[ 15 ] 前記 [ 13 ] に記載のアミノ化合物またはその塩であって、

前記置換アミノ酸残基のアミノ酸または前記ペプチド残基の構成アミノ酸が、アルギニン、リジン、バリン、チロシン、メチオニン、グリシン、ヒスチジン、グルタミン酸もしくはトリプトファンまたはそれらの置換体であることを特徴とする質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

[ 16 ] 前記 [ 13 ] ~ [ 15 ] のいずれかに記載のアミノ化合物またはその塩であって、

前記アミノ化合物が、一般式 [li] で表されることを特徴とする質量分析用のアミノ化合物またはその塩。

【化 18 - 11】

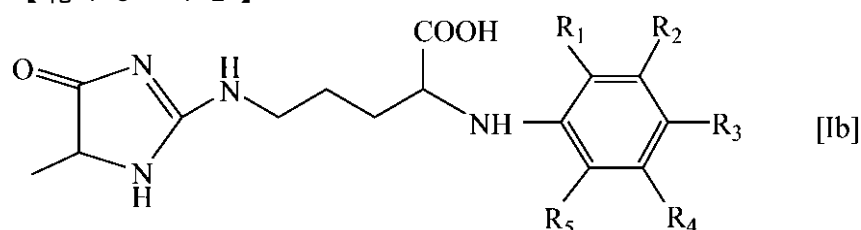


(式中、R は前記と同じ意味を有する。)

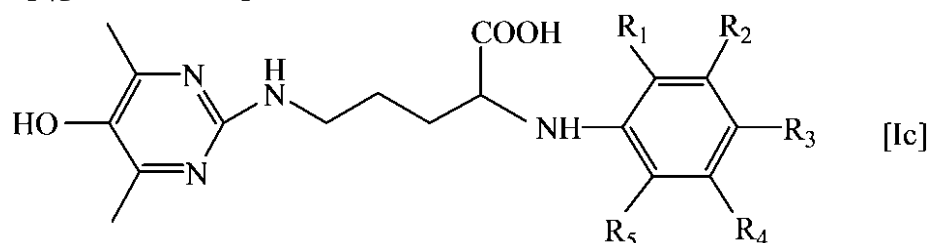
【0077】

[17] 一般式 [lb] で表されるニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または一般式 [lc] で表されるニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩。

【化 18 - 12】



【化 18 - 13】

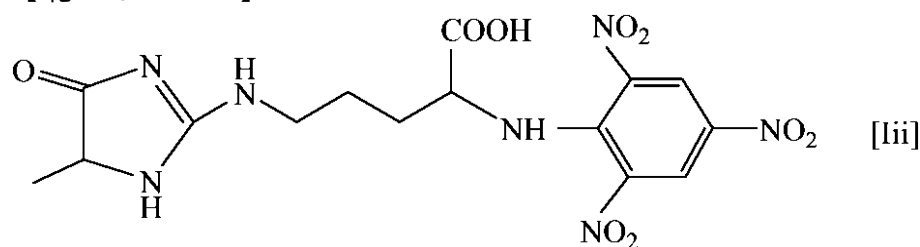


(式中、 $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$ 、 $\text{R}_4$  および  $\text{R}_5$  はそれぞれ同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、 $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$ 、 $\text{R}_4$  および  $\text{R}_5$  の少なくとも 1 個はニトロ基を意味する。)

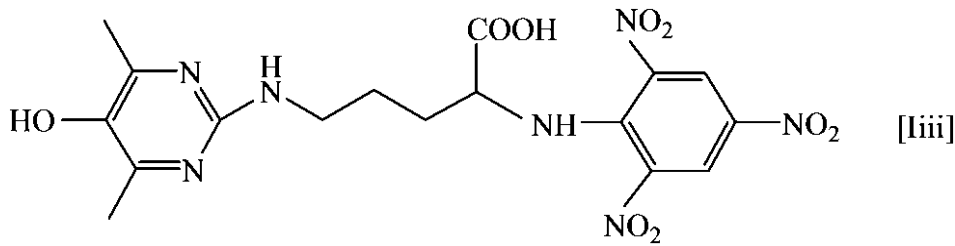
[18] 前記 [17] に記載のアミノ化合物またはその塩であって、

前記アミノ化合物が、構造式 [lii] で表されるトリニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体または構造式 [liii] で表されるトリニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体であることを特徴とするアミノ化合物またはその塩。

【化 18 - 14】



【化 18 - 15】



【発明の効果】

【0078】

本発明によって、アミノ酸誘導体のN末端アミノ基を誘導体化することにより、質量分析におけるイオン化効率が向上し、試料中に少量しか存在しない最終糖化産物等の分子バイオマーカーやペプチドホルモンについても、質量分析方法を用いて迅速、高感度かつ高精度な定量分析が可能になる。したがって、本発明は、アミノ酸誘導体とニトロベンゼン化合物等の誘導体化剤との誘導体化生成物である新規なアミノ化合物、好ましくはタンパク質の解糖等の反応中間産物である糖化タンパク質分解物がニトロベンゼン化合物等の誘導体化剤で誘導体化された、耐糖能異常の診断に有用な新規な糖化タンパク質分解物誘導体を提供する。また、本発明は、そのアミノ化合物についての迅速、高感度かつ高精度な定量が可能な質量分析方法およびそれを用いたバイオマーカーのアッセイ方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1】メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体(MG-H1)の質量スペクトル(MS、MS/MS)である。

【図2】MG-H1の2,4,6-トリニトロフェニル誘導体(MG-H1-TNP)の質量スペクトル(MS、MS/MS)である。

【図3】アルグピリミジン(AP)の質量スペクトル(MS、MS/MS)である。

【図4】APの2,4,6-トリニトロフェニル誘導体(AP-TNP)の質量スペクトル(MS、MS/MS)である。

【図5】質量スペクトルより予測されるMG-H1の2,4,6-トリニトロフェニル誘導体(MG-H1-TNP)のフラグメンテーションパターンを示す図である。

【図6】質量スペクトルより予測されるAPの2,4,6-トリニトロフェニル誘導体(AP-TNP)のフラグメンテーションパターンを示す図である。

【図7】(A)はMG-H1の、(B)はMG-H1の2,4,6-トリニトロフェニル誘導体(MG-H1-TNP)のLC-MS分析の結果を示すマスクロマトグラムである。

【図8】(A)はAPの、(B)はAPの2,4,6-トリニトロフェニル誘導体(AP-TNP)のLC-MS分析の結果を示すマスクロマトグラムである。

【図9】MG-H1-TNPの濃度と質量スペクトルのピーク強度について、内部標準法を用いて作製した検量線である。

【図10】AP-H1-TNPの濃度と質量スペクトルのピーク強度について、内部標準法を用いて作製した検量線である。

【図11】MG-H1の2,4,6-トリニトロフェニル化に及ぼすpHの影響を示すグラフである。

【図12】APの2,4,6-トリニトロフェニル化に及ぼすpHの影響を示すグラフである。

【図13】ラット血漿の前処理のプロトコールを示す図表である。

【発明を実施するための形態】

【0080】

以下、本発明の実施形態について説明する。ただし、本発明は、下記の実施形態に限定



されるものではなく、下記の実施形態は、本発明を具体的に詳細に説明するために例示的に記載するものである。したがって、下記の実施形態から想到される形態もまた、本発明の範囲に包含されるものと理解されるべきである。

【0081】

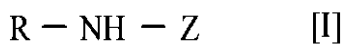
なお、本明細書においては、説明を簡潔にするために、誘導体化剤としてはニトロベンゼン化合物を例に挙げて説明するが、本発明においては、誘導体化剤はニトロベンゼン化合物に一切限定されるものではなく、その他の誘導体化剤も本発明の範囲に当然包含されるものとして理解されるべきである。したがって、本明細書においては、誘導体化剤でアミノ酸誘導体の末端アミノ基を誘導体化した残基についても、ニトロベンゼン化合物の残基であるニトロフェニル基について説明するが、これについても一切限定されるものではなく、その他の誘導体化剤の残基も同様に包含されるものと理解されるべきである。

【0082】

本発明に係るアミノ化合物は、一般式 [ I ] で表すことができる。

【0083】

【化19】



【0084】

式 [ I ] において、R はアミノ置換基を意味し、Z はニトロフェニル基を意味する。

【0085】

上記一般式において、用語「アミノ置換基」は、アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基またはペプチド残基を意味する。

ここで、用語「アミノ酸残基」とは、非置換アミノ酸からアミノ基を除外した残基を意味している。例えば、アラニンの場合には、2 - アミノプロパン酸と別称されるので、2 - アミノプロパン酸からアミノ基を除外したアミノ酸残基は、カルボキシルエチル基である。同様に、リジンの場合のアミノ酸残基は1 - カルボキシル - 5 - アミノペンチル基である。

【0086】

また、上記一般式において、用語「置換アミノ酸残基」とは、上記アミノ酸からアミノ基を除外したアミノ酸残基であって、該アミノ酸を構成するカルボキシル基以外の残基、つまり原子団が置換基で置換されて形成された原子団、つまり置換部分 (moiety) を有するアミノ酸残基を意味している。置換アミノ酸残基の例としては、上記リジン残基の5 - アミノ基にカルボキシルメチル基が置換した1 - カルボキシル - 5 - (カルボキシルメチル) アミノペンチル基が挙げられる。また別の例として、例えば、アルギニン残基のアミノ - イミノメチル基が2 - ピリミジニル基に変換した置換アミノ酸残基等も挙げることができる。

【0087】

さらに、上記一般式において、用語「ペプチド残基」とは、上記アミノ酸および/または置換アミノ酸がペプチド結合して形成されたペプチドの末端アミノ酸から末端アミノ基が除外された残基を意味している。例えば、ペプチド Val - Tyr の場合、ペプチド残基とは、末端アミノ酸のパリンからアミノ基が除外された残基を意味する。

【0088】

本発明において、用語「アミノ酸誘導体」とは、特段の定めがない限り、非置換アミノ酸誘導体、もしくはN末端アミノ基以外のアミノ酸部分が置換基等で修飾されている置換アミノ酸誘導体、またはペプチドを意味している。

【0089】

したがって、本発明において使用する用語「アミノ化合物」は、特段の定めがない限り、アミノ酸誘導体 [ II ] またはその塩のN末端アミノ基が、ニトロベンゼン化合物 [ III ] によりニトロフェニル化されたニトロフェニル化アミノ化合物を意味している。

【0090】

本発明において、アミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基のアミノ酸、またはペプチド

残基のペプチド構成アミノ酸のアミノ酸は、広義には、アミノ基とカルボキシ基の両方の官能基を有する化合物であれば、特に限定されるものではないが、狭義には、例えば、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、フェニルアラニン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、ロイシン、メチオニン、プロリン、アルギニン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファンおよびチロシン、好ましくはアルギニンおよびリジン等のタンパク質の構成成分であるアミノ酸およびそれらを構成するカルボキシル基以外の残基が置換基で置換されて形成された置換部分を有する置換アミノ酸残基が挙げられる。

【0091】

好ましいアミノ酸としては、例えば、好ましくはアルギニン、リジン、バリン、チロシン、メチオニン、グリシン、ヒスチジン、グルタミン酸またはトリプトファンが挙げられる。

【0092】

また、本発明において使用する用語「置換アミノ酸残基」は、上記アミノ酸の末端アミノ基以外の残基に任意の置換基が結合して形成された別の原子団を有する置換アミノ酸誘導体の残基を意味している。かかるアミノ酸誘導体としては、本発明の目的を逸脱しない限り、特に限定されるものではなく、例えば、アミノ酸等の生体成分の分解生成物や中間生成物、または代謝産物等が挙げられ、例えば、タンパク質の糖化反応によって生成される各種最終糖化産物（AGE類）、アルギニンの分解生成物であるオルニチン、筋肉へのエネルギー供給源のクレアチニンリン酸の代謝産物であるクレアチニン、肝臓中のグルタチオン欠乏を示すバイオマーカーであるオフタルミン酸生合成の中間体の  $\gamma$ -アミノ酪酸（AABA）、主に神経伝達物質として作用する  $\gamma$ -アミノ酪酸（GABA）等の他、各種疾患の診断および予後予測等に用いられる分子バイオマーカーや、馬尿酸等も挙げられる。これらアミノ酸のうち、上記AGE類等が好ましい。より好ましいのは、例えば、アルギニンの側鎖の Guanidyl 基とメチルグリオキサール、またはリジンのアミノ基とグリオキサールもしくはメチルグリオキサール等の脂質過酸化、メイラード反応、解糖等の反応中間産物との反応により生成されるAGE類等が挙げられる。かかるAGE類等のうち、好ましいものとしては、置換アルギニン誘導体や置換リジン誘導体等が挙げられる。

【0093】

置換アルギニン誘導体としては、例えば、アルギニンの Guanidyl 基がカルボキシルメチル基、カルボキシルエチル基等の置換基で修飾されたアルキル置換アルギニン誘導体、イミダゾロン類、ピリミジン類、イミダゾピリジン類等の Guanidyl 基が環状構造になっている環状アルギニン誘導体等が挙げられる。

【0094】

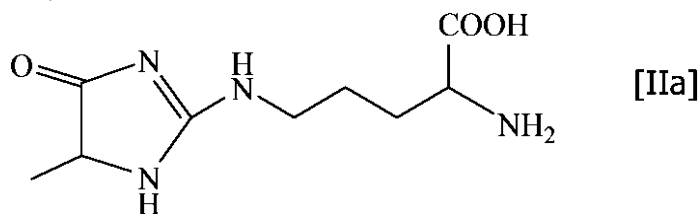
更に具体的には、アルキル置換アルギニン誘導体としては、例えば、カルボキシルメチルアルギニン（CMA）等が挙げられる。また、環状アルギニン誘導体のイミダゾロン類としては、例えば、イミダゾロン、グリオキサールヒドロイミダゾロン（G-H）、メチルグリオキサールヒドロイミダゾロン（MG-H）、N-[5-(2,3,4-トリヒドロキシブチル)-5-ヒドロ-4-イミダゾロン2-イル]-オルニチン（3-DG-H）等が挙げられる。ピリミジン類としては、例えば、アルグピリミジン、テトラヒドロピリミジン等が挙げられる。イミダゾピリジン類としては、例えば、ペントシジン等が挙げられる。

【0095】

これら置換アルギニン誘導体のうち、特に好ましいのは、例えば、構造式 [IIa] で表されるメチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体（MG-H1：N-(5-ヒドロ-5-メチル-4-イミダゾロン2-イル)-オルニチン）、または構造式 [IIb] で表されるアルグピリミジン（AP）が挙げられる。

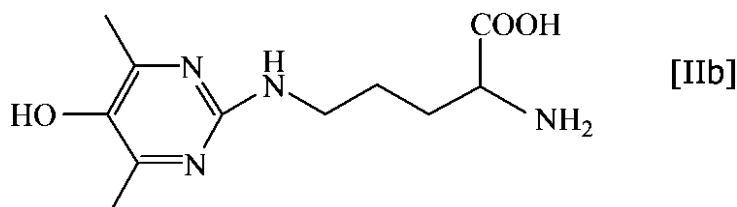
【0096】

【化20】



【0097】

【化21】

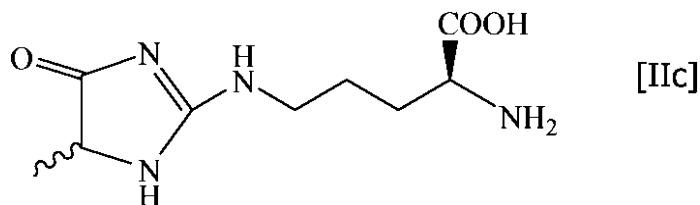


【0098】

更に具体的には、上記アミノ酸誘導体は、立体構造を有し、構造式 [IIC] または構造式 [IId] でそれぞれ表すことができる。

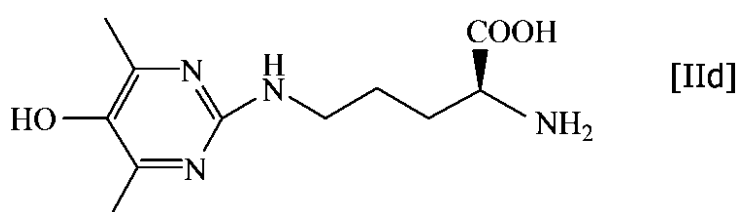
【0099】

【化22】



【0100】

【化23】



【0101】

また、上記AGE類のうち、置換リジン誘導体としては、例えば、リジンのアミノ基がカルボキシルメチル基、カルボキシルエチル基等の置換基で修飾されたアルキル置換リジン誘導体、リジンのアミノ基が環状構造を有している環状リジン誘導体等が挙げられる。

【0102】

アルキル置換リジン誘導体としては、例えば、カルボキシメチルリジン (CML)、カルボキシエチルリジン (CEL) 等が挙げられる。また、環状リジン誘導体としては、例えば、ピラリン、FTP (Formyl Therosyl Pyrrole) 等のピロール誘導体、GOLD (グリオキサール由来リジン二量体)、MOLD (メチルグリオキサール由来リジン二量体)、DOLD (3-デオキシグルコソ由来リジン二量体) 等のイミダゾール誘導体、GLAP (Glyceraldehyde-derived pyridinium)、GA-ピリジン (glycolaldehyde-ピリジン) 等のピリジン誘導体、ペントシジン等のイミダゾピリジン誘導体等が挙げられる。

【0103】

さらに、上記一般式 [I] において、置換基 R で表されるペプチド残基のペプチドとしては、そのペプチドを構成する上記アミノ酸の数は特に限定されないが、上記アミノ酸が

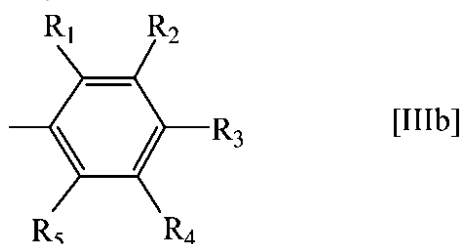
2個～10個、好ましくは2個～6個、より好ましくは2個～4個ペプチド結合して構成されているペプチドであるのがよい。かかるペプチドとしては、例えば、バリルチロシン、リシルチロシン、メチオニルチロシン、グリシルチロシン、ヒスチジルチロシン、グルタミルチロシン、トリプトファンチロシン、ヒスチジニルトリプトファン、カルノシン、アンセリン等のジペプチド、グルタチオン等のトリペプチド等が挙げられる。その他に、エンケファリン、カキシトシン、バソプレッシン等を挙げることができる。これらペプチドのうち、バリルチロシン、リシルチロシン、メチオニルチロシン、グリシルチロシン、ヒスチジルチロシン、グルタミルチロシン、トリプトファンチロシンならびにヒスチジニルトリプトファン等のジペプチドが好ましい。また、ペプチドは、タンパク質の消化物、最終糖化産物等の代謝産物、ペプチドホルモン等の生理活性ペプチドのいずれであってもよく、各種疾患の診断および予後予測等に用いられる分子バイオマーカーであってもよい。

【0104】

一方、上記一般式 [I] において、置換基 Z は、アミノ酸誘導体 [II] の末端アミノ基をニトロフェニル化したニトロベンゼン化合物の残基であって、一般式 [IIIb] で表すことができる。

【0105】

【化24】



【0106】

式 [IIIb] において、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  はいずれも、同じであってもまたは異なってもよく、水素原子またはニトロ基を意味する。ただし、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  および  $R_5$  の少なくとも1個はニトロ基を意味する。

【0107】

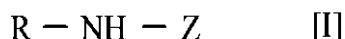
ここで、ニトロフェニル基としては、例えば、モノ -、ジ - またはトリ - ニトロフェニル基、好ましくはトリ - ニトロフェニル基、特に好ましくは2、4、6 - ニトロフェニル基が挙げられる。ニトロ置換基の位置にしても、特に限定はないが、1個の場合は2 - 位、2個の場合は2 - 位と4 - 位、3個の場合に2 - 位、4 - 位ならびに6 - 位であるのがよい。

【0108】

したがって、本発明に係るアミノ化合物は、一般的には、一般式 [I] で表され、より具体的には、一般式 [Ia] で表すことができる。

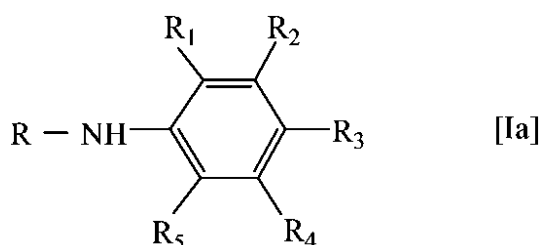
【0109】

【化25】



【0110】

【化26】



## 【0111】

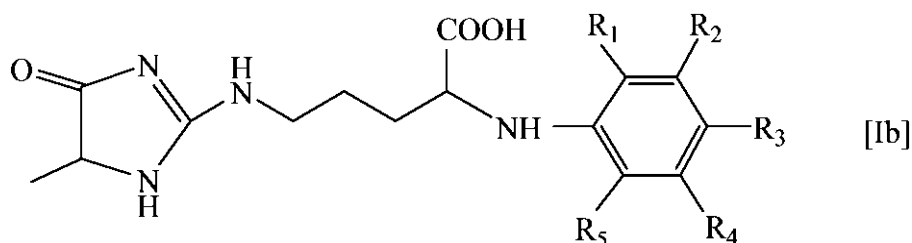
式 [1a] において、R、Z、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はいずれも前記と同じ意味を有する。

## 【0112】

本発明において、構造式 [1a] で表されるアミノ化合物の好ましい例としては、例えば、構造式 [1b] で表されるニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体、または構造式 [1c] で表されるニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体が挙げられる。

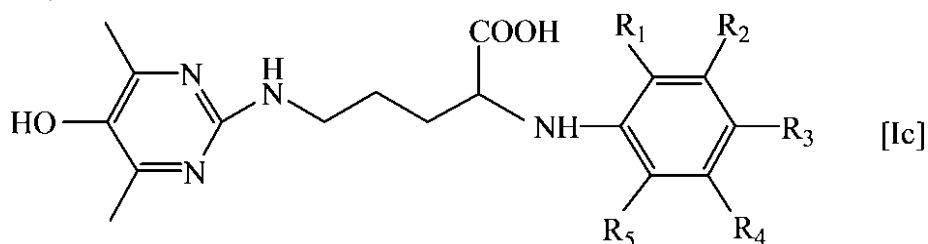
## 【0113】

## 【化27】



## 【0114】

## 【化28】



## 【0115】

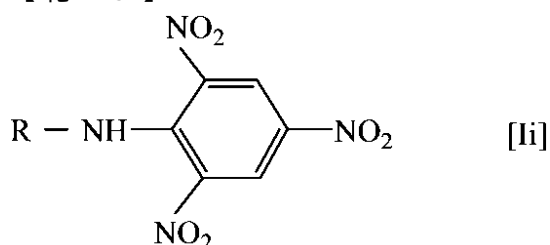
式 [1b] および [1c] において、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はいずれも前記と同じ意味を有する。

## 【0116】

さらに好ましいアミノ化合物は、例えば、一般式 [1i] で表すことができる。

## 【0117】

## 【化29】



## 【0118】

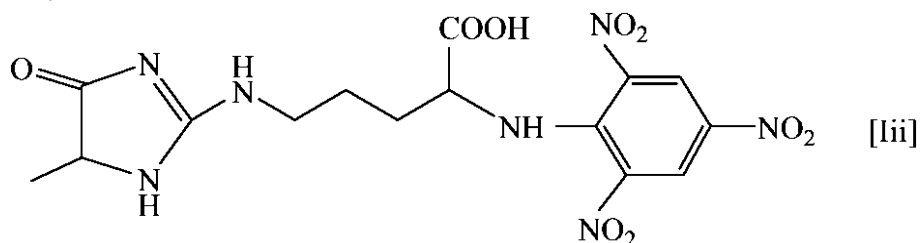
式 [1i] において、R は前記と同じ意味を有する。

## 【0119】

したがって、アミノ化合物としては、例えば、構造式 [1ii] で表されるニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体、または一般式 [1iii] で表されるニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体がさらに好ましい。

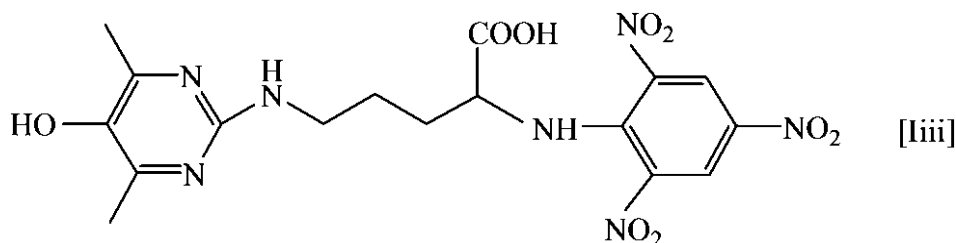
## 【0120】

【化 3 0】



【 0 1 2 1】

【化 3 1】

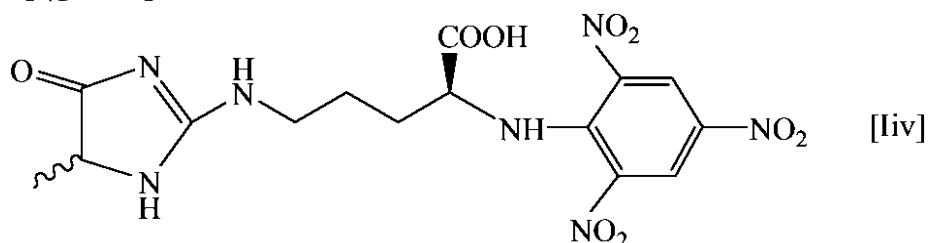


【 0 1 2 2】

上記のトリニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体およびトリニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体の立体構造式（[liv]および[iv]）はそれぞれ次のように表すことができる。

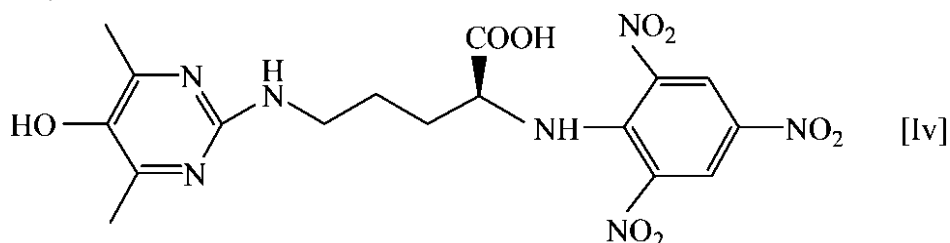
【 0 1 2 3】

【化 3 2】



【 0 1 2 4】

【化 3 3】

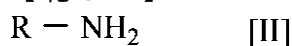


【 0 1 2 5】

本発明に係るアミノ化合物 [I] は、一般式 [II] で表されるアミノ酸誘導体またはその塩を、一般式 [III] で表されるニトロベンゼン化合物で誘導体化反応することにより得ることができる。

【 0 1 2 6】

【化 3 4】



【 0 1 2 7】

式 [II] において、R は前記と同じ意味を有する。

【 0 1 2 8】

【化35】

X-Z [III]

【0129】

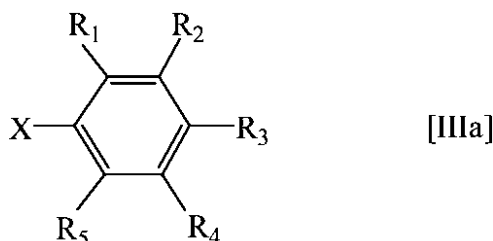
式 [III] において、X はアミノ基反応性官能基を意味し、Z は上記と同じ意味を有する。

【0130】

より具体的には、本発明のアミノ化合物 [Ia] は、アミノ酸誘導体 [II] またはその塩と、一般式 [IIIa] で表されるニトロベンゼン化合物との誘導体化反応により得ることができる。

【0131】

【化36】



【0132】

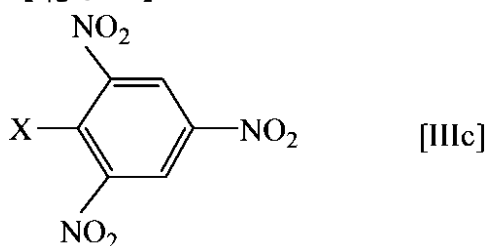
式 [IIIa] において、X、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> はいずれも前記と同じ意味を有する。

【0133】

更に具体的には、本発明のアミノ化合物 [Ii] は、アミノ酸誘導体 [II] またはその塩と、一般式 [IIIc] で表されるトリニトロベンゼン化合物との誘導体化反応により得ることができる。

【0134】

【化37】



【0135】

式 [IIIc] において、X は前記と同じ意味を有する。

【0136】

ここで、X で表されるアミノ基反応性官能基としては、アミノ酸または置換アミノ酸 ([II]) をニトロフェニル誘導体化する反応性官能基であれば特に限定されないが、例えば、塩素原子、フッ素原子、臭素原子もしくはヨウ素原子から選ばれるハロゲン原子、またはスルホン酸またはスルホン酸塩、アルキルスルホン酸エステル基、アリールスルホン酸エステル基、パーフルオロアルキルスルホン酸エステル基等の、ニトロベンゼン誘導体の芳香族求核置換反応において脱離基となり得る任意の官能基が挙げられる。

【0137】

そこで、好ましいニトロベンゼン化合物としては、例えば、2, 4, 6-トリニトロフルオロベンゼン、2, 4, 6-トリニトロクロロベンゼン、2, 4, 6-トリニトロブロモベンゼン、2, 4, 6-トリニトロヨードベンゼンおよび2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸またはその塩等が挙げられ、これらのうち特に好ましいのは、2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸またはその塩である。塩としては、例えば、ナトリウム塩等のアルカリ金属塩、カリウム塩等のアルカリ土類金属塩等が挙げられる。

## 【0138】

本発明において、上記アミノ酸誘導体のN末端アミノ基をニトロベンゼン化合物で誘導体化するには、上記アミノ酸誘導体とニトロベンゼン化合物とを、アルカリ性の水溶液または、水と有機溶媒の混合溶液中にて室温で数十分間混合することにより行うことができる。好ましくはアルカリ性水溶液中で行われる。また、水と有機溶媒との混合溶液を用いる場合、有機溶媒としてはエタノール等の水との親和性が高い有機溶媒が好ましく用いられる。これらの溶液のpHは8~10であることが好ましく、より好ましくは8.5~9.5であるのがよい。溶液のpHが高すぎると、分析対象のアミノ酸誘導体またはこの化合物が分解する可能性が増大し、低すぎるとニトロフェニル化反応が迅速に進行しなくなる。ここでpHとは、pHメータにより直接測定される値である。なお、室温とは15から40程度の温度であり、30前後で反応を行うことが好ましい。また、混合はいかなる方法であってもよく、1分以上1時間以下、好ましくは5分から40分間の混合が行われる。通常は30分間の混合で十分である。

## 【0139】

本発明の特徴の一つは、かかる温和な条件下で、ニトロフェニル化反応を行うことができることである。試料中の分析対象となる物質を単離してニトロフェニル化を行ってもよいが、夾雑物等を含むような試料中でそのままニトロフェニル化を行ってもよい。本発明はこのような試料中でそのままニトロフェニル化を行うことができるため、単離によるロス等を低減することができ、分析対象となる物質が少量しか含まれないような場合であっても測定することができるという優れた方法である。また、複雑な操作を行う必要が無く、簡便に測定することができる。特に対象試料が生体試料等の場合は、分析対象となる物質が少なく、かつ、夾雑物が多い状態であることが多いため有効である。

## 【0140】

また、例えば、試料中のアミノ酸誘導体を測定するに当たっては、生体試料に、ニトロベンゼン化合物を添加することにより、試料中のバイオマーカーとしてのアミノ酸誘導体をニトロベンゼン化合物で誘導体化することも可能であるとともに、かかる誘導体化したアミノ酸誘導体をバイオマーカーとして測定できることは当然のことである。

本発明において試料となるものは、測定対象となる最終糖化産物等の、本発明によってアミノ酸誘導体とニトロベンゼン系化合物との誘導体化で得られるアミノ化合物となるものを含有するものであればよい。また、生体由来の試料を生体試料とよぶ。

## 【0141】

さらに、アミノ酸誘導体の塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、リチウム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩等を使用することができる。

## 【0142】

本発明においては、誘導体化剤として、上記ニトロベンゼン化合物の他に、その他のアミノ基を誘導体化する誘導体化剤も使用できることは当然のことである。かかる誘導体化剤としては、例えば、ニトロベンゼンスルホン酸化合物、フルオロ-ニトロベンゼン等のニトロベンゼン化合物の他に、1-ピレンスルホニルクロライド(PSCL)、ダンシルクロライド(DNS-CL)等のスルホニル化合物、9-フルオレニルメチルクロロホルメート(FMOC)、4-ジメチルアミノスルホニル-7-フルオロベンゾキサジアゾール(DBD-F)、4-フルオロ-7-ニトロベンゾフラザン(NBD-F)、2、3-ナフタレンジアルデヒド(NDAL)、3-アミノピリジル-N-ヒドロキシサクシニミジルカルバメート(APDS)等のカルバメート化合物、3-クロロカルボニル-6、7-ジメトキシ-1-メチル-2-キノキサリノン(DMEQ-COCL)、3-ニトロフェニルイソチオシアネート、3-ピリジルイソチオシアネート、4-(ジメチルアミノ)フェニルイソチオシアネート、フルオレセイン-5-イソチオシアネート(FITC)等のイソチオシアネート化合物、ジエチルエトキシメチレンマロネート等のマロネート化合物、(5-サクシニミドキシ-5-オキソペンチル)トリフェニルホスホニウムプロミド(SPTPP)等のホスホニウム化合物、または2-クロロ-1-メチルピリジニウム塩等の



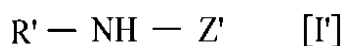
ピリジニウム化合物等を挙げることができる。これらの誘導体化剤も、上記ニトロベンゼン化合物と実質的に同様に使用することができる。

【0143】

つまり、本発明において、上記誘導体化剤を使用する場合は、本発明に係るアミノ化合物は、一般式 [ I' ] で表される。

【0144】

【化38】



【0145】

式 [ I' ] において、R' は上記 R と同じ意味を有するアミノ酸残基もしくは置換アミノ酸残基またはペプチド残基を意味し、Z' は誘導体化残基を意味する。

【0146】

ここで、誘導体化残基は、上記誘導体化剤が、置換アミノ酸誘導体 ( R' - NH<sub>2</sub> ) のアミノ基を誘導体化した残基を意味している。例えば、誘導体化剤としてダンシルクロライドを使用した場合、置換アミノ酸誘導体 ( R' - NH<sub>2</sub> ) のアミノ基がダンシル化、つまり、ジメチルアミノナフタレンスルホニル化されるので、このダンシル基が誘導体化残基ということができる。

【0147】

したがって、この場合も、本明細書において、ニトロベンゼンスルホン酸を誘導体化剤として用いた場合についての記載を実質的に同様に適用することができる。

【0148】

本発明において、質量分析に用いられる試料のイオン化法については、特に制限はないが、生体分子の検出および定量に広く用いられている MALDI 法、ESI 法、APCI 法等用いられるのが好ましい。分離技術と組み合わせた LC / MS や GC / MS 等においては、試料のイオン化法としては ESI 法や APCI 法を用いられるのがよい。分析には、MS / MS、MS<sup>3</sup> 等のタンデム質量分析方法を用いることができる。この場合、プロダクトイオンの検出には、例えば、夾雑物の影響を排除し高感度な検出が可能な多重反応モニタリング ( MRM ) を用いるのが好ましい。

【0149】

次に、本発明に係る質量分析方法を用いたバイオマーカーのアッセイ方法について説明する。

本発明は、分析対象としてバイオマーカーを選択することにより、バイオマーカーを、迅速に、高感度かつ高精度に検出および定量できるアッセイ方法を提供することができる。すなわち、本発明のバイオマーカーのアッセイ方法は、アミノ酸誘導体であるバイオマーカーの N 末端アミノ基とニトロベンゼン化合物等の誘導体化剤とを反応させ、N 末端アミノ基をニトロフェニル化等の誘導体化する工程と、N 末端アミノ基がニトロフェニル化等の誘導体化されたアミノ酸誘導体またはその塩を質量分析する工程と、質量分析方法を用いて得られた質量スペクトルの強度データを用いて、生体試料中のバイオマーカー濃度の定量を行う工程を有している。

【0150】

本発明において、バイオマーカーとしては、アミノ基を有するアミン化合物である限り、特に制限はないが、本発明のアッセイ方法が特に好ましく適用できるものとしては、例えば、アミノ酸誘導体と糖の代謝産物との反応により生成される最終糖化産物 ( AGE 類 ) 等や、生体アミンであるカテコールアミン ( ドパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン )、インドールアミン ( セロトニン、メラトニン )、イミダゾールアミン ( ヒスタミン )、アセチルコリン、ポリアミン ( プトレシン、スペルミジン、スペルミン ) 等が挙げられる。

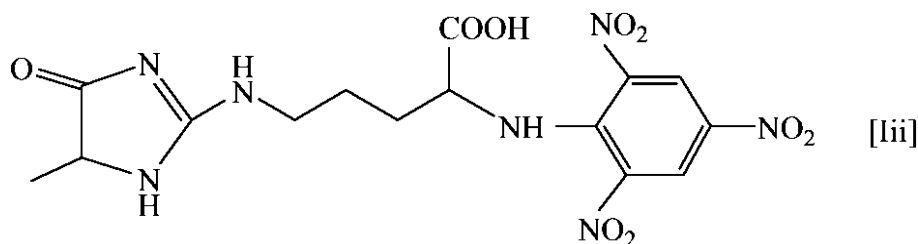
【0151】

本発明のアッセイ方法による分析対象のバイオマーカーとして特に好ましい AGE 類としては、例えば、構造式 [ Iii ] で表されるトリニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体 ( MG - H1 )、および構造式 [ Iiii ] で表されるトリニ

トロフェニル化アルグピリミジン誘導体 (AP) を挙げることができる。

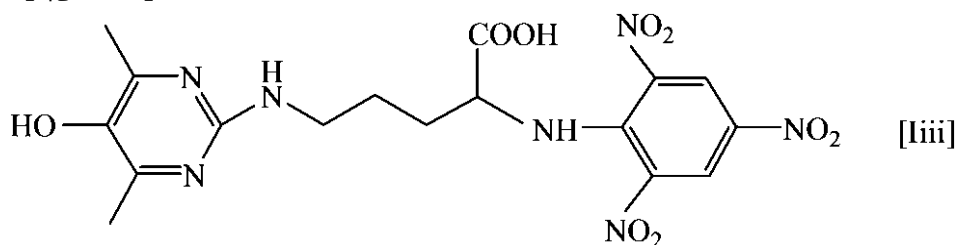
【0152】

【化39】



【0153】

【化40】



【0154】

これらはそれぞれ、MG-H1およびAPのN-2, 4, 6-トリニトロフェニル誘導体であり、質量分析方法により高感度で検出および定量が可能なAGEであり、耐糖能異常の診断指標として有用である。

【0155】

本発明において、アッセイ対象となるアミノ酸誘導体またはペプチドの濃度をマススペクトルの面積強度から定量するためには、例えば、検量線法または同位体希釈法が用いられる。質量分析において、分析対象物質を定量分析する手法の一つに検量線法が挙げられる。検量線法は、既知量の標準物質を含み、濃度の異なるいくつかの標準試料と、これらの標準試料から得られる信号強度との関係（検量線）が理論的には線形関係になることを利用し、未知試料から得られた信号強度からその試料の濃度を定量する方法である。標準とする試料の調製法により、検量線法は、外部標準法、内部標準法、標準添加法に大別されるが、本アッセイ方法ではいずれの方法を用いてもよい。同位体希釈法は、測定対象化合物を構成する特定の元素の同位体比に着目し、同位体比が既知のスパイクを一定量添加して測定対象化合物の同位体組成を平衡に到達させた後、スパイク添加前後の試料の同位体比を測定し、同位体組成の変化から試料の元素濃度を求める方法であり、検出限界が1 pg程度と低いことが利点として挙げられる。

【0156】

上記の様にして得られたバイオマーカーの定量データは、疾患の発症、進行度、予後等の予測や診断に用いることができる。すなわち、本発明の一実施形態としては、アミノ酸誘導体またはペプチドであるバイオマーカーのN末端アミノ基とトリニトロフェニル化剤等の誘導体化剤とを反応させ、N末端アミノ基をトリニトロフェニル化等の誘導体化する工程と、N末端アミノ基がトリニトロフェニル化等の誘導体化されたアミノ酸誘導体またはペプチドを質量分析する工程と、質量分析方法を用いて得られた質量スペクトルの強度データを用いて、生体試料中のバイオマーカー濃度の定量を行う工程と、このようにして得られるバイオマーカーの濃度データを元に、疾患の発症、進行度、予後等に関する診断を行う工程を有する疾患の診断方法に関するものである。

【0157】

本発明の診断方法は、複数種のAGE類を同時に測定、定量できることからも有用である。すなわち、本発明は、試料中でニトロフェニル化を行うことができる方法であり、また質量分析により分析するものであるから、質量数が異なる対象物質を測定する場合、質

量分析法と組み合わせることで同時に測定（定量）することができる優れた方法を提供するものである。本発明により、従来の早期診断法に比べて、費用および手間を大幅に削減することができる。

【実施例】

【0158】

以下、本発明の実施例に基づいて、本発明の特徴、作用効果についてより具体的に説明する。これらの実施例はあくまでも例示であり、本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】

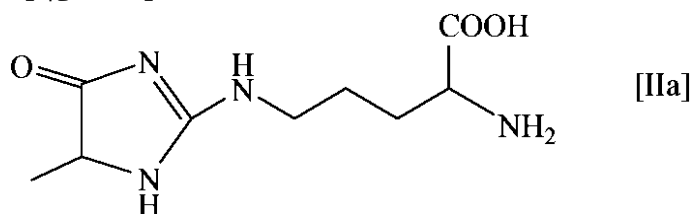
【0159】

トリニトロフェニル化メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体（MG-H1-TNP）[Iii]を次のようにして製造した。

メチルグリオキサール由来ヒドロイミダゾロン誘導体（MG-H1）[IIa]を0.1Mホウ酸溶液（pH9.3）に溶解させ、30mM 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム塩（TNBS）-0.1Mホウ酸溶液（pH9.3）を10μL添加後、十分に混和した。得られた混合物を30℃にて20分間インキュベートして、誘導体化を行った。誘導体化したMG-H1（MG-H1-TNP）を、それぞれ、100%CH<sub>3</sub>CN/0.1%ギ酸（3mL）及び0.1%ギ酸（3mL）で平衡化したSep-Pak Plus C<sub>18</sub>カートリッジ（Waters）に負荷し、0.1%FA（3mL）で洗浄後、100%CH<sub>3</sub>CN/0.1%ギ酸（3mL）にて溶出した画分を遠心エバレータで乾固した。画分乾固物は脱イオン水1.5mLで再溶解し、凍結乾燥後、-40℃で保存した。

【0160】

【化41】



【実施例2】

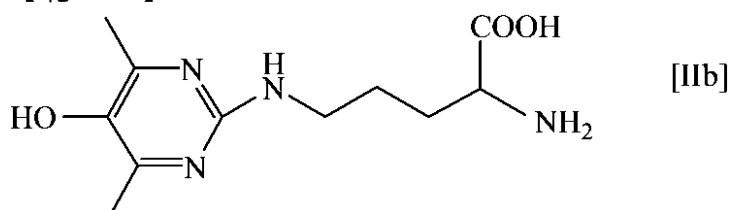
【0161】

トリニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体（AP-TNP）[Iiii]を次のようにして製造した。

アルグピリミジン [IIb] を、実施例1と実質的に同様に処理してトリニトロフェニル化アルグピリミジン誘導体（AP-TNP）[Iiii]を得た。

【0162】

【化42】



【実施例3】

【0163】

質量スペクトルの測定

MG-H1およびAP、ならびに上記の様にして調製したMG-H1およびAPのN-2,4,6-トリニトロフェニル誘導体（それぞれ「MG-H1-TNP」および「AP-TNP」）を0.1%ギ酸に溶解させ、質量スペクトルの測定を行った。測定条件は下記のとおりである。

- ・イオン化モード ESI - positive
- ・スキャン範囲 100 ~ 500 m/z
- ・ドライガス 330、8.0 L/分
- ・ネブライザーガス 276 kPa
- ・キャピラリー電圧 - 2750 V
- ・スキマー電圧 40 V
- ・キャピラリー出口電圧 124 V

## 【0164】

MG-H1、AP、MG-H1-TNPおよびAP-TNPの質量スペクトル(MSおよびMS/MS)を、それぞれ、図1、2、3、4に示す。なお、図2、4において、MG-H1およびAPのN-2, 4, 6-トリニトロフェニル誘導体は、それぞれ、「MG-H1-TNP」、「AP-TNP」と表記されている。MS/MSの測定に用いたプリカーサーイオンは、それぞれの化合物についての[M+H]<sup>+</sup>イオンである。得られた質量スペクトルのうち、ピーク強度の最も大きなものを、後述するLC-MRM-MS/MS分析においてモニターの対象となるイオンピークとして選択した。

## 【0165】

また、図3、図4に示すMSスペクトルおよびMS/MSスペクトルより予測されるMG-H1-TNPおよびAP-TNPのフラグメンテーションパターンを、それぞれ図5および図6に示す。

## 【実施例4】

## 【0166】

## LC-MRM-MS/MS分析

下記の条件下で、MG-H1、AP、MG-H1-TNPおよびAP-TNPのLC-MRM-MS/MS分析を行った。サンプル濃度はいずれも10 nmol/Lとし、いずれも0.1%ギ酸水溶液に溶解させた。

## &lt;HPLC条件&gt;

- ・移動相 MeOH - 0.1%ギ酸水溶液
- ・流速 0.20 mL/分
- ・グラジエント 0 ~ 100% (25分)
- ・固定相 Waters Atlantis T3 (2.1 x 100 mm)
- ・カラムオープン温度 40

## 【0167】

## &lt;MS条件&gt;

- ・イオン化モード ESI - positive
- ・スキャン範囲 100 ~ 500 m/z
- ・ドライガス 330、8.0 L/分
- ・ネブライザーガス 276 kPa
- ・キャピラリー電圧 - 2750 V
- ・スキマー電圧 40 V
- ・キャピラリー出口電圧 124 V
- ・インジェクション体積 25 μL

## 【0168】

MG-H1、AP、MG-H1-TNPおよびAP-TNPのマスキロマトグラムを、それぞれ、図7、8に示す。図7の結果より、MG-H1のN末端アミノ基を2, 4, 6-トリニトロフェニル化することにより、ピーク強度が1500倍程度に増大することが確認された。

## 【実施例5】

## 【0169】

検量線の作製ならびに検出限界および定量限界の決定

内部標準としてMG-H1-TNPの重水素化体(MG-H1-d3-TNP)を用い

て、MG-H1-TNPおよびAP-TNPの検量線を作製した。酸による分解の影響を避けるために、インジェクション直前に0.1%ギ酸水溶液を添加する手順(表1参照)で希釈を行い、高濃度側から測定を行った。まず、原液として、MG-H1-TNPおよびAP-TNPの1 $\mu$ mol/mL水溶液を調製し、終濃度が400、200、40、20、4、2 $\mu$ mol/mLとなるように水で希釈した。各濃度について、これらの等モル混合物25 $\mu$ Lに、MG-H1-d3-TNPの400 $\mu$ mol/mL水溶液25 $\mu$ Lを加え、0.2%ギ酸水溶液50 $\mu$ Lを加えて十分混和し、うち25 $\mu$ LをLC-MS分析に用いた。

【0170】

【表1】

| MG-H1-TNP + AP-TNP mixture | + | MG-H1-d3-TNP | - | 0.2% FA    | ⇒ | injection   |
|----------------------------|---|--------------|---|------------|---|-------------|
| 25 $\mu$ L                 |   | 25 $\mu$ L   |   | 50 $\mu$ L |   | 25 $\mu$ L  |
| 400 pmol/mL                |   | 400 pmol/mL  |   |            |   | 100 pmol/mL |
| 200 pmol/mL                |   | 400 pmol/mL  |   |            |   | 50 pmol/mL  |
| 40 pmol/mL                 |   | 400 pmol/mL  |   |            |   | 10 pmol/mL  |
| 20 pmol/mL                 |   | 400 pmol/mL  |   |            |   | 5 pmol/mL   |
| 4 pmol/mL                  |   | 400 pmol/mL  |   |            |   | 1 pmol/mL   |
| 2 pmol/mL                  |   | 400 pmol/mL  |   |            |   | 0.5 pmol/mL |

【0171】

得られた質量スペクトルにおけるMG-H1-TNPまたはAP-TNPと、MG-H1-d3-TNPとのピーク強度比をMG-H1-TNPまたはAP-TNPの濃度に対しプロットすることにより、図9および10に示す検量線が得られた。これらより、MG-H1-TNPについて、検出限界2.05 $\mu$ mol/mL、定量限界6.20 $\mu$ mol/mL、AP-TNPについて、検出限界0.11 $\mu$ mol/mL、定量限界0.33 $\mu$ mol/mLという結果が得られた。同様にCML-TNPについて検量線を作製し濃度換算すると、検出限界5.3nmol/L、定量限界16nmol/Lであった。また、CEL-TNPについては、検出限界2.7nmol/L、定量限界8.0nmol/Lであった。検量線については、相関係数0.996以上の良好な直線性が得られると共に、それぞれについて $\mu$ molレベル(濃度としてnM/Lレベル)での定量分析が可能であることが確認された。これらの数値は、従来より用いられている誘導体化剤であるダンシルクロリドやNDA(2,3-ナフタレンジアルデヒド)における検出限界の1/100~1/200であり、2,4,6-トリニトロフェニル化により大幅な感度向上が可能であることを示している。

【実施例6】

【0172】

2,4,6-トリニトロフェニル化におけるpHの影響

実施例1および2においてMG-H1-TNPおよびAP-TNPのそれぞれの調製において、反応液のpHを7.5、8.0、8.5にした場合における誘導体化率を、LC-MS分析を用いて算出した。遠心エバポレータ処理により得られた乾固物を0.2%ギ酸水溶液100 $\mu$ Lに溶解し、内部標準としてMG-H1-d3-TNPの200 $\mu$ mol/mL水溶液50 $\mu$ Lを加え、十分に混和した後、25 $\mu$ LをLC-MS分析に供し、検量線法により2,4,6-トリニトロフェニル体の濃度を決定した。結果は、図11、12に示すとおりであり、MG-H1-TNPまたはAP-TNPのいずれの場合についても、pH8.5~9.3で、定量的に誘導体化が可能であることが確認された。

【実施例7】

【0173】

ラット血漿スパイク試験

S Dラットのコントロール血漿に対し、MG-H1、APおよび内部標準であるMG-H1-d3をスパイクし、回収後、2, 4, 6-トリニトロフェニル化を行った。血漿に対する前処理は、図13に示すプロトコール(E.M.N. Nakashima et al., Anal. Biochem., 414, 109-116 (2011) 参照)に準拠して行い、スパイクしたMG-H1、APおよびMG-H1-d3の同時検出を試みた。標準添加法により作製した検量線を用いたLC-MS分析により、MG-H1およびAPについて、血漿中濃度の定量が可能であることが確認された。

【実施例8】

【0174】

Val-Tyrを用いた検討

AGE類であるMG-H1およびAPの代わりにジペプチドVal-Tyrを用いて、上記と同様の手順により、2, 4, 6-トリニトロフェニル化による検出感度の変化を検討した結果、MG-H1の場合と同様、2, 4, 6-トリニトロフェニル化によりピーク強度が約50倍に増大することが確認された(表2)。

【実施例9】

【0175】

ジペプチドを用いた検討

実施例8と実質的に同様にして下記ジペプチドを調製し、検出感度の変化を検討した。その結果を表2に示す。

【0176】

【表2】

| ペプチド    | PA-untreat | SN-untreated | PA-TNP | SN-TNP |
|---------|------------|--------------|--------|--------|
| Val-Tyr | 1          | 1            | 20.06  | 16.57  |
| Lys-Tyr | 1          | 1            | 14.87  | 48.03  |
| Met-Tyr | 1          | 1            | 29.04  | 18.91  |
| Gly-Tyr | 1          | 1            | 18.48  | 55.16  |
| His-Tyr | 1          | 1            | 1.07   | 18.11  |
| Glu-Tyr | 1          | 1            | 0.25   | 2.87   |
| Trp-His | 1          | 1            | 1.32   | 2.52   |
| His-Trp | 1          | 1            | 0.30   | 3.06   |

注: PA-untreat: TNBS未処理ペプチドをLC-MS検出したときのピーク面積

SN-untreated: TNBS未処理ペプチドをLC-MS検出したときのシグナル/ノイズ比(S/N比)

PA-TNP: TNBS誘導体化ペプチドをLC-MS検出したときのピーク面積

SN-TNP: TNBS誘導体化ペプチドをLC-MS検出したときのシグナル/ノイズ比(S/N比)

【産業上の利用可能性】

【0177】

この発明は、例えば、生体内成分であるタンパク質が代謝過程で糖化等された最終糖化産物や中間産物等の代謝産物を始めとするアミノ酸誘導体をニトロベンゼン化合物等の誘導体化剤により誘導体化したアミノ化合物であって、特に耐糖能異常の診断に有用な化合物であるところから、これらのあの化合物を迅速、高感度かつ高精度に定量することが可能である質量分析方法である。したがって、これらのアミノ化合物をバイオマーカーとしてアッセイすることにより様々な疾患の予防や診断に役立ち、これによりその疾患の予防薬や治療薬の開発に役に立つことが期待できる。

## 【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT   |   | International application No.<br>PCT/JP2013/069038   |
|---|---|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>C07D233/66(2006.01)i, C07D239/47(2006.01)i, C07K5/06(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)i, G01N33/66(2006.01)i<br><br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |   |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C07D233/66, C07D239/47, C07K5/06, G01N27/62, G01N33/66<br><br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013<br>Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013<br><br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>CApus/REGISTRY (STN) |   |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>   |   |  |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.  |
| A   | BHUSHAN, R. et al, Use of Marfey's reagent and analogs for chiral amino acid analysis: assessment and applications to natural products and biological systems, J Chromatography B 2011, v.879, n.29, p.3148-3161, entire text | 1-25   |
| A   | BHUSHAN, R. et al, Marfey's reagent for chiral amino acid analysis: a review, Amino Acids 2004, v.27, n.3-4, p.231-247, entire text   | 1-25   |
| A   | HARADA, K. et al, Abnormal elution behavior of ornitine derivatized with 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-leucinamide in advanced Marfey's method, J Chromatography A 2001, v.921, n.2, p.187-195, entire text                    | 1-25   |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.  |   |  |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search<br>01 October, 2013 (01.10.13)  |   | Date of mailing of the international search report<br>15 October, 2013 (15.10.13)  |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japanese Patent Office  |   | Authorized officer   |
| Facsimile No.   |   | Telephone No.  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/069038

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                       |
|---|---|-----------------------|
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| A   | WO 1997/007396 A1 (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA),<br>27 February 1997 (27.02.1997),<br>entire text<br>& US 5770083 A  | 1-25                  |
| A   | FUJII, K. et al, A nonempirical method using LC/MS for determination of the absolute configuration of constituent amino acids in a peptide: Combination of Marfey's method with mass spectrometry and its practical application, Anal Chem 1997, v.69, n.24, p.5146-5151, entire text | 1-25                  |
| A   | FUJII, K. et al, A nonempirical method using LC/MS for determination of the absolute configuration of constituent amino acids in a peptide: Elucidation of limitations of Marfey's method and of its separation mechanism, Anal Chem 1997, v.69, n.16, p.3346-3352, entire text       | 1-25                  |
| A   | STUDIER, M.H. et al, Mass spectrometry of DNP-amino acids combination with paper chromatography, Biochem Biophys Res Commun 1970, v.40, n.4, p.894-900, entire text   | 1-25                  |
| A   | SIGNOR, A. et al, Chemical modification of arginine by nitromalondialdehyde. Synthesis and properties of $\delta$ -(5-nitro-2-pyrimidyl)ornithyl derivatives, Biochemistry 1971, v.10, n.14, p.2748-2752, entire text   | 1-25                  |
| A   | DIBELLO, C. et al, Thin-layer chromatography of dinitropyridyl- and nitropyrimidyl-amino acids, J Chromatography 1965, v.17, p.506-512, entire text   | 1-25                  |
| X   | YANG W.C. et al., Enhancement of amino acid detection and quantification by electrospray ionization mass spectrometry, Anal Chem. 2006, v.78, n.13, p.4702-4708, page 4702, right column  | 23-25                 |
| X   | JP 2007-163423 A (Ajinomoto Co., Inc.),<br>28 June 2007 (28.06.2007),<br>claim 1; paragraph [0024]<br>& US 2008/0315084 A1 & EP 1965205 A1<br>& WO 2007/069591 A1   | 23-25                 |
| X   | WO 2007/132164 A2 (ROYAL HOLLOWAY AND BEDFORD NEW COLLEGE),<br>22 November 2007 (22.11.2007),<br>page 33<br>(Family: none)  | 23-25                 |



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/069038

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|---|--|-----------------------|
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| X   | HUI Y. et al., A new derivatization method coupled with LC-MS/MS to enable baseline separation and quantification of dimethylarginines in human plasma from patients to receive on-pump CABG surgery, Electrophoresis 2012, v.33, n.12, p.1911-1920, fig. 2 to 3 | 23-25                 |
| X   | SU C.L. et al., Selective detection of homocysteine by laser desorption/ionization mass spectrometry, Rapid Commun Mass Spectrom. 2006, v.20, n.22, p.3303-3308, fig. 3  | 23-25                 |
| X   | MANICA D.P. et al., Analysis of the stability of amino acids derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde using high-performance liquid chromatography and mass spectrometry, Anal Biochem. 2003, v.322, n.1, p.68-78, fig. 1                               | 23-25                 |
| X   | SHAH A.J. et al., Development of a protocol for the automated analysis of amino acids in brain tissue samples and microdialysates, J Chromatogr B, 1999, v.735, n.2, p.133-140, fig. 1   | 23-25                 |
| X   | CREVELING C.R. et al., Use of dansyl derivatives and mass spectrometry for identification of biogenic amines, Clin Chem. 1968, v.14, n.4, p.302-309, fig. 3  | 23-25                 |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/069038

**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:

It is considered that the following two invention groups are involved in claims 1-25 of the present application.

[Invention group 1] Inventions relating to a compound represented by general formula [I] recited in claims 1, 13 and 18, which are described in claims 1-12, claims 13-17, claims 18-22 and a part of claim 25 which refers to claims 13-22.

[Invention group 2] Inventions relating to a compound represented by general formula [I'] recited in claim 23, which are described in claims 23-24 and a part of claim 25 which refers to the aforementioned claims.

(Continued to extra 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 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.:

**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/JP2013/069038

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

It is considered that the above-mentioned invention groups 1 and 2 relate to a compound represented by general formula [I] and a compound represented by general formula [I'], respectively. However, the common basic skeleton between the compound represented by general formula [I] and the compound represented by general formula [I'] is only "-NH-", and therefore it cannot be said that both of the compounds share any common special technical feature. Consequently, it cannot be considered that the invention groups 1 and 2 are so linked to each other as to form a single general inventive concept.

Further, any other same or corresponding special technical feature cannot be found between the inventions groups 1 and 2.

Accordingly, the number of inventions set forth in claims 1-25 of the present application is two.

Subject to be covered by this search:

with respect to the inventions in claims of the present application, the inventions, which are considered to be disclosed within the meaning of PCT Article 5, are extremely slight parts of the inventions of claims 1-10, 13-15, 18-22 and claim 25 which refers to the afore-said claims, and it cannot be considered that the inventions of claims 1-10, 13-15, 18-22 and claim 25 which refers to the afore-said claims are fully supported within the meaning of PCT Article 6, and therefore, it is impossible to carry out a full and meaningful prior-art search with respect of the inventions of these claims.

Consequently, with respect to the inventions described in claims 1-10, 13-15 and 18-22 in the present application, the search report was prepared on the scope which is supported by and disclosed in the description, i.e., only on "the invention relating to the compound recited in claims 11-12", "the invention relating to the mass spectrometry method described in claims 16-17", and "the invention relating to a method in which the compound described in claims 11-12 is produced and then the amino compound is analyzed by the mass spectrometry method described in claims 16-17".

Meanwhile, the search has been perfectly carried out with respect to claims 11-12 and 16-17.

| 国際調査報告  |   | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 6 9 0 3 8                               |          |
|---|---|--|----------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))<br>Int.Cl. C07D233/66(2006.01)i, C07D239/47(2006.01)i, C07K5/06(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)i, G01N33/66(2006.01)i |   |  |          |
| B. 調査を行った分野<br>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))<br>Int.Cl. C07D233/66, C07D239/47, C07K5/06, G01N27/62, G01N33/66                                       |   |  |          |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの<br>日本国実用新案公報 1922-1996年<br>日本国公開実用新案公報 1971-2013年<br>日本国実用新案登録公報 1996-2013年<br>日本国登録実用新案公報 1994-2013年                  |   |  |          |
| 国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用了用語)<br>CAplus/REGISTRY (STN)  |   |  |          |
| C. 関連すると認められる文献   |   |  |          |
| 引用文献の<br>カテゴリー*   | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求項の番号   |          |
| A   | BHUSHAN, R. et al, Use of Marfey's reagent and analogs for chiral amino acid analysis: assessment and applications to natural products and biological systems, J Chromatography B 2011, v. 879, n. 29, p. 3148-3161, 全文 | 1-25   |          |
| A   | BHUSHAN, R. et al, Marfey's reagent for chiral amino acid analysis: a review, Amino Acids 2004, v. 27, n. 3-4, p. 231-247, 全文   | 1-25   |          |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。   |   |  |          |
| * 引用文献のカテゴリー  |   | の日の後に公表された文献   |          |
| 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの   |   | 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの     |          |
| 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの   |   | 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの                     |          |
| 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)   |   | 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの |          |
| 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  |   | 「&」同一パテントファミリー文献   |          |
| 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願   |   |  |          |
| 国際調査を完了した日<br>01.10.2013  |   | 国際調査報告の発送日<br>15.10.2013   |          |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁 (ISA/J P)<br>郵便番号100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号   |   | 特許庁審査官 (権限のある職員)<br>早川 裕之  | 4 P 4500 |
|   |   | 電話番号 03-3581-1101 内線 3492  |          |

| 国際調査報告                |  | 国際出願番号 PCT/JP2013/069038 |
|-----------------------|--|--------------------------|
| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                          |
| 引用文献の<br>カテゴリ*        | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求項の番号           |
| A                     | HARADA, K. et al, Abnormal elution behavior of ornithine derivatized with 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-leucinamide in advanced Marfey's method, J Chromatography A 2001, v.921, n.2, p.187-195, 全文   | 1-25                     |
| A                     | WO 1997/007396 A1 (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA) 1997.02.27, 全文<br>& US 5770083 A  | 1-25                     |
| A                     | FUJII, K. et al, A nonempirical method using LC/MS for determination of the absolute configuration of constituent amino acids in a peptide: Combination of Marfey's method with mass spectrometry and its practical application, Anal Chem 1997, v.69, n.24, p.5146-5151, 全文 | 1-25                     |
| A                     | FUJII, K. et al, A nonempirical method using LC/MS for determination of the absolute configuration of constituent amino acids in a peptide: Elucidation of limitations of Marfey's method and of its separation mechanism, Anal Chem 1997, v.69, n.16, p.3346-3352, 全文       | 1-25                     |
| A                     | STUDIER, M.H. et al, Mass spectrometry of DNP-amino acids combination with paper chromatography, Biochem Biophys Res Commun 1970, v.40, n.4, p.894-900, 全文   | 1-25                     |
| A                     | SIGNOR, A. et al, Chemical modification of arginine by nitromalondialdehyde. Synthesis and properties of $\delta$ -(5-nitro-2-pyrimidyl)ornithyl derivatives, Biochemistry 1971, v.10, n.14, p.2748-2752, 全文   | 1-25                     |
| A                     | DIBELLO, C. et al, Thin-layer chromatography of dinitropyridyl- and nitropyrimidyl-amino acids, J Chromatography 1965, v.17, p.506-512, 全文   | 1-25                     |
| X                     | YANG W.C. et al., Enhancement of amino acid detection and quantification by electrospray ionization mass spectrometry, Anal Chem. 2006, v.78, n.13, p.4702-4708, 4702頁右欄等  | 23-25                    |
| X                     | JP 2007-163423 A (味の素株式会社) 2007.06.28, 請求項1および段落【0024】等<br>& US 2008/0315084 A1 & EP 1965205 A1 & WO 2007/069591 A1  | 23-25                    |

| 国際調査報告                |  | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 6 9 0 3 8 |
|-----------------------|--|--------------------------------------|
| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                                      |
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求項の番号                       |
| X                     | WO 2007/132164 A2 (ROYAL HOLLOWAY AND BEDFORD NEW COLLEGE)<br>2007.11.22, 33頁等<br>(ファミリーなし)  | 23-25                                |
| X                     | HUI Y. et al., A new derivatization method coupled with LC-MS/MS<br>to enable baseline separation and quantification of<br>dimethylarginines in human plasma from patients to receive<br>on-pump CABG surgery, Electrophoresis 2012, v.33, n.12,<br>p.1911-1920, 図2～3等 | 23-25                                |
| X                     | SU C.L. et al., Selective detection of homocysteine by laser<br>desorption/ionization mass spectrometry, Rapid Commun Mass<br>Spectrom. 2006, v.20, n.22, p.3303-3308, 図3等   | 23-25                                |
| X                     | MANICA D.P. et al., Analysis of the stability of amino acids<br>derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde using<br>high-performance liquid chromatography and mass spectrometry,<br>Anal Biochem. 2003, v.322, n.1, p.68-78, 図1等                               | 23-25                                |
| X                     | SHAH A.J. et al., Development of a protocol for the automated<br>analysis of amino acids in brain tissue samples and<br>microdialysates, J Chromatogr B, 1999, v.735, n.2, p.133-140,<br>図1等   | 23-25                                |
| X                     | CREVELING C.R. et al., Use of dansyl derivatives and mass<br>spectrometry for identification of biogenic amines, Clin Chem.<br>1968, v.14. n.4, p.302-309, 図3等   | 23-25                                |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 6 9 0 3 8

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

本願請求項1-25には、以下の2つの発明群が記載されていると認められる。

【発明群1】請求項1-12、請求項13-17、請求項18-22、および請求項13-22を引用する請求項25の一部に記載された、請求項1、13、18に記載の一般式[I]で表される化合物に関する発明。

【発明群2】請求項23-24および当該請求項を引用する請求項25の一部に記載された、請求項23に記載の一般式[I']で表される化合物に関する発明。

上記の発明群1および2は、それぞれ一般式[I]および一般式[I']で表される化合物に関するものと認められるが、一般式[I]および一般式[I']で表される化合物に共通する基本骨格は「-NH-」のみであって両化合物が特別な技術的特徴を共有しているとはいえないから、発明群1および2は、単一の一般的発明概念を形成するように関連しているものとは認められない。そして、発明群1および2の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は見当たらない。したがって、本願請求項1-25に記載された発明の数は2である。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2013/069038

<調査の対象について>

本願請求項に係る発明について、PCT第5条の意味において開示されていると認められる発明は、請求項1-10, 13-15, 18-22および当該請求項を引用する請求項25に係る発明のうち極わずかな部分に過ぎず、そして、請求項1-10, 13-15, 18-22および当該請求項を引用する請求項25に係る発明は、PCT第6条の意味で十分に裏付けられているとはいえないから、当該請求項に係る発明については十分且つ有意義な先行技術調査をすることができない。

したがって、本願請求項1-10, 13-15, 18-22に係る発明については、明細書に裏付けられ、開示されている範囲、すなわち「請求項11-12に記載の化合物の発明」、「請求項16-17に記載の質量分析方法の発明」および「請求項11-12に記載の化合物を得て当該アミノ化合物を請求項16-17に記載の質量分析方法で分析する方法の発明」に限定して調査報告を作成した。なお、請求項11-12, 16-17については、完全な調査を行った。



## 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 K 5/06 (2006.01) C 0 7 K 5/06**

(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, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 渡辺 俊明

福岡県福岡市城南区七隈八丁目 1 9 番 1 号 学校法人福岡大学内

F ターム ( 参考 ) 2G041 CA01 FA10 JA04 LA08

2G045 AA13 AA16 AA25 CA26 CB03 CB17 DA35 FA34 FB05 FB06

4H045 AA10 AA20 AA30 BA11 BA15 BA50 CA42 EA50 FA10

( 注 ) この公表は、国際事務局 ( W I P O ) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 ( 日本語実用新案登録出願 ) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 ( 実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項 ) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。