

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-530039

(P2020-530039A)

(43) 公表日 令和2年10月15日 (2020. 10. 15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C08G 75/06 (2006.01)</b>	C08G 75/06	4C076
<b>A61K 47/22 (2006.01)</b>	A61K 47/22	4C083
<b>A61K 8/49 (2006.01)</b>	A61K 8/49	4F006
<b>C08G 79/00 (2006.01)</b>	C08G 79/00	4H045
<b>C07K 2/00 (2006.01)</b>	C07K 2/00	4J030
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 68 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-500709 (P2020-500709)	(71) 出願人	509248257
(86) (22) 出願日	平成30年7月11日 (2018. 7. 11)		ノースイースタン ユニヴァーシティ
(85) 翻訳文提出日	令和2年2月10日 (2020. 2. 10)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
(86) 国際出願番号	PCT/US2018/041581		2115 ボストン ハンティントン
(87) 国際公開番号	W02019/014311		アヴェニュー 360
(87) 国際公開日	平成31年1月17日 (2019. 1. 17)	(74) 代理人	100139723
(31) 優先権主張番号	62/530, 934		弁理士 樋口 洋
(32) 優先日	平成29年7月11日 (2017. 7. 11)	(72) 発明者	アガー, ジェフリー エヌ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
(31) 優先権主張番号	62/680, 318		2459 ニュートン ビーコン ストリ
(32) 優先日	平成30年6月4日 (2018. 6. 4)		ート 1045
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	F ターム (参考)	4C076 AA95 DD61
			4C083 AC861 CC28 CC34 EE25
			4F006 AA02 AB32 CA09
			4H045 AA10 AA30 BA51
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複素環—ジチオールクリックケミストリー

## (57) 【要約】

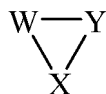
式 I の部分を含む複素環をチオールおよびチオラートと架橋させることに焦点を合わせて、ポリマー、ポリマーの製造方法、および組成物を開示する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

少なくとも 2 つのチオール官能基を含む第 1 のモノマーと、式 I の部分を含む第 1 の架橋剤とから誘導されるポリマー；

## 【化 1】



式 I

10

式中、

W は、S および S e からなる群より独立して選択され；

Y は、S、S e、S ( O )、S e ( O )、S ( O )<sub>2</sub> および S e ( O )<sub>2</sub> からなる群より独立して選択され；

X は W および Y と一緒になって、置換または非置換の 3 ~ 10 員の複素環を形成する。

## 【請求項 2】

前記第 1 のモノマーが、ジチオール化合物、トリチオール化合物、テトラチオール化合物、およびチオマーからなる群より選択される、請求項 1 に記載のポリマー。

20

## 【請求項 3】

前記第 1 のモノマーが、ジチオール化合物、トリチオール化合物、テトラチオール化合物、ヘキサチオール化合物、およびオクタチオール化合物からなる群より選択される、請求項 1 に記載のポリマー。

## 【請求項 4】

前記第 1 のモノマーが、ジチオスレイトール ( D T T )、1, 2 - エタンジチオール、1, 3 - プロパンジチオール、1, 4 - ブタンジチオール、1, 5 - ペンタンジチオール、1, 6 - ヘキサジチオール、1, 7 - ヘプタンジチオール、1, 8 - オクタンジチオール、1, 9 - ノナンジチオール、1, 10 - デカンジチオール、1, 11 - ウンデカンジチオール、1, 12 - ドデカンジチオール、1, 13 - トリデカンジチオール、1, 14 - テトラデカンジチオール、1, 16 - ヘキサデカンジチオール、ジチオールブチルアミン ( D T B A )、テトラ ( エチレングリコール ) ジチオール、ヘキサ ( エチレングリコール ) ジチオール、2 - メルカプトエチルエーテル、2, 2' - チオジエタンチオール、2, 2' - ( エチレンジオキシ ) ジエタンチオール、プロパン - 1, 2, 3 - トリチオール、トリメチロールプロパントリス ( 2 - メルカプトアセタート )、トリメチロールプロパントリス ( 3 - メルカプトアセタート )、3, 3', 3'' - ( ( ( ( 1, 3, 5 - トリアジン - 2, 4, 6 - トリイル ) トリス ( オキシ ) ) トリス ( プロパン - 3, 1 - ジイル ) ) トリス ( スルファンジイル ) ) トリス ( プロパン - 1 - チオール )、4, 4', 4'' - ( ( ( ( 1, 3, 5 - トリアジン - 2, 4, 6 - トリイル ) トリス ( オキシ ) ) トリス ( プロパン - 3, 1 - ジイル ) ) トリス ( スルファンジイル ) ) - トリス ( ブタン - 1 - チオール )、ペンタエリスリチルテトラチオール、ペンタエリスリトールテトラキス ( 3 - メルカプトプロピオナート )、ジスルフィド結合を有するペプチド、およびジスルフィド結合を有するタンパク質からなる群より選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のポリマー。

30

40

## 【請求項 5】

前記第 1 のモノマーが、ポリ ( エチレングリコール ) ジチオール、4 arm - P E G 2 K - S H、4 arm - P E G 5 K - S H、4 arm - P E G 10 K - S H、4 arm - P E G 20 K - S H、4 アームポリ ( エチレンオキシド ) チオール末端、8 arm - P E G 10 K - S H ( ヘキサグリセロールコア )、8 arm - P E G 10 K - S H ( トリペンタエリスリトールコア )、8 arm - P E G 20 K - S H ( ヘキサグリセロールコア )、8

50

arm - PEG20K - SH (トリペンタエリスリトールコア)、および 8 アームポリ (エチレンオキシド) チオール末端からなる群より選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のポリマー。

【請求項 6】

前記第 1 のモノマーが、ジスルフィド結合を有するペプチドまたはジスルフィド結合を有するタンパク質である、請求項 1 に記載のポリマー。

【請求項 7】

前記第 1 のモノマーが、銅 / 亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) 変異体、DJ-1 変異体、エフェクターカスパーゼ、および鉄硫黄クラスターアセンブリ酵素 (ISCU) からなる群より選択されるジスルフィド結合を有するタンパク質である、請求項 6 に記載のポリマー。

10

【請求項 8】

前記第 1 のモノマーが家族性筋萎縮性側索硬化症 (fALS) - SOD1 変異体である、請求項 7 に記載のポリマー。

【請求項 9】

W および Y が S である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のポリマー。

【請求項 10】

W が S であり、Y が S (O) である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のポリマー。

【請求項 11】

20

W および Y が Se である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のポリマー。

【請求項 12】

W が Se であり、Y が Se (O) である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のポリマー。

【請求項 13】

W が Se であり、Y が S である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のポリマー。

【請求項 14】

W が S であり、Y が Se である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のポリマー。

【請求項 15】

W が Se であり、Y が S (O) である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のポリマー。

30

【請求項 16】

W が S であり、Y が Se (O) である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のポリマー。

【請求項 17】

X が  $-(CR^1R^2)_n-$  であり、ここで n は 1、2、3、4、5、6、7 および 8 からなる群より選択される整数であり、

各  $CR^1R^2$  基上の各  $R^1$  および各  $R^2$  は、H、OH、NO<sub>2</sub>、CN、NH<sub>2</sub>、置換されていてもよい C<sub>1</sub> ~ C<sub>12</sub> アルキル、置換されていてもよい C<sub>2</sub> ~ C<sub>12</sub> アルケニル、置換されていてもよい C<sub>2</sub> ~ C<sub>12</sub> アルキニル、置換されていてもよい C<sub>2</sub> ~ C<sub>12</sub> ヘテロアルキル、置換されていてもよい C<sub>3</sub> ~ C<sub>12</sub> シクロアルキル、置換されていてもよい C<sub>2</sub> ~ C<sub>12</sub> ヘテロシクロアルキル、置換されていてもよい C<sub>2</sub> ~ C<sub>12</sub> ヘテロシクロアルケニル、置換されていてもよい C<sub>6</sub> ~ C<sub>18</sub> アリール、置換されていてもよい C<sub>1</sub> ~ C<sub>18</sub> ヘテロアリール、置換されていてもよい C<sub>1</sub> ~ C<sub>12</sub> アルキルオキシ、置換されていてもよい C<sub>2</sub> ~ C<sub>12</sub> アルケニルオキシ、置換されていてもよい C<sub>2</sub> ~ C<sub>12</sub> アルキニルオキシ、置換されていてもよい C<sub>2</sub> ~ C<sub>12</sub> ヘテロアルキルオキシ、置換されていてもよい C<sub>3</sub> ~ C<sub>12</sub> シクロアルキルオキシ、置換されていてもよい C<sub>3</sub> ~ C<sub>12</sub> シクロアルケニルオキシ、置換されていてもよい C<sub>1</sub> ~ C<sub>12</sub> ヘテロシクロアルキルオキシ、置換されていてもよい C<sub>2</sub> ~ C<sub>12</sub> ヘテロシクロアルケニルオキシ、置換されていてもよい C<sub>6</sub> ~ C<sub>18</sub> アリールオキシ、置換されていてもよい C<sub>1</sub> ~ C<sub>18</sub> ヘテロアリールオキシ、置換

40

50

されていてもよい  $C_1 \sim C_{12}$  アルキルアミノ、 $CONR^3R^4$ 、 $NR^3COR^4$ 、 $NR^3COOR^4$ 、 $NR^3SO_2R^4$ 、 $NR^3CONR^3R^4$ 、および  $NR^3R^4$  からなる群より独立して選択され、

各  $R^3$  および  $R^4$  は、H、置換されていてもよい  $C_1 \sim C_{12}$  アルキル、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  アルケニル、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  アルキニル、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  ヘテロアルキル、置換されていてもよい  $C_3 \sim C_{12}$  シクロアルキル、置換されていてもよい  $C_3 \sim C_{12}$  シクロアルケニル、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  ヘテロシクロアルキル、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  ヘテロシクロアルケニル、置換されていてもよい  $C_6 \sim C_{18}$  アリール、および置換されていてもよい  $C_1 \sim C_{18}$  ヘテロアリールからなる群より独立して選択される、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載のポリマー。

10

【請求項 18】

$n$  が 3、4、5 および 6 からなる群より選択される整数である、請求項 17 に記載のポリマー。

【請求項 19】

各  $CR^1R^2$  基上の各  $R^1$  および各  $R^2$  が、H、OH、 $NO_2$ 、CN、 $NH_2$ 、置換されていてもよい  $C_1 \sim C_{12}$  アルキル、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  ヘテロアルキル、置換されていてもよい  $C_3 \sim C_{12}$  シクロアルキル、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  ヘテロシクロアルキル、置換されていてもよい  $C_1 \sim C_{12}$  アルキルオキシ、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  ヘテロアルキルオキシ、置換されていてもよい  $C_3 \sim C_{12}$  シクロアルキルオキシ、および置換されていてもよい  $C_1 \sim C_{12}$  ヘテロシクロアルキルオキシからなる群より独立して選択される、請求項 17 または 18 に記載のポリマー。

20

【請求項 20】

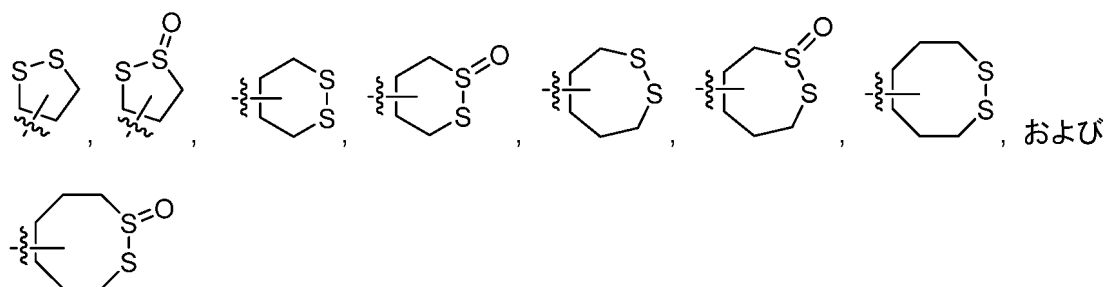
各  $CR^1R^2$  基上の各  $R^1$  および各  $R^2$  が、H、OH、 $NO_2$ 、CN、 $NH_2$ 、置換されていてもよい  $C_1 \sim C_{12}$  アルキル、置換されていてもよい  $C_3 \sim C_{12}$  シクロアルキル、置換されていてもよい  $C_1 \sim C_{12}$  アルキルオキシ、および置換されていてもよい  $C_3 \sim C_{12}$  シクロアルキルオキシからなる群より独立して選択される、請求項 17 ~ 19 のいずれか一項に記載のポリマー。

【請求項 21】

前記第 1 の架橋剤が、

30

【化 2】



40

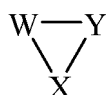
からなる群より選択される式 I の部分を含む、請求項 1 ~ 8 および 17 ~ 20 のいずれか一項に記載のポリマー。

【請求項 22】

分子を共有結合する方法であって、

式 I の部分を含む複数の第 1 の分子を提供し：

## 【化 3】



式 I

式中、

Wは、SおよびSeからなる群より独立して選択され；

10

Yは、S、Se、S(O)、Se(O)、S(O)<sub>2</sub>およびSe(O)<sub>2</sub>からなる群より独立して選択され；

XはWおよびYと一緒にあって、置換または非置換の3～10員の複素環を形成する；  
前記第1の分子を、少なくとも1つのチオール官能基を含む複数の第2の分子と接触させ、

それによって前記第1の分子のSまたはSe原子と前記第2の分子の遊離チオール基との間に複数の共有結合を形成することを含む方法。

## 【請求項 2 3】

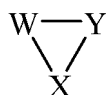
物体、デバイス、またはアセンブリの表面をコーティングする方法であって、

20

(a) 物体、デバイス、またはアセンブリの表面を提供する；

(b) 前記表面を、反応性部分と式 I の部分とを含む複数の第1の分子と接触させ；

## 【化 4】



式 I

式中、

Wは、SおよびSeからなる群より独立して選択され；

30

Yは、S、Se、S(O)、Se(O)、S(O)<sub>2</sub>およびSe(O)<sub>2</sub>からなる群より独立して選択され；

XはWおよびYと一緒にあって、置換または非置換の3～10員の複素環を形成する；

それによって前記表面と前記第1の分子の反応性部分との間に複数の共有結合を形成して、第1の単分子層を形成する

ステップを含む方法。

## 【請求項 2 4】

(c) 前記単分子層を、少なくとも1つのチオール官能基を含む第2の分子と接触させ、それによって、前記第1の分子のSまたはSe原子と前記第2の分子の遊離チオール基との間に複数の共有結合が形成された第1の二分子層を形成することをさらに含む、請求項 2 3に記載の方法。

40

## 【請求項 2 5】

(d) 電位を印加し、それによって共有結合を還元して、第2の単分子層を形成することをさらに含む、請求項 2 4に記載の方法。

## 【請求項 2 6】

(f) 水および複数の金属イオンを含む水性混合物を提供し、それによって複数の金属イオンをキレート化した第2の単分子層の複数の金属キレート基を含む錯体を形成して、第2の二分子層を形成することをさらに含む、請求項 2 5に記載の方法。

50

## 【請求項 27】

前記複数の金属キレート基が S 原子である、請求項 26 に記載の方法。

## 【請求項 28】

前記複数の金属キレート基が Se 原子である、請求項 27 に記載の方法。

## 【請求項 29】

前記複数の金属イオンが複数の金属カチオンである、請求項 26 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 30】

前記金属カチオンが +1 の電荷を有する、請求項 29 に記載の方法。

## 【請求項 31】

前記金属カチオンが Ag または Au のカチオンである、請求項 30 に記載の方法。

10

## 【請求項 32】

前記金属カチオンが +2 の電荷を有する、請求項 29 に記載の方法。

## 【請求項 33】

前記金属カチオンが、Ca、Cd、Co、Cr、Cu、Er、Fe、Hg、Mg、Mn、Nb、Ni、Pb、Pd、Sc、Sn、Sr、V、または Zn のカチオンである、請求項 32 に記載の方法。

## 【請求項 34】

前記金属カチオンが +3 の電荷を有する、請求項 29 に記載の方法。

## 【請求項 35】

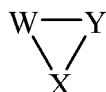
金属カチオンが、Au、Ce、Dy、Er、Eu、Fe、Gd、Ho、La、Lu、Nb、Nd、Pm、Pr、Sm、Tb、Tm、または Yb のカチオンである、請求項 34 に記載の方法。

20

## 【請求項 36】

(f) 前記第 2 の二分子層を、式 I の部分を含む複数の第 3 の分子と接触させ：

## 【化 5】



式 I

30

式中、

W は、S および Se からなる群より独立して選択され；

Y は、S、Se、S(O)、Se(O)、S(O)<sub>2</sub> および Se(O)<sub>2</sub> からなる群より独立して選択され；

X は W および Y と一緒になって、置換または非置換の 3 ~ 10 員の複素環を形成する；

それによって複数の第 3 の分子が前記複数の金属イオンをキレート化した三分子層を形成することをさらに含む、請求項 26 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法。

40

## 【請求項 37】

W および Y が S である、請求項 22 ~ 36 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 38】

W が S であり、Y が S(O) である、請求項 22 ~ 36 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 39】

W および Y が Se である、請求項 22 ~ 36 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 40】

W が Se であり、Y が Se(O) である、請求項 22 ~ 36 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 41】

50

WがS eであり、YがSである、請求項22～36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項42】

WがSであり、YがS eである、請求項22～36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項43】

WがS eであり、YがS(O)である、請求項22～36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項44】

WがSであり、YがS e(O)である、請求項22～36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項45】

10

Xが $-(CR^1R^2)_n-$ であり、nが1、2、3、4、5、6、7および8からなる群より選択される整数であり、

各 $CR^1R^2$ 基上の各 $R^1$ および各 $R^2$ は、H、OH、 $NO_2$ 、CN、 $NH_2$ 、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{12}$ ヘテロアルキル、置換されていてもよい $C_3 \sim C_{12}$ シクロアルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{12}$ ヘテロシクロアルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{12}$ ヘテロシクロアルケニル、置換されていてもよい $C_6 \sim C_{18}$ アリール、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{18}$ ヘテロアリール、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{12}$ アルキルオキシ、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{12}$ アルケニルオキシ、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{12}$ アルキニルオキシ、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{12}$ ヘテロアルキルオキシ、置換されていてもよい $C_3 \sim C_{12}$ シクロアルキルオキシ、置換されていてもよい $C_3 \sim C_{12}$ シクロアルケニルオキシ、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{12}$ ヘテロシクロアルキルオキシ、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{12}$ ヘテロシクロアルケニルオキシ、置換されていてもよい $C_6 \sim C_{18}$ アリールオキシ、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{18}$ ヘテロアリールオキシ、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{12}$ アルキルアミノ、 $CONR^3R^4$ 、 $NR^3COR^4$ 、 $NR^3COOR^4$ 、 $NR^3SO_2R^4$ 、 $NR^3CONR^3R^4$ 、および $NR^3R^4$ からなる群より独立して選択され、

20

ここで、各 $R^3$ および $R^4$ は、H、置換されていてもよい $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{12}$ ヘテロアルキル、置換されていてもよい $C_3 \sim C_{12}$ シクロアルキル、置換されていてもよい $C_3 \sim C_{12}$ シクロアルケニル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{12}$ ヘテロシクロアルキル、置換されていてもよい $C_2 \sim C_{12}$ ヘテロシクロアルケニル、置換されていてもよい $C_6 \sim C_{18}$ アリール、および置換されていてもよい $C_1 \sim C_{18}$ ヘテロアリールからなる群より独立して選択される、請求項22～44のいずれか一項に記載の方法。

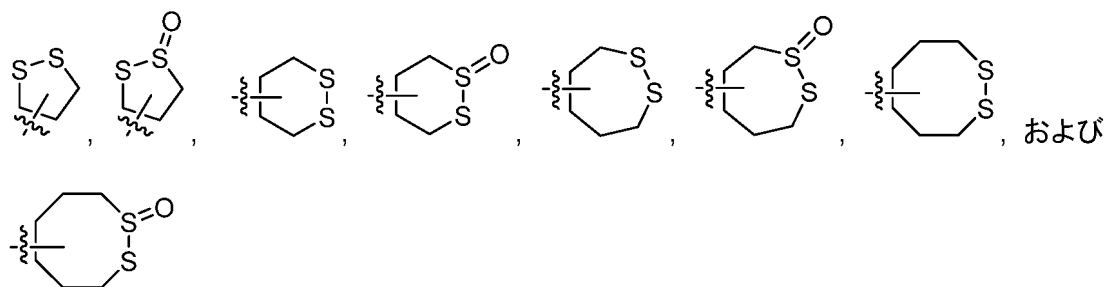
30

【請求項46】

前記第1の分子が、

【化6】

40



からなる群より選択される式Iの部分を含む、請求項22～45のいずれか一項記載の方

50

法。

【請求項 47】

前記第 2 の分子が、(11-メルカプトウンデシル)-N、N、N-トリメチルアンモニウムブロミド、(11-メルカプトウンデシル)ヘキサ(エチレングリコール)、(11-メルカプトウンデシル)テトラ(エチレングリコール)、1-(11-メルカプトウンデシル)イミダゾール、1-メルカプト-2-プロパノール、11-(1H-ピロール-1-イル)ウンデカン-1-チオール、11-(フェロセニル)ウンデカンチオール、11-アミノ-1-ウンデカンチオール塩酸塩、11-アジド-1-ウンデカンチオール、11-メルカプト-1-ウンデカノール、11-メルカプトウンデカンアミド、11-メルカプトウンデカン酸、11-メルカプトウンデシルヒドロキノン、11-メルカプトウンデシルホスホン酸、12-メルカプトドデカン酸、16-アミノ-1-ヘキサデカンチオール塩酸塩、16-メルカプトヘキサデカンアミド、16-メルカプトヘキサデカン酸、3-アミノ-1-プロパンチオール塩酸塩、3-クロロ-1-プロパンチオール、3-メルカプト-1-プロパノール、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプト-1-ブタノール、6-(フェロセニル)ヘキサチオール、6-アミノ-1-ヘキサチオール塩酸塩、6-メルカプト-1-ヘキサノール、6-メルカプトヘキサン酸、8-アミノ-1-オクタンチオール塩酸塩、8-メルカプト-1-オクタノール、8-メルカプトオクタン酸、9-メルカプト-1-ノナノール、トリエチレングリコールモノ-11-メルカプトウンデシルエーテル、1-メルカプトコハク酸、システイン残基を有するペプチド、システイン残基を有するタンパク質、システアミン、1-チオヘキシトール、ポリ(エチレングリコール)2-メルカプトエチルエーテル酢酸、ポリ(エチレングリコール)メチルエーテルチオール、1-チオグリセロール、2-ナフタレンチオール、ビフェニル-4-チオール、3-アミノ-1,2,4-トリアゾール-5-チオール、5-(トリフルオロメチル)ピリジン-2-チオール、1-[2-(ジメチルアミノ)エチル]-1H-テトラゾール-5-チオール、1-プロパンチオール、1-ブタンチオール、1-ペンタンチオール、1-ヘキサチオール、1-オクタンチオール、3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-トリデカフルオロ-1-オクタンチオール、および -Glu-Cys からなる群より選択される、請求項 22 および 24 ~ 46 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

【請求項 48】

前記第 2 の分子が、ジチオール化合物、トリチオール化合物、テトラチオール化合物、およびチオマーからなる群より選択される、請求項 22 および 24 ~ 46 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 49】

前記第 2 の分子が、ジチオール化合物、トリチオール化合物、テトラチオール化合物、ヘキサチオール化合物、およびオクタチオール化合物からなる群より選択される、請求項 22 および 24 ~ 46 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 50】

前記第 2 の分子が、DTT、1,2-エタンジチオール、1,3-プロパンジチオール、1,4-ブタンジチオール、1,5-ペンタンジチオール、1,6-ヘキサンジチオール、1,7-ヘプタンジチオール、1,8-オクタンジチオール、1,9-ノナンジチオール、1,10-デカンジチオール、1,11-ウンデカンジチオール、1,12-ドデカンジチオール、1,13-トリデカンジチオール、1,14-テトラデカンジチオール、1,16-ヘキサデカンジチオール、DTBA、テトラ(エチレングリコール)ジチオール、ヘキサ(エチレングリコール)ジチオール、2-メルカプトエチルエーテル、2,2'-チオジエタンチオール、2,2'-(エチレンジオキシ)ジエタンチオール、プロパン-1,2,3-トリチオール、トリメチロールプロパントリス(2-メルカプトアセタート)、トリメチロールプロパントリス(3-メルカプトアセタート)、3,3',3''-( (((1,3,5-トリアジン-2,4,6-トリイル)トリス(オキシ)) トリス(プロパン-3,1-ジイル)) トリス(スルファンジイル)) トリス(プロパン-1

40

50



- チオール)、4, 4', 4'' - ( ( ( ( 1, 3, 5 - トリアジン - 2, 4, 6 - トリイル) トリス(オキシ)) トリス(プロパン - 3, 1 - ジイル)) トリス(スルファンジイル)) トリス(ブタン - 1 - チオール)、ペンタエリスリチルテトラチオール、ペンタエリスリトールテトラキス(3 - メルカプトプロピオナート)、ジスルフィド結合を有するペプチド、およびジスルフィド結合を有するタンパク質からなる群より選択される、請求項 22、24 ~ 46、48、および 49 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

前記第 2 の分子が、ポリ(エチレングリコール)ジチオール、4 arm - PEG 2 K - SH、4 arm - PEG 5 K - SH、4 arm - PEG 10 K - SH、4 arm - PEG 20 K - SH、4 アームポリ(エチレンオキシド)チオール末端、8 arm - PEG 10 K - SH (ヘキサグリセロールコア)、8 arm - PEG 10 K - SH (トリペンタエリスリトールコア)、8 arm - PEG 20 K - SH (ヘキサグリセロールコア)、8 arm - PEG 20 K - SH (トリペンタエリスリトールコア)、および 8 アームポリ(エチレンオキシド)チオール末端からなる群より選択される、請求項 22、24 ~ 46、48、および 49 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 52】

前記第 2 の分子が、ジスルフィド結合を有するペプチドまたはジスルフィド結合を有するタンパク質である、請求項 24 ~ 46、48、および 49 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 53】

前記第 2 の分子が、SOD 1 変異体、DJ - 1 変異体、エフェクターカスパーゼ、および I s c U からなる群より選択されるジスルフィド結合を有するタンパク質である、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

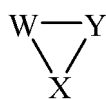
前記第 2 の分子が f A L S - SOD 1 変異体である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

基材およびコーティング材を含む組成物であって、前記コーティング材は、複数の式 I の部分を含む第 1 の単分子層を含み；

【化 7】

30



式 I

式中、

W は、S および S e からなる群より独立して選択され；

Y は、S、S e、S(O)、S e(O)、S(O)<sub>2</sub> および S e(O)<sub>2</sub> からなる群より独立して選択され；

40

X は W および Y と一緒になって、置換または非置換の 3 ~ 10 員の複素環を形成する；  
前記コーティング材は前記基材に共有結合している、組成物。

【請求項 56】

前記コーティング材が、式 I の部分と少なくとも 1 つのチオール官能基を含む複数の第 1 のモノマーとから誘導されるポリマーを含む第 1 の二分子層を含み、前記複数の式 I の部分の S または S e 原子と前記第 1 のモノマーの遊離チオール基との間に複数の共有結合が形成される、請求項 55 に記載の組成物。

【請求項 57】

前記コーティング材が、前記複数の式 I の部分の還元形態を含む第 2 の単分子層を含む、請求項 56 に記載の組成物。

50

## 【請求項 58】

前記コーティング材が、複数の金属イオンをキレート化した前記第2の単分子層の複数の金属キレート基を含む第2の二分子層を含む、請求項57に記載の組成物。

## 【請求項 59】

前記複数の金属キレート基がS原子である、請求項58に記載の組成物。

## 【請求項 60】

前記複数の金属キレート基がSe原子である、請求項58に記載の組成物。

## 【請求項 61】

前記複数の金属イオンが複数の金属カチオンである、請求項58～60のいずれか一項に記載の組成物。

10

## 【請求項 62】

前記金属カチオンが+1の電荷を有する、請求項61に記載の組成物。

## 【請求項 63】

前記金属カチオンがAgまたはAuのカチオンである、請求項62に記載の組成物。

## 【請求項 64】

前記金属カチオンが+2の電荷を有する、請求項61に記載の組成物。

## 【請求項 65】

前記金属カチオンが、Ca、Cd、Co、Cr、Cu、Er、Fe、Hg、Mg、Mn、Nb、Ni、Pb、Pd、Sc、Sn、Sr、V、またはZnのカチオンである、請求項64に記載の組成物。

20

## 【請求項 66】

前記金属カチオンが+3の電荷を有する、請求項61に記載の組成物。

## 【請求項 67】

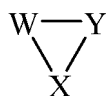
前記金属カチオンが、Au、Ce、Dy、Er、Eu、Fe、Gd、Ho、La、Lu、Nb、Nd、Pm、Pr、Sm、Tb、Tm、またはYbのカチオンである、請求項66に記載の組成物。

## 【請求項 68】

前記コーティング材が、複数の金属イオンをキレート化した複数の第3の分子をさらに含む三分子層を含み、前記第3の分子は式Iの部分を含む、請求項58～67のいずれか一項に記載の組成物：

30

## 【化 8】



式I

式中、

Wは、SおよびSeからなる群より独立して選択され；

40

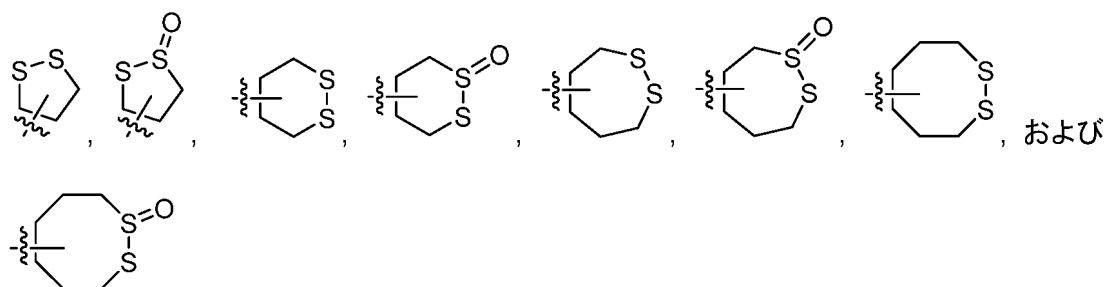
Yは、S、Se、S(O)、Se(O)、S(O)<sub>2</sub>およびSe(O)<sub>2</sub>からなる群より独立して選択され；

XはWおよびYと一緒にあって、置換または非置換の3～10員の複素環を形成する。

## 【請求項 69】

前記第1の単分子層が、

## 【化 9】



10

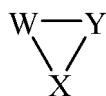
からなる群より選択される複数の部分を含む、請求項 55 ~ 68 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 70】

細胞膜を横切って目的分子を輸送する方法であって、

(a) 式 I の部分を含む目的機能性分子を提供する：

## 【化 10】



式 I

20

式中、

W は、S および S e からなる群より独立して選択され；

Y は、S、S e、S(O)、S e(O)、S(O)<sub>2</sub> および S e(O)<sub>2</sub> からなる群より独立して選択され；

X は W および Y と一緒になって、置換または非置換の 3 ~ 10 員の複素環を形成する；

(b) 式 I の部分が 1 つまたは複数の細胞膜輸送タンパク質に可逆的に結合する条件下で、目的細胞を前記目的機能性分子と接触させ、

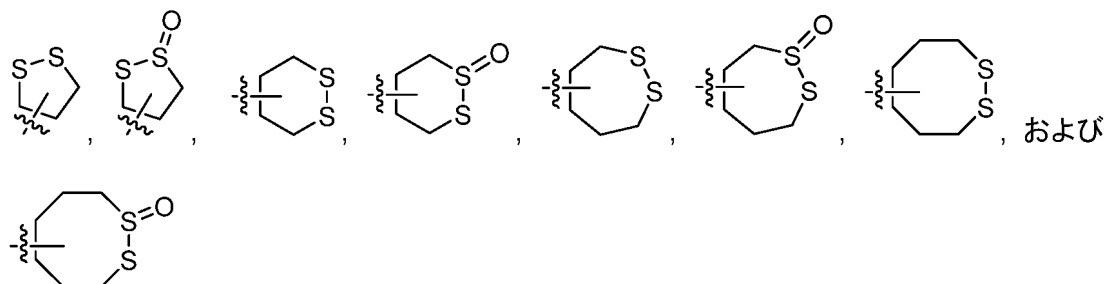
それによって細胞膜を横切る目的分子の輸送を促進させることを含む方法。

30

## 【請求項 71】

前記機能性分子が、

## 【化 11】



40

からなる群より選択される式 I の部分を含む、請求項 70 に記載の方法。

## 【請求項 72】

ケラチン含有物質を処理する方法であって、

i) 複数のジスルフィド結合を含むケラチン含有物質サンプルである複数の第 1 のモノ

50

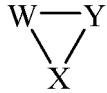
マーを提供する；

i i) 前記ケラチン含有物質サンプルに、約 0.1 質量%～約 15 質量%の濃度の還元剤を含む混合物を所定の期間適用し、それによって複数の遊離チオール基を含む還元ケラチン含有物質サンプルを生成する；

i i i) 式 I の部分を含む第 1 の架橋剤を前記還元ケラチン含有物質サンプルに適用し

：

【化 1 2】



式 I

10

式中、

W は、S および S e からなる群より独立して選択され；

Y は、S、S e、S(O)、S e(O)、S(O)<sub>2</sub> および S e(O)<sub>2</sub> からなる群より独立して選択され；

X は W および Y と一緒になって、置換または非置換の 3～10 員の複素環を形成する；

それによって遊離チオール基と第 1 の架橋剤との間に複数の共有結合を形成することを含む方法。

20

【請求項 7 3】

前記還元剤が、チオグリコール酸アンモニウム、L-システイン、グルタチオン、アスコルビン酸、 $\gamma$ -メルカプトエタノール、2-メルカプトエチルアミン、2-メルカプトエチルアミン塩酸塩、ジチオスレイトール(DTT)、チオ乳酸、チオサリチル酸、トリス-2-カルボキシエチルホスフィン塩酸塩(TCEP)、次亜硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、二亜硫酸カリウム、二亜硫酸ナトリウム、硫酸水素ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸水素アンモニウム、チオグリコール酸、チオグリコール酸カルシウム、チオグリコール酸カリウム、チオグリコール酸ナトリウム、システイン塩酸塩、チオ乳酸アンモニウム、チオグリセリン、メルカプトプロピオン酸、チオグリコール酸グリセリルおよびジチオールブチルアミン(DTBA)からなる群より選択される、請求項 7 2 に記載の方法。

30

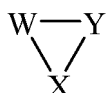
【請求項 7 4】

ケラチン含有物質を処理する方法であって、

i) 複数のジスルフィド結合を含むケラチン含有物質サンプルである複数の第 1 のモノマーを提供する；

i i) 前記ケラチン含有物質サンプルに、式 I の部分を含む第 1 の架橋剤を含有する混合物を所定の期間適用し；

【化 1 3】



式 I

40

式中、

W は、S および S e からなる群より独立して選択され；

Y は、S、S e、S(O)、S e(O)、S(O)<sub>2</sub> および S e(O)<sub>2</sub> からなる群より独立して選択され；

50

XはWおよびYと一緒にあって、置換または非置換の3～10員の複素環を形成する；それによって、複数の遊離チオール基を形成し、それが第1の架橋剤と反応して遊離チオール基と第1の架橋剤との間に複数の共有結合を形成することを含む方法。

【請求項75】

前記ケラチン含有物質が、毛髪、眉毛、まつげ、指の爪、および足の爪からなる群より選択される、請求項72～74のいずれか一項に記載の方法。

【請求項76】

前記ケラチン含有物質が毛髪である、請求項72～74のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【関連出願の相互参照】

【0001】

この出願は、2017年7月11日出願の米国仮出願第62/530,934号、および2018年6月4日出願の米国仮出願第62/680,318号の優先権の利益を主張する。

【技術分野】

【0002】

本開示は、目的分子または分子種の間に共有結合を形成する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

20

2つの分子または分子種の共有結合は、生体分子の生成およびタグ付け、ポリマー合成、 dendrimerなどの複雑な分子構造の合成、および表面化学などの多様な分野で広く使用されている基本的に重要な化学反応である。「クリック」ケミストリーは、この分野での最近の開発において重要な役割を果たしてきた。クリックケミストリーの概念は2001年に初めて導入された<sup>1</sup>（非特許文献1）。

【0004】

「クリック」反応という用語は、一般的に、ワンポットで生じ、水に敏感ではなく、最小限の無害な副産物を生成し、さらには迅速かつ不可逆的に反応を駆動して高い反応特異性で高収率の単一反応生成物をもたらす高い熱力学的駆動力を有する化学反応を説明するために使用される。典型的なクリック反応には、アルキンへのアジドの付加などの不飽和種の環化付加；求核置換；「非アルドール」タイプのカルボニル反応；およびディールス・アルダー反応（Diels - Alder chemistry）を含む、炭素 - 炭素多重結合の付加が含まれる。

30

【0005】

クリック反応は、反応が位置特異的で高収率である必要があり、副産物が非毒性である必要があり（*in vivo*システムの場合）、さらに反応生成物が生理学的に安定である必要がある、複雑な生物学的環境で反応を実行するのに特に適している。

【0006】

チオラート基は、独自の求核性と分極率を有しており、それによって高い特異性で標的化されることが可能となる。チオラート - エン反応は大きな熱力学的駆動力を有し、反応収率が高く、立体特異的で、クリックケミストリーの一種として受け入れられている<sup>2</sup>（非特許文献2）。多数の薬物がシステイン（Cys）チオラートと共有結合を形成する。サブマイクロモル濃度の親和性のキナーゼ阻害剤を使用してオフターゲット反応を最小限に抑える際に、特定の（Cys含有）構造を有するキナーゼに対する特異性を高めるために - エン（-ene）、- イン（-yne）、およびその他の弱求電子弾頭が使用されてきた<sup>3</sup>（非特許文献3）

40

【0007】

チオール - エン反応は、チオール架橋を必要とする用途でも一般的である<sup>4</sup>（非特許文献4）。チオール - エン架橋反応の合成応用には、自己修復ポリマー<sup>2</sup>（非特許文献2）、ナノゲル<sup>3</sup>（非特許文献3）、熱硬化性ポリマー、ヒドロゲル<sup>5</sup>（非特許文献5）、お

50

よびデンドリマー<sup>6</sup>（非特許文献6）が含まれる。チオール - エン架橋の一般的な生化学的応用には、*in vitro*での生物学的製剤の機能化または安定化<sup>7</sup>（非特許文献7）、および高次タンパク質構造とタンパク質間相互作用の探索<sup>8</sup>（非特許文献8）が含まれる。

#### 【0008】

ジチオラート - ジエン反応は、プラスチックからタンパク質に至るまでの物質の高次構造をテンプレート化することもできる。残念ながら、-エン（ene）部分は生体直交性ではなく、例えばホスファターゼおよびシステインプロテアーゼの孤立した触媒システイン残基など、タンパク質機能に不可欠な生物学的環境における数百ものシステイン残基の多くに無差別に結合する。これにより、チオール - エン反応の*in vivo*適用を制限する毒性レベルがもたらされる。

10

#### 【0009】

これらのチオール - エン架橋ツールの欠点の1つは、それらが架橋選択的でないことである。これらのツールは、2つの官能基がたまたま到達範囲内にある場合を除き、末端の「デッドエンド」修飾（“dead-end” modification）を形成する<sup>9</sup>（非特許文献9）。デッドエンド修飾は生体内で有毒である；特に、必須の触媒システイン（例えば、ホスファターゼおよびシステイン [Cys] プロテアーゼ）の修飾、および有害な免疫応答のリスクを高める「非自己」エピトープの作成<sup>9</sup>（非特許文献9）。この固有の毒性および乏しい細胞透過性が、*in vivo*架橋の使用の障害となっている。

20

#### 【先行技術文献】

##### 【非特許文献】

#### 【0010】

【非特許文献1】Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., *Angew. Chem., Int. Ed.* 2001, 40 (11), 2004 - 2021

【非特許文献2】Kuhl, N.; Geitner, R.; Vitz, J.; Bode, S.; Schmitt, M.; Popp, J.; Schubert, U. S.; Hager, M. D., *J. Appl. Polym. Sci.* 2017, 134 (19), 1 - 8

【非特許文献3】Lockhart, J. N.; Beezer, D. B.; Stevens, D. M.; Spears, B. R.; Harth, E., *J. Control. Release* 2016, 244, 366 - 374

【非特許文献4】Hoyle, C. E.; Bowman, C. N., *Angew. Chem., Int. Ed.* 2010, 49 (9), 1540 - 1573

30

【非特許文献5】Wang, J. Q.; Zhang, F. J.; Tsang, W. P.; Wan, C.; Wu, C., *Biomaterials* 2017, 120, 11 - 21

【非特許文献6】Killops, K. L.; Campos, L. M.; Hawker, C. J., *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130 (15), 5062 - 5064

【非特許文献7】Marculescu, C.; Kossen, H.; Morgan, R. E.; Mayer, P.; Fletcher, S. A.; Tolner, B.; Chester, K. A.; Jones, L. H.; Baker, J. R., *Chem. Commun.* 2014, 50 (54), 7139 - 7142

【非特許文献8】Auclair, J. R.; Boggio, K. J.; Petsko, G. A.; Ringe, D.; Agar, J. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010, 107 (50), 21394 - 21399

【非特許文献9】Konermann, L.; Vahidi, S.; Sowole, M. A., *Anal. Chem.* 2014, 86 (1), 213 - 232

40

#### 【発明の概要】

##### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0011】

したがって、ジチオラート - ジエン反応におけるジエンの生体適合性代替物が必要とされている。あるいはまたは加えて、チオールを架橋することへの選択性が改善された化学ツールが必要とされている。あるいはまたは加えて、幅広いクラスの生体分子に適用できる、新規で、簡単で、清潔で、かつ高効率な固定化反応（immobilization chemistry）が必要とされている。

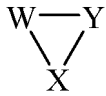
##### 【課題を解決するための手段】

50

## 【 0 0 1 2 】

第 1 の態様では、本開示は、分子の共有結合の方法を提供し、その方法は、式 I の部分を含む複数の第 1 の分子を提供し：

## 【 化 1 】



式 I

10

式中、

W は、S および S e からなる群より独立して選択され；

Y は、S、S e、S ( O )、S e ( O )、S ( O )<sub>2</sub> および S e ( O )<sub>2</sub> からなる群より独立して選択され；

X は W および Y と一緒になって、置換または非置換の 3 ~ 10 員の複素環を形成する；

前記複数の第 1 の分子を、少なくとも 1 つのチオール官能基を含む複数の第 2 の分子と接触させ、

それによって前記第 1 の分子の S または S e 原子と前記第 2 の分子の遊離チオール基との間に複数の共有結合を形成する

20

ことを含む。

## 【 0 0 1 3 】

第 2 の態様では、本開示は、第 1 のモノマーおよび第 1 の架橋剤から誘導されるポリマーを提供し、

前記第 1 のモノマーは、少なくとも 2 つのチオール官能基を含み、

前記第 1 の架橋剤は、式 I の部分を含む；

## 【 化 2 】



式 I

30

式中、

W は、S および S e からなる群より独立して選択され；

Y は、S、S e、S ( O )、S e ( O )、S ( O )<sub>2</sub> および S e ( O )<sub>2</sub> からなる群より独立して選択され；

X は W および Y と一緒になって、置換または非置換の 3 ~ 10 員の複素環を形成する。

## 【 0 0 1 4 】

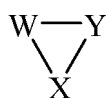
40

第 3 の態様では、本開示は、デンドリマーの製造方法を提供し、その方法は、

( i ) 少なくとも 3 つのチオール官能基を含む複数の第 1 のコアデンドリマー前駆体分子を提供し、

前記複数の第 1 のコアデンドリマー前駆体分子を、式 I の部分：

## 【化 3】



式 I

式中、

Wは、SおよびSeからなる群より独立して選択され；

10

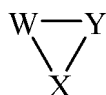
Yは、S、Se、S(O)、Se(O)、S(O)<sub>2</sub>およびSe(O)<sub>2</sub>からなる群より独立して選択され；

XはWおよびYと一緒にあって、置換または非置換の3～10員の複素環を形成する；を含む複数の第1の架橋剤と、チオール官能基と式Iの部分との間で反応が生じることができる条件下で接触させ、それによってコア前駆体 dendrimer 分子を架橋剤と共有結合により架橋させて dendrimer を形成することを含む、あるいは

(ii) 少なくとも3つの式Iの部分を含む複数の第2のコア dendrimer 前駆体分子を提供し；

## 【化 4】

20



式 I

式中、

Wは、SおよびSeからなる群より独立して選択され；

Yは、S、Se、S(O)、Se(O)、S(O)<sub>2</sub>およびSe(O)<sub>2</sub>からなる群より独立して選択され；

30

XはWおよびYと一緒にあって、置換または非置換の3～10員の複素環を形成する；

前記複数の第2のコア dendrimer 前駆体分子を、少なくとも2つのチオール官能基を含む複数の第2の架橋剤と、チオール官能基と式Iの部分との間で反応が生じることができる条件下で接触させ、それによってコア前駆体 dendrimer 分子を架橋剤と共有結合により架橋させて dendrimer を形成することを含む。

## 【0015】

一部の実施形態では、第1および第3の態様の方法、ならびに第2の態様のポリマーは、高収率で、立体選択性をもって、高い反応速度で進行し、さらに熱力学的駆動力により駆動されるため、クリックケミストリー反応を伴う。

## 【0016】

40

有利には、式Iの部分は、チオールを架橋するために使用されてきたジエン（または他の一般的に使用される求電子剤）よりも生体適合性が高い。

## 【0017】

第1～第3の態様の一部の実施形態において、

Xは  $-(CR^1R^2)_n-$  であり、ここでnは1、2、3、4、5、6、7および8からなる群より選択される整数であり、

各  $CR^1R^2$  基における各  $R^1$  および各  $R^2$  は、H、OH、NO<sub>2</sub>、CN、NH<sub>2</sub>、置換されていてもよいC<sub>1</sub>～C<sub>12</sub>アルキル、置換されていてもよいC<sub>2</sub>～C<sub>12</sub>アルケニル、置換されていてもよいC<sub>2</sub>～C<sub>12</sub>アルキニル、置換されていてもよいC<sub>2</sub>～C<sub>12</sub>ヘテロアルキル、置換されていてもよいC<sub>3</sub>～C<sub>12</sub>シクロアルキル、置換されていても

50



よい  $C_2 \sim C_{12}$  ヘテロシクロアルキル、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  ヘテロシクロアルケニル、置換されていてもよい  $C_6 \sim C_{18}$  アリール、置換されていてもよい  $C_1 \sim C_{18}$  ヘテロアリール、置換されていてもよい  $C_1 \sim C_{12}$  アルキルオキシ、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  アルケニルオキシ、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  アルキニルオキシ、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  ヘテロアルキルオキシ、置換されていてもよい  $C_3 \sim C_{12}$  シクロアルキルオキシ、置換されていてもよい  $C_3 \sim C_{12}$  シクロアルケニルオキシ、置換されていてもよい  $C_1 \sim C_{12}$  ヘテロシクロアルキルオキシ、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  ヘテロシクロアルケニルオキシ、置換されていてもよい  $C_6 \sim C_{18}$  アリールオキシ、置換されていてもよい  $C_1 \sim C_{18}$  ヘテロアリールオキシ、置換されていてもよい  $C_1 \sim C_{12}$  アルキルアミノ、 $CONR^3R^4$ 、 $NR^3COR^4$ 、 $NR^3COOR^4$ 、 $NR^3SO_2R^4$ 、 $NR^3CONR^3R^4$ 、および  $NR^3R^4$  からなる群より独立して選択され、

ここで、各  $R^3$  および  $R^4$  は、H、置換されていてもよい  $C_1 \sim C_{12}$  アルキル、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  アルケニル、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  アルキニル、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  ヘテロアルキル、置換されていてもよい  $C_3 \sim C_{12}$  シクロアルキル、置換されていてもよい  $C_3 \sim C_{12}$  シクロアルケニル、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  ヘテロシクロアルキル、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  ヘテロシクロアルケニル、置換されていてもよい  $C_6 \sim C_{18}$  アリール、および置換されていてもよい  $C_1 \sim C_{18}$  ヘテロアリールからなる群より独立して選択される。

#### 【0018】

第3の態様の一部の実施形態では、少なくとも3つのチオール官能基を含む複数の第1のコアデンドリマー前駆体分子は、1, 3プロパンジチオールまたは1, 4ブタンジチオールなどのジチオールと、2, 4, 6-トリス(アリールオキシ)-1, 3, 5-トリアジンなどのトリアルケンとの間のチオール-エン反応によって形成することができる。一部の実施形態では、この方法を使用して、コアデンドリマー前駆体分子とエクステンダー分子(extender molecule)の比によって特性を制御できる「自己修復」樹枝状超構造(“self-healing” dendritic superstructure)を作成することができる。あるいは、トリチオール化合物およびテトラチオール化合物を架橋して、少なくとも3つのチオール官能基を有するコアデンドリマー前駆体分子を提供することができる。架橋剤は、式Iの部分を含んでいてよい。

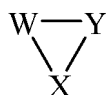
#### 【0019】

第4の態様では、本開示は、ポリマーまたはデンドリマーの製造方法を提供し、その方法は、

少なくとも2つのチオール官能基を含む複数の第1のモノマーを提供し、

前記複数の第1のモノマーを、式Iの部分：

#### 【化5】



式I

式中、

Wは、SおよびSeからなる群より独立して選択され；

Yは、S、Se、S(O)、Se(O)、S(O)<sub>2</sub>およびSe(O)<sub>2</sub>からなる群より独立して選択され；

XはWおよびYと一緒にあって、置換または非置換の3～10員の複素環を形成する；を含む複数の第1の架橋剤と、チオール官能基と架橋剤との間で反応が生じることができる条件下で接触させ、それによって架橋剤分子を介してモノマーを共有結合で架橋させる

ことによりポリマーまたはデンドリマーを形成することを含む。

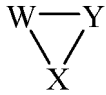
【0020】

第5の態様では、本開示は、物体、デバイス、またはアセンブリの表面をコーティングする方法を提供し、その方法は以下のステップを含む：

(a) 物体、デバイス、またはアセンブリの表面を提供する；

(b) 前記表面に、反応性部分と式Iの部分とを含む複数の第1の分子を接触させ：

【化6】



式I

10

式中、

Wは、SおよびSeからなる群より独立して選択され；

Yは、S、Se、S(O)、Se(O)、S(O)<sub>2</sub>およびSe(O)<sub>2</sub>からなる群より独立して選択され；

XはWおよびYと一緒にあって、置換または非置換の3～10員の複素環を形成する；

それによって表面と第1の分子の反応性部分との間に複数の共有結合を形成して、第1の単分子層を形成する。

20

【0021】

第5の態様の一例では、カルボキシ部分を使用して - リポ酸を表面に結合させることができる。これにより、(電子が適用される前に)機能性ジチオール(functionalized dithiol)とクリック反応を行って二分子層(すなわち、第1の二分子層)を形成することができる電気化学的に活性な単分子層(すなわち、第1の単分子層)が形成される。一部の実施形態では、第1の二分子層は半導体である。電子が適用された後、ジスルフィド結合が還元されて単分子層(すなわち、第2の単分子層)を作成することができる。一部の実施形態では、第2の単分子層は、金属をキレート化して二分子層(すなわち、第2の二分子層)を形成する。一部の実施形態では、第2の二分子層は、キレート化された金属の正体(identity)によって調整可能なP-Nギャップを有する半導体である。金属層に対して、三分子層用に、式Iの部分を含む複素環(例えば、環状ジスルフィドまたは環状チオスルフィナート)の第3の層がくる。一部の実施形態では、三分子層の形成は、金属の酸化還元状態に依存し、これは印加電圧によって制御することができる。一部の実施形態では、三分子層システムは電池である。一部の実施形態において、環状チオスルフィナートは、第二世代のリチウムイオン電池で使用されるS8と同様に作用する。

30

【0022】

第1、第3および第4の態様の方法は、自己修復ポリマー、ヒドロゲル、ナノゲル、薄膜、金属ナノ粒子、および物質内の2つの層を作成するために使用できる反応を提供し、また第2の態様は、自己修復ポリマー、ヒドロゲル、ナノゲル、薄膜、金属ナノ粒子、および物質内の2つの層を作成するために使用できるポリマーを提供する。一部の実施形態において、それら方法およびポリマーは、表面の機能化、腐食防止、緩和(pacifying)、および不動態化(passivating)に使用することができる。一部の実施形態では、その方法およびポリマーは、合成クリックケミストリーに使用することができる。一部の実施形態では、その方法およびポリマーを使用して、フォトクロミック剤およびフラボラント(flavorant)を作成することができる。一部の実施形態では、その方法およびポリマーは、イオン液体の機能化に使用することができる。一部の実施形態において、その方法およびポリマーは、自己組織化単分子層および分子スケールエレクトロニクスを作成するために使用することができる。一部の実施形態では、その方法およびポリマーを超伝導体を使用することができる。一部の実施形態では、その方法およびポリマーを電池に使用するこ

40

50

とができる。

【 0 0 2 3 】

第 1、第 3 および第 4 の態様で生じる反応、ならびに第 2 の態様のポリマーの重要な特徴には以下のものが含まれる：1) 単一チオラートへの結合は可逆的であるが、ジチオール架橋はそうではない；2) 脱離基は、架橋時にのみ消費される；3) ジスルフィド結合が第 1 のチオール部分に形成されると、第 2 のチオール部分の EC は急激に増加する（すなわち、閉環を介した第 1 のチオールからの解放と架橋形成は類似のエントロピーを有する）；4) 架橋は、S - S、S - S e または S e - S e 結合のかなりの結合エンタルピーと水の形成によって促進される；高収量；および確立された立体選択性；5) カルボン酸塩、アミン、およびジスルフィドを含む他の反応性官能基が回避される。

10

【 0 0 2 4 】

トランスフェリン受容体の C y s への可逆的な環状ジスルフィドの結合はこれまで、薬物カージョ送達 (drug cargo delivery) などの細胞膜を横切る輸送に利用されてきた。これに基づき、式 I の化合物は同様の用途に使用することができる。したがって、第 6 の態様において、本明細書は、細胞膜を通して目的分子を輸送する方法を提供し、その方法は、

( a ) 式 I の部分を含む目的機能性分子 ( functionalized molecule of interest ) を提供する；

【 化 7 】

20



式 I

式中、

W は、S および S e からなる群より独立して選択され；

Y は、S、S e、S ( O )、S e ( O )、S ( O )<sub>2</sub> および S e ( O )<sub>2</sub> からなる群より独立して選択され；

30

X は W および Y と一緒になって、置換または非置換の 3 ~ 10 員の複素環を形成する；

( b ) 前記式 I の部分が 1 つ以上の細胞膜輸送タンパク質に可逆的に結合する条件下で、目的細胞を前記目的機能性分子と接触させ、

それによって細胞膜を横切る目的分子の輸送を促進することを含む。

【 0 0 2 5 】

本発明の実施形態を、添付の図面を参照して説明する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 6 】

【 図 1 A 】 理論に束縛されることなく、環状ジスルフィドおよび環状チオスルフィナートを使用したチオール架橋の提案メカニズム。最初のジスルフィド結合の形成は可逆的である。エントロピー的に好ましい閉環により、デッドエンド修飾 ( dead-end modification ) が最小限に抑えられる ( メカニズム I )。架橋は、C y s<sub>A</sub> と、チオラート<sub>B</sub> の律速 S 酸化 ( メカニズム I I ) または環状チオスルフィナート ( メカニズム I I I ) のいずれかに由来するスルフェン酸との縮合により進行する。

40

【 図 1 B 】 図 1 A で提案されたメカニズムによる非酵素反応のポテンシャルエネルギー局面。自由エネルギー値は、 $M06 - 2X / 6 - 311 + G ( d , p ) I E F - P C M ^ { H 2 O } / / M06 - 2X / 6 - 31 + G ( d , p ) I E F - P C M ^ { H 2 O }$  を使用して計算する。

\* 上側の点線は、5 の酸化のゼロ次半減期速度論 ( zeroth - order half - life kinetics ) から導かれる活性化障壁を示す。D F T で計算して “  $G = - 132 . 4 \text{ k c a l m o}$

50

$1 \cdot 1$ ; S-S結合および水の形成の公開されたエンタルピーから計算して  $G = -131 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。1および5へのMeS<sup>-</sup>の求核付加の遷移構造を示す。結合長とエネルギー値は、それぞれ  $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  で報告されている。

【図2A】環状チオスルフィナートによるチオール架橋は、*in vitro*および細胞内でSOD1二量体を速度論的に安定化する。代表的な生の質量スペクトル(左)およびデコンボリューション処理を行った質量スペクトル(右)。架橋二量体(D)の分子量31,808 Daは、図1Aで提案されたメカニズムを裏付ける(例えば、2つのSOD1単量体[2x15,844 Da(M)]+1,2-ジチアン-1-オキシド[136 Da]-酸素[16 Da])。

【図2B】図2Aの代表的なデータを架橋率の計算に使用した。10分のインキュベーション後、1,2-ジチアン-1-オキシドおよび1,2-ジチアンはそれぞれ、SOD1の95%および0%を架橋した。

【図2C】環状ジスルフィド架橋剤の反応速度がチオール酸化により制限されることに合致して、1,2-ジチアンは、3日後にSOD1の11%しか架橋しない。様々な濃度の化合物と30分間インキュベートしたHep G2細胞からのSOD1のウェスタンブロット。1,2-ジチアン-1-オキシド架橋のEC<sub>50</sub>は、Hep G2およびHELA細胞で1~5 μMであった。

【図3】1,2-ジチアン-1-オキシドの架橋半減期の決定。Singhら<sup>13</sup>のプロトコルに従って一連の複数濃度速度反応実験を行い、環状チオスルフィナート媒介架橋生成物形成の全体的な二次速度定数が  $1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{分}^{-1}$  であることを特定し、その値を、その実験条件下で、SOD1を1,2-ジチアン-1-オキシドで架橋させるための予測半減期3分に外挿した。ここに示されているのは、50 μMのSOD1を20倍過剰の1,2-ジチアン-1-オキシド(1 mM)と共に用いる1つの濃度での代表的な結果である。

【図4】1,2-ジチアン-1-オキシド架橋部位の確認。1,2-ジチアン-1-オキシドとインキュベートした野生型(WT)およびCys<sub>111</sub>Ser SOD1のLC-MS分析。SOD1変異体であるCys<sub>111</sub>Serは共有結合二量体形成を示さず、1,2-ジチアン-1-オキシド架橋の位置がSOD1の二量体界面におけるCys<sub>111</sub>ペアであることを確認する。

【図5】1,2-ジチアン+SOD1反応の完全な反応速度論。50 μMのSOD1を20倍過剰の1,2-ジチアンとインキュベートすると、図1Aで提案したメカニズムと整合する予想二量体質量31,808 Daでのゆっくりとした(環状チオスルフィナートと比較して)架橋形成を示す。

【図6】1,2-ジチアン-1-オキシドは、HELA細胞においてWT SOD1を架橋する。漸増濃度の環状チオスルフィナート(1,2-ジチアン-1-オキシド)で処理したHELA細胞から抽出したSOD1のウェスタンブロットは、SOD1の1,2-ジチアン-1-オキシド架橋のEC<sub>50</sub>が約5 μMであることを示す。

【図7】1,2-ジチアン-1-オキシドの細胞生存アッセイ。様々な濃度の1,2-ジチアン-1-オキシドとインキュベートしたSH-SY5Y細胞は、測定されたEC<sub>50</sub>よりも50倍高い架橋剤濃度で細胞生存率が未処理細胞と同等であり、LC<sub>50</sub>がEC<sub>50</sub>のおよそ200倍であることを示す。

【図8】環状チオスルフィナートである-リポ酸は、Hep G2細胞においてSOD1を架橋し、環状ジスルフィドである-リポ酸よりも効率的に架橋する。漸増濃度のリポ酸(および)で処理したHep G2から抽出したSOD1のウェスタンブロットは、1-オキシド形態が*in vivo*架橋を増加させることを示す(変性SDS-PAGEの後、SOD1二量体(矢印)の形成によって測定)。

【図9】SOD1の-リポ酸架橋と-リポ酸架橋の質量分析アッセイ。SOD1の共有結合架橋の速度と程度の両方が、-リポ酸の-リポ酸への酸化により高められる。

【図10A】1,2-ジチアン-1-オキシドの架橋効率。SOD1を10倍(10x)の1,2-ジチアン-1-オキシドとインキュベートする。

10

20

30

40

50

【図 10 B】10 倍 (10 x) の 1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドおよび 100 倍 (100 x) の還元型グルタチオンでの架橋効率は、過剰なグルタチオンの存在下でさえ、1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドが SOD1 を効率的に架橋できることを示す。グルタチオンの存在下で、架橋の速度は低下したが、架橋収率 (100%) は影響を受けなかった。

【図 11】1, 2 - ジチアン - 1 - オキシド / DTT 競合の質量分析アッセイ。様々な DTT 濃度で 24 時間インキュベートした SOD1 サンプルは、架橋剤 : DTT = 1 : 1 で、1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドが SOD1 のチオールペアを架橋する能力を確認する。

【図 12】それぞれ、MeS<sup>-</sup>、1, 2 - ジチアン、および 1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドの HOMO および LUMO のエネルギー。M06 - 2X / 6 - 311++G(d, p) IEF - PCM<sup>H<sub>2</sub>O</sup> / M06 - 2X / 6 - 31 + G(d, p) を使用して計算した。

【図 13】1, 2 - ジチエパン - 1 - オキシドを使用した SOD1 の架橋。1, 2 - ジチエパン - 1 - オキシドは、1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドと同じ提案されたメカニズムに従って、SOD1 の迅速かつ完全な架橋を形成するが、1, 2 - ジチエパンはそうではない。観察された共有結合二量体 (D) は 31, 824 Da (2 つの SOD1 単量体 [2 x 15, 844 Da] + 1, 2 - ジチエパン - 1 - オキシド [152 Da] - 酸素 [16 Da]) に現れた。

【図 14】環状チオスルフィナート媒介重合。すべての混合物はポリエチレンジチオールを含んでいた。左から右に、混合物は、促進剤を含まない (-)、トリチオシアヌル酸を含む、トリメチロールプロパントリス (3 - MP) を含む、およびペンタエリスリトールテトラ (3 - MP) を含むであり、また 1, 2 - ジチアン - 1 - オキシド架橋剤を含むかまたは架橋剤を含まない (-) のいずれかである。固体の塊への矢印はポリマーを示す；混合物への矢印は、推定ナノ粒子を示す。MP = 3 - メルカプトプロピオナート。

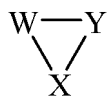
【図 15】1, 2 - ジチオカン - 1 - オキシドを使用した SOD1 の架橋。1, 2 - ジチオカン - 1 - オキシドは、1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドと同じ提案されたメカニズムに従って、SOD1 の迅速かつ完全な架橋を形成するが、1, 2 - ジチオカンはそうではない。観察された共有結合二量体 (D) は 31, 834 Da (2 つの SOD1 単量体 [2 x 15, 844 Da] + 1, 2 - ジチオカン - 1 - オキシド [162 Da] - 酸素 [16 Da]) に現れた。

【発明を実施するための形態】

【0027】

本明細書では、チオールおよびチオラートを架橋するためのより生体適合性の高い方法に焦点を合わせて、ポリマー、ポリマーの製造方法、および組成物を開示する。本開示の一部の実施形態において、ポリマー、製造方法、および組成物は、ジチオールおよびジチオラートと複素環との反応に焦点を合わせる。本開示の一部の実施形態において、ポリマー、製造方法、および組成物は、チオールおよびチオラートと複素環との反応に焦点を合わせる。一部の実施形態では、複素環は式 I の部分を含む：

【化 8】



式 I

式中、

W は、S および Se からなる群より独立して選択され；

Y は、S、Se、S(O)、Se(O)、S(O)<sub>2</sub> および Se(O)<sub>2</sub> からなる群より独立して選択され；

10

20

30

40

50

XはWおよびYと一緒にあって、置換または非置換の3～10員の複素環を形成する。環状ジスルフィドでは、WおよびYはSである。一部の実施形態では、複素環は環状チオスルフィナートであり、WはSであり、YはS(O)である。一部の実施形態では、複素環は環状ジセレニドであり、WおよびYはSeである。一部の実施形態では、複素環は環状セレノセレノキシドであり、WはSeであり、YはSe(O)である。一部の実施形態では、複素環は環状セレノスルフィドであり、WはSeであり、YはSである；または、WはSであり、YはSeである。一部の実施形態において、複素環は環状セレノスルフィナートであり、WはSeであり、YはS(O)である。一部の実施形態では、複素環は環状チオセレノキシドであり、WはSであり、YはSe(O)である。

#### 【0028】

チオール、チオラート、ジチオール、およびジチオラートは、様々な化学反応で利用される。一部の実施形態では、式Iの部分を含む複素環を用いて、チオール-求電子剤媒介架橋における求電子剤（例えば、-エン分子、-イン分子、マイケルアクセプタなど）を置き換える。一部の実施形態では、式Iの部分を含む複素環は、自己修復ポリマー<sup>8</sup>、ヒドロゲル<sup>9</sup>、ナノゲル<sup>10</sup>、薄膜<sup>11</sup>、金属ナノ粒子<sup>12</sup>、および物質内の2つの層<sup>13</sup>の架橋において、チオール、チオラート、ジチオール、またはジチオラートと反応する。一部の実施形態において、本明細書に記載の反応および方法は、表面の機能化<sup>14</sup>、腐食防止<sup>15</sup>、緩和<sup>16</sup>および不動態化に使用される。一部の実施形態では、本明細書に記載の反応および方法は、合成クリックケミストリーに使用される（例えば、ベンゼンジチオールなどのジチオールを使用して、オキソ環状ジスルフィドと反応させる）。一部の実施形態では、本明細書に記載の反応および方法は、クリックケミストリーを触媒する（Cuリガンドとして機能する）<sup>17</sup>。一部の実施形態では、本明細書に記載の反応および方法は、フォトクロミック剤<sup>18</sup>およびフラポラントを作成するために使用される。一部の実施形態において、本明細書に記載の反応および方法は、イオン液体の機能化に使用される<sup>19</sup>。一部の実施形態では、本明細書に記載の反応および方法を使用して、自己組織化単分子層および分子スケールエレクトロニクスを作成する<sup>20</sup>。一部の実施形態では、本明細書に記載の反応および方法は、超伝導体に使用される<sup>21</sup>。一部の実施形態では、本明細書に記載の反応および方法は、リチウム硫黄電池の容量維持に使用される<sup>22</sup>。in vitro重合および表面化学に使用される最も一般的なメカニズムはそれぞれ、チオール-エンクリックケミストリー（ラジカル型とマイケル型の両方）および金属ライゲーションである。

#### 【0029】

一部の実施形態において、本明細書に記載の反応および方法は、ジエンの使用に類似しており、ジエンが式Iの部分を含むより生体適合性の高い複素環（例えば、環状ジスルフィド）によって置き換えられる。本明細書に記載の方法は、環状ジスルフィドが式Iの基として使用されるときは常にBarcan<sup>23</sup>の方法と異なり、また環状ジスルフィドが架橋剤として使用されないときは、環状ジスルフィド当たり1つのジチオールを使用し、したがって、キャップ/機能化される必要のある遊離チオールの形成をもたらさないことによりBarcanの方法とは異なる（バルカンの場合、マレイミドのチオール-エン反応を使用する）。

#### 【0030】

本明細書に記載の反応および方法は、選択的に架橋を形成できる化学ツールの必要性に対処する。現代のチオール選択的架橋剤は、例えば、アクセス可能なすべてのチオールを修飾するが、サブセット間で架橋を形成するのみである。結果として生じる孤立(lone)チオールの末端「デッドエンド」修飾は有毒であり、高分子構造の架橋ベースの研究を混乱させ、ポリマー合成における望ましくなくそして現在回避できない副産物である。

#### 【0031】

チオラート-エン「クリック」ケミストリーにより例示されるように、チオラートの独特な特性は、高度に選択的な反応を可能にする。ジチオール-ジエン反応パートナーは、高次構造をテンプレート化することができ、ポリマー合成において、生化学的プローブに

10

20

30

40

50

において、およびタンパク質を安定化するために (*in vitro* で) 使用される。残念ながら、エンは無数の必須タンパク質のシステイン残基と反応し、*in vivo* での適用性を制限する毒性をもたらす。チオラートペアを架橋するためのより生体適合性が高いおよび/または選択的な方法が求められていた。環状チオスルフィナート ( 耐容性に優れた環状ジスルフィド天然物の S - オキソ誘導体 ) は、ジチオールを選択的に架橋すると推論された。理論に拘束されることなく、以下のメカニズムが提案される: チオスルフィナートジスルフィドに対するチオラート A ( 例えば、Cys<sub>A</sub> ) による求核攻撃は、環開裂に付随するチオラート - ジスルフィド交換、およびジスルフィドテザード ( disulfide - tethered ) 末端スルフェン酸部分をもたらす ( 図 1 A )。次に、スルフェン酸の硫黄に対するチオラート B の求核攻撃により、水の放出に連動した第 2 のジスルフィド結合の形成および架橋がもたらされる ( 図 1 A )。環状セレノセレノキシド、環状チオセレノキシド、および環状セレノスルフィナートでも同様のメカニズムが生じると推論された。

10

#### 【 0 0 3 2 】

一部の実施形態では、ジチオール - 環状チオスルフィナート化学の重要な属性には以下のものが含まれる: 1 ) 孤立システイン ( 例えば、架橋剤との反応が望まれないヒトタンパク質 ) への回避結合は可逆的であるが、ジチオールへの架橋はそうではない; 2 ) 架橋ステップは、ジスルフィド結合と水形成の相当の結合エンタルピーによって駆動される; 3 ) 他のタンパク質官能基との直交性、高反応収率、迅速な反応、立体選択性、水性溶媒との適合性、および既存の第 2 周期元素のシステムよりも桁違いに高い環ひずみ依存性を含む、クリックケミストリーの属性のほとんど。

20

#### 【 0 0 3 3 】

Cu / Zn - スーパーオキシドジスムターゼ ( SOD1 ) のチオールペアを使用して、環状ジスルフィド ( 薬物 / 栄養補助剤のリポ酸を含む ) がチオールペアを効率的に架橋するが、デッドエンド修飾を回避することが実証された。環状ジスルフィドに対するチオラート指向性求核攻撃により、チオール - ジスルフィド交換および環開裂が生じた。結果として得られたジスルフィドテザード末端チオラート部分は、逆反応を導いて環状ジスルフィドを放出するか、あるいは酸化ジスルフィド ( 架橋 ) 形成に参加した ( 図 1 A )。環状ジスルフィドのモノ - S - オキソ誘導体は、環開裂の後すぐに末端スルフェン酸を形成し、これまで律速段階であったチオール酸化を不要にして、新たな律速段階である環開裂を加速するという仮説が立てられ、密度汎関数理論 ( DFT ) 計算で確認された。理論に束縛されることなく、DFT 計算は、環開裂の加速の発端が、チオラート - ジスルフィド交換の遷移におけるフロンティア分子軌道の重なり改善であることを示唆する ( 図 1 B )。5 ~ 7 員の環状チオスルフィナートが合成され、環状ジスルフィド前駆体よりも最高 104 倍速く効率的に架橋し; 生物学的濃度のグルタチオンの存在下で機能し; さらに、細胞透過性で、強力な、耐容性である細胞内架橋剤として機能した。一部の実施形態において、この新規クラスのチオール架橋剤は、ジスルフィドおよび水形成のエンタルピーによって駆動される高収率、一般の官能基との直交性、水適合性、および環ひずみ依存性を含む、クリック様の属性を示した。

30

#### 【 0 0 3 4 】

この反応では、孤立チオラートへの結合が可逆的であり、理想的に有利であることが必要である ( 図 1 A、一番上 )。環状ジスルフィドの高い効果濃度 ( 「EC」 ) - すなわち、環状ジスルフィドのエントロピーにより駆動される酸化されて環状のままである傾向 - が、単一チオラートへの可逆的結合を可能にすると推論された。環状ジスルフィドのチオラートへの共有結合は、S<sub>N</sub>2 チオラート - ジスルフィド交換により急速に進行させることができる。これは、薬物カーゴ送達に利用されてきた - カーゴは、トランスフェリン受容体の Cys への可逆的な環状ジスルフィドの結合を介して細胞膜を横切って輸送される<sup>2 4</sup>。重要なこととして、環状ジスルフィドの反応性 ( および EC ) の環ひずみ ( 特に C - S - S - C 二面角 ) 依存性は、第 2 周期元素で構成される環よりもはるかに大きい<sup>2 5</sup>。言い換えれば、環状ジスルフィドの反応性は予測可能であり、高度に調整可能である。

40

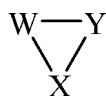
#### 【 0 0 3 5 】

50

したがって、本明細書では、細胞膜を横切って目的分子を輸送する方法も提供し、その方法は、

(a) 式 I の部分を含む目的機能性分子を提供する：

【化 9】



式 I

10

式中、

Wは、SおよびSeからなる群より独立して選択され；

Yは、S、Se、S(O)、Se(O)、S(O)<sub>2</sub>およびSe(O)<sub>2</sub>からなる群より独立して選択され；

XはWおよびYと一緒に、置換または非置換の3～10員の複素環を形成する；

(b) 式 I の部分が1つまたは複数の細胞膜輸送タンパク質に可逆的に結合する条件下で、目的細胞を目的機能性分子と接触させ、

それによって細胞膜を横切る目的分子の輸送を促進させる

ことを含む。

20

【0036】

一部の実施形態では、細胞膜輸送タンパク質は、ATP駆動ポンプタンパク質、イオンチャネルタンパク質、または輸送体タンパク質である。一部の実施形態では、細胞膜輸送タンパク質はトランスフェリン受容体である。

【0037】

環状ジスルフィドは酸化剤なしではジチオラートを架橋できない - 第2のジスルフィド結合を形成するには、追加の二電子酸化が必要である(図1A、真ん中)。S-オキソ-環状ジスルフィド(環状チオスルフィナート)を使用すると、オキソ基は、第2のジスルフィドの形成および不可逆的な架橋に付随して水として脱離できると推論された(図1A、一番下)。要約すると、環状チオスルフィナートに対するチオラート<sub>A</sub>による求核攻撃は、チオラート-ジスルフィド交換をもたらす。末端のスルフェン酸が露出し、チオラート<sub>B</sub>に攻撃される。スルフェン酸素が第2のジスルフィドの酸化的形成に付随して還元され、ジチオラート架橋をもたらす。

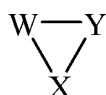
30

【0038】

したがって、本明細書では、分子の共有結合の方法を提供する。その方法は、

式 I の部分を含む複数の第1の分子を提供する：

【化 10】



式 I

40

式中、

Wは、SおよびSeからなる群より独立して選択され；

Yは、S、Se、S(O)、Se(O)、S(O)<sub>2</sub>およびSe(O)<sub>2</sub>からなる群より独立して選択され；

XはWおよびYと一緒に、置換または非置換の3～10員の複素環を形成する；

前記複数の第1の分子を、少なくとも1つのチオール官能基を含む複数の第2の分子と

50



接触させ、

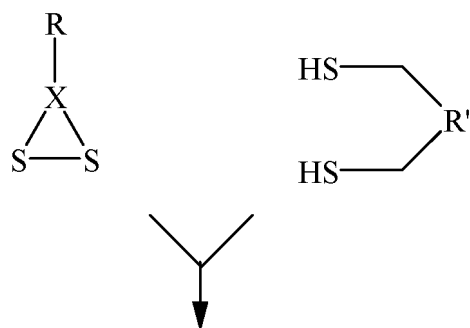
それによって第 1 の分子の S または S e 原子と第 2 の分子の遊離チオール基との間に複数の共有結合を形成する

ことを含む。

【 0 0 3 9 】

一部の実施形態では、式 I において W および Y は S である。これらの実施形態では、反応は一般に次のように表すことができる：

【 化 1 1 】



10

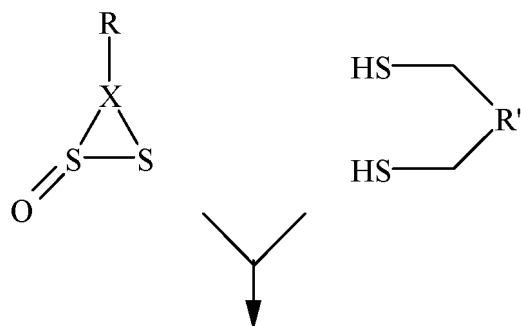
20

式中、R および R ' は、目的分子であるか、または目的分子に結合したリンカー基である。

【 0 0 4 0 】

一部の実施形態では、式 I において、W は S であり、Y は S ( O ) である。これらの実施形態では、反応は次のように表すことができる：

【 化 1 2 】



30

式中、R および R ' は、目的分子であるか、または目的分子に結合したリンカー基である。

【 0 0 4 1 】

上記の各反応において、式 I の基の硫黄原子の 1 つまたは複数をセレン原子と交換することができる。

【 0 0 4 2 】

この反応は、チオール基と式 I の部分との間で反応が生じ、それによって第 1 の分子を第 2 の分子に共有結合で架橋させることができる条件下で行われる。一部の実施形態では、第 1 の分子の複数の S または S e 原子と第 2 の分子の複数の遊離チオール基との間に複数の共有結合が形成される。

【 0 0 4 3 】

式 I において W および Y が S または S e ( すなわち、環状ジスルフィドまたは環状ジセレニド ) である場合、その条件は一般に、酸化剤で反応混合物を処理することを含む。こ

50

の目的のために過酸および過酸化物を使用してよい。硫黄またはセレンを酸化するために使用できる様々な酸化剤が当技術分野で知られており、使用することができる。例として、*m*-クロロペルオキシ安息香酸 (mCPBA) および過酸化水素が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0044】

その条件は、適切な溶媒中において2つの目的分子を互いに接触させることを含んでよい。適切な溶媒には、水、DMSO、DMF、メタノール、エタノール、プロパノール、ジクロロメタン、およびそれらの混合物が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0045】

一部の実施形態では、1, 2-ジチアンおよび1, 2-ジチアン-1-オキシドを、本明細書に記載のポリマー、ポリマーの製造方法、および組成物において使用する。上記および下記の式Iの部分の一部の実施形態において、

Xは $-(CR^1R^2)_n-$ であり、ここでnは1、2、3、4、5、6、7および8からなる群より選択される整数であり；

各 $CR^1R^2$ 基における各 $R^1$ および各 $R^2$ は、H、OH、NO<sub>2</sub>、CN、NH<sub>2</sub>、置換されていてもよいC<sub>1</sub>~C<sub>12</sub>アルキル、置換されていてもよいC<sub>2</sub>~C<sub>12</sub>アルケニル、置換されていてもよいC<sub>2</sub>~C<sub>12</sub>アルキニル、置換されていてもよいC<sub>2</sub>~C<sub>12</sub>ヘテロアルキル、置換されていてもよいC<sub>3</sub>~C<sub>12</sub>シクロアルキル、置換されていてもよいC<sub>2</sub>~C<sub>12</sub>ヘテロシクロアルキル、置換されていてもよいC<sub>2</sub>~C<sub>12</sub>ヘテロシクロアルケニル、置換されていてもよいC<sub>6</sub>~C<sub>18</sub>アリール、置換されていてもよいC<sub>1</sub>~C<sub>18</sub>ヘテロアリール、置換されていてもよいC<sub>1</sub>~C<sub>12</sub>アルキルオキシ、置換されていてもよいC<sub>2</sub>~C<sub>12</sub>アルケニルオキシ、置換されていてもよいC<sub>2</sub>~C<sub>12</sub>アルキニルオキシ、置換されていてもよいC<sub>2</sub>~C<sub>12</sub>ヘテロアルキルオキシ、置換されていてもよいC<sub>3</sub>~C<sub>12</sub>シクロアルキルオキシ、置換されていてもよいC<sub>3</sub>~C<sub>12</sub>シクロアルケニルオキシ、置換されていてもよいC<sub>1</sub>~C<sub>12</sub>ヘテロシクロアルキルオキシ、置換されていてもよいC<sub>2</sub>~C<sub>12</sub>ヘテロシクロアルケニルオキシ、置換されていてもよいC<sub>6</sub>~C<sub>18</sub>アリールオキシ、置換されていてもよいC<sub>1</sub>~C<sub>18</sub>ヘテロアリールオキシ、置換されていてもよいC<sub>1</sub>~C<sub>12</sub>アルキルアミノ、CONR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>、NR<sup>3</sup>COR<sup>4</sup>、NR<sup>3</sup>COOR<sup>4</sup>、NR<sup>3</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>4</sup>、NR<sup>3</sup>CONR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>、およびNR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>からなる群より独立して選択され；

ここで、各 $R^3$ および $R^4$ は、H、置換されていてもよいC<sub>1</sub>~C<sub>12</sub>アルキル、置換されていてもよいC<sub>2</sub>~C<sub>12</sub>アルケニル、置換されていてもよいC<sub>2</sub>~C<sub>12</sub>アルキニル、置換されていてもよいC<sub>2</sub>~C<sub>12</sub>ヘテロアルキル、置換されていてもよいC<sub>3</sub>~C<sub>12</sub>シクロアルキル、置換されていてもよいC<sub>3</sub>~C<sub>12</sub>シクロアルケニル、置換されていてもよいC<sub>2</sub>~C<sub>12</sub>ヘテロシクロアルキル、置換されていてもよいC<sub>2</sub>~C<sub>12</sub>ヘテロシクロアルケニル、置換されていてもよいC<sub>6</sub>~C<sub>18</sub>アリール、および置換されていてもよいC<sub>1</sub>~C<sub>18</sub>ヘテロアリールからなる群より独立して選択される。

#### 【0046】

上記および下記の式Iの部分の一部の実施形態において、WおよびYはSである。一部の他の実施形態では、WはSであり、YはS(O)である。一部の他の実施形態では、WおよびYはSeである。一部の他の実施形態では、WはSeであり、YはSe(O)である。一部の他の実施形態では、WはSであり、YはSである。一部の他の実施形態では、WはSであり、YはSeである。一部の他の実施形態では、WはSeであり、YはS(O)である。一部の他の実施形態では、WはSであり、YはSe(O)である。

#### 【0047】

上記および下記の一部の実施形態では、WおよびYはSであり、式Iの部分は、

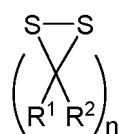
10

20

30

40

## 【化 1 3】



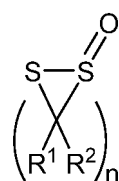
により表され、ここで  $n$  は 1 ~ 8 の整数である。

## 【0048】

10

上記および下記の一部の実施形態では、 $W$  は  $S$  であり、 $Y$  は  $S(O)$  であり、式 I の部分は、

## 【化 1 4】



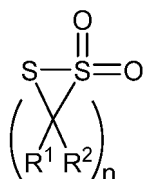
20

により表され、ここで  $n$  は 1 ~ 8 の整数である。

## 【0049】

上記および下記の一部の実施形態では、 $W$  は  $S$  であり、 $Y$  は  $S(O)_2$  であり、式 I の部分は、

## 【化 1 5】



30

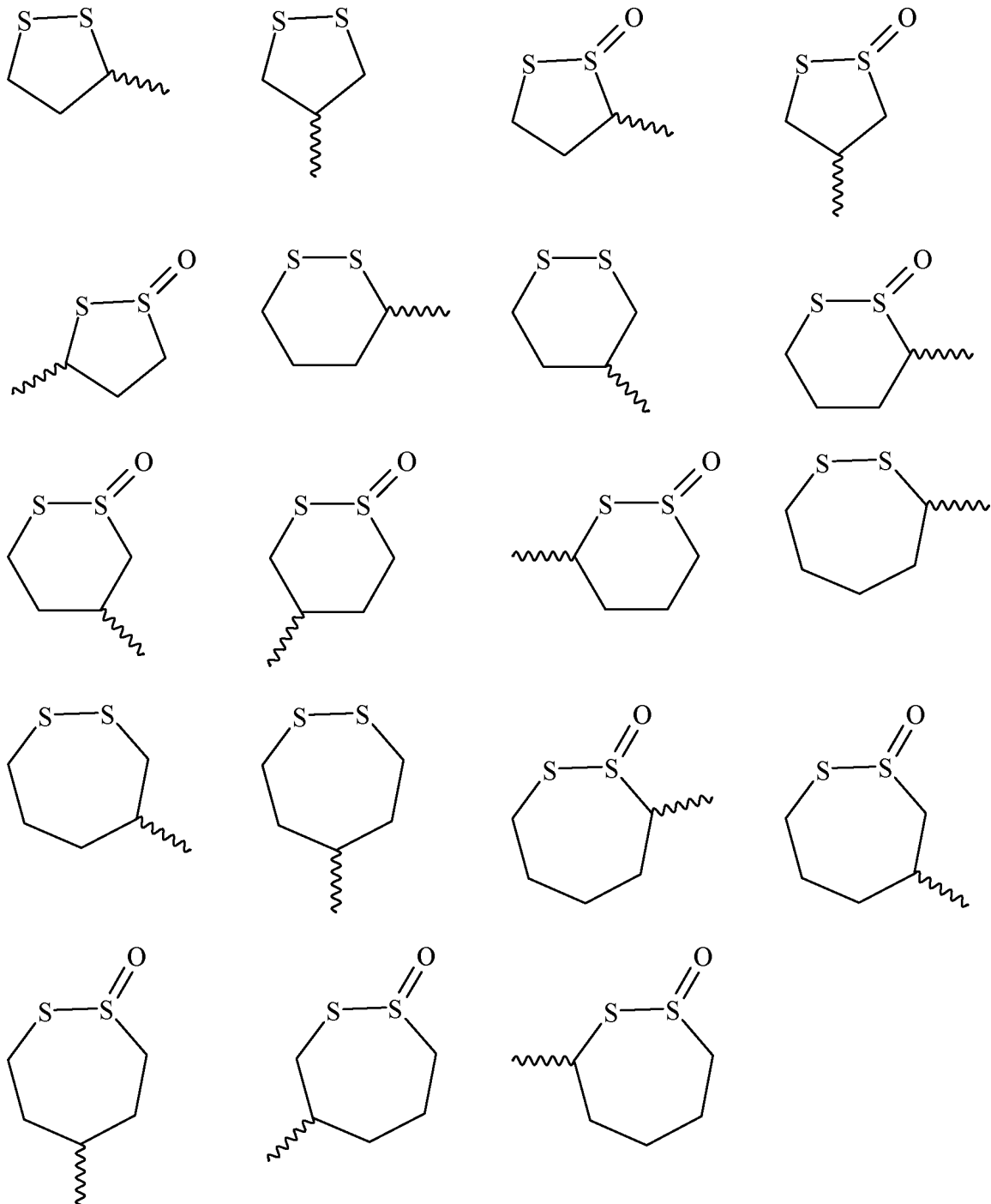
により表され、ここで  $n$  は 1 ~ 8 の整数である。

## 【0050】

上記および下記の式 I の部分の一部の実施形態では、 $X$  は  $-(CR^1R^2)_n-$  であり、ここで、 $R^1$  および  $R^2$  は前述のとおりであり、 $n$  は 3、4 または 5 からなる群より選択される整数である。一部の実施形態では、 $R^1$  および  $R^2$  は  $H$  である。一部の実施形態では、式 I の部分は、

40

## 【化 1 6】



10

20

30

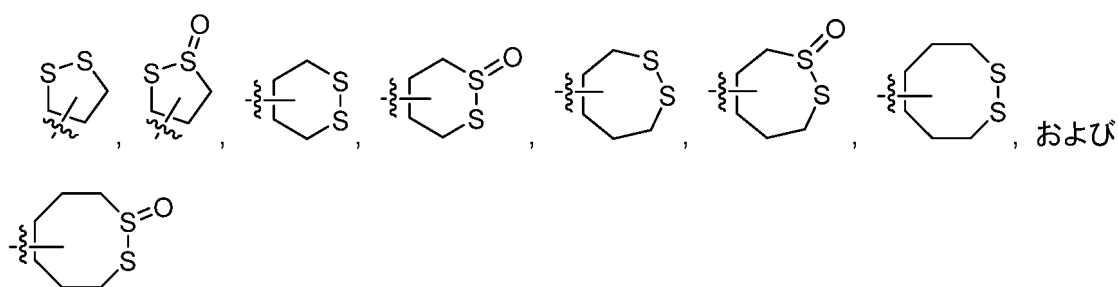
40

からなる群より選択される（波線は目的分子への結合点を表す）。

## 【0051】

上記および下記の式 I の部分の一部の実施形態では、 $X$  は  $-(CR^1R^2)_n-$  であり、ここで、 $R^1$  および  $R^2$  は前述のとおりであり、 $n$  は 3、4、5、6、または 7 からなる群より選択される整数である。一部の実施形態では、式 I の部分は、

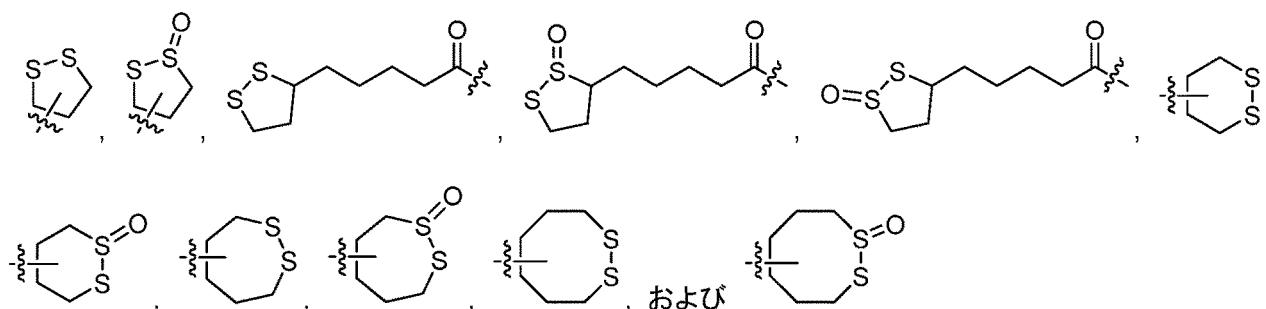
## 【化 17】



10

からなる群より選択される。一部の実施形態では、式 I の部分は、

## 【化 18】



20

からなる群より選択される。上記および下記の式 I の部分の一部の実施形態において、各  $CR^1R^2$  基における各  $R^1$  および各  $R^2$  は、H、OH、 $NO_2$ 、CN、 $NH_2$ 、置換されていてもよい  $C_1 \sim C_{12}$  アルキル、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  ヘテロアルキル、置換されていてもよい  $C_3 \sim C_{12}$  シクロアルキル、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  ヘテロシクロアルキル、置換されていてもよい  $C_1 \sim C_{12}$  アルキルオキシ、置換されていてもよい  $C_2 \sim C_{12}$  ヘテロアルキルオキシ、置換されていてもよい  $C_3 \sim C_{12}$  シクロアルキルオキシ、および置換されていてもよい  $C_1 \sim C_{12}$  ヘテロシクロアルキルオキシからなる群より独立して選択される。

30

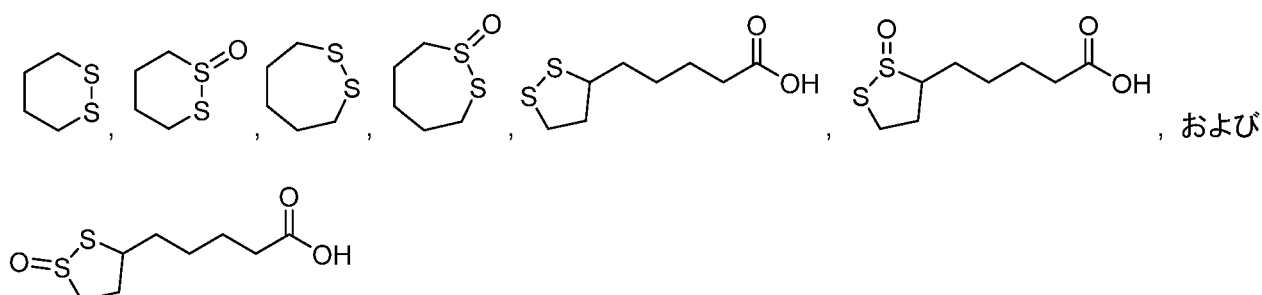
## 【0052】

上記および下記の式 I の部分の一部の実施形態において、各  $CR^1R^2$  基における各  $R^1$  および各  $R^2$  は、H、OH、 $NO_2$ 、CN、 $NH_2$ 、置換されていてもよい  $C_1 \sim C_{12}$  アルキル、置換されていてもよい  $C_3 \sim C_{12}$  シクロアルキル、置換されていてもよい  $C_1 \sim C_{12}$  アルキルオキシ、および置換されていてもよい  $C_3 \sim C_{12}$  シクロアルキルオキシからなる群より独立して選択される。

## 【0053】

上記および下記の一部の実施形態では、式 I の部分を含む複素環は、

## 【化 19】



40

50

からなる群より選択される。

【0054】

上記および下記の式 I の部分の一部の実施形態では、上記構造中の硫黄 (S) 原子の 1 つまたは複数をセレン (Se) 原子と交換することができ、結果として生じる構造も本開示によって企図されている。

【0055】

一部の実施形態では、本明細書に記載の方法および物質は、「クリック」化学反応で利用される。例えば、式 I の基とジチオール (またはジチオラート) のペアリングは、既知のクリック化学反応で利用されるアジド - アルキンペアおよび / またはテトラジン - アルケン / アルキンペアに取って代わることができる。一部の実施形態において、本明細書に記載の方法で利用される分子は、色素 (例えば、蛍光色素、非蛍光色素、クエンチャー色素) ; タグ (例えば、ビオチン、FLAG タグ) ; 二官能性試薬 ; 三官能性試薬 ; PEG 化試薬 ; 生体分子 (例えば、ヌクレオチド、ヌクレオシド、アミノ酸、RNA、DNA、ペプチド、タンパク質、単糖類、多糖類) ; および基材 (substrate) (例えば、アガロース、磁気ビーズ) からなる群より選択される部分を含むが、これらに限定されない。

【0056】

一部の実施形態では、本明細書に記載の方法および物質は位置特異的である。一部の実施形態では、本明細書に記載の方法および物質は立体特異的である。一部の実施形態では、本明細書に記載の方法および物質は、単一の異性体を生成するまたは表す。一部の実施形態では、本明細書に記載の方法および物質は、異性体の混合物を生成するまたは表す。

【0057】

本明細書に記載の方法および物質を使用して dendrimer を形成することもできる。Fang<sup>26</sup> の研究では、使用前に環状ジスルフィドが還元され、その後でチオール - エン架橋剤が利用された。対照的に、本方法では、環状ジスルフィドの代わりにオキシ環状ジスルフィドを利用して、ジチオールの (二官能性) ペアを持つ分子を用いて架橋させる。あるいは、環状ジスルフィドをジチオールに還元し、その後で (例えば) ホモ二官能性環状チオスルフィナート架橋剤 (またはよりゆっくりとホモ二官能性環状ジスルフィド架橋剤) と反応させることができる。あるいは、上記の環状ジスルフィドをモノチオールで置き換えることができ、2 つのそのような分子を単一の環状ジスルフィドまたは環状チオスルフィナートで架橋することができる。一部の実施形態では、環状ジスルフィドを酸化剤と組み合わせて利用する。

【0058】

加えて、本明細書に記載の方法および物質を美容処理 (cosmetic treatment) にも利用することができる。ケラチン含有物質は、1) 水素結合 ; 2) 酸基と塩基基の間の塩橋 ; および 3) ジスルフィド結合 ; を介して互いに結合している多くの長いタンパク質鎖で構成されている。ケラチン含有物質におけるジスルフィド結合は、加熱または様々な還元処理の利用のせいで、わずかにアルカリ性の pH 8.5 で切断される。ケラチン含有物質の処理のために、本明細書に記載の方法および物質を利用して、ケラチン含有物質における遊離チオール基を架橋することによりケラチン含有物質を処理することができる。例えば、式 I の化合物を、着色剤、治療剤または化粧剤などのヘアトリートメント剤に結合させてよく、壊れたジスルフィド結合を含む毛髪を、ヘアトリートメント剤を含む組成物で処理して、チオール基を架橋させるおよび / またはヘアトリートメント剤を髪に共有結合により付着させる。

【0059】

さらに、本明細書に記載の方法を用いた *in vivo* チオール架橋は、薬理的タンパク質安定化の戦略として、および基質アナログによる安定化の長年求められてきた非阻害的代替として利用することができる<sup>11</sup>。家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) を含めて多くの疾患は、四次構造の喪失およびタンパク質の不安定化 (Cu/Zn - スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) 突然変異で見られる) に関連している。多量体安定化 - 基質 / カーゴアナログであるトランスサイレチン安定化薬タファミジス<sup>12</sup> により例示

される - は、これら疾患の治療戦略である。S O D 1 の隣接サブユニット上のチオールペア ( C y s <sub>111A+B</sub>、8 離れている ) の架橋が f A L S - S O D 1 変異体を 4 0 まで安定化できることを実証する概念実証研究でチオール架橋剤が使用された<sup>8</sup>。このアプローチは、本質的に不活性である f A L S - S O D 1 変異体の酵素活性も救済した<sup>8</sup>。このアプローチが他のタンパク質に適用可能か否かを判断するために、ヒトタンパク質構造のコンピューターによるスクリーニングを実施した。このスクリーニングにより、パーキンソン病関連突然変異によって不安定化された二量体タンパク質である D J - 1 を含む、サブユニット間システイン架橋によって安定化され得る四次構造を有する 2 0 個の追加の多量体タンパク質が発見された。

#### 【 0 0 6 0 】

本発明者らは、薬物を調査して、i n v i v o で耐容性を示すことができる選択的チオール結合のメカニズムを特定した。薬物設計への最近のアプローチの 1 つは、柔らかく、時には細かく「調整された」C y s 選択的求電子剤<sup>10</sup>を高親和性バインダー ( 結合剤 ) に付着させることである<sup>13-14</sup>。残念ながら、よくあることであるが、高親和性の S O D 1 バインダーがないため、この構造に基づくアプローチは除外された。チオラート選択的薬物で使用される他のメカニズムであるジスルフィド結合形成は、最も一般的で成熟したものである ( ジスルフィラム / アンタビュース ( A n t a b u s e ) 療法は 1 9 4 8 年に始まった )<sup>15</sup>。不活性プロドラッグはチオールに変換され、自然酸化の後、薬物代謝産物のスルフェン酸と標的タンパク質のシステインチオラートとの間に長寿命のジスルフィド結合を形成する。一部の薬物は酵素活性部位の C y s とジスルフィドを形成し ( 例えば、ジスルフィラム<sup>16</sup> )、他の薬物はアロステリック部位の C y s と形成する ( 例えば、オメプラゾール / プリロセック ( P r i l o s e c )<sup>17</sup>、プラスグレル / エフィアント ( E f f i a n t )<sup>18</sup> など )。残念ながら、2 つのこれら薬剤を結合して二官能性架橋剤を作成する戦略では、デッドエンド修飾を回避できるツールをもたらさない。

#### 【 0 0 6 1 】

一部の実施形態において、本明細書に記載の式 I の部分を含む複素環は、一時的な結合を形成する。一部の実施形態では、複素環は、追加の分子なしでデッドエンド修飾を回避する。一部の実施形態では、複素環は環状ジスルフィドまたは環状チオスルフィナートである。環状ジスルフィドは、一時的な結合を形成できる ( すなわち、他の分子の助けなしにデッドエンド修飾を回避できる ) ことを本発明者らが知っている唯一のチオラート選択的足場である。環状ジスルフィド化学は、W h i t e s i d e s のグループによる一連の出版物で広く特徴付けられている<sup>19-21</sup>。これらの研究は、環状ジスルフィドの高い効果濃度 ( E C - すなわち、エントロピーにより駆動される酸化されて環状のままである傾向 ; 具体的には、ジチオールが環状ジスルフィドを形成することとジアルキルジスルフィドが 2 つのチオールを形成することの間の  $K_{eq}$  ) が、孤立チオールへの一時的な結合をもたらすことを実証した。さらに、孤立チオールへの環状ジスルフィドの結合の  $K_{eq}$  ( すなわち、「 $K_{eq}$  デッドエンド」 ) は、高度に環ひずみ依存性であり、3 桁以上にわたって大きく変化する<sup>19-20</sup>。環状ジスルフィドテザード薬物カーゴは、環ひずみによって異なる効率で、トランスフェリン受容体の C y s への可逆的結合を介して細胞膜を横切って輸送され得る<sup>22、27</sup>。環状ジスルフィドは、5 g / 日 / ヒトまでの用量で耐容性を示し、エタノール、フルクトース、および塩化ナトリウムの範囲の L D <sub>50</sub> を有する。

#### 【 0 0 6 2 】

本発明者らは、環状ジスルフィドが、デッドエンドの C y s 修飾を最小限にしながらチオールペアを架橋できると仮定した。環状ジスルフィドに対する C y s チオラートの可逆的 S<sub>N</sub>2 型攻撃は、開環に付随してチオラート - ジスルフィド交換をもたらし、末端チオラートを形成する。この末端チオラートがスルフェナート ( すなわち、酸化された C y s ) の結合距離内にある場合、ジスルフィド結合への縮合により架橋が形成できる ( 図 1 A、メカニズム I I )<sup>28</sup>。そうでなければ、環状ジスルフィドが逆 ( チオラート - ジスルフィド交換 ) 反応によって放出される ( 図 1 A、メカニズム I )。さらには、モノ - S -

10

20

30

40

50

オキソ環状ジスルフィド（環状チオスルフィナート）を代わりに使用した場合、架橋反応手順の最も遅いステップであるチオラート酸化は必要とされない（図 1 A、メカニズム I I I）。代わりに、環状チオスルフィナートとのチオラート - ジスルフィド交換は、ジスルフィド結合末端スルフェン酸を直接もたらし、それが近くの第 2 のチオラートと縮合し、水を放出することにより迅速に架橋を形成する<sup>2 8</sup>。チオラート - ジスルフィド交換は、それぞれ  $-0.5$ 、 $-0.3$ 、および  $-0.7$  のブランステッド係数（ $\rho$ ）を有する求核性 - （ $S_n$ ）、中心 - （ $S_c$ ）、および脱離基 - （ $S_l$ ）硫黄からなる線状トリスルフィド様中間体を介して進行する<sup>2 0</sup>、<sup>2 9</sup>。脱離基と中心硫黄のブランステッド係数はそれぞれ  $-0.7$  と  $-0.3$  であり、我々の量子力学的計算（図 1 B）は、チオラート - ジスルフィド交換の速度が  $S_l$  の  $pK_a$  に高感受性であり、それに反比例することを暗示している。孤立チオラートに対する 1 の反応性が 5 のほぼ 110 倍に増加することの発端（原因）、および観察された可逆性を理解するために、DFT 計算を使用した。出発物質、遷移構造、および中間体に対して立体配座検索を実行した。グルタチオンは、立体配座探索空間と計算時間を削減するために、メチルチオラートとして表した。

#### 【0063】

TS（1 2 b）の活性化自由エネルギーが TS（5 2 a）と比較して  $2.9 \text{ kcal mol}^{-1}$  低いことは、遷移状態でのより好ましいフロンティア分子軌道の相互作用によるものである（図 1 B）。1 の  $\sigma^*$  軌道（図 1 2）は、5 におけるよりもエネルギーが  $0.21 \text{ eV}$  低く、したがって TS（1 2 b）のエネルギーを低くする。1 および 5 の開環ステップはエネルギー吸収性（それぞれ、 $G = 4.6$  および  $5.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ ）であり、実験と一致して可逆的である。架橋生成物と水の形成は、熱力学的に有利であり、反応物よりも自由エネルギーが  $130 \text{ kcal mol}^{-1}$  以上低い。1, 2 - ジチアンが開環すると、2 a はゆっくりと（ $t_{1/2} = 10$  日）酸化されて 3 a になり、これは律速であり、最終架橋生成物をもたらす。QM の結果は、低  $pK_a$  のスルフェン酸基の 2 つの主要な意味を強調する。第 1 に、スルフェン酸を放出する非オキソチオスルフィナートの S への求核攻撃は、より求電子性のスルフィニルの硫黄への攻撃よりも  $> 10$  倍速く、したがって起こりやすい。第 2 に、律速のチオール酸化の必要性を排除することに加えて、チオスルフィナートは、生成されるスルフェナート中間体を介して、チオラート - ジスルフィド交換の速度も増加させる。

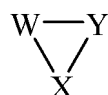
#### 【0064】

本明細書に記載の一般プロトコルに従って、ポリマーまたは dendrimer も次の方法で製造できる：

少なくとも 2 つのチオール官能基を含む複数の第 1 のモノマーを提供し、

前記複数の第 1 のモノマーを、式 I の部分

#### 【化 20】



式 I

式中、

W は、S および Se からなる群より独立して選択され；

Y は、S、Se、S(O)、Se(O)、S(O)<sub>2</sub> および Se(O)<sub>2</sub> からなる群より独立して選択され；

X は W および Y と一緒になって、置換または非置換の 3 ~ 10 員の複素環を形成する；を含む複数の第 1 の架橋剤と、チオール官能基と架橋剤との間で反応が生じることができ条件下で接触させ、それによって架橋剤を介してモノマーを共有結合で架橋させてポリマーまたは dendrimer を形成する。



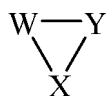
## 【 0 0 6 5 】

別の態様において、本明細書で提供するのは、第 1 のモノマーおよび第 1 の架橋剤から誘導されるポリマーであり、

第 1 のモノマーは、少なくとも 2 つのチオール官能基を含み、

第 1 の架橋剤は、式 I の部分を含む：

## 【 化 2 1 】



式 I

10

式中、

W は、S および Se からなる群より独立して選択され；

Y は、S、Se、S(O)、Se(O)、S(O)<sub>2</sub> および Se(O)<sub>2</sub> からなる群より独立して選択され；

X は W および Y と一緒になって、置換または非置換の 3 ~ 10 員の複素環を形成する。

## 【 0 0 6 6 】

前述の式 I の特定の実施形態では、Y は、S(O)、Se(O)、S(O)<sub>2</sub> および Se(O)<sub>2</sub> からなる群より独立して選択される。

20

## 【 0 0 6 7 】

上記および下記に記載の方法およびポリマーの一部の実施形態では、第 1 のモノマーは、ジチオール化合物、トリチオール化合物、テトラチオール化合物、およびチオマーからなる群より選択される。一部の実施形態では、第 1 のモノマーは、ジチオール化合物、トリチオール化合物、テトラチオール化合物、ヘキサチオール化合物、およびオクタチオール化合物からなる群より選択される。

## 【 0 0 6 8 】

上記および下記に記載の方法およびポリマーの一部の実施形態において、第 1 のモノマーは、ジチオスレイトール (DTT)、1, 2 - エタンジチオール、1, 3 - プロパンジチオール、1, 4 - ブタンジチオール、1, 5 - ペタンジチオール、1, 6 - ヘキサンジチオール、1, 7 - ヘブタンジチオール、1, 8 - オクタンジチオール、1, 9 - ノナンジチオール、1, 10 - デカンジチオール、1, 11 - ウンデカンジチオール、1, 12 - ドデカンジチオール、1, 13 - トリデカンジチオール、1, 14 - テトラデカンジチオール、1, 16 - ヘキサデカンジチオール、ジチオールブチルアミン (DTBA)、テトラ (エチレングリコール) ジチオール、ヘキサ (エチレングリコール) ジチオール、2 - メルカプトエチルエーテル、2, 2' - チオジエタンチオール、2, 2' - (エチレンジオキシ) ジエタンチオール、プロパン - 1, 2, 3 - トリチオール、トリメチロールプロパントリス (2 - メルカプトアセタート)、トリメチロールプロパントリス (3 - メルカプトアセタート)、3, 3', 3'' - ( ( ( (1, 3, 5 - トリアジン - 2, 4, 6 - トリイル) トリス (オキシ) ) トリス (プロパン - 3, 1 - ジイル) ) トリス (スルファンジイル) ) トリス (プロパン - 1 - チオール)、4, 4', 4'' - ( ( ( (1, 3, 5 - トリアジン - 2, 4, 6 - トリイル) トリス (オキシ) ) トリス (プロパン - 3, 1 - ジイル) ) トリス (スルファンジイル) ) - トリス (ブタン - 1 - チオール)、ペンタエリスリチルテトラチオール、ペンタエリスリチルテトラキス (3 - メルカプトプロピオナート)、ジスルフィド結合を有するペプチド、およびジスルフィド結合を有するタンパク質からなる群より選択される。

30

40

## 【 0 0 6 9 】

一部の実施形態では、第 1 のモノマーは、ジスルフィド結合を有するペプチドまたはジスルフィド結合を有するタンパク質である。一部の実施形態では、第 1 のモノマーは、ジ

50

スルフィド結合を有するタンパク質である。

【0070】

一部の実施形態において、第1のモノマーは、パーキンソン病に関係している銅ノ亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)またはDJ-1である。一部の実施形態では、第1のモノマーは、SOD1変異体、DJ-1変異体、エフェクターカスパーゼ(例えば、カスパーゼ-3)、および鉄硫黄クラスターアセンブリ酵素(iron-sulfur cluster assembly enzyme)(IscU)からなる群より選択される。一部の実施形態では、第1のモノマーはSOD1である。一部の実施形態では、第1のモノマーはfALS-SOD1変異体である。一部の実施形態では、第1のモノマーはDJ-1変異体である。一部の実施形態では、第1のモノマーはエフェクターカスパーゼである。一部の実施形態では、第1のモノマーはカスパーゼ-3である。一部の実施形態では、第1のモノマーはIscUである。

10

【0071】

一部の実施形態では、第1のモノマーはケラチン含有物質である。一部の実施形態では、ケラチン含有物質は、毛(眉毛、まつげ、あごひげ、および口ひげなどの顔の毛を含む)、指の爪および足の爪からなる群より選択される。一部の実施形態では、ケラチン含有物質は、毛髪、眉毛、まつげ、指の爪および足の爪からなる群より選択される。一部の実施形態では、ケラチン含有物質は毛である。

【0072】

上記および下記に記載の方法およびポリマーの一部の実施形態において、第1のモノマーは、ポリ(エチレングリコール)ジチオール(PEG-DT、例えば、平均Mnが1500のPEG-DT)、4arm-PEG2K-SH、4arm-PEG5K-SH、4arm-PEG10K-SH、4arm-PEG20K-SH、4アームポリ(エチレンオキシド)チオール末端、8arm-PEG10K-SH(ヘキサグリセロールコア)、8arm-PEG10K-SH(トリペンタエリスリトールコア)、8arm-PEG20K-SH(ヘキサグリセロールコア)、8arm-PEG20K-SH(トリペンタエリスリトールコア)、および8アームポリ(エチレンオキシド)チオール末端からなる群より選択される。上記および下記に記載の方法およびポリマーの一部の実施形態において、第1のモノマーは、ポリ(エチレングリコール)ジチオールまたはポリエチレンジチオールである。

20

30

【0073】

上記および下記に記載の方法およびポリマーのある実施形態では、少なくとも2つのチオール官能基を含む第1のモノマーは、ポリエチレンジチオール、ポリプロピレンジチオールなどの、ポリアルキレンジチオールである。

【0074】

上記および下記に記載の方法およびポリマーの一部の実施形態において、式Iの部分を含む第1の架橋剤は、第1のモノマーを安定化させる。一部の実施形態において、第1の架橋剤は、ジスルフィド結合を有するペプチドまたはジスルフィド結合を有するタンパク質を安定化させる。一部の実施形態では、第1の架橋剤は、fALS-SOD1変異体またはDJ-1変異体を安定化させる。一部の実施形態では、第1のモノマーのアンフォールディング温度(unfolding temperature)が上昇する。一部の実施形態では、アンフォールディング温度は、少なくとも2、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、または少なくとも100上昇する。一部の実施形態では、アンフォールディング温度は、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、

40

50

約 29、約 30、約 31、約 32、約 33、約 34、約 35、約 36、  
 約 37、約 38、約 39、約 40、約 41、約 42、約 43、約 44、  
 約 45、約 46、約 47、約 48、約 49、約 50、約 51、約 52、  
 約 53、約 54、約 55、約 56、約 57、約 58、約 59、約 60、  
 約 61、約 62、約 63、約 64、a b 65、約 66、約 67、約 68  
 、約 69、約 70、約 71、約 72、約 73、約 74、約 75、約 76  
 、約 77、約 78、約 79、約 80、約 81、約 82、約 83、約 84  
 、約 85、約 86、約 87、約 88、約 89、約 90、約 91、約 92  
 、約 93、約 94、約 95、約 96、約 97、約 98、約 99、約 100  
 、約 101、約 102、約 103、約 104、約 105、約 106、約 107、約 108、約 109、および約 110 からなる群より選択される温度だけ  
 上昇する。

#### 【0075】

上記および下記に記載の方法およびポリマーの一部の実施形態において、式 I の部分を含む第 1 の架橋剤は、第 1 のモノマーの凝集を抑制する。一部の実施形態では、第 1 の架橋剤は、ジスルフィド結合を有するペプチドまたはジスルフィド結合を有するタンパク質の凝集を抑制する。一部の実施形態では、第 1 の架橋剤は f A L S - S O D 1 変異体の凝集を抑制する。

#### 【0076】

上記および下記に記載の方法およびポリマーの一部の実施形態において、式 I の部分を含む第 1 の架橋剤はアポトーシスを阻害する。一部の実施形態では、第 1 の架橋剤はエフェクターカスパーゼを架橋する。

#### 【0077】

上記および下記に記載の方法およびポリマーの一部の実施形態において、式 I の部分を含む第 1 の架橋剤はフェロプトーシスを引き起こす。一部の実施形態では、第 1 の架橋剤は多数の癌細胞を殺す。一部の実施形態では、第 1 の架橋剤は I s c U を架橋する。

#### 【0078】

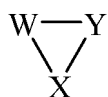
上記および下記に記載の方法およびポリマーの一部の実施形態では、式 I の部分を含む第 1 の架橋剤は、ケラチン含有物質を処理する方法で使用される。一部の実施形態では、第 1 の架橋剤は、ケラチン含有物質を架橋する。一部の実施形態では、ケラチン含有物質を処理する方法は、

i) 複数のジスルフィド結合を含むケラチン含有物質サンプルである複数の第 1 のモノマーを提供する；

i i) ケラチン含有物質サンプルに、約 0.1 質量% ~ 約 15 質量% の濃度の還元剤を含む混合物を、所定の期間適用し、それによって複数の遊離チオール基を含む還元ケラチン含有物質サンプルを生成する；

i i i) 式 I の部分；

#### 【化 2 2】



式 I

式中、

W は、S および S e からなる群より独立して選択され；

Y は、S、S e、S ( O )、S e ( O )、S ( O )<sub>2</sub> および S e ( O )<sub>2</sub> からなる群より独立して選択され；

X は W および Y と一緒になって、置換または非置換の 3 ~ 10 員の複素環を形成する；

を含む第 1 の架橋剤を、還元ケラチン含有物質サンプルに適用し、

それによって遊離チオール基と第 1 の架橋剤との間に複数の共有結合を形成することを含む。

【0079】

一部の実施形態では、還元剤は、チオグリコール酸アンモニウム、L-システイン、グルタチオン、アスコルビン酸、 $\beta$ -メルカプトエタノール、2-メルカプトエチルアミン、2-メルカプトエチルアミン塩酸塩、ジチオスレイトール(DTT)、チオ乳酸、チオサリチル酸、トリス-2-カルボキシエチルホスフィン塩酸塩(TCEP)、次亜硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、二亜硫酸カリウム、二亜硫酸ナトリウム、硫酸水素ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸水素アンモニウム、チオグリコール酸、チオグリコール酸カルシウム、チオグリコール酸カリウム、チオグリコール酸ナトリウム、システイン塩酸塩、チオ乳酸アンモニウム、チオグリセリン、メルカプトプロピオン酸、チオグリコール酸グリセリルおよびジチオールブチルアミン(DTBA)からなる群より選択される。一部の実施形態では、還元剤は、チオグリコール酸アンモニウム、L-システイン、グルタチオン、 $\beta$ -メルカプトエタノール、2-メルカプトエチルアミン、DTT、チオ乳酸、TCEP、DTBA、ヒドロサルファイトナトリウム(または亜ジチオン酸ナトリウム)、およびチオ硫酸ナトリウムからなる群より選択される。一部の実施形態では、還元剤は、チオグリコール酸アンモニウム、L-システイン、グルタチオン、およびチオ乳酸からなる群より選択される。一部の実施形態では、還元剤はチオグリコール酸アンモニウムまたはL-システインである。一部の実施形態では、還元剤はチオグリコール酸アンモニウムである。一部の実施形態では、還元剤は $\beta$ -メルカプトエタノールである。

10

20

【0080】

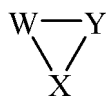
一部の実施形態では、還元剤は、式 I の部分を含む第 1 の架橋剤を含む混合物である。一部の実施形態では、還元剤は、環状ジスルフィドと環状チオスルフィナートの混合物である。一部の実施形態では、ケラチン含有物質を処理する方法は、

i) 複数のジスルフィド結合を含むケラチン含有物質サンプルである複数の第 1 のモノマーを提供する；

ii) ケラチン含有物質サンプルに、式 I の部分：

【化 23】

30



式 I

式中、

Wは、SおよびSeからなる群より独立して選択され；

Yは、S、Se、S(O)、Se(O)、S(O)<sub>2</sub>およびSe(O)<sub>2</sub>からなる群より独立して選択され；

40

XはWおよびYと一緒にあって、置換または非置換の3～10員の複素環を形成する；を含む第 1 の架橋剤を含有する混合物を所定の期間適用し、

それによって複数の遊離チオール基を形成し、それが第 1 の架橋剤と反応して遊離チオール基と第 1 の架橋剤との間に複数の共有結合を形成することを含む。

【0081】

上記および下記に記載の方法およびポリマーの一部の実施形態において、第 1 の架橋剤は、1-オキソ-1,2-ジチアン、1-オキソ-1,2-ジチエパン、および1-オキソ-1,2-ジチオカンからなる群より選択される。一部の実施形態では、第 1 の架橋剤は1-オキソ-1,2-ジチアンである。

50

## 【 0 0 8 2 】

上記および下記に記載の方法およびポリマーの一部の実施形態において、第 1 のモノマーと第 1 の架橋剤の比は、約 1 : 10 ~ 約 10 : 1 である。一部の実施形態では、第 1 のモノマーと第 1 の架橋剤の比は、約 1 : 10、約 1 : 9、約 1 : 8、約 1 : 7、約 1 : 6、約 1 : 5、約 1 : 4、約 1 : 3、約 1 : 2、約 1 : 1、約 2 : 1、約 3 : 1、約 4 : 1、約 5 : 1、約 6 : 1、約 7 : 1、約 8 : 1、約 9 : 1、および約 10 : 1 から選択される。

## 【 0 0 8 3 】

上記および下記に記載の方法のある実施形態において、方法は、複数の第 1 の架橋剤を、少なくとも 2 つのチオール官能基を含む複数の第 2 のモノマーと接触させることをさらに含む。

10

## 【 0 0 8 4 】

蒸気および下記に記載のポリマーの一部の実施形態では、ポリマーは、第 1 のモノマー、第 1 の架橋剤、および第 2 のモノマーから誘導される。

## 【 0 0 8 5 】

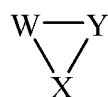
上記および下記に記載の方法およびポリマーの一部の実施形態において、第 2 のモノマーは、トリチオシアヌル酸、トリメチロールプロパントリス ( 3 - メルカプトプロピオナート )、およびペンタエリスリトールテトラ ( 3 - メルカプトプロピオナート ) などの、トリチオール化合物またはテトラチオール化合物である。一部の実施形態では、第 2 のモノマーは、トリチオシアヌル酸、トリメチロールプロパントリス ( 3 - メルカプトプロピオナート )、およびペンタエリスリトールテトラ ( 3 - メルカプトプロピオナート ) からなる群より選択される。

20

## 【 0 0 8 6 】

上記および下記に記載の方法の一部の実施形態において、方法は、複数の第 1 の架橋剤を、式 I の部分を含む複数の第 2 の架橋剤と接触させることをさらに含む：

## 【 化 2 4 】



式 I

30

式中、

W は、S および S e からなる群より独立して選択され；

Y は、S、S e、S ( O )、S e ( O )、S ( O )<sub>2</sub> および S e ( O )<sub>2</sub> からなる群より独立して選択され；

X は W および Y と一緒になって、置換または非置換の 3 ~ 10 員の複素環を形成する。

## 【 0 0 8 7 】

上記および下記に開示されるポリマーの一部の実施形態では、ポリマーは、第 1 のモノマー、第 1 の架橋剤、および第 2 の架橋剤から誘導される。

40

## 【 0 0 8 8 】

上記および下記に記載の方法およびポリマーの一部の実施形態において、複数の第 1 の架橋剤は、複数の第 2 の架橋剤とは異なる。一部の実施形態では、複数の第 1 の架橋剤と複数の第 2 の架橋剤の比は、約 1 : 10 ~ 約 10 : 1 である。一部の実施形態では、その比は、約 1 : 10、約 1 : 9、約 1 : 8、約 1 : 7、約 1 : 6、約 1 : 5、約 1 : 4、約 1 : 3、約 1 : 2、約 1 : 1、約 2 : 1、約 3 : 1、約 4 : 1、約 5 : 1、約 6 : 1、約 7 : 1、約 8 : 1、約 9 : 1、および約 10 : 1 から選択される。一部の実施形態では、複数の第 1 の架橋剤は環状ジスルフィドを含む。一部の実施形態では、第 1 の架橋剤は環状チオスルフィナートを含む。一部の実施形態では、複数の第 2 の架橋剤は環状ジスルフ

50

イドを含む。一部の実施形態では、複数の第 2 の架橋剤は環状チオスルフィナートを含む。

【0089】

別の態様では、本開示は、物体、デバイス、またはアセンブリの表面をコーティングする方法を提供し、その方法は以下のステップを含む：

(a) 物体、デバイス、またはアセンブリの表面を提供する；

(b) 前記表面を、反応性部分と式 I の部分とを含む複数の第 1 の分子と接触させ；

【化 25】



式 I

10

式中、

W は、S および S e からなる群より独立して選択され；

Y は、S、S e、S(O)、S e(O)、S(O)<sub>2</sub> および S e(O)<sub>2</sub> からなる群より独立して選択され；

X は W および Y と一緒になって、置換または非置換の 3 ~ 10 員の複素環を形成する；

それによって表面と第 1 の分子の反応性部分との間に複数の共有結合を形成して、第 1 の単分子層を形成する。

20

【0090】

表面をコーティングする方法の一部の実施形態では、W は S であり、Y は S または S(O) である。一部の実施形態では、表面は還元性である。一部の実施形態では、反応性部分はチオールまたはチオスルフィナートである。

【0091】

一部の実施形態では、表面をコーティングする方法は、

(c) 単分子層を、少なくとも 1 つのチオール官能基を含む第 2 の分子と接触させ、それによって第 1 の分子の S または S e 原子と第 2 の分子の遊離チオール基との間で複数の共有結合が形成された第 1 の二分子層を形成することをさらに含む。

30

【0092】

表面をコーティングする方法の一部の実施形態では、第 2 の分子はモノチオール化合物である。一部の実施形態では、第 2 の分子は、(11 - メルカプトウンデシル) - N、N、N - トリメチルアンモニウムブロミド、(11 - メルカプトウンデシル) ヘキサ(エチレングリコール)、(11 - メルカプトウンデシル) テトラ(エチレングリコール)、1 - (11 - メルカプトウンデシル) イミダゾール、1 - メルカプト - 2 - プロパノール、11 - (1H - ピロール - 1 - イル) ウンデカン - 1 - チオール、11 - (フェロセニル) ウンデカンチオール、11 - アミノ - 1 - ウンデカンチオール塩酸塩、11 - アジド - 1 - ウンデカンチオール、11 - メルカプト - 1 - ウンデカノール、11 - メルカプトウンデカンアミド、11 - メルカプトウンデカン酸、11 - メルカプトウンデシルヒドロキノン、11 - メルカプトウンデシルホスホン酸、12 - メルカプトドデカン酸、16 - アミノ - 1 - ヘキサデカンチオール塩酸塩、16 - メルカプトヘキサデカンアミド、16 - メルカプトヘキサデカン酸、3 - アミノ - 1 - プロパンチオール塩酸塩、3 - クロロ - 1 - プロパンチオール、3 - メルカプト - 1 - プロパノール、3 - メルカプトプロピオン酸、4 - メルカプト - 1 - ブタノール、6 - (フェロセニル) - ヘキサチオール、6 - アミノ - 1 - ヘキサチオール塩酸塩、6 - メルカプト - 1 - ヘキサノール、6 - メルカプトヘキサン酸、8 - アミノ - 1 - オクタンチオール塩酸塩、8 - メルカプト - 1 - オクタノール、8 - メルカプトオクタン酸、9 - メルカプト - 1 - ノナノール、トリエチレングリコールモノ - 11 - メルカプトウンデシルエーテル、1 - メルカプトコハク酸、システ

40

50

イン残基を有するペプチド、システイン残基を有するタンパク質、システアミン、1 - チオヘキシトール、ポリ(エチレングリコール)2 - メルカプトエチルエーテル酢酸、ポリ(エチレングリコール)メチルエーテルチオール、1 - チオグリセロール、2 - ナフタレンチオール、ピフェニル - 4 - チオール、3 - アミノ - 1, 2, 4 - トリアゾール - 5 - チオール、5 - (トリフルオロメチル)ピリジン - 2 - チオール、1 - [2 - (ジメチルアミノ)エチル] - 1H - テトラゾール - 5 - チオール、1 - プロパンチオール、1 - ブタンチオール、1 - ペンタンチオール、1 - ヘキサンチオール、1 - オクタンチオール、3, 3, 4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 8 - トリデカフルオロ - 1 - オクタンチオール、および - G l u - C y s からなる群より選択される。

#### 【0093】

表面をコーティングする方法の一部の実施形態では、第2の分子は、ジチオール化合物、トリチオール化合物、テトラチオール化合物、およびチオマーからなる群より選択される。一部の実施形態では、第2の分子は、ジチオール化合物、トリチオール化合物、テトラチオール化合物、ヘキサチオール化合物、およびオクタチオール化合物からなる群より選択される。

#### 【0094】

表面をコーティングする方法の一部の実施形態では、第2の分子は、ジチオスレイトール(DTT)、1, 2 - エタンジチオール、1, 3 - プロパンジチオール、1, 4 - ブタンジチオール、1, 5 - ペンタンジチオール、1, 6 - ヘキサンジチオール、1, 7 - ヘプタンジチオール、1, 8 - オクタンジチオール、1, 9 - ノナンジチオール、1, 10 - デカンジチオール、1, 11 - ウンデカンジチオール、1, 12 - ドデカンジチオール、1, 13 - トリデカンジチオール、1, 14 - テトラデカンジチオール、1, 16 - ヘキサデカンジチオール、ジチオールブチルアミン(DTBA)、テトラ(エチレングリコール)ジチオール、ヘキサ(エチレングリコール)ジチオール、2 - メルカプトエチルエーテル、2, 2' - チオジエタンチオール、2, 2' - (エチレンジオキシ)ジエタンチオール、プロパン - 1, 2, 3 - トリチオール、トリメチロールプロパントリス(2 - メルカプトアセタート)、トリメチロールプロパントリス(3 - メルカプトアセタート)、3, 3', 3'' - (( ( ( (1, 3, 5 - トリアジン - 2, 4, 6 - トリイル) トリス(オキシ)) トリス(プロパン - 3, 1 - ジイル)) トリス(スルファンジイル)) トリス(プロパン - 1 - チオール)、4, 4', 4'' - (( ( ( (1, 3, 5 - トリアジン - 2, 4, 6 - トリイル) トリス(オキシ)) トリス(プロパン - 3, 1 - ジイル)) トリス(スルファンジイル)) トリス(ブタン - 1 - チオール)、ペンタエリスリチルテトラチオール、ペンタエリスリチルテトラキス(3 - メルカプトプロピオナート)、ジスルフィド結合を有するペプチド、およびジスルフィド結合を有するタンパク質からなる群より選択される。一部の実施形態では、第2の分子は、ジスルフィド結合を有するペプチドまたはジスルフィド結合を有するタンパク質である。一部の実施形態では、第2の分子は、ジスルフィド結合を有するタンパク質である。一部の実施形態では、第2の分子は、パーキンソン病に関連している銅/亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)またはDJ-1である。一部の実施形態では、第2の分子はSOD1である。

#### 【0095】

表面をコーティングする方法の一部の実施形態では、第2の分子は、4 arm - PEG 2K - SH、4 arm - PEG 5K - SH、4 arm - PEG 10K - SH、4 arm - PEG 20K - SH、4 - アームポリ(エチレンオキシド)チオール末端、8 arm - PEG 10K - SH(ヘキサグリセロールコア)、8 arm - PEG 10K - SH(トリペンタエリスリチルコア)、8 arm - PEG 20K - SH(ヘキサグリセロールコア)、8 arm - PEG 20K - SH(トリペンタエリスリチルコア)、および8アームポリ(エチレンオキシド)チオール末端からなる群より選択される。

#### 【0096】

表面をコーティングする方法のある実施形態では、第2の分子は、ポリエチレンジチオール、ポリプロピレンジチオールなどの、ポリアルキレンジチオールである。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 7 】

表面をコーティングする方法のある実施形態では、第 2 の分子は、例えばトリチオシアンル酸、トリメチロールプロパントリス ( 3 - メルカプトプロピオナート ) 、およびペンタエリスリトールテトラ ( 3 - メルカプトプロピオナート ) などの、トリチオール化合物またはテトラチオール化合物である。

## 【 0 0 9 8 】

一部の実施形態では、表面をコーティングする方法は、

( d ) 電位を印加し、それによって共有結合を還元して、第 2 の単分子層を形成することをさらに含む。

## 【 0 0 9 9 】

10

一部の実施形態では、表面をコーティングする方法は、

( e ) 水および複数の金属イオンを含む水性混合物を提供し、それによって複数の金属イオンをキレート化した第 2 の単分子層の複数の金属キレート基を含む錯体を形成して、第 2 の二分子層を形成する。

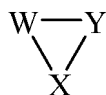
## 【 0 1 0 0 】

一部の実施形態では、表面をコーティングする方法は、

( f ) 第 2 の二分子層を、式 I の部分を含む複数の第 3 の分子と接触させ：

## 【 化 2 6 】

20



式 I

式中、

W は、S および S e からなる群より独立して選択され；

Y は、S、S e、S ( O )、S e ( O )、S ( O )<sub>2</sub> および S e ( O )<sub>2</sub> からなる群より独立して選択され；

X は W および Y と一緒になって、置換または非置換の 3 ~ 10 員の複素環を形成する；

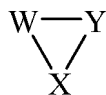
30

それによって複数の第 3 の分子が複数の金属イオンをキレート化した三分子層を形成することをさらに含む。

## 【 0 1 0 1 】

別の態様において、本明細書に提供される組成物は、基材およびコーティング材を含み、コーティング材は、複数の式 I の部分を含む第 1 の単分子層を含み：

## 【 化 2 7 】



式 I

40

式中、

W は、S および S e からなる群より独立して選択され；

Y は、S、S e、S ( O )、S e ( O )、S ( O )<sub>2</sub> および S e ( O )<sub>2</sub> からなる群より独立して選択され；

X は W および Y と一緒になって、置換または非置換の 3 ~ 10 員の複素環を形成する；

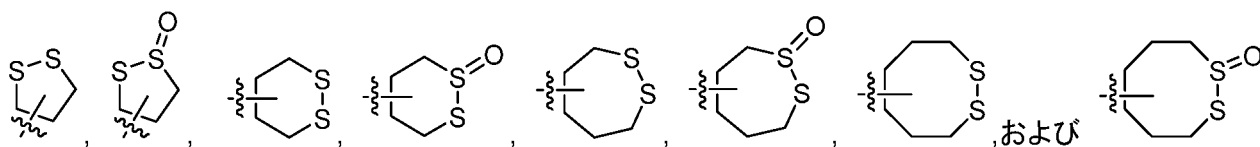
コーティング材は基材に共有結合している。

## 【 0 1 0 2 】

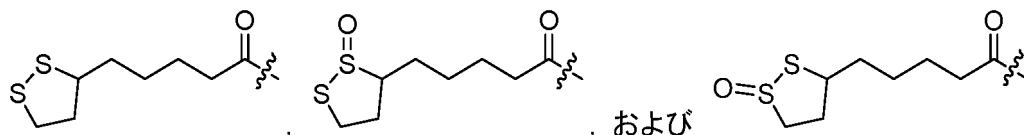
50



組成物の一部の実施形態では、第 1 の単分子層は、  
【化 2 8】



からなる群より選択される複数の部分を含む。一部の実施形態では、第 1 の単分子層は、  
【化 2 9】



からなる群より選択される複数の部分を含む。

【0103】

組成物の一部の実施形態では、コーティング材は、式 I の部分と、少なくとも 1 つのチオール官能基を含む複数の第 1 のモノマーとから誘導されるポリマーを含む第 1 の二分子層を含み、複数の式 I の部分の S または S e 原子と第 1 のモノマーの遊離チオール基との間に複数の共有結合が形成される。

【0104】

組成物の一部の実施形態では、コーティング材は、複数の式 I の部分の還元形態を含む第 2 の単分子層を含む。

【0105】

組成物の一部の実施形態において、コーティング材は、複数の金属イオンをキレート化した第 2 の単分子層の複数の金属キレート基を含む第 2 の二分子層を含む。

【0106】

コーティング方法またはコーティング組成物の一部の実施形態では、複数の金属キレート基は S 原子である。一部の実施形態では、複数の金属キレート基は S e 原子である。

【0107】

コーティング方法またはコーティング組成物の一部の実施形態では、複数の金属イオンは複数の金属カチオンである。

【0108】

コーティング方法またはコーティング組成物の一部の実施形態では、金属カチオンは +1 の電荷を有する。一部の実施形態では、金属カチオンは、A g または A u のカチオンである。

【0109】

コーティング方法またはコーティング組成物の一部の実施形態では、金属カチオンは +2 の電荷を有する。一部の実施形態では、金属カチオンは、C a、C d、C o、C r、C u、E r、F e、H g、M g、M n、N b、N i、P b、P d、S c、S n、S r、V、または Z n のカチオンである。一部の実施形態では、金属カチオンは、C d、C o、C r、C u、F e、H g、M n、N b、N i、P b、P d、S n、S r、V、または Z n のカチオンである。

【0110】

コーティング方法またはコーティング組成物の一部の実施形態では、金属カチオンは +3 の電荷を有する。一部の実施形態では、金属カチオンは、A u、C e、D y、E r、E u、F e、G d、H o、L a、L u、N b、N d、P m、P r、S m、T b、T m、または Y b のカチオンである。一部の実施形態では、金属カチオンは、C e、D y、E r、E

10

20

30

40

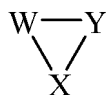
50

u、Gd、Ho、La、Lu、Nd、Pm、Pr、Sm、Tb、Tm、またはYbのカチオンである。一部の実施形態では、金属カチオンは、Au、Fe、またはGdのカチオンである。一部の実施形態では、金属カチオンは、AuまたはFeのカチオンである。

【0111】

組成物の一部の実施形態では、コーティング材は、複数の金属イオンをキレート化した複数の第3の分子をさらに含む三分子層を含み、第3の分子は式Iの部分を含む：

【化30】



式I

10

式中、

Wは、SおよびSeからなる群より独立して選択され；

Yは、S、Se、S(O)、Se(O)、S(O)<sub>2</sub>およびSe(O)<sub>2</sub>からなる群より独立して選択され；

XはWおよびYと一緒にあって、置換または非置換の3～10員の複素環を形成する。

【0112】

20

要約すると、孤立チオールへの可逆的結合を含めて、環状ジスルフィドおよび環状ジセレニドの反応性は予測可能であり、高度に調整可能である。環状チオスルフィナート、環状チオセレノキシド、および環状セレノスルフィナート架橋剤は、以下のものとしての潜在能力を有する：

1) どちらもモノチオールと反応することができるCys特異的ジエン架橋剤およびフェニルアルシノキシド架橋剤の毒性が低い代替物<sup>33</sup>、

2) 必須の生体内機能を実行し、しばしば金属および金属補因子(metallocofactor)リガンドとして機能するタンパク質性Cys-ジチオラート用のプローブ<sup>34-36</sup>、

3) 官能基間距離の測定ツール、

4) ポリマー合成における高次構造用の生体適合性テンプレート、および

30

5) 細胞チオールペア架橋剤。

【0113】

定義

本明細書で別途定義されない限り、本出願で使用される科学用語および技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。一般に、本明細書に記載される化学に関連して使用される命名法およびその化学技術は、当技術分野で周知であり一般的に使用されるものである。

【0114】

明細書および特許請求の範囲を通して、文脈が特に必要としない限り、「含む」および「含まれる」という言葉、ならびに「含んでいる」および「含まれている」などの変形は、記載の整数または整数の群の包含を意味すると理解されるが、他の整数または整数の群を除外するものではない。

40

【0115】

「アシル」という用語は当技術分野で認識されており、一般式：ヒドロカルビルC(O)-、好ましくはアルキルC(O)-で表される基を指す。

【0116】

「アシルアミノ」という用語は、当技術分野で認識されており、アシル基で置換されたアミノ基を指し、例えば、式：ヒドロカルビルC(O)NH-で表すことができる。

【0117】

「アシルオキシ」という用語は当技術分野で認識されており、一般式：ヒドロカルビル

50

C(O)O-、好ましくはアルキルC(O)O-で表される基を指す。

【0118】

「アルコキシ」という用語は、酸素が結合したアルキル基を指す。代表的なアルコキシ基には、メトキシ、トリフルオロメトキシ、エトキシ、プロポキシ、tert-ブトキシなどが含まれる。

【0119】

「アルコキシアルキル」という用語は、アルコキシ基で置換されたアルキル基を指し、一般式：アルキル-O-アルキルで表すことができる。

【0120】

本明細書で使用される「アルケニル」という用語は、少なくとも1つの二重結合を含む脂肪族基を指し、「非置換アルケニル」および「置換アルケニル」の両方を含むことが意図されており、後者は、アルケニル基の1つまたは複数の炭素上の水素が置換基で置換されたアルケニル部分を指す。典型的には、直鎖または分岐鎖アルケニル基は、特に定義しない限り、1～約20個の炭素原子、好ましくは1～約10個の炭素原子を有する。そのような置換基は、1つまたは複数の二重結合に含まれるまたは含まれない1つまたは複数の炭素上に存在してよい。さらに、そのような置換基には、安定性が禁止的である場合を除き、以下で説明するように、アルキル基について考えられるすべてのものが含まれる。例えば、1つまたは複数のアルキル、カルボシクリル、アリール、ヘテロシクリル、またはヘテロアリール基によるアルケニル基の置換が考えられる。

10

【0121】

「アルキル」基または「アルカン」は、完全に飽和した直鎖または分岐鎖の非芳香族炭化水素である。典型的には、直鎖または分岐鎖アルキル基は、特に定義しない限り、1～約20個、好ましくは1～約10個の炭素原子を有する。一部の実施形態では、アルキル基は、1～8個の炭素原子、1～6個の炭素原子、1～4個の炭素原子、または1～3個の炭素原子を有する。直鎖および分岐鎖アルキル基の例には、メチル、エチル、n-プロピル、iso-プロピル、n-ブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチルおよびオクチルが含まれる。

20

【0122】

さらに、明細書、実施例、および特許請求の範囲全体で使用される「アルキル」という用語は、「非置換アルキル」および「置換アルキル」の両方を含むものとする。後者は、炭化水素骨格の1つまたは複数の置換可能な炭素上の水素を置換した置換基を有するアルキル部分を指す。そのような置換基には、特に明記しない限り、例えば、ハロゲン（例えば、フルオロ）、ヒドロキシル、カルボニル（カルボキシル、アルコキシカルボニル、ホルミル、またはアシルなど）、チオカルボニル（チオエステル、チオアセタート、またはチオホルマートなど）、アルコキシ、ホスホリル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、アミノ、アミド、アミジン、イミン、シアノ、ニトロ、アジド、スルフヒドリル、アルキルチオ、スルファート、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、スルホニル、ヘテロシクリル、アラキル、または芳香族もしくはヘテロ芳香族部分が含まれる。好ましい実施形態では、置換アルキル上の置換基は、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-6</sub>シクロアルキル、ハロゲン、カルボニル、シアノ、またはヒドロキシルから選択される。より好ましい実施形態では、置換アルキル上の置換基は、フルオロ、カルボニル、シアノ、またはヒドロキシルから選択される。適切な場合、炭化水素鎖上の置換された部分自体が置換されていてもよいことは当業者に理解されるであろう。例えば、置換アルキルの置換基には、アミノ、アジド、イミノ、アミド、ホスホリル（ホスホナートおよびホスフィナートを含む）、スルホニル（スルファート、スルホンアミド、スルファモイルおよびスルホナートを含む）、およびシリル基の置換および非置換形態、ならびにエーテル、アルキルチオ、カルボニル（ケトン、アルデヒド、カルボキシラート、エステルを含む）、-CF<sub>3</sub>、-CNなどが含まれ得る。例示的な置換アルキルは下記に記載する。シクロアルキルは、アルキル、アルケニル、アルコキシ、アルキルチオ、アミノアルキル、カルボニル置換アルキル、-CF<sub>3</sub>、-CNなどでさらに置換されていてもよい。

30

40

50

## 【 0 1 2 3 】

「 $C_{x-y}$ 」という用語は、アシル、アシルオキシ、アルキル、アルケニル、アルキニル、またはアルコキシなどの化学部分と組み合わせて使用される場合、鎖に  $x \sim y$  個の炭素を含む基を含むことを意味する。例えば、用語「 $C_{x-y}$  アルキル」は、ハロアルキル基を含めて、鎖中に  $x \sim y$  個の炭素を含む直鎖アルキルおよび分岐鎖アルキル基を含む、置換または非置換飽和炭化水素基を指す。好ましいハロアルキル基には、トリフルオロメチル、ジフルオロメチル、2, 2, 2 - トリフルオロエチル、およびペンタフルオロエチルが含まれる。 $C_0$  アルキルは、その基が末端位置にある場合は水素、内部にある場合は結合を表す。用語「 $C_{2-y}$  アルケニル」および「 $C_{2-y}$  アルキニル」は、上記のアルキルと長さおよび可能な置換は類似するが、それぞれ少なくとも1つの二重結合または三重結合を含む置換または非置換の不飽和脂肪族基を指す。

10

## 【 0 1 2 4 】

本明細書で使用される「アルキルアミノ」という用語は、少なくとも1つのアルキル基で置換されたアミノ基を指す。

## 【 0 1 2 5 】

本明細書で使用される「アルキルチオ」という用語は、アルキル基で置換されたチオール基を指し、一般式：アルキル S - で表すことができる。

## 【 0 1 2 6 】

本明細書で使用される「アリールチオ」という用語は、アリール基で置換されたチオール基を指し、一般式：アリール S - で表すことができる。

20

## 【 0 1 2 7 】

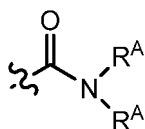
本明細書で使用される「アルキニル」という用語は、少なくとも1つの三重結合を含む脂肪族基を指し、「非置換アルキニル」と「置換アルキニル」の両方を含むことが意図されており、後者は、アルキニル基の1つまたは複数の炭素上の水素を置換する置換基を有するアルキニル部分を指す。典型的には、直鎖または分岐鎖アルキニル基は、特に定義しない限り、1 ~ 約20個、好ましくは1 ~ 約10個の炭素原子を有する。そのような置換基は、1つまたは複数の三重結合に含まれるまたは含まれない1つまたは複数の炭素上に存在してよい。さらに、そのような置換基には、安定性が禁止的である場合を除いて、上述したように、アルキル基について考えられるすべてのものが含まれる。例えば、1つまたは複数のアルキル、カルボシクリル、アリール、ヘテロシクリル、またはヘテロアリール基によるアルキニル基の置換が考えられる。

30

## 【 0 1 2 8 】

本明細書で使用される「アミド」という用語は次式の基を指す：

## 【 化 3 1 】



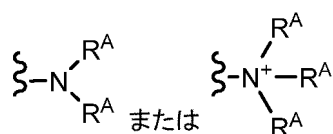
40

式中、各  $R^A$  は独立して水素またはヒドロカルビル基を表すか、あるいは2つの  $R^A$  はそれらが結合しているN原子と一緒に、環構造に4 ~ 8個の原子を有する複素環を完成する。

## 【 0 1 2 9 】

「アミン」および「アミノ」という用語は当技術分野で認識されており、非置換および置換アミンとその塩の両方を指し、例えば、次式により表すことができる部分を指す：

## 【化 3 2】



式中、各  $R^A$  は独立して水素またはヒドロカルビル基を表すか、あるいは2つの  $R^A$  はそれらが結合しているN原子と一緒にあって、環構造に4～8個の原子を有する複素環を完成する。

10

## 【0 1 3 0】

本明細書で使用される「アミノアルキル」という用語は、アミノ基で置換されたアルキル基を指す。

## 【0 1 3 1】

本明細書で使用される「アラルキル」という用語は、アリール基で置換されたアルキル基を指す。

## 【0 1 3 2】

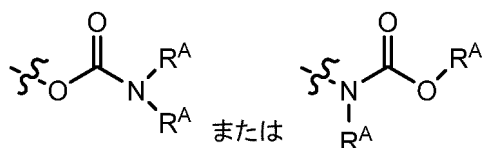
本明細書で使用される「アリール」という用語は、環の各原子が炭素である置換または非置換の単環芳香族基を含む。好ましくは、環は6員環または20員環であり、より好ましくは6員環である。「アリール」という用語は、2つ以上の炭素が2つの隣接する環に共通であり、環の少なくとも1つが芳香族である2つ以上の環を有する多環系も含み、例えば、他方の環はシクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、および/またはヘテロシクリルであってよい。アリール基には、ベンゼン、ナフタレン、フェナントレン、フェノール、アニリンなどが含まれる。

20

## 【0 1 3 3】

「カルバマート」という用語は当技術分野で認識されており、次式の基を指す：

## 【化 3 3】



30

式中、各  $R^A$  は独立して水素またはアルキル基などのヒドロカルビル基を表すか、あるいは両方の  $R^A$  が介在原子と一緒にあって、環構造に4～8個の原子を有する複素環を完成する。

## 【0 1 3 4】

本明細書で使用される「炭素環」および「炭素環式」という用語は、環の各原子が炭素である飽和または不飽和環を指す。好ましくは、炭素環基は3～20個の炭素原子を有する。炭素環という用語には、芳香族炭素環と非芳香族炭素環の両方が含まれる。非芳香族炭素環には、すべての炭素原子が飽和しているシクロアルカン環と、少なくとも1つの二重結合を含むシクロアルケン環の両方が含まれる。「炭素環」には、5～7員の単環および8～12員の二環が含まれる。二環式炭素環の各環は、飽和環、不飽和環、および芳香環から選択することができる。炭素環には、2つの環の間で1つ、2つ、または3つ以上の原子が共有されている二環式分子が含まれる。「縮合炭素環」という用語は、各環が他の環と2つの隣接する原子を共有している二環式炭素環を指す。縮合炭素環の各環は、飽和環、不飽和環、および芳香環から選択することができる。例示的な実施形態では、芳香環、例えばフェニルを、飽和または不飽和環、例えばシクロヘキサン、シクロペンタン、またはシクロヘキセンと縮合させてよい。原子価が許す限り、飽和、不飽和、および芳香族の二環式環の任意の組み合わせが、炭素環の定義に含まれる。例示的な「炭素環」には

40

50

、シクロペンタン、シクロヘキサン、ビシクロ[2.2.1]ヘプタン、1,5-シクロオクタジエン、1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン、ビシクロ[4.2.0]オクト-3-エン、ナフタレンおよびアダマンタンが含まれる。例示的な縮合炭素環には、デカリン、ナフタレン、1,2,3,4-テトラヒドロナフタレン、ビシクロ[4.2.0]オクタン、4,5,6,7-テトラヒドロ-1H-インデンおよびビシクロ[4.1.0]ヘプト-3-エンが含まれる。「炭素環」は、水素原子を持つことができる任意の1つまたは複数の位置において置換されていてよい。

【0135】

「シクロアルキル」基は、完全に飽和した環状炭化水素である。「シクロアルキル」には、単環および二環が含まれる。好ましくは、シクロアルキル基は3~20個の炭素原子を有する。典型的には、単環式シクロアルキル基は、特に定義しない限り、3~約10個の炭素原子、より典型的には3~8個の炭素原子を有する。二環式シクロアルキルの第2の環は、飽和環、不飽和環、および芳香環から選択することができる。シクロアルキルには、2つの環の間で1つ、2つまたは3つ以上の原子が共有されている二環式分子が含まれる。「縮合シクロアルキル」という用語は、各環が他の環と2つの隣接する原子を共有している二環式シクロアルキルを指す。縮合二環式シクロアルキルの第2の環は、飽和環、不飽和環、および芳香環から選択することができる。「シクロアルケニル」基は、1つまたは複数の二重結合を含む環状炭化水素である。

10

【0136】

本明細書で使用される「カルボシクリルアルキル」という用語は、炭素環基で置換されたアルキル基を指す。

20

【0137】

本明細書で使用される「カルボナート」という用語は、 $-OCO_2-R^A$  で表される基を指し、ここで、 $R^A$  はヒドロカルビル基を表す。

【0138】

本明細書で使用される「カルボキシ」という用語は、式  $-CO_2H$  で表される基を指す。

【0139】

本明細書で使用される「エステル」という用語は、 $-C(O)OR^A$  で表される基を指し、ここで、 $R^A$  はヒドロカルビル基を表す。

30

【0140】

本明細書で使用される「エーテル」という用語は、酸素を介して別のヒドロカルビル基に結合したヒドロカルビル基を指す。したがって、ヒドロカルビル基のエーテル置換基は、ヒドロカルビル-O-であり得る。エーテルは対称または非対称のいずれであってもよい。エーテルの例には、複素環-O-複素環およびアリール-O-複素環が含まれるが、これらに限定されない。エーテルには、一般式：アルキル-O-アルキルで表される「アルコキシアルキル」基が含まれる。

【0141】

本明細書で使用される「ハロ」および「ハロゲン」という用語は、ハロゲンを意味し、クロロ、フルオロ、プロモ、およびヨードが含まれる。

40

【0142】

本明細書で使用される「ヘタラルキル」および「ヘテロアラルキル」という用語は、ヘタリール基で置換されたアルキル基を指す。

【0143】

本明細書で使用される「ヘテロアルキル」という用語は、炭素原子および少なくとも1つのヘテロ原子の飽和または不飽和鎖を指し、2つのヘテロ原子は隣接していない。

【0144】

「ヘテロアリール」および「ヘタリール」という用語は、置換または非置換の芳香族単環構造、好ましくは5~20員環、より好ましくは5~6員環を含み、その環構造は少なくとも1個のヘテロ原子、好ましくは1~4個のヘテロ原子、より好ましくは1個または

50

2 個のヘテロ原子を含む。「ヘテロアリール」および「ヘタリール」という用語には、2 つ以上の炭素が 2 つの隣接する環に共通であり、少なくとも 1 つの環がヘテロ芳香族である 2 つ以上の環を有する多環式環系も含まれ、例えば、他方の環はシクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、および / またはヘテロシクリルであってよい。ヘテロアリール基には、例えば、ピロール、フラン、チオフェン、イミダゾール、オキサゾール、チアゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリダジン、およびピリミジンなどが含まれる。

【0145】

本明細書で使用される「ヘテロ原子」という用語は、炭素または水素以外の任意の元素の原子を意味する。好ましいヘテロ原子は、窒素、酸素、および硫黄である。

10

【0146】

用語「ヘテロシクリル」、「複素環」、および「複素環式」は、その環構造に少なくとも 1 個のヘテロ原子、好ましくは 1 ~ 4 個のヘテロ原子、より好ましくは 1 個または 2 個のヘテロ原子が含まれる、置換または非置換の非芳香族環構造、好ましくは 3 ~ 20 員環、より好ましくは 3 ~ 7 員環を指す。用語「ヘテロシクリル」および「複素環式」には、2 つ以上の炭素が 2 つの隣接する環に共通であり、少なくとも 1 つの環が複素環である 2 つ以上の環を有する多環式環系も含まれ、例えば、他方の環はシクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、および / またはヘテロシクリルであってよい。ヘテロシクリル基（または複素環基）には、例えば、ピペリジン、ピペラジン、ピロリジン、モルホリン、ラクトン、ラクタムなどが含まれる。

20

【0147】

本明細書で使用される「ヘテロシクリルアルキル」という用語は、複素環基で置換されたアルキル基を指す。

【0148】

本明細書で使用される「ヒドロカルビル」という用語は、炭素原子を介して結合し、その炭素原子が = O または = S 置換基を有さない基を指す。ヒドロカルビルは、任意選択で、ヘテロ原子を含んでいてもよい。ヒドロカルビル基には、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシアルキル、アミノアルキル、アラルキル、アリール、アラルキル、カルボシクリル、シクロアルキル、カルボシクリルアルキル、ヘテロアラルキル、炭素原子を介して結合したヘテロアリール基、炭素原子を介して結合したヘテロシクリル基、ヘテロシクリルアルキル、またはヒドロキシアルキルが含まれるが、これらに限定されない。したがって、メチル、エトキシエチル、2 - ピリジル、およびトリフルオロメチルなどの基はヒドロカルビル基であるが、アセチル（連結炭素上に = O 置換基を持つ）やエトキシ（炭素ではなく酸素を介して結合する）などの置換基はヒドロカルビル基ではない。

30

【0149】

本明細書で使用される「ヒドロキシアルキル」という用語は、ヒドロキシ基で置換されたアルキル基を指す。

【0150】

「低級」という用語は、アシル、アシルオキシ、アルキル、アルケニル、アルキニル、またはアルコキシなどの化学部分と組み合わせて使用する場合、置換基に 6 個以下の非水素原子がある基を含むことを意味する。例えば、「低級アルキル」は、6 個以下の炭素原子を含むアルキル基を指す。一部の実施形態において、アルキル基は、1 ~ 6 個の炭素原子、1 ~ 4 個の炭素原子、または 1 ~ 3 個の炭素原子を有する。ある実施形態では、本明細書で定義されるアシル、アシルオキシ、アルキル、アルケニル、アルキニル、またはアルコキシ置換基は、それらが単独で現れるか、あるいは例えばヒドロキシアルキルおよびアラルキル（この場合、例えば、アルキル置換基の炭素原子を数えるとき、アリール基内の原子は数えられない）の記載のように他の置換基と組み合わせて現れるかにかかわらず、それぞれ低級アシル、低級アシルオキシ、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルキニル、または低級アルコキシである。

40

【0151】

50

用語「ポリシクリル」、「多環」、および「多環式」は、2つ以上の原子が2つの隣接する環に共通である、2つ以上の環（例えば、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール、ヘテロアリール、および/またはヘテロシクリル）を指し、例えば、環は「縮合環」である。多環の各環は置換されていても非置換であってもよい。ある実施形態では、多環の各環は、環内に3～10個、好ましくは5～7個の原子を含む。

【0152】

「ポリ（メタ-フェニレンオキシド）」の語句において、用語「フェニレン」は、包括的に、6員アリールまたは6員ヘテロアリール部分を指す。例示的なポリ（メタ-フェニレンオキシド）は、本開示の第1～第20の態様に記載されている。

【0153】

「シリル」という用語は、3つのヒドロカルビル部分が結合したシリコン部分を指す。

【0154】

「置換された」という用語は、骨格の1つまたは複数の炭素上の水素を置換する置換基を有する部分を指す。「置換」または「で置換された」は、そのような置換が、置換される原子および置換基の許容される原子価に従い、置換により安定な化合物、例えば、再配置、環化、除去などによる変形を自発的に受けない化合物がもたらされるという、暗黙の条件を含むことが理解されるであろう。置換され得る部分には、本明細書に記載される任意の適切な置換基、例えば、アシル、アシルアミノ、アシルオキシ、アルコキシ、アルコキシアルキル、アルケニル、アルキル、アルキルアミノ、アルキルチオ、アリールチオ、アルキニル、アミド、アミノ、アミノアルキル、アラキル、カルバマート、カルボシクリル、シクロアルキル、カルボシクリルアルキル、カーボナート、エステル、エーテル、ヘテロアラキル、ヘテロシクリル、ヘテロシクリルアルキル、ヒドロカルビル、シリル、スルホン、またはチオエーテルが含まれ得る。本明細書で使用される「置換」という用語は、有機化合物のすべての許容可能な置換基を含むことが企図される。広い態様において、許容される置換基には、有機化合物の非環式および環式、分岐および非分岐、炭素環式および複素環式、芳香族および非芳香族の置換基が含まれる。許容される置換基は、適切な有機化合物に対して1つまたは複数であってもよく、また同じでも異なっているもよい。本発明の目的のために、窒素などのヘテロ原子は、水素置換基および/またはヘテロ原子の原子価を満たす本明細書に記載の有機化合物の任意の許容可能な置換基を有している。置換基には、本明細書に記載の任意の置換基、例えば、ハロゲン、ヒドロキシル、カルボニル（カルボキシル、アルコキシカルボニル、ホルミル、またはアシルなど）、チオカルボニル（チオエステル、チオアセタート、またはチオホルマートなど）、アルコキシ、ホスホリル、ホスファート、ホスホナート、ホスフィナート、アミノ、アミド、アミジン、イミン、シアノ、ニトロ、アジド、スルフヒドリル、アルキルチオ、スルファート、スルホナート、スルファモイル、スルホンアミド、スルホニル、ヘテロシクリル、アラキル、または芳香族もしくはヘテロ芳香族部分が含まれ得る。好ましい実施形態では、置換アルキル上の置換基は、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{3-6}$ シクロアルキル、ハロゲン、カルボニル、シアノ、またはヒドロキシルから選択される。より好ましい実施形態では、置換アルキル上の置換基は、フルオロ、カルボニル、シアノ、またはヒドロキシルから選択される。適切であれば、置換基自体を置換できることが当業者に理解されるであろう。「非置換」と具体的に記載されていない限り、本明細書の化学部分への言及は、置換変異体を含むと理解される。例えば、「アリール」基または部分への言及は、置換および非置換の両方の変異体を暗黙的に含む。

【0155】

「スルホナート」という用語は当技術分野で認識されており、 $SO_3H$ 基、またはその薬学的に許容される塩を指す。

【0156】

「スルホン」という用語は当技術分野で認識されており、 $-S(O)_2-R^A$ で表される基を指し、ここで $R^A$ はヒドロカルビルを表す。

【0157】

10

20

30

40

50



本明細書で使用される「チオエーテル」という用語は、酸素が硫黄で置き換えられているエーテルと同等である。

#### 【実施例】

#### 【0158】

##### 材料および機器

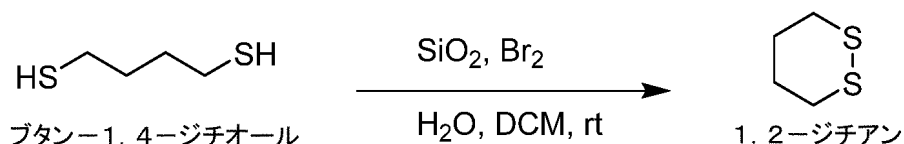
1, 2 - ジチアンおよび 1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドの両方の合成に使用される 1, 4 - ブタンジチオールは、TCI America (米国、オレゴン州、ポートランド) から購入した。速度論的アッセイ (kinetic assay) 実験で使用したすべてのバッファー成分および溶媒 (ESI 溶媒を含む) は、Sigma - Aldrich (米国、ミズーリ州、セントルイス) から購入したギ酸を除き、Fisher Scientific (米国、ニューハンプシャー州、ハンプトン) から購入した。サンプルのインキュベーションは、Eppendorf Thermomixer R (米国、ニューヨーク、Hampden) で行った。すべての細胞培養材料は、ATCC (米国、バージニア州、マナッサス) から購入した。細胞を ThermoFisher Isotemp インキュベーター (米国、マサチューセッツ州、ウォルサム) でインキュベートした。SDS Page は、Bio Rad (米国、カリフォルニア州、Hercules) の MiniProtean 電気泳動チャンバ (Hep G2 実験) および Criterion 電気泳動チャンバ (HeLa 実験) を使用して実行した。Cu/Zn SOD ポリクローナル抗体は、Enzo (米国、ニューヨーク州、ファーマングデール) から購入した。Pierce 二次抗体は、Thermo Scientific (米国、マサチューセッツ州、ウォルサム) から購入した。膜は、Bio Rad ChemiDoc MP (米国、カリフォルニア州、Hercules) で画像化した。速度論的アッセイの質量スペクトルは、エレクトロスプレーイオン化源と 9.4 テスラ磁石とを備えた Bruker Solarix XR FT - ICR 質量分析計で取得した。取得したデータは、Bruker Daltonics DataAnalysis 4.4.102 ソフトウェア (米国、マサチューセッツ州、ビレリカ) を使用して解析および処理した。<sup>1</sup>H NMR スペクトルは、内部標準として残留溶媒のシグナル (CHCl<sub>3</sub> 7.26 ppm) で示される溶媒中、400 MHz で動作する Varian Mercury NMR 分光計 (米国カリフォルニア州パロアルト) において周囲温度で記録した。<sup>13</sup>C NMR スペクトルは、内部標準として残留溶媒のシグナル (CHCl<sub>3</sub> 77.16 ppm) で示される溶媒中、100 MHz で動作する Varian NMR 分光計において周囲温度で <sup>1</sup>H (プロトン) デカップリング測定で記録した。データは次のように報告される: 化学シフト、多重度 (m = 多重線、dt = 二重の三重線、td = 三重の二重線、dt = 二重の三重の三重線)、積分値および結合定数 (Hz)。薄層クロマトグラフィー (TLC) は、シリカゲル 60 F254 プレコートプレートを使用して実施し、UV 光 (254 nm) に暴露してまたは過マンガン酸カリウム染色 (KMnO<sub>4</sub>) に続いて加熱することによって可視化した。フェニルアルシンオキシドは、Sigma - Aldrich (米国、ミズーリ州、セントルイス) から購入した。SOD1 (WT および C111S) 酵母発現ベクターは、P. J. Hart (テキサス大学健康科学センター) により親切に提供された。フェニルセファロス疎水性相互作用クロマトグラフィーカラムおよび Mono Q 10/100 陰イオン交換クロマトグラフィーカラムはいずれも GE Life Sciences (米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ) から購入し、タンパク質精製は Akta Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) (米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ) で実施した。LC - MS データは、Bruker HCT Ultra イオントラップ (米国、マサチューセッツ州、ビレリカ) で収集した。

#### 【0159】

##### 方法

##### 1, 2 - ジチアンの合成

## 【化 3 4】



1, 2 - ジチアンの調製は、既知の文献手順<sup>3 7</sup>から適合させた。シリカゲル (40 ~ 60 μm 粒子径、60 孔径、41 g) を丸底フラスコに添加し、蒸留水 (102 mL) を均一な懸濁液が形成されるまで激しく攪拌しながらゆっくりと加えた。攪拌しながら、ジクロロメタン (200 mL) および 1, 4 - ブタンジチオール (2.00 g、16.4 mmol、1 当量) を懸濁液に加えた。激しく攪拌しながら、ジクロロメタン (16 mL) 中の Br<sub>2</sub> (2.88 g、18 mmol、1.10 当量) の溶液をオフホワイトの懸濁液に滴下した。反応混合物を 5 分間攪拌し、TLC 分析により反応の完了を確認した。反応混合物をセライトで濾過し、1.25 M NaOH (12 mL) の攪拌溶液を含むフラスコに入れた。無色の有機相を除去し、蒸留水 (3 x 50 mL) で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧下で除去し、粗生成物を -20 でヘキサンから結晶化させて、1, 2 - ジチアンを白色の結晶固体として得た (1.63 g、83%)。R<sub>f</sub> = 0.80 (ヘキサン : EtOAc = 5 : 1) ; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 1.97 (bs, 4H), 2.85 (bs, 4H) ; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ) : 27.9, 33.5. mp 29 - 32 (文献値 28 - 30)<sup>3 7</sup>。

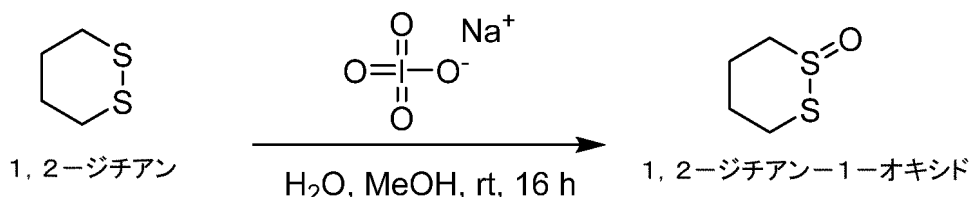
10

20

## 【0160】

1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドの合成

## 【化 3 5】



30

1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドの調製は、既知の文献手順<sup>3 7</sup>から適合させた。水 (64 mL) 中の過ヨウ素酸ナトリウム (843 mg、3.94 ミリモル、1.10 当量) の溶液を、0 でメタノール (193 mL) 中の 1, 2 - ジチアン (431 mg、3.58 ミリモル、1 当量) の攪拌溶液に滴下した。反応混合物を 16 時間 (h) 攪拌し、TLC 分析により反応の完了を確認した。白いスラリーを室温 (rt) まで温め、セライトで濾過し、濾液を減圧下で濃縮した。残りの溶液をクロロホルム (40 mL) で希釈し、分液漏斗に移した。少量の固体 NaCl を加え、水層を CHCl<sub>3</sub> (3 x 40 mL) で抽出した。合わせた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧下で除去し、2% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を用いたシリカゲルでのフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドを無色の固体として得た (214 mg、44%)。R<sub>f</sub> = 0.33 (2% MeOH / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) ; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ) : 1.85 - 1.88 (m, 1H), 1.96 - 2.06 (dtt, J = 13.7, 12.7, 3.0 Hz, 1H), 2.11 - 2.15 (m, 1H), 2.62 - 2.71 (m, 2H), 3.04 - 3.12 (dt, J = 13.1, 3.0 Hz, 1H), 3.18 - 3.23 (td, J = 13.3, 3.6 Hz, 1H), 3.62 - 3.70 (ddd, J = 14.5, 12.0, 2.5 Hz, 1H) ; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ) : 15.3, 23.5, 25.8, 51.9. HRMS - ESI

40

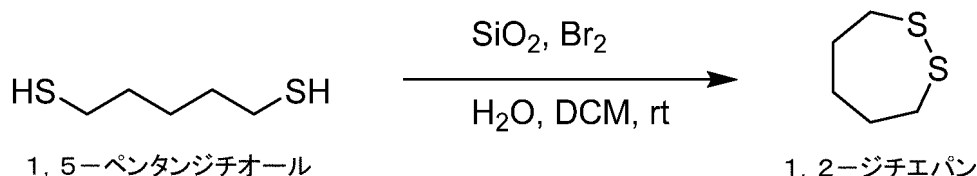
50

( $m/z$ ) :  $[M+H]^+$   $C_4H_8OS_2$  の計算値 : 137.00893 Da ; 実測値 : 137.00893 Da . mp 83 - 86 °C (文献値 85 °C)<sup>3 7</sup>。

【0161】

1, 2 - ジチエパンの合成

【化36】



10

1, 2 - ジチエパンの調製は、既知の文献の手順から適合させた<sup>3 7</sup>。シリカゲル（粒径 40 ~ 60  $\mu m$ 、孔径 60、46 g）を丸底フラスコに添加し、蒸留水（23 mL）を均一な懸濁液が形成されるまで激しく攪拌しながらゆっくりと加えた。攪拌しながら、ジクロロメタン（230 mL）および 1, 5 - ペンタンジチオール（3.00 g、22.01 mmol、1 当量）を懸濁液に添加した。激しく攪拌しながら、ジクロロメタン（23 mL）中の  $Br_2$ （3.87 g、24.22 mmol、1.10 当量）の溶液をオフホワイトの懸濁液に滴下した。反応混合物を 5 分間攪拌し、TLC 分析により反応の完了を確認した。反応混合物をセライトで濾過し、1.25 M NaOH（110 mL）の攪拌溶液を含むフラスコに入れた。無色の有機相を除去し、蒸留水（3 x 70 mL）で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧下で除去し、粗生成物をヘキサン / EtOAc（20 : 1）を用いたシリカゲルでのフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、1, 2 - ジチエパンを透明な液体として得た（2.83 g、96%）。 $R_f = 0.82$ （ヘキサン : EtOAc = 9 : 1）； $^1H$  NMR（400 MHz,  $CDCl_3$ , ） : 1.75 - 1.79 (m, 2H), 2.00 - 2.05 (m, 4H), 2.82 - 2.84 (t,  $J = 6.3$ , 4H)； $^{13}C$  NMR（100 MHz,  $CDCl_3$ , ） : 26.0, 30.0, 39.2。

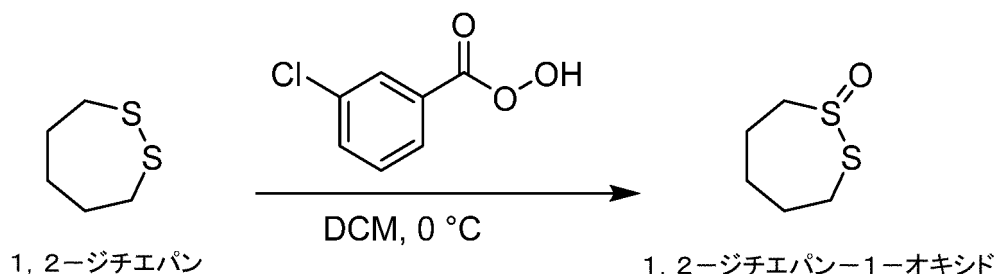
20

【0162】

1, 2 - ジチエパン - 1 - オキシドの合成

30

【化37】



40

1, 2 - ジチエパンの調製は、ジスルフィドの酸化に関する既知の文献手順から適合させた<sup>3 8</sup>。mCPBA（73%、214 mg、0.909 mmol、1.07 等量）を 0 で無水ジクロロメタン（5.5 mL）中の 1, 2 - ジチエパン（114 mg、0.849 mmol、1 当量）の溶液に添加した。その溶液を氷浴で 1 時間攪拌した後、炭酸ナトリウム（1 g）を加え、0 で 30 分間攪拌した。溶液をセライトパッドおよび硫酸マグネシウムで濾過し、溶媒を減圧下で除去し、粗生成物をヘキサン / EtOAc（5 : 1）を用いたシリカゲルでのフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製し、1, 2 - ジチエパン - 1 - オキシドを透明な液体として得た（97 mg、76%）。 $R_f = 0.19$ （ヘキサン : EtOAc = 5 : 1）； $^1H$  NMR（400 MHz,  $CDCl_3$ , ） :

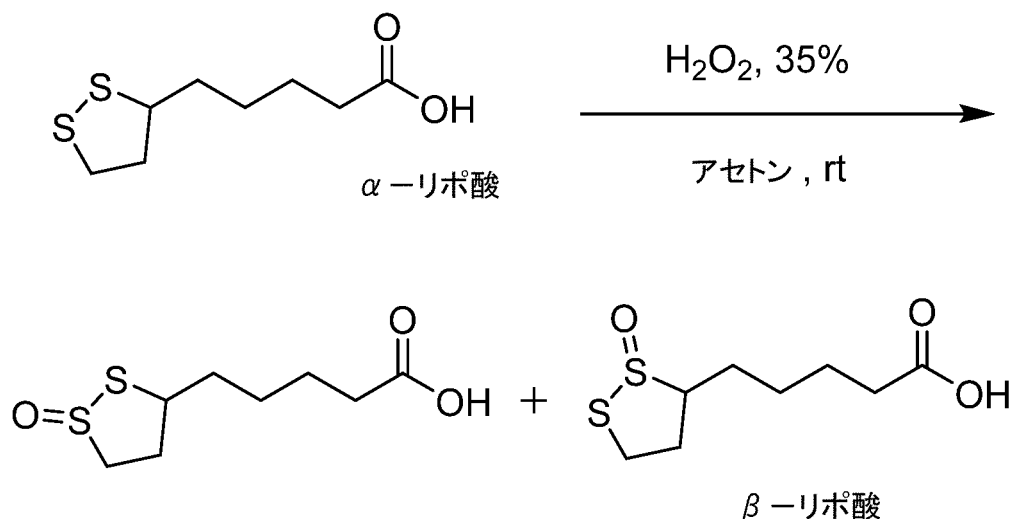
50

1.73 - 1.81 (m, 1H), 1.91 - 2.02 (m, 4H), 2.09 - 2.16 (m, 1H), 2.77 - 2.86 (m, 2H), 3.36 - 3.41 (dd, J = 6.5, 13.8 Hz, 1H), 3.50 - 3.57 (m, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 18.02, 22.31, 26.77, 28.46, 60.56. HRMS - ESI (m/z):  $[\text{M} + \text{H}]^+ \text{C}_5\text{H}_{10}\text{OS}_2$  の計算値: 151.024584 Da; 実測値: 151.02498 Da。

【0163】

- リポ酸の合成

【化38】



10

20

30

40

50

- リポ酸の調製は、既知の文献手順から適合させた<sup>39</sup>。過酸化水素水 (0.841 mL、 $\text{H}_2\text{O}$  中 35%、9.77 ミリモル、2 当量) をアセトン (2.5 mL) 中の DL-チオクト酸 (- リポ酸、1.01 g、4.89 ミリモル、1 当量) の溶液に添加し、24 時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、ジクロロメタン (25 mL) で希釈した後、ブライン (50 mL) に添加した。水層をジクロロメタン (3 x 25 mL) で抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧下で除去し、3% MeOH /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、0.1% AcOH を用いたシリカゲルでのフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、- リポ酸を無色の油として得た (418 mg、39%)。Rf = 0.46 (8% MeOH /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、0.1% AcOH)。 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルおよび  $^{13}\text{C}$ -NMR のデータは、4 つのすべての立体異性体と位置異性体の混合物について他者が報告したデータ<sup>39-40</sup>と一致した： $^1\text{H}$ -R および  $^{13}\text{C}$ -NMR の化学シフトは、Mueller<sup>40</sup>らによって実施された 2D 技術によって報告されているように正確に観察された。HRMS - ESI (m/z):  $[\text{M} + \text{H}]^+ \text{C}_4\text{H}_{14}\text{O}_3\text{S}_2$  の計算値: 223.04571 Da; 実測値: 223.04626 Da。

【0164】

1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドおよび 1, 2 - ジチアンの架橋の速度論

環状ジスルフィドおよび環状チオスルフィナートの架橋活性を試験するために、1, 2 - ジチアンおよび 1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドを合成し、隣接サブユニット上に溶媒接触可能なチオールペア ( $\text{Cys}_{111\text{A}+\text{B}}$ 、8 離れている) を含むホモ二量体タンパク質である SOD1 とインキュベートした。極超音速ガス膨張領域内の電圧上昇と 10% ギ酸での短時間処理の組合せを使用して、単量体 SOD1 または共有結合架橋した SOD1 二量体のみを作成する反応を、質量分析 (MS) アッセイを使用して監視した。ギ酸は反応をクエンチし、あらゆる反応性チオールを非反応性チオールに変換する。その結果、反応が起こらなければ、apo-SOD1 (アポ型 SOD1) 単量体のみが検出される (図 2A)。我々の仮説のメカニズムと一致して: 1) 1, 2 - ジチアン - 1 - オキシド

は、SOD1の迅速かつ完全なジチオラート架橋（半減期は2～3分）をもたらしたが、1, 2 - ジチアンはもたらさなかった（図2B、および図3）；2）単一Cys残基（SOD1は遊離Cys<sub>111</sub>とCys<sub>6</sub>を有する）への結合は、いずれの化合物のサンプルでも観察されなかった；3）1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドのS - オキシソからの酸素の損失なしには架橋は観察されなかった；4）1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドをC<sub>111</sub>S SOD1とインキュベートした場合、架橋は観察されなかった（図4）。チオラートがスルフェン酸に酸化されるのに十分な時間（数日～数週間のオーダーで起こる）を考えると、1, 2 - ジチアンでもSOD1を架橋すると予想された。1, 2 - ジチアンとの72時間のインキュベーション後、11%のSOD1が、予想された共有結合二量体を形成していた（図5）。SOD1と1, 2 - ジチエパンおよび1, 2 - ジチエパン - 1 - オキシドとのインキュベーションから同等の結果が観察された（図13）。SOD1と1, 2 - ジチオカンおよび1 - オキシソ - 1, 2 - ジチオカンとのインキュベーションからも同等の結果が観察された（図15）。

10

20

30

40

50

#### 【0165】

1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドと比較して1, 2 - ジチアンの架橋効率の速度論的試験をタンデムで実施した。10 mMの酢酸アンモニウム（pH 7.4）中の50 μlのヒトWT SOD1を、1000 μlの1, 2 - ジチアンまたは1, 2 - ジチアン - 1 - オキシド（20倍過剰）と37 でインキュベートした。ヒトWT SOD1は酵母で発現させた。1, 2 - ジチアンおよび1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドの両方をHPLCグレードの100%メタノールに溶解して、25 mMのストック濃度にした。実験前に、HPLCグレードの水で1 mMの環状ジスルフィドに希釈した。陰性対照として、50 μlのヒトWT SOD1を4%のHPLCグレードのメタノールと37 でインキュベートした。分析の各時点で、1 μlの各サンプルをそれぞれの反応バイアルから取り出した。サンプルを10%のギ酸と室温で短時間（～30秒）インキュベートして、質量分析の前にSOD1から金属を除去し、架橋反応をクエンチした。次に、サンプルをアセトニトリル：水（50：50）、0.1%FA中の1 μl SOD1に希釈し、Bruker Solarix XR FT-ICR質量分析計に直接注入して分析した。相対的な二量体（31,808 Da）と単量体（15,844 Da）のMaxEntデコンボリューションされたピークの高さ（二量体 / （二量体 + 単量体））を比較して、二量体形成パーセントを計算した。同じ方法を - リポ酸および - リポ酸の速度論的試験に使用した。1, 2 - ジチエパンと1, 2 - ジチエパン - 1 - オキシドの速度論試験は、SOD1二量体：架橋剤の比が1：1で実施した。

#### 【0166】

hSOD1（WTおよびC111S）の発現および精製

WT SOD1およびC111S SOD1の発現および精製は、以前に公開されたとおり実施した<sup>41-43</sup>。簡単に説明すると、酵母発現ベクターYEp-351にクローニングしたヒトSOD1 cDNAをEGY118 SOD1酵母に導入し、30で36～48時間増殖させた。培養物をペレット化し、0.5 mmのガラスビーズとブレンダーを使用して溶解し、氷上で60%硫酸アンモニウムカットにかけた。硫酸アンモニウム沈殿法の後、サンプルをペレット化し、上清を～0.19容量のバッファー（50 mMリン酸ナトリウム、150 mM塩化ナトリウム、0.1 M EDTA、0.25 mM DTT、pH 7.0）で希釈して、2.0 M硫酸アンモニウムの最終濃度にした。次に、高塩バッファー（2.0 M硫酸アンモニウム、50 mMリン酸ナトリウム、150 mM塩化ナトリウム、0.1 M EDTA、0.25 mM DTT、pH 7.0）から低塩濃度バッファー（50 mMリン酸ナトリウム、150 mM塩化ナトリウム、0.1 M EDTA、0.25 mM DTT、pH 7.0）への300 mLの直線的に減少する塩勾配を用いるフェニルセファロース疎水性相互作用クロマトグラフィーカラムを使用して、サンプルを精製した。SOD1を含むサンプルは、通常、1.6～1.1 Mの硫酸アンモニウムの間に溶出し、これは、ゲル電気泳動を使用して確認された。SOD1含有画分をプールし、10 mM Tris（pH 8.0）バッファーに交換した。次に、タンパク質をMon

o Q 10 / 100 陰イオン交換クロマトグラフィーカラムにロードし、低塩バッファー (10 mM Tris、pH 8.0) から高塩バッファー (10 mM Tris、pH 8.0、1 M 塩化ナトリウム) への 200 ml の直線的に増加する塩勾配を用いて溶出した。勾配は、0 ~ 30 % の 10 mM Tris、pH 8.0、1 M 塩化ナトリウムで行い、SOD1 は 5 ~ 12 % の 10 mM Tris、pH 8.0、1 M 塩化ナトリウムで溶出される。陰イオン交換からの SOD1 画分を、ゲル電気泳動を使用して確認した。最終的な SOD1 含有画分を一緒にプールし、ミリポア (Millipore) のアミコン遠心フィルターにおいて 10 mM の重炭酸アンモニウムで 3 回洗浄し、バッファーを 10 mM の酢酸アンモニウム (pH 7.4) に交換した。使用するまでタンパク質を -80 で保存した。

10

## 【0167】

点突然変異 C111S SOD1 を使用した架橋の位置特定

1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドを最初に 100 % DMSO に溶解した。酵母から精製した組換えヒト WT SOD1 および C111S SOD1 (10  $\mu$ ) を、希釈後に 0.1 % DMSO 中の 100  $\mu$  の 1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドと室温で一晩インキュベートした。各 SOD1 インキュベーションからのアリコート、0.1 % ギ酸含有 H<sub>2</sub>O で個々に 10 倍希釈し、Bruker HCT Ultra イオントラップで逆相 C18 LC-MS を使用して分析した。得られたデータを、Data Analysis 3.4 (Bruker Daltonics) を使用して処理した。質量スペクトルは、SOD1 が溶出した時点に対応する保持時間にわたり平均化され、非荷電種の分子量を決定するためにデコンボリューションされた。液体クロマトグラフィー中に用いられた酸性条件および比較的過酷なエレクトロスプレーイオン化プロセスにより、天然の金属の損失と天然の二量体の解離が生じたことに留意されたい。

20

## 【0168】

In vitro グルタチオン競合アッセイ

精製 WT SOD1 を、10 mM 酢酸アンモニウム (pH 7.4) で 10  $\mu$ M に希釈した。タンパク質を、新たに調製した 5 % メタノール中の 100  $\mu$ M の 1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドおよび 1000  $\mu$ M の還元型グルタチオン (水中) と 37 で一定時間インキュベートした。サンプルを 10 % ギ酸で短時間 (10 秒) 抽出し、0 分、1 分、10 分、100 分、1000 分に分析した。対照サンプルには次のものが含まれる：1) 10  $\mu$  SOD1；2) 10  $\mu$  SOD1 + 100  $\mu$  1, 2 - ジチアン - 1 - オキシド；3) 10  $\mu$  SOD1 + 1000  $\mu$  還元型グルタチオン。サンプルを 10 % ギ酸と室温で短時間 (~30 秒) インキュベートして、質量分析の前に SOD1 から金属を除去した。その後、サンプルをアセトニトリル：水 (50 : 50)、0.1 % FA で 1  $\mu$ M SOD1 に希釈し、Bruker Solarix XR FT-ICR 質量分析計に直接注入して分析した。相対的な二量体 (31, 808 Da) と単量体 (15, 844 Da) の MaxEnt デコンボリューションされたピークの高さ (二量体 / (二量体 + 単量体)) を比較して、二量体形成パーセントを計算した。

30

## 【0169】

In vitro DTT 競合アッセイ

精製 WT SOD1 を 10 mM の酢酸アンモニウム (pH 7.4) で 50  $\mu$ M に希釈した。2  $\mu$ L の 50  $\mu$ M SOD1 溶液を、1  $\mu$ L の 2 mM 1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドおよび 1  $\mu$ L の様々な濃度の DTT とインキュベートした。DTT 溶液は、100 % の HPLC グレードの H<sub>2</sub>O で作成した。DTT 溶液の濃度は、1 mM、2 mM および 4 mM であった。サンプルを 37 で 24 時間インキュベートした。次に、サンプルをアセトニトリル：水 (50 : 50)、0.1 % FA で 1  $\mu$  SOD1 に希釈したし、Bruker Solarix XR FT-ICR 質量分析計に直接注入して分析した。

40

## 【0170】

Hep-G2 細胞での細胞培養および 1, 2 - ジチアン - 1 - オキシド / 1, 2 - ジチアンの投薬、ならびに - リボ酸 / - リボ酸

50

1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドが細胞透過性のジチオールペア架橋剤として有用であることを実証するために、2つの広く使用されているヒト細胞株 (Hep G2 および HeLa) の両方において、競合する還元型グルタチオンまたはDTTの存在下で、精製SOD1を用いて架橋反応を調べた。グルタチオンは、7 mMまでの濃度でヒト細胞に存在する; Hep G2 および HeLa 細胞はいずれも約5 mMのグルタチオンを含んでいる<sup>30</sup>。様々な濃度の1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドと30分間インキュベートしたHep G2 細胞 (図2C) およびHeLa細胞 (図6) は、ウェスタンブロットで $\sim 5 \mu$ のEC<sub>50</sub>を示し、細胞条件が架橋を妨げないことを確認した。細胞生存率は、EC<sub>50</sub>より50倍高い1, 2 - ジチアン - 1 - オキシド濃度により影響を受けず、1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドのLC<sub>50</sub>はEC<sub>50</sub>よりも約200倍高かった (図7)。細胞試験と一致して、精製SODの架橋は、10:1の比のグルタチオン: 1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドの存在下で完了まで進行し (図10)、さらに等モル濃度の還元剤ジチオスレイトール (DTT) の存在下でも完了まで進行した (図11)。おそらく還元剤と1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドとの間の可逆的チオラート - ジスルフィド交換のせいで、架橋速度は競合還元剤の存在下で低下した (1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドまたはSOD1のグルタチニルまたはDTT付加物は観察されなかった)。これらの結果は、適度な量の追加の還元剤の存在下でさえ、これら架橋剤が有用であることを確認する。

#### 【0171】

環状ジスルフィド<sup>31</sup>およびその誘導体 (例えば、ジチオレンチオン)<sup>24</sup> は治療的に使用されており、それらの標的の多くが知られている。しかしながら、栄養補助食品や糖尿病合併症治療の - リボ酸 (ALA) を含めて、これら薬物の結合メカニズムは特徴づけられていない<sup>25</sup>。環状ジスルフィド媒介架橋の適用性を広げ、潜在的な作用機序を探るために、ALAを購入し、ALA栄養補助食品の質量分析アッセイで観察された - リボ酸 (BLA) を合成し、上記のようにアッセイした。ALAと比較して、BLAは細胞においてSOD1を架橋し、*in vitro*で30%多くSOD1を架橋した (図8および図9)。特に、ALAおよびBLAの末端カルボン酸は官能化の機会を提供する<sup>32</sup>。

#### 【0172】

Hep G2 細胞は、37、5% CO<sub>2</sub> で、96ウェルCostar (登録商標) コーニングCellBINDプレートにおいて、10%ウシ胎児血清およびペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEMで培養した。細胞を単層コンフルエントまで培養した。1, 2 - ジチアンおよび1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドの20 mM、2 mM、200  $\mu$  M、20  $\mu$ 、および2  $\mu$  のストックを100% DMSOで調製した。ストックを1 x PBSで20倍に希釈した (最終5% DMSO)。細胞を200  $\mu$  Lの化合物で処理し、37、5% CO<sub>2</sub> で30分間インキュベートした。細胞を1 x PBSで洗浄し、20  $\mu$  Lの6 x 非還元サンプルバッファーを各ウェルに添加した。96ウェルプレートを90に10分間加熱した。サンブラーをBeckman Coulter Microfuge (登録商標) 18遠心分離機において14000 RPMで5分間回転させた。150 Vで、12%プレキャストTGXポリアクリルアミドゲルにおいて、Bio Rad Mini-Protean電気泳動チャンバを使用してサンプルを泳動した。分離が完了した後、ゲルをカセットから取り出し、社内の転写バッファー中、90で10分間インキュベートして、タンパク質バンドの完全な転写、および抗体の完全な結合を確実にした (25 mM Tris、192 mMグリシン、10 mM 2 -メルカプトエタノール、0.1% SDS)。転写は、トランスブロットTurbo転写パックを使用して、Bio RadトランスブロットTurbo転写システムで実施した。膜を乾燥させ、室温で2時間、5%ミルクでブロッキングした。次いで、一次抗体として抗SOD1抗体のSOD100を用いて、4で一晩プローブした。膜をHRP標識二次抗体とインキュベートし、ECL Western Blotting Substrateを使用して視覚化し、Chemidoc MPを使用して画像化する。

#### 【0173】

HeLa細胞での細胞培養および1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドの投薬アッセイ

HeLa細胞は、37℃、5%CO<sub>2</sub>で、24ウェルCostar（登録商標）コーニングCellBINDプレートにおいて、10%ウシ胎児血清およびペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEMで培養した。細胞を単層コンフルエントまで培養した。DMSOに溶解させて100mM濃度の1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドを作成した。その100mM溶液を1xPBS溶液で様々な濃度に希釈した。その溶液1mLを24ウェルプレートのHeLa細胞に添加した。1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドを細胞と1時間相互作用させた。細胞を1mLのPBSで2回洗浄した。2回目のPBS洗浄液を除去した後、細胞を6X非還元SDSサンプルバッファーで処理し、収集した。収集した細胞溶解物を2つに分けた。陰性対照として、半分を5%の - で処理して、結合した環状ジスルフィドを除去した。残りの半分は同量のミリQ水で処理した。次に、すべての細胞溶解物サンプルをEppendorf Thermomixerにおいて80℃で10分間加熱した。サンプルを、Beckman Coulter Microfuge遠心分離機において14000rpmで5分間回転させた。HeLa細胞抽出物を、室温、80Vで泳動して、12%SDS - ポリアクリルアミド Tris HClゲルで分離した。タンパク質を、ウェスタンブロッティングのためにニトロセルロース膜に転写した。ウサギポリクローナル抗SOD1抗体SOD100を使用して、単量体および共有結合した二量体SOD1を検出した。膜をHRP標識二次抗体とインキュベートし、ECL Western Blotting Substrateを使用して視覚化し、Chemidoc MPを使用して画像化する。

10

20

#### 【0174】

細胞培養および1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドの細胞生存アッセイ

ヒト不死化神経芽細胞腫細胞（SH-SY5Y）は、ATCC（米国、バージニア州、マナッサス）から購入した。37℃、5%CO<sub>2</sub>で、10%ウシ胎児血清を追加したイーグル最小必須培地（EMEM）において、細胞を>70%コンフルエントまで増殖させた。200μLの2%DMSO中の様々な濃度の1, 2 - ジチアン - 1 - オキシド（250μM、500μM、750μM、および1000μM）で細胞を処理し、96ウェルプレート（Corning Inc., コーニング、ニューヨーク、米国）で24時間インキュベートした。1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドとのインキュベーション後、22μLのPrestoBlue（登録商標）を各ウェルに添加し、37℃で10分間インキュベートした。Infinite（登録商標）200プレートリーダー（スイス、マンネドルフ、Tecan）を使用して、560/590（nm）の励起/発光で測定した。細胞の生存率は、未処理細胞に対して相対的に定量化された。

30

#### 【0175】

計算方法

すべての計算はGaussian 09、Rev E.0144で実行した。報告された静止点は、DFTレベルの理論でM06-2X<sup>45</sup>密度汎関数を使用して最適化された。Gaussian 09のデフォルトの超微細積分グリッドと、水のパラメーターを用いた積分方程式表式化バリエーションを使用した分極性連続体モデル（PCM）（IEF-PCM）<sup>46-48</sup>を利用した。各静止点に振動解析が行われ、すべての遷移構造には1つの負の周波数があり、他のすべての静止点には0より大きい周波数があり、極小値を示す。次に、前述のように、超微細グリッドとPCMモデルを使用して、DFTレベルの理論で6-31+G(d, p)最適化されたジオメトリに対して一点エネルギー計算を実行した。一点エネルギーは、6-311+G(d, p)基底セットを使用して実行した。全エネルギーは、自由エネルギー補正と一点エネルギーを加えて計算した。

40

#### 【0176】

遷移構造立体配座検索のパラメーターは最小値で同じであったが、形成するS-S結合は、環状ジスルフィド開環ステップ（TS5->2aおよびTS1->2b）で2.4オングストローム、チオラート/スルフェン酸縮合反応（TS(3a, b->4)）で2.3オングストロームに制限された。各制約付き遷移状態検索では、遷移状態検索の対象と

50



なる  $12 \text{ kcal/mol}$  (OPLS 2005 による) 内に 10 個の構造が生成された。図 1 に報告されている構造は、各変換の最低エネルギー遷移構造である。

#### 【0177】

QM 計算は実証実験と一致する

遷移状態理論 (アイリングの式) を使用して、計算された遷移状態 (TS (1 2 b) および TS (5 2 a)) から速度を外挿し、それらが、無数の公開された小分子およびタンパク質の実験データ (下記を参照)、ならびにここに提示するデータと一致していることが分かった。特に、QM の結果は、脱離基硫黄の  $pK_a$  を (硫黄アニオンの代わりにスルフェン酸アニオンを介して) 減少させると、2 つの別個のメカニズム (すなわち、律速のチオール酸化を排除することに加えて、環状チオスルフィナートは、新しい律速段階であるチオラート - ジスルフィド交換の障壁を低減する) によって全体の反応速度がどのように増大するかについて推定機構を提供する。具体的には、Singh らのプロトコルに従って一連の詳細な (多濃度) 速度論的実験を実施して、環状チオスルフィナート媒介架橋生成物形成の全体的な二次反応速度定数を  $1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{分}^{-1}$  と決定し、それは、我々の実験条件下で、SOD 1 を 1, 2 - ジチアン - 1 - オキシドと架橋することに関して予測半減期 2.7 分に外挿される<sup>49</sup>。特に、この値は図 1 から当てはめられた半減期 (2.2 分) と整合し、律速段階であるチオール - ジスルフィド中間体 2 b の計算値  $13.1 \text{ kcal/mol}$  から外挿された絶対速度と一致する。酸化 DTT (環状ジスルフィド) と還元型グルタチオンのチオール - ジスルフィド交換反応は、ここに示した 1, 2 - ジチアンのデータと最も近い類似性を提供するが、200 分を超える外挿半減期 ( $1.8 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{分}^{-1}$  の速度定数) を有する<sup>50</sup>。実際に、環状チオスルフィナートについて観察および計算された速度は、環状ジスルフィドについてこれまでに報告されたどの速度よりも速かった (我々の知る限り、チオール - ジスルフィド交換の最速の報告された速度は、パパイン - S - SCH<sub>3</sub> と DTT の反応であり、それは  $3.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{分}^{-1}$  の速度定数と 12 分の外挿半減期であった)<sup>51</sup>。これらを組み合わせた結果は、チオスルフィナートが、律速段階である S 酸化を排除することにより、および新しい律速段階であるチオラート - ジスルフィド交換を減らすことにより、全体の速度を速めることを実証する。報告されているチオラートとスルフェン酸の縮合反応速度はかなり変動性があるが、我々が実験で決定した速度定数は報告値の中央値に近く、レビューしたように図 1 に報告されている  $11.0 \text{ kcal/mol}$  の遷移状態 (TS (3 a, 3 b 4)) とも一致する。例えば、Gupta らは、スルフェン酸 / チオラート縮合によるジスルフィド形成の速度定数は、 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{分}^{-1}$  (Cys - SOH + Cys)  $\sim 1.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{分}^{-1}$  (HSA - SOH + Cys) の範囲であると報告しており、それらは、我々の実験条件下において、それぞれ数ミリ秒  $\sim 30$  分までの範囲の半減期に外挿される<sup>55</sup>。

#### 【0178】

Thapa らは、明示的な溶媒和なしでチオールの  $pK_a$  を計算することの難しさを強調しており、チオール - ジスルフィド交換の実験速度は一般に、非プロトン性溶媒と比較してプロトン性溶媒中において 3 桁低下し、気相と比較して水中において 9 桁低下する<sup>3-54</sup>。これらの障害があり、さらにタンパク質にはプロトン性環境と非プロトン性環境の両方が含まれるため、中間体 3 a および 3 b の連続体モデルに基づく計算は報告されなかった。この中間体の  $pK_a$  を推定するために必要な実験データは得られなかったため、 $0 \text{ kcal/mol}$  の任意の値として記載されている<sup>55</sup>。ただし、この値は、実験的に決定した速度と整合しており、それは中間体 3 a, 3 b のエネルギーが約  $3 \text{ kcal/mol}$  より高くなることはできないことを意味し、またモノチオール中間体の観察の欠如とも整合し、それはそのエネルギーがおそらく約  $-3 \text{ kcal/mol}$  よりも低くはないことを意味する。

#### 【0179】

ナノ粒子、デンドリマー、およびポリマー合成のための環状チオスルフィナートの使用

環状チオスルフィナートが、ナノ粒子、デンドリマー、およびポリマー合成のためのジ

エン（例えば、ビスマレイミド）架橋剤に置き換わることができることが実証され、その結果を図 14 に示す。

#### 【0180】

簡単に説明すると、ポリエチレンジチオールを次のいずれか：促進剤なし（-）；トリチオシアヌル酸；トリメチロールプロパントリス（3-メルカプトプロピオナート）；またはペンタエリスリトールテトラ（3-メルカプトプロピオナート）：と混合し、各混合物を 1, 2-ジチアン-1-オキソ架橋剤または架橋剤なし（-）で処理した。図 14 の赤い矢印は、ポリマーが形成される反応を示し、オレンジの矢印は、推定ナノ粒子が形成される反応を示す。ポリ（エチレングリコール）ジチオール（PEG-DT、例えば、平均  $M_n$  1, 500 を有する）を 1, 2-ジチアン-1-オキソ架橋剤と混合して、固相反応を経て透明なポリマーを生成した。

10

#### 【0181】

本発明は、その使用が記載された特定の用途に限定されないことを当業者は理解するであろう。本発明は、本明細書に記載または図示された特定の要素および／または特徴に関して、その好ましい実施形態において制限されない。本発明は、開示された 1 つまたは複数の実施形態に限定されず、特許請求の範囲に記載および規定される本発明の範囲から逸脱することなく、多数の再配置、修正および置換が可能である。

#### 【参考文献】

#### 【0182】

- (1) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., *Angew. Chem., Int. Ed.* 2001, 40 (11), 2004-2021. 20
- (2) Kuhl, N.; Geitner, R.; Vitz, J.; Bode, S.; Schmitt, M.; Popp, J.; Schubert, U. S.; Hager, M. D., *J. Appl. Polym. Sci.* 2017, 134 (19), 1-8.
- (3) Lockhart, J. N.; Beezer, D. B.; Stevens, D. M.; Spears, B. R.; Harth, E., *J. Control. Release* 2016, 244, 366-374.
- (4) Hoyle, C. E.; Bowman, C. N., *Angew. Chem., Int. Ed.* 2010, 49 (9), 1540-1573.
- (5) Wang, J. Q.; Zhang, F. J.; Tsang, W. P.; Wan, C.; Wu, C., *Biomaterials* 2017, 120, 11-21.
- (6) Killups, K. L.; Campos, L. M.; Hawker, C. J., *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130 (15), 5062-5064. 30
- (7) Marculescu, C.; Kossen, H.; Morgan, R. E.; Mayer, P.; Fletcher, S. A.; Tolner, B.; Chester, K. A.; Jones, L. H.; Baker, J. R., *Chem. Commun.* 2014, 50 (54), 7139-7142.
- (8) Auclair, J. R.; Boggio, K. J.; Petsko, G. A.; Ringe, D.; Agar, J. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010, 107 (50), 21394-21399.
- (9) Konermann, L.; Vahidi, S.; Sowole, M. A., *Anal. Chem.* 2014, 86 (1), 213-232.
- (10) Baillie, T. A., *Angew. Chem., Int. Ed.* 2016, 55 (43), 13408-13421.
- (11) Valenzano, K. J.; Khanna, R.; Powe, A. C.; Boyd, R.; Lee, G.; Flanagan, J. J.; Benjamin, E. R., *Assay Drug Dev. Technol.* 2011, 9 (3), 213-235.
- (12) Narita, A.; Shirai, K.; Itamura, S.; Matsuda, A.; Ishihara, A.; Matsushita, K.; Fukuda, C.; Kubota, N.; Takayama, R.; Shigematsu, H.; Hayashi, A.; Kumada, T.; Yuge, K.; Watanabe, Y.; Kosugi, S.; Nishida, H.; Kimura, Y.; Endo, Y.; Higaki, K.; Nanba, E.; Nishimura, Y.; Tamasaki, A.; Togawa, M.; Saito, Y.; Maegaki, Y.; Ohno, K.; Suzuki, Y., *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2016, 3 (3), 200-215. 40
- (13) Liu, Q.; Sabnis, Y.; Zhao, Z.; Zhang, T.; Buhrlage, S. J.; Jones, L. H.; Gray, N. S., *Chem. Biol.* 2013, 20 (2), 146-159.
- (14) Nelson, V.; Ziehr, J.; Agulnik, M.; Johnson, M., *Onco Targets Ther.* 2013, 6, 135-143.
- (15) Hald, J.; Jacobsen, E., *Lancet (London, England)* 1948, 2 (6539), 1001-1004.
- (16) Lindberg, P.; Nordberg, P.; Alminger, T.; Brandstrom, A.; Wallmark, B., J. 50

Med. Chem. 1986, 29 (8), 1327-1329.

(17) Shin, J. M.; Besancon, M.; Simon, A.; Sachs, G., Biochim. Biophys. Acta 1993, 1148 (2), 223-233.

(18) Ferri, N.; Corsini, A.; Bellosta, S., Drugs 2013, 73 (15), 1681-1709.

(19) Burns, J. A.; Whitesides, G. M., J. Am. Chem. Soc. 1990, 112 (17), 6296-6303.

(20) Szajewski, R. P.; Whitesides, G. M., J. Am. Chem. Soc. 1980, 102 (6), 2011-2026.

(21) Singh, R.; Whitesides, G. M., J. Am. Chem. Soc. 1990, 112 (17), 6304-6309.

(22) Abegg, D.; Gasparini, G.; Hoch, D. G.; Shuster, A.; Bartolami, E.; Matile, S., J. Am. Chem. Soc. 2017, 139 (1), 231-238. 10

(23) Barcan, G. A.; Zhang, X. Y.; Waymouth, R. M., Structurally Dynamic Hydrogels Derived from 1,2-Dithiolanes. J Am Chem Soc 2015, 137 (17), 5650-5653.

(24) Nare, B.; Smith, J. M.; Prichard, R. K., Biochem. Pharmacol. 1992, 43 (6), 1345-1351.

(25) Shay, K. P.; Moreau, R. F.; Smith, E. J.; Smith, A. R.; Hagen, T. M., Biochim. Biophys. Acta 2009, 1790 (10), 1149-1160.

(26) Fang, J.; Ye, S. H.; Wang, J.; Zhao, T.; Mo, X. M.; Wagner, W. R., Biomacromolecules 2015, 16 (5), 1622-1633.

(27) Zong, L.; Bartolami, E.; Abegg, D.; Adibekian, A.; Sakai, N.; Matile, S., ACS Cent. Sci. 2017, 3 (5), 449-453. 20

(28) Gupta, V.; Carroll, K. S., Chem. Sci. 2016, 7 (1), 400-415.

(29) Shaked, Z.; Szajewski, R. P.; Whitesides, G. M., Biochemistry 1980, 19 (18), 4156-4166.

(30) Jiang, X.; Yu, Y.; Chen, J.; Zhao, M.; Chen, H.; Song, X.; Matzuk, A. J.; Carroll, S. L.; Tan, X.; Sizovs, A.; Cheng, N.; Wang, M. C.; Wang, J., ACS Chem. Biol. 2015, 10 (3), 864-874.

(31) Sun, H.; Yao, W.; Tang, Y.; Zhuang, W.; Wu, D.; Huang, S.; Sheng, H., J. Clin. Lab. Anal. 2017, 31 (6), 1-7.

(32) Gasparini, G.; Sargsyan, G.; Bang, E. K.; Sakai, N.; Matile, S., Angew. Chem., Int. Ed. 2015, 54 (25), 7328-7331. 30

(33) Schmidt, A.-C.; Koppelt, J.; Neustadt, M.; Otto, M., Rapid Commun. Mass Spectrom. 2007, 21 (2), 153-163.

(34) Alon, A.; Grossman, I.; Gat, Y.; Kodali, V. K.; DiMaio, F.; Mehlman, T.; Haran, G.; Baker, D.; Thorpe, C.; Fass, D., Nature 2012, 488 (7411), 414-418.

(35) Owen, G. R.; Channell, J. A.; Forsyth, V. T.; Haertlein, M.; Mitchell, E. P.; Capovilla, A.; Papathanasopoulos, M.; Cerutti, N. M., Biochemistry 2016, 55 (15), 2227-2237.

(36) Gutle, D. D.; Roret, T.; Hecker, A.; Reski, R.; Jacquot, J. P., Plant Sci. 2017, 255, 1-11. 40

(37) Ananikov, V. P.; Gayduk, K. A.; Beletskaya, I. P.; Khrustalev, V. N.; Antipin, M. Y., Eur. J. Inorg. Chem. 2009, 2009 (9), 1149-1161.

(38) Fong, J.; Yuan, M.; Jakobsen, T. H.; Mortensen, K. T.; Delos Santos, M. M. S.; Chua, S. L.; Yang, L.; Tan, C. H.; Nielsen, T. E.; Givskov, M., J. Med. Chem. 2017, 60 (1), 215-227.

(39) Saito, I.; Fukui, S., J. Vitaminol. 1967, 13 (2), 115-21.

(40) Mueller, A.; Knaack, M.; Olbrich, A., Magn. Reson. Chem. 1998, 35 (2), 111-114.

(41) Hayward, L. J.; Rodriguez, J. A.; Kim, J. W.; Tiwari, A.; Goto, J. J.; Cabelli, D. E.; Valentine, J. S.; Brown, R. H., Jr., J. Biol. Chem. 2002, 277 (18), 50

15923-31.

(42) Doucette, P. A.; Whitson, L. J.; Cao, X.; Schirf, V.; Demeler, B.; Valentine, J. S.; Hansen, J. C.; Hart, P. J., *J. Biol. Chem.* 2004, 279 (52), 54558-54566.

(43) Auclair, J. R.; Boggio, K. J.; Petsko, G. A.; Ringe, D.; Agar, J. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010, 107 (50), 21394-9.

(44) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J., *Gaussian 09*, Revision B.01. Wallingford CT, 2009.

10

20

(45) Zhao, Y.; Truhlar, D. G., *Theor. Chem. Acc.* 2008, 120 (1), 215-241.

(46) Pascual-ahuir, J. L.; Silla, E.; Tunon, I., *J. Comput. Chem.* 1994, 15 (10), 1127-1138.

(47) Miertus, S.; Tomasi, J., *Chem. Phys.* 1982, 65 (2), 239-245.

(48) Miertus, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J., *Chem. Phys.* 1981, 55 (1), 117-129.

(49) Singh, J.; Dobrusin, E. M.; Fry, D. W.; Haske, T.; Whitty, A.; McNamara, D. J., *J. Med. Chem.* 1997, 40 (7), 1130-1135.

(50) Rothwarf, D. M.; Scheraga, H. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992, 89 (17), 7944-7948.

(51) Singh, R.; Whitesides George, M., *Thiol-disulfide interchange*. John Wiley & Sons Ltd: 2010.

30

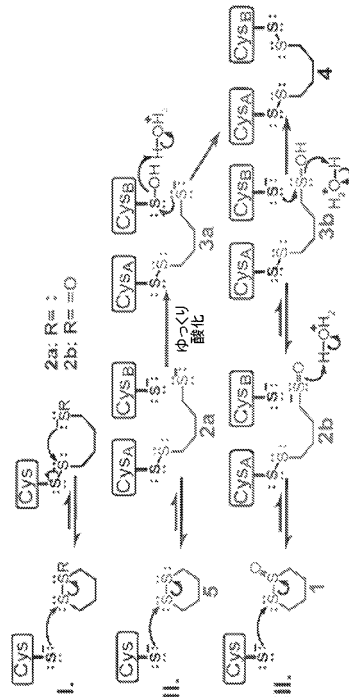
(52) Gupta, V.; Carroll, K. S., *Biochim. Biophys. Acta* 2014, 1840 (2), 847-875.

(53) Thapa, B.; Schlegel, H. B., *J. Phys. Chem. A* 2016, 120 (28), 5726-5735.

(54) Singh, R.; Whitesides, G. M., *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112 (3), 1190-1197.

(55) Ullmann, G. M., *J. Phys. Chem. B* 2003, 107 (5), 1263-1271.

【図 1 A】



【図 1 B】

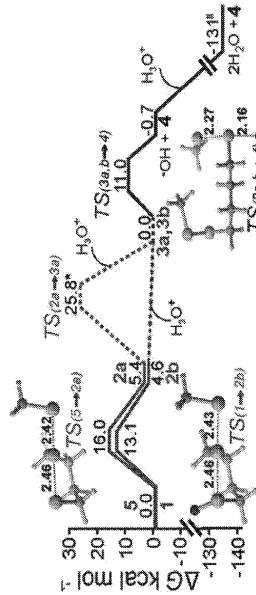
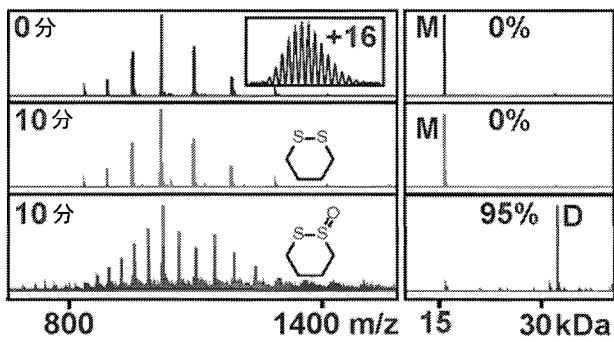
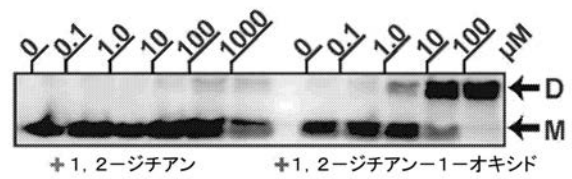


FIGURE 1B

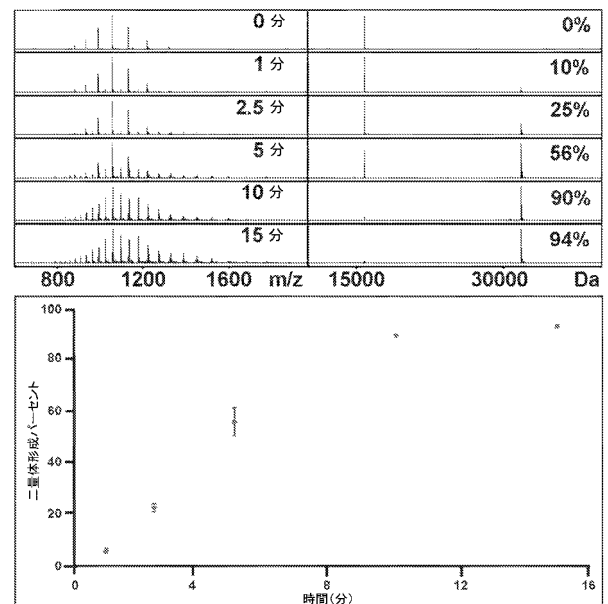
【図 2 A】



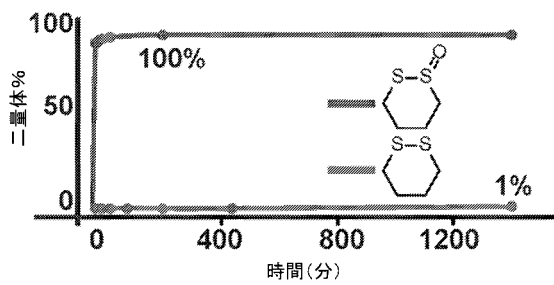
【図 2 C】



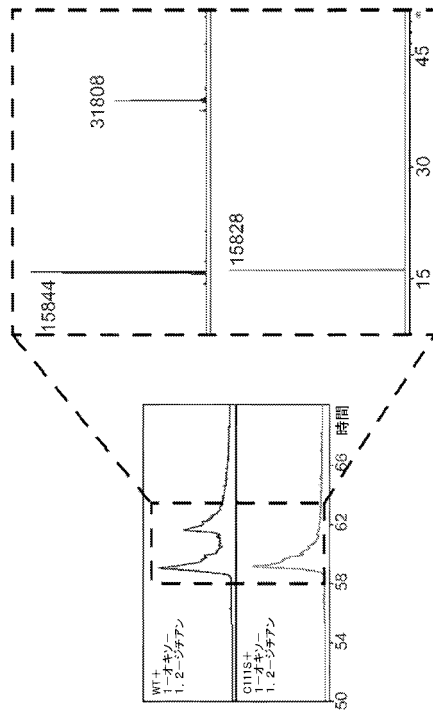
【図 3】



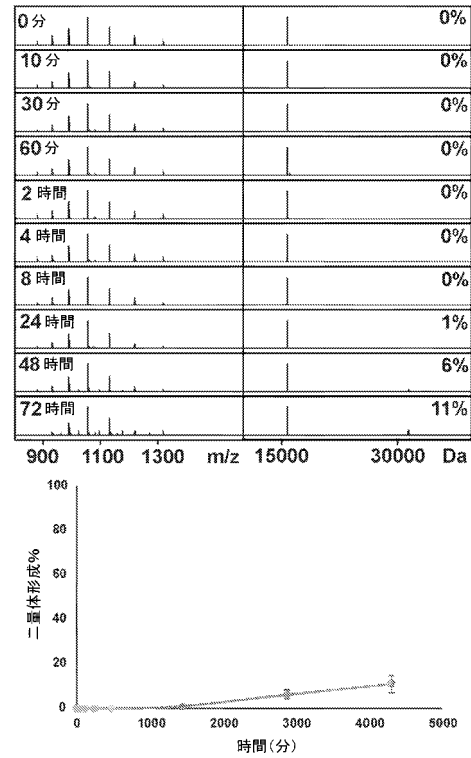
【図 2 B】



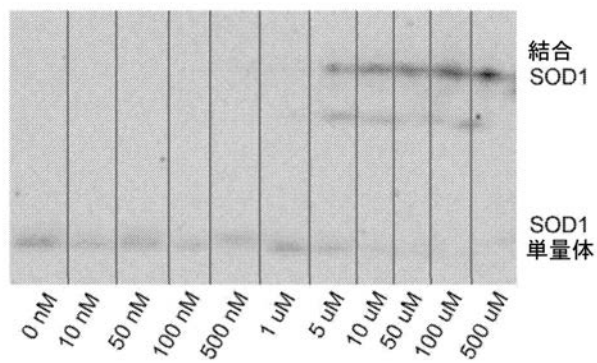
【図 4】



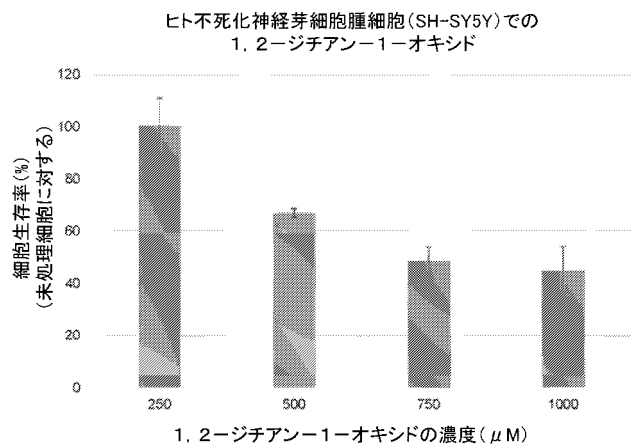
【図 5】



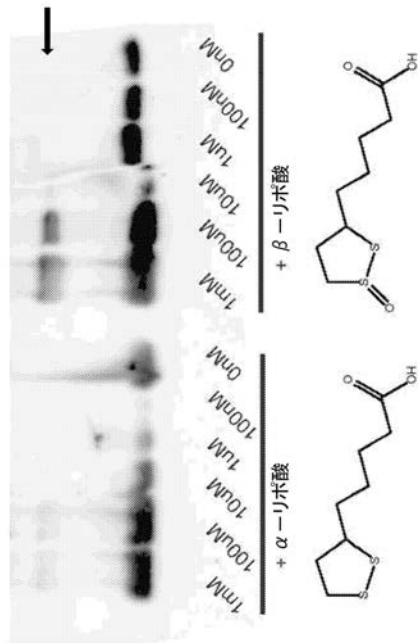
【図 6】



【図 7】



【 図 8 】



【 図 9 】

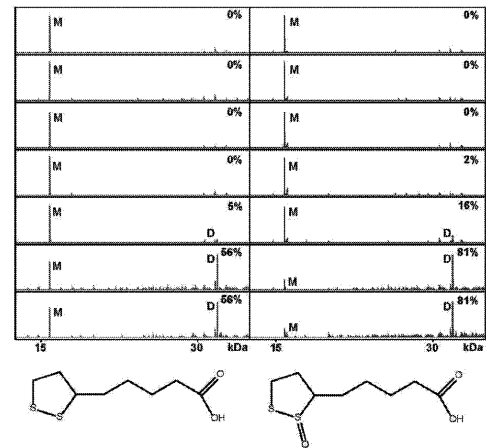
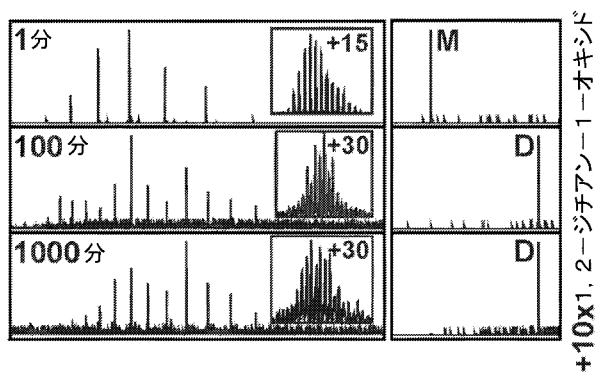
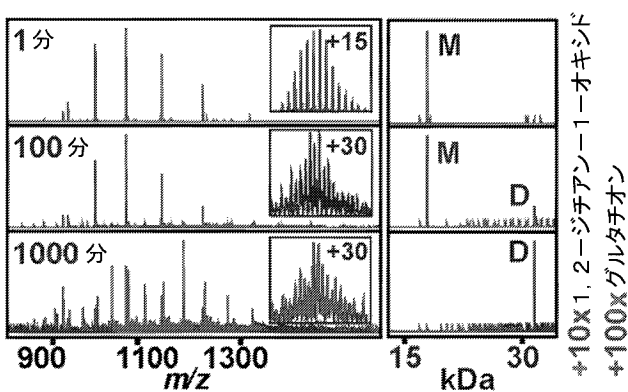


FIGURE 9

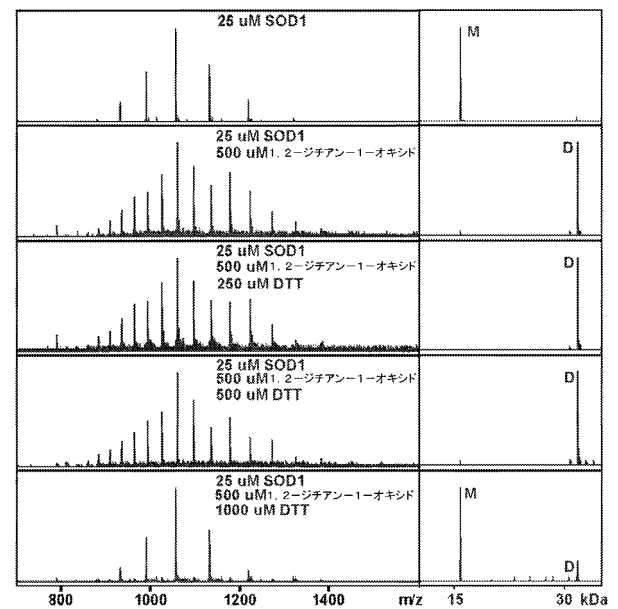
【 図 10 A 】



【 図 10 B 】



【 図 11 】



【 図 12 】

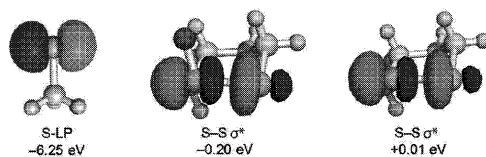
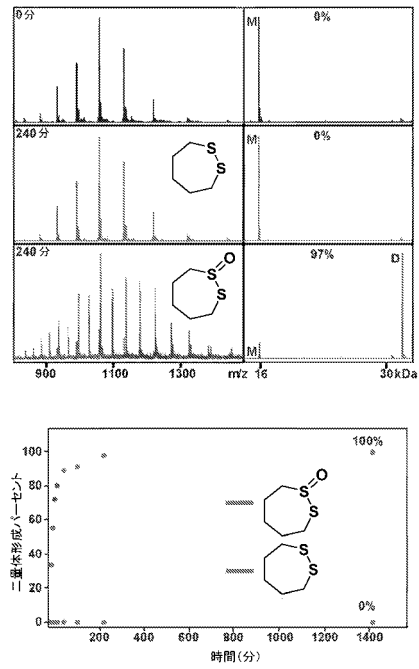


FIGURE 12

【図 13】



【図 14】

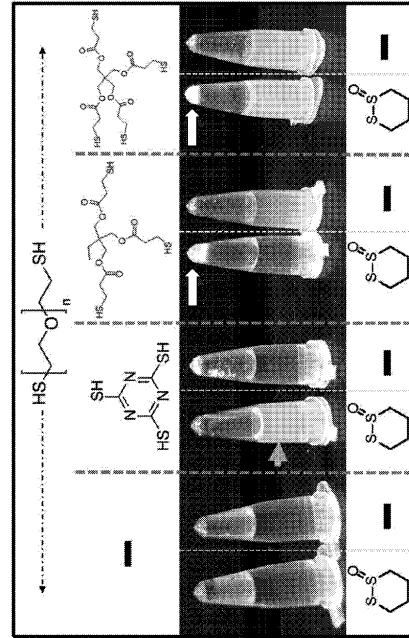
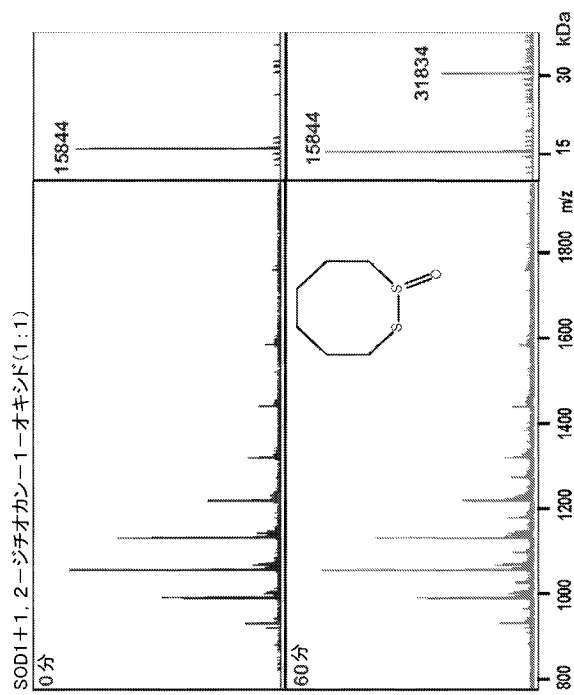


FIGURE 14

【図 15】





## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 18/41581
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61P 35/00, C07D 215/44, C07D 401/12 (2018.01) CPC - A61P 35/00, C07D 215/44, C07D 401/12		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
See Search History Document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
See Search History Document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
See Search History Document		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2015/0284478 A1 (Brandeis University) 08 October 2015 (08.10.2015); Abstract, para[0059], para[0077], para[0079], para[0179]	1-4, 6-8 ----- 5
Y	Barcan et al. 'Structurally Dynamic Hydrogels Derived from 1,2-Dithiolanes', Journal of the American Chemical Society, 28 April 2015 (28.04.2015), Vol.137, pages5650-5653; Abstract	5
A	Karch et al. 'A Limited Role for Disulfide Cross-linking in the Aggregation of Mutant SOD1 Linked to Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis', The Journal Of Biological Chemistry, 16 May 2008 (16.05.2008), Vol.283, pages13528-13537; p13528	1-4, 6-7
A	Pubmed Compound Summary for CID 79045, '1,2-Dithiolane', U.S. National Library of Medicine, 26 March 2005 (26.03.2005), page1-5; p3 ( <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/79045">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/79045</a> )	1-8
A	US 9,556,308 B1 (The Board of Trustees of The Leland Stanford Junior University) 31 January 2017 (31.01.2017); entire document	1-8
A	US 2007/0270548 A1 (Bojkova et al.) 22 November 2007 (22.11.2007); entire document	1-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 September 2018		Date of mailing of the international search report <b>06 DEC 2018</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/41581

**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.: 9-21, 36-54, 68-69  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Box

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.:  
1-8

**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/US 18/41581

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-8 directed to a polymer derived from a first monomer and a first cross-linker, wherein the first monomer comprises at least two thiol functional groups; the first cross-linker comprises a moiety of Formula I

Group II: Claims 22-35 directed to a method of coating a surface of an object, a device, or an assembly, comprising the steps of: (a) providing a surface of an object, a device, or an assembly; (b) contacting the surface with a plurality of first molecules comprising a reactive moiety and a moiety of Formula I; thereby forming a plurality of covalent bonds between the surface and the reactive moieties of the first molecule to form a first monolayer

Group III: Claims 55-67 directed to a composition, wherein the composition comprises a substrate and a coating material, wherein the coating material comprises a first monolayer comprising a plurality of moieties of Formula I and the coating material is covalently bonded to the substrate.

Group IV: Claims 70-71 directed to a method for transporting a molecule of interest across a cell membrane comprising: (a) providing a functionalized molecule of interest comprising a moiety of Formula I; (b) contacting a cell of interest with the functionalized molecule of interest under conditions for the moiety of Formula I to reversibly bind to one or more cell membrane transport proteins, thereby facilitating transport of the molecule of interest across the cell membrane.

Group V: Claims 72-76 directed to a method for treating a keratin-containing material, comprising: i) providing a plurality of first monomers, wherein the first monomer is a keratin-containing material sample comprising a plurality of disulfide bonds; ii) applying to the keratin-containing material sample for a period of time a mixture, comprising a reducing agent in a concentration of about 0.1 % by weight to about 15% by weight, thereby producing a reduced keratin-containing material sample, wherein the reduced keratin-containing material sample comprises a plurality of free thiol groups; and iii) applying a first cross-linker to the reduced keratin-containing material sample, wherein the first cross-linker comprises a moiety of Formula I; thereby forming a plurality of covalent bonds between the free thiol groups and the first cross-linkers.

The inventions listed as Groups I-V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

## Special Technical Features:

Groups II requires a method of coating a surface of an object, a device, or an assembly, not required by groups I and III-V

Group III requires a composition, wherein the composition comprises a substrate and a coating material, wherein the coating material comprises a first monolayer comprising a plurality of moieties of Formula I and the coating material is covalently bonded to the substrate, not required by groups I-II and IV-V

Group IV requires a method for transporting a molecule of interest across a cell membrane, not required by groups I-III and V

Group V requires a method for treating a keratin-containing material, not required by groups I-IV

## Common Technical Features:

Groups I-V share the technical feature of a molecule comprising a moiety of Formula I. However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is being anticipated by PubChem CID 79045 (hereinafter "CID"). CID discloses a molecule comprising a moiety of Formula I wherein W is S; Y is S; and X together with W and Y forms an unsubstituted 5-membered heterocyclic ring (p3, "2D Structure").

As the shared technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered common technical features that would otherwise unify the groups. Therefore, Groups I-V lack unity under PCT Rule 13.

Note Re: Item 4: claims 9-21, 36-54, 68-69 are determined unsearchable because they are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
<b>C 0 7 K</b>	<b>14/46</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 0 7 K</b>	<b>14/46</b>	<b>4 J 0 3 8</b>	
<b>C 0 8 J</b>	<b>7/04</b>	<b>(2020.01)</b>	<b>C 0 8 J</b>	<b>7/04</b>	<b>C E P U</b>	
<b>C 0 9 D</b>	<b>185/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 0 9 D</b>	<b>185/00</b>		
<b>A 6 1 P</b>	<b>25/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>25/00</b>		

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

F ターム (参考) 4J030 BA05 BA26 BA44 BA45 BA51 BB03 BB04 BB06 BC11 BG02  
 BG32 BG34 CA03 CC02 CC04 CC12 CC13 CC15 CC23 CC30  
 CD11 CE02  
 4J038 DM001 DM021 MA07 PB01 PC05