

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5517620号
(P5517620)

(45) 発行日 平成26年6月11日 (2014. 6. 11)

(24) 登録日 平成26年4月11日 (2014. 4. 11)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K	1/113	(2006. 01)	C O 7 K	1/113	Z N A
C O 7 K	1/10	(2006. 01)	C O 7 K	1/10	
C O 7 K	5/10	(2006. 01)	C O 7 K	5/10	
C O 7 K	7/06	(2006. 01)	C O 7 K	7/06	
C O 7 K	9/00	(2006. 01)	C O 7 K	9/00	

請求項の数 10 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-525431 (P2009-525431)
 (86) (22) 出願日 平成20年7月30日 (2008. 7. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2008/063659
 (87) 国際公開番号 W02009/017154
 (87) 国際公開日 平成21年2月5日 (2009. 2. 5)
 審査請求日 平成23年5月26日 (2011. 5. 26)
 (31) 優先権主張番号 特願2007-199372 (P2007-199372)
 (32) 優先日 平成19年7月31日 (2007. 7. 31)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(出願人による申告) 平成18年度、文部科学省、科学
 技術振興機構委託研究、産業技術力強化法第19条の適
 用を受ける特許出願

(73) 特許権者 512088316
 株式会社糖鎖工学研究所
 京都府京都市下京区中堂寺南町134
 (74) 代理人 100113376
 弁理士 南条 雅裕
 (74) 代理人 100179394
 弁理士 瀬田 あや子
 (74) 代理人 100156443
 弁理士 松崎 隆
 (72) 発明者 梶原 康宏
 大阪府豊中市桜の町6-11-20 シャ
 インロータス302号
 (72) 発明者 坂本 泉
 徳島県徳島市川内町加賀須野463 大塚
 化学株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチドの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ライゲーション法より得られた-SH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドにおいて
 、前記-SH基を-OH基に変換することを特徴とするペプチドの製造方法であって、以
 下の工程 (a) ~ (c) :

(a) ペプチド中の-SH基とメチル化剤とを反応させる工程 ;
 (b) 工程 (a) で得られた-SMe基とシアン化剤とを酸性条件下で反応させる工程 ;
 及び
 (c) ヒドラジン含水物を添加することにより、工程 (b) と比較してより塩基性条件と
する工程 ;
 を含む、前記製造方法。

【請求項2】

ライゲーション法より得られた-SH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドにおいて
 、前記-SH基を-OH基に変換することを特徴とするペプチドの製造方法であって、以
 下の工程 (a) ~ (c) :

(a) ペプチド中の-SH基とメチル化剤とを反応させることにより、前記-SH基を-SMe基に変換する工程 ;
 (b) 工程 (a) で得られた-SMe基とシアン化剤とを酸性条件下で反応させることにより、反応中間体を生成する工程 ; 及び
 (c) ヒドラジン含水物を添加することにより、工程 (b) と比較してより塩基性条件下

、工程（b）で得られた反応中間体を、－OH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドに変換する工程；

を含む、前記製造方法。

【請求項3】

ライゲーション法より得られたシステイン残基を含むペプチドにおいて、前記システイン残基をセリン残基に変換することを特徴とするペプチドの製造方法であって、以下の工程（a）～（c）：

（a）ペプチド中のシステイン残基の－SH基とメチル化剤とを反応させることにより、前記－SH基を－SMe基に変換する工程；

（b）工程（a）で得られた－SMe基とシアン化剤とを酸性条件下で反応させることにより、反応中間体を生成する工程；及び

（c）ヒドラジン含水物を添加することにより、工程（b）と比較してより塩基性条件下、工程（b）で得られた反応中間体を、セリン残基を含むペプチドに変換する工程；
を含む、前記製造方法。

【請求項4】

前記反応中間体がエステル体である、請求項2又は3に記載のペプチドの製造方法。

【請求項5】

－OH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドの製造方法であって、

（o）カルボキシル基が式－C（＝O）－SR（式中、Rは、ベンジル基である。）で表されるα-カルボキシチオエステル基で置換されたアミノ酸残基をC末端に含む第1のペプチドと、－SH基を有するアミノ酸残基をN末端に含む第2のペプチドとを、ライゲーション法により連結して－SH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドを得る工程；

（a）工程（o）で得られたペプチド中の－SH基とメチル化剤とを反応させることにより、前記－SH基を－SMe基に変換する工程；

（b）工程（a）で得られた－SMe基とシアン化剤とを酸性条件下で反応させることにより反応中間体を生成する工程；及び

（c）ヒドラジン含水物を添加することにより、工程（b）と比較してより塩基性条件下、工程（b）で得られた反応中間体を、－OH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドに変換する工程；

を含む、前記製造方法。

【請求項6】

セリン残基を含むペプチドの製造方法であって、

（o）カルボキシル基が式－C（＝O）－SR（式中、Rは、ベンジル基である。）で表されるα-カルボキシチオエステル基で置換されたアミノ酸残基をC末端に含む第1のペプチドと、システイン残基をN末端に含む第2のペプチドとを、ライゲーション法により連結してシステイン残基を含むペプチドを得る工程；

（a）工程（o）で得られたペプチド中のシステイン残基の－SH基とメチル化剤とを反応させることにより、前記－SH基を－SMe基に変換する工程；

（b）工程（a）で得られた－SMe基とシアン化剤とを酸性条件下で反応させることにより反応中間体を生成する工程；及び

（c）ヒドラジン含水物を添加することにより、工程（b）と比較してより塩基性条件下、工程（b）で得られた反応中間体を、セリン残基を含むペプチドに変換する工程；
を含む、前記製造方法。

【請求項7】

前記反応中間体がエステル体である、請求項5又は6に記載のペプチドの製造方法。

【請求項8】

ライゲーション法より得られた－SH基を有するアミノ酸残基を含む糖ペプチドにおいて、前記－SH基を－OH基に変換することを特徴とする糖ペプチドの製造方法であって、以下の工程（a）～（c）：

（a）糖ペプチド中の－SH基とメチル化剤とを反応させる工程；

(b) 工程 (a) で得られた $-SMe$ 基とシアン化剤とを酸性条件下で反応させる工程；及び

(c) ヒドラジン含水物を添加することにより、工程 (b) と比較してより塩基性条件とする工程；

を含む、前記製造方法。

【請求項 9】

ライゲーション法より得られた $-SH$ 基を有するアミノ酸残基を含む糖ペプチドにおいて、前記 $-SH$ 基を $-OH$ 基に変換することを特徴とする糖ペプチドの製造方法であって、以下の工程 (a) ~ (c)：

(a) 糖ペプチド中の $-SH$ 基とメチル化剤とを反応させることにより、前記 $-SH$ 基を $-SMe$ 基に変換する工程；

(b) 工程 (a) で得られた $-SMe$ 基とシアン化剤とを酸性条件下で反応させることにより、反応中間体を生成する工程；及び

(c) ヒドラジン含水物を添加することにより、工程 (b) と比較してより塩基性条件下、工程 (b) で得られた反応中間体を、 $-OH$ 基を有するアミノ酸残基を含む糖ペプチドに変換する工程；

を含む、前記製造方法。

【請求項 10】

ライゲーション法より得られたシステイン残基を含む糖ペプチドにおいて、前記システイン残基をセリン残基に変換することを特徴とする糖ペプチドの製造方法であって、以下の工程 (a) ~ (c)：

(a) 糖ペプチド中のシステイン残基の $-SH$ 基とメチル化剤とを反応させることにより、前記 $-SH$ 基を $-SMe$ 基に変換する工程；

(b) 工程 (a) で得られた $-SMe$ 基とシアン化剤とを酸性条件下で反応させることにより、反応中間体を生成する工程；及び

(c) ヒドラジン含水物を添加することにより、工程 (b) と比較してより塩基性条件下、工程 (b) で得られた反応中間体を、セリン残基を含む糖ペプチドに変換する工程；

を含む、前記製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ペプチド及び糖ペプチドの製造方法に関する。

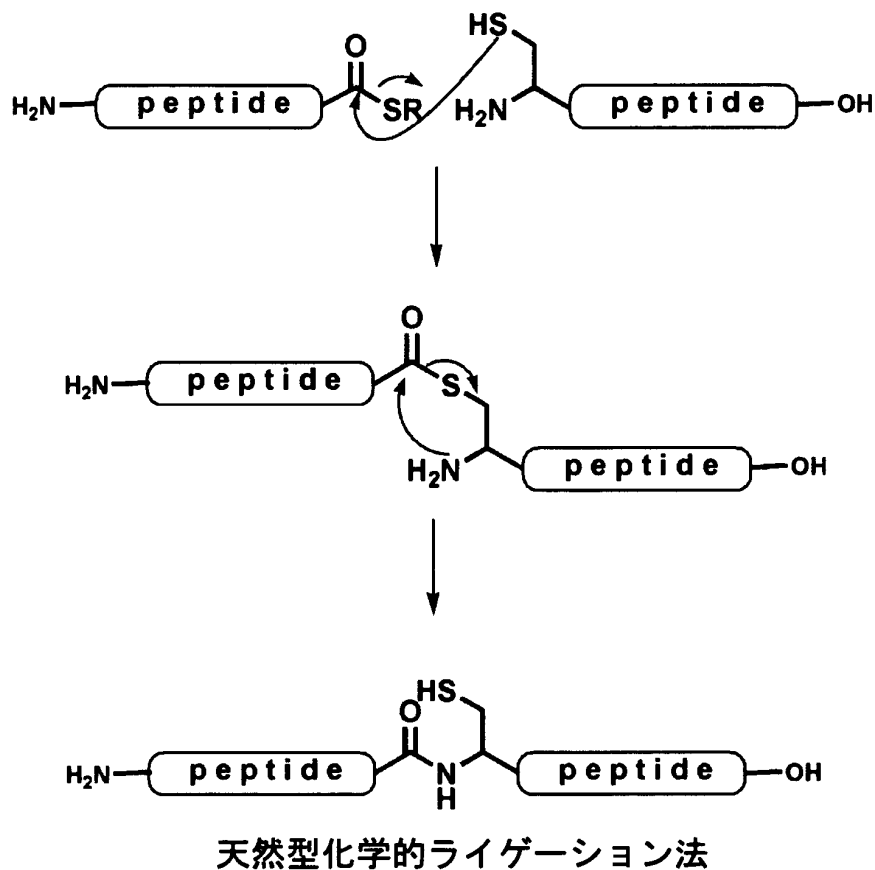
【背景技術】

【0002】

ペプチドの製造方法として、ライゲーション法が有用である。その中でも、天然型化学的ライゲーション法(Native Chemical Ligation、NCL法)は、連結部位(ライゲーション部位)に天然アミド結合(ペプチド結合)を有するペプチドを製造することができる方法である。NCL法は、無保護のペプチド鎖同士でも行うことができ、連結部位に天然アミド結合を生成するための有用な方法であることが知られている(例えば、特許文献1)。NCL法は、以下に図示するように、C末端に α カルボキシチオエステル部分を有するようにした第1のペプチドとN末端にシステイン残基を有する第2のペプチドとの化学選択反応であり、システインの側鎖のチオール基(SH基。スルフヒドリル基ともいう。)がチオエステル基のカルボニル炭素に選択的に反応し、チオール交換反応により、チオエステル結合初期中間体が生成する。この中間体は、自発的に分子内転位して、連結部位に天然アミド結合を与え、一方、システイン側鎖チオールを再生させる。この反応を用いることで様々なポリペプチドを効率よく合成することが可能となった。

【0003】

【化 1】



【0004】

典型的なNCL法の主な欠点は、この方法においては、連結される2つのペプチド断片のうち、一方は、N末端においてシステイン残基を有していなければならない、連結後において得られるペプチドも連結部位においてシステイン残基を有することになる点である。故に、合成して得ようとする所望のペプチドにシステイン残基が存在しない場合には、この方法を用いることができなかった。

【0005】

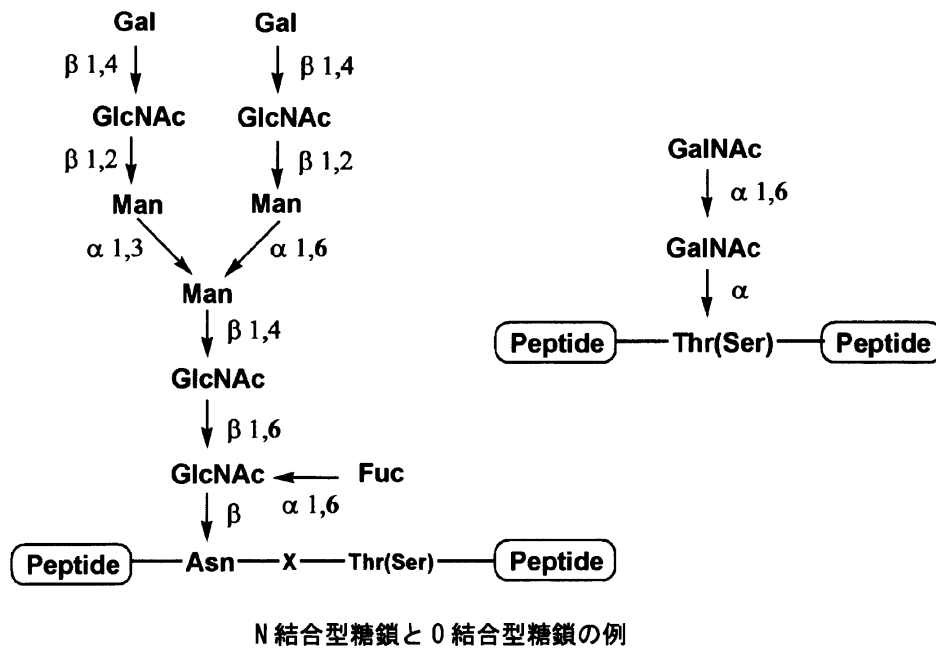
また、典型的なNCL法においては、連結しようとする2つまたはそれ以上のペプチド断片を、例えば固相合成法等によって用意するが、例えば生体内に存在するペプチドのように、システイン含有量が非常に少ない場合(又はシステインが存在しない場合)、NCL法に供するために、非常に長いペプチド断片を用意する必要がある、効率的とは言えなかった。

【0006】

一方、生体内には様々な糖ペプチド及び糖タンパク質が存在することが知られている。これらの糖ペプチド又は糖タンパク質の糖鎖はN結合型とO結合型の2種類に大別される。N結合型糖鎖は、一般的に、アスパラギン側鎖のアミドの窒素にN-グリコシド結合をした糖鎖であり、通常、天然の状態においては、しばしば、-Asn-X-Ser/Thr- (式中、Xはプロリン以外のアミノ酸である。)というコンセンサス配列におけるAsnに結合している。O結合型糖鎖はセリン又はトレオニン側鎖の水酸基にO-グリコシド結合をしている糖鎖である。以下にその一例を示す(Gal:ガラクトース、GlcNAc:N-アセチルグルコサミン、Man:マンノース、Fuc:フコース、GalNAc:N-アセチルガラクトサミン)。O結合型糖鎖を有する天然の糖ペプチドは、プロリン、トレオニン及びセリンの含有率が高いことが知られている(非特許文献1及び2)。

【0007】

【化2】



【特許文献1】国際公開W096/34878号

【非特許文献1】TRENDS in biochemical sciences, Vol.27, No.3, March 2002

【非特許文献2】Cancer Biology & Therapy 6:4, 481-486, April 2007

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の課題は、ペプチド及び糖ペプチドの新規な製造方法を提供することである。

特に、従来、典型的なNCL法においては、連結される2つのペプチド断片のうち、片方は、N末端においてシステイン残基を有していなければならない、また、連結後において得られるペプチドも連結部位においてシステイン残基を有することになるため、最終的に得ようとする所望のペプチド(又は糖ペプチド)におけるシステイン残基を連結部位として、NCL法を設計し適用するほかなかった。そこで、本発明は、得ようとする所望のペプチドにおけるシステイン残基以外にも、セリン残基やトレオニン残基に対応する部分を連結部位としたライゲーション法を設計可能とする、ペプチド及び糖ペプチドの新規な製造方法を提供する。

【0009】

より具体的には、本発明の一態様によれば、ペプチド(又は糖ペプチド)中のシステイン残基をセリン残基に変換することができる。そのため、N末端にシステイン残基を有するペプチドを他のペプチドとNCL法により連結し、その後、このシステイン残基をセリン残基に変換することができる。よって、本発明によれば、得ようとする所望の配列にシステイン残基が存在しなくてもセリン残基が存在すれば、その位置をNCL法における連結部位として設計することができる。

【0010】

また、本発明の一態様によれば、N末端に-SH基を有するトレオニン誘導体(または該-SH基がジスルフィド結合等により保護されたトレオニン誘導体)残基をN末端に有するペプチドを他のペプチドとライゲーション法により連結し、その後、得られるトレオニン誘導体残基をトレオニン残基に変換することができる。よって、本発明によれば、得ようとする

所望の配列にシステイン残基が存在しなくてもトレオニン残基が存在すれば、その位置をライゲーショソ法における連結部位として設計することができる。

このように、本発明は、糖ペプチド中に豊富に存在するセリンやトレオニソをライゲーショソ法による連結部位として設計可能とする、ライゲーショソ法を用いたペプチド及び糖ペプチドの新規な製造方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0011】

以上の課題を解決するために本発明は以下の特徴を有し得る。

すなわち、本発明は、

-SH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドにおいて、前記-SH基を-OH基に変換すること
を特徴とするペプチドの製造方法であって、以下の工程(a)～(c)： 10

(a)ペプチド中の-SH基とメチル化剤とを反応させる工程；

(b)工程(a)で得られた-SMe基とシアン化剤とを反応させる工程；及び

(c)工程(b)と比較してより塩基性条件とする工程；

を含む、前記製造方法を提供し得る。

【0012】

本発明は、また、

-SH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドにおいて、前記-SH基を-OH基に変換すること
を特徴とするペプチドの製造方法であって、以下の工程(a)～(c)： 20

(a)ペプチド中の-SH基とメチル化剤とを反応させることにより、前記-SH基を-SMe基に
変換する工程；

(b)工程(a)で得られた-SMe基とシアン化剤とを反応させることにより、反応中間体を生
成する工程；及び

(c)工程(b)と比較してより塩基性条件下、工程(b)で得られた反応中間体を、-OH基を有
するアミノ酸残基を含むペプチドに変換する工程；

を含む、前記製造方法を提供し得る。

【0013】

本発明はまた、

システイン残基を含むペプチドにおいて、前記システイン残基をセリン残基に変換すること
を特徴とするペプチドの製造方法であって、以下の工程(a)～(c)： 30

(a)ペプチド中のシステイン残基の-SH基とメチル化剤とを反応させることにより、前記
-SH基を-SMe基に変換する工程；

(b)工程(a)で得られた-SMe基とシアン化剤とを反応させることにより、反応中間体を生
成する工程；及び

(c)工程(b)と比較してより塩基性条件下、工程(b)で得られた反応中間体を、セリン残
基を含むペプチドに変換する工程；

を含む、前記製造方法を提供し得る。

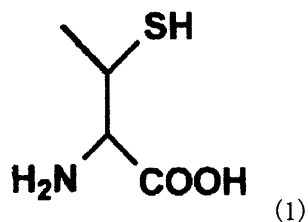
【0014】

本発明はまた、

式(1)で示されるトレオニン誘導体A 40

【0015】

【化 3】



10

【0016】

をアミノ酸残基として含むペプチドにおいて、前記トレオニン誘導体A残基をトレオニン残基に変換することを特徴とするペプチドの製造方法であって、以下の工程(a)～(c)：

(a)ペプチド中のトレオニン誘導体A残基の-SH基とメチル化剤とを反応させることにより、前記-SH基を-SMe基に変換する工程；

(b)工程(a)で得られた-SMe基とシアン化剤とを反応させることにより、反応中間体を生成する工程；及び

(c)工程(b)と比較してより塩基性条件下、工程(b)で得られた反応中間体を、トレオニン残基を含むペプチドに変換する工程；

を含む、前記製造方法を提供し得る。

20

【0017】

本発明はまた、

-SMe基を有するアミノ酸残基を含むペプチドにおいて、前記-SMe基を-OH基に変換することを特徴とするペプチドの製造方法であって、以下の工程(b)及び(c)：

(b)ペプチド中の-SMe基とシアン化剤とを反応させることにより反応中間体を生成する工程；及び

(c)工程(b)と比較してより塩基性条件下、工程(b)で得られた反応中間体を、-OH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドに変換する工程；

を含む、前記製造方法を提供し得る。

【0018】

30

本発明はまた、

-OH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドの製造方法であって、

(o)カルボキシル基が式-C(=O)-SR(式中、Rは、ベンジル基、アリール基又はアルキル基から選択され、これらは置換基によりさらに置換されていてもよい。)で表されるα-カルボキシチオエステル基で置換されたアミノ酸残基をC末端に含む第1のペプチドと、-SH基を有するアミノ酸残基をN末端に含む第2のペプチドとを、ライゲーション法により連結して-SH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドを得る工程；

(a)工程(o)で得られたペプチド中の-SH基とメチル化剤とを反応させることにより、前記-SH基を-SMe基に変換する工程；

(b)工程(a)で得られた-SMe基とシアン化剤とを反応させることにより反応中間体を生成する工程；及び

40

(c)工程(b)と比較してより塩基性条件下、工程(b)で得られた反応中間体を、-OH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドに変換する工程；

を含む、前記製造方法を提供し得る。

【0019】

本発明はまた、

セリン残基を含むペプチドの製造方法であって、

(o)カルボキシル基が式-C(=O)-SR(式中、Rは、ベンジル基、アリール基又はアルキル基から選択され、これらは置換基によりさらに置換されていてもよい。)で表されるα-カルボキシチオエステル基で置換されたアミノ酸残基をC末端に含む第1のペプチドと、システ

50

イン残基をN末端に含む第2のペプチドとを、ライゲーション法により連結してシステイン残基を含むペプチドを得る工程；

(a)工程(o)で得られたペプチド中のシステイン残基の-SH基とメチル化剤とを反応させることにより、前記-SH基を-SMe基に変換する工程；

(b)工程(a)で得られた-SMe基とシアン化剤とを反応させることにより反応中間体を生成する工程；及び

(c)工程(b)と比較してより塩基性条件下、工程(b)で得られた反応中間体を、セリン残基を含むペプチドに変換する工程；
を含む、前記製造方法を提供し得る。

【0020】

10

本発明はまた、
トレオニン残基を含むペプチドの製造方法であって、

(o)カルボキシル基が式-C(=O)-SR(式中、Rは、ベンジル基、アリール基又はアルキル基から選択され、これらは置換基によりさらに置換されていてもよい。)で表される α -カルボキシチオエステル基で置換されたアミノ酸残基をC末端に含む第1のペプチドと、トレオニン誘導体残基をN末端に含む第2のペプチドとを、ライゲーション法により連結して上記式(1)で示されるトレオニン誘導体Aをアミノ酸残基として含むペプチドを得る工程；

(a)工程(o)で得られたペプチド中のトレオニン誘導体A残基の-SH基とメチル化剤とを反応させることにより、前記-SH基を-SMe基に変換する工程；

(b)工程(a)で得られた-SMe基とシアン化剤とを反応させることにより反応中間体を生成する工程；及び

20

(c)工程(b)と比較してより塩基性条件下、工程(b)で得られた反応中間体を、トレオニン残基を含むペプチドに変換する工程；
を含む、前記製造方法を提供し得る。

【0021】

本発明はまた、
-SH基を有するアミノ酸残基を含む糖ペプチドにおいて、前記-SH基を-OH基に変換することを特徴とする糖ペプチドの製造方法であって、以下の工程(a)～(c)；

(a)糖ペプチド中の-SH基とメチル化剤とを反応させる工程；

(b)工程(a)で得られた-SMe基とシアン化剤とを反応させる工程；及び

30

(c)工程(b)と比較してより塩基性条件とする工程；
を含む、前記製造方法を提供し得る。

【0022】

本発明はまた、
-SH基を有するアミノ酸残基を含む糖ペプチドにおいて、前記-SH基を-OH基に変換することを特徴とする糖ペプチドの製造方法であって、以下の工程(a)～(c)；

(a)糖ペプチド中の-SH基とメチル化剤とを反応させることにより、前記-SH基を-SMe基に変換する工程；

(b)工程(a)で得られた-SMe基とシアン化剤とを反応させることにより、反応中間体を生成する工程；及び

40

(c)工程(b)と比較してより塩基性条件下、工程(b)で得られた反応中間体を、-OH基を有するアミノ酸残基を含む糖ペプチドに変換する工程；
を含む、前記製造方法を提供し得る。

【0023】

本発明はまた、
システイン残基を含む糖ペプチドにおいて、前記システイン残基をセリン残基に変換することを特徴とする糖ペプチドの製造方法であって、以下の工程(a)～(c)；

(a)糖ペプチド中のシステイン残基の-SH基とメチル化剤とを反応させることにより、前記-SH基を-SMe基に変換する工程；

(b)工程(a)で得られた-SMe基とシアン化剤とを反応させることにより、反応中間体を生

50

成する工程；及び

(c)工程(b)と比較してより塩基性条件下、工程(b)で得られた反応中間体を、セリン残基を含む糖ペプチドに変換する工程；
を含む、前記製造方法を提供し得る。

【0024】

本発明はまた、上記式(1)で示されるトレオニン誘導体Aをアミノ酸残基として含む糖ペプチドにおいて、前記トレオニン誘導体A残基をトレオニン残基に変換することを特徴とする糖ペプチドの製造方法であって、以下の工程(a)～(c)：

(a)糖ペプチド中のトレオニン誘導体A残基の-SH基とメチル化剤とを反応させることにより、前記-SH基を-SMe基に変換する工程；

10

(b)工程(a)で得られた-SMe基とシアン化剤とを反応させることにより、反応中間体を生成する工程；及び

(c)工程(b)と比較してより塩基性条件下、工程(b)で得られた反応中間体を、トレオニン残基を含む糖ペプチドに変換する工程；
を含む、前記製造方法を提供し得る。

【0025】

本発明はまた、
-OH基を有するアミノ酸残基を含む糖ペプチドの製造方法であって、

(o)カルボキシ基が式-C(=O)-SR(式中、Rは、ベンジル基、アリール基又はアルキル基から選択され、これらは置換基によりさらに置換されていてもよい。)で表されるα-カルボキシチオエステル基で置換されたアミノ酸残基をC末端に含む第1のペプチド又は糖ペプチドと、-SH基を有するアミノ酸残基をN末端に含む第2のペプチド又は糖ペプチド（ここで、第1のペプチド又は糖ペプチド及び第2のペプチド又は糖ペプチドの少なくとも一方は糖ペプチドである）とを、ライゲーショニング法により連結して-SH基を有するアミノ酸残基を含む糖ペプチドを得る工程；

20

(a)工程(o)で得られた糖ペプチド中の-SH基とメチル化剤とを反応させることにより、前記-SH基を-SMe基に変換する工程；

(b)工程(a)で得られた-SMe基とシアン化剤とを反応させることにより反応中間体を生成する工程；及び

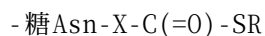
(c)工程(b)と比較してより塩基性条件下、工程(b)で得られた反応中間体を、-OH基を有するアミノ酸残基を含む糖ペプチドに変換する工程；
を含む、前記製造方法を提供し得る。

30

【0026】

本発明はまた、
セリン残基を含む糖ペプチドの製造方法であって、

(o)C末端が以下の式で表される第1の糖ペプチド：



(式中、

糖Asnは糖鎖が付加したアスパラギンであり、

Xはプロリン以外の任意のアミノ酸残基のカルボキシ基以外の部分であり、

40

Rは、ベンジル基、アリール基又はアルキル基から選択され、これらは置換基によりさらに置換されていてもよい。)

と、システイン残基をN末端に含む第2のペプチドとを、ライゲーショニング法により連結してシステイン残基を含む糖ペプチドを得る工程；

(a)工程(o)で得られた糖ペプチド中のシステイン残基の-SH基とメチル化剤とを反応させることにより、前記-SH基を-SMe基に変換する工程；

(b)工程(a)で得られた-SMe基とシアン化剤とを反応させることにより反応中間体を生成する工程；及び

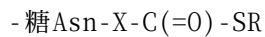
(c)工程(b)と比較してより塩基性条件下、工程(b)で得られた反応中間体を、セリン残基を含む糖ペプチドに変換する工程；

50

を含む、前記製造方法を提供し得る。

【0027】

本発明はまた、
トレオニン残基を含む糖ペプチドの製造方法であって、
(o)C末端が以下の式で表される第1の糖ペプチド：



(式中、

糖Asnは糖鎖が付加したアスパラギンであり、

Xはプロリン以外の任意のアミノ酸残基のカルボキシル基以外の部分であり、

Rは、ベンジル基、アリール基又はアルキル基から選択され、これらは置換基によりさらに置換されていてもよい。) 10

と、トレオニン誘導体残基をN末端に含む第2のペプチドとを、ライゲーション法により連結して上記式(1)で示されるトレオニン誘導体Aをアミノ酸残基として含む糖ペプチドを得る工程；

(a) 工程(o)で得られた糖ペプチド中のトレオニン誘導体A残基の-SH基とメチル化剤とを反応させることにより、前記-SH基を-SMe基に変換する工程；

(b) 工程(a)で得られた-SMe基とシアン化剤とを反応させることにより反応中間体を生成する工程；及び

(c) 工程(b)と比較してより塩基性条件下、工程(b)で得られた反応中間体を、トレオニン残基を含む糖ペプチドに変換する工程； 20

を含む、前記製造方法を提供し得る。

【0028】

本発明はまた、以下の式：



(式中、

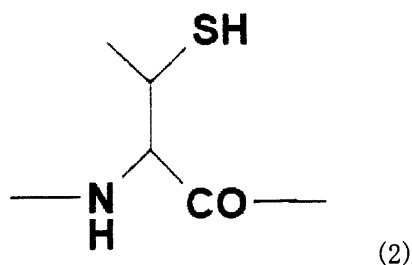
糖Asnは糖鎖が付加したアスパラギンであり、

Xはプロリン以外の任意のアミノ酸残基であり、

Yは、式(2)で示されるトレオニン誘導体A残基

【0029】

【化4】



【0030】

である)

で示される構造を含む糖ペプチドを提供し得る。

【0031】

本発明において、実施態様によっては、工程(a)又は工程(o)におけるペプチド若しくは糖ペプチド中のメチオニン残基が、保護メチオニン残基であり、さらに所望により以下の工程(d)：

(d) 保護メチオニン残基を脱保護する工程；

を工程(b)又は(c)の後、特に工程(c)の後に含むことが好ましい場合がある。

【0032】

本発明において、実施態様によっては、工程(b)で得られる反応中間体は、好ましくは 50

エステル体であり得る。

本発明において、実施態様によっては、工程(b)は、酸性条件下、特にpH2～3で行うことが好ましい場合がある。

本発明において、実施態様によっては、工程(b)で用いるシアン化剤は、好ましくは臭化シアンであり得る。

【0033】

本発明において、実施態様によっては、工程(c)を、弱塩基性条件下、例えば、pH7～9、特にpH7～8で行うことが好ましい場合がある。弱塩基性条件下で工程(c)を行う場合、実施態様によっては、工程(c)を約10分以上、特に約15分以上(例えば、約10分～30時間程度、特に約15分～30時間程度)行うことが好ましい場合がある。

10

【0034】

本発明において、実施態様によっては、工程(c)を、強塩基性条件下、例えば、pH9～13、特にpH10～11で行うことが好ましい場合がある。強塩基性条件下で工程(c)を行う場合、実施態様によっては、工程(c)を約1時間以下、特に約10分以下(例えば、約5分～1時間程度、特に約5分～10分程度)行うことが好ましい場合がある。

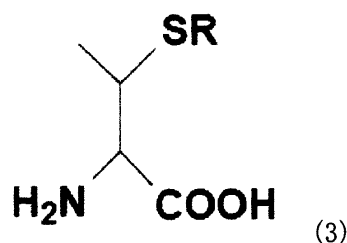
【0035】

本発明において、第2のペプチドのN末端にトレオニン誘導体残基が含まれる場合、実施態様によっては、前記トレオニン誘導体残基は、式(3)：

【0036】

【化5】

20



(式中、Rは、H又はライゲーシオン反応の条件下で容易に脱保護されるチオール基の保護基であり、好ましくはH又はジスルフィド基である。)

30

で表されるトレオニン誘導体のN末端アミノ酸残基であり得る。

【0037】

本発明において、実施態様によっては、第1のペプチド(又は糖ペプチド)及び第2のペプチド(又は糖ペプチド)のいずれか、より特定すれば両方が、システインを含まないかシステインが保護システインであるペプチド(又は糖ペプチド)であることが好ましい場合がある。

【0038】

本発明において、実施態様によっては、第1のペプチド(又は糖ペプチド)及び第2のペプチド(又は糖ペプチド)のいずれかは、80個以下、好ましくは50個以下、より好ましくは30個以下のアミノ酸残基を有するペプチド(又は糖ペプチド)であることが好ましい場合がある。

40

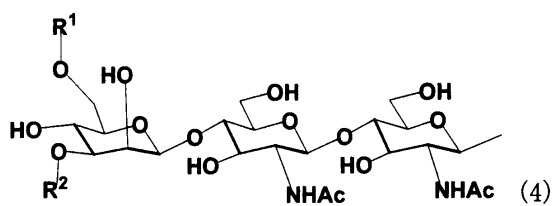
【0039】

本発明において、糖ペプチドにおける糖鎖は、実施態様によっては、N結合型糖鎖又はO結合型糖鎖であることが好ましい場合がある。

本発明において、糖鎖は、実施態様によっては、以下の式(4)で表される糖鎖が好ましい場合がある。

【0040】

【化 6】



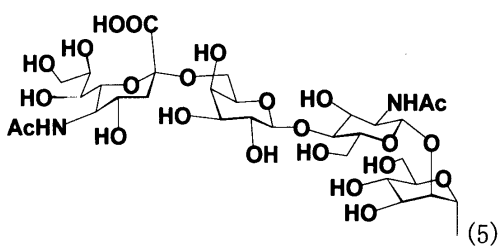
10

【 0 0 4 1】

[式中、R¹ および R² は、各々独立して、水素原子、又は、式(5)～(8)で示される基である。]

【 0 0 4 2】

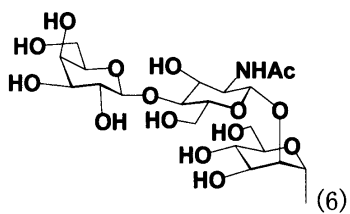
【化 7】



20

【 0 0 4 3】

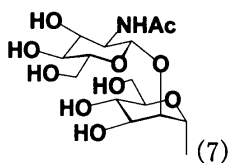
【化 8】



30

【 0 0 4 4】

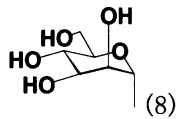
【化 9】



40

【 0 0 4 5】

【化 1 0】



【0 0 4 6】

10

本発明において、実施態様によっては、工程(c)又は工程(d)の後、更に糖鎖を付加する工程を含むことが好ましい場合がある。

【0 0 4 7】

本発明の製造方法で得られるペプチド又は糖ペプチドは、実施態様によっては、全てのアミド結合が天然アミド結合であることが好ましい場合がある。

本発明の製造方法で得られるペプチド又は糖ペプチドは、実施態様によっては、全ての構成アミノ酸が、生体内にペプチド又は糖ペプチドの構成アミノ酸として存在するアミノ酸であることが好ましい場合がある。

【発明の効果】

【0 0 4 8】

20

本発明のペプチドの製造方法によれば、-SH基を有するペプチドの-SH基を-OH基に変換することができる。また、-C(=O)-SRで表される α -カルボキシチオエステル部分をC末端に有するようにした第1のペプチドと、-SH基を有するアミノ酸残基をN末端に有する第2のペプチドとをライゲーション法により連結して得られた、-SH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドの-SH基を-OH基に変換することができる。これらの方法は糖ペプチドに応用することもできる。

【0 0 4 9】

従って、本発明のペプチドの製造方法によれば、ペプチド中のシステイン残基をセリン残基に変換することが可能になり、得ようとする所望の配列にシステイン残基が存在しなくてもセリン残基が存在すれば、NCL法を適用することが可能になる。

30

【0 0 5 0】

また、本発明は、-SH基を有するトレオニン誘導体を連結部位としたライゲーション法をも提供し、このライゲーション法で得られたペプチド中の-SH基を有するトレオニン誘導体残基をトレオニン残基に変換することができるため、トレオニンを有するペプチドの製造に、トレオニン残基を連結部位として、ライゲーション法を適用することが可能になる。

【0 0 5 1】

従来の天然型化学的ライゲーション法における連結部位であったシステインは、生体内のペプチド中における含有率が低かったが、本発明の方法によれば、生体内のペプチド、特に糖ペプチド中において含有率の高いセリン及びトレオニンを、ライゲーション法における新たな連結部位として設計することができる。

40

【0 0 5 2】

さらに、上記の方法を糖ペプチド、特に、セリン及びトレオニンの含有率の高いO結合型糖鎖や、コンセンサス配列として-糖Asn-X-Ser-又は-糖Asn-X-Thr-(式中、糖Asnは糖鎖が付加したアスパラギンであり、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸残基である)の配列を有するN結合型糖鎖を有する糖ペプチドに適用することで、ライゲーション法を利用して天然型と同じ構造の、N結合型糖鎖又はO結合型糖鎖を有する糖ペプチドを製造することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0 0 5 3】

50

本発明の第1の側面は、-SH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドにおいて、下記の工程(a)～(c)を含む工程を経ることにより、-OH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドを得ることである。

- (a) ペプチド中の-SH基とメチル化剤とを反応させる工程；
- (b) 工程(a)で得られた-SMe基とシアン化剤とを反応させる工程；及び
- (c) 工程(b)と比較してより塩基性条件とする工程。

【0054】

上記工程(a)～(c)は、より特定すれば、

- (a) ペプチド中の-SH基とメチル化剤とを反応させることにより、前記-SH基を-SMe基に変換する工程；
 - (b) 工程(a)で得られた-SMe基とシアン化剤とを反応させることにより、反応中間体を生成する工程；及び
 - (c) 工程(b)と比較してより塩基性条件下、工程(b)で得られた反応中間体を、-OH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドに変換する工程；
- である。

【0055】

本発明の第2の側面は、以下の工程：

カルボキシル基が式-C(=O)-SR(式中、Rは、ベンジル基、アリール基又はアルキル基から選択され、これらは置換基によりさらに置換されていてもよい。)で表される α -カルボキシチオエステル基で置換されたアミノ酸残基をC末端に含む第1のペプチドと、-SH基を有するアミノ酸残基をN末端に含む第2のペプチドとを、ライゲーション法により連結して-SH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドを得る工程；及び、上記の工程(a)～(c)を含む工程を経ることにより、-OH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドを得ることである。

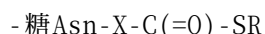
【0056】

本発明の第3の側面は、-SH基を有するアミノ酸残基を含む糖ペプチドにおいて、上記の工程(a)～(c)を含む工程を経ることにより、-OH基を有するアミノ酸残基を含む糖ペプチドを得ることである。

【0057】

本発明の第4の側面は、以下の工程：

C末端が以下の式で表される第1の糖ペプチド：



(式中、糖Asnは糖鎖が付加したアスパラギンであり、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸残基のカルボキシル基以外の部分であり、Rは、ベンジル基、アリール基又はアルキル基から選択され、これらは置換基によりさらに置換されていてもよい。)

と、-SH基を有するアミノ酸残基をN末端に含む第2のペプチドとを、ライゲーション法により連結して-SH基を有するアミノ酸残基を含む糖ペプチドを得る工程；及び、上記の工程(a)～(c)を含む工程を経ることにより、-OH基を有するアミノ酸残基を含む糖ペプチドを得ることである。

【0058】

本明細書中において、「ペプチド」とは、2以上のアミノ酸がアミド結合により結合しているものであれば特に限定されず、公知ペプチド及び新規ペプチド並びにペプチド改変体を含む。一般にタンパク質と呼ばれるものも、本発明においてはペプチド中に含むものとする。好ましい態様において、本発明の製造方法で得られるペプチド(又は糖ペプチド)は、天然型と同じアミド結合(ペプチド結合)で2以上のアミノ酸が結合している。

【0059】

本明細書中において、「ペプチド改変体」とは、ペプチドを天然又は人工的に改変した化合物であり、そのような改変としては、例えば、ペプチドの1又は複数のアミノ酸残基の、アルキル化、アシル化(例えばアセチル化)、アミド化(例えば、ペプチドのC末端のアミド化)、カルボキシル化、エステル形成、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質

10

20

30

40

50

化、リン酸化、水酸化、標識成分の結合等が挙げられる。

【0060】

本明細書中において、「アミノ酸」とは、その最も広い意味で用いられ、天然のアミノ酸、例えばセリン(Ser)、アスパラギン(Asn)、バリン(Val)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)、アラニン(Ala)、チロシン(Tyr)、グリシン(Gly)、リジン(Lys)、アルギニン(Arg)、ヒスチジン(His)、アスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu)、グルタミン(Gln)、トレオニン(Thr)、システイン(Cys)、メチオニン(Met)、フェニルアラニン(Phe)、トリプトファン(Trp)、プロリン(Pro)のみならず、アミノ酸変異体及び誘導体といったような非天然アミノ酸を含む。当業者であれば、この広い定義を考慮して、本明細書におけるアミノ酸として、例えばL-アミノ酸；D-アミノ酸；アミノ酸変異体及び誘導体等の化学修飾されたアミノ酸；ノルロイシン、β-アラニン、オルニチン等生体内でタンパク質の構成材料とならないアミノ酸；及び当業者に公知のアミノ酸の特性を有する化学的に合成された化合物などが挙げられることを理解するであろう。非天然アミノ酸の例として、以下に詳述するトレオニン誘導体Aのほか、α-メチルアミノ酸(α-メチルアラニンなど)、D-アミノ酸、ヒスチジン様アミノ酸(2-アミノ-ヒスチジン、β-ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン、α-フルオロメチル-ヒスチジン及びα-メチル-ヒスチジンなど)、側鎖に余分のメチレンを有するアミノ酸(「ホモ」アミノ酸)及び側鎖中のカルボン酸官能基アミノ酸がスルホン酸基で置換されるアミノ酸(システイン酸など)が挙げられる。

10

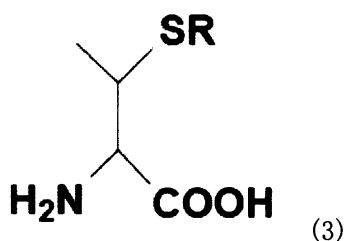
【0061】

本明細書中において、「トレオニン誘導体」とは、以下の式(3)：

20

【0062】

【化11】



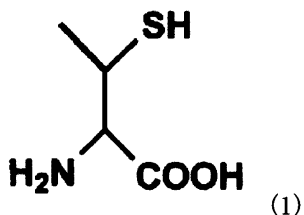
30

【0063】

で示される化合物をいう。式(3)中、RはH又はライゲーシオン反応の条件下で容易に脱保護されるチオール基の保護基であり、好ましくはH又はジスルフィド基である。特に、上記式(3)において、RがHである以下の式(1)の化合物を、トレオニン誘導体Aと呼ぶ。

【0064】

【化12】



40

【0065】

式(3)のトレオニン誘導体は、トレオニンの-OH基の部位が-SR基である化合物であり、いずれの立体配置を有するものも含む。本発明の製造方法において、ペプチド中のアミノ酸残基の-SH基が-OH基に変換する際に、立体反転が起こると考えられるため、特に天然に存在するトレオニンを得ようとする際には、天然に存在するトレオニンの-OH基と立体が反転した-SR基を有するトレオニン誘導体を用いることが好ましい場合がある。

50

【0066】

上記のトレオニン誘導体は、例えば後述の実施例及び合成例も参照し、以下の方法で得ることができる。

まず、トレオニンのアミノ基及びカルボキシル基を保護したものを用意する。それぞれの保護基は以降の反応で目的のペプチドが得られる限り特に限定されないが、例えば、アミノ基をBoc基で保護し、カルボキシル基をTMSE(トリメチルシリルエチル)基で保護したものをを用いることができる。次に公知の手法を用いてβ位の水酸基をメシル化する。次いで、例えばDBUとチオ酢酸を用いて、このメシル基をチオアセチル基へと置換する(D. Crichton et al, J. Am. Chem. Soc., 129, 10064(2007)参照)。

【0067】

10

このチオアセチル基を、公知の手法により、ジスルフィド基、アセトアミドメチル基、ニトロベンジル基、トリチル基等、当業者に公知の保護基で保護したチオール基に変換する。例えば、ジスルフィド基で保護したチオール基とする場合、後述の合成例1を参照することができる。ジスルフィド基は、その後のライゲーション法の反応条件下で容易に脱保護される。

【0068】

好ましい態様において、本発明の製造方法で得られるペプチド(又は糖ペプチド)は、全て生体内にペプチド(又は糖ペプチド)の構成アミノ酸として存在するアミノ酸からなる。また、本発明の一態様において、本発明の製造方法によって得られるペプチドは、システイン残基を含まないかあるいは構成アミノ酸中のシステイン含有量が少ないペプチドであることが好ましい。さらに、本発明の一態様において、本発明の製造方法によって得られるペプチドは、任意のセリン残基又はトレオニン残基から、次のセリン残基若しくはトレオニン残基又はN末端若しくはC末端までのいずれかの間に、80個以下、好ましくは50個以下、より好ましくは30個以下のアミノ酸残基を有する。例えば、本発明の一態様において、本発明の製造方法によって得られるペプチドは、5～40アミノ酸残基中、好ましくは20～30アミノ酸残基中に1つ以上、セリン残基又はトレオニン残基を有する。

20

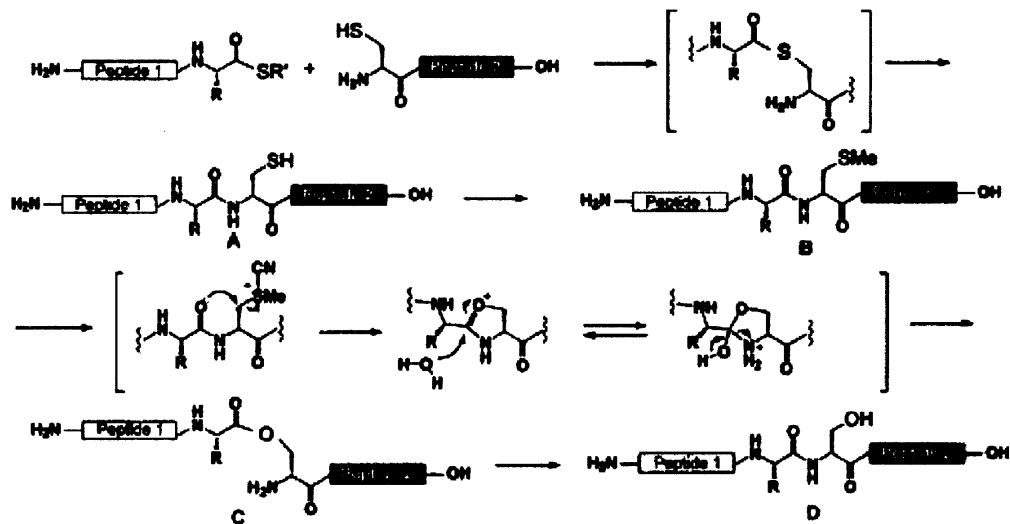
【0069】

本明細書中において、「反応中間体」とは、広い意味において、ペプチド中の-SMe基にシアン化剤を反応させた後、-OH基に変換されるまでの各化合物のいずれをも指す。本発明の反応スキームは、以下のスキーム1のようであると考えられ、以下のスキーム1中、Cで示されるエステル体も本発明における反応中間体の1つである。なお、本明細書中において、例えば以下のスキーム1中に「ペプチド-OH」との記載があるが、この-OHは特筆しない限り、ペプチドのC末端カルボキシル基の-OHを示す。

30

【0070】

【化 1 3】



スキーム 1

【0071】

本明細書において、「糖ペプチド」とは、前記のペプチドに少なくとも1の糖鎖が付加した化合物であれば特に限定されず、公知の糖ペプチド及び新規の糖ペプチドを含む。一般に糖タンパク質と呼ばれるものも、本発明における糖ペプチドの定義に含むものとする。

【0072】

好ましい態様において、本発明の製造方法で得られる糖ペプチドは、N結合型糖鎖又はO結合型糖鎖を有するペプチドであり、例えば、エリスロポエチン、インターロイキン、インターフェロン-β、抗体、単球走化性因子タンパク質-3(MCP-3、monocyte chemotactic protein-3)等のペプチドの一部あるいは全部が挙げられる。

【0073】

本発明の一態様において、本発明の製造方法によって得られる糖ペプチドは、糖鎖を付加していない任意のセリン残基又はトレオニン残基から、次のセリン残基若しくはトレオニン残基又はN末端若しくはC末端までのいずれかの間に、80個以下、好ましくは50個以下、より好ましくは30個以下のアミノ酸残基を有する。例えば、本発明の一態様において、本発明の製造方法によって得られる糖ペプチドは、5～40アミノ酸残基中、好ましくは20～30アミノ酸残基中に1つ以上、セリン残基又はトレオニン残基を有する。

【0074】

糖ペプチドにおいて、糖鎖とペプチド中のアミノ酸残基とは、直接結合していても、リンカーを介して結合していてもよい。糖鎖とアミノ酸との結合部位に特に制限はないが、糖鎖の還元末端にアミノ酸が結合していることが好ましい。

【0075】

糖鎖が結合するアミノ酸の種類は特に限定されず、天然アミノ酸、非天然アミノ酸のいずれに結合していてもよい。糖ペプチドが生体内に存在する糖ペプチド(糖たんぱく質)と同一又は類似の構造を有するという観点からは、糖鎖は、N結合型糖鎖のようにAsnに結合していること、又はO結合型糖鎖のようにSer若しくはThrに結合していることが好ましい。特に、N結合型糖鎖の場合、本発明の製造方法により得られる糖ペプチドは、Asnに糖鎖が結合し、該AsnのC末端側にプロリン以外のアミノ酸(X)がアミド結合(ペプチド結合)し、さらに該XのC末端側にThr又はSerがアミド結合(ペプチド結合)した構造(-糖Asn-X-Thr/Ser-)を有する糖ペプチドであることが好ましい。

【0076】

糖鎖とアミノ酸とがリンカーを介して結合している場合、リンカーとの結合容易性とい

10

20

30

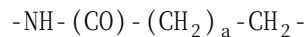
40

50

う観点からは、糖鎖が結合するアミノ酸は：アスパラギン酸やグルタミン酸等の分子内に2以上のカルボキシル基を持つアミノ酸；リシン、アルギニン、ヒスチジン、トリプトファン等の分子内に2以上のアミノ基を持つアミノ酸；セリン、トレオニン、チロシン等の分子内に水酸基を持つアミノ酸；システイン等の分子内にチオール基を持つアミノ酸；又はアスパラギン、グルタミン等の分子内にアミド基を持つアミノ酸が好ましい。特に、反応性の観点からは、アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、アルギニン、セリン、トレオニン、システイン、アスパラギン又はグルタミンが好ましい。

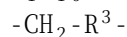
【0077】

糖ペプチドにおいて、糖鎖とアミノ酸とがリンカーを介して結合している場合、リンカーとしては、当該分野において用いられているものを広く使用することができるが、例えば：



(式中、aは整数であり、目的とするリンカー機能を阻害しない限り限定されるものではないが、好ましくは0～4の整数を示す。);

C₁₋₁₀ポリメチレン；



(ここで、R³は、アルキル、置換されたアルキル、アルケニル、置換されたアルケニル、アルキニル、置換されたアルキニル、アリール、置換されたアリール、炭素環基、置換された炭素環基、複素環基及び置換された複素環基からなる群より選択される基から水素原子が1つ脱離して生ずる基である)；

等を挙げることができる。

【0078】

本明細書中において、「糖鎖」とは、単位糖(単糖及び/又はその誘導体)が2つ以上連なってできた化合物の他、1つの単位糖(単糖及び/又はその誘導体)からなる化合物をも含む。このような糖鎖としては、例えば、生体中に含有される単糖類及び多糖類(グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、キシロース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、シアル酸並びにそれらの複合体及び誘導体)の他、分解された多糖、糖タンパク質、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、糖脂質などの複合生体分子から分解又は誘導された糖鎖など広範囲なものが挙げられるがそれらに限定されない。単位糖が2つ以上連なる場合、各々の単位糖同士の間は、グリコシド結合による脱水縮合によって結合する。糖鎖は直鎖型であっても分岐鎖型であってもよい。

【0079】

また、本明細書中において、「糖鎖」には糖鎖の誘導体も含まれ、糖鎖の誘導体としては、例えば、糖鎖を構成する糖が、カルボキシル基を有する糖(例えば、C-1位が酸化されてカルボン酸となったアルドン酸(例えば、D-グルコースが酸化されたD-グルコン酸)、末端のC原子がカルボン酸となったウロン酸(D-グルコースが酸化されたD-グルクロン酸))、アミノ基又はアミノ基の誘導体(例えば、アセチル化されたアミノ基)を有する糖(例えば、N-アセチル-D-グルコサミン、N-アセチル-D-ガラクトサミンなど)、アミノ基及びカルボキシル基を両方とも有する糖(例えば、N-アセチルノイラミン酸(シアル酸)、N-アセチルムラミン酸など)、デオキシ化された糖(例えば、2-デオキシ-D-リボース)、硫酸基を含む硫酸化糖、リン酸基を含むリン酸化糖などである糖鎖が挙げられるがこれらに限定されない。

【0080】

本発明の糖鎖は、好ましくは、生体内で複合糖質(糖ペプチド(又は糖タンパク質)、プロテオグリカン、糖脂質等)として存在する糖鎖であり、好ましくは、生体内で糖ペプチド(又は糖タンパク質)としてペプチド(又はタンパク質)に結合している糖鎖であるN-結合型糖鎖、O-結合型糖鎖等である。O-結合型糖鎖が結合している糖ペプチドにおいては、ペプチドのSer又はThrにN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、キシロース、フコース等がO-グリコシド結合で結合し、これにさらに糖鎖が付加する。N結合型糖鎖としては、例えば、高マンノース(ハイマンノース)型、複合(コンプレッ

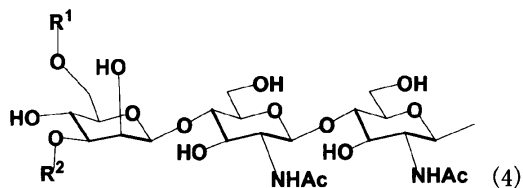
クス)型、混成(ハイブリッド)型を挙げることができ、複合型が好ましい。

【0081】

本発明において、好ましい糖鎖としては、例えば、下記式(4)で表される糖鎖である。

【0082】

【化14】

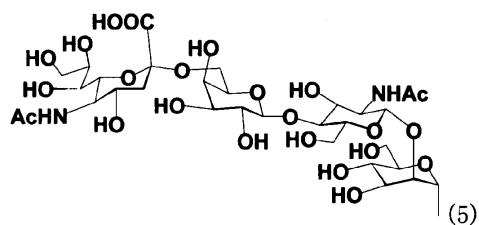


【0083】

[式中、 R^1 および R^2 は、各々独立して、水素原子、又は、式(5)～(8)で示される基である。]

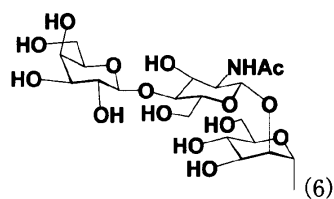
【0084】

【化15】



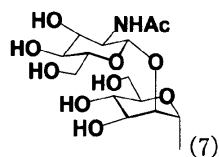
【0085】

【化16】



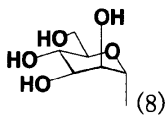
【0086】

【化17】



【0087】

【化 18】



【0088】

本発明の糖ペプチドの製造方法を、医薬品等の製造の分野に適用することを考慮した場合に抗原性等の問題を回避し得るという観点からは、好ましい糖鎖としては、例えば、ヒト体内において、タンパク質と結合した糖タンパク質として存在する糖鎖(例えば、FEBS LETTERS Vol.50, No.3, Feb. 1975に記載の糖鎖)と、同一の構造を有する糖鎖(構成糖の種類及びそれらの結合様式が同一の糖鎖)又はこれの非還元末端から1又は複数の糖を失った糖鎖を挙げることができる。

10

【0089】

糖ペプチドにおける、糖鎖の付加数は、1鎖以上であれば特に限定されないが、生体内に存在する糖ペプチドと類似した構造の糖ペプチドを提供するという観点からは、体内に存在する糖ペプチドと同程度の付加数であれば、より好ましいであろう。

【0090】

本発明の好ましい一態様において、本発明の糖ペプチドにおける糖鎖の構造は、均一である。本明細書中において、糖ペプチドにおける糖鎖の構造が均一であるとは、糖ペプチド間で比較した場合に、ペプチド中の糖鎖付加部位、糖鎖を構成する各糖の種類、結合順序、及び糖間の結合様式が同一であることをいい、少なくとも90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは99%以上の糖鎖の構造が均一であることを言う。糖鎖が均一である糖ペプチドは、品質が一定であり、特に医薬品の製造や、アッセイなどの分野において好ましい。

20

【0091】

本発明の製造方法において原料として用いるペプチドは、例えば、固相合成、液相合成、細胞による合成、天然に存在するものを分離抽出する方法等、当業者に公知のペプチド製造方法を適用することにより製造することができる。また、原料として糖ペプチドを用いる場合、上記の公知のペプチドの製造方法に、糖鎖付加工程を組み込むことで製造することができる。糖鎖付加工程で用いる糖鎖の製造方法に関しては、例えば、国際公開番号W003/008431、W02004/058984、W02004/058824、W02004/070046、W02007/011055等を参照することができる。

30

【0092】

具体例として、-SH基を有するアミノ酸残基を含むペプチド又は糖ペプチドを固相合成法により製造する方法を以下に示す。以下に示す方法において、国際公開番号W02004/005330も参照することができる。

【0093】

まず、(1)水酸基を有する樹脂(レジン)の水酸基と、脂溶性保護基でアミノ基が保護されたアミノ酸のカルボキシル基をエステル化反応させる。この場合アミノ酸のアミノ基を脂溶性保護基で保護しているので、アミノ酸同士の自己縮合は防止され、レジンの水酸基とアミノ酸のカルボキシル基が反応してエステル化が起こる。

40

【0094】

次に(2)上記で得られたエステルの脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、(3)この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基が保護された所望のアミノ酸のカルボキシル基とアミド化反応させ、(4)上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、(5)上記(3)及び(4)の工程を必要に応じて繰り返すことにより、所望の数の所望のアミノ酸が連結した、末端にレジンを結合し、他端に遊離アミノ基を有するペプチドが得られる。

50

【0095】

上記(1)～(5)の工程でアミノ酸として-SH基を有する(-SH基は保護されていてもよい)アミノ酸(例えば、システインや既出の式(3)のトレオニン誘導体)を使用することにより、-SH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドを得ることができる。なお、上記(1)～(5)の工程で用いる際には、-SH基を有するアミノ酸の-SH基は当業者に公知の保護基、例えば、ジスルフィド基、アセトアミドメチル基、ニトロベンジル基、トリチル基等の保護基で保護されていることができ、その後、必要に応じ脱保護することができる。また、上記(1)～(5)の工程でアミノ酸として、糖鎖が付加したアミノ酸(例えば、アスパラギンに糖鎖が付加した糖鎖アスパラギン、セリン又はトレオニンに糖鎖が付加した糖鎖セリン又は糖鎖トレオニン等)を用いることにより、さらに、所望の位置に1つ又は2つ以上の糖鎖を有するN結合型及び/又はO結合型糖ペプチドを得ることもできる。このようなN結合型又はO結合型の糖ペプチドは、上述のとおり、所望の位置に、-SH基を有するアミノ酸残基を含むことが可能である。

10

【0096】

(6)そして、酸で樹脂(レジン)と(1)のアミノ酸との間のエステル結合を切断することにより、所望のペプチド(又は糖ペプチド)を製造することができる。

【0097】

固相樹脂(レジン)としては、通常、固相合成で使用する樹脂(レジン)であればよく、例えば、Amino-PEGAレジン(メルク社製)、Wangレジン(メルク社製)、HMPA-PEGAレジン(メルク社製)、Trt Chlorideレジン(メルク社製)等を用いることができる。

20

また、Amino-PEGAレジン(樹脂)とアミノ酸との間にリンカーを存在させてもよく、このようなリンカーとして、例えば、4-ヒドロキシメチルフェノキシ酢酸(HMPA)、4-(4-ヒドロキシメチル-3-メトキシフェノキシ)-ブチル酢酸(HMPB)等を挙げることができる。

【0098】

脂溶性保護基としては、例えば、9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)基、t-ブチルオキシカルボニル(Boc)基、アリルオキシカルボニル(Alloc)基等のカルボニル含有基、アセチル(Ac)基等のアシル基、アリル基、ベンジル基等の保護基を挙げることができるが、特にこれらに限定されるものではない。

脂溶性保護基を導入するには、例えばFmoc基を導入する場合には9-フルオレニルメチル-N-スクシニミジルカーボネートと炭酸水素ナトリウムを加えて反応を行うことにより導入できる。反応は0～50℃、好ましくは室温で、約1～5時間程度行うのが良い。

30

【0099】

脂溶性保護基で保護したアミノ酸としては、既出のアミノ酸を上記の方法で保護したものを用いることができる。また、市販のものも使用することができる。例えば、Fmoc-Ser、Fmoc-Asn、Fmoc-Val、Fmoc-Leu、Fmoc-Ile、Fmoc-Ala、Fmoc-Tyr、Fmoc-Gly、Fmoc-Lys、Fmoc-Arg、Fmoc-His、Fmoc-Asp、Fmoc-Glu、Fmoc-Gln、Fmoc-Thr、Fmoc-Cys、Fmoc-Met、Fmoc-Phe、Fmoc-Trp、Fmoc-Proを挙げることができる。

【0100】

エステル化触媒として、例えば1-メシチレンスルホニル-3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール(MSNT)、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(DI-PCDI)等の公知の脱水縮合剤を用いることができる。アミノ酸と脱水縮合剤との使用割合は、前者1重量部に対して、後者が、通常1～10重量部、好ましくは2～5重量部である。

40

【0101】

エステル化反応は、例えば、固相カラムにレジンを入れ、このレジンに溶剤で洗浄し、その後アミノ酸の溶液を加えることにより行うのが好ましい。洗浄用溶剤としては、例えばジメチルホルムアミド(DMF)、2-プロパノール、塩化メチレン等を挙げることができる。アミノ酸を溶解する溶媒としては、例えばジメチルスルホキシド(DMSO)、DMF、塩化メチレン等を挙げることができる。エステル化反応は0～50℃、好ましくは室温で、約10分～30時間程度、好ましくは15分～24時間程度行うのが良い。

この時固相上の未反応の官能基を、無水酢酸等を用いてアセチル化してキャッピングす

50

ることも好ましい。

【0102】

脂溶性保護基の脱離は、例えば塩基で処理することにより行うことができる。塩基としては、例えばピペリジン、モルホリン等を挙げることができる。その際、溶媒の存在下行うのが好ましい。溶媒としては、例えばDMSO、DMF、メタノール等を挙げることができる。

遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された任意のアミノ酸のカルボキシル基とのアミド化反応は、活性化剤及び溶媒の存在下行うのが好ましい。

【0103】

活性化剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・塩酸塩(WSC/HCl)、ジフェニルホスホリルアジド(DPPA)、カルボニルジイミダゾール(CDI)、ジエチルシアノホスホネート(DEPC)、1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(DIPCI)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ-トリスピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(PyBOP)、3-ジエトキシホスホリルオキシ-1,2,3-ベンゾトリアジン-4(3H)-オン(DEPBT)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)、ヒドロキシスクシンイミド(HOSu)、ジメチルアミノピリジン(DMAP)、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール(HOAt)、3-ヒドロキシ-4-オキソ-3,4-ジヒドロ-5-アザベンゾ-1,2,3-トリアジン(HODhbt)、ヒドロキシフタルイミド(HOPht)、ペンタフルオロフェノール(Pfp-OH)、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU)、0-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスホネート(HATU)、0-ベンゾトリアゾール-1-イル-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート(TBTU)等を挙げることができる。

活性化剤の使用量は、脂溶性の保護基でアミノ基窒素が保護された任意のアミノ酸に対して、1~20当量、好ましくは1~10当量、さらに好ましくは、1~5当量とするのが好ましい。

【0104】

上記活性化剤のみでも反応は進行するが、補助剤としてアミンを併用することが好ましい。アミンとしては、例えば、ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)、N-エチルモルホリン(NEM)、N-メチルモルホリン(NMM)、N-メチルイミダゾール(NMI)等を用いることができる。補助剤の使用量は、脂溶性の保護基でアミノ基窒素が保護された任意のアミノ酸に対して、1~20当量、好ましくは1~10当量、さらに好ましくは、1~5当量とするのが好ましい。

【0105】

溶媒としては、例えばDMSO、DMF、塩化メチレン等を挙げることができる。反応は0~50℃、好ましくは室温で、約10~30時間程度、好ましくは15分~24時間程度行うのが良い。この際にも固相上の未反応のアミノ基を無水酢酸等を用いてアセチル化しキャッピングするのが好ましい。脂溶性保護基の脱離は、上記と同様に行うことができる。

【0106】

レジン(樹脂)からペプチド鎖を切断するには酸で処理するのが好ましい。酸としては、例えばトリフルオロ酢酸(TFA)、弗化水素(HF)等を挙げることができる。その際、アミノ酸に使用していた脂溶性保護基およびレジン(樹脂)上のリンカーから、反応性の高いカチオン種が生成する場合があるため、このものを捕獲するため求核性試薬を添加することが好ましい。求核性試薬としてはトリイソプロピルシラン(TIS)、フェノール、チオアニソール、エタンジチオール(EDT)等を挙げることができる。

【0107】

このようにして、-SH基を有するアミノ酸残基を含むペプチド(又は糖ペプチド)を得ることができる。

また、上述のようにして得られた、-SH基を有するアミノ酸残基を含むペプチド又は糖ペプチドに、トランスグルタミナーゼに代表される、酵素の逆反応を利用する方法を用いて糖鎖を付加することで、-SH基を有するアミノ酸を含む糖ペプチドを得ることもできる

。さらに、上記の方法に、転移酵素による糖鎖伸長反応を組み合わせることも可能である。

【0108】

上述のようにして得られた、ペプチド又は糖ペプチドのうち、-SH基を有するアミノ酸残基をN末端に含むペプチド(又は糖ペプチド)と、C末端に α -カルボキシチオエステル部分を有するようにしたペプチド(又は糖ペプチド)とを、ライゲーション法を用いて連結することができる。

なお、本明細書中において、「ライゲーション法」とは、特許文献1に記載の天然型化学的ライゲーション法(Native Chemical Ligation、NCL法)のみならず、後述の実施例に記載のように、非天然アミノ酸、アミノ酸誘導体(例えば、式(1)のトレオニン誘導体A、保護メチオニン、糖鎖付加アミノ酸等)を含むペプチドについて、上記天然型化学的ライゲーション法を応用する場合をも含む。ライゲーション法により、連結部位に天然アミド結合(ペプチド結合)を有するペプチドを製造することができる。

10

【0109】

ライゲーション法を用いた連結は、ペプチド-ペプチド間、ペプチド-糖ペプチド間、糖ペプチド-糖ペプチド間の、いずれにおいても行うことができる。

ライゲーション法に用いる、C末端に α -カルボキシチオエステル部分を有するようにしたペプチド(又は糖ペプチド)は、特許文献1に記載のように、当業者に公知の手法を用いて製造することができる。

20

【0110】

例えば、後述の実施例に記載のように、固相合成法によって、アミノ酸側鎖とN末端のアミノ基が保護された保護ペプチド(又は糖ペプチド)を得て、このC末端側のカルボキシル基を、液相中において縮合剤にPyBOP(Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate)/DIPEAを用いてベンジルチオールと縮合させ、その後、95%TFA溶液を用いてアミノ酸の鎖を脱保護することで、C末端に α -カルボキシチオエステル部分を有するようにしたペプチド(又は糖ペプチド)を得ることができる。

【0111】

ライゲーション法は、特許文献1に記載のような当業者に公知の手法を用いて、また、後述の実施例の記載を参照して実施することができる。例えば、C末端に $-C(=O)-SR$ により表される α -カルボキシチオエステル部分を有するようにした第1のペプチドと、N末端に-SH基を有するアミノ酸残基を有する第2のペプチドとを上述の記載を参照して用意する。なお、第1のペプチドにおいて、Rはチオール交換反応を阻害せず、カルボニル炭素への求核置換反応において脱離基となる基であれば特に限定されないが、好ましくはベンジルメルカプタン等のベンジル型、チオフエノール、4-(カルボキシメチル)-チオフエノール等のアリール型、2-メルカプトエタンスルホン酸塩、3-メルカプトプロピオン酸アミド等のアルキル型等から選択することができる。また、第2のペプチドのN末端の-SH基は、所望により保護基により保護されていてもよいが、この保護基は以下のライゲーション反応までの所望の時点で脱保護し、N末端に-SH基を有する第2のペプチドが、第1のペプチドと反応する。例えばジスルフィド基等、ライゲーションが起こる条件において自然に脱保護される保護基であれば、保護基により保護した第2のペプチドをそのまま以下のライゲーション反応に用いることもできる。

30

40

【0112】

これらの2つのペプチドを、必要に応じ、4-メルカプトフェニル酢酸、ベンジルメルカプタン、チオフエノール等の触媒チオールの存在下、100mMリン酸緩衝溶液等の溶液中で混合する。好ましくは、第1のペプチド1当量に対し第2のペプチドを0.5~2当量及び触媒チオールを5当量程度の割合で反応を行う。反応はpH6.5~7.5程度、20~40℃程度の条件下、約1~30時間程度行うのが望ましい。反応の進行は、HPLC、MS等を組み合わせた公知の手法を用いて確認することができる。

【0113】

50

これに、ジチオスレイトール(DTT)、トリス2-カルボキシエチルホスフィン塩酸塩(TCEP)のような還元剤を加えて副反応を抑制し、所望により精製することで、第1のペプチドと第2のペプチドとを連結することができる。

【0114】

なお、C末端にカルボキシチオエステル部分(-C(=O)-SR)を有するようにしたペプチドにおいて、R基の異なるペプチドが存在する場合、ライゲーショ反応の順序を操作することが可能であり(Protein Science (2007), 16:2056-2064等参照)、複数回のライゲーショを行う場合にはこれを考慮することができる。例えば、Rとしてアリール基、ベンジル基及びアルキル基が存在する場合には、一般に、この順に、連結反応が進行する。

【0115】

本発明において、-SH基を有するアミノ酸残基を含むペプチド(又は糖ペプチド)の-SH基を-OH基に変換することを特徴とするペプチド(又は糖ペプチド)の製造方法を具体的に示す。原料としては、上述の方法で得られたペプチド又は糖ペプチドを用いる。本発明の一態様においては、ライゲーショ法を用いて得られたペプチド又は糖ペプチドを用いることが好ましい。次いで、以下の工程(a)~(c)：

(a)ペプチド中の-SH基とメチル化剤とを反応させることにより、前記-SH基を-SMe基に変換する工程；

(b)工程(a)で得られた-SMe基とシアン化剤とを反応させることにより、反応中間体を生成する工程；及び

(c)工程(b)と比較してより塩基性条件下、工程(b)で得られた反応中間体を、-OH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドに変換する工程；

を含む工程を行う。以下、原料としてペプチドを用いた場合について例示する。

【0116】

工程(a)

工程(a)のメチル化において用いるメチル化剤はペプチド中の-SH基を-SMe基に変換することができるものであれば特に限定されず、例えば、ヨードメタン、メチル-4-ニトロベンゼンスルホネート等を挙げることができる。

メチル化剤の使用量は、原料ペプチドの-SH基1残基に対して、1~1000当量とすることができ、好ましくは、10~100当量、より好ましくは、15~30当量とすることができ。メチル化反応は、0~50℃、好ましくは20~30℃で、約10分~30時間程度、好ましくは15分~1時間程度行うことが望ましい。

【0117】

メチル化反応を行う際の溶媒としては緩衝溶液が好ましく、そのpHは7~9、特に8~9を示すものを好適に用いることができる。例えば、0.25Mトリス塩酸緩衝溶液(6Mグアニジン塩酸液、3.3mM EDTA含有、pH8.6)等を用いることができる。

【0118】

なお、ペプチド中にアミノ酸としてシステイン残基が含まれ、これをセリン残基に変換せず、本発明の製造方法で得られるペプチド中にシステイン残基として存在させる場合、システインを保護した保護システインの形で公知の手法を用いてペプチドに導入することで、システインの-SH基が工程(a)においてメチル化されることを防ぐことができる。システインの保護基としては、本発明の製造方法の各工程におけるチオール交換反応、酸処理、塩基処理等を考慮し、適切な保護基を用いることができ、例えば、アセトアミドメチル(Acm)基、ベンジル基、アセトアミド基、トリチル基等、好ましくはAcm基を用いることができる。工程(a)~(c)の後、所望により、公知の手法を用いて保護システイン残基を脱保護する。例えば、Acm基、ニトロベンジル基、トリチル基等を保護基とした保護システインを導入した場合、酢酸銀酢酸水溶液による脱保護法、光による脱保護法、酸処理による脱保護法等を用いた工程を追加することで、システイン残基に変換される。このようにして、本発明の製造方法で得られるペプチドにシステイン残基を存在させることができる。

【0119】

なお、本発明の一態様によれば、-SMe基を有するペプチドから-SMe基を-OH基に変換す

ることで-OH基を有するペプチドを得ることも可能であり、このような場合には、上記工程(a)を省略することが可能である。

【0120】

工程(b)

工程(b)において用いるシアン化剤としては、例えば、安定性等の観点から、臭化シアン、フェニルシアネート等を用いることができ、好ましくは、入手容易な臭化シアンを用いることができる。

シアン化剤の使用量は、-SMe基1に対して、1～1000当量とすることができ、好ましくは、10～100当量、より好ましくは、15～30当量とすることができ、シアン化剤との反応は、0～50℃、好ましくは30～40℃で、約30分～100時間程度、好ましくは12時間～50時間程度行うことが望ましい。

10

【0121】

シアン化剤との反応は、酸性条件下で行い、特に好ましくはpH2～3で行う。酸性水溶性物質、具体的には、蟻酸、トリフルオロ酢酸、メタンスルホン酸等の使用により、反応を酸性条件下で行うことができる。この際、使用する酸性水溶性物質は、硫黄原子の酸化防止のため脱気したものであることが特に好ましい。また、シアン化剤の安定性の観点から、反応は遮光下で行うことが好ましい。

【0122】

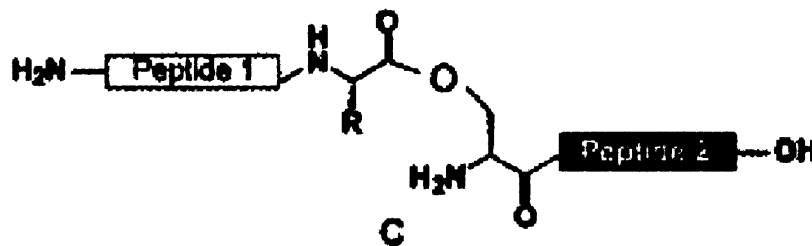
溶媒としては上記のpH2～3を示す水溶性溶媒、例えば、80%蟻酸溶液、70%蟻酸溶液、2%トリフルオロ酢酸/39%アセトニトリル含有水溶液等を好適に用いることができる。

20

工程(b)で得られる反応中間体の一例は、以下の構造で示されるエステル体である。

【0123】

【化19】



30

【0124】

なお、ペプチド中にアミノ酸としてメチオニン残基が含まれる場合には、メチオニン残基の-SMe基と工程(a)で得られる-SMe基を区別することが好ましい。本明細書中において、保護メチオニンとは、工程(b)におけるシアン化剤と反応しない化合物であれば特に限定されず、例えば、スルホキシド型メチオニン(Met(O)：-CH₂-CH₂-S(=O)-CH₃)を挙げることができる。後述の実施例5に記載のように、保護メチオニン(例えばMet(O))を公知の手法を用いてペプチドに導入することで、メチオニン残基と工程(a)で得られる-SMe基とが区別され、工程(b)のシアン化剤との反応に対し、メチオニン残基が不活性となる。その後、適宜公知の手法を用いて保護メチオニン残基をメチオニン残基に変換する(後述の工程(e))。このようにして、メチオニン残基を有するペプチドも、本発明の製造方法を用いて得ることができる。

40

【0125】

また、必要に応じ、工程(b)のシアン化剤との反応の際に形成された副生成物である、システインの酸化体の除去を行うことができる。このような除去工程は、例えば、工程(b)で得られた反応中間体を含む混合物を、ヨウ化アンモニウム及びジメチルスルフィドの存在下、室温下に30分程度反応させ、その後分液洗浄することで行うことができる。除去工程は、工程(b)の後であればどの時点で行ってもよく、好ましくは工程(c)の後に行うことができる。

【0126】

50

工程(c)

工程(c)においては、工程(b)と比較してより塩基性条件下、工程(b)で得られた反応中間体のO-からN-への分子内アシル転移によって-OH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドが得られる。

工程(c)における塩基性条件は、工程(b)と比較してより塩基性条件であれば酸性又は中性であってもよく、より特定すれば、工程(b)で得られた反応中間体のエステル結合に隣接するC原子上の-NH₂基がプロトン化されない条件であればよい。反応中間体から-OH基を有するペプチドへの変換を効率よく行うという観点からは、弱塩基性条件又は強塩基性条件を用いることができる。

【0127】

10

工程(c)における塩基性条件が弱塩基性である場合、そのpHは、pH7～9であり、好ましくはpH7～8である。例えば、グアニジン、燐酸二ナトリウム、トリス、炭酸水素ナトリウム等、当業者に公知のpH調整剤である塩基性化合物を溶液に添加することで、弱塩基性条件とすることができる。このとき、塩基性化合物の使用量は、原料ペプチドに対して、1～1000当量とすることができ、好ましくは、10～100当量、より好ましくは、15～30当量とすることができる。

【0128】

工程(c)における塩基性条件が弱塩基性である場合、反応は、0～50℃、好ましくは20～40℃で、約10分～30時間程度、好ましくは15分～30時間程度行うことが望ましく、pH7～9、好ましくはpH7～8を示す緩衝溶液中で行うことが望ましい。例えば、0.2Mリン酸緩衝液(6Mグアニジン塩酸液含有、pH7.2)中で工程(c)を行うことができる。

20

工程(c)における塩基性条件が弱塩基性である場合、さらにpHを下げて工程(c)を終了することもできるが、そのままpHを変化させずに、HPLC等による精製工程に移ることも可能である。

【0129】

工程(c)における塩基性条件が強塩基性である場合、そのpHは、pH9～13であり、好ましくはpH10～11である。強塩基性条件は、水酸基に過剰反応した化合物を加水分解により取り除ける条件であることが好ましく、塩基性水溶性物質、例えば、ヒドラジン含水物、50mM水酸化ナトリウム水溶液等を溶液に添加して強塩基性条件とすることができる。このとき、塩基性水溶性物質の使用量は、原料ペプチドに対して0.5～100当量とすることができ、好ましくは、0.1～10当量、より好ましくは、0.5～1当量とすることができる。例えば、pH10～11を示す5%ヒドラジン水溶液中で工程(c)を行うことができる。

30

【0130】

工程(c)における塩基性条件が強塩基性である場合、工程(b)で得られた反応中間体のO-からN-への分子内アシル転移によって-OH基を有するアミノ酸残基を含むペプチドが得られるとともに、工程(a)～(b)で過剰に反応した-OH基について、脱シアノ化(過剰反応したシアノ化剤を加水分解により取り除く脱シアノ化反応)、脱ホルミル化(過剰反応した蟻酸の脱ホルミル化反応)等が起こり得る。

【0131】

工程(c)における塩基性条件が強塩基性である場合、工程(c)は、0～50℃、好ましくは20～30℃で、約5分～3時間程度、好ましくは5分～1時間、より好ましくは5分～10分程度行うことが望ましい。工程(c)における塩基性条件が強塩基性である場合、工程(c)を長時間行くと、ラセミ化、ペプチド結合の切断等の副反応が起こり得る。

40

【0132】

工程(c)における塩基性条件が強塩基性である場合、工程(c)は、pHをpH4～9、好ましくは5～9、例えばpH7付近やpH8～9等に下げることによって終了することができる。

【0133】

なお、工程(c)において、得られる-OH基を有するアミノ酸残基のβ位の立体は、工程(b)で得られた反応中間体から反転すると予想される。

【0134】

50

工程(d)

保護メチオニン残基を含むペプチドを原料とした場合、さらに所望により以下の工程(d)を、工程(b)又は(c)の後に行う：

(d)保護メチオニンを脱保護する工程。

【0135】

脱保護は、用いた保護メチオニンに応じて、当業者に公知の手法を用いて行うことができる。例えば、保護メチオニンとしてメチオニンをスルホキシド型(Met(O))で導入した場合、ヨウ化アンモニウム/ジメチルスルフィド/TFA混合液等を用いた還元工程を追加することで、保護メチオニンがメチオニンに変換される。副反応を回避するという観点からは、好ましくは工程(c)の後に、工程(d)を行う。

10

このようにして、メチオニン残基を有するペプチドを得る場合についても本発明の製造方法を適用することができる。

【0136】

生成物の精製は、数種類の高速液体クロマトグラフィー条件下で97%以上の精製物を与える手法を用いることが好ましい。具体的には結晶化、交流分配法、分配クロマトグラフィー、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等が挙げられる。好ましくは高速液体クロマトグラフィー等を用いることができる。

【0137】

上記の工程に加え、さらに糖鎖の付加工程を行うことができる。糖鎖の付加は、ペプチド及び糖ペプチドのいずれについても行うことができ、目的とする糖ペプチドを得られる限りどの時点で行うことも可能であるが、工程(c)の後に行うことが好ましい。

20

【0138】

糖鎖の付加は、トランスグルタミナーゼに代表される、酵素の逆反応を利用する方法や、以下のように国際公開番号W02005/010053の記載を参照した方法を用いて行うことができる。

まず、ハロアセタミド化複合型糖鎖誘導体を、上記で得たペプチド(特に、アスパラギン酸やグルタミン酸等の分子内に2つ以上のカルボキシル基を持つアミノ酸；リシン、アルギニン、ヒスチジン、トリプトファン等の分子内に2以上のアミノ基を持つアミノ酸；セリン、トレオニン、チロシン等の分子内に水酸基を持つアミノ酸；システイン等の分子内にチオール基を持つアミノ酸；アスパラギン、グルタミン等の分子内にアミド基を持つアミノ酸等を含むペプチド。特に、アスパラギン酸、グルタミン酸、リシン、アルギニン、セリン、トレオニン、システイン、アスパラギン又はグルタミンを含むペプチド)と反応させることにより製造する。上記反応は、通常0~80℃、好ましくは、10~60℃、更に好ましくは15~35℃で行うのが良い。反応時間は、好ましくは、通常30分~5時間程度である。反応終了後は、適宜、公知の方法(例えば、高速液体カラムクロマトグラフィー(HPLC))で精製するのが良い。

30

【0139】

ハロアセタミド化複合型糖鎖誘導体は、例えば、複合型アスパラギン結合型糖鎖の1位の炭素に結合している水酸基を、 $-NH-(CO)-(CH_2)_a-CH_2X$ (式中、Xはハロゲン原子、aは整数であり、目的とするリンカー機能を阻害しない限り限定されるものではないが、好ましくは0~4の整数を示す。)で置換した化合物である。

40

具体的には、ハロアセタミド化複合型糖鎖誘導体と、上記で得たペプチドとをリン酸緩衝液中、室温で反応させる。反応終了後、HPLCで精製することにより糖鎖が付加された糖ペプチドを得ることができる。

【0140】

上記の方法に加え、転移酵素による糖鎖伸長反応を組み合わせることも可能である。このようにして得られた糖ペプチドもまた、本発明の範囲に含まれる。

【実施例】**【0141】**

以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが何らこれらに限定されるものでは

50

ない。

【0142】

実施例1 Ac-Ala-Ser-Gly-Leuの製造

固相合成用カラムにWang resin (メルク社製) (100 μ mol) を入れ、塩化メチレン (DCM)、DMFで十分に洗浄した後、DCMで十分に膨潤させた。Fmoc-Leu (0.50 mmol)、MSNT (0.50 mmol) 及びN-メチルイミダゾール (0.375 mmol) をDCM (2 mL) に溶解させて、固相合成用カラムに入れ、25℃にて1時間攪拌した。なお、DCMは1.5 mLとすることもできる。攪拌後、樹脂をDCM及びDMFで十分に洗浄し、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液 (2 mL) で15分間処理し脱保護した。なお、本脱保護処理は10分間行うこともできる。DMFで洗浄後、その後のペプチド鎖の伸長は以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。

10

【0143】

Fmoc基でアミノ基を保護したアミノ酸とHOBt (67.6 mg、0.50 mmol)、DIPCI (77.0 μ L、63.1 mg、0.50 mmol)、をDMF (1 mL) に溶解させ、15分間活性化させた後、固相合成用カラムに入れた。なお、DMFは2 mLとすることもできる。25℃で1時間攪拌した後、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液 (2 mL) で20分間処理し脱保護した。なお、本脱保護処理は10分間行うこともできる。この操作を繰り返し、アミノ酸を順次縮合させた。Fmoc基で保護したアミノ酸にはFmoc-Gly (148.7 mg、0.50 mmol)、Fmoc-Cys (Trt) (292.9 mg、0.50 mmol)、Fmoc-Ala (155.7 mg、0.50 mmol) を用い、固相樹脂にFmoc-Ala-Cys (Trt)-Gly-Leuの保護基を有する4残基ペプチド (配列番号1) を得た。その後、樹脂上で、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液 (2 mL) で20分間処理して脱保護し、20%無水酢酸/DMF溶液 (2 mL) を用いて、遊離アミノ基に対し、アセチル保護を行った。なお、20%無水酢酸/DMF溶液は1.7 mLとすることもできる。DMF、DCMを用いて洗浄した後、予め用意した試薬 (TFA/水/フェノール/チオアニソール/EDT (1, 2-エタンジチオール)/TIPS = 81.5/5/5/5/2.5/1) を樹脂が十分に浸る程度に加え、2時間25℃で攪拌した。樹脂をろ過して除き、反応溶液を減圧下で濃縮した。得られた残渣をHPLC (Vydac column C8 250 $\times$ 10 mm 展開溶媒A: 0.1% TFA水溶液 B: 0.08% TFA アセトニトリル: 水 = 90:10 グラジエントA:B = 85:15 $\rightarrow$ 50:50 60分 流速3.0 mL/min) で精製し、Ac-Ala-Cys-Gly-Leuの保護基を有する4残基ペプチド (配列番号2) を得た。

20

30

【0144】

得られた4残基のペプチド (配列番号2) 30 mg (73 μ mol) をナスフラスコにいれ、0.25 M トリス塩酸緩衝溶液73 mL (pH 8.6、6 M グアニジン塩酸液、3.3 mM EDTA含有) とアセトニトリル24 mLに溶解させた後、25℃にてメチル-4-ニトロベンゼンスルホネート (316 mg) を加えた。30分後、10% TFA溶液 (7.3 mL) 加え、pH 4にした後、ジエチルエーテルを加え抽出操作を行った。濃縮後、得られた残渣をODSカラムにて精製を行いAc-Ala-Cys (Me)-Gly-Leuのシステイン残基の硫黄原子がメチル化された保護基を有する4残基ペプチド (配列番号3) を25 mg得た。

40

ESI-MS: Calcd for $C_{17}H_{30}N_4O_6S$: $[M+1H]^+$ 419.2、found、419.1

【0145】

得られたシステイン残基の硫黄原子がメチル化された4残基ペプチド (配列番号3) 6.5 mg (15 μ mol) をエッペンチューブに入れ、80% 蟻酸溶液 (6.5 mL) に溶解させた後、25℃にて臭化シアン159.0 mg (1.5 mmol) を加えた。反応容器を遮光した後、37℃にて反応を行い、28.5時間後、反応溶液を凍らせ反応を停

50

止させた。このものを凍結乾燥後、得られた残渣をHPLC (Vydac column C4 250×4.6mm 展開溶媒A:0.1%TFA水溶液 B:0.08%TFA アセトニトリル:水=90:10 グラジエントA:B=100:0→60:40 30分 流速1.0ml/min)にて精製を行い、反応中間体であるエステル体を3.8mg得た。

ESI-MS: Calcd for $C_{16}H_{28}N_4O_7$: $[M+1H]^+ 389.4$, found, 389.2

【0146】

同様にして得られた反応中間体5mgをエッペンチューブにいれ、リン酸緩衝溶液(pH7.2、6M グアニジン塩酸含有)0.6mLにて溶解させた後、37℃にて反応させた。1時間後、反応が終了していることをHPLCで確認後、HPLC (Vydac column C4 250×4.6mm 展開溶媒A:0.1%TFA水溶液 B:0.08%TFA アセトニトリル:水=90:10 グラジエントA:B=100:0→60:40 30分 流速1.0ml/min)にて精製を行い、目的とする保護基を有する4残基ペプチドAc-Ala-Ser-Gly-Leu(配列番号4)を3.5mg得た。なお、反応終了は30分後とすることもできる。

ESI-MS: Calcd for $C_{16}H_{28}N_4O_7$: $[M+1H]^+ 389.4$, found, 389.1

【0147】

実施例2 Val-Asp-Lys-Ala-Val-Ser-Gly-Leuの製造

固相合成用カラムにWang resin(メルク社製)(100μmol)を入れ、塩化メチレン(DCM)、DMFで十分に洗浄した後、DCMで十分に膨潤させた。Fmoc-Leu(0.50mmol)、MSNT(0.50mmol)及びN-メチルイミダゾール(0.375mmol)をDCM(2mL)に溶解させて、固相合成用カラムに入れ、25℃にて1時間攪拌した。なお、DCMは1.5mLとすることもできる。攪拌後、樹脂をDCM及びDMFで十分に洗浄し、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2mL)で15分間処理し脱保護した。なお、本脱保護処理は10分間行うこともできる。DMFで洗浄後、その後のペプチド鎖の伸長は以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。

【0148】

Fmoc基でアミノ基を保護したアミノ酸とHOBt(67.6mg、0.50mmol)、DIPCI(77.0μL、63.1mg、0.50mmol)、をDMF(1mL)に溶解させ、15分間活性化させた後、固相合成用カラムに入れた。なお、DMFは2mLとすることもできる。25℃で1時間攪拌した後、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2mL)で20分間処理し脱保護した。なお、本脱保護処理は10分間行うこともできる。この操作を繰り返し、アミノ酸を順次縮合させた。Fmoc基で保護したアミノ酸にはFmoc-Gly(148.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Cys(Trt)(292.9mg、0.50mmol)、Fmoc-Val(169.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Ala(155.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Lys(Boc)(234.3mg、0.50mmol)、Fmoc-Asp(OtBu)(205.8mg、0.50mmol)、Fmoc-Val(169.7mg、0.50mmol)を用い、固相樹脂にFmoc-Val-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Ala-Val-Cys(Trt)-Gly-Leuの保護基を有する8残基ペプチド(配列番号5)を得た。その後、樹脂上で、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2mL)で20分間処理し脱保護し、DMF、DCMを用いて洗浄した後に、予め用意した試薬K(TFA/水/フェノール/チオアニソール/EDT=82.5/5/5/5/2.5)を樹脂が十分に浸る程度に加え、2時間25℃で攪拌した。なお、試薬Kの代わりに、TFA/水/フェノール/チオアニソール/EDT/TIPS=81.5/5/5/5/2.5/1.0を用いることもできる。樹脂をろ過して除き、反応溶液を減圧下で濃縮した。得られた残渣をHPLC(Vydac column C1

10

20

30

40

50

8 250×10mm 展開溶媒A：0.1%TFA水溶液 B：0.08%TFA アセトニトリル：水＝90：10 グラジエントA：B＝85：15→50：50 15分
流速2.5ml/min)で精製し、8残基のペプチド、Val-Asp-Lys-Ala-Val-Cys-Gly-Leu(配列番号6)を得た。

【0149】

得られた8残基のペプチド(配列番号6)32mg(40μmol)をナスフラスコにいれ、0.25M トリス塩酸緩衝溶液40mL(pH8.6、6M グアニジン塩酸液、3.3mM EDTA含有)とアセトニトリル13mLに溶解させた後、25℃にてメチル-4-ニトロベンゼンスルホネート(261mg)を加えた。1時間後、10%TFA溶液(3.8mL)を加え、pH4にした後、ジエチルエーテルを加え抽出操作を行った。濃縮後、得られた残渣をODSカラムにて精製を行い、Val-Asp-Lys-Ala-Val-Cys(Me)-Gly-Leuのシステイン残基の硫黄原子がメチル化された8残基ペプチド(配列番号7)を30mg得た。

ESI-MS: Calcd for $C_{35}H_{64}N_9O_{11}S$: $[M+1H]^+ 819.0$, found, 818.8

【0150】

得られたシステイン残基の硫黄原子がメチル化された8残基ペプチド(配列番号7)29mg(36μmol)をナスフラスコに入れ、80%蟻酸溶液15mLにて溶解させた後、25℃にて臭化シアン381mg(3.6mmol)を加えた。反応容器を遮光した後、25℃で反応を行い、32時間後、反応溶液を凍らせ反応を停止させた。このものを凍結乾燥後、得られた残渣をHPLC(Vydac column C8 250×10mm 展開溶媒A：0.1%TFA水溶液 B：0.08%TFA アセトニトリル：水＝90：10 グラジエントA：B＝90：10→70：30 60分 流速4.0ml/min)にて精製を行い、反応中間体であるエステル体を18mg得た。

ESI-MS: Calcd for $C_{34}H_{62}N_9O_{12}$: $[M+1H]^+ 788.9$, found, 788.5

【0151】

得られた反応中間体5mgをエッペンチューブにいれ、リン酸緩衝溶液(pH7.2、6M グアニジン塩酸含有)0.63mLで溶解させた後、37℃にて反応させた。9.25時間後、反応が終了していることを確認後、HPLC(Vydac column C4 250×4.6mm 展開溶媒A：0.1%TFA水溶液 B：0.08%TFA アセトニトリル：水＝90：10 グラジエントA：B＝100：0→40：60 30分 流速1.0ml/min)にて精製を行い、目的とする8残基ペプチドVal-Asp-Lys-Ala-Val-Ser-Gly-Leu(配列番号8)を4.1mg得た。なお、反応終了は7.25時間後とすることもできる。

ESI-MS: Calcd for $C_{34}H_{62}N_9O_{12}$: $[M+1H]^+ 788.9$, found, 788.7

【0152】

実施例3 Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Glyの製造

固相合成用カラムにWang resin(メルク社製)(100μmol)を入れ、塩化メチレン(DCM)、DMFで十分に洗浄した後、DCMで十分に膨潤させた。Fmoc-Gly(0.50mmol)、MSNT(0.50mmol)及びN-メチルイミダゾール(0.375mmol)をDCM(2mL)に溶解させて、固相合成用カラムに入れ、25℃にて1時間攪拌した。なお、DCMは1.5mLとすることもできる。攪拌後、樹脂をDCM及びDMFで十分に洗浄し、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2mL)で15分間処理し脱保護した。なお、本脱保護処理は10分間行うこともできる。DMFで洗浄後、その後のペプチド鎖の伸長は以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。

【0153】

Fmoc基でアミノ酸を保護したアミノ酸とHOBt (67.6mg、0.50mmol)、DIPCI (77.0μL、63.1mg、0.50mmol)、をDMF (1mL)に溶解させ、15分間活性化させた後、固相合成用カラムに入れた。25℃で1時間攪拌した後、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液 (2mL)で20分間処理し脱保護した。なお、本脱保護処理は10分間行うこともできる。この操作を繰り返し、アミノ酸を順次縮合させた。Fmoc基で保護したアミノ酸にはFmoc-Arg (Pbf) (324.4mg、0.50mmol)、Fmoc-Leu (176.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Phe (193.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Asn (177.2mg、0.50mmol)、Fmoc-Cys (Trt) (292.9mg、0.50mmol)、Fmoc-Tyr (tBu) (229.8mg、0.50mmol)、Fmoc-Val (169.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Arg (Pbf) (324.4mg、0.50mmol)、Fmoc-Phe (193.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Leu (176.7mg、0.50mmol)を用い、固相樹脂にFmoc-Leu-Phe-Arg (Pbf)-Val-Tyr (tBu)-Cys (Trt)-Asn-Phe-Leu-Arg (Pbf)-Glyの保護基を有する11残基ペプチド (配列番号9)を得た。その後、樹脂上で、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液2mLで20分間処理し脱保護した。なお、本脱保護処理は10分間行うこともできる。DMF、DCMを用いて洗浄した後、予め用意した試薬K (TFA/水/フェノール/チオアニソール/EDT=82.5/5/5/5/2.5)を樹脂が十分に浸る程度に加え、2時間25℃で攪拌した。なお、試薬Kの代わりに、TFA/水/フェノール/チオアニソール/EDT/TIPS=81.5/5/5/5/2.5/1.0を用いることもできる。樹脂をろ過して除き、反応溶液を減圧下で濃縮した。得られた残渣をHPLC (Vydac column C18 250×10mm 展開溶媒A:0.1%TFA水溶液 B:0.08%TFA アセトニトリル:水=90:10 グラジエントA:B=70:30→40:60 15分 流速2.0ml/min)で精製し、Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Cys-Asn-Phe-Leu-Arg-Glyの11残基のペプチド (配列番号10)を得た。

【0154】

得られた11残基のペプチド (配列番号10) 21mg (15μmol)をナスフラスコにいれ、0.25M トリス塩酸緩衝溶液15mL (pH8.6、6M グアニジン塩酸液、3.3mM EDTA含有)とアセトニトリル (5mL)に溶解させた後、25℃にてメチル-4-ニトロベンゼンスルホネート (66mg)を加えた。30分間後、10%TFA溶液 (1.5mL)加え、pH4にした後、ジエチルエーテルを加え抽出操作を行った。濃縮後、得られた残渣をODSカラムにて精製を行い、Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Cys (Me)-Asn-Phe-Leu-Arg-Glyのシステイン残基の硫黄原子がメチル化された11残基ペプチド (配列番号11)を19mg得た。

ESI-MS: Calcd for $C_{66}H_{100}N_{18}O_{14}S$: $[M+2H]^{2+}$ 701.4、found、701.5

【0155】

得られたシステイン残基の硫黄原子がメチル化された11残基ペプチド (配列番号11) 18mg (13μmol)をナスフラスコに入れ、2.4mM 80%蟻酸溶液5.4mLで溶解させた後、25℃にて臭化シアン136mg (1.3mmol)を加えた。反応容器を遮光した後、25℃にて反応を行い、約50時間後、反応溶液を凍らせ反応を停止させた。このものを凍結乾燥後、得られた残渣をHPLC (Vydac column C8 250×10mm 展開溶媒A:0.1%TFA水溶液 B:0.08%TFA アセトニトリル:水=90:10 グラジエントA:B=85:15→50:50 60分 流速3.0ml/min)にて精製を行い、反応中間体であるエステル体を7.5mg得た。

ESI-MS: Calcd for $C_{65}H_{100}N_{18}O_{15}$: $[M+2H]^{2+}$

686.4、found、686.5

【0156】

得られた反応中間体7mgをエッペンチューブにいれ、りん酸緩衝溶液（pH7.2、6M グアニジン塩酸含有）0.50mLで溶解させた後、37℃にて反応させた。1時間後、反応が終了していることを確認後、HPLC（Vydac column C4 250×4.6mm 展開溶媒A：0.1%TFA水溶液 B：0.08%TFA アセトニトリル：水＝90：10 グラジエントA：B＝80：20→40：60 30分 流速1.0ml/min）にて精製を行い、目的とするLeu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Glyの11残基ペプチド（配列番号12）を5.4mg得た。

ESI-MS：Calcd for $C_{65}H_{100}N_{18}O_{15}$ ：[M+2H]²⁺ 686.4、found、686.4

【0157】

実施例4 Ala-Leu-Leu-Val-Asn (Oligosaccharide chain)-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Alaの製造

固相合成用カラムにAmino-PEGA resin（メルク社製）（100μmol）を入れ、塩化メチレン（DCM）、DMFで十分に洗浄した後、DMFで十分に膨潤させた。4-ヒドロキシメチルー3-メトキシフェノキシ酪酸（HMPB）（0.25mmol）、TBTU（0.25mmol）及びN-エチルモルホリン（0.25mmol）をDMF（2ml）に溶解させてカラムに入れ、25℃で4時間攪拌した。樹脂をDMF及びDCMで十分に洗浄し、HMPB-PEGA resinを得、これを固相合成用の固相担体として用いた。

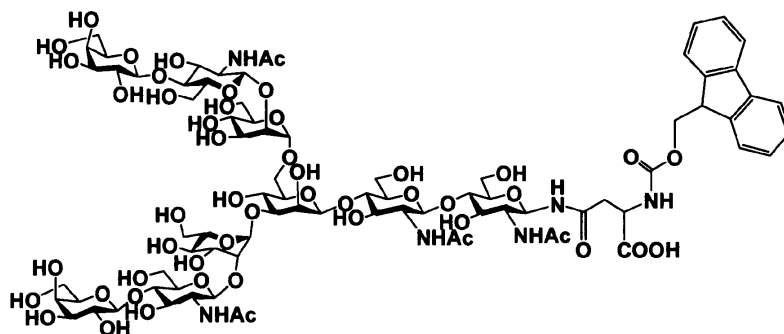
【0158】

Fmoc-Ser(tBu)（0.50mmol）、MSNT（0.50mmol）及びN-メチルイミダゾール（0.375mmol）をDCM（2ml）に溶解させて、固相合成用カラムに入れ、25℃で3時間攪拌した。なお、DCMは2.5mLとすることもできる。攪拌後、樹脂をDCM、DMFを用いて洗浄し、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液（2ml）で15分間処理し脱保護した。なお、本脱保護処理は10分間行うこともできる。

DMFで洗浄後、1残基のペプチド2μmol相当の樹脂をエッペンチューブに移した。下記式（9）で表される糖鎖アスパラギン（10mg，3.6μmol）とDEPBT（2mg，6μmol）をDMF（0.12mL）に溶解させ、エッペンチューブに入れ、DIPEA（0.68μl，4μmol）を加えて25℃で18時間攪拌した。

【0159】

【化20】



(9)

【0160】

攪拌後、樹脂をDCM、DMFを用いて洗浄した。Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液（1ml）で15分間処理し脱保護した。DMFで洗浄後、その後の糖ペプチド

鎖の伸長は以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。

【0161】

Fmoc基でアミノ酸を保護したアミノ酸とHOBt (1.35mg、0.01mmol)、DIPCI (1.53μL、1.26mg、0.01mmol)をDMF (0.02mL)に溶解させ、15分間活性化させた後、固相合成用カラムに入れた。25℃で1時間攪拌した後、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液 (1mL)で20分間処理し脱保護した。この操作を繰り返し、アミノ酸を順次縮合させた。アミノ基を保護したアミノ酸にはFmoc-Val (3.4mg、0.01mmol)、Fmoc-Leu (3.5mg、0.01mmol)、Fmoc-Leu (3.5mg、0.01mmol)、Fmoc-Ala (3.1mg、0.01mmol)を用い、固相樹脂にFmoc-Ala-Leu-Leu-Val-Asn (Oligosaccharide chain)-Ser (tBu)の保護基を有する6残基糖付加ペプチド (配列番号13)を得た。このものを、酢酸：トリフルオロエタノール (=1:1)を樹脂が十分に浸る程度に加え、4時間後、樹脂をろ過して除き、ろ液部分を別途用意したジエチルエーテルに加え晶析を行い、溶液部分をメンブレンフィルターで除くことで、保護基を有する6残基の糖鎖付加ペプチド (配列番号13)を含む残渣が得られた。

10

【0162】

得られた保護基を有する6残基の糖鎖付加ペプチド (配列番号13) 2mg (0.55μmol)とモレキュラーシーブ (MS) 4A (10mg)、ベンジルメルカプタン (2μl, 16.4μmol)をDMF溶媒中 (85μl)アルゴン気流下-20℃で1時間攪拌した後、PyBOP (1.4mg, 2.7μmol)、DIPEA (0.46μl, 2.7μmol)を加え2.5時間攪拌した。その後、反応溶液にジエチルエーテル (5ml)を加え化合物を沈殿させ、ろ過した後に沈殿物をアセトニトリル50%水溶液で回収した。これを凍結乾燥し、得られた凍結乾燥品に95%TFA水溶液を加えて25℃で2時間攪拌した。樹脂をろ過して除き、反応溶液を濃縮した後に、50%アセトニトリル水溶液に溶かして凍結乾燥した。凍結乾燥品をHPLC (Vydac column C4 250×4.6mm 展開溶媒A:0.1%TFA水溶液 B:0.08%TFAアセトニトリル:水=90:10 グラジエントA:B=80:20→40:60 60分 流速1.0ml/min)で精製して、C末端がベンジルチオエステルであるAla-Leu-Leu-Val-Asn (Oligosaccharide chain)-Ser-SBnの6残基の糖鎖付加ペプチド (配列番号15)を得た。

20

30

【0163】

なお、エッペンチューブ内での糖鎖アスパラギンとの反応から配列番号15の6残基の糖鎖付加ペプチドを得る上記の工程として、以下の手法を用いることも可能であった：DMFで洗浄後、1残基のペプチド4.3μmol相当の樹脂をエッペンチューブに移した。式(9)で表される糖鎖アスパラギン (17mg, 8.6μmol)とDEPBT (6mg, 8.6μmol)をDMF:DMSO=4:1、0.29mLに溶解させ、エッペンチューブに入れ、DIPEA (1.5μl, 8.6μmol)を加えて25℃で18時間攪拌した。

40

【0164】

攪拌後、樹脂をDCM、DMFを用いて洗浄した。Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液 (1ml)で10分間処理し脱保護した。DMFで洗浄後、その後の糖ペプチド鎖の伸長は以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。

【0165】

Fmoc基でアミノ酸を保護したアミノ酸とHOBt (2.9mg、0.022mmol)、DIPCI (3.3μL、0.022mmol)、をDMF (0.54mL)に溶解させ、15分間活性化させた後、固相合成用カラムに入れた。25℃で1時間攪拌した後、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液 (1mL)で20分間処理し脱保護した。この操作を繰り返し、アミノ酸を順次縮合させた。アミノ基を保護したアミノ酸にはFmoc-Val (7.3mg、0.022mmol)、Fmoc-Leu (7.6mg、

50

0.022 mmol)、Fmoc-Leu (7.6 mg、0.022 mmol)、Boc-Ala (4.0 mg、0.022 mmol) を用い、固相樹脂に Boc-Ala-Leu-Leu-Val-Asn (Oligosaccharide chain)-Ser (tBu) の保護基を有する 6 残基糖付加ペプチド (配列番号 14) を得た。このものを、酢酸：トリフルオロエタノール (= 1 : 1) を樹脂が十分に浸る程度に加え、24 時間後、樹脂をろ過して除き、ろ液部分を別途用意したジエチルエーテルに加え晶析を行い、溶液部分をメンブレンフィルターで除くことで、保護基を有する 6 残基の糖鎖付加ペプチド (配列番号 14) を含む残渣が得られた。

【0166】

得られた保護基を有する 6 残基の糖鎖付加ペプチド (配列番号 14) 18 mg (7.5 μ mol) とモレキュラーシーブ (MS) 4A (190 mg)、ベンジルメルカプタン (26 μ l, 37.5 μ mol) を DMF 溶媒中 (1.9 mL) アルゴン気流下 -20 °C で 1 時間攪拌した後、PyBOP (20 mg, 37.5 μ mol)、DIPEA (6.7 μ l, 37.5 μ mol) を加え 2 時間攪拌した。その後、反応溶液にジエチルエーテル (10 mL) を加え化合物を沈殿させ、ろ過した後に沈殿物を DMF で溶解した。これを減圧下に濃縮し、得られた残渣に 95 % TFA 水溶液を加えて 25 °C で 2 時間攪拌した。反応液を濃縮後、HPLC (Vydac column C4 250 $\times$ 4.6 mm 展開溶媒 A : 0.1 % TFA 水溶液 B : 0.08 % TFA アセトニトリル : 水 = 90 : 10 グラジエント A : B = 100 : 0 $\rightarrow$ 40 : 60 60 分 流速 1.0 mL/min) で精製して、C 末端がベンジルチオエステルである Ala-Leu-Leu-Val-Asn (Oligosaccharide chain)-Ser-SBn の 6 残基の糖鎖付加ペプチド (配列番号 15) を得た。

【0167】

一方、固相合成用カラムに Wang resin (メルク社製) (100 μ mol) を入れ、塩化メチレン (DCM)、DMF で十分に洗浄した後、DCM で十分に膨潤させた。Fmoc-Ala (0.50 mmol)、MSNT (0.50 mmol) 及び N-メチルイミダゾール (0.375 mmol) を DCM (2 mL) に溶解させて、固相合成用カラムに入れ、25 °C にて 1 時間攪拌した。なお、DCM は 1.5 mL とすることもできる。攪拌後、樹脂を DCM 及び DMF で十分に洗浄し、Fmoc 基を 20 % ピペリジン / DMF 溶液 (2 mL) で 15 分間処理し脱保護した。なお、本脱保護処理は 10 分間行うこともできる。DMF で洗浄後、その後のペプチド鎖の伸長は以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。

【0168】

Fmoc 基でアミノ基を保護したアミノ酸と HOBt (67.6 mg、0.50 mmol)、DIPCI (77.0 μ L, 63.1 mg、0.50 mmol)、を DMF (1 mL) に溶解させ、15 分間活性化させた後、固相合成用カラムに入れた。なお、DMF は 2 mL とすることもできる。25 °C で 1 時間攪拌した後、Fmoc 基を 20 % ピペリジン / DMF 溶液 (2 mL) で 20 分間処理し脱保護した。この操作を繰り返し、アミノ酸を順次縮合させた。Fmoc 基で保護したアミノ酸には Fmoc-Lys (Boc) (234.3 mg、0.50 mmol)、Fmoc-Asp (OtBu) (205.8 mg、0.50 mmol)、Fmoc-Val (169.7 mg、0.50 mmol)、Fmoc-His (Trt) (309.9 mg、0.50 mmol)、Fmoc-Leu (176.7 mg、0.50 mmol)、Fmoc-Gln (184.2 mg、0.50 mmol)、Fmoc-Leu (176.7 mg、0.50 mmol)、Fmoc-Pro (168.7 mg、0.50 mmol)、Fmoc-Glu (OtBu) (212.8 mg、0.50 mmol)、Fmoc-Trp (Boc) (263.3 mg、0.50 mmol)、Fmoc-Pro (168.7 mg、0.50 mmol)、Fmoc-Gln (184.2 mg、0.50 mmol)、Fmoc-Cys (Trt) (292.9 mg、0.50 mmol) を用い、固相樹脂に Fmoc-Cys (Trt)-Gln-Pro-Trp (Boc)-Glu (OtBu)-Pro-Leu-Gln-Leu-His (Trt)-Val

-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Alaの保護基を有する14残基ペプチド(配列番号16)を得た。その後、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2mL)で20分間処理し脱保護し、DMF, DCMを用いて洗浄した後に、予め用意した試薬K(TFA/水/フェノール/チオアニソール/EDT=82.5/5/5/5/2.5)を樹脂が十分に浸る程度に加え、2時間25℃で攪拌した。なお、試薬Kの代わりに、TFA/水/フェノール/チオアニソール/EDT/TIPS=81.5/5/5/5/2.5/1.0を用いることもできる。樹脂をろ過して除き、反応溶液を減圧下で濃縮した。得られた残渣をHPLC(Vydac column C8 250×10mm 展開溶媒A:0.1%TFA水溶液 B:0.08%TFA アセトニトリル:水=90:10 グラジエントA:B=80:20→40:60 30分 流速4.0ml/min)で精製し、Cys-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Alaの14残基ペプチド(配列番号17)を得た。

10

【0169】

このようにして調製した14残基ペプチド(配列番号17)1.1mgと先に合成したC末端がベンジルチオエステルである6残基の糖付加ペプチド(配列番号15)1.3mgとの二種類を同じエッペンチューブにいれ、リン酸緩衝溶液(pH7.2、6M グアニジン塩酸含有)275μLに溶解させた後、25℃にてチオフェノール(1μL)とベンジルメルカプタン(1μL)を加え、37℃で反応を行った。26時間後、反応終了をHPLCで確認した後、反応溶液をHPLC(Vydac column C18 250×4.6mm 展開溶媒A:0.1%TFA水溶液 B:0.08%TFA アセトニトリル:水=90:10 グラジエントA:B=80:20→50:50 60分 流速1.0ml/min)にて精製を行い、Ala-Leu-Leu-Val-Asn(Oligosaccharide chain)-Ser-Cys-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Alaの20残基糖鎖付加ペプチド(配列番号18)を1.5mg得た。

20

【0170】

得られた20残基糖鎖付加ペプチド(配列番号18)1.5mg(0.39μmol)をナスフラスコにいれ、0.25M トリス塩酸緩衝溶液0.39mL(pH8.6、6M グアニジン塩酸液、3.3mM EDTA含有)とアセトニトリル0.13mLに溶解させた後、25℃にてメチルー4-ニトロベンゼンスルホネート(1.7mg)を加えた。40分間後、10%TFA溶液(1.5mL)を加え、pH4にした後、ジエチルエーテルを加え抽出操作を行った。水層を濃縮後、得られた残渣をHPLC(Vydac column C4 250×4.6mm 展開溶媒A:0.1%TFA水溶液 B:0.08%TFA アセトニトリル:水=90:10 グラジエントA:B=80:20→55:45 60分 流速1.0ml/min)にて精製を行い(なお、精製には上記C4カラムの代わりにC18カラムを用いることもできる)、Ala-Leu-Leu-Val-Asn(Oligosaccharide chain)-Ser-Cys(Me)-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Alaのシステイン残基の硫黄原子がメチル化された20残基の糖鎖付加ペプチド(配列番号19)を1.6mg得た。

30

40

ESI-MS: Calcd for $C_{165}H_{265}N_{31}O_{74}S$: $[M+2H]^+ 1300.7$, found, 1300.4

【0171】

得られたシステイン残基の硫黄原子がメチル化された20残基糖鎖付加ペプチド(配列番号19)1.6mg(0.4μmol)をエッペンチューブに入れ、80%蟻酸溶液0.4mLにて溶解させた後、25℃にて臭化シアン4.3mg(0.04mmol)を加えた。反応容器を遮光した後、37℃にて反応を行い、35時間後、反応溶液を凍らせ反応を停止させた。このものを凍結乾燥後、得られた残渣に5%ヒドラジン含水和物(200μL)を加え反応系内をpH10~11にした。5分後、酢酸(5μL)を加え反応系内

50

をpH8～9にした。このものをHPLC (Vydac column C4 250×4.6mm 展開溶媒A:0.1%TFA水溶液 B:0.08%TFA アセトニトリル:水=90:10 グラジエントA:B=80:20→50:50 30分 流速1.0ml/min)にて精製を行い、目的とする糖ペプチドAla-Leu-Leu-Val-Asn(Oligosaccharide chain)-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Alaの20残基の糖鎖付加ペプチド(配列番号20)を0.7mg得た。

【0172】

なお、臭化シアンとの反応後、34時間後、反応溶液を減圧下に濃縮し、得られた残渣に5%ヒドラジン含水和物(200μL)加え10分間攪拌した後、反応液に酢酸5μLを加え、HPLCで精製を行っても、同様に20残基の糖鎖付加ペプチド(配列番号20)を得ることができた。

ESI-MS: Calcd for $C_{164}H_{263}N_{31}O_{75}$: $[M+2H]^{2+}$ 1290.6, found, 1290.7

【0173】

実施例5 Ac-Gly-Ser-Gly-Met-Alaの製造

固相合成用カラムにWang resin(メルク社製)(100μmol)を入れ、塩化メチレン(DCM)、DMFで十分に洗浄した後、DCMで十分に膨潤させた。Fmoc-Ala(0.50mmol)、MSNT(0.50mmol)及びN-メチルイミダゾール(0.375mmol)をDCM(1.5mL)に溶解させて、固相合成用カラムに入れ、25℃にて2時間攪拌した。攪拌後、樹脂をDCM及びDMFで十分に洗浄し、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2mL)で15分間処理し脱保護した。DMFで洗浄後、その後のペプチド鎖の伸長は以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。

【0174】

Fmoc基でアミノ酸を保護したアミノ酸とHOBt(67.6mg、0.50mmol)、DIPI(77.0μL、63.1mg、0.50mmol)、をDMF(2mL)に溶解させ、15分間活性化させた後、固相合成用カラムに入れた。25℃で1時間攪拌した後、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2mL)で10分間処理し脱保護した。この操作を繰り返し、アミノ酸を順次縮合させた。Fmoc基で保護したアミノ酸にはFmoc-Met(O)(193.8mg、0.50mmol)、Fmoc-Gly(148.9mg、0.50mmol)、Fmoc-Cys(Trt)(292.9mg、0.50mmol)、Fmoc-Gly(148.9mg、0.50mmol)を用い、固相樹脂上にFmoc-Gly-Cys(Trt)-Gly-Met(O)-Alaの保護基を有する5残基ペプチド(配列番号21)を得た。その後、樹脂上で、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2mL)で10分間処理して脱保護し、20%無水酢酸/DMF溶液(1.25mL)を用いて、遊離アミノ基に対し、アセチル保護を行った。DMF、DCMを用いて洗浄した後に、予め用意した試薬(TFA/水/TIPS=95/2.5/2.5)を樹脂が十分に浸る程度に加え、2時間25℃で攪拌した。樹脂をろ過して除き、ろ液にジエチルエーテル20mLを加え沈殿させた。沈殿をろ過した後、0.1%TFA水溶液にて溶解させた。このものを減圧下に濃縮した後、凍結乾燥を行い、Ac-Gly-Cys-Gly-Met(O)-Alaである4位のメチオニンの硫黄原子が酸化された5残基ペプチド(配列番号22)を含む混合物を得た。

【0175】

得られた4位のメチオニンの硫黄原子が酸化された5残基ペプチド(配列番号22)混合物5mgをナスフラスコにいれ、0.25M トリス塩酸緩衝溶液(pH8.6、6M グアニジン塩酸液、3.3mM EDTA含有)10mLで溶解した。このものに2-メルカプトエタノール(7μL)を加え10分間攪拌を行った後、反応液にメチル-4-ニトロベンゼンスルホネート(66mg)を含有するアセトニトリル溶液3.3mLを加えた。25分後、10%TFA溶液(1.0mL)加え、中和した後、ジエチルエーテルを加え抽出操作を3回行った。水層を減圧下に濃縮後、得られた残渣をHPLC(Vydac c

column C-18 250×10mm、展開溶媒A：0.1% TFA水溶液 B：0.09% TFA アセトニトリル：水=90：10、グラジエントA：B=100：0→100：0→60：40、0分→5分→35分 流速4.0mL/min)で精製し、Ac-Gly-Cys(Me)-Gly-Met(O)-Alaである2位のシステイン残基の硫黄原子がメチル化、4位のメチオニン残基が酸化された5残基ペプチド(配列番号23)を4mg得た。

【0176】

得られた2位のシステイン残基の硫黄原子がメチル化、4位のメチオニン残基が酸化された5残基ペプチド(配列番号23)3.8mgをエッペンチューブに入れ、80%蟻酸溶液3.1mLに溶解させた後、臭化シアン79.0mgを加え遮光した後、アルゴン置換

10

【0177】

得られた残渣をエッペンチューブにいれ、pH7.2のリン酸ナトリウム緩衝溶液1.25mL(6Mグアニジン塩酸含有)にて溶解させた後、45分間攪拌した。その後、反応液に、トリフルオロ酢酸3.6mL、ヨウ化アンモニウム22mg、ジメチルスルフィド11μLを加え、室温にて攪拌した。30分後、反応液に水10mLを加えた後、四塩化炭素にて分液洗浄を行った。水層を減圧下に濃縮し、得られた残渣をHPLC(Vydac column C18 250×4.6mm、展開溶媒A：0.1% TFA水溶液 B：0.09% TFA アセトニトリル：水=90：10、グラジエントA：B=100：0→100：0→60：40、0分→5分→65分 流速1.0mL/min)にて精製を行い、目的とするAc-Gly-Ser-Gly-Met-Alaの保護基を有する5残基ペプチド(配列番号24)を2.6mg得た。

20

ESI-MS: Calcd for $C_{16}H_{28}N_4O_7$: $[M+1H]^+ 464.2$, found, 464.5

【0178】

実施例6 Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Glyの製造

30

固相合成用カラムにAmino-PEGA resin(メルク社製)(100μmol)を入れ、塩化メチレン(DCM)、DMFで十分に洗浄した後、DMFで十分に膨潤させた。4-ヒドロキシメチル-3-メトキシフェノキシ酪酸(HMPB)(0.25mmol)、TBTU(0.25mmol)及びN-エチルモルホリン(0.25mmol)をDMF(2mL)に溶解させてカラムに入れ、25℃で2時間攪拌した。樹脂をDMF及びDCMで十分に洗浄し、HMPB-PEGA resinを得、これを固相合成用の固相担体として用いた。

【0179】

Fmoc-Gly(0.50mmol)、MSNT(0.50mmol)及びN-メチルイミダゾール(0.375mmol)をDCM(4.5mL)に溶解させて、固相合成用カラムに入れ、25℃で3時間攪拌した。攪拌後、樹脂をDCM、DMFを用いて洗浄し、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2mL)で10分間処理し脱保護した。DMFで洗浄後、その後のペプチド鎖の伸長は以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。

40

【0180】

Fmoc基でアミノ基を保護したアミノ酸とHOBt(67.6mg、0.50mmol)、DIPCI(77.0μL、63.1mg、0.50mmol)、をDMF(4mL)に溶解させ、15分間活性化させた後、固相合成用カラムに入れた。25℃で1時間攪拌した後、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2mL)で10分間処理し脱保護した。

50

この操作を繰り返し、アミノ酸を順次縮合させた。Fmoc基で保護したアミノ酸にはFmoc-Pro、Fmoc-Ala、Fmoc-Pro、Fmoc-Arg(Pbf)、Fmoc-Thr(tBu)、Fmoc-Asp(OtBu)、Fmoc-Pro、Fmoc-Ala、Fmoc-Ser(tBu)、Fmoc-Thr(tBu)、Fmoc-Val、Fmoc-Gly、Fmoc-His(Trt)、Fmoc-Ala、Fmoc-Pro、Fmoc-Pro、Fmoc-Alaを用い、固相樹脂上にFmoc-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Ala-Pro-Asp(OtBu)-Thr(tBu)-Arg(Pbf)-Pro-Ala-Pro-Glyの保護基を有する18残基ペプチド(配列番号25)を得た。

【0181】

この保護基を有する18残基ペプチド(配列番号25)を、樹脂上で、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2mL)で10分間処理して脱保護した。DMF、DCMを用いて洗浄した後にFmoc-Thr(GalNAc)(0.20mmol)、HOBt(0.50mmol)、DIPCI(0.50mmol)、をDMF(3.6mL)に溶解させ、15分間活性化させたものを加えた。5時間反応後、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2mL)で20分間処理し脱保護し、固相樹脂上にThr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Ala-Pro-Asp(OtBu)-Thr(tBu)-Arg(Pbf)-Pro-Ala-Pro-Glyの保護基を有する19残基糖付加ペプチド(配列番号26)を得た。

【0182】

得られた固相樹脂上の保護基を有する19残基糖付加ペプチド(配列番号26)の0.02mmol相当を別途固相合成用カラムにとり、Boc-Ser(tBu)(0.1mmol)、DIPCI(0.1mmol)、HOBt(0.1mmol)をDMF0.5mLに溶解させ、15分間活性化させたものを加え1時間反応を行った。反応液をろ過後、酢酸：トリフルオロエタノール=1：1を樹脂が十分に浸る程度に加え、14時間後、樹脂をろ過して除き、ろ液を減圧下に濃縮し、Boc-Ser(tBu)-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Ala-Pro-Asp(OtBu)-Thr(tBu)-Arg(Pbf)-Pro-Ala-Pro-Glyの保護基を有する20残基糖付加ペプチド(配列番号27)を含む残渣が得られた。

【0183】

得られた20残基の保護基を有する糖付加ペプチド(配列番号27)75mg(35μmol)とベンジルメルカプタン123μl(105μmol)をDMF3.5mLに加え、アルゴン気流下-20℃で1時間攪拌した後、PyBOP(91mg, 175μmol)、DIPEA(30μl, 175μmol)を加え2.5時間攪拌した。反応液にジエチルエーテルを加え、結晶を沈殿させた後、ろ過、得られた残渣にTFA/水/TIPS=95/2.5/2.5を樹脂が十分に浸る程度に加え、2時間25℃で攪拌した。樹脂をろ過して除いた後、ろ液を濃縮し残渣を回収した。得られた残渣を、HPLC(Vydac column C8 250×10mm 展開溶媒A：0.1%TFA水溶液 B：0.09%TFA アセトニトリル：水=90：10 グラジエントA：B=90：10→60：40 30分 流速4.0mL/min)で精製して、C末端がベンジルチオエステルである、Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-SBnの20残基糖付加ペプチド(配列番号28)を得た。

【0184】

一方、先に得られた固相樹脂上の19残基の保護基を有する糖付加ペプチド(配列番号26)の0.02mmol相当を別途固相合成用カラムにとり、Boc-ThiA(0.04mmol)、DIPCI(0.1mmol)、HOBt(0.1mmol)をDMF1.5mLに溶解させ、15分間活性化させたものを加え20分間反応を行った。反応液をろ過

10

20

30

40

50

後、試薬(TFA/水/TIPS=95/2.5/2.5)を樹脂が十分に浸る程度に加え、2時間25℃で攪拌した。樹脂をろ過して除いた後、ろ液を濃縮した。得られた残渣を、0.2Mメトキシアミン及び0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH4、6M塩酸グアニジン含有)2.1mlに溶解させ、N末端のチアゾリンを開環した後、HPLC(Vydac column C8 250×10mm 展開溶媒A:0.1%TFA水溶液 B:0.08%TFA アセトニトリル:水=90:10 グラジエントA:B=90:10→60:40 30分 流速4.0mL/min)で精製して、Cys-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Glyの20残基の糖付加ペプチド(配列番号29)を得た。

10

【0185】

このようにして得られた、20残基の糖付加ペプチド(配列番号29)13mgと先に得られたC末端がベンジルチオエステルである20残基のペプチド(配列番号28)12mgを、リン酸緩衝溶液(pH7.2、6M グアニジン塩酸含有)2.9mLに溶解させ、このものに4-メルカプトフェニル酢酸30mg、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン17mgを加え、3時間反応させた。反応液を、HPLC(Vydac column C8 250×10mm 展開溶媒A:0.1%TFA水溶液 B:0.09%TFA アセトニトリル:水=90:10 グラジエントA:B=90:10→60:40 30分 流速4.0mL/min)で精製して、Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Cys-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Glyの40残基糖付加ペプチド(配列番号30)を18mg得た。

20

【0186】

得られた40残基の糖付加ペプチド(配列番号30)16mgをナスフラスコにいれ、0.25M トリス塩酸緩衝溶液(pH8.6、6M グアニジン塩酸液、3.3mM EDTA含有)3.8mLで溶解した。このものに2-メルカプトエタノール(3μL)を加え10分間攪拌を行った後、メチルー4-ニトロベンゼンスルホネート25mgを含有したアセトニトリル1.27mLを加えた。25分後、10%TFA溶液0.45mL加え、中和した後、ジエチルエーテル2mLを加え分液洗浄を3回行った。水層を減圧下に濃縮後、得られた残渣をHPLC(Vydac column C-4 250×4.6mm、展開溶媒A:0.1%TFA水溶液 B:0.08%TFA アセトニトリル:水=90:10、グラジエントA:B=100:0→100:0→90:10→60:40、0分→10分→40分 流速1.2mL/min)で精製し、Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Cys(Me)-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Glyの21位のシステイン残基の硫黄原子がメチル化された40残基糖付加ペプチド(配列番号31)を含む混合物を13mg得た。

30

40

【0187】

得られた21位のシステイン残基の硫黄原子がメチル化された40残基糖付加ペプチド(配列番号31)を含む混合物12mgをナスフラスコに入れ、80%蟻酸水溶液2.9mLにて溶解させた後、25℃にて臭化シアン152mgを加えた。反応容器を遮光した後、37℃にて反応を行い、36時間後、反応溶液を減圧下に濃縮した。残渣をトリフルオロ酢酸2.9mLに溶解させ、ヨウ化アンモニウム2.4mg、ジメチルスルフィド24μLを加え、室温下に30分反応させた。30分後、反応系に水6mLを加えた後、四塩化炭素にて分液洗浄を行った。水層を、減圧下に濃縮後、残渣を5%ヒドラジン水溶液1.4mLに溶解させ、10分間室温にて反応させた。10分後、反応液に酢酸0.14m

50

Lを加えた後、HPLC(Vydac column C-4 250×4.6mm、展開溶媒A:50mM AcONH₄水溶液 B:アセトニトリル、グラジエントA:B=90:10→70:30、60分 流速1.0mL/min)で精製し、Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Glyの目的とする40残基糖付加ペプチド(配列番号32)を2.3mg得た。

ESI-MS: Calcd for : [M+3H]³⁺ 1388.5、found、 10
1388.6

【0188】

実施例7 Glu-Ser-Asn-Gly-Thr-Leu-Thr-Leuの製造
固相合成用カラムにTrt chloride resin(メルク社製)(100μmol)を入れ、塩化メチレン(DCM)、DMFで十分に洗浄した後、DCMで十分に膨潤させた。ろ過後、Fmoc-Gly(0.20mmol)、DIPEA(0.4mmol)をDCM(0.66mL)に溶解させて、固相合成用カラムに入れ、25℃にて2時間攪拌した。攪拌後、樹脂をDCM:MeOH:DIPEA=17:2:1、DCM及びDMFで十分に洗浄した後、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(1mL)で20分間処理し脱保護した。DMFで洗浄後、その後のペプチド鎖の伸長は以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。 20

【0189】

アミノ基を保護したアミノ酸とHOBt(67.6mg、0.50mmol)、DIPCI(77.0μL、63.1mg、0.50mmol)、をDMF(2mL)に溶解させ、15分間活性化させた後、固相合成用カラムに入れた。25℃で1時間攪拌した後、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2mL)で20分間処理し脱保護した。この操作を繰り返し、アミノ酸を順次縮合させた。保護したアミノ酸にはFmoc-Asn(177.2mg、0.50mmol)、Fmoc-Ser(tBu)(191.6mg、0.50mmol)、Boc-Glu(OtBu)(151.6mg、0.50mmol)を用い、固相樹脂上にBoc-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-Asn-Glyの保護基を有する4残基ペプチド(配列番号33)を得た。 30

【0190】

DMF、DCMを用いて洗浄した後に、AcOH:MeOH:DCM=5:4:1、2mLを加え、室温で2時間反応させた。2時間後、反応液をろ過して回収し、減圧下に濃縮を行い、残渣を得た。この残渣にベンゼン1mLを加え共沸操作を2回行った後、DMF0.81mLにて溶解させた。この溶液に対し、アルゴン気流下0℃で、PyBOP42.1mg、DIPEA14μl、ベンジルメルカプタン57μLを加え30分攪拌した。反応後、飽和塩化アンモニウム水溶液で中和後、水および飽和食塩水にて分液洗浄を行った。有機層を、硫酸マグネシウムにて乾燥後、ろ過、次いでろ液を減圧下に濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒;酢酸エチル:MeOH:水=20:2:1)にて精製し、目的とするペプチドが含まれるフラクションを集め、減圧下に濃縮を行った。得られた残渣を、95%TFA水溶液で溶解し、10分間反応させた。反応液を減圧下に濃縮し、C末端にベンジルチオエステルを有するGlu-Ser-Asn-Gly-SBnの4残基ペプチド(配列番号34)を得た。 40

【0191】

一方、固相合成用カラムにWang resin(メルク社製)(0.1mmol)を入れ、塩化メチレン(DCM)、DMFで十分に洗浄した後、DCMで十分に膨潤させた。Fmoc-Leu(0.50mmol)、MSNT(0.50mmol)及びN-メチルイミダゾール(0.375mmol)をDCM(2mL)に溶解させて、固相合成用カラムに入れ、25℃にて2時間攪拌した。2時間後、樹脂をDCM及びDMFで十分に洗浄し、Fmoc基 50

を20%ピペリジン/DMF溶液(2mL)で20分間処理し脱保護した。DMF、DCMで洗浄後、その後のペプチド鎖の伸長は以下に示す方法を用いて、順次アミノ酸を縮合させた。

【0192】

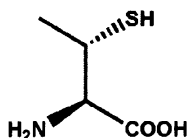
アミノ基を保護したアミノ酸とHOBt(67.6mg、0.50mmol)、DIPCI(77.0μL、0.50mmol)、をDMF 2mLに溶解させ、15分間活性化させた後、固相合成用カラムに入れた。25℃で1時間攪拌した後、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2mL)で20分間処理し脱保護した。この操作を繰り返し、アミノ酸を順次縮合させた。保護したアミノ酸にはFmoc-Thr(tBu)(198.8mg、0.50mmol)、Fmoc-Leu(176.8mg、0.50mmol)を用い、固相樹脂上にFmoc-Leu-Thr(tBu)-Leuの保護基を有する3残基ペプチドを得た。その後、Fmoc基を20%ピペリジン/DMF溶液(2mL)で20分間処理し脱保護した後、別途合成例1で合成したBoc-Thr(S-SecBu)の保護基を有するトレオニン誘導体を、HOBt(67.6mg、0.50mmol)、DIPCI(77.0μL、0.50mmol)、をDMF 2mLに溶解させ、15分間活性化させたものを加え3時間反応させ、固相樹脂上に、Boc-Thr(S-SecBu)-Leu-Thr(tBu)-Leuの保護基を有する4残基ペプチド(配列番号35)を得た。このものに、95%TFA水溶液を加え、室温で2時間反応させた後、樹脂をろ過して除き、ろ液を減圧下に濃縮し、Thr(S-SecBu)-Leu-Thr-Leuの保護基を有する4残基ペプチド(配列番号36)を得た。

【0193】

このようにして得られた保護基を有する4残基ペプチド(配列番号36)2.2mgと、先に得られたチオエステルを有する4残基ペプチド(配列番号34)2.2mgを0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3、6M塩酸グアニジン、4-メルカプトフェニル酢酸20mg含有)xxmLに溶解し、3.5時間反応させた。反応後、ジチオスレイトールを加え、10分間攪拌した後、反応液をHPLC(Cadenza column C18 75×4.6mm 展開溶媒A:0.1%TFA水溶液 B:0.1%TFAアセトニトリル:水=90:10 グラジエントA:B=90:10→35:65 15分 流速1.0mL/min)で精製し、5位のトレオニン残基の側鎖水酸基がチオール基で置換された、Glu-Ser-Asn-Gly-Thr(SH)-Leu-Thr-Leuである8残基のペプチド、(配列番号37)を得た。得られたペプチドに含まれるトレオニン誘導体残基は、主に以下の式で示される立体配置を有すると考えられた。

【0194】

【化21】



【0195】

得られた5位のトレオニン残基の側鎖水酸基がチオール基で置換された8残基のペプチド、(配列番号37)3.5mgをナスフラスコにいれ、0.25Mトリス塩酸緩衝溶液(pH8.6、6Mグアニジン塩酸液、3.3mMEDTA含有)4.1mLで溶解した。このものに2-メルカプトエタノール(2.9μL)を加え15分間攪拌を行った後、メチル-4-ニトロベンゼンスルホネート(26.2mg)をアセトニトリル1.37mLに溶解したものを加え50分間反応させた。反応後、10%TFA溶液(1.0mL)加え、中和した後、反応液をHPLC(Cadenza column C18 75×4

． 6 mm、 展開溶媒 A：0.1 % TFA 水溶液 B：0.1 % TFA アセトニトリル：水 = 90：10、 グラジエント A：B = 90：10 → 35：65 15 分 流速 1.0 mL/min) で精製し、5 位のトレオニン残基の置換されたチオール基の硫黄原子がメチル化された、Glu-Ser-Asn-Gly-Thr(SMe)-Leu-Thr-Leu である 8 残基ペプチド(配列番号 38)を得た。

【0196】

得られた 5 位のトレオニン残基の置換されたチオール基の硫黄原子がメチル化された 8 残基ペプチド(配列番号 38) 4 mg をナスフラスコに入れ、70 % 蟻酸溶液 4.63 mL に溶解させた後、臭化シアン 49.0 mg を加え遮光、アルゴン置換下、37 °C にて攪拌した。48 時間後、減圧濃縮を行った後、5 % ヒドラジン水溶液 0.93 mL を加え 15 分間反応した。このものに酢酸 60 µL を加えた後、反応液を HPLC (Cadenza column C18 75 × 4.6 mm 展開溶媒 A：0.1 % TFA 水溶液 B：0.1 % TFA アセトニトリル：水 = 90：10 グラジエント A：B = 85：15 → 45：55 15 分 流速 1.0 mL/min) で精製し、Glu-Ser-Asn-Gly-Thr-Leu-Thr-Leu の目的とする 8 残基ペプチド、(配列番号 39) を得た。得られたペプチド中に含まれるトレオニン残基の立体配置は、天然のものと同様であると反応機構から推察された。

ESI-MS: Calcd for $C_{34}H_{59}N_9O_{15}$: $[M+1H]^+ 834.41$, found, 835.1

【0197】

合成例 1 Boc-Thr(S-SecBu) の合成

Boc-Thr (300 mg, 1.37 mmol) を蒸留した DMF (6.85 mL, 20 mM) に溶かした後に N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (786 mg, 4.1 mmol) と HOBt (370 mg, 2.74 mmol) を加え、0 °C で 15 分攪拌した後、TMSEtOH (1.95 mL, 13.7 mmol) を加え、0 °C で攪拌した。20 時間後、TLC で反応終了確認後、反応溶液を酢酸エチルで希釈し、飽和重曹水で中和し、水で 2 回、飽和食塩水で 1 回分液洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させた後、ろ過を行い、ろ液を減圧下に濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒、酢酸エチル：ヘキサン = 1：3) で精製し、Boc-Thr-TMS エステル(収量：342 mg, 収率：78 %)を得た。

【0198】

得られた Boc-Thr-TMS エステルを、ベンゼンで 2 回共沸した後、残渣を DCM 20.8 mL に溶かした。メタンスルホンクロライド 322 mL (4.16 mmol) とトリエチルアミン 1.16 mL (8.32 mmol) を加えて、0 °C で攪拌した。10 分後、TLC で反応終了を確認後、反応溶液を DCM で希釈し、飽和塩化アンモニウム水溶液で中和後、水で 2 回、飽和食塩水で 1 回分液洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させた後、ろ過を行い、ろ液を減圧下に濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒、酢酸エチル：ヘキサン = 1：4) で精製し、Boc-Thr(OMs)-TMS エステル(収量 724.6 mg, 収率 88 %)を得た。

【0199】

得られた Boc-Thr(OMs)-TMS エステル 1.06 g を、ベンゼンで 2 回共沸した後、一晚デシケーターで乾燥させた。このものを DMF 8.9 mL に溶解させた後、チオ酢酸 0.57 mL (7.95 mmol) と DBU 0.79 mL (5.3 mmol) を DMF 4.4 mL に溶解させ 20 分間反応させた溶液を加え、45 °C で攪拌した。18 時間後、TLC にて反応の終了を確認した後、飽和塩化アンモニウム水溶液で中和後、水で 2 回、飽和食塩水で 1 回分液洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させた後、ろ過を行い、ろ液を減圧下に濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒、酢酸エチル：ヘキサン = 1：20) で精製し、Boc-Thr(SAc)-TMS エステル(収量 536.8 mg, 収率 53.7 %)を得た。

【0200】

得られたBoc-Thr(SAc)-TMSエステル1. 1gをメタノール100mLに溶解した後、ジピリジルジスルフィド(3. 21g、14. 6mmol)、Sec-BuSH 1. 75mL(16. 1mmol)をメタノール5. 5mLに溶解させた溶液を加えた。その後、水酸化ナトリウムのメタノール溶液(500mM) 11. 7mLを加えた。18時間後、TLCにて反応の終了を確認後、1%酢酸水溶液で中和後、減圧下に濃縮した後、酢酸エチルで希釈した。このものを水で2回、飽和食塩水で1回分液洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させた後ろ過を行い、ろ液を減圧下に濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒、酢酸エチル:ヘキサン=1:40)で精製した。得られた混合物をベンゼンで2回共沸した後、DMF 29mL(100mM)に溶解させた。これにテトラブチルアンモニウムフルオリド・3水和物2. 28mg(7. 3mmol)を加え、0℃で攪拌した。15分攪拌後、TLCにて反応の終了を確認、次いで飽和塩化アンモニウム水溶液で中和を行った。この反応液を水で2回、飽和食塩水で1回洗浄した後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥を行い、ろ過後、ろ液を減圧下に濃縮した。残渣をシリカゲルカラム(展開溶媒、酢酸エチル:ヘキサン=1:4→酢酸エチル:メタノール:水=20:2:1)で精製し、目的とするBoc-Thr(S-SecBu)(収量650mg、収率69%)を得た。

10

【0201】

配列表フリーテキスト

配列番号1は、実施例1の、保護基を有するアミノ酸配列である。
 配列番号2は、実施例1の、アセチル化されたアミノ酸配列である。
 配列番号3は、実施例1の、メチル化されたシステインを有するアミノ酸配列である。
 配列番号4は、実施例1の、アセチル化されたアミノ酸配列である。
 配列番号5は、実施例2の、保護基を有するアミノ酸配列である。
 配列番号6は、実施例2の、アミノ酸配列である。
 配列番号7は、実施例2の、メチル化されたシステインを有するアミノ酸配列である。
 配列番号8は、実施例2の、アミノ酸配列である。
 配列番号9は、実施例3の、保護基を有するアミノ酸配列である。
 配列番号10は、実施例3の、アミノ酸配列である。
 配列番号11は、実施例3の、メチル化されたシステインを有するアミノ酸配列である。
 配列番号12は、実施例3の、アミノ酸配列である。
 配列番号13は、実施例4の、糖鎖が付加された、保護基を有するアミノ酸配列である。
 配列番号14は、実施例4の、糖鎖が付加された、保護基を有するアミノ酸配列である。
 配列番号15は、実施例4の、糖鎖が付加された、ベンジルチオエステル基を有するアミノ酸配列である。
 配列番号16は、実施例4の、保護基を有するアミノ酸配列である。
 配列番号17は、実施例4の、アミノ酸配列である。
 配列番号18は、実施例4の、糖鎖が付加されたアミノ酸配列である。
 配列番号19は、実施例4の、糖鎖が付加された、メチル化されたシステインを有するアミノ酸配列である。
 配列番号20は、実施例4の、糖鎖が付加されたアミノ酸配列である。

20

30

40

【0202】

配列番号21は、実施例5の、保護基及びメチオニンスルホキシドを有するアミノ酸配列である。
 配列番号22は、実施例5の、メチオニンスルホキシドを有する、アセチル化されたアミノ酸配列である。
 配列番号23は、実施例5の、メチル化されたシステイン及びメチオニンスルホキシドを有する、アセチル化されたアミノ酸配列である。
 配列番号24は、実施例5の、アセチル化されたアミノ酸配列である。
 配列番号25は、実施例6の、保護基を有するアミノ酸配列である。

50

配列番号26は、実施例6の、糖鎖が付加された、保護基を有するアミノ酸配列である。
配列番号27は、実施例6の、糖鎖が付加された、保護基を有するアミノ酸配列である。
配列番号28は、実施例6の、糖鎖が付加された、ベンチルチオエステル基を有するアミノ酸配列である。

配列番号29は、実施例6の、糖鎖が付加されたアミノ酸配列である。

配列番号30は、実施例6の、糖鎖が付加されたアミノ酸配列である。

配列番号31は、実施例6の、糖鎖が付加された、メチル化されたシステインを有するアミノ酸配列である。

配列番号32は、実施例6の、糖鎖が付加されたアミノ酸配列である。

配列番号33は、実施例7の、保護基を有するアミノ酸配列である。

10

配列番号34は、実施例7の、ベンチルチオエステル基を有するアミノ酸配列である。

配列番号35は、実施例7の、保護基及びトレオニン誘導体を有するアミノ酸配列である。

。

配列番号36は、実施例7の、トレオニン誘導体を有するアミノ酸配列である。

配列番号37は、実施例7の、トレオニン誘導体を有するアミノ酸配列である。

配列番号38は、実施例7の、トレオニン誘導体を有するアミノ酸配列である。

配列番号39は、実施例7の、アミノ酸配列である。

【産業上の利用可能性】

【0203】

本発明は、ペプチド及び糖ペプチドの製造方法を提供する。本発明によれば、システインを含まないペプチドを得ようとする場合にも、ライゲーション法を用いることができる。本発明はまた、N結合型糖ペプチド及びO結合型糖ペプチドの製造に有用である。

20

【配列表】

0005517620000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C O 7 K 14/46 (2006.01) C O 7 K 14/46

(72)発明者 南部 由利
徳島県徳島市川内町加賀須野463 大塚化学株式会社内
(72)発明者 深江 一博
徳島県徳島市川内町加賀須野463 大塚化学株式会社内
(72)発明者 朝井 洋明
徳島県徳島市川内町加賀須野463 大塚化学株式会社内

審査官 水落 登希子

(56)参考文献 特開平10-077294(JP, A)
国際公開第2004/005330(WO, A1)
Biochem.Biophys.Res.Comm., 1974年, Vol.59, No.3, p.1145-1150
バイオテクノロジージャーナル, 2006年, Vol.5-6, p.299-305
Angew.Chem.Int.Ed., 2008年 6月11日, Vol.47, p.5402-5406
J.Am.Chem.Soc., 2007年, Vol.129, p.10064-10065
Bull.Chem.Soc.Jpn, 1982年, Vol.55, p.3878-3881
Amino Acids, 1993年, Vol.5, No.3, p.441
J.Virol., 1997年, Vol.71, No.8, p.6208-6213

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C O 7 K 1/00-1/36
C O 7 K 5/00-5/103
C O 7 K 7/00-7/66
C O 7 K 9/00
C O 7 K 14/00-14/825
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/WPIX(STN)