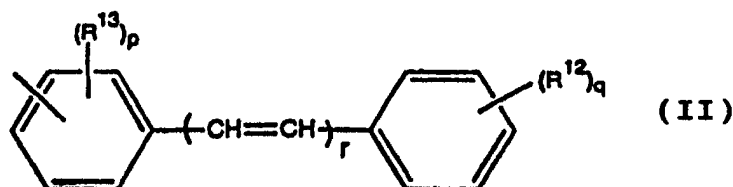
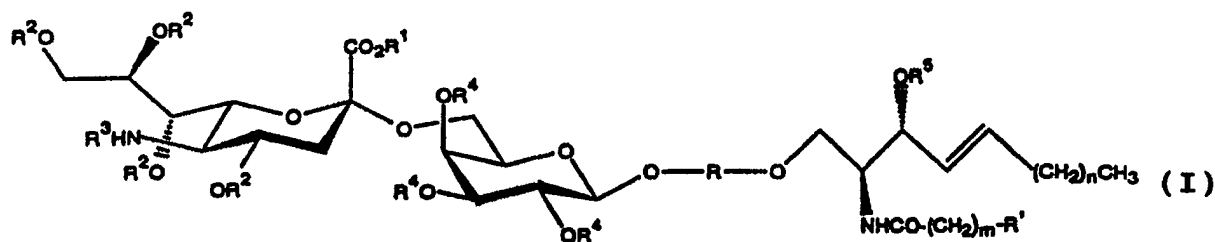




(51) 国際特許分類6 C07H 15/04, G01N 33/566, 33/569	A1	(11) 国際公開番号 WO98/17674 (43) 国際公開日 1998年4月30日 (30.04.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03810 (22) 国際出願日 1997年10月22日 (22.10.97) (30) 優先権データ 特願平8/279725 1996年10月22日 (22.10.96) (71) 出願人（米国を除くすべての指定国について） ダイキン工業株式会社(DAIKIN INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒530 大阪府大阪市北区中崎西2丁目4番12号 梅田センタービル Osaka, (JP) (72) 発明者；および (75) 発明者／出願人（米国についてのみ） 飯田隆夫(IIDA, Takao)[JP/JP] 大平 豊(OHIRA, Yutaka)[JP/JP] 〒305 茨城県つくば市御幸が丘3番地 ダイキン工業株式会社内 Ibaraki, (JP) (74) 代理人 弁理士 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP)	(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書	

(54)Title: GANGLIOSIDES HAVING FLUORESCENT-TAGGED CERAMIDE MOIETIES

(54)発明の名称 セラミド部を蛍光標識したガングリオシド類

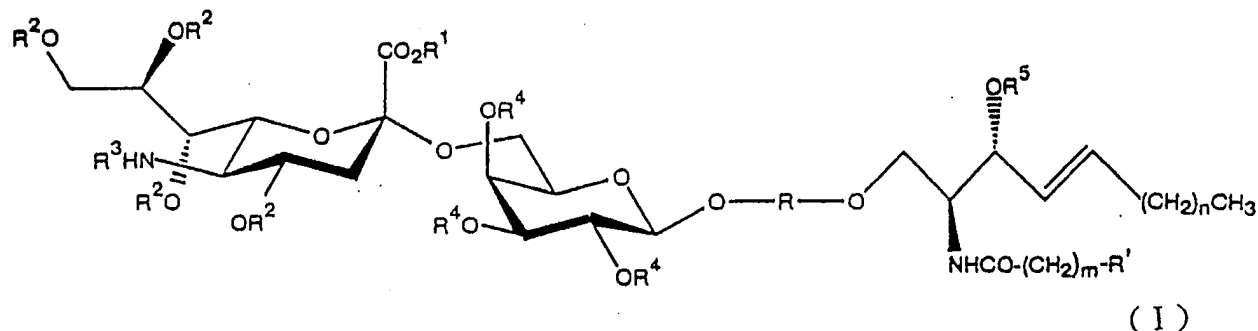


(57) Abstract

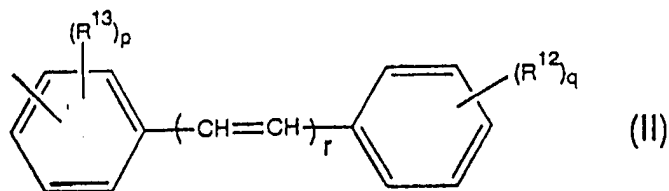
Compounds useful as a reagent for detecting influenza virus and represented by general formula (I), wherein m is an integer of 2 to 15; n is an integer of 0 to 12; R represents a sugar chain or a derivative thereof; R' represents a group represented by general formula (II), (wherein p is an integer of 0 to 4; q is an integer of 0 to 5; r is an integer of 2 to 5; and R¹² and R¹³ may be the same or different and each represents hydrogen, lower alkyl, aliphatic acyl, nitro or cyano); R¹ represents hydrogen or a carboxyl protective group; R², R⁴ and R⁵ may be the same or different and each represents hydrogen, aliphatic acyl or aromatic acyl; and R³ represents acetyl, glycolyl or trifluoroacetyl.

(57) 要約

本発明は、インフルエンザウイルス検出用試薬として有用な下記式 (I) の化合物を提供する。



〔式中、mは2～15の整数；nは0～12の整数；Rは糖鎖またはその誘導体；R'は一般式 (II)〕



〔式中、pは0～4の整数；qは0～5の整数；rは2～5の整数；R¹²及びR¹³は、互いに同じであっても異なってもよく、水素原子、低級アルキル基、脂肪族アシル基、ニトロ基又はニトリル基を示す。〕、R¹は水素原子またはカルボン酸の保護基を示し、R²、R⁴及びR⁵は、互いに同じであっても異なってもよく、各々水素原子、脂肪族あるいは芳香族アシル基を示し；R³はアセチル基、グリコリル基またはトリフルオロアセチル基を示す。〕

PCTに基づいて公開される国際願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	TD	チャード
AU	オーストラリア	GB	英国	MC	モナコ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バルバドス	GM	ガンビア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BE	ベルギー	GN	ギニア			TT	トリニダード・トバゴ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BH	ブルハリア	GR	ギリシャ	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	US	米国
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
BY	ベラルーシ	IE	アイランド	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CA	カナダ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CF	中央アフリカ	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CG	コンゴ共和国	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CH	スイス	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CI	コートジボアール	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CM	カメルーン	KG	キルギス	PT	ポルトガル		
CN	中国	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CU	キューバ	KR	韓国	RU	ロシア		
CY	キプロス	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
CZ	チェコ	LC	セント・ルシア	SE	スウェーデン		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
DK	デンマーク	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア		
EE	エストニア	LR	リベリア	SK	スロヴァキア		
ES	スペイン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ		

明 細 書

セラミド部を蛍光標識したガングリオシド類

技 術 分 野

本発明は、セラミド部を蛍光色素で標識したガングリオシド類とその合成中間体、及び該ガングリオシド類を用いたインフルエンザウイルス検出用の試薬及びキットに関する。

背 景 技 術

哺乳動物細胞の糖脂質は、長鎖アミノアルコールであるスフィンゴシンに長鎖脂肪酸がアミド結合したセラミドといわれる脂質部分、各種のオリゴ糖鎖、シアル酸から構築されるスフィンゴ糖脂質に属している。ここで、ガングリオシドとは、特にシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質の総称である。ガングリオシド類は、一般にその大部分が動物の細胞表層に局在し、そのシアリル糖鎖部分を細胞外に配向して、細胞における識別や情報の受容と応答、ホルモン、ウイルス、バクテリア、細胞毒素、その他のレセプター機能、細胞間認識や細胞の分化、増殖、癌化、免疫等の基本的生命現象に重要な役割を果たしていることが最近の研究により証明されてきた。

これら糖鎖の中で、A型インフルエンザウイルスのウイルス膜を構成するヘマグルチニン（赤血球凝集素）が、シアリル（ $\alpha 2-6$ ）ガラクトース糖鎖を含む5糖鎖からなるガングリオシドに極めて効果的に結合することが見出された（特開平6-247995号公報参照）。

このガングリオシドと同様のヘマグルチニン結合活性を持ち、インフルエンザウイルスが膜上に持つシアリダーゼ（シアル酸加水分解酵素）に対して抵抗性を示し、さらに蛍光を発する誘導体を合成すれば、インフルエンザウイルスの検出・同定を簡便に行えるようになり、インフルエンザウイルスの研究においても新規な手段を提供できると考えられる。

インフルエンザウイルスは、糖脂質及び糖蛋白質に含まれるシアル酸含有糖鎖をレセプターとして結合することが明らかになってきている。すなわち、インフルエンザウイルスには、A、B及びC型があり、A、B型ウイルスは、N-アセチルノイラミン酸またはN-グリコシルノイラミン酸含有糖鎖と、C型ウイルス

は9-O-アセチルシアル酸含有糖鎖とヘマグルチンを介して結合している。特に、A型インフルエンザウイルスは感染性が強く、この型の識別が臨床において重要であることが広く認識されるようになってきた。

糖脂質にバクテリア、細菌産生毒素やウイルスが結合する現象を検出（プローブ）する方法として用いられているラジオアイソトープ法は、(1)研究者の健康管理、(2)特別な施設・設備の必要性、(3)取り扱い責任者をおく必要性、(4)廃棄物の処理、(5)ラジオアイソトープの半減期が長いといった問題がある。さらに、放射性のプローブの比活性を上げすぎるとプローブの自己崩壊が促進されるため、放射性標識の高活性化は限界があり、原理的に検出限界の向上は難しいといわれている。そこで最近では、非放射性プローブ技術の開発が重要視されるようになり、蛍光標識法が効果的であると考えられるようになってきた。

すなわち、蛍光標識した、シアリル糖鎖含有糖脂質が得られれば、これを感染性であるA型インフルエンザウイルスの検出、同定、診断剤として利用することができ、有用であると考えられる。具体的には、糖脂質の受容体への結合に関与しない脂質部分に蛍光色素を導入し、さらに本来のA型インフルエンザウイルスのヘマグルチニンへの結合活性を保持した誘導体を合成すれば、受容体であるウイルスの検出・特定と、その挙動を目視で追跡できるようになり、ウイルスと細胞との相互作用の研究においても新しい手段を提供できると考えられる。

このような観点より、既に本発明者はセラミド部分にフルオレッセンを有するGM3を合成した（特開平7-309888号公報参照）。しかし、得られた化合物の蛍光性を検討したところ、ウイルスに結合したGM3フルオレッセンは疎水状態（マイクロプレートに付着させてデンストメーターで測定する状態）では蛍光の発色性が著しく低くなり、インフルエンザウイルスの検出には不十分であることが明らかになった。

さらに、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンは、GM3のシアリル（ α 2-3）ガラクトース結合よりも、むしろシアリル（ α 2-6）ガラクトース結合を認識する傾向にある（糖鎖研究の最先端（福田穰編：羊水社）、141頁、1996）。

前述のごとく、臨床で用いられるまでの検出感度を得るには至らなかったため、

シアリル ($\alpha 2-6$) ガラクトース結合性を持ち、さらに検出環境に依存しない蛍光色素を導入した誘導体を種々検討することが必要とされている。

本発明は、A型インフルエンザウイルスの膜に存在するヘマグルチニンに対する結合活性を持ち、疎水状態でも蛍光特性が維持された標識色素を導入したガングリオシド誘導体 (I) と (V) 及びこれらの合成中間体を提供すること、さらにこれらを用いたインフルエンザウイルスの検出試薬を提供することを目的とするものである。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の化合物3 (▲) とGM3 (シアリル ($\alpha 2-3$) ラクトシルセラミド; ●) によるインフルエンザウイルスA/Aichi/2/68 (H3N2) への結合活性の測定結果を示す。

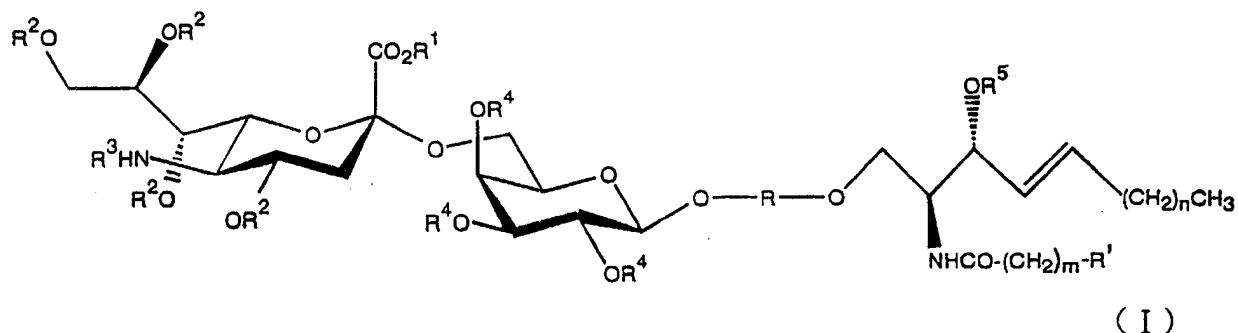
発明の開示

化合物 (I) 及び化合物 (V) を得るためには、脱保護条件下で安定な結合を用いる必要があり、セラミド部分のアミド結合を構成する脂肪酸残基に対して標識修飾する方法を採用した。セラミドのアミド結合と標識色素の間の原子数としては2~20個 (炭素、酸素、窒素、硫黄、リン等から構成され、好ましくは2~10個) が必要である。標識色素は種々の型を用いることができる。

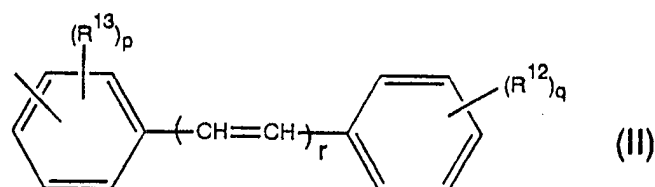
本発明者は、A型インフルエンザウイルスに結合活性を持ち、簡便な検出・診断操作によっても蛍光特性を減じないガングリオシド誘導体を検討した結果、セラミドの脂肪酸の代わりに、疎水性のジフェニルヘキサトリエン系色素の脂肪酸を導入することにより、インフルエンザウイルス、特にA型インフルエンザウイルスに効果的に結合して、さらに乾燥状態でも蛍光特性に変化がないことを見出した。

本発明は上記知見に基づき完成されたものであり、下記のガングリオシド類とその合成中間体、及び該ガングリオシド類を用いたインフルエンザウイルス検出用の試薬及びキットに関する。

1. 下記一般式 (I)



〔式中、 m は2～15の整数； n は0～12の整数； R は糖鎖またはその誘導体； R' は一般式 (II)



〔式中、 p は0～4の整数； q は0～5の整数； r は2～5の整数； R^{12} 及び R^{13} は、互いに同じであっても異なってもよく、水素原子、低級アルキル基、脂肪族アシル基、ニトロ基又はニトリル基を示す。〕、 R^1 は水素原子またはカルボン酸の保護基を示し、 R^2 、 R^4 及び R^5 は、互いに同じであっても異なってもよく、各々水素原子、脂肪族あるいは芳香族アシル基を示し； R^3 はアセチル基、グリコリル基またはトリフルオロアセチル基を示す。〕

で示される化合物。

2. $O-R$ が、

- ・ 4-O- β -D-グルコピラノシル；
- ・ 3-O- β -D-グルコピラノシル；
- ・ 4-O-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル；
- ・ 3-O-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル；
- ・ 4-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル)-(1 $\rightarrow$ 3)-O-(β -D-ガラクトピラノシル)-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D-

グルコピラノシル；

・ 4-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル)-(1→4)-O-(β-D-ガラクトピラノシル)-(1→3)-O-β-D-グルコピラノシル；

・ 4-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル)-(1→3)-O-(β-D-ガラクトピラノシル)-(1→3)-O-β-D-グルコピラノシル；

・ 4-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル)-(1→4)-O-(β-D-ガラクトピラノシル)-(1→4)-O-β-D-グルコピラノシル；

・ 3-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル)-(1→3)-O-(β-D-ガラクトピラノシル)-(1→4)-O-β-D-グルコピラノシル；

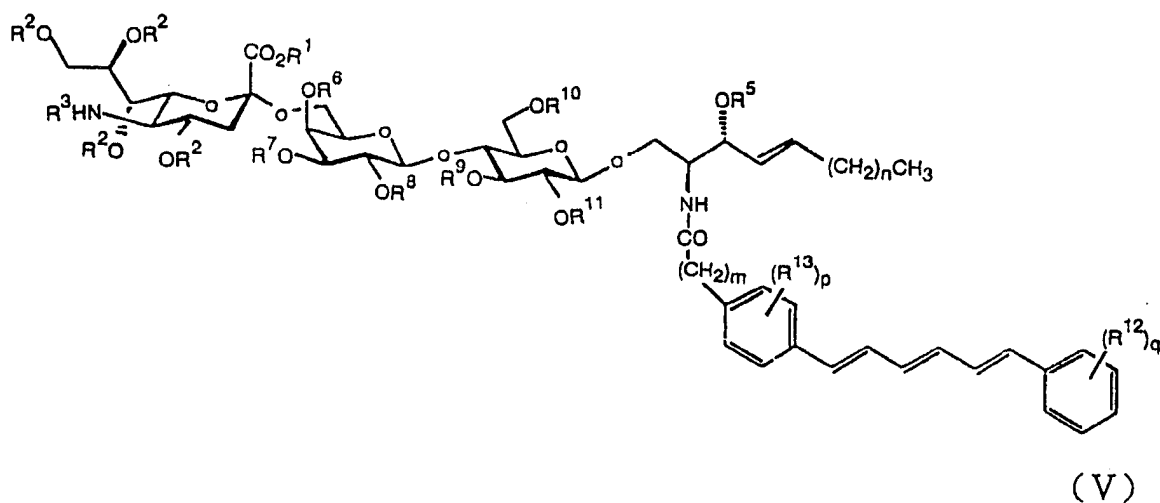
・ 3-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル)-(1→4)-O-(β-D-ガラクトピラノシル)-(1→3)-O-β-D-グルコピラノシル；

・ 3-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル)-(1→3)-O-(β-D-ガラクトピラノシル)-(1→3)-O-β-D-グルコピラノシル；及び

・ 3-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル)-(1→4)-O-(β-D-ガラクトピラノシル)-(1→4)-O-β-D-グルコピラノシル。

からなる群から選ばれるいずれか1種の糖鎖またはその誘導体である項1記載の化合物。

3. 下記一般式 (V) :



〔式中、 m は2～15の整数； n は0～12の整数； p は0～4の整数； q は0～5の整数； R^1 は水素原子又はカルボン酸の保護基を示し； R^2 及び $R^5 \sim R^{11}$ は、互いに同じであっても異なってもよく、各々水素原子、脂肪族あるいは芳香族アシル基または水酸基の保護基を示す。 R^{12} 及び R^{13} は、互いに同じであっても異なってもよく、水素原子、低級アルキル基、脂肪族アシル基、ニトロ基又はニトリル基を示す。 R^3 はアセチル基、グリコリル基またはトリフルオロアセチル基を示す。〕で表される項1記載のシアリル ($\alpha 2-6$) ラクトシルセラミド。

4. インフルエンザウイルスを検出するための項1～3のいずれかに記載の化合物の使用。

5. 項1～3のいずれかに記載の化合物を含むインフルエンザウイルス検出用試薬。

6. 項1～3のいずれかに記載の化合物をインフルエンザウイルス検出用試薬として含むインフルエンザウイルス検出用キット。

7. さらにPBS緩衝液、マイクロプレート、赤血球、抗インフルエンザ抗体、ペルオキシダーゼ標識プロテインAを含む項6に記載のインフルエンザウイルス検出用キット。

本発明の化合物は、インフルエンザウイルスの検出用試薬として有用であり、

特にA型インフルエンザウイルスの検出に有用である。

R^{12} 及び R^{13} で表される低級アルキル基としては、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチルなどの炭素数1～4のアルキル基が挙げられる。

R^2 及び $R^4 \sim R^{13}$ で表される脂肪族アシル基としては、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、バレリル、イソバレリル、ピバロイルなどの炭素数2～5の脂肪族アシル基、好ましくはアセチル基が挙げられる。

R^1 で表されるカルボン酸の保護基としては、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチルなどの低級アルキル基、置換されていてもよいフェニル基、置換されていてもよいベンジル基が挙げられる。

R^2 及び $R^4 \sim R^{11}$ で表される芳香族アシル基としては、炭素数1～4の低級アルキル基、メトキシ基、エトキシ基、水酸基、メチレンジオキシ基、アミノ基、炭素数1～4の低級アルキルまたはジ（炭素数1～4の低級アルキル）アミノ基、ニトロ基、ニトリル基、塩素原子、臭素原子、フッ素原子などの置換基を1～3個有していてもよいベンゾイル基が挙げられる。

O-R-で表される糖鎖としては、下記のものが例示される：

- ・ 4-O- β -D-グルコピラノシル；
- ・ 3-O- β -D-グルコピラノシル；
- ・ 4-O-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル；
- ・ 3-O-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル；
- ・ 4-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル)-(1 $\rightarrow$ 3)-O-(β -D-ガラクトピラノシル)-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D-グルコピラノシル；
- ・ 4-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(β -D-ガラクトピラノシル)-(1 $\rightarrow$ 3)-O- β -D-グルコピラノシル；
- ・ 4-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル)-(1 $\rightarrow$ 3)-O-(β -D-ガラクトピラノシル)-(1 $\rightarrow$ 3)-O- β -D-

グルコピラノシル；

・ 4-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル) - (1→4)-O-(β-D-ガラクトピラノシル) - (1→4)-O-β-D-グルコピラノシル；

・ 3-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル) - (1→3)-O-(β-D-ガラクトピラノシル) - (1→4)-O-β-D-グルコピラノシル；

・ 3-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル) - (1→4)-O-(β-D-ガラクトピラノシル) - (1→3)-O-β-D-グルコピラノシル；

・ 3-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル) - (1→3)-O-(β-D-ガラクトピラノシル) - (1→3)-O-β-D-グルコピラノシル；及び

・ 3-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル) - (1→4)-O-(β-D-ガラクトピラノシル) - (1→4)-O-β-D-グルコピラノシル。

好ましい糖鎖は、

・ 4-O-β-D-グルコピラノシル；

・ 3-O-β-D-グルコピラノシル；

・ 4-O-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル；

・ 3-O-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル；及び

・ 3-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル) - (1→3)-O-(β-D-ガラクトピラノシル) - (1→4)-O-β-D-グルコピラノシルである。

O-R-に関する前記糖鎖誘導体とは、糖鎖の水酸基の水素原子少なくとも1種が上記に定義された脂肪族アシル基または芳香族アシル基で置換された化合物であり、好ましくはアセチル基またはベンゾイル基で保護された化合物である。

本発明の一般式(I)の化合物において；

R¹は、好ましくは水素原子、メチル基、エチル基、tert-ブチル基またはベンジ

ル基である。

R^{12} 及び R^{13} の好ましい基は、水素原子、メチル基又はアセチル基である。

R^2 、 R^4 及び $R^6 \sim R^{11}$ の好ましい基は水素原子又はアセチル基、より好ましくは水素原子である。

R^3 の好ましい基は、アセチル基又はグリコリル基、より好ましくはアセチル基である。

R^5 の好ましい基は、水素原子又はベンゾイル基である。

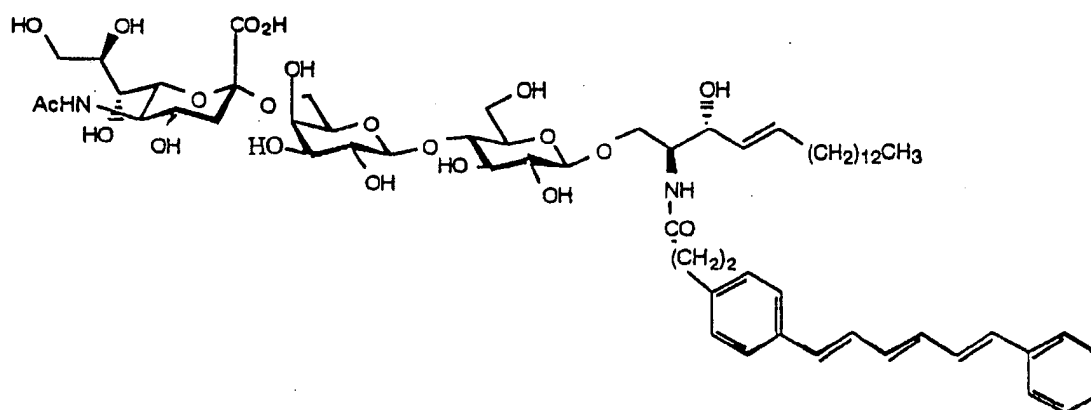
p は 0～4 の整数、好ましくは 0 または 1、より好ましくは 0 である。

q は 0～5 の整数、好ましくは 0 または 1、より好ましくは 0 である。

r は 2～5 の整数、好ましくは 3 である。

本発明の化合物は、 R' 基に r 個の二重結合を有しているが、これら二重結合の各々はトランス型でもシス型でもよく、多数の立体異性体を包含する。好ましい化合物は、全ての二重結合がトランス型の化合物である。

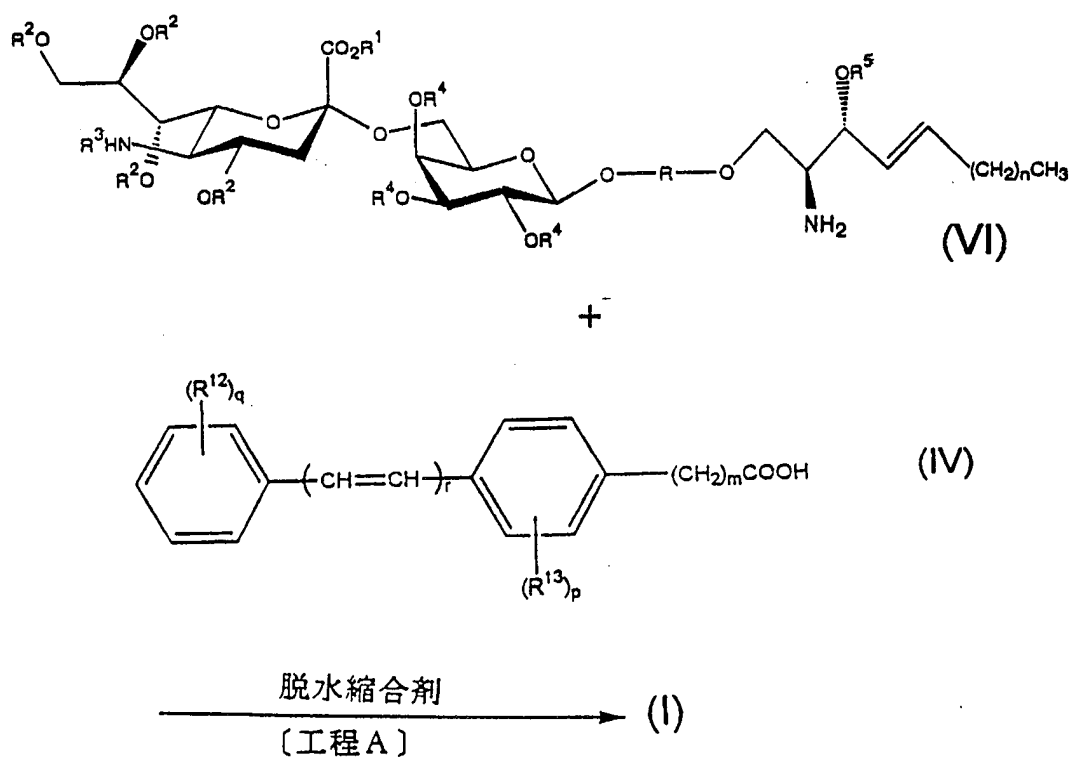
本発明において、特に好ましい化合物（化合物 3）を以下に示す。



化合物 3

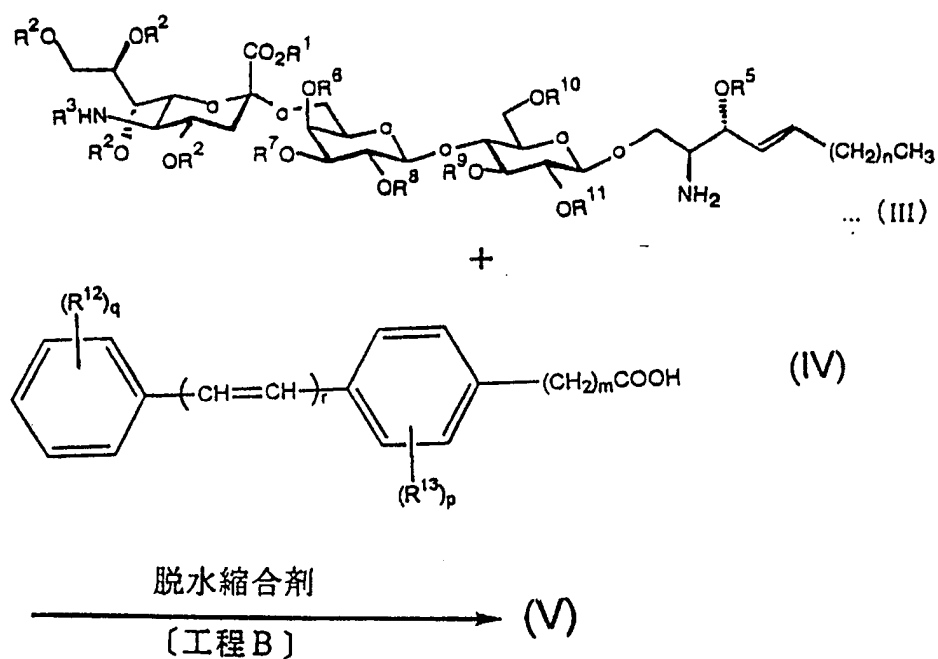
本発明の一般式 (I) 及び一般式 (V) の化合物は、下記の＜反応工程式 1＞及び＜反応工程式 2＞に従い、各々製造できる。

< 反応工程式 1 >



[式中、n、m、p、q、r、R、R¹~R⁵、R¹²及びR¹³は前記に同じ]

< 反応工程式 2 >



〔式中、 n 、 m 、 p 、 q 、 $R^1 \sim R^3$ および $R^5 \sim R^{13}$ は前記に同じ〕

〔工程A〕

一般式(VI)の化合物と一般式(IV)の化合物とを、溶媒中、脱水縮合剤の存在下に反応させ、必要に応じて脱保護することにより、一般式(I)の化合物を得る。溶媒としては、DMF、酢酸エチル、クロロホルム、ジクロロメタン、THF、ホルムアミド等が挙げられる。脱水縮合剤としては、DCC、水溶性カルボジイミド(WSC)、カルボニルジイミダゾール等が挙げられる。反応は、溶媒中一般式(VI)の化合物1モルに対し、一般式(IV)の化合物1～1.1モル程度、脱水縮合剤1～1.1モル程度を用い、室温から溶媒の沸点程度の温度下に1～24時間程度反応させることにより有利に進行する。アセチル基等の水酸基の脱保護(エステル加水分解)を行う場合には、メタノール、エタノールなどのアルコールまたは水などの溶媒中、1当量から過剰量のアルカリ(アルコール中ではナトリウムメトキシド、ナトリウムエトキシド等のナトリウムアルコキシド、NaHなど、水溶液中では水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等)を用いて反応させる。

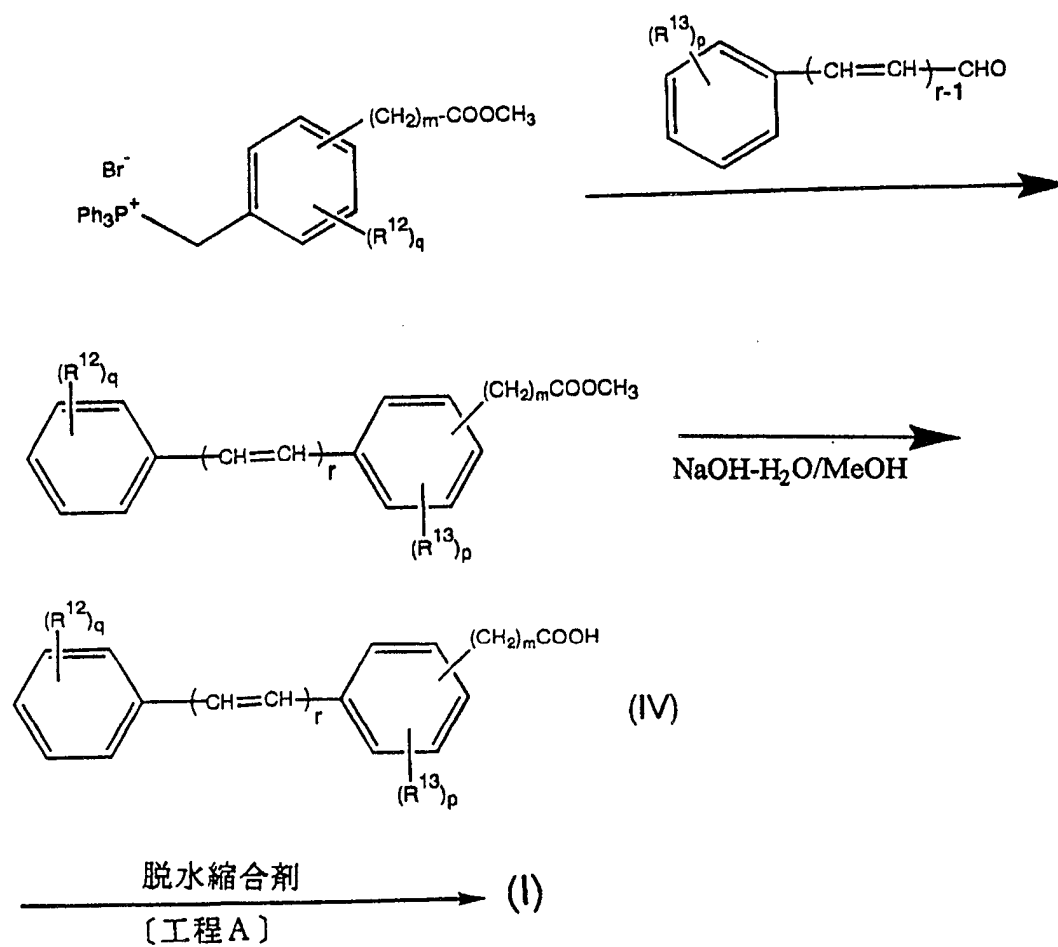
〔工程B〕

一般式(III)の化合物と一般式(IV)の化合物とを、溶媒中、脱水縮合剤の存在下に反応させ、必要ならば脱保護することにより、一般式(V)の化合物を得る。一般式(VI)の化合物に代えて一般式(III)の化合物を用いる他は、脱水縮合剤、溶媒、反応時間、反応温度、各試薬の使用割合は、上記<反応工程式1>と同様にして反応させることにより、一般式(V)の化合物を得ることができる。

上記一般式(III)及び一般式(VI)の化合物は公知であり、特開平7-309888号公報又は特開平6-247995号公報の記載に従い製造することができる。

なお、一般式(IV)の化合物は、(Biochimica et Biophysica Acta, 692, 196-201 (1982))の記載に準じて、以下の<反応工程式3>に従い製造できる。

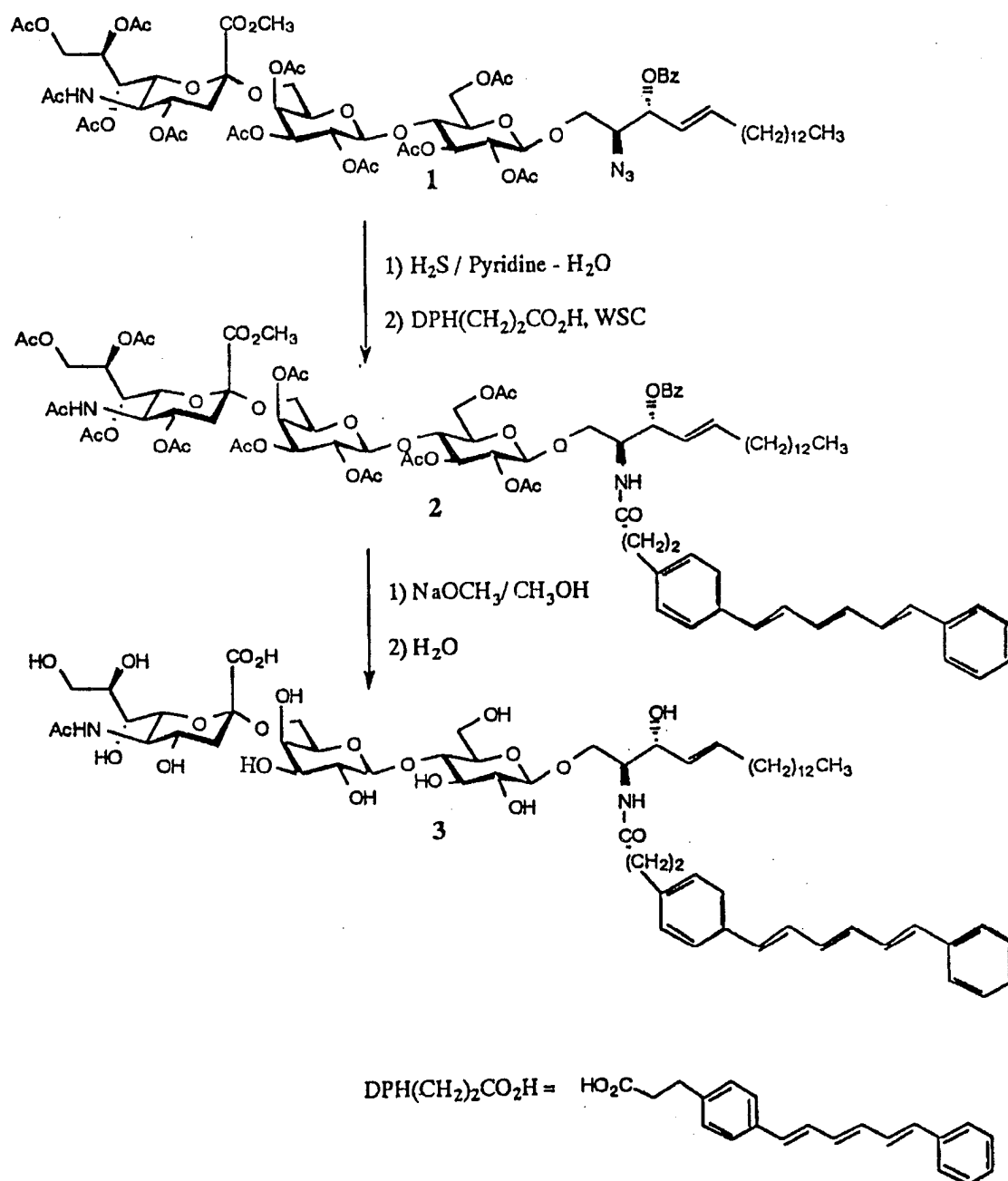
<反応工程式 3>



[式中、 m 、 p 、 q 、 r 、 $\text{R}^{12} \sim \text{R}^{13}$ は前記に同じ]

参考のため、実施例に記載の化合物 3 の合成経路を以下の<反応工程式 4>に示す。

< 反応工程式 4 >



〔式中、“Ac”はアセチル基を示し、“Bz”はベンゾイル基を示す。〕

なお、化合物1は、長谷川ら(Biosci. Biotech. Biochem., 56, 535-536 (1992))に記載されている。また、3-(p-(6-フェニル)1,3,5-ヘキサトリエニル)フェニルプロピオン酸の合成は、(Biochimica et Biophysica Acta, 692, 196-201 (1982))に従い行うことができる。

本発明の化合物は、ウイルス膜にヘマグルチニンを有するA型及びB型インフルエンザウイルスにより感染した試料中の該ウイルスを簡便に検出・同定する手段を提供するものであり、特に感染性の強いA型インフルエンザウイルスの検査、診断用試剤及びキットとして有用であることが明らかになった。その他、該ウイルスの糖鎖受容体の動的挙動を追跡できる試剤及びキットとしても使用しうる有用な化合物である。

本発明のキットは、一般式(I)の化合物、PBS緩衝液、マイクロプレート、赤血球、抗インフルエンザ抗体、ペルオキシダーゼ標識プロテインAなどが含まれる。一般式(I)の化合物以外の試剤その他は、市販品が利用でき、各成分の使用量は、下記実施例3を参考にして、当業者であれば容易に決定できる。

以下、本発明を実施例に従いより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

発明を実施するための最良の形態

実施例1

〇-(メチル 5-アセトアミド-4,7,8,9-テトラ-O-アセチル-3,5-ジデオキシ-D-グリセロ- α -D-ガラクト-2-ノヌロピラノシロネート)-(2 $\rightarrow$ 6)-O-(2,3,4-トリ-O-アセチル- β -D-ガラクトピラノシル)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-トリ-O-アセチル- β -D-グルコピラノシル)-(1 $\rightarrow$ 1)-(2S,3R,4E)-3-O-ベンゾイル-2-(3-(p-(6-フェニル)1,3,5-ヘキサトリエニル)フェニルプロピオンアミド)-4-オクタデセン-1,3-ジオール(化合物2)の合成

〇-(メチル 5-アセトアミド-4,7,8,9-テトラ-O-アセチル-3,5-ジデオキシ-D-グリセロ- α -D-ガラクト-2-ノヌロピラノシロネート)-(2 $\rightarrow$ 6)-O-(2,3,4-トリ-O-アセチル- β -D-ガラクトピラノシル)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-トリ-O-アセチル- β -

D-グルコピラノシル) - (1→1) - (2 S, 3 R, 4 E) - 2-アジド-3-
 -O-ベンゾイル-4-オクタデセン-1, 3-ジオール(化合物1) 130mg
 (0.088mmol)をピリジン83%水溶液14.4mlに溶かし、室温で硫化水素ガスを
 29時間通した。原料の消失を確認後、反応混合物から先ず硫化水素を除き、次
 いでピリジンと水を真空留去した。残渣を無水ジクロロメタン7mlに溶かし、ア
 ルゴン雰囲気下、3-(p-(6-フェニル)1, 3, 5-ヘキサトリエニル)
 フェニルプロピオン酸40mg(0.17mmol)及び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50mg(0.26mmol)を加え、室温で18時間攪拌
 した。反応混合物をジクロロメタン70mlで希釈し、水で洗浄、無水硫酸ナトリ
 ウムで乾燥、減圧濃縮で得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー
 (充填剤:シリカゲル60(7734), 溶出液:酢酸エチル/ヘキサン=3/
 1)に供して化合物2を98mg得た。収率64%。

$[\alpha]_D^{25} -9.3(c2.4, CHCl_3)$

IR KBr max cm^{-1} : 3400(NH)1750, 1220(エステル), 1670, 1540(アミド), 720(Ph)
 NMR(CDC13, TMS): δ 0.88(t, 3H, J=6.2Hz, $\underline{CH_3CH_2}$), 1.25(s, 22H, 11CH₂), 1.
 89(s, 3H, AcN), 2.55(dd, 1H, J_{3a,3e}=12.8Hz, J_{3e,4}=4.4Hz, H-3e(7H)), 3.7
 5(s, 3H, MeO), 4.45(d, 1H, J_{1,2}=7.7Hz, H-1(Glc)), 4.53(d, 1H, J_{1,2}=7.3Hz,
 H-1(Gal)), 4.97(dd, 1H, J_{2,3}=10.5Hz, J_{3,4}=3.3Hz, H-3(Gal)), 5.06(dd, 1H,
 J_{2,3}=10.5Hz, J_{1,2}=7.3Hz, H-2(Gal)), 5.21(dd, 1H, J_{6,7}=2.9Hz, J_{7,8}=9.5Hz,
 H-7(7H)), 5.78(d, 1H, NH), 5.85(dt, 1H, J_{4,5}=14.1Hz, J_{5,6}=7.1Hz, H-5(ス
 ファゴシ)), 及び6.45-8.05(m, 20H, Ph及びトランス-CH=CH)。

実施例2

O-(メチル 5-アセトアミド-3, 5-ジデオキシ-D-グリセロ- α -D
 -ガラクト-2-ノヌロピラノシロン酸)-(2→6)-O-(β -D-ガラク
 トピラノシル)-(1→4)-O-(β -D-グルコピラノシル)-(1→1)
 -(2 S, 3 R, 4 E)-2-(3-(p-(6-フェニル)1, 3, 5-ヘキ
 サトリエニル)フェニルプロピオンアミド)-4-オクタデセン-1, 3-ジオ
 ール(化合物3)の合成

無水メタノール5mlに、化合物2(88mg, 0.051mmol)を溶かし、アルゴン雰囲気

気下、ナトリウムメトキシド20mgを加え、室温で5.5時間攪拌した。0℃に冷却後、水0.5mlを加え、室温で12時間攪拌した。アンバーライトIR120 (H⁺) カラムクロマトグラフィー (溶出液: メタノール) に供して、溶出液を減圧濃縮後、残渣をカラムクロマトグラフィー (充填剤: セファデックスLH-20, 溶出液: メタノール-水=1:1) に供して化合物3を28mg得た。収率43%。

$[\alpha]_D^{25} +8.5$ (c 0.18, 1:1 メタノール-水)

IR KBr max cm^{-1} : 3700 - 3200(OH, NH), 2920, 2850(Me, メチル), 1730(カルボニル), 1640, 1560(アミド), 1070(エーテル), 750(Ph)

NMR(1:1 CD₃OD-CDCl₃, TMS): δ 0.89(t, 3H, J=6.2Hz, CH₃CH₂), 1.28(s, 22H, 11CH₂), 1.99(s, 3H, AcN), 2.16(dd, 1H, J_{3a,3e}=J_{3e,4}=11.7Hz, H-3a(シアル)), 2.79(dd, 1H, J_{3a,3e}=11.7Hz, J_{3e,4}=4.4Hz, H-3e(シアル)), 5.43(dd, 1H, J_{3,4}=7.2Hz, J_{4,5}=15.5Hz, H-4(スフィンゴシ)), 5.68(dt, 1H, J_{4,5}=15.45Hz, J_{5,6}=7.0Hz, H-5(スフィンゴシ)), 及び6.5-8.1(m, 15H, Ph及びトランス-CH=CH)。

実施例 3

シアリル (α 2-6) ラクトース誘導体 (化合物3) のインフルエンザウイルスとの結合活性の測定

化合物3のインフルエンザウイルスAとの結合活性を測定 (TLC/ウイルス結合アッセイ法) し、インフルエンザウイルス検出試剤としての有用性を見出すことができた。

実験材料

使用されたインフルエンザウイルス: A/Aichi/2/68 (H3N2)

結合活性の比較化合物: シアリル (α 2-3) ラクトシルセラミド (GM3)

シリカゲル薄層板 (5×5cm; Polygram SIL G, Marchery Nsgel) 上に、化合物3とGM3の各ガングリオシド(0.5, 1, 4, 6 nmol)をスポットし、クロロホルム/メタノール/12mM塩化マグネシウム水溶液 (5:4:1) (V/V) で展開し、風乾後、1%卵白アルブミン、1%ポリビニルピロリドン、(PVP) 含有PBS (0.9%食塩を含有するリン酸緩衝液) 溶液 (ソリューションA) で徐々に浸し、37℃、3時間ブロッキングした。このプレートをPBSで5回洗

浄後、H A U (Hemagglutinin unit) (赤血球凝集活性：マイクロプレート(96U-bottom wells, Falcon製) 上にて、インフルエンザウイルスを0.01%ゼラチン-PBS溶液で倍々希釈し、それに0.5%(V/V)ニワトリ赤血球-PBS浮遊液を加え、4℃、1時間反応させた。H A Uは、ニワトリ赤血球が凝集するために必要なウイルスの最高希釈倍率で表した。)が 2^8 個のインフルエンザウイルス：A/Aichi/2/68(H3N2)-PBS懸濁液3mlを加え、4℃、一晚振盪しながら反応した。このプレートをPBSで5回洗浄後、3%PVPP-PBS(ソリューションB)で1000倍に希釈したウサギ抗インフルエンザウイルス抗体3mlを加え、4℃、2時間振盪した。このプレートをPBSで5回洗浄後、ソリューションAで4℃、30分間ブロッキングし、さらにPBSで5回洗浄後、ソリューションBで1000倍に希釈したホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識プロテインA(Oganon Teknika Corp. 製) 溶液3mlを加え、4℃、2時間振盪した。このプレートをPBSで5回洗浄後、0.1M酢酸緩衝液(pH6.0)10mlに110mMの4-クロロ-1-ナフトールのアセトニトリル溶液200 μ l、31%過酸化水素水1 μ l混和した発色液を加え、4℃で5分間振盪した。これを蒸留水で洗浄後風乾し、発色をデンシトメーター(島津製作所製CS-9000)で測定波長620nm、対照波長430nmにて定量した。結果を図1に示す。図1において、各ガングリオシドの濃度における相対測定強度を(%)で示した。化合物3を6nmolにしたときの、(620nmのデンシトメーターのレスポンス) - (430nmのデンシトメーターのレスポンス)を100とした。

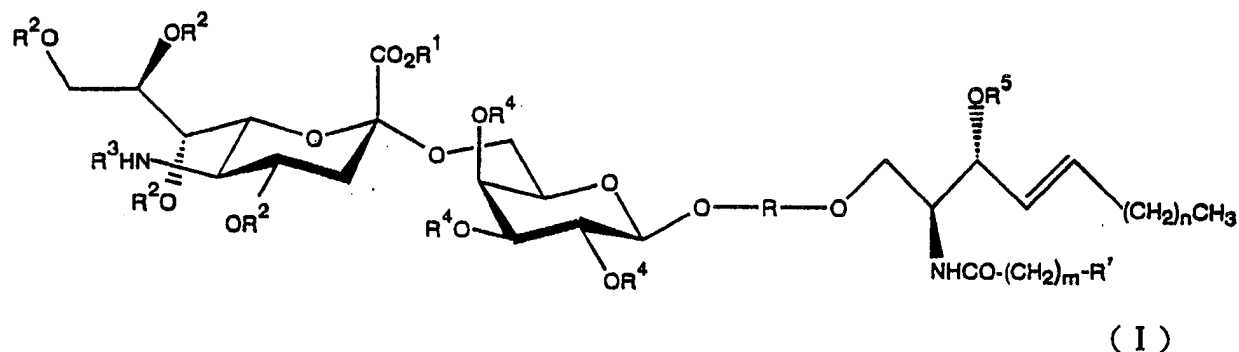
以上のように、化合物3はインフルエンザウイルスを非常に感度よく検出する化合物であることが判明した。

A/Aichi/2/68は、($\alpha 2-3$)と($\alpha 2-6$)の二つの結合を認識し、そのレセプターの存在比は約1:3であるが、図1から、化合物3の検出感度は、GM3に比較して約12倍であるから、感度としては通常のシリアル($\alpha 2-6$)ラクトシルセラミドの4倍に感度が上がっていることが分かった。

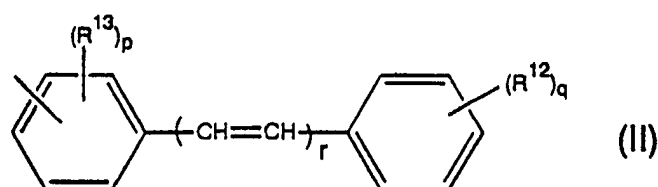
以上の結果から、本発明の化合物は、インフルエンザウイルスA型のヘマグルチニンを感度よく検出できることが明らかになった。

請求の範囲

1. 下記一般式 (I)



〔式中、 m は2～15の整数； n は0～12の整数； R は糖鎖またはその誘導体； R' は一般式 (II)



〔式中、 p は0～4の整数； q は0～5の整数； r は2～5の整数； R^{12} 及び R^{13} は、互いに同じであっても異なってもよく、水素原子、低級アルキル基、脂肪族アシル基、ニトロ基又はニトリル基を示す。〕、 R^1 は水素原子またはカルボン酸の保護基を示し、 R^2 、 R^4 及び R^5 は、互いに同じであっても異なってもよく、各々水素原子、脂肪族あるいは芳香族アシル基を示し； R^3 はアセチル基、グリコリル基またはトリフルオロアセチル基を示す。〕

で示される化合物。

2. $O-R$ が、

- ・ 4-O- β -D-グルコピラノシル；
- ・ 3-O- β -D-グルコピラノシル；
- ・ 4-O-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル；
- ・ 3-O-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル；
- ・ 4-O-(2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル)-

(1→3) - O - (β-D-ガラクトピラノシル) - (1→4) - O - β-D-グルコピラノシル;

・ 4 - O - (2 - アセトアミド - 2 - デオキシ - β-D-グルコピラノシル) - (1→4) - O - (β-D-ガラクトピラノシル) - (1→3) - O - β-D-グルコピラノシル;

・ 4 - O - (2 - アセトアミド - 2 - デオキシ - β-D-グルコピラノシル) - (1→3) - O - (β-D-ガラクトピラノシル) - (1→3) - O - β-D-グルコピラノシル;

・ 4 - O - (2 - アセトアミド - 2 - デオキシ - β-D-グルコピラノシル) - (1→4) - O - (β-D-ガラクトピラノシル) - (1→4) - O - β-D-グルコピラノシル;

・ 3 - O - (2 - アセトアミド - 2 - デオキシ - β-D-グルコピラノシル) - (1→3) - O - (β-D-ガラクトピラノシル) - (1→4) - O - β-D-グルコピラノシル;

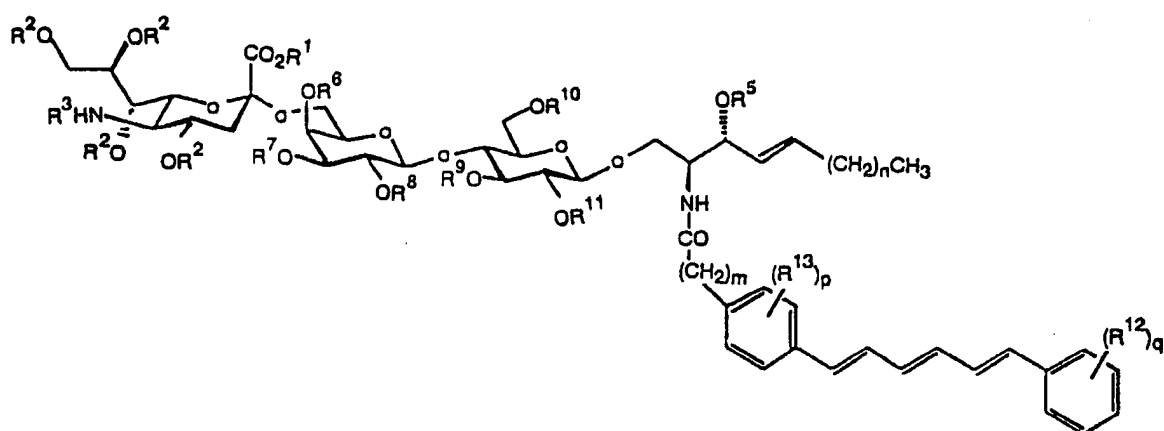
・ 3 - O - (2 - アセトアミド - 2 - デオキシ - β-D-グルコピラノシル) - (1→4) - O - (β-D-ガラクトピラノシル) - (1→3) - O - β-D-グルコピラノシル;

・ 3 - O - (2 - アセトアミド - 2 - デオキシ - β-D-グルコピラノシル) - (1→3) - O - (β-D-ガラクトピラノシル) - (1→3) - O - β-D-グルコピラノシル; 及び

・ 3 - O - (2 - アセトアミド - 2 - デオキシ - β-D-グルコピラノシル) - (1→4) - O - (β-D-ガラクトピラノシル) - (1→4) - O - β-D-グルコピラノシル

からなる群から選ばれるいずれか1種の糖鎖またはその誘導体である請求項1記載の化合物。

3. 下記一般式 (V) :



(V)

〔式中、 m は2～15の整数； n は0～12の整数； p は0～4の整数； q は0～5の整数； R^1 は水素原子又はカルボン酸の保護基を示し； R^2 及び $R^5 \sim R^{11}$ は、互いに同じであっても異なってもよく、各々水素原子、脂肪族あるいは芳香族アシル基または水酸基の保護基を示す。 R^{12} 及び R^{13} は、互いに同じであっても異なってもよく、水素原子、低級アルキル基、脂肪族アシル基、ニトロ基又はニトリル基を示す。 R^3 はアセチル基、グリコリル基またはトリフルオロアセチル基を示す。〕で表される請求項1記載のシアリル ($\alpha 2-6$) ラクトシルセラミド。

4. インフルエンザウイルスを検出するための請求項1～3のいずれかに記載の化合物の使用。

5. 請求項1～3のいずれかに記載の化合物を含むインフルエンザウイルス検出用試薬。

6. 請求項1～3のいずれかに記載の化合物をインフルエンザウイルス検出用試薬として含むインフルエンザウイルス検出用キット。

7. さらにPBS緩衝液、マイクロプレート、赤血球、抗インフルエンザ抗体、ペルオキシダーゼ標識プロテインAを含む請求項6に記載のインフルエンザウイルス検出用キット。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03810

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C07H15/04, G01N/33/566, G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C07H15/04, G01N/33/566, G01N33/569

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 7-309888, A (Daikin Industries, Ltd.), November 28, 1995 (28. 11. 95), Claims & WO, 9532211, A	1 - 7
P,A	US, 5573909, A (Molecular Probe, Inc.), November 12, 1996 (12. 11. 96), Abstract; column 13, lines 34, 35	1 - 7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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 document 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

January 9, 1998 (09. 01. 98)

Date of mailing of the international search report

January 20, 1998 (20. 01. 98)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int cl⁶ C07H15/04, G01N/33/566, G01N33/569

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int cl⁶ C07H15/04, G01N/33/566, G01N33/569

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 7-309888, A (ダイキン工業株式会社) 28. 11月. 1995 (28. 11. 95) 特許請求の範囲 & WO, 9532211, A	1-7
P, A	US, 5573909, A (Molecular Probe, Inc.) 12. 11月. 1996 (12. 11. 96) ABSTRACT, 第13欄第34-35行	1-7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 01. 98

国際調査報告の発送日

20.01.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内藤 伸一

4C

8615

電話番号 03-3581-1101 内線 3452