

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6846509号
(P6846509)

(45) 発行日 令和3年3月24日(2021.3.24)

(24) 登録日 令和3年3月3日(2021.3.3)

(51) Int. Cl.		F I	
C07H 1/00	(2006.01)	C07H	1/00
C07H 7/033	(2006.01)	C07H	7/033
C08B 37/00	(2006.01)	C08B	37/00 J
C08B 37/04	(2006.01)	C08B	37/04

請求項の数 13 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2019-510315 (P2019-510315)	(73) 特許権者	519051779
(86) (22) 出願日	平成28年8月15日 (2016. 8. 15)		上海緑谷製薬有限公司
(65) 公表番号	特表2019-527726 (P2019-527726A)		SHANGHAI GREEN VALLEY PHARMACEUTICAL CO., LTD.
(43) 公表日	令和1年10月3日 (2019. 10. 3)		中華人民共和国201203上海市浦東張江高科技園區牛頓路421号
(86) 国際出願番号	PCT/CN2016/095368		421 Niudun Road, Zhang Jiang Hi-Tech Park, Pudong New Area, Shanghai 201203, China
(87) 国際公開番号	W02018/032272	(74) 代理人	100145403
(87) 国際公開日	平成30年2月22日 (2018. 2. 22)		弁理士 山尾 憲人
審査請求日	令和1年6月27日 (2019. 6. 27)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴマンヌロン二酸の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

オリゴマンヌロン酸を臭素含有酸化剤と接触させる酸化反応工程を含む、オリゴマンヌロン二酸の製造方法であって、該臭素含有酸化剤が、臭素水、液体臭素、次亜臭素酸、次亜臭素酸塩、臭化物イオン源と次亜塩素酸塩との組合せ、および臭素と次亜塩素酸塩との組合せからなる群から選択され、酸化反応の温度が10～40である、製造方法。

【請求項 2】

次亜臭素酸および/または次亜塩素酸塩に基づいて算出される臭素含有酸化剤のモル量が反応原料であるオリゴマンヌロン酸の1.0～2.0倍である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

酸化反応のpHが6.5～9.5になるように制御される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

次亜臭素酸または次亜臭素酸塩がin situでの製造により得られる、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

in situでの製造が臭素とアルカリ水溶液との反応によって達成される、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

アルカリ水溶液が、水酸化ナトリウムまたはリン酸ナトリウムまたは炭酸ナトリウムの水溶液などの、アルカリ金属水酸化物またはアルカリ金属リン酸塩またはアルカリ金属炭酸塩の水溶液である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

次亜臭素酸塩または次亜塩素酸塩が、ナトリウム塩またはカリウム塩などのアルカリ金属塩である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

オリゴマンヌロン酸出発物質が、2 ~ 20 個のマンヌロン酸単位を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

オリゴマンヌロン酸出発物質が、2 ~ 15 個、2 ~ 13 個、3 ~ 12 個、4 ~ 10 個、または 4 ~ 8 個のマンヌロン酸単位を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記オリゴマンヌロン酸が、高い重合度を有するポリマンヌロン酸の分解によって得られる、請求項 8 または 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記分解が酸性条件下での分解である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記ポリマンヌロン酸が、15% (w/v) を超える濃度とポリマンヌロン酸の分解を可能にするために 5.0 未満に調整された pH を有する濃縮溶液として調製される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記ポリマンヌロン酸が 20 以上の重合度を有する、請求項 10 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、重要な生物活性物質であるオリゴマンヌロン二酸の新規な製造方法に関する。本方法は、出発物質として M セグメント中間体を利用し、酸分解と活性化次亜臭素酸化工程により目的物質を得るというものである。

【背景技術】

【0002】

オリゴマンヌロン二酸は、その潜在的な医薬的価値により広く注目されている。オリゴマンヌロン二酸は、典型的には、原料のアルギン酸から多段階で製造される。

【0003】

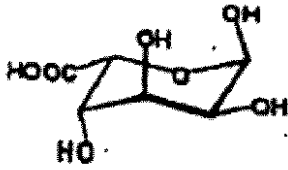
原料であるアルギン酸の多糖分子は、-1,4-グルコシド結合を介して D-マンヌロン酸から形成される M セグメント、-1,4-グルコシド結合を介して L-グルロン酸から形成される G セグメント、およびこの 2 つの糖のハイブリダイゼーションにより形成される MG セグメントを含んでいる。それらの構造式を以下に示す。

10

20

30

【化1】

(M ; β -D-マンヌロン酸)(G ; α -L-グルロン酸)

10

【0004】

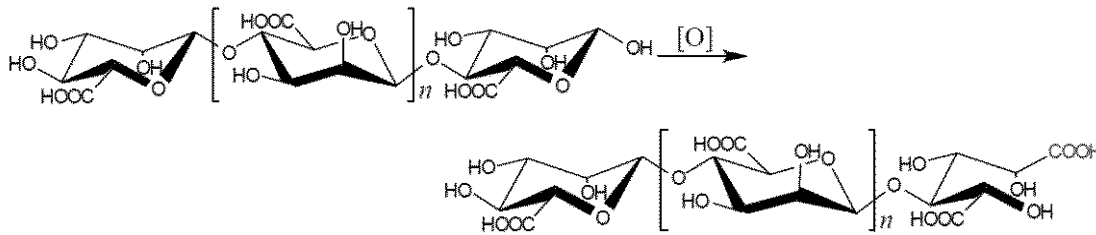
MセグメントおよびGセグメントは、原料のアルギン酸から単離することができる。典型的な方法は以下の通りである：アルギン酸を予め分解してポリマンヌロン酸とポリグルロン酸の混合多糖を生成させ；次いで、この混合多糖を酸性法により沈殿させてその中のポリグルロン酸を除去し、さらに精製して純度90%を超えるホモポリマンヌロン酸（以下「Mセグメント中間体」と呼ぶ）を得る。例えば、中国特許出願第98806637.8号およびCN02823707.2号に開示されている方法を参照することができる。

【0005】

Geng Meiyuらの中国特許出願第200580009396.5号および米国特許US8835403B2は、オリゴマンヌロネートの誘導体であるマンヌロン二酸が重要な薬学的価値を有することを開示している。マンヌロン二酸のための反応プロセスは、以下のスキーム（I）によって説明される。すなわち、オリゴマンヌロン酸の多糖還元末端のマンヌロン酸のC1位のアルデヒド基がカルボキシル基に酸化される。

20

【化2】



30

【0006】

上記の酸化に使用される酸化剤としては、米国特許第8835403号におけるような、アルカリ硫酸銅溶液、すなわちフェーリング溶液が挙げられる。具体的には、アルカリ条件下で、反応基質であるオリゴマンヌロン酸を硫酸銅溶液に加え、沸騰水浴中で15分から2時間反応させる。このような方法では、 Cu^{2+} イオンがアルデヒド基を酸化するための酸化剤として用いられ、反応中に赤レンガ色の酸化第一銅の沈殿が生成する。この反応は通常、還元糖を同定するために用いられる。

40

【0007】

グルコースをグルコン酸に酸化する反応も同様である。これらの反応は3つのタイプに分類することができる。第1のタイプは、生物学的発酵または酵素的酸化によるものであり、例えば中国特許第96119169.4号に記載の、*Aspergillus niger*等による発酵、米国特許第5,962,286号、第5,017,485号、および第5,190,869号に記載の、グルコン酸を生産する微生物発酵、および例えば米国特許第6,942,997号、第5,897,995号、および第3,935,071号に記載のグルコース酸化法が挙げられる。第2のタイプとしては、重金属触媒酸化によるもの：米国特許第5,132,452号および第4,843,173号に記載されているような、グルコン酸を製造するためのパラジウム触媒酸化が挙げられる。第3のタイプは化学試薬による

50

もの：中国特許第2011103384029号に記載されているような、グルコン酸を製造するための、過酸化水素によるグルコースの酸化が挙げられる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかしながら、上記方法にはいくつかの欠点がある。例えば、長い製造時間や生物学的発酵および酵素触媒のための高いコスト；重金属触媒は失活し易く、重金属の残留物が混入し易い；水酸化銅または過酸化水素の反応に約100の高温が必要、多くの副反応、および低い収率（<50%）がある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

発明の要約

本発明者らは、特定の酸化剤を使用することによって、反応収率が大幅に改善され、オリゴマンヌロン二酸を生成する反応速度が速くなり、そして副反応が少なくなることを見出した。この反応は、十分なメタノールまたはエタノールを反応生成物に加えることにより終了し、油状の沈殿物を得ることができる。油状物質は、分液漏斗で単離し乾燥する。単糖類、塩類、および有機酸不純物を除去するために精製が必要な場合は、透析またはカラムクロマトグラフィーによる簡単な操作をさらに行うことができる。

【0010】

本発明は特に、原料としてのMセグメント中間体の酸化によるオリゴマンヌロン二酸の製造方法に関する。具体的には、Mセグメント中間体を分解してMセグメントオリゴ糖（本明細書では「オリゴマンヌロン酸」とも呼ばれる）とし、これをさらに、臭素水や活性次亜臭素酸塩などの、次亜臭素酸として機能し得る臭素含有物質を酸化剤として、酸化することにより、オリゴマンヌロン二酸に変換する。

【0011】

本発明の第1の態様は、オリゴマンヌロン酸を臭素含有酸化剤と接触させる酸化反応工程を含む、オリゴマンヌロン二酸の製造方法を提供する。特に、本発明のための臭素含有酸化剤は、臭素水、液体臭素、次亜臭素酸、次亜臭素酸塩、臭化物イオン源と次亜塩素酸塩との組合せ、および臭素と次亜塩素酸塩との組合せからなる群から選択される。これらの酸化剤は、臭素イオンまたは次亜臭素酸イオンによって機能する。本発明の一実施形態では、次亜臭素酸および/または次亜塩素酸塩として計算される臭素含有酸化剤のモル量は、反応の原料であるオリゴマンヌロン酸の1.0~2.0倍である。

【0012】

本発明の別の態様は、還元オリゴ糖または多糖の酸化における、臭素イオンまたは次亜臭素酸イオン（BrO⁻）を介して機能する酸化剤の使用に関する。

【0013】

本発明のオリゴマンヌロン二酸の製造方法は、穏やかな反応条件を使用することができ、副反応がほとんどなく、さらなる精製を必要とせず、90%を超える、さらには95%を超える収率を達成することができる。本発明の酸化反応は、反応速度が速く、収率が高く、室温で反応が進行し、自動制御を実施するのが容易な反応プロセスにて、オンライン連続反応装置での製造に適している。選択された酸化剤は、費用効果が高く、取り扱いが容易であり、大規模製造に適している。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、本発明における原料であるMセグメント中間体の核磁気共鳴分光法（¹H-NMR）を示す。

【図2】図2は、臭素水による酸化から得られたオリゴマンヌロン二酸のSEC-HPLCグラフを示す。

【図3】図3は、液体臭素による酸化から得られたオリゴマンヌロン二酸のSEC-HPLCグラフを示す。

10

20

30

40

50

【図4】図4は、NaBrOを用いた酸化から得られたオリゴマンヌロン二酸のSEC-HPLCグラフを示す。

【図5】図5は、臭化ナトリウムによって触媒された次亜塩素酸ナトリウムの酸化から得られたオリゴマンヌロン二酸のSEC-HPLCグラフを示す。

【図6】図6は、臭素-次亜塩素酸ナトリウムによる酸化から得られたオリゴマンヌロン二酸のSEC-HPLCグラフを示す。

【図7A】図7Aは、(臭素水-次亜塩素酸ナトリウムによる)酸化前のマンヌロン酸のヘキソース部分のLC-MSグラフを示す。

【図7B】図7Bは、(臭素水-次亜塩素酸ナトリウムによる)酸化後のマンヌロン酸のヘキソース部分のLC-MSグラフを示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本明細書で使用される「約」という用語は、その用語で修飾された値の±5%の範囲内に入ること、好ましい実施形態では、その用語で修飾された値の±3%の範囲内に入ること、そして、より好ましい実施形態では、この用語で修飾された値の±1%の範囲内に入ることの意味する。

【0016】

Mセグメント中間体の調製

本発明において使用される原料であるMセグメント中間体は、先行技術において知られている方法、例えば、中国特許出願第98806637.8号およびCN02823707.2号に開示されている方法によって調製することができる。これらの方法について簡単に説明すると以下のとおりである：まずアルギン酸を分解してポリマンヌロン酸とポリグルロン酸の混合多糖とし；次いで、この混合多糖を酸性法により沈殿させてその中のポリグルロン酸を除去し、さらに精製して90%を超える純度のホモポリマンヌロン酸を得る。

【0017】

本方法によって調製されるMセグメント中間体は、約10KDaの分子量を有し、その構造は、図1に示されるように、¹H-NMRスペクトル(¹H-NMR)により確認される。特定の実施形態では、¹H-NMRスペクトルにおける4.5ppmの化学シフト値付近に、末端プロトンのシグナルが1つのみあり、これはマンヌロン酸のC1位の1Hに帰属し、そして、3.5ppmから3.9ppmの間には4つの水素シグナルがあり、それらはC2-C5における4つの¹Hシグナルに帰属する。このようにして得られたMセグメント中間体は、次の工程の反応に直接使用することができる。

【0018】

好ましい実施形態では、本発明に適したMセグメント中間体は、60%を超える、好ましくは70%を超える、より好ましくは80%を超える純度、および1~15KDa、好ましくは2~12KDa、およびより好ましくは4~10KDaの範囲の分子量を有する。

【0019】

Mセグメントオリゴ糖の調製

Mセグメント中間体は、酸化すべきMセグメントオリゴ糖を得るための酸分解の原料として使用される。Mセグメント中間体は、水に溶解して15%(w/v)を超える濃度の濃縮溶液とした後、酸分解に付される。好ましくは、この溶液は、20%(w/v)を超える、より好ましくは25%(w/v)を超える濃度を有する。

【0020】

その後、この溶液のpHを酸性、好ましくはpH5未満、より好ましくはpH4未満、最も好ましくはpH3.5未満に調整する。この溶液は、高温高压下での分解に付され、室温に自然冷却される。

【0021】

酸分解は、高温高压条件下で行われる。温度は、95~150、好ましくは100~

10

20

30

40

50

130、さらに好ましくは105～120である。圧力は、0.10～0.50 MPa、好ましくは0.10～0.28 MPa、さらに好ましくは0.15～0.20 MPaである。

【0022】

分解後の溶液を濃縮し、蒸発させ、乾燥させて無水の固体を得る。

【0023】

Mセグメントオリゴ糖は、二糖～十三糖の混合物を含んでなり、ここで、二糖～十三糖の混合物の重量基準で、二糖～四糖は約40～60%、好ましくは50%；五糖～十糖は約30～50%、好ましくは40%；十一糖～十三糖は約5～15%、好ましくは約10%を占める。

10

【0024】

活性な次亜臭素酸塩による酸化工程

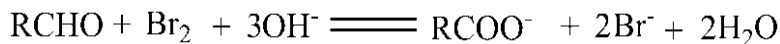
前の工程で調製された無水Mセグメントオリゴ糖を酸化して、本発明のオリゴマンノロン二酸を製造する。この工程で使用される酸化剤は臭素含有酸化剤である。具体的には、この臭素含有酸化剤は、臭素水、液体臭素、次亜臭素酸、次亜臭素酸塩、臭化物イオン源と次亜塩素酸塩との組合せ、および臭素と次亜塩素酸塩との組合せからなる群から選択される。次亜臭素酸塩または次亜臭素酸イオンは安定ではないので、本発明の方法で使用される次亜臭素酸塩は、反応系において、*in situ*で生成させることができ、または反応溶液に添加する前にその場で調製することができる。

【0025】

20

本発明の一実施形態では、酸化剤として臭素水または液体臭素が使用される。臭素水は市販品として供給業者から入手可能である。一般に市販されている臭素水は3%の濃度である。

【化3】



【0026】

本発明の一実施形態では、酸化剤として次亜臭素酸塩が使用される。次亜臭素酸塩は、次亜臭素酸ナトリウムおよび/または次亜臭素酸カリウムであり得る。次亜臭素酸塩は、液体臭素およびアルカリを反応媒体に加えることによって、*in situ*で調製される。例えば、液体臭素とNaOHまたはKOHとの混合物から調製される。

30

【0027】

一例として次亜臭素酸ナトリウムを取り上げると、このようにして行われる酸化反応の化学式は以下の通りである。

【化4】



【0028】

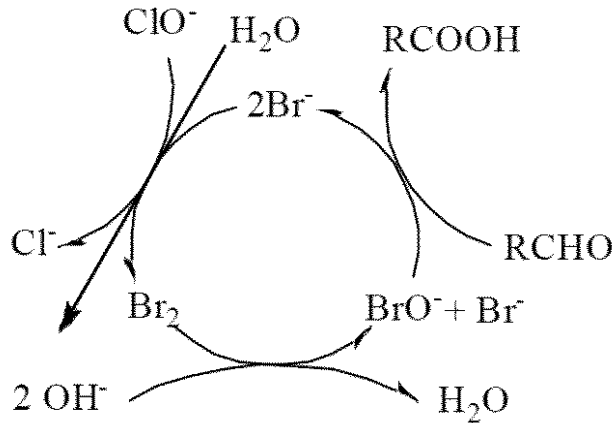
40

本発明の別の実施形態では、次亜臭素酸塩は、金属臭化物と次亜塩素酸ナトリウムまたは次亜塩素酸カリウムとの反応の進行によって*in situ*で調製することができる。反応の間に反応溶液は褪色し、その後徐々に赤褐色となり、 Br_2 の生成を示す。反応の進行とともに色は薄くなる。一例として次亜塩素酸ナトリウムを取り上げると、このようにして行われる酸化反応の化学式は以下の通りである。

【化5】



反応メカニズム



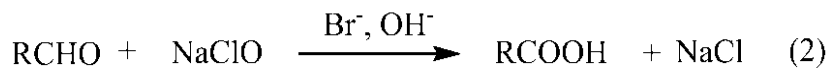
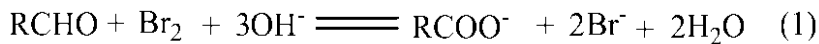
10

【0029】

あるいは、別の実施形態では、次亜臭素酸塩は、臭素水と次亜塩素酸ナトリウムまたは次亜塩素酸カリウムとを反応させることによって、*in situ*で調製することができる。一例として次亜塩素酸ナトリウムを取り上げると、反応は以下の通りである。

20

【化6】



【0030】

この実施形態では、添加された臭素によって、原料であるオリゴマンヌロン酸の一部が酸化されて臭化物イオンを生じ；この臭化物イオンが、次亜塩素酸ナトリウムを触媒し、反応が完了するまで未反応の原料が連続的に反応する。

30

【0031】

本発明の酸化工程は、pH 6 ~ 10、好ましくはpH 6.5 ~ 9.6、より好ましくはpH 7.5 ~ 9.5で行われる。本発明の酸化工程は、好ましくは0 ~ 70、より好ましくは10 ~ 45の温度で行われる。

【0032】

このようにして製造されたオリゴマンヌロン二酸は精製してもよい。例えば、沈殿させるため、エタノールまたはメタノールなどのアルコールを使用することができる。次いで、沈殿物を再溶解し、2回目のアルコール沈殿に付す。油状の沈殿物は、分液漏斗で単離する。この油状の沈殿物を乾燥して所望のオリゴマンヌロン二酸を得る。生成物中に残留する単糖類、有機酸不純物、および無機塩をさらに除去するためにさらに精製が必要な場合は、膜透析またはカラムクロマトグラフィーを行ってもよい。これらの操作は、当業者に知られている。以下に記載する実施例でそれらの実施形態のいくつかを説明する。

40

【0033】

本発明の別の態様は、還元オリゴ糖または多糖の酸化において臭素イオンまたは次亜臭素酸イオン (BrO^-) によって機能する酸化剤の使用を提供し、ここで酸化剤は、臭素水、液体臭素、*in situ*で次亜臭素酸塩を生じる混合物、次亜塩素酸塩と金属臭化物の組み合わせ、および臭素 - 次亜塩素酸ナトリウムの組み合わせからなる群から選択される。

【0034】

一実施形態において、還元オリゴ糖または多糖の還元末端にある糖環 (saccharide ring) のC1位のアルデヒド基またはヘミアセタールは、カルボキシル基に酸化されて、対

50

応する糖酸または糖二酸を生じる。一実施形態では、還元オリゴ糖または多糖は、ポリマンヌロン酸およびポリグルロン酸からなる群から選択され、好ましくはポリマンヌロン酸である。

【0035】

本発明の利点は、以下の非限定的な実施例においてさらに説明される。但し、実施例において用いられる特定の材料やその量ならびに他の実験条件によって本発明は限定されないということは理解されるであろう。特記しない限り、本発明における部、比率、百分率などは、重量基準である。

【実施例】

【0036】

10

実施例 1

工程 1) : Mセグメントオリゴ糖の調製

1500 g の Mセグメント中間体を秤量し、蒸留水で溶解して7500 mL の溶液とした。この溶液を、濃塩酸で pH 3.5 に調整し、いくつかに分け、オートクレーブに入れて110 で3.5 時間加熱し、冷却して取り出し、ロータリーエバポレーターで濃縮し、真空オープン中60 にて乾燥し、1515 g の Mセグメントオリゴ糖を得た。

この Mセグメントオリゴ糖を HPLC - MS により定性分析した。HPLC 条件 : クロマトグラフィーカラム、Waters ACQUITY UPLC BEH 125 SEC 1.7 μm、4.6 × 300 mm ; 移動相 : 20%メタノール - 水に溶解した50 mM NH₄Ac、流速0.1 mL / 分 ; 試料濃度 : 1 mg / mL ; 注入量 : 8 μl ; カラムインキュベーター温度 : 30 ; 検出器 : DAD 検出器、210 nm。MS 条件 : Agilent 6540 QTOF ; イオン源 : ESI ; フラグメンテーション電圧 : 120 V ; アニオンモード

20

酸分解によって得られた Mセグメントオリゴ糖生成物は全てオリゴマンヌロン酸であり、これらは主に二糖 ~ 十三糖であった。二糖 ~ 十三糖までの MS 解析を、以下の表 1 の左半分に示す。

【0037】

工程 2) : オリゴマンヌロン二酸の調製

100 g の上記無水 Mセグメントオリゴ糖を 5 L のガラスビーカーに入れ、1 L の蒸留水で溶解し、1 L の 1 M Na₂HPO₄ を加え、濃塩酸で pH 8.0 に調整した。3.3 L の市販の 3% 臭素水を攪拌しながら室温 (20) で 10 分以内にゆっくり加えた。反応が完了するまで混合物を 2 時間連続的に攪拌した。

30

反応後の溶液を、4 L の 95% エタノールを入れたプラスチック製のバケツに注ぎ、穏やかに攪拌した後 1 時間静置した。静置して層ができたなら、上澄み液を除去し、下層に適量の 95% エタノールを加えて脱水した。下層の黄褐色の油状物を集め、真空オープン (60) 中、12 時間減圧乾燥して、125 g のオリゴマンヌロン二酸である乾燥した酸化生成物を得た。この乾燥したオリゴマンヌロン二酸を少量取り、正確に秤量して 5.0 g とし、これに水を加えて溶解させて 10% 溶液を調製した。この溶液を、分画分子量 1000 Da の透析バッグを用いた透析によって脱塩し、単糖も除去した。脱塩後にこれを濃縮、乾燥し、秤量すると 3.8 g であった。酸化反応の原料である 100 g の Mセグメントオリゴ糖から計算すると、脱塩乾燥後のオリゴマンヌロン二酸の収率は 95.0% であった。

40

脱塩乾燥後の上記の生成物を、HPLC - MS により定性分析した。HPLC 条件 : クロマトグラフィーカラム、Waters ACQUITY UPLC BEH 125 SEC 1.7 μm、4.6 × 300 mm ; 移動相 : 20%メタノール - 水に溶解した50 mM NH₄Ac、流速0.1 mL / 分 ; 試料濃度 : 1 mg / mL ; 注入量 : 8 μl ; カラムインキュベーター温度 : 30 ; 検出器 : DAD 検出器、210 nm。MS 条件 : Agilent 6540 QTOF ; イオン源 : ESI ; フラグメンテーション電圧 : 120 V ; アニオンモード。酸化反応の完全性は 95% 以上であり、さらなる副反応は起こらなかった。脱塩操作により、大部分の単糖および少量の二糖が除去された。酸化生成物であるオリゴマンヌ

50

ロン二酸の二糖～十三糖までのMS解析を、以下の表1の右半分に示す。

【0038】

【表1】

表1 オリゴマンヌロン酸およびその酸化生成物のMS解析

オリゴマンヌロン酸	m/z	シグナルの帰属	オリゴマンヌロン二酸	m/z	シグナルの帰属
二糖	739.14	[2M-H] ⁻	二糖	771.14	[2M-H] ⁻
	369.07	[M-H] ⁻		385.07	[M-H] ⁻
三糖	545.10	[M-H] ⁻	三糖	561.10	[M-H] ⁻
				280.05	[M-2H] ²⁻
四糖	721.13	[M-H] ⁻	四糖	737.12	[M-H] ⁻
	360.06	[M-2H] ²⁻		368.06	[M-2H] ²⁻
五糖	897.17	[M-H] ⁻	五糖	913.15	[M-H] ⁻
	448.08	[M-2H] ²⁻		456.07	[M-2H] ²⁻
六糖	1073.20	[M-H] ⁻	六糖	1089.21	[M-H] ⁻
	536.09	[M-2H] ²⁻		544.10	[M-2H] ²⁻
七糖	1249.23	[M-H] ⁻	七糖	1265.21	[M-H] ⁻
	624.11	[M-2H] ²⁻		632.10	[M-2H] ²⁻
八糖	712.13	[M-2H] ²⁻	八糖	1441.28	[M-H] ⁻
				720.14	[M-2H] ²⁻
九糖	1601.97	[M-H] ⁻	九糖	1617.30	[M-H] ⁻
	800.14	[M-2H] ²⁻		808.15	[M-2H] ²⁻
				538.43	[M-3H] ³⁻
十糖	888.16	[M-2H] ²⁻	十糖	896.17	[M-2H] ²⁻
				597.11	[M-3H] ³⁻
十一糖	976.17	[M-2H] ²⁻	十一糖	984.19	[M-2H] ²⁻
	650.45	[M-3H] ³⁻		655.79	[M-3H] ³⁻
十二糖	1064.69	[M-2H] ²⁻	十二糖	1072.20	[M-2H] ²⁻
	709.13	[M-3H] ³⁻		714.47	[M-3H] ³⁻
				535.60	[M-4H] ⁴⁻
十三糖	1152.70	[M-2H] ²⁻	十三糖	1160.72	[M-2H] ²⁻
	768.14	[M-3H] ³⁻		773.15	[M-3H] ³⁻
				579.61	[M-4H] ⁴⁻

【0039】

実施例2

実施例1で調製した100gのMセグメントオリゴ糖を5リットルのガラスビーカーに入れ、1リットルの蒸留水で溶解し、1リットルの1M Na₂HPO₄を添加し、濃塩酸でpH6.5に調整し、水浴中で40℃に加熱し、攪拌した。1.7Lの市販の3%臭素

10

20

30

40

50

水を10分以内にゆっくり加えた。3時間連続して撹拌した後、2倍量の95%エタノールを添加することにより反応を停止させ、生成物を沈殿させた。沈殿物を適量の水で溶解し、アルコール沈殿操作を1回繰り返した。最後に、沈殿物を真空オープン中で乾燥して、96gの褐色レンガ色の固体を約96%の収率で得た。実施例1と同じ実験条件で、固体物質の組成をHPLC-MSにより分析した。SEC-HPLCの分析結果を図2Aに示す。

【0040】

実施例3

実施例1で調製した100gのMセグメントオリゴ糖を5Lのガラスビーカーに入れ、1Lの蒸留水で溶解し、1Lの1M Na_2HPO_4 を加え、濃塩酸でpH9.5に調整し、適量の氷を加えることにより水浴中で10℃に冷却し、撹拌した。4.7Lの市販の3%臭素水を10分以内にゆっくり加えた。1時間連続して撹拌した後、2倍量の95%エタノールを添加することにより反応を停止させ、生成物を沈殿させた。沈殿物を適量の水で溶解し、アルコール沈殿操作を1回繰り返した。最後に、沈殿物を真空オープン中で乾燥させて94gの褐色レンガ色の固体を約94%の収率で得た。実施例1と同じ実験条件で、固体物質の組成をHPLC-MSにより分析した。SEC-HPLC分析結果を図2Bに示す。

【0041】

実施例4

実施例1で調製した100gのMセグメントオリゴ糖を500mLの1M Na_2HPO_4 緩衝液に溶解し、塩酸でpH8.0に調整し、氷水浴中で撹拌して冷却し、100g(約35mL)の液体臭素(商業的に入手可能、含有量>99%)をゆっくり加えた。液体臭素を滴加しながら、適量の6M NaOH を補充した。反応溶液のpHをpH試験紙で試験して7~9の間になるようにコントロールした。液体臭素の滴加が完了した後、氷水浴を取り外した。室温(23℃)で1.5時間撹拌した後、2倍量の95%エタノールを加えて反応を停止させ、生成物を沈殿させた。沈殿物を適量の水で溶解し、アルコール沈殿操作を1回繰り返した。最後に、沈殿物を真空オープン中で乾燥させて、97gの褐色レンガ色の固体を約97%の収率で得た。実施例1と同じ実験条件で、固体物質の組成をHPLC-MSにより分析した。SEC-HPLCの分析結果を図3Aに示す。

【0042】

実施例5

実施例1で調製した100gのMセグメントオリゴ糖を500mLの1M Na_2HPO_4 緩衝液に溶解し、塩酸でpH6.5に調整し、氷水浴中で撹拌して冷却し、60g(約20mL)の液体臭素(商業的に入手可能、含有量>99%)をゆっくり加えた。液体臭素を滴加しながら、適量の6M NaOH を補充した。反応溶液のpHをpH試験紙で試験して7~9の間になるようにコントロールした。液体臭素の滴加が完了した後、氷水浴を取り外した。水浴中で40℃に加熱し、3時間撹拌した後、2倍量の95%エタノールを添加することにより反応を停止させ、生成物を沈殿させた。沈殿物を適量の水で溶解し、アルコール沈殿操作を1回繰り返した。最後に、沈殿物を真空オープン中で乾燥させて94gの褐色レンガ色の固体を約94%の収率で得た。実施例1と同じ実験条件で、固体物質の組成をHPLC-MSにより分析した。SEC-HPLCの分析結果を図3Bに示す。

【0043】

実施例6

実施例1で調製した100gのMセグメントオリゴ糖を500mLの1M Na_2HPO_4 緩衝液に溶解し、塩酸でpH9.5に調整し、氷水浴中で撹拌して冷却し、150g(約50mL)の液体臭素(市販、含有量>99%)をゆっくり加えた。液体臭素を滴加しながら、適量の6M NaOH を補充した。反応溶液のpHをpH試験紙で試験して7~9の間になるようにコントロールした。液体臭素の滴加が完了した後、氷水浴を取り外した。氷が溶けた後に温度が10℃になるよう適量の氷を水浴に添加し、必要であれば適宜

10

20

30

40

50

水を補充して温度を10℃にコントロールした。1時間攪拌した後、2倍量の95%エタノールを添加することにより反応を停止させ、生成物を沈殿させた。沈殿物を適量の水で溶解し、アルコール沈殿操作を1回繰り返した。最後に、沈殿物を真空オーブン中で乾燥して、93gの褐色レンガ色の固体を約93%の収率で得た。実施例1と同じ実験条件で、固体物質の組成をHPLC-MSによって分析した。SEC-HPLCの分析結果を図3Cに示す。

【0044】

実施例7

実施例1で調製した100gのMセグメントオリゴ糖を500mLの1M Na_2HPO_4 緩衝液に溶解し、塩酸でpH8.0に調整してMセグメントオリゴ糖溶液を得た。1000mLの6M NaOH 溶液を調製し、氷水浴中で冷却した。液体臭素も氷水浴中で予め冷却した。反応時に、 NaOH 溶液を液体臭素と反応させて次亜臭素酸ナトリウムを生成させ、次いで次亜臭素酸ナトリウムをMセグメントオリゴ糖と反応させた。

次亜臭素酸ナトリウムは安定ではないので、使用直前に調製する必要があった。このようにしてオンライン連続反応装置を適用した：反応装置は、冷却器を備えた混合反応器Aと、混合反応器Bとを含み、それぞれ容積50mLおよび100mLであり、予め蒸留水で満たした；-10℃の冷却液を反応器Aの冷却管に通しながら、 NaOH 溶液と液体臭素とを別々に、手で、プラスチックシリンジにてそれぞれ5mL/分および1mL/分の一定速度で、連続的に送り込んだ； NaOH 溶液と液体臭素を混合反応器A中で一定時間反応させた後、得られた NaBrO を反応器Aから排出して反応器Bに導入し、室温で反応器Bにポンプ輸送（流速10mL/分）したMセグメントオリゴ糖溶液と反応させた。生成物のオリゴマンヌロン二酸は16mL/分の速度で混合反応器Bから排出した。排出液を800mLの95%エタノールを含むビーカーに回収した。

反応終了後、ビーカー内の下層にある黄褐色の油状沈殿物を回収し、適量の水で溶解した後、再度アルコール沈殿操作を行い、真空オーブン中で減圧乾燥（60℃、12時間）した後に約90%の収率で90gの褐色の固体を得た。HPLC-MS分析のために少量の乾燥生成物を取った。SEC-HPLCの分析結果を図4Aに示す。

【0045】

実施例8

実施例1で調製した100gのMセグメントオリゴ糖を500mLの1M Na_2HPO_4 緩衝液に溶解し、塩酸でpH6.5に調整した。1000mLの6M NaOH 溶液を調製し、氷水浴中で冷却した。液体臭素も氷水浴中で予め冷却した。反応を実施するため、 NaOH 溶液を液体臭素と反応させて次亜臭素酸ナトリウムを生成させ、これを次いでMセグメントオリゴ糖と反応させた。

反応装置は実施例7と同じであった。NaOH溶液および液体臭素が反応器Aに入るときの流速は、それぞれ3mL/分および0.6mL/分であった；反応器B中のMセグメントオリゴ糖溶液の流速は10mL/分であった。水浴で温度を40℃にすることにより反応を制御した。生成物のオリゴマンヌロン二酸は14mL/分の速度で混合反応器Bから排出した。排出液を800mLの95%エタノールを含むビーカーに回収した。反応終了後、ビーカー内の下層にある黄褐色の油状沈殿物を回収し、適量の水で溶解した後、再度アルコール沈殿操作を行った。最後に、沈殿物を真空オーブン中で減圧乾燥し（60℃、12時間）、93gの褐色の固体を約93%の収率で得た。HPLC-MS分析のために少量の乾燥生成物を取った。SEC-HPLCの分析結果を図4Bに示す。

【0046】

実施例9

実施例1で調製した100gのMセグメントオリゴ糖を500mLの1M Na_2HPO_4 緩衝液に溶解し、塩酸でpH9.5に調整してMセグメントオリゴ糖溶液を得た。1000mLの6M NaOH 溶液を調製し、氷水浴中で冷却した。液体臭素も氷水浴中で予め冷却した。反応を行うために、まずNaOH溶液を液体臭素と反応させて次亜臭素酸ナトリウムを生成させ、これを次いでMセグメントオリゴ糖と反応させた。

反応装置は実施例7と同じであった。NaOH溶液および液体臭素が反応器Aに入るときの流速はそれぞれ7.5 mL/分および1.5 mL/分であった。反応器B中のMセグメントオリゴ糖溶液の流速は10 mL/分であった。反応温度を10℃に制御した。生成物のオリゴマンヌロン二酸は19 mL/分の速度で混合反応器Bから排出した。排出液を800 mLの95%エタノールを含むビーカーに回収した。反応終了後、ビーカー内の下層にある黄褐色の油状沈殿物を回収し、適量の水で溶解した後、再度アルコール沈殿操作を行った。最後に、沈殿物を真空オーブン中で減圧乾燥し(60℃、12時間)、94 gの褐色の固体を約94%の収率で得た。HPLC-MS分析のために少量の乾燥生成物を取った。SEC-HPLCの分析結果を図4Cに示す。

【0047】

10

実施例10

実施例1で調製した100 gのMセグメントオリゴ糖を500 mLの1 M Na₂HPO₄緩衝液に溶解し、塩酸でpH 7.5に調整し、20 gの臭化ナトリウムを加えて攪拌しながら溶解し、50 mLの次亜塩素酸ナトリウム(市販、13%溶液として)を室温(18℃)で滴加した。反応溶液が褪色した後、徐々に赤褐色となった。反応が一定時間進行した後に色は薄くなった。反応が3時間進行した後、色はオレンジ-黄色になった。

反応溶液を95%エタノール600 mLの入ったビーカーに注ぎ、均一に混合した後、層ができるまで静置した。下層の液を適量の水で溶解し、2倍量の95%エタノールを用いて再沈殿した後、真空オーブン中60℃で12時間減圧乾燥した。乾燥後、97 gの褐色の固体が約97%の収率で得られた。HPLC-MS分析のために少量を取った。SEC-HPLCの分析結果を図5Aに示す。

20

【0048】

実施例11

実施例1で調製した100 gのMセグメントオリゴ糖を500 mLの1 M Na₂HPO₄緩衝液に溶解し、塩酸でpH 6.5に調整し、20 gの臭化ナトリウムを加えて攪拌しながら溶解し、25 mLの次亜塩素酸ナトリウム(市販、13%溶液として)を40℃にて滴加した。反応溶液が褪色した後、徐々に赤褐色となった。反応が一定時間進行した後に色は薄くなった。反応が3時間進行した後、色はオレンジ-黄色になった。反応溶液を95%エタノール600 mLの入ったビーカーに注ぎ、均一に混合した後、層ができるまで静置した。下層の液を適量の水で溶解し、2倍量の95%エタノールを用いて再沈殿した後、真空オーブン中60℃で12時間減圧乾燥した。乾燥後、90 gの褐色の固体が約90%の収率で得られた。HPLC-MS分析のために少量を取った。SEC-HPLCの分析結果を図5Bに示す。

30

【0049】

実施例12

実施例1で調製した100 gのMセグメントオリゴ糖を500 mLの1 M Na₂HPO₄緩衝液に溶解し、塩酸でpH 9.5に調整し、20 gの臭化ナトリウムを加えて攪拌しながら溶解し、75 mLの次亜塩素酸ナトリウム(市販の13%溶液)を40℃にて滴加した。反応溶液が褪色した後、徐々に赤褐色となった。反応が一定時間進行した後に色が薄くなった。反応が1時間進行した後、色はオレンジ-黄色になった。反応溶液を95%エタノール600 mLの入ったビーカーに注ぎ、均一に混合した後、層ができるまで静置した。下層の液を適量の水で溶解し、2倍量の95%エタノールを用いて再沈殿した後、真空オーブン中60℃で12時間減圧乾燥した。乾燥後、96 gの褐色固体が約96%の収率で得られた。HPLC-MS分析のために少量を取った。SEC-HPLCの分析結果を図5Cに示す。

40

【0050】

実施例13

実施例1で調製した100 gのMセグメントオリゴ糖を、塩酸でpH 8.5に調整した500 mLの1 MのNa₂HPO₄緩衝液に溶解し、室温で攪拌しながら10 mLの液体臭素を滴加した。この後、反応物に35 mLの次亜塩素酸ナトリウム(市販、13%溶液と

50

して)をさらに加えた。反応は1時間進行した。反応終了後、2倍量の95%エタノールを加えて反応を停止させ、層ができるまで静置した。下層の黄褐色の油状沈殿物を適量の水で溶解した後、再度アルコール沈殿操作を行った。最後に、沈殿物を真空オープン内で減圧乾燥して、91gの固形物を約91%の収率で得た。HPLC-MS分析のために少量のサンプルを採取した。SEC-HPLCの分析結果を図6Aに示す。

【0051】

実施例14

実施例1で調製した100gのMセグメントオリゴ糖を500mLの1M Na_2HPO_4 緩衝液に溶解し、塩酸でpH6.5に調整し、水浴中で40℃に加熱し、攪拌しながら8mLの液体臭素を滴加した。その後、反応物に次亜塩素酸ナトリウム(市販、濃度13%)20mLをさらに加えた。反応は3時間進行した。反応過程は実施例13において式(V)として示された。添加された臭素は、原料であるオリゴマンヌロン酸の一部を酸化して臭化物イオンを生じた;この臭化物イオンが次亜塩素酸ナトリウムを触媒し、反応が完了するまで未反応の原料が連続的に反応した。反応終了後、2倍量の95%エタノールを加えて反応を停止させ、層ができるまで静置した。下層の黄褐色の油状沈殿物を適量の水で溶解した後、再度アルコール沈殿操作を行った。最後に、沈殿物を真空オープン中で減圧乾燥して、96gを約96%の収率で得た。HPLC-MS分析のために少量のサンプルを採取した。SEC-HPLCの分析結果を図6Bに示す。

【0052】

実施例15

実施例1で調製した100gのMセグメントオリゴ糖を500mLの1M Na_2HPO_4 緩衝液に溶解し、塩酸でpH9.5に調整し、その間水浴中に氷を加えることにより温度を10℃に制御し、攪拌しながら15mLの液体臭素を滴加した。その後、反応物に次亜塩素酸ナトリウム50mL(市販、濃度13%)をさらに加えた。反応は0.5時間進行した。反応過程は実施例13において式(V)として示された。添加された臭素は原料のオリゴマンヌロン酸の一部を酸化し、臭化物イオンを生じた;この臭化物イオンが次亜塩素酸ナトリウムを触媒し、反応が完了するまで未反応の原料が連続的に反応した。反応終了後、2倍量の95%エタノールを加えて反応を停止させ、層ができるまで静置した。下層の黄褐色の油状沈殿物を適量の水で溶解した後、再度アルコール沈殿操作を行った。最後に、沈殿物を真空オープン中で減圧乾燥して、94gの固形物を約94%の収率で得た。HPLC-MS分析のために少量のサンプルを採取した。SEC-HPLCの分析結果を図6Cに示す。

【0053】

実施例16

実施例1で調製した10gのMセグメントオリゴ糖を水に溶解して0.1g/mLとし、Bio-Gel P6ゲルクロマトグラフィーカラムを用いて単離し、0.02M NaClで溶出し、UV210nmで検出し、自動コレクターにより回収した。同じ成分を混合し、Bio-Gel P6ゲルクロマトグラフィーカラムを用いて脱塩し、乾燥して10個のオリゴ糖成分を得た。それらの一つのオリゴ糖成分をHexaMとしてマークした。HexaMをHPLC-MSによって分析したところ、ほとんどが六糖のオリゴマンヌロン酸であったが、五糖および七糖が少量存在していたことが示された。詳細については図7Aを参照。

【0054】

0.5gの上記のHexaMを秤量し、5mLの水に溶解し、50mLの丸底フラスコに移し、5mLの1M Na_2HPO_4 を加え、6M HClでpH7.9に調整し、20の室温に保ち、マグネチックスターラーで攪拌し、市販の3%濃度の臭素水1.0mLを滴加し、30分間攪拌し、次亜塩素酸ナトリウム(市販の13%濃度)0.5mLを滴加し、1時間攪拌し、95%エタノール10mLを加えて反応を停止させ、生成物を沈殿させた。沈殿物を10mLの水で再溶解し、エタノールを添加することによって再び沈殿させた。上澄み液をピペットで除去し、沈殿物を集め、真空オープン中60℃で乾燥して0

10

20

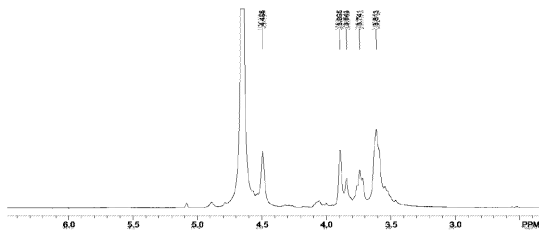
30

40

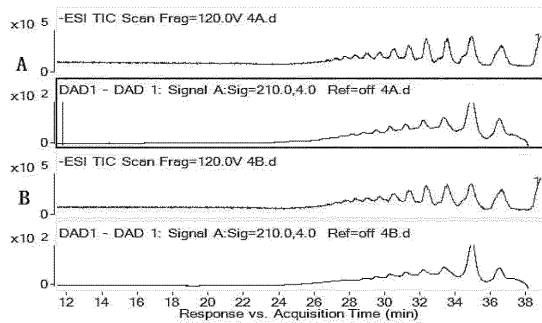
50

． 48 g の固体を得た。実施例 1 と同じ分析方法による H P L C - M S 分析のために適量の固体を採取した。分析結果は、反応原料中の主成分であるマンヌロン酸六糖がマンヌロン二酸六糖に酸化されたことを示し、反応完結率は > 98 % であった。L C - M S の分析結果を図 7 B に示す。

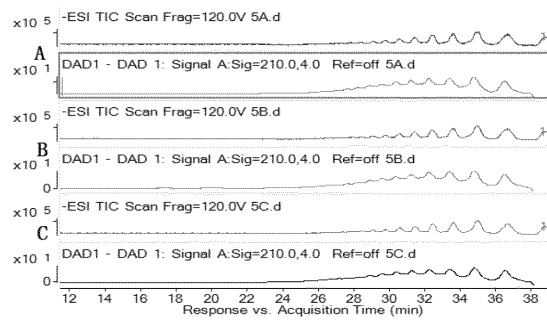
【 図 1 】



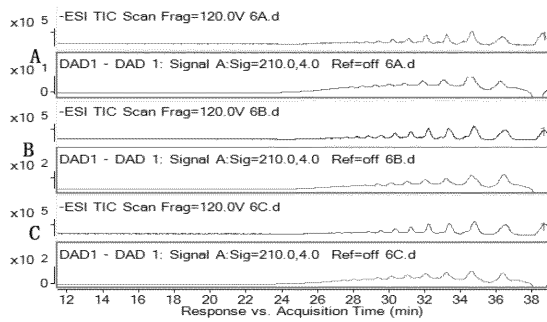
【 図 2 】



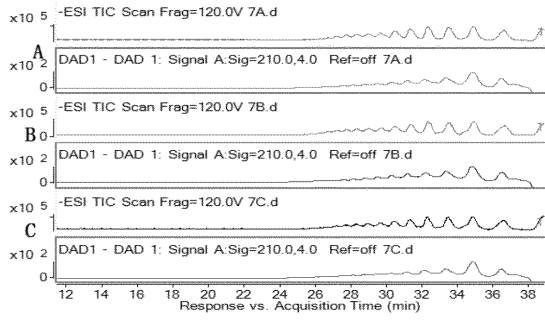
【 図 3 】



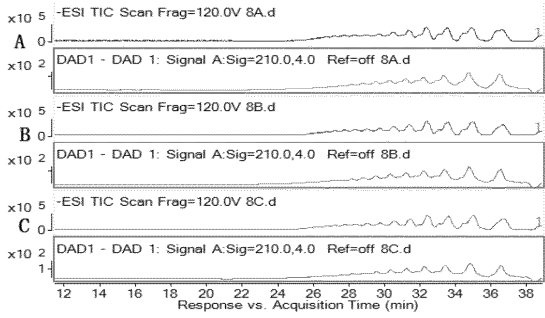
【 図 4 】



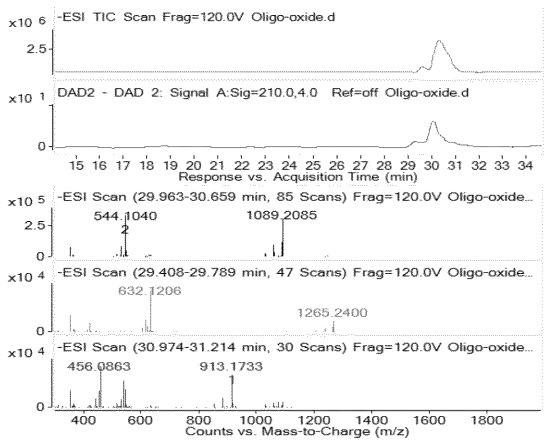
【 5 】



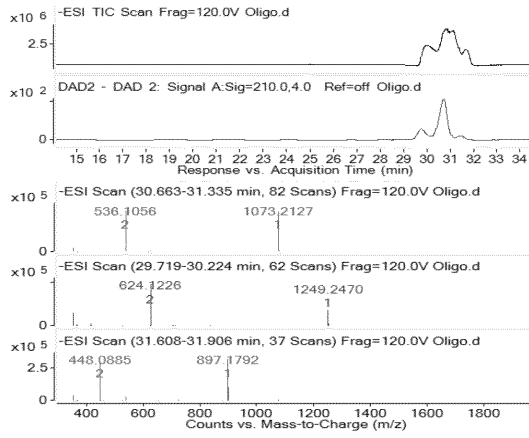
【 6 】



【 7 B 】



【 7 A 】



フロントページの続き

(74)代理人 100156144

弁理士 落合 康

(74)代理人 100103230

弁理士 高山 裕貢

(72)発明者 肖 中平

中華人民共和国 201200 上海市浦東新区华夏東路 2139 弄 28 号 501

(72)発明者 張 真慶

中華人民共和国 215123 江蘇省蘇州市蘇州工業園区高和路 58 号 87 幢 701

(72)発明者 耿 美玉

中華人民共和国 201203 上海市晨暉路 828 弄 15 号楼 1101

(72)発明者 丁 健

中華人民共和国 201203 上海市浦東新区青桐路 358 弄 7 号

審査官 前田 憲彦

(56)参考文献 特表 2007 - 530718 (JP, A)

特開 2007 - 230902 (JP, A)

英国特許第 00289280 (GB, B)

中国特許出願公開第 100508985 (CN, A)

Carbohydrate Research, 2006 年, 341(11), p.1779-1787

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07H 1/00

C07H 7/00

C08B 37/00

CAplus / REGISTRY (STN)