

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3947218号

(P3947218)

(45) 発行日 平成19年7月18日(2007.7.18)

(24) 登録日 平成19年4月20日(2007.4.20)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 H 15/04 (2006.01)

C O 7 H 15/04 A

C O 7 H 1/00 (2006.01)

C O 7 H 1/00

C O 7 H 7/027 (2006.01)

C O 7 H 7/027

請求項の数 23 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平8-506565
 (86) (22) 出願日 平成7年7月21日(1995.7.21)
 (65) 公表番号 特表平10-506103
 (43) 公表日 平成10年6月16日(1998.6.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1995/009223
 (87) 国際公開番号 W01996/004291
 (87) 国際公開日 平成8年2月15日(1996.2.15)
 審査請求日 平成14年7月19日(2002.7.19)
 (31) 優先権主張番号 08/286,573
 (32) 優先日 平成6年8月5日(1994.8.5)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者
 オクラホマ メディカル リサーチ ファ
 ンデーション
 アメリカ合衆国 オクラホマ州 7310
 4 オクラホマ シティー ノースイース
 ト サーティーンズ ストリート 825
 (74) 代理人
 弁理士 中村 稔
 (74) 代理人
 弁理士 大塚 文昭
 (74) 代理人
 弁理士 穴戸 嘉一
 (74) 代理人
 弁理士 竹内 英人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 4-アルコキシ-N-アセチルノイラミン酸の合成

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

4-アルコキシ-N-アセチルノイラミン酸の合成方法であって、以下の工程を含む該方法：

(a) C-1 にアルキルエステル及びC-2 にアルキルケトシドを有するN-アセチルノイラミン酸誘導体のC-8 及びC-9 のビシナルヒドロキシル基を酸触媒の存在下でケタールを形成することにより保護する工程；

(b) 工程(a) により保護された誘導体のC-4 をアルキル化して、C-4 にアルコキシ基を形成する工程；及び

(c) 工程(b) によりアルキル化された、保護された誘導体を、C-8 及びC-9 のケタール除去及びC-1 及びC-2 のアルキル基除去により脱保護して、4-アルコキシ-N-アセチルノイラミン酸を形成する工程。

【請求項2】

ケタールを形成するために使用される酸触媒が、p-トルエンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸塩、ZnCl₂及びFeCl₃からなる群から選択される請求項1 に記載の方法。

【請求項3】

酸触媒が、p-トルエンスルホン酸のピリジニウム塩である請求項2 に記載の方法。

【請求項4】

C-4 のアルキル化により、C-4 に式RO-（式中、R は1～6 個の炭素原子を有する

10

20

アルキル基である)のアルコキシ基が形成される請求項1に記載の方法。

【請求項5】

アルキル化が、ジメチルスルフェート、ジエチルスルフェート、ジプロピルスルフェート、ジブチルスルフェート、ジペンチルスルフェート及びジヘキシルスルフェートからなる群から選択されたアルキル化剤を用いて行われる請求項4に記載の方法。

【請求項6】

アルキル化が、0 ~ 30 の温度で10分~48時間行われる請求項4に記載の方法。

【請求項7】

アルキル化が、0 ~ 22 の温度で10分~30分間行われるメチル化である請求項6に記載の方法。

10

【請求項8】

C - 8及びC - 9のケタール基が、酢酸を用いた処理により除去される請求項1に記載の方法。

【請求項9】

C - 1及びC - 2のアルキル基が、アルカリ処理及びその後の酸水解により除去される請求項1に記載の方法。

【請求項10】

4 - アルコキシ - N - アセチルノイラミン酸の合成方法であって、以下の工程を含む該方法：

(a) N - アセチルノイラミン酸のC - 1のカルボン酸基及びC - 2のヒドロキシル基をアルキル化して、N - アセチルノイラミン酸のアルキルエステルアルキルケトシドを形成する工程；

20

(b) アルキルエステルアルキルケトシドのC - 8及びC - 9のビスナルヒドロキシル基を、p - トルエンスルホン酸、p - トルエンスルホン酸塩、ZnCl₂及びFeCl₃からなる群から選択された酸触媒の存在下でケタールを形成することにより保護する工程；

(c) 工程(b)の保護されたアルキルエステルケトシドのC - 4のヒドロキシル基をアルキル化して、C - 4にアルコキシ基を形成する工程；及び

(d) 工程(c)の生成物のC - 8及びC - 9に形成されたケタール基を除去し、かつC - 1及びC - 2のアルキル基を除去して、4 - アルコキシ - N - アセチルノイラミン酸を得る工程。

30

【請求項11】

C - 1のカルボン酸基が、触媒の存在下でアルキル化される請求項10に記載の方法。

【請求項12】

触媒が、トリフルオロ酢酸及びカチオン交換樹脂からなる群から選択される請求項11に記載の方法。

【請求項13】

C - 2のヒドロキシル基が、有効量の塩化アセチルの存在下でアルキル化される請求項10に記載の方法。

【請求項14】

酸触媒が、p - トルエンスルホン酸のピリジニウム塩である請求項10に記載の方法。

40

【請求項15】

C - 4のヒドロキシル基をアルキル化して、式RO - (式中、Rは1 ~ 6個の炭素原子を有するアルキル基である)のアルコキシ基を形成する請求項10に記載の方法。

【請求項16】

C - 4のアルキル化が、ジメチルスルフェート、ジエチルスルフェート、ジプロピルスルフェート、ジブチルスルフェート、ジペンチルスルフェート及びジヘキシルスルフェートからなる群から選択されたアルキル化剤を用いて行われる請求項15に記載の方法。

【請求項17】

C - 4のアルキル化が、0 ~ 30 の温度で10分~48時間行われる請求項16に記載の方法。

50

【請求項 18】

C - 4 のアルコキシ基がメトキシ基であり、かつ C - 4 のアルキル化が 0 ~ 2.2 の温度で 10 分 ~ 3.0 分 間行われる請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

C - 8 及び C - 9 のケタール基が、酢酸を用いた処理により除去される請求項 10 に記載の方法。

【請求項 20】

C - 1 及び C - 2 のアルキル基が、アルカリ処理及びその後の酸水解により除去される請求項 10 に記載の方法。

【請求項 21】

4 - アルコキシ基が 4 - メトキシ基又は 4 - エトキシ基である 4 - アルコキシ - N - アセチルノイラミン酸の合成方法であって、以下の工程を含む該方法：

(a) N - アセチルノイラミン酸の C - 1 のカルボン酸基を、トリフルオロ酢酸及びカチオン交換樹脂からなる群から選択された触媒の存在下でメチル化して、N - アセチルノイラミン酸のメチルエステルを形成する工程；

(b) N - アセチルノイラミン酸のメチルエステルの C - 2 のヒドロキシル基を、有効量の塩化アセチルの存在下でメチル化して、N - アセチルノイラミン酸のメチルエステルメチルケトシドを形成する工程；

(c) メチルエステルメチルケトシドの C - 8 及び C - 9 のビシナルヒドロキシル基を、p - トルエンスルホン酸、p - トルエンスルホン酸塩、ZnCl₂ 及び FeCl₃ からなる群から選択された酸触媒の存在下でケタールを形成することにより保護する工程；

(d) 保護されたアルキルエステルケトシドの C - 4 のヒドロキシル基をアルキル化して、C - 4 にメトキシ基又はエトキシ基を形成する工程、ここで該アルキル化は 0 ~ 3.0 の温度で 10 分 ~ 2.4 時間 行われる；及び

(e) C - 8 及び C - 9 に形成されたケタール基を、酢酸を用いた処理により除去し、かつ C - 1 及び C - 2 のメチル基をアルカリ処理及びその後の酸水解により除去して、4 - アルコキシ - N - アセチルノイラミン酸（該 4 - アルコキシ基は 4 - メトキシ基又は 4 - エトキシ基である）を得る工程。

【請求項 22】

4 - アルコキシ基がメトキシ基であり、かつ工程 (d) のアルキル化が 0 ~ 2.2 の温度で 10 分 ~ 3.0 分 間行われる請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

4 - アルコキシ基がエトキシ基であり、かつ工程 (d) のアルキル化が 0 ~ 2.2 の温度で 1 時間 ~ 2.4 時間 行われる請求項 21 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、ウイルス診断アッセイ (viral diagnostic assay) に有用な化合物の改良された合成方法に関するものである。より具体的には、本発明は、4 - アルコキシ - N - アセチルノイラミン酸の改良された合成方法に関するものである。

本発明の背景

病院への訪問の最も共通の理由は、感染症である。ウイルスが、他の全ての微生物の組合せの群より一層、これらの感染の原因となるものである。ウイルスにより引き起こされる種々の感染の全てのもののうち、呼吸器系ウイルス（インフルエンザ A 及び B；パラインフルエンザ 1、2 及び 3；呼吸器系多核ウイルス；及びアデノウイルス）が、概して、最も流行しているものである。インフルエンザウイルスの致死性は、紀元前 430 年程も前にアテネの疫病の際に発見された（Langmuir らの *New Engl. J. Medicine*, 313 (1985) 1027）。インフルエンザは、急性の呼吸器系統の病気の原因の 1 番であり、米国の年間死亡原因の 5 番目にあたる。つまり、ウイルス感染 (virus and viral infection) の診断方法の開発が益々重要となってきた。

ウイルス感染の急速診断は、また、良好な医学的診療に不可欠なものとなってきた。

数種のウイルスは、製造可能な抗体に対する限定的な抗原をもつ。従って、イムノアッセ

10

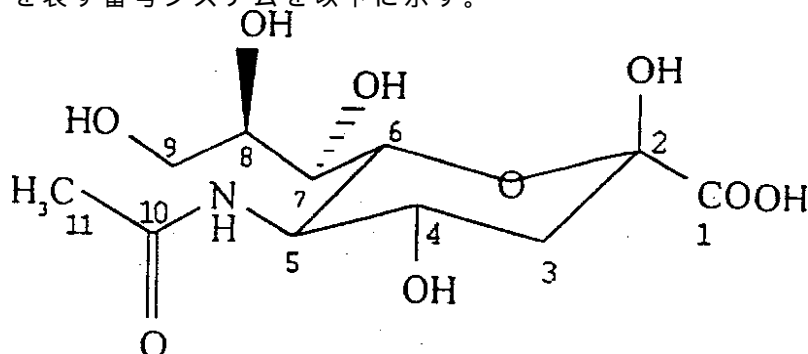
20

30

40

50

イが、ビリオンの存在の測定に幅広く使用されている。幅広い群のビリオン測定を望む場合、ウイルスの特定の成分を検出することが可能である。例えば、インフルエンザウイルスは、ノイラミニダーゼ（シアリダーゼ）活性を有する表面グリコプロテインを表現する。ノイラミニダーゼ酵素により、2-ケトシド結合したN-アセチルノイラミン酸（またシアル酸として知られるNeu5Ac）を含む基質が加水分解される。Neu5Acは、9個の炭素原子を有する主鎖、カルボキシル基及びN-アセチル基からなる。一般構造、及び炭素原子を表す番号システムを以下に示す。



ノイラミニダーゼ活性をもつビリオンをNeu5Acの色素性又は蛍光性グリコシドを用いてインキュベートすれば、酵素によって色素性又は蛍光性アグリコンが基質から切断され、かつ、その反応生成物によりビリオンの存在が示されるであろう。

酵素と該酵素の色素性基質との反応によりウイルスの存在を検出する方法の1つは、米国特許第5,252,458号に記載されており、該文献の記載は、本明細書に含まれるものとする。インフルエンザノイラミニダーゼの直接測定のアッセイは、Yolkenらによって開発された（*J. Infectious Diseases*, 142 (1980) 516-523）。Yolkenは、Neu5Acの4-メチルウンベリフェリル-2-ケトシドを蛍光性基質として使用して、少量の培養ウイルスを含む配合物中、及びインフルエンザウイルスに感染したボランティアの人の鼻洗浄試験体群中のノイラミニダーゼ活性を測定した。Yolkenは、“インフルエンザノイラミニダーゼの検出のための蛍光酵素アッセイの首尾良い開発により、適切な予防及び治療的関与の規定に備えるのに十分早いインフルエンザ診断の診療手段が講じられるであろう”と示唆している。Yolkenによれば、比色アッセイ（colorimetric assay）は、臨床適用での感度が不十分なものであった。対照的に、Yolkenは、蛍光アッセイは、臨床サンプル中のインフル

エンザノイラミニダーゼを検出するのに適したものであり得るとしている。Pachuckiらは、Neu5Acの4-メチルウンベリフェリル-2-ケトシドを、インフルエンザ患者から集めた臨床試験体において試験した（*J. Clinical Microbiology*, 26 (1988) 2664-2666）。その低感度性のために、そのアッセイは、ノイラミニダーゼを臨床試験体において直接的及び素早く検出するのに有用なものではなかった。しかしながら、そのアッセイにより、組織培養体の摂取後25時間で91%のウイルス陽性分離物が確認された。改質されたNeu5Ac基質の使用により、ノイラミニダーゼアッセイの特異性が高まり得る。シアル酸では、C-4（上記構造参照）が、酵素-基質相互作用の重要な役割を果たすと思われる。更に、唾液腺細菌ウイルスがノイラミニダーゼ活性を示すことが知られているので（Varkiらの*J. Biol. Chem.*, 258 (1983) 12465-12471）、これらの不本意な相互作用を除去するのが必須である。4-メトキシ-Neu5Acのケトシドは、細菌シアリダーゼに対して抵抗性のものであるが、ウイルスシアリダーゼにより素早く切断されることが、すでに知られている（Beauらの*Eur. J. Biochem.*, 106 (1980) 531-540）。

4-メトキシNeu5Acの合成は文献（Kuhnらの*Liebigs Ann. Chem.*, 636 (1960) 164-173；Beauらの*Carbohydr. Res.*, 65 (1978) 1-10；Beauらの*Carbohydr. Res.*, 67 (1978) 65-77）に記載されている。しかしながら、文献記載の手順は、適切に保護されたNeu5Ac誘導体の直接アルキル化に基づくものではなく、かつ、より多くの工程を包含している。また、この方法は、シアン化水素酸等の有害物質の使用を必要としているので、商業的に実用的なものでない。

直接メチル化の手順は、PCTの国際公開公報W0 91/09972（1991年7月11日）に記載さ

10

20

30

40

50

れている。この方法によれば、Neu5Acのメチルエステルメチルケトシド (Neu5Ac-MEMK) を、tert-ブチルジメチルシリル (TBMS) クロライド、イミダゾール、及び、触媒量の 4 - ジメチルアミノピリジンを用いて、65 で処理して、9-O-TBMS-Neu5Ac-MEMKを得る。この化合物を、アセトン及び触媒量の p - トルエンスルホン酸モノ水和物を用いて室温で処理することにより、9-O-TBMS-7,8-イソプロピリデン -Neu5Ac-MEMKが生じ、その後、それを、ジアゾメタン/トリフルオロボレートを用いてエーテル中で0 で処理して、対応する 4 - メトキシ誘導体を得る。この化合物を、テトラブチル - アンモニウムフルオリドを用いた THF 中での処理、その後の水酸化ナトリウムでのアルカリ分解及び希塩酸 / Dowex 50 (H^+) での酸水解により脱保護 (deprotected) して、4 - メトキシ - N - アセチルノイラミン酸を得る。この方法は、収率が低く、かつ毒性及び爆発性のジアゾメタン、気体試薬の使用を必要とする。

10

本発明の概要

本発明により、4 - アルコキシ - N - アセチルノイラミン酸 (4 - アルコキシ - Neu5Ac) の首尾良い簡単な合成を提供する。この方法は、素早くかつ簡単にスケールアップすることができる。その方法によれば、N - アセチルノイラミン酸を C - 1 及び C - 2 についての 2 段階の工程によりアルキル化 (好ましくはメチル化) して、アルキルエステルアルキルケトシド (好ましくはメチルエステルメチルケトシド) を得る。アルキルエステルアルキルケトシドの C - 8 及び C - 9 に位置するビシナルヒドロキシル基を、その後、ケタールの形成により保護する。ケタールは、アルキルエステルアルキルケトシドをアセトン及び触媒を用いて処理することにより形成する。保護されたアルキルエステルアルキルケトシドを、その後、C - 4 位についてアルキル化し、それにより、C - 4 ヒドロキシル基の水素をアルキル基で置換して、C - 4 位にアルコキシ基を形成する。C - 8 及び C - 9 に形成されたケタール基を、酢酸を用いた処理により除去する。最終的な脱保護は、C - 1 及び C - 2 のアルキル基を、アルカリ処理及びその後の酸水解により除去することにより行う。

20

本発明の目的は、ウイルス検出用診断方法に有用な基質の合成方法を提供することである。本発明の他の目的は、実用的で、首尾良い、コスト的に有効な、4 - アルコキシ - Neu5Acの製造方法を提供することである。本発明の他の目的は、素早くスケールアップすることができる 4 - アルコキシ - Neu5Acの合成方法を提供することである。本発明の他の目的は、保護されたアルキルエステルアルキルケトシドの C - 4 をアルキル化して、C - 4 にアルコキシ基を形成することを含む、4 - アルコキシ - Neu5Acの合成方法を提供することである。

30

本発明の更に他の目的は、4 - アルコキシ - N - アセチルノイラミン酸の合成方法であって、以下の工程を含む該方法を提供することである：

(a) C - 1 にアルキルエステル及び C - 2 にアルキルケトシドを有する N - アセチルノイラミン酸誘導体の C - 8 及び C - 9 のビシナルヒドロキシル基を酸触媒の存在下でケタールを形成することにより保護する工程；

(b) 工程 (a) により保護された誘導体の C - 4 をアルキル化して、C - 4 にアルコキシ基を形成する工程；及び

(c) 工程 (b) によりアルキル化された、保護された誘導体を、C - 8 及び C - 9 のケタール除去及び C - 1 及び C - 2 のアルキル基除去により脱保護して、4 - アルコキシ - N - アセチルノイラミン酸を形成する工程。

40

本発明の更に他の目的は、4 - アルコキシ - N - アセチルノイラミン酸の合成方法であって、以下の工程を含む該方法を提供することである：

(a) N - アセチルノイラミン酸の C - 1 のカルボン酸基及び C - 2 のヒドロキシル基をアルキル化して、N - アセチルノイラミン酸のアルキルエステルアルキルケトシドを形成する工程；

(b) アルキルエステルアルキルケトシドの C - 8 及び C - 9 のビシナルヒドロキシル基を、p - トルエンスルホン酸、p - トルエンスルホン酸塩、 $ZnCl_2$ 及び $FeCl_3$ からなる群から選択された酸触媒の存在下でケタールを形成することにより保護する工程；

50

(c) 工程 (b) の保護されたアルキルエステルケトシドの C - 4 のヒドロキシル基をアルキル化して、C - 4 にアルコキシ基を形成する工程；及び

(d) 工程 (c) の生成物の C - 8 及び C - 9 に形成されたケタール基を除去し、かつ C - 1 及び C - 2 のアルキル基を除去して、4 - アルコキシ - N - アセチルノイラミン酸を得る工程。

本発明の更に他の目的は、4 - アルコキシ - N - アセチルノイラミン酸の合成方法であって、4 - アルコキシ基が 4 - メトキシ基又は 4 - エトキシ基であり、以下の工程を含む該方法を提供することである：

(a) N - アセチルノイラミン酸の C - 1 のカルボン酸基を、トリフルオロ酢酸及びカチオン交換樹脂からなる群から選択された触媒の存在下でメチル化して、N - アセチルノイラミン酸のメチルエステルを形成する工程；

10

(b) N - アセチルノイラミン酸のメチルエステルの C - 2 のヒドロキシル基を、有効量の塩化アセチルの存在下でメチル化して、N - アセチルノイラミン酸のメチルエステルメチルケトシドを形成する工程；

(c) メチルエステルメチルケトシドの C - 8 及び C - 9 のビシナルヒドロキシル基を、p - トルエンスルホン酸、p - トルエンスルホン酸塩、 $ZnCl_2$ 及び $FeCl_3$ からなる群から選択された酸触媒の存在下でケタールを形成することにより保護する工程；

(d) 保護されたアルキルエステルケトシドの C - 4 のヒドロキシル基をアルキル化して、C - 4 にメトキシ基又はエトキシ基を形成する工程（該アルキル化は、約 0 ～ 約 30 の温度で約 10 分～約 24 時間行われる）；及び

20

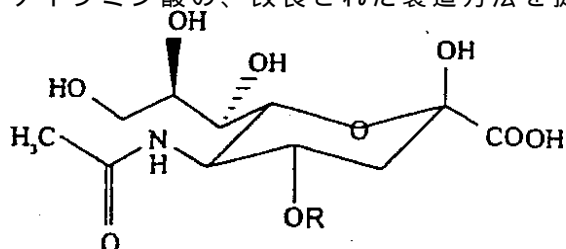
(e) C - 8 及び C - 9 に形成されたケタール基を、酢酸を用いた処理により除去し、かつ C - 1 及び C - 2 のメチル基をアルカリ処理及びその後の酸水解により除去して、4 - アルコキシ - N - アセチルノイラミン酸（該 4 - アルコキシ基は 4 - メトキシ基又は 4 - エトキシ基である）を得る工程。

本発明の他の目的、利点、特色及び特徴は、以下の記載及びクレームを参照すればより明らかとなるであろう。

本発明の詳細な記載

本明細書に記載の方法により、N - アセチルノイラミン酸（Neu5Ac）の C - 4 ヒドロキシル基を特定のアルキル化して、4 - アルコキシ基を形成する方法を提供する。具体的には、本明細書に記載の方法により、以下の一般式を有する 4 - アルコキシ - N - アセチルノイラミン酸の、改良された製造方法を提供する：

30

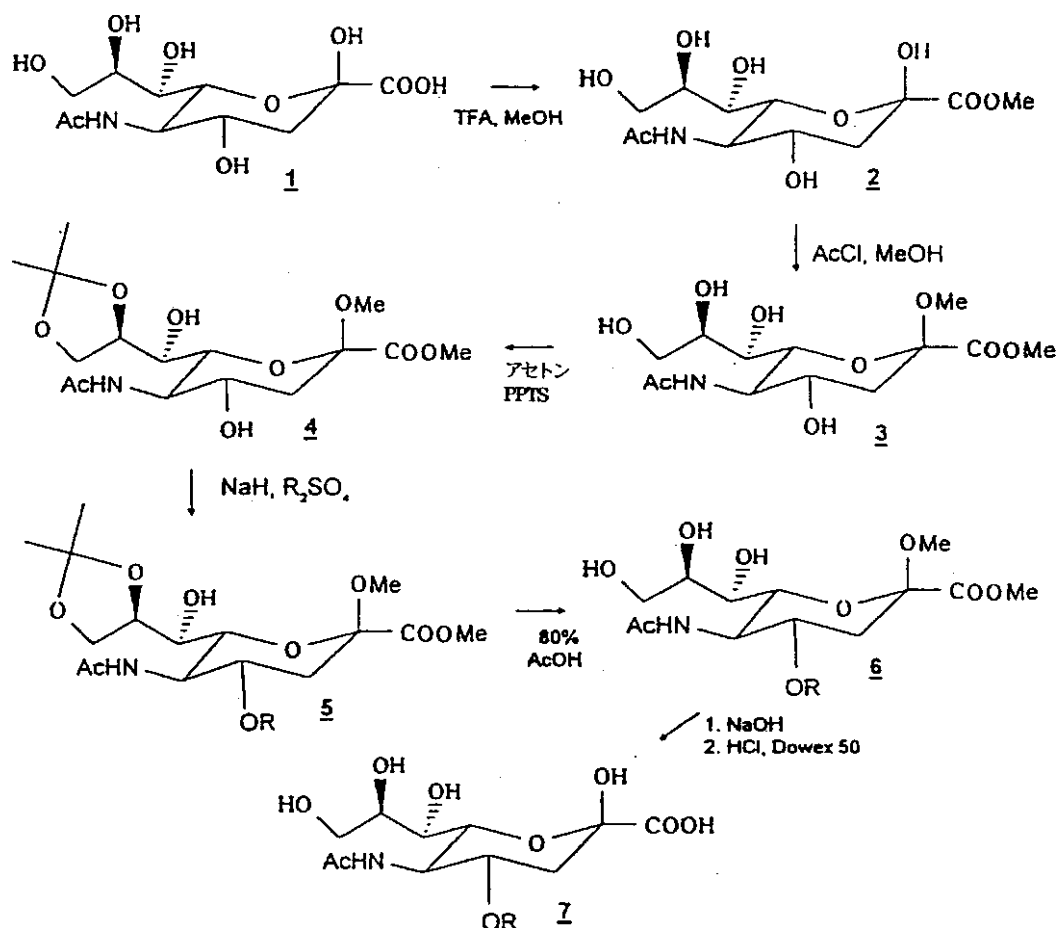


（式中、R は 1 ～ 6 個の炭素原子を含むアルキル基である）。

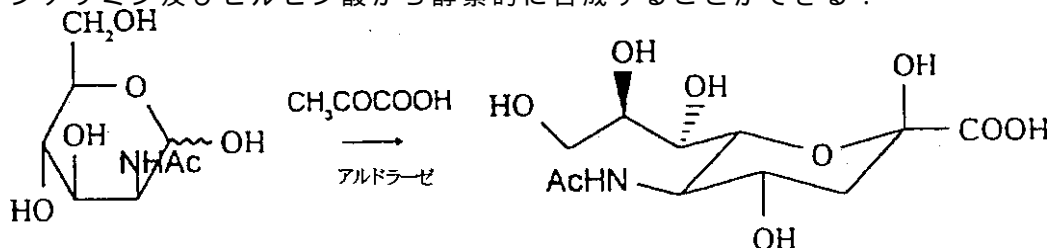
高級アルキル基（即ち、R が 3 ～ 6 個の炭素原子を含む場合）は、線状、分枝状、及び環状異性体を含んでいてもよい。好ましくは、R は、1 ～ 4 個の炭素原子を含むアルキル基であり；より好ましくは、R は、1 又は 2 個の炭素原子を含むアルキル基であり；更に好ましくは、R はメチルである。C - 4 のアルコキシ基についての特異性は、Neu5Ac 分子内の反応基の保護及びその後の脱保護によりもたらされる。更なる反応特異性は、反応条件の調節によりもたらされる。本明細書に記載の反応機構により、簡単でコスト的に有効な 4 - アルコキシ - Neu5Ac が高収率で得られる方法を提供する。この手順を容易にスケールアップして、商業的な量の 4 - アルコキシ - Neu5Ac を、高コストとなることなく提供することができる。以下により詳細に記載したような一般的に好ましい反応体を用いる、4 - アルコキシ - Neu5Ac の一般的な合成を以下の反応機構において説明する（式中、R は 1 ～ 6 個の炭素原子を含むアルキル基である）。

40

50



出発材料Neu5Ac (1) は商業的に入手可能である (MediHerb Inc., 4540 S. Navajo#1, Englewood, Co. 80110)。また、それは、KimらのJ. Am. Chem. Soc., 110 (1988) 6481に記載され、かつ以下の化学反応式により説明される手順を用いて、N - アセチル - D - マンノサミン及びピルピン酸から酵素的に合成することができる：



酵素反応は、薄層クロマトグラフィー (TLC) によりモニターすることができ、かつその生成物は、イオン交換クロマトグラフィーにより精製することができる。

本発明では、Neu5AcのC - 1のカルボキシレート基及びC - 2のヒドロキシル基を最初に、アルキル化により保護する。C - 1及びC - 2の基のアルキル化は、好ましくはメチル化であるが、エチル化、プロピル化及びブチル化であってもよい。本発明の好ましい実施態様では、Neu5Acを、2段階の工程で、アルキルエステルアルキルケトシドに転化する。更に好ましくは、この2段階のアルキル化は、メチルエステルメチルケトシド (3) を形成するための2段階の好ましいメチル化工程を包含する。この第1メチル化段階では、C - 1カルボキシル基を無水メタノールを用いて酸触媒の存在下でメチル化する。適切な触媒としては、トリフルオロ酢酸 (TFA)、及びカチオン交換樹脂がある。適切なカチオン交換樹脂は、Dowex 50 (H⁺) 及びAmberlyst 15 (H⁺) 等である。(第1メチル化段階でのメタノール系塩化アセチルの使用は、一般に、それにより、塩化アシル誘導体等の望ましくない副生成物が生じ得るので推奨されない。) 第2の好ましいメチル化段階では、C - 2ヒドロキシル基を、メタノール系塩化アセチルの使用によりメチル化する。第2段階でのメタノール系塩化アセチルの使用により、このメチル化を達成するためにDowex 50 (

40

50

H⁺) 樹脂を用いる従来の方法において通常生じていた、メチルケトシドの望ましくない加水分解が低減される。

2段階のアルキル化により一層良い収率が得られる。なぜなら、第1段階後の作業(work-up)によりアルキル化の間に生じる水の除去が可能となるからである。水の存在は、それにより、新しく形成されたグリコシド結合の開裂が促進されるため、望ましくない。本発明では、塩化アセチルを第2段階において使用した場合、メチル化の間に生じた水が塩化アセチルと反応して、酢酸及び無水HClが生じ、それにより、加水分解が低減又は除去される。第2アルキル化段階からのDowex樹脂の除去により、処理時間及びコストが低減され、かつ収率が改良される。なぜなら、Dowex樹脂の乾燥は、不適切に行われるとアルキル化収率を低下させ得る、時間のかかる困難なプロセスであるからである。

10

工程の次の段階では、メチルエステルメチルケトシド(3)のC-8及びC-9のピシナルヒドロキシル基を、ケタール(4)の形成により保護する。メチルエステルメチルケトシドを、有効量のアセトン及び酸触媒を用いて処理して、ケタールを形成する。適切な酸触媒としては、p-トルエンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸塩(ピリジニウム塩(PPTS)及び他の塩)、ZnCl₂及びFeCl₃等がある。好ましい酸触媒は、p-トルエンスルホン酸の非吸湿性ピリジニウム塩である。

保護されたメチルエステルメチルケトシド(4)を、その後、C-4についてアルキル化して、4位にアルコキシ基を含む中間体(5)を形成する。C-4のヒドロキシル基のアルキル化は、メチル化、エチル化、プロピル化、ブチル化、ペンチル化又はヘキシル化であってもよく、それにより、C-4のヒドロキシル基がRO-基(Rは1~6個の炭素原子を含むアルキルラジカルである)に転化される。好ましくは、C-4でのアルキル化は、メチル化、エチル化、プロピル化又はブチル化である。より好ましくは、C-4でのアルキル化は、メチル化又はエチル化であり、それにより4-メトキシ又は4-エトキシ誘導体が得られる。更に好ましくは、C-4でのアルキル化は、メチル化であり、4-メトキシ誘導体が得られる。C-4位の高級アルキル基の導入は、一般に、メチル化より遅く、かつその収率はいくらか低い。更に、高級アルキル基を有する色素性基質は、4-メトキシ-Neu5Acより酵素的切断を受けにくく、それにより、アッセイの感受性がより低くなる。それにもかかわらず、いくつかの特定の用途及びアッセイについては、そのようなC-4の高級アルキル基が有用なものであり得、かつ好ましくさえあるかもしれない。

20

C-7のより立体的なヒンダード遊離ヒドロキシル基についてのアルキル化は本質的に防止することができ、かつC-5のN-アセチル基についてのアルキル化はこの直後に記載のように反応条件を調節することにより最小にすることができる。そのプロセスによれば、中間体(4)を、水酸化ナトリウムの80%分散液中において、約1.2~約1.4モル当量のアルキル化剤を用いて処理する。アルキル化剤は、ジメチルスルフェート、ジエチルスルフェート、ジプロピルスルフェート、ジブチルスルフェート、ジペンチルスルフェート及びジヘキシルスルフェートからなる群から選択される。反応は、一般に、約0~約30の温度で、約10分~約48時間行う。好ましくは、反応温度は、約0~約22の範囲内とする。4位に高級アルコキシ基を形成する場合には、一般に、長い反応時間が好ましい。本発明の好ましい実施態様では、C-4にメトキシ基を形成するためのメチル化反応は、約0~約30の温度、より好ましくは約0~約22の温度で、約10分~約30分間行う。本発明の他の好ましい実施態様では、C-4にエトキシ基を形成するためのエチル化反応は、約0~約30、より好ましくは約0~約22の温度で約1時間~約24時間行う。それぞれ約60%及び40%より高い4-メトキシ及び4-エトキシ誘導体(5)の収率は、精製後にカラムクロマトグラフィーにより得ることができる。

30

40

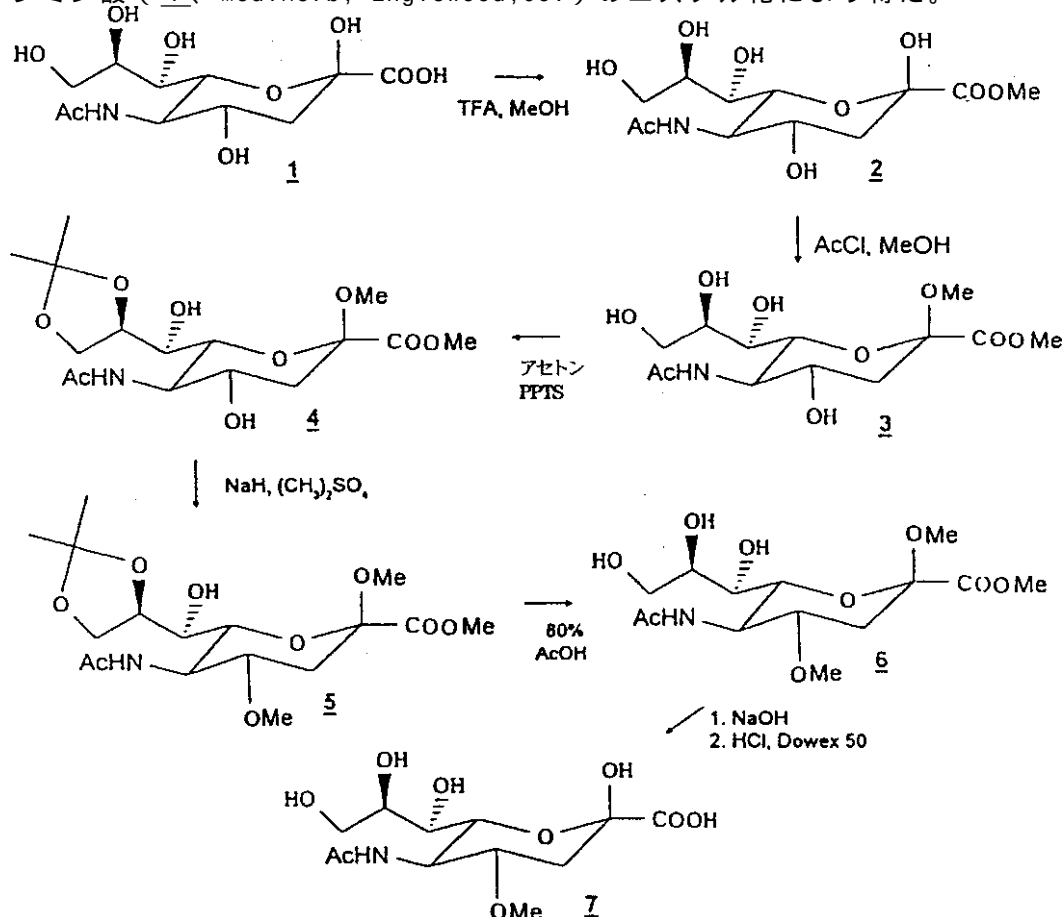
(5)からのケタール基の除去は、約80%酢酸を用いる処理により達成する。酢酸加水分解により、また、C-9ヒドロキシル基での部分アセチル化が起こり得る。従って、加水分解生成物をナトリウムメトキシドで処理して、C-9における酢酸根を除去することができる。(6)の最終的な脱保護を、アルカリ処理及びその後の酸水解により行って、最終生成物4-アルコキシ-Neu5Ac(7)を得る。

50

4 - アルコキシ - Neu5Acは、例えば、色素性又は蛍光性マーカークループを含む任意の適切なマーカークループへの結合により、更なる利用が可能である。好ましいマーカークループは、例えば、4 - クロロ - 1 - ナフトール、6 - ブロモ - 1 - ナフトール及び5 - ブロモ - 4 - クロロインドール等を含む色素性グループである。色素性改質 4 - アルコキシ - Neu5Acは、臨床サンプル又は試験体におけるウイルスノイラミニダーゼ活性を検出するのに有用なノイラミニダーゼアッセイに導入することができる。そのような4位改質色素性N - アセチルノイラミン酸基質の合成方法及びウイルスアッセイにおける使用方法は、PCTの国際公開公報W0 91/09972; YolkenらのJ. Infectious Diseases, 142 (1980) 516-523; 及びPachuckiらのJ. Clinical Microbiology, 26 (1988) 2664-2666に記載されている(それぞれの文献の記載は本明細書に含まれるものとする)。当然、現在の4 - アルコキシ - N - アセチルノイラミン酸を使用して、他の色素体及び蛍光体含有誘導体を形成することができ、かつそれは他のウイルスアッセイに使用することができる。以下の実施例は、本発明を行う方法を説明しており、かつクレームに記載の本発明の範囲を制限することのない説明的なものである理解されるべきである。

実施例 I : 4 - メトキシ - N - アセチルノイラミン酸

4 - メトキシ - N - Neu5Acの合成を、以下の反応式に表す。化合物 2 を、刊行物 (BaumrgerらのHelv. Chim. Acta 69 (1986) 1927) に記載の手順に従って、N - アセチルノイラミン酸 (1, MediHerb, Englewood, Co.) のエステル化により得た。



2 (10 g) のメタノール (200 ml) の冷 (氷浴) 溶液に、塩化アセチル (10 ml) を添加し、かつ混合物を3時間70 で攪拌した。混合物を蒸発させて乾燥状態にし、残留物を減圧下で乾燥して、生原料メチルエステルメチルケトシド (3) を得た。生原料 3 を、公知の手順 (HagedornらのHelv. Chim. Acta 69 (1986) 2127) によりアセタールに転化した。3 のアセトン (300 ml) 溶液に、ピリジニウム p - トルエンスルホネート (50 mg) を添加した。混合物を、室温で1時間攪拌した。混合物を、その後、Dowe x 1 (OH) で中和し、かつ残留物を濾過し、アセトンで洗浄した。濾液を蒸発させて乾燥状態にし、残留物をシリカゲルカラムにおいて精製した。塩化メチレン : メタノール (1

5 : 1) による溶離により、ほとんどの副生成物が除去された。塩化メチレン : メタノール (9 : 1) による連続溶離により、純粋なメチル 5 - アセタミド - 3 , 5 - ジデオキシ - 8 , 9 - O - イソプロピリデン - 4 - メトキシ - β - D - グリセロ - D - ガラクト - 2 - ノヌロピラノシドニックアシッド (nonulopyranosidonic acid) メチルエステル (4、5 . 19 g、45 %) を得た。

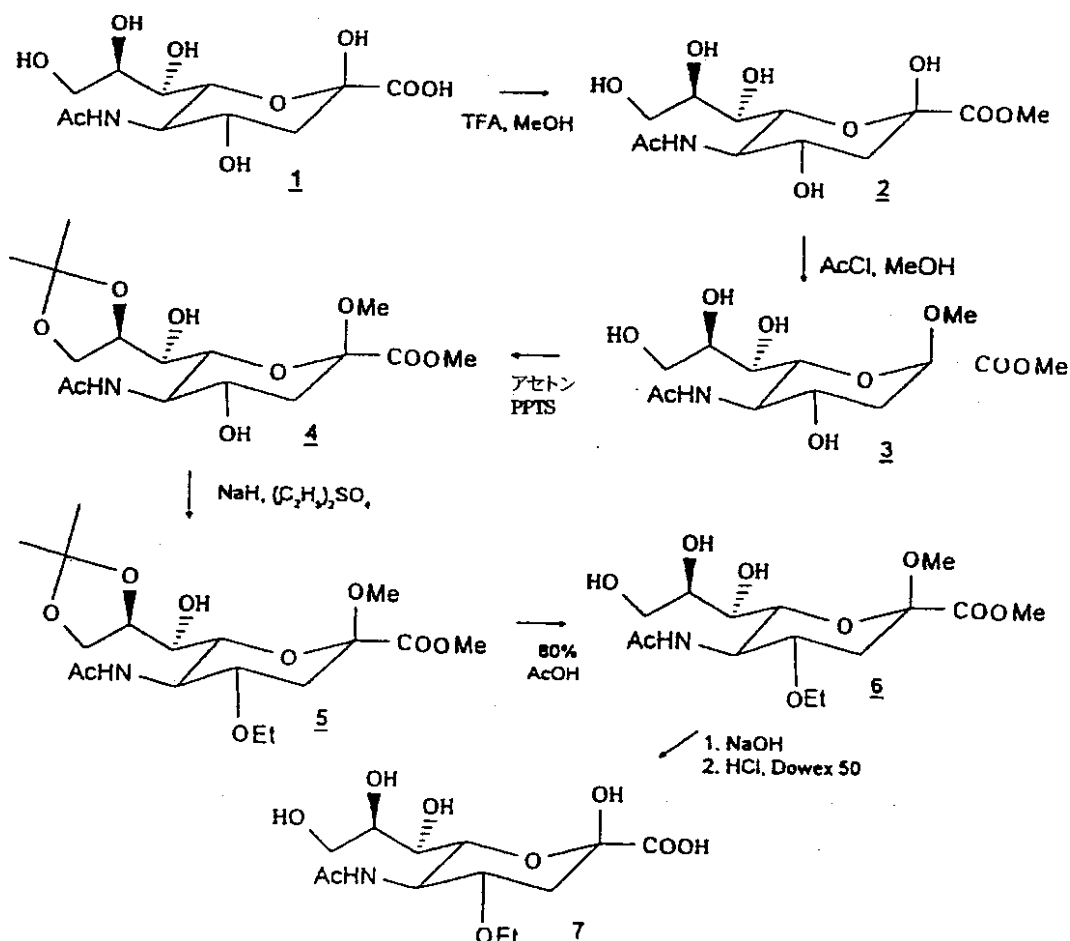
4 (1 . 7 g) のアセトニトリル (15 ml) 冷 (氷浴) 溶液に、水酸化ナトリウム (80 % 分散液、245 mg) を (窒素下で) 添加した。ジメチルスルフェート (0 . 8 ml) を添加する前に、混合物を、15 分間氷浴において (窒素下で) 攪拌した。氷浴での攪拌を、更に 20 分間続けた。混合物を、セライトにより濾過し、かつ濾液を蒸発させて乾燥状態にした。残留物をシリカゲルカラム (80 g) において精製し、かつ純生成物 (5) を塩化メチレン : メタノール (25 : 1) により溶離した。5 の収率は、1 . 22 g (69 %) であった。化合物 5 (1 . 22 g) を、80 % 酢酸水溶液 (15 ml) を用いて 85 ° で 1 時間処理した。酢酸を、蒸発及び水との共蒸発 (co-evaporation) により除去した。残留物を、メタノール (10 ml) の M ナトリウムメトキシド溶液 (2 . 2 ml) を用いて室温で 1 時間処理した。混合物の pH を、Dowex 50 (H^+) 樹脂を用いて pH 約 7 に調節し、樹脂を濾過により除去し、かつ濾液を蒸発させた。残留物をシリカゲルカラムにおいて精製し、かつ生成物を、塩化メチレン - メタノール (5 : 1 の容量) により溶離した。6 の収率は、0 . 87 g (80 %) であった。

化合物 6 (0 . 87 g) を、水 (3 . 5 ml) 及びエチルアルコール (3 . 5 ml) の M 水酸化ナトリウム溶液 (3 . 0 ml) を用いて室温で 1 時間処理した。混合物を、Dowex 50 (H^+) 樹脂を用いて中和し、濾過により樹脂を除去し、かつ濾液を蒸発させた。残留物を、Dowex 50 (H^+) (1 . 5 g) 及び 0 . 025 M 塩酸を用いて 105 ° で 3 時間処理した。樹脂を濾過により除去し、かつ濾液を蒸発させて乾燥状態にした。残留物を乾燥させて、生成物 7 (0 . 71 g、88 %) を得た。7 の構造を、プロトン及びカーボン - 13 NMR 分光学により確認した。

実施例 II : 4 - エトキシ - N - アセチルノイラミン酸

4 - エトキシ - Neu5Ac の合成を、以下の反応式に表す。化合物 1 ~ 4 を実施例 I に記載の手順に従って合成した。

メチル 5 - アセタミド - 8 , 9 - O - イソプロピリデン - 3 , 5 - ジデオキシ - β - D - グリセロ - D - ガラクト - 2 - ノヌロピラノシドニックアシッドメチルエステル (4、1 . 69 g) の塩化メチレン (10 ml) 溶液 (窒素下 0 ° で維持した) に、80 % 水酸化ナトリウム (220 mg) を添加し、かつ混合物を 10 分間攪拌した。ジメチルスルフェート (2 . 5 ml) を添加して、混合物を 15 分間氷浴中で、更に 17 時間室温で (窒素下で) 攪拌した。混合物をセライトにより濾過し、かつ濾液を蒸発させた。粗残留物をシリカゲル (60 g) において精製し、かつ生成物を塩化メチレン - メタノール (25 : 1 の容量) により溶離した。5 の収率は、0 . 76 g (42 %) であった。生成物の構造を、NMR 分光学により確認した。



化合物 5 (6 8 6 m g) を、8 0 % 酢酸水溶液 (1 0 m l) を用いて 9 0 ° で 1 時間処理した。混合物を蒸発させ、かつ残留物を、メタノール (5 m l) の M ナトリウムメトキシド溶液 (1 . 6 m l) により処理した。混合物を、1 時間室温で攪拌し、Dowex 50 (H^+) を用いて中和し、濾過し、かつその後、蒸発させた。残留物を、シリカゲル (3 0 g) において精製した。塩化メチレン - メタノール (5 : 1 の容量) での溶離により、急速移動 (fast-moving) 副生成物を除去した。同一溶剤システムでの連続溶離により、化合物 6 (4 5 0 m g 、 7 3 %) を得た。化合物 6 (4 5 0 m g) を、エチルアルコール (5 m l) と水 (5 m l) との混合物の M 水酸化ナトリウム溶液 (1 m l) を用いて室温で 1 時間処理した。混合物を、Dowex 50 (H^+) を用いて中和し、かつ蒸発させた。残留物を、0 . 0 2 5 M 塩酸において Dowex 50 (H^+) を用いて 9 0 ° で 4 時間処理し、かつ蒸発させた。残留物を乾燥させて、化合物 7 (3 3 3 m g 、 8 0 %) を得た。生成物の構造を N M R 分光学により確認した。

本発明の実施における種々の改良及び変更は、本発明の前述の詳細な記載を読んだ当業者には予期し得ることである。従って、そのような改良及び変更は、以下のクレームの範囲内に包含されている。

フロントページの続き

(74)代理人

弁理士 今城 俊夫

(74)代理人

弁理士 小川 信夫

(74)代理人

弁理士 村社 厚夫

(74)代理人

弁理士 箱田 篤

(72)発明者 リアヴ アブラハム

アメリカ合衆国 コロラド州 80222 デンヴァー サウス ユードラ 1245

(72)発明者 ハードグレイヴ ラーゲン エフ

アメリカ合衆国 テキサス州 77327 クリーブランド サウス ウォーカー ロード 338

(72)発明者 ブリストン シェリー

アメリカ合衆国 オハイオ州 44060 コンコード モーリー ロード 7465

(72)発明者 ターナー グレゴリー エイ

アメリカ合衆国 ミズーリー州 64055 インディペンダンス クラッカーネック ロード 16301

審査官 山田 拓

(56)参考文献 特開昭60-190787(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07H 1/00 - 23/00

CA(STN)

REGISTRY(STN)