

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：97128910

※申請日期：97.7.30

※IPC 分類：

C07K1/113 (2006.01)

C07K5/10 (2006.01)

C07K7/06 (2006.01)

C07K9/00 (2006.01)

C07K14/46 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

胜肽之製造方法

二、申請人：(共1人)

姓名或名稱：(中文/英文)

糖鎖工學研究所股份有限公司

代表人：(中文/英文) 朝井 洋明/ASAI Hiroaki

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國京都府京都市下京區中堂寺南町134/

134, Chudoujiminami-machi, Shimogyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto,
6008813 Japan

國籍：(中文/英文)

日本/Japan

三、發明人：(共5人)

姓名：(中文/英文)

1. 梶原 康宏/KAJIHARA, Yasuhiro

2. 坂本 泉/SAKAMOTO, Izumi

3. 南部 由利/NAMBU, Yuri

4. 深江 一博/FUKAE, Kazuhiro

5. 朝井 洋明/ASAI, Hiroaki

國籍：(中文/英文)

1-5. 日本/Japan

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項第一款或第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

日本、2007年7月31日、特願2007-199372

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日；申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要

一種胜肽之製造方法，係於含有具-SH 基之胺基酸殘基之胜肽中，其特徵為，將該-SH 基變換為-OH 基並提供以下 (a) ~ (c) 步驟：

- (a) 由胜肽中之-SH 基與甲基化助劑反應，將該-SH 基變換為-SMe 基之步驟；
- (b) 由在步驟 (a) 所得到之-SMe 基與氰化物反應，而產生反應中間體之步驟；以及
- (c) 在比步驟 (b) 更鹼性條件下，將在步驟 (b) 所得之中間體變換為含有具-OH 基之胺基酸殘基之胜肽之步驟。

六、英文發明摘要

無

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：無。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

九、發明說明：

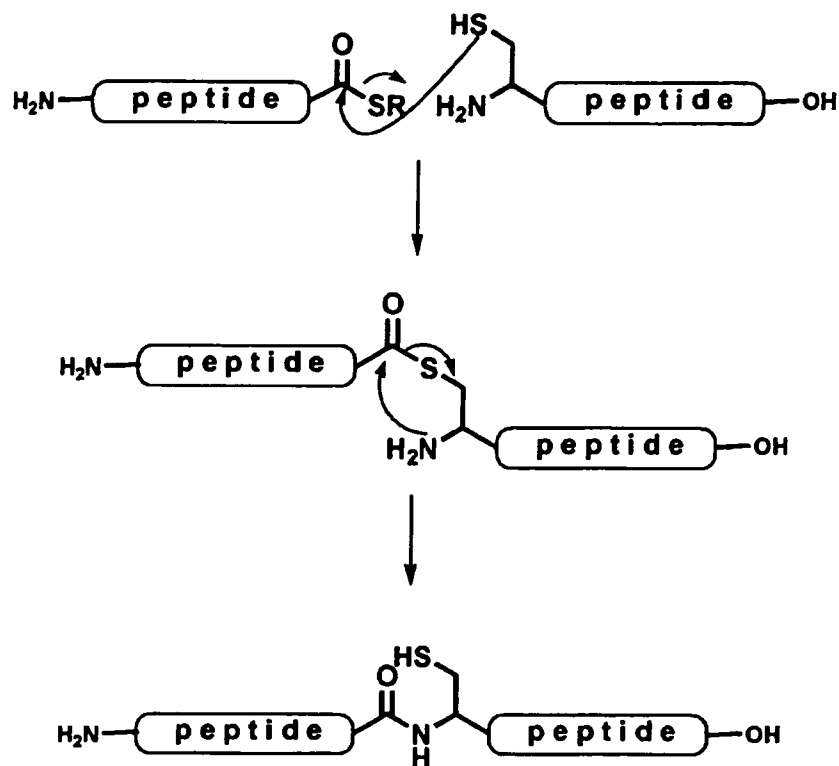
【發明所屬之技術領域】

本發明係有關胜肽及糖胜肽之製造方法。

【先前技術】

作為胜肽之製造方法，天然化學接合法是有用的。其中天然形化學的天然化學接合法 (Native Chemical Ligation, NCL 法) 係能夠製造在連接部位 (接合部份) 上，具有天然醯胺結合 (胜肽結合) 之胜肽之方法。NCL 法也可以在去保護之胜肽鏈之彼此間來進行，用於在連結部位上產生天然醯胺結合之有用之方法係為習知 (例如，專利文獻 1)。NCL 法係如以下圖示所示，係為在 C 末端上具有 α 羧基硫酯部分之第 1 之胜肽及於 N 末端上具有半胱胺酸殘基之第 2 胜肽之化學選擇反應，半胱胺酸之側鏈之硫醇基 (SH 基，亦稱巰基) 在硫酯之羧基碳作選擇性之反應，由硫醇交換反應而產生硫酯結合初期中間體。此中間體係自發性分子內重排，在連接部位上給予天然醯胺結合，另一方面，使再生半胱胺酸側鏈硫醇，使用此反應可有效合成各種多肽。

[化 1]



天然型化学的ライゲーション法

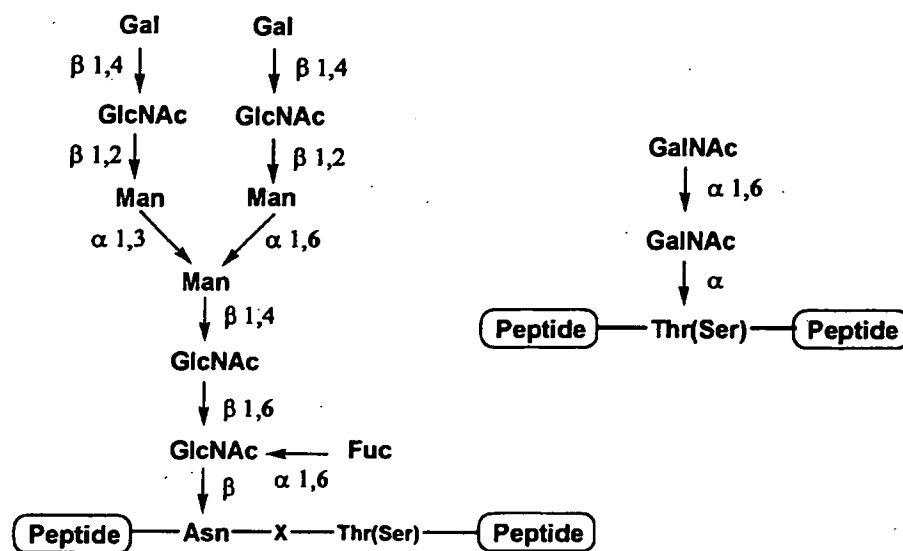
典型的 NCL 法之主要缺點，在於此方法，當連接 2 個胜肽斷片中，其一方，在 N 末端需具有半胱胺酸殘基，在連結後也在所得之胜肽於連接部位形成具有半胱胺酸殘基。因此，以合成而要得到所要之胜肽上不存在半胱胺酸殘基之場合，則不能使用此方法。

又，在典型的 NCL 法中，例如以固相合法等準備所要連接 2 個或 2 個以上之胜肽斷片，但例如存在活體內之胜肽之半胱胺酸含量非常少之場合（或半胱胺酸不存在之場合），為了提供 NCL 法，有必要準備非常長之胜肽片段，不能說是有效率。

另一方面，在活體內，存在各種之糖胜肽及糖蛋白質屬習知。而這些糖胜肽或糖蛋白質之糖鏈，大致分成 N 結合型及 O 結合型兩大類。一般是，在天門冬醯胺側鏈之醯胺之氮元素上進行氮—糖苷結合（N-glycoside）之糖鏈，一般在天然之狀態，總是在 -Asn-X-Ser/Thr-（式中，X 為脯胺酸以外之胺基酸）之所謂共有序列（Consensus Sequence）上結合有 Asn。O 結合型糖鏈係在絲胺酸或蘇胺酸側鏈之

氫氧基上為進行氧糖苷結合之糖鏈。以下表示其中一例子 (Gal: 半乳糖、GlcNAc: 氮-乙醯胺半乳糖胺)。具有氧結合型糖鏈之天然之糖胜肽，具有高的脯胺酸、蘇胺酸及絲胺酸之含有率為習知。(如非專利文獻 1 及 2)

[化 2]



N 結合型糖鏈及 O 結合型糖鏈之例子

【專利文獻 1】 國際公開 WO96/34878 號

【非專利文獻 1】 TRENDS in biochemical sciences, Vol.27, No.3, March 2002

【非專利文獻 2】 Cancer Biology & Therapy 6:4, 481-486, April 2007

【發明內容】

【發明解決所要之課題】

本發明之課題係提供胜肽及糖胜肽新穎之製造方法。

特別是，在典型的 NCL 法中，在連接 2 個胜肽片段中，其中 1 個，在 N 末端需具有半胱胺酸殘基，又因在連結後所得之胜肽於連接部位也形成具有半胱胺酸殘基，在最後所要得到之胜肽(或糖胜肽)

中之作為連接半胱胺酸殘基之部位，只適用設計 NCL 法。因此，本發明是提供在所得到之胜肽中除了半胱胺酸殘基以外，對應於絲胺酸殘基或蘇胺酸殘基之部位可設計作為連接部位之天然化學接合法之胜肽及糖胜肽之新穎之製造方法。

更具體中，依本發明之一態樣，可變換胜肽（或糖胜肽）中之半胱胺酸殘基為絲胺酸。因而，在 N 末端上。可由 NCL 法將含有半胱胺酸之胜肽連接其他之胜肽，其後，可將此半胱胺酸殘基變換為絲胺酸殘基。因此，依本發明，即使在所得到之序列中不存在有半胱胺酸殘基，若存在有絲胺酸殘基，則可將其位置在 NCL 法中作為連接部位來設計。

又，依本發明之一態樣，將在 N 末端上具有蘇胺酸衍生物（或該-SH 基由二硫化物結合等來保護之蘇胺酸衍生物）殘基之胜肽以天然化學接合法與其他的胜肽結合，該蘇胺酸衍生物殘基在 N 末端上具有-SH 基，其後可將得到之蘇胺酸衍生物殘基變換為蘇胺酸殘基。因此依本發明在所得到之序列上即使不存在有半胱胺酸殘基，若存在有蘇胺酸殘基，可設計其位置作為於天然化學接合法之連接部位。如此，本發明可將豐富存在糖胜肽中之絲胺酸或蘇胺酸由天然化學接合法作為連結部位來設計，而提供一新穎之使用天然化學接合法之胜肽及糖胜肽之製造方法。

【解決課題之手段】

為了解決以上課題而本發明可有以下之特徵。

亦即，本發明在含有-SH 基之胺基酸殘基之胜肽中，其特徵為，將該-SH 基變換為-OH 基，並可提供含有以下 (a) ~ (c) 之步驟之製造方法：

(a) 讓胜肽中之-SH 基與甲基化助劑反應之步驟；

(b) 讓在步驟 (a) 所得到-SMe 基與氰化物 (cyanide agents) 反應之步驟；以及

(c) 比步驟 (b) 更為鹼性條件之步驟。

又，本發明於含有具-SH 基之胺基酸殘基之胜肽中，其特徵為，

將該-SH 基變換為-OH 基並可提供包含以下 (a) ~ (c) 步驟之製造方法：

(a) 由胜肽中之-SH 基與甲基化助劑反應，將該-SH 基變換為-SMe 基之步驟；

(b) 由在步驟 (a) 所得到之-Sme 基使與氰化物 (cyanide agents) 反應，而產生反應中間體之步驟；以及

(c) 在比步驟 (b) 更鹼性條件下，將在步驟 (b) 所得之中間體變換為含有具-OH 基之胺基酸殘基之胜肽之步驟。

又本發明，於含有半胱胺酸殘基之胜肽中，其特徵為，將半胱胺酸殘基變換為絲胺酸殘基，並可提供含有步驟 (a) ~ (c) 之製造方法：

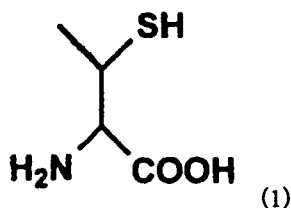
(a) 由胜肽中之半胱胺酸殘基之-SH 基與甲基化助劑反應，將前述-SH 基變換為-SMe 基之步驟；

(b) 由在步驟 (a) 所得到-SMe 基與氰化物 (cyanide agents) 反應，而產生反應中間體之步驟；以及

(c) 由比步驟 (b) 更鹼性條件下，將步驟 (b) 所得之反應中間體變換為含有絲胺酸殘基之胜肽之步驟；

又本發明，在含有以式 (1) 表示之蘇胺酸衍生物 A

[化 3]



作為胺基酸殘基之胜肽中，其特徵為，將該蘇胺酸衍生物 A 殘基變換為蘇胺酸殘基之胜肽之製造方法，並可提供包含以下步驟 (a) ~ (c) 之該製造方法：

(a) 由胜肽中之蘇胺酸衍生物 A 殘基之-SH 基與甲基化助劑反

應，將該-SH 基變換為-SMe 基之步驟；

(b) 由在步驟 (a) 所得到的-SMe 基與氰化物反應，而產生反應中間體之步驟；以及

(c) 在較步驟 (b) 更具鹼性條件下，將在步驟 (b) 所得到之反應中間體變換為含有蘇胺酸殘基之胜肽之步驟。

又，本發明在含有-SMe 基之胺基酸殘基之胜肽中，其特徵為，將該-SMe 基變換為-OH 基之胜肽製造方法，並可提供含有 (b) 及 (c) 步驟之該製造方法：

(b) 由胜肽中之-SMe 基與氰化物反應而產生反應中間體之步驟；以及

(c) 在較步驟 (b) 更具鹼性條件下，將在步驟 (b) 所得到之反應中間體變換為含有胺基酸殘基之胜肽之步驟。

又，本發明係一種包含具有-OH 基之胺基酸殘基之胜肽之製造方法，其特徵為可提供以下步驟之該製造方法：

(o) 由天然化學接合法來連接第 1 胜肽及第 2 胜肽而得到含有具-SH 基之胺基酸殘基之胜肽之步驟，該第一胜肽為在 C 末端含有羧基以由式-C(=O)-SR (式中 R 為苄基、芳基、烷基所選出，這些再由置換基置換亦可) 表示之 α 羧基硫酯基置換之胺基酸殘基，該第 2 胜肽係在 N 末端含有具-SH 基之胺基酸殘基之胜肽；

(a) 由在步驟 (o) 所得到之胜肽中之-SH 基與甲基化助劑反應，將該-SH 基變換為-SMe 基之步驟；

(b) 由在步驟 (a) 所得到的-SMe 基與氰化物反應，而產生反應中間體之步驟；以及

(c) 在比步驟 (b) 更為鹼性條件下，將在步驟 (b) 反得到之反應中間體變換為含有具-OH 基之胺基酸殘基之胜肽之步驟。

本發明係製造含有絲胺酸殘基的方法，其特徵為可提供含有以下步驟之該製造方法：

(o) 步驟係由天然化學接合法來連接第 1 胜肽及第 2 胜肽而得到含有半胱胺酸殘基之胜肽步驟，該第 1 胜肽為在 C 末端含有羧基

以由式-C(=O)-SR (式中 R 為苄基，芳基或烷基所選出，這些再由置換基置換亦可) 表示之 α 羧基硫酸酯基置換之胺基酸殘基，該第 2 胜肽為在 N 末端含有半胱胺酸殘基；

(a) 由在步驟 (o) 所得到之胜肽中之半胱胺酸殘基之-SH 基與甲基化助劑反應而將該-SH 基變換為-SMe 基之步驟；

(b) 使由步驟 (a) 所得之-SMe 基與氰化物反應而產生反應中間體之步驟；以及

(c) 由較步驟 (b) 更為鹼性條件下，將在步驟 (b) 所得到之反應中間體變換為含有絲胺酸殘基之胜肽之步驟。

又本發明係製造含有蘇胺酸殘基之方法，其特徵為可提供以下步驟之該製造方法：

(o) 由天然化學接合法來連接第 1 胜肽及第 2 胜肽而得到含有蘇胺酸衍生物 A 作為胺基酸殘基之胜肽之步驟，該第 1 胜肽為在 C 末端含有羧基以式-C(=O)-SR (式中 R 為苄基、芳基、烷基所選出，這些再由置換基置換亦可) 表示之 α 羧基硫酸酯基置換之胺基酸殘基。該第 2 胜肽為在 N 末端含有蘇胺酸殘基；

(a) 由在步驟 (o) 所得到之胜肽中之蘇胺酸衍生物 A 殘基之-SH 基與甲基化助劑反應，而將該-SH 基變換為-SMe 基之步驟；

(b) 由在步驟 (a) 所得到-SMe 基與氰化物反應而產生反應中間體之步驟；以及

(c) 在較步驟 (b) 更為鹼性條件下，將步驟 (b) 所得到之反應中間體變換為含有蘇胺酸殘基之胜肽之步驟。

又本發明在含有具-SH 基之胺基酸殘基之糖胜肽中，其特徵為具有將該-SH 基變換為-OH 基之糖胜肽之製造方法，可提供以下之步驟

(a) ~ (c) 之該製造方法：

(a) 糖胜肽中之-SH 基與甲基化助劑反應之步驟；

(b) 在步驟 (a) 所得到之-SMe 基與氰化物反應之步驟；以及

(c) 在較步驟 (b) 更為鹼性條件之步驟。

又本發明，在含有具-SH 基之胺基酸殘基之胜肽中，其

特徵為具有將該-SH 基變換為-OH 基之糖胜肽之製造方法，並可提供以下步驟 (a) ~ (c) 之該製造方法：

(a) 由糖胜肽中之-SH 基與甲基化助劑反應，將該-SH 基變換為-SMe 基之步驟；

(b) 由在步驟 (a) 所得到之-SMe 基與氰化物反應，而產生反應中間體之步驟；以及

(c) 在較步驟 (b) 更鹼性條件下，將步驟 (b) 所得到之反應中間體變換為含有具-OH 基之胺基酸殘基之糖胜肽之步驟。

又本發明，在含有半胱胺酸殘基之糖胜肽中，其特徵為將該半胱胺酸殘基變換為絲胺酸殘基之糖胜肽之製造方法，並可提供以下步驟 (a) ~ (c) 之該製造方法：

(a) 由糖胜肽中之半胱胺酸殘基之-SH 基與甲基化助劑反應，將該-SH 基變換為-SMe 基之步驟；

(b) 在步驟 (a) 所得到之-SMe 基與氰化物反應而產生反應中間體之步驟；以及

(c) 在較步驟 (b) 更為鹼性條件下，將在步驟 (b) 所得到之反應中間體變換為含有絲胺酸殘基糖胜肽之步驟。

又本發明，在含有以上式 (1) 所表示之蘇胺酸衍生物 A 以作為胺基酸殘基之糖胜肽中，其特徵為該蘇胺酸衍生物 A 殘基變換為蘇胺酸殘基之糖胜肽之製造方法，並可提供以下 (a) ~ (c) 步驟：

(a) 由糖胜肽中之蘇胺酸衍生物 A 殘基之-SH 基與甲基化助劑反應，將-SH 基變換為-SMe 基之步驟；

(b) 將在步驟 (a) 所得到-SMe 基與氰化物反應而產生反應中間體之步驟；以及

(c) 在較 (b) 步驟更鹼性條件下，將在步驟 (b) 所得到反應中間體，變換為含有蘇胺酸殘基之糖胜肽之步驟。

又本發明，係為含有具-OH 基之胺基酸殘基之糖胜肽之製造方法，其特徵係可提供以下步驟之該製造方法：

(o) 由天然化學接合法來連接第 1 胜肽或糖胜肽及第 2 胜肽或糖胜肽而得到含有具-SH 基之胺基酸殘基之糖胜肽之步驟，該第 1 胜肽或糖胜肽為在 C 末端含有羧基以式-C(=O)-SR (式中 R 為苄基、芳基、烷基所選出，這些再由置換基置換亦可) 表示之 α 羧基置換之胺基酸殘基，第 2 胜肽或糖胜肽 (在此，第 1 胜肽或糖胜肽以及第 2 胜肽或糖胜肽之至少一方為糖胜肽) 係在 N 末端含有具-SH 基之胺基酸殘基；

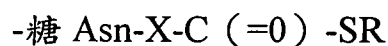
(a) 由步驟 (o) 所得到之糖胜肽中之-SH 基與甲基化助劑反應，將該-SH 基變換為-SMe 基之步驟；

(b) 由在步驟 (a) 所得到之-SMe 基與氰化物反應，而產生反應中間體之步驟；以及

(c) 在較步驟 (b) 更鹼性條件下，將步驟 (b) 所得到之反應中間體變換為含有具-OH 基之胺基酸殘基之糖胜肽之步驟。

又本發明，係含有絲胺酸殘基之糖胜肽之製造方法，其特徵係可提供以下步驟之該製造方法：

(o) 由天然化學接合法來連接第 1 糖胜肽與第 2 胜肽而得到含有半胱胺酸之糖胜肽之步驟，第 1 糖胜肽 C 末端係以下式來表示：



(式中，糖 Asn 為附加糖鏈天門冬醯胺，X 為脯胺酸以外任意之胺基酸殘基之羧基以外之部分，R 為由苄基、芳基、烷基所選出，這些再由置換基置換亦可)，

該第 2 胜肽係在 N 末端含有半胱胺酸殘基；

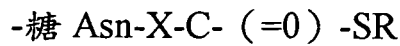
(a) 由在步驟 (o) 所得到糖胜肽中之半胱胺酸殘基中之-SH 基與甲基化助劑反應，將該-SH 基變換為-SMe 基之步驟；

(b) 由在步驟 (a) 所得到的-SMe 基與氰化物反應而產生反應中間體之步驟；以及

(c) 以較步驟 (b) 更鹼性條件下，將在步驟 (b) 所得之反應中間體變換為含有絲胺酸殘基之糖胜肽步驟。

又本發明，係一種含有蘇胺酸殘基之糖胜肽之製造方法，其特徵為可提供以下步驟之該製造方法：

(o) 由天然化學接合法連接 C 末端以下式表示之第 1 糖胜肽：



(式中，糖 Asn 為附加糖鏈天門冬醯胺，X 為脯胺酸以外之任意之胺基酸殘基之羧基以外之部分，R 為由苄基、芳基、烷基所選出，再將這些自由置換基置換亦可)

與第 2 胜肽而得到含有上述 (1) 式所表示含有蘇胺酸衍生物 A 作為胺基酸殘基之糖胜肽之步驟，

該第 2 胜肽係在 N 末端含有蘇胺酸殘基；

(a) 由在步驟 (o) 所得到之糖胜肽中之蘇胺酸衍生物 A 殘基之 -SH 基與甲基化助劑反應，將該 -SH 基變換為 -SMe 基之步驟；

(b) 由在步驟 (a) 所得到之 -SMe 基與氰化劑反應而得到反應中間體之步驟；以及

(c) 在比步驟 (b) 更鹼性條件下，將在步驟 (b) 所得到反應中間體變換為含有蘇胺酸殘基之糖胜肽之步驟。

又本發明可提供含有以下式表示之構造之糖胜肽，



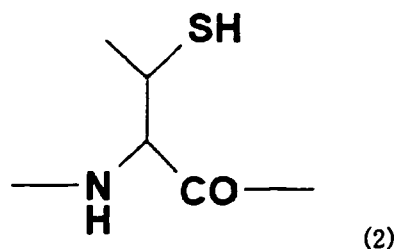
(式中，

糖 Asn 為附加糖鏈天門冬醯胺，

X 為脯胺酸以外之任意胺基酸殘基，

Y 為以式 (2)

[化 4]



表示之蘇胺酸衍生物 A 殘基。

在本發明中，依實施態樣，在步驟 (a) 或步驟 (o) 中之胜肽或糖胜肽中之蛋胺酸殘基，係保護蛋胺酸殘基，較佳的情況下，亦可於步驟 (b) 或步驟 (c) 後，特別是步驟 (c) 之後含有以下之步驟 (d)：

(d) 將保護蛋胺酸殘基去保護 (deprotection) 之步驟。

在本發明中，依實施態樣，在步驟 (b) 所得到反應中間體最好可為酯。

在本發明中，依實施態樣，步驟 (b) 在酸性條件下，最好有特別在 pH2~pH3 條件下進行之場合。

在本發明，依實施態樣，在步驟 (b) 所用之氰化物最好可為氰化溴。

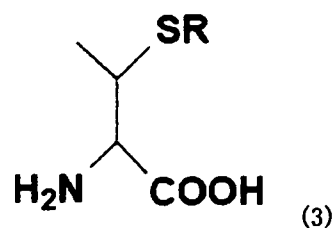
在本發明中，依實施態樣，步驟 (c) 在弱鹼性條件下，例如最好有在 pH7~9 特別是在 pH7~8 下進行之場合。在弱鹼性條件下進行步驟 (c) 之場合，依實施態樣，最好有在步驟 (c) 進行 10 分鐘以上，特別約為 15 分鐘以上 (例如約 10 分鐘~30 小時之程度，特別是約 15 分鐘~30 小時之程度) 之場合。

在本發明中，依實施態樣，將步驟 (c) 在強鹼性條件下，最好有例如在 pH9~13 特別是在 pH10~11 條件下進行之場合，在強鹼性條件下進行步驟 (c) 之場合依實施態樣，步驟 (c) 可進行約 1 小時以下，最好有特別是進行約 10 分鐘以下 (例如 5 分鐘~1 小時之程度，特別

是約 5 分鐘~10 分鐘之程度) 之場合。

在本發明中，在第 2 胜肽之 N 末端含有蘇胺酸衍生物殘基之場合，依實施態樣，可得到該蘇胺酸衍生物殘基，係為以式 (3)：

[化 5]



(式中，R 係 H 或在天然化學接合法之反應條件下容易地去保護之硫醇基之保護基，最好為 H 或二硫化物基) 所表示之蘇胺酸衍生物之 N 末端胺基酸殘基。

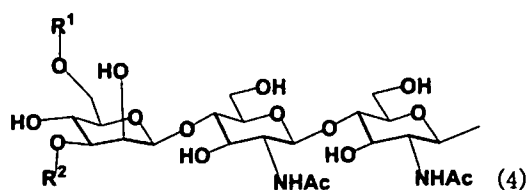
在本發明，依實施態樣有最好為第 1 胜肽 (或糖胜肽) 以及第 2 胜肽 (或糖胜肽) 之任何 1 個，兩者最好更特定為不含半胱胺酸或半胱胺酸為保護半胱胺酸之胜肽 (或糖胜肽) 之場合。

在本發明中，依實施態樣，有第 1 胜肽 (或糖胜肽) 及第 2 胜肽 (或糖胜肽) 之任何 1 個，為具有 80 個以下，較佳為 50 個以下，更佳為 30 個以下之胺基酸殘基之胜肽 (或糖胜肽) 之場合。

在本發明中，在糖胜肽中之糖鏈，依實施態樣最好有 N 結合型糖鏈或 O 結合型糖鏈之場合。

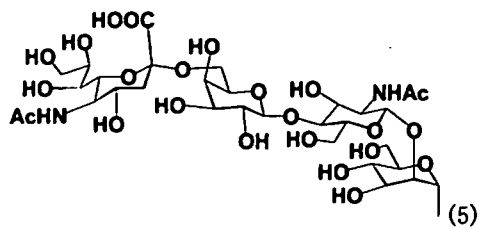
在本發明中，糖鏈依實施態樣最好有以下式 (4) 表示之糖鏈之場合。

[化 6]

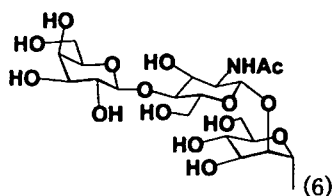


[式中 R^1 及 R^2 係為各自獨立之氫原子或以式(5)~(8)所表示之基。]

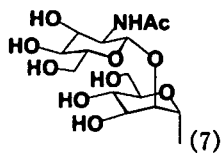
[化 7]



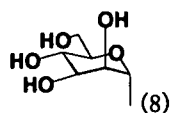
[化 8]



[化 9]



[化 10]



在本發明中，依實施態樣，在步驟(c)或步驟(d)後，最好更含有附加糖鏈之步驟之場合。

在本發明製造方法所得到胜肽或糖胜肽，依實施態

樣，最好有所有之醯胺結合為天然醯胺結合之場合。

在本發明之製造方法中所得到的胜肽或糖胜肽，依實施態樣，所有構成之胺基酸，最好係有構成活體內之胜肽或糖胜肽之胺基酸所存在之胺基酸之場合。

【發明之效果】

依本發明之胜肽之製造方法，可將具有-SH基之胜肽之-SH基變換為-OH基。又由天然化學接合法，連結第1胜肽及第2胜肽，而可得到將含有具-SH基之胺基酸殘基之胜肽之-SH基變換為-OH基，該第1胜肽為在C末端具有以-C(=O)-SR所表示之 α -羧硫酯部分，該第2胜肽為在N末端含有具-SH基之胺基酸殘基。這些方法可應用於糖胜肽。

因此，依本發明之胜肽製造方法的話，可將胜肽中之半胱胺酸殘基變換為絲胺酸殘基，即使欲得到之所要之序列不存在半胱胺酸，只要存在絲胺酸，亦可適用NCL法。

又本發明，也提供具-SH基蘇胺酸為連接部位之天然化學接合法，因可將天然化學接合法所得到的胜肽中之具-SH基之蘇胺酸殘基變換為蘇胺酸殘基，因此在具蘇胺酸胜肽之製造中，將蘇胺酸殘基作為連接部位可適用天然化學接合法。

在習知之天然化學的天然化學接合法為連結部位之半胱胺酸雖在活體內之胜肽中含有率低，但若依本發明之方法，在活體內之胜肽，特別在糖胜肽中，可將含有率高的絲胺酸及蘇胺酸設計為在天然化學接合法中作為新的連接部位。

再者，上述之方法因適用於糖胜肽，特別是因適用於含有絲胺酸及蘇胺酸之含有率高之O結合型糖鏈或適用於含有具-糖Asn-X-Ser或-糖Asn-X-Thr(式中，糖Asn係附加糖鏈之天門冬醯胺，X為脯胺酸以外之任意之胺基酸殘基)之序列之N結合型糖鏈之糖胜肽以作為共有序列，因此利用天然化學接合法可製造與天然型同構造之具有N結合型糖鏈或O結合型糖鏈之糖胜肽。

【實施方式】

【發明實施之最佳型態】

本發明之第 1 方面，在含有具有-SH 基之胺基酸殘基胜肽中，經由含有下述步驟 (a) ~ (c) 而可得到含有具-OH 基之胺基酸殘基之胜肽：

(a) 讓胜肽中之-SH 基與甲基化物助劑反應；

(b) 讓在步驟 (a) 所得到之-SMe 基與氰化物反應；

以及

(c) 在比步驟 (b) 更鹼性條件下進行之步驟。

上述步驟 (a) ~ (c)，若較為特定下係為

(a) 由讓胜肽中之-SH 基與甲基化助劑反應，將該-SH 基變換為-SMe 基之步驟；

(b) 由讓在步驟 (a) 所得到之-SMe 基與氰化物反應而產生反應中間體；以及

(c) 在較步驟 (b) 更為鹼性條件下，將步驟 (b) 所得到反應中間體變換為含有具-OH 基之胺基酸殘基之胜肽之步驟。

在本發明之第 2 方面，為以下之步驟：

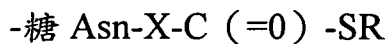
將第 1 胜肽及第 2 胜肽以天然化學接合法連結，而得到含有具-SH 基之胺基酸殘基之胜肽之步驟；以及為經由含有上述步驟 (a) ~ (c) 步驟而得到含有具-OH 基之胺基酸殘基胜肽；該第 1 胜肽為在 C 末端含有羧基以式-C(=O)-SR (式中 R 為苄基、芳基或烷基所選出，這些再由置換基置換亦可) 表示之 α 羧硫酯基置換之胺基酸殘基，該第 2 胜肽為在 N 末端含有具-SH 基之胺基酸殘基。

本發明之第 3 方面，在含有具-SH 基之胺基酸殘基之糖胜肽，由經過含有上述步驟 (a) ~ (c) 而可得到含有具-OH 基胺基酸殘基之

糖胜肽。

在本發明之第 4 之方面，為以下之步驟：

將第 1 胜肽及第 2 胜肽以天然化學接合法連結而得到含有具-SH 基之胺基酸之糖胜肽之步驟；以及經由上述步驟 (a) ~ (c) 而得到含有具-OH 基之胺基酸殘基之胜肽；該第 1 胜肽為 C 末端以下式表示之第 1 糖胜肽



(式中糖 Asn 係附加糖鏈天門冬醯胺，X 為脯胺酸以外之任意之胺基酸殘基之羧基以外之部分，R 為由苄基、芳基或烷基所選出，這些再由置換基置換亦可)。該第 2 胜肽為 N 末端含有具-SH 基之胺基酸殘基。

在本說明書中，所謂胜肽，只要是 2 個以上之胺基酸由醯胺結合之結合物並無特別限定，含有習知之胜肽及新穎之胜肽及胜肽改變體。一般所稱蛋白質之物，在本發明中係為含於胜肽中之物者。在較佳之態樣中，以本發明之製造方法所得到之胜肽（或糖胜肽）係以與天然型相同之醯胺結合（胜肽結合）之結合有 2 個以上之胺基酸。

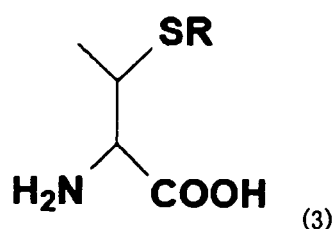
在本說明書中所謂「胜肽改變體」係天然或人工改變胜肽之化合物，作為其如此的改變，例如可舉出胜肽之 1 個或數個胺基酸殘基之烷基化、醯化（例如乙醯化）、醯胺化（例如胜肽 C 末端之醯胺化）、羧化、酯成形、二硫化物結合形成，糖基化、脂質化、磷酸化、氫氧化，標識成份之結合等。

在本說明中，所謂「胺基酸」係用在其最廣之意義，天然胺基酸，例如不僅含絲胺酸 (Ser)、天門冬醯胺 (Asn)、纈胺酸 (Val)、白胺酸 (Leu)、異白胺酸 (Ile)、丙胺酸 (Ala)、酪胺酸 (Tyr)、甘胺酸 (Gly)、離胺酸 (Lys)、精胺酸 (Arg)、組胺酸 (His)、天門冬胺酸 (Asp)、麩胺酸 (Glu)、麩醯胺 (Gln)、蘇胺酸 (Thr)、半胱胺酸 (Cys)、蛋胺酸 (Met)、苯丙胺酸 (Phe)、色胺酸 (Trp)、脯胺酸 (Pro)，亦含有所謂胺基酸變異體及衍生物等非天然胺基酸。只要該行業者，考慮此廣之定義，作為在本說明書之胺基酸可理解而舉出有例如 L-胺

基酸、D-胺基酸，胺基酸變異體及衍生物等化學修飾之胺基酸；正白安酸、 β -丙胺酸、鳥胺酸等在活體內非構成蛋白質之材料之胺基酸，以及該行業者所習知之具有胺基酸特性之化學合成之化合物。作為非天然胺基酸，除了以下所詳述蘇胺酸衍生物 A 外，可舉出有 α -甲基胺基酸（ α -甲基丙胺酸等）、D-胺基酸、組胺酸樣胺基酸（2-胺基-組胺酸、 β -羥基-組胺酸、高組胺酸、 α -氟甲基-組胺酸及 α -甲基-組胺酸等），將在側鏈上具多餘之亞甲基之胺基酸（「高」胺基酸）以及在側鏈中之羧酸官能基胺基酸以羧酸基置換之胺基酸（半胱胺酸等）。

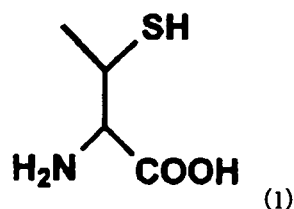
在本說明書中，所謂「蘇胺酸衍生物」係以下式 (3)

[化 11]



來表示之化合物。式 (3) 中，R 為在 H 或天然化學接合法之條件下容易去保護之硫醇基之保護基。最好是 H 或二硫化物基，特別是在上述式 (3) 中，將 R 是 H 之以下式 (1) 之化合物稱為蘇胺酸衍生物 A。

[化 12]



式 (3) 之蘇胺酸衍生物，蘇胺酸之-OH 基之部位為是-SR 基之化

合物，亦含有具任何之立體配置。在本發明之製造方法中，當胜肽中之胺基酸殘基之-SH基變換為-OH基時，因考慮產生立體反轉，因此，當特別要得到天然中存在之蘇胺酸時，最好有使用天然存在之蘇胺酸之-OH基及立體反轉-SR基之蘇胺酸衍生物之場合。

上述蘇胺酸衍生物係例如參照後述之實施例及合成例而能以下述之方法來得之。

首先，準備保護蘇胺酸之胺基及羧基之物。各保護基只要以下述之反應可得到所要的胜肽並無特別限定，例如可使用以BOC基保護胺基，以TMSE（三甲基硅烷基乙基）基來保護羧基。其次，使用習知之手法將 β 位之氫氧基甲磺醯化。其次例如使用DBU及硫代醋酸將此甲磺醯基對硫代乙醯基置換（參照D. Crich et al, J. Am. Chem. Soc. 129, 10064(2007)）。

將此硫代乙醯基變換為以習知手法之用二硫化基、乙醯胺甲基、硝基苄基、三苯甲基等該行業者所習知之保護基來保護之硫醇基。例如在以二硫基（disulfide）保護硫醇基之場合，可參照後述之合成例1。二硫基係在其後之天然化學接合法之反應條件下容易地被去保護。

在較佳之態樣中，以本發明製造方法所製得之胜肽（或糖胜肽）係由作為所有活體內胜肽（或糖胜肽）所構成之胺基酸來存在之胺基酸所形成。在本發明之一態樣，由本發明之製造方法所製得之胜肽，最好為不含半胱胺酸殘基或含量少之構成胺基酸中之半胱胺酸之胜肽。再者，在本發明之一態樣中，由本發明之製造方法所得之胜肽，係由任意絲胺酸殘基或蘇胺酸殘基到下一個絲胺酸或蘇胺酸或N末端或C末端之任何一個間具有80個以下，較佳為50個以下，更加為30個以下之胺基酸殘基。例如在本發明之一態樣中，由本發明之製造方法所得到之胜肽為於50~40胺基酸殘基中，最好在20~30胺基酸殘基中為具有一個以上絲胺酸或蘇胺酸殘基。

在本說明書中，所謂「反應中間體」在廣義中係指在胜肽中之-SMe基中讓氰化物反應後，至被變換為-OH基之各化合物中之任何一個。本發明之反應圖係如以下之圖1所示。以下圖1中，在以C所表示

之酯也是在本發明中之反應中間體中之一個。又，在本說明書中例如在以下圖 1 中雖記載有「胜肽-OH」但只要不特別強調記載為此-OH，則表示胜肽 C 末端之羧基之-OH。

[化 13]

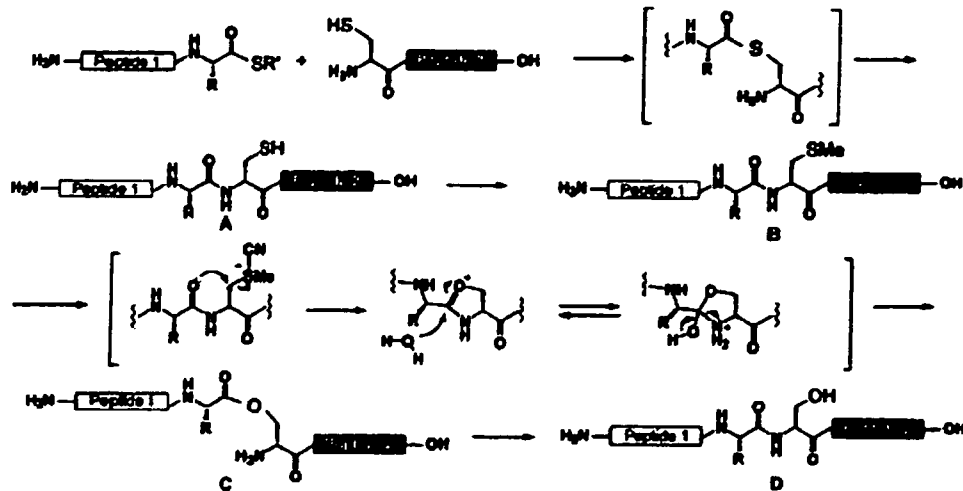


圖 1

在本說明書中，所謂糖胜肽，只要是上述胜肽中至少附加一個糖鏈之化合物，並無特別限定，而含有習知之胜肽及新穎之糖胜肽。一般所謂糖蛋白質者，係含在本發明之糖胜肽之定義中。

在較佳的態樣中，在本發明之製造方法中所得之糖胜肽為具有 N 結合型糖鏈或 O 結合型糖鏈之胜肽，例如可舉出紅血球生成素、白介素、干擾素-β、抗體、單核細胞趨化因子蛋白質-3(MCP-3、monocyte chemotactic protein-3)等胜肽之一部分或全部。

在本發明之一態樣中，由本發明之製造方法所得之糖胜肽係由未附加糖鏈之任意絲胺酸或蘇胺酸殘基至其次之絲胺酸殘基或蘇胺酸殘基或 N 末端或 C 末端之任何其間具有 80 個以下，較佳為 50 個以下，更佳為 30 個以下之胺基酸殘基，例如在本發明之一態樣中，由本發明之製造方法所得之糖胜肽，係在 5~40 個胺基酸殘基中，較佳為 20~30 胺基酸殘基中具有 1 個以上之絲胺酸或蘇胺酸殘基。

在糖胜肽中，所謂糖鏈及胜肽中之胺基酸殘基即使為直接接合，亦可藉由連接子 (linker) 結合亦可。在糖鏈與胺基酸之結合部位上

並無特別限制，但最好在糖鏈之還元末端中結合胺基酸。

糖鏈所結合之胺基酸之種類並無特別限定，亦可結合在任何之天然胺基酸、非天然之胺基酸上。糖胜肽從具有與存在在活體內之糖胜肽（糖蛋白質）同一或類似之構造之觀點觀之，糖鏈最好為如 N 結合型糖鏈之結合在 Asn 上，或如 O 結合型糖鏈結合在 Ser 或 Thr 上。特別是，在 N 結合型糖鏈之場合，依本發明之製造方法所得之糖胜肽最好為具有在 Asn 上結合糖鏈，在該 Asn 之 C 末端上脯胺酸以外胺基酸（X）結合醯胺基（胜肽結合），且最好在具有在 X 之 C 末端側上具有 Thr 或 Ser 結合醯胺基（胜肽結合）之構造（-糖 Asn-X-Thr/Ser-）之糖胜肽。

在糖鏈及胺基酸藉由連結子結合之場合，由與連結子結合之容易性之觀點，結合糖鏈之胺基酸最好為：在天門冬胺酸或麩胺酸等分子內具有 2 個以上羧基之胺基酸，在離胺酸、精胺酸、組胺酸、色胺酸等具有 2 個以上之胺基之胺基酸，在絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸中等分子內具有氫氧基之胺基酸，在半胱胺酸等分子內具有硫醇基之胺基酸，或在天門冬醯胺，麩醯胺等分子內具有醯胺基之胺基酸為佳，特別是就反應性觀點觀之，以天門冬胺酸、麩胺酸、離胺酸、精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、半胱胺酸、天門冬醯胺或麩醯胺為佳。

在糖胜肽中，藉由連結子結合糖鏈及胺基酸之場合。在該領域中雖能廣泛使用作為連結子，例如可舉出： $-\text{NH}-(\text{CO})-(\text{CH}_2)_a-\text{CH}_2-$

（式中 a 為整數，只要不阻礙作為目的之連結子之機能；並無限定但最好為 0~40 之整數）；

C_{1-10} 聚亞甲基；

$-\text{CH}_2-\text{R}^3-$

（在此 R^3 為由烷基，被置換之烷基、鏈烯基、被置換之鏈烯基、炔基、被置換之炔基、芳基、被置換之芳基、碳環基、由被置換之碳環基、雜環基及被置換之雜環基之所形成之族群中被選擇之基中脫離一氫原子所產生之基）等。

在本說明書中，所謂「糖鏈」除了單位糖（單糖及/或其衍生物）

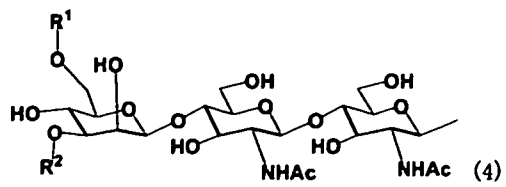
連結 2 個以上之化合物外亦含有由 1 個之單位糖（單糖及/或其衍生物）所形成化合物。作為此一糖鏈，例如可舉出在活體中含有單糖類及多糖類（葡萄糖、半乳糖、甘露糖、岩藻糖、木糖、N-乙醯葡萄糖胺、N-乙醯半乳糖胺、唾液酸以及這些之複合物及衍生物）外，亦可舉出有分解多糖、糖蛋白質、蛋白聚糖、葡萄糖聚糖、糖酯質等之由複合生物分子所分解或衍生之糖鏈等之廣範圍，但不僅限於這些。在連結 2 個以上單位糖之場合，在各單位糖彼此間，由二糖甘鏈結以脫水縮合來結合，糖鏈為直鏈型以分歧鏈型亦可。

又，在本說明書中，在「糖鏈」亦含有糖鏈之衍生物，作為糖鏈之衍生物，例如構成糖鏈之糖，可舉出具羧基之糖（例如 C1 位置由被氧化之羧酸所形成之醛糖糖酸（例如，D-葡萄糖被氧化之 D-葡糖酸）、末端之 C 原子由羧酸所形成之糖醛（D-葡萄糖被氧化之 D-葡糖醛酸）），具有胺基或胺基衍生物（例如乙醯化胺基）之糖（例如 N-乙醯基-D-葡糖胺、N-乙醯基-D-半乳糖胺等），在兩方具有胺基及羧基之糖（例如 N-乙醯神經胺酸（唾液酸）、N-乙醯胞壁酸等）、去氧化糖（例如 2-去氧-D-核糖）、含有硫酸基之硫酸化糖，含有磷酸基之磷酸化糖等糖鏈，但不限定於此等。

本發明之糖鏈，最好為，在活體內作為複合糖質（糖胜肽（或糖蛋白質）、蛋白聚糖、糖酯質等）存在之糖鏈、較佳為在活體內，作為糖胜肽（或糖蛋白質）之結合胜肽（或蛋白質）之糖鏈之 N-結合型糖鏈，O-結合型糖鏈等。在 O-結合型糖鏈結合糖胜肽中，N-乙醯基半乳糖胺（GalNAc）、N-乙醯基葡萄糖胺（GlcNAc）、木糖、岩藻糖等以 O-葡糖苷結合來連結胜肽之 Ser 或 Thr，對此再附加糖鏈。作為 N 結合型糖鏈，例如可舉出高甘露糖（High mannose）型、複合（Complex）型、混成（Hybrid、雜合）型，較佳為複合型。

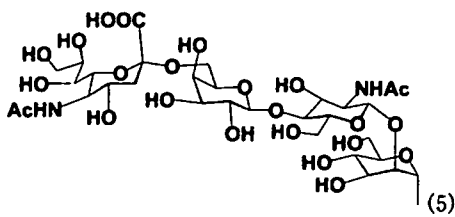
在本發明，作為較佳之糖鏈例如以下述式（4）來表示之糖鏈。

[化 14]

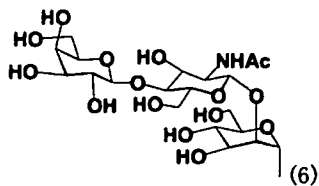


[式中 R^1 及 R^2 為各自獨立，氫原子或以式(5)~(8)表示之基。]

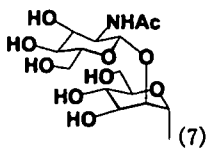
[化 15]



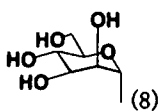
[化 16]



[化 17]



[化 18]



本發明之糖胜肽之製造方法，在考慮適用於醫藥品等領域之場合，由可能迴避抗原性等問題之觀點，作為較佳之糖鏈，例如可舉出在人體內，與蛋白質結合而作為糖蛋質存在之糖鏈（例如 FEBS、LETTERS、Vol. 50、No. 3 1975 年 2 月所記載之糖鏈），及具有同一構造之糖鏈（構成糖之種類及這些同一結合樣式之糖鏈）或由這些非還原末端失去 1 個或數個糖之糖鏈。

在糖胜肽中，附加糖鏈之數量，只要是 1 鏈以上並無特別限定，但由提供存在於人體內之糖胜肽類似構造之糖胜肽之觀點，只要是附加與存在體內之糖胜肽同程度之數量為更佳。

在本發明較佳之一態樣中，本發明之糖胜肽之糖鏈之構造為均一。在本說明書中，所謂在糖胜肽中之糖鏈構造為均一，在糖胜肽間之比較之場合，係指胜肽中糖鏈附加部位，構成糖鏈之各糖之種類，結合順序及糖間之結合樣式為同一，至少為 90% 以上，較佳為 95% 以上，更佳為 99% 以上之糖鏈構造為均一。糖鏈為均一之糖胜肽，品質穩定，特別在醫藥品之製造或化驗（assay）等領域為佳。

在本發明製造方法作為原料使用之胜肽，例如可由適用固相合成、液相合成、由細胞之合成、分離抽出天然存在物方法等，可由該行業者所熟知之胜肽製造方法來製造。又，用糖胜肽作為原料之場合，在上述習知之胜肽之製造方法中，能以組入糖鏈附加步驟來製造。有關在糖鏈附加步驟使用之糖鏈之製造方法，例如可參照國際公開號 WO03/008431、WO2004/058984、WO2004/058824、WO2004/070046、WO2007/011055 等。

作為具體例，以下表示由固相合成法製造含有具-SH 基之胺基酸殘基之胜肽或糖胜肽，在以下所示之方法中可參照國際公開號 WO2004/005330。

首先（1）讓具氫氧基之樹脂（Resin）之氫氧基及以脂溶性保護基保護胺基之胺基酸之羧基酯化反應。此時，因胺基酸之胺基以脂溶性保護基保護，可防止胺基酸彼此間產生自我縮合，樹脂之氫氧基及胺基酸之羧基產生而反應酯化。

其次 (2) 脫離上述所得之酯之脂溶性保護基使形成游離胺基。

(3) 使此游離之胺基與以脂溶性保護基保護胺基之所要之胺基酸之羧基產生醯胺化反應。

(4) 脫離上述脂溶性保護基使形成游離胺基。

(5) 必要時由因應上述 (3)、(4) 步驟來反覆進行，而得到連結所要數量之所要胺基酸，而末端結合樹脂，他端具有游離胺基之胜肽。

在上述 (1) ~ (5) 步驟中，由使用作為胺基酸之具-SH 基 (-SH 基被保護亦可) 之胺基酸 (例如半胱胺酸或前示之式 (3) 之蘇胺酸衍生物)，而可得到具-SH 基之胺基酸殘基。又在上述 (1) ~ (5) 步驟使用時，具-SH 基胺基酸之-SH 基以該行業人士習知之保護基，例如二硫化基乙醯胺甲基、硝基苄基、三苯甲基來保護亦可，其後依需要去保護亦可。又在上述步驟 (1) ~ (5) 作為胺基酸由使用附加糖鏈之胺基酸 (例如在天門冬醯胺上附加糖鏈之糖鏈天門冬醯胺，絲胺酸或蘇胺酸上附加糖鏈之糖鏈絲胺酸或糖鏈蘇胺酸等)，更可得到在所要之位置上具有一個或兩個以上糖鏈之 N 結合型及/或 O 結合型糖鏈胜肽。此一 N 結合型或 O 結合型胜肽，如上述在所期望之位置上可包含有具-SH 基之胺基酸殘基。

(6) 並且，由用酸將樹脂 (Resin) 及 (1) 之胺基酸間之酯結合切斷而可製造所期望之胜肽 (或糖胜肽)。

作為固相樹脂 (樹脂 Resin) 一般以固相合成之使用之樹脂為佳，例如可使用 Amino-PEGA Resin (Merck 公司製)、Wang Resin (Merck 公司製)、HMPA-PEGA Resin (Merck 公司製)、Trt Chloride Resin (Merck 公司製) 等，又讓 Amino-PEGA Resin (樹脂) 與胺基酸間存在連結子 (Linker) 亦可，作為此一連結子，例如可舉出，4-羥甲基苯氧乙酸 (HMPA)、4-(4-羥甲基-3-甲氧苯氧基)-丁基醋酸 (HMPB) 等。

作為脂溶性保護基，例如可舉出 9-芴甲氧羰基 (Fmoc) 基、t-丁氧羰基 (Boc) 基、烯丙氧羰基 (Alloc) 基等之含有羰基之基、乙醯

基 (Ac) 等之醯基、烯丙基、苄基等之保護基，但不特別限定這些。

在導入脂溶性保護基中，例如在導入 Fmoc 基之場合中，可由加入 9-芴甲基-N-琥珀醯亞胺基碳酸酯及碳酸氫鈉進行反應來導入。反應為 0~50°C 較佳為在室溫進行約 1~5 小時之程度。

作為以脂溶性保護基所保護之胺基酸，可使用以上述方法來保護所示之胺基酸，又可使用市販品。例如可舉出 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。

作為酯化觸媒例如可使用 1-(均三甲苯基-乙-碲基)-3-硝基-1,2,4-三唑 (MSNT)、二環己基碳二亞胺 (DCC)、1,3-二異丙基碳二亞胺 (DIPCDI) 等之習知之脫水縮合劑。胺基酸及脫水縮合劑之使用比率、對前者 1 重量部 (重量百分比) 後者一般是 1~10 重量部，較佳為 2~5 重量部。

酯化反應，例如最好進行將樹脂放入固相圓管柱容器內，此樹脂用溶劑洗淨，其係由加上胺基酸之溶液來進行為佳。作為洗淨用溶劑，例如可舉出二甲基乙醯胺 (DMF)、2-丙醇、亞甲基氯等。作為溶解胺基酸之溶媒，例如可舉出二甲基亞碲 (DMSO)、DMF、亞甲基氯等。酯化反應為 0~50°C，最好在室溫進行約 10 分鐘~30 小時之程度，最好進行 15 分鐘~24 小時為佳。

用醋酸酐等將此時固相上之未反應之官能基來乙醯化密封 (Capping)。

脂溶性保護基之脫離例如能以鹼 (Base) 來處理。

作為鹼可舉出吡啶、嗎啉等。其時點，最好在溶媒存在下進行。作為溶媒可舉出例如 DMSO、DMF、甲醇等。游離胺基與以脂溶性保護基保護胺基氮之任意胺基酸之羧基之醯胺化反應最好有活化性劑及溶媒之存在下進行。

作為活化劑如何可舉出二環己基碳二亞胺 (DCC)、1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基) 碳二亞胺、鹽酸鹽 (WSC/HCL)、疊氮磷酸二酯苯

(DPPA)、羰二咪唑 (CDI)、氰基膦酸二乙酯 (DEPC) 3-二異丙基碳二亞胺 (DIPCI)、六氟磷酸苯並三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷 (PyBop)、3-(二乙氧磷醯氧基)、-1,2,3-苯並三嗪-4(3H)-酮 (DEPBT)、1-羥基苯並三唑 (HOBt) 羥基丁二醯亞胺 (HOSu)、二甲胺基吡啶 (DMAP)、1-羥基-7-偶氮苯並三氮唑 (HOAt)、3-羥基-4-羧基-3,4-二氫-5-氮雜苯並-1,2,3-三嗪 (HODhbt)、羥基鄰苯二甲醯亞胺 (HOPht)、五氟苯酚 (Pfp-OH)、2-(1H-苯並三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯 (HBTU)、O-(7-偶氮苯並三氮唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸 (HATU)、O-苯並三氮唑-1-基-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸酯 (TBTU) 等。

活性化劑之使用量，對以脂溶性之保護基保護胺基氮之任意之胺基酸，佳為 1~20 當量，較佳為 1~10 當量，更佳為 1~5 當量。

雖只以上述活化劑進行反應，但最好併用胺作為補助劑。作為胺例如可使用二異丙基乙胺 (DIPEA)、N-乙基嗎啉 (NEM)、N-甲基嗎啉 (NMM)、N-甲基咪唑 (NMI)。補助之使用量對以脂溶性之保護基保護胺基氮之任意胺基酸，最好使用 1~20 當量，較佳為 1~10 當量，更佳為 1~5 當量。

作為溶媒，例如可舉出 DMSO、DMF。反應最好在 0~50°C，較佳為室溫約 10~30 小時之程度，較佳進行 15 分鐘~24 小時之程度。此時使用醋酸酐乙醯化固相上來反應之胺基來密封 (Capping) 為佳。脂溶性保護基之脫離可與上述相同來進行。

在由 Resin (樹脂) 來切斷胜肽鏈中最好以酸來處理，作為酸，例如可舉出三氟醋酸 (TFA)、氟化氫 (HF)、其時點由在胺基酸所使用之脂溶性保護基及 Resin (樹脂) 上之連結子，因有產生反應性高的陽離子種之場合，最好添加為了獲取此物之親核試劑。作為親核試劑，可舉出三異丙基矽烷 (TIS)、酚 (phenol)、大茴香硫醚 (甲基苯基硫醚)、乙二硫醇 (EDT) 基。

如此行之，可得到含有具-SH 基之胺基酸殘基胜肽 (或糖胜肽)。

又，如此行之在所得含有具-SH 基胺基酸殘基之胜肽或糖胜肽

中，因使用代表轉谷胺醯胺酶，利用酵素之逆反應之方法附加糖鏈，而可得到含有具-SH基之胺基酸之糖胜肽。

再者，在上述之方法中，可由轉移酵素來組合糖鏈伸長反應。

可使用天然化學接合法來連接上述所得到之胜肽或糖胜肽中之在 N 末端含有具-SH 基之胺基酸殘基之胜肽（糖胜肽）及在 C 末端具有如 α -羧基硫酸酯部份之胜肽（或糖胜肽）。

又，在本發明中，所謂「天然化學接合法」不僅為專利文獻 1 記載之天然型化學之天然化學接合法（Native Chemical Ligation, NCL 法），如後述實施例所述，有關於非天然胺基酸、胺基酸衍生物（例如式 (1) 中之蘇胺酸衍生物 A、保護蛋胺酸、附加糖鏈胺基酸等）之胜肽，也含有應用上述天然型化學的天然化學接合法之場合。由天然化學接合法可製造在連接部位上具天然醯胺接合（胜肽結合）之胜肽。

使用天然化學接合法之連接，在胜肽-胜肽、胜肽-糖胜肽、糖胜肽-糖胜肽間任何一個皆可。

天然化學接合法中所用之在 C 末端上具有如 α -羧基硫酸酯部份之胜肽（或糖胜肽），如專利文獻所述該行業者可利用習知之手法來製造。

例如，如後述實施例所述之由固相合成法得到胺基酸側鏈及 N 末端之胺基被保護之保護胜肽（或糖胜肽），讓此 C 末端側之羧基用 PyBOP(Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate)/DIPEA 在液相中之縮合劑中與苄硫醇縮合，其後用 95%TFA 溶液去保護（deprotection）胺基酸之鏈，而得到之如 C 末端上具有 α -羧基硫酸酯部份之胜肽（或糖胜肽）。

天然化學接合法，係使用專利文獻 1 所記載之該行業者所習知之手法，又可參照後述之實施例所記載來實施。例如，參照上述所述在 C 末端上由 $-C(=O)-SR$ 表示之 α -羧基硫酸酯部份之第 1 胜肽及具有在 N 末端含-SH 基之胺基酸殘基之第 2 胜肽來準備。

又，在第 1 胜肽，R 不妨礙硫醇交換反應而在對羧基碳之親核置換反應中只要是形成為離去基（脫離基）並無特別限定，但最好可由

苄基硫醇等之苄基型、苯硫酚、4-(羧甲基)-苯硫酚等之芳基型、乙-巰基乙磺酸鹽、3-巰基丙酸醯胺等烷基型所選出。又第 2 之胜肽之胜肽之 N 末端之-SH 基，亦可依所要之由保護基來保護，但此保護基至以下之天然化學接合法反應為止之所期望之時點來去保護，在 N 末端上具-SH 基之第 2 胜肽與第 1 胜肽反應。例如二硫化物基等，只要是在產生天然化學接合法之條件自然地被去保護之保護基，由保護基保護之第 2 胜肽可原樣地用於以下之天然化學接合法反應中。

必要時，將這兩個胜肽於 4-巰基苯乙酸、苄基硫醇、苯硫酚等觸媒硫醇之存在下，在 100mM 磷酸緩衝溶液等之溶液中混合。最好為在，相對於第 1 胜肽 1 當量之第 2 胜肽 0.5~2 當量，及在與 5 當量之觸媒硫醇之比率下進行反應。反應係在 pH6.5~7.5 程度，20~40°C 程度之條件下、約進行 1~30 小時為佳。反應之進行可使用習知組合 HPLC、MS 等之手法來確認。

對此，加上如二硫蘇糖醇 (DTT)、三(2-羧基乙基)磷酸鹽酸鹽 (TCEP) 之還原劑來抑制副反應，以由所期望之精製能來連接第 1 胜肽及第 2 胜肽。

又，之如在 C 末端上具有羧基硫醇部份 (-C=O-SR) 之胜肽上，於存在不同 R 基之胜肽之場合，可操作天然化學接合反應順序 (參照 Protein Science (2007), 16: 2056-2064 等)，在進行多次之天然化學接合之場合可考慮此，例如在作為 R 之存在芳基、苄基及烷基之場合，一般依此順序進行之連接反應。

在本發明中，具體表示含有具-SH 基之胺基酸殘基胜肽 (或糖胜肽) 之-SH 基變換為-OH 基之特徵。使用以上述方法所得到之胜肽或糖胜肽作為原料。在本發明之一態樣中，最好使用天然化學接合法而得到之胜肽或糖胜肽。其次進行含有以下之步驟 (a)~(c) 之步驟：

(a) 由讓胜肽中之-SH 基與甲基化助劑反應，將前述-SH 基變換將-SMe 基之步驟；

(b) 由讓在步驟 (a) 所得到之-SMe 基與氰化物反應，而產生反

應中間體之步驟；以及

(c) 在與步驟 (b) 較之更為鹼性條件下，將在步驟 (b) 所得到之中間體變換為含有具-OH 基之胺基酸殘基之胜肽之步驟。以下例示有關使用胜肽作為原料之場合。

步驟 (a)

在步驟 (a) 之甲基化中使用甲基化助劑，只要能將胜肽中之-SH 基變換為-SMe 基並無特別限定，例如可舉出碘代甲烷、甲基-4-硝基苯磺酸鹽等。

甲基化劑之使用量，對原料胜肽之-SH 基 1 殘基可為 1~1000 當量，較佳為 10~100 當量，更佳可為 15~30 當量。甲基化反應為 0~50°C、較佳為在 20~30°C 進行約 10 分鐘~30 小時程度，較佳為 15 分鐘~1 小時。

作為進行甲基化時之溶媒較佳為緩衝溶液，其 pH 為 7~9，特別是可適當地用表示 pH 值為 8~9 之物。例如可使用 0.25M tris-鹽酸緩衝液（含有 6M 胍鹽酸液含有 3.3mM EDTA、pH8.6）。

再者，胜肽中含半胱胺酸殘基作為胺基酸，不把此（半胱胺酸殘基）變換為絲胺酸殘基，在本發明之製造方法所得到胜肽中讓其（半胱胺酸殘基）以作為半胱胺酸存在之場合，因係以保護半胱胺酸之保護半胱胺酸之形來使用習知之手法來導入胜肽中，故可防止半胱胺酸之-SH 基在步驟 (a) 中被甲基化。作為半胱胺酸保護基，考慮在本發明之製造方法之各步驟中之硫醇交換反應，酸處理、鹼處理等可使用適切之保護基，例如可使用乙醯胺甲基（Acm）基、苄基、乙醯胺基、三苯甲基等，最好可使用 Acm 基。在步驟 (a)~(c) 之後，由所期望，使用習知之手法去保護半胱胺酸。例如導入 Acm 基、硝基苄基、三苯甲基作為保護基之半胱胺酸之場合，因追加使用以醋酸銀醋酸水溶液之去保護法，以光之去保護法，以酸處理之去保護法等步驟來變換半胱胺酸殘基。如此，可讓以本發明製造方法所得到的胜肽中存在半胱胺酸殘基。

又，依本發明之一態樣，以由具有-SMe 基之胜肽將-SMe 基變換

為-OH 基可而得到具有-OH 基之胜肽為可能，在此場合可省略上述步驟 (a)。

步驟 (b)

作為在步驟 (b) 所使用之氰化劑，例如由穩定性等之觀點可使用氰化溴，氰酸苯酯等，最好可使用容易取得之氰化溴。

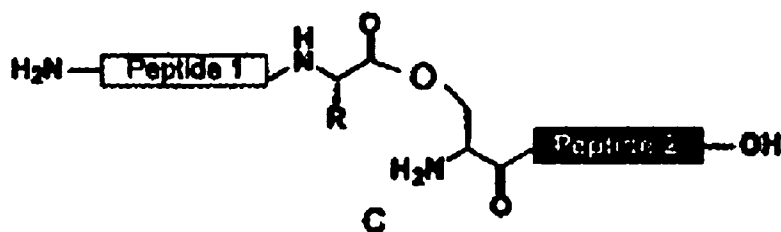
氰化物之使用量，對-SMe 基 1 可使用 1~1000 當量，較佳為 10~100 當量，更佳為 15~30 當量。與氰化物之反應，反應之進行最好是 0~50°C 較佳為在 30~40°C，約 30 分鐘~100 小時之程度，較佳為 12 小時~50 小時之程度。

與氰化物之反應，係在酸性條件下進行，特別是最好在 pH2~3 下進行。酸性水溶性物質，具體上，由使用蟻酸、三氟醋酸、甲磺酸等，可在酸性條件下之進行反應。此時，使用之酸性水溶性物質，為了防止硫磺原子之氧化最好為已除氣。又由氰化物穩定性之觀點，反應最好在遮光下進行。

作為溶媒，上述表示 pH2~3 之水溶性溶媒，例如可適當地使用 80%蟻酸溶液、70%蟻酸溶液、2%三氟醋酸/含有 39%乙腈水溶液等。

在步驟 (b) 所得之反應中間物之一例，係以以下之構造來表示之酯。

[化 19]



又，在胜肽中作為胺基酸含有蛋胺酸殘基之場合，最好區別蛋胺酸殘基之-SMe 基及在步驟 (a) 所得到之-SMe 基。在本說明書中，所謂蛋胺酸，只要是不與在步驟 (b) 之氰化物反應之化合物，並無特別限定，例如可舉出亞砷型蛋胺酸 (Met(O) : -CH₂-CH₂-S(=O)-CH₃)。如後述實施例 5 所述，因係使用習知手法將

保護蛋胺酸（例如 Met (o)）導入至胜肽，蛋胺酸殘基與步驟 (a) 所得之-SMe 基被區別，對於與步驟 (b) 之氰化物之反應，蛋胺酸殘基變成非活性。其後，使用適當習知手法將保護蛋胺酸殘基變換為蛋胺酸殘基（後述之步驟 (e)），如此為之，使用本發明製造方法也可得到具有蛋胺酸殘基之胜肽。

又，因應需要可進行去除於步驟 (b) 之與氰化物反應時所形成之副生成物半胱胺酸化體。如此之去除步驟，例如在碘化銨二甲硫 (Dimethyl Sulfide) 之存在下，讓步驟 (b) 所得之含反應中間物之混合物在室溫下反應 30 分鐘之程度，其後可進行分液洗淨。去除步驟只要在步驟 (b) 之後任何時點皆可以，最好可在步驟 (c) 之後進行。

步驟 (c)

在步驟 (c) 中，較佳步驟 (b) 更為鹼性條件下由步驟 (b) 所得之反應中間體之 O-向 N-之分子內轉移醯基，而可得到具-OH 基之胺基酸殘基之胜肽。

在步驟 (c) 之鹼性條件，由較步驟 (b) 更具鹼性條件即使酸性或中性亦佳，更特定的話，只要是隣接在步驟 (b) 所得到之反應中間物之酯結合之 C 原子上之-NH₂ 基不被質子化之條件皆佳。由有效率地將反應中間物變換為具有-OH 基胜肽之觀點，可使用弱鹼性條件或強鹼性條件。

在步驟 (c) 鹼性條件為弱鹼性之場合，其 pH 為 pH7~9，較佳為 pH7~8，例如因添加胍 (guanidine)、磷酸二鈉、Tris、碳酸氫鈉等，因該行業人士將習知 pH 調整劑之鹼性化合物添加到溶液中，而可為弱鹼性條件。此時鹼性化合物之使用量，對原料胜肽可用 1~1000 當量，較佳 10~100 當量，更佳為 15~30 當量。

在步驟 (c) 鹼性條件為弱鹼性之場合，反應為 0~50°C，最好在 20~24°C 下進行約 10 分鐘~30 小時程度，較佳為 15 分鐘~30 小時程度，最好在 pH7~9、較佳為 pH7~8 之緩衝溶液中進行。例如在 0.2M 磷酸緩衝液（含有 6M 胍鹽酸液，pH7.2）中進行步驟 (c) 亦可。在

步驟 (c) 鹼性條件為弱鹼性之場合，雖可把 pH 下降而在步驟 (c) 終了，但亦可保持原 pH 值不使其變化而移到由 HPLC 等來精製之步驟。

在步驟 (c) 鹼性條件為強鹼性之場合，其 pH 為 pH9~13，較佳為 pH10~11。強鹼條件最好為在由加水分解去除在氫氧基中過剩反應之化合物之條件，可將鹼性水溶性物質，例如可添加聯胺含水物，50mM 氫氧化鈉水溶液等至溶液中作為強鹼性條件。此時鹼性水溶性物質之使用量，對原料胜肽可為 0.5~100 當量，較佳為 0.1~10 當量，更佳可為 0.5~1 當量。例如也可進行在 pH10~11、5% 聯胺水溶液中之步驟 (c)。

在步驟 (c) 鹼性條件為強鹼性之場合，由在步驟 (b) 所得反應中間物之由 O-向 N-分子內醯基轉移而可得到含有具-OH 基之胺基酸殘基之胜肽，也可發生去氰基化 (Cyanation，由加水分解過剩反應之氰化劑去除氰基化反應)、去甲醯基化 (過剩反應之蟻酸之脫甲醯基化反應) 等。

在步驟(c)鹼性條件為強鹼性條件之場合，步驟(c)最好在 0~50°C 佳為 20~30°C 進行約 5 分鐘~30 小時之程度，較佳為 5 分鐘~1 小時更佳為進行 5 分鐘~10 分鐘之程度。在步驟 (c) 鹼性條件為強鹼性之場合，進行長時間步驟 (c) 時，可得到發生外消旋 (racemization) 作用，胜肽結合之切斷等之副反應。

在步驟 (c) 鹼性條件為強鹼性之場合，步驟 (c) Ph 值為 pH4~9 較佳為 5~9，例如可下降至 pH7 附近或 pH8~9 而終了。

又，在步驟 (c)，得到具有-OH 基之胺基酸殘基之 β 位之立體可被預想為由在步驟 (b) 所得到反應中間體來反轉。

步驟 (d)

含有保護蛋胺酸殘基胜肽為原料之場合，再者依需要在步驟 (b) 或步驟 (c) 之後進行步驟 (d)：

(d) 去保護保護蛋胺酸步驟。

去保護為因應所用之保護蛋胺酸，可使用該行業者習知手法來進

行。例如，作為保護蛋胺酸將蛋胺酸以亞砷型 (Met (o)) 導入之場合，因使用碘化鉍/二甲硫/TFA 混合液等追加還原步驟，保護蛋胺酸變換為蛋胺酸。又迴避副反應之觀點，最好在步驟 (c) 後，進行步驟 (d)。

如此為之，即使在有關得到具蛋胺酸殘基胜肽之場合也可適用本發明之製造方法。

生成物之精製在數種類之高速液相層析法條件下，最好使用提供 97% 以上之精製物之手法。具體尚可舉出結晶化，交流分配法、分配層析法、凝膠過濾法、離子交換層析法、高效液相層析法。最好使用高效液相層析法。

除了上述步驟，可再進行糖鏈之附加步驟。糖鏈之附加雖可進行胜肽及糖胜肽之任何一個，以及只要能得到糖胜肽為目的任何時點進行都可能，但最好在步驟 (c) 之後來進行。

糖鏈之附加，可使用代表轉穀氨醯胺酶利用酵素之逆反應方法或參照以下國際公開號 WO2005/010053 記載之方法。

首先，鹵乙醯胺讓複合型糖鏈衍生物與在上述所得胜肽 (特別是含有在天門冬胺酸或麩胺酸等分子內具有 2 個以上羧基之胺基酸、在離胺酸、精胺酸、組胺酸、色胺酸等分子內具有 2 個以上胺基之胺基酸，在絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸等分子內具有氫氧基之胺基酸；半胱胺酸等分子內具有硫醇基之胺基酸，在天門冬醯胺、麩醯胺等分子內含有具有醯胺基之胺基酸等之胜肽。特別是含有天門冬胺酸、麩胺酸、離胺酸、精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、半胱胺酸、天門冬醯胺或麩胺酸之胜肽) 反應來製造。上述反應適常在 0~80°C，較佳為 10~60°C，更好在 15~35°C 下進行。反應時間較佳通通常為 30 分鐘~5 小時之程度。反應終了後，以適當習知方法 (例如高效液相層析儀 (HPLC)) 來精製為佳。

鹵乙醯胺化複合型糖鏈衍生物，例如係將結合在複合型天門冬醯胺結合型糖鏈之第 1 位置之碳之氫氧基以 $\text{-NH-(CO)-(CH}_2\text{)}_a\text{-CH}_2\text{X}$ (式中，X 為鹵素原子、a 為整數，只要不妨礙連結子功能之目的，並無

特別限定，最好為 0~4 之整數) 置換之化合物。

具體上，使鹵乙醯胺化複合型糖鏈衍生物與上述所得到之胜肽在磷酸緩衝液中，以室溫反應。反應終了係由以 HPLC 精製而得到附加糖鏈糖胜肽。

除上述之方法外亦可由轉移酵素組合糖鏈伸長反應。如此為之所得之糖胜肽也包括在本發明之範圍之內。

【實施例】

以下基於本發明實施例來說明，但並非僅限於此。

實施例 1 Ac-Ala-Ser-Gly-Leu 之製造

將 Wang resin (Merck 公司製) (100 μ mol) 放入固相合成用管柱容器內，以亞甲基氯 (methylene chloride, DCM)、DMF 充份洗淨後，以 DCM 充份使其膨脹 (Swelling)。使 Fmoc-Leu (0.50mmol)、MSNT (0.50mmol) 及 N-甲基咪唑 (0.375mmol) 溶解於 DCM (2mL) 中，放入固相合成用管柱容器內，在 25 $^{\circ}$ C 攪拌 1 小時。又，DCM 使用 1.5mL 亦可。攪拌後，以 DCM 及 DMF 充份洗淨樹脂，將 Fmoc 基以 20% 哌啶/DMF 溶液 (2mL) 處理 15 分鐘以去保護 (deprotection)。又本去保護處理亦可進行 10 分鐘。以 DMF 洗淨後，其後之胜肽鏈之伸長使用以下所示方法，逐次讓胺基酸縮合。

讓以 Fmoc 基保護胺基之胺基酸及 HOBt(67.6mg、0.50mmol)、DIPCI(77.0 μ L、63.1mg、0.50mmol)溶解於 DMF(1mL)中、使活性化 15 分鐘後，放入固相合成用管柱內。又 DMF 亦可使用 2mL。在 25 $^{\circ}$ C 攪拌一小時後，將 Fmoc 基以 20%哌啶/DMF 溶液(2mL)處理 20 分鐘以去保護。又本去保護處理亦可進行 10 分鐘。重覆此操作，讓胺基酸逐次縮合。在以 Fmoc 基所保護之胺基酸中使用 Fmoc-Gly(148.7mg、0.50mmol)，Fmoc-Cys(Trt)(292.9mg、0.50mmol)，Fmoc-Ala(155.7mg、0.50mmol)，而在固相樹脂中得到具有 Fmoc-Ala-Cys(Trt)-Gly-Leu 之保護基之 4 殘基胜肽(序列號碼 1)。其後，在樹脂上以 20%哌啶/DMF 溶液(2mL)將 Fmoc 基處理 20 分鐘來

去保護，使用 20%醋酸酐/DMF(2mL)對游離胺基進行醯胺基保護。又可使用 20%醋酸酐/DMF 溶液 1.7mL。使用 DMF DCM 洗淨後，預先準備好之試藥(Reagent)(TFA/水/酚/甲基苯基硫醚 EDT(1.2-乙二硫醇)/TIPS=81.5/5/5/5/2.5/1)充分浸滿樹脂程度在 25 度 C 攪拌 2 小時。過濾樹脂除去，在減壓下濃縮反應溶液。將所得殘渣在 HPLC (Vydac column C8 250×10mm 展開溶媒 A：0.1%TFA 水溶液 B：0.08%TFA 乙腈：水=90：10 梯度 A：B=85：15—>50：50 60 分鐘 流速 3.0ml/min) 下精製，而得到具有 Ac-Ala-Gly-Leu 之保護基之 4 殘基胜肽(序列號碼 2)。

將得到 4 殘基之胜肽 (序列號 2) 30mg (73 μ mol) 放入茄形燒瓶中，使其溶解在 0.25M Tris 鹽酸緩衝溶液 73mL (含有 pH8.6、6M 胍鹽酸液，3.3mM EDTA) 及乙腈 24mL 中後，在 25°C 加上甲基-4-硝基苯磺酸鹽 (316mg)。30 分鐘後加上 10%TFA 溶液 (7.3mL)，達 pH4 後，加上二乙醚進行抽出操作。濃縮後，將所得殘渣在 ODS 管柱容器進行精製而得到 25mg 之具有 Ac-Ala-Cys (Me)-Gly-Leu 之半胱胺酸殘基之硫磺原子被甲基化之保護基之 4 殘基胜肽 (序列號碼 3)。

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

將所得 6.5mg (15 μ mol) 半胱胺酸殘基之硫磺原子被甲基化之 4 殘基胜肽 (序列號碼 3) 放入微離心管內，使溶解於 80%蟻酸溶液 (6.5mL) 後在 25°C 加上氰化溴 159.0mg (1.5mmol)。將反應容器遮光後在 37°C 進行反應，28.5 小時後，使反應溶液凍結而使反應停止。此物凍結乾燥後將所得殘渣在 HPLC (Vydac column C4 250×4.6mm 展開溶媒 A：0.1%TFA 水溶液 B：0.08%TFA 乙腈：水=90：10 梯度 A：B=100：0—>60：40 30 分鐘 流速 1.0ml/min) 進行精製得到 3.8mg 之為反應中間物之酯。

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

同樣地將所得反應中間物 5mg 放入微離心管 (eppen tube)，在 0.6mL 磷酸緩衝溶液 (含有 pH7.2、6M 胍鹽酸液) 使其溶解後，在 37°C 使之反應。1 小時後，以 HPLC 確認，反應終了後，在 HPLC (Vydac column C4 250×4.6mm 展開溶媒 A: 0.1% TFA 水溶液 B: 0.08% TFA 乙腈: 水=90:10 梯度 A: B=100:0 → 60:40 30 分鐘 流速 1.0ml/min) 來進行精製，得到 3.5mg 之具有保護基之 4 殘基胜肽 Ac-Ala-Ser-Gly-Leu (序列號碼 4)。又反應終了亦可在 30 分鐘後。

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

實施例 2 Val-Asp-Lys-Ala-Val-Ser-Gly-Leu 之製造

將 Wang resin (Merck 公司製) (100μmol) 放入固相合成用管柱容器內，以亞甲基氯 (methylene chloride, DCM)，DMF 充份洗淨後，以 DCM 充份使其膨脹 (Swelling)。使 Fmoc-Leu (0.50mmol)、MSNT (0.50mmol) 及 N-甲基咪唑 (0.375mmol) 溶解於 DCM (2mL) 中，放入固相合成用管柱容器內，在 25°C 攪拌 1 小時。又，DCM 使用 1.5mL 亦可。攪拌後，以 DCM 及 DMF 充份洗淨樹脂，將 Fmoc 基以 20% 哌啶/DMF 溶液 (2mL) 處理 15 分鐘以去保護 (deprotection)。又本去保護處理亦可進行 10 分鐘。以 DMF 洗淨後，其後之胜肽鏈之伸長使用以下所示方法，逐次讓胺基酸縮合。

讓以 Fmoc 基保護胺基之胺基酸及 HOBt (67.6mg、0.50mmol)、DIPCI (77.0μL、63.1mg、0.50mmol) 溶解於 DMF (1mL) 中、使活性化 15 分鐘後，放入固相合成用管柱內。又 DMF 亦可使用 2mL。在 25°C 攪拌 1 小時後，將 Fmoc 基以 20% 哌啶/DMF 溶液 (2mL) 處理 20 分鐘以去保護。又本去保護處理亦可進行 10 分鐘。重覆此操作，讓胺基酸逐次縮合。在以 Fmoc 基所保護之胺基酸中使用 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)而得到在固相樹脂中得到具有 Fmoc-Val-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Ala-Val-Cys(Trt)-Gly-Leu 之保護基之 8 殘基胜肽(序列號碼 5)。其後，在樹脂上，將 Fmoc 基以 20% 吡啶/DMF 溶液(2mL)將 Fmoc 基處理 20 分鐘來去保護，使用 DMF、DCM 洗淨後，將預先準備之試藥 K(TFA/水/酚/苯基甲基硫醚/EDT=82.5/5/5/5/2.5)加到可充分浸滿樹脂之程度，在 25°C 攪拌 2 小時。又取代試藥 K 也可使用 TFA/水/酚/苯基甲基硫醚/EDT/TIPS=81.5/5/5/5/2.5/1.0。過濾樹脂去除，在減壓下濃縮反應溶液。將所得殘渣以 HPLC (Vydac column C18 250×10mm 展開溶媒 A: 0.1%TFA 水溶液 B: 0.08%TFA 乙腈:水=90:10 梯度 A: B=85:15 → 50:50 15 分鐘 流速 2.5ml/min) 精製，而得到 8 殘基之胜肽，Val-Asp-Lys-Ala-Val-Cys-Gly-Leu(序列號碼 6)。

將所得到 8 殘基之胜肽(序列號 6)32mg(40μmol)放入茄形燒瓶中，使溶解於 0.25M tris 鹽酸緩衝溶液 40mL(含有 pH8.6、6M 胍鹽酸液、3.3mM EDTA)及乙腈 13mL 中後，在 25°C 加上甲基-4-硝基苯基磺酸鹽(261mg)。1 小時後，加上 10%TFA 溶液(3.8mL)，達 pH4 後，加上二乙醚，進行抽出操作。濃縮後將所得到殘渣在 ODS 管柱容器進行精製而得到 30mg 之具有 Val-Asp-Lys-Ala-Val-Cys(Me)-Gly-Leu 之半胱氨酸殘基之硫磺原子被甲基化之 8 殘基胜肽(序列號碼 7)。

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

將所得到 29mg(36μmol)半胱氨酸殘基之硫磺原子被甲基化之 8 殘基胜肽(序列號碼 7)放入微離心管內，使溶解於 80%蟻酸溶液(15mL)後在 25°C 加上氰化溴，381mg(3.6mmol)。將反應容器遮光後在 25°C 進行反應，32 小時後，凍結反應溶液使反應停止。此物凍結乾燥後，將所得殘渣在 HPLC (Vydac column C8 250×10mm 展開溶媒 A: 0.1%TFA 水溶液 B: 0.08%TFA 乙腈:水=90:10 梯度 A: B=90:10 → 70:30 60 分鐘 流速 4.0ml/min) 進行精製得到 18mg

之為反應中間物之酯。

ESI-MS: Calcd for $C_{34}H_{52}N_9O_{12} : [M+1H]^+ 788.9$ 、found、
788.5

將所得反應中間物 5mg 放入微離心管(eppen tube)在 0.63mL 磷酸緩衝溶液(含有 pH7.2、6M 胍鹽酸液)使其溶解後，在 37°C 使之反應。9.25 小時後，以 HPLC 確認反應終了後，在 HPLC (Vydac column C4 250×4.6mm 展開溶媒 A: 0.1%TFA 水溶液 B: 0.08%TFA 乙腈: 水=90:10 梯度 A: B=100:0 → 40:60 30 分鐘 流速 1.0ml/min)來進行精製，得到 4.1mg 之具有保護基 8 之殘基胜肽 Val-Asp-Lys-Ala-Val-Ser-Gly-Leu(序列號碼 8)。又反應終了在 7.25 小時後亦可。

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

實施例 3 Leu—Phe—Arg—Val—Tyr—Ser—Asn—Phe—Leu—Arg—Gly 之製造

將 Wang resin(Merck 公司製)(100μmol)放入固相合成用管柱容器內，以亞甲基氯(methylene chloride, DCM)、DMF 充分洗淨後，以 DCM 充分使其膨脹(Swelling)。使 Fmoc-Gly (0.50mmol)，MSNT(0.50mmol)及 N-甲基咪唑(0.375mmol)溶解於 DCM(2mL)中，放入固相合成用管柱容器內，在 25°C 攪拌 1 小時。又，DCM 使用 1.5mL 亦可。攪拌後，以 DCM 及 DMF 充分洗淨樹脂，將 Fmoc 基以 20% 哌啶/DMF 溶液(2mL)處理 15 分鐘以去保護(deprotection)。又本去保護處理亦可進行 10 分鐘。以 DMF 洗淨後，其後之胜肽鏈之伸長使用以下所示之方法，逐次讓胺基縮合。

讓以 Fmoc 基保護胺基之胺基酸與 HOBt(67.6mg、0.50mmol)、DIPCI(77.0μL、63.1mg、0.50mmol)溶解於 DMF(1mL)中，使活性化 15 分鐘後，放入固相合成用管柱內。在 25°C 攪拌後，將 Fmoc 基以 20%哌啶/DMF 溶液(2mL)處理 20 分鐘去保護。又去保護處理亦可進

行 10 分鐘。重覆此操作，讓胺基酸逐次縮合。在以 Fomc 基所保護之胺基酸中，使用 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)，而在固相樹脂中得到具有 Fmoc-Leu-Phe-Arg(Pbf)-Val-Tyr(tBu)-Cys(Trt)-Asn-Phe-Leu-Arg(Pbf)-Gly 之保護基之 11 殘基胜肽(序列序號 9)。其後在樹脂上以 20%哌啶/DMF 溶液(2mL)處理 20 分鐘來去保護。又，本去保護處理亦可進行 10 分鐘。用 DMF、DCM 洗淨後加上預先準備之試藥 K(TFA/水/酚/甲基苯基硫醚/EDT=82.5/5/5/5/2.5)可充分浸滿樹脂之程度，在 25°C 攪拌 2 小時。又取代試藥 K，可使用 TFA/水/酚/甲基苯基硫醚/EDT/TIPS=81.5/5/5/5/2.5/1.0 亦可。過濾樹脂去除，在減壓下濃縮反應溶液。將所得殘渣以 HPLC(Vydac column C18 250×10mm 展開溶媒 A:0.1%TFA 水溶液 B:0.08%TFA 乙腈:水=90:10 梯度 A:B=70:30→40:60 15 分鐘 流速 2.0ml/min)來精製，而得到 Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Cys-Ans-Phe-Leu-Arg-Gly 之 11 殘基之胜肽(序列號碼 10)。

將得到 11 殘基之胜肽(序列號 10)21mg(15μmol)放入茄形燒瓶中，使其溶解在 0.25M tris 鹽酸緩衝溶液 15mL(pH8.6、6M 胍鹽酸液，含有 3.3mM EDTA)及乙腈 5mL 中後，在 25°C 加上甲基-4-硝基苯碳酸鹽(66mg)。30 分鐘後加上 10%TFA 溶液(1.5mL)，達 pH4 後，加上二乙醚，進行抽出操作。濃縮後，將所得殘渣在 ODS 管柱容器進行精製而得到 19mg 之具有 Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Cys(Me)-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly 之半胱胺酸殘基之硫磺原子被甲基化之 11 殘基胜肽(序列號碼 11)。

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

將所得到 18mg(13 μ mol)半胱胺酸殘基之硫磺原子被甲基化之 11 殘基胜肽(序列序號 11)放入微離心管內,使溶解於 2.4mM 80%蟻酸溶液(5.4mL)後在 25°C 加上氰化溴 136mg(1.3mmol)。將反應容器遮光後再 25°C 進行反應,50 小時後,凍結反應溶液使反應停止。此物凍結乾燥後,將所得殘渣在 HPLC(Vydac column C8 250 \times 10mm 展開溶媒 A:0.1% TFA 水溶液 B:0.08%TFA 乙腈:水=90:10 梯度 A:B=85:15 \rightarrow 50:50 60 分鐘 流速 3.0ml/min)進行精製得到 7.5mg 之為反應中間物之酯。

ESI-MS:Calcd for $C_{65}H_{100}N_{18}O_{15}:[M+2H]^{2+}$ 686.4、found、686.5

同樣地將所得反應中間物 7mg 放入微離心管(eppen tube)在 0.50mL 磷酸緩衝溶液(含有 pH7.2、6M 胍鹽酸液)使其溶解後,在 37°C 使之反應。1 小時後,以 HPLC 確認反應終了後,在 HPLC(Vydac column C4 250 \times 4.6mm 展開溶媒 A:0.1%TFA 水溶液 B:0.08% TFA 乙腈:水=90:10 梯度 A:B=80:20 \rightarrow 40:60 30 分鐘 流速 1.0ml/min)來進行精製,得到 5.4mg 之具有保護基之 11 殘基胜肽 Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly(序列號碼 12)。

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

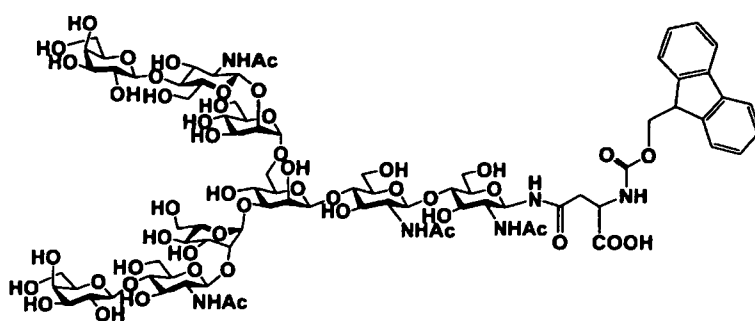
實施例 4 Ala-Leu-Leu-Val-Asn (Oligosaccharide chain) - Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Als 之製造

在固相合成用管柱容器放入 Amino-PEGA resin(Merck 公司製)(100 μ mol)以亞甲基氯(DCM)、DMF 充分洗淨後,以 DMF 使之充分膨脹。4-羥甲基-3-甲氧苄氧基酪酸(HMPB)(0.25mmol), TBTU(0.25mmol)及 N-乙基嗎啉(0.25mmol)被溶解於 DMF(2ml)中,放入管柱容器內在 25°C 攪拌 4 小時,將樹脂用 DMF 及 DM 充分洗淨,

而得到 HMPB-PEGA 樹脂，將此作為固相合成用固相載體使用。

使 Fmoc-Ser(tBu)(0.50mmol)，MSNT(0.50mmol)及 N-甲基咪唑(0.375mmol)溶解於 DCM(2ml)中，次放入固相合成用管柱管器，在 25°C 攪拌 3 小時。又 DCM 可為 2.5mL。攪拌後將樹脂用 DCM、DMF 洗淨，將 Fmoc 基用 20%吡啶/DMF 溶液(2ml)處理 15 分鐘來去保護。又本去保護處理亦可進行 10 分鐘。以 DMF 洗淨後，將 1 殘基之胜肽 2 μ mol 相當之樹脂移到微離心管(eppen tube)。讓以下述(9)表示之糖鏈天門冬醯胺(10mg、3.6 μ mol)及 DEPBT(2mg、6 μ mol)溶於 DMF(0.12mL)中，放入微離心管，加上 DIPEA(0.68 μ l、4 μ mol)在 25°C 攪拌 18 小時。

[化 20]



(9)

攪拌後，將樹脂用 DCM、DMF 洗淨，Fmoc 基在 20%吡啶/DMF 溶液 (1mL) 處理 15 分鐘來去保護。以 DMF 洗淨後，其後之糖胜肽之伸長使用下示方法，逐次讓胺基縮合。

讓以 Fmoc 基保護胺基之胺基酸及 HOBt (1.35mg、0.01mmol)、DIPCI (1.53 μ L、1.26mg、0.01mmol) 溶解於 DMF (0.02mL) 中，使活性化 15 分鐘後，放入固相合成用管柱內。在 25°C 攪拌 1 小時後，將 Fmoc 基以 20%吡啶/DMF 溶液(1mL)處理 20 分鐘以去保護。重覆此操作，讓胺基酸逐次縮合。在保護胺基之胺基酸中使用 Fmoc-Val (3.4mg、0.01mmol)、Fmoc-Leu (3.5mg、0.01mmol)、Fmoc-Leu (3.5mg、0.01mmol)、Fmoc-Ala (3.1mg、0.01mmol)，而在固相樹

脂中得到具有 Fmoc-Ala-Leu-Leu-Val-Asn(Oligosaccharide chain)-Ser(tBu) 之保護基之 6 殘基附加糖鏈胜肽 (序列號碼 13)。將此物以醋酸：三氟乙酸 (1:1) 加到可充滿浸滿樹脂之程度，4 小時後過濾樹脂後去除，將過濾液加到另外準備之二乙醚中進行晶析，將溶液部份用薄膜過濾器去除，而得到含有具保護基之 6 殘基之附加糖鏈胜肽 (序列號碼 13) 之殘渣。

將所得到之具有保護基之 6 殘基之附加糖鏈胜肽 (序列號碼 13) 2mg (0.55 μ mol) 及分子篩 (MS) 4A (10mg)，苄硫醇 (2 μ l, 16.4 μ mol) 在 DMF 溶媒中 (85 μ l) 氫氣流下 -20 $^{\circ}$ C 中攪拌 1 小時後加上 PyBOP (1.4mg, 2.7 μ mol)、DIPEA (0.46 μ l, 2.7 μ mol) 攪拌 2.5 小時。其後，在反應溶液中加上二乙醚 (5ml) 讓化合物沉澱，過濾後以乙腈 50% 水溶液回收沉澱物。將此凍結乾燥，在所得凍結乾燥品上加上 95% TFA 水溶液、在 25 $^{\circ}$ C 下攪拌 2 小時。將樹脂過濾去除，反應溶液濃縮後，溶於 50% 乙腈水溶液凍結乾燥。將凍結乾燥品在 HPLC (Vydac column C4 250 \times 4.6mm 展開溶媒 A: 0.1% TFA 水溶液 B: 0.08% TFA 乙腈: 水=90:10 梯度 A:B=80:20 \rightarrow 40:60 60 分鐘 流速 1.0ml/min) 下精製，而得到 C 末端為苄硫酯 Ala-Leu-Leu-Val-Asn (低聚糖鏈 Oligosaccharide chain) -Ser-SBn 之 6 殘基之附加糖鏈胜肽 (序列號碼 15)。

又，由與微離心管內糖鏈天門冬醯胺之反應得到序列號碼 15 之 6 殘基之附加糖鏈胜肽之作為上述步驟，也可使用以下之手法：

以 DMF 洗淨後，將 1 殘基之胜肽 4.3 μ mol 相當之樹脂移到微離心管。將式 (9) 表示之天門冬醯胺 (17mg, 8.6 μ mol) 及 DEPBT (6mg, 8.6 μ mol) 使之溶於 DMF:DMSO=4:1、0.29mL，放入微離心管，加上 DIPEA (1.5 μ l, 8.6 μ mol) 在 25 $^{\circ}$ C 攪拌 18 小時。

攪拌後，使用 DCM、DMF 下洗淨樹脂。將 Fmoc 基以 20% 吡啶/DMF 溶液 (1ml) 處理 10 分鐘來去保護。以 DMF 洗淨後，其後糖胜肽鏈之伸長使用以下所示之方法，讓胺基酸逐次縮合。

讓以 Fmoc 基保護胺基之胺基酸及 HOBt (2.9mg、0.022mmol)、

DIPCI (3.3 μ L、0.022mmol)、溶解於 DMF (0.54mL) 中，使活性化 15 分鐘後，放入固相合成用管柱容器內。在 25 $^{\circ}$ C 攪拌 1 小時後，將 Fmoc 基以 20% 吡啶/DMF 溶液 (1mL) 處理 20 分鐘以去保護。重複此操作，讓胺基酸逐次縮合。在保護胺基之胺基酸使用 Fmoc-Val (7.3mg、0.022mmol)、Fmoc-Leu (7.6mg、0.022mmol)、Fmoc-Leu (7.6mg、0.022mmol)、Boc-Als (4.0mg、0.022mmol)，得到在固相樹脂中具有 Boc-Ala-Leu-Leu-Val-Asn (Oligosaccharide Chain)-Ser(tBu) 之保護基之 6 殘基附加糖鏈胜肽 (序列號碼 14)。將此物加醋酸：三氟乙醇 (=1:1) 至浸滿樹脂之程度，經 24 小時後，過濾樹脂去除，將過濾液放入到另外準備之二乙醚中進行晶析，將溶液部分用濾膜過濾器來去除而得到含有具保護基之 6 殘基之附加糖鏈胜肽 (序列號碼 14) 之殘渣。

將所得到之具保護基之 6 殘基之附加糖鏈胜肽 (序列號碼 14) 18mg(7.5 μ mol) 及分子篩 (MS)4A(190mg)，苄硫醇(26 μ l, 37.5 μ mol) 放至 DMF 溶媒中 (1.9mL) 氬氣流下 -20 $^{\circ}$ C 攪拌 1 小時後，加上、PyBOP (20mg, 37.5 μ mol)、DIPEA (6.7 μ l, 37.5 μ mol) 攪拌 2 小時。其後在反應溶液中加上二乙醚(10mL)讓化合物沉澱，過濾後以 DMF 溶解沉澱物。將此在減壓下濃縮，所得殘渣上加上 95%TFA 水溶液在 25 $^{\circ}$ C 攪拌 2 小時。將反應物濃縮後，在 HPLC (Vydac column C4 250 \times 4.6mm 展開溶媒 A:0.1%TFA 水溶液 B:0.08%TFA 乙腈：水=90:10 梯度 A:B=100:0->40:60 60 分鐘 流速 1.0ml/min) 來精製，而得到在 C 末端為苄硫酯之 Ala-Leu-Leu-Val-Asn (Oligosaccharide Chain)-Ser-SBn 之 6 殘基之附加糖鏈胜肽 (序列號碼 15)。

另一方面，將 Wang resin (Merck 公司製) (100 μ mol) 放入固相合成用管柱容器內，以亞甲基氯 (methylene chloride, DCM)，DMF 充份洗淨後，以 DCM 充份使其膨脹 (Swelling)。使 Fmoc-Als (0.50mmol)、MSNT (0.50mmol) 及 N-甲基咪唑 (0.375mmol) 溶解於 DCM (2mL) 中，放入固相合成用管柱容器內，在 25 $^{\circ}$ C 攪拌 1

小時。又，DCM 使用 1.5mL 亦可。攪拌後，以 DCM 及 DMF 充份洗淨樹脂，將 Fmoc 基以 20%哌啶/DMF 溶液 (2mL) 處理 15 分鐘以去保護 (deprotection)。又本去保護處理亦可進行 10 分鐘。以 DMF 洗淨後，其後之胜肽鏈之伸長使用以下所示方法，逐次讓胺基酸縮合。

讓以 Fmoc 基保護胺基之胺基酸及 HOBt(67.6mg、0.50mmol)、DIPCI(77.0 μ L、63.1mg、0.50mmol)溶解於 DMF(1mL)中、使活性化 15 分鐘後，放入固相合成用管柱內。又 DMF 亦可使用 2mL。在 25°C 攪拌 1 小時後，將 Fmoc 基以 20%哌啶/DMF 溶液(2mL)處理 20 分鐘以去保護。重複此操作、逐次讓胺基酸縮合。再以 Fmoc 基保護之胺基酸中使用 Fmoc-Lys(Boc)(234.3mg、0.50mmol)、Fmoc-Asp(OtBu)(205.8mg、0.50mmol)、Fmoc-Val(169.7mg、0.50mmol)、Fmoc-His(Trt)(309.9mg、0.50mmol)、Fmoc-Leu(176.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Gln(184.2mg、0.50mmol)、Fmoc-Leu(176.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Pro(168.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Glu(OtBu)(212.8mg、0.50mmol)、Fmoc-Trp(Boc)(263.3mg、0.50mmol)、Fmoc-Pro(168.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Gln(184.2mg、0.50mmol)、Fmoc-Cys(Trt)(292.9mg、0.50mmol) 而在固相樹脂上得到具有 Fmoc-Cys(Trt)-Gln-Pro-Trp(Boc)-Gln(OtBu)-Pro-Leu-Gln-Leu-His(Trt)-Val-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Ala 之保護基之 14 殘基胜肽(序列號 16)。其後將 Fmoc 基用 20%哌啶/DMF 溶液(2mL)處理 20 分鐘來去保護、使用 DMF、DCM 洗淨後、加預先準備之試藥 K(TFA/水/酚/甲基苯基硫醚/EDT=82.5/5/5/5/2.5)至可將樹脂充滿浸滿之程度，在 25°C 攪拌 2 小時。又、取代試藥 A、亦可使用 TFA/水/酚/甲基苯基硫醚/EDT/TIPS=81.5/5/5/5/2.5/1.0。過濾樹脂去除、在減壓下濃縮反應溶液。將所得殘渣以 HPLC (Cydac column C8 250 \times 10mm 展開溶媒 A:0.1%TFA 水溶液 B:0.08%TFA 乙腈:水=90:10 梯度 A:B=80:20->40:60 30 分鐘 流速 4.0ml/min) 下精製、而得到 Cys-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Ala 之 14 殘基胜肽(序列號 17)。

將如此調製之兩種類之 14 殘基胜肽(序列號碼 17)1.1mg 及前所合成之 C 末端為苄硫酯之 6 殘基之附加糖胜肽(序列號碼 15)1.3mg 放入相同之微離心管、使其溶解於磷酸緩衝溶液(含有 pH7.2、6M 胍鹽酸液)275 μ L 中使其溶解後、在 25 $^{\circ}$ C 加上苄硫酚(1 μ l)及苄硫醇(1 μ l)、在 37 $^{\circ}$ C 進行反應。26 小時後以 HPLC 確認反應終了後、將反應溶液放在 HPLC (Vydac column C18 250 \times 4.6mm 展開溶媒 A:0.1%TFA 水溶液 B:0.08%TFA 乙腈:水=90:10 梯度 A:B=80:20 \rightarrow 50:50 60 分鐘 流速 1.0ml/min) 中進行精製、而得到 Ala-Leu-Leu-Val-Asn (Oligosaccharide chain) - Ser-Cys-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Ala 之 20 殘基附加糖鏈胜肽(序列號碼 18)1.5mg。

將所得到之 20 殘基附加糖鏈胜肽(序列號碼 18)1.5mg(0.39 μ mol) 放入微離心管中、使其溶解於 0.25M tris 鹽酸緩衝溶液 0.39mL(含有 pH8.6、6M 胍鹽酸液、3.3mM EDTA) 及乙腈 0.13mL 後、在 25 $^{\circ}$ C 加上甲基-4-硝基苯磺酸鹽(1.7mg)。40 分鐘後加上 10%TFA 溶液(1.5mL)達 pH4 後、加上二乙醚進行抽出操作。將所得殘渣在 HPLC (Vydac column C4 250 \times 4.6mm 展開溶媒 A:0.1%TFA 水溶液 B:0.08%TFA 乙腈:水=90:10 梯度 A:B=80:20 \rightarrow 55:45 60 分鐘 流速 1.0ml/min) 進行精製(又、在精製上、可使用 C18 管柱容器取代 C4 管柱容器)而可得到 1.6mg Ala-Leu-Leu-Val-Asn (Oligosaccharide chain) - Ser-Cys(Me) - Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Ala 之半胱氨酸殘基之硫磺原子甲基化之 20 殘基之附加糖鏈胜肽(序列號碼 19)。

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

將所得半胱氨酸殘基硫磺原子甲基化 20 殘基附加糖鏈胜肽(序列號碼 19)1.6mg (0.4 μ mol) 放入微離心管、在 80%蟻酸溶液 0.4mL 中使之溶解後、在 25 $^{\circ}$ C 加上氰化溴、4.3mg (0.04mmol)。將反應器遮光後、在 37 $^{\circ}$ C 進行反應、35 小時後、讓反應溶液凍結使停止反應。

將此物凍結乾燥後、在所得殘渣中加上 5% 聯胺(hydrazine)含水和物 (200 μ L)使反應系統內為 pH8~9。將此物以 HPLC (Vydac column C4 250 \times 4.6mm 展開溶媒 A: 0.1%TFA 水溶液 B: 0.08%TFA 乙腈: 水=90:10 梯度 A:B=80:20 \rightarrow 50:50 30 分鐘 流速 1.0ml/min) 來進行精製、而得到所要之 0.7mg 胜肽 Ala-Leu-Leu-Val-Asn(Oligosaccharide chain)-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Ala 之 20 殘基之附加糖鏈胜肽(序列號碼 20)。

又與氰化溴反應之後、於 34 小時後、將反應溶液減壓下濃縮、將所得殘渣加上 5% 之水合聯胺(hydrazine hydrate)(200 μ L)攪拌 10 分鐘後、在反應液加上醋酸 5 μ L, 即使在 HPLC 進行精製、同樣地也可得到 20 殘基之附加糖鏈胜肽(序列號碼 20)。

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

實施例 5 Ac-Gly-Ser-Gly-Met-Ala 之製造

將 Wang resin (Merck 公司製) (100 μ mol) 放入固相合成用管柱容器內, 以亞甲基氯 (methylene chloride, DCM)、DMF 充份洗淨後, 以 DCM 充份使其膨脹 (Swelling)。使 Fmoc-Ala (0.50mmol)、MSNT (0.50mmol) 及 N-甲基咪唑 (0.375mmol) 溶解於 DCM (1.5mL) 中, 放入固相合成用管柱容器內, 在 25 $^{\circ}$ C 攪拌 2 小時。攪拌後, 以 DCM 及 DMF 充份洗淨樹脂, 將 Fmoc 基以 20% 哌啶/DMF 溶液 (2mL) 處理 15 分鐘以去保護 (deprotection)。以 DMF 洗淨後, 其後之胜肽鏈之伸長使用以下所示方法, 逐次讓胺基縮合。

讓以 Fmoc 基保護胺基之胺基酸及 HOBt (67.6mg、0.50mmol)、DIPCI (77.0 μ L、63/1mg、0.50mmol)、溶解於 DMF (2mL) 中、使活性化 15 分鐘後、放入固相合成用管柱內。在 25 $^{\circ}$ C 攪拌 1 小時後、將 Fmoc 基以 20% 哌啶/DMF 溶液 (2mL) 處理 10 分鐘去保護。重複此操作、讓胺基酸逐次縮合。在以 Fmoc 基所保護之胺基酸中、使用 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)、而在固相樹脂中得到具有 Fmoc-Gly-Cys(Trt)-Gly-Met(O)-Ala 之保護基之 5 殘基胜肽(序列號碼 21)。其後、在樹脂上、將 Fmoc 基以 20%哌啶/DMF 溶液(2mL)處理 10 分來去保護、使用 20%醋酸酐/DMF 溶液(1.25mL)對游離胺基進行醯胺基保護。使用 DMF、DCM 洗淨後、加上預先準備之試藥(TFA/水/TIPS=95/2.5/2.5)至充分浸滿樹脂之程度、在 25°C 攪拌 2 小時、過濾樹脂去除、在濾液上加上二乙醚 20mL 使其沉澱。沉澱過濾後、在 0.1%TFA 水溶液中使其溶解、將此物在減壓下濃縮後進行凍結乾燥、而得到含有 Ac-Gly-Cys-Gly-Met(O)-Ala 之第 4 位置之蛋胺酸之硫磺原子被氧化之 5 殘基胜肽(配序列號 22)之混合物。

將所得第 4 位置蛋胺酸之硫磺原子被氧化之 5 殘基胜肽(序列號碼 22)混合物 5mg 放入微離心管中、以 0.25M tris 鹽酸緩衝溶液(含有 pH8.6、6M 胍鹽酸液、3.3mM EDTA)10mL 溶解。在此物中加上 2-巰基乙醇(7 μ L)攪拌 10 分鐘後、反應液中加上含有甲基-4-硝基苯磺酸鹽(66mg)之乙腈溶液 3.3mL。25 分鐘後、加上 10%TFA 溶液(1.0mL)中和後、加上二乙醚進行 3 次抽出操作。將水層減壓下濃縮後、將所得殘渣以 HPLC(Vydac column C-18 2500 \times 10mm、展開溶媒 A: 0.1%TFA 水溶液 B: 0.09%TFA 乙腈:水=90:10、梯度 A: B=100:0 \rightarrow 100:0 \rightarrow 60:40、0 分鐘 \rightarrow 5 分鐘 \rightarrow 35 分鐘 流速 4.0mL/min)精製、而得到 4mg Ac-Gly-Cys(Me)-Gly-Met(O)-Ala 之第 2 位置之半胱酸殘基之硫磺原子甲基化、第 4 位置之蛋胺酸殘基氧化之第 5 殘基胜肽(序列號碼 23)。

將所得第 2 位置之半胱酸殘基之硫磺原子甲基化、第 4 位置之蛋胺酸殘基被氧化之 5 殘基胜肽(序列號碼 23)3.8mg 放入微離心管中、使溶解於 80%蟻酸溶液 3.1mL 後、加上 79.0mg 之氟化溴、遮光後、氫置換下、在 37°C 攪拌 39 小時。反應後進行減壓濃縮、而得到含有反應中間體之酯之殘渣。

將所得到殘渣放入微離心管、放入 pH7.2 之磷酸鈉緩衝溶液 1.25mL(含有胍鹽酸液 6M)中使其溶解後、攪拌 45 分鐘。其後、在反應液中加上三氟醋酸 3.6mL、碘化銨 22mg、二甲基硫 11 μ L、在室溫攪拌。30 分鐘後、在反應液中加上 10mL 水後、在四氯化碳進行分液洗淨。水層在減壓下濃縮、將所得之殘渣以 HPLC (Vydac column C18 250 \times 4.6mm、展開溶媒 A: 0.1%TFA 水溶液 B: 0.09%TFA 乙腈: 水=90: 10、梯度 A: B=100: 0 \rightarrow 100: 0 \rightarrow 60: 40、0 分鐘 \rightarrow 5 分鐘 \rightarrow 65 分鐘 流速 1.0ml/min)進行精製、而所到 2.6mg 之所要具有 Ac—Gly—Ser—Gly—Met—Ala 之保護基之 5 殘基胜肽(序列號碼 24)。

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

實施例 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 之製造

將 Amino—PEGA resin(Merck 公司製)(100 μ mol)放入固相合成用管柱容器內、以亞甲基氯(DCM)、DMF 充分洗淨後、以 DMF 使其充分膨脹。使 4-羥甲基-3-甲氧苄氧基酪酸(HMPB)(0.25mmol)、TBTU(0.25mmol)及 N-乙基嗎啉 (0.25mmol)放入於 DMF(2mL)使其溶解、置入管柱容器在 25 $^{\circ}$ C 攪拌 2 小時。將樹脂以 DMF 及 DCM 充分洗淨、而得到 HMPB—PEGA resin、將此作為固相合成用之固相載體來使用。

將 Fmoc—Gly(0.50mmol)、MSNT(0.50mmol)及 N-甲基咪唑 (0.375mmol)於 DCM(4.5mL)使其溶解、放入固相合成用管柱容器內、在 25 $^{\circ}$ C 攪拌 3 小時。攪拌後、將樹脂用 DCM、DMF 洗淨。將 Fmoc 基以 20%哌啶/DMF 溶液(2mL)處理 10 分鐘來去保護。以 DMF 洗淨

後、其後之胜肽鏈之伸長使用以下之方法逐次使胺基酸縮合。

讓以 Fmoc 基保護胺基之胺基酸及 HOBt(67.6mg、0.50mmol)、DIPCI(77.0 μ L、63.1mg、0.50mmol)溶解於 DMF(4mL)中、使活性化 15 分鐘後，放入固相合成用管柱內。在 25°C 攪拌 1 小時後，將 Fmoc 基以 20%哌啶/DMF 溶液(2mL)處理 10 分鐘以去保護。重覆此操作，讓胺基酸逐次縮合。在以 Fmoc 基所保護之胺基酸中使用 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，而在固相樹脂上得到具有 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 之保護基之 18 殘基胜肽(配到序號 25)。

將具有此保護基之 18 殘基胜肽(序列號 25)，在樹脂上將 Fmoc 基以 20%哌啶/DMF 溶液(2mL)處理 10 分鐘來去保護。以 DMF、DCM 洗淨後加上使 Fmoc-Thr(GalNAc)(0.20mmol)、BOBt(0.50mmol)、DIPCI(0.50mmol)溶於 DMF(3.6mL)中，加上經 15 分鐘活化之物。經 5 小時反應後，將 Fmoc 基以 20%哌啶/DMF 溶液(2mL)處理 20 分鐘來去保護，而得到在固相樹脂上具有 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 之保護基之 19 殘基附加糖胜肽(序列號碼 26)。

將所得在固相樹脂上具有保護基之 19 殘基附加胜肽，(序列號碼 26)之相當 0.02mmol 量放入另外準備之固相合成用管柱容器，加上將 Boc-Ser(tBu)(0.1mmol)、DIPCI(0.1mmol)、HOBt(0.1mmol)使溶解於 DMF 0.5mL 中，經 15 分鐘活性化之物進行反應 1 小時，過濾反應液後加醋酸：三氟乙醇=1：1 至充份浸滿樹脂之程度，14 小時後過濾樹脂去除(濾除)，濾液在減壓下濃縮，而得到含有 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 之保護基之 20 殘基附加糖胜肽（序列號碼 27）之殘渣。

將所得到之具有 20 殘基之保護基之附加糖胜肽（序列號碼 27）75mg(35 μ mol)及苄硫醇 123 μ l(105 μ mol)加到 DMF3.5mL 中，在氫氣流下於 -20°C 攪拌 1 小時後，加上 PyBOP(91mg, 175 μ mol)、DIPEA(30 μ l, 175 μ mol)攪拌 2.5 小時。在反應液中加上二乙醚讓結晶沉澱後，過濾、在所得殘渣上加上 TFA/水/TIPS=95/2.5/2.5 至充份浸滿樹脂之程度，在 25°C 攪拌 2 小時。過濾樹脂去除後，且濃縮濾液回收殘渣。將得到之殘渣以 HPLC(Vydac column C8 250 \times 10mm 展開溶媒 A:0.1%TFA 水溶液 B:0.09%TFA 乙腈：水=90:10 梯度 A:B=90:10 \rightarrow 60:40 30 分鐘 流速 4.0mL/min)精製，而得到 C 末端為苄硫酯之 Ser—Thr(GalNAc)—Ala—Pro—Pro—Ala—His—Gly—Val—Thr—Ser—Ala—Pro—Asp—Thr—Arg—Pro—Ala—Pro—Gly—SBn 之 20 殘基附加糖胜肽（序列號碼 28）。

另一方面，將先前所得到之在固相樹脂上之具有 19 殘基之保護基之附加糖胜肽（序列號碼 26）之 0.02mmol 相當量放入另外準備固相合成用管柱容器加上讓 Boc—Thia(0.04mmol)、DIPCI(0.1mmol)、HOBt(0.1mmol)溶解於 DMF 1.5mL 中加上，經 15 分鐘活性化，進行 20 分鐘反應。過濾反應液後，加上試藥(TFA/水/TIPS=95/2.5/2.5)至充份浸滿樹脂，在 25°C 攪拌 2 小時。樹脂過濾去除後，濃縮濾液。將所得殘渣使其溶解於 0.2M 甲氧基胺及 0.1M 磷酸鈉緩衝液（含有 pH4, 6M 胍鹽酸液）2.1ml 中，將 N 末端之噻唑啉開環（ring-opening）後以 HPLC(vydac column C8 250 \times 10mm 展開溶媒 A:0.1%TFA 水溶液 B:0.08%TFA 乙腈：水=90:10 梯度 A:B=90:10 \rightarrow 60:40 30 分鐘 流速 4.0mL/min)來精製，而得到 Cys—Thr(GalNAc)—Ala—Pro—Pro—Ala—His—Gly—Val—Thr—Ser—Ala—Pro—Asp—Thr—Arg—Pro—Ala—Pro—Gly 之 20 殘基之糖胜肽（序列號碼 29）。

如此可得到 20 殘基之附加糖胜肽（序列號碼 29）13mg 與先前所

得到在 C 末端為苄硫酯之 20 殘基之胜肽 (序列號碼 28) 12mg, 將其放入於磷酸緩衝溶液 (含有 pH7.2, 6M 胍鹽酸液) 2.9mL 中使其溶解, 在此物中加上 4-巰基苯乙酸 30mg、三(2-羧基乙基)磷酸鹽 17mg, 使反應 3 小時。將反應液以 HPLC (Vydac column C8 250×10mm 展開溶媒 A: 0.1%TFA 水溶液 B: 0.09%TFA 乙腈: 水=90:10 梯度 A: B=90:10→60:40 30 分鐘 流速 4.0mL/min) 來精製, 而得到 18mg 之 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 之 40 殘基附加糖胜肽 (序列號碼 30)。

將所得 40 殘基之附加糖胜肽 (序列號碼 30) 16mg 放入微離心管在 0.25M tris 鹽酸緩衝液 (含有 pH8.6、6M 胍鹽酸液、3.3mM EDTA) 3.8mL 溶解。在此物上加上 2-巰基乙醇 (3μL) 進行 10 分鐘攪拌後, 加上含有 25mg 之甲基-4-硝基苯磺酸鹽 25mg 之乙腈 1.27mL。25 分鐘後加上 10%TFA 溶液 0.45mL 中和後, 加上二乙醚 2mL 進行 3 次分液洗淨。減壓下將水層濃縮後, 將所得殘渣在 HPLC (Vydac column C-4 250×4.6mm、展開溶媒 A: 0.1%TFA 水溶液 B: 0.08%TFA 乙腈: 水=90:10、梯度 A: B=100:0→100:0→90:10→60:40、0 分鐘→10 分鐘→40 分鐘 流速 1.2ml/min) 來精製, 而得到 13mg 含有 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 之第 21 位置之半胱胺酸殘基之硫磺原子被甲基化之 40 殘基附加糖胜肽 (序列號碼 31) 之混合物。

將含有所得之第 21 位置之半胱胺酸殘基之硫磺原子被甲基化之 40 殘基附加糖胜肽 (序列號碼 31) 之混合物 12mg 放入茄形燒瓶內, 以 80% 蟻酸水溶液 2.9mL 使其溶解後, 在 25°C 加上 152mg 之氰化

溴。將反應容器遮光後在 37°C 進行反應，36 小時後減壓下濃縮反應溶液。使殘渣溶解於三氟乙酸 2.9mL 中，加上 2.4mL 碘化銨，24 μ l 二甲基硫醚，在室溫下使反應 30 分鐘。30 分鐘後，加水 6mL 於反應系統內後，以四氯化碳進行分液 (Separatingt) 洗淨。減壓下將水層濃縮後，使殘渣溶解於 5% 之聯胺水溶液 1.4Ml 中，在室溫使反應 10 分鐘。10 分鐘後，在反應液中加上醋酸 0.14mL 後，以 HPLC (Vydac column C-4 250 \times 4.6mm、展開溶媒 A: 50mM AcONH₄ 水溶液 B: 乙腈、梯度 A:B=90:10 \rightarrow 70:30、60 分鐘 流速 1.0mL/min) 精製，而得到 2.3mg 所要之 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 之 40 殘基附加糖胜肽 (序列號碼 32)。

實施例 7 Glu-Ser-Asn-Gly-Thr-Leu-Thr-Leu 之製造

將 chloride resin (Merck 公司製) (100 μ mol) 放入固相合成用管柱容器內，以亞甲基氯 (methylene chloride, DCM)、DMF 充份洗淨後，以 DCMM 充份使其膨脹 (Swelling)。過濾後，Fmoc-Gly (0.20mmol)、DIPEA (0.40mmol) 溶於 DCM (0.066mL) 中，放入固相合成用管柱容器內，在 25°C 攪拌 2 小時。攪拌後將樹脂以 DCM:MeOH:DIPEA=17:2:1 以 DCM 及 DMF 來充份洗淨後，Fmoc 基以 20% 哌啶/DMF 溶液 (1mL) 處理 20 分鐘以去保護 (deprotection)。以 DMF 洗淨後，其後之胜肽鏈之伸長使用以下所示方法，逐次讓胺基縮合。

保護胺基之胺基酸及 HOBt(67.6mg、0.50mmol)、DIPIC(77.0 μ L、63.1mg、0.50mmol) 溶解於 DMF (2mL) 中，使活性 15 分鐘後，放入固相合成用管柱容器內。在 25°C 攪拌 1 小時後，將 Fmoc 基以 20% 哌啶/DMF (2mL) 處理 20 分鐘去保護。重複此操作逐次縮合胺基酸。在保護之胺基酸中使用 Fmoc-Asn(177.2mg、0.50mmol)、Fmoc

—Ser(tBu)(191.6mg、0.50mmol)、Boc—Glu(OtBu)(151.6mg、0.50mmol) 而得到在固相樹脂上具有 Boc—Glu(OtBu)—Ser(tBu)—Asn—Gly 之保護基之 4 殘基胜肽 (序列號碼 33)。

使用 DMF、DCM 洗淨後，加上 AcOH:MeOH:DCM=5:4:1、2mL，在室溫反應 2 小時。2 小時後，過濾反應液回收，減壓下進行濃縮得到殘渣。在此殘渣加上苯 1mL 進行 2 次共沸操作 (Azeotropic) 後，在 DMF 0.8mL 中使之溶解。對此物在氫氣流下於 0°C，加上 PyBOP 42.1mg、DIPEA 14 μ L，苄硫醇 57 μ L 攪拌 30 分鐘。反應後，在飽和氯化銨水溶液中中和後在水及飽和食鹽之水進行分液洗淨。將有基層以硫酸鎂乾燥後，過濾、其次將濾液在減壓下濃縮。而得到殘渣在矽膠管柱層析法 (展開溶媒；醋酸乙酯:MeOH:水=20:2:1) 精製，而收集所要之含有胜肽之部分，減壓下進行濃縮。將所得殘渣以 95%TFA 水溶液溶解，使反應 10 分鐘。將反應液減壓下濃縮，而得到在 C 末端具有苄硫酯之 Glu—Ser—Asn—Gly—SBn 之 4 殘基胜肽 (序列號碼 34)。

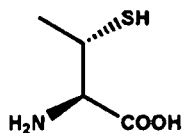
另一方面，在固相合成用管柱容器內放入 Wang resin (Merck 公司製) (0.1mmol) 以亞甲基氯 (DMF)、DMF 充份洗淨後，以 DCM 使之充分膨脹。將 Fmoc—Leu(0.50mmol)、MSNT(0.50mmol)，及 N—甲基咪唑(0.375mmol) 使溶解於 DCM(2mL) 中，放入固相合成用管柱容器，在 25°C 攪拌 2 小時。2 小時後，將樹脂以 DCM 及 DMF 充份洗淨，將 Fmoc 基以 20% 哌啶/DMF 溶液 (2mL) 處理 20 分鐘以去保護。以 DMF、DCM 洗淨後，其後之胜肽鏈之伸長使用下示方法，逐次讓胺基縮合。

保護胺基之胺基酸及 HOBt(67.6mg、0.50mmol)、DIPCI(77.0 μ L、0.50mmol) 溶解於 DMF (2mL) 中，使活性 15 分鐘後，放入固相合成用管柱容器內。在 25°C 攪拌 1 小時後，將 Fmoc 基以 20% 哌啶/DMF (2mL) 處理 20 分鐘去保護。重複此操作逐次縮合胺基酸。在保護之胺基酸中使用 Fmoc—Thr(tBu)(198.8mg、0.50mmol)、Fmoc—Leu(176.8mg、0.50mmol)，在固相樹脂上得到具有 Fmoc—Leu—

Thr(tBu)-Leu 保護基之 3 殘基胜肽。其後，將 Fmoc 基以 20% 哌啶 / DMF 溶液 (2mL) 處理 20 分鐘去保護後，在於合成例 1 所合成之具有 Boc-Thr(S-SsecBu)-Leu 之保護基之蘇胺酸衍生物中加入 HOBt(67.6mg、0.50mmol)、DIPCI(77.0 μ L、0.50mmol) 溶解於 DMF 2mL 中並經 15 分鐘活性化之物，使其反應 3 小時，而在固相樹脂上得到具有 Boc-Thr(S-SsecBu)-Leu-Thr(tBu)-Leu 之保護基之 4 殘基胜肽 (序列號碼 35)。將此物中，加上 95% TFA 水溶液，在室溫使反應 2 小時後、過濾樹脂去除，在減壓下濃縮濾液而得到具有 Thr(S-SsecBu)-Leu-Thr-Leu 之具保護基之 4 殘基之胜肽 (序列號碼 36)。

將如此所得具有保護基之 4 殘基胜肽 (序列號碼 36) 2.2mg 及先前所得到的具有硫酯之 4 殘基胜肽 (序列號碼 34) 2.2mg 溶於 0.2M 磷酸鈉緩衝液 (含有 pH7.3、6M 胍鹽酸液、4-巰基苯乙酸 20mg) xxmL，使反應 3.5 小時。反應後加上二硫糖蘇醇，攪拌 10 分鐘後，將反應液以 HPLC (Cadenza column C18 75 \times 4.6mm 展開溶媒 A: 0.1% TFA 水溶液 B: 0.1% TFA 乙腈: 水 = 90:10 梯度 A: B = 90:10 \rightarrow 35:65 15 分鐘 流速 1.0mL/min) 精製，而得到第 5 位置之蘇胺酸殘基之側鏈氫氧基以硫醇基置換，而得到為 Glu-Ser-Asn-Gly-Thr(SH)-Leu-Thr-Leu 之 8 殘基之胜肽 (序列號碼 37)。所得之胜肽中含有蘇胺酸衍生物殘基，主要具有以下式所表示之立體配置。

[化 21]



將所得到第 5 位置之蘇胺酸殘基之側鏈氫氧基被硫醇基置換之第 8 殘基之胜肽 (序列號碼 37) 3.5mg 放入茄形燒瓶中，在 0.25M tris

鹽酸緩衝溶液中(含有 pH8.6、6M 胍鹽酸液、3.3mM EDTA) 4.1mL 中溶解。在此物中加上 2-巰基乙醇(2.9 μ L)進行攪拌 15 分鐘後，將 甲基-4-硝基苯磺硫酯(26.2mg)溶解於乙腈 1.37mL 之物加入而使其反應 50 分鐘。反應後加上 10%TFA(1.0mL)中和後，將反應液以 HPLC(Cadenza column C18 75 \times 4.6mm、展開溶媒 A:0.1% TFA 水溶液 B:0.1%TFA 乙腈:水=90:10、梯度 A:B=90:10 \rightarrow 35:65 15 分鐘 流速 1.0mL/min)精製，而得到第 5 位置之蘇胺酸殘基被置換之硫醇基之硫磺原子被甲基化之為 Glu-Ser-Asn-Gly-Thr(SMe)-Leu-Thr-Leu 之 8 殘基胜肽(序列號碼 38)。

將所得第 5 位置蘇胺酸殘基所置換之硫醇基之硫磺原子被甲基化之 8 殘基胜肽(序列號碼 38) 4mg 放入茄形燒瓶，使溶解於 70%蟻酸溶液 4.63mL 後，加上氰化溴 49.0mg 遮光、在氫置換下、於 37 $^{\circ}$ C 攪拌。48 小時後，進行減壓濃縮後，加上 5%聯胺(hydrazine)溶液 0.93mL 反應 15 分鐘。此物加上醋酸 60 μ L 後，將反應液以 HPLC(Cadenza column C18 75 \times 4.6mm 展開溶媒 A:0.1%TFA 水溶液 B:0.1%TFA 乙腈:水=90:10 梯度 A:B=85:15 \rightarrow 45:55 15 分鐘 流速 1.0ml/min)精製，而得到所要的 Glu-Ser-Asn-Gly-Thr-Leu-Thr-Leu 8 殘基胜肽(序列號碼 39)。所得之胜肽中含有之蘇胺酸殘基之立體配置，由反應機構推察係為與天然物相同。

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

合成例 1 Boc-Thr(S-SecbU)之合成

蒸餾 Boc-Thr(300mg, 1.37mmol)，將溶液於 DMF(6.85mL, 200mM)後加上 N-(3-Dimethylaminoproph1)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride(786mg, 4.1mmol)及 HOBt(370mg, 2.74mmol)，在 0 $^{\circ}$ C 攪拌 15 分鐘後，加上 TMSEtOH(1.95mL, 13.7mmol)，在 0 $^{\circ}$ C 攪拌。20 小時後，在 TLC 反應，確認終了後，以

乙酸乙酯稀釋反應溶液，在飽和碳酸氫鈉水中中和，在水中 2 次、飽和食鹽水中 1 次來分液 (separating) 洗淨。將有機層以硫酸鎂使之乾燥後，進行過濾，減壓下濃縮濾液。將殘渣以矽膠管柱層析法 (展開溶媒，乙酸乙酯：己烷=1：3) 精製，而得到 Boc-Thr-Tms 酯 (得量: 342mg、取得率: 78%)。

將所得 Boc-Thr-TMS 酯以苯來 2 次共沸 (azeotropy) 後、將殘渣溶於 DCM 20.8mL 中。加入甲磺醯氯 322mL (4.16mmol) 及三乙胺 1.16mL (8.32mmol)，在 0°C 攪拌。10 分鐘後，以 TLC 確認反應終了後，以 DCMM 稀釋反應溶液，以飽和氯化銨水溶液中中和後，用水 2 次、飽和食鹽水 1 次來分液洗淨。以硫酸鎂使有機層乾燥後，進行過濾，減壓下濃縮濾液。將殘渣以矽膠管柱層析法 (展開溶媒、乙酸乙酯：己烷=1：4) 精製，得到 Boc-Thr(OMs)-TMS 酯 (得量: 724.6mg、取得率 88%)。

將所得 Boc-Thr(OMs)-TMS 酯 1.06g 以苯來共沸 2 次後，在乾燥器使其乾燥一晚。將此物使溶解於 DMF 8.9mL 後，加入使硫代醋酸 0.57mL (7.95mmol) 及 DBU 0.79mL (5.3mmol) 溶解於 DMF 4.4mL 中並經使其反應 20 分鐘之溶液，在 45°C 攪拌。18 小時後，以 TLC 確認反應終了後，在飽和氯化銨水溶液中中和後，以水 2 次，飽和食鹽水 1 次分液洗淨，以硫酸鎂將有機層乾燥後，進行過濾，在減壓下將濾液濃縮。將殘渣以矽膠管柱層析法 (展開溶媒、乙酸乙酯：己烷=1：20) 精製，得到 Boc-Thr(SAc)-TMS 酯 (得量: 536.8mg、取得率 53.7%)。

將所得 Boc-Thr(SAc)-TMS 酯 1.1g 溶解於甲醇 100mL 後，加上讓二吡啶基二硫 (3.21g、14.6mmol)、Sec-BuSh 1.75mL (16.1mmol) 溶解於甲醇 5.5mL 之溶液。其後加上氫氧化鈉之甲醇溶液 (500mM) 11.7mL。18 小時後以 TLC 確認反應之終了後，以 1% 醋酸水溶液中中和後，減壓下濃縮後、以乙酸乙酯稀釋。將此物以水 2 次、飽和食鹽水 1 次來分液洗淨。將有機層以硫酸鎂使之乾燥過濾後，減壓下濃縮濾液。將殘渣以矽膠管柱層析法 (展開溶媒、乙酸

乙酯：己烷 1：40) 精製。將所得混合物以苯共沸 2 次後，使溶解於 DMF 29mL (100mM) 中。對此，加上四丁基氟化銨三水和物 2.28mg (7.3mmol)，在 0°C 攪拌。攪拌 15 分鐘後，以 TLC 確認反應終了，其次在飽和氯化銨水溶液中進行中和。將此反應液以水 2 次，飽和食鹽水 1 次洗淨後，將有機層用硫酸鎂進行乾燥。過濾後，減壓下濃縮濾液。有機層用硫酸鎂進行乾燥，過濾後，減壓下濃縮濾液。將殘渣以矽膠管柱容器 (展開溶媒，乙酸乙酯：己烷=1：4→乙酸乙酯：乙醇：水=20：2：1) 精製而得到所要的 Boc-Thr(S-SsecBu)(得量：650mg、取得率 69%)。

序列表之非關鍵詞文字

序列號 1 係實施例 1 之具有保護基之胺基酸序列。

序列號 2 係實施例 1 之被乙醯化之胺基酸序列。

序列號 3 係實施例 1 之具有被甲基化半胱胺酸之胺基酸之序列。

序列號 4 係實施例 1 之被乙醯化之胺基酸序列。

序列號 5 係實施例 2 之具有保護基之胺基酸序列。

序列號 6 係實施例 2 之胺基酸序列。

序列號 7 係實施例 2 之具有被甲基化半胱胺酸之胺基酸序列。

序列號 8 係實施例 2 之胺基酸序列。

序列號 9 係實施例 3 之具有保護基之胺基酸序列。

序列號 10 係實施例 3 之胺基酸序列。

序列號 11 係實施例 3 之具有被甲基化半胱胺酸之胺基酸序列。

序列號 12 係實施例 3 之胺基酸序列。

序列號 13 係實施例 4 之附加糖鏈而具有保護基之胺基酸序列。

序列號 14 係實施例 4 之附加糖鏈而具有保護基之胺基酸序列。

序列號 15 係實施例 4 之附加糖鏈而具有苄硫酯基之胺基酸序列。

序列號 16 係實施例 4 之具有保護基之胺基酸序列。

序列號 17 係實施例 4 之胺基酸序列。

序列號 18 係實施例 4 之附加糖鏈胺基酸序列。

- 序列號 19 係實施例 4 之附加糖鏈具有被甲基化之半胱胺酸。
- 序列號 20 係實施例 4 之附加糖鏈胺基酸序列。
- 序列號 21 係實施例 5 之具有保護基及蛋胺酸亞砒之胺基酸序列。
- 序列號 22 係實施例 5 之具有蛋胺酸亞砒而被乙醯化之胺基酸序列。
- 序列號 23 係實施例 5 之具有被甲基化之半胱胺酸及蛋胺酸亞砒、乙醯化之胺基酸序列。
- 序列號 24 係實施例 5 之乙醯化之胺基酸序列。
- 序列號 25 係實施例 6 之具有保護基之胺基酸序列。
- 序列號 26 係實施例 6 之附加糖鏈，具有保護基之胺基酸序列。
- 序列號 27 係實施例 6 之附加糖鏈具有保護基之胺基酸序列。
- 序列號 28 係實施例 6 之附加糖鏈具有苄硫酯基之胺基酸序列。
- 序列號 29 係實施例 6 之附加糖鏈胺基酸序列。
- 序列號 30 係實施例 6 之附加糖鏈胺基酸序列。
- 序列號 31 係實施例 6 之附加糖鏈具有被甲基化之半胱胺酸之胺基酸序列。
- 序列號 32 係實施例 6 之附加糖鏈胺基酸序列。
- 序列號 33 係實施例 7 之具有保護基之胺基酸序列。
- 序列號 34 係實施例 7 之具有苄硫酯基之胺基酸序列。
- 序列號 35 係實施例 7 之具有保護基及蘇胺酸衍生物之胺基酸序列。
- 序列號 36 係實施例 7 之具有蘇胺酸衍生物之胺基酸序列。
- 序列號 37 係實施例 7 之具有蘇胺酸衍生物之胺基酸序列。
- 序列號 38 係實施例 7 之具有蘇胺酸衍生物之胺基酸序列。
- 序列號 39 係實施例 7 之胺基酸序列。

【產業上可利性】

本發明係提供胜肽及糖胜肽之製造方法。依本發明即使在要得到不含光胱胺酸之胜肽，也可使用天然化學接合法。又、本發明對 N 結合型糖胜肽及 O 結合型胜肽之製造係有用的。

【圖式簡單說明】

無

【主要元件符號說明】

無

序列表

<110> 大塚化學股份有限公司 (Otsuka Chemical Co., Ltd.)

<120> 胜肽的製造方法

<130> 00331AAP001TW

<150> JP 2007-199372

<151> 2007-07-31

<160> 40

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胺基酸序列末端有多封閉基團 (實驗例 1)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1).. (1)

<223> 丙胺酸有封閉基團 Fmoc

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2).. (2)

<223> 胱胺酸有封閉基團 Trt

<400> 1

Ala Cys Gly Leu

1

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 乙醯化胺基酸序列 (實驗例 1)

<220>

<221> MOD_RES
<222> (1).. (1)
<223> ACETYLATION

<400> 2

Ala Cys Gly Leu
1

<210> 3
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 胺基酸序列有甲基化胱胺酸 (實驗例 1)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1).. (1)
<223> ACETYLATION

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2).. (2)
<223> METHYLATION

<400> 3

Ala Cys Gly Leu
1

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 乙醯化胺基酸序列 (實驗例 1)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1).. (1)
<223> ACETYLATION

<400> 4

Ala Ser Gly Leu

1

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胺基酸序列末端有多封閉基團 (實驗例 2)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1).. (1)

<223> 纈胺酸有封閉基團 Fmoc

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2).. (2)

<223> 天冬胺酸有封閉基團 OtBu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3).. (3)

<223> 離胺酸有封閉基團 Boc

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6).. (6)

<223> 胱胺酸有封閉基團 Trt

<400> 5

Val Asp Lys Ala Val Cys Gly Leu

1

5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胺基酸序列 (實驗例 2)

<400> 6

Val Asp Lys Ala Val Cys Gly Leu
1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胺基酸序列有甲基化胱胺酸 (實驗例 2)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> METHYLATION

<400> 7

Val Asp Lys Ala Val Cys Gly Leu
1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胺基酸序列 (實驗例 2)

<400> 8

Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu
1 5

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胺基酸序列末端有多封閉基團 (實驗例 3)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> 白胺酸有封閉基團 Fmoc

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3).. (3)
 <223> 精胺酸有封閉基團 Pbf

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5).. (5)
 <223> 酪胺酸有封閉基團 tBu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6).. (6)
 <223> 胱胺酸有封閉基團 Trt

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10).. (10)
 <223> 精胺酸有封閉基團 Pbf

<400> 9

Leu Phe Arg Val Tyr Cys Asn Phe Leu Arg Gly
 1 5 10

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 胺基酸序列 (實驗例 3)

<400> 10

Leu Phe Arg Val Tyr Cys Asn Phe Leu Arg Gly
 1 5 10

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 胺基酸序列有甲基化胱胺酸 (實驗例 3)

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> METHYLATION

<400> 11

Leu Phe Arg Val Tyr Cys Asn Phe Leu Arg Gly
 1 5 10

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 胺基酸序列 (實驗例 3)

<400> 12

Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly
 1 5 10

<210> 13
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 糖化之胺基酸序列有多封閉基團 (實驗例 4)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> 丙胺酸有封閉基團 Fmoc

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (5)..(5)
 <223> 天冬醯胺酸以去唾液酸 (asialo) 寡糖鏈糖化

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> 絲胺酸有封閉基團 tBu

<400> 13

Ala Leu Leu Val Asn Ser
1 5

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 糖化之胺基酸序列有多封閉基團 (實驗例 4)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1).. (1)
<223> 丙胺酸有封閉基團 Boc

<220>
<221> CARBOHYD
<222> (5).. (5)
<223> 天冬醯胺酸以去唾液酸寡糖鏈糖化

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6).. (6)
<223> 絲胺酸有封閉基團 tBu

<400> 14

Ala Leu Leu Val Asn Ser
1 5

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 糖化胺基酸序列有苯硫酯 (benzyl thioester) 基團 (實驗例 4)

<220>
<221> CARBOHYD
<222> (5).. (5)
<223> 天冬醯胺酸以去唾液酸寡糖鏈糖化

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6).. (6)

<223> 絲胺酸有苯硫酯基團

<400> 15

Ala Leu Leu Val Asn Ser

1 5

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胺基酸序列末端有多封閉基團 (實驗例 4)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1).. (1)

<223> 胱胺酸有封閉基團 Fmoc and Trt

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4).. (4)

<223> 色胺酸有封閉基團 Boc

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5).. (5)

<223> 麩胺酸有封閉基團 OtBu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10).. (10)

<223> 組胺酸有封閉基團 Trt

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12).. (12)

<223> 天冬胺酸有封閉基團 OtBu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13).. (13)

<223> 離胺酸有封閉基團 Boc

<400> 16

Cys Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala
 1 5 10

<210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 胺基酸序列 (實驗例 4)

<400> 17

Cys Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala
 1 5 10

<210> 18
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 糖化胺基酸序列 (實驗例 4)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (5).. (5)
 <223> 天冬醯胺酸以去唾液酸寡糖鏈糖化

<400> 18

Ala Leu Leu Val Asn Ser Cys Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His
 1 5 10 15

Val Asp Lys Ala
 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 胺基酸序列有甲基化胱胺酸 (實驗例 4)

<220>
 <221> CARBOHYD

<222> (5).. (5)
 <223> 天冬醯胺酸以去唾液酸寡糖鏈糖化

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7).. (7)
 <223> METHYLATION

<400> 19

Ala Leu Leu Val Asn Ser Cys Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His
 1 5 10 15

Val Asp Lys Ala
 20

<210> 20
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 糖化胺基酸序列 (實驗例 4)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (5).. (5)
 <223> 天冬醯胺酸以去唾液酸寡糖鏈糖化

<400> 20

Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His
 1 5 10 15

Val Asp Lys Ala
 20

<210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 胺基酸序列末端有多封閉基團與甲基胺酸亞礬 (實驗例 5)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1).. (1)

<223> 甘胺酸有封閉基團 Fmoc

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2).. (2)

<223> 胱胺酸有封閉基團 Trt

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4).. (4)

<223> 甲基胺酸亞砜 (Methionine Sulfoxide)

<400> 21

Gly Cys Gly Met Ala

1

5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 乙醯化胺基酸序列有甲基胺酸亞砜 (實驗例 5)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1).. (1)

<223> ACETYLTATION

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4).. (4)

<223> 甲基胺酸亞砜

<400> 22

Gly Cys Gly Met Ala

1

5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 乙醯化胺基酸序列有甲基化胱胺酸及甲基胺酸亞砜 (實驗例 5)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1).. (1)
 <223> ACETYLATION

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2).. (2)
 <223> METHYLATION

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4).. (4)
 <223> 甲基胺酸亞砷

<400> 23

Gly Cys Gly Met Ala
 1 5

<210> 24
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 乙醯化胺基酸序列 (實驗例 5)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1).. (1)
 <223> ACETYLATION

<400> 24

Gly Ser Gly Met Ala
 1 5

<210> 25
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 胺基酸序列末端有多封閉基團 (實驗例 6)

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (1).. (1)
 <223> 丙胺酸有封閉基團 Fmoc

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5).. (5)
 <223> 組胺酸有封閉基團 Trt

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8).. (8)
 <223> 蘇安酸有封閉基團 tBu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9).. (9)
 <223> 絲胺酸有封閉基團 tBu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12).. (12)
 <223> 天冬胺酸有封閉基團 OtBu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13).. (13)
 <223> 蘇安酸有封閉基團 tBu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14).. (14)
 <223> 精胺酸有封閉基團 Pbf

<400> 25

Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Gly

<210> 26
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 糖化之胺基酸序列有多封閉基團 (實驗例 6)

<220>
 <221> CARBOHYD
 <222> (1).. (1)
 <223> 蘇胺酸以 N-乙醯半乳胺糖糖化

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6).. (6)
 <223> 組胺酸有封閉基團 Trt

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9).. (9)
 <223> 蘇胺酸有封閉基團 tBu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10).. (10)
 <223> 絲胺酸有封閉基團 tBu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13).. (13)
 <223> 天冬胺酸有封閉基團 OtBu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14).. (14)
 <223> 蘇胺酸有封閉基團 tBu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15).. (15)
 <223> 精胺酸有封閉基團 Pbf

<400> 26

Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro
 1 5 10 15

Ala Pro Gly

<210> 27

- <211> 20
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 糖化之胺基酸序列有多封閉基團 (實驗例 6)

- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (1).. (1)
- <223> 絲胺酸有封閉基團 Boc 及 tBu

- <220>
- <221> CARBOHYD
- <222> (2).. (2)
- <223> 蘇胺酸以 N-乙醯半乳胺糖糖化

- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (7).. (7)
- <223> 組胺酸有封閉基團 Trt

- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (10).. (10)
- <223> 蘇胺酸有封閉基團 tBu

- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (11).. (11)
- <223> 絲胺酸有封閉基團 tBu

- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (14).. (14)
- <223> 天冬胺酸有封閉基團 OtBu

- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (15).. (15)
- <223> 蘇胺酸有封閉基團 tBu

- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (16).. (16)
- <223> 精胺酸有封閉基團 Pbf

<400> 27

Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg
1 5 10 15

Pro Ala Pro Gly
20

<210> 28

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 糖化胺基酸序列末端有甲基胺酸亞礪 (實驗例 6)

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (2)..(2)

<223> 蘇胺酸以 N-乙醯半乳胺糖糖化

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> 甘胺酸有甲基胺酸亞礪

<400> 28

Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg
1 5 10 15

Pro Ala Pro Gly
20

<210> 29

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 糖化之胺基酸序列 (實驗例 6)

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (2)..(2)

<223> 蘇胺酸以 N-乙醯半乳胺糖糖化

<400> 29

Cys Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg
1 5 10 15

Pro Ala Pro Gly
20

<210> 30

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 糖化之胺基酸序列 (實驗例 6)

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (2)..(2)

<223> 蘇胺酸以 N-乙醯半乳糖糖化

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (22)..(22)

<223> 蘇胺酸以 N-乙醯半乳糖糖化

<400> 30

Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg
1 5 10 15

Pro Ala Pro Gly Cys Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala
20 25 30

Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly
35 40

<210> 31

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 糖化之胺基酸序列有甲基化脒胺酸 (實驗例 6)

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (2)..(2)

<223> 蘇胺酸以 N-乙醯半乳胺糖糖化

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21).. (21)

<223> METYLATION

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (22).. (22)

<223> 蘇胺酸以 N-乙醯半乳胺糖糖化

<400> 31

Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg
1 5 10 15

Pro Ala Pro Gly Cys Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala
20 25 30

Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly
35 40

<210> 32

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 糖化胺基酸序列 (實驗例 6)

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (2).. (2)

<223> 蘇胺酸以 N-乙醯半乳胺糖糖化

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (22).. (22)

<223> 蘇胺酸以 N-乙醯半乳胺糖糖化

<400> 32

Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg
1 5 10 15

Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala
20 25 30

Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly
35 40

<210> 33
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 胺基酸序列末端有多封閉基團 (實驗例 7)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1).. (1)
<223> 麩胺酸有封閉基團 Boc 及 OtBu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2).. (2)
<223> 絲胺酸有封閉基團 tBu

<400> 33

Glu Ser Asn Gly
1

<210> 34
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 胺基酸序列末端有甲基胺酸亞砷基團 (實驗例 7)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4).. (4)
<223> 甘胺酸有甲基胺酸亞砷基團

<400> 34

Glu Ser Asn Gly
1

<210> 35
<211> 4
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胺基酸序列有蘇胺酸衍生物及多封閉基團 (實驗例 7)

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (1).. (1)

<223> 蘇胺酸衍生物有 S-SsecBu 基團以替代羥基團 (hydroxyl group) 及封閉基團 Boc

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3).. (3)

<223> 蘇胺酸有封閉基團 tBu

<400> 35

Xaa Leu Thr Leu

1

<210> 36

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胺基酸序列有蘇胺酸衍生物 (實驗例 7)

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (1).. (1)

<223> 蘇胺酸衍生物有 S-SsecBu 基團以替代羥基團

<400> 36

Xaa Leu Thr Leu

1

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胺基酸序列有蘇胺酸衍生物 (實驗例 7)

<220>

<221> MUTAGEN
 <222> (5)..(5)
 <223> 蘇胺酸衍生物有巰基團 (thiol group) 以替代羥基團

<400> 37

Glu Ser Asn Gly Xaa Leu Thr Leu
 1 5

<210> 38
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 胺基酸序列有蘇胺酸衍生物 (實驗例 7)

<220>
 <221> MUTAGEN
 <222> (5)..(5)
 <223> 蘇胺酸衍生物有甲基化巰 (methylated thiol) 基團以替代羥基團

<400> 38

Glu Ser Asn Gly Xaa Leu Thr Leu
 1 5

<210> 39
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

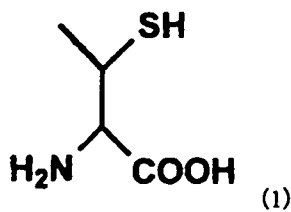
<220>
 <223> 胺基酸序列 (實驗例 7)

<400> 39

Glu Ser Asn Gly Thr Leu Thr Leu
 1 5

十、申請專利範圍：

1. 一種胜肽之製造方法，係於含有-SH 基之胺基酸殘基之胜肽中，其特徵為，將該-SH 基變換為-OH 基，並含有以下 (a) ~ (c) 之步驟：
 - (a) 讓胜肽中之-SH 基與甲基化助劑反應之步驟；
 - (b) 讓在步驟 (a) 所得到-SMe 基與氰化物 (cyanide agents) 反應之步驟；以及
 - (c) 在 pH>3 之條件下的步驟。
2. 一種胜肽之製造方法，係於含有具-SH 基之胺基酸殘基之胜肽中，其特徵為，將該-SH 基變換為-OH 基並包含以下 (a) ~ (c) 步驟：
 - (a) 由胜肽中之-SH 基與甲基化助劑反應，將該-SH 基變換為-SMe 基之步驟；
 - (b) 由在步驟 (a) 所得到之-SMe 基與氰化物 (cyanide agents) 反應，而產生反應中間體之步驟，以及
 - (c) 在 pH>3 之條件下，將在步驟 (b) 所得之中間體來變換為含有具-OH 基之胺基酸殘基之胜肽之步驟。
3. 一種胜肽之製造方法，係於含有半胱胺酸殘基之胜肽中，其特徵為，將半胱胺酸殘基變換為絲胺酸殘基，並含有以下步驟 (a) ~ (c)：
 - (a) 由胜肽中之半胱胺酸殘基之-SH 基與甲基化助劑反應，將所述-SH 基變換為-SMe 基之步驟；
 - (b) 由在步驟 (a) 所得到-SMe 基與氰化物 (cyanide agents) 反應，而產生反應中間體之產生步驟；以及
 - (c) 在 pH>3 之條件下，將步驟 (b) 所得之反應中間體變換為含有絲胺酸殘基之胜肽之步驟。
4. 一種胜肽之製造方法，係於含有以式 (1) 表示之蘇胺酸衍生物 A，
[化 1]



作為胺基酸殘基之胜肽中，其特徵為，將該蘇胺酸衍生物 A 殘基變換為蘇胺酸殘基之胜肽之製造方法，並包含以下步驟(a)~(c)：

- (a) 由胜肽中之蘇胺酸衍生物 A 殘基之-SH 基與甲基化助劑反應，將該-SH 基變換為-SMe 基之步驟；
- (b) 由在步驟 (a) 所得到的-SMe 基與氰化物反應而產生反應中間體之步驟；以及
- (c) 在 pH>3 之條件下，將在步驟 (b) 所得到之反應中間體變換為含有蘇胺酸殘基之胜肽之步驟。

5. 一種胜肽之製造方法，係於含有具-SMe 基之胺基酸殘基之胜肽中，其特徵為，將該-SMe 基變換為-OH 基之胜肽製造方法，並含有以下 (b) 及 (c) 步驟：

- (b) 由胜肽中之-SMe 基與氰化物反應而產生反應中間體之步驟；以及
- (c) 在 pH>3 之條件下，將在步驟 (b) 所得到之反應中間體變換為含有具-SH 基之胺基酸殘基之胜肽之步驟。

6. 如申請專利範圍第 2 項至第 5 項中任一項所述之胜肽之製造方法，其中該反應中間體為酯者。

7. 如申請專利範圍第 1 項至第 5 項中任一項所述之胜肽之製造方法，其中在步驟 (c) 之鹼性條件為 pH7~9。

8. 如申請專利範圍第 1 項至第 5 項中任一項所述之胜肽之製造方法，其中在步驟 (c) 之鹼性條件為 pH9~13。

9. 如申請專利範圍第 1 項至第 5 項中任一項所述之胜肽之製造方法，其中在步驟 (a) 之胜肽中之蛋胺酸殘基係

為保護蛋胺酸殘基，且在步驟 (b) 或 (c) 之後係含有所要之以下步驟 (d)：

(d) 將保護蛋胺酸殘基去保護之步驟。

10. 一種胜肽之製造方法，係包含具-OH 基之胺基酸殘基之胜肽之製造方法，其特徵係包含以下步驟：

(o) 由天然化學接合法來連接第 1 胜肽及第 2 胜肽而得到含有具-SH 基之胺基酸殘基之胜肽之步驟，該第一胜肽為在 C 末端含有羧基以式-C(=O)-SR (式中 R 為羧基、芳基、烷基所選出這些再由置換基置換亦可) 表示之 α 羧硫酯基置換之胺基酸殘基，該第 2 胜肽係在 N 末端含有具-SH 基之胺基酸殘基；

(a) 由在步驟 (o) 所得到之胜肽中之-SH 基與甲基化助劑反應將該-SH 基變換為-SMe 基之步驟；

(b) 由在步驟 (a) 所得到的-SMe 基與氰化物反應，而產生反應中間體之步驟；以及

(c) 在 pH>3 之條件下，將在步驟 (b) 反得到之反應中間體變換為含有具-OH 基之胺基酸殘基之胜肽之步驟。

11. 一種胜肽之製造方法，係包含絲胺酸殘基，其特徵為，含有以下步驟：

(o) 由天然化學接合法來連接第 1 胜肽及第 2 胜肽而得到含有半胱胺酸殘基之胜肽之步驟，該第 1 胜肽為在 C 末端含有羧基以式-C(=O)-SR (式中 R 為苄基，芳基或烷基所選出，這些再由置換基置換亦可) 表示之 α 羧硫酯基置換之胺基酸殘基，該第 2 胜肽係在 N 末端含有半胱胺酸殘基；

(a) 由在步驟 (o) 所得到之胜肽中之半胱胺酸殘基之-SH 基與甲基化助劑，將-SH 基變換為-SMe 基之步驟；以及

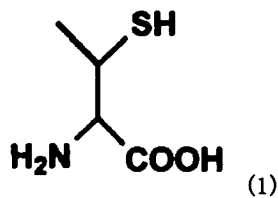
(b) 由步驟 (a) 所得之-SMe 基與氰化物反應而將該-SH 基變換為-SMe 基之步驟；以及

(c) 在 pH>3 之條件下，將在步驟 (b) 所得到之反應中間體變換

為含有絲胺酸殘基之胜肽之步驟。

12. 一種胜肽之製造方法，係包含蘇胺酸殘基之製造方法，其特徵為，包含以下步驟：

- (o) 由天然化學接合法來連接第 1 胜肽及第 2 胜肽而得到含有以
(1) 式表示之蘇胺酸衍生物 A
[化 2]



作為胺基酸殘基之胜肽之步驟，該第 1 胜肽為在 C 末端含有羧基以式-C(=O)-SR (式中 R 為苄基、芳基、烷基所選出，這些再由置換基置換亦可) 表示之 α 羧硫酯基置換之胺基酸殘基，該第 2 胜肽係在 N 末端含有蘇胺酸殘基；

- (a) 由在步驟 (o) 所得到之胜肽中之蘇胺酸衍生物之 A 殘基之 -SH 基與甲基化助劑反應，將該-SH 基變換為-SMe 基之步驟；
- (b) 由在步驟 (a) 所得到-SMe 基與氰化物反應而產生反應中間體之步驟；以及
- (c) 在 pH>3 之條件下，將步驟 (b) 所得到之反應中間體變換為含有蘇胺酸殘基之胜肽之步驟。

13. 如申請專利範圍第 10 項至第 12 項中任一項所述之胜肽之製造方法，其中該反應中間體為酯者。

14. 如申請專利範圍第 10 項至第 12 項中任一項所述之胜肽之製造方法，其中在步驟 (c) 之鹼性條件係為 pH7~9。

15. 如申請專利範圍第 10 項至第 12 項中任一項所述之製造方法，其中在步驟 (c) 之鹼性條件為 pH9~13。

16. 如申請專利範圍第 10 項至第 12 項中任一項所述之胜肽之製造方

法，其中在步驟 (a) 之胜肽中之蛋胺酸係為保護蛋胺酸殘基，且在步驟 (b) 或 (c) 之後含有所要之如下步驟 (d)：

(d) 將保護蛋胺酸殘基去保護之步驟。

17. 如申請專利範圍第 10 項至第 12 項中任一項之胜肽之製造方法，其中該第 1 胜肽係為不含半胱胺酸殘基之胜肽或半胱胺酸殘基為保護半胱胺酸殘基之胜肽，

該第 2 胜肽係為 N 末端以下不含半胱胺酸殘基之胜肽或 N 末端以外之胜肽之半胱胺酸殘基為保護半胱胺酸殘基之胜肽者。

18. 一種糖胜肽之製造方法，係於含有具-SH 基之胺基酸殘基之糖胜肽中，其特徵為，將該-SH 基變換為-OH 基之糖胜肽之製造方法，並含有以下之步驟 (a) ~ (c)：

(a) 糖胜肽中之-SH 基與甲基化助劑反應之步驟；

(b) 在步驟 (a) 所得到之-SMe 基與氰化物反應之步驟；以及

(c) 在 pH>3 之條件的步驟。

19. 一種糖胜肽之製造方法，係於含有具-SH 基之胺基酸殘基之糖胜肽中，其特徵為，具有將該-SH 基變換為-OH 基之糖胜肽之製造方法，並含有以下步驟 (a) ~ (c)：

(a) 由糖胜肽中之-SH 基與甲基化助劑反應，將該-SH 基變換為-SMe 基之步驟；

(b) 由在步驟 (a) 所得到之-SMe 基與氰化物反應，而產生反應中間體之步驟；以及

(c) 在 pH>3 之條件下，將步驟 (b) 所得到之中間體變換為含有具-OH 基之胺基酸殘基之糖胜肽步驟。

20. 一種糖胜肽之製造方法，係於含有半胱胺酸殘基之糖胜肽中，其特徵為，將該半胱胺酸殘基變換為絲胺酸殘基之糖胜肽之製造方法，並含以下步驟 (a) ~ (c)：

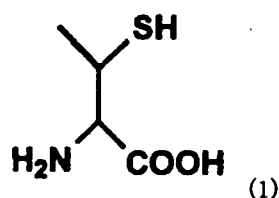
(a) 由糖胜肽中之半胱胺酸殘基之-SH 基與甲基化助劑反應，將該-SH 基變換為-SMe 基之步驟；

(b) 由在步驟 (a) 所得到之-SMe 基與氰化物反應而產生反應中間體之步驟；以及

(c) 在 pH>3 之條件下，將在步驟 (b) 所得到之反應中間體變換為含有絲胺酸殘基糖胜肽之步驟。

21. 一種糖胜肽之製造方法，係含有式 (1) 所表示之蘇胺酸衍生物 A

[化 3]



以作為胺基酸殘基之糖胜肽，其特徵為，該蘇胺酸衍生物 A 殘基變換為蘇胺酸殘基，並含有以下 (a) ~ (c) 步驟：

(a) 由糖胜肽中之蘇胺酸衍生物 A 殘基之-SH 基與甲基化助劑反應，將-SH 基變換為-SMe 基之步驟；

(b) 將在步驟 (a) 所得到-SMe 基與氰化物反應而產生反應中間體之步驟；以及

(c) 在 pH>3 之條件下，將在步驟 (b) 所得到反應中間體，變換為含有蘇胺酸殘基之糖胜肽之步驟。

22. 如申請專利範圍第 19 項至第 21 項中任一項所述之糖胜肽之製造方法，其中該反應中間體為酯者。

23. 如申請專利範圍第 18 項至第 21 項中任一項所述之糖胜肽之製造方法，其中在步驟 (c) 之鹼性條件係為 pH7~9。

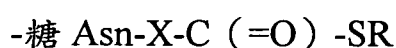
24. 如申請專利範圍第 18 項至第 21 項中任一項所述之糖胜肽之製造方法，其中在步驟 (c) 之鹼性條件為 pH9~13。

25. 如申請專利範圍第 18 項至第 21 項中任一項所述之糖胜肽之製造方法，其中糖胜肽係具有 N 結合型糖鏈者。

26.如申請專利範圍第 18 項至第 21 項中任一項所述之糖胜肽之製造方法，其中該糖胜肽係具有 O 結合型糖鏈者。

27.一種含有絲胺酸殘基之糖胜肽之製造方法，其特徵係提供以下步驟：

(o) 由天然化學接合法來連接第 1 糖胜肽與第 2 胜肽而得到含有半胱胺酸之糖胜肽之步驟，該第 1 糖胜肽 C 末端係以下式來表示：



(式中，糖 Asn 為附加糖鏈天門冬醯胺，X 為脯胺酸以外任意之胺基酸殘基之羧基以外之部分，R 為由苄基、芳基、烷基所選出，這些再由置換基置換亦可)，

該第 2 胜肽係在 N 末端含有半胱胺酸殘基；

(a) 由在步驟 (o) 所得到糖胜肽中之半胱胺酸殘基中之-SH 基與甲基化助劑反應，將該-SH 基變換為-SMe 基之步驟；

(b) 由在步驟 (a) 所得到的-SMe 基與氰化物反應而產生反應中間體之步驟；以及

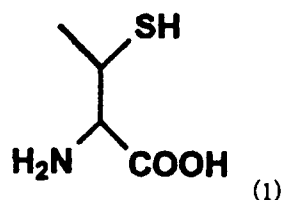
(c) 在 pH>3 之條件下，將在步驟 (b) 所得之反應中間體變換為含有絲胺酸殘基之糖胜肽步驟。

28.一種含有蘇胺酸殘基之糖胜肽之製造方法，其特徵係提供以下步驟：

(o) 由天然化學接合法連接第 1 糖胜肽與第 2 胜肽而得到含有以

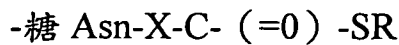
(1) 式

[化 4]



所表示含有蘇胺酸衍生物 A 作為胺基酸殘基之糖胜肽之步

驟，該第 1 糖胜肽 C 末端以下式來表示：



(式中，糖 Asn 為附加糖鏈天門冬醯胺，X 為脯胺酸以外之任意之胺基酸殘基之羧基以外之部分，R 為由苄基、芳基、烷基所選出，再將這些自由置換基置換亦可)，

該第 2 胜肽係在 N 末端含有蘇胺酸殘基；

- (a) 由在步驟 (o) 所得到之糖胜肽中之蘇胺酸衍生物 A 殘基之 -SH 基與甲基化助劑反應，將該 -SH 基變換為 -SMe 基之步驟；
- (b) 由在步驟 (a) 所得到之 -SMe 基與氰化劑反應而得到反應中間體之步驟；以及
- (c) 在 pH>3 之條件下，將在步驟 (b) 所得到反應中間體變換為含有蘇胺酸殘基之糖胜肽之步驟。

29. 如申請專利範圍第 27 項或第 28 項所述之糖胜肽之製造方法，其中該反應中間體係為酯者。

30. 如申請專利範圍第 27 項或第 28 項所述之糖胜肽之製造方法，其中在步驟 (c) 之鹼性條件為 pH7~9。

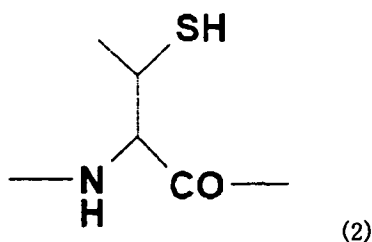
31. 如申請專利範圍第 27 項或第 28 項所述之糖胜肽之製造方法，其中在步驟 (c) 之鹼性條件為 pH9~13。

32. 一種糖胜肽，包含以下式表示之構造：



(式中，糖 Asn 係附加天門冬醯胺，X 為脯胺酸以外之任意之胺基酸殘基，Y 為在式 (2) 所表示之蘇胺酸衍生物 A 殘基

[化 5]



)。