

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2010 年 6 月 17 日(17.06.2010)



(10) 国際公開番号
WO 2010/067563 A1

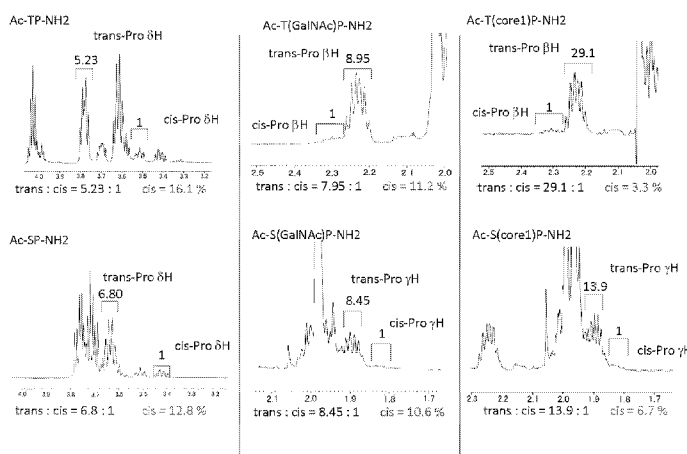
- (51) 国際特許分類:
C12P 21/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/006641
- (22) 国際出願日: 2009 年 12 月 4 日(04.12.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-312507 2008 年 12 月 8 日(08.12.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 北海道大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北 8 条西 5 丁目 8 番地 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 西村紳一郎 (NISHIMURA, Shin-Ichiro). 藤谷直樹(FUJITANI, Naoki).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス(SIKS & Co.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING GLYCOPEPTIDE

(54) 発明の名称: 糖ペプチドの製造方法

[図3]



(57) Abstract: Disclosed is a peptide derivative which has only a trans conformation as a result of the control of cis-trans isomerization and also has controlled functions and quality. Also disclosed is a process for producing a glycopeptide containing at least one trans-type proline residue, wherein an amino acid residue adjacent to the N-terminal of the trans-type proline residue is a serine or threonine residue having a disaccharide core-1-type sugar chain (Galβ(1→3)GalNAc-α) added thereto. The process utilizes a chemical peptide synthesis method, and involves the step of binding a serine or threonine residue having a disaccharide core-1-type sugar chain (Galβ(1→3)GalNAc-α) added thereto to the N-terminal of a proline residue that is desired to be formed into a trans form, wherein the step is carried out at least once. Alternatively, the process involves the steps of providing a peptide containing a proline residue and also containing a serine or threonine residue as an amino acid residue to be placed adjacent to the N-terminal of the proline residue, and introducing a disaccharide core-1-type sugar chain (Galβ(1→3)GalNAc-α) into the serine or threonine residue adjacent to the N-terminal of at least one proline residue in the peptide.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2010/067563 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

シス→トランス異性化を制御してトランス体のみのコンフォメーションを有する、機能・品質を管理されたペプチド誘導体を提供する。少なくとも 1 のトランス型のプロリン残基を含み、かつ前記トランス型のプロリン残基は、N 末端側に隣接するアミノ酸残基が二糖 core1 型糖鎖 ($\text{Gal}\beta(1\rightarrow3)\text{GalNAc-}\alpha$) を付加したセリン残基またはスレオニン残基である糖ペプチドの製造方法。ペプチドの化学合成方法を利用し、トランス型にしたいプロリン残基の N 末端側に、二糖 core1 型糖鎖 ($\text{Gal}\beta(1\rightarrow3)\text{GalNAc-}\alpha$) を付加したセリンまたはスレオニンを結合する工程を少なくとも 1 回含む。または、プロリン残基を含み、かつ前記プロリン残基の N 末端側に隣接するアミノ酸残基としてセリン残基またはスレオニン残基を含むペプチドを用意し、前記ペプチドの少なくとも 1 のプロリン残基の N 末端側に隣接するセリン残基またはスレオニン残基に、二糖 core1 型糖鎖 ($\text{Gal}\beta(1\rightarrow3)\text{GalNAc-}\alpha$) を導入する工程を含む。

明 細 書

発明の名称：糖ペプチドの製造方法

関連出願の相互参照

- [0001] 本出願は、2008年12月8日出願の日本特願2008-312507号の優先権を主張し、その全記載は、ここに特に開示として援用される。

技術分野

- [0002] 本発明は、糖ペプチドの製造方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、少なくとも1のトランス型のプロリン残基を含む糖ペプチドの製造方法に関する。

背景技術

- [0003] プロテインデータバンク (PDB) 等の立体構造解析データベースを用い、経験的な関数を利用することで人工的に構造をデザインしたタンパク質の合成に成功した例は多くの報告がある（非特許文献1～5）
- [0004] しかしながら、ペプチド鎖中のシス→トランス異性化反応が、タンパク質の立体構造形成（folding）および変性（unfolding）にとっての1つの重要な要素であることが示唆されているにも関わらず、現在までにシス→トランスの異性化を制御する方法はない。

非特許文献1：J. Mol. Biol. (2005) 354, 801-814

非特許文献2：Science (2003), 302, 1364-1368

非特許文献3：Science (1997), 278, 82-87

非特許文献4：Curr. Opin. Biotechnol. (1995), 6, 460-466

非特許文献5：Science (1995), 270, 935-941

非特許文献6：Peptides: Chemistry and Biology 2002. Sewald, Norbert / Jakubke, Hans-Dieter, WILEY-VCH

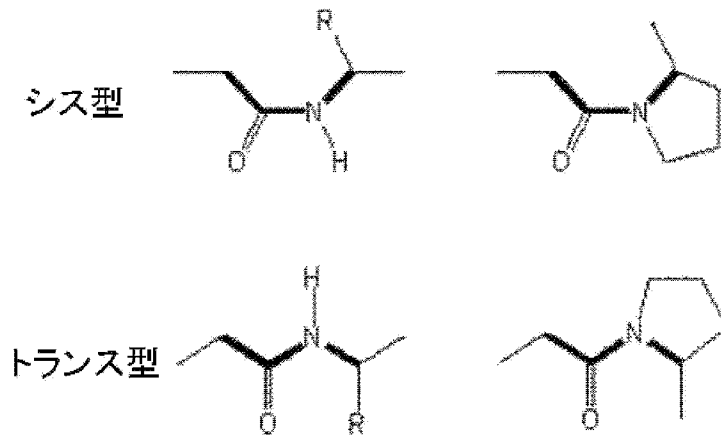
非特許文献1～6の全記載は、ここに特に開示として援用される。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 一般的にはペプチド鎖中のアミド結合はそのほとんどがトランス体を形成しているが、X（任意のアミノ酸）-Pの配列では、他の配列に比べシス体を形成することが多い（平均6.5%がシス体を形成する）（非特許文献6）。

[0006] [化1]



[0007] 同一配列からなる生理活性ペプチドにおいて、複数のコンフォメーションが存在することは、その機能を低下、あるいは機能を予測することが困難になる要因である。

[0008] そこで本発明は、シス・トランス異性化を制御してトランス体のみのコンフォメーションを有する、機能・品質を管理されたペプチド誘導体を提供することを解決すべき課題(目的)とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記X-Pの配列に着目し、アミノ酸Xにおける糖鎖付加を行った。具体的には、上記Xとしてセリン（S）およびスレオニン（T）残基を選び、かつこれらの残基に二糖core1型糖鎖（Gal β (1 $\rightarrow$ 3) GalNAc- α ）を付加することでS-P間、およびT-P間のシス・トランス異性化を制御し、トランス体のみのコンフォメーションを有する糖ペプチドを製造できることを見出して、本発明を完成させた。

[0010] 本発明は以下のとおりである。

[1]

少なくとも1のトランス型のプロリン残基を含み、かつ

前記トランス型のプロリン残基は、N末端側に隣接するアミノ酸残基が二糖core1型糖鎖 ($\text{Gal } \beta (1 \rightarrow 3) \text{GalNAc-}\alpha$) を付加したセリン残基またはスレオニン残基である糖ペプチドの製造方法であって、

ペプチドの化学合成方法を利用し、

トランス型にしたいプロリン残基のN末端側に、二糖core1型糖鎖 ($\text{Gal } \beta (1 \rightarrow 3) \text{GalNAc-}\alpha$) を付加したセリンまたはスレオニンを結合する工程を少なくとも1回含む、前記製造方法。

[2]

ペプチドの化学合成方法として固相合成法を用いる[1]に記載の製造方法。

[3]

前記トランス型にしたいプロリン残基がC末端を固相に固定化したプロリン残基であり、かつ二糖core1型糖鎖 ($\text{Gal } \beta (1 \rightarrow 3) \text{GalNAc-}\alpha$) を付加したセリンまたはスレオニンを結合する工程を1回含む、[2]に記載の製造方法。

[4]

少なくとも1のトランス型のプロリン残基を含み、かつ

前記トランス型のプロリン残基は、N末端側に隣接するアミノ酸残基が二糖core1型糖鎖 ($\text{Gal } \beta (1 \rightarrow 3) \text{GalNAc-}\alpha$) を付加したセリン残基またはスレオニン残基である糖ペプチドの製造方法であって、

プロリン残基を含み、かつ前記プロリン残基のN末端側に隣接するアミノ酸残基としてセリン残基またはスレオニン残基を含むペプチドを用意し、

前記ペプチドの少なくとも1のプロリン残基のN末端側に隣接するセリン残基またはスレオニン残基に、二糖core1型糖鎖 ($\text{Gal } \beta (1 \rightarrow 3) \text{GalNAc-}\alpha$) を導入する工程を含む、前記製造方法。

[5]

前記二糖core1型糖鎖 ($\text{Gal } \beta (1 \rightarrow 3) \text{GalNAc-}\alpha$) の導入が、前記ペプチドが有するセリン残基またはスレオニン残基の側鎖水酸基にGalNAcが付加され、次いでGalNAcにGalが付加されることで行われる[4]に記載の方法。

[6]

セリン残基またはスレオニン残基の側鎖水酸基へのGalNAcの付加が、GalNAc転移酵素によって行われ、GalNAcのGalへの付加が、Gal転移酵素によって行われる[5]に記載の方法。

[7]

ペプチドのアミノ酸残基数が2～200個の範囲であり、かつトランス型のプロリン残基数が1～100個の範囲である、[1]～[6]のいずれかに記載の方法。

発明の効果

[0011] 一般に、糖鎖付加を施さないS-PおよびT-P配列においてはシス体とトランス体が混在する。しかし、上記本発明の方法により、プロリン残基のN末端側に隣接するセリンまたはスレオニンに二糖core1型糖鎖 (Gal β (1 $\rightarrow$ 3) GalNAc- α) を付加することにより、S-PおよびT-Pのいずれの配列においても、プロリンをトランス体として固定化することができる。このように、本発明では、糖鎖付加により、S-PおよびT-P配列のシスートランス異性化を制御し、一定のコンフォメーションを有する、即ち、プロリンをトランス体として固定化した、糖ペプチドを調製することができる。

[0012] 本発明の製造方法によれば、シスートランスの異性化を抑え、一定のコンフォーマーを提示したペプチドを提供できることから、プロリンを含まなければならないペプチド製剤の薬効を一定にすることができると考えられる。異性化が起こったままだと、どちらか一方が薬理活性を示し、結果的にその効果が弱まり、投与量の増加につながるのに対して、活性体のみを用いることで投与量を最小限に抑えられる。自己免疫疾患に見られる、自己抗体の高感度な検出(代表的な使用方法としてはELISA法)に応用できる。自己免疫疾患は、何らかの理由により、あるタンパク質が過剰発現し、それを認識してしまう抗体(自己抗体)にそのタンパク質が攻撃されてしまう場合や、あるタンパク質の変性(糖鎖形成不全等も含む)によって攻撃を受けることによって、体に変調を来す疾患である。この場合、自己抗体はタンパク質中の一定の領域(エピトープ)を認識するが、その領域にプロリンが含まれる場合、圧

倒的にトランス体であることが予想される。ここで、自己抗体を診断のために検出する場合、エピトープ配列を合成しなければならない。すなわち、天然タンパク質と同じトランス体を有するペプチドの合成が必要となる。そのタンパク質がムチンである場合、本発明の製造方法における糖鎖修飾による立体構造の制御は有用である。

図面の簡単な説明

- [0013] [図1-1] 図1-1は、化合物1についてのNMR解析結果を示す。
- [図1-2] 図1-2は、化合物2についてのNMR解析結果を示す。
- [図1-3] 図1-3は、化合物3についてのNMR解析結果を示す。
- [図2-1] 図2-1は、化合物1についてのTOCSYスペクトルのNH-メチルプロトン（スレオニン）の相関領域を示す。
- [図2-2] 図2-2は、化合物2についてのTOCSYスペクトルのNH-メチルプロトン（スレオニン）の相関領域を示す。
- [図2-3] 図2-3は、化合物3についてのTOCSYスペクトルのNH-メチルプロトン（スレオニン）の相関領域を示す。
- [図2-4] 図2-4は、化合物2についての主鎖構造（左図）及び糖鎖を表示したPro1からThr11の領域の構造（右図）を示す。
- [図3] 図3は、実施例2において得られた、¹H-NMRによるシス体とトランス体の定量結果を示す。

発明を実施するための形態

- [0014] 本発明の糖ペプチドの製造方法は、少なくとも1のトランス型のプロリン残基を含み、かつ前記トランス型のプロリン残基は、N末端側に隣接するアミノ酸残基が二糖core1型糖鎖（Gal β (1 $\rightarrow$ 3) GalNAc- α ）を付加したセリン残基またはスレオニン残基である糖ペプチドの製造方法である。
- [0015] 本発明の製造方法において製造される糖ペプチドのペプチドは、少なくとも1つのプロリン残基とこのプロリン残基のN末端側にセリン残基またはスレオニン残基が隣接するものであれば良く、さらに、プロリン残基のN末端側に隣接するセリン残基またはスレオニン残基は、二糖core1型糖鎖（Gal β (1 $\rightarrow$ 3

)GalNAc- α)を付加したものであり、その結果、前記プロリン残基はトランス型の構造を有するものである。

[0016] ペプチドのアミノ酸残基数には特に制限はないが、例えば、2~200個の範囲であることができ、さらには、10~100個の範囲であることができる。また、プロリン残基数は、例えば、1~100個の範囲であることができ、その中の一部または全部のプロリン残基がトランス型であることができる。プロリン残基、セリン残基またはスレオニン残基以外のアミノ酸残基の種類や配列には特に制限はない。ペプチドの具体例としては、例えば、IgA1またはその部分配列、O-結合型糖鎖を多量に含む糖タンパク質であるヒト由来ムチン(MUC)のタンデムリピート配列(MUC1~20においてMUC1, MUC9, MUC14, MUC15, MUC18, MUC19以外すべてにSPおよびTPが存在)(MUC2: PTTIPITTTTTVTPIPIPITGTQT(配列番号2), MUC3A: HSTIPSFTSSITTTETTS(配列番号3), MUC4: TSSASTGHATIPLPVT(配列番号4), MUC5AC, MUC6, MUC7, MUC8, MUC10, MUC11, MUC12, MUC13, MUC16, MUC17, MUC20)、不凍活性を有する不凍糖タンパク質AFGPのタンデムリピート配列であるAATAATIPATAATPA(配列番号5)等であることができる。

[0017] 本発明の糖ペプチドの製造方法は、以下の第1の態様および第2の態様を含む。

[0018] 本発明の糖ペプチドの製造方法の第1の態様は、上記製造方法であって、さらに、ペプチドの化学合成方法を利用し、かつトランス型にしたいプロリン残基のN末端側に、二糖core1型糖鎖(Gal β (1 $\rightarrow$ 3)GalNAc- α)を付加したセリンまたはスレオニンを結合する工程を少なくとも1回含むものである。

[0019] また、本発明の糖ペプチドの製造方法の第2の態様は、上記製造方法であって、さらに、プロリン残基を含み、かつ前記プロリン残基のN末端側に隣接するアミノ酸残基としてセリン残基またはスレオニン残基を含むペプチドを用意し、

前記ペプチドの少なくとも1のプロリン残基のN末端側に隣接するセリン残基またはスレオニン残基に、二糖core1型糖鎖(Gal β (1 $\rightarrow$ 3)GalNAc- α)を導入する工程を含むものである。

[0020] [糖ペプチドの製造方法(1)]

本発明の糖ペプチドの製造方法の第1の態様は、糖アミノ酸を用いるペプチドの化学合成方法を利用するものである。さらに、ペプチドの化学合成方法としては、例えば、固相合成法を用いることができる。第1の態様では、トランス型にしたいプロリン残基のN末端側に、糖アミノ酸として、二糖core1型糖鎖 ($\text{Gal } \beta (1 \rightarrow 3) \text{GalNAc-}\alpha$) を付加したセリンまたはスレオニンを結合する。従って、ペプチドの化学合成方法としては、糖を付加したアミノ酸である糖アミノ酸を用いてペプチドを合成するのに適した方法を用いることが適当である。そのような方法として、例えば、特開2006-28141号公報に記載のマイクロ波を照射しながらペプチド合成形成反応を行う方法を挙げることができる。

[0021] 具体的には、まず、固相担体に最初の糖アミノ酸（又はアミノ酸）のN末端アミノ基又はC末端カルボキシル基を結合し（例えば、C末端のカルボキシル基をクロロトリチル樹脂、クロルメチル樹脂、オキシメチル樹脂、p-アルコキシベンジルアルコール樹脂等の担体に結合する）、所望により縮合剤を用いて、順次糖アミノ酸（又はアミノ酸）を結合していく。

[0022] 二糖core1型糖鎖 ($\text{Gal } \beta (1 \rightarrow 3) \text{GalNAc-}\alpha$) を付加したセリンまたはスレオニンは、例えば、以下のように合成することができる。

Fmoc-セリンおよびFmoc-スレオニンをカルボジイミド系の縮合剤であるDCCを用いてC末端のカルボン酸をt-ブチル基で保護する。次に水酸基を完全アセチル化した（1位のみフリー）Gal誘導体に対し、4位と6位がベンジリデン基で保護され、2位にアジド基を有するGal誘導体をジクロロメタン中でTMSトリフラートを用いて縮合する。この糖鎖誘導体と先に述べたアミノ酸誘導体を同様に縮合して糖アミノ酸誘導体を作成する。80%酢酸80℃でベンジリデン基を切断後、アジド基を亜鉛によって還元後無水酢酸でNアセチル基を作成し、最後にC末端のt-ブチル基を90%トリフルオロ酢酸で切断する。

[0023] 縮合剤としては、例えば、ジフェニルホスホリルアジド(DPPA)、ジエ

チルホスホリルシアニデート、アジドトリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロリン酸塩等の有機リン化合物、N-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキノリン(EEDQ)、1-イソブチル-2-イソブチル-1,2-ジヒドロキシキノリン等のキノリン系ペプチド縮合剤、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU)、DCC等のカルボジイミド類等があげられる。

[0024] 本発明では、この固相合成反応をマイクロ波を照射しながら行う。マイクロ波を照射しながらの固相合成反応は、すべてのカップリング反応およびFmoc基脱保護反応に適応することが好ましい。本明細書で言う「マイクロ波」とは波長約0.3~30cm程度の電磁波(1~100GHzに相当する)のことをいう。マイクロ波の波長としては、好ましくは2300~2600MHzであるが、さらに好ましくは2350~2550MHz、特に好ましくは2400~2500MHzである。

[0025] 固相合成反応においてマイクロ波を照射することにより、ペプチド形成反応が促進される。これは、マイクロ波は誘電率の高い分子のみを活性化したが、固相合成反応系に存在する反応種の中で最も極性が高いのはアミノ基及びカルボン酸であるので、マイクロ波を照射するとこれらの官能基が誘電分極して選択的に活性化・加熱され、ペプチド形成反応が促進されるものと推察される。他の官能基は活性化されないで副反応を大幅に低減することができる。

[0026] マイクロ波照射によりペプチド形成反応が促進され、従来法と比較して大幅に反応時間を減らすことができる。さらに、マイクロ波は固相担体の内部にまで到達するので、従来は反応の進行が困難な部位(例えば、固相担体の内部)に存在するような反応種でも反応させることが可能となる。

[0027] さらに、マイクロ波照射と同時に、振動や超音波を加えて固相合成反応を行ってもよい。

[0028] この反応工程において、アミノ酸残基が有する反応に関与すべきでない官

能基は、保護基により保護するのが好ましい。アミノ基の保護基としては、例えばベンジルオキシカルボニル（Bz）、*t*-ブチルオキシカルボニル（Boc）、*p*-ビフェニルイソプロピロオキシカルボニル、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル（Fmoc）等が挙げられる。カルボキシル基の保護基としては例えばアルキルエステル、ベンジルエステル等を形成し得る基が挙げられる。

[0029] 固相合成における反応温度は、特に限定されないが、通常0～80℃とするが、好ましくは25～50℃である。反応時間は、反応温度やマイクロ波の出力等にもよるが、例えば0.1～120分であり、好ましくは1～60分、さらに好ましくは1～30分である。従来法による糖アミノ酸のカップリング法では室温において通常数時間～24時間程度の反応時間を必要とするが、これと比較するとこの製造方法では上記のように短時間でペプチド結合形成反応が完了し、非常に効率的である。その他の反応条件は、通常のペプチド固相合成を参考にすることができる。

[0030] 縮合反応終了後、場合により保護基を除去し、そして得られた糖ペプチドのC末端と担体樹脂との結合を切断する。切り離された糖ペプチドは通常の方法にしたがって精製され、例えばイオン交換クロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を用いて精製できる。

[0031] 合成した糖ペプチドの配列は、例えば、エドマン分解法でN-末端からアミノ酸配列を読み取るプロティンシークエンサー、MALDI-TOF MS/MS等で分析することができる。

[0032] 上記製造方法は、特には糖アミノ酸残基を1～30個程度有する糖ペプチドを製造するのに好適である。また、試薬・溶媒の供給、反応系の制御、洗浄等のペプチド固相合成の各工程を自動化した市販の一般的な自動ペプチド固相合成装置にマイクロ波を発生するためのマイクロは出力手段を備えた糖ペプチド自動合成装置を用いて、製造方法を自動化して行うことも可能である。

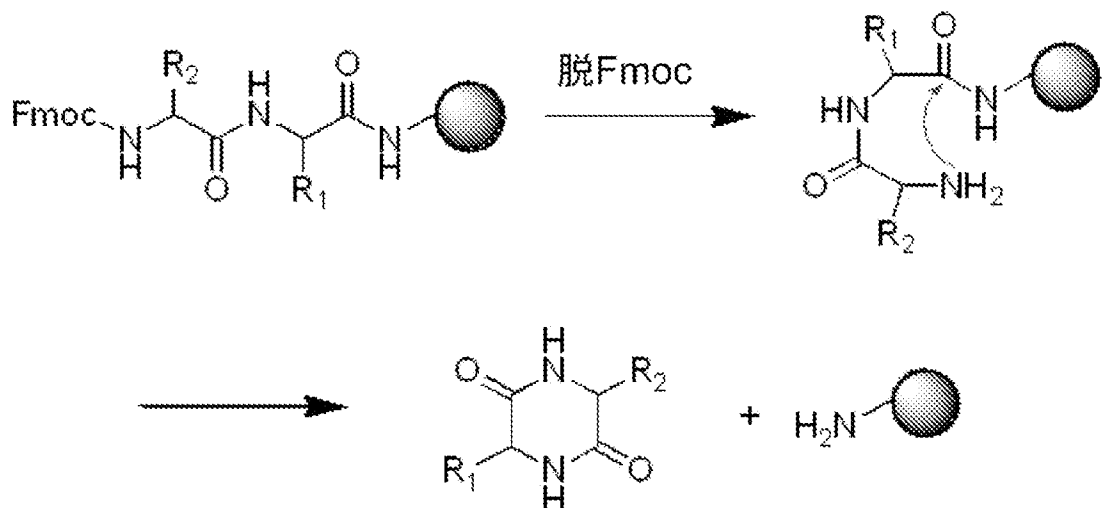
[0033] 本発明の糖ペプチドの製造方法の第1の態様においては、前記トランス型にしたいプロリン残基がC末端を固相に固定化したプロリン残基であり、かつ二糖core1型糖鎖 ($\text{Gal } \beta (1 \rightarrow 3) \text{GalNAc-}\alpha$) を付加したセリンまたはスレオニンを結合する工程を1回含むことができる。

[0034] Fmoc基を用いたペプチド固相合成方法は、上述のように一般に、Fmoc基でN末端側アミノ基が保護されたアミノ酸誘導体を用いる。樹脂にN末端がFmoc基で保護されC末端にカルボン酸を有するアミノ酸誘導体をカップリングし、後にFmoc基を塩基（20%ピペリジン溶液）で脱保護する。さらに次のアミノ酸誘導体をカップリングし、アミノ酸を伸長する。すなわちこのカップリングと脱保護を繰り返すことによって目的のアミノ酸配列をC末端側から合成する。

[0035] 樹脂へ最初のカップリング、すなわちC末端がプロリン残基である場合、そのプロリンのFmoc基を脱離後に次のアミノ酸をカップリングし、そのアミノ酸残基のFmoc基を脱離する際に問題が生じることが知られている。この時、最初のプロリンはシス体とトランス体の混合であり、そのシス体が2番目のアミノ酸のFmoc基を脱保護する際に環状のdiketopiperazine構造を形成し、樹脂からペプチド鎖が乖離することによって以降のカップリングが進行せずに、大きく収率が悪化する。（非特許文献6）。

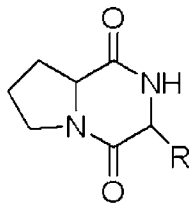
[0036] [化2]

diketopiperazine 構造生成の反応機構



[0037] この時、最初のプロリンはシス体とトランス体の混合であり、そのシス体が2番目のアミノ酸のFmoc基を脱保護する際に、以下に示す環状のdiketopiperazine構造を形成し、樹脂からペプチド鎖が乖離することによって以降のカップリングが進行せずに、大きく収率が悪化する。下記のdiketopiperazine構造はプロリンと任意のアミノ酸の環状構造である。

[0038] [化3]



[0039] それに対して本発明の製造方法では、トランス型にしたいプロリン残基がC末端を固相に固定化したプロリン残基である場合、このプロリン残基の次のアミノ酸にグリコシル化されたセリンまたはスレオニンをカップリングすることで、プロリンをトランス体に制御することによってdiketopiperazine構造を回避することができ、収率を向上することができる。特に、グリコシル化されたセリンまたはスレオニンが、二糖core1型糖鎖 ($\text{Gal } \beta (1 \rightarrow 3) \text{GalNAc-} \alpha$) を付加したセリンまたはスレオニンであることで、diketopiperazine構造を回避することができ、収率を向上することができる(実施例2参照)。

[0040] [糖ペプチドの製造方法(2)]

本発明の糖ペプチドの製造方法の第2の態様は、(1)プロリン残基を含み、かつ前記プロリン残基のN末端側に隣接するアミノ酸残基としてセリン残基またはスレオニン残基を含むペプチドを用意する工程、および(2)前記ペプチドの少なくとも1のプロリン残基のN末端側に隣接するセリン残基またはスレオニン残基に、二糖core1型糖鎖 ($\text{Gal } \beta (1 \rightarrow 3) \text{GalNAc-} \alpha$) を導入する工程を含む。

[0041] 上記工程(1)では、プロリン残基を含み、かつ前記プロリン残基のN末端側に隣接するアミノ酸残基としてセリン残基またはスレオニン残基を含むペプチドを用意する。このペプチドは、糖鎖を有さない、通常のペプチドである

ことができ、合成物であっても、半合成物であっても、天然物であってもよい。但し、このペプチドは、プロリン残基を含み、かつ前記プロリン残基のN末端側に隣接するアミノ酸残基としてセリン残基またはスレオニン残基を含むものであれば、その他のアミノ酸配列に制限はない。

[0042] 上記工程(2)では、工程(1)で用意されたペプチドの少なくとも1のプロリン残基のN末端側に隣接するセリン残基またはスレオニン残基に、二糖core1型糖鎖 ($\text{Gal } \beta (1 \rightarrow 3) \text{GalNAc-}\alpha$) を導入する。二糖core1型糖鎖 ($\text{Gal } \beta (1 \rightarrow 3) \text{GalNAc-}\alpha$) の導入は、例えば、前記ペプチドが有するセリン残基またはスレオニン残基の側鎖水酸基にGalNAcが付加され、次いでGalNAcにGalが付加されることで行われる。具体的には、セリン残基またはスレオニン残基の側鎖水酸基へのGalNAcの付加は、例えば、GalNAc転移酵素によって行うことができる。また、GalNAcのGalへの付加は、例えば、Gal転移酵素によって行うことができる。

[0043] GalNAc転移酵素によって行われる、セリン残基またはスレオニン残基の側鎖水酸基へのGalNAcの付加は、例えば、以下のように実施できる。
メタノール代謝酵母 (*P. pastris*) ヘヒト由来のGalNAc転移酵素 (ppGalNAc-T) の遺伝子を導入し形質転換を行った後、大量発現したものを糖供与体であるUDP-GalNAc、10mM 塩化マンガンおよびペプチド糖鎖と混合し、終夜反応を行う。反応確認はMADTI-TOF MSによる。

[0044] Gal転移酵素によって行われる、GalのGalNAcへの付加は、例えば、以下のように実施できる。

Core1を特異的に認識し、それを選択的に切断する酵素であるEndo- α -N-アセチルガラクトサミニダーゼを逆反応を用いてcore1糖鎖をセリンまたはスレオニンに転移する (J. Biol. Chem. (2005) 280, 37415-37422)。

または、ペプチド鎖に直接結合したGalNAcに $\beta 1,3$ 結合でGalを付加できる酵素 (G1Gal-T2) を用いて、上記ppGalNAc-Tを用いて作成した糖ペプチドにGalを付加する (J. Biol. Chem. (2002), 277, 47724-47731)。

[0045] 得られた糖ペプチドは、通常の方法にしたがって精製され、例えばイオン

交換クロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を用いて精製できる。また、得られた糖ペプチドの配列は、例えば、エドマン分解法でN-末端からアミノ酸配列を読み取るプロテインシーケンサー、MALDI-TOF MS/MS等で分析することができる。

[0046] 生体中において、おもにサイクロフィリン（シクロフィリン）A~Dなどのタンパク質はそのPPIase (peptidyl prolyl isomerase) 活性がプロリンのシストランス異性化反応を促進することが知られている。アルツハイマー病やIgA腎症などで顕著に観察される、タンパク質のunfolding（変性）が疾患の原因の1つとなっている場合、糖鎖修飾によってシストランス異性化反応を抑制（PPIaseからの防御）し、トランス体へ固定化することによって変性を防ぎ、疾患の進行を遅延することが期待できる。

[0047] さらに、IgA腎症において、GalNAcのみになったものへの自己抗体が発見されている(J. Clin. Invest 104, 73-81 (1999))。すなわちGalNAcのみになったIgA1を認識するIgGが自動的に生体内で作成される。IgA腎症はIgA-IgGコンプレックス（免疫複合体）が腎臓に沈着して発症する。今のところ、GalNAcのみになり、cis体の含有量が増えて、それが抗原として提示される可能性があると考えられる。即ち、cis体（生体中では少ない）が、免疫系に（IgG産生にとって）有利に働くことで自己抗体ができやすいと考えられる。逆にいえば、cis体が自己抗体を作ってしまうと、病気が進行してしまうともいえる（下記参照）。

[0048] そこで、本発明の製造方法を利用することで、
(i)糖鎖付加によってcore1型まで伸長し、trans体にするすることで、自己抗体の産生を抑えること、
(ii)cisをcore1型より多く含むGalNAcのみのペプチドを「おとり」として利用し、ワクチンのように使うことで「出来てしまった自己抗体IgG-ペプチドの複合体」とし、IgA-IgGのような高分子量の免疫複合体ができるのを抑えることによって、腎臓への沈着を防ぎ症状を緩和することが可能になる、と考えられる。

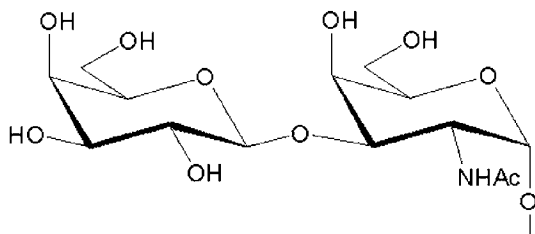
実施例

- [0049] 以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。
- [0050] 天然に存在する配列としてヒト由来immunoglobulin A1 (IgA1)のヒンジ領域のペプチドを選択した。このペプチドは19残基のPSTPPTPSPSTPPTPSPS(配列番号1)という配列で構成される。
- [0051] 慢性腎疾患、特にIgA腎症は、IgA1が腎糸球体に沈着することで発症することが知られている。現在までに、以下に示すヒンジ領域の糖鎖異常によるIgA1の糸球体沈着機序が考えられている。1. 易変性性IgA1凝集体の形成、2. IgA免疫複合体形成、3. IgA1のメサングウム構成タンパク質との粘着性。(新しい診断と治療のABC23(富野康日己 編), IgA腎症第2章、最新医学社)。
- [0052] 上記1の易変性性IgA1凝集体の形成は、タンパク質の立体構造安定性と密接な関係にある。GalおよびNeuAc欠損がIgA1の自己凝集に関係するという報告(Kokubo, T. et al. J. Am. Soc. Nephrol. 9, 2048-2054, 1998)はあるが、IgA1の立体構造変化については未解明である。また上記2の免疫複合体形成は、IgA1のヒンジ領域を認識する抗体(IgG)が結合することが知られている。
- [0053] ヒトIgA1 hinge領域の一次構造において、O-結合型糖鎖が付加するアミノ酸残基は9箇所(S: 4箇所、T: 5箇所)であるが、Matthew, B. et al. J. Biol. Chem. 280, 19136-19145, 2005により、T3、T6、S8、S10が特にcore1型($\text{Gal } \beta (1 \rightarrow 4) \text{GalNAc-}\alpha$)の糖鎖修飾を受ける事例が多いことから、本発明ではこれら4アミノ酸残基の糖鎖修飾体をターゲットとして合成した。
- [0054] 実験
- 以下に示す方法によって、以下の化合物1~3を合成した。
- 化合物 1: PSTPPTPSPSTPPTPSPS-CONH₂
- 化合物 2: PSIPPIPSSTPPTPSPS-CONH₂
- (I、Sはそれぞれスレオニン、セリン側鎖水酸基にGalNAcが α 結合で付加したもの)
- 化合物 3: PSI*PPI*PS*PS*TPPTPSPS-CONH₂
- (I*, S*はそれぞれスレオニン、セリン側鎖水酸基にcore1型糖鎖が α 結合で

付加したもの)

[0055] [化4]

Core1 型糖鎖 Gal β 1 $\rightarrow$ 4GalNAc- α



[0056] Fmoc Rinkamide Tentagel (Hipec Laboratories, 0.24mmol/mg)、83.3 mg (20 μ molスケール)を担体として、N末端保護アミノ酸をマイクロ波支援糖ペプチド製造方法(特開2006-28141号公報)で順次縮合した。

[0057] プロリン、セリン、スレオニンの縮合時は合成スケールの5倍等量(100 μ mol)のFmoc保護アミノ酸を、溶媒N, N-dimethylformamide (DMF) 285 μ lに溶解し、5倍等量(100 μ mol)の0.4 M O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluoro-phosphate (HBTU)/1-hydroxybenzotriazole(HOBt)と10倍等量(200 μ mol)のN, N-diisopropylethylamine (DIEA)を混合し、2450 MHzの電磁波照射下で5分間、50°Cで反応を行った。

[0058] 糖アミノ酸の縮合時は、1.5倍等量の各Fmoc保護糖アミノ酸を、溶媒DMF 91 μ lに溶解し、1.5倍等量のHBTU/HOBtと4.5倍等量のDIEAを混合し、2450 MHzの電磁波照射下で10分間、50°Cで反応を行った。

[0059] アミノ酸縮合前のFmoc基切断は20 % piperidine溶液1ml中に担体を浸し、2450 MHzの電磁波照射下で3分間、50°Cで反応を行った。

[0060] ペプチド伸長反応後、95 % trifluoroacetic acid (TFA)、2.5 % Triisopropylsilane、2.5 %水の溶液中で、室温で2時間反応させることによってペプチド残基上の保護基を脱離させるとともに、固相担体上から化合物1, 2を遊離させた。樹脂を濾別し、TFAを揮発留去した後、純水に溶解し逆相HPLC(Inertsil登録標章ODS-3 20 $\times$ 250 mmカラム、移動層A: 0.1 % TFA水溶液に対するB: 0.1 % TFA含有アセトニトリルの2%から30%のグラジエント)により

精製して化合物1, 2, 3を得た。

[0061] 2. 化合物1, 2, 3のNMR解析

化合物1, 2, 3の1.0 mM重水溶液300 μ l (pH 6.8) をそれぞれ調整し、各水溶液についてNMR測定を行った。装置はBruker AVANCE600 (プロトン共鳴周波数600.13MHz) を用い、極低温型高感度プローブ(Cryoprobe) を装着してT0 CSY (積算8回) を測定した。結果を図1-1~1-3に示す。

[0062] 図1-1に示す、化合物1のスペクトルは配列中のプロリンがシス体とトランス体の立体異性体の混合物であることが示唆された。図中の丸で示したシグナルはシス体プロリン由来のシグナルである。

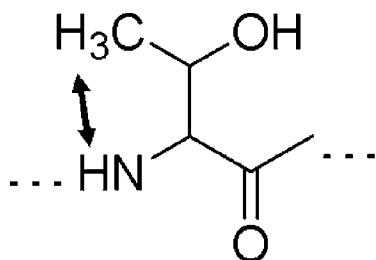
図1-2に示す、化合物2のスペクトルからシス体プロリン由来のシグナルが化合物1の場合と比べて減少していることが明らかである。

さらに図1-3に示す、化合物3のスペクトルはシス体プロリンのシグナルはほとんど観測されなかったことを示し、糖鎖付加によってプロリンのほとんどがトランス体に固定化されたことを示唆している。

[0063] 以上より、core1糖鎖がシス-トランス異性化を制御していることが明らかである。

[0064] 次に、TOCSYスペクトルのNH-メチルプロトン (スレオニン) の相関領域を示す。溶媒の重水素と交換するアミドプロトンとの相関を観測するため、溶媒に90% H_2O , 10% D_2O を用いた。濃度、pHは上記の測定と同一である。結果は、図2-1~2-3に示す。

[0065] [化5]



[0066] 図2-1に化合物 1: PSTPPTPSPSTPPTSPS-CONH₂の結果を示す。

Tは4つしかないが8残基分の相関が観測された。

これはシス-トランス異性体の影響である。

[0067] 図2-2に化合物 2: $\text{PSI}[\text{PPI}[\text{PS}]\text{PTPPTSPS}-\text{CONH}_2$ の結果を示す。

GalNAc-Thrは配列上2か所である。

NMRでそれに対応するシグナルは2か所であり、両者は一致した。

フリーのスレオニンは2か所のはずだが5つのシグナルを確認した。

[0068] 図2-3に化合物 3: $\text{PSI}[\text{PPI}[\text{PS}]\text{PTPPTSPS}-\text{CONH}_2$ の結果を示す。

Core1-Thrは配列上2か所である。

NMRでそれに対応するシグナルは2か所であり、両者は一致した。

フリーのスレオニンは2か所のはずだが4つのシグナルを確認した。

[0069] 以上の結果から、糖鎖修飾を受けたスレオニン残基は一定のコンフォメーションを形成しているが、フリーのスレオニンはシス-トランス異性化の影響を受け、複数のコンフォメーションを形成していることが明らかである。また、core1付加体（化合物3）はGalNAc付加体（化合物2）に比べ、フリーのスレオニンのシグナルが減少している。これは、二糖core1の方が単糖GalNAcよりもペプチド全体のコンフォメーションを安定化していることを示している。

[0070] 次に、化合物 2の立体構造は核磁気共鳴(NMR)法によって決定し結果を示す。サンプルは2mMに調整しpHを6.5とした。測定機器はbruker社製Avance600（プロトン共鳴周波数600.03MHz）を用いた。二次元DQF-COSYと二次元TOCSYスペクトルを帰属することによって各アミノ酸残基のシグナルを帰属し、二次元NOESYによって核間距離情報を収集した。NOESY測定におけるミキシングタイムは200msecとした。収集した距離情報を用いてディスタンスジオメトリー/シミュレーテッドアニーリング法によって立体構造を算出した。50個の構造を算出し、もっとも分子ポテンシャルエネルギーが低い20個の立体構造をこのペプチドの構造として提示した（図2-4）。

[0071] 図2-4に示す結果は、IgA1ヒンジ領域(PSTPPTSPSTPPTSPS)の4か所(Thr3, Thr6, Ser8, Ser10)に二糖core1構造を導入することで、ペプチドのコンフォメーションを一定に保つことができることを示す。これにより、二糖core1構

造を導入したN末端側領域において、非常によく収束した立体構造を得ることに成功した。また、その構造から糖鎖がペプチドのコンフォメーションを制御していることも明らかになった。

[0072] core1の方が糖鎖が多いにもかかわらずNMRシグナルが少ないことから、シス・トランス異性化がGalNAcのみよりcore1型の方がトランス側に固定化され、一意のコンフォメーションを形成することが明らかであると考え（GalNAcのみでは依然としてシス・トランス異性化が存在しているので複数のコンフォーマーが存在し、スペクトルが複雑化している）。

よって、一種類の立体構造を形成するcore1型のIgA1ヒンジに関して立体構造の算出が可能となった。

[0073] 糖鎖構造の変化が疾患マーカーとして知られていることが多く、その原因を探るために立体構造解析は不可欠である。しかし、糖鎖の種類の変化の多様性（microheterogeneity）が複数のコンフォーマーを発生させるため、一定の立体構造を形成せず、その解析は一般に困難である。しかし、二糖core1構造に調整することによって、一定のコンフォメーションを形成させることに成功し、立体構造算出に至った。この例では、特にThr6に付加したcore1糖鎖がよく収束した構造が明らかとなり、この領域の糖鎖変化が疾患と強く関わっていることが容易に示唆される。（Thr6の二糖が変化すれば、この構造は保てないだろうと考えられる）。

[0074] TPあるいはSP配列におけるO-結合型糖鎖の種類が多岐にわたり、複数のコンフォーマーを形成するために立体構造算出が困難な場合、core1型糖鎖に調製することで立体構造を一種類に固定化し立体構造解析に至るものとする。X線結晶構造解析では複数のコンフォーマーの存在や複数種の糖鎖の存在は、結晶化を阻害することが珍しくないが、この方法により立体構造解析を進めることが可能となると考える。

[0075] 実施例2

1H-NMRによるシス体とトランス体の定量

N末端にアセチル基、C末端にアミド基をもつSPおよびTPの配列からなるジ

ペプチドを実施例1と同様の方法で固相合成した。但し、ペプチドの合成は、100mmolのスケールで行った（収率100%で100 mmol生成できる系）。(1)Ac-Thr-Pro-CONH₂とAc-Ser-Pro-CONH₂の配列のThr (T) およびSer (S) に糖鎖付加がない場合、(2) α -GalNAcが付加した場合、(3) 二糖core1が付加した場合について検証した。収率を以下の表1に示す。

[0076] [表1]

使用樹脂:Wang Resin	TP(mg, 収率)	SP(mg, 収率)
T および S に修飾無し	3.3 mg, 15.2 %	1.2 mg, 5.9 %
T および S に GalNAc 付加	9.3 mg, 22.2 %	18.6 mg, 45.9 %
T および S に core1 構造付加	24.2 mg, 41.7 %	23.7 mg, 41.8 %

[0077] 表1に示す結果から、プロリンのN末端側に糖鎖修飾を施したペプチドの場合、非修飾体に比べ著しい収率の向上が認められた。特にスレオニンの場合は単糖GalNAcより二糖core1の方がその効果は顕著であった。但し、セリンに関しては単糖GalNAcでも十分にその効果が認められた。

[0078] 合成した各（糖）ペプチドを2mMに調整し、プロトン600MHzのNMR（Bruker社製Avance600）にて測定を行った（積算回数8回）。結果を図3に示す。

[0079] その結果、糖鎖なしのAc-TP-NH₂、およびAc-SP-NH₂ではシス体がそれぞれ6.1%, 12.8%であり、GalNAcのみ付加体ではAc-TP-NH₂、およびAc-SP-NH₂のシス体はそれぞれ、11.2%、10.6%、さらにcore1付加型ではAc-TP-NH₂、およびAc-SP-NH₂のシス体はそれぞれ、3.3%、6.7%であった。

[0080] このことから、GalNAcのみでもある程度シーストランス異性化を抑え、トランス側へ偏らせることが可能であるが、core1型にすることで、その効果がより顕著になることが明らかになった。

産業上の利用可能性

[0081] 本発明は、ペプチドが有するプロリンのコンフォメーションをトランス型に安定化した糖ペプチドを利用する例えば、医薬や診断の分野に有用である。

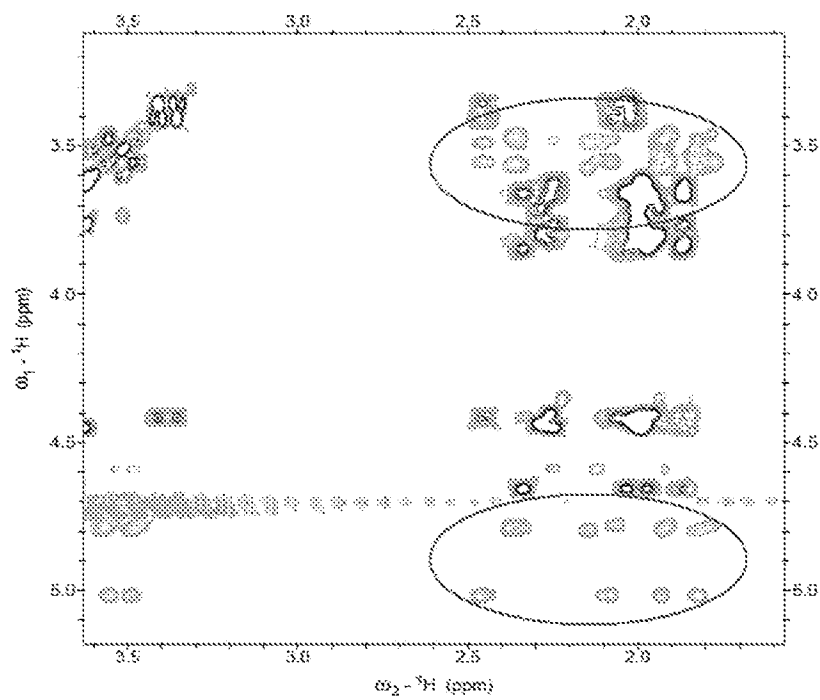
請求の範囲

- [請求項1] 少なくとも1のトランス型のプロリン残基を含み、かつ
前記トランス型のプロリン残基は、N末端側に隣接するアミノ酸残基
が二糖core1型糖鎖（Gal β (1 $\rightarrow$ 3) GalNAc- α ）を付加したセリン残基
またはスレオニン残基である糖ペプチドの製造方法であって、
ペプチドの化学合成方法を利用し、
トランス型にしたいプロリン残基のN末端側に、二糖core1型糖鎖（Ga
l β (1 $\rightarrow$ 3) GalNAc- α ）を付加したセリンまたはスレオニンを結合する
工程を少なくとも1回含む、前記製造方法。
- [請求項2] ペプチドの化学合成方法として固相合成法を用いる請求項1に記載の
製造方法。
- [請求項3] 前記トランス型にしたいプロリン残基がC末端を固相に固定化したプ
ロリン残基であり、かつ二糖core1型糖鎖（Gal β (1 $\rightarrow$ 3) GalNAc- α ）
を付加したセリンまたはスレオニンを結合する工程を1回含む、請求
項2に記載の製造方法。
- [請求項4] 少なくとも1のトランス型のプロリン残基を含み、かつ
前記トランス型のプロリン残基は、N末端側に隣接するアミノ酸残基
が二糖core1型糖鎖（Gal β (1 $\rightarrow$ 3) GalNAc- α ）を付加したセリン残基
またはスレオニン残基である糖ペプチドの製造方法であって、
プロリン残基を含み、かつ前記プロリン残基のN末端側に隣接するア
ミノ酸残基としてセリン残基またはスレオニン残基を含むペプチドを
用意し、
前記ペプチドの少なくとも1のプロリン残基のN末端側に隣接するセ
リン残基またはスレオニン残基に、二糖core1型糖鎖（Gal β (1 $\rightarrow$ 3) Ga
lNAc- α ）を導入する工程を含む、前記製造方法。
- [請求項5] 前記二糖core1型糖鎖（Gal β (1 $\rightarrow$ 3) GalNAc- α ）の導入が、前記ペプ
チドが有するセリン残基またはスレオニン残基の側鎖水酸基にGalNAc
が付加され、次いでGalNAcにGalが付加されることで行われる請求項4

に記載の方法。

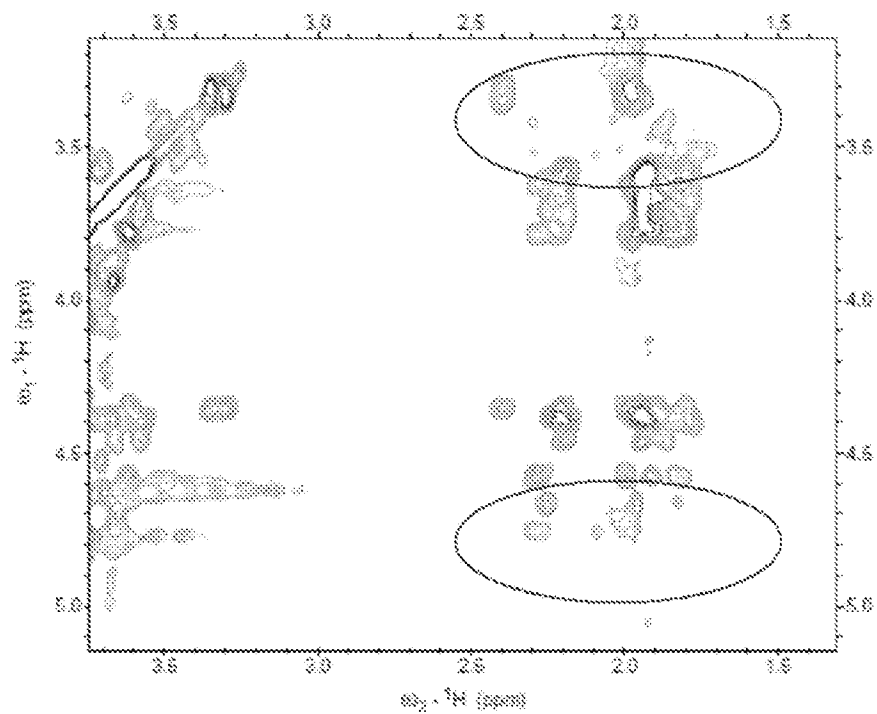
- [請求項6] セリン残基またはスレオニン残基の側鎖水酸基へのGalNAcの付加が、GalNAc転移酵素によって行われ、GalNAcのGalへの付加が、Gal転移酵素によって行われる請求項5に記載の方法。
- [請求項7] ペプチドのアミノ酸残基数が2～200個の範囲であり、かつトランス型のプロリン残基数が1～100個の範囲である、請求項1～6のいずれかに記載の方法。

[図1-1]



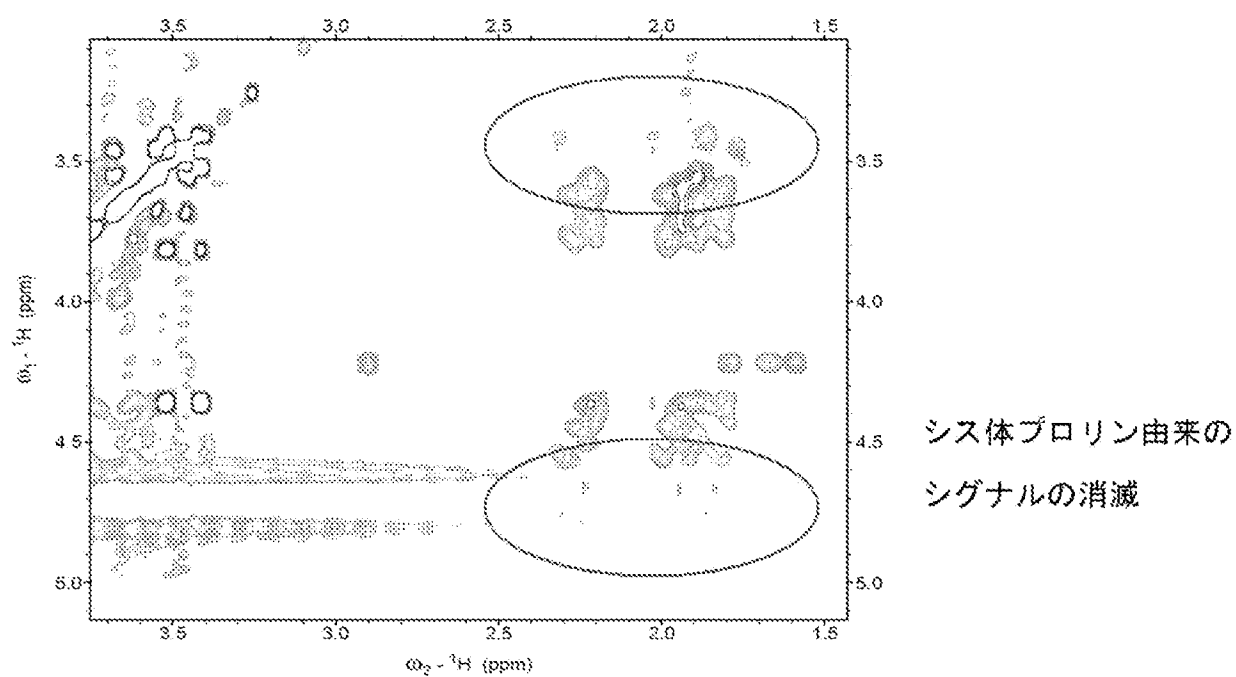
シス-トランス異性体の混合

[図1-2]

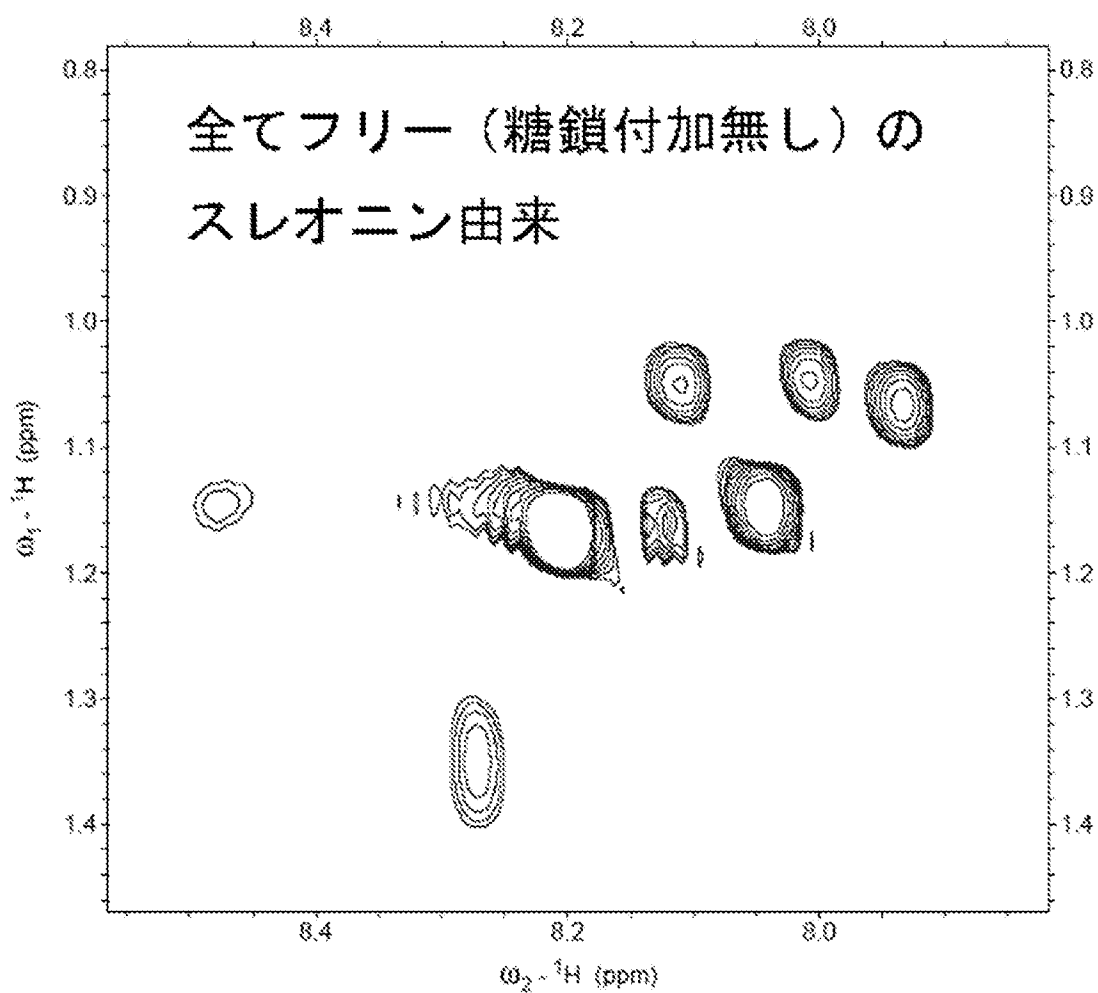


シス体プロリン由来の
シグナルの減少

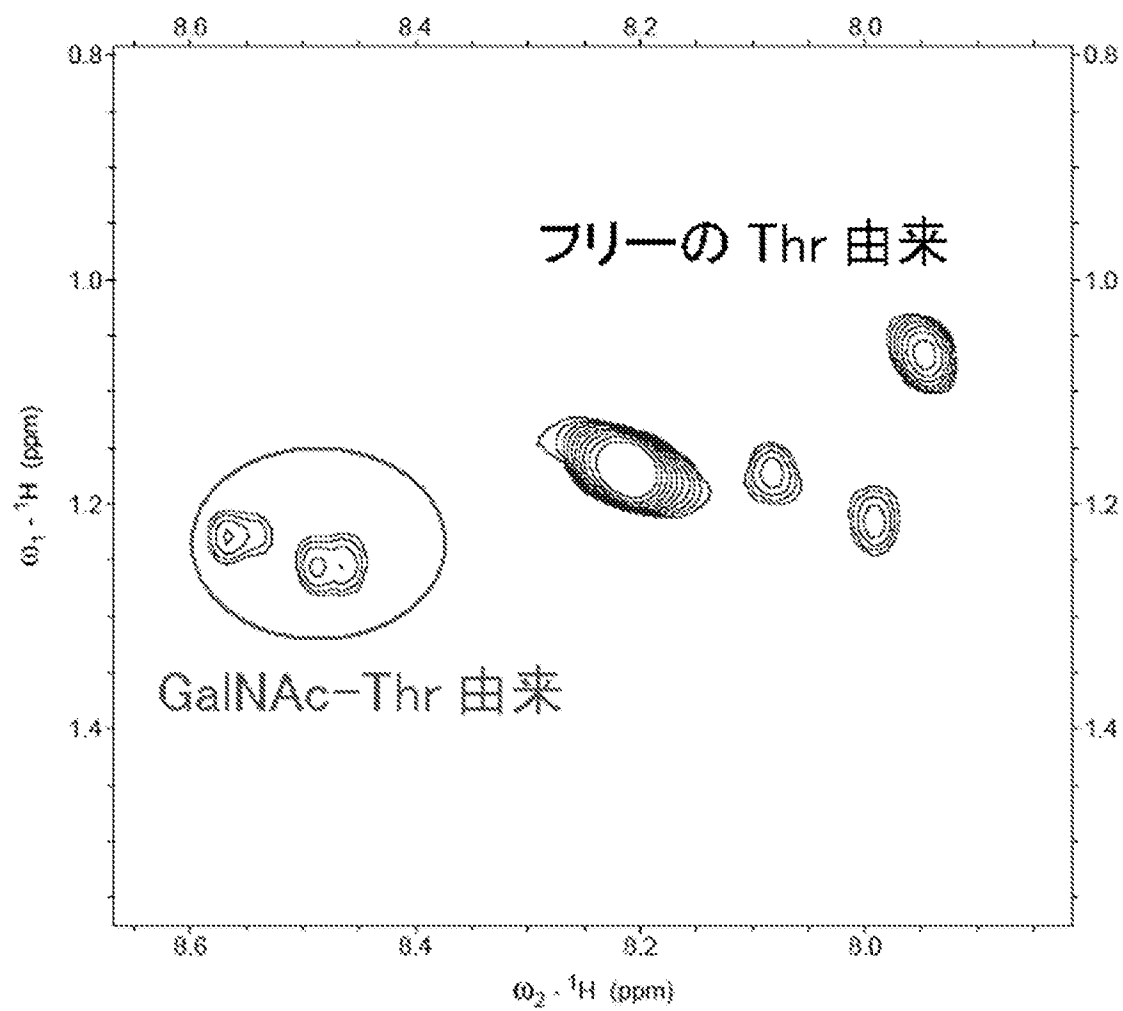
[図1-3]



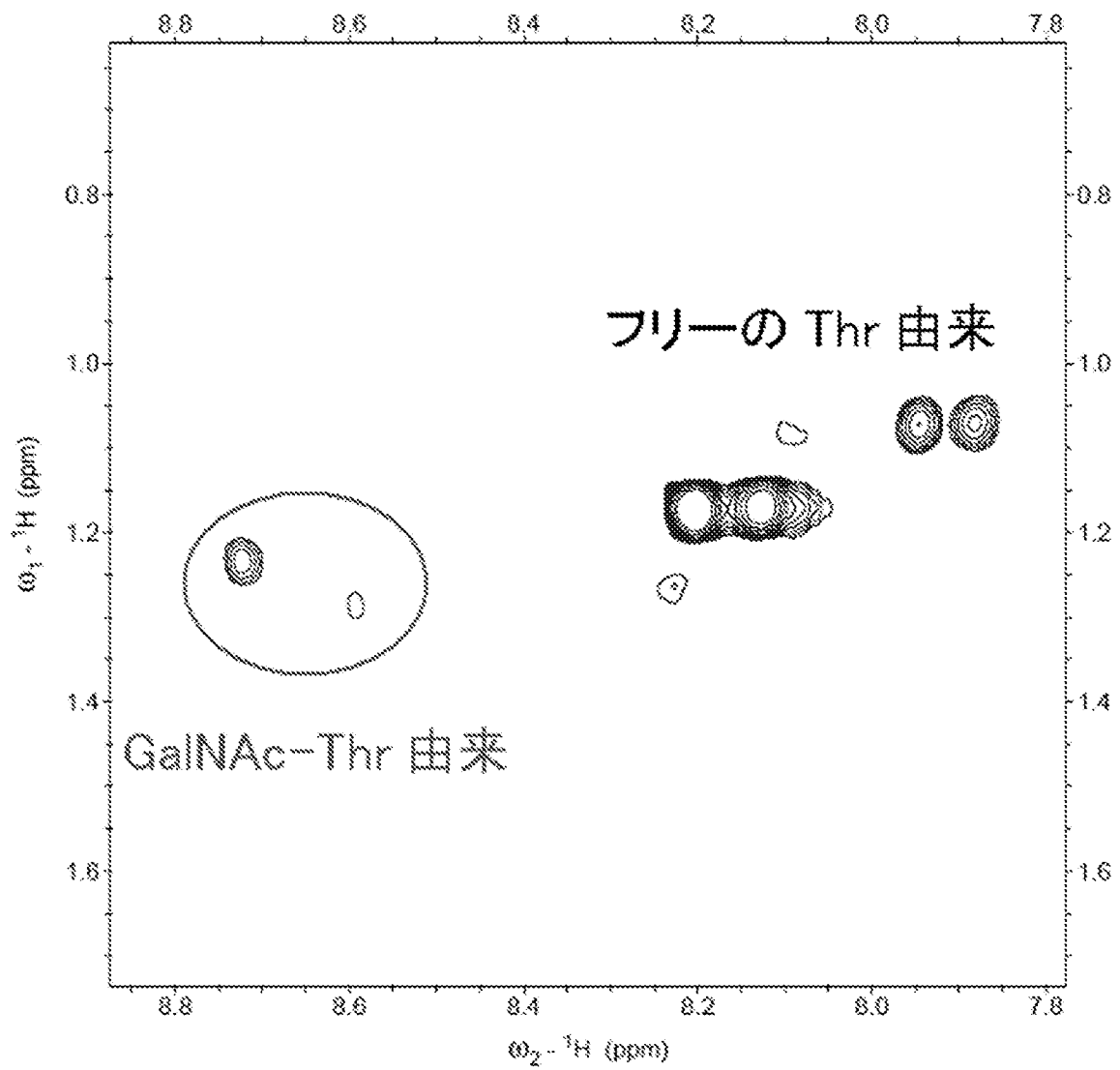
[図2-1]



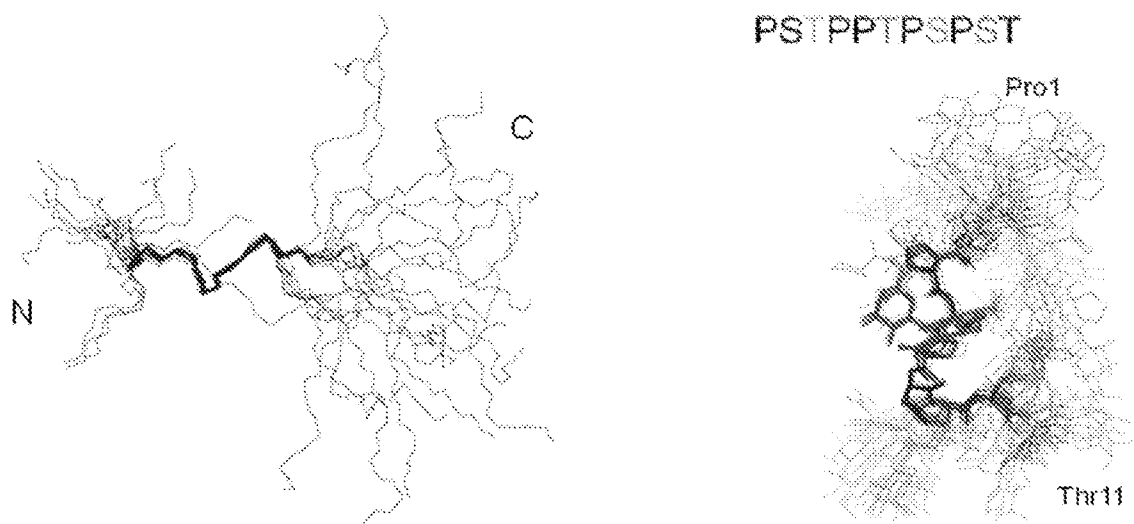
[図2-2]



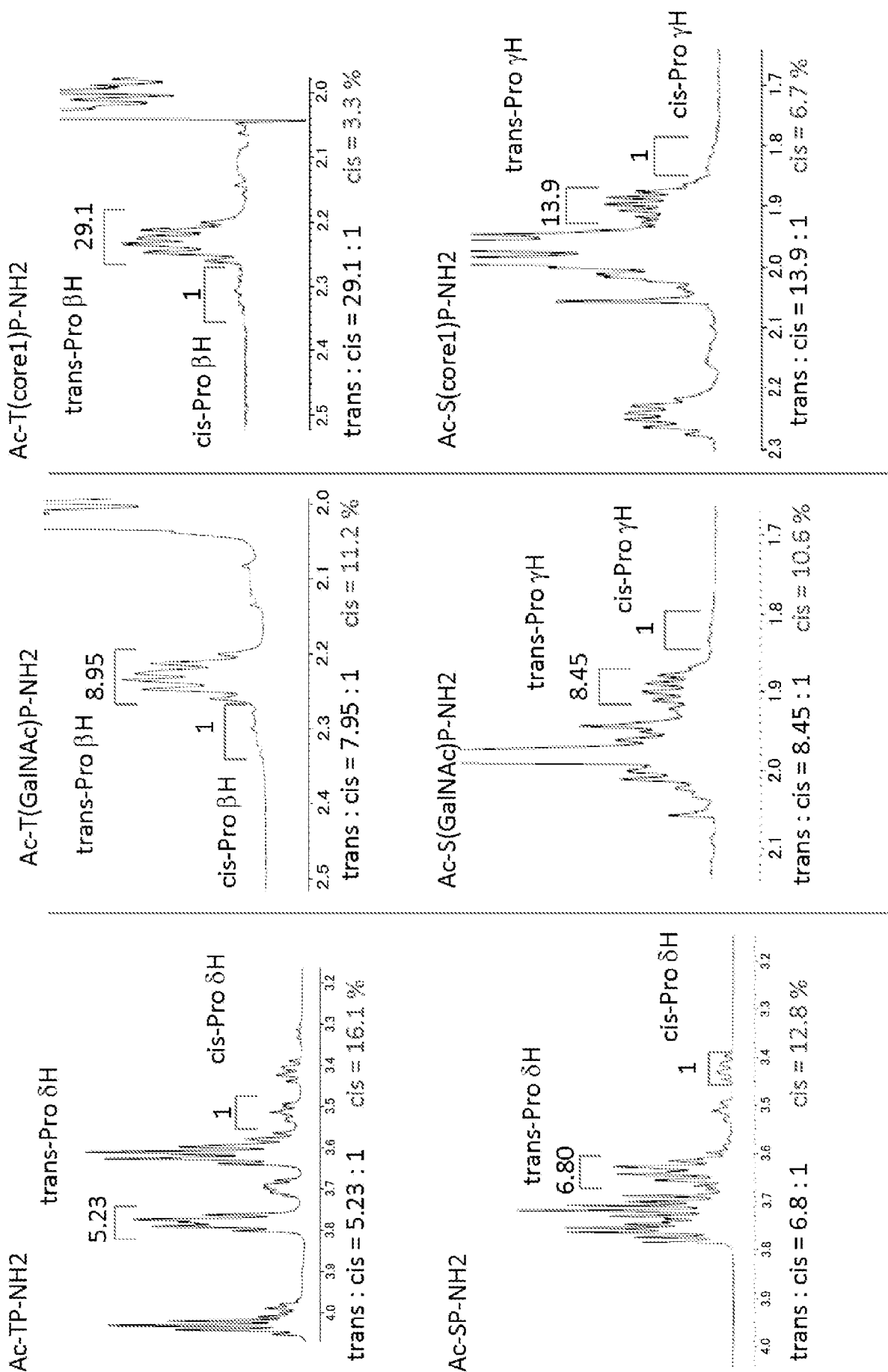
[図2-3]



[図2-4]



[圖3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/006641

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P21/02 (2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P21/02

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTPlus (JDreamII), PubMed, CiNii, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PAO, Ya-Lan et al., Effect of Serine O-glycosylation on Cis-Trans Proline Isomerization, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996, Vol. 219, p. 157-162, page 159, lines 36 to 50, fig. 2	1-7
A	NAGANAGOWDA, G.A. et al., NMR analysis of human salivary mucin (MUC7) derived O-linked model glycopeptides: comparison of structural features and carbohydrate-peptide interactions, The Journal of Peptide Research, 1999, Vol. 54, No. 4, p. 290-310, Abstract, Table 1.	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 January, 2010 (05.01.10)

Date of mailing of the international search report

12 January, 2010 (12.01.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/006641

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WU, Wen-guey et al., Structural Study on O-glycopeptides: Glycosylation-Induced Conformational Changes of O-GlcNAc, O-LacNAc, O-Sialyl-LacNAc, and O-Sialyl-Lewis-X Peptides of the Mucin Domain of MAdCAM-1, Journal of American Chemical Society, 1999, Vol. 121, p. 2409-2417	1-7
A	OTVOS, Laszlo, Jr. et al., Conformation of Glycopeptides, Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2003, Vol. 3, p. 703-711	1-7
A	Naoki FUJITANI et al., "Shuyo Marker ni Taisuru Tosa Shushoku ga Yudo suru Rittai Kozo Henka", The 46th Annual Meeting of The NMR Society of Japan, 2007, pages 246, 247	1-7
A	HENNEBICQ, Sylviane et al., Influence of the amino acid sequence on the MUC5AC motif peptide O-Glycosylation by Human gastric UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (s), Glycoconjugate Journal, 1998, Vol. 15, p. 275-282	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12P21/02 (2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 年

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

CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTPlus (JDreamII), PubMed, CiNii, WPI

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	PAO, Ya-Lan et al., Effect of Serine O-glycosylation on Cis-Trans Proline Isomerization, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996, Vol. 219, p. 157-162, 第 1 5 9 頁第 3 6 - 5 0 行、FIG. 2.	1 - 7
A	NAGANAGOWDA, G.A. et al., NMR analysis of human salivary mucin (MUC7) derived O-linked model glycopeptides: comparison of structural features and carbohydrate-peptide interactions, The Journal of Peptide Research, 1999, Vol. 54, No. 4, p. 290-310,	1 - 7

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

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日

0 5 . 0 1 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

1 2 . 0 1 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

飯室 里美

4 B

4 5 0 4

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
	Abstract、Table 1.	
A	WU, Wen-guey et al., Structural Study on O-glycopeptides: Glycosylation-Induced Conformational Changes of O-GlcNAc, O-LacNAc, O-Sialyl-LacNAc, and O-Sialyl-Lewis-X Peptides of the Mucin Domain of MAdCAM-1, Journal of American Chemical Society, 1999, Vol. 121, p. 2409-2417	1 - 7
A	OTVOS, Laszlo, Jr. et al., Conformation of Glycopeptides, Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2003, Vol. 3, p. 703-711	1 - 7
A	藤谷直樹他, 腫瘍マーカーに対する糖鎖修飾が誘導する立体構造変化, 第46回NMR検討会, 2007, p. 246, 247	1 - 7
A	HENNEBICQ, Sylviane et al., Influence of the amino acid sequence on the MUC5AC motif peptide O-Glycosylation by Human gastric UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase(s), Glycoconjugate Journal, 1998, Vol. 15, p. 275-282	1 - 7