

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7144643号
(P7144643)

(45)発行日 令和4年9月29日(2022.9.29)

(24)登録日 令和4年9月20日(2022.9.20)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 H	15/08 (2006.01)	C 0 7 H	15/08	C S P
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	C 0 7 K	16/00	

請求項の数 7 (全56頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-510760(P2022-510760)
 (86)(22)出願日 令和3年3月26日(2021.3.26)
 (86)国際出願番号 PCT/JP2021/012997
 (87)国際公開番号 WO2021/193951
 (87)国際公開日 令和3年9月30日(2021.9.30)
 審査請求日 令和4年2月22日(2022.2.22)
 (31)優先権主張番号 特願2020-55760(P2020-55760)
 (32)優先日 令和2年3月26日(2020.3.26)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 日本国(JP)
 早期審査対象出願

(73)特許権者 000173924
 公益財団法人野口研究所
 東京都板橋区加賀一丁目9番7号
 (74)代理人 100139594
 弁理士 山口 健次郎
 (74)代理人 100090251
 森田 憲一
 (72)発明者 後藤 浩太郎
 東京都板橋区加賀一丁目9番7号 公益
 財団法人野口研究所内
 (72)発明者 水野 真盛
 東京都板橋区加賀一丁目9番7号 公益
 財団法人野口研究所内
 (72)発明者 松田 昭生
 東京都板橋区加賀一丁目9番7号 公益
 最終頁に続く

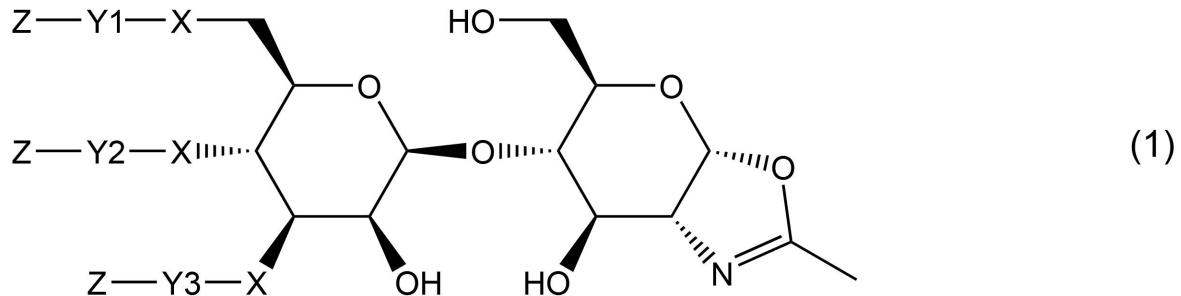
(54)【発明の名称】 ポリエチレングリコール鎖を有する糖化合物、及び抗体薬物複合体の前駆体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記一般式(1)で表されるポリエチレングリコール鎖を有する糖化合物。

【化1】

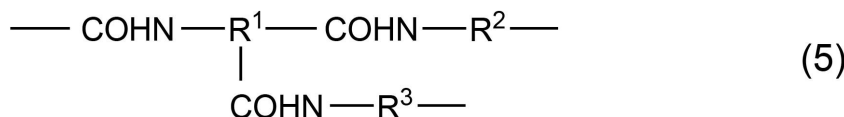


10

(式(1)中、

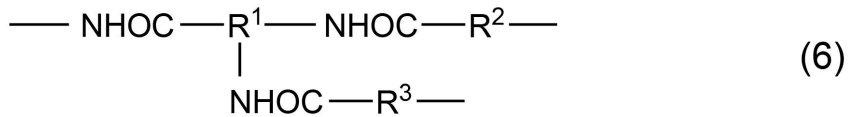
Xはそれぞれ独立して、単結合、酸素原子、-NH-、-COHN-、-COO-、又は式(5)又は(6)：

【化2】



20

【化 3】



(式中、 R^1 は、炭素数1～6の3価の分岐炭化水素基であり、 R^2 及び R^3 は、それぞれ独立して炭素数1～3のアルキレン基である)で表される基

であり、

$Y_1 \sim 3$ はいずれか1つ以上は存在し、それぞれ独立して、PEG鎖、置換されたPEG鎖、又は酸素原子、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{COHN}-$ 、又は $-\text{COO}-$ を主鎖に含むPEG鎖であり、PEG鎖の構造は直鎖構造又は分岐構造であり、分岐構造の場合は、分岐数は2～10であり、

Zはそれぞれ独立して、ヒドロキシ基、メトキシ基、アジド基、又は場合により置換されることのあるテトラジン基であり、少なくとも1つ以上のZは、アジド基又は場合により置換されることのあるテトラジン基であり、

$Y_1 \sim 3$ のいずれかが存在しない場合、Zは水素そしてXは酸素であり、

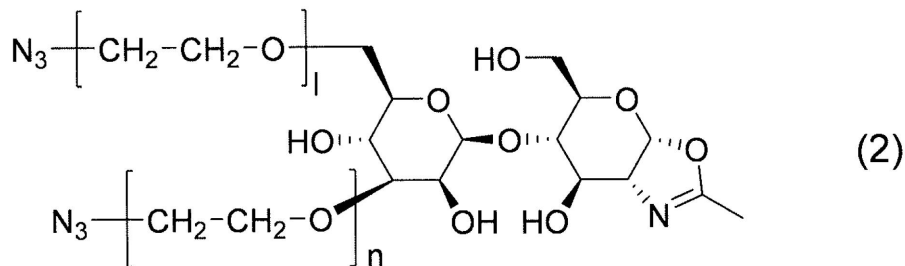
Xが前記式(5)又は(6)で表される基の場合、 $Y_1 \sim 3$ は分岐鎖の R^2 及び R^3 にそれぞれ結合しており、

PEG鎖が分岐構造の場合、それぞれの分岐鎖にZが結合している。)

【請求項 2】

下記一般式(2)で表される、請求項1に記載のポリエチレングリコール鎖を有する糖化合物。

【化 4】

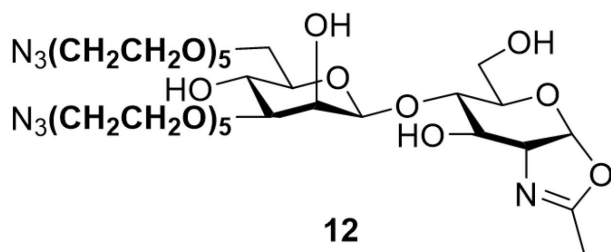


(式(2)中、 l 及び n は、それぞれ独立して2から10の整数を表す。)

【請求項 3】

下記式

【化 5】



10

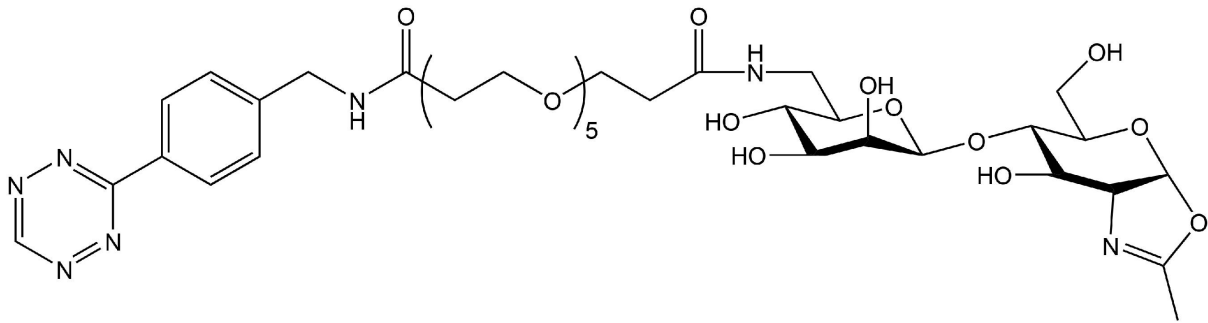
20

30

40

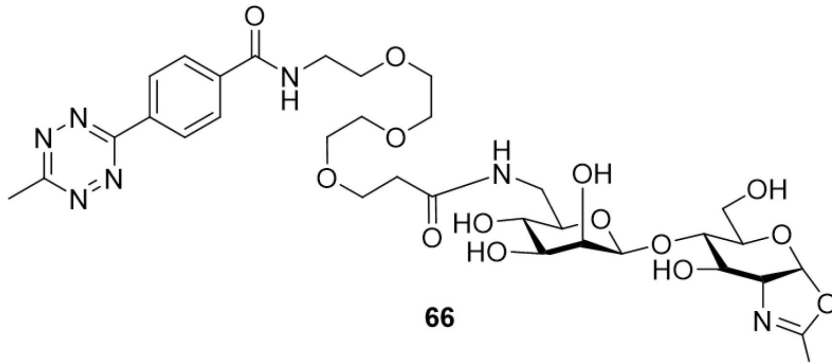
50

【化 6】



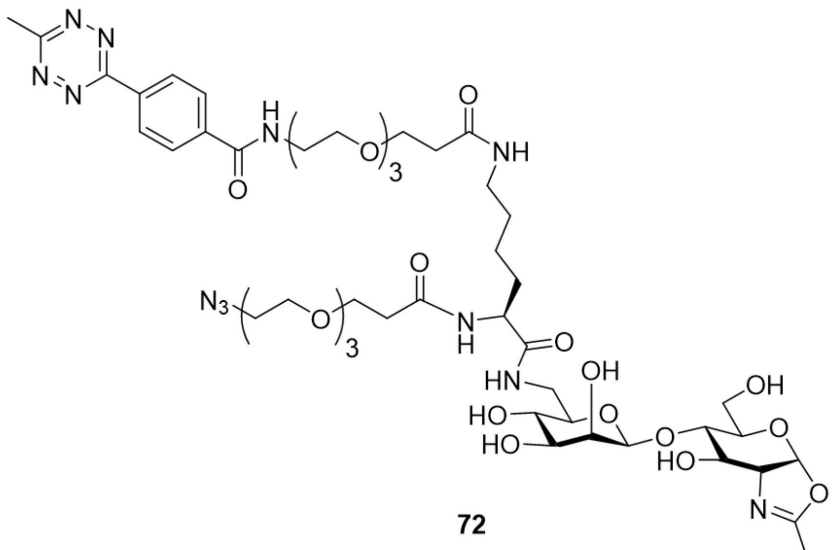
10

【化 7】



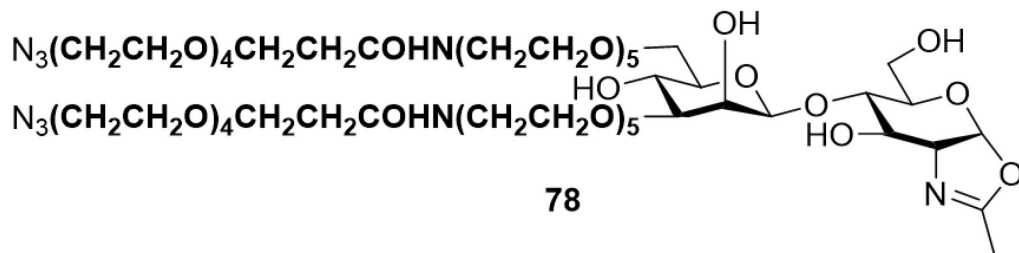
20

【化 8】



30

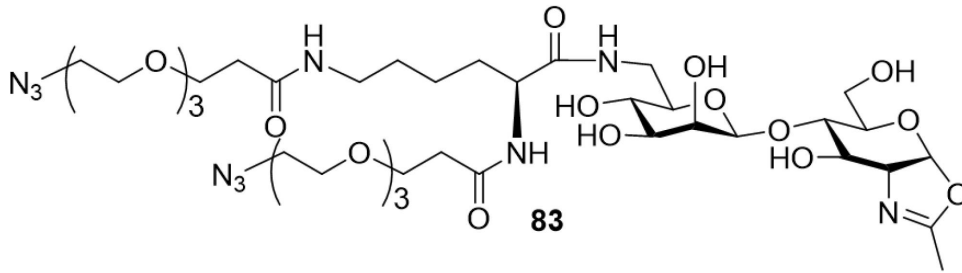
【化 9】



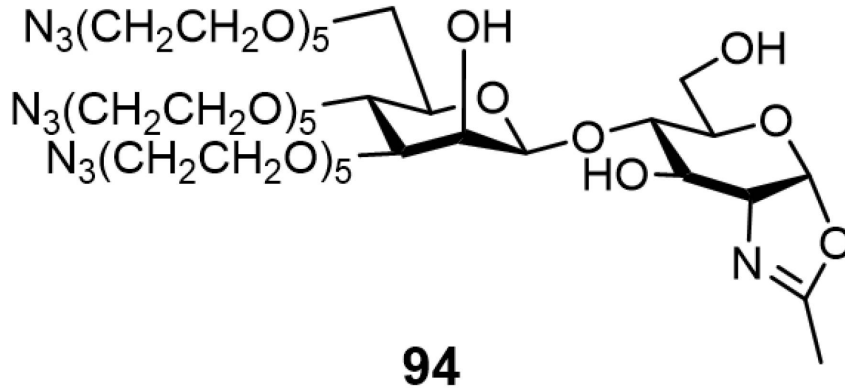
40

50

【化 1 0】



【化 1 1】

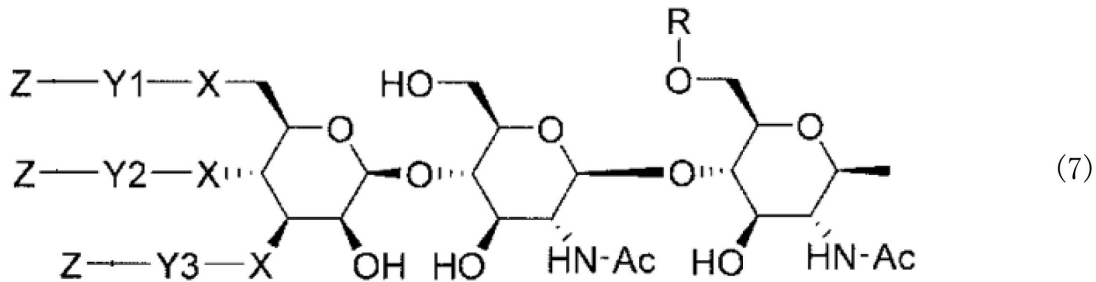


からなる群から選択される式で表される、請求項 1 に記載のポリエチレングリコール鎖を有する糖化合物。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のポリエチレングリコール鎖を有する糖化合物から誘導される下記式 (7) :

【化 1 2】



(式中、X、Y 1 ~ 3、及び Z は前記の通りであり、R は L - フコース又は水素原子である)

で表されるポリエチレングリコール鎖を有する糖化合物基を、Fc 領域のアスパラギン残基の側鎖の糖結合部位に有する、修飾された免疫グロブリン抗体。

【請求項 5】

前記免疫グロブリン抗体が免疫グロブリン G 抗体であり、Fc 領域のアスパラギン残基が、Fc 領域の 297 番目のアスパラギン残基である、下記一般式 (3) で表される、請求項 4 に記載の修飾された免疫グロブリン抗体。

10

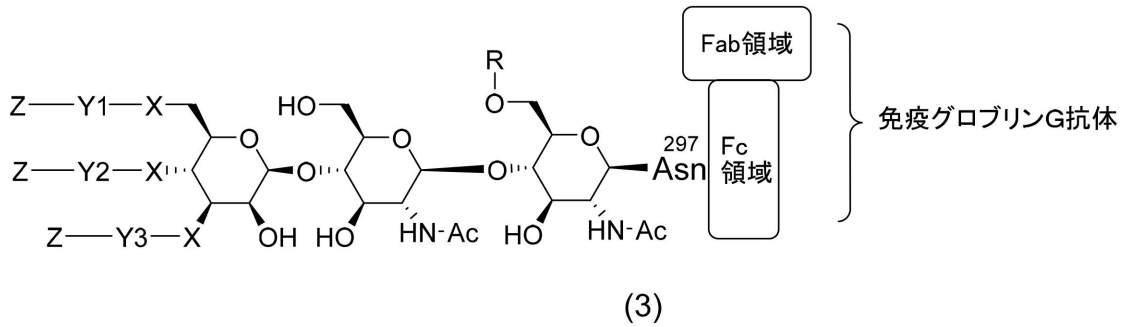
20

30

40

50

【化 1 3】



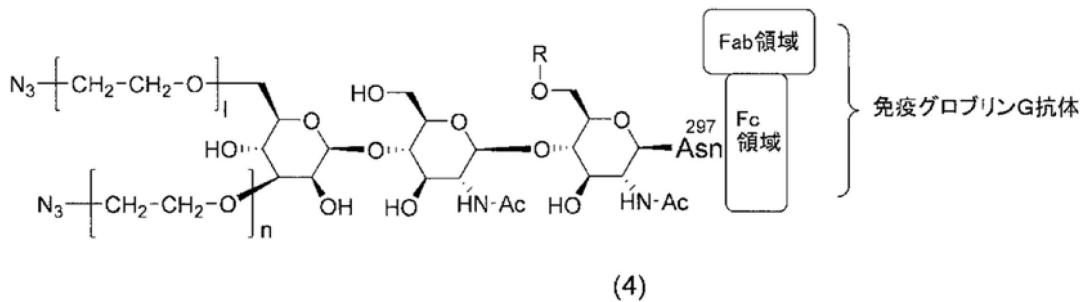
10

(式中、式中、X、Y 1 ~ 3、及びZは前記の通りであり、RはL - フコース又は水素原子である。)

【請求項 6】

前記ポリエチレングリコール鎖を有する糖化合物が、請求項 2 に記載の糖化合物である、下記一般式 (4) で表される請求項 5 に記載の修飾された免疫グロブリン抗体。

【化 1 4】



20

(式 (4) 中、RはL - フコース又は水素を示す。lとnは2から10の整数を表す。)

【請求項 7】

請求項 1 ~ 3 に記載の糖化合物を含む、抗体と薬物との複合体を形成させる剤。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体薬物複合体 (Antibody - drug conjugate : ADC) の前駆体となる修飾された免疫グロブリン (Immunoglobulin) 抗体、及びその合成原料となる官能基で修飾されたポリエチレングリコール鎖を有する糖化合物 (糖オキサゾリン化合物) に関する。

【背景技術】

【0002】

がん細胞に発現している標的抗原に対して特異的に結合する抗体医薬に、細胞傷害活性を有する薬物を結合させたADCが次世代抗体医薬品として近年注目を浴びている。

40

【0003】

しかし、ADCの合成方法としては、例えばIgG抗体の側鎖アミノ基やチオール基に対してリンカーを介して薬物を結合させる手法が一般的に用いられており、抗体上に複数箇所存在するアミノ基やチオール基にランダムに導入されるため、薬物導入の位置や数に幅広い分布を有する多様なADC異性体群が得られる。このようなADC異性体群は品質管理、及び薬効 (循環半減期や有効性の低下) 等、臨床的な問題が懸念される。

【0004】

この問題点を解決する方法の1つとして、IgG抗体のFc領域のN結合型糖鎖を足掛かりとして、位置選択的に薬物を導入する方法が報告されている (非特許文献1、2)。これらの方法は抗体上の糖鎖部分にのみ選択的に薬物を導入することができるため、従来

50

のランダムに薬物を導入する方法よりも高い位置選択性と薬物の導入数の制御が可能な利点を持つ。

【0005】

これらの方法ではいずれも糖鎖非還元末端のN-アセチルノイラミン酸に対して薬物導入のための官能基を導入する必要がある。しかしN-アセチルノイラミン酸は血液中で糖鎖から遊離する可能性が指摘されており、薬物が標的細胞外でADCから放出されてしまう危険性が懸念される。また、これらの方法で使用されている糖鎖は鶏卵より調製されているため卵由来のアレルゲンが薬剤製造においてはGMPの観点から問題となる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

10

【0006】

【文献】F. Tang et al., *Org. Biomol. Chem.*, 14, 9501 (2016)

M. Iwamoto et al., *Bioconjugate Chem.*, 29, 2829 (2018)

K. Goto et al., *Tetrahedron Lett.*, 61, 151475 (2020)

Aoyama, M., et al., *Mabs*, 11: 826-836 (2019)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0007】

本発明の目的は、薬物の位置選択的かつ導入数の制御が可能なADCの合成法、及びそのための合成中間体や合成原料を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記課題を解決するべく鋭意検討した結果、抗体に対して位置選択的かつ導入薬物数を制御できるADC合成用ツールとなる糖オキサゾリン誘導体の開発に成功した。本発明の糖オキサゾリン誘導体は完全化学合成品であることから、大量合成に適しており、またアレルゲンの問題も克服できる。更に分子内にN-アセチルノイラミン酸を有さないことから、血中安定性の問題点も克服することができると期待される。また本糖オキサゾリン誘導体は糖加水分解酵素の中の1つであるエンド-β-N-アセチルグルコサミニダゼ(ENGase)を用いることで抗体の糖部位に位置選択的に導入できることで、薬物導入のための位置選択的修飾化された抗体の合成を行う。このようにして得られる修飾化された抗体をADC前駆体として用いることで抗体に対する位置選択的な薬物の導入と薬物の導入数の制御が可能となると考えた。以上のような知見に基づいて本発明を完成するに至った。

30

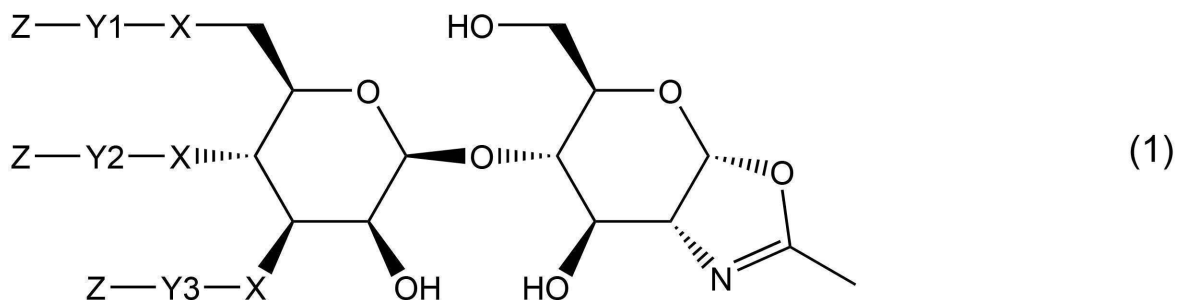
【0009】

従って、本発明は、

[1] 下記一般式(1)で表されるポリエチレングリコール鎖を有する糖化合物。

【化1】

40

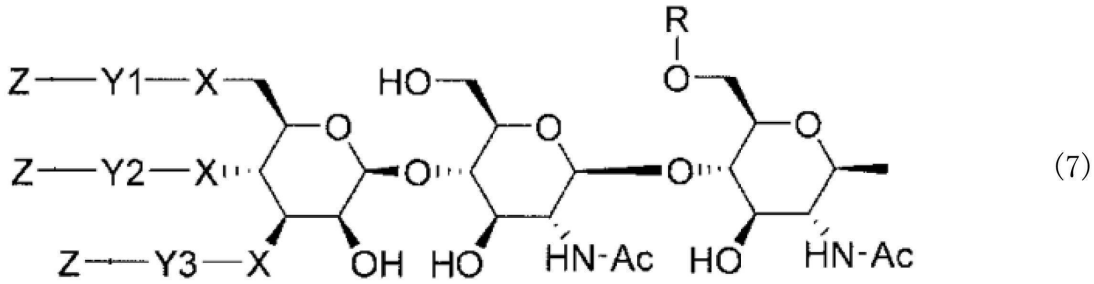


(式(1)中、

50

[4] [1] ~ [3] のいずれかに記載のポリエチレングリコール鎖を有する糖化合物から誘導される下記式 (7) :

【化 6】

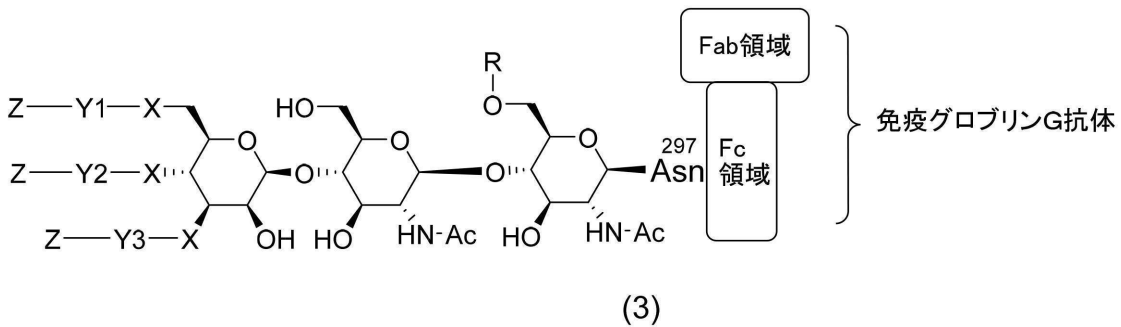


10

(式中、X、Y 1 ~ 3、及び Z は前記の通りであり、R は L - フコース又は水素原子である) で表されるポリエチレングリコール鎖を有する糖化合物基を、Fc 領域のアスパラギン残基の側鎖の糖結合部位に有する、修飾された免疫グロブリン抗体、

[5] 前記免疫グロブリン抗体が免疫グロブリン G 抗体であり、Fc 領域のアスパラギン残基が、Fc 領域の 297 番目のアスパラギン残基である、下記一般式 (3) で表される、[4] に記載の修飾された免疫グロブリン抗体

【化 7】

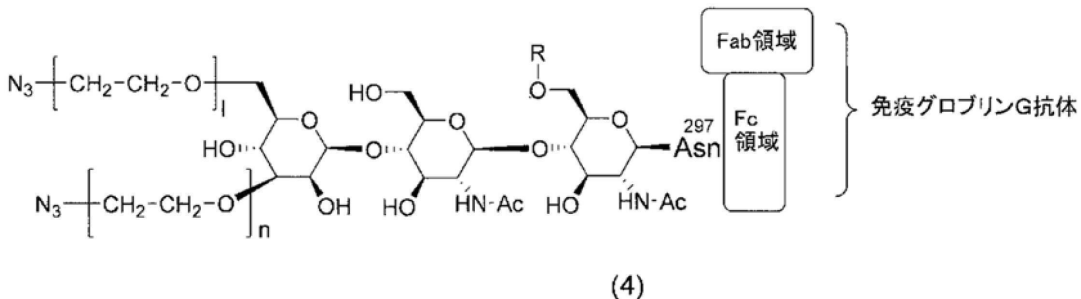


20

(式中、式中、X、Y 1 ~ 3、及び Z は前記の通りであり、R は L - フコース又は水素原子である)、及び

[6] 前記ポリエチレングリコール鎖を有する糖化合物が、[2] に記載の糖化合物である、下記一般式 (4) で表される [5] に記載の修飾された免疫グロブリン抗体

【化 8】



30

(式 (4) 中、R は L - フコース又は水素を示す。l と n は 2 から 10 の整数を表す。)、に関する。

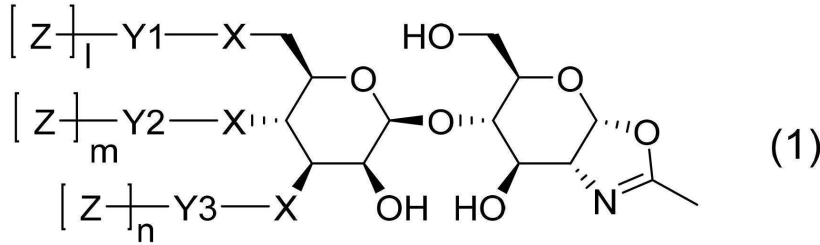
本明細書は、以下のとおりの糖オキサゾリン誘導体とそれから誘導化される ADC 前駆体となる修飾された I g G 抗体を開示する。

< 1 > 下記一般式 (1) で表される、官能基を有するポリエチレングリコール (PEG) 鎖が結合した糖オキサゾリン誘導体

40

50

【化 9】



(式(1)中、Xは酸素、アミド基を示す。Y1～3は必ずいずれか1つ以上は存在し、PEG鎖、もしくは官能基及び/又は有機基で誘導化されたPEG誘導体を示しPEG鎖及びPEG誘導体の構造は直鎖構造又は分岐構造であり分岐構造の場合は分岐数は2～10であり、Zはアジド基、テトラジン誘導体を示す。Y1～3のうちいずれかが存在しない箇所ではZは水素を、Xは酸素を示す。l、m、nの数はY1～3が直鎖構造の場合は1で分岐構造の場合は分岐数と同じ又はそれ以下であり、Y1～3のうちいずれかが存在しない箇所ではl、m、nの数は1である。Y1～3が分岐構造でZがY1～3に複数存在する場合はZは同一であっても同一でなくてもよい。X-Y、Y-Z間の結合は共有結合であり、X、Y、Zはその表示各位において同一である必要はない。)

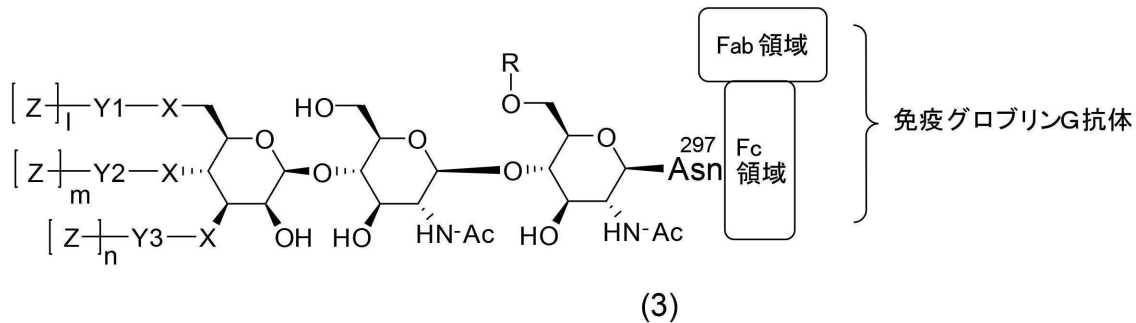
10

【0010】

<2> EN G a s e 存在下で I g G と一般式(1)で表される糖オキサゾリン誘導体を反応させて得られる下記一般式(3)で表されるADC前駆体である修飾化 I g G。

20

【化 10】



(3)

30

(式中、X、Y1～3、Z、l、m、nは式(1)の場合と同じ。RはL-フコース又は水素を示す。)

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、抗体上の特定の位置に決まった数の薬物を導入でき、化学的・生化学的に安定な構造を有し、アレルギーの問題も克服した、これまでにないADC前駆体である修飾化抗体が調製できる。また、本発明の糖化合物を、抗体と薬物との結合に用いることにより、抗体薬物複合体に、温和な条件(pH及び温度など)で薬物を導入することができる。従って、反応時において抗体を劣化させることがない。

【図面の簡単な説明】

40

【0012】

【図1】原料のリツキシマブのアクセプター(13)及び化合物12の転移反応の溶液を示すSDS-PAGEの写真である。

【図2】リツキシマブのアクセプター(13)への化合物12の転移反応を示した図である。

【図3】クリックケミストリーによりアジドPEG化リツキシマブへの蛍光基が導入されたことを示すSDS-PAGEの写真である。

【図4】実施例2の反応生成物中のアジドPEG化されたリツキシマブのモノマー部位を用いて実施例3の反応を示した図である。

【図5】実施例2の反応生成物中のアジドPEG化されたリツキシマブのモノマー部位を

50

用いて実施例 1 2 の反応を示した図である。

【図 6】クリックケミストリーによりアジド P E G 化リツキシマブへ薬物が導入されたことを示す S D S - P A G E の写真である。

【図 7】R a m o s (R A 1) 細胞及び J u r k a t 細胞に対する各種抗体の細胞殺傷効果を示したグラフである。

【図 8】原料であるトラスツズマブに対する化合物 1 2 の転移反応の経時的な変化を示す S D S - P A G E 泳動像である。

【図 9】3 時間転移反応を行った反応液の液体クロマトグラフィーチャートである。

【図 1 0】実施例 1 4 の反応で、ネイティブなトラスツズマブに対する化合物 1 2 のワンポット転移反応を示した図である。

【発明を実施するための形態】

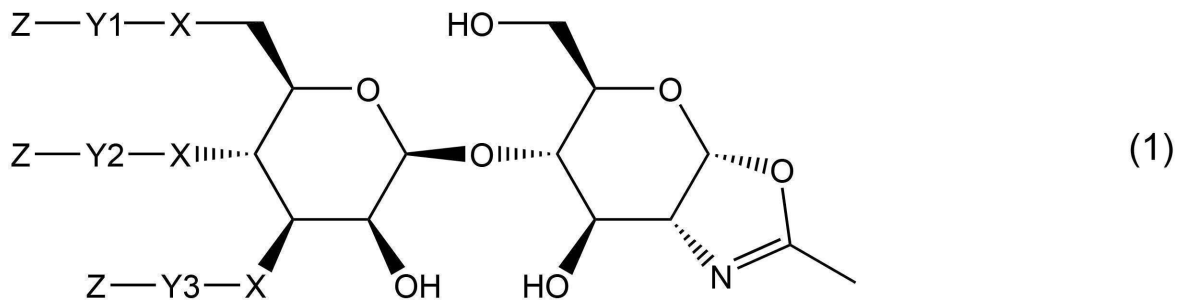
【0 0 1 3】

以下、本発明を詳細に説明する。

[1] 糖化合物

本発明の糖化合物は、糖オキサゾリン誘導体であり、下記一般式 (1) で表される。

【化 1 1】

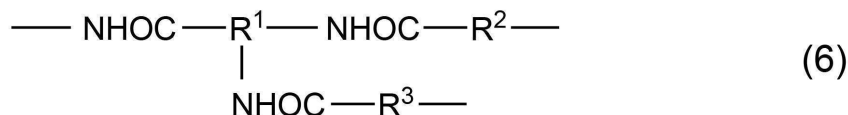


式中、X はそれぞれ独立して、単結合、酸素原子、- N H -、- C O H N -、- C O O -、又は式 (5) 又は (6) :

【化 1 2】



【化 1 3】



(式中、R¹ は、炭素数 1 ~ 6 の 3 価の分岐炭化水素基であり、R² 及び R³ は、それぞれ独立して炭素数 1 ~ 3 のアルキレン基である) で表される基であり、

Y 1 ~ 3 はいずれか 1 つ以上は存在し、それぞれ独立して、P E G 鎖、置換された P E G 鎖、又は酸素原子、- N H -、- C O H N -、又は - C O O - を主鎖に含む P E G 鎖であり、P E G 鎖の構造は直鎖構造又は分岐構造であり、分岐構造の場合は、分岐数は 2 ~ 1 0 であり、

Z はそれぞれ独立して、ヒドロキシ基、メトキシ基、アジド基、場合により置換されることのあるテトラジン基、ノルボルネン基、t r a n s - シクロオクテン基、ジベンジルシクロオクチル基、又はピシクロ [6 . 1 . 0] ノナ - 4 - イン - 9 - イルメチル基、又は場合により置換されることのあるシアノベンゾチアゾール基であり、少なくとも 1 つ以上の Z は、ヒドロキシ基又はメトキシ基ではなく、

Y 1 ~ 3 のいずれかが存在しない場合、Z は水素そして X は酸素であり、

10

20

30

40

50

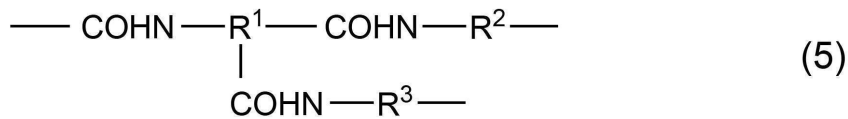
Xが前記式(5)又は(6)で表される基の場合、Y¹~Y³は分岐鎖のR²及びR³にそれぞれ結合しており、

PEG鎖が分岐構造の場合、それぞれの分岐鎖にZが結合している。

【0014】

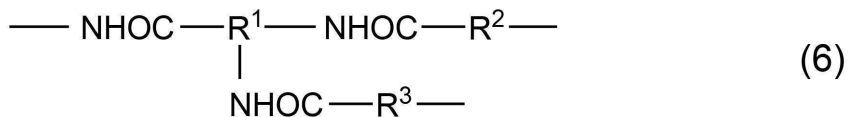
Xは、糖とPEG鎖等を結合するものであり、それぞれ独立して、単結合、酸素原子、-NH-、-COHN-、-COO-、又は式(5)又は(6)：

【化14】



10

【化15】



(式中、R¹は、炭素数1~6の3価の分岐炭化水素基であり、R²及びR³は、それぞれ独立して炭素数1~3のアルキレン基である)で表される基である。

Xが単結合、酸素原子、-NH-、-COHN-、又は-COO-である場合、Xに結合するPEG鎖等は1つである。Xが式(5)又は(6)で表される基の場合、分岐にそれぞれPEG鎖等が結合する。

20

【0015】

Y¹~Y³は、PEG鎖、置換されたPEG鎖、又は酸素原子、-NH-、-COHN-、又は-COO-を主鎖に含むPEG鎖(以下、纏めてPEG鎖等と称することがある)であり、PEG鎖等の構造は直鎖構造又は分岐構造でもよい。PEG鎖等は無毒性かつ非免疫原性の高分子であり、PEG鎖等により修飾されたタンパク質治療薬は免疫原性の低下、各種酵素による分解からの保護、半減期の増大などにより、生体内での安定性を高める効果を得ることができる。

PEG鎖の繰り返し数は、特に限定されるものではないが、例えば、2~1000であり、ある態様においては2~100であり、ある態様においては2~50であり、ある態様においては2~30であり、ある態様においては2~20であり、ある態様においては2~10であり、ある態様においては2~5である。前記繰り返し数は、1つのPEG鎖における繰り返し数であり、分岐したPEG鎖においては、それぞれの分岐したPEG鎖における繰り返し数を意味する。まあ、後述の酸素原子、-NH-、-COHN-、又は-COO-を主鎖に含むPEG鎖における繰り返し数は、これらの基を含む1つのPEG鎖における繰り返し数を意味する。

30

【0016】

前記置換されたPEG鎖は、PEG鎖の側鎖の水素原子が置換されたPEG鎖を意味する。置換基としては、本発明の効果が得られる限りにおいて、特に限定されるものではないが、アルキル基、アラルキル基、アルケニル基、アルキニル基、水酸基、アミノ基、アルデヒド基、ケトン基、カルボキシル基、アミド基、チオール基、又はエーテル基が挙げられるが、特に炭素数1~6のアルキル基が好ましい。

40

【0017】

前記酸素原子、-NH-、-COHN-、又は-COO-を主鎖に含むPEG鎖は、主鎖のポリエチレングリコール(CH²CH²O)の繰り返し単位の中に、前記酸素原子(エーテル結合)、-NH-、-COHN-(アミド結合)、又は-COO-(エステル結合)を有するものである。又は、主鎖のポリエチレングリコール(CH²CH²O)の酸素原子(-O-)に置き換えて、-NH-、-COHN-、又は-COO-を含んでもよい。

【0018】

50

前記 P E G 鎖等は、直鎖構造又は分岐構造である。分岐構造の場合は分岐数に制限はないが 2 ~ 10 が好ましい。P E G 鎖の重合度についても、前記の通り特に制限はないが、重合度 2 から 10 が特に好ましい。

【0019】

一般式(1)において Z は、Y 1 ~ 3 が存在する箇所ではヒドロキシ基、メトキシ基、アジド基、場合により置換されることのあるテトラジン基、ノルボルネン基、trans-シクロオクテン基、ジベンジルシクロオクチル基、又はビスクロ[6.1.0]ノナ-4-イン-9-イルメチル基、又は場合により置換されることのあるシアノベンゾチアゾール基である。Y 1 ~ 3 のいずれかが存在しない箇所では水素を、X は酸素を示す。また、少なくとも 1 つ以上の Z は、ヒドロキシ基、又はメトキシ基ではない。すなわち、少なくとも 1 つの Z が、アジド基、場合により置換されることのあるテトラジン基、ノルボルネン基、trans-シクロオクテン基、ジベンジルシクロオクチル基、又はビスクロ[6.1.0]ノナ-4-イン-9-イルメチル基、又は場合により置換されることのあるシアノベンゾチアゾール基である。これらの基に、薬物を導入することができる。少なくとも 1 つの Z が、アジド基、場合により置換されることのあるテトラジン基、ノルボルネン基、trans-シクロオクテン基、ジベンジルシクロオクチル基、又はビスクロ[6.1.0]ノナ-4-イン-9-イルメチル基、又は場合により置換されることのあるシアノベンゾチアゾール基であることによって、本発明の糖化合物に効率的に、薬物を導入することができる。

10

【0020】

前記アジド基は、-N₃ で表される基である。

20

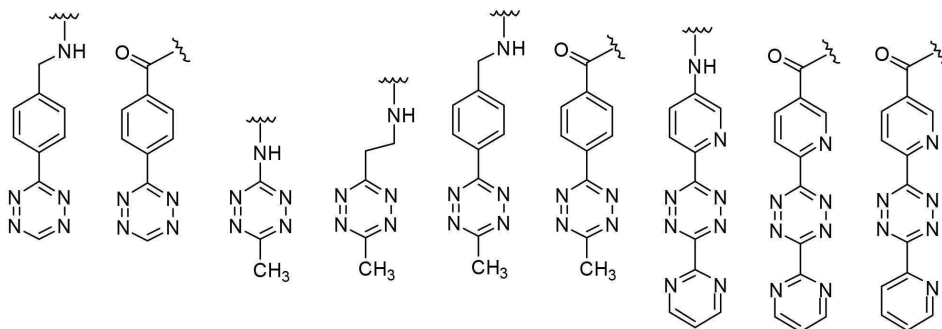
【0021】

前記テトラジン基は、1, 2, 4, 5-テトラジン基である。置換されたテトラジン基の置換基は 3 位及び / 又は 6 位の水素原子が置換されたものである。3 位の置換基としては、限定されるものではないが、炭素数 1 ~ 3 のアルキル基、ピリジニル基、ビピリジニル基、-CF₃ 基 (フルオロアルキル基)、-COOCH₃ (エステル基)、又はフェニル基が挙げられる。また、6 位の置換基としては、限定されるものではないが、アミノ基、炭素数 1 ~ 3 のアルキレン基 (例えば、エチレン基)、フェニレン基、又はピリジニレン基が挙げられる。更に、6 位の置換基であるアミノ基、炭素数 1 ~ 3 のアルキレン基 (例えば、エチレン基)、フェニレン基、又はピリジニレン基が、アミド結合、アミノ基、を介して Y 1 ~ 3 に結合してもよい。また、テトラジン基、又は置換されたテトラジン基は、前記 P E G 鎖等に直接結合してもよいが、例えばエーテル結合、エステル結合、カーボネート結合、カルバメート結合、又はアミド結合などによって結合してもよい。

30

具体的な置換されたテトラジン基としては、限定されるものではないが、下記の式で表される基が挙げられる。

【化 16】



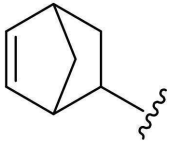
40

【0022】

前記ノルボルネン基は、下記式(8) :

50

【化 17】



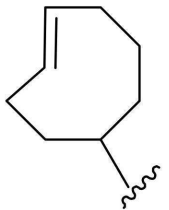
(8)

で表される基である。前記ノルボルネン基は、前記 P E G 鎖等に直接結合してもよいが、例えばエーテル結合、エステル結合、カーボネート結合、カルバメート結合、又はアミド結合などによって結合してもよい。

【0023】

前記 *trans*-シクロオクテン基は下記式(9)：

【化 18】



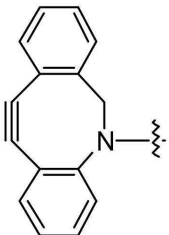
(9)

で表される基である。前記 *trans*-シクロオクテン基は、前記 P E G 鎖等に直接結合してもよいが、例えばエーテル結合、エステル結合、カーボネート結合、カルバメート結合、又はアミド結合などによって結合してもよい。

【0024】

前記ジベンジルシクロオクチル基は下記式(10)：

【化 19】



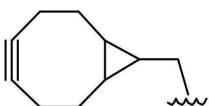
(10)

で表される基である。前記ジベンジルシクロオクチル基は、前記 P E G 鎖等に直接結合してもよいが、例えばエーテル結合、エステル結合、カーボネート結合、カルバメート結合、又はアミド結合などによって結合してもよい。

【0025】

前記ビスシクロ[6.1.0]ノナ-4-イン-9-イルメチル基は下記式(11)：

【化 20】



(11)

で表される基である。前記ビスシクロ[6.1.0]ノナ-4-イン-9-イルメチル基は、前記 P E G 鎖等に直接結合してもよいが、例えばエーテル結合、エステル結合、カーボネート結合、カルバメート結合、又はアミド結合などによって結合してもよい。

【0026】

前記シアノベンゾチアゾール基は、下記式(12)：

10

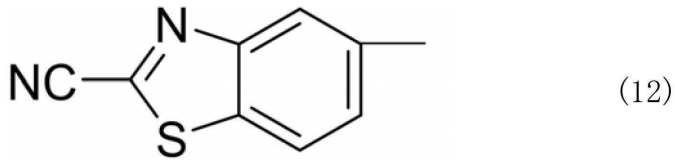
20

30

40

50

【化 2 1】



で表される基である。置換されたシアノベンゾチアゾール基は、Y 1 ~ 3 との結合が、アミド結合、エーテル結合、又はエステル結合を介して結合したものである。前記シアノベンゾチアゾール基及び置換されたシアノベンゾチアゾール基は、前記 P E G 鎖等に直接結合してもよいが、例えばエーテル結合、エステル結合、又はアミド結合などによって結合してもよい。

10

【0027】

Y 1 ~ 3 が分岐構造で Z が Y 1 ~ 3 に複数存在する場合は、Z は同一であっても同一でなくてもよい。

【0028】

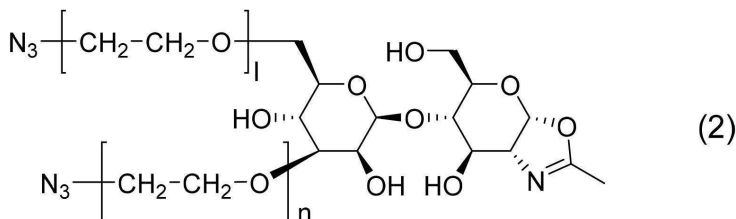
一般式 (1) の Y 1 ~ 3 において置換基は、特に限定されるものではなく、例えば有機基、又は官能基が挙げられる。有機基とは、炭素原子を必須とする原子の集合体であり、例えばアルキル基、アラルキル基、アルケニル基、アルキニル基が挙げられ、特にアルキル基、アルケニル基が好ましい。アルキル基、アルケニル基の構造に特に制限はなく飽和又は不飽和の鎖式炭化水素基又は脂環式炭化水素基となってもよい。アルキル基、アルケニル基の炭素数に特に制限はないが 1 ~ 3 0 が好ましく特に 1 ~ 2 0 が好ましい。官能基とは、有機化合物の性質を決定する原子の集合体であり、例えば水酸基、アミノ基、アルデヒド基、ケトン基、カルボキシル基、アミド基、チオール基、エーテル基が挙げられ、特に水酸基、アミノ基、カルボキシル基、アミド基、エーテル基が好ましい。

20

【0029】

本発明の糖化合物 (糖オキサゾリン誘導体) として、下記式 (2) で表される糖化合物 (オキサゾリン誘導体) が好ましい。

【化 2 2】



30

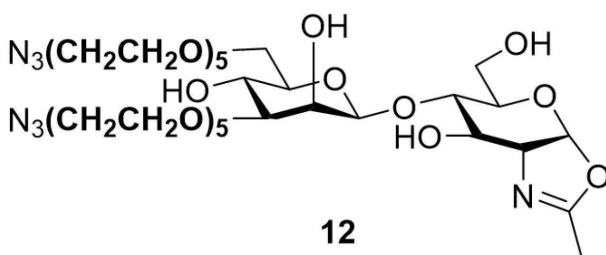
一般式 (2) においてポリエチレングリコール鎖の重合度についても特に制限はないが、重合度 2 から 1 0 が好ましい。

【0030】

本発明の糖化合物 (糖オキサゾリン誘導体) として、より具体的には、下記式で表される糖化合物 (オキサゾリン誘導体) が挙げられる。

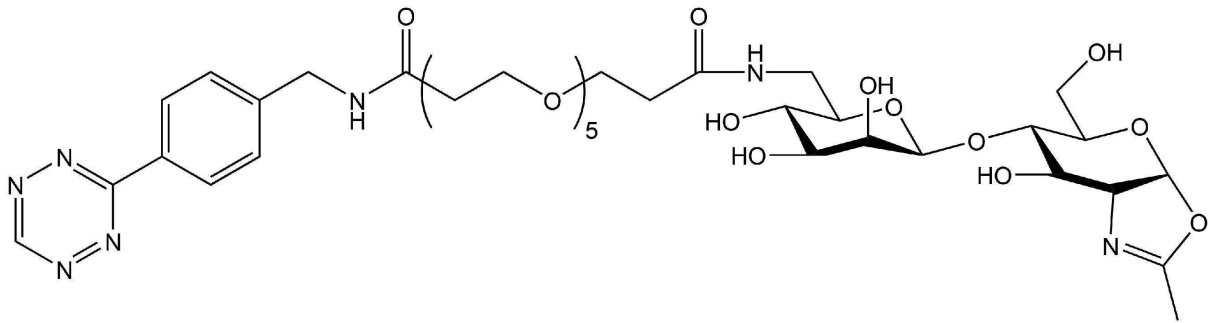
40

【化 2 3】



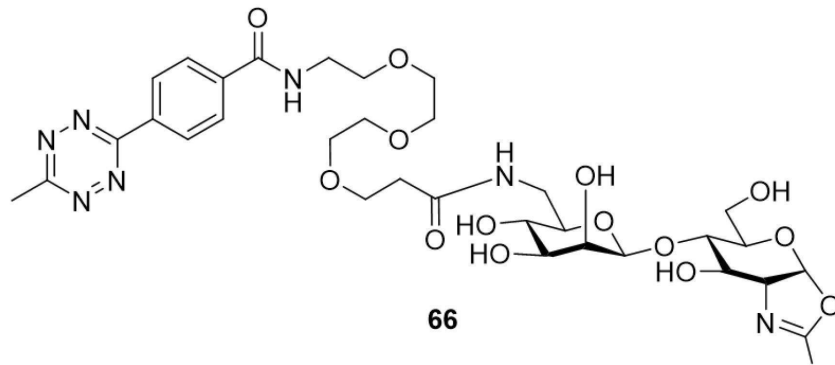
50

【化 2 4】



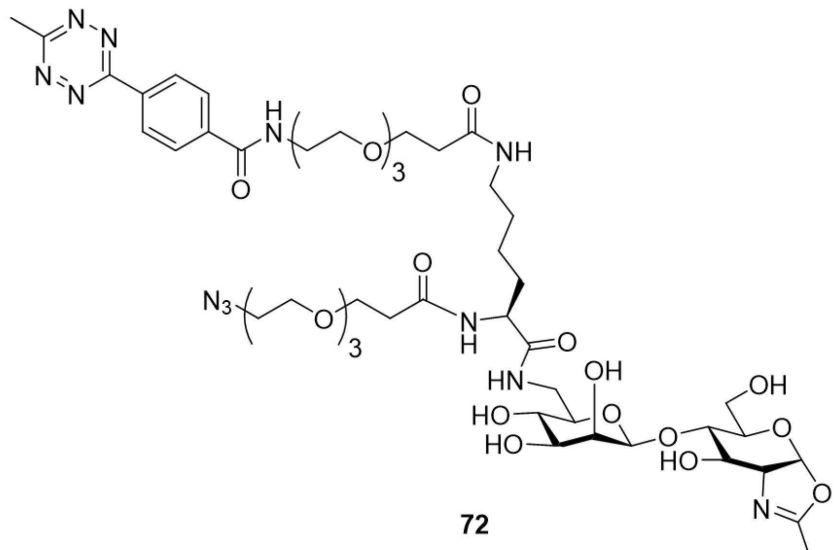
10

【化 2 5】



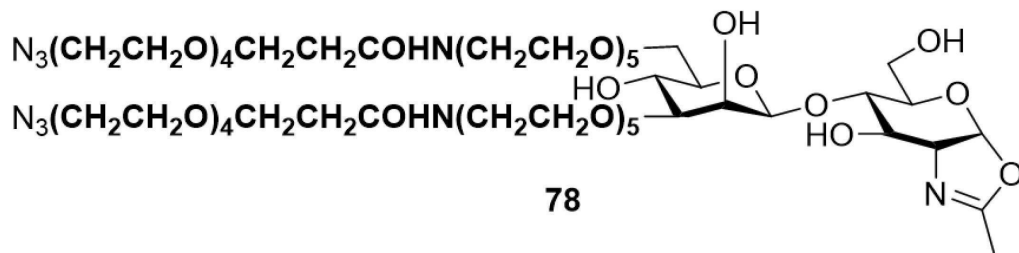
20

【化 2 6】



30

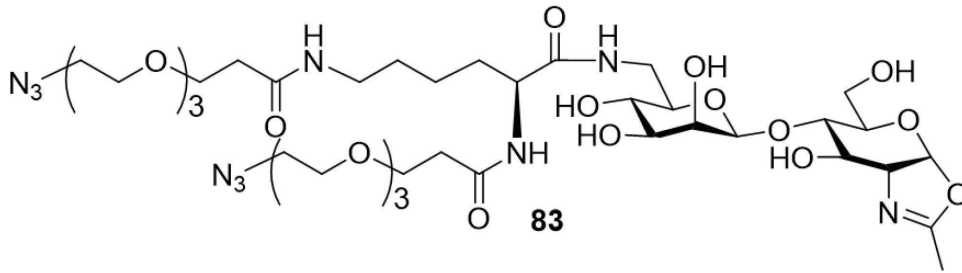
【化 2 7】



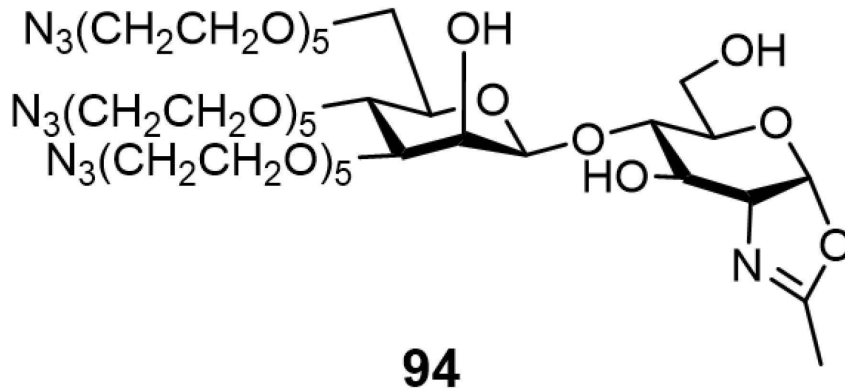
40

50

【化 2 8】



【化 2 9】

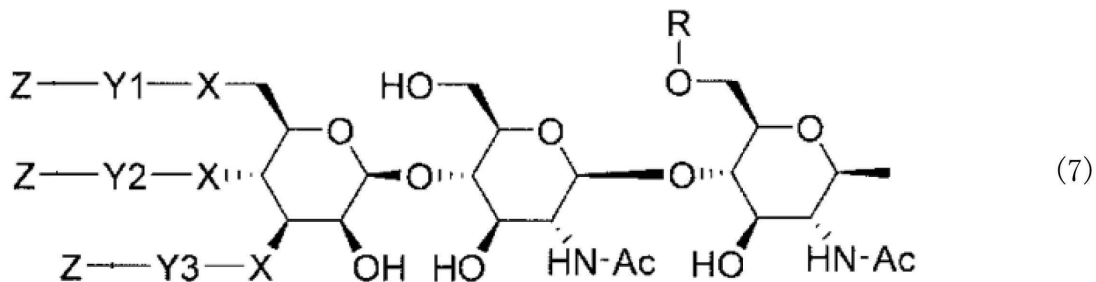


【 0 0 3 1】

[2] 修飾免疫グロブリン抗体

本発明の修飾免疫グロブリン抗体は、前記ポリエチレングリコール鎖を有する糖化合物から誘導される下記式(7)：

【化 3 0】



(式中、X、Y1~3、及びZは前記の通りであり、RはL-フコース又は水素原子である)で表されるポリエチレングリコール鎖を有する糖化合物基を、Fc領域のアスパラギン残基の側鎖の糖結合部位に有する。

抗体と一般式(1)で表される糖化合物(糖オキサゾリン誘導体)をENGase存在下で反応させることで、前記式(7)で表される糖化合物基を有する修飾免疫グロブリン抗体が得られる。

【 0 0 3 2】

抗体は特に限定されるものではなく、IgG、IgA1、IgA2、IgE、IgD、又はIgMが挙げられる。IgGのFc領域のアスパラギン残基は297番目である。IgA1のFc領域のアスパラギン残基は144番目及び340番目である。IgA2のFc領域のアスパラギン残基は131番目、205番目、及び327番目である。IgEのFc領域のアスパラギン残基は140番目、168番目、218番目、265番目、371番目、383番目、及び394番目である。IgDのFc領域のアスパラギン残基は354番目、445番目、及び496番目である。IgMのFc領域のアスパラギン残基は171番目、332番目、395番目、402番目、及び563番目である。

【 0 0 3 3】

10

20

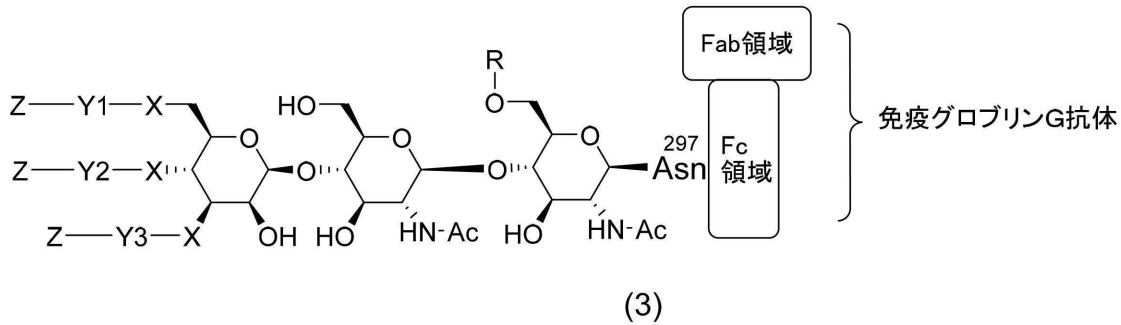
30

40

50

I g Gの場合、例えば下記一般式(3)で表されるADC前駆体である修飾化I g G抗体が得られる。

【化31】



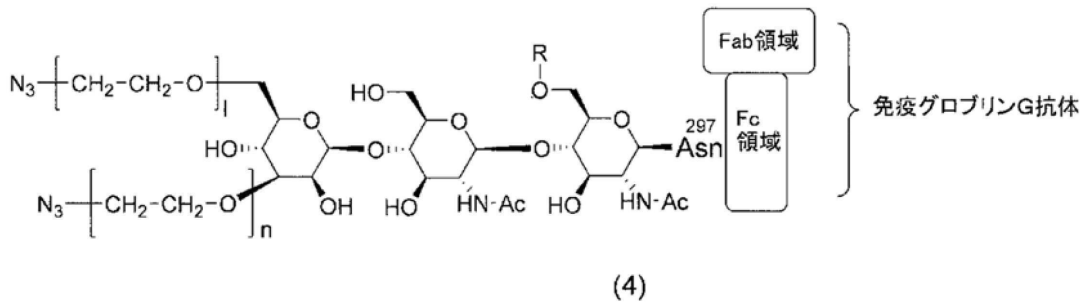
10

(式中、X、Y1~3、及びZは前記の通りであり、RはL-フコース又は水素原子である)

【0034】

一般式(3)で表されるADC前駆体である修飾化I g G抗体のうち、下記一般式(4)で表され修飾化I g G抗体が本発明品としては特に好ましい。

【化32】



20

(式(4)中、RはL-フコース又は水素を示す。lとnは2から10の整数を表す。)

【0035】

30

[3] 抗体薬物複合体

本発明の抗体薬物複合体は、前記糖化合物のZに薬物を、例えばリンカー(抗体と薬物を連結する分子で、薬物の放出速度、放出機構、放出現場を制御する分子)を介して結合させ、糖化合物のオキサゾリン骨格に抗体のアスパラギン残基を結合させるものである。リンカーとしては、限定されるものではないが、例えばVal-Citリンカー、MCCLリンカー、Gly-Gly-Phe-Glyリンカーが挙げられる。本発明の糖化合物(糖オキサゾリン誘導体)は、前記の通り、ENGase存在下で抗体と反応させることによって、抗体のFc部分のアスパラギン酸に本発明の糖化合物(糖オキサゾリン誘導体)が導入される。

本発明の修飾免疫グロブリン抗体は、前記Zの基に薬物を結合させる。前記Zの基(アジド基、テトラジン基の誘導体、ノルボルネン基、trans-シクロオクテン基、ジベンジルシクロオクチル基、又はビスクロ[6.1.0]ノナ-4-イン-9-イルメチル基、又はシアノベンゾチアゾール基の誘導体)は、温和な条件で薬物を導入することができる。例えば、中性領域のpHで、室温で迅速に反応を進行させることができる。従って、抗体を高い温度にさらすことなく、抗体の劣化が起こらない。

40

【実施例】

【0036】

以下に、本発明を実施例を用いて更に詳細に説明するが、この実施例は本発明の具体例を示すもので、本発明を何ら限定するものではない。

《実施例1》

50

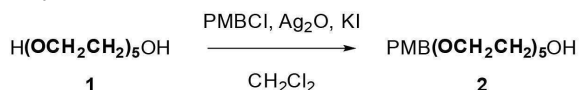
【0037】

本実施例では、末端にアジド基を有するPEG鎖を有する糖化合物を作製した。

(化合物2の調製)

化合物1 (2.03 g, 8.52 mmol) をトルエン (40 mL) に溶解し、p-メトキシベンジルクロリド (1.27 mL, 9.37 mmol)、ヨウ化カリウム (283 mg)、酸化銀 (I) (2.96 g, 12.8 mmol) を順次加え、60 °C で一晩撹拌した。固形物を濾別し、クロロホルムで洗浄後、濾液と洗液を合わせて減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム:メタノール = 50:1) で精製し、黄色油状の化合物2 (1.66 g, 58%) を得た。

【化33】



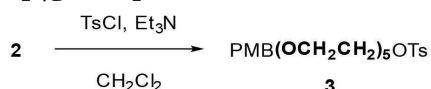
化合物2 ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 2.66 (br s, 1H), 3.57 - 3.62 (m, 4H), 3.63 - 3.69 (m, 14H), 3.69 - 3.74 (m, 2H), 3.80 (s, 3H), 4.50 (s, 2H), 6.87 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.27 (d, J = 7.1 Hz, 2H).

【0038】

(化合物3の調製)

化合物2 (773 mg, 2.28 mmol) をジクロロメタン (15 mL) に溶解し、トリエチルアミン (1.57 mL, 11.4 mmol) 及びトシルクロライド (610 mg, 3.20 mmol) を加え、室温で一晩撹拌した。反応液に水を加え、クロロホルムで2回抽出した。有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄後、硫酸ナトリウムを加え乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 トルエン:酢酸エチル = 2:3) で精製し、淡黄色の化合物3 (1.08 g, 92%) を得た。

【化34】



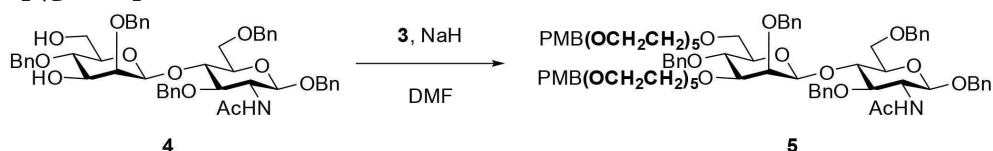
化合物3 ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 2.44 (s, 3H), 3.55 - 3.71 (m, 18H), 3.80 (m, 3H), 4.15 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.49 (s, 2H), 6.87 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.26 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.80 (d, J = 8.2 Hz, 2H).

【0039】

(化合物5の調製)

非特許文献3記載の方法で調製した化合物4 (435 mg, 522 μmol) 及び化合物3 (1.07 g, 2.09 mmol) をDMF (2.1 mL) に溶解し、水素化ナトリウム (50.1 mg, 1.15 mmol) を加え、0 °C で10分、次いで室温で一晩撹拌した。反応液に5%クエン酸水溶液 (2 mL) を加え反応を停止させた後、水を加え酢酸エチルで2回抽出した。有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄後、硫酸マグネシウムを加え乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 酢酸エチル) で精製し、無色油状の化合物5 (624 mg, 79%) を得た。

【化35】



10

20

30

40

50

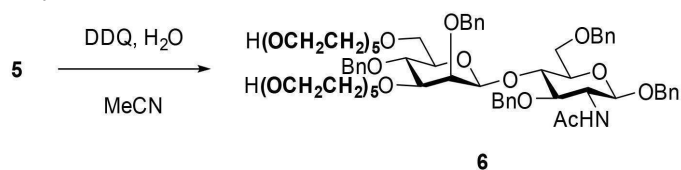
化合物 5 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 1.66 (s, 3H), 3.23 - 3.30 (m, 2H), 3.42 - 3.47 (m, 2H), 3.47 - 3.87 (m, 52H), 3.90 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 4.05 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 4.45 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.46 - 4.50 (m, 5H), 4.52 - 4.60 (m, 3H), 4.64 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.75 - 4.91 (m, 6H), 6.11 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 8.9 Hz, 4H), 7.19 - 7.34 (m, 27H), 7.40 (d, J = 7.6 Hz, 2H).

【0040】

(化合物 6 の調製)

化合物 5 (627 mg, 414 μmol) をジクロロメタン (6 mL) に溶解し、水 (0.6 mL) 及び DDQ (263 mg, 1.16 mmol) を加え、0 で 15 分、次いで室温で 2.5 時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (18 mL) 及びクロロホルム (12 mL) を加え室温で 10 分攪拌した後、水を加えクロロホルムで 2 回抽出した。有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄後、硫酸ナトリウムを加え乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 酢酸エチル : メタノール = 8 : 1) で精製し、無色油状の化合物 6 (286 mg, 54%) を得た。

【化 3 6】



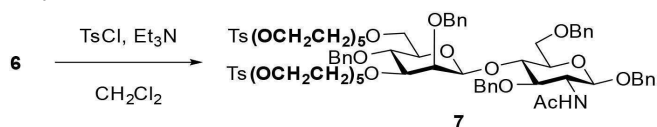
化合物 6 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 1.68 (s, 3H), 2.83 (brs, 1H), 2.95 (brs, 1H), 3.26 - 3.31 (m, 2H), 3.42 - 3.84 (m, 48H), 3.91 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 4.07 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.50 (s, 1H), 4.53 - 4.61 (m, 3H), 4.64 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.75 - 4.91 (m, 6H), 6.26 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.18 - 7.36 (m, 23H), 7.40 (d, J = 7.6 Hz, 2H).

【0041】

(化合物 7 の調製)

化合物 6 (663 mg, 520 μmol) をジクロロメタン (6 mL) に溶解し、トリエチルアミン (582 μL , 4.16 mmol) 及びトシルクロライド (397 mg, 2.08 mmol) を順次加え、室温で一晩攪拌した。反応液に水を加え、酢酸エチルで 2 回抽出した。有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄後、硫酸マグネシウムを加え乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 トルエン : 酢酸エチル = 1 : 20) で精製し、無色油状の化合物 7 (658 mg, 80%) を得た。

【化 3 7】



化合物 7 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 1.66 (s, 3H), 2.43 (s, 6H), 3.24 - 3.30 (m, 2H), 3.43 - 3.85 (m, 44H), 3.91 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 4.05 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 4.11 - 4.14 (m, 4H), 4.44 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.49 (s, 1H), 4.52 - 4.60 (m, 3H), 4.63 (d, J = 11.7 Hz, 1

H), 4.75 - 4.91 (m, 6H), 6.08 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.17 - 7.38 (m, 27H), 7.40 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 7.78 (d, J = 8.2 Hz, 4H).

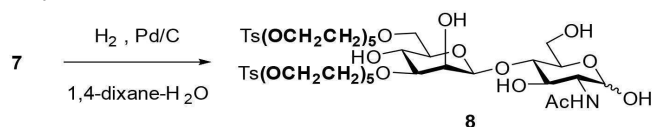
【0042】

(化合物8の調製)

化合物7 (422 mg, 279 μmol) を1,4-ジオキサン (16 mL) に溶解し、Pd/C (260 mg) の1,4-ジオキサン懸濁液 (4 mL) に加えた後、水 (5 mL) を加え、水素雰囲気下、室温にて一晩攪拌した。固形物を濾別し、50% 1,4-ジオキサン水溶液で洗浄後、濾液と洗液を合わせて減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム:メタノール:水 = 85:15:0.8) で精製し、無色油状の化合物8 (245 mg, 78%) を得た。

10

【化38】



化合物8 ^{13}C NMR (150 MHz, CD₃OD): = 21.65, 22.70, 23.00, 55.65, 58.27, 58.36, 62.10, 67.58, 69.14, 69.17, 69.79, 69.90, 70.63, 71.03, 71.37, 71.47, 71.52, 71.55, 71.61, 71.82, 71.86, 71.88, 73.91, 76.49, 76.89, 81.62, 82.11, 83.78, 83.80, 92.25, 97.32, 102.07, 102.15, 129.12, 131.13, 146.52, 173.46, 174.03

20

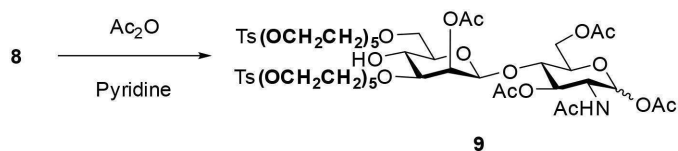
【0043】

(化合物9の調製)

化合物8 (222 mg, 196 μmol) をピリジン (2 mL) に溶解し、無水酢酸 (1 mL) を加え、室温で一晩攪拌した。反応液にメタノール (2 mL) を加え過剰な試薬を分解した後、反応液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム:メタノール:水 = 20:1) で精製し、無色油状の化合物9 (131 mg, 50%, / = 7/3) を得た。

30

【化39】



化合物9 ^1H NMR (600 MHz, CDCl₃): = 1.93 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.09 (s, 0.9H), 2.10 - 2.13 (m, 9H), 2.18 (s, 2.1H), 2.45 (s, 6H), 3.44 - 3.77 (m, 40H), 3.77 - 3.83 (m, 0.3H), 3.86 - 3.95 (m, 1.7H), 4.13 - 4.19 (m, 4H), 4.22 - 4.40 (m, 3H), 4.55 (s, 0.7H), 4.58 (s, 0.3H), 4.91 - 5.01 (m, 1H), 5.12 (t, J = 8.9 Hz, 0.3H), 5.20 (dd, J = 8.9 Hz, 11.0 Hz, 0.7H), 5.45 (d, J = 3.4 Hz, 0.3H), 5.48 (d, J = 3.4 Hz, 0.7H), 5.61 (d, J = 8.9 Hz, 0.3H), 5.62 (d, J = 8.9 Hz, 0.7H), 5.88 (d, J = 9.6 Hz, 0.3H), 6.10 (d, J = 4.1 Hz, 0.7H), 7.35 (d, J = 8.2 Hz, 4H), 7.80 (d, J = 8.2 Hz, 4H).

40

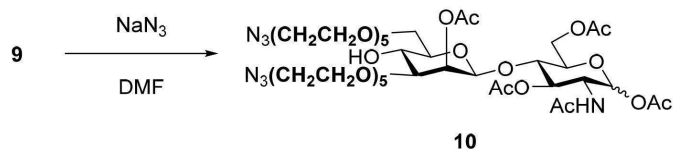
【0044】

(化合物10の調製)

50

化合物 9 (76.2 mg, 56.8 μmol) を DMF (1.5 mL) に溶解し、アジ化ナトリウム (36.9 mg, 568 μmol) を加え、50 °C で一晩撹拌した。反応液に水を加え酢酸エチルを加え 2 回抽出した。有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄後、硫酸マグネシウムを加え乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム : メタノール : 水 = 30 : 1) で精製し、無色油状の化合物 10 (48.9 mg, 80%, $\eta_{\text{D}}^{20} = 75/25$) を得た。

【化 40】



10

化合物 10 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 1.93 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.10 (s, 0.75H), 2.11 - 2.14 (m, 9H), 2.18 (s, 2.25H), 3.39 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H), 3.44 - 3.78 (m, 40H), 3.78 - 3.83 (m, 0.25H), 3.87 - 3.95 (m, 1.75H), 4.20 - 4.40 (m, 3H), 4.53 (s, 0.75H), 4.56 (s, 0.25H), 4.92 - 5.00 (m, 1H), 5.11 (t, $J = 9.6$ Hz, 0.25H), 5.19 (dd, $J = 8.9$ Hz, 11.0 Hz, 0.75H), 5.45 (d, $J = 3.4$ Hz, 0.25H), 5.48 (d, $J = 3.4$ Hz, 0.75H), 5.56 (d, $J = 8.9$ Hz, 0.75H), 5.61 (d, $J = 8.2$ Hz, 0.25H), 5.81 (d, $J = 9.6$ Hz, 0.25H), 6.11 (d, $J = 4.1$ Hz, 0.75H).

20

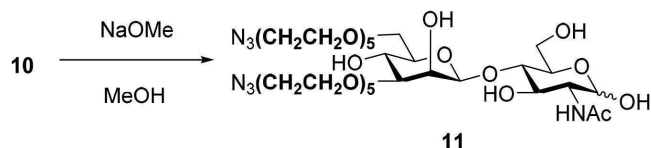
【0045】

(化合物 11 の調製)

化合物 10 (41.3 mg, 38.1 μmol) をメタノール (10 mL) に溶解し、触媒量の 28% ナトリウムメトキシドメタノール溶液を滴下し、室温で一晩撹拌した。反応液に Amberlite IR-120 (H^+ form) を加えて中和後、樹脂を濾別した。濾液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム : メタノール : 水 = 85 : 15 : 0.1) で精製し、無色油状の化合物 11 (14.6 mg, 44%) を得た。

30

【化 41】



化合物 11 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ = 1.93 (s, 3H), 3.37 - 3.89 (m, 51H), 4.18 - 4.23 (m, 1H), 4.62 - 4.67 (m, 1.4H), 5.12 (d, $J = 2.7$ Hz, 0.6H).

40

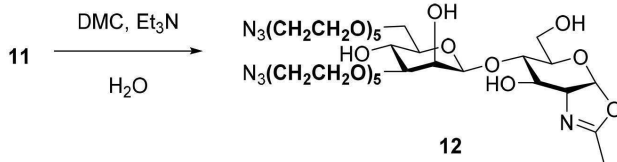
【0046】

(化合物 12 の調製)

化合物 11 (6.6 mg, 7.55 μmol) に 0.780 M の 2-クロロ-1,3-ジメチルイミダゾリニウムクロリド水溶液 (300 μL , 234 μmol) 及びトリエチルアミン (82.1 μL , 589 μmol) を加え、0 °C で一晩撹拌した。反応液をゲルろ過クロマトグラフィー (展開溶媒 0.05% トリエチルアミン水溶液) で精製し、化合物 12 を定量的 (6.57 mg) に得た。

50

【化 4 2】



化合物 12 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ = 1.93 (s, 3H), 3.23 - 3.28 (m, 1H), 3.30 (dd, J = 2.7 Hz, 9.6 Hz, 1H), 3.32 - 3.40 (m, 6H), 3.46 - 3.78 (m, 4H), 4.01 - 4.07 (m, 2H), 4.22 (s, 1H), 4.55 (s, 1H), 5.93 (d, J = 7.5 Hz, 1H).

10

【0047】

《実施例 2》

本実施例では、リツキシマブ (抗体) に実施例 1 で得られた化合物を結合させた。

(リツキシマブ糖鎖結合部位への化合物 12 の転移反応)

リツキシマブのアクセプター (13) は全薬工業社製造のリツキシマブを用いて非特許文献 4 に従って調製した。リツキシマブのアクセプター 13 の糖鎖結合部位への化合物 12 の転移反応は、調製したリツキシマブのアクセプター 13 (2 mg)、化合物 12 (1.384 μmol)、並びに、大腸菌で発現及び精製した野生型酵素 Endo-F3 WT (200 μg) を 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) 中に加え、総量 0.5 mL として 37 °C で 1 時間静置することで実施した。反応液の一部を取り出し 9.0% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE (クーマシーブリリアントブルー染色) で確認したところ、化合物 12 の転移により高分子側にシフトした重鎖バンドが確認された (図 1)。当該反応液に同緩衝液で平衡化した Ab-Catcher Extra (プロテノバ社) をウェットボリュームで 80 μL 加えて室温で 1 時間回転振盪し、ゲル担体にリツキシマブを吸着させた。ゲル担体に対して、1.8 mL の NETN 緩衝液 (50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)、150 mM 塩化ナトリウム、1 mM EDTA 及び 0.1% (w/v) NP-40) を用いた室温、転倒混和による洗浄作業を計 3 回、1.8 mL の NETN 緩衝液を用いた室温、5 分間の回転振盪による洗浄作業を 1 回、1 mL の PBS を用いたリンスを 4 回行った。洗浄した担体に 200 μL の 0.1 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.7) を加えリツキシマブを溶出させ、溶出液に 1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) を 6.67 μL 加えて中和した。当該溶出作業を計 4 回行い、溶出液をまとめてアミコンウルトラ-0.5 (分画分子量 30 kDa、メルクミリポア社) で濃縮しながら PBS に緩衝液置換した。その結果、リツキシマブの糖鎖結合部位への化合物 12 の転移生成物として Fully アジド PEG 化リツキシマブ体 (14) と Hemi アジド PEG 化リツキシマブ体 (15) と未反応のリツキシマブアクセプター (13) の混合物が 1.46 mg 得られた (図 2)。質量分析による解析の結果、重鎖の糖鎖部位への化合物 12 の転移収率は 46.7% であった。

20

30

【0048】

《実施例 3》

本実施例では、アジド基に蛍光基を導入した。

(アジド PEG 化リツキシマブへの蛍光基の導入)

実施例 2 で得られた反応生成物の水溶液 (7.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) を 4.0 μL に 1.0 M の pH 8.0 リン酸緩衝液 2.0 μL 、水 15.3 μL 及び化合物 16 の 1% DMSO 水溶液 (100 μM) を 18.7 μL を加え、遮光して室温で 2 時間反応させた。

反応液の一部 (3.3 μL) を取り出し 10% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE (クーマシーブリリアントブルー染色) で確認したところ、原料中のアジド PEG 化された重鎖に相当するバンドがクリック反応により高分子側にシフトし、蛍光基が導入されたことが確認された (図 3)。

質量分析による解析の結果、重鎖の 2 か所のアジド基に対して 2 箇所とも蛍光基が導入

40

50

された生成物は76%、2か所のうちどちらか1箇所にものみ蛍光基が導入された生成物は20%、未反応物が4%であった(図4)。

【0049】

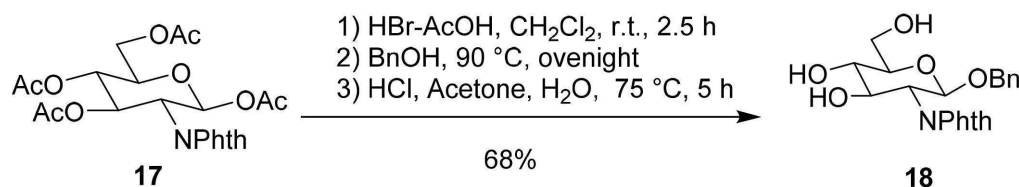
《実施例4》

本実施例では、末端にテトラジン基を有するPEG鎖を有する糖化合物を作製した。

(化合物18の調製)

市販の化合物17(5.01g, 11.2mmol)をジクロロメタン(6mL)に溶解し、25%臭化水素酢酸溶液(15mL)を加え、室温で2.5時間攪拌した。反応液に氷水を加え、クロロホルムで抽出した。有機相を水(2回)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水の順で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣(4.96g)をベンジルアルコール(14mL)に溶解し、90℃で一晩攪拌した。反応液にアセトン(40mL)、水(15mL)及び塩酸(10mL)を加え、75℃で更に5時間攪拌した。反応液にトリエチルアミン(20mL)を加えて反応を停止させた後、減圧濃縮した。残渣に水を加え酢酸エチル(2回)で抽出した。有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水の順で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒 CHCl₃:MeOH=10:1)で精製し、化合物18(3.05g, 68%)を得た。

【化43】



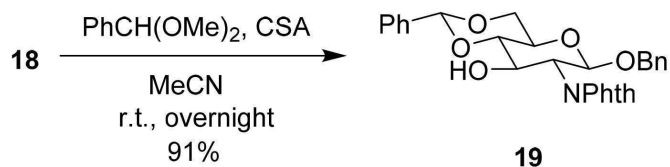
化合物18 ¹H NMR(600MHz, CDCl₃): δ = 7.82 - 7.75(m, 2H), 7.73 - 7.69(m, 2H), 7.14 - 7.03(m, 5H), 5.25(d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.80(d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.53(d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.36 - 4.30(m, 1H), 4.16(dd, J = 8.2 Hz, 11.0 Hz, 1H), 3.97 - 3.86(m, 2H), 3.70(dt, J = 2.7 Hz, 8.9 Hz, 1H), 3.52 - 3.48(m, 2H), 3.17(d, J = 4.8 Hz, 1H), 2.59(t, J = 6.2 Hz, 1H).

【0050】

(化合物19の調製)

化合物18(3.03g, 7.59mmol)をアセトニトリル(125mL)に溶解し、ベンズアルデヒドジメチルアセタール(2.27mL, 15.2mmol)及びCSA(250mg)を順次加え、室温で一晩攪拌した。反応液にトリエチルアミン(0.5mL)を加え、減圧濃縮した。残渣に水を加えて酢酸エチル(2回)で抽出した。有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水の順で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(展開溶媒 Hexane:EtOAc=2:1)で精製し、化合物19(3.36g, 91%)を得た。

【化44】



化合物19 ¹H NMR(600MHz, CDCl₃): δ = 7.86 - 7.70(m, 4H), 7.53 - 7.48(m, 2H), 7.41 - 7.35(m, 3H), 7.11

- 7.02 (m, 5H), 5.58 (s, 1H), 5.28 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.85 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.69 - 4.60 (m, 1H), 4.52 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.43 (dd, J = 3.4 Hz, 9.6 Hz, 1H), 4.30 (dd, J = 8.9 Hz, 10.3 Hz, 1H), 3.87 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 3.69 - 3.61 (m, 2H), 2.46 (d, J = 3.4 Hz, 1H).

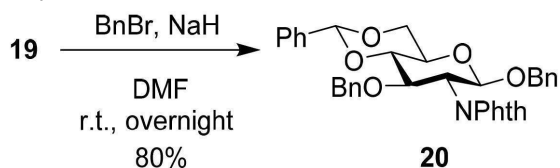
【0051】

(化合物20の調製)

化合物19 (4.36 g, 8.96 mmol) をDMF (40 mL) に溶解し、ベンジ
ルプロミド (5.32 mL, 44.8 mmol) 及び水素化ナトリウム (589 mg, 1
3.4 mmol) を順次加え、0 で30分、室温で一晩攪拌した。反応液に5%クエン
酸水溶液 (5 mL) を加えて反応を停止させた後、水を加えて酢酸エチル (2回) で抽出
した。有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄し、硫酸ナトリウ
ムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラ
フィー (展開溶媒 Toluene : EtOAc = 20 : 1) で精製し、化合物20 (4
.14 g, 80%) を得た。

10

【化45】



20

化合物20 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): = 7.88 - 7.64 (m, 3
H), 7.54 - 7.48 (m, 3H), 7.43 - 7.36 (m, 3H), 7.07 -
6.94 (m, 7H), 6.92 - 6.83 (m, 3H), 5.63 (s, 1H), 5.
19 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.80 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.7
7 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.48 (d, J = 12.4 Hz, 2H), 4.4
5 - 4.36 (m, 2H), 4.26 (dd, J = 8.9 Hz, 10.3 Hz, 1H),
3.88 (t, J = 10.3 Hz, 1H), 3.83 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 3
.67 (m, 1H).

30

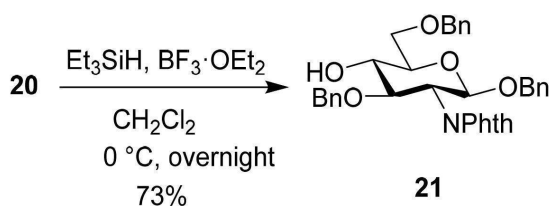
【0052】

(化合物21の調製)

化合物20 (4.05 g, 7.01 mmol) をジクロロメタン (120 mL) に溶解
し、アルゴン雰囲気下、トリエチルシラン (3.34 mL, 21.0 mmol) 及び三フ
ッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 (2.91 mL, 23.1 mmol) を順次加え、- 7
8 で10分、0 で一晩攪拌した。反応液にメタノール (13 mL)、トリエチルア
ミン (6.5 mL) 及びクロロホルム (19.5 mL) の混合溶液を加えて反応を停止させ
た後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えてクロロホルム (2回) で抽出した。有機相
を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去
した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒 Hexane : EtOAc = 2
: 1) で精製し、化合物8 (2.98 g, 73%) を得た。

40

【化46】



化合物21 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): = 7.85 - 7.51 (m,
4H), 7.41 - 7.35 (m, 4H), 7.35 - 7.30 (m, 1H), 7.11

50

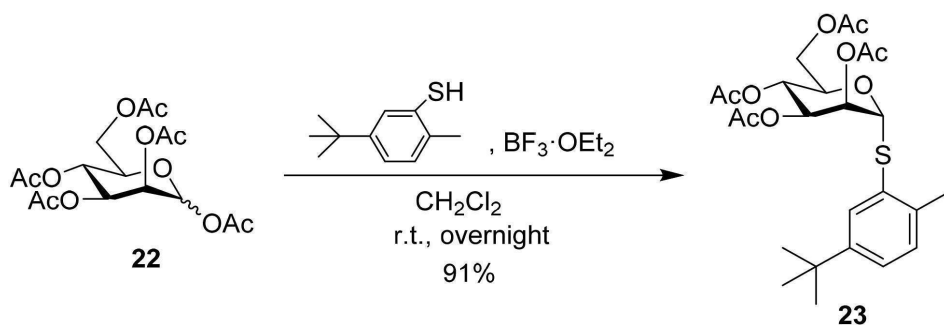
- 7.01 (m, 7H), 6.99 - 6.90 (m, 3H), 5.15 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.78 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.72 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.67 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.51 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.47 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.26 - 4.19 (m, 2H), 3.89 - 3.78 (m, 3H), 3.68 - 3.61 (m, 1H), 2.89 (d, J = 2.1 Hz, 1H).

【0053】

(化合物23の調製)

市販の化合物22 (5.65 g, 14.5 mmol) をジクロロメタン (56 mL) に溶解し、5-tert-ブチル-2-メチルベンゼンチオール (5.27 mL, 28.9 mmol) 及び三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 (3.37 mL, 28.9 mmol) を順次加え、室温で一晩撹拌した。反応液に飽和食塩水を加えてクロロホルム (2回) で抽出した。有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒 Hexane : EtOAc = 2 : 1) で精製し、化合物23 (6.75 g, 91%) を得た。

【化47】



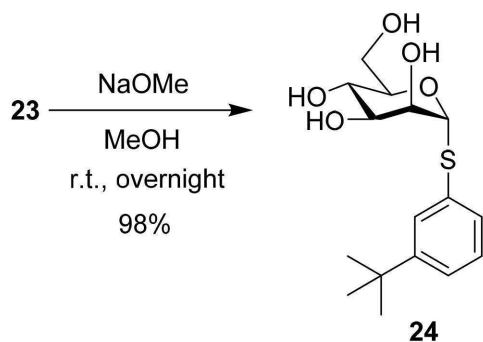
化合物23 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 7.53 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.23 (dd, J = 2.1 Hz, 8.2 Hz, 1H), 7.14 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.53 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 5.41 - 5.34 (m, 2H), 4.58 - 4.49 (m, 1H), 4.35 (dd, J = 4.8 Hz, 12.4 Hz, 1H), 4.08 (dd, J = 2.7 Hz, 12.4 Hz, 1H), 2.41 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.30 (s, 9H).

【0054】

(化合物24の調製)

化合物23 (8.07 g, 15.8 mmol) をメタノール (80 mL) に溶解し、触媒量28%のナトリウムメトキシドメタノール溶液を加え、室温で一晩撹拌した。反応液にAmberlite IR-120 (H^+ form) を加えて中和後、樹脂を濾別し、濾液を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒 CHCl_3 : MeOH = 10 : 1) で精製し、化合物24 (5.29 g, 98%) を得た。

【化48】



10

20

30

40

50

化合物 24 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ = 7.60 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.23 (dd, J = 2.1 Hz, 8.2 Hz, 1H), 7.14 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 5.33 (s, 1H), 4.11 (t, J = 2.1 Hz, 1H), 4.06 - 3.97 (m, 1H), 3.79 - 3.73 (m, 4H), 2.39 (s, 3H), 1.29 (s, 9H).

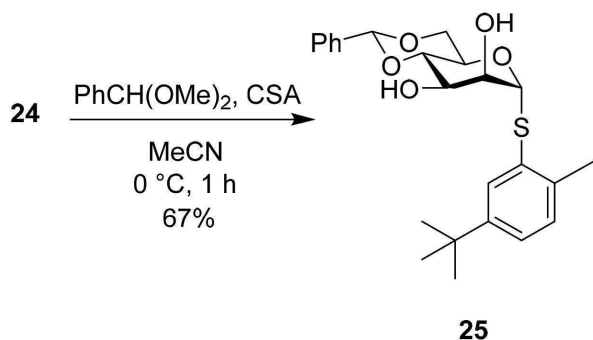
【0055】

(化合物 25 の調製)

化合物 24 (5.01 g, 14.6 mmol) をアセトニトリル (250 mL) に溶解し、ベンズアルデヒドジメチルアセタール (3.29 mL, 21.9 mmol) 及び CSA (507 mg) を順次加え、0 で 1 時間攪拌した。反応液にトリエチルアミン (1.5 mL) 加えて反応を停止させた後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒 Toluene : EtOAc = 3 : 1) で精製し、化合物 25 (4.12 g, 67%) を得た。

10

【化 49】



20

化合物 25 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 7.58 - 7.48 (m, 3H), 7.42 - 7.35 (m, 3H), 7.25 - 7.20 (m, 1H), 7.16 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.59 (s, 1H), 5.52 (s, 1H), 4.41 - 4.33 (m, 2H), 4.24 - 4.17 (m, 2H), 4.02 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 3.85 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 2.85 (s, 1H), 2.77 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 2.41 (s, 3H), 1.30 (s, 9H).

30

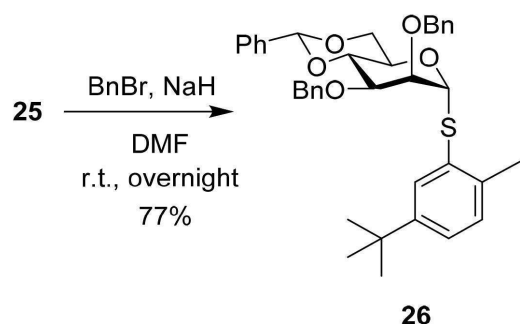
【0056】

(化合物 26 の調製)

化合物 25 (4.08 g, 9.48 mmol) を DMF (40 mL) に溶解し、水素化ナトリウム (996 mg, 22.7 mmol) 及びベンジルブロミド (2.70 mL, 22.7 mmol) を順次加え、0 で 15 分、室温で一晩攪拌した。反応液にメタノール (3 mL) を加えて過剰な試薬を分解させた後、水を加えて酢酸エチル (2 回) で抽出した。有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順に洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒 Toluene) で精製し、化合物 26 (4.46 g, 77%) を得た。

【化 50】

40



化合物 26 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 7.52 (d, J = 6.9

50

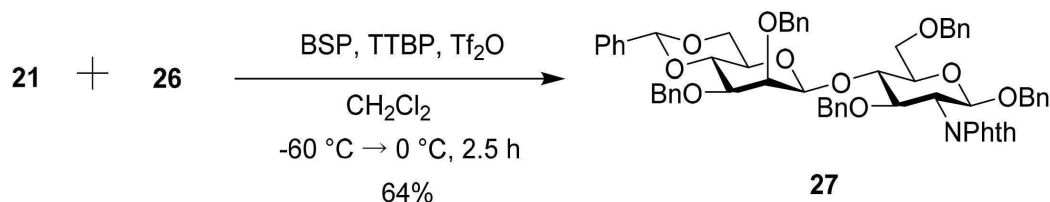
H z , 2 H) , 7 . 4 8 (d , J = 2 . 1 H z 1 H) , 7 . 4 3 - 7 . 2 7 (m , 1 3 H) , 7 . 2 2 (d d , J = 2 . 1 H z , 8 . 2 H z , 1 H) , 7 . 1 3 (d , J = 8 . 2 H z , 1 H) , 5 . 6 7 (s , 1 H) , 5 . 4 2 (s , 1 H) , 4 . 8 4 (d , J = 1 2 . 4 H z , 1 H) , 4 . 7 4 (s , 2 H) , 4 . 6 7 (d , J = 1 2 . 4 H z , 1 H) , 4 . 3 6 - 4 . 3 0 (m , 2 H) , 4 . 2 2 - 4 . 1 9 (m , 1 H) , 4 . 0 8 (d , J = 3 . 4 H z , 1 H) , 4 . 0 2 (d d , J = 3 . 4 H z , 9 . 6 H z , 1 H) , 3 . 9 1 (t , J = 9 . 6 H z , 1 H) , 2 . 3 1 (s , 3 H) , 1 . 2 9 (s , 9 H) .

【 0 0 5 7 】

(化合物 2 7 の調製)

化合物 2 6 (2 . 1 7 g , 3 . 5 5 m m o l) 、 B S P (8 1 8 m g , 3 . 9 1 m m o l) 及び T T B P (1 . 7 7 g , 7 . 1 1 m m o l) をジクロロメタン (3 6 m L) に溶解し、アルゴン雰囲気下、モレキュラーシーブス 3 A (4 . 1 1 g) を加え、 - 6 0 で 1 5 分攪拌した。その後 T f ₂ O (7 1 7 m L) を加えて 5 分攪拌した後、化合物 2 1 (1 . 6 5 g , 2 . 8 4 m m o l) のジクロロメタン (3 6 m L) 溶液を加えた。反応液を - 6 0 で 1 時間攪拌した後、室温まで 1 . 5 時間かけて昇温させた。反応液にトリエチルアミン (1 . 2 m L) を加えて反応を停止させた後、固形物をシリカゲル濾過によって濾別後、酢酸エチルで洗浄した。濾液は洗液と合わせて減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒 T o l u e n e : E t O A c = 1 0 : 1) で精製し、化合物 2 7 (1 . 8 3 g , 6 4 %) を得た。

【 化 5 1 】



化合物 2 7 ¹ H N M R (6 0 0 M H z , C D C l ₃) : = 7 . 8 3 - 7 . 4 9 (m , 4 H) , 7 . 4 9 - 7 . 4 2 (m , 4 H) , 7 . 3 9 - 7 . 2 1 (m , 1 6 H) , 7 . 1 1 - 7 . 0 3 (m , 5 H) , 6 . 9 3 - 6 . 8 9 (m , 2 H) , 6 . 8 3 - 6 . 8 0 (m , 3 H) , 5 . 5 1 (s , 1 H) , 5 . 1 1 (d , J = 8 . 2 H z , 1 H) , 4 . 8 9 - 4 . 8 2 (m , 3 H) , 4 . 8 0 (d , J = 1 2 . 4 H z , 1 H) , 4 . 7 4 (d , J = 1 2 . 4 H z , 1 H) , 4 . 6 8 (d , J = 1 2 . 4 H z , 1 H) , 4 . 5 8 (d , J = 1 2 . 4 H z , 1 H) , 4 . 5 4 (s , 1 H) , 4 . 4 9 (d , J = 1 2 . 4 H z , 1 H) , 4 . 4 1 (d , J = 1 2 . 4 H z , 1 H) , 4 . 4 0 (d , J = 1 1 . 0 H z , 1 H) , 4 . 2 6 - 4 . 1 5 (m , 3 H) , 4 . 0 7 (t , J = 9 . 6 H z , 1 H) , 4 . 0 3 (t , J = 9 . 6 H z , 1 H) , 3 . 7 4 (d , J = 2 . 7 H z , 1 H) , 3 . 6 7 (d d , J = 1 . 4 H z , 1 1 . 0 H z , 1 H) , 3 . 5 9 - 3 . 5 5 (m , 2 H) , 3 . 4 9 - 3 . 4 6 (m , 1 H) , 3 . 4 1 (d d , J = 3 . 4 H z , 1 0 . 3 H z , 1 H) , 3 . 1 4 (d t , J = 4 . 8 H z , 9 . 6 H z , 1 H) , .

【 0 0 5 8 】

(化合物 2 8 の調製)

化合物 2 7 (1 . 7 2 g , 1 . 7 0 m m o l) に 1 . 0 M B H ₃ の T H F 溶液 (1 2 . 8 m L , 1 2 . 8 m m o l) 及び 1 . 0 M n - B u ₂ B O T f のジクロロメタン溶液 (2 . 5 6 m L , 2 . 5 6 m m o l) を順次加え、 0 で 1 . 5 時間攪拌した。反応液にトリエチルアミン (1 . 5 m L) を加えて反応を停止させた後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒 T o l u e n e : E t O A c = 5 : 1) で精製し、化合物 2 8 (1 . 5 3 g , 8 9 %) を得た。

10

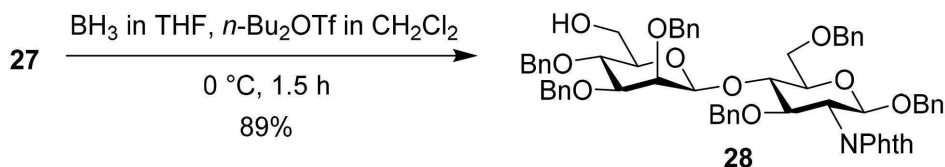
20

30

40

50

【化52】



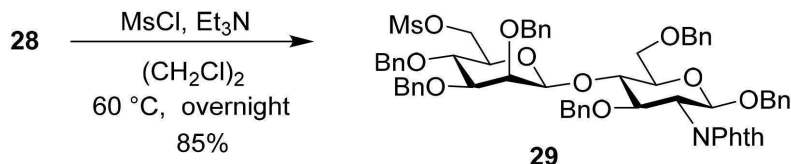
化合物 28 = 7.83 - 7.52 (m, 4H), 7.44 - 7.40 (m, 2H), 7.35 - 7.23 (m, 18H), 7.11 - 7.02 (m, 5H), 6.90 - 6.81 (m, 5H), 5.13 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.90 - 4.82 (m, 4H), 4.80 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.67 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.56 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.53 - 4.45 (m, 5H), 4.40 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.27 - 4.19 (m, 2H), 4.00 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 3.79 - 3.70 (m, 4H), 3.66 (dd, J = 3.4 Hz, 11.0 Hz, 1H), 3.58 - 3.54 (m, 1H), 3.47 - 3.41 (m, 1H), 3.36 (dd, J = 3.4 Hz, 9.6 Hz, 1H), 3.22 - 3.18 (m, 1H), 2.10 (brs, 1H).

【0059】

(化合物 29 の調製)

化合物 28 (790 mg, 782 μmol) を 1, 2 - ジクロロエタン (8 mL) に溶解し、トリエチルアミン (437 μL , 3.13 mmol) 及びメシルクロリド (121 μL , 1.56 mmol) を順次加え、60 で一晩撹拌した。反応液に水を加えて酢酸エチル (2回) で抽出した。有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒 Toluene : EtOAc = 10 : 1) で精製し、化合物 29 (720 mg, 85%) を得た。

【化53】



化合物 29 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): = 7.83 - 7.52 (m, 4H), 7.41 - 7.21 (m, 20H), 7.13 - 7.08 (m, 1H), 7.06 (d, J = 4.1 Hz, 4H), 6.84 - 6.75 (m, 5H), 5.14 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.91 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.90 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.83 (s, 2H), 4.79 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.71 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.58 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.55 (s, 1H), 4.50 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.49 - 4.43 (m, 3H), 4.37 (d, J = 13.1 Hz, 2H), 4.25 - 4.18 (m, 2H), 4.14 (dd, J = 8.2 Hz, 10.3 Hz, 1H), 4.02 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 3.79 - 3.72 (m, 3H), 3.69 (dd, J = 3.4 Hz, 11.0 Hz, 1H), 3.58 - 3.54 (m, 1H), 3.37 - 3.32 (m, 2H), 2.86 (s, 3H).

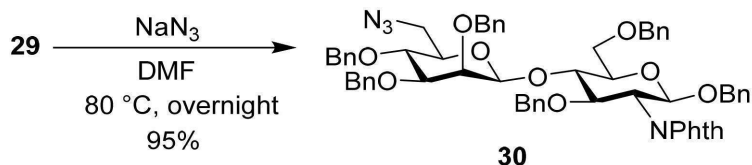
【0060】

(化合物 30 の調製)

化合物 29 (956 mg, 877 μmol) を DMF (9.5 mL) に溶解し、アジ化ナトリウム (285 mg, 4.38 mmol) を加え 80 で一晩撹拌した。反応液に水を加えて酢酸エチル (2回) で抽出した。有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒 Toluene : EtOAc

= 10 : 1) で精製し、化合物 30 (862 mg, 95%) を得た。

【化 5 4】



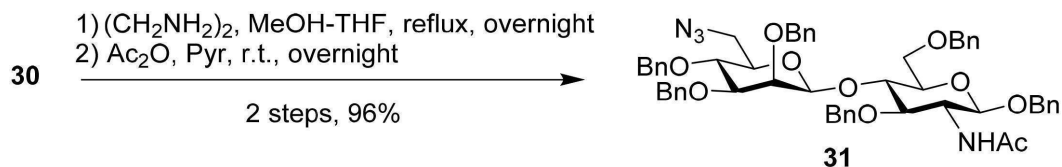
化合物 30 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): = 7.81 - 7.60 (m, 3 H), 7.46 - 7.43 (m, 3 H), 7.35 - 7.23 (m, 18 H), 7.10 - 7.01 (m, 5 H), 6.91 - 6.88 (m, 2 H), 6.77 - 6.74 (m, 3 H), 5.11 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H), 4.91 (d, $J = 11.7$ Hz, 3 H), 4.86 (d, $J = 12.4$ Hz, 1 H), 4.78 (d, $J = 12.4$ Hz, 1 H), 4.67 (d, $J = 12.4$ Hz, 1 H), 4.56 (d, $J = 11.0$ Hz, 1 H), 4.56 (s, 1 H), 4.51 - 4.41 (m, 5 H), 4.26 - 4.19 (m, 2 H), 4.05 (dd, $J = 8.2$ Hz, 9.6 Hz, 1 H), 3.82 (t, $J = 9.6$ Hz, 1 H), 3.77 (d, $J = 2.7$ Hz, 1 H), 3.72 (dd, $J = 2.1$ Hz, 11.0 Hz, 1 H), 3.65 (dd, $J = 3.4$ Hz, 11.0 Hz, 1 H), 3.55 - 3.51 (m, 1 H), 3.45 (d, $J = 12.4$ Hz, 1 H), 3.32 (dd, $J = 3.4$ Hz, 9.6 Hz, 1 H), 3.27 - 3.24 (m, 1 H), 3.22 (dd, $J = 5.5$ Hz, 12.4 Hz, 1 H).

【0061】

(化合物 31 の調製)

化合物 30 (156 mg, 150 μmol) をメタノール (4 mL) - THF (1 mL) の混合溶液に溶解し、エチレンジアミン (1 mL) を加え一晩加熱還流した。反応液を減圧濃縮し、残渣にピリジン (1 mL) 及び無水酢酸 (2 mL) を加えて室温で一晩撈拌した。反応液にメタノール (2 mL) を加えて反応を停止させた後、減圧濃縮した。残渣に水を加えて酢酸エチルで抽出した。有機相を 1 M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒 $\text{ToIuene} : \text{EtOAc} = 5 : 1$) で精製し、化合物 31 (137 mg, 96%) を得た。

【化 5 5】



化合物 31 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): = 7.39 (d, $J = 6.9$ Hz, 2 H), 7.35 - 7.22 (m, 28 H), 5.92 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H), 4.94 - 4.86 (m, 3 H), 4.85 - 4.78 (m, 3 H), 4.65 (d, $J = 11.7$ Hz, 1 H), 4.60 - 4.50 (m, 5 H), 4.47 (d, $J = 11.7$ Hz, 1 H), 4.42 (d, $J = 11.7$ Hz, 1 H), 4.04 (t, $J = 6.2$ Hz, 1 H), 3.96 (t, $J = 6.2$ Hz, 1 H), 3.85 - 3.69 (m, 6 H), 3.38 (dd, $J = 2.7$ Hz, 9.6 Hz, 1 H), 3.30 (dd, $J = 1.4$ Hz, 12.4 Hz, 1 H), 3.27 - 3.18 (m, 2 H), 1.65 (s, 3 H).

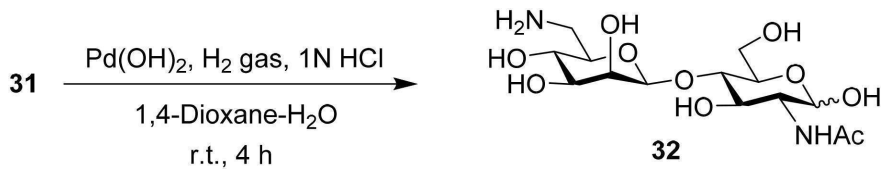
【0062】

(化合物 32 の調製)

化合物 31 (101 mg, 103 μmol) を 1, 4 - ジオキサン (10.0 mL) に溶解し、水酸化パラジウム (99.5 mg) の 1, 4 - ジオキサン (2.0 mL) の懸濁液に加えた。水 (3.0 mL) 及び 1 N 塩酸 (155 μL , 155 μmol) を加えたの

ち、水素雰囲気下、室温にて4時間攪拌した。固形物を濾別し、水で洗浄後、濾液は洗液を合わせて凍結乾燥し、化合物32(42.9mg)を得た。

【化56】



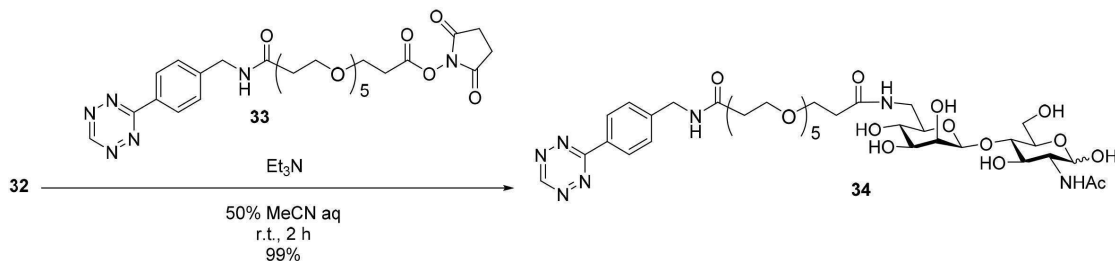
化合物32 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 7.39 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 7.33 - 7.21 (m, 2.8H), 5.80 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.92 - 4.86 (m, 4H), 4.84 - 4.79 (m, 2H), 4.63 - 4.55 (m, 4H), 4.53 - 4.44 (m, 4H), 4.03 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 3.89 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 3.79 - 3.75 (m, 2H), 3.70 - 3.61 (m, 4H), 3.38 (dd, J = 2.7 Hz, 8.9 Hz, 1H), 3.09 - 3.05 (m, 1H), 2.92 (dd, J = 2.7 Hz, 13.1 Hz, 1H), 2.61 (dd, J = 7.5 Hz, 13.1 Hz, 1H), 1.69 (s, 3H), 1.48 (br s, 2H).

【0063】

(化合物34の調製)

化合物32(42.9mg)を50%アセトニトリル水溶液(0.80mL)に溶解し、トリエチルアミン(6.96 μ L, 50.0 μ mol)及び化合物33(15.1mg, 25.0 μ mol)を順次加え、室温で2時間攪拌した。反応液に水(2.0mL)を加え凍結乾燥した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒 7.5:2.5:0.3 CHCl_3 - MeOH - H_2O)で精製し、化合物34(22.2mg, 2工程99%)を得た。

【化57】



化合物34 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ = 10.35 (s, 1H), 8.55 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 5.10 (d, J = 2.1 Hz, 0.8H), 4.64 (s, 1H), 4.58 (d, J = 8.2 Hz, 0.2H), 4.53 (s, 2H), 3.93 - 3.56 (m, 2.8H), 3.49 - 3.43 (m, 3H), 3.31 - 3.27 (m, 1H), 2.55 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 2.48 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 1.98 (s, 3H)

得られた化合物34は既存のオキサゾリン化法を用いることでオキサゾリン体へと誘導することができる。

【0064】

《実施例5》

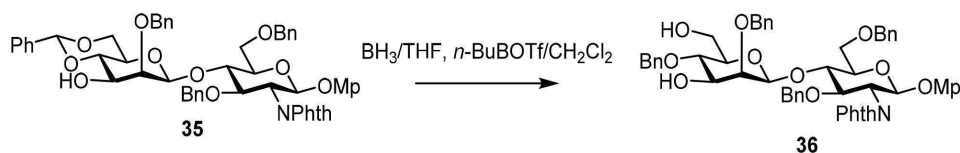
本実施例では、実施例1とは異なる工程で化合物12を調製した。

(化合物36の調製)

化合物35(4.07g, 4.35mmol)に1.0M BH_3 のTHF溶液(32.6mL, 32.6mmol)及び1.0M $n\text{-Bu}_2\text{BOTf}$ のジクロロメタン溶液(6.52mL, 6.52mmol)を順次加えアルゴン雰囲気下、0 $^\circ\text{C}$ で1時間攪拌した。反応液にトリエチルアミン(12mL)を加え反応を停止させた後、反応液を減圧濃縮し

た。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 n -ヘキサン：酢酸エチル = 3 : 2 : 1）で精製し、白色固体の化合物 36（4.08 g, 88%）を得た。

【化 5 8】

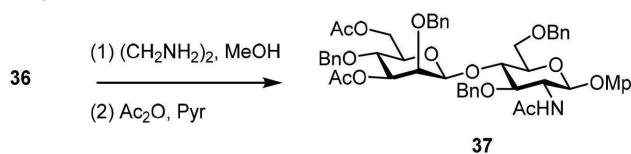


【0065】

（化合物 37 の調製）

化合物 36（3.57 g, 3.81 mmol）をメタノール（48 mL）に溶解し、エチレンジアミン（12 mL）を加え、17 時間加熱還流した。反応液を濃縮し、DMF で 3 回共沸した。残渣にピリジン（30 mL）及び無水酢酸（15 mL）を順次加え、室温で 18 時間撹拌した。反応溶液にメタノール（10 mL）を加え反応を停止させ、減圧濃縮した。残渣に水を加え酢酸エチルで 2 回抽出した。有機相を 1 M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水の順で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 n -ヘキサン：酢酸エチル = 1 : 1）で精製し、白色固体の化合物 37（3.45 g, 2 工程 97%）を得た。

【化 5 9】

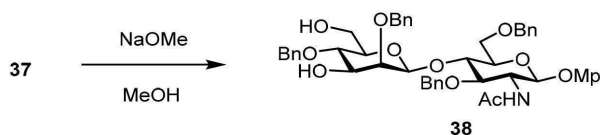


【0066】

（化合物 38 の調製）

化合物 37（3.44 g, 3.68 mmol）をメタノール（60 mL）に溶解し、触媒量の 28% ナトリウムメトキシナトリウム溶液を加え室温で 24 時間撹拌した。反応液に Amberlite IR-120（H⁺ form）を加えて中和後、樹脂を濾別し、濾液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 n -ヘキサン：酢酸エチル = 2 : 3）で精製し、白色固体の化合物 38（3.02 g, 96%）を得た。

【化 6 0】



【0067】

（化合物 39 の調製）

化合物 38（3.00 g, 3.52 mmol）及び化合物 3（7.41 g, 14.5 mmol）を DMF（15 mL）に溶解し、アルゴン雰囲気下、水素化ナトリウム（323 mg, 1.84 mmol）を加え 0 で 1 時間、室温で 20 時間撹拌した。反応液に 5% クエン酸水溶液（9.0 mL）を加え反応を停止させた後、水を加え酢酸エチルで 2 回抽出した。有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水の順で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 酢酸エチル）で精製し、無色油状の化合物 39（3.98 g, 74%）を得た。

10

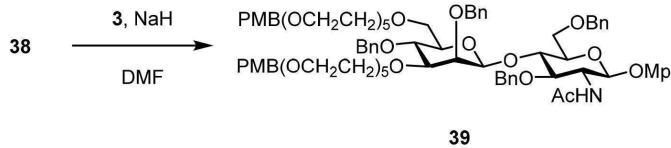
20

30

40

50

【化61】

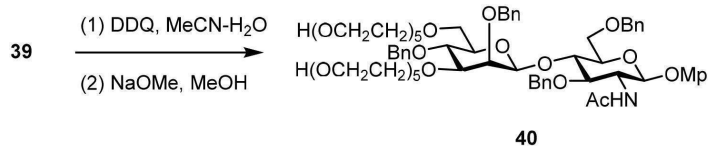


【0068】

(化合物40の調製)

化合物39 (3.98 g, 2.60 mmol) をジクロロメタン (60 mL) に溶解し、ジクロロメタン (54 mL) - TFA (5.7 mL) - 水 (0.3 mL) の混合溶媒を加え0 で2.5時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (240 mL) を加え1時間攪拌し反応を停止させた後、水を加えクロロホルムで2回抽出した。有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水の順で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣 (5.27 g) をメタノール (40 mL) に溶解し、触媒量の28%ナトリウムメトキシドナトリウム溶液を加え室温で2時間攪拌した。反応液にAmberlite IR-120 (H⁺ form) を加えて中和後、樹脂を濾別し、濾液を減圧濃縮した。残渣をシカゲルカラムクロマトグラフィ- (展開溶媒 酢酸エチル クロロホルム : メタノール = 20 : 1) で精製し、淡黄色油状の化合物40 (3.26 g, 2工程97%) を得た。

【化62】

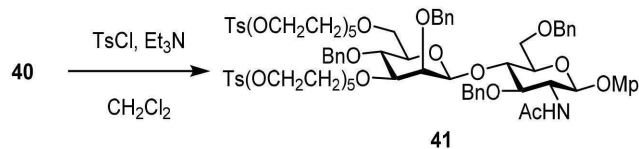


【0069】

(化合物41の調製)

化合物40 (3.26 g, 2.53 mmol) をジクロロメタン (30 mL) に溶解し、トリエチルアミン (4.24 mL, 30.3 mmol) 及びトリルクロリド (2.89 g, 15.2 mmol) を順次加え、室温で16時間攪拌した。反応液をクロロホルムで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加え抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ- (展開溶媒 クロロホルム : メタノール = 50 : 1) で精製し、黄色油状の化合物41 (3.48 g, 86%) を得た。

【化63】



【0070】

(化合物42の調製)

化合物41 (3.45 g, 2.16 mmol) を1,4-ジオキサン (50 mL) に溶解し、Pd/C (2.86 g) の1,4-ジオキサン懸濁液 (10 mL) に加えた後、水 (10 mL) 加え、水素雰囲気下、室温にて22時間攪拌した。固形物を濾別し、50% 1,4-ジオキサン水溶液で洗浄後、濾液と洗液を合わせて減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ- (展開溶媒 クロロホルム : メタノール : 水 = 9 : 1 : 0.06) で精製し、無色油状の化合物42 (2.51 g, 94%) を得た。

10

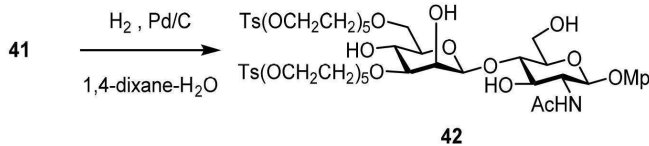
20

30

40

50

【化64】



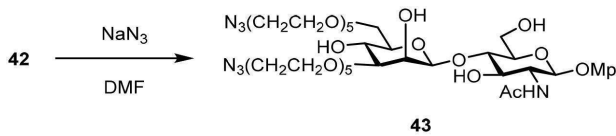
【0071】

(化合物43の調製)

化合物42 (2.41 g, 1.95 mmol) をDMF (25 mL) に溶解し、アジ化ナトリウム (1.27 g, 19.5 mmol) を加え、50 °C で20時間撹拌した。反応液を減圧濃縮した後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム:メタノール:水 = 9:1:0.06) で精製し、無色油状の化合物43 (1.76 g, 92%) を得た。

10

【化65】



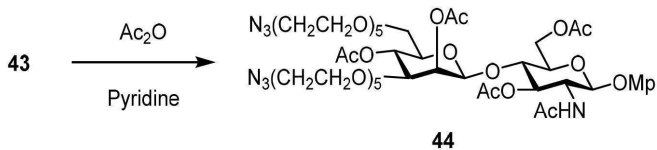
【0072】

(化合物44の調製)

化合物43 (1.75 g, 1.79 mmol) をピリジン (8.0 mL) に溶解し、無水酢酸 (4.0 mL) を加え、室温で26時間撹拌した。反応液にメタノール (8 mL) を加え過剰な試薬を分解した後、反応液を減圧濃縮した。残渣に水を加え酢酸エチルで2回抽出した。有機相を1M塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水の順で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム:メタノール:水 = 20:1) で精製し、無色油状の化合物44 (2.07, quant.) を得た。

20

【化66】



30

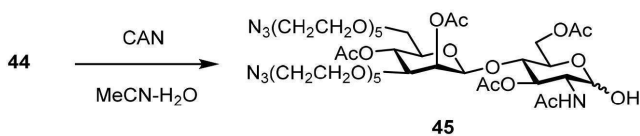
【0073】

(化合物45の調製)

化合物44 (1.50 g, 1.31 mmol) を25%アセトリル水溶液 (28 mL) に溶解し、CAN (2.15 g, 3.92 mmol) を加え、0 °C で2.5時間撹拌した。反応溶液をクロロホルムで希釈し水を加え2回分液した。有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水の順で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム:メタノール = 40:1 20:1) で精製し、橙色油状の化合物45 (900 mg, 66%) を得た。

40

【化67】



【0074】

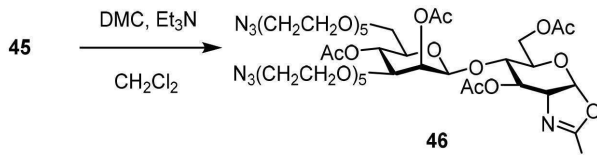
(化合物46の調製)

化合物45 (900 mg, 864 μmol) をジクロロメタン (18 mL) に溶解し、

50

トリエチルアミン (724 μL , 5.18 mmol) 及びDMC (438 mg, 2.59 mmol) を順次加え、室温で1.5時間撹拌した。反応溶液をクロロホルムで希釈し飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え5回分液した。有機相を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム : メタノール = 60 : 1 (1% トリエチルアミン入り)) で精製し、橙色油状の化合物46 (660 mg, 75%) を得た。

【化68】



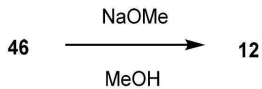
10

【0075】

(化合物12の調製)

化合物46 (16.1 mg, 27.3 μmol) をメタノール (3.0 mL) に溶解し、触媒量の28%ナトリウムメトキシナトリウム溶液を加え室温で18時間撹拌した。反応液を減圧濃縮し、淡黄色油状の化合物12を得た。

【化69】



20

【0076】

《実施例6》

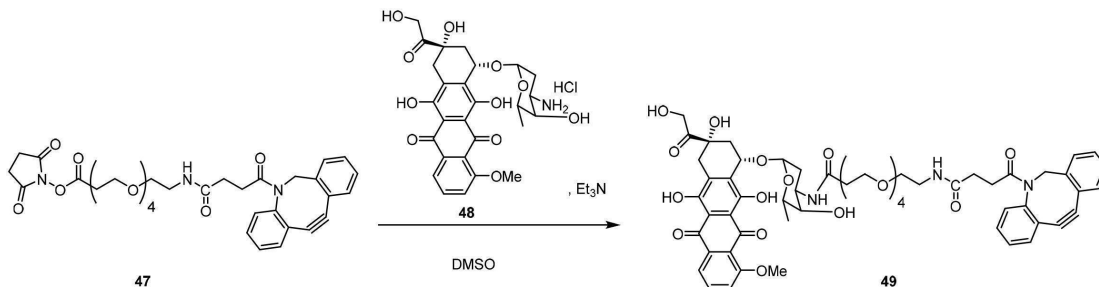
本実施例では、化合物12のアジド基に薬物を導入した。

(化合物49の調製)

化合物47の100 mM DMSO溶液 (358 μL , 38.5 μmol) にトリエチルアミン (16.1 μL , 116 μmol) 及び化合物48の100 mM DMSO溶液 (462 μL , 46.2 μmol) を順次加え室温で4時間撹拌した。反応液をシカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム : メタノール = 15 : 1) で精製した後、得られた粗生成物 (605 mg) をLH-20 (展開溶媒 メタノール) で再精製した。得られた粗生成物 (450 mg) に水を加え酢酸エチルで2回抽出した。有機相をもう一度水で洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去し褐色固体の化合物49 (28.3 mg, 68%) を得た。

30

【化70】



40

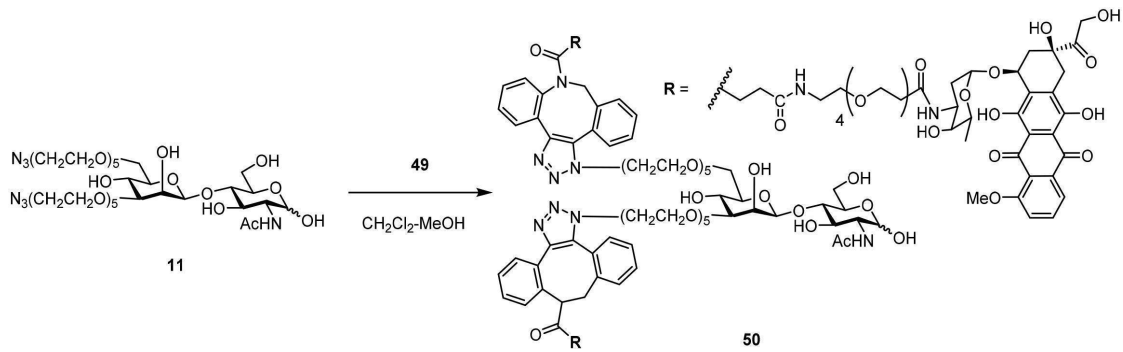
【0077】

(化合物50の調製)

化合物49の10 mM クロロホルム - メタノール溶液 (1.94 mL, 19.4 μmol) に化合物11の10 mM メタノール溶液 (242 μL , 2.42 μmol) を加え、室温で3時間撹拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣をシカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム : メタノール = 85 : 15 クロロホルム : メタノール : 水 = 8 : 2 : 0.15) で精製し、褐色固体の化合物50 (4.2 mg, 57%) を得た。

50

【化 7 1】



10

【 0 0 7 8】

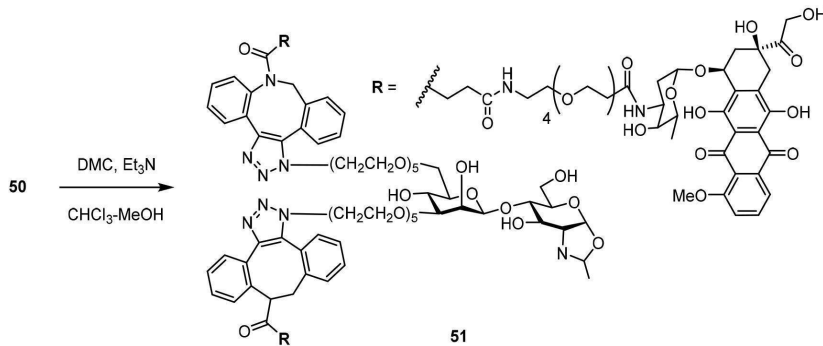
(化合物 5 1 の調製)

化合物 5 0 (3 . 1 m g , 1 . 0 2 μ m o l) を重クロロホルム (0 . 2 m L) - 重メタノール (0 . 2 m L) 混合溶媒に溶解し、2 - クロロ - 1 , 3 - ジメチルイミダゾリニウムクロリド (5 . 2 m g , 3 0 . 7 μ m o l) 及びトリエチルアミン (1 0 . 7 μ L , 7 6 . 7 μ m o l) を順次加え、0 で一晩攪拌した。反応液のMALDI - TOFMSを測定し、化合物 5 1 の生成を確認した。

MALDI - TOFMS : Calcd for $\text{C}_{148}\text{H}_{187}\text{N}_{13}\text{O}_{54}\text{Na}_m/z [\text{M} + \text{Na}]^+ : 3033.2$, Found 3031.6.

20

【化 7 2】



30

【 0 0 7 9】

《実施例 7》

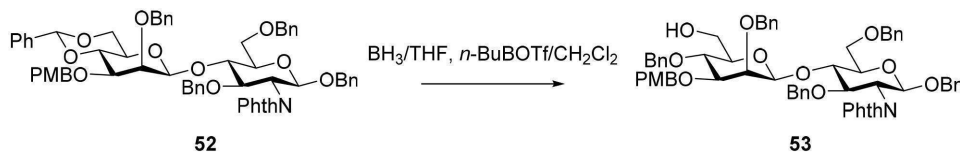
本実施例では、末端に置換されたテトラジン基を有するPEG鎖を有する糖化合物を調製した。

(化合物 5 3 の調製)

化合物 5 2 (2 . 4 6 g , 2 . 3 6 m m o l) に 1 . 0 M B H ₃ の T H F 溶液 (1 7 . 7 m L , 1 7 . 7 m m o l) 及び 1 . 0 M n - B u ₂ B O T f のジクロロメタン溶液 (3 . 3 5 m L , 3 . 3 5 m m o l) を順次加えアルゴン雰囲気下、0 で1時間攪拌した。反応液にトリエチルアミン (5 . 0 m L) を加え反応を停止させた後、反応液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 トルエン : 酢酸エチル = 4 : 1) で精製し、白色粉末の化合物 5 3 (2 . 3 2 g , 9 9 %) を得た。

40

【化 7 3】



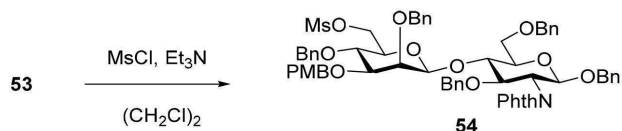
【 0 0 8 0】

(化合物 5 4 の調製)

50

化合物 53 (2.22 g, 1.13 mmol) を 1,2-ジクロロエタン (20 mL) に溶解し、トリエチルアミン (1.78 mL, 12.8 mmol) 及びメシルクロリド (495 μ L, 6.39 mmol) を順次加え、60 で 24 時間攪拌した。反応液に水を加えクロロホルムで 2 回抽出した。有機相を飽和炭酸水素ナトリウム溶液及び飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 トルエン : 酢酸エチル = 7 : 1) で精製し、白色粉末の化合物 54 (1.27 g, 62%) を得た。

【化 7 4】



10

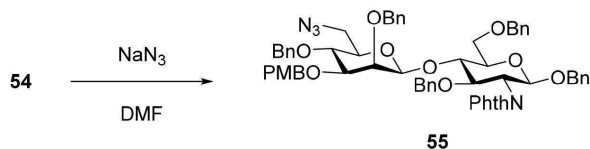
【 0 0 8 1】

(化合物 55 の調製)

化合物 54 (1.27 g, 1.13 mmol) を DMF (13 mL) に溶解し、アジ化ナトリウム (368 mg, 5.67 mmol) を加え、80 で 15 時間攪拌した。反応液に水を加え酢酸エチルで 2 回抽出した。有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水の順で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 トルエン : 酢酸エチル = 8 : 1) で精製し、白色粉末の化合物 55 (1.11 g, quant.) を得た。

20

【化 7 5】



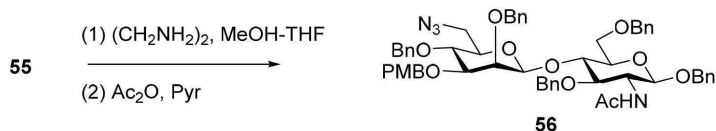
【 0 0 8 2】

(化合物 56 の調製)

化合物 55 (1.16 g, 1.09 mmol) をメタノール (12 mL) - THF (3.0 mL) 混合溶媒に溶解し、エチレンジアミン (3.0 mL) を加え、18 時間加熱還流した。反応液を減圧濃縮し、DMF で 3 回共沸した。残渣にピリジン (4.5 mL) 及び無水酢酸 (3.0 mL) を順次加え、室温で 18 時間攪拌した。反応液にメタノール (4.5 mL) を加え反応を停止させ、減圧濃縮した。残渣に水を加え酢酸エチルで 2 回抽出した。有機相を 1 M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水の順で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 トルエン : 酢酸エチル = 3 : 1) で精製し、白色固体の化合物 56 (1.08 g, 2 工程 98%) を得た。

30

【化 7 6】



40

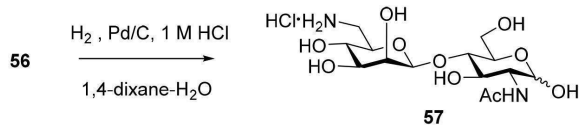
【 0 0 8 3】

(化合物 57 の調製)

化合物 56 (195 mg, 199 μ mol) を 1,4-ジオキサン (10 mL) に溶解し、Pd/C (128 mg) の 1,4-ジオキサン懸濁液 (2.0 mL) に加えた後、水 (10 mL) 及び 1 M 塩酸 () を順次加え、水素雰囲気下、室温にて 21 時間攪拌した。固形物を濾別し、50% 1,4-ジオキサン水溶液で洗浄後、濾液と洗液を合わせて減圧濃縮し化合物 57 (79.0 mg) を得た。

50

【化 7 7】



【0084】

(化合物 59 の調製)

12-ヒドロキシ-4,7,10-トリオキサドデカン酸 tert-ブチル (化合物 58) (204 mg, 0.73 mmol) をジクロロメタン (7 mL) に溶解し、トリエチルアミン (305 μL , 2.19 mmol)、トシルクロリド (419 mg, 2.19 mmol) を順次加え、室温で 18 時間攪拌させた。反応液をクロロホルムで希釈したのち、5%クエン酸水溶液、飽和食塩水にて洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を DMF (7 mL) に溶解し、アジ化ナトリウム (233 mg, 3.60 mmol) を加え 65 $^{\circ}\text{C}$ で 18 時間攪拌した。反応液をクロロホルムで希釈した後、水、飽和食塩水の順洗浄し、無水マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒 n-ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 1) で精製し、無色油状の化合物 59 (209 mg, 96%) を得た。

10

【化 7 8】



20

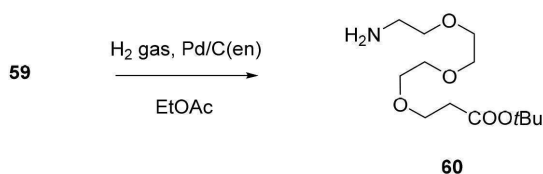
【0085】

(化合物 60 の調製)

化合物 59 (185 mg, 0.61 mmol) を酢酸エチル (8 mL) に溶解し、パラジウム-活性炭素エチレンジアミン複合体 (167 mg) を加え、水素雰囲気下室温で 1 時間攪拌した。反応液をセライトろ過し、溶媒を減圧留去したところ定量的に化合物 60 を得た。

30

【化 7 9】



【0086】

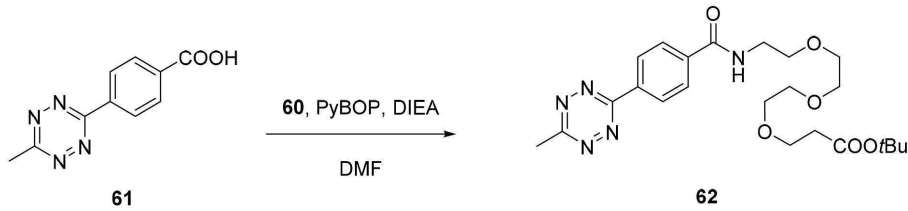
(化合物 62 の調製)

化合物 61 (84.0 mg, 0.39 mmol) を DMF (4 mL) に溶解し、DIEA (82 μL , 0.47 mmol) 及び PyBOP (243 mg, 0.47 mmol) を順次加え 10 分間室温で攪拌した後、化合物 60 (107 mg, 0.39 mmol) を加え室温で 18 時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈したのち、飽和炭酸ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒 n-ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 5) で精製し、赤色固体の化合物 62 (132 mg, 71%) を得た。

40

50

【化 8 0】



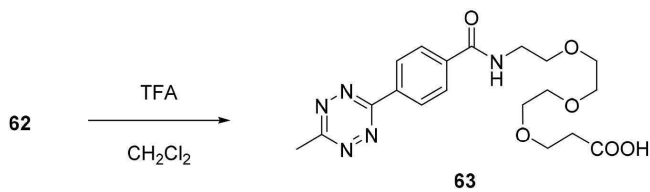
【0 0 8 7】

(化合物 6 3 の調製)

化合物 6 2 (6 2 . 2 m g , 1 3 7 μ m o l) をジクロロメタン (2 . 0 m L) に溶解し、トリフルオロ酢酸 (0 . 2 m L) を加え、室温で 4 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、トルエンを加え 3 回共沸した。残渣をシカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム : メタノール : 水 = 9 : 1 : 0 . 0 6) で精製し、桃色固体の化合物 6 3 (5 4 . 1 m g , 9 4 %) を得た。

10

【化 8 1】



20

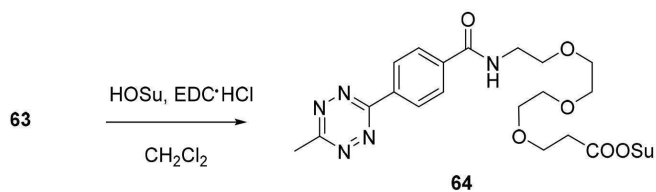
【0 0 8 8】

(化合物 6 4 の調製)

化合物 6 3 (5 2 . 6 m g , 1 2 5 μ m o l) をジクロロメタン (3 . 8 m L) に溶解し、1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩 (5 2 . 9 m g , 2 7 6 μ m o l) 及び H O S u (1 9 . 5 m g , 1 6 9 μ m o l) を順次を加え、室温で 1 6 時間攪拌した。反応液に水を加え酢酸エチルで 2 回抽出した。有機相を 5 % クエン酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去し、桃色固体の化合物 6 4 (6 3 . 3 m g , 8 6 % (N M R 収率)) を得た。

30

【化 8 2】



【0 0 8 9】

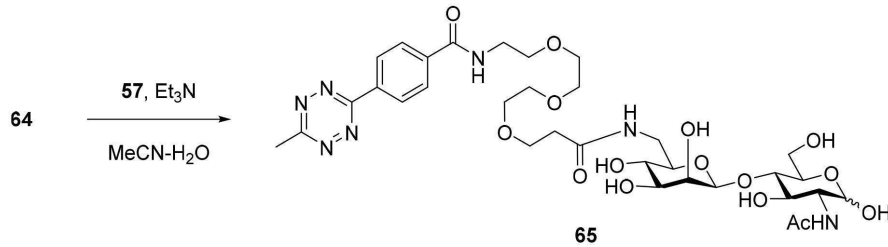
(化合物 6 5 の調製)

化合物 5 7 (7 9 . 0 m g , 1 8 9 μ m o l) を水 (0 . 8 5 m L) に溶解し、トリエチルアミン (1 3 . 3 μ L , 9 4 . 5 μ m o l) 及び化合物 6 4 (2 4 . 4 m g , 4 7 . 2 μ m o l) のアセトニトリル溶液 (0 . 8 m L) を順次加え、室温で 2 時間攪拌した。反応液に水 (3 m L) を加え、凍結させた後、凍結乾燥した。残渣をシカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム ; メタノール : 水 = 8 : 2 : 0 . 1 5 7 : 3 : 0 . 3) で精製し、桃色固体の化合物 6 5 (2 8 . 7 m g , 7 8 %) を得た。

40

50

【化 8 3】



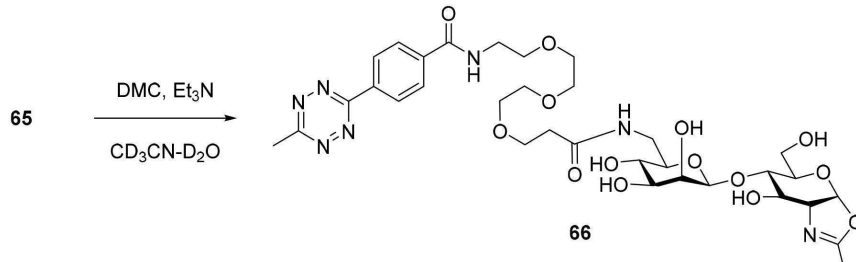
【0090】

(化合物66の調製)

化合物65 (3.1 mg, 3.96 μmol) を重アセトニトリル (0.20 mL) - 重水 (0.10 mL) 混合溶媒に溶解し、2-クロロ-1,3-ジメチルイミダゾリニウムクロリド (20.0 mg, 119 μmol) 及びトリエチルアミン (41.5 μL , 297 μmol) を順次加え、0 で一晩撹拌した。反応液のMALDI-TOFMSを測定し、化合物66の生成を確認した。

MALDI-TOFMS: Calc'd for $\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{Na}m/z [M+Na]^+$: 788.3, Found 788.7.

【化 8 4】



【0091】

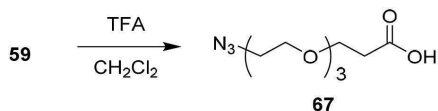
《実施例8》

本実施例では、末端にアジド基及び置換されたテトラジン基を有するPEG鎖を有する分岐状の糖化合物を作製した。

(化合物67の調製)

化合物59 (557 mg, 1.83 mmol) をジクロロメタン (25 mL) に溶解し、氷冷下にトリフルオロ酢酸 (2.6 mL, 34 mmol) を加え、室温で3時間撹拌した。反応液にトルエンを加えて濃縮したのち、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 ヘキサン: 酢酸エチル = 1:2) で精製し、化合物67 (375 mg, 83%) を得た。

【化 8 5】

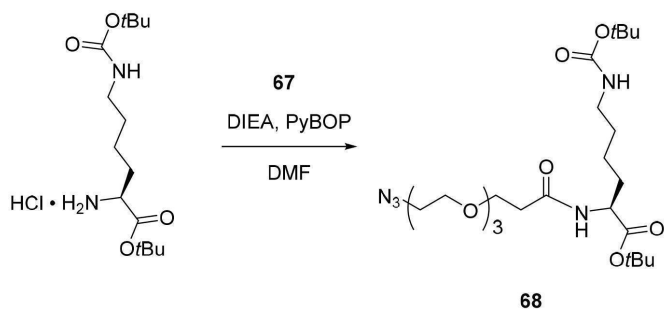


【0092】

(化合物68の調製)

H-Lys(Boc)-OtBu塩酸塩 (122 mg, 0.36 mmol) 及び化合物67 (89 mg, 0.36 mmol) をDMF (4 mL) に溶解し、DIEA (138 μL , 0.79 mmol) 及びPyBOP (255 mg, 0.43 mmol) を順次加え、室温で18時間撹拌させた。反応液を酢酸エチルで希釈し、飽和炭酸ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒 n-ヘキサン: 酢酸エチル = 1:3) で精製し、白色固体の化合物68 (172 mg, 90%) を得た。

【化 8 6】



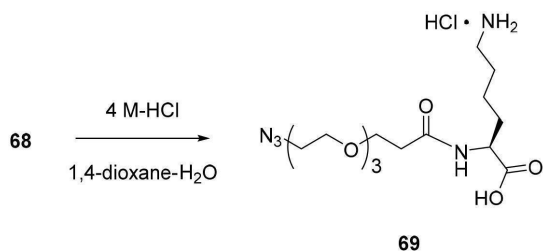
10

【0093】

(化合物 69 の調製)

化合物 68 (170 mg, 0.32 mmol) を 4 M 塩化水素 - 1,4 - ジオキサン溶液 (4 mL) に溶解し、室温にて 4 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、凍結乾燥し、無色油状の化合物 69 (128 mg, 98%) を得た。

【化 8 7】



20

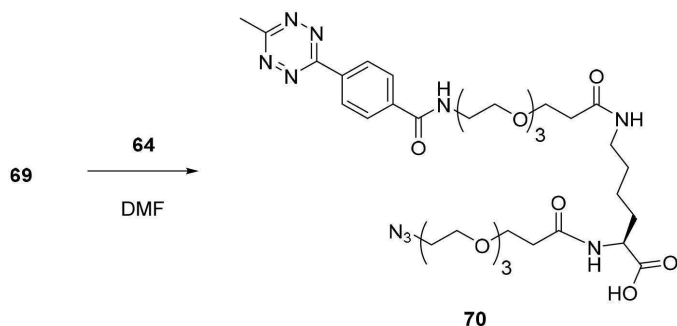
【0094】

(化合物 70 の調製)

化合物 69 (270 mg, 0.43 mmol) 及び化合物 64 (182 mg, 0.44 mmol) を DMF (5 mL) に溶解し、トリエチルアミン (178 μL, 1.28 mmol) を加え、室温にて 3 時間攪拌した。反応液を減圧留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム : メタノール : 水 = 10 : 1 : 0.06) で精製し、桃色固体の化合物 70 (347 mg, 96%) を得た。

30

【化 8 8】



40

【0095】

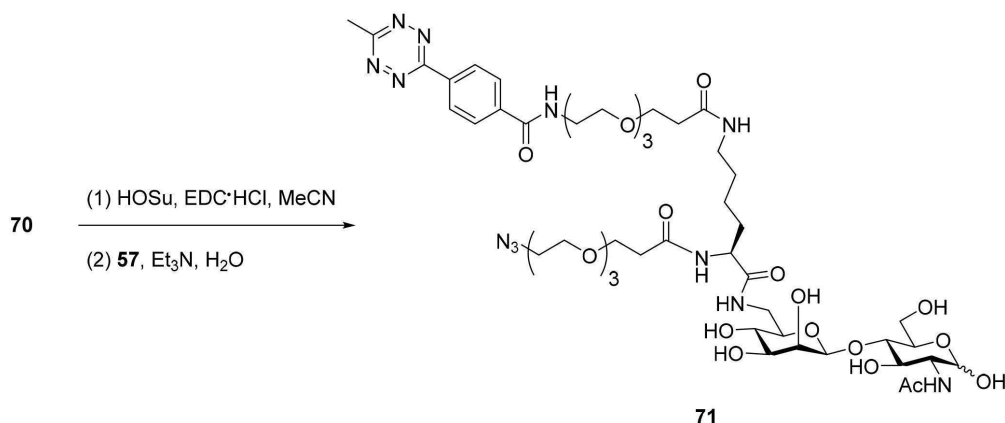
(化合物 71 の調製)

化合物 70 (10.4 mg, 13.3 μmol) をアセトニトリル (0.5 mL) に溶解し、HOSu (2.2 mg, 19.1 μmol) 及び 1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩 (3.8 mg, 19.8 μmol) を順次加え、室温で一晩攪拌した。反応液に更に HOSu (1.1 mg, 9.6 μmol) 及び 1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩 (1.9 mg, 9.9 μmol) を順次追加し、室温で 5 時間攪拌した。反応液に化合物 57 (5.0 mg, 13.3 μmol) の水溶液 (150 μL) 及びトリエチルアミン (3.7 μL, 26.6 μmol) を順次加え室温で一晩攪拌した。反応液に凍結乾燥した後、残渣をシリカゲル

50

クロマトグラフィー（展開溶媒 クロロホルム：メタノール = 80 : 20 70 : 30）で精製し、桃色固体の化合物 71（3.1 mg, 20%）を得た。

【化 89】



10

【0096】

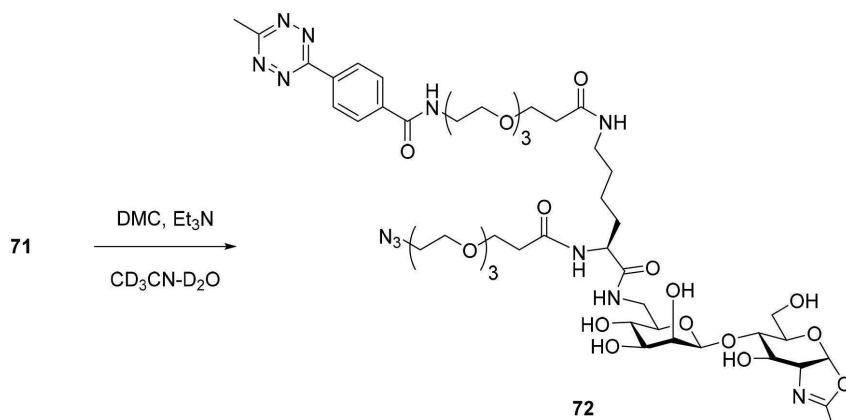
（化合物 72 の調製）

化合物 71（3.1 mg, 2.72 μmol）を重アセトニトリル（0.10 mL） - 重水（0.10 mL）混合溶媒に溶解し、2-クロロ-1,3-ジメチルイミダゾリニウムクロリド（13.8 mg, 81.5 μmol）及びトリエチルアミン（28.5 μL, 204 μmol）を順次加え、0 で一晩撹拌した。反応液のMALDI-TOFMSを測定し、化合物 72 の生成を確認した。

20

MALDI-TOFMS : Calcd for C₄₈H₇₄N₁₂O₁₉Na_m/z [M + Na]⁺ : 1145.5, Found 1146.3.

【化 90】



30

【0097】

《実施例 9》

本実施例では、末端にアジド基を有する PEG 鎖を有する糖化合物を作製した。

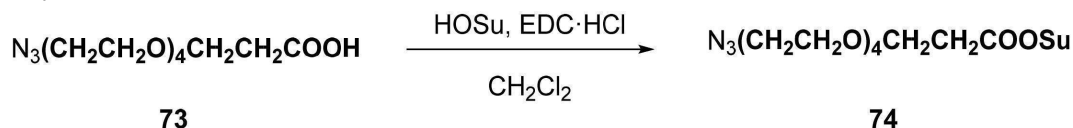
40

（化合物 74 の調製）

化合物 73（55.9 mg, 192 μmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、N-ヒドロキシスクシンイミド（39.0 mg, 339 μmol）、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩（64.7 mg, 338 μmol）を順次加え、室温で一晩撹拌した。反応液に水を加え、クロロホルムで 2 回抽出した。有機相を水、飽和食塩水の順で洗浄後、無水硫酸マグネシウムを加え乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去し、化合物 74（72.4 mg, 97%）を得た。

50

【化 9 1】

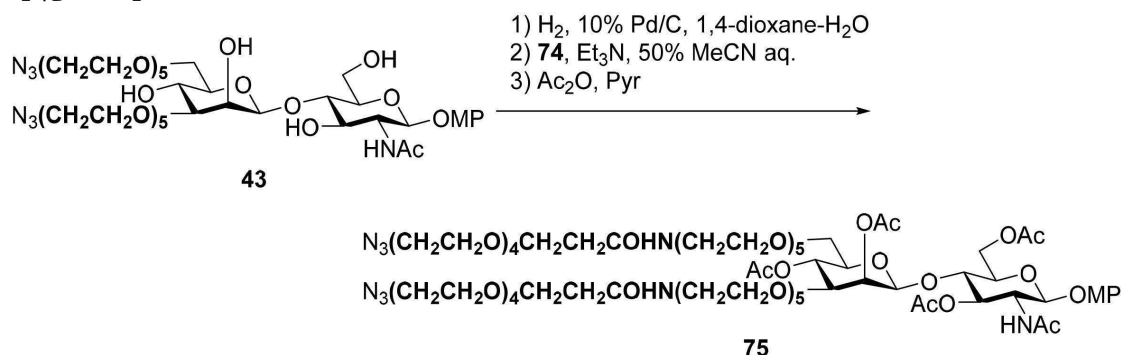


【0098】

(化合物 75 の調製)

化合物 43 (45.2 mg, 46.1 μmol) をジオキサン (1 mL) に溶解し、10% パラジウム活性炭 (29.47 mg) の 1, 4 - ジオキサン 懸濁液 (3 mL) を加えたのち、水 (1 mL) を加えた。水素雰囲気下、室温にて一晩攪拌した。固形物を濾別し、50% 1, 4 - ジオキサン 水溶液で洗浄後、濾液と洗液を合わせて減圧濃縮した。得られた残渣に、化合物 74 (72.4 mg, 186 μmol) の 50% アセトニトリル水溶液 (1.6 mL)、トリエチルアミン (54 μL, 390 μmol) を加えた。室温で一晩攪拌したのち、反応液に水 (2.0 mL) を加え凍結乾燥した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 CHCl₃ - MeOH - H₂O = 9 : 1 : 0.06) で精製した。精製物をピリジン (3 mL) 及び無水酢酸 (1.5 mL) を加えて室温で一晩攪拌した。反応液にメタノール (4 mL) を加えて反応を停止させた後、減圧濃縮した。トルエン (4 mL) による共沸を 5 回繰り返したのち、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒 CHCl₃ - MeOH - H₂O = 15 : 1 : 0.04) で精製し、化合物 75 (30.4 mg, 3 工程 40%) を得た。

【化 9 2】

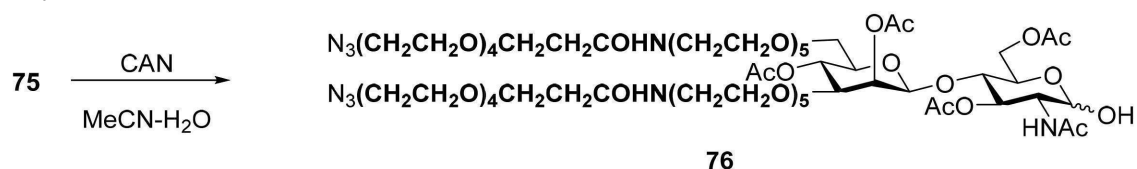


【0099】

(化合物 76 の調製)

化合物 75 (8.7 mg, 5.3 μmol) をアセトニトリル (2 mL) に溶解し、0 °C で水 (0.5 mL) 及び硝酸アンモニウムセリウム (IV) (11.2 mg, 21 μmol) 加え、1.5 時間、次いで室温で 2 時間攪拌した。更に、反応液に硝酸アンモニウムセリウム (IV) (10.5 mg, 19 μmol) 加え、0 °C で 1.5 時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えクロロホルムで 2 回抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムを加え乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 CHCl₃ - MeOH - H₂O = 9 : 1 : 0.06) で精製し、化合物 76 (4.6 mg, 57%) を得た。

【化 9 3】



【0100】

(化合物 77 の調製)

10

20

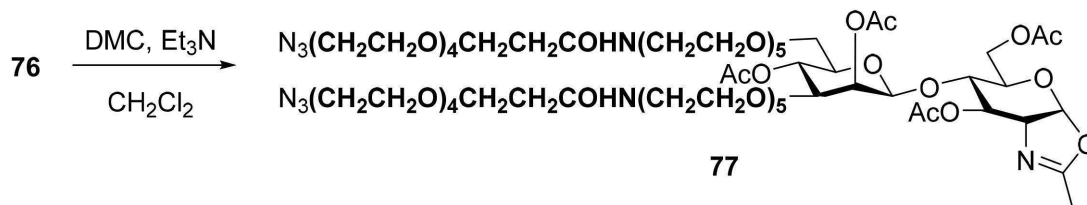
30

40

50

化合物 76 (4.6 mg, 3.0 μmol) をジクロロメタン (1 mL) に溶解し、トリエチルアミン (20 μL, 140 μmol) 及び 2-クロロ-1,3-ジメチルイミダゾリニウムクロリドのジクロロメタン溶液 (0.2 M, 180 μL, 36 μmol) を加え、室温で 2 時間撹拌した。反応液に水を加え、クロロホルムで 2 回抽出した。有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄後、硫酸マグネシウムを加え乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 CHCl₃ - MeOH - H₂O = 20 : 1 : 0.2) で精製し、化合物 77 (4.0 mg, 89%) を得た。

【化 9 4】



10

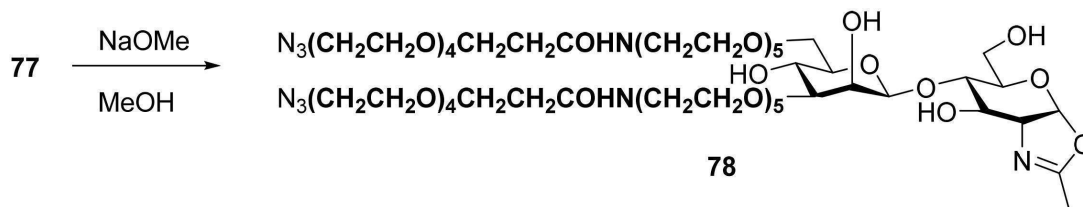
【0101】

(化合物 78 の調製)

化合物 77 (4.0 mg, 2.6 μmol) をメタノール (1 mL) に溶解し、0 °C でナトリウムメトキシド (0.5 mol/L メタノール溶液, 2 μL, 1 μmol) を加えた後、水 (5 mL) を加え、1 時間、次いで室温で 1 時間撹拌した。溶媒を減圧留去したのち、MALDI-TOFMS を測定し、化合物 78 の存在を確認した。

20

【化 9 5】



78

化合物 78 MALDI-TOFMS : [M + Na] + m/z 1372.4 (calcd 1372.7).

30

【0102】

《実施例 10》

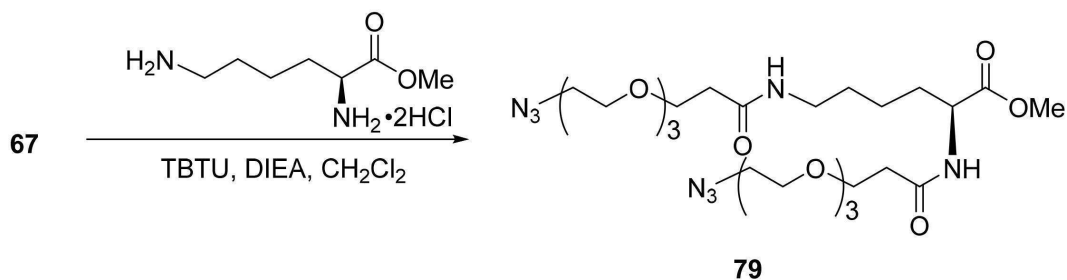
本実施例では、末端にアジド基を有する PEG 鎖を有する分岐状の糖化合物を作製した。(化合物 79 の調製)

化合物 67 (305 mg, 1.23 mmol) に L-リジンメチルエステル二塩酸塩 (108 mg, 462 μmol) 及びジクロロメタン (1.6 mL) を加えた。この溶液に氷冷下、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.45 mL, 3.2 mmol) 及び 1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-ベンゾトリアゾリウム 3-オキシドテトラフルオロボラート (390 mg, 1.21 mmol) を加え、室温で一晩撹拌した。反応液を濃縮したのち、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム : メタノール = 60 : 1) で精製した。精製物をクロロホルムに溶解し、有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄後、無水硫酸マグネシウムを加え乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去し、化合物 79 (283 mg, 98%) を得た。

40

50

【化96】

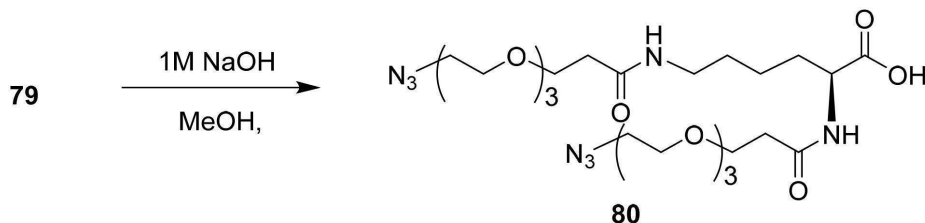


【0103】

(化合物80の調製)

化合物79 (103 mg, 167 μmol) をメタノール (3.0 mL) に溶解し、氷冷下に 1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (194 μL) を加え、室温で 5 時間攪拌した。反応液を水で抽出し、ジエチルエーテルで洗浄した。水相に 1 M 塩酸水溶液を加え、pH を 1 にしたのち、酢酸エチル及びクロロホルムで抽出し、有機相に無水硫酸マグネシウムを加え乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去し、化合物80 (71.7 mg, 72%) を得た。

【化97】

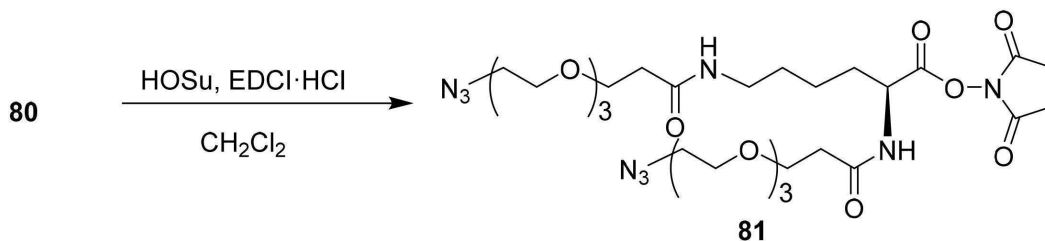


【0104】

(化合物81の調製)

化合物80 (52 mg, 86 μmol) をジクロロメタン (0.86 mL) に溶解し、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (36.5 mg, 190 μmol) 及び N-ヒドロキシスクシンイミド (13.4 mg, 116 μmol) を加え、室温で一晩攪拌した。反応液に水を加え、クロロホルムで 2 回抽出した。有機相を飽和塩化アンモニウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄後、無水硫酸マグネシウムを加え乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去し、化合物81 (52.3 mg, 87%) を得た。

【化98】



【0105】

(化合物82の調製)

化合物56 (88.0 mg, 91.2 μmol) を 1,4-ジオキサン (10.8 mL) に溶解し、水酸化パラジウム (89 mg)、水 (2.64 mL)、1 M 塩酸 (136 μL) の順に加え、水素雰囲気下、室温にて一晩攪拌した。固形物を濾別し、50% 1,4-ジオキサン水溶液で洗浄後、濾液と洗液を合わせて減圧濃縮した。得られた残渣と、化合物81 (52.3 mg, 74.5 μmol) を 50% アセトニトリル水溶液 (0.8 mL) に溶解し、トリエチルアミン (20 μL , 144 μmol) を加え、室温で 5 時間攪

10

20

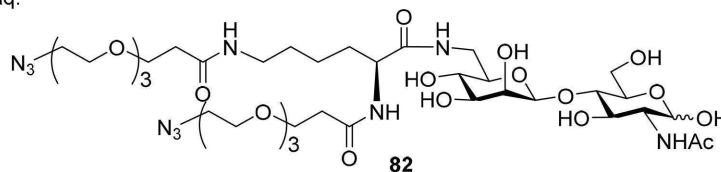
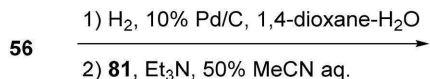
30

40

50

拌した。反応液に水を加え、凍結乾燥したのち残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 クロロホルム：メタノール：水 = 7.5 : 2.5 : 0.3）で精製し、化合物 82（22.7 mg, 38%）を得た。

【化 99】



10

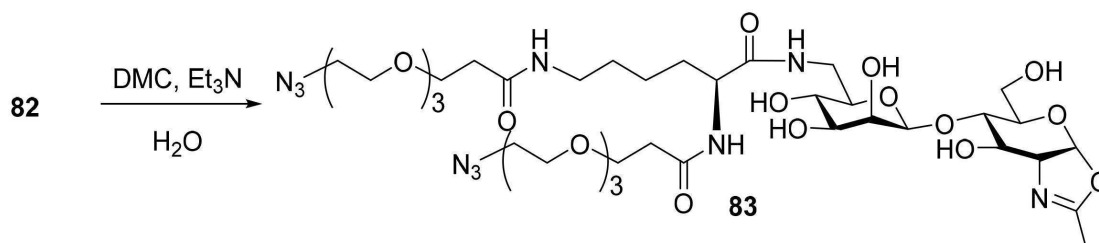
【0106】

（化合物 83 の調製）

化合物 82（11.4 mg, 11.8 μmol）を水（0.482 mL）に溶解し、氷冷下で 0.757 M の 2-クロロ-1,3-ジメチルイミダゾリニウムクロリド水溶液（0.482 mL, 365 μmol）及びトリエチルアミン（235 μL, 1.70 mmol）を加え、室温で 18 時間攪拌した。反応液に水を加え、凍結乾燥したのち残渣をゲルろ過クロマトグラフィー（展開溶媒 0.05% トリエチルアミン水溶液）で精製し、化合物 HM9 を含む溶出液に 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液（129 μL, 12.9 μmol）を加えた。この溶液を凍結乾燥し、化合物 83 と水酸化ナトリウム、そしてトリエチルアミンの混合物を 22.0 mg 得た。1H-NMR スペクトルからオキサゾリンの構造を確認し、その積分値から化合物 83 の量を算出し、化合物 HM9（9.2 mg, 83%）を得た。

20

【化 100】



30

化合物 83 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ = 6.14 (d, J = 6.14 Hz, 1H).

【0107】

《実施例 11》

本実施例では、末端に 3 つのアジド基を有する糖化合物を作製した。

（化合物 84 の調製）

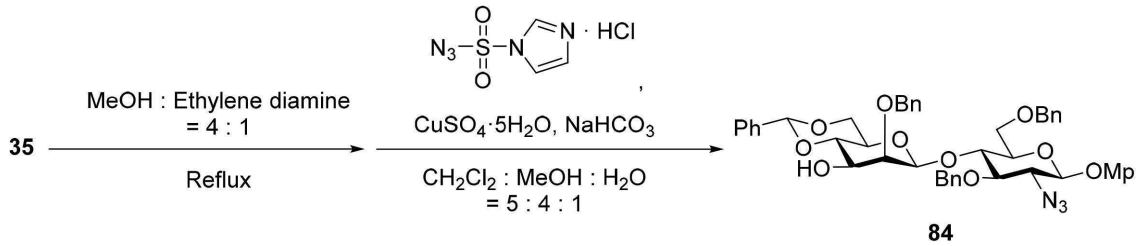
化合物 35（797.4 mg, 852 μmol）をメタノール（6.80 mL）に溶解し、室温でエチレンジアミン（1.70 mL）を加えた。反応液を加熱還流下で 17 時間攪拌し、反応液をジメチルホルムアミドで希釈し、溶媒を減圧留去した。ジメチルホルムアミドで 3 回共沸し、残渣を真空乾燥することで、粗生成物を得た。この粗生成物をメタノール（6.82 mL）と精製水（1.70 mL）に溶解し、室温で炭酸水素ナトリウム（218.3 mg, 2.60 mmol）と硫酸化銅・五水和物（45.2 mg, 181 μmol），イミダゾール-1-スルホニルアジド塩酸塩（271.3 mg, 1.29 mmol），ジクロロメタン（8.52 mL）を順次加えた。反応液を室温で 1 時間半攪拌し、硫酸化銅・五水和物（44.4 mg, 178 μmol）を加えた。反応液を室温で 18 時間攪拌し、炭酸水素ナトリウム（152.3 mg, 1.81 mmol）と、イミダゾール-1-スルホニルアジド塩酸塩（359.3 mg, 1.71 mmol）を加えた。反応液を室温で 3 時間攪拌し、反応液をクロロホルムで希釈し、1 M 塩酸水溶液を加え、クロロホルムで 3 回抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、クロロホルム

40

50

ムで3回抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 トルエン：酢酸エチル = 7 : 1）で精製し、無色固体の化合物84（641.8 mg, 91%）を得た。

【化101】



10

化合物84 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) : 7.46 (dd, $J = 7.2, 1.7$ Hz, 2H), 7.42 - 7.27 (m, 18H), 7.06 - 7.02 (m, 2H), 6.85 - 6.81 (m, 2H), 5.45 (s, 1H), 5.08 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.93 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.72 - 4.67 (m, 3H), 4.66 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 4.61 (s, 1H), 4.47 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 4.09 (dd, $J = 10.3, 4.8$ Hz, 1H), 4.06 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.76 - 3.71 (m, 2H), 3.70 - 3.65 (m, 3H), 3.57 (td, $J = 9.3, 3.2$ Hz, 1H), 3.49 (t, $J = 10.3$ Hz, 1H), 3.47 - 3.44 (m, 1H), 3.41 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H), 3.10 (td, $J = 9.6, 4.8$ Hz, 1H), 2.33 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H).

MALDI-TOFMS (AXIMA-TOF²) m/z [M+Na]⁺ calculated for $\text{C}_{47}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{Na}$, 854.3, found 854.2.

20

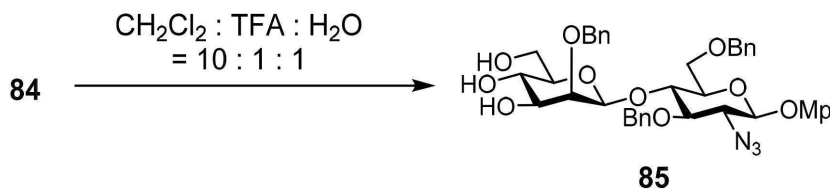
【0108】

(化合物85の調製)

化合物84 (460.1 mg, 553.4 μmol) をジクロロメタン (4.61 mL) に溶解し、室温で精製水 (461 μL) を加え、氷冷下でトリフルオロ酢酸 (461 μL) を加えた。反応液を室温で20時間攪拌し、反応液をクロロホルムで希釈し、飽和炭酸ナトリウム水溶液を加え、クロロホルムで3回抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（トルエン：酢酸エチル = 1 : 2）で精製し、無色固体の化合物85 (379.8 mg, 92%) を得た。

30

【化102】



40

化合物85 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) : 7.38 - 7.27 (m, 15H), 7.06 - 7.01 (m, 2H), 6.85 - 6.80 (m, 2H), 5.06 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.97 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.71 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 4.69 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 4.57 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.52 (s, 1H), 4.49 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 4.00 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.76 (dd, $J = 11.0, 2.1$ Hz, 1H), 3.71 - 3.63 (m, 3H), 3.61 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 3.55 - 3.49 (m, 2H), 3.43 - 3.36 (m, 2H), 3.22 (td, $J = 8.9, 2.7$ Hz, 1H), 3.05 - 3.02 (m, 1H), 2.37 (s, 1H), 2.35 (s, 1H), 2.25 (d, $J = 1$

50

0.3 Hz, 1H).

MALDI-TOFMS (AXIMA-TOF²) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₄₀H₄₅N₃O₁₁Na, 766.3, found 765.5.

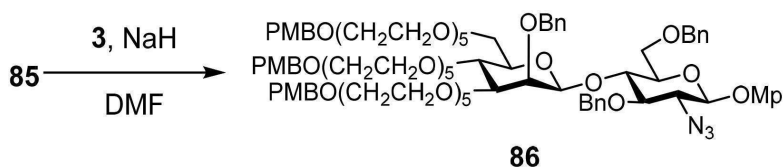
【0109】

(化合物86の調製)

化合物85 (379.8 mg, 511 μmol) と化合物3 (1.576 g, 3.07 mmol) をトルエンで3回共沸後、真空乾燥した後、ジメチルホルムアミド (5.10 mL) に溶解し、水素化ナトリウム (370.1 mg, 8.49 mmol, 45% oil complex) を加えた。反応液を室温で20時間半攪拌し、反応液を酢酸エチルで希釈し、1 M塩酸水溶液を加え、酢酸エチルで3回抽出した。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム:メタノール=50:1) で粗精製した。得られた混合物をゲルろ過クロマトグラフィー (展開溶媒 メタノール) で精製し、無色油状の化合物86 (775.8 mg, 86%) を得た。

10

【化103】



20

化合物86 ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) : 7.40 - 7.20 (m, 2H), 7.04 - 7.01 (m, 2H), 6.88 - 6.84 (m, 6H), 6.82 - 6.79 (m, 2H), 5.15 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.84 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.76 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 4.67 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.67 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.50 - 4.47 (m, 7H), 4.45 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 3.97 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 3.94 - 3.90 (m, 1H), 3.81 - 3.76 (m, 10H), 3.73 - 3.57 (m, 56H), 3.56 - 3.52 (m, 4H), 3.52 - 3.49 (m, 4H), 3.48 - 3.42 (m, 3H), 3.42 - 3.39 (m, 3H), 3.22 (ddd, J = 9.6, 6.2, 1.4 Hz, 1H), 3.13 (dd, J = 9.6, 2.7 Hz, 1H).

30

MALDI-TOFMS (AXIMA-TOF²) m/z [M+Na]⁺ calcd for C₉₄H₁₂₉N₃O₂₉Na, 1786.9, found 1786.3.

【0110】

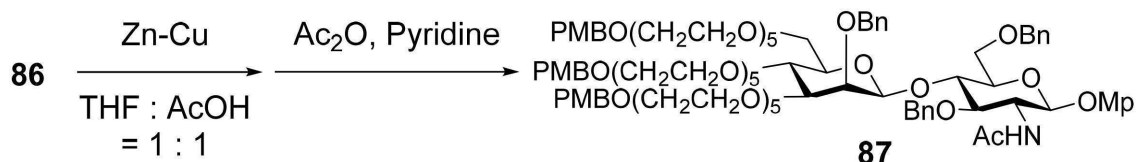
(化合物88の調製)

亜鉛粉末を水に懸濁させ、30分超音波洗浄したのち、2%硫酸銅水溶液を加えて攪拌した。沈殿を濾取した後、風乾させてZn-Cu complexを調製した。化合物86 (635.0 mg, 359.8 μmol) をテトラヒドロフラン (18.0 mL) と酢酸 (18.0 mL) に溶解し、Zn-Cu complex (1.19 g) を添加した。反応液を室温で2時間攪拌し、トルエンで希釈し、固体を濾別後、溶媒を減圧留去し、真空乾燥することで残渣を得た。この残渣を無水酢酸 (4.0 mL) とピリジン (4.0 mL) に溶解した。反応液を室温で18時間攪拌した後、トルエンで希釈し、溶媒を減圧留去した。残渣をトルエンで3回共沸し、クロロホルムに溶解した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、クロロホルムで3回抽出した。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム:メタノール=50:1) で精製し、粗精製物87を得た。

40

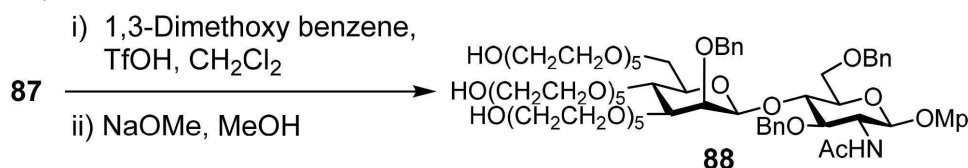
50

【化104】



粗生成物 87 をジクロロメタン (5.5 mL) に溶解し、1,3-ジメトキシベンゼン (107.5 μL , 832 μmol) を室温に加え、氷冷下でトリフルオロメタンスルホン酸 (36.7 μL , 416 μmol) を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、クロロホルムで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、クロロホルムで3回抽出した。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣を真空乾燥することで粗生成物を得た。この粗生成物をジクロロメタン (2.77 mL) とメタノール (2.77 mL) に溶解し、28% ナトリウムメトキシド-メタノール溶液 (50 μL) を室温に加えた。反応液を室温で6時間攪拌した後、クロロホルムで希釈し、Amberlite IR-120 (H⁺ form) を加えて中和後、樹脂を濾別した。濾液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム:メタノール = 20:1) で精製し、無色油状の化合物 88 (322.6 mg, 4段階63%) を得た。

【化105】



化合物 88 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) : 7.38 (d, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 2H), 7.33 - 7.21 (m, 13H), 6.97 (d, $J = 8.9 \text{ Hz}$, 2H), 6.80 (d, $J = 8.9 \text{ Hz}$, 2H), 6.50 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 1H), 5.34 (d, $J = 5.5 \text{ Hz}$, 1H), 4.86 (d, $J = 11.7 \text{ Hz}$, 1H), 4.78 (s, 1H), 4.76 (s, 1H), 4.71 (d, $J = 11.7 \text{ Hz}$, 1H), 4.50 (s, 1H), 4.46 (d, $J = 11.7 \text{ Hz}$, 1H), 4.41 (d, $J = 11.7 \text{ Hz}$, 1H), 4.17 (t, $J = 5.8 \text{ Hz}$, 1H), 4.07 (dd, $J = 14.1, 5.8 \text{ Hz}$, 1H), 3.98 - 3.93 (m, 2H), 3.91 - 3.84 (m, 2H), 3.83 (d, $J = 2.7 \text{ Hz}$, 1H), 3.76 (s, 4H), 3.74 - 3.47 (m, 59H), 3.30 - 3.24 (m, 2H), 2.88 (t, $J = 6.2 \text{ Hz}$, 2H), 2.80 (t, $J = 6.2 \text{ Hz}$, 1H), 1.78 (brs, 6H) .

MALDI-TOFMS (AXIMA-TOF²) m/z [M+Na]⁺ calc for $\text{C}_{72}\text{H}_{109}\text{NO}_{27}\text{Na}$, 1442.7, found 1443.3 .

【0111】

(化合物 89 の調製)

化合物 88 (322.6 mg, 227 μmol) をジクロロメタン (4.54 mL) に溶解し、室温でトリエチルアミン (286 μL , 2.05 mmol) と塩化パラトルエンスルホンル (358.4 mg, 2.10 mmol) を順次加えた。反応液を室温で1時間攪拌し、4-ジメチルアミノピリジン (8.4 mg, 68.8 μmol) を加えた。反応液を室温で18時間攪拌した後、クロロホルムで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、クロロホルムで3回抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム:メタノール = 50:1) で精製し、無色油状の化合物 89 (403.4 mg, 94%) を得た。

10

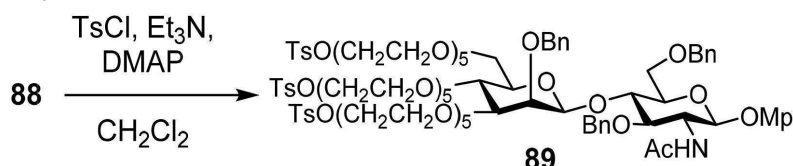
20

30

40

50

【化106】



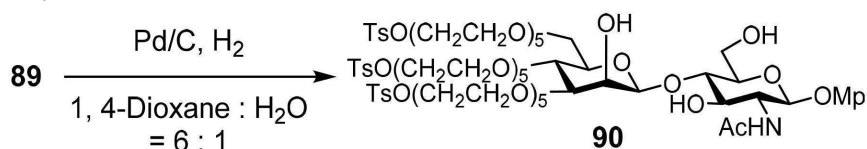
化合物 89 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) : 7.82 - 7.76 (m, 6 H), 7.40 - 7.19 (m, 21 H), 6.97 (d, $J = 8.9$ Hz, 2 H), 6.79 (d, $J = 9.6$ Hz, 2 H), 6.39 (d, $J = 8.9$ Hz, 1 H), 5.33 (d, $J = 5.5$ Hz, 1 H), 4.86 (d, $J = 11.7$ Hz, 1 H), 4.79 - 4.75 (m, 2 H), 4.71 (d, $J = 11.7$ Hz, 1 H), 4.49 (s, 1 H), 4.46 (d, $J = 11.7$ Hz, 1 H), 4.40 (d, $J = 12.4$ Hz, 1 H), 4.17 - 4.11 (m, 8 H), 4.07 (dd, $J = 13.4, 5.8$ Hz, 1 H), 3.97 - 3.92 (m, 2 H), 3.90 - 3.83 (m, 2 H), 3.82 (d, $J = 2.7$ Hz, 1 H), 3.76 (s, 3 H), 3.74 - 3.46 (m, 6.5 H), 3.29 - 3.22 (m, 2 H), 1.80 (d, $J = 6.2$ Hz, 3 H).
 MALDI-TOFMS (AXIMA-TOF²) m/z [M+Na]⁺ calc'd for $\text{C}_{93}\text{H}_{127}\text{NO}_{33}\text{S}_3\text{Na}$, 1904.7, found 1904.9.

【0112】

(化合物 90 の調製)

化合物 89 (403.4 mg, 214 μmol) を 1,4-ジオキサン (18.4 mL) と精製水 (3.05 mL) に溶解し、室温で 10% Pd/C (482.2 mg, 204 μmol) を加えた。反応液を水素雰囲気下、室温で 21 時間半攪拌した後、(クロロホルム：メタノール = 1 : 1) 混合溶液で希釈した。固形物をセライトで濾別し、(クロロホルム：メタノール = 1 : 1) 混合溶液で洗浄した。濾液と洗液を合わせて減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム：メタノール = 10 : 1) で精製し、無色固体の化合物 90 (265.9 mg, 77%) を得た。

【化107】



化合物 90 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) : 7.82 - 7.75 (m, 6 H), 7.37 - 7.32 (m, 6 H), 6.94 - 6.90 (m, 2 H), 6.80 - 6.76 (m, 2 H), 6.27 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H), 5.19 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H), 4.80 (s, 1 H), 4.58 (s, 1 H), 4.18 - 4.10 (m, 7 H), 4.06 (t, $J = 9.3$ Hz, 1 H), 3.94 (dt, $J = 11.0, 4.5$ Hz, 1 H), 3.91 - 3.86 (m, 1 H), 3.82 - 3.43 (m, 6.3 H), 3.39 (dd, $J = 8.2, 2.7$ Hz, 1 H), 2.45 (s, 3 H), 2.44 (s, 6 H), 2.05 (brs, 3 H), 1.99 (s, 3 H).
 MALDI-TOFMS (AXIMA-TOF²) m/z [M+Na]⁺ calc'd for $\text{C}_{72}\text{H}_{109}\text{NO}_{33}\text{S}_3\text{Na}$, 1634.6, found 1634.4.

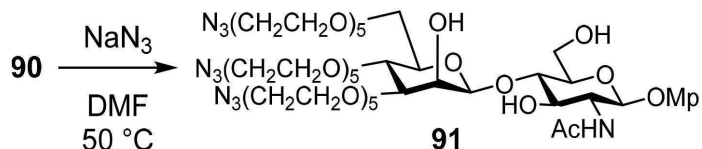
【0113】

(化合物 91 の調製)

化合物 90 (265.9 mg, 165 μmol) をジメチルホルムアミド (3.30 mL) に溶解し、室温でアジ化ナトリウム (171.4 mg, 2.64 mmol) を加えた。反応液を 50 °C で 20 時間攪拌した後、トルエンとメタノールで希釈し、溶媒を減圧留去した。残渣をトルエンで 2 回共沸し、真空乾燥した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム：メタノール = 10 : 1) で精製し、無色固体の

化合物 91 (176.6 mg, 87%) を得た。

【化108】



化合物 91 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) : 6.95 - 6.91 (m, 2H), 6.82 - 6.78 (m, 2H), 6.23 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 5.24 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 4.79 (br s, 1H), 4.58 (s, 1H), 4.15 - 4.08 (m, 2H), 3.94 (dt, $J = 11.0, 4.8$ Hz, 1H), 3.91 - 3.87 (m, 1H), 3.83 - 3.55 (m, 60H), 3.50 - 3.46 (m, 2H), 3.41 - 3.34 (m, 7H), 3.29 (s, 1H), 2.29 (dd, $J = 8.6, 5.2$ Hz, 1H), 2.01 (br s, 5H).
 MALDI-TOFMS (AXIMA-TOF²) m/z [M+Na]⁺ calc'd for $\text{C}_{51}\text{H}_{88}\text{N}_{10}\text{O}_{24}\text{Na}$, 1247.6, found 1247.3.

10

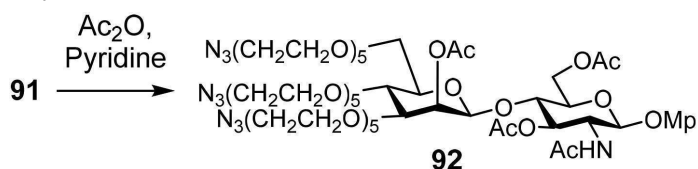
【0114】

(化合物 92 の調製)

化合物 91 (176.6 mg, 144 μmol) を無水酢酸 (1.50 mL) とピリジン (1.50 mL) に溶解した。反応液を室温で 18 時間攪拌した後、クロロホルムで希釈し、溶媒を減圧留去した。残渣をトルエンで 3 回共沸し、真空乾燥した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム:メタノール = 20:1) で精製し、無色油状の化合物 92 (191.9 mg, 99%) を得た。

20

【化109】



化合物 92 ^1H -NMR (CDCl_3) : 6.95 - 6.89 (m, 2H), 6.82 - 6.76 (m, 2H), 5.84 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 5.40 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 5.21 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 4.95 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.48 (s, 1H), 4.36 (dd, $J = 12.4, 2.7$ Hz, 1H), 4.28 (dd, $J = 12.0, 5.2$ Hz, 1H), 4.21 (dd, $J = 17.5, 9.3$ Hz, 1H), 3.97 (dt, $J = 11.0, 4.5$ Hz, 1H), 3.91 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H), 3.82 - 3.32 (m, 68H), 2.13 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 1.97 (s, 3H).
 MALDI-TOFMS (AXIMA-TOF²) m/z [M+Na]⁺ calc'd for $\text{C}_{57}\text{H}_{94}\text{N}_{10}\text{O}_{27}\text{Na}$, 1373.6, found 1373.4.

30

【0115】

(化合物 93 の調製)

化合物 92 (1.2 mg, 0.89 μmol) をアセトニトリル (142 μL) と精製水 (35.5 μL) に溶解し、氷冷下でヘキサニトратセリウム (IV) 酸アンモニウム (2.3 mg, 4.20 μmol) を加えた、反応液を 0 °C で 1 時間半攪拌した後、クロロホルムで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、クロロホルムで 3 回抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム:メタノール = 20:1) で精製し、無色油状の化合物 93 (0.6 mg, 54%) を得た。

40

【0118】

《実施例13》

本実施例では、実施例12で得られたリツキシマブの細胞障害の作用を検討した。

(薬物搭載リツキシマブの細胞殺傷効果の確認)

培養細胞としてCD20陽性のRamos (RA1)細胞及びCD20陰性のJurkat細胞を終濃度10%のSuperLowIgGFBs (Cytiva社)及びZellShield (Minerva Biolabs社)含有RPMI-1640培地(富士フイルム和光純薬社)を用いて培養し準備した。96ウェルマイクロプレート(Corning社)に対し、培地に懸濁したRamos (RA1)細胞又はJurkat細胞を1ウェルあたり 1.0×10^4 cells / 90 μ L分播種した。その際、blankとなる培地のみウェルも準備した。そして37、5%CO₂のインキュベーター内で一晩培養した。翌日コントロールであるPBS、リツキシマブ、実施例2で得られたアジドPEG化リツキシマブ、又は実施例12で得られたMMAE搭載リツキシマブをそれぞれ10 μ L分各ウェルに添加し、37、5%CO₂のインキュベーター内で72時間静置した。抗体サンプルはPBSで希釈し、培養液中で終濃度が50、500又は5000 ng/mLになるように添加した。72時間の静置後にCell Counting Kit-8 (同仁化学研究所社)を10 μ L添加し、37、5%CO₂のインキュベーター内で更に2時間静置した。2時間後マイクロプレートリーダーSH-1300 Lab (コロナ電気社)を用い、波長450 nmの吸光度を測定した。各サンプルの各濃度に関してn=3で測定し、blankの吸光度を差し引いた後の吸光度の平均値を算出した。結果は横軸を対数表示でサンプル濃度、縦軸を吸光度とした片対数グラフで示す(図7)。CD20陽性のRamos (RA1)細胞に対して、MMAE搭載リツキシマブでは500及び5000 ng/mLの抗体濃度において吸光度が低下しており、細胞が殺傷されていることが確認された。一方、CD20陰性のJurkat細胞に対しては各抗体濃度において吸光度はほぼ変わらず、明確な細胞殺傷効果は見られなかった。

10

20

【0119】

《実施例14》

本実施例では、トラスツズマブに化合物12を導入した。

(トラスツズマブ糖鎖結合部位への化合物12の転移反応(ワンポット反応。抗体アクセプターの事前調製が不要な、実施例2の別法))

中外製薬株式会社製造のトラスツズマブ(80 μ g)、化合物12(54 nmol)、並びに、大腸菌を宿主として発現させ精製した酵素Halo-Endo-S野生型(8 μ g)を50 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.0)中に加え、総量20 μ Lとして37で3時間まで静置することで実施した。0.5、1、2及び3時間で反応液の一部を取り出し10%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGE(クーマシーブリアントブルー染色)で確認したところ、0.5時間から化合物12の転移により高分子側にシフトした重鎖バンドが確認された(図8)。3時間の反応でトラスツズマブの糖鎖結合部位への化合物12の転移生成物としてFullyアジドPEG化トラスツズマブとHemiアジドPEG化トラスツズマブの76:24の混合物が得られた(図9)。質量分析による解析の結果、重鎖の糖鎖部位への化合物12の転移収率は87.4%であった。

30

40

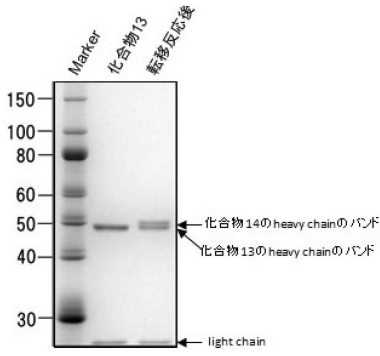
【産業上の利用可能性】

【0120】

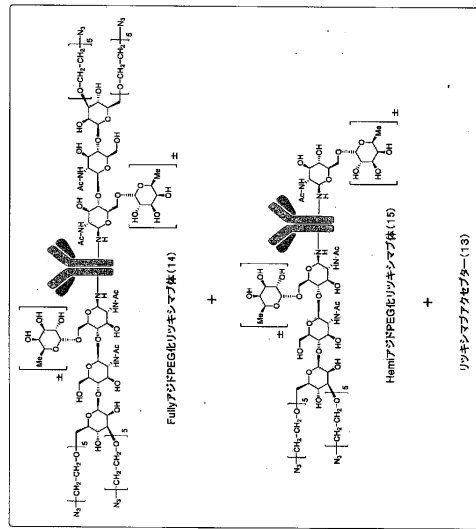
本発明の糖化合物は、抗体薬物複合体の作成において、抗体の劣化を防ぎ、薬物を効率的に抗体に結合させることができる。

【図面】

【図 1】



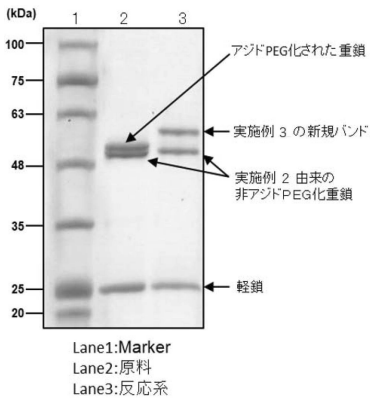
【図 2】



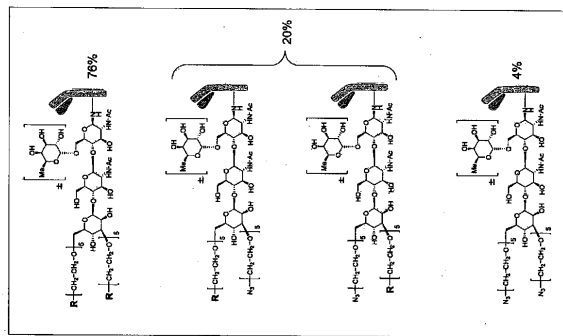
10

20

【図 3】

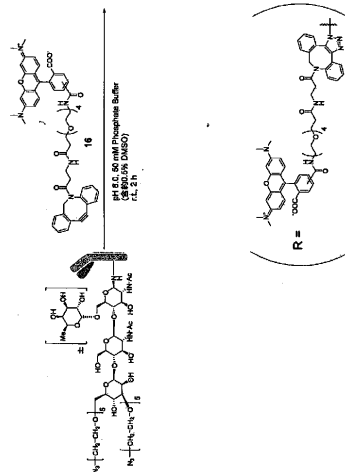


【図 4】



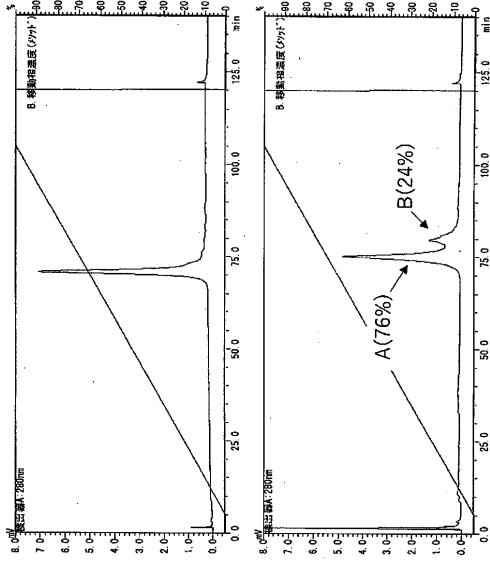
30

40



50

【 9 】

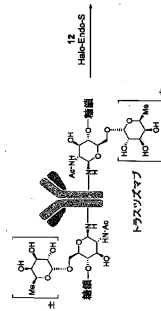
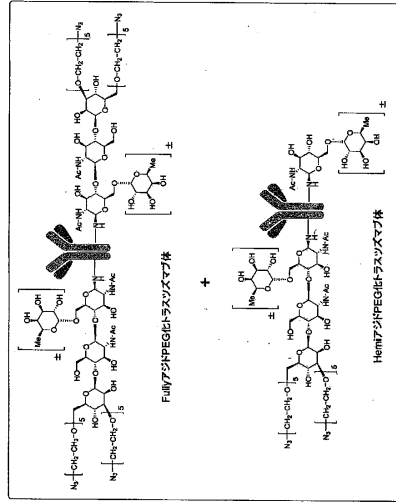


トラスズズマブ
(原料)

3時間反応後
(one-pot反応)

A=FulliyアジドPEG化トラスズズマブ
B=HemiアジドPEG化トラスズズマブ

【 10 】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I
A 6 1 K 47/68

財団法人野口研究所内

(72)発明者

月村 亘

東京都板橋区加賀一丁目9番7号 公益財団法人野口研究所内

審査官

三上 晶子

(56)参考文献

特開2018-027078(JP, A)

国際公開第2019/057087(WO, A1)

特表2018-512374(JP, A)

特表2011-515698(JP, A)

特開2018-062655(JP, A)

後藤浩太郎 他, ENGaseを利用したタンパク質の位置選択的なPEG化法の開発, 日本薬学会
年会要旨集(CD-ROM), 2019年, Vol.139th, No.22PO-am100

後藤浩太郎 他, ENGaseの転移活性を利用したタンパク質のPEG化法の開発, 日本糖質学会
年会要旨集, 2018年, Vol.37th, p.138

ZILAN Z. et al., Herceptin conjugated PLGA-PHis-PEG pH sensitive nanoparticles for target
ed and controlled drug deliv, International Journal of Pharmaceutics, 2015年, Vol.487,
No.1-2, pp.81-90

(58)調査した分野

(Int.Cl., DB名)

C 0 7 H 1 5 / 0 8

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A 6 1 P 3 5 / 0 0

C 0 7 H 9 / 0 6

C 0 7 K 1 6 / 0 0

A 6 1 K 4 7 / 6 8

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)