(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
2025年1月9日(09.01.2025)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2025/009591 A1

(51) 国際特許分類:
C07H 5/06 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01) *C08B 37/08* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/024239

(22) 国際出願日： 2024年7月4日(04.07.2024)

(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 2023-111400 2023年7月6日(06.07.2023) JP

(71) 出願人：株式会社糖鎖工学研究所(**GLYTECH, INC.**) [JP/JP]；〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町１３４番地 Kyoto (JP).

(72) 発明者：梶原 康宏 (**KAJIHARA, Yasuhiro**)；〒5600043 大阪府豊中市待兼山１－１ 大阪大学大学院理学研究科内 Osaka (JP). 岡本 亮(**OKAMOTO, Ryo**)；〒5600043 大阪府豊中市待兼山１－１ 大阪大学大学院理学研究科内 Osaka (JP). 真木 勇太(**MAKI, Yuta**)；〒5600043 大阪府豊中市待兼山１－１ 大阪大学大学院理学研究科内 Osaka (JP). 劉 晏博(**LIU, Yanbo**)；〒5600043 大阪府豊中市待兼山１－１ 大阪大学大学院理学研究科内 Osaka (JP). 藤田 正一(**FUJITA, Shoichi**)；〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町１３４ 株式会社糖鎖工学研究所内 Kyoto (JP). エルワリ ソフィア(**ELOUALI, Sofia**)；〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町１３４ 株式会社糖鎖工学研究所内 Kyoto (JP).

(74) 代理人：南条 雅裕，外(**NANJO, Masahiro** et al.)；〒1600022 東京都新宿区新宿１－１－７ コスモ新宿御苑ビル３階 弁理士法人 東京ＡＣＴｉ国際特許事務所 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）

(54) **Title:** SOLUBILIZATION GROUP FOR POORLY WATER-SOLUBLE PROTEINS

(54) 発明の名称： 難水溶性タンパク質用可溶化基

(57) **Abstract:** [Problem] To provide a new means that can be used to solubilize poorly water-soluble proteins. [Solution] Provided is a hydrophilic solubilization group for proteins or peptides, comprising: a sugar chain portion; and a functional group portion that is bonded to a carboxy group or an amino group of the sugar chain, and that binds to an amino acid side-chain and can be released from the protein or amino acid side-chain in the presence of an acid.

(57) 要約：【課題】難水溶性のタンパク質を可溶化するために使用することができる新規な手段を提供すること。【解決手段】糖鎖部分と、前記糖鎖のアミノ基またはカルボキシ基に結合した、アミノ酸側鎖に結合しかつ酸の存在下で前記タンパク質またはアミノ酸の側鎖から脱離可能な官能基部分とからなる、タンパク質またはペプチド用の親水性の可溶化基が提供される。

WO 2025/009591 A1

明　細　書

発明の名称 ： 難水溶性タンパク質用可溶化基

技術分野

[0001]　本開示は、難水溶性のタンパク質を可溶化するための可溶化基、および当該可溶化基を用いた、可溶化タンパク質等の製造方法に関する。

背景技術

[0002]　タンパク質の可溶化には、従来から多くのニーズが存在する。例えば、タンパク質を医薬有効成分として使用したい場合には、全身投与（例えば経口投与）による吸収性の向上、製剤における有効成分高濃度化、製剤における適正な粘度の実現などの点から、タンパク質が水に対して十分に溶解性であることが好ましい。また、創薬の段階でも、タンパク質のフォールディングや、フォールディングしたタンパク質と疾患の原因となる標的分子との複合体の解析などには、やはりタンパク質の可溶化が必要である。その一方で、近年の創薬技術の高度化、複雑化により、難水溶性の候補分子がますます増加してきており、可溶化技術のニーズがさらに高まりつつある。

[0003]　難水溶性タンパク質を可溶化する一手法として、親水性タグを用いる手法が知られている。例えば特許文献１は、難水溶性タンパク質を可溶化するための、親水性のポリリジンタグを記載している。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Ｔｓｕｄａ　ｅｔ　ａｌ．，　Ａｎｇｅｗ．　Ｃｈｅｍ．　Ｉｎｔ．　Ｅｄ．　２０１８，　５７，　２１０５－２１０９

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005]　本開示は、難水溶性のタンパク質を可溶化するために使用することができる新規な手段を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 糖鎖は、生体内で膜タンパク質や分泌タンパク質などに結合し、その生物活性に様々な影響を与えることが知られている。一方、糖鎖は、その有用性とは対照的に、取得困難性や高コストであることにより、その使用が制限されていた。

本願発明者らは、上記課題を解決するべく鋭意検討を重ねる過程で、難水溶性タンパク質に糖鎖可溶化基を付与することで難水溶性タンパク質を可溶化できることを見出した。さらに、その際、糖鎖可溶化基に特定の官能基部分を保持させることによって、目的の可溶化タンパク質を取得した後に、可溶化に用いた糖鎖可溶化基を分離・回収し、再利用できることを見出し、発明を完成させるに至った。

[0007] すなわち、本開示は以下の特徴を包含する：

（１） タンパク質またはペプチド用の親水性の可溶化基であって、

糖鎖部分と、前記糖鎖のアミノ基またはカルボキシ基に結合した、アミノ酸側鎖に結合しかつ酸の存在下で前記タンパク質またはアミノ酸の側鎖から脱離可能な官能基部分とからなる、

可溶化基。

[0008] （２） （１）に記載の可溶化基であって、

糖鎖部分と、前記糖鎖のアミノ基またはカルボキシ基に結合したトリフェニルメタノール部分とからなる、

可溶化基。

[0009] （３） （２）に記載の可溶化基であって、

前記トリフェニルメタノール部分は、前記糖鎖のカルボキシ基に結合している、

可溶化基。

[0010] （４） （１）に記載の可溶化基であって、

前記糖鎖は、４個以上の糖からなることを特徴とする、

可溶化基。

[0011] （５） （１）に記載の可溶化基であって、

前記糖鎖は、７個以上糖からなることを特徴とする、

可溶化基。

[0012] （６） （１）に記載の可溶化基であって、

前記糖鎖は、９個以上糖からなることを特徴とする、

可溶化基。

[0013] （７） （１）に記載の可溶化基であって、

前記糖鎖は、２本鎖複合型糖鎖、３本鎖複合型糖鎖、または４本鎖複合型糖鎖であることを特徴とする、

可溶化基。

[0014] （８） （１）に記載の可溶化基であって、

前記糖鎖は、２本鎖複合型糖鎖であることを特徴とする、

可溶化基。

[0015] （９） （８）に記載の可溶化基であって、

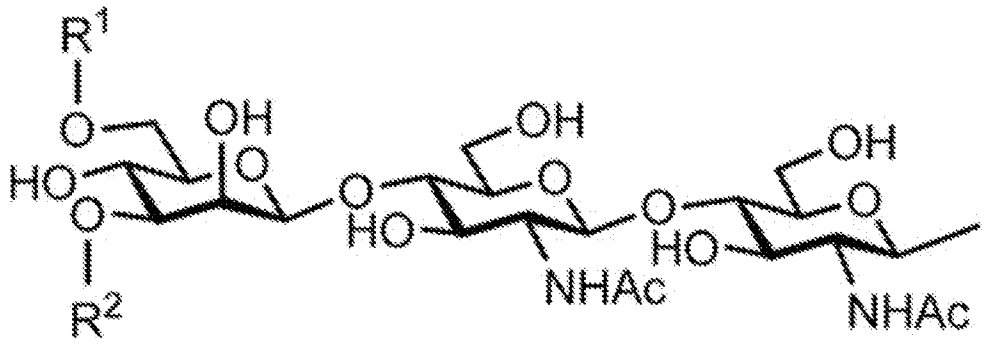
前記２本鎖複合型糖鎖が、ジシアロ糖鎖、モノシアロ糖鎖、アシアロ糖鎖、ジグルクナック糖鎖、およびジマンノース糖鎖からなる群から選択される糖鎖であることを特徴とする、

可溶化基。

[0016] （１０） （１）に記載の可溶化基であって、

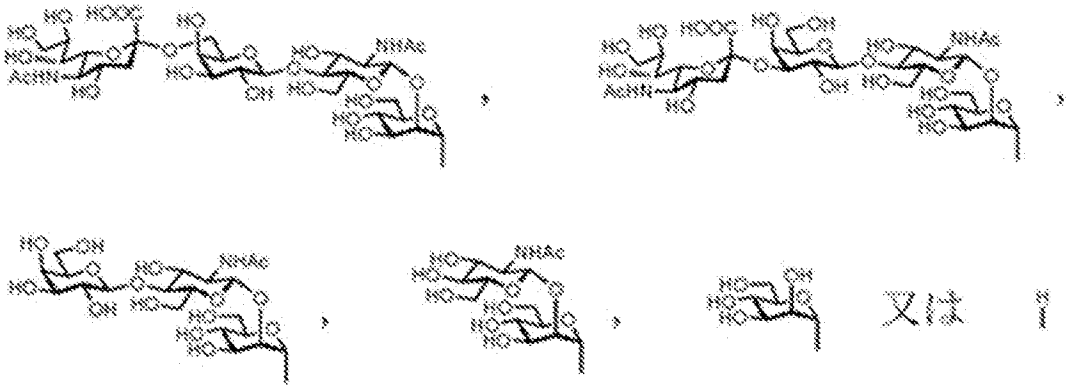
前記糖鎖は、下記式：

[化1]



[式中、Ｒ[1]およびＲ[2]は、同一または異なって、

[化2]



を示し、Ａｃは、アセチル基を示す。]

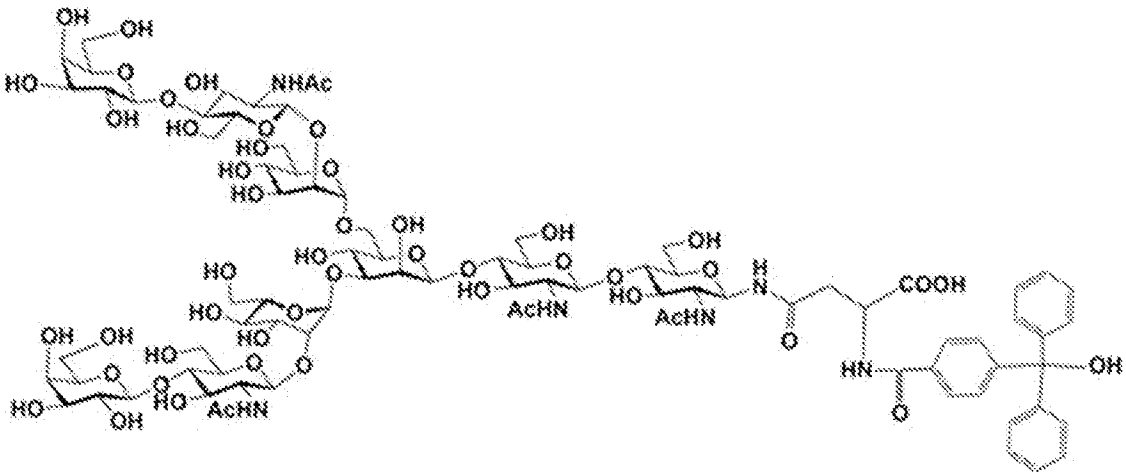
で表される糖鎖であることを特徴とする、

可溶化基。

[0017] （１１） （１）に記載の可溶化基であって、

下記構造を有する：

[化3]



可溶化基。

[0018] （１２） （１）に記載の可溶化基を１つ以上有する、ペプチドまたはタンパク質。

[0019] （１３） （１２）に記載のペプチドまたはタンパク質であって、

難水溶性のペプチドまたはタンパク質である、

ペプチドまたはタンパク質。

[0020] （１４） （１２）に記載のペプチドまたはタンパク質であって、

インターロイキンおよび膜貫通タンパク質、ならびにその断片よりなる群から選択されるペプチドまたはタンパク質。

[0021] （１５） （１４）に記載のペプチドまたはタンパク質であって、

ロドプシンもしくはＩＬ－６、またはその断片である、

ペプチドまたはタンパク質。

[0022] （１６） 可溶化タンパク質またはペプチドを製造する方法であって、

任意のタンパク質またはペプチドを構成する１つ以上のアミノ酸側鎖のスルフドリル基、カルボキシ基またはアミノ基に、請求項１に記載の可溶化基を結合するステップ、

を含む、

方法。

[0023] （１７） 難水溶性タンパク質またはペプチドを用いて、目的のタンパク質またはペプチドを製造する方法であって、

前記難水溶性タンパク質またはペプチドを構成する１つ以上のアミノ酸側鎖のスルフドリル基、カルボキシ基またはアミノ基に、請求項１に記載の可溶化基を結合して可溶化するステップ、および

前記可溶化されたタンパク質またはペプチドを、別の可溶性タンパク質もしくはペプチド、または可溶化タンパク質もしくはペプチドと連結して、目的のタンパク質を取得するステップ

を含む、

製造方法。

[0024] （１８） （１７）に記載の方法であって、

酸の存在下で前記目的のタンパク質から前記可溶化基を脱離させるステップ、および

前記可溶化基を回収するステップ、

をさらに含む、

製造方法。

発明の効果

[0025] 本開示によれば、難水溶性のタンパク質等を可溶化するために使用することができる新規な手段が提供される。

図面の簡単な説明

[0026] [図1]図１は、製造した糖鎖可溶化基１のＨＰＬＣ精製による結果を示す。

[図2]図２は、糖鎖可溶化基１とペプチド２の反応経過と、その反応物である化合物３のＨＰＬＣ精製による結果を示す。

[図3]図３は、化合物３からの糖鎖可溶化基１の脱保護反応の経過と、その反応後産物であるペプチド２のＨＰＬＣ精製による結果を示す。

[図4]図４は、化合物３からのＳＵＭＯタグタンパク質の除去反応の経過と、その反応後産物である化合物４およびＳＵＭＯタグタンパク質のＨＰＬＣ精製による結果を示す。

[図5]図５は、糖鎖可溶化基１とＩＬ－６　Ｎ末端ペプチドの反応経過と、その反応後産物である化合物６のＨＰＬＣ精製による結果を示す。

[図6]図６は、化合物６からの糖鎖可溶化基１の脱保護反応の経過と、その反応後産物である化合物５および糖鎖可溶化基１のＨＰＬＣ精製による結果を示す。

[図7]図７は、糖鎖可溶化基１を有するペプチド６と、可溶化ペプチド７とのペプチド連結反応の経過と、その反応後産物である化合物８のＨＰＬＣ精製による結果を示す。

[図8]図８は、化合物８の脱硫化反応の経過と、その反応後産物である化合物９のＨＰＬＣ精製による結果を示す。

[図9]図９は、化合物９から糖鎖可溶化基１の脱保護反応後産物である化合物１０のＨＰＬＣチャートを示す。

[図10]図１０は、化合物１０のフォールディング反応の反応経過と、その反応後産物である化合物１１のＨＰＬＣチャートを示す。

発明を実施するための形態

[0027] 以下、本開示の内容を詳細に説明する。

本開示は、タンパク質を可溶化するための親水性の可溶化基（本明細書中、単に「本開示に係る可溶化基」とも称する。）に関する。

[0028] 本開示において、「タンパク質」は、タンパク質またはその一部（すなわちペプチド）、ならびにそれらの誘導体を含み得る。タンパク質は、典型的には、難水溶性のタンパク質である。タンパク質の誘導体は、天然のタンパク質からの誘導体を指し、例えば、天然のタンパク質を構成するアミノ酸の一部が、非天然のアミノ酸に置き換えられたもの、天然のタンパク質に化学的または遺伝子的な処理が施されたもの、天然のタンパク質断片の組み合わせ物等を含むが、これに限定されるものではない。

[0029] 本開示において、タンパク質には、可溶化するニーズのある任意の難水溶性タンパク質が含まれ、非限定的に、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－６などのインターロイキン、各種ケモカイン、インターフェロン、リンホカインなどその他のサイトカイン、ロドプシンなどの膜貫通タンパク質など、ならびにそれらの断片が含まれうる。

[0030] 本開示に係る可溶化基は、糖鎖部分と、前記糖鎖のアミノ基またはカルボキシ基に結合した、アミノ酸側鎖に結合しかつ酸の存在下で前記タンパク質またはアミノ酸の側鎖から脱離可能な官能基部分とからなることを特徴とする。

[0031] 本開示において、前記官能基部分として、これに限定されるものではないが、例えばトリフェニルメタノール、メトキシベンジル、フェナシル、ジフェニルメチルなどの官能基部分を有するものを挙げることができる。前記官能基部分はまた、糖鎖部分と結合するためのカルボキシ基、アミノ基、水酸基などをさらに有している。

[0032] 本開示において、「酸の存在下」とは、保護基の脱保護に一般的に用いられる酸性条件を指す。本開示において使用することができる酸は、これに限定されるものではないが、例えば、塩酸、硫酸等の無機酸、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル（ＢＦ３・ＯＥｔ２）、トリフルオロメタンスルホン酸ジメチル（メチルチオ）スルホニウム（ＤＭＴＳＴ）、トリフルオロメタンス

ルホン酸トリメチルシリル、トリフルオロメタンスルホン酸トリエチルシリル、トリフルオロメタンスルホン酸トリプロピルシリル、トリフルオロメタンスルホン酸ジメチルエチルシリル、トリフルオロメタンスルホン酸トリベンジルシリル、トリフルオロメタンスルホン酸トリナフチルシリル又はトリフルオロメタンスルホン酸トリベンジルメチルシリル、トリフルオロメタンスルホン酸銀、シクロペンタジエニル塩化ハフニウム、シクロペンタジエニル塩化ジルコニウム、塩化錫等のルイス酸、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、無水トリフルオロ酢酸、トリフルオロメタンスルホン酸、テトラフルオロメタンスルホン酸等の有機酸などを挙げることができる。これらの酸は、１種または２種以上を併用することができる。また、酸の使用量について、当業者は適宜調整することができ、可溶化タンパク質に対して過剰量で用いることが好ましい。

[0033] 本開示の一態様において、可溶化基は、糖鎖部分と、前記糖鎖のアミノ基またはカルボキシ基に結合したトリフェニルメタノール部分とから構成されるものである。本開示のより具体的な一実施形態において、可溶化基は、前記糖鎖のカルボキシ基に結合したトリフェニルメタノール部分とから構成されるものである。

[0034] 本開示において、「糖鎖」とは、単位糖（単糖および／またはその誘導体）が１つ以上連なってできた化合物をいう。単位糖が２つ以上連なる場合、各々の単位糖同士の間は、グリコシド結合による脱水縮合によって結合する。このような糖鎖としては、例えば、生体中に含有される単糖類および多糖類（グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、キシロース、Ｎ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）、Ｎ－アセチルガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）、シアル酸並びにそれらの複合体および誘導体）の他、分解された多糖、糖タンパク質、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、糖脂質などの複合生体分子から分解または誘導された糖鎖など広範囲なものが挙げられるがそれらに限定されない。糖鎖は直鎖型であっても分岐鎖型であってもよい。

[0035] また、本開示において、「糖鎖」には糖鎖の誘導体も含まれ、糖鎖の誘導体としては、これに限定されるものではないが、例えば、糖鎖を構成する糖が、カルボキシ基を有する糖（例えば、Ｃ－１位が酸化されてカルボン酸となったアルドン酸（例えば、Ｄ－グルコースが酸化されたＤ－グルコン酸）、末端のＣ原子がカルボン酸となったウロン酸（Ｄ－グルコースが酸化されたＤ－グルクロン酸））、アミノ基またはアミノ基の誘導体（例えば、アセチル化されたアミノ基）を有する糖（例えば、Ｎ－アセチル－Ｄ－グルコサミン、Ｎ－アセチル－Ｄ－ガラクトサミンなど）、アミノ基およびカルボキシ基を両方とも有する糖（例えば、Ｎ－アセチルノイラミン酸（シアル酸）、Ｎ－アセチルムラミン酸など）、デオキシ化された糖（例えば、２－デオキシ－Ｄ－リボース）、硫酸基を含む硫酸化糖、リン酸基を含むリン酸化糖などである糖鎖が挙げられる。

[0036] 本開示において、糖鎖を構成する単位糖の種類は、難水溶性タンパク質の溶解度に応じて、これに十分な可溶性を付与できるものであれば特に制限されない。一実施形態において、本開示に係る糖鎖は、少なくとも２個のマンノースを含む。

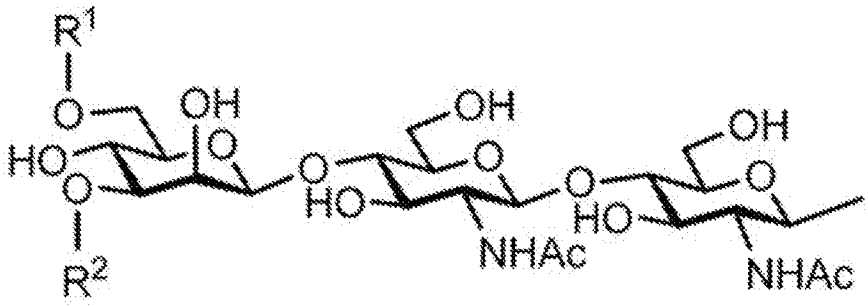
[0037] 本開示における糖鎖はまた、生体内で複合糖質（糖ペプチド（または糖タンパク質）、プロテオグリカン、糖脂質等）として存在する糖鎖であってもよいし、生体内では複合糖質として存在しない糖鎖であってもよい。

[0038] 生体内で複合糖質として存在する糖鎖は、例えば、本開示に係る可溶化基を難水溶性タンパク質に付し、可溶化して生体に投与するために用いる場合に好ましい。そのような糖鎖としては、生体内で糖ペプチド（または糖タンパク質）としてペプチド（またはタンパク質）に結合している糖鎖であるＮ－結合型糖鎖、Ｏ－結合型糖鎖等が挙げられ、好ましくは、Ｎ－結合型糖鎖が用いられる。Ｎ結合型糖鎖としては、例えば、高マンノース（ハイマンノース）型、複合（コンプレックス）型、混成（ハイブリッド）型を挙げることができ、好ましくは、複合型である。

[0039] 一実施形態において、本開示で使用する複合型糖鎖として、例えば、下記

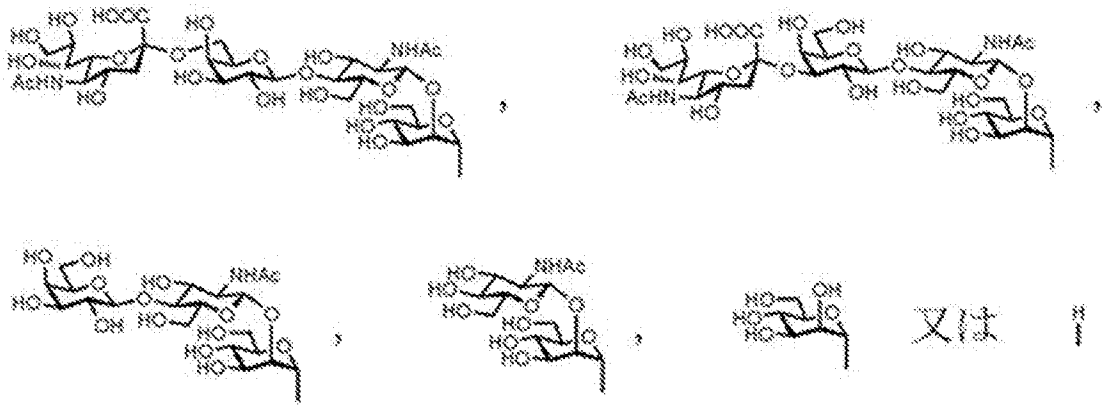
一般式

[化4]



［式中、Ｒ１およびＲ２は、同一または異なって、

[化5]



を示す。Ａｃはアセチル基を示す。］

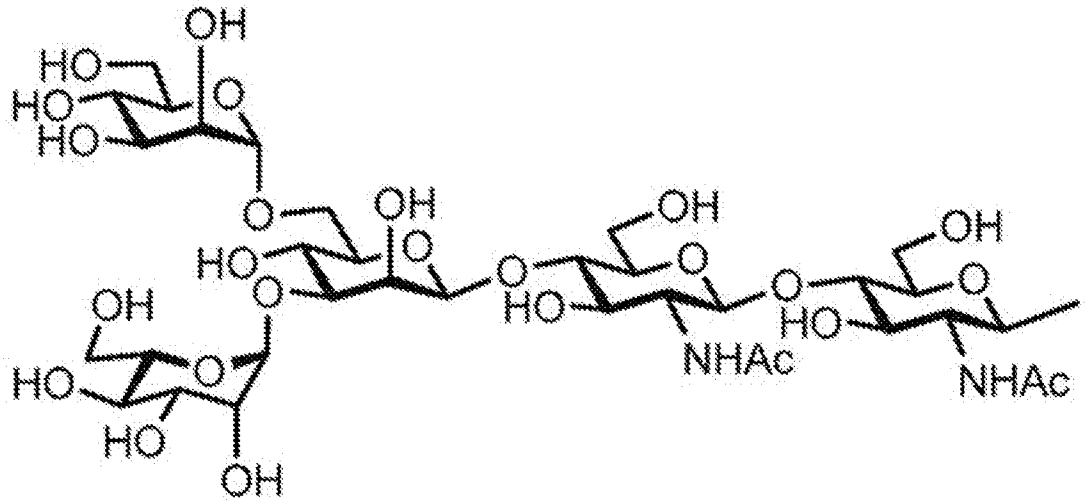
で表される糖鎖が挙げられる。

[0040] 本開示の一態様において、糖鎖は、難水溶性タンパク質に十分な可溶性を付与するのに十分な糖を含むものであれば数は制限されないが、４個以上、例えば５個以上、７個以上、９個以上、または１１個以上の糖からなる糖鎖であることが好ましい。

[0041] 本開示の別の実施形態において、糖鎖は、４～１１個、７～１１個、例えば９個の糖からなる糖鎖である。

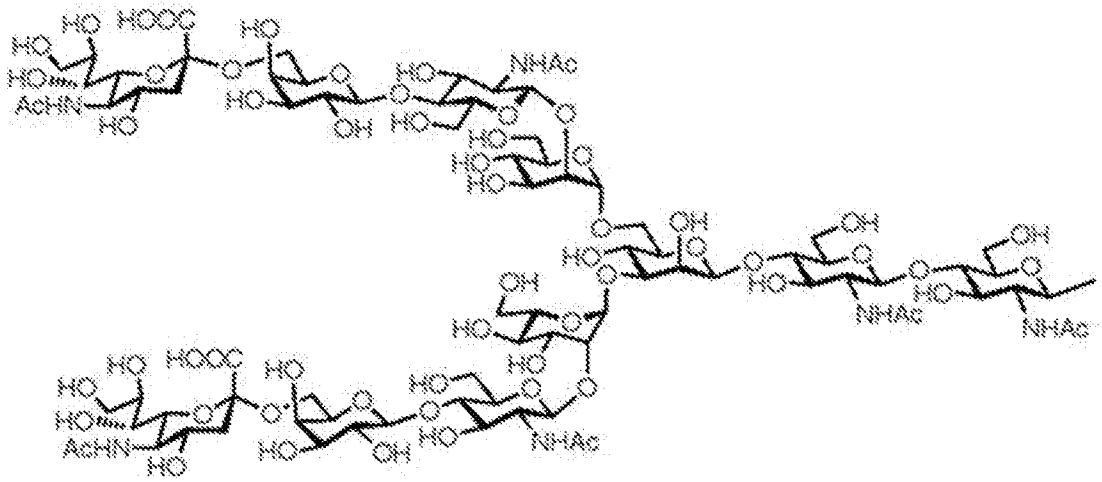
[0042] 本開示の一態様において、糖鎖は、２本鎖の複合型糖鎖である。複合型糖鎖とは、２種類以上の単糖を含み、以下に示す基本構造と、ＧａｌβＩ－４ＧｌｃＮＡｃで示されるラクトサミン構造を有することを特徴とする。

[化6]



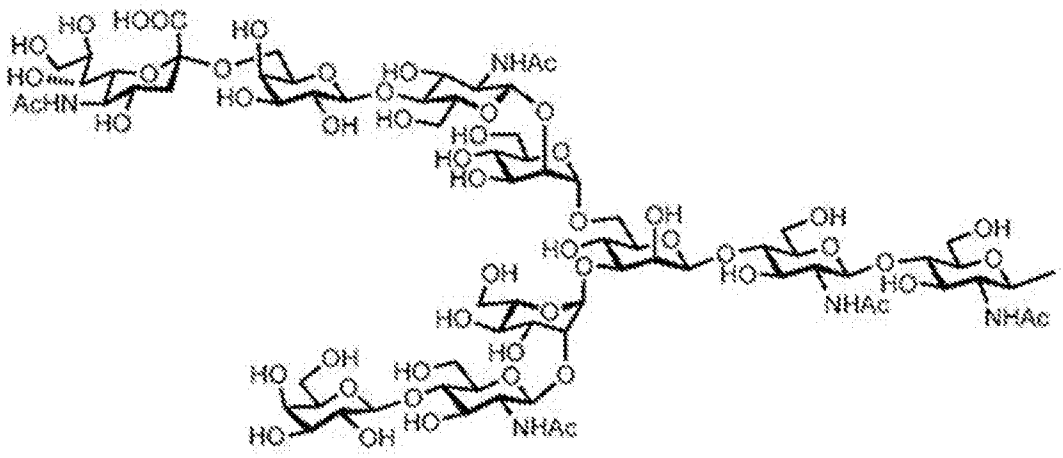
[0043] ２本鎖複合型糖鎖とは、基本構造の末端の２つのマンノースに、それぞれ０～３糖からなる１本鎖の糖鎖が結合しているものをいう。２本鎖複合型糖鎖としては、例えば、以下に示すジシアロ糖鎖、

[化7]

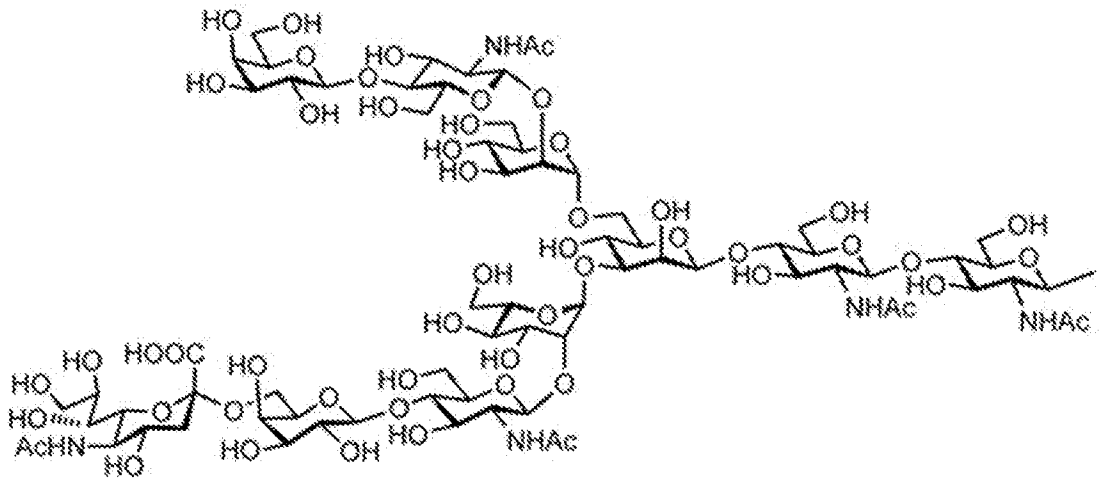


モノシアロ糖鎖、

[化8]

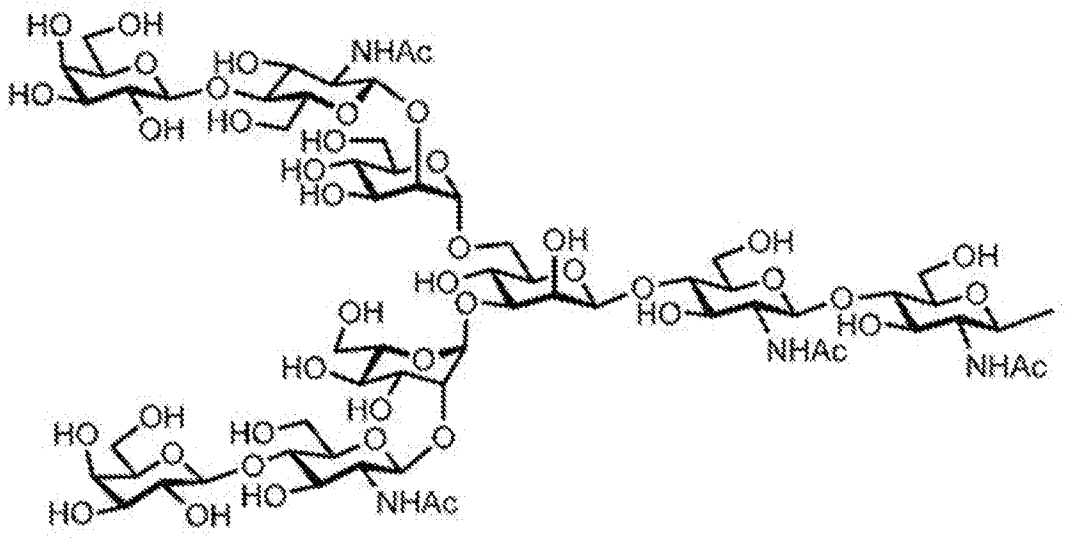


[化9]



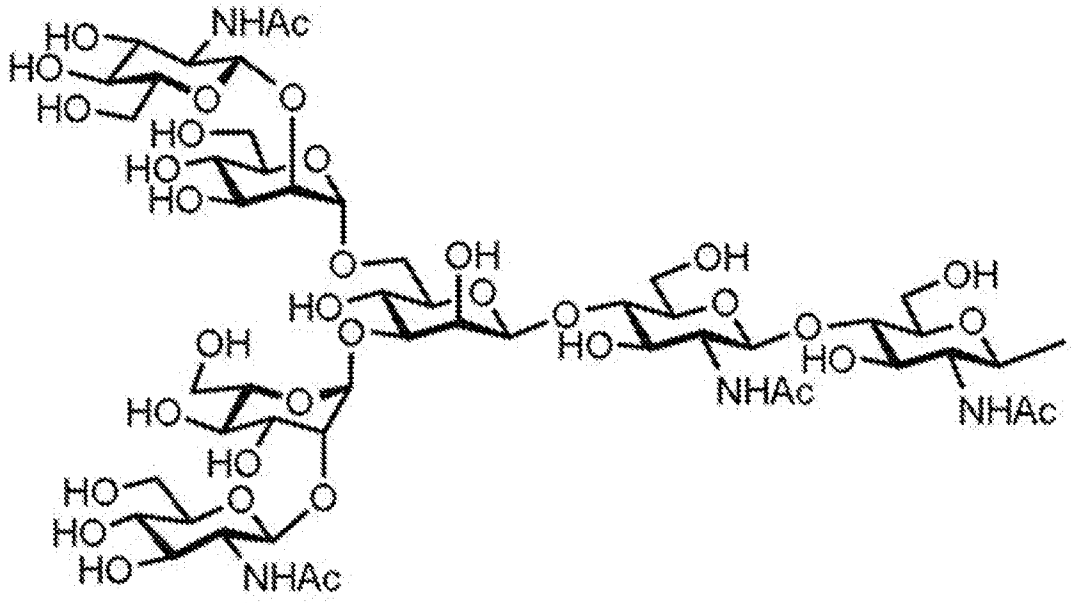
アシアロ糖鎖、

[化10]



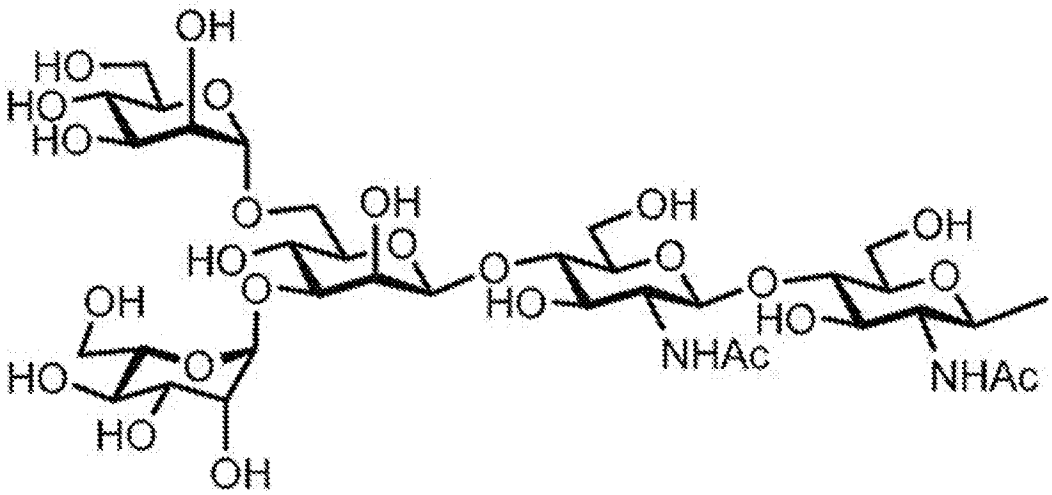
ジグルクナック糖鎖、

[化11]



ジマンノース糖鎖、

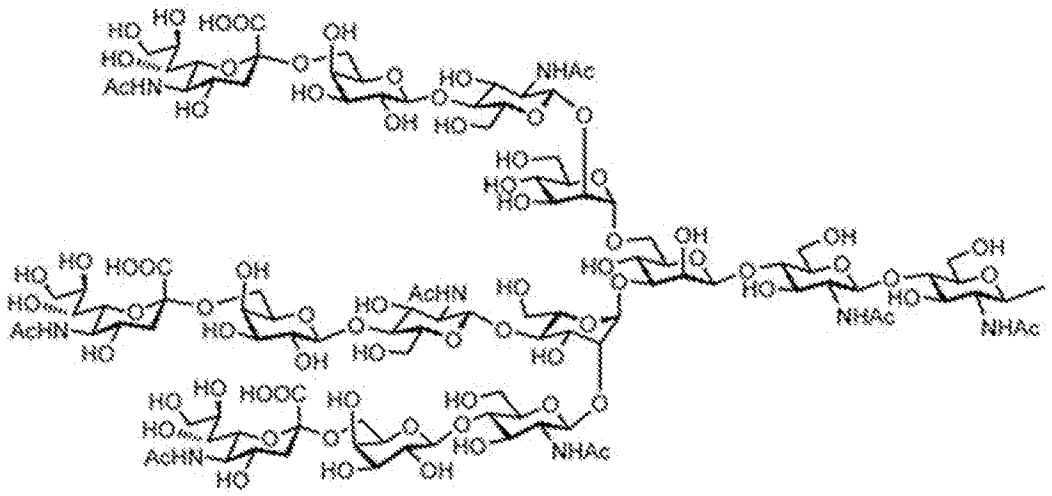
[化12]



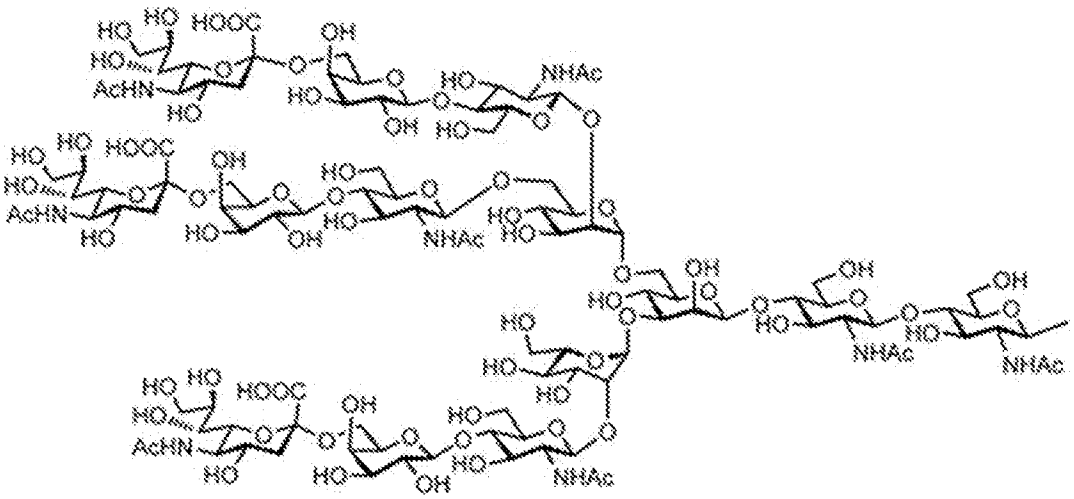
等を挙げることができる。本開示の一実施形態において、２本鎖複合型糖鎖は、アシアロ糖鎖である。

[0044] また、本開示の複合型糖鎖は、２本鎖複合型糖鎖の他、３本鎖の複合型糖鎖（３分岐型複合型糖鎖）、４本鎖の複合型糖鎖（４分岐型複合型糖鎖）も含む。例えば、３本鎖、４本鎖の複合型糖鎖としては、以下の構造式で表わされる、トリシアロ糖鎖

[化13]

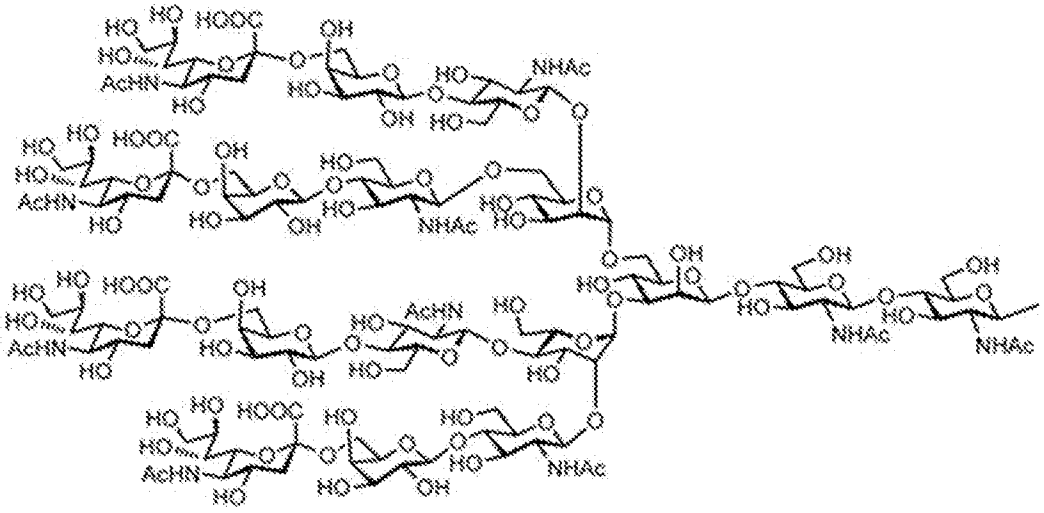


[化14]



下記構造式で表わされるテトラシアロ糖鎖

[化15]

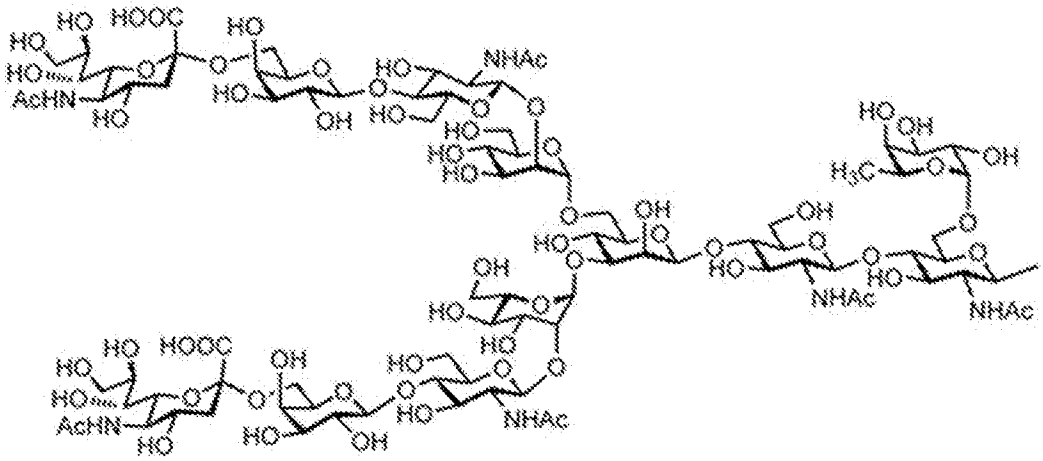


を挙げることができる。また、３本鎖複合型糖鎖および４本鎖複合型糖鎖としては、これらのトリシアロ糖鎖またはテトラシアロ糖鎖の非還元末端から１または複数の糖を失った糖鎖も挙げることができる。

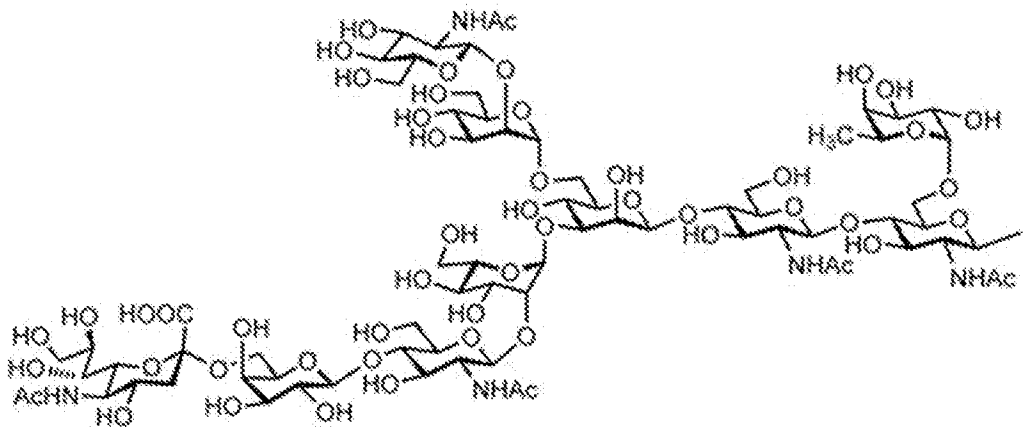
[0045] さらに、本開示の複合型糖鎖には、フコースが付いたものも含む。フコースが付いた複合型糖鎖としては、以下の構造式で表わされるフコース含有複

合型糖鎖

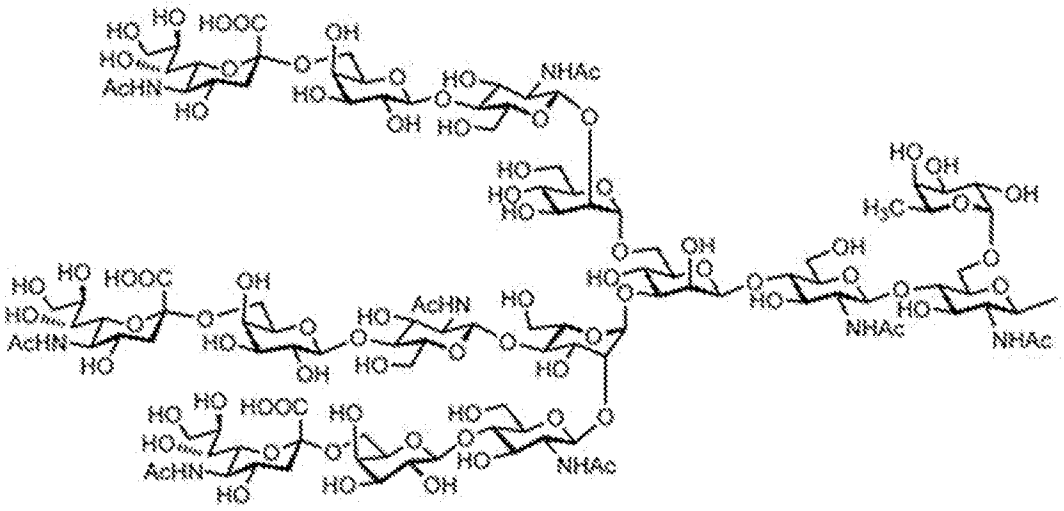
[化16]



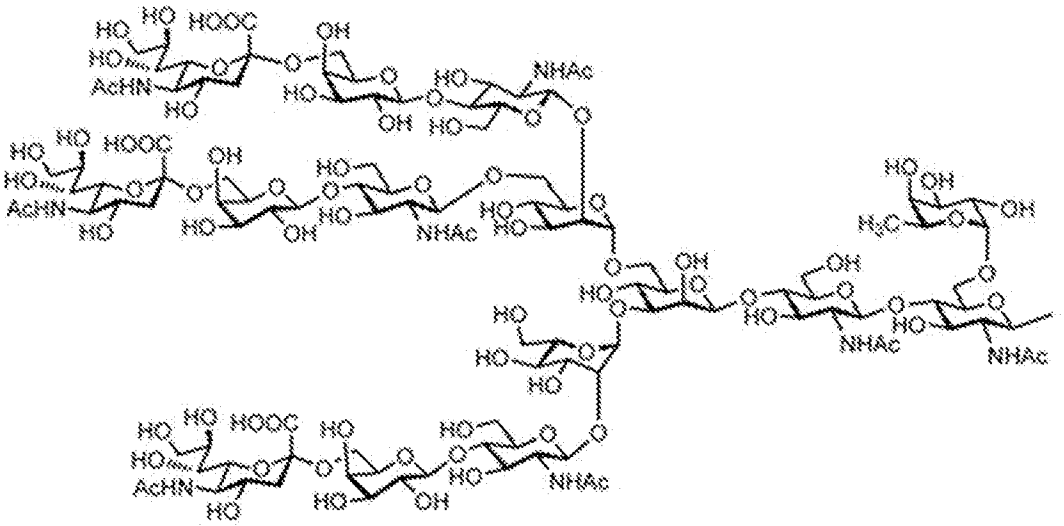
[化17]



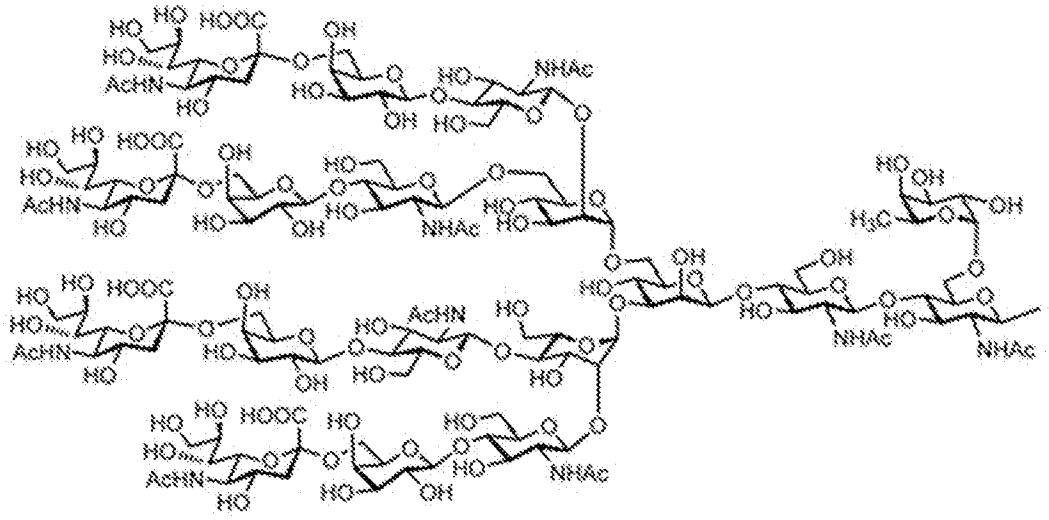
[化18]



[化19]



[化20]



を挙げることができる。また、これらのフコース含有複合型糖鎖の非還元末端から１または複数の糖を失った糖鎖も挙げることができる。

[0046] また、本開示において「ジシアロ糖鎖」、「モノシアロ糖鎖」、「アシアロ糖鎖」、「ジグルクナック糖鎖」、「ジマンノース糖鎖」、「２本鎖複合型糖鎖」、「３本鎖複合型糖鎖」、「４本鎖複合型糖鎖」、「フコース含有複合型糖鎖」には、上記化学式で示したもののほか、化学式で示した例と結合様式の異なるものも含まれ、かかる糖鎖も本開示の糖鎖に含まれる。かかる糖鎖としては、例えば、ジシアロ糖鎖またはモノシアロ糖鎖においてシアル酸とガラクトースが（α２→３）結合で結合しているもの等が挙げられる。

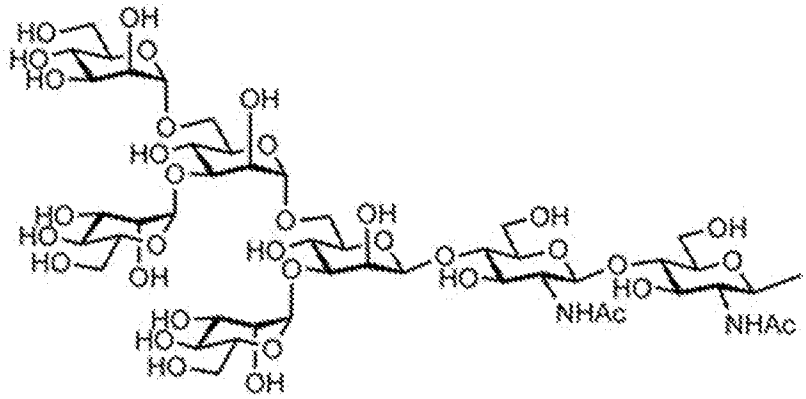
[0047] また、糖鎖の非還元末端にシアル酸を有する糖鎖の場合には、シアル酸のカルボキシ基が修飾された糖鎖を用いることもできる。シアル酸のカルボキシ基の修飾としては、カルボキシ基の負電荷を消失させる、または、正電荷へ変換できる基であることが好ましく、例えば、炭素数１～３０のアルキルアミノ基、ベンジル基、アミノ基、アミノエチルアミノ基等を挙げることができる。これらの修飾基の導入により、シアル酸のカルボキシ基の負電荷を消失させる（ベンジル基、アミノ基等）、または、正電荷へ変換する（アミノエチルアミノ基等）ことで、糖鎖付加ポリペプチドの血中クリアランスや

体内分布の制御を意図することができる。

[0048] また、本開示で用いられる高マンノース型糖鎖は、上述した複合型糖鎖の基本構造に、さらにマンノースが２個以上結合している糖鎖である。高マンノース型糖鎖は嵩高いので、ペプチドに高マンノース型糖鎖を結合させることにより血中安定性がより高くなりうる。哺乳類の高マンノース型糖鎖のように、５～９個のマンノースを含む糖鎖が好ましいが、酵母の高マンノース型糖鎖のように、より多くのマンノースを含む糖鎖であってもよい。本開示に好ましく用いられる高マンノース型糖鎖としては、例えば、

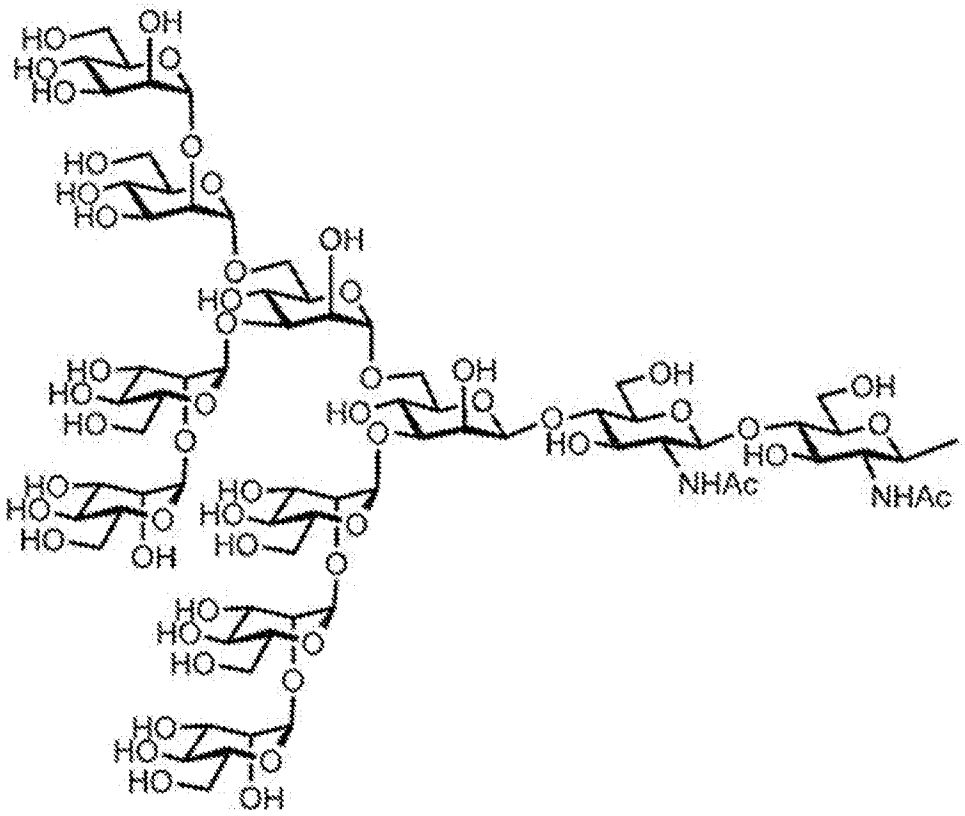
ハイマンノース－５（Ｍ－５）

[化21]



ハイマンノース－９（Ｍ－９）

[化22]

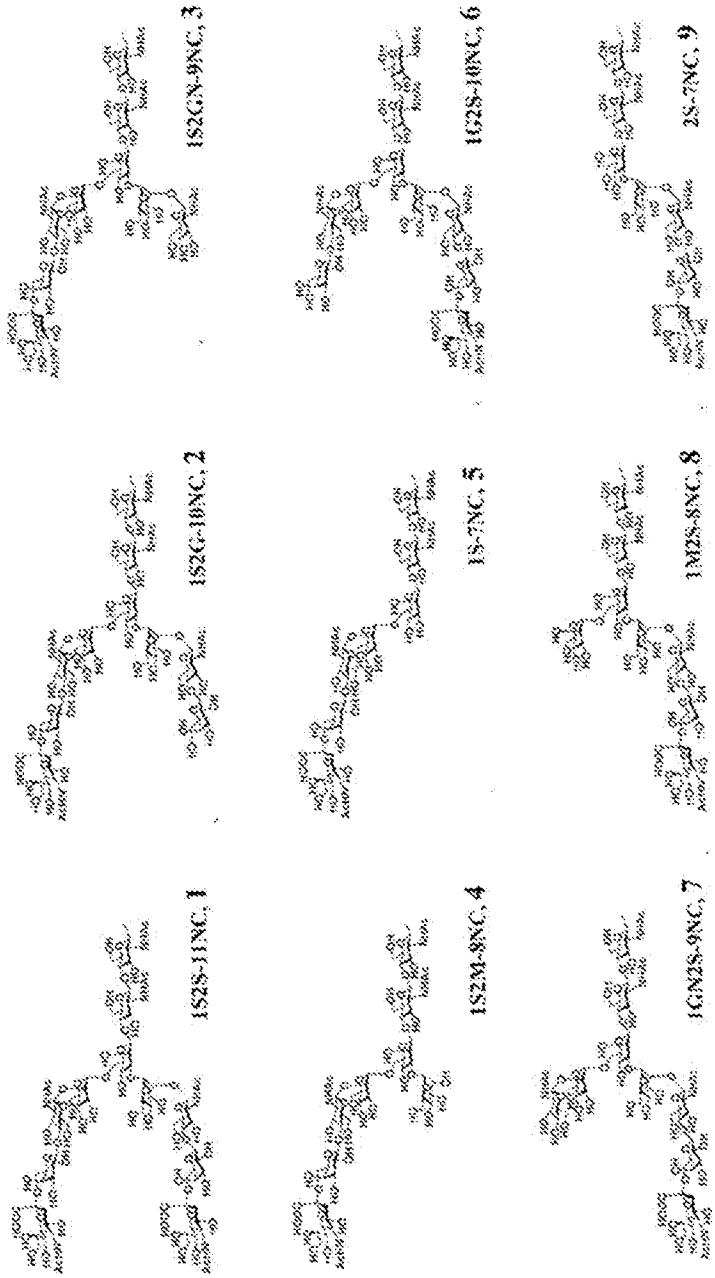


等を挙げることができる。

[0049] 本開示において、好ましい糖鎖としては、例えば、ヒト体内において、タンパク質と結合した糖タンパク質として存在する糖鎖（例えば、「ＦＥＢＳ ＬＥＴＴＥＲＳ Ｖｏｌ．５０，Ｎｏ．３，Ｆｅｂ．１９７５」に記載の糖鎖）と、同一の構造を有する糖鎖（構成糖の種類およびそれらの結合様式が同一の糖鎖）またはこれの非還元末端から１または複数の糖を失った糖鎖である、下記に記載の糖鎖を挙げることができる。

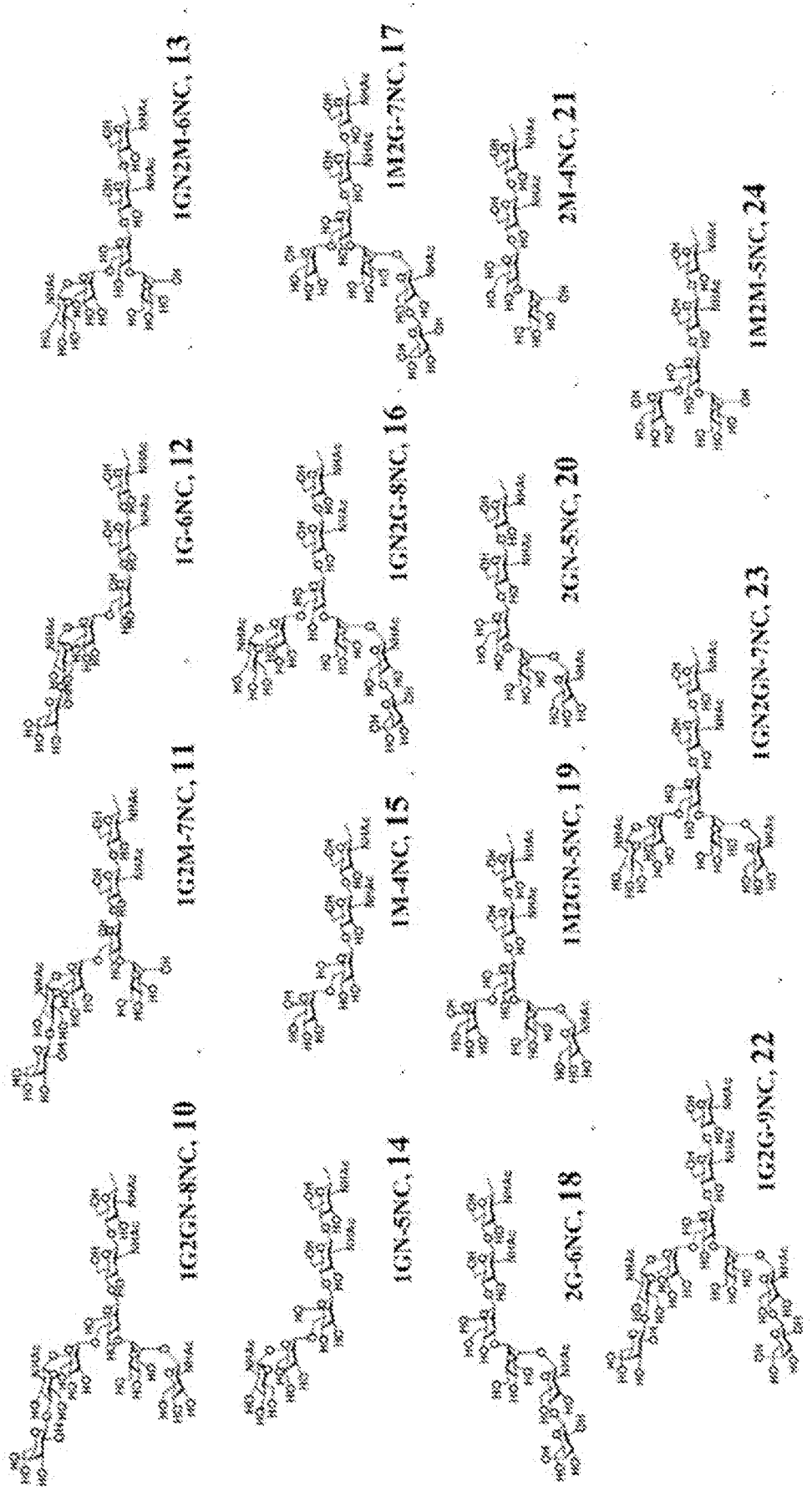
[0050]

[化23]


IS2G-9NC, 3
IG2S-10NC, 6
2S-7NC, 9
IS2G-10NC, 2
1S-7NC, 5
1M2S-8NC, 8
IS2S-11NC, 1
IS2M-8NC, 4
1GN2S-9NC, 7

[0051]

[化24]


1G2M-7NC, 11
1G-6NC, 12
1GN2M-6NC, 13
1G2GN-8NC, 10
1GN-5NC, 14
1M-4NC, 15
1GN2G-8NC, 16
1M2G-7NC, 17
2G-6NC, 18
1M2GN-5NC, 19
2GN-5NC, 20
2M-4NC, 21
1G2G-9NC, 22
1GN2GN-7NC, 23
1M2M-5NC, 24

[0052]

[化25]

1S(3)2G-9NC, 27

1G2S(3)-10NC, 30

1S(3)2G-10NC, 26

1S(3)-7NC, 29

1M2S(3)-8NC, 32

2S(3)-7NC, 33

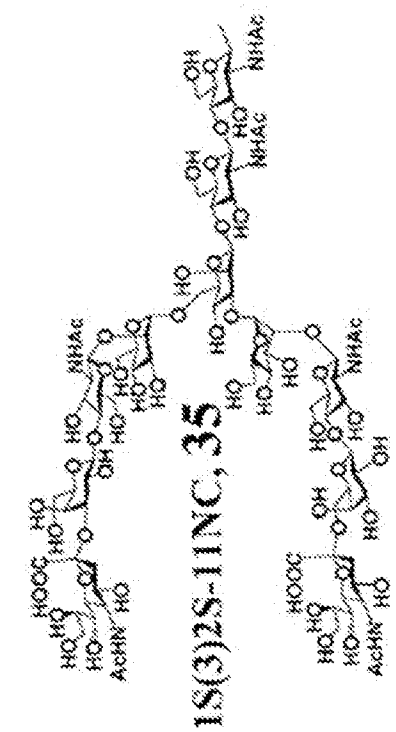
1S(3)2S(3)-11NC, 25

1S(3)2M-8NC, 28

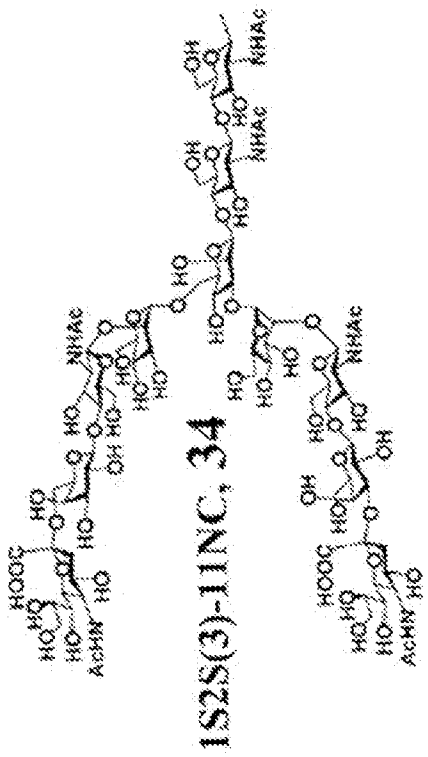
1GN2S(3)-9NC, 31

[0053]

[化26]



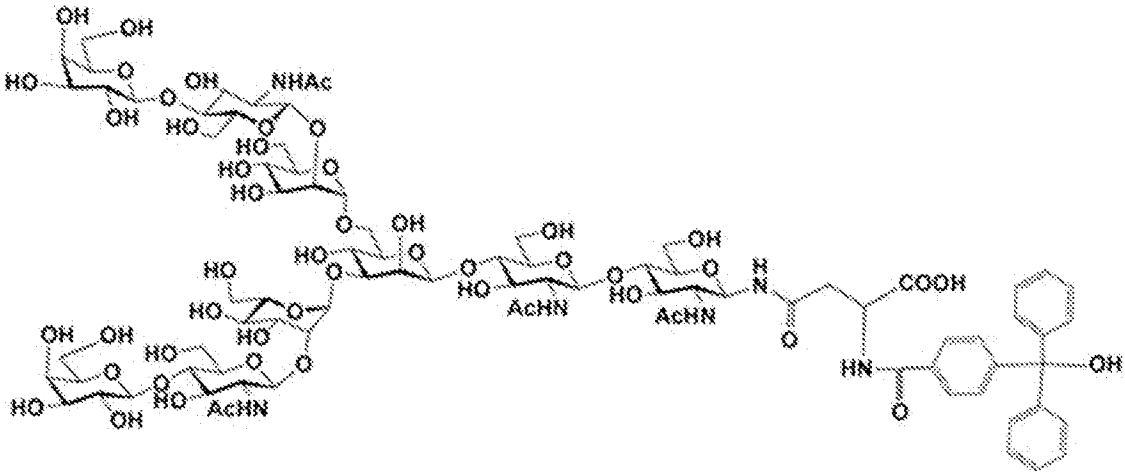
1S(3)2S-11NC, 35



1S2S(3)-11NC, 34

[0054] 本開示の一実施形態において、本開示に係る可溶化基は、下記構造を有する：

[化27]



[0055] 本開示に係る可溶化基は、当業者に周知の方法に従って製造することができる。例えば、所望の糖鎖を有する糖鎖付加アミノ酸（例えば糖鎖付加アスパラギン、糖鎖付加システイン）の反応基（例えばアミノ基）と、本開示に係る官能基部分の反応基（例えばカルボキシ基）との間で脱水縮合させることによって製造することができる。例示的な実施形態において、例えば、４－（ジフェニルヒドロキシメチル）安息香酸を活性化し、これに糖鎖付加アスパラギン等の糖鎖付加アミノ酸を反応させることで、官能基部分としてトリフェニルメタノールを含む可溶化基を得ることができる。反応時間は、用いる試薬や溶媒により異なり得るが、１分～４８時間、好ましくは１０分～２４時間、例えば６時間とすることができる。また、反応温度は、用いる試薬や溶媒により異なり得るが、－７８℃～３００℃、好ましくは－７８℃～１５０℃、例えば室温とすることができる。

[0056] 官能基部分のカルボキシ基を活性化することができる試薬としては、これに限定されるものではないが、１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェート（ＨＡＴＵ）、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドハイドロクロライド（ＷＳＣＤ）などのカ

ルボジイミド系縮合剤、４－（４，６－ジメトキシ－１，３，５－トリアジン－２－イル）－４－メチルモルホリニウムクロライド－ｎ－ハイドレート（ＤＭＴ－ＭＭ）などのトリアジン系縮合剤、塩化チオニル、クロロギ酸エチルなどのハロギ酸低級アルキル、硫酸などを挙げることができる。上記試薬は、１種を用いてもよいし、複数種を組み合わせて用いてもよい。

[0057] 本開示に係る可溶化基を製造する際に用いることができる溶媒は、特に制限されず、例えば、メタノール、エタノール、ｔｅｒｔ－ブチルアルコール、２－メトキシエタノール、１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－イソプロパノール（ＨＦＩＰ）などのアルコール類；ジエチルエーテル、ジフェニルエーテル、テトラヒドロフラン、１，２－ジメトキシエタンなどのエーテル類；クロロベンゼン、トルエン、キシレンなどの芳香族炭化水素類；シクロヘキサン、ヘキサンなどの飽和炭化水素類；Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）、Ｎ－メチルピロリドン（ＮＭＰ）などのアミド類；ジクロロメタン、四塩化炭素などのハロゲン化炭化水素類；アセトニトリル、ジメチルスルホキシド、ピリジン、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、塩酸、硫酸、酢酸エチル、アセトン、メチルエチルケトン、グアニジンおよび尿素水溶液と混合したアセトニトリルなどを挙げることができる。上記溶媒は１種を用いてもよいし、複数種を組み合わせて用いてもよい。

[0058] 別の態様において、本開示は、前記可溶化基を１つ以上含むタンパク質またはペプチドに関する。本開示に係るタンパク質またはペプチドは、前記可溶化基が結合していることにより、典型的には、水に対する溶解性が増加している。

[0059] 本開示において、可溶化基がタンパク質またはペプチドに結合する部位は特に制限されないが、典型的には、タンパク質またはペプチドを構成するアミノ酸側鎖のスルフドリル基、カルボキシ基またはアミノ基に結合することができる。一実施形態において、本開示に係る可溶化基は、タンパク質またはペプチドを構成するアミノ酸側鎖のスルフドリル基に結合する。

[0060] また、本開示に係るタンパク質またはペプチドが１分子あたりに有する可

溶化基の数は、タンパク質またはペプチドのサイズおよび溶解性、目的とする溶解性の程度などに応じて適宜変更することができ、特に制限されないが、アミノ酸２０～３０残基あたり１つの可溶化基を用いることとすればよい。

[0061] 本開示において、タンパク質またはペプチドへの本開示に係る可溶化基の導入は、当業者に周知の方法に従って行うことができる。例えば、可溶化の対象となるタンパク質またはペプチド中のシステインのスルフドリル基と、本開示に係る可溶化基との間でジスルフィド結合を形成させることによって、本開示に係る可溶化基をタンパク質またはペプチドに導入することができる。当該反応は、適当な溶媒中で行うことができ、例えばこれに限定されるものではないが、１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－イソプロパノール（ＨＦＩＰ）、トリフルオロエタノールなどの溶媒を用いることができる。

[0062] 上記反応において、必要に応じて触媒を用いてもよく、これに限定されるものではないが、例えばトリフルオロエタノールなどを使用することができる。

[0063] 別の態様において、本開示は、可溶化タンパク質またはペプチドを製造する方法に関する（本開示中、「本開示に係る可溶化タンパク質等の製造方法」とも称する。）。本開示に係る可溶化タンパク質等の製造方法は、任意のタンパク質またはペプチドを構成する１つ以上のアミノ酸側鎖のスルフドリル基、カルボキシ基またはアミノ基に、本開示に係る可溶化基を結合するステップ（本開示中、「結合ステップ」とも称する。）を含んでいる。

[0064] 本開示に係る可溶化タンパク質等の製造方法において、前記結合ステップは、適当な溶媒中で行うことができ、例えばこれに限定されるものではないが、１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－イソプロパノール（ＨＦＩＰ）、トリフルオロエタノールなどの溶媒中で、対象のタンパク質と本開示に係る可溶化基とを混合することによって行うことができる。当該反応は、必要に応じて触媒を用いてもよく、これに限定されるものではないが、例え

ばトリフルオロエタノールなどを使用することができる。

[0065] 前記結合ステップにおける反応時間は、用いる試薬や溶媒により異なり得るが、１分～４８時間、好ましくは１０分～２４時間、例えば６時間とすることができる。また、反応温度は、用いる試薬や溶媒により異なり得るが、－１０℃～５０℃、好ましくは－１０℃～４０℃、例えば室温とすることができる。

[0066] 本開示に係る可溶化タンパク質等の製造方法においては、本開示に係る可溶化基を導入する対象は、必ずしも難水溶性タンパク質でなくてもよい。例えば、水溶性ペプチドとの融合タンパク質として化学的にまたは遺伝子的に調製された溶解性タンパク質に、本開示に係る可溶化基を導入し、次いで、前記水溶性ペプチドを除去することにより、目的の可溶化タンパク質を得る方法も、本開示の範囲内である。

[0067] 別の態様において、本開示は、難水溶性タンパク質またはペプチドを用いて、目的のタンパク質を製造する方法に関する（本開示中、「本開示に係るタンパク質の製造方法」とも称する）。具体的に、本開示に係るタンパク質の製造方法は、難水溶性タンパク質またはペプチドを構成する１つ以上のアミノ酸側鎖のスルフドリル基、カルボキシル基またはアミノ基に、本開示に係る可溶化基を結合して可溶化するステップ（本開示中、「可溶化ステップ」とも称する）、および前記可溶化されたタンパク質またはペプチドを、別の可溶性タンパク質もしくはペプチド、または可溶化タンパク質もしくはペプチドと連結して、目的のタンパク質を取得するステップ（本開示中、「連結ステップ」とも称する）を含む。

[0068] 可溶化ステップにおいて可溶化されるべき難水溶性タンパク質またはペプチドは、目的のタンパク質の一部を構成する難水溶性タンパク質またはペプチドである。また、可溶化ステップにおいて可溶化されるべき難水溶性タンパク質またはペプチドは、１種であっても複数種であってもよい。

[0069] 前記可溶化ステップは、適当な溶媒中で行うことができ、例えばこれに限定されるものではないが、１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－イソ

プロパノール（ＨＦＩＰ）、トリフルオロエタノールなどの溶媒中で、対象のタンパク質と本開示に係る可溶化基とを混合することによって行うことができる。当該反応は、必要に応じて触媒を用いてもよく、これに限定されるものではないが、例えばトリフルオロエタノールなどを使用することができる。

[0070] 前記可溶化ステップにおける反応時間は、用いる試薬や溶媒により異なり得るが、１分～４８時間、好ましくは１０分～２４時間、例えば６時間とすることができる。また、反応温度は、用いる試薬や溶媒により異なり得るが、－１０℃～５０℃、例えば室温とすることができる。

[0071] 連結ステップは、可溶化ステップで可溶化されたタンパク質またはペプチドと、本来的に可溶性であるタンパク質もしくはペプチド（本開示中、「可溶性タンパク質もしくはペプチド」とも称する）、または本開示に係る方法または本開示に係る方法とは別の方法によって可溶化された他の難水溶性タンパク質またはペプチドとを連結する方法である。本開示に係る方法とは別の方法による可溶化には、これに限定されるものではないが、例えば水溶性ペプチドとの融合タンパク質として化学的にまたは遺伝子的に調製することを含む。

[0072] 可溶化タンパク質もしくはペプチド／可溶性タンパク質もしくはペプチドの連結は、当業者に公知の任意のライゲーション法を用いて行うことができる。本開示の一実施形態において、連結ステップは、天然型化学的ライゲーション法（Ｎａｔｉｖｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ、ＮＣＬ法）を用いて実施される。ＮＣＬ法は、Ｃ末端にαカルボキシチオエステル部分を有するようにした第１のペプチドとＮ末端にシステイン残基を有する第２のペプチドとの化学選択反応であり（例えば国際公開第９６／３４８７８号）、その反応条件、第１および第２のペプチドの調製方法も当業者に公知である（例えば国際公開第２０１３／０４７３７２）。あるいは、可溶化タンパク質もしくはペプチド／可溶性タンパク質もしくはペプチドの連結は、ペプチドリンカーなどを介して行ってもよい。

[0073] 本開示の一実施形態において、本開示に係るタンパク質の製造方法は、目的のタンパク質を取得後に、本開示に係る可溶化基を脱離し、回収することをさらに含むことができる。すなわち、目的とするタンパク質の構成によっては、水溶性ペプチドまたはタンパク質との連結により、もはや本開示に係る可溶化基が存在しなくても可溶性を維持できる場合がある。その場合に、目的のタンパク質から可溶化基を脱離、回収し、取得が困難かつ高価な糖鎖含有の可溶化基を繰り返し使用できれば極めて有益である。

[0074] 具体的に、本開示に係るタンパク質の製造方法は、一実施形態において、酸の存在下で前記目的のタンパク質から前記可溶化基を脱離させるステップ、および前記可溶化基を回収するステップをさらに含む。

[0075] 本開示に係るタンパク質の製造方法において、「酸の存在下」は、保護基の脱保護に一般的に用いられる酸性条件を指す。本開示に係るタンパク質の製造方法において使用することができる酸は、これに限定されるものではないが、例えば、塩酸、硫酸等の無機酸、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル（ＢＦ３・ＯＥｔ２）、トリフルオロメタンスルホン酸ジメチル（メチルチオ）スルホニウム（ＤＭＴＳＴ）、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル、トリフルオロメタンスルホン酸トリエチルシリル、トリフルオロメタンスルホン酸トリプロピルシリル、トリフルオロメタンスルホン酸ジメチルエチルシリル、トリフルオロメタンスルホン酸トリベンジルシリル、トリフルオロメタンスルホン酸トリナフチルシリル又はトリフルオロメタンスルホン酸トリベンジルメチルシリル、トリフルオロメタンスルホン酸銀、シクロペンタジエニル塩化ハフニウム、シクロペンタジエニル塩化ジルコニウム、塩化錫等のルイス酸、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、無水トリフルオロ酢酸、トリフルオロメタンスルホン酸、テトラフルオロメタンスルホン酸等の有機酸などを挙げることができる。これらの酸は、１種または２種以上を併用することができる。また、酸の使用量について、当業者は適宜適切な量を設定することができ、可溶化タンパク質に対して過剰量で用いることが好ましい。

[0076] 本開示に係るタンパク質の製造方法において、脱離した可溶化基の回収は、当業者に周知の方法で行うことができる。例えば、可溶化基の回収は、分子量、電荷、その他の化学的性質に基づいて物質を分離することができる手法であれば、特に制限されないが、液体カラムクロマトグラフィーを用いることが好ましい。

[0077] なお、本明細書において用いられる用語は、特定の実施形態を説明するために用いられるのであり、発明を限定する意図ではない。

[0078] また、本明細書において用いられる「含む」との用語は、文脈上明らかに異なる理解をすべき場合を除き、記述された事項（部材、ステップ、要素、数字など）が存在することを意図するものであり、それ以外の事項（部材、ステップ、要素、数字など）が存在することを排除しない。

[0079] 異なる定義が無い限り、ここに用いられるすべての用語（技術用語および科学用語を含む。）は、本開示が属する技術の当業者によって広く理解されるのと同じ意味を有する。ここに用いられる用語は、異なる定義が明示されていない限り、本明細書および関連技術分野における意味と整合的な意味を有するものとして解釈されるべきであり、理想化され、または、過度に形式的な意味において解釈されるべきではない。

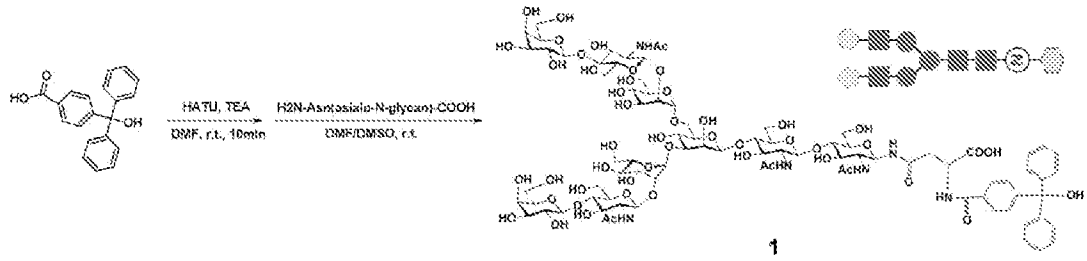
[0080] 第１の、第２のなどの用語が種々の要素を表現するために用いられる場合があるが、これらの要素はそれらの用語によって限定されるべきではないことが理解される。これらの用語は一つの要素を他の要素と区別するためのみに用いられているのであり、例えば、第１の要素を第２の要素と記し、同様に、第２の要素は第１の要素と記すことは、本開示の範囲を逸脱することなく可能である。

[0081] 以下、実施例により本開示をより具体的に説明するが、しかしながら、本開示はいろいろな形態により具現化することができ、ここに記載される実施例に限定されるものとして解釈されてはならない。

実施例

[0082] 実施例１：糖鎖可溶化基の調製

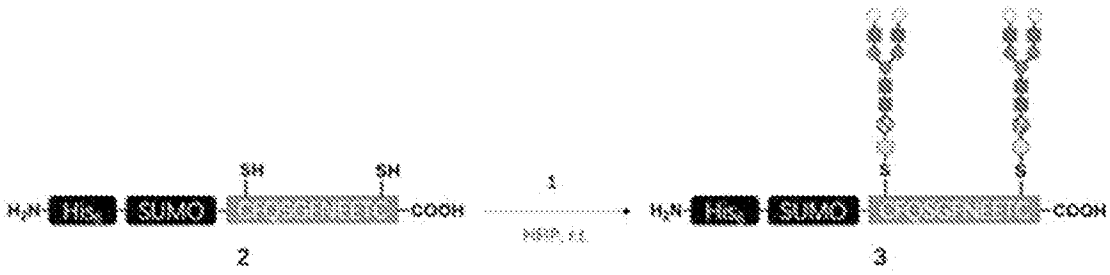
[化28]



[0083] ４－（ジフェニルヒドロキシメチル）安息香酸（４．５ｍｇ、１５μｍｏｌ、６等量；シグマアルドリッチ（登録商標））と１－［ビス（ジメチルアミノ）メチレン］－１Ｈ－１，２，３－トリアゾロ［４，５－ｂ］ピリジニウム３－オキシドヘキサフルオロホスフェート（ＨＡＴＵ）（３．８ｍｇ、１０μｍｏｌ、４等量；Ｎｏｖａｂｉｏｃｈｅｍ（登録商標））を乾燥ＤＭＦ（１５０μＬ；関東化学株式会社）に溶かし、続いてトリエチルアミン（１．４μＬ、１０μｍｏｌ、４等量；ナカライテスク（登録商標））を加えた。この混合物を室温で１０分攪拌し、４－（ジフェニルヒドロキシメチル）安息香酸を活性化した。ここに、H_2N－Ａｓｎ（アシアロ－Ｎ－グリカン）－ＣＯＯＨ（４．４ｍｇ、２．５μｍｏｌ、１等量）を乾燥ＤＭＦ：ＤＭＳＯ（７：３、２５０μＬ）に溶したものを加え、室温で反応させた。反応状況をＬＣ／ＭＳで追跡し、完了するのを確認した。反応終了後、この溶液に、冷却したジエチルエーテルを加え、生成物を沈殿させ、遠心により残渣である目的物を単離した。得られた固形物を逆相ＨＰＬＣ（Ｐｒｏｔｅｏｎａｖｉカラム；勾配比Ａ：Ｂ、９０／１０～１０／９０、６０分、２．５ｍｌ／分、溶媒Ａ：０．１％ＴＦＡ（H_2O中）、溶媒Ｂ：０．１％ＴＦＡ（９０／１０アセトニトリル／H_2O中）で精製し、目的物1を無色固形物として得た（３．５ｍｇ、７５％収率）（図１）。ＥＳＩ－ＭＳ　［Ｍ－ＯＨ＋Ｈ］＋２　ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ　１０１２．３６　ｆｏｕｎｄ　１０１２．３２

[0084] 実施例２：モデルペプチドを用いた糖鎖保護

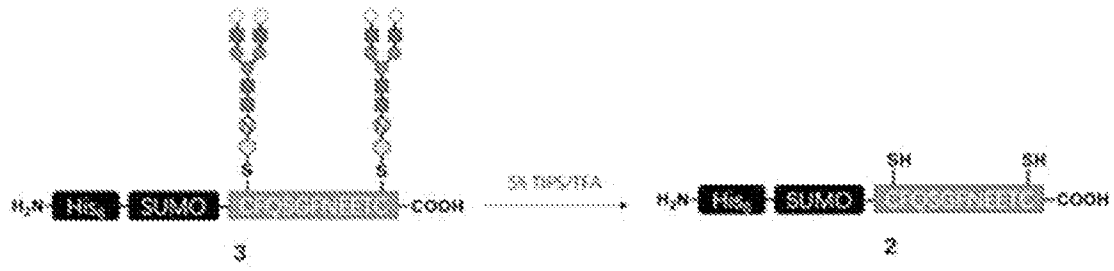
[化29]



[0085] 化合物1（１．４ｍｇ、０．６８６μｍｏｌ、ペプチドに対し８等量）を１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－イソプロパノール（ＨＦＩＰ、１８０μＬ；東京化成工業株式会社）に溶解させた。この黄色の溶液に大腸菌発現法で調製したペプチド2（１．２ｍｇ、０．０９μｍｏｌ）を加え反応を開始した。反応状況をＬＣ／ＭＳで追跡し、完了するのを確認した。反応終了後、この溶液に、冷却したジエチルエーテルを加え、生成物を沈殿させ、遠心により残渣である目的物を単離後、逆相ＨＰＬＣ（Ｐｒｏｔｅｏｎａｖｉカラム；勾配比Ａ：Ｂ、９０／１０～３０／７０、６０分、２．５ｍｌ／分、溶媒Ａ：０．１％ＴＦＡ（H_2O中）、溶媒Ｂ：０．１％ＴＦＡ（９０／１０アセトニトリル／H_2O中）で精製し、目的物3を無色固形物として得た（１．０ｍｇ、８０％収率）（図２）。ＥＳＩ－ＭＳ［Ｍ＋１Ｈ］＋１ ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ １８０５１．５０ ｆｏｕｎｄ １８０５１．７３

[0086] 糖鎖可溶化基の脱保護－１

[化30]

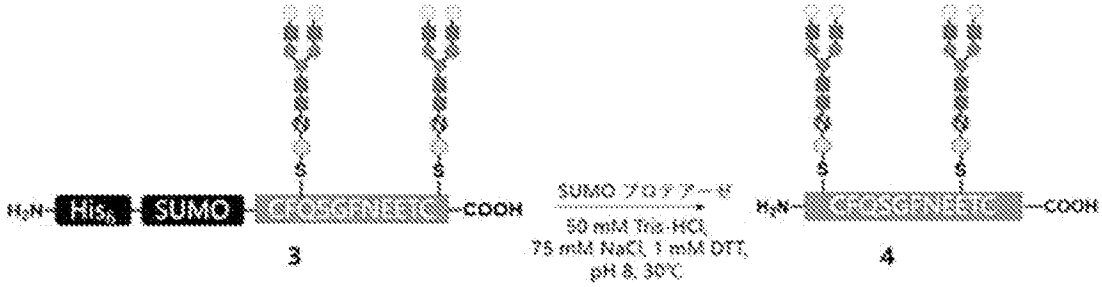


[0087] 化合物3（１ｍｇ、０．５６μｍｏｌ）を５％テトライソプロピルシラン（ＴＩＰＳ；東京化成工業株式会社）／ＴＦＡ（５００μＬ；富士フイルム

和光純薬株式会社）に溶かし、室温で１０分反応させた。反応終了後、ＴＦＡを蒸発させ、残ったＴＦＡ溶液に、冷却したジエチルエーテルを加え、生成物を沈殿させ、遠心により残渣である目的物を単離後、逆相ＨＰＬＣ（Ｐｒｏｔｅｏｎａｖｉカラム；勾配比Ａ：Ｂ、９０／１０～３０／７０、６０分、２．５ｍｌ／分、溶媒Ａ：０．１％ＴＦＡ（H_2O中）、溶媒Ｂ：０．１％ＴＦＡ（９０／１０アセトニトリル／H_2O中）で精製し、目的物２を無色固形物として得た（０．７ｍｇ、９０％収率）（図３）。

[0088] ＳＵＭＯタグタンパク質の酵素による除去

[化31]

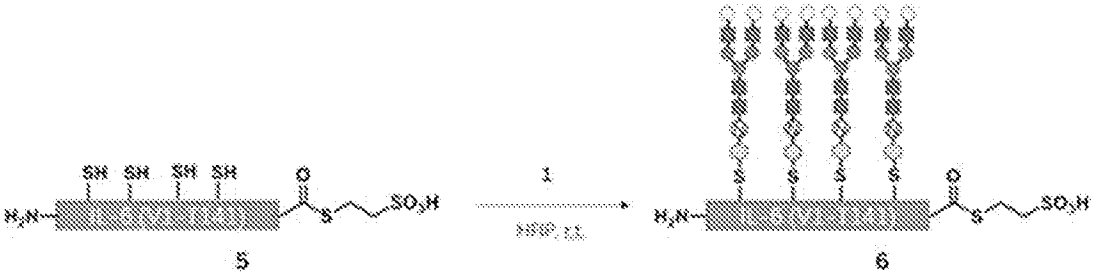


[0089] 疎水性ペプチドを可溶化するＳＵＭＯタグタンパク質および、アフィニティー精製用のＨｉｓＴａｇの除去をＳＵＭＯプロテアーゼでおこなった。化合物３（１ｍｇ、０．５６μｍｏｌ）をトリス緩衝溶液（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（富士フイルム和光純薬株式会社）、７５ｍＭ　ＮａＣｌ（富士フイルム和光純薬株式会社）、１ｍＭジチオトレイトール（ＤＴＴ、富士フイルム和光純薬株式会社）、ｐＨ８．０）に溶かし、ＳＵＭＯプロテアーゼを反応が進行するよう適量を加え、３０℃で反応が終了するまでＬＣ／ＭＳで追跡した。反応終了後、溶液を直接逆相ＨＰＬＣ（Ｐｒｏｔｅｏｎａｖｉカラム；勾配比Ａ：Ｂ、９０／１０～３０／７０、６０分、２．５ｍｌ／分、溶媒Ａ：０．１％ＴＦＡ（H_2O中）、溶媒Ｂ：０．１％ＴＦＡ（９０／１０アセトニトリル／H_2O中）で精製し、目的物２を無色固形物として得た（０．３ｍｇ、９０％収率）（図４）。ＥＳＩ－ＭＳ　［Ｍ＋Ｈ］＋１　ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ　５３１１．０４，　ｆｏｕｎｄ　５３１１．７０

[0090] 実施例３：糖鎖可溶化基を利用するインターロイキン－６（ＩＬ－６）Ｎ末

端フラグメント（１－１４１）の糖鎖保護

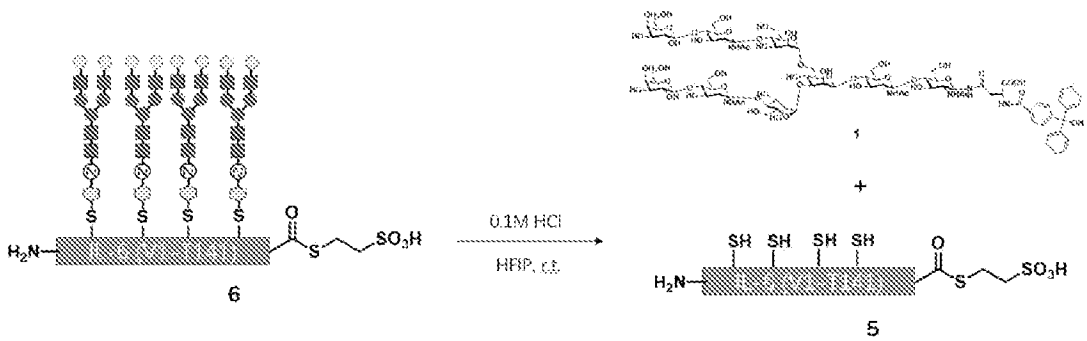
[化32]



化合物1（１ｍｇ、０．４９μｍｏｌ、ペプチドに対し１６等量）を１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－イソプロパノール（ＨＦＩＰ、６０μＬ）に溶解させた。この黄色の溶液に大腸菌発現法で調製したペプチド5（０．５ｍｇ、０．０３μｍｏｌ）を加えて溶かし、反応を開始した。反応状況をＬＣ／ＭＳで追跡し、完了するのを確認した。反応終了後、この溶液に、冷却したジエチルエーテルを加え、生成物を沈殿させ、遠心により残渣である目的物を単離後、逆相ＨＰＬＣ（Ｐｒｏｔｅｏｎａｖｉカラム；勾配比Ａ：Ｂ、７０／３０～２０／８０、３０分、１．０ｍｌ／分、溶媒Ａ：０．１％ＴＦＡ（H_2O中）、溶媒Ｂ：０．１％ＴＦＡ（９０／１０アセトニトリル／H_2O中）で精製し、目的物6を無色固形物として得た（０．４ｍｇ、８０％収率）（図５）。ＥＳＩ－ＭＳ［Ｍ＋Ｈ］＋１　ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ　２４０８８．８７７０，　ｆｏｕｎｄ　２４０８７．０７５１

[0091] 糖鎖可溶化基の脱保護－２

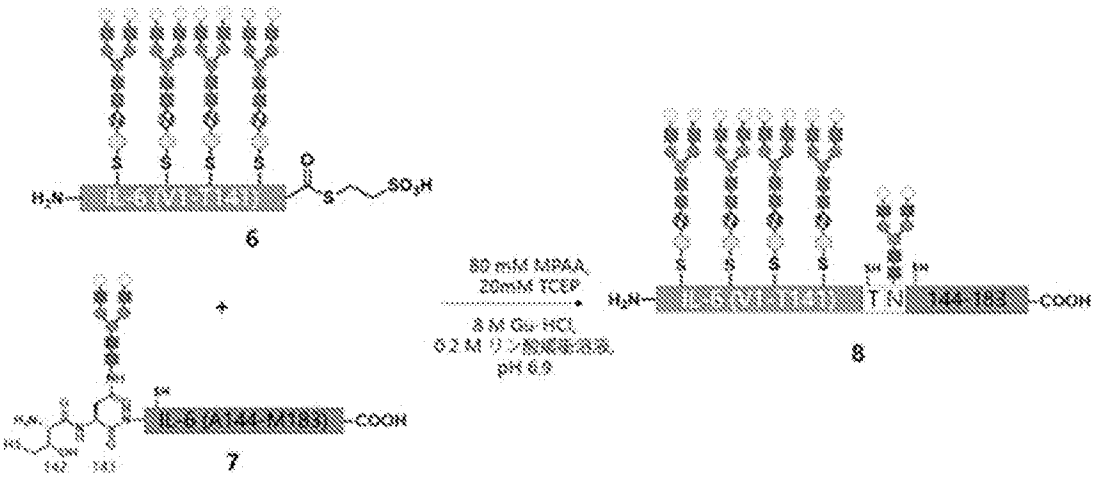
[化33]



[0092] 化合物6（０．４ｍｇ、０．０２μｍｏｌ、１等量）を０．１Ｍ　ＨＣｌ／ＨＦＩＰ溶液（２５μＬ）に溶かし、糖鎖可溶化基を除去した。反応はＬＣ／ＭＳで追跡し、反応終了後トリス緩衝溶液（６Ｍ　Ｇｎ－ＨＣｌ（富士フイルム和光純薬株式会社）、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ８．０、５００μＬ）を加え、直接逆相ＨＰＬＣ（Ｐｒｏｔｅｏｎａｖｉカラム；勾配比Ａ：Ｂ、９０／１０～１０／９０、６０分、２．５ｍｌ／分、溶媒Ａ：０．１％ＴＦＡ（H_2O中）、溶媒Ｂ：０．１％　ＴＦＡ（９０／１０アセトニトリル／H_2O中）で精製し、目的物5および1を得た（図６）。回収された糖鎖可溶化基は、その構造が1であることを確認した。

[0093] 実施例４：ｎａｔｉｖｅ　ｃｈｅｍｉｃａｌ　ｌｉｇａｔｉｏｎと糖鎖可溶化基を利用する疎水性糖タンパク質ＩＬ６の合成

[化34]



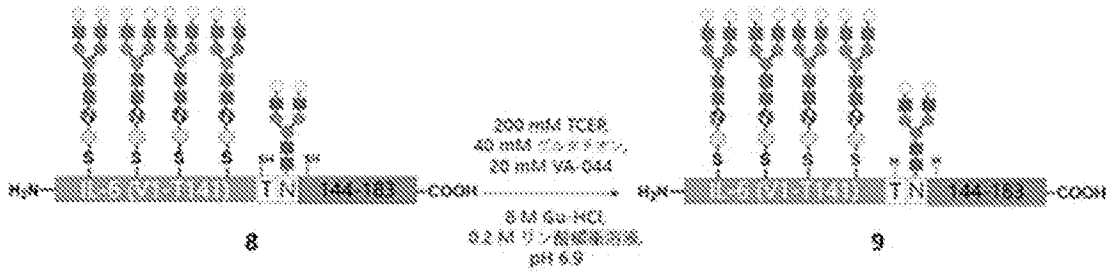
[0094] 化合物6（１．１ｍｇ、０．０５μｍｏｌ）を２００ｍＭリン酸緩衝溶液に溶かし、以下の濃度になるよう各混合物を調整した（化合物6：２．０ｍＭ、８Ｍ　Ｇｕ－ＨＣｌ、８０ｍＭ　４－メルカプトフェニル酢酸：ＭＰＡＡ、富士フイルム和光純薬株式会社、２０ｍＭトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン：ＴＣＥＰ、東京化成工業株式会社、ｐＨ６．９）。この溶液に大腸菌発現法と液相法で糖鎖を結合させた化合物7（０．５ｍｇ、０．１０μｍｏｌ）を溶かし、ペプチド連結反応をおこなった。反応は、室温で

２日間おこなった。途中経過は、反応溶液にＴＣＥＰを加え、ＬＣ／ＭＳでおこなった。反応終了後、ＨＰＬＣのゲル濾過カラム（カラム：ＴＳＫｇｅｌ　ＳｕｐｅｒＳＷ３０００、４．６ｍｍ　ｘ　３０ｃｍ、４μｍ）で精製した。移動相には、６Ｍ　Ｇｕ－ＨＣｌを含む０．１Ｍリン酸溶液（ｐＨ６．７、０．２ｍｌ／分、３５分）を使い８を得た（図７）。ＥＳＩ－ＭＳ　［Ｍ＋Ｈ］＋１　ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ　３０５９６．０８５０，ｆｏｕｎｄ　３０５９４．６３５０．

得られた生成物は、直接、次の脱硫化実験に用いた。

[0095] 糖鎖可溶化基存在化でのチオールの脱硫化反応

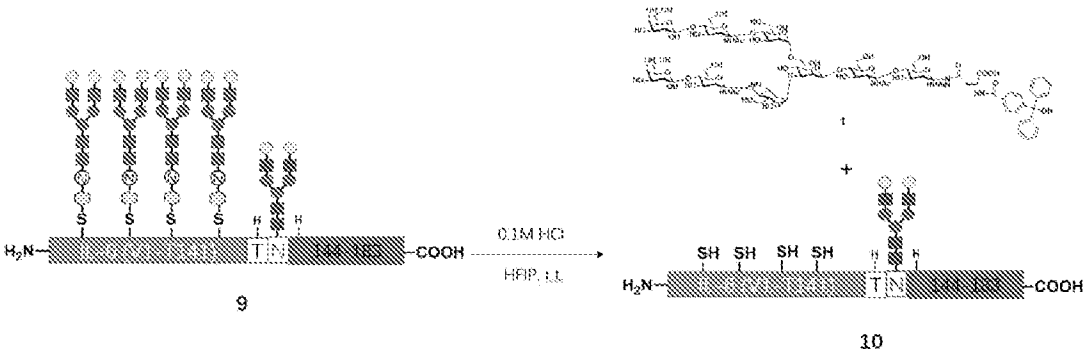
[化35]



[0096] ゲル濾過による精製で得られた化合物８を緩衝溶液（８Ｍ　Ｇｕ－ＨＣｌ、０．２Ｍホスフェート、２００ｍＭ　ＴＣＥＰ、４０ｍＭグルタチオン（シグマアルドリッチ（登録商標））、および２０ｍＭ　ＶＡ－０４４（富士フイルム和光純薬株式会社））に溶かし、室温で放置することで、チオールの脱硫化をおこなった。反応はＬＣ／ＭＳで追跡し、反応終了後、直接逆相ＨＰＬＣ（Ｐｒｏｔｅｏｎａｖｉカラム；勾配比Ａ：Ｂ、７０／３０～１０／９０、６０分、１．０ｍｌ／分、溶媒Ａ：０．１％ＴＦＡ（H_2O）、溶媒Ｂ：０．１％ＴＦＡ（９０／１０アセトニトリル／H_2O中）で精製し、目的物９を無色固形物として得た（０．９ｍｇ、２ステップで６０％の収率）（図８）。ＥＳＩ－ＭＳ　［Ｍ＋Ｈ］＋１　ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ　３０５３１．９６５０　，ｆｏｕｎｄ　３０５２９．８５４８

[0097] ＩＬ－６を用いる糖鎖可溶化基の脱保護

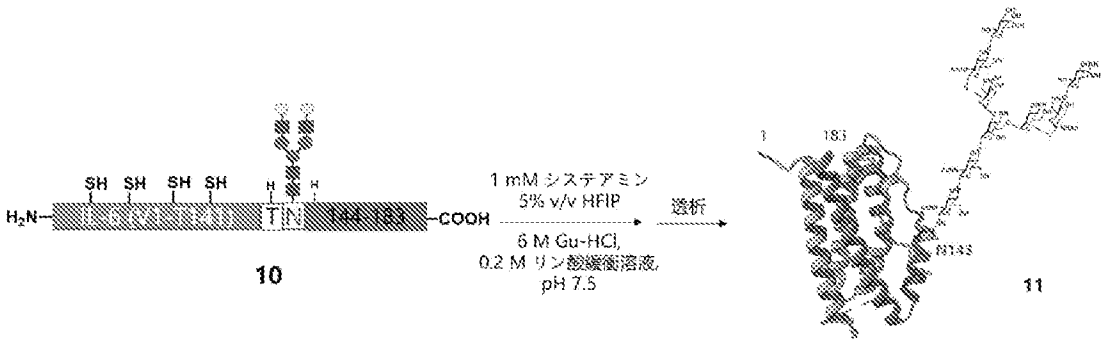
[化36]



[0098] 化合物９（０．９ｍｇ、０．０３μｍｏｌ）をＨＦＩＰに溶かし、ＨＣｌ溶液を加え、１００ｍＭにした。この溶液を室温で放置し、糖鎖可溶化基が除去できたことをＬＣ／ＭＳで確認し（図９）、そのままタンパク質フォールディング操作を実施した。

[0099] 糖鎖可溶化基の除去と、ＩＬ－６のフォールディング

[化37]



化合物１０を含むＨＦＩＰ溶液に、６Ｍ　Ｇｕ－ＨＣｌと１ｍＭシステアミン（富士フイルム和光純薬株式会社）を含む５０ｍＭトリス緩衝溶液（最終ｐＨは７．３～７．５）を加え、室温で放置した。フォールディングの反応はＬＣ／ＭＳで追跡し、フォールディング後、５０ｍＭのトリス緩衝溶液（ｐＨ＝８）で透析し、フォールドしたＩＬ－６　１１を得た（図１０）。ＥＳＩ－ＭＳ　［Ｍ＋Ｈ］＋１　ｃａｌｃｕｌａｔｅｄ　２２４３２．２７３０，ｆｏｕｎｄ　２２４３０．８２０９

請求の範囲

[請求項1] タンパク質またはペプチド用の親水性の可溶化基であって、

糖鎖部分と、前記糖鎖のアミノ基またはカルボキシ基に結合した、アミノ酸側鎖に結合しかつ酸の存在下で前記タンパク質またはアミノ酸の側鎖から脱離可能な官能基部分とからなる、

可溶化基。

[請求項2] 請求項１に記載の可溶化基であって、

糖鎖部分と、前記糖鎖のアミノ基またはカルボキシ基に結合したトリフェニルメタノール部分とからなる、

可溶化基。

[請求項3] 請求項２に記載の可溶化基であって、

前記トリフェニルメタノール部分は、前記糖鎖のカルボキシ基に結合している、

可溶化基。

[請求項4] 請求項１に記載の可溶化基であって、

前記糖鎖は、４個以上の糖からなることを特徴とする、

可溶化基。

[請求項5] 請求項１に記載の可溶化基であって、

前記糖鎖は、７個以上糖からなることを特徴とする、

可溶化基。

[請求項6] 請求項１に記載の可溶化基であって、

前記糖鎖は、９個以上糖からなることを特徴とする、

可溶化基。

[請求項7] 請求項１に記載の可溶化基であって、

前記糖鎖は、２本鎖複合型糖鎖、３本鎖複合型糖鎖、または４本鎖複合型糖鎖であることを特徴とする、

可溶化基。

[請求項8] 請求項１に記載の可溶化基であって、

前記糖鎖は、２本鎖複合型糖鎖であることを特徴とする、

可溶化基。

[請求項9] 請求項８に記載の可溶化基であって、

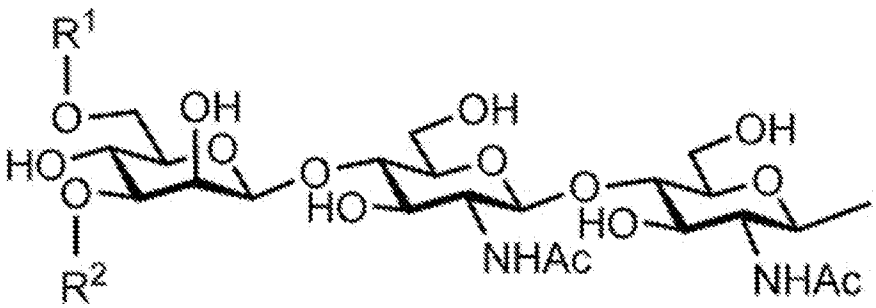
前記２本鎖複合型糖鎖が、ジシアロ糖鎖、モノシアロ糖鎖、アシアロ糖鎖、ジグルクナック糖鎖、およびジマンノース糖鎖からなる群から選択される糖鎖であることを特徴とする、

可溶化基。

[請求項10] 請求項１に記載の可溶化基であって、

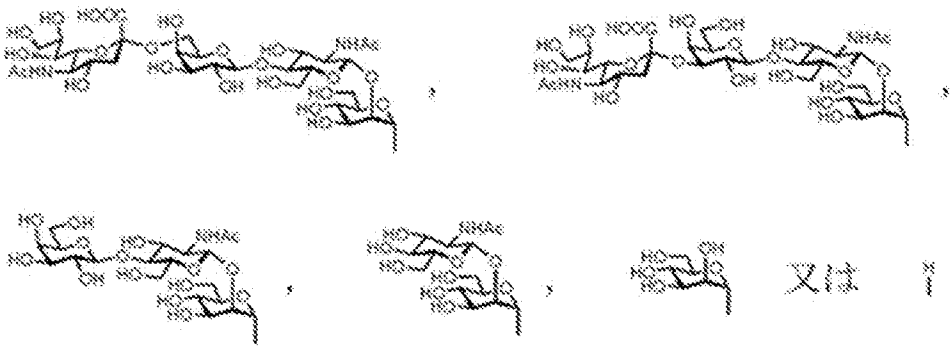
前記糖鎖は、下記式：

[化1]



［式中、Ｒ[1]およびＲ[2]は、同一または異なって、

[化2]



を示し、Ａｃは、アセチル基を示す。］

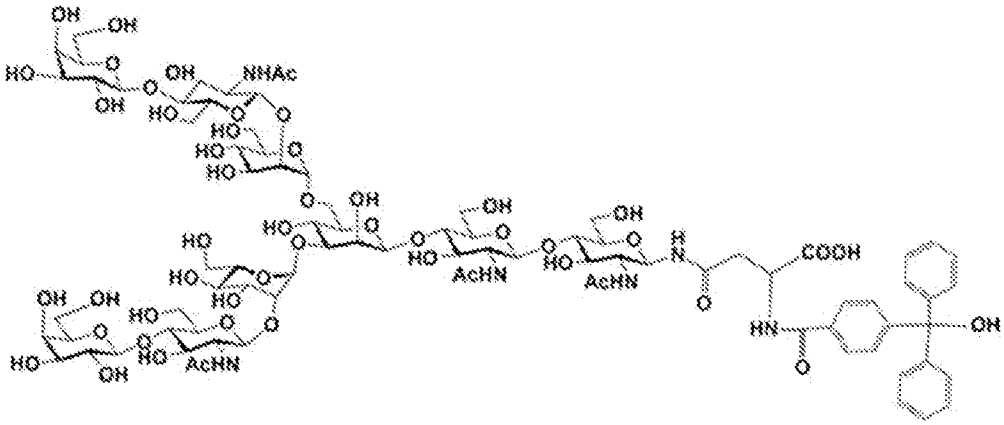
で表される糖鎖であることを特徴とする、

可溶化基。

[請求項11] 請求項１に記載の可溶化基であって、

下記構造を有する：

[化3]



可溶化基。

[請求項12] 請求項１に記載の可溶化基を１つ以上有する、ペプチドまたはタンパク質。

[請求項13] 請求項１２に記載のペプチドまたはタンパク質であって、

難水溶性のペプチドまたはタンパク質である、

ペプチドまたはタンパク質。

[請求項14] 請求項１２に記載のペプチドまたはタンパク質であって、

インターロイキンおよび膜貫通タンパク質、ならびにその断片よりなる群から選択されるペプチドまたはタンパク質。

[請求項15] 請求項１４に記載のペプチドまたはタンパク質であって、

ロドプシンもしくはＩＬ－６、またはその断片である、

ペプチドまたはタンパク質。

[請求項16] 可溶化タンパク質またはペプチドを製造する方法であって、

任意のタンパク質またはペプチドを構成する１つ以上のアミノ酸側鎖のスルフドリル基、カルボキシ基またはアミノ基に、請求項１に記載の可溶化基を結合するステップ、

を含む、

方法。

[請求項17] 難水溶性タンパク質またはペプチドを用いて、目的のタンパク質またはペプチドを製造する方法であって、

前記難水溶性タンパク質またはペプチドを構成する１つ以上のアミノ酸側鎖のスルフドリル基、カルボキシ基またはアミノ基に、請求項１に記載の可溶化基を結合して可溶化するステップ、および

前記可溶化されたタンパク質またはペプチドを、別の可溶性タンパク質もしくはペプチド、または可溶化タンパク質もしくはペプチドと連結して、目的のタンパク質を取得するステップ

を含む、

製造方法。

[請求項18] 請求項１７に記載の方法であって、

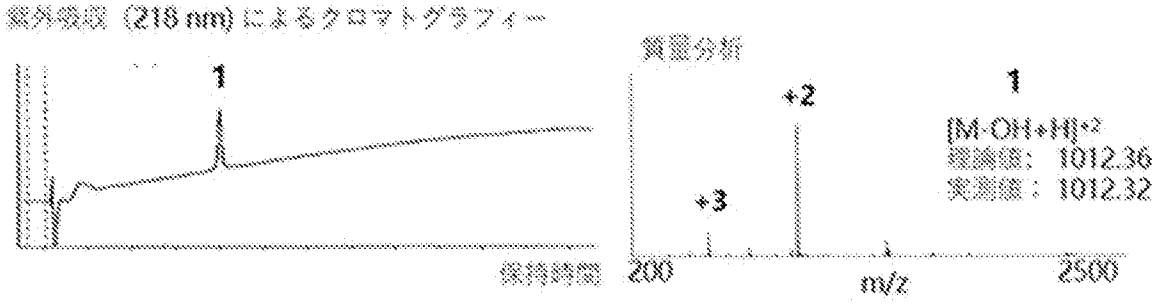
酸の存在下で前記目的のタンパク質から前記可溶化基を脱離させるステップ、および

前記可溶化基を回収するステップ、

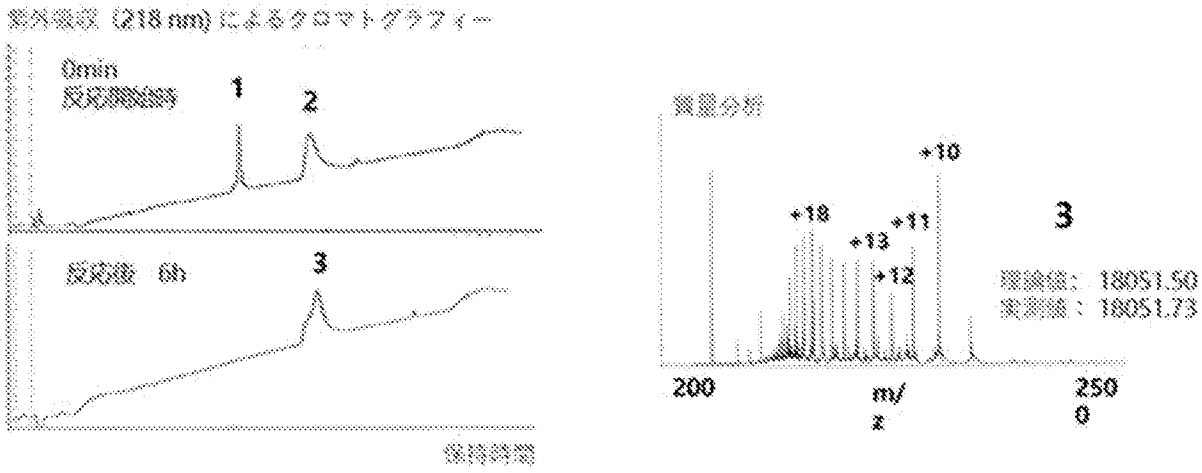
をさらに含む、

製造方法。

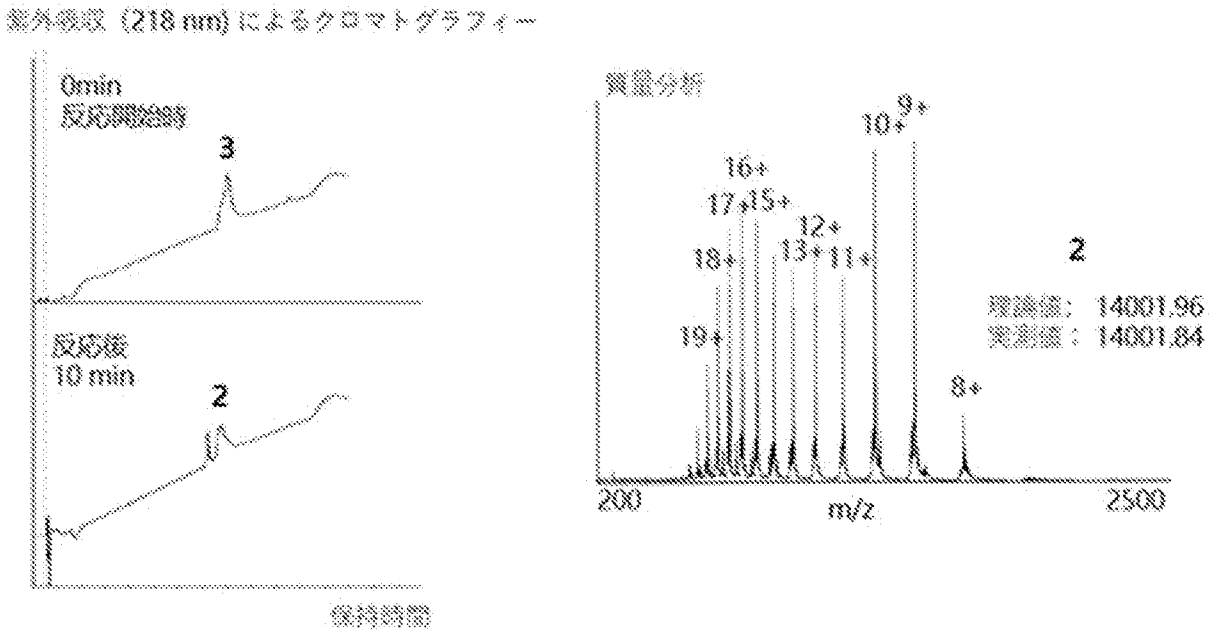
[図1]


紫外吸収（218 nm）によるクロマトグラフィー
1
保持時間
質量分析
+2
+3
1
[M-OH+H]+2
理論値： 1012.36
実測値： 1012.32
200
m/z
2500

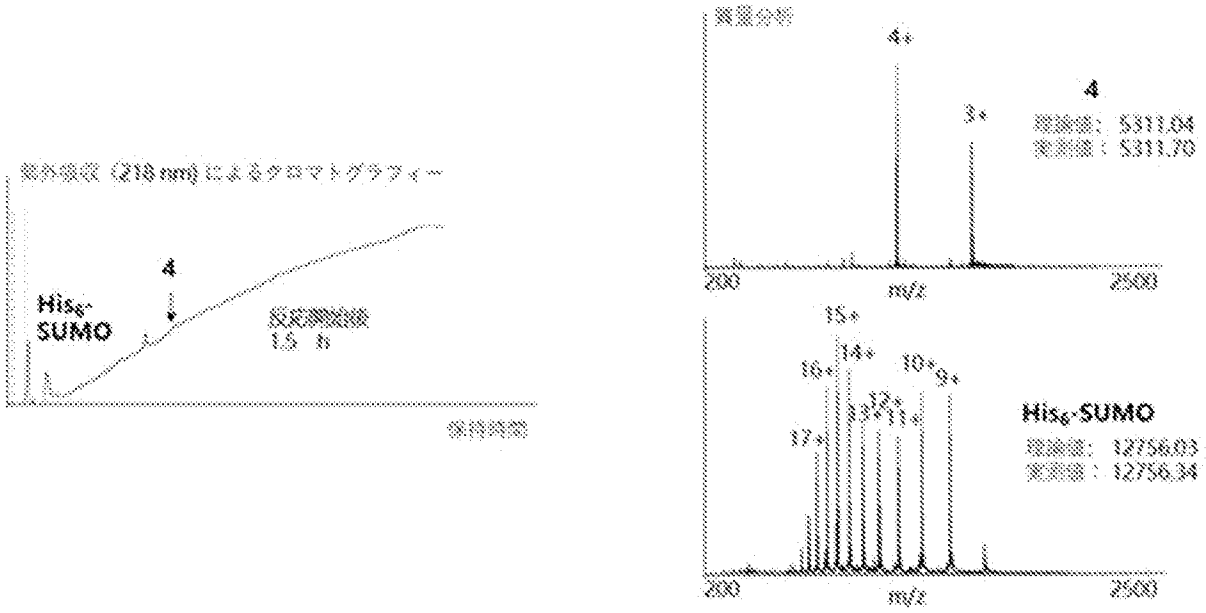
[図2]


紫外吸収（218 nm）によるクロマトグラフィー
0min
1
2
反応後 6h
3
保持時間
質量分析
+10
+18
+13
+11
+12
3
理論値： 18051.50
実測値： 18051.73
200
m/z
250
0

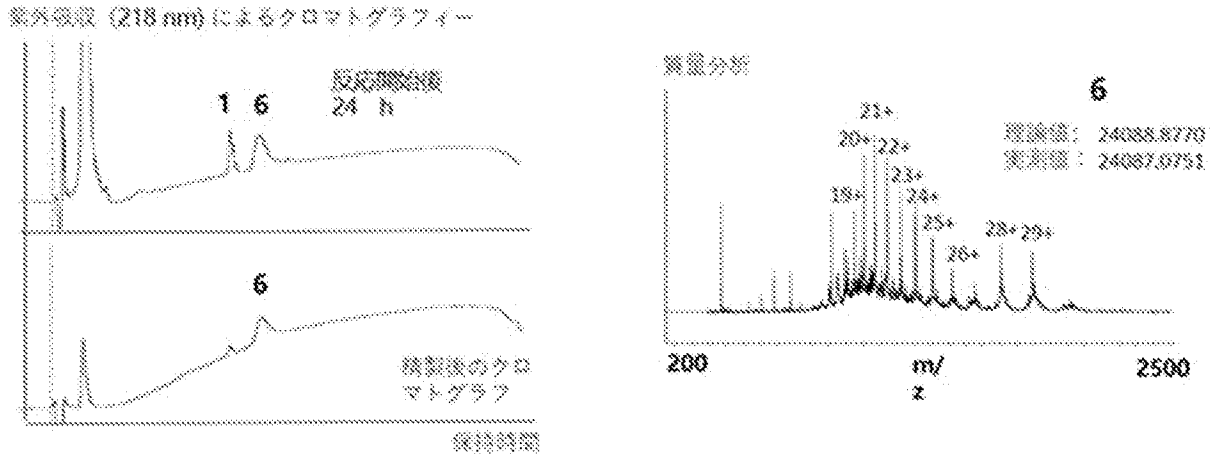
[図3]


紫外吸収（218 nm）によるクロマトグラフィー
0min
3
反応後
10 min
2
保持時間
質量分析
9+
10+
16+
17+
15+
12+
18+
13+
11+
19+
8+
2
理論値： 14001.96
実測値： 14001.84
200
m/z
2500

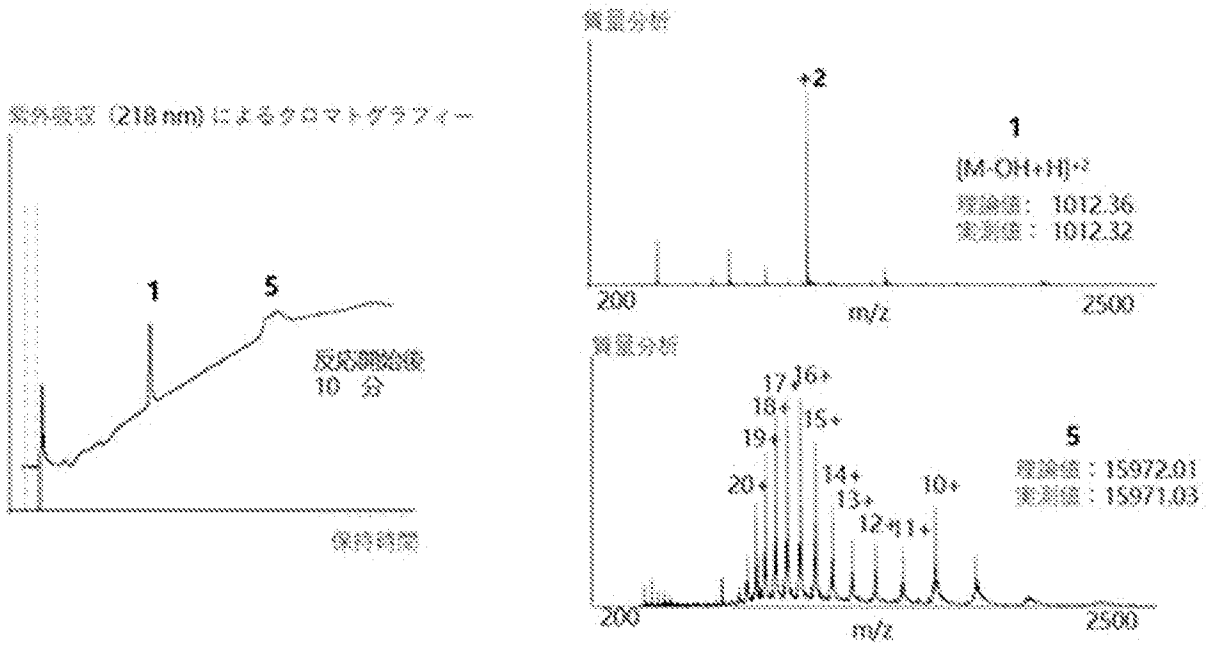
[図4]


紫外吸収（218 nm）によるクロマトグラフィー
His6-SUMO
4
反応開始後
1.5 h
保持時間
質量分析
4
4+
3+
200
m/z
2500
His6-SUMO
15+
14+
10+
9+
12+
13+
11+
17+

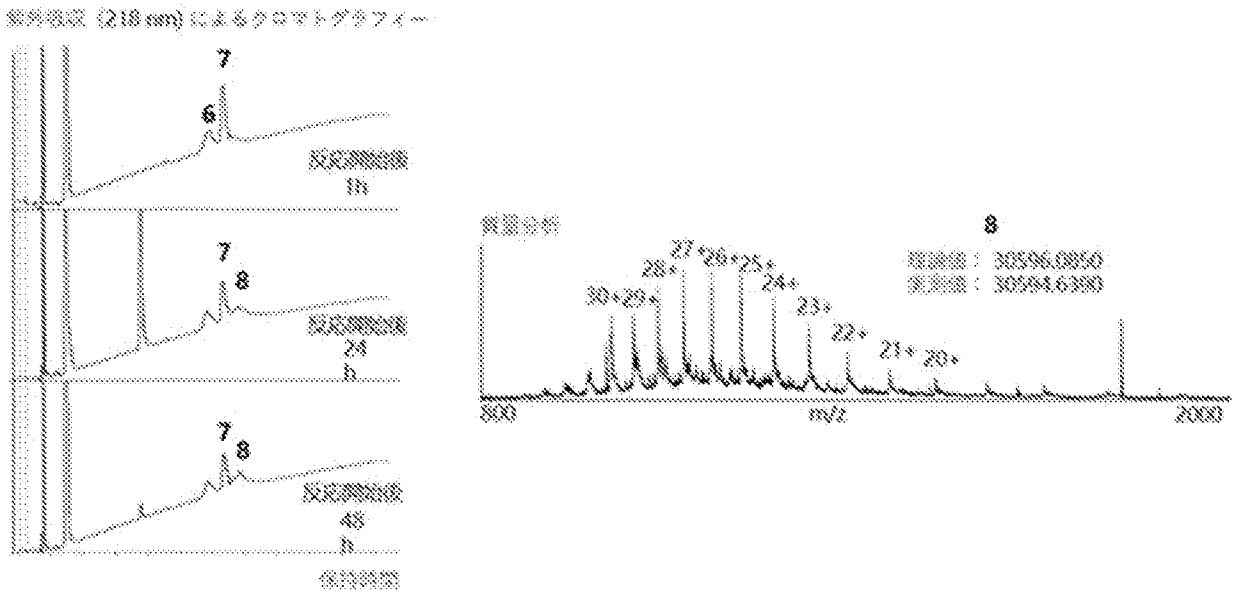
[図5]


紫外吸収（218 nm）によるクロマトグラフィー
1
6
反応開始後
24 h
6
精製後のクロマトグラフ
保持時間
質量分析
6
21+
20+
22+
23+
19+
24+
25+
28+
29+
26+
200
m/z
2500

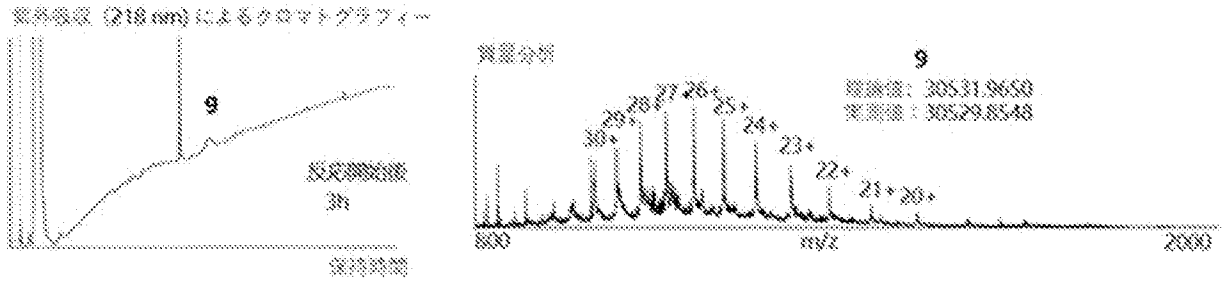
[図6]


紫外吸収（218 nm）によるクロマトグラフィー
1
5
反応開始後
10 分
保持時間
質量分析
+2
1
200
m/z
2500
5
17+
16+
18+
15+
19+
20+
14+
13+
10+
12+
11+

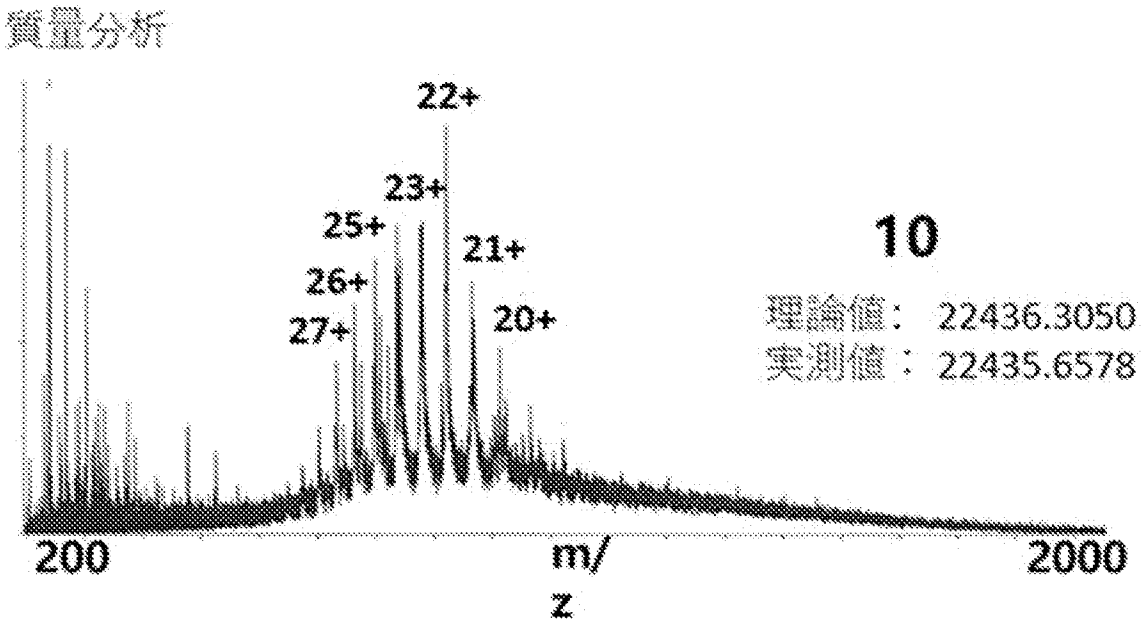
[図7]


7
6
1h
7
8
2h
7
8
4h
8
30+
29+
28+
27+
26+
25+
24+
23+
22+
21+
20+
m/z
2000

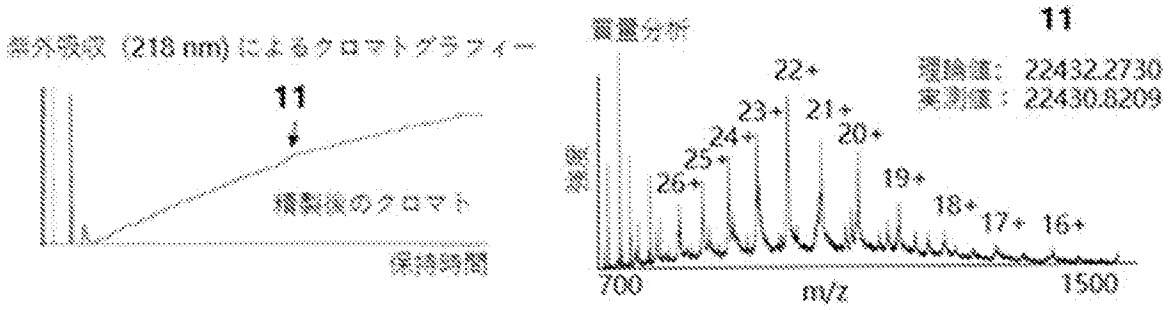
[図8]


9
3h
9
30+
29+
28+
27+
26+
25+
24+
23+
22+
21+
20+
m/z
2000

[図9]


質量分析
22+
23+
25+
26+
27+
21+
20+
10
理論値： 22436.3050
実測値： 22435.6578
200
m/z
2000

[図10]


紫外吸収（218 nm）によるクロマトグラフィー
11
精製後のクロマト
保持時間
質量分析
11
理論値： 22432.2730
実測値： 22430.8209
22+
23+
21+
24+
20+
25+
19+
26+
18+
17+
16+
強度
700
m/z
1500

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/024239

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H 5/06(2006.01)i; ***C07K 14/54***(2006.01)i; ***C07K 14/705***(2006.01)i; ***C08B 37/08***(2006.01)i
FI: C07H5/06; C07K14/54; C07K14/705; C08B37/08 A

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)

C07H5/06; C07K14/54; C07K14/705; C08B37/08

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/007747 A1 (OTSUKA CHEMICAL CO., LTD.) 20 January 2011 (2011-01-20) in particular, paragraphs [0043]-[0093]	1, 4-10, 12-14, 16-17
Y		1-10, 12-18
A		11
X	ANGWANDTE CHEMIE. International Edition. 2011, 50(28), 6406-6410, DOI 10.1002/anie.201101270 in particular, schemes S5-S7	1-10, 12-13, 16-17
Y		1-10, 12-18
A		11
Y	ANGWANDTE CHEMIE. International Edition. 2018, 57(8), 2105-2109, DOI 10.1002/anie.201711546 in particular, fig. 2	1-10, 12-18
A		11

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
28 August 2024	**24 September 2024**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Organic & Biomolecular Chemistry. 2019, 17(48), 10228-10236, DOI 10.1039/c9ob02253h in particular, scheme 1	1-10, 12-18
A		11
Y	ChemBioChem. 2019, 20(16), 2063-2069, DOI 10.1002/cbic.201900193 in particular, fig. 1	1-10, 12-18
A		11
Y	Organic & Biomolecular Chemistry. 2019, 17(5), 1202-1205, DOI 10.1039/c8ob03098g in particular, fig. 1	1-10, 12-18
A		11
Y	田中 克典 TANAKA, Katsunori. 糖鎖を用いた生体内イメージングとターゲティング In Vivo Imaging and Targeting by Oligosacharides and Related Molcules. BIO INDUSRTY, February issue. 27(2), 2010, 29-36 in particular, p. 29, left column, p. 30, left column, p. 35, left column	1-10, 12-18
A		11
X	WO 2019/131964 A1 (KYOUWA HAKKOU KIRINN CO., LTD.) 04 July 2019 (2019-07-04) in particular, claims, examples	1, 4-10, 12-14, 16-17
Y		1-10, 12-18
A		11
Y	US 2013/0324707 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 05 December 2013 (2013-12-05) in particular, claims, examples	1-10, 12-18
A		11
Y	JP 6-256394 A (KIRIN AMUJIEN DERAUEA INC.) 13 September 1994 (1994-09-13) in particular, claims, paragraphs [0011], [0033], [0038]	1-10, 12-18
A		11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/024239

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Document 1: WO 2011/007747 A1 (OTSUKA CHEMICAL CO., LTD.) 20 January 2011 (2011-01-20) in particular, paragraphs [0043]-[0093] & US 2012/0114595 A1
Document 2: ANGWANDTE CHEMIE. International Edition. 2011, 50(28), 6406-6410, DOI 10.1002/anie.201101270 in particular, schemes S5-S7

(Invention 1) Claims 1-11

Claims 1-11 have a special technical feature of "a hydrophilic solubilizing group for a protein or peptide, the solubilizing group comprising a saccharide moiety; and a functional group moiety that is bound to the amino group or carboxyl group of the saccharide, bound to the side chain of the amino acid, and capable of being detached from the side chain of the protein or amino acid in the presence of an acid," and are thus classified as invention 1.

Here, “soluble group” is understood as the invention of a composition of matter, and is also understood as “a compound having a soluble group” or “a protein having a soluble group.” n addition, in the claim 11 dependent on claim 1, the chemical structure of a protein-free compound is described, and since the term “soluble group having the structure” is described, the examination is made on the assumption that the “soluble group” means a “compound having a soluble group” in a broader interpretation.

(Invention 2) Claims 12-18

Claim 12, which is "a peptide or a protein having one or more solubilizing groups set forth in claim 1", shares with claim 1 classified as invention 1, the common technical feature of “a hydrophilic solubilizing group for a protein or peptide, the solubilizing group comprising a sugar chain moiety and a functional group moiety bound to an amino group or carboxyl group of the sugar chain, bound to an amino acid side chain, and capable of detaching from the side chain of the protein or amino acid in the presence of an acid." However, the technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosures of documents 1-2 and thus cannot be the to be a special technical feature. Also, note that the definition of “functional group moiety” is qualitative.

Also, there are no other the same as or corresponding special technical features between these inventions.

In addition, claims 12-18 are not dependent on claim 1. Furthermore, claims 12-18 are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1.

Thus, claims 12-18 cannot be classified as invention 1, and are thus classified as invention 2.

1. ☑ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant’s protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant’s protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☑ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/024239

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2011/007747 A1	20 January 2011	US 2012/0114595 A1 in particular, paragraphs [0093]-[0181] EP 2455396 A1	
WO 2019/131964 A1	04 July 2019	US 2021/0060169 A1 in particular, claims, examples EP 3733693 A1 KR 10-2020-0103681 A CN 111868079 A	
US 2013/0324707 A1	05 December 2013	US 2010/0311956 A1 in particular, claims, examples	
JP 6-256394 A	13 September 1994	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/024239

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07H 5/06(2006.01)i; C07K 14/54(2006.01)i; C07K 14/705(2006.01)i; C08B 37/08(2006.01)i
FI: C07H5/06; C07K14/54; C07K14/705; C08B37/08 A

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（ＩＰＣ））

C07H5/06; C07K14/54; C07K14/705; C08B37/08

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	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY (STN)

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
X	WO 2011/007747 A1 (大塚化学株式会社) 20.01.2011 (2011-01-20) 特に、段落0043-0093	1,4-10,12-14,16-17
Y		1-10,12-18
A		11
X	Angewandte Chemie, International Edition, 2011, 50(28), 6406-6410, DOI 10.1002/anie.201101270 特に、スキームＳ５～Ｓ７	1-10,12-13,16-17
Y		1-10,12-18
A		11
Y	Angewandte Chemie, International Edition, 2018, 57(8), 2105-2109, DOI 10.1002/anie.201711546 特に、Figure 2	1-10,12-18
A		11

☑ 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
"D" 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
"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抵触するものではなく、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	国際調査報告の発送日
28.08.2024	24.09.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
安藤　倫世 4P 9837
電話番号 03-3581-1101 内線 3492

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
Y	Organic & Biomolecular Chemistry, 2019, 17(48) , 10228-10236, DOI 10.1039/c9ob02253h 特に、スキーム１	1-10,12-18
A		11
Y	ChemBioChem, 2019, 20(16), 2063-2069, DOI 10.1002/cbic.201900193 特に、Figure 1	1-10,12-18
A		11
Y	Organic & Biomolecular Chemistry, 2019, 17(5), 1202-1205, DOI 10.1039/c8ob03098g 特に、Fig. 1	1-10,12-18
A		11
Y	田中 克典 Katsunori Tanaka Katsunori Tanaka, 糖鎖を用いた生体内イメージングとターゲティング In Vivo Imaging and Targeting by Oligosacharides and Related Molcules, ＢＩＯ　ＩＮＤＵＳＴＲＹ　２月号 , 27(2), 2010, 29-36 特に、第29頁左欄、第30頁左欄、第35頁左欄	1-10,12-18
A		11
X	WO 2019/131964 A1 (協和発酵キリン株式会社) 04.07.2019 (2019-07-04) 特に、特許請求の範囲、実施例	1,4-10,12-14,16-17
Y		1-10,12-18
A		11
Y	US 2013/0324707 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 05.12.2013 (2013-12-05) 特に、特許請求の範囲、実施例	1-10,12-18
A		11
Y	JP 6-256394 A (キリンーアムジエン（デラウエア）インコーポレーテツド) 13.09.1994 (1994-09-13) 特に、特許請求の範囲、段落0011,0033,0038	1-10,12-18
A		11

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/024239

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

文献１：WO 2011/007747 A1（大塚化学株式会社）20.01.2011(2011-01-20)
特に、段落0043-0093
& US 2012/0114595 A1
文献２：Angewandte Chemie, International Edition, 2011, 50(28), 6406-6410
DOI 10.1002/anie.201101270
特に、スキームＳ５～Ｓ７

（発明１）請求項１－１１
請求項１－１１は、「タンパク質またはペプチド用の親水性の可溶化基であって、糖鎖部分と、前記糖鎖のアミノ基またはカルボキシ基に結合した、アミノ酸側鎖に結合しかつ酸の存在下で前記タンパク質またはアミノ酸の側鎖から脱離可能な官能基部分とからなる、可溶化基。」という技術的特徴を有しているので、発明１に区分する。
ここで、「可溶性基。」は、物の発明であると解されるところ、「可溶性基を有する化合物」であるとも、「可溶性基を有するタンパク質」であるとも解される。そして、請求項１に従属する請求項１１において、タンパク質部分の存在しない化合物の化学構造が記載された上、当該「構造を有する可溶性基。」と記載されていることから、「可溶性基。」は、より広義の解釈である前者「可溶性基を有する化合物」を意味するものとして、判断を行う。

（発明２）請求項１２－１８
請求項１２は、「請求項１に記載の可溶化基を１つ以上有する、ペプチドまたはタンパク質。」であり、発明１に区分された請求項１と、「タンパク質またはペプチド用の親水性の可溶化基であって、糖鎖部分と、前記糖鎖のアミノ基またはカルボキシ基に結合した、アミノ酸側鎖に結合しかつ酸の存在下で前記タンパク質またはアミノ酸の側鎖から脱離可能な官能基部分とからなる、可溶化基。」を有するという共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献１－２の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。なお、「官能基部分」の定義が定性的であることに留意する。
また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。
さらに、請求項１２－１８は、請求項１の従属請求項ではない。また、請求項１２－１８は、発明１に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。
したがって、請求項１２－１８は発明１に区分できず、発明２に区分する。

1. ☑ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☑ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/024239

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2011/007747 A1	20.01.2011	US 2012/0114595 A1 特に、段落0093-0181 EP 2455396 A1	
WO 2019/131964 A1	04.07.2019	US 2021/0060169 A1 特に、特許請求の範囲、実施例 EP 3733693 A1 KR 10-2020-0103681 A CN 111868079 A	
US 2013/0324707 A1	05.12.2013	US 2010/0311956 A1 特に、特許請求の範囲、実施例	
JP 6-256394 A	13.09.1994	（ファミリーなし）	