



(21)申請案號：101135056

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 09 月 25 日

(51)Int. Cl.: C07K1/107 (2006.01)

(30)優先權：2011/09/26 日本

2011-210007

(71)申請人：糖鎖工學研究所股份有限公司(日本) GLYTECH, INC. (JP)

日本

(72)發明人：木尾原康宏 KAJIHARA, YASUHIRO (JP)；岡本亮 OKAMOTO, RYO (JP)；木村元春 KIMURA, MOTOHARU (JP)；石井一之 ISHII, KAZUYUKI (JP)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

JP 2009-242372A

WO 2010/150730A

Jonathan P. Richardson and Derek Macmillan, Optimisation of chemical protein cleavage for erythropoietin semi-synthesis using native chemical ligation, Org. Biomol. Chem., 2008, 6, 3977-3982, 2008/09/05.

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：19 項 圖式數：6 共 77 頁

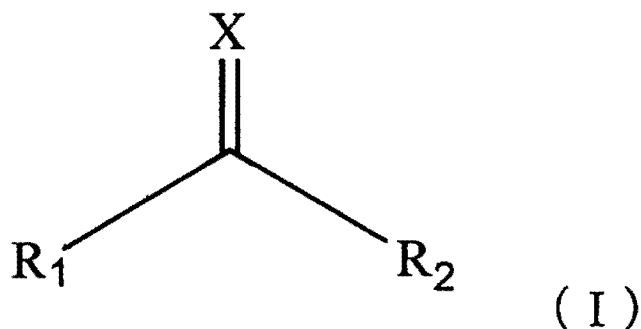
(54)名稱

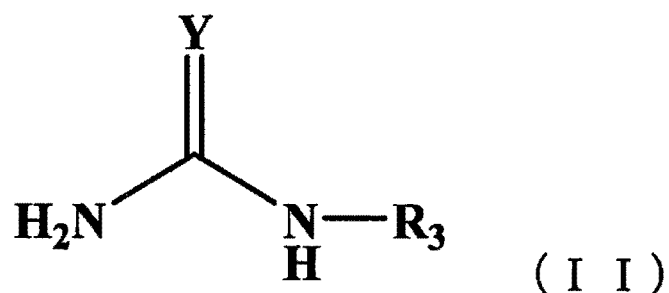
適於 N C L 法之多胜肽片段之有效率的製造方法

NCL-ADAPTED METHOD FOR EFFICIENTLY PRODUCING POLYPEPTIDE FRAGMENTS

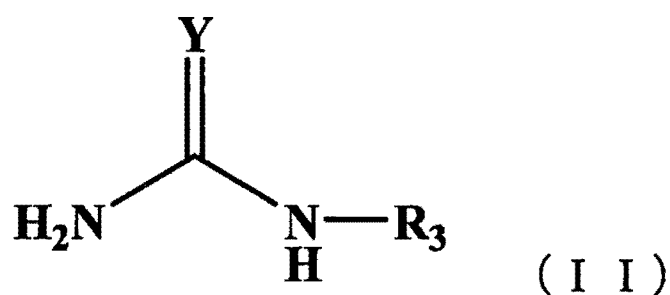
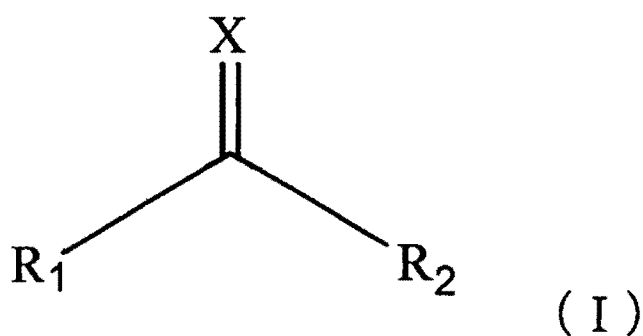
(57)摘要

本發明以提供適於 NCL 法之多胜肽片段之有效率的製造方法為目的。本發明的製造方法包含將包括經-Cys-W-(His)_n-Z-Met-的介入序列而連接的 N 末端為半胱胺酸之第 1 多胜肽片段及第 2 多胜肽片段之多胜肽與 CNBr 反應，而得 N 末端為半胱胺酸的第 1 多胜肽片段與第 3 多胜肽片段的步驟，與將第 3 多胜肽片段與下述式(I)表示的化合物及下述式(II)表示的化合物依序反應，而得 C 末端被修飾的第 2 多胜肽片段的步驟。

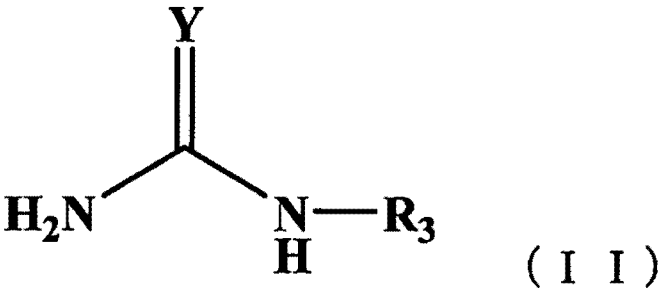
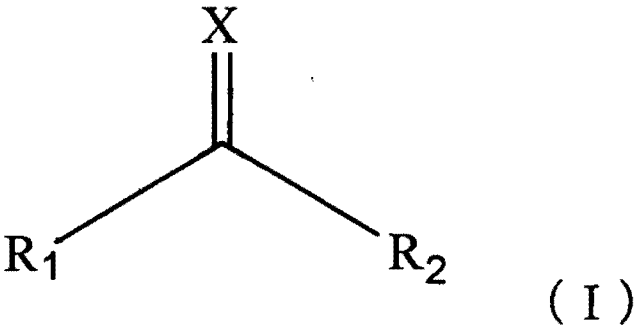




The purpose of this invention is to provide a NCL-adapted method for efficiently producing polypeptide fragments. The method of the invention comprises a step of reacting a polypeptide with CNBr, wherein the polypeptide comprises a first polypeptide fragment having N-terminal being cysteine and a second polypeptide fragment, wherein the first polypeptide fragment and the second polypeptide fragment are linked through an intervening sequence of -Cys-W-(His)_n-Z- Met, to obtain a first polypeptide fragment having N-terminal being cysteine and a third polypeptide fragment; and a step of reacting the third polypeptide fragment with the compound represented by the following formula (I) and then the compound represented by the following formula (II), to obtain a second polypeptide fragment having a modified C-terminal.



特徵化學式：



發明摘要

公告本

※申請案號：101175056

※申請日：10/1/97

※IPC 分類：C07K 1/02(2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

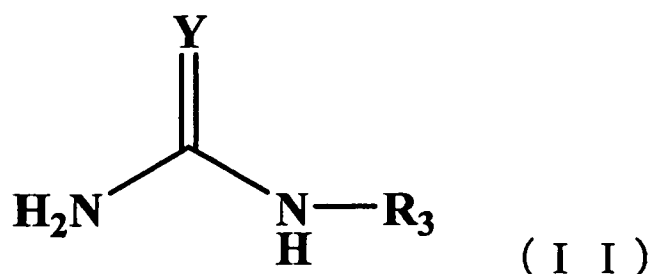
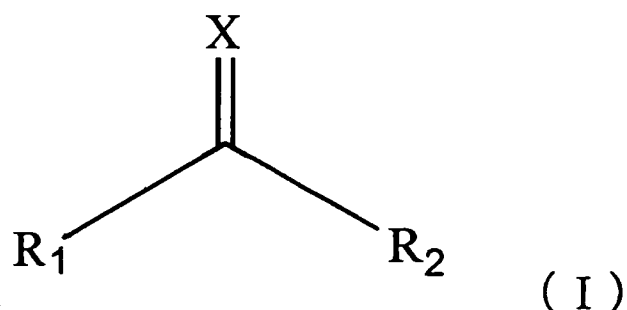
適於 NCL 法之多胜肽片段之有效率的製造方法

NCL-ADAPTED METHOD FOR EFFICIENTLY

PRODUCING POLYPEPTIDE FRAGMENTS

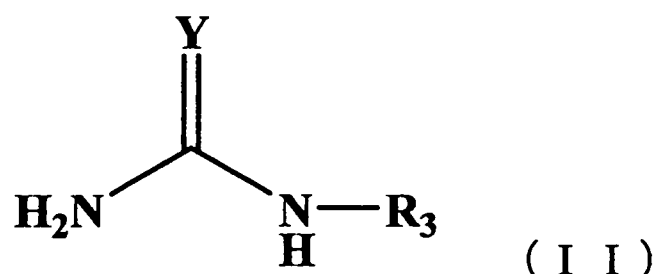
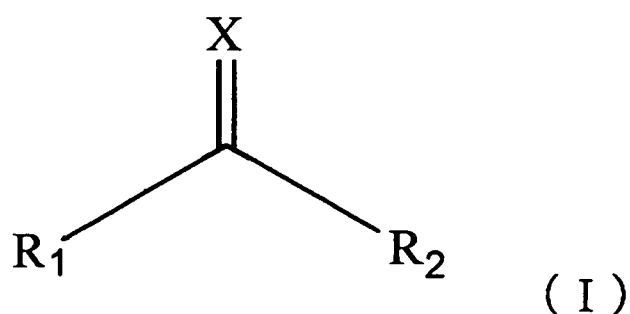
【中文】

本發明以提供適於 NCL 法之多胜肽片段之有效率的製造方法為目的。本發明的製造方法包含將包括經 -Cys-W-(His)_n-Z-Met- 的介入序列而連接的 N 末端為半胱胺酸之第 1 多胜肽片段及第 2 多胜肽片段之多胜肽與 CNBr 反應，而得 N 末端為半胱胺酸的第 1 多胜肽片段與第 3 多胜肽片段的步驟，與將第 3 多胜肽片段與下述式(I)表示的化合物及下述式(II)表示的化合物依序反應，而得 C 末端被修飾的第 2 多胜肽片段的步驟。



【英文】

The purpose of this invention is to provide a NCL-adapted method for efficiently producing polypeptide fragments. The method of the invention comprises a step of reacting a polypeptide with CNBr, wherein the polypeptide comprises a first polypeptide fragment having N-terminal being cysteine and a second polypeptide fragment, wherein the first polypeptide fragment and the second polypeptide fragment are linked through an intervening sequence of -Cys-W-(His)_n-Z- Met, to obtain a first polypeptide fragment having N-terminal being cysteine and a third polypeptide fragment; and a step of reacting the third polypeptide fragment with the compound represented by the following formula (I) and then the compound represented by the following formula (II), to obtain a second polypeptide fragment having a modified C-terminal.



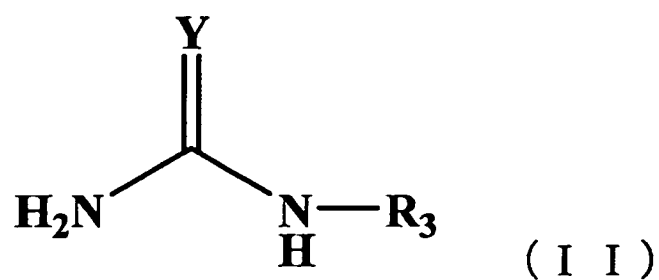
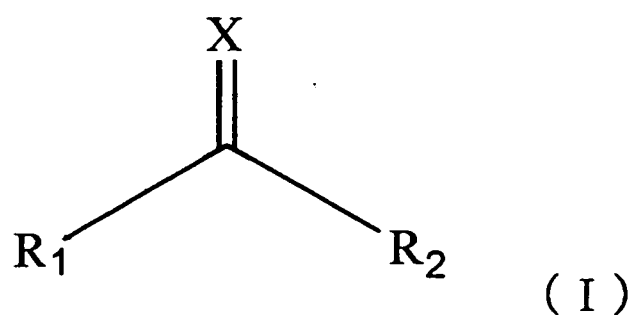
【代表圖】

【本案指定代表圖】：無指定代表圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

由於本案的圖式為實施形態之模式圖，並非本案的代表圖。故本案無指定代表圖。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

適於 NCL 法之多胜肽片段之有效率的製造方法

NCL-ADAPTED METHOD FOR EFFICIENTLY

PRODUCING POLYPEPTIDE FRAGMENTS

【技術領域】

本發明是關於適合於 NCL 法(天然化學連接法(Native Chemical Ligation))的多胜肽片段之有效率的製造方法。

【先前技術】

對蛋白質的合成，已知有生物合成，化學合成，無細胞合成等種種方法。在生物合成方法中，利用大腸菌等的細胞內，將編碼作為合成目的之蛋白質的 DNA 導入於細胞內使其表現，而得蛋白質。化學合成是將胺基酸以有機化學的方法依序鍵結，而合成目的之蛋白質。又，無細胞合成是利用存在於大腸菌等的各種細胞內的酶等，以無細胞的方法合成蛋白質。這些方法，可視蛋白質的使用目的，大小，要加成的性質等而適宜，分別選用，或組合。

在胺基酸序列的中間部分，要合成均勻地具有糖鏈或脂質等的特定修飾的蛋白質時，使用的方法是將含有糖鏈的胜肽片段，與不含糖鏈的胜肽片段各分別合成，以連接法(ligation)合成最後的蛋白質。含糖鏈的胜肽片段的合成，可使用預先經以糖鏈或脂質等修飾的胺基酸而化學合成。有不含糖鏈部分的胜肽片段的合成，可使用化學合成

或生物合成而製造。

化學合成胜肽鏈的方法而言，主要使用固相合成法。但固相合成法所得的胜肽鏈，一般是短鏈，最長也不過是 50 個殘基左右。因此要合成長鏈的胜肽鏈時，使用生物合成爲理想。

胜肽鏈連接手法而言有各種各樣的手法的報告，廣被使用的方法之一就是天然型化學的連接法 (Native Chemical Ligation, NCL)。NCL 法已知在無保護的胜肽鏈間也可進行，要在連接部位 (ligation 部位) 生成天然醯胺鍵結 (胜肽鍵結) 的有用的方法 (例如，專利文獻 1)。NCL 法是在 C 末端有 α 羧硫酯部分的第 1 胜肽與在 N 末端有半胱胺酸殘基的第 2 胜肽之間的化學選擇反應，半胱胺酸側鏈的硫醇基 (SH 基，也稱爲巯基) 與硫酯基的羰基碳選擇性地反應，經由硫醇基交換反應，生成硫酯鍵結初期中間物。此中間物進行自發性分子內轉位，在連接部位產生天然醯胺鍵，另一方面，使半胱胺酸側鏈硫醇再生。

此方法是只使用無保護的胜肽在緩衝溶液中混合，而可經由胜肽鍵結將二個胜肽鏈連接的手法。NCL 法是如胜肽的有多數官能基的化合物間的反應，也可選擇性地將一方的胜肽 C 末端與他方的胜肽 N 末端連接。由如此觀點，要將蛋白質化學合成時，如何利用 NCL 法成爲很重要。

但在利用 NCL 法時的問題點而言，可舉做爲原料而必需的，在 C 末端有 α 羧硫酯部分的胜肽硫酯體的調製。胜肽硫酯的調製法，有各種各樣的方法的報告 (例如，非專

利文獻 1 及專利文獻 2)，任何的手法都是，以固相合成法做為基礎，受固相合成的限制所束縛，因而能合成的胜肽硫酯體的大小受限制。再者，使用連接子的手法則需要將非天然型的胺基酸衍生物，或特別的衍生物另行化學合成，其步驟未必是簡便的。

另一方面，有以細胞生物合成的多胜肽片段做為硫酯體而得的方法(內含蛋白(Intein)法)的報告(非專利文獻 2)，但使用此方法時，不只是使多胜肽表現，要使蛋白質有發揮剪接(splicing)功能，則需要有成為標靶的胜肽序列，又所表現的內含蛋白複合蛋白質必需摺疊(folding)，採取固有的三維構造。因此，視所要表現的多胜肽序列，未必能得到胜肽硫酯，經常有需要做充分條件的最適化，附帶作業上的麻煩複雜性。

又，與 Intein 法之外，也有可適用於生物合成的多胜肽的硫酯體的製造方法的報告(專利文獻 3)。此方法是將所合成的多胜肽所含的半胱胺酸活性化，而將活性化的半胱胺酸的位置做為硫酯體而切取的方法。即，可將所活性化的半胱胺酸的 N 末端的胜肽片段做為硫酯體而得。但，用此方法時，所活性化的半胱胺酸在 C 末端被切取的多胜肽，在切取時其 N 末端形成化學性安定的環狀構造，不能使用於之後的蛋白合成。因此，N 末端的胜肽片段需要另外製造成為可連接的胜肽片段。

又，在生物合成中，全長的蛋白質雖能正常表現，但胜肽片段的情況時在細胞中會被認識有錯誤，被分解等有

不能正常表現的情況。於是，在將全長蛋白質生物合成之後，以上述方法將需要的胜肽片段做為硫酯體切取時，所切取的胜肽片段不能利用 C 末側的長鏈的多胜肽。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

[專利文獻 1]國際公開第 96/34878 號小冊

[專利文獻 2]國際公開第 2007/114454 號小冊

[專利文獻 3]國際公開第 2010/150730 號小冊

[非專利文獻]

[非專利文獻 1] Ingenito et al., J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 11369-11374

[非專利文獻 2] Schwartz et al., CHEM. COMMUN., 2003, 2087-2090

【發明內容】

（發明要解決的課題）

本發明的目的是提供一種適於 NCL 法、有效率地製造 N 末端為半胱氨酸的第 1 多胜肽片段與 C 末端被修飾的第 2 多胜肽片段的方法。

（解決課題的手段）

本發明者等，為了解決上述課題而累積研究的結果，發現：將第 1 多胜肽片段與第 2 多胜肽片段經由特定的序列，製成為 1 個多胜肽，則可以有效率地製造適於 NCL 法，N 末端為半胱氨酸的第 1 多胜肽片段與 C 末側被修飾的第 2 多胜肽片段。

即，本發明是關於適於 NCL 法之有效率地製造 N 末端為半胱氨酸的第 1 多胜肽片段與 C 末側被修飾的第 2 多胜肽片段的方法。該方法含有以下的步驟：

(1)具有以下的構造的多胜肽與 CNBr 反應：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段-Cys-W-(His)_n-Z-Met-第 1 多胜肽片段 (C 末側)

[在此 n 表示 0 至 10 的整數，Cys 表示半胱氨酸，W 表示任意的 1，2 或 3 個的胺基酸，Z 表示任意的 0，1，或 2 個的胺基酸，His 表示組胺酸，Met 表示甲硫氨酸。又，第 1 多胜肽片段的 N 末端是半胱氨酸。]

得以下多胜肽片段的步驟：

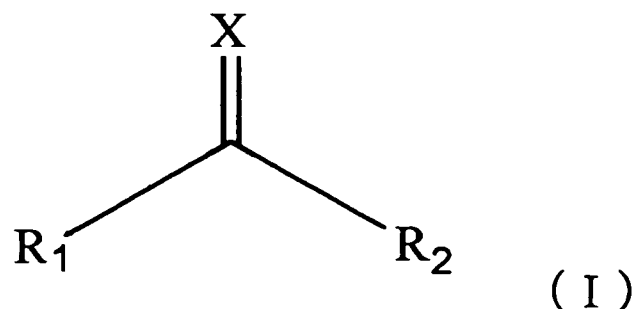
(A)N 末端為半胱氨酸的第 1 多胜肽片段；

(B)有以下的構造的第 3 多胜肽片段：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段-Cys-W-(His)_n-Z-Met'
(C 末側)

[在此，Met'表示，Met 的衍生物。]

(2)前述第 3 多胜肽片段，與下述式(I)表示的化合物反應：

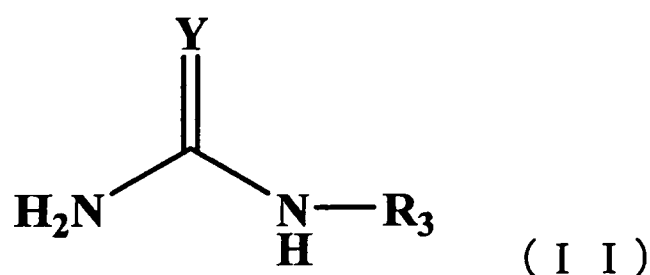


[式中，

X 是硫原子或氧原子，

R₁ 及 R₂ 是脫離基。]

繼而，在有機溶媒中，與下述式(II)表示的化合物反應：



[式中，

Y 是氧原子，硫原子，或=NH，

R₃ 是氫原子，鹼基，或烷氧羰基。]

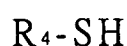
藉以獲得具有以下構造的 C 末側被修飾的第 2 多胜肽片段的步驟：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段 -C(=O)-NH-C(=Y)NHR₃

(C 末側)

在此，本發明的製造方法的一實施態樣中，再含有下述的步驟為特徵：

在前述(2)的步驟中所得的 C 末側被修飾的第 2 多胜肽片段，與下述式表示的硫醇反應：



[式中，R₄ 是由有取代或無取代的苄基，有取代或無取代的芳基，及有取代或無取代的烷基所成之群中所選擇的任一個基。]

將 C 末側的 -NH-C(=Y)NHR₃ 基與硫醇基交換，藉以獲得具有以下的構造的 C 末側被修飾第 2 多胜肽片段：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段 -C(=O)-SR₄ (C 末側)。

又，在本發明的製造方法的一實施態樣中，前述式(I)

表示的化合物的 X 是硫原子為特徵。

又，在本發明的製造方法的一實施態樣中，前述式(I)表示的化合物的 R₁ 是 -O-C₆ 芳基為特徵。

又，在本發明的製造方法的一實施態樣中，前述式(I)表示的化合物的 R₂ 是鹵原子，或有取代或無取代的 -S-C₆₋₁₀ 芳基為特徵。

又，在本發明的製造方法的一實施態樣中，前述式(II)表示的化合物的 Y 是 =NH 為特徵。

又，在本發明的製造方法的一實施態樣中，前述式(II)表示的化合物的 R₃ 是乙醯基為特徵。

又，在本發明的製造方法的一實施態樣中，前述，有以下的構造的多胜肽：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段 -Cys-W-(His)_n-Z-Met-第 1 多胜肽片段 (C 末側)

是由細胞表現的重組型多胜肽片段為特徵。

又，在本發明的製造方法的一實施態樣中，前述細胞是大腸菌為特徵。

又，在本發明的製造方法的一實施態樣中，W 是 1 個胺基酸，且為由 Val, Ile, Leu, Trp 所成之群中所選擇的任一個胺基酸為特徵。

又，在本發明的製造方法的一實施態樣中，n 是 6 至 10 為特徵。

又，本發明的別的態樣是關於製造適於 NCL 法，N 末側是半胱胺酸的第 1 多胜肽片段的製造方法，係將有以下

的構造的多胜肽與 CNBr 反應為特徵：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段-P-Met-第 1 多胜肽片段

(C 末側)

[在此，P 是任意的 0 至 10 個的胺基酸，Met 表示甲硫胺酸，第 1 多胜肽片段的 N 末側是半胱胺酸。]

又，本發明的別的態樣是關於含有下列步驟的糖鏈加成多胜肽的製造方法：

(1)將要製造的所希望的糖鏈加成多胜肽的胜肽序列，至少分類而設計成如下所示的多胜肽片段的步驟：

- 包括含有糖鏈加成的胺基酸的多胜肽之含有糖鏈多胜肽片段，
- 包括含有比含有糖鏈多胜肽片段在較靠 N 末側的所希望的糖鏈加成胜肽的 N 末側的多胜肽之第 2 多胜肽片段，
- 包括含有比含有糖鏈多胜肽片段在較靠 C 末側的所希望的糖鏈加成胜肽的 C 末側的多胜肽之第 1 多胜肽片段，
- 可以存在時，在含有糖鏈多胜肽片段與第 2 多胜肽片段之間的多胜肽片段，
- 可以存在時，在含有糖鏈多胜肽片段與第 1 多胜肽片段之間的多胜肽片段；

在此，第 1 多胜肽片段的 N 末端是設計為半胱胺酸，
(2)使用含有編碼具有以下構造的多胜肽的核苷酸序列的表現載體(expression vector)，並由大腸菌表現，而取得具有前述構造的多胜肽的步驟：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段-Cys-W-(His)_n-Z-Met-第 1 多胜

肽片段 (C 末側)

[在此，n 表示 0 至 10 的整數，Cys 表示半胱胺酸，W 表示任意的 1，2 或 3 個胺基酸，Z 表示任意的 0，1，或 2 個的胺基酸，His 表示組胺酸，Met 表示甲硫胺酸。又，第 1 多胜肽片段的 N 末端是半胱胺酸。]

(3)將在步驟(2)所得的多胜肽與 CNBr 反應，而獲得以下的多胜肽片段的步驟；

(A)N 末端為半胱胺酸的第 1 多胜肽片段

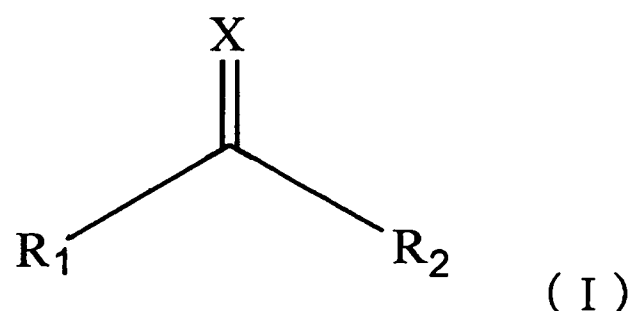
(B)具有以下的構造的第 3 多胜肽片段：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段-Cys-W-(His)_n-Z-Met'

(C 末側)

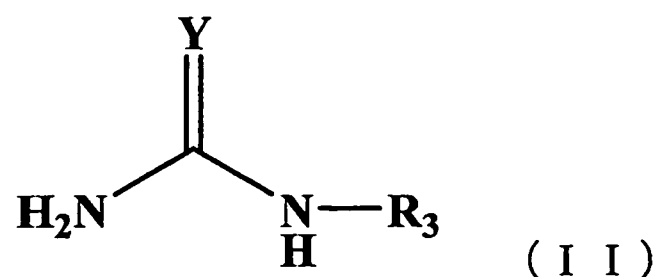
(在此，Met'表示 Met 的衍生物。)

(4)前述第 3 多胜肽片段與下述式(I)表示的化合物反應：



[式中，X 是硫原子或氧原子，R₁ 及 R₂ 是脫離基。]

繼而，在有機溶媒中，與下述式(II)表示的化合物反應：



[式中，

Y 是氧原子，硫原子，或 NH 基，

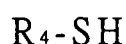
R₃ 是氫原子，鹽基，或烷氧羰基。]

，藉以獲得具有以下構造的 C 末側被修飾的第 2 多胜肽片段的步驟：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段 -C(=O)-NH-C(=Y)NHR₃

(C 末側)；

(5)任意地在前述(4)的步驟中所得的 C 末側被修飾的第 2 多胜肽片段，再與下述式表示的硫醇反應：



[式中，R₄ 是由有取代或無取代的苄基，有取代或無取代的芳基，及有取代或無取代的烷基所成之群中所選擇的任一個基。]

並將 C 末側的 -NH-C(=Y)NHR₃ 基與硫醇基交換，藉以獲得具有以下的構造的 C 末側被修飾的第 2 多胜肽片段的步驟：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段 -C(=O)-SR₄ (C 末側)

(6)將以化學的方法合成而另外調製的

- 前述含有糖鏈多胜肽片段，
 - 可以存在時，在含有糖鏈多胜肽片段與第 2 多胜肽片段之間的前述多胜肽片段，
 - 可以存在時，在含有糖鏈多胜肽片段與第 1 多胜肽片段之間的前述多胜肽片段，
- 與，

在步驟(3)中所得的 N 末端為半胱胺酸之第 1 多胜肽片段

與在步驟(4)或(5)中所得的 C 末側被修飾的第 2 多胜肽片段，以能得到所希望的糖鏈加成多胜肽的順序，以連接 (Ligation) 法鍵結的步驟。

又，在本發明的糖鏈加成多胜肽的製造方法的一實施態樣中，前述式(I)表示的化合物的 X 是硫原子為特徵。

又，在本發明的糖鏈加成多胜肽的製造方法的一實施態樣中，前述式(I)表示的化合物中的 R_1 是 -O-C₆ 芳基為特徵。

又，在本發明的糖鏈加成多胜肽的製造方法的一實施態樣中，前述式(I)表示的化合物的 R_2 是鹵原子，或有取代或無取代的 -S-C₆₋₁₀ 芳基為特徵。

又，在本發明的糖鏈加成多胜肽的製造方法的一實施態樣中，前述式(II)表示的化合物 Y 是 =NH 為特徵。

又，在本發明的糖鏈加成多胜肽的製造方法的一實施態樣中，前述式(II)表示的化合物 R_3 是乙醯基為特徵。

又，在本發明的糖鏈加成多胜肽的製造方法的一實施態樣中，W 是 1 個胺基酸，且為由 Val, Ile, Leu, Trp 所成之群中所選擇的任一個胺基酸為特徵。

又，在本發明的糖鏈加成多胜肽的製造方法的一實施態樣中，n 是 6 至 10 為特徵。

(發明的功效)

由本發明，提供一種適於 NCL 法之由多胜肽鏈有效率地製造 N 末端為半胱胺酸的第 1 多胜肽片段，及 C 末側被修飾的第 2 多胜肽片段的方法。

又，本發明是即使做為胜肽片段不能正常地表現，也以胜肽片段與其他的胜肽片段連接的狀態，可使用連接使其表現，可有效率地製成被數個胜肽片段。

又，將本發明的方法與以往的胜肽合成法併用，而即使是以往合成困難的在胜肽的一部分有修飾的長鏈胜肽，例如，使用本發明的方法，將沒有修飾的部分以容易產生比較長鏈的生物合成法製成片段，有修飾的部分則使用固相合成法製成片段，將這些連接而可簡便地製造。

更具體而言，如果修飾是糖鏈時，只將含有天然鍵結型的糖鏈加成的胺基酸的片段以化學合成，其他的部分則以生物合成調製，以本申請案的方法將適合於連接的胜肽片段製成，連接，而可簡便製造長鏈的糖鏈胜肽。

又，經由連接子在胜肽鏈後加成糖鏈等的方法是公知的，這在生物合成的長鏈胜肽也可以做糖鏈之後加成。但，經由連接子的糖鏈鍵結方法是利用特定的胺基酸及構造而將糖鏈等鍵結者。因此，例如，在胜肽中可以鍵結糖鏈的部位有複數個存在時，以生物合成得長鏈胜肽之後，將只含所希望的鍵結部位的胜肽片段，使用本案的方法由長鏈胜肽切出而加成糖鏈，與其餘的部分重新連接，也可以比以往較簡便地在選擇部位加成糖鏈。

如以上所述，本發明的胜肽硫酯化方法在蛋白質合成的總體中 useful。

【圖式簡單說明】

第 1 圖係表示在本發明的一實施的形態中，使用於多

胜肽的表現的 pET32a 載體的序列資訊圖。

第 2 圖係在本發明的一實施的形態中，表示使用大腸菌的具有本發明的介入序列的多胜肽片段的生物合成的模式圖。

第 3 圖係表示將經表現的蛋白以 Ni 管柱精製時的照片圖。第 3 圖中，M=分子量標誌，E=經表現的混合物，P=通過管柱部分，1 至 8 是以 250mM 咪唑的溶出分液編號，B=空白組。

第 4 圖係在本發明的一實施的形態中，將以大腸菌表現的具有介入序列的多胜肽片段，使用 CNBr 分割成為 2 個多胜肽片段的步驟的流程圖。再者，在以大腸菌表現的多胜肽片段的 N 末端，經由甲硫胺酸而加成硫氧化還原蛋白，在 CNBr 的處理時，硫氧化還原蛋白也被切離。

第 5a 圖表示將 CNBr 處理後的分解物以 HPLC 分析的結果。第 5b 圖表示有介白素-13 衍生物的第 1 至第 27 個的胺酸的胜肽片段 A 的質量分析結果。第 5c 圖表示有介白素-13 衍生物的第 56 個至第 112 個的胺基酸的胜肽片段 D 的質量分析結果。

第 6 圖係利用本發明的適於 NCL 法的多胜肽片段製造方法的一實施的形態，將介白素-13 衍生物分成 4 個多胜肽片段，生物合成爲片段 A 與片段 D 之具有介入序列的融合蛋白質的流程的模式圖。

【實施方式】

以下，說明本發明的合適的實施形態。

本發明是將含有以下構造的多胜肽(i)與 CNBr 反應：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段-Cys-W-(His)_n-Z-Met-第 1 多胜肽片段 (C 末側) (i)

[在此，n 表示 0 至 10 的整數，Cys 表示半胱胺酸，W 表示任意的 1，2 或 3 個胺基酸，Z 表示任意的 0，1，或 2 個胺基酸，His 表示組胺酸，Met 表示甲硫胺酸。又，第 1 多胜肽片段的 N 末端是半胱胺酸。]

而得以下的多胜肽片段步驟。

(A)N 末端為半胱胺酸的第 1 多胜肽片段

(B)有以下的構造的第 3 多胜肽片段(ii)：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段-Cys-W-(His)_n-Z-Met'

(C 末側) (ii)

[在此，Met'表示 Met 的衍生物。]

在本說明書中，「胜肽」就是有 2 個以上的胺基酸經由醯胺鍵而鍵結則無特別的限定，含公知胜肽及新穎胜肽以及胜肽改質體。一般稱為蛋白質的物質，在本發明中也將其包含在胜肽中。又，在本發明中，「多胜肽」也同樣包含在胜肽中。本發明的方法所用的胜肽鏈，可為天然的蛋白質，也可為以生物合成，化學合成或無細胞合成等方法而得的胜肽鏈。

在本說明書中，「胜肽改質體」就是包含胜肽的自然變異體，轉譯後修飾體，或以人工方法改質的化合物。如此改質而言，例如，可舉胜肽的 1 或複數個的胺基酸殘基的烷化，醯化(例如乙醯化)，醯胺化(例如，胜肽的 C 末端的

醯胺化)，羧化，酯形成，二硫化鍵形成，糖基化，脂質化，磷酸化，氫氧化，標識成分的鍵結等。

本說明書中，「胺基酸」就是以其最廣的意義而使用，包含不只是天然的胺基酸，例如絲胺酸(Ser)，天冬醯胺酸(Asn)，纈胺酸(Val)，白胺酸(Leu)，異白胺酸(Ile)，丙胺酸(Ala)，酪胺酸(Tyr)，甘胺酸(Gly)，離胺酸(Lys)，精胺酸(Arg)，組胺酸(His)，天冬醯胺酸(Asp)，麩胺酸(Glu)，麩醯胺酸(Gln)，蘇胺酸(Thr)，半胱胺酸(Cys)，甲硫胺酸(Met)，苯丙胺酸(Phe)，色胺酸(Trp)，脯胺酸(Pro)，也包含胺基酸變異體及衍生物等非天然胺基酸。如是此項技術領域者，考慮此廣義的定義，則應可理解在本發明中的胺基酸，例如可舉 L-胺基酸；D-胺基酸；胺基酸變異體及衍生物等的經化學修飾的胺基酸；正白胺酸， β -丙胺酸，鳥胺酸等在生體內不會成為蛋白質的構成材料的胺基酸；及此項技術領域者公知的具有胺基酸特性的以化學方法合成的化合物等。

本說明書中，「多胜肽片段」就是合成目的蛋白質時被製造，含有目的蛋白質的胺基酸序列的一部分的多胜肽。

在此，「第 1 多胜肽片段」及「第 2 多胜肽片段」就是各分別含有目的蛋白質的胺基酸序列的一部分的片段。本發明中，「第 1 多胜肽片段」及「第 2 多胜肽片段」是以經由介入序列而連接的狀態而被合成。又，本發明的方法中，「第 1 多胜肽片段」及「第 2 多胜肽片段」是最後分別可以適合於連接的形態的多胜肽片段獲得。

又，第 1 多胜肽是設計為在其 N 末端含有半胱胺酸的多胜肽。如此在最後，成為第 1 多胜肽片段而切出時，在 N 末側與其他的胜肽片段可以連接。又，第 2 多胜肽片段是最後成為第 2 多胜肽而被切出時，C 末側被修飾成為適合於連接的形態，在 C 末側可以連接其他的多胜肽片段。

又，本發明的多胜肽(i)是在第 1 多胜肽片段與第 2 多胜肽片段之間，有「(N 末側)-Cys-W-(His)_n-Z-Met-(C 末側)」的介入序列。

在此，n 是表示 0 至 10 的整數，Cys 表示半胱胺酸，W 表示任意的 1, 2 或 3 個胺基酸，Z 表示任意的 0, 1, 或 2 個胺基酸，His 表示組胺酸，Met 表示甲硫胺酸。又，第 1 多胜肽片段的 N 末端是半胱胺酸。

又，多胜肽(i)是其 N 末側及/或 C 末側中，經由上述介入序列，再跟別的多胜肽片段連接也可以。

介入序列中，做為 W 表示的胺基酸而言，含由 Val, Ile, Leu, Trp 所成之群中所選擇的任一個胺基酸為理想，特別是，直接鄰接於 N 末側的 Cys 的胺基酸是由這些胺基酸所選擇為理想。如此，將高容積的胺基酸鄰接於 Cys，則在後述的使用式(II)表示的化合物的反應(b)中，可抑制副反應的發生率，可提高目的之 C 末側被修飾的第 2 多胜肽的收率。

又，介入序列中，(His)_n 表示組胺酸標籤(His tag)，係使經生物合成的多胜肽的精製容易者。組胺酸標籤加成的多胜肽的精製，可用該行業者周知的方法進行，例如，可

使用商品的 Ni-NTA 瓊脂糖凝膠而容易精製。

再者，上述介入序列中沒有組胺酸標籤時($n=0$ 時)，也可將組胺酸標籤在多胜肽(i)的 N 末側或 C 末側加成而表現。介入序列具有組胺酸標籤時， n 的理想是 6 至 10 的整數。

又，介入序列中，Met 是將在此 Met 更靠 C 末側存在的第 1 多胜肽切離時使用的胺基酸。

將生物合成所得的多胜肽(i)在 Met 的位置切離時，例如，使用 CNBr，70% HCOOH 水溶液，而可在室溫處理。再者，要處理的胜肽序列中，在側鏈有 OH 基的 Ser 或 Thr 含多量時，側鏈的甲酸酯成爲問題。這種情況時，爲了避免酯化，應進行降低反應溶液的甲酸的含有量，使用無機酸，爲了產生可以容易除去的三氟乙酸酯起見而使用 TFA 等應對爲理想。

上述反應中使用的理想的酸而言，例如，可舉甲酸，磷酸，三氟乙酸(TFA)，三溴乙酸，甲烷磺酸，但並不限定於這些。這些酸是以 0.1%至 50%的濃度加入爲理想，較理想是 1%至 20%，更理想是 1%至 5%。

又在上述反應中也可使用水混合性溶劑。水混合性溶劑只要是具有水混合性的溶劑則無特別限定，例如，可舉乙腈，三氟乙醇，二甲基甲醯胺，二甲基亞砷(DMSO)，氯化甲烷等，其中尤以乙腈，三氟乙醇，二甲基甲醯胺爲理想。這種溶劑，以 1%至 70%的濃度加入爲理想，較理想是 20%至 60%，更理想是 35%至 50%。

如此，在酸與水混合性溶劑的存在下切斷，則可提高目的多胜肽的產生率。

再者，由上述反應，在 Met 的位置將多胜肽(i)切離時，可得在 N 末側的有第 2 多胜肽片段-Cys-W-(His)_n-Z-Met'的胺基酸序列多胜肽片段，及在 C 末側的第 1 多胜肽片段。

又，Met'表示 Met 的衍生物，表示在如上述的切斷反應生成的 Met 的衍生物。

本發明的多胜肽(i)所含的「第 1 多胜肽片段」及「第 2 多胜肽片段」，基於胺基酸序列的長度或胺基酸的種類，可適宜設計理想片段。本發明中，在設計多胜肽片段時，特別是做為第 1 多胜肽片段而生物合成的多胜肽片段，設計在其 N 末端有半胱胺酸。

本發明的多胜肽(i)，可為天然的蛋白質，也可為以生物合成，化學合成或無細胞合成等方法而得的胜肽鏈，理想是在菌體或細胞內表現的重組型蛋白質。重組型蛋白質只要是以人為在菌體內或細胞內表現即可，可為具有與天然蛋白質相同胜肽序列，也可為具有變異或精製用的標籤等的修飾的胜肽序列。

本發明的多胜肽(i)，可以此項技術領域者公知的方法調製。例如，可在重組型載體導入目的之基因而使其表現。在本發明使用的重組型載體而言，只要能將宿主細胞形質轉換即可，視宿主細胞如何而可使用大腸菌用的質體，枯草菌用的質體，酵母用的質體，反轉錄病毒(retrovirus)，牛痘病毒(vaccinia virus)，桿狀病毒(baculovirus)等動物病

毒載體等。這些中，在其宿主細胞中有適當地能將蛋白質表現的啟動子(promotor)等控制序列的載體為理想。又，宿主細胞而言，以重組型載體能將外來性基因表現即可，一般而言，可使用大腸菌，枯草菌，酵母，昆蟲細胞，動物細胞等。

對宿主細胞將重組型載體移入的方法而言，使用一般常用的方法即可，例如，大腸菌的情況時，可利用熱刺激(heat shock)法，氯化鈣法或電穿孔法(electroporation)，酵母的情況時可利用氯化鋰法或電穿孔法。又，動物細胞的形質轉換，可使用電穿孔等物理的方法，或，脂質體法或磷酸鈣法等化學的方法，或反轉錄病毒等的病毒載體而進行。又，載體導入後是，以此項技術領域者周知的方法，確認目的之 DNA 序列有正確編入為理想。形質轉換體的宿主細胞的培養形態，考慮宿主的營養生理學性質而選擇培養條件即可。

在本發明使用的胜肽是經過精製為理想。胜肽的精製方法可以用通常的一般性的精製法進行。例如，如是重組型蛋白質時，將表現在本發明使用的重組型蛋白質的菌體或細胞培養後，以公知的方法收集菌體或細胞，將此以適當的緩衝液懸浮，以超音波，溶菌酶及/或冷凍融解等而破壞菌體或細胞後，以離心分離或過濾而調製胜肽的粗抽出液。緩衝液中可以含有尿素或鹽酸胍等蛋白質變性劑，或 TritonX-100TM 等界面活性劑。如此所得的抽出液，或培養上澄液中所含的胜肽的精製，可用公知的精製方法進行。

例如，將親和層析法，離子交換層析法，過濾器，超濾法，凝膠過濾，電泳法，鹽析，透析等適宜選擇，組合，而可進行胜肽的分離，精製。

又，爲了使重組型蛋白質的精製容易起見，在表現載體編入種種的標籤也可以。標籤之例而言，提高表現效率的標籤，提高精製效率的標籤等，可使用此項技術領域周知的標籤，例如可舉，硫氧化還原蛋白，GST 標籤，Myc 標籤，FLAG 標籤，麥芽糖鍵結蛋白(MBP)等。

又，這些標籤也可經由多胜肽(i)與 Met(甲硫胺酸)連接。如此經由甲硫胺酸將標籤連接於多胜肽(i)而製成，則將第 1 多胜肽片段與第 2 多胜肽片段以甲硫胺酸做爲標靶而切離時，同時可將標籤切離。

又，不做爲多胜肽(i)製成的，其他的蛋白質合成所必需的多胜肽片段的合成，則可使用在該技術領域已知的任意的化學合成法。特別是，糖鏈鍵結部分的多胜肽鏈的合成是爲了要製造有均一的糖鏈構造の胜肽片段起見以化學合成爲理想，這種手法而言，並無限定，例如可舉，液相合成法，固相合成法，Boc 法，Fmoc 法等。更具體而言，可使用做爲糖鏈加成的胺基酸而使用糖鏈加成 Asn，與通常の胜肽片段合成同樣，適用固相合成，液相合成等公知の胜肽合成方法而製造糖鏈加成胜肽片段的方法。這種方法，在國際公開第 2004/005330 號小冊(US2005222382(A1))中有說明，其所述內容整體在本說明書中參照而編入。

又，做爲目的之蛋白質の胺基酸序列中，製造在 N 末

側及 C 末側有必需連接的胜肽片段時，為避免連接的副生成物，N 末側的半胱胺酸，先要以噻唑啉型(thiazolidine type)的半胱胺酸或以 Ac_m 基等保護的半胱胺酸連接。即，連接製程是，由做為目的之蛋白質的 C 末側的胜肽片段進行連接，將連接完成的胜肽片段的 N 末端的半胱胺酸恢復成為可連接的狀態，依序在蛋白質的 N 末側將胜肽片段進行連接。例如，導入噻唑啉型的半胱胺酸時，在固相合成時導入也可以，以此項技術領域者周知的方法在多胜肽片段的合成後選擇性地將半胱胺酸噻唑啉化也可以。

又，也可在所合成的多胜肽鏈經由鍵結基加成糖鏈。這種糖鏈的鍵結，可以使用該技術領域已知的任意的手法。這種手法而言，並無限定，例如可舉，將在還原末端具有由 $-NH-(CO)-CH_2X$ ， $-NH-(CO)-(CH_2)_b-CH_2X$ ，異硫氰酸酯基， $-NH-(CO)_a-(CH_2)_b-CO_2H$ 及 $-NH-(CO)_a-(CH_2)_b-CHO$ (式中，X 表示鹵原子，a 是 0 或 1，b 是 1 至 4 的整數)所成之群中所選擇的基的糖鏈衍生物與半胱胺酸的巰基縮合的方法(參照 WO2005/010053)，或 WO2005/095331 所說明的使用鍵結劑的方法等。

又，以上述方法，做為目的之胜肽的一部分的片段所製造的胜肽片段，為了要用於連接製程，而在連接製程之前必需有將位置 N 末側的多胜肽的 C 末端硫酯化的製程。這種硫酯化，可以使用此項技術領域者周知的方法實施，例如，將 C 末端的羧酸用 PyBOP 及 DIPEA 活性化，加過剩量的烷硫醇基而達成。使用此手法時，為了抑制在片段

末端的胺基酸的 α 碳的立體配置，烷硫醇基的添加要在低溫進行為理想，較理想是 10°C 至 -80°C ，更理想是在 0°C 至 -40°C 的溫度進行。又，上述硫酯化是，使用 Yamamoto et al., J. Am. Chem. Soc. 2008, 130(2), 501-510 所說明的 Fmoc 法或 Boc 法等也可進行。

本發明中，「胜肽硫酯體」(以下，有時只稱為硫酯體)就是指在 C 末端有羧硫酯部分 ($-\text{C}=\text{O}-\text{SR}$) 的胜肽而言。在本發明使用的胜肽硫酯體，只要能與其他的硫醇基可產生交換反應的硫酯體，則無特別的限定。R 基而言，例如，可舉下述的 R_4 所例示基。

如此合成的本發明的多胜肽(i)，在介入序列中的 Met 的位置切離，而可得以下的多胜肽片段。

(A)N 末側是半胱胺酸的第 1 多胜肽片段

(B)有以下構造的第 3 多胜肽片段(ii)

(N 末側) 第 2 多胜肽片段 $-\text{Cys}-\text{W}-(\text{His})_n-\text{Z}-\text{Met}'$

(C 末側) (ii)

[在此，Met'表示 Met 的衍生物。]

再者，在多胜肽(i)的 N 末側及/或 C 末側中，經由上述介入序列，再有別的多胜肽片段連接時，例如，再可得下述多胜肽片段。

(B')(N 末側) 多胜肽片段 $-\text{Cys}-\text{W}-(\text{His})_n-\text{Z}-\text{Met}'$

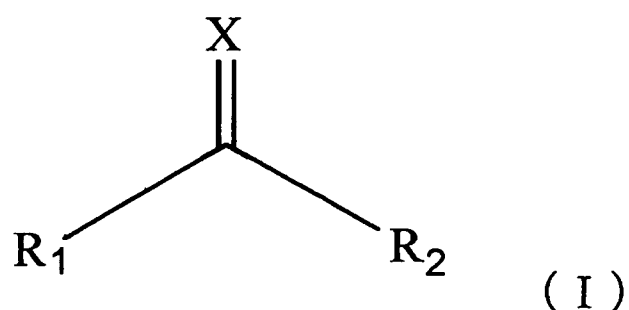
(C 末側)

如上述而得的(A)N 末側為半胱胺酸的第 1 多胜肽片段，可與 C 末端具有硫酯的胜肽連接。因此，本發明也提供一

種多胜肽的製造方法，係含有以本發明的方法所得的 N 末端爲半胱胺酸的第 1 多胜肽片段，與 C 末端有硫酯的胜肽以連接法鍵結的製程。

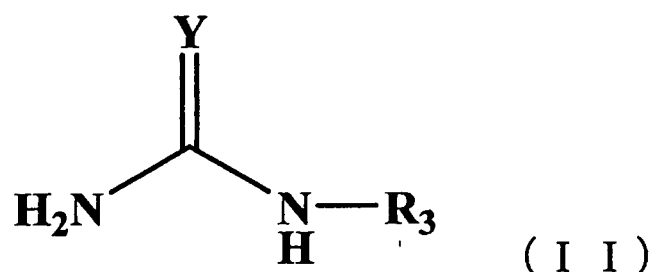
在此，本發明的方法包含下述步驟：

將多胜肽(i)切離而得的第 3 多胜肽片段(ii)，與以下述式(I)表示的化合物反應：



[式中，X 是硫原子或氧原子，R₁ 及 R₂ 是脫離基。]

繼而，在有機溶媒中，與下述式(II)表示的化合物反應：



[式中，Y 是氧原子，硫原子，或，=NH，R₃ 是氫原子，醯基，或烷氧羰基。]

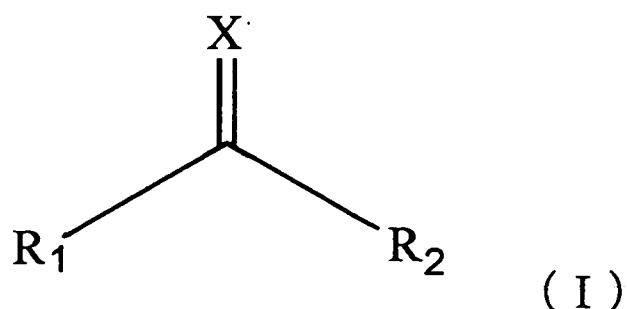
而得有以下構造的 C 末側被修飾的第 2 多胜肽片段：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段 -C(=O)-NH-C(=Y)NHR₃

(C 末側)

上述的步驟，首先，在有半胱胺酸殘基的第 3 多胜肽片段(ii)中，在前述半胱胺酸殘基的硫醇基與式(I)表示的化合物反應(反應 a)，而製成第 1 中間物的製程。

在反應(a)中使用的化合物是以下的式(I)表示。



式中，X 是硫原子或氧原子，但理想是硫原子。

R₁ 及 R₂ 是做為脫離基，在反應(a)的條件下，如比被取代的原子或原子團的求核性低，而有脫離功能者則無特別的限定，但 R₁ 及 R₂ 是各分別是不同的脫離基為理想。做為 R₁ 及 R₂ 具體而言，可舉鹵原子，有取代或無取代的-O-烷基，有取代或無取代的-O-烯基，有取代或無取代的-O-炔基，有取代或無取代的-O-芳基，有取代或無取代的-O-雜芳基，有取代或無取代的-S-烷基，有取代或無取代的-S-烯基，有取代或無取代的-S-炔基，有取代或無取代的-S-芳基，或有取代或無取代的-S-雜芳基。做為 R₁ 及 R₂ 較理想的組合可舉 R₁ 是由有取代或無取代的-O-C₆₋₁₀ 芳基及有取代或無取代的-S-C₁₋₈ 烷基所成之群中所選的脫離基，及，R₂ 是由鹵原子，有取代或無取代的-S-C₁₋₈ 烷基，有取代或無取代的-S-C₆₋₁₀ 芳基所成之群中所選的脫離基。

本發明中，「烷基」是由脂肪族烴除去任意的 1 個氫原子而衍生的一價基，是含有氫及碳原子的烴基或具有烴的部分集合。烷基是含直鏈狀或支鏈狀的構造。做為本發明的烷基而理想的可舉碳原子數是 1 至 8 的烷基。再者，「C₁₋₈ 烷基」就是表示碳原子數是 1 至 8 的烷基，具體例而言，

可舉甲基，乙基，丙基，丁基，戊基，己基，庚基，辛基等。

本發明中，「烯基」就是至少有 1 個雙鍵的 1 價基。依雙鍵及取代基的配置，雙鍵的幾何學的形態，可採取異側(E)或同側(Z)，順或反配置。烯基是含直鏈狀或支鏈狀。做為本發明的烯基而理想可舉碳原子數是 2 至 8 的烯基。

「 C_{2-8} 烯基」就是表示碳原子數是 2 至 8 的烯基，具體例而言，可舉乙烯基，烯丙基(allyl)，丙烯基(propenyl)，丁烯基，戊烯基，己烯基，庚烯基，辛烯基等。

本發明中，「炔基」就是至少有 1 個參鍵的 1 價基。炔基是含直鏈狀或支鏈狀的炔基。做為本發明的炔基而理想可舉碳原子數是 2 至 8 的炔基。「 C_{2-8} 炔基」就是表示碳原子數是 2 至 8 的炔基，具體例而言，可舉乙炔基，1-丙炔基，2-丙炔基，丁炔基，戊炔基，己炔基，庚炔基，辛炔基等。

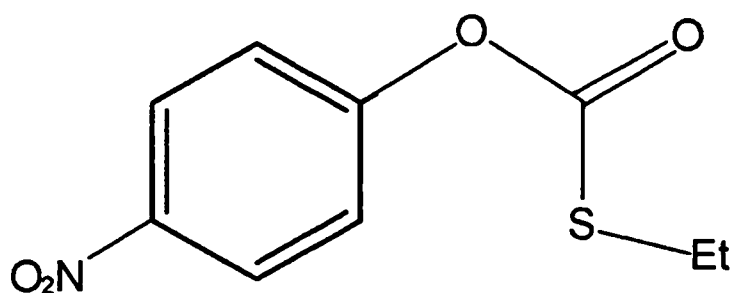
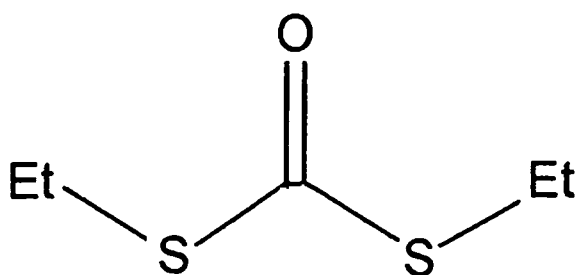
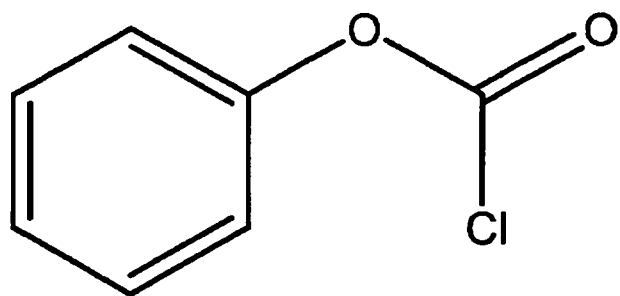
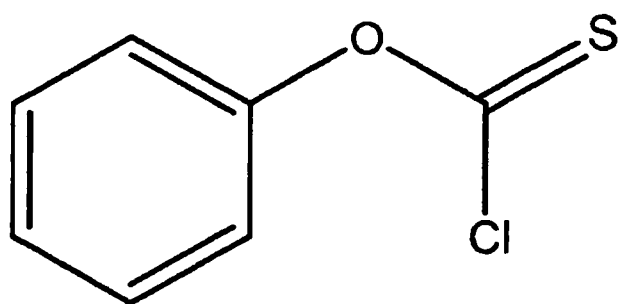
本發明中，「芳基」就是表示芳香族性的烴環式基。本發明的芳基而理想可舉碳原子數是 6 至 10 的芳基。「 C_{6-10} 芳基」就是表示碳原子數是 6 至 10 的芳基，具體而言，例如可舉，苯基，1-萘基，2-萘基等。

本發明中，「雜芳基」就是表示由雜芳環除去任意位置的 1 或 2 個氫原子所衍生的 1 價或 2 價基。本發明中，「雜芳環」就是表示構成環的原子中含有 1 或複數個雜原子的芳香族性環，理想是 5 至 9 員環。環可為單環，也可為苯環或與單環雜芳環縮合的 2 環式雜芳基。具體例而言，可

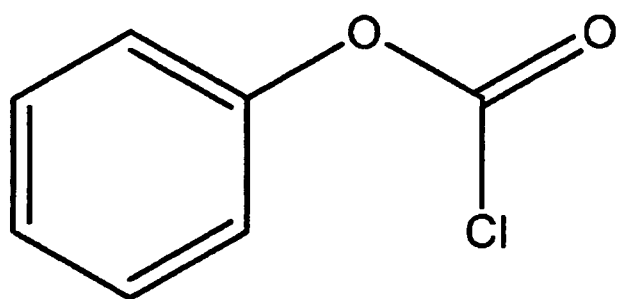
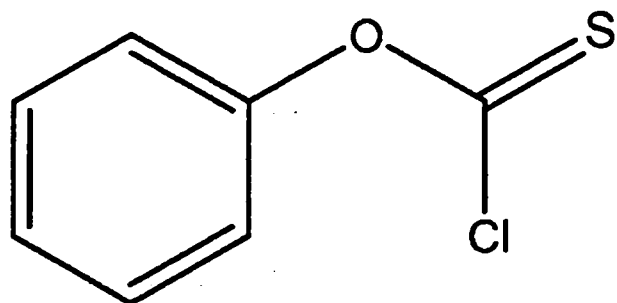
舉呋喃基，噻吩基，吡咯基，苯並呋喃基，苯並噻吩基，
 吡啶基，吡啶基，喹啉基等。

上述的脫離基所有的取代基的種類，個數，取代位置
 並無特別的限定，做為取代基而言，例如可舉，烷基，烯
 基，烷氧基，芳基，甲醯基，羰基，羧基，烷羧基，烷氧
 羰基，鹵原子，磺醯基，或硝基等。

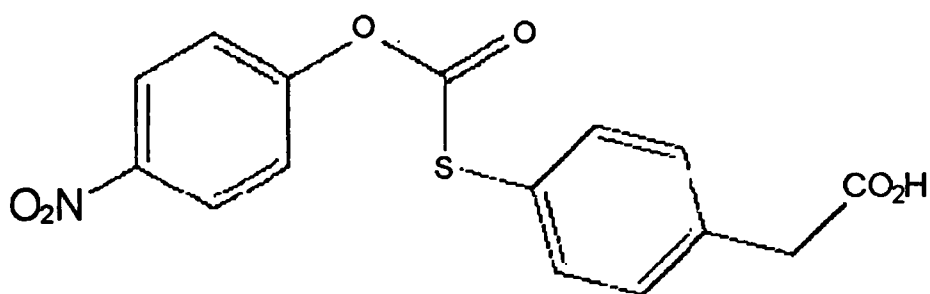
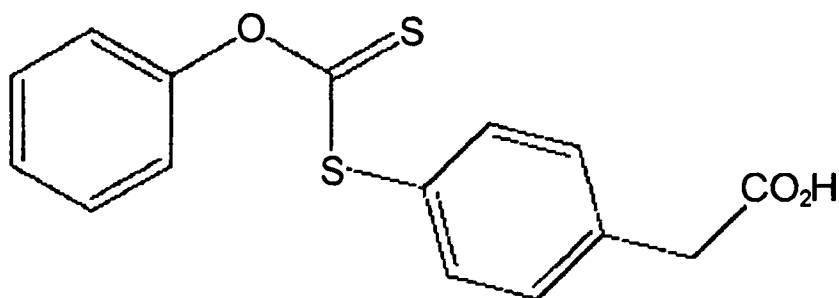
做為本發明的式(I)表示的化合物而言，更具體而言，
 可舉：



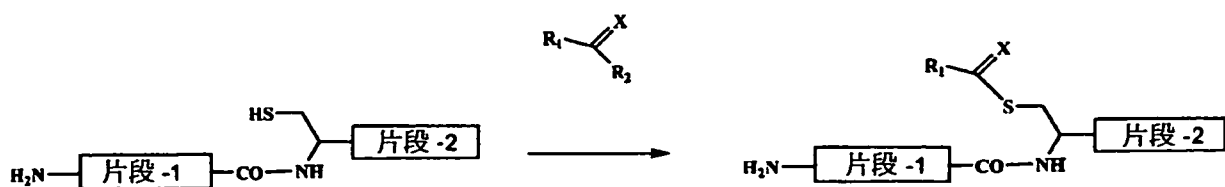
再者，也可使用上述的，



與 MPAA((4-羧甲基)硫酚)反應的下述硫甲醯酯化試劑，



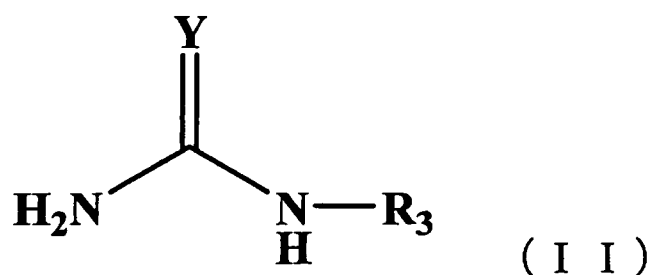
將式(I)表示的化合物與第 3 多胜肽片段(ii)的半胱胺酸殘基反應，可得如下圖之半胱胺酸殘基中的 SH 基鍵結 -C(=X)-R₁ 基的第 1 中間物。



在本發明中，反應(a)是在酸性條件下為理想，特別是在 pH3 至 5 進行為理想。反應是在緩衝液與乙腈的混合溶媒中，在 0 至 50°C，理想是在 15 至 25°C，進行約 0.1 至 3 小時，理想是進行 10 分鐘至 1 小時為理想，但不受其限定。

其次，在本發明的方法中，在有機溶媒中，進行在前述第 1 中間物與式(II)表示的化合物反應，在形成鄰接於前述半胱氨酸殘基的 N 末側的胺基酸之間的胜肽鍵結的羧基上加成 -NH-C(=Y)NHR₃ 基，將前述胜肽鍵結切斷，可將比所切斷的前述胜肽鍵結較在 N 末側的胜肽片段做為第 2 中間物而得的製程(反應(b))。

上述反應(b)中使用的化合物是以下的式(II)表示。



式中，Y 是氧原子，NH 基，或硫原子，R₃ 是，氫原子，醯基，或烷氧羰基。

本發明中，「醯基」就是表示由羧酸的羧基除去 OH 基的原子團。做為本發明的醯基而言，理想是可舉碳原子數是 1 至 5 的醯基。具體而言，例如可舉，乙醯基，三甲基乙醯基，丙醯基，丁醯基等。

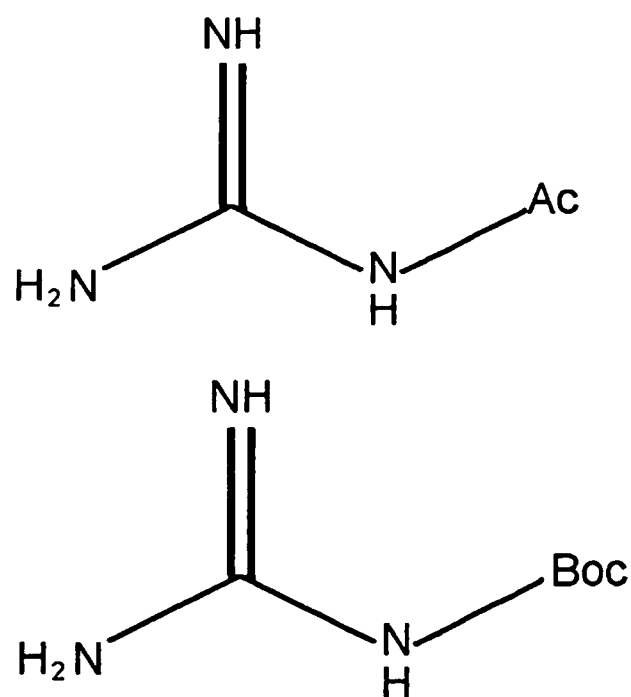
本發明中，「烷氧基」就是表示有「烷基」鍵結的氧基。本發明的烷氧基可為直鏈狀也可為支鏈狀。本發明的烷氧基理想是可舉碳原子數是 1 至 14 的直鏈狀烷氧基或碳原子

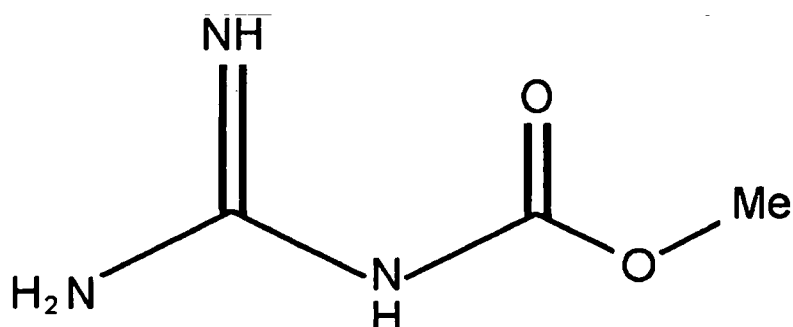
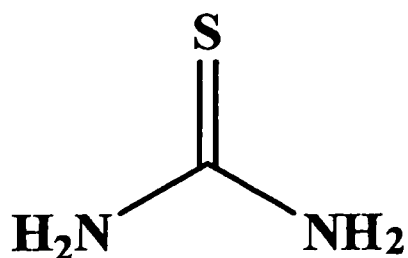
數是 3 至 14 個的支鏈狀烷氧基。具體而言，例如可舉，甲氧基，乙氧基，正丙氧基，異丙氧基，正丁氧基，2-甲基-2-丙氧基，正戊氧基，正己氧基等。

又，「 C_{2-n} 烷氧羰基」就是表示有 $C_{1-(n-1)}$ 的烷氧基的羰基。本發明的烷氧羰基理想是可舉碳原子數是 2 至 15 的烷氧羰基。具體而言，例如可舉甲氧羰基，乙氧羰基，正丙氧羰基，異丙氧羰基，正丁氧羰基，2-甲基-2-丙氧羰基，正戊氧羰基，正己氧羰基等。

做為醯基理想是可舉乙醯基。又，做為烷氧羰基理想是可舉三級丁氧羰基(Boc 基)。

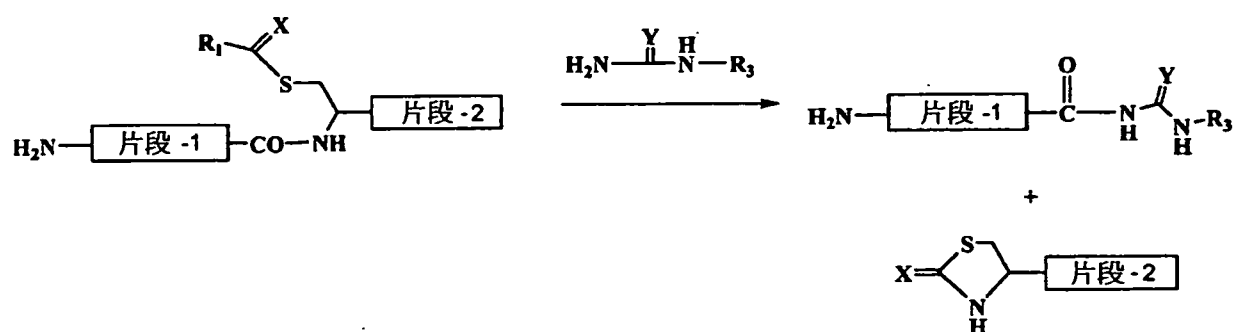
做為本發明的式(II)表示的化合物，更具體而言，可舉下列化合物等：





本發明中，反應(b)是在有機溶媒的存在下中進行為理想。有機溶媒是溶解性高，且求核性低的溶媒為理想。這種有機溶媒而言，例如可舉，DMSO，DMF，二噁烷等。反應是在 0 至 50℃，理想是 15 至 25℃，進行約 1 至 24 小時，理想是 5 至 10 小時為理想，但不限定於這些。

在鄰接於半胱胺酸殘基的 N 末側的胺基酸之間形成胜肽鍵結的羧基加成 -NH-C(=Y)NHR₃ 基，如下圖，胜肽鍵在半胱胺酸殘基的 N 末側被切斷。

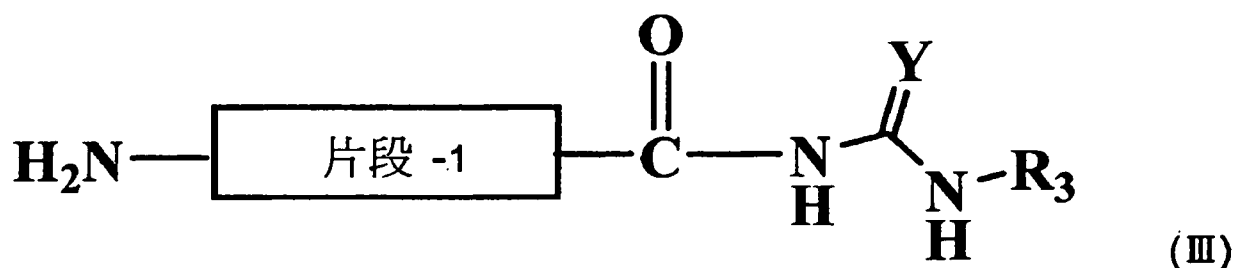


再者，胜肽的側鏈上有胺基時，在進行本發明的反應(b)之前，在側鏈的胺基導入脂溶性的保護基也可以。脂溶

性保護基而言，例如可舉，9-芴基甲氧羰(Fmoc)基，三級丁氧羰(Boc)基，烯丙氧羰(Alloc)基等含羰基，乙醯(Ac)基等醯基，烯丙基，苄基等保護基，但並不特別限定於這些。

要將脂溶性保護基導入時，例如要導入 Fmoc 基時，加入 9-芴基甲基-N-羥基丁二醯亞胺碳酸酯(9-fluorenylmethyl-N-succinimidyl carbonate)及碳酸氫鈉進行反應而可導入。反應是在 0 至 50℃，理想是在室溫，進行約 1 至 5 小時左右為佳，但不受限定。

反應(b)中，可將比被切斷的胜肽鏈的切斷部更靠 N 末側的胜肽片段作為如下述式(III)的第 2 中間物。



本發明的胜肽硫酯體的製造方法是再含有將前述第 2 中間物與硫醇基反應，將 C 末端的 -NH-C(=Y)NHR₃ 基與硫醇基交換，而將第 2 中間物的 C 末端硫酯化的製程(反應(c))。

在反應(c)所用的第 2 中間物可在反應(b)的後單離，也可不單離。

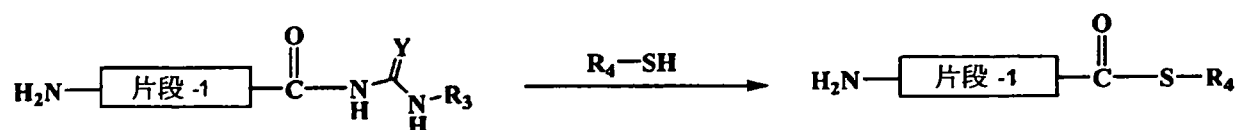
在理想態樣中，在前述反應(c)中，使用以下的式(IV)表示的硫醇基。



R₄ 是只要不阻礙硫醇基交換反應，在羰基碳上的取代

反應中可成爲脫離基的基則無特別的限定。理想是， R_4 是由有取代或無取代的苄基，有取代或無取代的芳基及有取代或無取代的烷基所選擇的任一個基，較理想是由有取代或無取代的苄基，有取代或無取代的 C_{6-10} 芳基，及，有取代或無取代的 C_{1-8} 烷基所選擇的任一個基。更具體而言，可由苄硫醇等苄型的脫離基，硫酚，4-(羧甲基)-硫酚等芳型的脫離基，2-巰基乙磺酸基，3-巰基丙酸鹽胺等烷型的脫離基等選擇。這些脫離基所有的取代基的種類，個數，取代位置是沒有特別的限定。

由反應(c)的進行，第 2 中間物是如下述圖所示會完全變換爲硫酯體。



如上述所得的胜肽硫酯體是在胜肽或被修飾胜肽中，將有-SH基的胺基酸殘基在 N 末端含有的胜肽(或被修飾胜肽)，可使用連接法連接。因此，本發明也提供一種多胜肽的製造方法，該方法係含有將本發明的方法所得的胜肽硫酯體，與在 N 末端有半胱胺酸的胜肽鏈用連接法鍵結的製程。

又，代替上述胜肽硫酯體，而將在前述步驟(b)所得的第 2 中間物，原封不動使用於連接法也是可能的。這時，可省略成爲硫酯體的變換製程之點而爲理想。

在本發明中，「連接法(ligation)」不只是在專利文獻 1 所說明的天然型化學的連接法(Native Chemical Ligation,

NLC 法)，也包含對含有非天然胺基酸，胺基酸衍生物(例如，蘇胺酸衍生物 A，保護甲硫胺酸，糖鏈加成胺基酸等)的胜肽，應用上述天然型化學的連接法的情況。由連接法，可製造在連接部位有天然醯胺鍵(胜肽鍵結)的胜肽。

使用連接法的連接可在胜肽-胜肽間，胜肽-被修飾胜肽間，被修飾胜肽-被修飾胜肽間的任一者。

再者，本說明書中所用的用語是用於說明特定的實施態樣而使用，並無限定發明的意圖。

又，本說明書中所用的「含」的用語，除開由文脈上可明白地應做不同的理解的情況，是所說明的事項(部材，步驟，要素，數字等)之存在的意圖，不排除此以外的事項(部材，步驟，要素，數字等)的存在。

除非有不同的定義，這裏所用的全部的用語(含技術用語及科學用語。)，與由本發明所屬技術領域者所廣受理解的意義相同。這裏所用的用語，除非明白的表示有不同的定義，應解釋為與本說明書及在關連技術領域中的意義有整合性的意義，不應被理想化，或，被過度解釋成形式性的意義。

本發明的實施態樣有時在參照模式圖下說明的情況，但模式圖的情況，為了能明確說明起見，有表現誇張的情況。

第一，第二等用語被用於表現種種的要素而使用，但可理解這些要素不為這些用語所限定。這些用語是只用於將一個要素與其他的要素區別而使用的，例如，第一的要

素當做第二的要素而說明，同樣地，第二的要素當做第一的要素說明就是，在不逸脫本發明的範圍是可能的。

以下，將本發明參照實施例更詳細說明。但是，本發明是可用各種各樣的態樣具現化，應解釋為不受在這裏說明的實施例所限定。

[實施例]

下述實施例中，陳述使用本發明的方法的介白素-13(Interleukin 13, IL13)的衍生物(序列編號 1)(糖鏈與天然的 IL13 不同之故稱為「衍生物」。)的合成方法。

具體而言，將想要製造的所希望的糖鏈加成多胜肽的介白素 13 衍生物分類如下而設計。

- ・多胜肽片段 A，係有在 IL13 的第 1 至第 27 個胺基酸序列(這是相當於「在比含有糖鏈多胜肽片段在較靠 N 末側，而含有所希望的糖鏈加成胜肽的 N 末側的多胜肽所成之第 2 多胜肽片段」。)
- ・多胜肽片段 B，係有在 IL13 的第 28 至第 43 個胺基酸序列的(這是相當於「在含有糖鏈多胜肽片段與第 2 多胜肽片段之間的多胜肽片段」。)
- ・多胜肽片段 C，係有在 IL13 的第 44 至第 55 個胺基酸序列(此片段含有加成糖鏈的胺酸。因此，此片段是相當於「含有糖鏈加成的胺基酸的多胜肽所成之含有糖鏈多胜肽片段」。)
- ・多胜肽片段 D，係在 IL13 的第 56 至第 112 個胺基酸序列(這是相當於「在比含有糖鏈多胜肽片段在較靠 C 末側而

含有所希望的糖鏈加成胜肽的 C 末側的多胜肽所成之第 1 多胜肽片段」。))

第 6 圖是這種表示設計的模式圖。

如後述，上述多胜肽片段 A 與上述多胜肽片段 D 是以大腸菌表現法而使其表現，經由規定的步驟而調製。

又，上述多胜肽片段 B 與上述多胜肽片段 C 是以化學合成調製。

然後將這些被調製的 4 個多胜肽片段以連接法使其連接而製造 IL-13 衍生物。

再者，例如，寫成多胜肽片段 C·D 時，是表示由多胜肽片段 C 與多胜肽片段 D 連接而成。

1. 多胜肽片段 A(第 1 至第 27 個胺基酸)及多胜肽片段 D(第 56 至第 112 個胺基酸序列)的調製

2 個糖鏈非鍵結部分(多胜肽片段 A(化合物 1)(序列編號 2)及多胜肽片段 D(化合物 4)(序列編號 3)是使用大腸菌表現系製成爲融合蛋白質(化合物 6)(序列編號 4)。

1-1. 將編碼糖鏈非鍵結部分的核酸分子在大腸菌的導入

(1)在內有 5ml LB 培養基 A(組成：H₂O 1l 中，含有胰蛋白胍(Bacto-tryptone)10g，酵母抽提物 5g，NaCl 10g，洋菜 15g)的試管中，加大腸菌(BL21)懸液 100 μ l，以漩渦混合器(Vortex mixer)處理後在 37°C 孵育一夜。

(2)製成 2 支試管，內有 5ml LB 培養基 A 並加(1)的培養液 200 μ l，在 37°C 孵育。測定濁度(OD600)，在 50 分鐘後達 OD600=0.4 時將試管放入於冰中。

(3)將(2)的試管中內容物移入於錐形管，在 0°C ，以 2,000rpm 離心 20 分鐘。

(4)以傾倒法將上澄液捨棄，將沈澱物打碎，加 0.1M CaCl_2 3ml，在冰中放置 20 分鐘。

(5)將(4)的管在 0°C ，以 2,000rpm 離心 20 分鐘。

(6)以傾倒法將上澄液捨棄，將沈澱物打碎，加 0.1M CaCl_2 0.5ml，以漩渦混合器處理後，移到另外準備的管中。

(7)在(6)的管中，加入含有編碼有 IL13 的第 1 至第 27 個的胺基酸序列，介入序列(Cys-Val-His-His-His-His-His-Met)，及第 56 至第 112 個的胺基酸序列連接的序列的核酸分子(序列編號 5)的 pET32a 載體 2ml，輕輕地混合後，在冰中靜置 1 小時。再者，該載體是由其發明者等自由分送給第三者。前述核酸分子是插入在 pET32a 載體(Novagen 公司)的硫氧化還原蛋白(redoxin)的下游的 NcoI/BamHI 部位(參照第 1 圖)。

(8)將(7)的試樣在 42°C 的水浴浮置 3 分鐘(熱震法)，繼而在冰中冷卻 1 分鐘。

(9)在(8)中，加 LB 培養基 A 5ml，在 37°C 孵育 45 分鐘後，在室溫，以 3,000rpm 離心 10 分鐘。

(10)捨棄上澄液(濾液)，打碎沈澱物後，對沈澱物加 LB 培養基 A 1ml，漩渦混合器處理後全量分成 $100\mu\text{l}$ ， $900\mu\text{l}$ 的 2 部分，分別加 LB 培養基 B(組成： H_2O 1l 中，加有胰蛋白胨 10g，酵母抽提物 5g， NaCl 5g 及葡萄糖 5g 而混合，對此加 1.5%的洋菜(15g/l)，20 分鐘高壓釜處理，

放冷至 50 至 60℃ 加 100mg 的氨苄青黴素(Ampicillin) 30ml 的培養皿中，使用康拉地細菌接種棒(Conradi bacteria spreader)撒佈。

(11)將(10)的培養皿在 37℃ 靜置 10 小時。

(12)將在(11)所形成的菌落，以滅菌過的牙籤勾取於試管中(內有在 LB 培養基 A 中以 1000 : 1 的比含有 10%氨苄青黴素的 LBamp 培養基 3ml)，漩渦混合器處理後在 37℃ 孵育一夜。

2. 基因的確認

2-1. 質體 DNA 的取出

(1)將上述 1-1 · (12)的試樣的 1.5ml 移入於 Eppendorf 管。

(2)在室溫以 7,000rpm 離心 3 分鐘後，除去上澄液並打碎沈澱物。

(3)對沈澱物，加 100ml 的 GTE(50mM 葡萄糖，25mM Tris · HCl，10mMEDTA)，漩渦混合器處理後，使用振盪器懸浮 5 分鐘，再加鹼 SDS 溶液(0.2N NaOH，1%SDS)200ml 翻轉混和後，在冰中冷卻 5 分鐘。

(4)加 5M 乙酸鉀溶液 150ml 翻轉混和後，在冰中冷卻 5 分鐘。

(5)加三氯甲烷 15ml 而漩渦混合器處理，在 4℃，以 13,000rpm 離心 15 分鐘後，將上澄液移入於另一個 Eppendorf 管，對此上澄液加 10mg/ml Rnase 3ml，在 37℃ 放置 1 小時。

(6)對(5)的試樣，加(酚：三氯甲烷：異戊醇=25：24：

1) 500ml，在室溫，以 13,000rpm 離心 10 分鐘。

(7)將上澄液移到另一支 Eppendorf 管，加 3M NaOAc 40ml，EtOH 1ml 而翻轉混和，漩渦混合器處理後在 -80℃ 靜置 30 分鐘。

(8)將(7)的 Eppendorf 管在 4℃，以 13,000rpm 離心 30 分鐘。

(9)除去上澄液，對沈澱物加 70% EtOH 1ml 漩渦混合器處理後，在室溫，以 13,000rpm 離心 5 分鐘。

(10)除去上澄液，以乾燥器乾燥。

(11)加經過高壓釜處理的純水(aH₂O)15ml，以振盪器攪拌 10 分鐘。

2-2.質體 DNA 的限制酶處理及電泳法

(1)取上述 2-1·(11)的試樣的 5ml，添加含 BamHI 及 NcoI 的限制酶處理液 A(10×K 緩衝液(Tris·HCl pH8.5 200mM，MgCl₂ 100mM，DTT 10mM，KCl 1M)2.25ml，0.1% BSA 2.25ml，NcoI 0.85ml，BamHI 0.85ml，aH₂O 10.76ml)15ml 而混合，在 37℃ 放置 2 小時。

(2)恢復到室溫，加反應停止液(H₂O 中，50%甘油，0.5% SDS，2mM EDTA，0.25%二甲苯腈(xylene cyanol)，0.25% 溴酚藍)5ml。

(3)在 4%聚丙烯醯胺凝膠(30%丙烯酸溶液 1.995ml，10×TBE(H₂O 1l 中，Trisma base 108g，硼酸 55g，0.25M EDTA 80ml)1.5ml，10%APS(H₂O 1l 中，過硫酸銨 0.1g)75ml，TEMED

10ml, aH₂O 15ml)(2)上裝設試樣，以 50V(定電壓)電泳。(電泳緩衝液是 1×TBE(將 10×TBE 稀釋 10 倍)，分子量標誌(marker)是使用 $\Phi \times 174$ 。)

(4)以溴化乙啶 (Ethidium bromide)染色 15 分鐘，在 300nm 評估試料時，可看到 759bp 左右的帶域。使其表現的蛋白質是有 253 個胺基酸長，因此可確認有相當於該長度的 DNA 被割出。

3. 蛋白質的表現

(1)在試管 2 支中分別加入 2×YTamp(aH₂O 1l 中，胰蛋白胰 16g, bacto 酵母抽提物 10g, NaCl 5g, 氨苄青黴素 100mg)5ml, 再各分別加入上述 1-1·(12)的液(4℃保存 2 週的試樣)30ml 後，在 37℃ 孵育一夜。

(2)在 2×YTamp1l 加(1)的製成溶液 10ml, 在 37℃ 開始孵育。

(3)測定濁度(OD600), 在 2 小時後達 OD=0.6 時加 1M 異丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)1ml, 進行誘導 3 小時。

(4)將(3)的試樣放在冰中，在 4℃, 以 3,500rpm 離心 10 分鐘。

(5)捨棄上澄液，收集菌體。

(6)在 -20℃ 保存。

4. 表現蛋白的精製

(1)將在上述 3.(6)所得的試樣在室溫解凍後，溶解於 100ml 的緩衝液 A(100Mm NaH₂PO₄, 10mM Tris·HCl, 6M 鹽酸胍, 5mM 咪唑, pH8.0), 在冰中超音波處理，破碎細

胞壁。

(2)取 Ni-NTA 瓊脂膠(50%EtOH)10ml, 在固相合成管(管柱)充填後以緩衝液 A 取代, 將(1)的試樣裝入並與 Ni-NTA 瓊脂膠充分混和後溶出。

(3)將溶出液回收, 再度裝入於管柱。將此操作重複 10 次, 將最後的溶出液回收。(透過液(1))

(4)將(3)的 Ni-NTA 瓊脂膠, 以緩衝液 B(100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris · HCl, 6M 鹽酸胍, 250mM 咪唑, pH8.0)100ml 清洗, 回收清洗液。(透過液(2))

(5)使用緩衝液 C(100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris · HCl, 6M 鹽酸胍, 400mM 咪唑, pH8 · 0)10ml 溶出(溶出液)。使用考馬斯亮藍液(Coomassie Brilliant Blue G250, CBBG), 確認蛋白的溶出。

(6)在透析管中放入(5)的溶出液, 裝有純水的 5l 燒杯中使透析管浮起, 在 4℃ 攪拌一夜, 進行透析。

(7)將透析管的內容物回收於離心沉澱管中, 在 4℃, 以 3,500rpm 離心 10 分鐘後, 捨棄上澄液, 而得硫氧化還原蛋白蛋白質為鍵結的多胜肽片段 A-Cys-Val-His 標籤 -Met-多胜肽片段 D 融合多胜肽(化合物 6)約 25mg(參照第 2 圖及第 3 圖)。



(6)

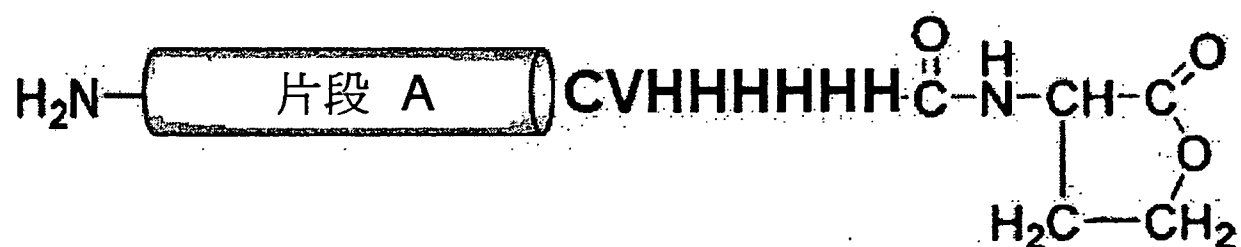
(再者, C 是表示 Cys, V 是表示 Val, H 是表示 His, M 是

表示 Met。以下均同。)

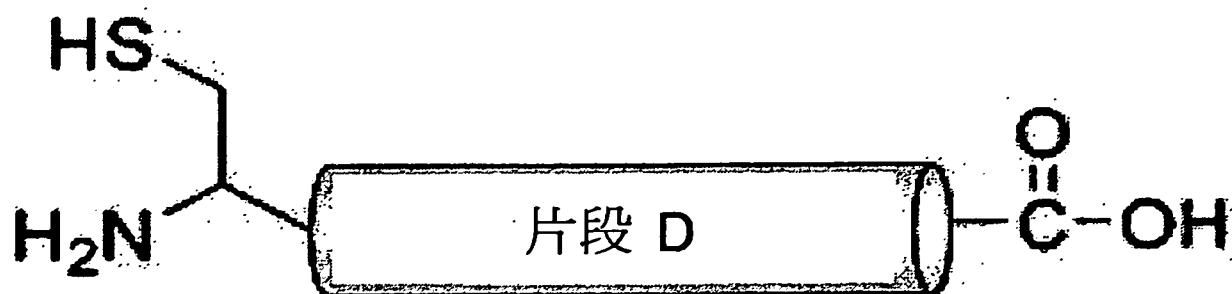
5. CNBr 處理

(1)對將在 4.(7)所得的融合多胜肽(化合物 6)以 HPLC 精製後冷凍乾燥試樣 100mg，在氬氣下加 20ml 的含有 2%TFA 及 40%乙腈水溶液，再加 76mg 的 CNBr 在遮光下攪拌一夜。由此處理，融合蛋白質的硫氧化還原蛋白部及 His 標籤與糖鏈非鍵結部多胜肽片段 D 之間的甲硫胺酸的 C 末側的醯胺鍵被加水分解，可在多胜肽片段 A 加成介入序列，與多胜肽片段 D 分離。

(2)用 HPLC 分析，以質量分析確認保持時間 12 分鐘處得到所希望的多胜肽片段 A-C-Val-His-His-His-His-His-His-Met 衍生物(化合物 10)(序列編號 6)2.3mg，及多胜肽片段 D(化合物 4)4.2mg(參照第 4 圖及第 5 圖)。



(10)

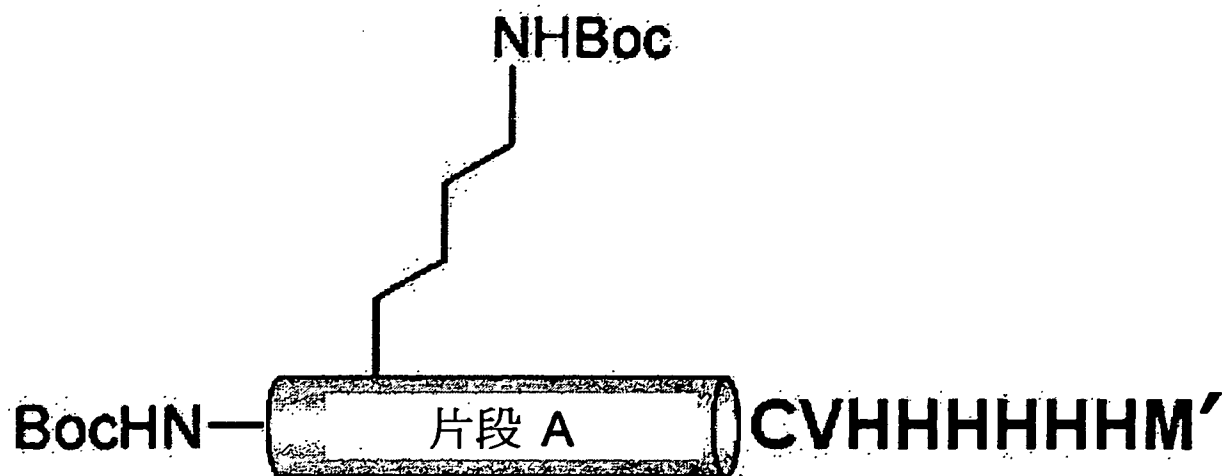


(4)

6. 硫酯化

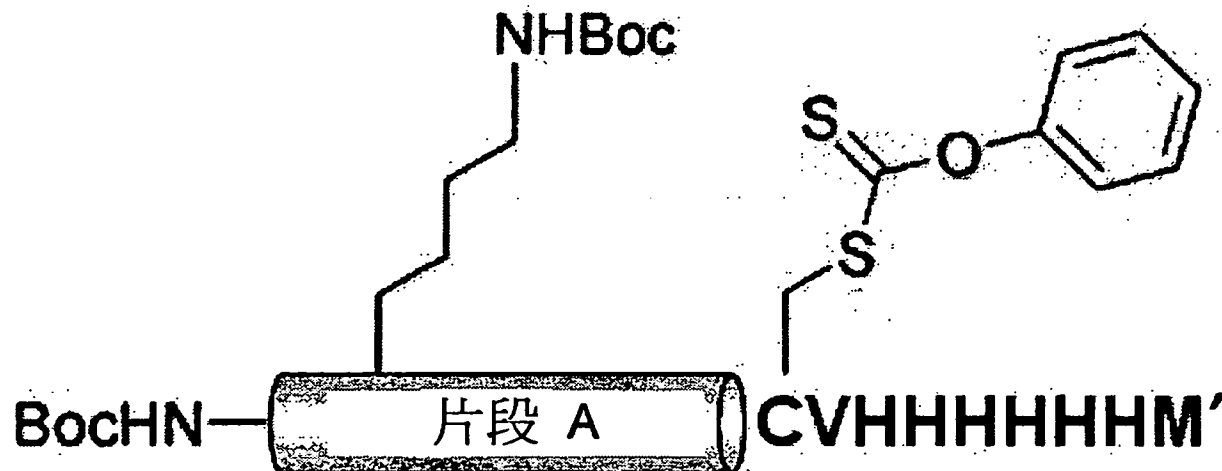
將在上述 5. 所得的多胜肽片段 A-C-Val-His-His-His-His-His-His-Met 衍生物(化合物 10)6mg 溶解於二甲基甲醯胺(DMF)680 μ l 後，在溶液加 N,N-二異丙基乙胺(DIEtN)2.6 μ l(10eq)，及 Boc-OSu3.2mg(10eq) 反應約 1 小時，得多胜肽片段 A-C-Val-His-His-His-His-His-His-Met 衍生物(化合物 10)的 N 末端的胺基及序列中的 Lys 殘基的側鏈的胺基的計 2 個地方被 Boc 化的 37 殘基的部分保護的多胜肽片段(化合物 100)(序列編號 7)。將此 37 殘基胜肽，溶解於磷酸緩衝溶液(pH=5.0，100nM)，加氯硫代甲酸酯(chlorothionoformate)(5 當量)，將半胱胺酸的硫醇基修飾為硫碳酸型，原封不動直接用 HPLC 精製。將所得的多胜肽片段(化合物 101)(序列編號 8)冷凍乾燥而獲得 1.7mg。將此全量溶解於 DMSO，加乙醯胍(0.5M 在 DMSO 中)，在常溫反應 8 小時。將生成物用 HPLC 精製，得有 IL-13 的第 1 至第 27 的胺基酸序列多胜肽片段 A 的 C 末端的羧基為胍基修飾的多胜肽片段(化合物 102)(序列編號 9)0.3mg。

此胜肽-胍衍生物是，巯基乙基硫酸等烷硫醇基處理而變換為硫酯衍生物，但以胍基原封不動，也可做為天然化學連接之用。

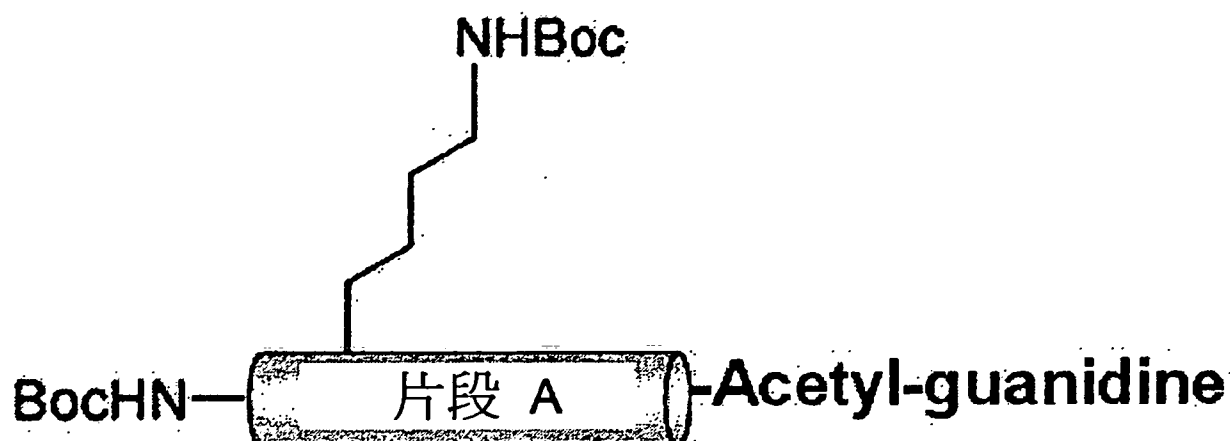


(100)

(又，M'表示 Met 的衍生物。以下均同。)



(101)



(102)

7. 多胜肽片段 B(第 28 至第 43 個的胺基酸)的合成

多胜肽片段 B(化合物 2)的伸長是使用一般性的 Fmoc 法或 Boc 法的固相合成法而合成。

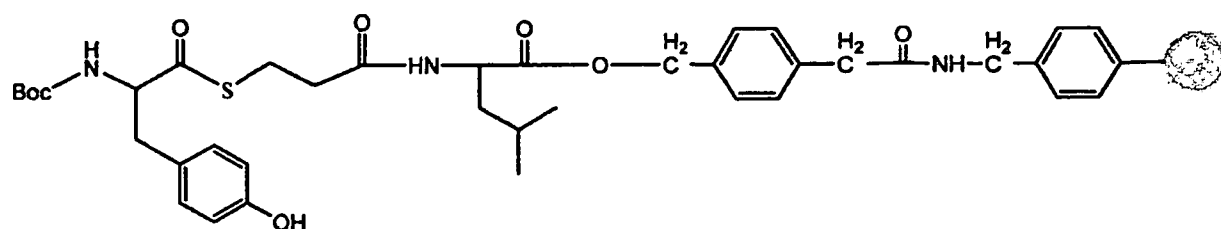
在固相合成管裝入使用蒸餾 DMF 及蒸餾 DCM 充分清洗後乾燥的 Boc-Leu-PAM 樹脂 94.34mg($50\mu\text{mol}$)。使用於縮合的胺基酸的胺基是使用 Boc 基加以保護。又，反應如無特別註明是在固相合成管內進行。

以 DMF，DCM 充分清洗，之後，將 10%硫酸/二噁烷溶液(1.0ml)加於樹脂而攪拌 30 分鐘，將 Boc 基做脫保護，以 DCM，DMF 將樹脂清洗。

之後，做為連接子而將 S-三苯甲基(trityl)-3-巰丙酸 5 當量(87.1mg， $250\mu\text{mol}$)，DIPEA 10 當量($87.3\mu\text{l}$ ， $500\mu\text{mol}$)，及 HBTU 5 當量(94.8mg， $250\mu\text{mol}$)溶解於 DMF (1.0ml)，裝入於前述的充填有調製樹脂的固相合成用管內，在室溫攪拌 0.5 小時。攪拌後，將樹脂以 DCM 及 DMF 清洗數次，繼而以 DCM，DMF 充分清洗。之後，將 TFA

加於樹脂攪拌 30 分鐘而將三苯甲基(trityl)脫保護，以 DCM，DMF 將樹脂清洗。

其次，將樹脂以 DMF 清洗後，將第 1 個殘基的 Boc-Tyr (Br-Z)-COOH 5 當量(123.6mg， $250\mu\text{mol}$)，HBTU 5 當量(94.8mg， $50\mu\text{mol}$)，DIPEA 10 當量($87.3\mu\text{l}$ ， $500\mu\text{mol}$)在 DMF 溶媒(1.0ml)中混合，將其加於樹脂並在室溫攪拌 0.5 小時而得中間物(化合物 14)。



(14)

縮合後將樹脂以 DMF 清洗後，以凱澤測試(Kaiser test)確認在樹脂上有胺基酸的縮合，依序與 Boc-Leu-PAM-Resin 同樣將 Boc 基脫保護。第 2 殘基以下也是同樣進行縮合。第 16 殘基為止，都各以單次縮合(single coupling)而結束。

又，相當於在 IL-13 的胺基酸序列中的第 28 個的胺基酸 Cys 是以噻唑啉型保護而縮合。

縮合完成的樹脂以 DMF 及 DCM 充分清洗，將 TFA：DMS：間-甲酚：EDT：TfOH=5：3：0.8：0.2：1 的混合物 1ml 加於樹脂並在冰上攪拌 1 小時，以樹脂進行側鏈的脫保護。將此以二乙醚充分清洗後乾燥。

8. 由樹脂的切出

在上述 7.所調製胜肽要從樹脂切出時，將 TFA：苯甲硫醚(Thioanisol)：EDT：TfOH=8：0.8：0.2：0.8 的混合物 1ml 在冰上加入，攪拌 1 小時。以二乙醚沈澱後，在室溫乾燥後將試樣用 HPLC(管柱：Synmetry 300(TM)C4， $3.5\mu\text{m}$ ， $4.6\times 150\text{mm}$ ，流速：1.0ml/分，含 18%至 54%CH₃CN 的 0.09%TFA 的 18 分鐘的線型梯度)分析，保持時間 13 分鐘處，得連接子加成而成硫酯體的狀態切出，有在 IL13 的胺基酸序列中第 28 至第 43 個胺基酸序列的胜肽硫酯體(化合物 103)。將此胜肽硫酯(化合物 103)(序列編號 10)用 HPLC 精製，將分取溶液冷凍乾燥而得 5mg。

IL13(28 至 43)硫酯體(化合物 103)；ESI-MS：m/z 以 C₈₅H₁₃₀N₂₀O₂₅S₄ 的計算值： $[M+H]^+$ 1959.8， $[M+2H]^{2+}$ 980.4，實測值：1960.8，981.0

9. 糖鏈鍵結部分的多胜肽片段 C(第 44 至第 55 個胺基酸)的合成

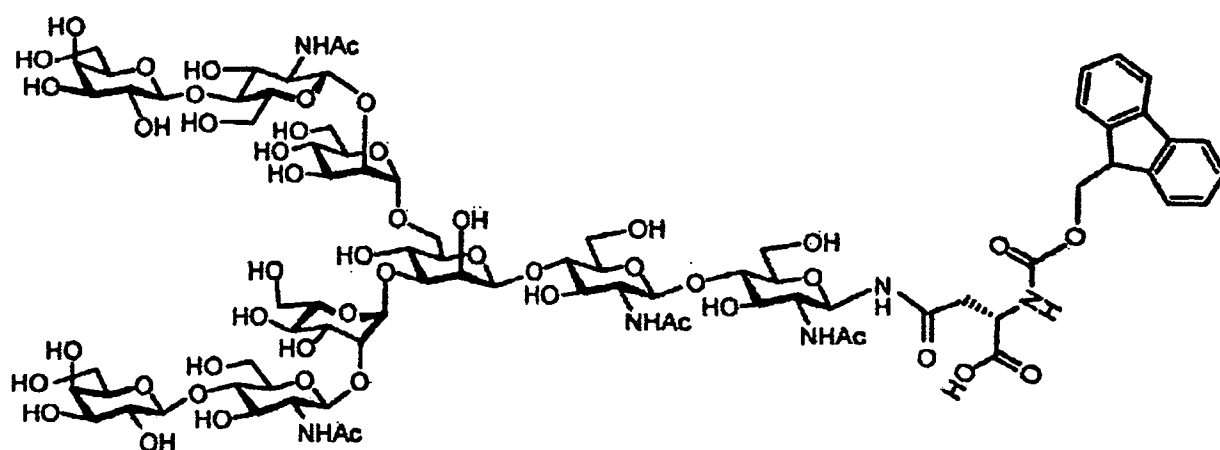
多胜肽片段 C(化合物 3)的伸長是使用一般性的 Fmoc 法的固相合成法。

在固相合成管中裝入 4-(4-羥甲基-3-甲氧基苯氧基)-丁酸(HMPB)-聚(乙二醇)-聚(二甲基丙烯醯胺)共聚物(PEGA)樹脂 1.67mg($50\mu\text{mol}$)，以蒸餾 DMF 及蒸餾 DCM 充分清洗、乾燥後使用。用於縮合的胺酸的胺基是以 Fmoc 基保護。又，反應是如無特別說明時都是在固相合成管內進行。

將 Fmoc-Gly-OH 5 當量(74.3mg， $250\mu\text{mol}$)及 N-甲基

咪唑 3.75 當量($14.9 \mu\text{l}$, $187.5 \mu\text{mol}$)溶解於 DCM (1.0ml)，裝入於有充填前述調製樹脂的固相合成用管內，在室溫攪拌 2 小時。攪拌後，將樹脂用 DCM:MeOH:DIPEA=17:2:1 清洗數次，繼而以 DCM、DMF 充分清洗。之後，將 20% 哌啶/DMF 溶液(1.0ml)加於樹脂攪拌 30 分鐘而將 Fmoc 基脫保護，以 DMF 清洗樹脂。

其次，將樹脂以 DMF 清洗後，將第 2 個殘基的 Fmoc-Ser(tButyl)-COOH 5 當量(95.9mg , $50 \mu\text{mol}$)，HOBT · H_2O 5 當量(33.8mg , $50 \mu\text{mol}$)，DIPCDI 5 當量($38.5 \mu\text{l}$, $50 \mu\text{mol}$) 在 DMF 溶媒(1.0ml)中混合，將其加於樹脂在室溫攪拌 1 小時。縮合後將樹脂以 DMF 清洗後，以凱澤測試確認在樹脂上有胺基酸縮合，與第 1 個殘基同樣將 Fmoc 基脫保護。第 3 個殘基也同樣進行縮合。其次，做為第 4 個殘基，而將下述式(20)表示的 Fmoc-Asn-去唾液酸糖(asialoglycose) 鏈鍵結。



(20)

即，將第 3 個殘基的纈胺酸的 Fmoc 基脫保護後，以

DMF 清洗樹脂後，將 Fmoc-Asn-去唾液酸糖鏈(大塚化學股份有限公司製，198mg， $100\ \mu\text{mol}$)，DEPBT 3 當量(45mg， $150\ \mu\text{mol}$)，DIPEA 2 當量($18.5\ \mu\text{l}$ ， $100\ \mu\text{mol}$)加 DMSO：DMF 溶媒 4：1 (2.5ml)，在第 4 個殘基導入糖鏈天冬醯胺酸。之後，胺基酸的縮合是與第 1 至第 3 個殘基的胺基酸同樣進行，但所用的 Fmoc-保護胺基酸的反應溶液中的濃度，都是以 DMF 調製成爲 50mM 左右而進行。糖鏈天冬醯胺酸加成後，Fmoc 保護胺酸是各單次的縮合(single coupling)而完成。

再者，位置在 N 末端的 Cys(相當於在 IL-13 的胺基酸序列中的第 45 個的胺基酸的 Cys)是以噻唑啉型保護。

將縮合完成的樹脂以 DMF 及 DCM 充分清洗，將 AcOH：DCM：MeOH=5：4：1 的混合物 2ml 加於樹脂攪拌 3 小時後，由樹脂將胺基酸側鏈受保護的含有糖鏈的多胜肽片段(化合物 104)(序列編號 11)切出。將此，在室溫減壓濃縮並乾固，以苯將乙酸共沸。在其一部分，加 95%TFA，2.5%三異丙基矽烷(TIS)，2.5% H_2O ，將相當於 IL-13 的胺基酸序列中的第 44 個的 Cys 以外的胺基酸側鏈的保護基除去，在室溫減壓濃縮後，使用高速液體層析法(HPLC)確認純度，結果在保持 11 分鐘處由質量分析的結果確認做爲目的之含有糖鏈的多胜肽片段 C(化合物 105)(序列編號 12)。

化合物 105：ESI-MS： m/z 以 $\text{C}_{112}\text{H}_{187}\text{N}_{17}\text{O}_{63}\text{S}$ 的計算值： $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 1406.1， $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ 937.7，實測值：1406.8，938.3

10. 含有糖鏈多胜肽片段 C 的硫酸化

將在上述 9. 所得的胺基酸側鏈受保護的含有糖鏈的多胜肽片段(化合物 104)用苯共沸後，以乾燥器乾燥。此多胜肽片段(化合物 104)之中，將 10.1mg($3.3 \mu\text{mol}$)溶解於 DMF 0.4ml，加乾燥分子篩 4Å(6mg)及苄硫醇基 30 當量($11.6 \mu\text{l}$ ， $99 \mu\text{mol}$)，在 -20°C 攪拌 1 小時，加 PyBOP 5 當量(8.58mg， $16.5 \mu\text{mol}$)，DIPEA 5 當量($2.9 \mu\text{l}$ ， $16.5 \mu\text{mol}$)反應 2 小時而進行 C 末端的硫酯化。反應完成後，在二乙醚 6ml 中將反應溶液滴下，將白色沈澱物以離心分離法回收。以二乙醚將沈澱物清洗數次，乾燥成白色固形物而得含有糖鏈多胜肽硫酯(化合物 106)(序列編號 13)。對此固形物加 TFA : H_2O : TIS : EDT=90 : 5 : 2.5 : 2.5 的混合物 1ml 攪拌 3 小時，除去胜肽側鏈的保護基。在室溫減壓濃縮後將試樣用 HPLC(管柱：Synmetry300(TM)C4， $3.5 \mu\text{m}$ ， $4.6 \times 150\text{mm}$ ，流速：1.0ml/分，含 18%至 54% CH_3CN 的 0.09%TFA 的 15 分鐘的線型梯度)分析，在保持時間 9.5 分鐘處得有在 IL13 的胺基酸序列中的第 44 至第 55 個的胺基酸的糖鏈多胜肽硫酯(化合物 107)(序列編號 14)。將此含有糖鏈多胜肽硫酯(化合物 107)使用 HPLC 精製，將分取溶液冷凍乾燥而得 7.2mg。

IL13(44 至 55)硫酯體(化合物 107)；ESI-MS : m/z 以 $\text{C}_{119}\text{H}_{193}\text{N}_{17}\text{O}_{62}\text{S}_2$ 的計算值： $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ 1459.1， $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ 973.1，實測值：1459.7，973.5

11. 含有糖鏈多胜肽片段 C 與多胜肽片段 D 的連接

將在上述 10.所得的硫酯化含有糖鏈多胜肽片段(化合

物 107)(1.2mg, 425nmol), 與在上述 5.所得的糖鏈非鍵結部分的多胜肽片段 D(化合物 4)(2.3mg, 355nmol), 加於緩衝溶液(6M 鹽酸胍, 0.2MPBS, 20mMTCEP(三(2-羧乙基)磷), 0.04M MPAA(4-巰苯乙酸), pH6.8)180 μ l, 在室溫反應 3 小時, 而得含有糖鏈多胜肽片段 C 與多胜肽片段 D 連接的含有糖鏈多胜肽片段(化合物 108)(序列編號 15)。天然化學連接法完成後, 將其原封不動, 將甲氧胺鹽酸鹽(30mg, 359 μ mol)加入於反應溶液, 將 pH 調整為 4.0 而分解 N 末端的噻唑啉, 變換為半胱胺酸。12 小時後, 將反應混合物使用 HPLC 分析的結果, 觀察到與其相當的尖峰。又, 將此尖峰的化合物精製, 以質量分析, 確認得到含有糖鏈多胜肽片段(化合物 109)(序列編號 16)2.3mg。

化合物 109: ESI-MS: m/z 以 $C_{402}H_{654}N_{102}O_{141}S_3$ 的計算值: $[M + 4H]^{4+}$ 2316.7, $[M + 5H]^{5+}$ 1853.5, $[M + 6H]^{6+}$ 1544.8, $[M + 7H]^{7+}$ 1324.2, $[M + 8H]^{8+}$ 1158.8, $[M + 9H]^{9+}$ 1030.2, 實測值: 2317.7, 1854.5, 1545.7, 1325.2, 1030.9

12. 多胜肽片段 B 與含有糖鏈多胜肽片段 C · D 的連接

將在上述 11.所得的含有糖鏈多胜肽片段(化合物 109)(1.3mg, 140nmol), 與在上述 8.所得的硫酯化多胜肽片段 B(化合物 103)(0.40mg, 209nmol), 加入於緩衝溶液(6M 鹽酸胍, 0.2M PBS, 40mM TCEP(三(2-羧乙基)磷), 0.02M MPAA(4-巰苯乙酸), pH7.1)70 μ l, 在室溫反應 8 小時, 得多胜肽片段 B 與含有糖鏈多胜肽片段 C · D 連接的含有糖鏈多胜肽片段(化合物 110)(序列編號 17)。天然化學連接法完成

後，將其原封不動，將甲氧胺鹽酸鹽(1.2mg, 14 μ mol)加入於反應溶液，將 pH 調整為 4.0 分解 N 末端的噻唑啉，變換成半胱胺酸。12 小時後，將反應混合物用 HPLC 分析的結果，觀察到與其相當的尖峰。又，將此尖峰的化合物精製，以質量分析，確認得到含有糖鏈多胜肽片段(化合物 111)(序列編號 18)0.6mg。

化合物 111: ESI-MS: m/z 以 $C_{477}H_{767}N_{121}O_{163}S_6$ 的計算值: $[M + 5H]^{5+}$ 2199.1, $[M + 6H]^{6+}$ 1832.7, $[M + 7H]^{7+}$ 1571.1, $[M + 8H]^{8+}$ 1374.8, $[M + 9H]^{9+}$ 1222.2, $[M + 10H]^{10+}$ 1100.0, $[M + 11H]^{11+}$ 1000.1, 實測值: 2200.4, 1834.1, 1572.3, 1375.9, 1223.3, 1100.9, 1000.9

13. 多胜肽片段 A 與含有糖鏈多胜肽片段 B · C · D 的連接

在上述 12. 所得的含有糖鏈多胜肽片段(化合物 111)(0.6mg, 54nmol), 與在上述 6. 所得的胍衍生物化多胜肽片段(化合物 102)(0.2mg, 62nmol), 加入於緩衝溶液(6M 鹽酸胍, 0.2M PBS, 20mM TCEP(三(2-羧乙基)膦), 0.1M MPAA(4-巰苯乙酸), pH7.2)50 μ l, 在室溫反應 24 小時。24 小時後，將反應混合物用 HPLC 分析的結果，觀察到與其相當的尖峰。將此尖峰的化合物精製，以質量分析，確認得到含有糖鏈多胜肽(化合物 112)(序列編號 19)0.1mg。

化合物 112: ESI-MS: m/z 以 $C_{617}H_{1000}N_{156}O_{207}S_6$ 的計算值: $[M + 8H]^{8+}$ 1763.4, $[M + 9H]^{9+}$ 1567.6, $[M + 10H]^{10+}$ 1410.9, $[M + 11H]^{11+}$ 1282.7, $[M + 12H]^{12+}$ 1175.9, $[M + 13H]^{13+}$ 1085.5, $[M + 14H]^{14+}$ 1008.1, 實測值: 1764.3, 1568.5,

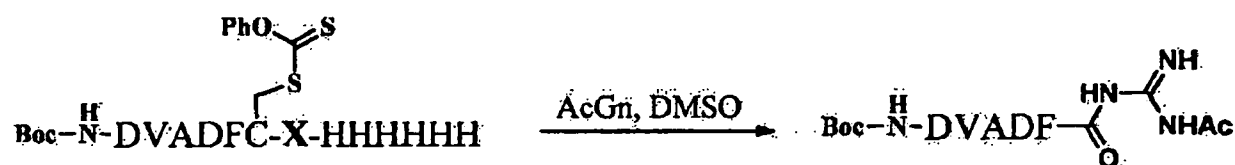
1411.8, 1283.6, 1176.8, 1086.3, 1009.0

14. Boc 基的除去

將在上述 13. 所得的 112 殘基的含有糖鏈多胜肽(化合物 112)0.1mg, 溶解於 5% 含水三氟乙酸 $200\ \mu\text{l}$, 在室溫反應 1 小時。將反應後的溶液吹氫氣濃縮後, 以緩衝溶液(6M 鹽酸胍, 0.2M PBS) $200\ \mu\text{l}$ 稀釋, 將所得的溶液用 HPLC 精製。回收主尖峰而得有做為目的之均勻的糖鏈的介白素-13 衍生物(化合物 113)(序列編號 1)0.1mg。

15. 介入序列的最適化

爲了要將在介入序列(-Cys-W-(His)_n-Z-Met-)的 W 最適化, 比較在 C 末端有組胺酸標籤的胜肽硫代甲酸酯的胍化中生成的胍體(下示反應式)的單離收率。



X=G, V, I, P, F, W, L

(此處, D 表示 Asp, V 表示 Val, A 表示 Ala, F 表示 Phe, C 表示 Cys, X 表示 Gly, Val, Ile, Pro, Phe, Trp, Leu 的任一個胺基酸。)

在胍化反應中, 在 Boc-Asp-Val-Ala-Asp-Phe-Cys(C(S)OPh)-Xaa-His-His-His-His-His-His-OH(Xaa=Gly, Val, Ile, Phe, Pro, Trp)(序列編號 20)的 Xaa, 使用胺基酸不同的 6 個胜肽硫代甲酸酯。在含各胜肽硫代甲酸酯的胜肽硫代甲酸酯/DMSO 溶液(2mM)中加同體積量的 1-乙醯胍/DMSO 溶

液(1M)，以漩渦混合器攪拌。在 37℃ 的水浴中靜置 1 日後，以二乙醚沈澱，清洗。以半分取 HPLC 精製，得目的化合物(序列編號 21)。將各胜肽的單離收率在第 1 表中分別表示。ESIMS 計算值[M + H]⁺ 748.3 實測值，748.3。

如第 1 表所示的結果，將 Val，Trp，Ile 插入在組胺酸標籤的 N 末側時，能得到非常多量的胍體。特別是，Val 及 Ile，能抑制副生成物的生成。

[第 1 表]

序列	X-胺酸	胍體	副生成物
DVADFOX • HHHHHH	G	16%	24%
	V	56%	痕跡*
	I	46%	痕跡*
	F	36%	17%
	P	26%	檢不出
	W	53%	14%

*以質量分析檢出

【符號說明】

無。

【序列表】(請換頁單獨記載)

<110> 糖鎖工學研究所股份有限公司

<120> 適於 NCL 法之多胜肽片段之有效率的製造方法

<130> OCKP1105F

<150> JP2011-210007

<151> 2011-09-26

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5.1

<210> 1

<211> 112

<212> PTR

<213> 智人

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (52).. (52)

<223> 去唾液酸寡糖

<400> 1

Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu

1 5 10 15

Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met

20 25 30

Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala Leu Glu

35 40 45

Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg

50 55 60

Ala Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser

65 70 75 80

Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys

85 90 95

Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg Phe Asn

100 105 110

<210> 2

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化學合成

<400> 2

Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu

1 5 10 15

Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu

20 25

<210> 3

<211> 57

<212> PRT

<213> 人工

<220>
<223> 化學合成

<400> 3
Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg Ala Leu Ser Gly Phe Cys Pro
1 5 10 15
His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr
20 25 30
Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys
35 40 45
Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg Phe Asn
50 55

<210> 4
<211> 253
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 化學合成

<400> 4
Met Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr Asp
1 5 10 15
Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala Glu Trp
20 25 30
Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala Asp
35 40 45
Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp Gln Asn
50 55 60
Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu Leu
65 70 75 80
Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu Ser
85 90 95
Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser Gly
100 105 110
Ser Gly His Met His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
115 120 125
Arg Gly Ser Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln
130 135 140
His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp Asp Asp Lys Ala Met
145 150 155 160
Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu
165 170 175
Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Val His His His
180 185 190

His His His Met Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg Ala Leu Ser
195 200 205

Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu His
210 215 220

Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu
225 230 235 240

Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg Phe Asn
245 250

<210> 5
<211> 282
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 化學合成

<400> 5
atgggtccgg ttccgcctag taccgcactg cgtgagctga ttgaagaact ggtcaacatt 60
accagaacc aaaaggcccc gctgtgcgta catcaccacc atcatcacat gtgctctgcg 120
atcgaaaaga cgcaacgcgc gctgagtggc ttctgtccac acaaggtgag cgccggtcag 180
ttctctagcc tgcacgttcg tgacactaaa atcgaagtgg ctcagtttgt gaaagacctg 240
ctgctgcacctgaagaaactgtttcgtgagggccgctttaat 282

<210> 6
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 化學合成

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (36).. (36)
<223> X 為高絲胺酸內酯

<400> 6
Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu
1 5 10 15

Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Val His His His
20 25 30

His His His Xaa
35

<210> 7
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 化學合成

<220>
<221> BINDING
<222> (1).. (1)
<223> Boc

<220>
<221> BINDING

<222> (24).. (24)
<223> Boc

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (36).. (36)
<223> X 為高絲胺酸內酯

<400> 7
Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu
1 5 10 15
Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Val His His His
20 25 30
His His His Xaa
35

<210> 8
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 化學合成

<220>
<221> BINDING
<222> (1).. (1)
<223> Boc

<220>
<221> BINDING
<222> (24).. (24)
<223> Boc

<220>
<221> BINDING
<222> (28).. (28)
<223> C(=S)OPh

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (36).. (36)
<223> X 為高絲胺酸內酯

<400> 8
Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu
1 5 10 15
Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Val His His His
20 25 30
His His His Xaa
35

<210> 9
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 化學合成

<220>
<221> BINDING
<222> (1).. (1)
<223> Boc

<220>

<221> BINDING
<222> (24).. (24)
<223> Boc

<220>
<221> BINDING
<222> (27).. (27)
<223> -NH-C=NH(NHAc)

<400> 9
Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu
1 5 10 15

Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu
20 25

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 化學合成

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (1)
<223> 1C 具有噻唑啉基

<220>
<221> BINDING
<222> (16).. (16)
<223> -S-CH2CH2CONHCH(CH2CH(CH3)2)COOH

<400> 10
Cys Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr
1 5 10 15

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 化學合成

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (1)
<223> 1C 具有噻唑啉基

<220>
<221> BINDING
<222> (1).. (1)
<223> Boc

<220>
<221> BINDING
<222> (5).. (5)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (6).. (6)
<223> tBu

<220>
<221> BINDING
<222> (11).. (11)
<223> tBu

<220>
<221> CARBOHYD
<222> (9).. (9)
<223> 去唾液酸寡糖

<400> 11
Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly
1 5 10

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 化學合成

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (1)
<223> 1C 具有噻唑啉

<220>
<221> CARBOHYD
<222> (9).. (9)
<223> 去唾液酸寡糖

<400> 12
Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly
1 5 10

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 化學合成

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (1)
<223> 1C 具有噻唑啉基

<220>
<221> BINDING
<222> (1).. (1)
<223> Boc

<220>
<221> BINDING
<222> (5).. (5)
<223> OtBu

<220>
<221> BINDING
<222> (6).. (6)
<223> tBu

<220>
<221> BINDING
<222> (11).. (11)
<223> tBu

<220>
<221> BINDING
<222> (12).. (12)
<223> -SBn

<220>
<221> CARBOHYD
<222> (9).. (9)

<223> 去唾液酸寡糖

<400> 13

Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly
1 5 10

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化學合成

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> 1C 具有噻唑啉基

<220>

<221> BINDING

<222> (12)..(12)

<223> -SBn

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (9)..(9)

<223> 去唾液酸寡糖

<400> 14

Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly
1 5 10

<210> 15

<211> 69

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 化學合成

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> 1C 具有噻唑啉基

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (9)..(9)

<223> 去唾液酸寡糖

<400> 15

Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile
1 5 10 15

Glu Lys Thr Gln Arg Ala Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser
20 25 30

Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val
35 40 45

Ala Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Asn
65

<210> 16

<211> 69

<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 化學合成

<220>
<221> CARBOHYD
<222> (9).. (9)
<223> 去唾液酸寡糖

<400> 16
Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile
1 5 10 15

Glu Lys Thr Gln Arg Ala Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser
20 25 30

Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val
35 40 45

Ala Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Asn
65

<210> 17
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 化學合成

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (1)
<223> 1C 具有噻唑啉基

<220>
<221> CARBOHYD
<222> (25).. (25)
<223> 去唾液酸寡糖

<400> 17
Cys Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr
1 5 10 15

Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile
20 25 30

Glu Lys Thr Gln Arg Ala Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser
35 40 45

Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val
50 55 60

Ala Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg
65 70 75 80

Glu Gly Arg Phe Asn
85

<210> 18
<211> 85
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 化學合成

<220>
<221> CARBOHYD
<222> (25).. (25)
<223> 去唾液酸寡糖

<400> 18
Cys Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr
1 5 10 15

Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile
20 25 30

Glu Lys Thr Gln Arg Ala Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser
35 40 45

Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val
50 55 60

Ala Gln Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg
65 70 75 80

Glu Gly Arg Phe Asn
85

<210> 19
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 化學合成

<220>
<221> BINDING
<222> (1).. (1)
<223> Boc

<220>
<221> BINDING
<222> (24).. (24)
<223> Boc

<220>
<221> CARBOHYD
<222> (52).. (52)
<223> 去唾液酸寡糖

<400> 19
Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu
1 5 10 15

Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met
20 25 30

Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala Leu Glu
35 40 45

Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg

50 55 60

Ala Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser
65 70 75 80

Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys
85 90 95

Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg Phe Asn
100 105 110

<210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 化學合成

<220>
<221> BINDING
<222> (1)..(1)
<223> Boc

<220>
<221> BINDING
<222> (6)..(6)
<223> C(=S)OPh

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X is G, V, I, P, F, W, or L
<400> 20
Asp Val Ala Asp Phe Cys Xaa His His His His His His
1 5 10
13

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 化學合成

<220>
<221> BINDING
<222> (1)..(1)
<223> Boc

<220>
<221> BINDING
<222> (5)..(5)
<223> -NH-C=NH(NHAc)

<400> 21
Asp Val Ala Asp Phe
1 5

申請專利範圍

公告本

1. 一種製造方法，其係適於 NCL 法之高效率的製造 N 末端為半胱胺酸的第 1 多胜肽片段，與 C 末側被修飾的第 2 多胜肽片段的方法，該方法含有以下的步驟：

(1)將具有以下構造的多胜肽與 CNBr 反應：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段-Cys-W-(His)_n-Z-Met-第 1 多胜肽片段 (C 末側)

[在此，n 表示 0 至 10 的整數，Cys 表示半胱胺酸，W 表示任意的 1，2 或 3 個胺基酸，Z 表示任意的 0，1 或 2 個胺基酸，His 表示組胺酸，Met 表示甲硫胺酸；又，第 1 多胜肽片段的 N 末端為半胱胺酸]

而得以下多胜肽片段的步驟；

(A) N 末端為半胱胺酸的第 1 多胜肽片段

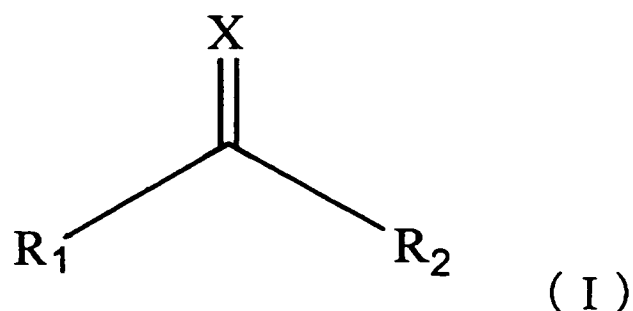
(B) 有以下構造的第 3 多胜肽片段：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段-Cys-W-(His)_n-Z-Met'

(C 末側)

[在此，Met'是表示 Met 的衍生物]

(2)前述第 3 多胜肽片段，與下述式(I)表示的化合物反應：

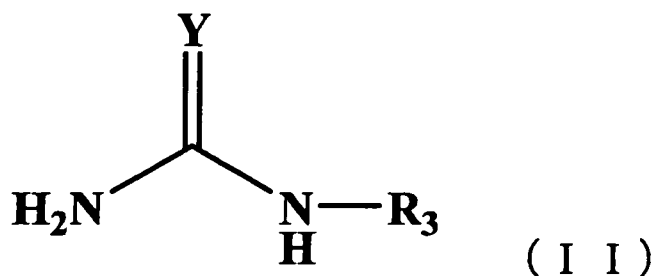


[式中，

X 是硫原子或氧原子，

R_1 及 R_2 是脫離基]

繼而在有機溶媒中，與下述式(II)表示的化合物反應：



[式中，

Y 是氧原子，硫原子或=NH，

R_3 是氫原子，鹼基或烷氧羰基。]

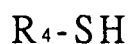
藉以獲得具有以下構造的 C 末側被修飾的第 2 多胜肽片段的步驟：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段- $\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{C}(=\text{Y})\text{NHR}_3$

(C 末側)。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之製造方法，復包含下述的步驟：

在前述(2)的步驟中所得的 C 末側被修飾的第 2 多胜肽片段，再與下述式表示的硫醇基反應：



[式中， R_4 是由有取代或無取代的苄基，有取代或無取代的芳基，及有取代或無取代的烷基所成之群中所選擇的任一個基]

而將 C 末側的- $\text{NH}-\text{C}(=\text{Y})\text{NHR}_3$ 基與硫醇基交換，藉以獲得具有以下構造的 C 末側被修飾的第 2 多胜肽片

段的步驟；

(N 末側) 第 2 多胜肽片段-C(=O)-SR₄ (C 末側)。

3. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之製造方法，其中，前述式(I)表示的化合物中的 X 為硫原子。
4. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之製造方法，其中，前述式(I)表示的化合物中的 R₁ 為 -O-C₆ 芳基。
5. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之製造方法，其中，前述式(I)表示的化合物中的 R₂ 是鹵原子或有取代或無取代的 -S-C₆₋₁₀ 芳基。
6. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之製造方法，其中，前述式(II)表示的化合物中的 Y 是 =NH。
7. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之製造方法，其中，前述式(II)表示的化合物中的 R₃ 是乙醯基。
8. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之製造方法，其中，前述具有以下構造的多胜肽：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段-Cys-W-(His)_n-Z-Met-第 1 多胜肽片段 (C 末側)

是由細胞表現的重組型多胜肽片段。

9. 如申請專利範圍第 8 項所述之製造方法，其中，前述細胞是大腸菌。
10. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之製造方法，其中，W 是 1 個胺基酸，且為由 Val，Ile，Leu，Trp 所成之群中所選擇的任一個胺基酸。
11. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之製造方法，其

中， n 是 6 至 10 的整數。

12. 一種糖鏈加成多胜肽的製造方法，係含有以下的步驟：

(1) 將要製造的所希望的糖鏈加成多胜肽的胜肽序列，至少分類而設計成如下所示的多胜肽片段的步驟，

- 包括含有糖鏈加成的胺基酸的多胜肽之含有糖鏈多胜肽片段，

- 包括含有比含有糖鏈多胜肽片段在較靠 N 末側的所希望的糖鏈加成胜肽的 N 末側的多胜肽之第 2 多胜肽片段，

- 包括含有比含有糖鏈多胜肽片段在較靠 C 末側的所希望的糖鏈加成胜肽的 C 末側的多胜肽之第 1 多胜肽片段，

- 可以存在時，在含有糖鏈多胜肽片段與第 2 多胜肽片段之間的多胜肽片段，

- 可以存在時，在含有糖鏈多胜肽片段與第 1 多胜肽片段之間的多胜肽片段；

在此，第 1 多胜肽片段的 N 末端是設計成為半胱胺酸，

(2) 使用含有編碼具有以下構造的多胜肽的核苷酸序列的表現載體：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段-Cys-W-(His) n -Z-Met-第 1 多胜肽片段 (C 末側)

[在此， n 是表示 0 至 10 的整數，Cys 表示半胱胺酸，W 表示任意的 1，2 或 3 個胺基酸，Z 表示任意的 0，1 或 2 個胺基酸，His 表示組胺酸，Met 表示甲硫胺酸；

又，第 1 多胜肽片段的 N 末端為半胱胺酸]

並由大腸菌表現，而取得具有前述構造的多胜肽的步驟；

(3)將在步驟(2)所得的多胜肽與 CNBr 反應，而獲得以下之多胜肽片段的步驟；

(A)N 末端為半胱胺酸的第 1 多胜肽片段

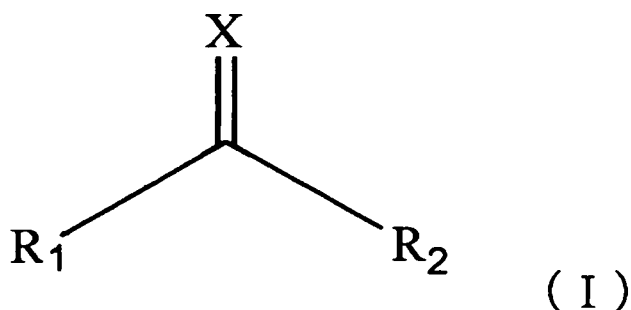
(B)具有以下的構造的第 3 多胜肽片段：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段 -Cys-W-(His)_n-Z-Met'

(C 末側)

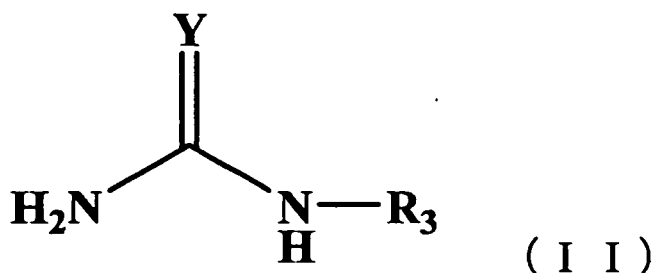
(在此，Met'表示 Met 的衍生物)

(4)將前述第 3 多胜肽片段與下述式(I)表示的化合物反應：



[式中，X 是硫原子或氧原子，R₁ 及 R₂ 是脫離基]

繼而，在有機溶媒中，與下述式(II)表示的化合物反應：



[式中，

Y 是氧原子，硫原子，或 NH 基，

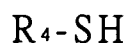
R_3 是氫原子，鹼基，或烷氧羰基]

，藉以獲得具有以下的構造的 C 末側被修飾的第 2 多胜肽片段的步驟：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段 $-C(=O)-NH-C(=Y)NHR_3$

(C 末側)

(5)任意地在前述(4)的步驟中所得的 C 末側被修飾的第 2 多胜肽片段，再與下述式表示的硫醇基反應：



[式中， R_4 是由有取代或無取代的苄基，有取代或無取代的芳基，及有取代或無取代的烷基所成之群中所選擇的任一個基]

並將 C 末側的 $-NH-C(=Y)NHR_3$ 基與硫醇基交換，藉以獲得具有以下的構造的 C 末側被修飾的第 2 多胜肽片段的步驟：

(N 末側) 第 2 多胜肽片段 $-C(=O)-SR_4$ (C 末側)

(6)將以化學的方法合成而另外調製的

- 前述含有糖鏈多胜肽片段，
 - 可以存在時，在含有糖鏈多胜肽片段與第 2 多胜肽片段之間的前述多胜肽片段，
 - 可以存在時，在含有糖鏈多胜肽片段與第 1 多胜肽片段之間的前述多胜肽片段，及
- 在步驟(3)所得的 N 末端為半胱胺酸之第 1 多胜肽片段，及

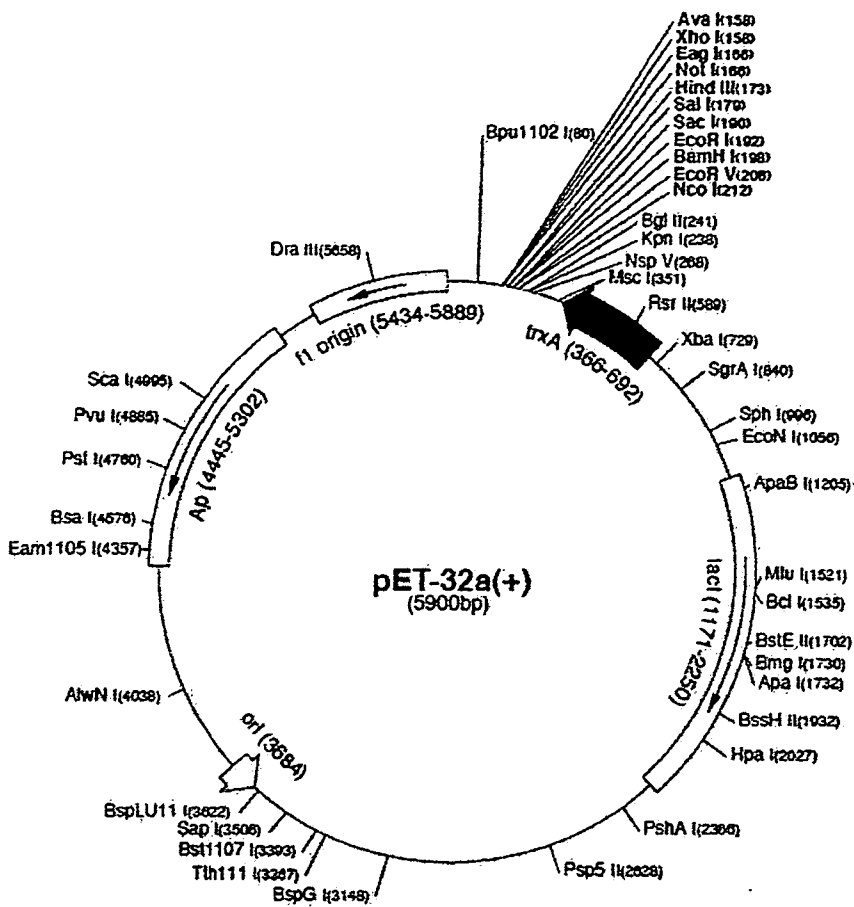
在步驟(4)或(5)所得的 C 末側被修飾的第 2 多胜肽片段

以能得到所希望的糖鏈加成多胜肽的順序，以連接法鍵結的步驟。

13. 如申請專利範圍第 12 項所述之製造方法，其中，前述式(I)表示的化合物中的 X 是硫原子。
14. 如申請專利範圍第 12 項或第 13 項所述之製造方法，其中，前述式(I)表示的化合物中的 R_1 是 -O-C₆ 芳基。
15. 如申請專利範圍第 12 項或第 13 項所述之製造方法，其中，前述式(I)表示的化合物中的 R_2 是鹵原子或有取代或無取代的 -S-C₆₋₁₀ 芳基。
16. 如申請專利範圍第 12 項或第 13 項所述之製造方法，其中，前述式(II)表示的化合物中的 Y 是 =NH。
17. 如申請專利範圍第 12 項或第 13 項所述之製造方法，其中，前述式(II)表示的化合物中的 R_3 是乙醯基。
18. 如申請專利範圍第 12 項或第 13 項所述之製造方法，其中，W 是 1 個胺基酸，且為由 Val, Ile, Leu, Trp 所成之群中所選擇的任一個胺基酸。
19. 如申請專利範圍第 12 項或第 13 項所述之製造方法，其中，n 是 6 至 10 的整數。

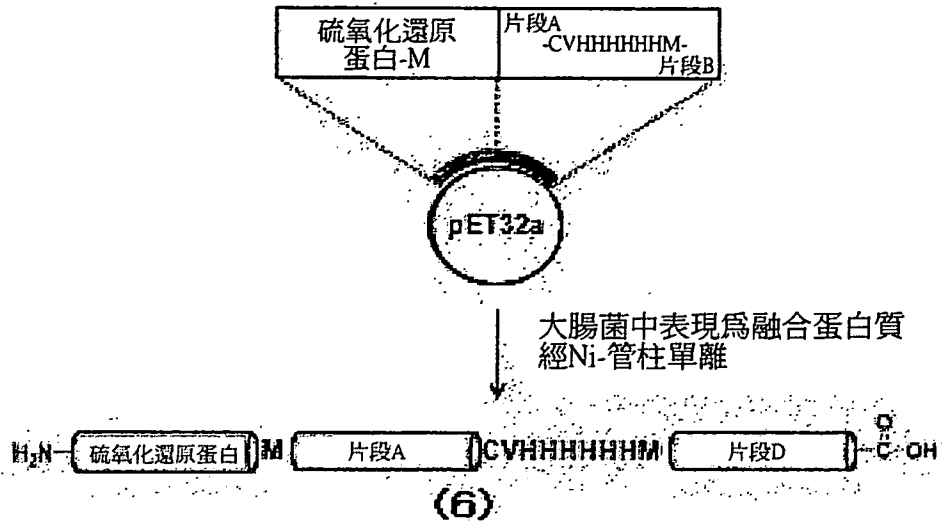
圖式

公告本

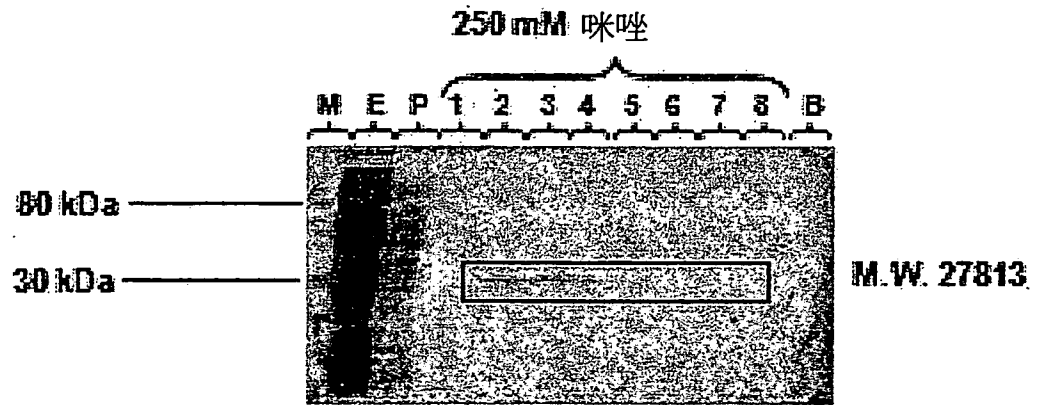


第1圖

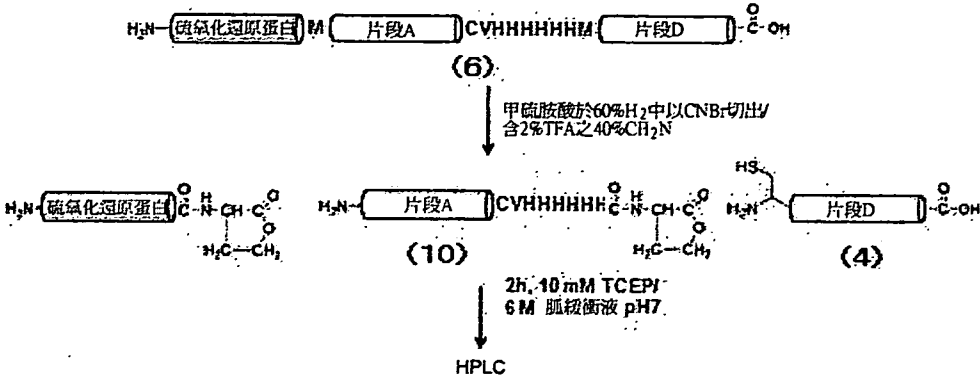
大腸菌中表現



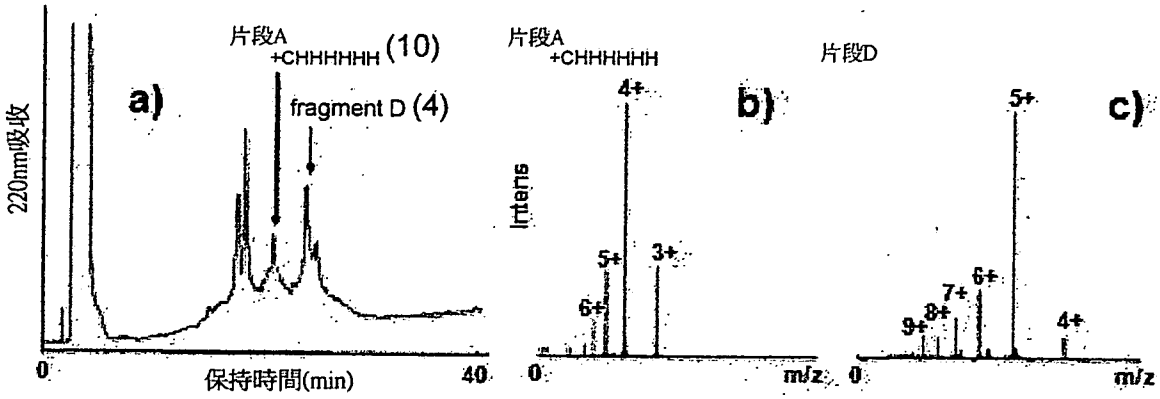
第2圖



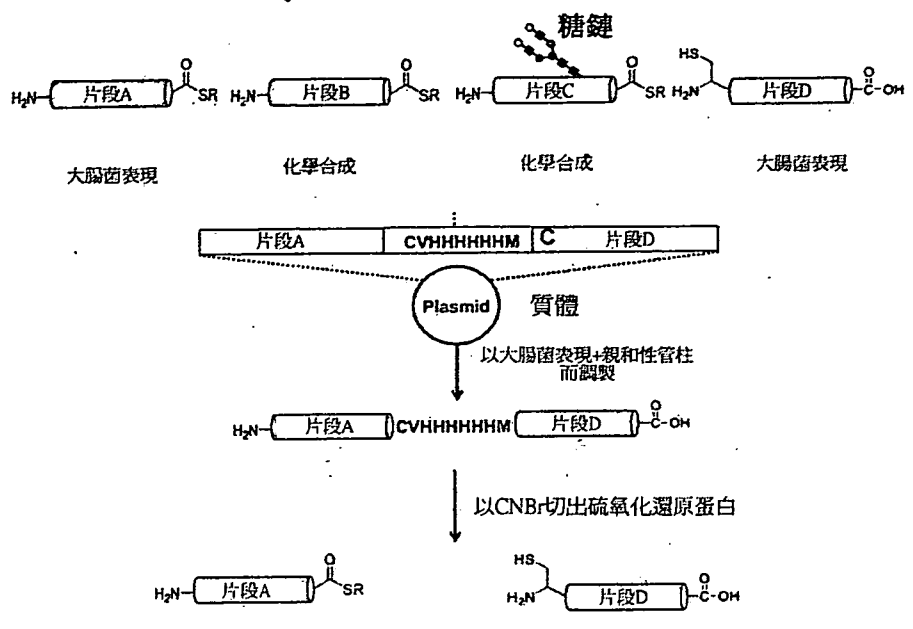
第3圖



第4圖



第5圖



第6圖