



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101796064 B

(45) 授权公告日 2014.04.16

(21) 申请号 200880101043.1

(22) 申请日 2008.07.30

(30) 优先权数据

2007-199372 2007.07.31 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010.01.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2008/063659 2008.07.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/017154 JA 2009.02.05

(73) 专利权人 株式会社糖锁工学研究所

地址 日本京都

(72) 发明人 梶原康宏 坂本泉 南部由利

深江一博 朝井洋明

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 陈昕

(51) Int. Cl.

C07K 1/113 (2006.01)

(56) 对比文件

Naoki Yamamoto, et al. An Approach for a synthesis of asparagine-linked Sialylglycopeptides Having Intact and Homogeneous Complex-Type

Undecadisialyloligosaccharides. 《Chemistry - A european journal》. 2007, 613-625.

Erhard Gross, et al. The research of cyanogen bromide with S-methylcysteine ; Fragmentation of the peptide 14-29

of bovine pancreatic ribonuclease

A. 《Biochemical and Biophysical Research Communications》. 1974, 1145-1150.

审查员 唐宁

权利要求书5页 说明书35页

序列表25页

(54) 发明名称

肽的制备方法

(57) 摘要

本发明提供肽的制备方法,其特征在于,在含有具有-SH基的氨基酸残基的肽中,将上述-SH基转变成-OH基,该方法包括以下的工序(a)~(c):(a)通过使肽中的-SH基与甲基化剂反应,将上述-SH基转变成-SMe基的工序;(b)通过使工序(a)中获得的-SMe基与氰化剂反应,生成反应中间体的工序;以及(c)在与工序(b)相比为碱性较强的条件下,将工序(b)中获得的反应中间体转变成含有具有-OH基的氨基酸残基的肽的工序。

1. 肽的制备方法,其特征在于,在含有具有-SH基的氨基酸残基的肽中,将上述-SH基转变成-OH基,该方法包括以下的工序(a)~(c):

(a) 通过使肽中的-SH基与甲基化剂反应,将上述-SH基转变成-SMe基的工序;所述甲基化剂为碘甲烷或甲基-4-硝基苯磺酸酯,相对于所述肽中-SH基1残基,以1~1000当量使用所述甲基化剂,

(b) 通过使工序(a)中获得的-SMe基与氰化剂反应,生成反应中间体的工序;所述氰化剂为溴化氰或氰酸苯酯,相对于所述肽中的-SMe基1残基,以1~1000当量使用所述氰化剂,以及

(c) 在与工序(b)相比为碱性较强的条件下,将工序(b)中获得的反应中间体转变成含有具有-OH基的氨基酸残基的肽的工序。

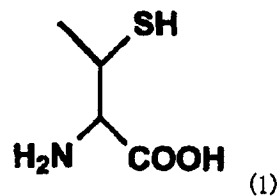
2. 肽的制备方法,其特征在于,在含有半胱氨酸残基的肽中,将上述半胱氨酸残基转变成丝氨酸残基,该方法包括以下的工序(a)~(c):

(a) 通过使肽中的半胱氨酸残基的-SH基与甲基化剂反应,将上述-SH基转变成-SMe基的工序;所述甲基化剂为碘甲烷或甲基-4-硝基苯磺酸酯,相对于所述肽中-SH基1残基,以1~1000当量使用所述甲基化剂,

(b) 通过使工序(a)中获得的-SMe基与氰化剂反应,生成反应中间体的工序;所述氰化剂为溴化氰或氰酸苯酯,相对于所述肽中的-SMe基1残基,以1~1000当量使用所述氰化剂,以及

(c) 在与工序(b)相比为碱性较强的条件下,将工序(b)中获得的反应中间体转变成含有丝氨酸残基的肽的工序。

3. 肽的制备方法,其特征在于,在含有由式(1)表示的苏氨酸衍生物A



作为氨基酸残基的肽中,将上述苏氨酸衍生物A残基转变成苏氨酸残基,该方法包括以下的工序(a)~(c):

(a) 通过使肽中的苏氨酸衍生物A残基的-SH基与甲基化剂反应,将上述-SH基转变成-SMe基的工序;所述甲基化剂为碘甲烷或甲基-4-硝基苯磺酸酯,相对于所述肽中-SH基1残基,以1~1000当量使用所述甲基化剂,

(b) 通过使工序(a)中获得的-SMe基与氰化剂反应,生成反应中间体的工序;所述氰化剂为溴化氰或氰酸苯酯,相对于所述肽中的-SMe基1残基,以1~1000当量使用所述氰化剂,以及

(c) 在与工序(b)相比为碱性较强的条件下,将工序(b)中获得的反应中间体转变成含有苏氨酸残基的肽的工序。

4. 肽的制备方法,其特征在于,在含有具有-SMe基的氨基酸残基的肽中,将上述-SMe基转变成-OH基,该方法包括以下的工序(b)和(c):

(b) 通过使肽中的-SMe基与氰化剂反应,生成反应中间体的工序;所述氰化剂为溴化

氰或氰酸苯酯,相对于所述肽中的-SMe基1残基,以1~1000当量使用所述氰化剂,以及
(c)在与工序(b)相比为碱性较强的条件下,将工序(b)中获得的反应中间体转变成含有具有-OH基的氨基酸残基的肽的工序。

5. 权利要求1~4中任1项所述的肽的制备方法,其中,上述反应中间体为酯体。

6. 权利要求1~4中任1项所述的肽的制备方法,其中,工序(c)的碱性条件为弱碱性条件。

7. 权利要求1~4中任1项所述的肽的制备方法,其中,工序(c)的碱性条件为强碱性条件。

8. 权利要求1~4中任1项所述的肽的制备方法,其中,工序(a)中的肽中的蛋氨酸残基为保护蛋氨酸残基,在工序(b)或者(c)之后包括以下的工序(d):

(d) 将保护蛋氨酸残基脱保护的工序。

9. 含有具有-OH基的氨基酸残基的肽的制备方法,该方法包括以下的工序:

(o) 采用连接法将在C末端上含有羧基被由式-C(=O)-SR表示的 α -羧基硫代酯基取代的氨基酸残基的第1肽与在N末端上含有具有-SH基的氨基酸残基的第2肽连接起来,获得含有具有-SH基的氨基酸残基的肽的工序;所述式-C(=O)-SR中,R选自苄基、芳基或者烷基,

(a) 通过使工序(o)中获得的肽中的-SH基与甲基化剂反应,将上述-SH基转变成-SMe基的工序;所述甲基化剂为碘甲烷或甲基-4-硝基苯磺酸酯,相对于所述肽中-SH基1残基,以1~1000当量使用所述甲基化剂,

(b) 通过使工序(a)中获得的-SMe基与氰化剂反应,生成反应中间体的工序;所述氰化剂为溴化氰或氰酸苯酯,相对于所述肽中的-SMe基1残基,以1~1000当量使用所述氰化剂,以及

(c) 在与工序(b)相比为碱性较强的条件下,将工序(b)中获得的反应中间体转变成含有具有-OH基的氨基酸残基的肽的工序。

10. 含有丝氨酸残基的肽的制备方法,该方法包括以下的工序:

(o) 采用连接法将在C末端上含有羧基被由式-C(=O)-SR表示的 α -羧基硫代酯基取代的氨基酸残基的第1肽与在N末端上含有半胱氨酸残基的第2肽连接起来,获得含有半胱氨酸残基的肽的工序;所述式-C(=O)-SR中,R选自苄基、芳基或者烷基,

(a) 通过使工序(o)中获得的肽中的半胱氨酸残基的-SH基与甲基化剂反应,将上述-SH基转变成-SMe基的工序;所述甲基化剂为碘甲烷或甲基-4-硝基苯磺酸酯,相对于所述肽中-SH基1残基,以1~1000当量使用所述甲基化剂,

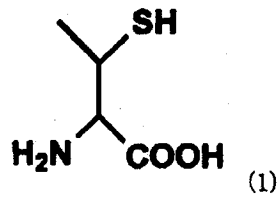
(b) 通过使工序(a)中获得的-SMe基与氰化剂反应,生成反应中间体的工序;所述氰化剂为溴化氰或氰酸苯酯,相对于所述肽中的-SMe基1残基,以1~1000当量使用所述氰化剂,以及

(c) 在与工序(b)相比为碱性较强的条件下,将工序(b)中获得的反应中间体转变成含有丝氨酸残基的肽的工序。

11. 含有苏氨酸残基的肽的制备方法,该方法包括以下的工序:

(o) 采用连接法将在C末端上含有羧基被由式-C(=O)-SR表示的 α -羧基硫代酯基取代的氨基酸残基的第1肽与在N末端上含有苏氨酸衍生物残基的第2肽连接起来,获得含

有由式 (1) 表示的苏氨酸衍生物 A 作为氨基酸残基的肽的工序;所述式 $-C(=O)-SR$ 中,R 选自苄基、芳基或者烷基,



(a) 通过使工序 (o) 中获得的肽中的苏氨酸衍生物 A 残基的 $-SH$ 基与甲基化剂反应,将上述 $-SH$ 基转变成 $-SMe$ 基的工序;所述甲基化剂为碘甲烷或甲基-4-硝基苯磺酸酯,相对于所述肽中 $-SH$ 基 1 残基,以 1 ~ 1000 当量使用所述甲基化剂,

(b) 通过使工序 (a) 中获得的 $-SMe$ 基与氰化剂反应,生成反应中间体的工序;所述氰化剂为溴化氰或氰酸苯酯,相对于所述肽中的 $-SMe$ 基 1 残基,以 1 ~ 1000 当量使用所述氰化剂,以及

(c) 在与工序 (b) 相比为碱性较强的条件下,将工序 (b) 中获得的反应中间体转变成含有苏氨酸残基的肽的工序。

12. 权利要求 9 ~ 11 中任 1 项所述的肽的制备方法,其中,上述反应中间体为酯体。

13. 权利要求 9 ~ 11 中任 1 项所述的肽的制备方法,其中,工序 (c) 的碱性条件为弱碱性条件。

14. 权利要求 9 ~ 11 中任 1 项所述的肽的制备方法,其中,工序 (c) 的碱性条件为强碱性条件。

15. 权利要求 9 ~ 11 中任 1 项所述的肽的制备方法,其中,工序 (a) 中的肽中的蛋氨酸残基为保护蛋氨酸残基,在工序 (b) 或者 (c) 之后包括以下的工序 (d) :

(d) 将保护蛋氨酸残基脱保护的工序。

16. 权利要求 9 ~ 11 中任 1 项所述的肽的制备方法,其中,上述第 1 肽为不含半胱氨酸残基的肽或者半胱氨酸残基为保护半胱氨酸残基的肽,

上述第 2 肽为在 N 末端以外不含半胱氨酸残基的肽或者在 N 末端以外的肽的半胱氨酸残基为保护半胱氨酸残基的肽。

17. 糖肽的制备方法,其特征在于,在含有具有 $-SH$ 基的氨基酸残基的糖肽中,将上述 $-SH$ 基转变成 $-OH$ 基,该方法包括以下的工序 (a) ~ (c) :

(a) 通过使糖肽中的 $-SH$ 基与甲基化剂反应,将上述 $-SH$ 基转变成 $-SMe$ 基的工序;所述甲基化剂为碘甲烷或甲基-4-硝基苯磺酸酯,相对于所述肽中 $-SH$ 基 1 残基,以 1 ~ 1000 当量使用所述甲基化剂,

(b) 通过使工序 (a) 中获得的 $-SMe$ 基与氰化剂反应,生成反应中间体的工序;所述氰化剂为溴化氰或氰酸苯酯,相对于所述肽中的 $-SMe$ 基 1 残基,以 1 ~ 1000 当量使用所述氰化剂,以及

(c) 在与工序 (b) 相比为碱性较强的条件下,将工序 (b) 中获得的反应中间体转变成含有具有 $-OH$ 基的氨基酸残基的糖肽的工序。

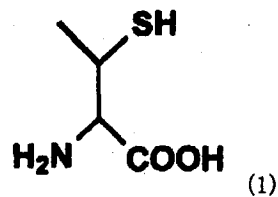
18. 糖肽的制备方法,其特征在于,在含有半胱氨酸残基的糖肽中,将上述半胱氨酸残基转变成丝氨酸残基,该方法包括以下的工序 (a) ~ (c) :

(a) 通过使糖肽中的半胱氨酸残基的 -SH 基与甲基化剂反应, 将上述 -SH 基转变成 -SMe 基的工序; 所述甲基化剂为碘甲烷或甲基-4-硝基苯磺酸酯, 相对于所述肽中 -SH 基 1 残基, 以 1 ~ 1000 当量使用所述甲基化剂,

(b) 通过使工序 (a) 中获得的 -SMe 基与氰化剂反应, 生成反应中间体的工序; 所述氰化剂为溴化氰或氰酸苯酯, 相对于所述肽中的 -SMe 基 1 残基, 以 1 ~ 1000 当量使用所述氰化剂, 以及

(c) 在与工序 (b) 相比为碱性较强的条件下, 将工序 (b) 中获得的反应中间体转变成含有丝氨酸残基的糖肽的工序。

19. 糖肽的制备方法, 其特征在于, 在含有由式 (1) 表示的苏氨酸衍生物 A 作为氨基酸残基的糖肽中, 将上述苏氨酸衍生物 A 残基转变成苏氨酸残基, 该方法包括以下的工序 (a) ~ (c):



(a) 通过使糖肽中的苏氨酸衍生物 A 残基的 -SH 基与甲基化剂反应, 将上述 -SH 基转变成 -SMe 基的工序; 所述甲基化剂为碘甲烷或甲基-4-硝基苯磺酸酯, 相对于所述肽中 -SH 基 1 残基, 以 1 ~ 1000 当量使用所述甲基化剂,

(b) 通过使工序 (a) 中获得的 -SMe 基与氰化剂反应, 生成反应中间体的工序; 所述氰化剂为溴化氰或氰酸苯酯, 相对于所述肽中的 -SMe 基 1 残基, 以 1 ~ 1000 当量使用所述氰化剂, 以及

(c) 在与工序 (b) 相比为碱性较强的条件下, 将工序 (b) 中获得的反应中间体转变成含有苏氨酸残基的糖肽的工序。

20. 权利要求 17 ~ 19 中任 1 项所述的糖肽的制备方法, 其中, 上述反应中间体为酯体。

21. 权利要求 17 ~ 19 中任 1 项所述的糖肽的制备方法, 其中, 工序 (c) 的碱性条件为弱碱性条件。

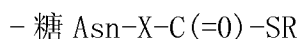
22. 权利要求 17 ~ 19 中任 1 项所述的糖肽的制备方法, 其中, 工序 (c) 的碱性条件为强碱性条件。

23. 权利要求 17 ~ 19 中任 1 项所述的糖肽的制备方法, 其中, 上述糖肽具有 N 键型糖链。

24. 权利要求 17 ~ 19 中任 1 项所述的糖肽的制备方法其中, 上述糖肽具有 O 键型糖链。

25. 含有丝氨酸残基的糖肽的制备方法, 该方法包括以下的工序:

(o) 采用连接法将 C 末端由以下式表示的第 1 糖肽:



与在 N 末端上含有半胱氨酸残基的第 2 肽连接起来, 获得含有半胱氨酸残基的糖肽的工序; 所述式 -糖 Asn-X-C(=O)-SR 中, 糖 Asn 为加成了糖链的天冬酰胺, X 为除脯氨酸以外的任意的氨基酸残基中除羧基以外的部分, R 选自苄基、芳基或者烷基,

(a) 通过使工序 (o) 中获得的糖肽中的半胱氨酸残基的 -SH 基与甲基化剂反应, 将上

述 -SH 基转变成 -SMe 基的工序；所述甲基化剂为碘甲烷或甲基-4-硝基苯磺酸酯，相对于所述肽中 -SH 基 1 残基，以 1 ~ 1000 当量使用所述甲基化剂，

(b) 通过使工序 (a) 中获得的 -SMe 基与氰化剂反应，生成反应中间体的工序；所述氰化剂为溴化氰或氰酸苯酯，相对于所述肽中的 -SMe 基 1 残基，以 1 ~ 1000 当量使用所述氰化剂，以及

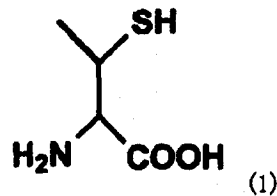
(c) 在与工序 (b) 相比为碱性较强的条件下，将工序 (b) 中获得的反应中间体转变成含有丝氨酸残基的糖肽的工序。

26. 含有苏氨酸残基的糖肽的制备方法，该方法包括以下的工序：

(o) 采用连接法将 C 末端由以下式表示的第 1 糖肽：

- 糖 Asn-X-C(=O)-SR

与在 N 末端上含有苏氨酸衍生物残基的第 2 肽连接起来，获得含有由式 (1) 表示的苏氨酸衍生物 A 作为氨基酸残基的糖肽的工序；所述式：- 糖 Asn-X-C(=O)-SR 中，糖 Asn 为加成了糖链的天冬酰胺，X 为除脯氨酸以外的任意的氨基酸残基中除羧基以外的部分，R 选自苄基、芳基或者烷基，



(a) 通过使工序 (o) 中获得的糖肽中的苏氨酸衍生物 A 残基的 -SH 基与甲基化剂反应，将上述 -SH 基转变成 -SMe 基的工序；所述甲基化剂为碘甲烷或甲基-4-硝基苯磺酸酯，相对于所述肽中 -SH 基 1 残基，以 1 ~ 1000 当量使用所述甲基化剂，

(b) 通过使工序 (a) 中获得的 -SMe 基与氰化剂反应，生成反应中间体的工序；所述氰化剂为溴化氰或氰酸苯酯，相对于所述肽中的 -SMe 基 1 残基，以 1 ~ 1000 当量使用所述氰化剂，以及

(c) 在与工序 (b) 相比为碱性较强的条件下，将工序 (b) 中获得的反应中间体转变成含有苏氨酸残基的糖肽的工序。

27. 权利要求 25 或 26 所述的糖肽的制备方法，其中，上述反应中间体为酯体。

28. 权利要求 25 或 26 所述的糖肽的制备方法，其中，工序 (c) 的碱性条件为弱碱性条件。

29. 权利要求 25 或 26 所述的糖肽的制备方法，其中，工序 (c) 的碱性条件为强碱性条件。

肽的制备方法

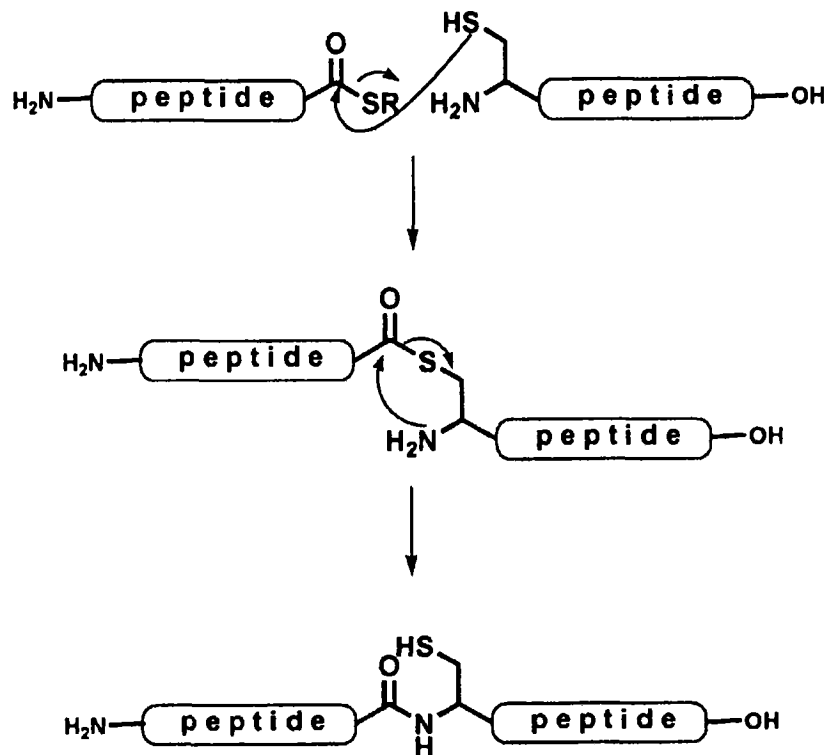
【技术领域】

[0001] 本发明涉及肽和糖肽的制备方法。

【背景技术】

[0002] 作为肽的制备方法,适用的有连接法。其中,自然化学连接法(Native Chemical Ligation、NCL法)是可以制备在连接部位(Ligation部位)具有天然酰胺键(肽键)的肽的方法。NCL法也可以在无保护的肽链之间进行,并且已知是用于在连接部位生成天然酰胺键的有效的方法(例如,专利文献1)。NCL法如下图所示,该方法是使第1肽与N末端上具有半胱氨酸残基的第2肽进行化学选择反应,以便使得在C末端上具有 α 羧基硫代酯部分,这时,半胱氨酸的侧链巯基(SH基,也称为巯基)选择性地与硫代酯基的羰基碳反应,通过巯基交换反应,生成硫代酯键的初期中间体。该中间体自发地发生分子内转位,在连接部位形成天然酰胺键,另一方面,使其再生半胱氨酸侧链硫醇。通过采用该反应,可以高效地合成各种各样的多肽。

[0003]



[0004] 自然化学连接法

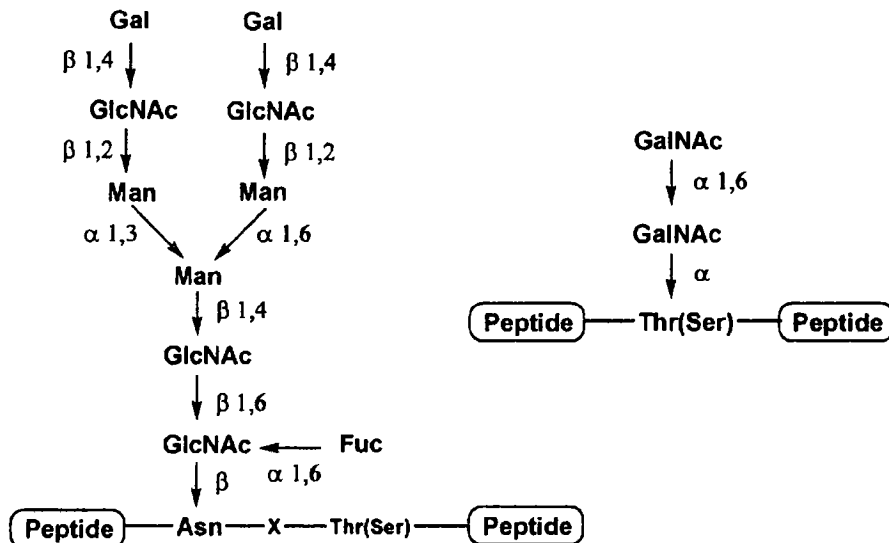
[0005] 典型的NCL法的主要缺点是,该方法中,所连接的2个肽断片中的一个必须在N末端上具有半胱氨酸残基,连接后得到的肽也在连接部位具有半胱氨酸残基。因此,当在想要通过合成获得的所希望的肽中不存在半胱氨酸残基时,就不能采用该方法。

[0006] 另外,在典型的NCL法中,采用例如固相合成法等来准备想要连接的2个或者2个以上的肽断片,但当象例如生物体内存在的肽那样,半胱氨酸含量非常少时(或者不存在

半胱氨酸时),为了供给 NCL 法,必须准备非常长的肽断片,因此不能说是有效率的。

[0007] 另一方面,已知在生物体内存在各种各样的糖肽和糖蛋白质。这些糖肽或者糖蛋白质的糖链可分为 N 键型和 O 键型这 2 种类型。N 键型糖链一般是与天冬酰胺侧链的酰胺氮形成 N-糖苷键的糖链,通常在天然的状态下,常常与称为 -Asn-X-Ser/Thr-(式中, X 为脯氨酸以外的氨基酸)。的共有序列 (consensus sequence) 中的 Asn 键合。O 键型糖链为在丝氨酸或者苏氨酸侧链的羟基中形成 O-糖苷键的糖链。下面示出其一例 (Gal :半乳糖、GlcNAc :N-乙酰基葡萄糖胺、Man :甘露糖、Fuc :岩藻糖、GalNAc :N-乙酰基半乳糖胺)。已知具有 O 键型糖链的天然糖肽中,脯氨酸、苏氨酸和丝氨酸的含有率高 (非专利文献 1 和 2)。

[0008]



[0009] N 键型糖链和 O 键型糖链的例子

[0010] 【专利文献 1】国际公开 W096/34878 号

[0011] 【非专利文献 1】TRENDS in biochemical sciences, Vol. 27, No. 3, March 2002

[0012] 【非专利文献 2】Cancer Biology & Therapy 6 :4, 481-486, April 2007

【发明内容】

[0013] 【发明所要解决的课题】

[0014] 本发明的课题是提供肽和糖肽的新的制备方法。

[0015] 特别地,在以往典型的 NCL 法中,连接在一起的 2 个肽断片中的一个在 N 末端必须具有半胱氨酸残基,而且,连接后获得的肽也在连接部位具有半胱氨酸残基,因此,想要将最终得到的所希望的肽(或者糖肽)中的半胱氨酸残基作为连接部位,只能设计并使用 NCL 法。因此,本发明提供一种可以设计连接法的肽和糖肽的新的制备方法,该方法除了能以想要获得的所希望的肽中的半胱氨酸残基作为连接部位以外,还能以与丝氨酸残基或苏氨酸残基相对应的部分作为连接部位。

[0016] 更具体地,根据本发明的一个方案,可以将肽(或者糖肽)中的半胱氨酸残基转变成丝氨酸残基。因此,可以通过采用 NCL 法将在 N 末端上具有半胱氨酸残基的肽与其他的肽连接,然后,将该半胱氨酸残基转变成丝氨酸残基。因此,根据本发明,即使想要获得的所希望的序列中不存在半胱氨酸残基,但是只要存在丝氨酸残基,也可以将该位置作为 NCL 法中的连接部位来设计。

[0017] 另外,根据本发明的一个方案,可以将N末端上具有-SH基的苏氨酸衍生物(或者该-SH基被二硫键等保护的苏氨酸衍生物)残基通过利用连接法将N末端上具有的肽与其他的肽连接起来,然后,将获得的苏氨酸衍生物残基转变成苏氨酸残基。因此,根据本发明,即使在想要获得的所希望的序列中不存在半胱氨酸残基,但是只要存在苏氨酸残基,也可以将该位置作为连接法中的连接部位来设计。

[0018] 这样,本发明提供一种能够将糖肽中丰富存在的丝氨酸或苏氨酸作为采用连接法的连接部位来设计的、采用连接法的肽和糖肽的新型的制备方法。

[0019] 【用于解决课题的手段】

[0020] 为了解决以上的课题,本发明可以具有以下特征。

[0021] 即,本发明可以提供肽的制备方法,其特征在于,在含有具有-SH基的氨基酸残基的肽中,将上述-SH基转变成-OH基,该方法包括以下的工序(a)~(c):

[0022] (a) 使肽中的-SH基与甲基化剂反应的工序;

[0023] (b) 使工序(a)中获得的-SMe基与氰化剂反应的工序;以及

[0024] (c) 形成与工序(b)相比为碱性较强的条件的工序。

[0025] 本发明还提供肽的制备方法,其特征在于,在含有具有-SH基的氨基酸残基的肽中,将上述-SH基转变成-OH基,该方法包括以下的工序(a)~(c):

[0026] (a) 通过使肽中的-SH基与甲基化剂反应,将上述-SH基转变成-SMe基的工序;

[0027] (b) 通过使工序(a)中获得的-SMe基与氰化剂反应,生成反应中间体的工序;以及

[0028] (c) 在与工序(b)相比为碱性较强的条件下,将工序(b)中获得的反应中间体转变成含有具有-OH基的氨基酸残基的肽的工序。

[0029] 本发明还提供肽的制备方法,其特征在于,在含有半胱氨酸残基的肽中,将上述半胱氨酸残基转变成丝氨酸残基,该方法包括以下的工序(a)~(c):

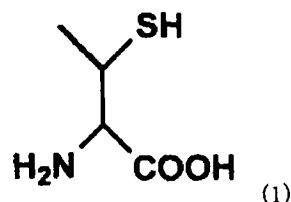
[0030] (a) 通过使肽中的半胱氨酸残基的-SH基与甲基化剂反应,将上述-SH基转变成-SMe基的工序;

[0031] (b) 通过使工序(a)中获得的-SMe基与氰化剂反应,生成反应中间体的工序;以及

[0032] (c) 在与工序(b)相比为碱性较强的条件下,将工序(b)中获得的反应中间体转变成含有丝氨酸残基的肽的工序。

[0033] 本发明还提供肽的制备方法,其特征在于,在含有由式(1)表示的苏氨酸衍生物A

[0034]



[0035] 作为氨基酸残基的肽中,将上述苏氨酸衍生物A残基转变成苏氨酸残基,该方法包括以下的工序(a)~(c):

[0036] (a) 通过使肽中的苏氨酸衍生物A残基的-SH基与甲基化剂反应,将上述-SH基转变成-SMe基的工序;

[0037] (b) 通过使工序 (a) 中获得的 $-SMe$ 基与氰化剂反应,生成反应中间体的工序;以及

[0038] (c) 在与工序 (b) 相比为碱性较强的条件下,将工序 (b) 中获得的反应中间体转变成含有苏氨酸残基的肽的工序。

[0039] 本发明还提供肽的制备方法,其特征在于,在含有具有 $-SMe$ 基的氨基酸残基的肽中,将上述 $-SMe$ 基转变成 $-OH$ 基,该方法包括以下的工序 (b) 和 (c):

[0040] (b) 通过使肽中的 $-SMe$ 基与氰化剂反应,生成反应中间体的工序;以及

[0041] (c) 在与工序 (b) 相比为碱性较强的条件下,将工序 (b) 中获得的反应中间体转变成含有具有 $-OH$ 基的氨基酸残基的肽的工序。

[0042] 本发明还提供含有具有 $-OH$ 基的氨基酸残基的肽的制备方法,该方法包括以下的工序:

[0043] (o) 采用连接法将在 C 末端上含有羧基被由式 $-C(=O)-SR$ (式中, R 选自苄基、芳基或者烷基,它们也可以进一步被取代基取代) 表示的 α -羧基硫代酯基取代的氨基酸残基的第 1 肽与在 N 末端上含有具有 $-SH$ 基的氨基酸残基的第 2 肽连接起来,获得含有具有 $-SH$ 基的氨基酸残基的肽的工序;

[0044] (a) 通过使工序 (o) 中获得的肽中的 $-SH$ 基与甲基化剂反应,将上述 $-SH$ 基转变成 $-SMe$ 基的工序;

[0045] (b) 通过使工序 (a) 中获得的 $-SMe$ 基与氰化剂反应,生成反应中间体的工序;以及

[0046] (c) 在与工序 (b) 相比为碱性较强的条件下,将工序 (b) 中获得的反应中间体转变成含有具有 $-OH$ 基的氨基酸残基的肽的工序。

[0047] 本发明还提供含有丝氨酸残基的肽的制备方法,该方法包括以下的工序:

[0048] (o) 采用连接法将在 C 末端上含有羧基被由式 $-C(=O)-SR$ (式中, R 选自苄基、芳基或者烷基,它们也可以进一步被取代基取代) 表示的 α -羧基硫代酯基取代的氨基酸残基的第 1 肽与在 N 末端上含有半胱氨酸残基的第 2 肽连接起来,获得含有半胱氨酸残基的肽的工序;

[0049] (a) 通过使工序 (o) 中获得的肽中的半胱氨酸残基的 $-SH$ 基与甲基化剂反应,将上述 $-SH$ 基转变成 $-SMe$ 基的工序;

[0050] (b) 通过使工序 (a) 中获得的 $-SMe$ 基与氰化剂反应,生成反应中间体的工序;以及

[0051] (c) 在与工序 (b) 相比为碱性较强的条件下,将工序 (b) 中获得的反应中间体转变成含有丝氨酸残基的肽的工序。

[0052] 本发明还提供含有苏氨酸残基的肽的制备方法,该方法包括以下的工序:

[0053] (o) 采用连接法将在 C 末端上含有羧基被由式 $-C(=O)-SR$ (式中, R 选自苄基、芳基或者烷基,它们也可以进一步被取代基取代) 表示的 α -羧基硫代酯基取代的氨基酸残基的第 1 肽与在 N 末端上含有苏氨酸衍生物残基的第 2 肽连接起来,获得含有由上述式 (1) 表示的苏氨酸衍生物 A 作为氨基酸残基的肽的工序;

[0054] (a) 通过使工序 (o) 中获得的肽中的苏氨酸衍生物 A 残基的 $-SH$ 基与甲基化剂反应,将上述 $-SH$ 基转变成 $-SMe$ 基的工序;

[0055] (b) 通过使工序 (a) 中获得的 -SMe 基与氰化剂反应,生成反应中间体的工序;以及

[0056] (c) 在与工序 (b) 相比为碱性较强的条件下,将工序 (b) 中获得的反应中间体转变成含有苏氨酸残基的肽的工序。

[0057] 本发明还提供糖肽的制备方法,其特征在于,在含有具有 -SH 基的氨基酸残基的糖肽中,将上述 -SH 基转变成 -OH 基,该方法包括以下的工序 (a) ~ (c):

[0058] (a) 使糖肽中的 -SH 基与甲基化剂反应的工序;

[0059] (b) 使工序 (a) 中获得的 -SMe 基与氰化剂反应的工序;以及

[0060] (c) 形成与工序 (b) 相比为碱性较强的条件的工序。

[0061] 本发明还提供糖肽的制备方法,其特征在于,在含有具有 -SH 基的氨基酸残基的糖肽中,将上述 -SH 基转变成 -OH 基,该方法包括以下的工序 (a) ~ (c):

[0062] (a) 通过使糖肽中的 -SH 基与甲基化剂反应,将上述 -SH 基转变成 -SMe 基的工序;

[0063] (b) 通过使工序 (a) 中获得的 -SMe 基与氰化剂反应,生成反应中间体的工序;以及

[0064] (c) 在与工序 (b) 相比为碱性较强的条件下,将工序 (b) 中获得的反应中间体转变成含有具有 -OH 基的氨基酸残基的糖肽的工序。

[0065] 本发明还提供糖肽的制备方法,其特征在于,在含有半胱氨酸残基的糖肽中,将上述半胱氨酸残基转变成丝氨酸残基,该方法包括以下的工序 (a) ~ (c):

[0066] (a) 通过使糖肽中的半胱氨酸残基的 -SH 基与甲基化剂反应,将上述 -SH 基转变成 -SMe 基的工序;

[0067] (b) 通过使工序 (a) 中获得的 -SMe 基与氰化剂反应,生成反应中间体的工序;以及

[0068] (c) 在与工序 (b) 相比为碱性较强的条件下,将工序 (b) 中获得的反应中间体转变成含有丝氨酸残基的糖肽的工序。

[0069] 本发明还提供糖肽的制备方法,其特征在于,在含有由上述式 (1) 表示的苏氨酸衍生物 A 作为氨基酸残基的糖肽中,将上述苏氨酸衍生物 A 残基转变成苏氨酸残基,该方法包括以下的工序 (a) ~ (c):

[0070] (a) 通过使糖肽中的苏氨酸衍生物 A 残基的 -SH 基与甲基化剂反应,将上述 -SH 基转变成 -SMe 基的工序;

[0071] (b) 通过使工序 (a) 中获得的 -SMe 基与氰化剂反应,生成反应中间体的工序;以及

[0072] (c) 在与工序 (b) 相比为碱性较强的条件下,将工序 (b) 中获得的反应中间体转变成含有苏氨酸残基的糖肽的工序。

[0073] 本发明还提供含有具有 -OH 基的氨基酸残基的糖肽的制备方法,该方法包括以下的工序:

[0074] (o) 采用连接法将在 C 末端上含有羧基被由式 $-C(=O)-SR$ (式中, R 选自苄基、芳基或者烷基,它们也可以进一步被取代基取代)。表示的 α -羧基硫代酯基取代的氨基酸残基的第 1 肽或者糖肽与在 N 末端上含有具有 -SH 基的氨基酸残基的第 2 肽或者糖肽 (此处,第 1 肽或者糖肽以及第 2 肽或者糖肽中的至少一方为糖肽) 连接起来,获得含有具有 -SH

基的氨基酸残基的糖肽的工序；

[0075] (a) 通过使工序 (o) 中获得的糖肽中的 -SH 基与甲基化剂反应, 将上述 -SH 基转变成 -SMe 基的工序；

[0076] (b) 通过使工序 (a) 中获得的 -SMe 基与氰化剂反应, 生成反应中间体的工序；以及

[0077] (c) 在与工序 (b) 相比为碱性较强的条件下, 将工序 (b) 中获得的反应中间体转变成含有具有 -OH 基的氨基酸残基的糖肽的工序。

[0078] 本发明还提供含有丝氨酸残基的糖肽的制备方法, 该方法包括以下的工序：

[0079] (o) 采用连接法将 C 末端由以下式表示的第 1 糖肽：

[0080] - 糖 Asn-X-C(=O)-SR

[0081] (式中,

[0082] 糖 Asn 为加成了糖链的天冬酰胺,

[0083] X 为除脯氨酸以外的任意的氨基酸残基中除羧基以外的部分,

[0084] R 选自苄基、芳基或者烷基, 它们也可以进一步被取代基取代) 与在 N 末端上含有半胱氨酸残基的第 2 肽连接起来, 获得含有半胱氨酸残基的糖肽的工序；

[0085] (a) 通过使工序 (o) 中获得的糖肽中的半胱氨酸残基的 -SH 基与甲基化剂反应, 将上述 -SH 基转变成 -SMe 基的工序；

[0086] (b) 通过使工序 (a) 中获得的 -SMe 基与氰化剂反应, 生成反应中间体的工序；以及

[0087] (c) 在与工序 (b) 相比为碱性较强的条件下, 将工序 (b) 中获得的反应中间体转变成含有丝氨酸残基的糖肽的工序。

[0088] 本发明还提供含有苏氨酸残基的糖肽的制备方法, 该方法包括以下的工序：

[0089] (o) 采用连接法将 C 末端由以下式表示的第 1 糖肽：

[0090] - 糖 Asn-X-C(=O)-SR

[0091] (式中,

[0092] 糖 Asn 为加成了糖链的天冬酰胺,

[0093] X 为除脯氨酸以外的任意的氨基酸残基中除羧基以外的部分,

[0094] R 选自苄基、芳基或者烷基, 它们也可以进一步被取代基取代) 与在 N 末端上含有苏氨酸衍生物残基的第 2 肽连接起来, 获得含有由上述式 (1) 表示的苏氨酸衍生物 A 作为氨基酸残基的糖肽的工序；

[0095] (a) 通过使工序 (o) 中获得的糖肽中的苏氨酸衍生物 A 残基的 -SH 基与甲基化剂反应, 将上述 -SH 基转变成 -SMe 基的工序；

[0096] (b) 通过使工序 (a) 中获得的 -SMe 基与氰化剂反应, 生成反应中间体的工序；以及

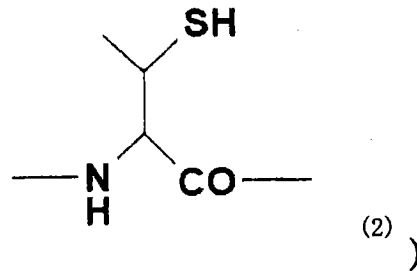
[0097] (c) 在与工序 (b) 相比为碱性较强的条件下, 将工序 (b) 中获得的反应中间体转变成含有苏氨酸残基的糖肽的工序。

[0098] 本发明还提供含有由以下式：

[0099] - 糖 Asn-X-Y-

[0100] (式中,

- [0101] 糖 Asn 为加成了糖链的天冬酰胺，
 [0102] X 为除脯氨酸以外的任意的氨基酸残基，
 [0103] Y 为由式 (2) 表示的苏氨酸衍生物 A 残基
 [0104]



[0105] 表示的结构的糖肽。

[0106] 在本发明中,根据实施方案,工序(a)或者工序(o)中的肽或者糖肽中的蛋氨酸残基为保护蛋氨酸残基,进而,根据希望,优选在工序(b)或者(c)之后,特别是在工序(c)之后包括以下的工序(d):

[0107] (d) 将保护蛋氨酸残基脱保护的工序。

[0108] 在本发明中,根据实施方案,在工序(b)中获得的反应中间体优选为酯体。

[0109] 在本发明中,根据实施方案,工序(b)优选在酸性条件下、特别是在 pH2 ~ 3 下进行。

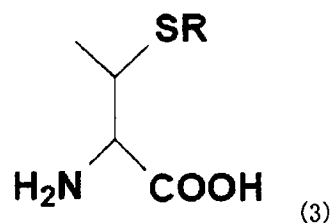
[0110] 在本发明中,根据实施方案,在工序(b)中使用的氰化剂优选为溴化氰。

[0111] 在本发明中,根据实施方案,优选在弱碱性条件下,例如,在 pH7 ~ 9、特别是 pH 7 ~ 8 下进行工序(c)。当在弱碱性条件下进行工序(c)时,根据实施方案,优选将工序(c)进行约 10 分钟以上、特别是约 15 分钟以上(例如,约 10 分钟 ~ 30 小时左右、特别是约 15 分钟 ~ 30 小时左右)。

[0112] 在本发明中,根据实施方案,优选在强碱性条件下,例如,在 pH9 ~ 13、特别是 pH10 ~ 11 下进行工序(c)。当在强碱性条件下进行工序(c)时,根据实施方案,优选将工序(c)进行约 1 小时以下、特别是约 10 分钟以下(例如,约 5 分钟 ~ 1 小时左右、特别是约 5 分钟 ~ 10 分钟左右)。

[0113] 在本发明中,当在第 2 肽的 N 末端上含有苏氨酸衍生物残基时,根据实施方案,上述苏氨酸衍生物残基为由式(3):

[0114]



[0115] (式中, R 为 H 或者在连接反应的情况下容易被脱保护的硫羟基的保护基,优选为 H 或者二硫基)。

[0116] 表示的苏氨酸衍生物的 N 末端氨基酸残基。

[0117] 在本发明中,根据实施方案,第 1 肽(或者糖肽)和第 2 肽(或者糖肽)中的任一个,在特定情况下为二者,优选为不含半胱氨酸或是半胱氨酸为保护半胱氨酸的肽(或者

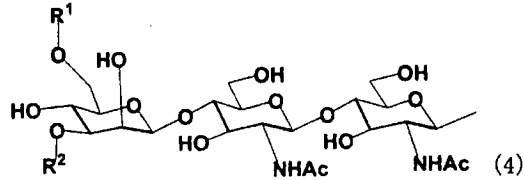
糖肽)。

[0118] 在本发明中,根据实施方案,第1肽(或者糖肽)和第2肽(或者糖肽)中的任一个优选为具有80个以下、优选50个以下、更优选30个以下的氨基酸残基的肽(或者糖肽)。

[0119] 在本发明中,根据实施方案,糖肽中的糖链优选为N键型糖链或者O键型糖链。

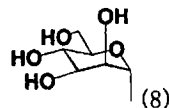
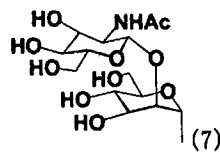
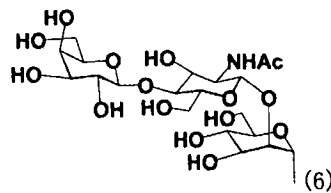
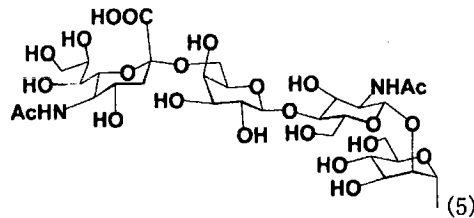
[0120] 在本发明中,根据实施方案,糖链优选为由以下式(4)表示的糖链。

[0121]



[0122] [式中, R^1 和 R^2 各自独立地为氢原子或者由式(5)~(8)表示的基团]

[0123]



[0124] 在本发明中,根据实施方案,工序(c)或者工序(d)之后,优选还包括加成了糖链的工序。

[0125] 采用本发明的制备方法获得的肽或者糖肽,根据实施方案,全部的酰胺键优选为天然酰胺键。

[0126] 采用本发明的制备方法获得的肽或者糖肽,根据实施方案,全部的构成氨基酸优

选为在生物体内作为肽或者糖肽的构成氨基酸而存在的氨基酸。

【0127】 【发明的效果】

【0128】 根据本发明的肽的制备方法,可以将具有-SH基的肽的-SH基转变成-OH基。另外,本发明的方法还可以把通过连接法将在C末端上具有由 $-C(=O)-SR$ 表示的 α -羧基硫代酯部分的第1肽与在N末端上含有具有-SH基的氨基酸残基的第2肽连接起来而获得的、含有具有-SH基的氨基酸残基的肽的-SH基转变成-OH基。这些方法也可以应用于糖肽。

【0129】 因此,根据本发明的肽的制备方法,可以将肽中的半胱氨酸残基转变成丝氨酸残基,即使在想要获得的所希望的序列中不存在半胱氨酸残基,但是只要存在丝氨酸残基,就可以适用于NCL法。

【0130】 另外,本发明还提供将具有-SH基的苏氨酸衍生物作为连接部位的连接法,由于能够将采用该连接法获得的肽中具有-SH基的苏氨酸衍生物残基转变成苏氨酸残基,因此在制备具有苏氨酸的肽时,将苏氨酸残基作为连接部位,可以适用连接法。

【0131】 以往的自然化学连接法中作为连接部位的半胱氨酸,在生物体内的肽中的含有率低,但根据本发明的方法,可以将生物体内的肽、特别是糖肽中含有率高的丝氨酸和苏氨酸作为连接法中新的连接部位来设计。

【0132】 进而,通过将上述的方法适用于糖肽、特别是丝氨酸和苏氨酸的含有率高的O键型糖链和具有作为共有序列的具有-糖Asn-X-Ser-或者-糖Asn-X-Thr-(式中,糖Asn为加成了糖链的天冬酰胺,X为除脯氨酸以外的任意的氨基酸残基)的序列的N键型糖链的糖肽,利用连接法,可以制备与自然结构相同的、具有N键型糖链或者O键型糖链的糖肽。

【具体实施方式】

【0133】 本发明的第1方面为,对于含有具有-SH基的氨基酸残基的肽,使其通过包括下述工序(a)~(c)的工序,获得含有具有-OH基的氨基酸残基的肽:

【0134】 (a) 使肽中的-SH基与甲基化剂反应的工序;

【0135】 (b) 使工序(a)中获得的-SMe基与氰化剂反应的工序;以及

【0136】 (c) 形成与工序(b)相比为碱性较强的条件的工序。

【0137】 上述工序(a)~(c)在较特定的情况下为:

【0138】 (a) 通过使肽中的-SH基与甲基化剂反应,将上述-SH基转变成-SMe基的工序;

【0139】 (b) 通过使工序(a)中获得的-SMe基与氰化剂反应,生成反应中间体的工序;以及

【0140】 (c) 在与工序(b)相比为碱性较强的条件下,将工序(b)中获得的反应中间体转变成含有具有-OH基的氨基酸残基的肽的工序。

【0141】 本发明的第2方面为,通过以下的工序:

【0142】 采用连接法将在C末端上含有羧基被由式 $-C(=O)-SR$ (式中,R选自苄基、芳基或者烷基,它们也可以进一步被取代基取代)表示的 α -羧基硫代酯基取代的氨基酸残基的第1肽与在N末端上含有具有-SH基的氨基酸残基的第2肽连接起来,获得含有具有-SH基的氨基酸残基的肽的工序;

【0143】 以及包括上述工序(a)~(c)的工序;获得含有具有-OH基的氨基酸残基的肽。

[0144] 本发明的第 3 方面是,对于含有具有 -SH 基的氨基酸残基的糖肽,通过包括上述工序 (a) ~ (c) 的工序,获得含有具有 -OH 基的氨基酸残基的糖肽。

[0145] 本发明的第 4 方面是,通过以下的工序:

[0146] 采用连接法将 C 末端由以下式表示的第 1 糖肽:

[0147] -糖 Asn-X-C(=O)-SR

[0148] (式中,糖 Asn 为加成了糖链的天冬酰胺, X 为除脯氨酸以外的任意的氨基酸残基中除羧基以外的部分, R 选自苄基、芳基或者烷基,它们也可以进一步被取代基取代)。

[0149] 与在 N 末端上含有具有 -SH 基的氨基酸残基的第 2 肽连接起来,获得含有具有 -SH 基的氨基酸残基的糖肽的工序;

[0150] 以及包括上述工序 (a) ~ (c) 的工序;获得含有具有 -OH 基的氨基酸残基的糖肽。

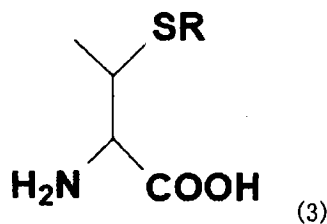
[0151] 在本说明书中,“肽”只要是由 2 个以上的氨基酸通过酰胺键键合而成的,就没有特殊限定,包含公知的肽和新型的肽以及肽的变体。一般被称为蛋白质的成分也包含在本发明的肽中。在优选的方案中,采用本发明的制备方法获得的肽(或者糖肽),与天然产物相同,2 个以上的氨基酸通过酰胺键(肽键)而键合在一起。

[0152] 在本说明书中,“肽变体”是指由肽天然地或者人工地改变而成的化合物,作为这种改变,可举出例如,肽的 1 个或者多个氨基酸残基的、烷基化、酰基化(例如乙酰基化)、酰胺化(例如,肽的 C 末端的酰胺化)、羧基化、酯形成、二硫键形成、糖基化、脂质化、磷酸化、羟基化、标识成分的结合等。

[0153] 在本说明书中,“氨基酸”是按照其最广泛的含义来使用,不仅包含天然的氨基酸,例如丝氨酸(Ser)、天冬酰胺(Asn)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、丙氨酸(Ala)、酪氨酸(Tyr)、甘氨酸(Gly)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、组氨酸(His)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、谷氨酰胺(Gln)、苏氨酸(Thr)、半胱氨酸(Cys)、蛋氨酸(Met)、苯基丙氨酸(Phe)、色氨酸(Trp)、脯氨酸(Pro),此外还包含被称为氨基酸变异体和衍生物等非天然的氨基酸。如果是本领域技术人员,考虑到该广泛的定义,作为本说明书中的氨基酸,可举出例如 L-氨基酸;D-氨基酸;氨基酸变异体和衍生物等被化学修饰的氨基酸;正亮氨酸、 β -丙氨酸、鸟氨酸等不属于生物体内蛋白质的构成材料的氨基酸;以及本领域技术人员公知的具有氨基酸特性的化学合成的化合物等,这是可以理解的。作为非天然氨基酸的例子,除了以下详述的苏氨酸衍生物 A 以外,还可举出 α -甲基氨基酸(α -甲基丙氨酸等)、D-氨基酸、组氨酸之类的氨基酸(2-氨基-组氨酸、 β -羟基-组氨酸、高组氨酸、 α -氟甲基-组氨酸以及 α -甲基-组氨酸等)、侧链上具有多余的亚甲基的氨基酸(“高”氨基酸)以及侧链中的羧基官能团氨基酸被磺基取代的氨基酸(磺基丙氨酸等)。

[0154] 在本说明书中,“苏氨酸衍生物”是指由以下式 (3) 表示的化合物:

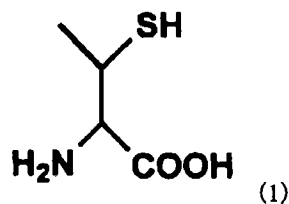
[0155]



[0156] 式 (3) 中, R 为 H 或者在连接反应的条件下容易被脱保护的硫羟基的保护基,优选

为 H 或者二硫基。特别地,在上述式 (3) 中,将 R 为 H 的以下式 (1) 的化合物称为苏氨酸衍生物 A。

[0157]



[0158] 式 (3) 的苏氨酸衍生物是苏氨酸的 -OH 基部位为 -SR 基的化合物,也包含具有任何立体构型的化合物。在本发明的制备方法中,由于认为当肽中的氨基酸残基的 -SH 基转变成 -OH 基时会引起立体反转,因此,特别是当想要获得天然存在的苏氨酸时,优选使用天然存在的苏氨酸的 -OH 基和具有立体反转的 -SR 基的苏氨酸衍生物。

[0159] 上述的苏氨酸衍生物也可以参照例如后述的实施例和合成例,按照以下的方法来获得。

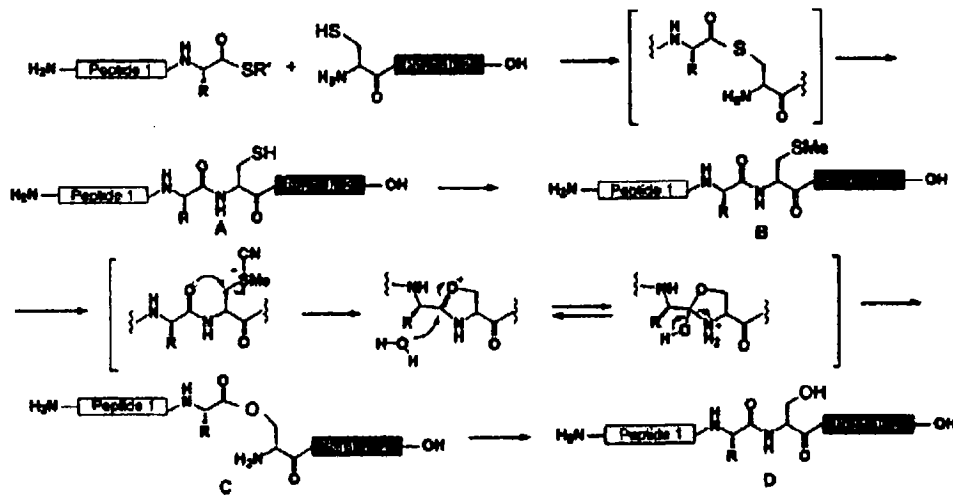
[0160] 首先,准备将氨基和羧基保护起来的苏氨酸。各自的保护基只要在以后的反应中可以获得目标的肽,就没有特别的限定,例如,可以使用将氨基用 Boc 基保护起来并将羧基用 TMSE (三甲基甲硅烷基乙基) 基保护起来的苏氨酸。其次,使用公知的方法,将 β 位的羟基进行甲磺酰基化。接着,使用例如 DBU 和硫代乙酸,将该甲磺酰基取代为硫代乙酰基 (参见 D. Crich et al, J. Am. Chem. Soc., 129, 10064 (2007))。

[0161] 采用公知的方法,将该硫代乙酰基转变成一种被二硫基、乙酰胺甲基、硝基苄基、三苯甲基等为本领域技术人员公知的保护基保护起来的硫羟基。例如,在形成被二硫基保护的硫羟基的情况下,可以参照后述的合成例 1。二硫基在随后的连接法的反应条件下很容易被脱保护。

[0162] 在优选的方案中,采用本发明的制备方法获得的肽 (或者糖肽) 全部由在生物体内作为肽 (或者糖肽) 的构成氨基酸而存在的氨基酸构成。另外,在本发明的一个方案中,采用本发明的制备方法获得的肽优选为不含半胱氨酸残基或者在构成氨基酸中的半胱氨酸含量少的肽。进而,在本发明的一个方案中,采用本发明的制备方法获得的肽,在从任意的丝氨酸残基或者苏氨酸残基至下一个丝氨酸残基或者苏氨酸残基或者 N 末端或者 C 末端的任意二者之间,具有 80 个以下、优选 50 个以下、更优选 30 个以下的氨基酸残基。例如,在本发明的一个方案中,采用本发明的制备方法获得的肽在 5 ~ 40 氨基酸残基中、优选 20 ~ 30 氨基酸残基中具有 1 个以上的丝氨酸残基或者苏氨酸残基。

[0163] 在本说明书中,“反应中间体”按照广泛的含义,是指在使肽中的 -SMe 基与氰化剂反应之后转变成 -OH 基而成的各化合物中的任一种。认为本发明的反应流程为以下的流程图 1 那样,以下的流程图 1 中,由 C 表示的酯体也是本发明中的反应中间体之 1。予以说明,在本说明书中,例如在以下的流程图 1 中记载为“肽 -OH”,只要没有特意指明,该 -OH 均表示肽的 C 末端羧基的 -OH。

[0164]



[0165] 流程图 1

[0166] 在本说明书中，“糖肽”只要是在上述的肽中至少加成 1 个糖链的化合物，就没有特殊限定，包括公知的糖肽以及新型的糖肽。一般被称为糖蛋白质的化合物也包含在本发明中的糖肽的定义中。

[0167] 在优选的方案中，采用本发明的制备方法获得的糖肽为具有 N 键型糖链或者 O 键型糖链的肽，可举出例如，红细胞生成素、白介素、干扰素-β、抗体、单核细胞向化性因子蛋白质-3 (MCP-3、monocyte chemotactic protein-3) 等的肽的一部分或者全部。

[0168] 在本发明的一个方案中，采用本发明的制备方法获得的糖肽在从没有加成了糖链的任意的丝氨酸残基或者苏氨酸残基至下一个丝氨酸残基或者苏氨酸残基或者 N 末端或者 C 末端的任意二者之间，具有 80 个以下、优选 50 个以下、更优选 30 个以下的氨基酸残基。例如，在本发明的一个方案中，采用本发明的制备方法获得的糖肽在 5 ~ 40 氨基酸残基中、优选 20 ~ 30 氨基酸残基中具有 1 个以上的丝氨酸残基或者苏氨酸残基。

[0169] 在糖肽中，糖链与肽中的氨基酸残基可以直接键合，也可以借助连接基来键合。糖链与氨基酸的键合部位没有特殊限制，优选氨基酸键合到糖链的还原末端。

[0170] 与糖链键合的氨基酸的种类没有特殊限定，可以与天然氨基酸、非天然氨基酸中的任一种键合。从糖肽具有与生物体内存在的糖肽（糖蛋白质）相同或者类似结构的观点考虑，糖链优选象 N 键型糖链那样键合到 Asn 上，或者象 O 键型糖链那样键合到 Ser 或者 Thr 上。特别地，在 N 键型糖链的情况下，采用本发明的制备方法获得的糖肽，是具有这样一种结构的糖肽，即，糖链键合到 Asn 上，除了脯氨酸以外的氨基酸 (X) 在该 Asn 的 C 末端侧上形成酰胺键（肽键），进而 Thr 或者 Ser 在该 X 的 C 末端侧形成酰胺键（肽键）的结构（-糖 Asn-X-Thr/Ser-）。

[0171] 在糖链与氨基酸借助连接基而键合的情况下，从与连接基容易键合的观点考虑，与糖链键合的氨基酸优选为：天冬氨酸或谷氨酸等在分子内具有 2 个以上羧基的氨基酸；赖氨酸、精氨酸、组氨酸、色氨酸等在分子内具有 2 个以上的氨基的氨基酸；丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸等在分子内具有羟基的氨基酸；半胱氨酸等在分子内具有巯基的氨基酸；或者天冬酰胺、谷氨酰胺等在分子内具有酰胺基的氨基酸。特别地，从反应性的观点考虑，优选天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺或者谷氨酰胺。

[0172] 在糖肽中，在糖链与氨基酸借助连接基而键合的情况下，作为连接基，可以广泛使用该领域中所使用的连接基，可举出例如：

[0173] $-\text{NH}-(\text{CO})-(\text{CH}_2)_a-\text{CH}_2-$

[0174] (式中, a 为整数, 只要不抑制作为目标的连接基功能就没有限定, 优选为 0 ~ 4 的整数)。

[0175] C_{1-10} 聚亚甲基;

[0176] $-\text{CH}_2-\text{R}^3-$

[0177] (式中, R^3 为从选自烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、碳环基、取代的碳环基、杂环基以及取代的杂环基中的基团脱离 1 个氢原子而生成的基团); 等。

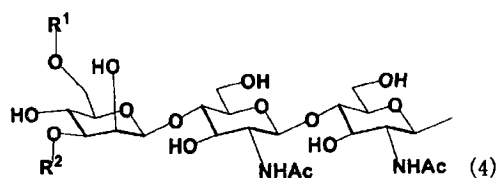
[0178] 在本说明书中, “糖链”除了 2 个以上的单位糖(单糖和 / 或其衍生物)连接而成的化合物以外, 也包含由 1 个单位糖(单糖和 / 或其衍生物)构成的化合物。作为这种糖链, 可举出例如, 生物体中含有的单糖类和多糖类(葡萄糖、半乳糖、甘露糖、岩藻糖、木糖、N-乙酰基葡萄糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、脱唾液酸(asialo acid)以及它们的复合物和衍生物), 除此之外, 还可举出分解的多糖、糖蛋白质、蛋白多糖、葡萄糖胺多糖、糖脂质等由复合生物体分子分解或者衍生的糖链等广范围的糖, 但限定于这些。在 2 个以上单位糖连接的情况下, 各个单位糖之间, 通过糖苷键脱水缩合而键合在一起。糖链可以是直链型, 也可以是支链型。

[0179] 另外, 在本说明书中, “糖链”也包含糖链的衍生物, 作为糖链的衍生物, 可举出例如, 构成糖链的糖为具有羧基的糖(例如, C-1 位被氧化而形成羧酸的醛糖糖酸(例如, D-葡萄糖被氧化而成的 D-葡萄糖酸)、末端的 C 原子形成羧酸的糖醛酸(D-葡萄糖被氧化的 D-葡萄糖醛酸))、具有氨基或者氨基衍生物(例如, 被乙酰基化的氨基)的糖(例如, N-乙酰基-D-葡萄糖胺、N-乙酰基-D-半乳糖胺等)、具有氨基和羧基二者的糖(例如, N-乙酰基神经氨酸(脱唾液酸)、N-乙酰基胞壁酸等)、脱氧化的糖(例如, 2-脱氧-D-核糖)、含有硫酸基的硫酸化糖、含有磷酸基的磷酸化糖等的糖链, 但限定于这些。

[0180] 本发明的糖链优选为在生物体内作为复合糖质(糖肽(或者糖蛋白质)、蛋白多糖、糖脂质等)而存在的糖链, 优选为那些属于在生物体内作为糖肽(或者糖蛋白质)而与肽(或者蛋白质)键合的糖链的 N-键型糖链、O-键型糖链等。在由 O-键型糖链键合而成的糖肽中, N-乙酰基半乳糖胺(GalNAc)、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、木糖、岩藻糖等通过 O-糖苷键键合到肽的 Ser 或者 Thr 上, 从而向其中进一步加成了糖链。作为 N-键型糖链, 可举出例如, 高甘露糖(高甘露糖)型、复合(complex)型、杂合(hybrid)型, 优选为复合型。

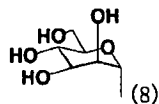
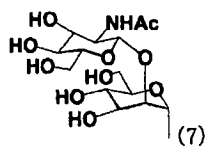
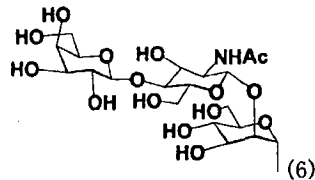
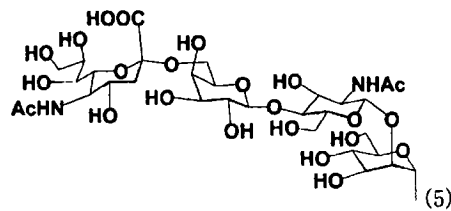
[0181] 本发明中, 作为优选的糖链, 为例如, 由下述式(4)表示的糖链。

[0182]



[0183] [式中, R^1 和 R^2 各自独立地为氢原子或者由式(5) ~ (8)表示的基团]

[0184]



[0185] 在考虑将本发明的糖肽的制备方法用于药品等的制造领域的情况下,从能够避免抗原性等问题的观点考虑,作为优选的糖链,可举出例如,在人体内,作为与蛋白质结合的糖蛋白质而存在的糖链(例如,FEBS LETTERS Vol. 50, No. 3, Feb. 1975 中记载的糖链)以及具有相同结构的糖链(构成糖的种类以及它们的结合样式相同的糖链)或者从它们的非还原末端失去1个或多个糖而形成的糖链。

[0186] 糖肽中的糖链的加成数,只要是1链以上,就没有特殊的限定,从提供与生物体内存在的糖肽类似结构的糖肽的观点考虑,更优选是与体内存在的糖肽具有同等程度的加成数。

[0187] 在本发明的一个优选方案中,本发明的糖肽中的糖链结构是均匀的。在本说明书中,所谓糖肽中的糖链结构是均匀的是指,在糖肽之间进行比较的情况下,肽中的糖链加成部位、构成糖链的各糖的种类、结合顺序、以及糖间的键合样式是相同的,或者是指,至少90%以上、优选95%以上、更优选99%以上的糖链结构是均匀的。糖链均匀的糖肽,其品质是一定的,特别是在药品的制造和分析等领域是优选的。

[0188] 在本发明的制备方法中作为原料使用的肽,可以采用例如,固相合成、液相合成、利用细胞的合成、分离提取天然存在的肽的方法等本领域技术人员公知的肽制备方法来制备。另外,在使用糖肽作为原料时,可以通过在上述公知的肽的制备方法中组合加入糖链加成工序来制备。关于糖链加成工序中使用的糖链的制备方法,可以参照例如,国际公开编号WO 03/008431、WO2004/058984、WO2004/058824、WO2004/070046、WO2007/011055等。

[0189] 作为具体例,以下示出采用固相合成法制备含有具有-SH基的氨基酸残基的肽或者糖肽的方法。在以下所示的方法中,也可以参照国际公开编号WO2004/005330。

[0190] 首先, (1) 使具有羟基的树脂(树脂)的羟基与由脂溶性保护基将氨基保护起来的氨基酸的羧基进行酯化反应。这时, 由于用脂溶性保护基将氨基酸的氨基保护起来, 因此, 可以防止氨基酸之间的自缩合, 从而使树脂的羟基与氨基酸的羧基进行反应, 引起酯化。

[0191] 其次, (2) 使上述获得的酯的脂溶性保护基脱离, 形成游离氨基;

[0192] (3) 使该游离氨基与由脂溶性保护基将氨基保护起来的所希望的氨基酸的羧基进行酰胺化反应;

[0193] (4) 使上述脂溶性保护基脱离, 形成游离氨基;

[0194] (5) 根据需要重复进行上述(3)和(4)的工序, 获得由希望数目的希望氨基酸连接而成的、在末端上键合树脂并在另一端具有游离氨基的肽。

[0195] 在上述(1)~(5)的工序中, 通过使用具有-SH基(-SH基也可以被保护)的氨基酸作为氨基酸(例如, 半胱氨酸或上述的式(3)的苏氨酸衍生物), 可以获得含有具有-SH基的氨基酸残基的肽。予以说明, 当在上述(1)~(5)的工序中使用时, 具有-SH基的氨基酸的-SH基可以被本领域技术人员公知的保护基, 例如, 二硫基、乙酰胺甲基、硝基苄基、三苯甲基等保护基保护起来, 然后, 根据需要进行脱保护。另外, 在上述(1)~(5)的工序中, 通过使用加成了糖链的氨基酸(例如, 在天冬酰胺中加成了糖链的糖链天冬酰胺、在丝氨酸或者苏氨酸中加成了糖链的糖链丝氨酸或者糖链苏氨酸等)作为氨基酸, 也可以获得在所希望的位置具有1个或者2个以上糖链的N键型和/或O键型糖肽。如上所述, 这种N键型或者O键型的糖肽可以在所希望的位置含有具有-SH基的氨基酸残基。

[0196] (6) 另外, 通过用酸将树脂(树脂)与(1)的氨基酸之间的酯键切断, 可以制备所希望的肽(或者糖肽)。

[0197] 作为固相树脂(树脂), 通常, 只要是在固相合成中使用的树脂(树脂)即可, 可以使用例如, Amino-PEGA树脂(Merck公司制)、王氏树脂(Wang resin, Merck公司制)、HMPA-PEGA树脂(Merck公司制)、Trt Chloride树脂(Merck公司制)等。

[0198] 另外, 在Amino-PEGA树脂(树脂)与氨基酸之间也可以存在连接基, 作为这种连接基, 可举出例如, 4-羟基甲基苯氧基乙酸(HMPA)、4-(4-羟甲基-3-甲氧基苯氧基)-丁基乙酸(HMPB)等。

[0199] 作为脂溶性保护基, 可举出例如, 9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)基、叔丁氧基羰基(Boc)基、烯丙氧基羰基(Alloc)基等含羰基的基团; 乙酰基(Ac)基等酰基; 烯丙基、苄基等保护基, 对它们没有特殊限定。

[0200] 为了引入脂溶性保护基, 在引入例如Fmoc基的情况下, 可以通过加入9-苄基甲基-N-琥珀酰重胺基(succinimidyl)碳酸酯和碳酸氢钠进行反应来引入。反应可以在0~50°C、优选在室温下进行约1~5小时左右。

[0201] 作为被脂溶性保护基保护的氨基酸, 可以使用按照上述的方法将上述的氨基酸保护起来的氨基酸。另外, 也可以使用市售品。可举出例如, Fmoc-Ser、Fmoc-Asn、Fmoc-Val、Fmoc-Leu、Fmoc-Ile、Fmoc-Ala、Fmoc-Tyr、Fmoc-Gly、Fmoc-Lys、Fmoc-Arg、Fmoc-His、Fmoc-Asp、Fmoc-Glu、Fmoc-Gln、Fmoc-Thr、Fmoc-Cys、Fmoc-Met、Fmoc-Phe、Fmoc-Trp、Fmoc-Pro。

[0202] 作为酯化催化剂, 可以使用例如1-均三甲苯磺酰基-3-硝基-1,2,4-三唑(MSNT)、二环己基碳化二亚胺(DCC)、1,3-二异丙基碳化二亚胺(DIPCDI)等公知的脱水缩

合剂。氨基酸与脱水缩合剂的使用比例,相对于前者 1 重量份,后者通常为 1 ~ 10 重量份,优选为 2 ~ 5 重量份。

[0203] 酯化反应优选通过例如,向固相柱子中加入树脂,将该树脂用溶剂洗涤,然后加入氨基酸的溶液来进行。作为洗涤用溶剂,可举出例如二甲基甲酰胺 (DMF)、2- 丙醇、二氯甲烷等。作为用于溶解氨基酸的溶剂,可举出例如二甲亚砜 (DMSO)、DMF、二氯甲烷等。酯化反应可以在 0 ~ 50℃、优选在室温下进行约 10 分钟 ~ 30 小时左右、优选 15 分钟 ~ 24 小时左右。

[0204] 优选将此时固相上的未反应官能团用乙酸酐等进行乙酰基化,由此将其封端。

[0205] 脂溶性保护基的脱离,可以通过例如用碱处理来进行。作为碱,可举出例如哌啶、吗啉等。此时,优选在溶剂的存在下进行。作为溶剂,可举出例如 DMSO、DMF、甲醇等。

[0206] 游离氨基与由脂溶性保护基将氨基氮保护起来的任意的氨基酸的羧基进行的酰胺化反应,优选在活性化剂和溶剂的存在下进行。

[0207] 作为活性化剂,可举出例如,二环己基碳化二亚胺 (DCC)、1- 乙基 -3-(3- 二甲氨基丙基) 碳化二亚胺· 盐酸盐 (WSC/HCl)、二苯基磷酰基叠氮化物 (DPPA)、羰基二咪唑 (CDI)、二乙基氰基膦酸酯 (DEPC)、1,3- 二异丙基碳化二亚胺 (DIPCI)、苯并三唑 -1- 基氧基 - 三吡咯烷基六氟磷酸磷 (PyBOP)、3- 二乙氧基磷酰氧基 -1,2,3- 苯并三唑 -4(3H) - 酮 (DEPBT)、1- 羟基苯并三唑 (HOBt)、羟基琥珀酰亚胺 (HOSu)、二甲基氨基吡啶 (DMAP)、1- 羟基 -7- 氮杂苯并三唑 (HOAt)、3- 羟基 -4- 氧代 -3,4- 二氢 -5- 氮杂苯并 -1,2,3- 三唑 (HODhbt)、羟基邻苯二甲酰亚胺 (HOPht)、五氟苯酚 (Pfp-OH)、2-(1H- 苯并三唑 -1- 基) -1,1,3,3- 四甲基脲六氟磷酸酯 (HBTU)、0-(7- 氮杂苯并三唑 -1- 基) -1,1,3,3- 四甲基脲六氟磷酸酯 (HATU)、0- 苯并三唑 -1- 基 -1,1,3,3- 四甲基脲四氟硼酸酯 (TBTU) 等。

[0208] 活性化剂的用量,相对于由脂溶性的保护基将氨基氮保护起来的任意的氨基酸,为 1 ~ 20 当量,优选为 1 ~ 10 当量,更优选为 1 ~ 5 当量。

[0209] 虽然仅用上述活性化剂也可以进行反应,但优选并用胺作为辅助剂。作为胺,可以使用例如,二异丙基乙基胺 (DIPEA)、N- 乙基吗啉 (NEM)、N- 甲基吗啉 (NMM)、N- 甲基咪唑 (NMI) 等。辅助剂的用量,相对于由脂溶性的保护基将氨基氮保护起来的任意的氨基酸,为 1 ~ 20 当量,优选为 1 ~ 10 当量,更优选为 1 ~ 5 当量。

[0210] 作为溶剂,可举出例如 DMSO、DMF、二氯甲烷等。反应可以在 0 ~ 50℃、优选在室温下进行约 10 ~ 30 小时左右、优选 15 分钟 ~ 24 小时左右。此时优选使用乙酸酐等将固相上的未反应氨基进行乙酰基化以将其封端。脂溶性保护基的脱离可以与上述同样地进行。

[0211] 为了将肽链与树脂 (resin) 切断,优选用酸进行处理。作为酸,可举出例如三氟乙酸 (TFA)、氟化氢 (HF) 等。此时,由于可能从用于氨基酸的脂溶性保护基和树脂 (树脂) 上的连接基生成反应性高的阳离子种类,优选添加用于捕获该类阳离子的亲核性试剂。作为亲核性试剂,可举出三异丙基硅烷 (TIS)、苯酚、茴香硫醚、乙二硫醇 (EDT) 等。

[0212] 这样就可以获得含有具有 -SH 基的氨基酸残基的肽 (或者糖肽)。

[0213] 另外,通过采用利用以反式谷氨酰胺酶为代表的酶的逆反应的方法,向上述那样获得的含有具有 -SH 基的氨基酸残基的肽或者糖肽加成了糖链,也可以获得含有具有 -SH 基的氨基酸的糖肽。

[0214] 进而,也可以在上述的方法中组合利用转移酶的糖链伸长反应。

[0215] 在上述那样获得的、肽或者糖肽中,可以采用连接法将在N末端上含有具有-SH基的氨基酸残基的肽(或者糖肽)与在C末端上具有 α -羧基硫代酯部分的肽(或者糖肽)连接起来。

[0216] 予以说明,在本说明书中,“连接法”不仅是指专利文献1记载的自然化学连接法(Native Chemical Ligation、NCL法),而且也包含如后述实施例所记载那样,对于包含非天然氨基酸、氨基酸衍生物(例如,式(1)的苏氨酸衍生物A、保护蛋氨酸、糖链加成氨基酸等)的肽应用上述自然化学连接法的情况。采用连接法可以制备在连接部位具有天然酰胺键(肽键)的肽。

[0217] 采用连接法的连接,也可以在肽-肽间、肽-糖肽间、糖肽-糖肽间之中的任何二者之间进行。

[0218] 连接法中使用的、在C末端上具有 α -羧基硫代酯部分的肽(或者糖肽),如专利文献1所记载的那样,可以采用本领域技术人员公知的方法来制备。

[0219] 例如,如后述实施例所记载的那样,采用固相合成法,获得氨基酸侧链和N末端的氨基被保护起来的保护肽(或者糖肽),使用PyBOP(苯并三唑-1-基-氧基-三-吡咯烷基-六氟磷酸磷)/DIPEA作为缩合剂,使该C末端侧的羧基在液相中与苄基硫醇缩合,然后,通过使用95%TFA溶液将氨基酸的链脱保护,由此可以获得在C末端上具有 α -羧基硫代酯部分的肽(或者糖肽)。

[0220] 连接法可以采用专利文献1所记载的本领域技术人员公知的方法,并参照后述实施例的记载来实施。例如,参照上述的记载,准备在C末端上具有由 $-C(=O)-SR$ 表示的 α -羧基硫代酯部分的第1肽和具有在N末端上具有-SH基的氨基酸残基的第2肽。予以说明,在第1肽中,R只要不妨碍硫醇交换反应,并且在向羰基碳的亲核取代反应中成为脱离基的基团,就没有特殊限定,优选从苄基硫醇等苄基型;苯硫酚、4-(羧基甲基)-苯硫酚等芳基型;2-巯基乙磺酸盐、3-巯基丙酰胺等烷基型等中选择。另外,第2肽的N末端的-SH基也可以根据希望被保护基保护起来,该保护基在直到以下的连接反应之前的希望时间点进行脱保护,在N末端上具有-SH基的第2肽与第1肽进行反应。例如二巯基等,只要是在引起连接的条件自然脱保护的基,被保护基保护的肽也可以直接用于以下的连接反应。

[0221] 根据需要,在4-巯基苯基乙酸、苄基硫醇、苯硫酚等催化剂硫醇的存在下,将这2个肽在100mM磷酸缓冲溶液等溶液中混合。优选地,相对于1当量的第1肽,按照0.5~2当量的比例使用第2肽,以及按照5当量左右的比例使用催化剂硫醇,进行反应。反应希望在pH 6.5~7.5左右、在20~40℃左右的条件下进行约1~30小时左右。反应的进行可以采用将HPLC、MS等组合的公知方法来确认。

[0222] 通过向其中加入、二硫代苏糖醇(DTT)、三2-羧乙基膦盐酸盐(TCEP)之类的还原剂来抑制副反应,根据希望进行精制,由此可以将第1肽与第2肽连接起来。

[0223] 予以说明,当在C末端上具有羧基硫代酯部分($-C(=O)-SR$)的肽中存在R基不同的肽时,可以按照连接反应的顺序进行操作(参照Protein Science(2007),16:2056-2064等),有时可以考虑进行多次的连接操作。例如,当存在芳基、苄基和烷基作为R时,一般地,按照该顺序进行连接反应。

[0224] 在本发明中,具体地示出肽(或者糖肽)的制备方法,其特征在于,将含有具有-SH

基的氨基酸残基的肽（或者糖肽）的-SH基转变成-OH基。作为原料，使用采用上述方法获得的肽或者糖肽。在本发明的一个方案中，优选使用采用连接法获得的肽或者糖肽。然后，进行以下的工序(a)~(c)：

[0225] (a) 通过使肽中的-SH基与甲基化剂反应，将上述-SH基转变成-SMe基的工序；

[0226] (b) 通过使工序(a)中获得的-SMe基与氰化剂反应，生成反应中间体的工序；以及

[0227] (c) 在与工序(b)相比为碱性较强的条件下，将工序(b)中获得的反应中间体转变成含有具有-OH基的氨基酸残基的肽的工序。

[0228] 以下示出使用肽作为原料的情况。

[0229] 工序(a)

[0230] 在工序(a)的甲基化中使用的甲基化剂只要是能够将肽中的-SH基转变成-SMe基，就没有特殊的限定，可举出例如，碘甲烷、甲基-4-硝基苯磺酸酯等。

[0231] 甲基化剂的用量，相对于原料肽的-SH基1残基，可以为1~1000当量，优选为10~100当量，更优选为15~30当量。甲基化反应希望在0~50℃、优选在20~30℃下进行约10分钟~30小时左右、更优选15分钟~1小时左右。

[0232] 作为进行甲基化反应时的溶剂，优选缓冲溶液，优选可以使用其pH值7~9、特别是8~9的缓冲溶液。例如，可以使用0.25M三盐酸缓冲溶液（含有6M盐酸胍液、3.3mM EDTA, pH 8.6）等。

[0233] 予以说明，在肽中，当作为氨基酸含有半胱氨酸残基，并且不希望将其转变成丝氨酸残基，而是使其在按照本发明的制备方法获得的肽中作为半胱氨酸残基存在时，可以采用公知的方法将其以一种把半胱氨酸保护起来的保护半胱氨酸的形态引入肽中，这样可以防止半胱氨酸的-SH基在工序(a)中被甲基化。作为半胱氨酸的保护基，考虑到本发明的制备方法的各工序中的硫醇交换反应、酸处理、碱处理等，可以使用适当的保护基，例如，可以使用乙酰胺甲基(Acm)、苄基、乙酰胺基、三苯甲基等，优选使用Acm基。在工序(a)~(c)之后，根据希望，采用公知的方法将保护半胱氨酸残基脱保护。例如，在将Acm基、硝基苄基、三苯甲基等作为保护基引入保护半胱氨酸的情况下，通过追加利用乙酸银乙酸水溶液的脱保护法、利用光的脱保护法、利用酸处理的脱保护法等的工序，将其转变成半胱氨酸残基。这样，可以使半胱氨酸残基存在于采用本发明的制备方法获得的肽中。

[0234] 予以说明，根据本发明的一个方案，也可以由具有-SMe基的肽通过将-SMe基转变成-OH基来获得具有-OH基的肽，这样就可以省略上述工序(a)。

[0235] 工序(b)

[0236] 作为在工序(b)中使用的氰化剂，例如，从稳定性等观点考虑，可以使用溴化氰、氰酸苯酯等，优选可以使用容易获得的溴化氰。

[0237] 氰化剂的用量，相对于-SMe基1，可以为1~1000当量，优选为10~100当量，更优选为15~30当量。与氰化剂的反应希望在0~50℃下、优选在30~40℃下进行约30分钟~100小时左右、优选12小时~50小时左右。

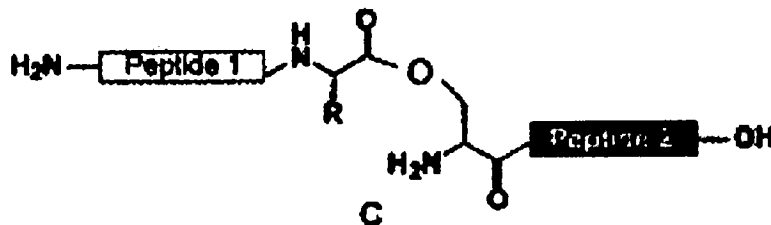
[0238] 与氰化剂的反应，在酸性条件下进行，特别优选在pH值2~3的条件下进行。可以通过使用酸性水溶性物质、具体为甲酸、三氟乙酸、甲磺酸等，在酸性条件下进行反应。此时，作为使用的酸性水溶性物质，为了防止硫原子氧化，特别优选使用经过脱气的物质。另

外,从氰化剂的稳定性的观点考虑,反应优选在遮光下进行。

[0239] 作为溶剂,优选使用上述的 pH 值为 2~3 的水溶性溶剂,例如,80%甲酸溶液、70%甲酸溶液、含有 2%三氟乙酸/39%乙腈的水溶液等。

[0240] 在工序 (b) 中获得的反应中间体的一例为由以下结构表示的酯体。

[0241]



[0242] 予以说明,在肽中,当作为氨基酸含有蛋氨酸残基时,优选将蛋氨酸残基的 -SMe 基与工序 (a) 中获得的 -SMe 基区分开。在本说明书中,保护蛋氨酸只要是在工序 (b) 中不与氰化剂反应的化合物,就没有特殊限定,可举出例如,亚砷型蛋氨酸 (Met(O) : -CH₂-CH₂-S(=O)-CH₃)。如后述的实施例 5 所记载的那样,通过采用公知的方法将保护蛋氨酸 (例如 Met(O)) 引入到肽中,可将蛋氨酸残基与工序 (a) 中获得的 -SMe 基区分开,使得蛋氨酸残基相对于与工序 (b) 的氰化剂的反应,成为惰性的。然后,采用适宜的公知方法,将保护蛋氨酸残基转变成蛋氨酸残基 (后述的工序 (e))。这样,具有蛋氨酸残基的肽也可以采用本发明的制备方法来获得。

[0243] 另外,根据需要,可以除去作为在与工序 (b) 的氰化剂的反应时所形成的副生成物的半胱氨酸的氧化体。这种除去工序可以通过例如,使含有工序 (b) 中获得的反应中间体的混合物在碘化铵和二甲硫醚的存在下、在室温下反应 30 分钟左右,然后进行分液洗涤。除去工序只要是在工序 (b) 之后,在任何时点进行均可,优选可以在工序 (c) 之后进行。

[0244] 工序 (c)

[0245] 在工序 (c) 中,在与工序 (b) 相比为碱性较强的条件下,通过由工序 (b) 中获得的反应中间体的 O- 向 N- 的分子内酰基转移,获得含有具有 -OH 基的氨基酸残基的肽。

[0246] 工序 (c) 中的碱性条件只要是与工序 (b) 相比为碱性较强的条件即可,可以是酸性或者中性,更具体地说,只要是与工序 (b) 中获得的反应中间体的酯键相邻的 C 原子上的 -NH₂ 基不被质子化的条件即可。从高效地进行由反应中间体向具有 -OH 基的肽的转变的观点考虑,可以使用弱碱性条件或者强碱性条件。

[0247] 当工序 (c) 中的碱性条件为弱碱性时,其 pH 值为 pH7~9,优选为 pH7~8。例如,通过将胍、磷酸二钠、磷酸三钠、碳酸氢钠等属于本领域技术人员公知的 pH 调节剂的碱性化合物添加到溶液中,可以形成弱碱性条件。此时,碱性化合物的用量,相对于原料肽,可以为 1~1000 当量,优选为 10~100 当量,更优选为 15~30 当量。

[0248] 当工序 (c) 中的碱性条件为弱碱性时,反应希望在 0~50°C、优选在 20~40°C 下进行约 10 分钟~30 小时左右、优选 15 分钟~30 小时左右,希望在 pH7~9、优选 pH7~8 的缓冲溶液中进行。例如,可以在 0.2M 磷酸缓冲液 (含有 6M 盐酸胍液、pH7.2) 中进行工序 (c)。

[0249] 当工序 (c) 中的碱性条件为弱碱性时,可以通过将 pH 值进一步降低来结束工序

(c),但是在原有的 pH 值保持不变的条件下,也可利用 HPLC 等使工序转变为精制工序。

[0250] 当工序 (c) 中的碱性条件为强碱性时,其 pH 值为 pH9 ~ 13,优选为 pH10 ~ 11。强碱性条件优选为可以通过水解将羟基过量反应的化合物除去的条件,将碱性水溶性物质,例如,胍含水物、50mM 氢氧化钠水溶液等添加到溶液中,形成强碱性条件。此时,碱性水溶性物质的用量,相对于原料肽,可以为 0.5 ~ 100 当量,优选为 0.1 ~ 10 当量,更优选为 0.5 ~ 1 当量。例如,可以在 pH10 ~ 11 的 5% 胍水溶液中进行工序 (c)。

[0251] 当工序 (c) 中的碱性条件为强碱性时,通过由工序 (b) 中获得的反应中间体的 O- 向 N- 的分子内酰基转移,获得含有具有 -OH 基的氨基酸残基的肽,同时,对于在工序 (a) ~ (b) 中过量反应的 -OH 基,会引起脱氰基化(通过水解将过量反应的氰化剂除去的脱氰基化反应)、脱甲酰基化(过量反应的甲酸的脱甲酰基化反应)等。

[0252] 当工序 (c) 中的碱性条件为强碱性时,工序 (c) 希望在 0 ~ 50°C、优选 20 ~ 30°C 下进行约 5 分钟 ~ 3 小时左右、优选 5 分钟 ~ 1 小时、更优选 5 分钟 ~ 10 分钟左右。当工序 (c) 中的碱性条件为强碱性时,如果长时间进行工序 (c),则会引起外消旋化、肽键的切断等副反应。

[0253] 当工序 (c) 中的碱性条件为强碱性时,工序 (c) 可以通过将 pH 值降低至 pH4 ~ 9、优选 5 ~ 9、例如 pH7 附近和 pH8 ~ 9 等来使其结束。

[0254] 予以说明,在工序 (c) 中,获得的具有 -OH 基的氨基酸残基的 β 位的立体预想由工序 (b) 中获得的反应中间体进行反转。

[0255] 工序 (d)

[0256] 在以含有保护蛋氨酸残基的肽作为原料的情况下,根据希望,进一步在工序 (b) 或者 (c) 之后进行以下的工序 (d) :

[0257] (d) 将保护蛋氨酸脱保护的工序。

[0258] 脱保护可以根据所使用的保护蛋氨酸,采用本领域技术人员公知的方法来进行。例如,当用亚砷型 (Met(O)) 引入蛋氨酸作为保护蛋氨酸时,通过追加使用碘化铵 / 二甲硫醚 / TFA 混合液等的还原工序,将保护蛋氨酸转变成蛋氨酸。从避免副反应的观点考虑,优选在工序 (c) 之后进行工序 (d)。

[0259] 这样,对于获得具有蛋氨酸残基的肽的情况,也可以使用本发明的制备方法。

[0260] 生成物的精制优选采用在数种高效液相色谱条件下获得 97% 以上的精制物的方法。具体地可举出,结晶化、交流分配法、分配色谱法、凝胶过滤法、离子交换色谱法、高效液相色谱法等。优选可以使用高效液相色谱法等。

[0261] 除了上述的工序以外,可以进一步进行糖链的加成工序。糖链的加成也可以对肽和糖肽中的任一个来进行,只要获得目标的糖肽,在任何时间点进行都可以,优选在工序 (c) 之后进行。

[0262] 糖链的加成可以利用以反式谷氨酰胺酶为代表的、酶的逆反应的方法、和参照以下那些国际公开编号 W02005/010053 的记载的方法来进行。

[0263] 首先,通过使卤代乙酰胺化复合型糖链衍生物与上述获得的肽(特别是包含天冬氨酸和谷氨酸等在分子内具有 2 个以上羧基的氨基酸;赖氨酸、精氨酸、组氨酸、色氨酸等在分子内具有 2 个以上氨基的氨基酸;丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸等在分子内具有羟基的氨基酸;半胱氨酸等在分子内具有巯基的氨基酸;天冬酰胺、谷氨酰胺等在分子内具有酰胺

基的氨基酸等的肽。特别是包含天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺或者谷氨酰胺的肽)反应来制备。上述反应通常可以在 0 ~ 80°C、优选 10 ~ 60°C、更优选 15 ~ 35°C 下进行。反应时间优选通常为 30 分钟 ~ 5 小时左右。反应结束后也可以采用适宜的、公知方法(例如,高效液相色谱法(HPLC))进行精制。

[0264] 卤代乙酰胺化复合型糖链衍生物为例如,通过使用 $\text{-NH-(CO)-(CH}_2\text{)}_a\text{-CH}_2\text{X}$ (式中, X 为卤原子, a 为整数, 只要不抑制目标的连接基功能就没有限定, 优选为 0 ~ 4 的整数)。将在复合型天冬酰胺键型糖链的 1 位碳上键合的羟基取代而获得的化合物。

[0265] 具体地, 使卤代乙酰胺化复合型糖链衍生物与上述获得的肽在磷酸缓冲液中、在室温下进行反应。反应结束后, 用 HPLC 精制, 可以获得加成了糖链的糖肽。

[0266] 除了上述的方法以外, 也可以组合利用转移酶的糖链伸长反应。这样获得的糖肽也包含在本发明的范围内。

[0267] 【实施例】

[0268] 以下基于实施例, 具体地说明本发明, 但本发明不受它们的任何限定。

[0269] 实施例 1 Ac-Ala-Ser-Gly-Leu 的制备

[0270] 向固相合成用柱子中加入王氏树脂(Merck 公司制)(100 μmol), 用二氯甲烷(DCM)、DMF 充分洗涤后, 用 DCM 使其充分溶胀。使 Fmoc-Leu(0.50mmol)、MSNT(0.50mmol) 和 N-甲基咪唑(0.375mmol) 溶解于 DCM(2mL) 中, 将其加入到固相合成用柱子中, 在 25°C 下搅拌 1 小时。予以说明, DCM 也可以为 1.5mL。搅拌后, 将树脂用 DCM 和 DMF 充分洗涤, 将 Fmoc 基用 20% 哌啶 / DMF 溶液(2mL) 处理 15 分钟, 进行脱保护。予以说明, 本脱保护处理也可以进行 10 分钟。用 DMF 洗涤后, 其后的肽链的伸长采用以下所示的方法, 依次使氨基酸缩合。

[0271] 把用 Fmoc 基将氨基保护起来的氨基酸和 HOBt(67.6mg、0.50mmol)、DIPCI(77.0 μL 、63.1mg、0.50mmol) 溶解于 DMF(1mL), 活化 15 分钟后, 将其加入到固相合成用柱子中。予以说明, DMF 也可以为 2mL。在 25°C 下搅拌 1 小时后, 将 Fmoc 基用 20% 哌啶 / DMF 溶液(2mL) 处理 20 分钟, 进行脱保护。予以说明, 本脱保护处理也可以进行 10 分钟。重复该操作, 依次使氨基酸缩合。作为被 Fmoc 基保护起来的氨基酸, 使用 Fmoc-Gly(148.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Cys(Trt)(292.9mg、0.50mmol)、Fmoc-Ala(155.7mg、0.50mmol), 获得固相树脂中具有 Fmoc-Ala-Cys(Trt)-Gly-Leu 的保护基的 4 残基肽(序列编号 1)。然后, 在树脂上, 将 Fmoc 基用 20% 哌啶 / DMF 溶液(2mL) 处理 20 分钟, 进行脱保护, 使用 20% 乙酸酐 / DMF 溶液(2mL), 对游离氨基进行乙酰基保护。予以说明, 20% 乙酸酐 / DMF 溶液也可以为 1.7mL。使用 DMF、DCM 洗涤后, 将预先准备的试剂(TFA/水/苯酚/茴香硫醚/EDT(1, 2-乙二硫酚)/TIPS = 81.5/5/5/5/2.5/1) 加入到足以充分浸没树脂的程度, 在 25°C 下搅拌 2 小时。过滤除去树脂, 将反应溶液减压浓缩。将获得的残留物用 HPLC(Vydac 柱 C8 250 \times 10mm; 展开溶剂 A: 0.1% TFA 水溶液、B: 0.08% TFA、乙腈: 水 = 90 : 10; 梯度 A : B = 85 : 15 \rightarrow 50 : 50、60 分钟; 流速 3.0ml/min) 精制, 获得具有 Ac-Ala-Cys-Gly-Leu 的保护基的 4 残基肽(序列编号 2)。

[0272] 将获得的 4 残基的肽(序列编号 2) 30mg(73 μmol) 加入到茄型烧瓶中, 使其溶解于 0.25M 三盐酸缓冲溶液 73mL(pH8.6、含有 6M 盐酸胍液、3.3mM EDTA) 和乙腈 24mL 中, 然后, 在 25°C 下加入甲基-4-硝基苯磺酸酯(316mg)。30 分钟后, 加入 10% TFA 溶液(7.3mL),

调节至 pH4 后,加入乙醚,进行萃取操作。浓缩后,将获得的残留物用 ODS 柱子进行精制,获得具有 Ac-Ala-Cys(Me)-Gly-Leu 的半胱氨酸残基的硫原子被甲基化的保护基的 4 残基肽(序列编号 3)25mg。

[0273] ESI-MS:Calcd for $C_{17}H_{30}N_4O_6S$: $[M+1H]^{1+}$ 419.2、found、419.1

[0274] 将获得的半胱氨酸残基的硫原子被甲基化的 4 残基肽(序列编号 3)6.5mg(15 μ mol) 加入到离心管(Eppendorf tube, microcentrifuge tube, microfuge tube)中,使其溶解于 80%甲酸溶液(6.5mL)中,然后,在 25 $^{\circ}$ C 下加入溴化氰 159.0mg(1.5mmol)。将反应容器遮光,然后,在 37 $^{\circ}$ C 下进行反应,28.5 小时后,将反应溶液冷冻以使反应停止。将该反应产物冻干后,将获得的残留物用 HPLC(Vydac 柱 C4 250 \times 4.6mm;展开溶剂 A:0.1% TFA 水溶液、B:0.08% TFA、乙腈:水=90:10;梯度 A:B=100:0 \rightarrow 60:40、30 分钟;流速 1.0ml/min)进行精制,获得作为反应中间体的酯体 3.8mg。

[0275] ESI-MS:Calcd for $C_{16}H_{28}N_4O_7$: $[M+1H]^{1+}$ 389.4、found、389.2

[0276] 将同样获得的反应中间体 5mg 加入到离心管中,用磷酸缓冲溶液(pH7.2、含有 6M 盐酸胍)0.6mL 使其溶解后,在 37 $^{\circ}$ C 下使其反应。1 小时后,用 HPLC 确认反应结束,然后用 HPLC(Vydac 柱 C4 250 \times 4.6mm;展开溶剂 A:0.1% TFA 水溶液、B:0.08% TFA、乙腈:水=90:10;梯度 A:B=100:0 \rightarrow 60:40、30 分钟;流速 1.0ml/min)进行精制,获得具有目的保护基的 4 残基肽 Ac-Ala-Ser-Gly-Leu(序列编号 4)3.5mg。予以说明,反应结束时间也可以定在 30 分钟后。

[0277] ESI-MS:Calcd for $C_{16}H_{28}N_4O_7$: $[M+1H]^{1+}$ 389.4、found、389.1

[0278] 实施例 2 Val-Asp-Lys-Ala-Val-Ser-Gly-Leu 的制备

[0279] 向固相合成用柱子中加入王氏树脂(Merck 公司制)(100 μ mol),用二氯甲烷(DCM)、DMF 充分洗涤后,用 DCM 使其充分溶胀。使 Fmoc-Leu(0.50mmol)、MSNT(0.50mmol)和 N-甲基咪唑(0.375mmol)溶解于 DCM(2mL)中,将其加入到固相合成用柱子中,在 25 $^{\circ}$ C 下搅拌 1 小时。予以说明,DCM 也可以为 1.5mL。搅拌后,将树脂用 DCM 和 DMF 充分洗涤,将 Fmoc 基用 20%哌啶/DMF 溶液(2mL)处理 15 分钟,进行脱保护。予以说明,本脱保护处理也可以进行 10 分钟。用 DMF 洗涤后,其后的肽链的伸长采用以下所示的方法,依次使氨基酸缩合。

[0280] 把用 Fmoc 基将氨基保护起来的氨基酸和 HOBt(67.6mg、0.50mmol)、DIPCI(77.0 μ L、63.1mg、0.50mmol)溶解于 DMF(1mL)中,活化 15 分钟后,将其加入到固相合成用柱子中。予以说明,DMF 也可以为 2mL。在 25 $^{\circ}$ C 下搅拌 1 小时后,将 Fmoc 基用 20%哌啶/DMF 溶液(2mL)处理 20 分钟,进行脱保护。予以说明,本脱保护处理也可以进行 10 分钟。重复该操作,依次使氨基酸缩合。作为被 Fmoc 基保护起来的氨基酸,使用 Fmoc-Gly(148.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Cys(Trt)(292.9mg、0.50mmol)、Fmoc-Val(169.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Ala(155.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Lys(Boc)(234.3mg、0.50mmol)、Fmoc-Asp(OtBu)(205.8mg、0.50mmol)、Fmoc-Val(169.7mg、0.50mmol),获得固相树脂中具有 Fmoc-Val-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Ala-Val-Cys(Trt)-Gly-Leu 的保护基的 8 残基肽(序列编号 5)。然后,在树脂上,将 Fmoc 基用 20%哌啶/DMF 溶液(2mL)处理 20 分钟,进行脱保护,使用 DMF、DCM 洗涤后,将预先准备的试剂 K(TFA/水/苯酚/茴香硫醚/EDT=82.5/5/5/5/2.5)加入到

足以充分浸没树脂的程度,在 25℃下搅拌 2 小时。予以说明,也可以使用 TFA/水/苯酚/茴香硫醚/EDT/TIPS = 81.5/5/5/5/2.5/1.0 代替试剂 K。过滤除去树脂,将反应溶液减压浓缩。将获得的残留物用 HPLC(Vydac 柱 C18 250×10mm;展开溶剂 A:0.1% TFA 水溶液、B:0.08% TFA、乙腈:水 = 90:10;梯度 A:B = 85:15→50:50、15 分钟;流速 2.5ml/min) 精制,获得 8 残基的肽、Val-Asp-Lys-Ala-Val-Cys-Gly-Leu(序列编号 6)。

[0281] 将获得的 8 残基的肽(序列编号 6)32mg(40 μmol) 加入到茄型烧瓶中,使其溶解于 0.25M 三盐酸缓冲溶液 40mL(pH8.6、含有 6M 盐酸胍液、3.3mM EDTA) 和乙腈 13mL 中,然后在 25℃下加入甲基-4-硝基苯磺酸酯(261mg)。1 小时后,加入 10% TFA 溶液(3.8mL),调节至 pH4 后,加入乙醚,进行萃取操作。浓缩后,将获得的残留物用 ODS 柱子进行精制,获得 Val-Asp-Lys-Ala-Val-Cys(Me)-Gly-Leu 的半胱氨酸残基的硫原子被甲基化的 8 残基肽(序列编号 7)30mg。

[0282] ESI-MS:Calcd for C₃₅H₆₄N₉O₁₁S:[M+1H]¹⁺ 819.0、found、818.8

[0283] 将获得的半胱氨酸残基的硫原子被甲基化的 8 残基肽(序列编号 7)29mg(36 μmol) 加入到茄型烧瓶中,使其溶解于 80% 甲酸溶液 15mL 中,然后在 25℃下加入溴化氰 381mg(3.6mmol)。将反应容器遮光,然后在 25℃下进行反应,32 小时后,将反应溶液冷冻以使反应停止。将该反应产物冻干后,将获得的残留物用 HPLC(Vydac 柱 C8 250×10mm;展开溶剂 A:0.1% TFA 水溶液、B:0.08% TFA、乙腈:水 = 90:10;梯度 A:B = 90:10→70:30、60 分钟;流速 4.0ml/min) 进行精制,获得作为反应中间体的酯体 18mg。

[0284] ESI-MS:Calcd for C₃₄H₆₂N₉O₁₂:[M+1H]¹⁺ 788.9、found、788.5

[0285] 将获得的反应中间体 5mg 加入到离心管中,用磷酸缓冲溶液(pH7.2、含有 6M 盐酸胍)0.63mL 使其溶解后,在 37℃下使其反应。9.25 小时后,确认反应结束,然后用 HPLC(Vydac 柱 C4 250×4.6mm;展开溶剂 A:0.1% TFA 水溶液、B:0.08% TFA、乙腈:水 = 90:10;梯度 A:B = 100:0→40:60、30 分钟;流速 1.0ml/min) 进行精制,获得目标的 8 残基肽 Val-Asp-Lys-Ala-Val-Ser-Gly-Leu(序列编号 8)4.1mg。予以说明,反应结束时间也可以定在 7.25 小时后。

[0286] ESI-MS:Calcd for C₃₄H₆₂N₉O₁₂:[M+1H]¹⁺ 788.9、found、788.7

[0287] 实施例 3 Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly 的制备

[0288] 向固相合成用柱子中加入王氏树脂(Merck 公司制)(100 μmol),用二氯甲烷(DCM)、DMF 充分洗涤后,用 DCM 使其充分溶胀。使 Fmoc-Gly(0.50mmol)、MSNT(0.50mmol) 和 N-甲基咪唑(0.375mmol) 溶解于 DCM(2mL) 中,将其加入到固相合成用柱子中,在 25℃下搅拌 1 小时。予以说明,DCM 也可以为 1.5mL。搅拌后,将树脂用 DCM 和 DMF 充分洗涤,将 Fmoc 基用 20% 哌啶/DMF 溶液(2mL) 处理 15 分钟,进行脱保护。予以说明,本脱保护处理也可以进行 10 分钟。用 DMF 洗涤后,其后的肽链的伸长采用以下所示的方法,依次使氨基酸缩合。

[0289] 把用 Fmoc 基将氨基酸保护起来的氨基酸和 HOBt(67.6mg、0.50mmol)、DIPCI(77.0 μL、63.1mg、0.50mmol) 溶解于 DMF(1mL) 中,活化 15 分钟后,将其加入到固相合成用柱子中。在 25℃下搅拌 1 小时后,将 Fmoc 基用 20% 哌啶/DMF 溶液(2mL) 处理 20 分钟,进行脱保护。予以说明,本脱保护处理也可以进行 10 分钟。重复该操作,依次使氨

氨基酸缩合。作为被 Fmoc 基保护起来的氨基酸,使用 Fmoc-Arg(Pbf) (324.4mg、0.50mmol)、Fmoc-Leu(176.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Phe(193.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Asn(177.2mg、0.50mmol)、Fmoc-Cys(Trt) (292.9mg、0.50mmol)、Fmoc-Tyr(tBu) (229.8mg、0.50mmol)、Fmoc-Val(169.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Arg(Pbf) (324.4mg、0.50mmol)、Fmoc-Phe(193.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Leu(176.7mg、0.50mmol),获得固相树脂中具有 Fmoc-Leu-Phe-Arg(Pbf)-Val-Tyr(tBu)-Cys(Trt)-Asn-Phe-Leu-Arg(Pbf)-Gly 的保护基的 11 残基肽(序列编号 9)。然后,在树脂上,将 Fmoc 基用 20%哌啶/DMF 溶液 2mL 处理 20 分钟,进行脱保护。予以说明,本脱保护处理也可以进行 10 分钟。使用 DMF、DCM 洗涤后,将预先准备的试剂 K(TFA/水/苯酚/茴香硫醚/EDT = 82.5/5/5/5/2.5) 加入到足以充分浸没树脂的程度,在 25℃ 下搅拌 2 小时。予以说明,也可以使用 TFA/水/苯酚/茴香硫醚/EDT/TIPS = 81.5/5/5/5/2.5/1.0 代替试剂 K。过滤除去树脂,将反应溶液减压浓缩。将获得的残留物用 HPLC(Vydac 柱 C18 250×10mm;展开溶剂 A:0.1% TFA 水溶液、B:0.08% TFA、乙腈:水 = 90:10;梯度 A:B = 70:30→40:60、15 分钟;流速 2.0ml/min) 精制,获得 Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Cys-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly 的 11 残基的肽(序列编号 10)。

[0290] 将获得的 11 残基的肽(序列编号 10) 21mg (15 μmol) 加入到茄型烧瓶中,使其溶解于 0.25M 三盐酸缓冲溶液 15mL (pH8.6、含有 6M 盐酸胍液、3.3mM EDTA) 和乙腈 (5mL) 中,然后,在 25℃ 下加入甲基-4-硝基苯磺酸酯 (66mg)。30 分钟后,加入 10% TFA 溶液 (1.5mL),调节至 pH4 后,加入乙醚,进行萃取操作。浓缩后,将获得的残留物用 ODS 柱子进行精制,获得 Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Cys(Me)-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly 的半胱氨酸残基的硫原子被甲基化的 11 残基肽(序列编号 11) 19mg。

[0291] ESI-MS:Calcd for $C_{66}H_{100}N_{18}O_{14}S$: [M+2H]²⁺ 701.4、found、701.5

[0292] 将获得的半胱氨酸残基的硫原子被甲基化的 11 残基肽(序列编号 11) 18mg (13 μmol) 加入到茄型烧瓶中,使其溶解于 2.4mM 80%甲酸溶液 5.4mL 中,然后,在 25℃ 下加入溴化氰 136mg (1.3mmol)。将反应容器遮光,然后,在 25℃ 下进行反应,约 50 小时后,将反应溶液冷冻以使反应停止。将该反应产物冻干后,将获得的残留物用 HPLC(Vydac 柱 C8 250×10mm;展开溶剂 A:0.1% TFA 水溶液、B:0.08% TFA、乙腈:水 = 90:10;梯度 A:B = 85:15→50:50、60 分钟;流速 3.0ml/min) 进行精制,获得作为反应中间体的酯体 7.5mg。

[0293] ESI-MS:Calcd for $C_{65}H_{100}N_{18}O_{15}$: [M+2H]²⁺ 686.4、found、686.5

[0294] 将获得的反应中间体 7mg 加入到离心管中,用磷酸缓冲溶液 (pH7.2、含有 6M 盐酸胍) 0.50mL 使其溶解后,在 37℃ 下使其反应。1 小时后,确认反应结束后,用 HPLC(Vydac 柱 C4 250×4.6mm;展开溶剂 A:0.1% TFA 水溶液、B:0.08% TFA、乙腈:水 = 90:10;梯度 A:B = 80:20→40:60、30 分钟;流速 1.0ml/min) 进行精制,获得目标的 Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly 的 11 残基肽(序列编号 12) 5.4mg。

[0295] ESI-MS:Calcd for $C_{65}H_{100}N_{18}O_{15}$: [M+2H]²⁺ 686.4、found、686.4

[0296] 实施例 4 Ala-Leu-Leu-Val-Asn(寡糖链)-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Ala 的制备

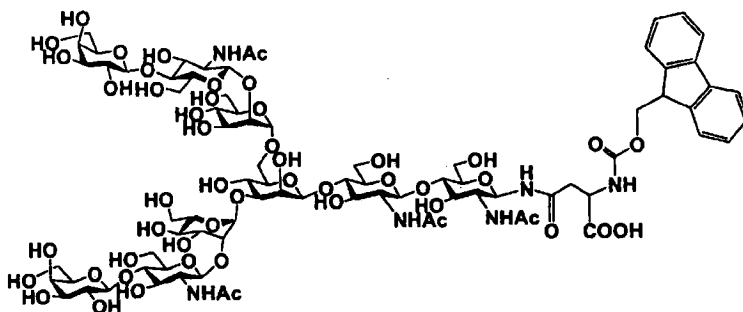
[0297] 向固相合成用柱子中加入氨基-PEGA 树脂 (Merck 公司制) (100 μmol),用二氯甲烷 (DCM)、DMF 充分洗涤后,用 DMF 使其充分溶胀。使 4-羟甲基-3-甲氧基苯氧基丁酸

(HMPB) (0.25mmol)、TBTU(0.25mmol) 和 N- 乙基吗啉 (0.25mmol) 溶解于 DMF (2ml) 中, 将其加入到柱子中, 在 25℃ 下搅拌 4 小时。将树脂用 DMF 和 DCM 充分洗涤, 获得 HMPB-PEGA 树脂, 将其用作固相合成用的固相载体。

[0298] 使 Fmoc-Ser (tBu) (0.50mmol)、MSNT(0.50mmol) 和 N- 甲基咪唑 (0.375mmol) 溶解于 DCM(2ml) 中, 将其加入到固相合成用柱子中, 在 25℃ 下搅拌 3 小时。予以说明, DCM 也可以为 2.5mL。搅拌后, 将树脂用 DCM、DMF 洗涤, 将 Fmoc 基用 20% 哌啶 /DMF 溶液 (2mL) 处理 15 分钟, 进行脱保护。予以说明, 本脱保护处理也可以进行 10 分钟。

[0299] 用 DMF 洗涤后, 将与 1 残基的肽 $2 \mu\text{mol}$ 相当的树脂转移至离心管中。使下述式 (9) 表示的糖链天冬酰胺 (10mg, $3.6 \mu\text{mol}$) 和 DEPBT (2mg, $6 \mu\text{mol}$) 溶解于 DMF (0.12mL) 中, 将其加入到离心管中, 加入 DIPEA ($0.68 \mu\text{mol}$, $4 \mu\text{mol}$), 在 25℃ 下搅拌 18 小时。

[0300]



(9)

[0301] 搅拌后, 将树脂用 DCM、DMF 洗涤。将 Fmoc 基用 20% 哌啶 /DMF 溶液 (1ml) 处理 15 分钟, 进行脱保护。用 DMF 洗涤后, 其后的糖肽链的伸长采用以下所示的方法, 依次使氨基酸缩合。

[0302] 把用 Fmoc 基将氨基酸保护起来的氨基酸和 HOBt (1.35mg、0.01mmol)、DIPCI ($1.53 \mu\text{L}$ 、1.26mg、0.01mmol) 溶解于 DMF (0.02mL) 中, 活化 15 分钟后, 将其加入到固相合成用柱子中。在 25℃ 下搅拌 1 小时后, 将 Fmoc 基用 20% 哌啶 /DMF 溶液 (1mL) 处理 20 分钟, 进行脱保护。重复该操作, 依次使氨基酸缩合。作为氨基被保护起来的氨基酸, 使用 Fmoc-Val (3.4mg、0.01mmol)、Fmoc-Leu (3.5mg、0.01mmol)、Fmoc-Leu (3.5mg、0.01mmol)、Fmoc-Ala (3.1mg、0.01mmol), 获得固相树脂中具有 Fmoc-Ala-Leu-Leu-Val-Asn (寡糖链)-Ser (tBu) 的保护基的 6 残基糖加成肽 (序列编号 13)。将所获产物加入到乙酸: 三氟乙醇 (= 1 : 1) 中以便达到树脂被充分浸没的程度, 4 小时后, 过滤除去树脂, 将滤液部分加入到另外准备的乙醚中, 进行晶析, 将溶液部分用膜式过滤器除去, 获得含有具有保护基的 6 残基的糖链加成肽 (序列编号 13) 的残留物。

[0303] 将获得的具有保护基的 6 残基的糖链加成肽 (序列编号 13) 2mg ($0.55 \mu\text{mol}$) 和分子筛 (MS) 4A (10mg)、苄基硫醇 ($2 \mu\text{L}$, $16.4 \mu\text{mol}$) 在 DMF 溶剂中 ($85 \mu\text{L}$)、在氩气流中、在 -20℃ 下搅拌 1 小时, 然后, 加入 PyBOP (1.4mg, $2.7 \mu\text{mol}$)、DIPEA ($0.46 \mu\text{L}$, $2.7 \mu\text{mol}$), 搅拌 2.5 小时。然后, 向反应溶液中加入乙醚 (5ml), 使化合物沉淀, 过滤后, 将沉淀物用乙腈 50% 水溶液回收。将其冻干, 向获得的冻干品中加入 95% TFA 水溶液, 在 25℃ 下搅拌 2 小时。过滤除去树脂, 将反应溶液浓缩后, 将其溶解于 50% 乙腈水溶液中, 冻干。将冻干品用 HPLC (Vydac 柱 C4 250×4.6mm; 展开溶剂 A : 0.1% TFA 水溶液、B : 0.08% TFA、乙腈 : 水 = 90 : 10; 梯度 A : B = 80 : 20→40 : 60、60 分钟; 流速 1.0ml/min) 进行精制, 获得 C 末

端为苄基硫代酯的 Ala-Leu-Leu-Val-Asn(寡糖链)-Ser-SBn 的 6 残基的糖链加成肽(序列编号 15)。

[0304] 予以说明,作为通过与离心管内的糖链天冬酰胺的反应而获得序列编号 15 的 6 残基的糖链加成肽的上述工序,也可以采用以下的方法:

[0305] 用 DMF 洗涤后,将与 1 残基的肽 $4.3 \mu\text{mol}$ 相当的树脂转移至离心管中。使式 (9) 表示的糖链天冬酰胺 (17mg, $8.6 \mu\text{mol}$) 和 DEPBT (6mg, $8.6 \mu\text{mol}$) 溶解于 DMF : DMSO = 4 : 1 的混合液 0.29mL 中,将其加入到离心管中,加入 DIPEA ($1.5 \mu\text{L}$, $8.6 \mu\text{mol}$),在 25°C 下搅拌 18 小时。

[0306] 搅拌后,将树脂用 DCM、DMF 洗涤。将 Fmoc 基用 20% 哌啶 /DMF 溶液 (1mL) 处理 10 分钟,进行脱保护。用 DMF 洗涤后,其后的糖肽链的伸长采用以下所示的方法,依次使氨基酸缩合。

[0307] 把用 Fmoc 基将氨基酸保护起来的氨基酸和 HOBt (2.9mg, 0.022mmol)、DIPCI ($3.3 \mu\text{L}$, 0.022mmol) 溶解于 DMF (0.54mL) 中,活化 15 分钟后,将其加入到固相合成用柱子中。在 25°C 下搅拌 1 小时后,将 Fmoc 基用 20% 哌啶 /DMF 溶液 (1mL) 处理 20 分钟,进行脱保护。重复该操作,依次使氨基酸缩合。作为氨基被保护起来的氨基酸,使用 Fmoc-Val (7.3mg, 0.022mmol)、Fmoc-Leu (7.6mg, 0.022mmol)、Fmoc-Leu (7.6mg, 0.022mmol)、Boc-Ala (4.0mg, 0.022mmol),获得固相树脂中具有 Boc-Ala-Leu-Leu-Val-Asn(寡糖链)-Ser(tBu) 的保护基的 6 残基糖加成肽(序列编号 14)。将所获产物加入到乙酸:三氟乙醇 (= 1 : 1) 中以便达到树脂被充分浸没的程度,24 小时后,过滤除去树脂,将滤液部分加入到另外准备的乙醚中,进行晶析,将溶液部分用膜式过滤器除去,获得含有具有保护基的 6 残基的糖链加成肽(序列编号 14) 的残留物。

[0308] 将获得的具有保护基的 6 残基的糖链加成肽(序列编号 14) 18mg ($7.5 \mu\text{mol}$) 和分子筛 (MS) 4A (190mg)、苄基硫醇 ($26 \mu\text{L}$, $37.5 \mu\text{mol}$) 在 DMF 溶剂中 (1.9mL)、在氩气流中、在 -20°C 下搅拌 1 小时,然后,加入 PyBOP (20mg, $37.5 \mu\text{mol}$)、DIPEA ($6.7 \mu\text{L}$, $37.5 \mu\text{mol}$),搅拌 2 小时。然后,向反应溶液中加入乙醚 (10mL),使化合物沉淀,过滤后,将沉淀物用 DMF 溶解。将其减压浓缩,向获得的残留物中加入 95% TFA 水溶液,在 25°C 下搅拌 2 小时。将反应液浓缩后,用 HPLC (Vydac 柱 C4 $250 \times 4.6\text{mm}$; 展开溶剂 A : 0.1% TFA 水溶液、B : 0.08% TFA、乙腈 : 水 = 90 : 10; 梯度 A : B = 100 : 0 \rightarrow 40 : 60, 60 分钟; 流速 $1.0\text{mL}/\text{min}$) 精制,获得 C 末端为苄基硫代酯的 Ala-Leu-Leu-Val-Asn(寡糖链)-Ser-SBn 的 6 残基的糖链加成肽(序列编号 15)。

[0309] 另一方面,向固相合成用柱子中加入王氏树脂 (Merck 公司制) ($100 \mu\text{mol}$),用二氯甲烷 (DCM)、DMF 充分洗涤后,用 DCM 使其充分溶胀。使 Fmoc-Ala (0.50mmol)、MSNT (0.50mmol) 和 N-甲基咪唑 (0.375mmol) 溶解于 DCM (2mL) 中,将其加入到固相合成用柱子中,在 25°C 下搅拌 1 小时。予以说明,DCM 也可以为 1.5mL。搅拌后,将树脂用 DCM 和 DMF 充分洗涤,将 Fmoc 基用 20% 哌啶 /DMF 溶液 (2mL) 处理 15 分钟,进行脱保护。予以说明,本脱保护处理也可以进行 10 分钟。用 DMF 洗涤后,其后的肽链的伸长采用以下所示的方法,依次使氨基酸缩合。

[0310] 把用 Fmoc 基将氨基保护起来的氨基酸和 HOBt (67.6mg, 0.50mmol)、DIPCI ($77.0 \mu\text{L}$, 63.1mg , 0.50mmol) 溶解于 DMF (1mL) 中,活化 15 分钟后,将其加入到固相合

成用柱子中。予以说明,DMF 也可以为 2mL。在 25℃下搅拌 1 小时后,将 Fmoc 基用 20%哌啶/DMF 溶液 (2mL) 处理 20 分钟,进行脱保护。重复该操作,依次使氨基酸缩合。作为被 Fmoc 基保护起来的氨基酸,使用 Fmoc-Lys(Boc) (234.3mg、0.50mmol)、Fmoc-Asp(OtBu) (205.8mg、0.50mmol)、Fmoc-Val (169.7mg、0.50mmol)、Fmoc-His(Trt) (309.9mg、0.50mmol)、Fmoc-Leu (176.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Gln (184.2mg、0.50mmol)、Fmoc-Leu (176.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Pro (168.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Glu(OtBu) (212.8mg、0.50mmol)、Fmoc-Trp(Boc) (263.3mg、0.50mmol)、Fmoc-Pro (168.7mg、0.50mmol)、Fmoc-Gln (184.2mg、0.50mmol)、Fmoc-Cys(Trt) (292.9mg、0.50mmol), 获得固相树脂中具有 Fmoc-Cys(Trt)-Gln-Pro-Trp(Boc)-Glu(OtBu)-Pro-Leu-Gln-Leu-His(Trt)-Val-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Ala 的保护基的 14 残基肽 (序列编号 16)。然后,将 Fmoc 基用 20%哌啶/DMF 溶液 (2mL) 处理 20 分钟,进行脱保护,使用 DMF、DCM 洗涤后,将预先准备的试剂 K (TFA/水/苯酚/茴香硫醚/EDT = 82.5/5/5/5/2.5) 加入到足以充分浸没树脂的程度,在 25℃下搅拌 2 小时。予以说明,也可以使用 TFA/水/苯酚/茴香硫醚/EDT/TIPS = 81.5/5/5/5/2.5/1.0 代替试剂 K。过滤除去树脂,将反应溶液减压浓缩。将获得的残留物用 HPLC (Vydac 柱 C8 250×10mm;展开溶剂 A:0.1% TFA 水溶液、B:0.08% TFA、乙腈:水 = 90:10;梯度 A:B = 80:20→40:60、30 分钟;流速 4.0ml/min) 精制,获得 Cys-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Ala 的 14 残基肽 (序列编号 17)。

[0311] 将这样制备的 14 残基肽 (序列编号 17) 1.1mg 和事先合成的 C 末端为苄基硫代酯的 6 残基的糖加成肽 (序列编号 15) 1.3mg 这两种成分加入到相同的离心管中,使其溶解于磷酸缓冲溶液 (pH7.2、含有 6M 盐酸胍) 275 μL 中后,在 25℃下加入苯硫酚 (1 μL) 和苄基硫醇 (1 μL),在 37℃下进行反应。26 小时后,用 HPLC 确认反应结束后,将反应溶液用 HPLC (Vydac 柱 C18 250×4.6mm;展开溶剂 A:0.1% TFA 水溶液、B:0.08% TFA、乙腈:水 = 90:10;梯度 A:B = 80:20→50:50、60 分钟;流速 1.0ml/min) 进行精制,获得 Ala-Leu-Leu-Val-Asn(寡糖链)-Ser-Cys-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Ala 的 20 残基糖链加成肽 (序列编号 18) 1.5mg。

[0312] 将获得的 20 残基糖链加成肽 (序列编号 18) 1.5mg (0.39 μmol) 加入到茄型烧瓶中,使其溶解于 0.25M 三盐酸缓冲溶液 0.39mL (pH8.6、含有 6M 盐酸胍液、3.3mM EDTA) 和乙腈 0.13mL 中,然后,在 25℃下加入甲基-4-硝基苯磺酸酯 (1.7mg)。40 分钟后,加入 10% TFA 溶液 (1.5mL),调节至 pH4 后,加入乙醚,进行萃取操作。将水层浓缩后,将获得的残留物用 HPLC (Vydac 柱 C4 250×4.6mm;展开溶剂 A:0.1% TFA 水溶液、B:0.08% TFA、乙腈:水 = 90:10;梯度 A:B = 80:20→55:45、60 分钟;流速 1.0ml/min) 进行精制 (予以说明,精制也可以使用 C18 柱代替上述 C4 柱),获得 Ala-Leu-Leu-Val-Asn(寡糖链)-Ser-Cys(Me)-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Ala 的半胱氨酸残基的硫原子被甲基化的 20 残基的糖链加成肽 (序列编号 19) 1.6mg。

[0313] ESI-MS:Calcd for $C_{165}H_{265}N_{31}O_{74}S$: $[M+2H]^{2+}$ 1300.7、found、1300.4

[0314] 将获得的半胱氨酸残基的硫原子被甲基化的 20 残基糖链加成肽 (序列编号 19) 1.6mg (0.4 μmol) 加入到离心管中,用 80%甲酸溶液 0.4mL 使其溶解后,在 25℃下加入溴化氰 4.3mg (0.04mmol)。将反应容器遮光,然后,在 37℃下进行反应,35 小时后,将反应溶液冷冻以使反应停止。将所获产物冻干后,向获得的残留物中加入含 5%胍的水合物

(200 μ L), 将反应体系内调节至 pH10 ~ 11。5 分钟后, 加入乙酸 (5 μ L), 将反应体系内调节至 pH8 ~ 9。将所获产物用 HPLC (Vydac 柱 C4 250 \times 4.6mm; 展开溶剂 A : 0.1% TFA 水溶液、B : 0.08% TFA、乙腈 : 水 = 90 : 10; 梯度 A : B = 80 : 20 \rightarrow 50 : 50、30 分钟; 流速 1.0ml/min) 进行精制, 获得作为目的物的糖肽 Ala-Leu-Leu-Val-Asn (寡糖链)-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Ala 的 20 残基的糖链加成肽 (序列编号 20) 0.7mg。

[0315] 予以说明, 在与溴化氰的反应结束 34 小时后, 将反应溶液减压浓缩, 向获得的残留物中加入含 5% 胍的水合物 (200 μ L), 搅拌 10 分钟后, 向反应液中加入乙酸 5 μ L, 用 HPLC 进行精制, 同样可以获得 20 残基的糖链加成肽 (序列编号 20)。

[0316] ESI-MS : Calcd for $C_{164}H_{263}N_{31}O_{75}$: $[M+2H]^{2+}$ 1290.6、found、1290.7

[0317] 实施例 5 Ac-Gly-Ser-Gly-Met-Ala 的制备

[0318] 向固相合成用柱子中加入王氏树脂 (Merck 公司制) (100 μ mol), 用二氯甲烷 (DCM)、DMF 充分洗涤后, 用 DCM 使其充分溶胀。使 Fmoc-Ala (0.50mmol)、MSNT (0.50mmol) 和 N-甲基咪唑 (0.375mmol) 溶解于 DCM (1.5mL) 中, 将其加入到固相合成用柱子中, 在 25 $^{\circ}$ C 下搅拌 2 小时。搅拌后, 将树脂用 DCM 和 DMF 充分洗涤, 将 Fmoc 基用 20% 哌啶 / DMF 溶液 (2mL) 处理 15 分钟, 进行脱保护。用 DMF 洗涤后, 其后的肽链的伸长采用以下所示的方法, 依次使氨基酸缩合。

[0319] 把用 Fmoc 基将氨基酸保护起来的氨基酸和 HOBt (67.6mg、0.50mmol)、DIPCI (77.0 μ L、63.1mg、0.50mmol) 溶解于 DMF (2mL) 中, 活化 15 分钟后, 将其加入到固相合成用柱子中。在 25 $^{\circ}$ C 下搅拌 1 小时后, 将 Fmoc 基用 20% 哌啶 / DMF 溶液 (2mL) 处理 10 分钟, 进行脱保护。重复该操作, 依次使氨基酸缩合。作为被 Fmoc 基保护起来的氨基酸, 使用 Fmoc-Met (O) (193.8mg、0.50mmol)、Fmoc-Gly (148.9mg、0.50mmol)、Fmoc-Cys (Trt) (292.9mg、0.50mmol)、Fmoc-Gly (148.9mg、0.50mmol), 获得在固相树脂上具有 Fmoc-Gly-Cys (Trt)-Gly-Met (O)-Ala 的保护基的 5 残基肽 (序列编号 21)。然后, 在树脂上, 将 Fmoc 基用 20% 哌啶 / DMF 溶液 (2mL) 处理 10 分钟, 进行脱保护, 使用 20% 乙酸酐 / DMF 溶液 (1.25mL), 对于游离氨基, 进行乙酰基保护。使用 DMF、DCM 洗涤后, 将预先准备的试剂 (TFA / 水 / TIPS = 95 / 2.5 / 2.5) 加入到足以充分浸没树脂的程度, 在 25 $^{\circ}$ C 下搅拌 2 小时。过滤除去树脂, 向滤液中加入乙醚 20mL, 使其沉淀。将沉淀过滤后, 用 0.1% TFA 水溶液使其溶解。将该溶液减压浓缩后, 进行冻干, 获得含有为 Ac-Gly-Cys-Gly-Met (O)-Ala 的 4 位的蛋氨酸的硫原子被氧化的 5 残基肽 (序列编号 22) 的混合物。

[0320] 将获得的 4 位的蛋氨酸的硫原子被氧化的 5 残基肽 (序列编号 22) 混合物 5mg 加入到茄型烧瓶中, 用 0.25M 三盐酸缓冲溶液 (pH8.6、含有 6M 盐酸胍液、3.3mM EDTA) 10mL 将其溶解。向所获溶液中加入 2-巯基乙醇 (7 μ L), 搅拌 10 分钟后, 向反应液中加入含有甲基-4-硝基苯磺酸酯 (66mg) 的乙腈溶液 3.3mL。25 分钟后, 加入 10% TFA 溶液 (1.0mL), 中和后, 加入乙醚, 进行 3 次萃取操作。将水层减压浓缩后, 将获得的残留物用 HPLC (Vydac 柱 C-18 250 \times 10mm; 展开溶剂 A : 0.1% TFA 水溶液、B : 0.09% TFA、乙腈 : 水 = 90 : 10; 梯度 A : B = 100 : 0 \rightarrow 100 : 0 \rightarrow 60 : 40、0 分钟 \rightarrow 5 分钟 \rightarrow 35 分钟; 流速 4.0mL/min) 精制, 获得为 Ac-Gly-Cys (Me)-Gly-Met (O)-Ala 的 2 位半胱氨酸残基的硫原子被甲基化、4 位蛋氨酸残基被氧化的 5 残基肽 (序列编号 23) 4mg。

[0321] 将获得的2位的半胱氨酸残基的硫原子被甲基化、4位的蛋氨酸残基被氧化的5残基肽(序列编号23)3.8mg加入到离心管中,使其溶解于80%甲酸溶液3.1mL中后,加入溴化氰79.0mg,将其遮光后,在氩置换下、在37℃下,搅拌39小时。反应后,进行减压浓缩,获得含有作为反应中间体的酯体的残留物。

[0322] 将获得的残留物加入到离心管中,用pH7.2的磷酸钠缓冲溶液1.25mL(含有6M盐酸胍)使其溶解后,搅拌45分钟。然后,向反应液中,加入三氟乙酸3.6mL、碘化铵22mg、二甲硫醚11 μ L,在室温下搅拌。30分钟后,向反应液中加入水10mL,用四氯化碳进行分液洗涤。将水层减压浓缩,将获得的残留物用HPLC(Vydac柱C18 250 \times 4.6mm;展开溶剂A:0.1%TFA水溶液、B:0.09%TFA、乙腈:水=90:10;梯度A:B=100:0 \rightarrow 100:0 \rightarrow 60:40、0分钟 \rightarrow 5分钟 \rightarrow 65分钟、流速1.0mL/min)进行精制,获得作为目的物的具有Ac-Gly-Ser-Gly-Met-Ala的保护基的5残基肽(序列编号24)2.6mg。

[0323] ESI-MS:Calcd for $C_{16}H_{28}N_4O_7$: $[M+1H]^{1+}$ 464.2、found、464.5

[0324] 实施例6 Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly的制备

[0325] 向固相合成用柱子中加入氨基-PEGA树脂(Merck公司制)(100 μ mol),用二氯甲烷(DCM)、DMF充分洗涤后,用DMF使其充分溶胀。使4-羟甲基-3-甲氧基苯氧基丁酸(HMPB)(0.25mmol)、TBTU(0.25mmol)和N-乙基吗啉(0.25mmol)溶解于DMF(2mL)中,加入到柱子中,在25℃下搅拌2小时。将树脂用DMF和DCM充分洗涤,获得HMPB-PEGA树脂,将其用作固相合成的固相载体。

[0326] 将Fmoc-Gly(0.50mmol)、MSNT(0.50mmol)和N-甲基咪唑(0.375mmol)溶解于DCM(4.5mL)中,将其加入到固相合成用柱子中,在25℃下搅拌3小时。搅拌后,用DCM、DMF将树脂洗涤,将Fmoc基用20%哌啶/DMF溶液(2mL)处理10分钟,进行脱保护。用DMF洗涤后,其后的肽链的伸长采用以下所示的方法,依次使氨基酸缩合。

[0327] 把用Fmoc基将氨基保护起来的氨基酸和HOBt(67.6mg、0.50mmol)、DIPCI(77.0 μ L、63.1mg、0.50mmol)溶解于DMF(4mL)中,活化15分钟后,将其加入到固相合成用柱子中。在25℃下搅拌1小时后,将Fmoc基用20%哌啶/DMF溶液(2mL)处理10分钟,进行脱保护。重复该操作,依次使氨基酸缩合。作为被Fmoc基保护起来的氨基酸,使用Fmoc-Pro、Fmoc-Ala、Fmoc-Pro、Fmoc-Arg(Pbf)、Fmoc-Thr(tBu)、Fmoc-Asp(OtBu)、Fmoc-Pro、Fmoc-Ala、Fmoc-Ser(tBu)、Fmoc-Thr(tBu)、Fmoc-Val、Fmoc-Gly、Fmoc-His(Trt)、Fmoc-Ala、Fmoc-Pro、Fmoc-Pro、Fmoc-Ala,获得在固相树脂上具有Fmoc-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Ala-Pro-Asp(OtBu)-Thr(tBu)-Arg(Pbf)-Pro-Ala-Pro-Gly的保护基的18残基肽(序列编号25)。

[0328] 将具有该保护基的18残基肽(序列编号25)固定在树脂上、将Fmoc基用20%哌啶/DMF溶液(2mL)处理10分钟,进行脱保护。用DMF、DCM将其洗涤后,使Fmoc-Thr(GalNAc)(0.20mmol)、HOBt(0.50mmol)、DIPCI(0.50mmol)溶解于DMF(3.6mL)中,活化15分钟后将其加到树脂上。反应5小时后,将Fmoc基用20%哌啶/DMF溶液(2mL)处理20分钟,进行脱保护,获得在固相树脂上具有Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Ala-Pro-Asp(OtBu)-Thr(tBu)-Arg(Pbf)-Pro-Ala-Pro-Gly的保护基的19

残基糖加成肽（序列编号 26）。

[0329] 准备一支与获得的在固相树脂上具有保护基的 19 残基糖加成肽（序列编号 26）0.02mmol 相当的另外的固相合成用柱子，向其中加入由 Boc-Ser(tBu) (0.1mmol)、DIPCI (0.1mmol)、HOBT (0.1mmol) 溶解于 DMF 0.5mL 中并活化 15 分钟后的溶液，进行 1 小时反应。将反应液过滤后，将乙酸：三氟乙醇 = 1 : 1 的混合液加入到足以充分浸没树脂的程度，14 小时后，过滤除去树脂，将滤液减压浓缩，获得含有具有 Boc-Ser(tBu)-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Ala-Pro-Asp(OtBu)-Thr(tBu)-Arg(Pbf)-Pro-Ala-Pro-Gly 的保护基的 20 残基糖加成肽（序列编号 27）的残留物。

[0330] 将获得的 20 残基的具有保护基的糖加成肽（序列编号 27）75mg (35 μmol) 和苄基硫醇 123 μl (105 μmol) 加入到 DMF 3.5ml 中，在氩气流中、在 -20℃ 下搅拌 1 小时后，加入 PyBOP (91mg, 175 μmol)、DIPEA (30 μl, 175 μmol)，搅拌 2.5 小时。向反应液中加入乙醚，使结晶沉淀后，过滤，向获得的残留物中加入 TFA/水/TIPS = 95/2.5/2.5 以便达到足以充分浸没树脂的程度，在 25℃ 下搅拌 2 小时。将树脂过滤除去后，将滤液浓缩，回收残留物。将获得的残留物用 HPLC (Vydac 柱 C8 250×10mm；展开溶剂 A : 0.1% TFA 水溶液、B : 0.09% TFA、乙腈：水 = 90 : 10；梯度 A : B = 90 : 10 → 60 : 40、30 分钟；流速 4.0mL/min) 精制，获得 C 末端为苄基硫代酯的、Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-SBn 的 20 残基糖加成肽（序列编号 28）。

[0331] 另一方面，准备一支与原先获得的固相树脂上的 19 残基的具有保护基的糖加成肽（序列编号 26）0.02mmol 相当的另外的固相合成用柱子，向其中加入由 Boc-Thia (0.04mmol)、DIPCI (0.1mmol)、HOBT (0.1mmol) 溶解于 DMF 1.5mL 中并活化 15 分钟后的溶液，进行 20 分钟反应。将反应液过滤后，将试剂 (TFA/水/TIPS = 95/2.5/2.5) 加入到足以充分浸没树脂的程度，在 25℃ 下搅拌 2 小时。将树脂过滤除去后，将滤液浓缩。将获得的残留物溶解于 0.2M 甲氧基胺和 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH4、含有 6M 盐酸胍) 2.1ml 中，将 N 末端的噻唑啉开环后，用 HPLC (Vydac 柱 C8 250×10mm；展开溶剂 A : 0.1% TFA 水溶液、B : 0.08% TFA、乙腈：水 = 90 : 10；梯度 A : B = 90 : 10 → 60 : 40、30 分钟；流速 4.0mL/min) 精制，获得 Cys-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly 的 20 残基的糖加成肽（序列编号 29）。

[0332] 将这样获得的、20 残基的糖加成肽（序列编号 29）13mg 与事先获得的 C 末端为苄基硫代酯的 20 残基的肽（序列编号 28）12mg 溶解于磷酸缓冲溶液 (pH7.2、含有 6M 盐酸胍) 2.9mL 中，向其中加入 4-巯基苯基乙酸 30mg、三(2-羧乙基)膦 17mg，使其反应 3 小时。将反应液用 HPLC (Vydac 柱 C8 250×10mm；展开溶剂 A : 0.1% TFA 水溶液、B : 0.09% TFA、乙腈：水 = 90 : 10；梯度 A : B = 90 : 10 → 60 : 40、30 分钟；流速 4.0mL/min) 精制，获得 Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Cys-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly 的 40 残基糖加成肽（序列编号 30）18mg。

[0333] 将获得的 40 残基的糖加成肽（序列编号 30）16mg 加入到茄型烧瓶中，用 0.25M 三盐酸缓冲溶液 (pH8.6、含有 6M 盐酸胍液、3.3mMEDTA) 3.8mL 将其溶解。向其中加入 2-巯基乙醇 (3 μL)，搅拌 10 分钟后，加入含有甲基-4-硝基苯磺酸酯 25mg 的乙腈 1.27mL。25 分钟后，加入 10% TFA 溶液 0.45mL，中和，然后加入乙醚 2mL，进行 3 次分液洗涤。将水层减压浓

缩后,将获得的残留物用 HPLC(Vydac 柱 C-4250×4.6mm;展开溶剂 A:0.1% TFA 水溶液、B:0.08% TFA、乙腈:水=90:10;梯度 A:B=100:0→100:0→90:10→60:40、0 分钟→10 分钟→40 分钟流速 1.2ml/min) 精制,获得含有 Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Cys(Me)-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly 的 21 位的半胱氨酸残基的硫原子被甲基化的 40 残基糖加成肽(序列编号 31)的混合物 13mg。

[0334] 将获得的含有 21 位的半胱氨酸残基的硫原子被甲基化的 40 残基糖加成肽(序列编号 31)的混合物 12mg 加入到茄型烧瓶中,使其溶解于 80%甲酸水溶液 2.9mL 中后,在 25℃下加入溴化氰 152mg。将反应容器遮光,然后在 37℃下进行反应,36 小时后,将反应溶液减压浓缩。将残留物溶解于三氟乙酸 2.9mL 中,加入碘化铵 2.4mg、二甲硫醚 24 μL,在室温下使其反应 30 分钟。30 分钟后,向反应体系中加入水 6mL,然后用四氯化碳进行分液洗涤。将水层减压浓缩后,将残留物溶解于 5%胍水溶液 1.4mL 中,在室温下使其反应 10 分钟。10 分钟后,向反应液中加入乙酸 0.14mL,然后用 HPLC(Vydac 柱 C-4 250×4.6mm;展开溶剂 A:50mM AcONH₄ 水溶液、B:乙腈;梯度 A:B=90:10→70:30、60 分钟、流速 1.0mL/min) 精制,获得 Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly 的作为目的产物的 40 残基糖加成肽(序列编号 32) 2.3mg。

[0335] ESI-MS:Calcd for:[M+3H]³⁺ 1388.5、found、1388.6

[0336] 实施例 7 Glu-Ser-Asn-Gly-Thr-Leu-Thr-Leu 的制备

[0337] 向固相合成用柱子中加入 Trt chloride resin(Merck 公司制)(100 μmol),用二氯甲烷(DCM)、DMF 充分洗涤后,用 DCM 使其充分溶胀。过滤后,将 Fmoc-Gly(0.20mmol)、DIPEA(0.4mmol) 溶解于 DCM(0.66mL) 中,再将其加入到固相合成用柱子中,在 25℃下搅拌 2 小时。搅拌后,将树脂用 DCM:MeOH:DIPEA=17:2:1、DCM 和 DMF 充分洗涤后,将 Fmoc 基用 20%哌啶/DMF 溶液(1mL) 处理 20 分钟,进行脱保护。用 DMF 洗涤后,其后的肽链的伸长采用以下所示的方法,依次使氨基酸缩合。

[0338] 将氨基被保护起来的氨基酸和 HOBt(67.6mg、0.50mmol)、DIPCI(77.0 μL、63.1mg、0.50mmol) 溶解于 DMF(2mL) 中,活化 15 分钟后,将其加入到固相合成用柱子中。在 25℃下搅拌 1 小时后,将 Fmoc 基用 20%哌啶/DMF 溶液(2mL) 处理 20 分钟,进行脱保护。重复该操作,依次使氨基酸缩合。作为被保护的氨基酸,使用 Fmoc-Asn(177.2mg、0.50mmol)、Fmoc-Ser(tBu)(191.6mg、0.50mmol)、Boc-Glu(OtBu)(151.6mg、0.50mmol),获得在固相树脂上具有 Boc-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-Asn-Gly 的保护基的 4 残基肽(序列编号 33)。

[0339] 用 DMF、DCM 洗涤后,加入 AcOH:MeOH:DCM=5:4:1 的混合液 2mL,在室温下使其反应 2 小时。2 小时后,将反应液过滤回收,减压浓缩,获得残留物。向该残留物中加入苯 1mL,进行 2 次共沸操作后,使其溶解于 DMF 0.81mL 中。在氩气流中、在 0℃下向该溶液中加入 PyBOP 42.1mg、DIPEA 14 μL、苄基硫醇 57 μL,搅拌 30 分钟。反应后,用饱和氯化铵水溶液中和后,用水和饱和食盐水进行分液洗涤。将有机层用硫酸镁干燥后,过滤,接着将滤液减压浓缩。将获得的残留物用硅胶柱色谱法(展开溶剂;乙酸乙酯:MeOH:水=

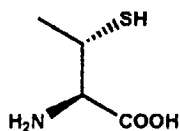
20 : 2 : 1) 精制,收集含有作为目的产物的肽的级分,减压下进行浓缩。将获得的残留物用 95% TFA 水溶液溶解,使其反应 10 分钟。将反应液减压浓缩,获得在 C 末端上具有苄基硫代酯的 Glu-Ser-Asn-Gly-SBn 的 4 残基肽 (序列编号 34)。

[0340] 另一方面,向固相合成用柱子中加入王氏树脂 (Merck 公司制) (0.1mmol),用二氯甲烷 (DCM)、DMF 充分洗涤后,用 DCM 使其充分溶胀。将 Fmoc-Leu (0.50mmol)、MSNT (0.50mmol) 和 N-甲基咪唑 (0.375mmol) 溶解于 DCM (2mL) 中,再将其加入到固相合成用柱子中,在 25°C 下搅拌 2 小时。2 小时后,将树脂用 DCM 和 DMF 充分洗涤,将 Fmoc 基用 20% 哌啶 /DMF 溶液 (2mL) 处理 20 分钟,进行脱保护。用 DMF、DCM 洗涤后,其后的肽链的伸长采用以下所示的方法,依次使氨基酸缩合。

[0341] 将氨基被保护起来的氨基酸和 HOBt (67.6mg、0.50mmol)、DIPCI (77.0 μ L、0.50mmol) 溶解于 DMF 2mL 中,活化 15 分钟后,将其加入到固相合成用柱子中。在 25°C 下搅拌 1 小时后,将 Fmoc 基用 20% 哌啶 /DMF 溶液 (2mL) 处理 20 分钟,进行脱保护。重复该操作,依次使氨基酸缩合。作为被保护的氨基酸,使用 Fmoc-Thr (tBu) (198.8mg、0.50mmol)、Fmoc-Leu (176.8mg、0.50mmol),获得在固相树脂上具有 Fmoc-Leu-Thr (tBu)-Leu 的保护基的 3 残基肽。然后,将 Fmoc 基用 20% 哌啶 /DMF 溶液 (2mL) 处理 20 分钟,进行脱保护后,向其中加入由另外在合成例 1 中合成的具有 Boc-Thr (S-SsecBu) 的保护基的苏氨酸衍生物以及 HOBt (67.6mg、0.50mmol)、DIPCI (77.0 μ L、0.50mmol) 溶解于 DMF 2mL 中并使其活化 15 分钟的溶液,使其反应 3 小时,获得在固相树脂上具有 Boc-Thr (S-SsecBu)-Leu-Thr (tBu)-Leu 的保护基的 4 残基肽 (序列编号 35)。向该反应产物中加入 95% TFA 水溶液,在室温下反应 2 小时后,过滤除去树脂,将滤液减压浓缩,获得具有 Thr (S-SsecBu)-Leu-Thr-Leu 的保护基的 4 残基肽 (序列编号 36)。

[0342] 将这样获得的具有保护基的 4 残基肽 (序列编号 36) 2.2mg 和事先获得的具有硫代酯的 4 残基肽 (序列编号 34) 2.2mg 溶解于 0.2M 磷酸钠缓冲液 (pH7.3、含有 6M 盐酸胍、4-巯基苯基乙酸 20mg) xxmL,使其反应 3.5 小时。反应后,加入二硫代苏糖醇,搅拌 10 分钟后,将反应液用 HPLC (Cadenza 柱 C18 75 \times 4.6mm;展开溶剂 A :0.1% TFA 水溶液、B :0.1% TFA、乙腈 :水 = 90 : 10;梯度 A : B = 90 : 10 \rightarrow 35 : 65、15 分钟;流速 1.0mL/min) 精制,获得 5 位的苏氨酸残基的侧链羟基被硫羟基取代的、作为 Glu-Ser-Asn-Gly-Thr (SH)-Leu-Thr-Leu 的 8 残基的肽 (序列编号 37)。可以认为,获得的肽中所含的苏氨酸衍生物残基主要具有由下式表示的立体构型。

[0343]



[0344] 将获得的 5 位的苏氨酸残基的侧链羟基被硫羟基取代的 8 残基的肽 (序列编号 37) 3.5mg 加入到茄型烧瓶中,用 0.25M 三盐酸缓冲溶液 (pH8.6、含有 6M 盐酸胍液、3.3mM EDTA) 4.1mL 将其溶解。向该溶液中加入 2-巯基乙醇 (2.9 μ L),搅拌 15 分钟后,加入由甲基-4-硝基苯磺酸酯 (26.2mg) 溶解于乙腈 1.37mL 而形成的溶液,使其反应 50 分钟。反应后,加入 10% TFA 溶液 (1.0mL),中和后,将反应液用 HPLC (Cadenza 柱 C18 75 \times 4.6mm;展开溶剂 A :0.1% TFA 水溶液、B :0.1% TFA、乙腈 :水 = 90 : 10;梯度 A : B

= 90 : 10 → 35 : 65、15 分钟 ;流速 1.0mL/min) 精制,获得 5 位的苏氨酸残基被取代的硫羟基的硫原子被甲基化的、作为 Glu-Ser-Asn-Gly-Thr(SMe)-Leu-Thr-Leu 的 8 残基肽 (序列编号 38)。

[0345] 将获得的 5 位的苏氨酸残基的被取代的硫羟基的硫原子被甲基化的 8 残基肽 (序列编号 38) 4mg 加入到茄型烧瓶中,使其溶解于 70% 甲酸溶液 4.63mL 中后,加入溴化氰 49.0mg,遮光,在氩置换下、在 37°C 下搅拌。48 小时后,减压浓缩后,加入 5% 胂水溶液 0.93mL,使其反应 15 分钟。向该反应产物中加入乙酸 60 μL 后,将反应液用 HPLC(Cadenza 柱 C18 75×4.6mm;展开溶剂 A :0.1% TFA 水溶液、B :0.1% TFA、乙腈 :水 = 90 : 10 ;梯度 A : B = 85 : 15 → 45 : 55、15 分钟 ;流速 1.0ml/min) 精制,获得 Glu-Ser-Asn-Gly-Thr-Leu-Thr-Leu 的作为目的产物的 8 残基肽 (序列编号 39)。根据反应机理,可以推测,获得的肽中所含的苏氨酸残基的立体构型与天然产物相同。

[0346] ESI-MS :Calcd for $C_{34}H_{59}N_9O_{15}$: $[M+1H]^{1+}$ 834.41、found、835.1

[0347] 合成例 1 Boc-Thr(S-SsecBu) 的合成

[0348] 将 Boc-Thr(300mg, 1.37mmol) 溶解于经过蒸馏的 DMF(6.85mL, 200mM) 中,然后向其中加入 N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳化二亚胺氯化氢 (786mg, 4.1mmol) 和 HOBt(370mg, 2.74mmol),在 0°C 下搅拌 15 分钟后,加入 TMSEtOH(1.95mL, 13.7mmol),在 0°C 下搅拌 20 小时,用 TLC 确认反应结束后,将反应溶液用乙酸乙酯稀释,用饱和碳酸氢钠水溶液中和,用水分液洗涤 2 次,用饱和食盐水分液洗涤 1 次。将有机层用硫酸镁干燥后,过滤,将滤液减压浓缩。将残留物用硅胶柱色谱法 (展开溶剂 : 乙酸乙酯 : 己烷 = 1 : 3) 精制,获得 Boc-Thr-TMS 酯 (收量 :342mg, 收率 :78%)。

[0349] 将获得的 Boc-Thr-TMS 酯在苯中共沸 2 次后,将残留物溶解于 DCM20.8mL。加入甲烷磺酰氯 322mL(4.16mmol) 和三乙胺 1.16mL(8.32mmol),在 0°C 下搅拌 10 分钟,用 TLC 确认反应结束后,将反应溶液用 DCM 稀释,用饱和氯化铵水溶液中和后,用水分液洗涤 2 次,用饱和食盐水分液洗涤 1 次。将有机层用硫酸镁干燥后,过滤,将滤液减压浓缩。将残留物用硅胶柱色谱法 (展开溶剂 : 乙酸乙酯 : 己烷 = 1 : 4) 精制,获得 Boc-Thr(OMs)-TMS 酯 (收量 724.6mg, 收率 88%)。

[0350] 将获得的 Boc-Thr(OMs)-TMS 酯 1.06g 在苯中共沸 2 次后,在干燥器中使其干燥一夜。将该干燥产物溶解于 DMF 8.9mL 中后,加入由硫代乙酸 0.57mL(7.95mmol) 和 DBU 0.79mL(5.3mmol) 溶解于 DMF 4.4mL 中并使其反应 20 分钟而成的溶液,在 45°C 下搅拌 18 小时,用 TLC 确认反应结束后,用饱和氯化铵水溶液中和后,用水分液洗涤 2 次,用饱和食盐水分液洗涤 1 次。将有机层用硫酸镁干燥后,过滤,将滤液减压浓缩。将残留物用硅胶柱色谱法 (展开溶剂 : 乙酸乙酯 : 己烷 = 1 : 20) 精制,获得 Boc-Thr(SAc)-TMS 酯 (收量 536.8mg、收率 53.7%)。

[0351] 将获得的 Boc-Thr(SAc)-TMS 酯 1.1g 溶解于甲醇 100mL 中后,加入二吡啶基二硫化物 (3.21g、14.6mmol)、Sec-BuSH 1.75mL(16.1mmol) 溶解于甲醇 5.5mL 中而成的溶液。然后,加入氢氧化钠的甲醇溶液 (500mM) 11.7mL。18 小时后,用 TLC 确认反应结束后,用 1% 乙酸水溶液中和,减压浓缩后,用乙酸乙酯稀释。将该稀释液用水分液洗涤 2 次,用饱和食盐水分液洗涤 1 次。将有机层用硫酸镁干燥后,进行过滤,将滤液减压浓缩。将残留物用硅胶柱色谱法 (展开溶剂 : 乙酸乙酯 : 己烷 = 1 : 40) 精制。将获得的混合物在苯中共沸 2 次后,

使其溶解于 DMF 29mL (100mM) 中。向其中加入四丁基氟化铵·3 水合物 2.28mg (7.3mmol)，在 0℃ 下搅拌。搅拌 15 分钟后，用 TLC 确认反应结束，接着用饱和氯化铵水溶液进行中和。将该反应液用水洗涤 2 次，用饱和食盐水洗涤 1 次，然后，将有机层用硫酸镁进行干燥，过滤后，将滤液减压浓缩。将残留物用硅胶柱（展开溶剂：乙酸乙酯：己烷 = 1 : 4 → 乙酸乙酯：甲醇：水 = 20 : 2 : 1）精制，获得作为目的产物的 Boc-Thr (S-SsecBu)（收量 650mg、收率 69%）。

[0352] 序列表文本

[0353] 序列编号 1 为实施例 1 的、具有保护基的氨基酸序列。

[0354] 序列编号 2 为实施例 1 的、被乙酰基化的氨基酸序列。

[0355] 序列编号 3 为实施例 1 的、具有被甲基化的半胱氨酸的氨基酸序列。

[0356] 序列编号 4 为实施例 1 的、被乙酰基化的氨基酸序列。

[0357] 序列编号 5 为实施例 2 的、具有保护基的氨基酸序列。

[0358] 序列编号 6 为实施例 2 的、氨基酸序列。

[0359] 序列编号 7 为实施例 2 的、具有被甲基化的半胱氨酸的氨基酸序列。

[0360] 序列编号 8 为实施例 2 的、氨基酸序列。

[0361] 序列编号 9 为实施例 3 的、具有保护基的氨基酸序列。

[0362] 序列编号 10 为实施例 3 的、氨基酸序列。

[0363] 序列编号 11 为实施例 3 的、具有被甲基化的半胱氨酸的氨基酸序列。

[0364] 序列编号 12 为实施例 3 的、氨基酸序列。

[0365] 序列编号 13 为实施例 4 的、加成了糖链的、具有保护基的氨基酸序列。

[0366] 序列编号 14 为实施例 4 的、加成了糖链的、具有保护基的氨基酸序列。

[0367] 序列编号 15 为实施例 4 的、加成了糖链的、具有苄基硫代酯基的氨基酸序列。

[0368] 序列编号 16 为实施例 4 的、具有保护基的氨基酸序列。

[0369] 序列编号 17 为实施例 4 的、氨基酸序列。

[0370] 序列编号 18 为实施例 4 的、加成了糖链的氨基酸序列。

[0371] 序列编号 19 为实施例 4 的、加成了糖链的、具有被甲基化的半胱氨酸的氨基酸序列。

[0372] 序列编号 20 为实施例 4 的、加成了糖链的氨基酸序列。

[0373] 序列编号 21 为实施例 5 的、具有保护基和蛋氨酸亚砷的氨基酸序列。

[0374] 序列编号 22 为实施例 5 的、具有蛋氨酸亚砷的、被乙酰基化的氨基酸序列。

[0375] 序列编号 23 为实施例 5 的、具有被甲基化的半胱氨酸和蛋氨酸亚砷的、被乙酰基化的氨基酸序列。

[0376] 序列编号 24 为实施例 5 的、被乙酰基化的氨基酸序列。

[0377] 序列编号 25 为实施例 6 的、具有保护基的氨基酸序列。

[0378] 序列编号 26 为实施例 6 的、加成了糖链的、具有保护基的氨基酸序列。

[0379] 序列编号 27 为实施例 6 的、加成了糖链的、具有保护基的氨基酸序列。

[0380] 序列编号 28 为实施例 6 的、加成了糖链的、具有苄基硫代酯基的氨基酸序列。

[0381] 序列编号 29 为实施例 6 的、加成了糖链的氨基酸序列。

[0382] 序列编号 30 为实施例 6 的、加成了糖链的氨基酸序列。

[0383] 序列编号 31 为实施例 6 的、加成了糖链的、具有被甲基化的半胱氨酸的氨基酸序列。

[0384] 序列编号 32 为实施例 6 的、加成了糖链的氨基酸序列。

[0385] 序列编号 33 为实施例 7 的、具有保护基的氨基酸序列。

[0386] 序列编号 34 为实施例 7 的、具有苄基硫代酯基的氨基酸序列。

[0387] 序列编号 35 为实施例 7 的、具有保护基和苏氨酸衍生物的氨基酸序列。

[0388] 序列编号 36 为实施例 7 的、具有苏氨酸衍生物的氨基酸序列。

[0389] 序列编号 37 为实施例 7 的、具有苏氨酸衍生物的氨基酸序列。

[0390] 序列编号 38 为实施例 7 的、具有苏氨酸衍生物的氨基酸序列。

[0391] 序列编号 39 为实施例 7 的、氨基酸序列。

[0392] **【产业上的可利用性】**

[0393] 本发明提供肽和糖肽的制备方法。根据本发明,在想要获得不含半胱氨酸的肽的情况下,可以采用连接法。本发明还适用于制备 N 键型糖肽和 O 键型糖肽。

[0394] **【序列表】**

[0395] PCT 肽的制备方法 20080730 115403 21.txt

序列表

<110> 大塚化学株式会社和横浜市立大学

<120> 肽的制备方法

<130>00331AAP001PCT

<150>JP 2007-199372

<151>2007-07-31

<160>40

<170>PatentIn version 3.1

<210>1

<211>4

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有保护基的氨基酸序列 (实施例 1)

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1).. (1)

<223> 具有保护基 Fmoc 的 Ala

<220>

<221>MOD_RES

<222>(2).. (2)

<223> 具有保护基 Trt 的 Cys

<400>1

Ala Cys Gly Leu

1

<210>2

<211>4

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 被乙酰基化的氨基酸序列（实施例 1）

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1).. (1)

<223>ACETYLATION

<400>2

Ala Cys Gly Leu

1

<210>3

<211>4

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有被甲基化的半胱氨酸的氨基酸序列（实施例 1）

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1).. (1)

<223>ACETYLATION

<220>

<221>MOD_RES

<222>(2).. (2)

<223>METHYLATION

<400>3

Ala Cys Gly Leu

1

<210>4

<211>4

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 被乙酰基化的氨基酸序列（实施例 1）

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1)..(1)

<223>ACETYLATION

<400>4

Ala Ser Gly Leu

1

<210>5

<211>8

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有保护基的氨基酸序列（实施例 2）

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1)..(1)

<223> 具有保护基 Fmoc 的 Val

<220>

<221>MOD_RES

<222>(2)..(2)

<223> 具有保护基 OtBu 的 Asp

<220>

<221>MOD_RES

<222>(3)..(3)

<223> 具有保护基 Boc 的 Lys

<220>

<221>MOD_RES

<222>(6)..(6)

<223> 具有保护基 Trt 的 Cys

<400>5

Val Asp Lys Ala Val Cys Gly Leu

1 5

<210>6

<211>8

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 氨基酸序列 (实施例 2)

<400>6

Val Asp Lys Ala Val Cys Gly Leu

1 5

<210>7

<211>8

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有被甲基化的半胱氨酸的氨基酸序列 (实施例 2)

<220>

<221>MOD_RES

<222>(6)..(6)

<223>METHYLATION

<400>7

Val Asp Lys Ala Val Cys Gly Leu
1 5

<210>8

<211>8

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 氨基酸序列 (实施例 2)

<400>8

Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu
1 5

<210>9

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有保护基的氨基酸序列 (实施例 3)

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1)..(1)

<223> 具有保护基 Fmoc 的 Leu

<220>

<221>MOD_RES

<222>(3)..(3)

<223> 具有保护基 Pbf 的 Arg

<220>

<221>MOD_RES

<222>(5)..(5)

<223> 具有保护基 tBu 的 Tyr

<220>

<221>MOD_RES

<222>(6)..(6)

<223> 具有保护基 Trt 的 Cys

<220>

<221>MOD_RES

<222>(10)..(10)

<223> 具有保护基 Pbf 的 Arg

<400>9

Leu Phe Arg Val Tyr Cys Asn Phe Leu Arg Gly

1 5 10

<210>10

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 氨基酸序列 (实施例 3)

<400>10

Leu Phe Arg Val Tyr Cys Asn Phe Leu Arg Gly

1 5 10

<210>11

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有被甲基化的半胱氨酸的氨基酸序列 (实施例 3)

<220>

<221>MOD_RES

<222>(6).. (6)

<223>METHYLATION

<400>11

Leu Phe Arg Val Tyr Cys Asn Phe Leu Arg Gly

1 5 10

<210>12

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 氨基酸序列 (实施例 3)

<400>12

Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly

1 5 10

<210>13

<211>6

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 加成了糖链的、具有保护基的氨基酸序列 (实施例 4)

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1).. (1)

<223> 具有保护基 Fmoc 的 Ala

<220>

<221>CARBOHYD

<222>(5).. (5)

<223> 被脱唾液酸寡糖链 (asialo oligosaccharide chain) 糖基化的 Asn

<220>

<221>MOD_RES

<222>(6)..(6)

<223> 具有保护基 tBu 的 Ser

<400>13

Ala Leu Leu Val Asn Ser

1

5

<210>14

<211>6

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 加成了糖链的、具有保护基的氨基酸序列

(实施例 4)

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1)..(1)

<223> 具有保护基 Boc 的 Ala

<220>

<221>CARBOHYD

<222>(5)..(5)

<223> 被脱唾液酸寡糖链糖基化的 Asn

<220>

<221>MOD_RES

<222>(6)..(6)

<223> 具有保护基 tBu 的 Ser

<400>14

Ala Leu Leu Val Asn Ser

1

5

<210>15

<211>6

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 加成了糖链的、具有苄基硫代酯基的氨基酸序列（实施例 4）

<220>

<221>CARBOHYD

<222>(5)..(5)

<223> 被脱唾液酸寡糖链糖基化的 Asn

<220>

<221>MOD_RES

<222>(6)..(6)

<223> 具有苄基硫代酯基的 Ser

<400>15

Ala Leu Leu Val Asn Ser

1

5

<210>16

<211>14

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有保护基的氨基酸序列（实施例 4）

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1)..(1)

<223> 具有保护基 Fmoc 和 Trt 的 Cys

<220>

<221>MOD_RES

<222>(4)..(4)

<223> 具有保护基 Boc 的 Trp

<220>

<221>MOD_RES

<222>(5)..(5)

<223> 具有保护基 OtBu 的 Glu

<220>

<221>MOD_RES

<222>(10)..(10)

<223> 具有保护基 Trt 的 His

<220>

<221>MOD_RES

<222>(12)..(12)

<223> 具有保护基 OtBu 的 Asp

<220>

<221>MOD_RES

<222>(13)..(13)

<223> 具有保护基 Boc 的 Lys

<400>16

Cys Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala

1

5

10

<210>17

<211>14

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 氨基酸序列 (实施例 4)

<400>17

Cys Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala

1

5

10

<210>18

<211>20

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 加成了糖链的氨基酸序列 (实施例 4)

<220>

<221>CARBOHYD

<222>(5)..(5)

<223> 被脱唾液酸寡糖链糖基化的 Asn

<400>18

Ala	Leu	Leu	Val	Asn	Ser	Cys	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His
1				5					10					15	
Val	Asp	Lys	Ala												
			20												

<210>19

<211>20

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 加成了糖链的、具有被甲基化的半胱氨酸的氨基酸序列 (实施例 4)

<220>

<221>CARBOHYD

<222>(5)..(5)

<223> 被脱唾液酸寡糖链糖基化的 Asn

<220>

<221>MOD_RES

<222>(7)..(7)

<223>METHYLATION

<400>19

Ala	Leu	Leu	Val	Asn	Ser	Cys	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

<223> 具有保护基 Trt 的 Cys

<220>

<221>MOD_RES

<222>(4).. (4)

<223> 蛋氨酸亚砷

<400>21

Gly Cys Gly Met Ala

1 5

<210>22

<211>5

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有蛋氨酸亚砷的、被乙酰基化的氨基酸序列 (实施例 5)

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1).. (1)

<223>ACETYLATION

<220>

<221>MOD_RES

<222>(4).. (4)

<223> 蛋氨酸亚砷

<400>22

Gly Cys Gly Met Ala

1 5

<210>23

<211>5

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有被甲基化的半胱氨酸和蛋氨酸亚砷的、被乙酰基化的氨基酸序列（实施例 5）

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1)..(1)

<223>ACETYLATION

<220>

<221>MOD_RES

<222>(2)..(2)

<223>METHYLATION

<220>

<221>MOD_RES

<222>(4)..(4)

<223> 蛋氨酸亚砷

<400>23

Gly Cys Gly Met Ala

1 5

<210>24

<211>5

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 被乙酰基化的氨基酸序列（实施例 5）

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1)..(1)

<223>ACETYLATION

<400>24

Gly Ser Gly Met Ala

1 5

<210>25

<211>18

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有保护基的氨基酸序列（实施例 6）

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1)..(1)

<223> 具有保护基 Fmoc 的 Ala

<220>

<221>MOD_RES

<222>(5)..(5)

<223> 具有保护基 Trt 的 His

<220>

<221>MOD_RES

<222>(8)..(8)

<223> 具有保护基 tBu 的 Thr

<220>

<221>MOD_RES

<222>(9)..(9)

<223> 具有保护基 tBu 的 Ser

<220>

<221>MOD_RES

<222>(12)..(12)

<223> 具有保护基 OtBu 的 Asp

<220>

<221>MOD_RES

<222>(13)..(13)

<223> 具有保护基 tBu 的 Thr

<220>

<221>MOD_RES

<222>(14)..(14)

<223> 具有保护基 Pbf 的 Arg

<400>25

Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala

1 5 10 15

Pro Gly

<210>26

<211>19

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 加成了糖链的、具有保护基的氨基酸序列（实施例 6）

<220>

<221>CARBOHYD

<222>(1)..(1)

<223> 被 N-乙酰基半乳糖胺糖基化的 Thr

<220>

<221>MOD_RES

<222>(6)..(6)

<223> 具有保护基 Trt 的 His

<220>

<221>MOD_RES

<222>(9)..(9)

<223> 具有保护基 tBu 的 Thr

<220>

<221>MOD_RES

<222>(10)..(10)

<223> 具有保护基 tBu 的 Ser

<220>

<221>MOD_RES

<222>(13)..(13)

<223> 具有保护基 OtBu 的 Asp

<220>

<221>MOD_RES

<222>(14)..(14)

<223> 具有保护基 tBu 的 Thr

<220>

<221>MOD_RES

<222>(15)..(15)

<223> 具有保护基 Pbf 的 Arg

<400>26

Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro

1

5

10

15

Ala Pro Gly

<210>27

<211>20

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 加成了糖链的、具有保护基的氨基酸序列（实施例 6）

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1)..(1)

<223> 具有保护基 Boc 和 tBu 的 Ser

<220>

<221>CARBOHYD

<222>(2)..(2)

<223> 被 N-乙酰基半乳糖胺糖基化的 Thr

<220>

<221>MOD_RES

<222>(7)..(7)

<223> 具有保护基 Trt 的 His

<220>

<221>MOD_RES

<222>(10)..(10)

<223> 具有保护基 tBu 的 Thr

<220>

<221>MOD_RES

<222>(11)..(11)

<223> 具有保护基 tBu 的 Ser

<220>

<221>MOD_RES

<222>(14)..(14)

<223> 具有保护基 OtBu 的 Asp

<220>

<221>MOD_RES

<222>(15)..(15)

<223> 具有保护基 tBu 的 Thr

<220>

<221>MOD_RES

<222>(16)..(16)

<223> 具有保护基 Pbf 的 Arg

<400>27

Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg

1

5

10

15

Pro Ala Pro Gly

20

<210>28

<211>20

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 加成了糖链的、具有苄基硫代酯基的氨基酸序列（实施例 6）

<220>

<221>CARBOHYD

<222>(2)..(2)

<223> 被 N- 乙酰基半乳糖胺糖基化的 Thr

<220>

<221>MOD_RES

<222>(20)..(20)

<223> 具有苄基硫代酯基的 Gly

<400>28

Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg
1				5					10					15	
Pro	Ala	Pro	Gly												
				20											

<210>29

<211>20

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 加成了糖链的氨基酸序列（实施例 6）

<220>

<221>CARBOHYD

<222>(2)..(2)

<223> 被 N- 乙酰基半乳糖胺糖基化的 Thr

<400>29

Cys	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

<400>32

Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg
 1 5 10 15
 Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala
 20 25 30
 Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly
 35 40

<210>33

<211>4

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有保护基的氨基酸序列 (实施例 7)

<220>

<221>MOD_RES

<222>(1).. (1)

<223> 具有保护基 Boc 和 OtBu 的 Glu

<220>

<221>MOD_RES

<222>(2).. (2)

<223> 具有保护基 tBu 的 Ser

<400>33

Glu Ser Asn Gly
 1

<210>34

<211>4

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有苄基硫代酯基的氨基酸序列（实施例 7）

<220>

<221>MOD_RES

<222>(4)..(4)

<223> 具有苄基硫代酯基的 Gly

<400>34

Glu Ser Asn Gly

1

<210>35

<211>4

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有苏氨酸衍生物和保护基的氨基酸序列（实施例 7）

<220>

<221>MUTAGEN

<222>(1)..(1)

<223> 具有 S-SsecBu 基代替羟基和保护基 Boc 的 Thr 衍生物

<220>

<221>MOD_RES

<222>(3)..(3)

<223> 具有保护基 tBu 的 Thr

<400>35

Xaa Leu Thr Leu

1

<210>36

<211>4

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有苏氨酸衍生物的氨基酸序列 (实施例 7)

<220>

<221>MUTAGEN

<222>(1).. (1)

<223> 具有 S-SsecBu 基代替羟基的 Thr 衍生物

<400>36

Xaa Leu Thr Leu

1

<210>37

<211>8

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有苏氨酸衍生物的氨基酸序列 (实施例 7)

<220>

<221>MUTAGEN

<222>(5).. (5)

<223> 具有硫羟基代替羟基的 Thr 衍生物

<400>37

Glu Ser Asn Gly Xaa Leu Thr Leu

1

5

<210>38

<211>8

<212>PRT

<213> 人工序列

