

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7621270号

(P7621270)

(45)発行日 令和7年1月24日(2025.1.24)

(24)登録日 令和7年1月16日(2025.1.16)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 H 5/10 (2006.01)

C 0 7 H 5/10

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

B

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

H

A 6 1 P 35/00

請求項の数 8 (全62頁)

(21)出願番号 特願2021-558537(P2021-558537)

(73)特許権者 317010417

(86)(22)出願日 令和2年3月10日(2020.3.10)

アカデミア シニカ

(65)公表番号 特表2022-529408(P2022-529408
A)

台湾 タイペイ ナンカン アカデミア

ロード セクション 2 1 2 8 オフィス

オブ パブリック アフェアーズ (テク

ノロジー トランスファー) (05)

(43)公表日 令和4年6月22日(2022.6.22)

(86)国際出願番号 PCT/US2020/014608

(87)国際公開番号 WO2020/205034

(74)代理人 100114775

(87)国際公開日 令和2年10月8日(2020.10.8)

弁理士 高岡 亮一

審査請求日 令和5年2月8日(2023.2.8)

(74)代理人 100121511

(31)優先権主張番号 62/829,736

弁理士 小田 直

(32)優先日 平成31年4月5日(2019.4.5)

(74)代理人 100202751

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100208580

弁理士 三好 玲奈

(74)代理人 100191086

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 シアリダーゼ耐性糖およびその調製および使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

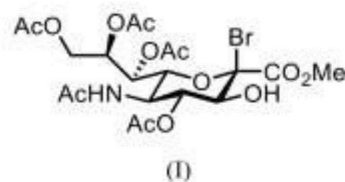
3-ヒドロキシシアル酸を糖と反応させることによりグリコシル化反応を行ってα2, 6-結合型3-ヒドロキシシアロシドを形成する工程、および

前記α2, 6-結合型3-ヒドロキシシアロシドをフッ素化剤と反応させることによりフッ素化反応を行って3-フルオロシアル酸を含む糖を形成する工程

を含む、3-フルオロシアル酸を含む糖を調製する方法であって、

前記3-ヒドロキシシアル酸は、式(I)の化合物：

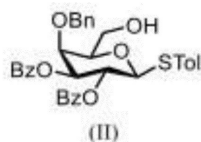
【化1】



であり、

前記糖は、式(II)の化合物：

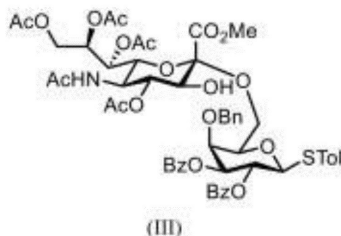
【化 2】



であり、

前記 α 2, 6-結合型 3-ヒドロキシ-シアロシドは、式 (III) の化合物：

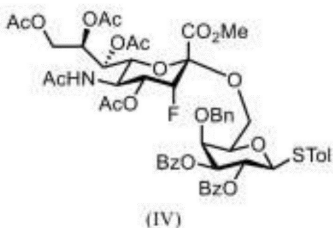
【化 3】



であり、

前記 3-フルオロ-シアル酸を含む糖は、式 (IV) の化合物：

【化 4】



である、3-フルオロ-シアル酸を含む糖を調製する方法。

【請求項 2】

前記フッ素化剤はペルフルオロ-1-ブタンスルホニルフルオリド (NfF) であり、前記フッ素化反応は触媒の存在下で行い、前記触媒は 1, 8-ジアザビシクロ [5, 4, 0] -ウンデカ-7-エン (DBU) であり、前記フッ素化反応は、トルエン中で行い、前記フッ素化反応はさらにジフルオロトリメチルケイ酸トリス (ジメチルアミノ) スルホニウム (TASF) の存在下で行う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記フッ素化剤は NfF であり、前記グリコシル化反応は AgOTf および Na_2HPO_4 の存在下で行い、前記フッ素化反応は触媒の存在下で行う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記触媒は DBU であり、前記グリコシル化およびフッ素化反応はそれぞれトルエン中で行い、

前記フッ素化反応はさらに TASF の存在下で行う、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 3-フルオロ-シアル酸を含む糖を第 2 の糖と反応させることにより別のグリコシル化反応を行う工程をさらに含み、

前記フッ素化剤は NfF であり、前記グリコシル化反応は AgOTf および Na_2HPO_4 の存在下で行い、前記フッ素化反応は触媒の存在下で行い、

前記触媒は DBU であり、前記グリコシル化およびフッ素化反応はそれぞれトルエン中に行い、

前記フッ素化反応は、任意で、さらに TASF の存在下で行う、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

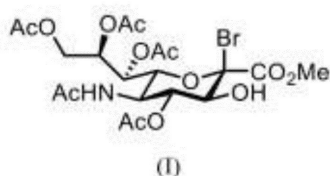
モノクローナル抗体を 3-フルオロ-シアル酸を含む糖でグリコシル化する工程を含む、3-フルオロ-シアル酸を含む糖に結合された均質な抗体を調製する方法であって、前記 3-フルオロ-シアル酸を含む糖は、

3-ヒドロキシ-シアル酸を糖と反応させることによりグリコシル化反応を行って α 2, 6-結合型 3-ヒドロキシ-シアロシドを形成する工程、および

前記 α 2, 6-結合型 3-ヒドロキシ-シアロシドをフッ素化剤と反応させることによりフッ素化反応を行って 3-フルオロ-シアル酸を含む糖を形成する工程によって得られ、

前記 3-ヒドロキシ-シアル酸は、式 (I) の化合物：

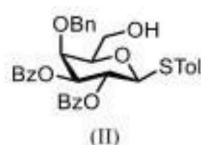
【化 5】



であり、

前記糖は、式 (II) の化合物：

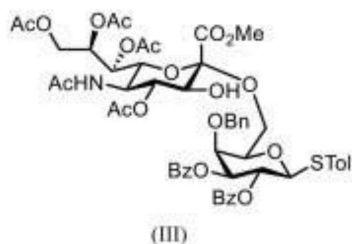
【化 6】



であり、

前記 α 2, 6-結合型 3-ヒドロキシ-シアロシドは、式 (III) の化合物：

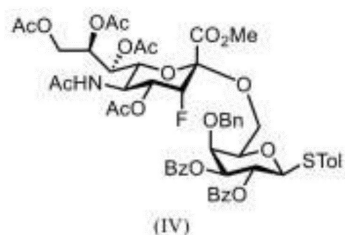
【化 7】



であり、

前記 3-フルオロ-シアル酸を含む糖は、式 (IV) の化合物：

【化 8】



である、3-フルオロ-シアル酸を含む糖に結合された均質な抗体を調製する方法。

【請求項 7】

前記フッ素化剤は N f F であり、前記グリコシル化反応は A g O T f および N a₂H P

10

20

30

40

50

O₄の存在下で行い、前記フッ素化反応は触媒の存在下で行い、前記触媒はDBUであり、前記グリコシル化およびフッ素化反応はそれぞれトルエン中で行う、

請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記フッ素化反応後に、前記3-フルオロ-シアル酸を含む糖を第2の糖と反応させることにより別のグリコシル化反応を行う工程をさらに含む、請求項7に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

シアル酸は、糖脂質および糖タンパク質上のグリカンの最外端に示されることが多い負に帯電した単糖であり、細胞、ウイルスおよび細菌上の他の生体分子および受容体との相互作用を含む多くの生理的な細胞内および細胞間プロセスに関与している¹。またシアル化は、分泌型糖タンパク質および膜結合受容体の機能および運命を調節するのに重要な役割を担う。例えば上皮増殖因子受容体（EGFR）のシアル化はEGFR二量体化を阻害し、このようにしてEGF結合およびリン酸化を妨害することが分かっており、これは腫瘍発生に関連づけられている²。またN-グリカンの脱シアル化は基礎をなすガラクトースを露出し、これが肝臓のアシアロ糖タンパク質受容体によって認識され、それにより循環からの糖タンパク質の急速な除去が生じるため、シアル化は血液循環中の糖タンパク質の半減期を調整する³。故にシアル化の程度の増加は、糖タンパク質治療薬の半減期および望ましくない効果を高める可能性がある。

【0002】

最近ではタンパク質構造および機能に対するグリコシル化の役割が集中的に研究されており、タンパク質、特に治療用モノクローナル抗体（mAbs）のグリカンsynthesisicampillaryおよび糖鎖工学のための新しい方法の開発を奨励している⁵。例えば末端の α -2, 6-結合型シアル酸を有する脱フコシル化二分岐N-グリカンは、抗体依存性細胞傷害（ADCC）、補体依存性細胞障害（CDC）および抗炎症活性の増強にとって最適なグリカン構造を有することが分かっている⁶。

【0003】

C-3位にフッ素を有するシアル酸誘導体は、シアリルトランスフェラーゼおよびシアリダーゼ（またはノイラミニダーゼ）を阻害し、かつより安定であることが知られている⁷。しかしドナーとしてのフッ化糖によるグリコシル化は、グリコシル化反応を不活性化させるフッ素基の強力な電子効果により大きな課題をもたらすことが多い。対応するシチジン-リン酸-シアル酸から3-フルオロ-シアル酸残基を転移させて α -2, 3-結合型シアロシドを形成することができるシアリルトランスフェラーゼは存在するが、利用可能な対応する α -2, 6-シアリルトランスフェラーゼは存在しない¹¹。

【0004】

従って、糖タンパク質治療薬を開発するために使用することができる α -2, 6-結合型3-フルオロ-シアロシド（ α -2,6-linked 3-fluoro-sialosides）を含む糖を確実に調製するための方法を提供することが必要とされている。

【発明の概要】

【0005】

本発明の態様は、3-フルオロ-シアル酸を含む糖を調製する方法である。本方法は、3-ヒドロキシ-シアル酸を糖と反応させることによりグリコシル化反応を行って α 2, 6-結合型3-ヒドロキシ-シアロシドを形成する工程、および α 2, 6-結合型3-ヒドロキシ-シアロシドをフッ素化剤と反応させることによりフッ素化反応を行って3-フルオロ-シアル酸を含む糖を形成する工程を含む。

【0006】

本発明の別の態様は、3-フルオロ-シアル酸を含む糖に結合された均質な抗体を調製する方法である。本方法は、モノクローナル抗体を糖でグリコシル化することにより行う。

10

20

30

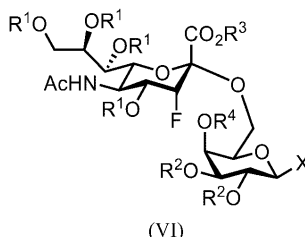
40

50

【0007】

本発明のさらなる態様は、式（VI）の化合物：

【化1】



10

（式中、 R^1 はAcまたはHであり、 R^2 はBzまたはHであり、 R^3 はメチルまたはHであり、 R^4 はBnまたはHであり、かつXはOH、脱離基または糖である）に関する。なお、「Ac」はアセチルを表し、「Bz」はベンジルを表し、「Bn」はベンジルを表し、糖は単糖、二糖またはオリゴ糖であってもよい。

【0008】

$\alpha 2, 6$ -結合型3-フルオロ-シアロシド末端N-グリカンに結合されたモノクローナル抗体も本発明の範囲内である。

【0009】

さらに癌を治療する方法が本発明によって包含される。本方法は、有効量の $\alpha 2, 6$ -結合型3-フルオロ-シアロシド末端N-グリカンに結合されたモノクローナル抗体をそれを必要とする対象に投与する工程を含む。

20

【0010】

本発明の詳細は、以下の発明を実施するための形態に記載されている。本発明の他の特徴、目的および利点は、いくつかの実施形態の以下の詳細な説明および添付の特許請求の範囲からも明らかになるであろう。

【0011】

以下の説明は添付の図面を参照する。

【図面の簡単な説明】

30

【0012】

【図1】図1Aは酵素濃度の関数として3種類のシアロシド、すなわち1、2およびS27の酵素触媒加水分解を示す2つのグラフを示し、図1Bは2、S27または2-デオキシ-2, 3-ジデヒドロ-N-アセチルノイラミン酸（DANA）（シアリダーゼ阻害剤）の濃度の関数としてシアリダーゼ阻害を示す2つのグラフを示す。

【図2】4種類のN-グリカン：（1）リツキサン-G、（2）リツキサン- F^{ax} -SCT、（3）リツキサン-SCTおよび（4）市販のリツキサンの染色された電気泳動ゲルである。

【図3】3種類のN-グリカン、すなわちリツキサン- F^{ax} -SCT、リツキサン-SCTおよびリツキサンについて得られた質量スペクトルを示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0013】

本明細書に最初に詳細に開示されているのは、3-フルオロ-シアル酸を含む糖を調製する方法である。

【0014】

繰り返すが、本方法は、3-ヒドロキシ-シアル酸を糖と反応させることによりグリコシル化反応を行って $\alpha 2, 6$ -結合型3-ヒドロキシ-シアロシドを形成する工程、および $\alpha 2, 6$ -結合型3-ヒドロキシ-シアロシドをフッ素化剤と反応させることによりフッ素化反応を行って3-フルオロ-シアル酸を含む糖を形成する工程を含む。糖は単糖、二糖またはオリゴ糖であってもよい。例示的な方法では、糖は単糖である。

50

【0015】

本方法の特定の実施形態では、3-ヒドロキシシアル酸は2-ブロモ-3-ヒドロキシシアル酸であり、グリコシル化反応はトリフルオロメタンスルホン酸銀 (AgOTf) およびリン酸水素二ナトリウム (Na₂HPO₄) の存在下で行う。好ましくは、グリコシル化反応はトルエン中で行う。

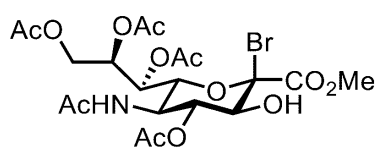
【0016】

本方法の他の実施形態では、フッ素化剤はペルフルオロ-1-ブタンスルホニルフルオリド (NfF) であり、フッ素化反応は触媒の存在下で行う。例えば触媒は、1,8-ジアザビシクロ[5,4,0]-ウンデカ-7-エン (DBU) である。好ましくは、フッ素化反応はトルエン中で行う。なお、この反応はさらにジフルオロトリメチルケイ酸トリス (ジメチルアミノ) スルホニウム (TASF) の存在下で行うことができる。

【0017】

例示的な方法では、3-ヒドロキシシアル酸は、式 (I) の化合物：

【化2】

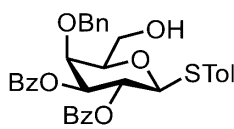


(I)

であり、

糖は、式 (II) の化合物：

【化3】

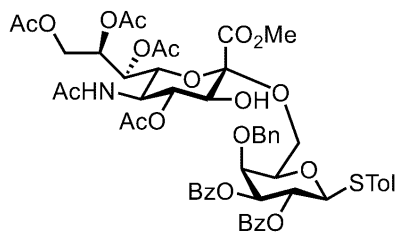


(II)

であり、

α2,6-結合型3-ヒドロキシシアロシドは、式 (III) の化合物：

【化4】



(III)

であり、かつ

3-フルオロシアル酸を含む糖は、式 (IV) の化合物：

10

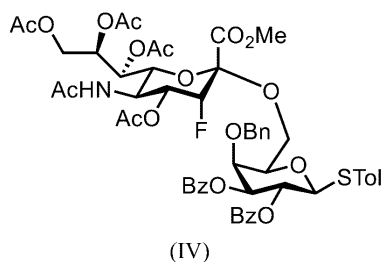
20

30

40

50

【化 5】



である。

【0018】

さらなる実施形態では、本方法は、3-フルオロシアル酸を含む糖を第2の糖と反応させることにより別のグリコシル化反応を行う工程をさらに含む。

【0019】

3-フルオロシアル酸を含む糖に結合された均質な抗体を調製する方法も本発明の範囲内である。この場合も、本方法はモノクローナル抗体を3-フルオロシアル酸を含む糖でグリコシル化する工程を含む。

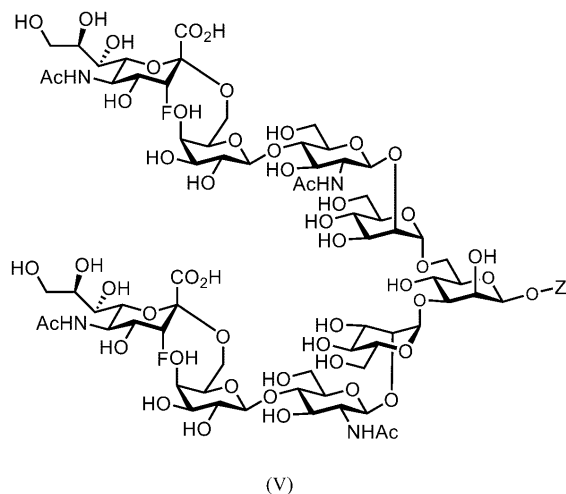
【0020】

本方法の特定の実施形態では、3-フルオロシアル酸を含む糖は、3-ヒドロキシシアル酸を糖と反応させることによりグリコシル化反応を行って α 2, 6-結合型3-ヒドロキシシアロシドを形成する工程、および α 2, 6-結合型3-ヒドロキシシアロシドをフッ素化剤と反応させることによりフッ素化反応を行って3-フルオロシアル酸を含む糖を形成する工程を含む上記方法およびその実施形態によって得られる。

【0021】

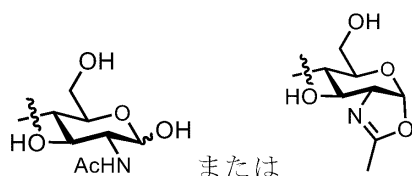
他の実施形態では、3-フルオロシアル酸を含む糖は、 α 2, 6-結合型3-フルオロシアロシド末端N-グリカンであり、これは式(V)の化合物：

【化 6】



であってもよく、
式中、Zは、

【化 7】



10

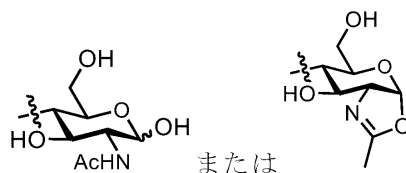
20

30

40

50

【化 1 1】



である。

【0025】

本発明は、3-フルオロシアル酸を含む糖に結合されたモノクローナル抗体も包含し、3-フルオロシアル酸を含む糖は α 2, 6-結合型3-フルオロシアロシド末端N-グリカンである。好ましくは α 2, 6-結合型3-フルオロシアロシド末端N-グリカンは、上に示されている式(V)の化合物である。

【0026】

癌または自己免疫疾患を治療する方法が本発明によってさらに包含され、これは有効量の上記モノクローナル抗体をそれを必要とする対象に投与することを含む。例えば、癌は白血病またはリンパ腫であってもよく、自己免疫疾患は関節リウマチ、自己免疫性溶血性貧血、赤芽球癆、血栓性血小板減少性紫斑病、特発性血小板減少性紫斑病白血病、リンパ腫、エバンス症候群、脈管炎、水疱性皮膚症、1型糖尿病、シェーグレン症候群、抗NMDA受容体脳炎、デビック病、グレーブス眼症、自己免疫性膵炎、オプソクロノス・ミオクロノス症候群またはIgG4関連疾患であってもよい。

【0027】

「治療する」または「治療」という用語は本明細書では、治療もしくは予防効果を与えるという目的で、上記疾患すなわち癌、そのような疾患の症状またはそのような疾患に対する素因を有する対象に上記医薬組成物を投与することを指す。「有効量」という用語は、そのような効果を与えるために必要な活性薬物の量を指す。有効な用量は当業者によって認識されるように、治療される疾患の種類、投与経路、賦形剤の使用および他の治療処置と同時使用する可能性に応じて異なる。

【0028】

本発明の特定の具体的な態様のより詳細な説明を以下に提供する。

【0029】

3-フルオロ置換されたシアル酸誘導体は、非フッ素化シアル酸誘導体と比較してシアリダーゼに対してより安定であることが知られている⁷。フッ素原子をアノマーのC-3位に導入することにより、2, 3-ジフルオロシアル酸(DFSA)を開発し(スキーム1)⁸、生化学的プローブ⁹およびシアリダーゼを研究するための活性系タンパク質プロファイリングプローブ¹⁰として使用した。DFSAの助けを借りて、C-3において軸方向位置にあるフッ素原子($3F^{ax}$)が、 $3F^{eq}$ 誘導体よりも酵素の脱活性化(k_i)および再活性化(k_{hydr})の両方の減速に対してより大きい効果を有することが分かった^{8b}。この観察に触発されて、本発明者らは糖タンパク質治療薬におけるそれらの潜在的な使用のために3-フルオロシアル酸を用いてシアロシドの安定性を調査することを望んだ。具体的には本発明者らは、mAb上のN-グリカンの末端に $3F^{ax}$ -Neu5Acモチーフを組み込むことによりシアリダーゼに対するその安定性を高め、かつそのエフェクター機能を維持することができるかを研究する意図である。

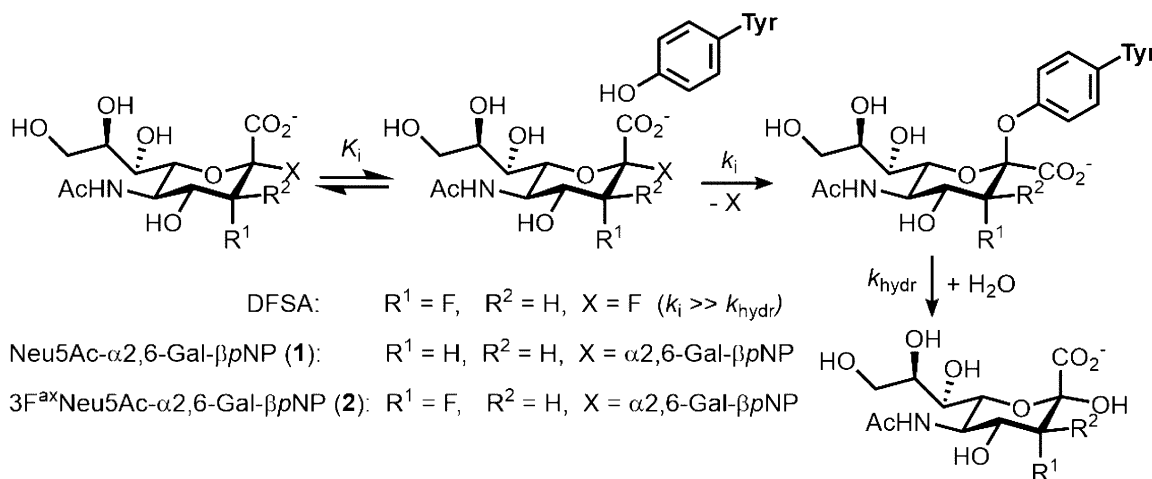
【0030】

本発明者らの目標に向かって、本発明者らは二分岐N-グリカンを含む α 2, 6-結合型 $3F^{ax}$ -Neu5Acオリゴ糖の合成のための分取方法を開発した。本発明者らは、合成の $3F^{ax}$ -Neu5Ac- α 2, 6-Gal結合はシアリダーゼの存在下でより安定であり、かつ対応する二分岐グリカンを有する抗体は非フッ素化対応物と同じ結合親和力を有することも証明した。

【0031】

(a) $\text{XeF}_2 - \text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$ ¹²、分子状フッ素¹³および *Selectfluor* による保護されたグリカンのフッ素化^{7c}、(b) シアル酸誘導体における C3 でのエクタリアルヒドロキシル基の反転^{7f}、および (c) *ManNAc* および 3-フルオロ-ピルビン酸の $3\text{F}^{\text{eq}}\text{Neu5Ac}$ および $3\text{F}^{\text{ax}}\text{Neu5Ac}$ へのアルドラーゼ触媒酵素変換^{7a}、^{11a}、¹⁴を含む、 $3\text{F}-\text{Neu5Ac}$ の合成のためのいくつかの方法が報告された。しかし本発明者らの知る限りでは、 $3\text{F}^{\text{ax}}-\text{Neu5Ac}$ 末端 N-グリカンの合成について記載している方法はこれまで存在しない。 $3\text{F}^{\text{ax}}-\text{Neu5Ac}$ を含む二糖の調製を開示している唯一の説明は $3-\text{F}^{\text{ax}}\text{Neu5Ac}-\alpha 2, 3-\text{Lac}$ の酵素合成に限られており、必要とされている $\alpha 2, 6$ -結合型のものではない^{11a}。従って本発明者らは、本発明者らの努力をこの結合の化学合成に焦点を当てた¹⁵。

【化 12】

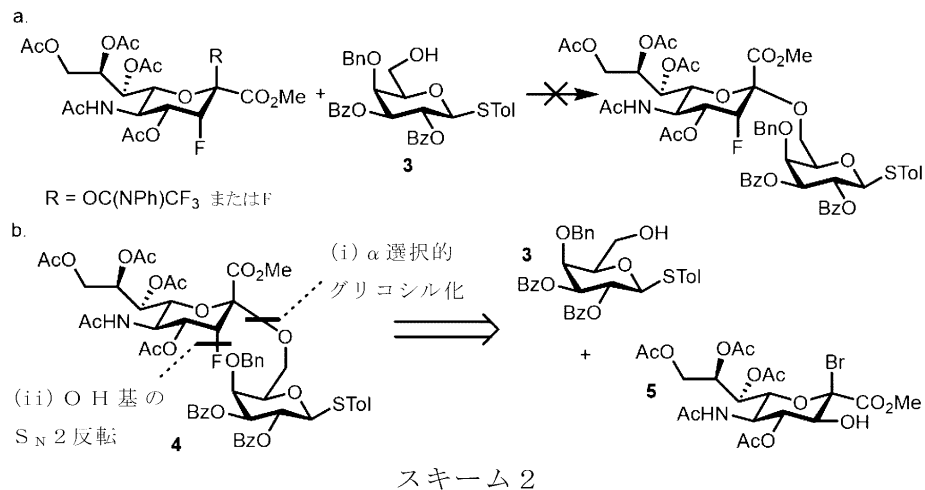


スキーム 1

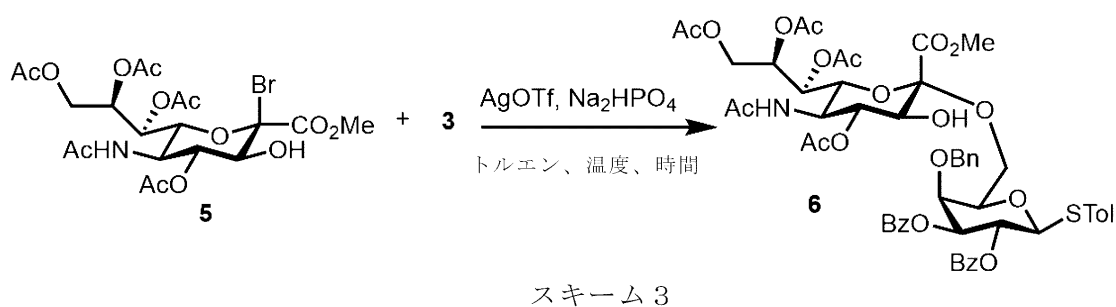
【0032】

$3\text{F}^{\text{ax}}-\text{Neu5Ac}$ 系のドナーを用いた様々なグリコシル化条件のスクリーニング後に (スキーム 2 a)、本発明者らは、 $3\text{OH}-\text{Neu5Ac}-\alpha 2, 6-\text{Gal}-\text{STol}$ における 3OH^{eq} の 3F^{ax} への $\text{S}_{\text{N}}2$ 反応を包含する他の戦略を調査した (スキーム 2 b)。最初に本発明者らは、Gotoらによって報告されている条件を用いて O-6 におけるシアル化を調べた (表 1、項目 1)¹⁶。この反応はトルエン中で 1 当量の促進剤としての *AgOTf* およびベースとして Na_2HPO_4 を用いて -10°C で行った (スキーム 3)。これらの条件により 3 : 1 (α : β) のアノマー比で二糖 6 が低い収率 (15%) で得られた。溶媒を CH_2Cl_2 に変えてもジアステレオ選択性は向上しなかった (項目 2)。温度および反応時間を増加させることにより、その収率は上昇したが、選択性は劇的に低下した (項目 3~5)。驚くべきことに、より多くの当量のアクセプターを使用するほど、より良好な立体選択性が観察された (項目 3 対 6)。最適化された条件 (項目 7) により優れた α 選択性 (α : β = 13 : 1) で 6 が 35% (99% *brsm*) の収率で得られた。

【化 1 3】



10



20

【表 1】

グリコシル化工程の最適化

項目	5/3/AgOTf/Na ₂ HPO ₄ (当量)	温度 (°C)	時間 (時間)	α : β ^a	収率 ^b (%) (b r s m) ^c
1	1/1.1/1/4.6	-10	0.5	3.1:1	15 ^d
2 ^e	1.1/1/1.1/--	-78~-20	3	2.7:1	21 ^d
3	0.8/1/1.6/4.5	-50	16	5.2:1	46 (94)
4	0.7/1/1.5/4.2	-50~-35	16	3.8:1	53 (99)
5	0.7/1/1.5/4.2	-50~-15	16	1.8:1	72 (99)
6	1/1.25/1.5/4.2	-50	16	16:1	28
7	1/1/1.5/4.2	-50	16	13:1	35 (99)
8 ^f	1/1/1.5/--	-50	16	11:1	33 (99)
9 ^g	1/1/1.5/4.2	-50	24	13:1	35 (99)

^a ¹H NMRにより決定。^b 単離された生成物の収率。^c 回収された出発物質（アクセプター）に基づく収率（b r s m）。^d ドナーおよびアクセプターは完全に消費されなかった。
^e 4 ÅのMSを含むCH₂Cl₂を使用。^f 4 ÅのMSを含む。^g グラムスケール。

30

40

【0 0 3 3】

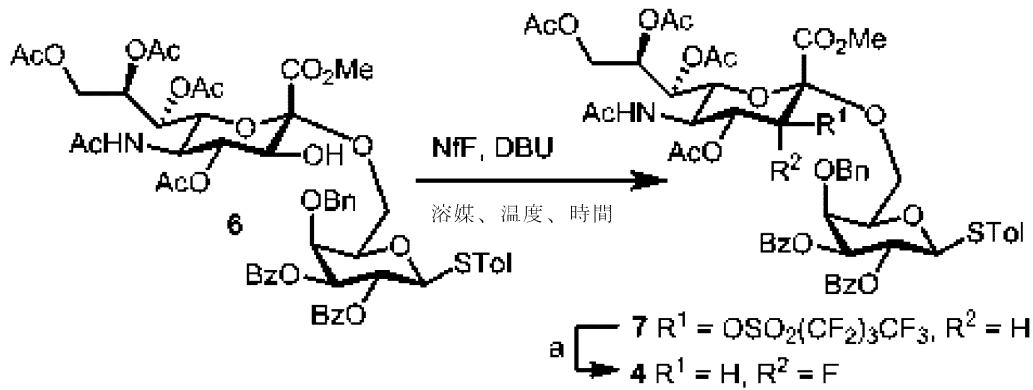
OH^eqのF^axへの反転は困難な作業であることが分かった。TASFを用いたOTfおよびOMsのフッ素での置換により出発物質の分解が生じた。この変換を最適化するために、本発明者らは様々なフッ素化試薬をスクリーニングしたが全く成功しなかった。しかし、6を無水トルエン中の1, 8-ジアザビシクロ[5, 4, 0]-ウンデカ-7-エン(DBU)の存在下でペルフルオロ-1-ブタンスルホニルフルオリド(NfF)により90°Cで2日間処理することにより(スキーム3)、4が6%の収率で得られた(表2、項目1)¹⁷。反応温度の低下(項目1、5および6)および反応時間の増加(項目7)などの反応条件のさらなる最適化により4の全収率が向上した。7から4への変換はC

50

－ 3 の周りでの立体障害が原因で律速段階であるように思われる。多くの場合に、本発明者らは 1 日以内に室温および N f F および D B U の存在下で形成された 7 を単離することができた。しかし、7 から 4 への変換（77% b r s m の収率）は長い反応時間を必要とする。反応温度を上げることでよりその変換を向上させる試みにより、7 の分解が生じた。従って本発明者らの最良の結果は、試薬の量の増加および反応時間の 15 日間への延長により得られた（項目 8）。最後に本発明者らは、T A S F の添加により反応効率を高め、それにより反応時間をたった 2 日に短縮させるのに役立つことを見出した（項目 9）。完全に保護された 3 F^{a x}－N e u 5 A c－α 2, 6－G a l－S T o l 二糖（4）の立体化学を X 線回折分析により確認した。

【化 1 4】

10



20

スキーム 4

【表 2】

フッ素化工程の最適化

項目	N f F / D B U (当量)	溶媒	温度 (°C)	時間 (日)	収率 ^b (%) 4 : 7
1	6/6	T H F	25~90	2	4
2	6/6	C H ₃ C N	25~90	2	2
3	6/6	トルエン	25~90	2	6
4	4/4	D M F	40	9	— ^c
5	4/4	トルエン	50	6	8:71
6	4/4	トルエン	40	7	30:52
7	4/4	トルエン	40	17	36:44
8 ^d	8/8	トルエン	40	15	63:15
9 ^e	8/8	トルエン	40	2	60:8

30

^a 試薬および条件：(a) N f F、D B U、トルエン、40 °C、15 日間、49% (77% b r s m)。^b 単離された生成物の収率。^c 観察された生成物なし。^d N f F (4 当量/日) および D B U (4 当量/日) の数回に分けた添加、その後の 14 日間の撹拌。^e N f F (4 当量/日)、D B U (4 当量/日) およびジフルオロトリメチルケイ酸トリス（ジメチルアミノ）スルホニウム（T A S F）(2 当量/日) の数回に分けた添加。

40

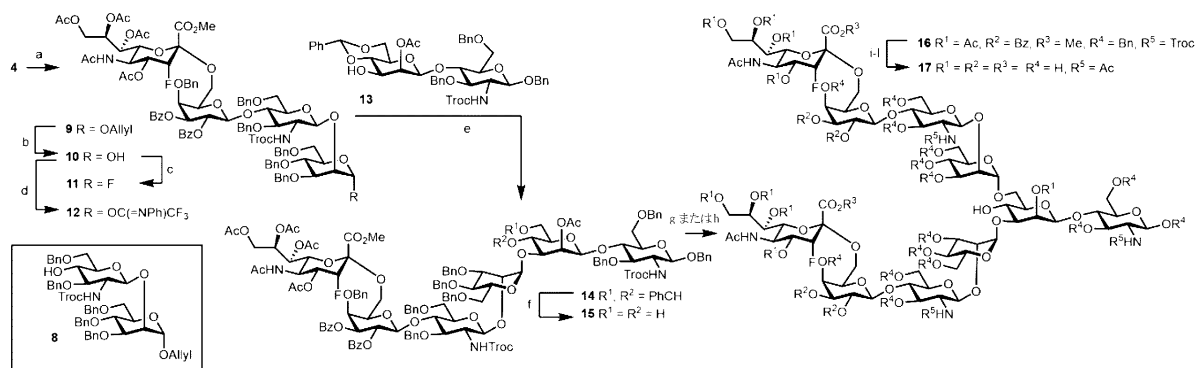
【0034】

スキーム 5 を参照すると、N I S / T M S O T f を用いて 3 F^{a x}－N e u 5 A c－二糖ドナー 4 をアクセプター (8) に結合させて 9 を得た。次にアノマー位置にある O－a l l y l 基を A c O H / N a O A c 中の P d C l₂ による異性化によって除去し、アノマーのヒドロキシル基 (10) をさらにフルオリド (11) およびイミデート (12) に変換した。C p₂ H f C l₂ / A g O T f 条件を用いた 3 F^{a x}－N e u 5 A c 末端フルオリドドナー (11) による O－3 におけるコア二糖 (13) のグリコシル化によりヘキサ糖 14 を 85% の収率で得た。ベンジリデン基の除去後に、15 を O－6 位においてグリコ

50

シル化して、優れた位置選択性および α 立体選択性により所望の十糖（16）を70%の収率で得た。本発明者らは、N-フェニルトリフルオロアセトイミデートドナー（12）を用いたTfOH促進グリコシル化も試験したが、これにより不十分な収率の生成物が得られた。次に、以下の一連の工程：（a）エステルおよびNHTrOc基を除去するためのLiOHによる鹸化、（b）遊離アミンおよびアルコールのアセチル化、（c）ナトリウムメトキシドによるOAc基の除去、および（d）MeOH/水/HCO₂H混合物中のPd/CによるO-ベンジル基の水素化分解^{4b}に従って、完全に脱保護されたグリカン（17）を40%の全収率で得た。

【化15】



スキーム5

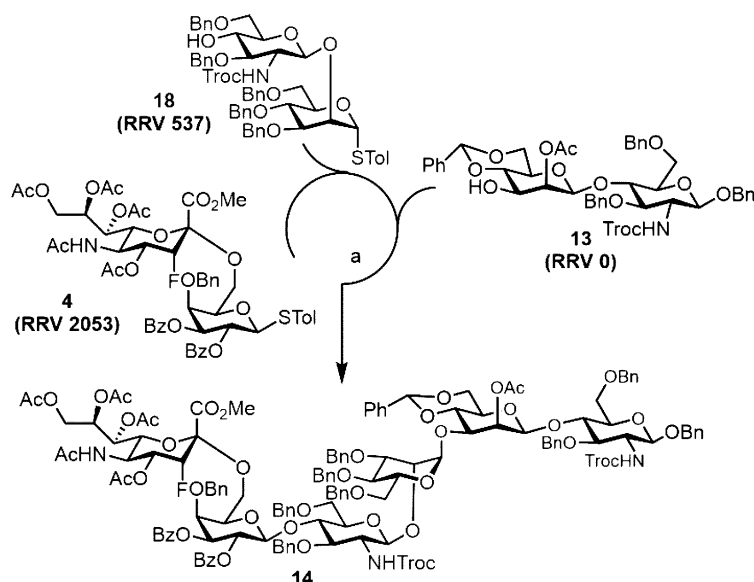
【0035】

スキーム5における試薬および条件：（a）8、TfOH、NIS、4ÅのMS、CH₂Cl₂、-40℃、2時間、64%。（b）PdCl₂、CH₃COONa、AcOH/H₂O、82%。（c）DAST、CH₂Cl₂、-20℃、73%。（d）CLC(=NPh)CF₃、Cs₂CO₃、CH₂Cl₂、0℃～室温、3時間、56%。（e）11、AgOTf、Cp₂HfCl₂、トルエン、4ÅのMS、0℃、3時間、85%。（f）pTSA・H₂O、CH₃CN、室温、6時間、75%。（g）11、AgOTf、Cp₂HfCl₂、トルエン、4ÅのMS、-15℃、3時間、70%（80%brsm）。（h）12、TfOH、CH₂Cl₂、4ÅのMS、-60～-20℃、3時間、33%（55%brsm）。（i）LiOH、ジオキサン/H₂O（4：1）、90℃、16時間。（j）Ac₂O、Py、16時間。（k）NaOMe、MeOH、16時間。（l）Pd(OH)₂、MeOH/H₂O/HCOOH（6：3：1）、H₂、16時間、40%（4段階）。

【0036】

段階的合成のためのプロトコルを確立した後、本発明者らは、17の前駆体であるヘキサ糖（14）のプログラム可能な[2+2+2]ワンポット合成を開発することによりグリカンの組み立てを合理化した（スキーム6）。設計したワンポットプロトコルは、-40℃での3F^{ax}-Neu5Ac-二糖ドナー（4）（RRV=2053）と反応性のより低いアクセプター（18）（RRV=537）との最初の結合、その後の-20℃での還元末端アクセプター13の注入で構成されていた。-10℃および標準的な精製プロトコルで1時間後、ヘキサ糖14を26%の収率で単離した。

【化 16】



スキーム 6

【0037】

スキーム 6 における試薬および条件：(a) TfOH 、NIS、4 Å の MS、 CH_2Cl_2 、 $-40^\circ\text{C} \sim -10^\circ\text{C}$ 、3 時間、26%。

【0038】

シアリダーゼの存在下で $3\text{Fax-Neu5Ac-}\alpha 2, 6\text{-Gal}$ モチーフの安定性に関する予備データを収集するために、本発明者らはウェルシュ菌およびコレラ菌由来の市販されているシアリダーゼを用いるインビトロアッセイ¹⁹のために、(1) $\text{Neu5Ac-}\alpha 2, 6\text{-Gal-pNP}$ および (2) 3Fax-Neu5Ac 類似体を基質として調製した (スキーム 1)。どちらの酵素も未変性の基質 1 に対して期待された加水分解活性を示したが、 3Fax- 類似体 2 に対しては不活性であった (図 1A を参照)。本発明者らは、2 が DANA のように 1 の加水分解を有意に阻害しないことも観察した (図 1B を参照)。

【0039】

mAb の均質なグリコフォームを調製するために、標準的なプロトコル⁶に従って化合物 17 をオキサゾリンドナーに変換し、かつ Endo S2 (D184Q) の存在下で GlcNAc により修飾された IgG (コアフコースを含まない) に連結させた。均質な 3Fax-Neu5Ac グリコフォームの $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ への結合親和力を、親の非フッ素化グリコフォーム (G2S2) およびリツキシマブの市販試料 (主要なグリコフォーム: G1F1 、 G0F1 、 G2F1) と共に、表面プラズモン共鳴分析⁶により測定した。リツキシマブの市販試料と比較した場合、 $\alpha 2, 6$ -シアル化を含み、かつコアフコースを含まない二分岐 N-グリカンを含む IgG の均質なグリコフォームは、結合親和力における 39.9 倍 (Neu5Ac-G2S2) および 37.4 倍 (3Fax-Neu5Ac-G2S2) の向上を示した (表 4 を参照)。 3Fax-Neu5Ac 修飾されたグリコフォームの結合親和力は親のグリカンと同じ範囲内であることが分かったという事実は、 3Fax-Neu5Ac グリコシル化 mAb のインビボ研究のための前提を与える。これらの結果はそのうち報告されるであろう。

【0040】

結論として本発明者らは、シアリダーゼ耐性オリゴ糖および 3Fax-Neu5Ac 末端二分岐 N-グリカンを含む代表的な均質な抗体の合成のためのビルディングブロックとして、 $3\text{Fax-Neu5Ac-}\alpha 2, 6\text{-Gal-STol}$ の化学合成を開発した。市販のリツキシマブ試料と比較した場合、 3Fax-Neu5Ac グリカンにより修飾さ

10

20

30

40

50

れた均質なグリコフォームは、FcγRIIIaに結合する際に37.4倍の向上を示した。さらに親の非フッ素化および3F^{ax}-Neu5Ac修飾された抗体グリコフォームは、Fc受容体への同様の結合親和力を示した。全体として本発明者らの結果は、治療用糖タンパク質の半減期の向上のための新しい一般的な戦略を明らかにした。

【0041】

さらなる詳細がなくとも、当業者であれば上記説明に基づいて本発明を最大限に利用することができると考えられる。従って以下の具体例は単に例示であり、何であっても決して本開示の残りを限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書に引用されている全ての文献はそれら全体が参照により組み込まれる。

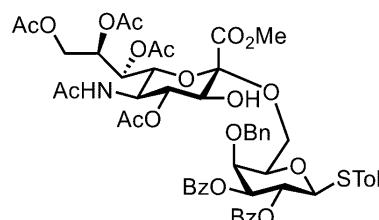
【0042】

実施例1：3-フルオロシアル酸を含む糖および前駆体の合成

特に記載がない限り全ての反応を不活性雰囲気下で行い、その後に標準的なシリンジセプタム技術を行った。溶媒は商業的供給源から購入し、さらに精製することなく使用した。微粉状モレキュラーシーブ4Å (EMD Millipore社)を粉碎して粉末にし、使用前に活性化させた。全ての反応の進行をシリカゲル60 F254 (Merck KGaA社)で予めコーティングしたTLCガラスプレートにより監視した。TLCを紫外線(254nm)、p-アニスアルデヒドおよび/またはセリウムモリブデン酸アンモニウム染色により可視化した。Acrossシリカゲル(粒径0.035~0.070mm、60Å)でカラムクロマトグラフィを行った。¹H、¹³Cおよび¹⁹F NMRスペクトルをBruker AVIII-600、DRX-500、AV-400、DPX-400、AVANCE 500 AVおよびAVANCE 600分光計により25℃で記録し、残留する溶媒ピークを内部標準として用いて化学シフトをδ(ppm)で測定した(δ、¹H NMRではppm:7.24(CHCl₃)、4.80(H₂O)、¹³C NMRでは77(CDCl₃))。結合定数(J)はHzで測定した。データは「化学シフト、多重度(s=一重線、d=二重線、t=三重線、q=四重線、m=多重線、br=幅広)」で表す。エレクトロスプレーイオン化飛行時間(ESI-TOF)リフレクトロン実験ではAgilent LC/MSD TOF質量分析計で高解像度質量スペクトル(HRMS)を記録した。Cu Kα放射線(λ=1.5478)を備えたBruker D8 Platinum-¹³⁵CCD回折計により単結晶X線回折研究を行った。Hitachi HPLC D-7000システムによりHPLC測定を行った。1mL/分の流速で溶媒系EtOAc/ヘキサンを用いて順相ZORBAX RX-SIL、5μm、4.6×250mm(コロイド状シリカ、Agilent Technologies社)を用いてRRV測定値を記録し、254nmで可視化した。

【0043】

【化17】

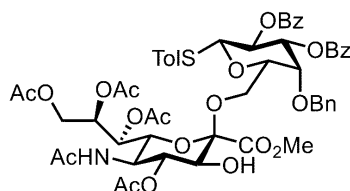


p-トリル[5-アセトアミド-4,7,8,9-テトラ-O-アセチル-5-デオキシ-D-エリスロ-α-L-グルコノナー-2-ウロピラノソン酸メチル]-(2→6)-2,3-ジ-O-ベンゾイル-4-O-ベンジル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド6α。無水トルエン(60mL)中のアクセプター3(1.05g、1.80mmol、1当量)およびドナー5(1.02mg、1.80mmol、1当量)混合物をアルゴン雰囲気下で10分間攪拌した。次いで反応混合物を-50℃に冷却し、乾燥Na₂HPO₄(1.07g、7.54mmol、4.2当量)、その後にAgOTf(692mg、2.69mmol、1.5当量、トルエン18mL中)を攪拌しながら添加した。反

応が完了したら（24時間後にTLCが出発物質の消失を示した）、反応混合物をEtOAc（80mL）で希釈し、20%Na₂S₂O₃水溶液（10mL）、飽和NaHCO₃水溶液（5mL）および塩水（5mL）で洗浄し、次いで有機層をMgSO₄で乾燥し、濾過し、濃縮した。得られた残留物をアセトン／トルエン（3：7）を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、回収されたアクセプター3（670mg、99%brsm）と共に化合物6（ α ： β =13：1）を白色の粉末として得た（680mg、35%）。 α -アノマー6 α ： R_f =0.36（シリカゲル、CHCl₃：MeOH=20：1）；¹H NMR（600MHz，CDCl₃）： δ 7.96–7.94（m，2H，Ar–H），7.91–7.90（m，2H，Ar–H），7.50–7.47（m，2H，Ar–H），7.40–7.39（m，2H，Ar–H），7.37–7.32（m，5H，Ar–H），7.25–7.18（m，4H，Ar–H），7.06–7.04（m，2H，Ar–H），5.81（dd，J=10.2，9.6Hz，1H），5.59（d，J=10.2Hz，1H），5.38（dd，J=9.0，3.0Hz，1H），5.35–5.32（m，1H），5.25（dd，J=10.2，9.6Hz，1H），5.24（d，J=7.8，2.4Hz，1H），4.92（d，J=9.6Hz，1H，C1–H β ），4.71（d，J=12.0Hz，1H），4.60（d，J=12.0Hz，1H），4.49（dd，J=10.8，1.8Hz，1H），4.30（dd，J=12.6，3.0Hz，1H），4.26（ddd，J=10.2，10.2，10.2Hz，1H），4.20（d，J=3.0Hz，1H），4.10（dd，J=10.2，7.2Hz，1H），4.04（dd，J=12.6，6.6Hz，1H），4.00（dd，J=6.6，6.6Hz，1H），3.86（d，J=9.6Hz，1H），3.82–3.73（m，2H），3.75（s，3H，–CH₃），2.30（s，3H，–CH₃），2.09（s，3H，–CH₃），2.07（s，3H，–CH₃），2.06（s，3H，–CH₃），1.96（s，3H，–CH₃），1.89（s，3H，–CH₃）；¹³C NMR（150MHz，CDCl₃）： δ 171.6，170.6，170.3，170.1，169.5，168.5，165.8，165.1，138.0，137.9，133.4，133.1，129.8，129.7，129.6，128.9，128.6，128.4，128.3，128.2，127.7，127.6，100.3，86.6，75.9，74.5，73.7，73.2，73.1，72.5，68.8，68.3，63.1，62.5，52.8，48.4，23.1，21.2，20.9，20.8，20.7，20.7；HRMS（ESI–TOF）m/e：C₅₄H₅₉NO₂₀SNa [M+Na]⁺の計算値：1096.3243／実測値：1096.3241。

【0044】

【化18】

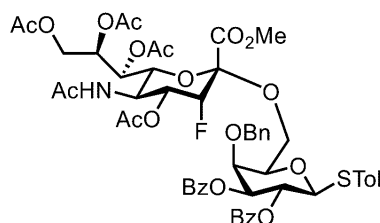


p-トリル[5-アセトアミド-4，7，8，9-テトラ-O-アセチル-5-デオキシ-D-エリスロ-β-L-グルコ-ノナ-2-ウロピラノソン酸メチル]-(2→6)-2，3-ジ-O-ベンゾイル-4-O-ベンジル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド6β。 β -アノマー6 β ： R_f =0.42（シリカゲル、CHCl₃：MeOH=20：1）；¹H NMR（600MHz，CDCl₃）： δ 7.94–7.92（m，4H，Ar–H），7.50–7.47（m，2H，Ar–H），7.43–7.40（m，6H，Ar–H），7.37–7.31（m，5H，Ar–H），7.13–7.12（m，2H，Ar–H），5.81（dd，J=10.2，10.2Hz，1H），5.51（dd，J=10.2，3.0Hz，1H），5.22（ddd，J=6.0，6.0

, 3.0 Hz, 1H), 5.14 (d, $J=13.2$ Hz, 1H), 5.07 (dd, $J=6.0, 2.4$ Hz, 1H), 4.90 (d, $J=10.2$ Hz, 1H, C1-H $_{\beta}$), 4.66–4.62 (m, 2H), 4.55 (dd, $J=12.6, 2.4$ Hz, 1H), 4.29 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 4.14 (dd, $J=7.8, 7.2$ Hz, 1H), 4.08 (ddd, $J=10.8, 10.8, 10.8$ Hz, 1H), 3.98 (dd, $J=12.6, 6.6$ Hz, 1H), 3.92–3.88 (m, 2H), 3.85–3.77 (m, 3H), 3.83 (s, 3H, -CH $_3$), 3.53 (dd, $J=10.8, 2.4$ Hz, 1H), 2.32 (s, 3H, -CH $_3$), 2.26 (s, 3H, -CH $_3$), 2.07 (s, 3H, -CH $_3$), 2.04 (s, 3H, -CH $_3$), 1.97 (s, 3H, -CH $_3$), 1.68 (s, 3H, -CH $_3$); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl $_3$): δ 171.4, 170.6, 170.3, 169.8, 169.8, 166.6, 165.8, 165.2, 139.2, 138.4, 133.5, 133.4, 133.1, 129.9, 129.8, 129.5, 128.9, 128.5, 128.3, 127.2, 126.0, 99.6, 86.9, 76.0, 75.5, 74.3, 73.1, 72.5, 71.7, 70.3, 68.4, 67.2, 62.1, 62.0, 53.3, 47.5, 22.9, 21.5, 21.2, 20.8, 20.7, 20.7; HRMS (ESI-TOF) m/e : C $_{54}$ H $_{59}$ NO $_{20}$ S [M+H] $^{+}$ の計算値: 1074.3424/実測値: 1074.3458.

【0045】

【化19】



p-トリル [5-アセトアミド-4, 7, 8, 9-テトラ-O-アセチル-3, 5-ジデオキシ-3-フルオロ-D-エリスロ- α -L-マンノ-ノナ-2-ウロピラノソン酸メチル] - (2 $\rightarrow$ 6) - 2, 3-ジ-O-ベンゾイル-4-O-ベンジル-1-チオ- β -D-ガラクトピラノシド4. 攪拌子を含むスクリュキャップバイアル中の化合物6 α (500 mg、0.47 mmol、1当量) のトルエン (5 mL) 溶液に、DBU (0.28 mL、1.86 mmol、4当量)、ペルフルオロ-1-ブタンスルホニルフルオリド (0.33 mL、1.86 mmol、4当量) およびTASF (256 mg、0.93 mmol、2当量) を添加した。この反応バイアルを密閉し、40 $^{\circ}\text{C}$ で攪拌した。24時間後に、反応混合物をさらなる量のDBU (0.28 mL、1.86 mmol、4当量)、ペルフルオロ-1-ブタンスルホニルフルオリド (0.33 mL、1.86 mmol、4当量) およびTASF (256 mg、0.93 mmol、2当量) で処理し、次いで40 $^{\circ}\text{C}$ でさらに24時間攪拌した。反応混合物をシリカゲルカラムに直接充填し、アセトン／トルエン (7:3) で溶離した。淡黄色の粉末としてのペルフルオロ-1-ブタンスルホニル化合物7 (50 mg、8%) と共に、二糖4を淡黄色の粉末として得た (300 mg、60%)。

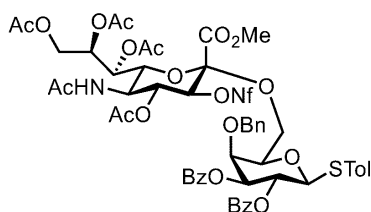
【0046】

7からの二糖4の合成：攪拌子を含むスクリュキャップバイアル中の化合物7 (730 mg、0.54 mmol、1当量) のトルエン (7 mL) 溶液に、DBU (0.64 mL、4.31 mmol、8当量) およびペルフルオロ-1-ブタンスルホニルフルオリド (0.77 mL、4.31 mmol、8当量) を添加した。この容器を密閉し、40 $^{\circ}\text{C}$ で15日間攪拌した。反応混合物をシリカゲルカラムに直接充填し、溶離液としてのアセトン／トルエン (7:3) で溶離した。淡黄色の粉末としてのペルフルオロ-1-ブタンスルホニル化合物7 (267 mg、77% b r s m) と共に、二糖4を淡黄色の粉末として

単離した (282 mg、49%)。R_f = 0.43 (シリカゲル、アセトン／トルエン = 2 : 3) ; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) : δ 7.95–7.93 (m, 2H, Ar–H), 7.87–7.85 (m, 2H, Ar–H), 7.48–7.44 (m, 2H, Ar–H), 7.41–7.39 (m, 2H, Ar–H), 7.35–7.33 (m, 2H, Ar–H), 7.31–7.29 (m, 2H, Ar–H), 7.25–7.24 (m, 2H, Ar–H), 7.21–7.19 (m, 2H, Ar–H), 7.16–7.14 (m, 1H, Ar–H), 7.04–7.03 (m, 2H, Ar–H), 5.79 (dd, J = 10.2, 9.6 Hz, 1H), 5.49 (ddd, J = 9.0, 5.4, 2.4 Hz, 1H), 5.42 (dd, J = 10.2, 3.0 Hz, 1H), 5.31–5.28 (m, 2H), 5.20 (dd, J = 27.0, 11.4 Hz, 1H, sia–C4–H), 5.01 (dd, J = 51.6, 1.8 Hz, 1H, sia–C3–H), 4.97 (d, J = 10.2 Hz, 1H, C1–H_β), 4.66 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 4.58 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 4.37 (dd, J = 12.6, 2.4 Hz, 1H), 4.28–4.26 (m, 2H), 4.17 (dd, J = 12.6, 5.4 Hz, 1H), 4.09–4.05 (m, 2H), 3.98 (dd, J = 10.2, 6.0 Hz, 1H), 3.74 (dd, J = 10.2, 8.4 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H, –CH₃), 2.29 (s, 3H, –CH₃), 2.17 (s, 3H, –CH₃), 2.16 (s, 3H, –CH₃), 2.09 (s, 3H, –CH₃), 1.98 (s, 3H, –CH₃), 1.91 (s, 3H, –CH₃) ; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) : δ 170.9, 170.7, 170.4, 170.2, 169.8, 165.6, 165.3, 138.3, 137.6, 133.2, 133.0, 132.6, 129.8, 129.8, 129.7, 129.5, 129.3, 129.1, 128.4, 128.3, 128.1, 127.5, 127.3, 98.3, 98.2, 88.1, 86.8, 86.4, 76.2, 75.6, 74.6, 74.0, 71.4, 69.2, 69.0, 68.5, 68.0, 67.3, 63.4, 62.5, 53.2, 45.5, 23.4, 21.2, 21.2, 20.8, 20.7, 20.7 ; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃) : δ –215.9 ; HRMS (ESI–TOF) m/e : C₅₄H₅₈FNO₁₉SNa [M+Na]⁺ の計算値 : 1098.3200 / 実測値 : 1098.3212.

[0047]

[化20]

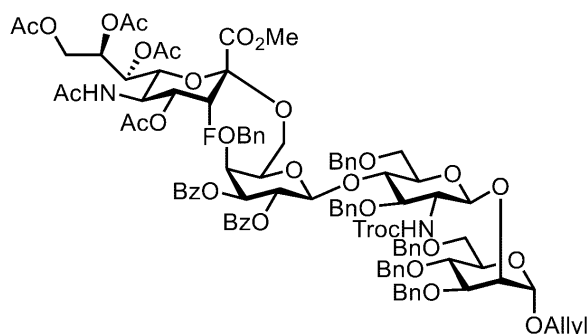


p-トリル [5-アセトアミド-4, 7, 8, 9-テトラ-O-アセチル-5-デオキシ-3-O-(ペルフルオロ-1-ブタン)スルホニル-D-エリスロ-α-L-グルコ-ノナー-2-ウロピラノソン酸メチル] – (2→6) – 2,3-ジ-O-ベンゾイル-4-O-ベンジル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド7。R_f = 0.59 (シリカゲル、アセトン：トルエン = 2 : 3) ; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) : δ 7.95–7.94 (m, 2H, Ar–H), 7.90–7.89 (m, 2H, Ar–H), 7.49–7.45 (m, 2H, Ar–H), 7.40–7.39 (m, 2H, Ar–H), 7.36–7.30 (m, 4H, Ar–H), 7.27–7.26 (m, 2H, Ar–H), 7.25–7.18 (m, 3H, Ar–H), 7.04–7.03 (m, 2H, Ar–H), 5.82 (dd, J = 10.2, 9.6 Hz, 1H), 5.62–5.38 (m, 4H), 5.26 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.96–4.94 (m, 2H, C1–H_β), 4.70–4.64 (m, 3H), 4.35–4.30 (m, 1H),

4.22–4.20 (m, 2H), 4.09 (dd, $J=9.6, 6.0$ Hz, 1H), 4.02 (dd, $J=12.6, 6.0$ Hz, 1H), 3.98 (dd, $J=6.6, 6.0$ Hz, 1H), 3.93 (dd, $J=10.2, 7.2$ Hz, 1H), 3.76 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.29 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.17 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.09 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.06 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.94 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.90 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ 170.6, 170.2, 170.1, 169.3, 167.0, 165.7, 165.2, 138.1, 137.7, 133.2, 133.0, 132.5, 129.8, 129.7, 129.7, 129.5, 129.1, 129.0, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0, 127.5, 127.4, 97.8, 86.5, 83.4, 75.7, 74.6, 74.2, 72.6, 70.0, 68.4, 67.9, 66.5, 64.5, 62.4, 53.1, 49.0, 23.0, 21.1, 20.9, 20.7, 20.6, 20.3; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3): δ -126.2, -126.2, -121.5, -121.5, -110.4, -110.4, -81.0, -80.9, -80.9; HRMS (ESI-TOF) m/e : $\text{C}_{58}\text{H}_{58}\text{F}_9\text{NO}_{22}\text{S}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ の計算値: 1378.2640 / 実測値: 1378.2644.

【0048】

【化21】

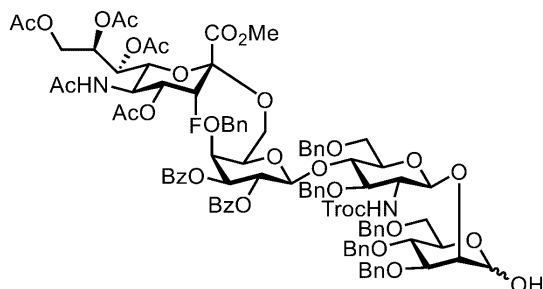


アリル [5-アセトアミド-4, 7, 8, 9-テトラ-O-アセチル-3, 5-ジデオキシ-3-フルオロ-D-エリスロ- α -L-マンノ-ノナ-2-ウロピラノソン酸メチル] - (2 $\rightarrow$ 6) - [2, 3-ジ-O-ベンゾイル-4-O-ベンジル-1- β -D-ガラクトピラノシル] - (1 $\rightarrow$ 4) - [3, 6-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ-2- (2, 2, 2-トリクロロエトキシ) カルボニルアミノ- β -D-グルコピラノシル] - (1 $\rightarrow$ 2) - 3, 4, 6-トリ-O-ベンジル- α -D-マンノピラノシド 9。無水 CH_2Cl_2 (7 mL) 中のアクセプター 8 (1.04 g, 1.03 mmol, 1 当量)、ドナー 4 (1.39 g, 1.29 mmol, 1.25 当量) および活性化させた粉末状 4 Å の MS (0.70 g) の混合物をアルゴン下で 1 時間攪拌した。次いで反応混合物を -40 °C に冷却し、NIS (465 mg, 2.06 mmol, 2 当量)、その後に TfOH (Et_2O 中 0.5 M, 0.62 mL, 0.31 mmol, 0.3 当量) を攪拌しながら添加した。反応が完了したら (約 2 時間に TLC が出発物質の消失を示した)、反応混合物を Et_3N (0.4 mL) で失活させ、セライトパッドで濾過した。濾液を CH_2Cl_2 (30 mL) で希釈し、20% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液 (10 mL)、飽和 NaHCO_3 水溶液 (15 mL) および塩水 (8 mL) で洗浄した。分離した有機層を MgSO_4 で乾燥し、濃縮した。得られた残留物をアセトン/トルエン (1:2) を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物 9 を白色の粉末として得た (1.30 g, 64%)。 $R_f = 0.51$ (シリカゲル、アセトン:トルエン = 2:3); ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 7.90–7.88 (m, 4H, Ar-H), 7.48–7.45 (m, 2H, Ar-H), 7.34–7.22 (m, 24H, Ar-H), 7.18–7.13 (m, 10H, Ar-H), 5.85–5.78 (m, 2H), 5

. 47–5.44 (m, 1H), 5.35–5.32 (m, 4H), 5.24–5.16 (m, 2H), 5.11 (dd, $J=10.2, 1.2$ Hz, 1H), 5.06–4.97 (m, 3H, C1–H $_{\beta}$), 4.85–4.73 (m, 4H, C1–H $_{\alpha}$, C1–H $_{\beta}$), 4.70–4.54 (m, 6H), 4.53–4.42 (m, 4H), 4.33–4.26 (m, 2H), 4.23–4.18 (m, 3H), 4.14–4.04 (m, 3H), 3.97–3.93 (m, 1H), 3.89–3.81 (m, 5H), 3.73–3.58 (m, 10H), 3.45–3.43 (m, 1H), 3.32–3.30 (m, 1H), 2.16 (s, 3H, –CH $_3$), 2.13 (s, 3H, –CH $_3$), 2.10 (s, 3H, –CH $_3$), 2.01 (s, 3H, –CH $_3$), 1.92 (s, 3H, –CH $_3$); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl $_3$): δ 170.7, 170.6, 170.4, 170.2, 169.8, 165.6, 165.4, 165.4, 165.1, 153.8, 138.8, 138.6, 138.5, 138.2, 138.2, 138.1, 133.7, 133.2, 133.1, 133.1, 130.8, 130.0, 129.8, 129.6, 129.4, 129.0, 128.4, 128.3, 128.3, 128.2, 128.2, 128.2, 128.1, 128.1, 128.0, 128.0, 127.9, 127.6, 127.6, 127.5, 127.4, 127.3, 127.2, 125.2, 117.1, 100.0, 98.3, 98.2, 96.9, 95.6, 88.1, 86.8, 77.9, 75.0, 74.7, 74.6, 74.5, 74.2, 74.1, 73.9, 73.4, 73.3, 73.1, 73.0, 72.4, 71.9, 71.4, 70.9, 70.9, 69.5, 69.2, 69.1, 69.0, 68.0, 67.9, 67.2, 62.9, 62.3, 57.2, 53.2, 45.5, 23.3, 21.0, 20.7, 20.7, 20.6; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl $_3$): δ –215.6; HRMS (ESI–TOF) m/e : C $_{100}$ H $_{108}$ Cl $_3$ FN $_2$ O $_3$ Na [M+Na] $^+$ の計算値: 1979.5878/実測値: 1979.5889.

[0049]

[化22]

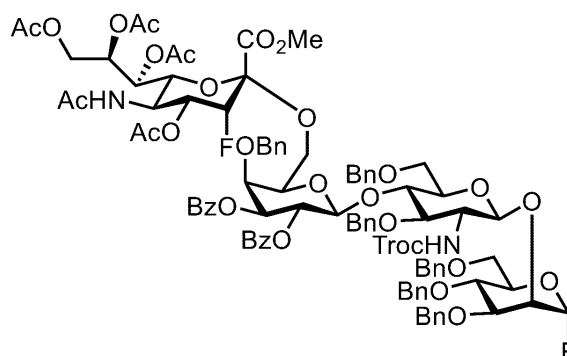


[5–アセトアミド–4, 7, 8, 9–テトラ–O–アセチル–3, 5–ジデオキシ–3–フルオロ–D–エリスロ– α –L–マンノ–ノナー–2–ウロピラノソン酸メチル] – (2 $\rightarrow$ 6) – [2, 3–ジ–O–ベンゾイル–4–O–ベンジル–1– β –D–ガラクトピラノシル] – (1 $\rightarrow$ 4) – [3, 6–ジ–O–ベンジル–2–デオキシ–2–(2, 2, 2–トリクロロエトキシ)カルボニルアミノ– β –D–グルコピラノシル] – (1 $\rightarrow$ 2) – 3, 4, 6–トリ–O–ベンジル– α –D–マンノピラノシド10。四糖9 (578 mg、0.30 mmol、1当量)の酢酸 (6.0 mL、酢酸/水、10:1 = v/v) 攪拌溶液に、CH $_3$ COONa (121 mg、1.48 mmol、5当量)を添加し、その後PdCl $_2$ (105 mg、0.59 mmol、2当量)を室温で添加した。20時間後に、TLCが出發物質の消失を示した際に、反応混合物を酢酸エチル (20 mL)で希釈し、飽和NaHCO $_3$ 水溶液 (20 mL)の中に注ぎ入れた。水層を酢酸エチルで抽出し (2 $\times$ 10 mL)、1つにまとめた有機相をMgSO $_4$ で乾燥し、濃縮した。得られた残留物をアセトン/ヘキサン (2:3)を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物10を白色の粉末として得た (465 mg、82%)。R $_f$ =0.23 (シリカゲル、アセトン:ヘキサン=2:3); ^1H NMR (600 M

Hz, CDCl₃) : δ 7.90–7.87 (m, 4H, Ar–H), 7.48–7.45 (m, 2H, Ar–H), 7.34–7.20 (m, 24H, Ar–H), 7.19–7.12 (m, 10H, Ar–H), 5.80–5.75 (m, 1H), 5.45–5.43 (m, 1H), 5.33–5.28 (m, 3H), 5.21–4.89 (m, 5H, man–C1–H_α, man–C1–H_β, C1–H_β), 4.84–4.30 (m, 15H, C1–H_β), 4.27–3.79 (m, 12H), 3.78–3.43 (m, 12H), 2.13–2.12 (m, 6H, –2CH₃), 2.09–2.08 (m, 3H, –CH₃), 2.02–2.00 (m, 3H, –CH₃), 1.91 (br, 3H, –CH₃); ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) : δ 170.8, 170.7, 170.7, 170.7, 170.6, 170.5, 170.4, 170.3, 170.3, 170.2, 169.9, 169.8, 165.6, 165.6, 165.4, 165.2, 165.2, 154.0, 138.6, 138.5, 138.3, 138.2, 138.1, 133.2, 133.1, 129.8, 129.6, 129.5, 129.0, 128.4, 128.4, 128.3, 128.3, 128.2, 128.2, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.9, 127.7, 127.7, 127.6, 127.5, 127.5, 127.4, 127.4, 127.3, 100.0, 99.5, 98.3, 98.2, 98.1, 95.8, 95.7, 92.3, 88.2, 88.1, 86.8, 76.1, 74.8, 74.7, 74.6, 74.6, 74.3, 74.2, 74.2, 73.9, 73.8, 73.3, 73.2, 73.1, 73.1, 72.7, 72.6, 72.4, 72.3, 71.6, 71.4, 71.2, 70.9, 70.8, 69.9, 69.5, 69.3, 69.2, 69.1, 69.0, 68.1, 68.0, 67.2, 67.1, 63.0, 62.3, 62.2, 62.1, 53.3, 53.3, 45.5, 45.4, 26.3, 23.3, 21.1, 20.8, 20.7, 20.7, 20.6, 20.6; ¹⁹F NMR (376MHz, CDCl₃) : δ –215.2, –215.7; HRMS (ESI–TOF) m/e : C₉₇H₁₀₄Cl₃FN₂O₃₁Na [M+Na]⁺の計算値 : 1939.5565 / 実測値 : 1939.5619.

【0050】

【化23】

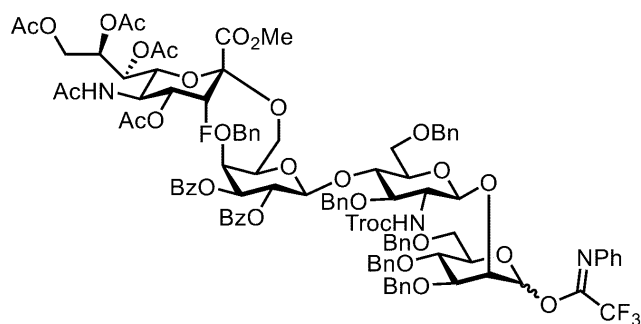


〔5–アセトアミド–4, 7, 8, 9–テトラ–O–アセチル–3, 5–ジデオキシ–3–フルオロ–D–エリスロ–α–L–マンノ–ノナ–2–ウロピラノソン酸メチル〕–(2→6)–〔2, 3–ジ–O–ベンゾイル–4–O–ベンジル–1–β–D–ガラクトピラノシル〕–(1→4)–〔3, 6–ジ–O–ベンジル–2–デオキシ–2–(2, 2, 2–トリクロロエトキシ)カルボニルアミノ–β–D–グルコピラノシル〕–(1→2)–3, 4, 6–トリ–O–ベンジル–α–D–マンノピラノシルフルオリド11。ヘミアセタール10 (395mg、0.21mmol、1当量)の無水CH₂Cl₂ (12mL)の十分に攪拌した溶液に、DAST (81.6μL、0.62mmol、3当量)を–20℃で添加した。TLCが出発物質の消失を示すまで (3時間)、反応混合物を激しく攪拌した。反応混合物をCH₂Cl₂ (10mL)で希釈し、飽和NaHCO₃水溶液 (5mL)および塩水 (4mL)で洗浄した。有機相をMgSO₄で乾燥し、濾過し、濃縮

した。得られた残留物をアセトン／ヘキサン（３：４）を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物１１を白色の粉末として得た（２８９ｍｇ、７３％）。 $R_f = 0.32$ （シリカゲル、アセトン：ヘキサン＝３：４）； $^1\text{H NMR}$ （６００MHz， CDCl_3 ）： δ 7.89－7.88（m，４H，Ar－H），7.47－7.45（m，２H，Ar－H），7.33－7.22（m，２H，Ar－H），7.17－7.12（m，１H，Ar－H），5.78（dd， $J = 10.2$ ，7.8 Hz，１H），5.53－5.40（m，２H），5.33－5.29（m，３H，C1－ H_α ），5.21（dd， $J = 27.6$ ，11.4 Hz，１H，sia－C4－H），5.05－4.96（m，２H，C1－ H_β ），4.94（d， $J = 11.4$ Hz，１H），4.82－4.79（m，４H，C1－ H_β ），4.75－4.72（m，１H），4.68－4.59（m，３H），4.58－4.54（m，２H），4.50－4.48（m，２H），4.30（dd， $J = 12.6$ ，3.0 Hz，１H），4.26（d， $J = 10.2$ Hz，１H），4.23－4.15（m，４H），4.08－4.04（m，２H），3.95（dd， $J = 9.0$ ，8.4 Hz，１H），3.89－3.78（m，５H），3.72－3.57（m，９H），3.50－3.48（m，１H），3.35（d， $J = 0.6$ Hz，１H）2.14（s，３H，－ CH_3 ），2.12（s，３H，－ CH_3 ），2.09（s，３H，－ CH_3 ），2.00（s，３H，－ CH_3 ），1.91（s，３H，－ CH_3 ）； $^{13}\text{C NMR}$ （１５０MHz， CDCl_3 ）： δ 170.8，170.7，170.4，170.2，169.9，165.6，165.4，165.2，153.9，138.2，138.1，137.8，133.2，133.1，129.8，129.6，129.4，129.0，128.4，128.3，128.2，128.1，128.0，127.9，127.7，127.6，127.6，127.4，127.3，127.3，106.9，105.4，99.8，99.2，98.3，98.2，95.6，88.1，86.8，74.9，74.8，74.2，74.0，73.9，73.8，73.3，73.2，72.5，71.4，71.3，70.9，69.1，69.1，68.9，68.0，67.3，62.8，62.3，56.9，53.3，45.6，23.4，21.1，20.8（２C），20.6； $^{19}\text{F NMR}$ （３７６MHz， CDCl_3 ）： δ －138.6，－215.7；HRMS（ESI－TOF） m/e ： $\text{C}_{97}\text{H}_{103}\text{Cl}_3\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_{30}\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ の計算値：1941.5521／実測値：1941.5521。

【００５１】

【化２４】

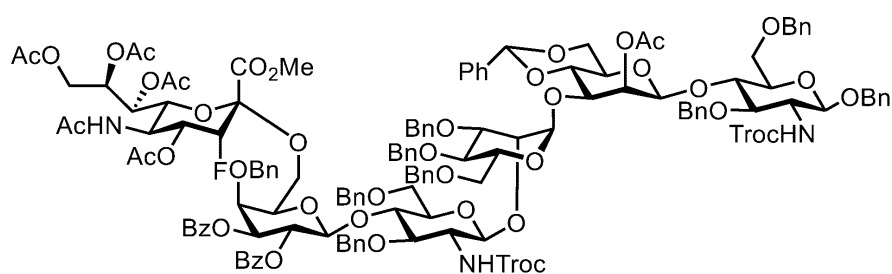


（ N －フェニル）－２，２，２－トリフルオロアセトイミデート [５－アセトアミド－４，７，８，９－テトラ－ O －アセチル－３，５－ジデオキシ－３－フルオロ－ D －エリスロ－ α － L －マンノノナ－２－ウロピラノソン酸メチル]－（２→６）－[２，３－ジ－ O －ベンゾイル－４－ O －ベンジル－１－ β － D －ガラクトピラノシル]－（１→４）－[３，６－ジ－ O －ベンジル－２－デオキシ－２－（２，２，２－トリクロロエトキシ）カルボニルアミノ－ β － D －グルコピラノシル]－（１→２）－３，４，６－トリ－ O －ベンジル－ D －マンノピラノシド １２。ヘミアセタール １０（３９５ｍｇ、０.２１ mmol、１当量）の無水 CH_2Cl_2 （１２ mL）の十分に攪拌した溶液に、 Cs_2CO_3

3 (83.2 mg、0.26 mmol、2当量) および 2, 2, 2-トリフルオロ-N-フェニル-アセトイミドイルクロリド (41 μ L、0.26 mmol、2当量) を攪拌しながら 0°C で添加し、次いで混合物を室温に温め、3時間攪拌した。反応混合物を CH_2Cl_2 (10 mL) で希釈し、セライトパッドで濾過し、濃縮した。得られた残留物をアセトン/ヘキサン (1:2) を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物 12 を白色の泡状物として得た (150 mg、56%) ; アノマーの混合物 (α : β =1:1)。 R_f =0.55 (シリカゲル、アセトン:ヘキサン=1:1) ; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) : δ 7.93–7.88 (m, 4H, Ar-H), 7.49–7.45 (m, 2H, Ar-H), 7.40–7.12 (m, 38H, Ar-H), 6.75–6.71 (m, 1H, Ar-H), 5.82–5.78 (m, 1H), 5.46–5.42 (m, 1H), 5.36–5.30 (m, 3H), 5.24–5.16 (m, 1H), 5.08–4.81 (m, 5H, 0.5 man-C1-H α , 2 C1-H β), 4.78–4.74 (m, 1H), 4.69–4.41 (m, 9H, 0.5 man-C1-H β), 4.33–4.06 (m, 7H), 3.95–3.82 (m, 5H), 3.69–3.36 (m, 10H), 2.16–2.10 (m, 9H, -3CH $_3$), 2.01–1.99 (m, 3H, -CH $_3$), 1.92 (s, 3H, -CH $_3$) ; ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) : δ 170.7, 170.7, 170.7, 170.7, 170.4, 170.2, 169.9, 169.9, 165.6, 165.6, 165.4, 165.2, 165.1, 154.1, 153.9, 143.3, 143.1, 138.7, 138.5, 138.3, 138.2, 138.2, 138.1, 138.0, 138.0, 137.8, 137.7, 133.2, 133.1, 133.1, 129.8, 129.6, 129.4, 129.3, 129.0, 128.7, 128.4, 128.4, 128.3, 128.3, 128.3, 128.2, 128.2, 128.1, 128.1, 128.1, 128.0, 127.9, 127.7, 127.7, 127.6, 127.5, 127.5, 127.5, 127.4, 127.3, 119.4, 119.2, 102.3, 100.2, 100.0, 98.3, 98.2, 95.6, 95.5, 88.0, 86.7, 80.0, 79.3, 75.9, 75.0, 74.7, 74.7, 74.5, 74.3, 74.2, 73.8, 73.8, 73.5, 73.3, 73.2, 73.1, 72.8, 72.4, 72.3, 71.5, 71.4, 71.1, 71.0, 70.9, 70.1, 69.8, 69.3, 69.1, 68.2, 67.2, 67.2, 62.8, 62.3, 62.2, 53.3, 53.2, 45.5, 23.3, 21.0, 21.0, 20.7, 20.7, 20.6 ; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) : δ -65.2, -65.4, -65.5, -65.6, -65.6, -65.7, -215.6, -215.7 ; HRMS (ESI-TOF) m/e : $\text{C}_{105}\text{H}_{108}\text{Cl}_3\text{F}_4\text{N}_3\text{O}_{31}\text{Na}$ [M+Na] $^+$ の計算値 : 2110.5860 / 実測値 : 2110.5865.

【0052】

【化25】



ベンジル [5-アセトアミド-4, 7, 8, 9-テトラ-O-アセチル-3, 5-ジデオキシ-3-フルオロ-D-エリスロ- α -L-マンノ-ノナ-2-ウロピラノソン酸メチル] - (2 $\rightarrow$ 6) - [2, 3-ジ-O-ベンゾイル-4-O-ベンジル-1- β -D-ガラクトピラノシル] - (1 $\rightarrow$ 4) - [3, 6-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ-2-

(2, 2, 2-トリクロロエトキシ)カルボニルアミノ-β-D-グルコピラノシル]-(1→2)-[3, 4, 6-トリ-O-ベンジル-α-D-マンノピラノシル]-(1→3)-[2-O-アセチル-4, 6-O-ベンジリジン-β-D-マンノピラノシル]-(1→4)-3, 6-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ-2-(2, 2, 2-トリクロロエトキシ)カルボニルアミノ-β-D-グルコピラノシド14。無水トルエン(15 mL)中のAgOTf(194 mg、0.75 mmol、アクセプターに対して6当量)、ビスCp₂HfCl₂(167 mg、0.44 mmol、アクセプターに対して3.5当量)および新たに活性化させた4 ÅのMS(1.50 g)の混合物をアルゴン下室温で1時間攪拌した。次いで反応混合物を-20℃に冷却し、ドナー11(290 mg、0.15 mmol、1.2当量)およびアクセプター13(115 mg、0.13 mmol、1当量)の無水トルエン(8 mL)溶液で処理した。TLCが出発物質の消失を示すまで(3時間)、反応混合物を0℃で攪拌した。反応が完了したら反応混合物をEt₃N(0.25 mL)で失活させ、EtOAc(25 mL)で希釈し、セライトパッドで濾過した。濾液を飽和NaHCO₃水溶液(10 mL)および塩水(6 mL)で2回洗浄し、有機相をMgSO₄で乾燥し、濾過し、濃縮した。得られた残留物をアセトン/トルエン(1:2)を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物14を白色の粉末として得た(299 mg、85%)。

【0053】

ワンポット合成：無水CH₂Cl₂(1.25 mL)中のアクセプター18(40.0 mg、0.037 mmol、1当量)、ドナー4(60.1 mg、0.056 mmol、1.5当量)および活性化させた粉末状の4 ÅのMS(0.25 g)の混合物をアルゴン下で1時間攪拌した。次いで反応混合物を-40℃に冷却し、NIS(12.6 mg、0.056 mmol、1.5当量)、その後にTfOH(Et₂O中0.5 M、22.3 μL、0.011 mmol、0.3当量)を添加し、次いで混合物を-20℃まで2時間攪拌した。次に、出発物質が消失したら(TLCによって監視)、反応混合物をアルゴン下で攪拌しながら、無水CH₂Cl₂(1.25 mL)中のアクセプター13(34.2 mg、0.037 mmol、1当量)、NIS(16.8 mg、0.075 mmol、2当量)およびTfOH(Et₂O中0.5 M、22.3 μL、0.011 mmol、0.3当量)で10分間連続的に処理した。全ての試薬を添加したら、混合物を-10℃に温め、TLCが出発物質の消失を示すまで(1時間)攪拌し続けた。完了したら、その反応をEt₃N(0.4 mL)で失活させ、セライトパッドで濾過した。濾液をCH₂Cl₂(10 mL)で希釈し、20%Na₂S₂O₃水溶液(3 mL)、飽和NaHCO₃水溶液(2 mL)および塩水(2 mL)で洗浄した。分離した有機層をMgSO₄で乾燥し、濾過し、真空濃縮した。得られた残留物をアセトン/トルエン(1:2)を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィ、その後にアセトン/ヘキサン(3:4)を溶離液として用いる第2のカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物14を白色の粉末として得た(27 mg、26%)。R_f=0.43(シリカゲル、アセトン:トルエン=3:5); ¹H NMR(600 MHz, CDCl₃): δ 7.96-7.95 (m, 2H, Ar-H), 7.91-7.90 (m, 2H, Ar-H), 7.51-7.47 (m, 2H, Ar-H), 7.36-7.26 (m, 35H, Ar-H), 7.23-7.10 (m, 19H, Ar-H), 5.84 (dd, J=10.2, 7.8 Hz, 1H), 5.45-5.42 (m, 1H), 5.34-5.27 (m, 4H), 5.21-5.15 (m, 2H), 5.04-4.94 (m, 4H, C1-H_α, C1-H_β), 4.87-4.78 (m, 4H), 4.71-4.50 (m, 14H, 2C1-H_β), 4.46-4.34 (m, 5H), 4.31-4.21 (m, 4H), 4.16 (dd, J=12.6, 5.4 Hz, 1H), 4.13-4.06 (m, 2H), 3.98-3.95 (m, 4H, C1-H_β), 3.84-3.57 (m, 17H), 3.51-3.41 (m, 4H), 3.36-3.35 (m, 2H), 3.15 (br, 1H), 2.93 (br, 1H), 2.68-2.67 (m, 1H), 2.12 (s, 3H, -CH₃), 2.11 (s, 3H, -CH₃), 2.09 (s, 3H, -CH₃), 1.99 (s, 3H, -CH₃), 1

10

20

30

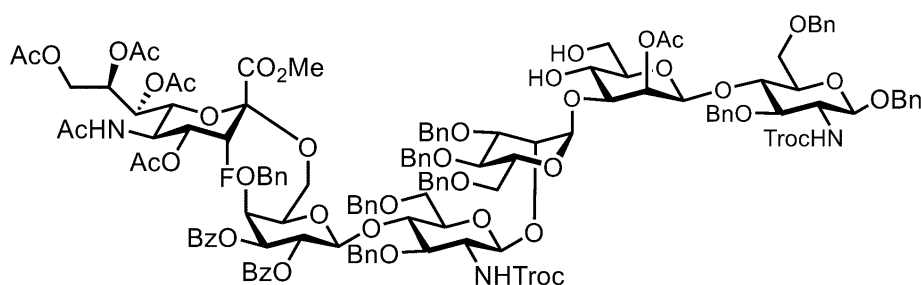
40

50

. 91 (s, 3H, -CH₃), 1.85 (s, 3H, -CH₃); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 170.8, 170.7, 170.4, 170.2, 169.7, 169.4, 165.6, 165.4, 165.2, 153.7, 153.6, 138.9, 138.7, 138.4, 138.3, 137.9, 137.1, 133.2, 129.8, 129.7, 129.5, 129.1, 128.9, 128.6, 128.5, 128.4, 128.4, 128.3, 128.3, 128.2, 128.1, 128.1, 128.0, 128.0, 127.9, 127.9, 127.9, 127.8, 127.8, 127.6, 127.6, 127.6, 127.5, 127.4, 127.4, 127.3, 127.2, 126.3, 102.1, 100.1, 99.0, 98.7, 98.6, 95.8, 95.5, 88.2, 86.9, 78.8, 78.4, 74.8, 74.5, 74.3, 74.2, 73.9, 73.8, 73.3, 72.9, 72.3, 71.9, 71.4, 71.1, 70.7, 70.3, 69.2, 69.1, 69.0, 68.4, 68.3, 67.9, 67.2, 66.2, 63.2, 62.3, 57.4, 56.8, 53.3, 45.5, 23.3, 21.0, 20.8, 20.7, 20.6, 20.6; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃): δ -215.6; HRMS (ESI-TOF) m/e: C₁₄₂H₁₅₀Cl₆FN₃O₄₃Na₂ [M+2Na]²⁺の計算値: 1429.8771/実測値: 1429.8864.

【0054】

【化26】

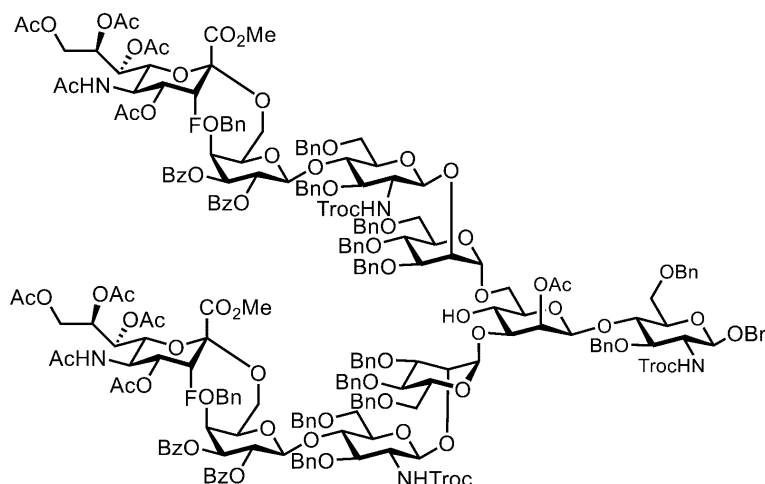


ベンジル [5-アセトアミド-4, 7, 8, 9-テトラ-O-アセチル-3, 5-ジデオキシ-3-フルオロ-D-エリスロ-α-L-マンノ-ノナ-2-ウロピラノソン酸メチル] - (2→6) - [2, 3-ジ-O-ベンゾイル-4-O-ベンジル-1-β-D-ガラクトピラノシル] - (1→4) - [3, 6-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ-2-(2, 2, 2-トリクロロエトキシ)カルボニルアミノ-β-D-グルコピラノシル] - (1→2) - [3, 4, 6-トリ-O-ベンジル-α-D-マンノピラノシル] - (1→3) - [2-O-アセチル-β-D-マンノピラノシル] - (1→4) - 3, 6-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ-2-(2, 2, 2-トリクロロエトキシ)カルボニルアミノ-β-D-グルコピラノシド15。出発物質14 (318mg、0.11mmol、1当量) のアセトニトリル (12mL) 攪拌溶液に、p-TsOH・H₂O (21.5mg、0.11mmol、1当量) を添加した。TLCが出発物質の消失を示すまで (6時間)、反応混合物を激しく攪拌した。完了したら、反応混合物をEt₃N (0.3mL) で失活させ、高真空下で濃縮した。得られた残留物をアセトン/トルエン (3:5) を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物15を白色の粉末として得た (231mg、75%)。R_f=0.25 (シリカゲル、アセトン:トルエン=1:2); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.88-7.87 (m, 4H, Ar-H), 7.46 (dd, J=7.2, 7.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.43 (dd, J=7.2, 7.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.33-7.13 (m, 4H, Ar-H), 7.09-7.08 (m, 2H, Ar-H), 6.01 (br, 1H), 5.76 (dd, J=10.2, 7.8 Hz, 1H), 5.46-5.43 (m, 1H), 5.38 (d, J=8.4 Hz, 1H), 5.31-5.29 (m, 3H), 5.19-5.13 (m, 2H, C1-H_α), 5.05-4.96 (m, 3H, C1-H_β)

), 4.89–4.79 (m, 4H, C1–H_β), 4.69–4.60 (m, 8H, C1–H_β), 4.57–4.49 (m, 8H, C1–H_β), 4.45 (d, J=12.0 Hz, 1H), 4.40–4.36 (m, 2H), 4.31 (dd, J=12.6, 2.4 Hz, 1H), 4.24–4.16 (m, 4H), 4.12–4.09 (m, 2H), 4.02 (br, 1H), 3.98–3.93 (m, 2H), 3.91–3.86 (m, 2H), 3.80 (dd, J=7.8, 6.0 Hz, 1H), 3.76–3.69 (m, 6H), 3.66–3.37 (m, 18H), 2.96–2.93 (m, 1H), 2.13 (s, 3H, –CH₃), 2.11 (s, 3H, –CH₃), 2.09 (s, 3H, –CH₃), 1.98 (s, 3H, –CH₃), 1.93 (s, 3H, –CH₃), 1.90 (s, 3H, –CH₃); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 170.8, 170.7, 170.4, 170.3, 170.2, 169.8, 165.6, 165.5, 165.3, 154.3, 153.8, 138.6, 138.4, 138.3, 138.1, 138.0, 137.8, 137.2, 133.3, 133.1, 129.8, 129.6, 129.4, 129.0, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.2, 127.9, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.5, 127.4, 127.4, 127.3, 100.1, 99.1, 98.3, 98.2, 98.1, 95.7, 95.5, 88.2, 86.9, 78.6, 78.2, 75.4, 75.1, 74.8, 74.7, 74.4, 74.2, 74.1, 73.8, 73.3, 73.2, 72.6, 71.9, 71.8, 71.5, 71.4, 70.9, 70.6, 69.5, 62.3, 57.2, 56.8, 53.8, 53.3, 45.4, 23.3, 21.1, 21.0, 20.7 (2C), 20.7; ¹⁹F NMR (376 MHz, CDCl₃): δ –215.6; HRMS (ESI–TOF) m/e: C₁₃₅H₁₄₆Cl₆FN₃O₄₃Na [M+Na]⁺ の計算値: 2748.7337 / 実測値: 2748.7373.

【0055】

【化27】



ベンジル [5-アセトアミド-4, 7, 8, 9-テトラ-O-アセチル-3, 5-ジデオキシ-3-フルオロ-D-エリスロ-α-L-マンノ-ノナ-2-ウロピラノソン酸メチル-(2→6)-2, 3-ジ-O-ベンゾイル-4-O-ベンジル-1-β-D-ガラクトピラノシル-(1→4)-3, 6-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ-2-(2, 2, 2-トリクロロエトキシ)カルボニルアミノ-β-D-グルコピラノシル-(1→2)-3, 4, 6-トリ-O-ベンジル-α-D-マンノピラノシル-(1→3)] - [5-アセトアミド-4, 7, 8, 9-テトラ-O-アセチル-3, 5-ジデオキシ-3-フルオロ-D-エリスロ-α-L-マンノ-ノナ-2-ウロピラノソン酸メチル-(2→6)-2, 3-ジ-O-ベンゾイル-4-O-ベンジル-1-β-D-ガラクトピラノシル-(1→4)-3, 6-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ-2-(2, 2, 2-トリクロロ

エトキシ)カルボニルアミノ-β-D-グルコピラノシル-(1→2)-3,4,6-トリ-O-ベンジル-α-D-マンノピラノシル-(1→6)]-[2-O-アセチル-β-D-マンノピラノシル]-(1→4)-3,6-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ-2-(2,2,2-トリクロロエトキシ)カルボニルアミノ-β-D-グルコピラノシド16。

【0056】

フルオリドドナーから：無水トルエン(10mL)中のAgOTf(142mg、0.55mmol、アクセプターに対して8当量)、Cp₂HfCl₂(105mg、0.28mmol、アクセプターに対して4当量)および新たに活性化させた4ÅのMS(1g)の混合物をアルゴン雰囲気下、室温で1時間攪拌した。次いで反応混合物を-40℃に冷却し、ドナー11(232mg、0.12mmol、1.75当量)およびアクセプター15(188mg、0.069mmol、1当量)の無水トルエン(1mL)溶液を添加した。-15℃で3時間攪拌を続けた。反応混合物をEt₃N(0.20mL)で失活させ、EtOAc(20mL)で希釈し、セライトパッドで濾過した。濾液を飽和NaHCO₃水溶液(8mL)および塩水(4mL)で2回洗浄した。有機相をMgSO₄で乾燥し、濾過し、真空濃縮した。得られた残留物をアセトン/トルエン(2:3)を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、回収された15(23.0mg、80%brsm)と共に化合物16を白色の粉末として得た(223mg、70%)。

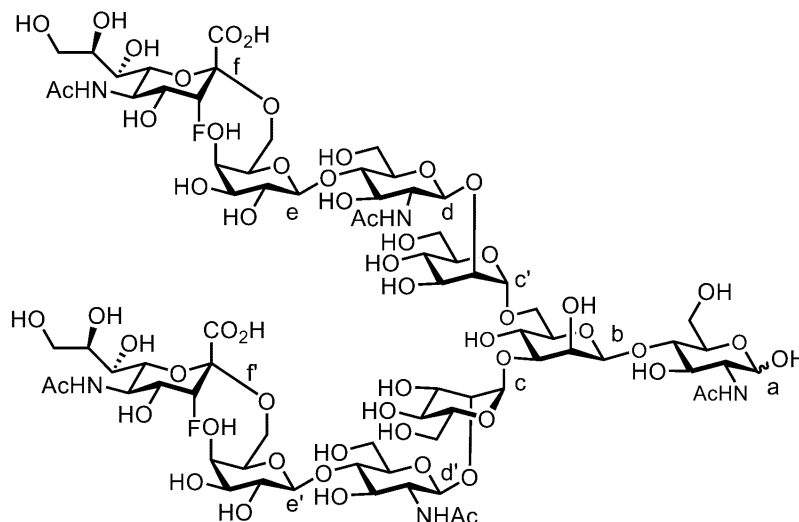
【0057】

トリフルオロアセトイミデートドナーから：無水CH₂Cl₂(2mL)中のアクセプター15(32.0mg、0.012mmol、1当量)、ドナー12(42.9mg、0.021mmol、1.75当量)および活性化させた粉末状の4ÅのMS(200mg)の混合物をアルゴン下で30分間攪拌した。次いで反応混合物を-60℃に冷却し、TfOH(Et₂O中0.5M、5.86μL、2.93μmol、アクセプターに対して0.25当量)で処理した。-20℃で3時間攪拌した後、反応混合物をEt₃N(0.10mL)で失活させ、CH₂Cl₂(10mL)で希釈し、セライトパッドで濾過した。濾液を飽和NaHCO₃水溶液(4mL)および塩水(3mL)で2回洗浄した。有機相をMgSO₄で乾燥し、濾過し、濃縮した。得られた残留物をアセトン/トルエン(2:3)を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、回収されたアクセプター(12.6mg、55%brsm)と共に化合物16を白色の粉末として得た(18.0mg、33%)。R_f=0.17(シリカゲル、アセトン:トルエン=1:2);¹H NMR(600MHz, CDCl₃): δ 7.91-7.86(m, 8H, Ar-H), 7.48-7.42(m, 4H, Ar-H), 7.33-7.11(m, 83H, Ar-H), 5.81-5.75(m, 2H), 5.43-5.38(m, 3H), 5.31-5.07(m, 11H, 2C1-H_α), 5.03-4.78(m, 9H, 2C1-H_β), 4.75-4.08(m, 48H, 4C1-H_β), 4.05-3.89(m, 7H), 3.87-2.99(m, 40H), 2.13-2.12(m, 6H, -2CH₃), 2.10-2.07(m, 15H, -5CH₃), 1.99-1.97(s, 6H, -2CH₃), 1.90-1.88(m, 6H, -2CH₃);¹³C NMR(150MHz, CDCl₃): δ 170.7, 170.6, 170.6, 170.4, 170.2, 169.8, 169.7, 169.6, 165.6, 165.5, 165.4, 165.4, 165.1, 154.0, 153.6, 139.1, 138.8, 138.4, 138.3, 138.1, 138.0, 137.7, 133.2, 133.1, 129.8, 129.8, 129.7, 129.6, 129.6, 129.5, 129.5, 129.1, 129.1, 128.4, 128.4, 128.3, 128.2, 128.2, 128.0, 128.0, 127.8, 127.8, 127.8, 127.7, 127.7, 127.5, 127.4, 127.4, 127.3, 127.2, 127.1, 100.1, 99.8, 98.8, 98.4, 98.2, 95.7, 88.1, 86.8, 78.3, 77.8, 75.3, 74.7, 74.5, 74.4, 74.3,

74.2, 74.0, 73.9, 73.4, 73.3, 73.3, 73.2, 73.1, 73.0, 72.9, 72.5, 72.4, 72.0, 71.9, 71.5, 71.0, 71.0, 70.9, 70.9, 70.7, 69.5, 69.4, 69.2, 69.1, 69.0, 69.0, 68.5, 68.1, 68.1, 68.0, 67.2, 62.9, 62.2, 57.5, 57.2, 53.8, 53.2, 53.2, 45.5, 45.3, 23.3, 21.0, 21.0, 20.8, 20.7, 20.7, 20.6; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3): δ -215.6 (2F); HRMS (ESI-TOF) m/e : $\text{C}_{232}\text{H}_{255}\text{Cl}_9\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_{74}$ [$\text{M} + \text{H}_3\text{O} + \text{NH}_4$] $^{2+}$ の計算値: 2330.6770 / 実測値: 2330.6724.

【0058】

【化28】

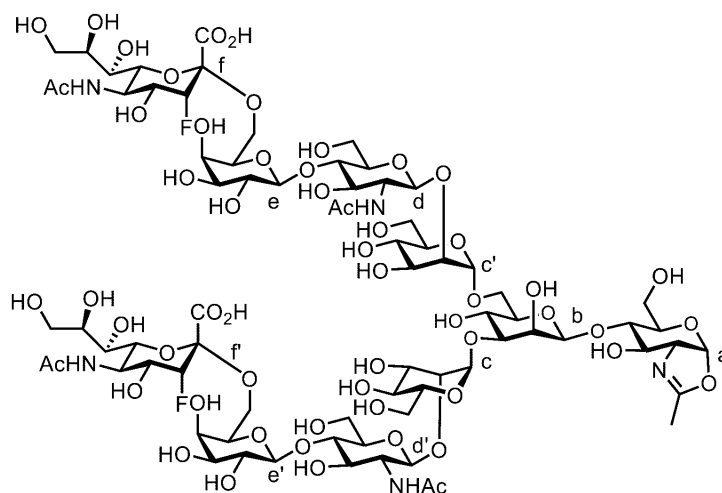


〔5-アセトアミド-3, 5-ジデオキシ-3-フルオロ-D-エリスロ- α -L-マンノ-ノナ-2-ウロピラノソネート-(2 $\rightarrow$ 6)- β -D-ガラクトピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-マンノピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)]-〔5-アセトアミド-3, 5-ジデオキシ-3-フルオロ-D-エリスロ- α -L-マンノ-ノナ-2-ウロピラノソネート-(2 $\rightarrow$ 6)- β -D-ガラクトピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-マンノピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)]-〔 β -D-マンノピラノシル〕-(1 $\rightarrow$ 4)-2-アセトアミド-2-デオキシ-D-グルコピラノシド17。保護されたグリカン16 (103 mg、0.022 mmol、1当量) および LiOH (51.5 mg、S. M. wtで50%) の1, 4-ジオキサン/ H_2O 混合物 (3 mL、4:1=v/v) 溶液を90°Cで16時間攪拌した。反応混合物を高真空下で濃縮し、アセチル化条件 (ピリジン (2.5 mL)、 Ac_2O (1.5 mL)、室温、16時間) に供した。溶媒を除去した後、粗製の残留物を H_2O / MeOH (1:5) を溶離液として用いる LiChroprep (登録商標) RP-18 逆相カラムクロマトグラフィにより精製した。その生成物を MeOH (3 mL、0.5 M) 中の NaOMe で16時間攪拌することにより脱アセチル化した。反応混合物をIR-120で中和し、濾過し、真空濃縮した。残留物を H_2O / MeOH (1:4) を溶離液として用いる LiChroprep (登録商標) RP-18 逆相カラムクロマトグラフィにより精製した。脱アセチル化した粗製生成物を MeOH / H_2O / HCOOH (3 mL、6:3:1=v/v) の混合物に溶解し、 $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (51.5 mg、S. M. wtで50%) で20時間処理した。反応混合物をセライトパッドで濾過し、真空濃縮した。残留物を (BIO-RAD) Biogel P-2 カラムクロマトグラフィ (水で溶離) で精製し、その後に LiChroprep (登録商標) RP-18 逆相カラムクロマトグラフィ (水で溶離) で精製して、化合物17をアノマーの混合物 (α : β =0.65:0.35) の白

色の粉末として得た (18.3 mg、40%)。 ^1H NMR (600 MHz, D_2O) : δ 5.23 (d, $J=3.0$ Hz, 0.65 H, a-C1-H $_{\alpha}$), 5.14 (d, $J=52.8$ Hz, 2 H, s i a-C3-H), 5.14 (br, 1 H, c-C1-H $_{\alpha}$), 4.96 (br, 1 H, c'-C1-H $_{\alpha}$), 4.79 (br, 1 H, b-C1-H $_{\beta}$), 4.73 (br, 0.35 H, a-C1-H $_{\beta}$), 4.60 (d, $J=7.8$ Hz, 2 H, dd'-C1-H $_{\beta}$), 4.48 (d, $J=7.8$ Hz, 2 H, ee'-C1-H $_{\beta}$), 4.28-4.21 (m, 4 H), 4.13 (br, 1 H), 4.00-3.51 (m, 57 H), 2.09-2.08 (m, 9 H, -3 CH $_3$), 2.05 (br, 6 H, -2 C H $_3$); ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) : δ 174.5, 174.2, 174.1, 102.7, 102.6, 100.0, 99.1, 98.9, 98.9, 98.7, 98.6, 96.6, 94.4, 91.0, 90.0, 89.8, 80.0, 79.7, 79.3, 78.9, 76.0, 75.8, 74.1, 74.0, 73.9, 73.1, 72.9, 72.7, 72.4, 71.9, 71.9, 71.6, 71.5, 71.1, 70.3, 69.8, 69.4, 69.2, 69.1, 69.0, 68.7, 68.0, 67.8, 66.9, 66.8, 65.4, 65.2, 63.6, 62.2, 61.2, 61.2, 59.7, 59.6, 55.6, 54.4, 53.1, 46.3, 21.9, 21.6; ^{19}F NMR (376 MHz, D_2O) : δ -217.4, -217.4; H RMS (ESI-TOF) m/e : C $_{76}$ H $_{121}$ F $_2$ N $_5$ O $_{57}$ [M-2H] $^{-2}$ の計算値 : 1026.8351 / 実測値 : 1026.8299.

【0059】

【化29】

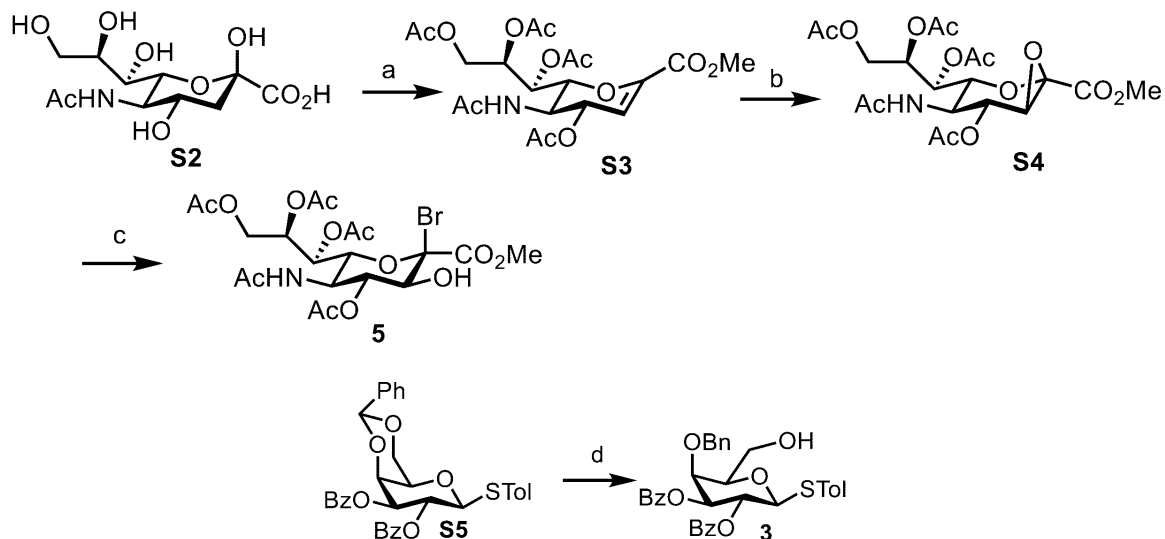


[5-アセトアミド-3, 5-ジデオキシ-3-フルオロ-D-エリスロ- α -L-マンノ-ノナ-2-ウロピラノソネート-(2 $\rightarrow$ 6)- β -D-ガラクトピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-マンノピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)]-[5-アセトアミド-3, 5-ジデオキシ-3-フルオロ-D-エリスロ- α -L-マンノ-ノナ-2-ウロピラノソネート-(2 $\rightarrow$ 6)- β -D-ガラクトピラノシル-(1 $\rightarrow$ 4)-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-マンノピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)]-[β -D-マンノピラノシル]-(1 $\rightarrow$ 4)-(2-アセトアミド-1, 2-ジデオキシ-D-グルコピラノ)-[2, 1-d]-2-メチルオキサゾリン S1。グリカンオキサゾリンの代表的な合成。グリカン17 (14.5 mg、7.05 μmol 、1当量)、2-クロロ-1, 3-ジメチル-1H-ベンズイミダゾール-3-イウムクロリド (CDMBI) (12.2 mg、0.056 mmol、8当量) および Et $_3$ N (19.9 μL) の水 (121.1 μL) 溶液を 4 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間 攪拌 した。反応混合物を Sephadex G-25 カラム による ゲル 濾過 クロマト グラフィ に 供 し、0.05% Et $_3$ N 水 溶液 で 溶 離 した。グリカンオキサゾリン 生成物 を 含 有 す る 画 分 を 1 つ に ま と め、凍 結 乾 燥 し て 所 望 の 生 成

物 S 1 を白色の粉末として得た (12.6 mg、収率 87%)。 ^1H NMR (600 MHz, $\text{D}_2\text{O} + 0.05\% \text{Et}_3\text{N}$): δ 6.09 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, oxa-C1-H $_{\alpha}$), 5.12 (d, $J = 52.2$ Hz, 2H, sia-C3-H), 5.11 (br, 1H, c-C1-H $_{\alpha}$), 4.95 (br, 1H, c'-C1-H $_{\alpha}$), 4.74 (br, 1H, b-C1-H $_{\beta}$), 4.60–4.57 (m, 2H, dd'-C1-H $_{\beta}$), 4.46–4.45 (m, 2H, ee'-C1-H $_{\beta}$), 4.39 (br, 1H), 4.22–4.15 (m, 5H), 3.98–3.49 (m, 55H), 3.43–3.40 (m, 1H), 2.07–2.02 (m, 15H, -5CH $_3$); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{D}_2\text{O} + 0.05\% \text{Et}_3\text{N}$): δ 174.9, 174.7, 174.7, 170.7, 170.7, 168.5, 103.1, 103.1, 101.4, 99.9, 99.5, 99.4, 99.2, 99.1, 99.0, 96.5, 91.4, 90.2, 80.4, 79.4, 77.9, 76.4, 76.0, 74.6, 74.2, 73.4, 73.4, 72.8, 72.4, 72.3, 72.0, 71.9, 71.5, 70.8, 70.7, 70.2, 69.6, 69.5, 69.4, 69.1, 68.5, 68.2, 67.2, 65.8, 65.7, 65.1, 64.1, 62.6, 61.6, 61.6, 60.1, 54.9, 46.7, 22.4, 22.0, 12.9; ^{19}F NMR (470 MHz, $\text{D}_2\text{O} + 0.05\% \text{Et}_3\text{N}$): δ -217.3 (d, $J_{\text{FH}} = 51.3$ Hz), -217.3 (d, $J_{\text{FH}} = 51.3$ Hz); HRMS (ESI-TOF) m/e : C $_{76}$ H $_{120}$ F $_2$ N $_5$ O $_5$ 6 [M-H] $^-$ の計算値: 2036.6658/実測値: 2036.6672.

【0060】

【化30】

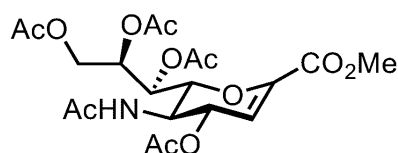


スキーム S 1

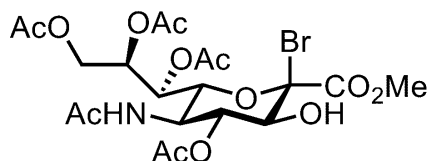
スキーム S 1 における試薬および条件: (a) TFA、MeOH、60°C、16時間、次いで AcCl、室温、2日間、次いで Na $_2$ HPO $_4$ 、CH $_3$ CN、還流、20時間、92%。(b) 参照3、80% (3段階)。(c) TiBr $_4$ 、ジクロロエタン、室温、10分間、92%。(d) BH $_3$ 、Cu(OTf) $_2$ 、THF、室温、8時間、96%。

【0061】

【化31】



5-アセトアミド-4,7,8,9-テトラ-O-アセチル-3,5-ジデオキシ-2,6-アンヒドロ-D-グリセロ-D-ガラクト-ノン-2-エン酸メチル¹⁹。化合物S2 (20 g、64.7 mmol、1当量)のMeOH (600 mL) 攪拌溶液に、TfOH (4.95 mL、64.7 mmol、1当量)を添加した。反応混合物を60℃で16時間攪拌した。溶媒を減圧下での回転蒸発により除去し、トルエンと共に2回同時蒸発させて微量の水を除去した。得られた残留物を丸底フラスコ中のAcCl (200 mL)に0℃で溶解し、密閉し、室温まで2日間攪拌した。溶媒を除去したら、得られた残留物を無水アセトニトリル (200 mL)で希釈し、次いでNa₂HPO₄ (19.6 g、155 mmol、2.4当量)をアルゴン下で添加した。TLCが出発物質の消失を示すまで (16時間)、反応混合物を90℃で激しく攪拌した。この溶液をセライトパッドで濾過し、MgSO₄で乾燥し、真空濃縮した。得られた残留物をEtOAc/ヘキサン (4:1)を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物S3を褐色の泡状物として得た (28.2 g、92%)。分光学的数据は以前に文献において報告されているものと一致していた¹⁹。R_f = 0.30 (シリカゲル、EtOAc) ; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) : δ 5.95 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 5.81 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 5.47–5.44 (m, 2H), 5.32–5.30 (m, 1H), 4.59 (dd, J = 12.0, 3.0 Hz, 1H), 4.38–4.33 (m, 2H), 4.15 (d, J = 12.0, 7.2 Hz, 1H), 3.76 (s, 3H, -CH₃), 2.08 (s, 3H, -CH₃), 2.03 (s, 3H, -CH₃), 2.02 (s, 3H, -CH₃), 2.01 (s, 3H, -CH₃), 1.88 (s, 3H, -CH₃) ; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) : δ 170.7, 170.5, 170.1, 170.1, 170.0, 161.6, 145.0, 107.9, 70.6, 67.8, 67.6, 61.9, 52.5, 46.5, 23.1, 20.8, 20.7, 20.7 ; HRMS (ESI-TOF) m/e : C₂₀H₂₇NO₁₂Na [M+Na]⁺の計算値 : 496.1425 / 実測値 : 496.1435。
 【0062】
 【化32】



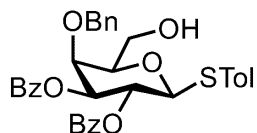
5-アセトアミド-4,7,8,9-テトラ-O-アセチル-2-ブromo-2,5-ジデオキシ-D-エリスロ-α-L-グルコ-ノン-2-ウロピラノソン酸メチル²⁰。エポキシドS4の合成を報告されている手順を用いてシアル酸から行った²¹。エポキシド化合物S4 (1.10 g、2.25 mmol、1当量)の無水1,2-ジクロロエタン (18 mL) 攪拌溶液に、TiBr₄ (0.91 g、2.47 mmol、1.1当量)をアルゴン下で10分間添加した。高真空下での回転蒸発により溶媒を除去した。得られた残留物をEtOAc (30 mL)で希釈し、Na₂SO₄飽和水溶液 (10 mL)、5% NaHCO₃水溶液 (10 mL)、次いで塩水 (5 mL)で洗浄した。分離した有機層をMgSO₄で乾燥し、真空濃縮し、得られた残留物をアセトン/ヘキサン (2:1)を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物3を白色の粉末として得た (1.18 g、92%)。分光学的数据およびプロトコルは以前に報告されているものと同一であった²⁰。R_f = 0.23 (シリカゲル、アセトン:トルエン = 1:1) ; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) : δ 5.99 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 5.42 (dd, J = 7.2, 1.2 Hz, 1H), 5.21–5.18 (m, 1H), 5.10 (ddd, J = 6.0, 6.0, 2.4 Hz, 1H), 4.38 (dd, J = 12.6, 2.4 Hz, 1H), 4.32–4.30 (m, 2H), 3.99 (dd, J = 12.6, 6.0 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H, -CH₃), 3.78

(d, $J=9.0$ Hz, 1H), 3.66 (br, 1H, -OH), 2.07 (s, 3H, -CH₃), 2.06 (s, 3H, -CH₃), 2.05 (s, 3H, -CH₃), 2.01 (s, 3H, -CH₃), 1.84 (s, 3H, -CH₃); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 171.4, 170.6, 170.3, 169.8, 169.7, 167.0, 98.0, 75.0, 72.8, 72.2, 69.9, 66.5, 61.9, 54.0, 47.2, 22.9, 21.0, 20.7, 20.6; HRMS (ESI-TOF) m/e : C₂₀H₂₉BrNO₁₃ [M+H]⁺の計算値: 570.0817 / 実測値: 570.0822.

【0063】

【化33】

10



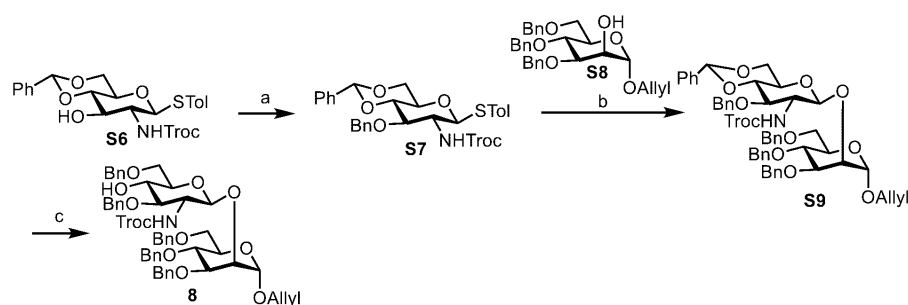
p-トリル2,3-ジ-O-ベンゾイル-4-O-ベンジル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド⁵²²。出発物質⁵²³ (4.00 g、6.86 mmol、1当量)のBH₃-THF複合体 (THF中に1M、34.3 mL、34.3 mmol、5当量) 攪拌溶液に、Cu(OTf)₂ (124 mg、0.34 mmol、0.05当量) を添加し、反応混合物を室温で8時間攪拌した。完了したら、反応系を0℃でTEA (0.96 mL、6.86 mmol、1当量) により慎重に中和し、次いでMeOH (15 mL) で希釈した。真空中で溶媒を除去した後、得られた残留物をEtOAc/ヘキサン (1:2) を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物5を白色の粉末として得た (3.85 g、96%)。分光学的データは以前に文献において報告されているものと一致していた²²。R_f=0.45 (シリカゲル、EtOAc:ヘキサン=1:1); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.97-7.94 (m, 4H, Ar-H), 7.51-7.48 (m, 2H, Ar-H), 7.38-7.34 (m, 6H, Ar-H), 7.27-7.21 (m, 5H, Ar-H), 5.85 (dd, $J=10.2, 10.2$ Hz, 1H), 5.36 (dd, $J=9.6, 3.0$ Hz, 1H), 4.87 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, C1-H_β), 4.74 (d, $J=12.0$ Hz, 1H), 4.47 (d, $J=12.0$ Hz, 1H), 4.16 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 3.91 (d, $J=11.4, 7.2$ Hz, 1H), 3.76 (dd, $J=6.0, 6.0$ Hz, 1H), 3.61 (dd, $J=11.4, 5.4$ Hz, 1H), 2.30 (s, 3H, -CH₃), 1.83 (br, 1H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 165.9, 165.2, 138.1, 137.4, 133.4, 133.1, 133.0, 129.8, 129.7, 129.6, 129.5, 128.9, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 127.9, 86.8, 79.0, 76.0, 74.6, 73.7, 68.5, 61.9, 21.1; HRMS (ESI-TOF) m/e : C₃₄H₃₂O₇SNa [M+Na]⁺の計算値: 607.1761 / 実測値: 607.1770.

【0064】

40

50

【化 3 4】



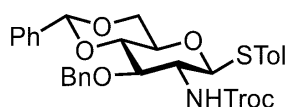
スキーム S 2

10

スキーム S 2 における試薬および条件：(a) TESOTf 、 BnCHO 、 TESH 、トルエン、 THF 、2 時間、 -20°C 、90%。(b) NIS 、 TfOH 、 $4\text{ \AA}$ の MS 、 -40°C 、1.5 時間、 CH_2Cl_2 、75%。(c) NaBH_3CN 、 HCl ／エーテル、 AW-300 、 THF 、 0°C ～室温、16 時間、85%。

【0065】

【化 3 5】



20

p-トリル 3-O-ベンジル-4,6-O-ベンジリデン-2-デオキシ-1-チオ-2-(2,2,2-トリクロロエトキシ)カルバモイルアミノ- β -D-グルコピラノシド S7。出発物質 S6²⁴ (5.17 g、9.42 mmol、1 当量) の THF ／トルエン混合物 (45 mL、1:2 = v/v) 攪拌溶液に、 TESOTf (4.26 mL、18.8 mmol、2 当量) をアルゴン下 -20°C で添加した。 -20°C で 45 分間攪拌した後、ベンズアルデヒド (4.79 mL、47.1 mmol、5 当量) およびトリエチルシラン (2.26 mL、14.1 mmol、1.5 当量) を混合物に攪拌しながら滴下した。 -20°C で 2 時間後、 TL C が出発物質の消失を示し、その反応を Na_2CO_3 飽和水溶液で失活させ、 EtOAc (100 mL) で希釈し、 Na_2CO_3 飽和水溶液 (30 mL) および塩水で洗浄した。1 つにまとめた有機層を MgSO_4 で乾燥し、濾過し、真空濃縮した。得られた残留物を最初に溶離液として CH_2Cl_2 ／トルエン (1:4) を用い、次いで EtOAc ／トルエン (1:10) を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物 S7 を白色の固体として得た (5.40 g、90%)。 $R_f = 0.50$ (シリカゲル、 EtOAc ：トルエン = 1:25)； $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, アセトン- d_6)： δ 7.52–7.50 (m, 2H, Ar-H), 7.42–7.36 (m, 4H, Ar-H), 7.32–7.31 (m, 2H, Ar-H), 7.29–7.22 (m, 4H, Ar-H), 7.18–7.15 (m, 2H, Ar-H), 5.72 (s, 1H, Ph-CH), 5.03 (d, $J = 10.8\text{ Hz}$, 1H, C1-H β), 4.90–4.82 (m, 3H), 4.74 (d, $J = 12.0\text{ Hz}$, 1H), 4.30 (dd, $J = 10.2, 5.4\text{ Hz}$, 1H), 3.95 (dd, $J = 9.6, 9.0\text{ Hz}$, 1H), 3.84–3.71 (m, 3H), 3.56 (ddd, $J = 9.6, 9.6, 4.8\text{ Hz}$, 1H), 2.83 (s, 2H), 2.32 (s, 3H, -CH $_3$)； $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, アセトン- d_6)： δ 155.3, 139.8, 139.4, 138.6, 133.3, 130.7, 130.5, 129.8, 129.6, 129.1, 129.0, 129.0, 128.5, 128.2, 127.1, 101.8, 97.1, 88.6, 82.7, 80.8, 75.0, 75.0, 71.2, 69.1, 57.4, 21.1； HRMS (ESI-TOF) m/e ： $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{Cl}_3\text{NO}_6\text{SNa}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ の計算値：660.0752／実測値：660.0749。

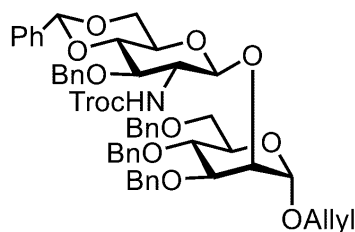
30

40

【0066】

50

【化 3 6】



アリル [3-O-ベンジル-4,6-O-ベンジリデン-2-デオキシ-2-(2,2,2-トリクロロエトキシ)カルボニルアミノ-β-D-グルコピラノシル]-(1→2)-3,4,6-トリ-O-ベンジル-α-D-マンノピラノシド S9。無水CH₂Cl₂ (20 mL) 中のアクセプター S8²⁵ (523 mg、0.94 mmol、1 当量)、ドナー S7 (900 mg、1.41 mmol、1.5 当量) および活性化させた粉末状の 4 Å の MS (2.00 g) の混合物をアルゴン下で 1 時間攪拌した。次いで反応混合物を -40 °C に冷却し、NIS (423 mg、1.88 mmol、2 当量) および TfOH (Et₂O 中 0.5 M、0.47 mL、0.23 mmol、0.25 当量) で処理した。その温度で 1.5 時間攪拌した後、TLC 分析は出発物質の消失を示し、反応混合物を Et₃N (0.2 mL) で失活させ、セライトパッドで濾過した。濾液を CH₂Cl₂ (20 mL) で希釈し、20% Na₂S₂O₃ 水溶液 (5 mL)、飽和 NaHCO₃ 水溶液 (10 mL) および塩水 (5 mL) で洗浄した。分離した有機層を MgSO₄ で乾燥し、真空濃縮した。得られた残留物を EtOAc / トルエン (1:10) を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物 S9 を白色の泡状物として得た (710 mg、75%)。R_f = 0.36 (シリカゲル、EtOAc : トルエン = 1 : 10) ; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) : δ 7.50–7.48 (m, 2H, Ar-H), 7.39–7.36 (m, 6H, Ar-H), 7.33–7.25 (m, 15H, Ar-H), 7.23–7.22 (m, 2H, Ar-H), 5.84 (ddd, J = 16.2, 10.8, 5.4 Hz, 1H), 5.55 (s, 1H, Ph-CH), 5.26 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 5.23–5.20 (m, 1H), 5.16 (dd, J = 10.8, 1.2 Hz, 1H), 5.01 (d, J = 7.8 Hz, 1H, C1-H_β), 4.90 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 4.83 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 4.75–4.62 (m, 6H, C1-H_α), 4.55–4.51 (m, 3H), 4.33–4.29 (m, 2H), 4.13–4.10 (m, 1H), 4.08 (dd, J = 2.4, 2.4 Hz, 1H), 4.00–3.97 (m, 1H), 3.94 (dd, J = 9.6, 3.0 Hz, 1H), 3.89 (dd, J = 13.2, 6.0 Hz, 1H), 3.82–3.78 (m, 2H), 3.72–3.66 (m, 3H), 3.50–3.46 (m, 1H), 3.12 (d, J = 6.0 Hz, 1H) ; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) : δ 153.8, 138.6, 138.5, 138.3, 138.1, 137.3, 133.7, 129.0, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.8, 127.6, 127.6, 127.4, 126.0, 117.2, 101.2, 98.9, 96.9, 95.5, 82.4, 78.5, 75.6, 75.2, 74.6, 74.4, 74.2, 73.3, 72.2, 72.2, 69.2, 68.6, 68.0, 66.1, 58.1 ; HRMS (ESI-TOF) m/e : C₅₃H₅₆Cl₃NO₁₂Na [M+Na]⁺ の計算値 : 1026.2760 / 実測値 : 1026.2780.

【0067】

10

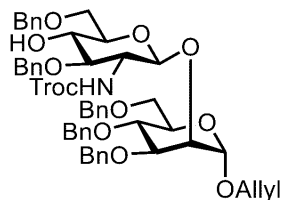
20

30

40

50

【化 37】



アリル [3, 6-ジ-*O*-ベンジル-2-デオキシ-2-(2, 2, 2-トリクロロエトキシ)カルボニルアミノ-β-D-グルコピラノシル]-(1→2)-3, 4, 6-トリ-*O*-ベンジル-α-D-マンノピラノシド 8²⁷。出発物質 S9 (500 mg、0.50 mmol、1 当量) の無水 THF (12 mL) 攪拌溶液に、活性化させた粉末状 AW300MS (1.20 g) をアルゴン下で添加した。次いで反応混合物を 0℃ に冷却し、NaCNBH₃ (313 mg、4.97 mmol、10 当量) を添加し、その後に HCl・Et₂O (Et₂O 中 2 M、2.24 mL、4.48 mmol、9 当量) をゆっくりと添加し、TLC が出発物質の消失を示すまで (16 時間)、混合物を攪拌し続けた。完了したら、反応混合物を飽和 NaHCO₃ 水溶液 (0.5 mL) で失活させ、セライトパッドで濾過した。濾液を CH₂Cl₂ (20 mL) で希釈し、次いで飽和 NaHCO₃ 水溶液 (8 mL) および塩水 (5 mL) で洗浄した。分離した有機層を MgSO₄ で乾燥し、濃縮した。得られた残留物を EtOAc/トルエン (1:5) を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物 8 を白色の泡状物として得た (425 mg、85%)。分光学的データは文献²⁷において報告されているものと一貫していた。R_f=0.17 (シリカゲル、EtOAc:トルエン=1:10); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.36–7.23 (m, 23 H, Ar-H), 7.20–7.19 (m, 2 H, Ar-H), 5.84 (ddd, J=16.2, 10.2, 6.0 Hz, 1 H), 5.35 (br, 1 H), 5.21 (dd, J=16.2, 1.2 Hz, 1 H), 5.14 (dd, J=10.2, 1.2 Hz, 1 H), 4.95 (d, J=7.2 Hz, 1 H, C1-H_β), 4.88 (d, J=10.8 Hz, 1 H), 4.78 (d, J=1.8 Hz, 1 H, C1-H_α), 4.75 (d, J=11.4 Hz, 1 H), 4.70–4.63 (m, 5 H), 4.60 (d, J=11.4 Hz, 1 H), 4.55–4.49 (m, 4 H), 4.14–4.07 (m, 3 H), 3.96–3.87 (m, 3 H), 3.77 (dd, J=10.8, 4.2 Hz, 1 H), 3.73–3.70 (m, 3 H), 3.66 (dd, J=10.8, 1.8 Hz, 1 H), 3.61 (dd, J=9.6, 8.4 Hz, 1 H), 3.54–3.51 (m, 1 H), 3.08 (m, 1 H), 2.71 (m, 1 H, -OH); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 154.0, 138.5, 138.5, 138.4, 138.1, 137.6, 133.7, 128.5, 128.5, 128.3, 128.3, 128.3, 128.2, 128.0, 128.0, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6, 127.6, 127.5, 117.3, 79.2, 78.2, 75.1, 74.6, 74.3, 74.2, 73.8, 73.7, 73.4, 73.3, 72.0, 71.7, 70.9, 69.3, 68.0, 57.5; HRMS (ESI-TOF) m/e: C₅₃H₅₈Cl₃NO₁₂Na [M+Na]⁺ の計算値: 1028.2917/実測値: 1028.2927。
【0068】

10

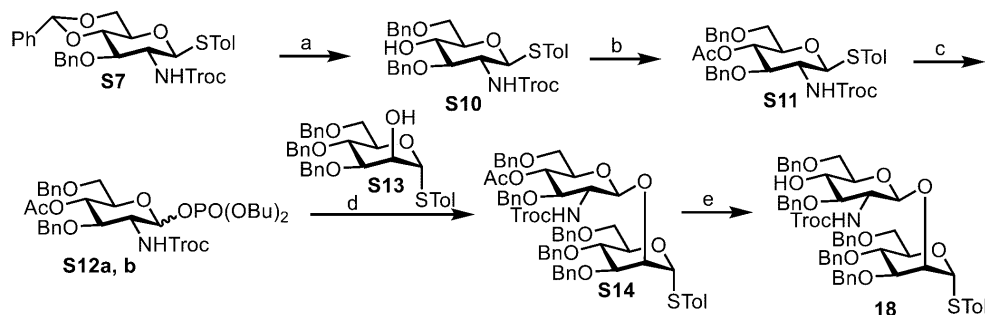
20

30

40

50

【化 3 8】

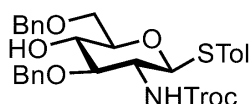


スキーム S 3

スキーム S 3 における試薬および条件：(a) NaBH_3CN 、 HCl ／エーテル、 AW-300 、 THF 、 0°C ～室温、16時間、90%。(b) Ac_2O 、ピリジン、室温、16時間、98%。(c) NIS 、 TfOH 、 $\text{HOPO}(\text{OBu})_2$ 、 $4\text{ \AA}$ の MS 、 -30°C 、2時間、 CH_2Cl_2 、90%。(d) TMSOTf 、 $4\text{ \AA}$ の MS 、 -50°C 、1時間、 CH_2Cl_2 、87%。(e) NaOMe 、 MeOH ／ CH_2Cl_2 、 0°C ～室温、76%。

【0069】

【化 3 9】



パートリル 3, 6-ジ- O -ベンジル-2-デオキシ-1-チオ-2-(2, 2, 2-トリクロロエトキシ)カルバモイルアミノ- β -D-グルコピラノシド S10^{28} 。出発物質 S7 (1.00 g、1.56 mmol、1当量)の無水 THF (30 mL) 攪拌溶液に、活性化させた粉末状 AW300MS (3.00 g)をアルゴン下で添加した。次いで反応混合物を 0°C に冷却し、 NaCNBH_3 (0.98 g、15.6 mmol、10当量)を添加し、その後に $\text{HCl} \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (Et_2O 中2M、7.04 mL、14.1 mmol、9当量)をゆっくりと添加し、 TLC が出発物質の消失を示すまで(16時間)、混合物を攪拌した。完了したら、反応混合物を飽和 NaHCO_3 水溶液 (0.5 mL)で失活させ、セライトパッドで濾過した。濾液を CH_2Cl_2 (50 mL)で希釈し、次いで飽和 NaHCO_3 水溶液 (15 mL)および塩水 (10 mL)で洗浄した。分離した有機層を MgSO_4 で乾燥し、濃縮した。得られた残留物を EtOAc ／ヘキサン／ CH_2Cl_2 (1:3:1)を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物 S10 を白色の泡状物として得た (902 mg、90%)。分光学的データは文献 ^{28} において報告されているものと一貫していた。 $R_f = 0.29$ (シリカゲル、 EtOAc ：ヘキサン=1:3)； $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3)： δ 7.40–7.38 (m, 2H, Ar-H), 7.36–7.27 (m, 10H, Ar-H), 7.04–7.03 (m, 2H, Ar-H), 5.20 (d, $J = 7.8\text{ Hz}$, 1H), 4.84 (d, $J = 10.2\text{ Hz}$, 1H, C1-H β), 4.77–4.72 (m, 4H), 4.58–4.52 (m, 2H), 3.76 (d, $J = 4.8\text{ Hz}$, 2H), 3.71–3.64 (m, 2H), 3.50–3.49 (m, 1H), 3.42–3.38 (m, 1H), 2.90 (br, 1H, -OH), 2.29 (s, 3H, -CH $_3$)； $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3)： δ 153.8, 138.1, 138.1, 137.7, 133.0, 129.6, 128.6, 128.5, 128.4, 128.1, 127.9, 127.8, 127.7, 95.5, 86.1, 81.9, 78.0, 74.5, 74.4, 73.6, 72.5, 70.4, 55.9, 21.1； HRMS (ESI-TOF) m/e ： $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{Cl}_3\text{NO}_6\text{SNa}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ の計算値：662.0

908／実測値：662.0919.

【0070】

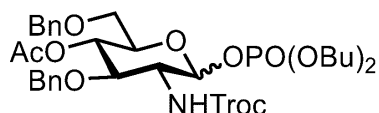
【化40】



p-トリル 4-O-アセチル-3,6-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ-1-チオ-2-(2,2,2-トリクロロエトキシ)カルバモイルアミノ-β-D-グルコピラノシド S11。出発物質 S10 (0.97 g、1.51 mmol、1 当量) のピリジン (12 mL) 攪拌溶液に、Ac₂O (6 mL) を添加した。反応混合物を室温で 16 時間激しく攪拌し、次いで真空濃縮し、EtOAc/ヘキサン/CH₂Cl₂ (1:4:1) を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物 S11 を白色の粉末として得た (1.01 g、98%)。R_f=0.47 (シリカゲル、EtOAc:ヘキサン=1:3)；¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.41–7.40 (m, 2H, Ar-H), 7.34–7.25 (m, 8H, Ar-H), 7.22–7.21 (m, 2H, Ar-H), 7.03–7.01 (m, 2H, Ar-H), 5.29 (d, J=7.2 Hz, 1H), 5.04 (d, J=10.2 Hz, 1H, C1-H_β), 4.98 (dd, J=9.6, 9.6 Hz, 1H), 4.78 (d, J=12.0 Hz, 1H), 4.70 (d, J=12.0 Hz, 1H), 4.62 (d, J=11.4 Hz, 1H), 4.57 (d, J=11.4 Hz, 1H), 4.50 (br, 2H), 4.05 (dd, J=9.6, 9.0 Hz, 1H), 3.65–3.63 (m, 1H), 3.59–3.55 (m, 2H), 3.33 (ddd, J=9.6, 9.6, 9.6 Hz, 1H), 2.29 (s, 3H, -CH₃), 1.87 (s, 3H, -CH₃)；¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 169.8, 153.7, 138.4, 138.0, 137.7, 133.3, 129.8, 128.6, 128.5, 128.4, 128.2, 128.1, 128.1, 127.9, 127.9, 127.7, 95.5, 85.3, 79.4, 77.7, 74.4, 73.6, 71.4, 69.7, 56.5, 21.1, 20.9；HRMS (ESI-TOF) m/e: C₃₂H₃₄Cl₃NO₇SNa [M+Na]⁺ の計算値：704.1014／実測値：104.1031。

【0071】

【化41】



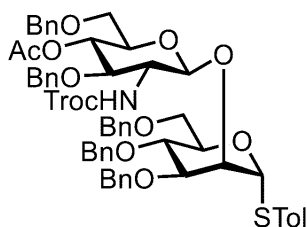
4-O-アセチル-3,6-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ-1-チオ-2-(2,2,2-トリクロロエトキシ)カルバモイルアミノ-αもしくはβ-D-グルコピラノシドリン酸ジブチル S12a, b。無水 CH₂Cl₂ (18 mL) 中の化合物 S11 (990 mg、1.45 mmol、1 当量)、リン酸ジブチル (1.15 mL、5.80 mmol、3 当量) および活性化させた粉末状の 4 Å の MS (1.80 g) 混合物をアルゴン下で 1 時間攪拌した。次いでそれを攪拌しながら -30 °C に冷却し、NIS (978 mg、4.35 mmol、2 当量) を添加し、その後に TfOH (Et₂O 中 0.5 M、0.87 mL、0.43 mmol、0.3 当量) を添加した。2 時間後、TLC 分析は出発物質の消失を示し、反応混合物を飽和 NaHCO₃ 水溶液 (0.5 mL) で失活させ、セライトパッドで濾過した。濾液を CH₂Cl₂ (50 mL) で希釈し、20% Na₂S₂O₃ 水溶液 (10 mL)、飽和 NaHCO₃ 水溶液 (5 mL) および塩水 (5 mL) で洗浄した。分離した有機層を MgSO₄ で乾燥し、真空濃縮した。得られた残留物を EtOAc/トルエン (1:3) を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物 S12 を白色の泡状物として得た (1.00 g、90%)；アノマーの混合

物 ($\alpha : \beta = 1 : 3$)。β-アノマー S12b : $R_f = 0.32$ (シリカゲル、EtOAc : トルエン = 1 : 3) ; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) : δ 7.30–7.22 (m, 10H, Ar–H), 5.81 (br, 1H), 5.35 (dd, $J = 7.8$, 7.8 Hz, 1H, C1–H $_{\beta}$), 5.09 (dd, $J = 9.6$, 9.0 Hz, 1H), 4.74 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.65–4.58 (m, 3H), 4.49–4.44 (m, 2H), 4.06–3.97 (m, 4H), 3.88 (dd, $J = 9.6$, 9.0 Hz, 1H), 3.77–3.74 (m, 1H), 3.69 (ddd, $J = 9.6$, 4.2, 4.2 Hz, 1H), 3.53–3.52 (m, 2H), 1.83 (s, 3H, –CH₃), 1.61–1.54 (m, 4H), 1.36–1.31 (m, 4H), 0.93–0.85 (m, 6H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) : δ 169.5, 154.2, 137.6, 137.6, 128.5, 128.4, 128.3, 127.9, 127.9, 127.7, 127.7, 96.5, 95.3, 78.3, 74.5, 73.9, 73.6, 73.5, 70.6, 69.2, 68.1, 68.1, 68.1, 68.0, 57.2, 57.2, 32.1, 32.0, 32.0, 20.7, 18.6, 18.6, 13.5 ; HRMS (ESI–TOF) m/e : $\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{Cl}_3\text{NO}_{11}\text{PNa}$ [M+Na]⁺ の計算値 : 790.1688 / 実測値 : 790.1685。

α-アノマー S12a : $R_f = 0.44$ (シリカゲル、EtOAc : トルエン = 1 : 3) ; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) : δ 7.31–7.22 (m, 10H, Ar–H), 5.67 (dd, $J = 6.0$, 3.6 Hz, 1H, C1–H $_{\alpha}$), 5.21–5.16 (m, 2H), 4.75 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.62–4.56 (m, 3H), 4.49–4.44 (m, 2H), 4.11–3.99 (m, 6H), 3.77 (dd, $J = 10.2$, 9.6 Hz, 1H), 3.50–3.49 (m, 2H), 1.89 (s, 3H, –CH₃), 1.60–1.55 (m, 4H), 1.35–1.31 (m, 4H), 0.92–0.86 (m, 6H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) : δ 169.3, 154.0, 137.4, 137.4, 128.4, 128.2, 127.8, 127.8, 127.8, 127.6, 127.6, 127.6, 96.4, 96.3, 95.2, 76.4, 74.6, 73.6, 73.5, 71.1, 70.1, 68.6, 68.1, 68.0, 68.0, 67.9, 54.4, 54.3, 32.1, 32.0, 20.7, 18.5, 18.5, 13.5 ; HRMS (ESI–TOF) m/e : $\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{Cl}_3\text{NO}_{11}\text{PNa}$ [M+Na]⁺ の計算値 : 790.1688 / 実測値 : 790.1688。

【0072】

【化42】

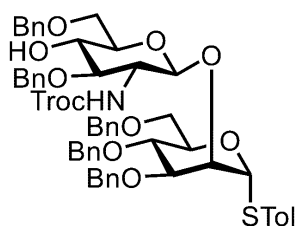


p-トリル [4-O-アセチル-3, 6-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ-2-(2, 2-トリクロロエトキシ)カルボニルアミノ-β-D-グルコピラノシル]-(1→2)-3, 4, 6-トリ-O-ベンジル-1-チオ-α-D-マンノピラノシド S14。無水 CH_2Cl_2 (2 mL) 中のアクセプター S13²⁹ (407 mg、0.73 mmol、1当量) およびドナー S12 (900 mg、1.17 mmol、1.6当量) および活性化させた粉末状 4 Å のモレキュラーシーブ (200 mg) の混合物をアルゴン下で 30 分間攪拌した。次いでそれを -50 °C に冷却し、その後に TLC 分析が出発物質の消失を示すまで (1 時間)、TMSOTf (0.21 mL、1.17 μmol、アクセプターに対して 1.6 当量) を攪拌しながら添加した。反応混合物を Et_3N (0.30 mL) で失活させ、 CH_2Cl_2 (20 mL) で希釈し、セライトパッドで濾過した。濾液を飽

和 NaHCO_3 水溶液 (8 mL) および塩水 (4 mL) で 2 回洗浄した。有機相を MgSO_4 で乾燥し、濾過し、真空濃縮した。得られた残留物を EtOAc / ヘキサン (1 : 3) を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物 **S14** を白色の粉末として得た (710 mg、87%)。 $R_f = 0.26$ (シリカゲル、 EtOAc : ヘキサン = 1 : 3) ; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) : δ 7.37–7.36 (m, 2H, Ar–H), 7.33–7.14 (m, 25H, Ar–H), 7.05–7.03 (m, 2H, Ar–H), 5.33 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, C1– H_α), 5.26 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 5.07 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, C1– H_β), 4.93–4.90 (m, 2H), 4.77 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H), 4.60–4.52 (m, 5H), 4.46–4.34 (m, 5H), 4.27 (dd, $J = 8.4, 8.4$ Hz, 1H), 4.19 (dd, $J = 9.6, 2.4$ Hz, 1H), 4.15 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.07 (dd, $J = 9.6, 9.0$ Hz, 1H), 3.84–3.81 (m, 2H), 3.64–3.63 (m, 2H), 3.57 (dd, $J = 10.8, 6.0$ Hz, 1H), 3.51 (dd, $J = 11.4, 3.0$ Hz, 1H), 3.01 (dd, $J = 6.6$ Hz, 1H), 2.28 (s, 3H, – CH_3), 1.82 (s, 3H, – CH_3) ; $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) : δ 169.7, 154.2, 138.5, 138.3, 138.0, 137.8, 137.7, 137.6, 132.5, 130.3, 129.8, 129.7, 129.0, 128.4, 128.4, 128.3, 128.2, 128.2, 128.2, 128.2, 127.9, 127.8, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6, 127.6, 127.6, 127.4, 125.2, 97.1, 95.4, 86.2, 78.3, 75.2, 75.1, 74.5, 74.1, 74.0, 73.6, 73.4, 73.1, 72.5, 71.7, 71.3, 70.0, 69.2, 58.1, 21.1, 20.8 ; HRMS (ESI–TOF) m/e : $\text{C}_{59}\text{H}_{62}\text{Cl}_3\text{NO}_{12}\text{SNa}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ の計算値 : 1136.2950 / 実測値 : 1136.2978.

【0073】

【化43】



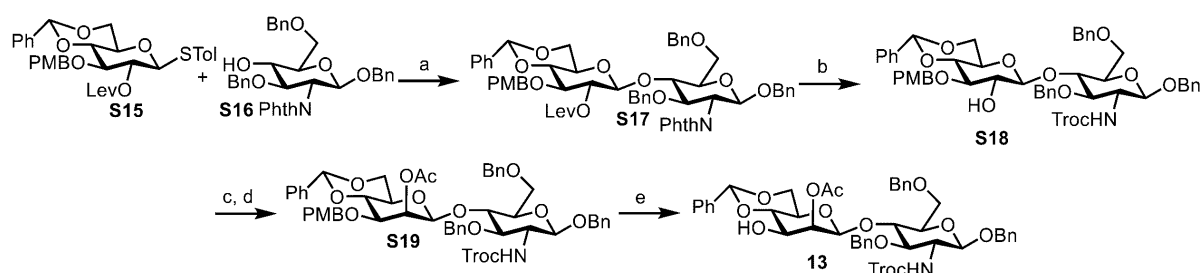
p-トリル [3, 6-ジ- O -ベンジル-2-デオキシ-2-(2, 2, 2-トリクロロエトキシ)カルボニルアミノ- β -D-グルコピラノシル] – (1 $\rightarrow$ 2) – 3, 4, 6-トリ- O -ベンジル-1-チオ- α -D-マンノピラノシド **18**。化合物 **S14** (203 mg、0.18 mmol、1 当量) の CH_2Cl_2 / MeOH 混合物 (10 mL、1 : 1 = v / v) の十分に攪拌した溶液に、 NaOMe (2.95 mg、0.055 mmol、0.3 当量) を 0 $^\circ\text{C}$ で添加した。20 分後、氷浴を除去し、TLC 分析が出発物質の消失を示すまで (4 時間)、反応混合物を攪拌しながら室温に温めた。完了したら、反応混合物を IR-120 で中和し、濾過し、真空濃縮した。得られた残留物を EtOAc / ヘキサン (1 : 2) を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物 **18** を白色の泡状物として得た (149 mg、76%)。 $R_f = 0.14$ (シリカゲル、 EtOAc : ヘキサン = 1 : 3) ; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) : δ 7.39–7.37 (m, 2H, Ar–H), 7.34–7.24 (m, 25H, Ar–H), 7.06–7.05 (m, 2H, Ar–H), 5.33 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, C1– H_α), 5.24 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 5.00 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, C1– H_β), 4.93 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 4.78 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H), 4.69–4.64 (m, 2H), 4.61 (d, $J =$

11.4 Hz, 2H), 4.57–4.51 (m, 4H), 4.43 (d, J=11.4 Hz, 1H), 4.34 (dd, J=2.4, 2.4 Hz, 1H), 4.22–4.20 (m, 2H), 4.07–4.04 (m, 2H), 3.84–3.82 (m, 2H), 3.77–3.72 (m, 2H), 3.67–3.65 (m, 1H), 3.59–3.54 (m, 2H), 3.01 (d, J=7.2 Hz, 1H), 2.68 (br, 1H, –OH), 2.30 (s, 3H, –CH₃); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 154.2, 138.5, 138.4, 138.3, 137.9, 137.7, 137.6, 132.5, 130.3, 129.8, 128.5, 128.5, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.8, 127.7, 127.6, 127.6, 127.5, 97.5, 95.4, 86.2, 79.1, 78.4, 75.3, 75.2, 74.6, 74.4, 74.2, 73.8, 73.8, 73.2, 73.1, 72.5, 71.4, 70.9, 69.3, 57.8, 21.1; HRMS (ESI-TOF) m/e: C₅₇H₆₀Cl₃NO₁₁SNa [M+Na]⁺ の計算値: 1094.2845 / 実測値: 1094.2881.

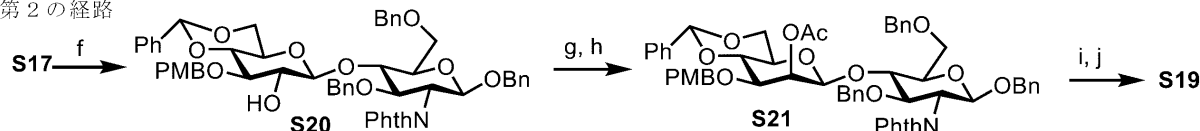
【0074】

【化44】

第1の経路



第2の経路



スキーム S 4

スキーム S 4 における試薬および条件: (a) NIS、TfOH、4 ÅのMS、−40 °C、1時間、CH₂Cl₂、93%。(b) エチレンジアミン/BuOH (1:4)、90 °C、2時間、次いでNaHCO₃、TroCCl、CH₂Cl₂、0 °C、3時間、81%。(c) Tf₂O、ピリジン、CH₂Cl₂、0 °C、4時間。(d) Bu₄NOAc、トルエン、超音波処理、室温、8時間、次いでNaHCO₃、TroCCl、CH₂Cl₂、0 °C、3時間、61% (2段階)。(e) DDQ、CH₂Cl₂、リン酸緩衝液 (pH=7)、0 °C~室温、3時間、85%。(f) ヒドラジン酢酸塩、THF、室温、16時間、92%。(g) Tf₂O、ピリジン、CH₂Cl₂、0 °C、2時間。(h) Bu₄NOAc、トルエン、超音波処理、室温、8時間、93% (2段階)。(i) エチレンジアミン/BuOH (1:4)、90 °C、2時間、次いでNaHCO₃、TroCCl、CH₂Cl₂、0 °C、3時間。(j) Ac₂O、ピリジン、CH₂Cl₂、室温、16時間、83% (2段階)。

【0075】

10

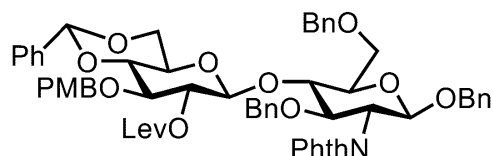
20

30

40

50

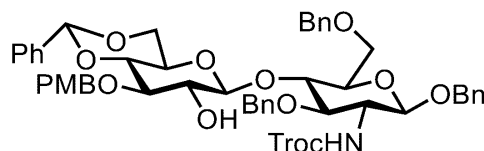
【化 4 5】



ベンジル [4, 6-O-ベンジリジン-3-O-p-メトキシ-ベンジル-2-O-レ
 ブリノイル-β-D-グルコピラノシル] - (1→4) - 3, 6-ジ-O-ベンジル-2-
 デオキシ-2-フタルイミド-β-D-グルコピラノシド S17。アクセプター S16
 の混合物³⁰。無水CH₂Cl₂ (50 mL) 中のアクセプター S16 の混合物³⁰ (1.
 59 g、2.74 mmol、1 当量)、ドナー S15²⁶ (2.11 g、3.57 mmol、1.3 当量) および活性化させた粉末状の 4 Å の MS (5.00 g) をアルゴン下で
 1 時間攪拌した。次いで反応混合物を -40 °C に冷却し、NIS (1.23 g、0.49
 mmol、2 当量) を添加し、その後に TfOH (Et₂O 中 0.5 M、1.37 mL、
 0.69 mmol、0.25 当量) を添加した。TLC が出発物質の消失を示すまで (2
 時間)、その反応を続けた。完了したら、反応混合物を Et₃N (0.7 mL) で失活さ
 せ、セライトパッドで濾過した。濾液を CH₂Cl₂ (50 mL) で希釈し、20% Na₂
 S₂O₃ 水溶液 (15 mL)、飽和 NaHCO₃ 水溶液 (20 mL) および塩水 (10 mL
) で洗浄した。分離した有機層を MgSO₄ で乾燥し、真空濃縮した。得られた残留物を
 EtOAc/ヘキサン (2:3) を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフ
 ィにより精製して、化合物 S17 を白色の泡状物として得た (2.68 g、93%)。R
 f = 0.43 (シリカゲル、アセトン:トルエン = 1:6) ; ¹H NMR (600 MHz
 , CDCl₃) : δ 7.75 (br, 1H, Ar-H), 7.63 (br, 2H, Ar-H), 7.50 (br, 1H, Ar-H), 7.46-7.45 (m, 2H, Ar-H)
 , 7.39-7.32 (m, 7H, Ar-H), 7.29-7.26 (m, 1H, Ar-H), 7.20-7.18 (m, 2H, Ar-H), 7.07-7.05 (m, 1H, A
 r-H), 7.02-7.01 (m, 4H, Ar-H), 6.98-6.97 (m, 2H
 , Ar-H), 6.87-6.83 (m, 5H, Ar-H), 5.44 (s, 1H, Ph
 -CH), 5.10-5.08 (m, 1H, C1-H_β), 4.92 (dd, J = 9.0
 , 8.4 Hz, 1H), 4.81-4.71 (m, 4H), 4.58 (d, J = 7.8 Hz
 , 1H, C1-H_β), 4.56 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 4.47 (d, J =
 6.0 Hz, 1H), 4.45 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 4.36 (d, J = 12
 .6 Hz, 1H), 4.23 (dd, J = 10.2, 4.8 Hz, 1H), 4.20-4
 .19 (m, 2H), 4.09-4.06 (m, 1H), 3.87 (dd, J = 11.4
 , 3.0 Hz, 1H), 3.79-3.78 (m, 1H), 3.78 (s, 3H, -CH
 3), 3.59 (dd, J = 9.6, 9.0 Hz, 1H), 3.55-3.51 (m, 2
 H), 3.43 (dd, J = 10.2, 10.2 Hz, 1H), 3.17 (ddd, J =
 9.6, 9.6, 4.8 Hz, 1H), 2.81-2.76 (m, 1H), 2.70-2
 .65 (m, 1H), 2.50-2.38 (m, 2H), 2.20 (s, 3H, -CH₃
) ; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) : δ 206.2, 171.1, 159.
 2, 138.6, 138.1, 137.3, 133.5, 131.6, 130.4, 12
 9.4, 129.0, 128.5, 128.2, 128.1, 127.9, 127.8,
 127.7, 127.5, 127.5, 127.0, 126.0, 123.1, 113.
 6, 101.1, 100.6, 97.4, 81.7, 78.0, 77.9, 76.6, 7
 4.8, 74.5, 73.7, 73.6, 70.7, 68.6, 67.7, 65.8, 5
 5.7, 55.3, 37.7, 29.9, 27.8 ; HRMS (ESI-TOF) m/e
 : C₆₁H₆₁NO₁₅Na [M+Na]⁺ の計算値 : 1070.3933 / 実測値 : 10
 70.3933.

【0076】

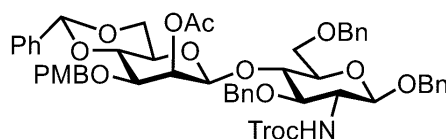
【化46】



ベンジル [4, 6-O-ベンジリジン-3-O-p-メトキシーベンジル-β-D-グルコピラノシル] - (1→4) - 3, 6-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ-2- (2, 2, 2-トリクロロエトキシ) カルボニルアミノ-β-D-グルコピラノシド S18。二糖 S17 (625 mg、0.596 mmol、1 当量) のエチレンジアミン / n-BuOH (7 mL、2 : 8 = v / v) 溶液を 90℃ で 2 時間攪拌した。溶媒を高真空下での回転蒸発により除去し、トルエンと共に 2 回同時蒸発させて微量の水を除去した。得られた残留物を無水 CH₂Cl₂ (15 mL) に溶解し、NaHCO₃ (250 mg、2.98 mmol、5 当量) およびクロロギ酸 2, 2, 2-トリクロロエチル (0.41 mL、2.98 mmol、5 当量) アルゴン下 0℃ で 3 時間処理した。完了したら、反応混合物を CH₂Cl₂ (20 mL) で希釈し、水 (20 mL) および塩水 (10 mL) で洗浄した。有機層を MgSO₄ で乾燥し、真空濃縮した。得られた残留物を EtOAc / トルエン (1 : 4) を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物 S18 を白色の粉末として得た (481 mg、81%)。R_f = 0.60 (シリカゲル、EtOAc : トルエン = 1 : 2) ; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) : δ 7.47–7.46 (m, 2H, Ar-H), 7.40–7.25 (m, 20H, Ar-H), 6.86–6.85 (m, 2H, Ar-H), 5.46 (s, 1H, Ph-CH), 5.12 (br, 1H), 4.88–4.85 (m, 3H), 4.71–4.55 (m, 9H, 2C1-H_β), 4.06–4.03 (m, 2H), 3.99 (dd, J = 11.4, 3.6 Hz, 1H), 3.87 (br, 1H), 3.80 (dd, J = 11.4, 1.8 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H, -CH₃), 3.56 (dd, J = 9.6, 9.0 Hz, 1H), 3.52–3.45 (m, 5H), 3.15 (ddd, J = 9.6, 9.6, 4.8 Hz, 1H), 3.03 (br, 1H, -OH) ; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) : δ 159.3, 153.8, 138.4, 137.7, 137.3, 137.2, 130.4, 129.6, 128.9, 128.4, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.8, 127.8, 127.6, 127.4, 126.0, 113.8, 103.2, 101.1, 99.2, 95.5, 81.3, 79.9, 79.2, 77.7, 74.9, 74.5, 74.3, 74.2, 73.5, 70.7, 68.6, 68.2, 66.2, 57.6, 55.2 ; HRMS (ESI-TOF) m/e : C₅₁H₅₄Cl₃NO₁₃Na [M+Na]⁺ の計算値 : 1016.2553 / 実測値 : 1016.2554。

【0077】

【化47】



ベンジル [2-O-アセチル-4, 6-O-ベンジリジン-3-O-p-メトキシーベンジル-β-D-マンノピラノシル] - (1→4) - 3, 6-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ-2- (2, 2, 2-トリクロロエトキシ) カルボニルアミノ-β-D-グルコピラノシド S19。S18 から : 二糖 S18 (1.02 g、1.02 mmol、1 当量) の無水 CH₂Cl₂ (13 mL) 攪拌溶液に、無水ピリジン (0.58 mL、7.17 mmol、7 当量) を添加し、その後に Tf₂O (0.30 mL、1.79 mmol、1.7

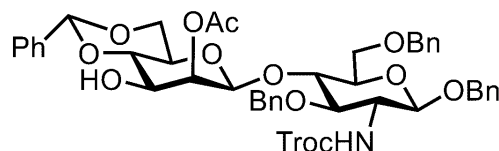
5 当量) をアルゴン下 0℃ で滴下した。T L C が出発物質の消失を示すまで (4 時間)、反応混合物を 0℃ で攪拌した。完了したら、それを CH_2Cl_2 (20 mL) で希釈し、0.5 N の HCl (20 mL) および塩水 (10 mL) で洗浄した。分離した有機層を MgSO_4 で乾燥し、真空濃縮した。粗製残留物を Bu_4NOAc (927 mg、3.07 mmol、3 当量) と混合し、トルエン (20 mL) に溶解した。溶媒を真空中で除去し、残留物をトルエンと共に 2 回同時蒸発させ、次いで無水トルエン (13 mL) に再溶解し、混合物を 8 時間超音波処理した。この時間の間に、本発明者らは NHTr oc の部分的脱保護を観察し、反応混合物を高真空下で濃縮した。得られた残留物を CH_2Cl_2 (13 mL) に溶解し、 NaHCO_3 (430 mg、5.12 mmol、5 当量) およびクロロギ酸 2, 2, 2-トリクロロエチル (0.71 mL、5.12 mmol、5 当量) でアルゴン下 0℃ で処理した。3 時間攪拌した後、反応混合物を CH_2Cl_2 (20 mL) で希釈し、水 (20 mL) および塩水 (10 mL) で洗浄した。分離した有機層を MgSO_4 で乾燥し、真空濃縮した。得られた残留物を EtOAc / トルエン (1 : 5) を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物 S 19 を白色の粉末として得た (650 mg、61%)。

【0078】

S 21 から：二糖 S 21 (1.20 g、1.21 mmol、1 当量) のエチレンジアミン / $n\text{-BuOH}$ (15 mL、2 : 8 = v / v) 溶液を 90℃ で 2 時間攪拌した。溶媒の除去後、粗製生成物をトルエンと共に 2 回同時蒸発させた。得られた残留物を CH_2Cl_2 (30 mL) に溶解し、 NaHCO_3 (508 mg、6.05 mmol、5 当量) およびクロロギ酸 2, 2, 2-トリクロロエチル (0.83 mL、6.05 mmol、5 当量) でアルゴン下 0℃ で処理した。3 時間後、反応混合物を CH_2Cl_2 (45 mL) で希釈し、水 (30 mL) および塩水 (15 mL) で洗浄した。有機層を MgSO_4 で乾燥し、濃縮し、トルエンと共に 2 回同時蒸発させ、真空中で蒸発させた。得られた残留物を、温度を 0℃ から室温に 16 時間かけてゆっくりと温めながら、アセチル化条件ピリジン (14 mL) 中の Ac_2O (7 mL) に直接供した。反応混合物を高真空下で濃縮し、アセトン / トルエン (1 : 5) を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物 S 19 を白色の粉末として得た (1.04 g、83%)。 $R_f = 0.54$ (シリカゲル、 EtOAc : トルエン = 1 : 3) ; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) : δ 7.48–7.46 (m, 2H, Ar–H), 7.39–7.35 (m, 3H, Ar–H), 7.33–7.25 (m, 14H, Ar–H), 7.24–7.21 (m, 3H, Ar–H), 6.84–6.82 (m, 2H, Ar–H), 5.50 (s, 1H, Ph–CH), 5.41 (d, $J = 3.0\text{ Hz}$, 1H), 5.09 (br, 1H), 4.92 (d, $J = 10.8\text{ Hz}$, 1H), 4.88 (d, $J = 12.0\text{ Hz}$, 1H), 4.72–4.62 (m, 5H, 2C1-H_β), 4.58–4.56 (m, 3H), 4.47–4.44 (m, 2H), 4.08 (dd, $J = 10.2, 4.8\text{ Hz}$, 1H), 4.04 (dd, $J = 9.0, 8.4\text{ Hz}$, 1H), 3.87–3.84 (m, 2H), 3.78–3.72 (m, 5H, $-\text{CH}_3$), 3.59 (dd, $J = 10.2, 10.2\text{ Hz}$, 1H), 3.45–3.43 (m, 2H), 3.38 (ddd, $J = 8.4, 8.4, 8.4\text{ Hz}$, 1H), 3.10 (ddd, $J = 9.6, 9.6, 4.8\text{ Hz}$, 1H), 2.07 (s, 3H, $-\text{CH}_3$) ; $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) : δ 170.3, 159.3, 153.8, 138.4, 137.8, 137.4, 137.1, 129.7, 129.2, 128.9, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 126.1, 113.8, 101.4, 99.1, 99.1, 77.8, 75.3, 74.4, 73.5, 71.4, 70.8, 69.1, 68.5, 68.4, 67.0, 57.5, 55.2, 21.0 ; HRMS (ESI–TOF) m/e : $\text{C}_{53}\text{H}_{56}\text{Cl}_3\text{NO}_{14}\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ の計算値 : 1058.2658 / 実測値 : 1058.2657。

【0079】

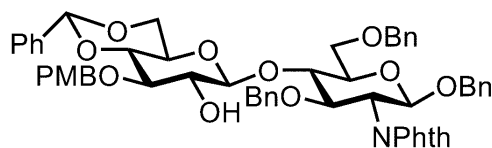
【化 48】



ベンジル [2-O-アセチル-4,6-O-ベンジリジン-β-D-マンノピラノシル] - (1→4) - 3,6-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ-2-(2,2,2-トリクロロエトキシ)カルボニルアミノ-β-D-グルコピラノシド 13。S19 (120 mg、0.12 mmol、1 当量) の CH_2Cl_2 / リン酸緩衝液混合物 (pH = 7) (3 mL、9 : 1 = v / v) 攪拌溶液に、2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノベンゾキノン (52.5 mg、0.23 mmol、2.2 当量) を 0℃ で添加した。TLC が出発物質の消失を示すまで (3 時間)、反応混合物を激しく攪拌した。完了したら、反応混合物を CH_2Cl_2 (10 mL) で希釈し、飽和 NaHCO_3 水溶液 (8 mL) および塩水 (4 mL) で洗浄し、有機相を MgSO_4 で乾燥し、濾過し、濃縮した。得られた残留物を EtOAc / トルエン (1 : 4) を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物 13 を白色の粉末として得た (90 mg、85%)。R_f = 0.29 (シリカゲル、EtOAc : トルエン = 1 : 3) ; ¹H NMR (600 MHz, CDCl_3) : δ 7.45–7.44 (m, 2H, Ar-H), 7.39–7.34 (m, 7H, Ar-H), 7.33–7.26 (m, 11H, Ar-H), 5.47 (s, 1H, Ph-CH), 5.23 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 5.06 (br, 1H), 4.91 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 4.87 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.74 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.68–4.61 (m, 4H, 2C1-H_β), 4.58–4.56 (m, 2H), 4.48 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.08 (dd, J = 10.2, 4.8 Hz, 1H), 4.04 (dd, J = 9.0, 9.0 Hz, 1H), 3.83 (br, 1H), 3.78 (dd, J = 11.4, 3.0 Hz, 1H), 3.73–3.70 (m, 2H), 3.64 (dd, J = 9.6, 3.6 Hz, 1H), 3.56 (dd, J = 10.2, 10.2 Hz, 1H), 3.43–3.36 (m, 2H), 3.11 (ddd, J = 9.6, 9.6, 4.8 Hz, 1H), 2.21 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 2.11 (s, 3H, -CH₃) ; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl_3) : δ 170.5, 153.8, 138.5, 137.8, 137.1, 137.0, 129.3, 128.6, 128.6, 128.4, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 126.2, 102.1, 99.1, 99.0, 78.5, 78.2, 74.4, 74.4, 73.6, 71.2, 70.8, 69.7, 68.4, 68.4, 66.7, 57.5 ; HRMS (ESI-TOF) m/e : C₄₅H₄₉Cl₃NO₁₃ [M+H]⁺ の計算値 : 916.2264 / 実測値 : 916.2252。

【0080】

【化 49】

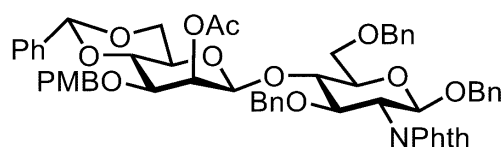


ベンジル [4,6-O-ベンジリジン-3-O-p-メトキシ-ベンジル-β-D-グルコピラノシル] - (1→4) - 3,6-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ-2-フタルイミド-β-D-グルコピラノシド S20。出発物質 S17 (2.48 g、2.37 mmol、1 当量) の無水 THF (55 mL) 攪拌溶液に、ヒドラジン酢酸塩 (327 mg、3.55 mmol、1.5 当量) をアルゴン下室温で添加した。TLC が出発物質の消失

を示すまで（１６時間）、反応混合物を激しく攪拌した。完了したら、反応混合物をEtOAc（１５０ｍＬ）で希釈し、水（６０ｍＬ）および塩水（３０ｍＬ）で洗浄した。有機相をMgSO₄で乾燥し、濾過し、真空濃縮した。得られた残留物をEtOAc／ヘキサン（１：２）を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物S20を白色の泡状物として得た（２．０７ｇ、９２％）。R_f＝０．５４（シリカゲル、EtOAc：ヘキサン＝１：１）；¹H NMR（６００MHz，CDCl₃）：δ 7．79－7．54（m，4 H，Ar－H），7．51－7．44（m，2 H，Ar－H），7．38－7．33（m，7 H，Ar－H），7．30－7．27（m，3 H，Ar－H），7．08－7．04（m，1 H，Ar－H），7．02－7．01（m，4 H，Ar－H），6．98－6．97（m，2 H，Ar－H），6．89－6．81（m，5 H，Ar－H），5．46（s，1 H，Ph－CH），5．09（d，J＝8．4 Hz，1 H，C1－H_β），4．85（d，J＝11．4 Hz，1 H），4．77（d，J＝12．6 Hz，1 H），4．75（d，J＝4．2 Hz，1 H），4．73（d，J＝4．2 Hz，1 H），4．68（d，J＝11．4 Hz，1 H），4．62（d，J＝7．2 Hz，1 H，C1－H_β），4．56（d，J＝12．0 Hz，1 H），4．46（d，J＝12．0 Hz，1 H），4．38（d，J＝12．0 Hz，1 H），4．32（dd，J＝10．8，8．4 Hz，1 H），4．21（d，J＝10．8，8．4 Hz，1 H），4．15－4．10（m，2 H），4．04（dd，J＝11．4，3．0 Hz，1 H），3．82（dd，J＝11．4，1．8 Hz，1 H），3．78（s，3 H，－CH₃），3．61（ddd，J＝9．6，3．0，3．0 Hz，1 H），3．56（dd，J＝3．0，3．0 Hz，1 H），3．52－3．45（m，3 H），3．18（ddd，J＝9．6，9．6，4．8 Hz，1 H），2．98（br，1 H，－OH）；¹³C NMR（１５０MHz，CDCl₃）：δ 167．9，159．3，138．4，137．8，137．3，137．2，133．6，131．6，130．5，129．7，128．9，128．4，128．2，128．1，128．0，127．9，127．8，127．5，127．4，127．1，126．0，123．2，113．8，103．4，101．1，97．5，81．3，79．5，78．8，77．8，75．0，74．7，74．5，74．2，73．6，70．8，68．6，68．2，66．2，55．8，55．3；HRMS（ESI－TOF）m／e：C₅₆H₅₅NO₁₃Na [M＋Na] の計算値⁺：972．3565／実測値：972．3567．

【0081】

【化50】

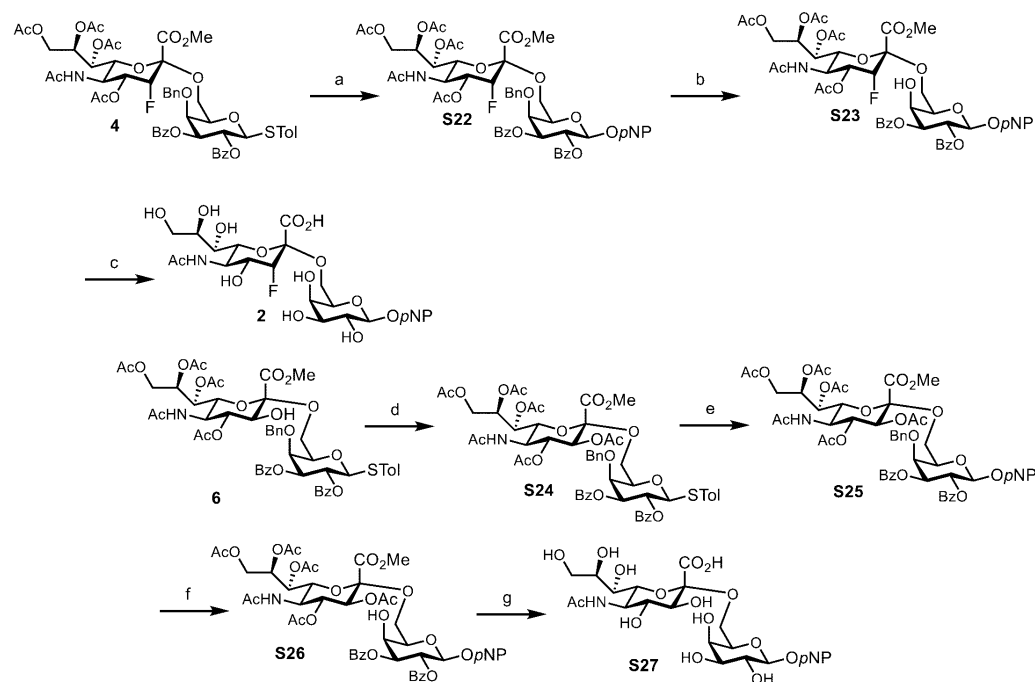


ベンジル [2－O－アセチル－4，6－O－ベンジリジン－3－O－p－メトキシーベンジル－β－D－マンノピラノシル]－（１→４）－3，6－ジ－O－ベンジル－2－デオキシ－2－フタルイミド－β－D－グルコピラノシド S21。二糖 S20（936 mg、0．985 mmol、1 当量）の無水CH₂Cl₂（12 mL）攪拌溶液に、無水ピリジン（0．56 mL、6．90 mmol、7 当量）を添加し、次いでトリフルオロメタンスルホン酸無水物（0．29 mL、1．72 mmol、1．75 当量）をアルゴン下 0℃で滴下し、TLC が出発物質の消失を示すまで（2 時間）、混合物を 0℃で攪拌した。完了したら、反応混合物をCH₂Cl₂（20 mL）で希釈し、0．5 NのHCl（20 mL）および塩水（10 mL）で洗浄した。分離した有機層をMgSO₄で乾燥し、真空濃縮し、得られた残留物をさらなる反応のためにそのまま使用した。上記得られた残留物にBu₄NOAc（594 mg、1．97 mmol、2 当量）を添加し、トルエン（18 mL）に溶解した。溶媒を真空中で除去し、残留物をトルエンと共に 2 回同時蒸発させて微量の水を除去した。残留物を無水トルエン（12 mL）に再溶解し、混合物を 8 時間超音

波処理した。完了したら、反応混合物をEtOAc (20 mL) で希釈し、水 (20 mL) および塩水 (10 mL) で洗浄した。分離した有機層をMgSO₄で乾燥し、濃縮した。得られた残留物をEtOAc/ヘキサン (1:2) を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物S21を白色の粉末として得た (913 mg、93%)。R_f=0.29 (シリカゲル、EtOAc:ヘキサン=1:2); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.76–7.49 (m, 4H, Ar–H), 7.48–7.46 (m, 2H, Ar–H), 7.39–7.31 (m, 7H, Ar–H), 7.26–7.22 (m, 3H, Ar–H), 7.10–7.06 (m, 1H, Ar–H), 7.04–7.03 (m, 4H, Ar–H), 6.99–6.98 (m, 2H, Ar–H), 6.90–6.84 (m, 5H, Ar–H), 5.49 (s, 1H, Ph–CH), 5.44 (d, J=3.0 Hz, 1H), 5.09 (d, J=7.8 Hz, 1H, C1–H_β), 4.82–4.76 (m, 3H), 4.68 (s, 1H, C1–H_β), 4.58 (d, J=12.0 Hz, 1H), 4.49–4.44 (m, 3H), 4.38 (d, J=12.6 Hz, 1H), 4.26–4.19 (m, 2H), 4.17–4.11 (m, 2H), 3.86–3.82 (m, 2H), 3.78 (s, 3H, –CH₃), 3.78–3.76 (m, 1H), 3.57–3.54 (m, 2H), 3.44 (dd, J=10.2, 3.6 Hz, 1H), 3.13 (dddd, J=9.6, 9.6, 4.8 Hz, 1H), 2.15 (s, 3H, –CH₃); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 170.2, 167.8, 159.2, 138.5, 137.8, 137.4, 137.1, 133.6, 131.5, 129.7, 129.2, 128.9, 128.5, 128.1, 128.1, 127.9, 127.9, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.1, 126.0, 123.1, 113.8, 101.4, 99.5, 97.3, 79.1, 77.7, 76.9, 75.4, 74.5, 74.3, 73.5, 71.3, 70.7, 69.1, 68.4, 68.3, 66.9, 55.6, 55.2, 21.0; HRMS (ESI–TOF) m/e: C₅₈H₅₇NO₁₄Na [M+Na]⁺の計算値: 1014.3671/実測値: 1014.3699.

[0082]

【化51】



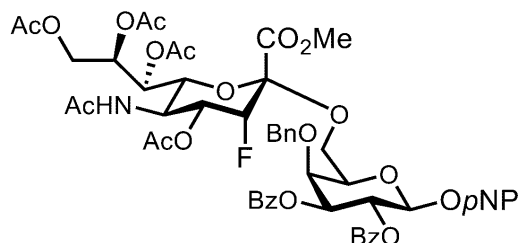
スキーム S 5

スキーム S 5における試薬および条件: (a) Br₂、CH₂Cl₂、0℃、10分間、次いでp-ニトロフェノール、Ag₂O、CH₃CN、1時間、73%。(b) NaBrO

3、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、 H_2O 、 EtOAc 、室温、1.5時間、93%。(c) $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 MeOH 、室温、16時間、84%。(d) Ac_2O 、ピリジン、室温、16時間、90%。(e) Br_2 、 CH_2Cl_2 、 0°C 、10分間、次いでp-ニトロフェノール、 Ag_2O 、 CH_3CN 、1時間、74%。(f) NaBrO_3 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、 H_2O 、 EtOAc 、室温、1.5時間、97%。(g) $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 MeOH 、室温、16時間、94%。

【0083】

【化52】

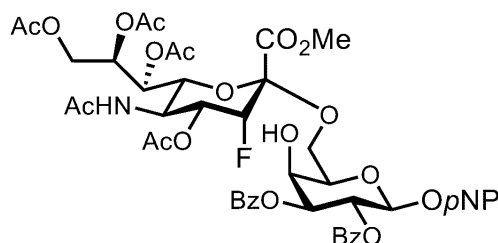


p-ニトロフェニル [5-アセトアミド-4, 7, 8, 9-テトラ-O-アセチル-3, 5-ジデオキシ-3-フルオロ-D-エリスロ- α -L-マンノ-ノナ-2-ウロピラノソン酸メチル] - (2 $\rightarrow$ 6) - 2, 3-ジ-O-ベンゾイル-4-O-ベンジル- β -D-ガラクトピラノシド S22。チオグリコシド4 (115mg、0.11mmol、1当量) の無水 CH_2Cl_2 (2mL) 攪拌溶液に、臭素 (6.02 μL 、0.12mmol、1.1当量) を 0°C で添加した。反応混合物を激しく10分間攪拌した後、溶媒を真空中で除去し、残留物をトルエンと共に2回同時蒸発させて微量の水を除去した。従って得られた残留物を無水 CH_3CN (2mL) に溶解し、4-ニトロフェノール (25.3mg、0.18mmol、1.7当量) および Ag_2O (124mg、0.53mmol、5当量) で処理した。TLCが出発物質の消失を示すまで (1時間)、反応混合物を暗所において N_2 中で激しく攪拌した。完了したら、反応混合物を EtOAc (10mL) で希釈し、セライトパッドで濾過した。濾液を飽和 NaHCO_3 水溶液 (4mL) および塩水 (3mL) で2回洗浄した。有機相を MgSO_4 で乾燥し、濾過し、真空濃縮した。得られた残留物をアセトン/トルエン (1:2) を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物S22を白色の粉末として得た (85mg、73%)。 $R_f = 0.46$ (シリカゲル、アセトン:トルエン=2:3) ; $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3) : δ 8.13–8.11 (m, 2H, Ar-H), 7.96–7.94 (m, 2H, Ar-H), 7.91–7.89 (m, 2H, Ar-H), 7.49–7.44 (m, 2H, Ar-H), 7.35–7.30 (m, 6H, Ar-H), 7.24–7.22 (m, 2H, Ar-H), 7.20–7.18 (m, 2H, Ar-H), 7.13–7.11 (m, 1H, Ar-H), 6.09 (dd, $J = 10.2, 7.8\text{ Hz}$, 1H), 5.65–5.59 (dd, $J = 10.2, 3.0\text{ Hz}$, 1H, C1-H β), 5.35 (d, $J = 9.6\text{ Hz}$, 1H), 5.28 (dd, $J = 9.6, 1.8\text{ Hz}$, 1H), 5.19 (dd, $J = 27.0, 10.8\text{ Hz}$, 1H, sia-C4-H), 5.04 (dd, $J = 51.0, 1.8\text{ Hz}$, 1H, sia-C3-H), 4.72–4.67 (m, 2H), 4.44 (dd, $J = 12.6, 3.6\text{ Hz}$, 1H), 4.40 (d, $J = 3.0\text{ Hz}$, 1H), 4.37 (dd, $J = 8.4, 6.6\text{ Hz}$, 1H), 4.31 (d, $J = 10.8\text{ Hz}$, 1H), 4.18 (ddd, $J = 4.2, 4.2, 4.2\text{ Hz}$, 1H), 4.08 (dd, $J = 12.6, 6.6\text{ Hz}$, 1H), 3.89–3.80 (m, 5H, -CH $_3$), 2.26 (s, 6H, -2CH $_3$), 2.10 (s, 3H, -CH $_3$), 1.93 (s, 3H, -CH $_3$), 1.92 (s, 3H, -CH $_3$) ; $^{13}\text{C NMR}$ (150MHz, CDCl_3) : δ 171.1, 170.8, 170.4, 170.3, 170.2, 165.5, 165.5, 165.4, 165.3, 161.8, 142.6, 138.0, 133.2, 133.1, 129.8, 129.7, 129

. 4, 129.0, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.5, 125.6, 116.8, 98.8, 98.7, 98.2, 88.1, 86.8, 75.0, 73.9, 73.7, 73.2, 71.6, 69.7, 69.1, 69.0, 67.3, 67.2, 63.4, 63.3, 53.4, 45.1, 23.3, 21.2, 20.8, 20.7, 20.6; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3): δ -215.5; HRMS (ESI-TOF) m/e : $\text{C}_{53}\text{H}_{55}\text{FN}_2\text{O}_{22}\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ の計算値: 1113.3123/実測値: 1113.3131.

【0084】

【化53】

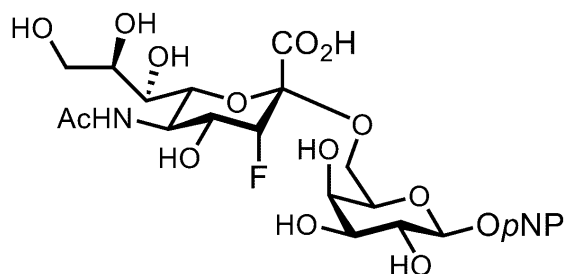


p-ニトロフェニル [5-アセトアミド-4, 7, 8, 9-テトラ-O-アセチル-3, 5-ジデオキシ-3-フルオロ-D-エリスロ- α -L-マンノ-ノナ-2-ウロピラノソン酸メチル] - (2 $\rightarrow$ 6) - 2, 3-ジ-O-ベンゾイル- β -D-ガラクトピラノシド S23。化合物 S22 (63.0 mg、0.058 mmol、1 当量) の EtOAc (0.8 mL) 攪拌溶液に、 H_2O (0.6 mL) 中の NaBrO_3 (85%、39.2 mg、0.26 mmol、4.5 当量) を添加し、その後 H_2O (1.2 mL) 中の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (40.2 mg、0.23 mmol、4 当量) をゆっくりと室温で添加した。TLC が出発物質の消失を示すまで (1.5 時間)、反応混合物を攪拌した。反応が完了したら反応混合物を EtOAc (10 mL) で希釈し、20% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液 (5 mL) および塩水 (3 mL) で洗浄した。有機相を MgSO_4 で乾燥し、濾過し、真空濃縮し、得られた残留物をアセトン/トルエン (3:5) を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物 S23 を白色の粉末として得た (54 mg、93%)。 R_f = 0.40 (シリカゲル、アセトン:トルエン = 2:3); ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 8.13–8.12 (m, 2H, Ar-H), 7.99–7.98 (m, 2H, Ar-H), 7.95–7.94 (m, 2H, Ar-H), 7.50–7.46 (m, 2H, Ar-H), 7.37–7.32 (m, 4H, Ar-H), 7.19–7.18 (m, 2H, Ar-H), 6.05 (dd, J = 10.2, 9.8 Hz, 1H), 5.53 (ddd, J = 9.0, 6.0, 3.0 Hz, 1H), 5.49–5.45 (m, 2H, C1-H $_{\beta}$), 5.36 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 5.27 (dd, J = 9.0, 1.8 Hz, 1H), 5.19 (dd, J = 27.0, 11.4 Hz, 1H, *sia*-C4-H), 5.05 (dd, J = 51.6, 1.8 Hz, 1H, *sia*-C3-H), 4.47 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 4.37 (dd, J = 12.6, 3.0 Hz, 1H), 4.26 (dd, J = 10.8, 1.2 Hz, 1H), 4.18 (dd, J = 6.6, 6.6 Hz, 1H), 4.13–4.07 (m, 1H), 4.05 (dd, J = 12.6, 6.6 Hz, 1H), 3.99–3.98 (m, 2H), 3.85 (s, 3H, -CH $_3$), 2.99 (br, 1H, -OH), 2.17 (s, 3H, -CH $_3$), 2.08 (s, 3H, -CH $_3$), 2.07 (s, 3H, -CH $_3$), 1.93 (s, 3H, -CH $_3$), 1.88 (s, 3H, -CH $_3$); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ 170.9, 170.8, 170.5, 170.3, 165.6, 165.6, 165.3, 161.8, 142.9, 133.4, 133.3, 129.8, 129.7, 129.2, 129.1, 129.0, 128.4, 128.4, 128.2, 125.6, 125.3, 117.1, 99.0, 98.1, 98.0, 88.3, 87.0, 73.9, 73.3, 71.6, 69.2, 69.1, 69.0,

67.9, 67.2, 66.5, 63.6, 62.9, 53.4, 45.1, 23.3, 21.1, 20.7, 20.6, 20.6; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3): δ -216.0; HRMS (ESI-TOF) m/e : $\text{C}_{46}\text{H}_{50}\text{FN}_2\text{O}_{22}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算値: 1001.2834 / 実測値: 1001.2833.

【0085】

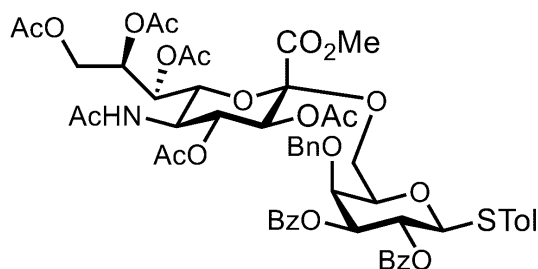
【化54】



p-ニトロフェニル [5-アセトアミド-3, 5-ジデオキシ-3-フルオロ-D-エリスロ- α -L-マンノ-2-ウロピラノソン酸メチル] - (2 $\rightarrow$ 6) - β -D-ガラクトピラノシド2。化合物S23 (53 mg、0.053 mmol、1当量) のメタノール (5 mL) 溶液に、水 (1 mL) 中の $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (22.2 mg、0.53 mmol、10当量) を添加した。室温で16時間攪拌した後、反応混合物をIR-120で中和し、濾過し、真空濃縮した。得られた残留物を(BIO-RAD) Biogel P-2カラムクロマトグラフィ (水で溶離) で精製して、化合物2を得た (27 mg、84%)。 ^1H NMR (600 MHz, D_2O): δ 8.29-8.28 (m, 2H, Ar-H), 7.30-7.29 (m, 2H, Ar-H), 5.21 (dd, $J=51.6$, 2.4 Hz, 1H, C3-H), 5.18 (d, $J=7.8$ Hz, C1-H_β), 4.17 (dd, $J=9.0$, 9.0 Hz, 1H), 4.07-4.00 (m, 3H), 3.91-3.77 (m, 7H), 3.63 (dd, $J=12.0$, 6.6 Hz, 1H), 3.57 (dd, $J=9.0$, 1.8 Hz, 1H), 2.04 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O): δ 175.0, 170.8, 161.9, 142.5, 126.1, 116.5, 100.0, 98.9, 98.9, 91.6, 90.3, 73.9, 72.4, 72.4, 71.6, 70.3, 69.7, 69.5, 68.4, 68.1, 63.7, 62.6, 46.8, 46.8, 22.0; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3): δ -217.6; HRMS (ESI-TOF) m/e : $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{FN}_2\text{O}_{16}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算値: 611.1730 / 実測値: 611.1732.

【0086】

【化55】

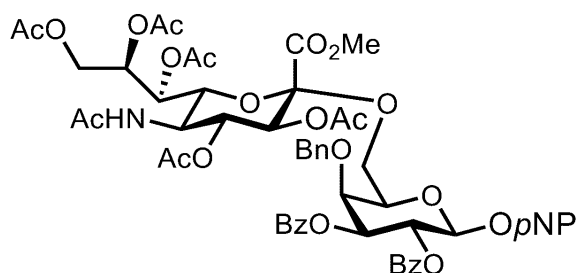


p-トリル [5-アセトアミド-3, 4, 7, 8, 9-ペンターO-アセチル-5-デオキシ-D-エリスロ- α -L-グルコ-2-ウロピラノソン酸メチル] - (2 $\rightarrow$ 6) - 2, 3-ジ-O-ベンゾイル-4-O-ベンジル-1-チオ- β -D-ガラクトピラノシドS24。出発物質6 (174 mg、0.16 mmol、1当量) のピリジン (2

mL) 攪拌溶液に、 Ac_2O (1 mL) を添加した。反応混合物を室温で 16 時間激しく攪拌し、次いで高真空下で濃縮した。得られた残留物をアセトン／トルエン (1 : 2) を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物 S 2 4 を白色の粉末として得た (162 mg、90%)。 $R_f = 0.49$ (シリカゲル、アセトン : トルエン = 2 : 3) ; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) : δ 7.94–7.92 (m, 2H, Ar–H), 7.88–7.87 (m, 2H, Ar–H), 7.48–7.44 (m, 2H, Ar–H), 7.40–7.38 (m, 2H, Ar–H), 7.35–7.27 (m, 6H, Ar–H), 7.23–7.20 (m, 2H, Ar–H), 7.18–7.16 (m, 1H, Ar–H), 7.05–7.03 (m, 2H, Ar–H), 5.80 (dd, $J = 10.2, 9.6$ Hz, 1H), 5.44–5.42 (m, 2H), 5.35–5.29 (m, 3H), 5.25 (dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, 1H), 4.95 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H, C1–H $_{\beta}$), 4.67–4.61 (m, 3H), 4.33 (ddd, $J = 10.2, 10.2, 10.2$ Hz, 1H), 4.25–4.22 (m, 2H), 4.03–3.97 (m, 3H), 3.92–3.89 (m, 1H), 3.75 (s, 3H, –CH $_3$), 2.29 (s, 3H, –CH $_3$), 2.15 (s, 3H, –CH $_3$), 2.07 (s, 3H, –CH $_3$), 2.00 (s, 3H, –CH $_3$), 1.95 (s, 3H, –CH $_3$), 1.94 (s, 3H, –CH $_3$), 1.89 (s, 3H, –CH $_3$) ; ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) : δ 171.0, 170.5, 170.3, 170.0, 169.3, 168.5, 168.0, 165.7, 165.2, 138.4, 137.6, 133.1, 132.9, 132.5, 129.8, 129.7, 129.7, 129.5, 129.2, 129.1, 128.3, 128.2, 128.0, 127.4, 127.2, 98.9, 86.5, 76.9, 75.5, 74.6, 74.3, 72.7, 71.6, 71.5, 68.5, 68.3, 66.9, 62.6, 62.5, 52.7, 48.4, 23.0, 21.1, 20.8, 20.7, 20.6, 20.6, 20.5 ; HRMS (ESI–TOF) m/e : $\text{C}_{56}\text{H}_{61}\text{NO}_{21}\text{SNa}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ の計算値 : 1138.3349 / 実測値 : 1138.3358 .

【0087】

【化56】

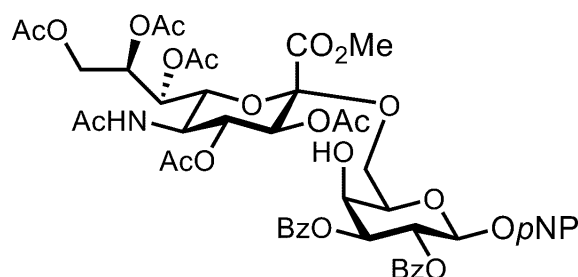


p–ニトロフェニル [5–アセトアミド–3, 4, 7, 8, 9–ペンター–O–アセチル–5–デオキシ–D–エリスロ– α –L–グルコーノナ–2–ウロピラノソン酸メチル]–(2 $\rightarrow$ 6)–2, 3–ジ–O–ベンゾイル–4–O–ベンジル– β –D–ガラクトピラノシド S 2 5。チオグリコシド S 2 4 (132 mg、0.12 mmol、1 当量) の無水 CH_2Cl_2 (2.5 mL) 攪拌溶液に、臭素 (6.67 μL 、0.13 mmol、1.1 当量) を 0 $^\circ\text{C}$ で添加した。10 分間激しく攪拌した後、溶媒を真空中で除去し、残留物をトルエンと共に 2 回同時蒸発させて微量の水を除去した。得られた残留物を無水 CH_3CN (2.5 mL) に溶解し、4–ニトロフェノール (28.0 mg、0.20 mmol、1.7 当量) および Ag_2O (137 mg、0.59 mmol、5 当量) で処理した。TLC が出発物質の消失を示すまで (1 時間)、反応混合物を暗所において N_2 中で激しく攪拌した。反応が完了したら反応混合物を EtOAc (12 mL) で希釈し、セライトパッドで濾過した。濾液を飽和 NaHCO_3 水溶液 (5 mL) および塩水 (3 mL) で 2 回洗浄した。有機相を MgSO_4 で乾燥し、濾過し、真空濃縮し、得られた残留物をアセ

トン／トルエン（３：５）を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物Ｓ２５を白色の粉末として得た（９９ｍｇ、７４％）。 $R_f = 0.51$ （シリカゲル、アセトン：トルエン＝２：３）； ^1H NMR（６００ＭＨｚ， CDCl_3 ）： δ ８．１５－８．１３（ｍ，２Ｈ， Ar-H ），７．９５－７．９２（ｍ，４Ｈ， Ar-H ），７．５０－７．４４（ｍ，２Ｈ， Ar-H ），７．３６－７．３１（ｍ，６Ｈ， Ar-H ），７．２４－７．１９（ｍ，２Ｈ， Ar-H ），７．１７－７．１５（ｍ，３Ｈ， Ar-H ），６．１０（ｄｄ， $J = 10.2, 7.8$ Ｈｚ，１Ｈ），５．５４（ｄｄ， $J = 10.2, 3.0$ Ｈｚ，１Ｈ），５．５２（ｄ， $J = 7.8$ Ｈｚ，１Ｈ， C1-H_β ），５．４８（ｄｄｄ， $J = 10.2, 7.2, 3.0$ Ｈｚ，１Ｈ），５．３９（ｄ， $J = 10.2$ Ｈｚ，１Ｈ），５．３１－５．２９（ｍ，２Ｈ），５．２３（ｄｄ， $J = 9.6, 1.8$ Ｈｚ，１Ｈ），４．７３（ｄｄ， $J = 10.8, 2.4$ Ｈｚ，１Ｈ），４．７１－４．６５（ｍ，２Ｈ），４．３２－４．３０（ｍ，３Ｈ），４．１９（ｄｄ， $J = 7.2, 7.2$ Ｈｚ，１Ｈ），３．９７（ｄｄ， $J = 12.6, 7.2$ Ｈｚ，１Ｈ），３．８８－３．８６（ｍ，２Ｈ），３．８３（ｓ，３Ｈ， $-\text{CH}_3$ ），２．２４（ｓ，３Ｈ， $-\text{CH}_3$ ），２．１２（ｓ，３Ｈ， $-\text{CH}_3$ ），２．０１（ｓ，３Ｈ， $-\text{CH}_3$ ），１．９８（ｓ，３Ｈ， $-\text{CH}_3$ ），１．９０（ｓ，３Ｈ， $-\text{CH}_3$ ），１．８８（ｓ，３Ｈ， $-\text{CH}_3$ ）； ^{13}C NMR（１５０ＭＨｚ， CDCl_3 ）： δ １７１．０，１７０．７（２Ｃ），１７０．０，１６９．６，１６８．５，１６８．３，１６５．７，１６５．３，１６１．７，１４２．７，１３７．９，１３３．３，１３３．２，１２９．９，１２９．７，１２９．３，１２８．９，１２８．４，１２８．３，１２８．２，１２８．０，１２７．６，１２５．７，１１６．８，９９．７，９８．４，７５．１，７４．１，７４．０，７３．９，７２．８，７１．６，７１．１，６９．７，６７．６，６７．０，６３．８，６３．３，５２．９，４８．４，２３．０，２０．９，２０．８，２０．７，２０．６；HRMS（ESI-TOF） m/e ： $\text{C}_{55}\text{H}_{59}\text{N}_2\text{O}_{24}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ の計算値：１１３１．３４５２／実測値：１１３１．３４４０．

【００８８】

【化５７】

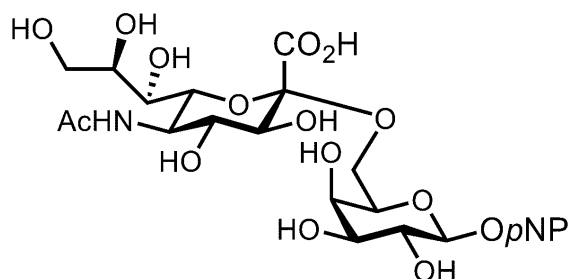


p-ニトロフェニル〔５-アセトアミド-３，４，７，８，９-ペンター-O-アセチル-５-デオキシ-D-エリスロ- α -L-グルコーノナ-２-ウロピラノソン酸メチル〕-（２→６）-２，３-ジ-O-ベンゾイル- β -D-ガラクトピラノシドＳ２６。化合物Ｓ２５（９１．０ｍｇ、０．０８０ｍｍｏｌ、１当量）の EtOAc （１．２ｍＬ）攪拌溶液に、 H_2O （０．９ｍＬ）中の NaBrO_3 （５４．６ｍｇ、０．３６ｍｍｏｌ、４．５当量）を添加し、その後に H_2O （１．８ｍＬ）中の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ （８５％、５６．０ｍｇ、０．３２ｍｍｏｌ、４当量）を室温でゆっくりと添加した。ＴＬＣが出発物質の消失を示すまで（１．５時間）、反応混合物を攪拌した。完了したら、反応混合物を EtOAc （１５ｍＬ）で希釈し、２０％ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液（７ｍＬ）および塩水（４ｍＬ）で洗浄した。有機相を MgSO_4 で乾燥し、濾過し、真空濃縮した。得られた残留物をアセトン／トルエン（３：５）を溶離液として用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製して、化合物Ｓ２６を白色の粉末として得た（８１ｍｇ、９７％）。 $R_f = 0.23$ （シリカゲル、アセトン：トルエン＝２：３）； ^1H NMR（６００ＭＨｚ， CDCl_3 ）： δ ８．１８－８．１６（ｍ，２Ｈ， Ar-H ），８．００－７．９９（ｍ

, 2 H, Ar-H), 7.94–7.93 (m, 2 H, Ar-H), 7.51–7.46 (m, 2 H, Ar-H), 7.38–7.32 (m, 4 H, Ar-H), 7.15–7.13 (m, 2 H, Ar-H), 6.07 (dd, $J=10.2, 7.8$ Hz, 1 H), 5.46–5.34 (m, 5 H, C1-H β), 5.30 (d, $J=10.2$ Hz, 1 H), 5.22 (dd, $J=7.8, 1.8$ Hz, 1 H), 4.60 (dd, $J=10.8, 1.8$ Hz, 1 H), 4.43 (d, $J=3.0$ Hz, 1 H), 4.33 (dd, $J=12.6, 2.4$ Hz, 1 H), 4.26 (dddd, $J=10.2, 10.2, 10.2$ Hz, 1 H), 4.12 (dd, $J=6.6, 6.6$ Hz, 1 H), 4.05 (dd, $J=10.2, 6.6$ Hz, 1 H), 3.99 (dd, $J=10.2, 6.6$ Hz, 1 H), 3.93 (dd, $J=12.6, 7.2$ Hz, 1 H), 3.83 (s, 3 H, -CH₃), 3.17 (br, 1 H, -OH), 2.14 (s, 3 H, -CH₃), 2.05 (s, 3 H, -CH₃), 2.02 (s, 3 H, -CH₃), 2.00 (s, 3 H, -CH₃), 1.87 (s, 3 H, -CH₃), 1.85 (s, 3 H, -CH₃); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 171.1, 171.0, 170.4, 170.0, 169.9, 168.8, 167.9, 165.8, 165.2, 161.7, 142.9, 133.4, 133.3, 129.9, 129.7, 129.3, 129.1, 128.4, 128.4, 125.8, 116.9, 99.1, 98.9, 74.0, 73.9, 73.0, 71.1, 70.6, 69.2, 68.7, 67.2, 66.5, 63.0, 62.5, 53.0, 48.5, 23.0, 20.8, 20.7, 20.6, 20.6; HRMS (ESI-TOF) m/e : C₄₈H₅₃N₂O₂₄ [M+H]⁺ の計算値: 1041.2983 / 実測値: 1041.2976.

【0089】

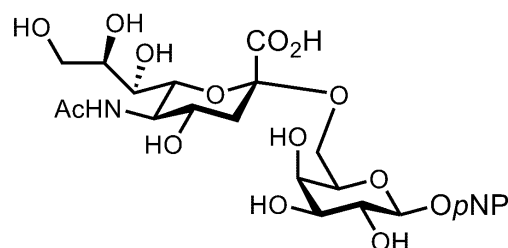
【化58】



p-ニトロフェニル [5-アセトアミド-5-デオキシ-D-エリスロ- α -L-グルコノナ-2-ウロピラノソネート] - (2 $\rightarrow$ 6) - β -D-ガラクトピラノシド S 27。化合物 S 26 (75 mg、0.072 mmol、1 当量) のメタノール (5 mL) 溶液に、水 (1 mL) 中の LiOH $\cdot$ H₂O (30 mg、0.72 mmol、10 当量) を添加した。室温で 16 時間攪拌した後、反応混合物を IR-120 で中和し、濾過し、濃縮した。得られた残留物を水を溶離液として用いる (BIO-RAD) Biogel P-2 カラムクロマトグラフィにより精製して、化合物 S 27 を得た (41 mg、94%)。 ¹H NMR (600 MHz, D₂O): δ 8.29–8.28 (m, 2 H, Ar-H), 7.28–7.27 (m, 2 H, Ar-H), 5.20 (d, $J=7.2$ Hz, C1-H β), 4.09–4.06 (m, 2 H), 4.01 (dd, $J=10.8, 7.8$ Hz, 1 H), 3.92–3.79 (m, 6 H), 3.71 (d, $J=10.8$ Hz, 1 H), 3.64–3.60 (m, 2 H), 3.53 (d, $J=9.6$ Hz, 1 H), 3.49 (d, $J=9.6$ Hz, 1 H), 2.02 (s, 3 H, -CH₃); ¹³C NMR (150 MHz, D₂O): δ 174.8, 173.0, 161.9, 142.5, 126.1, 116.4, 99.9, 98.1, 76.1, 73.9, 73.5, 72.4, 72.2, 71.5, 70.3, 68.4, 68.0, 63.0, 62.6, 50.7, 21.9; HRMS (ESI-TOF) m/e : C₂₃H₃₃N₂O₁₇ [M+H]⁺ の計算値: 609.1774 / 実測値: 609.1774.

【0090】

【化 5 9】



p-ニトロフェニル [5-アセトアミド-5-デオキシ-D-グリセロ-α-D-ガラクトーノナ-2-ウロピラノシルオネート] - (2→6) - β-D-ガラクトピラノシド 1。15 mL のトリス緩衝液 (pH 7.0) 中の pNP-β-Gal (1.0 mmol)、シアル酸 (1.2 mmol)、シチジン三リン酸 (1.2 mmol)、CMP-シアル酸合成酵素 (CSS、12 U)、ピロホスファターゼ (PPA、1 U) および α-2, 6-シアリルトランスフェラーゼ (SiaT、15 U) を 5 mM の MgCl₂ および 5 mM の MnCl₂ と混合することにより、Neu5Ac-α2, 6-Gal-pNP: Neu5Ac-α2, 6-Gal-pNP を合成した。加熱および遠心分離によるタンパク質の除去後に、生成物を水を溶離液として用いる (BIO-RAD) Biogel P-2 カラムクロマトグラフィにより精製した。Neu5Ac-α2, 6-Gal-pNP を含有する画分を回収し、凍結乾燥して化合物 1 を得た (50%)。¹H NMR (600 MHz, D₂O): δ 8.33-8.32 (m, 2H, Ar-H), 7.31-7.29 (m, 2H, Ar-H), 5.23 (d, J=7.8 Hz, C1-H_β), 4.06-4.04 (m, 2H), 3.99 (dd, J=10.2, 8.4 Hz, 1H), 3.90-3.86 (m, 3H), 3.83 (dd, J=10.2, 3.6 Hz, 1H), 3.80-3.76 (m, 1H), 3.73-3.69 (m, 3H), 3.65-3.62 (m, 2H), 3.57 (d, J=8.4 Hz, 1H), 2.79 (dd, J=12.6, 4.8 Hz, 1H), 2.04 (s, 3H, -CH₃), 1.68 (dd, J=12.6, 12.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (150 MHz, D₂O): δ 174.6, 173.1, 161.4, 142.1, 125.7, 116.0, 99.8, 99.4, 73.6, 72.1, 71.9, 71.3, 69.8, 68.0, 67.7, 67.7, 62.5, 62.2, 51.4, 39.8, 21.6; HRMS (ESI-TOF) m/e: C₂₃H₃₃N₂O₁₆ [M+H]⁺ の計算値: 593.1825 / 実測値: 593.1825.

【0091】

実施例 2: シアリダーゼ触媒加水分解に対する安定性およびシアリダーゼ阻害の分析³¹
材料:

ニホンコウジカビ (G5160) の β-ガラクトシダーゼならびにコレラ菌 (11080725001) およびウェルシュ菌 (11585886001) 由来のシアリダーゼを Sigma Aldrich 社から受け取った。

【0092】

シアリダーゼのための酵素アッセイ:

このアッセイは、基質 (0~20 mM) および β-ガラクトシダーゼ (100 mU) を含有する 50 μL の最終体積で 96 ウェルプレートにおいて 2 連で 37℃で行った。2 種類のシアリダーゼのためのアッセイ条件は以下のとおりである: ウェルシュ菌 (1 mU)、酢酸ナトリウム緩衝液 (50 mM) (pH 5.0) および CaCl₂ (10 mM); コレラ菌 (2 mU)、酢酸ナトリウム緩衝液 (50 mM) (pH 5.5)、CaCl₂ (10 mM) および NaCl (150 mM)。これらの反応をウェルシュ菌では 40 分間~2 時間、コレラ菌では一晩行った。65 μL の CAPS 緩衝液 (N-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸、0.5 M、pH 10.5) を添加して、このアッセイを止めた。形成された p-ニトロフェノールの量は、マイクロプレートリーダーを用いて反応混合物の A_{405 nm} を測定することにより決定した。3 種類の化合物 (Neu5Ac-α

2、6-GalβpNP、3F^{ax}-Neu5Ac-α2、6-GalβpNPおよび3OH^{eq}-Neu5Ac-α2、6-GalβpNP)を酵素のための基質として試験した。全ての3種類の化合物は、シアリダーゼの非存在下37℃で1時間のインキュベーション後に20mMにおいてA_{405nm}のバックグラウンド吸光度を有する。3種類の化合物、すなわちNeu5Ac-α2、6-GalβpNP、3F^{ax}-Neu5Ac-α2、6-GalβpNPおよび3OH^{eq}-Neu5Ac-α2、6-GalβpNPの吸光度はそれぞれ0.044、0.129および0.072であった。pNPの標準曲線は0.35mMのpNPの段階2倍希釈により決定し、次いでpNPの濃度に対してA_{405nm}をグラフ化することによりpNPの標準曲線を得た。

【0093】

シアリダーゼのための阻害アッセイ：

当該アッセイは、様々な濃度(0~20mM)の阻害剤の非存在または存在下で基質Neu5Ac-α2、6-GalβpNP(0.6mM)、β-ガラクトシダーゼ(100mU)およびシアリダーゼを含有する50μLの最終体積で96ウェルプレートにおいて2連で37℃で行った。反応をウェルシュ菌では40分間~2時間、コレラ菌では一晩進行させた。CAPS緩衝液(65μL、0.5M、pH10.5)を添加することにより、このアッセイを止めた。形成されたp-ニトロフェノールの量はマイクロプレートリーダーを用いて反応混合物のA_{405nm}を測定することにより決定した(図1)。

【0094】

実施例3：表面プラズモン共鳴(SPR)分析によるFcγRIIIaへの結合に対する効果を研究するための3F^{ax}-Neu5AcおよびNeu5Acにより修飾された均質なmAbの調製

酵素の発現：

エンドグリコシダーゼEndo-S、Endo-S2、Endo-S2突然変異体(D184Q)、およびバクテロイデス・フラジリスNCTC9343由来のα-ラーフコシダーゼを大腸菌において発現させ、Ni-NTAアガロースビーズを用いて酵素の精製を行った。

【0095】

モノ-GlcNAc-リツキシマブの調製：

以前に記載されているように³²、トリス-HCl緩衝液(50mM、pH7.4、1.5mL)中のリツキシマブ(3.0mg、リツキサン(登録商標)、Roche社)をEndo-S(120μg)、Endo-S2(240μg)およびBfFucH(4.5mg)と共に37℃で24時間インキュベートした。LC-MSおよびSDS-PAGE分析は重鎖上のN-グリカンの完全な切断を示した。反応混合物をトリス-HCl緩衝液(50mM、pH7.4)により予め平衡化されたタンパク質A-アガロース樹脂カラム(1mL、GE Healthcare社)によるアフィニティークロマトグラフィに供した。次いで、このカラムをトリス-HCl緩衝液(50mM、pH7.4、20mL)で洗浄した。結合されたIgGをグリシン-HCl(100mM、pH3.0、10mL)により遊離し、溶出画分をトリス-HCl緩衝液(1.0M、pH8.3)で直接中和した。当該抗体を含有する画分を1つにまとめ、遠心濾過(Amicon Ultra遠心式フィルター、Millipore社、マサチューセッツ州ビルリカ)により濃縮してモノ-GlcNAcリツキシマブ(2.4mg)を得た。生成物をトリプシン処理し、糖ペプチド、すなわちTKPREEQYNSTYR(m/z=1391.58)およびEEQYNSTYR(m/z=1873.88)をナノスプレーLC/MSを用いて分析して、モノ-GlcNAcのグリコシル化パターンを確認した。

【0096】

グリカンオキサゾリンによるモノ-GlcNAcリツキシマブのグリコシル基転移：

グリカンオキサゾリンを50mMのトリス緩衝液(pH7.4)中のEndo-S2D184Qおよびモノ-GlcNAcリツキシマブ混合物に添加した。この溶液を37℃で30分間インキュベートした。次いで反応混合物をタンパク質Aアフィニティークラム

10

20

30

40

50

、その後、C a p t o Q (G E H e a l t h c a r e 社) のアニオン交換カラムで精製して所望の生成物を回収した。

【0097】

糖鎖工学的に操作されたハーセプチン抗体のSDS-PAGE検出：

全てのSDS-PAGE分析を試料中に存在する2-メルカプトエタノールと共に、MOPS緩衝液中のNuPAGE (登録商標) Novex (登録商標) 4~12% Bis-Trisゲル (Invitrogen社) を用いて行った (図2)。

【0098】

糖鎖工学的に操作されたmAbのMS分光分析：

トリプシン処理した糖ペプチドの分析のために、高解像度および高質量精度ナノフローLC-MS/MS実験を、ナノエレクトロスプレーイオン源 (New Objective社)、Agilent 1100 Series二成分高速液体クロマトグラフィポンプ (Agilent Technologies社、カリフォルニア州パロアルト)、およびFamosオートサンプラ (LC Packings、カリフォルニア州サンフランシスコ) を備えたLTQFT Ultra (線形四重極イオントラップフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴) 質量分析計 (Thermo Electron社、カリフォルニア州サンノゼ) により行った。消化溶液 (6 μ L) を自己充填プレカラム (150 μ m (内径) $\times$ 20 mm、5 μ m、100 $\text{\AA}$) に10 μ L/分の流速で注入した。300 nL/分の流速で動作する移動相Aとして0.1%ギ酸/水および移動相Bとして0.1%ギ酸/80%アセトニトリルを用いる自己充填逆相C18ナノカラム (75 μ m (内径) $\times$ 300 mm、5 μ m、100 $\text{\AA}$) により、クロマトグラフ分離を行った。フルスキャンMS条件：質量範囲m/z 320~2000、解像度m/z 400における100,000の調査。LTQによりMS2のために10種の最も強力なイオンを連続的に単離した。エレクトロスプレー電圧を1.8 kVに維持し、キャピラリー温度を200 $^{\circ}$ Cに設定した (図3および表3)。

【0099】

表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析

全てのSPR実験を、泳動用緩衝液としてHBS-EP (10 mMのHEPES (pH 7.4)、0.15 MのNaCl、3 mMのEDTA、0.005%のSurfactant P20) を用いて25 $^{\circ}$ Cで、BIAcore T200による単一サイクル速度論的方法を用いて行った。Fc γ RIIIaをHEK-293細胞にトランスフェクトして、分析物として複合型グリコシル化組換えタンパク質を発現させた。Fc γ RIIIa受容体へのリツキシマブ結合の分析のために、ヒトFab捕捉キット (GE Healthcare社) 内の抗ヒトFab抗体をCM5センサチップの参照および活性チャネルの両方に固定し、次いでFc γ RIIIa分析物の段階希釈物 (2, 6-FluoSCTおよび2, 6-SCTのために2.5、5、10、20、40 nM; 市販のリツキシマブのために8、24、72、216、648 nM) と、240秒間の結合およびその後の420秒の解離時間にわたって30 μ L/分で相互作用させるために、リツキシマブを活性チャネル上に捕捉した。リツキシマブデータをバックグラウンド除去のための二重参照により処理した。リツキシマブのデータをBiaEvaluationソフトウェア (GE Healthcare社) において1:1のLangmuir結合モデルに当て嵌めて、反応速度/親和定数を得た (表4)。分析対象の抗体をヒトFab捕捉キットにより捕捉し、単一サイクル速度論的方法により検出した。

10

20

30

40

50

【表 3】

N-グリカンの相対的存在量の較正^{3,3)}

R i t - F ^a × S C T	R i t - S C T	%
濃度	濃度	
1.0	0.0	なし
1.7	1.8	Rit-GlcNa
0.0	98.2	Rit-SCT
97.3	0.0	Rit-FluoSCT

【表 4】

10

S P Rにより測定した糖鎖工学的に操作されたリツキシマブ I g G 1 の F c γ R I I I a への結合親和力

試料	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	倍
リツキシマブ	2.31E+05	0.07054	3.06E-07	32.33	1 倍
2,6-F ^a SCT	2.44E+05	0.001996	8.18E-09	71.28	37.4 倍
2,6-SCT	2.68E+05	0.002059	7.67E-09	60.64	39.9 倍

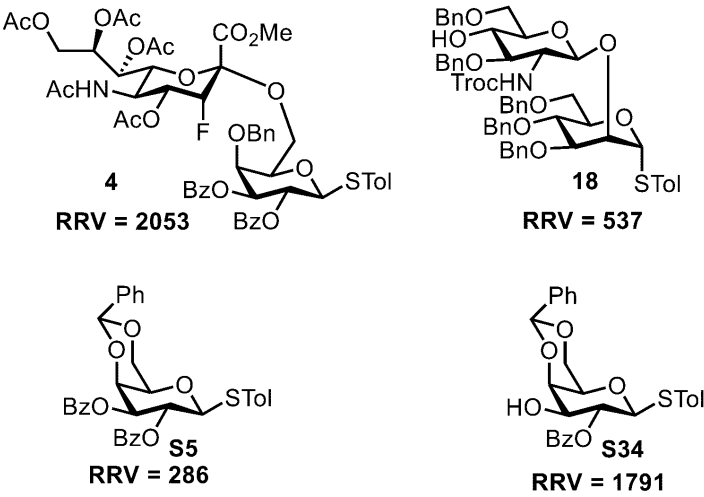
【0100】

実施例 4：化合物 4 および 18 の相対反応性値 (R R V)

20

以前に報告されている実験手順^{3,4)}に従って R R V を 3 連で測定した。二糖ドナー 4 の R R V (2053) を競合参照ドナー S 3 4^{2,3)} (R R V = 1791) に対して測定した。二糖ドナー 18 の R R V (537) を競合参照ドナー S^{2,3)} (R R V = 286) に対して測定した。

【化 6 0】



30

【0101】

他の実施形態

40

本明細書に開示されている特徴の全てをあらゆる組み合わせで 1 つにまとめてもよい。本明細書に開示されている各特徴を同じ、同等もしくは同様の目的を果たす他の特徴で置き換えてもよい。従って明示的に別段の定めをした場合を除き、開示されている各特徴は一般的な一連の同等もしくは同様の特徴の例にすぎない。

【0102】

さらに上記説明から、当業者であればその趣旨および範囲から逸脱することなく本発明の必須の特性を容易に確認することができ、かつそれを様々な使用および条件に適合させるために本発明の様々な変更および修正をなすことができる。従って他の実施形態も特許請求の範囲内である。

【0103】

50

参考文献

- (1) Varki, A. Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol. Med.* 2008, 14, 351.
- (2) (a) Liu, Y.-C.; Yen, H.-Y.; Chen, C.-Y.; Chen, C.-H.; Cheng, P.-F.; Juan, Y.-H.; Chen, C.-H.; Khoo, K.-H.; Yu, C.-J.; Yang, P.-C.; Hsu, T.-L.; Wong, C.-H. Sialylation and fucosylation of epidermal growth factor receptor suppress its dimerization and activation in lung cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011, 108, 11332. (b) Yen, H.-Y.; Liu, Y.-C.; Chen, N.-Y.; Tsai, C.-F.; Wang, Y.-T.; Chen, Y.-J.; Hsu, T.-L.; Yang, P.-C.; Wong, C.-H. Effect of sialylation on EGFR phosphorylation and resistance to tyrosine kinase inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015, 112, 6955. 10
- (3) (a) Ashwell, G.; Harford, J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu. Rev. Biochem.* 1982, 51, 531. (b) Weigel, P. H.; Yik, J. H. Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1572, 341.
- (4) (a) Wang, Z.; Chinoy, Z. S.; Ambre, S. G.; Peng, W.; McBride, R.; de Vries, R. P.; Glushka, J.; Paulson, J. C.; Boons, G. J. A general strategy for the chemoenzymatic synthesis of asymmetrically branched N-glycans. *Science* 2013, 341, 379. (b) Shivatare, S. S.; Chang, S. H.; Tsai, T. I.; Tseng, S. Y.; Shivatare, V. S.; Lin, Y. S.; Cheng, Y. Y.; Ren, C. T.; Lee, C. C.; Pawar, S.; Tsai, C. S.; Shih, H. W.; Zeng, Y. F.; Liang, C. H.; Kwong, P. D.; Burton, D. R.; Wu, C. Y.; Wong, C. H. Modular synthesis of N-glycans and arrays for the hetero-ligand binding analysis of HIV antibodies. *Nat. Chem.* 2016, 8, 338. (c) Li, L.; Liu, Y.; Ma, C.; Qu, J.; Calderon, A. D.; Wu, B.; Wei, N.; Wang, X.; Guo, Y.; Xiao, Z.; Song, J.; Sugiarto, G.; Li, Y.; Yu, H.; Chen, X.; Wang, P. G. Efficient chemoenzymatic synthesis of an N-glycan isomer library. *Chem. Sci.* 2015, 6, 5652. 20
- (5) Li, C.; Wang, L.-X. Chemoenzymatic Methods for the Synthesis of Glycoproteins. *Chem. Rev.* 2018, 118, 8359.
- (6) (a) Lin, C.-W.; Tsai, M.-H.; Li, S.-T.; Tsai, T.-I.; Chu, K.-C.; Liu, Y.-C.; Lai, M.-Y.; Wu, C.-Y.; Tseng, Y.-C.; Shivatare, S. S.; Wang, C.-H.; Chao, P.; Wang, S.-Y.; Shih, H.-W.; Zeng, Y.-F.; You, T.-H.; Liao, J.-Y.; Tu, Y.-C.; Lin, Y.-S.; Chuan, H.-Y.; Chen, C.-L.; Tsai, C.-S.; Huang, C.-C.; Lin, N.-H.; Ma, C.; Wu, C.-Y.; Wong, C.-H. A common glycan structure on immunoglobulin G for enhancement of effector functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015, 112, 10611. (b) Tsai, T.-I.; Li, S.-T.; Liu, C.-P.; Chen, K. Y.; Shivatare, S. S.; Lin, C.-W.; Liao, S.-F.; Lin, C.-W.; Hsu, T.-L.; Wu, Y.-T.; Tsai, M.-H.; Lai, M.-Y.; Lin, N.-H.; Wu, C.-Y.; Wong, C.-H. An Effective Bacterial Fucosidase for Glycoprotein Remodeling. *ACS Chem. Biol.* 2017, 12, 63. (c) Liu, C.-P.; Tsai, T.-I.; Cheng, T.; Shivatare, V. S.; Wu, C.-Y.; Wu, C.-Y.; Wong, C.-H. Glycoengineering of antibody (Herceptin) through yeast expression and in vitro enzymatic glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2018, 115, 720. 30
- (7) (a) Gantt, R.; Millner, S.; Binkley, S. B. Inhibition of N-Acetylneuraminic Acid Aldolase by 3-Fluorosialic Acid. *Biochemistry* 1964, 3, 1952. (b) Hagiwara, T.; Kijima-Suda, I.; Ido, T.; Ohnui, H.; Tomita, K. Inhibition of bacterial and viral sialidases by 3-fluoro-N-acetylneuraminic acid. *Carbohydr. Res.* 1994, 263, 167. (c) Burkart, M. D.; Zhang, Z.; Hung, S.-C.; Wong, C.-H. A New Method for the Synthesis of Fluoro-Carbohydrates and Glycosides Using Selectfluor. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 11743. (d) D. Burkart, M.; P. Vincent, S.; Wong, C.-H. An efficient synthesis of CMP-3-fluoroneuraminic acid. *Chem. Commun.* 1999, 1525. (e) Burkart, M. D.; Vincent, S. P.; Duffels, A.; Murray, B. W.; Ley, 40 50

- S. V.; Wong, C.-H. Chemo-enzymatic synthesis of fluorinated sugar nucleotide: useful mechanistic probes for glycosyltransferases. *Bioorg. Med. Chem.* 2000, 8, 1937. (f) Sun, X. - L.; Kanie, Y.; Guo, C. - T.; Kanie, O.; Suzuki, Y.; Wong, C. - H. Syntheses of C - 3 - Modified Sialylglycosides as Selective Inhibitors of Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase. *Eur. J. Org. Chem.* 2000, 2643. (g) Rillahan, C. D.; Antonopoulos, A.; Lefort, C. T.; Sonon, R.; Azadi, P.; Ley, K.; Dell, A.; Haslam, S. M.; Paulson, J. C. Global metabolic inhibitors of sialyl- and fucosyltransferases remodel the glycome. *Nat. Chem. Biol.* 2012, 8, 661.
- (8) Ishiwata, K.; Ido, T.; Nakajima, T.; Ohru, H.; Kijima-Suda, I.; Itoh, M. Tumor uptake study of ¹⁸F-labeled N-acetylneuraminic acids. *International journal of radiation applications and instrumentation. Int. J. Rad. Appl. Instrum. B* 1990, 17, 363. 10
- (9) (a) Watts, A. G.; Damager, I.; Amaya, M. L.; Buschiazzi, A.; Alzari, P.; Frasch, A. C.; Withers, S. G. Trypanosoma cruzi Trans-sialidase Operates through a Covalent Sialyl-Enzyme Intermediate: Tyrosine Is the Catalytic Nucleophile. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 7532. (b) Buchini, S.; Gallat, F. X.; Greig, I. R.; Kim, J. H.; Wakatsuki, S.; Chavas, L. M.; Withers, S. G. Tuning Mechanism-Based Inactivators of Neuraminidases: Mechanistic and Structural Insights. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014, 53, 3382. (c) Kim, J. H.; Resende, R.; Wennekes, T.; Chen, H. M.; Bance, N.; Buchini, S.; Watts, A. G.; Pilling, P.; Streltsov, V. A.; Petric, M.; Liggins, R.; Barrett, S.; McKimm-Breschkin, J. L.; Niikura, M.; Withers, S. G. Mechanism-Based Covalent Neuraminidase Inhibitors with Broad-Spectrum Influenza Antiviral Activity. *Science* 2013, 340, 71. 20
- (10) Tsai, C. S.; Yen, H. Y.; Lin, M. I.; Tsai, T. I.; Wang, S. Y.; Huang, W. I.; Hsu, T. L.; Cheng, Y. S.; Fang, J. M.; Wong, C.-H. Cell-permeable probe for identification and imaging of sialidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013, 110, 2466.
- (11) (a) Chokhawala, H. A.; Cao, H.; Yu, H.; Chen, X. Enzymatic Synthesis of Fluorinated Mechanistic Probes for Sialidases and Sialyltransferases. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 10630. (b) McArthur, J. B.; Yu, H.; Zeng, J.; Chen, X. Converting Pasteurella multocida α 2-3-sialyltransferase 1 (PmST1) to a regioselective α 2,6-sialyltransferase by saturation mutagenesis and regioselective screening. *Org. Biomol. Chem.*, 2017, 15, 1700. 30
- (12) Petrie, C. R.; Sharma, M.; Simmons, O. D.; Korytnyk, W. Synthesis of analogs of N-acetylneuraminic acid and their effect on CMP-sialate synthase. *Carbohydr. Res.* 1989, 186, 326.
- (13) Nakajima, T.; Hori, H.; Ohru, H.; Meguro, H.; Ido, T. Synthesis of N-Acetyl-3-fluoro-neuraminic Acids *Agric. Biol. Chem.* 1988, 52, 1209.
- (14) Watts, A. G.; Withers, S. G. The synthesis of some mechanistic probes for sialic acid processing enzymes and the labeling of a sialidase from Trypanosoma rangeli. *Can. J. Chem* 2004, 82, 1581. 40
- (15) Hayashi, T.; Kehr, G.; Gilmour R. Stereospecific α - sialylation by site-selective fluorination. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 10.1002/anie.201812963.
- (16) Okamoto, K.; Kondo, T.; Goto, T. An effective synthesis of α -glycosides of N-acetylneuraminic acid derivatives by use of 2-deoxy-2 β -halo-3 β -hydroxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid methyl ester. *Tetrahedron* 1987, 43, 5919.
- (17) Bennua-Skalmowski, B.; Vorbruggen, H. A facile conversion of primary or secondary alcohols with n-perfluorobutane-sulfonyl fluoride/1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene into their corresponding fluorides. *Tetrahedron Lett.* 1 50

995, 36, 2611.

(18) Cao, H.; Li, Y.; Lau, K.; Muthana, S.; Yu, H.; Cheng, J.; Chokhawala, H. A.; Sugiarto, G.; Zhang, L.; Chen, X. Sialidase substrate specificity studies using chemoenzymatically synthesized sialosides containing C5-modified sialic acids. *Org. Biomol. Chem.*, 2009, 7, 5137.

(19) Orlova, A. V.; Shpirt, A. M.; Kulikova, N. Y.; Kononov, L. O. N,N-Diacetyl sialyl chloride-a novel readily accessible sialyl donor in reactions with neutral and charged nucleophiles in the absence of a promoter. *Carbohydr. Res.* 2010, 345, 721.

(20) Okamoto, K.; Kondo, T.; Goto, T. Functionalization of 2-Deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic Acid Methyl Ester. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1987, 60, 631.

(21) Pascolutti, M.; Madge, P. D.; Thomson, R. J.; von Itzstein, M. Access to 3-O-Functionalized N-Acetylneuraminic Acid Scaffolds. *J. Org. Chem.* 2015, 80, 7746.

(22) Wang, C.-C.; Lee, J.-C.; Luo, S.-Y.; Kulkarni, S. S.; Huang, Y.-W.; Lee, C.-C.; Chang, K.-L.; Hung, S.-C. Regioselective one-pot protection of carbohydrates. *Nature* 2007, 446, 896.

(23) Zhang, Z.; Ollmann, I. R.; Ye, X.-S.; Wischnat, R.; Baasov, T.; Wong, C.-H. Programmable One-Pot Oligosaccharide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 734.

(24) Huang, L.; Huang, X. Highly Efficient Syntheses of Hyaluronic Acid Oligosaccharides. *Chem. Eur. J.* 2007, 13, 529.

(25) Shivatare, S. S.; Chang, S.-H.; Tsai, T.-I.; Ren, C.-T.; Chuang, H.-Y.; Hsu, L.; Lin, C.-W.; Li, S.-T.; Wu, C.-Y.; Wong, C.-H. Efficient Convergent Synthesis of Bi-, Tri-, and Tetra-antennary

(26) Complex Type N-Glycans and Their HIV-1 Antigenicity. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 15382.

(27) Shivatare, S. S.; Chang, S.-H.; Tsai, T.-I.; Tseng, S. Y.; Shivatare, V. S.; Lin, Y.-S.; Cheng, Y.-Y.; Ren, C.-T.; Lee, C.-C. D.; Pawar, S.; Tsai, C.-S.; Shih, H.-W.; Zeng, Y.-F.; Liang, C.-H.; Kwong, P. D.; Burton, D. R.; Wu, C.-Y.; Wong, C.-H. Modular synthesis of N-glycans and arrays for the hetero-ligand binding analysis of HIV antibodies. *Nat. Chem.* 2016, 8, 338.

(28) Mong, T. K.-K.; Huang, C.-Y.; Wong, C.-H. A New Reactivity-Based One-Pot Synthesis of N-Acetylglucosamine Oligomers. *J. Org. Chem.* 2003, 68, 2135.

(29) Dinkelaar, J.; Duivenvoorden, B. A.; Wennekes, T.; Overkleeft, H. S.; Boot, R. G.; Aerts, J. M. F. G.; Codee J. D. C.; van der Marel, G. A. A Preparative Synthesis of Human Chitinase Fluorogenic Substrate (4'-Deoxychitobiosyl)-4-methylumbelliferone. *Eur. J. Org. Chem.* 2010, 2565.

(30) Chayajarus, K.; Chambers, D. J.; Chughtai, M. J.; Fairbanks, A. J. Stereospecific Synthesis of 1,2-cis Glycosides by Vinyl-Mediated IAD. *Org. Lett.* 2004, 6, 3797-3800.

(31) Cao, H.; Li, Y.; Lau, K.; Muthana, S.; Yu, H.; Cheng, J.; Chokhawala, H. A.; Sugiarto, G.; Zhang, L.; Chen, X. Sialidase substrate specificity studies using chemoenzymatically synthesized sialosides containing C5-modified sialic acids. *Org. Biomol. Chem.*, 2009, 7, 5137.

(32) Lin, C.-W.; Tsai, M.-H.; Li, S.-T.; Tsai, T.-I.; Chu, K.-C.; Liu, Y.-C.; Lai, M.-Y.; Wu, C.-Y.; Tseng, Y.-C.; Shivatare, S. S.; Wang, C.-H.; Chao, P.; Wang, S.-Y.; Shih, H.-W.; Zeng, Y.-F.; You, T.-H.; Liao, J.-Y.; Tu, Y.-C.; Lin, Y.-S.; Chuang, H.-Y.; Chen, C.-L.; Tsai, C.-S.; Huang, C.-C.; Lin, N.-H.; Ma, C.; Wu, C.-Y.; Wong, C.-H. A common glycan structure on immunoglobulin G for enhancement o

10

20

30

40

50

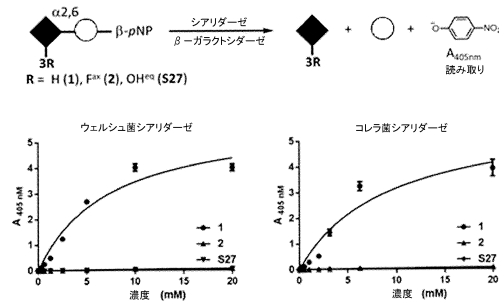
f effector functions. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2015, 112, 10611.

(33) Stavenhagen, K.; Hinneburg, H.; Thaysen-Andersen, M.; Hartmann, L.; Silva, D. V.; Fuchser, J.; Kaspar, S.; Rapp, E.; Seeberger, P. H.; Kolarich, D. Quantitative mapping of glycoprotein micro-heterogeneity and macro-heterogeneity: an evaluation of mass spectrometry signal strengths using synthetic peptides and glycopeptides. J. Mass Spectrom. 2013, 48, 627.

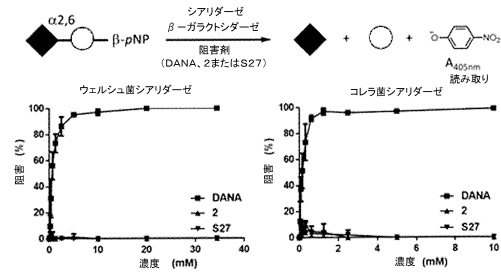
(34) Lee, J.-C.; Greenberg, W. A; Wong, C.-H. Programmable reactivity-based one-pot oligosaccharide synthesis. Nat. Protoc. 2006, 1, 3143.

【図面】

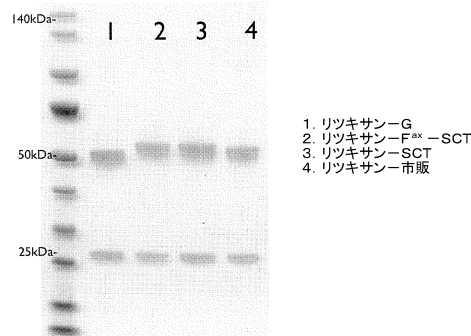
【図 1 A】



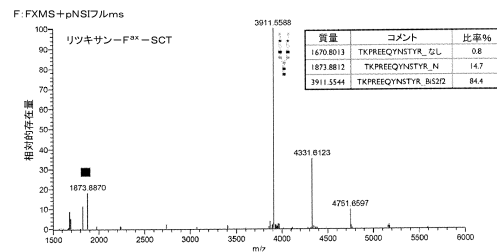
【図 1 B】



【図 2】



【図 3 - 1】



10

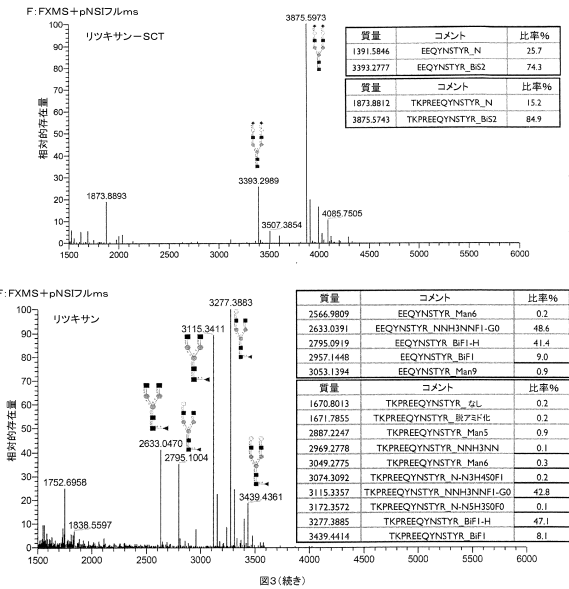
20

30

40

50

【図 3 - 2】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- 弁理士 高橋 香元
- (72)発明者 ウォン, チーヒューイ
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 92067, ランチョ サンタ フェ, ピー. オー. ボックス
8154
- (72)発明者 ロー, ホンージェイ
台湾, 239, ニュー タイペイ シティ, インガー ディストリクト, ジョンジェン 1番 ロード
, 236番, 4階
- 審査官 安藤 倫世
- (56)参考文献 特表2017-518989 (JP, A)
国際公開第2014/115797 (WO, A1)
Journal of the American Chemical Society, 2007年, 129(35), 10630-10631, DOI: 10.1021/ja072687u
Angewandte Chemie International Edition, 2019年01月25日, 58(12), 3814-3818, DOI: 10.1002/anie.201812963
Tetrahedron, 1987年, 43(24), 5919-5928, DOI: 10.1016/S0040-4020(01)87797-8
Journal of the American Chemical Society, 2019年04月15日, 141(16), 6484-6488, DOI: 10.1021/jacs.9b01991
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C07H
A61K
CAplus/REGISTRY (STN)