

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004年1月15日 (15.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/005330 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 9/00, 1/04, 1/06, C08B 37/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008551
- (22) 国際出願日: 2003年7月4日 (04.07.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-196821 2002年7月5日 (05.07.2002) JP  
特願2002-349166  
2002年11月29日 (29.11.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大塚化学株式会社 (OTSUKA CHEMICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒540-0021 大阪府 大阪市 中央区 大手通 3丁目 2番 27号 Osaka (JP).
- (71) 出願人 および  
(72) 発明者: 梶原 康宏 (KAJIHARA, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒224-0014 神奈川県 横浜市 都筑区 牛久保東 2-4-2-205 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 田村 巖 (TAMURA, Iwao); 〒561-0872 大阪府 豊中市 寺内 1丁目 9番 22号 田村特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING SUGAR PEPTIDE HAVING ASPARAGINE SUGAR CHAIN AND THE SUGAR PEPTIDE

(54) 発明の名称: 糖鎖アスパラギンを有する糖ペプチドの製造法及び該糖ペプチド

(57) Abstract: A process for producing a peptide having at least one asparagine sugar chain, characterized by esterifying a hydroxy group of a hydroxylated resin with the carboxy group of an amino acid in which the amino nitrogen has been protected by a lipid-soluble protective group, eliminating the lipid-soluble protective group to form a free amino group, amidating the free amino group with the carboxy group of an amino acid in which the amino nitrogen has been protected by a lipid-soluble protective group or of the asparagine moiety of an asparagine sugar chain in which the amino nitrogen has been protected by a lipid-soluble protective group, eliminating the lipid-soluble protective group to form a free amino group, repeating the steps (3) and (4) one or more times, and cleaving the resin with an acid; and a sugar peptide capable of being obtained by the production process.

(57) 要約:

- (1) 水酸基を有する樹脂 (レジン) の水酸基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシル基をエステル化反応させ、
- (2) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、
- (3) この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸又は糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基とアミド化反応させ、
- (4) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、
- (5) 上記(3)及び(4)の工程を1回以上繰り返し、
- (6) 酸で樹脂 (レジン) を切断することを特徴とする少なくとも1以上の糖鎖アスパラギンを有するペプチドの製造方法、及び上記製造方法により取得可能な糖ペプチド。

WO 2004/005330 A1

## 明 細 書

## 糖鎖アスパラギンを有する糖ペプチドの製造法及び該糖ペプチド

## 5 技術分野

本発明は糖鎖アスパラギンを有する糖ペプチドの製造法及び該製造法により取得可能な糖ペプチドに関する。

## 背景技術

10 近年、核酸（DNA）、タンパク質に続く第三の鎖状生命分子として、糖鎖分子が注目されてきている。ヒトの体は、約60兆個の細胞から成っている一大細胞社会であり、全ての細胞表面は糖鎖分子によって覆われている。例えば、ABO式血液型は細胞表面の糖鎖の違いにより決定されている。

糖鎖は、細胞間の認識や相互作用に関わる働きをもち、細胞社会を成り立たせる要となっている。細胞社会の乱れは、癌、慢性疾患、感染症、老化などにつながる。

例えば、細胞が癌化すると糖鎖の構造変化が起こることが分かっている。また、コレラ菌やインフルエンザウイルスなどは、ある特定の糖鎖を認識し結合することにより、細胞に侵入し感染することが知られている。

20 糖鎖機能の解明は、新しい原理に基づく医薬品や食品の開発などをもたらし、病気の予防、治療に貢献するなど、幅広い応用が期待されている。

糖鎖は単糖の配列、結合様式・部位、鎖の長さ・分岐様式、全体の高次構造などの多様性から、核酸やタンパク質の構造と比べると非常に複雑な構造である。従って、その構造に由来する生物学的な情報は核酸やタンパク質に比べて多種多様である。糖鎖は、研究の重要性を認識されながらも、その構造の複雑さや多様性により、核酸やタンパク質に比べて研究の推進が遅れている状況にある。

上記のように細胞膜表面や血清などに存在するタンパク質の多くは糖鎖が結合している。糖鎖がタンパク質に共有結合した分子は糖タンパク質とよばれ、糖とタンパク質との結合様式の違いから2つのグループに分けることができる。一つはアスパラギン (A s n) の側鎖のアミノ基と糖鎖が結合したアスパラギン結合型糖鎖 (N-グリコシド結合型) である。もう一方はセリン (S e r) やトレオニン (T h r) のアルコールに糖鎖が結合したムチン結合型糖鎖 (O-グリコシド結合型) である。すべてのアスパラギン結合型糖鎖は5つの糖残基からなる基本骨格をもち、結合する糖鎖の非還元末端の糖残基の種類によって高マンノース型、複合型、混成型のサブグループに分類される。一方ムチン結合型糖鎖は基本骨格 (コア) の違いから4グループに分類される。

ペプチド合成法として現在広く用いられているのは、1963年にR. B. Merrifieldによって開発された固相合成法である。固相合成法は樹脂 (レジン) とよばれる固相上にアミノ酸をつなげ、ペプチド鎖を伸長していく。ペプチド鎖の伸長が終了したら、固相からペプチド鎖を切り出し、目的物を得る。この応用としてペプチド鎖伸長の際、糖鎖を結合させたアミノ酸を組み込むことで糖ペプチド鎖の合成が可能となる。

そこでA s nやS e r (T h r) に糖鎖を結合させた糖鎖アミノ酸をペプチド合成に応用し、糖ペプチド鎖の合成が盛んに行なわれるようになった。しかし化学合成の技術進歩にもかかわらず大きな糖鎖を持ったペプチド鎖を化学的に合成した例は少ない。

そのひとつの問題点として、アスパラギン残基と結合させる糖鎖の絶対量の不足である。糖鎖を得る手段として、生体内に存在する糖タンパク質から糖鎖だけを遊離させる方法がある。しかし糖タンパク質から糖鎖を切り出す際に用いる、ヒドラジンは危険であり、大量に糖鎖を合成するのは困難である。また生体内には構造が酷似した糖鎖が多く存在し、単一の糖鎖のみを得るのは難しい。さらにヒドラジン分解により糖鎖とアスパラギン残基が解離するため、遊離させた糖鎖

とアスパラギン残基を再び結合させなくてはならないので、行程数が増えてしまう。

また糖鎖を化学合成により合成する場合、10個程度の糖残基が連結した糖鎖を合成された例はあるが、その多くが、目的物である糖鎖を1年間で数ミリグラム程度しか合成できていない。このため化学合成により糖鎖を得るのは困難とな

5 っている。

ふたつめの問題として、ペプチド固相合成の後にペプチド鎖を固相から切り出すためのTFA（トリフルオロ酢酸）処理である。例えば糖鎖の非還元末端に存在するシアル酸は酸性条件下で容易に加水分解されてしまうため、TFA処理によ

10 ってシアル酸が合成した糖ペプチドから切りはなされてしまう可能性がある。

このためにシアル酸を有する糖鎖を固相合成に用いた例はほとんどない。この問題の解決法として、ペプチド合成後にシアル酸転移酵素によりシアル酸を、糖鎖に転移させる方法が報告されている。しかしこの方法はシアル酸を導入する方法

15 としては有用であるが、糖転移酵素が高価であるため、糖ペプチドの大量合成は困難という問題も残っている。

しかしながら、以下に述べるように本発明では糖ペプチドを人工的に容易に大量に合成可能となったので、上記シアル酸転移酵素を用いてシアル酸もしくはその誘導体を導入することも工業的に可能となった。

また従来シアル酸そのものの結合した糖鎖は天然に存在するが、シアル酸の誘

20 導体の結合した糖鎖は天然には存在しないため、シアル酸誘導体を糖鎖に導入するためにはいずれにしてもシアル酸転移酵素を用いるしか方法がなかった。

本発明の課題は少なくとも1以上の糖鎖アスパラギンまたはムチン結合型糖鎖をペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドを人工的に容易に大量に合成可能な糖ペプチドの製造法を提供することにある。

25 また本発明の課題はシアル酸を有する糖鎖アルパラギンであっても、酸処理によってシアル酸が糖ペプチドから切断されず、容易にシアリル糖ペプチドを得る

方法を提供することにある。

また本発明の課題は糖残基が任意に除去された各種の新規な糖鎖アスパラギンの少なくとも1以上をペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドを人工的に容易に大量に合成可能な糖ペプチドの製造法を提供することにある。

- 5      また本発明の課題は糖ペプチドにシアル酸転移酵素を用いてシアル酸もしくはその誘導体を導入することにより、シアル酸もしくはその誘導体が導入された糖ペプチドの製造法を提供することにある。

また本発明の課題は上記各種の糖ペプチドの製造法により、取得可能な糖ペプチドを提供することにある。

10

#### 発明の開示

本発明は(1)水酸基を有する樹脂(レジン)の水酸基と、脂溶性(fat-soluble)保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシル基をエステル化反応させ、

- 15      (2)上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、  
          (3)この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシル基とアミド化反応させ、  
          (4)上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、  
          (5)上記(3)及び(4)の工程を1回以上繰り返し、  
20      (6)脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基とアミド化反応させ、  
          (7)上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、  
          (8)この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシル基とアミド化反応させ、  
25      (9)上記(7)及び(8)の工程を1回以上繰り返し  
          (10)上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、

(11) 酸で樹脂（レジン）を切断することを特徴とする少なくとも1以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドの製造法に係る。

本発明は(6)の、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基とアミド化反応させ、(7)の、上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる工程を、適宜追加する少なくとも2以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドの製造法に係る。

本発明は(6)の、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基とアミド化反応させ、(7)の、上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる工程を、最終工程で行う少なくとも1以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖に有する糖ペプチドの製造法に係る。

本発明は(6)の工程に代えて、或いは(6)の工程に加えて、(1)水酸基を有する樹脂（レジン）の水酸基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基をエステル化反応させる、糖ペプチドの製造法に係る。

本発明は(6)の糖鎖アスパラギンが、6以上の糖残基を有するものである糖ペプチドの製造法に係る。

本発明は(6)の糖鎖アスパラギンが、9～11の糖残基を有するものである糖ペプチドの製造法に係る。

本発明は(6)の糖鎖アスパラギンが、6以上の糖残基を有し、2分岐型糖鎖を結合したものである糖ペプチドの製造法に係る。

本発明は(6)の糖鎖アスパラギンが、ジシアロ糖鎖アスパラギンもしくはモノシアロ糖鎖アスパラギンであって、該シアル酸のカルボキシル基が保護基により保護されたものである記載の糖ペプチドの製造法に係る。

本発明は(6)の糖鎖アスパラギンが、アシアロ糖鎖アスパラギンである糖ペプチドの製造法に係る。

本発明は糖鎖アスパラギンの一部又は全部の代わりにムチン結合型糖鎖を用いる糖ペプチドの製造法に係る。

本発明は上記製造法により、取得可能な少なくとも1以上の糖鎖アスパラギンまたはムチン結合型糖鎖をペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドに係る。

- 5 本発明は糖鎖アスパラギンまたはムチン結合型糖鎖が、6以上の糖残基を有し、2分岐型糖鎖を結合したものである糖ペプチドに係る。

本発明は糖鎖アスパラギンとしてジシアロ糖鎖アスパラギン及びモノシアロ糖鎖アスパラギンから選ばれる少なくとも1種以上を結合した糖ペプチドに係る。

- 本発明は(1)水酸基を有する樹脂(レジン)の水酸基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシル基をエステル化反応させ、
- 10 (2)上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、
- (3)この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシル基とアミド化反応させ、
- (4)上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、
- 15 (5)上記(3)及び(4)の工程を1回以上繰り返す、
- (6)脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基とアミド化反応させ、
- (7)上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、
- (8)この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸
- 20 のカルボキシル基とアミド化反応させ、
- (9)上記(7)及び(8)の工程を1回以上繰り返す
- (10)上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、
- (11)酸で樹脂(レジン)を切断し、
- (12)得られた糖ペプチドにシアル酸転移酵素を用いてシアル酸もしくはその
- 25 誘導体を転移させることを特徴とする少なくとも1以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖の任意の位置に有し、且つ末端にシアル酸もしくはその誘導体残基を有

する糖ペプチドの製造法に係る。

本発明は上記工程(11)の酸で樹脂(レジン)を切断する前に、標識剤を反応させる糖ペプチドの製造法に係る。

本発明は標識剤がダンシルハライドである糖ペプチドの製造法に係る。

- 5 本発明はN-アセチル-4-デオキシ-4-フルオロ-D-マンノサミン、ピルビン酸ナトリウム、牛血清アルブミン、シアル酸アルドラーゼを反応させることを特徴とする5-アセタミド-3,5,7-トリデオキシ-7-フルオロ-D-グリセロ-β-D-ラクト-2-ノヌロピラノシドニック アシッドの製造法に係る。
- 10 本発明はベンジル 2-アジド-2,4-ジデオキシ-4-フルオロ-β-D-マンノピラノシドを、無水酢酸の存在下、水素添加して、N-アセチル-4-デオキシ-4-フルオロ-D-マンノサミンを得て、次いでこれとピルビン酸ナトリウム、牛血清アルブミン、シアル酸アルドラーゼを反応させることを特徴とする5-アセタミド-3,5,7-トリデオキシ-7-フルオロ-D-グリセロ-
- 15 β-D-ラクト-2-ノヌロピラノシドニック アシッドの製造法に係る。

- 本発明者は、先に特願2001-185685号(以下、先願という)において、種々の単離された糖鎖アスパラギン誘導体を従来に比べて非常に容易かつ大量に得ることができる、糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン、糖鎖の製造方法、更には糖残基が任意に欠失した糖鎖が結合した新規な糖鎖アスパラギン
- 20 誘導体、糖鎖アスパラギン、糖鎖を開発した。

この先願の方法は例えば

- (1) (a) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、
- 25 ならびに
- (b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物

に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、

を含む、糖鎖アスパラギン由来の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(2) (b') 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解  
5 酵素を用いて加水分解する工程をさらに含む前記 (1) 記載の糖鎖アスパラギン  
誘導体の製造方法、

(3) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物が、下記式

(A) の化合物および/または該化合物において1以上の糖残基が欠失した化合物を含むものである、前記 (1) または (2) 記載の糖鎖アスパラギン誘導体の  
10 製造方法、

(4) 脂溶性の保護基がフルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基である前記 (1) ~ (3) いずれか記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(5) 工程 (a) が、非還元末端にシアル酸残基を有する1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンにFmoc基  
15 を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、前記 (1) ~ (3) いずれか記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(6) (a) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物  
20 物を得る工程、

(b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、ならびに

(c) 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去して糖鎖  
25 アスパラギンを得る工程、

を含む、糖鎖アスパラギンの製造方法、

(7) (b') 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、および/または

(c') 工程 (c) で得られた糖鎖アスパラギンを糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、

5 をさらに含む、前記 (6) 記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

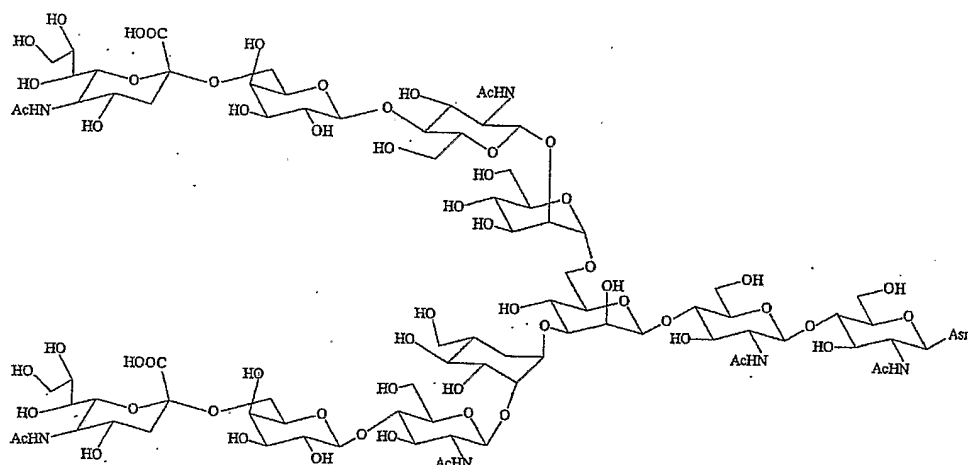
(8) 1 種もしくは 2 種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物が、下記式

(A) の化合物および/または該化合物において 1 以上の糖残基が欠失した化合物を含むものである、前記 (6) または (7) 記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

10 (9) 脂溶性の保護基が Fmoc 基である前記 (6) ~ (8) いずれか記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

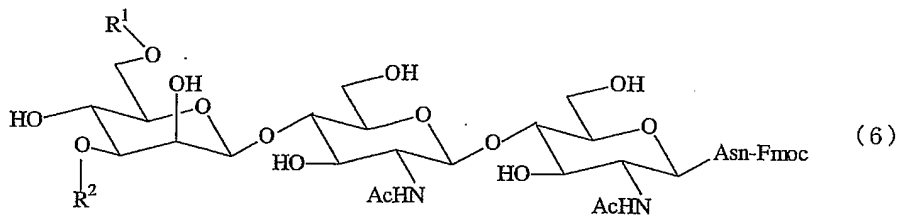
(10) 工程 (a) が、非還元末端にシアル酸残基を有する 1 種もしくは 2 種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに Fmoc 基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体

15 混合物を得る工程である、前記 (6) ~ (8) いずれか記載の糖鎖アスパラギンの製造方法などである。

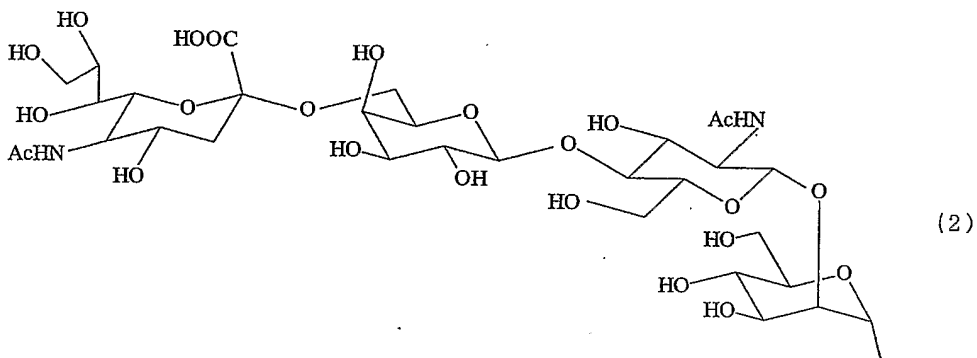


(A)

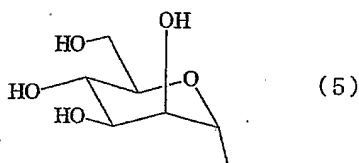
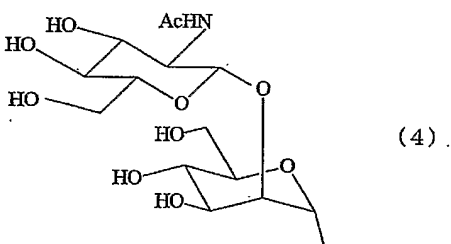
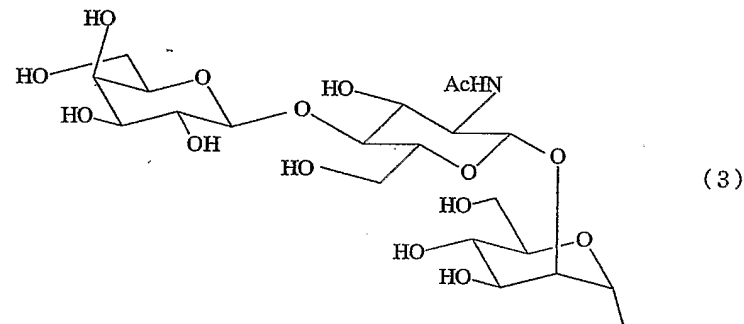
ここで上記糖鎖アスパラギン誘導体は例えば式 (6) で表される。



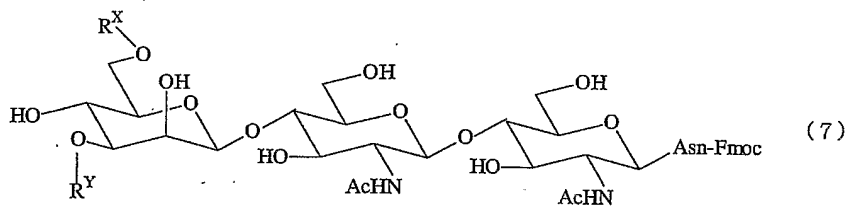
[式中、 $R^1$ および $R^2$ は、水素原子、式(2)～(5)で示される基であり、同一でも異なってもよい。ただし、 $R^1$ および $R^2$ が共に式(3)である場合を除く。]



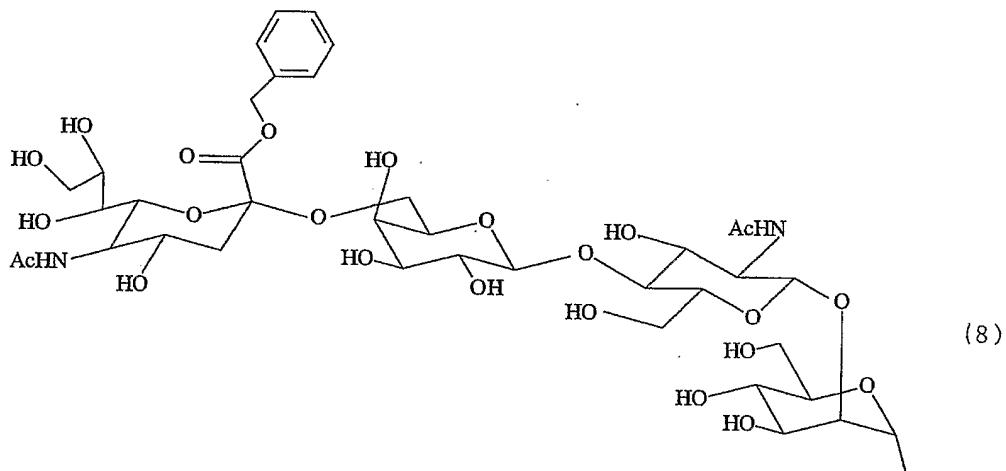
5



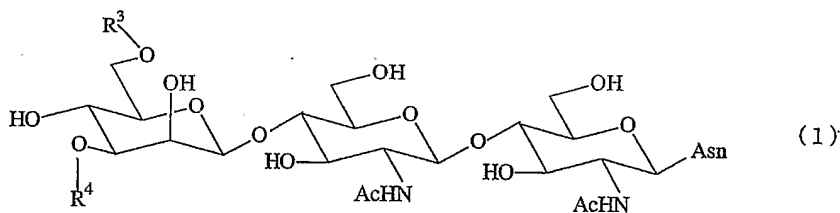
また上記他の糖鎖アスパラギン誘導体は例えば式(7)で表される。



[式中、 $R^X$ および $R^Y$ は、一方が式(8)で示される基であり、他方が、水素原子、式(8)、または式(2)～(5)で示される基である。]



5 また上記糖鎖アスパラギンは例えば式(1)で表される。



[式中、 $R^3$ および $R^4$ は、水素原子、式(2)～(5)で示される基であり、同一でも異なってもよい。ただし、 $R^3$ および $R^4$ が共に式(2)または式(3)である場合を除く。]

10 これら糖鎖アスパラギン誘導体及び糖鎖アスパラギンの製造についての詳細は、上記先願に述べられているので、これを引用する。しかし若干先願の内容について述べると、先願の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法は、たとえば、天然の糖タンパク質に由来する糖鎖アスパラギン、好ましくはアスパラギン結合型糖鎖が

ら得られる糖鎖アスパラギンの混合物に含まれる当該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入（結合）して糖鎖アスパラギン誘導体の混合物を得た後に当該混合物を各糖鎖アスパラギン誘導体に分離することを1つの大きな特徴とする。なお、本明細書において、「糖鎖アスパラギン」とはアスパラギンが結合した状態の糖鎖をいう。また、「アスパラギン結合型糖鎖」とはタンパク質のポリペプチド中のアスパラギン（Asn）の酸アミノ基に、還元末端に存在するN-アセチルグルコサミンがN-グリコシド結合した糖鎖群であって、Man ( $\beta$ 1-4) GlcNac ( $\beta$ 1-4) GlcNacを母核とする糖鎖群をいう。「糖鎖アスパラギン誘導体」とはアスパラギン残基に脂溶性の保護基が結合した状態の糖鎖アスパラギンをいう。また、化合物の構造式中、「AcHN」はアセトアミド基を示す。

前記するように、天然の糖タンパク質に由来する糖鎖は非還元末端の糖残基がランダムに欠失した糖鎖の混合物である。本発明者らは、意外にも天然の糖タンパク質に由来する糖鎖、具体的には糖鎖アスパラギンの混合物に含まれる当該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入することで、当該保護基が導入された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物を公知のクロマトグラフィーの手法を用いて容易に個々の糖鎖アスパラギン誘導体に分離することができることを見出した。それにより、種々の構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体をそれぞれ大量に調製することが可能となった。たとえば、従来分離が困難であった類似構造の糖鎖アスパラギン誘導体同士の分離が可能となり、それらの化合物を各々、容易かつ大量に調製することができる。また、得られた糖鎖アスパラギン誘導体を元に、たとえば、糖加水分解酵素を順次作用させて糖残基を除去することにより、さらに様々な糖鎖アスパラギン誘導体を合成することもできる。

このように、糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して誘導体化することにより個々の糖鎖アスパラギン誘導体の分離が可能となったが、これは、脂溶性の保護基を導入したことにより糖鎖アスパラギン誘導体の全体の脂溶性が高まり、

たとえば、好適に使用される逆相系カラムとの相互作用が格段に向上し、その結果、より鋭敏に糖鎖構造の差を反映して個々の糖鎖アスパラギン誘導体が分離されるようになったことによると考えられる。

さらに先願によれば、得られた糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去することにより種々の糖鎖アスパラギンを、人工的に容易かつ大量に得ることができる。

本発明では上記先願で得られた各種の糖鎖アスパラギンを用いて、本発明の上記方法により、目的とする糖ペプチドを得るものである。

本発明の方法においては先ず、(1) 水酸基を有する樹脂(レジン)の水酸基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシル基をエステル化反応させる。

この場合アミノ酸のアミノ基窒素を脂溶性保護基で保護しているため、アミノ酸同士の自己縮合は防止され、レジンの水酸基とアミノ酸のカルボキシル基が反応してエステル化が起こる。

次に(2)上記で得られたエステルの脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、

(3) この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された任意のアミノ酸のカルボキシル基とアミド化反応させ、

(4) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、

(5) 上記(3)及び(4)の工程を1回以上繰り返すことにより、任意の数の任意のアミノ酸が連結した、末端にレジンを結合し、他端に遊離アミノ基を有するペプチドが得られる。

(6) 次に、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基と上記遊離アミノ基をアミド化反応させ、

(7) 更に上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、

(8) この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された任意のアミノ酸のカルボキシル基とアミド化反応させ、

(9) 上記(7)及び(8)の工程を1回以上繰り返し、

(10) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させることにより、任意の数の任意のアミノ酸が連結した、末端にレジン相结合し、他端に遊離アミノ基を有し、中間に糖鎖アスパラギンを有する糖ペプチドが得られる。

- 5 (11) そして、酸で樹脂(レジン)を切断することにより、糖鎖アスパラギンをペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドを製造することができる。

更に、上記(6)の脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基と上記遊離アミノ基をアミド化反応させる工程を、適宜追加することにより少なくとも2以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドを製造することができる。またこの時、異なる糖鎖アスパラギンを用いることにより2種以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドを製造することもできる。

また、この糖鎖アスパラギンをペプチド鎖の端部に導入することもできる。

- 15 更には、糖鎖アスパラギンのようなアスパラギン結合型糖鎖の一部又は全部の代わりにムチン結合型糖鎖を用いることもできる。

本発明において水酸基を有する樹脂(レジン)としては、通常、固相合成で使用する水酸基を有する樹脂(レジン)であればよく、例えばWangレジン(メルク社製)、HMPA-PEGレジン(メルク社製)等を用いることができる。

- 20 アミノ酸としては全てのアミノ酸を用いることができ、例えばセリン(Ser)、アスパラギン(Asn)、バリン(Val)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)、アラニン(Ala)、チロシン(Tyr)、グリシン(Gly)、リジン(Lys)、アルギニン(Arg)、ヒスチジン(His)、アスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu)、グルタミン(Gln)、スレオニン(Thr)、システイン(Cys)、メチオニン(Met)、フェニルアラニン(Phe)、トリプトファン(Trp)、プロリン(Pro)を挙げることができる。
- 25

脂溶性保護基としては、例えば9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基、t-ブチルオキシカルボニル (Boc) 基、ベンジル基、アリル基、アリルオキシカルボニル基、アセチル基などの、カーボネート系またはアミド系の保護基等を挙げることができる。脂溶性保護基を導入するには、例えばFmoc

5 基を導入する場合には9-フルオレニルメチル-N-スクシニミジルカーボネートと炭酸水素ナトリウムを加えて反応を行うことにより導入できる。反応は0～50℃、好ましくは室温で、約1～5時間程度行うのが良い。

脂溶性保護基で保護したアミノ酸としては、上記のアミノ酸を上記の方法で製造することができる。また、市販のものも使用することができる。例えば、Fmoc

10 -Ser、Fmoc-Asn、Fmoc-Val、Fmoc-Leu、Fmoc-Ile、Fmoc-Ala、Fmoc-Tyr、Fmoc-Gly、Fmoc-Lys、Fmoc-Arg、Fmoc-His、Fmoc-Asp、Fmoc-Glu、Fmoc-Gln、Fmoc-Thr、Fmoc-Cys、Fmoc-Met、Fmoc-Phe、Fmoc-Trp、Fmoc-Proを挙げること

15 とができる。

エステル化触媒として、例えば1-メシチレンスルホニル-3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール (MSNT)、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DC

20 C)、ジイソプロピルカルボジイミド (DIPCDI) などの脱水縮合剤を用いることができる。エステル化反応は例えば固相カラムにレジンを入れ、溶媒で洗浄し、その後アミノ酸の溶媒溶液を加えることにより行うのが好ましい。洗浄用溶媒としては、例えばジメチルホルムアミド (DMF)、2-プロパノール、塩化メチレン等を挙げることができる。アミノ酸を溶解する溶媒としては、例えばジメチルスルホキシド (DMSO)、DMF、塩化メチレン等を挙げることができる。反応は0～50℃、好ましくは室温で、約10分～30時間程度、好ま

25 くは15分～24時間程度行うのが良い。

この時固相上の未反応の水酸基を無水酢酸等を用いてアセチル化しキャッピン

グすることも好ましい。

脂溶性保護基の脱離は、例えば塩基で処理することにより行うことができる。塩基としては、例えばピペリジン、モルホリン等を挙げることができる。その際、溶媒の存在下行うのが好ましい。溶媒としては、例えばDMSO、DMF、メタ  
5 ノール等を挙げることができる。

遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された任意のアミノ酸のカルボキシル基とアミド化反応させる反応、活性化剤および溶媒の存在下行うのが好ましい。

活性化剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、1  
10 -エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・塩酸塩 (WSC/HC1)、ジフェニルホスホリルアジド (DPPE)、カルボニルジイミダゾール (CDI)、ジエチルシアノホスホネート (DEPC)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリスピロリジノホスホニウム (DIPCI)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリスピロリジノホスホニウムヘキサフルオロ  
15 ホスフェート (PyBOP)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT)、ヒドロキスクシンイミド (HOSu)、ジメチルアミノピリジン (DMAP)、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール (HOAt)、ヒドロキシフタルイミド (HOPht)、ペンタフルオロフェノール (Pfp-OH)、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニ  
20 ウムヘキサフルオロホスフェート (HBTU)、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスホネート (HATU)、O-ベンゾトリアゾール-1-イル-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート (TBTU)、3,4-ジヒドロ-3-ヒドロジ-4-オキサ-1,2,3-ベンゾトリアジン (Dhbt)  
25 等を挙げることができる。

活性化剤の使用量は、脂溶性の保護基でアミノ基窒素が保護された任意のアミ

ノ酸に対して、1～20当量、好ましくは1～10当量、さらに好ましくは、1～5当量とするのが好ましい。

溶媒としては、例えばDMSO、DMF、塩化メチレン等を挙げるができる。反応は0～50℃、好ましくは室温で、約10～30時間程度、好ましくは  
5 15分～24時間程度行うのが良い。この際にも固相上の未反応の水酸基を無水酢酸等を用いてアセチル化しキャッピングするのが好ましい。脂溶性保護基の脱離は、上記と同様に行うことができる。

樹脂（レジン）からペプチド鎖を切断するには酸で処理するのが好ましい。酸としては、例えばトリフルオロ酢酸（TFA）、弗化水素（HF）等を挙げるこ  
10 とができる。

本発明においては上記（6）の、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基とアミド化反応させ、  
（7）の、上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる工程を、適宜追加することにより、少なくとも2以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖の任意  
15 の位置に有する糖ペプチドを製造することができる。

また本発明においては上記（6）の、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基とアミド化反応させ、  
（7）の、上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる工程を、最終工程で行うことにより、少なくとも1以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖に有  
20 する糖ペプチドを製造することができる。

また本発明においては上記（6）の工程に代えて、或いは（6）の工程に加えて、（1）水酸基を有する樹脂（レジン）の水酸基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基をエステル化反応させることにより、端部に糖鎖アスパラギンを有する糖ペプチドを製  
25 造することができる。

本発明において用いる糖鎖アスパラギンは任意の数の糖残基を有するものが使

用できるが、特に従来にない6以上の糖残基を有する糖鎖アスパラギンあるいはムチン結合型糖鎖を使用することもでき、本発明の特異な特徴を構成する。特に9～11の糖残基を有する糖鎖アスパラギンを使用することも可能である。

更には6以上の糖残基を有し、2分岐型糖鎖を結合した糖鎖アスパラギンを使用することも可能である。例えば糖鎖アスパラギンが、ジシアロ糖鎖アスパラギンもしくはモノシアロ糖鎖アスパラギンを使用することも可能である。このようなジシアロ糖鎖アスパラギンもしくはモノシアロ糖鎖アスパラギンが結合した糖ペプチドは本発明の好ましい糖ペプチドである。

糖鎖アスパラギンが、ジシアロ糖鎖アスパラギンもしくはモノシアロ糖鎖アスパラギンであって、該シアル酸のカルボキシル基が保護基により保護されたものを使用することも可能である。

本発明において用いる糖鎖アスパラギンあるいはムチン結合型糖鎖は、該糖鎖の水酸基を保護してもよい。保護基としては、例えば、アセチル基、トリエチルシリル基等を挙げることができる。好ましくは、合成した糖ペプチドから切断する時に同時に酸で処理できる保護基が好ましい。例えば、トリエチルシリル基を挙げることができる。

糖鎖アスパラギンが、ジシアロ糖鎖アスパラギンもしくはモノシアロ糖鎖アスパラギンである場合、該シアル酸は酸により切断される恐れがあるので、上記のような該シアル酸のカルボキシル基が保護基により保護されたものは、該シアル酸が切断されることが防止され好ましい。この保護基としては、例えばベンジル基、アリル基、ジフェニルメチル基等を挙げることができる。

シアル酸のカルボキシル基に保護基を導入する反応は、公知の方法、例えば *Protective groups in Organic Chemistry*, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6 参照) により行うことができる。

本発明において、シアル酸の誘導體としては、シアル酸の7位、8位或いは9位の炭素に結合している水酸基を水素原子或いはハロゲン原子で置換したものを

挙げることができる。ハロゲン原子としては、フッ素、塩素、臭素等を挙げることができるが、好ましくはフッ素がよい。

本発明において、シアル酸転移酵素としては、一般に市販されているシアル酸転移酵素を用いることができ、転移させるシアル酸或いはシアル酸の誘導体の種類、結合様式により適宜選択することができる。具体的には、R a t R e c o  
5 m b i n a n t由来のもの、R a t L i v e r由来のものを挙げることができる。また、シアリターゼを用いてpH調整等により平衡をずらすことにより、シアル酸或いはシアル酸の誘導体を転移させてもよい。

本発明の糖ペプチドは医薬品開発等の分野において非常に有用である。たとえば、医薬品開発における応用例としては、たとえば、ガンのワクチン合成があげ  
10 られる。細胞がガン化すると体内にはなかった糖鎖が発現することが知られている。また、当該糖鎖を化学的に合成し、ワクチンとして個体に投与すると、ガンの増殖が抑制されることも知られている。そこで、本発明により所望の糖ペプチドを製造することができれば、ガンの治療に有効なワクチンの合成を行うことが  
15 可能である。また、本発明により得られる糖ペプチドを、さらに化学的な反応および糖転移酵素による反応などを組み合わせて新たな糖残基を結合させて誘導體化し、新規なワクチンの合成を行うことも可能である。

糖ペプチドは、糖の結合していないペプチドに比べて水に対する溶解度が高くなり、また、水溶液及び血中等での安定性も高くなる。

20 非還元末端のシアル酸の誘導體化は糖鎖自身の分解を防ぐことができ、そのことにより糖ペプチドの安定性をより高めることができる。

さらに非還元末端のシアル酸誘導體化は非天然型糖鎖であるので、ワクチン製造にも有効な場合がある。

25 発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げて説明するが、本発明は何らこれら実施例に限定されるも

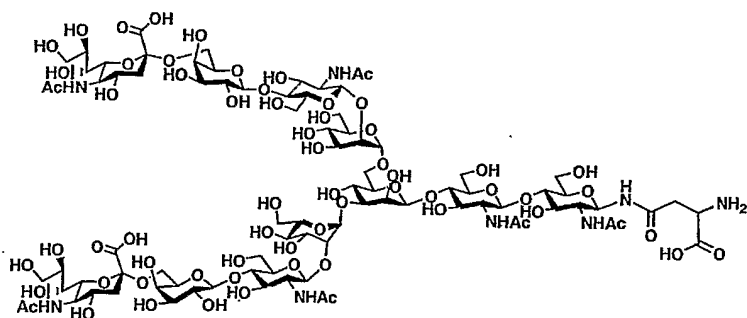
のではない。

まず、以下で用いる Fmoc-Val、Fmoc-Leu、Fmoc-Leu-Opfp、Fmoc-Ala、Fmoc-Ala-Opfp、Fmoc-Val-Opfp、Fmoc-Ser(Bzl)-OH、Fmoc-Ser(OtBu) は公知の物質であり、それぞれ購入したものを用いた。ここで例えば、Leu-OpfpのOpfpとは、ロイシン(Leu)のカルボキシル基がペンタフルオロフェニル(pfp)基により保護されたもの、Ser(Bzl)-OHとは、セリン(Ser)の水酸基がベンジル(Bzl)基により保護されたもの、Ser(OtBu)-OHとは、セリン(Ser)のOH基がt-ブチル(tBu)基により保護されたものを意味する。

#### 参考例1

#### ジシアロ糖鎖アスパラギン(10)の合成

粗精製のSGP(シアリルグリコペプチド)500mgとアジ化ナトリウム10mg(319 $\mu$ mol)をトリス-塩酸・塩化カルシウム緩衝溶液(TRIZMA BASE 0.05mol/l、塩化カルシウム 0.01mol/l、pH=7.5)25mlに溶解させた。これにアクチナーゼ-E(タンパク質分解酵素、科研製薬)50mgをトリス-塩酸・塩化カルシウム緩衝溶液5mlに溶かした溶液を加え、37 $^{\circ}$ Cで静置した。115時間後、この溶液を凍結乾燥した。この残留物をゲルろ過カラムクロマトグラフィーで2回精製し、目的のジシアロ糖鎖アスパラギン10を252mg得た。



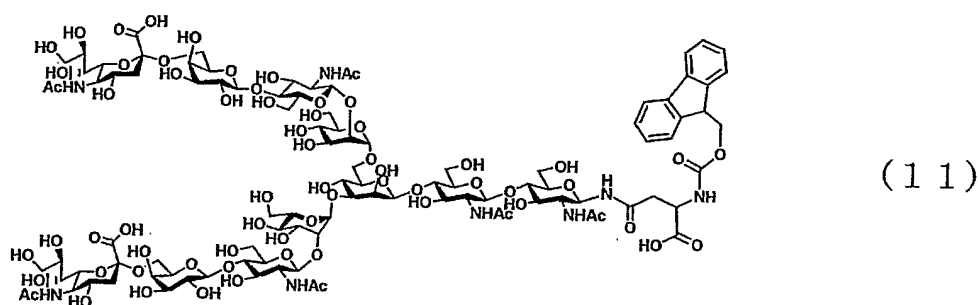
(10)

$^1\text{H-NMR}$  (30°C)  $\delta$  5.13 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H,  $J=9.5\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.95 (s, 1H, Man4-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61 (d, 1H,  $J=7.6\text{ Hz}$ , GlcNAc2-H-1), 4.60 (d, 2H,  $J=7.6\text{ Hz}$ , GlcNAc5, 5-H-1), 4.44 (d, 2H,  $J=8.0\text{ Hz}$ , Gal6, 6-H-1), 4.25 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.20 (bdd, 1H, Man4-H-2), 4.12 (bd, 1H, Man4-H-2), 2.94 (dd, 1H,  $J=4.5\text{ Hz}$ ,  $17.2\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{ CH}$ ), 2.85 (dd, 1H,  $J=7.0\text{ Hz}$ ,  $17.2\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{ CH}$ ), 2.67, 2.66 (dd, 2H,  $J=4.6\text{ Hz}$ ,  $12.4\text{ Hz}$ , NeuAc7, 7-H-3<sub>eq</sub>), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.06 (s, 6H, Ac $\times$ 2), 2.02 (s, 6H, Ac $\times$ 2), 2.01 (s, 3H, Ac), 1.71 (dd, 2H,  $J=12.4\text{ Hz}$ ,  $12.4\text{ Hz}$ , NeuAc7, 7-H-3<sub>ax</sub>).

## 参考例2

15 Fmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジシアロ糖鎖アスパラギン(11)の合成

参考例1で得られたジシアロ糖鎖アスパラギン(10) 80mg (0.034 mmol)を蒸留水 2.7mlとアセトン 4.1ml混合溶液に溶解させ、これに9-フルオレニルメチル-N-スクシニミジルカーボネート(Fmoc-OSn) 34.7mg (0.103 mmol)と炭酸水素ナトリウム 11.5mg (0.137 mmol)を加え、室温で2時間攪拌した。TLCで反応終了を確認後この溶液を減圧濃縮し、アセトンを除去した。残渣をオクタデシルシリル基を結合したシリカゲルを充填したカラム(ODSカラム)にかけ精製し、目的のFmoc-ジシアロ糖鎖アスパラギン(11) 60.1mg 収率68%を得た。



$^1\text{H-NMR}$  (30°C)

8.01 (2H, d,  $J=7.5\text{Hz}$ , Fmoc), 7.80 (2H, d,  $J=7.5\text{Hz}$ , Fmoc), 7.60 (2H, dd,  $J=7.5\text{Hz}$ , Fmoc),  
 5 7.53 (2H, dd,  $J=7.5\text{Hz}$ , Fmoc), 5.23 (1H, s, Man4-H<sub>1</sub>), 5.09 (1H, d,  $J=9.4\text{Hz}$ , GlcNAc1-H<sub>1</sub>),  
 5.04 (1H, s, Man4'-H<sub>1</sub>), 4.86 (1H, s, Man3-H<sub>1</sub>), 4.70~4.66 (m, GlcNAc2-H<sub>1</sub> GlcNAc5, 5'-  
 H<sub>1</sub>), 4.54 (2H, d,  $J=7.9\text{Hz}$ , Gal6, 6'-H<sub>1</sub>), 4.44  
 10 (1H, d, FmocCH), 4.34 (1H, bd, Man3-H<sub>2</sub>), 4.2  
 9, (1H, bd, Man4'-H<sub>2</sub>), 4.20 (1H, bd, Man4-H<sub>2</sub>), 2.77 (2H, dd, NeuAc7, 7'-H<sub>3eq</sub>), 2.80 (1H,  
 bdd, Asn-βCH), 2.62 (1H, bdd, Asn-βCH), 2.1  
 4 (18H, s×6, -Ac), 1.80 (2H, dd, NeuAc7, 7'-  
 15 H<sub>3ax</sub>)

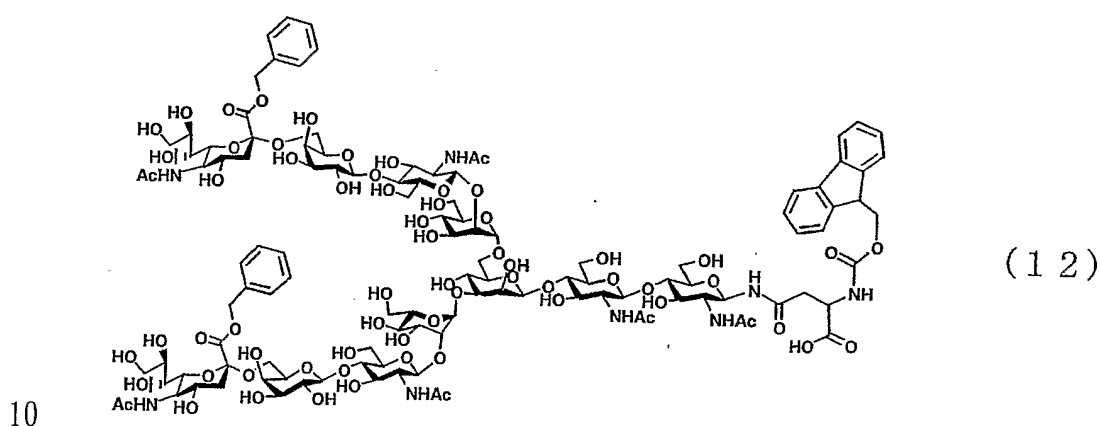
### 参考例3

Fmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護され、且つシアル酸のカルボキシル基がベンジル基で保護されたジシアロ糖鎖アスパラギン(12)の合成

4°Cに冷やしたDowex-50Wx8(H<sup>+</sup>)のカラム(φ0.5cm×5  
 20 cm)に、Fmoc-アスパラギン結合型二分岐糖鎖(20mg)の冷水溶液を  
 流し、溶出した水溶液を凍結乾燥した。

得られたFmoc-アスパラギン結合型二分岐糖鎖を4°Cの冷水に溶かし、こ

れに  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  水溶液 (2.5 mg / 1 ml) を加え水溶液の pH が 5 ~ 6 になるよう調整し、その後、糖鎖水溶液を凍結乾燥した。凍結乾燥後の Fmoc-ジシアロ糖鎖試料を乾燥 DMF (1.3 ml) に溶かし、ベンジルブロミド (5.1  $\mu$ l) を加えてアルゴン気流下室温で 45 時間攪拌した。TLC で反応終了を確認後、反応溶液を 0°C に冷やしジエチルエーテル 10 ml を加え目的物を析出させた。これをろ紙でろ過した。残った目的物に蒸留水を加えろ液として溶出させ、続いてこれを減圧濃縮した。得られた残渣を ODS カラムにかけ精製し目的のジベンジル Fmoc-ジシアロ糖鎖アスパラギン (12) 18.2 mg (収率 85%) を得た。



$^1\text{H-NMR}$  (30°C),

7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.70 (d, 2H, Fmoc), 7.53 - 7.40 (m, 9H, Bn, Fmoc), 5.36 (d, 2H,  $J=11.6$ , Hz,  $\text{CH}_2$ ), 5.30 (d, 2H,  $J=11.6$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 5.12 (s, 1H, Man4- $\text{H}_1$ ), 4.99 (d, 1H,  $J=9.7$  Hz, GlcNAc1- $\text{H}_1$ ), 4.93 (s, 1H, Man4'- $\text{H}_1$ ), 4.75 (s, 1H, Man3- $\text{H}_1$ ), 4.57 (m, 3H, GlcNAc2- $\text{H}_1$ , GlcNAc5, 5'- $\text{H}_1$ ), 4.32 (d, 2H, Gal6, 6'- $\text{H}_1$ ), 4.24 (d, 1H, Man3- $\text{H}_2$ ), 4.18 (d, 1H, Man4'- $\text{H}_2$ ), 4.10 (1H, d, Man4- $\text{H}_2$ ), 2.72 (bd, 1H, Asn- $\beta$ CH), 2.67

15

20

(dd, 2H, NeuAc 7, 7' -H<sub>3cq</sub>), 2.51 (bdd, 1H, Asn-βCH), 2.06 (s, 3H, Ac), 2.03, 2.01 (each s, each 6H, Ac×2), 1.89 (s, 3H, Ac), 1.83 (2H, dd, J=12.2, 12.2Hz, NeuAc 7, 7' -H<sub>3ax</sub>)

5 HRMS Calcd for C<sub>117</sub>H<sub>165</sub>N<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>66</sub> [M+Na<sup>+</sup>]  
2783.9597, found 2783.9501

#### 参考例 4

特願 2001-185685号に準じてモノシアロ糖鎖アスパラギンを得た。

#### 参考例 5

10 HOOC-Val-Leu-Leu-Ala-NH<sub>2</sub> (13) の合成

##### I 樹脂 (レジン) への導入

固相合成用カラムにWangレジン 1.6gを入れ、メチレンクロライド、次いでメタノールで十分に洗浄し乾燥させた。Fmoc-Val 409.2mg (1.2mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (HOBt·H<sub>2</sub>O) 121.5mg (0.9mmol) をN,N-ジメチルアセトアミド (DMA) 4.5mlに溶解させ、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 247.5mg (1.2mmol) を加え、0℃で15分攪拌してアミノ酸溶液を得る。樹脂をDMFで膨潤させる。上記アミノ酸溶液を固相合成用カラムに入れ室温で17時間攪拌した。攪拌後、樹脂をメチレンクロライド、イソプロパノール、メタノールの順で洗浄し、乾燥させた。

乾燥させた樹脂をカラム内でDMFで膨潤させた後、20%ピペリジン/DMF溶液約10mlを加え、室温で15分間攪拌してFmoc基を脱保護してレジン-Val-NH<sub>2</sub>を得た。次いでDMFで洗浄し、乾燥させた。

##### II ペプチド鎖の伸長

25 乾燥させた樹脂 (レジン-Val-NH<sub>2</sub>) をカラム内でDMFで膨潤させた後、Fmoc-Leu 318.6mg (0.9mmol)、HOBt·H<sub>2</sub>O 1

2 1.5 mg (0.9 mmol) を加え樹脂が浸るくらいにDMFを加えた。ジイソプロピルカルボジイミド (DIPCDI) 138.5  $\mu$ l (0.9 mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。攪拌後、DMFで洗浄し、乾燥させた。

乾燥させた樹脂をカラム内でDMFで膨潤させた後、20%ピペリジン/DMF溶液約 10 ml を加え、室温で15分間攪拌してFmoc基を脱保護してレジン-V al -L eu -NH<sub>2</sub>を得た。次いでDMFで洗浄し、乾燥させた。

乾燥させた樹脂をカラム内でDMFで膨潤させた後、Fmoc-L eu 318.6 mg (0.9 mmol)、HOBt · H<sub>2</sub>O 121.5 mg (0.9 mmol) を加え樹脂が浸るくらいにDMFを加えた。DIPCDI 138.5  $\mu$ l (0.9 mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。攪拌後、DMFで洗浄し、乾燥させた。

乾燥させた樹脂をカラム内でDMFで膨潤させた後、20%ピペリジン/DMF溶液約 10 ml を加え、室温で15分間攪拌してFmoc基を脱保護してレジン-V al -L eu -L eu -NH<sub>2</sub>を得た。次いでDMFで洗浄し、乾燥させた。

乾燥させた樹脂をカラム内でDMFで膨潤させた後、Fmoc-A l a 293.4 mg (0.9 mmol)、HOBt · H<sub>2</sub>O 121.5 mg (0.9 mmol) を加え樹脂が浸るくらいにDMFを加えた。DIPCDI 138.5  $\mu$ l (0.9 mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。攪拌後、DMFで洗浄し、乾燥させた。

乾燥させた樹脂をカラム内でDMFで膨潤させた後、20%ピペリジン/DMF溶液約 10 ml を加え、室温で15分間攪拌してFmoc基を脱保護してレジン-V al -L eu -L eu -A l a -NH<sub>2</sub>を得た。次いでDMFで洗浄し、乾燥させた。

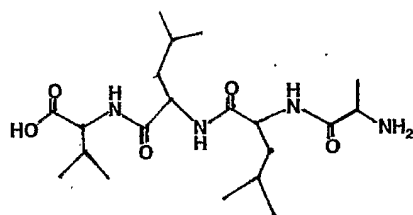
25 III 固相からの切り出し

HOOC-V al -L eu -L eu -A l a -NH<sub>2</sub>の合成

乾燥させた樹脂に T F A 5 % 水溶液を加え、室温で 3 時間攪拌した。攪拌後、溶液をナスフラスコに移し取り氷中でジエチルエーテルを加え、目的物を沈殿させ、これをろ過した。

$^1\text{H-NMR}$  (30°C)

- 5 8.56 (1H, d,  $J=6.5\text{ Hz}$ , Leu-2NH), 8.42 (1H, d,  $J=7.4\text{ Hz}$ , Leu-1NH), 8.25 (1H, d,  $J=8.3\text{ Hz}$ , Val NH), 4.34 (1H, d,  $J=6.7\text{ Hz}$ , Val- $\alpha$ ), 4.16 (1H, d,  $J=7.1\text{ Hz}$ , Ala- $\alpha$ ), 2.27 (1H, ddd, Val- $\beta$ ), 1.69~1.58 (m, 11H, Leu-1, Leu-2), 1.59 (3H, d,  $J=7.2\text{ Hz}$ , Ala- $\beta$ ), 1.01~0.96 (m, 25H, Leu-1, Leu-2, Val)
- 10



(13)

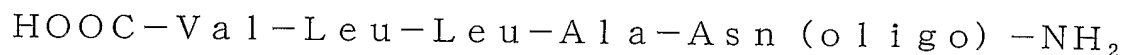
#### 実施例 1

- 参考例 4 の固相から切り出す前の乾燥したレジン-V a l - L e u - L e u -
- 15 A l a - N H <sub>2</sub> からなる樹脂 17 mg をエッペンチューブに取った。参考例 3 で得られたジベンジル F m o c - ジシアロ糖鎖アスパラギン (12) 35 mg (14.8  $\mu\text{mol}$ ) と O - (7 - アザベンゾトリアゾール - 1 - y l) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスホネート (HATU) 0.64 mg (2.7  $\mu\text{mol}$ ) を加え、DMF を 150  $\mu\text{l}$  加えた。ジイソプロピル
- 20 エチルアミン (D I P E A) 0.31  $\mu\text{l}$  を加え、室温で 24 時間攪拌した。攪拌後、DMF で洗浄し乾燥させた。

乾燥させた樹脂をエッペンチューブ内で膨潤させた後、20%ピペリジン/D MF 溶液約 1 ml を加え、室温で 15 分間攪拌し攪拌して F m o c 基を脱保護し

てレジン-Val-Leu-Leu-Ala-Asn (oligo) -NH<sub>2</sub>を得た。次いでDMFで洗浄し、乾燥させた。ここでAsn (oligo) とは参考例3で得られたジベンジルFmoc-ジシアロ糖鎖アスパラギン(12)からFmoc基の脱離したジベンジルージシアロ糖鎖アスパラギンである。

5 (固相からの切り出し)



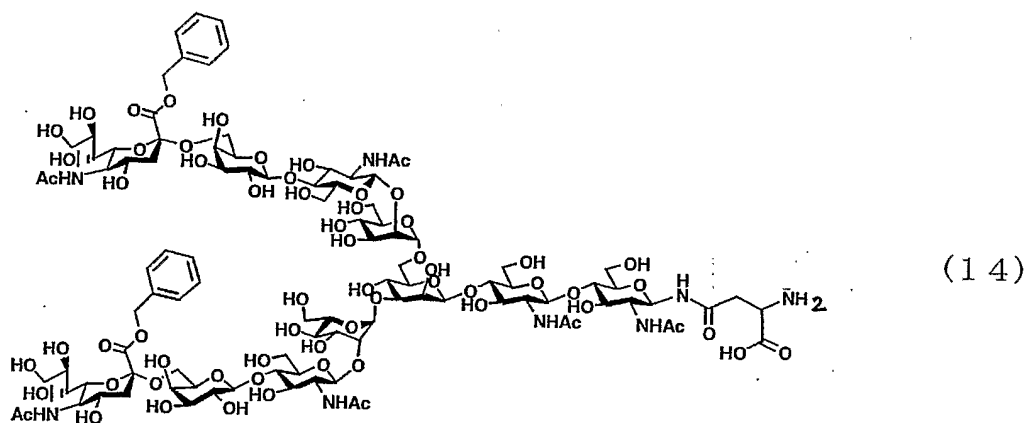
の合成

乾燥させた上記樹脂にトリフルオロ酢酸 (TFA) 95%水溶液を加え、室温で3時間攪拌した。攪拌後、溶液をエッペンチューブに移し取り氷中でジエチルエーテルを加え、目的物を沈殿させた。沈殿物を0.1% TFA水溶液に溶かし、

10 逆相カラムクロマトグラフィーで精製した。(YMC-Pack ODS-A 250×3.0mm 流速0.45ml/min 展開溶媒A:0.1% TFA水溶液 B:0.1% TFA アセトニトリル:水=90:10を用いた。

グラジエント Aのみ10分 A100%→B100% 30分),

15 上記Asn (oligo) の構造を下記に示す。



<sup>1</sup>H-NMR (30°C)

7.59~7.55 (m, 10H, Bn), 5.45 (4H, dd, Bn-CH<sub>2</sub>×2), 5.23 (1H, s, Man4-H<sub>1</sub>), 5.15 (1H, d, GlcNAc1-H<sub>1</sub>), 5.03 (1H, s, Man4'-H<sub>1</sub>), 4.87 (1H,

20

s, Man 3-H<sub>1</sub>), 4.67 (3H, d, GlcNAc 2-H<sub>1</sub>, GlcNAc 5, 5'-H<sub>1</sub>), 4.42 (2H, d, Gal 6, 6'-H<sub>1</sub>), 4.34 (1H, d, Man 3-H<sub>2</sub>), 4.28 (1H, d, Man 4'-H<sub>2</sub>), 4.20 (1H, d, Man 4-H<sub>2</sub>), 2.82 (2H, dd, J=6.68 Hz, NeuAc 7, 7'-H<sub>3<sub>eq</sub></sub>), 2.65 (1H, dd, J=16.69 Hz, 6.83 Hz, Asn-βCH), 2.13 (18H, s×6, -Ac), 1.94 (2H, dd, J=12.24 Hz, NeuAc 7, 7'-H<sub>3<sub>ax</sub></sub>), 1.41~1.26 (m, 25H, Leu-1, Leu-2, Val)

## 実施例 2

### 10 HOOC-Ser-Ser-Asn (oligo) -NH<sub>2</sub>の合成

#### I 樹脂 (レジン) への導入

固相合成用カラムにPEG Aレジン50mgを入れ、メチレンクロライド、次いでメタノールで十分に洗浄し乾燥させた。

Fmoc-Ser (Bzl) -OH 80mg (180 μmol)、HOBt · H<sub>2</sub>O 19mg (135 μmol) をDMF 10mlに溶解させ、DCC 37mg (180 μmol) を加え、0℃で15分攪拌してアミノ酸溶液を得る。樹脂をDMFで膨潤させる。上記アミノ酸溶液を固相合成用カラムに入れ室温で17時間攪拌した。攪拌後、樹脂をメチレンクロライド、イソプロパノール、メタノールの順で洗浄し、乾燥させた。

20 乾燥させた樹脂をカラム内でDMFで膨潤させた後、20%ピペリジン/DMF溶液約2.0mlを加え、室温で15分間攪拌してFmoc基を脱保護してレジン-Ser-NH<sub>2</sub>を得た。次いでイソプロパノールとDMFで洗浄し、乾燥させた。

#### II ペプチド鎖の伸長

25 乾燥させた樹脂をカラム内でDMFで膨潤させた後、Fmoc-Ser (Bzl) -OH 40.0mg (89.8 μmol)、HOBt · H<sub>2</sub>O 12mg (8

9.8  $\mu\text{mol}$ ) を加えDMF 2.0 ml 加えた。DIPCDI 14  $\mu\text{l}$  (89.8  $\mu\text{mol}$ ) を加え、室温で2時間攪拌した。攪拌後、DMFで洗浄し、乾燥させた。

乾燥させた樹脂をカラム内でDMFで膨潤させた後、20%ピペリジン/DMF  
5 F溶液約2.0 mlを加え、室温で15分間攪拌してFmoc基を脱保護してレジン-Ser-Ser-NH<sub>2</sub>を得た。次いでイソプロパノールとDMFで洗浄し、乾燥させた。

乾燥させた樹脂をカラム内でジメチルスルホキシド (DMSO) で膨潤させた後、参考例3で得られたジベンジル-Fmoc-ジシアロ糖鎖アスパラギン (1  
10 2) 13.5 mg (5.7  $\mu\text{mol}$ ) をDMFに溶かしカラムに移し入れた。これにHATU 1.6 mg (6.8  $\mu\text{mol}$ ) とDIPEA 0.83  $\mu\text{l}$ を加え、室温で24時間攪拌した。攪拌後、イソプロパノールとDMFで洗浄し乾燥させた。

乾燥させた樹脂をエッペンチューブ内で膨潤させた後、20%ピペリジン/DMF溶液約1 mlを加え、室温で15分間攪拌し、Fmoc基を脱保護してレジン-Ser-Ser-Asn(oligo)-NH<sub>2</sub>を得た。次いでDMFで洗浄し、乾燥させた。ここでAsn(oligo)は実施例1のものと同じものである。

### III 固相からの切り出し

乾燥させた樹脂にTFA 95%水溶液を加え、室温で3時間攪拌した。反応溶  
20 液を、逆相カラムクロマトグラフィーで精製した。(YMC-Pack ODS-A 250×3.0 mm 流速0.35 ml/min 展開溶媒 A:0.1%TFA水溶液 B:0.1%TFA アセトニトリル:水=90:10を用いた。グラジエントA 100%→B100% 120分)

<sup>1</sup>H-NMR (30°C)

25 7.60~7.45 (m, 20H, Bn), 5.35 (4H, dd, J=11.8 Hz, Bn-CH<sub>2</sub>-), 5.21 (1H, s, Man4-H<sub>1</sub>), 5.13 (1

H, d,  $J=9.2\text{ Hz}$ ,  $\text{GlcNAc } 1\text{-H}_1$ ), 5.03 (1H, s,  $\text{Man } 4'\text{-H}_1$ ), 4.34 (1H, d,  $\text{Man } 3\text{-H}_2$ ), 4.28 (1H, d,  $\text{Man } 4'\text{-H}_2$ ), 4.20 (1H, d,  $\text{Man } 4\text{-H}_2$ ), 2.82 (2H, dd,  $J=6.68\text{ Hz}$ ,  $\text{NeuAc } 7, 7'\text{-H}_{3_{\text{eq}}}$ ), 2.13 (18H, s × 6, -Ac), 1.93 (2H, dd,  $J=12.24\text{ Hz}$ ,  $\text{NeuAc } 7, 7'\text{-H}_{3_{\text{ax}}}$ )

### 実施例 3

$\text{HOOC-Ser-Ser-Asn (disialooligo) -Val-Leu-Leu-Ala-NH}_2$  の合成

10 上記目的糖ペプチドにおける  $\text{Asn (disialooligo)}$  とは、ベンジル基で保護されていないシアル酸を有するジシアロオリゴアスパラギンを意味する。

固相合成用カラムに  $\text{HMPA-PEGA}$  レジン 50 mg を入れ、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , DMF で十分に洗浄し乾燥させた。

15  $\text{Fmoc-Ser (OtBu) -OH}$ , 1-メチレンスルホニル-3-ニトロロ-1, 2, 4-トリアゾール (MSNT),  $\text{N-メチルイミダゾール}$  を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  に溶解させ 5 分間攪拌した後、樹脂の入った固相合成用カラムに入れ室温で 3 時間攪拌した。攪拌後、樹脂をメチレンクロライド、イソプロパノール、DMF で洗浄し乾燥させた。その後、20 分間 20% 無水酢酸 DMF 溶液を用いて固相上の未反応のアミノ基をアセチル化しキャッピングした。DMF で樹脂を洗浄後、20% ピペリジン/DMF 溶液を用いて 20 分攪拌することにより  $\text{Fmoc}$  基を脱保護しレジン- $\text{Ser-NH}_2$  を得た。DMF で洗浄後、乾燥させた。

次に、 $\text{Fmoc-Ser (OtBu) -OH}$  を用い  $\text{HOBT} \cdot \text{H}_2\text{O}$  と  $\text{DIPCDI}$  によって縮合させた。

25 次に、参考例 3 で得られたジベンジル  $\text{Fmoc}$ -ジシアロ糖鎖アスパラギン (12) を DMSO、DMF 1 対 1 の混合溶媒に溶かし、 $\text{HATU}$  と  $\text{DIPEA}$

を用いて室温24時間攪拌させて縮合させた。DMFで洗浄後10%無水酢酸/2-プロパノール:メタノールで20分間攪拌しキャッピングした。樹脂を2-プロパノール、DMFで洗浄後、20%ピペリジン/DMFで20分間攪拌しFmoc基を脱保護しDMFで樹脂を洗浄した。

- 5 この樹脂に、バリン (Val)、ロイシン (Leu)、ロイシン (Leu)、アラニン (Ala) を同様に縮合およびFmoc基の脱保護を行って、レジン-Ser-Ser-Asn (ジベンジルdisialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>を得た。ここでAsn (ジベンジルdisialooligo) とは、ベンジル基で保護されたシアル酸を有するジシアロオリゴ
- 10 アスパラギンを意味する。

バリン (Val)、ロイシン (Leu)、アラニン (Ala) のアミノ酸はカルボキシル基をpfpエステル化したFmoc-AA-Opfp (AA=アミノ酸) を用い、3,4-ジヒドロ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン-3-yl (Dhbt) によって縮合させた。すべての縮合はDMF溶液中で行った。

- 15 縮合が終了した樹脂をよく乾燥した後、95%TFA水溶液を加え、室温で3時間攪拌してレジンを切断した。レジンをろ過して除き、反応溶液を室温で減圧濃縮した後、水に溶かし凍結乾燥した。凍結乾燥品をpH11の水酸化ナトリウム水溶液に溶かし、ベンジルエステルを加水分解してベンジルを脱離した後、酢酸で中和しそのまま凍結乾燥した。凍結乾燥品をHPLCで精製することで目的
- 20 とするHOOC-Ser-Ser-Asn (disialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>を得た。

- (YMC-Pack ODS-A 250×3.0mm 展開溶媒 A:0.1%TFA水溶液 B:0.1%TFA アセトニトリル:水=90:10 グラジエントA 100% 0.35ml/min→B 100% 0.40ml/min 90分 流速0.35ml/minから0.40ml/min)
- 25

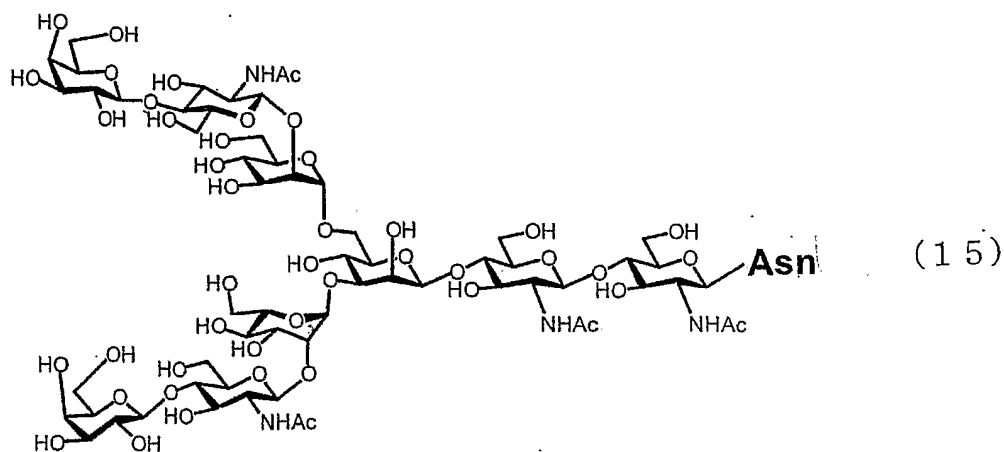
<sup>1</sup>H-NMR (30°C)

$\delta$  5.22 (s, 1H, Man4-H1), 5.11 (d, 1H, GlcNAc  
 1-H1), 5.04 (s, 1H, Man4'-H1), 4.86 (1H, Asn  
 $\alpha$ ), 4.70 (bd, 3H, GlcNAc2, 5, 5'-H1), 4.62-4.  
 57 (m, 2H, Ser $\alpha$ ×2), 4.53 (d, 2H, Gal6, 6'-H  
 5 1), 4.52-4.48 (m, 2H, Leu $\alpha$ ×2), 4.34 (bs, 1H,  
 Man3-H2), 4.28 (bs, 1H, Man4-H2), 4.21-4.1  
 5 (m, 3H, Man4'-H2, Val $\alpha$ , Ala $\alpha$ ), 2.98 (dd, 1  
 H, Asn $\beta$ ), 2.86 (dd, 1H, Asn $\beta$ ), 2.75 (bdd, 2H,  
 NeuAc7, 7'-H3eq), 2.16-2.10 (Ac×6, Val $\beta$ ),  
 10 1.82 (dd, 2H, NeuAc7, 7'-H3ax), 1.76-1.68  
 (bd, 6H, Leu $\beta$ CH<sub>2</sub>×2, Leu $\gamma$ CH×2), 1.60 (d, 3H,  
 Ala $\beta$ CH<sub>3</sub>), 1.03-0.97 (m, 18H, Leu-CH<sub>3</sub>×4, Va  
 1-CH<sub>3</sub>×2)

実施例4

15 HOOC-Ser-Ser-Asn (disialooligo) -Val-  
 Leu-Leu-Ala-Asn (asialooligo) -Val-Leu  
 -Leu-Ala-NH<sub>2</sub>の合成

上記目的糖ペプチドにおけるAsn (asialooligo) とは、下記で  
 示される糖鎖アスパラギンである。



実施例3の固相から切り出す前のレジニン-Ser-Ser-Asn (ジベンジルdisialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>に、更にAsn (asialooligo)、バリン (Val)、ロイシン (Leu)、ロイシン (Leu)、アラニン (Ala) を用いて縮合させ、次いで実施例3と同様にペプチド鎖を固相から切り出し、次いでベンジル基を脱離してHOOC-Ser-Ser-Asn (disialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-Asn (asialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>からなる糖ペプチドを得た。

バリン (Val)、ロイシン (Leu)、アラニン (Ala) のアミノ酸はカルボキシル基をpfpエステル化したFmoc-AA-Opfp (AA=アミノ酸) を用い、3,4-ジヒドロ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン-3-yl (Dhbt) によって縮合させた。すべての縮合はDMF溶液中で行った。そして20%ピペリジン/DMF溶液を加え室温20分攪拌しFmoc基を脱保護した。

糖鎖アスパラギンの次にくるアミノ酸 (Val) を導入後は20%無水酢酸/2-プロパノール、メタノール1対1溶液で糖鎖アスパラギンの未反応のアミノ基をキャッピングした後にFmoc基の脱保護を行った。樹脂をイソプロパノールとDMF洗浄し、乾燥した。Fmoc-アシアロ糖鎖アスパラギンの縮合は、実施例3のジベンジルFmoc-ジシアロ糖アスパラギンの縮合と同様に行った。

得られたHOOC-Ser-Ser-Asn (disialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-Asn (asialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>からなる糖ペプチドの<sup>1</sup>H-NMR (30°C) を以下に示す。

δ 5.22, 5.21 (each s, each 1H, Man4-H1, ManD-H1), 5.11 (d, 2H, GlcNAc1-H1, GlcNAcA-H1), 5.03, 5.01 (each s, each 1H, Man4'-H1,

ManD' -H-1), 4.86 (2H, Asn $\alpha$ ), 4.69-4.66 (GlcNAc2, B, 5, 5', E, E' -H1), 4.61-4.48 (Leu $\alpha$  × 4, Ser $\alpha$  × 2, Gal6, 6', F, F' -H1), 4.33 (bs, 2H, Man3, C-H2), 4.28 (bs, 2H, Man4, D-H2), 4.20  
 5 (bs, 2H, Man4', D' -H2), 4.20-4.17 (Val $\alpha$  × 2, Ala $\alpha$  × 2), 3.00 (dd, 2H, Asn $\beta$  × 2), 2.83 (dd, 2H, Asn $\beta$  × 2), 2.76 (dd, 2H, NeuAc7, 7' -H3eq), 1.82 (dd, 2H, NeuAc7, 7' -H3ax), 2.16-2.10 (Ac × 10, Val $\beta$ ), 1.70-1.60 (m, Leu $\beta$ ,  $\gamma$ ), 1.60, 1.4  
 10 9 (each d, each 3H, Ala $\beta$ ), 1.02-0.96 (m, 36 H, Val-CH<sub>3</sub> × 4, Leu-CH<sub>3</sub> × 8)

#### 参考例6

上記Asn (asialooligo) で示される糖鎖アスパラギンは、特願  
 2001-185685号の実施例に準じて合成した。そのNMRデータを下記  
 15 に示す。

<sup>1</sup>H-NMR (30°C)

$\delta$  5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, J=9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4' -H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62 (d, 1H, J=8.0 Hz, GlcNAc2-H-1), 4.58 (d, 2H, J=7.8 Hz, GlcNAc5, 5' -H-1), 4.47 (d, 2H, J=7.9 Hz, Gal6, 6' -H-1), 4.24 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.19 (bdd, 1H, J=3.2 Hz, 1.4 Hz, Man4' -H-2), 4.12 (bdd, 1H, J=3.2 Hz, 1.4 Hz, Man4-H-2), 2.93 (dd, 1H, J=4.5 Hz, 17.0 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.93 (dd, 1H, J=6.8 Hz, 17.0 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.

0.5 (s, 6H, Ac×2), 2.01 (s, 3H, Ac)

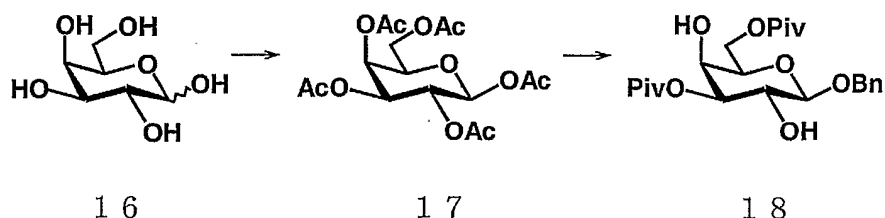
また、参考例2と同様にしてFmoc-アシアロ糖鎖アスパラギンを合成した。そのNMRデータを下記に示す。

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 30℃)

5 δ 7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc),  
7.55 (4H, m, Fmoc), 5.12 (1H, s, Man4-H1),  
5.06 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.93 (1H, s, Ma  
n4'-H1), 4.82 (1H, s, Man3-H1), 4.69 (1H,  
d, GlcNAc2-H1), 4.67 (2H, d, GlcNAc5, 5'-  
10 H1), 4.53 (2H, d, Gal6, 6'-H1), 4.34 (1H,  
d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Man4'-H2), 4.19  
(1H, d, Man4-H2), 3.03 (1H, bdd, Asn-βCH),  
3.00 (1H, bdd, Asn-βCH), 2.15 (12H, s×4,  
-Ac)

#### 15 参考例7

(ベンジル 3,6-ジ-O-ピバロイル-β-D-ガラクトピラノシド Benzyl 3,6-di-O-pivaloyl-β-D-galactopyranoside 18の合成)



#### 20 (1) 化合物17の合成

無水酢酸 (60 ml) に酢酸ナトリウム (5 g, 69 mmol) を溶かし、加熱した後にD-ガラクトース (16) (10 g, 55 mmol) を少しずつ加える。2時間加熱還流した後TLC (トルエン：酢酸エチル=5：1) にて反応が

終了したことを確認した。反応溶液を室温に戻した後に、氷水300ccに注ぐ。ろ過して沈殿物を集める。沈殿物をエタノール(14ml)に溶かし再結晶を行い、化合物17を9.0g(収率41%)得た。

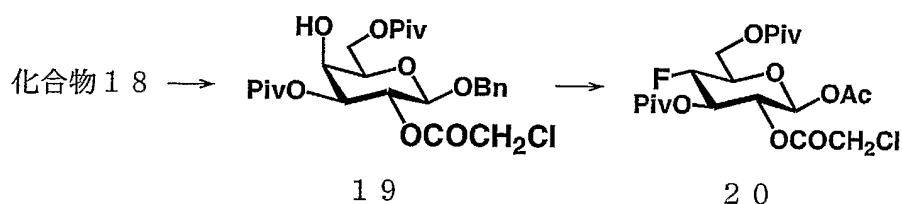
(2) 化合物18の合成

- 5 化合物17(4.3g, 11mmol)を塩化メチレン(120ml)の溶かした後、アルゴン気流下-20℃まで冷却した。続いて、反応溶液に四塩化スズ(3.1g, 12mmol)を加え20分攪拌した後、ベンジルアルコール(2.3g, 22mmol)を加え反応温度を室温に戻した。TLC(ヘキサン:酢酸エチル=1:1)で反応終了を確認後、反応溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に注ぎ、塩化メチレンで抽出した。塩化メチレン層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過、減圧濃縮した。残渣をデシケータで乾燥後、蒸留したメタノール(80ml)に溶かしナトリウムメトキシド(431mg, 5.5mmol)を加えアルゴン気流下攪拌した。TLC(酢酸エチル:メタノール:水=10:5:1)で反応終了を確認した後、陽イオン交換樹脂IR-120(+)で中和し反応を終了させた。樹脂をろ過して取り除いた後、濾液を減圧濃縮した。残渣をデシケータで乾燥後、ピリジン(44ml)に溶かし、反応溶液を0℃に冷却した。反応溶液にピバロイルクロライド(4.6g, 38.5mmol)を加えた後、室温に戻しアルゴン気流下1時間攪拌した。反応終了をTLC(ヘキサン:酢酸エチル=2:1)で確認し0℃に冷却後メタノールを加え反応を終了させた。
- 10
- 15
- 20 反応溶液をそのまま減圧濃縮した後、残渣を酢酸エチルに溶かし飽和食塩水溶液、水で洗浄し無水硫酸マグネシウムで酢酸エチルを乾燥させた。硫酸マグネシウムをろ過して取り除いた後、濾液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒ヘキサン:酢酸エチル=2:1)で精製し化合物18(2.8g, 収率58%)を得た。

25 参考例8

(ベンジル 2-オ-クロロアセチル-4-デオキシ-4-フルオロ-3,6

ージ- $\text{O}$ -ピバロイル- $\beta$ - $\text{D}$ -グルコピラノシド Benzyl 2- $\text{O}$ -chloroacetyl-4-deoxy-4-fluoro-3,6-di- $\text{O}$ -pivaloyl- $\beta$ - $\text{D}$ -gulucopyranoside 20の合成)



5

(1) ベンジル 2- $\text{O}$ -クロロアセチル-3,6- $\beta$ - $\text{D}$ -ガラクトピラノシド Benzyl 2- $\text{O}$ -chloroacetyl-3,6-di- $\text{O}$ -pivaloyl- $\beta$ - $\text{D}$ -galactopyranoside (19)の合成

10 化合物 18 (200 mg, 0.455 mmol) をジクロロメタン (7.8 ml) とピリジン (1.3 ml) に溶かし、無水クロロ酢酸 (155 mg, 0.91 mmol) を加えて、アルゴン気流下-15 $^{\circ}\text{C}$ で攪拌しながら15分間反応させた。反応終了を確認後、メタノール (5 ml) で無水クロロ酢酸をクエンチし、トルエンで3回共沸しながら減圧濃縮した。残渣を酢酸エチルで抽出し、飽和食

15 塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:ヘキサン=1:4) で精製し、化合物 19 (収量172 mg, 収率73.5%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  7.37-7.29 (m, 5H, Ph), 5.39 (dd, 1H,  $J_{1,2}=8.0$  Hz,  $J_{2,3}=10.4$  Hz, H-2), 4.89 (dd, 1H,  $J_{3,4}=3.4$  Hz, H-3), 4.89, 4.62 (2d, 2H,  $J=12.5$  Hz,  $\text{OCH}_2$  Ph), 4.53 (d, 1H, H-1), 4.37 (dd, 1H,  $J_{6a,6b}=11.5$  Hz,  $J_{6a,5}=6.0$  Hz, H-6a), 4.32 (dd, 1H,  $J_{6b,5}=6.$

20

6 Hz, H-6 b), 4.00 (m, 1H, H-4), 3.92 (s, 2H, COC  
H<sub>2</sub>C1), 3.75 (dd, 1H, H-5), 1.23, 1.19 [2s, 18H,  
COC (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]

<sup>13</sup>C-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)

5 δ 178.33, 177.57, 165.92, (C=O), 136.66, 12  
8.48, 128.07, 127.89 (Ph), 99.16 (C-1), 72.82  
(C-3), 72.35 (C-5), 70.92 (C-2), 70.49 (OCH<sub>2</sub>P  
h), 67.29 (C-4), 62.30 (C-6), 40.40 (COCH<sub>2</sub>C1),  
38.95, 38.80 [COC (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 27.14, 26.98 [COC  
10 (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]

<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMRはBrukerのAVANCE 400 (400M  
Hzと表記)で測定した。溶媒が重クロロホルムの際は内部標準としてトリメチ  
ルシランを用いた。その他の重溶媒を用いたときは溶媒ピークを基準とした。化  
学シフトは、δ (ppm)で、結合定数はJ (Hz)示した。シリカゲルカラム  
15 クロマトグラフィーには、Merck Silicagel 60, 70-230  
mesh又は230-400meshを、球状シリカゲルは関東化学社製のSi  
lica Gel 60 (Spherical)を、反応検出用 (以下TLC)  
としてはE. Merck社製DC-Platten Kieselgel 60  
F254 (Art 1, 05715)を使用した。高速液体クロマトグラフィー  
20 (HPLC)のカラムはナカライテスク社製 COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-A  
R Packed Column (φ4.6×150mm), を使用し、分光蛍光  
光度計は、JASCO社製のFP-210 Spectrofluoromet  
erを用いた。

(2) ベンジル 2-オ-クロロアセチル-4-デオキシ-4-フルオロ-3,  
25 6-ジ-オ-ピバロイル-β-D-グルコピラノシド (20) の合成

化合物19 (300mg, 0.583mmol) をジクロロメタン (5.8m

1)に溶かし、アルゴン気流下 $-15^{\circ}\text{C}$ で攪拌しながらジエチルアミノスルファートリフルオリド(DAST)を加えた。DASTを加え10分後室温に戻し1時間反応させた。TLCで原料消失を確認し、メタノール(3ml)でDASTをクエンチ後減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:ヘキサン=1:6)で精製し化合物20(収量211mg、収率70%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  7.37-7.27 (m, 5H, Ph), 5.31 (ddd, 1H,  $J_{3,\text{F}}=14.3\text{Hz}$ ,  $J_{3,4}=9.69\text{Hz}$ ,  $J_{2,3}=9.63\text{Hz}$ , H-3), 5.04 (dd, 1H,  $J_{1,2}=7.93\text{Hz}$ , H-2), 4.86 (d, 1H,  $J=12.2\text{Hz}$ ,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.60 (d, 1H, H-1), 4.59 (d, 1H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.44 (ddd, 1H,  $J_{4,5}=9.04\text{Hz}$ ,  $J_{4,\text{F}}=50.6\text{Hz}$ , H-4), 4.43 (ddd, 1H,  $J_{6a,6b}=12.1\text{Hz}$ ,  $J_{6a,5}=2.41\text{Hz}$ ,  $J_{6a,\text{F}}=2.23\text{Hz}$ , H-6a), 4.24 (ddd, 1H,  $J_{6b,5}=5.67\text{Hz}$ ,  $J_{6b,\text{F}}=1.28\text{Hz}$ , H-6b), 3.93 (s, 2H,  $\text{OCOCH}_2\text{Cl}$ ), 3.75 (m, 1H, H-5), 1.25, 1.18 [2s, 18H,  $\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$ ]

$^{13}\text{C-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  177.94, 117.43, 165.88 (C=O), 136.34, 128.55, 138.23, 127.92 (Ph), 98.68 (C-1), 87.35 (d,  $J_{4,\text{F}}=188.62\text{Hz}$ , C-4), 72.65 (d,  $J_{2,\text{F}}=7.96\text{Hz}$ , C-2), 72.05 (d,  $J_{3,\text{F}}=20.02\text{Hz}$ , C-3), 71.49 (d,  $J_{5,\text{F}}=23.09\text{Hz}$ , C-5), 70.80 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 62.12 (C-6), 40.30 ( $\text{OCOCH}_2\text{Cl}$ ), 38.87 [ $\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$ ], 27.17, 26.92 [ $\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$ ]

参考例9



$J_{6b, F} = 1.26 \text{ Hz}$ , H-6 b), 3.75 (m, 1H, H-5), 3.54 (m, 1H,  $J_{2, OH} = 2.70 \text{ Hz}$ , H-2), 1.27, 1.26 [2s, 18H,  $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ]

$^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

5  $\delta$  178.17, 177.94 (C=O), 136.54, 128.54, 128.17, 128.12 (Ph), 101.31 (C-1), 87.45 (d,  $J_{4, F} = 187.39 \text{ Hz}$ , C-4), 74.17 (d,  $J_{3, F} = 18.88 \text{ Hz}$ , C-3), 72.45 (d,  $J_{2, F} = 7.56 \text{ Hz}$ , C-2), 71.45 (d,  $J_{5, F} = 23.26 \text{ Hz}$ , C-5), 71.09 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 62.44 (C-6), 38.9  
10 0, 38.85 [ $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ], 27.14, 26.99 [ $\text{C}(\text{H}_3)_3$ ]

(2) ベンジル 2-アジド-2,4-ジデオキシ-4-フルオロ-3,6-ジ-  
O-ピバロイル- $\beta$ -D-マンノピラノシド (22) の合成

ピリジン (22.2  $\mu\text{l}$ , 0.274 mmol) を溶かしたジクロロメタン (3  
15 70  $\mu\text{l}$ ) 溶液に 0°C で無水トリフルオロメタンスルホン酸 (46  $\mu\text{l}$ , 0.274 mmol) を滴下し、15分後、化合物 21 をジクロロメタン (1 ml) に溶かしたものを 0°C で滴下した。TLC で原料消失を確認し、反応混合物をジクロロメタンで希釈した。有機層を飽和重曹水、飽和食塩水、水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後濃縮した。残渣を真空ポンプでさらに乾燥後ベンゼン  
20 (1 ml) に溶かし、アルゴン気流下室温でアジ化ナトリウム (13 mg, 0.206 mmol)、テトラアンモニウムクロライド (57 mg, 0.206 mmol) を加え 40°C で反応させた。2時間後 TLC で原料消失を確認後減圧濃縮した。残渣を酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水、水で洗浄し無水硫酸マグネシウムで乾燥後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 4) で精製して化合物 22 (収量 30.4 mg, 収率 9  
25 5%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  7.39–7.32 (m, 5H, Ph), 4.99 (ddd, 1H,  $J_{3,\text{F}}=1$   
3.18 Hz,  $J_{3,4}=9.27$  Hz,  $J_{2,3}=3.87$  Hz, H-3), 4.93  
(d, 1H,  $J=12.07$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.67 (d, 1H,  $J_{1,2}=$   
5 1.18 Hz, H-1), 4.63 (d, 1H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.51 (ddd,  
1H,  $J_{6a,6b}=11.95$  Hz,  $J_{6a,5}=2.54$  Hz,  $J_{6a,\text{F}}=2.08$  Hz,  
H-6a), 4.23 (ddd, 1H,  $J_{6b,5}=6.14$  Hz,  $J_{6b,\text{F}}=1.$   
14 Hz, H-6b), 4.08 (m, 1H, H-2), 3.64 (m, 1H, H-  
5), 1.26 [2s, 18H,  $\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$ ]

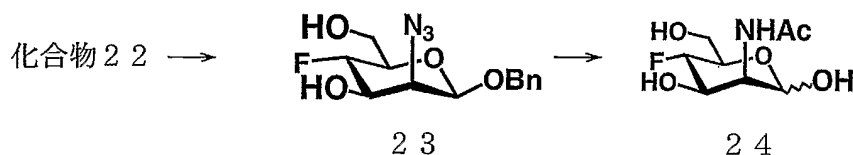
10  $^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  178.01, 177.68 (C=O), 136.06, 128.63, 128.  
31, 128.14 (Ph), 97.25 (C-1), 85.51 (d,  $J_{4,\text{F}}=1$   
83.97, C-4), 72.01 (d,  $J_{5,\text{F}}=23.89$ , C-5), 71.73  
(d,  $J_{3,\text{F}}=18.98$ , C-3)  
15 70.57 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 62.42 (C-2, C-6), 39.08, 38.9  
0 [ $\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$ ], 27.18, 26.95 [ $\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$ ]

参考例10

(N-アセチル-4-デオキシ-4-フルオロ-D-マンノサミン N-ac  
ety l-4-deoxy-4-fluoro-D-mannosamine

20 24の合成)



(1) ベンジル 2-アジド-2,4-ジデオキシ-4-フルオロ- $\beta$ -D-マ  
ンノピラノシド Benzyl 2-azido-2,4-dideoxy-4-  
-fluoro- $\beta$ -D-mannopyranoside (23) の合成

化合物22 (180mg, 0.387mmol) をメタノール (8ml) に溶かしナトリウムメトキシド (922mg, 9.67mmol) を加え攪拌し40℃で反応させた。4.5時間後TLCで1スポットにまとまったことを確認し陽イオン交換樹脂IR-120 (+) で中和後、濾過し濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル：ヘキサン=1：1) で精製し化合物23 (収量105.3mg, 収率91.6%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  7.40–7.31 (m, 5H, Ph), 4.96 (d, 1H,  $J=12.13$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.71 (d, 1H,  $J_{1,2}=1.33$  Hz, H-1), 4.69 (d, 1H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4.49 (ddd, 1H,  $J_{4,F}=51.06$  Hz,  $J_{4,5}=9.19$  Hz,  $J_{3,4}=9.20$  Hz, H-4), 4.02 (m, 1H, H-2), 3.93 (dddd, 1H,  $J_{6a,6b}=12.19$  Hz,  $J_{6a,5}=2.31$  Hz,  $J_{6a,F}=2.32$  Hz,  $J_{6a,OH}=6.20$  Hz, H-6a), 3.89–3.77 (m, 2H, H-3, H-6b), 3.39 (m, 1H, H-5)

$^{13}\text{C-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  136.39, 128.62, 128.24, 127.83 (Ph), 98.63 (C-1), 88.19 (d,  $J_{4,F}=178.91$  Hz, C-4), 73.95 (d,  $J_{5,F}=25.48$  Hz, C-5), 71.18 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 71.16 (d,  $J_{3,F}=19.69$  Hz, C-3), 64.48 (d,  $J_{2,F}=8.42$  Hz, C-2), 61.39 (C-6)

(2) N-アセチル-4-デオキシ-4-フルオロ-D-マンノサミン N-acetyl-4-deoxy-4-fluoro-D-mannosamine (24) の合成

化合物23 (105mg, 0.353mmol) をメタノール (7ml) に溶かし無水酢酸 (333 $\mu$ l, 3.53mol) を加えた後、アルゴン気流下で触媒量の10% Pd/Cを加え水素置換してから室温で攪拌した。2時間後TL

Cで原料消失を確認し、活性炭濾過後濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：メタノール＝5：1）で精製し化合物24（収量57mg，収率72%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

5  $\delta$  5.23 (dd, 1H,  $J_{1,2}=2.69\text{Hz}$ ,  $J_{1,F}=1.44\text{Hz}$ , H-1- $\alpha$ ), 4.65 (ddd, 1H,  $J_{4,F}=50.94\text{Hz}$ ,  $J_{3,4}=9.06\text{Hz}$ ,  $J_{4,5}=9.58\text{Hz}$ , H-4- $\alpha$ ), 4.47 (m, 1H, H-2- $\alpha$ ), 4.43 (ddd, 1H,  $J_{3,F}=14.28\text{Hz}$ ,  $J_{2,3}=4.9\text{Hz}$ , H-3- $\alpha$ ), 4.16 (m, 1H, H-5- $\alpha$ ), 3.95 (m, 2H, H-6a- $\alpha$ , H-6b- $\alpha$ ), 2.14 (s, 3H,  $\text{NHCOCH}_3$ - $\alpha$ )

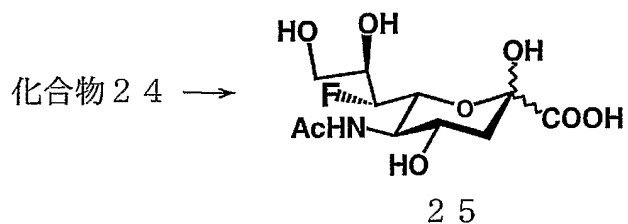
$^{13}\text{C-NMR}$  (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

15  $\delta$  175.27 (C=O- $\alpha$ ), 93.46 (C-1- $\alpha$ ), 88.30 (d,  $J_{4,F}=177.00\text{Hz}$ , C-4- $\alpha$ ), 69.91 (d,  $J_{5,F}=24.41\text{Hz}$ , C-5- $\alpha$ ), 67.60 (d,  $J_{3,F}=18.74\text{Hz}$ , C-3- $\alpha$ ), 60.36 (C-6), 54.12 (d,  $J_{2,F}=8.68\text{Hz}$ , C-2- $\alpha$ ), 22.31 (NHCOCH<sub>3</sub>- $\alpha$ )

参考例11

(5-アセタミド-3,5,7-トリデオキシ-7-フルオロ-D-グリセロ- $\beta$ -D-ラクト-2-ノヌロピラノシドニック アシッド

20 5-Acetamide-3,5,7-trideoxy-7-fluoro-D-glycero- $\beta$ -D-galacto-2-nonulopyranosidonic acid 25の合成)



化合物 24 (50 mg, 0.224 mmol) ピルビン酸ナトリウム (123 mg, 1.12 mmol) と牛血清アルブミン (5 mg) をリン酸ナトリウム緩衝溶液 (100 mM, pH 7.5, 3.4 ml) に溶かし、その後シアル酸アルドラーゼ (50 U) を加え室温で反応を開始した。24 時間後反応溶液を凍結乾燥

5 させ、少量の水に溶かし陰イオン交換樹脂カラム (AG 1-X8, 200-400 mesh, formate form) にのせた。水 300 ml 流した後、1 M ギ酸で目的物を溶出させ減圧濃縮し、ゲル濾過カラム (Sephadex G-15, 水) で精製し化合物 25 (収量 40 mg, 収率 58.9%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

10  $\delta$  4.61 (dd, 1H,  $J_{7,8}=8.97\text{ Hz}$ ,  $J_{7,\text{F}}=45.56\text{ Hz}$ , H-7), 4.18 (dd, 1H,  $J_{5,6}=10.63\text{ Hz}$ ,  $J_{6,\text{F}}=29.86\text{ Hz}$ , H-6), 4.15 (m, 1H, H-4), 4.07 (m, 1H, H-8), 4.02 (dd, 1H,  $J_{4,5}=10.10\text{ Hz}$ , H-5), 3.90 (ddd, 1H,  $J_{9a,9b}=12.18\text{ Hz}$ ,  $J_{9a,8}=2.77\text{ Hz}$ ,  $J_{9a,\text{F}}=2.86\text{ Hz}$ , H-9a),

15 a), 3.76 (ddd, 1H,  $J_{9b,8}=5.33\text{ Hz}$ ,  $J_{9b,\text{F}}=2.06\text{ Hz}$ , H-9b), 2.40 (dd, 1H,  $J_{3eq,3ax}=13.00$ ,  $J_{3eq,4}=4.88\text{ Hz}$ , H-3eq), 2.15 (s, 3H,  $\text{OCOCH}_3$ ), 2.00 (dd, 1H,  $J_{3ax,4}=11.70\text{ Hz}$ , H-3ax)

$^{13}\text{C-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

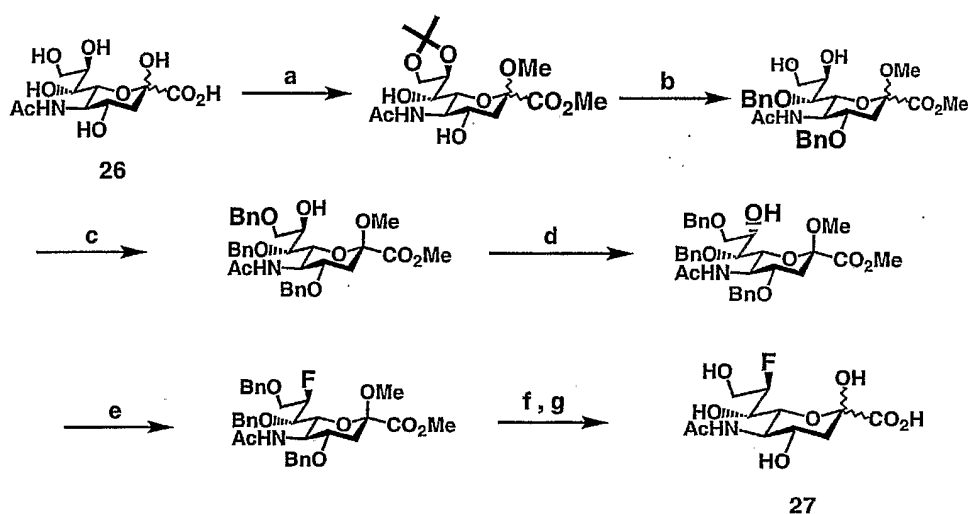
20  $\delta$  175.17, 173.68 (C=O), 96.01 (C-1), 89.12 (d,  $J_{7,\text{F}}=179.23\text{ Hz}$ , C-7), 69.67 (d,  $J_{6,\text{F}}=17.41\text{ Hz}$ , C-6), 68.31 (d,  $J_{8,\text{F}}=26.50\text{ Hz}$ , C-8), 67.26 (C-4), 62.70 (C-6), 52.17 (C-5), 39.19 (C-3), 22.61 (NHCOCH<sub>3</sub>)

25 参考例 12

(5-アセタミド-3,5,8-トリデオキシ-8-フルオロ-D-グリセロ-

$\beta$ -D-ラクト-2-ノヌロピラノシドニック アシッド (5-Acetamide-3,5,8-trideoxy-8-fluoro-D-glycero- $\beta$ -D-galacto-2-nonulopyranosidonic acid (27)の合成)

- 5 下記のスキームに従ってシアル酸 (26) から5-アセタミド-3,5,8-トリデオキシ-8-フルオロ-D-グリセロ- $\beta$ -D-ラクト-2-ノヌロピラノシドニック アシッド (27) を合成した。



(a) (1) Dowex 50-X8, dist. MeOH, (2) Acetone dimethyl acetal, Camphor sulfonic acid, MeCN,  $y=73\%$ ;

(b) (1) BaO, Ba(OH)<sub>2</sub>, BnBr, DMF, (2) CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>, (3) 60% AcOH,  $y=61.8\%$ ;

(c) (1) Dibutyltin oxide, toluene : MeOH=5 : 1, (2) tetra-n-butyl ammonium bromide, BnBr, toluene,  $y=74.3\%$ ;

(d) (1) DMSO, Oxalyl chloride, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (2) BH<sub>3</sub>NH<sub>3</sub>, MeOH,  $y=73.2\%$ ;

(e) DAST, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,  $y=29.8\%$ ;

(f) Pd/C, AcOH,  $y = 74.2\%$ ;

(g) (1) 0.3N NaOH, (2) Amberlyst 15H (+),  
0.016N HCl,  $y = 72.6\%$

(a) (1) シアル酸 (26) (1.02 g, 3.31 mmol) を蒸留したメタ  
5 ノール (150 ml) に溶かし、陽イオン交換樹脂Dowex 50W-X8  
(2.0 g) を加えて、加熱還流下24時間反応させた。反応の終点は、反応溶  
液を一部取りNMRを用いて確認した。反応溶液を濾過し、樹脂に再びメタノール  
(100 ml) を加え1時間攪拌して樹脂に吸着した化合物を回収した。溶液  
を再び濾過し、先ほどの濾液と合わせて減圧濃縮し、化合物を得た。

10 (2) 上記で得られた化合物 (5.05 g, 14.97 mmol) を蒸留したアセ  
トニトリル (75 ml) に溶かし、アルゴン気流下室温で攪拌しながらカンファ  
ースルホン酸 (498 mg, 2.14 mmol) を加えた。その後アセトンジメ  
チルアセタール (2.75 ml, 22.36 mmol) を少しずつ滴下して30分  
間反応させた。反応終了を確認後、トリエチルアミン (2 ml) を加えて反応を  
15 止め、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチ  
ル:メタノール=20:1) で精製し、アセトナイド誘導体を得た ( $\alpha : \beta =$   
1:10、収量5.29 g)。

(b) (1) 上記で得られたアセトナイド誘導体 (3.2 g, 8.48 mmol)  
をN, N-ジメチルホルムアミド (43 ml) に溶かし、酸化バリウム (9.3  
20 g, 60.65 mmol) と水酸化バリウム8水和物 (2.4 g, 7.61 mmol)  
1) を加えた。その後、ベンジルブロミド (10 ml, 84.1 mmol) を加  
え室温で攪拌した。TLCで原料が消失したことを確認後、ジクロロメタンで希  
釈し1%ギ酸水溶液、水で洗浄後、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。  
無水硫酸マグネシウムをろ過して取り除いた後、有機層を減圧濃縮した。

25 (2) 残渣をエタノール (25 ml)、ベンゼン (50 ml) の混合溶媒に溶か  
し、ジアゾメタン (42.5 mmol) が溶解したエーテル溶液を加えた。この

際ジアゾメタンは、エーテルとエタノールの混合溶液にp-トルエンスルフォニル-N-ニトロアミドを加え50%水酸化カリウムを滴下することで発生させた。ジアゾメタンを加えた後、室温で10分間反応させた。TLCで原料消失を確認してから酢酸(12ml)で過剰のジアゾメタンをクエンチし、そのまま減  
5 圧濃縮した。

(3) 続いて、残渣を60%酢酸水溶液に溶かし60度で12時間反応させた。TLCで原料消失を確認後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:メタノール=15:1)で精製し化合物を得た( $\alpha$ : $\beta$   
=1:24、収量2.7g)。

10 (c) (1) 上記で得た化合物(1.08g, 2.08mmol)をトルエン(30ml)とメタノール(6.5ml)に溶かしジブチル酸化錫(780mg, 3.48mmol)を加え、85度で2時間反応させた。その後、反応溶液を減圧濃縮しよく脱水したトルエンで3回共沸した。

(2) 残渣をトルエン(24ml)に再び溶かし、テトラブチルアンモニウムブ  
15 ロミド(1.00g, 3.48mmol)とベンジルブロミド(977ml, 10.4mmol)を加え、80度で4時間反応させた。TLCで原料消失を確認後、室温に戻し減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル:ヘキサン=4:1)で精製し4,7,9-ベンジル体を得た( $\alpha$ : $\beta$ =1:10、収量1.15g)。

20 (d) (1) ジクロロメタン(13ml)にオキザリルクロリド(1.82g, 14.3mmol)を加え-78度に冷却した。15分後この溶液にジメチルスルフォキシド(1.3ml, 17.9mmol)とジクロロメタン(5ml)の混合溶液を加え-78度で再び攪拌した。そして20分後、ジクロロメタン(18ml)に溶かした上記で得られた4,7,9-ベンジル体(2.18mg, 3.59  
25 mmol)をゆっくり加えた。-78度で20分間攪拌した後、トリエチルアミン(4.00ml, 28.7mmol)を加え10分間攪拌した後、反応温度を室

温に戻した。TLCで原料消失を確認後、ジクロロメタンで希釈し飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水溶液で洗浄し有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。無水硫酸マグネシウムをろ過して取り除いた後、有機層を減圧濃縮した。

(2) 残渣を精製することなくそのままメタノール (16 ml) に溶かし-15  
5 度に冷却後、 $\text{BH}_3\text{NH}_3$  (122 mg, 3.95 mmol) を加え反応温度を室温にもどした。TLCで原料消失を確認後反応溶液をそのまま減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル : ヘキサン = 2 : 1) で精製し8-エピマー体を得た (収量1.05 g)。

(e) 上記で得られた8-エピマー体 (533 mg, 0.87 mmol) をジク  
10 ロロメタン (13 ml) に溶かしアルゴン気流下-15度に冷却した。ジメチルアミノスルファートリフルオリド (580 ml, 3.51 mmol) をゆっくり加え30分攪拌した後、反応温度を40度に上げ、さらに16時間攪拌した。メタノールを加え反応を止めた後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマト  
15 トグラフィー (酢酸エチル : ヘキサン = 2 : 3) で精製し8-フルオロ体を得た (収量144 mg)。

(f) 上記で得られた8-フルオロ体 (120 mg, 0.197 mmol) を酢  
酸 (4 ml) に溶かしアルゴン気流下で10% Pd/C (120 mg) を加え、  
水素置換した後室温で攪拌した。2時間後TLCで反応終了を確認し、活性炭ろ  
20 過し、ろ液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル : メタノール = 6 : 1) で精製し化合物を得た (収量57 mg)。

(g) (1) 上記で得られた化合物 (50 mg, 0.147 mmol) をメタノ  
ール (2 ml) に溶かし0.3 Nの水酸化ナトリウム水溶液 (2 ml) を加え室  
温で攪拌した。TLCで反応終了を確認後、IR-120 (+) で反応溶液を中  
和した。IR-120 (+) をろ過し取り除いた後、ろ液を減圧濃縮した。

25 (2) 残渣をそのまま0.016 N塩酸水溶液 (5 ml) に溶かしAmberl  
y s t 15 (H+) (150 mg) を加え75度で24時間反応させた。反応終

了をNMRによって確認し、反応溶液を減圧濃縮した。残渣をAG1×X8 (200~400 mesh, formate form) にのせ、水150ml流した後1Mギ酸水溶液で溶出させることで8-フルオロシアル酸(27)を得た(収量33mg)。

5 8-フルオロシアル酸のNMRデータを以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

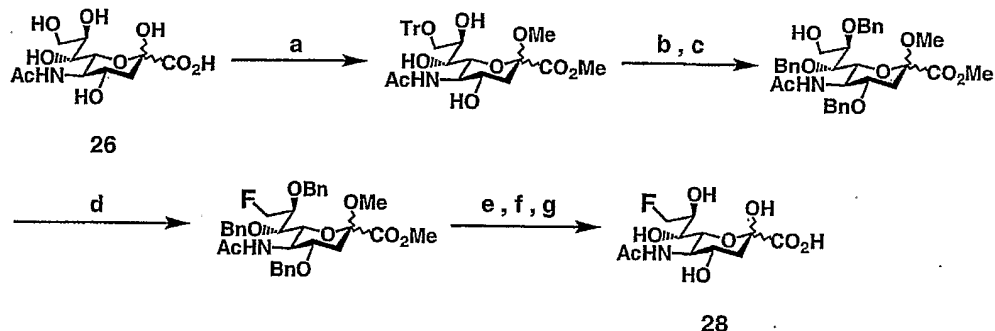
$\delta$  4.69 (dddd, 1H,  $J_{8,\text{F}}=48.7\text{Hz}$ ,  $J_{8,9\text{a}}=5.0\text{Hz}$ ,  $J_{8,9\text{b}}=3.5\text{Hz}$ , H-8), 4.03 (ddd, 1H,  $J_{4,5}=10.0\text{Hz}$ ,  $J_{3\text{ax},4}=11.1\text{Hz}$ ,  $J_{3\text{eq},4}=4.7\text{Hz}$ , H-4), 3.95 (dd, 1  
 10 H,  $J_{4,5}=10.0\text{Hz}$ ,  $J_{5,6}=9.9\text{Hz}$ , H-5), 3.94 (ddd, 1H,  $J_{6,7}\sim 0\text{Hz}$ ,  $J_{7,8}=6.8\text{Hz}$ ,  $J_{7,\text{F}}=14.0\text{Hz}$ , H-7), 3.88 (ddd, 1H,  $J_{9\text{a}9\text{b}}=13.3\text{Hz}$ ,  $J_{9\text{a},8}=3.5\text{Hz}$ ,  $J_{9\text{b},\text{F}}=28.0\text{Hz}$ , H-9b), 3.86 (dd, 1H,  $J_{5,6}=9.9\text{Hz}$ ,  $J_{6,7}\sim 0\text{Hz}$ , H-6), 3.72 (ddd, 1H,  $J_{9\text{a},9\text{b}}=5.33\text{Hz}$ ,  $J_{9\text{a},8}=5.0\text{Hz}$ ,  $J_{9\text{a},\text{F}}=30.6\text{Hz}$ , H-9a), 2.28 (dd, 1H,  $J_{3\text{eq},3\text{ax}}=13.00$ ,  $J_{3\text{eq},4}=4.6\text{Hz}$ , H-3eq), 2.05 (s, 3H, Ac), 1.87 (dd, 1H,  $J_{3\text{ax},4}=11.1\text{Hz}$ ,  $J_{3\text{eq},3\text{ax}}=13.00$ , H-3ax)

参考例13

20 (5-アセタミド-3,5,9-トリデオキシ-9-フルオロ-D-グリセロ- $\beta$ -D-ラクト-2-ノヌロピラノシドニック アシッド 5-Acetamide-3,5,9-trideoxy-9-fluoro-D-glycero- $\beta$ -D-galacto-2-nonulopyranosidonic acid 28の合成)

25 下記のスキームに従ってシアル酸(26)から5-アセタミド-3,5,9-トリデオキシ-9-フルオロ-D-グリセロ- $\beta$ -D-ラクト-2-ノヌロピラノ

シドニック アシッド (28) を合成した。



(a) (1) Dowex 50W-X8, MeOH, reflux, (2) TrCl, pyridine, 72%

5 (b) (1) BaO, Ba(OH), (2) DMF, (3) CH<sub>2</sub>CN<sub>2</sub>, 88%

(c) AcOH, 100°C, 78%

(d) (1) Tf<sub>2</sub>O, pyridine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (2) TASF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 52%

10 (e) H<sub>2</sub>, Pd/C (10%), AcOH, 86%

(f) NaOH aq.

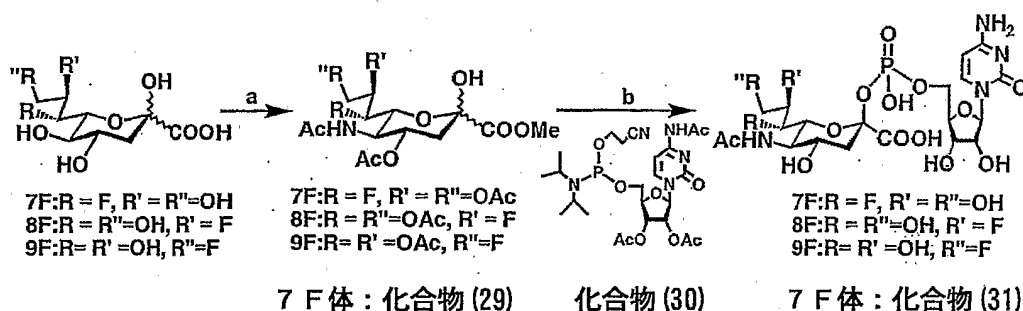
(g) 0.02N HCl aq., Amberlyst 15 (H+), 86%

上記反応は下記文献に準じて行った。

15 T. Miyazaki, T. Sakakibara, H. Sato, Y. Kajihara; Chemoenzymatic Synthesis of the 9-Deoxy-9-fluoro-[3-<sup>13</sup>C]-NeuAc-a-(2,6)-[U-<sup>13</sup>C]-Gal-b-Sequence on An Intact Glycoprotein. J. Am. Chem. Soc., 121, 1411-1412 (1999).

参考例 14

(CMP-7-フルオロシアル酸誘導体の合成)



(a) (1) Dowex 50-X8, MeOH, (2) Ac<sub>2</sub>O, 60% HClO<sub>4</sub>;

(b) (1) 1H-Tetrazole, CH<sub>3</sub>CN, (2) t-BuOOH, CH<sub>3</sub>CN, (3) DBU, CH<sub>3</sub>CN, (4) NaOMe, MeOH, H<sub>2</sub>O

- 5 フルオロシアル酸誘導体である化合物 (25) (0.074 mmol) を蒸留メタノール (3 ml) に溶かし、アルゴン気流下室温で攪拌しながら Dowex-50W-X8 (65 mg) を加え、3時間反応させた。反応終了を確認し、濾過後減圧濃縮した。残渣を無水酢酸 (200 μl) に溶かし、-20℃で攪拌しながら無水酢酸 : 60% 過塩素酸 = 15 : 1 溶液 (22 μl) を加え、10℃にて40分反応させた。反応終了を確認後、反応溶液を酢酸エチルで希釈して、飽和重曹水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮して、化合物 (29) を含む残渣を得た。残渣とCMP-5'-ホスホロアミダイト誘導体 (30) (136 mg, 0.23 mmol) をベンゼンで別々に3回共沸し、蒸留したアセトニトリル (100 μl) にそれぞれ溶かし混ぜた。アルゴン気流下氷水中で攪拌しながら1H-テトラゾール (17 mg, 0.23 mmol) を加えた。5分後に室温に戻し、さらに10分間反応させた。反応終了を確認後、溶液を酢酸エチルで希釈し、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過後30℃以下で濃縮した後さらにトルエンで2回共沸し水を取り除いた。残渣に蒸留したアセトニトリル (400 μl) を加え、アルゴン気流下氷冷しながら2.5Mのt-BuOOHトルエン溶液 (290 μl) を滴下した。5分後に室温に戻し、さらに20分間攪拌した。
- 10
- 15
- 20

反応終了を確認後、ジメチルスルフィド (53  $\mu$ l) を滴下し10分間攪拌して t-BuOOH をクエンチした。その後、DBU (18  $\mu$ l) を滴下して20分間室温で攪拌した。反応終了を確認後、メタノール (0.67 ml)、水 (1.35 ml)、ナトリウムメトキシド (360 mg) を加え室温で16時間反応させた。反応終了を確認後水で抽出し、ジクロロメタンで洗浄した。水層を25°C以下で8ml程度まで減圧濃縮した。この水溶液を Sephadex G-15 (1.8  $\phi$   $\times$  90 cm) を用いるゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: 20 mM アンモニア水、流速: 0.3 ml/min) で精製し、CMP-フルオロシアル酸誘導体 (31) を得た。

10 CMP-7''-デオキシ-7''-フルオロシアル酸 (31) のNMRデータを以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, 50 mM  $\text{ND}_4\text{DCO}_3$  in  $\text{D}_2\text{O}$ ),  
 $\delta$  8.04 (d, 1H,  $J_{5,6} = 7.6$  Hz, H-6), 6.20 (d, 1H,  $J_{6,5} = 7.6$  Hz, H-5), 6.06 (d, 1H,  $J_{1',2'} = 4.5$  Hz, H-1'), 4.54 (dd, 1H,  $J_{7'',8''} = 9.5$  Hz,  $J_{7'',F} = 45.9$  Hz, H-7''), 4.42~4.20 (m, 7H, H-2', H-3', H-4', H-5' a, H-5' b, H-6'', H-8''), 4.16 (ddd, 1H,  $J_{4'',3''\text{eq}} = 4.7$  Hz,  $J_{4'',3''\text{ax}} = 11.3$  Hz,  $J_{4,5} = 10.3$  Hz, H-4''), 4.03 (dd, 1H,  $J_{5'',4''} = J_{5'',6''} = 10.3$  Hz, H-5''),  
 20 3.91 (ddd, 1H,  $J_{9''\text{a},9''\text{b}} = 12.2$  Hz,  $J_{9''\text{a},8''} = 2.8$  Hz,  $J_{9''\text{a},F} = 2.8$  Hz, H-9'' a), 3.75 (ddd, 1H,  $J_{9''\text{a},9''\text{b}} = 12.2$  Hz,  $J_{9''\text{b},8''} = 5.4$  Hz,  $J_{9''\text{b},F} = 2.1$  Hz, H-9'' b), 2.61 (dd, 1H,  $J_{3''\text{eq},4''} = 4.7$  Hz,  $J_{gem} = 13.3$  Hz, H-3'' eq), 2.14 (s, 3H, Ac), 1.76 (ddd, 1H,  $J_{3''\text{ax},4''} = 1$   
 25 1.5 Hz,  $J_{gem} = 13.3$  Hz,  $J_{3''\text{ax},P} = 5.6$  Hz, H-3'' ax)

参考例15

## CMP-8''-デオキシ-8''-フルオロ-シアル酸の合成

化合物(25)の代わりに化合物(27)を用いた以外は参考例14と同様に  
してCMP-8''-デオキシ-8''-フルオロ-シアル酸を合成した。NMRデ  
ータを以下に示す。

- 5  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz, 50mM  $\text{ND}_4\text{DCO}_3$  in  $\text{D}_2\text{O}$ )  
 $\delta$  8.08 (d, 1H,  $J_{5,6}=7.6\text{Hz}$ , H-6), 6.20 (d, 1H,  
 $J_{6,5}=7.6\text{Hz}$ , H-5), 6.09 (d, 1H,  $J_{1',2'}=4.1\text{Hz}$ , H  
-1'), 4.90 (m, 1H, H-8''), 4.42 (dd, 1H,  $J_{3',2'}=$   
 $J_{3',4'}=4.9\text{Hz}$ , H-3'), 4.39 (dd, 1H,  $J_{2',1'}=4.1\text{H}$   
10 z,  $J_{2',3'}=4.9\text{Hz}$ , H-2'), 4.31-4.28 (m, 3H, H-  
4', H-5' a, H-5' b), 4.15 (ddd, 1H,  $J_{4'',3''\text{eq}}=4.$   
4Hz,  $J_{4'',3''\text{ax}}=11.5\text{Hz}$ ,  $J_{4,5}=10.5\text{Hz}$ , H-4''), 4.1  
0-3.90 (m, 5H, H-5'', H-6'', H-7'', H-9'' a, H-  
9'' b), 2.60 (dd, 1H,  $J_{3''\text{eq},4''}=4.4\text{Hz}$ ,  $J_{\text{gem}}=13.1\text{H}$   
15 z, H-3'' eq), 2.13 (s, 3H, Ac), 1.77 (ddd, 1H,  $J$   
 $_{3''\text{ax},4''}=11.5\text{Hz}$ ,  $J_{\text{gem}}=13.1\text{Hz}$ ,  $J_{3''\text{ax},\text{P}}=4.5\text{Hz}$ , H-  
3'' ax)

## 参考例16

## CMP-9''-デオキシ-9''-フルオロ-シアル酸の合成

- 20 化合物(25)の代わりに化合物(28)を用いた以外は参考例14と同様に  
してCMP-9''-デオキシ-9''-フルオロ-シアル酸を合成した。

## 実施例5

[ $\text{HOOC-Ser-Ser-Asn(asialooligo)-Val-}$   
 $\text{Leu-Leu-Ala-NH-Dansyl}$ の合成]

- 25 固相合成用カラムにHMPA-PEGALレジン370mgを入れ、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$   
 $_2$ , DMFで十分に洗浄し反応に用いた。

Fmoc-Ser(OtBu)-OH、1-メチレンスルホニル-3-ニトロ  
ロ-1,2,4-トリアゾール(MSNT)、N-メチルイミダゾールをCH<sub>2</sub>C  
1<sub>2</sub>に溶解させ5分間攪拌した後、樹脂の入った固相合成用カラムに入れ室温で  
3時間攪拌した。攪拌後、樹脂をメチレンクロライド、イソプロパノール、DM  
5 Fで洗浄し乾燥させた。その後、20分間20%無水酢酸DMF溶液を用いて固  
相上の未反応の水酸基をアセチル化しキャッピングした。DMFで樹脂を洗浄後、  
20%ピペリジン/DMF溶液を用いて20分攪拌することによりFmoc基を  
脱保護しレジニン-Ser-NH<sub>2</sub>を得た。DMFで洗浄後、乾燥させた。

次に、Fmoc-Ser(OtBu)-OHを用いHOBT・H<sub>2</sub>OとDIP  
10 CDIによって縮合させた。

次に、Fmoc-アシアロ糖鎖アスパラギンをDMSO、DMF1対1の混合  
溶媒に溶かし、HATUとDIPEAを用いて室温24時間攪拌させて縮合させ  
た。DMFで洗浄後10%無水酢酸/2-プロパノール:メタノールで20分間  
攪拌しキャッピングした。樹脂を2-プロパノール、DMFで洗浄後、20%ピ  
15 ペリジン/DMFで20分間攪拌しFmoc基を脱保護しDMFで樹脂を洗浄し  
た。

この樹脂に、バリン(Val)、ロイシン(Leu)、ロイシン(Leu)、  
アラニン(Ala)、を同様に縮合およびFmoc基の脱保護を行って、レジニ  
-Ser-Ser-Asn(asialooligo)-Val-Leu-Le  
20 u-Ala-NH<sub>2</sub>を得た。

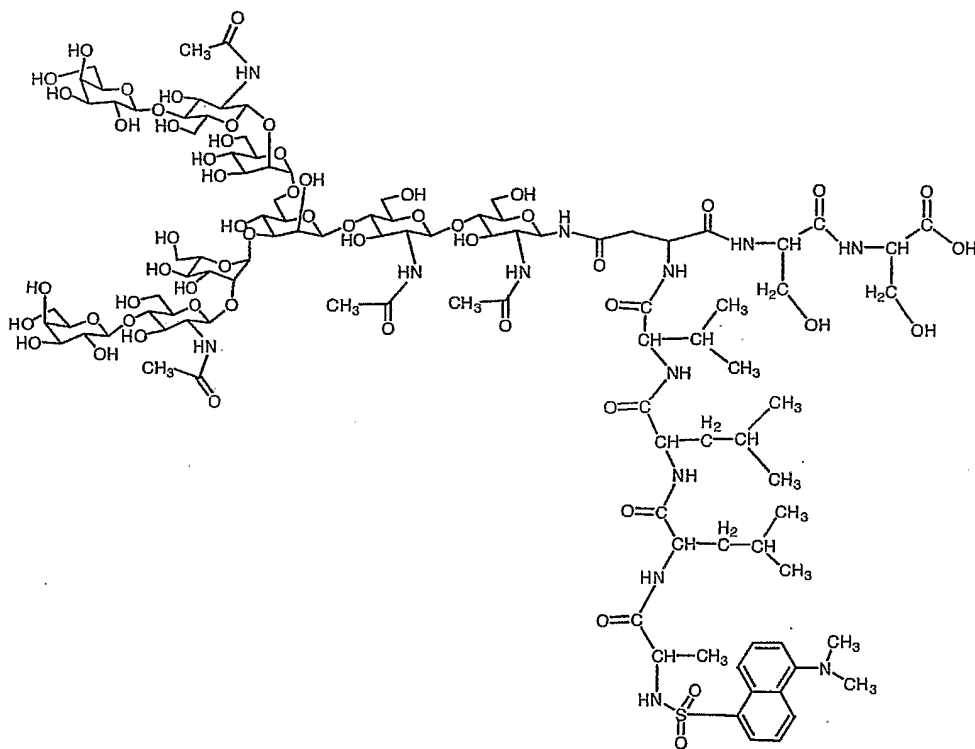
バリン(Val)、ロイシン(Leu)、アラニン(Ala)のアミノ酸はカル  
ボキシル基をpfpエステル化したFmoc-AA-Opfp(AA=アミノ  
酸)を用い、3,4-ジヒドロ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン-3  
-イル(Dhbt)によって縮合させた。すべての縮合はDMF溶液中で行った。

次に蛍光標識するためにダンシルクロリドとジイソプロピルエチルアミンを用  
いてDMF中30分反応させた。ダンシル化が終了した後、DMF, CH<sub>2</sub>C1

2で樹脂を洗浄した。

樹脂を洗浄後、95% TFA水溶液を加え、室温で3時間攪拌してレジン切断した。レジンを通り過ぎて除き、反応溶液を室温で減圧濃縮した後、水に溶かし凍結乾燥した。凍結乾燥品をHPLCで精製することで目的とするHOOC-Ser-Ser-Asn (asialooligo) -Val-Leu-Leu-Ala-NH-Dansylを得た。

(YMC-Pack A-314 S-5 ODS 300×6.0mm 展開溶媒 A:0.1% TFA水溶液 B:0.1% TFA アセトニトリル:水=90:10 グラジエントA 100% 0.60ml/min→B 100% 0.60ml/min 60分)

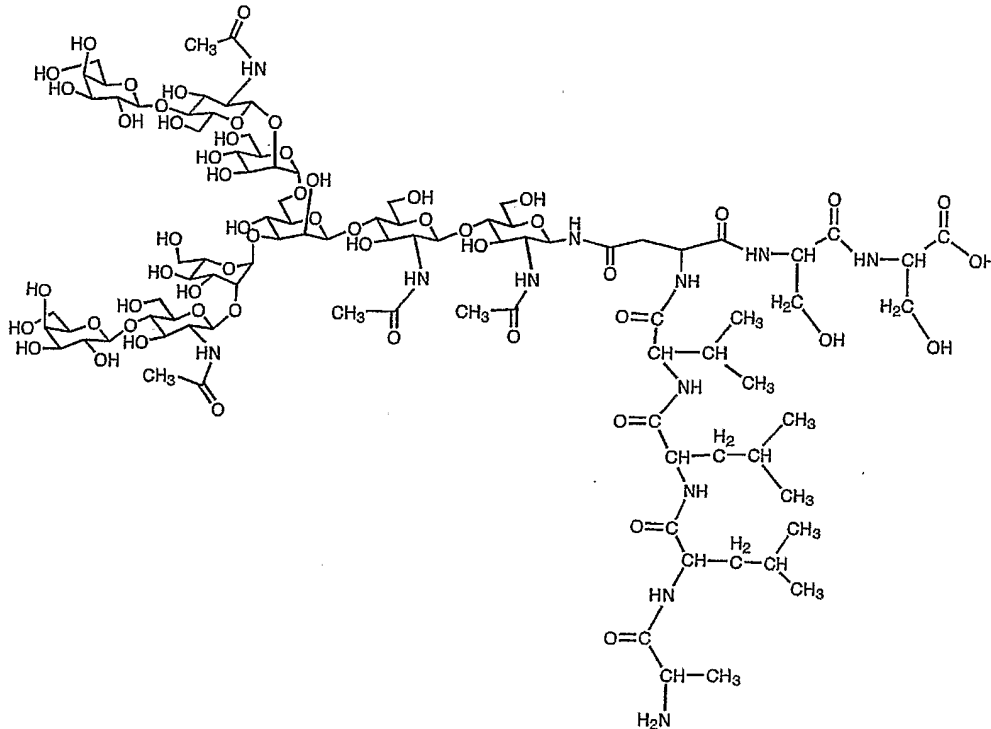


#### 実施例 6

[HOOC-Ser-Ser-Asn (asialooligo) -Val-Leu-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>の合成]

15 実施例 5において、蛍光標識するためダンシル化を省略した以外は同様にして

HOOC-Ser-Ser-Asn (asialooligo) -Val-Leu-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>を合成した。



#### 実施例 7

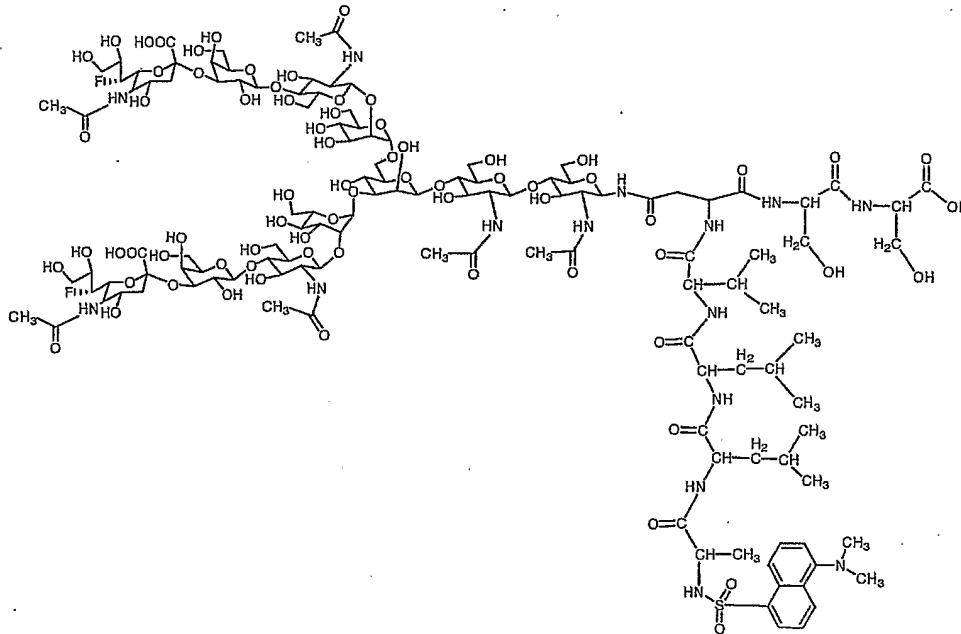
- 5 実施例 5 で得られた Dansyl 化したアシアロ糖鎖ペプチドにシアル酸転移酵素を用いて参考例 14 のシアル酸誘導体を転移させた。

シアル酸転移酵素として  $\alpha$  2, 3 転移酵素である市販の Rat Recombinant 由来のものを用いた。

- 10 酵素反応条件は Dansyl 化アシアロ糖鎖ペプチドに対し CMP-シアル酸誘導体 4 当量を使用し、反応溶媒には 50 mM カコジル酸緩衝溶液 (pH 5.0) を用い、反応溶液には 10 mM 磷酸加水分解酵素と牛血清アルブミンを加えておく。反応が終了した後、そのまま凍結乾燥した。凍結乾燥品を HPLC で精製することにより下記に示す Dansyl 化したジ-7-シアル酸誘導体の結合した糖鎖ペプチドを得た。

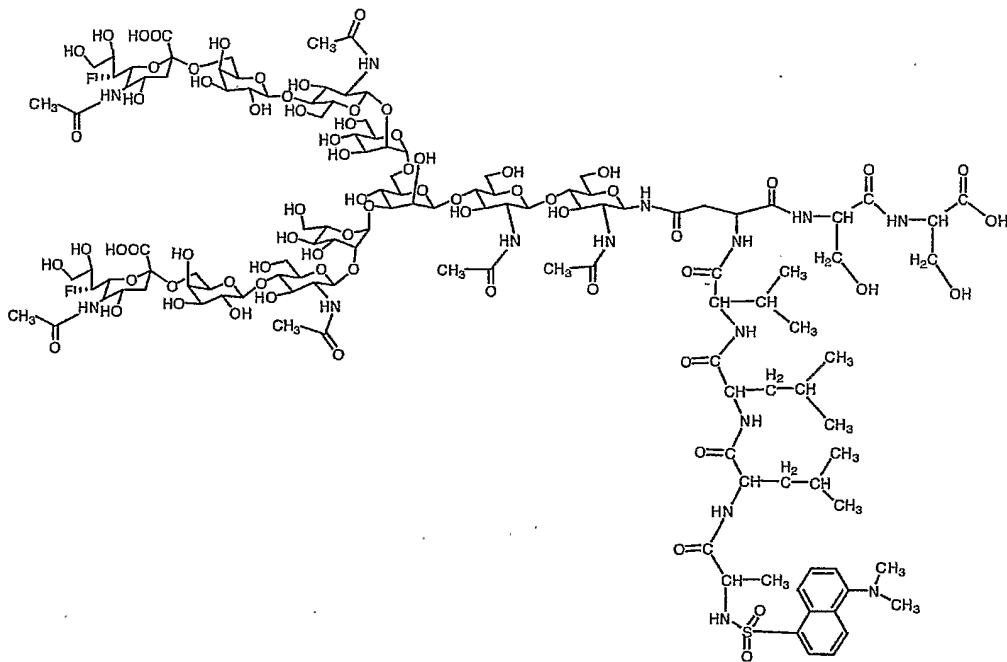
- 15 (YMC-Pack A-314 S-5 ODS 300×6.0 mm 展開溶媒 A: 0.1% TFA 水溶液 B: 0.1% TFA アセトニトリル:水=

90 : 10 グラジエントA 100% 0.60 ml/min → B 100%  
0.60 ml/min (60分)



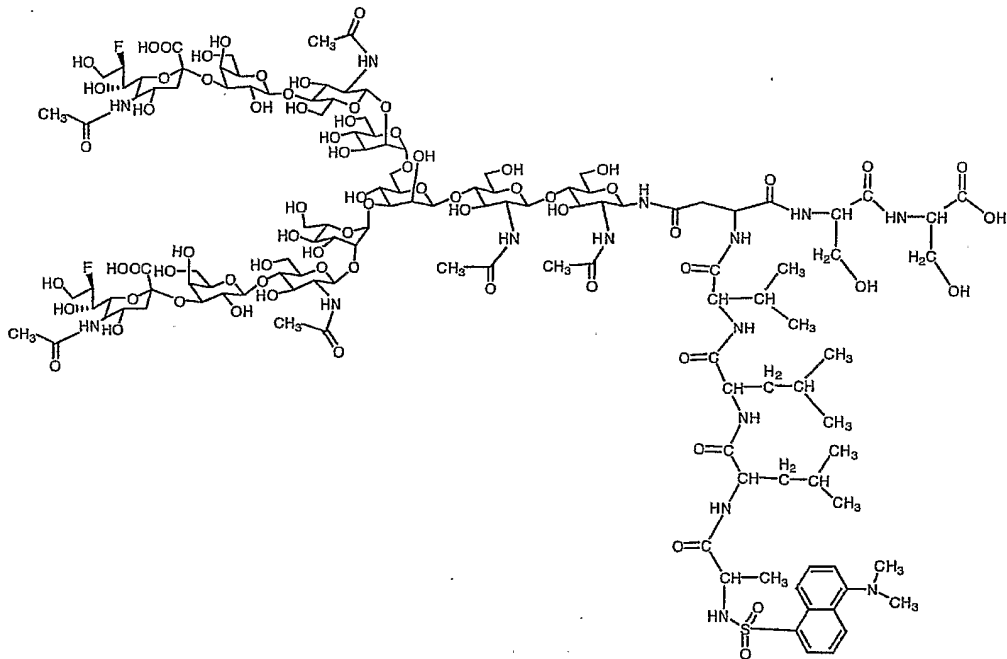
### 実施例 8

- 5 シアル酸転移酵素として $\alpha 2, 6$  転移酵素である市販のRat Liver由来のものを用い、カコジル酸緩衝溶液のpHを6.0とした以外は実施例7と同様にして下記に示すDansyl化したジ-7-シアロ誘導体の2,6-結合した糖鎖ペプチドを得た。



実施例 9

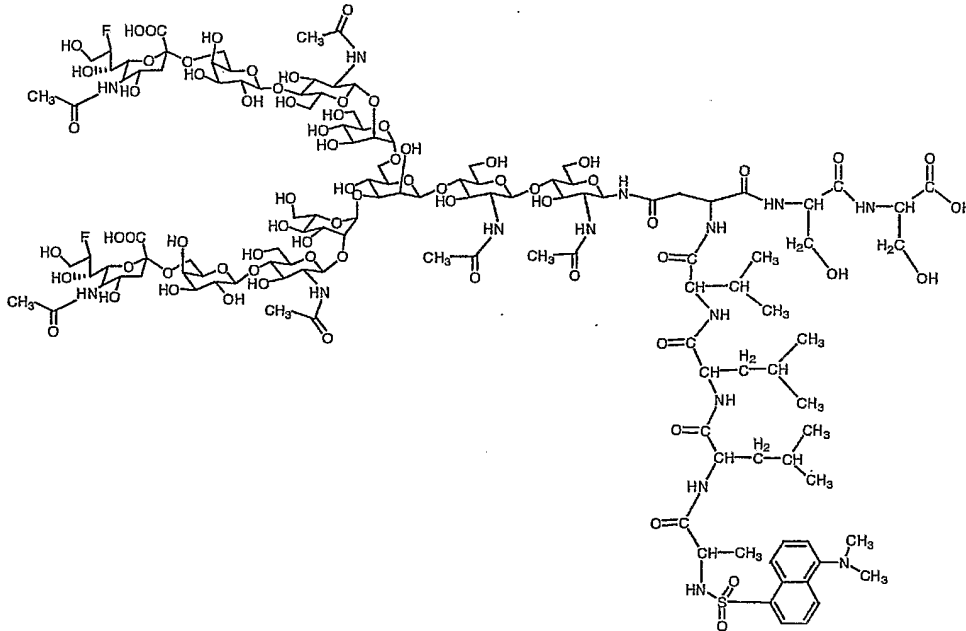
参考例 1 4 のシアル酸誘導体の代わりに、参考例 1 5 のシアル酸誘導体を用いた以外は実施例 7 と同様にして下記に示すジ-8-シアロ誘導体の 2, 3-結合した糖鎖ペプチドを得た。



実施例 1 0

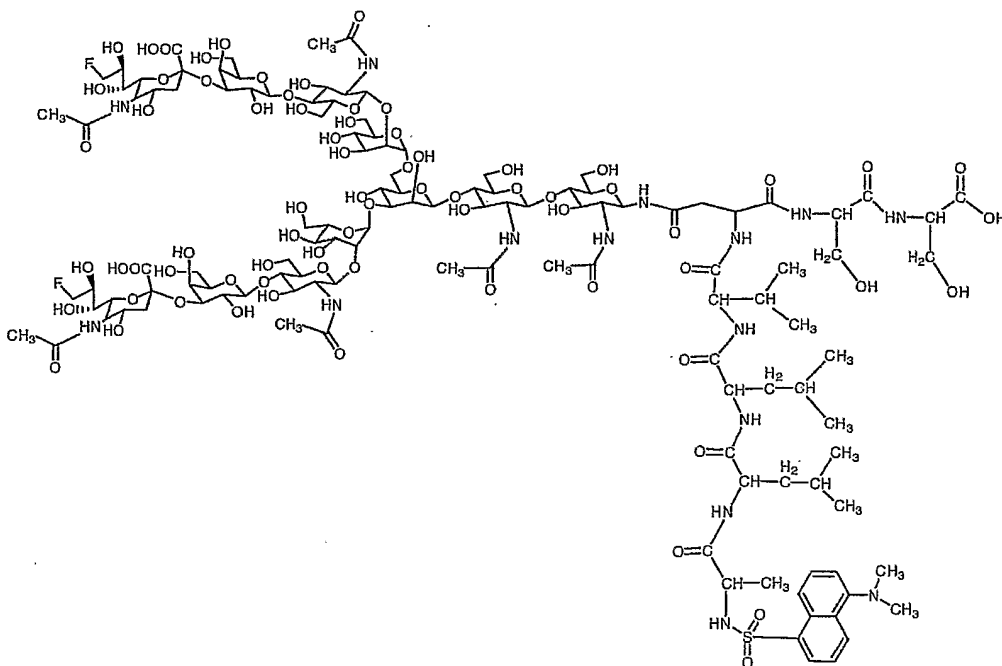
参考例 1 4 のシアル酸誘導体の代わりに、参考例 1 5 のシアル酸誘導体を用い

た以外は実施例 8 と同様にして下記に示すジ-8-シアロ誘導体の 2, 6-結合した糖鎖ペプチドを得た。



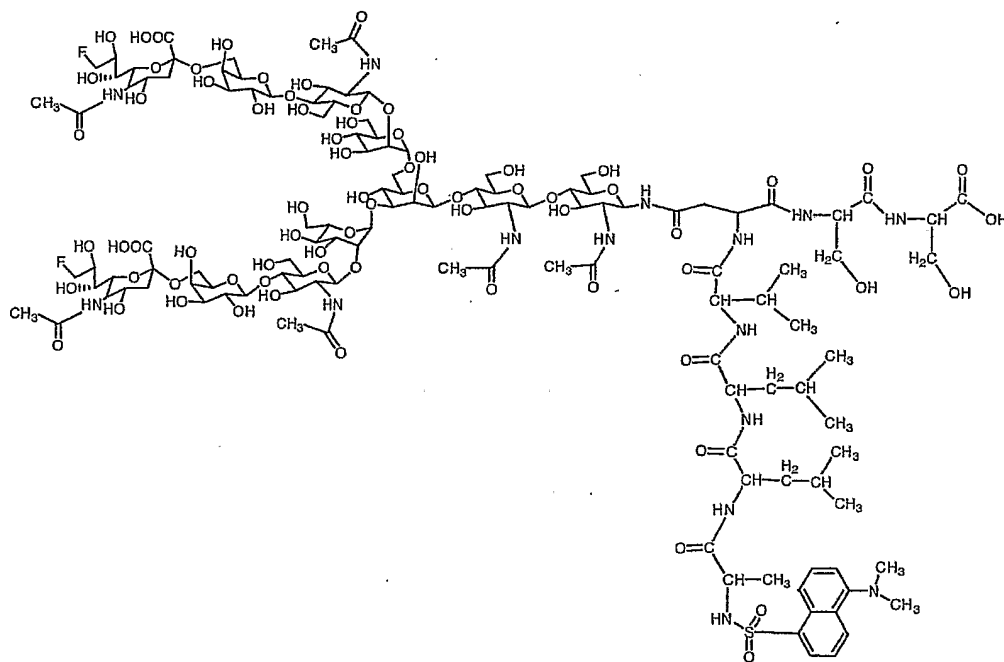
#### 実施例 1 1

- 5 参考例 1 4 のシアル酸誘導体の代わりに、参考例 1 6 のシアル酸誘導体を用いた以外は実施例 7 と同様にして下記に示すジ-9-シアロ誘導体の 2, 3-結合した糖鎖ペプチドを得た。



## 実施例 1 2

参考例 1 4 のシアル酸誘導体の代わりに、参考例 1 6 のシアル酸誘導体を用いた以外は実施例 8 と同様にして下記に示すジ-9-シアロ誘導体の 2, 6-結合した糖鎖ペプチドを得た。

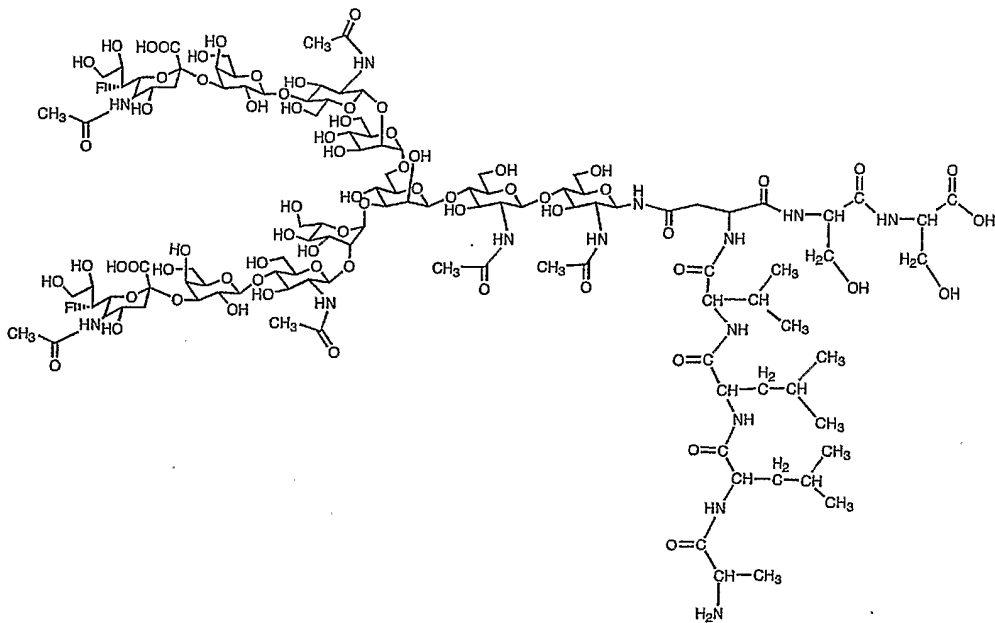


5

## 実施例 1 3

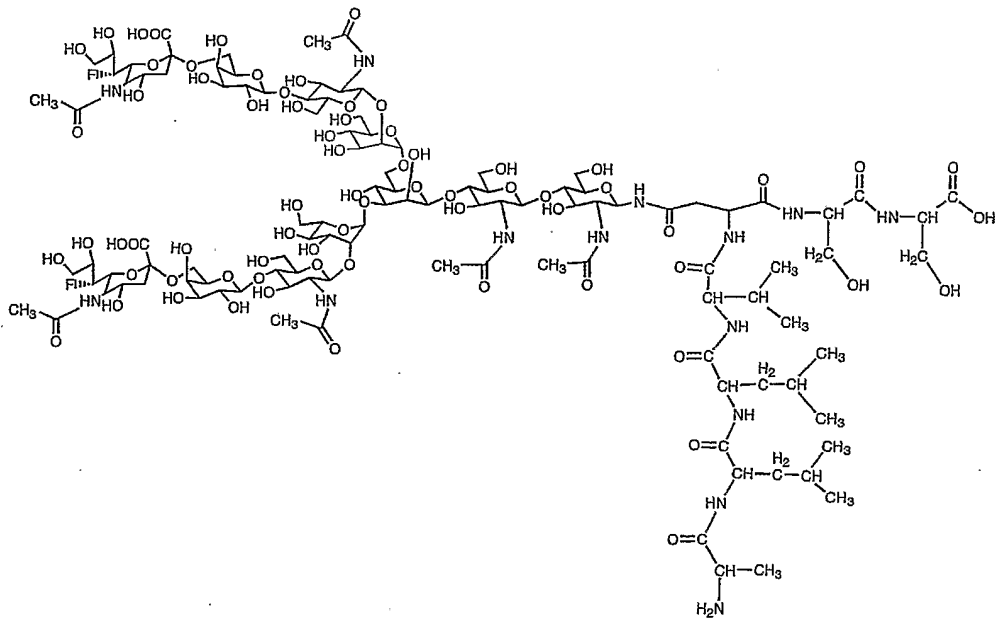
実施例 6 で得られた Dansyl 化しないアシアロ糖鎖ペプチドを用いた以外は実施例 7 と同様にして下記に示すジ-7-シアロ誘導体の 2, 3-結合した糖鎖ペプチドを得た。

10



実施例 1 4

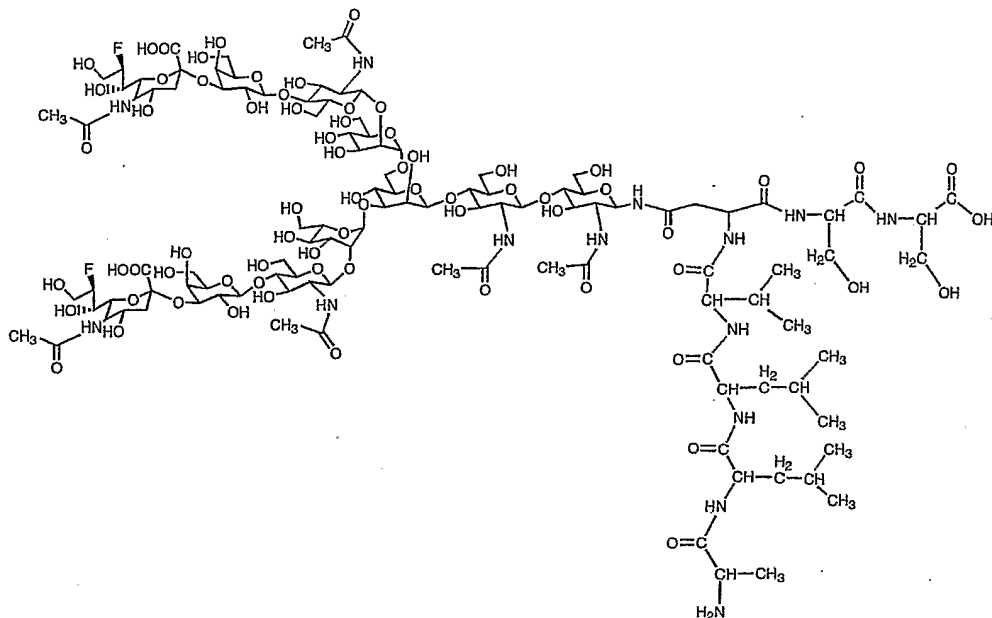
実施例 6 で得られた D a n s y l 化しないアシアロ糖鎖ペプチドを用いた以外は実施例 8 と同様にして下記に示すジ-7-シアロ誘導体の 2, 6-結合した糖鎖ペプチドを得た。



実施例 1 5

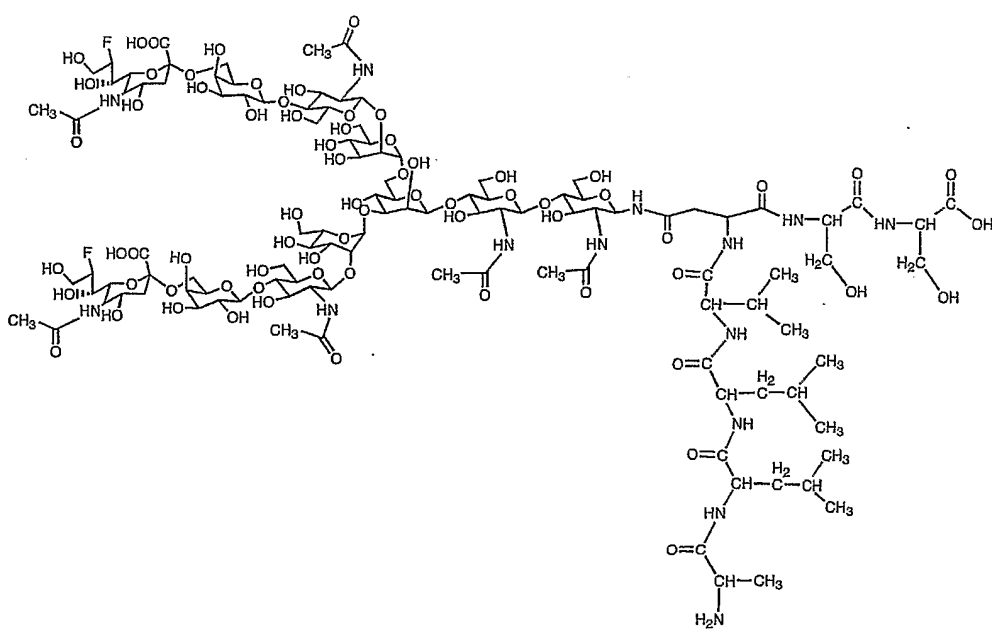
実施例 6 で得られた D a n s y l 化しないアシアロ糖鎖ペプチドを用いた以外

は実施例 9 と同様にして下記に示すジ-8-シアロ誘導体の 2, 3-結合した糖鎖ペプチドを得た。



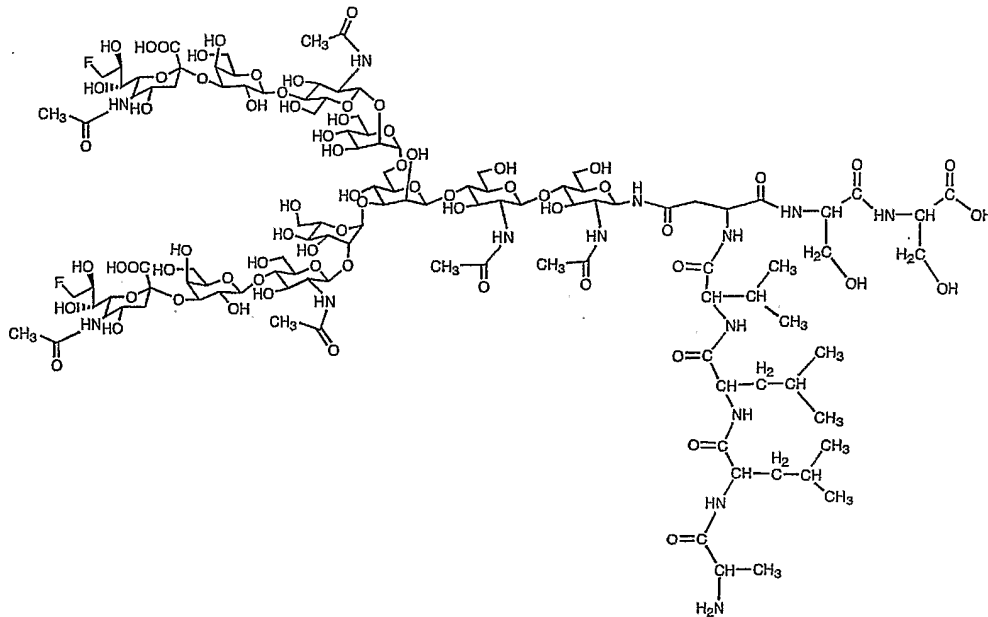
実施例 1 6

5 実施例 6 で得られた Dansyl 化しないアシアロ糖鎖ペプチドを用いた以外は実施例 1 0 と同様にして下記に示すジ-8-シアロ誘導体の 2, 6-結合した糖鎖ペプチドを得た。



## 実施例 17

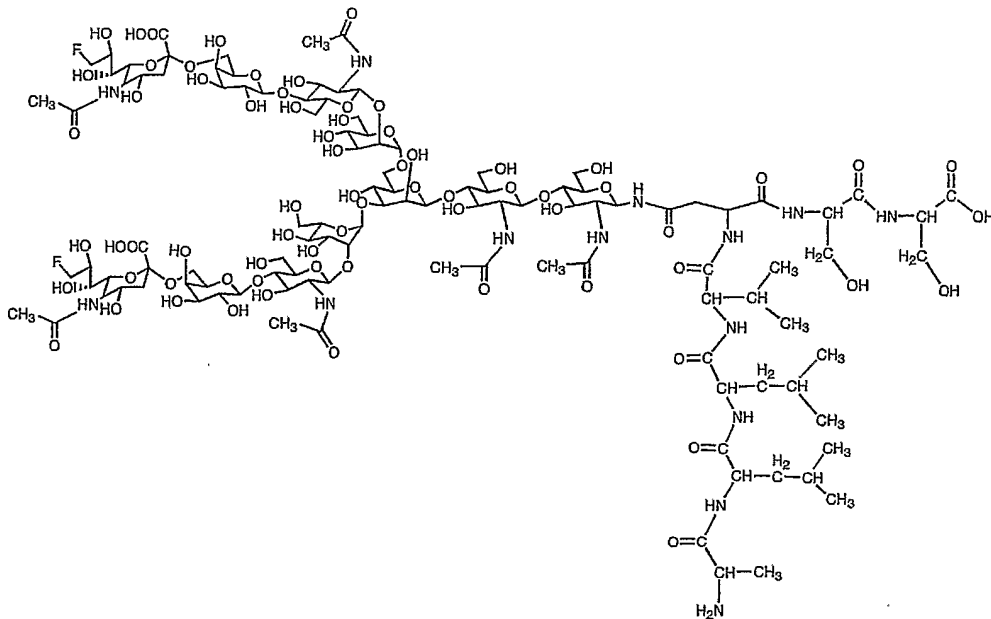
実施例 6 で得られた D a n s y l 化しないアシアロ糖鎖ペプチドを用いた以外は実施例 11 と同様にして下記に示すジ-9-シアロ誘導体の 2, 3-結合した糖鎖ペプチドを得た。



5

## 実施例 18

実施例 6 で得られた D a n s y l 化しないアシアロ糖鎖ペプチドを用いた以外は実施例 12 と同様にして下記に示すジ-9-シアロ誘導体の 2, 6-結合した糖鎖ペプチドを得た。



### 実施例 19

HOOC-Ser-Thr-Thr-Asp-Asn (disialooligo)  
o) -Asp-Ile-Pro-NH<sub>2</sub> の合成

- 5 上記目的糖ペプチドにおけるAsn (disialooligo) とは、ベンジル基で保護されていないシアル酸を有するジシアロオリゴアスパラギンを意味する。

固相合成用カラムにHMPA-PEGAREJIN 50mgを入れ、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, DMFで十分に洗浄し乾燥させた。

- 10 Fmoc-Ser(OtBu)-OH、1-メシチレンスルホニル-3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール (MSNT), N-メチルイミダゾールをCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>に溶解させ5分間攪拌した後、樹脂の入った固相合成用カラムに入れ室温で3時間攪拌した。攪拌後、樹脂をメチレンクロライド、イソプロパノール、DMFで洗浄し乾燥させた。その後、20分間20%無水酢酸DMF溶液を用いて固相
- 15 上の未反応の水酸基をアセチル化しキャッピングした。DMFで樹脂を洗浄後、20%ピペリジン/DMF溶液を用いて20分攪拌することによりFmoc基を脱保護しレジン-Ser-NH<sub>2</sub>を得た。DMFで洗浄後、乾燥させた。

次に、Fmoc-Thr(OtBu)-OH、Fmoc-Thr(OtBu)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OHの順にHOBt・H<sub>2</sub>OとPyBOP・DIPEAによって縮合させた。各アミノ酸縮合後、20%ピペリジン/DMF溶液を用いて20分攪拌することによりFmoc基を脱保護した。

- 5 次に、ジベンジルFmoc-ジシアロ糖鎖アスパラギンをDMSO、DMF 1対1の混合溶媒に溶かし、HATUとDIPEAを用いて室温24時間攪拌させて縮合させた。DMFで洗浄後10%無水酢酸/2-プロパノール：メタノールで20分間攪拌しキャッピングした。DMFで洗浄後、樹脂にDMF：2,6-Lutidine=1：1の混合溶媒を加え、各糖水酸基に対し3当量のTES
- 10 OTfを加えた後1時間反応させることで糖水酸基をTES (Triethylsilyl) 基で保護した。

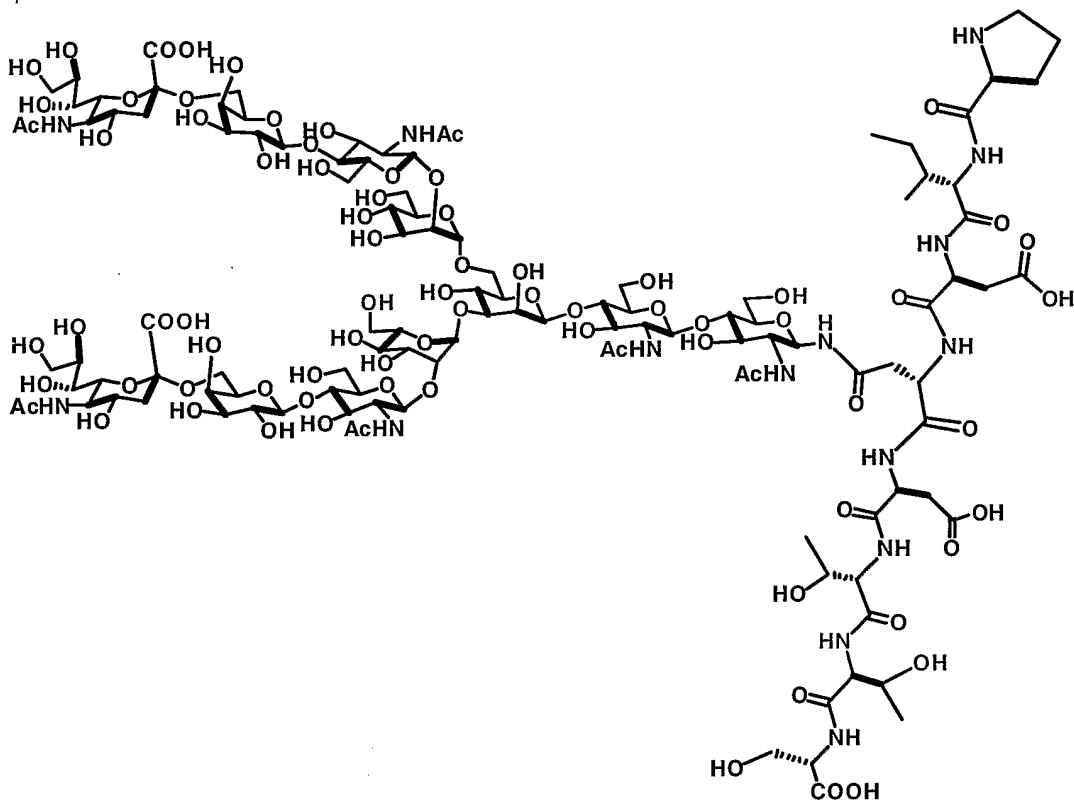
樹脂をDMF, THFで洗浄後、20%ピペリジン/THFで20分間攪拌しFmoc基を脱保護しTHFで樹脂を洗浄した。

- この樹脂に、アスパラギン酸 (Asp)、イソロイシン (Ile)、プロリン
- 15 (Pro) をTHF溶媒中、HOBt・H<sub>2</sub>OとPyBOP・DIPEAを用いて縮合し、20%ピペリジン/THFでFmoc基の脱保護を行って、レジン-Ser-Thr-Thr-Asp-Asn (TES化ジベンジルdisialooligo) -Asp-Ile-Pro-NH<sub>2</sub>を得た。ここでAsn (TES化ジベンジルdisialooligo) とは、シアル酸のカルボキシル基がベ
- 20 ンジル基、糖水酸基がTES基で保護されたシアル酸を有するジシアロオリゴアスパラギンを意味する。

- 縮合が終了した樹脂をよく乾燥した後、95%TFA水溶液を加え、室温で3時間攪拌してアミノ酸の保護基・TES基およびレジンを切断した。レジンをろ過して除き、反応溶液を室温で減圧濃縮した後、水に溶かし凍結乾燥した。凍結
- 25 乾燥品をpH11の水酸化ナトリウム水溶液に溶かし、ベンジルエステルを加水分解してベンジルを脱離した後、酢酸で中和しそのまま凍結乾燥した。凍結乾燥

品をHPLCで精製することで目的とするHOOC-Ser-Thr-Thr-Asp-Asn(disialooligo)-Asp-Ile-Pro-NH<sub>2</sub>を得た。

(Mightysyl ODS-C18 250×20mm 展開溶媒 A: 0.1%TFA水溶液 B: 0.1%TFA アセトニトリル:水=90:10 グラジエントA 100% 0→B 100% 60分 流速2.50ml/min)



## 10 産業上の利用可能性

本発明によれば、少なくとも1以上の糖鎖アスパラギンまたはムチン結合型糖鎖をペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドを人工的に容易に大量に合成可能な糖ペプチドの製造法を提供することができる。

また本発明によれば、シアル酸を有する糖鎖アルパラギンであっても、酸処理  
15 によってシアル酸が糖ペプチドから切断されず、容易にシアリル糖ペプチドを得

ることができる。

また本発明によれば、糖残基が任意に除去（欠失）された各種の新規な糖鎖アスパラギンの少なくとも1以上をペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドを人工的に容易に大量に合成可能である。

- 5 また本発明によれば、糖ペプチドにシアル酸転移酵素を用いてシアル酸もしくはその誘導体を導入することにより、シアル酸もしくはその誘導体が導入された糖ペプチドを得ることができる。

## 請求の範囲

1. (1) 水酸基を有する樹脂（レジン）の水酸基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシル基をエステル化反応させ、
  - 5 (2) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、
  - (3) この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシル基とアミド化反応させ、
  - (4) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、
  - (5) 上記(3)及び(4)の工程を1回以上繰り返し、
  - 10 (6) 脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基とアミド化反応させ、
  - (7) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、
  - (8) この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシル基とアミド化反応させ、
  - 15 (9) 上記(7)及び(8)の工程を1回以上繰り返し
  - (10) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、
  - (11) 酸で樹脂（レジン）を切断することを特徴とする少なくとも1以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドの製造法。
2. (6)の、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギン  
20 のアスパラギン部分のカルボキシル基とアミド化反応させ、(7)の、上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる工程を、適宜追加する少なくとも2以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖の任意の位置に有する糖ペプチドの製造法。
3. (6)の、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギン  
25 のアスパラギン部分のカルボキシル基とアミド化反応させ、(7)の、上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる工程を、最終工程で行う少なく

とも1以上の糖鎖アスパラギンをペプチド鎖に有する糖ペプチドの製造法。

4. (6)の工程に代えて、或いは(6)の工程に加えて、(1)水酸基を有する樹脂(レジン)の水酸基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基をエステル化反応させる、

5 請求の範囲第1項に記載の糖ペプチドの製造法。

5. 請求の範囲第1項(6)の糖鎖アスパラギンが、6以上の糖残基を有するものである請求の範囲第1～4項に記載の糖ペプチドの製造法。

6. 請求の範囲第1項(6)の糖鎖アスパラギンが、9～11の糖残基を有するものである請求の範囲第1～4項に記載の糖ペプチドの製造法。

10 7. 請求の範囲第1項(6)の糖鎖アスパラギンが、6以上の糖残基を有し、2分岐型糖鎖を結合したものである請求の範囲第1～4項に記載の糖ペプチドの製造法。

8. 請求の範囲第1項(6)の糖鎖アスパラギンが、ジシアロ糖鎖アスパラギンもしくはモノシアロ糖鎖アスパラギンであって、該シアル酸のカルボキシル基が保護基により保護されたものである請求の範囲第1～4項に記載の糖ペプチドの製造法。

15 9. 請求の範囲第1項(6)の糖鎖アスパラギンが、アシアロ糖鎖アスパラギンである請求の範囲第1～4項に記載の糖ペプチドの製造法。

20 10. シアル酸のカルボキシル基の保護基がベンジル基である請求の範囲第8項に記載の糖ペプチドの製造法。

11. 脂溶性保護基が9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)基である請求の範囲第1～4項に記載の糖ペプチドの製造法。

12. 糖鎖アスパラギンの一部又は全部の代わりにムチン結合型糖鎖を用いる請求の範囲第1～11項に記載の糖ペプチドの製造法。

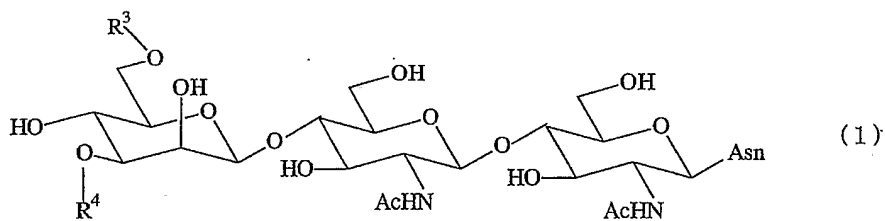
25 13. 請求の範囲第1～12項に記載の製造法により、取得可能な少なくとも1以上の糖鎖アスパラギンまたはムチン結合型糖鎖をペプチド鎖の任意の位置

に有する糖ペプチド。

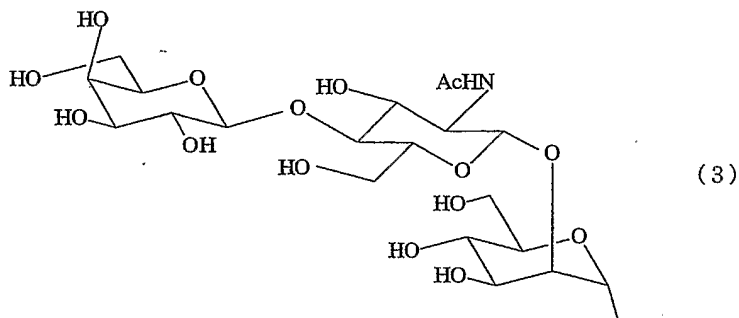
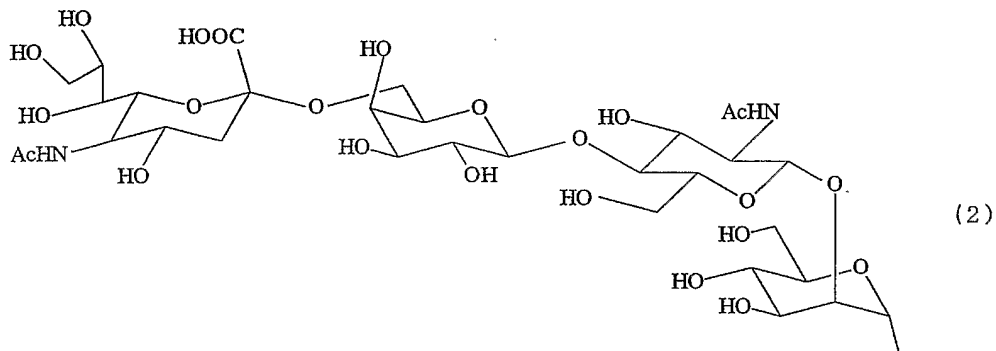
14. 糖鎖アスパラギンまたはムチン結合型糖鎖が、6以上の糖残基を有し、2分岐型糖鎖を結合したものである請求の範囲第13項に記載の糖ペプチド。

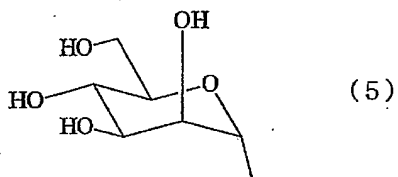
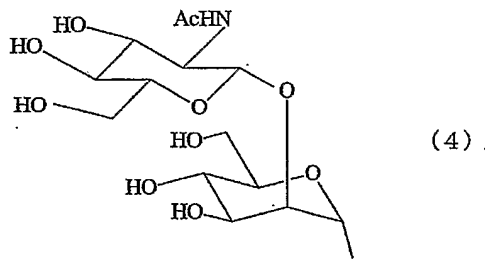
15. 糖鎖アスパラギンとしてジシアロ糖鎖アスパラギン及びモノシアロ糖鎖アスパラギンから選ばれる少なくとも1種以上を結合した糖ペプチドである請求の範囲第13項に記載の糖ペプチド。

16. 糖鎖アスパラギンが式(1)で表されるものである請求の範囲第13項に記載の糖ペプチド。



10 [式中、 $R^3$ および $R^4$ は、水素原子、式(2)~(5)で示される基であり、同一でも異なってもよい。]





17. (1) 水酸基を有する樹脂（レジン）の水酸基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシル基をエステル化反応させ、
- 5 (2) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、
- (3) この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシル基とアミド化反応させ、
- (4) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、
- (5) 上記(3)及び(4)の工程を1回以上繰り返し、
- 10 (6) 脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンのアスパラギン部分のカルボキシル基とアミド化反応させ、
- (7) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、
- (8) この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシル基とアミド化反応させ、
- 15 (9) 上記(7)及び(8)の工程を1回以上繰り返し
- (10) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、
- (11) 酸で樹脂（レジン）を切断し、
- (12) 得られた糖ペプチドにシアル酸転移酵素を用いてシアル酸もしくはその誘導体を転移させることを特徴とする少なくとも1以上の糖鎖アスパラギンをペ

プチド鎖の任意の位置に有し、且つ末端にシアル酸もしくはその誘導体残基を有する糖ペプチドの製造法。

18. 上記工程(11)の酸で樹脂(レジン)を切断する前に、標識剤を反応させる請求の範囲第17項に記載の糖ペプチドの製造法。

5 19. 標識剤がダンシルハライドである請求の範囲第18項に記載の糖ペプチドの製造法。

20. N-アセチル-4-デオキシ-4-フルオロ-D-マンノサミン、ピルビン酸ナトリウム、牛血清アルブミン、シアル酸アルドラーゼを反応させることを特徴とする5-アセタミド-3,5,7-トリデオキシ-7-フルオロ-D-グリセロ-β-D-ラクト-2-ノヌロピラノシドニック アシッドの製造法。

10 21. ベンジル 2-アジド-2,4-ジデオキシ-4-フルオロ-β-D-マンノピラノシドを、無水酢酸の存在下、水素添加して、N-アセチル-4-デオキシ-4-フルオロ-D-マンノサミンを得て、次いでこれとピルビン酸ナトリウム、牛血清アルブミン、シアル酸アルドラーゼを反応させることを特徴とする5-アセタミド-3,5,7-トリデオキシ-7-フルオロ-D-グリセロ-β-D-ラクト-2-ノヌロピラノシドニック アシッドの製造法。

15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08551

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl <sup>7</sup> C07K9/00, 1/04, 1/06, C08B37/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> C07K9/00, 1/04, 1/06, C08B37/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE/REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 10-259198 A (Sankyo Co., Ltd.), 29 September, 1998 (29.09.98), Examples (Family: none)	1-21
Y	WO 94/8711 A1 (WARNER-LAMBERT CO.), 19 March, 1994 (19.03.94), Example 1 & EP 663856 A1 & JP 8-502482 A & US 5324483 A	1-21
X Y	Ichiro MATSUO et al., "Synthesis of a Glycopeptide Carrying a N-Linked Core Pentasaccharide", Bioorganic & Medicinal Chemistry, Vol.3(11), pages 1455 to 1463, (1995), full text	13,16 1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 03 October, 2003 (03.10.03)		Date of mailing of the international search report 14 October, 2003 (14.10.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08551

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 11-255807 A (The Noguchi Institute), 21 September, 1999 (21.09.99), Claims; examples (Family: none)	1-21
Y	Carlo Unverzagt et al., "Chemoenzymatic synthesis of a sialylated diantennary N-glycan linked to asparagine", Carbohydrate Research, Vol.305, pages 423 to 431, (1998), full text	1-21
<u>X</u> Y	D. Leger et al., "Structure Determination of the Single Glycan of Rabbit Serotransferrin by Methylation Analysis and 360 MHz 1H NMRFEBS Letters, Vol.93(2), pages 255 to 260, (1978), table 4	<u>13-16</u> 1-21
<u>X</u> Y	Jacques U. Baenziger et al., "Structure of the Oligosaccharide of Human J Chain", The Journal of Biological Chemistry, Vol.254(10), pages 4063 to 4071, (1979), full text	<u>13-16</u> 1-21
Y	Indravathamma POOLA et al., "Interaction of asparagine-linked oligosaccharides with an immobilized rice(Oryza sativa) lectin column", Biochemical Journal, Vol.250, pages 117 to 124, (1988), table 1	1-21

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K9/00, 1/04, 1/06, C08B37/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K9/00, 1/04, 1/06, C08B37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE/REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 10-259198 A, (三共株式会社) 1998. 09. 29, 実施例参照, (ファミリーなし)	1-21
Y	WO 94/8711 A1, (WARNER-LAMBERT COMPANY) 1994. 03. 19, 実施例1等参照, & EP 663856 A1 & JP 8-502482 A & US 5324483 A	1-21
<u>X</u> <u>Y</u>	Ichiro Matsuo et al. "Synthesis of a Glycopeptide Carrying a N-Linked Core Pentasaccharide" Bioorganic & Medicinal Chemistry, Vol.3(11), p.1455-1463 (1995) 文献全体参照	<u>13, 16</u> <u>1-21</u>

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
03. 10. 03

国際調査報告の発送日  
**14.10.03**

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
坂崎 恵美子  
4N 9451  
電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 11-255807 A, (財団法人野口研究所) 1999.09.21, 特許請求の範囲及び実施例参照, (ファミリーなし)	1-21
Y	Carlo Unverzagt et al. "Chemoenzymatic synthesis of a sialylated diantennary N-glycan linked to asparagine" Carbohydrate Research, Vol.305, p.423-431 (1998) 文献全体参照	1-21
<u>X</u> <u>Y</u>	D. Leger et al. "Structure Determination of the Single Glycan of Rabbit Serotransferrin by Methylation Analysis and 360 MHz 1H NMR Spectroscopy" FEBS Letters, Vol.93(2), p.255-260 (1978) Table4参照	<u>13-16</u> <u>1-21</u>
<u>X</u> <u>Y</u>	Jacques U. Baenziger et al. "Structure of the Oligosaccharide of Human J Chain" The Journal of Biological Chemistry, Vol.254(10), p.4063-4071 (1979) 文献全体参照	<u>13-16</u> <u>1-21</u>
Y	Indravathamma POOLA et al. "Interaction of asparagine-lonked oligosaccharides with an immobilized rice (Oryza sativa) lectin column" Biochemical Journal, Vol.250, p.117-124 (1988) Table1参照	1-21