

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年12月31日 (31.12.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/001805 A1

- (51) 国際特許分類:
C08G 69/48 (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)
A61K 31/7012 (2006.01) *C08G 69/10* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) *C08G 69/40* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/061429
- (22) 国際出願日: 2008年6月24日 (24.06.2008)
- (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2007-170079 2007年6月28日 (28.06.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人静岡大学 (NATIONAL UNIVERSITY

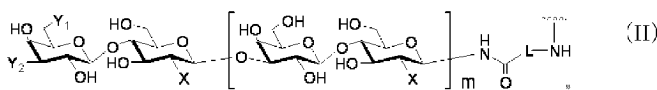
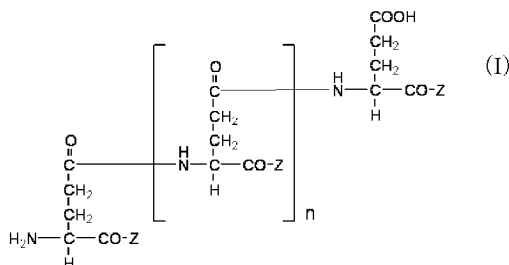
CORPORATION SHIZUOKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4228529 静岡県静岡市駿河区大谷 8 3 6 Shizuoka (JP). 静岡県公立大学法人 (SHIZUOKA PREFECTURAL UNIVERSITIES CORPORATION) [JP/JP]; 〒4228021 静岡県静岡市駿河区小鹿二丁目 2 番 1 号 Shizuoka (JP). ヤマサ醤油株式会社 (YAMASA CORPORATION) [JP/JP]; 〒2880056 千葉県銚子市新生町 2 丁目 1 0 番地の 1 Chiba (JP).

- (72) 発明者; および
 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 碓氷 泰市 (USUI, Taiichi) [JP/JP]; 〒4228529 静岡県静岡市駿河区大谷 8 3 6 国立大学法人静岡大学 農学部内 Shizuoka (JP). 村田 健臣 (MURATA, Takeomi) [JP/JP]; 〒4228529 静岡県静岡市駿河区大谷 8 3 6 国立大学法人静岡大学 農学部内 Shizuoka (JP). 鈴木 隆 (SUZUKI, Takashi) [JP/JP]; 〒4228526 静岡県静岡市駿河区谷田 5 2 - 1 静岡県立大学薬学部内 Shizuoka (JP). 左 一八 (JWA,

[続葉有]

(54) Title: NOVEL ARTIFICIAL N-LINKED SIALO-SUGAR CHAIN-CONTAINING POLYMER AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 新規なN結合型人工シアロ糖鎖含有ポリマーおよびその製造方法



(57) Abstract: It is intended to provide a sialo-sugar chain-containing polymer, which can be synthesized by a practical method capable of achieving a high synthetic yield and has an improved infection inhibitory activity against an influenza virus, and a method for producing the same. An N-linked sialo-sugar chain-containing polymer which is represented by the following structural formula (I) and in which a sialo-sugar chain has been linked to γ -polyglutamic acid via a compound having an amino group and a carboxyl group at an end thereof as a linker. Formula (I) (In the formula, Z means a hydroxy group or a residue represented by the formula (II), and n represents an integer of 10 or more, with the proviso that any one or more of the Z's is a residue represented by the formula (II).) Formula (II) (In the formula, X means a hydroxy group or an acetyl amino group, Y₁ and Y₂ means a hydroxy group or an N-acetylneuraminic acid residue, L means a hydrocarbon, and m represents 0 or an integer of 1 or 2, with the proviso that Y₁ and Y₂ are not the same.)

(57) 要約: 合成収率が高く実用的な方法で合成でき、インフルエンザウイルスの感染阻害活性が向上されたシアロ糖鎖含有ポリマーおよびその製造方法を提供する。下記構造式 (I) で表され、 γ -ポリグルタミン酸に末端

[続葉有]



WO 2009/001805 A1



Ilpal) [KR/JP]; 〒4228526 静岡県静岡市駿河区谷田
5 2 - 1 静岡県立大学薬学部内 Shizuoka (JP). 大
庭 勇介 (OHBA, Yusuke) [JP/JP]; 〒2880056 千葉県
銚子市新生町 2 丁目 1 0 番地の 1 ヤマサ醤油株式
会社内 Chiba (JP). 浜本 智樹 (HAMAMOTO, Tomoki)
[JP/JP]; 〒2880056 千葉県銚子市新生町 2 丁目 1 0 番
地の 1 ヤマサ醤油株式会社内 Chiba (JP). 野口 利忠
(NOGUCHI, Toshitada) [JP/JP]; 〒2880056 千葉県銚子
市新生町 2 丁目 1 0 番地の 1 ヤマサ醤油株式会
社内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人高橋・林アンドパートナーズ
(TAKAHASHI, HAYASHI AND PARTNER PATENT
ATTORNEYS, INC.); 〒1440052 東京都大田区蒲田
5 - 2 4 - 2 損保ジャパン蒲田ビル9階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,

DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM,
KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), OAPI (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
- 補正書

にアミノ基とカルボキシル基を有する化合物をリンカーとしてシアロ糖鎖を結合させたN結合型シアロ糖鎖含有ポリマー。式 (I) (式中、Zは水酸基又は式 (I I) で表される残基を意味し、nは10以上の整数を示す。ただし、いずれか1以上のZは式 (I I) で表される残基である。) 式 (I I) (式中、Xは水酸基又はアセチルアミノ基、Y₁及びY₂は水酸基又はN-アセチルノイラミン酸残基、Lは炭化水素を意味し、mは0又は1もしくは2の整数を示す。ただし、Y₁とY₂は同一でない。)

明 細 書

新規なN結合型人工シアロ糖鎖含有ポリマーおよびその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、ポリグルタミン酸骨格の新規なN結合型人工シアロ糖鎖含有ポリマーおよびその効率的な製造方法に関するものである。

背景技術

[0002] インフルエンザウイルスは、有効な治療法や感染防御法が見出されていない病原体の一つである。インフルエンザウイルスは、極めて感染性が強く、抗原変異を繰り返し、それまでの抗原性とは異なる新種が出現するため、ワクチンなどによる効果的な防御対策を立てにくいという問題がある。最近では、トリインフルエンザウイルスを起源とした新たなヒトインフルエンザウイルスの発生が危惧されている。そのため、インフルエンザ予防のため、インフルエンザウイルス吸着剤あるいは感染阻害剤などの開発が期待されている。

[0003] インフルエンザウイルスの宿主細胞への感染は、ウイルス表面蛋白質であるヘマグルチニン(赤血球凝集素:HA)が宿主細胞表面のシアル酸含有複合糖鎖を受容体として認識して結合することによると考えられている。トリ類から単離したインフルエンザウイルスA型は末端にNeuAc(α 2,3)Galを有する糖鎖に優先的に結合するが、このウイルスと非常に類似したヒトウイルスは末端のNeuAc(α 2,6)Gal構造に高い結合親和性を示すことが報告されている。

[0004] このように、インフルエンザウイルスには変異により種々の亜型が存在するため、より有効な抗インフルエンザウイルス剤としてはウイルスの亜型に関係なく広く受容体の結合を阻害する抗インフルエンザ作用を有するものが望まれており、シアル酸含糖鎖(シアロ糖鎖)化合物は、インフルエンザウイルス感染の最初のステップであるウイルス受容体への結合を阻害する感染阻害剤として、またはインフルエンザウイルス吸着剤として機能しうることを期待される。

[0005] 従来、種々のシアロ糖鎖化合物を使用し、赤血球凝集阻止活性を指標としたインフルエンザウイルスの付着阻止実験が行われてきたが、ウイルスの付着阻止活性が低

い、あるいはその合成法が複雑で実用的でないなどの理由から、シアロ糖鎖化合物を有効成分とするインフルエンザウイルスの感染阻害剤は未だ開発されていないのが現状である。

[0006] たとえば、特許文献1及び非特許文献1は、 α -ポリグルタミン酸を骨格としてN-アセチルラクトサミンを α -ポリグルタミン酸の側鎖にパラ-アミノフェニル基をリンカーとして導入し、さらにオリゴ糖鎖の非還元末端にシアル酸を付与した、分子量2,000~100万のシアリル-N-アセチルラクトサミン含有人工糖鎖ポリペプチドが開示され、広範囲なインフルエンザウイルス分離株に対し感染阻害活性を有することが確認されている。このシアリル-N-アセチルラクトサミン結合人工糖鎖ポリペプチドは、インフルエンザウイルスの感染阻害剤あるいは吸着剤として有用であるが、その原料である α -ポリグルタミン酸やN-アセチルグルコサミン誘導体(パラ-ニトロフェニル配糖体)などは高価な化合物であり、また製造法も煩雑であり、極めて高い製造コストが必要であるのに対し、そのインフルエンザウイルスの感染阻害活性 IC_{50} は、3-30 μ g/mlであり、実用上十分な活性とは言えなかった。

[0007] また、特許文献2及び非特許文献2には、上記シアリル-N-アセチルラクトサミン含有人工糖鎖ポリペプチドのポリペプチド部を安価に入手可能な γ -ポリグルタミン酸に、またシアロ糖鎖部とポリグルタミン酸のリンカー部を安価なアミノアルキルアルコールに改変したシアリル-N-アセチルラクトサミン含有人工糖鎖ポリペプチドが開示され、得られたポリマーが従来のポリマーと比べて数十倍のインフルエンザウイルス感染阻害活性を有することが報告されている。

[0008] 特許文献1:特開2003-73397号公報

特許文献2:国際公開パンフレット第WO2007/026669号

非特許文献1:Glycobiology, 13, 315-326(2003)

非特許文献2:Bioorg. Med. Chem., 15, 1383-1393(2007)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0009] 特許文献2及び非特許文献2に記載の人工シアロ糖鎖含有ポリマーは、安価な原料よりその合成が可能とはなっているが、実践的な製造にはまだ多くの課題がある。

まず、アシアロ糖鎖部とリンカーとなるアミノアルキルアルコールとの縮合には高度に精製したトリコデルマ(Trichoderma)由来のセルラーゼが必要であり、かつ加水分解酵素の逆反応を利用するため、合成率は極めて低い(使用糖鎖の1%程度)という問題がある(問題点1)。

[0010] また、これまでの人工アシアロ糖鎖含有ポリマーの合成は、アシアロ糖鎖部に結合したアミノアルキルアルコールをリンカーとして用い、リンカーのアミノ基とポリグルタミン酸のカルボキシル基との縮合を過剰量の試薬を用いて行っている。これにより、有機溶媒に対する溶解性の低いポリグルタミン酸を均一に活性化させ、ゲル化などによる縮合反応の不均一化を防ぐことができるが、アシアロ糖鎖を使用した場合には過剰量の試薬により非還元末端のシアル酸の有するカルボキシル基とリンカー末端のアミノ基が反応し、糖鎖部同士の縮合も生じるためこの方法を適用できない。そこで、アシアロ糖鎖部とリンカーとを結合してO結合型のアシアロ糖鎖を合成した後、このO結合型アシアロ糖鎖を γ -ポリグルタミン酸と縮合しアシアロ糖鎖含有ポリマーを合成し、最終的にラット由来のシアル酸転移酵素を用いてアシアロ糖鎖部の非還元末端にシアル酸を転移するという煩雑な工程で合成されていた(問題点2)。

[0011] さらに、アシアロ糖鎖をポリグルタミン酸と縮合させた後にシアリル化することは、アシアロ糖鎖をシアリル化した後ポリグルタミン酸と縮合させるより困難である。例えば従来法の最終工程のシアル酸転移反応では微生物由来のシアル酸転移酵素は使用できず、アシアロ糖鎖含有ポリマーの分解を防ぐため、高度に精製された動物(ヒトを含む)由来のシアル酸転移酵素が必要となっているなど、結果的に製造コストを上昇させ、実用的な方法としては満足できる方法とはいえなかった(問題点3)。

課題を解決するための手段

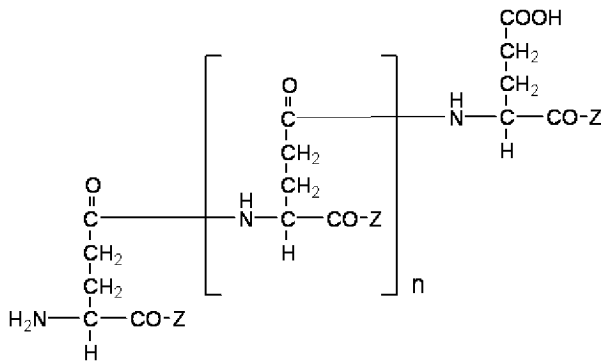
[0012] 本発明者らは、従来法の課題を解決すべく、鋭意検討の結果、1位を化学的にアミノ化して生成させたアミノ糖に、アミノ基を導入したアルキルカルボン酸など、一方の末端にアミノ基を有し他方の末端にカルボキシル基を有する化合物をリンカーとしてアミド結合させる、すなわちこれまでの糖鎖還元末端とリンカーのO結合型様式からN結合型に変更することで糖鎖部とリンカーの縮合を極めて簡便で高効率化できることを見出した。

[0013] また、得られた新規なN結合型シアロ糖鎖含有ポリマーが従来のO結合型シアロ糖鎖含有ポリマーの数倍のインフルエンザウイルス感染阻害活性を有することを見出した。

[0014] さらに、シアロ糖鎖とポリグルタミン酸の縮合反応に、従来とは異なり含水系の混合溶媒を用いることで、ポリグルタミン酸の溶解性を改善し、過剰量の試薬を用いなくともポリグルタミン酸中のカルボキシル基を均一に活性エステル化できることを見出した。このように活性エステル化されたポリグルタミン酸溶液には過剰の試薬が存在しないため、シアロ糖鎖を添加することで過剰量の試薬によるシアロ糖鎖同士の縮合反応を未然に防ぐことができ、シアロ糖鎖のカルボキシル基を保護することなしに、リンカーを介したシアロ糖鎖部とポリグルタミン酸の縮合を高効率で行えることを確認し、本発明を完成させた。

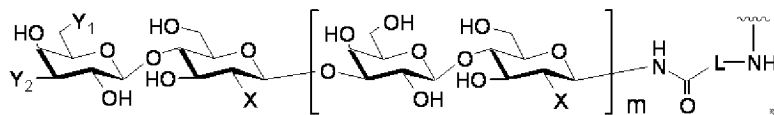
[0015] したがって、本発明は、下記構造式(I)で表され、γ-ポリグルタミン酸に、一方の末端にアミノ基を有し他方の末端にカルボキシル基を有する化合物をリンカーとしてシアロ糖鎖を結合させたN結合型シアロ糖鎖含有ポリマーに関するものである。

[0016] 式(I)



(式(I)中、Zは水酸基又は式(II)で表される残基を意味し、nは10以上の整数を示す。ただし、いずれか1以上のZは式(II)で表される残基である。)

[0017] 式(II)



(式(II)中、Xは水酸基又はアセチルアミノ基、Y₁及びY₂は水酸基又はN-アセチルイラミン酸残基、Lは炭化水素を意味し、mは0又は1もしくは2の整数を示す。た

だし、 Y_1 と Y_2 は同一でない。)

[0018] また、本発明は、次の工程からなることを特徴とするN結合型シアロ糖鎖含有ポリマーの製造法(製法1)に関する。

[0019] (工程1)

糖の還元末端の1位をアミノ化し、一方の末端にアミノ基を有し他方の末端にカルボキシル基を有する化合物をリンカーとしてアミド結合させてN結合型の糖プライマーを合成する工程。

[0020] (工程2)

必要に応じて工程1で得られた糖プライマーに糖転移酵素を用いて糖鎖を伸長させ、非還元末端に目的とするアシアロ糖鎖部を合成してN結合型アシアロ糖鎖を合成する工程。

[0021] (工程3)

工程2で合成したN結合型アシアロ糖鎖をポリグルタミン酸のカルボキシル基側鎖に縮合してアシアロ糖鎖含有ポリマーを合成する工程。

[0022] (工程4)

工程3で合成したアシアロ糖鎖含有ポリマーを、シアル酸転移酵素を用いてシアリル化し、目的とするシアロ糖鎖含有ポリマーを単離取得する工程。

[0023] さらに、本発明は、次の工程からなることを特徴とするN結合型シアロ糖鎖含有ポリマーの製造法(製法2)に関する。

[0024] (工程1)

糖の還元末端の1位をアミノ化し、一方の末端にアミノ基を有し他方の末端にカルボキシル基を有する化合物をリンカーとしてアミド結合させてN結合型の糖プライマーを合成する工程。

[0025] (工程2)

工程1で得られた糖プライマーに糖転移酵素を用いて必要に応じて糖鎖を伸長させた後、シアル酸転移酵素を用いてシアリル化反応を行って前記糖プライマーの非還元末端に目的とするシアロ糖鎖部を合成してN結合型シアロ糖鎖を合成する工程。

。

[0026] (工程3)

カルボキシル基の活性エステル化剤、縮合剤及び／又は添加剤を用いて γ -ポリグルタミン酸を活性化し、工程2で合成したシアロ糖鎖をポリグルタミン酸のカルボキシル基側鎖に縮合する工程。

[0027] 製法2において工程3で合成したシアロ糖鎖含有ポリマーを次の工程で単離精製し、目的とするシアロ糖鎖含有ポリマーを取得してもよく、同様に製法1において工程4で構成したシアロ糖鎖含有ポリマーを単離精製する工程を設けてもよい。

発明の効果

[0028] 本発明は、従来のシアロ糖鎖含有ポリマーのシアロ糖鎖部とリンカーの結合様式を改変し、安価にかつ収率良く製造可能で、従来のシアロ糖鎖含有ポリマーの数倍のインフルエンザウイルス感染阻害活性を示すシアロ糖鎖含有ポリマーを提供したものである。より収率の点を具体的に説明すれば、従来のO結合型シアロ糖鎖含有ポリマーを合成する際、シアロ糖鎖部とリンカーとなるアミノアルキルアルコールとの縮合には高度に精製したトリコデルマ(Trichoderma)由来のセルラーゼを必要し、かつ極めて低い合成収率でしか目的化合物を合成できなかったのに対し(使用糖鎖の1%程度)、N結合型に変更するだけで80%以上の合成収率で目的化合物を合成することが可能である。

[0029] このような本発明のシアロ糖鎖含有ポリマーは、インフルエンザウイルスの感染やインフルエンザの流行を防止する様々な手段に適用できる。ウイルス吸着剤として、フィルターへ充填することによる空気中からのインフルエンザウイルス除去、マスクへ充填することによるウイルスの拡散防止や感染予防など、有用性は高い。さらには、糖鎖部の非還元末端のシアル酸の付与を α 2, 3型とすれば、トリ感染型のインフルエンザウイルスに対する感染阻害剤としての利用も可能である。

[0030] さらに、本発明の製法によれば、シアロ糖部とポリグルタミン酸の縮合反応はかなり難しい反応であったが、従来とは異なり含水系の混合溶媒を用いることで、ポリグルタミン酸の溶解性を改善し、過剰量の試薬を用いなくともポリグルタミン酸中のカルボキシル基を均一に活性エステル化でき、このように活性エステル化されたポリグルタミン酸溶液には過剰の試薬が存在しないため、従来法でみられた過剰量の試薬によるシ

アロ糖鎖同士の縮合反応を未然に防ぐことができ、シアロ糖鎖のカルボキシル基を保護することなしにリンカーを介したシアロ糖鎖部とポリグルタミン酸の縮合を高効率で行わせることができるため、シアロ糖鎖含有ポリマーの実用的な製造法を初めて提供することを可能とした。

図面の簡単な説明

[0031] [図1]実施例1で調製したPoly[Neu5Ac α 2-3lactosylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA]の構造と $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示したものである。

[図2]実施例1で調製したPoly[Neu5Ac α 2-3-N-acetyllactosaminylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA]の構造と $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示したものである。

[図3]実施例1で調製したPoly[Neu5Ac α 2-3lacto-N-neotetraosylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA]の構造と $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示したものである。

[図4]実施例1で調製したPoly[Neu5Ac α 2-6lactosylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA]の構造と $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示したものである。

[図5]実施例1で調製したPoly[Neu5Ac α 2-6-N-acetyllactosaminylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA]の構造と $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示したものである。

[図6]実施例1で調製したPoly[Neu5Ac α 2-6lacto-N-neotetraosylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA]の構造と $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示したものである。

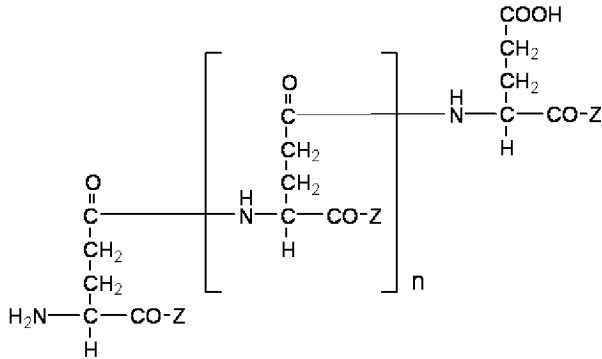
[図7]実施例2で調製したPoly[Neu5Ac α 2-6-N-acetyllactosaminylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA]の構造と $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示したものである。

発明を実施するための最良の形態

[0032] (1) N結合型人工シアロ糖鎖含有ポリマー

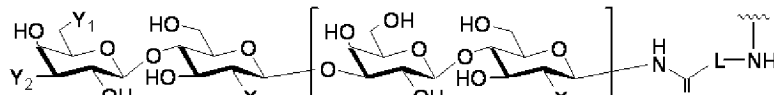
本発明のN結合型人工シアロ糖鎖含有ポリマー(N結合型人工シアロ糖鎖含有ポリペプチドと称することもある)は、以下の構造式(I)で示されるものである。

[0033] 式(I)



(式(I)中、Zは水酸基又は式(II)で表される残基を意味し、nは10以上の整数を示す。ただし、いずれか1以上のZは式(II)で表される残基である。)

[0034] 式(II)



(式(II)中、Xは水酸基又はアセチルアミノ基、 Y_1 及び Y_2 は水酸基又はN-アセチルノイラミン酸残基、Lは炭化水素を意味し、mは0又は1もしくは2の整数を示す。ただし、 Y_1 と Y_2 は同一でない。)

[0035] 式(II)中、Lで表される炭化水素としては、炭素数1~30のものが好ましく、飽和炭化水素基及び不飽和炭化水素基のいずれであってもよい。具体的にはアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、シクロアルキル置換アルキル基、もしくはそれらを2個以上アミド結合などで縮合させ組み合わせさせたもの等が挙げられる。

[0036] ここで、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基としては、炭素数1~20の直鎖又は分枝鎖のものが挙げられる。アルキル基の具体例としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、n-ブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基、n-オクチル基、n-デシル基、n-ドデシル基、n-テトラデシル基等の直鎖アルキル基；イソプロピル基、イソブチル基、t-ブチル基、2-エチルヘキシル基等の分枝鎖アルキル基が挙げられる。

[0037] アルケニル基の具体例としてはビニル基、プロペニル基、アリル基等が挙げられる。アルキニル基の具体例としてはエチニル基、プロピニル基、ブチニル基などが挙げら

れる。

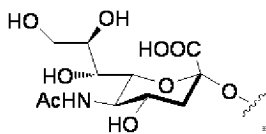
[0038] シクロアルキル基としては、炭素数3～10のものが挙げられ、特に炭素数3～8のもの、例えばシクロプロピル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基等が好ましい。

[0039] アリール基としては炭素数6～14のもの、例えばフェニル基、トリル基、ナフチル基等が挙げられる。アラルキル基としては、炭素数7～14のアラルキル基、具体的にはベンジル基、フェネチル基などが挙げられる。シクロアルキル置換アルキル基としてはC3-C8シクロアルキル置換C1-C10アルキル基、例えばシクロプロピルメチル基、シクロペンチルメチル基、シクロヘキシルメチル基、シクロプロピルエチル基、シクロペンチルエチル基、シクロヘキシルエチル基、シクロプロピルプロピル基、シクロペンチルプロピル基、シクロヘキシルプロピル基等が挙げられる。

[0040] また、当該炭化水素は置換基を有していても良く、そのような置換基としては、ヒドロキシル基、アジド基、シアノ基、アルコキシ基、シクロアルキルオキシ基、アリールオキシ基、エステル化されていてもよいカルボキシル基等が挙げられる。さらに、これら化合物を2個以上アミド結合などで縮合して組み合わせたものも使用できる。

[0041] Y_1 又は Y_2 で表されるN-アセチルノイラミン酸残基は下記式(III)で表されるものであり、水酸基、カルボキシル基又はアセチルアミノ基が、同一または別異にハロゲン基、アルキル基またはアシル基で化学的に修飾されていてもよい。

[0042] 式(III)



[0043] このようなN結合型シアロ糖鎖含有ポリマーは、塩型、遊離酸型のいずれであつてもよく、塩型としては、例えば、アルカリ金属塩(例えばナトリウム塩、カリウム塩等);アルカリ土類金属塩(例えばカルシウム塩、マグネシウム塩等);有機塩基塩(例えばトリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ピリジン塩、ピコリン塩、ジシクロヘキシルアミン塩等)等が挙げられる。また、水和物あるいはアルコール等との溶媒和物であつてもよい。

[0044] また、N結合型シアロ糖鎖含有ポリマーの分子量は、例えば、2,000～500万の範囲であり、グルタミン酸単位重合度(n)は、例えば10～10,000の範囲であり、グルタ

ミン酸残基に対するシアリルオリゴ糖の導入率は、10～80%の範囲である。

[0045] (2)N結合型シアロ糖鎖含有ポリマーの製造法(製法1)

(工程1)糖プライマーの合成

[0046] 工程1は、容易に入手可能な糖類の還元末端の1位水酸基を化学的にアミノ化したもの(1-アミノ糖類)に、リンカーとして末端にアミノ基とカルボキシル基とをそれぞれ有する化合物をアミド結合させることでN結合型糖プライマーを得る工程である。

[0047] 反応に使用する糖としては、アノマー位の水酸基がその後のアミノ化反応において活性を有しているものであれば、その他の水酸基が修飾または置換されているものでもよく、これは単糖、二糖、オリゴ糖のいずれでも良い。具体的には、グルコース、N-アセチルグルコサミン、ラクトース、N-アセチルラクトサミンなどがあげられる。

[0048] 1-アミノ糖類は、公知の方法で調製すればよく、たとえば、上記の糖類の溶液(水、メタノール、エタノール、またはこれらの混合溶媒など)中に炭酸水素アンモニウムを飽和させた後、10～70℃、好ましくは30～50℃で1～100時間程度、必要により攪拌しながら反応させるか(Biochem. Biophys. Acta, 1226, 117-122(1997))、上記糖類の溶液を耐圧容器に入れ、アンモニアガスを飽和させた状態で10～70℃、好ましくは30～50℃で1～100時間程度、必要により攪拌しながら反応させる(J. Org. Chem., 23, 1309-1319(1958))ことでも実施できる。

[0049] 合成した1-アミノ糖は、炭酸水素アンモニウムを用いた場合は、過剰分の試薬を結晶化により除去するか、もしくは水との共沸を繰り返して試薬を除去することで精製し、アンモニアガスを用いた場合は、反応液をろ過し、回収した結晶を有機溶媒(エタノール、ジエチルエーテルなど)で洗浄することで単離精製し、次の反応に使用する。

[0050] リンカーであるアミノ基とカルボキシル基を有する化合物としては、 $\text{NH}_2\text{-L-COOH}$ で表される化合物であり、Lは前記説明のとおり炭化水素である。具体的には、アミノ基を導入したアルキルカルボン酸等の ω -アミノ酸を例示することができる。アミノ基とカルボキシル基を有する化合物は、アミノ基を常法により適切な保護基で保護していてもかまわない。ここで用いる保護基としては、後の反応条件下において安定であり、さらにシアロ糖鎖構造に影響を与えない条件下で脱保護できるものが好ましく、た

たとえばトリフルオロアセチル基、ベンジル基、ベンジロキシカルボニル基、9-フルオレニルメトキシカルボニル基などがあげられる。

- [0051] 1-アミノ糖とアミノ基を保護したリンカーとをアミド結合させる縮合反応は、有機溶媒(ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドなど)中、塩基(トリエチルアミン、トリブチルアミンなど)存在下、縮合剤(カルボニルジイミダゾール、クロロ炭酸エチル、テトラメチルーO-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)ウロニウムヘキサフルオロリン酸塩など)で処理することで実施される。
- [0052] 塩基および縮合剤の使用量は、通常リンカーに対して1当量以上あればよい。また必要に応じて4-N、N-ジメチルアミノピリジンなどの一般的なアシル化反応の触媒を添加してもかまわない。
- [0053] 縮合反応は-10°Cから100°Cで実施することができ、特に0°Cから30°Cが好ましい。このように、1-アミノ糖とリンカーとを縮合反応に供することで、還元末端のアミノ化された1位の部分にリンカーが結合されたN結合型糖プライマーが合成される。
- [0054] 合成されたN結合型糖プライマーは、通常オリゴ糖の分離精製手段を用いて単離精製でき、例えば逆相ODSカラムクロマトグラフィやイオン交換クロマトグラフィなどを適宜組み合わせることで単離精製できる。
- [0055] (工程2)アシアロ糖鎖部の合成
- 工程2は、工程1で合成した糖プライマー(N結合型糖プライマー)と糖供与体(糖ヌクレオチド:ウリジン5'-ジリン酸ガラクトース、ウリジン5'-ジリン酸N-アセチルグルコサミンなど)を含有する反応系に合目的な糖転移酵素(β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ、 β 1,3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼなど)を添加してN結合型糖プライマーの非還元末端側に糖鎖を伸長させ、N結合型糖プライマーの非還元末端側にアシアロ糖鎖部を合成する工程である。
- [0056] 反応系に添加する糖転移酵素としては、目的とする酵素活性を有する限りどのような形態であってもよい。酵素調製の簡便さと共に調製効率を高めるため、該酵素遺伝子をクローン化し、微生物菌体内で大量発現させ、該酵素の大量調製を行う、いわゆるDNA組換え技術を用いた酵素生産が最も都合がよい。
- [0057] 酵素標品としては具体的には、微生物の菌体、該菌体の処理物または該処理物か

ら得られる酵素調製物などを例示することができる。微生物の菌体の調製は、当該微生物が生育可能な培地を用い、常法により培養後、遠心分離等で集菌する方法で行うことができる。具体的に、大腸菌 (*Escherichia coli*) のように *Escherichia* 属に属する細菌を例に挙げ説明すれば、培地としてはブイヨン培地、LB培地 (1%トリプトン、0.5%イーストエキストラクト、1%食塩) または2×YT培地 (1.6%トリプトン、1%イーストエキストラクト、0.5%食塩) などを使用することができ、当該培地に種菌を接種後、30~50°Cで10~50時間程度必要により攪拌しながら培養し、得られた培養液を遠心分離して微生物菌体を集菌することにより、目的の酵素活性を有する微生物菌体を調製することができる。

- [0058] 微生物の菌体処理物としては、上記微生物菌体を機械的破壊 (ワーリングブレンダー、フレンチプレス、ホモジナイザー、乳鉢などによる)、凍結融解、自己消化、乾燥 (凍結乾燥、風乾などによる)、酵素処理 (リゾチームなどによる)、超音波処理、化学処理 (酸、アルカリ処理などによる) などの一般的な処理法に従って処理して得られる菌体の破壊物または菌体の細胞壁もしくは細胞膜の変性物を例示することができる。
- [0059] 酵素調製物としては、上記菌体処理物から当該酵素活性を有する画分を通常の酵素の精製手段 (塩析処理、等電点沈澱処理、有機溶媒沈澱処理、透析処理、各種クロマトグラフィ処理など) を施して得られる粗酵素または精製酵素を例示することができる。
- [0060] 糖供与体としての糖ヌクレオチドは、それぞれ市販の製品を使用することができる。使用濃度としては1~200mM、好ましくは5~50mMの範囲から適宜設定できる。
- [0061] アシアロ糖鎖部の合成は、上記の糖プライマー及び糖ヌクレオチドを含有する反応系に、糖転移酵素を0.001ユニット/ml以上、好ましくは、0.01~10ユニット/ml程度になるようにそれぞれ添加し、5~50°C、好ましくは10~40°Cで1~100時間程度、必要により攪拌しながら反応させることにより実施できる。このようにして還元末端にアミノ基およびカルボン酸を有するリンカーが結合され、非還元末端にアシアロ糖鎖部を有するN結合型アシアロ糖鎖が得られる。
- [0062] このようにして製造したN結合型アシアロ糖鎖は、オリゴ糖の通常分離精製手段を用いて単離すればよく、例えば、逆相ODSカラムクロマトグラフィやイオン交換カラ

ムクロマトグラフィなどを適宜組み合わせることで単離精製できる。

[0063] なお、工程2の糖鎖伸長反応は必要に応じて実施すればよく、工程1で用いる糖の種類によっては糖鎖の伸長反応は省略してもよい。例えば、工程1で2以上の糖を有する糖ポリマーをアミノ化した1-アミノ糖にリンカー化合物を結合させた場合は、得られたN結合型糖ポリマーは非還元末端にアシアロ糖鎖部を有し、還元末端にリンカーを有するため、工程1の反応物をN結合型アシアロ糖鎖として工程2を省略してそのまま、次に述べる工程3に供することができる。

[0064] (工程3)アシアロ糖鎖と γ -ポリグルタミン酸の縮合

工程3は、工程2で合成したN結合型アシアロ糖鎖を、その還元末端にあるリンカーのアミノ基を介して γ -ポリグルタミン酸のカルボキシル基側鎖に化学的に縮合する工程である。

[0065] 工程2で合成したN結合型アシアロ糖鎖は、非還元末端にアシアロ糖鎖部を有し、還元末端にリンカーとして導入された化合物由来のアミノ基を有する。リンカー中のアミノ基が保護基で保護されている場合、工程3の縮合反応を行う前にリンカー中のアミノ基の保護基を常法により脱保護し、場合によっては通常のオリゴ糖の精製手段(ゲルろ過や逆相ODSカラムクロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィなど)を用いて単離精製した後、 γ -ポリグルタミン酸との縮合反応に用いる。

[0066] 原料ポリマーとして用いる γ -ポリグルタミン酸は、市販のものを使用できる。

[0067] 縮合反応は、公知の方法(特許文献1及び2、非特許文献1及び2)に従って行うことができる。このような縮合反応により、 γ -ポリグルタミン酸のカルボキシル基にN結合型アシアロ糖鎖を縮合させた縮合反応物(N結合型アシアロ糖鎖含有ポリマー)が得られる。

[0068] (工程4)

工程4は、工程3で合成したN結合型アシアロ糖鎖含有ポリマーを、シアル酸転移酵素を用いてシアリル化し、目的とするN結合型シアロ糖鎖含有ポリマーを単離取得する工程である。シアル酸転移酵素を用いてN結合型アシアロ糖鎖含有ポリマーをシアリル化する工程は、公知の方法(特許文献1及び2、非特許文献1及び2)により実施することができる。合成されたN結合型シアロ糖鎖含有ポリマーの単離精製は、

通常、タンパクの精製に用いる方法で行えばよく、例えば、透析やゲルろ過などを適宜組み合わせることで単離精製することができる。

[0069] このようにして調製したN結合型シアロ糖鎖含有ポリマーのシアロ糖導入率の測定は、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルより測定することができる。例えば、シアロ糖鎖やリンカーに用いた化合物に特徴的なピークの積分値を、ポリグルタミン酸に特徴的なピークの積算値で除した値を糖導入率として利用すればよい。

[0070] (3)N結合型シアロ糖鎖含有ポリマーの製造法(製法2)

(工程1)糖プライマーの合成

[0071] 工程1は、容易に入手可能な糖類の1位水酸基を化学的にアミノ化し、これにリンカーとしてアミノ基とカルボキシル基を有する化合物をアミド結合させることでN結合型糖プライマーを得る工程であり、製法1と同じである。

[0072] (工程2)シアロ糖鎖部の合成

工程2は、糖プライマーと糖供与体(糖ヌクレオチド:ウリジン5'-ジリン酸ガラクトース、ウリジン5'-ジリン酸N-アセチルグルコサミン、シチジン5'-モノリン酸N-アセチルノイラミン酸など)を含有する反応系に合目的的な糖転移酵素(β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ、 β 1,3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、 α 2,6-シアルルトランスフェラーゼなど)を添加して、目的とするシアロ糖鎖部を合成する工程である。

[0073] 酵素の調製及び反応条件は、製法1の工程2と同様の調製及び反応条件で実施することができる。なお、上記工程2は、糖鎖の伸長反応を行う段階とシアルル化反応を行う段階とを含む工程として記載している。すなわち、ここでは工程2について、製法1で用いたのと同じ糖プライマーと糖供与体、および糖転移酵素(β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ、 β 1,3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ)を用いて糖鎖の伸長反応を行った後、シアル酸転移酵素(α 2,3-シアルルトランスフェラーゼ、 α 2,6-シアルルトランスフェラーゼなど)を用いたシアルル化反応を行う工程として記載している。

[0074] ただし、製法2においても工程2の糖鎖の伸長反応は必要によって行えばよく、省略可能である。すなわち、製法2の工程2はN結合型糖プライマーの非還元末端にア

シアロ糖鎖部ではなくシアロ糖鎖部を合成する工程であり、工程1で合成した糖プライマーによっては伸長反応を省略できる。例えば、工程1で非還元末端に2以上の糖を有する糖ポリマーをアミノ化して1-アミノ糖としてこれにリンカーを結合させた場合、工程2では糖鎖の伸長反応を行うことなく、工程1の反応物(N結合型アシアロ糖鎖)をシアル酸転移酵素でシアリル化してN結合型シアロ糖鎖を合成すればよい。

[0075] かかる工程により、還元末端にアミノ基を有するリンカーが結合され、非還元末端にシアロ糖鎖部が合成されたN結合型シアロ糖鎖が得られる。このようにして製造したN結合型シアロ糖鎖は、オリゴ糖の通常分離精製手段を用いて単離すればよく、例えば、逆相ODSカラムクロマトグラフィやイオン交換カラムクロマトグラフィなどを適宜組み合わせることで単離精製できる。

[0076] (工程3)シアロ糖鎖と γ -ポリグルタミン酸の縮合

工程3は、工程2で合成したN結合型シアロ糖鎖を、その還元末端にあるリンカーのアミノ基を介して γ -ポリグルタミン酸のカルボキシル基側鎖に化学的に縮合する工程である。

[0077] 工程2で合成したN結合型シアロ糖鎖は、非還元末端にシアロ糖鎖部を有し、還元末端にリンカーとして導入された化合物由来のアミノ基を有する。工程3ではリンカー中のアミノ基が保護されている場合はこの保護基を常法により脱保護し、場合によっては通常のオリゴ糖の精製手段(ゲルろ過や逆相ODSカラムクロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィなど)を用いて単離精製した後、 γ -ポリグルタミン酸との縮合反応に用いる。

[0078] 原料ポリマーとして用いる γ -ポリグルタミン酸は、市販のものを使用できる。

[0079] 縮合工程に用いる溶媒としては、水や緩衝液(炭酸塩など、pHは4から10のものが好ましい)と有機溶媒(ジメチルホルムアミドやジメチルスルホキシドなど)の混合溶媒を使用できる。この際、含水率が1%から80%の溶媒を用いることができ、特に10%から50%の含水率のものが好ましい。

[0080] 縮合反応は、上記溶媒中、塩基(トリエチルアミンやトリブチルアミンなど)存在下、カルボキシル基の活性エステル化剤、縮合剤及び/又は添加剤を用いて γ -ポリグルタミン酸を活性化した後、上記脱保護反応によりリンカーの保護基を外したN結合

型シアロ糖鎖と反応させることで実施できる。

- [0081] カルボキシル基の活性エステル化剤としては、クロロギ酸p-ニトロフェニル、ジスクシニルカーボネート、カルボニルジイミダゾール等を例示でき、縮合剤としては、ジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド(およびその塩酸塩)、ベンゾトリアゾール-1-イルトリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロリン酸塩などを例示でき、添加剤としては、N-ヒドロキシコハク酸イミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、3-ヒドロキシ4-オキソ-3,4-ジヒドロ1,2,3-ベンゾトリアゾールなどを例示することができる。
- [0082] 活性エステル化剤、縮合剤及び/又は添加剤の組み合わせとしては、合成目的のシアロ糖鎖含有ポリマーに応じて適宜選択すれば良く、好ましい組み合わせとしては縮合剤と添加剤との組み合わせを挙げることができ、より具体的にはN-エチル-N'-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミドとN-ヒドロキシコハク酸イミドの組み合わせが好適である。
- [0083] アミノ基の保護基を脱保護したN結合型シアロ糖鎖の使用量は、目的とするシアロ糖鎖含有ポリマーの糖置換率に応じて添加すればよく、通常、 γ -ポリグルタミン酸のグルタミン酸単位に対して0.1当量以上あればよい。また、活性エステル化剤、縮合剤及び添加剤の使用量は、シアロ糖鎖の使用当量と同程度でよい。さらに、縮合反応に用いる塩基の使用量は、 γ -ポリグルタミン酸のグルタミン酸単位に対して1当量以上あればよい。
- [0084] 縮合反応は -10°C ~ 100°C で実施することができる。また必要に応じて4-N,N-ジメチルアミノピリジンなどの一般的なアシル化反応の触媒を添加してもかまわない。
- [0085] なお、 γ -ポリグルタミン酸を含水溶媒中に溶解させることで、 γ -ポリグルタミン酸のカルボキシル基を反応しやすい状態にすることができる。このため、 γ -ポリグルタミン酸を含水溶媒に溶解させる場合、シアロ糖鎖との縮合反応に必要な試薬(縮合剤)の添加量を少なくできる。具体的には、従来法ではシアロ糖鎖に対して縮合剤が3当量以上必要であったのに対し、含水溶媒を用いる本発明方法によれば使用する

縮合剤はシアロ糖鎖と同当量程度でよい。

[0086] さらに、 γ -ポリグルタミン酸のグルタミン酸単位当量以下の縮合剤と、含水溶媒中で安定な活性エステルを形成することのできる添加剤を用いて、 γ -ポリグルタミン酸を活性エステル体へと変換することで、シアロ糖鎖の副反応の原因となる縮合剤を実質的に完全に消費できる上、 γ -ポリグルタミン酸のカルボキシル基を含水溶媒中で反応しやすい状態にすることができる。よって、シアル酸のカルボキシル基が反応してしまう副反応を抑制でき、シアロ糖鎖含有ポリマーと γ -ポリグルタミン酸とを縮合させる際に過剰量の試薬を用いることによる上記不都合を回避できる。このため、製法2によればシアロ糖鎖含有ポリマーを γ -ポリグルタミン酸と縮合させることができ、製法1のようにアシアロ糖鎖をグルタミン酸と縮合させた後にシアリル化する必要がない。

[0087] (工程4)

工程4は、工程3で合成したN結合型シアロ糖鎖含有ポリマーを単離精製し、目的とするシアロ糖鎖含有ポリマーを取得する工程である。合成されたシアロ糖鎖含有ポリマーの単離精製は、通常、タンパクの精製に用いる方法で行えばよく、例えば、透析やゲルろ過などを適宜組み合わせることで単離精製することができる。

[0088] このようにして調製したN結合型シアロ糖鎖含有ポリマーのシアロ糖導入率の測定は、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルより測定することができる。例えば、シアロ糖鎖やリンカーに用いた化合物に特徴的なピークの積分値を、ポリグルタミン酸に特徴的なピークの積算値で除した値を糖導入率として利用すればよい。

[0089] (4)人工シアロ糖鎖含有ポリマーの有用性

本発明のN結合型人工シアロ糖鎖含有ポリマーは、その合成のし易さに加え、従来のO結合型シアロ糖鎖含有ポリマーの数倍のインフルエンザウイルス感染阻害活性を有することから、インフルエンザウイルス感染、インフルエンザウイルスの流行を防止する各種の手段に適用できる。例えば、マスクや空気清浄機、エアコンなどのフィルターにおけるウイルス吸着剤などの用途があげられる。さらには、ヒト感染型とトリ感染型のインフルエンザウイルスのレセプター認識の特異性の違い(レセプターのシアロ糖鎖のシアル酸結合様式の違い)から、 $\alpha 2, 3$ 型結合シアロ糖鎖含有ポリマーと

α 2, 6型結合型糖鎖含有ポリマーを基材に用いて、インフルエンザウイルスのレセプター認識特異性の解析が可能であることから、新型インフルエンザウイルスのサーベランスにも適用できる。

[0090] なお、本発明において、対象となるウイルスは、特にインフルエンザウイルスに制限されず、用いるシアロ糖鎖含有ポリマーに対応し、様々なウイルスに適用可能である。例えば、パラミクソウイルス群、パラインフルエンザウイルス群、ロタウイルス、アデノウイルス、コロナウイルス、ポリオーマウイルス等が例示される。前記インフルエンザウイルスとしては、高病原性A型トリインフルエンザウイルス、ヒトA型インフルエンザウイルスおよびヒトB型インフルエンザウイルス等が挙げられる。

実施例

[0091] つぎに、本発明の実施例について説明する。なお、本発明は、下記の実施例によって、なんら制限されない。

[0092] <材料調製法および分析方法>

(1)HPLC

サンプルはすべて0.45 μ mのフィルター濾過した後、分析した。分析条件は下記に示したものをを用いた。

カラム : Mightysil Si60 (ϕ 4.6 \times 250mm)

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

流速 : 1.0ml/min

検出波長 : 210nm

溶媒 : 90%CH₃CN

あるいは、

カラム : YMC Pro C18RS (ϕ 6.0 \times 150mm)

カラム温度 : 30 $^{\circ}$ C

流速 : 1.0ml/min

検出波長 : 210nm

溶媒 : 20%CH₃CN - 20mM KH₂PO₄

[0093] (2)NMR

分析機器 :JEOL EX-270 NMR spectrometer,
JEOL lamda 500FT NMR spectrometer
Bruker AV-500 NMR spectrometer

外部標準 :TPS[sodium3-(trimethylsilyl)-propionate]

溶媒 :D₂O

温度 :25°Cあるいは60°C

サンプル管 :φ 3または5mm

[0094] (3)酵素の調製

3-1. β 1, 4-ガラクトース転移酵素(β 1, 4-GalT)の調製

WO2007/026669の記載に従って調製した。

[0095] 3-2. ヒト β 1, 3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ(β 3GnTII)の調製

文献(Protein Expr. Purif. , 35, 54-61(2004))の記載に従って調製した。

。

[0096] 3-3. シアル酸転移酵素

(3-3-1)ラットシアル酸転移酵素

α 2, 3-シアルルトランスフェラーゼ(Rat, Recombinant, Spodoptera frugiperda)、α 2, 6-シアルルトランスフェラーゼ(Rat, Recombinant, Spodoptera frugiperda)は、Calbiochem社より購入した。

(3-3-2) α 2, 3-Sialyltransferase(α 2, 3-SiaT)の調製

WO2007/026669の記載の実施例に従って調製した。

(3-3-3) α 2, 6-Sialyltransferase (α 2, 6-SiaT)の調製

WO2007/026669の記載の実施例に従って調製した。

[0097] (4)材料(反応基質および試薬)

Lactose Monohydrate、5-amino-1-pentanolは、和光純薬(株)より、γ-PGAは、明治製菓(株)より、糖ヌクレオチド(UDP-GlcNAc, UDP-Gal, CMP-NeuAc)はヤマサ醤油(株)より、LacNAcは焼津水産(株)より購入した。Trifluoroacetic Anhydride、MnCl₂・4H₂Oは、和光純薬(株)より購入した。α-PGA

、BOP、HOBt、およびBSAは、Sigma-Aldrich社より購入した。

[0098] 使用材料の略語は以下の通りである。

pNP:p-nitrophenol

pAP:p-aminophenol

Lac:Lactose(Gal(β 1-4)Glc)

Gal:Galactose

LacNAc:N-acetyllactosamine(Gal(β 1-4)GlcNAc)

NeuAc:N-acetylneuraminic acid

GlcNAc:N-acetylglucosamine

α -PGA: α -polyglutamic acids

γ -PGA: γ -polyglutamic acids

DMSO:Dimethyl sulfoxide

DMF:Dimethyl formamide

DIEA:N,N-Diisopropylethylamine

UDP-GlcNAc \cdot 2Na:Uridine 5'-diphospho N-acetylglucosamine, disodium salt

UDP-Gal \cdot 2Na:Uridine 5'-diphospho - α -D. -galactose disodium salt

HBTU:o-(Benzotriazol-1-yl)-tetramethyluronium hexafluorophosphate

HOSu:N-hydroxysuccinimide

EDC:1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride

BOP:Benzo-triazol-1-yloxytris-(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate

HOBt:1-Hydroxybenzotriazole hydrate

PBS:10mM Phosphate buffered saline(pH7.4)

TPS:Sodium 3-(trimethylsilyl)-propionateCMP NeuAc:Cytidine-m

onophosphate N-acetylneuraminic acid

[0099] <実施例1:製法1による各種人工シアロ糖鎖含有ポリマーの合成>

まず、工程1について、末端にアミノ基とカルボキシル基を有する化合物(6-Trifluoroacetamidohexanoic acid)を合成する工程(1-A)、1-アミノ糖を合成する工程(1-B)、工程1-Aで合成したリンカー化合物と工程1-Bで合成した1-アミノ糖とを縮合させN結合型糖プライマーを合成する工程(1-C)に分けて説明する。

[0100] (1-A)6-Trifluoroacetamidohexanoic acidの合成

Methyl 6-aminohexanoate hydrochloride(10g, 55mmol)にピリジン(70ml)を加えて溶解した。これを氷冷、攪拌し、そこへ無水トリフルオロ酢酸(25ml, 180mmol)を滴下しながら添加し反応を開始した。反応開始から5分おきに薄層クロマトグラフィ(TLC:展開溶媒 クロロホルム:アセトン=9:1)で、リンモリブデン酸発色を用い反応を確認した。2時間後、TLCで原料が消失したのを確認した後、クラッシュアイスで反応液と同量程度加えて反応を停止させ、続いて飽和炭酸水素ナトリウム水溶液280mlを加えて反応液を中和した。反応液を濃縮後、アセトンを適量加え再び濃縮を行った。この操作を3回程度繰り返した。続いて、反応液をH₂Oで溶解後、分液ロートに移し、等量のクロロホルムとH₂Oで分配し、クロロホルム層を回収することで多量に存在する炭酸水素ナトリウムを除去した。次に、このクロロホルム層を濃縮し、クロロホルム:アセトン=9:1で平衡化(10ml/min)したシリカゲルカラムクロマトグラフィ(3.5×50cm)に供した。約20mlごとにカラムを通過してきた移動層をサンプリングした。溶出画分はTLC(展開溶媒 クロロホルム:アセトン=9:1)で、リンモリブデン酸発色を用い生成物を確認した。目的物は、フラクションナンバー25~56(500~1120ml)に見られた。これを濃縮し、この工程の目的物であるMethyl 6-trifluoroacetamidohexanoateを収量12.4g、収率93%で得た。

[0101] 次に、Methyl 6-trifluoroacetamidohexanoate(3.7g, 15.4mmol)を10mM borate buffer pH8.0(3000ml)に溶解した後、Porcine liver由来カルボキシルエステラーゼ(2160U, 1.2ml)を添加し、30°Cで反応を行った。反応開始から72時間後、100°Cで10分間煮沸し反応を停止した後、反応液を濃縮し、クロロホルム:アセトン=8:2で平衡化(10ml/min)したシリカゲルカラムクロマトグラフィ(

2. 0×30cm)に供した。約20ml/tubeずつ分取後、TLC(展開溶媒 クロロホルム :アセトン=8:2)で、リンモリブデン酸発色を用い、生成物を確認した。目的画分を含むフラクションナンバーNo. 5~15(100~300ml)を濃縮後、凍結乾燥し、6-T rifluoroacetamidohexanoic acidを得た(収量:3. 1g, 収率:89%)。

[0102] (1-B) 1-アミノ糖の化学合成

糖類をメタノール(MeOH)溶液に溶解させ、アンモニアガスを飽和させるか、または炭酸水素アンモニウムを溶解させ、1-アミノ糖を調製した。糖類としては、ラクトース、N-アセチルラクトサミン(LacNAc)、またはN-アセチルグルコサミンを用いた。

(1-B-1) β -Lactosylamineの化学合成

耐圧ガラス容器にラクトース(5. 0g, 0. 014mol)を入れ、95%MeOH containing 0. 5%CH₃COOH(117ml)で溶解した。続いて、反応液を氷冷後、アンモニアガスを用いて反応液をアンモニア飽和させた。アンモニア飽和後、耐圧ガラス容器の蓋をきつく閉め、攪拌しながら40°Cで反応を行った。反応開始から48時間後、エタノール(110ml)を加えて反応を停止した。次に、反応液をガラスフィルターでろ過後、エタノール(500ml)とジエチルエーテル(500ml)で順次洗浄し、白色粉末として β -Lactosylamineを収量4. 5g, 収率95%で得た。

[0103] (1-B-2) β -N-Acetyllactosaminylamineの化学合成

耐圧ガラス容器にLacNAc(1. 0g, 2. 6mmol)とammoniumbicarbonate(0. 21g, 2. 6mmol)を入れ、MeOH(8ml)で溶解した。続いて、反応液を氷冷後、アンモニアガスを用いて反応液をアンモニア飽和させた。アンモニア飽和後、耐圧ガラス容器の蓋をきつく閉め、攪拌しながら40°Cで反応を行った。反応開始から120時間後、エタノール(8ml)を加えて反応を停止した。次に、反応液をガラスフィルターでろ過後、エタノール(50ml)とジエチルエーテル(50ml)で順次洗浄し、白色粉末として β -N-Acetyllactosaminylamineを収量0. 71g, 収率71%で得た。

[0104] (1-B-3) β -N-Acetylglucoaminylamineの化学合成

N-Acetylglucosamine(5. 0g, 22. 6mmol)と炭酸水素アンモニウム(40g)を蒸留水(50ml)に溶解し、40°Cで攪拌した。反応の進行をTLC(展開溶媒AcOEt: MeOH: AcOH: H₂O=4: 3: 3: 2、アニスアルデヒドにて呈色、Rf: S. M. =0. 65

、Prod. =0.48)で確認した。原料の消失をTLCで確認後、反応溶液を冷却して過剰量の炭酸水素アンモニウムを析出させ、これをろ過することで除去した。ろ液を約10mlまで減圧下濃縮し、冷却後再び析出する炭酸水素アンモニウムをろ過により除去した。ろ液に蒸留水を加え、減圧下濃縮する操作を3回繰り返すことで、残存する炭酸水素アンモニウムを除去し、アメ状物質を得た。これを少量の蒸留水に溶解し凍結乾燥することで β -N-Acetylglucoaminyllamine白色粉末7.4gを得た。

[0105] (1-C)各種N結合型糖プライマーの化学・酵素合成

(1-C-1) N-(ϵ -Trifluoroacetamidocaproyl)- β -lactosylamineの化学合成

6-Trifluoroacetamidohexanoic acid(334mg, 1.47mmol)を有機溶媒(DMSO:2.6ml)に溶解した後、塩基(DIEA:1.3ml, 7.35mmol)と縮合剤(HBTU:557mg, 1.47mmol)を加え、5分間攪拌した。その後、あらかじめ別の容器でDMSO(5.3ml)に溶解した β -Lactosylamine(500mg, 1.47mmol)を加え、攪拌しながら室温で反応を行った。反応の経時変化はオルシノール硫酸発色法を用いてTLC(クロロホルム:メタノール:水=7:3:0.5)で分析した。反応開始から5時間後反応を終了し、クロロホルム:メタノール:水=7:3:0.5で平衡化(10ml/min)したシリカゲルカラムクロマトグラフィ(3.5×60cm)に供した。約30ml/tubeずつ分取後、TLC(展開溶媒 クロロホルム:メタノール:水=7:3:0.5)で、オルシノール硫酸発色を用い、生成物を確認した。目的画分を含むフラクションナンバー68~135(2,040~4,050ml)を濃縮後、凍結乾燥し、N結合型糖プライマーとして、N-(ϵ -Trifluoroacetamidocaproyl)- β -lactosylamineを収量685mg, 収率82%で得た。

[0106] (1-C-2)N-(ϵ -Trifluoroacetamidocaproyl)- β -N-acetyllactosaminyllamineの化学合成

6-Trifluoroacetamidohexanoic acid(41mg, 0.18mmol)をDMSO(330 μ l)に溶解した後、DIEA(160 μ l, 0.9mmol)とHBTU(68mg, 0.18mmol)を加え、5分間攪拌した。その後、あらかじめ別の容器でDMSO(660 μ l)に溶解した β -N-Acetyllactosaminyllamine(70mg, 0.18mmol)を加え、攪拌しながら

室温で反応を行った。反応の経時変化はオルシノール硫酸発色法を用いてTLC(クロロホルム:メタノール:水=7:3:0.5)で分析した。反応開始から5時間後反応を終了し、クロロホルム:メタノール:水=7:3:0.5で平衡化(10ml/min)したシリカゲルカラムクロマトグラフィ(3.5×60cm)に供した。約30ml/tubeずつ分取後、TLC(展開溶媒 クロロホルム:メタノール:水=7:3:0.5)で、オルシノール硫酸発色を用い、生成物を確認した。目的画分を含むフラクションナンバー65~90(1950~2700ml)を濃縮後、凍結乾燥し、N結合型糖プライマーとしてN-(ε-Trifluoroacetamidocaproyl)-β-N-acetyllactosaminylamineを収量81mg、収率75%で得た。

[0107] 次に述べる工程1-C-3では、上記工程1-B-3で合成した1-アミノ糖であるβ-N-Acetylglucoaminylamine(GlcNAc-NH₂)について、アミノ基を保護したリンカー化合物と縮合させてN結合型アシアロ糖鎖を得た。以下、具体的に説明する。

[0108] (1-C-3)N-(ε-Trifluoroacetamidocaproyl)-β-N-acetylglucosaminylamineの化学合成

6-Aminohexanoic acid(0.538g、4.1mmol)、Triethylamine(0.86ml、6.2mmol)にMeOH(5ml)を加え懸濁した。これにEthyl trifluoroacetate(0.75ml、6.2mmol)を滴下し、室温(約22°C)で1時間攪拌した。TLC(展開溶媒AcOEt:MeOH:AcOH:H₂O=4:3:3:2、ニンヒドリン呈色、Rf:S. M. =0.66、Prod. =none)にて原料の消失を確認後、反応溶液を減圧下濃縮した。残渣にDMFを加え減圧下濃縮する操作を3回繰り返す、残存する試薬等を除去した。残渣をDMF(40ml)に溶解し、氷浴にて0°Cに冷却後Ethyl chlorocarbonate(0.78ml、8.2mmol)、Triethylamine(1.14ml、8.2mmol)を添加した。0°Cにて10分間攪拌後、これをGlcNAc-NH₂(3.1g、8.2mmol、純度75%として算出)のDMF(40ml)懸濁液に加え、氷浴から出して徐々に室温に戻しつつ1時間攪拌した。反応溶液を再び氷浴で冷却し、蒸留水(10ml)を加え、反応を停止した後、析出した塩酸塩をろ過により除去した。ろ液を減圧下濃縮し、蒸留水により共沸操作を行うことで、残存するDMFを除去した。残渣を蒸留水にて40mlに調製し、5%アセトニトリルに

て平衡化したODSカラム(CV=200ml)に供した。流速400ml/hr、1Fr=20mlにて分取し、目的物の溶出をTLC及びHPLCにより確認し、溶出画分を回収した。回収した溶離液を減圧下濃縮後、残渣を少量の蒸留水で溶解して凍結乾燥することで、目的物であるアミノ基が保護基で保護されたN結合型アシアロ糖鎖N-(ϵ -Trifluoroacetamidocaproyl)- β -N-acetylglucosaminylamine(GlcNAc-6AHA-TFA)を収量0.63g、収率36%で得た。

[0109] 次に、上記工程1-C-1で合成したN結合型糖プライマーについて、これを糖受容体とし、糖転移酵素の存在下で糖供与体と反応させ非還元末端に糖鎖を伸長させる工程2を説明する。

[0110] (2) N-(ϵ -Trifluoroacetamidocaproyl)- β -lacto-N-neotetraosylamineの酵素合成

150mM Tris-HCl buffer(pH6.8, 5.7ml)に受容体基質となるN-(ϵ -Trifluoroacetamidocaproyl)- β -Lactosylamineを50mg(0.09mmol)、供与体基質としての糖ヌクレオチド(UDP-GlcNAc \cdot 2Na)を117mg(0.18mmol)、MnCl₂ \cdot 4H₂Oを14.5mg(0.07mmol)溶解させ、防腐剤として1%(w/v)NaN₂を0.09ml加えた後、3.3ml(250mU)の精製した糖転移酵素(β 3GnTII)を添加して37°Cで反応を行った。144時間後、供与体基質のGlcNAcの転移が100%進んだところで反応液を5分間煮沸することにより反応を停止した。次に、反応液に別の糖ヌクレオチド(UDP-Gal \cdot 2Na)を111mg(0.18mmol)加え、別の糖転移酵素(β 4GalTI) 500 μ l(950mU)を添加してGal転移反応を行った。156時間後、Gal転移が100%進んだところで反応液を5分間煮沸することにより反応を停止した。反応液を濃縮後、5%MeOHで平衡化(2.0ml/min)したODSカラムクロマトグラフィ(2.5 \times 50cm)に供した。5%MeOH(760ml)で非吸着部を溶出した後、5%(500ml)-15%(500ml)のMeOH直線濃度勾配法により20ml/tubeずつ分取後、各フラクションを210nmの吸光度で測定し、生成物を確認した。目的画分を含むフラクションナンバー28~38(560ml~760ml)を濃縮後、凍結乾燥し、非還元末端側に糖鎖を伸長させたN結合型アシアロ糖であるN-(ϵ -Trifluoroacetamidocaproyl)- β -lacto-N-neotetraosylamineを収量67mg、収率80%で得た。

[0111] 工程3については、工程1-C-1、工程1-C-3で合成したN結合型アシアロ糖鎖、および工程2で伸長反応を行って得られたN結合型アシアロ糖鎖について、保護基を脱保護する工程3-Aと、工程3-Aで脱保護処理を行ったN結合型アシアロ糖鎖を γ -ポリグルタミンと縮合させる工程3-Bに分けて説明する。

[0112] (3-A-1) N-(ϵ -Aminocaproyl)- β -lactosylamineの化学合成

工程1-C-1で合成したN-(ϵ -Trifluoroacetamidocaproyl)- β -lactosylamine (150mg, 0.27mmol)に1.0M NaOH(1.5ml)を加えて溶解し、室温で反応を開始した。反応開始から30分おきにTLC(展開溶媒 クロロホルム:メタノール:水=6:4:1)で、オルシノール硫酸発色とリンモリブデン酸発色とを用い反応を確認した。1時間後、TLCで原料が消失したのを確認したのち反応液を、水で平衡化(0.5ml/min)したSephadex G-25カラムクロマトグラフィ(2.5×55cm)に供した。約3.0mlごとにカラムを通過してきた移動層をサンプリングした。溶出画分は、TLC(展開溶媒 クロロホルム:メタノール:水=6:4:1)でリンモリブデン酸発色を用い生成物を確認した。目的物は、フラクションナンバー47~58(141ml~174ml)に見られた。これを濃縮し、この工程の目的物であるN-(ϵ -Aminocaproyl)- β -lactosylamineを収量123mg、収率99%で得た。

[0113] (3-A-2) N-(ϵ -Aminocaproyl)- β -N-acetyllactosaminylamineの化学合成

工程1-C-3で得られたN-(ϵ -Trifluoroacetamidocaproyl)- β -N-acetyllactosaminylamine(160mg, 0.27mmol)に1.0M NaOH(1.6ml)を加えて溶解し、室温で反応を開始した。反応開始から30分おきにTLC(展開溶媒 クロロホルム:メタノール:水=6:4:1)で、オルシノール硫酸発色とリンモリブデン酸発色とを用い反応を確認した。1時間後、TLCで原料が消失したのを確認したのち反応液を、水で平衡化(0.5ml/min)したSephadex G-25カラムクロマトグラフィ(2.5×55cm)に供した。約3.0mlごとにカラムを通過してきた移動層をサンプリングした。溶出画分は、TLC(展開溶媒 クロロホルム:メタノール:水=6:4:1)でリンモリブデン酸発色を用い生成物を確認した。目的物は、フラクションナンバー45~56(135ml~168ml)に見られた。これを濃縮し、この工程の目的物であるN-(ϵ -Aminocaproyl)- β -N-acetyllactosaminylamineを収量123mg、収率99%で得た。

nocaproyl) - β - N - acetyllactosaminylamineを収量123mg、収率92%で得た。

[0114] (3-A-3) N-(ϵ -Aminocaproyl)- β -lacto-N-neotetraosylamine
の化学合成

工程2で得られたN-(ϵ -Trifluoroacetamidocaproyl)- β -lacto-N-neotetraosylamine(45mg, 0.05mmol)に1.0M NaOH(1.0ml)を加えて溶解し、室温で反応を開始した。反応開始から30分おきにTLC(展開溶媒 クロロホルム:メタノール:水=6:4:1)で、オルシノール硫酸発色とリンモリブデン酸発色とを用い反応を確認した。1時間後、TLCで原料が消失したのを確認したのち反応液を、水で平衡化(0.5ml/min)したSephadex G-25カラムクロマトグラフィ(2.5×55cm)に供した。約3.0mlごとにカラムを通過してきた移動層をサンプリングした。溶出画分は、TLC(展開溶媒 クロロホルム:メタノール:水=6:4:1)でリンモリブデン酸発色を用い生成物を確認した。目的物は、フラクションナンバー50~61(150ml~183ml)に見られた。これを濃縮し、目的物であるN-(ϵ -Aminocaproyl)- β -lacto-N-neotetraosylamineを収量40mg、収率99%で得た。

[0115] (3-B-1) Poly[N-(ϵ -aminocaproyl)- β -lactosylamine/ γ -PGA]
の合成

γ -PGA(M. W. :990000, 30.0mg)を100mM Na₂CO₃/NaHCO₃ pH10.0(3.6ml)に溶解後、予めDMSO(10.9ml)に溶解しておいた縮合剤(BOP:298mg)、および添加剤(HOBt:29.5mg)を加えスターラーで攪拌した。最後に工程3-A-1で得られたN-(ϵ -Aminocaproyl)- β -lactosylamine(45.1mg)を100mM Na₂CO₃/NaHCO₃ pH10.0(1.8ml)に溶解後、添加し、攪拌しながら室温で24時間反応を行った。反応終了後、反応液が17.5mlになるようにPBSを添加した。その後、PD-10カラム1本あたり2.5mlの反応液をPBSで平衡化したPD-10(1.7×5.0cm, Sephadex G-25)カラムに供し、3.5mlのPBSでPoly[N-(ϵ -aminocaproyl)- β -lactosylamine/ γ -PGA]を溶出した。次にこの画分を2.5Lの超純水に対して3日間透析した。その間、超純水の交換を6回行った。透析後、濃縮し、凍結乾燥した。次に、これを¹H-NMRによる構造解析

に供し、糖置換度を算出した。糖残基置換度

(%)の計算は¹H-NMRより、 γ -PGAの β および γ 位プロトンとN-(ϵ -aminocaproyl)- β -lactosylamineのアグリコン部の α 位のプロトン2個分の積分比の和(A)とN-(ϵ -aminocaproyl)- β -lactosylamineのアグリコン部位のプロトン6個分の積分比(B)を以下に示す式にあてはめ算出した。その結果、糖残基置換度31%のPoly[N-(ϵ -aminocaproyl)- β -lactosylamine/ γ -PGA)]を収量34.3mgで得た。

(計算式)

$$\frac{4 \times 100}{A - 2(B/6)}$$

[0116] (3-B-2) Poly[N-(ϵ -aminocaproyl)- β -N-acetyllactosaminylamine/ γ -PGA)]

γ -PGA (M. W. : 990000, 30.0mg) を100mM Na₂CO₃/NaHCO₃ pH10.0 (3.6ml) に溶解後、予めDMSO (10.9ml) に溶解しておいたBOP (298mg)、HOBt (29.5mg) を加えスターラーで攪拌した。最後に工程3-A-2で得られたN-(ϵ -Aminocaproyl)- β -N-acetyllactosaminylamine (49.3mg) を100mM Na₂CO₃/NaHCO₃ pH10.0 (1.8ml) に溶解後、添加し、攪拌しながら室温で24時間反応を行った。反応終了後、反応液が17.5mlになるようにPBSを添加した。その後、PD-10カラム1本あたり2.5mlの反応液をPBSで平衡化したPD-10 (1.7×5.0cm, Sephadex G-25) カラムに供し、3.5mlのPBSでPoly[N-(ϵ -aminocaproyl)- β -N-acetyllactosaminylamine/ γ -PGA)] を溶出した。次にこの画分を2.5Lの超純水に対して3日間透析した。その間、超純水の交換を6回行った。透析後、濃縮し、凍結乾燥した。次に、これを¹H-NMRによる構造解析に供し、糖置換度を算出した。糖残基置換度(%)の計算は¹H-NMRより、 γ -PGAの β および γ 位プロトンとN-(ϵ -aminocaproyl)- β -N-acetyllactosaminylamineのアグリコン部の α 位のプロトン2個分およびN-アセチル基に由来するプロトン3個分の積分比の和(A)とN-(ϵ -aminocaproyl)- β -N-acetyllactosaminylamineのアグリコン部位のプロトン6個分の積分比(B)を以下に

示す式にあてはめ算出した。その結果、糖残基置換度32%のPoly[N-(ϵ -aminocaproyl)- β -N-acetyllactosaminylamine/ γ -PGA)]を収量36.6mgで得た。

(計算式)

$$\frac{4 \times 100}{A - 5(B/6)}$$

[0117] (3-B-3) Poly[N-(ϵ -aminocaproyl)- β -lacto-N-neotetraosylamine/ γ -PGA)]

γ -PGA (M. W. : 990000, 12.0mg) を 100mM $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ pH10.0 (1.4ml) に溶解後、予め DMSO (4.4ml) に溶解しておいた BOP (94.7mg)、HOBt (11.8mg) を加えスターラーで攪拌した。最後に工程 3-A-3 で得られた N-(ϵ -Aminocaproyl)- β -lacto-N-neotetraosylamine (32.6mg) を 100mM $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ pH10.0 (0.7ml) に溶解後、添加し、攪拌しながら室温で 24 時間反応を行った。反応終了後、反応液が 7.5ml になるように PBS を添加した。その後、PD-10 カラム 1 本あたり 2.5ml の反応液を PBS で平衡化した PD-10 (1.7×5.0cm, Sephadex G-25) カラムに供し、3.5ml の PBS で Poly[N-(ϵ -aminocaproyl)- β -lacto-N-neotetraosylamine/ γ -PGA)] を溶出した。次にこの画分を 2.5L の超純水に対して 3 日間透析した。その間、超純水の交換を 6 回行った。透析後、濃縮し、凍結乾燥した。次に、これを $^1\text{H-NMR}$ による構造解析に供した。次に、これを $^1\text{H-NMR}$ による構造解析に供し、糖置換度を算出した。糖残基置換度 (%) の計算は $^1\text{H-NMR}$ より、 γ -PGA の β および γ 位プロトンと N-(ϵ -aminocaproyl)- β -lacto-N-neotetraosylamine のアグリコン部の α 位のプロトン 2 個分および N-アセチル基に由来するプロトン 3 個分の積分比の和 (A) と N-(ϵ -aminocaproyl)- β -lacto-N-neotetraosylamine のアグリコン部位のプロトン 6 個分の積分比 (B) を以下に示す式にあてはめ算出した。その結果、糖残基置換度 32% の Poly[N-(ϵ -aminocaproyl)- β -lacto-N-neotetraosylamine/ γ -PGA)] を収量 19.6mg で得た。

(計算式)

$$\frac{4 \times 100}{A - 5(B/6)}$$

A-5(B/6)

[0118] 最後に工程4として、工程3で合成された3種類のアシアロ糖鎖含有ポリマーをシアリル化してN結合型シアロ糖鎖含有ポリマーを合成する工程について説明する。工程4では公知の方法に従い、CMPシアル酸および糖転移酵素を用いる酵素反応により、アシアロ糖鎖含有ポリマーへのシアル酸導入を行った。

[0119] (4-1) Poly[Neu5Ac α 2-3lactosylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl) / γ -PGA]

受容体基質として工程(3-B-1)で合成したPoly[N-(ϵ -aminocaproyl) - β -lactosylamine / γ -PGA)]_[31%, 1800kDa] 7. 1mgをlactose-単位当たり8. 0mM、供与体基質としてCMPシアル酸(CMP-Neu5Ac) 16. 0mM、MnCl₂ 2. 5mM、牛血清アルブミン(BSA) 0. 1%、MOPS buffer(pH7. 4) 50mMとなるよう反応液を調製した。次に、反応液に対し10U/mlのアルカリフォスファターゼおよび40mU/mlのラット α 2, 3-(N)-シアリルトランスフェラーゼを添加し、37°Cで48時間反応を行った。続いて、この反応液を工程(3-B-1)と同様の方法で処理した。シアリル化率は¹H-NMRより、N-(ϵ -aminocaproyl) - β -lactosylamineのGlcの1位のプロトン1個分の積分比(A)と、Neu5Acに特徴的な3位エクアトリアルプロトンおよびアキシアルプロトンの積分比(B, B')を以下に示す式にあてはめ算出した。その結果、シアリル化率100%のPoly[Neu5Ac α 2-3lactosylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl) / γ -PGA]を収量8. 4mgで得た。

(計算式)

$$\frac{(B+B') / 2 \times 100}{A / 1}$$

[0120] (4-2) Poly[Neu5Ac α 2-3-N-acetyllactosaminylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl) / γ -PGA]

受容体基質として工程(3-B-2)で合成したPoly[N-(ϵ -aminocaproyl) - β -N-acetyllactosaminylamine / γ -PGA)]_[32%, 1900kDa] 7. 0mgをLacN Ac-単位当たり8. 0mM、供与体基質としてCMP-Neu5Ac 16. 0mM、MnCl₂

2. 5mM、BSA 0.1%、MOPS buffer(pH7.4)50mMとなるよう調製した。次に、反応液に対し10U/mlのアルカリフォスファターゼおよび40mU/mlのラット α 2,3-(N)-シアリルトランスフェラーゼを添加し、37°Cで48時間反応を行った。続いて、この反応液を工程(3-B-2)と同様の方法で処理した。シアリル化率は $^1\text{H-NMR}$ より、 $\text{N}-(\epsilon\text{-aminocaproyl})-\beta\text{-N-acetyllactosaminylamine}$ のGlcNAcの1位のプロトン1個分の積分比(A)と、Neu5Acに特徴的な3位エクアトリアルプロトンの積分比(B)を以下に示す式にあてはめ算出した。その結果、シアリル化率が約100%のPoly[Neu5Ac α 2-3-N-acetyllactosaminylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA]を収量7.9mgで得た。

(計算式)

$$\frac{B \times 100}{A / 1}$$

[0121] (4-3) Poly[Neu5Ac α 2-3lacto-N-neotetraosylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA]

受容体基質として工程(3-B-3)で合成したPoly[N-(ϵ -aminocaproyl)- β -lacto-N-neotetraosylamine/ γ -PGA]_[32%, 2600kDa] 5.1mgをLNnT-単位当たり8.0mM、供与体基質としてCMP-Neu5Ac 16.0mM、 MnCl_2 2.5mM、BSA

0.1%、MOPS buffer(pH7.4)50mMとなるよう調製した。次に、反応液に対し10U/mlのアルカリフォスファターゼおよび40mU/mlの α 2,3-(N)-シアリルトランスフェラーゼを添加し、37°Cで48時間反応を行った。続いて、この反応液を工程(3-B-3)と同様の方法で処理した。シアリル化率は $^1\text{H-NMR}$ より、 $\text{N}-(\epsilon\text{-aminocaproyl})-\beta\text{-lacto-N-neotetraosylamine}$ のGlcの1位のプロトン1個分の積分比(A)と、Neu5Acに特徴的な3位エクアトリアルプロトンおよびアキシアルプロトンの積分比(B, B')を以下に示す式にあてはめ算出した。その結果、シアリル化率が約100%のPoly[Neu5Ac α 2-3lacto-N-neotetraosylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA]を収量5.2mgで得た。

(計算式)

$$\frac{(B+B')}{2} \times 100$$

$$A / 1$$

[0122] (4-4) Poly[Neu5Ac α 2-6lactosylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl) / γ -PGA]

酵素を代え、工程4-1と同様の操作を行った。具体的には受容体基質として工程(3-B-1)で合成したPoly[N-(ϵ -aminocaproyl) - β -lactosylamine / γ -PGA]_[31%, 1800kDa] 7. 0mgをlactose-単位当たり8. 0mM、供与体基質としてCMP-Neu5Ac 16. 0mM、MnCl₂ 2. 5mM、BSA 0. 1%、MOPS buffer (pH7. 4) 50mMとなるよう調製した。次に、反応液に対し10U/mlのアルカリフォスファターゼおよび40mU/mlの α 2, 6-(N)-シアリルトランスフェラーゼを添加し、37°Cで48時間反応を行った。続いて、この反応液を工程(3-B-1)と同様の方法で処理した。シアリル化率は¹H-NMRより、N-(ϵ -aminocaproyl) - β -lactosylamineのGlcの1位のプロトン1個分の積分比(A)と、Neu5Acに特徴的な3位エクアトリアルプロトンおよびアキシアルプロトンの積分比(B, B')を以下に示す式にあてはめ算出した。その結果、シアリル化率71%のPoly[Neu5Ac α 2-6lactosylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl) / γ -PGA]を収量7. 2mgで得た。

(計算式)

$$\frac{(B+B')}{2} \times 100$$

$$A / 1$$

[0123] (4-5) Poly[Neu5Ac α 2-6-N-acetyllactosaminylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl) / γ -PGA]

酵素を代え、工程4-2と同様の操作を行った。具体的には受容体基質として工程(3-B-2)で合成したPoly[N-(ϵ -aminocaproyl) - β -N-acetyllactosaminylamine / γ -PGA]_[32%, 1900kDa] 7. 0mgをLacNAc-単位当たり8. 0mM、供与体基質としてCMP-Neu5Ac 16. 0mM、MnCl₂ 2. 5mM、BSA 0. 1%、MOPS buffer (pH7. 4) 50mMとなるよう調製した。次に、反応液に対し10U/mlのアルカリフォスファターゼおよび40mU/mlのラット α 2, 6-(N)-シアリルトランスフェラーゼを添加し、37°Cで48時間反応を行った。続いて、この反応液を

工程(3-B-2)と同様の方法で処理した。シアリル化率は¹H-NMRより、N-(ε-aminocaproyl)-β-lactosylamineのGlcNAcの1位のプロトン1個分の積分比(A)と、Neu5Acに特徴的な3位エクアトリアルプロトンおよびアキシアルプロトンの積分比(B, B')を以下に示す式にあてはめ算出した。その結果、シアリル化率が約100%のPoly[Neu5Ac α 2-6-N-acetyllactosaminylamine β-N-(ε-aminocaproyl)/γ-PGA]を収量7.9mgで得た。

(計算式)

$$\frac{(B+B')}{2 \times 100} \\ A/1$$

[0124] (4-6) Poly[Neu5Ac α 2-6-lacto-N-neotetraosylamine β-N-(ε-aminocaproyl)/γ-PGA]

酵素を代え、工程4-3と同様の操作を行った。具体的には受容体基質として工程(3-B-3)で合成したPoly[N-(ε-aminocaproyl)-β-lacto-N-neotetraosylamine/γ-PGA]_[32%, 2600kDa] 5.1mgをLNnT-単位当たり8.0mM、供与体基質としてCMP-Neu5Ac 16.0mM、MnCl₂ 2.5mM、BSA 0.1%、MOPS buffer(pH7.4)50mMとなるよう調製した。次に、反応液に対し10U/mlのアルカリフォスファターゼおよび40mU/mlのα 2, 6-(N)-シアリルトランスフェラーゼを添加し、37°Cで48時間反応を行った。続いて、この反応液を工程(3-B-3)と同様の方法で処理した。シアリル化率は¹H-NMRより、N-(ε-aminocaproyl)-β-lacto-N-neotetraosylamineのGlcの1位のプロトン1個分の積分比(A)と、Neu5Acに特徴的な3位エクアトリアルプロトンおよびアキシアルプロトンの積分比(B, B')を以下に示す式にあてはめ算出した。その結果、シアリル化率が約100%のPoly[Neu5Ac α 2-6-lacto-N-neotetraosylamine β-N-(ε-aminocaproyl)/γ-PGA]を収量5.4mgで得た。

(計算式)

$$\frac{(B+B')}{2 \times 100} \\ A/1$$

[0125] <実施例2:製法2による人工シアロ糖鎖含有ポリマーの合成>

(1)N-(ϵ -Trifluoroacetamidocaproyl)- β -N-acetylglucosaminylamineの合成

実施例2の工程1として、実施例1の工程(1-C-3)記載と同じ方法で、アミノ基が保護されたリンカー化合物と1-アミノ糖とを縮合させ、N-(ϵ -Trifluoroacetamidocaproyl)- β -N-acetylglucosaminylamine(GlcNAc-6AHA-TFA)を調製した。

[0126] (2)N-(ϵ -aminocaproyl)- β -neu5Ac- α 2,6-N-acetyllactosaminylamine(α 2,6-SLN-6AHA)の合成

工程2では、前記工程(1)で調製したN結合型シアロ糖鎖(GlcNAc-6AHA-THA)をシアリル化してシアロ糖鎖部を合成した後(工程2-1)、これを精製した(工程2-2)。以下、具体的に説明する。

[0127] (2-1)シアロ糖鎖部の合成

前記工程(1)で調製したGlcNAc-6AHA-TFA 420mg(1.04mmol)、20mM塩化マグネシウム、7.5mM UDP-Gal、0.1U/ml反応液アルカリフォスファターゼを含有する100mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)190mlにH. influenzae由来 β 1,4-ガラクトース転移酵素を0.16U/ml反応液になるように添加し、37°Cにて振とうしながら反応を開始した。反応開始26時間後、沸騰湯浴中に反応液を移し、内液を80°Cに達温させることで β 1,4-ガラクトース転移酵素反応を停止させた。熱処理した β 1,4-ガラクトース転移酵素反応液を十分に放冷した後、7.5mM CMP-NeuAc、50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)分を更に添加し、続いて0.1U/ml反応液になるようにP. damselaе由来 α 2,6-シアル酸転移酵素を添加し、37°Cで振とうしながらシアリル化反応を開始した。反応開始17時間後、沸騰浴中に反応液を移し、内液を80°Cに達温させることで α 2,6-シアル酸転移酵素反応を停止させ、非還元末端側にシアロ糖鎖部を有するN結合型シアロ糖鎖(α 2,6-SLN-6AHA-TFA)を合成した。

[0128] (2-2)N結合型シアロ糖鎖の精製

以上の手順で合成したN結合型シアロ糖鎖を以下の手順により精製した。まず、工程(2-1)の反応停止液を放冷後、遠心分離(20,000g \times 10min)し、さらに得られ

た上清を0.45 μ mフィルターろ過することで、残渣を完全に取り除き、上清画分を回収した。これを50mM炭酸水素アンモニウムで平衡化したODSカラム(200ml)に通液し α 2,6-SLN-6AHA-TFAを吸着させた後、続いて50mM炭酸水素アンモニウムで洗浄を行うことで、核酸、糖等の親水性物質を除去した。10%メタノールを含有する炭酸水素アンモニウムで吸着剤に吸着した α 2,6-SLN-6AHA-TFAを溶出した後、これをエバポレーター濃縮乾固、水共沸を行うことで含有する炭酸水素アンモニウムを除去した。上記手順で調製した α 2,6-SLN-6AHA-TFA乾固物を蒸留水で50mlに溶解した後、DEAEカラム(50ml、炭酸水素型)に通液することで、 α 2,6-SLN-6AHA-TFAをカラムに吸着させた。このカラムを蒸留水で洗浄することで残存していたアシアロ糖鎖を取り除いた後、50mM炭酸水素アンモニウムを通液することでカラムに吸着された α 2,6-SLN-6AHA-TFAを溶出させた。

[0129] (3-1)保護基の脱保護

α 2,6-SLN-6AHA-TFAは、アミノ酸を保護する保護基(TFA基)を持つことから、ポリグルタミン酸との縮合反応を行う前に、保護基を脱保護した。具体的には、上記操作で得られた α 2,6-SLN-6AHA-TFAを減圧下濃縮することにより乾固させた後、1M NaOHで溶解、室温で1時間攪拌することで α 2,6-SLN-6AHA-TFA中のTFA基を外した。

[0130] 脱TFA化液を0.5M塩酸で中和した後、50mM炭酸水素アンモニウムで平衡化したSephadexG-25カラム(1.6 \times 100cm)に通過させた。糖を含有する画分は、分画した画分をTLC上にスポットし、これをアニスアルデヒド呈色することで確認し、得られた糖含有画分を回収した。これを減圧下濃縮、乾固し、メタノール共沸を行った後、50 $^{\circ}$ C、2時間減圧乾燥することで、保護基を外したN結合型シアロ糖鎖(α 2,6-SLN-6AHA)のアンモニウム塩を357mg(0.48mmol)回収した。

[0131] (3-2) Poly[Neu5Ac α 2,6-N-acetyllactosaminylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl) / γ -PGA] (α 2,6-SLN-6AHA / γ -PGA) の合成

次に、工程3-1で得られた(α 2,6-SLN-6AHA)のアンモニウム塩と γ -ポリグルタミン酸とを縮合させた。具体的には γ -PGA(4.3mg、0.033mmol as Gl

u)に蒸留水0.05ml、DMF 0.45mlを加え均一な溶液とし、氷浴中で0°Cに冷却した。 γ -PGA溶液に縮合剤としてHOSu:1.4mg、0.012mmol)、EDC(2.6mg、0.013mmol)を加え0°Cで2時間攪拌した。続いて反応溶液に α 2,6-SLN-6AHA(11.2mg、0.013mmol)、Triethylamine(13.8 μ L、0.1mmol)を加え25°Cで9時間攪拌し、Poly[Neu5Ac α 2,6-N-acetyllactosaminylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA](α 2,6-SLN-6AHA/ γ -PGA)を合成した。反応液を0°Cに冷却後1.0M NaOH水溶液0.5mlを添加し、0°Cで30分間攪拌して反応を停止した。

[0132] (4) Poly[Neu5Ac α 2,6-N-acetyllactosaminylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA](α 2,6-SLN-6AHA/ γ -PGA)の単離

1.0M AcOH水溶液を用いて上記反応液をpH7に調整し、これを透析チューブに入れ、蒸留水(1,000ml \times 7)にて透析を行った。透析チューブ内の溶液を回収し、イオン交換カラム(Dowex AG 50W-8X, Na form, CV=2ml)へ通液しNa塩へと変換した。回収液を減圧下濃縮し、残渣を少量の蒸留水に溶解し、凍結乾燥することで、 α 2,6-SLN-6AHA/ γ -PGAの白色粉末を12.2mg得た。得られた α 2,6-SLN-6AHA/ γ -PGAについて、 1 H-NMR分析を行い、下記式に基づき糖残基置換度(DS)を求めた結果、37%と算出された。

$$DS = A / (B - A / 2 - 3A / 4 - 3C \times 3A / 4)$$

$$A = 1.5 \text{ ppm} : 6\text{AHA} (2\text{CH}_2)$$

$$B = 1.8 \sim 2.5 \text{ ppm} : (\gamma\text{-PGA} (2\text{CH}_2) + \text{Ac}(\text{GlcNAc}) + \text{Ac}(\text{NeuAc}) + 6\text{AHA} (\text{CH}_2))$$

$$C = 2.7 \text{ ppm} : \text{NeuAc} (2-\text{CH}')$$

[0133] 実施例3: A型インフルエンザウイルスを用いた各種人工糖鎖含有ポリペプチドの赤血球凝集阻害試験

赤血球凝集活性測定用マイクロプレートを氷上に置き、各ウエルに0.01% gelatine含有PBSを25 μ lずつ加えた。次に、実施例1の工程3-Bで調製された3種類の人工シアロ糖鎖含有ポリペプチドおよび工程4で調製された6種類の人工シアロ糖鎖含有ポリマーを0.01% gelatin含有PBSに溶解させ、各々25 μ l

をNo.1のウエルに加え、No. 2のウエルから連続2倍希釈となるように調製する。続いて、試料を希釈した各ウエルにPBSで懸濁したインフルエンザウイルス(Human strain:A/Aichi/2/28(H3N2), 感染価 2^{20} HAU、Avian strain:A/Duck/HongKong/313/4/76(H5N2), 感染価 2^{17} HAU)(それぞれ 2^2 HAU)を $25\mu\text{l}$ ずつ加え、マイクロプレートミキサーで数秒間攪拌後、 4°C で1時間静置した。この各ウエルに0.6%(v/v)モルモット赤血球含有PBS懸濁液を $50\mu\text{l}$ ずつ加え、マイクロプレートミキサーで数秒間攪拌後、 4°C で2時間静置した。最後に赤血球凝集像を観察しHI活性(Hemagglutination inhibition activity)を求めた。HI活性はインフルエンザウイルスの完全凝集阻止が認められる試料の最高希釈濃度で表した。

[0134] [表1]

表1. インフルエンザウイルスを用いた人工シアロ糖鎖ポリマーの赤血球凝集阻害試験

glycopolypeptides	HI activity IC ₅₀ (nM)	
	A/Aichi/2/68	A/Duck/HK/313/4/78
	(H3N2)	(H5N3)
γ -PGA ^a	>200	>200
Poly[N-(ϵ -aminocaproyl)- β -lactosylamine/ γ -PGA]	>200	>200
Poly[N-(ϵ -aminocaproyl)- β -N-acetylactosaminylamine/ γ -PGA]	>200	>200
Poly[N-(ϵ -aminocaproyl)- β -lacto-N-neotetraosylamine/ γ -PGA]	>200	>200
Poly (Neu5Ac α 2-3lactosylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA)	37.5	37.5
Poly (Neu5Ac α 2-3-N-acetylactosaminylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA)	37.5	37.5
Poly (Neu5Ac α 2-3-lacto-N-neotetraosylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA)	18.8	37.5
Poly (Neu5Ac α 2-6lactosylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA)	4.7	>200
Poly (Neu5Ac α 2-6-N-acetylactosaminylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA)	1.2	>200
Poly (Neu5Ac α 2-6-lacto-N-neotetraosylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA)	0.29	>200

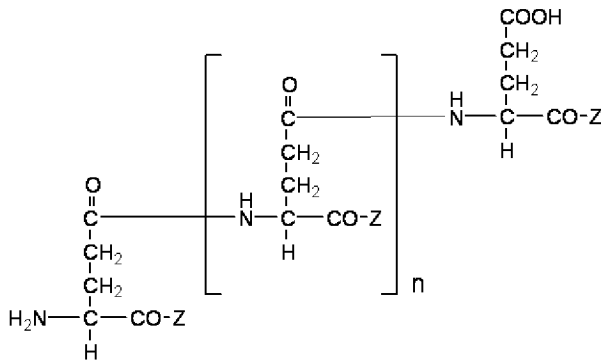
表1から明らかのように、実施例1で調製されたN-結合型のPoly (Neu5Ac α 2-6-LacNAc β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA) (表1の下から2つめの化合物)は、文献(Bioorg. Med. Chem., 15, 1383-1393(2007))で報告されている従来の糖鎖部分の構造は同じであるO-結合型人工シアロ糖鎖含有ポリマー(Poly (Neu5Ac α 2-6LacNAc β -5-aminopentyl/ γ -PGA)の数倍のヒトインフルエンザウイルス感染阻害活性を示しており、またPoly[Neu5Ac α 2-6lacto-

N-neotetraosylamine β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA] (表1の最下部の化合物)は、Poly[Neu5Ac α 2-6-LacNAc β -N-(ϵ -aminocaproyl)/ γ -PGA]のさらに数倍高いヒトインフルエンザウイルス感染阻害活性を示した。

請求の範囲

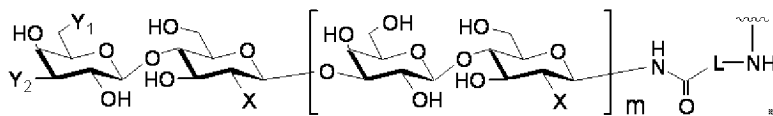
- [1] 下記構造式(I)で表され、 γ -ポリグルタミン酸に、一方の末端にアミノ基を有し他方の末端にカルボキシル基を有する化合物をリンカーとしてシアロ糖鎖を結合させたN結合型シアロ糖鎖含有ポリマー。

式(I)



(式(I)中、Zは水酸基又は式(II)で表される残基を意味し、nは10以上の整数を示す。ただし、いずれか1以上のZは式(II)で表される残基である。)

式(II)



(式(II)中、Xは水酸基又はアセチルアミノ基、 Y_1 及び Y_2 は水酸基又はN-アセチルノイラミン酸残基、Lは炭化水素を意味し、mは0又は1もしくは2の整数を示す。ただし、 Y_1 と Y_2 は同一でない。)

- [2] 前記リンカーが、 ω -アミノ酸である請求項1に記載のN結合型シアロ糖鎖含有ポリマー。
- [3] 前記Lで表される炭化水素が、炭素数1~30のものである請求項1に記載のN結合型シアロ糖鎖含有ポリマー。
- [4] 前記Lで表される炭化水素が、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、シクロアルキル置換アルキル基もしくはそれらを2個以上アミド結合で縮合させたものである請求項1に記載のN結合型シアロ糖鎖含有ポリマー。
- [5] 糖の還元末端の1位をアミノ化した1-アミノ糖に、アミノ基とカルボキシル基をそれぞれの末端に有する化合物をリンカーとしてアミド結合させ、非還元末端側にアシア

ロ糖鎖部を有するN結合型アシアロ糖鎖を得る工程と、

前記N結合型アシアロ糖鎖を、このN結合型アシアロ糖鎖の還元末端に結合されている前記リンカーのアミノ基を介してポリグルタミン酸のカルボキシル基側鎖に縮合させアシアロ糖鎖含有ポリマーを合成する工程と、

前記アシアロ糖鎖含有ポリマーをシアリル化してN結合型シアロ糖鎖含有ポリマーを得る工程と、を含むN結合型シアロ糖鎖含有ポリマーの製造方法。

- [6] 前記リンカーが、 ω -アミノ酸である請求項5に記載のN結合型シアロ糖鎖含有ポリマーの製造方法。
- [7] 前記リンカーが含む炭化水素が、炭素数1~30のものである請求項5に記載のN結合型シアロ糖鎖含有ポリマーの製造方法。
- [8] 前記リンカーが含む炭化水素が、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、シクロアルキル置換アルキル基もしくはそれらを2個以上アミド結合で縮合させたものである請求項5に記載のN結合型シアロ糖鎖含有ポリマーの製造方法。
- [9] 糖の還元末端の1位をアミノ化した1-アミノ糖に、アミノ基とカルボキシル基をそれぞれの末端に有する化合物をリンカーとしてアミド結合させ、非還元末端側にアシアロ糖鎖部を有するN結合型アシアロ糖鎖を得る工程と、
前記N結合型アシアロ糖鎖をシアリル化して、非還元末端側にシアロ糖鎖部が合成されたN結合型シアロ糖鎖を得る工程と、
前記N結合型シアロ糖鎖を、このN結合型シアロ糖鎖の還元末端に結合されている前記リンカーのアミノ基を介してポリグルタミン酸のカルボキシル基側鎖に縮合させシアロ糖鎖含有ポリマーを合成する工程と、を含むN結合型シアロ糖鎖含有ポリマーの製造方法。
- [10] 水又は緩衝液と有機溶媒とを含む混合溶媒に γ -ポリグルタミン酸を溶解させ、カルボキシル基の活性エステル化剤、縮合剤及び/又は添加剤を用いて前記 γ -ポリグルタミン酸を活性化した後、前記N結合型シアロ糖鎖と縮合させる請求項9に記載のN結合型シアロ糖鎖含有ポリマーの製造方法。
- [11] 前記リンカーが、 ω -アミノ酸である請求項9に記載のN結合型シアロ糖鎖含有ポリ

マーの製造方法。

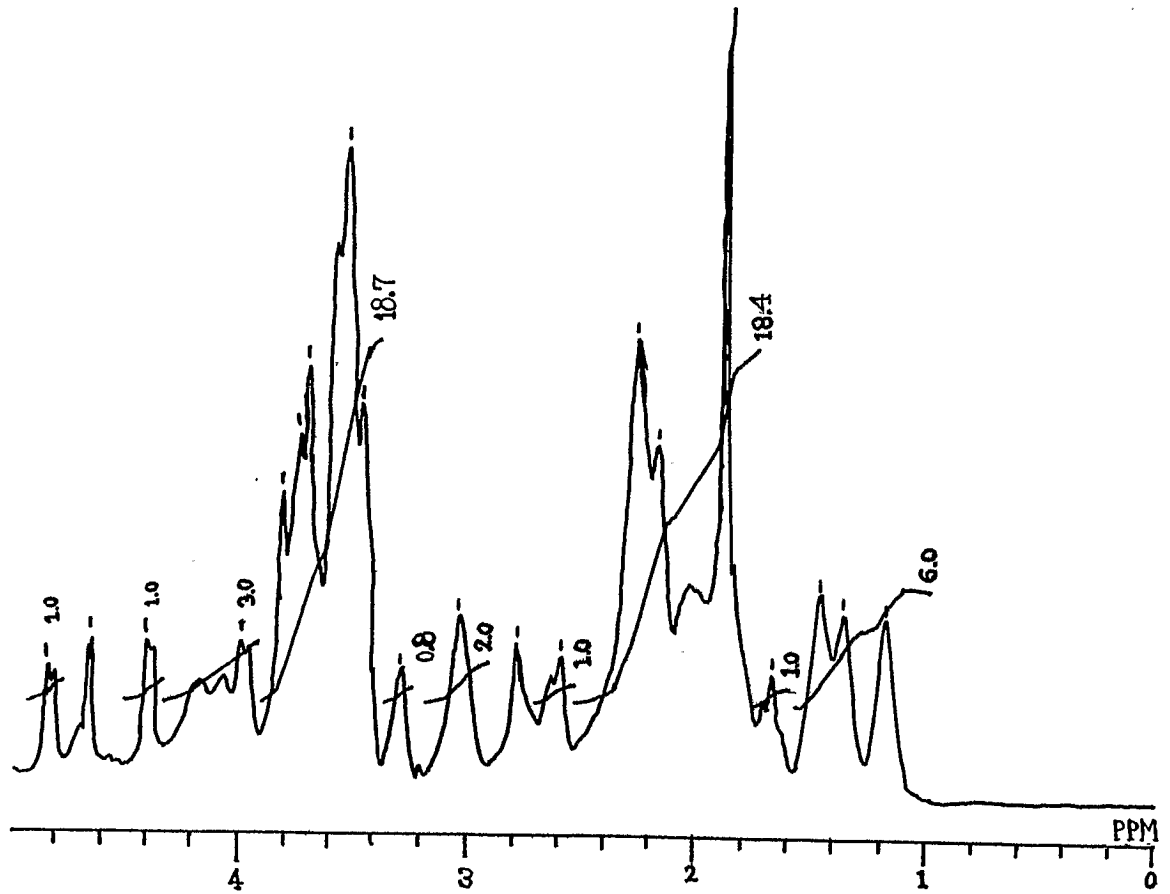
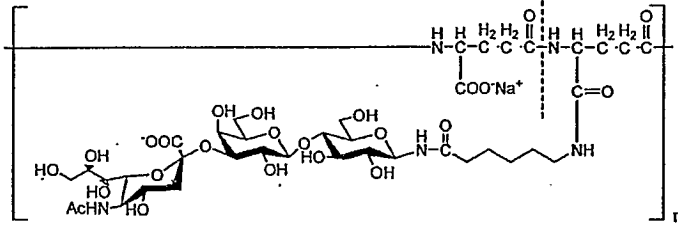
- [12] 前記リンカーが含む炭化水素が、炭素数1～30のものである請求項9に記載のN結合型シアロ糖鎖含有ポリマーの製造方法。
- [13] 前記リンカーが含む炭化水素が、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基、シクロアルキル置換アルキル基もしくはそれらを2個以上アミド結合で縮合させたものである請求項9に記載のN結合型シアロ糖鎖含有ポリマーの製造方法。

補正された請求の範囲

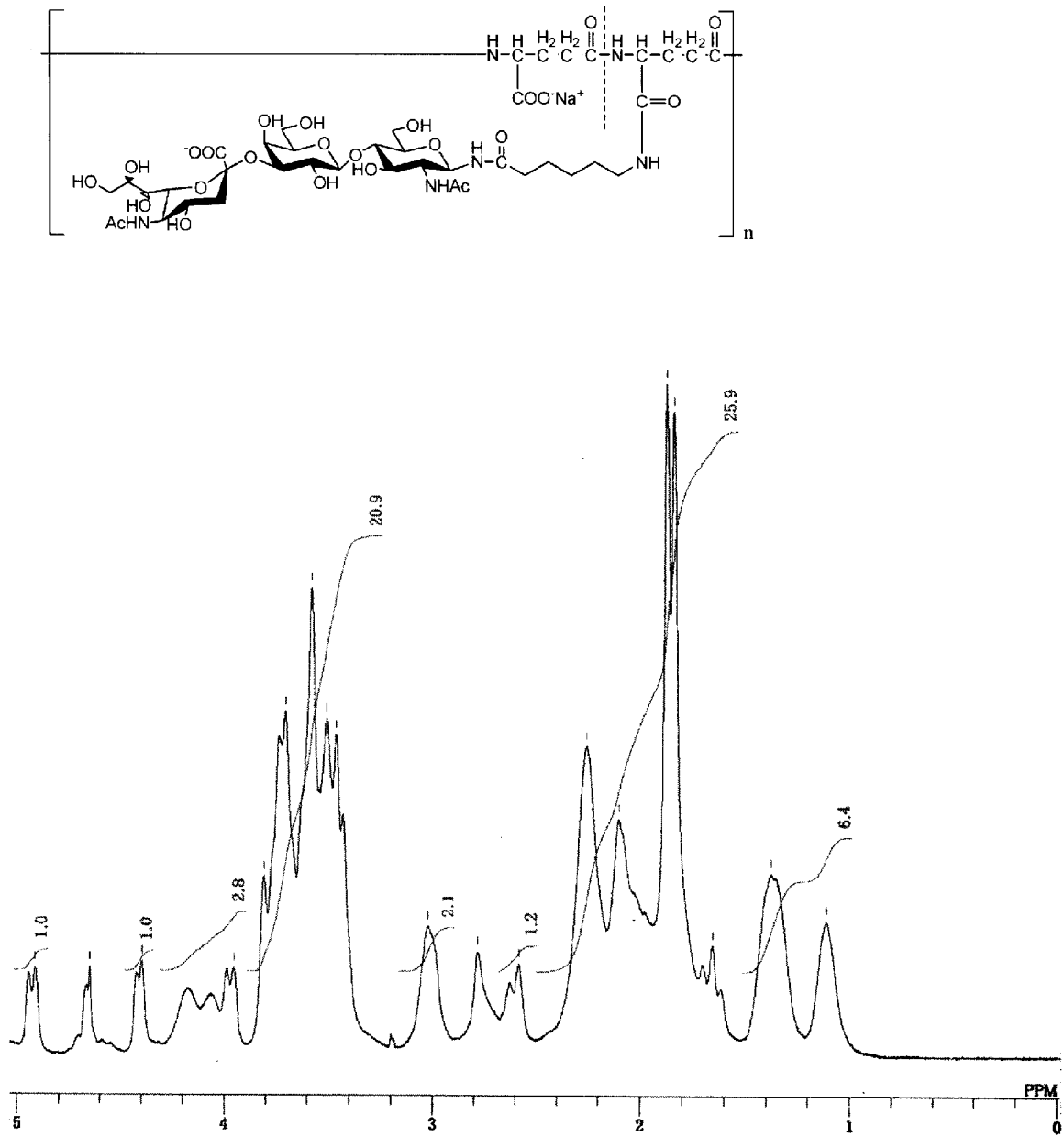
[2008年8月29日(29.08.2008) 国際事務局受理]

- [1] (削除)
- [2] (削除)
- [3] (削除)
- [4] (削除)
- [5] 糖の還元末端の1位をアミノ化した1-アミノ糖に、アミノ基とカルボキシル基をそれぞれの末端に有する化合物をリンカーとしてアミド結合させ、非還元末端側にアシア

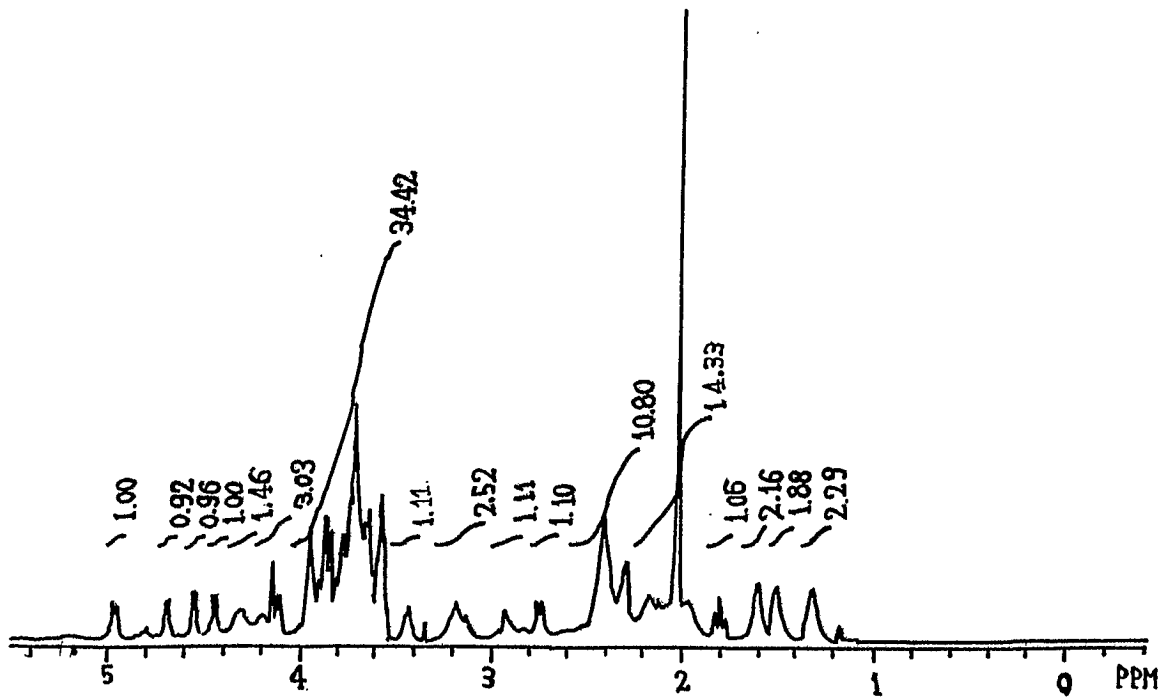
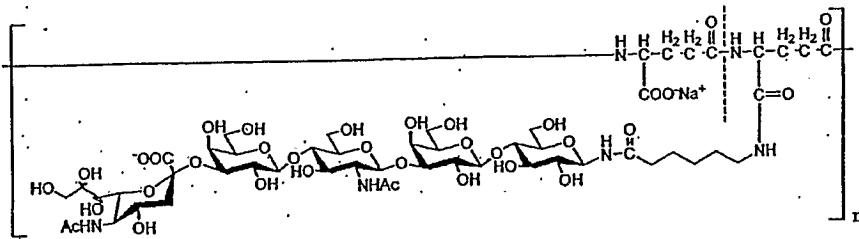
[図1]



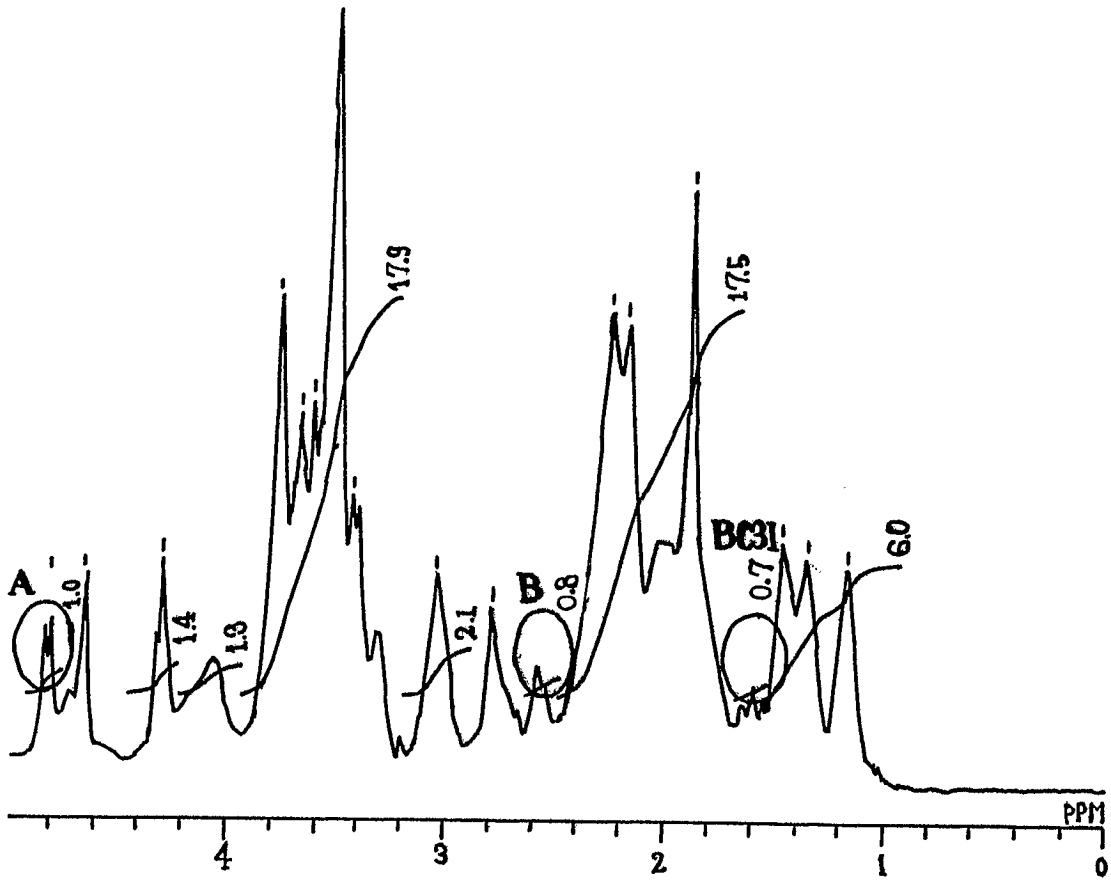
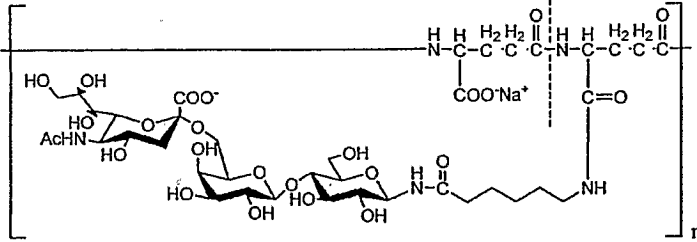
[図2]



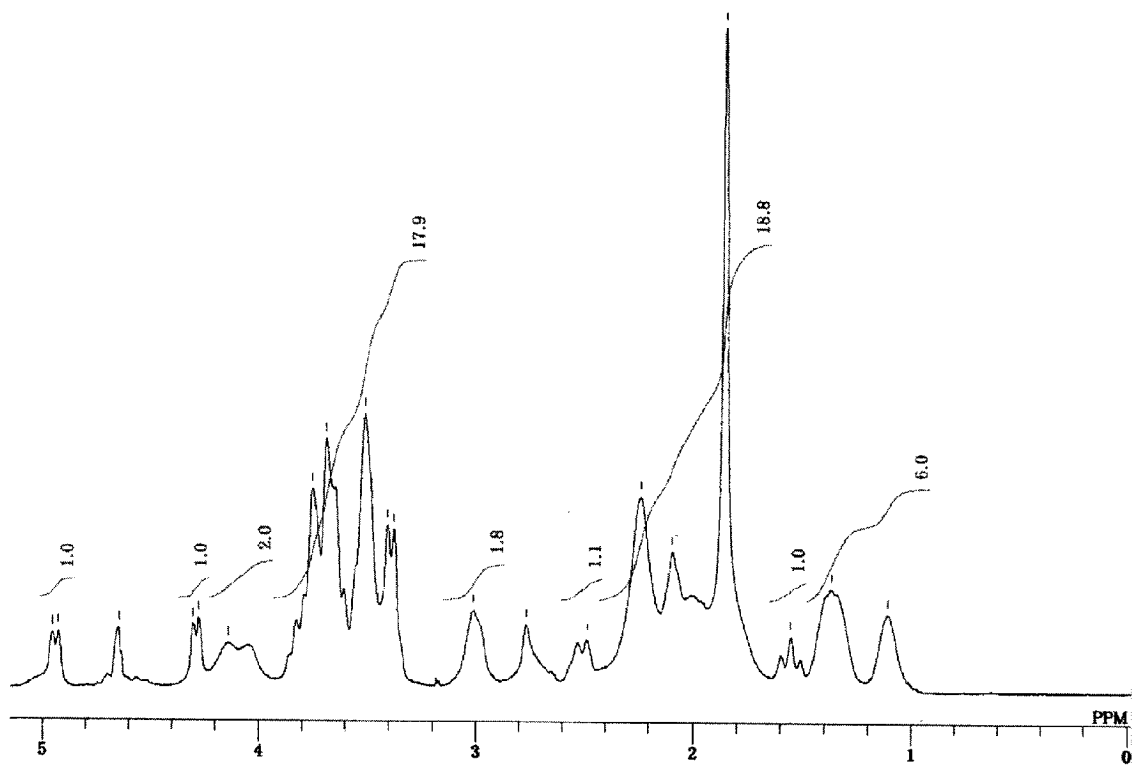
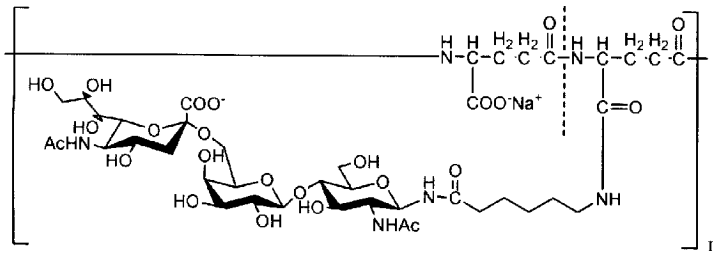
[図3]



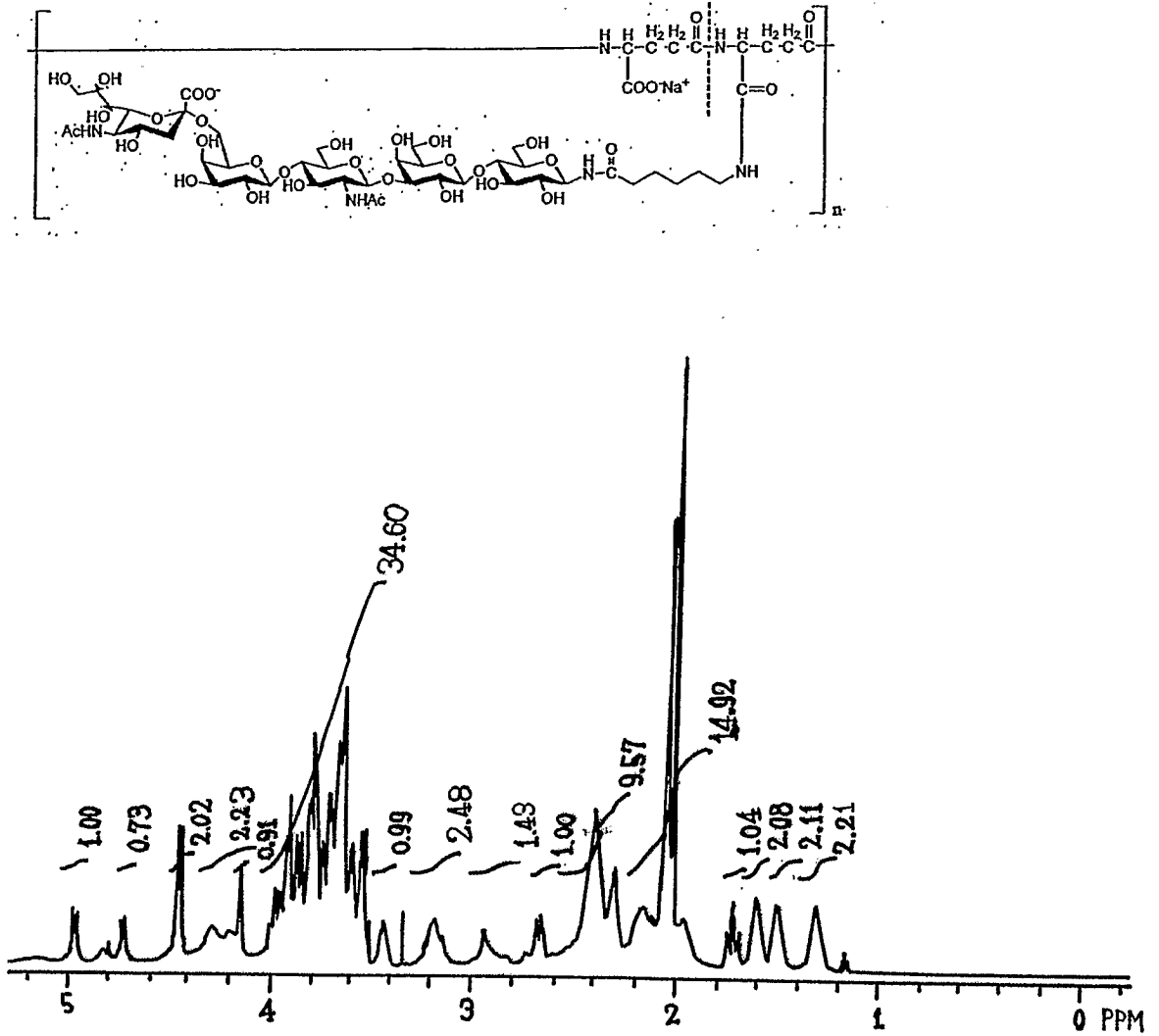
[図4]



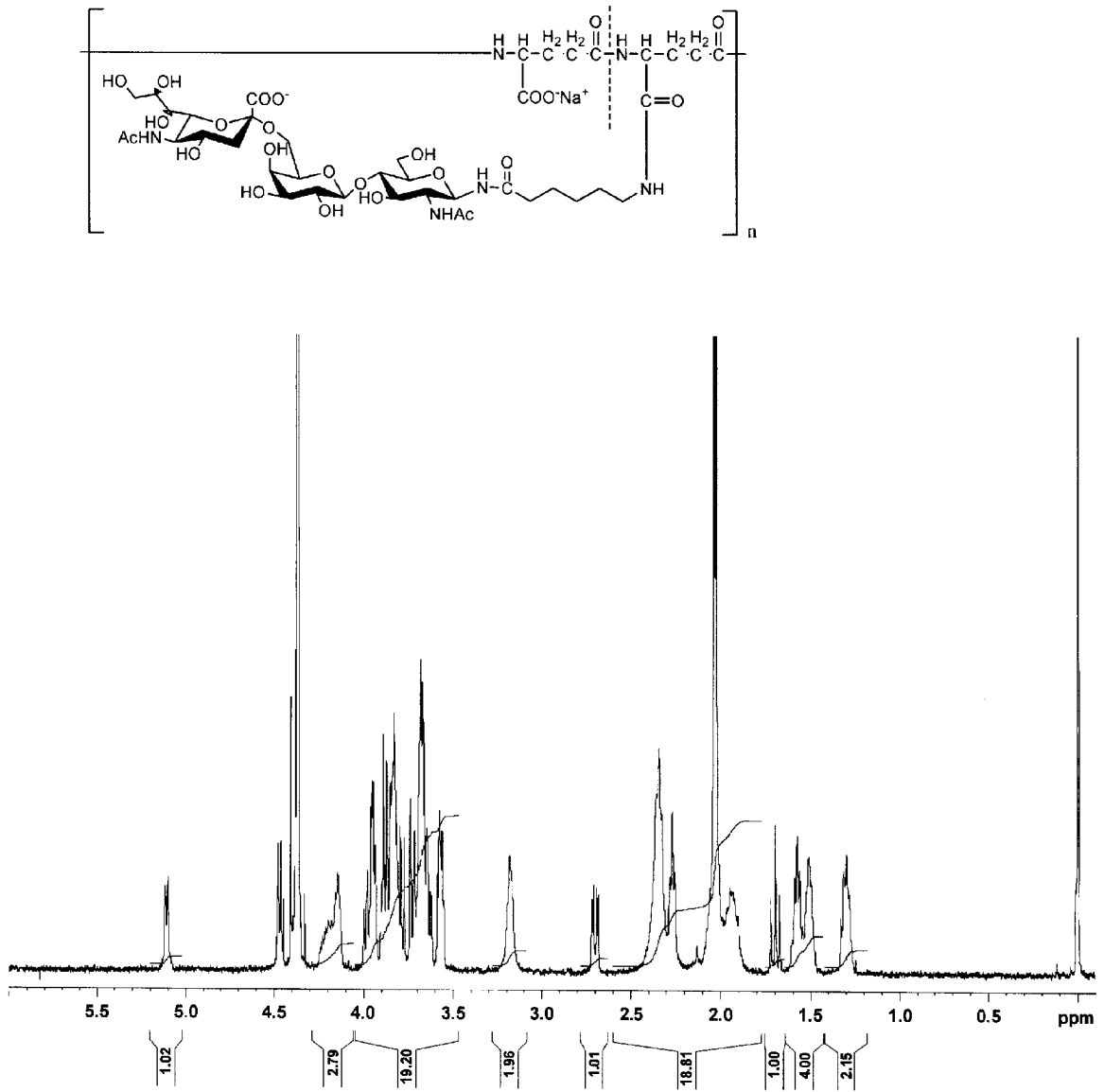
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/061429

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08G69/48(2006.01)i, A61K31/7012(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i,
A61P31/12(2006.01)i, C08G69/10(2006.01)i, C08G69/40(2006.01)i

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)

C08G69/48, A61K31/7012, A61K47/48, A61P31/12, C08G69/10, C08G69/40

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2008	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2008

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Bioorg.Med.Chem., 2007.02.01, 15, 1383-1393	1-4
Y	JP 2002-514186 A (Syntesome Gesellschaft für Med. Biochemie mbH), 14 May, 2002 (14.05.02), Claims; example 1 & EP 863769 A & WO 1998/014215 A2 & DE 19640791 A	1-4
A	WO 2007/026669 A1 (Yamasa Corp.), 08 March, 2007 (08.03.07), Claims (Family: none)	1-13

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 July, 2008 (11.07.08)

Date of mailing of the international search report
22 July, 2008 (22.07.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/061429

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 10-310610 A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 24 November, 1998 (24.11.98), Claims (Family: none)	1-13
A	JP 2003-73397 A (Wakamoto Pharmaceutical Co., Ltd.), 12 March, 2003 (12.03.03), Claims (Family: none)	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C08G69/48(2006.01)i, A61K31/7012(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, C08G69/10(2006.01)i, C08G69/40(2006.01)i

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. C08G69/48, A61K31/7012, A61K47/48, A61P31/12, C08G69/10, C08G69/40

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2008年
日本国実用新案登録公報	1996-2008年
日本国登録実用新案公報	1994-2008年

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

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	B i o o r g . M e d . C h e m . , 2007.02.01, 15, 1383-1393	1-4
Y	JP 2002-514186 A (シンテゾーメ ゲゼルシャフト フュア メッ ド. ビオフェミー ミット. ベシユレンクター. ハフツンク.) 2002.05.14, 特許請求の範囲、実施例 1 & EP 863769 A & WO 1998/014215 A2 & DE 19640791 A	1-4
A	WO 2007/026669 A1 (ヤマサ醤油株式会社) 2007.03.08, 請求の範囲 (ファミリーなし)	1-13

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

11.07.2008

国際調査報告の発送日

22.07.2008

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/J P)
 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)	4 J	9 2 7 9
渡辺 陽子		
電話番号 03-3581-1101 内線 3457		

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
A	JP 10-310610 A (雪印乳業株式会社) 1998. 11. 24, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1 - 13
A	JP 2003-73397 A (わかもと製薬株式会社) 2003. 03. 12, 特許請求の 範囲 (ファミリーなし)	1 - 13