

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-76270

(P2018-76270A)

(43) 公開日 平成30年5月17日(2018.5.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07H 15/04 (2006.01)</b>	C07H 15/04	CSPA 2G043
<b>C12Q 1/02 (2006.01)</b>	C12Q 1/02	4B063
<b>G01N 21/65 (2006.01)</b>	G01N 21/65	4C057

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 12 頁)

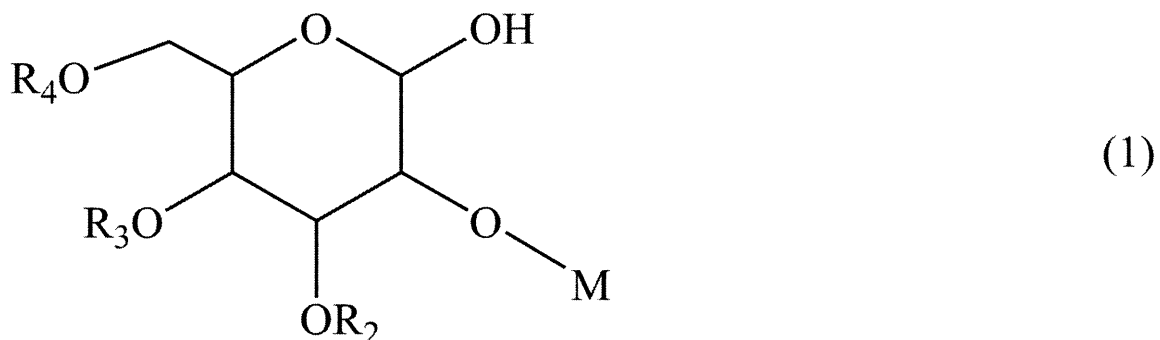
(21) 出願番号	特願2016-220908 (P2016-220908)	(71) 出願人	503360115 国立研究開発法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(22) 出願日	平成28年11月11日(2016.11.11)	(74) 代理人	100105315 弁理士 伊藤 温
		(72) 発明者	岡本 晃充 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大 学法人東京大学内
		(72) 発明者	山口 哲志 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大 学法人東京大学内
		(72) 発明者	堅田 淑伽 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大 学法人東京大学内
		Fターム(参考)	2G043 AA01 DA02 EA03 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な単糖類及びそれを用いた単糖類取り込み細胞検出剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】細胞内で多糖類を重合する種を含め、どのような細胞にも適合した、ラマン分光にて標的細胞を分析するに際して有用な、新規なアルキニル修飾単糖類の提供。

【解決手段】式(1)で示される単糖類。



(Mはアルキニル含有基；R<sub>2</sub>～R<sub>4</sub>は夫々独立してH、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリール、アシル又はシリル；但し、R<sub>2</sub>～R<sub>4</sub>の少なくともいずれか一つは、H)

【選択図】なし

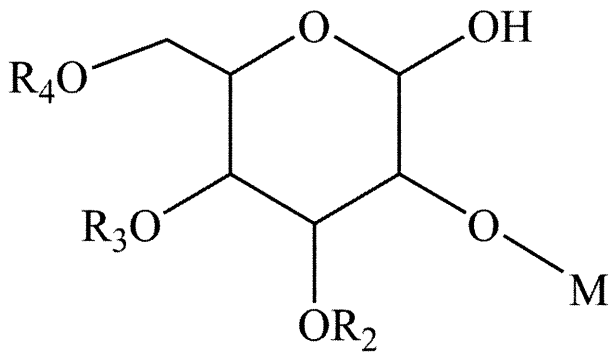
【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式(1)：

【化1】

【化1】



(1)

10

(式中、Mは、アルキニル含有基であり；R<sub>2</sub>～R<sub>4</sub>は、相互に独立して、水素原子、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリール、アシル、シリルであり、但し、R<sub>2</sub>～R<sub>4</sub>の少なくともいずれか一つは、水素原子である)で示される単糖類。

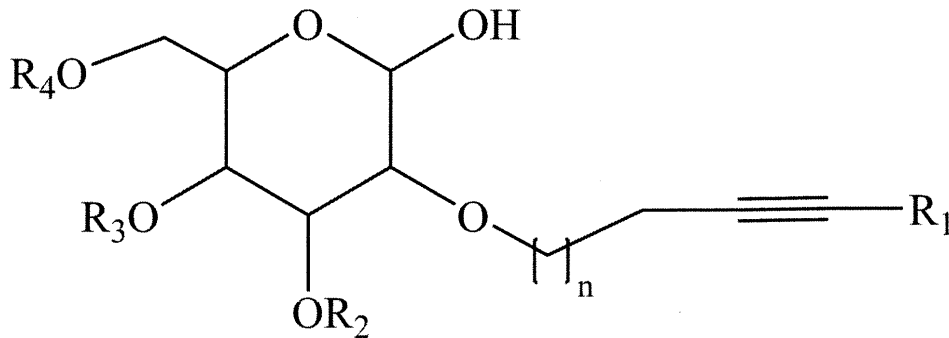
20

【請求項 2】

式(1-1)又は(1-2)：

【化2】

【化2】

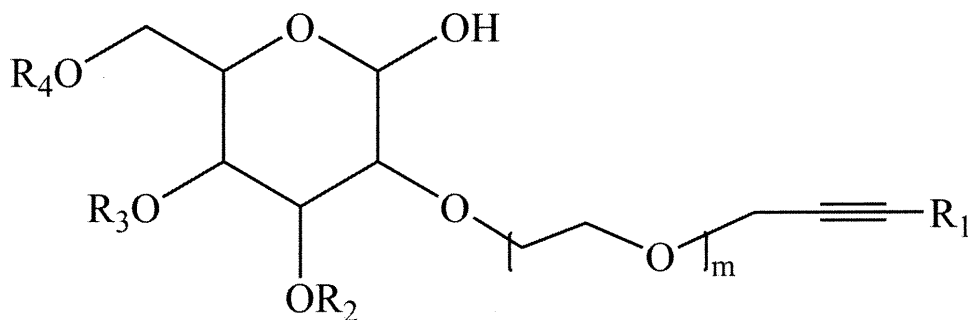


(1-1)

30

【化3】

【化3】



(1-2)

40

(式中、R<sub>1</sub>は、相互に独立して、水素原子、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリール、アシル、シリルである；nは0～100であり、mは1～100である)で示される、請求項1記載の単糖類。

50

## 【請求項 3】

$R_2 \sim R_4$  のすべてが、水素原子である、請求項 1 又は 2 記載の単糖類。

## 【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の単糖類を有する、ラマン分光イメージングによる、単糖類取り込み細胞検出剤。

## 【請求項 5】

前記単糖類取り込み細胞が、細胞表層もしくは内部に多糖を生産する細胞である、請求項 4 記載の単糖類取り込み細胞検出剤。

## 【請求項 6】

前記多糖を生産する細胞が、ミドリムシ、がん細胞、小胞体機能異常細胞である、請求項 5 記載の単糖類取り込み細胞検出剤。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、新規な単糖類及びそれを用いた単糖類取り込み細胞検出剤に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

これまでも、アルキニル基で修飾された単糖類は、幾つかの技術文献にて報告されている（非特許文献 1 ~ 4 及び特許文献 1）。

## 【先行技術文献】

20

## 【非特許文献】

## 【0003】

【非特許文献 1】Organic Letters (2013), 15(20), 5190-5193

【非特許文献 2】Tetrahedron Letters (2011), 52(8), 894-898

【非特許文献 3】Carbohydrate Research (2012), 363, 38-42

【非特許文献 4】Angewandte Chemie, International Edition (2015), 54(34), 9821-9825.

## 【特許文献】

## 【0004】

【特許文献 1】WO 2014205074 A2

30

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

ところで、前述のような公知のアルキニル修飾単糖類を用いてラマン分光にて標的細胞の同定等を行う場合、当該標的細胞の種類によっては、不適なことがある。特に、単糖類を取り込んで、生体内にて、当該単糖類を重合して多糖類を形成させる種の細胞に対し、前述のような公知のアルキニル修飾単糖類を使用することは不適である。多糖類を重合する際の手となる位置がアルケニルにより修飾されているからである。

## 【0006】

そこで、本発明は、例えば、細胞内で多糖類を重合する種を含め、どのような細胞にも適合した、ラマン分光にて標的細胞を分析するに際して有用な、新規なアルキニル修飾単糖類を提供することを課題とする。

40

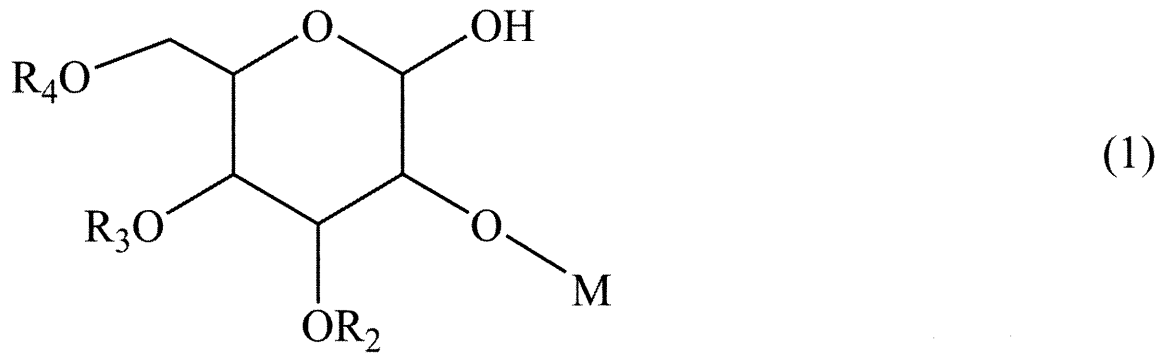
## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

本発明(1)は、式(1)：

【化4】

【化4】



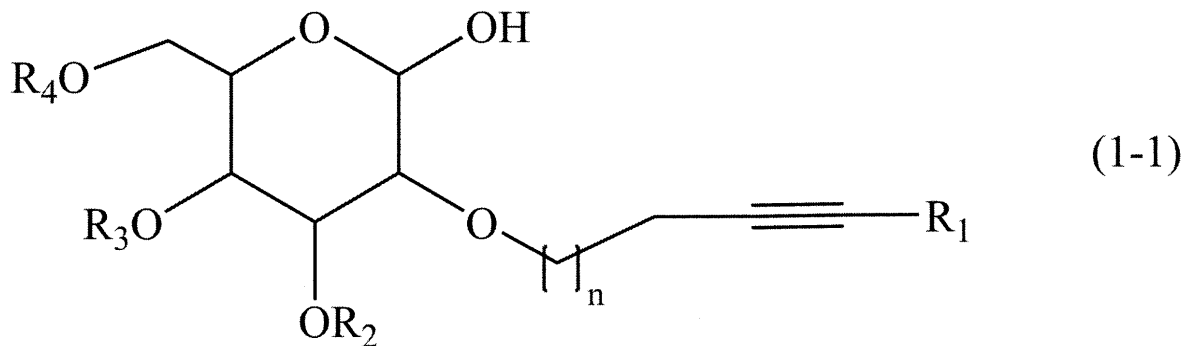
10

(式中、Mは、アルキニル含有基であり； $R_2 \sim R_4$ は、相互に独立して、水素原子、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリール、アシル、シリルであり、但し、 $R_2 \sim R_4$ の少なくともいずれか一つは、水素原子である)で示される単糖類である。

本発明(2)は、式(1-1)又は(1-2)：

【化5】

【化5】

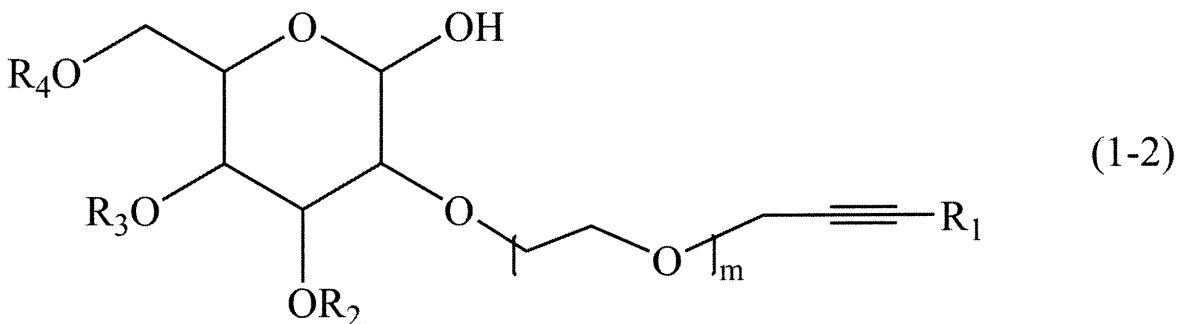


20

30

【化6】

【化6】



40

(式中、 $R_1$ は、相互に独立して、水素原子、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリール、アシル、シリルである； $n$ は0~100であり、 $m$ は1~100である)で示される、上記発明(1)の単糖類である。

本発明(3)は、 $R_2 \sim R_4$ のすべてが、水素原子である、前記発明(1)又は(2)の単糖類である。

本発明(4)は、前記発明(1)~(3)の単糖類を有する、ラマン分光イメージング

50

による、単糖類取り込み細胞検出剤である。

本発明(5)は、前記単糖類取り込み細胞が、細胞表層もしくは内部に多糖を生産する細胞である、前記発明(4)の単糖類取り込み細胞検出剤である。

本発明(6)は、前記多糖を生産する細胞が、ミドリムシ、がん細胞、小胞体機能異常細胞である、前記発明(5)の単糖類取り込み細胞検出剤である。

【発明の効果】

【0008】

本発明によれば、単糖類の1位に加え、3位、4位及び/又は6位がOHであるため、1位 3位、1位 4位、1位 6位の結合が可能となる結果、例えば、細胞内で多糖類を重合する種を含め、どのような細胞にも適合した、ラマン分光にて標的細胞を分析するに際して有用な、新規なアルキニル修飾単糖類を提供することが可能となる。

10

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1は、製造例1に係る中間体の<sup>1</sup>H NMRスペクトルである。

【図2】図2は、製造例1に係る中間体の<sup>1</sup>H NMRスペクトルである。

【図3】図3は、製造例1に係る最終産物の<sup>1</sup>H NMRスペクトルである。

【図4】図4は、ラマン分光イメージングに係るスペクトルである。

【図5】図5は、ラマン分光イメージング時におけるユーグレナの写真である。

【図6】図6は、ラマン分光イメージングに係るスペクトルである。

【発明を実施するための形態】

20

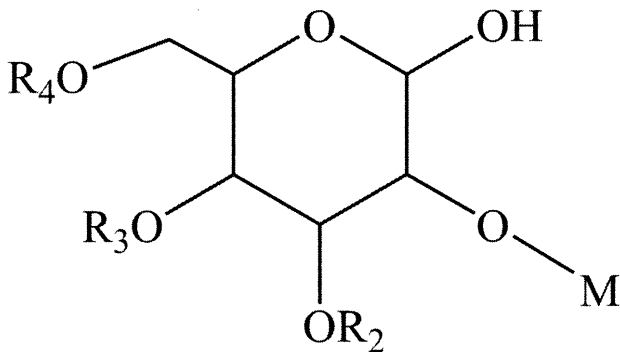
【0010】

新規アルキニル修飾単糖類

本発明に係る新規アルキニル修飾単糖類は、式(1)：

【化7】

【化7】



30

(式中、Mは、アルキニル含有基であり；R<sub>2</sub>～R<sub>4</sub>は、相互に独立して、水素原子、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリール、アシル、シリルであり、但し、R<sub>2</sub>～R<sub>4</sub>の少なくともいずれか一つは、水素原子である)で示される単糖類である。

40

【0011】

ここで、「単糖類」とは、グルコース、フルクトース、ガラクトース、マンノースを挙げることができる(、いずれも含む)。

【0012】

また、「アルキニル含有基」とは、アルキニル残基を有する限り特に限定されず、具体例としては、以下のアルキン、例えば、アセチレン、プロピン、1-ブチン、2-ブチン、イソブチン、sec-ブチン、1-ペンチン、2-ペンチン、イソペンチン、1-ヘキシシン、2-ヘキシシン、3-ヘキシシン、イソヘキシシン、ヘブチン、オクチン、ノニン、デシンなどのアルキン、の二価基が挙げられる。

【0013】

50

また、「アルキル」及び「アシル基のアルキル」とは、一般的に特定の数の炭素原子を有する、直鎖及び分枝飽和炭化水素基を指す（例えばC 1 - 3アルキルは、1 ~ 3つの炭素原子を有するアルキル基、C 1 - 6アルキルは1 ~ 6つの炭素原子を有するアルキル基を指す、等）。アルキル基としては、例えば、メチル、エチル、n - プロピル、i - プロピル、n - ブチル、s - ブチル、i - ブチル、t - ブチル、ペンタ - 1 - イル、ペンタ - 2 - イル、ペンタ - 3 - イル、3 - メチルブタ - 1 - イル、3 - メチルブタ - 2 - イル、2 - メチルブタ - 2 - イル、2, 2, 2 - トリメチルエタ - 1 - イル、n - ヘキシルなどが挙げられる。

【0014】

また、「シクロアルキル」とは、飽和単環式及び二環式炭化水素基を指し、前記環を含む一般的に特定の数の炭素原子を有する（例えば、C 3 - 8シクロアルキルは環員として、3 ~ 8つの炭素原子を有するシクロアルキル基を指す）。また、「アルケニル」とは、1つ以上の炭素 - 炭素二重結合を有し、及び一般的に特定の数の炭素原子を有する直鎖及び分枝炭化水素基を指す。アルケニル基としては、例えば、エテニル、1 - プロペン - 1 - イル、1 - プロペン - 2 - イル、2 - プロペン - 1 - イル、1 - ブテン - 1 - イル、1 - ブテン - 2 - イル、3 - ブテン - 1 - イル、3 - ブテン - 2 - イル、2 - ブテン - 1 - イル、2 - ブテン - 2 - イル、2 - メチル - 1 - プロペン - 1 - イル、2 - メチル - 2 - プロペン - 1 - イル、1, 3 - ブタジエン - 1 - イル、1, 3 - ブタジエン - 2 - イルなどが挙げられる。

10

【0015】

また、「アリアル」とは、環員（例えば、C 6 - 14アリアルは、環員として、6 ~ 14個の炭素原子を有するアリアル基を指す）を含む一般的に特定の数の炭素原子を有する、少なくとも1つの芳香族環で、単環式及び二環式の双方のアリアル基を有する、十分に不飽和の単環式の芳香族の炭化水素、及び多環式炭化水素を指す。アリアル基としては、例えば、フェニル、ピフェニル、シクロブタベンゼニル、インデニル、ナフタレニル、ベンゾシクロヘプタニル、ピフェニレニル、フルオレニル、シクロヘプタトリエンカチオンから由来する基等が挙げられる。

20

【0016】

また、「ヘテロアリアル」とは、少なくとも1つの芳香族基を有する不飽和単環式芳香族基及び多環式基を指し、前記基は各々、窒素、酸素、及び硫黄から独立して選択される炭素原子及び1 ~ 4つのヘテロ原子を含む環原子を有する。単環式及び多環式基の双方とも、環員（例えば、C 1 - 9ヘテロアリアルは、環員として1 ~ 9つの炭素原子及び1 ~ 4つのヘテロ原子を有するヘテロアリアル基を指す）として、一般的に特定の数の炭素原子を有し、及び、上に挙げた単環式複素環のいずれもがベンゼン環に縮合される、二環式基のいずれも含み得る。ヘテロアリアル基としては、例えば、ピロリル（例えば、ピロール - 1 - イル、ピロール - 2 - イル、及びピロール - 3 - イル）、フラニル、チオフェニル、ピラゾリル、イミダゾリル、イソオキサゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、チアゾリル、1, 2, 3 - トリアゾリル、1, 3, 4 - トリアゾリル、1 - オキサ - 2, 3 - ジアゾリル、1 - オキサ - 2, 4 - ジアゾリル、1 - オキサ - 2, 5 - ジアゾリル、1 - オキサ - 3, 4 - ジアゾリル、1 - チア - 2, 3 - ジアゾリル、1 - チア - 2, 4 - ジアゾリル、1 - チア - 2, 5 - ジアゾリル、1 - チア - 3, 4 - ジアゾリル、テトラゾリル、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、及びピラジニルのような単環式基が挙げられる。

30

40

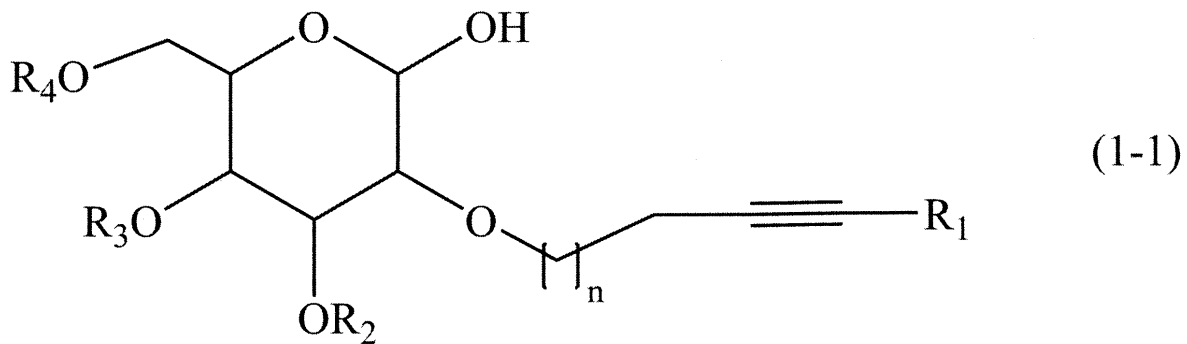
【0017】

ここで、式(1)に係る新規アルキニル修飾単糖類の内、式(1-1)又は(1-2)

:

【化 8】

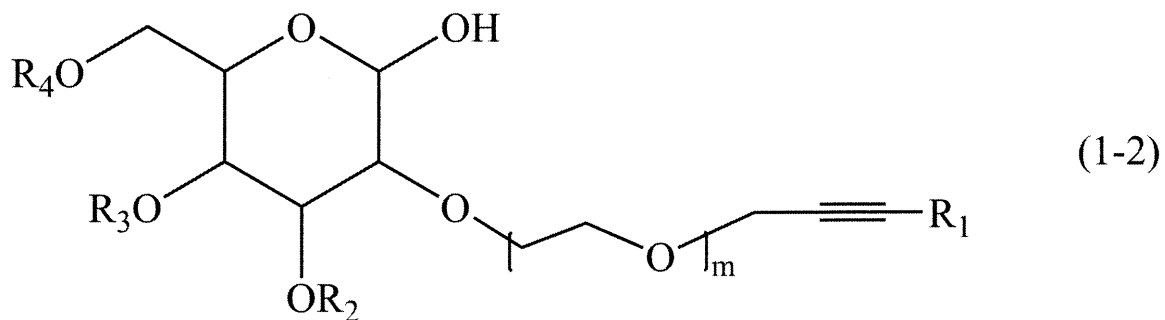
【化 8】



10

【化 9】

【化 9】



20

{ 式中、 $R_1 \sim R_4$  は、相互に独立して、水素原子、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アリール、ヘテロアリール、アシル、シリルであり、但し、 $R_2 \sim R_4$  の少なくともいずれか一つは、水素原子である； $n$  は 0 ~ 100、 $m$  は 1 ~ 100 ( $n$  及び  $m$  は、それぞれ、好適には 1 ~ 20、より好適には 1 ~ 5) である } で示される単糖類が好適である。

30

【0018】

ここで、式 (1)、式 (1-2) 及び式 (1-2) において、 $M$  や  $R_1 \sim R_4$  の基 (上記のアルキルやアリール等) は、他の置換基で置換されていてもよい。ここで、当該置換基としては、例えば、ヒドロキシ；カルボキシ；アルコキシ部が炭素数 1 から 4 個のアルコキシカルボニル；炭素数 1 ~ 4 個のヒドロキシアルキル；アルコキシ部が炭素数 1 ~ 4 個のアルコキシアルコキシ (メトキシメトキシ、エトキシメトキシ、プロポキシメトキシ、ブトキシメトキシ、2-メトキシエトキシ、3-メトキシプロポキシ、4-メトキシブトキシなど)；アルキル部が炭素数 1 から 4 個のカルボキシアルキルカルボニルオキシ (カルボキシメチルカルボニルオキシ、2-カルボキシエチルカルボニルオキシなど)；炭素数 1 から 4 個のアシルオキシ；ベンゾイルオキシ；フェニル；炭素数 1 から 4 個のアル

40

【0019】

50

ここで、 $R_2 \sim R_4$  のすべてが水素原子であることが好適である。1位 3位、1位 4位、1位 6位のいずれの結合にも対応可能であるからである。

【0020】

新規アルキニル修飾単糖類の製造方法

本発明に係る式(1)の化合物は、例えば、下記方法により製造し得る。まず、単糖の1位をメチル基などのアルキル基で保護したのち、3位と4位と6位の水酸基を保護する(このような水酸基の保護方法に関しては、「日本化学会編 実験化学講座」等に詳しい)。末端にハロゲンなどの求核置換を引き起こす脱離基を有する、アルキル(1-1)またはエチレングリコール(1-2)リンカーが結合したアルキンを塩基性条件下で2位の水酸基に付加する。その後、1位、3位、4位、6位を脱保護して、目的化合物を得る。

10

【0021】

新規アルキニル修飾単糖類の用途

本発明に係る新規アルキニル修飾単糖類は、ラマン分光イメージングによる、単糖類取り込み細胞検出剤として有用である。特に、アルキンは細胞内でも破壊されにくく、細胞内にアルキンを付した単糖類を入れて多糖類に変化しても、ラマン分光で検出できる点を特徴とする。例えば、細胞表層もしくは内部に特徴的な多糖を生産する細胞、例として、がん細胞や、アルツハイマー病をもたらす小胞体機能異常細胞、ミドリムシ等の細胞検出に有用である。

【0022】

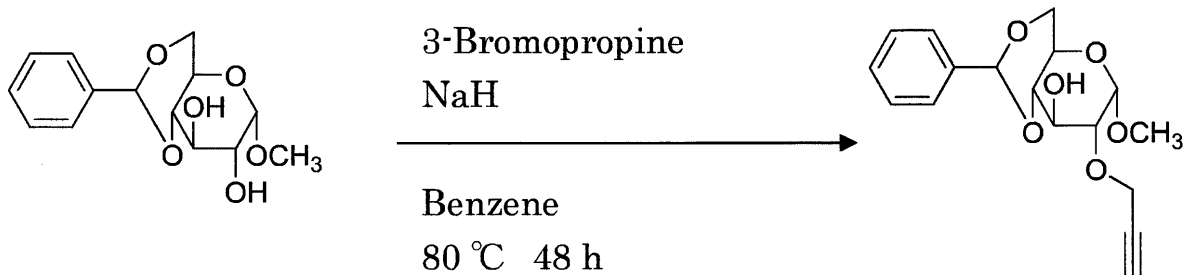
実施例

20

(製造例1)

【化10】

【化10】



30

2.01 g (0.0071 mol, 1 eq) の methyl - 4,6-O-Benzylidene - -D-glucopyranoside に、1.41 mL (0.0163 mol, 2.3 eq) の臭化プロパルギルと43 mLのベンゼンを加えた。そこに0.6 g (0.0149 mol, 2.1 eq) の水素化ナトリウム(60% in mineral oil)を2回に分けて添加し、80 で64時間反応させた。室温に戻した反応溶液を濃縮し、クロロホルム100 mLで溶解させ、これをろ過した。ろ液を濃縮し、シリカゲルカラムで精製した。(展開溶媒: クロロホルム100%) 751.8 mgの白色個体を得た(収率33%)。

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

2.51 ( s, 1 H ), 3.46 ( s, 3 H ), 3.55 ( t, J = 9.4 Hz, 1 H ), 3.69 ( dd, J = 3.4, 9.1 Hz, 1 H ), 3.76 ( t, J = 10.2 Hz, 1 H ), 3.82 - 3.86 ( m, 1 H ), 4.14 ( t, J = 9.3 Hz, 1 H ), 4.29 - 4.32 ( m, 1 H ), 4.38 - 4.45 ( m, 2 H ), 4.95 ( d, J = 3.2 Hz, 1 H ), 5.55 ( s, 1 H ), 7.38 ( d, J = 6.2 Hz, 3 H ), 7.51 ( d, J = 5.9 Hz, 2 H )

MS(ESI) m/z: 343.2 ( M + Na ) ( 図 1 )

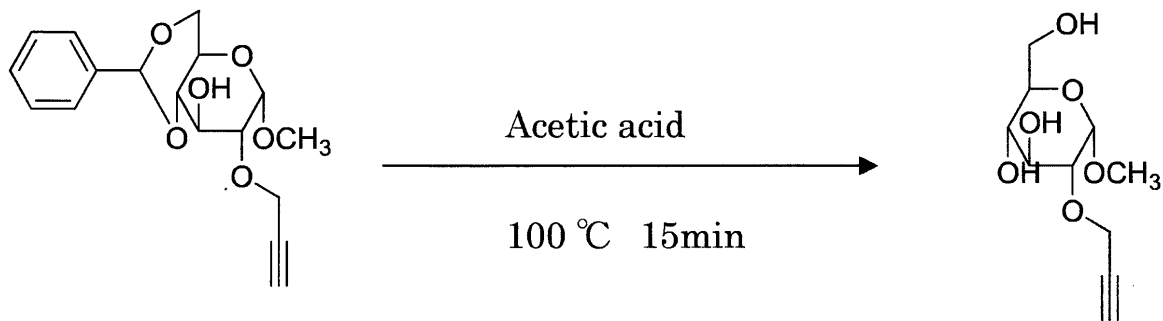
【0023】

40



【化11】

【化11】



10

751.8 mg (2.35 mmol) の methyl -2-O-propargyl 4,6-O-Benzylidene- -D-glucopyranoside に、3.54 mL の酢酸を添加し、100 °C まで加熱した。そこに、2.35 ml の水をゆっくり少量添加し、15分攪拌した。濃縮し、トルエンで共沸させ水を除去し、シリカカラムで精製した。(chloroform : methanol = 9 : 1) 468.4 mg の白色個体を得た (収率86%)。

<sup>1</sup>H NMR ( 600 MHz, CDCl<sub>3</sub> )

3.34 - 3.35 ( m, 2 H ), 3.43 ( s, 3 H ), 3.44 - 3.46 ( dd, J = 4.3, 10.0 Hz 1 H ), 3.51 - 3.54 ( m, 1 H ), 3.68 - 3.73 ( m, 2 H ), 3.84 ( d, J = 11.7 Hz, 1 H ), 4.33 - 4.41 ( m, 2 H ), 4.95 ( s, 1 H )

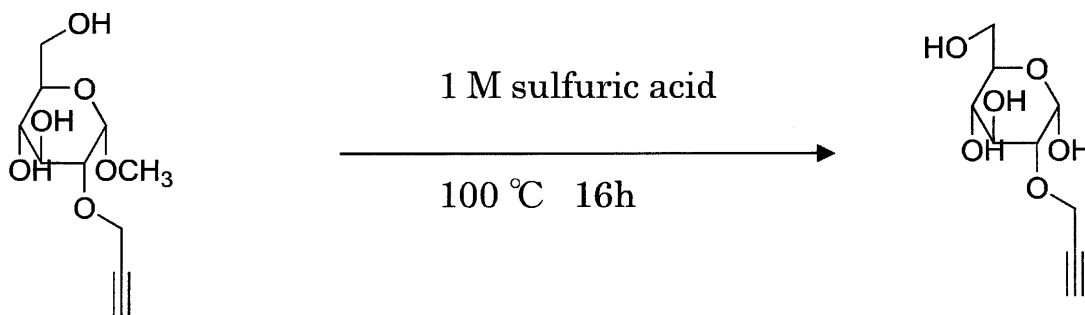
20

MS( ESI ) m/z: 255.1 ( M + Na ) ( 図 2 )

【0024】

【化12】

【化12】



30

468.4 mg ( 2.02 mmol ) の methyl -2-O-propargyl - -D-glucopyranoside に、1 M の硫酸を 7.65 mL 加え、100 °C で16時間、攪拌した。溶液が室温に戻し、炭酸バリウムを中和するまで添加した。その後、ろ過し (メタノール洗浄)、ろ液を濃縮して、シリカカラムで精製した。(chloroform : methanol = 5 : 1)

254.3 mg の白色個体を得た (収率58%)

40

<sup>1</sup>H NMR ( 600 MHz, CD<sub>3</sub>OD )

2.81 ( s, 1 H ), 2.88 ( s, 1 H ), 3.08 ( t, J = 8.4 Hz, 1 H ), 3.26 - 3.29 ( m, 1 H ), 3.34 - 3.38 ( m, 2 H ), 3.41 ( dd, J = 4.1, 9.7 Hz, 1 H ), 3.62 - 3.65 ( m, 1 H ), 3.69 ( dd, J = 4.9, 11.7 Hz, 1 H ), 3.74 - 3.79 ( m, 4 H ), 3.84 ( d, J = 11.7 Hz, 1 H ), 4.36 ( s, 2 H ), 4.47 ( dq, J = 2.9, 12.6 Hz, 2 H ), 4.54 ( d, J = 7.6 Hz, 1 H ), 5.33 ( d, J = 3.6 Hz, 1 H )

MS( ESI ) m/z: 241.1 ( M + Na ) ( 図 3 )

【0025】

ラマン分光イメージング

( 試験方法 )

50

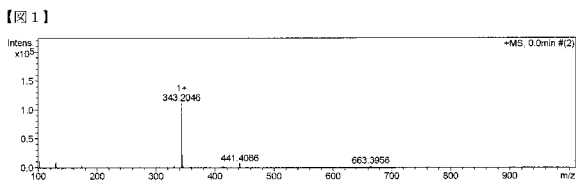
上記にて得られたアルキン化グルコース (AGluc) 6 mg/mL を含む、pH 5.5 の KH 培地を作り、遮光条件下にて 1 週間培養する。次に、培養したユーグレナを遠心により分離し、PBS で洗浄することで PBS に置換して、ラマン観察を行う。ユーグレナを石英ガラスボトムディッシュに 100  $\mu$ L 置き、2.5% グルタルデヒドで固定し、短時間静置した後に、水浸型レンズ 63 倍倍率のレンズでラマン観察を行う。観察条件として、532 nm 励起で、StreamLine モード (一定範囲をスキャンするモード) を使用し、レーザー強度 50%、照射時間 0.1 / s でレーザー照射を行い、1100 - 2600  $\text{cm}^{-1}$  の範囲のラマンスペクトルを取得した (図 4 参照)。

【 0 0 2 6 】

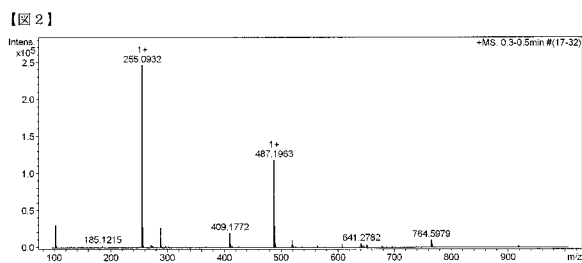
(結果)

解析ソフト (Wire 4.0) を用いて、得られたスペクトルを解析した。写真 (図 5) において、2250 - 2350 nm にベースラインに対してピークが認められるであろう場所に色をつける (本試験では、赤紫、赤が最もシグナルが強いと考えられる箇所とした)。ピークとしての閾値 (コントラスト、と表現される) は 2000 - 2200 である。色のついた点 (赤いスポット) にカーソルを合わせると、その点におけるラマンスペクトルが得られる (図 6 参照)。なお、ラマン顕微鏡は、RENISHAW 社製のものを用いた。

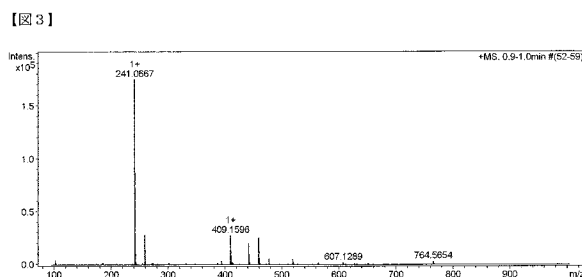
【 図 1 】



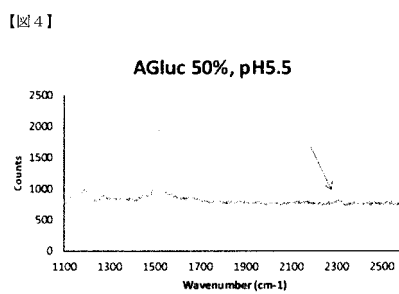
【 図 2 】



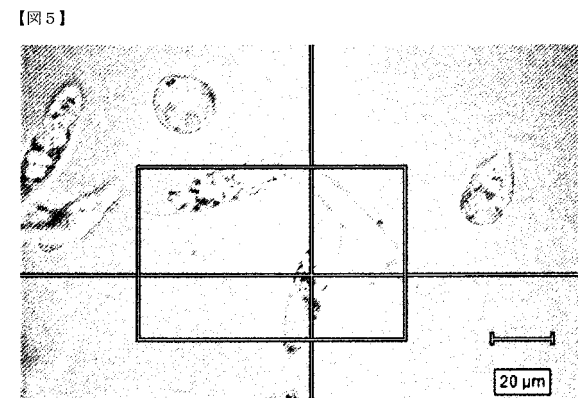
【 図 3 】



【 図 4 】

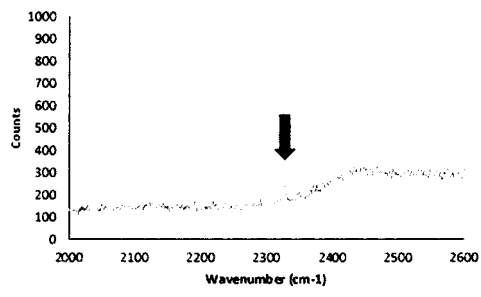


【 図 5 】



【 図 6 】

【 図 6 】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B063 QA18 QQ05 QQ08 QR44 QS36 QX02  
4C057 BB02 CC01 DD03 JJ03