

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2014年10月2日(02.10.2014)



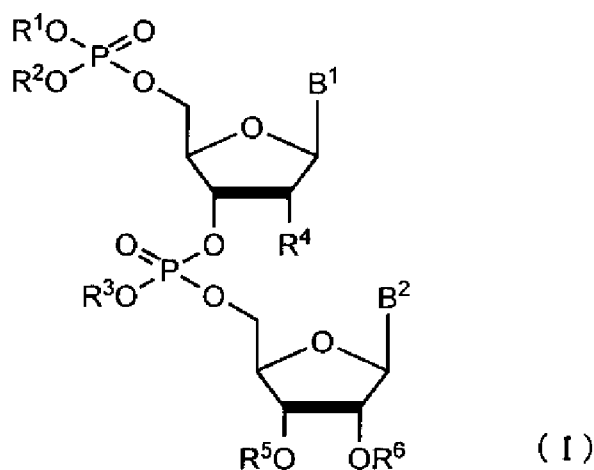
(10) 国際公開番号  
WO 2014/157434 A1

- (51) 国際特許分類:  
C07H 21/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/058711
- (22) 国際出願日: 2014年3月27日(27.03.2014)
- (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 2013-073744 2013年3月29日(29.03.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人高知大学(KOCHI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7808520 高知県高知市曙町2丁目5番1号 Kochi (JP).
- (72) 発明者: 本家 孝一(HONKE, Koichi); 〒7808520 高知県高知市曙町2丁目5番1号 国立大学法人高知大学内 Kochi (JP). 小槻 日吉三(KOTSUKI, Hiyoshizo); 〒7808520 高知県高知市曙町2丁目5番1号 国立大学法人高知大学内 Kochi (JP). 片岡 正典(KATAOKA, Masanori); 〒7808520 高知県高知市曙町2丁目5番1号 国立大学法人高知大学内 Kochi (JP). 福井 千春(FUKUI, Chiharu); 〒7808520 高知県高知市曙町2丁目5番1号 国立大学法人高知大学内 Kochi (JP).
- (74) 代理人: 植木 久一, 外(UEKI, Kyuichi et al.); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番16号 フジタ東洋紡ビル9階 Osaka (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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,

[続葉有]

(54) Title: N-GLYCOSYL ACID AMIDE AMINO ACID-NUCLEIC ACID DERIVATIVE AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称: N-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体およびその製造方法



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide an N-glycosyl acid amide amino acid-nucleic acid derivative, which would serve as a stepping stone to the synthesis of a glycoprotein containing an N-binding type sugar chain, and a method for producing the same. The N-glycosyl acid amide amino acid-nucleic acid derivative according to the present invention or a salt thereof is characterized by being represented by formula (I). In formula (I): R<sup>1</sup> to R<sup>3</sup> independently represent a hydrogen atom, etc.; R<sup>4</sup> represents a hydrogen atom, etc.; B<sup>1</sup> and B<sup>2</sup> represent a nucleic acid base group; and one of R<sup>5</sup> and R<sup>6</sup> represents a hydrogen atom and the other represents an N-glycosyl acid amide amino acid group.

(57) 要約: 本発明は、N-結合型糖鎖を含む糖タンパク質の合成の足掛かりとなるN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体と、その製造方法を提供することを目的とする。本発明に係るN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体またはその塩は、下記式(I)で表されることを特徴とする。[式中、R<sup>1</sup>~R<sup>3</sup>は独立して水素原子等を示し; R<sup>4</sup>は水素原子等を示し; B<sup>1</sup>およびB<sup>2</sup>は核酸塩基を示し; R<sup>5</sup>とR<sup>6</sup>は一方が水素原子を示し、他方がN-グリコシル酸アミドアミノ酸基を示す]

WO 2014/157434 A1

NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI 添付公開書類:  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, — 國際調查報告 (條約第 21 條(3))  
MR, NE, SN, TD, TG).

## 明 細 書

発明の名称：

**N-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体およびその製造方法**

### 技術分野

[0001] 本発明は、N-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体とその製造方法に関するものである。

### 背景技術

[0002] 糖タンパク質は、特定のアミノ酸の一部に糖鎖が結合しているタンパク質の総称であり、様々な機能を有し、生体内でも重要な役割を担っている。

[0003] 例えば、細胞膜に存在するタンパク質や細胞から分泌されるタンパク質の多くは、その構造中に糖鎖を有する糖タンパク質であり、生体内に存在するタンパク質の60～70%程度は糖タンパク質であるといわれている。また、細胞表面に発現した糖タンパク質の糖鎖は、生体内の他の細胞との接着に関与するのみならず、細菌やウイルスが細胞に接着する際のリガンドとなったり、細胞間の情報伝達に重要な役割を果たす場合もある。さらに、糖鎖によりタンパク質が安定化したり、高親水性の糖鎖を有する糖タンパク質が組織を保護するといった作用も有する。また、がん化した細胞では、正常細胞に比べて糖タンパク質の糖鎖構造に違いが生じる。その他、生理活性を有する糖タンパク質では、糖鎖によりその活性が制御されている。例えば、赤血球の産生促進作用を有する糖タンパク質であるエリスロポエチンは、その糖鎖末端のシアル酸が欠如したのみで血中半減期が減少し、活性をほとんど示さなくなってしまう。

[0004] 上記のとおり、様々な作用を有し、また、生体機能の解明や新薬開発の鍵となり得る糖タンパク質であるが、近年における遺伝子工学の目覚ましい発展にもかかわらず、その研究は十分に進んでいないのが現状である。その理由として、糖タンパク質の活性などは、その糖鎖構造が僅かに異なるのみで影響を受ける一方で、糖タンパク質の人工的な合成が非常に難しいことが挙げ

られる。

[0005] 例えば、ヒトのサイトカインや抗体などのタンパク質を製造する手段として、これらの遺伝子をチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞に組み込む方法が知られている。しかし、この方法で得られる糖タンパク質の糖鎖構造は不均一であり、活性が十分でないのみならず、体内で免疫応答反応を引き起こす場合もある。

[0006] そこで、非特許文献1の方法では、有機合成により糖ペプチドを合成し、それらを連結して糖タンパク質を合成している。この方法により、生理活性を有するエリスロポエチンが合成されている。しかし、糖タンパク質を製造するに当たっては、特定のアミノ酸の側鎖に特定の糖鎖を結合させなければならぬため、この方法には大変な手間や時間がかかるという問題がある。

[0007] そこで、非特許文献2のとおり、無細胞翻訳システムを用いることが考えられる。具体的には、当該システムでは、終止コドンの1つであるUAGコドンをはじめとする非コードコドンへ特異的に結合するものであり且つ非天然アミノ酸が結合したtRNAを調製する。また、当該非天然アミノ酸を導入したい位置に上記コドンを組み込んだmRNAを調製する。これらを用いてペプチド合成を行うことにより、所望の位置に非天然アミノ酸が導入されたペプチドを得ることができる。非特許文献2では、非天然アミノ酸として、 $\beta$ -水酸基を介してグルコースなどが導入されたセリンが、リボースの3'位に結合したリン酸-デオキシシトシン-リン酸-アデノシン（pdCpA）が合成されている。当該化合物が結合したtRNAを用い、無細胞翻訳システムでペプチドを合成すれば、所望の位置に特定の糖鎖を有する糖タンパク質が得られる可能性がある。

## 先行技術文献

### 非特許文献

[0008] 非特許文献1：Y. Kajiharaら, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48, pp. 9557-9560 (2009)

非特許文献2：M. Hechtら, *Carbohydrate Research*, 330, pp. 149-164 (200

1)

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0009] 上述したように、所望の位置に特定の糖鎖を有する糖タンパク質を合成するための技術は、理論的には確立されている。しかし実際には、非特許文献2の技術のみでは糖タンパク質を合成することができない。その理由としては、糖タンパク質の糖鎖としては、O-結合型糖鎖とN-結合型糖鎖があることによる。

[0010] 即ち、糖タンパク質における糖鎖は、ペプチド鎖中のセリンまたはトレオニンの $\beta$ -水酸基を介して結合しているO-結合型糖鎖と、アスパラギンの側鎖アミド基中のアミノ基を介して結合しているN-結合型糖鎖がある。非特許文献2では、セリンのカルボキシ基をシアノメチルエステル化して活性化した後、p d C p Aと反応させている。ところが、本発明者らによる実験的知見によれば、この反応をグルコサミル-N-アスパラギンの合成に適用したところ、アスパラギンのイミノラクトンや環状イミド化合物のみが得られ、活性エステルであるシアノメチルエステルは痕跡量が認められるのみで単離することはできなかった。この事実が、糖タンパク質の研究の必要性が切望されているにも関わらず、N-グリコシル化アスパラギン-p d C p Aの合成の報告が未だに無い最大の理由であるといえる。

[0011] そこで本発明は、N-結合型糖鎖を含む糖タンパク質の合成の足掛かりとなるN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体と、その製造方法を提供することを目的とする。

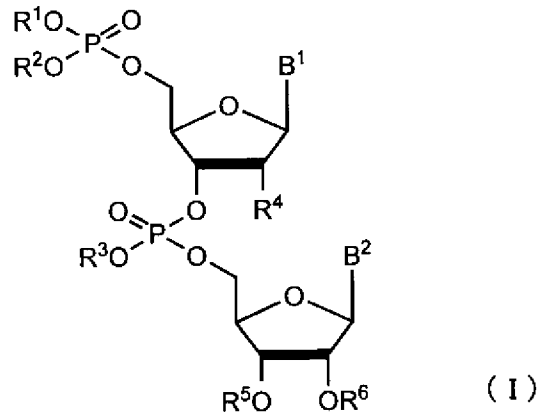
### 課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた。その結果、公知技術のとおり活性エステル法ではN-グリコシル酸アミドアミノ酸と核酸誘導体を反応させることはできないが、脱水縮合剤を使用すれば反応が進行することを見出し、これまで前例の無いN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体の合成に初めて成功して、本発明を完成した。

[0013] 以下、本発明を示す。

[0014] [1] 下記式(1)で表されることを特徴とするN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体またはその塩。

[0015] [化1]



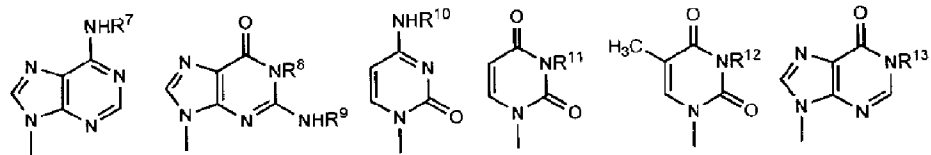
[式中、

R<sup>1</sup>~R<sup>3</sup>は、独立して水素原子またはリン酸基の保護基を示し；

R<sup>4</sup>は、水素原子、水酸基、保護水酸基、C<sub>1-6</sub>アルコキシ基、2-(C<sub>1-6</sub>アルコキシ)エトキシ基またはハロゲン原子を示し；

B<sup>1</sup>およびB<sup>2</sup>は、独立して下記式で表される何れかの核酸塩基基：

[0016] [化2]

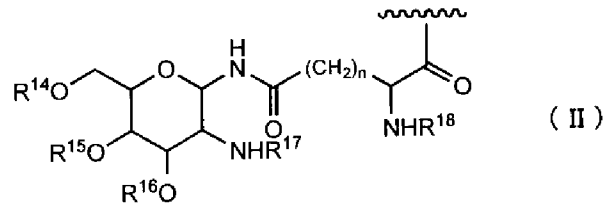


[式中、R<sup>7</sup>~R<sup>13</sup>は、独立して水素原子またはアミノ基の保護基を示す]を示し；

R<sup>5</sup>は下記式(11)で表されるN-グリコシル酸アミドアミノ酸基を示し且つR<sup>6</sup>は水素原子を示すか、或いは、R<sup>5</sup>は水素原子を示し且つR<sup>6</sup>は下記式(11)で表されるN-グリコシル酸アミドアミノ酸基を示す：

[0017]

[化3]



[式中、

$R^{14} \sim R^{16}$ は、独立して水素原子または水酸基の保護基を示し；

$R^{17}$ と $R^{18}$ は、独立して水素原子またはアミノ基の保護基を示し；

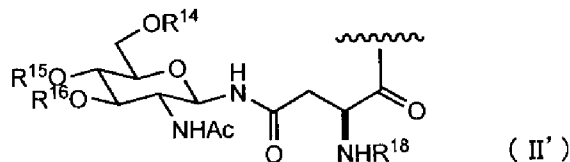
$n$ は1または2を示す] ]。

[0018] [2]  $n$ が1である上記[1]に記載のN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体またはその塩。

[0019] [3]  $R^{17}$ がアセチル基である上記[1]または[2]に記載のN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体またはその塩。

[0020] [4] N-グリコシル酸アミドアミノ酸基(II)が、下記式(II')で表されるN-(N-アセチルグルコサミル)-L-アスパラギニル基である上記[1]に記載のN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体またはその塩。

[0021] [化4]



[式中、 $R^{14} \sim R^{16}$ および $R^{18}$ は上記と同義を示す]。

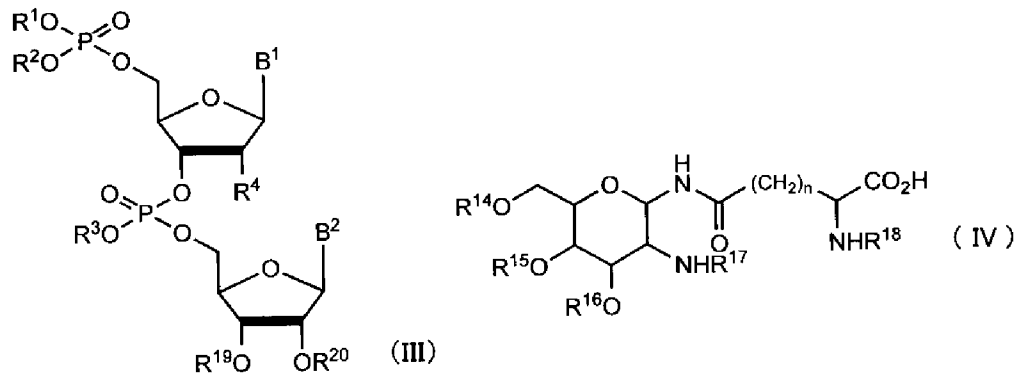
[0022] 糖タンパク質のN-結合型糖鎖は、通常、L-アスパラギンの側鎖アミド基中のアミノ基を介して結合しており、また、基底部の糖はN-アセチルグルコサミンであることが多い。即ち、上記のN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体またはその塩は、天然型の糖タンパク質を製造するためのものとして非常に有用である。

[0023] [5] B<sup>1</sup>がシトシニル基であり且つB<sup>2</sup>がアデニル基である上記[1]～[4]のいずれかに記載のN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体またはその塩。当該化合物は、無細胞翻訳システムにおいて糖結合アミノ酸などの非天然アミノ酸をタンパク質へ導入するためのtRNAの合成に有用である。

[0024] [6] 上記[1]に記載のN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体(I)またはその塩を製造するための方法であって、

脱水縮合剤の存在下、下記式(III)で表される核酸誘導体またはその塩と、下記式(IV)で表されるN-グリコシル酸アミドアミノ酸誘導体とを縮合する工程を含むことを特徴とする方法。

[0025] [化5]



[式中、R<sup>1</sup>～R<sup>4</sup>、B<sup>1</sup>、B<sup>2</sup>およびnは上記と同義を示し；R<sup>14</sup>～R<sup>18</sup>は上記と同義を示すが、水素原子ではないものとし；R<sup>19</sup>とR<sup>20</sup>は、いずれか一方が水素原子で且つ他方が水酸基の保護基を示すか、或いは、両方とも水素原子を示す]。

### 発明の効果

[0026] 従来、非特許文献2のとおり、無細胞翻訳システムにおけるアンバーサプレッサーtRNAの合成に用いられるO-グリコシルセリン-核酸誘導体の合成方法は知られており、この合成方法によりO-グリコシルトレオニン-核酸誘導体も合成可能であると考えられる。しかし、当該方法はN-グリコシルアスパラギン-核酸誘導体の合成には適用できず、これまでN-グリコ



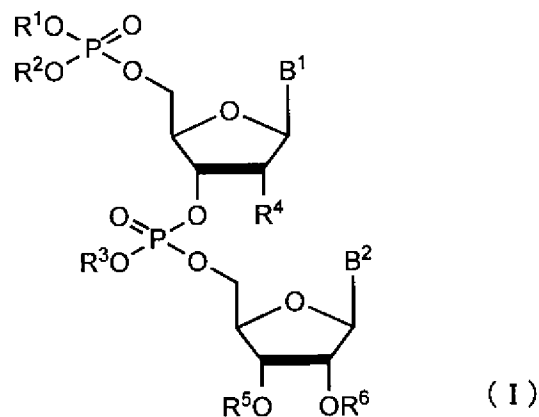
シルアスパラギン-核酸誘導体が合成されたとの報告はなかった。糖タンパク質の糖鎖は、通常、セリンまたはトレオニンの側鎖水酸基と、アスパラギンの側鎖アミノ基を介してタンパク質に結合していることから、N-グリコシルアスパラギン-核酸誘導体が無ければ、無細胞翻訳システムを利用して糖タンパク質を製造することはできない。また、糖タンパク質の糖鎖は、全て同一の構造を有するわけではなく、且つ全てのセリン等に結合してはいないことから、糖タンパク質を化学合成するには特定の糖鎖を特定のセリン等へ結合させなくてはならない。よって、糖タンパク質の化学合成は非常に難しいものであった。

[0027] それに対して本発明によれば、N-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体を提供することができ、N-結合型糖鎖を有する糖タンパク質が無細胞翻訳システムを用いて製造可能になることから、生体機能の作用機序の解明、創薬、ドラッグデリバリー、疾病の診断など、これまで糖タンパク質の合成ができなかったが為に進まなかった分野での研究が飛躍的に発展する可能性があり得る。

### 発明を実施するための形態

[0028] 本発明に係るN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体は、下記式(1)で表される：

[0029] [化6]



式中、R<sup>1</sup>~R<sup>3</sup>は、独立して水素原子またはリン酸基の保護基を示す。リン

酸基の保護基としては、例えば、 $C_{1-6}$ アルキル基などのアルキル系リン酸保護基； $\beta$ -シアノエチル基などの置換アルキル系リン酸保護基；フェニルアミノ基などのアミド系リン酸保護基；フェニルチオ基などのチオエステル系リン酸保護基；ベンジル基、ジフェニルメチル基、トリフェニルメチル基、ニトロベンジル基などのベンジル系保護基；フェニル基や

-（メチルメルカプト）フェニル基などのフェニル系保護基などを挙げることができる。好適には、核酸誘導体の合成で汎用される $\beta$ -シアノエチル基が好ましい。

[0030]  $R^4$ は、水素原子、水酸基、保護水酸基、 $C_{1-6}$ アルコキシ基、2-（ $C_{1-6}$ アルコキシ）エトキシ基またはハロゲン原子を示す。保護水酸基は、保護基で保護された水酸基を意味し、後述する $-OR^{14}$ （但し、 $R^{14}$ は水酸基の保護基を示す）と同様の基を挙げることができる。「2-（ $C_{1-6}$ アルコキシ）エトキシ基」は、エトキシ基の2位に上記 $C_{1-6}$ アルコキシ基が置換した基をいう。例えば2-メトキシエトキシ基は、 $CH_3OCH_2CH_2O-$ の構造を有する。「ハロゲン原子」としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子を挙げることができる。 $R^4$ のハロゲン原子としては、フッ素原子が好適である。

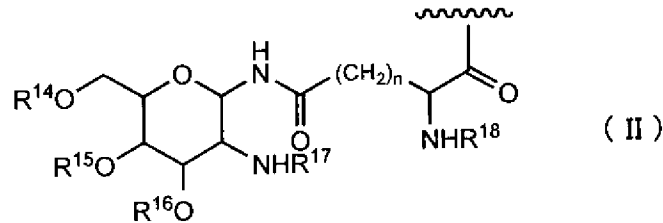
[0031]  $B^1$ および $B^2$ は、独立して、アデニル基、グアニル基、ウラシル基、チミニル基、シトシニル基、ヒポキサンチニル基から選択される核酸塩基基を示す。これら核酸塩基基中のアミノ基は、保護されていてもよい。当該保護基としては、例えば、ベンジル基やジ（4-メトキシフェニル）メチル基などのベンジル系保護基；アリル基などのアリル系保護基；メチルカルバメート基、エチルカルバメート基、9-フルオレニルメチルカルバメート基、*t*-ブチルカルバメート基などのカルバメート系保護基；アセチル基、ベンゾイル基、イソプロピルカルボニル基、フェノキシアセチル基などのアシル系保護基などを挙げることができる。なお、核酸塩基基中の $-NHR^7$ 基などにおいては、保護基である $R^7$ 等は、例えば、ジメチルアミノメチレン基、ベンジリデン基、ジフェニルメチレン基などのイミン系保護基や、環状保護基など、 $-N=R^7$ 等の形でアミノ基を保護するものであってもよいものとする。

[0032] なお、 $R^4$ が水素原子、 $B^1$ がシトシニル基であり且つ $B^2$ がアデニル基である

N-グリコシルアスパラギン-核酸誘導体 (I) は、既存の無細胞翻訳システムで用いられる tRNA で非天然アミノ酸の結合部分として有用である。

[0033] R<sup>5</sup>とR<sup>6</sup>は、一方が水素原子であり、他方がN-グリコシル酸アミドアミノ酸基 (I I) :

[0034] [化7]



[式中、R<sup>14</sup>~R<sup>18</sup>は上記と同義を示す]

である。

[0035] なお、N-グリコシル酸アミドアミノ酸基 (I I) が2'位に結合している化合物と3'位に結合している化合物とは等価であり、溶液中では遷移状態を経て互いに平衡である。

[0036] 上記式 (I I) 中、R<sup>14</sup>~R<sup>16</sup>は、独立して水素原子または水酸基の保護基を示す。水酸基の保護基としては、例えば、ベンジル基、p-メトキシベンジル基、3,4-ジメトキシベンジル基、o-またはp-ニトロベンジル基、p-ハロベンジル基、2,6-ジクロロベンジル基などのベンジル系保護基；トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、トリスプロピルシリル基、t-ブチルジメチルシリル基、t-ブチルジフェニルシリル基、トリフェニルシリル基などのシリル系保護基；アセチル基やベンゾイル基などのアシル系保護基；メトキシメチル基、p-メトキシベンジルオキシメチル基、t-ブトキシメチル基、2-メトキシエトキシメチル基、1-メトキシエチル基、1-エトキシエチル基などのアルコキシメチル系保護基などを挙げる事ができる。

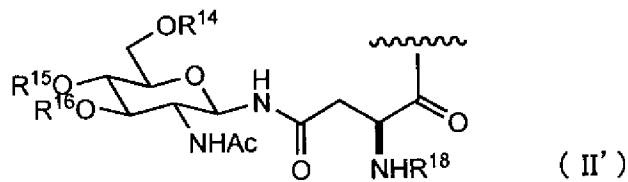
[0037] R<sup>17</sup>とR<sup>18</sup>は、独立して水素原子またはアミノ基の保護基を示す。アミノ基の保護基としては、核酸塩基中のアミノ基の保護基と同様のものを例示す

ることができる。

[0038] nは1または2を示し、nが1である場合、酸アミドアミノ酸部分がアスパラギンとなり、nが2である場合はグルタミンとなる。

[0039] R<sup>17</sup>としてはアセチル基が、nとしては1が、糖部分はN-アセチルグルコサミンが、アミノ酸部分としてはL体が好ましい。即ち、N-グリコシル酸アミドアミノ酸基(II)としては、下記式(II')で表されるN-(N-アセチルグルコサミル)-L-アスパラギニル基が好ましい。

[0040] [化8]



[式中、R<sup>14</sup>~R<sup>16</sup>およびR<sup>18</sup>は上記と同義を示す]

糖タンパク質において、N-結合型の糖鎖の多くはある特定配列中のL-アスパラギンに結合しており、その基底部分の糖はN-アセチルグルコサミンであることが多い。即ち、上記N-(N-アセチルグルコサミル)-L-アスパラギニル基(II')を有する核酸誘導体は、天然型の糖タンパク質を製造するための原料化合物として有用である。

[0041] 但し、天然型の糖タンパク質の中にも、グルタミニル基、特にL-グルタミニル基の側鎖アミノ基に糖鎖が結合したものもある。また、アスパラギニル基またはグルタミニル基の最初に結合した糖がN-アセチルガラクトサミンであるものもある。本発明には、これらも含まれるものとする。

[0042] 本発明に係るN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体(I)は、塩であってもよい。当該塩としては、例えば、ナトリウム塩やカリウム塩などのアルカリ金属塩；テトラメチルアンモニウム塩、テトラエチルアンモニウム塩、テトラブチルアンモニウム塩、ピリジニウム塩などの第四級アンモニウム塩；アンモニウム塩；ジアザビスクロウンデセニウム塩、トリエチルア

ンモニウム塩、ジイソプロピルアンモニウム塩など、その他の1～3級アンモニウム塩；塩化物塩や臭化物塩などのハロゲン化物塩；塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩などの無機酸塩；ギ酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩、プロピオン酸塩、安息香酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、パラトルエンスルホン酸塩などの有機酸塩を挙げることができる。

[0043] 本発明に係るN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体(Ⅰ)またはその塩は、脱水縮合剤の存在下、核酸誘導体(ⅠⅠⅠ)またはその塩と、N-グリコシル酸アミドアミノ酸誘導体(ⅠⅤ)とを縮合することにより製造することができる。

[0044] 核酸誘導体(ⅠⅠⅠ)またはその塩は、当業者であれば、公知の核酸製造法や公知方法の改良方法に基づいて合成することができる。なお、本発明者らが見出した方法では、核酸誘導体(ⅠⅠⅠ)の前駆体化合物におけるリン酸基の保護基であるシアノエチル基、水酸基の保護基であるTBDMs基、および核酸塩基基のアミノ基の保護基であるベンゾイル基を、水酸化テトラブチルアンモニウム水溶液を用いて同時に除去し、且つ、有機溶媒に対する溶解性を向上する目的で行われるテトラブチルアンモニウム塩へのイオン交換も不要になっている。また、当業者であれば、N-グリコシル酸アミドアミノ酸誘導体(ⅠⅤ)も、アスパラギン、グルタミンまたはこれらの誘導体と糖を縮合することにより、容易に合成することができる。

[0045] なお、本工程に加え、本工程以前または以降の何れの工程においても、適時、各保護基を各反応に適したものに变更してもよいものとする。適切な保護基と保護反応および脱保護反応は、当業者であれば公知方法から適宜選択することができる。例えば、T. W. Green, P. G. M. Wuts, "PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS", JOHN WILEY & SONS, Inc. や、Beaucage, S. ら, Tetrahedron, 1992, 48, pp. 2223-2311を参照すればよい。

[0046] 核酸誘導体(ⅠⅠⅠ)またはその塩とN-グリコシル酸アミドアミノ酸誘導体(ⅠⅤ)とは、1対1で反応させればよいが、N-グリコシル酸アミド

アミノ酸誘導体（ⅠⅤ）をより多く用いることが好ましい。一般的には、N-グリコシル酸アミドアミノ酸誘導体（ⅠⅤ）に比べて核酸誘導体（ⅠⅠⅠ）またはその塩の方が合成ステップが多いことによる。また、核酸誘導体（ⅠⅠⅠ）の溶媒に対する溶解度が低いということもある。例えば、核酸誘導体（ⅠⅠⅠ）またはその塩1モルに対して、N-グリコシル酸アミドアミノ酸誘導体（ⅠⅤ）を1倍モル以上、10倍モル以下用いることができ、より好ましくは8倍モル以下、さらに好ましくは6倍モル以下、特に好ましくは5倍モル以下用いる。

[0047] 本工程で用いる脱水縮合剤は、糖水酸基とアミノ酸のカルボキシ基を脱水縮合できるものであれば特に制限されないが、例えば、ジイソプロピルカルボジイミド（DIPC）、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド（EDCまたはWSC1）、1-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（WSC1·HCl）、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）などのカルボジイミド系脱水縮合剤；O-ベンゾトリアゾール-1-イル-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HBTU）、ベンゾトリアゾール-1-イル-トリメチルアミノホスホニウムヘキサフルオロリン化物塩（BOP）、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フェート、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェートなどのフルオロホスフェート系脱水縮合剤；O-(1, 2-ジヒドロ-2-オキソ-1-ピリジル)-N, N, N, N'-テトラメチルウロニウム-テトラフルオロボラート（TPTU）などのフルオロボラート系脱水縮合剤；2-クロロ-1, 3-ジメチルイミダゾリニウムクロライド（DMC）、1, 1'-カルボニルジイミダゾール（CDI）などのイミダゾール系脱水縮合剤；ヨウ化2-クロロ-1-メチルピリジニウム（CMP1）などのピリジン系脱水縮合剤；ジフェニルホスホリルアジド（DPPA）などが挙げられる。好ましくはカルボジイミド系脱水縮合剤を用い

る。また、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロライド(DMT-MM)も好ましく使用できる。

[0048] 1モルの脱水縮合剤は、1モルの水を捕捉できるので、核酸誘導体(III)またはその塩とN-グリコシル酸アミドアミノ酸誘導体(IV)とで多い方と同程度用いることが好ましい。例えば、N-グリコシル酸アミドアミノ酸誘導体(IV)1モルに対して、1倍モル以上、5倍モル以下用いることができ、1.2倍モル以上、2倍モル以下用いることがより好ましい。

[0049] 本工程においては、脱水縮合剤による反応を促進するために、いわゆる縮合助剤を併用することが好ましい。かかる縮合助剤としては、例えば、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)などのN-ヒドロキシトリアゾール類；ピリジン、4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)、ピロリジノピリジン(PPY)などのピリジン系；N-ヒドロキシコハク酸イミド(HONSu)、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボン酸イミド(HONB)などのN-ヒドロキシ多価カルボン酸イミド類；3-ヒドロキシ-4-オキソ-3,4-ジヒドロ-1,2,3-ベンゾトリアジン(HOObt)などのトリアジン類；2-ヒドロキシイミノ-2-シアノ酢酸エチルエステルなどが挙げられる。縮合助剤としては、N-ヒドロキシトリアゾール類縮合助剤が好ましく、HOBtが特に好ましい。なお、縮合助剤の使用量は、適宜調整すればよい。例えば、ピリジン系の縮合助剤の使用量は脱水縮合剤に対して比較的少なくすることができ、また、トリアジン類の縮合助剤は過剰に使う方が良い結果が得られる場合がある。

[0050] 本工程は、通常、溶媒中で実施する。使用できる溶媒としては、各化合物を適度に溶解することができ且つ反応を阻害しないものであれば特に制限されず、適宜選択すればよいが、例えば、ジメチルホルムアミドやジメチルアセトアミドなどのアミド系溶媒；ジクロロメタンやジクロロエタンなどのハロゲン化炭化水素系溶媒；アセトニトリルなどのニトリル系溶媒；1,4-ジオキサンやテトラヒドロフランなどのエーテル系溶媒；ピリジンなどのピ

リジン系溶媒；ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド系溶媒；これら2以上の混合溶媒を挙げることができる。なお、本工程では脱水縮合反応を行うので、溶媒は事前に乾燥しておくことが好ましい。また、溶媒の使用量は、各化合物を溶解できる範囲で適宜調整すればよい。

[0051] 反応温度は適宜調整すればよいが、通常、10℃以上、80℃未満とすることができる。また、反応時間も適宜調整すればよく、例えば、核酸誘導体(III)またはその塩とN-グリコシル酸アミドアミノ酸誘導体(IV)のうち使用量の少ない方が反応液中から検出されなくなるまでとしたり、或いは予備実験などで決定することができる。通常は、1時間以上、10時間以下程度とすることができる。

[0052] 反応終了後は、一般的な後処理を行えばよい。例えば、溶媒を減圧留去した後、クロマトグラフィなどで精製すればよい。

[0053] 本発明に係るN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体(I)またはその塩は、例えば、無細胞翻訳システムを用いたペプチド合成において、糖鎖を有するアスパラギンやグルタミンを導入するために用いることができる。より詳しくは、本発明に係るN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体(I)またはその塩の糖部分に、例えばエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼなどを用いて所望の糖鎖を結合させた上で上記のとおりペプチドを合成したり、或いは、本発明に係るN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体(I)またはその塩を導入したペプチドを上記のとおり合成した上で、エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼなどを用いて、誘導体(I)の糖部分に所望の糖鎖を結合させることもでき得る。

[0054] 本願は、2013年3月29日に出願された日本国特許出願第2013-73744号に基づく優先権の利益を主張するものである。2013年3月29日に出願された日本国特許出願第2013-73744号の明細書の全内容が、本願に参考のため援用される。

## 実施例

[0055] 以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はもとよ

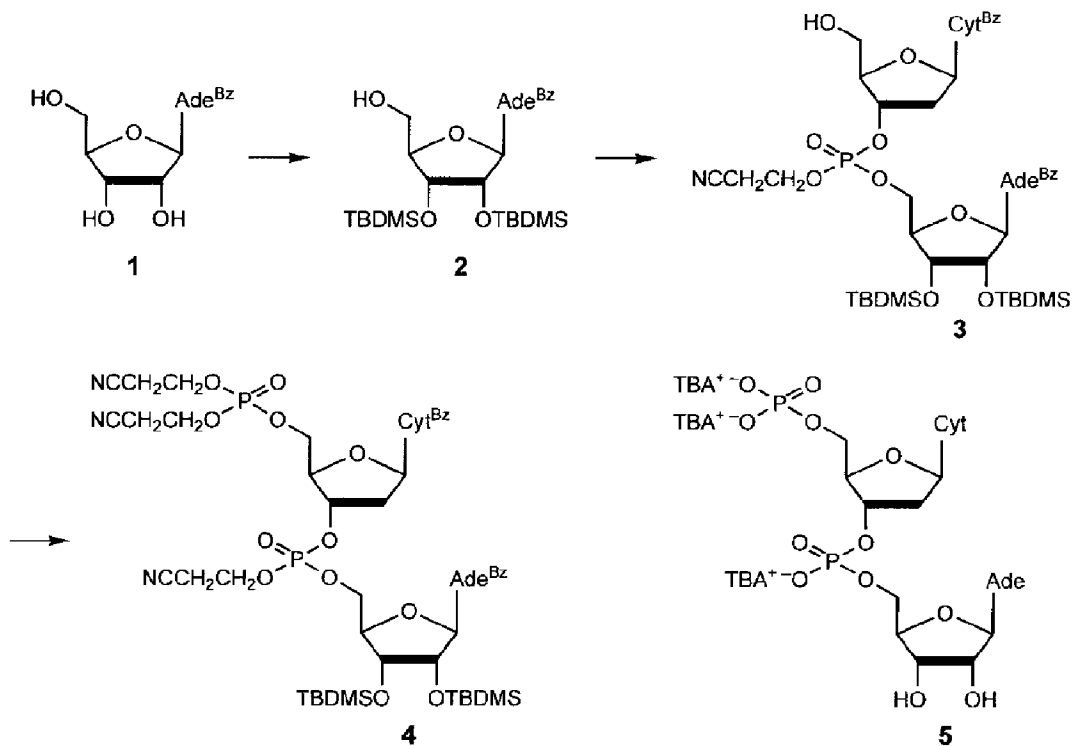


り下記実施例によって制限を受けるものではなく、前・後記の趣旨に適合し得る範囲で適当に変更を加えて実施することも勿論可能であり、それらはいずれも本発明の技術的範囲に包含される。

[0056] 実施例 1

(1) 核酸部分の合成

[0057] [化9]



(1-1) 2', 3'-O-ジ (t-ブチルジメチルシリル) -N<sup>6</sup>-ベンゾイルアデノシン (化合物2) の調製

N<sup>6</sup>-ベンゾイルアデノシン (化合物1, 3.7g, 10mmol)、t-ブチルジメチルシリルクロライド (9.0g, 60mmol) およびイミダゾール (6.2g, 90mmol) を乾燥DMF (50mL) に溶解し、当該溶液を室温で48時間攪拌した。当該反応液を濃縮した後に、得られた粗生成物 (トリTBDMS化合物) をジクロロメタン (25mL) に溶解し、氷冷した蒸留水 (1.5L) に滴下した。有機層を分離して濃縮し、得られた粗生成物を2.2Mトリフルオロ酢酸/純水-THF (1/4) 溶液 (2

16 mL) に溶解し、5 時間反応させた。当該反応液を氷冷し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (400 mL) を投入した。ジクロロメタン (100 mL) で2回抽出した後、無水硫酸ナトリウム (10 g) で乾燥した。乾燥した抽出液を濃縮後、得られた粗生成物を順相クロマトグラフィで精製することにより、目的化合物を無色のガム状体として得た (収量: 4.9 g, 8.2 mmol, 収率: 82%)。なお、順相クロマトグラフィでは、シリカゲルとして Yamazen 社製の High-Flash 40  $\mu$ m silica gel (120 g) を用い、溶出液としては、n-ヘキサン/酢酸エチル = 1/2 を用いた。

[0058] (1-2) N<sup>4</sup>-ベンゾイル-2'-デオキシシチジリル-[3'-O<sup>p</sup>-(2-シアノエチル)→5']-N<sup>6</sup>-ベンゾイルアデノシン (化合物3) の調製

上記 (1-1) で得られた化合物2 (1.8 g, 3.0 mmol)、2'-デオキシシチジンホスホルアミダイド (3.0 g, 3.6 mmol) およびモレキュラーシーブス4A (100 mg) を乾燥ジクロロメタン (9 mL) に懸濁し、当該懸濁液を室温で60分間攪拌した。当該反応液にベンゾイミダゾリウムトリフレート (1.2 g, 4.5 mmol) を加え、さらに120分攪拌した。反応混合物をビス(トリメチルシリル)パーオキサイド (3.3 mL, 15 mmol) で60分間処理した後、不溶物を濾別した。濾液を濃縮し、5'水酸基保護ヌクレオシド二量体を無色のガム状体として得た (収量: 5.0 g)。当該二量体を、さらに3%トリクロロ酢酸/ジクロロメタン溶液 (90 mL) で10分間処理した後、激しく攪拌された飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (300 mL) に投入した。有機層を分離し、無水硫酸ナトリウム (10 g) で乾燥した後に濃縮し、無色のガム状物質を得た (収量: 5.0 g)。得られた粗生成物から順相クロマトグラフィにより保護基由来の非極性夾雑物を除去した後、逆相クロマトグラフィで精製することにより、反応剤由来の夾雑物を除去して、目的化合物をジアステレオ混合物 (1:1) の無色ガム状体として得た (収量: 2.2 g, 2.1 mmol)

, 収率: 69%)。なお、順相クロマトグラフィでは、シリカゲルとして Yamazen社製の High-Flash 40 $\mu$ m silica gel (120g) を用い、溶出液としては、酢酸エチル/メタノール=8/2 を用いた。逆相クロマトグラフィでは、シリカゲルとして Yamazen社製の High-Flash 50 $\mu$ m ODS silica gel (30g) を用い、溶出液としては、水/メタノール=1/9 を用いた。

[0059] (1-3) 5'-O-ジ(2-シアノエチル)ホスホリル-N<sup>4</sup>- (ベンゾイル-2'-デオキシシチジリル-[3'-O<sup>p</sup>-(2-シアノエチル)→5'])-N<sup>6</sup>-ベンゾイルアデノシン (化合物4) の調製

上記(1-2)で得た化合物3 (770mg, 2.9mmol)、dCpA5 (2.0g, 1.9mmol) およびモレキュラーシーブス4A (100mg) を乾燥ジクロロメタン (5.6mL) に懸濁し、当該懸濁液を30分間攪拌した。当該懸濁液へ、ベンゾイミダゾリウムトリフレート (1.0g, 3.8mmol) を加え、さらに120分間攪拌した。当該反応液にビス(トリメチルシリル)ペルオキサイド (2.0mL, 9.5mmol) を加えて60分間酸化反応した後、不溶物を濾別した。得られた濾液を濃縮し、ガム状の粗生成物を得た (4.2g)。得られた粗生成物から逆相クロマトグラフィにより反応剤由来の夾雑物を除去した後、順相クロマトグラフィにより基質由来の夾雑物を除去することにより、目的化合物を無色ガム状体として得た (収量: 1.5g, 1.2mmol, 収率: 65%)。なお、逆相クロマトグラフィでは、シリカゲルとして Yamazen社製の High-Flash 50 $\mu$ m ODS silica gel (45g) を用い、溶出液としては、水/メタノール=1/9 を用いた。順相クロマトグラフィでは、シリカゲルとして Yamazen社製の High-Flash 40 $\mu$ m silica gel (30g) を用い、溶出液としては、酢酸エチル/メタノール=1/1 を用いた。

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  9.34 (2H, d, J=9.7Hz) , 8.80 (4H, br s) , 8.32 (1H, s) , 8.29 (1H, s) , 8.06-7.95 (6H, m) , 7.88 (4H, m) , 7.62

-7.56 (4H, m), 7.52-7.49 (10H, m), 6.22 (1H, t, J=6.6Hz), 6.18 (1H, t, J=6.6Hz), 6.02 (2H, dd, J=3.2Hz), 5.12 (1H, m), 5.06 (1H, m), 4.89 (1H, t, J=4.0Hz), 4.84 (1H, t, J=4.0Hz), 4.49-4.15 (28H, m), 2.85-2.73 (14H, m), 2.26 (1H, m), 2.20 (1H, m), 0.94 (18H, s), 0.86 (9H, s), 0.84 (9H, s), 0.14 (6H, s), 0.12 (6H, s), 0.04 (3H, s), 0.03 (3H, s), -0.08 (3H, s), -0.12 (3H, s)

$^{31}\text{P}$  NMR (202.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  -1.59, -1.14, -1.70, -1.75

(1-4) 5'-O-ホスホリル-2'-デオキシシチジリル-(3'→5')-アデノシン(化合物5)の調製

上記(1-3)で得た化合物4(200mg, 0.16mmol)のメタノール溶液(2.4mL)に、1,4-ジオキサン(0.35mL)と10%テトラブチルアンモニウムヒドロキシド水溶液(2.9mL)を加えて放置した。放置時間は、常圧の場合には24時間とし、800MPaの場合は14時間とした。当該反応液を濃縮し、サイズ排除クロマトグラフィにより目的化合物を薄黄色固体として得た(収量:220mg, 0.16mmol, 収率:>99%)。なお、サイズ排除クロマトグラフィでは、担体としてSephadex G-10(20mL)を用い、溶出液としては、水/メタノール=4/1を用いた。

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  8.65 (1H, m), 8.14 (2H, m), 7.92 (1H, m), 6.42 (1H, m), 6.11 (1H, m), 5.95 (1H, m), 4.74 (1H, m), 4.60 (1H, m), 4.26 (2H, m), 4.06 (4H, m), 3.62 (1H, m), 3.23 (24H, m, TBA), 2.41 (1H, m), 1.62 (24H, m, TBA), 1.40 (24H, m, TBA), 1.01 (36H, m, TBA)

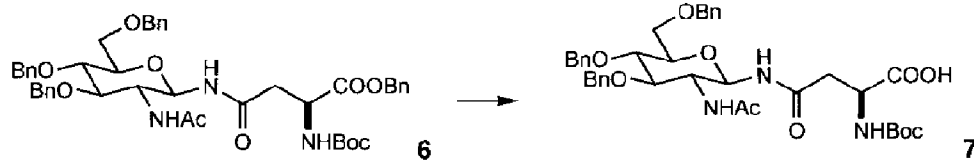
$^{31}\text{P}$  NMR (202.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  4.28, -0.46

MALDI-TOFMS : calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_8\text{O}_{13}\text{P}_2$ ,  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z : 637.12, Found m/z : 637.52

(2)  $\text{N}^\omega$ -(2-アセトアミド-3,4,6-トリ-O-ベンジル-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラノシル)- $\text{N}^\alpha$ -(t-ブトキシカルボニル

) -アスパラギン (化合物7) の調製

[0060] [化10]



$N^{\omega}$ -(2-アセトアミド-3,4,6-トリ-O-ベンジル-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラノシル)- $N^{\alpha}$ -(t-ブトキシカルボニル)-アスパラギン ベンジルエステル (化合物6, 50 mg, 63  $\mu$ mol) をジクロロメタン/メタノール=9/1 混合液 (1.2 mL) に溶解し、当該溶液へ水酸化ナトリウム (5 mg, 126  $\mu$ mol) を加え、30分間攪拌した。当該反応液へ、氷冷下、0.5 M塩酸 (250  $\mu$ L) を滴下した後、ジクロロメタン (1.0 mL) を加え、有機層を分離した。当該有機層を濃縮後、得られた残渣をジエチルエーテル (0.2 mL) で洗浄することにより、目的化合物を無色固体として得た (収量: 44 mg, 62  $\mu$ mol, 収率: >99%)。

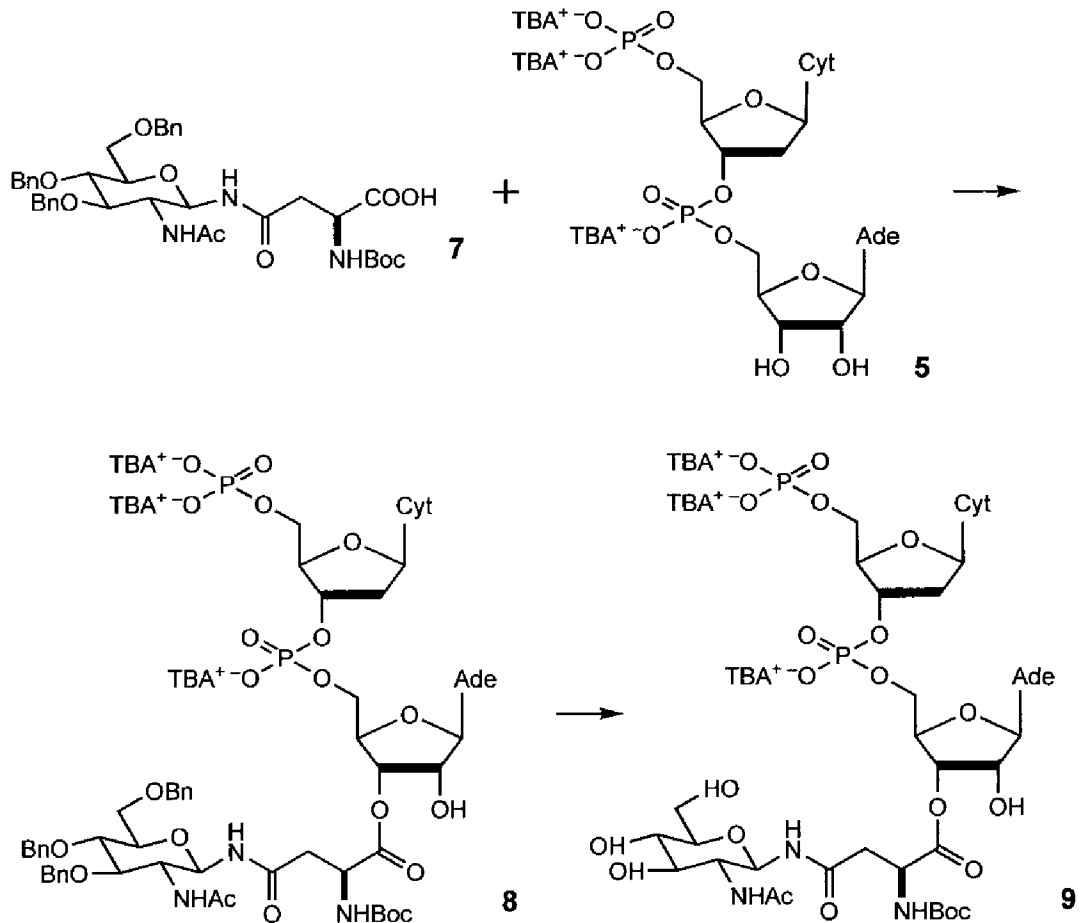
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.52-7.15 (15H, m), 5.84 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz), 5.64 (1H, m), 4.81 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz), 4.76 (1H, d,  $J = 11.5$  Hz), 4.61 (2H, dd,  $J = 11.5$  Hz), 4.52 (1H, d,  $J = 10.9$  Hz), 4.46 (1H, d,  $J = 12.1$  Hz), 3.95 (1H, m), 3.71 (3H, m), 3.53 (2H, m), 2.83 (1H, m), 2.63 (1H, m), 1.77 (3H, d,  $J = 18.9$  Hz), 1.40 (9H, s)

### (3) エステル化と脱保護

なお、リボヌクレオチドの2'位と3'位におけるエステルは、溶液中、互いに平衡の関係にあり等価なものであるといえるが、以下のスキームでは代表的に2'位エステルのみ示している。

[0061]

[化11]



(3-1)  $N^{\omega}$ -(2-アセトアミド-3, 4, 6-トリ- $O$ -ベンジル-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラノシル)- $N^{\alpha}$ -( $t$ -ブトキシカルボニル)-アスパラギン pdCpAエステル (化合物8) の調製

上記(2)で得た化合物7 (35 mg, 50  $\mu$ mol)、ジイソプロピルカルボジイミド (7.8  $\mu$ L, 50  $\mu$ mol) および1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (6.8 mg, 50  $\mu$ mol) を乾燥DMF (100  $\mu$ L) に溶解した。別途、上記(1-4)で得た化合物5 (14 mg, 10  $\mu$ mol) を乾燥DMF (100  $\mu$ L) に溶解した。化合物7の溶液へ化合物5の溶液を加え、室温で3時間攪拌したところ、化合物5は完全に消費された。当該反応液に1.0 mLの純水またはメタノールを加えた。当該混合液を濃縮後、残渣をメタノール (1 mL) に溶解した。当該溶液をサイズ排除クロマ

トグラフィに供して、目的化合物を無色固体として得た（収量：5.9 mg, 2.9 μmol, 収率：29%）。なお、サイズ排除クロマトグラフィでは、担体としてSephadex LH-20（10 mL）を用い、溶出液としてはメタノールを用いた。

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 8.60 (1H, m), 8.16 (1H, m), 7.24–7.16 (15H, m), 6.30 (1H, m), 6.07 (1H, m), 4.75–3.52 (24H, m), 3.21 (8H, m), 1.88 (3H, br s), 1.63 (8H, m), 1.40 (17H, m), 0.99 (12H, m)

<sup>31</sup>P NMR (202.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ 1.56, -0.14

MALDI-TOFMS : calcd for C<sub>57</sub>H<sub>69</sub>N<sub>11</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>22</sub>P<sub>2</sub>, [M+3Na+H]<sup>+</sup> m/z : 1390.38, Found m/z : 1390.50

(3-2) N<sup>ω</sup>-(2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル)-N<sup>α</sup>-(t-ブトキシカルボニル)-アスパラギン pdCpA エステル (化合物9) の調製

上記(3-1)で得た化合物8 (5.9 mg, 2.9 μmol)、10 mM塩酸 (10 μL) および10%パラジウム炭素 (0.10 mg) をエタノール (1.0 mL) に懸濁した。当該懸濁液を、H<sub>2</sub>ガス雰囲気下 (1.0 atm)、12時間攪拌した。当該反応液の不溶物を濾別し、濾液を濃縮した。得られた粗生成物を逆相クロマトグラフィに供し、目的化合物を無色固体として得た（収量：2.2 mg, 1.9 μmol, 収率：66%）。なお、逆相クロマトグラフィでは、シリカゲルとしてYamazen社製のHigh-Flash 50 μm ODS silica gel (6 g) を用い、溶出液としては、水/メタノール=1/1を用いた。

[0062] 比較例1：非特許文献2に記載の方法の応用

非特許文献2に記載の活性エステル法を適用して本発明に係るN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体の製造を試みた。詳しくは、化合物7 (4.0 mg, 5.7 μmol)、クロロアセトニトリル (1.8 μL, 28 μmol) およびトリエチルアミン (3.9 μL, 28 μmol) を乾燥D

MF (53  $\mu$ L) に溶解し、室温で2時間攪拌した。その結果、化合物7は完全に消費された。

[0063] しかし、得られた生成化合物のほとんどが分子内環化してしまい、イミド化合物やイミノラクトン化合物といった分子内環化化合物に変換され、シアノメチルエステル体は痕跡量が確認されるのみであり、単離が可能であるほどの量は生成しなかった。

[0064] 分子内環化化合物のスペクトルデータ

MALDI-TOFMS : calcd for  $C_{19}H_{27}N_8O_{13}$ ,  $[M+H]^+$  m/z : 637.12, Found m/z : 637.52

比較例2 : リパーゼの使用

リパーゼを用いたエステル化方法を用いて、本発明に係るN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体の製造を試みた。具体的には、化合物5 (14 mg, 10  $\mu$ mol)、ベンジルエステル化合物6 (8.8 mg, 10  $\mu$ mol)、*Candida cylindracea*由来のリパーゼ (CCL, 2.9 mg, 2030 unit)、モレキュラーシーブス13X (100 mg) を乾燥DMF (300  $\mu$ L) に溶解し、37°Cで24時間攪拌した。しかし、化合物5は全く消費されず、化合物6が加水分解された化合物7のみが観察された。なお、lipase PSを用いても同様の結果となった。

[0065] 実施例2 N $\omega$ -(2-アセトアミド-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラノシル) アスパラギン pdCpAエステル (化合物10) の調製

[0066]

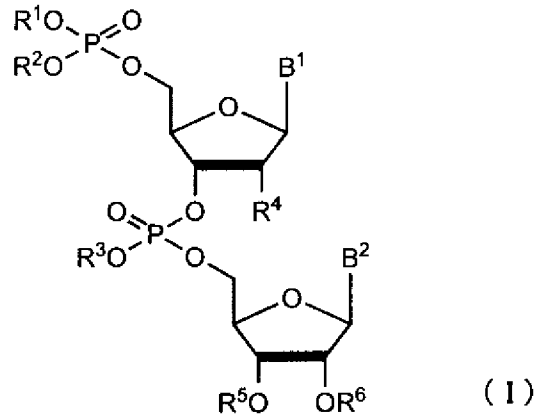




## 請求の範囲

[請求項1] 下記式(1)で表されるN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体またはその塩。

[化1]



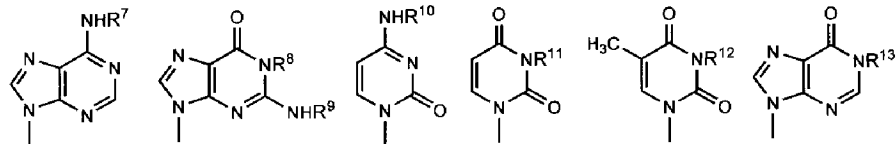
[式中、

$R^1 \sim R^3$ は、独立して水素原子またはリン酸基の保護基を示し；

$R^4$ は、水素原子、水酸基、保護水酸基、 $C_{1-6}$ アルコキシ基、2-( $C_{1-6}$ アルコキシ)エトキシ基またはハロゲン原子を示し；

$B^1$ および $B^2$ は、独立して下記式で表される何れかの核酸塩基基：

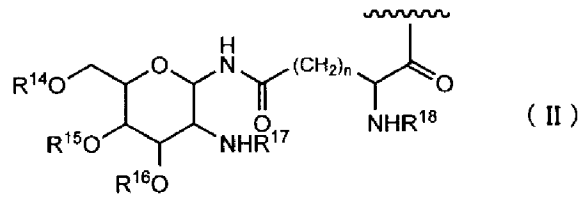
[化2]



[式中、 $R^7 \sim R^{13}$ は、独立して水素原子またはアミノ基の保護基を示す]を示し；

$R^5$ は下記式(11)で表されるN-グリコシル酸アミドアミノ酸基を示し且つ $R^6$ は水素原子を示すか、或いは、 $R^5$ は水素原子を示し且つ $R^6$ は下記式(11)で表されるN-グリコシル酸アミドアミノ酸基を示す：

[化3]



[式中、

$R^{14} \sim R^{16}$ は、独立して水素原子または水酸基の保護基を示し；

$R^{17}$ と $R^{18}$ は、独立して水素原子またはアミノ基の保護基を示し；

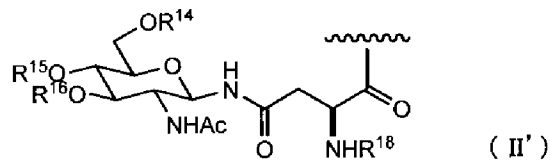
$n$ は1または2を示す]

[請求項2]  $n$ が1である請求項1に記載のN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体またはその塩。

[請求項3]  $R^{17}$ がアセチル基である請求項1または2に記載のN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体またはその塩。

[請求項4] N-グリコシル酸アミドアミノ酸基(II)が、下記式(II')で表されるN-(N-アセチルグルコサミル)-L-アスパラギンル基である請求項1に記載のN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体またはその塩。

[化4]

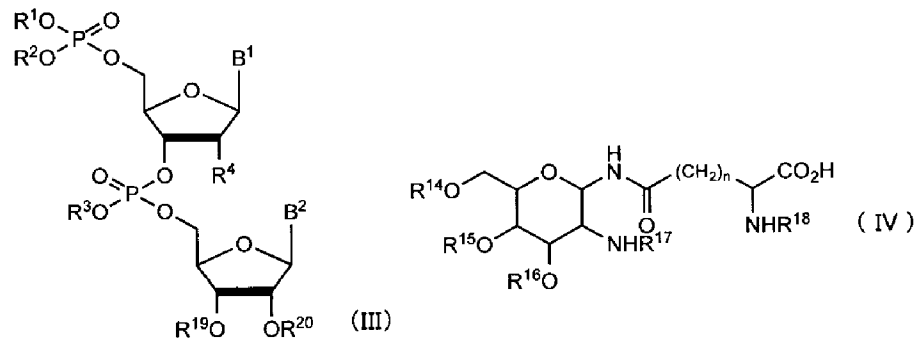
[式中、 $R^{14} \sim R^{16}$ および $R^{18}$ は上記と同義を示す]

[請求項5]  $B^1$ がシトシニル基であり且つ $B^2$ がアデニル基である請求項1~4のいずれかに記載のN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体またはその塩。

[請求項6] 請求項1に記載のN-グリコシル酸アミドアミノ酸-核酸誘導体(I)またはその塩を製造するための方法であって、

脱水縮合剤の存在下、下記式（III）で表される核酸誘導体またはその塩と、下記式（IV）で表されるN-グリコシル酸アミノ酸誘導体とを縮合する工程を含む方法。

[化5]



[式中、R<sup>1</sup>~R<sup>4</sup>、B<sup>1</sup>、B<sup>2</sup>およびnは上記と同義を示し；R<sup>14</sup>~R<sup>18</sup>は上記と同義を示すが、水素原子ではないものとし；R<sup>19</sup>とR<sup>20</sup>は、いずれか一方が水素原子で且つ他方が水酸基の保護基を示すか、或いは、両方とも水素原子を示す]

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2014/058711

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
C07H21/04(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)  
C07H21/04

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROEHRIG, C.H. et al, A new strategy for the synthesis of dinucleotides loaded with glycosylated amino acids - investigations on in vitro non-natural amino acid mutagenesis for glycoprotein synthesis, ChemBioChem, 2005, Vol. 6, No.10, pp.1805-1816	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 04 June, 2014 (04.06.14)	Date of mailing of the international search report 17 June, 2014 (17.06.14)
---------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C07H21/04(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. C07H21/04		
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 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014年		
国際調査で利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 A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )		
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 請求項の番号
X	ROEHRIG, C.H. et al, A new strategy for the synthesis of dinucleotides loaded with glycosylated amino acids - investigations on in vitro non-natural amino acid mutagenesis for glycoprotein synthesis, ChemBioChem, 2005, Vol.6, No.10, pp.1805-1816	1-6
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <span style="margin-left: 200px;"><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</span>		
* 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 04.06.2014	国際調査報告の発送日 17.06.2014	
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） 三上 晶子 電話番号 03-3581-1101 内線 3492	4 P    4 0 4 2