

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4381002号  
(P4381002)

(45) 発行日 平成21年12月9日(2009.12.9)

(24) 登録日 平成21年10月2日(2009.10.2)

(51) Int.Cl. F 1  
C 0 7 H 15/04 (2006.01) C 0 7 H 15/04 E

請求項の数 1 (全 5 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2003-48499 (P2003-48499)                  (22) 出願日 平成15年2月26日 (2003.2.26)                  (65) 公開番号 特開2004-256433 (P2004-256433A)                  (43) 公開日 平成16年9月16日 (2004.9.16)                  審査請求日 平成17年12月16日 (2005.12.16)</p>	<p>(73) 特許権者 000173924                  財団法人野口研究所                  東京都板橋区加賀 1-8-1                  (72) 発明者 佐藤 玲子                  神奈川県横浜市南区井土ヶ谷下町 2 1 5 -                  1 - 2 - 1 1 0 8                  (72) 発明者 戸潤 一孔                  神奈川県相模原市陽光台 4 - 8 - 3 6                  審査官 荒木 英則</p>
--	---

最終頁に続く

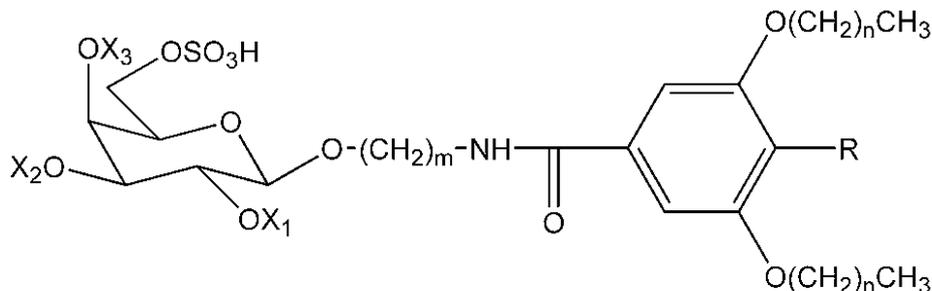
(54) 【発明の名称】 ガラクトース二硫酸誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式(1)で示されるガラクトース二硫酸誘導体。

【化 1】



(1)

(ただし、式中で、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ は、 $X_1 = SO_3H$ 、 $X_2 = H$ 、 $X_3 = H$ 、または、 $X_1 = H$ 、 $X_2 = SO_3H$ 、 $X_3 = H$ 、または、 $X_1 = H$ 、 $X_2 = H$ 、 $X_3 = SO_3H$ のいずれかの組み合わせを表し、 $R$ は $H$ または $O(CH_2)_nCH_3$ を、 $m$ は2から6の整数を、 $n$ は1から17の整数を表す。)

【発明の詳細な説明】

【0001】

以下で、DMFはジメチルホルムアミドの略号である。

## 【 0 0 0 2 】

## 【 発明の属する技術分野 】

本発明は、動物細胞培養に使用可能な、新規なガラクトース二硫酸誘導体に関するものである。

## 【 0 0 0 3 】

## 【 従来技術 】

硫酸基を持つ糖鎖には、ヘパラン硫酸、デルマタン硫酸等の様々な生理作用を有するものが知られている。例えば、造血が行われている器官である骨髄中には種々の細胞外マトリックス成分と共にヘパリンなどの硫酸糖が多量に含まれている。これら硫酸糖は、生体内で極微量で種々の生理活性を示す多くのサイトカインや増殖因子と親和性が高く、これらの因子の局在化を生じ、造血作用などの種々の生理作用を促進していると言われている。

10

## 【 0 0 0 4 】

こうした硫酸糖の機能を利用して、動物細胞培養を効率的に行おうとする試みが種々行われている。例えば、ヒト造血細胞の培養液にサイトカインを添加する際にヘパリンを共存させるとサイトカインの造血細胞増殖促進作用が大幅に増強されることが知られており、これはサイトカインとヘパリンとの間に親和性があるためとされている（非特許文献1参照）。そこで、遊離のヘパリンを用いるのではなく、動物細胞が接着する基質表面にヘパリンを固定化することにより、動物細胞近傍にサイトカインを局在化させ、より効果的に細胞培養を促進しようとする試みもなされてきた。具体的には、細胞培養用ディッシュ表面にヘパリンを固定するために、まず、正電荷を有するキトサンを固定化し、固定化されたキトサンにヘパリンやコンドロイチン硫酸をイオン結合により固定化する。引き続き、このディッシュにサイトカインとして幹細胞因子（SCF、5 ng/ml）、インターロイキン3（10 ng/ml）を加えた上で、ヒト臍帯血CD34表面抗原陽性細胞を培養すると、サイトカインだけを用いて培養する場合に比べ、CD34表面抗原陽性細胞を20～30倍多く増殖できた（非特許文献2参照）。また、細胞の接着基質であるポリエステル表面に酸素プラズマ放電で水酸基を導入し、これに続く数段の反応でヘパリンを共有結合により固定化する方法も開発された（非特許文献3参照）。

20

## 【 0 0 0 5 】

我々はこれまでに、簡単な構造を持つ低分子である、各種の糖脂質アナログを合成し（特許文献1、2参照）、その脂質類似構造の疎水性を利用して、細胞培養素材に固定化することにより、単糖誘導体でも肝臓細胞の培養等に有効に利用できることを示してきた（特許文献3、非特許文献4、5参照）。

30

さらに、特願2003-47144号に記載したように、ガラクトース-6-硫酸誘導体を合成して、造血細胞の培養に有効であることが示された。つまり、ヘパリン等の天然由来の複雑な多糖の混合物を用いずに、簡単に合成できる単糖誘導体を用いて、従来よりも簡便な工程で動物細胞培養素材が得られることが明らかになった。

## 【 0 0 0 6 】

しかし、ヘパリン等の硫酸化された天然多糖には、糖残基が2ヶ所硫酸化されたものも含まれていること、また、一般に、糖残基当たりの硫酸基数が多い程、相互作用が強くなる可能性があること等から、複数の硫酸基を持った誘導体の合成が望まれていた。

40

## 【 0 0 0 7 】

## 【 特許文献1 】

特開2001-122889号公報

## 【 特許文献2 】

特開2002-30091号公報

## 【 特許文献3 】

特開2002-27977号公報

## 【 非特許文献1 】

ブラッド（Blood）、2000年、95巻、p.147-155

## 【 非特許文献2 】

50

ステムセルズ (Stem Cells)、1999年、17巻、p. 295 - 305

【非特許文献3】

バイオマテリアルズ (Biomaterials)、2000年、21巻、p. 121 - 130

【非特許文献4】

ジャーナル・オブ・アーティフィシャル・オーガズ (J. Artif. Organs)、2001年、4巻、p. 315 - 319

【非特許文献5】

ジャーナル・オブ・バイオサイエンス・アンド・バイオエンジニアリング (J. Bioscience Bioengineering)、2002年、93巻、p. 437 - 439

【0008】

10

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、新規な構造を持ち、細胞培養素材への固定化が容易で、動物細胞培養に使用可能な、ガラクトース-2,6-二硫酸誘導体、ガラクトース-3,6-二硫酸誘導体、および、ガラクトース-4,6-二硫酸誘導体を提供することにある。

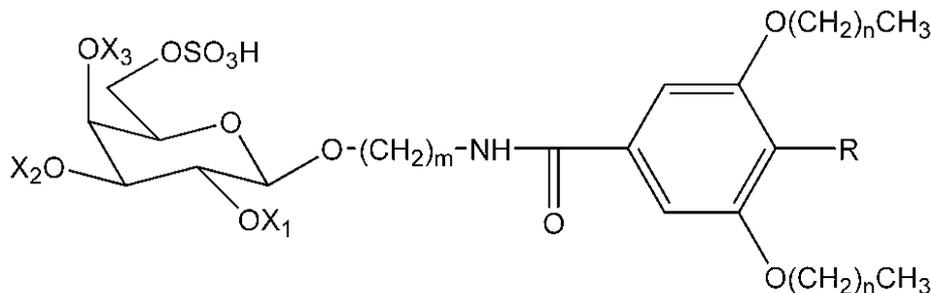
【0009】

【課題を解決するための手段】

上記課題を鋭意検討した結果、本発明者らは、ガラクトース-6-硫酸誘導体を合成した条件を改良することにより、新規な構造を持ち、細胞培養素材への固定化が容易で、動物細胞培養に使用可能な、ガラクトース-2,6-二硫酸誘導体、ガラクトース-3,6-二硫酸誘導体、および、ガラクトース-4,6-二硫酸誘導体を合成し、本発明を完成するに至った。

20

【化2】



30

(1)

(ただし、式中で、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ は、 $X_1 = SO_3H$ 、 $X_2 = H$ 、 $X_3 = H$ 、または、 $X_1 = H$ 、 $X_2 = SO_3H$ 、 $X_3 = H$ 、または、 $X_1 = H$ 、 $X_2 = H$ 、 $X_3 = SO_3H$ のいずれかの組み合わせを表し、 $R$ は $H$ または $O(CH_2)_nCH_3$ を、 $m$ は2から6の整数を、 $n$ は11から17の整数を表す。)

【0010】

以下に、本発明を詳細に説明する。

本発明の化合物の合成は、如何なる方法によっても構わない。例えば、我々が報告した方法(特開2001-122889号公報、特開2002-27977号公報)に従って合成した硫酸基を持たないガラクトース誘導体に対して、水酸基を無保護のまま、過剰量の三酸化硫黄・ピリジン錯体や三酸化硫黄・トリメチルアミン錯体等の適当な硫酸化剤を反応させることによって、単工程で、3種類の位置異性体を同時に調製することができる。化合物は、一般に、混合物として得られるので、必要に応じてシリカゲル等を用いた高性能薄層クロマトグラフィーや、アミドカラム等を用いた高性能液体クロマトグラフィーにより分取して使用する。

40

【0011】

式(1)の化合物はエタノールに可溶であり、そのエタノール溶液として、任意の形状を持ったポリエステル、ポリスチレン等の様々な疎水性表面に、容易にコーティングすることができ、エタノールを除去した後に、動物細胞培養に利用することが可能である。

【0012】

50

## 【発明の実施の形態】

以下に、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

## 【0013】

## 【実施例1】

(N-(O(2,6-ジ-O-スルホガラクトピラノシル)-6-オキシヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド、および、N-(O(3,6-ジ-O-スルホガラクトピラノシル)-6-オキシヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド、および、N-(O(4,6-ジ-O-スルホガラクトピラノシル)-6-オキシヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミドの合成)

N-(Oガラクトピラノシル-6-オキシヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド(30.0 mg, 0.040 mmol)をDMF(2.2 ml)に溶解させ、三酸化硫黄・ピリジン錯体(32.4 mg, 0.20 mmol, 5当量)を加え、アルゴン気流下、室温にて2.5時間撹拌した。反応終了後、メタノール(20 ml)を加え、溶媒を留去した。残渣をゲル濾過カラムクロマトグラフィー(LH-20、クロロホルム:メタノール:水=108:58:1、トリエチルアミン1%)にて分取し、さらに、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム:メタノール=4:1、トリエチルアミン1%)にて精製し、目的物(27.8 mg, 84%)を混合物として得た。

10

これらの化合物がエタノールに可溶であることを確認した。

## 【0014】

<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O=98:2, 60 )

20

N-(O(2,6-ジ-O-スルホガラクトピラノシル)-6-オキシヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド

6.96(t, J=2.4 Hz), 6.55(bs), 4.22(d, J=8.3 Hz), 4.09(dd, J=8.3, 9.3 Hz), 3.98(t, J=6.5 Hz), 3.86(dd, J=6.2, 10.3 Hz), 3.76(dd, J=6.2, 10.3 Hz), 3.70(m), 3.64(dd, J=2.0, 8.6 Hz), 3.58(t, J=6.2 Hz), 3.50(m), 3.47(m), 3.20(m), 1.69(m), 1.53(m), 1.41(m), 1.29(m), 0.85(t, J=6.9 Hz)

N-(O(3,6-ジ-O-スルホガラクトピラノシル)-6-オキシヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド

6.96(t, J=2.4 Hz), 6.55(bs), 4.15(d, J=7.6 Hz), 3.98(t, J=6.5 Hz), 3.95(dd, J=3.4, 9.6 Hz), 3.87(bd, J=3.4 Hz), 3.86(dd, J=6.2, 10.3 Hz), 3.76(dd, J=6.2, 10.3 Hz), 3.58(t, J=6.2 Hz), 3.47(m), 3.43(dd, J=7.6, 9.6 Hz), 3.20(m), 1.69(m), 1.53(m), 1.41(m), 1.29(m), 0.85(t, J=6.9 Hz)

30

N-(O(4,6-ジ-O-スルホガラクトピラノシル)-6-オキシヘキシル)-3,5-ビス(ドデシロキシ)ベンズアミド

6.96(t, J=2.4 Hz), 6.55(bs), 4.34(d, J=3.4 Hz), 4.06(d, J=7.6 Hz), 3.98(t, J=6.5 Hz), 3.94(m), 3.76(dd, J=6.2, 10.3 Hz), 3.70(m), 3.47(m), 3.34(dd, J=3.4, 9.6 Hz), 3.20(m), 1.69(m), 1.53(m), 1.41(m), 1.29(m), 0.85(t, J=6.9 Hz)

## 【0015】

## 【発明の効果】

40

本発明は、新規な構造を持ち、動物細胞培養に使用可能な、ガラクトース-2,6-二硫酸誘導体、ガラクトース-3,6-二硫酸誘導体、および、ガラクトース-4,6-二硫酸誘導体を提供する。

---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2001-122889(JP,A)  
特開2002-30091(JP,A)  
MADHALLY, S., et al., Stem Cells, 17, pp.295-305 (1999)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C07H 1/00-99/00  
CA/REGISTRY(STN)