

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4878777号  
(P4878777)

(45) 発行日 平成24年2月15日(2012.2.15)

(24) 登録日 平成23年12月9日(2011.12.9)

(51) Int. Cl. F I  
**C07H 15/04 (2006.01)** C O 7 H 15/04 C S P E  
**C07K 1/22 (2006.01)** C O 7 K 1/22  
**C07K 14/47 (2006.01)** C O 7 K 14/47

請求項の数 2 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2005-159038 (P2005-159038)	(73) 特許権者	000173924
(22) 出願日	平成17年5月31日(2005.5.31)		公益財団法人野口研究所
(65) 公開番号	特開2006-335652 (P2006-335652A)		東京都板橋区加賀 1-8-1
(43) 公開日	平成18年12月14日(2006.12.14)	(73) 特許権者	503360115
審査請求日	平成20年5月27日(2008.5.27)		独立行政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
		(72) 発明者	佐藤 玲子
			神奈川県横浜市南区井土ヶ谷下町215-1-2-1108
		(72) 発明者	戸潤 一孔
			神奈川県相模原市陽光台4-8-36
		審査官	三上 晶子

最終頁に続く

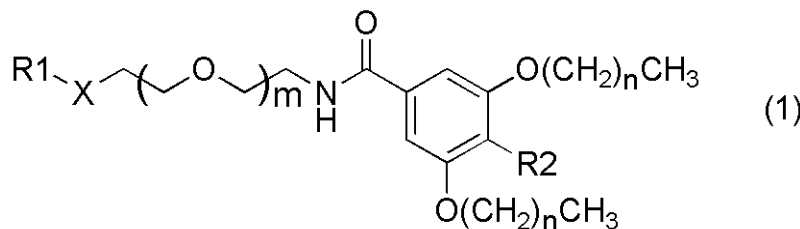
(54) 【発明の名称】 低非特異相互作用糖鎖プローブ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(1)で示されるベンズアミド誘導体。

【化1】



(ただし、式中で、mは1から100までの整数を、nは11から17までの整数を、XはOまたはNHを、R1は単糖またはオリゴ糖または還元末端が開環したオリゴ糖を、R2はO(CH2)nCH3またはHを表す。)

【請求項2】

請求項1に記載した式(1)で示される化合物を用いる糖鎖に結合する物質の精製法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規なベンズアミド誘導体に関するものである。さらに詳しくは、非特異相互作用が低く抑えられ、糖鎖に結合する物質の精製等に使用可能なベンズアミド誘導体に関するものである。

【背景技術】

【0002】

糖鎖は生体内で様々な機能を担っていることが知られている（例えば、非特許文献1参照）。そうした糖鎖の機能の多くは、各々の糖鎖とそれを特異的に認識する物質との相互作用を分子的な基盤としている。従って、糖鎖に結合する物質を探索、捕捉するための糖鎖プローブは、研究用の試薬としてだけでなく、糖鎖の機能を医薬品や診断薬に応用する上でも重要である。

10

【0003】

我々はこれまでに、長鎖アルキルオキシベンジルアルコール誘導体あるいは長鎖アルキルオキシベンズアミド誘導体を基本骨格とする人工脂質に糖鎖を結合した糖鎖プローブ（特許文献1～3参照）、あるいは、長鎖アルキルオキシベンズアミド誘導体の基本骨格に天然由来の糖鎖を還元アミノ化によって導入した糖鎖プローブ（特許文献4参照）等を提供してきた。これらの人工脂質型の糖鎖プローブは、その脂質部分を利用してプラスチックディッシュ等の疎水表面に固定することにより、糖鎖に結合する物質を探索、捕捉するための糖鎖プローブとして使用することができる。

【0004】

疎水表面上に固定した糖脂質型の糖鎖プローブの問題点として、表面自体の疎水性あるいは人工脂質部分に由来すると考えられる非特異的な相互作用が挙げられる。これまでに我々が提供した糖鎖プローブに関して開示した様に、そうした非特異的な相互作用は、精製された蛋白質と糖鎖との間の相互作用を解析するといった用途には支障が無い。また、適当なブロッキング剤を用いることにより、ある程度は非特異的な相互作用を抑えることもできる。しかし、例えば、生体由来試料等の複雑な混合物から糖鎖と特異的に相互作用する物質を探索、捕捉するといった用途では、非特異的な相互作用に由来するバックグラウンドが問題になる場合がある。また、こうした用途に対しては、適当なブロッキング剤を選択することも、必ずしも容易ではない。

20

【0005】

そこで、我々は、そうした疎水性表面への固定に由来する非特異相互作用を回避するための1つの方策として、水溶性の糖鎖プローブを提供した（特願2005-33012参照）。しかし、固体表面への糖鎖プローブの固定化は、既に様々な用途に用いられており、応用展開が容易である。また、プラスチック等の安価な素材の機能化が容易に行えることから、実用的な観点からも優れた面がある。そこで、疎水表面への固定化という機能は残しつつ、非特異的な相互作用はできる限り低く抑えた新たな糖鎖プローブの開発が望まれていた。我々は、以前にポリまたはオリゴエチレングリコールが結合した長鎖アルキルオキシベンズアミド誘導体を疎水表面に固定することで、非特異的な相互作用を低減できることを示している（特願2004-42011参照）。しかし、その様な化合物の糖鎖プローブへの応用はこれまでに検討されていなかった。

30

【特許文献1】特開2001-122889号 公報

40

【特許文献2】特開2001-253896号 公報

【特許文献3】特開2002-30091号 公報

【特許文献4】特開2004-75641号 公報

【非特許文献1】谷口直之他編、「糖鎖機能」（蛋白質核酸酵素2003年6月号増刊、共立出版、2003年）

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、非特異的な相互作用が小さく、疎水表面に固定可能な新たな糖鎖プローブ、および、その糖鎖プローブを用いる糖鎖に結合する物質の精製法を提供することに

50

ある。

【課題を解決するための手段】

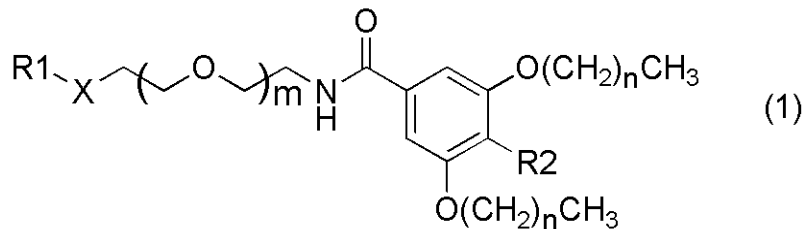
【0007】

上記課題を鋭意検討した結果、本発明者らは、まず、適当な長さを持ったオリゴエチレングリコール誘導体を介して糖鎖と長鎖アルキルオキシベンズアミド誘導体を結合した化合物を合成し、得られた化合物が疎水表面に固定できることを確認した。次いで、この糖鎖プローブが糖鎖に結合する物質と特異的に相互作用すること、また、非特異的相互作用が低いことを見出して、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明は、式(1)で示されるベンズアミド誘導体、および、式(1)の化合物を用いる糖鎖に結合する物質の精製法を提供する。

【化2】



(ただし、式中で、mは1から100までの整数を、nは11から17までの整数を、XはOまたはNHを、R1は単糖またはオリゴ糖または還元末端が開環したオリゴ糖を、R2はO(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>またはHを表す。)

【発明の効果】

【0009】

本発明は、非特異相互作用が小さく、疎水表面に固定が可能で、糖鎖に結合する物質の精製等に使用可能な新規糖鎖プローブ、及び、その糖鎖プローブを用いる糖鎖に結合する物質の精製法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

式(1)で示される化合物の合成は如何なる方法によっても好い。

式(1)において、mは1から100までの整数が有効であるが、十分に低い非特異相互作用を与えること、化合物調製に必要とする工程数等を考慮すると、好ましくは2から11の整数である。また、式(1)のR1として、グルコース、マンノース、ガラクトース、フコース、キシロース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、シアル酸、グルクロン酸、イズロン酸等の単糖、天然の糖蛋白質由来のN-結合型糖鎖またはO-結合型糖鎖、または、それらの部分オリゴ糖、天然の糖脂質由来の糖鎖、または、その部分オリゴ糖、天然のプロテオグリカン由来の糖鎖、または、その部分オリゴ糖、あるいは、有機合成等を用いて調製した天然型および人工の糖鎖等が挙げられる。

エチレングリコールのオリゴマーまたはポリマーの原料として、市販の化合物を用いることができる。また、任意の長さを持つ単一のオリゴマーおよびその一端または両端の保護体は、例えば、F. A. Loiseau等の方法(J. Org. Chem., 69, 639-647, 2004)に従って合成できる。

【0011】

エチレングリコールのオリゴマーまたはポリマーの一端をアミノ基に変換した化合物は、例えば、エチレングリコールのオリゴマーまたはポリマーの一端を、まず、トシル化して、次いで、トシル基をヨウ素に置換し、さらに、フタルイミドに変換した化合物をヒドラジンで脱保護することによって得られる。

エチレングリコールのオリゴマーまたはポリマーの両端をアミノ基に変換した化合物は、例えば、上記の方法で、最初にチレングリコールのオリゴマーまたはポリマーの両端を

10

20

30

40

50

トシル化し、以下、同様の手順で得られる。

【0012】

式(1)においてR1が水素(H)である化合物は、この様にして得られたエチレングリコールのオリゴマーまたはポリマーの一端がアミノ基に置換された化合物、あるいは、エチレングリコールのオリゴマーまたはポリマーの両端がアミノ基に置換された化合物を、必要に応じて一端を保護した状態で、長鎖のアルキル基がエーテル結合した3,5-ジヒドロキシ安息香酸あるいは3,4,5-トリヒドロキシ安息香酸(バイオオーガニック・アンド・メディシナル・ケミストリー(Bioorg. Med. Chem.)2002年、10巻、p.4013-4022参照)と、ジシクロヘキシルカルボジイミドや水溶性カルボジイミド等の適当な縮合剤を用いた縮合、あるいは、活性エステル、酸無水物、酸塩化物等のカルボン酸側の活性化法によって結合させることにより、必要に応じて脱保護の後、合成される。

10

【0013】

式(1)で示される化合物は、末端が水酸基である上記の化合物に対して、通常用いられるグリコシレーションを用いる糖鎖導入法(例えば、木曾眞編、「生理活性糖鎖研究法」(学会出版センター、東京、1999年)参照)によって合成される。また、末端がアミノ基の場合には、還元アミノ化法(例えば、特開2004-75641参照)を用いることによって、還元末端の糖残基が開環した形で糖鎖が導入される。糖鎖部分の保護、脱保護が不要なため、天然由来の糖鎖導入にはこの還元アミノ化を用いる方法が有効である。

20

【0014】

糖鎖の導入手順は、式(1)においてR1が水素である合成中間体を経て、最後に糖鎖導入を行う上記の方法以外に、一端または両端がアミノ基に変換されたエチレングリコールのオリゴマーまたはポリマーの一端のアミノ基を適当な保護基で保護した化合物、あるいは、保護されたアミノ基の代わりに容易にアミノ基に変換可能な官能基(例えば、アジド等)とした化合物に対して、まず、上記と同様に糖鎖導入を行い、次いで、アミノ基の脱保護、あるいは、アミノ基への変換を行い、その後、長鎖のアルキル基がエーテル結合した3,5-ジヒドロキシ安息香酸あるいは3,4,5-トリヒドロキシ安息香酸との縮合を行う手順を用いることもできる。

式(1)で示される化合物を用いる糖鎖に結合する物質の精製は、例えば、以下の手順によって行う。まず、式(1)で示される化合物が可溶性エタノール、プロパノール等の溶媒に化合物を溶解させることによって、化合物の溶液を調製する。次いで、調製した溶液に浸す等の手段で、プラスチックディッシュ、マイクロビーズ、中空糸等の適当な形状を持った疎水性表面に接触させることにより、化合物を疎水性表面上に固定化し、乾燥等の適当な方法によって溶媒を除き、水等で洗浄を行う。次いで、目的とする糖鎖に結合する物質を含む溶液を、化合物が固定された表面と接触させることにより、糖鎖に結合する物質を捕捉し、糖鎖と結合しない物質を洗い流す。こうして捕捉された糖鎖に結合する物質を、適当な手段によって回収することによって精製することができる。

30

以下に、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の記述に限定されるものではない。

40

【実施例1】

【0015】

(N-(O-(D-ガラクトピラノシル)-17-オキシ-3,6,9,12,15-ペンタオキサヘプタデシル)-3,5-ビス(ドデシルオキシ)ベンズアミドの合成)

17-フタルイミド-3,6,9,12,15-ペンタオキサヘプタデカノール(特願2004-42011参照)(0.24g, 0.59mmol)と1,2,3,4,6-ペンタ-O-アセチル-D-ガラクトース(0.30g, 0.77mmol)を乾燥ジクロロメタン(5ml)に溶解させた後、溶液を氷冷した。氷冷下、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体(0.30ml, 2.4mmol)を加え、反応液を室温に戻しながら、アルゴン気流下で18時間攪拌した。反

50

応終了後、反応液をクロロホルムで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水の後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 1 : 3、次いで、クロロホルム：メタノール = 1 8 : 1）により精製し、17 - フタルイミド - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル - 2, 3, 4, 6 - テトラ - O - アセチル - - D - ガラクトシド (0.33g, 76%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600MHz) 7.84-7.85 (m, 2H), 7.71-7.72 (m, 2H), 5.39 (d, 1H,  $J = 3.4$  Hz), 5.21 (dd, 1H,  $J = 8.3, 10.3$  Hz), 5.02 (dd, 1H,  $J = 3.4, 10.3$  Hz), 4.57 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz), 4.17 (dd, 1H,  $J = 6.9, 11.7$  Hz), 4.13 (dd, 1H,  $J = 6.9, 11.7$  Hz), 3.96 (m, 1H), 3.89-3.92 (m, 3H), 3.73-3.76 (m, 3H), 3.58-3.68 (m, 18H), 2.15 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.98 (s, 3H)

【0016】

17 - フタルイミド - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル - 2, 3, 4, 6 - テトラ - O - アセチル - - D - ガラクトシド (0.17g, 0.22mmol) を乾燥メタノール (6ml) に溶解した後、ナトリウムメトキシド (6.38mg, 0.11mmol) を加え、室温で1.5時間攪拌した。反応液にアンバーライトIR-120 ( $\text{H}^+$ ) を加えて中和し、その後、溶媒を留去した。残渣を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 = 5 : 1）により精製し、17 - フタルイミド - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル - - D - ガラクトシド (0.10g, 77%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600MHz) 7.84-7.86 (m, 2H), 7.71-7.72 (m, 2H), 4.33 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz), 4.05 (m, 1H), 3.98 (d, 1H,  $J = 3.4$  Hz), 3.96 (dd, 1H,  $J = 5.5, 11.0$  Hz), 3.90 (t, 2H,  $J = 5.8$  Hz), 3.85 (m, 1H), 3.56-3.79 (m, 24H)

【0017】

17 - フタルイミド - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル - - D - ガラクトシド (0.10g, 0.17mmol) をメタノール (5ml) に溶解した後、ヒドラジーン水和物 (29.4  $\mu\text{l}$ , 0.61mmol) を加え、60 で2時間攪拌した。溶媒を留去した後、クロロホルムを加え、不溶物をろ別した。ろ液の溶媒を留去した後、残渣にトルエンを加え、再度溶媒を留去して、17 - アミノ - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル - - D - ガラクトシドの粗生成物を得た。

次に、3, 5 - ビス (ドデシルオキシ) 安息香酸 (81.1mg, 0.17mmol) をジクロロメタン (2.5ml) に溶解した後、水溶性カルボジイミド (35.4mg, 0.18mmol) と1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (24.9mg, 0.18mmol) を加え、アルゴン気流下、室温で1時間攪拌した。ジクロロメタン (2ml) に溶解させた17 - アミノ - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル - - D - ガラクトシドの粗生成物 (約0.17mmol) を加え、アルゴン気流下、室温で4時間攪拌した。反応液をクロロホルムで希釈した後、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水の後、溶媒を留去した。残渣を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 = 10 : 1）により精製し、目的物 (95.7mg, 63%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600MHz) 7.11 (t, 1H,  $J = 5.5$  Hz), 6.94 (d, 2H,  $J = 2.8$  Hz), 6.55 (t, 1H,  $J = 2.8$  Hz), 4.31 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 4.01-4.04 (m, 1H), 3.96 (t, 4H,  $J = 6.5$  Hz), 3.92-3.94 (m, 2H), 3.83 (dd, 1H,  $J = 4.8, 12.4$  Hz), 3.73-3.77 (m, 1H), 3.61-3.69 (m, 23H), 3.55 (dd, 1H,  $J = 3.4, 9.6$  Hz), 3.51 (t, 1H,  $J = 5.5$  Hz), 1.76 (m, 4H), 1.43 (m, 4H), 1.27-1.35 (m, 32H), 0.88 (t, 6H,  $J = 6.9$  Hz)

【実施例2】

【0018】

(N - (O - (- D - マンノピラノシル) - 17 - オキシ - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル) - 3, 5 - ビス (ドデシルオキシ) ベンズアミドの合成)  
17 - フタルイミド - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデカノール (0.25g, 0.61mmol) と1, 2, 3, 4, 6 - ペンタ - O - アセチル - - D - マンノース (0.30g, 0.77mmol) を乾燥ジクロロメタン (5ml) に溶解させた後、溶液を氷冷した。氷冷下

10

20

30

40

50

、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 (0.30ml, 2.4mmol) を加え、反応液を室温に戻しながら、アルゴン気流下で15時間攪拌した後、50 で6時間攪拌した。反応終了後、反応液をクロロホルムで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水の後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル = 1 : 3、次いで、クロロホルム：メタノール = 18 : 1) により精製し、17-フタルイミド-3, 6, 9, 12, 15-ペンタオキサヘプタデシル-2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-D-マンノシド (0.39g, 88%) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600MHz) 7.84-7.85 (m, 2H), 7.71-7.72 (m, 2H), 5.36 (dd, 1H, J = 3.4, 10.3 Hz), 5.29 (t, 1H, J = 10.3 Hz), 5.27 (dd, 1H, J = 1.7, 3.4 Hz), 4.87 (d, 1H, J = 1.7 Hz), 4.29 (dd, 1H, J = 4.8, 12.0 Hz), 4.09 (dd, 1H, J = 2.8, 12.0 Hz), 4.06 (ddd, 1H, J = 2.8, 4.8, 10.3 Hz), 3.90 (t, 2H, J = 5.8 Hz), 3.74 (t, 2H, J = 5.8 Hz), 3.59-3.69 (m, 20H), 2.15 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.99 (s, 3H)

【0019】

17-フタルイミド-3, 6, 9, 12, 15-ペンタオキサヘプタデシル-2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-D-マンノシド (0.33g, 0.45 mmol) を乾燥メタノール (6ml) に溶解した後、ナトリウムメトキシド (12.3mg, 0.23mmol) を加え、室温で5時間攪拌した。反応液にアンバーライトIR-120 (H<sup>+</sup>) を加えて中和し、ろ過後、溶媒を留去した。残渣を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 = 7 : 1) により精製し、17-フタルイミド-3, 6, 9, 12, 15-ペンタオキサヘプタデシル-D-マンノシド (0.20g, 76%) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600MHz) 7.84-7.86 (m, 2H), 7.71-7.73 (m, 2H), 4.90 (d, 1H, J = 1.7 Hz), 3.95 (bs, 1H), 3.91 (t, 2H, J = 6.1 Hz), 3.78-3.87 (m, 6H), 3.73-3.75 (m, 3H), 3.59-3.68 (m, 19H)

【0020】

17-フタルイミド-3, 6, 9, 12, 15-ペンタオキサヘプタデシル-D-マンノシド (0.15g, 0.26mmol) をメタノール (6ml) に溶解した後、ヒドラジーン水和物 (45.0 μl, 0.93mmol) を加え、60 で2時間攪拌した。溶媒を留去した後、クロロホルムを加え、不溶物をろ別した。ろ液の溶媒を留去した後、残渣にトルエンを加え、再度溶媒を留去して、17-アミノ-3, 6, 9, 12, 15-ペンタオキサヘプタデシル-D-マンノシドの粗生成物を得た。

次に、3, 5-ビス(ドデシルオキシ)安息香酸 (0.13g, 0.26mmol) をジクロロメタン (4ml) に溶解した後、水溶性カルボジイミド (56.0mg, 0.29mmol) と1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (39.8mg, 0.29mmol) を加え、アルゴン気流下、室温で1時間攪拌した。ジクロロメタン (3ml) に溶解させた17-アミノ-3, 6, 9, 12, 15-ペンタオキサヘプタデシル-D-マンノシドの粗生成物 (約0.26mmol) を加え、アルゴン気流下、室温で18時間攪拌した。反応液をクロロホルムで希釈した後、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水の後、溶媒を留去した。残渣を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 = 10 : 1) により精製し、目的物 (0.17g, 68%) を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600MHz) 6.96 (d, 2H, J = 2.1 Hz), 6.60 (t, 1H, J = 2.1 Hz), 4.79 (d, 1H, J = 2.1 Hz), 4.00 (t, 4H, J = 6.5 Hz), 3.80-3.83 (m, 3H), 3.68-3.72 (m, 2H), 3.59-3.66 (m, 22H), 3.55-3.57 (m, 3H), 1.77 (m, 4H), 1.48 (m, 4H), 1.29-1.40 (m, 32H), 0.90 (t, 6H, J = 6.9 Hz)

【実施例3】

【0021】

(N-(O-(ラクトシル)-17-オキシ-3, 6, 9, 12, 15-ペンタオキサヘプタデシル)-3, 5-ビス(ドデシルオキシ)ベンズアミドの合成)

17-フタルイミド-3, 6, 9, 12, 15-ペンタオキサヘプタデカノール (0.14

10

20

30

40

50

g, 0.34mmol) と 1, 2, 3, 6, 2', 3', 4', 6' - オクタ - O - アセチル -  
 - ラクトース (0.30g, 0.44mmol) を乾燥ジクロロメタン (3ml) に溶解させた後、溶液を  
 氷冷した。氷冷下、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 (0.17ml, 1.4mmol) を加え、  
 反応液を室温に戻しながら、アルゴン気流下で 14 時間攪拌した。反応終了後、反応液を  
 ジクロロメタンで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した。  
 有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水の後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロ  
 マトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 3、次いで、クロロホルム : メタノール =  
 20 : 1) により精製し、17 - フタルイミド - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサ  
 ヘプタデシル - 2, 3, 6, 2', 3', 4', 6' - ヘプタ - O - アセチル - - ラク  
 トシド (0.16g, 46%) を得た。

10

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600MHz) 7.84-7.85 (m, 2H), 7.71-7.73 (m, 2H), 5.35 (d, 1H, J = 3.4 Hz), 5.19 (t, 1H, J = 9.3 Hz), 5.10 (dd, 1H, J = 8.3, 10.3 Hz), 4.95 (dd, 1H, J = 3.4, 10.3 Hz), 4.89 (dd, 1H, J = 7.6, 9.3 Hz), 4.56 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 4.48-4.49 (m, 2H), 4.06-4.15 (m, 3H), 3.86-3.92 (m, 4H), 3.79 (t, 1H, J = 9.3 Hz), 3.71-3.75 (m, 3H), 3.58-3.64 (m, 19H), 2.15 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.04 (s, 6H), 2.03 (s, 3H), 1.97 (s, 3H)

## 【 0 0 2 2 】

17 - フタルイミド - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル - 2, 3, 6, 2', 3', 4', 6' - ヘプタ - O - アセチル - - ラクトシド (0.15g, 0.14mmol) を乾燥メタノール (6ml) に溶解した後、ナトリウムメトキシド (6.04mg, 0.071mmol) を加え、室温で 3.5 時間攪拌した。反応液にアンバーライト IR-120 ( $\text{H}^+$ ) を加えて中和し、ろ過後、溶媒を留去した。残渣を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 = 5 : 1) により精製し、17 - フタルイミド - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル - - ラクトシド (77.9mg, 75%) を得た。

20

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600MHz) 7.85-7.87 (m, 2H), 7.80-7.82 (m, 2H), 4.35 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 4.34 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 3.99 (m, 1H), 3.90 (dd, 1H, J = 2.8, 12.4 Hz), 3.87 (t, 2H, J = 5.5 Hz), 3.83 (dd, 1H, J = 4.8, 12.4 Hz), 3.82 (d, 1H, J = 3.4 Hz), 3.77 (dd, 1H, J = 7.6, 11.7 Hz), 3.73-3.75 (m, 3H), 3.69-3.71 (m, 3H), 3.51-3.65 (m, 20H), 3.48 (dd, 1H, J = 3.4, 10.3 Hz), 3.41 (m, 1H), 3.26 (dd, 1H, J = 7.6, 8.9 Hz)

30

## 【 0 0 2 3 】

17 - フタルイミド - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル - - ラクトシド (73.6mg, 0.10mmol) をメタノール (4ml) に溶解した後、ヒドラジン-水和物 (17.0  $\mu\text{l}$ , 0.35mmol) を加え、60 で 2 時間攪拌した。溶媒を留去した後、クロロホルムを加え、不溶物をろ別した。ろ液の溶媒を留去した後、残渣にトルエンを加え、再度溶媒を留去して、17 - アミノ - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル - - ラクトシドの粗生成物を得た。

次に、3, 5 - ビス (ドデシルオキシ) 安息香酸 (49.1mg, 0.10mmol) をジクロロメタン (2ml) に溶解した後、水溶性カルボジイミド (21.2mg, 0.11mmol) と 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール-水和物 (14.9mg, 0.11mmol) を加え、アルゴン気流下、室温で 1 時間攪拌した。ジクロロメタン (1ml) とメタノール (0.2ml) の混合溶液で溶かした 17 - アミノ - 3, 6, 9, 12, 15 - ペンタオキサヘプタデシル - - ラクトシドの粗生成物 (約 0.10mmol) を加え、アルゴン気流下、室温で一昼夜攪拌した。反応液をクロロホルムで希釈した後、水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水の後、溶媒を留去した。残渣をゲルろ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 = 7 : 3) により精製し、目的物 (15.5mg, 14%) を得た。

40

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600MHz) 6.96 (d, 1H, J = 2.1 Hz), 6.60 (t, 2H, J = 2.1 Hz), 4.35 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 4.33 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 3.98 (t, 4H, J = 6.5 Hz), 3.97 (m, 1H), 3.89 (dd, 1H, J = 2.4, 12.4 Hz), 3.83 (dd, 1H, J = 4.8, 12.4 Hz), 3.81 (d, 1H, J = 3.4 Hz), 3.77 (dd, 1H, J = 7.2, 11.3 Hz), 3.51-3.73 (m, 28H), 3.4

50

8 (dd, 1H, J = 3.4, 9.6 Hz), 3.40 (m, 1H), 3.26 (t, 1H, J = 8.3 Hz), 1.77 (m, 4H), 1.48 (m, 4H), 1.29-1.39 (m, 32H), 0.90 (t, 6H, J = 6.9 Hz)

【実施例4】

【0024】

(糖鎖に結合する物質との相互作用解析)

糖鎖プローブと糖鎖に結合する蛋白質であるレクチンとの相互作用は、分子間相互作用解析装置であるIASys plus (Affinity Sensors社製)を用いて解析した。

IASys plusの疎水キュベットを、界面活性剤水溶液、バッファー、イソプロパノールで洗浄後、各糖鎖プローブの1mM溶液(クロロホルム:メタノール:イソプロパノール=1:3:16)60 $\mu$ lを用いて固定化を行った。このキュベットを、バッファー、塩酸水溶液、水酸化ナトリウム水溶液、バッファーで洗浄した。その後、マンノースに特異的に結合するレクチンであるコンカナバリンA(Con A)の10 $\mu$ M溶液を50 $\mu$ l添加して5分間放置、さらに、バッファーに置換して3分間放置した後のCon Aの結合量を求めた。

N-(O-(D-マンノピラノシル)-17-オキシ-3,6,9,12,15-ペンタオキサヘプタデシル)-3,5-ビス(ドデシルオキシ)ベンズアミドの固定化量は274.69 Arc seconds、Con Aの結合量は1421.84 Arc secondsであり、Con Aの糖特異的な相互作用が確認された。

N-(O-(D-ガラクトピラノシル)-17-オキシ-3,6,9,12,15-ペンタオキサヘプタデシル)-3,5-ビス(ドデシルオキシ)ベンズアミドの固定化量は270.77 Arc seconds、Con Aの結合量は0 Arc secondsであり、Con Aはこのプローブに対して非特異的な相互作用を示さないことが確認された。

【産業上の利用可能性】

【0025】

本発明は、使用法が簡便な糖鎖プローブを提供するものであり、生体由来試料等からの糖鎖を認識する物質の精製等に利用可能である。

10

20



---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2004-075641(JP,A)  
特開2002-030091(JP,A)  
特開2001-253896(JP,A)  
特開2001-122889(JP,A)  
特表2003-505702(JP,A)  
特開2003-252835(JP,A)  
LABELL,R.Y. et al, Synthesis of Novel Glycolipids That Bind HIV-1 Gp120, Bioconjugate Chemistry, 2002年, Vol.13, No.1, pp.143-149  
Arrays of self-assembled monolayers for studying inhibition of bacterial adhesion, Analytical Chemistry, 2002年, Vol.74, No.8, pp.1805-1810

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07H 1/00 - 99/00  
C07K 1/00 - 19/00  
CAplus/REGISTRY(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)