

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5285022号
(P5285022)

(45) 発行日 平成25年9月11日(2013.9.11)

(24) 登録日 平成25年6月7日(2013.6.7)

(51) Int.Cl.	F I
CO8B 37/00 (2006.01)	CO8B 37/00 Z
CO7K 9/00 (2006.01)	CO7K 9/00
GO1N 33/569 (2006.01)	GO1N 33/569 L
GO1N 33/533 (2006.01)	GO1N 33/533
GO1N 30/88 (2006.01)	GO1N 30/88 I O I L
請求項の数 17 (全 21 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2010-105504 (P2010-105504)	(73) 特許権者	000000033 旭化成株式会社
(22) 出願日	平成22年4月30日(2010.4.30)		大阪府大阪市北区中之島三丁目3番23号
(65) 公開番号	特開2011-231293 (P2011-231293A)	(73) 特許権者	000173924 公益財団法人野口研究所
(43) 公開日	平成23年11月17日(2011.11.17)		東京都板橋区加賀1-8-1
審査請求日	平成23年4月7日(2011.4.7)	(74) 代理人	100079108 弁理士 稲葉 良幸
		(74) 代理人	100109346 弁理士 大貫 敏史
		(74) 代理人	100117189 弁理士 江口 昭彦
		(74) 代理人	100134120 弁理士 内藤 和彦
最終頁に続く			

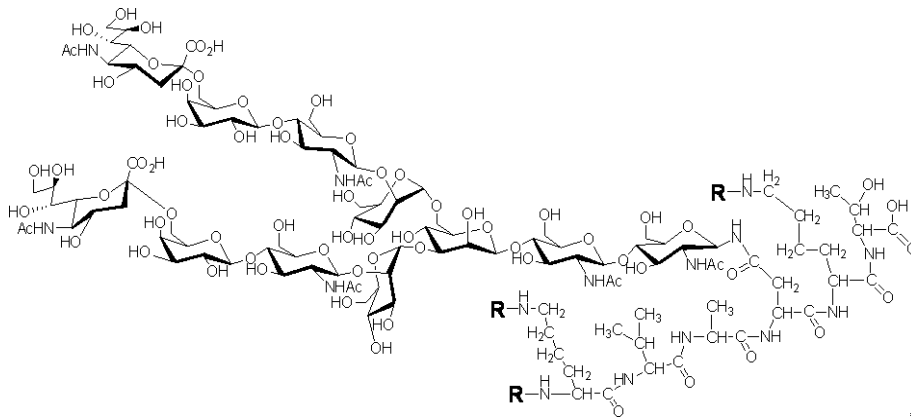
(54) 【発明の名称】 糖ペプチド誘導体及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記式(I)で表される検出可能に標識した糖ペプチド誘導体。

【化1】



10

[式中、Rの少なくとも一つは標識物質を表し、その他は水素原子を表す。]

【請求項2】

全てのRが標識物質である、請求項1に記載の糖ペプチド誘導体。

【請求項3】

20

前記標識物質が、蛍光物質である、請求項 1 又は 2 に記載の糖ペプチド誘導体。

【請求項 4】

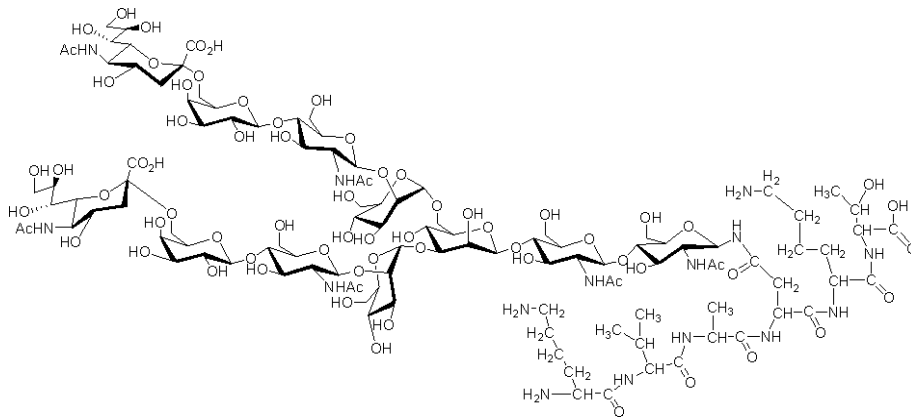
前記蛍光物質が、ローダミン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、ダンシル、ピレン、アントラニロイル、ニトロベンゾキサジアゾール、シアニン系色素、蛍光タンパク質、フルオレセイン、及びフィコエリスリンからなる群より選択される、請求項 3 に記載の糖ペプチド誘導体。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の糖ペプチド誘導体の製造方法であって、

鳥類卵脱脂卵黄を水又は塩溶液で抽出して下記式 (I I) で表される糖ペプチドを含む抽出液を得る抽出工程、

【化 2】



(I I)

前記抽出液を水溶性有機溶媒に添加して糖ペプチドを含む沈殿物を得る沈殿工程、
前記沈殿物を脱塩する脱塩工程、及び

標識物質を前記糖ペプチドのペプチド中の遊離アミノ基の少なくとも1つに導入して糖ペプチド誘導体を得る導入工程

を含む方法。

【請求項 6】

標識物質導入後、反応液を水溶性有機溶媒に添加して糖ペプチド誘導体を沈殿させる工程をさらに含む、請求項 5 に記載の製造方法。

【請求項 7】

前記標識物質導入後の沈殿工程で用いる水溶性有機溶媒が、炭素数 1 ~ 5 のアルコールである請求項 6 に記載の製造方法。

【請求項 8】

前記アルコールが、メタノール、エタノール、及び 2 - プロパノールからなる群より選択される請求項 7 に記載の製造方法。

【請求項 9】

前記脱塩工程が、前記沈殿物を樹脂に保持させて水で洗浄する工程を含む、請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 10】

前記樹脂が、逆相分配クロマトグラフィー充填用樹脂である請求項 9 に記載の製造方法。

【請求項 11】

前記逆相分配クロマトグラフィー充填用樹脂が、化学結合型シリカゲル樹脂である請求項 10 に記載の製造方法。

【請求項 12】

前記化学結合型シリカゲル樹脂を構成するシリカが、ジメチルオクタデシル、オクタデシル、ジメチルオクチル、オクチル、フェニル、ドコシル、トリアコンチル基からなる群

10

20

30

40

50

から選択される基と化学結合している請求項 1 1 に記載の製造方法。

【請求項 1 3】

前記脱塩工程が、さらに有機溶媒水溶液により糖ペプチドを溶出する工程を含む請求項 5 ~ 1 2 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 1 4】

前記有機溶媒水溶液が、アセトニトリル、メタノール、及びエタノールからなる群より選択される少なくとも 1 種である請求項 1 3 に記載の製造方法。

【請求項 1 5】

前記有機溶媒水溶液の濃度が 0 . 1 ~ 2 0 % (v / v) である、請求項 1 3 または 1 4 に記載の製造方法。

10

【請求項 1 6】

前記抽出工程が、鳥類卵脱脂卵黄を水で抽出する工程であり、前記沈殿工程に用いる水溶性有機溶媒がエタノールであり、前記脱塩工程が、前記沈殿物を O D S 樹脂に保持させて水で洗浄する工程を含む、請求項 5 に記載の製造方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の糖ペプチド誘導体を含む、インフルエンザウイルス検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は検出可能に標識された糖ペプチド誘導体及びその製造方法等に関する。

20

【背景技術】

【0 0 0 2】

近年、生命分子として、核酸やタンパク質に加え、糖鎖が注目されている。糖鎖は、単糖が縮合して形成されるため、構成糖の種類や数の違い、配列の順序、結合部位・様式、分岐様式、全体の高次構造の違い等によって、極めて多様な構造が存在する。その結果、特定構造の糖鎖と他の物質の特異的な結合を介して、生体内で様々な情報が伝達される。

【0 0 0 3】

例えば、インフルエンザウイルスなどの病原性ウイルスは、細胞表面の特定の糖鎖を認識し結合することにより、細胞に侵入し感染することが知られている。インフルエンザウイルス感染は、ウイルス表面のヘマグルチニンが喉や肺表面にある特定の糖鎖に特異的に結合することで開始される。

30

また、生体内にはレクチンや糖鎖受容体など、特定構造の糖鎖と特異的に結合するタンパク質が存在し、当該結合に反応して様々な反応が惹起される。

【0 0 0 4】

従って、特定構造を有する糖鎖、特に生体内に存在する構造を有する糖鎖を検出可能に標識すれば、例えば、試料に含まれる当該糖鎖と特異的に結合する物質を検出又は測定することができるので診断、検査、研究等に有用である。

【0 0 0 5】

鶏卵卵黄中にはインフルエンザウイルスの受容体であるヒト型糖鎖と同一のシアリルオリゴ糖が存在することが報告されている。従って、かかる糖鎖を単離精製し、検出可能に標識すれば、上記診断等にも用いることができる。

40

これまでも鶏卵卵黄中からヒト型糖鎖を単離する方法が報告されている。しかし、生体内における糖鎖は多様な構造を有するだけでなく、存在量も微量であり、タンパク質などと結合して存在することも多いことから、一般にその精製は数多くの工程を経る必要があることが多く、糖鎖の抽出・精製操作は難しいことが知られている。

【0 0 0 6】

特許文献 1 には、鶏卵由来脱脂卵黄（粉末）から 1 1 糖シアリルオリゴ糖ペプチドおよび糖鎖アスパラギンを調製することが開示されている。特許文献 2 には、脱脂卵黄をタンパク質分解酵素とペプチド分解酵素で順次処理した後、糖鎖アスパラギンに脂溶性保護基

50

を導入し、クロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する方法が開示されている。特許文献3には、シアル酸類含有オリゴ糖を鳥類卵脱脂卵黄から水もしくは塩溶液で抽出することにより製造する方法が開示されている。特許文献4には、1種又は2種以上の糖鎖アスパラギンの混合物に脂溶性保護基を導入し、クロマトグラフィーに供して、各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する方法が開示されている。

また、非特許文献1には、鶏卵の可溶画分より糖鎖ペプチド(SGP:シアリルグリコペプチド)が得られることが開示されている。このSGPは、11個の糖残基からなる複合型糖鎖の還元末端に、アミノ酸6残基からなるペプチド鎖のペプチド残基が結合した化合物である。

【0007】

しかしながら、特許文献1に開示された逆浸透膜による濃縮とイオン交換樹脂を用いて調製されるシアリルオリゴ糖ペプチドは純度が90%程度であり、純粋な糖鎖ペプチドを単離しているとはいえない。また、脱脂卵黄50kgから、モノシアリルオリゴ糖ペプチド及びジシアリルオリゴ糖ペプチドが13.8gしか得られておらず、収率が十分ではない。

特許文献2及び4の方法も、酵素により糖鎖アスパラギンを得てからクロマトグラフィーで分離するため工程が多い。

特許文献3に開示された方法は、限外ろ過を用いたシアル酸含有オリゴ糖を工業的に製造する方法であり、酵素処理によりシアル酸が1残基以上オリゴ糖に共有結合しかつアミノ酸を含まない低分子性のオリゴ糖鎖を遊離させている。

こうして得られるオリゴ糖鎖は遊離アミノ基を含有しないために、シアル酸を温存したままで蛍光標識を簡便に導入することが出来ない。

また、非特許文献1に開示された方法では、鶏卵卵黄1個から11糖シアリルオリゴ糖ペプチドを約8mg得ているが、5種類のカラムクロマトグラフィーによる精製を経るため大量処理には不向きである。

【0008】

このような事情から、これまで鶏卵卵黄中からヒト型糖鎖を有する糖ペプチドを単離精製することが困難であったため、これを検出可能に標識した糖ペプチド誘導体も得られなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】国際公開96/2255号パンフレット

【特許文献2】国際公開04/70046号パンフレット

【特許文献3】特開平8-99988号公報

【特許文献4】特開2003-128703号公報

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Akira Seko, Mamoru Koketsu, Masakazu Nishizono, Yuko Enoki, Hisham R. Ibrahim, Lekh Raji Juneja, Mujo Kim, Takehiko Yamamoto, *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, Vol.1335, p.23-32

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、医療および医薬品開発の分野等において有効なツールとなり得る検出可能に標識した糖ペプチド誘導体及びその製造方法等を提供することを課題とする。

【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検討した結果、鳥類卵脱脂卵黄を水又は塩溶液で抽出して糖ペプチドを含む抽出液を得る抽出工程と、当該抽出液を水溶性有機溶

10

20

30

40

50

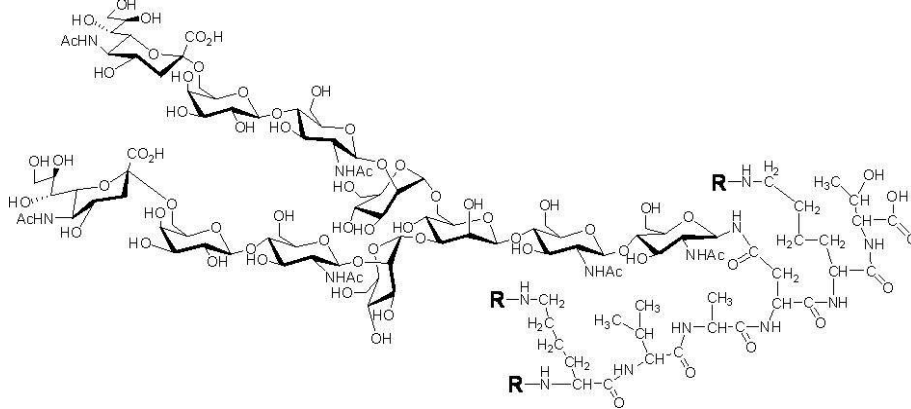
媒に加えて糖ペプチドを含む沈殿物を得る工程と、当該沈殿物を脱塩する脱塩工程と、を行うことによって純度の高い糖ペプチドを得られること、さらに脱塩工程で得られた糖ペプチドに蛍光標識を導入することで上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成した。

【 0 0 1 3 】

すなわち、本発明は、以下のとおりである。

〔 1 〕 下記式 (I) で表される検出可能に標識した糖ペプチド誘導体；

【 化 1 】



10

(I)

20

〔 式 中 、 R の 少 なく とも 一 つ は 標 識 物 質 を 表 し 、 そ の 他 は 水 素 原 子 を 表 す 。 〕

〔 2 〕 全 て の R が 標 識 物 質 で 是 る 、 上 記 〔 1 〕 に 記 載 の 糖 ペ プ チ ド 誘 導 体 ；

〔 3 〕 前 記 標 識 物 質 が 、 蛍 光 物 質 で 是 る 、 上 記 〔 1 〕 又 は 〔 2 〕 に 記 載 の 糖 ペ プ チ ド 誘 導 体 ；

〔 4 〕 前 記 蛍 光 物 質 が 、 ロ ー ダ ミ ン 、 テ ト ラ メ チ ル ロ ー ダ ミ ン イ ソ チ オ シ ア ネ ー ト 、 ダ ン シ ル 、 ピ レ ン 、 ア ン ト ラ ニ ロ イ ル 、 ニ ト ロ ベ ン ゾ キ サ ジ ア ゾ ー ル 、 シ ア ニ ン 系 色 素 、 蛍 光 タ ン パ ク 質 、 フ ル オ レ セ イ ン 、 及 び フ ィ コ エ リ ス リ ン か ら な る 群 よ り 選 択 さ れ る 、 上 記 〔 3 〕 に 記 載 の 糖 ペ プ チ ド 誘 導 体 ；

〔 5 〕 上 記 〔 1 〕 に 記 載 の 糖 ペ プ チ ド 誘 導 体 の 製 造 方 法 で あ っ て 、 鳥 類 卵 脱 脂 卵 黄 を 水 又 は 塩 溶 液 で 抽 出 し て 糖 ペ プ チ ド を 含 む 抽 出 液 を 得 る 抽 出 工 程 、 前 記 抽 出 液 を 水 溶 性 有 機 溶 媒 に 添 加 し て 糖 ペ プ チ ド を 含 む 沈 殿 物 を 得 る 沈 殿 工 程 、 前 記 沈 殿 物 を 脱 塩 す る 脱 塩 工 程 、 及 び 標 識 物 質 を 前 記 糖 ペ プ チ ド の ペ プ チ ド 中 の リ ジ ン 残 基 の ア ミ ノ 基 に 導 入 し て 糖 ペ プ チ ド 誘 導 体 を 得 る 導 入 工 程 を 含 む 方 法 ；

30

〔 6 〕 標 識 物 質 導 入 後 、 反 応 液 を 水 溶 性 有 機 溶 媒 に 添 加 し て 糖 ペ プ チ ド 誘 導 体 を 沈 殿 さ せ る 工 程 を さ ら に 含 む 、 上 記 〔 5 〕 に 記 載 の 製 造 方 法 ；

〔 7 〕 前 記 水 溶 性 有 機 溶 媒 が 、 炭 素 数 1 ~ 5 の ア ル コ ー ル 、 エ ー テ ル 、 ニ ト リ ル 、 ケ ト ン 、 ア ミ ド 、 及 び ス ル ホ キ シ ド の い ず れ か か ら 選 択 さ れ る 溶 媒 を 少 なく とも 一 種 以 上 含 有 す る 上 記 〔 5 〕 又 は 〔 6 〕 に 記 載 の 製 造 方 法 ；

〔 8 〕 前 記 水 溶 性 有 機 溶 媒 が 、 炭 素 数 1 ~ 5 の ア ル コ ー ル で 是 る 上 記 〔 7 〕 に 記 載 の 製 造 方 法 ；

40

〔 9 〕 前 記 ア ル コ ー ル が 、 メ タ ノ ー ル 、 エ タ ノ ー ル 、 及 び 2 - プ ロ パ ノ ー ル か ら な る 群 よ り 選 択 さ れ る 上 記 〔 8 〕 に 記 載 の 製 造 方 法 ；

〔 1 0 〕 前 記 脱 塩 工 程 が 、 前 記 沈 殿 物 を 樹 脂 に 保 持 さ せ て 水 で 洗 浄 す る 工 程 を 含 む 、 上 記 〔 5 〕 ~ 〔 9 〕 の い ず れ か 1 項 に 記 載 の 製 造 方 法 ；

〔 1 1 〕 前 記 樹 脂 が 、 逆 相 分 配 ク ロ マ ト グ ラ フ ィ ー 充 填 用 樹 脂 で 是 る 上 記 〔 1 0 〕 に 記 載 の 製 造 方 法 ；

〔 1 2 〕 前 記 逆 相 分 配 ク ロ マ ト グ ラ フ ィ ー 充 填 用 樹 脂 が 、 化 学 結 合 型 シ リ カ ゲ ル 樹 脂 で 是 る 上 記 〔 1 1 〕 に 記 載 の 製 造 方 法 ；

〔 1 3 〕 前 記 化 学 結 合 型 シ リ カ ゲ ル 樹 脂 を 構 成 す る シ リ カ が 、 ジ メ チ ル オ ク タ デ シ ル 、 オ ク タ デ シ ル 、 ジ メ チ ル オ ク チ ル 、 オ ク チ ル 、 フ ェ ニ ル 、 ド コ シ ル 、 ト リ ア コ ン チ ル 基 か ら

50

なる群から選択される基と化学結合している上記〔10〕に記載の製造方法；

〔14〕前記脱塩工程が、さらに有機溶媒水溶液により糖ペプチドを溶出する工程を含む上記〔5〕～〔13〕のいずれかに記載の製造方法；

〔15〕前記有機溶媒が、アセトニトリル、メタノール、及びエタノールからなる群より選択される少なくとも1種である上記〔14〕に記載の製造方法；

〔16〕前記有機溶媒水溶液の濃度が0.1～20%(v/v)である、上記〔14〕または〔15〕に記載の製造方法；

〔17〕前記抽出工程が、鳥類卵脱脂卵黄を水で抽出する工程であり、前記沈殿工程に用いる水溶性有機溶媒がエタノールであり、前記脱塩工程が、前記沈殿物をODS樹脂に保持させて水で洗浄する工程を含む、上記〔5〕に記載の製造方法；及び

〔18〕上記〔1〕から〔4〕のいずれか1項に記載の糖ペプチド誘導体を含む、インフルエンザウイルス検出用キット。

【発明の効果】

【0014】

本発明に係る糖ペプチド誘導体によれば、試料中に含まれる、その糖鎖に特異的に結合する物質、例えばインフルエンザウイルスを可視化して検出又は測定することができる。

また、本発明に係る糖ペプチド誘導体の製造方法によれば、高品質な糖ペプチド誘導体を工業的規模で製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】実施例1において製造された11糖シアリルオリゴ糖ペプチドのHPLCチャートを示す。

【図2】実施例1において製造された11糖シアリルオリゴ糖ペプチドの¹H-NMRチャートを示す。

【図3】実施例1において製造された11糖シアリルオリゴ糖ペプチドのHPLCチャートを示す。

【図4】実施例1において製造されたフルオレセイン標識 - 糖ペプチド誘導体のHPLCチャートを示す。

【図5】実施例2において製造された11糖シアリルオリゴ糖ペプチドのHPLCチャートを示す。

【図6】実施例2において製造されたダンシル標識 - 糖ペプチド誘導体のHPLCチャートを示す。

【図7】実施例3において製造されたローダミン標識 - 糖ペプチド誘導体のHPLCチャートを示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

以下、本発明を実施するための形態（以下、「本実施の形態」という。）について詳細に説明する。なお、本発明は、以下の実施の形態に限定されるものではなく、その要旨の範囲内で種々変形して実施することができる。

【0017】

（糖ペプチド誘導体）

本実施の形態において、糖ペプチド誘導体とは、下記式（I）で表される検出可能に標識された11糖シアリルオリゴ糖ペプチドをいう。

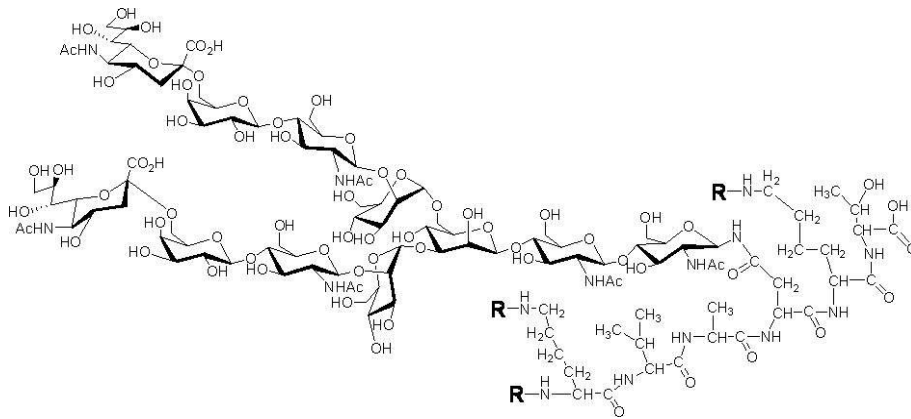
10

20

30

40

【化1】



10

(I)

[式中、Rの少なくとも一つは標識物質を表し、その他は水素原子を表す。]

【0018】

式(I)に示されるとおり、本実施の形態の糖ペプチド誘導体の糖鎖は、11個の糖残基からなる2分岐複合型糖鎖であり、2ヶ所の非還元末端にシアル酸を有する。

【0019】

本実施の形態の糖ペプチド誘導体の糖鎖の還元末端には、アミノ酸6残基(Lys - Val - Ala - Asn - Lys - Thr (配列番号1))からなるペプチド鎖が結合している。Lys、Val、Ala、Asn、及びThrは、アミノ酸の3文字表記であり、それぞれ、リジン、バリン、アラニン、アスパラギン、及びスレオニンを意味する。

20

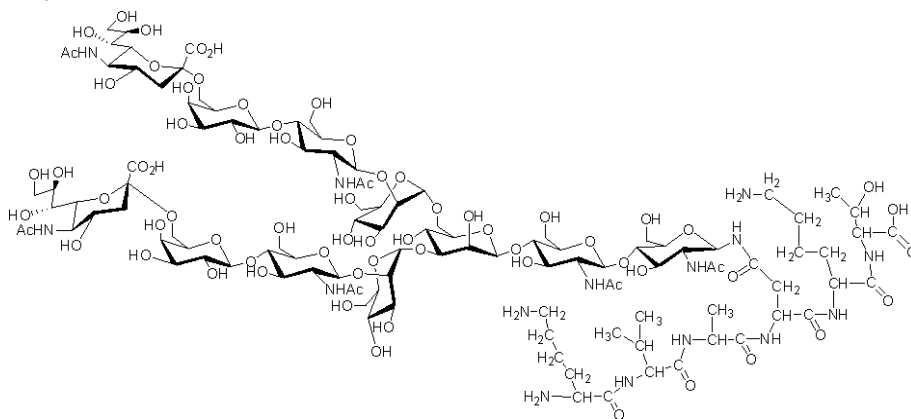
アミノ酸は、L-アミノ酸であっても、D-アミノ酸であってもよく、ラセミ体などを含め、L-アミノ酸とD-アミノ酸の任意の比率の混合物であってもよいが、L-アミノ酸であることが好ましい。また、各アミノ酸は、各アミノ酸と等価な誘導体であってもよい。

【0020】

本実施の形態の糖ペプチドとは、特にことわりがない限り、上記式(I)で表される糖ペプチド誘導体において、3つのRがすべて水素原子であるもの、即ち、下記式(II)で表される糖ペプチドをいう。

30

【化2】



40

(II)

【0021】

本実施の形態の「検出可能に標識された」とは、本実施の形態の糖ペプチド誘導体の糖鎖のリジン残基中の3ヶ所のアミノ基に、検出装置を使用して又は使用しないで可視化で

50

きる標識物質が結合していることを意味する。

標識物質は、3ヶ所のアミノ基の少なくとも1つ、好ましくは2つ、さらに好ましくは3ヶ所に結合している。標識物質の結合数が多いほど、標識の強度が上昇し、検出しやすい。

【0022】

本実施の形態の標識物質としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 等の放射性物質、フルオレセイン、ローダミン、ダンシル、ピレン、アントラニロイル、ニトロベンゾキサジアゾール、シアニン系色素(Cy3、Cy5等)、フィコエリスリン、テトラメチルローダミン、蛍光タンパク質(オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質、造礁サンゴ由来蛍光タンパク質、フルーツ蛍光タンパク質等)、近赤外蛍光材料等の蛍光物質、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、エクオリン等の発光物質の他、量子ドットなどのナノ粒子が挙げられる。

10

また、ビオチンで標識し、これと酵素等で標識したアビジンまたはストレプトアビジンを結合させることによっても可視化することができ、これらの物質も本発明の標識物質に含まれる。

【0023】

標識物質としては、特に蛍光物質が好ましく、中でもフルオレセイン、ダンシルやローダミン、蛍光タンパク質が好ましい。

【0024】

(糖ペプチド誘導体の製造方法)

20

本実施の形態の糖ペプチド誘導体の製造方法は、鳥類卵脱脂卵黄を水又は塩溶液で抽出して糖ペプチドを含む抽出液を得る抽出工程、前記抽出液を水溶性有機溶媒に添加して糖ペプチドを含む沈殿物を得る沈殿工程、前記沈殿物を脱塩する脱塩工程、および標識物質を糖ペプチドのペプチド中のリジン残基のアミノ基に導入する導入工程を含む。

【0025】

本実施の形態の製造方法によれば、抽出工程、沈殿工程、及び脱塩工程により、鳥類卵脱脂卵黄より工業的規模で選択的に、安価且つ簡便に糖ペプチドを精製することができるので、これに標識物質を導入して、安価且つ簡便に工業的規模で高純度の糖ペプチド誘導体を製造することができる。

【0026】

30

(抽出工程)

抽出工程とは、鳥類卵脱脂卵黄を、水又は塩溶液に懸濁し、糖ペプチドの混合物などを抽出して、糖ペプチドの粗精製物である抽出液を得る工程である。ここでいう糖ペプチドは、本実施の形態の上記式(II)で表される糖ペプチド以外の糖ペプチドも含む。

鳥類卵脱脂卵黄としては、市販の脱脂卵黄を用いてもよく、鳥類卵から調製した鳥類卵脱脂卵黄を用いてもよい。

鳥類卵としては、特に限定されるものではないが、例えば、ニワトリ、ウズラ、アヒル、カモ、ダチョウ、及びハトなどの卵が挙げられ、卵黄内に含まれる糖ペプチドの量が多いので、鶏卵などが好ましい。

鳥類卵としては、生の卵であってもよく、乾燥して得られる卵の乾燥粉末であってもよく、鶏卵卵黄又は鶏卵卵黄粉末などを用いることが好ましい。

40

【0027】

鳥類卵脱脂卵黄は、例えば、鳥類卵の全卵又は卵黄を、有機溶媒により脱脂処理することにより得ることができる。

脱脂処理する方法としては、特に限定されるものではないが、例えば、鳥類卵に有機溶媒を添加して、沈殿物と有機溶媒層を分離する方法などが挙げられる。

脱脂処理に用いられる有機溶媒としては、アセトン、メタノール、エタノール、及び2-プロパノールなどが挙げられ、これらの溶媒は単独で用いてもよく、2種以上の混合溶媒として用いてもよい。

脱脂処理において、鳥類卵に添加する有機溶媒の量としては、特に限定されるものでは

50

ないが、鳥類卵に対して、質量で1～5倍の有機溶媒を用いることにより脱脂処理を行うことができる。

また、脱脂処理を行う温度としては、特に限定されるものではないが、0～25で行うことができる。

【0028】

鳥類卵に有機溶媒を添加した後、有機溶媒と鳥類卵とをよく攪拌することにより、有機溶媒により鳥類卵に含まれる脂分を除去することができる。

有機溶媒と沈殿物とを分離する方法としては、特に限定されるものではないが、例えば、2,000～10,000rpmで5～30分遠心分離してもよい。

有機溶媒を用いた脱脂処理は、2～6回行うことが好ましい。

10

【0029】

鳥類卵脱脂卵黄に水又は塩溶液を添加して、鳥類卵脱脂卵黄から糖ペプチドを含む抽出液を抽出する方法は、特に限定されるものではないが、抽出工程において用いられる塩溶液としては、塩化ナトリウム水溶液及びリン酸緩衝液などが挙げられる。これらの塩溶液は単独で用いてもよく、2種以上の混合溶媒として用いてもよい。

塩溶液の濃度は、0.0001～2.0% (w/v) であってもよく、鳥類卵脱脂卵黄に添加する水又は塩溶液の量は、特に限定されるものではないが、鳥類卵脱脂卵黄に対して、質量で、0.1～50倍の水又は塩溶液を用いることができる。

また、糖ペプチドの抽出を行う温度は、特に限定されるものではないが、4～25で行うことができる。糖ペプチドの抽出を行うpHは、特に限定されるものではないが、pH5～pH9で行うことができる。

20

【0030】

鳥類卵脱脂卵黄に水又は塩溶液を添加した後、鳥類卵脱脂卵黄と水又は塩溶液とをよく攪拌することにより、糖ペプチドを含む抽出液を抽出することができる。

水又は塩溶液で抽出した糖ペプチドを含有する抽出液と鳥類卵脱脂卵黄とを分離する方法は、特に限定されるものではないが、例えば、2,000～10,000rpmで5～30分遠心分離してもよい。

水又は塩溶液を用いた抽出処理は、2～6回行うことが好ましい。

抽出工程は、水を用いて行うことが好ましい。

【0031】

30

(沈殿工程)

沈殿工程とは、抽出工程で得られた、糖ペプチドを含む抽出液を水溶性有機溶媒に添加することにより、抽出液を濃縮するだけでなく精製度の向上した糖ペプチドを沈殿物として得る工程である。沈殿工程においては、抽出液に水溶性有機溶媒を添加して粗精製物として、沈殿物を沈殿させてもよい。

本実施の形態において、水溶性有機溶媒とは、水と相溶性を有する有機溶媒であれば特に限定されないが、例えば、水と相溶性を有する炭素数1～5の有機溶媒などが挙げられる。炭素数1～5の有機溶媒とは、溶媒分子中の炭素数が1～5であることを意味する。

該溶媒として、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、エチレングリコール、グリセリン等のアルコール系、あるいはジエチルエーテル、ジオキサン、ジメトキシエタン、テトラヒドロフラン等のエーテル系、あるいはアセトニトリル等のニトリル系、アセトン等のケトン系、ジメチルホルムアミド等のアミド系、ジメチルスルホキシド等のスルホキシド系からなる群から選択される溶媒が挙げられる。これら低分子量溶媒は、1種で用いてもよく、2種以上の混合溶媒として用いてもよい。

40

水溶性有機溶媒としては、炭素数1～5のアルコールであることが好ましく、沈殿工程において、水溶性有機溶媒がアルコールである場合、該沈殿工程は、抽出液をアルコールに添加してアルコール沈殿する工程(以下、「アルコール沈殿工程」と記載する場合がある。)であり、抽出工程で得られた、糖ペプチドを含有する抽出液をアルコールに添加することにより、抽出液を濃縮するだけでなく精製度の向上した糖ペプチドを沈殿物として得るアルコール沈殿工程である。

50

【0032】

以下、沈殿工程をアルコール沈殿工程として説明するが、アルコール以外の炭素数1～5の水溶性有機溶媒を用いた沈殿工程においても同様に実施することができる。用いる水溶性有機溶媒量や沈殿させる際の溶媒温度などの条件は、溶媒ごとに適宜選択することができるが、以下に例示するアルコール沈殿工程と同様に設定することができる。

【0033】

アルコール沈殿工程に用いられるアルコールの量は、特に限定されるものではないが、抽出液に対して、質量で2～20倍のアルコールを用いることができる。またアルコール沈殿工程に用いられるアルコールは、炭素数1～5個のアルコールであればよく、好ましくは炭素数1～3個のアルコールである。炭素数1～3個のアルコールとしては具体的に

10

は、メタノール、エタノール、2-プロパノール(イソプロパノール)を挙げることができる。中でもエタノールが好ましい。

本実施の形態において、アルコール沈殿工程において用いるアルコールは1種類であってもよいし、アルコールの混合物又は他の溶媒との混合物であってもよい。

アルコール溶媒が混合物である場合、例えば、メタノール又は2-プロパノールをエタノールに対し0.01～50%添加した混合溶媒を用いてもよい。また、エタノールに対しアセトン、アセトニトリル又はジエチルエーテルを0.01～50%添加した混合溶媒を用いてもよい。

【0034】

糖ペプチドを含む沈殿物を分離する温度は、特に限定されるものではないが、4～25

20

で行うことができる。

【0035】

アルコール沈殿工程で用いる、先の抽出工程により得られた抽出液は、ろ過することで、清澄な抽出液とすることもでき、また、減圧濃縮などにより濃縮した抽出液として用いてもよい。

【0036】

アルコール沈殿工程において、糖ペプチドを含む沈殿物を分離する方法は、特に限定されるものではないが、例えば、2,000～10,000rpmで5～30分遠心分離してもよく、4～25℃で静置することで分離してもよい。

得られた糖ペプチドを含む沈殿物を、水又は塩溶液に溶解し、再度アルコール沈殿工程

30

を行うことにより、より精製された沈殿物を得ることができる。

【0037】

(脱塩工程)

脱塩工程とは、沈殿工程で得られた糖ペプチドを含有する沈殿物から塩を除去する工程である。

脱塩工程は、脱塩方法として知られた種々の公知の方法で行うことができるが、例えば、イオン交換樹脂、イオン交換膜、ゲルろ過、透析膜、限外ろ過膜又は逆浸透膜などを用いて脱塩することも可能である。脱塩工程としては、例えば、沈殿工程で得られた沈殿物を樹脂に保持させて水で洗浄することにより脱塩することもできる。

【0038】

40

沈殿物を樹脂に保持させる方法は、吸着、担持など公知の結合様式を利用した方法とすることができる。また、沈殿物は、水で洗浄する際に沈殿物が洗浄液と共に流出しない程度に、保持されていればよい。

また、樹脂としては、逆相分配クロマトグラフィー充填用樹脂等が挙げられ、逆相分配クロマトグラフィー充填用樹脂とは、シリカゲル系、ポリマー系を代表的とする樹脂を意味しポリ(スチレン/ジビニルベンゼン)ポリマーゲル樹脂、ポリスチレン-ジビニルベンゼン樹脂、ポリヒドロキシメタクリレート樹脂、スチレンビニルベンゼン共重合体樹脂、ポリビニルアルコール樹脂、ポリスチレン樹脂、ポリメタクリレート樹脂、化学結合型シリカゲル樹脂などが挙げられる。

化学結合型シリカゲル樹脂とは、例えば、多孔性シリカゲルにジメチルオクタデシルク

50

ロロシランの様なシランカップリング剤を反応させて製造するODS樹脂などが挙げられ、シリカゲルに対し、同様の手法で異なるシリル化剤を用いることで、オクタデシル、ジメチルオクタデシル、メチルオクタデシル、ジメチルオクチル、オクチル、フェニル、シアノプロピル、アミノプロピル基からなる群から選択される基を化学結合させることで得られる樹脂等も挙げられる。あるいは炭素数22のドコシル基又は炭素数30のトリアコンチル基を結合して得られる樹脂であってもよい。

【0039】

脱塩工程は、脱塩した後も樹脂に保持されている上記式(II)で表される糖ペプチドを、有機溶媒水溶液により溶出する工程を含むことが好ましい。樹脂に保持された糖ペプチドを水で洗浄することで脱塩した後、溶出工程を行うことにより糖ペプチドの純度を向上させることができる。また水洗浄の工程では、糖ペプチドができるだけ水と共に流出せず、有機溶媒水溶液による溶出工程によって溶出することが好ましい。

10

溶出工程では、例えば、糖ペプチドを保持させたODS樹脂などのシリカゲル樹脂に対し、質量で1~50倍の有機溶媒水溶液を用いて樹脂から溶出させることができる。

水洗浄による脱塩工程後における溶出工程に用いる有機溶媒は、例えば、アセトニトリル、メタノール、及びエタノールからなる群から選択される少なくとも1種を含有するものが挙げられる。有機溶媒水溶液の濃度は0.1~20%(v/v)であり、好ましくは0.5~20%(v/v)であり、より好ましくは10%(v/v)以下、さらに好ましくは5%(v/v)以下である。

有機溶媒水溶液により糖ペプチドを溶出する工程においては、水から徐々に濃度を上げていき、有機溶媒水溶液である溶出液にグラジエントをかけて溶出を行ってもよい。

20

【0040】

脱塩工程又は溶出工程を行う温度は、特に限定されるものではないが、4~25度で行うことができる。

【0041】

また、脱塩工程は、前記の樹脂を用いた脱塩工程以外にも、例えば分離膜を用いることにより沈殿工程で得られた沈殿物から脱塩することが可能である。

斯かる脱塩工程としては、例えば、限外ろ過膜又は逆浸透膜を用いることで沈殿物の脱塩を行うことができる。

脱塩工程に用いる膜としては、例えば、ポリアクリロニトリル、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリビニリデンフルオライド、ポリテトラフルオロエチレン、芳香族ポリアミド、酢酸セルロース、ポリビニルアルコールを構成基材とする平膜又は中空糸膜、スパイラル膜又はチューブラー膜であってもよい。さらにはイオン交換樹脂、イオン交換膜、ゲルろ過、透析膜、限外ろ過膜あるいは逆浸透膜で脱塩することも可能である。

30

【0042】

樹脂を用いた脱塩方法以外で(例えば分離膜による方法で)脱塩工程を行った後の処理液中に含まれる糖ペプチドを精製する方法としては、公知のペプチド、糖質、糖ペプチド等の精製方法を用いることができるが、例えば、順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー又はサイズ排除クロマトグラフィーなどが挙げられる。逆相クロマトグラフィーに用いられる担体としては、例えば、シリカを基材としてオクタデシル、ジメチルオクタデシル、メチルオクタデシル、ジメチルオクチル、オクチル、フェニル、シアノプロピル、アミノプロピル、ドコシル、トリアコンチル基などを充填剤表面に固定化したものが用いられるが、その中でODS樹脂などが挙げられる。

40

【0043】

ODS樹脂などのシリカゲル樹脂充填剤を用いたカラムクロマトグラフィーによる精製方法においては、沈殿により得られた糖ペプチド中に含まれる塩を脱塩する工程を含んでもよく、有機溶媒水溶液により糖ペプチドを溶出する工程を含んでもよい。

糖ペプチドを添加して保持させたシリカゲル樹脂に対し、質量で、1~50倍の水を用いて樹脂を洗浄することにより糖ペプチドの脱塩を行うことができる。

50

【0044】

以上のとおり、本発明においては、(1)鳥類卵脱脂卵黄を、水又は塩溶液に懸濁し、糖ペプチドの混合物などを抽出して、糖ペプチドの粗精製物である抽出液を得る抽出工程、(2)抽出工程で得られた糖ペプチドを含む抽出液を水溶性有機溶媒に添加することにより、抽出液を濃縮するだけでなく精製度の向上した糖ペプチドを沈殿物として得る沈殿工程、及び(3)沈殿工程で得られた糖ペプチドを含有する沈殿物から塩を除去する脱塩工程を含み、この脱塩工程において化学結合型シリカゲル樹脂を用いた場合は糖ペプチドが樹脂に保持されるために有機溶媒水溶液により溶出する溶出工程を含むことがある。

ここで(3)の脱塩工程においては、樹脂を用いた脱塩以外の方法、例えば膜を用いて脱塩した場合、公知の糖ペプチドの精製方法を用いて更に糖ペプチドを精製することができる。この際には当然の事ながら、化学結合型シリカゲル樹脂を用いて精製しても良い。

10

【0045】

溶出された糖ペプチドは、有機溶媒水溶液の減圧濃縮及び乾燥などにより粉末状の糖ペプチドとして得ることができる。

本実施の形態において、得られた糖ペプチドは、再度アルコール沈殿工程あるいは脱塩工程を行ってさらに精製してもよい。

【0046】

(導入工程)

導入工程とは、標識物質を糖ペプチドのペプチド部分に存在する3個のアミノ基に導入する工程のことである。用いる標識物質の量、反応液のpH、反応時間、反応温度などの反応条件を選択することにより、3個のアミノ基に対し標識物質を1~3ヶ所に導入することができる。標識強度の増加による検出感度向上のために、標識物質は3ヶ所全てのアミノ基に導入することが好ましい。

20

標識物質は、本実施の形態の糖ペプチド誘導体で説明したものと同様のものを使用することができる。

【0047】

標識物質が蛍光物質である場合、蛍光物質をペプチドのアミノ基に導入するにあたり、色素に導入された官能基を活用してもよい。すなわち、色素に導入されたコハク酸イミド基、イソシアナート基、スルホニルクロリド基、カルボニルクロリド基、カルボニルフルオリド基、イソチオシアネート基を利用することで糖ペプチドに対し簡便に蛍光標識を行うことができる。

30

蛍光物質を糖ペプチドのアミノ基に導入するためには、蛍光物質を、例えば必要に応じて、標識試薬を溶解できるアセトン、アセトニトリル、DMF、DMSO等の有機溶媒と水との混合溶媒中で有機アミンなどの有機塩基、炭酸水素ナトリウム、リン酸緩衝液あるいは炭酸緩衝液などの無機塩基の存在下、氷冷下もしくは室温下で15分~180分反応させることで良い。

この際、添加する蛍光物質を糖ペプチドのアミノ基(ペプチド1モルあたり3モルのアミノ基を有する)に対して過剰量、例えば総アミノ基のモル数に対して1.1倍から5倍のモル数の蛍光物質を添加することで、糖ペプチドの全アミノ基に蛍光標識を導入することができる。

40

【0048】

糖ペプチド誘導体を精製するためには、アセトン、アセトニトリル又はジエチルエーテル等を添加したアルコール沈殿工程および脱塩工程を組み合わせることで達成される。脱塩を行った後に、有機溶媒水溶液で溶出することにより糖ペプチド誘導体を得ることができる。糖ペプチド誘導体を添加して、糖ペプチドを保持させたODS樹脂などのシリカゲル樹脂に対し、質量で1~50倍の有機溶媒水溶液を用いて樹脂から溶出させることにより高純度の糖ペプチド誘導体を製造することができる。

【0049】

有機溶媒水溶液としては、例えば、アセトニトリル、メタノール、及びエタノールからなる群から選択される少なくとも1種の有機溶媒の水溶液などが挙げられ、有機溶媒水溶

50

液の濃度は0.1～70%(v/v)であり、好ましくは1～50%(v/v)である。有機溶媒水溶液により糖ペプチド誘導体を溶出する工程においては、水から徐々に濃度を上げていき、有機溶媒水溶液である溶出液にグラジエントをかけて溶出を行ってもよい。

【0050】

溶出された糖ペプチド誘導体は、有機溶媒水溶液の減圧濃縮及び乾燥などにより粉末状の糖ペプチド誘導体として得ることができる。本実施の形態において、得られた糖ペプチド誘導体は、再度アルコール沈殿工程あるいは脱塩工程を行ってさらに精製してもよい。

【0051】

本発明によって製造される糖ペプチド誘導体は、例えば、ウイルス感染症の検査・診断のために用いることができる。特にヒトインフルエンザウイルスの確認を高感度に行うために活用される。

10

インフルエンザウイルスはウイルス表面に存在するヘマグルチニン(HA)が、本実施の形態に係る糖ペプチドの糖鎖と同一の糖鎖を認識する。従って、本実施の形態に係る糖ペプチド誘導体を用いれば、試料中のインフルエンザウイルスを標識によって可視化し、検出することが可能である。

例えば、被検者から採取した咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、鼻腔吸引液、肺胞洗浄液等のサンプルに、本実施の形態に係る糖ペプチド誘導体を添加し、標識を検出することによって、サンプル中のインフルエンザウイルスを検出又は測定することができる。

また、本発明によって得られる糖ペプチド誘導体は、当該糖ペプチドの糖鎖が特異的に結合する糖鎖受容体やレクチンの検出にも有用である。

20

【0052】

(インフルエンザウイルス検出キット)

本実施の形態において、糖ペプチド誘導体を含むインフルエンザウイルス検出キットは、被検者から採取したサンプル中のインフルエンザウイルスを迅速に検出又は測定するためのキットである。

当該キットは、糖ペプチド誘導体のほか、被検者からサンプルを採取するための綿棒、反応容器等を適宜備えてもよい。

【実施例】

【0053】

以下、本実施の形態を実施例及び比較例によってさらに具体的に説明するが、本実施の形態はこれらの実施例のみに限定されるものではない。なお、本実施の形態に用いられる測定方法は以下のとおりである。

30

【0054】

[HPLC分析]

1) 11糖シアリルオリゴ糖ペプチドの分析例

カラム(Cadenza CD-C18 (Imtakt、150×2mm))を備えたGLサイエンス製HPLC GL-7400システムを用いて、以下の測定条件によりHPLC分析を行った。

測定条件：

グラジエント；2% 17%(15min)、CH₃CN in 0.1% TFA solution

40

流速；0.3mL/min

UV；214nm

【0055】

2) FITC-標識糖ペプチド誘導体の分析例

測定条件：

グラジエント；30% 90%(15min)、CH₃CN in 0.1% TFA solution

流速；0.3mL/min

UV；214nm

50

3) Dan - 標識糖ペプチド誘導体の分析例

測定条件:

グラジエント; 30% 45% (15 min)、CH₃CN in 0.1% TFA solution

流速; 0.3 mL/min

UV; 214 nm

[¹H-NMR測定]

11 糖シアリルオリゴ糖ペプチドの分析例

D₂O 0.4 mLに試料 2 mgを溶解して、JEOL製JNM-600 (600 MHz)で¹H-NMRを測定した。

【0056】

[LC/MS測定]

以下の測定条件でLC/MS測定を行った。用いたLC及びMSのシステムは以下のとおりである。

1) Fmoc - 11 糖シアリルオリゴ糖ペプチドの分析例

LC: アジレント製1100シリーズ

カラム: Cadenza CD-C18 (Imtakt, 150 x 2 mm)

カラム温度: 40

流速; 0.2 mL/min

UV: 262 nm

グラジエント; 40% 100% (30 min)、CH₃CN in 0.05% Formic acid solution

MS: サーマエレクトロン製LCQ

イオン化: ESI

モード: Positive

2) FITC - 11 糖シアリルオリゴ糖ペプチドの分析例

LC: アジレント製1100シリーズ

カラム: Cadenza CD-C18 (Imtakt, 150 x 2 mm)

カラム温度: 40

流速; 0.2 mL/min

UV: 214 nm

グラジエント; 30% 70% (20 min)、CH₃CN in 0.05% Formic acid solution

MS: サーマエレクトロン製LCQ

イオン化: ESI

モード: Positive、Negative

3) Dan - 11 糖シアリルオリゴ糖ペプチドの分析例

LC: アジレント製1100シリーズ

カラム: Cadenza CD-C18 (Imtakt, 150 x 2 mm)

カラム温度: 40

流速; 0.2 mL/min

UV: 214 nm

グラジエント; 2% 100% (30 min)、CH₃CN in 0.05% Formic acid solution

MS: サーマエレクトロン製LCQ

イオン化: ESI

モード: Positive、Negative

4) TAMRA - 11 糖シアリルオリゴ糖ペプチドの分析例

LC: アジレント製1100シリーズ

カラム: Cadenza CD-C18 (Imtakt, 150 x 2 mm)

50

カラム温度：40
 流速；0.2 mL/min
 UV：214 nm
 グラジエント；20% 70% (30 min)、CH₃CN in 0.05% Formic acid solution
 MS：サーモエレクトロン製LCQ
 イオン化：ESI
 モード：Positive、Negative

【0057】

[実施例1]フルオレセイン-標識糖ペプチド誘導体の製造

10

(1)糖ペプチドの精製

鶏卵卵黄10個にエタノール350 mLを添加し、よく攪拌した。8,000 rpmで20分遠心分離し、デカンテーションにより上清を除去することで沈殿物を得た。得られた沈殿物にエタノール300 mLを添加し、よく攪拌後、遠心分離し、上清を除去する操作を3回繰り返して、沈殿物として脱脂卵黄150 gを得た。

得られた上記脱脂卵黄150 gに水200 mLを添加し、よく攪拌した。8,000 rpmで20分遠心分離し、デカンテーションにより上清を得た。デカンテーションにより得られた沈殿物に水100 mLを添加し、よく攪拌後、遠心分離し、上清を回収する操作を3回繰り返した。回収した上清をガラスフィルターにて濾過後、100 mLまで減圧濃縮した。その後、得られた濃縮溶液をエタノール700 mLに注加し、生じた沈殿物を、8,000 rpmで20分遠心分離し、デカンテーションにより上清を除去することで回収した。得られた沈殿物を水に溶解し、再度エタノールに注加した。この操作を3回繰り返した。ここで生じた沈殿物を回収することで粗精製糖ペプチド1.58 gを得た。

20

ODS樹脂としてシリカゲル樹脂Wakogel(100C18)25 gをガラスカラムに充填し、該樹脂をメタノールで洗浄後、水で置換した。粗精製糖ペプチド1.5 gを水5 mLに溶解し水で置換後の樹脂に添加した。粗精製糖ペプチドを添加した樹脂を水100 mLで洗浄後、2%アセトニトリル溶液で糖ペプチドを溶出した。溶出液を凍結乾燥することで117 mgの糖ペプチドを得た。

得られた糖ペプチドのHPLC及び¹H-NMRによる測定結果をそれぞれ図1及び2に示す。HPLCによる純度では95%であった。得られた糖ペプチドは標品(東京化成製)との比較により上記式(II)で表される構造であることが分かった。

30

ODS樹脂としてシリカゲル樹脂Wakogel(100C18)25 gをガラスカラムに充填し、該樹脂をメタノールで洗浄後、水で置換した。上記実施例1で得られた糖ペプチド50 mgを水1 mLに溶解し水で置換後の樹脂に添加した。粗精製糖ペプチドを添加した樹脂を水100 mLで洗浄後、2%アセトニトリル溶液で糖ペプチドを溶出した。溶出液を凍結乾燥することで30 mgの糖ペプチドを得た。得られた糖ペプチドのHPLCによる測定結果を図3に示す。HPLCによる純度では99%であった。

【0058】

(2)フルオレセイン導入工程

(1)で得られた糖ペプチド10 mgをアセトン-水(1/1:体積比)1 mLに加え、さらに0.1 mLの1 M重曹水を加えた。その後FITC試薬14 mg(FITC-I, Fluorescein-4-isothiocyanate、同仁化学製)のアセトン溶液0.5 mLを加え遮光下で1時間反応を行い、エタノール-アセトン(1/1:体積比)10 mLを加え粗精製フルオレセイン標識-糖ペプチド誘導体を沈殿させた。3,500 rpmで15分遠心分離し、デカンテーションにより上清を除去することで回収した。得られた沈殿物を水に溶解し、再度エタノール-アセトン(1/1:体積比)10 mLに注加した。この操作を3回繰り返した。ここで生じた沈殿物を回収することで粗精製糖ペプチド誘導体10.5 mgを得た。

40

この沈殿物を水に溶解し、Waters製Sep-Pak Plus C18カートリッジを用いて樹脂に保持させた後、水で洗浄しその後20%アセトニトリル水溶液で溶出することでフルオレセイ

50

ン標識 - 糖ペプチド誘導体 8 . 1 m g を得た。

得られたフルオレセイン標識 - 糖ペプチド誘導体の H P L C による測定結果を図 4 に示す。反応生成物について L C / M S 測定を行った。その結果、7 . 2 分に検出されるピークは検出イオンが 1345.2 ($[M+3H]^{3+}$) 推定分子量 4032.6、また検出イオンが 1343.2 ($[M-3H]^{3-}$) 推定分子量 4032.6 であり、糖ペプチドの 3 個のアミノ基に 3 個のフルオレセインが導入された化合物であることが推定された。

【 0 0 5 9 】

[実施例 2] ダンシル - 標識糖ペプチド誘導体の製造

(1) 糖ペプチドの精製

鶏卵卵黄 5 0 個にアセトン 1 . 1 L を添加し、よく攪拌した。8 , 0 0 0 r p m で 1 5 分遠心分離し、デカンテーションにより上清を除去することで沈殿物を得た。得られた沈殿物にエタノール 7 0 0 m L を添加し、よく攪拌後、遠心分離し、上清を除去する操作を 2 回繰り返して、沈殿物として脱脂卵黄 5 0 0 g を得た。

得られた上記脱脂卵黄 5 0 0 g に水 6 0 0 m L を添加し、よく攪拌した。8 , 0 0 0 r p m で 1 5 分遠心分離し、デカンテーションにより上清を得た。デカンテーションにより得られた沈殿物に水 4 0 0 m L を添加し、よく攪拌後、遠心分離し、上清を回収する操作を 3 回繰り返した。回収した上清をガラスフィルターにて濾過後、4 0 0 m L まで減圧濃縮した。その後、得られた濃縮溶液をエタノール 2 L に注加し、生じた沈殿物を、8 , 0 0 0 r p m で 1 5 分遠心分離し、デカンテーションにより上清を除去することで回収した。得られた沈殿物を水に溶解し、エタノールに注加した。この操作を 3 回繰り返した。ここで生じた沈殿物を回収することで粗精製糖ペプチド 9 . 0 g を得た。

O D S 樹脂としてシリカゲル樹脂 W a k o g e l (1 0 0 C 1 8) 5 0 g をガラスカラムに充填し、該樹脂をメタノールで洗浄後、水で置換した。粗精製糖ペプチド 9 . 0 g を水 8 0 m L に溶解し水で置換後の樹脂に添加した。粗精製糖ペプチドを添加した樹脂を水 2 0 0 m L で洗浄後、2 % アセトニトリル溶液で糖ペプチドを溶出した。溶出液を凍結乾燥することで 3 8 9 m g の糖ペプチドを得た。

得られた糖ペプチドの H P L C による測定結果を図 5 に示す。H P L C による純度では 9 6 % であった。得られた糖ペプチドは標品 (東京化成製) との比較により上記式 (I I) で表される構造であることが分かった。

(2) ダンシルクロライド導入工程

(1) で得られた糖ペプチド 2 4 m g をジメチルホルムアミド - 水 (4 / 1 : 体積比) 2 . 5 m L に加え、さらに 0 . 2 m L の 1 M 重曹水を加えた。その後ダンシルクロライド 2 0 m g (D a n - C l : Dancyl Chloride、5-Dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl Chloride、東京化成製) のジメチルホルムアミド溶液 0 . 5 m L を加え、遮光下で 1 . 5 時間反応を行い、エタノール - アセトン (2 / 1 : 体積比) 1 0 m L を加え、粗精製 D a n 標識 - 糖ペプチド誘導体を沈殿させた。

3 , 5 0 0 r p m で 1 5 分遠心分離し、デカンテーションにより上清を除去することで回収した。得られた沈殿物を水に溶解し、再度エタノール - アセトン (2 / 1 : 体積比) 1 0 m L に注加した。この操作を 3 回繰り返した。ここで生じた沈殿物を回収することで粗精製糖ペプチド誘導体 4 1 . 4 m g を得た。

この沈殿物を水に溶解し、Waters 製 Sep-Pak Plus C18 カートリッジを用いて樹脂に保持させた後、水で洗浄しその後 2 0 % アセトニトリル水溶液で溶出することでダンシル標識 - 糖ペプチド誘導体 8 . 8 m g を得た。

得られたダンシル標識 - 糖ペプチド誘導体の H P L C による測定結果を図 6 に示す。反応生成物について L C / M S 測定を行った。その結果、3 . 5 分に検出されるピークは検出イオンが 1783.3 ($[M+2H]^{2+}$) 推定分子量 3564.6 であり、糖ペプチドの 3 個のアミノ基に 3 個のダンシル基が導入された化合物であることが推定された。

【 0 0 6 0 】

[実施例 3] T A M R A - 標識ペプチド誘導体の製造

実施例 2 の (1) で得られた糖ペプチド 7 m g を水 1 m L に加え、さらに 0 . 1 m L の

10

20

30

40

50

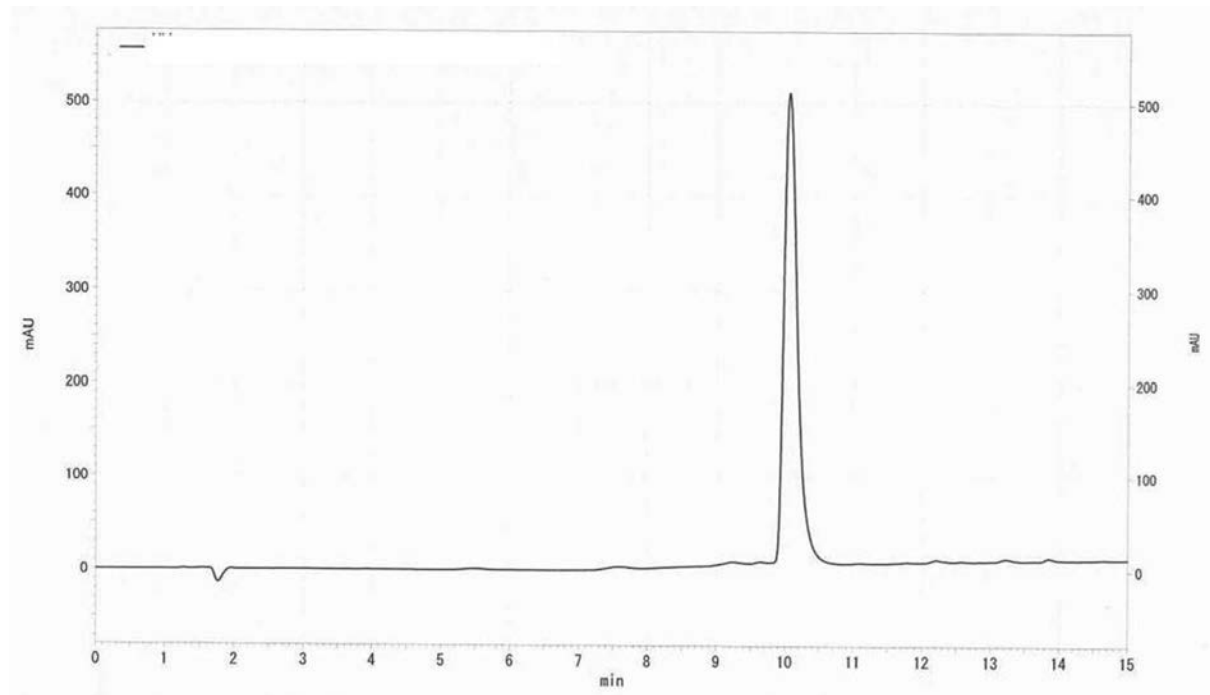
1 M重曹水を加えた。その後5-Carboxytetramethyl-rhodamine, succinimidylyester, single isomer 5 mg (5-TAMRA, SE, EMP Biotech GmbH) のジメチルホルムアミド溶液 0.3 mL を加え遮光下で2時間反応を行い、エタノール-アセトン-ジエチルエーテル(1/1/1:体積比) 9 mL を加え粗精製 TAMRA 標識-糖ペプチド誘導体を沈殿させた。

8,000 rpm で5分遠心分離し、デカンテーションにより上清を除去することで回収した。得られた沈殿物を水に溶解し、再度エタノール-アセトン-ジエチルエーテル(1/1/1:体積比) 9 mL に注加した。この操作を3回繰り返した。ここで生じた沈殿物を回収することで粗精製糖ペプチド誘導体 6 mg を得た。

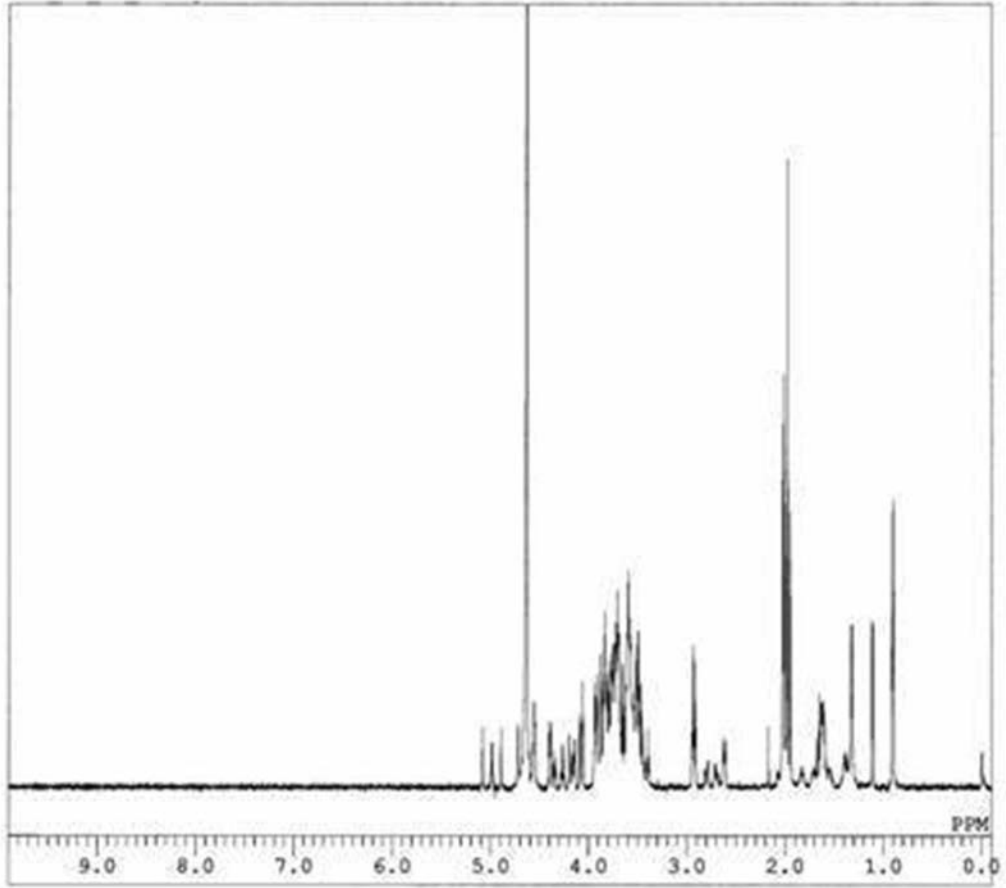
得られたローダミン標識-糖ペプチド誘導体の HPLC による測定結果を図7に示す。反応生成物について LC/MS 測定を行った。その結果、10.5分に検出されるピークは検出イオンが1368.3 ($[M+3H]^{3+}$) 推定分子量4101.9であり、糖ペプチドの3個のアミノ基に3個の TAMRA が導入された化合物であることが推定された。また9.6分に検出されるピークは検出イオンが1230.8 ($[M+3H]^{3+}$) 推定分子量3689.4であり、糖ペプチドの3個のアミノ基に2個の TAMRA が導入された化合物であることが推定された。

10

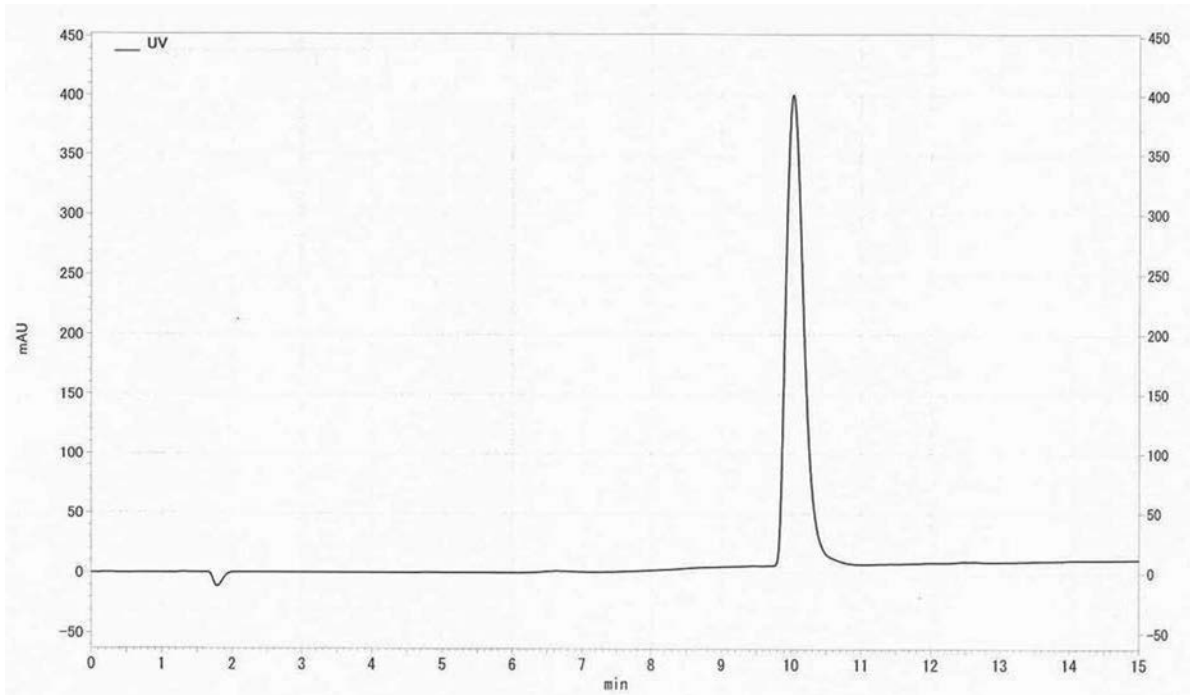
【図1】



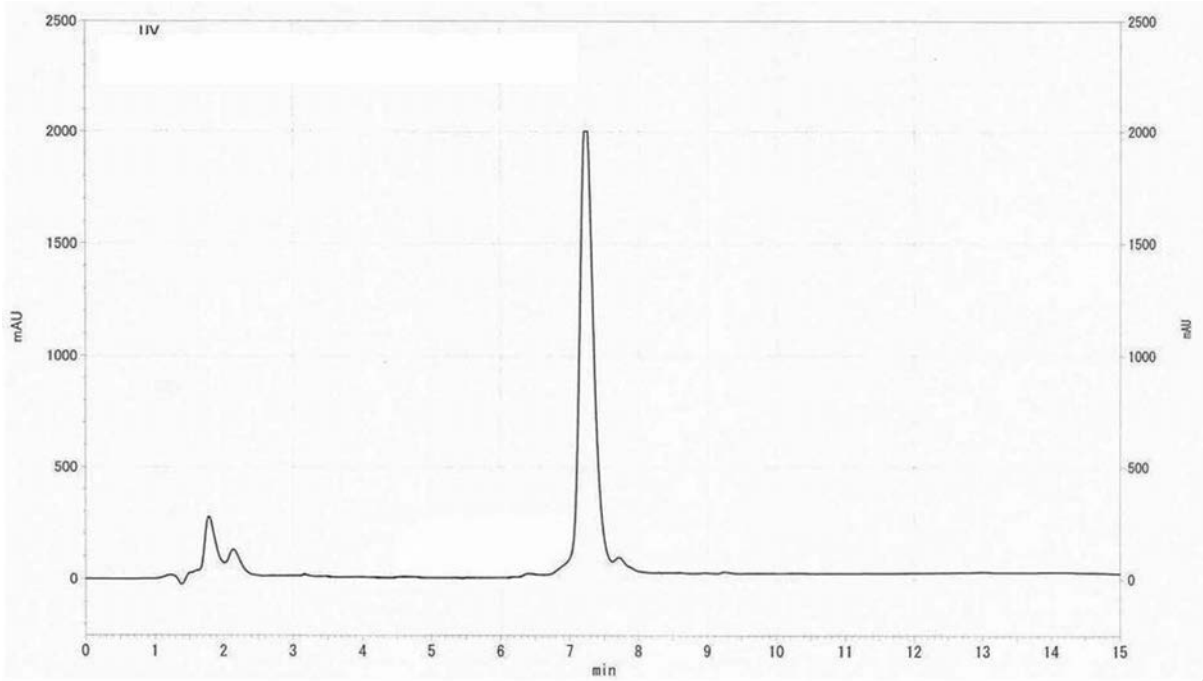
【 図 2 】



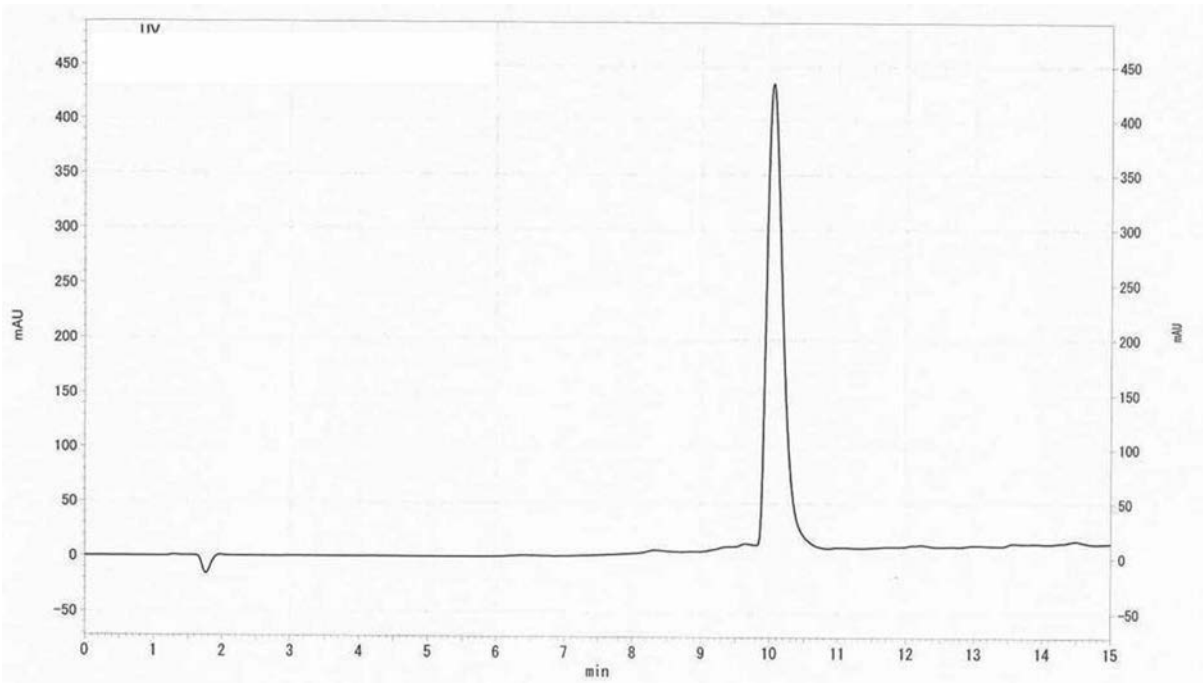
【 図 3 】



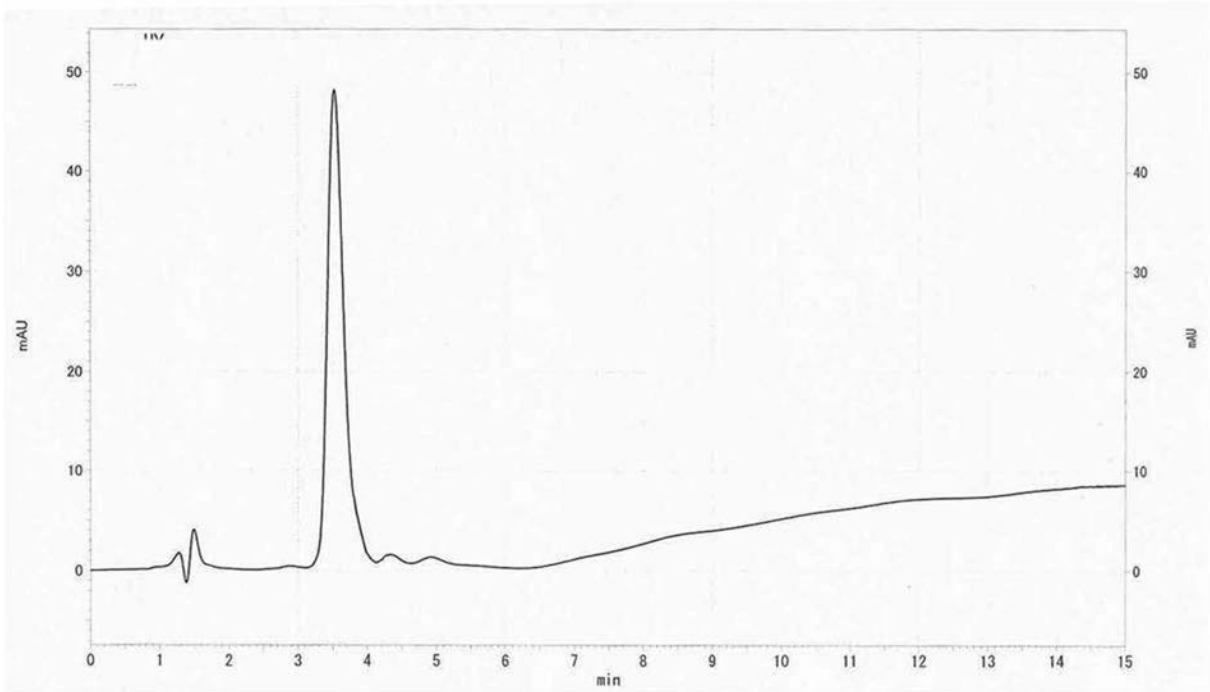
【 4 】



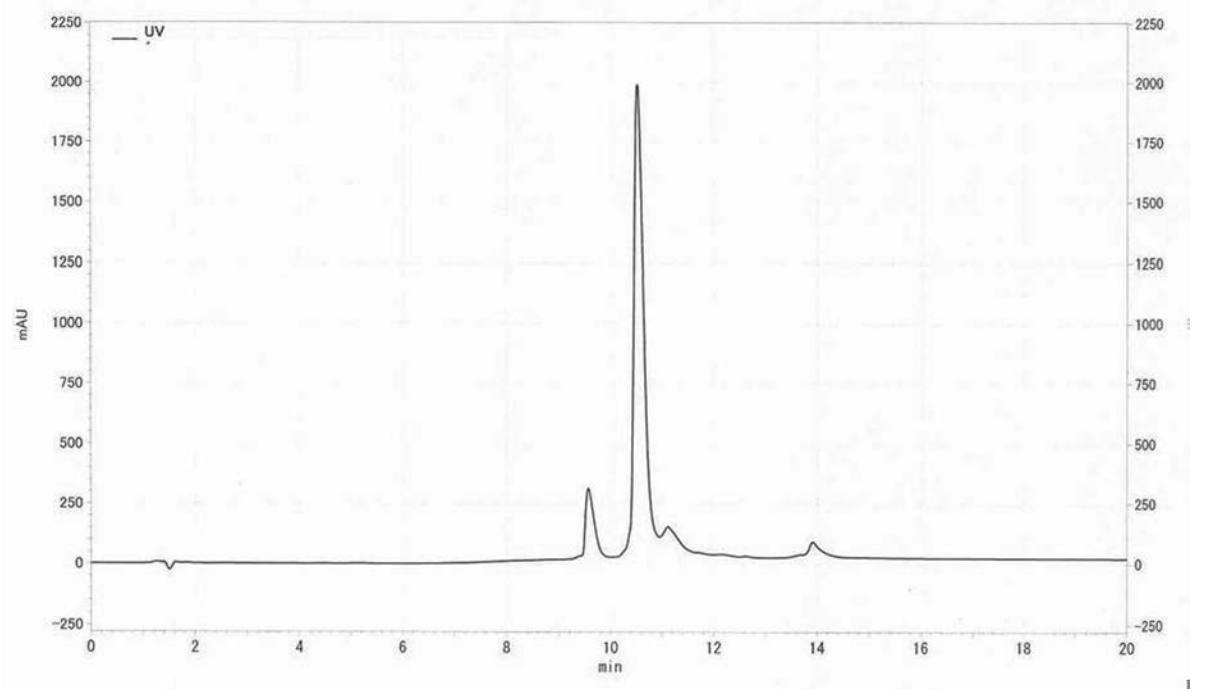
【 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 30/00 (2006.01) G 0 1 N 30/00 C

(72)発明者 菅原 州一
 静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成株式会社内

(72)発明者 大隅 賢二
 東京都板橋区加賀1-8-1 財団法人野口研究所内

審査官 中西 聡

(56)参考文献 国際公開第96/002255(WO,A1)
 国際公開第2010/010674(WO,A1)
 特開2004-317398(JP,A)
 特表2004-510767(JP,A)
 特開2004-018841(JP,A)
 特表2007-501888(JP,A)
 特開2002-029974(JP,A)
 国際公開第2004/070046(WO,A1)
 国際公開第2004/058984(WO,A1)
 国際公開第2011/027868(WO,A1)
 POETSCHKE,P. et al, Morphology and electrical resistivity of melt mixed blends of poly ethylene and carbon nanotube fille, Polymer, 2003年, Vol.44, p.8061-8069
 SEKO,A. et al, Occurrence of a sialylglycopeptide and free sialylglycans in hen's egg yolk, Biochimica et Biophysica Acta, 1997年, Vol.1335, No.1-2, p.23-32

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 8 B 1 / 0 0 - 3 7 / 1 8
 A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8
 A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0
 C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 C 0 7 H 1 / 0 0 - 9 9 / 0 0
 G 0 1 N 3 0 / 0 0 - 3 0 / 9 6 , 3 3 / 5 3 3 , 3 3 / 5 6 9
 REGISTRY (STN)
 CAplus (STN)
 MEDLINE (STN)
 EMBASE (STN)
 BIOSIS (STN)
 JSTPlus (JDream2)
 JMEDPlus (JDream2)
 JST7580 (JDream2)