

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6731381号
(P6731381)

(45) 発行日 令和2年7月29日(2020.7.29)

(24) 登録日 令和2年7月8日(2020.7.8)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 P 19/28 (2006.01) C 1 2 P 19/28
C 0 7 H 1/00 (2006.01) C 0 7 H 1/00

請求項の数 1 (全 11 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2017-120310 (P2017-120310) (22) 出願日 平成29年6月20日 (2017. 6. 20) (65) 公開番号 特開2018-27078 (P2018-27078A) (43) 公開日 平成30年2月22日 (2018. 2. 22) 審査請求日 平成31年4月11日 (2019. 4. 11) (31) 優先権主張番号 特願2016-158070 (P2016-158070) (32) 優先日 平成28年8月10日 (2016. 8. 10) (33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)</p>	<p>(73) 特許権者 000173924 公益財団法人野口研究所 東京都板橋区加賀一丁目9番7号 (72) 発明者 後藤 浩太郎 東京都板橋区加賀一丁目9番7号 公益財 団法人野口研究所内 (72) 発明者 水野 真盛 東京都板橋区加賀一丁目9番7号 公益財 団法人野口研究所内 審査官 松本 淳</p>
---	---

最終頁に続く

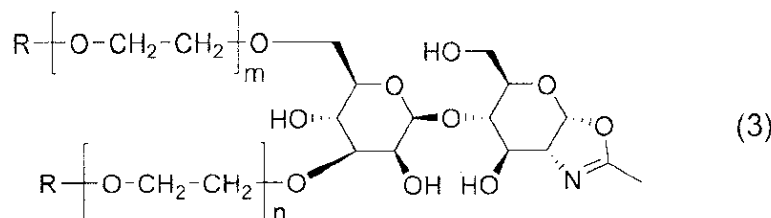
(54) 【発明の名称】 ポリエチレングリコール鎖が導入された化合物の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

GlcNAcを含む化合物を糖受容体とし、下記一般式(3)で表されるオキサゾリン誘導体を糖供与体として、エンド - - N - アセチルグルコサミニターゼを用いた糖受容体中の糖部位に PEG 修飾した糖を転移させることを特徴とする、PEG 鎖が導入された化合物の製造方法。

【化 1 4】



(式(3)中、Rは水素、または炭素1から20のアルキル基またはアルケニル基を示す。mとnは、5から2000の整数である。)

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖転移活性を有する糖加水分解酵素を用いて、従来は困難であった、分子内

に P E G 鎖が導入された化合物を効率的に合成する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、タンパク質やペプチド性薬物分子に水溶性高分子ポリエチレングリコール (P E G) を結合させる P E G 化医薬品の研究が盛んに行われている。この P E G は無毒性かつ非免疫原性の高分子であり、P E G 化されたタンパク質治療薬は免疫原性の低下、各種酵素による分解からの保護、半減期の増大などにより、生体内での安定性を高める効果が得られることが知られている。

【0003】

しかし、その主な方法としてはタンパク質の側鎖アミノ基への P E G 鎖の導入が用いられているが、タンパク質上に複数箇所存在するアミノ基にランダムに導入されるため、P E G 鎖の導入位置や数の異なる種々の P E G 化タンパク質の混合物が生成物として得られる。このような P E G 鎖の導入位置が非選択的な方法ではタンパク質の高次構造の変化や生理活性の低下や喪失が懸念される。

【0004】

この問題点を解決する方法の1つとして、糖タンパク質上の糖を足掛かりとして、糖転移酵素を用いた糖転移反応により位置選択的に P E G 化する方法が既に報告されている (非特許文献 1) 。この方法は糖の結合した部分にのみ選択的に P E G 鎖を導入することができるため、従来のランダムに P E G 鎖を導入する方法よりも高い位置選択性を有する利点を持つ。さらにこの手法により P E G 化の導入された糖タンパク質はこれまで研究が行われている P E G 化されたタンパク質やペプチド性薬剤と同様に生体内半減期が延長されることが明らかになっている。

【0005】

しかし、糖転移酵素を用いて P E G 化された糖タンパク質を合成する場合は、糖供与体として P E G 化された糖ヌクレオチドが必要不可欠となる。当然そのような糖ヌクレオチドは市販されておらず、また合成する場合にもその安定性などから、大量に調製することは非常に困難であると言わざるを得ない。また反応に用いる糖転移酵素自体も高価である。これらの理由からこの方法は大変優れた手法ではあるが、一方で大量調製を考慮した場合、非現実的である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】S . D e F r e e s ら、G l y c o b i o l o g y 16 , 833 (2006)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、糖加水分解酵素を用いた糖転移反応によって P E G 化された糖誘導体を効率的に製造する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は上記課題を解決するべく鋭意検討した結果、糖転移酵素より安価である糖加水分解酵素を用いることを考えた。一般に糖加水分解酵素は糖転移酵素と比べて格段に安価であり、また近年では糖加水分解酵素にも糖転移活性があるものが多く含まれていることが明らかになっている。そのような糖加水分解酵素の中の1つであるエンド - N - アセチルグルコサミニダ - ゼ (E N G a s e) はエンド型加水分解酵素の1つであり、N - 結合型糖タンパク質糖鎖のジアセチルキトピオース部分を切断して糖鎖部位と G l c N A c 1 残基を有する糖タンパク質を生成する機能を有している。さらにある種の E N G a s e は糖鎖を水酸基を有する化合物に付加するという糖鎖転移活性を有している。また、この E N G a s e を用いる糖転移反応の基質としては糖オキサゾリン誘導体が有用であ

ることが既に明らかになっている。一般に糖オキサゾリン誘導体は対応する糖ヌクレオチドと比較して合成も容易であり、さらに格段に安定である。この点からも従来の糖転移酵素を用いる手法よりも大量調製が容易になる。以上の点を改良することで本発明を完成するに至った。

【0009】

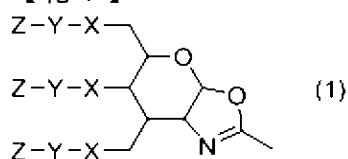
すなわち、本発明は以下のとおりの製造方法である。

< 1 > 糖を含む化合物を糖受容体とし、糖部位がポリエチレングリコール (P E G) 修飾された糖誘導体を糖供与体として、糖転移活性を有する糖加水分解酵素を用いて糖受容体中の糖部位に P E G 修飾した糖を転移させることを特徴とする、 P E G 鎖が導入された化合物の製造方法。

< 2 > 糖転移活性を有する糖加水分解酵素としてエンド - N - アセチルグルコサミニダ - ゼを用いる < 1 > に記載の製造方法。

< 3 > 糖供与体として下記一般式 (1) で表されるオキサゾリン誘導体を用いる < 1 > または < 2 > に記載の製造方法。

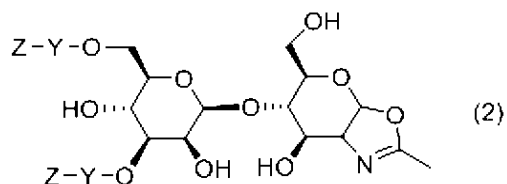
【化 1】



(式 (1) 中、 X は存在するか存在せず、存在する場合には酸素、アミノ基、硫黄、有機基、糖を、 Y は存在するか存在せず、存在する場合には P E G 鎖もしくは官能基や有機基で誘導化された P E G 鎖を、 Z は存在するか存在せず、存在する場合には水素、有機基または官能基を示す。 X - Y、 Y - Z 間の結合は共有結合であり、 X、 Y、 Z はその表示各位において同一である必要はない。ただし、 Y が全く存在しない場合は除く。)

< 4 > 糖供与体として下記一般式 (2) で表されるオキサゾリン誘導体を用いる < 1 > または < 2 > に記載の製造方法。

【化 2】



(式 (2) 中、 Y は P E G 鎖もしくは官能基や有機基で誘導化された P E G 鎖を、 Z は水素、有機基または官能基を示す。 Y - Z 間の結合は共有結合であり、 Y、 Z はその表示各位において同一である必要はない。)

< 5 > 糖受容体として糖誘導体または複合糖質を用いる < 1 > または < 2 > に記載の製造方法。

【発明の効果】

【0010】

本発明の製造方法を用いれば、タンパク質上の決まった位置に糖を足掛かりとして決まった構造の P E G 鎖を導入できるこれまでにない手法となる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図 1】カイコ絹糸腺産生トラスツズマブアクセプターの 3 種類の糖鎖構造を示す模式図。

【図 2】化合物 8 が転移されたカイコ絹糸腺産生トラスツズマブアクセプターの S D S - P A G E。

【図 3】 P E G 化糖残基が導入されたトラスツズマブアクセプター、未反応体の糖鎖構造

を示す模式図、および H P L C による解析結果。

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の糖転移活性を有する糖加水分解酵素を用いる分子内に P E G 鎖が導入されている化合物の合成法は、従来の一般的に行われているタンパク質の P E G 化とは異なり、糖を足掛かりとすることでタンパク質上の決まった位置のみ P E G 鎖を導入することが可能になる。さらにすでに報告されている糖転移酵素を用いる P E G 化では、高価な糖転移酵素と不安定な糖ヌクレオチドを使用する問題点があったが、本手法では糖転移反応に安価な糖加水分解酵素を使用し、さらに糖供与体に比較的安定なオキサゾリン誘導体を用いることで従来法の問題点を解決することを特徴とする。

10

【0013】

本発明に用いる糖転移活性を有する糖加水分解酵素としては特に制限はないが、G H 1 8、G H 2 0、G H 5 6、G H 8 4、G H 8 5 ファミリーが好ましく、特に G H 1 8、G H 8 5 ファミリーが好ましい。

本発明に使用する糖加水分解酵素は緩衝溶液中に可溶化していても良いし、不溶性でも良い。また、固体担体に固定化されていても良い。

【0014】

本発明に使用する緩衝溶液の種類には特に制限はないが、リン酸緩衝溶液、クエン酸緩衝溶液、トリス - 塩酸緩衝溶液などが好ましい。

20

当該反応の際に溶媒となる緩衝溶液に有機溶媒を混合させる場合は、当該反応において不活性な溶媒の 1 種または 2 種以上を用いる。有機溶媒としては、ジメチルスルホキシド、エチレングリコールジメチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、アセトニトリル、プロピオニトリル、N, N - ジメチルホルムアミド、N, N - ジメチルアセトアミド、N - メチルピロリドンなどの水溶性有機溶媒を使用する。また用いる溶媒の量に特に制限はない。

【0015】

当該反応の p H には何ら制限はないが、p H 3 から 1 0 が好ましく、特に 4 から 8 が好ましい。

当該反応の圧力は、減圧下、大気圧下、または加圧下のいずれであってもよい。

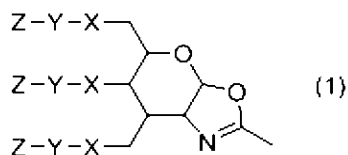
30

当該反応の反応時間には何ら制限はないが、5 分 ~ 7 2 時間が好ましい。

当該反応の反応温度には何ら制限はないが、0 ~ 6 0 が好ましい。

本発明に用いる糖供与体として、下記一般式 (1) で表されるオキサゾリン誘導体を用いることが好ましい。

【化 3】



【0016】

一般式 (1) において X は存在するか存在せず、存在する場合には酸素、アミノ基、硫黄、有機基、糖を示す。糖の構造に特に制限はないが、ヘキソース、ヘキソサミンが好ましい。

一般式 (1) において Y は存在するか存在せず、存在する場合にはポリエチレングリコール鎖もしくは官能基や有機基で誘導化されたポリエチレングリコール鎖を示す。ポリエチレングリコール鎖の構造としては直鎖構造でも分岐構造であっても特に制限はない。ポリエチレングリコール鎖の重合度についても特に制限はないが、重合度 3 から 1 0 0 0 0 が好ましく、特に重合度 5 から 2 0 0 0 が好ましい。

一般式 (1) において Z は存在するか存在せず、存在する場合には水素または有機基ま

50

たは官能基である。

【 0 0 1 7 】

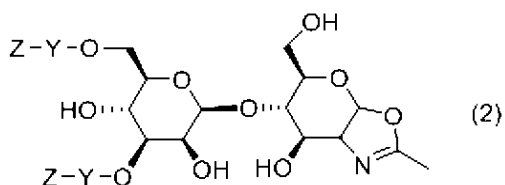
一般式(1)のX、Y、Zにおいて有機基とは、炭素原子を必須とする原子の集合体であり、例えばアルキル基、アラルキル基、アルケニル基、アルキニル基が挙げられ、特にアルキル基、アルキニル基が好ましい。アルキル基、アルケニル基の構造に特に制限はなく飽和または不飽和の鎖式炭化水素基または脂環式炭化水素基となってもよい。アルキル基、アルケニル基の炭素数に特に制限はないが1~30が好ましく特に1~20が好ましい。

一般式(1)のY、Zにおいて官能基とは、有機化合物の性質を決定する原子の集合体であり、例えば水酸基、アミノ基、アジド基、アルデヒド基、ケトン基、ボロン酸、アミド基、チオール基が挙げられ、特に水酸基、アミノ基、アジド基、カルボキシル基、アルデヒド基が好ましい。

X-Y、Y-Z間の結合は共有結合であり、X、Y、Zはその表示各位において同一である必要はない。ただし、Yが全く存在しない場合は除く。

本発明に用いる糖供与体として、下記一般式(2)で表されるオキサゾリン誘導体を用いることが特に好ましい。

【化4】



【 0 0 1 8 】

一般式(2)においてYはポリエチレングリコール鎖もしくは官能基や有機基で誘導化されたポリエチレングリコール鎖を示す。ポリエチレングリコール鎖の構造としては直鎖構造でも分岐構造であっても特に制限はない。ポリエチレングリコール鎖の重合度についても特に制限はないが、重合度3から10000が好ましく、特に重合度5から2000が好ましい。

一般式(2)においてZは水素または有機基または官能基である。

一般式(2)のY、Zにおいて有機基とは、一般式(1)のX、Y、Zにおける有機基と同様である。

一般式(2)のY、Zにおいて官能基とは、一般式(1)のY、Zにおける官能基と同様である。

Y-Z間の結合は共有結合であり、Y、Zはその表示各位において同一である必要はない。

【 0 0 1 9 】

一般式(1)あるいは(2)で示されるオキサゾリン誘導体に、糖加水分解酵素による糖転移反応を行うことで目的のPEG化された糖誘導体は合成される。

一般式(1)あるいは(2)で示されるオキサゾリン誘導体と反応させる糖受容体の構造、分子サイズに何ら制限はないが、分子内にN-アセチルグルコサミン残基を有していることが好ましい。

糖転移反応の際に使用する一般式(1)あるいは(2)で示されるオキサゾリン誘導体の使用量に特に制限はないが、使用する糖受容体に対してモル比で1.0モルから300モル当量が好ましく、1.0から150モル当量がさらに好ましい。

本発明に用いる糖受容体として、糖誘導体または複合糖質を用いることが好ましい。

【実施例】

【 0 0 2 0 】

以下に、本発明を実施例を用いて更に詳細に説明するが、この実施例は本発明の具体例を示すもので、本発明を何ら限定するものではない。

10

30

40

50

【実施例 1】

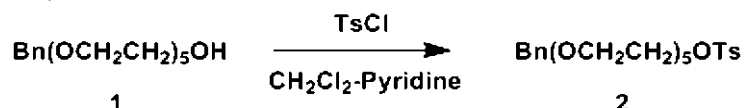
【0021】

(1) 化合物 2 の調製

化合物 1 (3.83 g, 11.7 mmol) をジクロロメタン (60 mL) - ピリジン (10 mL) 混合溶媒に溶解し、トシルクロライド (3.33 g, 17.5 mmol) を加え、室温で一晩撹拌した。反応液を減圧濃縮した後、残渣に水を加え、酢酸エチルで 2 回抽出した。有機相を 1 N 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄後、硫酸マグネシウムを加え乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 n-ヘキサン:酢酸エチル = 1:3) で精製し、化合物 2 (4.93 g, 88%) を得た。

10

【化 5】



【0022】

化合物 2 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 2.44 (s, 3H), 3.57 (s, 4H), 3.59 - 3.70 (m, 14H), 4.15 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 4.56 (s, 2H), 7.25 - 7.29 (m, 1H), 7.30 - 7.36 (m, 6H), 7.33 (d, J = 6.9 Hz, 2H).

20

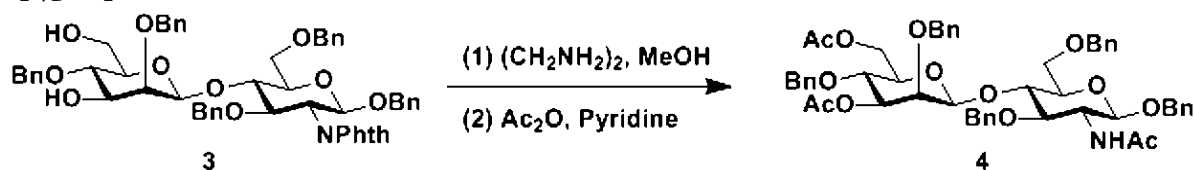
【0023】

(2) 化合物 4 の調製

化合物 3 (182 mg, 197 μmol) をメタノール (8 mL) に溶解し、エチレンジアミン (2 mL) を加え、一晩加熱還流した。反応液を濃縮後、残渣にピリジン (2 mL) と無水酢酸 (1 mL) を加え、室温で一晩撹拌した。反応液にメタノール (2 mL) を加え過剰な試薬を分解した後、酢酸エチルで 2 回抽出した。有機相を 1 N 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄後、硫酸マグネシウムを加え乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 n-ヘキサン:酢酸エチル = 1:1) で精製し、化合物 4 (160 mg, 88%) を得た。

30

【化 6】



【0024】

化合物 4 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 1.69 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 3.36 (ddd, J = 2.8 Hz, 4.8 Hz, 9.6 Hz, 1H), 3.64 - 3.75 (m, 3H), 3.81 (dd, J = 3.4 Hz, 10.3 Hz, 1H), 3.84 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 3.93 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 3.98 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 4.04 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 4.18 (dd, J = 4.8 Hz, 11.7 Hz, 1H), 4.21 (dd, J = 2.1 Hz, 11.7 Hz, 1H), 4.47 - 4.68 (m, 8H), 4.76 (dd, J = 3.4 Hz, 8.9 Hz, 1H), 4.78 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 4.85 (d, J = 13.1 Hz, 1H), 4.87 (d, J = 12.1 Hz, 1H), 4.88 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 5.76 (d, J = 8.2 Hz,

40

50

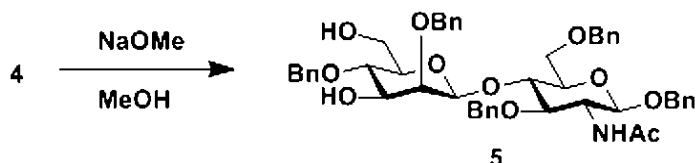
1 H), 7.17 - 7.39 (m, 25 H).

【0025】

(3) 化合物5の調製

化合物4 (159 mg, 173 μmol) をメタノール (10 mL) に溶解し、触媒量の28%ナトリウムメトキシドメタノール溶液を滴下し、室温で一晩攪拌した。反応液にAmberlite IR-120 (H^+ form) を加えて中和後、樹脂を濾別した。濾液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 n-ヘキサン:酢酸エチル = 1:2) で精製し、化合物5 (132 mg, 92%) を得た。

【化7】



10

【0026】

化合物5 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 1.76 (s, 3 H), 2.06 (br s, 1 H), 2.30 (d, $J = 8.9$ Hz, 1 H), 3.08 - 3.14 (m, 1 H), 3.41 - 3.53 (m, 4 H), 3.60 - 3.66 (m, 2 H), 3.69 (dd, $J = 2.1$ Hz, 11.7 Hz, 1 H), 3.72 (dd, $J = 4.1$ Hz, 11.0 Hz, 1 H), 3.77 (dd, $J = 2.7$ Hz, 10.3 Hz, 1 H), 3.90 (t, $J = 8.2$ Hz, 1 H), 4.49 (d, $J = 12.3$ Hz, 1 H), 4.54 - 4.62 (m, 5 H), 4.64 (d, $J = 12.3$ Hz, 1 H), 4.82 (d, $J = 11.0$ Hz, 1 H), 4.89 (d, $J = 11.7$ Hz, 1 H), 4.94 (d, $J = 11.7$ Hz, 1 H), 4.94 (d, $J = 11.6$ Hz, 1 H), 4.98 (d, $J = 6.8$ Hz, 1 H), 5.62 (d, $J = 7.6$ Hz, 1 H), 7.19 - 7.42 (m, 25 H).

20

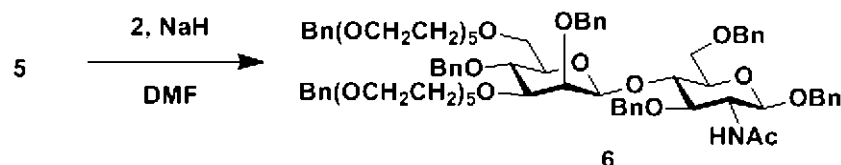
【0027】

(4) 化合物6の調製

化合物5 (132 mg, 158 μmol) および化合物2 (306 mg, 633 μmol) をDMF (0.6 mL) に溶解し、水素化ナトリウム (16.6 mg, 380 μmol) を加え、0 で15分、次いで室温で一晩攪拌した。反応液に5%クエン酸水溶液 (1 mL) を加え反応を停止させた後、水を加え酢酸エチルで2回抽出した。有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄後、硫酸マグネシウムを加え乾燥させた。乾燥剤を濾別後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 トルエン:酢酸エチル = 1:5) で精製し、化合物6 (147 mg, 64%) を得た。

30

【化8】



【0028】

化合物6 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 1.65 (s, 3 H), 3.22 - 3.30 (m, 2 H), 3.38 - 3.76 (m, 45 H), 3.77 - 3.82 (m, 2 H), 3.84 (q, $J = 6.2$ Hz, 1 H), 3.91 (t, $J = 6.2$ Hz, 1 H), 4.06 (t, $J = 6.2$ Hz, 1 H), 4.45 (d, $J = 11.7$ Hz, 1 H), 4.48 (s, 1 H)

50

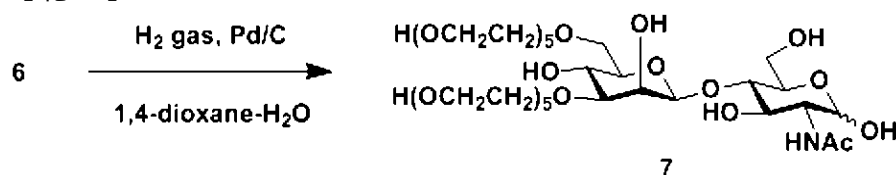
), 4.51 - 4.61 (m, 7H), 4.64 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 4.73 - 4.94 (m, 6H), 6.11 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.19 - 7.36 (m, 33H), 7.40 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H).

【0029】

(5) 化合物7の調製

化合物6 (147 mg, 101 μmol) を1,4-ジオキサン (10 mL) に溶解し、Pd/C (125 mg) の1,4-ジオキサン懸濁液 (2 mL) に加えた後、水 (3 mL) を加え、水素雰囲気下、室温にて一晩撹拌した。固形物を濾別し、50% 1,4-ジオキサン水溶液で洗浄後、濾液と洗液を合わせて減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒 クロロホルム:メタノール:水 = 7:3:0.4) で精製し、化合物7 (60.9 mg, 73%) を得た。

【化9】



【0030】

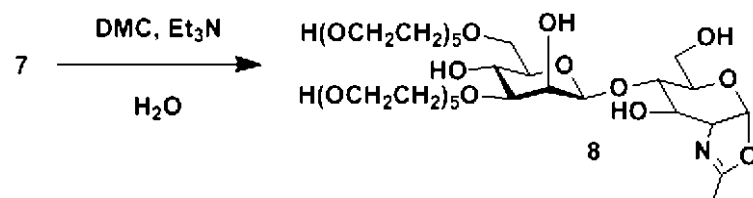
化合物7 ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O): = 22.02, 22.33, 53.84, 56.22, 60.24, 60.37, 60.49, 60.61, 65.85, 65.88, 67.18, 67.21, 68.30, 69.24, 69.57, 69.69, 69.71, 69.76, 69.84, 69.99, 70.03, 70.08, 70.16, 71.70, 71.84, 71.98, 72.48, 74.67, 74.76, 79.60, 79.83, 81.31, 90.92, 95.02, 100.28, 100.32.

【0031】

(6) 化合物8の調製

化合物7 (60.9 mg, 11.2 μmol) に0.760 Mの2-クロロ-1,3-ジメチルイミダゾリニウムクロリド水溶液 (3.02 mL, 2.29 mmol) およびトリエチルアミン (804 μL , 5.77 mmol) を加え、0 で一晩撹拌した。反応液をゲルろ過クロマトグラフィー (展開溶媒 0.05% トリエチルアミン水溶液) で精製し、化合物8 (57.8 mg, 96%) を得た。

【化10】



【0032】

化合物8 ^1H NMR (600 MHz, D_2O): = 1.95 (s, 3H), 3.28 - 3.31 (m, 1H), 3.33 (dd, $J = 3.4$ Hz, 9.6 Hz, 1H), 3.37 - 3.44 (m, 1H), 3.47 - 3.69 (m, 44H), 3.71 - 3.81 (m, 2H), 4.04 - 4.10 (m, 2H), 4.24 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H), 4.58 (brs, 1H), 5.97 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H).

【0033】

(7) 化合物10の調製

10

20

30

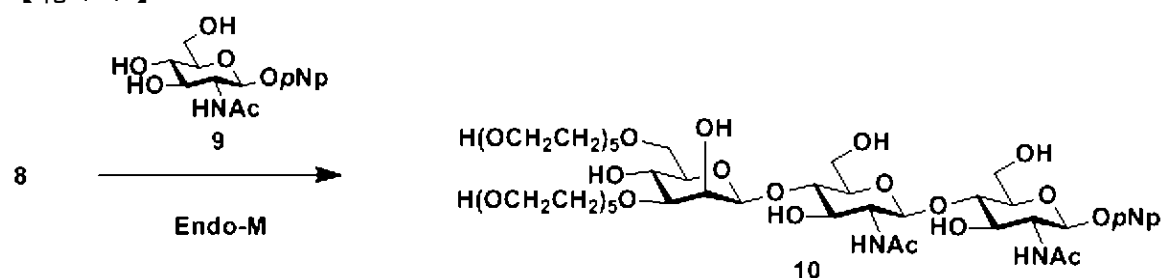
50

N - 結合型糖鎖に作用する *Mucor hiemalis* 由来のエンド - N - アセチルグルコサミニダ - ゼ (Endo - M) を酵素触媒として用いた。糖供与体は 50 mM の化合物 8 水溶液を 50 μ L 使用した。糖受容体には 15 mM の化合物 9 の 10% DMSO 水溶液 55.5 μ L を使用した。この混合溶液に 1.0 M の pH 7.0 リン酸緩衝溶液 12.5 μ L、水 107 μ L および Endo - M 酵素溶液 (2 mU / μ L) 25 μ L を加えた。これを 1 バイアルとして 10 バイアル 並列して 30 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。その後反応液を 65 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱して反応を停止させた後、すべてのバイアルをまとめて HPLC で精製し、化合物 10 (3.9 mg, 41%) を得た。

【0034】

HPLC 条件は以下の通りである。カラム: Inertsil ODS - 3 (10 mm ID \times 250 mm、ジールサイエンス株式会社)、流量: 4.7 ml / min、溶出液: 0.1% トリフルオロ酢酸水溶液 - 0.1% トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液 (95:5 30:70、30分、リニアグラジエント)、検出波長 301 nm

【化11】



化合物 10 MALDI - TOF MS: Calcd for $C_{48}H_{81}N_3O_{28}Na$ m/z $[M+Na]^+$: 1171.2, Found: 1170.6.

【実施例 2】

【0035】

カイコ絹糸腺産生トラスツズマブの PEG 化

N - 結合型糖鎖に作用する *Streptococcus pyogenes* 由来のエンド - N - アセチルグルコサミニダ - ゼ (Endo - S) を酵素触媒として用いた。糖供与体は 50 mM の化合物 8 水溶液を 1.1 μ L 使用した。糖受容体には特開 2016 - 82962 の実施例 9 に記載の方法で調製したカイコ絹糸腺産生トラスツズマブアクセプターを使用した。本カイコ絹糸腺産生トラスツズマブアクセプターは、2つの Fc 部位の両方に N - アセチルグルコサミン残基を有する Fully 型と、2つの Fc 部位の片方にのみ N - アセチルグルコサミン残基を有する Hemi 型と、Fc 部位に N - アセチルグルコサミン残基が存在しない Aglycosylated 型の 3 種類の混合物であり、それらの割合は Fully 型が 73%、Hemi 型が 23%、Aglycosylated 型が 4% である (図 1)。このカイコ絹糸腺産生トラスツズマブアクセプター (21.2 μ g / μ L) 水溶液を 3.8 μ L に 1.0 M の pH 7.0 トリス塩酸緩衝液 1.0 μ L、水 10.1 μ L および Endo - S 酵素溶液 (1.0 μ g / μ L) 4.0 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C で 3 時間反応させた。その後反応液を -20 $^{\circ}$ C で凍結させて反応を停止させた。

【0036】

反応液の一部 (0.18 μ L) を 10% SDS - PAGE にかけたところ、化合物 8 がカイコ絹糸腺産生トラスツズマブアクセプターに転移されたために高分子側にシフトしたことが確認された (図 2)。

【0037】

さらに反応液の一部 (2.5 μ g) をトリプシン処理の後、Zorbax Extend - C18 1.0 \times 150 mm カラムを繋げた Thermo Scientific 製 LC - ESI MS 装置 (LTQ - Velos Pro) を用いて MS 測定を行ったところ

、Glu - Glu - Gln - Tyr - Asn - Ser - Thr - Tyr - ArgのAsn側鎖にPEG化マンノシルキトピオースが結合した化合物m/z = 2196.98が検出され、トラスツズマブアクセプターにPEG化糖残基が導入されたことが確認された。

【0038】

さらに、反応液の一部(3.8 μL)を用いてHPLCによる解析を行った。分析条件は以下の通りである。カラム: ProPac WCX-10(4 mmID×250 mm、ThermoFisher Scientific Inc., CA., USA)、流量: 1.0 ml/min、溶出液A[10 mM酢酸ナトリウム水溶液(pH4.3)]—溶出液B[10 mM酢酸ナトリウム水溶液(pH4.3)+1.0 M NaCl水溶液]、A:B=100:0(0-5分)、100:0 0:100%(5-105分、リニアグラジエント)、0:100(105-120分、洗浄)、100:0(120-140分、平衡化)、検出波長280 nm、分析温度25。その結果、抗体の2つの重鎖部位の両方にPEG鎖が導入されたFully PEGylated型トラスツズマブの収率が55%であることが確認された(図3)。

10

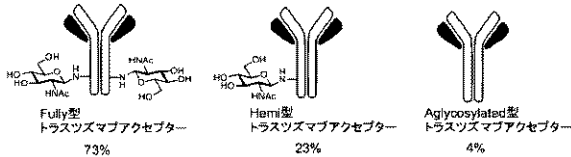
【産業上の利用可能性】

【0039】

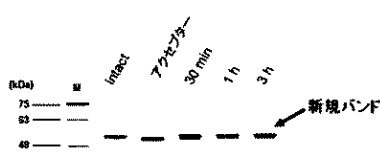
本発明によって糖を足掛かりとして、分子内の決まった位置に決まった長さのPEG鎖を導入した化合物を容易に製造できる。この手法を応用すればタンパク質製剤の合成にも応用することが可能であり、従って本発明化合物の工業的価値や波及効果は極めて大である。

20

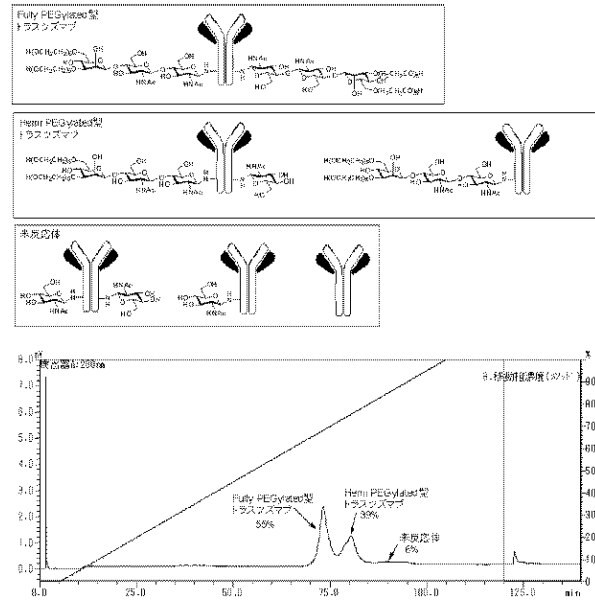
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第2016/076440(WO,A1)
特表2015-507925(JP,A)
国際公開第2018/003983(WO,A1)
特開2015-208260(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 1/00 - 41/00
C07H 1/00 - 99/00
CAplus/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)