

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5614897号  
(P5614897)

(45) 発行日 平成26年10月29日 (2014. 10. 29)

(24) 登録日 平成26年9月19日 (2014. 9. 19)

(51) Int. Cl.	F I
<b>C O 1 B 33/12 (2006. 01)</b>	C O 1 B 33/12 Z
<b>C O 9 C 1/28 (2006. 01)</b>	C O 9 C 1/28 Z N A
<b>B O 1 J 20/24 (2006. 01)</b>	B O 1 J 20/24 C
<b>B O 1 J 20/32 (2006. 01)</b>	B O 1 J 20/32 Z
<b>C O 7 K 7/06 (2006. 01)</b>	C O 7 K 7/06

請求項の数 8 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-104772 (P2012-104772)	(73) 特許権者	000000033 旭化成株式会社
(22) 出願日	平成24年5月1日 (2012. 5. 1)		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2013-230957 (P2013-230957A)	(73) 特許権者	000173924 公益財団法人野口研究所
(43) 公開日	平成25年11月14日 (2013. 11. 14)		東京都板橋区加賀一丁目8番1号
審査請求日	平成24年12月20日 (2012. 12. 20)	(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】 糖ペプチド被覆シリカ

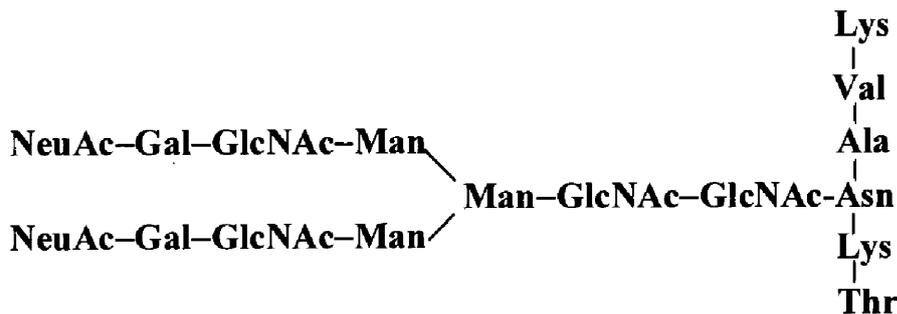
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

フッ素処理シリカの表面にフッ素原子含有糖ペプチド誘導体が吸着され、  
前記フッ素原子含有糖ペプチド誘導体は、下記式1に示される糖ペプチドのLys（リジン）に由来する合計3個の遊離アミノ基のうち少なくとも一つのアミノ基にフッ素原子含有置換基が結合する化合物であり、

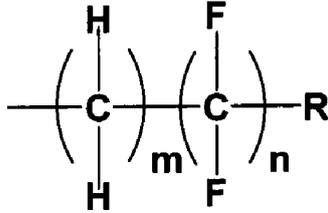
式1：

【化1】



前記フッ素原子含有置換基は、下記式2に示される構造を含む、  
式2：

## 【化 2】



(式中、mは0～4の整数であり、nは1～15の整数であり、Rはフッ素原子又は水素原子を示す。)

糖ペプチド被覆シリカ。

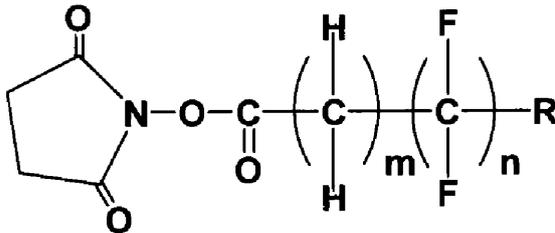
10

## 【請求項 2】

前記フッ素原子含有糖ペプチド誘導体が、下記式 3 に示される化合物と前記アミノ基が反応することにより得られる化合物である、請求項 1 に記載の糖ペプチド被覆シリカ。

式 3 :

## 【化 3】



20

(式中、mは0～4の整数であり、nは1～15の整数であり、Rはフッ素原子又は水素原子を示す。)

## 【請求項 3】

シリカ繊維又はシリカ粒子である、請求項 1 又は 2 に記載の糖ペプチド被覆シリカ。

## 【請求項 4】

請求項 3 に記載の糖ペプチド被覆シリカ繊維により構成される不織布又はフィルター。

## 【請求項 5】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の糖ペプチド被覆シリカ又は請求項 4 に記載の不織布若しくはフィルターを含む、インフルエンザウイルス結合材。

30

## 【請求項 6】

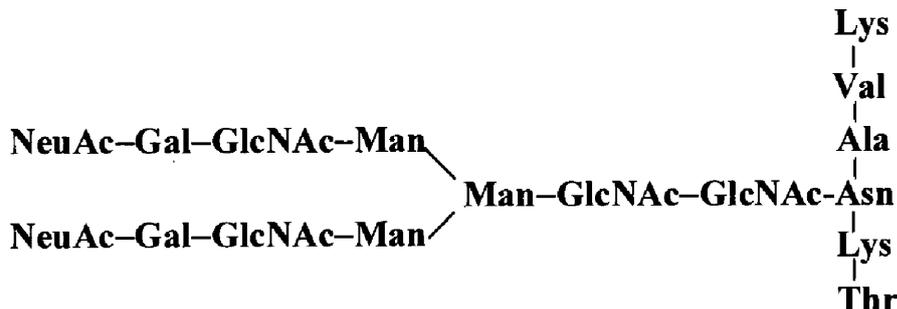
フッ素処理シリカと、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体を、溶液中で接触させる工程を含む、

フッ素処理シリカの表面にフッ素原子含有糖ペプチド誘導体が吸着され、

前記フッ素原子含有糖ペプチド誘導体は、下記式 1 に示される糖ペプチドの Lys (リジン) に由来する合計 3 個の遊離アミノ基のうち少なくとも一つのアミノ基にフッ素原子含有置換基が結合する化合物であり、

式 1 :

## 【化 4】



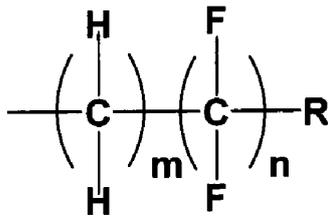
40

前記フッ素原子含有置換基は、下記式 2 で示される化合物からなる構造を含む、

50

式 2 :

【化 5】



(式中、mは0～4の整数であり、nは1～15の整数であり、Rはフッ素原子又は水素原子を示す。)

10

糖ペプチド被覆シリカの製造方法。

【請求項 7】

シリカと、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体を、フッ素塩化合物の共存下で、溶液中で接触させる、請求項 6 に記載の糖ペプチド被覆シリカの製造方法。

【請求項 8】

シリカとフッ素塩化合物を溶液中で接触させてフッ素処理シリカを得る工程をさらに含む、請求項 6 に記載の糖ペプチド被覆シリカの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、糖ペプチド被覆シリカ及びその製造方法に関する。具体的には、本発明は、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体が吸着された糖ペプチド被覆シリカ及びその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

無機材料であるシリカは、材料としての高い強度及び衝撃強さ、優れた熱安定性及び寸法安定性等を有しており、液晶表示装置の液晶の厚みを制御するスペーサー、シーラント、ゴム等のエラストマーの補強材等に用いられている(非特許文献 1)。

しかし、シリカ粒子をスペーサー粒子として使用する場合、シリカ表面が硬いために、液晶表示装置の配向膜を損傷させる恐れがある。そのため、高分子で被覆したシリカ粒子を用いる場合が多い。一般的に、無機粒子は、高分子中では良好な分散状態が得られないことが知られており、エラストマー等への高分子中での分散状態を良好にするために、無機微粒子表面のシランカップリング剤処理又は高分子被覆を行うことによって分散性の向上を図る研究も行われている(非特許文献 2)。

30

【0003】

非特許文献 3 には、シリカの表面に高分子材料を被覆する方法として、大別して、「粒子表面でモノマーを重合し、生成した高分子でシリカを被覆する方法」と「予め調製した高分子材料を用いる方法」が開示されている。

【0004】

「粒子表面でモノマーを重合し、生成した高分子でシリカ粒子を被覆する方法」には、シリカ粒子表面の活性種による重合法(非特許文献 4)、開始剤の吸着又は結合による重合法(非特許文献 5)、生長鎖の沈着による重合法(非特許文献 6)等が知られている。その他、モノマーの吸着、結合又は吸蔵による重合法、モノマーの表面吸着層への可溶化による重合法等、各種方法も知られている。

40

【0005】

一方、「予め調製した高分子材料を用いる方法」として、非特許文献 7 及び非特許文献 8 には、予め調製した高分子材料をシリカ粒子に吸着又は化学的に結合させる方法、コアセルベーション法、ヘテロ凝集法、ドライブレンド法等が開示されている。この方法によれば、被覆に使用する高分子の物性及び高分子が共重合体である場合の共重合組成等の情報を知ることができる上、高分子中の有機官能基を損ねることなく被覆することも可能

50

である。

【0006】

また、有機ケイ素化学の分野では、シリカカチオンは固い酸 (Hard acid) として知られ、フッ素アニオンは固い塩基 (Hard base) として知られている。そして、両者の結合で生じる「シリカ - フッ素結合」は「シリカ - 酸素結合」よりも強固であることが知られている (非特許文献9)。そこでこのようなシリカ - フッ素原子の間の相互作用を活用することはシリカへ高分子材料被覆させる場合に有効な手段となり得る。

【0007】

従来、シリカへ高分子材料を吸着させることによる被覆方法は、シリカ表面と高分子材料の親和性が被膜形成に影響を与え、その親和性が低い場合には、高分子材料による被覆が不十分となる場合も多い。そのため、化学的に結合させる方法が採用されており、1) シリカ表面にあるシラノール基を介して直接結合させることにより高分子材料を被覆させる方法、2) シラノール基にシランカップリング剤を反応させて導入した有機官能基を介して結合させることにより高分子材料を被覆させる方法、等の多くの研究が報告されている。しかし、いずれの場合においても、シリカ表面に十分な量のシラノール基が存在しないと、高分子材料の被覆は不十分となることが懸念される。従って、シリカへ高分子材料を化学的又は物理的に吸着させることによって被覆させる場合には、その被覆効率を増加させるために、シリカ表面にあるシラノール基を増加させることが最も重要である。

【0008】

シラノール基を介してシランカップリング剤を導入する方法として、特許文献1には、ケイ素原子に直結したアルコキシ基を有する有機ケイ素化合物を、フッ素含有ケイ素化合物又はフッ素塩化合物触媒の存在下、溶媒中に分散させたシリカと、限定されたシランカップリング剤とを反応させる表面処理シリカの製造方法が開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特許第2820873号

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】川口春馬監修、「微粒子・粉体の最先端技術」、第4章 光と微粒子、2. 液晶セル用スペーサー、2000年、シーエムシー 30

【非特許文献2】齋藤文良等編、「粉碎・分級と表面改質」、第5章 実際の応用例、5.4 表面改質による混練物の流動性・分散性向上、2001年、(株)NGT

【非特許文献3】柳田博明監修、「微粒子工学大系 第1巻 基本技術」、第6章 安定化・改質および複合化、2001年、フジ・テクノシステム

【非特許文献4】O. Prucker and J. Ruhe, Mechanism of Radical Chain Polymerization Initiated by Azo Compounds Covalently Bound to the Surface of Spherical Particles, Macromolecules, 1998, vol. 31, p. 602 - 613 40

【非特許文献5】長井勝利、シリカ粒子のポリマー修飾、高分子、1999、48(4)、p. 265

【非特許文献6】嶋田遵生子、ゾル - ゲル法を用いた有機 無機ハイブリット材料の設計とその応用、高分子、1999、48、p. 267

【非特許文献7】田中真人、微粒子応用講座 (第VII講) マイクロカプセル、色材、1998、71(9)、p. 593 - 598

【非特許文献8】古澤邦夫、有機・無機複合化粒子の作製技術、高分子、1999、48(4)、p. 252 - 255

【非特許文献9】Tse - Lok Ho, Hard and Soft Acids and Base Principle in Organic Chemistry、 50

Academic Press, New York, p. 4 - 12, 1977

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

しかしながら、この特許文献1には、1) 処理する物質は、シランカップリング剤に限定されている、2) シランカップリング剤以外の通常の高分子化合物、糖鎖又は糖鎖ペプチドを用いた被覆についての記載は無い。

【0012】

本発明が解決しようとする課題は、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体によって被覆されたシリカ及びその製造方法を提供することである。

10

【課題を解決するための手段】

【0013】

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、シリカ表面へ糖ペプチドを被覆させる場合には、シリカ表面のフッ素処理と同時に糖鎖ペプチドのペプチド部分にフッ素原子含有置換基を導入することが有効であることを見出し、本発明を完成した。

【0014】

すなわち、本発明は、以下のとおりである。

(1)

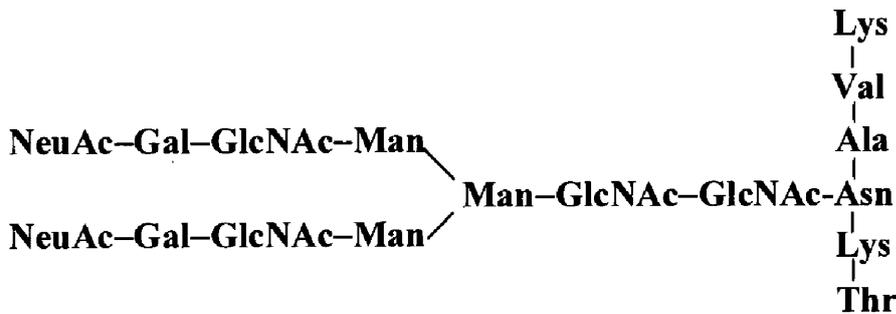
フッ素処理シリカの表面にフッ素原子含有糖ペプチド誘導体が吸着され、

前記フッ素原子含有糖ペプチド誘導体は、下記式1に示される糖ペプチドのLys(リジン)に由来する合計3個の遊離アミノ基のうち少なくとも一つのアミノ基にフッ素原子含有置換基が結合する化合物であり、

20

式1:

【化1】

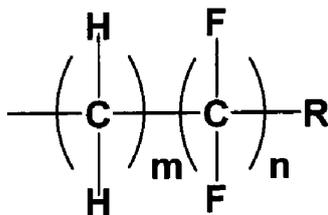


30

前記フッ素原子含有置換基は、下記式2に示される構造を含む、

式2:

【化2】



40

(式中、mは0~4の整数であり、nは1~15の整数であり、Rはフッ素原子又は水素原子を示す。)

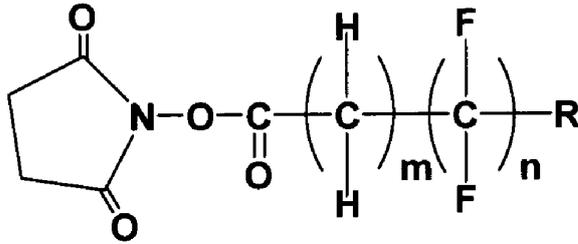
糖ペプチド被覆シリカ。

(2)

前記フッ素原子含有糖ペプチド誘導体が、下記式3に示される化合物と前記アミノ基が反応することにより得られる化合物である、(1)に記載の糖ペプチド被覆シリカ。

式3:

## 【化 3】



(式中、mは0～4の整数であり、nは1～15の整数であり、Rはフッ素原子又は水素原子を示す。) 10

(3)

シリカ繊維又はシリカ粒子である、(1)又は(2)に記載の糖ペプチド被覆シリカ。

(4)

(3)に記載の糖ペプチド被覆シリカ繊維により構成される不織布又はフィルター。

(5)

(1)～(3)のいずれかに記載の糖ペプチド被覆シリカ又は請求項4に記載の不織布若しくはフィルターを含む、インフルエンザウイルス結合材。

(6)

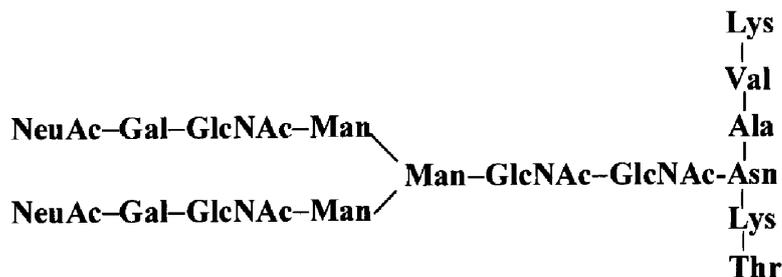
フッ素処理シリカと、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体と、溶液中で接触させる工程を含む、 20

フッ素処理シリカの表面にフッ素原子含有糖ペプチド誘導体が吸着され、

前記フッ素原子含有糖ペプチド誘導体は、下記式1に示される糖ペプチドのLys(リジン)に由来する合計3個の遊離アミノ基のうち少なくとも一つのアミノ基にフッ素原子含有置換基が結合する化合物であり、

式1：

## 【化 4】

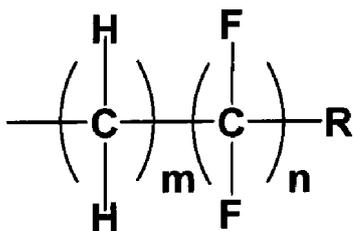


30

前記フッ素原子含有置換基は、下記式2で示される化合物からなる構造を含む、

式2：

## 【化 5】



40

(式中、mは0～4の整数であり、nは1～15の整数であり、Rはフッ素原子又は水素原子を示す。)

糖ペプチド被覆シリカの製造方法。

(7)

シリカと、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体を、フッ素塩化合物の共存下で、溶液中で 50

接触させる、(6)に記載の糖ペプチド被覆シリカの製造方法。

(8)

シリカとフッ素塩化合物を溶液中で接触させてフッ素処理シリカを得る工程をさらに含む、(6)に記載の糖ペプチド被覆シリカの製造方法。

【発明の効果】

【0015】

本発明によれば、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体によって被覆されたシリカ及びその製造方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】製造例1において製造された糖ペプチドのHPLCチャートを示す。

【図2】製造例1において製造された糖ペプチドの<sup>1</sup>H-NMRチャートを示す。

【図3】製造例1において再度ODS樹脂で精製された糖ペプチドのHPLCチャートを示す。

【図4】製造例3において製造されたフッ素原子含有糖ペプチド誘導体(1)のHPLCチャートを示す。

【図5】製造例5において製造された糖ペプチド誘導体(2)のHPLCチャートを示す。

【図6】実施例1において、フッ化カリウム水溶液で希釈することでフッ素原子含有糖ペプチド誘導体(1)濃度がそれぞれ $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ に調製された溶液中でグラスフィルターを接触させた後、SSAレクチンとのELISAによる結合評価を行った結果を示す。なお、図6中、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体(1)を除いたコントロール群を比較対照とする多重比較検定から\*は危険率5%未満で有意な差があることを、\*\*は危険率1%未満で有意な差があることを意味する。

【図7】参考例1において、フッ化カリウム水溶液で希釈することで糖ペプチド誘導体(2)濃度がそれぞれ $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ に調製された溶液中でグラスフィルターを接触させた後、SSAレクチンとのELISAによる結合評価を行った結果を示す。

【図8】参考例2において、PBSで希釈することでフッ素原子含有糖ペプチド誘導体(1)濃度がそれぞれ $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ に調製された溶液中でグラスフィルターを接触させた後、SSAレクチンとのELISAによる結合評価を行った結果を示す。

【図9】実施例2において、PBSで希釈することでフッ素原子含有糖ペプチド誘導体(1)濃度がそれぞれ $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ に調製された溶液中でフッ素塩処理グラスフィルターを接触させた後、SSAレクチンとのELISAによる結合評価を行った結果を示す。なお、図9中、\*は、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体(1)を除いたコントロール群を比較対照とする多重比較検定から危険率5%未満で有意な差があることを意味する。

【発明を実施するための形態】

【0017】

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。

【0018】

本実施の形態の糖ペプチド被覆シリカは、フッ素処理シリカの表面にフッ素原子含有糖ペプチド誘導体が吸着され、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体は、下記式1に示される糖ペプチドのLys(リジン)に由来する合計3個の遊離アミノ基のうち少なくとも一つのアミノ基にフッ素原子含有置換基が結合する化合物であり、

式1:

10

20

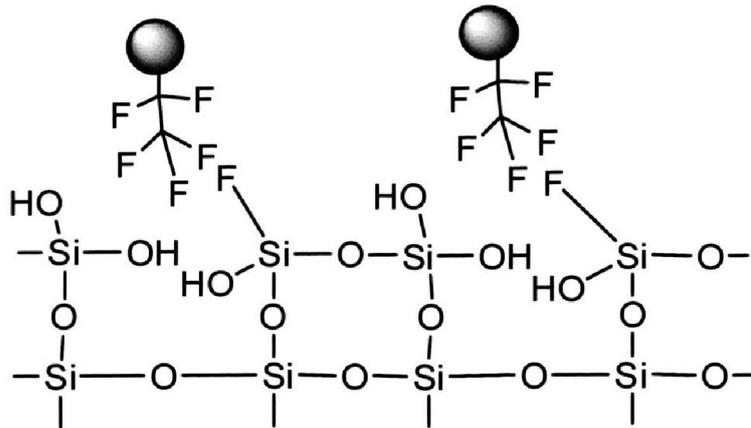
30

40





## 【化 1 2】



10

本実施の形態において、フッ素処理シリカの表面にフッ素原子含有糖ペプチド誘導体が吸着したとは、フッ素処理シリカの表面にフッ素原子含有糖ペプチド誘導体が保持又は固定化された上記説明したような状態を意味する。

## 【0023】

フッ素処理シリカと、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体と、溶液中で接触させる工程は、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体とシリカを接触させる際に、フッ素塩化合物を共存させて接触させる工程として行ってもよく、シリカとフッ素塩化合物を溶液中で接触させてフッ素処理シリカを得てから、次いで、フッ素処理シリカと、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体を接触させる工程として行ってもよい。

20

## 【0024】

(フッ素処理シリカ)

シリカとフッ素塩化合物によりフッ素処理シリカが得られるが、フッ素塩化合物を共存させて接触させる場合であっても、先にフッ素処理シリカを得てから接触させる場合であっても、水又は含水有機溶剤又は有機溶媒等の溶剤中で行うことができる。

## 【0025】

有機溶剤としては、例えば、メチルアルコール、エチルアルコール、1-プロピルアルコール、プロピルアルコール等のアルコール、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジプロピルエーテル等のエーテル、酢酸メチル、酢酸エチル、アセト酢酸エチル等のエステル、アセトン、ジエチルケトン、イソプロピルメチルケトン、メチルエチルケトン等のケトン、トルエン、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等が挙げられる。

30

## 【0026】

フッ素処理シリカと、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体と、溶液中で接触させる際の溶剤の量は、処理するシリカ1質量部に対して2~1000質量部が好ましく、より好ましくは5~500質量部である。

溶剤の量が2質量部以上であることにより、シリカ表面に均一にフッ素処理することができ、1000質量部以下であることにより、工業的規模においても反応装置等を大きくすることなく十分量のシリカを回収することができる。

40

## 【0027】

フッ素塩化合物を直接添加してもよいが、フッ素塩化合物を溶剤に溶解させて使用することが好ましい。

フッ素塩化合物の量は、溶剤1質量部に対して0.0001~1質量部が好ましく、より好ましくは0.001~0.1質量部である。

フッ素塩化合物の量が0.0001質量部以上であることにより、シリカへの均一なフッ素処理を短時間で行うことができ、1質量部以下であることにより、溶剤へ溶解させることができる。

## 【0028】

50

シリカの溶液に所定量のフッ素塩化合物を加え、シリカ中のシロキサン結合にフッ素塩化合物を反応させることにより、改質された表面を有するシリカをフッ素処理シリカとして得ることができる。この際、フッ素塩化合物が反応系内に残っている場合、シリカをろ過、遠心分離等の方法により、フッ素塩化合物が含まれている溶液からフッ素処理シリカを分離してもよい。

#### 【0029】

フッ素塩化合物としては、フッ化物イオン ( $F^-$ ) と金属イオン ( $M^{n+}$ ,  $n$  は陽電荷の価数を示す。) との塩化合物を用いることができ、例えば、例えば、 $LiF$ 、 $NaF$ 、 $KF$ 、 $RbF$ 、 $CsF$  等の周期律表 I 族元素のフッ化物塩、 $BeF_2$ 、 $MgF_2$ 、 $CaF_2$ 、 $SrF_2$ 、 $BaF_2$  等の II 族元素のフッ化物塩、 $BF_3$ 、 $AlF_3$ 、 $GaF_3$ 、 $InF_3$ 、 $TlF_3$  等の III 族元素のフッ化物塩、 $CuF_2$ 、 $ZnF_2$ 、 $SnF_2$ 、 $PdF_2$ 、 $SbF_3$ 、 $CrF_3$ 、 $YF_3$  等のフッ化物塩、 $LaF_3$ 、 $CeF_3$ 、 $PrF_3$ 、 $NdF_3$ 、 $SmF_3$ 、 $EuF_3$ 、 $GdF_3$ 、 $TbF_3$ 、 $DyF_3$ 、 $HoF_3$ 、 $ErF_3$  等のランタノイド系のフッ化物塩、これらの水和物等が挙げられる。

また、フッ素塩化合物としては、例えば、 $(CH_3)_4N \cdot F$ 、 $(CH_3CH_2)_4N \cdot F$ 、 $(CH_3CH_2CH_2)_4N \cdot F$ 、 $(CH_3CH_2CH_2CH_2)_4N \cdot F$  等のフッ化物イオンとアンモニウム塩との塩化合物が挙げられる。

中でも、水溶解性、操作性及び安全性を考慮すると、 $NaF$ 、 $KF$  及びテトラブチルアンモニウムフルオライド ( $(CH_3CH_2CH_2CH_2)_4N \cdot F$ ) が好ましい。

有機溶媒中でシリカとフッ素塩化合物を反応させる場合、有機溶剤中に容易に溶解するため、ベンジルトリメチルアンモニウムフルオライドを用いることもできる (佐藤史衛・山本経二・今本恒雄 / 編、「合成化学者のための実験有機金属化学」、第 I 部、典型金属を用いる反応、6: ケイ素、講談社サイエンティフィク、1992年、p. 76 - 78)。

#### 【0030】

(フッ素処理シリカとフッ素原子含有糖ペプチド誘導体の接触)

フッ素処理シリカとフッ素原子含有糖ペプチド誘導体を溶液中で接触させることにより、フッ素処理シリカの表面にフッ素原子含有糖ペプチドが吸着させられる。

本実施の形態においては、フッ素塩化合物により表面改質されたシリカ (フッ素処理シリカ) に、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体を含む溶液を所定の温度で添加することにより実施することができる。

フッ素原子含有糖ペプチド誘導体は水、リン酸緩衝液を含む種々の塩水溶液、あるいはエタノール、メタノール等を用いた含水アルコール類、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アセトン、ジオキサン等の水溶性有機溶媒等を用いた含水有機溶媒に溶解してシリカに添加することで接触させ実施することができる。

温度は、フッ素処理シリカ表面にフッ素原子含有糖ペプチド誘導体を十分に吸着させるために、0 ~ 100 であることが好ましい。

フッ素原子含有糖ペプチド誘導体を被覆した後に、シリカを反応液中から分離するには、遠心分離法、ろ過法等の方法でも行うことができる。

#### 【0031】

(シリカ)

本実施の形態におけるシリカとは、二酸化ケイ素 ( $SiO_2$ ) 又は二酸化ケイ素により構成される物質であるが、少なくとも表面にシロキサン結合部分又はシラノール基を有するケイ素化合物である。

シリカの主成分は、二酸化ケイ素であるが、少量成分として、アルミナ、アルミン酸ナトリウム等を含んでいてもよく、さらに安定剤として、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム、アンモニア等の無機塩基、テトラメチルアンモニウムのような有機塩基等が含まれていてもよい。

また、石英ガラス、硼珪酸ガラス等のガラス製品より形成されるシリカ繊維やシリカ粒子であってもよい。

【0032】

本実施の形態においては、シリカ繊維やシリカ粒子である糖ペプチド被覆シリカは、フッ素処理を行ったシリカ繊維やシリカ粒子に対して、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体を吸着させることにより製造することができる。糖ペプチド被覆シリカ繊維により構成される不織布又はフィルターについては、糖ペプチド被覆シリカ繊維から不織布又はフィルターを製造してもよいが、シリカ繊維を不織布又はフィルターとした後に、不織布又はフィルターに対してフッ素原子含有糖ペプチド誘導体を吸着させることにより糖ペプチド被覆シリカとすることが好適である。

【0033】

本実施の形態において、シリカ繊維として、熔融石英繊維と非晶質の高ケイ酸質繊維等

10

が挙げられる。  
熔融石英繊維は、石英棒をガスバーナーで溶かしながら延伸する熔融法、またはシリカアルコキシドを原料とし、重合させながら紡糸し、その後焼成するゾル-ゲル法により製造することができ、非晶質の高ケイ酸質繊維は通常のガラス繊維の製法で得たアルカリポロシリケート繊維を酸洗いして製造することができる。

【0034】

本実施の形態においては、例えば、シリカ繊維により構成されるフィルターの場合、粒子保持能0.1~100µm、厚み0.1~5mm、重量1~600g/m<sup>2</sup>、好ましくは粒子保持能0.1~30µm、厚み10~1000µm、重量10~300g/m<sup>2</sup>、より好ましくは粒子保持能0.1~10µm、厚み200~700µm、重量40~200g/m<sup>2</sup>のガラス(シリカ)フィルターを好適に用いることができる。

20

【0035】

本実施の形態においては、シリカ粒子である場合、平均粒径が0.1µm~1000µm、好ましくは1µm~100µmである。

シリカ粒子の形状は限定されるものではないが、例えば、真球状、楕円球状、円柱状等があげられる。

このようなシリカ粒子は、例えば、特開平5-193928号公報、特開平6-48720号公報等に記載された方法により調整することができる。

【0036】

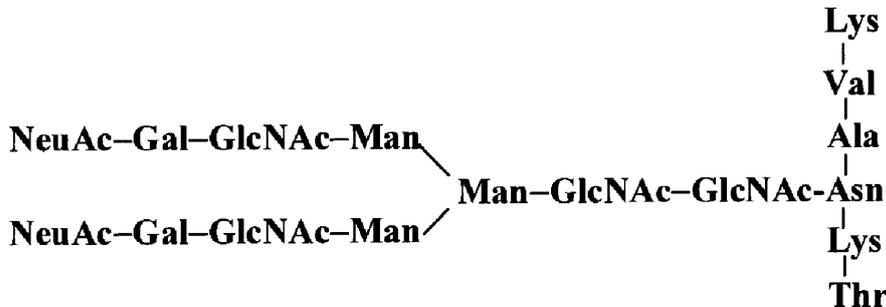
(フッ素原子含有糖ペプチド誘導体)

30

本実施の形態におけるフッ素原子含有糖ペプチド誘導体とは、下記式1に示される糖ペプチドのLys(リジン)に由来する合計3個の遊離アミノ基のうち少なくとも一つのアミノ基にフッ素原子含有置換基が結合する化合物であり、

式1:

【化13】

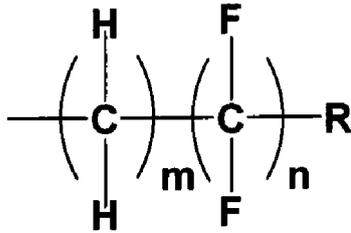


40

フッ素原子含有置換基は、下記式2に示される構造を含む。

式2:

## 【化14】



(式中、mは0～4の整数であり、nは1～15の整数であり、Rはフッ素原子又は水素原子を示す。)

10

## 【0037】

本実施の形態におけるフッ素原子含有糖ペプチド誘導体において、糖ペプチド部分構造は、式1に示されるとおり、11個の糖残基からなる2分岐複合型糖鎖を有し、また、2ヶ所の非還元末端にガラクトースに結合するシアル酸を有する。

NeuAc、Gal、GlcNAc、及びManは、糖の表記であり、それぞれ、シアル酸、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、及びマンノースを意味する。

糖は、D-糖であっても、L-糖であってもよく、D-糖とL-糖の任意の比率の混合物であってもよいが、D-糖であることが好ましい。また、各糖は、各糖と実質的に等価な誘導体であってもよい。

## 【0038】

20

本実施の形態におけるフッ素原子含有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)からなるペプチド鎖が結合している(配列番号1)。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、及びスレオニンの意味する。

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。

## 【0039】

30

本実施の形態において、「アミノ基にフッ素原子含有置換基が結合する」とは、アミノ基とフッ素原子含有置換基が結合することにより、糖ペプチドにフッ素原子含有置換基が導入されフッ素原子含有糖ペプチド誘導体を形成することを意味する。

Lys(リジン)は、側鎖に4-アミノブチル基を有するアミノ酸であり、式1に示される糖ペプチド中には、Lysが2残基含まれるため、N末端のLysが2つのアミノ基を、AsnとThrに結合するLysが、1つのアミノ基を有する。

式1に示される糖ペプチドには、2つのLysに由来する合計3個の遊離アミノ基が存在し、フッ素原子含有置換基は、3ヶ所のアミノ基の少なくとも一つ、好ましくは二つ、さらに好ましくは三つに結合している。二つ以上のアミノ基にフッ素原子含有置換基が結合している場合、フッ素原子含有置換基は同一のもので異なるものでもよい。

40

## 【0040】

本実施の形態において、フッ素原子含有置換基としては、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体において、アミノ基と結合し、式2で示される構造を含むのであれば特に限定されるものではないが、フッ素原子含有置換基とは、糖鎖ペプチド誘導体におけるLysアミノ基に結合した部分構造となる構造を意味する。

式2において、m及びnについては、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体の水に対する溶解性の観点から、mは4以下の整数であり、nは15以下の整数であることが好ましく、nは10以下の整数であることがより好ましい。シリカに対する保持又は固定化の効果の観点から、nは1以上の整数であり、3以上の整数であることが好ましい。

式2における左側のメチレン炭素から延びる実線は、他の原子との結合手を意味する。

50



ができる。フッ素原子含有置換基の増加によるシリカ表面との反応性向上のために、フッ素原子含有置換基は好ましくは2ヶ所、より好ましくは3ヶ所全てのアミノ基に導入する。

【0045】

フッ素原子含有置換基をアミノ基に導入する方法は、特に限定されないが、通常のペプチド合成に用いる縮合方法を用いることができる。

かかる縮合反応としては、例えば、N-ヒドロキシコハク酸イミドや、ニトロフェノール又はペンタフルオロフェノール等でカルボン酸を活性化させた活性エステルを、必要に応じて、反応試薬を溶解できるアセトン、アセトニトリル、DMF（ジメチルホルムアミド）、DMSO（ジメチルスルホキシド）等の有機溶媒と水との混合溶媒中で、有機アミン等の有機塩基、又は炭酸水素ナトリウム、リン酸緩衝液若しくは炭酸緩衝液等の無機塩基の存在下、氷冷下又は室温下で15分～180分、必要に応じて1日反応させる方法が挙げられる。

フッ素原子含有置換基を導入するための反応試薬は、糖ペプチドのアミノ基（糖ペプチド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、アミノ基に対して1.1～5倍モル添加して、糖ペプチドのアミノ基にフッ素原子含有置換基を導入することができる。

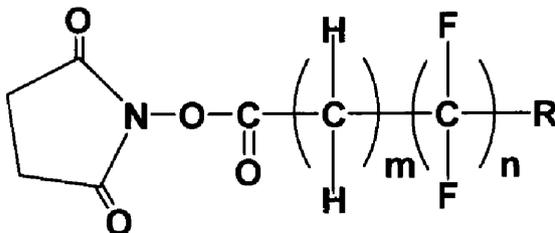
【0046】

かかる縮合反応に用いる、フッ素原子含有置換基を導入するための反応試薬として、下記式3又は下記式5に示される化合物が挙げられる。

【0047】

式3：

【化17】

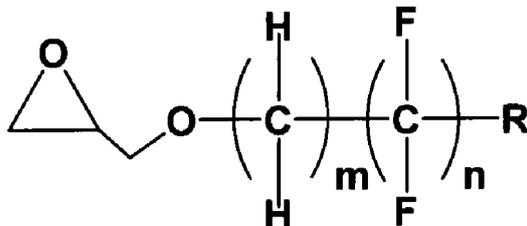


（式中、mは0～4の整数であり、nは1～15の整数であり、Rはフッ素原子又は水素原子を示す。）

【0048】

式5：

【化18】



（式中、mは0～4の整数であり、nは1～15の整数であり、Rはフッ素原子又は水素原子を示す。）

【0049】

式3に示される化合物や式5に示される化合物と、式1に示される糖ペプチドとを反応させることにより、式3又は式5に示される化合物中の、フッ素原子含有置換基に相当する部分が、糖ペプチド中のアミノ基と結合し、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体が合成される。

フッ素原子含有置換基は、アミノ基と、式3に示される化合物を用いた場合には、アミ

10

20

30

40

50

ド結合により導入され、式 5 に示される化合物を用いた場合には、C - N 結合により導入される。

フッ素原子含有置換基は、アミノ基と結合する際に、かかる結合は特に限定されるものではないが、アミノ基と結合し得る公知の結合を利用することができ、アミド結合、C - N 結合、カーバメート結合、イミド結合などの結合によりフッ素原子含有置換基は導入される。

【 0 0 5 0 】

フッ素原子含有置換基に相当する反応試薬としては、フッ素原子含有置換基と、アミノ基と結合し得る脱離基とに相当する構造を有していることが好ましく、脱離基部分が脱離してアミノ基と求核置換反応することにより、フッ素原子含有置換基とアミノ基との結合が形成される。

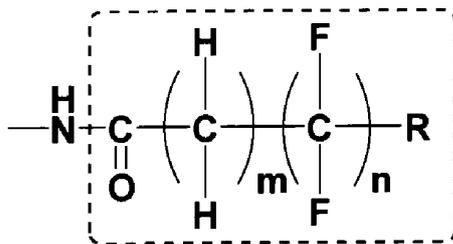
10

【 0 0 5 1 】

反応試薬として、式 3 に示される化合物を用いた場合を例示して説明すると、下記式 6 に示される構造を有するフッ素原子含有糖ペプチド誘導体を得ることができる。

式 6 :

【 化 1 9 】



20

式 6 中、アミド結合は、アミノ基とフッ素原子含有置換基との結合を意味し、破線で囲まれた部分が、フッ素原子含有置換基を意味する。

該フッ素原子含有置換基においては、式 2 に示される構造が、C = O (カルボニル) 基を介して、L y s のアミノ基と結合している。

【 0 0 5 2 】

フッ素原子含有糖ペプチド誘導体を精製するためには、沈殿工程及びさらに必要に応じて脱塩工程を組み合わせることで達成される。

30

【 0 0 5 3 】

( 沈 殿 工 程 )

沈殿工程とは、導入工程によるフッ素原子含有置換基導入後、反応液を水溶性有機溶媒に添加してフッ素原子含有糖ペプチド誘導体を沈殿させる工程を意味する。

沈殿工程により、精製度の向上したフッ素原子含有糖ペプチド誘導体を沈殿物として得ることができる。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。

【 0 0 5 4 】

本実施の形態において、水溶性有機溶媒とは、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、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、アセトニトリル、アセトン、ジメチルホルムアミド、及びジメチルスルホキシドからなる群から選択される溶媒が挙げられる。これら溶媒は、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。)

である。抽出工程で得られた、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体を含む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フッ素原子含有糖ペプチド誘導体を沈殿物として得るアルコール沈殿工程である。沈殿工程は、ア

50

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として行うこともできる。

【0055】

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。

【0056】

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。中でも毒性を含めた安全性の面から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。

【0057】

フッ素原子含有糖ペプチド誘導体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で行うことができる。

【0058】

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。

【0059】

アルコール沈殿工程において、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体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。

得られたフッ素原子含有糖ペプチド誘導体を含む沈殿物を、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。

【0060】

(脱塩工程)

脱塩工程とは、沈殿工程で得られたフッ素原子含有置換基が導入されたフッ素原子含有糖ペプチド誘導体を含む沈殿物から塩を除去する工程を意味する。

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。

【0061】

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る。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

10

20

30

40

50

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。また、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。

#### 【0062】

脱塩工程は、脱塩した後に樹脂に保持されているフッ素原子含有糖ペプチド誘導体を、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。溶出工程を行うことによりフッ素原子含有糖ペプチド誘導体の純度を向上させることができる。

10

溶出工程では、例えば、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体を保持させた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。また水洗浄の工程では、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体ができるだけ、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。

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。

20

有機溶媒水溶液によりフッ素原子含有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。

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℃で行うことができる。

#### 【0063】

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フッ素原子含有糖ペプチド誘導体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。

30

#### 【0064】

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フッ素原子含有糖ペプチド誘導体中に含まれる塩を脱塩する工程を含んでいてもよく、有機溶媒水溶液によりフッ素原子含有糖ペプチド誘導体を溶出する工程を含んでいてもよい。

40

フッ素原子含有糖ペプチド誘導体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フッ素原子含有糖ペプチド誘導体の脱塩を行うことができる。

#### 【0065】

溶出されたフッ素原子含有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フッ素原子含有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、得られたフッ素原子含有糖ペプチド誘導体は、再度アルコール沈殿工程又は脱塩工程を行ってさらに精製してもよい。

#### 【実施例】

#### 【0066】

50

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。

【0067】

[HPLC分析]

1) 糖ペプチドの分析例

カラム (Cadenza CD-C18 (Imtakt, 150 × 2 mm)) 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% (15 min)、CH<sub>3</sub>CN in 0.1% TFA solution (TFA：トリフルオロ酢酸)

流速；0.3 mL/min

UV；214 nm

10

【0068】

2) フッ素原子含有糖ペプチド誘導体の分析例

測定条件：

グラジエント；20% 100% (15 min)、CH<sub>3</sub>CN in 0.1% TFA solution

流速；0.2 mL/min

UV；214 nm

20

【0069】

[<sup>1</sup>H-NMR測定]

D<sub>2</sub>O 0.4 mL に試料 2 mg を溶解して、JEOL 製 JNM-600 (600 MHz) で <sup>1</sup>H-NMR を測定した。

【0070】

[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。

LC：アジレント製 1100 シリーズ

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

カラム温度：40

流速；0.2 mL/min

UV：214 nm

グラジエント；20% 100% (20 min)、CH<sub>3</sub>CN 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

30

【0071】

[製造例1] 鶏卵卵黄からの糖ペプチドの製造

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,

40

50

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。

ODS (オクタデシルシリル) 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<sup>1</sup>H-NMRによる測定結果をそれぞれ図1及び図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1に示される構造であることが分かった。

さらに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。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。

#### 【0072】

##### [製造例2]

336 mgの4, 4, 5, 5, 6, 6, 6-ヘプタフルオロヘキサ酸を15 mL塩化メチレンに溶解し、959 mgの水溶性カルボジイミド塩酸塩、691 mgのN-ヒドロキシコハク酸イミド、550 μLのN-メチルモルホリン、61 mgのN, N-ジメチルアミノピリジンを加え室温で終夜攪拌した。

反応液に飽和重曹水と酢酸エチルを加え、分液後、有機溶媒層を除去した。更に水層を酢酸エチルで洗浄後、10%クエン酸水溶液を加え酸性にした後、水層から酢酸エチルで抽出した。有機溶媒層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮し上記4, 4, 5, 5, 6, 6, 6-ヘプタフルオロヘキサ酸の粗精製コハク酸イミドエステル335 mgを得た。

#### 【0073】

##### [製造例3] フッ素原子含有糖ペプチド誘導体(1)の製造

製造例1と同様の手法で得られた糖ペプチド11 mgを水-ジメチルホルムアミド(2/1:体積比)1.5 mLに加え、さらに0.1 mLの1 M重曹水を加えた。その後1 mLのDMFに溶解した製造例2で得られた4, 4, 5, 5, 6, 6, 6-ヘプタフルオロヘキサ酸の粗精製コハク酸イミドエステル11.9 mgを加え12時間反応を行った。

反応終了後、エタノールを加え8,000 rpmで5分遠心し、フッ素原子含有置換基が導入された糖ペプチド誘導体を沈殿させ、上清を除去することで沈殿を回収した。得られた沈殿物を0.5 mL蒸留水に溶解し、再度エタノール-エーテル混合液15 mLに注加し8,000 rpmで5分遠心し沈殿を回収した。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フッ素原子含有糖ペプチド誘導体(1)4.9 mgを得た。

得られたフッ素原子含有糖ペプチド誘導体のHPLCによる測定結果を図4に示す。反応生成物についてLC/MS測定を行った。

その結果、12.5分に検出されるピークは検出イオンが1769.4([M+2H]<sup>2+</sup>)及び1767.5([M-2H]<sup>2-</sup>)であることから推定分子量3536.9であり、糖ペプチドの3個のアミノ基に3個の4, 4, 5, 5, 6, 6, 6-ヘプタフルオロヘキサ酸が導入された糖ペプチド誘導体であると推定された。

#### 【0074】

##### [製造例4]

580 mgのヘキサ酸を15 mL塩化メチレンに溶解し、959 mgの水溶性カルボジイミド塩酸塩、1150 mgのN-ヒドロキシコハク酸イミド、550 μLのN-メチ

10

20

30

40

50

ルモルホリン、61 mgのN,N-ジメチルアミノピリジンを加え室温で終夜攪拌した。

反応液に飽和重曹水と酢酸エチルを加え、分液後、有機溶媒層を除去した。更に水層を酢酸エチルで洗浄後、10%クエン酸水溶液を加え酸性にした後、水層から酢酸エチルで抽出した。有機溶媒層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮しヘキサン酸の粗精製コハク酸イミドエステル831 mgを得た。

【0075】

[製造例5] 糖ペプチド誘導体(2)の製造

製造例1と同様の手法で得られた糖ペプチド10 mgを水-ジメチルホルムアミド(2/1:体積比)1.5 mLに加え、さらに0.1 mLの1 M重曹水を加えた。その後1 mLのDMFに溶解した製造例4で得られたヘキサン酸の粗精製コハク酸イミドエステル1

10

1 mgを加え12時間反応を行った。  
反応終了後、エタノールを加え8,000 rpmで5分遠心し、糖ペプチド誘導体を沈殿させ、上清を除去することで沈殿を回収した。得られた沈殿物を0.5 mL蒸留水に溶解し、再度エタノール-エーテル混合液15 mLに注加し8,000 rpmで5分遠心し沈殿を回収した。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糖ペプチド誘導体(2)9.0 mgを得た。

得られた糖ペプチド誘導体のHPLCによる測定結果を図5に示す。反応生成物についてLC/MS測定を行った。その結果、10.2分に検出されるピークは検出イオンが1580.2([M+2H]<sup>2+</sup>)及び1578.5([M-2H]<sup>2-</sup>)であることから推定分子量3158.7であり、糖ペプチドの3個のアミノ基に3個のヘキサン酸が導入された糖ペプチド誘導体であると推定された。

20

【0076】

[実施例1]

<フッ化カリウム水溶液存在下でのフッ素原子含有糖ペプチド誘導体とガラスフィルターとの接触>

製造例3で得られたフッ素原子含有糖ペプチド誘導体(1)を $1 \times 10^{-5}$  Mフッ化カリウム水溶液で希釈し、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体濃度がそれぞれ $1 \times 10^{-7}$  M、 $1 \times 10^{-8}$  M、 $1 \times 10^{-9}$  M、 $1 \times 10^{-10}$  Mとなるように被検溶液を調製した。

NUNC製48穴細胞培養用プレートに1ウエルあたり1枚入れたミリポア製ガラスフィルター(10 mm、厚さ475 μm)に対し、被検溶液を各濃度群あたり3例で各ウエルあたり300 μLずつ添加し、4で終夜静置した。比較対照群としてミリポア製ガラスフィルターに対し $1 \times 10^{-5}$  Mフッ化カリウム水溶液を1群3例、1ウエルあたり300 μLずつ添加し、4で終夜静置した。

30

<ELISAによるレクチンとの結合評価>

次にレクチンとの反応を実施した。NUNC製48穴細胞培養用プレート中にあるガラスフィルターをPBS-0.05% Tween 20溶液で洗浄後、それぞれの48穴細胞培養用プレートに入れ、各ウエルに対し、5 μg/mLとなるようにPBSで希釈したJ-OILMILLS製SSA-Biotin(Sambucus sieboldiana Biotin conjugated)を各ウエルあたり300 μL加え室温で1時間静置した。

40

ガラスフィルターをPBS-0.05% Tween 20溶液で洗浄後、それぞれの48穴細胞培養用プレートに入れ、各ウエルに対し、 $3.1 \times 10^{-8}$  g/mLとなるようにPBSで希釈したStreptavidin-HRP(Jackson-ImmunoResearch Laboratories製)を各ウエルあたり300 μL加え室温で1時間静置した。

ガラスフィルターをPBS-0.05% Tween 20溶液で洗浄後、それぞれの48穴細胞培養用プレートに入れ、各ウエルに対し、クエン酸リン酸緩衝液、オルトフェニレンジアミン(OPD)及び過酸化水素水を加えて調製した発色基質溶液を加え発色させ、その後1 N HClを添加することで反応を停止させ、上清を96穴プレートに移し、プレートリーダーにて490 nmにおける吸光度を測定した。結果を図6に示す。

50

その結果、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体と  $1 \times 10^{-5}$  M フッ化カリウム水溶液存在下で反応させたグラスフィルター群 ( $1 \times 10^{-7}$  M、 $1 \times 10^{-8}$  M、 $1 \times 10^{-9}$  M 各群 3 例) は、 $1 \times 10^{-10}$  M 群を除き、 $1 \times 10^{-5}$  M フッ化カリウム水溶液による比較対照群 (1 群 3 例) と比べて、吸光度 (490 nm) において有意に高いことが確認された。

このことからフッ化カリウム水溶液存在下でフッ素原子含有糖ペプチド誘導体 (1) と接触したグラスフィルターは、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体との結合が可能であり、その結果としてその特異性が Neu5Ac (2-6) Gal/GalNAc であると報告されているレクチン SSA (Sambucus sieboldiana) と結合している可能性が示唆された。

更にフッ素原子含有糖ペプチド誘導体と反応させたグラスフィルターすなわちフッ素原子含有置換基が導入された糖ペプチド誘導体と反応させたグラスフィルターは、SSA レクチンとの結合能を有することから、ヒト型インフルエンザ A ウイルスヘマグルチニンと結合する可能性が示唆された。

【0077】

[参考例 1]

<フッ化カリウム水溶液存在下での糖ペプチド誘導体とグラスフィルターとの接触>

製造例 5 で得られた糖ペプチド誘導体 (2) を  $1 \times 10^{-5}$  M フッ化カリウム水溶液で希釈し、糖ペプチド誘導体濃度がそれぞれ  $1 \times 10^{-7}$  M、 $1 \times 10^{-10}$  M となるように被検溶液を調製した。比較対照群として  $1 \times 10^{-5}$  M フッ化カリウム水溶液を用い、実施例 1 と同様に実施した。

<ELISA によるレクチンとの結合評価>

実施例 1 と同様にして、490 nm における吸光度を測定した。結果を図 7 に示す。

その結果、糖ペプチド誘導体 (2) と  $1 \times 10^{-5}$  M フッ化カリウム水溶液存在下で反応させたフッ素塩処理グラスフィルター群 ( $1 \times 10^{-7}$  M、 $1 \times 10^{-10}$  M、各 1 群 3 例) は、いずれの群も  $1 \times 10^{-5}$  M フッ化カリウム水溶液による比較対照群 (1 群 3 例) と比べて、吸光度 (490 nm) において有意な差が無かった。

このことから糖ペプチド誘導体 (2) と接触したフッ素塩処理グラスフィルターはフッ素原子含有糖ペプチド誘導体との結合が出来ず、その結果としてレクチン SSA と出来ない可能性が示唆された。

【0078】

[参考例 2]

<PBS 存在下でのフッ素原子含有糖ペプチド誘導体とグラスフィルターとの接触>

フッ化カリウム水溶液の代わりに PBS で希釈した以外は、実施例 1 と同様に実施した。

<ELISA によるレクチンとの結合評価>

実施例 1 と同様にして、490 nm における吸光度を測定した。結果を図 8 に示す。

その結果、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体 (1) と PBS 存在下で反応させたグラスフィルター群 ( $1 \times 10^{-7}$  M、 $1 \times 10^{-8}$  M、 $1 \times 10^{-9}$  M、 $1 \times 10^{-10}$  M 各群 3 例) は、PBS による比較対照群 (1 群 3 例) と比べて吸光度 (490 nm) において有意差が見られない事が確認された。

このことから PBS 存在下でフッ素原子含有糖ペプチド誘導体 (1) と接触したグラスフィルターは、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体との結合が十分に出来ず、その結果としてレクチン SSA と結合しない可能性が示唆された。

【0079】

[実施例 2]

<フッ素塩処理グラスフィルターの製造>

ミリポア製グラスフィルター (10 mm、厚さ 475  $\mu$ m) 100 枚に対し 1 M フッ化カリウム水溶液 (MeOH : H<sub>2</sub>O = 90 : 10) を 30 mL 加え 4 で終夜静置した。次いで、グラスフィルターを濾別し、MeOH で洗浄後、減圧下乾燥し、フッ素塩処理グラスフィルターを得た。

10

20

30

40

50

< P B S 存在下でのフッ素原子含有糖ペプチド誘導体とフッ素塩処理ガラスフィルターとの接触 >

フッ素原子含有糖ペプチド誘導体を P B S で希釈し、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体濃度がそれぞれ  $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$  となるように被検溶液を調製し、得られたフッ素処理ガラスフィルターを用いた以外は、実施例 1 と同様に実施した。

< レクチンとの結合評価 >

実施例 1 と同様にして、 $490 \text{ nm}$  における吸光度を測定した。結果を図 9 に示す。

その結果、フッ素原子含有糖ペプチド誘導体 ( 1 ) と P B S 存在下で反応させたフッ素塩処理ガラスフィルター ( $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、1 群 3 例) は、P B S による比較対照群 ( 1 群 3 例) と比べて、吸光度 ( $490 \text{ nm}$ ) において有意に高いことが確認された。

10

このことからフッ素原子含有糖ペプチド誘導体 ( 1 ) と接触したフッ素塩処理ガラスフィルターはフッ素原子含有糖ペプチド誘導体との結合が可能であり、その結果としてその特異性が Neu 5 Ac ( 2 - 6 ) Gal / Gal NA c であると報告されているレクチン SSA ( Sambucus sieboldiana ) と結合している可能性が示唆された。

更にフッ素原子含有糖ペプチド誘導体と反応させたガラスフィルターすなわちフッ素原子含有置換基が導入された糖ペプチド誘導体と反応させたガラスフィルターは、SSA レクチンとの結合能を有することから、ヒト型インフルエンザ A ウイルスヘマグルチニンと結合する可能性が示唆された。

【産業上の利用可能性】

20

【 0 0 8 0 】

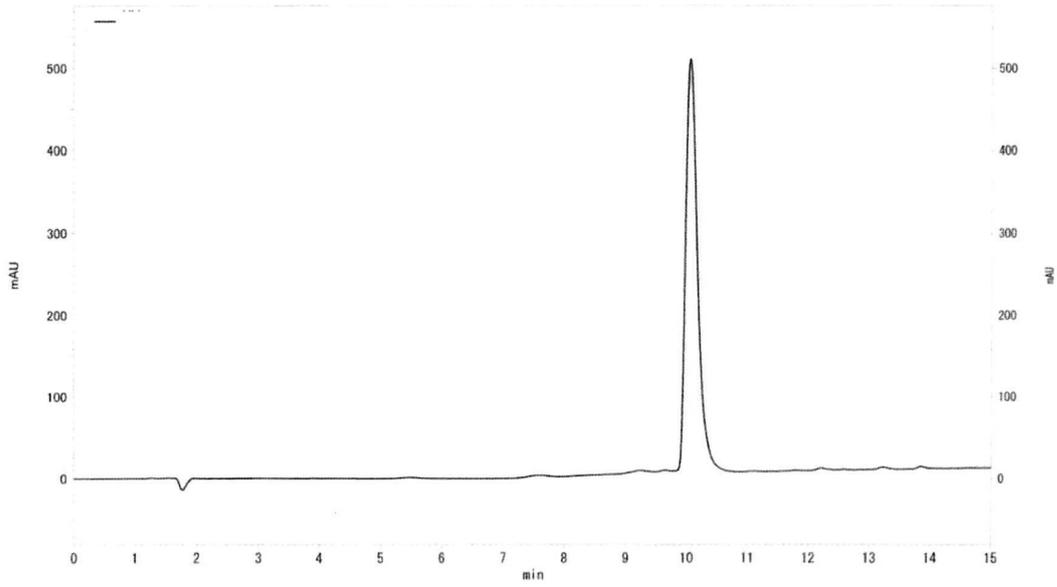
本発明の糖ペプチド被覆シリカは、医療及び医薬品開発の分野又はウイルス感染診断の分野における有効なリサーチツールとして産業上の利用可能性を有する。

【配列表フリーテキスト】

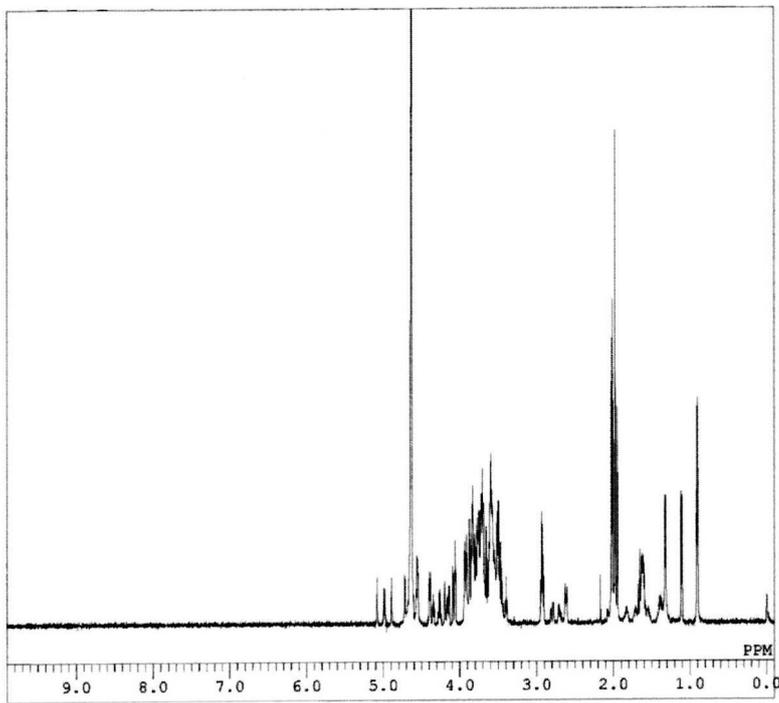
【 0 0 8 1 】

配列番号 1 は、式 1 に示される糖ペプチドのアミノ酸配列を示す。

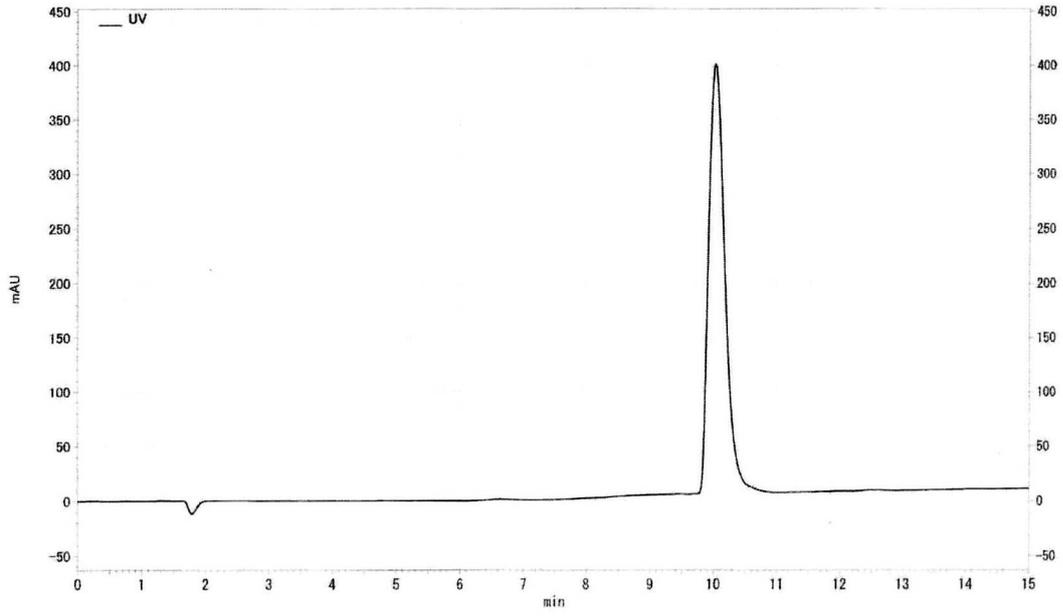
【 図 1 】



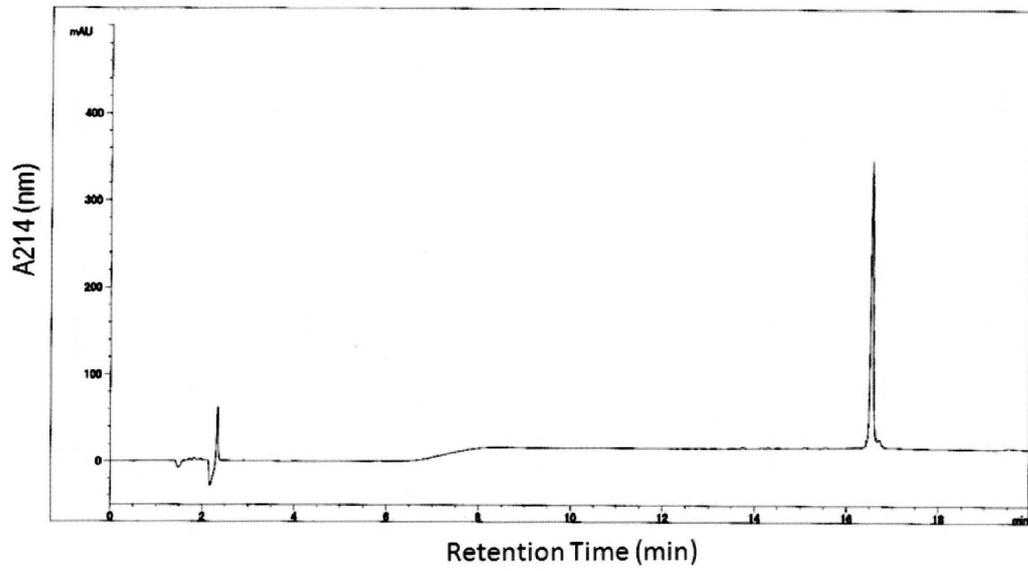
【 図 2 】



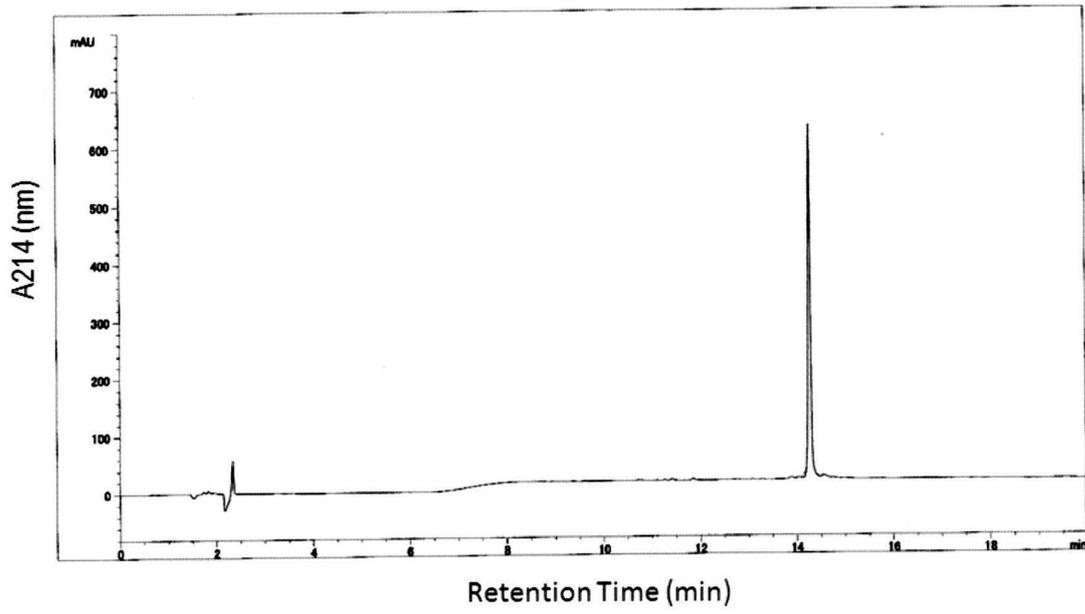
【 図 3 】



【 図 4 】

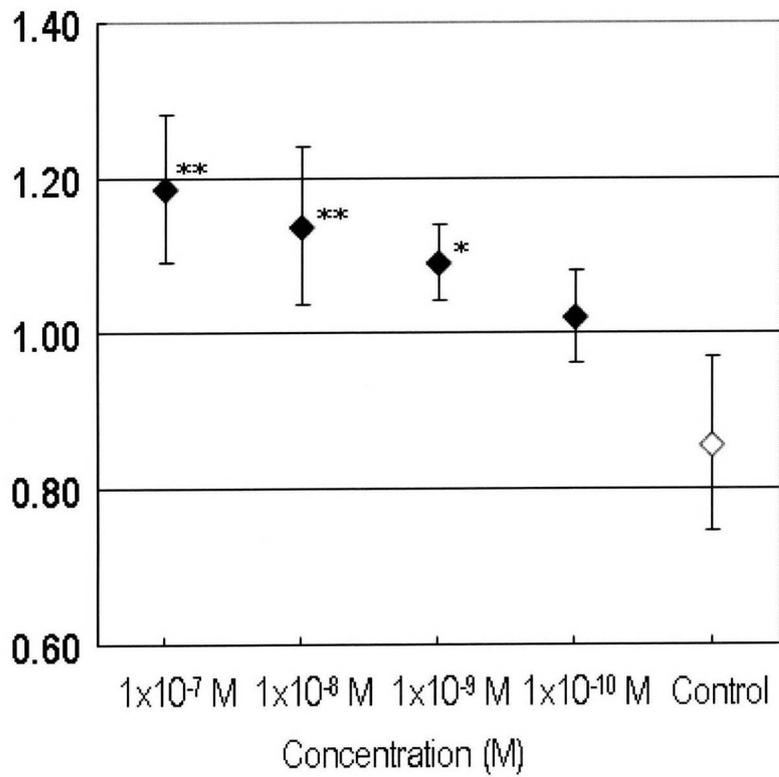


【 図 5 】

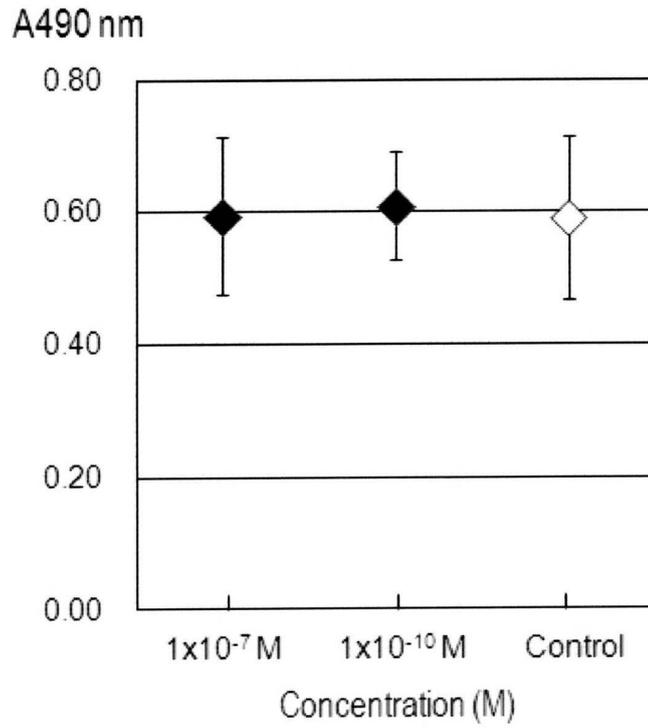


【 図 6 】

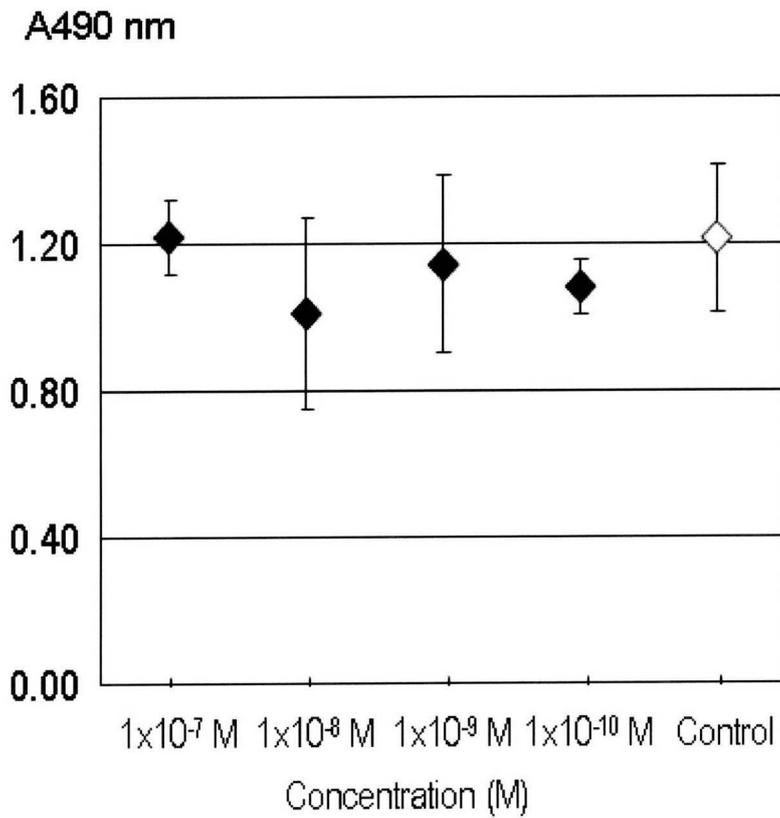
A490 nm



【 図 7 】

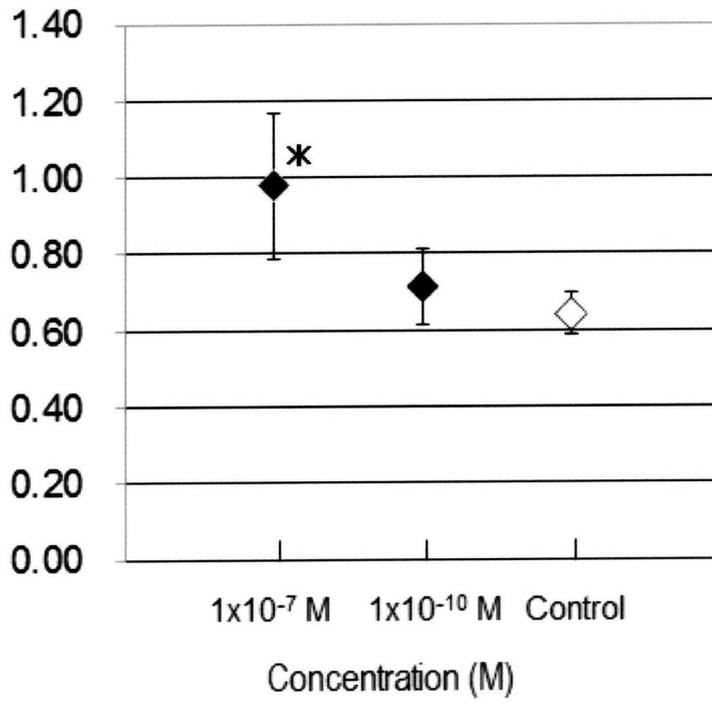


【 図 8 】



【 図 9 】

A490 nm



【 配列表 】

[0005614897000001.app](#)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	
C 0 9 C	3/08	(2006.01)	C 0 9 C	3/08
C 0 9 C	3/10	(2006.01)	C 0 9 C	3/10
D 0 6 B	1/00	(2006.01)	D 0 6 B	1/00

(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 公益財団法人野口研究所内

審査官 浅野 裕之

(56)参考文献 特開2004-231450(JP,A)  
特開平05-333015(JP,A)  
特開2011-231084(JP,A)  
特開2011-162762(JP,A)  
野口研究所時報, 2011, Vol.54, p.44-48  
Organic Letters, 2008, Vol.10, No.5, p.785-788  
J. Am. Chem. Soc., 2005, Vol.127, p.13162-13163  
Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 1997, Vol.9, No.49, p.399-407

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 1 B	3 3 / 0 0 ~ 3 3 / 1 9 3
B 0 1 J	2 0 / 2 4
B 0 1 J	2 0 / 3 2
C 0 7 K	7 / 0 6
C 0 9 C	1 / 2 8
C 0 9 C	3 / 0 8
C 0 9 C	3 / 1 0
D 0 6 B	1 / 0 0

J S T P l u s ( J D r e a m I I I )