

このようにして新たに開発したグローボ三糖誘導体の合成法をもとに、工業的スケールでグローボ三糖担持カルボシラン dendリマーを合成し、医薬品としての評価を行うべくジーエスプラッツ（株）より科学技術振興機構（JST）平成16年度委託開発事業に応募し書類審査は合格したが最終的採択には至らなかった。その資料を添付（B-6）する。

## B-2. 二糖 (Gal $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)-Gal) 担持カルボシランデンドリマーの合成と生理活性評価

研究協力者 山田 明宏

病原性大腸菌 0157:H7 の産生するペロ毒素が、生体内の細胞表層に存在するグロボトリアオシルセラミドに吸着される事で 0157:H7 への感染が開始する事が知られている。我々はこの感染メカニズムを参考に、グロボトリアオシルセラミドの一部分である クロボ三糖 [Gal $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)-Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)-Glc] をカルボシランデンドリマー末端に集積化させた Dumbbell (1) 6 (図 1) が、ペロ毒素に対し高い吸着能と無毒化作用があることを初めて見出した。しかし、ペロ毒素への接着部分となるグロボ三糖の合成は、有機合成的に複雑な合成ステップが多段階含まれている。今後、製薬としての実用化を視野に入れた場合、コスト的な面から合成経路の簡略化は重要な課題の一つである。

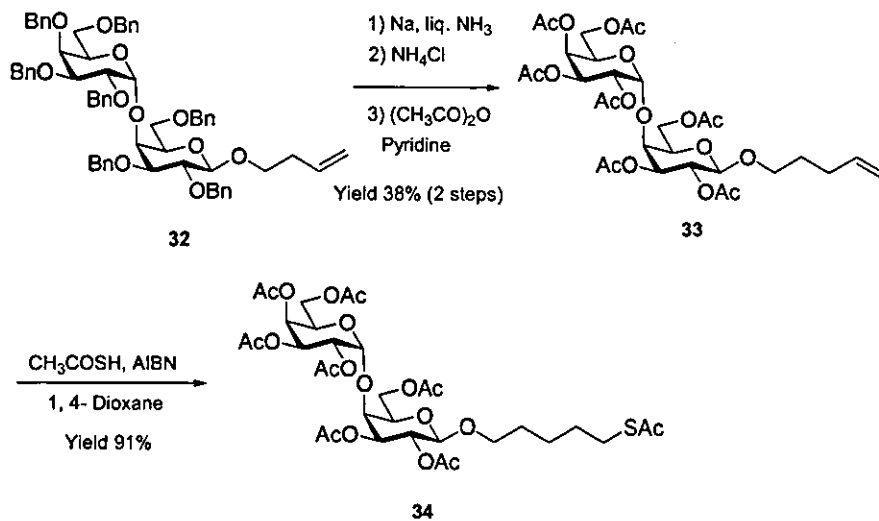
一方、ペロ毒素への接着にはグロボ三糖の中の先端二糖部分が特に強く関与しているとの研究報告がある。この先端の二糖はガラビオース [Gal $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)-Gal $\beta$ ] と呼ばれ、グロボ三糖に比べグルコース (Glc) 1 つ分少ない分子である。ガラビオースは、酵素を用いた反応によりガラクトースより容易かつ大量に合成可能な物質であり、これを担持したカルボシランデンドリマーが 0157:H7 に対して高い阻害活性を示せば治療薬としての実用化に一步前進できると考えられる。

そこで糖鎖構造の最適化の第 1 段階として、グロボ三糖の代わりにガラビオースを担持したカルボシランデンドリマーの新たな合成方法の検討を行った。

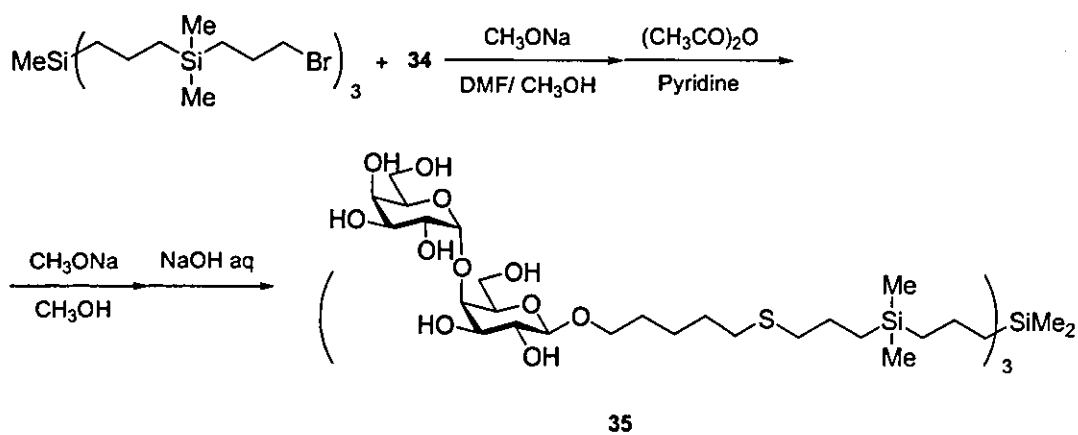
### B-2-1. 二糖 (Gal $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)-Gal) 担持カルボシランデンドリマーの合成

ガラクトースを出発物質としてグロボ三糖合成に用いた方法に準拠し、グリコシレーション反応によりガラビオース誘導体 (32) を合成した。更に、カルボシランデンドリマーへ導入可能にするため、ガラビオース誘導体に官能基化 (チオアセチル基: SAc) を施した (式 10)。

カルボシランデンドリマーへのガラビオース誘導体の導入は、グロボ三糖を導入する方法を参考にし、式 11 に示す反応条件でカルボシランデンドリマーへガラビオース誘導体を担持させた。その際、カルボシランデンドリマーの分子サイズがペロ毒素とガラビオース担持カルボシランデンドリマーのサイズを考慮してグロボ三糖を担持した場合よりも大きくなるよう分子設計した化合物を合成した。その後、ガラビオースの保護基であるアセチル基 (Ac) を脱保護して目的とするガラビオース担持カルボシランデンドリマーの一つである 35 を合成した。同様の方法にて他のガラビオース担持カルボシランデンドリマー合成を行った。また、Fan (1) 3-Gal2 (35) 同様に図 6 に示す Dumbbell (2) 6-Gal2 および Dumbbell (2) 4-Gal2 を合成した。



式 10. ガラピオース誘導体の官能基化



式 11. カルボシランデンドリマーへの導入反応

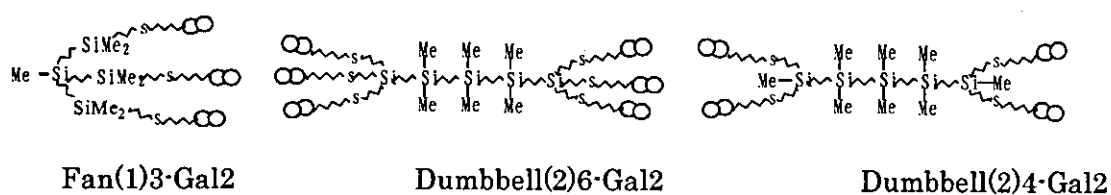


図 6. ガラピオース担持カルボシランデンドリマー

## B-2-2. 二糖 (Gal $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)-Gal) 担持カルボシラン dendリマーの生理活性評価

図6に示した3つの化合物を用いて、結合阻害活性試験と細胞毒性中和活性試験の2種類について検討した。前者の結合阻害活性試験は、二種類の Stx をそれぞれ I<sup>125</sup>により標識した毒素と培養細胞としてベロ細胞を用いて化合物の活性を検定した。その結果を図7に示す。

図7において▲印は Fan (1) 3-Gal2、●印は Dumbbell (2) 4-Gal2、◆印は Dumbbell (2) 6-Gal2 を阻害剤として用いていることを示している。これらのグラフは、縦軸が標識した各毒素の評価値、横軸がガラビオース担持 dendリマー化合物の濃度を示している。また、このグラフにおいて低い濃度方向で縦軸の値が0に近づくほど活性が高い化合物を示す。したがって、用いた3種類の化合物においては若干の変化はあるものの、大きな活性の違いは認められなかった。得られた IC<sub>50</sub> の値を表1に示す。

以上の結果から、ガラビオース担持 dendリマーは、何れも結合阻害活性を示すことが明らかとなったが、用いた化合物間での明確な構造活性相関は認められなかった。また、IC<sub>50</sub> の値から、これらの化合物群の活性ポテンシャルは、これまで用いてきたグロボ三糖含有カルボシラン dendリマーと比較して低いものと推定される。

次に、細胞毒性中和活性試験の結果を示す(図8)。この活性試験においては、ガラ

ビオース含有 dendリマー群が、二種類の Stx それぞれによるベロ細胞への毒性を中和する活性を測定するため、WST 法を利用した比色定量法により検定した。このグラフにおいても▲印は Fan (1) 3-Gal2、●印は Dumbbell (2) 4-Gal2、◆印は Dumbbell (2) 6-Gal2 を示している。図8のグラフは、縦軸が WST 法によって求めた培養後のベロ細胞の生存率、横軸がガラビオース担持 dendリマー化合物の濃度を示している。また、このグラフにおいて低い濃度方向で縦軸の値が大きくなるほど活性が高い化合物を示す。この活性評価試験においても先述の活性評価法と類似して、用いた3種類の化合物において若干の活性の変化はあるものの、大きな活性の違いは認められなかった。また、化合物の活性が低いため、この方法による測定濃度域での IC<sub>50</sub> の算出には至らなかった。これまで他のグループによって報告されてきているガラビオース由来の誘導体は、確かに活性が低いとされてきているが、クラスター化によりその活性が向上すると期待して合成を行った。しかしながら、今回合成した化合物群からは、活性の高い誘導体は見出されなかった。本研究において確立した合成ルートを考えると、合成上のメリットは捨て難く、ガラビオース誘導体による高い活性を保持した化合物は、極めて魅力的であると考えられる。今後、世代、形状や糖鎖の個数を変化させることによって、より高い活性を保持した化合物を見出すことを期待している。

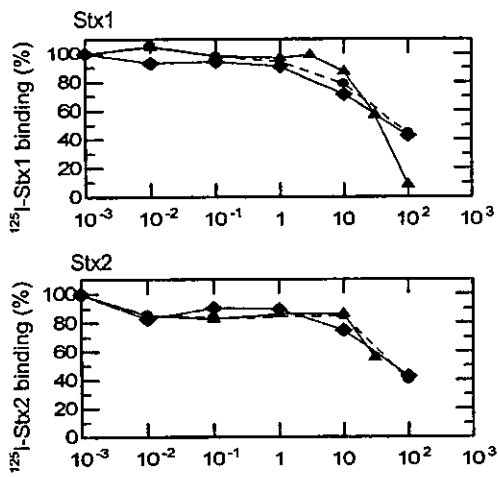


図 7.  $^{125}\text{I}$ -Stx-binding assays.  
 ▲, ● and ◆ indicate Fan(1)3-Ga2, Dumbbell(2)4-Ga2, and Dumbbell(2)6-Ga2, respectively.

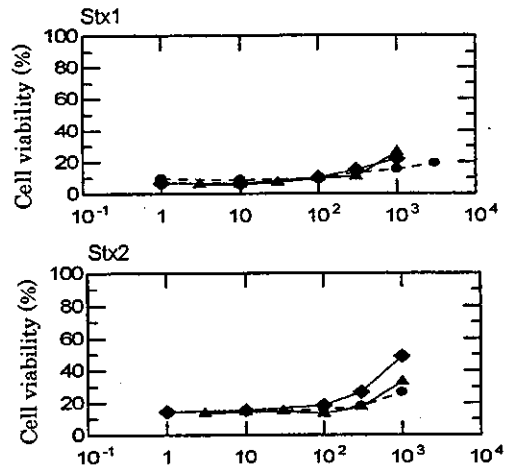


図 8. Cytotoxicity assay with Vero cells. ▲, ● and ◆ indicate Fan(1)3-Ga2, Dumbbell(2)4-Ga2, and Dumbbell(2)6-Ga2, respectively.

表 1. 二糖担持カルボシランデンドリマーによるペロ毒素結合阻害活性評価

|                   | 結合阻害活性           |                 |
|-------------------|------------------|-----------------|
|                   | IC <sub>50</sub> |                 |
|                   | Stx1<br>(µg/mL)  | Stx2<br>(µg/mL) |
| Fan(1)3-Gal2      | 33.5             | 31.6            |
| Dumbbell(2)4-Gal2 | 56.2             | 56.2            |
| Dumbbell(2)6-Gal2 | 47.3             | 44.7            |

一方、生理活性試験の結果よりガラビオース担持カルボシランデンドリマーの Stx に対する活性は低く見積もられはしたが、今後の合成上のメリットを考慮して、Stx とガラビオース担持カルボシランデンドリマーとの結晶構造解析を別途検討した。ガラビオース担持カルボシランデンドリマー群は、各測定における活性は低かったものの、Stx の各結合部位には、結合していると推定される。ここで用いた実験系の詳細については、平成14年度研究報告書を参照していただきたい。簡略化して記述すると、精製した Stx2 の B サブユニットペンタマー (Stx2B) とガラビオース担持カルボシランデンドリマー [用いた化合物は、最も単純な構造である Fan (1) 3-Gal2] とを種々の条件下において、共結晶化を試みた。ガラビオース担持カルボシランデンドリマーを除いたコントロールでは毒素由来と推定される結晶が得られた。一方、デンドリマーが共存する数種類のバッファーを用いた系においても結晶が観察されたことから、目的とした共結晶が得られたのではないかと推定した。しかしながら、X 線を利用した詳細な結晶構造解析による分析には、結晶の大きさや形状 (得られた結晶が針状結晶) が適切でなかったため、現在のところ至っていない。つぎに、得られた結晶がガラビオース担持カルボシランデンドリマーと Stx2B との錯体であることを証明するために、直接分子量の測定が可能である質量分析法を採用した。コントロールのガラビオース担持カルボシランデンドリマーと

Stx2B は、それぞれ基準ピークを与えることを確認した後、得られた共結晶の分子量測定を行った。その中から、特定のバッファー条件を適用した結晶のみが双方のピークを与えたことから、共結晶化が成功していることが示唆された。

### B-3. シアリルラクトース担持カルボシランデンドリマーの合成とインフルエンザウイルス阻害活性評価

末端糖鎖としてシアル酸を持つスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドにおいて、例えば、GM3は、細胞表層においてインフルエンザA型ウイルスにより特異的に認識され接着、そして感染することが知られている。また、最近の研究において、それらガングリオシドは、細胞表層上においてラフトやパッチと呼ばれるマイクロドメインを形成し、糖鎖のクラスター状となって存在していることが報告され、そのためウイルス接着時にはインフルエンザA型ウイルスの表層にクラスター状に存在するヘマグルチニンタンパク質との接着が高くなることが推定される。さらに、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンはGM3の構成糖鎖であるシアリルラクトースを認識することが報告されている。

インフルエンザウイルスは細胞膜上のガングリオシドに結合して細胞内に取り込まれた後、膜融合と脱核を引き起こしウイルスゲノムが放出される。核内に輸送されたゲノムの転写と複製の後、多数のウイルスコアが再構築され細胞膜から出芽していく。近年、様々なインフルエンザウイルス阻害剤が開発されてきた。ザナミビルは、ウイルスの出芽に必要なシアリターゼ活性を阻害して、細胞膜上にウイルス集塊を形成して出芽を阻害し、増殖サイクルを止めている。現在知られている抗インフルエンザ薬

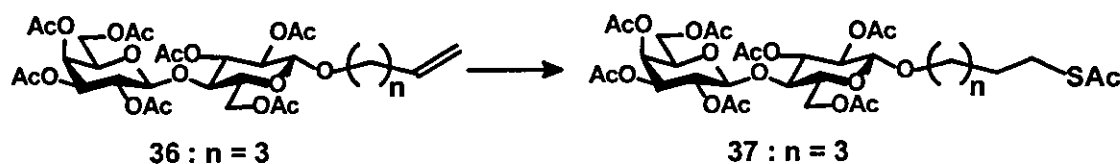
の数は非常に少なく、感染症予防の点においてもさらなる抗インフルエンザ薬の開発が望まれる。最近、我々は、デンドリマーの世代拡張が容易で、生体内における安全性(生化学的不活性)が期待できるカルボシランデンドリマーを調製して、これに機能性を有する糖鎖を均一に担持した新規な有機ケイ素・糖鎖複合体(Glyco-Silicon 機能材料)の合成を行った。この手法をインフルエンザウイルス阻害剤へと展開することを検討した。

まず第一に、糖鎖をカルボシランデンドリマーへ導入するための手法について検討した。これまで、機能性糖鎖誘導体とデンドリマー骨格との結合法は、液体アンモニア中でのバッチ還元によるベンジル基の還元とそのままデンドリマーとのスルフィド形成反応をワンポットで行うものであった。しかしながら、シアル酸を含む糖鎖の場合において、塩基性が強すぎる故に、この手法の改良法が望まれた。そこで、本研究において、新規結合法をシアル酸含有糖鎖に拡張するために、まず、ラクトースをモデルとして用いて条件を検討した。第二に、その手法を実際にシアリルラクトース誘導体へ適用することを検討した。これにより、より複雑なガングリオシド糖鎖を有するデンドリマーの合成に拡張できるものと期待できる。

### B-3-1. シアリルラクトース担持カルボシランデンドリマーの合成

既知のペンテニルラクトシド誘導体における不飽和 2 重結合へのアルキルチオールのラジカル付加反応について検討を行った。この反応は、通常、反マルコフニコフ則に従い、末端側に硫黄原子が付加することが知られている。そこで、報告例の少ない、不飽和 2 重結合へのチオ酢酸のラジカル付加をモデルとして、①アリルラクトシド完全アセチル化体、②アリルラクトシド完全ベンジル化体、③ペンテニルラクトシド完全アセチル化体、④ペンテニルラクトシド完全ベンジル化体の合計 4 化合物について検討した。その結果から、チオ酢酸のラジカル付加には糖のアグリコンのスペーサー長が重要であることを見出した。さらに、一般的なチオールのラジカル付加は触媒量のラジカル開始剤で反応が進行するが、チオ酢酸の付加においては比較的多量のラジカル開始剤が必要とされることが分かった (式 1 2)。

末端二重結合へのチオアセチル基の導入法が確立できたので、次に、それらとアルキルハライド型デンドリマーとの結合反応の検討に着手した。これまで我々が行ってきた末端に臭素原子を持ったカルボシランデンドリマーと糖鎖の結合反応は、糖のアグリコンにベンジルチオ基を持ったものをバーチ還元によって脱 *S*-ベンジル化しチオラートアニオンを発生させ、 $S_N2$  反応をワンポットで行う方法であった。この反応は、溶媒として液体アンモニアを用いているため、溶質の溶解度が向上するといった利点が挙げられるが、強塩基性条件下故、塩基に安定な糖しか用いられないといった欠点が挙げられた。本研究では、チオラートアニオンを発生させるために必要とされる塩基の検討、及び溶媒の検討を行った。その結果、原料であるアルキルハライド型デンドリマー 38 とアセチルチオラクトシド誘導体 37 の双方を均一に溶解させるため、DMF/MeOH 混合溶媒系を用い、塩基としてナトリウムメトキシドを加える方法が最適であると判



式 1 2. チオ酢酸のラジカル付加反応

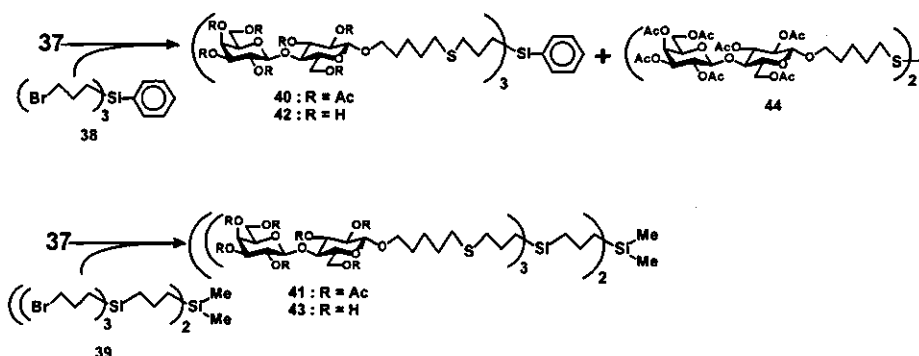


断した。さらに、この手法を第1世代ダンベル型のアルキルハライド型デンドリマー39に展開し、十分な汎用性も確認した。さらに、モデルとしたラクトース含有カルボシランデンドリマー40、41の脱保護をツエンプレン法とけん化反応により行ったところ、完全に脱アセチル化された化合物42、43を定量的に得ることに成功した(式13)。

以上のように、モデルとしてラクトースを用いた糖鎖のカルボシランデンドリマーへの弱塩基性条件下での新規導入法を確立したので、シアリル糖鎖に展開することとした。原料としたシアリル酸由来のトリクロロアセトイミデート45は、既知の方法により合成した。イミデート体とペンテニルアルコールとのグリコシル化反応は、ジクロ

ロメタン中、ボロントリフルオリドエーテル錯体を用いて行い、84%の収率で、立体選択的に目的物46を与えた。得られたアセチル体の脱保護を常法に従い行うことにより、水溶性のシアリルラクトースのペンテニルグリコシド47を得た。また、本研究において確立したチオ酢酸のラジカル付加反応を47に行い、反マルコフニコフ型のチオ酢酸付加体48を得た。

次に、 $\beta$ -アセチルチオペンチルシアリルラクトシド48と末端臭素置換されたカルボシランデンドリマー38との結合反応を、ラクトースをモデルとした時と同様の条件下で行った。すなわち、DMF/MEOH混合液中ナトリウムメトキシドを用いて行った。同様の後処理を行うことにより、シアリルラ



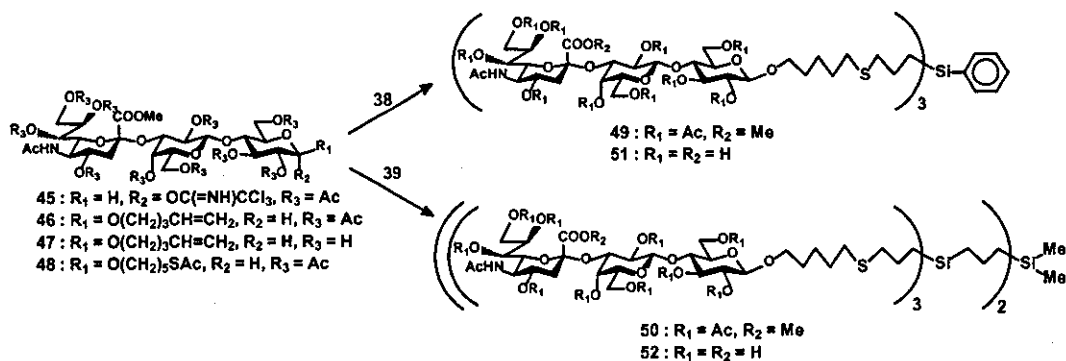
式13. ラクトース誘導体の合成

クトース含有カルボシラン dendriマー49を得た。さらに、ダンベル型カルボシラン dendriマー39との結合反応もファン型と同様の条件で行った。この場合も、高収率で目的の dendriマー50を得た。最後に、目的とした2種類のシアリルラクトース含有 dendriマーの脱保護体51および52を得るために、アセテート体のエステル交換反応とけん化反応を行った(式14)。

以上のように、塩基性条件下において不安定なシアリルラクトース誘導体を dendriマー上へ効率良く導入する方法を確立した。この手法により、目的とする有機ケイ素-糖鎖複合体を合成することに成功した。

### B-3-2. シアリルラクトース担持カルボシラン dendriマーのインフルエンザウイルス阻害活性評価

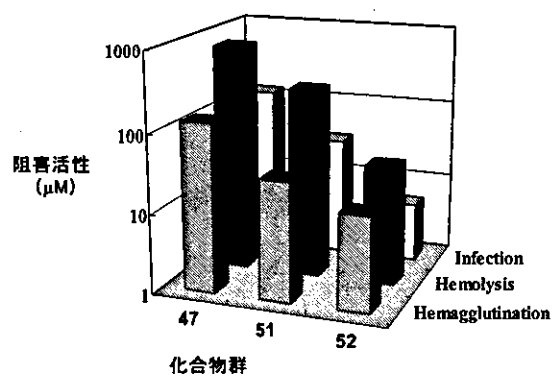
ペンテニルシアリルラクトシド 47、及び、シアリルラクトース含有カルボシラン dendriマー51 および 52 のインフルエンザ A 型ウイルス阻害活性試験を行った。活性試験はヒトから分離されたインフルエンザウイルス (A/PR/8/34, H1N1) を用い、赤血球凝集阻止試験、細胞融合活性阻止試験、宿主細胞 (MDCK 細胞) への感染・増殖阻害活性試験を行った。活性試験の結果を図に示す。何れの活性試験においてもカルボシラン dendriマーへの糖鎖の集積効果が顕著に認められ、クラスターを形成するほど高い阻害活性が現れた。特に、宿主細胞 (MDCK 細胞) への感染、増殖阻害活性試験において、52 は 47 の 23 倍もの阻害活性を示した (表 2)。



式14. シアリルラクトース誘導体の合成

表2. インフルエンザA型ウイルス (A/PR/8/34 strain) に対する  
シアリルラクトース誘導体の阻害活性能

| 化合物 | 阻害活性 ( $\mu\text{M}$ ) |                              |                                 |
|-----|------------------------|------------------------------|---------------------------------|
|     | 赤血球凝集阻止                | 細胞融合活性阻止<br>$\text{IC}_{50}$ | 宿主への感染、増殖阻害<br>$\text{IC}_{50}$ |
| 47  | 133.3                  | 745.3                        | 124.2                           |
| 51  | 31.3                   | 240.7                        | 32.3                            |
| 52  | 15.6                   | 31.2                         | 5.4                             |



#### B-4. マンノース担持カルボシランデンドリマーの設計技術開発に関する研究

(財) 医療機器センター 森 知紀

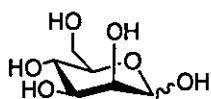
ヒト免疫不全ウイルス (HIV) はエイズとして知られる疾患の原因ウイルスである。HIV の感染は、ウイルス表面に存在する gp120 分子が標的細胞表面に存在する CD4 分子と結合することで始まる。gp120 分子は、ポリペプチド部分の 24 ヶ所に *N*-結合型糖鎖が結合している糖タンパク質であり、糖鎖は gp120 の約半分を占めている。*N*-結合型糖鎖は、マンノースのオリゴ糖フラグメント (3~9 個) 構造が基本となっている。特に、gp120 には高マンノース型糖鎖が多く存在している。糖タンパク質のポリペプチド部分はコンパクトに折りたたまれているが、糖鎖部分はタンパク質表面で大きく伸展して存在する。そのため、gp120 は糖鎖で包まれたような分子であると考えられている。更に、HIV が外界と接するの、感染する際に標的細胞と結合するの、gp120 表面の糖鎖であり、この糖鎖上に多く存在するマンノースであるといえる。従って、HIV はマンノースの集積場と考えることが出来る。

一方、本プロジェクトにおいて埼玉大学ではグロボ三糖担持カルボシランデンドリマーのペロ毒素中和活性やシアリルラクトース担持カルボシランデンドリマーのインフルエンザウイルスへの接着といった種々の糖鎖を集積化させたカルボシランデンドリマー製剤の設計技術開発に関する研究を

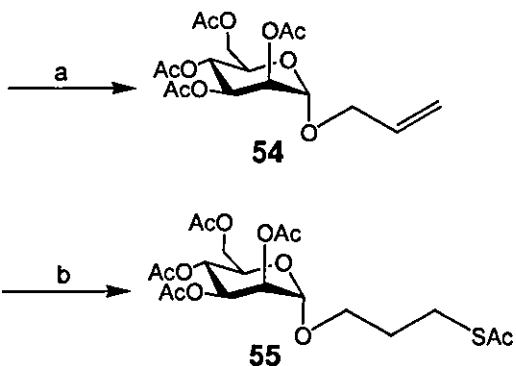
行っている。昨年度の本研究報告書では、糖鎖構造の最適化としてグロボ三糖の先端二糖部分 (ガラビオース : Gal- $\alpha$ -1, 4-Gal) を合成し、それをカルボシランデンドリマー骨格上に担持させ、病原性大腸菌 O-157: H7 が産生するペロ毒素に対する結合阻害活性が認められたことを報告している。

そこで本研究は、HIV (表面) のモデルとしてマンノースのその二糖 (Man- $\alpha$ -1, 3-Man と以下略記することがある) 誘導体を合成し、カルボシランデンドリマーに担持させクラスター化することでマンノースの人工的な集積場を構築し、従来の「酵素を標的」とする抗 HIV 剤ではなく「糖鎖を標的」とする新規の薬剤開発の可能性の検討を行うことを目的とする。ここでは、マンノースおよびその二糖誘導体の合成と、それらを導入した糖鎖担持カルボシランデンドリマーの合成結果を報告する。

マンノース単糖部分の合成を式 15、マンノース二糖部分の合成を式 16 に示した。

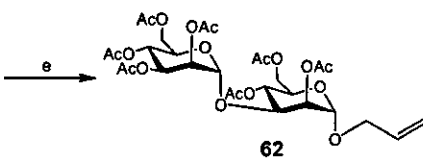
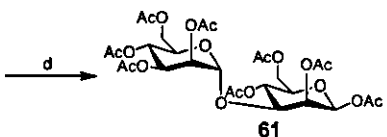
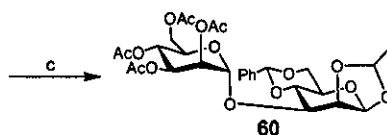
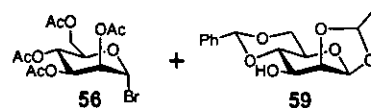
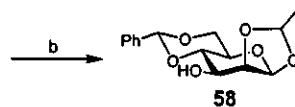
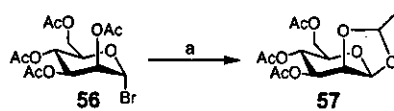


53



a) AcONa/ Ac<sub>2</sub>O, then allyl alcohol,  
BF<sub>3</sub>OEt<sub>2</sub>/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70 % (2 steps);  
b) AcSH, AIBN/ 1,4-dioxane, 73 %.

式15. マンノース誘導体の合成



a) NaBH<sub>4</sub>/ MeCN, 64 %; b) NaOMe/ MeOH,  
then PhCH(OMe)<sub>2</sub>, CSA/ DMF, quant. (2 steps);  
c) AgOTf, MS4A/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 66 %; d) 90 % CF<sub>3</sub>COOH  
aq., then AcONa/ Ac<sub>2</sub>O, 64 % (2 steps);  
e) allyl alcohol, BF<sub>3</sub>OEt<sub>2</sub>/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 43 %;  
f) AcSH, AIBN/ 1,4-dioxane, 97 %.

式16. マンノース二糖部分の合成

マンノース単糖誘導体については、常法によりマンノースのアセチル化を行い、グロボ三糖および昨年度本研究報告で記載したガラビオース誘導体と同様の方法で糖の1-位にオレフィン（本報告の場合、アリルアルコール）を導入し、オレフィン部分をチオアセチル化して 55 を得た。55 のアグリコンは、マンノースの1-位と $\alpha$ -グリコシドを形成していることがわかった。これは、従来合成してきた一連の糖鎖担持カルボシラン dendroliマーにおいて、糖鎖とスペーサー部分が $\alpha$ -グリコシドを形成していることと異なっている。

二糖誘導体は、Bromo 2, 3, 4, 6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside (56) を原料として、56 と 56 から合成した 4, 6-Benzylidene-1, 2-ethylidene- $\alpha$ -D-mannopyranoside (58) をトリフルオロメタンスルホン酸銀存在下グリコシド化を行い $\alpha$ -1, 3-結合を有するマンノース二糖 (60) を合成した。保護基を全てアセチル基にした後、マンノース単糖の場合と同様の方法で糖の1-位にアリル基を導入し、オレフィン部分をチオアセチル化して 63 を得た。単糖誘導体の場合と同様に、還元末端はアグリコン部分と $\alpha$ -グリコシドを形成している。

カルボシラン dendroliマー骨格として、埼玉大学で既に合成された典型的な三分岐型 (Fan (0) 3-Br)、四分岐型 (Ball (0) 4-Br)、および六分岐型 (Dumbbell (1) 6-Br) を

導入反応に用いた。使用したカルボシラン dendroliマー骨格を図9に示した。

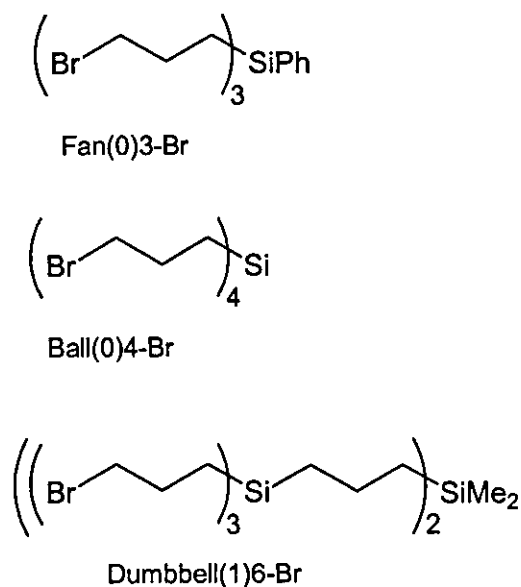
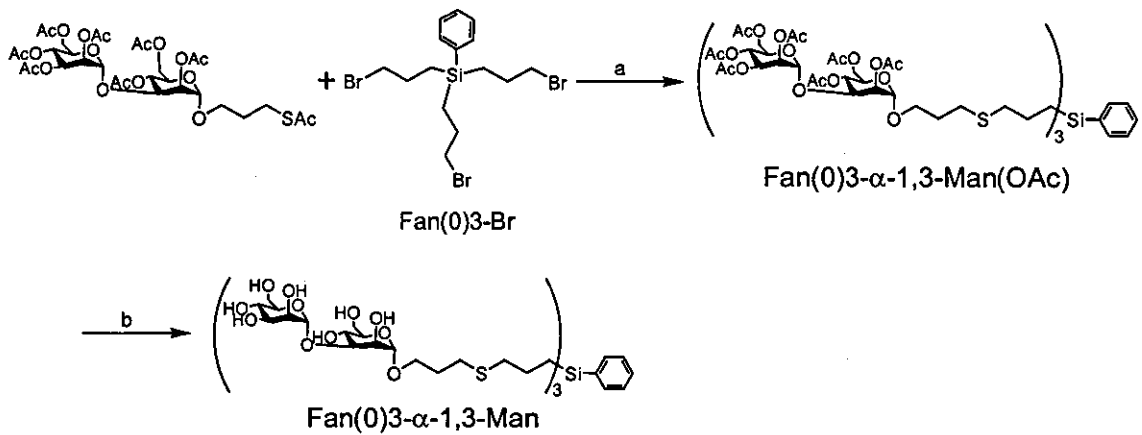


図9. 合成に用いたカルボシラン dendroliマー

マンノース単糖誘導体 55 およびマンノース二糖誘導体 63 をそれぞれ三種類のカルボシラン dendroliマー骨格に導入した。導入反応および脱保護反応はグロボ三糖およびガラビオースの場合の実験方法を参考にして行った。これらの反応の一例 (63 を Fan (0) 3-Br に導入) を式 17 に示した。今回新規に合成したマンノース担持カルボシラン dendroliマーを図 10 に示す。



a) NaOMe/ MeOH, DMF, then Ac<sub>2</sub>O/ pyridine, 30 % (2 steps);  
 b) NaOMe/ MeOH, then 0.1 mol/l NaOH aq., quant..

式 17. マンノース二糖担持カルボシランデンドリマーの合成

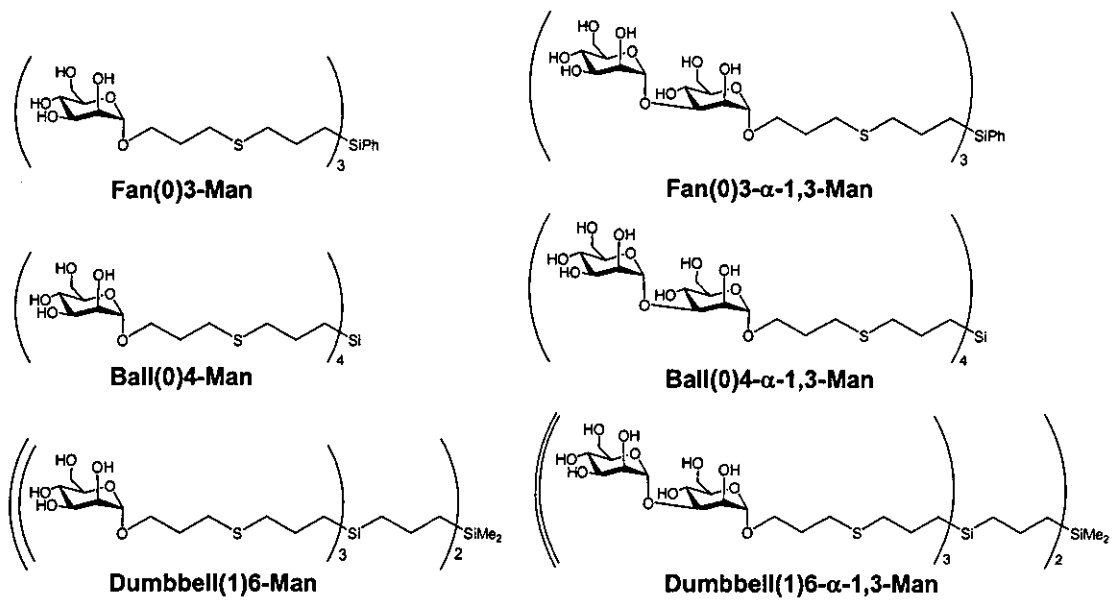


図 10. 今回合成したマンノースおよびマンノース二糖担持カルボシランデンドリマー.

B-5. ラクト-N-ネオテトラオース誘導体の合成とカルボシランデンドリマーへの担持

研究協力者 山田 明宏

生体内の細胞表層上には、糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質中の糖鎖が外側に向かってアンテナ状に存在している。生体内に侵入してきたウイルスや細菌はこれらの糖鎖をマーカーとし感染することが知られている。近年低濃度でしかも極めて効率よく抗ウイルス性を誘引させる糖鎖クラスター効果が注目を集めている。そのためデンドリマー末端や直鎖状ポリマーの側鎖に生理活性糖鎖を担持させたグライコクラスターモデルの構築が盛んに行われている。特に支持体としてデンドリマーを用いた場合は、分子の形状を制御したクラスターモデルを構築することができる大きな特徴である。我々はケイ素を分岐原子とするカルボシランデンドリマーを用いたグラ

イコクラスターモデルの構築を行ってきた。

これまでβ-シクロデキストリン、グロボ三糖、シアリルラクトースなどのクラスター化を報告してきた。特にグロボ三糖を担持したカルボシランデンドリマーのペロ毒素中和剤の開発において、担持した糖鎖数およびカルボシランデンドリマーの形状とペロ毒素中和活性の間には明確な構造活性相関があることを明らかにした。このコンセプトの拡張を図るため、本報告では機能性糖鎖としてラクト-N-ネオテトラオースを選択した(図11)。ラクト-N-ネオテトラオースはラクトサミンおよびラクトースからなる四糖構造をとっており、各種腫瘍の原因菌であるブドウ球菌と接着することで知られている糖鎖である。また近年、ラクトネオテトラオースはデングウイルスと接着し、デングウイルスの細胞への感染を阻害することも明らかになっている。

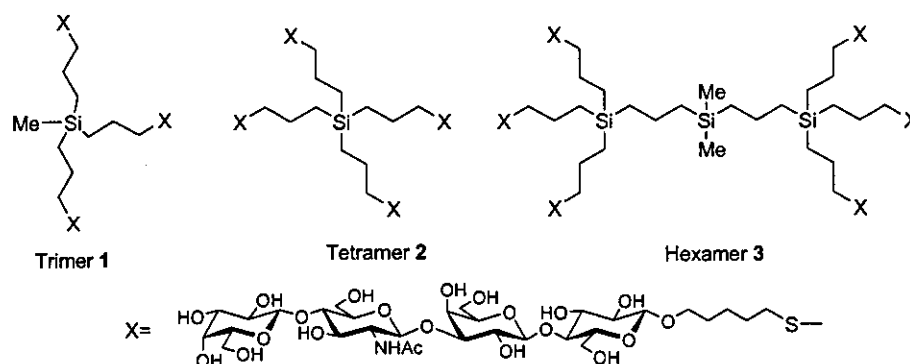
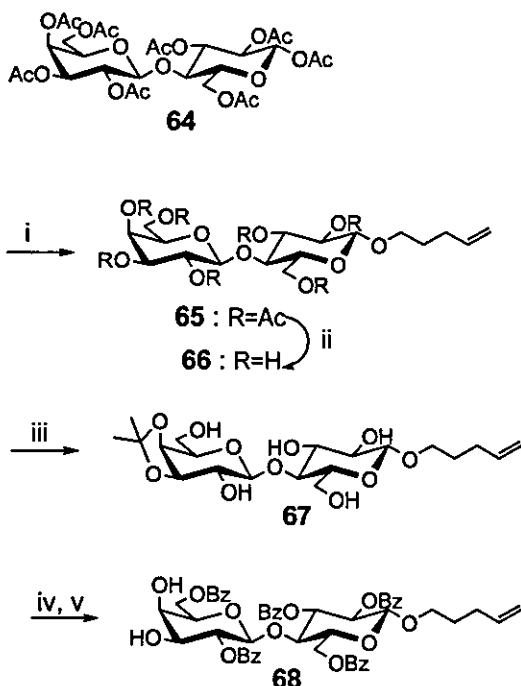


図11. ラクト-N-ネオテトラオース担持カルボシランデンドリマー



糖鎖受容体はD-ラクトースを原料として合成を行った (式18)。



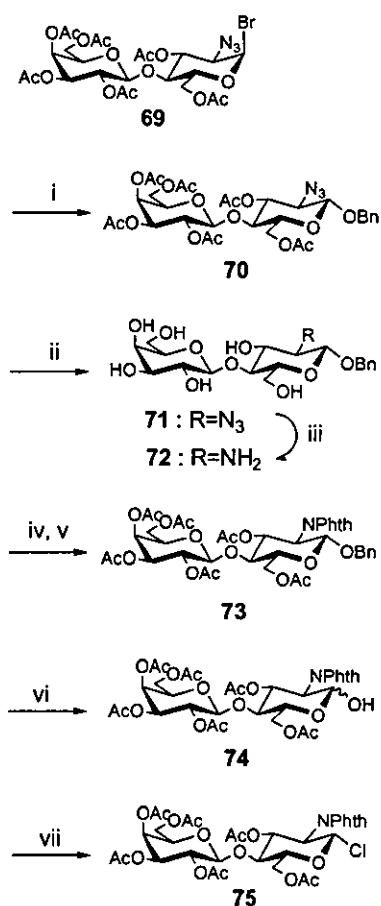
- (i) 4-pentene-1-ol,  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ;
- (ii)  $\text{MeONa}$ ,  $\text{MeOH}$ , r.t.;
- (iii)  $\text{Me}_2\text{C}(\text{OMe})_2$ , CSA, DMF,  $80^\circ\text{C}$ ;
- (iv)  $\text{BzCl}$ , pyridine, r.t.;
- (v) 50%  $\text{CF}_3\text{COOH}$  aq.,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , r.t.

### 式18. 糖受容体の合成

スペーサーとしてペンテニル基を導入し脱Oアセチル化した後に3', 4'位をイソプロピリデン保護した。その後残りの水酸基をアシル転移が起こりにくいと思われるベンゾイル基で保護を行った。酸性条件下でイソプロピリデン保護を外す際にアシル転移体と思われる副生成物がほんのわずかに生成していたが、収率77%で糖鎖受容体68を得ることができた。68をアセチル化することにより68のジオールの存在を $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )で $\delta$  2.03 (s, 3H), 1.83 (s, 3H),

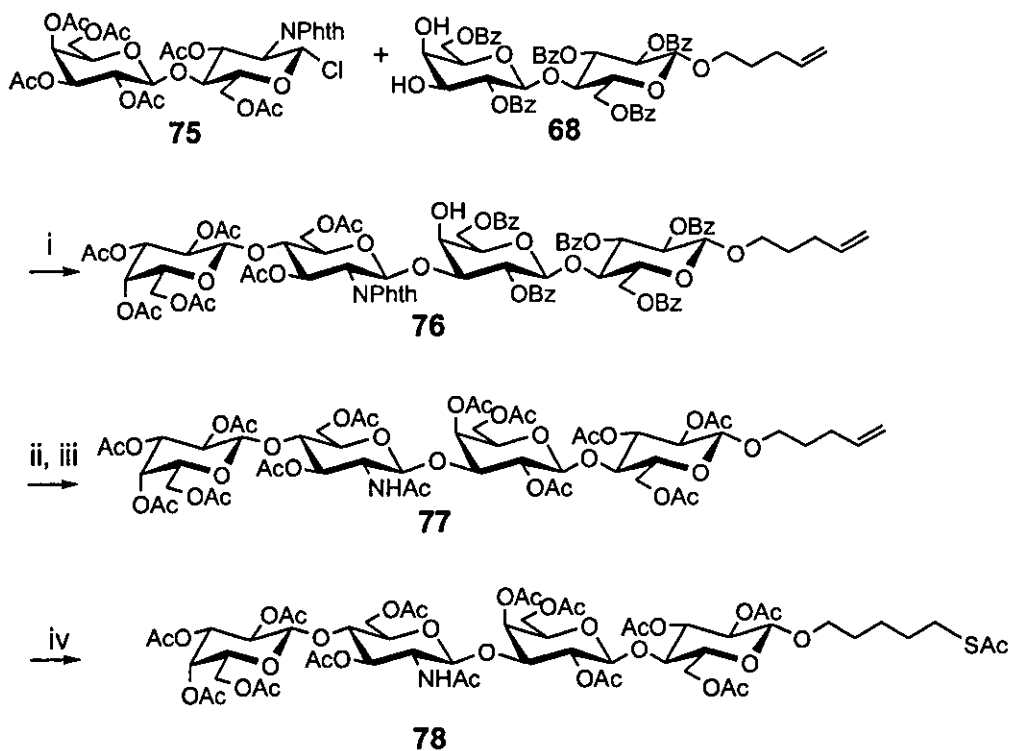
$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )で $\delta$  20.41, 20.32 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ -)と2つのアセチル基由来のシグナルが観測されたことから確認した。

一方、糖鎖供与体はLemieuxらの報告に準じて合成を行い化合物69から6段階の反応により収率33%で化合物75を得た (式19)。この75の融点は報告されている値とほぼ一致した。



- (i)  $\text{BnOH}$ ,  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ , Drierite,  $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ,  $-20^\circ\text{C}$ ;
- (ii)  $\text{NaOMe}$ ,  $\text{MeOH}$ , r.t.; (iii)  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , pyridine;
- (iv) Phthalic anhydride,  $\text{Et}_3\text{N}$ , pyridine,  $70^\circ\text{C}$ ; (v)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , pyridine,  $90^\circ\text{C}$ ;
- (vi)  $\text{H}_2$ , 20%  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ ,  $\text{EtOAc}$ ,  $\text{EtOH}$ ;
- (vii) Vilsmeier Reagent, *sym*-collidine,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , r.t.

### 式19. 糖供与体の合成

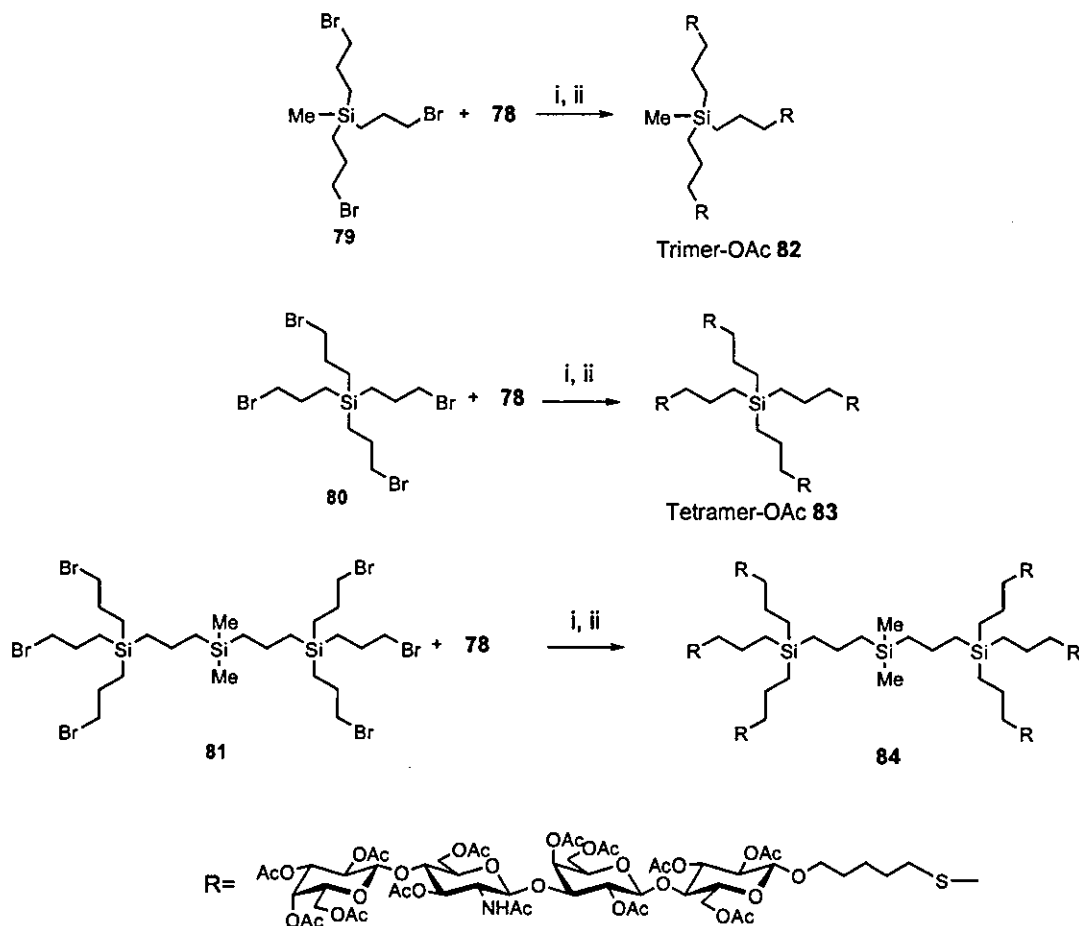


- (i) AgOTf, MS 4A powder, CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>, 0°C→r.t.  
(ii) n-BuNH<sub>2</sub>, MeOH, reflux ;(iii) Ac<sub>2</sub>O, pyridine ;  
(iv) AcSH, AIBN, 1,4-dioxane, 80°C

#### 式 20. 四糖の合成

これら糖鎖受容体と供与体とのグリコシル化反応により収率 76% で四糖構造を構築した (式 20)。<sup>13</sup>C NMR においてアノメリック位由来の 4 つのシグナルが、EI-MS によりその構造を確認した (Calc. for [M+Na]<sup>+</sup>: 1685、Found: 1685)。保護基の変換の後、スペーサーの二重結合へのチオ酢酸のラジカル付加により糖鎖誘導体 78 を収率 98% で合成した。これら四糖構造のオリゴ糖 76-78 の構造は <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR および質量分析、元素分析により確認した。

クラスター化の支持体として 3 つのカルボシランデンドリマー骨格 79-81 を用いた。糖鎖誘導体のカルボシランデンドリマーへの導入法はナトリウムメトキシドを用いてチオラートアニオンを発生させる導入反応を用いた (式 21)。それぞれの生成物はリサイクル分取型 HPLC で精製した。得られたアセチル体の 82, 83, 84 の収率はそれぞれ 64, 55, 44% と末端数が多くなるほど低下する傾向が見られた。構造決定は <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR および高分解能質量分析にて行った。六量体では分子量が大きい為、高分解能測定を

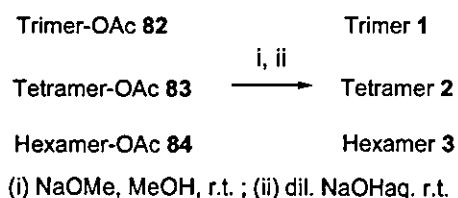


式 2 1. カルボシラン dendリマーへの導入

行うことができなかった。三量体 ESI-MS  
 Calc. for [M+2Na]<sup>2+</sup>/2: 2107.1948 Found:  
 2107.1950, 四量体 Calc. for  
 [M+2Na]<sup>2+</sup>/2: 2745.9075 Found: 2745.9112,  
 六量体 Calc. for [M+2Na]<sup>3+</sup>/3: 2799.84  
 Found: 2799.56.

これらアセチル保護したクラスター化合物  
 をツェンプレ法およびけん化により脱  
 アセチル化することにより目的とする無  
 保護のクラスター化合物 Trimer 1、  
 Tetramer 2、Hexamer 3 をそれぞれ収率 100、  
 68、96%で得ることができた(式 2 2)。これ

ら無保護のクラスター化合物は水に対し非  
 常に良い溶解性を示した。



式 2 2. ラクトネオテトラオース担持  
 カルボシラン dendリマーの合成

### C. 結論

本研究の中心的課題であるグロボ三糖担持カルボシランデンドリマーについて、最適構造の決定を行い Dumbbell (1) 6 が最適であり、これまでに合成した 17 個のグロボ三糖カルボシランデンドリマー中 Dumbbell (1) 6 および Dumbbell (2) 18 が *in vivo* において強いペロ毒素中和活性を示す化合物であると結論した。これらのことからグロボ三糖担持カルボシランデンドリマーの構造とペロ毒素中和活性の間には強い相関があることを実証することが出来た。また、ペロ毒素の結合サイトについて詳細な検討を行い、これまで述べられていた結合サイト 1 および 2 よりも結合サイト 3 が重要な役割を担っていることを明らかとした。

一方、グロボ三糖の実用的な合成方法の確立に向けて、実験室レベルでの検討を行った後、実用レベルでの生産のための準備を行った。

平成 14 年度に発足した本プロジェクトは、埼玉大学、国立国際医療センター、および（株）ジーエスプラッツが相互に連携し、ペロ毒素中和剤開発に向けて確実に成果をあげることができた。

また、治療薬としての効果进行评估するため研究を委託した奈良医大においても、Dumbbell (1) 6 の治療薬としての効果を実証する成果をあげた。さらに、インフルエンザウイルス阻害活性評価を委託した静岡県立大学においても所期の目的を達成する成果をあげることが出来た。

以上の結果、我々が提案する機能性糖鎖をカルボシランデンドリマーに担持するコンセプトの有効性を明示し、今後、このコンセプトにより、さらに多くの機能性糖鎖を用いる新規医薬品の創製が可能であることを実証した。

### D. 健康危険情報

特になし

### E. 知的財産取得状況

1) 新規糖鎖担持カルボシランデンドリマーおよびその製造法、並びにデング熱ウイルス感染阻害剤、抗ウイルス剤および抗 HIV 剤のスクリーニング用標的物質、照沼大陽、幡野健、松岡浩司、鈴木康夫、左一八、特願 2004-124757

2) ペロ毒素中和剤、松岡浩司、照沼大陽、幡野健、西川喜代孝、名取泰博、喜多英二、渡辺美帆、特願 2004-108483

3) 新規シアル酸供与体とその製造方法並びにそれを用いたシアル酸の導入方法、松岡浩司、照沼大陽、幡野健、坂入信夫、特願 2004-021766

4) 新規ラクトサミン誘導體とその製造方法、松岡浩司、照沼大陽、幡野健、特願 2003-212892

5) 抗ウイルス活性を有するカルボシランデンドリマー化合物、松岡浩司、照沼大陽、