

明 細 書

発明の名称：糖鎖－ポリペプチド複合体

技術分野

[0001] 本発明は、糖鎖がポリペプチドに結合した糖鎖－ポリペプチド複合体に関する。

背景技術

[0002] ヒドロゲルやファイブリン糊などのバイオゲルは、三次元培養等の研究用基材、術中／術後の止血剤や創傷治療シート等の外科用基材、ドラッグデリバリーシステム（DDS）などに利用されている。

[0003] しかし、これらの多くは生物由来材料を用いたものであることから、使用の際には、ウイルス等の微生物の感染、免疫原性、疾患の伝搬等のリスクが存在する。例えば、ファイブリン糊は手術時の止血剤として利用価値が高いが、原料がヒト血液由来であるため、実際に手術時に使用した際に、患者がファイブリン糊に混入していた肝炎ウイルスに感染する事故が多発し、大きな社会問題となっている。また、生物由来のバイオゲルでは、必ずしも均質な品質のゲルを供給できないという問題点も存在する。

[0004] 生物由来のバイオゲルに対し、化学合成によって製造されたバイオゲルは、感染のリスクがなく、均質な品質のゲルが提供できることが知られている（特許文献1）。しかし、これまでに知られているバイオゲルは、ゲルを形成させる際にバッファ交換や置換、多剤混合などの手順が必要であり、操作が複雑である。また、pH域によっては難溶解性となるため、併用する試薬や溶媒が限定されるだけでなく、適用できる部位（患部）が限られることや、使用時にシリンジやチューブが詰まってしまふなどの問題がある。また、特に生体のpHに近い、中性域において難溶解性（すなわち、透明でない）であるとして、例えば手術野などの視認性を必要とする場面において、用いることが困難である。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：米国特許第5 6 7 0 4 8 3号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、広範囲なpHにおいて透明で均質なヒドロゲルを形成し得る糖鎖-ポリペプチド複合体を提供することを課題とした。

課題を解決するための手段

[0007] 発明者らは、前記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、極性アミノ酸残基と非極性アミノ酸残基が交互に配置されたアミノ酸配列を含むポリペプチドに、糖鎖を結合させることによって製造された糖鎖-ポリペプチド複合体が、驚くべきことに、広範なpH域、特に中性域において高い水溶性を示し、透明で均質なヒドロゲルを形成することを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0008] すなわち、本発明は、糖鎖-ポリペプチド複合体であって、前記ポリペプチドが、極性アミノ酸残基と非極性アミノ酸残基が交互に配置された、8～34個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むポリペプチドであり、前記ポリペプチドに1または複数の糖鎖が結合していることを特徴とする、糖鎖-ポリペプチド複合体を提供する。

[0009] また、本発明の一実施形態においては、前記糖鎖-ポリペプチド複合体が、pHが中性付近の水溶液中において自己集合することにより、 β シート構造を含むヒドロゲルを形成しうるものであることを特徴とする。

[0010] また、本発明の一実施形態においては、前記各極性アミノ酸残基が、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、リジン残基、ヒスチジン残基、チロシン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、および、システイン残基からなる群から選択されるアミノ酸残基であることを特徴とする。

[0011] また、本発明の一実施形態においては、前記各非極性アミノ酸残基が、ア

ラニン残基、バリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、メチオニン残基、フェニルアラニン残基、トリプトファン残基、プロリン残基、および、グリシン残基からなる群から選択されるアミノ酸残基であることを特徴とする。

[0012] また、本発明の一実施形態においては、前記各極性アミノ酸残基が、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、および、トレオニン残基からなる群から選択されるアミノ酸残基であり、前記各非極性アミノ酸が、アラニン残基であることを特徴とする。

[0013] また、本発明の一実施形態においては、前記アミノ酸配列が、「RADAR」の繰り返し配列、または、「RATARA EA」の繰り返し配列であることを特徴とする。

[0014] また、本発明の一実施形態においては、前記アミノ酸配列が、RADARADARADARADA（配列番号1）、RADARADARADARADARADA（配列番号2）、および、RATARA EARATARA EA（配列番号3）からなる群から選択されるアミノ酸配列であることを特徴とする。

[0015] また、本発明の一実施形態においては、前記ポリペプチドに結合している1または複数の糖鎖に存在する糖残基の数の合計が5以上であることを特徴とする。

[0016] また、本発明の一実施形態においては、前記ポリペプチドに結合している糖鎖の数が、1、2、または、3本であることを特徴とする。

[0017] また、本発明の一実施形態においては、前記ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基から数えて、 x 番目までの全てのアミノ酸、および、C末端に位置するアミノ酸残基から数えて、 y 番目までの全てのアミノ酸（ここで、 x および y は整数であり、 $x \geq 0$ であり、 $y \geq 0$ であり、 $x + y$ は、ポリペプチドに結合している糖鎖の数の合計である）に糖鎖が結合していることを特徴とする。

[0018] また、本発明の一実施形態においては、前記ポリペプチドに結合している

糖鎖の数が、1、2、または3本であり、前記ポリペプチドに結合している糖鎖の数が1本の場合には、当該1本の糖鎖は、前記ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基、または、C末端に位置するアミノ酸残基と結合しており、

前記ポリペプチドに結合している糖鎖の数が2本の場合には、当該2本の糖鎖は、次の(1)～(3)からなる群から選択されるアミノ酸残基と結合しており、

(1) 前記ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基から数えて1番目および2番目のアミノ酸残基

(2) 前記ポリペプチドのC末端に位置するアミノ酸残基から数えて1番目および2番目のアミノ酸残基

(3) 前記ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基、および、前記ポリペプチドのC末端に位置するアミノ酸残基

前記ポリペプチドに結合している糖鎖の数が3本の場合には、当該3本の糖鎖は、次の(1)～(4)からなる群から選択されるいずれかのアミノ酸残基と結合していることを特徴とする。

(1) 前記ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基から数えて1番目、2番目、および、3番目のアミノ酸残基

(2) 前記ポリペプチドのC末端に位置するアミノ酸残基から数えて1番目、2番目、および、3番目のアミノ酸残基

(3) 前記ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基から数えて1番目および2番目のアミノ酸残基、ならびに、前記ポリペプチドのC末端に位置するアミノ酸残基

(4) 前記ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基、ならびに、前記ポリペプチドのC末端から数えて1番目および2番目に位置するアミノ酸残基

[0019] また、本発明の一実施形態においては、前記糖鎖が、分岐を有する糖鎖であることを特徴とする。

- [0020] また、本発明の一実施形態においては、前記糖鎖が、ジシアロ糖鎖、アシアロ糖鎖、ジグルクナック糖鎖、ジマンノース糖鎖、グルクナック糖鎖、マルトトリオース糖鎖、マルトース糖鎖、マルトテトラオース糖鎖、マルトヘプタオース糖鎖、 β -シクロデキストリン、および、 γ -シクロデキストリンからなる群から選択される糖鎖であることを特徴とする。
- [0021] また、本発明の一実施形態においては、本発明の糖鎖-ポリペプチド複合体を含む、ヒドロゲル形成用組成物であることを特徴とする。また、このようなヒドロゲル形成用組成物は、止血用医薬組成物であってよく、徐放担体用組成物であってよく、培養基材用組成物であってよい。
- [0022] また、本発明の一実施形態においては、本発明の糖鎖-ポリペプチド複合体を含む組成物であって、前記組成物が、ヒドロゲルの状態にあることを特徴とする。また、このような組成物は、止血用医薬組成物であってよく、徐放担体用組成物であってよく、培養基材用組成物であってよい。
- [0023] 以上述べた本発明の一又は複数の特徴を任意に組み合わせた発明も、本発明の範囲に含まれることを、当業者であれば理解するであろう。

発明の効果

- [0024] 本発明に係る糖鎖-ポリペプチド複合体は、中性域を含む広範なpH域において高い水溶性を有し、均一で透明なヒドロゲルを形成することから、併用する試薬や溶媒の制限を受けにくく、様々な用途に用いられ得る。また、広範なpH域において用いられ得ることから、適用部位（患部）が制限されにくい。
- [0025] また、本発明に係る糖鎖-ポリペプチド複合体は、中性域を含む広範なpH域において高い水溶性を有し、均一で透明なヒドロゲルを形成することから、中性pHにおいてゾル状態とゲル状態が可逆的に存在し得る。すなわち、糖鎖-ポリペプチド複合体は、一旦ゲル状態を形成した後に、機械的攪拌によってゾル状態になっても、再びゲル状態となることができる。したがって、ゲル状態（すなわち、Ready-to-Useの状態）で流通させることができ、他のペプチド性のゲルのように、ゲル化に適したpH（例えば

、酸性pH)でゲルを形成させた後に、中性pHにするためのバッファー交換(または置換)を行うなど、煩雑な操作を必要としない。すなわち、本発明に係る糖鎖-ポリペプチド複合体は、他のペプチド性のゲルと比較して、操作性に非常に優れている。また、本発明に係る糖鎖-ポリペプチド複合体は、使用できるpH域が広いため、使用時にシリンジやチューブが詰まってしまうなどの問題が生じにくい。

[0026] また、本発明に係る糖鎖-ポリペプチド複合体は、動物の生体内に存在する糖鎖によって修飾されているため、なんら修飾を有しないペプチドと比較して、抗原性が低減されている。また、本発明に係る糖鎖-ポリペプチド複合体は、ポリエチレングリコール(PEG)などによって修飾された化合物で見られるような毒性が生じる危険性もほとんどない。したがって、本発明に係る糖鎖-ポリペプチド複合体は、生体への使用に際して安全性が高い。

[0027] また、本発明に係る糖鎖-ポリペプチド複合体は、PEGを結合したポリペプチドと比較しても、より透明で均一なヒドロゲルを形成することも、本明細書の実施例から明らかである。

[0028] また、本発明に係る糖鎖-ポリペプチド複合体は、生理的条件下(中性域)において均一で透明なヒドロゲルを形成し、抗原性も少ないため、動物の生体に用いるヒドロゲルとして好適である。

[0029] より具体的には、本発明に係る糖鎖-ポリペプチド複合体を含むヒドロゲルは、中性pHにおいて、高濃度の血漿を含む条件下においても、透明で均一なゲル状態を維持する特徴を有していることから、例えば、止血剤として利用価値が高い。

[0030] さらに、本発明に係る糖鎖-ポリペプチド複合体を含むヒドロゲルは、中性pHにおいて、酸性タンパク質、塩基性タンパク質のいずれを含んだ場合においても、高い徐放性を有していることから、様々な物質についての徐放担体として利用価値が高い。

図面の簡単な説明

[0031] [図1]図1は、(RADA)4およびC(DiGlcNAc)-(RADA)

4 について、様々な pH におけるスチール球載荷試験の結果を示す写真である。

[図2]図2は、(RADA) 4 および C(DiGlcNAc) - (RADA) 4 について、様々な濃度の血漿を含む場合のスチール球載荷試験の結果を示す写真である。

[図3]図3は、(RADA) 4 および C(DiGlcNAc) - (RADA) 4 について、酸性タンパク質を内包した場合の徐放効果の測定結果を示すグラフである。

[図4]図4は、(RADA) 4 および C(DiGlcNAc) - (RADA) 4 について、塩基性タンパク質を内包した場合の徐放効果の測定結果を示すグラフである。

[図5]図5は、(RADA) 4 について、pH 2 または pH 7 の場合の円偏光二色性 (CD) 測定結果を示すグラフである。

[図6]図6は、C(DiGlcNAc) - (RADA) 4 について、pH 2 または pH 7 の場合の円偏光二色性 (CD) 測定結果を示すグラフである。

[図7]図7は、(RADA) 4 および C(DiGlcNAc) - (RADA) 4 について、pH 7 における動粘度測定の結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0032] 本発明に係る糖鎖-ポリペプチド複合体は、生物由来であってもよく、化学合成によって製造されたものでもよいが、安全性や品質の安定性、糖鎖の均一性の面から、化学合成によって製造されたものであることが好ましい。

[0033] 本発明に係る糖鎖-ポリペプチド複合体は、例えば、水溶液中において、ペプチド分子間の静電的相互作用、水素結合、および、疎水性相互作用などの相互作用を介して自己集合しうる。本明細書において、糖鎖-ポリペプチド複合体が水溶液中で「自己集合する」とは、水溶液中においてポリペプチド同士が、何らかの相互作用（例えば、静電的相互作用、水素結合、ファンデルワールス力、疎水性相互作用等）を介して、自発的に集合することを意味し、限定的な意味で解釈されてはならない。

[0034] 本発明に係る糖鎖ーポリペプチド複合体は、水溶液中において自己集合し、 β シート構造を形成しうる。さらに、その β シート構造が何重にも重なることにより、ヒドロゲルを形成し得る。水溶液中において糖鎖ーポリペプチド複合体が β シート構造を形成していることの確認方法は特に限定されないが、例えば、糖鎖ーポリペプチド複合体を含む水溶液の円偏光二色性（CD）を測定することにより、確認することができる。一般的に、 β シート構造を有する分子の特徴として、197 nm付近の波長に正の吸収がみられ、216 nm付近の波長に負の吸収がみられることから、円偏光二色性の測定により、これらの波長付近のピークを確認することによって、 β シート構造の形成を確認することができる。

[0035] 本発明に係る糖鎖ーポリペプチド複合体は、極性アミノ酸残基と非極性アミノ酸残基が交互に配置されたアミノ酸配列を含むことにより、水溶液中において β シート構造を形成した際に、 β シート構造の一方の面には極性アミノ酸残基のみが配置され得、他方の面に非極性アミノ酸残基のみが配置されうる。したがって、かかる β シート構造は、疎水面（非極性アミノ酸残基のみが配置された面）を隠すように集合して二層構造を形成しうる。そして、分子の自己集合が進むにつれてこの β シートの層構造が伸長してゆき、三次元の立体構造（例えば、ヒドロゲル）を形成しうる。本明細書において、このような性質を有するポリペプチドをSAP（Self-Assembling Peptide）と記載することがある。

[0036] 本発明において、「pHが中性付近」であるとは、pHが7.0付近であることを意味し、より具体的にはpHが5.0～9.0の範囲、好ましくは、pHが6.0～8.0の範囲内であることを意味する。

[0037] 本発明の一実施形態においては、糖鎖ーポリペプチド複合体が、pHが中性付近の水溶液中において自己集合して β シート構造を含むヒドロゲルを形成しうるものであることを特徴とするが、当該特徴を有している限り、pHが中性付近以外の水溶液中においても自己集合して β シート構造を含むヒドロゲルを形成しうるものを除外するものではない。

[0038] 本発明に係る糖鎖ーポリペプチド複合体は、極性アミノ酸残基と非極性アミノ酸残基が交互に配置されたアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むが、当該アミノ酸配列の長さは限定されず、好ましくは8～34個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列であってよく、より好ましくは12～25個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列であってよく、さらに好ましくは16～21個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列であってよい。

[0039] 本発明に係る糖鎖ーポリペプチド複合体は、極性アミノ酸残基と非極性アミノ酸残基が交互に配置されたアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むが、本発明において、「アミノ酸」とは、その最も広い意味で用いられ、タンパク質構成アミノ酸のみならずアミノ酸変異体および誘導体といったようなタンパク質非構成アミノ酸を含む。当業者であれば、この広い定義を考慮して、本発明におけるアミノ酸として、例えば、タンパク質構成L-アミノ酸；D-アミノ酸；アミノ酸変異体および誘導体などの化学修飾されたアミノ酸；ノルロイシン、 β -アラニン、オルニチンなどのタンパク質非構成アミノ酸；およびアミノ酸の特徴である当業界で公知の特性を有する化学的に合成された化合物などが挙げられることを理解するであろう。タンパク質非構成アミノ酸の例として、 α -メチルアミノ酸（ α -メチルアラニンなど）、D-アミノ酸、ヒスチジン様アミノ酸（2-アミノ-ヒスチジン、 β -ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン、 α -フルオロメチル-ヒスチジンおよび α -メチル-ヒスチジンなど）、側鎖に余分のメチレンを有するアミノ酸（「ホモ」アミノ酸）および側鎖中のカルボン酸官能基アミノ酸がスルホン酸基で置換されるアミノ酸（システイン酸など）が挙げられる。本発明の好ましい態様において、本発明において用いられるアミノ酸は、タンパク質構成アミノ酸であってよい。

[0040] 本発明において、極性アミノ酸残基は、側鎖が極性を有しうるアミノ酸残基であれば特に限定されないが、例えば、酸性アミノ酸残基と塩基性アミノ酸残基が含まれる。本明細書において、酸性アミノ酸残基は、例えば、アスパラギン酸（Asp：D）残基、および、グルタミン酸（Glu：E）など

を含み、塩基性アミノ酸とは、例えば、アルギニン（A r g : R）、リジン（L y s : K）、ヒスチジン（H i s : H）などを含む。

[0041] なお、本明細書中において、例えば「アスパラギン酸（A s p : D）」などの表記は、アスパラギン酸の略号として、三文字表記で「A s p」、一文字表記で「D」を用いることがあることを意味する。

[0042] また、本明細書において、中性アミノ酸残基のうち、水酸基、酸アミド基、チオール基等を含むアミノ酸残基は、極性を有するものとして、極性アミノ酸残基に含まれるものとする。例えば、本明細書において、チロシン（T y r : Y）、セリン（S e r : S）、トレオニン（T h r : T）、アスパラギン（A s n : N）、グルタミン（G l n : Q）、システイン（C y s : C）は極性アミノ酸残基に含まれる。

[0043] 本明細書において、非極性アミノ酸残基は、側鎖が極性を有しないアミノ酸であれば特に限定されないが、例えば、アラニン（A l a : A）、バリン（V a l : V）、ロイシン（L e u : L）、イソロイシン（I l e : I）、メチオニン（M e t : M）、フェニルアラニン（P h e : F）、トリプトファン（T r p : W）、グリシン（G l y : G）、プロリン（P r o : P）などを含む。

[0044] 本発明に係る糖鎖ーポリペプチド複合体において、「極性アミノ酸残基と非極性アミノ酸残基が交互に配置されたアミノ酸配列」は、好ましくは、当該アミノ酸配列は「R A D A」の繰り返し配列（繰り返しが2～8回、好ましくは繰り返しが3～6回）、または、「R A T A R A E A」の繰り返し配列（繰り返しが1～4回、好ましくは繰り返しが2～3回）であってよく、より好ましくは、当該アミノ酸配列は、R A D A R A D A R A D A R A D A（配列番号1）、R A D A R A D A R A D A R A D A R A D A（配列番号2）、および、R A T A R A E A R A T A R A E A（配列番号3）からなる群から選択されるアミノ酸配列であってよい。

[0045] 本発明において、「糖鎖」とは、単位糖（単糖および／またはその誘導体）が1つ以上連なってできた化合物をいう。単位糖が2つ以上連なる場合、

各々の単位糖同士の間は、グリコシド結合による脱水縮合によって結合する。このような糖鎖としては、例えば、生体中に含有される単糖類および多糖類（グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、キシロース、N－アセチルグルコサミン、N－アセチルガラクトサミン、シアル酸並びにそれらの複合体および誘導体）の他、分解された多糖、糖タンパク質、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、糖脂質などの複合生体分子から分解または誘導された糖鎖など広範囲なものが挙げられるがそれらに限定されない。糖鎖は直鎖型であっても分岐鎖型であってもよい。

[0046] また、本発明において、「糖鎖」には糖鎖の誘導体も含まれ、糖鎖の誘導体としては、例えば、糖鎖を構成する糖が、カルボキシ基を有する糖（例えば、C－1位が酸化されてカルボン酸となったアルドン酸（例えば、D－グルコースが酸化されたD－グルコン酸）、末端のC原子がカルボン酸となったウロン酸（D－グルコースが酸化されたD－グルクロン酸））、アミノ基またはアミノ基の誘導体を有する糖（例えば、D－グルコサミン、D－ガラクトサミンなど）、アミノ基およびカルボキシ基を両方とも有する糖（例えば、N－グリコイルノイラミン酸、N－アセチルムラミン酸など）、デオキシ化された糖（例えば、2－デオキシーD－リボース）、硫酸基を含む硫酸化糖、リン酸基を含むリン酸化糖などである糖鎖が挙げられるがこれらに限定されない。

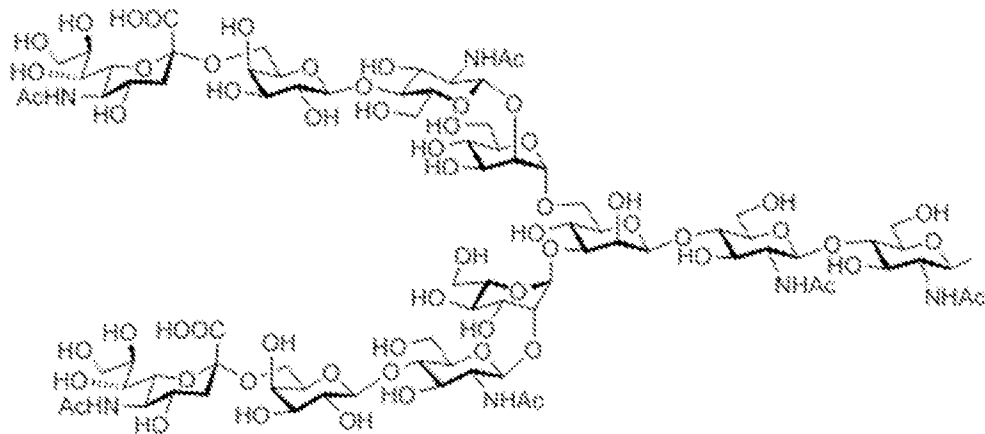
[0047] 本発明に係る糖鎖－ポリペプチド複合体において、ポリペプチドに結合される糖鎖は特に限定されないが、生体適合性の観点から、生体内で複合糖質（糖ペプチド（または糖タンパク質）、プロテオグリカン、糖脂質等）として存在する糖鎖であることが好ましい。かかる糖鎖としては、生体内で糖ペプチド（または糖タンパク質）としてペプチド（またはタンパク質）に結合している糖鎖であるN－結合型糖鎖、O－結合型糖鎖等が挙げられる。

[0048] 本発明に係る糖鎖－ポリペプチド複合体において、ポリペプチドに結合される糖鎖は、例えば、ジシアロ（Disialo）糖鎖、アシアロ（Asialo）糖鎖、ジグルクナック（DiGlcNAc）糖鎖、ジマンノース（

DiMan) 糖鎖、グルクナック (GlcNAc) 糖鎖、マルトトリオース (Maltotriose) 糖鎖、マルトース (Maltose) 糖鎖、マルトテトラオース (Maltotetraose) 糖鎖、マルトヘプタオース (Maltoheptaose) 糖鎖、 β -シクロデキストリン (β -cyclodextrin) 糖鎖、 γ -シクロデキストリン (γ -cyclodextrin) 糖鎖を用いることができる。

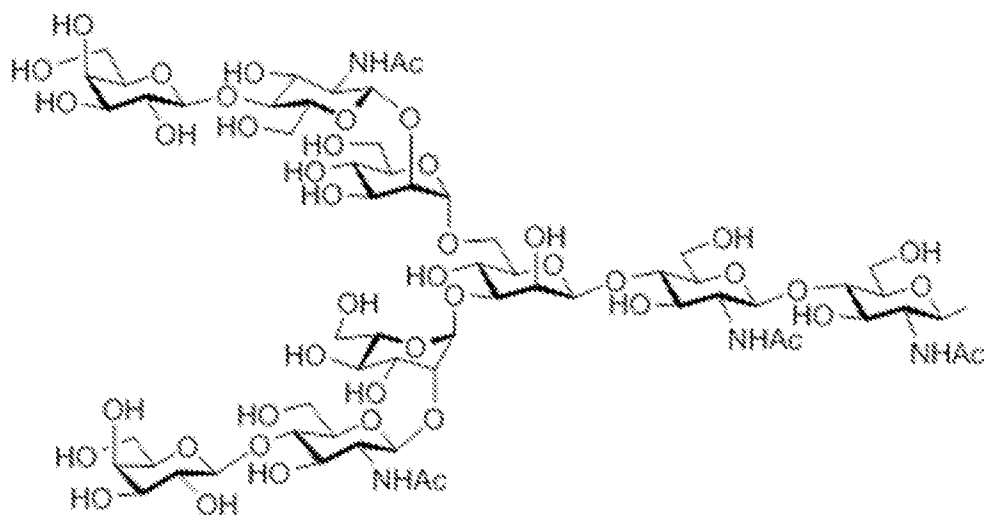
[0049] より具体的には、本発明に用いられる糖鎖は、以下の式 (1) で示すジシアロ糖鎖であってよく、以下の式 (2) で示すアシアロ糖鎖であってよく、以下の式 (3) で示すジグルクナック糖鎖であってよく、以下の式 (4) で示すジマンノース糖鎖であってよく、以下の式 (5) で示すグルクナック糖鎖であってよく、以下の式 (6) で示すマルトトリオース糖鎖であってよく、以下の式 (7) で示すマルトース糖鎖であってよく、以下の式 (8) で示すマルトテトラオース糖鎖であってよく、以下の式 (9) で示すマルトヘプタオース糖鎖であってよく、以下の式 (10) で示す β -シクロデキストリン糖鎖であってよく、以下の式 (10-2) で示す γ -シクロデキストリン糖鎖であってよい。

[化1]



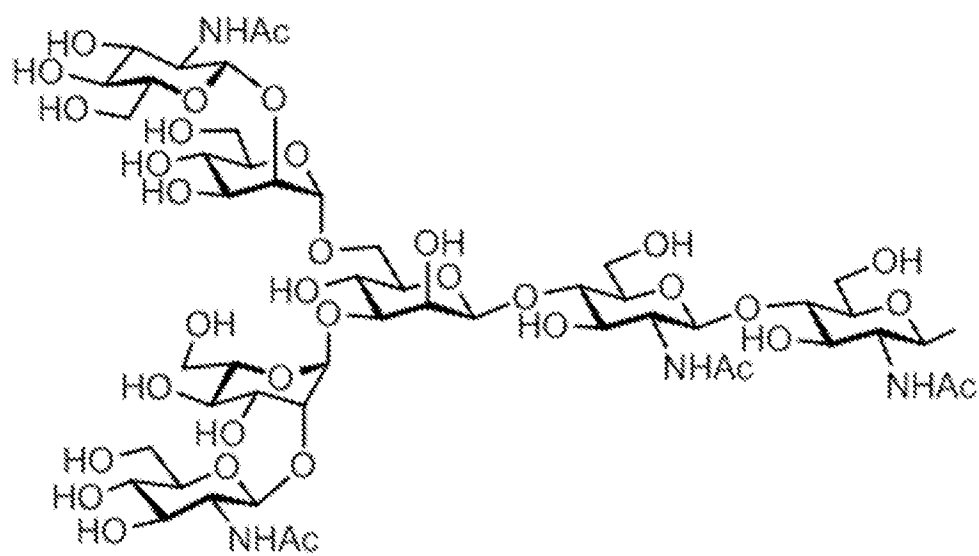
式 (1) ジシアロ糖鎖

[化2]



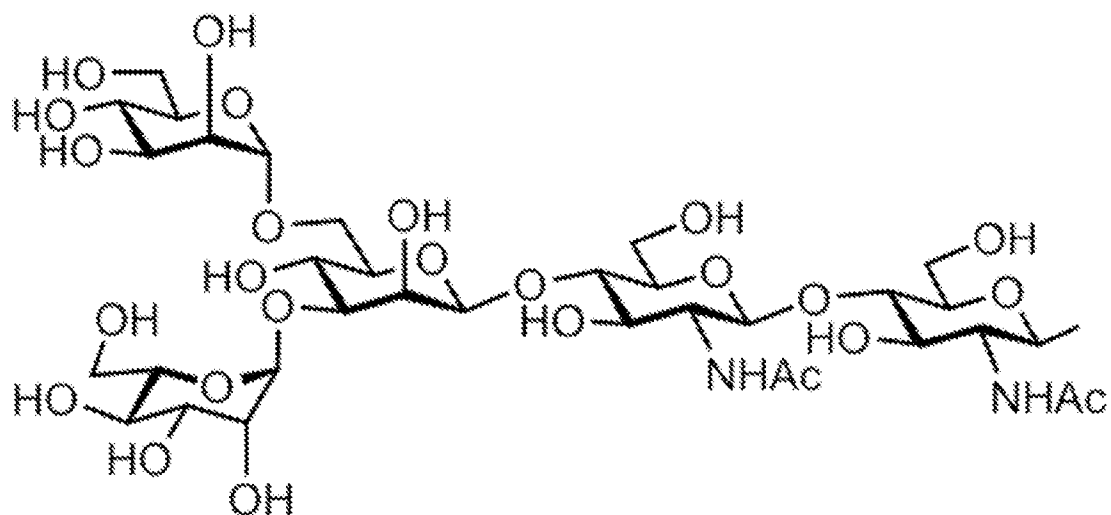
式（２） アシアロ糖鎖

[化3]



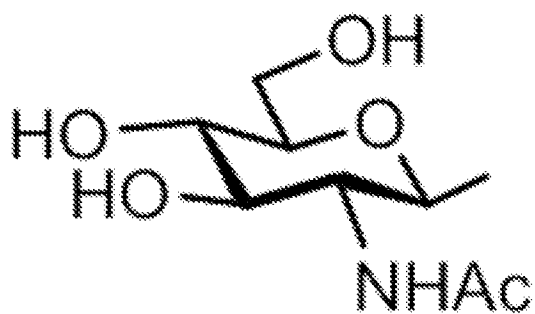
式（３）ジグルクナック糖鎖

[化4]



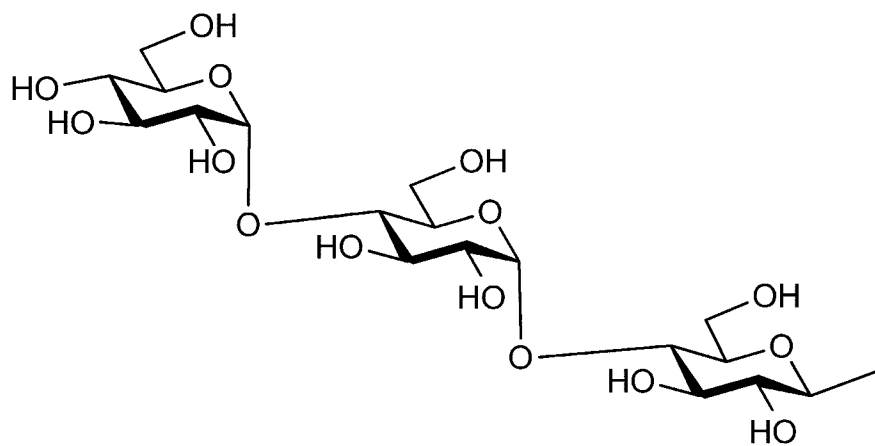
式（４）ジマンノース糖鎖

[化5]



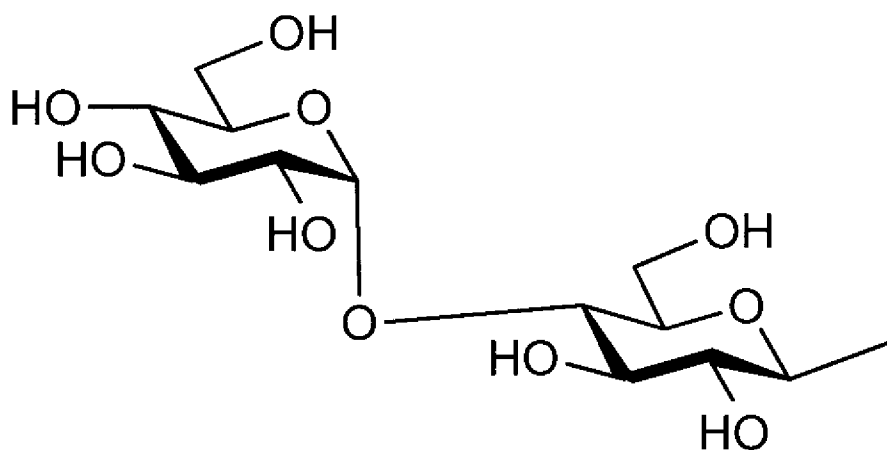
式（５）グルクナック糖鎖

[化6]



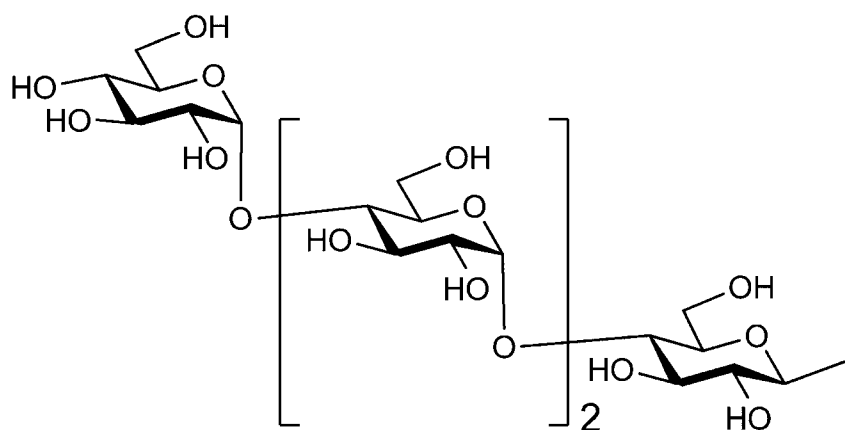
式（６）マルトリオース糖鎖

[化7]



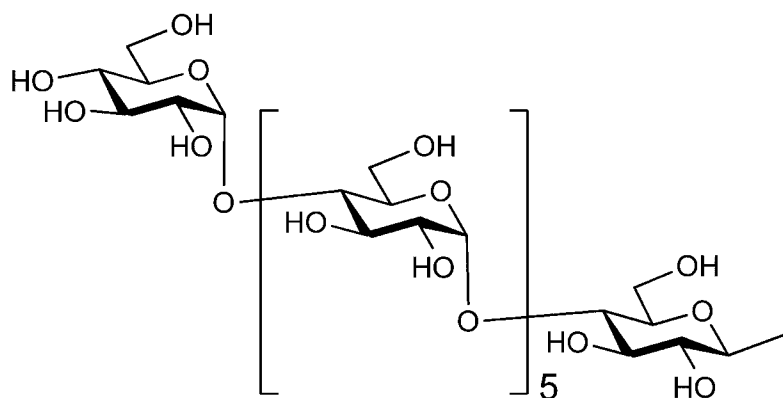
式（7）マルトース糖鎖

[化8]



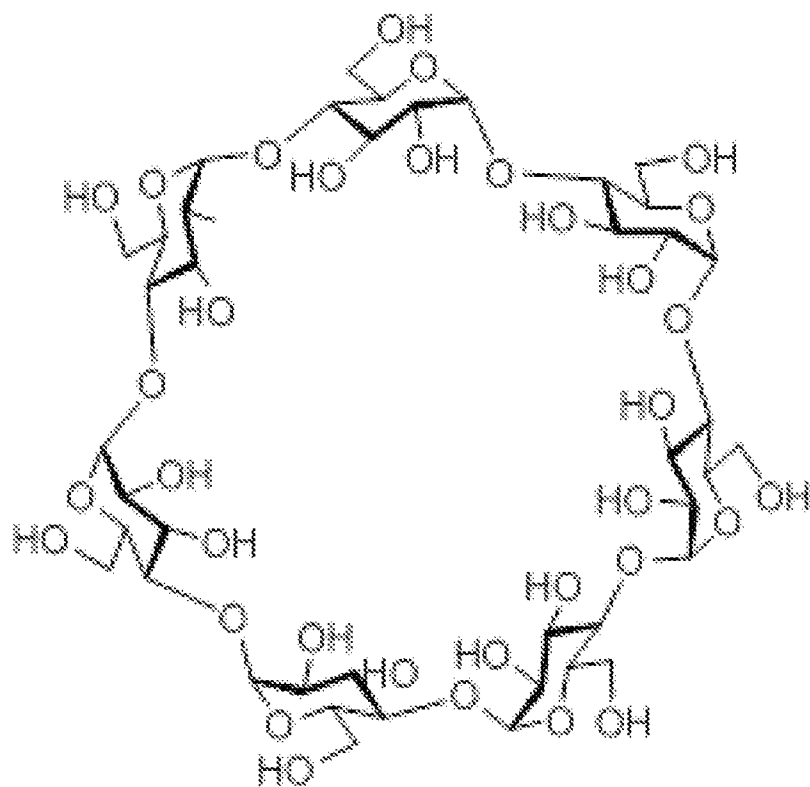
式（8）マルトテトラオース糖鎖

[化9]



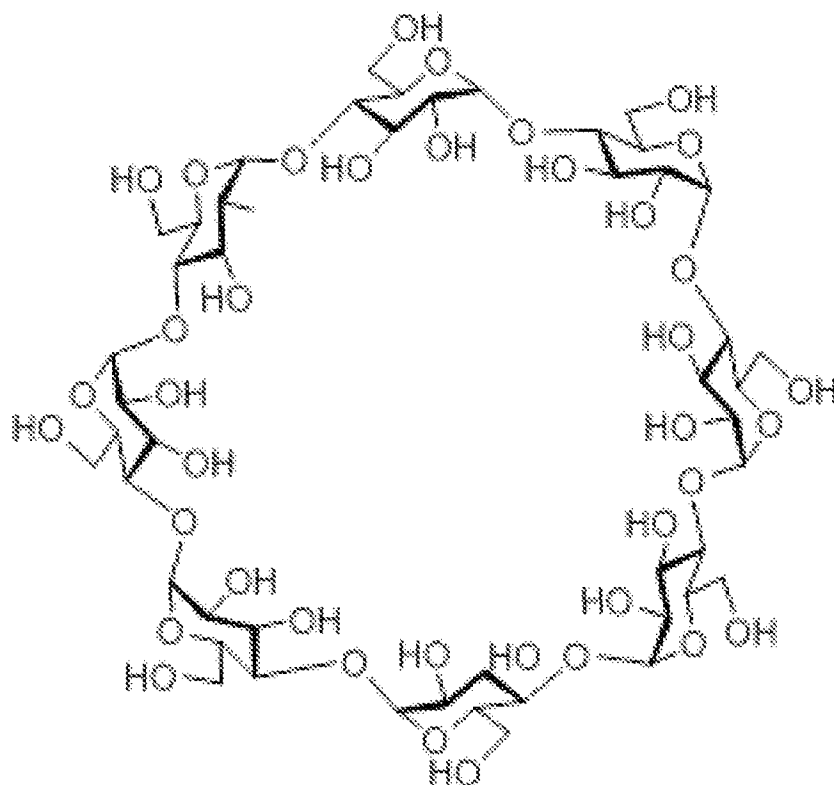
式（９） マルトヘプタオース糖鎖

[化10]



式（１０） β -シクロデキストリン糖鎖

[化11]

式（10-2） γ -シクロデキストリン糖鎖

[0050] 本発明において、上記のジシアロ糖鎖、アシアロ糖鎖、ジグルクナック糖鎖、ジマンノース糖鎖、またはマルトヘプタオース糖鎖の非還元末端から1または複数の糖を失った糖鎖も用いることができる。

[0051] 本発明において、糖鎖が結合されるアミノ酸残基は特に限定されないが、例えば糖鎖をシステイン（Cys : C）またはアスパラギン（Asn : N）に結合させることができ、好ましくはシステイン（Cys : C）に結合させることができる。

[0052] 本発明において、アミノ酸に糖鎖を結合させる方法は特に限定されず、例えば、アミノ酸残基に糖鎖を直接結合してもよく、アミノ酸残基にリンカーを介して糖鎖を結合させてもよい。

[0053] また、本発明において、糖鎖が結合したアミノ酸残基は、「極性アミノ酸残基と非極性アミノ酸残基が交互に配置されたアミノ酸配列」に対して直接結合していてもよく、例えば、リンカーを介して結合していてもよい。

[0054] このようなリンカーとしては、例えば、アミノ酸とペプチド結合できるように、両末端にアミノ基およびカルボキシ基を有するアルキル鎖やPEG鎖等を挙げることができる。このようなリンカーとしては、例えば、 $-NH-(CH_2)_n-CO-$ （式中、 n は整数であり、目的とするリンカー機能を阻害しない限り限定されるものではないが、好ましくは1～15の整数を示す。）や $-NH-(CH_2CH_2O)_m-CH_2CH_2-CO-$ （式中、 m は整数であり、目的とするリンカー機能を阻害しない限り限定されるものではないが、好ましくは1～7の整数を示す。）等を挙げることができる。より具体的には、 $-NH-(CH_2)_{11}-CO-(C12linker)$ や $-NH-(CH_2CH_2O)_3-CH_2CH_2-CO-(PEGlinker)$ 等を挙げることができる。

[0055] 本発明の糖鎖-ポリペプチド複合体は、当業者に公知のポリペプチド合成方法に、糖鎖付加工程を組み込むことで製造することができる。糖鎖付加に際しては、トランスグルタミナーゼに代表される、酵素を利用する方法も用いることができるが、この場合、付加する糖鎖が大量に必要な、最終工程後の精製が煩雑になる、糖鎖の付加位置および付加可能な糖鎖が制限される、等の問題があるため、アッセイ用等の少量の合成には用いることが可能でも、大規模な製造には実用的な方法とは言えないことがある。

[0056] 本発明の糖鎖-ポリペプチド複合体の簡便な製造方法の具体例として、以下、糖鎖が結合したAsn（糖鎖付加Asn）を使用し、固相合成、液相合成等の公知のペプチド合成方法を適用することにより糖鎖-ポリペプチド複合体を製造する方法（A法）、および、任意のアミノ酸残基をCysとしたポリペプチドを公知のペプチド合成方法に従って製造し、その後、Cysに化学合成により糖鎖を付加し、糖鎖-ポリペプチド複合体を製造する方法（B法）を例示する。これらの製造方法を参考に、当業者であれば様々な方法で糖鎖-ポリペプチド複合体を製造することが可能である。

[0057] また、これらのA法およびB法は、2つ以上を組み合わせることも可能である。アッセイなどに用いる少量の合成であれば、さらに、上記の方法

に、転移酵素による糖鎖伸長反応を組み合わせることも可能である。なお、A法は、国際公開第2004/005330号パンフレット（US2005222382（A1））に、B法は、国際公開第2005/010053号パンフレット（US2007060543（A1））に、それぞれ記載されており、その開示は全体として本明細書に参照により組み込まれる。また、A法およびB法において用いられる糖鎖構造が均一な糖鎖の製造に関しては、国際公開第03/008431号パンフレット（US2004181054（A1））、国際公開第2004/058984号パンフレット（US2006228784（A1））、国際公開第2004/058824号パンフレット（US2006009421（A1））、国際公開第2004/070046号パンフレット（US2006205039（A1））、国際公開第2007/011055号パンフレット等に記載されており、その開示は全体として本明細書に参照により組み込まれる。

[0058] 糖鎖ーポリペプチド複合体を製造する方法（A法）

糖鎖ーポリペプチド複合体は、例えば、以下に概略を示すように、糖鎖が結合したAsnを用いた固相合成によって製造することができる。

（1）脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシ基を樹脂（レジン）へ結合させる。この場合、アミノ酸のアミノ基窒素を脂溶性保護基で保護しているので、アミノ酸同士の自己縮合は防止され、レジンとアミノ酸とが反応して結合が起こる。

（2）得られた反応物の脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる。

（3）この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された任意のアミノ酸のカルボキシ基とを、アミド化反応させる。

（4）上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる。

（5）上記（3）および（4）の工程を1回以上繰り返すことにより、任意の数の任意のアミノ酸が連結した、末端にレジンを結合し、他端に遊離アミノ基を有するペプチドが得られる。

(6) 上記 (5) で合成したペプチドの遊離アミノ基をアセチル基で保護する場合、無水酢酸、酢酸等を用いてアセチル化することも好ましい。

(7) 最後に、酸でレジン切断することにより、所望のアミノ酸配列を有するペプチドを得ることができる。

[0059] ここで、(1) において、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸の代わりに、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖付加 A s n を用い、当該アスパラギン部分のカルボキシ基とレジンの水酸基とを反応させれば、C末端に糖鎖付加 A s n を有するペプチドを得ることができる。

[0060] また、(2) の後、または、(3) と (4) を 1 回以上の任意の回数繰り返した後、(3) において、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸の代わりに、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖付加 A s n を用いければ、ポリペプチドの任意の箇所に糖鎖を結合させることができる。

[0061] このように、(1) および (3) のいずれかの工程で、2 回以上、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸の代わりに、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された糖鎖付加 A s n を用いることで、ポリペプチドの任意の 2 ヶ所以上に糖鎖を結合させることができる。

[0062] 糖鎖付加 A s n を結合させた後、脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させ、その直後に工程 (7) を行えば、N末端に糖鎖付加 A s n を有するポリペプチドを得ることができる。

[0063] C末端をアミド基として供給する樹脂 (レジン) としては、通常、固相合成で使用する樹脂 (レジン) であればよく、例えば、アミノ基で官能化された R i n k - A m i d e - レジン (メルク社製)、R i n k - A m i d e - P E G A レジン (メルク社製) や、N H - S A L - レジン (渡辺化学社製) を用いることが好ましい。また、アミノ基で官能化された A m i n o - P E G A - レジン (メルク社製) 等に F m o c - N H - S A L - レジン - リンカー (渡辺化学社製) 等を結合させてもよい。このレジンとペプチドを酸で切断することにより、ペプチドのC末端アミノ酸をアミド化することができる。

[0064] また、C末端をカルボン酸にする場合の樹脂（レジン）としては、例えば

、塩素で官能化された2-クロロトリチルクロリド樹脂（メルク社製）や、アミノ基で官能化されたAmionoperegaling（メルク社製）、水酸基を有するNovasyn TGTPアルコール樹脂（メルク社製）、Wanaling（メルク社製）、HMPA-peregaling（メルク社製）等を用いることができる。また、Amionoperegalingとアミノ酸との間にリンカーを存在させてもよく、このようなリンカーとして、例えば、4-ヒドロキシメチルフェノキシ酢酸（HMPA）、4-（4-ヒドロキシメチルフェノキシフェノキシ）-ブチル酢酸（HMPB）等を挙げることができる。C末端のアミノ酸が樹脂にあらかじめ結合したH-Cys（Trt）-Trityl Novapeg樹脂（メルク社製）等も用いることができる。

樹脂と脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸との結合は、例えば、水酸基を有する樹脂や塩素で官能化された樹脂を使用するには、アミノ酸のカルボキシ基を樹脂へエステル結合させる。また、アミノ基で官能化された樹脂を使用する場合には、アミノ酸のカルボキシ基を樹脂にアミド結合により結合させる。なお、2-クロロトリチルクロリド樹脂は、固相合成においてペプチド鎖を伸長する際、末端にあるCysのラセミ化を防止することができる点において、好ましい。

[0065] 糖鎖-ポリペプチド複合体を製造する方法-2（A法）

糖鎖-ポリペプチド複合体は、例えば、以下に概略を示すように、糖鎖が結合したAsnを用いた液相合成によって製造することができる。
（1）脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたアミノ酸のカルボキシ基をアミノ基が遊離でカルボキシ基が保護またはアミド化されたアミノ酸へ結合させる。

（2）得られた反応物の脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる。

(3) この遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された任意

のアミノ酸のカルボキシ基とを、溶液中でアミド化反応させる。この場合、

N末端側のアミノ酸のアミノ基窒素を脂溶性保護基で保護しており、C末端

側のカルボキシ基は保護またはアミド化されているので、アミノ酸同士の間

に縮合は防止され、遊離のアミノ基とカルボキシ基とが反応して結合が起

る。

(4) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる。

(5) 上記(3)および(4)の工程を1回以上繰り返し行うことにより、任意

の数の任意のアミノ酸が連結した、C末端のカルボキシ基が保護またはアミ

ド化され、N末端に遊離アミノ基を有するペプチドが得られる。

(6) 上記(5)で合成したペプチドの遊離アミノ基をアセチル基で保護す

る場合、無水酢酸、酢酸等を用いてアセチル化することも好ましい。

(7) 最後に、酸で側鎖の脂溶性保護基を切断することにより、所望のアミ

ノ酸配列を有するペプチドを得ることができる。

[0066] 糖鎖-ポリペプチド複合体を製造する方法-3 (A法)

糖鎖-ポリペプチド複合体は、例えば、以下に概略を示すように、糖鎖が

結合したAsnを用いたフラグメント合成法によって製造することができる

。

(1) 上記の糖鎖-ポリペプチド複合体を製造する方法 (A法) の(1) -

(6) によって、アセチル基または脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護され

たポリペプチドまたは糖鎖-ポリペプチド複合体を樹脂上に合成する。

(2) 側鎖保護基が脱保護されない条件で、レジソからポリペプチドまたは

糖鎖-ポリペプチド複合体を切断し、C末端に遊離のカルボキシを有し、N

末端がアセチル基または脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護されたポリペ

チドまたは糖鎖-ポリペプチド複合体を得る。

(3) 得られたアセチル基または脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された

ポリペプチドまたは糖鎖-ポリペプチド複合体を、固相合成法または液相合

成法により、樹脂またはポリペプチドと連結させる。

(4) 上記脂溶性保護基を脱離して遊離アミノ基を形成させる。

(5) 上記(3)および(4)の工程を1回以上繰り返すことにより、任意の数の任意のアミノ酸が連結したペプチドが得られる。

(6) 最後に、酸でレジン切断することにより、所望のアミノ酸配列を有するペプチドを得ることができる。

[0067] 脂溶性保護基としては、例えば9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)基、t-ブチルオキシカルボニル(Boc)基、ベンジル基、アリル基、アリルオキシカルボニル基、アセチル基等の、カーボネート系またはアミド系の保護基等を挙げることができる。アミノ酸に脂溶性保護基を導入するには、例えばFmoc基を導入する場合には9-フルオレニルメチルーN-スクシニミジルカーボネートと炭酸水素ナトリウムを加えて反応を行うことにより導入できる。反応は0～50℃、好ましくは室温で、約1～5時間程度行うのが良い。

[0068] 脂溶性保護基で保護したアミノ酸としては、市販のものも使用することができる。例えば、Fmoc-Ser-OH、Fmoc-Asn-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Tyr-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys-OH、Fmoc-Arg-OH、Fmoc-His-OH、Fmoc-Asp-OH、Fmoc-Glu-OH、Fmoc-Gln-OH、Fmoc-Thr-OH、Fmoc-Cys-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Trp-OH、Fmoc-Pro-OHを挙げることができる。

[0069] また、脂溶性保護基で保護したアミノ酸であって、側鎖に保護基を導入したものとして、例えば、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Cys(Acm)-OH、Fmoc-Cys(StBu)-OH、Fmoc-Cys(tBu)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmo

c-His (Trt) -OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Ser (tBu) -OH、Fmoc-Thr (tBu) -OH、Fmoc-Trp (Boc) -OH、Fmoc-Tyr (tBu) -OHを挙げることができる。

[0070] また、糖鎖-ポリペプチド結合体のアミノ酸配列中に、リンカーを付加させたい場合には、固相合成の過程において、上記の脂溶性保護基で保護したアミノ酸の代わりに、脂溶性保護基で保護したリンカーを使用することで、好ましい位置に、リンカーを挿入することができる。

[0071] 2-クロロトリチルクロリド樹脂を用いる場合、ジイソプロピルエチルアミン (DIEA)、トリエチルアミン、ピリジン、2, 4, 6-コリジン等の塩基を用いることでエステル化を行うことができる。また、水酸基を有する樹脂を用いる場合、エステル化触媒として、例えば1-メシチレンスルホニル-3-ニトロ-1, 2, 4-トリアゾール (MSNT)、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド (DIC) 等の公知の脱水縮合剤を用いることができる。アミノ酸と脱水縮合剤との使用割合は、前者1等量に対して、後者が、通常1~10等量、好ましくは2~5等量である。

[0072] エステル化反応は、例えば、固相カラムにレジンを入れ、このレジンを溶剤で洗浄し、その後アミノ酸の溶液を加えることにより行うのが好ましい。洗浄用溶剤としては、例えばジメチルホルムアミド (DMF)、2-プロパノール、ジクロロメタン等を挙げることができる。アミノ酸を溶解する溶媒としては、例えばジメチルスルホキシド (DMSO)、DMF、ジクロロメタン等を挙げることができる。エステル化反応は0~50℃、好ましくは室温で、約10分~30時間程度、好ましくは15分~24時間程度行うのが良い。

[0073] この時固相上の未反応の基を、無水酢酸等を用いてアセチル化してキャッピングすることも好ましい。

[0074] 脂溶性保護基の脱離は、例えば塩基で処理することにより行うことができ

る。塩基としては、例えばピリジン、モルホリン等を挙げることができる。その際、溶媒の存在下で行うのが好ましい。溶媒としては、例えばDMSO、DMF、メタノール等を挙げることができる。

[0075] 遊離アミノ基と、脂溶性保護基でアミノ基窒素が保護された任意のアミノ酸のカルボキシ基とのアミド化反応は、活性化剤および溶媒の存在下行うのが好ましい。

[0076] 活性化剤としては、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)

、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・塩酸塩(WSC/HCI)、ジフェニルホルミルアジド(DPPA)、カルボニルジイミダザール(CDI)、ジエチルシアノホスホネート(DEPC)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリスピロジノホスホニウム、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリスピロジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(PyBOP)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(BOAT)、ヒドロキシブタリイミド(HOPht)、ベンゾフルオロフェノール(Pfp-OH)、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,3,3-チオトリスフルウロヘキサフルオロホスフェート(HBTU)、1-[ピス(ジメチルアミノ)メチレン]-5-クロロ-1H-ベンゾトリアゾリウム3-オキシドヘキサフルオロホスフェート(HCTU)、0-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,3,3-チオトリスフルウロヘキサフルオロホスフェート、0-ベンゾトリアゾール-1-イル-1,1,3,3-チオトリスフルウロニウムチラフルオロボレート(TBTU)、3,4-ジヒドロ-3-ヒドロジ-4-オキサ-1,2,3-ベンゾトリアジン(Dhbt)、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルフォリニウムクロライドn-ハイトレート(DMT-MM)等を挙げておける。

[0077] 活性化剤の使用量は、脂溶性の保護基でアミノ基窒素が保護された任意のアミノ酸に対して、1～20当量、好ましくは1～10当量、さらに好ましくは、1～5当量とするのが好ましい。

[0078] 溶媒としては、例えばDMSO、DMF、ジクロロメタン等を挙げることができる。反応は0～50℃、好ましくは室温で、約10分～30時間程度、好ましくは15分～24時間程度行うのが良い。脂溶性保護基の脱離は、上記と同様に行うことができる。

[0079] アミノ基で官能化されたRink-Amideレジン（メルク社製）、Rink-Amide-PEGレジン（メルク社製）、NH-SALレジン（渡辺化学社製）や、NH-SALレジン—リンカーが結合したAmino-PEGレジン（メルク社製）等にC末端のアミノ酸を導入する場合、上記のアミド化反応を用いて導入することができる。

[0080] 樹脂（レジン）からペプチド鎖を切断するには酸で処理するのが好ましい。酸としては、例えばトリフルオロ酢酸（TFA）、弗化水素（HF）等を挙げることができる。

[0081] このようにして、所望の位置に糖鎖付加Asnを有する糖鎖—ポリペプチド複合体を得ることができる。

[0082] なお、本発明の一実施態様において、固相合成に用いる糖鎖付加Asnにおける糖鎖上の非還元末端にシアル酸を含む場合には、酸処理によりシアル酸が切断されるのを防ぐために、当該シアル酸のカルボキシ基を、保護基により保護していることが好ましい。保護基としては、例えば、ベンジル基、アリル基、ジフェニルメチル基、フェナシル基等を挙げることができる。保護基の導入および保護基の脱離の方法は、公知の方法により行うことができる。

[0083] 糖鎖—ポリペプチド複合体を製造する方法（B法）

糖鎖—ポリペプチド複合体は、まずポリペプチドを合成し、後で合成したポリペプチドへ糖鎖を付加する方法によっても製造することができる。具体的には、糖鎖を付加したい位置にCysを含むポリペプチドを、固相合成法

、液相合成法、細胞により合成する方法、天然に存在するものを分離抽出する方法等により製造する。ポリペプチドを固相合成法または液相合成法により合成する場合、アミノ酸は一残基ずつ連結させても良く、ポリペプチドを連結させてもよい。ここで、ジスルフィド結合を形成する予定の位置にあるCys等、糖鎖を付加しないCysに対しては、例えばアセトアミドメチル（AcM）基で保護しておく。また、糖鎖を付加せず、かつ、ジスルフィド結合の形成にも使用しないCysを糖鎖-ポリペプチド複合体に導入する場合には、糖鎖付加工程およびジスルフィド結合形成工程の間、Cysを保護基により保護しておき、その後脱保護するようにしてCysを導入することができる。このような保護基としては、例えば、tert-ブチル（tBu）や4-メトキシベンジルを挙げることができる。

[0084] また、1つのポリペプチド中のCysに、異なる糖鎖を付加する場合には、最初に糖鎖を導入するCysを無保護とし、次に異なる糖鎖を導入するCysを、StBu等により保護しておくことで、異なる糖鎖を導入することができる。具体的には、固相合成等によりポリペプチドを合成する際、第一の糖鎖を導入したいCysを無保護とし、かつ、第二の糖鎖を導入したいCysをFmoc-Cys（StBu）-OH等を用いて、保護基を有するCysとする。その後、StBu等の保護基を保持したまま、無保護のCysへ糖鎖を導入する。次に、StBu基等を脱保護することで、無保護となったCysへ異なる糖鎖を導入することができる。なお、第一の糖鎖を導入したいCysおよび第二の糖鎖を導入したいCysは、1つ又は複数個とすることができる。

[0085] なお、StBu基の脱保護は、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩（TCEP）、ジチオトレイトール（DTT）、トリブチルホスフィン等の還元剤を用いて反応させることにより脱保護することができる。上記反応は、通常0～80℃、好ましくは、5～60℃、更に好ましくは10～35℃で行うのが良い。反応時間は、好ましくは、通常30分～5時間程度である。反応終了後は、適宜、公知の方法（例えば、高速液体カラムクロマト

グラフィー（HPLC）で精製するのが良い。

[0086] 異なる糖鎖を導入する際には、Cysの脱保護工程における還元条件やHPLC等の精製工程における酸性条件に対して、より安定な糖鎖から導入することが好ましい。特に、シアル酸含有糖鎖を導入する際には、シアル酸を有さない糖鎖又はシアル酸残基数が少ない糖鎖から、先に導入することが好ましい。

[0087] また、糖鎖-ポリペプチド複合体のアミノ酸配列中に、リンカーを付加させたい場合には、例えば固相合成の過程において、脂溶性保護基で保護したアミノ酸の代わりに、脂溶性保護基で保護したリンカーを使用することで、合成したポリペプチドの好ましい位置に、リンカーを挿入することができる。

[0088] 次に、ハロアセチル化糖鎖誘導体を上記で得た無保護のCysを含むペプチドと反応させることにより、糖鎖を無保護のCysのチオール基と反応させ、ペプチドに結合させる。上記反応は、リン酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液、クエン酸緩衝液、またはこれらの混合溶液中において、通常0～80℃、好ましくは、10～60℃、更に好ましくは15～35℃で行うのが良い。反応時間は、通常10分～24時間、好ましくは、通常30分～5時間程度である。反応終了後は、適宜、公知の方法（例えば、HPLC）で精製するのが良い。

[0089] ハロアセチル化糖鎖誘導体は、例えば、アスパラギン結合型糖鎖の1位の炭素に結合している水酸基を、 $-NH-(CH_2)_a-(CO)-CH_2X$ （Xはハロゲン原子、aは整数であり、目的とするリンカー機能を阻害しない限り限定されるものではないが、好ましくは0～4の整数を示す。）で置換した化合物である。

[0090] 具体的には、ハロアセチル化複合型糖鎖誘導体とCys含有ポリペプチドとをリン酸緩衝液中、室温で反応させる。反応終了後、HPLCで精製することにより糖鎖が結合したCysを有する糖鎖-ポリペプチド複合体を得ることができる。

- [0091] また、DMSO、DMF、メタノール、アセトニトリルといった有機溶媒と、上記の緩衝液との混合溶液中で反応を行うこともできる。このとき、有機溶媒の比率は、0～99%（v/v）の範囲で、上記緩衝液に添加することができる。緩衝液への溶解性が低い無保護のCysを含むペプチドは、このような有機溶媒を添加することにより反応溶液への溶解性を向上させることができ、好ましい。
- [0092] または、DMSO、DMF、メタノール、アセトニトリルといった有機溶媒や、それらの混合溶液中で反応を行うこともできる。その際、塩基の存在下で行うのが好ましい。塩基としては、例えばDIEA、トリエチルアミン、ピリジン、2, 4, 6-コリジン等を挙げることができる。また、グアニジン塩酸塩や尿素を緩衝溶液に加えた混合溶液中においても反応を行うことができる。なお、グアニジン塩酸塩や尿素は、最終濃度が1M～8Mとなるように上記緩衝液に加えることができる。グアニジン塩酸塩や尿素の添加によっても、緩衝液への溶解性の低いペプチドの溶解性を向上させることができ、好ましい。
- [0093] さらに、無保護のCysを含むポリペプチドが、ジスルフィド結合を介した2量体を形成することを防止するために、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩（TCEP）やジチオトレイトール（DTT）を緩衝液に添加して反応させることもできる。TCEPやDTTは、最終濃度が10μM～10mMとなるように緩衝液に加えることができる。
- [0094] また、糖鎖を目的のCysへ結合させた後、AcM等で保護されたCysの保護基を脱保護する。保護基がAcM基である場合は、水、メタノール、酢酸、またはこれらの混合溶液中において、ヨウ素、酢酸水銀（II）、硝酸銀（I）、または、酢酸銀（I）等を用いて反応させることにより脱保護することができる。
- [0095] 上記反応は、通常0～80℃、好ましくは、5～60℃、更に好ましくは10～35℃で行うのが良い。反応時間は、好ましくは、通常5分～24時間程度である。反応終了後は、DTTや塩酸等により処理した後、適宜、公

知の方法（例えば、HPLC）で精製するのが良い。

[0096] このようにして、所望の位置に糖鎖が結合したCysを有する糖鎖－ポリペプチド複合体を得ることができる。また、このように精製された糖鎖－ポリペプチド複合体は、後述するように、脱保護されたCys同士でのジスルフィド結合を形成させることができる。

[0097] また、ジシアロ糖鎖やモノシアロ糖鎖等のシアル酸含有糖鎖をペプチド配列中に複数本有する糖鎖－ポリペプチド複合体を製造する際には、導入する糖鎖上のシアル酸のカルボキシ基が、ベンジル（Bn）基、アリル基、ジフェニルメチル基、フェナシル基等により保護されたシアル酸含有糖鎖を用いることができる。

[0098] シアル酸のカルボキシ基が保護された糖鎖を導入した際には、後述する糖鎖－ポリペプチド複合体におけるジスルフィド結合の形成工程の後、シアル酸保護基の脱保護の工程をすることができる。

[0099] このように、シアル酸のカルボキシ基をベンジル基等で保護することにより、製造工程におけるHPLC等による分離・精製工程が容易となる。また、シアル酸のカルボキシ基の保護は、酸に不安定なシアル酸の脱離を防ぐことも可能である。

[0100] 糖鎖上のシアル酸のカルボキシ基の保護反応は、当業者に周知の方法により行うことができる。また、ジスルフィド結合を形成させた糖鎖－ポリペプチド複合体において、シアル酸のカルボキシ基の保護基は、塩基性条件下で加水分解することによって脱保護できる。上記反応は、通常0～50℃、好ましくは、0～40℃、更に好ましくは0～30℃で行うのが良い。反応時間は、好ましくは、通常5分～5時間程度である。反応終了後は、リン酸や酢酸などの弱酸によって中和した後、適宜、公知の方法（例えば、HPLC）で精製するのが良い。

[0101] また、上記A法およびB法により作製された糖鎖－ポリペプチド複合体は、空気および／または酸素、ヨウ素、DMSO、酸化および還元されたグルタチオンの混合物、フェリシアン酸カリウム、エルマン試薬（5，5'－ジ

チオピス（2-ニトロ安息香酸）、トリフルオロ酢酸タリウム（III）、な
らびに、アルキルトリクロロシリルホキシドなどを用いた当業者に周知
の方法で、Cys同士のジスルフィド結合を形成することができる。

[0102] なお、Cys-Cys間でのジスルフィド結合を形成させる際に、ジスル
フィド結合することが望ましくない糖鎖-ポリペプチド複合体中のCysに
対しては、保護基により保護しておく。このような保護基としては、Ac
、tBu、4-メトキシベンジル、4-メチルベンジル等、酸化条件で安定
な保護基を用いることができる。

[0103] また、B法において、ジスルフィド結合の形成は、糖鎖の導入に行う
ことも可能である。ただし、ジスルフィド結合させたいCysに保護基が導
入されている場合には、脱保護の工程がジスルフィド結合形成の工程よりも
先となる。

また、B法においてハロアセチル化複合型糖鎖誘導体と反応させるアミノ
酸は、チオール基を含有するアミノ酸であれば特に限定されず、例えば、D
体のシステイン（D-Cys）、ホモシステイン、ノルシステイン、ペニシ
ラミンなどもCysと同様に用いることが可能である。

[0104] 本発明に係る糖鎖-ポリペプチド複合体に結合する糖鎖の種類は特に限定
されないが、糖鎖-ポリペプチド複合体に結合している糖鎖に存在する糖残
基の数の合計が5以上であることが好ましい。例えば、5糖以上の糖鎖を1
本以上付加してもよく、5糖以下の糖鎖を複数本付加することにより、1つ
の糖鎖-ポリペプチド複合体に付加された糖鎖に存在する糖残基の数が5以
上になるようにしてもよい。糖鎖を複数本付加する場合には、1つのペプチ
ドに結合される糖鎖の種類は同一であってもよく、異なる種類の糖鎖を組み
合わせて結合してもよいが、同一であることが好ましい。

[0105] 例えば、糖鎖-ポリペプチド複合体に結合している糖鎖に存在する糖残基
の数の合計が5の場合、2つの糖残基を有するアルトース糖鎖と、3つの糖
残基を有するアルトトリオース糖鎖がそれぞれ1本ずつ結合していてもよい
。また、糖鎖-ポリペプチド複合体に結合している糖鎖に存在する糖残基の

数の合計が6の場合、マルトース糖鎖が3本結合されていてもよく、マルトリオース糖鎖が2本結合されていてもよい。また、糖鎖-ポリペプチド複合体に結合している糖鎖に存在する糖残基の数の合計が7の場合、マルトース糖鎖が2本およびマルトリオース糖鎖が1本結合されていてもよく、7つの糖残基を有するジグルクナック糖鎖が1本結合されていてもよい。同様に、糖鎖-ポリペプチド複合体に結合している糖鎖に存在する糖残基の数の合計が8以上の場合においても、様々な組み合わせの糖鎖が結合されていてもよい。

[0106] 本発明に係る糖鎖-ポリペプチド複合体に結合する糖鎖の数は、糖鎖-ポリペプチド複合体が、pHが中性付近の水溶液中において自己集合することにより、 β シート構造を形成するという特徴を失わない限り限定されない。例えば、1、2、3、4、5、または、6本であってよく、好ましくは、1、2、または、3本であってよい。

[0107] 本発明に係る糖鎖-ポリペプチド複合体において、糖鎖が結合するアミノ酸残基の位置は、糖鎖-ポリペプチド複合体が、pHが中性付近の水溶液中において自己集合することにより、 β シート構造を形成するという特徴を失わない限り限定されない。例えば、糖鎖が結合するアミノ酸残基の位置はポリペプチドのN末端側および／またはC末端側であってよく、N末端側およびC末端側以外の位置であってもよい。

[0108] 好ましくは、ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基から数えて、 x 番目までの全てのアミノ酸、および、C末端に位置するアミノ酸残基から数えて、 y 番目までの全てのアミノ酸（ここで、 x および y は整数であり、 $x \geq 0$ であり、 $y \geq 0$ であり、 $x + y$ は、ポリペプチドに結合している糖鎖の数の合計である）に糖鎖が結合されていてもよい。

[0109] より具体的には、ポリペプチドに結合している糖鎖の数が1本の場合には、当該1本の糖鎖は、前記ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基、または、C末端に位置するアミノ酸残基と結合してもよい。

[0110] また、ポリペプチドに結合している糖鎖の数が2本の場合には、当該2本

の糖鎖は、次の（１）～（３）からなる群から選択されるアミノ酸残基と結合していてもよい。

（１）ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基から数えて１番目および２番目のアミノ酸残基

（２）ポリペプチドのC末端に位置するアミノ酸残基から数えて１番目および２番目のアミノ酸残基

（３）ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基、および、前記ポリペプチドのC末端に位置するアミノ酸残基

[0111] また、ポリペプチドに結合している糖鎖の数が３本の場合には、当該３本の糖鎖は、次の（１）～（４）からなる群から選択されるいずれかのアミノ酸残基と結合していてもよい。

（１）ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基から数えて１番目、２番目、および、３番目のアミノ酸残基

（２）ポリペプチドのC末端に位置するアミノ酸残基から数えて１番目、２番目、および、３番目のアミノ酸残基

（３）ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基から数えて１番目および２番目のアミノ酸残基、ならびに、ポリペプチドのC末端に位置するアミノ酸残基

（４）ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基、ならびに、ポリペプチドのC末端から数えて１番目および２番目に位置するアミノ酸残基

[0112] 本発明に係る糖鎖－ポリペプチド複合体に付加される糖鎖は、分岐を有していることが好ましい。ここで、本発明において、ポリペプチドに結合された糖鎖が「分岐を有する糖鎖」であるとは、例えば、ジシアロ糖鎖、アシアロ糖鎖、ジグルクナック糖鎖のように、１つの糖鎖の中で分岐を有している場合に限定されず、例えば、１つのポリペプチドに複数本の直鎖状の糖鎖が付加されることにより、ペプチド全体として糖鎖が分岐を有している状態にある場合も含まれる。例えば、１つのペプチドにマルトース糖鎖やマルトリオース糖鎖等の直鎖状の糖鎖が２本以上結合している場合も、本発明にお

いて「分岐を有する糖鎖」に含まれることとする。

[0113] 本発明において、ヒドロゲルとは、分散媒が実質的に水であるゲルを意味する。本発明に係るペプチドを水に分散させると、ヒドロゲルを形成するが、ペプチドと水との混合割合は特に限定されず、ヒドロゲルの用途に応じて当業者が適宜混合割合を調節することができる。例えば、本発明の一実施形態に係る、C(DiGlcNAc)-(RADA)₄を用いてヒドロゲルを製造する場合、ペプチド濃度が0.5重量%以上である場合には広範なpHでヒドロゲルを形成するが、ペプチド濃度が約0.25重量%である場合には、中性pHではヒドロゲルを形成し、酸性pHではヒドロゲルを形成しないことがある。このように、本発明に係るペプチドから製造されたヒドロゲルは、ペプチド濃度が低濃度である場合、pHによってヒドロゲル形成をコントロールすることができる。このような性質を利用して、例えば、ヒドロゲルの使用後にpHを変化させることにより、ゲルからゾルに変化させ、速やかに廃棄または排泄させることができる。

[0114] 本発明において、ヒドロゲルの強度や性質についての評価方法は特に限定されないが、例えば、スチール球載荷試験や動粘度度測定によって評価することができる。スチール球載荷試験では、例えば、ダーラム管内で形成させたヒドロゲルの表面に所定の重量のスチール球を載荷し、スチール球がヒドロゲルの表面に留まるか、沈むかを観察することによって、ヒドロゲルの強度を評価することができる。また、スチール球載荷試験では、ヒドロゲル中の透明度や、不溶物・沈殿の有無を目視で確認することができる。ヒドロゲルの動粘度度測定では、対象となるヒドロゲルについて、検流計を用いて動粘度を測定することにより、時間の経過にともなうヒドロゲルの強度の変化を測定することができる。

[0115] なお、本実施例においてヒドロゲルを評価する場合には、ヒドロゲルを形成させる操作の一つとして、激しい攪拌操作を含んでいる。このような激しい攪拌操作を行うことにより、均一性の高いゲルを形成させることができ、より信頼性の高い評価を行うことができる。

- [0116] 本発明に係るヒドロゲルは様々な用途に用いることができるが、例えば、本発明に係るヒドロゲルは生体に対して安全性が高いことから、医薬用途（止血基材、血管塞栓材等の手術補助剤、医薬品等の徐放担体、外科手術や再生医療等における創傷被覆材、粘膜隆起材、歯槽骨再建材、角膜再生材などの組織再建材、組織培養実験等における三次元培養基材）や化粧品用途（スキンケア用品、ヘアケア用品等）に用いることができる。特に好ましくは、止血基材、徐放担体、または、培養基材として用いることができる。
- [0117] 本発明において、止血基材とは、生体からの出血を止めるために用いられる基材を広く意味する。本発明に係る止血基材は、本発明に係る糖鎖ーポリペプチド複合体と水のみを含むものに限定されず、その他の様々な成分を含んでいてもよい。例えば、消毒・殺菌成分を有する薬剤を含むことにより、傷口からの出血を止めるだけでなく、同時に傷口の殺菌・消毒も行うことができる。
- [0118] 本発明において、徐放担体とは、内包した物質や薬剤が徐々に放出される性質を有する担体を広く意味する。本発明に係る徐放担体に内包する物質は特に限定されず、様々な物質や薬剤を内包することができる。また、本発明に係る徐放担体に内包する物質や薬剤は1種類に限定されず、2種類以上の物質や薬剤を同時に内包することができる。
- [0119] 本発明において、培養基材とは、細胞や組織の培養の際に用いられる基材を広く意味する。例えば、細胞培養用のディッシュを本発明に係る培養基材でコートし、細胞を培養することによって、細胞の接着性・成長性を向上させることができる。また、例えば、本発明に係る培養基材に細胞や組織を内包させて培養することにより、細胞や組織の効率的な3次元培養を行うことができる。
- [0120] 本発明において、粘膜隆起材とは、内視鏡手術による胃癌や食道癌等の粘膜切除手術や粘膜下層剥離手術において、病変部位の粘膜隆起を形成する膜下注入材を広く意味する。例えば、内視鏡などで病変部位を切除する際、病変部位の下部に本発明に係る組織隆起材を注入し切除部位を隆起させることに

より、病変部位の切除を容易に行うことができる。

[0121] 本発明において、血管塞栓材とは、動脈塞栓術において、塞栓物として用いるための血管内塞栓促進用補綴材を広く意味する。肝臓がんや子宮筋腫などにおける動脈塞栓術において、本発明に係る血管塞栓材を病変部の上流にある動脈内に注入すると、血液と接触することによってヒドロゲルが形成される。これにより腫瘍への栄養の供給路である動脈を塞ぎ、腫瘍を死滅させることができる。

[0122] 本発明において、組織再建材とは、再生医療において、生体内で組織を再建する際に足場となる材料を広く意味する。例えば、骨の再生において、本発明に係る組織再建材を注入すると、骨形成を行う細胞の足場となることができ、骨の再生を促進することを行うことができる。

[0123] なお、本明細書において用いられる用語は、特定の実施形態を説明するために用いられるのであり、発明を限定する意図ではない。

[0124] また、本明細書において用いられる「含む」との用語は、文脈上明らかに異なる理解をすべき場合を除き、記述された事項（部材、ステップ、要素、数字など）が存在することを意図するものであり、それ以外の事項（部材、ステップ、要素、数字など）が存在することを排除しない。

[0125] 異なる定義が無い限り、ここに用いられるすべての用語（技術用語及び科学用語を含む。）は、本発明が属する技術の当業者によって広く理解されるのと同じ意味を有する。ここに用いられる用語は、異なる定義が明示されていない限り、本明細書及び関連技術分野における意味と整合的な意味を有するものとして解釈されるべきであり、理想化され、又は、過度に形式的な意味において解釈されるべきではない。

[0126] 第一の、第二のなどの用語が種々の要素を表現するために用いられる場合があるが、これらの要素はそれらの用語によって限定されるべきではないことが理解される。これらの用語は一つの要素を他の要素と区別するためのみに用いられているのであり、例えば、第一の要素を第二の要素と記し、同様に、第二の要素は第一の要素と記すことは、本発明の範囲を逸脱することな

く可能である。

[0127] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、しかしながら、本発明はいろいろな形態により具現化することができ、ここに記載される実施例に限定されるものとして解釈されてはならない。

[0128] 本明細書において、例えば、Disialo-BrAcと示した場合には、ブromoアセチル化されたジシアロ糖鎖を示す。また、例えば、C(Disialo)-(RADA)4と示した場合には、RADARADARADARADAのアミノ酸配列を有するポリペプチドのN末端に、ジシアロ糖鎖が結合したシステイン残基が結合していることを示す。

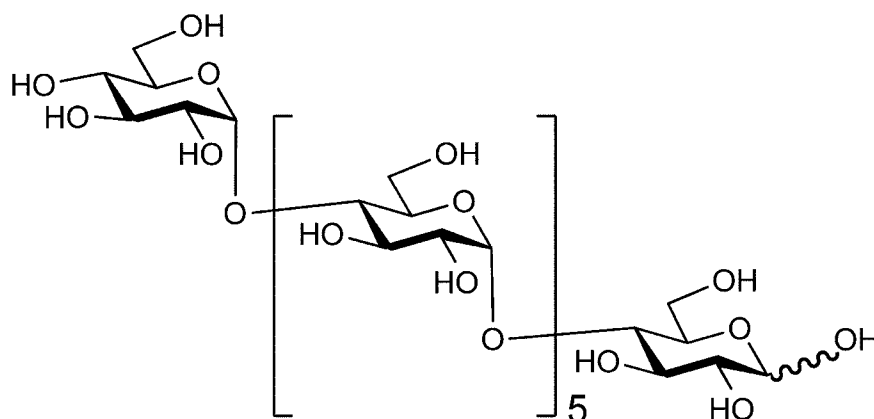
実施例

[0129] (合成例1) Maltoseptaose-BrAcの合成

(合成例1-1) アミノ化

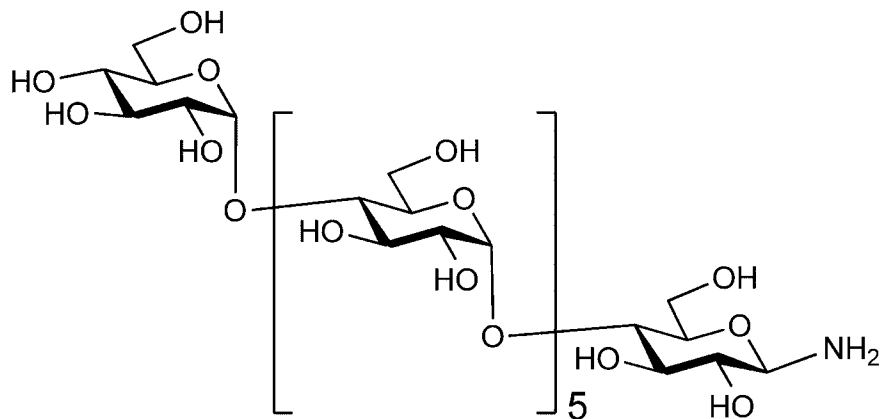
下記式(11)であらわされる化合物1(商品名: マルトヘプタオース、東京化成社製)(53.2mg、46.1 μ mol)を水(5mL)に溶解した。炭酸水素ナトリウム(3.6g)を溶液に加え、37 $^{\circ}$ Cに昇温後19時間撹拌した。水を加えた後、減圧条件下で濃縮を数回行った。再度水に溶解させ凍結乾燥し、下記式(12)であらわされる化合物2を含む凍結乾燥品を得た。

[化12]



式(11)

[化13]



式 (12)

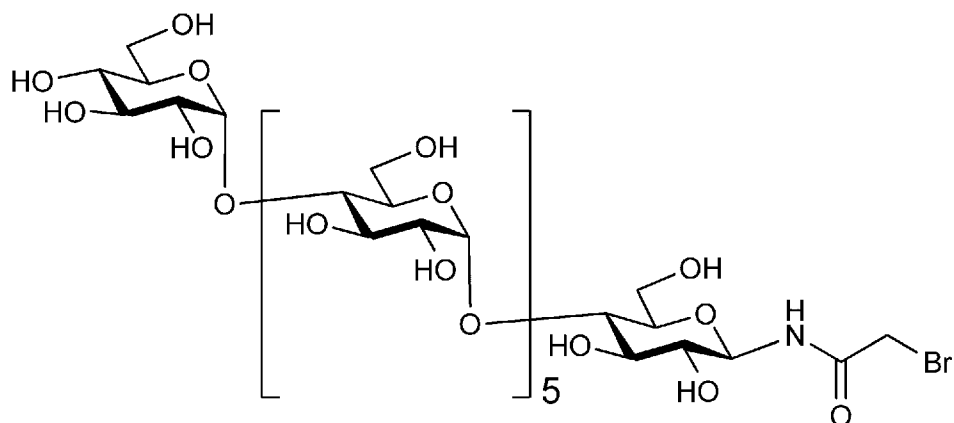
[0130] (合成例1-2) ブロモアセチル化

合成例1-1で得られた化合物2と炭酸ナトリウム(83.0mg、0.92mmol、化合物2に対し20等量)を水に溶解し0℃に冷却した。ジクロロメタンに溶解したブロモアセチルブロミド(40.0μL、0.46mmol、化合物2に対し10等量)

をゆっくり滴下し、2時間攪拌した。ジクロロメタン及び水を用いて分相し、水槽に臭化水素酸を加えた。減圧条件下、水を一部濃縮した。

[0131] 反応溶液を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5μm)、φ20×250mm、流速: 7.0mL/分、展開溶媒 A: 水 B: アセトニトリル グラジエント A: B=99.5:0.5→90:10 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(13)で表わされる Maltose-BrA (26.7mg、20.9μmol、収率46%) を得た。

[化14]

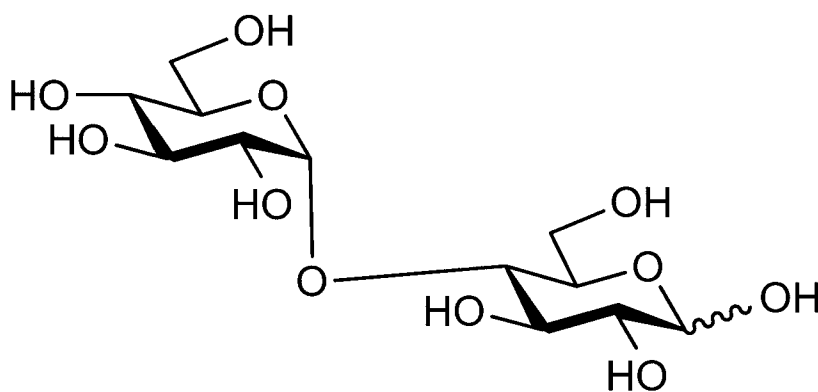


式 (13)

[0132] (合成例2) Maltose-BrAcの合成

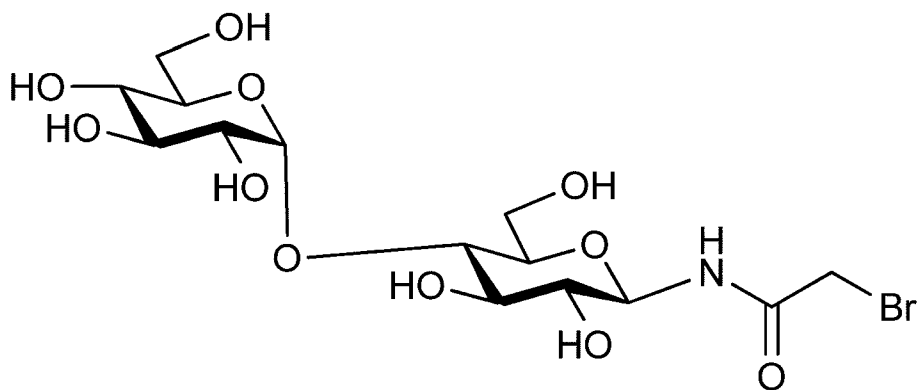
化合物1のかわりに、下記式(14)であらわされる化合物3(商品名: マルトース、東京化成社製)(200mg、0.58mmol)を用いた以外は合成例1と同様の手法で合成を行い、下記式(15)であらわされるMaltose-BrAc(179.1mg、収率67%)を得た。

[化15]



式 (14)

[化16]

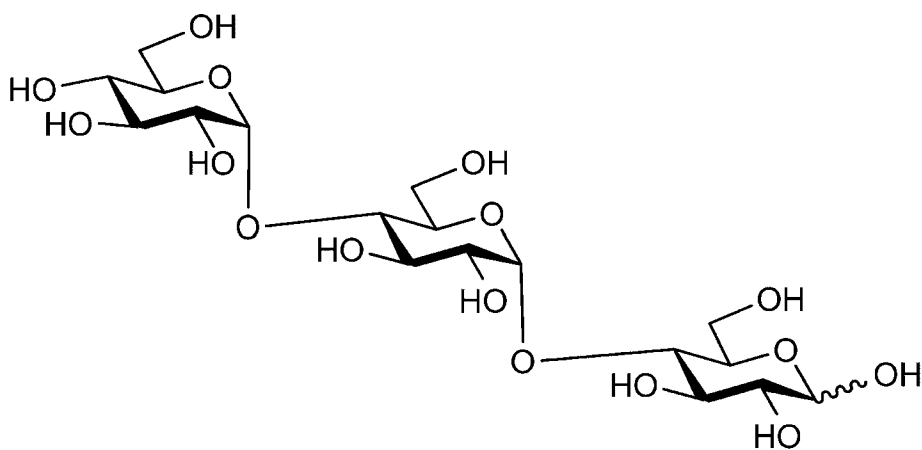


式 (15)

[0133] (合成例3) Maltotriose-BrAcの合成

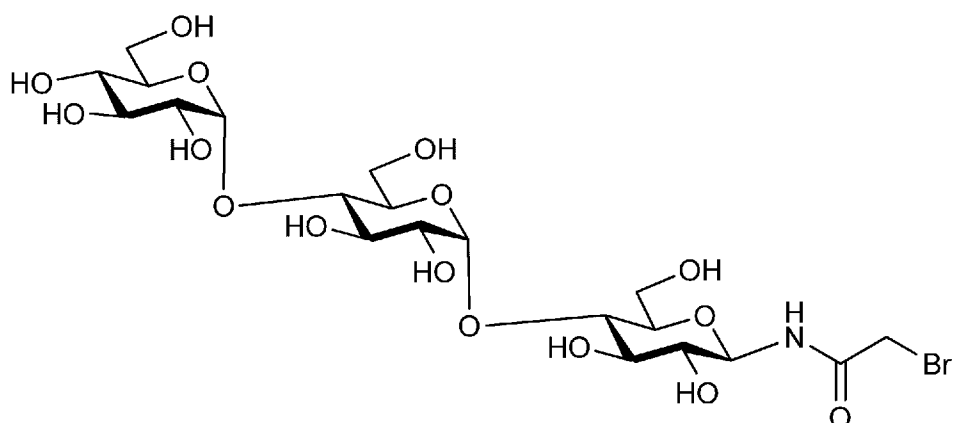
化合物1のかわりに、下記式(16)であらわされる化合物4(商品名: マルトトリオース、東京化成社製)(100mg、198.6 μmol)を用いた以外は合成例1と同様の手法で合成を行い、下記式(17)であらわされるMaltotriose-BrAc(58.2mg、収率47%)を得た。

[化17]



式 (16)

[化18]

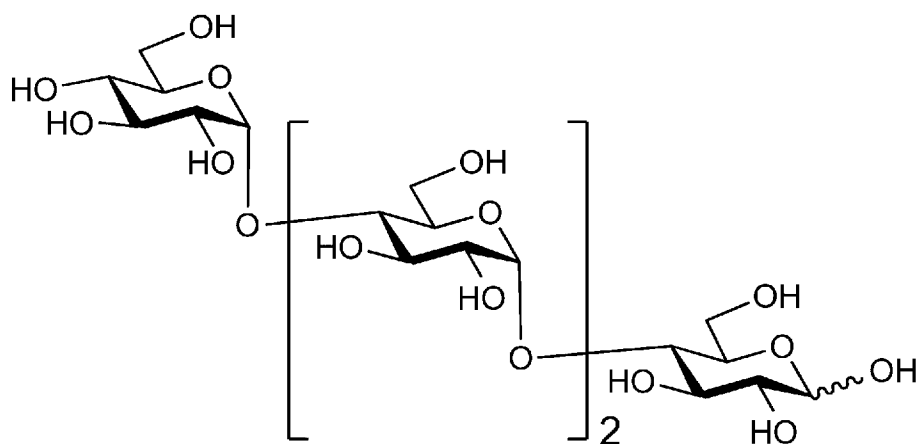


式 (17)

[0134] (合成例4) Maltotetraose-BrAcの合成

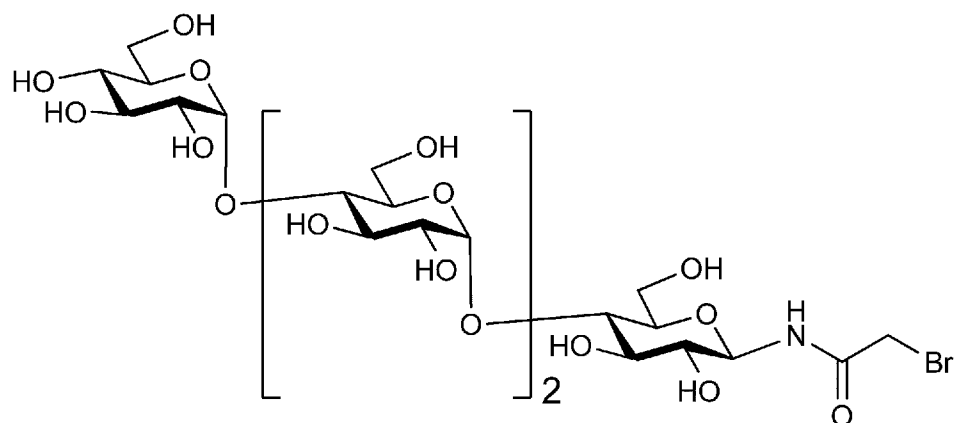
化合物1のかわりに、下記式(18)であらわされる化合物5(商品名: マルトテトラオース、東京化成社製)(200mg、0.2mmol)を用いた以外は合成例1と同様の手法で合成を行い、下記式(19)であらわされるMaltotetraose-BrAc(133.1mg、収率51%)を得た。

[化19]



式 (18)

[化20]

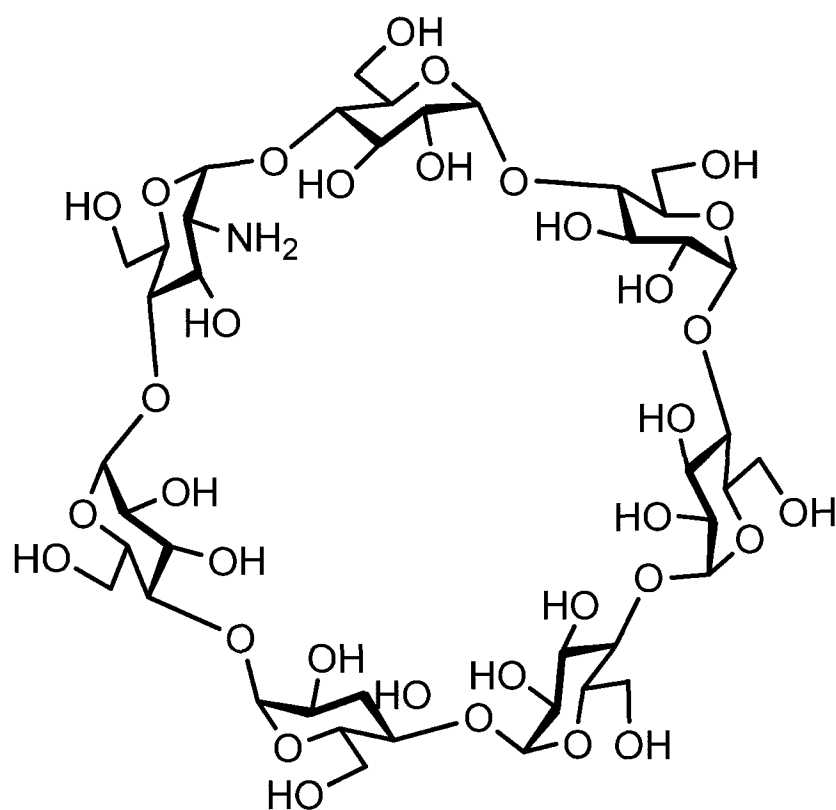


式 (19)

[0135] (合成例5) β -cyclodextrin-BrAcの合成

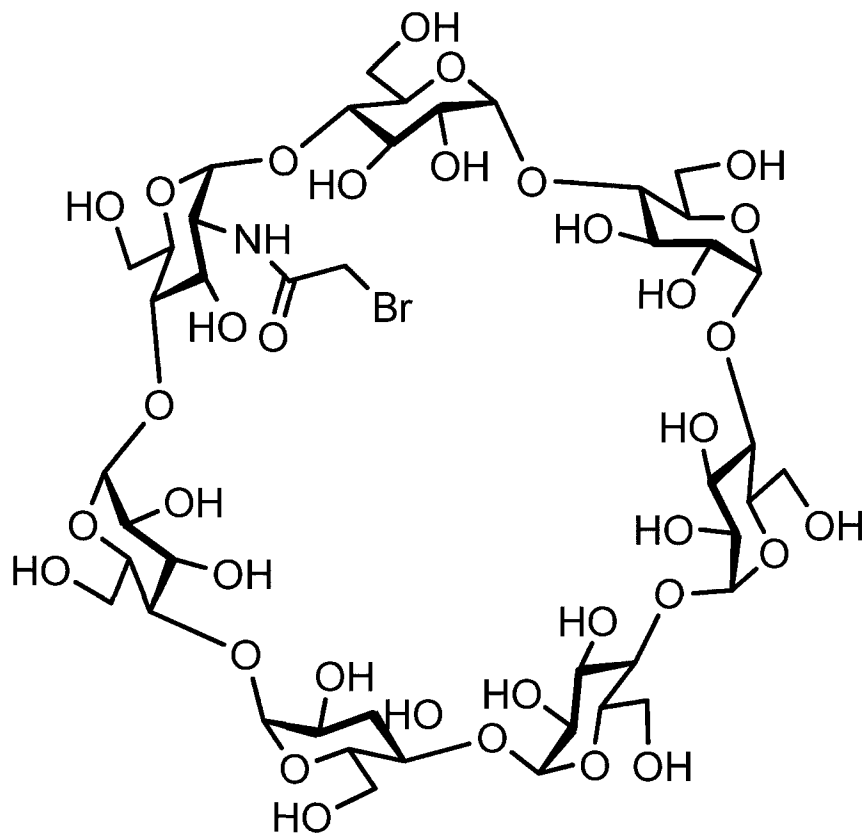
化合物1のかわりに、下記式(20)であらわされる化合物6(商品名: 3Aニアミノニ3Aーデオキシ-(2AS, 3AS)- β -シクロデキストリン水和物、東京化成社製)(101.5mg、89.5 μ mol)を用いた以外は合成例1-2と同様の手法で合成を行い、下記式(21)であらわされる β -cyclodextrin-BrAc(31.2mg、収率28%)を得た。

[化21]



式 (20)

[化22]

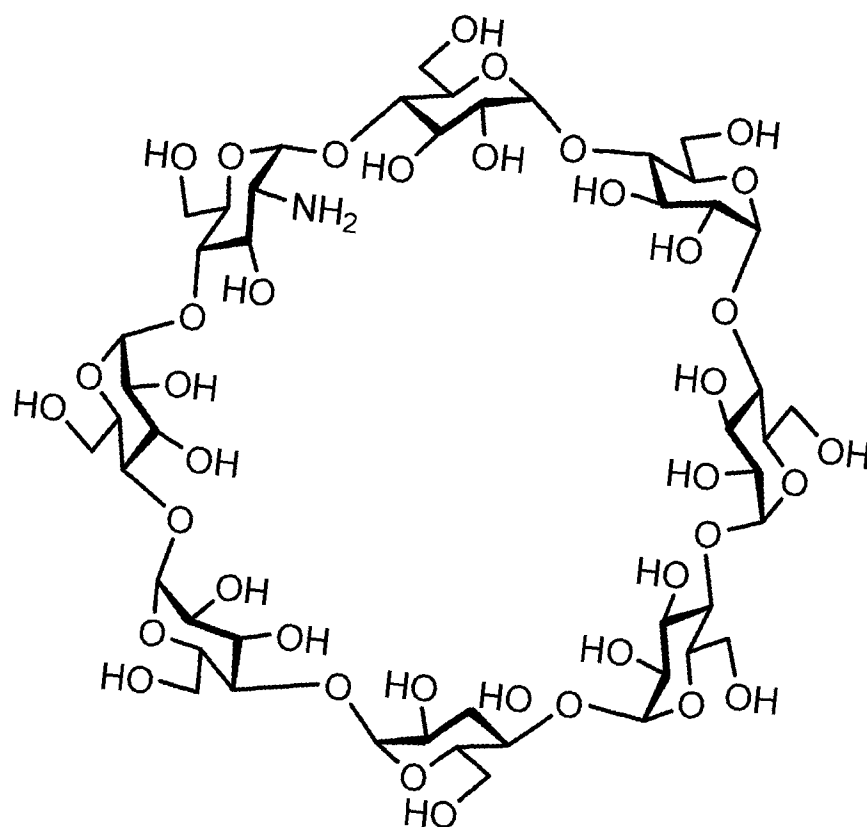


式 (21)

[0136] (合成例6) γ -cyclodextrin-BrAcの合成

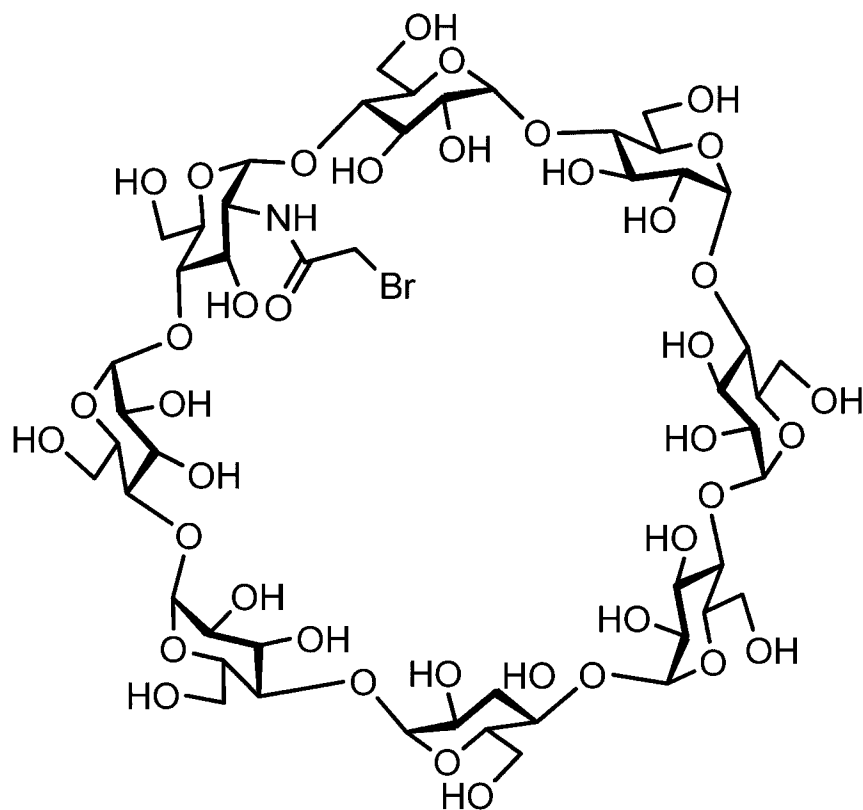
化合物1のかわりに、下記式(22)であらわされる化合物7(商品名: 3A-アミノ-3A-デオキシ-(2AS, 3AS)- γ -シクロデキストリン水和物、東京化成社製)(100.0mg、77.1 μ mol)を用いた以外は合成例1-2と同様の手法で合成を行い、下記式(23)であらわされる γ -cyclodextrin-BrAc(41.1mg、収率38%)を得た。

[化23]



式 (2 2)

[化24]

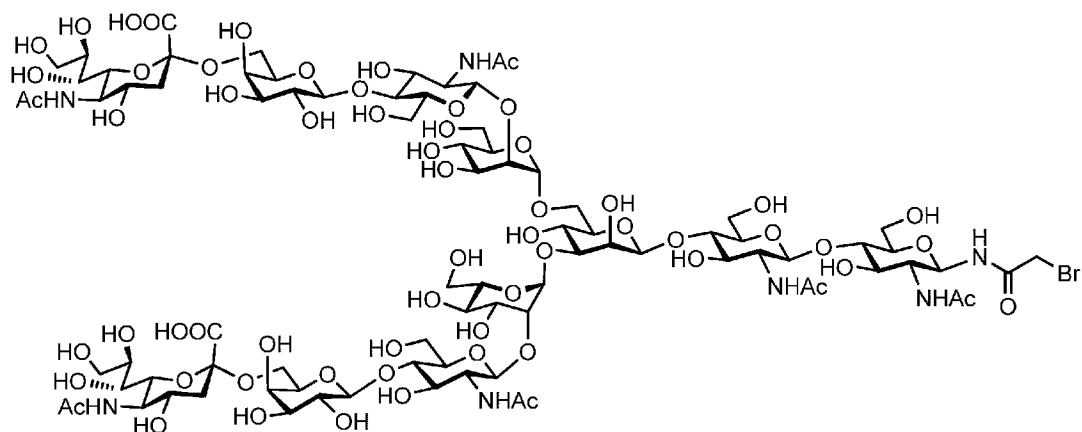


式 (23)

[0137] (合成例7) Disialo-BrAcの合成

WO2005/010053に記載の方法と同様の手法で合成を行い、下記式(25)であらわされるDisialo-BrAcを得た。

[化25]

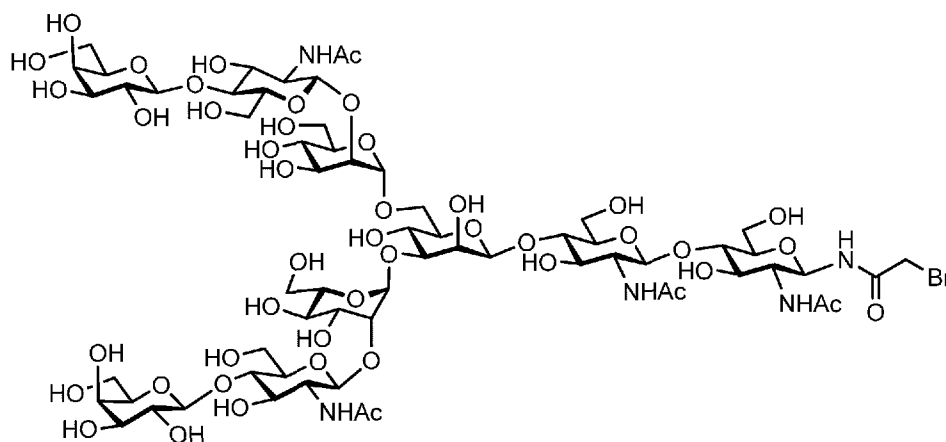


式 (25)

[0138] (合成例 8) A s i a l o - B r A c の合成

WO 2005 / 010053 に記載の方法と同様の手法で合成を行い、下記式 (27) であらわされる A s i a l o - B r A c を得た。

[化26]

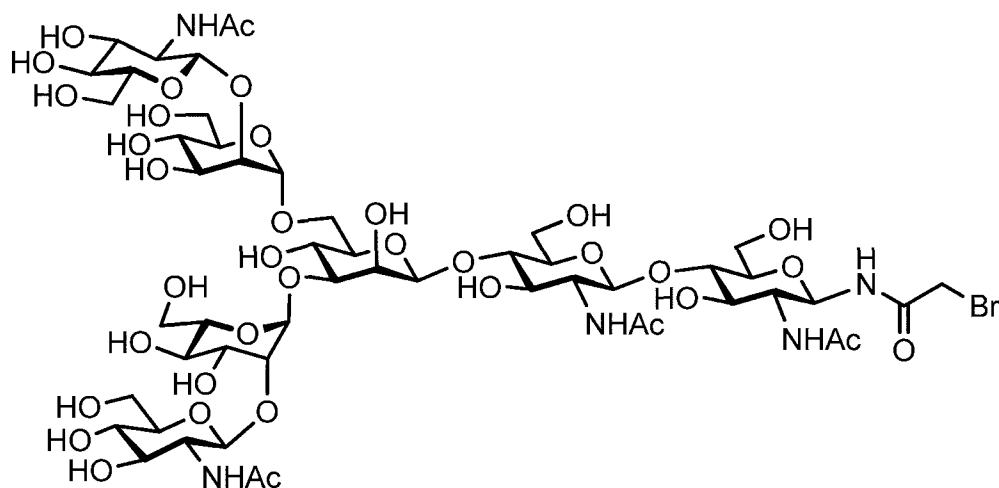


式 (27)

[0139] (合成例 9) D i G l c N A c - B r A c の合成

WO 2005 / 010053 に記載の方法と同様の手法で合成を行い、下記式 (29) であらわされる D i G l c N A c - B r A c を得た。

[化27]

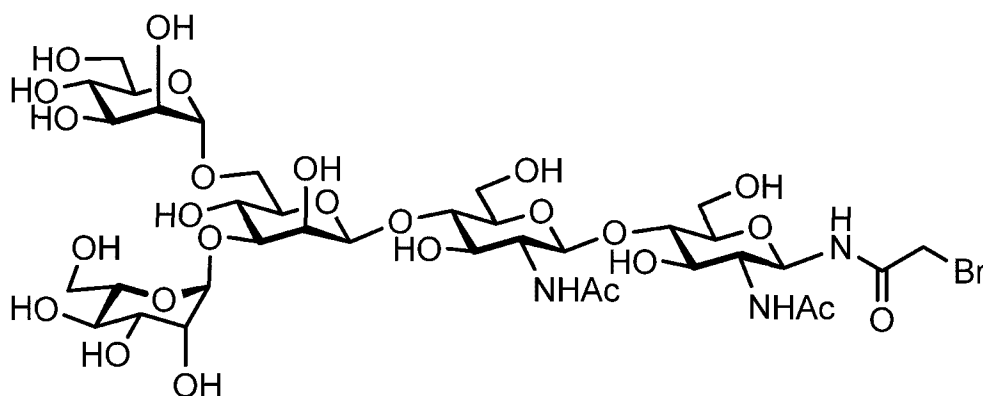


式 (29)

[0140] (合成例 10) DiMan-BrAcの合成

WO 2005/010053に記載の方法と同様の手法で合成を行い、下記式(31)であらわされるDiMan-BrAcを得た。

[化28]

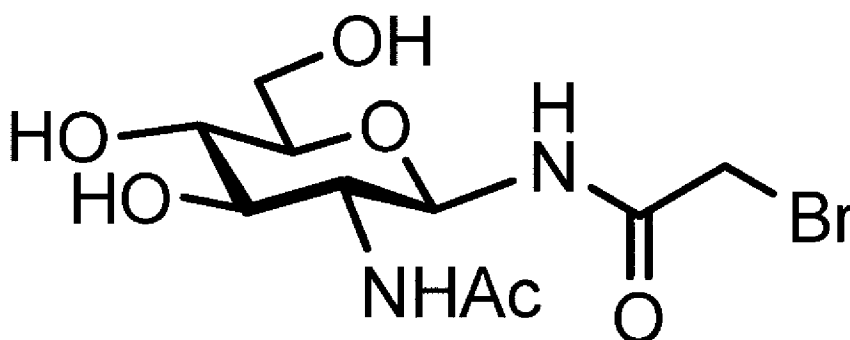


式(31)

[0141] (合成例 11) GlcNAc-BrAcの合成

WO 2005/010053に記載の方法と同様の手法で合成を行い、下記式(33)であらわされるGlcNAc-BrAcを得た。

[化29]



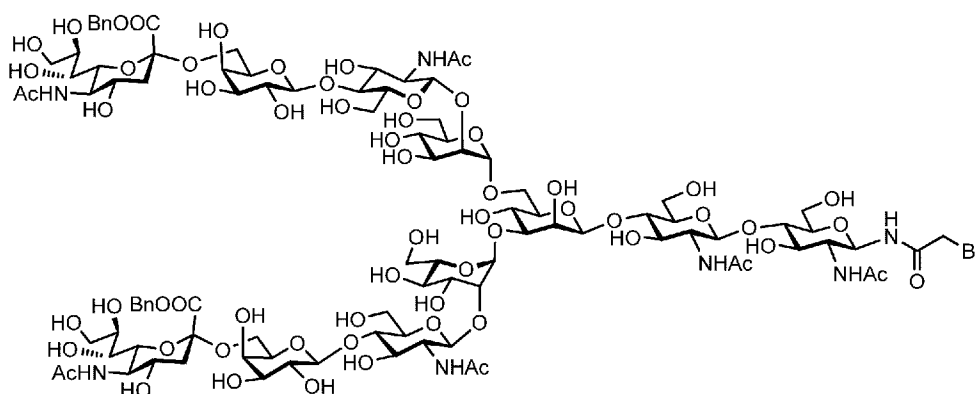
式(33)

[0142] (合成例 12) DiBn-Disialo-BrAcの合成

Disialo-BrAc (28.9 mg、12.3 μ mol) にDMF (0.58 mL)、臭化リチウム (21.5 mg、248 μ mol)、臭化ベンジル (14.6 μ L、122 μ mol) を順次加え、30℃で20時間

反応させた。臭化ベンジル（14.6 μ L、122 μ mol）をさらに添加して20時間反応させた。反応液にトルエン（30 mL）を加え、遠心分離（10,000 $\times$ g、10分間）の後、沈殿物を水（100 μ L）に溶解してHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（5 μ m）、 ϕ 20 $\times$ 250 mm、流速：8.0 mL/分、展開溶媒 水：アセトニトリル＝95：5 $\rightarrow$ 70：30 20分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式（35）で表されるDiBn-Disialo-BrAc（7.6 mg、収率24%）を得た。

[化30]



式（35）

MALDI-MS: (m/z) calcd for $C_{100}H_{152}BrN_7O_6$
 $_2$: $[M+Na]^+$ 2544.8, found 2544.4.

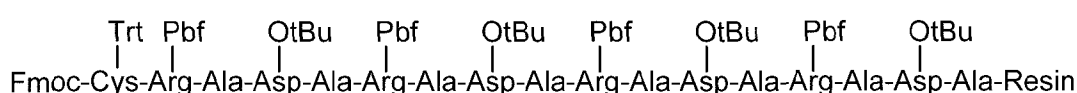
[0143] （合成例13）C（Disialo）-（RADA）4の合成

（合成例13-1）Ac-C（RADA）4-NH₂の合成

固相合成用カラムにRink amide PEGA樹脂（100 μ mol）を取り、DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Ala-OH（124.5 mg、400 μ mol）と1-ビスジメチルアミノメチレン-5-クロロ-1H-ベンゾトリアゾリウム 3-オキシドヘキサフルオロホスフェイト（HCTU）（157.2 mg、380 μ mol）とジイソプロピルエチルアミン（DIPEA）（104.5 μ L、600 μ mol）のDMF（2.5 mL）溶液を加え、15分間振盪した。ジクロロメタンおよ

びDMFで洗浄後、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、Prelude（商標）ペプチド合成機を用いて、Fmoc法によるペプチド固相合成法にて保護された下記式（36）で表わされる、樹脂に結合した状態にあるポリペプチド（配列番号4）を合成した。縮合反応は、縮合剤としてHCTUを使用してDMF中で行った。

[化31]



式（36）

[0144] Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、無水酢酸及びピリジンを加え1時間振盪した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、トリフルオロ酢酸（TFA）：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール（＝90：2.5：5：2.5）を加え、4時間室温で振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドの一部をHPLC〔カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（5μm）、φ20×250mm、流速：7.0mL／分、展開溶媒 A：0.1％TFA水 B：0.09％TFA／10％水／90％アセトニトリル、グラジエント A：B＝88：12→78：22％ 11分 直線濃度勾配溶出〕を用いて精製し、下記式（37）で表わされるポリペプチド（配列番号5）（32.7mg）を得た。

[化32]



式（37）

[0145] （合成例13-2）チオールの糖鎖修飾反応

合成例13-1に記載の方法で得られたポリペプチド（配列番号5）（2

0.5 mg、11.2 μ mol) と、合成例7で合成したDisialo-BrAc (66.0 mg、28.0 μ mol、ペプチド1に対して2.5等量) を33 μ MのTCEPおよび8Mグアニジン塩酸塩を含む0.2Mリン酸緩衝液 (pH 7.3、3.7 mL) に溶解し、室温で4時間反応させた。

[0146] 反応溶液を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20×250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=90:10→75:25 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(38)で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体 (配列番号6) (23.8 mg、5.83 μ mol、収率52%) を得た。

[化33]



式(38)

[0147] ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{121}\text{H}_{203}\text{N}_{35}\text{O}_{62}\text{S}$:
[M+2H]²⁺ 2040.5、[M+3H]³⁺ 1360.7、[M+4H]⁴⁺ 1020.7、found 2040.4、1360.6、1020.7。

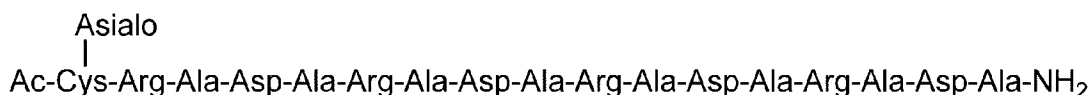
[0148] (合成例14) C(Asialo)-(RADA)4の合成

合成例13-1で合成したポリペプチド (配列番号5) (22.7 mg、12.5 μ mol) と、合成例8で合成したAsialo-BrAc (55.0 mg、31.2 μ mol、ペプチド1に対して2.5等量) を33 μ MのTCEPおよび8Mグアニジン塩酸塩を含む0.2Mリン酸緩衝液 (pH 7.3、4.7 mL) に溶解し、室温で3時間反応させた。

[0149] 反応溶液を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20×250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA/1

0%水／90%アセトニトリル グラジエント A : B = 90 : 10 → 75 : 25 18分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(39)で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体(配列番号7)(20.5mg、5.86 μmol、収率47%)を得た。

[化34]



式(39)

[0150] ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{133}\text{H}_{223}\text{N}_{35}\text{O}_{72}\text{S}$:
 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1749.2、 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1166.5、 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 875.1、found 1749.3、1166.2、874.9。

[0151] (合成例15) C(DiGlcNAc)-(RADA)4の合成

合成例13-1で合成したポリペプチド(配列番号5)(25.3mg、13.9 μmol)と、合成例9で合成したDiGlcNAc-BrAc(30.0mg、20.9 μmol、ペプチド1に対して1.5等量)を33 μMのTCEPおよび8Mグアニジン塩酸塩を含む0.2Mリン酸緩衝液(pH7.3、4.7mL)に溶解し、室温で3時間反応させた。

[0152] 反応溶液を、HPLC[カラム:SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120(5 μm)、φ20×250mm、流速:7.0mL/分、展開溶媒 A:0.1%TFA水 B:0.09%TFA/10%水／90%アセトニトリル グラジエント A:B=88:12→81:19 10分 直線濃度勾配溶出]を用いて精製し、下記式(40)で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体(配列番号8)(23.9mg、7.53 μmol、収率54%)を得た。

[化35]



式 (40)

[0153] ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{121}H_{203}N_{35}O_{62}S$:
 $[M+2H]^{2+}$ 1587.1, $[M+3H]^{3+}$ 1058.4, $[M+4H]^{4+}$ 794.0, found 1586.7, 1058.1, 793.8.

[0154] (合成例16) C(DiMan) - (RADA) 4の合成

合成例13-1で合成したポリペプチド(配列番号5)(15.2mg、 $8.37\mu\text{mol}$)と、合成例10で合成したDiMan-BrAc(21.5mg、 $20.9\mu\text{mol}$ 、ペプチド1に対して2.5等量)を $33\mu\text{M}$ のTCEPおよび8Mグアニジン塩酸塩を含む0.2Mリン酸緩衝液(pH 7.2、3.1mL)に溶解し、室温で2時間反応させた。

[0155] 反応溶液を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 ($5\mu\text{m}$)、 $\phi 20 \times 250\text{mm}$ 、流速: 7.0mL/分、展開溶媒 A: 0.1%TFA水 B: 0.09%TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=90:10→75:25 15分 直線濃度勾配溶出]を用いて精製し、下記式(41)で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体(配列番号9)(16.9mg、 $6.1\mu\text{mol}$ 、収率73%)を得た。

[化36]



式 (41)

[0156] ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{121}H_{203}N_{35}O_{62}S$:
 $[M+2H]^{2+}$ 1383.9, $[M+3H]^{3+}$ 922.9, $[M+4H]^{4+}$ 629.5, found 1383.6, 922.7, 629.3.

[0157] (合成例17) C(GlcNAc) - (RADA) 4の合成

合成例13-1で合成したポリペプチド(配列番号5)(14.9mg、 $8.21\mu\text{mol}$)と、合成例11で合成したGlcNAc-BrAc(5

、6 mg、16.4 μ mol、ペプチド1に対して2.0等量)を33 μ MのTCEPおよび8 Mグアニジン塩酸塩を含む0.2 Mリン酸緩衝液(pH 7.3、3.1 mL)に溶解し、室温で2時間反応させた。

[0158] 反応溶液を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20 x 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=95:5 $\rightarrow$ 5:95 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(42)で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体(配列番号10) (15.4 mg、7.42 μ mol、収率90%)を得た。

[化37]



式(42)

[0159] ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{79}\text{H}_{134}\text{N}_{32}\text{O}_{32}\text{S}$:
[M+2H]²⁺ 1039.1、[M+3H]³⁺ 693.1、[M+4H]⁴⁺ 520.0、found 1039.0、692.6、520.0。

[0160] (合成例18) C(Maltoheptaose)-(RADA)4の合成
合成例13-1で合成したポリペプチド(配列番号5) (9.3 mg、5.12 μ mol)と合成例1で合成したMaltoheptaose-BrAc (9.8 mg、7.68 μ mol、ペプチド1に対して1.5等量)を33 μ MのTCEPおよび8 Mグアニジン塩酸塩を含む0.2 Mリン酸緩衝液(pH 7.3、3.1 mL)に溶解し、室温で4時間反応させた。

[0161] 反応溶液を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20 x 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=88:12 $\rightarrow$ 72:28 16分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(43)で表

わされる糖鎖-ポリペプチド複合体（配列番号11）（5.1mg、1.70 μmol 、収率33%）を得た。

[化38]



式(43)

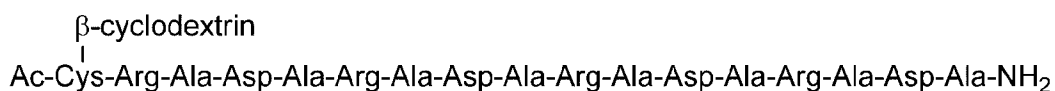
[0162] ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{113}\text{H}_{191}\text{N}_{31}\text{O}_{62}\text{S}$:
 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1505.0、 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1003.7、found 1504.6、1003.4。

[0163] （合成例19）C(β -cyclodextrin)-(RADA)4の合成

合成例13-1で合成したポリペプチド（配列番号5）（17.7mg、9.75 μmol ）と、合成例5で合成した β -cyclodextrin-BrAc（36.7mg、29.2 μmol 、ペプチド1に対して3.0等量）を33 μM のTCEPおよび8Mグアニジン塩酸塩を含む0.2Mリン酸緩衝液（pH7.3、3.3mL）に溶解し、室温で24時間反応させた。

[0164] 反応溶液を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、 $\phi 20 \times 250\text{mm}$ 、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=88:12 $\rightarrow$ 72:28 16分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(44)で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体（配列番号12）（6.8mg、2.27 μmol 、収率23%）を得た。

[化39]



式 (44)

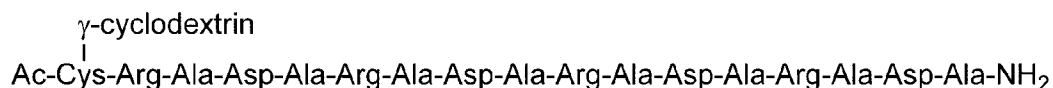
[0165] ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{113}H_{189}N_{31}O_{61}S$:
 $[M+2H]^{2+}$ 1496.0, $[M+3H]^{3+}$ 997.7, $[M+4H]^{4+}$ 748.5, found 1495.6, 997.7, 748.3。

[0166] (合成例20) C (γ -cyclodextrin) - (RADA) 4の合成

合成例13-1で合成したポリペプチド (配列番号5) (16.0mg、 $8.81\mu\text{mol}$) と、合成例6で合成した γ -cyclodextrin-BrAc (36.7mg、 $25.9\mu\text{mol}$ 、ペプチド1に対して3.0等量) を $33\mu\text{M}$ の TCEP および 8M グアニジン塩酸塩を含む 0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.3、 3.0mL) に溶解し、室温で5時間反応させた。

[0167] 反応溶液を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 ($5\mu\text{m}$)、 $\phi 20 \times 250\text{mm}$ 、流速: $7.0\text{mL}/\text{分}$ 、展開溶媒 A: 0.1% TFA 水 B: 0.09% TFA/ 10% 水/ 90% アセトニトリル グラジエント A:B= $90:10 \rightarrow 5:95$ 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (45) で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体 (配列番号13) (6.0mg 、 $1.90\mu\text{mol}$ 、収率 22%) を得た。

[化40]



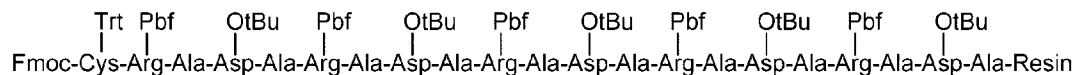
[0168] ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{119}H_{199}N_{31}O_{66}S$:
 $[M+2H]^{2+}$ 1577.1, $[M+3H]^{3+}$ 1051.7, $[M+4H]^{4+}$ 789.0, found 1576.7, 1051.4, 788.8。

[0169] (合成例21) C (Disialo) - (RADA) 5の合成

(合成例21-1) Ac-C (RADA) 5-NH₂の合成

固相合成用カラムにRink amide PEGA樹脂（100 μmol ）を取り、DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Ala-OH（124.5 mg、400 μmol ）とHCTU（157.2 mg、380 μmol ）とDIPEA（104.5 μL 、600 μmol ）のDMF（2.5 mL）溶液を加え、15分間振盪した。ジクロロメタンおよびDMFで洗浄後、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、Prelude（商標）ペプチド合成機を用いて、Fmoc法によるペプチド固相合成法にて保護された下記式（46）で表わされる、樹脂に結合した状態にあるポリペプチド（配列番号14）を合成した。縮合反応は、縮合剤としてHCTUを使用してDMF中で行った。

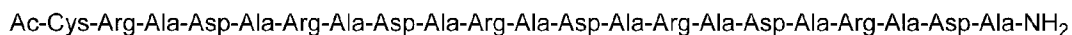
[化41]



式（46）

[0170] Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、無水酢酸及びピリジンを加え1時間振盪した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、TFA：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール（=90：2.5：5：2.5）を加え、4時間室温で振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドの一部をHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（5 μm ）、 $\phi 20 \times 250 \text{ mm}$ 、流速：7.0 mL/分、展開溶媒 A：0.1% TFA水 B：0.09% TFA/10%水/90% アセトニトリル、グラジエント A：B=88：12→78：22% 11分 直線濃度勾配溶出]を用いて精製し、下記式（47）で表わされる化合物ポリペプチド（配列番号15）（32.7 mg）を得た。

[化42]



式 (47)

[0171] (合成例21-2) チオール糖鎖修飾反応

合成例21-1で合成されたポリペプチド(配列番号15)(13.9 mg、6.24 μmol)と、合成例7で合成されたDisialo-BrAc(36.5 mg、15.6 μmol 、ペプチド1に対して2.5等量)を33 μM のTCEPおよび8 Mグアニジン塩酸塩を含む0.2 Mリン酸緩衝液(pH 7.3、2.1 mL)に溶解し、室温で3時間反応させた。

[0172] 反応溶液を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、 $\phi 20 \times 250 \text{ mm}$ 、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=90:10 $\rightarrow$ 75:25 15分 直線濃度勾配溶出]を用いて精製し、下記式(48)で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体(配列番号16)(7.8 mg、1.74 μmol 、収率28%)を得た。

[化43]



式 (48)

[0173] ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{171}\text{H}_{284}\text{N}_{44}\text{O}_{94}\text{S}$:
 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1498.5、 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 1124.1、 $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ 899.5 found 1498.6、1123.9、899.4。

[0174] (合成例22) C(Asialo)-(RADA)5の合成

合成例21-1で合成されたポリペプチド(配列番号15)(18.8 mg、8.43 μmol)と、合成例8で合成されたAsialo-BrAc

(44.5 mg、25.3 μmol 、ペプチド1に対して3.0等量)を33 μM のTCEPおよび8Mグアニジン塩酸塩を含む0.2Mリン酸緩衝液(pH 7.2、2.8 mL)に溶解し、室温で2時間反応させた。

[0175] 反応溶液を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、 $\phi 20 \times 250 \text{ mm}$ 、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=90:10 $\rightarrow$ 75:25 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(49)で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体(配列番号17) (16.0 mg、4.09 μmol 、収率49%)を得た。

[化44]



式(49)

[0176] ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{149}\text{H}_{250}\text{N}_{42}\text{O}_{78}\text{S}$:
 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1955.9、 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1304.3、 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 978.5 found 1955.8、1304.2、978.2。

[0177] (合成例23) C(DiGlcNAc)-(RADA)5の合成

合成例21-1で合成されたポリペプチド(配列番号15) (19.4 mg、8.70 μmol)と、合成例9で合成されたDiGlcNAc-BrAc (20.0 mg、21.7 μmol 、ペプチド1に対して2.5等量)を33 μM のTCEPおよび8Mグアニジン塩酸塩を含む、0.2Mリン酸緩衝液(pH 7.2、3.1 mL)に溶解し、室温で2時間反応させた。

[0178] 反応溶液を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、 $\phi 20 \times 250 \text{ mm}$ 、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=95:5 $\rightarrow$ 60:

40 20分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(50)で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体(配列番号18)(16.8mg、4.69 μ mol、収率54%)を得た。

[化45]



式(50)

[0179] ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{149}\text{H}_{250}\text{N}_{42}\text{O}_{78}\text{S}$:
[M+3H]³⁺ 1196.2, [M+4H]⁴⁺ 897.4, found 1195.9, 897.2.

[0180] (合成例24) C(GlcNAc)-(RADA)5の合成

合成例21-1で合成されたポリペプチド(配列番号15)(18.8mg、8.43 μ mol)と、合成例11で合成されたGlcNAc-BrAc(8.7mg、25.3 μ mol、ペプチド1に対して3.0等量)を7Mグアニジン、0.2Mリン酸緩衝液(pH7.2、4.2mL)に溶解し、室温で1時間反応させた。

[0181] 反応溶液を、HPLC[カラム:SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120(5 μ m)、 ϕ 20 $\times$ 250mm、流速:7.0mL/分、展開溶媒 A:0.1%TFA水 B:0.09%TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=95:5 $\rightarrow$ 5:95 15分 直線濃度勾配溶出]を用いて精製し、下記式(51)で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体(配列番号19)(14.9mg、5.99 μ mol、収率71%)を得た。

[化46]



式(51)

[0182] ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{95}\text{H}_{161}\text{N}_{39}\text{O}_{38}\text{S}$:

$[M+2H]^{2+}$ 1245.8、 $[M+3H]^{3+}$ 830.9、 $[M+4H]^{4+}$ 623.4 found 1245.1、830.8、623.3。

[0183] (合成例25) C (DiBn-Disialo) - (RADA) 5の合成

合成例21-1で合成したポリペプチド（配列番号15）（20.7mg、9.29 μ mol）と、合成例12で合成したDiBn-Disialo-BrAc（58.6mg、23.2 μ mol、ペプチド1に対して2.5等量）を33 μ MのTCEPおよび8Mグアニジン塩酸塩を含む0.2Mリン酸緩衝液（pH7.3、3.2mL）に溶解し、室温で1時間反応させた。

[0184] 反応溶液を、HPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（5 μ m）、 ϕ 20 $\times$ 250mm、流速：7.0mL/分、展開溶媒 A：0.1%TFA水 B：0.09%TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A：B=85：15 $\rightarrow$ 73：27 17分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式（52）で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体（配列番号20）（7.5mg、1.61 μ mol、収率17%）を得た。

[化47]



式（52）

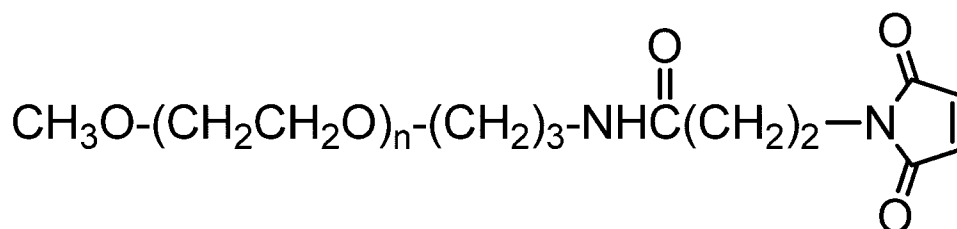
[0185] ESI-MS：(m/z) calcd for $C_{185}H_{296}N_{44}O_{94}S$ ：
 $[M+3H]^{3+}$ 1558.6、 $[M+4H]^{4+}$ 1169.2、 $[M+5H]^{5+}$ 935.5 found 1558.4、1169.0、925.6。

[0186] (合成例26) C (PEG2000) - (RADA) 5の合成

合成例21-1で合成したポリペプチド（配列番号15）（15.9mg、7.13 μ mol）と、下記式（53）で表わされる化合物（マレイミド化されたPEG、商品名：SUNBRIGHT（商標） ME-020MA

、平均分子量 2333、日油株式会社製) (24.9 mg、10.7 μ mol、ペプチド 1 に対して 1.5 等量) を 8 M グアニジンを含む 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.3、2.4 mL) に溶解し、室温で 1 時間反応させた。

[化 48]



式 (53)

[0187] 反応溶液を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 2.0 x 250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA 水 B: 0.09% TFA/10% 水/90% アセトニトリル グラジエント A:B=75:25 $\rightarrow$ 40:60 12 分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (54) で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体 (配列番号 21) (10.9 mg、2.39 μ mol、収率 34%) を得た。

[化 49]



式 (54)

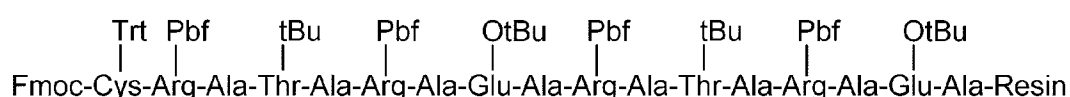
[0188] (合成例 27) C (Asia10) - (RATARA EA) 2 の合成

(合成例 27-1) Ac-C- (RATARA EA) 2-NH₂ の合成

固相合成用カラムに Rink amide PEGA 樹脂 (100 μ mol) を取り、DMF およびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Ala-OH (124.5 mg、400 μ mol) と HCTU (157.2 mg、380 μ mol) と DIPEA (104.5 μ L、600 μ mol) の DMF (2.5 mL) 溶液を加え、15 分間振盪した。ジクロロメタンおよび DMF

で洗浄後、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、Prelude（商標）ペプチド合成機を用いて、Fmoc法によるペプチド固相合成法にて保護された下記式（55）で表わされる、樹脂に結合した状態にあるポリペプチド（配列番号22）を合成した。縮合反応は、縮合剤としてHCTUを使用してDMF中で行った。

[化50]



式（55）

[0189] Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、無水酢酸及びピリジンを加え1時間振盪した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、TFA：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール（＝90：2.5：5：2.5）を加え、4時間室温で振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドの一部をHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（5μm）、φ20×250mm、流速：7.0mL/分、展開溶媒 A：0.1%TFA水 B：0.09%TFA/10%水/90%アセトニトリル、グラジエント A：B＝88：12→78：22% 11分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式（56）で表わされるポリペプチド（配列番号23）（32.7mg）を得た。

[化51]



式（56）

[0190] （合成例27-2）チオールの糖鎖修飾反応

合成例27-1で合成したポリペプチド（配列番号23）（7.3mg、

4.02 μmol) と、合成例8で合成したAsialo-BrAc (17.7 mg、16.5 μmol 、ペプチド1に対して1.5等量) を33 μM のTCEPおよび8Mグアニジン塩酸塩を含む0.2Mリン酸緩衝液 (pH 7.3、1.3 mL) に溶解し、室温で3時間反応させた。

[0191] 反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、 $\phi 20 \times 250 \text{ mm}$ 、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=95:5 $\rightarrow$ 29:71 11分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(57)で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体 (配列番号24) (4.6 mg、1.32 μmol 、収率33%) を得た。

[化52]



式(57)

[0192] ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{123}\text{H}_{211}\text{N}_{35}\text{O}_{60}\text{S}$:
[M+3H]³⁺ 1166.5, [M+4H]⁴⁺ 875.1 found
1166.2, 875.1。

[0193] (合成例28) C(DiGlcNAc)-(RATARA EA)2の合成

合成例27-1で合成したポリペプチド (配列番号23) (20.0 mg、11.0 μmol) と、合成例7で合成したDisialo-BrAc (23.7 mg、16.5 μmol 、ペプチド1に対して1.5等量) をDM SO (0.9 mL) に溶解した。溶液にDIPEA (5.8 μL) を加え室温で15分間反応させた。

[0194] 反応溶液に蒸留水 (4.0 mL) 加え、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、 $\phi 20 \times 250 \text{ mm}$ 、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント

A : B = 90 : 10 → 29 : 71 11分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(58)で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体(配列番号25)(23.9mg、7.53μmol、収率68%)を得た。

[化53]



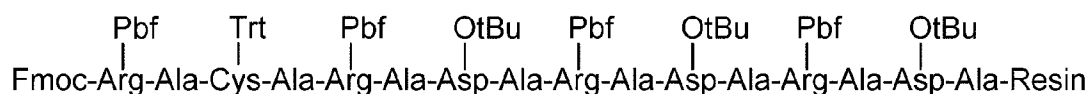
式(58)

[0195] ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{123}\text{H}_{211}\text{N}_{35}\text{O}_{60}\text{S}$:
[M+3H]³⁺ 1058.4, [M+4H]⁴⁺ 794.0 found
1057.8, 793.9。

[0196] (合成例29) RAC(Asialo)-A-(RADA)3の合成
(合成例29-1) Ac-RACA-(RADA)3-NH₂の合成

固相合成用カラムにRink amide PEGA樹脂(100μmol)を取り、DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Ala-OH(124.5mg、400μmol)とHCTU(157.2mg、380μmol)とDIPEA(104.5μL、600μmol)のDMF(2.5mL)溶液を加え、15分間振盪した。ジクロロメタンおよびDMFで洗浄後、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、Prelude(商標)ペプチド合成機を用いて、Fmoc法によるペプチド固相合成法にて保護された下記式(59)で表わされる、樹脂に結合した状態にあるポリペプチド(配列番号26)を合成した。縮合反応は、縮合剤としてHCTUを使用してDMF中で行った。

[化54]

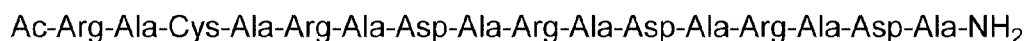


式(59)

[0197] Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより

除去した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、無水酢酸及びピリジンを加え1時間振盪した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、TFA：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール（＝90：2.5：5：2.5）を加え、4時間室温で振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドの一部をHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、φ20×250 mm、流速：7.0 mL/分、展開溶媒 A：0.1% TFA水 B：0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル、グラジエント A：B＝88：12→78：22% 11分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式（60）で表わされるポリペプチド（配列番号27）（32.7 mg）を得た。

[化55]



式（60）

[0198] （合成例29-2）チオールの糖鎖修飾反応

合成例29-1で合成したポリペプチド（配列番号27）（14.1 mg、8.29 μmol）と合成例8で合成したAsialo-BrAc（36.0 mg、20.7 μmol、ペプチド1に対して2.5等量）を33 μMのTCEPおよび8 Mグアニジン塩酸塩を含む、0.2 Mリン酸緩衝液（pH 7.3、2.6 mL）に溶解し、室温で1時間反応させた。

[0199] 反応溶液をHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、φ20×250 mm、流速：7.0 mL/分、展開溶媒 A：0.1% TFA水 B：0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A：B＝95：5→29：71 11分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式（61）で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体（配列番号28）（13.4 mg、3.96 μmol、収率48%）を得た。

[化56]



式 (61)

[0200] ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{129}\text{H}_{218}\text{N}_{34}\text{O}_{69}\text{S}$:
 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1691.7, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1128.1 found 1691.8, 1128.2。

[0201] (合成例30) RAC (DiGlcNAc) -A- (RADA) 3の合成
 合成例29-1で合成したポリペプチド (配列番号27) (10.1mg、
 5.94 μmol) と、合成例7で合成したDisialo-BrAc (2
 1.3mg、14.8 μmol 、ペプチド1に対して2.5等量) を33 μM
 のTCEPおよび8Mグアニジン塩酸塩を含む、0.2Mリン酸緩衝液 (
 pH7.3、2.0mL) に溶解し、室温で4時間反応させた。

[0202] 反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PA
 K C18 UG-120 (5 μm)、 $\phi 20 \times 250\text{mm}$ 、流速: 7.0
 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA/10
 %水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=90:10 $\rightarrow$ 75:
 25 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (62) で表わ
 される糖鎖-ポリペプチド複合体 (配列番号29) (11.9mg、3.8
 9 μmol 、収率66%) を得た。

[化57]



式 (62)

[0203] ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{117}\text{H}_{198}\text{N}_{34}\text{O}_{59}\text{S}$:
 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1529.5, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1020.0, $[\text{M}+4$
 $\text{H}]^{4+}$ 765.3 found 1529.2, 1019.8, 765.

1。

[0204] (合成例31) RC (Asialo) - DA - (RADA) 3の合成

(合成例31-1) Ac - RCDA - (RADA) 3 - NH₂の合成

固相合成用カラムにRink amide PEGA樹脂 (100 μmol) を取り、DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Ala-OH (124.5 mg、400 μmol) とHCTU (157.2 mg、380 μmol) とDIPEA (104.5 μL、600 μmol) のDMF (2.5 mL) 溶液を加え、15分間振盪した。ジクロロメタンおよびDMFで洗浄後、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、Prelude (商標) ペプチド合成機を用いて、Fmoc法によるペプチド固相合成法にて保護された下記式 (63) で表わされる、樹脂に結合した状態にあるポリペプチド (配列番号30) を合成した。縮合反応は、縮合剤としてHCTUを使用してDMF中で行った。

[化58]



式 (63)

[0205] Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、無水酢酸及びピリジンを加え1時間振盪した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、TFA : 水 : トリイソプロピルシラン : エタンジチオール (=90 : 2.5 : 5 : 2.5) を加え、4時間室温で振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドの一部をHPLC [カラム : SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、φ20×250 mm、流速 : 7.0 mL/分、展開溶媒 A : 0.1% TFA水 B : 0.09% TFA / 10% 水 / 90% アセトニトリル、グラジエント A : B = 88 : 12 → 78 : 22% 11

分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (64) で表わされるポリペプチド (配列番号31) (32.7 mg) を得た。

[化59]

Ac-Arg-Cys-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-NH₂
式 (64)

[0206] (合成例31-2) チオールの糖鎖修飾反応

合成例31-1で合成したポリペプチド (配列番号31) (14.8 mg、8.48 μmol) と、合成例8で合成した Asialo-BrAc (37.4 mg、21.2 μmol、ペプチド1に対して2.5等量) を33 μMのTCEPおよび8Mグアニジン塩酸塩を含む、0.2Mリン酸緩衝液 (pH7.3、2.8 mL) に溶解し、室温で2時間反応させた。

[0207] 反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、φ20×250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA/10% 水/90% アセトニトリル グラジエント A:B=95:5→29:7 11分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (65) で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体 (配列番号32) (21.7 mg、6.34 μmol、収率75%) を得た。

[化60]

Asialo
|
Ac-Arg-Cys-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-NH₂

式 (65)

[0208] ESI-MS: (m/z) calcd for C₁₃₀H₂₁₈N₃₄O₇₁S:
[M+2H]²⁺ 1713.7、[M+3H]³⁺ 1142.8、[M+4H]⁴⁺ 857.3 found 1713.7、1142.5、857.1。

[0209] (合成例32) RC(DiGlcNAc)-DA-(RADA)3の合成

合成例31-1で合成したポリペプチド (配列番号31) (11.0 mg

、6.30 μmol ）と、合成例9で合成したDiGlcNAc-BrAc（22.6 mg、15.7 μmol 、ペプチド1に対して2.5等量）を33 μM のTCEPおよび8 Mグアニジン塩酸塩を含む、0.2 Mリン酸緩衝液（pH 7.3、2.1 mL）に溶解し、室温で3時間反応させた。

[0210] 反応溶液をHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（5 μm ）、 ϕ 20×250 mm、流速：7.0 mL/分、展開溶媒 A：0.1% TFA水 B：0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A：B=90：10→75：25 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式（66）で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体（配列番号33）（19.0 mg、6.12 μmol 、収率97%）を得た。

[化61]



式（66）

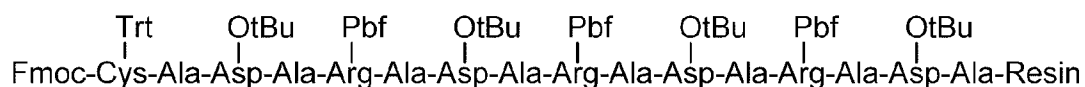
[0211] ESI-MS：(m/z) calcd for $\text{C}_{118}\text{H}_{198}\text{N}_{34}\text{O}_{61}\text{S}$ ：
[M+2H]²⁺ 1551.6、[M+3H]³⁺ 1034.7、[M+4H]⁴⁺ 776.3 found 1551.2、1034.5、776.1。

[0212] （合成例33）C（Asialo）-ADA-（RADA）3の合成
（合成例33-1）Ac-CADA-（RADA）3-NH₂の合成

固相合成用カラムにRink amide PEGA樹脂（100 μmol ）を取り、DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Ala-OH（124.5 mg、400 μmol ）とHCTU（157.2 mg、380 μmol ）とDIPEA（104.5 μL 、600 μmol ）のDMF（2.5 mL）溶液を加え、15分間振盪した。ジクロロメタンおよびDMFで洗浄後、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、Prelude（商標）ペプチド合成

機を用いて、Fmoc法によるペプチド固相合成法にて保護された下記式（67）で表わされる、樹脂に結合した状態にあるポリペプチド（配列番号34）を合成した。縮合反応は、縮合剤としてHCTUを使用してDMF中で行った。

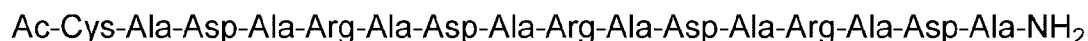
[化62]



式（67）

[0213] Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、無水酢酸及びピリジンを加え1時間振盪した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、TFA：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール（＝90：2.5：5：2.5）を加え、4時間室温で振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドの一部をHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（5 μ m）、 ϕ 20 $\times$ 250mm、流速：7.0mL/分、展開溶媒 A：0.1%TFA水 B：0.09%TFA/10%水/90%アセトニトリル、グラジエント A：B＝88：12 $\rightarrow$ 78：22% 11分 直線濃度勾配溶出]を用いて精製し、下記式（68）で表わされるポリペプチド（配列番号35）（32.7mg）を得た。

[化63]



式（68）

（合成例33-2）チオールの糖鎖修飾反応

合成例33-1で合成したポリペプチド（配列番号35）（13.0mg、7.83 μ mol）と、合成例8で合成したAsialo-BrAc（34.5mg、19.6 μ mol、ペプチド1に対して2.5等量）を33 μ

MのTCEPおよび8Mグアニジン塩酸塩を含む0.2Mリン酸緩衝液(pH7.3、2.6mL)に溶解し、室温で2時間反応させた。

[0214] 反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20 $\times$ 250mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1%TFA水 B: 0.09%TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=95:5 $\rightarrow$ 29:71 11分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(69)で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体(配列番号36)(15.2mg、4.55 μ mol、収率58%)を得た。

[化64]



式(69)

[0215] ESI-MS: (m/z) calcd for C₁₂₇H₂₁₁N₃₁O₇₁S: [M+2H]²⁺ 1671.1、[M+3H]³⁺ 1114.4、[M+4H]⁴⁺ 836.1 found 1671.2、1114.1、835.8。

[0216] (合成例34) C(DiGlcNAc)-ADA-(RADA)3の合成

合成例33-1で合成したポリペプチド(9.9mg、5.96 μ mol)と、合成例9で合成したDiGlcNAc-BrAc(21.4mg、15.7 μ mol、ペプチド1に対して2.5等量)を33 μ MのTCEPおよび8Mグアニジン塩酸塩を含む、0.2Mリン酸緩衝液(pH7.3、2.1mL)に溶解し、室温で4時間反応させた。

[0217] 反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20 $\times$ 250mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1%TFA水 B: 0.09%TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=90:10 $\rightarrow$ 75:25 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(70)で表わ

される糖鎖-ポリペプチド複合体（配列番号37）（10.9mg、3.61 μmol 、収率61%）を得た。

[化65]



式(70)

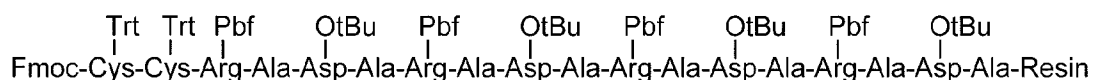
[0218] ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{115}\text{H}_{191}\text{N}_{31}\text{O}_{61}\text{S}$:
 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1509.0, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1006.3, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 755.0 found 1508.7, 1006.1, 754.9.

[0219] (合成例35) 2C (Maltose) - (RADA) 4の合成

(合成例35-1) Ac-2C - (RADA) 4-NH₂の合成

固相合成用カラムにRink amide PEGA樹脂（100 μmol ）を取り、DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Ala-OH（124.5mg、400 μmol ）とHCTU（157.2mg、380 μmol ）とDIPEA（104.5 μL 、600 μmol ）のDMF（2.5mL）溶液を加え、15分間振盪した。ジクロロメタンおよびDMFで洗浄後、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、Prelude（商標）ペプチド合成機を用いて、Fmoc法によるペプチド固相合成法にて保護された下記式（71）で表わされる、樹脂に結合した状態にあるポリペプチド（配列番号38）を合成した。縮合反応は、縮合剤としてHCTUを使用してDMF中で行った。

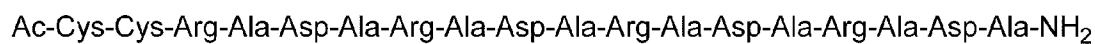
[化66]



式(71)

[0220] Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、無水酢酸及びピリジンを加え1時間振盪した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、TFA：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール（＝90：2.5：5：2.5）を加え、4時間室温で振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドの一部をHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、φ20×250 mm、流速：7.0 mL/分、展開溶媒 A：0.1% TFA水 B：0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル、グラジエント A：B＝90：10→75：25% 11分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式（72）で表わされるポリペプチド（配列番号39）を得た。

[化67]



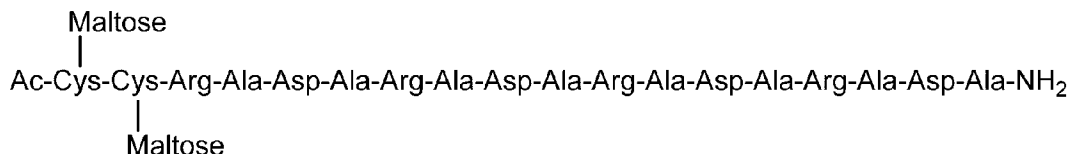
式（72）

[0221] （35－2）チオールの糖鎖修飾反応

合成例35－1で合成されたポリペプチド（配列番号39）（9.8 mg、5.11 μmol）と、合成例2で合成されたMaltose-BrAc（11.8 mg、54.6 μmol、ペプチド1に対して5.0等量）を33 μMのTCEPおよび8 Mグアニジン塩酸塩を含む、0.2 Mリン酸緩衝液（pH 7.3、1.7 mL）に溶解し、室温で1.5時間反応させた。

[0222] 反応溶液をHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、φ20×250 mm、流速：7.0 mL/分、展開溶媒 A：0.1% TFA水 B：0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A：B＝90：10→75：25 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式（73）で表わされる糖鎖－ポリペプチド複合体（配列番号40）（9.2 mg、3.43 μmol、収率67%）を得た。

[化68]



式 (73)

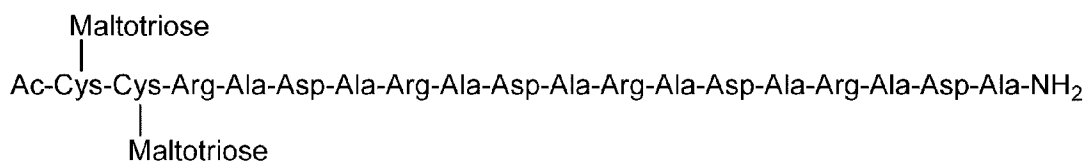
[0223] ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{100}\text{H}_{169}\text{N}_{33}\text{O}_{49}\text{S}_2$
 : $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1341.9, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 894.9, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 671.4 found 1341.6, 894.7, 671.3
 。

[0224] (合成例36) 2C (Maltotriose) - (RADA) 4の合成

合成例35-1で合成したポリペプチド (配列番号39) (17.5mg、 $9.12\mu\text{mol}$) と、合成例3で合成したMaltotriose-B
 rAc (34.1mg、 $54.6\mu\text{mol}$ 、ペプチド1に対して6.0等量)
) を $33\mu\text{M}$ のTCEPおよび8Mグアニジン塩酸塩を含む、0.2Mリン
 酸緩衝液 (pH7.3、3.1mL) に溶解し、室温で1.5時間反応させ
 た。

[0225] 反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PA
 K C18 UG-120 ($5\mu\text{m}$)、 $\phi 20 \times 250\text{mm}$ 、流速: 7.0
 mL/分、展開溶媒 A: 0.1%TFA水 B: 0.09%TFA/10
 %水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=90:10→75:
 25 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (74) で表わ
 される糖鎖-ポリペプチド複合体 (配列番号41) (19.6mg、 3.6
 $1\mu\text{mol}$ 、収率72%) を得た。

[化69]



式 (74)

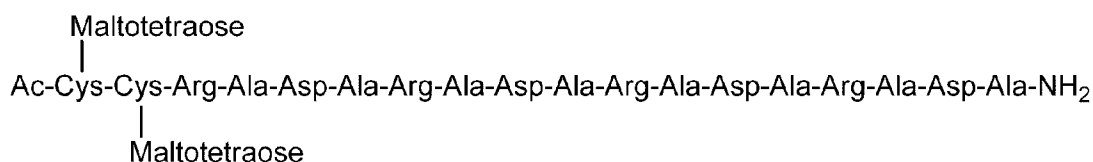
[0226] ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{112}H_{189}N_{33}O_{59}S_2$
: $[M+2H]^{2+}$ 1504.0, $[M+3H]^{3+}$ 1003.0, $[M+4H]^{4+}$ 752.5 found 1503.7, 1002.7, 752.3。

[0227] (合成例37) 2C (Maltotetraose) - (RADA) 4の合成

合成例35-1で合成したポリペプチド（配列番号39）（9.8mg、 $5.11\mu\text{mol}$ ）と、合成例4で合成したMaltotetraose-BrAc（20.1mg、 $25.5\mu\text{mol}$ 、ペプチド1に対して5.0等量）を $33\mu\text{M}$ のTCEPおよび8Mグアニジン塩酸塩を含む、0.2Mリン酸緩衝液（pH7.3、1.7mL）に溶解し、室温で2時間反応させた。

[0228] 反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 ($5\mu\text{m}$)、 $\phi 20 \times 250\text{mm}$ 、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=90:10→75:25 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(75)で表われる糖鎖-ポリペプチド複合体（配列番号42）（10.6mg、 $3.18\mu\text{mol}$ 、収率62%）を得た。

[化70]



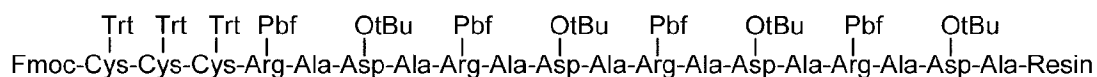
式(75)

[0229] ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{124}H_{209}N_{33}O_{69}S_2$
: $[M+2H]^{2+}$ 1666.2, $[M+3H]^{3+}$ 1111.1, $[M+4H]^{4+}$ 833.6 found 1666.2, 1110.8, 833.3。

[0230] (合成例38) 3C (Maltose) - (RADA) 4の合成(合成例38-1) Ac-3C-(RADA) 4-NH₂の合成

固相合成用カラムにRink amide PEGA樹脂 (100 μmol) を取り、DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Ala-OH (124.5 mg、400 μmol) とHCTU (157.2 mg、380 μmol) とDIPEA (104.5 μL、600 μmol) のDMF (2.5 mL) 溶液を加え、15分間振盪した。ジクロロメタンおよびDMFで洗浄後、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、Prelude (商標) ペプチド合成機を用いて、Fmoc法によるペプチド固相合成法にて保護された下記式 (76) で表わされる、樹脂に結合した状態にあるポリペプチド (配列番号43) を合成した。縮合反応は、縮合剤としてHCTUを使用してDMF中で行った。

[化71]



式 (76)

[0231] Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、無水酢酸及びピリジンを加え1時間振盪した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、TFA:水:トリイソプロピルシラン:エタンジチオール (=90:2.5:5:2.5) を加え、4時間室温で振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドの一部をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、φ20×250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA/10%水/90% アセトニトリル、グラジエント A: B=90:10→75:25% 11分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (77) で表わされるポリ

ペプチド（配列番号44）を得た。

[化72]



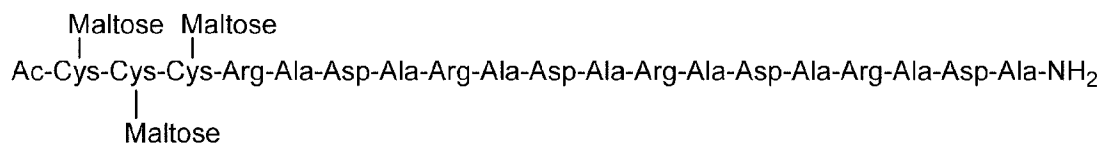
式（77）

[0232] （合成例38-2）チオールの糖鎖修飾反応

合成例38-1で合成されたポリペプチド（配列番号44）（15.0 mg、7.42 μmol ）と、合成例2で合成したMaltose-BrAc（20.6 mg、44.6 μmol 、ペプチド1に対して6.0等量）を33 μM のTCEPおよび8Mグアニジン塩酸塩を含む、0.2Mリン酸緩衝液（pH7.3、2.4 mL）に溶解し、室温で3時間反応させた。

[0233] 反応溶液をHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120（5 μm ）、 $\phi 20 \times 250 \text{ mm}$ 、流速：7.0 mL/分、展開溶媒 A：0.1% TFA水 B：0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A：B=90：10→75：25 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式（78）で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体（配列番号45）（16.1 mg、5.09 μmol 、収率69%）を得た。

[化73]



式（78）

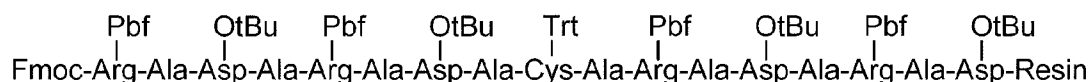
[0234] ESI-MS：(m/z) calcd for $\text{C}_{117}\text{H}_{197}\text{N}_{35}\text{O}_{61}\text{S}_3$: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1584.1、 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1056.4、 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 792.6 found 1583.7、1056.1、792.4。

[0235] （合成例39）（RADA）2-C（Maltose）-（ARAD）2の合成

(合成例 39-1) Ac-(RADA)2-C-(ARAD)2-NH₂の合成

固相合成用カラムに Rink amide PEGA 樹脂 (100 μmol) を取り、DMF およびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Asp (OtBu)-OH (164.6 mg、400 μmol) と HCTU (157.2 mg、380 μmol) と DIPEA (104.5 μL、600 μmol) の DMF (2.5 mL) 溶液を加え、15 分間振盪した。ジクロロメタンおよび DMF で洗浄後、Fmoc 保護基を、DMF 中の 20% のピペリジンで処理することにより除去した。DMF で洗浄後、Prelude (商標) ペプチド合成機を用いて、Fmoc 法によるペプチド固相合成法にて保護された下記式 (79) で表わされる、樹脂に結合した状態にあるポリペプチド (配列番号 46) を合成した。縮合反応は、縮合剤として HCTU を使用して DMF 中で行った。

[化74]



式 (79)

[0236] Fmoc 保護基を、DMF 中の 20% のピペリジンで処理することにより除去した。DMF およびジクロロメタンで洗浄後、無水酢酸及びピリジンを加え 1 時間振盪した。DMF およびジクロロメタンで洗浄後、TFA : 水 : トリイソプロピルシラン : エタンジチオール (= 90 : 2.5 : 5 : 2.5) を加え、4 時間室温で振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドの一部を HPLC [カラム : SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、φ 20 × 250 mm、流速 : 7.0 mL/分、展開溶媒 A : 0.1% TFA 水 B : 0.09% TFA / 10% 水 / 90% アセトニトリル、グラジエント A : B = 90 : 10 → 75 : 25% 15 分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (80) で表わされるポリ

ペプチド（配列番号４７）を得た。

[化75]

Ac-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Cys-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-NH₂
式（８０）

[0237]（合成例３９－２）チオールの糖鎖修飾反応

合成例３９－１で合成したポリペプチド（配列番号４７）（１５．４ｍｇ、
８．４８μｍｏｌ）と、合成例２で合成したMaltose-BrAc（
９．８ｍｇ、２１．２μｍｏｌ、ペプチド１に対して２．５等量）を３３μ
ＭのＴＣＥＰおよび８Ｍグアニジン塩酸塩を含む、０．２Ｍリン酸緩衝液（
ｐＨ７．３、２．９ｍＬ）に溶解し、室温で３時間反応させた。

[0238] 反応溶液をＨＰＬＣ〔カラム：ＳＨＩＳＥＩＤＯ　ＣＡＰＣＥＬＬ　ＰＡ
Ｋ　Ｃ１８　ＵＧ－１２０（５μｍ）、φ２０×２５０ｍｍ、流速：７．０
ｍＬ／分、展開溶媒　Ａ：０．１％ＴＦＡ水　Ｂ：０．０９％ＴＦＡ／１０
％水／９０％アセトニトリル　グラジエント　Ａ：Ｂ＝９０：１０→７５：
２５　１５分　直線濃度勾配溶出〕を用いて精製し、下記式（８１）で表わ
される糖鎖－ポリペプチド複合体（配列番号４８）（１７．８ｍｇ、８．１
０μｍｏｌ、収率９６％）を得た。

[化76]

Maltose
|
Ac-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Cys-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-NH₂

式（８１）

[0239]　ＥＳＩ－ＭＳ：（ｍ／ｚ）calcd for C₈₃H₁₄₁N₃₁O₃₇S：
[M+2H]²⁺ 1099.6、[M+3H]³⁺ 733.4、[M+4H]
]⁴⁺ 550.3 found 1099.5、733.0、550.2。

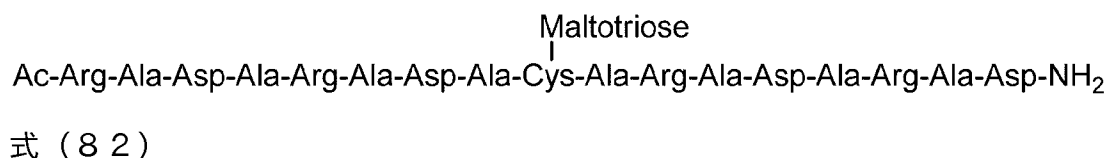
[0240] （合成例４０）（ＲＡＤＡ）２－Ｃ（Ｍａｌｔｏｔｒｉｏｓｅ）－（ＡＲＡ
Ｄ）２の合成

合成例３９－１で合成したポリペプチド（配列番号４７）（１４．８ｍｇ
、８．１５μｍｏｌ）と、合成例３で合成したMaltotriose-Br

rAc (12.7 mg、20.3 μ mol、ペプチド1に対して2.5等量) を33 μ MのTCEPおよび8Mグアニジン塩酸塩を含む、0.2Mリン酸緩衝液 (pH 7.3、2.8 mL) に溶解し、室温で3時間反応させた。

[0241] 反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20×250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=90:10→75:25 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(82)で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体(配列番号49) (13.8 mg、5.8 μ mol、収率72%)を得た。

[化77]



[0242] ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{89}\text{H}_{151}\text{N}_{31}\text{O}_{42}\text{S}$:
 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1180.2、 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 787.1、 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 590.6 found 1180.5、787.0、590.8。

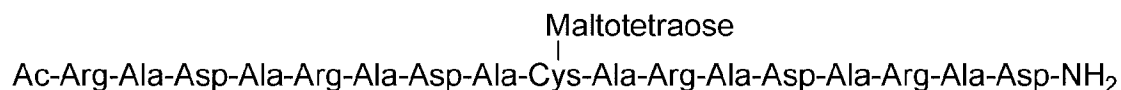
[0243] (合成例41) (RADA)2-C(Maltotetraose)-(ARAD)2の合成

合成例39-1で合成したポリペプチド(配列番号47) (14.0 mg、7.71 μ mol) と、合成例4で合成したMaltotetraose-BrAc (15.2 mg、20.3 μ mol、ペプチド1に対して2.5等量) を33 μ MのTCEPおよび8Mグアニジン塩酸塩を含む、0.2Mリン酸緩衝液 (pH 7.3、2.6 mL) に溶解し、室温で2.5時間反応させた。

[0244] 反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20×250 mm、流速: 7.0 mL/分、展開溶媒 A: 0.1% TFA水 B: 0.09% TFA/10

%水／90%アセトニトリル グラジエント A : B = 90 : 10 → 75 : 25 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(83)で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体(配列番号50)(14.9mg、5.91 μmol、収率77%)を得た。

[化78]



式(83)

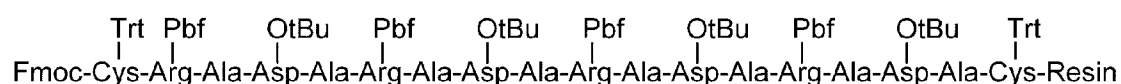
[0245] ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{95}\text{H}_{161}\text{N}_{31}\text{O}_{47}\text{S}$:
 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1261.8, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 841.5, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 631.4 found 1261.6, 841.4, 631.3.

[0246] (合成例42) C(Maltose) - (RADA)4 - C(Maltose)の合成

(合成例42-1) Ac-C - (RADA)4 - C-NH₂の合成

固相合成用カラムにRink amide PEGA樹脂(100 μmol)を取り、DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Cys(Trt)-OH(124.5mg、400 μmol)とHCTU(157.2mg、380 μmol)と2,4,6-トリメチルピリジン(79.3 μL、600 μmol)のDMF(2.5 mL)溶液を加え、1時間振盪した。ジクロロメタンおよびDMFで洗浄後、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、Prelude(商標)ペプチド合成機を用いて、Fmoc法によるペプチド固相合成法にて保護された下記式(84)で表わされる、樹脂に結合した状態にあるポリペプチド(配列番号51)を合成した。縮合反応は、縮合剤としてHCTUを使用してDMF中で行った。

[化79]



式 (84)

[0247] Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、無水酢酸及びピリジンを加え1時間振盪した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、TFA：水：トリイソプロピルシラン：エタンジチオール (=90：2.5：5：2.5)を加え、4時間室温で振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドの一部をHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、φ20×250mm、流速：7.0 mL/分、展開溶媒 A：0.1%TFA水 B：0.09%TFA/10%水/90%アセトニトリル、グラジエント A：B=90：10→75：25% 15分 直線濃度勾配溶出]を用いて精製し、下記式(85)で表わされるポリペプチド(配列番号52)を得た。

[化80]

Ac-Cys-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Arg-Ala-Asp-Ala-Cys-NH₂

式 (85)

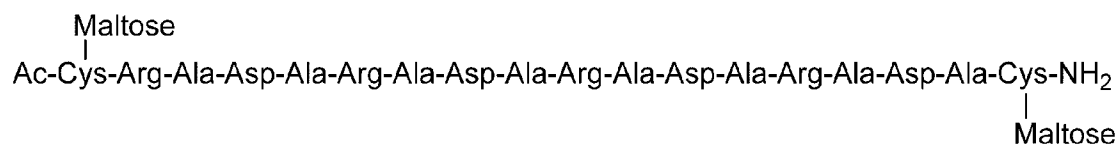
[0248] (合成例42-2) チオールの糖鎖修飾反応

合成例42-1で合成したポリペプチド(配列番号52)(14.7mg、7.66 μmol)と、合成例2で合成したMaltose-BrAc(17.7mg、38.3 μmol、ペプチド1に対して5等量)を33 μMのTCEPおよび8Mグアニジン塩酸塩を含む塩酸塩、0.2Mリン酸緩衝液(pH7.3、2.6 mL)に溶解し、室温で2時間反応させた。

[0249] 反応溶液を、HPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μm)、φ20×250mm、流速：7.0 mL/分、展開溶媒 A：0.1%TFA水 B：0.09%TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A：B=90：10→75：25 15分 直線濃度勾配溶出]を用いて精製し、下記式(86)で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体(配列番号53)(6.5mg、2.4

2 μ mol、収率32%)を得た。

[化81]



式(86)

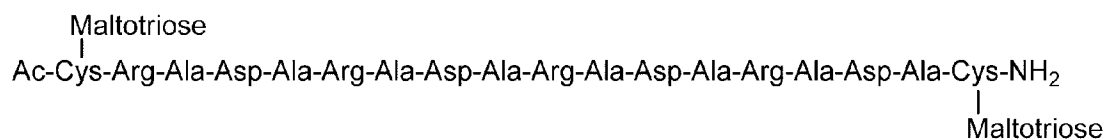
[0250] ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{100}\text{H}_{169}\text{N}_{33}\text{O}_{49}\text{S}_2$
: [M+2H]²⁺ 1341.9、[M+3H]³⁺ 894.9、[M+4H]⁴⁺ 671.4、found 1341.5、894.7、671.3
。

[0251] (合成例43) C(Maltotriose) - (RADA) 4 - C(Maltotriose) の合成

合成例42-1で合成したポリペプチド(配列番号52)(13.9mg、7.24 μ mol)と、合成例3で合成したMaltotriose-B_rAc(22.6mg、36.2 μ mol、ペプチド1に対して5等量)を33 μ MのTCEPおよび8Mグアニジン塩酸塩を含む塩酸塩、0.2Mリン酸緩衝液(pH7.3、2.5mL)に溶解し、室温で2時間反応させた。

[0252] 反応溶液を、HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20×250mm、流速: 7.0mL/分、展開溶媒 A: 0.1%TFA水 B: 0.09%TFA/10%水/90%アセトニトリル グラジエント A:B=90:10→75:25 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式(87)で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体(配列番号54)(9.6mg、3.19 μ mol、収率44%)を得た。

[化82]



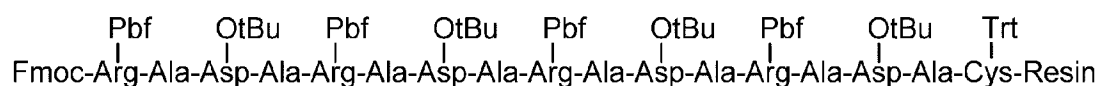
式 (87)

[0253] ESI-MS: (m/z) calcd for $C_{112}H_{189}N_{33}O_{59}S_2$
: $[M+2H]^{2+}$ 1504.1, $[M+3H]^{3+}$ 1003.0, $[M+4H]^{4+}$ 752.5, found 1503.8, 1002.8, 752.4.

[0254] (合成例44) Ac-(RADA)4-C(DiGlcNAc)の合成
(合成例44-1) Ac-(RADA)4-C-NH₂の合成

固相合成用カラムにRink amide PEGA樹脂 (100 μ mol) を取り、DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Cys (Trt)-OH (124.5 mg, 400 μ mol) と HCTU (157.2 mg, 380 μ mol) と 2, 4, 6-トリメチルピリジン (79.3 μ L, 600 μ mol) の DMF (2.5 mL) 溶液を加え、1時間振盪した。ジクロロメタンおよびDMFで洗浄後、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、Prelude (商標) ペプチド合成機を用いて、Fmoc法によるペプチド固相合成法にて保護された下記式 (88) で表わされる、樹脂に結合した状態にあるポリペプチド (配列番号55) を合成した。縮合反応は、縮合剤としてHCTUを使用してDMF中で行った。

[化83]

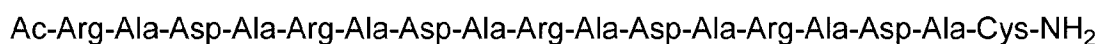


式 (88)

[0255] Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、無水酢酸及びピリジンを加え1時間振盪した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、TFA:水:トリイソプロピルシラン:エタンジチオール (=90:2.5:5:2.5) を加え、4時間室温で振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドの一部を

HPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 ($5\mu\text{m}$)、 $\phi 20 \times 250\text{mm}$ 、流速: $7.0\text{mL}/\text{分}$ 、展開溶媒 A: $0.1\%\text{TFA}$ 水 B: $0.09\%\text{TFA}/10\%\text{水}/90\%$ アセトニトリル、グラジエント A: B = $90:10 \rightarrow 75:25\%$ 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (89) で表わされるポリペプチド (配列番号56) を得た。

[化84]



式 (89)

[0256] (合成例44-2) チオールの糖鎖修飾反応

合成例44-1で合成したポリペプチド (配列番号56) (15.1mg 、 $8.31\mu\text{mol}$) と、合成例9で合成した DiGlcNAc-BrAc (29.8mg 、 $20.8\mu\text{mol}$ 、ペプチド1に対して2.5等量) を $3\mu\text{M}$ の TCEP および 8M グアニジン塩酸塩を含む、 0.2M リン酸緩衝液 ($\text{pH} 7.3$ 、 2.8mL) に溶解し、室温で3時間反応させた。

[0257] 反応溶液をHPLC [カラム: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 ($5\mu\text{m}$)、 $\phi 20 \times 250\text{mm}$ 、流速: $7.0\text{mL}/\text{分}$ 、展開溶媒 A: $0.1\%\text{TFA}$ 水 B: $0.09\%\text{TFA}/10\%\text{水}/90\%$ アセトニトリル グラジエント A: B = $90:10 \rightarrow 75:25$ 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (90) で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体 (配列番号57) (15.8mg 、 $5.01\mu\text{mol}$ 、収率 60%) を得た。

[化85]



式 (90)

[0258] ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{121}\text{H}_{203}\text{N}_{35}\text{O}_{62}\text{S}$:
 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1587.1、 $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ 1058.4、 $[\text{M}+4$

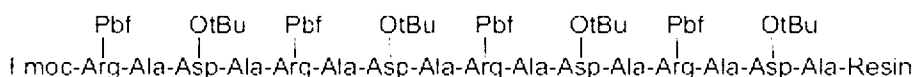
H] ⁴⁺ 794.0 found 1586.7, 1058.1, 793.8。

[0259] (合成例45) Ac-N (Asialo) (RADA) 4の合成

(合成例45-1) Fmoc-(RADA) 4-Resinの合成

固相合成用カラムにRink amide PEGA樹脂 (100 μmol) を取り、DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc-Ala-OH (124.5 mg、400 μmol) とHCTU (157.2 mg、380 μmol) とDIPEA (104.5 μL、600 μmol) のDMF (2.5 mL) 溶液を加え、15分間振盪した。ジクロロメタンおよびDMFで洗浄後、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFで洗浄後、Prelude (商標) ペプチド合成機を用いて、Fmoc法によるペプチド固相合成法にて保護された下記式 (91) で表わされる、樹脂に結合した状態にあるポリペプチド (配列番号58) を合成した。縮合反応は、縮合剤としてHCTUを使用してDMF中で行った。

[化86]



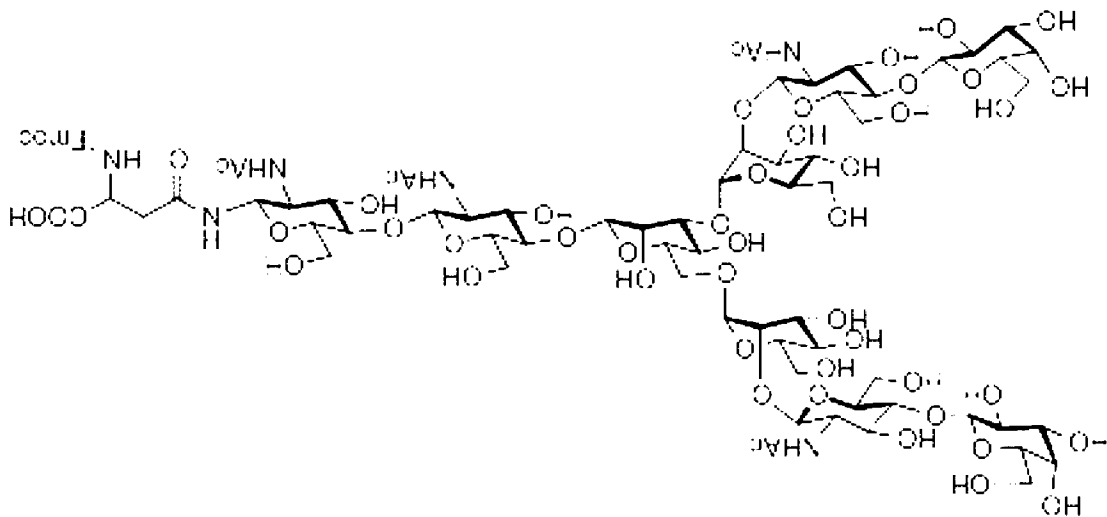
式 (91)

[0260] (合成例45-2) 樹脂上での糖鎖縮合反応

合成例45-1で合成した樹脂に結合した状態にあるポリペプチド (10 μmol) のFmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、下記式 (92) で表わされるFmoc-Asn (Asialo) -OH (29.8 mg、15 μmol)、DMF-DMSO (1/1、v/v、433 μL)、O-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウム テトラフルオロボラート (TBTU) (6.4 mg、30 μmol)、DIPEA (5.2 μL、30 μmol) を順次加え、終夜振盪した

。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、酢酸(2.86 μ L、50 μ mol)と1-ヒドロキシベンゾトリアール(HOBT)(6.8 mg、50 μ mol)とN,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)(7.3 μ L、50 μ mol)のDMF(500 μ L)溶液を加え1時間振盪した。

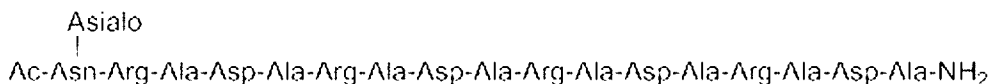
[化87]



式(92)

[0261] DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、TFA:水:トリイソプロピルシラン(=95:2.5:2.5)を加え、4時間室温で振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドの一部をHPLC[カラム:SHISEIDO C₁₈ CELL PAK C₁₈ UG-120(5 μ m)、 ϕ 20 $\times$ 250 mm、流速:7.0 mL/分、展開溶媒 A:0.1% TFA水 B:0.09% TFA/10%水/90%アセトニトリル、グラジエント A:B=90:10 $\rightarrow$ 75:25% 15分 直線濃度勾配溶出]を用いて精製し、下記式(93)で表わされる糖鎖-ポリペプチド複合体(配列番号59)(5.5 mg)を得た。

[化88]



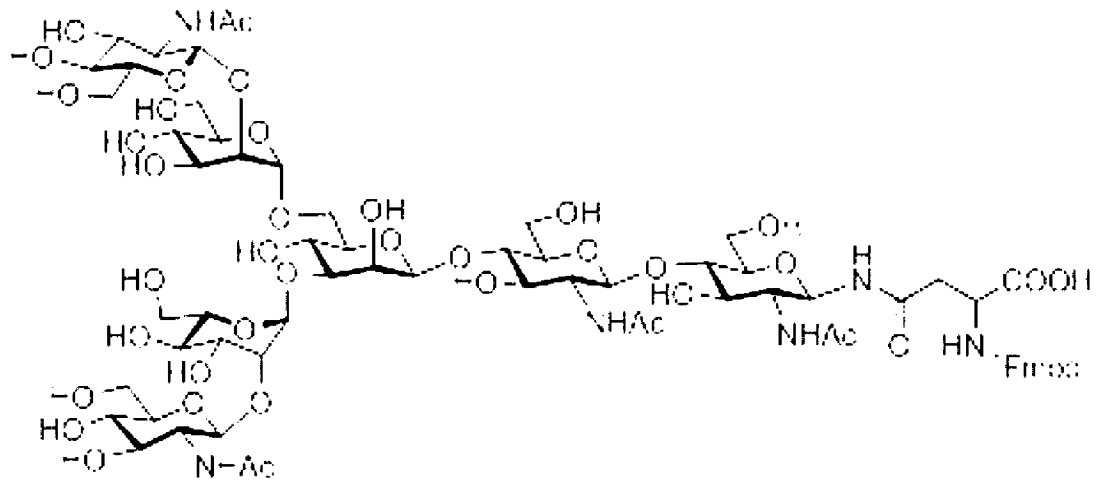
式 (93)

[0262] ESI-MS: (m/z) calcd for $\text{C}_{132}\text{H}_{221}\text{N}_{35}\text{O}_{72}$: [M+2H]²⁺ 1726.2, [M+3H]³⁺ 1151.1, [M+4H]⁴⁺ 863.6, found 1726.0, 1150.8, 863.4.

[0263] 合成例46 Ac-N(DiGlcNAc)(RADA)4の合成

合成例45-1で合成した樹脂に結合した状態にあるポリペプチド (32.1 μmol) のFmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、下記式 (94) で表わされるFmoc-Asn(DiGlcNAc)-OH (79.5 mg, 15 μmol)、DMSO-DMF (1/1, v/v, 2.5 mL)、TBTU (20.6 mg, 96.3 μmol)、DIPEA (17.2 μL, 96.3 μmol) を順次加え、2時間振盪した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、Fmoc保護基を、DMF中の20%のピペリジンで処理することにより除去した。DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、酢酸 (9.2 μL, 160.5 μmol) とHOBt (21.6 mg, 160.5 μmol) とDIC (25.1 μL, 160.5 μmol) のDMF (2 mL) 溶液を加え1時間振盪した。

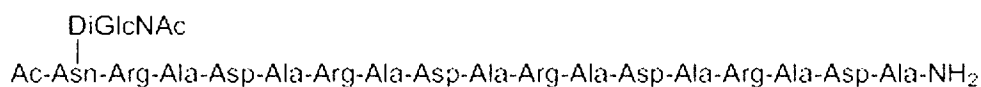
[化89]



式 (94)

[0264] DMFおよびジクロロメタンで洗浄後、TFA：水：トリイソプロピルシラン（＝95：2.5：2.5）を加え、4時間室温で振盪した。樹脂をろ過して除き、ろ液に冷却したジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿として得た。粗ペプチドの一部をHPLC [カラム：SHISEIDO CAPCELL PAK C18 UG-120 (5 μ m)、 ϕ 20×250 mm、流速：7.0 mL／分、展開溶媒 A：0.1％TFA水 B：0.09％TFA／10％水／90％アセトニトリル、グラジエント A：B＝90：10→75：25％ 15分 直線濃度勾配溶出] を用いて精製し、下記式 (95) で表わされる糖鎖－ポリペプチド複合体（配列番号60）（31.2 mg）を得た。

[化90]



式 (95)

[0265] ESI-MS: (m/z) calcd for C₁₂₀H₂₀₁N₃₅O₆₂: [M+2H]²⁺ 1564.1, [M+3H]³⁺ 1043.0, [M+4H]⁴⁺ 782.5, found 1563.7, 1043.8, 782.3。

[0266] (実施例1) スチール球載荷試験によるヒドロゲル特性の評価－1

10mgの糖鎖－ポリペプチド複合体、または、10mgの対照となるポリペプチドを500 μ Lの超純水に溶解し、2重量%のポリペプチド溶液を調製した。この溶液と各種緩衝液を同量ずつダーラム管（6*30mm、マルエム）内に添加し、ボルテックスにより激しく攪拌することで、ペプチド濃度が1重量%のヒドロゲルを作製した。このとき、緩衝液として、クエン酸－リン酸緩衝液（pH2.0及び3.5）、リン酸緩衝液（pH7.4）、リン酸－水酸化ナトリウム緩衝液（pH11.5）を用いた。ダーラム管内のヒドロゲルの表面を水平にし、20分間室温条件下で静置後、スチール球（直径1.56mm、重さ16mg、舟辺精工）をヒドロゲル上に載荷した。10分後、スチール球の位置を目視により観察した。

[0267] ダーラム管内のスチール球の位置は3段階で評価し、スチール球がヒドロゲル表面付近に留まった状態を○、載荷後に沈降し内部で留まった状態を△、またダーラム管の下部まで沈降した状態を×とした。また、ヒドロゲルが均一ではなく白濁や不溶物（沈殿物）が観察された場合に※を付記した。スチール球が表面付近に留まり（○）、白濁や不溶物が見られない（※がない）ヒドロゲルは、透明性があり、かつ均一なゲルと考えられた。得られた写真を図1に、また評価結果を表1に示す。

なお、表1において、「糖残基数」とは、糖鎖－ポリペプチド複合体に結合している糖鎖に存在する糖残基の数の合計を示す。また、表に示した化合物の番号は、説明のために便宜的に付したものであり、製造例の番号とは一致しない。

[表1]

表1

No.	化合物名	糖残基数	pH			
			2.0	3.5	7.4	11.5
1	(RADA)4	—	○	△*	×*	×*
2	C(DiGlcNAc)－(RADA)4	7	○	○	○	○

[0268] 図1および表1に示すように、C(DiGlcNAc)-(RADA)4は全てのpH領域(pH2.0～pH11.5)で透明で均一なヒドロゲル形成し、スチール球をヒドロゲル表面付近に保持した。一方、(RADA)4はpH2.0においては透明で均一なヒドロゲルを形成し、スチール球をヒドロゲル表面付近に保持したものの、pH3.5以上では白濁を伴った不均一なヒドロゲルを形成し、スチール球はヒドロゲルの内部まで侵入、もしくはダーラム管の底に沈降した。

[0269] 以上より、C(DiGlcNAc)-(RADA)4は中性pHにおいて、ヒドロゲルの強度を維持したまま、透明で均一なヒドロゲルを形成できることがわかった。

[0270] (実施例2) スチール球載荷試験によるヒドロゲル特性の評価－2

実施例1と同様の方法を用いて、C(Disialo)-(RADA)4、C(Asialo)-(RADA)4、C(Disialo)-(RADA)5、C(DiGlcNAc)-(RADA)5、および(RADA)4を用いたスチール球載荷試験を実施した。得られた評価結果を表2に示す。

[表2]

表2

No.	化合物名	糖残基数	pH	
			3.5	7.4
1	(RADA)4	—	△※	×※
2	C(DiGlcNAc)-(RADA)4	7	○	○
3	C(Disialo)-(RADA)4	11	○	○
4	C(Asialo)-(RADA)4	9	○	○
5	C(Disialo)-(RADA)5	11	○	○
6	C(Asialo)-(RADA)5	9	○	○
7	C(DiGlcNAc)-(RADA)5	7	○	○

[0271] 表2に示すように、(RADA)4の末端に比較的大きな糖鎖を修飾した

ものは、ヒドロゲルの強度を維持したまま、中性 pH において透明で均一なヒドロゲルを形成した。これは水溶性が高く、嵩高い糖鎖をポリペプチドに修飾することで、ペプチド鎖間の過度な会合の抑制、または会合体の水溶性の改善、もしくはその両方が働いた結果であると考えられる。

[0272] 以上より、(RADA) 4 または (RADA) 5 に種々の糖鎖を修飾した糖鎖-ポリペプチド複合体においても、ヒドロゲルの強度を維持したまま、中性 pH において透明で均一なヒドロゲルを形成できることが分かった。

[0273] (実施例 3) スチール球載荷試験によるヒドロゲル特性の評価-3

実施例 1 の方法と同様に、1 重量%、0.5 重量%及び 0.25 重量%のヒドロゲル濃度で C(DiGlcNAc)-(RADA) 4 のスチール球載荷試験を実施した。得られた評価結果を表 3 に示す。

[表3]

表 3

No.	化合物名	糖残基数	ヒドロゲル濃度	pH	
				3.5	7.4
2	C(DiGlcNAc)-(RADA)4	7	1 重量%	○	○
			0.5 重量%	○	○
			0.25 重量%	×	○

[0274] 表 3 に示すとおり、C(DiGlcNAc)-(RADA) 4 は、pH 7.4 において、低濃度域でも均一なヒドロゲルを形成した。また、C(DiGlcNAc)-(RADA) 4 はヒドロゲル濃度を 0.25 重量%に下げた場合、pH 7.4 のみ均一なヒドロゲルを形成した。このことから、C(DiGlcNAc)-(RADA) 4 は、ヒドロゲル濃度が低濃度である場合、pH によってヒドロゲル形成をコントロールできることがわかった。

[0275] すなわち、本発明の糖鎖-ポリペプチド複合体は、pH が中性の水溶液において、ヒドロゲル濃度が低い場合においても、ヒドロゲルの強度を維持したまま、透明で均一なヒドロゲルを形成することができることがわかった。

さらに、本発明の糖鎖-ポリペプチド複合体は、ヒドロゲル濃度が低濃度である場合、pHによってヒドロゲル形成をコントロールできることがわかった。

[0276] (実施例4) スチール球載荷試験によるヒドロゲル特性の評価-4

ヒドロゲルの濃度を0.5重量%で実施したこと以外は実施例1と同様の方法で、C(DiGlcNAc)-(RADA)4、2C(Maltose)-(RADA)4、2C(Maltotriose)-(RADA)4、C(Maltose)-(RADA)4-C(Maltose)、C(Maltotriose)-(RADA)4-C(Maltotriose)、3C(Maltose)-(RADA)4、(RADA)4-C(DiGlcNAc)、C(Maltoheptaose)-(RADA)4、(RATARA)2、C(DiGlcNAc)-(RATARA)2を用いたスチール球載荷試験を実施した。得られた評価結果を表4に示す。

[表4]

表 4

No.	化合物名	糖残基数	pH	
			3.5	7.4
1	(RADA)4	—	×※	×※
2	C(DiGlcNAc)－(RADA)4	7	○	○
8	2C(Maltose)－(RADA)4	4	○※	×※
9	2C(Maltotriose)－(RADA)4	6	○	○
10	C(Maltose)－(RADA)4 —C(Maltose)	4	○※	×※
11	C(Maltotriose)－(RADA)4 —C(Maltotriose)	6	○	○
12	3C(Maltose)－(RADA)4	6	○	○
13	(RADA)4－C(DiGlcNAc)	7	○	○
14	C (PEG2000) － (RADA) 4	—	×	×
15	C (PEG2000) － (RADA) 5	—	×	×
16	(RATARAEA) 2	—	×※	×※
17	C(DiGlcNAc)－ (RATARAEA)2	7	○	○

[0277] 表4に示すとおり、糖鎖－ポリペプチド複合体に結合している糖鎖に存在する糖残基の合計が5以上であるNo. 2、9、11、12、13、および

、17では、pH 3.5およびpH 7.4において透明で均一なヒドロゲルを形成した。また、表には記載していないが、(RADA)4のN末端にC (DiBn-Dissialo) (糖残基数11)を結合した糖鎖-ポリペプチド複合体も、pH 7.4において透明で均一なヒドロゲルを形成した。一方、糖鎖-ポリペプチド複合体に結合している糖鎖に存在する糖残基の合計が4以下であるNo. 8および、No. 10では、pH 7.4においてヒドロゲルを形成しなかった。すなわち、水溶液中で自己集合する性質を有するポリペプチドに、糖残基の合計が5以上の糖鎖を結合させた場合、当該糖鎖-ポリペプチド複合体は中性域において高い水溶性を示すようになり、透明で均一なヒドロゲルを形成することが明らかとなった。

[0278] また、糖鎖-ポリペプチド複合体に結合している糖鎖は、単独で分岐を有している糖鎖 (例えばNo. 2およびNo. 13のジグルクナック糖鎖、表2で示したジシアロ糖鎖およびアシアロ糖鎖) だけでなく、直鎖状の糖鎖 (例えば、マルトース糖鎖およびマルトリオース糖鎖) であっても、No. 9、No. 11、No. 12のように、1つのポリペプチドに2本以上結合することにより、糖鎖-ポリペプチド複合体全体として、糖鎖が分岐を有している状態であれば、pH 3.5およびpH 7.4において、透明で均一なヒドロゲルを形成することが明らかになった。

[0279] また、ポリペプチドの水溶性を向上させるために、ポリペプチドにPEGを結合させる手法が知られているが、(RADA)4および(RADA)5にPEG 2000を結合した場合 (No. 14、および、No. 15) においては、pH 3.5およびpH 7.4における不溶物は観察されなかったが、均一なヒドロゲルを形成しなかった。すなわち、本発明の糖鎖-ポリペプチド複合体は、PEG-ポリペプチド複合体と比較しても、より高い水溶性を示し、より透明で均一なヒドロゲルを形成することが明らかとなった。

[0280] また、No. 11では糖鎖がポリペプチドのN末端部分およびC末端部分に結合しており、No. 13では糖鎖がポリペプチドのC末端部分に糖鎖が結合しているが、いずれもpH 3.5およびpH 7.4において高い水溶性

を示し、透明で均一なヒドロゲルを形成した。すなわち、本発明の糖鎖－ポリペプチド複合体において、糖鎖の結合部位はポリペプチドのN末端部分だけでなく、C末端部分でもよく、両末端部分でもよいことが明らかとなった。

[0281] さらに、(RADA) 4や(RADA) 5と同様に、ヒドロゲルを形成するポリペプチドとして、(RATARA EA) 2が知られている。(RATARA EA) 2に糖鎖を結合させた場合に、ゲル形成能が向上するか否かについて、スチール球載荷試験で評価した。表4に示すとおり、糖鎖の結合がない(RATARA EA) 2であるNo. 16は、pHが3.5および7.4において不均一で白濁したヒドロゲルを形成し、スチール球はダーク管の底に沈降した。一方、(RATARA EA) 2のN末端部分にC(DiGlicNAc)を結合した糖鎖－ポリペプチド複合体であるNo. 17は、pH3.5およびpH7.4において透明で均一なゲルを形成した。また、表には示していないが、(RATARA EA) 2のN末端にC(Asialo)を結合させた糖鎖－ポリペプチド複合体も同様に、pH7.4において透明で均一なヒドロゲルを形成した。すなわち、(RATARA EA) 2を含むポリペプチドに糖鎖を結合させると、より高い水溶性を示し、より透明で均一なヒドロゲルを形成することが明らかとなった。

[0282] 以上の結果より、(RADA) 4に限らず、様々な配列のポリペプチドに対しても、糖鎖を結合させることにより、中性域を含む広範囲なpHにおいて透明で均一なゲルを形成する糖鎖－ポリペプチド複合体を製造できることが示された。

[0283] (実施例5) スチール球載荷試験によるヒドロゲル特性の評価－5

実施例1と同様の方法を用いて、N(Asialo)－(RADA) 4、N(DiGlicNAc)－(RADA) 4及びC(DiGlicNAc)－(RADA) 4を用いたスチール球載荷試験を実施した。得られた評価結果を表5に示す。

[表5]

表 5

No.	化合物名	糖残基数	pH	
			3.5	7.4
2	C(DiGlcNAc)–(RADA)4	7	○	○
18	N(Asialo)–(RADA)4	9	○	○
19	N(DiGlcNAc)–(RADA)4	7	○	○

表 5 に示す通り、アスパラギン結合型糖鎖–ポリペプチド複合体である N o. 18、19 もシステイン結合型糖鎖–ポリペプチド複合体である N o. 2 と同様に pH 3.5 及び pH 7.4 において透明で均一なヒドロゲルを形成した。すなわち、糖鎖が結合されるアミノ酸がシステイン以外であっても、本発明の糖鎖–ポリペプチド複合体は透明で均一なヒドロゲルを形成することが明らかになった。

[0284] (実施例 6) 止血基材としての利用法検討

本発明の糖鎖–ポリペプチド複合体を含むヒドロゲルが、止血材として利用できるか否かを検証するため、ラット血漿を用いた評価試験を行った。

実施例 1 と同様の方法で、ポリペプチド水溶液を調製した。7 週齢の Crlj:WI ラットからヘパリンナトリウム注（味の素）を用いて血液を採取し、遠心処理後の上清から血漿を得た。ポリペプチド水溶液、血漿、および、PBS をダーム管に加え、血漿濃度が 5 – 50 % で、ポリペプチド濃度が 0.5 重量% となるようにヒドロゲルを調製した。その後、20 分間室温条件下で静置後、実施例 1 の方法と同様にスチール球載荷試験を実施した。20 分間静置後のヒドロゲルの写真を図 2 に、評価結果を表 6 に示す。

[表6]

表 6

No.	化合物名	血漿濃度				備考
		50 %	25 %	10 %	5 %	
1	(RADA) 4	△※	△※	×※	×※	全濃度で沈殿物を確認 50 %では沈殿の上で球 を保持
2	C (D i G l c N A c) — (RADA) 4	○	○	○	○	

[0285] 図2および表6に示したように、C (D i G l c N A c) — (R A D A) 4を含むポリペプチド溶液は、血漿濃度に関わらず、均一なヒドロゲルを形成した。さらに驚くべきことには、C (D i G l c N A c) — (R A D A) 4は、血漿濃度が50 %という非常に高濃度の状態においても、均一なヒドロゲルを形成した。一方、(R A D A) 4を含むポリペプチド溶液は、全ての血漿濃度においてポリペプチド溶液が白濁し、不溶物が観察された。また、各ヒドロゲルのpHを確認したところ、全てpH6—8の間であった。すなわち、本発明の糖鎖—ポリペプチド複合体は、中性pHにおいて均一なヒドロゲルを形成するだけでなく、高濃度の血漿存在下においても、不溶物を生じにくく、透明なヒドロゲルを形成することが明らかになった。

[0286] 以上の結果から、本発明の糖鎖—ポリペプチド複合体は、止血用医薬組成物として、非常に高い利用価値を有することが示された。

[0287] (実施例7) 酸性タンパク質の徐放能の検討

本発明の糖鎖—ポリペプチド複合体を含むヒドロゲルが、中性pHにおいて徐放担体としての利用できるか否かについて検討するため、試験を行った。

[0288] 緩衝液としてリン酸緩衝液 (pH7.4) を用いた。また、ヒドロゲルに内包する酸性タンパク質として、A l e x a F l u o r (登録商標) 488で蛍光標識されたB o v i n e S e r u m A l b u m i n (B S A

(A13100、Life Technologies) を用いた。

緩衝液塩濃度が0.15Mで、BSA濃度が5 μ M、またポリペプチド濃度が0.25-1重量%となるようにチューブに加え、ボルテックスにより混合した。混合物をアルテラインシステム(351130、BD)に50 μ Lずつ添加し、37度インキュベーター(細胞培養用CO2インキュベーター、MCO-18A1C、SANYO)中で遮光下、一晚静置しBSA内包ヒドロゲルを調製した。37度インキュベーター中で、ヒドロゲルと同じ緩衝液を25 μ Lずつ加えた96well平底プレート(353928、BD)にインサートシステムを浸し、プレートシイカー(MICRO PLATE MIXER NS-P、アズワン、回転数：1/5目盛)を用いてプレートを振動させることで試験開始とした(0時間)。その後、経時的に平底プレート側に漏れ出してきた蛍光量を蛍光プレートリーダー(SpectraMax M3、モレキュラーデバイス)を用いて測定した。同一の蛍光標識BSAを用いて検量線を作成し、漏出した蛍光色素の量からタンパク質の濃度を算出した。(RADA)4を含むヒドロゲル、およびC(DiglicNAc)-(RADA)4を含むヒドロゲルを用いた結果を図3に示す。対照としては、緩衝液にBSAを添加しただけの溶液(W/O SAP)を用いた。図3中、Y軸は平底プレート中のBSA濃度を示し、X軸は試験開始からの時間を示す。

[0289] 図3に示したとおり、(RADA)4を含むヒドロゲルに内包されたBSAは、試験開始後短時間のうちに大部分が漏出した。また、その漏出速度は、ポリペプチドが0.5重量%以下では、ポリペプチドを含まない溶液の場合と同等の漏出速度であり、徐放能を有していないことが示された。一方、C(DiglicNAc)-(RADA)4を含むヒドロゲルは、0.25重量%という低濃度においても、ポリペプチドを含まない溶液の場合と比較してBSAの漏出速度が緩やかであり、徐放能を有していた。

[0290] すなわち、本発明の糖鎖-ポリペプチド複合体は、中性pHにおいて、酸性タンパク質を内包、保持し、徐放効果を有することが明らかとなった。

[0291] (実施例8) 塩基性タンパク質の徐放能の検討

内包するタンパク質として塩基性タンパク質であるL y s o z y m eを用いた以外は、実施例7に記載の方法と同様に、徐放性試験を行った。L y s o z y m eは、A l e x a F l u o r (登録商標) 488 P r o t e i n L a b e l i n g K i t (A10235、i n v i t r o g e n)を用いてA l e x a F l u o r (登録商標) 488で標識して使用した。結果を図4に示す。

[0292] 図4に示したとおり、(R A D A) 4を含むヒドロゲルに内包されたL y s o z y m eは、試験開始後1時間以内に大部分が漏出した。また、その漏出速度は、ポリペプチドを含まない溶液の場合とほぼ同等の漏出速度であり、徐放能を有していないことが示された。一方、C (D i G l c N A c) - (R A D A) 4を含むヒドロゲルは、0.25重量%という低濃度においても、ポリペプチドを含まない溶液の場合と比較してL y s o z y m eの漏出速度が緩やかであり、徐放能を有していた。

[0293] すなわち、本発明の糖鎖-ポリペプチド複合体は、中性pHにおいて、塩基性タンパク質を内包、保持し、徐放効果を有することが明らかとなった。

[0294] (実施例9) 円偏光二色性(CD)測定および解析

本発明の糖鎖-ポリペプチド複合体が β シート構造を形成することの確認として、CD測定を行った。一般的に、ある物質が β シート構造を有する場合に観察される波長の特徴は、197nm付近の正の吸収と216nm付近の負の吸収である。そのため、本発明についてもこれらの波長の大きさに注目し、pHが β シート構造に与える影響を調べた。

[0295] 本発明の一実施形態であるC (D i G l c N A c) - (R A D A) 4、または、対照として(R A D A) 4を超純水で溶解した。これらのポリペプチド水溶液へ、それぞれ1-10mMの水酸化ナトリウム水溶液を添加することでpHを調整し、pH2またはpH7の100mMポリペプチド水溶液を作成した。この水溶液を光路長0.1cmの石英セルに移した。そして、CDスペクトルを、スペクトル旋光計(J-805、J a s c o)を用いて、

波長 185 – 260 nm で、橢円形性（ミリ度）を測定した。平均残基橢円型性（Mean residue ellipticity） θ は以下の式を用いて算出した。

$$[\theta] = (\theta_{obs} / 10 \cdot l \cdot c) / r$$

ここで θ_{obs} はミリ度で測定した橢円形性、 l はセル長さ（cm）、 c は濃度（M）、そして r はアミノ酸の残基数を表す。

（RADA）4 についての結果のグラフを図 5 に示し、C（DiGlcNAc）－（RADA）4 についての結果のグラフを図 6 に示す。

[0296] 図 5 および図 6 に示すように、pH 2 では（RADA）4 および C（DiGlcNAc）－（RADA）4 とともに大きなモル橢円率を示した。一方、pH 7 においては C（DiGlcNAc）－（RADA）4 は大きなモル橢円率を示すものの、（RADA）4 のモル橢円率は著しく低下していた。すなわち、（RADA）4 は中性 pH において β シート構造をほとんど形成しなかったのに対し、C（DiGlcNAc）－（RADA）4 は中性 pH においても β シート構造を形成することが明らかとなった。

[0297] 上記の結果は、C（DiGlcNAc）－（RADA）4 は糖鎖の存在によって、ポリペプチド同士の過度な会合が抑制され、 β シートを維持していたのに対し、（RADA）4 は中性 pH では会合が過度に促進したために β シートが減少したのではないかと考えられる。このことは、（RADA）4 がスチール球載荷試験において、中性 pH で白濁・沈殿を起こし、均一で強固なヒドロゲルを形成できなくなった現象（例えば、図 1）と一致している。

[0298] 以上の結果から、本発明の糖鎖－ポリペプチド複合体は、中性 pH において β シート構造を形成することが確かめられた。

[0299] （実施例 10）動粘度測定及び解析

スチール球載荷試験で確認したヒドロゲルの強度に加えて、時間の経過におけるヒドロゲル強度の変化やヒドロゲルの安定性を観察するため、動粘度測定を行った。

[0300] 動粘度測定には、0.3 mmのギャップ高を有する直径25 mmのステンレス鋼平行プレートを備えた検流計（MCR 302、アントンパール）を用いた。本発明の一実施形態であるC（DiGlicNAc）-（RADA）4、または、対照として（RADA）4を超純水に溶解した。これらのポリペプチド水溶液へ、pH調整のために5 mMの水酸化ナトリウム水溶液を添加することで、pH7の0.5重量%のヒドロゲルを調製した。そして、これらのヒドロゲルを、25度に設定した検流計にすみやかに移し、時間経過に従って位相角（ $\tan \delta$ ）をモニタリングした。（周波数=1 Hz、歪み=10%）

この測定結果を図7に示す。

[0301] 図7に示すとおり、C（DiGlicNAc）-（RADA）4を含むヒドロゲルの位相角は、測定開始から速やかに減少していることから、強固なヒドロゲルが形成されていることが示された。一方、（RADA）4を含むヒドロゲルは位相角が大きく、壊れやすいヒドロゲルを形成している、あるいは不均一に一部分だけ強固なヒドロゲルを形成していることが示された。

[0302] このことは、（RADA）4がスチール球載荷試験において、中性pHで白濁・沈殿を起こし、均一で強固なヒドロゲルを形成できなくなった現象（例えば、図1）と一致している。

[0303] 以上の結果から、本発明の糖鎖-ポリペプチド複合体は、中性pHにおいて強固なヒドロゲルを形成することが確かめられた。

請求の範囲

- [請求項1] 糖鎖－ポリペプチド複合体であって、
前記ポリペプチドが、極性アミノ酸残基と非極性アミノ酸残基が交互に配置された、8～34個のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むポリペプチドであり、
前記ポリペプチドに1または複数の糖鎖が結合していることを特徴とする、
糖鎖－ポリペプチド複合体。
- [請求項2] 請求項1に記載の糖鎖－ポリペプチド複合体であって、
前記糖鎖－ポリペプチド複合体が、pHが中性付近の水溶液中において自己集合することにより、 β シート構造を含むヒドロゲルを形成しうるものであることを特徴とする、
糖鎖－ポリペプチド複合体。
- [請求項3] 請求項1に記載の糖鎖－ポリペプチド複合体であって、
前記各極性アミノ酸残基が、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、アルギニン残基、リジン残基、ヒスチジン残基、チロシン残基、セリン残基、トレオニン残基、アスパラギン残基、グルタミン残基、および、システイン残基からなる群から選択されるアミノ酸残基であることを特徴とする、
糖鎖－ポリペプチド複合体。
- [請求項4] 請求項1または3に記載の糖鎖－ポリペプチド複合体であって、
前記各非極性アミノ酸残基が、アラニン残基、バリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、メチオニン残基、フェニルアラニン残基、トリプトファン残基、プロリン残基、および、グリシン残基からなる群から選択されるアミノ酸残基であることを特徴とする、
糖鎖－ポリペプチド複合体。
- [請求項5] 請求項4に記載の糖鎖－ポリペプチド複合体であって、
前記各極性アミノ酸残基が、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残

基、アルギニン残基、および、トレオニン残基からなる群から選択されるアミノ酸残基であり、

前記各非極性アミノ酸が、アラニン残基であることを特徴とする、糖鎖-ポリペプチド複合体。

[請求項6] 請求項1に記載の糖鎖-ポリペプチド複合体であって、
前記アミノ酸配列が、「RADA」の繰り返し配列、または、「RATARA EA」の繰り返し配列であることを特徴とする、糖鎖-ポリペプチド複合体。

[請求項7] 請求項6に記載の糖鎖-ポリペプチド複合体であって、
前記アミノ酸配列が、RADARADARADARADA（配列番号1）、RADARADARADARADARADA（配列番号2）、および、RATARA E ARATARA EA（配列番号3）からなる群から選択されるアミノ酸配列であることを特徴とする、糖鎖-ポリペプチド複合体。

[請求項8] 請求項1に記載の糖鎖-ポリペプチド複合体であって、
前記ポリペプチドに結合している1または複数の糖鎖に存在する糖残基の数の合計が5以上であることを特徴とする、糖鎖-ポリペプチド複合体。

[請求項9] 請求項8に記載の糖鎖-ポリペプチド複合体であって、
前記ポリペプチドに結合している糖鎖の数が、1、2、または、3本であることを特徴とする、糖鎖-ポリペプチド複合体。

[請求項10] 請求項8に記載の糖鎖-ポリペプチド複合体であって、
前記ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基から数えて、 x 番目までの全てのアミノ酸、および、C末端に位置するアミノ酸残基から数えて、 y 番目までの全てのアミノ酸（ここで、 x および y は整数であり、 $x \geq 0$ であり、 $y \geq 0$ であり、 $x + y$ は、ポリペプチドに結合している糖鎖の数の合計である）に糖鎖が結合していることを特

徴とする、

糖鎖－ポリペプチド複合体。

[請求項11]

請求項10に記載の糖鎖－ポリペプチド複合体であって、

前記ポリペプチドに結合している糖鎖の数が、1、2、または3本であり、

前記ポリペプチドに結合している糖鎖の数が1本の場合には、当該1本の糖鎖は、前記ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基、または、C末端に位置するアミノ酸残基と結合しており、

前記ポリペプチドに結合している糖鎖の数が2本の場合には、当該2本の糖鎖は、次の(1)～(3)からなる群から選択されるアミノ酸残基と結合しており、

(1) 前記ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基から数えて1番目および2番目のアミノ酸残基

(2) 前記ポリペプチドのC末端に位置するアミノ酸残基から数えて1番目および2番目のアミノ酸残基

(3) 前記ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基、および、前記ポリペプチドのC末端に位置するアミノ酸残基

前記ポリペプチドに結合している糖鎖の数が3本の場合には、当該3本の糖鎖は、次の(1)～(4)からなる群から選択されるいずれかのアミノ酸残基と結合していることを特徴とする、

糖鎖－ポリペプチド複合体。

(1) 前記ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基から数えて1番目、2番目、および、3番目のアミノ酸残基

(2) 前記ポリペプチドのC末端に位置するアミノ酸残基から数えて1番目、2番目、および、3番目のアミノ酸残基

(3) 前記ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基から数えて1番目および2番目のアミノ酸残基、ならびに、前記ポリペプチドのC末端に位置するアミノ酸残基

(4) 前記ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基、ならびに、前記ポリペプチドのC末端から数えて1番目および2番目に位置するアミノ酸残基

- [請求項12] 請求項1に記載の糖鎖-ポリペプチド複合体であって、
前記糖鎖が、分岐を有する糖鎖であることを特徴とする、
糖鎖-ポリペプチド複合体。
- [請求項13] 請求項8に記載の糖鎖-ポリペプチド複合体であって、
前記糖鎖が、ジシアロ糖鎖、アシアロ糖鎖、ジグルクナック糖鎖、
ジマンノース糖鎖、グルクナック糖鎖、マルトトリオース糖鎖、マル
トース糖鎖、マルトテトラオース糖鎖、マルトヘプタオース糖鎖、 β -
シクロデキストリン、および、 γ -シクロデキストリンからなる群
から選択される糖鎖であることを特徴とする、
糖鎖-ポリペプチド複合体。
- [請求項14] 請求項1～13のいずれか1項に記載の糖鎖-ポリペプチド複合体
を含む、
ヒドロゲル形成用組成物。
- [請求項15] 請求項1～13のいずれか1項に記載の糖鎖-ポリペプチド複合体
を含む組成物であって、
前記組成物が、ヒドロゲルの状態にあることを特徴とする、
組成物。
- [請求項16] 請求項14または15に記載の組成物を含む、
止血用医薬組成物。
- [請求項17] 請求項14または15に記載の組成物を含む、
徐放担体用組成物。
- [請求項18] 請求項14または15に記載の組成物を含む、
培養基材用組成物。