明　細　書

発明の名称 ：

ＮＣＬ法に適した、ポリペプチド断片の効率的な製造方法

技術分野

[0001]　本発明は、ＮＣＬ法に適した、ポリペプチド断片の効率的な製造方法に関する。

背景技術

[0002]　タンパク質の合成には、生合成、化学合成、無細胞合成など種々の方法が知られている。生合成方法では、大腸菌等の細胞内を利用して、合成を目的とするタンパク質をコードするＤＮＡを細胞内に導入し発現させることにより、タンパク質を得る。化学合成は、アミノ酸を有機化学的に順番に結合させることにより、目的のタンパク質を合成する。また、無細胞合成は、大腸菌などの各種細胞内に存在する酵素等を利用して、無細胞的にタンパク質を合成する。これらの方法は、タンパク質の使用目的や、サイズ、付加する性質等によって適宜、使い分けたり、組み合わせたりすることができる。

[0003]　アミノ酸配列の中間部分に、糖鎖や脂質などの特定の修飾を均一に有するタンパク質を合成するためには、糖鎖を含むペプチド断片と、糖鎖を含まないペプチド断片とをそれぞれ合成し、ライゲーション法により最終的なタンパク質を合成する方法が用いられている。糖鎖を含むペプチド断片の合成は、あらかじめ糖鎖や脂質などで修飾されたアミノ酸を用いて化学合成することができる。また、糖鎖を含まない部分のペプチド断片の合成は、化学合成や生合成により製造することができる。

　ペプチド鎖を化学合成する方法としては、主に固相合成法が用いられる。しかし固相合成法によって得られるペプチド鎖は、一般的に短鎖であり、長くとも５０残基程度である。このため長鎖のペプチド鎖を合成するためには、生合成を用いることが好ましい。

[0004]　ペプチド鎖連結手法としては様々な手法が報告されているが、広く用いら

れている方法の一つが天然型化学的ライゲーション法（Ｎａｔｉｖｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ、ＮＣＬ法）である。ＮＣＬ法は、無保護のペプチド鎖同士でも行うことができ、連結部位（ライゲーション部位）に天然アミド結合（ペプチド結合）を生成するための有用な方法であることが知られている（例えば、特許文献１）。ＮＣＬ法は、Ｃ末端にαカルボキシチオエステル部分を有するようにした第１のペプチドとＮ末端にシステイン残基を有する第２のペプチドとの化学選択反応であり、システインの側鎖のチオール基（ＳＨ基、スルフヒドリル基ともいう）がチオエステル基のカルボニル炭素に選択的に反応し、チオール交換反応により、チオエステル結合初期中間体が生成する。この中間体は、自発的に分子内転位して、連結部位に天然アミド結合を与え、一方、システイン側鎖チオールを再生させる。

この方法は、無保護のペプチドを用い緩衝溶液中で混合するのみで、ペプチド結合を介して二つのペプチド鎖を連結することのできる手法である。ＮＣＬ法はペプチドのように数多くの官能基を有した化合物同士の反応であっても、選択的に一方のペプチドＣ末端と他方のペプチドＮ末端を連結することができる。このような点から、タンパク質を化学合成するためにはいかにＮＣＬ法を利用するかが重要になる。

[0005] しかしＮＣＬ法の利用における問題点として、原料として必要な、Ｃ末端にαカルボキシチオエステル部分を有するペプチドチオエステル体の調製が挙げられる。ペプチドチオエステルの調製法は、様々な方法が報告されているが（例えば、非特許文献１および特許文献２）、いずれの手法も、固相合成法を基盤としてものであり、固相合成の制限に束縛されるため、合成できるペプチドチオエステル体のサイズが制限されてしまう。さらに、リンカーを用いる手法では非天然型のアミノ酸誘導体や、特別な誘導体を別途化学合成しなければならず、必ずしもその手順は簡便であるとはいえない。

[0006] 一方、細胞により生合成されたポリペプチドフラグメントをチオエステル体として得る方法（Ｉｎｔｅｉｎ法）も報告されているが（非特許文献２）、この方法を用いる場合は、ポリペプチドを発現させるのみではなく、タン

パク質スプライシングを機能させるために、標的となるペプチド配列が必要であり、また必ず発現したインテイン複合タンパク質がフォールディングし、固有の三次元構造をとらなければならない。このため、発現させるポリペプチド配列によっては、必ずしもペプチドチオエステルが得られず、常に十分な条件の最適化が伴い、作業的な煩雑さが付随する。

[0007] また、Ｉｎｔｅｉｎ法とは別に、生合成したポリペプチドに適用可能な、チオエステル体の製造方法も報告されている（特許文献３）。この方法は、合成したポリペプチドに含まれるシステインを活性化させることにより、活性化したシステインの位置をチオエステル体として切り出す方法である。すなわち、活性化させたシステインよりＮ末側のペプチド断片をチオエステル体として得ることができる。しかしながら、この方法では、活性化されたシステインよりＣ末側に切り出されたポリペプチドは、切り出された際にそのＮ末端が化学的に安定な環状構造を形成し、これ以降のタンパク合成に使用することができなかった。このため、Ｎ末側のペプチド断片はライゲーション可能なペプチド断片として別途製造する必要があった。

[0008] また、生合成においては、全長のタンパク質は正常に発現されても、ペプチドフラグメントの場合は細胞中でミスであると認識され、分解されるなど正常に発現されないことがある。そこで、全長タンパク質を生合成した後に、上記方法で必要なペプチド断片をチオエステル体として切り出すような場合、切り出したペプチド断片よりＣ末側の長鎖のポリペプチドを利用することができなかった。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開第９６／３４８７８号パンフレット

特許文献2：国際公開第２００７／１１４４５４号パンフレット

特許文献3：国際公開第２０１０／１５０７３０号パンフレット

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Ｉｎｇｅｎｉｔｏ ｅｔ ａｌ．， Ｊ． Ａｍ． Ｃｈｅｍ

．　Ｓｏｃ．　１９９９，　１２１，　１１３６９－１１３７４
非特許文献2：Ｓｃｈｗａｒｔｚ　ｅｔ　ａｌ．，　ＣＨＥＭ．　ＣＯＭＭＵＮ．，　２００３　２０８７－２０９０

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011]　本発明は、ＮＣＬ法に適した、Ｎ末側がシステインである第１のポリペプチド断片とＣ末側が修飾された第２のポリペプチド断片とを効率的に製造する方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012]　本発明者らは、上記課題を解決するために研究を重ねた結果、
第１のポリペプチド断片と第２のポリペプチド断片とを特定の配列を介在させて、１つのポリペプチドとして作製することにより、ＮＣＬ法に適した、Ｎ末端がシステインである第１のポリペプチド断片とＣ末側が修飾された第２のポリペプチド断片とを効率的に製造できることを見出した。

即ち、本発明は、

（１）以下の構造を有するポリペプチド：

（Ｎ末側）　第２のポリペプチド断片－Ｃｙｓ－Ｗ－（Ｈｉｓ）ｎ－Ｚ－Ｍｅｔ－第１のポリペプチド断片　（Ｃ末側）

［ここでｎは、０～１０の整数を意味し、Ｃｙｓはシステイン、Ｗは任意の１、２又は３個のアミノ酸を意味し、Ｚは、任意の０、１、又は２個のアミノ酸を意味し、Ｈｉｓはヒスチジンを意味し、Ｍｅｔはメチオニンを意味する。また、第１のポリペプチド断片のＮ末端はシステインである。］

にＣＮＢｒを反応させ、以下のポリペプチド断片を得るステップ；

（Ａ）Ｎ末端がシステインである第１のポリペプチド断片

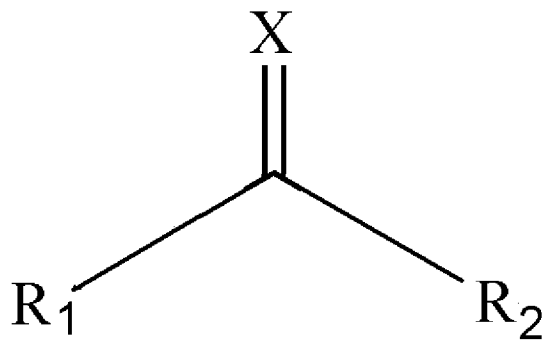
（Ｂ）以下の構造を有する第３のポリペプチド断片：

（Ｎ末側）　第２のポリペプチド断片－Ｃｙｓ－Ｗ－（Ｈｉｓ）ｎ－Ｚ－Ｍｅｔ’　（Ｃ末側）

［ここで、Ｍｅｔ’は、Ｍｅｔの誘導体を意味する。］

（２）前記第３のポリペプチド断片に、下記式（Ｉ）で表わされる化合物：

［化1］



（Ｉ）

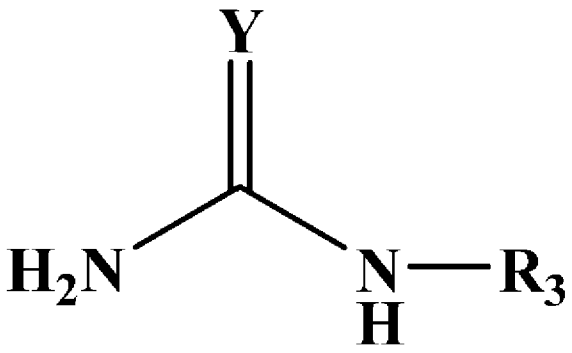
［式中、

Ｘは硫黄原子または酸素原子であり、

R_1及びR_2は、脱離基である。］

を反応させ、続いて、有機溶媒中で、下記式（ＩＩ）で表わされる化合物：

［化2］



（ＩＩ）

［式中、

Ｙは、酸素原子、硫黄原子、または、＝ＮＨであり、

R_3は、水素原子、アシル基、または、アルコキシカルボニル基である。］

を反応させることにより、以下の構造を有するＣ末側が修飾された第２のポリペプチド断片：

（Ｎ末側）　第２のポリペプチド断片－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－Ｃ（＝Ｙ）ＮＨR_3　（Ｃ末側）

を得るステップ、を含む、ＮＣＬ法に適した、Ｎ末端がシステインである第１のポリペプチド断片とＣ末側が修飾された第２のポリペプチド断片とを効率的に製造する方法に関する。

[0013] ここで、本発明の製造方法の一実施態様においては、

前記（２）のステップにおいて得られたＣ末側が修飾された第２のポリペプチド断片に、さらに下記式で表されるチオール

R_4－ＳＨ

［式中、R_4は、置換もしくは非置換のベンジル基、置換もしくは非置換のアリール基、および、置換もしくは非置換のアルキル基からなる群から選択されるいずれか一つの基である。］

を反応させ、Ｃ末側の－ＮＨ－Ｃ（＝Ｙ）ＮＨR_3基とチオール基とを交換させることにより、以下の構造を有するＣ末側が修飾された第２のポリペプチド断片：

（Ｎ末側）　第２のポリペプチド断片－Ｃ（＝Ｏ）－ＳR_4　（Ｃ末側）

を得るステップをさらに含むことを特徴とする。

また、本発明の製造方法の一実施態様においては、前記式（Ｉ）で表わされる化合物におけるＸが硫黄原子であることを特徴とする。

また、本発明の製造方法の一実施態様においては、前記式（Ｉ）で表わされる化合物中におけるR_1が、－Ｏ－C_6アリール基であることを特徴とする。

また、本発明の製造方法の一実施態様においては、前記式（Ｉ）で表わされる化合物におけるR_2が、ハロゲン原子、または、置換もしくは非置換の－Ｓ－C_{6-10}アリール基であることを特徴とする。

また、本発明の製造方法の一実施態様においては、前記式（ＩＩ）で表わされる化合物におけるＹが＝ＮＨであることを特徴とする。

また、本発明の製造方法の一実施態様においては、前記式（ＩＩ）で表わされる化合物におけるR_3が、アセチル基であることを特徴とする。

また、本発明の製造方法の一実施態様においては、前記、以下の構造を有

するポリペプチド：

（Ｎ末側）　　第２のポリペプチド断片－Ｃｙｓ－Ｗ－（Ｈｉｓ）ｎ－Ｚ－Ｍｅｔ－第１のポリペプチド断片　　（Ｃ末側）

が、細胞によって発現された組換えポリペプチド断片であることを特徴とする。

また、本発明の製造方法の一実施態様においては、前記細胞が大腸菌であることを特徴とする。

また、本発明の製造方法の一実施態様においては、Ｗが１個のアミノ酸であり、かつ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｔｒｐからなる群より選択されるいずれか一つのアミノ酸であることを特徴とする。

また、本発明の製造方法の一実施態様においては、ｎが６～１０であることを特徴とする。

[0014]　また、本発明の別の態様は、ＮＣＬ法に適した、Ｎ末側がシステインである第１のポリペプチド断片を製造する方法であって、

以下の構造を有するポリペプチド：

（Ｎ末側）　　第２のポリペプチド断片－Ｐ－Ｍｅｔ－第１のポリペプチド断片　　（Ｃ末側）

［ここでＰは、任意の０～１０個のアミノ酸であり、Ｍｅｔはメチオニンを意味し、第１のポリペプチド断片のＮ末側はシステインである。］

にＣＮＢｒを反応させることを特徴とする方法に関する。

[0015]　また、本発明の別の態様は、

（１）製造しようとする所望の糖鎖付加ポリペプチドのペプチド配列を、少なくとも、

・糖鎖が付加されたアミノ酸を含むポリペプチドからなる糖鎖含有ポリペプチド断片、

・糖鎖含有ポリペプチド断片よりもＮ末側にあり所望の糖鎖付加ペプチドのＮ末側を含むポリペプチドからなる第２のポリペプチド断片、

・糖鎖含有ポリペプチド断片よりもＣ末側にあり所望の糖鎖付加ペプチドの

Ｃ末側を含むポリペプチドからなる第１のポリペプチド断片、

・存在し得る場合には、糖鎖含有ポリペプチド断片と第２のポリペプチド断片との間のポリペプチド断片、

・存在し得る場合には、糖鎖含有ポリペプチド断片と第１のポリペプチド断片との間のポリペプチド断片、

に分類して設計するステップ；

ここで、第１のポリペプチド断片のＮ末端はシステインであるように設計されており、

（２）以下の構造を有するポリペプチド：

（Ｎ末側）　第２のポリペプチド断片－Ｃｙｓ－Ｗ－（Ｈｉｓ）ｎ－Ｚ－Ｍｅｔ－第１のポリペプチド断片　（Ｃ末側）

［ここでｎは、０～１０の整数を意味し、Ｃｙｓはシステイン、Ｗは任意の１、２又は３個のアミノ酸を意味し、Ｚは、任意の０、１、又は２個のアミノ酸を意味し、Ｈｉｓはヒスチジンを意味し、Ｍｅｔはメチオニンを意味する。また、第１のポリペプチド断片のＮ末端はシステインである。］

をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを用いて、大腸菌によって発現させ、前記構造を有するポリペプチドを取得するステップ；

（３）ステップ（２）で得られたポリペプチドにＣＮＢｒを反応させ、以下のポリペプチド断片を得るステップ；

（Ａ）Ｎ末端がシステインである第１のポリペプチド断片

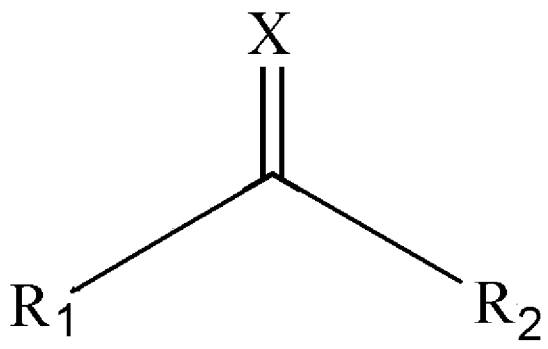
（Ｂ）以下の構造を有する第３のポリペプチド断片：

（Ｎ末側）　第２のポリペプチド断片－Ｃｙｓ－Ｗ－（Ｈｉｓ）ｎ－Ｚ－Ｍｅｔ’　（Ｃ末側）

（ここで、Ｍｅｔ’は、Ｍｅｔの誘導体を意味する。）

（４）前記第３のポリペプチド断片に、下記式（Ｉ）で表わされる化合物：

［化3］

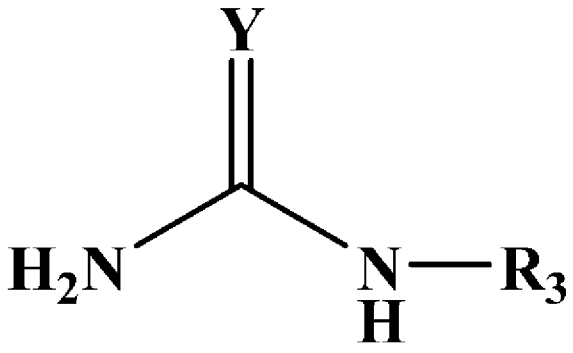


（Ｉ）

［式中、Ｘは硫黄原子または酸素原子であり、R_1及びR_2は、脱離基である。］

を反応させ、続いて、有機溶媒中で、下記式（ＩＩ）で表わされる化合物：

［化4］



（ＩＩ）

［式中、

Ｙは酸素原子、硫黄原子、または、ＮＨ基であり、

R_3は、水素原子、アシル基、または、アルコキシカルボニル基である。］

を反応させることにより、以下の構造を有するＣ末側が修飾された第２のポリペプチド断片：

（Ｎ末側）　第２のポリペプチド断片－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－Ｃ（＝Ｙ）ＮＨR_3　（Ｃ末側）

を得るステップ；

（５）任意に、前記（４）のステップにおいて得られたＣ末側が修飾された

第２のポリペプチド断片に、さらに下記式で表されるチオール

R_4－ＳＨ

［式中、R_4は、置換もしくは非置換のベンジル基、置換もしくは非置換のアリール基、および、置換もしくは非置換のアルキル基からなる群から選択されるいずれか一つの基である。］

を反応させ、Ｃ末側の－ＮＨ－Ｃ（＝Ｙ）ＮＨR_3基とチオール基とを交換させることにより、以下の構造を有するＣ末側が修飾された第２のポリペプチド断片：

（Ｎ末側）　第２のポリペプチド断片－Ｃ（＝Ｏ）－ＳR_4　（Ｃ末側）

を得るステップ；

（６）化学的に合成することにより別に調製された、

・前記糖鎖含有ポリペプチド断片、

・存在し得る場合には、糖鎖含有ポリペプチド断片と第２のポリペプチド断片との間の前記ポリペプチド断片、

・存在し得る場合には、糖鎖含有ポリペプチド断片と第１のポリペプチド断片との間の前記ポリペプチド断片、

と、

ステップ（３）によって得られたＮ末端がシステインである第１のポリペプチド断片

ステップ（４）又は（５）によって得られたＣ末側が修飾された第２のポリペプチド断片

とを、所望の糖鎖付加ポリペプチドが得られるような順序により、ライゲーション法により結合するステップ、を含む、糖鎖付加ポリペプチドの製造方法に関する。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの製造方法の一実施態様においては、前記式（Ｉ）で表わされる化合物におけるＸが硫黄原子であることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの製造方法の一実施態様においては

、前記式（Ｉ）で表わされる化合物中におけるＲ$_1$が、－Ｏ－Ｃ$_6$アリール基であることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの製造方法の一実施態様においては、前記式（Ｉ）で表わされる化合物におけるＲ$_2$が、ハロゲン原子、または、置換もしくは非置換の－Ｓ－Ｃ$_{6-10}$アリール基であることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの製造方法の一実施態様においては、前記式（ＩＩ）で表わされる化合物におけるＹが＝ＮＨであることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの製造方法の一実施態様においては、前記式（ＩＩ）で表わされる化合物におけるＲ$_3$が、アセチル基であることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの製造方法の一実施態様においては、Ｗが１個のアミノ酸であり、かつ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｔｒｐからなる群より選択されるいずれか一つのアミノ酸であることを特徴とする。

また、本発明の糖鎖付加ポリペプチドの製造方法の一実施態様においては、ｎが６～１０であることを特徴とする。

発明の効果

[0016] 本発明により、ポリペプチド鎖から、ＮＣＬ法に適したＮ末端がシステインである第１のポリペプチド断片と、Ｃ末側が修飾された第２のポリペプチド断片とを効率的に製造する方法が提供された。

[0017] また、本発明は、ペプチドフラグメントとして正常に発現できないものであっても、ペプチド断片を他のペプチド断片と連結された状態で、ライゲーションに使用可能に発現させることができ、複数のペプチド断片を効率的に作製することが可能となる。

[0018] また、本発明の方法を従来のペプチド合成法と併用することにより、これまで合成が困難であったペプチドの一部分に修飾を有する長鎖ペプチドであっても、例えば、本発明の方法を使用して、修飾を有さない部分は比較的長鎖を合成しやすい生合成法によりフラグメントを作成し、修飾を有する部分

は固相合成法を用いてフラグメントを作成し、これらを連結することによって簡便に製造することが可能である。

[0019] より具体的には、修飾が糖鎖であれば天然結合型の糖鎖を付加したアミノ酸を含む断片のみを化学合成し、その他の部分を生合成により調製して、本願の方法でライゲーションに適したペプチドフラグメントを作製、連結することで、より長鎖の糖鎖ペプチドを簡便に製造可能である。

[0020] また、リンカーを介してペプチド鎖に糖鎖等を後付けする方法が公知であり、これは生合成した長鎖ペプチドにも糖鎖の後付けが可能である。しかし、このリンカーを介した糖鎖結合方法は、特定のアミノ酸や構造を利用して糖鎖等を結合させるものである。したがって、例えば、糖鎖が結合可能な部位がペプチド中に複数存在する場合には、生合成により長鎖ペプチドを得た後に、所望の結合部位のみを含むペプチドフラグメントを、本願の方法を用いて長鎖ペプチドから切り出して糖鎖を付加し、残りの部分と連結し直すことで、従来と比較してより簡便に部位選択的に糖鎖を付加することもできる。

以上のように、本発明のペプチドチオエステル化方法は、タンパク質の合成全般において有用である。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]図１は、本発明の一実施の形態において、ポリペプチドの発現に使用するｐＥＴ３２ａベクターの配列情報を示す図である。

[図2]図２は、本発明の一実施の形態において、大腸菌を用いた本発明の介在配列を有するポリペプチド断片の生合成を示す摸式図である。

[図3]図３は、発現したタンパクをＮｉカラムで精製した際の写真を示す。図３中、Ｍ＝分子量マーカー、Ｅ＝発現した混合物、Ｐ＝カラムをスルーした画分、１～８は、２５０ｍＭ　イミダゾールでの溶出フラクション番号、Ｂ＝ブランクを示す。

[図4]図４は、本発明の一実施の形態において、大腸菌により発現させた介在配列を有するポリペプチド断片を、ＣＮＢｒを用いて２つのポリペプチド断

片に切り離す工程を示すフローチャートである。なお、大腸菌より発現させたポリペプチド断片のＮ末端には、メチオニンを介してチオレドキシンが付加されており、ＣＮＢｒの処理の際に、チオレドキシンも切り離している。

[図5]図５ａ）は、ＣＮＢｒ処理後の分解物をＨＰＬＣにより分析した結果を示す。図５ｂ）は、インターロイキン－１３誘導体の１～２７番目のアミノ酸を有するペプチド断片Ａの質量分析結果を示す。図５ｃ）は、インターロイキン－１３誘導体の５６～１１２番目のアミノ酸を有するペプチド断片Ｄの質量分析結果を示す。

[図6]図６は、本発明のＮＣＬ法に適したポリペプチド断片の製造方法を利用した一実施の形態であって、インターロイキン－１３誘導体を４つのポリペプチド断片に分け、フラグメントＡとフラグメントＤとを介在配列を有する融合タンパク質として、生合成するフローを示す摸式図である。

発明を実施するための形態

[0022] 以下、本発明の好適な実施の形態について説明する。

[0023] 本発明は、以下の構造を有するポリペプチド（ｉ）

（Ｎ末側） 第２のポリペプチド断片－Ｃｙｓ－Ｗ－（Ｈｉｓ）ｎ－Ｚ－Ｍｅｔ－第１のポリペプチド断片 （Ｃ末側）・・・・（ｉ）

［ここでｎは、０～１０の整数を意味し、Ｃｙｓはシステイン、Ｗは任意の１、２又は３個のアミノ酸を意味し、Ｚは、任意の０、１、又は２個のアミノ酸を意味し、Ｈｉｓはヒスチジンを意味し、Ｍｅｔはメチオニンを意味する。また、第１のポリペプチド断片のＮ末端はシステインである。］

にＣＮＢｒを反応させ、以下のポリペプチド断片を得るステップを含む。

（Ａ）Ｎ末端がシステインである第１のポリペプチド断片

（Ｂ）以下の構造を有する第３のポリペプチド断片（ｉｉ）：

（Ｎ末側） 第２のポリペプチド断片－Ｃｙｓ－Ｗ－（Ｈｉｓ）ｎ－Ｚ－Ｍｅｔ’ （Ｃ末側）・・・・（ｉｉ）

［ここで、Ｍｅｔ’は、Ｍｅｔの誘導体を意味する。］

[0024] 本明細書において、「ペプチド」とは、２以上のアミノ酸がアミド結合に

より結合しているものであれば特に限定されず、公知ペプチド及び新規ペプチド並びにペプチド改変体を含む。一般にタンパク質と呼ばれるものも、本発明においてはペプチド中に含むものとする。また、本発明においては「ポリペプチド」も、同様にペプチド中に含むものとする。本発明の方法に用いられるペプチド鎖は、天然のタンパク質であってもよいし、生合成、化学合成または無細胞合成等の方法によって得られたペプチド鎖であってもよい。

[0025] 本明細書において、「ペプチド改変体」とは、ペプチドの自然変異体、翻訳後修飾体、又は人工的に改変した化合物を含む。そのような改変としては、例えば、ペプチドの１又は複数のアミノ酸残基の、アルキル化、アシル化（例えばアセチル化）、アミド化（例えば、ペプチドのＣ末端のアミド化）、カルボキシル化、エステル形成、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、リン酸化、水酸化、標識成分の結合等が挙げられる。

[0026] 本明細書において、「アミノ酸」とは、その最も広い意味で用いられ、天然のアミノ酸、例えばセリン（Ｓｅｒ）、アスパラギン（Ａｓｎ）、バリン（Ｖａｌ）、ロイシン（Ｌｅｕ）、イソロイシン（Ｉｌｅ）、アラニン（Ａｌａ）、チロシン（Ｔｙｒ）、グリシン（Ｇｌｙ）、リジン（Ｌｙｓ）、アルギニン（Ａｒｇ）、ヒスチジン（Ｈｉｓ）、アスパラギン酸（Ａｓｐ）、グルタミン酸（Ｇｌｕ）、グルタミン（Ｇｌｎ）、トレオニン（Ｔｈｒ）、システイン（Ｃｙｓ）、メチオニン（Ｍｅｔ）、フェニルアラニン（Ｐｈｅ）、トリプトファン（Ｔｒｐ）、プロリン（Ｐｒｏ）のみならず、アミノ酸変異体及び誘導体といったような非天然アミノ酸を含む。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Ｌ－アミノ酸；Ｄ－アミノ酸；アミノ酸変異体及び誘導体等の化学修飾されたアミノ酸；ノルロイシン、β－アラニン、オルニチン等生体内でタンパク質の構成材料とならないアミノ酸；及び当業者に公知のアミノ酸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。

[0027] 本明細書において、「ポリペプチド断片」とは、目的とするタンパク質を合成する際に製造される、目的タンパク質のアミノ酸配列の一部を含むポリ

ペプチドである。

[0028] ここで、「第１のポリペプチド断片」および「第２のポリペプチド断片」とは、目的とするタンパク質のアミノ酸配列の一部をそれぞれ含む断片である。本発明において、「第１のポリペプチド断片」および「第２のポリペプチド断片」は、介在配列を介して連結された状態で合成される。また、本発明の方法において、「第１のポリペプチド断片」および「第２のポリペプチド断片」は、最終的にそれぞれライゲーションに適した形でポリペプチド断片として得ることができる。

なお、第１のポリペプチドは、そのＮ末端にシステインを含むように設計されるポリペプチドである。これにより、最終的に、第１のポリペプチド断片として切り出された際に、Ｎ末側で他のペプチド断片とライゲーションをすることが可能となる。また、第２のポリペプチド断片は、最終的に第２のポリペプチドとして切り出された際に、Ｃ末側がライゲーションに適した形に修飾されており、Ｃ末側において他のポリペプチド断片とライゲーションをすることが可能となる。

[0029] また、本発明のポリペプチド（ｉ）は、第１のポリペプチド断片と第２のポリペプチド断片との間に、「（Ｎ末側）　－Ｃｙｓ－Ｗ－（Ｈｉｓ）ｎ－Ｚ－Ｍｅｔ－　（Ｃ末側）」の介在配列を有する。

ここで、ｎは、０～１０の整数を意味し、Ｃｙｓはシステイン、Ｗは任意の１、２又は３個のアミノ酸を意味し、Ｚは、任意の０、１、又は２個のアミノ酸を意味し、Ｈｉｓはヒスチジンを意味し、Ｍｅｔはメチオニンを意味する。また、第１のポリペプチド断片のＮ末端はシステインである。

また、ポリペプチド（ｉ）は、そのＮ末側および／またはＣ末側において、上記介在配列を介して、さらに別のポリペプチド断片と連結していてもよい。

[0030] 介在配列において、Ｗで示されるアミノ酸としては、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｔｒｐからなる群より選択されるいずれか一つのアミノ酸を含む事が好ましく、特に、Ｎ末側のＣｙｓに直接隣接するアミノ酸がこれらのアミノ

酸から選択されることが好ましい。このように、嵩高いアミノ酸をＣｙｓに隣接させることにより、後述する式（ＩＩ）で表わされる化合物を用いる反応（ｂ）において、副反応の発生率が抑制することができ、目的とするＣ末側が修飾された第２のポリペプチドの収率を向上させることができる。

[0031] また、介在配列において、（Ｈｉｓ）ｎは、ヒスタグを示し、生合成したポリペプチドの精製を容易にするものである。ヒスタグが付加されたポリペプチドの精製は、当業者に周知の方法により行うことができ、例えば、市販のＮｉ－ＮＴＡアガロースゲルを用いることにより容易に精製することができる。

なお、上記介在配列においてヒスタグを有さない場合（ｎ＝０の場合）に、ヒスタグを、ポリペプチド（ｉ）のＮ末側またはＣ末側に付加させて、発現させることも可能である。介在配列がヒスタグを有する場合、ｎは、好ましくは、６～１０の整数である。

[0032] また、介在配列において、Ｍｅｔは、ＭｅｔよりＣ末側に存在する第１のポリペプチドを切り離す際に使用されるアミノ酸である。

生合成したポリペプチド（ｉ）をＭｅｔの位置にて、切り離す際には、例えば、ＣｎＢｒ、７０％ＨＣＯＯＨ水溶液を用いて、室温にて処理することができる。なお、処理するペプチド配列中において、側鎖にＯＨ基を有するＳｅｒやＴｈｒが多く含まれる場合、側鎖のギ酸エステルが問題となる。このような場合には、エステル化を避けるために、反応溶液のギ酸の含有量を下げる、無機酸を使用する、容易に除去可能なトリフルオロ酢酸エステルを生じさせるためにＴＦＡを使用する等の対応をすることが好ましい。

上記反応において使用される好ましい酸としては、例えば、ギ酸、リン酸、トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）、トリブロモ酢酸、メタンスルホン酸を挙げることができるがこれらに限定されない。これらの酸は、０．１％～５０％の濃度で加えることが好ましく、より好ましくは１％～２０％、さらに好ましくは１％～５％である。

また上記反応において水混和性溶剤を使用することもできる。水混和性溶

剤は、水混和性を有する溶剤である限り特に限定されないが、例えば、アセトニトリル、トリフルオロエタノール、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、塩化メチレン等を挙げることができ、中でも、アセトニトリル、トリフルオロエタノール、ジメチルホルムアミドが好ましい。このような溶剤は、１％～７０％の濃度で加えることが好ましく、より好ましくは２０％～６０％、さらに好ましくは、３５％～５０％である。

このように、酸と水混和性溶剤の存在下で切断することにより、目的ポリペプチドの産生率を上昇させることが可能である。

[0033] なお、上記反応により、Ｍｅｔの位置でポリペプチド（ｉ）を切り離した際には、Ｎ末側の第２ポリペプチド断片－Ｃｙｓ－Ｗ－（Ｈｉｓ）ｎ－Ｚ－Ｍｅｔ’のアミノ酸配列を有するポリペプチド断片と、Ｃ末側の第１ポリペプチド断片を得ることができる。

なお、Ｍｅｔ’は、Ｍｅｔの誘導体を意味し、上記のような切断反応により生成されるＭｅｔの誘導体を示す。

[0034] 本発明のポリペプチド（ｉ）に含まれる「第１のポリペプチド断片」および「第２のポリペプチド断片」は、アミノ酸配列の長さやアミノ酸の種類に基づき、適宜好ましい断片を設計することができる。本発明において、ポリペプチド断片を設計する際は、特に第１のポリペプチド断片として生合成されるポリペプチド断片が、そのＮ末端にシステインを有するように設計される。

[0035] 本発明のポリペプチド（ｉ）は、天然のタンパク質であってもよいし、生合成、化学合成または無細胞合成等の方法によって得られたペプチド鎖であってもよいが、好ましくは菌体もしくは細胞内で発現された組換えタンパク質である。組換えタンパク質は人為的に菌体内もしくは細胞内で発現させる限り、天然のタンパク質と同じペプチド配列を有するものであってもよいし、変異や精製用のタグなどの修飾を有するペプチド配列を有するものであってもよい。

[0036] 本発明ポリペプチド（ｉ）は、当業者に公知の方法によって調製が可能で

ある。例えば、組換えベクターに目的の遺伝子を導入して発現させることができる。本発明で用いる組換えベクターとしては、宿主細胞を形質転換し得るものであればよく、宿主細胞に応じて大腸菌用のプラスミド、枯草菌用のプラスミド、酵母用のプラスミド、レトロウイルス，ワクシニアウイルス，バキュロウイルスなどの動物ウイルスベクターなどが用いられる。これらには、その宿主細胞にてタンパク質を適切に発現させ得るプロモーター等の制御配列を有しているものが好ましい。また、宿主細胞としては、組換えベクターにて外来性遺伝子を発現できる物であればよく、一般的には、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

[0037] 宿主細胞に組換えベクターを移入する方法としては、一般的に常用されている方法を用いればよく、例えば、大腸菌の場合は、ヒートショック法、塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法、酵母の場合は塩化リチウム法やエレクトロポレーション法が利用できる。また、動物細胞の形質転換は、エレクトロポレーション等の物理的方法、あるいは、リポソーム法やリン酸カルシウム法等の化学的方法、あるいはレトロウイルス等のウイルスベクターを用いて行なうことができる。また、ベクター導入後は、当業者に周知の方法により、目的のＤＮＡ配列が正しく組込まれていることを確認することが好ましい。形質転換体である宿主細胞の培養形態は、宿主の栄養生理学的性質を考慮して培養条件を選択すればよい。

[0038] 本発明で使用されるペプチドは、精製されていることが好ましい。ペプチドの精製方法は通常の一般的な精製により行うことができる。たとえば、組換えタンパク質であれば、本発明で使用される組換えタンパク質を発現する菌体あるいは細胞を培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりペプチドの粗抽出液を調製する。緩衝液中には、尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンＸ－１００ＴＭなどの界面活性剤が含まれていてもよい。このようにして得られた抽出液、あるいは培養上清中に含まれるペプチ

ドの精製は、公知の精製方法によって行うことができる。例えば、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、フィルター、限外ろ過、ゲルろ過、電気泳動、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、ペプチドの分離、精製を行うことが可能である。

[0039] また、組換えタンパク質の精製を容易にするために、発現ベクターに種々のタグを組み込んでおくこともできる。タグの例としては、発現効率を向上させるタグや、精製効率を向上させるタグ等、当業者に周知のタグを使用することができ、例えば、チオレドキシン、ＧＳＴタグ、Ｍｙｃタグ、ＦＬＡＧタグ、マルトース結合タンパク（ＭＢＰ）などが挙げられる。

また、これらのタグは、ポリペプチド（ｉ）とＭｅｔ（メチオニン）を介して連結させておくこともできる。このようにメチオニンを介してタグをポリペプチド（ｉ）に連結させて作製することにより、第１のポリペプチド断片と第２のポリペプチド断片とをメチオニンを標的として切り離す際に、同時にタグを切り離すことができる。

[0040] また、ポリペプチド（ｉ）として作製されない、その他のタンパク質合成に必要なポリペプチド断片の合成には、当該技術分野で既知の任意の化学合成法を用いることができる。特に、糖鎖結合部分のポリペプチド鎖の合成は均一の糖鎖構造を有するペプチド断片を製造するために化学合成することが好ましく、かかる手法としては、限定されることなく、例えば、液相合成法、固相合成法、Ｂｏｃ法、Ｆｍｏｃ法などが挙げられる。より具体的には、糖鎖が付加したアミノ酸として糖鎖付加Ａｓｎを使用し、通常のペプチドフラグメントの合成と同様に、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付加ペプチドフラグメントを製造する方法を用いることができる。このような方法は、国際公開第２００４／００５３３０号パンフレット（ＵＳ２００５２２２３８２（Ａ１））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。

[0041] なお、目的とするタンパク質のアミノ酸配列において、Ｎ末側およびＣ末側にライゲーションを必要とするペプチド断片を製造する際には、ライゲー

ションの副生成物を避けるため、Ｎ末側のシステインは、チアゾリジン型のシステインやＡｃｍ基等で保護されたシステインを連結させておく。すなわち、ライゲーション工程は、目的とするタンパク質のＣ末側のペプチド断片より連結させていき、連結が終わったペプチド断片のＮ末端のシステインをライゲーション可能な状態に戻すことで、順番にタンパク質におけるＮ末側へペプチド断片を連結させていく。例えば、チアゾリジン型のシステインを導入する際は、固相合成時に導入することもできるし、当業者に周知の方法でポリペプチド断片の合成後に選択的にシステインをチアゾリジン化させることもできる。

[0042] また、合成したポリペプチド鎖へ結合基を介して糖鎖を付加させることもできる。このような糖鎖の結合は、当該技術分野で既知の任意の手法を用いることができる。かかる手法としては、限定されることなく、例えば、還元末端に－ＮＨ－（ＣＯ）－CH_2Ｘ、－ＮＨ－（ＣＯ）－$(CH_2)_b$－CH_2Ｘ、イソチオシアネート基、－ＮＨ－$(CO)_a$－$(CH_2)_b$－CO_2Ｈおよび－ＮＨ－$(CO)_a$－$(CH_2)_b$－ＣＨＯ（式中、Ｘはハロゲン原子、ａは０または１であり、ｂは１～４の整数を示す）からなる群から選択される基を有する糖鎖誘導体をシステインのスルフヒドリル基と縮合させる方法（ＷＯ２００５／０１００５３参照）や、ＷＯ２００５／０９５３３１に記載の結合剤を用いる方法などが挙げられる。

[0043] また、上記方法により、目的とするペプチドの一部の断片として製造されたペプチド断片は、連結工程に用いるために、Ｎ末側に位置するポリペプチドのＣ末端をチオエステル化する工程が、連結工程に先立って必要となる。かかるチオエステル化は、当業者に周知の方法で実施することができ、例えば、Ｃ末端のカルボン酸をＰｙＢＯＰおよびＤＩＰＥＡを用いて活性化させ、過剰のアルキルチオールを加えることで達成することができる。この手法を用いる場合、フラグメント末端のアミノ酸のα炭素の立体配置を抑制するため、アルキルチオールの添加は低温にて行うのが好ましく、より好ましくは１０℃～－８０℃、より好ましくは０℃～－４０℃の温度で行う。また、

上記チオエステル化は、Ｙａｍａｍｏｔｏ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．　Ａｍ．　Ｃｈｅｍ．　Ｓｏｃ．　２００８，　１３０　（２），　５０１　－５１０に記載のＦｍｏｃ法やＢｏｃ法などによっても行うことができる。

[0044] 本発明において、「ペプチドチオエステル体」（以下、単にチオエステル体と記載することもある）とはＣ末端にカルボキシチオエステル部分（－Ｃ＝Ｏ－ＳＲ）を有するペプチドをいう。本発明で用いられるペプチドチオエステル体は、他のチオール基と交換反応を起こすことのできるチオエステル体であれば、特に限定されない。Ｒ基としては、例えば、下記のR_4に例示される基が挙げられる。

[0045] このように合成された本発明のポリペプチド（ｉ）は、介在配列におけるＭｅｔの位置で切り離されることにより、以下のポリペプチド断片を得ることができる。

（Ａ）Ｎ末側がシステインである第１のポリペプチド断片

（Ｂ）以下の構造を有する第３のポリペプチド断片（ｉｉ）

（Ｎ末側）　第２のポリペプチド断片－Ｃｙｓ－Ｗ－（Ｈｉｓ）ｎ－Ｚ－Ｍｅｔ’　（Ｃ末側）・・・・（ｉｉ）

［ここで、Ｍｅｔ’は、Ｍｅｔの誘導体を意味する。］

なお、ポリペプチド（ｉ）のＮ末側および／またはＣ末側において、上記介在配列を介して、さらに別のポリペプチド断片が連結している場合には、例えば、さらに下記ポリペプチド断片を得ることができる。

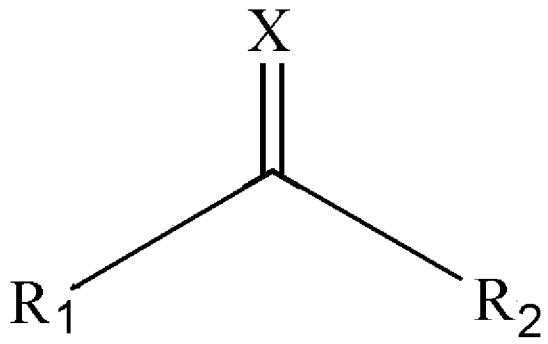
（Ｂ’）（Ｎ末側）　ポリペプチド断片－Ｃｙｓ－Ｗ－（Ｈｉｓ）ｎ－Ｚ－Ｍｅｔ’　（Ｃ末側）

上記のようにして得られた（Ａ）Ｎ末側がシステインである第１のポリペプチド断片は、Ｃ末端にチオエステルを有するペプチドとライゲーションすることができる。したがって、本発明は、本発明の方法により得られたＮ末端がシステインである第１のポリペプチド断片と、Ｃ末端にチオエステルを有するペプチドとをライゲーション法により結合する工程を含む、ポリペプチドの製造方法もまた、提供する。

[0046] ここで、本発明の方法は、

ポリペプチド（ｉ）を切り離すことにより得られた第３のポリペプチド断片（ｉｉ）に、下記式（Ｉ）で表わされる化合物：

[化5]

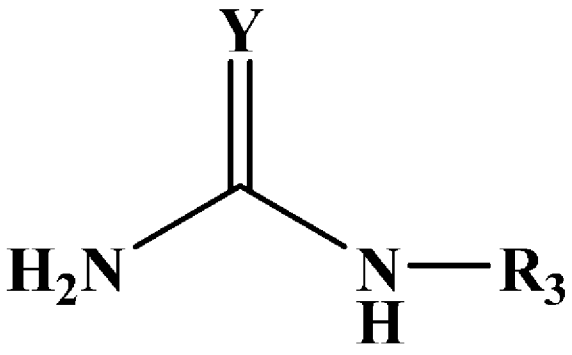


（Ｉ）

［式中、Ｘは硫黄原子または酸素原子であり、R_1及びR_2は、脱離基である。］

を反応させ、続いて、有機溶媒中で、下記式（ＩＩ）で表わされる化合物：

[化6]



（ＩＩ）

［式中、Ｙは、酸素原子、硫黄原子、または、＝ＮＨであり、R_3は、水素原子、アシル基、または、アルコキシカルボニル基である。］を反応させることにより、以下の構造を有するＣ末側が修飾された第２のポリペプチド断片：

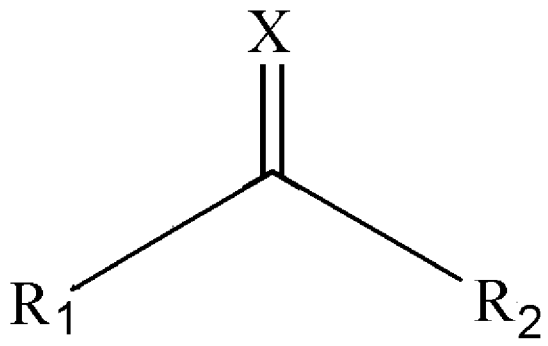
（Ｎ末側）　第２のポリペプチド断片－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－Ｃ（＝Ｙ）ＮＨR_3　（Ｃ末側）

を得るステップを含む。

[0047] 上記のステップは、まず、システイン残基を有する第３のポリペプチド断片（ｉｉ）において、前記システイン残基のチオール基に式（Ｉ）で表わされる化合物を反応させることにより（反応ａ）、第１中間体を作製する工程を行う。

反応（ａ）において、使用される化合物は以下の式（Ｉ）で示される。

[0048] [化7]



（Ｉ）

[0049] 式中、Ｘは硫黄原子または酸素原子であるが、好ましくは硫黄原子である。

R_1及びR_2は、脱離基として、反応（ａ）の条件下において、置換される原子又は原子団よりも求核性が低く、脱離される機能を有するものであれば特に限定されないが、R_1及びR_2はそれぞれ異なる脱離基であることが好ましい。R_1及びR_2として具体的には、ハロゲン原子、置換もしくは非置換の－Ｏ－アルキル基、置換もしくは非置換の－Ｏ－アルケニル基、置換もしくは非置換の－Ｏ－アルキニル基、置換もしくは非置換の－Ｏ－アリール基、置換もしくは非置換の－Ｏ－ヘテロアリール基、置換もしくは非置換の－Ｓ－アルキル基、置換もしくは非置換の－Ｓ－アルケニル基、置換もしくは非置換の－Ｓ－アルキニル基、置換もしくは非置換の－Ｓ－アリール基、または、置換もしくは非置換の－Ｓ－ヘテロアリール基が挙げられる。R_1及びR_2としてより好ましくは、R_1が置換もしくは非置換の－Ｏ－C_{6-10}アリール基、および、置換もしくは非置換の－Ｓ－C_{1-8}アルキル基からなる群より選

ばれる脱離基、および、R_2が、ハロゲン原子、置換もしくは非置換の－Ｓ－C_{1-8}アルキル基、置換もしくは非置換の－Ｓ－C_{6-10}アリール基からなる群より選ばれる脱離基、である組み合わせが挙げられる。

[0050] 本発明において、「アルキル基」とは、脂肪族炭化水素から任意の水素原子を１個除いて誘導される一価の基であり、水素および炭素原子を含有するヒドロカルビルまたは炭化水素の部分集合を有する。アルキル基は、直鎖状または分岐鎖状の構造を含む。本発明のアルキル基として好ましくは、炭素原子数が１から８のアルキル基が挙げられる。なお、「C_{1-8}アルキル基」とは、炭素原子数が１から８のアルキル基を示し、具体例としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基等が挙げられる。

[0051] 本発明において、「アルケニル基」とは、少なくとも１個の二重結合を有する１価の基である。二重結合および置換基の配置によって、二重結合の幾何学的形態は、エントゲーゲン（Ｅ）またはツザンメン（Ｚ）、シスまたはトランス配置をとることができる。アルケニル基は、直鎖状または分岐鎖状を含む。本発明のアルケニル基として好ましくは、炭素原子数が２から８のアルケニル基が挙げられる。「C_{2-8}アルケニル基」とは、炭素原子数が２から８のアルケニル基を示し、具体例としては、ビニル基、アリル基、プロペニル基、ブテニル基、ペンテニル基、ヘキセニル基、ヘプテニル基、オクテニル基等が挙げられる。

[0052] 本発明において、「アルキニル基」とは、少なくとも１個の三重結合を有する、１価の基である。アルキニル基は、直鎖状または分岐鎖状のアルキニル基を含む。本発明のアルキニル基として好ましくは、炭素原子数が２から８のアルキニル基が挙げられる。「C_{2-8}アルキニル基」とは、炭素原子数が２から８のアルキニル基を示し、具体例としては、エチニル基、１－プロピニル基、２－プロピニル基、ブチニル基、ペンチニル基、ヘキシニル基、ヘプチニル基、オクチニル基等が挙げられる。

[0053] 本発明において、「アリール基」とは、芳香族性の炭化水素環式基を意味

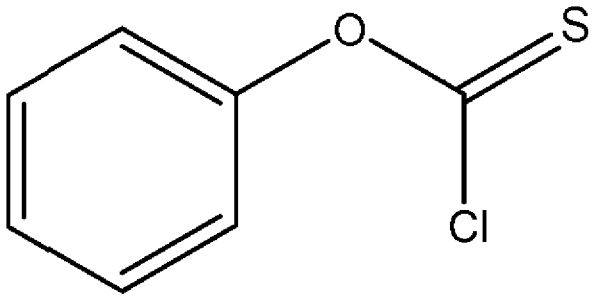
する。本発明のアリール基として好ましくは、炭素原子数が６から１０のアリール基が挙げられる。「C_{6-10}アリール基」とは、炭素原子数が６から１０のアリール基を示し、具体的には、例えば、フェニル基、１－ナフチル基、２－ナフチル基等が挙げられる。

[0054] 本発明において、「ヘテロアリール基」とは、ヘテロアリール環から任意の位置の水素原子を１または２個のぞいて誘導される１価または２価の基を意味する。本発明において、「ヘテロアリール環」とは、環を構成する原子中に１または複数個のヘテロ原子を含有する芳香族性の環を意味し、好ましくは５－９員環である。環は単環であってもよいし、ベンゼン環または単環ヘテロアリール環と縮合した２環式ヘテロアリール基であってもよい。具体例としては、フラニル基、チオフェニル基、ピロリル基、ベンゾフラニル基、ベンゾチオフェニル基、インドリル基、ピリジル基、キノリニル基などが挙げられる。

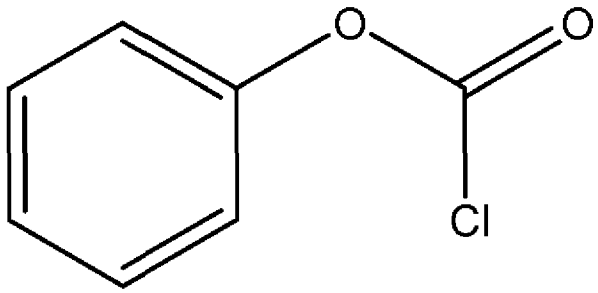
[0055] 上述の脱離基が有する置換基の種類、個数、置換位置は特に限定されないが、置換基として、例えば、アルキル基、アルケニル基、アルコキシ基、アリール基、ホルミル基、カルボニル基、カルボキシル基、アルキルカルボキシル基、アルコキシカルボニル基、ハロゲン、スルホニル基、または、ニトロ基などが挙げられる。

[0056] 本発明の式（Ｉ）で表わされる化合物として、より具体的には、

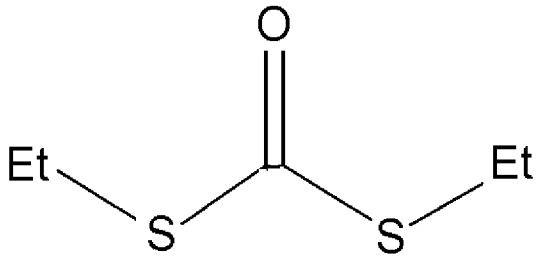
[化8]



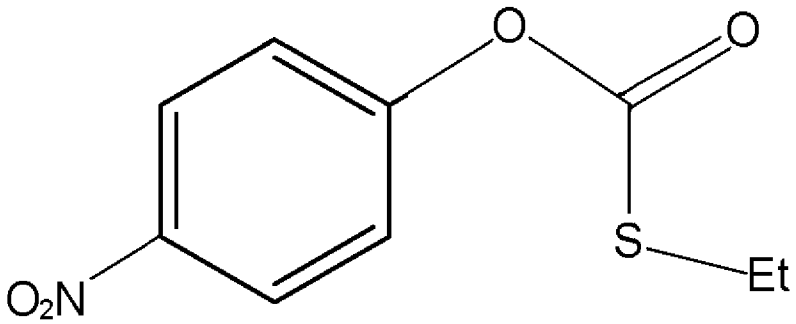
[化9]



[化10]



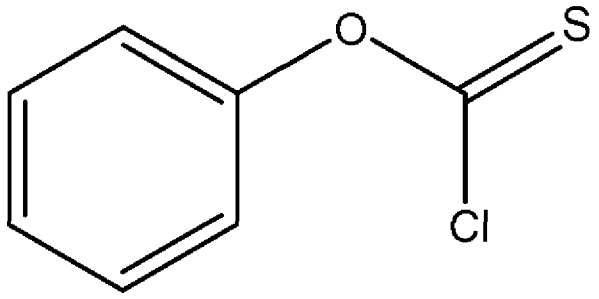
[化11]



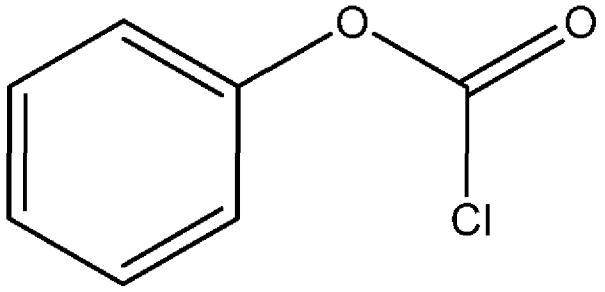
などを挙げることができる。

また、上記の、

［化12］

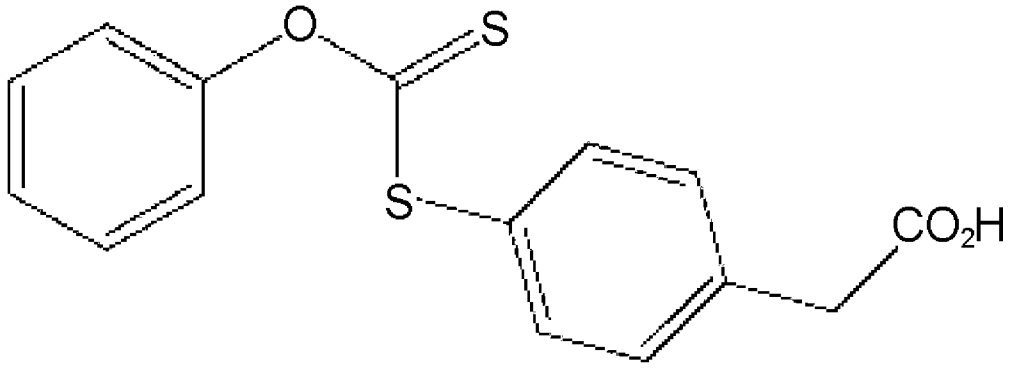


［化13］

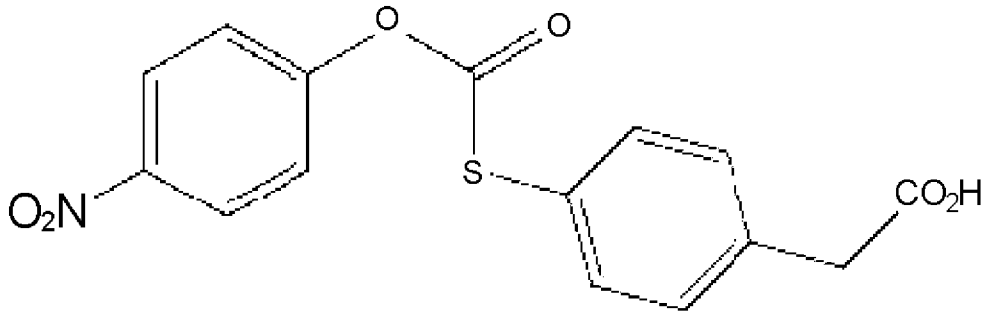


にＭＰＡＡ（（４－カルボキシメチル）チオフェノール）を反応させた下記のチオノフォルメート化試薬、

［化14］



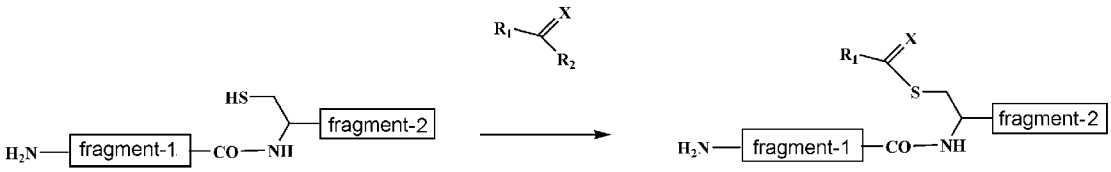
［化15］



を用いることも可能である。

［0057］　式（Ｉ）で表わされる化合物を第３のポリペプチド断片（ｉｉ）のシステイン残基に反応させることによって、下記図のようにシステイン残基中のＳＨ基に－Ｃ（＝Ｘ）－R_1基が結合した、第１中間体を得ることができる。

［化16］

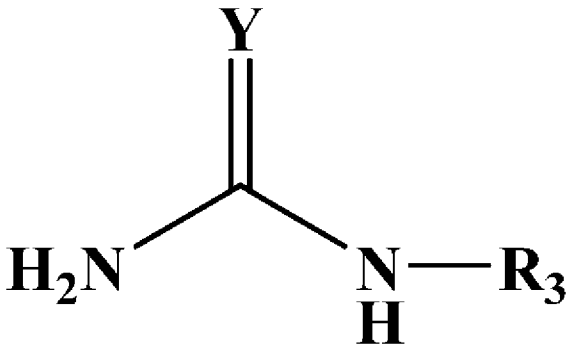


［0058］　本発明において、反応（ａ）は、酸性条件下が好ましく、特にｐＨ３～５で行うことが好ましい。反応は、緩衝液とアセトニトリルの混合溶媒中、０～５０℃、好ましくは１５～２５℃で、約０．１～３時間、好ましくは１０分～１時間行うのが好ましいが、これに限定されない。

［0059］　次いで、本発明の方法では、有機溶媒中で、前記第１中間体に式（ＩＩ）で表わされる化合物を反応させ、前記システイン残基のＮ末側に隣接するアミノ酸との間のペプチド結合を形成するカルボキシル基に－ＮＨ－Ｃ（＝Ｙ）ＮＨR_3基を付加し、前記ペプチド結合を切断することにより、切断された前記ペプチド結合よりもＮ末側のペプチド断片を第２中間体として得る工程を行う（反応（ｂ））。

［0060］　上記反応（ｂ）において使用する化合物は以下の式（ＩＩ）で示される。

［化17］



（ＩＩ）

［0061］　式中、Ｙは酸素原子、ＮＨ基、または、硫黄原子であり、R_3は、水素原子、アシル基、または、アルコキシカルボニル基である。

［0062］　本発明において、「アシル基」とは、カルボン酸のカルボキシル基からＯＨ基を除いた原子団を意味する。本発明のアシル基として、好ましくは炭素原子数が１－５のアシル基が挙げられる。具体的には、例えば、アセチル基、ピバロイル基、プロピオニル基、ブチロイル基等が挙げられる。

［0063］　本発明において、「アルコキシ基」とは、「アルキル基」が結合したオキシ基であることを意味する。本発明のアルコキシ基は、直鎖状であっても分岐鎖状であってもよい。本発明のアルコキシ基として、好ましくは炭素原子数が１から１４の直鎖状アルコキシ基または炭素原子数が３から１４個の分岐鎖状アルコキシ基が挙げられる。具体的には、例えば、メトキシ基、エトキシ基、ｎ－プロピルオキシ基、イソプロポキシ基、ｎ－ブトキシ基、２－メチル－２－プロピルオキシ基、ｎ－ペンチルオキシ基、ｎ－ヘキシルオキシ基等を挙げることができる。

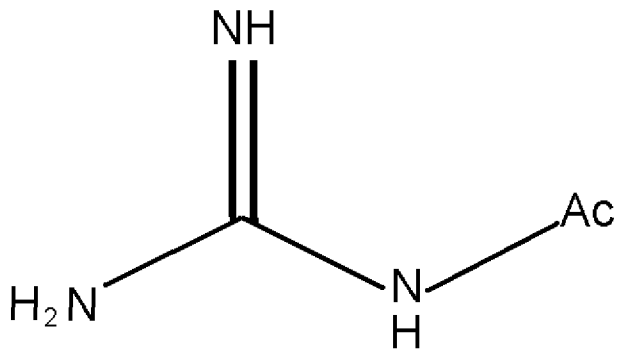
また、「C_{2-n}アルコキシカルボニル基」とは、$C_{1-(n-1)}$のアルコキシ基を有するカルボニル基であることを意味する。本発明のアルコキシカルボニル基として、好ましくは炭素原子数が２から１５のアルコキシカルボニル基を挙げることができる。具体的には、例えばメトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、ｎ－プロピルオキシカルボニル基、イソプロポキシカルボニル基、ｎ－ブトキシカルボニル基、２－メチル－２－プロピルオキシカル

ボニル基、ｎ－ペンチルオキシカルボニル基、ｎ－ヘキシルオキシカルボニル基等を挙げることができる。

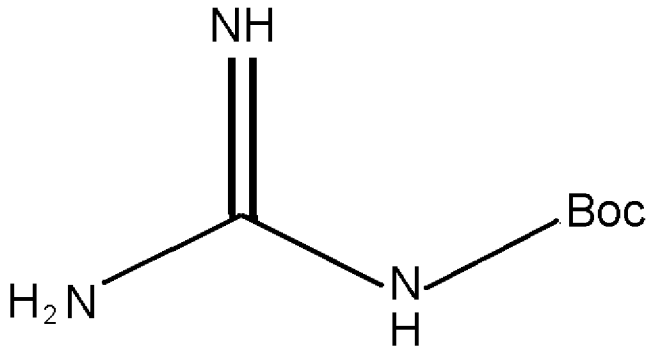
[0064] アシル基として、好ましくは、アセチル基が挙げられる。また、アルコキシカルボニル基として好ましくはｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基（Ｂｏｃ基）が挙げられる。

[0065] 本発明の式（ＩＩ）で表わされれる化合物として、より具体的には、

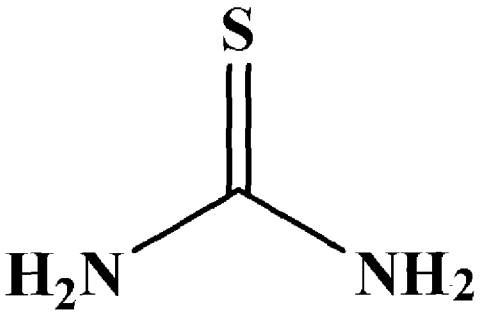
[化18]



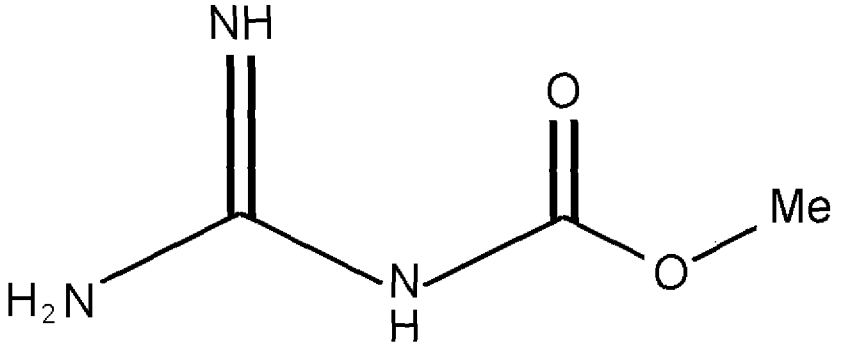
[化19]



[化20]



[化21]

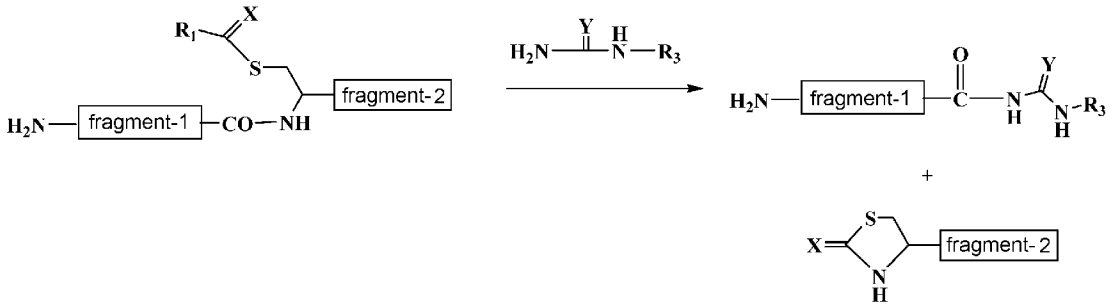


などを挙げることができる。

[0066] 本発明において、反応（ｂ）は、有機溶媒の存在下において行うのが好ましい。有機溶媒は溶解性が高く、かつ、求核性が低いものが好ましい。このような有機溶媒としては、例えば、ＤＭＳＯ、ＤＭＦ、ジオキサン等を挙げることができる。反応は、０～５０℃、好ましくは１５～２５℃で、約１～２４時間、好ましくは５～１０時間行うのが好ましいが、これに限定されない。

[0067] システイン残基のＮ末側に隣接するアミノ酸との間のペプチド結合を形成するカルボキシル基に－ＮＨ－Ｃ（＝Ｙ）ＮＨＲ$_3$基を付加することにより、下記図のように、システイン残基のＮ末側でペプチド鎖が切断される。

[化22]

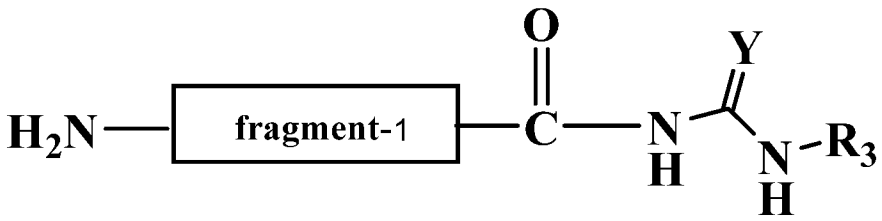


[0068] なお、ペプチドの側鎖にアミノ基を有する場合には、本発明の反応（ｂ）を行う前に、側鎖のアミノ基に脂溶性の保護基を導入してもよい。脂溶性保護基としては、例えば、９－フルオレニルメトキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）基、ｔ－ブチルオキシカルボニル（Ｂｏｃ）基、アリルオキシカルボニル（Ａｌｌｏｃ）基等のカルボニル含有基、アセチル（Ａｃ）基等のアシル基、アリル基、ベンジル基等の保護基を挙げることができるが、特にこれらに限定されるものではない。

[0069] 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－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が、これに限定されない。

[0070] 反応（ｂ）においては、切断されたペプチド鎖の切断部よりもＮ末側のペプチド断片を下記式（ＩＩＩ）の第２中間体として得ることができる。

[化23]



(Ⅲ)

[0071] 本発明のペプチドチオエステル体の製造方法は、さらに、前記第２中間体にチオールを反応させて、Ｃ末端の－ＮＨ－Ｃ（＝Ｙ）ＮＨＲ$_3$基とチオール基とを交換させることにより、第２中間体のＣ末端をチオエステル化する工

程を含む（反応（ｃ））。

反応（ｃ）に用いる第２中間体は、反応（ｂ）の後に単離されていても、単離されていなくてもよい。

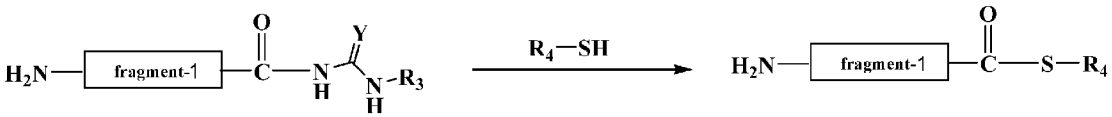
[0072] 好ましい態様において、前記反応（ｃ）には、以下の式（ＩＶ）で表わされるチオールが用いられる。

R_4－ＳＨ　　（式ＩＶ）

R_4は、チオール交換反応を阻害せず、カルボニル炭素上での置換反応において脱離基となる基であれば特に限定されない。好ましくは、R_4は、置換もしくは非置換のベンジル基、置換もしくは非置換のアリール基および置換もしくは非置換のアルキル基から選択されるいずれか一つの基であり、より好ましくは置換もしくは非置換のベンジル基、置換もしくは非置換のC_{6-10}アリール基、および、置換もしくは非置換のC_{1-8}アルキル基から選択されるいずれか一つの基である。より具体的には、ベンジルメルカプタン等のベンジル型の脱離基、チオフェノール、４－（カルボキシメチル）－チオフェノール等のアリール型の脱離基、２－メルカプトエタンスルホン酸基、３－メルカプトプロピオン酸アミド等のアルキル型の脱離基等から選択することができる。これらの脱離基が有する置換基の種類、個数、置換位置は特に限定されない。

[0073] 反応（ｃ）を行うことにより、第２中間体は、下記図のように完全にチオエステル体へと変換される。

[0074] [化24]



[0075] 上述のようにして得られたペプチドチオエステル体は、ペプチド又は被修飾ペプチドのうち、－ＳＨ基を有するアミノ酸残基をＮ末端に含むペプチド（又は被修飾ペプチド）と、ライゲーション法を用いて連結することができる。したがって、本発明は、本発明の方法により得られたペプチドチオエステル体と、Ｎ末端にシステインを有するペプチド鎖をライゲーション法によ

り結合する工程を含む、ポリペプチドの製造方法もまた、提供する。

また、上記ペプチドチオエステル体の代わりに、前記工程（ｂ）で得られた第２中間体を、そのままライゲーション法に使用することも可能である。この場合、チオエステル体への変換工程を省略できる点において好ましい。

[0076] 本発明において、「ライゲーション法」とは、特許文献１に記載の天然型化学的ライゲーション法（Ｎａｔｉｖｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｌｉｇａｔｉｏｎ、ＮＣＬ法）のみならず、非天然アミノ酸、アミノ酸誘導体（例えば、トレオニン誘導体Ａ、保護メチオニン、糖鎖付加アミノ酸等）を含むペプチドについて、上記天然型化学的ライゲーション法を応用する場合をも含む。ライゲーション法により、連結部位に天然アミド結合（ペプチド結合）を有するペプチドを製造することができる。

[0077] ライゲーション法を用いた連結は、ペプチドーペプチド間、ペプチドー被修飾ペプチド間、被修飾ペプチドー被修飾ペプチド間の、いずれにおいても行うことができる。

[0078] なお、本明細書において用いられる用語は、特定の実施態様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。

[0079] 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。

[0080] 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。

本発明の実施態様は模式図を参照しつつ説明される場合があるが、模式図である場合、説明を明確にするために、誇張されて表現されている場合があ

る。

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。

[0081] 以下において、本発明を、実施例を参照してより詳細に説明する。しかしながら、本発明はいろいろな態様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。

実施例

[0082] 下記実施例において、本発明の方法を使用したインターロイキン－１３（ＩＬ１３）の誘導体（配列番号１）（糖鎖が天然のＩＬ１３とは異なるため、「誘導体」と称する。）の合成方法を示す。

具体的には、製造しようとする所望の糖鎖付加ポリペプチドである、インターロイキン１３誘導体を以下に分類して設計した。

・ＩＬ１３における１～２７番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド断片Ａ（これは、「糖鎖含有ポリペプチド断片よりもＮ末側にあり所望の糖鎖付加ペプチドのＮ末側を含むポリペプチドからなる第２のポリペプチド断片」に相当する。）

・ＩＬ１３における２８～４３番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド断片Ｂ（これは、「糖鎖含有ポリペプチド断片と第２のポリペプチド断片との間のポリペプチド断片」に相当する。）

・ＩＬ１３における４４～５５番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド断片Ｃ（この断片には、糖鎖が付加されたアミノ酸が含まれている。したがって、この断片は、「糖鎖が付加されたアミノ酸を含むポリペプチドからなる糖鎖含有ポリペプチド断片」に相当する。）

・ＩＬ１３における５６～１１２番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド

断片Ｄ（これは、「糖鎖含有ポリペプチド断片よりもＣ末側にあり所望の糖鎖付加ペプチドのＣ末側を含むポリペプチドからなる第１のポリペプチド断片」に相当する。）

図６は、かかる設計（デザイン）を示す模式図である。

後述するとおり、上記ポリペプチド断片Ａと上記ポリペプチド断片Ｄは、大腸菌発現法により発現させ、所定のステップを経ることにより調製する。

また、上記ポリペプチド断片Ｂと上記ポリペプチド断片Ｃは、化学合成により調製する。

そしてこれら調製された４つのポリペプチド断片をライゲーションにより連結させてＩＬ－１３誘導体を製造する。

なお、例えば、ポリペプチド断片Ｃ・Ｄと記載する場合、ポリペプチド断片Ｃとポリペプチド断片Ｄが連結したものを意味する。

[0083] １．ポリペプチド断片Ａ（１～２７番目のアミノ酸）およびポリペプチド断片Ｄ（５６-１１２番目のアミノ酸配列）の調製

２つの糖鎖非結合部分（ポリペプチド断片Ａ（化合物１）（配列番号２）およびポリペプチド断片Ｄ（化合物４）（配列番号３）は、大腸菌発現系を用いて融合タンパク質（化合物６）（配列番号４）として作製した。

[0084] １－１．糖鎖非結合部分をコードする核酸分子の大腸菌への導入

（１）ＬＢ培地Ａ（H_2O　１ｌ中、バクトトリプトン　１０ｇ、酵母エキス　５ｇ、ＮａＣｌ　１０ｇ、寒天　１５ｇを含む）を５ｍｌ入れた試験管に、大腸菌（ＢＬ２１）懸濁液を１００μｌ加え、ボルテックス処理後一晩３７℃でインキュベートした。

（２）ＬＢ培地Ａが５ｍｌ入った試験管に、（１）の培養液を２００μｌ加えたものを２本作製し、３７℃でインキュベートした。濁度（ＯＤ６００）を測定し、５０分後にＯＤ６００＝０．４になった時点で試験管を氷中に入れた。

（３）（２）の試験管内容物をコニカルチューブに移し、０℃、２，０００ｒｐｍで２０分遠心した。

（４）デカントで上清を捨て沈殿物を砕き、０．１Ｍ　ＣａＣｌ$_2$を３ｍｌ加え、氷中で２０分放置した。

（５）（４）のチューブを０℃、２，０００ｒｐｍで２０分遠心した。

（６）デカントで上清を捨て沈殿物を砕き、０．１Ｍ　ＣａＣｌ$_2$を０．５ｍｌ加え、ボルテックス処理後、別途用意したチューブに移した。

（７）（６）のチューブに、ＩＬ１３の１～２７番目のアミノ酸配列、介在配列（Ｃｙｓ－Ｖａｌ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｍｅｔ）、および、５６～１１２番目のアミノ酸配列が連結された配列をコードする核酸分子（配列番号５）を含むｐＥＴ３２ａベクターを２ｍｌ加え、軽く混ぜた後、氷中で１時間静置した。なお、当該ベクターはその発明者らより、第三者に自由に配布されている。前記核酸分子は、ｐＥＴ３２ａベクター（Ｎｏｖａｇｅｎ社）のチオレドキシンの下流のＮｃｏＩ／ＢａｍＨＩ部位に挿入されている（図１参照）。

（８）（７）のサンプルを４２℃の水浴に３分浮かべ（ヒートショック法）、続いて氷中で１分間冷却した。

（９）（８）に、ＬＢ培地Ａを５ｍｌ加え、３７℃で４５分インキュベートした後、室温、３，０００ｒｐｍで１０分遠心した。

（１０）上清（濾液）を捨て、沈殿物を砕いた後、沈殿物に対しＬＢ培地Ａを１ｍｌ加え、ボルテックス処理後全量を１００μｌ、９００μｌの２つに分けてそれぞれをＬＢ培地Ｂ（Ｈ$_2$Ｏ　１ｌ中、バクトトリプトン　１０ｇ、酵母エキス　５ｇ、ＮａＣｌ　５ｇおよびブドウ糖　５ｇを混合し、これに１．５％の寒天（１５ｇ／ｌ）を加え、２０分間オートクレーブ処理し、５０～６０℃に放冷して１００ｍｇのアンピシリンを加えたもの）を３０ｍｌプレーティングしたシャーレーにコンラージを用いて散布した。

（１１）（１０）のシャーレーを３７℃で１０時間静置した。

（１２）（１１）によって形成されたコロニーを、試験管（ＬＢ培地Ａに１０％アンピシリンを１０００：１の比で含むＬＢａｍｐ培地を３ｍｌ入れたもの）に滅菌済みの爪楊枝を用いてピックアップし、ボルテックス処理後

３７℃で一晩インキュベートした。

[0085] ２．遺伝子の確認

２－１．プラスミドＤＮＡ取り出し

（１）上記１－１．（１２）のサンプルの１．５ｍｌをエッペンドルフチューブに移した。

（２）室温にて７，０００ｒｐｍで３分遠心後、上清を除去し沈殿物を砕いた。

（３）沈殿物に対し、１００ｍｌのＧＴＥ（５０ｍＭ　ブドウ糖、２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ・ＨＣｌ、１０ｍＭ　ＥＤＴＡ）を加え、ボルテックス処理後、シェーカーを使用して５分懸濁し、さらにアルカリＳＤＳ溶液（０．２Ｎ　ＮａＯＨ、１％ＳＤＳ）を２００ｍｌ加えて転倒混和した後、氷中で５分冷却した。

（４）５Ｍ酢酸カリウム溶液を１５０ｍｌ加え転倒混和した後、氷中で５分冷却した。

（５）クロロホルムを１５ｍｌ加えてボルテックス処理し、４℃、１３，０００ｒｐｍで１５分遠心した後、上清を別のエッペンドルフチューブに移し、この上清に対して１０ｍｇ／ｍｌ　ＲＮａｓｅを３ｍｌ加え、３７℃で１時間放置した。

（６）（５）のサンプルに対し、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール＝２５：２４：１）を５００ｍｌ加え、室温、１３，０００ｒｐｍで１０分遠心した。

（７）上清を別のエッペンドルフチューブに移し、３Ｍ　ＮａＯＡｃ　４０ｍｌ、ＥｔＯＨ　１ｍｌを加えて転倒混和し、ボルテックス処理後－８０℃で３０分静置した。

（８）（７）のエッペンドルフチューブを４℃、１３，０００ｒｐｍで３０分遠心した。

（９）上清を除去し、沈殿物に対して７０％ＥｔＯＨ　１ｍｌを加えてボルテックス処理後、室温、１３，０００ｒｐｍで５分遠心した。

（１０）上清を除去し、デシケーターで乾燥させた。

（１１）オートクレーブ処理した純水（ａH_2O）を１５ｍｌ加え、シェーカーで１０分攪拌した。

[0086] ２－２．　プラスミドＤＮＡの制限酵素処理および電気泳動

（１）上記２－１．（１１）のサンプルの５ｍｌをとり、ＢａｍＨＩおよびＮｃｏＩを含む制限酵素処理液Ａ（１０×Ｋバッファー（Ｔｒｉｓ・ＨＣｌ　ｐＨ８．５　２００ｍＭ、$MgCl_2$　１００ｍＭ、ＤＴＴ　１０ｍＭ、ＫＣｌ　１Ｍ）２．２５ｍｌ、０．１％ＢＳＡ　２．２５ｍｌ、ＮｃｏＩ　０．８５ｍｌ、ＢａｍＨＩ　０．８５ｍｌ、ａH_2O　１０．７６ｍｌ）を１５ｍｌ添加混合し、３７℃で２時間放置した。

（２）室温に戻し、反応停止液（H_2O中の、５０％グリセロール、０．５％ＳＤＳ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．２５％キシレンシアノール、０．２５％ブロモフェノールブルー）を５ｍｌ加えた。

（３）４％ポリアクリルアミドゲル（３０％アクリル溶液１．９９５ｍｌ、１０×ＴＢＥ（H_2O１ｌ中、Ｔｒｉｓｍａ　ｂａｓｅ　１０８ｇ、ホウ酸５５ｇ、０．２５Ｍ　ＥＤＴＡ　８０ｍｌ）１．５ｍｌ、１０％ＡＰＳ（H_2O　１ｌ中、過硫酸アンモニウム０．１ｇ）７５ｍｌ、ＴＥＭＥＤ　１０ｍｌ、ａH_2O　１５ｍｌ）に（２）のサンプルをロードし、５０Ｖ（定電圧）で泳動した。（ランニングバッファーは、１×ＴＢＥ（１０×ＴＢＥを１０倍希釈したもの）を、分子量マーカーはΦ×１７４を用いた。）

（４）エチジウムブロマイドで１５分染色し、３００ｎｍで試料を評価したところ、７５９ｂｐ程度のバンドを認めた。発現させるタンパク質は２５３アミノ酸長であるため、これに相当する長さのＤＮＡが切り出されたことが確認された。

[0087] ３．タンパク質の発現

（１）試験管２本にそれぞれ２×ＹＴａｍｐ（ａH_2O　１ｌ中、バクトトリプトン１６ｇ、バクト酵母エキス１０ｇ、ＮａＣｌ　５ｇ、アンピシリン１００ｍｇ）を５ｍｌ入れ、そこに上記１－１．（１２）の液（４℃で２週

間保存していたサンプル）の３０ｍｌをそれぞれ加えた後、３７℃で一晩インキュベートした。

（２）２×ＹＴａｍｐ　１ｌに（１）で作製した溶液１０ｍｌを加え、３７℃でインキュベーションを開始した。

（３）濁度（ＯＤ６００）を測定して、２時間後にＯＤ＝０．６になったところで１Ｍ　イソプロピルーβーＤーチオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を１ｍｌ加え、３時間誘導を行った。

（４）（３）のサンプルを氷につけ、４℃、３，５００ｒｐｍで１０分遠心した。

（５）上清を捨て、集菌した。

（６）－２０℃で保存した。

４．発現したタンパクの精製

（１）上記３．（６）で得たサンプルを室温で解凍後、１００ｍｌのバッファーＡ（１００ｍＭ　NaH_2PO_4、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ・ＨＣｌ、６Ｍ　塩酸グアニジン、５ｍＭ　イミダゾール、ｐＨ８．０）に溶かし、氷中でソニケーションし、細胞壁を破砕した。

（２）Ｎｉ－ＮＴＡアガロース（５０％ＥｔＯＨ）を１０ｍｌとり、固相合成チューブ（カラム）に充填した後バッファーＡで置換し、（１）のサンプルをロードしてＮｉ－ＮＴＡアガロースと十分混和した後に溶出した。

（３）溶出液を回収し、再度カラムにロードした。この操作を１０回繰り返し、最終的な溶出液を回収した。（透過液（１））

（４）（３）のＮｉ－ＮＴＡアガロースを、バッファーＢ（１００ｍＭ　NaH_2PO_4、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ・ＨＣｌ、６Ｍ　塩酸グアニジン、２５０ｍＭ　イミダゾール、ｐＨ８．０）１００ｍｌで洗浄し、洗液を回収した。（透過液（２））

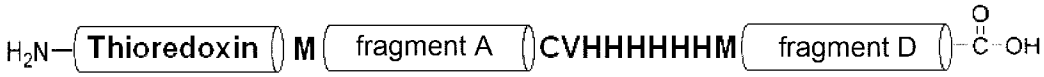
（５）バッファーＣ（１００ｍＭ　NaH_2PO_4、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ・ＨＣｌ、６Ｍ　塩酸グアニジン、４００ｍＭ　イミダゾール、ｐＨ８．０）１０ｍｌを用いて溶出した（溶出液）。ＣＢＢＧ液（Ｃｏｏｍａｓｓｉｅ

Ｂｒｉｌｌｉａｎｔ　Ｂｌｕｅ　Ｇ２５０）を用いて、タンパクの溶出を確認した。

（６）透析チューブに（５）の溶出液を入れ、純水が入った５ｌビーカーに透析チューブを浮かべ、４℃で一晩攪拌し、透析を行った。

（７）透析チューブの内容物を遠沈管に回収し、４℃、３，５００ｒｐｍで１０分遠心後、上清を捨て、チオレドキシンタンパク質が結合したポリペプチド断片Ａ－Ｃｙｓ－Ｖａｌ－Ｈｉｓタグ－Ｍｅｔ－ポリペプチド断片Ｄ融合ポリペプチド（化合物６）を約２５ｍｇ得た（図２および図３参照）。

[化25]



（６）

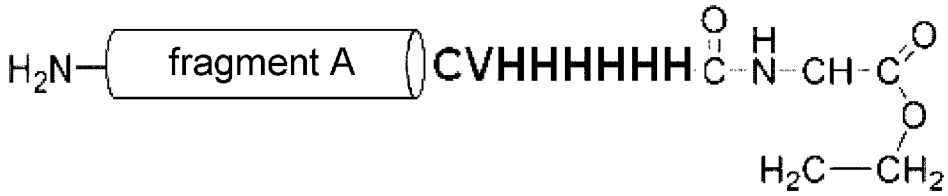
（なお、CはCysを示し、VはValを示し、HはHisを示し、MはMetを示す。以下、同じ。）

[0088] ５．ＣＮＢｒ処理

（１）４．（７）で得られた融合ポリペプチド（化合物６）をＨＰＬＣで精製した後凍結乾燥したサンプル１００ｍｇに対し、アルゴン下にて２０ｍｌの２％ＴＦＡ及び４０％アセトニトリル含有水溶液を加え、さらに７６ｍｇのＣＮＢｒを加え遮光して一晩攪拌した。この処理により、融合タンパク質であるチオレドキシン部及びＨｉｓタグと糖鎖非結合部分であるポリペプチド断片Ｄとの間のメチオニンのＣ末側のアミド結合が加水分解され、ポリペプチド断片Ａに介在配列が付加したものと、ポリペプチド断片Ｄとを分離することができる。

（２）ＨＰＬＣを用いて分析し、保持時間１２分に所望のポリペプチド断片Ａ－Ｃ－Ｖａｌ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｍｅｔ誘導体（化合物１０）（配列番号６）２．３ｍｇ、およびポリペプチド断片Ｄ（化合物４）４．２ｍｇを得たことを質量分析により確認した（図４および図５参照）。

[化26]



（１０）

[化27]

（４）

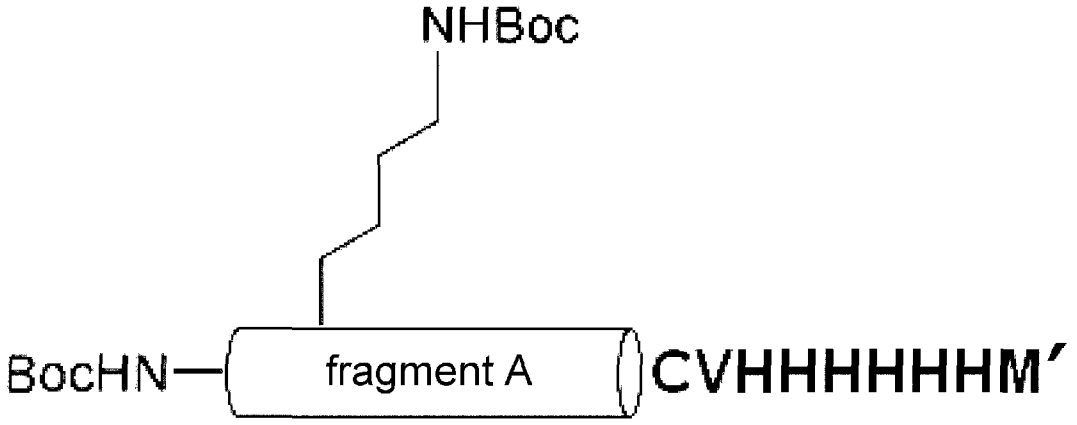
[0089] ６．チオエステル化

上記５．で得られたポリペプチド断片Ａ－Ｃ－Ｖａｌ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｍｅｔ誘導体（化合物１０）６ｍｇを、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）６８０μＬに溶解させた後、溶液にＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（ＤＩＥｔＮ）２．６μＬ（１０ｅｑ）、及びＢｏｃ－ＯＳｕ３．２ｍｇ（１０ｅｑ）を加え約１時間反応させ、ポリペプチド断片Ａ－Ｃ－Ｖａｌ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｍｅｔ誘導体（化合物１０）のＮ末端のアミノ基および配列中のＬｙｓ残基の側鎖のアミノ基の計２か所がＢｏｃ化された３７残基の部分保護されたポリペプチド断片（化合物１００）（配列番号７）を得た。この３７残基ペプチドを、リン酸緩衝溶液（ｐＨ＝５．０、１００ｎＭ）に溶かし、クロロチオノフォルメート（５等量）を加え、システインのチオール基をチオ炭酸型として修飾し、そのままＨＰＬＣを用いて精製した。得られたポリペプチド断片（化合物１０１）（配列番号８）を凍結乾燥することで１．７ｍ

ｇ獲得した。この全量をＤＭＳＯに溶かし、アセチルグアニンジン（０．５Ｍ　ｉｎ　ＤＭＳＯ）を加え、常温で８時間反応させた。生成物をＨＰＬＣで精製し、ＩＬ－１３の１～２７番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド断片ＡのＣ末端のカルボキシル基がグアニジノ基で修飾されたポリペプチド断片（化合物１０２）（配列番号９）０．３ｍｇを得た。

このペプチドーグアニンジン誘導体は、メルカプトエチル硫酸等のアルキルチオールで処理してチオエステル誘導体に変換することもできるが、グアニジノ基のまま、ネイティブケミカルライゲーションに用いることもできる。

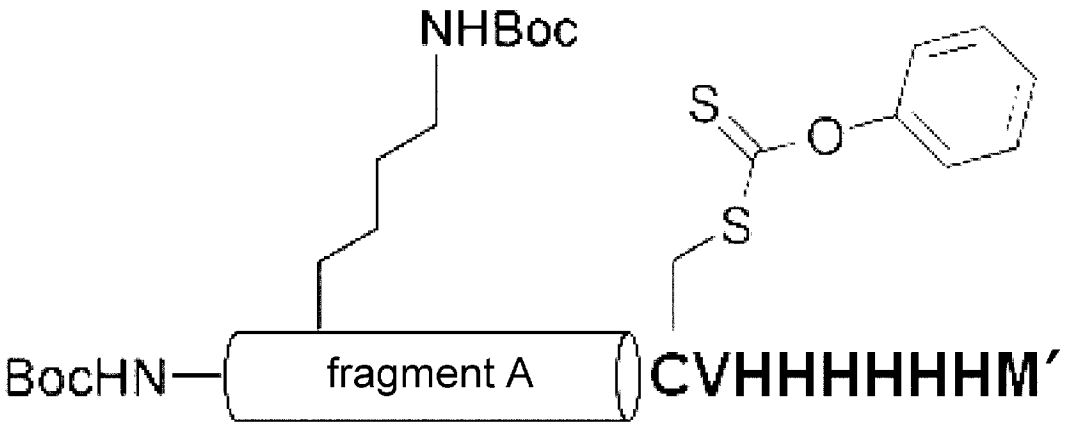
［化28］



（１００）

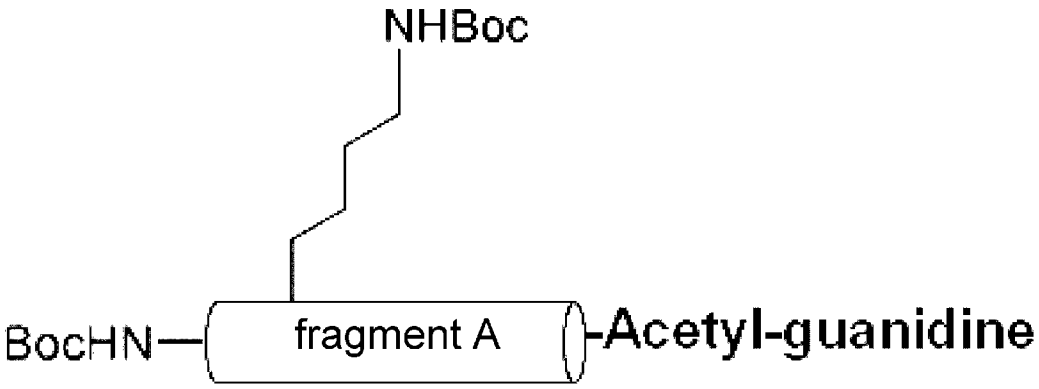
（なお、M’はMetの誘導体を示す。以下、同じ。）

[化29]



（１０１）

[化30]



（１０２）

[0090] ７．ポリペプチド断片Ｂ（２８～４３番目のアミノ酸）の合成

ポリペプチド断片Ｂ（化合物２）の伸張は一般的なＦｍｏｃ法あるいはＢｏｃ法による固相合成法を用い合成した。

固相合成チューブにＢｏｃ－Ｌｅｕ－ＰＡＭ樹脂９４．３４ｍｇ（５０μｍｏｌ）を入れ、蒸留ＤＭＦおよび蒸留ＤＣＭで十分に洗浄後に乾燥させたものを用いた。縮合に用いるアミノ酸のアミノ基はＢｏｃ基によって保護されているものを用いた。また、反応は特に記載が無い限り固相合成チューブ

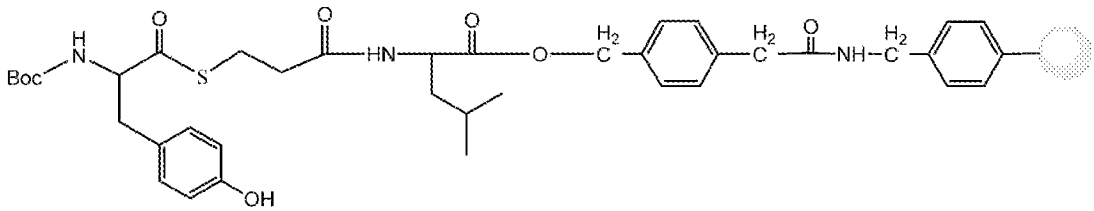
内で行った。

ＤＭＦ、ＤＣＭでよく洗浄し、その後、１０％硫酸／ｄｉｏｘａｎｅ溶液（１．０ｍｌ）を樹脂に加え３０分撹拌することによりＢｏｃ基を脱保護し、ＤＣＭ，ＤＭＦで樹脂を洗浄した。

その後、リンカーとしてＳ－ｔｒｉｔｙｏｌ－３－ｍｅｒｃａｐｔｏｐｒｏｐｉｏｎｉｃ　ａｃｉｄ　５等量（８７．１ｍｇ、２５０μｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ　１０等量（８７．３μｌ、５００μｍｏｌ）、およびＨＢＴＵ５等量（９４．８ｍｇ、２５０μｍｏｌ）をＤＭＦ（１．０ｍｌ）に溶解し、前記で調製した樹脂が充填された固相合成用チューブに入れ、室温で０．５時間攪拌した。攪拌後、樹脂をＤＣＭ及びＤＭＦで数回洗い、続いてＤＣＭ、ＤＭＦでよく洗浄した。その後、ＴＦＡを樹脂に加え３０分撹拌することによりｔｒｉｔｙｌ基を脱保護し、ＤＣＭ、ＤＭＦで樹脂を洗浄した。

[0091]　次に、樹脂をＤＭＦで洗浄後、１残基目のＢｏｃ－Ｔｙｒ（Ｂｒ－Ｚ）－ＣＯＯＨ　５等量（１２３．６ｍｇ、２５０μｍｏｌ）、ＨＢＴＵ　５等量（９４．８ｍｇ、５０μｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ　１０等量（８７．３μｌ、５００μｍｏｌ）をＤＭＦ溶媒（１．０ｍｌ）中で混合し、これを樹脂に加え室温で０．５時間攪拌し中間体（化合物１４）を得た。

[化31]



（１４）

縮合後は樹脂をＤＭＦで洗浄後、カイザー試験で樹脂上にアミノ酸が縮合されていることを確認し、順次Ｂｏｃ－Ｌｅｕ－ＰＡＭ－Ｒｅｓｉｎと同様にＢｏｃ基を脱保護した。２残基目以降も同様に縮合を行った。１６残基目までは、全て各１回の縮合（ｓｉｎｇｌｅ　ｃｏｕｐｌｉｎｇ）で終えた。

なお、ＩＬ－１３のアミノ酸配列における２８番目のアミノ酸に相当するＣｙｓはチアゾリジン型で保護されたものを縮合させた。

縮合が終了した樹脂をＤＭＦおよびＤＣＭでよく洗浄し、ＴＦＡ：ＤＭＳ：ｍ－ｃｒｅｓｏｌ：ＥＤＴ：ＴｆＯＨ＝５：３：０．８：０．２：１のカクテル１ｍｌを樹脂に加え氷上で１時間攪拌し、樹脂から側鎖の脱保護をおこなった。これを、ジエチルエーテルでしっかりと洗い乾燥させた。

[0092] ８．樹脂からの切り出し

上記７．で調製したペプチドを樹脂から切り出すために、ＴＦＡ：Ｔｈｉｏａｎｉｓｏｌ：ＥＤＴ：ＴｆＯＨ＝８：０．８：０．２：０．８のカクテル１ｍｌを氷上で加えて、１時間撹拌した。ジエチルエーテルで沈殿させた後、室温で乾燥させた後サンプルをＨＰＬＣ（カラム：Ｓｙｎｍｅｔｏｒｙ３００（ＴＭ）　Ｃ４、３．５μｍ、４．６×１５０ｍｍ、流速：１．０ｍｌ／分、１８％～５４％CH_3CNを含む０．０９％ＴＦＡの１８分のリニアグラジエント）で分析し、保持時間１３分に、リンカーが付加することでチオエステル体の状態で切り出された、ＩＬ１３のアミノ酸配列における２８～４３番目のアミノ酸配列を有するペプチドチオエステル体（化合物１０３）を得た。このペプチドチオエステル（化合物１０３）（配列番号１０）をＨＰＬＣを用いて精製し、分取した溶液を凍結乾燥し５ｍｇを得た。

ＩＬ１３（２８～４３）チオエステル体（化合物１０３）；ＥＳＩ－ＭＳ：ｍ／ｚ　$C_{85}H_{130}N_{20}O_{25}S_4$についての計算値：$[M+H]^+$　１９５９．８，　$[M+2H]^{2+}$　９８０．４、実測値：１９６０．８，　９８１．０

[0093] ９．糖鎖結合部分のポリペプチド断片Ｃ（４４～５５番目のアミノ酸）の合成

ポリペプチド断片Ｃ（化合物３）の伸張は一般的なＦｍｏｃ法による固相合成法を用いた。

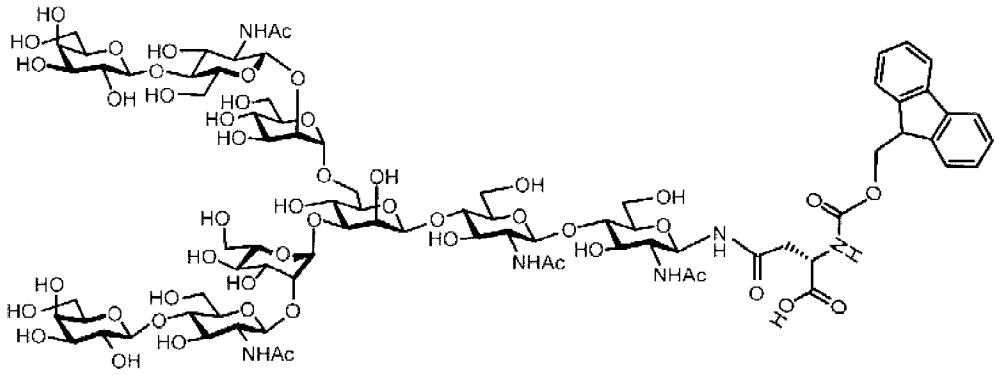
固相合成チューブに４－（４－ｈｙｄｒｏｘｙｍｅｔｈｙｌ－３－ｍｅｔｈｏｘｙｐｈｅｎｏｘｙ）－ｂｕｔｙｒｉｃ　ａｃｉｄ（ＨＭＰＢ）－ｐｏ

ｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ　ｇｌｙｃｏｌ）－ｐｏｌｙ（ｄｉｍｅｔｈｙｌａｃｒｙｌａｍｉｄｅ）ｃｏｐｏｌｙｍｅｒ（ＰＥＧＡ）樹脂１．６７ｍｇ（５０μｍｏｌ）を入れ、蒸留ＤＭＦおよび蒸留ＤＣＭで十分に洗浄後に乾燥させたものを用いた。縮合に用いるアミノ酸のアミノ基はＦｍｏｃ基によって保護されているものを用いた。また、反応は特に記載が無い限り固相合成チューブ内で行った。

Ｆｍｏｃ－Ｇｌｙ－ＯＨ　５等量（７４．３ｍｇ、２５０μｍｏｌ）およびＮ－ｍｅｔｙｌｉｍｉｄａｚｏｌｅ　３．７５等量（１４．９μｌ、１８７．５μｍｏｌ）をＤＣＭ（１．０ｍｌ）に溶解し、前記で調製した樹脂が充填された固相合成用チューブに入れ、室温で２時間攪拌した。攪拌後、樹脂をＤＣＭ：ＭｅＯＨ：ＤＩＰＥＡ＝１７：２：１で数回洗い、続いてＤＣＭ、ＤＭＦでよく洗浄した。その後、２０％ピペリジン／ＤＭＦ溶液（１．０ｍｌ）を樹脂に加え３０分撹拌することによりＦｍｏｃ基を脱保護し、ＤＭＦで樹脂を洗浄した。

[0094] 次に、樹脂をＤＭＦで洗浄後、２残基目のＦｍｏｃ－Ｓｅｒ（ｔＢｕｔｙｌ）－ＣＯＯＨ　５等量（９５．９ｍｇ、５０μｍｏｌ）、ＨＯＢｔ・H_2O　５等量（３３．８ｍｇ、５０μｍｏｌ）、ＤＩＰＣＤＩ　５等量（３８．５μｌ、５０μｍｏｌ）をＤＭＦ溶媒（１．０ｍｌ）中で混合し、これを樹脂に加え室温で１時間攪拌した。縮合後は樹脂をＤＭＦで洗浄後、カイザー試験で樹脂上にアミノ酸が縮合されていることを確認し、１残基目と同様にＦｍｏｃ基を脱保護した。３残基目も同様に縮合を行った。次に、４残基目として、下記式（２０）で表わされるＦｍｏｃ－Ａｓｎ－アシアロ糖鎖を結合させた。

［化32］



（２０）

すなわち、３残基目のバリンのＦｍｏｃ基を脱保護後、ＤＭＦで樹脂を洗浄後、Ｆｍｏｃ－Ａｓｎ－アシアロ糖鎖（大塚化学株式会社製、１９８ｍｇ、１００μｍｏｌ）、ＤＥＰＢＴ　３等量（４５ｍｇ、１５０μｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ　２等量（１８．５μｌ、１００μｍｏｌ）をＤＭＳＯ：ＤＭＦ溶媒４：１（２．５ｍｌ）を加え、４残基目に糖鎖アスパラギンを導入した。その後、アミノ酸の縮合は、１－３残基目のアミノ酸と同様に行うが、用いるＦｍｏｃ－保護アミノ酸の反応溶液中の濃度は、全て５０ｍＭ程度になるようＤＭＦの量を調製して行った。糖鎖アスパラギン付加後は、Ｆｍｏｃ保護アミノ酸は、各１回の縮合（ｓｉｎｇｌｅ　ｃｏｕｐｌｉｎｇ）で終えた。

なお、Ｎ末端に位置するＣｙｓ（ＩＬ－１３のアミノ酸配列における４５番目のアミノ酸に相当するＣｙｓ）はチアゾリジン型で保護されたものを用いた。

［0095］　縮合が終了した樹脂をＤＭＦおよびＤＣＭでよく洗浄し、ＡｃＯＨ：ＤＣＭ：ＭｅＯＨ＝５：４：１のカクテル２ｍｌを樹脂に加え３時間攪拌した後、樹脂からアミノ酸側鎖が保護された糖鎖含有のポリペプチド断片（化合物１０４）（配列番号１１）を切り出した。これを、室温で減圧濃縮して乾固させ、ベンゼンで酢酸を共沸した。一部、９５％ＴＦＡ、２．５％トリイソプロピルシラン（ＴＩＳ）、２．５％H_2Oを加えて、ＩＬ－１３のアミノ酸

配列における４４番目に相当するＣｙｓ以外のアミノ酸側鎖の保護基を除去し、室温で減圧濃縮後、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）を用いて純度を確認したところ、保持時間１１分に目的とする糖鎖含有のポリペプチド断片Ｃ（化合物１０５）（配列番号１２）を質量分析の結果より確認した。

化合物１０５：ＥＳＩ－ＭＳ：ｍ／ｚ　$C_{112}H_{187}N_{17}O_{63}S$についての計算値：$[M+2H]^{2+}$　１４０６．１，　$[M+3H]^{3+}$　９３７．７、実測値：１４０６．８　，　９３８．３

[0096] １０．糖鎖含有ポリペプチド断片Ｃのチオエステル化

上記９．で得たアミノ酸側鎖が保護された糖鎖含有のポリペプチド断片（化合物１０４）をベンゼンを用いて共沸後、デシケーターで乾燥させた。このポリペプチド断片（化合物１０４）のうち、１０．１ｍｇ（３．３μｍｏｌ）をＤＭＦ　０．４ｍｌに溶解させ、乾燥させたモレキュラーシーブス４Å（６ｍｇ）およびベンジルチオール３０等量（１１．６μｌ、９９μｍｏｌ）を加え、－２０℃で１時間攪拌し、ＰｙＢＯＰ　５等量（８．５８ｍｇ、１６．５μｍｏｌ）、ＤＩＰＥＡ　５等量（２．９μｌ、１６．５μｍｏｌ）を加え２時間反応させてＣ末端のチオエステル化を行った。反応終了後、ジエチルエーテル６ｍｌ中に反応溶液を滴下し、白色沈殿物を遠心分離法により回収した。数回ジエチルエーテルで沈殿物を洗浄し、乾燥させ白色固形物として糖鎖含有ポリペプチドチオエステル（化合物１０６）（配列番号１３）を得た。この固形物に対し、ＴＦＡ：H_2O：ＴＩＳ：ＥＤＴ＝９０：５：２．５：２．５のカクテル１ｍｌを加え３時間攪拌させ、ペプチド側鎖の保護基を除去した。室温で減圧濃縮後サンプルをＨＰＬＣ（カラム：Ｓｙｎｍｅｔｏｒｙ３００（ＴＭ）　Ｃ４、３．５μｍ、４．６×１５０ｍｍ、流速：１．０ｍｌ／分、１８％～５４％CH_3CNを含む０．０９％ＴＦＡの１５分のリニアグラジエント）で分析し、保持時間９．５分にＩＬ１３のアミノ酸配列における４４～５５番目のアミノ酸を有する糖鎖含有ポリペプチドチオエステル（化合物１０７）（配列番号１４）を得た。この糖鎖含有ポ

リペプチドチオエステル（化合物１０７）をＨＰＬＣを用いて精製し、分取した溶液を凍結乾燥し７．２ｍｇを得た。

ＩＬ１３（４４～５５）チオエステル体（化合物１０７）；ＥＳＩ－ＭＳ：ｍ／ｚ　$C_{119}H_{193}N_{17}O_{62}S_2$についての計算値：［Ｍ＋２Ｈ］$^{2+}$　１４５９．１，　［Ｍ＋３Ｈ］$^{3+}$９７３．１、実測値：１４５９．７，　９７３．５

[0097] １１．糖鎖含有ポリペプチド断片Ｃとポリペプチド断片Ｄの連結

上記１０．で得たチオエステル化した糖鎖含有ポリペプチド断片（化合物１０７）（１．２ｍｇ、４２５ｎｍｏｌ）と、上記５．で得た糖鎖非結合部分であるポリペプチド断片Ｄ（化合物４）（２．３ｍｇ、３５５ｎｍｏｌ）とを、緩衝溶液（６Ｍ　塩酸グアニジン、０．２Ｍ　ＰＢＳ、２０ｍＭ　ＴＣＥＰ（トリス（２－カルボシキシエチル）ホスフィン）、０．０４Ｍ　ＭＰＡＡ（４－メルカプトフェニル酢酸）、ｐＨ６．８）１８０μｌに加え、室温で３時間反応させることにより、糖鎖含有ポリペプチド断片Ｃとポリペプチド断片Ｄとが連結された糖鎖含有ポリペプチド断片（化合物１０８）（配列番号１５）を得た。ＮＣＬ終了後、そのまま、メトキシアミン塩酸塩（３．０ｍｇ、３５．９μｍｏｌ）を反応溶液に加え、ｐＨを４．０に合わせＮ末端のチアゾリジンを分解し、システインへと変換した。１２時間後、反応混合物をＨＰＬＣで分析したところ、相当するピークが観察された。また、このピークの化合物を精製し、質量分析により、糖鎖含有ポリペプチド断片（化合物１０９）（配列番号１６）を２．３ｍｇ得たことを確認した。

化合物１０９：ＥＳＩ－ＭＳ：ｍ／ｚ　$C_{402}H_{654}N_{102}O_{141}S_3$についての計算値：［Ｍ＋４Ｈ］$^{4+}$　２３１６．７，　［Ｍ＋５Ｈ］$^{5+}$　１８５３．５，　［Ｍ＋６Ｈ］$^{6+}$　１５４４．８，　［Ｍ＋７Ｈ］$^{7+}$　１３２４．２，　［Ｍ＋８Ｈ］$^{8+}$　１１５８．８，　［Ｍ＋９Ｈ］$^{9+}$　１０３０．２、実測値：２３１７．７，　１８５４．５，　１５４５．７，　１３２５．２，１０３０．９

[0098] １２．ポリペプチド断片Ｂと糖鎖含有ポリペプチド断片Ｃ・Ｄとの連結

上記１１．で得た糖鎖含有ポリペプチド断片（化合物１０９）（１．３ｍｇ、１４０ｎｍｏｌ）と、上記８．で得たチオエステル化したポリペプチド断片Ｂ（化合物１０３）（０．４０ｍｇ、２０９ｎｍｏｌ）とを、緩衝溶液（６Ｍ　塩酸グアニジン、０．２Ｍ　ＰＢＳ、４０ｍＭ　ＴＣＥＰ（トリス（２－カルボシキシエチル）ホスフィン）、０．０２Ｍ　ＭＰＡＡ（４－メルカプトフェニル酢酸）、ｐＨ７．１）７０μｌに加え、室温で８時間反応させることにより、ポリペプチド断片Ｂと糖鎖含有ポリペプチド断片Ｃ・Ｄとが連結した糖鎖含有ポリペプチド断片（化合物１１０）（配列番号１７）を得た。ＮＣＬ終了後、そのまま、メトキシアミン塩酸塩（１．２ｍｇ、１４μｍｏｌ）を反応溶液に加え、ｐＨを４．０に合わせＮ末端のチアゾリジンを分解し、システインへと変換した。１２時間後、反応混合物をＨＰＬＣで分析したところ、相当するピークが観察された。また、このピークの化合物を精製し、質量分析により、糖鎖含有ポリペプチド断片（化合物１１１）（配列番号１８）を０．６ｍｇ得たことを確認した。

化合物１１１：ＥＳＩ－ＭＳ：ｍ／ｚ　$C_{477}H_{767}N_{121}O_{163}S_{6}$についての計算値：$[M+5H]^{5+}$　２１９９．１，　$[M+6H]^{6+}$　１８３２．７，　$[M+7H]^{7+}$　１５７１．１，　$[M+8H]^{8+}$　１３７４．８，　$[M+9H]^{9+}$　１２２２．２，　$[M+10H]^{10+}$　１１００．０，$[M+11H]^{11+}$　１０００．１、実測値：２２００．４，　１８３４．１，　１５７２．３，　１３７５．９，　１２２３．３，　１１００．９，１０００．９

[0099] １３．ポリペプチド断片Ａと糖鎖含有ポリペプチド断片Ｂ・Ｃ・Ｄとの連結

上記１２．で得た糖鎖含有ポリペプチド断片（化合物１１１）（０．６ｍｇ、５４ｎｍｏｌ）と、上記６．で得たグアニンジン誘導体化したポリペプチド断片（化合物１０２）（０．２ｍｇ、６２ｎｍｏｌ）とを、緩衝溶液（６Ｍ　塩酸グアニジン、０．２Ｍ　ＰＢＳ、２０ｍＭ　ＴＣＥＰ（トリス（２－カルボシキシエチル）ホスフィン）、０．１Ｍ　ＭＰＡＡ（４－メルカプトフェニル酢酸）、ｐＨ７．２）５０μｌに加え、室温で２４時間反応さ

せた。２４時間後、反応混合物をＨＰＬＣで分析したところ、相当するピークが観察された。このピークの化合物を精製し、質量分析により、糖鎖含有ポリペプチド（化合物１１２）（配列番号１９）を０．１ｍｇ得たことを確認した。

化合物１１２：ＥＳＩ－ＭＳ：ｍ／ｚ　$C_{617}H_{1000}N_{156}O_{207}S_6$についての計算値：［Ｍ＋８Ｈ］$^{8+}$　１７６３．４，　［Ｍ＋９Ｈ］$^{9+}$　１５６７．６，　［Ｍ＋１０Ｈ］$^{10+}$　１４１０．９，　［Ｍ＋１１Ｈ］$^{11+}$　１２８２．７，　［Ｍ＋１２Ｈ］$^{12+}$　１１７５．９，　［Ｍ＋１３Ｈ］$^{13+}$　１０８５．５，　［Ｍ＋１４Ｈ］$^{14+}$　１００８．１、実測値：１７６４．３，１５６８．５，　１４１１．８，　１２８３．６，　１１７６．８，　１０８６．３，　１００９．０

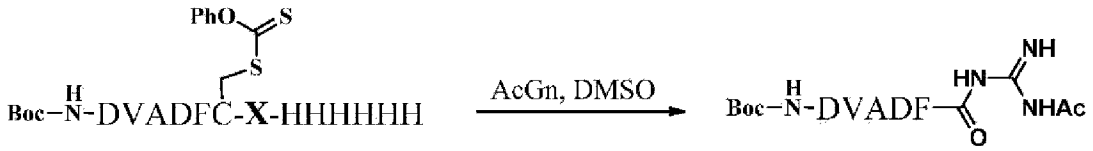
[0100] １４．Ｂｏｃ基の除去

上記１３．で得た１１２残基の糖鎖含有ポリペプチド（化合物１１２）０．１ｍｇを、５％含水トリフルオロ酢酸２００μＬに溶解させ、室温下に１時間反応させた。反応後の溶液をアルゴンガスの吹き付けにより濃縮した後、緩衝溶液（６Ｍ　塩酸グアニジン、０．２Ｍ　ＰＢＳ）２００μＬにて希釈し、得られた溶液をＨＰＬＣにて精製した。メインピークを回収し目的とする均一な糖鎖を有するインターロイキン－１３誘導体（化合物１１３）（配列番号１）を０．１ｍｇ得た。

[0101] １５．介在配列の最適化

介在配列（－Ｃｙｓ－Ｗ－（Ｈｉｓ）ｎ－Ｚ－Ｍｅｔ－）におけるＷを最適化するために、Ｃ末端にヒスタグを有するペプチドチオノホルメートのグアニジド化において生成するグアニジド体（下記に反応式を示す）の単離収率を比較した。

[化33]



Ｘ＝Ｇ，Ｖ，Ｉ，Ｐ，Ｆ，Ｗ，Ｌ

（なお、ＤはＡｓｐ、ＶはＶａｌ、ＡはＡｌａ、ＦはＰｈｅ、ＣはＣｙｓ、ＸはＧｌｙ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｐｒｏ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、Ｌｅｕのいずれか一つのアミノ酸を示す。）

グアニジド化反応には、Ｂｏｃ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ａｌａ－Ａｓｐ－Ｐｈｅ－Ｃｙｓ（Ｃ（Ｓ）ＯＰｈ）－Ｘａａ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－ＯＨ （Ｘａａ＝Ｇｌｙ，Ｖａｌ，Ｉｌｅ，Ｐｈｅ，Ｐｒｏ，Ｔｒｐ）（配列番号２０）のＸａａにおいてアミノ酸が異なる６つのペプチドチオノホルメートを使用した。各ペプチドチオノホルメートを含むペプチドチオノホルメート／ＤＭＳＯ溶液（２ｍＭ）へ同じ体積量の１－アセチルグアニジン／ＤＭＳＯ溶液（１Ｍ）を加え、ボルテックスミキサーで撹拌した。３７℃の湯浴中にて１日間静置した後、ジエチルエーテルで沈殿、洗浄した。セミ分取ＨＰＬＣにて精製し、目的化合物（配列番号２１）を得た。それぞれのペプチドの単離収率を表１に記載する。ＥＳＩ ＭＳ ｃａｌｃｄ ［Ｍ＋Ｈ］$^{+}$ ７４８．３ ｆｏｕｎｄ，７４８．３．

表１に示す結果より、Ｖａｌ、Ｔｒｐ、ＩｌｅをヒスタグのＮ末側へ挿入した場合、グアニジノ体を非常に多く得ることができた。特に、ＶａｌおよびＩｌｅは、副生成物の生成を抑えることができた。

[0102] [表1]

配列	**X**＝アミノ酸	グアニジノ体	副生成物
DVADFC**X**-HHHHHH	G	16%	24%
	V	56%	痕跡*
	I	46%	痕跡*
	F	36%	17%
	P	26%	検出せず
	W	53%	14%

*: 質量分析により検出

請求の範囲

［請求項1］　ＮＣＬ法に適した、Ｎ末端がシステインである第１のポリペプチド断片とＣ末側が修飾された第２のポリペプチド断片とを効率的に製造する方法であって、以下のステップを含む方法：

（１）以下の構造を有するポリペプチド：

（Ｎ末側）　第２のポリペプチド断片－Ｃｙｓ－Ｗ－（Ｈｉｓ）ｎ－Ｚ－Ｍｅｔ－第１のポリペプチド断片　（Ｃ末側）

［ここでｎは、０～１０の整数を意味し、Ｃｙｓはシステイン、Ｗは任意の１、２又は３個のアミノ酸を意味し、Ｚは、任意の０、１、又は２個のアミノ酸を意味し、Ｈｉｓはヒスチジンを意味し、Ｍｅｔはメチオニンを意味する。また、第１のポリペプチド断片のＮ末端はシステインである。］

にＣＮＢｒを反応させ、以下のポリペプチド断片を得るステップ；

（Ａ）Ｎ末端がシステインである第１のポリペプチド断片

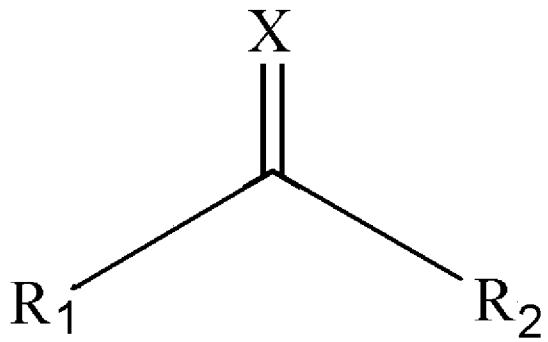
（Ｂ）以下の構造を有する第３のポリペプチド断片：

（Ｎ末側）　第２のポリペプチド断片－Ｃｙｓ－Ｗ－（Ｈｉｓ）ｎ－Ｚ－Ｍｅｔ’　（Ｃ末側）

［ここで、Ｍｅｔ’は、Ｍｅｔの誘導体を意味する。］

（２）前記第３のポリペプチド断片に、下記式（Ｉ）で表わされる化合物：

［化1］



（Ｉ）

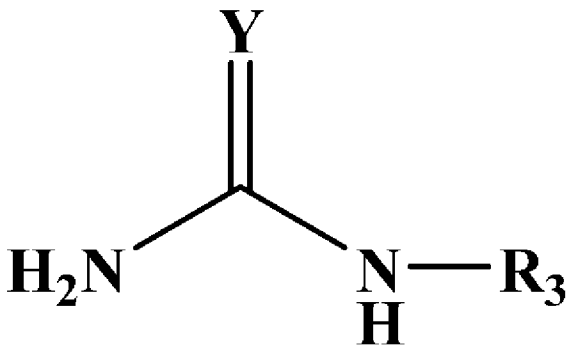
［式中、

Ｘは硫黄原子または酸素原子であり、

R_1及びR_2は、脱離基である。］

を反応させ、続いて、有機溶媒中で、下記式（ＩＩ）で表わされる化合物：

［化2］



（ＩＩ）

［式中、

Ｙは、酸素原子、硫黄原子、または、＝ＮＨであり、

R_3は、水素原子、アシル基、または、アルコキシカルボニル基である。］

を反応させることにより、以下の構造を有するＣ末側が修飾された第２のポリペプチド断片：

（Ｎ末側）　第２のポリペプチド断片－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－Ｃ（＝Ｙ）NHR_3　（Ｃ末側）

を得るステップ。

［請求項2］　請求項１に記載の製造方法であって、

前記（２）のステップにおいて得られたＣ末側が修飾された第２のポリペプチド断片に、さらに下記式で表されるチオール

R_4－ＳＨ

［式中、R_4は、置換もしくは非置換のベンジル基、置換もしくは非置換のアリール基、および、置換もしくは非置換のアルキル基からな

る群から選択されるいずれか一つの基である。]

を反応させ、C末側の－NH－C（＝Y）NHR_3基とチオール基とを交換させることにより、以下の構造を有するC末側が修飾された第２のポリペプチド断片：

（N末側）　第２のポリペプチド断片－C（＝O）－SR_4　（C末側）

を得るステップをさらに含む、製造方法。

[請求項3]　請求項１または２に記載の製造方法であって、

前記式（I）で表わされる化合物におけるXが硫黄原子であることを特徴とする、

製造方法。

[請求項4]　請求項１～３のいずれか一項に記載の製造方法であって、前記式（I）で表わされる化合物中におけるR_1が、－O－C_6アリール基であることを特徴とする、

製造方法。

[請求項5]　請求項１～４のいずれか一項に記載の製造方法であって、

前記式（I）で表わされる化合物におけるR_2が、ハロゲン原子、または、置換もしくは非置換の－S－C_{6-10}アリール基であることを特徴とする、

製造方法。

[請求項6]　請求項１～５のいずれか一項に記載の製造方法であって、

前記式（II）で表わされる化合物におけるYが＝NHであることを特徴とする、

製造方法。

[請求項7]　請求項１～６のいずれか一項に記載の製造方法であって、

前記式（II）で表わされる化合物におけるR_3が、アセチル基であることを特徴とする、

製造方法。

［請求項8］　請求項１～７に記載の製造方法であって、

前記、以下の構造を有するポリペプチド：

（Ｎ末側）　第２のポリペプチド断片－Ｃｙｓ－Ｗ－（Ｈｉｓ）ｎ－Ｚ－Ｍｅｔ－第１のポリペプチド断片　（Ｃ末側）

が、細胞によって発現された組換えポリペプチド断片であることを特徴とする、

製造方法。

［請求項9］　請求項８に記載の製造方法であって、

前記細胞が大腸菌であることを特徴とする、

製造方法。

［請求項10］　請求項１～９のいずれか一項に記載の製造方法であって、

Ｗが１個のアミノ酸であり、かつ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｔｒｐからなる群より選択されるいずれか一つのアミノ酸であることを特徴とする、

製造方法。

［請求項11］　請求項１～１０のいずれか一項に記載の製造方法であって、

ｎが６～１０の整数であることを特徴とする、

製造方法。

［請求項12］　ＮＣＬ法に適した、Ｎ末側がシステインである第１のポリペプチド断片を製造する方法であって、

以下の構造を有するポリペプチド：

（Ｎ末側）　第２のポリペプチド断片－Ｐ－Ｍｅｔ－第１のポリペプチド断片　（Ｃ末側）

［ここでＰは、任意の０～１０個のアミノ酸であり、Ｍｅｔはメチオニンを意味し、第１のポリペプチド断片のＮ末端はシステインである。］

にＣＮＢｒを反応させることを特徴とする方法。

［請求項13］　糖鎖付加ポリペプチドの製造方法であって、以下のステップを有する

製造方法：

（１）製造しようとする所望の糖鎖付加ポリペプチドのペプチド配列を、少なくとも、

・糖鎖が付加されたアミノ酸を含むポリペプチドからなる糖鎖含有ポリペプチド断片、

・糖鎖含有ポリペプチド断片よりもＮ末側にあり所望の糖鎖付加ペプチドのＮ末側を含むポリペプチドからなる第２のポリペプチド断片、

・糖鎖含有ポリペプチド断片よりもＣ末側にあり所望の糖鎖付加ペプチドのＣ末側を含むポリペプチドからなる第１のポリペプチド断片、

・存在し得る場合には、糖鎖含有ポリペプチド断片と第２のポリペプチド断片との間のポリペプチド断片、

・存在し得る場合には、糖鎖含有ポリペプチド断片と第１のポリペプチド断片との間のポリペプチド断片、

に分類して設計するステップ；

　ここで、第１のポリペプチド断片のＮ末端はシステインであるように設計されており、

（２）以下の構造を有するポリペプチド：

（Ｎ末側）　　第２のポリペプチド断片－Ｃｙｓ－Ｗ－（Ｈｉｓ）ｎ－Ｚ－Ｍｅｔ－第１のポリペプチド断片　　（Ｃ末側）

［ここでｎは、０～１０の整数を意味し、Ｃｙｓはシステイン、Ｗは任意の１、２又は３個のアミノ酸を意味し、Ｚは、任意の０、１、又は２個のアミノ酸を意味し、Ｈｉｓはヒスチジンを意味し、Ｍｅｔはメチオニンを意味する。また、第１のポリペプチド断片のＮ末端はシステインである。］

をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを用いて、大腸菌によって発現させ、前記構造を有するポリペプチドを取得するステップ；

（３）ステップ（２）で得られたポリペプチドにＣＮＢｒを反応させ

、以下のポリペプチド断片を得るステップ；

（Ａ）Ｎ末端がシステインである第１のポリペプチド断片

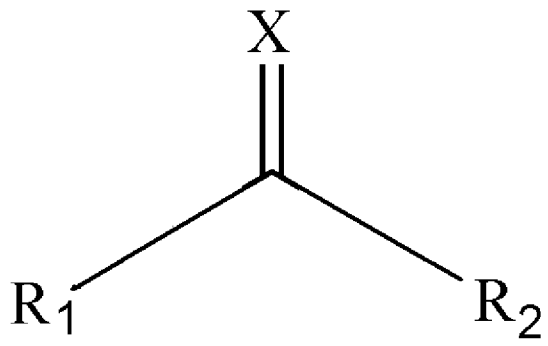
（Ｂ）以下の構造を有する第３のポリペプチド断片：

（Ｎ末側）　第２のポリペプチド断片－Ｃｙｓ－Ｗ－（Ｈｉｓ）ｎ－Ｚ－Ｍｅｔ’　（Ｃ末側）

（ここで、Ｍｅｔ’は、Ｍｅｔの誘導体を意味する。）

（４）前記第３のポリペプチド断片に、下記式（Ｉ）で表わされる化合物：

［化1］

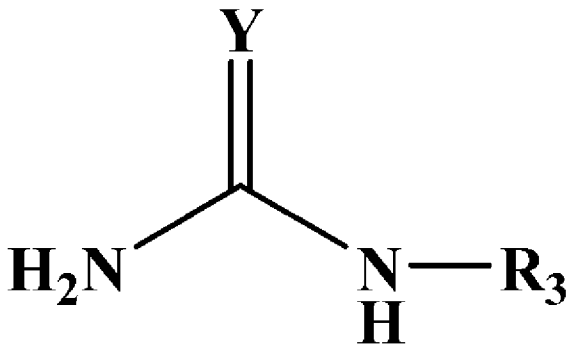


（Ｉ）

［式中、Ｘは硫黄原子または酸素原子であり、R_1及びR_2は、脱離基である。］

を反応させ、続いて、有機溶媒中で、下記式（ＩＩ）で表わされる化合物：

［化2］



（ＩＩ）

［式中、

Ｙは酸素原子、硫黄原子、または、ＮＨ基であり、

R_3は、水素原子、アシル基、または、アルコキシカルボニル基である。］

を反応させることにより、以下の構造を有するＣ末側が修飾された第２のポリペプチド断片：

（Ｎ末側）　第２のポリペプチド断片－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＨ－Ｃ（＝Ｙ）NHR_3　（Ｃ末側）

を得るステップ；

（５）任意に、前記（４）のステップにおいて得られたＣ末側が修飾された第２のポリペプチド断片に、さらに下記式で表されるチオール

R_4－ＳＨ

［式中、R_4は、置換もしくは非置換のベンジル基、置換もしくは非置換のアリール基、および、置換もしくは非置換のアルキル基からなる群から選択されるいずれか一つの基である。］

を反応させ、Ｃ末側の－ＮＨ－Ｃ（＝Ｙ）NHR_3基とチオール基とを交換させることにより、以下の構造を有するＣ末側が修飾された第２のポリペプチド断片：

（Ｎ末側）　第２のポリペプチド断片－Ｃ（＝Ｏ）－SR_4　（Ｃ末側）

を得るステップ；

（６）化学的に合成することにより別に調製された、

・前記糖鎖含有ポリペプチド断片、

・存在し得る場合には、糖鎖含有ポリペプチド断片と第２のポリペプチド断片との間の前記ポリペプチド断片、

・存在し得る場合には、糖鎖含有ポリペプチド断片と第１のポリペプチド断片との間の前記ポリペプチド断片、

と、

ステップ（３）によって得られたＮ末端がシステインである第１のポリペプチド断片

ステップ（４）又は（５）によって得られたＣ末側が修飾された第２のポリペプチド断片

とを、所望の糖鎖付加ポリペプチドが得られるような順序により、ライゲーション法により結合するステップ。

［請求項14］ 請求項１３に記載の製造方法であって、

前記式（Ｉ）で表わされる化合物におけるＸが硫黄原子であることを特徴とする、

製造方法。

［請求項15］ 請求項１３または１４に記載の製造方法であって、前記式（Ｉ）で表わされる化合物中におけるR_1が、$-O-C_6$アリール基であることを特徴とする、

製造方法。

［請求項16］ 請求項１３～１５のいずれか一項に記載の製造方法であって、

前記式（Ｉ）で表わされる化合物におけるR_2が、ハロゲン原子、または、置換もしくは非置換の$-S-C_{6-10}$アリール基であることを特徴とする、

製造方法。

［請求項17］ 請求項１３～１６のいずれか一項に記載の製造方法であって、

前記式（ＩＩ）で表わされる化合物におけるＹが＝ＮＨであることを特徴とする、

製造方法。

［請求項18］ 請求項１３～１７のいずれか一項に記載の製造方法であって、

前記式（ＩＩ）で表わされる化合物におけるR_3が、アセチル基であることを特徴とする、

製造方法。

［請求項19］ 請求項１３～１８のいずれか一項に記載の製造方法であって、

Ｗが１個のアミノ酸であり、かつ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｔｒｐからなる群より選択されるいずれか一つのアミノ酸であることを特徴とする、

製造方法。

［請求項20］ 請求項１３～１９のいずれか一項に記載の製造方法であって、

ｎが６～１０の整数であることを特徴とする、

製造方法。