

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07H 15/04

C07F 9/09 C12P 13/02

C12P 19/44



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 97198030.6

[45] 授权公告日 2005 年 3 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 1193035C

[22] 申请日 1997.7.17 [21] 申请号 97198030.6

[30] 优先权

[32] 1996.7.19 [33] JP [31] 207606/1996

[86] 国际申请 PCT/JP1997/002483 1997.7.17

[87] 国际公布 WO1998/003529 日 1998.1.29

[85] 进入国家阶段日期 1999.3.18

[71] 专利权人 宝生物工程公司

地址 日本滋贺县

[72] 发明人 伊东信 栗田丰久 光武进

喜多克洋

审查员 张轶东

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 张平元

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 4 页

[54] 发明名称 生产鞘脂类和鞘脂类衍生物的方法

[57] 摘要

一种特异地制备鞘脂或鞘脂衍生物的方法，其中通过该方法对结合到类鞘氨醇上的长链脂肪酸部分进行了修饰或取代并制备了鞘脂类或鞘脂类衍生物。该方法的特征在于在能够特异性地水解组成鞘脂的类鞘氨醇和脂肪酸组分之间的酰胺键并得到与脂族酸链中最初的那种不同的另一的鞘脂或鞘脂衍生物的酶的存在下将鞘脂与脂族羧酸等进行酶解反应。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种生产鞘脂类或鞘脂类衍生物的方法，其包括用鞘胺神经酰胺脱酰酶，对选自下列(a)到(c)的物质进行酶促反应的步骤：

- 5 (a) 鞘脂类与有或没有标记的脂族羧酸；
(b) 溶血鞘脂类与有或没有标记的脂族羧酸；
(c) 至少两种不同的鞘脂类或鞘脂类衍生物。

2. 权利要求1的方法，其包括将物质与假单胞菌属的细菌接触的步骤，所述假单胞菌属的细菌用作能生产酶的产酶剂，所述酶能特异性地水解鞘脂
10 中脂肪酸和类鞘氨醇间的酰胺键。

3. 根据权利要求2的方法，其中的假单胞菌属的细菌在选自下列的的培养基上培养：

- (a) 含有鞘脂类和有或没有标记的脂族羧酸的培养基；
(b) 含有溶血鞘脂类和有或没有标记的脂族羧酸的培养基；
15 (c) 含有至少两种不同的鞘脂类或鞘脂类衍生物的培养基。

生产鞘脂类和鞘脂类衍生物的方法

5 本发明涉及生产用于药品、糖工程、细胞工程及诸如此类的领域中鞘脂类或鞘脂类衍生物的方法，以及通过这种生产方法所得到的鞘脂类或鞘脂类衍生物。

“鞘脂类”是一个种属名称，它指具有长链类鞘氨醇(sphingoid)骨架的糖鞘脂、鞘磷脂(sphingophospholipids)及神经酰胺，并广泛存在于低等动物
10 和高等动物中。最近已经阐明这些鞘脂类参与了细胞增殖、分化诱导、程序性死亡等生物活动并扮演了重要角色。同样，由于它们是细胞表层的组分故已尝试将这些鞘脂类应用到化妆品等方面。

其常规结构是，鞘脂类具有神经酰胺结构，其中的长链脂肪酸具有不规则链长并通过酰胺键与类鞘氨醇(sphingoid)的氨基相连。对通过修饰或取代
15 鞘脂长链脂肪酸来产生鞘脂类或鞘脂类衍生物的方法而言，该方法是现有的，其中利用鞘脂中脂肪酸未通过酰胺键与类鞘氨醇的氨基相连的溶血鞘脂(lysosphingolipid)作为起始物质通过化学法或酶法来合成鞘脂类或鞘脂类衍生物。

在化学法中，将脂肪酸或脂肪酸衍生物通过下述方法缩合到溶血形式
20 (lyso-form)的氨基基团。例如，现有方法中有一种是利用脂肪酸活性酯(例如，脂肪酸的 N-羟基丁二酰亚胺酯)，有一种方法中使用了脂肪酸及偶联剂(例如，羰基二咪唑，二环己基碳二亚胺等)，有一种方法是使用了脂肪酸酐，有一种方法是使用了脂肪酸氯化物，等等。

酶学方法(Methods in Enzymology), 138 : 319-341(1987)，欧洲专利
25 373039 B1(1994)及欧洲专利 765883 A1(1997)报道了一种将溶血神经节苷脂(lysoganglioside)用作溶血形式的酸性糖脂的方法。还有，脂类研究杂志(Journal of Lipid Research) 28 : 710-718(1987)中描述了一种将鞘氨苷-磷酸胆碱(溶血性鞘磷脂)用作溶血形式的鞘磷脂的方法。

根据这些方法，在有些情况下会产生副反应(例如邻-酰化等)，因此有必要
30 要采取一些复杂的步骤来使用保护基团，纯化等等以选择性地得到 N-酰化的产物。同样，尽管鞘脂上除类鞘氨醇上的氨基外还有其它氨基，但当需要选

择性酰化的仅仅是鞘脂上的类鞘氨醇的氨基时，例如通过鞘磷脂或含氨基糖的糖鞘脂中的一员即神经酰胺氨基乙基磷酸(Ceramide Ciliatine)的化学脱乙酰来得到脱-N-乙酰溶血性神经节苷脂时，就有必要采取一些复杂的步骤，例如有一步来进行保护基团的导入、部分酰化、酰化后的部分脱酰化，以及有一步来进行在脱-N-乙酰溶血神经节苷脂进入脂质体后的选择性酰化，从而就使得进行选择性的酰化变得困难。

另一方面，在国际公开号 WO 94/26919 中描述了一种酶学合成法。在此种方法中，将脂肪酶置于有机溶剂中进行缩合反应，于是就需要大量的无水有机溶剂，而且由于其溶解度，底物量也有限。国际公开号 WO 94/26919 公开了一种神经酰胺和杂化神经酰胺的酶学合成方法，但其反应是非特异性的，故发现有邻-酰化产品的生成。而且，当底物上具有与化学合成法中相类似的多种氨基时，要使反应仅仅与类鞘氨醇的氨基发生特异性的反应是困难的。

如上所述，在通过化学法或酶法在鞘脂上进行长链脂肪酸的修饰或取代来合成鞘脂类或鞘脂类衍生物的现有方法中，将会产生不想要的副产品而且底物也有限。另外，在以前的方法里，所用的起始材料是鞘脂中的脂肪酸没有通过酰胺键与鞘脂中类鞘氨醇的 2 位相连的溶血鞘脂类。因此，当要合成鞘脂类或鞘脂类衍生物时，有必要在合成之前先制备溶血鞘脂类。

所以，本发明的一个目的是提供一种生产方法以特异性地合成鞘脂类或鞘脂衍生物，它们的经修饰或取代的长链脂肪酸不仅与溶血鞘脂的类鞘氨醇相连而且也与鞘脂的类鞘氨醇相连。

同时，本发明的另一个目的是提供通过上述方法所生产出来的鞘脂类或鞘脂衍生物。

将本发明进行一下总结的话，本发明的第一项发明是生产鞘脂类或鞘脂衍生物的方法，包括用一个能特异性地水解鞘脂的类鞘氨醇和脂肪酸之间的酰胺键以得到具有另一种不同脂肪酸链的另外的鞘脂或鞘脂衍生物的酶来将鞘脂与有或没有标记的脂族羧酸进行的酶反应。

本发明的第二项发明是一种生产鞘脂类或鞘脂衍生物的方法，包括用一个能特异性地水解鞘脂的类鞘氨醇和脂肪酸之间的酰胺键以得到鞘脂类或鞘脂衍生物的酶在溶血鞘脂与有或没有标记的脂族羧酸之间所进行的酶

反应。

本发明的第三项发明是一种生产鞘脂类或鞘脂衍生物的方法，包括用一个能特异性地水解鞘脂的类鞘氨醇和脂肪酸之间的酰胺键以得到具有交换了脂肪酸链的鞘脂类或鞘脂类衍生物的酶在至少两种不同的鞘脂类或鞘脂衍生物之间所进行的酶反应。

本发明的第四项发明是一种生产鞘脂类或鞘脂衍生物的方法，包括使用一种能产生酶的微生物，而不是上述本发明的第一到三项发明中的酶，并将该微生物与起始材料接触以得到目的物。

本发明的第五项发明是一种鞘脂或鞘脂衍生物，这种鞘脂或鞘脂衍生物通过上述本发明中的第一到第四项发明中的任一种方法产生。

本发明人在鞘脂或鞘脂衍生物的合成方法方面进行了研究，结果发现将脂肪酸重组到溶血鞘脂的类鞘氨醇的氨基上或用其它脂肪酸来取代通过酰胺键与鞘脂的类鞘氨醇结合的脂肪酸产生了鞘脂和鞘脂衍生物，这是通过利用酶作用于鞘脂类的类鞘氨醇上的酰胺键并将其水解为溶血鞘脂和脂肪酸而完成的。

以前，为了防止同时发生的水解反应，通过在有机溶剂系统中加入大大过量于受体的供体一定会产生酶的逆反应和转移反应。但是，本发明人已发现使用一种能特异性地水解鞘脂类中类鞘氨醇和脂肪酸之间的酰胺键的酶而不必要使用大大过量于受体的供体，在温和条件下在水溶液中就可以合成鞘脂或鞘脂衍生物，并从而完成了本发明。

附图简述

图 1 表明用脂肪酸分子型的 SCDase 时逆反应的特异性。

图 2 表明了 SCDase 逆反应的最适 pH。

图 3 表明了 SCDase 的水解反应、逆反应和脂肪酸交换反应的反应比率。

图 4 比较了 B16 细胞中神经酰胺酶(Ceramidase)活性。

下面将对本发明进行详述。

此处所用的术语“鞘脂类”指的是天然或合成的具长链骨架的类鞘氨醇的物质及其混合物，包括糖鞘脂类、鞘磷脂类及神经酰胺。术语“溶血鞘磷脂类”指的是 N-脱酰化形式的鞘脂类，其中通过酰胺键与类鞘氨醇的氨基相连的脂肪酸已被去除。

此处的“脂族羧酸”包括具有脂性(aliphaticity)的羧酸,例如脂肪酸中的烃链已被卤素或官能团(例如取代或未取代的氨基、氧代基团、羟基等)取代的酸,在烃链上含氧、硫或氨基的酸以及饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸。

此处所用的术语“鞘脂神经酰胺脱酰酶”指的是作用于鞘脂的类鞘氨醇的酰胺键的一种酶,而且它还能将鞘脂类特异性地水解为溶血鞘脂类和脂肪酸,也就是说它是一种能特异性地水解鞘脂类中类鞘氨醇和脂肪酸之间的酰胺键的酶。

其实例包括由属于假单胞菌属微生物产生的鞘脂神经酰胺脱酰酶,该酶广泛地作用于鞘脂类包括糖鞘脂类(神经节苷脂、中性糖脂)及鞘磷脂类(鞘磷脂)[SCDase, 生化杂志(Journal of Biological Chemistry), 270: 24370-24374(1995), 欧洲专利 707063 A1(1996)], 由诺卡氏菌属的微生物产生的仅作用于神经节苷脂的神经节苷脂神经酰胺酶[Journal of Biochemistry, 103: 1-4(1988), 美国专利 4,997,760, 美国专利 5,143,841], 由红球菌属微生物产生的仅作用于中性糖脂产生溶血型的酶, 由链霉菌属的微生物产生的作用于糖鞘脂类的糖鞘脂神经酰胺脱酰酶[Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 59: 2028-2032(1995), JP-A-7-107988], 以及作用于神经酰胺的神经酰胺酶(酰基鞘氨醇脱酰酶, EC 3.5.1.23)[Journal of Biological Chemistry, 241: 3731-3737(1966), Biochemistry, 8: 1692-1698(1968), Biochimica Biophysica Acta, 176: 339-347(1969), Science, 178: 1100-1102(1972)]. 然而, 本发明并不仅限于这些。

此外, 用编码这些酶的基因所得的重组酶以及由这些酶的基因所编码并通过缺失、增加、插入或取代所修饰后的重组酶也包括在本发明的鞘脂神经酰胺脱酰酶的范围之内, 条件是只要它们可以特异性地水解鞘脂中类鞘氨醇和脂肪酸之间的酰胺键。

25 在使用该酶时, 可以使用该酶的纯化产物, 或者含该酶的培养物物汤或粗提物。

此外, 如上所述, 可以使用能产生该酶的微生物来代替该酶。

此处所用的“能够产生特异性地水解鞘脂中鞘氨醇和脂肪酸间的酰氨键的酶的微生物”是未加限制的, 只要该微生物能产生鞘脂神经酰胺酶即可。所包括的微生物例如有细菌、酵母、放线菌、线霉、担子菌等等, 以及从植物、昆虫、动物等所得的细胞。

作用于鞘脂中类鞘氨醇的酰胺键并将其水解为溶血鞘脂和脂肪酸的酶或能产生该酶的微生物可被固定于一种已知的固体载体上或掺入到脂质体或反胶束中。也可使用以高分子物质修饰的酶。

本发明的反应可在含有用作原料的鞘脂或溶血鞘脂的缓冲溶液中进行，反应中可以使用有或没有标记的脂族羧酸以及任何纯化的酶、粗提物、培养物汤及微生物。如果所用的是微生物时，可将用作原料的鞘脂或溶血鞘脂以及脂族羧酸加到微生物的培养物汤中。对这些物质的用量并无具体的限制，而且可以使用其他饱和用量。一般而言，优选脂族羧酸为过量，但根据本发明，鞘脂类或溶血鞘脂与脂族羧酸甚至以 1: 1 的等摩尔量也能进行反应的，并且鞘脂或溶血鞘脂也可以是过量的。

同样，对酶或能产生该酶的微生物的用量也并无具体的限制，而且可在一个宽泛的范围内进行选择，例如对每 1 毫升的起始溶液来说，可以使其用量为约 0.1mU 或更多，优选 3mU 到 10U。对缓冲溶液而言，具有 pH 值从 5 到 9 的任何合适的缓冲溶液都可使用，但优选反应在 pH6 到 7 的缓冲溶液中进行反应。而且为了酶的活化和底物的溶解，优选将表面活性剂加入缓冲溶液中。对表面活性剂而言，可使用温和的酸性表面活性剂，非离子型表面活性剂等。虽然对所加表面活性剂的量也无具体限制，但所用的量应能达到酶活化和底物溶解的效果或者能使得产物能有效地获得，因此优选所加试剂量的范围在 0.01 % 到 2 % 之间。同样也可在反应溶液中加入有机溶剂，而且当使用这种有机溶剂时，反应可在水溶性有机溶剂或其与不溶性有机溶剂形成的两相系统中进行。对所加有机溶剂的用量也并无具特限制，前提条件是其用量不使酶失活而且能有效得到产品。

所得的鞘脂或鞘脂衍生物可通过薄层色谱确证。

本发明所得的鞘脂可通过传统的有机化合物的色谱法来进行分离和纯化。

实施例

通过下面的实施例将对本发明进行详细描述。但本发明并不仅限于这些实施例。

实施例 1

将含有 5 纳摩尔半乳糖鞘氨醇(Sigma 制造)，5 纳摩尔[1-¹⁴C]硬脂酸(Amersham 制造)，0.8 % 的 Triton X-100 及 150 μ U 的来自于假单胞菌属的

SCDase[Journal of Biological Chemistry, 270: 24370-24374(1995), 欧洲专利 707063 A1(1996)]的 50 毫摩尔/升乙酸缓冲液(pH6.0)的 50 微升的部分在 37 °C 下过夜反应。

5 反应溶液在薄层色谱上显影(显影液: 氯仿/甲醇/0.25 % 的氯化镁水溶液 = 65/25/4)并在影像板上曝光通过 BAS 1000 Imaging Analyzer(Fuji Photo Film)得到色谱。在这种情况下, 只有[1-¹⁴C]硬脂酸及新形成的半乳糖基神经酰胺能被检测到。

10 从薄层板上回收相应于半乳糖基神经酰胺的部分并以氯仿/甲醇(2/1 的体积比)提取。提取物蒸发至干燥并溶于含 16mU β-半乳糖苷酶(来自于刀豆属)及 0.4 % 牛磺脱氧胆酸的 10 微升 50 毫摩尔/升乙酸缓冲液(pH6.0)中于 37 °C 酶解过夜。反应溶液再于薄层色谱上显影(显影液: 氯仿/甲醇/液态氨 = 90/10/1)并用 BAS 1000 Imaging Analyzer(Fuji Photo Film 制造)分析以寻找与神经酰胺具有相同 Rf 值的那条带。同样, 当用来标记的硬脂酸进行相同的反应、薄层色谱及提取步骤时, 所得产物用快速原子轰击质谱(FAB-MS)

15 分析, 检测到对应于半乳糖基神经酰胺母离子的 m/z = 462 的峰以及对应于神经酰胺分子离子峰的碎片离子峰 m/z = 548。根据这些结果, 表明通过逆反应将脂肪酸转移到了鞘氨醇部分的氨基上。

实施例 2

20 将含有 50 纳摩尔鞘氨苷磷酸胆碱(溶血鞘磷脂, Sigma 制造), 5 纳摩尔[1-¹⁴C]硬脂酸, 0.8 % Triton X-100 及 150 μ U 来自于假单胞菌属的 SCDase 的 50 μ l 的 50 毫摩尔/升乙酸盐缓冲液(pH6.0)在 37 °C 下反应过夜。

反应溶液在薄层色谱上显影(显影液: 氯仿/甲醇/0.02 % 氯化钙水溶液 = 5/4/1)并在 BAS 1000 Imaging Analyzer(Fuji Photo Film 制造)上分析。在这种情况下, 仅检测到[1-¹⁴C]硬脂酸及新形成的鞘磷脂的带。

25 相应于鞘磷脂的部分从薄层板上回收, 提取并蒸发到干燥以得到逆反应的产物。产物溶于 25 微升含 35.7 μ U 来源于金黄色葡萄球菌的鞘磷脂酶(Sigma 制造)的 25 毫摩尔/升的磷酸盐缓冲液(pH7.5)中于 37 °C 下酶解过夜。

30 再将反应溶液于薄层色谱上显影(显影液: 氯仿/甲醇/液态氨 = 90/10/1)并以 BAS 1000 Imaging Analyzer 分析以寻找与神经酰胺具有相同 Rf 值的带。根据这些结果表明通过逆反应已将脂肪酸转移到了鞘氨醇部分的氨基上。

实施例 3

SCDase-1 在各种受体上的逆反应:

5 将 10 微升 50 毫摩尔/升的含 1 纳摩尔 $[1-^{14}\text{C}]$ 硬脂酸, 1 纳摩尔溶血鞘脂, 0.8 % Triton X-100 及 30 μU 来自假单胞菌属的 SCDase 的乙酸盐缓冲液(pH6.0)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应过夜。所得反应液于薄层色谱上显影并在影像板上曝光, 并通过 BAS1000 Imaging Analyzer(Fuji Photo Film 制造)确定反应产物。结果如表 1。

如表 1 所示, 该酶不仅可广泛地作用于溶血鞘脂的各种成员, 而且还可作用于用于受体的溶血鞘磷脂及鞘氨醇。

10

表 1

溶血鞘脂类	相对活性(%)
半乳糖基鞘氨醇	100.0
溶血硫苷脂	59.6
溶血乳糖神经酰胺	37.2
溶血红细胞糖苷脂	34.1
溶血神经节苷脂 GM1a	15.4
溶血鞘磷脂	5.7
鞘氨醇	11.5

实施例 4

SCDase-2 在各种受体上的逆反应:

15 将 41.6 微升的含 66.6 纳摩尔 N-三氟乙酰化的氨基十二烷酸, 33.3 纳摩尔溶血鞘脂, 0.3 % Triton X-100 及 148 μU 来源于假单胞菌属的 SCDase 25 毫摩尔/升的甘氨酸 - 氢氧化钠缓冲液(pH11)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 48 小时。

所得的反应溶液在薄层色谱上显影, 糖鞘脂用苔黑酚 - 硫酸染色, 其它鞘脂以考马斯亮蓝染色, 然后通过 Imaging Densitometer(Bio-Rad 制造)确定反应产物。结果见表 2。

20 如表 2 所示, 类似于实施例 3, 该酶不仅可广泛作用于溶血鞘脂的各成员而且还可作用于用作受体的鞘氨醇。

表 2

溶血鞘脂类	反应效率(%)
鞘氨醇	69
溶血神经节苷脂 GM3	24
溶血神经节苷脂 GD3	13
溶血神经节苷脂 GM1a	29
溶血神经节苷脂 GD1a	32

实施例 5

SCDase 逆反应对脂肪酸分子类型的特异性:

将 50 微升含有 5 纳摩尔半乳糖基鞘氨醇(Sigma 制造), 5 纳摩尔各种未标记的脂肪酸, 0.8 % 的 Triton X-100 以及 150 μ U 来源于假单胞菌属的 SCDase 的 50 毫摩尔/升的乙酸盐缓冲液在 37 $^{\circ}$ C 下反应过夜。

所得的反应溶液置于薄层色谱上显影, 反应产物用苔黑酚-硫酸法染色并用 Chromatoscanner CS 9000(Shimadzu Corporation 制造)确定。结果见图 1。即图 1 表明了 SCDase 逆反应对脂肪酸分子类型的特异性, 其中脂肪酸为纵标, 产率(%)为横标。

实施例 6

SCDase 逆反应的最佳 pH:

将 10 微升含 1 纳摩尔半乳糖基鞘氨醇, 1 纳摩尔[1- 14 C]硬脂酸, 0.8 % Triton X-100 及 30 μ U 来自假单胞菌的 SCDase 的各种不同缓冲溶液置于 37 $^{\circ}$ C 反应 3 小时。结果见图 2。即图 2 表明了逆反应的最适 pH, 其中分解比率(%)绘为纵标而 pH 绘为横标。在图 2 中, \square 代表乙酸盐缓冲液, \blacktriangle 代表磷酸盐缓冲液而 \bullet 代表甘氨酸-NaOH 缓冲液。

实施例 7

SCDase 在各种受体上的脂肪酸交换反应:

将 10 微升含有 1 纳摩尔[1- 14 C]硬脂酸, 1 纳摩尔鞘脂, 0.8 % Triton X-100 及 30 μ U 来源于假单胞菌属的 SCDase 的 50 毫摩尔乙酸盐缓冲液(pH6.0)在 37 $^{\circ}$ C 下反应过夜。

所得的反应溶液在薄层色谱上显影, 在影像板上曝光, 以 BAS 1000 Imaging Analyzer(Fuji Photo Film 制造)确定反应产物。结果见表 3。

如表 3 所示, 该酶可广泛地在鞘脂上发生脂肪酸交换反应。

表 3

鞘脂类	相对活性(%)
半乳糖基神经酰胺	100.0
葡萄糖基神经酰胺	129.0
硫苷脂	31.7
乳糖基神经酰胺	112.0
Asialo GM1	164.0
红细胞糖苷脂	141.0
神经节苷脂 GM3	54.4
神经节苷脂 GM2	5.5
神经节苷脂 GM1a	2.4
神经节苷脂 GD1a	6.2
神经节苷脂 GD1b	1.2
鞘磷脂	2.9
神经酰胺	77.5

实施例 8

反应条件测试:

为了测试水解反应、逆反应和脂肪酸交换反应的条件, 在下面的条件

5 (A)和(B)下进行反应:

反应条件(A)

补充下列物质到 200 微升含有 120 μ U 来源于假单胞菌属的 SCDase 和 0.8 % Triton X-100 的 25 毫摩尔/升的磷酸盐缓冲液作为底物: 在水解反应时使用 100 微摩尔/升 14 C-半乳糖基神经酰胺, 在逆反应时使用 100 微摩尔/升 $[1-^{14}$ C]硬脂酸及 100 微摩尔/升的半乳糖基鞘氨醇, 或者在脂肪酸交换反应时使用 100 微摩尔/升 $[1-^{14}$ C]硬脂酸和 100 微摩尔/升的半乳糖苷神经酰胺。

反应条件(B):

补充下列物质到 200 微升含 120 μ U 来源于假单胞菌的 SCDase 和 0.1 % Triton X-100 的 25 毫摩尔/升的磷酸盐缓冲液作为底物: 在水解反应时使用 100 微摩尔/升 14 C-半乳糖基神经酰胺, 在逆反应时使用 100 微摩尔/升 $[1-^{14}$ C]硬脂酸和 100 微摩尔/升半乳糖基鞘氨醇, 或者在脂肪酸交换反应时

使用 100 微摩尔/升 $[1-^{14}\text{C}]$ 硬脂酸和 100 微摩尔/升的半乳糖基神经酰胺。

在上述条件下,每个反应都在 37 °C 下进行,分别在反应后 0.25、0.5、1、3、7 或 21 小时后收集每个反应溶液的 20 微升样品,并在 100 °C 下加热 5 分钟以中止反应。

- 5 如此所得的每个反应溶液都在薄层色谱上显影(显影液:氯仿/甲醇/0.02 % 氯化钙水溶液 = 5/4/1),通过 BAS 1000 Imaging Analyzer (Fuji Photo Film 制造)确定反应产物及未反应物质以计算反应效率。结果见图 3。即图 3 表明了在上述反应条件(A)和(B)下水解反应、逆反应和脂肪酸交换的反应效率,其中将反应比率(%)绘作纵标,将反应时间(小时)绘为横标。在图 3 中,
- 10 O 代表水解反应, □ 代表逆反应, 以及 Δ 代表脂肪酸交换反应, 每一个都代表其反应比率。

结果发现 SCDase 的水解反应优选在具有酸性 pH 并含有高浓度表面活性剂的反应溶液中进行, SCDase 的逆反应及脂肪酸交换反应优选在中性并且表面活性剂浓度降低的反应溶液中进行。

15 实施例 9

^{14}C 神经酰胺的合成:

- 将 100 纳摩尔(5.0 微居里)的 $[1-^{14}\text{C}]$ 棕榈酸(Amersham 制造)及 200 纳摩尔的溶于乙醇中的鞘氨醇置于反应容器中并以氮气彻底干燥。将 0.5 毫升含 0.6 % Triton X-100 的 50 毫摩尔/升的磷酸缓冲液(pH7.0)加到容器中,充分
- 20 搅拌后以超声处理使之均一化。将如此所得的均匀溶液与 0.5 毫升来自于假单胞菌属的 SCDase(1mU/毫升)混合在 37 °C 下反应 20 小时。

- 反应完成后,所得的反应溶液以离心蒸发器干燥,所得的干燥产物在 1 毫升己烷/乙醚/乙酸(50/50/1 的体积比)溶解并置于已用相同溶液平衡的 Sep-Pak[®] Silica Cartridge 上,用 10 毫升的相同溶液洗脱未反应的 $[1-^{14}\text{C}]$ 棕榈
- 25 酸,然后用 10 毫升的氯仿/甲醇(2/1 体积比)洗脱 ^{14}C 神经酰胺。

洗脱物以氮气干燥,悬浮于蒸馏水中然后以超声波处理使之均一化。将所得的均匀溶液置于 Sep-Pak C18 Cartridge 上。将该柱用 20 毫升的蒸馏水洗脱,并以 3 毫升甲醇和 10 毫升氯仿/甲醇(2/1 体积比)稀释。

- 接着,将所得的洗脱物以氮气干燥,并溶于氯仿/甲醇/蒸馏水(90/10/1
- 30 的体积比)中然后置于已用为吸收未反应鞘氨醇所用的相同溶液平衡过的 Sep-Pak[®] CM Cartridge 上。在这种情况下,通过的部分以氮气干燥得到 66

纳摩尔(3.3 微居)的含 1 % 或更少脂肪酸和鞘氨醇的纯化 ^{14}C 神经酰胺。

实施例 10

氨基神经酰胺及其荧光衍生物的合成

将 41.6 毫升的含 66.6 微摩尔 N-三氟乙酰化的氨基十二烷酸, 33.3 微
5 摩尔鞘氨醇(Sigma 制造), 0.3 % Triton X-100 及 148mU 假单胞菌 SCDase
的 25 毫摩尔/升甘氨酸 - 氢氧化钠缓冲液(pH11)在 37 °C 反应 48 小时。

反应完成后, 反应溶液被置于 C18 反相硅胶柱上, 该柱以脱盐的水洗
涤, 并将 N-三氟乙酰化的氨基神经酰胺用氯仿/甲醇(2/1 体积比)洗脱。在溶
剂蒸发之后, 所得剩余物溶于氯仿/甲酸/水(90/10/1 的体积比)中并置于
10 Sep-Pak[®] QMA Cartridge(Waters 制造)上用于吸附未反应的鞘氨醇并得到含
N-三氟乙酰化氨基神经酰胺的未吸附部分。未吸附的部分置于 Sep-Pak[®]
QMA Cartridge(Waters 制造)上用以吸附未反应的 N-三氟乙酰化的氨基十二
烷酸并得到含有 N-三氟乙酰化的氨基神经酰胺的未吸附部分。

将含有所得的 N-三氟乙酰化的氨基神经酰胺及 1 % 甲醇钠的氯仿/甲醇
15 (2/1 体积比)在室温下反应过夜。反应完成后, 蒸发溶剂, 所得剩余物悬浮
于水中并置于 Sep-Pak[®] C18 Cartridge(Waters 制造)上, 以水洗涤该柱进行脱
盐, 然后以氯仿/甲醇(2/1 体积比)洗脱氨基神经酰胺。溶剂蒸发后, 所得剩
余物溶于氯仿/甲醇/水(60/30/5)中, 置于 Sep-Pak CM Cartridge 上并以氯仿/
甲醇/1N 盐酸(60/30/5)洗脱, 干燥洗脱剂以得到 5.6 微摩尔纯化的氨基神经
20 酰胺。

将 70 微升溶于甲醇中的 100 纳摩尔氨基神经酰胺, 20 微升的 50 毫摩
尔/升 VBD 氟化物(Sigma 制造)甲醇溶液及 10 微升的三乙胺在 60 °C 下反应 1
小时。反应完成后, 蒸发溶剂, 所得剩余物溶于己烷/乙醚/乙酸(50/50/1)并
置于 Sep-Pak[®] Silica Cartridge(Waters 制造)上用氯仿/甲醇(2/1 体积比), 然后
25 将洗脱物干燥得到 30 纳摩尔纯化的 NBD 神经酰胺。

实施例 11

用荧光鞘脂类衍生物 NBD 神经酰胺筛选美洲蚶神经酰胺酶:

通过离心美洲蚶(Limulus Polyphemus)血液得到的 10 微升血清被置于
37 °C 下与含有 1 纳摩尔实施例 10 中制备的 NBD 神经酰胺及 0.5 % Triton
30 X-100 的 50 毫摩尔/升的乙酸盐缓冲液(pH5.0)反应 18 个小时。反应完成后,
反应溶液在薄层色谱上显影(显影剂: 氯仿/甲醇/25 % 液态氨 = 90/20/0.5)并

在紫外灯下检测。在这种情况下检测到了新形成的 NBD 氨基十二烷酸，因此在美洲鲎血清中检测到神经酰胺酶的活性。

为了确证在美洲鲎血清中检测到的神经酰胺酶活性确实是神经酰胺酶所产生的活性，将神经酰胺酶纯化后发现它是最适 pH 在 4.5，通过凝胶过滤法测定时分子量约为 205KDa 的酸性神经酰胺酶。另外还发现该美洲鲎神经酰胺酶在水解 N-硬脂酰鞘氨醇(C18:0, d18:1)时效率最高，而且对含有

5 作为长链骨架的鞘氨醇或植物鞘氨醇的神经酰胺也有活性。

因此，通过利用本发明的生产方法得到的荧光鞘脂衍生物 NBD 神经酰胺第一次揭示了以前未知的无脊椎动物神经酰胺酶的存在，而且证实了荧光鞘脂衍生物 NBD 神经酰胺可作为底物用于测定神经酰胺酶的活性。

10

实施例 12

将放射性同位素标记的 ^{14}C 神经酰胺(C12- ^{14}C -Cer)和荧光鞘脂衍生物 NBD 神经酰胺(C12-NBD-Cer)作为底物在 B16 细胞中测定神经酰胺酶的活性：

通过将 6×10^6 个 B16 细胞悬浮于 200 微升 10 毫摩尔/升的磷酸盐缓冲液中制备细胞悬浮液。用 Micro BCATM 蛋白质检测试剂(Pierce 制造)来测定

15 蛋白质量。

反应条件 1：

在酸性条件下，于 10 微升含 10 微升细胞悬浮液(将蛋白质含量稀释至 50 微克)，在实施例 10 中所得到的 200 皮摩尔的 C12-NBD-Cer 或者在实施例

20 9 中使用月桂酸而不是棕榈酸所得到的 100 皮摩尔 C12-NBD-Cer(作为底物)以及 0.5 % Triton X-100 的 50 毫摩尔/升乙酸盐缓冲液(pH4.0)中。

反应条件 2：

在中性条件下，于 10 微升含 10 微升细胞悬浮液(将蛋白质含量稀释至 50 微克)，200 皮摩尔的 C12-NBD-Cer 或 100 皮摩尔 C12- ^{14}C -Cer(作为底物)

25 以及 0.5 % Triton X-100 的 50 毫摩尔/升磷酸盐缓冲液(pH7.0)中。

反应条件 3：

在碱性条件下，于 10 微升含有 10 微升细胞悬浮液(蛋白质量稀释至 50 微克)，200 皮摩尔/升的 Cer-NBD-Cer 或 100 皮和 100 皮摩尔的 C12- ^{14}C -Cer(用作底物)，以及 0.5 % Triton X-100 的 50 毫摩尔/升的 Tris-HCl 缓冲液

30 (pH8.5)中。

在上述任何一种条件下，反应都是在 37 °C 下进行 3 或 6 小时。然后，

在反应溶液中加入 100 微升的氯仿/甲醇(2/1)以中止反应。干燥所得的反应溶液并溶于氯仿/甲醇中, 将来用作样品。

将每种样品在薄层色谱上显影(显影剂, 氯仿/甲醇/25 % 液态氨 = 90/20/0.5), 并且用 BAS 1000 Imaging Analyzer(Fuji Photo Film 制造)测定释放的 ^{14}C 脂肪酸以计算反应比率。而且, 用 Chromatoscanner CS 9000(Shimadzu Corporation 制造)测定释放的 NBD 脂肪酸, 计算反应比率。结果见图 4。也就是说在图 4 中比较了 B16 细胞中神经酰胺活性的测定结果, 其中在纵坐标上将以 C12-NBD-Cer 为底物的 3 小时(3hr)和 6 小时(6hr)的反应及以 C12- ^{14}C -Cer 为底物的 3 小时和 6 小时的反应以下降的顺序绘制, 并将分解比率(%)绘为横坐标。

根据这些结果, 暗示碱性神经酰胺酶可以很好地作用于 C12-NBD-Cer 但几乎不对 C12- ^{14}C -Cer 起作用, 但酸性神经酰胺酶很好地作用于 C12- ^{14}C -Cer 但几乎不对 C12-NBD-Cer 起作用。

本发明提供了一种生产鞘脂衍生物的方法, 这种方法的实施是通过修饰或取代作为鞘脂类公有部分的神经酰胺部分的长链脂肪酸而实施的。而且, 这种生产方法的应用使得在工业上进行便利地生产任意的鞘脂类或鞘脂类衍生物成为可能。因为天然存在的鞘脂一般来说在长链脂肪酸的链长上有着不同, 所以很难得到具有链长一致的长链脂肪酸的鞘脂类。但是, 通过本发明的长链脂肪酸取代可以得到长链脂肪酸的链长一致化的鞘脂类。而且因为可以通过将生色团形成物质、荧光物质、生物素、放射性同位素等导入到鞘脂的脂肪酸部分中制备标记的鞘脂类, 标记了的鞘脂可用于阐明鞘脂的细胞内代谢、运输途径等。另外, 通过鞘脂内神经酰胺部分的转换, 例如通过导入有功能的高度饱和的脂肪酸, 例如二十碳五烯酸(EPA), 二十二碳六烯酸(DHA)等, 可以产生具有改良的细胞渗透性、细胞代谢或生物活性的新的鞘脂类衍生物, 这些鞘脂类衍生物可用于药物、美容、细胞技术等方面。

本发明的生产方法使得有效并便宜地生产用于药物、糖技术、细胞技术等方面的任意的鞘脂类或鞘脂类衍生物成为可能。

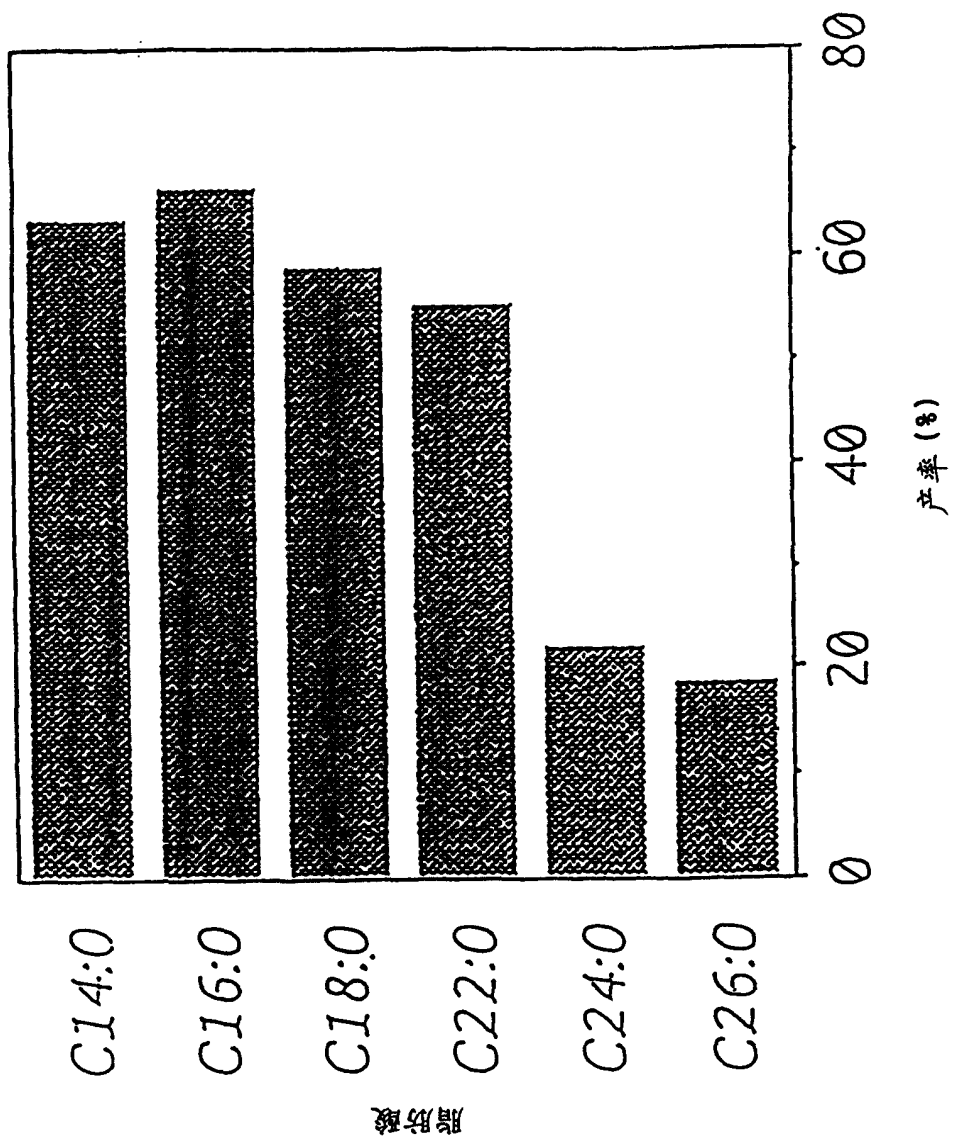


图1

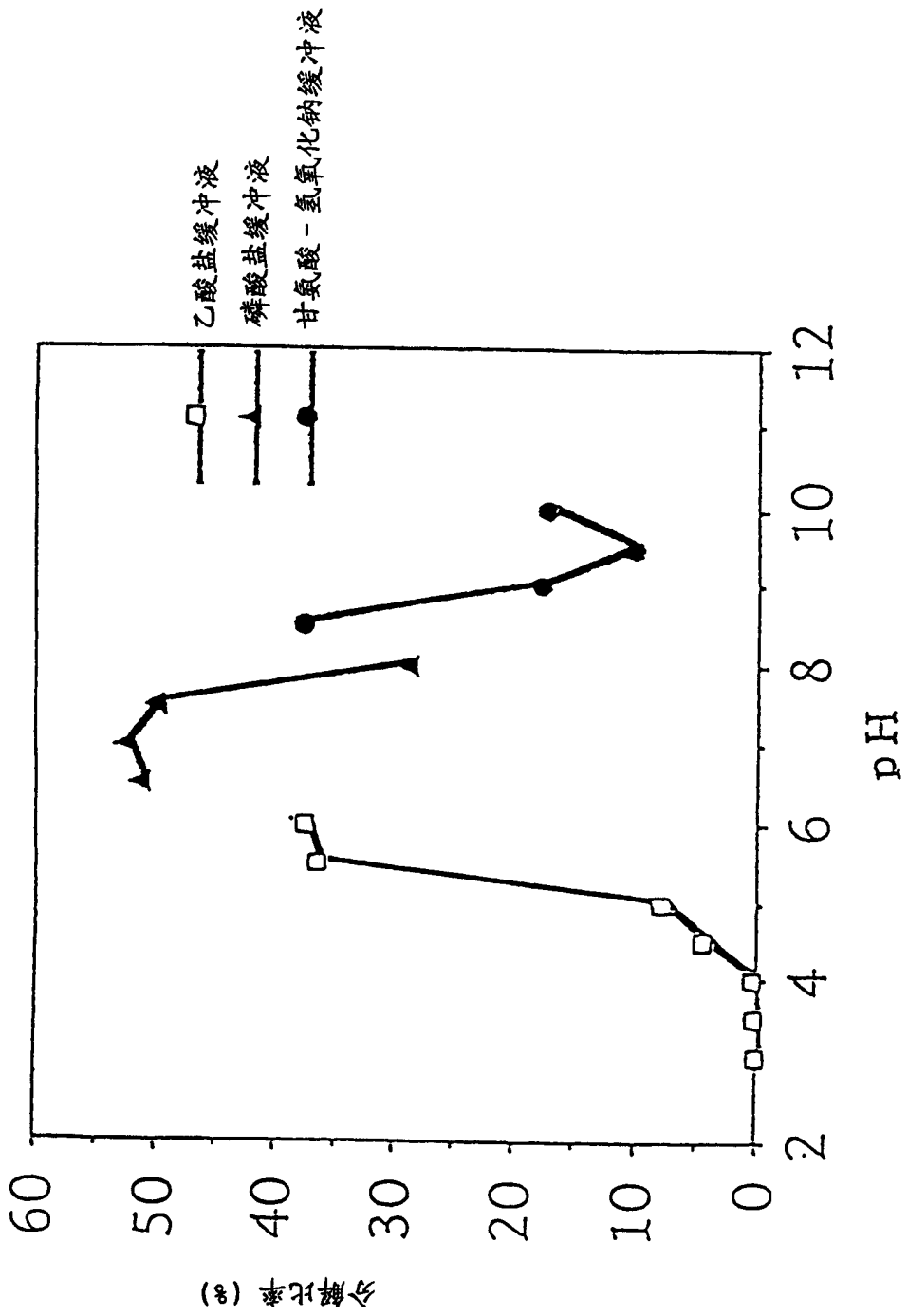


图2

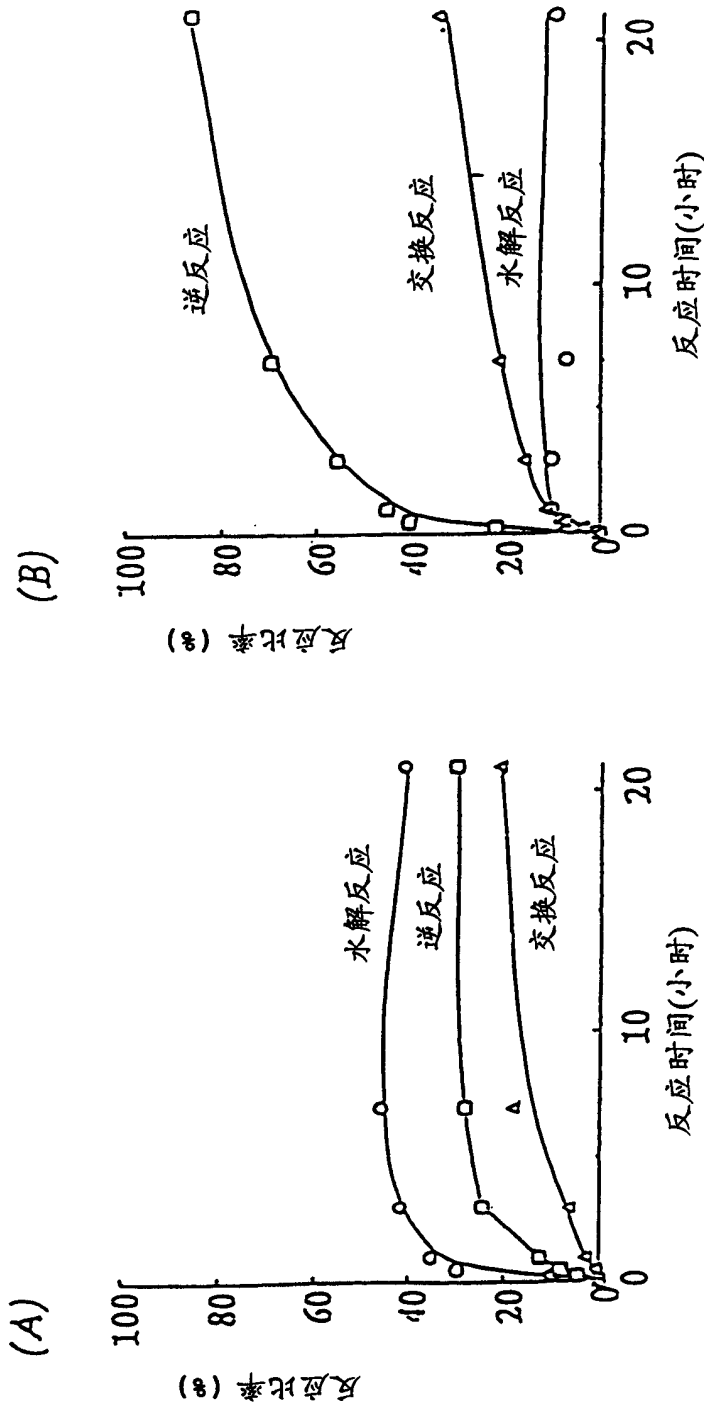


图 3

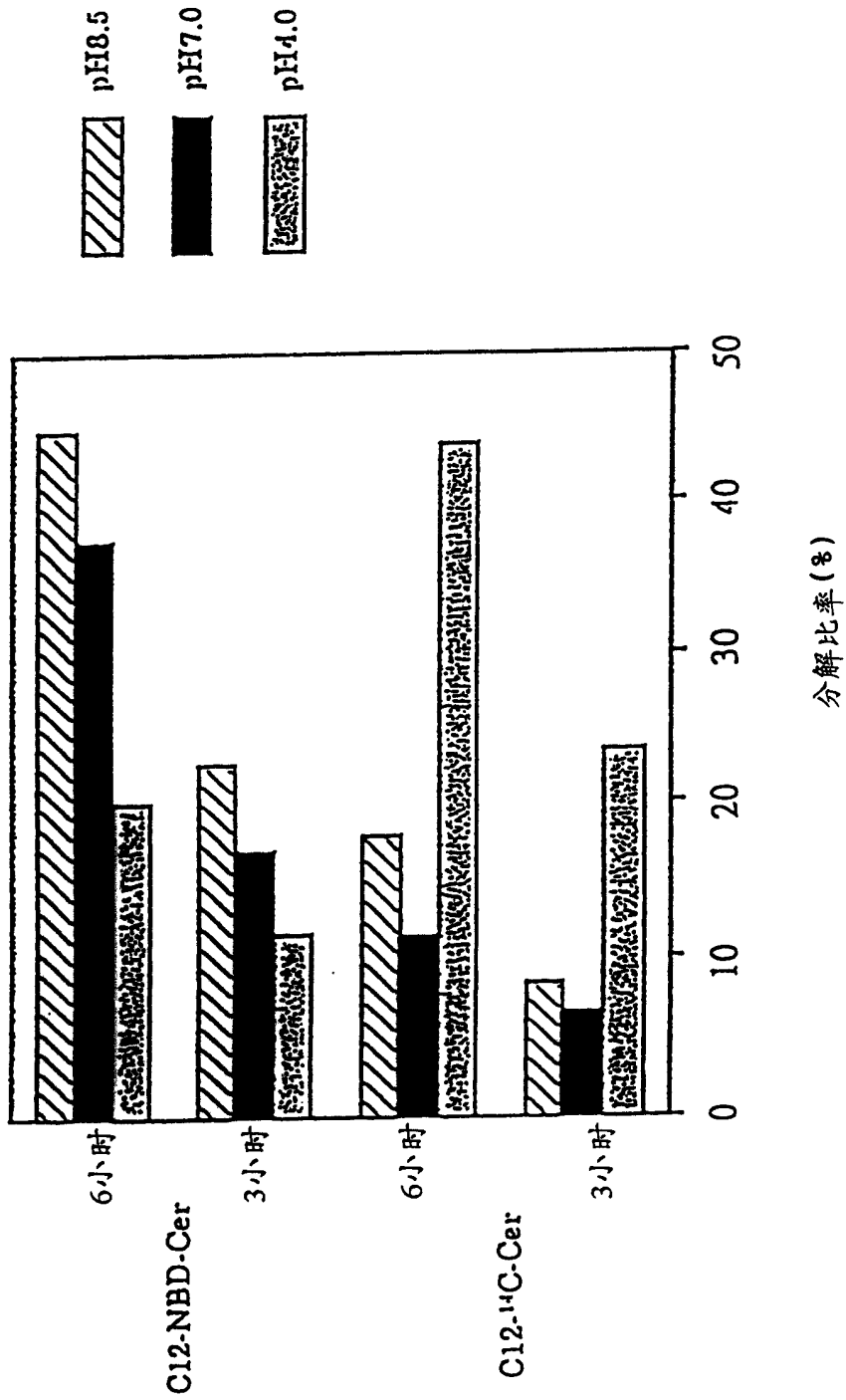


图 4