

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C08B 37/00 (2006.01)

B01J 20/281 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380107568.3

[45] 授权公告日 2008 年 4 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 100378128C

[22] 申请日 2003.12.26

[21] 申请号 200380107568.3

[30] 优先权

[32] 2002.12.26 [33] JP [31] 378203/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/016912 2003.12.26

[87] 国际公布 WO2004/058824 日 2004.7.15

[85] 进入国家阶段日期 2005.6.24

[73] 专利权人 大塚化学株式会社

地址 日本大阪府

共同专利权人 梶原康宏

[72] 发明人 梶原康宏 掛樋一晃 深江一博

[56] 参考文献

CN1379811A 2002.11.13

The Structure of the Complex Type Oligosaccharide from Rabbit Hepatic Binding Protein. Mark Lowe. and Bo Nilsson \$. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL THEMISTRY, Vol. 257 No. 15. 1982

The Structure of the Complex Type Oligosaccharide from Rabbit Hepatic Binding Protein. Mark Lowe. and Bo Nilsson \$. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL THEMISTRY, Vol. 258 No. 3. 1983

审查员 鄢来艳

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 陈 昕

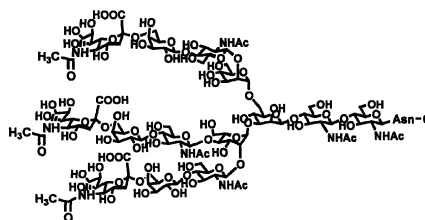
权利要求书 2 页 说明书 15 页

[54] 发明名称

3 支链型糖链天冬酰胺衍生物、该糖链天冬酰胺、该糖链和它们的制造方法

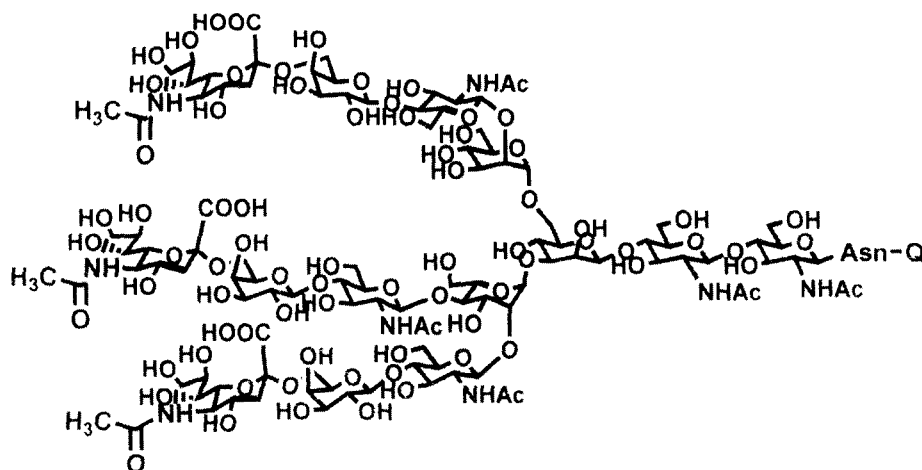
[57] 摘要

式(1)所示的天冬酰胺的氨基氮被脂溶性的保护基、生物素基或 FITC 基改性的 3 支链型糖链天冬酰胺衍生物、在该 3 支链型糖链天冬酰胺衍生物的糖链天冬酰胺的非还原末端侧的 N-乙酰葡萄糖胺上至少含有 1 个以上的岩藻糖的 3 支链型糖链天冬酰胺衍生物、它们的糖链天冬酰胺以及糖链。[式中, Q 表示脂溶性的保护基、生物素基或 FITC 基。]



[式中, Q表示脂溶性的保护基、生物素基或FITC基。]

1. 式(1)所示的天冬酰胺的氨基氮被脂溶性的保护基、生物素基或FITC基改性的3支链型糖链天冬酰胺衍生物,



式中, Q表示脂溶性的保护基、生物素基或FITC基。

2. 权利要求1所述的3支链型糖链天冬酰胺衍生物, 其在所述3支链型糖链天冬酰胺衍生物的糖链天冬酰胺的非还原末端侧的N-乙酰葡萄糖胺上至少含有1个以上的岩藻糖。

3. 权利要求1或2所述的3支链型糖链天冬酰胺衍生物, 其中, 脂溶性的保护基为Fmoc基。

4. 权利要求1所述的导入了脂溶性的保护基的3支链型糖链天冬酰胺衍生物的制造方法, 其特征在于包括:

(a) 在含有1种或2种以上的3支链型糖链天冬酰胺的混合物中所含有的该3支链型糖链天冬酰胺上导入脂溶性的保护基, 制得3支链型糖链天冬酰胺衍生物混合物的工序, 和

(b) 将该3支链型糖链天冬酰胺衍生物混合物、或将该3支链型糖链天冬酰胺衍生物混合物中含有的3支链型糖链天冬酰胺衍生物水解得到的混合物供给色谱, 将各3支链型糖链天冬酰胺衍生物分离的工序。

5. 权利要求1所述的被生物素基改性的3支链型糖链天冬酰胺衍生物的制造方法, 其特征在于: 使3支链型糖链天冬酰胺生物素化。

6. 权利要求1所述的被FITC基改性的3支链型糖链天冬酰胺衍生物的

制造方法，其特征在于：使3支链型糖链天冬酰胺FITC化。

7. 3支链型糖链天冬酰胺的制造方法，其特征在于：将权利要求1或2所述的3支链型糖链天冬酰胺衍生物的脂溶性的保护基、生物素基或FITC基除去。

8. 结合有权利要求1或2所述的被生物素基改性的3支链型糖链天冬酰胺衍生物的微量培养板。

9. 结合有权利要求1或2所述的被生物素基改性的3支链型糖链天冬酰胺衍生物的亲和柱。

3支链型糖链天冬酰胺衍生物、该糖链天冬酰胺、 该糖链和它们的制造方法

技术领域

本发明涉及3支链型糖链天冬酰胺衍生物、3支链型糖链天冬酰胺、3支链型糖链和它们的制造方法。

背景技术

近年来，作为继核酸（DNA）、蛋白质之后的第三个链状生命分子，糖链分子引人注目。人体是由约 60 兆个细胞构成的一大细胞社会，所有的细胞表面都被糖链分子覆盖。例如，ABO 式血型就是由细胞表面糖链的不同决定的。

糖链具有参与细胞间识别和相互作用的功能，成为构成细胞社会的要素。细胞社会的紊乱与癌、慢性疾病、感染病、老化等有关。

例如，已知细胞如果癌化，就会引起糖链的结构变化。另外也知道霍乱弧菌或流感病毒等通过识别、结合某一特定糖链，侵入、感染细胞。

糖链由于单糖的序列、结合样式以及部位、链长度以及分支样式、整体的高次结构等的多样性，所以与核酸或蛋白质的结构相比，是非常复杂的结构。因此，来自其结构的生物学信息与核酸和蛋白质相比，多种多样。现状是虽然人们认识到糖链研究的重要性，但由于其结构复杂和多样性，与核酸和蛋白质相比，研究进展缓慢。

E.Meinhjohanns (J.Chem.Soc.Perkin Trans1,1998,p549-560) 等由牛胎球蛋白 (Bovine Fetuin、来自于牛的糖蛋白质) 合成了2支链型糖链天冬酰胺。为了得到作为初始原料的2支链型糖链，利用了胍分解反应。该胍的毒性高，当将制得的糖链的衍生物应用于医药品时，由于存在混入微量胍的可能性，因此在安全性方面存在问题。此外，尚未合成出3支链型糖链天冬酰胺。

本发明的目的在于提供天冬酰胺的氨基氮被脂溶性的保护基、生物

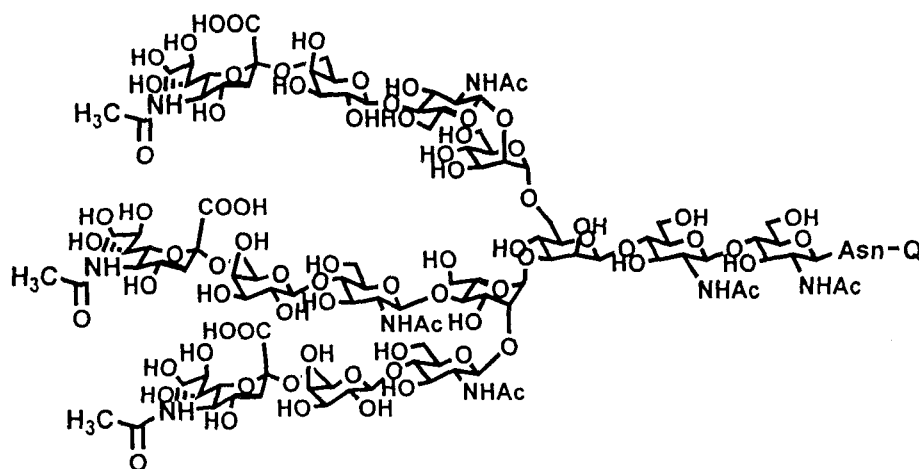
素基或FITC基改性的3支链型糖链天冬酰胺衍生物及其制造方法。

此外,本发明的目的在于提供3支链型糖链天冬酰胺、3支链型糖链和它们的制造方法。

发明内容

本发明涉及以下的发明。

1. 式(1)所示的天冬酰胺的氨基氮被脂溶性的保护基、生物素基或FITC基改性的3支链型糖链天冬酰胺衍生物。



[式中, Q表示脂溶性的保护基、生物素基或FITC基。]

2. 上述记载的3支链型糖链天冬酰胺衍生物,其在上述3支链型糖链天冬酰胺衍生物的糖链天冬酰胺的非还原末端侧的N-乙酰葡萄糖胺上至少含有1个以上的岩藻糖。

3. 将上述记载的3支链型糖链天冬酰胺衍生物的脂溶性的保护基、生物素基或FITC基除去的3支链型糖链天冬酰胺。

4. 将上述记载的3支链型糖链天冬酰胺的天冬酰胺残基除去的3支链型糖链。

5. 使上述记载的生物素化3支链型糖链天冬酰胺结合的微量培养板。

6. 使上述记载的生物素化3支链型糖链天冬酰胺结合的亲和柱。

本发明者开发出了由牛胎球蛋白(Bovine Fetuin、来自于牛的糖蛋白质)能够容易且大量制备各种离析的3支链型糖链天冬酰胺衍生物的3支链型糖链天冬酰胺衍生物、3支链型糖链天冬酰胺、3支链型糖链的制造方法,以及结合了糖残基任意缺失的糖链的新型的3支链型糖链天冬

酰胺衍生物、3支链型糖链天冬酰胺、3支链型糖链。

本发明的3支链型糖链天冬酰胺衍生物的制造方法的一个最大特征在于：将脂溶性的保护基导入（结合）例如来自天然的糖蛋白质的糖链天冬酰胺、优选由天冬酰胺结合型糖链得到的糖链天冬酰胺的混合物中含有的该3支链型糖链天冬酰胺，得到3支链型糖链天冬酰胺衍生物的混合物后，将该混合物分离为各3支链型糖链天冬酰胺衍生物。在本说明书中，所谓“糖链天冬酰胺”指的是结合了天冬酰胺状态的糖链。而所谓“天冬酰胺结合型糖链”指的是存在于还原末端的N-乙酰葡萄糖胺通过N-糖苷键与蛋白质的多肽中的天冬酰胺（Asn）的酸氨基连接的糖链组，以Man（ β 1-4）GlcNac（ β 1-4）GlcNac作为母核的糖链组。所谓“糖链天冬酰胺衍生物”指的是在天冬酰胺残基上结合了脂溶性的保护基状态的糖链天冬酰胺。此外，在化合物的结构式中，「AcHN」表示乙酰胺基。

如上所述，来自于天然的糖蛋白质的糖链是非还原末端的糖残基任意缺失的糖链的混合物。本发明者们意外地发现，通过将脂溶性的保护基导入来自天然的糖蛋白质的糖链，具体为糖链天冬酰胺的混合物中含有的该3支链型糖链天冬酰胺，使用公知的色谱法可以容易地将导入了该保护基的3支链型糖链天冬酰胺衍生物的混合物分离为各个3支链型糖链天冬酰胺衍生物。由此，可以大量地制备具有本发明结构的3支链型糖链天冬酰胺衍生物。

这样，通过将脂溶性的保护基导入3支链型糖链天冬酰胺而使其成为衍生物，可以分离各个3支链型糖链天冬酰胺衍生物，认为这是由于通过导入脂溶性的保护基，3支链型糖链天冬酰胺衍生物整体的脂溶性提高，例如，与适合使用的反相系柱的相互作用显著提高，其结果可更敏锐地反映糖链结构的差别，能够分离各个3支链型糖链天冬酰胺衍生物的缘故。例如，作为本发明中优选使用的脂溶性的保护基的Fmoc基的脂溶性非常高。即，认为Fmoc基的茆基骨架具有2个苯环与中心的5元环结合的脂溶性非常高的性质的结构，例如，产生与作为反相系柱的1个的ODS柱的十八烷基非常强的相互作用，可以分离相似结构的3支链型糖链天冬

酰胺衍生物。

此外，根据本发明，如后所述，通过将得到的3支链型糖链天冬酰胺衍生物的保护基除去，可以容易且大量地制备各种的3支链型糖链天冬酰胺，此外，通过将得到的3支链型糖链天冬酰胺的天冬酰胺残基除去，可以容易且大量地制备各种的3支链型糖链。

本发明的用脂溶性的保护基改性的3支链型糖链天冬酰胺衍生物的制造方法，具体包括：

(a) 在含有1种或2种以上的3支链型糖链天冬酰胺的混合物中所含有的该3支链型糖链天冬酰胺上导入脂溶性的保护基，制得3支链型糖链天冬酰胺衍生物混合物的工序，和

(b) 将该3支链型糖链天冬酰胺衍生物混合物、或将该3支链型糖链天冬酰胺衍生物混合物中含有的3支链型糖链天冬酰胺衍生物水解得到的混合物供给色谱，将各3支链型糖链天冬酰胺衍生物分离的工序。

作为在工序(a)中使用的含有1种或2种以上的3支链型糖链天冬酰胺的混合物，如果是含有1种或2种以上结合了天冬酰胺状态的糖链的混合物，则并无特别限定。例如，可以为含有1种或2种以上结合了1个或多个天冬酰胺的糖链的混合物。其中，从容易获得的观点出发，优选含有1种或2种以上还原末端结合了天冬酰胺的糖链的混合物。在本说明书中，所谓“糖链”是指结合了2个以上任意的单糖的糖链。

该3支链型糖链天冬酰胺的混合物可以采用公知的方法，优选由天然的原料例如来自牛的胎球蛋白得到糖蛋白质和/或糖肽的混合物，在该混合物中添加例如蛋白质分解酶，例如プロナーゼ(和光纯药社制)、アクチナーゼ-E(科研制药社制)或一般的羧基肽酶、氨基肽酶等酶，在公知的反应条件下进行反应从而将肽部分切断，作为该反应后的反应液或采用公知的方法，例如使用凝胶过滤柱、离子交换柱等的各种色谱或使用高速液相色谱(HPLC)的精制法从反应液中将糖链天冬酰胺以外的成分除去而得到。

使用如上所述得到的含有3支链型糖链天冬酰胺的混合物，将脂溶性的保护基导入其所含的3支链型糖链天冬酰胺中。作为该保护基并没

有特别限定，可以使用例如Fmoc基或叔丁氧羰（Boc）基、苄基、烯丙基、烯丙氧碳酸酯基、乙酰基等的碳酸酯系或酰胺系的保护基等。从能将得到的3支链型糖链天冬酰胺衍生物直接用于所期望的糖肽的合成的观点出发，作为该保护基，优选Fmoc基或Boc基等，更优选Fmoc基。Fmoc基当糖链中存在唾液酸等比较酸性的条件下不稳定的糖时特别有效。另外，保护基的导入可以按照公知的方法（例如参照Protecting groups in Organic Chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6）进行。

例如，当使用Fmoc基时，通过向含有3支链型糖链天冬酰胺的混合物中加入适量丙酮后，再加入9-芴甲基-N-琥珀酰亚胺基碳酸酯（9-フルオレニルメチル-N-スクシニミジルカーボネート）和碳酸氢钠进行溶解，于25℃下进行Fmoc基与天冬酰胺残基的结合反应，可以向该3支链型糖链天冬酰胺的天冬酰胺残基导入Fmoc基。

通过以上操作可以获得导入了脂溶性的保护基的3支链型糖链天冬酰胺衍生物。

其次，将上述导入了脂溶性的保护基的3支链型糖链天冬酰胺衍生物混合物供给到公知的色谱，特别是分级型的色谱，分离为各3支链型糖链天冬酰胺衍生物。各3支链型糖链天冬酰胺衍生物的采用色谱的分离可以适当地通过单独或多个组合使用公知的色谱而进行。

例如，将得到的3支链型糖链天冬酰胺衍生物混合物用凝胶过滤柱色谱精制后，再用HPLC精制。作为可以在HPLC中使用的柱子，反相系的柱子合适，例如，可以使用ODS、Phenyl系、腈系或阴离子交换系的柱子，具体来说，可以利用例如ファルマシア公司生产的モノQ柱、イヤトロン公司生产的イアトロビーズ柱等。分离条件等可以参照公知的条件进行适当调整。通过以上操作可以由3支链型糖链天冬酰胺衍生物混合物得到所期望的各3支链型糖链天冬酰胺衍生物。

此外，通过用糖转移酶将各种糖（例如岩藻糖）转移到上述得到的各种3支链型糖链天冬酰胺衍生物上，可以高效地得到具有所希望糖链结构的3支链型糖链天冬酰胺衍生物。例如，通过用糖转移酶转移岩藻

糖，可以得到含有岩藻糖的具有所希望糖链结构的3支链型糖链天冬酰胺衍生物。此外，通过所使用的糖转移酶，可以得到具有结合样式不同的所希望糖链结构的3支链型糖链天冬酰胺衍生物。

作为岩藻糖，可以使用一般市售的岩藻糖或化学合成的岩藻糖。

作为岩藻糖转移酶，可以使用一般市售的、来自天然的、或通过基因重组生产的岩藻糖转移酶，可以根据被转移的岩藻糖的种类适当选择。具体来说，可以列举作为使岩藻糖转移到糖链天冬酰胺的非还原末端侧的N-乙酰葡萄糖胺上的酶的岩藻糖基转移酶V (Fucosyltransferase V) (Human, Recombinant、来自血浆、来自血清、来自乳汁、来自肝脏)等。另外，使用岩藻糖水解酶，通过pH调整等错开平衡，也可以使岩藻糖转移。

此外，本发明提供能够大量地得到各种离析的3支链型糖链天冬酰胺的3支链型糖链天冬酰胺的制造方法。该方法在按照上述3支链型糖链天冬酰胺衍生物的制造方法进行的3支链型糖链天冬酰胺衍生物的制造工序后，还包括从得到的3支链型糖链天冬酰胺衍生物除去保护基的工序。

由3支链型糖链天冬酰胺衍生物除去保护基可以根据公知的方法进行(例如参照Protecting groups in Organic chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6)。例如，当保护基为Fmoc基时，在N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中，通过向3支链型糖链天冬酰胺衍生物中加入吗啉进行反应，可以除去Fmoc基。而Boc基可以通过使弱酸反应而除去。保护基除去后，根据需要可以适当利用公知的方法，例如使用凝胶过滤柱、离子交换柱等的各种色谱，或利用HPLC进行分离的方法进行精制，可以得到3支链型糖链天冬酰胺。

此外，当保护基为苄基时，苄基的除去可以按照公知的方法进行(例如参照Protecting groups in Organic Chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6)。

在本发明中，提供使3支链型糖链天冬酰胺的氨基氮生物素化或FITC化的糖链天冬酰胺。

所谓上述生物素化，是指通过3支链型糖链天冬酰胺的氨基与生物素（维生素H）的羧基的反应从而生成酰胺键。

此外，所谓上述FITC化，是指通过3支链型糖链天冬酰胺的氨基与异硫氰酸荧光素（FITC）的异硫氰酸酯基的反应而生成异硫酰胺基。

此外，在本发明中，提供使3支链型糖链天冬酰胺的氨基氮生物素化或FITC化的糖链天冬酰胺的制造方法。

作为本发明的生物素化或FITC化3支链型糖链天冬酰胺的制造方法，例如可以通过使上述离析的3支链型糖链天冬酰胺的天冬酰胺的氨基氮生物素化或FITC化而得到。

作为生物素化，可以根据公知的方法进行。例如，将3支链型糖链天冬酰胺溶于水，加入碳酸氢钠，然后加入溶有D-(+)-生物素基琥珀酰亚胺的二甲基甲酰胺，于室温下反应20分，用凝胶过滤柱等进行精制，可以得到生物素化3支链型糖链天冬酰胺。

本发明的使生物素化3支链型糖链天冬酰胺结合的微量培养板通过使生物素化的3支链型糖链天冬酰胺与市售的抗生物素蛋白化的微量培养板（例如ピアス公司制）反应可以制造。

此外，本发明的使生物素化3支链型糖链天冬酰胺结合的亲和柱通过使生物素化的3支链型糖链天冬酰胺与市售的抗生物素蛋白化的亲和柱反应可以制造。

作为本发明的FITC化，可以按照公知的方法进行。例如，将3支链型糖链天冬酰胺溶于水，加入丙酮、碳酸氢钠，然后再加异硫氰酸荧光素，于室温下反应2小时，用凝胶过滤柱等进行精制，可以得到FITC化3支链型糖链天冬酰胺。

本发明中得到的FITC化3支链型糖链天冬酰胺对于例如活体组织中的糖类的受体的研究、植物凝集素的糖结合特异性的研究是有用的。

此外，从3支链型糖链天冬酰胺中除去天冬酰胺残基可以根据公知的方法进行。例如，使3支链型糖链天冬酰胺与无水肼反应后，通过乙酰化除去天冬酰胺残基可以获得3支链型糖链。另外，将3支链型糖链天冬酰胺于碱性水溶液中加热回流后，通过乙酰化除去天冬酰胺残基也可

以获得3支链型糖链。除去天冬酰胺残基后，根据需要可以适当通过公知的方法，例如使用凝胶过滤柱、离子交换柱等的各种色谱，或利用HPLC的分离方法进行精制。

这样，通过本发明可以低成本且高效地大量制造3支链型糖链天冬酰胺衍生物、3支链型糖链天冬酰胺以及3支链型糖链（以下有时将三者一并称为糖链类）。

这样的糖链类在医药品开发等领域非常有用。例如，作为医药品开发中的应用例子，可以列举例如癌的疫苗合成。已知细胞一癌化，就会出现体内没有的糖链。此外还已知化学合成该糖链，作为疫苗给予个体，可以抑制癌的增殖。因此，如果通过本发明能够制造希望的糖链类，就可以进行对癌的治疗有效的疫苗的合成。另外，再通过将化学反应和利用糖转移酶的反应等组合使通过本发明得到的糖链类结合新的糖残基从而衍生物化，也可以进行新疫苗的合成。

此外，例如，作为糖蛋白质的红细胞生成素（EPO）由于其红细胞增殖能力，因此作为贫血的治疗药使用，已判明如果该EPO不与糖链结合就不体现活性。如上所述，由于在蛋白质中存在通过糖链的结合而体现生理活性的物质，例如，通过用不能使糖链结合的大肠菌体现系只大量调制蛋白质，然后导入具有所希望的糖链结构、本发明制造的糖链，可以给予生理活性的体现，此外，通过将具有各种糖链结构、本发明制造的3支链型糖链导入任意的蛋白质，可以合成具有新生理活性的新型的糖蛋白质。

此外，通过使天然的糖蛋白质中存在的糖链与本发明制造的3支链型糖链置换，也可以赋予新的生理活性。作为使糖蛋白质具有的糖链与本发明得到的3支链型糖链置换的技术，可以列举例如P. Sears and C. H. Wong, Science, 2001, vol291, p2344~2350中记载的方法。即，可以列举用 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶（Endo-H）处理糖蛋白质，使之成为蛋白质表面的天冬酰胺残基上只结合1个N-乙酰葡萄糖胺残基的状态。然后，使用 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶（Endo-M）使本发明得到的所希望的3支链型糖链结合到上述N-乙酰葡萄糖胺残基上的方法。此外，也可以预先使N-乙

酰葡萄糖胺与tRNA结合,利用大肠菌等的体系合成具有N-乙酰葡萄糖胺残基的糖蛋白质后,使用Endo-M导入本发明得到的所希望的3支链型糖链。

此外,现在作为利用糖蛋白质作为治疗药时的问题,可以列举给药的糖蛋白质的代谢速度快。这是由于如果糖蛋白质的糖链末端存在的唾液酸在活体内被除去,则该糖蛋白质立即被肝脏代谢。因此,必须给予一定程度量的糖蛋白质。因此,如果利用本发明制造在糖链的末端新组装了难于除去的唾液酸的糖链,利用Endo-M将该糖链导入对象蛋白质,可以控制糖蛋白质在活体内的代谢速度,也可以降低给药的糖蛋白质的量。

具体实施方式

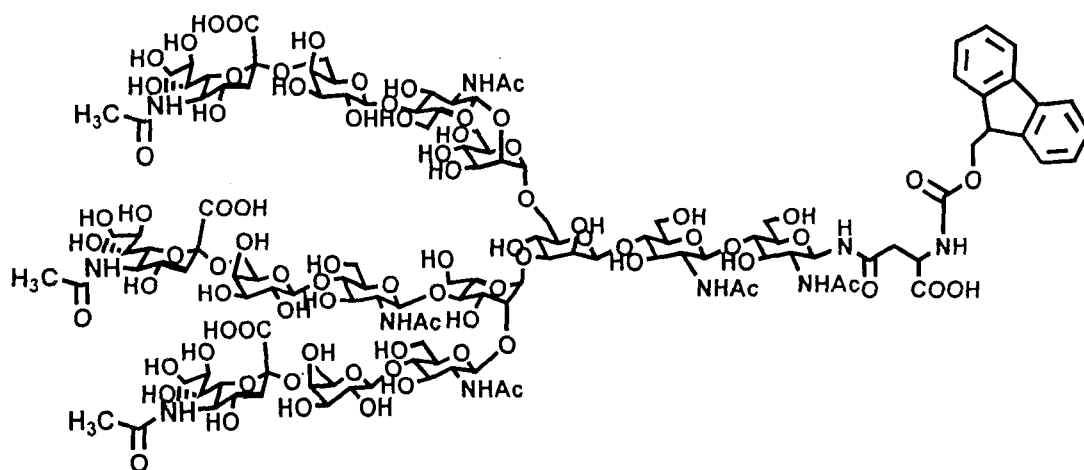
以下列举实施例进行说明,但本发明并不限于这些实施例。

实施例1

使FETUIN(SIGMA公司制造、1g)溶解于磷酸缓冲液(pH=7.0、0.40ml)后,加入 NaN_3 (10mg)。再加入オリエンターゼONS(HBI公司制造、1.5g),在50℃下静置约12小时。用TLC确认反应结束后,用塞里塑料将反应液过滤。通过浓缩使滤液减少,用凝胶过滤柱色谱(Sephadex G-25, 2.5×100cm, H_2O)进行精制。收集含有作为目的物的糖的级分,进行浓缩,然后进行冷冻干燥。在得到的残留物(约300mg)中加入Tris-盐酸·氯化钙缓冲溶液(pH=7.5, 20ml)、 NaN_3 (10mg),使其溶解。再加入アクチナーゼE(163mg),每隔12小时测定pH,同时静置48小时。用TLC确认反应结束后,用塞里塑料进行过滤,通过浓缩使滤液减少,用凝胶过滤柱色谱(Sephadex G-25, 2.5×100cm, H_2O)进行精制。收集含有作为目的物的糖的级分,进行浓缩,然后进行冷冻干燥。在得到的残留物中加入40mM HCl溶液,在80℃下静置1小时后进行中和处理。将反应液浓缩后,用凝胶过滤柱色谱(Sephadex G-25, 2.5×100cm, H_2O)进行精制。收集含有作为目的物的糖的级分,进行浓缩,然后进行冷冻干燥。将得到的残留物溶于水,加入碳酸氢钠。

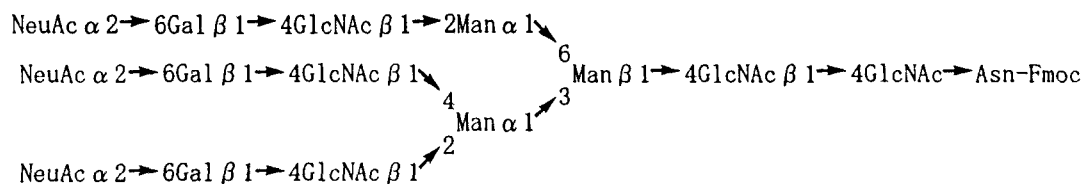
向其加入溶有Fmoc-OSu的二甲基甲酰胺,在室温下反应1小时。用TLC(异丙醇:1M醋酸铵水溶液=3:2)确认原料消失后,使用蒸发器进行浓

缩。用凝胶过滤柱 (f 20mm × 300mm, Sephadex G-25, 水) 对残渣进行精制, 收集含有作为目的物的糖的级分, 进行冷冻干燥。将该残留物用 HPLC 分取柱进行精制 (YMC-Pack R&D ODS, D-ODS-5-A, 20 × 250mm, AN/25mM AcONH₄ 缓冲液=18/82, 7.5ml/min., 波长: 274nm)。将35分钟后出现的主要的峰分取后, 进行浓缩, 然后用 ODS 柱进行脱盐处理。进行冷冻干燥, 收集得到的3支链糖链 (1.0mg, 0.42mmol), 溶解于50mM 二甲胂酸缓冲液 (pH=6.0, 250ml) 后, 加入牛血清清蛋白 (BSA, 1mg)。向其加入 CMP-唾液酸 (3.9mg, 6.1mmol)、碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase) (1ml, 25unit), 使其均匀。最后加入 α 2,6-唾液酸转移酶 (CALBIOCHEM 公司制造、100ml), 在 37℃ 下静置 36 小时。用 HPLC 对反应液进行监测, 当原料大致消失时终止反应, 用膜滤器进行过滤。将滤液浓缩而使滤液量减少后, 用 HPLC 分取柱进行精制 (YMC-Pack R&D ODS, D-ODS-5-A, 20 × 250mm, AN/25mM AcONH₄ 缓冲液=18/82, 7.5ml/min., 波长: 274nm), 11 分钟后目的物 3 支链三唾液酸基糖链溶出。将其分取后, 用 ODS 柱进行脱盐处理, 进行浓缩、冷冻干燥, 得到目的物 250mg (18.5%)。



上述糖链结构中的符号表示如下。其中:

NeuAc: 唾液酸 Gal: D-半乳糖 GlcNAc: N-乙酰葡萄糖胺
Man: D-甘露糖 Asn: 天冬酰胺。

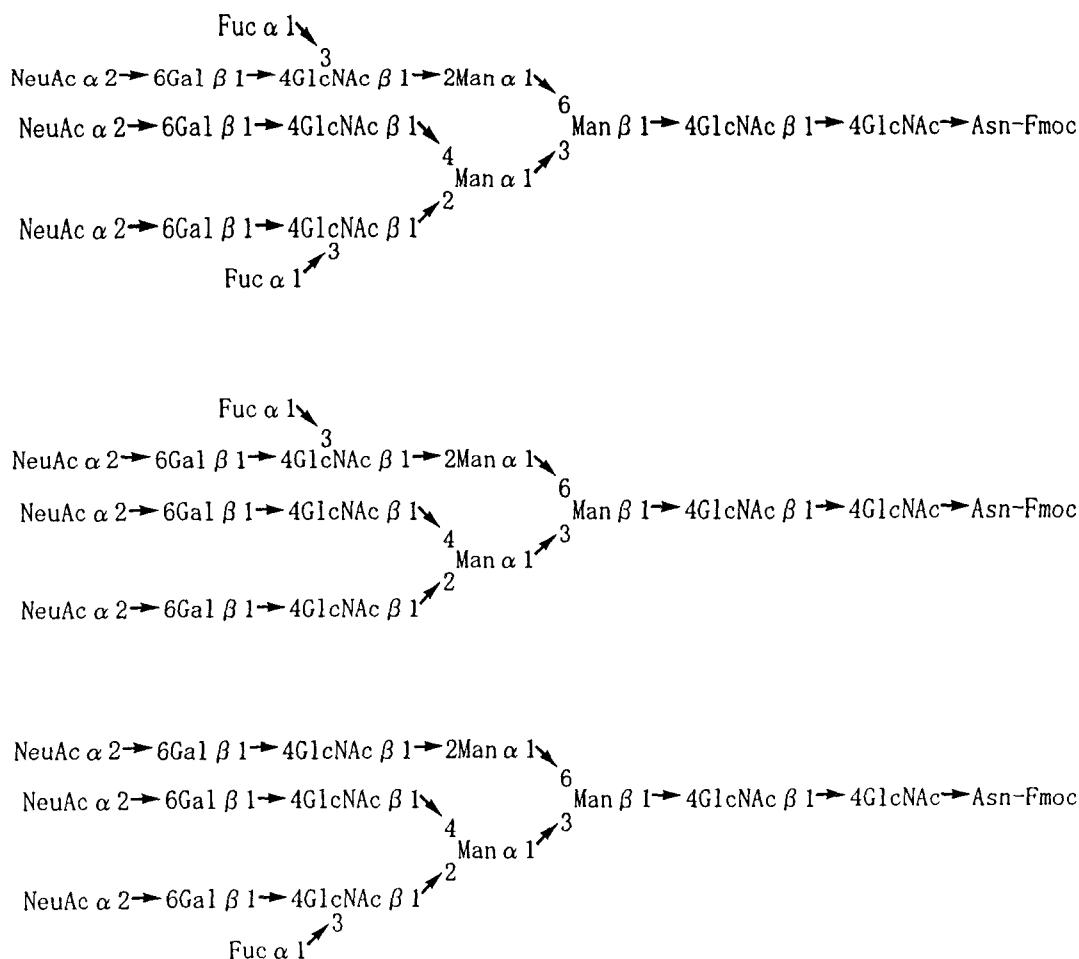


得到的化合物的¹H-NMR数据如下所示。

¹H NMR (400 MHz, D₂O, 30 °C, HOD = 4.81)
 d 7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.70 (d, 2H, Fmoc),
 7.50 (dd, 2H, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, Fmoc),
 5.11 (s, 1H, Man 4-H1), 4.97 (d, 1H, GlcNAc 1-H1),
 4.91 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.75 (s, 1H),
 4.45-4.60 (m), 4.42 (bd, 3H),
 4.33 (1H, Fmoc), 4.20 (m, 3H), 4.09 (bs),
 4.10 (m, 2H), 2.60-2.80 (m, 4H, Asn-bCH,
 NeuAc 7, 7', 7''-H3eq), 2.40-2.60 (m, 1H,
 Asn-bCH), 2.11, 2.08, 2.05, 2.01, 1.86 (each s, Ac),
 1.77 (ddd, 3H, NeuAc 7, 7', 7''-H3ax)

实施例2

使实施例1中得到的化合物2nmol溶解于Tris-盐酸缓冲液约10 μl中。向其加入GDP-岩藻糖 200nmol、岩藻糖基转移酶V (Human, Recombinant) 0.5mU, 在37 °C下静置约2小时, 使其反应。用20 μl超纯水将反应液稀释后, 用毛细管电泳 (熔融石英毛细管, 50mm i.d., 60cm, 缓冲液: 100mM Tris-硼酸盐, pH=8.3, 100mM Heptane sulfonate, 外加电压27kV, 温度25 °C, 214nm) 进行分离, 得到如下所示的含有岩藻糖的3支链型糖链天冬酰胺衍生物。

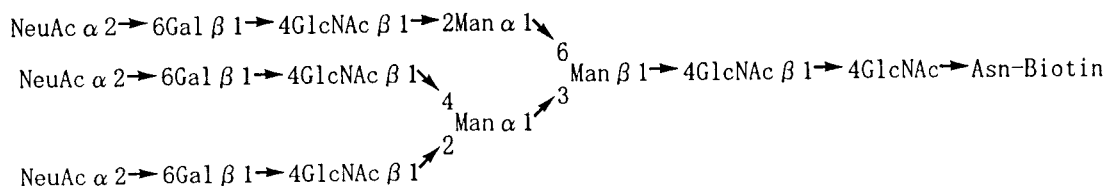
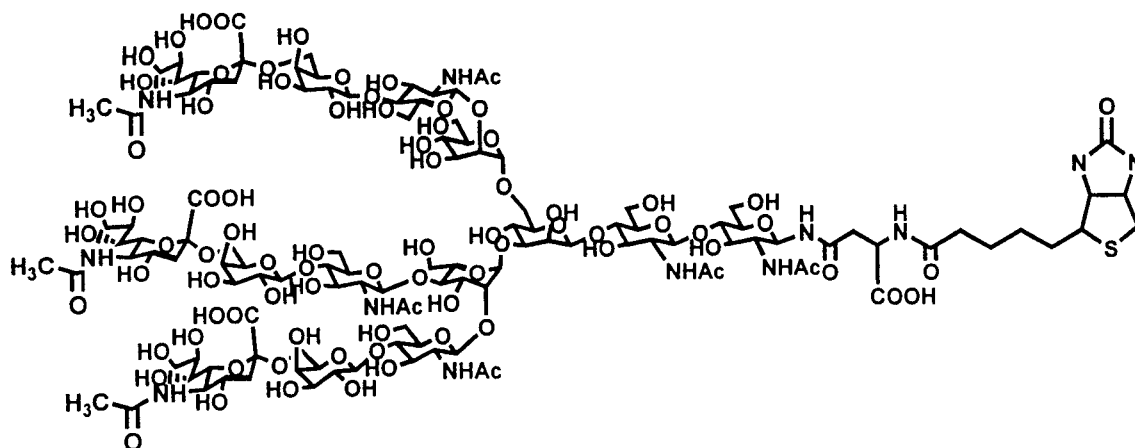


实施例3 (生物素化).

在每1 μmol 实施例1中得到的糖链天冬酰胺Fmoc体中加入240 μL 的N,N-二甲基甲酰胺、160 μL 的吗啉, 在室温下、氩气氛下使其反应。用TLC (使用1M醋酸铵: 异丙醇=8: 5作为洗脱溶剂) 确认反应结束后, 用冰水进行冷却。向其加入反应溶液10倍量的二乙醚, 搅拌15分钟后将析出的沉淀物过滤分离。使得到的残渣溶解于水, 在35 $^{\circ}\text{C}$ 下进行蒸发。再将加入甲苯3ml并蒸发的操作重复进行3次。用凝胶柱色谱 (Sephadex G-25, H_2O) 对残留物进行精制, 得到将Fmoc基除去的糖链天冬酰胺。

将上述得到的化合物 (6mg, 2.58 μmol) 溶解于水 (300 μL), 加入碳酸氢钠 (2.1mg, 24.9 μmol)。向其加入溶有D-(+)-生物素基琥珀酰亚胺 (4.2mg, 12.3 μmol) 的二甲基甲酰胺 (300 μL), 在室温下反应20分钟。用TLC (异丙醇: 1M醋酸铵水溶液=3: 2) 确认原料消失后, 用蒸发器进行浓缩。将残渣经凝胶柱色谱 (Sephadex G-25, 水) 精制,

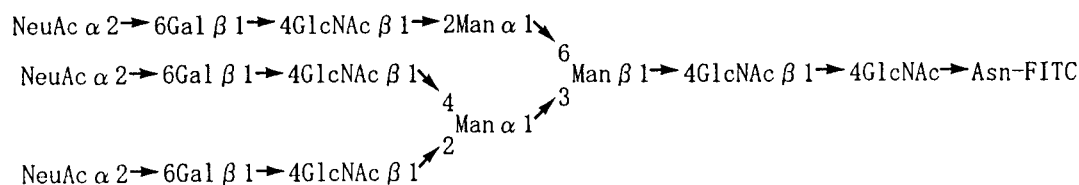
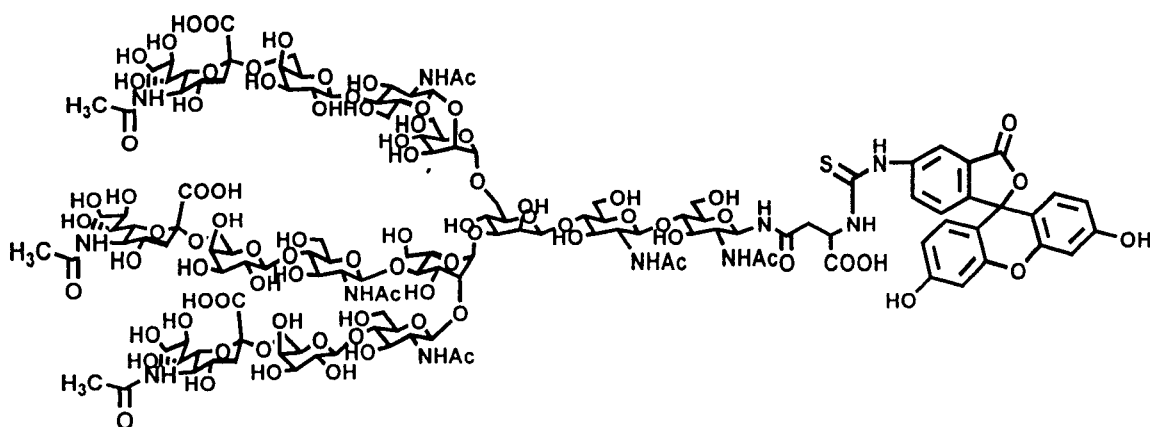
得到如下所示的生物素化3支链型糖链天冬酰胺衍生物(6.2mg, 94%)。



实施例4 (FITC化)

与实施例3同样, 得到将Fmoc基除去的糖链天冬酰胺。

使上述得到的化合物(1.4mg、0.60 μ mol)溶解于70 μ l纯水中。向其加入丙酮70 μ l、NaHCO₃(0.76mg, 9 μ mol), 于室温下搅拌后, 加入异硫氰酸荧光素(FITC, 0.95mg, 2.4mmol, SIGMA公司制造), 搅拌约2小时。2小时后, 用TLC确认反应结束后, 在减压下经蒸馏除去丙酮, 将剩余水溶液加到凝胶柱色谱(Sephadex G-25、H₂O)进行精制, 收集含有目的物的级分。将收集的级分浓缩后, 经HPLC(YMC-Pack ODS-AM, SH-343-5AM, 20 $\times$ 250mm, AN / 25mM AcONH₄缓冲液=10 / 90, 7.5ml / min., 波长: 274nm)分取后, 进行浓缩, 然后用凝胶柱色谱(Sephadex G-25、H₂O)进行脱盐处理。收集含有目的物的级分, 浓缩后进行冷冻干燥, 得到如下所示的荧光标记(FITC化)的3支链型糖链天冬酰胺衍生物(1.2mg, 收率73.5%)。



实施例5（微量培养板的制造）

对于96孔BD生物包被链霉抗生物素蛋白（バイオコートストレプトアビジン）（BDBioscience公司生产：生物分析用、结合能：5ng / 1孔），将实施例3的生物素化糖链天冬酰胺100 μ g（相当生物素结合能的约10倍的量）溶于蒸馏水，调整到1000 μ l。将该调整溶液按照每孔10 μ l加到各个孔中，用蒸馏水洗3次，制造微量培养板。各生物素化糖链天冬酰胺的结合收率为95%以上。固定化率的确认由洗出的非固定化糖链残量算出。

实施例6（亲和柱的制造）

将抗生物素蛋白包被珠（アビジンコートビーズ）（Hitachi Software Engineering公司生产、xMAP LumAvidin Development Microspheres 1ml）10ml与实施例3的生物素化糖链天冬酰胺30mg于浆料状态下搅拌，过滤珠，清洗。清洗使用珠体积的2倍量的蒸馏水，在滤纸上进行3次清洗。固定化的确认由洗净回收的生物素化糖链天冬酰胺的残余量确认。然后将上述的生物素化糖链天冬酰胺固定珠10ml用30ml的蒸馏水直接

以浆料状态充填到玻璃制的空心的色谱柱（ ϕ 20mm、长300mm）中，制造亲和柱。

根据本发明，与以往相比可以非常容易且大量地得到在医药品开发等领域中有用的离析的3支链型糖链天冬酰胺衍生物。此外，根据本发明，在得到3支链型糖链天冬酰胺衍生物的同时，与以往相比可以非常容易且大量地分别得到有用的离析的3支链型糖链天冬酰胺和3支链型糖链。

另外，根据本发明，利用生物素·抗生物素蛋白的结合特异性，只使生物素化的多个糖链在被抗生物素蛋白化的微量培养板上反应便可以简单地制造糖链微芯片。通过该微芯片可以阐明具有与特定糖链结合能力的蛋白质。

另外，以对某一特定的蛋白质进行分离精制为目的，通过将特定的生物素化的糖链结合、固定于抗生物素蛋白化的亲和柱，使含有与生物素化的糖链具有特异结合能力的蛋白质的混合物通过上述柱子，可以只分离目的蛋白质。

另外，本发明中得到的FITC化糖链天冬酰胺在例如活体组织中的糖类受体的研究、植物凝集素的糖结合特异性的研究上有用。