

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 2 月 14 日 (14.02.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/12254 A1

(51) 国際特許分類⁷: C07H 1/00, C07C 243/10, G01N 33/58

ストリート635番 Colorado (US). 加藤郁之進 (KATO, Ikunoshin) [JP/JP]; 〒611-0028 京都府宇治市南陵町 1-1-150 Kyoto (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/06524

(22) 国際出願日: 2001 年 7 月 30 日 (30.07.2001)

(74) 代理人: 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.); 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMP ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-234508 2000 年 8 月 2 日 (02.08.2000) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 寶酒造株式会社 (TAKARA SHUZO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮村 毅 (MIYAMURA, Tsuyoshi) [JP/JP]; 〒525-0025 滋賀県草津市西渋川2丁目12-1 ハーモパレス草津103号 Shiga (JP). 江頭知恵 (EGASHIRA, Tomoe) [JP/JP]; 〒520-2134 滋賀県大津市瀬田1丁目11-10 ジュネス瀬田B101 Shiga (JP). 佐野 睦 (SANO, Mutsumi) [JP/JP]; 〒520-0014 滋賀県大津市柳川2丁目4-7 ルモン西大津615号 Shiga (JP). ベンディアク ブラッド・ケイ (BENDIAK, Brad K.) [CA/US]; 80220 コロラド州 デンバー ジャージー・

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING HYDRAZINOMONOSACCHARIDE DERIVATIVES AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: ヒドラジノ単糖類誘導体の製造方法およびその用途

(57) Abstract: A process for producing hydrazinomonosaccharide derivatives and use of hydrazines in determining the structures of aldose and ketose monosaccharides located at the reducing ends of saccharides.

(57) 要約:

ヒドラジノ単糖類誘導体の製造および糖類の還元末端に位置するアルドースおよびケトース単糖類の構造を決定するためのヒドラジン類の使用。



WO 02/12254 A1

明 細 書

ヒドラジノ単糖類誘導体の製造方法およびその用途

5 技術分野

本発明は、単糖類分析のために有用なヒドラジノ単糖類誘導体の製造方法およびその用途に関する。さらに詳しくは、本発明は、ヒドラジノ単糖類誘導体の製造および糖類の還元末端に位置するアルドースおよびケトース単糖類の構造を決定するためのヒドラジン類の使用に関する。

10

背景技術

糖または炭水化物とも称される糖類は、生物系の主要な成分である。糖類は植物の乾燥重量の約80%を形成し、そしてモノマー（単糖類）か、または共有結合した単糖類よりなるポリマー（オリゴ糖類）かのいずれかとして、高等動物における代謝経路の不可欠な成分である。さらに、糖類はしばしば、より大きな生物学的マクロ分子（タンパク質、脂質および核酸を含む）の一部として見出される。この広範な種類の形態において、糖類は天然において非常に多くの重要な機能を有する。

15

生物系における糖類の重要性のため、遊離の単糖類およびオリゴ糖類のモノマー成分としての単糖類を同定する手段は非常に有用である。さらに、オリゴ糖類の還元末端に位置する単糖類を同定する手段は、オリゴ糖類構造の解析のために重要である。

20

最近、オリゴ糖類の構造解析方法として、WO 96/17824号（特表平11-501901号）に、オリゴ糖の還元末端に存在する単糖類をN, N'-ジアセチルヒドラジノ単糖類誘導体とし、この誘導体をガスクロマトグラフィー質量分析（GC/MS）などにより同定する方法が開示されている。この方法によれば、原理的に全てのオリゴ糖の還元末端に存在する単糖類の種類を同定することが可能である。

25

しかし、上記の方法は単離された糖類にしか使用することが出来ないという問

題点がある。数種類の糖類の混合物にこの方法を適用すると、得られた数種類のヒドラジノ単糖類誘導体が、それぞれの糖類に由来するかを決定することはできない。従って、天然に存在する糖類をこの方法により分析するには、予め糖類を単離する必要がある。

- 5 例えば、タンパク質や核酸にはそれ自体に紫外線の吸収があるため、分離精製操作においてこの吸収に基づいてその存在位置を追跡することが可能である。しかし、糖類にはこのような吸収が無いので、分離精製を容易にするために糖類を標識することが所望される。この目的のためには、例えば、蛍光色素による標識化が適している。天然供給源に由来する他の混在物（例えば、タンパク質、核酸
- 10 など）と糖類とが共存する場合、標識された糖類は、他の混在物と容易に区別されるべきである。従って、このような場合、標識化は、混在する糖類以外の成分が標識されないよう、糖類に対して選択的に行われなければならない。

- 天然供給源由来の他の成分を標識せずに、糖類を選択的に標識する方法としては、例えば、糖類の還元性残基を標識する方法がある。還元性残基としては、例
- 15 例えば、糖類の還元末端に位置するカルボニル基、遊離のアルデヒド基が挙げられる。糖類の還元性残基における反応としては、還元アミノ化反応、ヒドラジド化反応などが挙げられる。これらの反応は不可逆的な反応である。還元アミノ化反応を用いた糖類の標識化方法としては、例えば、2-アミノピリジンを用いた方
- 20 法（S. Hase, T. IbukiおよびT. Ikenaka, Journal of Biochemistry, 95, 197-203 (1984)）が、そしてヒドラジド化反応を用いた糖類の標識化方法としては、例えば、Biotin-x-hydrazide（カルビオケム（Calbiochem）社）を用いた方法
- （B. Ridley, D. Mohnenら, Analytical Biochemistry, 249, 10-19 (1997)）が挙げられる。後者の方法は、還元末端を有する糖類と、Biotin-x-hydrazideとの反応によりヒドラゾンを形成させた後、さらに還元化反応を行うことにより、ヒ
- 25 ドラジド結合を介した糖類のビオチン標識化物を調製する方法である。

WO 96/17824号に開示された方法は、糖類の遊離の還元末端を利用するので、上記のような方法によって糖類の還元末端を標識して単離された単糖類を、そのまま種類の同定用に使用することはできない。

さらに、糖類の還元末端に位置する単糖類の構造を詳細に決定するためには、

単糖類の種類の同定の他に、隣接単糖類との結合位置（以下、「置換位置」ともいう）を決定する（すなわち、還元末端に位置する単糖類と隣接する単糖類の還元性水酸基との結合が何位の水酸基を介して行われているかを決定する）ことが所望される。上記WO 96/17824号には、糖類の還元末端に位置する単糖類の種類の同定する技術が開示されているのみであり、置換位置を決定する技術については言及されていない。

糖類を構成している各単糖間の結合位置を決定する方法としてはメチル化分析が知られている。一般的なメチル化分析は、オリゴ糖のメチル化、メチル化オリゴ糖の加水分解、遊離メチル化単糖の還元、メチル化糖アルコールのアセチル化、部分メチル化／アセチル化糖アルコール(partially methylated alditol acetates, PMAA)の分析の順に行う。部分メチル化／アセチル化糖アルコールの質量分析における開裂パターンとその法則性は古くより詳細に調べられており、この開裂パターンよりアセチル基の位置の同定を行うことができる(B. Lindberg, Methods in Enzymology, Vol. 28, pp178-195 (1972))。一般的なメチル化分析においては、オリゴ糖を構成するすべての単糖についてPMAAが生成する。これらは、通常ガスクロマトグラフィー／質量分析装置(GC/MS)をもちいて分析する。アセチル基の位置は質量分析の開裂パターンによって同定可能であるが、単糖の種類の同定はガスクロマトグラフィー上での標準物質との比較同定に頼らざるを得ず、そのためにはオリゴ糖を構成するすべての単糖について可能なすべてのPMAAを標準物質として用意しておく必要がある。自然界に存在するすべての単糖について、可能なPMAAを調製することは多大な労力を要し、さらには自然界に存在するすべての単糖の、可能なすべてのPMAAを分離同定できるようなクロマトグラフィーを行うことは事実上不可能である。

発明の目的

本発明の主な目的は、単離された糖類でなくともその還元末端に位置する単糖類の種類および置換位置を決定することのできる手段を提供することにある。

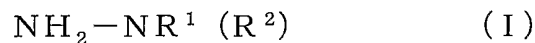
発明の概要

上記目的を達成するため、本発明者らは鋭意研究した結果、糖類をヒドラジノ単糖類誘導体とすることにより、単離されていない糖類であっても、WO 96/17824号と同様な方法で、その還元末端に位置する単糖類の種類を決定することが可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

5 すなわち、本発明は、

(1) 少なくとも、下記工程：

(a) 還元末端を有する糖類と、式 (I)：



10 [式中、 R^1 は、検出可能な標識および／または固定支持体をその一部として有するか、あるいは検出可能な標識および／または固定支持体に結合可能であり、 $\text{R}^1 - \text{N}$ 間の結合が、グリコシド結合を分解可能な反応によって分解可能な結合である、水素以外の基であり、 R^2 は水素または炭素数1～8のアルキル基である]

15 で表されるヒドラジン類とを反応させてヒドラゾンを製造する工程：

(b) 工程 (a) で得られたヒドラゾンをヒドラジノ誘導体に還元する工程、および

(c) 工程 (b) で得られたヒドラジノ誘導体を、グリコシド結合を分解可能な反応により分解し、ヒドラジノ単糖類誘導体を得る工程、

20 を包含することを特徴とするヒドラジノ単糖類誘導体の製造方法、

(2) 工程 (b) で得られるヒドラジノ誘導体を工程 (c) に付す前に、該ヒドラジノ誘導体のN-アセチル化を行なう上記 (1) 記載の方法、

(3) 工程 (b) で得られるヒドラジノ誘導体もしくはN-アセチル化されたヒドラジノ誘導体を工程 (c) に付す前に、該ヒドラジノ誘導体の水酸基をメチル化する上記 (1) または (2) 記載の方法、

25

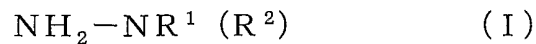
(4) R^1 がアシル基であることを特徴とする上記 (1) ～ (3) のいずれかに記載の方法、

(5) R^1 が紫外もしくは可視吸光物質、蛍光色素または固定支持体をその一

部として有するアシル基である上記（１）～（４）のいずれかに記載の方法、

（６）少なくとも下記工程：

（ａ）還元末端を有する糖類と、式（Ｉ）：



5

[式中、 R^1 は、検出可能な標識および／または固定支持体をその一部として有するか、あるいは検出可能な標識および／または固定支持体に結合可能であり、 $\text{R}^1\text{—N}$ 間の結合が、グリコシド結合を分解可能な反応によって分解可能な結合である、水素以外の基であり、 R^2 は水素または炭素数１～８のアルキル基である]

10

で表わされるヒドラジン類とを反応させてヒドラゾンを製造する工程、

（ｂ）工程（ａ）で得られたヒドラゾンをヒドラジノ誘導体に還元する工程、

（ｃ）工程（ｂ）で得られたヒドラジノ誘導体を、グリコシド結合を分解可能な反応により分解し、ヒドラジノ単糖類誘導体を得る工程、

15

（ｄ）工程（ｃ）で得られたヒドラジノ単糖類誘導体を完全にアセチル化する工程、および

（ｅ）工程（ｄ）で得られた完全にアセチル化されたヒドラジノ単糖類誘導体を同定する工程、

を包含することを特徴とする還元末端を有する糖類における還元末端単糖の同定および／または還元末端単糖の隣接単糖類との結合位置決定方法、

20

（７）工程（ｂ）で得られるヒドラジノ誘導体を工程（ｃ）に付す前に、該ヒドラジノ誘導体の N —アセチル化を行なう上記（６）記載の方法、

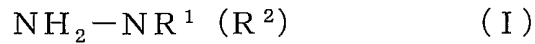
（８）工程（ｂ）で得られるヒドラジノ誘導体もしくは N —アセチル化されたヒドラジノ誘導体を工程（ｃ）に付す前に、該ヒドラジノ誘導体の水酸基をメチル化し、工程（ｅ）において還元末端単糖の隣接単糖類との結合位置を決定する上記（６）または（７）記載の方法、

25

（９）工程（ｅ）における同定がガスクロマトグラフィー／質量分析（ GC/MS ）によって実施される上記（６）～（８）のいずれかに記載の方法、

(10) 少なくとも下記工程：

(a) 還元末端を有する糖類と、式 (I)：



5 [式中、 R^1 は、検出可能な標識および／または固定支持体をその一部として有するか、あるいは検出可能な標識および／または固定支持体に結合可能であり、 $\text{R}^1 - \text{N}$ 間の結合が、グリコシド結合を分解可能な化学的反応によって分解可能な結合である、水素以外の基であり、 R^2 は水素または炭素数1～8のアルキル基である]

10 で表されるヒドラジン類とを反応させることによりヒドラゾンを製造する工程

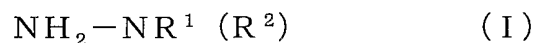
(b) 工程 (a) で得られたヒドラゾンをヒドラジノ誘導体に還元する工程、

(c) 工程 (b) で得られたヒドラジノ誘導体を、N-アセチル化する工程、

を包含する還元末端を有する糖類の標識方法、

(11) 上記 (1) ～ (10) のいずれかに記載の方法において使用される式

15 (I)：



20 [式中、 R^1 は、検出可能な標識および／または固定支持体をその一部として有するか、あるいは検出可能な標識および／または固定支持体に結合可能であり、 $\text{R}^1 - \text{N}$ 間の結合が、グリコシド結合を分解可能な反応によって分解可能な結合である、水素以外の基であり、 R^2 は水素または炭素数1～8のアルキル基である]

で表わされるヒドラジン類。

25 (12) 上記 (11) 記載のヒドラジン類を含むことを特徴とするヒドラジノ単糖類誘導体の製造用キット、

(13) 上記 (11) 記載のヒドラジン類を含むことを特徴とする糖類における還元末端単糖の同定および／または還元末端単糖の隣接単糖類との結合位置決

＝ 定用キット、

(14) 上記(11)記載のヒドラジン類を含むことを特徴とする還元末端を有する糖類の標識用キット、

(15) 式(I I I)で表される糖類：

5



10

[式中、Acはアセチル基、 R^1 は、検出可能な標識および／または固定支持体をその一部として有するか、あるいは検出可能な標識および／または固定支持体に結合可能であり、 R^1-N 間の結合が、グリコシド結合を分解可能な化学的反応によって分解可能な結合である、水素以外の基であり、 R^4 は、糖類とのグリコシド結合を有していてもよい、1-デオキシアルドースのC-1位に結合した水素が除去された基もしくは2-デオキシケトースのC-2炭素に結合した水素が1つ除去された基である。ただし R^1 がアセチル基であり、かつ、 R^4 が糖類とのグリコシド結合を有していない、1-デオキシアルドースのC-1位に結合した水素が除去された基もしくは2-デオキシケトースのC-2炭素に結合した水素が1つ除去された基である場合を除く]、および

15

(16) R^1 がアシル基であることを特徴とする上記(15)記載の糖類、を提供するものである。

20

本発明によれば、単離されていない糖類であっても、還元末端単糖の種類同定が可能となり、また、上記(7)のごとく、ヒドラジノ誘導体の水酸基をメチル化すると、隣接単糖類との結合位置を決定できる。固定支持体をその一部として有するかまたは固定支持体に結合可能な基を含むヒドラジン類を使用すると、反応生成物と反応液との分離操作を要せずに、上記のような同定／決定を実施できる。

25

図面の簡単な説明

図1：種々の条件で放置したN-アセチラクトサミンのベンゾイルヒドラジノ誘導体、およびそのN-アセチル化物を展開した薄層クロマトグラフィーを示

す図である。

発明の詳細な説明

本発明の方法によって製造されたヒドラジノ単糖類誘導体は、WO 96/17
5 824号（特表平11-501901号）（本明細書に出典明示で援用する）に
記載のような還元末端単糖の同定方法において使用される。WO 96/1782
4号に記載の方法によれば、単離された還元末端を有する糖類をヒドラジン類と
反応させてヒドラゾンを経由してヒドラジノ誘導体に還元し、この
際必要に応じてオリゴ糖からヒドラジノ単糖類誘導体を分解し、ヒドラジノ単糖
10 誘導体をアセチル化してN, N'-ジアセチルヒドラジノ単糖類誘導体とし、こ
れをGC/MSのような方法によって同定する。

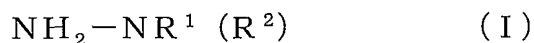
本発明のヒドラジノ単糖類誘導体の製造方法の工程（a）における還元末端を
有する糖類としては、特に限定するものではなく、還元末端単糖の同定および/
または還元末端単糖の隣接単糖類との結合位置決定の対象となるいずれの糖類で
15 もよく、単糖類、オリゴ糖類、多糖類、それらの混合物を包含する。本発明の方
法において使用される糖類を含む試料は、天然供給源由来のその他の成分（タン
パク質、核酸など）をさらに含んでもよい。本発明の方法において使用され
る糖類を含む試料を天然供給源から得るための方法は、例えば社団法人日本生
化学会編「生化学実験講座4 糖質の化学（上）」（1976年4月12日発行、
20 株式会社東京化学同人）に記載されている。

ここで用いる「還元末端単糖」なる語は、アルドースのC-1位またはケトース
のC-2位が置換を受けていない糖類の末端（「還元末端」）に位置する、還元性
を有する単糖類をいう。また、「アルドース」は、C-1位にアルデヒド基を有し
得る、遊離の単糖類かまたはオリゴ糖類の還元末端の単糖類のいずれかをいう。

25 「ケトース」は、単糖類の骨格に沿っていずれかの内部炭素原子にケトン基を有
し得る、遊離の単糖類かまたはオリゴ糖類の還元末端の単糖類のいずれかをいう。

本発明のヒドラジノ単糖類誘導体の製造方法には、WO 96/17824号に
記載の方法に使用されるヒドラジン類とは異なる構造を有するヒドラジン類を使用
する。これによって、分析すべき糖類を事前に単離する必要性が排除される。

ここに、「ヒドラジン類」とは、一般的には、ヒドラジンの水素原子を有機基で置換した化合物を表すが、本発明のヒドラジノ単糖類誘導体の製造方法において使用される「ヒドラジン類」は、式（I）：



5

[式中、 R^1 は、検出可能な標識および／または固定支持体をその一部として有するか、あるいは検出可能な標識および／または固定支持体に結合可能であり、 R^1-N 間の結合が、グリコシド結合を分解可能な反応によって分解可能な結合である、水素以外の基であり、 R^2 は水素または炭素数1～8のアルキル基である]で表される公知のまたは新規のいずれかの化合物である。WO 96/17824号に記載の方法に使用されるヒドラジン類においては、ヒドラジンの4個の水素原子のうち1個のみが1～8個の炭素原子を有するアルキル基で置換され得る。

10

15

「検出可能な標識」は、ヒドラジノ誘導体の精製を容易にする、当該分野で公知のいずれかの標識であり、例えば、紫外、可視吸光標識（例えば、ベンゼンおよびその誘導体）、蛍光標識（例えば、フルオレッセイン、ピレン、アントラセンおよびそれらの誘導体）、放射性標識（例えば、放射性水素、放射性炭素、放射性ヨウ素）およびビオチン標識やジゴキシゲニン標識などを包含する。ヒドラジノ誘導体を製造した後に検出可能な標識を結合させることが所望される場合は、検出可能な標識に結合可能な基を含むヒドラジン類と、検出可能な基とは別々に存在してもよいが、そうでなければ検出可能な標識をその一部として有する基を使用してもよい。検出可能な標識をその一部として有する基の例としては、蛍光色素をその一部として有するアシル基が挙げられる。例えば、モレキュラープローブス（Molecular Probes）社から市販されている1-ピレン酪酸ヒドラジドを使用して付加されるピレンによって発せられる蛍光を指標とし、順相高速液体クロマトグラフィーのような当該分野で公知の方法を使用することによって、ヒドラジノ誘導体を容易に精製することができる。その他に、検出可能な基を有するアシルヒドラジドとしてはビオチンヒドラジド（同人化学社製）ベンゾイルヒド

20

25

ラジン（東京化成社製）、カスケードブルーヒドラジド（モレキュラープローブ社製）など、多種の化合物が入手可能である。

また、検出可能な標識に用いるためのヒドラジン化合物は、当業者が容易に合成して得ることができる。例えば、官能基としてカルボン酸をもつ化合物とヒドラジンとを、ペプチド合成に用いられる手法〔泉屋ら、「ペプチド合成の基礎と実験」（1985）丸善株式会社〕を用いて結合させれば、容易にアシルヒドラジドを得ることができる。また、官能基としてアミノ基を有する化合物は、たとえば無水コハク酸によって官能基をカルボン酸に変換後、上記の方法でヒドラジンと縮合させることが可能である。さらにまた、官能基として水酸基を有する化合物は、ハロゲン化の後、カーボヒドラジド($\text{H}_2\text{N}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2$)と反応させることでヒドラジンを導入することが可能である。

なお、以上にあげたヒドラジン化合物の合成手法は検出可能な標識化合物の場合に限らず、固定支持体をもちいた場合も同様である。

本発明の方法におけるいずれかまたは全ての反応工程は、液相で行ってもよく、または固相で行ってもよい。「固定支持体」は、ヒドラジノ誘導体に対する種々の反応を固相で実施するために使用され得る。例えば、以下で詳細に説明するように、本発明の還元末端単糖の同定および／または還元末端単糖の隣接单糖類との結合位置決定方法において、工程（b）で得られるヒドラジノ誘導体を工程（c）に付す前に、ヒドラジノ誘導体の水酸基をメチル化することによって、工程（e）において還元末端単糖の隣接单糖類との結合位置を決定することができる。一般に、このメチル化反応には、数段階の反応／洗浄工程が含まれる。ヒドラジノ誘導体を固定支持体へ結合させることによって、各工程ごとの反応生成物と反応液との分離操作を省略することができる。

固定支持体が結合されたヒドラジノ誘導体が精製され得る場合は、使用される糖類が単離されている必要はないが、一般に、固定支持体をその一部として有するかまたは固定支持体に結合可能である基を含むヒドラジン類は、単離された糖類に対して使用される。単離されていない糖類に対しても、糖類混合物を検出可能な標識を含むヒドラジン化合物で標識し、次に標識を目印にヒドラジノ誘導体化糖を精製し、精製したヒドラジン誘導体化糖を固定支持体に結合させることも

可能である。例えば、糖と過剰量の4-アミノベンズヒドラジドとを反応させると、糖はヒドラジド基と優先的に縮合しヒドラゾン进行形成する。還元後、糖ヒドラジノ誘導体进行ベンゼン環の紫外吸收进行指標に精製することができる。精製した糖ヒドラジノ誘導体は、この誘導体のもつアミノ基を介して、例えば、官能基としてN-ヒドロキシスクシイミドエステル进行有する固定支持体结合させることができる。固定支持体は、ガラスビーズ、ポリマーマトリックス、焼結ガラスディスク、ファイバーガラス膜、またはポリマー膜などを包含する。固定支持体には、通常、ヒドラジン類や糖ヒドラジノ誘導体进行固定化するための官能基进行有していることが望まれる。官能基の例として、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、ハロゲン化アルキル基等があげられる。このような、官能基进行有する固定支持体の例としては、ノババイオケム (Nova Biochem) 社から市販されているノバシンTG ブロモレジン (NovaSyn TG bromo Resin) およびバイオラッド (Bio-Rad) 社から市販されているバイオレックス70レジン (Bio-Rex 70 Resin) が挙げられる。このような固定支持体进行その一部として有する基を含むヒドラジン類は、例えば、実施例2に記載の手順によって製造される。得られたヒドラジン類の還元力进行、

「パーク・ジョンソン法」 (Park, J. T. および Johnson, M. J., J. Biol. Chem., 181, 149-151 (1949)) のような当該分野で公知の方法に従って測定することができる。

工程 (a) における還元末端进行有する糖類とヒドラジン類との反応は、当業者に公知である適切な条件下で、例えば、適切な溶媒 (例えば、DMSO、アセトニトリル) 中、40~90℃で、0.1~20時間行われる。例えば、反応は、10%酢酸を含むジメチルスルホキシド (DMSO) 中で90℃で1時間加熱することによって実施される。

工程 (b) におけるヒドラゾンのヒドラジノ誘導体への還元は、当業者に公知のいずれかの適切な還元剂を使用して実施され得る。適切な還元剂は、例えば、水素化ホウ素試薬、ホウ素中心水素化物、ボラン/ジボラン、水素化アルミニウム試薬、共有結合した炭素または水素と置換するアルコキシ基进行有する他のアルミニウム中心水素化物进行包含する。触媒的水素化はまた、水素ガスおよび種々の金属およびラネーニッケル (ニッケル-アルミニウム合金) のような、調製され

た金属合金を使用して行われ得る。さらに、金属還元物の溶解、アルカリ金属（リチウム、ナトリウム、またはカリウム）の使用、および溶媒（例えば、アルコール、酢酸、液体アンモニア、または1, 2-ジメトキシエタンなどのエーテル）中の、例えば、亜鉛、マグネシウム、スズ、鉄、または水銀が一般に効果的である。

還元反応は、適切な溶媒（例えば、DMSO、水）中、20～90℃で、1～20時間行われる。例えば、DMSO中の2.5Mボランジメチルアミン錯体および30%酢酸の溶液中で80℃で1時間加熱することによって、または1M水素化ホウ素ナトリウム水溶液中で室温で16時間放置することによって実施される。これらの反応のいずれかに要する時間が、温度が上昇または低下するに従ってそれぞれ短縮または延長し得るということは、当業者には明らかである。還元工程での生成物および収量は、例えば、プロトンNMRおよび質量分析などの分析技術によりモニターすることができる。

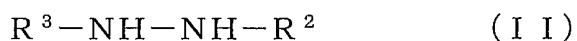
なお、工程（a）と（b）とは分離された工程として以外にも、同時進行する工程としても行えることは当業者ならば周知のことである。

さらにまた、必要であれば還元反応後にヒドラジノ誘導体のN-アセチル化を行っても良い。ヒドラジン誘導体のN-アセチル化の効果としては、電荷の消滅および化学的安定化が期待される。

工程（c）において、ヒドラジノ誘導体を、グリコシド結合を分解可能な反応により分解し、ヒドラジノ単糖類誘導体を得る。この際、工程（a）において使用されるヒドラジン類中に含まれるR¹-N間の結合も同時に分解される。当業者に公知の、グリコシド結合を分解可能ないずれかの反応を使用することができる（例えば、ビアマン（Biermann, C. J.）著、Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 46, 251-271を参照のこと）。R¹は、R¹-N間の結合が、選択された反応条件下で分解可能であるように、当業者によって適切に選択される。1つの実施態様において、R¹はアシル基である。別の実施態様において、R¹は検出可能な標識としての蛍光色素または固定支持体をその一部として有するアシル基である。分解の工程は、水、アルコール、またはカルボン酸のような種々の溶媒中で、酸性条件を使用することにより達成され得る。

適切な分解剤としては、水中の塩酸またはトリフルオロ酢酸溶液、無水メタノール中の塩酸、および無水酢酸溶液中の硫酸が挙げられ、一般に分解は、50～110℃で、1～10時間行われる。例えば、分解は、5%塩酸-メタノール中で90℃で4時間加熱することによって、または4M塩酸中で100℃で4時間加熱することによって実施される。

工程(a)～(c)を包含する方法によって得られるヒドラジノ単糖類誘導体は、式(I I)：



で表される。式中、 R^3 は式中のNに共有結合した1-デオキシアルドース部またはデオキシケトース部である。 R^3 が1-デオキシアルドース部である場合、Nへの共有結合はC-1位を介して生じる。 R^3 がデオキシケトース部である場合、Nへの共有結合は糖骨格におけるデオキシ炭素を介して生じる（これはケトン基に元々存在した炭素である）。全ての場合において、 R^2 は水素または炭素数1～8のアルキル基である。

式(I I)のヒドラジノ単糖類誘導体のうち、 R^3 で示される1-デオキシアルドース部またはデオキシケトース部が有する水酸基の全てまたはその一部がメチル化された構造を有するヒドラジノ単糖類誘導体を、特に、「O-メチル化ヒドラジノ単糖類誘導体」と称する。

R^3 で示される基を構成するアルドースおよびケトースは、いずれの遊離の単糖またはオリゴ糖の還元末端単糖でもよく、例えば、アルドースとしては、炭素数6個のアルドヘキソース（例えば、D-グルコース、L-グルコース、D-アロース、D-アルトロース、D-ガラクトース、D-グロース、D-イドース、D-マンノース、およびD-タロース）、炭素数5個のアルドペントース（例えば、D-アラビノース、D-リキソース、D-リボース、およびD-キシロース）、炭素数4個のアルドステトロース（例えば、D-エリトロースおよびD-トレオース）、炭素数3個のアルドストリオース（例えば、D-グリセルアルデヒド）が挙げられ、ケトースとしては、炭素数6個のケトースヘキソース

(例えば、D-フルクトース、D-プシコース、D-ソルボース、およびD-タガトース) が挙げられる。

上記の方法で得られたヒドラジノ単糖類誘導体を用いて、以下のように、還元末端を有する糖類における還元末端単糖の同定および／または還元末端単糖の隣接単糖類との結合位置決定が実施される。

工程 (d) において、ヒドラジノ単糖類誘導体を完全にアセチル化する。用語「アセチル化」は、1つまたはそれより多くのアセチル基を分子に共有結合させることをいい、「完全にアセチル化された」分子は、全ての遊離のヒドロキシル基および窒素原子がアセチル化された分子である。

当該分野で公知のいずれかの適切なO-アセチル化反応を、誘導体を完全にアセチル化するのに使用することができる。これらには、限定するものではないが、無水酢酸/ピリジン混合物、無水酢酸、塩化亜鉛、酢酸ナトリウム、または硫酸、またはピリジン溶液中のアセチルクロリドとの反応が含まれる (例えば、Horton D. IA, 「The Amino Sugars」、3-211頁 (R. W. Jeanloz編、Academic Press 1969) (本明細書に出典明示で援用する) を参照のこと)。

N-アセチル化は、O-アセチル化よりも容易に起こる。従って、デオキシ-ヒドラジノアルジトールおよびデオキシ-(N'-アルキルヒドラジノ)アルジトールの完全なアセチル化は、上記の「O-アセチル化」についての条性下で起こり、これらの分子の窒素基上および全ての遊離ヒドロキシル基上にアセチル基を生じる。

O-アセチル化は、例えば、試料にピリジン：無水酢酸の2：1混合液を添加し、これを37℃にて16時間保温することによって実施される。

一方、O-アセチル化は行なわずN-アセチル化を選択的行なう場合は、例えば、弱アルカリ性緩衝液中で無水酢酸と混合することによって実施される。弱アルカリ性緩衝液としては、飽和重炭酸ナトリウムが好んで用いられる。なお本明細書において「N-アセチル化」とは、特に断りの無い限り上記、窒素原子選択的なアセチル化を意味する。

本発明の方法において、工程 (b) で得られるヒドラジノ誘導体を工程 (c) に付す前に、ヒドラジノ誘導体の水酸基をメチル化してもよい。このメチル化に

よって、工程（e）において還元末端単糖の隣接単糖類との結合位置（または「置換位置」）を決定することができる。

糖類を構成している各単糖類間の結合位置を決定する「メチル化分析」は、還元末端単糖の隣接単糖類との結合位置を決定するために有用な方法である。この方法において、まず還元糖の遊離水酸基を完全にメチル化し、得られたメチル化糖類を分解して、隣接単糖類との結合位置の水酸基のみが遊離した部分メチル化単糖類を生じさせ、これをアセチル化し、アセチル化された位置を同定する。メチル化は当該分野で公知のいずれかの方法によって実施される。例えば、メチル化は、箱守法 [S. Hakomori, J. Biochem. (Tokyo), Vol. 55, 205-208(1964)]、DMSO-NaOH法 [I. Ciucanu and F. Kerek, Carbohydrate Research, Vol. 131, 209-217(1984)]、あるいはDMSO-NaOH法の改良法である Anumula らの方法 [Anumula, K. R. and Taylor, P.B., Anal. Biochem., Vol. 203, 101-108(1992)]（本明細書に出典明示で援用する）を用いて実施することができる。

なお本発明の還元末端糖と隣接単糖の結合位置の決定方法において、 R_1 がアシル基であり、メチル化の手段としてDMSO-NaOH法、あるいは Anumula らの方法を用いた場合、ヒドラジノ誘導体の糖に直接結合している窒素原子（N）がメチル化の前にアセチル化されていなければ後の工程（e）における完全にアセチル化されたヒドラジノ単糖類誘導体の同定が出来ない。この場合アセチル化はN-アセチル化であっても完全アセチル化であってもよい。なぜならば、完全アセチル化によって導入されたO-アセチル基はメチル化に用いられる強塩基条件下では速やかに脱離し、代りにメチル基が導入されるからである。なお該条件においてN-アセチル基は残存する。

ヒドラジノ誘導体のN-アセチル化は、当業者によれば容易に実行可能で、たとえばヒドラジノオリゴ糖誘導体をWO 96/17824号（特表平11-501901）に記載の方法で行うことができる。あるいは、ヒドラジノオリゴ糖誘導体を当業者に周知の方法、たとえばピリジン・無水酢酸の2対1の混液中で37℃で一晩放置する事により完全アセチル化してもよい。

一方、ヒドラジノ誘導体の、糖由来の炭素原子に直接結合している窒素原子

(N) をアセチル化することに全く予期しない別の効果を見出した。すなわち、ヒドラジノ誘導体の、糖由来の炭素原子に直接結合している窒素原子 (N) をアセチル化することで、ヒドラジノ誘導体の化学的安定性が増強されたのである。糖ヒドラジノ誘導体は酸溶液中で不安定なのに対して、ヒドラジノ誘導体のN-アセチル化物は極めて安定であるという現象が観察された。さらには、ヒドラジノ誘導体のN-アセチル化物は窒素原子のプロトン化による荷電がないため、精製や分析のためのクロマトグラフィーにおいて担体との相互作用がなく、N-アセチル化していないヒドラジノ誘導体に比べてシャープなピークやバンドがえられるという利点も付加された。

工程 (e) において、上記で得られた完全にアセチル化されたヒドラジノ単糖類誘導体を同定することによって、還元末端を有する糖類における還元末端単糖を同定することができる。さらに上記のように、ヒドラジノ誘導体の水酸基をメチル化すると、還元末端単糖の隣接单糖類との結合位置を決定することができる。

本発明の誘導体は、分析前に精製してもよく、または例えば、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) および液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) などにおけるように、クロマトグラフィーが分析装置に連結された系 (オンライン質量スペクトル分析と総称される) を使用する場合は、必ずしも精製しなくてもよい。完全にアセチル化されたヒドラジノ単糖類誘導体の精製は、アセチル化の前に実施してもよくまたはアセチル化の後に実施してもよい。

誘導体は、好ましくはクロマトグラフィー、より好ましくは、高速液体クロマトグラフィーを使用して精製される。

完全にアセチル化されたヒドラジノ単糖類誘導体は、単糖類の構造の決定に使用され得る。構造決定の方法は、好ましくは、クロマトグラフィーによる分離および質量分析からなり、より好ましくは、その分離は、ガスクロマトグラフィーによる (GC/MS) 。

誘導体の検出は、当業者に公知のいずれかの適切な技術により行われ得る。好ましくは、検出は、代表的には 200 nm における紫外吸収、または質量分析 (MS) を使用して行われる。GC/MS および LC/MS のようなオンライン質量スペクトル分析を使用する (すなわち、クロマトグラフィーによって分離さ

れた化合物が分析のために質量分析計に直接導入される) 誘導体の検出が特に好ましい。

質量分析において、真空中で気体状の試料が電子衝撃化 (E I) または化学イオン化 (C I) のような方法によってイオン化され、その結果生じたイオンを検出する。オンライン質量スペクトル分析の場合は、クロマトグラフィーによって分離された分子を、電子衝撃化または化学イオン化によりイオン化させる。分析に必要とされる試料の量は通常 1 pmol 未満である。基礎的な装置の総説については Cooks, R. G., Glish, G. L., McLucky, S. A. および Kaiser, R. E., Chemical and Engineering News, 1991年3月25日, 26-41頁 (本明細書に出典明示で援用する) を参照のこと。

なお本発明における糖の結合位置の決定方法は、先行技術の項で述べた一般的なメチル化分析とは異なり、メチル化分析を還元末端単糖についてのみ行うことを目的としている。還元末端単糖の種類の同定は、オリゴ糖をヒドラジノ誘導体化し、得られたヒドラジノオリゴ糖誘導体をグリコシド結合を分解可能な反応により分解し、ヒドラジノ単糖誘導体を得たのち完全アセチル化し、GC/MSによって行うことができる (Bendiak, B. and Fang, T. T., Carbohydr. Res. 327, 463-481 (2000))。還元末端単糖の隣接単糖類との結合位置の決定は一般的なメチル化分析とほぼ同様の手順で行うことができる。すなわち、オリゴ糖をヒドラジノ誘導体化し、得られたヒドラジノオリゴ糖誘導体を完全メチル化し、完全メチル化ヒドラジノオリゴ糖誘導体をグリコシド結合を分解可能な反応により分解し、部分メチル化ヒドラジノ単糖誘導体を得たのち完全アセチル化し、部分メチル化/アセチル化ヒドラジノ単糖誘導体 (partially methylated 1-deoxy-1-hydrazino alditol acetates あるいは partially methylated 2-deoxy-2-hydrazino alditol acetates, PMHAA) を GC/MS によって分析する。このとき、還元末端糖以外の糖も部分メチル化/アセチル化糖として検出されるが、部分メチル化/アセチル化ヒドラジノ単糖誘導体とは GC の保持時間やマススペクトルによって区別されうる。特にマススペクトルによる区別は有効で、たとえば、イソブタンをもちいた化学イオン化法による正イオンマススペクトルを測定すれば、PMHAA の分子イオンマスを検出することができる。還元末端分析で還元末端単糖

の種類が同定できていれば、期待されるPMHAAの可能な分子イオンマスは多くても6通りに絞られるため、それらのマスによってクロマトグラムを走査すれば容易にPMHAAのピークが同定できる。

さらに検出された分子イオンのMS/MSスペクトルを測定すれば、その開裂
5 パターンからPMHAAのアセチル基の位置が同定できる。

PMHAAのMS/MSによる開裂パターンは、基本的には従来より詳細に検討されてきたPMAAの質量分析における開裂パターンとその法則性を適用することが可能である。しかし、PMHAAはいまだ取得されたという報告はなく質量分析におけるPMHAA特有の開裂パターンとその法則性の仔細については全く検討が行われて
10 いない。

PMHAAは、N, N'-ジアセチル化ヒドラジノオリゴ糖類、たとえば1-デオキシ-1-(N, N'-ジアセチルヒドラジノ)-ラクチトールなどを原料に製造することができる。N, N'-ジアセチル化ヒドラジノオリゴ糖類の製造方法についてはすでにWO 96/17824号(特表平11-501901)に開示
15 されている方法を用いることができる。N, N'-ジアセチル化ヒドラジノオリゴ糖類を完全メチル化し、次にたとえばメタノリシスのようなグリコシド結合分解反応によって部分メチル化ヒドラジノ単糖を得る。えられた部分メチル化ヒドラジノ単糖を完全アセチル化することによりPMHAAを得ることができる。えられたPMHAAはそのまま使用することができるが、さらに、逆相高速液体クロマトグラ
20 フィーなどのクロマトグラフィーによって精製して用いてもよい。

また、PMHAAの特長の一つとして、揮発しにくいという性質がある。この性質によりPMAAの場合のように、窒素吹き付けによる穏和な溶媒溜去の必要が無く、濃縮遠心機をもちいた減圧乾固を行ってもサンプルの損失が全く見られない。

本発明はまた、上記のような本発明の方法において使用されるヒドラジン類、
25 およびこのヒドラジン類を必須の構成成分として含むヒドラジノ単糖類誘導体の製造用または糖類における還元末端単糖の同定および／もしくは還元末端単糖の隣接単糖類との結合位置決定用キットに関する。キットには各工程の反応において使用されるその他の試薬、反応容器および使用説明書などがさらに含まれ得る。

実施例

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明は、これらに限定されるものではない。

実施例 1

5 ヒドラジノグルコース誘導体の調製および解析

(a) ヒドラゾンの調製

360 μ g のグルコースをよく乾燥し、そこへジメチルスルホキシド(DMSO)中の4 μ M 1-ピレン酪酸ヒドラジド(モレキュラープローブス(Molecular Probes)社)の溶液20 μ lを添加し、超音波処理によりグルコースを十分に溶解した。そこへ2 μ lの酢酸を添加してよく攪拌した後、反応液を90℃にて1時間加熱した。

(b) ヒドラゾンの還元

(a)で得られた反応液を遠心濃縮機にて乾固した後、残渣にDMSO中に2.5Mボランジメチルアミン錯体および30%酢酸を含む溶液20 μ lを添加し、超音波処理により残渣を十分に溶解した後、80℃にて1時間加熱した。反応液を遠心濃縮機にて乾固した後、これを50%アセトニトリルに再溶解し、順相高速液体クロマトグラフィーにて精製した。ピレン化グルコースの存在を、精製物の分子量を4重極3連イオンスプレー質量分析装置、API-300(パーキン-エルマー・サイエクス(Perkin-Elmer Sciex)社製)にて測定して、正分子イオン(467.0)を検出することにより確認した。

(c) ピレン化グルコースのメタノリシス

(b)で得られた精製ピレン化グルコース(10 nmol)をガラス試験管に入れ、乾固した。試験管に5%塩酸-メタノール(ナカライテスク社)を100 μ l添加し、封管後90℃にて4時間加熱した。試験管を開管し、遠心濃縮機にて試料を乾固し分解産物を得た。

(d) GC/MS分析

(c)で得られたピレン化グルコースのメタノリシス後の残渣に、 $^{13}\text{C}_6$ -D-グルコース(アルドリッチ(Aldrich)社)を出発材料として公知の方法(特表平11-501901)(本明細書に出典明示で援用する)に従って調製した、

1-デオキシ-1-(N, N'-ジアセチルヒドラジノ)- $^{13}\text{C}_6$ -D-グルシ
トール 10 nmol を内部標準物質として添加し、再び乾固した。得られた残渣
にピリジン：無水酢酸の 2：1 混合液を 100 μl 添加し、よく攪拌した後、3
7°C にて 16 時間保温した。試料を遠心濃縮機にて乾固した後、残渣にクロロホ
5 ルムを 200 μl 添加して溶解し、そのうちの 1 μl を GC/MS にスプリット
レス導入して分析した。GC/MS 分析の条件は以下に示すとおりである。

System: GCQ (Finnigan MAT)

Column: DB-5 (5% diphenyl-95% dimethyl polysiloxane, 0.25 mm i.d. x 30 m,
0.25 micrometer film thickness) (J & W Scientific)

10 Carrier: Helium (40 cm/sec)

Ionization: EI

Injector temperature: 300°C

Column initial temperature: 90°C

Time program: 90°C for 2 min, 90°C-24°C/min-210°C, and 210°C-4°C/min-
15 300°C

Injection: 1 microliter (splitless injection)

トータルイオンマスクロマトグラムにおいて、16.04 分および 21.21
分に主ピークが観察された。完全アセチル化 1-デオキシ-1-(N, N'-ジ
アセチルヒドラジノ)- $^{12}\text{C}_6$ -D-グルシトールの特異的イオン ($[\text{M}-4$
20 $2]^+$)、 $m/z = 448$ のシングルマスクロマトグラムにおいては 16.04
分にピークが観察され、このピークは、内部標準由来の完全アセチル化 1-デオ
キシ-1-(N, N'-ジアセチルヒドラジノ)- $^{13}\text{C}_6$ -D-グルシトールの
特異的イオン ($[\text{M}-42]^+$)、 $m/z = 454$ のシングルマスクロマトグラ
ムのピークと一致した。21.21 分のピークは主イオンとして $m/z = 302$
25 を有し、これは 1-ピレン酪酸メチルエステルの分子イオンに一致した。

実施例 2

ヒドラジン固定支持体

(a) カーボヒドラジド固定化ノバシン TG レジンの調製

ノバシン TG ブロモレジン (NovaSyn TG bromo Resin) (ノババイオケム (Nova

Biochem) 社) 360 mg を DMSO 中の 0.5 M カーボヒドラジド (アルドリッチ (Aldrich) 社) の溶液に懸濁し、室温で 16 時間振とうした。レジンに充分量の DMSO、水、エタノールで洗浄後、15 mg/ml の酢酸セシウム/ジメチルホルムアミド (DMF) 溶液で処理し、その後充分量の DMF、水、エタノールで洗浄して、カーボヒドラジド固定化ノバシン TG レジンを得た。導入されたカーボヒドラジドの還元力をパーク・ジョンソン法 (Park, J. T. および Johnson, M. J., J. Biol. Chem., 181, 149-151 (1949)) に従って測定したところ、レジン 1 mg あたり 1.1 nmol の 4-メトキシフェニルヒドラジン塩酸塩に相当する還元力が示された。

10 (b) ヒドラジン固定化バイレックス 70 レジンの調製

イオン型をプロトンフォームに変換したバイオレックス 70 レジン (Bio-Rex 70 Resin) (バイオラッド (Bio-Rad) 社) 200 mg を 5 ml の N, N-ジメチルホルムアミド (DMF) に懸濁し、そこに 0.5 g の 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 (EDC) (ナカライテスク社) を添加し、室温で 16 時間振とうした。レジンに 20 ml の DMF で洗浄した後、DMF 中の 10% ヒドラジン (ナカライテスク) 溶液を 5 ml 添加し、さらに 5 時間振とうした。レジンに充分量の DMF、水、1 M 塩酸、水、メタノールで洗浄し、ヒドラジン固定化バイレックス 70 レジンを得た。導入されたヒドラジンの還元力をパーク・ジョンソン法 (Park, J. T. および Johnson, M. J., J. Biol. Chem., 181, 149-151 (1949)) に従って測定したところ、レジン 1 mg あたり 27.6 nmol の 4-メトキシフェニルヒドラジン塩酸塩に相当する還元力が示された。

(c) 糖のレジンへの結合

25 (b) で得られたヒドラジン固定化バイレックス 70 レジン各 10 mg に、DMSO 中に 100 mM グルコースおよび 10% 酢酸を含む溶液を 100 μ l 添加し、90°C にて 1 時間加熱した。レジンに 50 ml の DMSO で洗浄し、次いでレジンに 1 ml の 1 M 水素化ホウ素ナトリウム水溶液を添加し、室温で 16 時間放置した。レジンに充分量の水、0.1 M 塩酸、水、エタノールで順次洗浄し、乾燥した。

(d) 糖結合レジンの酸加水分解

(c) で得られた各乾燥糖結合レジンを経験管に移し、4M塩酸を100 μ l 加えて封管し、100℃にて4時間加熱した。開管した後、上清を回収し、減圧乾固し、加水分解産物を得た。

5 (e) GC/MS分析

(d) で得られた加水分解後の各残渣にピリジン：無水酢酸の2：1混合液100 μ l を添加し、よく攪拌した後、室温にて16時間放置した。試料を遠心濃縮機にて乾固した後、残渣にアセトニトリルを200 μ l 添加して溶解し、そのうちの1 μ l をGC/MSにスプリットレス導入して1分析した。GC/MS分析の条件は以下に示すとおりである。

System: GCQ (Finnigan MAT)

Column: DB-5 (5% diphenyl-95% dimethyl polysiloxane, 0.25 mm i.d. x 30 m, 0.25 micrometer film thickness) (J & W Scientific)

Carrier: Helium (40 cm/sec)

15 Ionization: EI

Injector temperature: 300℃

Column initial temperature: 90℃

Time program: 90℃ for 2 min, 90℃-(24℃/min)-210℃, and 210℃-(4℃/min)-300℃

20 Injection: 1 microliter (splitless injection)

完全アセチル化1-デオキシ-1-(N, N'-ジアセチルヒドラジノ)-D-グルシトールの特異的イオン ($[M-42]^+$)、 $m/z=448$ のシングルマスキロマトグラムにおいて14.5分にピークが観察され、このピークのマスキロマトグラフは標準の完全アセチル化1-デオキシ-1-(N, N'-ジアセチルヒドラジノ)-D-グルシトールのマスキロマトグラムのピークと一致した。

実施例3

メチル化分析

(a) ピレン化ラクトースの調製

50 nmol のラクトースをよく乾燥し、そこへDMSO中の400 nmol

1-ピレン酪酸ヒドラジド (モレキュラプローブス (Molecular Probes) 社) の溶液 $10\ \mu\text{l}$ を添加し、超音波処理によりラクトースを十分に溶解した。そこへ $1\ \mu\text{l}$ の酢酸を加えてよく攪拌した後、反応液を 90°C にて1時間加熱した。遠心濃縮機にて反応液を乾固した後、残渣に DMSO 中に $2.5\ \text{M}$ ボランジメチルアミン錯体および 30% 酢酸を含む溶液 $10\ \mu\text{l}$ を添加し、超音波処理により残渣を十分に溶解した後、 80°C にて1時間加熱した。反応液を遠心濃縮機にて乾固した後、 50% アセトニトリルに再溶解し、順相高速液体クロマトグラフィーにて精製した。精製ピレン化ラクトースの分子量を4重極3連イオンスプレー質量分析装置、API-300にて測定したところ、正分子イオン (629.3) が観察された。

(b) ピレン化ラクトースのメタノリシス

(a) で得られた精製ピレン化ラクトース ($20\ \text{nmol}$) をガラス試験管にいれ乾固した。試験管に 5% 塩酸-メタノール (ナカライテスク社) を $100\ \mu\text{l}$ くわえ、封管後 90°C にて4時間加熱した。試験管を開管し、遠心濃縮機にて試料を乾固し分解産物を得た。

(c) GC/MS 分析

ピレン化ラクトースのメタノリシス後の残渣にピリジン: 無水酢酸 (2 対 1) の混合液を $100\ \mu\text{l}$ 加え、よく攪拌後 37°C にて16時間加温した。試料を遠心濃縮機にて乾固したのち、残渣にアセトニトリルを $200\ \mu\text{l}$ 加えて溶解し、そのうちの $1\ \mu\text{l}$ を GC/MS にスプリットレス導入し分析した。GC/MS 分析の条件は以下に示すとおりである。

System: GCQ (Finnigan MAT)

Column: DB-5 (5% diphenyl-95% dimethyl polysiloxane, $0.25\ \text{mm i.d.} \times 30\ \text{m}$, $0.25\ \mu\text{m}$ film thickness) (J & W Scientific)

Carrier: Helium ($40\ \text{cm/sec}$)

Ionization: CI (Isobutane)

Injector temperature: 300°C

Column initial temperature: 90°C

Time program: 90°C for 2 min, 90°C - 24°C/min - 210°C , and 210°C - 4°C/min -

300°C

Injection: 1 microliter (splitless injection)

トータルイオンマスキログラムでは8. 1分と14. 6分、20. 1分に主ピークが観察された。完全アセチル化1-デオキシ-1-(N, N'-ジアセチルヒドラジノ)-D-グルシトールの正分子イオン ($[M+H]^+$) に相当する $m/z = 491$ のシングルマスキログラムでは14. 6分にピークが観察され、リテンションタイム、マススペクトル共に標準の完全アセチル化1-デオキシ-1-(N, N'-ジアセチルヒドラジノ)-D-グルシトールのそれと一致した。

10 (d) ピレン化ラクトースのメチル化

(a) で得られた精製ピレン化ラクトース、100 nmol をスクリュウキャップ付ガラス試験管にとり減圧乾固した。残渣にピリジン：無水酢酸（2対1）の混合液を200 μ l 加え、よく攪拌後室温にて16時間放置した。試料を遠心濃縮機にて乾固したのち、残渣にメタノールを100 μ l 加えて再乾固した。この試料についてAnumulaらの方法(Anumula, K. R. および Taylor, P. B., Anal. Biochem., 203, 101-108 (1992))を用いてピレン化ラクトースの完全メチル化処理を施し、クロロホルムにて抽出後減圧乾固した。

(e) メチル化ピレン化ラクトースのメタノリシス

(d) で得られたメチル化ピレン化ラクトース（50 nmol 相当）をガラス試験管にいれ乾固した。試験管に5%塩酸-メタノール（ナカライテスク社）を100 μ l 添加し、封管後90°Cにて4時間加温した。試験管を開管し、遠心濃縮機にて試料を乾固し、分解産物を得た。

(f) GC/MS分析

(e) で得られたメチル化ピレン化ラクトースのメタノリシス後の残渣に、ピリジン：無水酢酸（2対1）の混合液を100 μ l 加え、よく攪拌後室温にて16時間放置した。試料を遠心濃縮機にて乾固したのち、残渣にアセトニトリルを200 μ l 加えて溶解し、そのうちの1 μ l をGC/MSにスプリットレス導入し分析した。GC/MS分析の条件は以下に示すとおりである。

System: GCQ (Finnigan MAT)

Column: DB-5 (5% diphenyl-95% dimethyl polysiloxane, 0.25 mm i.d. x 30 m, 0.25 micrometer film thickness) (J & W Scientific)

Carrier: Helium (40 cm/sec)

Ionization: CI (Isobutane)

5 Injector temperature: 300°C

Column initial temperature: 90°C

Time program: 90°C for 2 min, 90°C-24°C/min-210°C, and 210°C-4°C/min-300°C

Injection: 1 microliter (splitless injection)

10 11. 3分に観察された主ピークのマスペクトルをとると、4-O-アセチル-1-デオキシ-2, 3, 5, 6-O-テトラメチル-1-(N, N'-ジアセチル-N'メチルヒドラジノ)-D-グルシトールの正分子イオンピーク ($[M+H]^+$) に相当する $m/z = 393$ が観察された。

実施例 4

15 部分メチル化/アセチル化ヒドラジノ単糖誘導体 (partially methylated 1-deoxy-1-hydrazino alditol acetates, PMHAA) の調製

ラクトース (Gal β 1-4 Glc) (ナカライテスク社)、マンノビオース (Man α 1-2 Man) (デキストララボラトリーズ社)、マンノトリオース (Man α 1-6 [Man α 1-3] Man) (デキストララボラトリーズ社)、
20 N-アセチルラクトサミン (Gal β 1-4 GlcNAc) (生化学工業社) 各 10 μ mol ずつを、WO 96/17824 号 (特表平 11-501901) 記載の方法で N, N'-ジアセチル化ヒドラジノ誘導体化した。各オリゴ糖の N, N'-ジアセチル化ヒドラジノ誘導体のうち 1 μ mol ずつを Anumula らの方法 (既述) で完全メチル化した。得られた完全メチル化オリゴ糖 N, N'-ジアセチル化ヒドラジノ誘導体をガラス試験管にいれ乾固した。試験管に 5% 塩酸-メタノール (ナカライテスク社) を 500 μ l 加え、封管後 90°C にて 4 時間加温した。試験管を開管し、遠心濃縮機にて試料を乾固し分解産物を得た。メタノリシス後の残渣に、ピリジン: 無水酢酸 (2 対 1) の混合液を 300 μ l 加え、よく攪拌後 37°C にて 2 時間加温した。試料を遠心濃縮機にて乾固したのち、残渣

にアセトニトリル水溶液を1000 μ l 加えて溶解し、各PMHAAを回収した。

GC/MS分析

各PMHAAアセトニトリル溶液1 μ l (出発物質1 nmolに相当) をGC/MSに
5 スプリットレス導入し分析した。GC/MS分析の条件は以下に示すとおりである。

System: GCQ (Finnigan MAT)

Column: DB-5 (5% diphenyl-95% dimethyl polysiloxane, 0.25 mm i.d. x 30 m,
0.25 micrometer film thickness) (J & W Scientific)

Carrier: Helium (40 cm/sec)

10 Ionization: CI (Isobutane)

Injector temperature: 300°C

Column initial temperature: 90°C

Time program: 90°C for 2 min, 90°C-24°C/min-210°C, and 210°C-4°C/min-
300°C

15 Injection: 1 microliter (splitless injection)

各PMHAAサンプルともGC/MS分析では複数のピークが観察されたが、それぞれの化学イオン化マススペクトルに見られる分子正イオンによってPMHAAのピークを同定した。

この結果より、ラクトースからは4-O-アセチル-1-デオキシ-2, 3,
20 5, 6-O-テトラメチル-1-(N, N'-ジアセチル-N'メチルヒドラジノ)-D-グルシトール (4-O-acetyl-1-deoxy-2, 3, 5, 6-O-tetramethyl-1-(N, N'-diacetyl-N'-methylhydrazino)-D-glucitol) が、マンノビオースからは2-O-アセチル-1-デオキシ-3, 4, 5, 6-O-テトラメチル-1-(N, N'-ジアセチル-N'メチルヒドラジノ)-D-マンニトール (2-O-acetyl-1-deoxy-3, 4, 5, 6-O-tetramethyl-1-(N, N'-diacetyl-N'-methylhydrazino)-D-mannitol) が、マンノトリオースからは3, 6-O-ジアセチル-1-デオキシ-2, 4, 5-O-トリメチル-1-(N, N'-ジアセチル-N'メチルヒドラジノ)-D-マンニトール (3, 6-O-diacetyl-1-deoxy-2, 4, 5-O-trimethyl-1-(N, N'-diacetyl-N'-methylhydrazino)-D-mannitol) が、N-アセチルラクト

サミンからは4-O-アセチル-1, 2-ジデオキシ-3, 5, 6-O-トリメチル-1-(N, N'-ジアセチル-N'メチルヒドラジノ)-D-グルシトール (4-O-acetyl-1,2-dideoxy-3, 5, 6-O-trimethyl-2-(N-methylacetoamido)-1-(N, N'-diacetyl-N'-methylhydrazino)-D-glucitol) がそれぞれ得られたことを
5 確認した。

ラクトースから得た4-O-アセチル-1-デオキシ-2, 3, 5, 6-O-テトラメチル-1-(N, N'-ジアセチル-N'メチルヒドラジノ)-D-グルシトール (4-O-acetyl-1-deoxy-2, 3, 5, 6-O-tetramethyl-1-(N, N'-diacetyl-N'-methylhydrazino)-D-glucitol) のGC/MS分析では11.4分の

10 ピークの化学イオン化マススペクトルに正分子イオンピーク ($[M+H]^+$)、 $m/z = 393$ が検出された。マンノビオースから得た2-O-アセチル-1-デオキシ-3, 4, 5, 6-O-テトラメチル-1-(N, N'-ジアセチル-N'メチルヒドラジノ)-D-マンニトール (2-O-acetyl-1-deoxy-3, 4, 5, 6-O-tetramethyl-1-(N, N'-diacetyl-N'-methylhydrazino)-D-mannitol) のGC/M
15 S分析では11.1分のピークの化学イオン化マススペクトルに正分子イオンピーク ($[M+H]^+$)、 $m/z = 393$ が検出された。マンノトリオースから得た3, 6-O-ジアセチル-1-デオキシ-2, 4, 5-O-トリメチル-1-(N, N'-ジアセチル-N'メチルヒドラジノ)-D-マンニトール (3, 6-O-diacetyl-1-deoxy-2, 4, 5-O-trimethyl-1-(N, N'-diacetyl-N'-

20 methylhydrazino)-D-mannitol) のGC/MS分析では13.1分のピークの化学イオン化マススペクトルに正分子イオンピーク ($[M+H]^+$)、 $m/z = 421$ が検出された。N-アセチルラクトサミンから得た4-O-アセチル-1, 2-ジデオキシ-3, 5, 6-O-トリメチル-1-(N, N'-ジアセチル-N'メチルヒドラジノ)-D-グルシトール (4-O-acetyl-1,2-dideoxy-3, 5, 6-O-trimethyl-2-(N-methylacetoamido)-1-(N, N'-diacetyl-N'-methylhydrazino)-D-glucitol) のGC/MS分析では14.5分のピークの化学
25 イオン化マススペクトルに正分子イオンピーク ($[M+H]^+$)、 $m/z = 434$ が検出された。

実施例5

紫外吸光標識ヒドラジド誘導体の調製とメチル化分析

5 $5 \mu\text{mol}$ のグルコース (ナカライテスク)、ソホロース ($\text{Glc}\beta 1-2\text{Glc}$ 、シグマ社)、ラミナリビオース ($\text{Glc}\beta 1-3\text{Glc}$ 、生化学工業)、マルトース ($\text{Glc}\alpha 1-4\text{Glc}$ 、関東化学)、イソマルトース ($\text{Glc}\alpha 1-6\text{Glc}$ 、生化学工業) をそれぞれよく乾燥し、そこへ $25 \mu\text{mol}$ のベンゾイルヒドラジン (Benzoylhydrazine) (東京化成) を含むジメチルスルホキシド (Dimethylsulfoxide, DMSO) 溶液を $25 \mu\text{l}$ 加え、超音波処理により糖類を十分に溶解した。そこへ $2.5 \mu\text{l}$ の酢酸を加えてよく攪拌した後、反応液を 90°C にて 1 時間加温した。遠心濃縮機にて反応液を乾固した後、残渣に 2.5M ボラン・ジメチルアミン錯体 (Borane-dimethylamine complex)、 30% 酢酸を含む DMSO 溶液を $50 \mu\text{l}$ 添加し、超音波処理により残渣を十分に溶解した後、 37°C にて 16 時間加温した。反応液を遠心濃縮機にて乾固した後、アセトニトリル添加と乾固を繰り返した。残渣を $100 \mu\text{l}$ の水で溶解し、過剰の試薬を $300 \mu\text{l}$ の水飽和酢酸エチルで 3 回抽出し除去した。WO 96/17824 号 (特表平 11-501901) に記載の方法をもちいて N-アセチル化をおこない、
15 ダウエックス (Dowex) 50W-X8 (室町化学) にて脱塩後、さらに HPLC にて精製し N-アセチル化ベンゾイルヒドラジン糖誘導体類をえた。

なお、HPLC の条件は下記の通りである。

Pump: LC6A (Shimadzu)

20 Column: Asahipak NH2P-50 (4.6 mm i.d. x 250 mm) (Showa Denko)

Solvent A: Acetonitrile/water, 95:5

Solvent B: Acetonitrile/water, 1:1

Flow rate: 1 ml/min

Temperature: 40°C

25 Gradient: 0-100% Solvent B in 30 min

Detection: Absorbance at 270 nm

各 N-アセチル化ベンゾイルヒドラジン糖誘導体類のうち $1 \mu\text{mol}$ ずつを Anumula らの方法 (既述) で完全メチル化した。得られた完全メチル化 N-アセチル化ベンゾイルヒドラジン糖誘導体の 20 分の 1 量をガラス試験管にいれ乾固

した。試験管に0.5 M塩酸含有80%酢酸水溶液を100 μ l 加え、封管後100°Cにて6時間加温した。試験管を開管し、遠心濃縮機にて試料を乾固し分解産物を得た。残渣にピリジン：無水酢酸（2対1）の混合液を200 μ l 加え、よく攪拌した後37°Cにて16時間加温した。試料を遠心濃縮機にて乾固したのち、残渣にアセトニトリル水溶液を100 μ l 加えて溶解し、PMHAAを回収した。

GC/MS分析

PMHAAアセトニトリル溶液1 μ l（出発物質1 nmolに相当）をGC/MSにスプリットレス導入し分析した。GC/MS分析の条件は以下に示すとおりである。

System: GCQ (Finnigan MAT)

Column: DB-5 (5% diphenyl-95% dimethyl polysiloxane, 0.25 mm i.d. x 30 m, 0.25 micrometer film thickness) (J & W Scientific)

Carrier: Helium (40 cm/sec)

Ionization: CI (Isobutane)

Injector temperature: 300°C

Column initial temperature: 90°C

Time program: 90°C for 2 min, 90°C-24°C/min-210°C, and 210°C-12°C/min-300°C

Injection: 1 microliter (splitless injection)

いずれのPMHAAのトータルマスクロマトグラムにおいても複数のピークが観察された。N-アセチル化ベンゾイルヒドラジングルコース由来サンプルの期待されるPMHAAの正分子イオン（ $[M+H]^+$ ）、 $m/z = 393$ のシングルマスクロマトグラムでは、9.2分にシングルピークを与えた。残り4サンプルの期待されるPMHAAの正分子イオン（ $[M+H]^+$ ）、 $m/z = 393$ のシングルマスクロマトグラムでは、N-アセチル化ベンゾイルヒドラジンソホロース由来サンプルは、9.4分に、N-アセチル化ベンゾイルヒドラジンラミナリビオース由来サンプルは、9.5分に、N-アセチル化ベンゾイルヒドラジンマルトース由来サンプルは、9.6分に、N-アセチル化ベンゾイルヒドラジンイソマルトース由来サンプルは、10.2分に、それぞれシングルピークを与えた。

各サンプルのPMHAAのピークのマススペクトルは、サンプルによって明らかに異なっており、これらのマススペクトル、すなわちPMHAAの開裂パターンの違いによってアセチル基の位置が同定できることが明らかとなった。

実施例 6

5 標識ヒドラジノ誘導体のN-アセチル化物の調製と安定性試験

50 μ mol のN-アセチルラクトサミン（生化学工業；以下、LNと略す）をよく乾燥し、そこへ100 μ mol のベンゾイルヒドラジン（Benzoylhydrazine）（東京化成）を含むDMSO溶液を100 μ l加え、超音波処理により糖類を十分に溶解した。そこへ80 μ lのDMSOと20 μ lの酢酸を加えてよく攪拌した後、反応液を90℃にて1時間加温した。加熱下、遠心濃縮機にて反応液を乾固した後、残渣に2M水素化ホウ素ナトリウム（ナカライテスク）を含有する25%アセトニトリル水溶液を500 μ l加えて良く攪拌し、室温で一晩放置した。反応液に純水を500 μ l加えたのち、溶液のpHが5付近になるまで酢酸を滴下し反応液を中和した。試験管に中和した溶液を800 μ lとり、さらに、純水を1ml加えて希釈し、WO96/17824号（特表平11-501901）に記載の方法をもちいてN-アセチル化をおこない、ダウエックス(Dowex) 50W-X8（室町化学）にて脱塩後、さらにHPLCにて精製しLNのベンゾイルヒドラジン誘導体（以下、LNベンゾイルヒドラジン誘導体と略す）のN-アセチル化物をえた。なお、同時にN-アセチル化しないLNベンゾイルヒドラジン誘導体の調製を行った。50 μ molのLN（生化学工業）をよく乾燥し、そこへ100 μ molのベンゾイルヒドラジン（東京化成）を含むDMSO溶液を100 μ lくわえ、超音波処理により糖類を十分に溶解した。そこへ80 μ lのDMSOと20 μ lの酢酸を加えてよく攪拌した後、反応液を90℃にて1時間加温した。加熱下、遠心濃縮機にて反応液を乾固した後、残渣に2M水素化ホウ素ナトリウムを含有する25%アセトニトリル水溶液を500 μ l加えて良く攪拌し、室温で一晩放置した。反応液に純水を500 μ l加えたのち、溶液のpHが5付近になるまで酢酸を滴下し反応液を中和した。中和した反応液のうち200 μ lをとり、遠心濃縮機で乾固した後、HPLCにて精製し、LNベンゾイルヒドラジン誘導体をえた。HPLCの条件はいずれも下記の通り

である。

Pump: LC6A (Shimadzu)

Column: Asahipak NH2P-50 (4.6 mm i.d. x 250 mm) (Showa Denko)

Solvent A: Acetonitrile/water, 95:5

5 Solvent B: Acetonitrile/water, 1:1

Flow rate: 1 ml/min

Temperature: 40°C

Gradient: 0-100% Solvent B in 30 min

Detection: Absorbance at 270 nm

10 精製したLNベンゾイルヒドラジン誘導体およびそのN-アセチル化物各25 nmolずつを、5 μ lの10%酢酸含有DMSO溶液、5 μ lの30%酢酸含有DMSO溶液、5 μ lの50%酢酸含有DMSO溶液にそれぞれ溶解し、37°Cにて一晩加温した。溶液を乾固した後、5 μ lの純水で再溶解し、そのうちの0.5 μ lをHPTLC (メルク) にスポットし、80%アセトニトリル水溶液にて展開後、オルシノール硫酸法にて中性糖を検出した。

15

薄層クロマトグラフィーの結果を図1に示す。なお図1において、レーン1は無処理のLNベンゾイルヒドラジン誘導体を、レーン2は10%酢酸含有DMSO溶液中で保温したLNベンゾイルヒドラジン誘導体を、レーン3は30%酢酸含有DMSO溶液中で保温したLNベンゾイルヒドラジン誘導体を、レーン4は50%酢酸含有DMSO溶液中で保温したLNベンゾイルヒドラジン誘導体を、

20 レーン5は無処理のLNベンゾイルヒドラジン誘導体のN-アセチル化物を、レーン6は10%酢酸含有DMSO溶液中で保温したLNベンゾイルヒドラジン誘導体のN-アセチル化物を、レーン7は30%酢酸含有DMSO溶液中で保温したLNベンゾイルヒドラジン誘導体のN-アセチル化物を、レーン8は50%酢酸含有DMSO溶液中で保温したLNベンゾイルヒドラジン誘導体のN-アセチル化物をそれぞれ展開したレーンである。

25

LNベンゾイルヒドラジン誘導体は酸条件下でTLC上で移動度の小さい物質に変化した。LNベンゾイルヒドラジン誘導体のN-アセチル化物には全く変化はなく、ベンゾイルヒドラジン誘導体のN-アセチル化物の化学的安定性が示

された。

産業上の利用の可能性

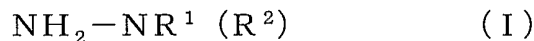
- 5 本発明によれば、単離された糖類でなくとも、その還元末端に位置する単糖類の種類および置換位置を決定することのできる手段が提供される。

請 求 の 範 囲

1. 少なくとも、下記工程：

(a) 還元末端を有する糖類と、式 (I)：

5



[式中、 R^1 は、検出可能な標識および／または固定支持体をその一部として有するか、あるいは検出可能な標識および／または固定支持体に結合可能であり、 R^1-N 間の結合が、グリコシド結合を分解可能な反応によって分解可能な結合である、水素以外の基であり、 R^2 は水素または炭素数1～8のアルキル基である]

10

で表されるヒドラジン類とを反応させてヒドラゾンを製造する工程：

(b) 工程 (a) で得られたヒドラゾンをヒドラジノ誘導体に還元する工程、および

(c) 工程 (b) で得られたヒドラジノ誘導体を、グリコシド結合を分解可能な反応により分解し、ヒドラジノ単糖類誘導体を得る工程、を包含することを特徴とするヒドラジノ単糖類誘導体の製造方法。

15

2. 工程 (b) で得られるヒドラジノ誘導体を工程 (c) に付す前に、該ヒドラジノ誘導体のN-アセチル化を行なう請求項1記載の方法。

3. 工程 (b) で得られるヒドラジノ誘導体もしくはN-アセチル化されたヒドラジノ誘導体を工程 (c) に付す前に、該ヒドラジノ誘導体の水酸基をメチル化する請求項1記載の方法。

20

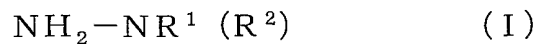
4. R^1 がアシル基であることを特徴とする請求項1記載の方法。

5. R^1 が紫外もしくは可視吸光物質、蛍光色素または固定支持体をその一部として有するアシル基である請求項1記載の方法。

25

6. 少なくとも下記工程：

(a) 還元末端を有する糖類と、式 (I)：



[式中、 R^1 は、検出可能な標識および／または固定支持体をその一部として有するか、あるいは検出可能な標識および／または固定支持体に結合可能であり、 R^1-N 間の結合が、グリコシド結合を分解可能な反応によって分解可能な結合である、水素以外の基であり、 R^2 は水素または炭素数1～8のアルキル基である]

で表わされるヒドラジン類とを反応させてヒドラゾンを製造する工程、

(b) 工程(a)で得られたヒドラゾンをヒドラジノ誘導体に還元する工程、

(c) 工程(b)で得られたヒドラジノ誘導体を、グリコシド結合を分解可能な反応により分解し、ヒドラジノ単糖類誘導体を得る工程、

(d) 工程(c)で得られたヒドラジノ単糖類誘導体を完全にアセチル化する工程、および

(e) 工程(d)で得られた完全にアセチル化されたヒドラジノ単糖類誘導体を同定する工程、

を包含することを特徴とする還元末端を有する糖類における還元末端単糖の同定および／または還元末端単糖の隣接単糖類との結合位置決定方法。

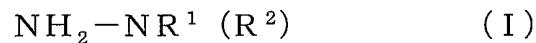
7. 工程(b)で得られるヒドラジノ誘導体を工程(c)に付す前に、該ヒドラジノ誘導体のN-アセチル化を行なう請求項6記載の方法。

8. 工程(b)で得られるヒドラジノ誘導体もしくはN-アセチル化されたヒドラジノ誘導体を工程(c)に付す前に、該ヒドラジノ誘導体の水酸基をメチル化し、工程(e)において還元末端単糖の隣接単糖類との結合位置を決定する請求項6記載の方法。

9. 工程(e)における同定がガスクロマトグラフィー／質量分析(GC/MS)によって実施される請求項6記載の方法。

10. 少なくとも下記工程：

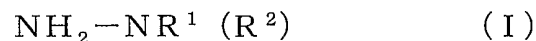
(a) 還元末端を有する糖類と、式(I)：



[式中、 R^1 は、検出可能な標識および／または固定支持体をその一部として有するか、あるいは検出可能な標識および／または固定支持体に結合可能であり、 R^1-N 間の結合が、グリコシド結合を分解可能な化学的反応によって分解可能な結合である、水素以外の基であり、 R^2 は水素または炭素数1～8のアルキル基である]

で表されるヒドラジン類とを反応させることによりヒドラゾンを製造する工程
(b) 工程(a)で得られたヒドラゾンをヒドラジノ誘導体に還元する工程、
(c) 工程(b)で得られたヒドラジノ誘導体を、N-アセチル化する工程、
を包含する還元末端を有する糖類の標識方法。

10 1 1. 請求項1記載の方法において使用される式(I) :



[式中、 R^1 は、検出可能な標識および／または固定支持体をその一部として有するか、あるいは検出可能な標識および／または固定支持体に結合可能であり、
15 R^1-N 間の結合が、グリコシド結合を分解可能な反応によって分解可能な結合である、水素以外の基であり、 R^2 は水素または炭素数1～8のアルキル基である]

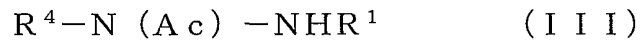
で表わされるヒドラジン類。

20 1 2. 請求項1 1記載のヒドラジン類を含むことを特徴とするヒドラジノ単糖類誘導体の製造用キット。

1 3. 請求項1 1記載のヒドラジン類を含むことを特徴とする糖類における還元末端単糖の同定および／または還元末端単糖の隣接単糖類との結合位置決定用キット。

25 1 4. 請求項1 1記載のヒドラジン類を含むことを特徴とする還元末端を有する糖類の標識用キット。

1 5. 式(I I I)で表される糖類 :

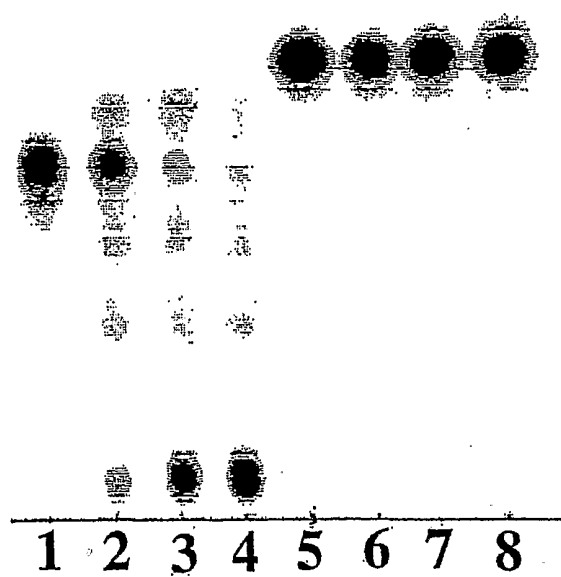


- 〔式中、Acはアセチル基、R¹は、検出可能な標識および／または固定支持体をその一部として有するか、あるいは検出可能な標識および／または固定支持体に結合可能であり、R¹-N間の結合が、グリコシド結合を分解可能な化学的反応によって分解可能な結合である、水素以外の基であり、R⁴は、糖類とのグリコシド結合を有していてもよい、1-デオキシアルドースのC-1位に結合した水素が除去された基もしくは2-デオキシケトースのC-2炭素に結合した水素が1つ除去された基である。ただしR¹がアセチル基であり、かつ、R⁴が糖類とのグリコシド結合を有していない、1-デオキシアルドースのC-1位に結合した水素が除去された基もしくは2-デオキシケトースのC-2炭素に結合した水素が1つ除去された基である場合を除く〕。

16. R¹がアシル基であることを特徴とする請求項15記載の糖類。

1/1

図 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06524

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C07H1/00, C07C243/10, G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C07H1/00, C07C243/10, G01N33/58

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 91/18912 A1 (University of Texas System), 12 December, 1991 (12.12.91),	11, 14
Y	& AU 9180564 A & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, Ohio, USA), DN.116:231337	1-10, 12, 13, 15, 16
Y	EP 867722 A2 (Takara Shuzo Co., Ltd.), 30 September, 1998 (30.09.98), & JP 10-267931 A & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, Ohio, USA), DN.129:272666	1-10, 12, 13, 15, 16
A	EP 796241 A2 (Biomembrane Institute), 24 September, 1997 (24.09.97), & WO 96/17824 A2 & US 5585473 A & JP 11-501901 A & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, Ohio, USA), DN.125:168567	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
--	---

Date of the actual completion of the international search
03 October, 2001 (03.10.01)

Date of mailing of the international search report
16 October, 2001 (16.10.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06524

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 649427 A1 (Biomembrane Institute), 26 April, 1995 (26.04.95), & WO 93/24503 A1 & JP 7-507999 A & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, Ohio, USA), DN.121:57876	1-16

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C07H1/00, C07C243/10, G01N33/58		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C07H1/00, C07C243/10, G01N33/58		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 91/18912 A1 (University of Texas System) 12. 12月. 1991 (12. 12. 91)	11, 14
Y	& AU 9180564 A & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN. 116:231337	1-10, 12, 13, 15, 16
Y	EP 867722 A2 (TAKARA SHUZO CO. LTD.) 30. 9月. 1998 (30. 09. 98) & JP 10-267931 A & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN. 129:272666	1-10, 12, 13, 15, 16
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	03. 10. 01	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 森井 隆信  電話番号 03-3581-1101 内線 3451
		4C 9455

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 796241 A2 (Biomembrane Institute) 24. 9月. 1997 (24. 09. 97) & WO 96/17824 A2 & US 5585473 A & JP 11-501901 A & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN. 125:168567	1-16
A	EP 649427 A1 (Biomembrane Institute) 26. 4月. 1995 (26. 04. 95) & WO 93/24503 A1 & JP 7-507999 A & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN. 121:57876	1-16