

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/34

C12P 19/12

C07H 3/04



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 96192398.9

[45] 授权公告日 2005 年 9 月 28 日

[11] 授权公告号 CN 1220779C

[22] 申请日 1996.11.8 [21] 申请号 96192398.9

[30] 优先权

[32] 1995.11.8 [33] ES [31] P9502185

[86] 国际申请 PCT/ES1996/000208 1996.11.8

[87] 国际公布 WO1997/017464 西 1997.5.15

[85] 进入国家阶段日期 1997.9.8

[71] 专利权人 康斯乔最高科学研究公司

地址 西班牙马德里

共同专利权人 尤尼弗西德特奥通诺马公司

[72] 发明人 J·J·阿朗戈雷耶斯

F·J·卡那达维思内

A·费尔那德茨 - 马约拉拉斯阿尔瓦雷茨

R·罗佩茨阿尔 - 瓦雷茨

M·马尔丁罗马斯

D·维拉鲁瓦托雷格罗扎

审查员 李 岚

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 吴玉和 谭明胜

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 1 页

[54] 发明名称 β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖在制备用于测定肠乳糖酶的组合物和溶液中的应用及其生产方法

[57] 摘要

本文公开了用 O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖,特别是 2-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖和 3-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖,在制备用于测定肠乳糖酶的组合物和溶液的应用,此二糖对乳糖酶具有基本上更高的亲和性。本文还公开了生产 O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖的方法,包括:在缓冲至 pH5.0-9.0 的水介质中,在温度 4-37℃下,使 D-木糖和 β -D-吡喃半乳糖基底物在存在 β -半乳糖苷酶的条件下反应;当通过薄层层析法检测到反应已达到生成二糖的最大产量时,通过在 100℃加热使 β -半乳糖苷酶失活,并通过在填充柱中过滤,分离出生成的二糖,所用的稀释剂选自水和水/醇。

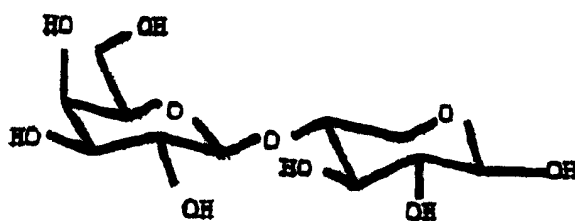
1. β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖在制备用于测定肠乳糖酶的组合物或溶液中的用途，其中所述组合物或溶液含有：

4-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖和 2-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖；

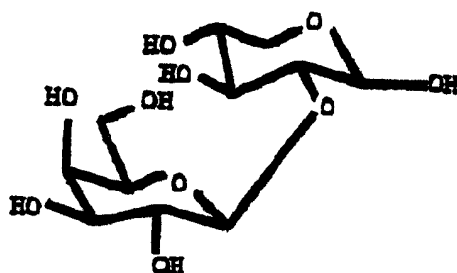
4-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖和 3-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖；或

4-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖、2-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖和 3-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖；

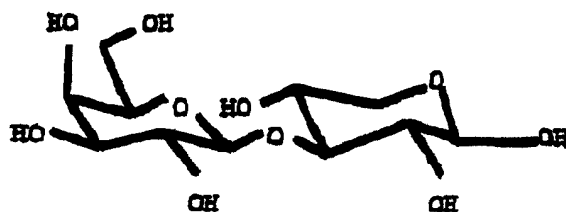
10 所述 4-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖具有下式：



2-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖具有下式：



3-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖具有下式：



2. 权利要求 1 的用途，其中组合物含有药剂学可接受量的至少一种选自如下种类的添加剂：稳定剂、保护剂、增味剂、乳糖、凝胶剂、助溶剂和防腐剂。

3. 权利要求 1 的用途, 其中溶液是水溶液。
4. 权利要求 1 或 3 的用途, 其中溶液是盐水。
5. 权利要求 1 或 3 的用途, 其中溶液还含有药剂学可接受量的至少一种选自如下种类的添加剂: 稳定剂、保护剂、增味剂、乳糖和防腐剂。
- 5 6. 制备权利要求 1 中的二糖 2-O-、3-O-、4-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖的混合物的酶促反应方法, 所述方法包括:
 - a) 使 D-木糖和 β -吡喃半乳糖苷底物, 在存在 β -半乳糖苷酶的情况下反应, D-木糖/ β -吡喃半乳糖苷底物的浓度比为 2-20:1, 在 pH5.0-9.0 的缓冲水溶液基质中, 温度 4-37°C,
 - 10 b) 当根据薄层层析法检测, 反应已达到生成二糖的最大产量时, 通过在 100°C 加热使 β -半乳糖苷酶失活,
 - c) 通过在填充柱中过滤, 分离出生成的二糖, 所用的稀释剂选自水以及水和醇的混合物。
- 15 7. 权利要求 6 的方法, 其中 β -吡喃半乳糖苷底物是 α -硝基苯基- β -吡喃半乳糖苷。
8. 权利要求 6 的方法, 其中 β -吡喃半乳糖苷底物是乳糖。
9. 权利要求 6 的方法, 其中 β -半乳糖苷酶是大肠杆菌 β -D-半乳糖苷酶。
10. 权利要求 6 的方法, 该方法是在存在至少一种可与水混溶的共
20 溶剂的条件下进行的。
11. 权利要求 10 的方法, 其中共溶剂选自乙腈、二甲基甲酰胺、二甲基亚砷以及它们的混合物。
12. 权利要求 6 的方法, 其中被填充的柱子是以 Sephadex G-10 和 Biogel P-2 中的一种填充的。
- 25 13. 权利要求 6 的方法, 其中被填充的柱子是以活性碳填充的。
14. 权利要求 6 的方法, 其中二糖是 2-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖, 3-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖, 和 4-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖的混合物。
- 30 15. 权利要求 6 或 14 的方法, 其中从所形成的二糖中至少分离出 2-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖、3-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖和 4-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖中的一种。

β - D - 吡喃半乳糖基 - D - 木糖在制备用于
测定肠乳糖酶的组合物和溶液中的应用及其生产方法

5

发明的技术范围

导致乳糖消化能力不足，或者甚至完全丧失消化乳糖的能力的肠乳糖酶缺乏或活性低下，虽然对于成年人是一种常见的综合症，但是作为先天性的代谢障碍则是罕见的。大部分哺乳动物，从断奶时开始，都存在乳糖酶活性急剧降低的情况。对于其祖先在长时间过程中，主要依靠消耗乳或乳制品生活的人，这种降低不常见。另一方面，对于正在哺育的婴儿，肠乳糖酶缺乏或活性低下的情况则十分常见。

本发明属于肠乳糖酶活性无血测定领域。

发明背景

测定肠乳糖酶活性对儿科学和胃肠病学都有重要意义，该测定可以在对受试者给药后通过分离粘液样品直接进行，或者可以通过测定血中葡萄糖浓度或呼出的氢含量而间接进行。

直接测定具有需要建立复杂和昂贵的方法的缺点，因为它需要特殊的仪器，并需要非常专业化的技术人员对必须交付后续分析的样品进行提取，且不说它对受试者不是没有危险而令人难以接受。

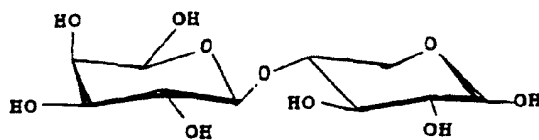
间接测定法具有与血液相关的技术的优点，该技术除了复杂和可能产生误差外，在对样品进行分析之前，还需要专业人员对血液进行提取，产生误差是由于存在受试者摄取的其它食物消化而产生的葡萄糖，以及可能已被迁移的内源性葡萄糖。

测定肠乳糖酶的其它方法基于如下事实：特异性的二糖，由于它们对乳糖酶有亲和性，易作为乳糖酶的底物，被该酶作用转化成特异性单糖，此单糖易被肠吸收，并从尿中消除。

因此，在西班牙专利 ES - P - 478590 和 ES - P - 482073 中公开的方法是基于“体内”的测定法，通过口服给予 3 - O - 甲基乳糖，分析尿中 3 - O - 甲基 - D - 葡萄糖，但是，该方法存在如下缺点，即它需要采用色谱技术检测尿中 3 - O - 甲基 - D - 葡萄糖，这意味着需要复杂和昂贵的设备及分析仪器。

另一方面,在西班牙专利 ES - P - 9001680 中公开了式(I)的二糖 4 - O - β - 吡喃半乳糖基(galactopyranosyl) - D - 木糖的制备,用于检测肠乳糖酶活性。

5



该二糖被口服给药后,在肠道内作为肠乳糖酶的底物,被分解成木糖和半乳糖,木糖被吸收,并通过尿消除,在此可以通过简单的比色法直接对它进行测定。尽管西班牙专利 ES - P - 9001680 的二糖与乳糖有十分相似的结构,但是其本身仍有缺点,即它对乳糖酶有更高的亲和性。这指的是,仅有一部分被消化的 4 - O - β - 吡喃半乳糖基 - D - 木糖被基于乳糖酶的酶活性水解,因而,未分解的木糖和半乳糖部分将随排泄物被消除。这意味着,在作出如下结论时有相当大的误差范围:受试尿样中木糖含量低或甚至不存在木糖,可能是由于乳糖活性不足或丧失,同时由于此二糖对乳糖酶缺乏亲和性,因而水解不充分。为了消除所述误差范围,必须让受试者消化相当量的二糖,但这又可能导致肠道问题如腹泻,和受试者相应的不适。

西班牙专利 ES - P - 9001680 还公开了制备 4 - O - β - 吡喃半乳糖基 - D - 木糖的方法,主要包括从苄基 - β - D - 吡喃木糖苷的合成步骤,随后的操作程序是进行选择保护反应、糖基化作用和去保护。不论是反应阶段的数目,在糖基化反应中应用昂贵的反应试剂如 silver triflate,还是在纯化中间产物和最后产物中应用层析柱,都造成了高成本,使按产业规模实施该生产方法有困难。

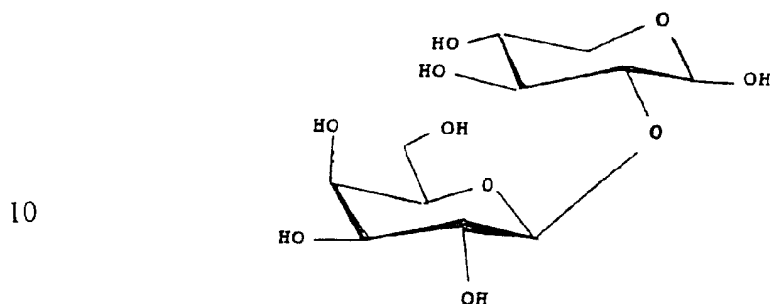
另一方面, Gorin 等在“通过独特掷孢酵母合成 β - 吡喃半乳糖基一和 β - 吡喃葡萄糖基二糖”, Can.J.Chem.42 (1964) 2307 - 2319 中公开了借助纯实验方法合成许多二糖,其中有 2 - O - β - D - 吡喃半乳糖基 - D - 木糖和 3 - O - β - D - 吡喃半乳糖基 - D - 木糖,在此出版物中得出了如下结论:由半乳糖基转移生成的产品,在使用不同接受体的情况下,大多数是来源于仲羟基而不是伯羟基的取代作用,同接受体反应的最低限度的结构要求,似乎是与取代羟基相邻的羟基。但是,

在此出版物中没有公开合成的二糖的任何用途。

发明描述

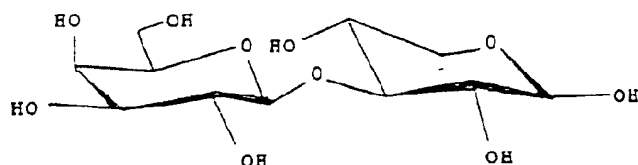
为了克服前述技术状况的缺点，本发明的目的是利用 β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖，特别是通式(II)的2-O- β -D-吡喃半乳糖基

5 -D-木糖：



和通式(III)的3-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖：

15



20

制备用于能无血并可靠地测定肠乳糖酶的组合物和溶液。

另一方面，本发明的另一目的是，借助于比这类型二糖的常规制备方法更简便的方法，制备其应用为本发明所保护的各种 β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖，以及其它各种 β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖的方法。

25 这种 β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖，即其应用为本发明所保护的2-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖和3-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖，比在这种类型测定中常规使用的二糖，对乳糖酶具有更高的亲和性，鉴于这二种化合物比以前使用的化合物，如4-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖，与乳糖在结构上更少相似的事实，这种结果是令人吃惊的，通过分子中分别与配糖键相邻的不同羟基，可从

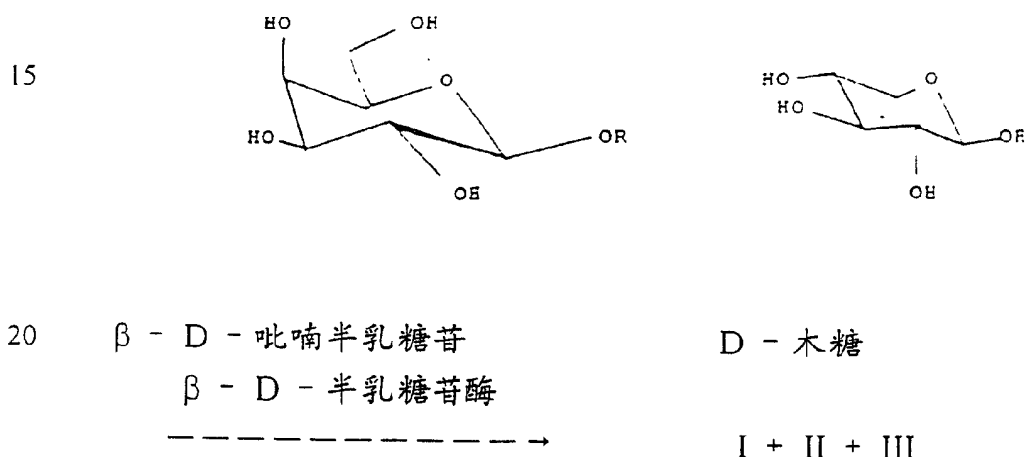
30 结构上把它们与4-O- β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖区分开。

式(II)和(III)的二糖可以包含在其本身常规的组合物和溶液中，它们

可以单独或结合存在，或者甚至可以与一定量的常规式(I)二糖，和/或少量乳糖混合。这种组合物和溶液可能含有其本身常规的，药剂学可接受的至少一种选自如下种类的添加成分：稳定剂、保护剂、增味剂、乳糖、凝胶剂（gelifiants）、助溶剂（fluxants）和防腐剂。这种溶液可以是其本身常规的水，水溶液或盐溶液。

已经观察到，即使使用三个二糖(I)、(II)和(III)的混合物，通过存在于尿中被清除的木糖对肠乳糖酶活性的测定，其结果也比仅用二糖(I)给药进行的测定明显提高，这清除地显示了本发明固有的惊人效果。

本发明的制备方法可以包括制备包括前述二糖I、II和III的 β -D-吡喃半乳糖基-D-木糖，并包含如下步骤：使D-木糖和底物 β -D-吡喃半乳糖苷，按照如下反应式，在存在 β -半乳糖苷酶的情况下反应：



D-木糖的浓度超过 β -D-吡喃半乳糖苷浓度的2至20倍，在缓冲至pH5.0 - 9.0的水介质中，在温度4 - 37℃下，当借助于薄层层析或以活性碳柱检测到已达到生成二糖的最大产量时（通常在4 - 8小时之后），通过在100℃加热使 β -半乳糖苷酶失活，并通过在以选定的水或水/醇配制的稀释填料装填的柱中过滤，分离出生成的二糖，这样，得到了二糖(I)、(II)和(III)的混合物，它们既可以以三种二糖混合物的形式包含在组合物或溶液中，也可在用相应的方法分离出二糖(II)或(III)中的一种之后，再与二糖(I)形成混合物，或者还可以单独地包含在组合物或溶液中。

在制备方法的一个实施方案中，所用的 β -D-吡喃半乳糖苷是

- 硝基苯基 β - D - 吡喃半乳糖苷, 而在另一个实施方案中是乳糖。

另一方面, β - 吡喃半乳糖苷酶可以是例如大肠杆菌, 其被 Spanish Company SIGMA - ALDRICH QUIMICA, S.A 商品化。

本制备方法可以在存在可与水混溶的共溶剂的情况下进行, 所述共
5 溶剂如乙腈, 二甲基甲酰胺, 或二甲亚砞。

用于分离二糖的过滤柱可以用 Sephadex™ G - 10 或 Biogel™ P-2 装填, 也可以用活性碳装填。

二糖 II 和 III 还可以通过其它常规的方法得到, 如 Gorin 等在“通过独特拟酵母合成 β - 吡喃半乳糖基一和 β - 吡喃葡萄糖基二糖”, Can. J.
10 Chem.42(1964)2307-2319 中公开的方法。

附图简述

如实施例所述, 此唯一的附图显示在大鼠生长过程中, a) β - D - 吡喃半乳糖基 - D - 木糖(I)、(II)和(III)的混合物在体内的水解, 以尿中被消除的木糖百分数表示, b) 肠乳糖酶活性 (nm/min/mg 蛋白质)。

15 本发明的实施方案

下面的实施例将对本发明的有关方面进行示例性的说明, 但并非是对本发明的限制。

实施例 1: 4 - O - β - D - 吡喃半乳糖基 - D - 木糖 (二糖 I), 2 - O - β - D - 吡喃半乳糖基 - D - 木糖 (二糖 II) 和 3 - O - β - D - 吡喃半乳糖基 - D - 木糖 (二糖 III) 的混合物的制备。
20

将 SIGMA 大肠杆菌 β - 半乳糖苷酶 (1.5mg, 560U) 加入在缓冲液 (0.05M KH_2PO_4 , 1mM MgCl_2 , 5mM 巯基乙醇, 265ml, pH7.0) 中配制的 δ - 硝基苯基 β - 吡喃半乳糖苷 (4g, 50mM) 的木糖 (20g, 500mM) 溶液中, 此混合物在 25 °C 温育 5 小时 45 分钟。此后, 将混合物在 100 °C 加热 10 分钟, 再使之浓缩, 并将此所得的残余物入活性碳柱中, 用水 - 乙醇 1:0 $\rightarrow$ 85:15 的梯度洗脱。首先是单糖木糖和半乳糖被洗脱出, 然后是二糖 I, II 和 III 的混合物, 得到 2g 二糖混合物 (相当于等当量起始 δ - 硝基苯基 β - 吡喃半乳糖苷的 50 %), I : II : III 比率分别为 8.6 : 1.4 : 1.0。
25

30 对于二糖 I, II 和 III 含有的不同官能团, 其中一些可以被各自独立地区分, 这些官能团可通过 RNM 对它们进行鉴定。以 Varian XL-300 分光计测定的二糖 I 组分的 ^1H - RMN 光谱 (300MHz, D_2O), 同以前

制备的产品相同。

为了对二糖 II 和 III 中所形成键的化学部位作明确的鉴别和测定, 将该化合物的浓缩组分乙酰化, 并通过半制备性 HPLC (正常相柱 SiO_2 , 己烷-醋酸乙酯 1:1, 以折射率检测) 将生成的产物分离。接着, 对每一个生成的衍生物测定其 ^1H RMN 光谱 (300MHz, CDL_3):

2 - O - β - D - 吡喃半乳糖基 - 6 - D - 吡喃木糖的乙酰化衍生物。

2 - O - β - D - 吡喃半乳糖基 - β - D - 吡喃木糖的乙酰化衍生物。

10 3 - O - β - D - 吡喃半乳糖基 - 6 - D - 吡喃木糖的乙酰化衍生物。

3 - O - β - D - 吡喃半乳糖基 - β - D - 吡喃木糖的乙酰化衍生物。

从层析柱中得到的二糖 I, II 和 III 的比率可通过气相色谱法测定, 所用色谱仪装备有火焰离子化检测器和毛细管柱 SE - 54 (固定相: 5 % 联苯和 95 % 二甲基聚硅氧烷 (polysiloxane), 长度 15m, 内径 0.15mm, 厚度 μm)。在此分析中, 使用了 1mL/min 的氮气流。使用的温度程序是: 起始温度 160 $^\circ\text{C}$, 起始时间 2 分钟, 温度增加 5 $^\circ\text{C}/\text{min}$, 最终温度: 250 $^\circ\text{C}$ 。使样品通过如下步骤的三甲基硅化处理后再进行分析: 将等分试样 (10 μl) 在 100 $^\circ\text{C}$ 加热 10 分钟, 然后加入含有作为内部参照物苄基 β -吡喃木糖苷 (10mM) 的吡啶 (25 μl), 以及 N - 三甲基硅咪唑 (N - trimethyl sylimidazol) (25 μl), 在 60 $^\circ\text{C}$ 继续加热 30 分钟。由不同二糖产生的峰保留时间为如下:

- 苄基 β -吡喃木糖苷 (内部参照物): 12.04min,
- 25 - 二糖 I: 20.35 和 20.50min,
- 二糖 II: 18.46 和 19.50min,
- 三糖 III: 18.30min

实施例 2: 体外水解作用的动力学测定

按照 A.Rivera - Sagredo, F.J. - Canada, O.Nieto, J.Jimenez- Barbero 和 M.Martin - Lomas, Eur.J.Biochem., 209(1992)415 - 422 的方法, 用绵羊肠乳糖酶, 在 pH6.0 将二糖 I, II 和 II, 以及乳糖水解, 得到如下有关米氏常数 (K_m) 和最大反应速率 (V_{max}) 的结果:

	二糖	K_m (mM)	V_{max} (%)
	乳糖	11.0	100
	二糖 I	340.0	20
	二糖 II	14.0	20
5	二糖 III	4.0	70

可以看出，二糖 II 和 III 的米氏常数都比二糖 I 的米氏常数低，二糖 III 的 K_m 甚至比乳糖的更低，明显表明二糖 II 和 III 对乳糖酶具有非常大的亲和性。

实施例 3：口服二糖 I，II 和 III 的混合物后尿中木糖的清除。

10 将按实施例 1 的方法制备的二糖 I，II 和 III 的混合物（比例分别为 8.6:1.4:1.0）用于检测肠乳糖酶的活性。为此，使用了来自同一窝的一组 Spraque - Dawley 12 天龄的幼鼠 17 只，先与母鼠隔离，禁食 6 小时。此后，通过经腹部膀胱压迫法，对每只动物收集基础尿液，并立即用灌胃针头，对每只动物给予在 0.3ml 蒸馏水中稀释的二糖混合物 18.2mg。从
15 此时开始，连续收集尿液 5 小时，借助于基于 fluoroglucinol 反应的比色分析法，在尿液中测定被清除的木糖，并用基础尿液作目标。收集尿液之后，立即活杀其中 3 只动物，对其肠粘膜内的乳糖酶活性进行直接测定。为此，先将小肠段吸干，洗净，借助玻璃研磨器作匀浆收集粘液，用分光光度法测定匀浆中乳糖酶的活性。余留下的动物被送回母鼠，在
20 此后 15，18，21，24 和 30 天龄，用这些动物在同样的条件下重复上述实验测定，直到整窝动物被用完。实验结果的平均值显示在附图中，其中显示了在大鼠生长过程中二糖 I，II 和 III 的混合物在体内的水解作用，以及肠乳糖酶的活性。为此目的，以被清除的木糖（%）（曲线 a），以及乳糖酶活性（nM/min/mg 蛋白质）（曲线 b），对鼠龄（天）作图。
25 这些试验结果表明：

- 1)检测到存在于尿中的木糖，它们来自于通过肠乳糖酶的作用，对所施用的二糖的水解，
- 2)尿中木糖的清除进程起始于口服，是与肠乳糖酶活性的已知生理学变化过程平行发展的，此酶活性在个体发育的整个过程中逐渐降低。该试
30 验表明，本方法对“体内”肠乳糖酶活性的测定是有用的，以诊断为目的的以无血检验方式进行的，用于测定该酶活性的本方法，对怀疑存在该酶缺乏的幼小个体是特别适用的。

实施例 4：

将一组同窝的 15 天龄 Sprague - Dawley 幼鼠，在 30 ℃ 的代谢盒内禁食 4 小时。对每只动物给予溶于 0.5ml 蒸馏水的二糖 I 18.2g。通过腹部压迫膀胱，收集动物 5 小时内的尿液。用分光光度法测定这段时间内尿
5 中清除的木糖。木糖清除的结果是 21 %，也就是说，比给予 I，II 和 III 混合物 15 天时得到的结果的一半还小。

通过将来自本实施例的数据与实施例 3 的数据进行比较，显然，二糖 II 和 III 在“体内”的亲合性是如此之高，以致当此三种二糖被混合给予，并且其中二糖 I 占优势时，它们仍可使二糖 I 的最低的亲合性得到补
10 偿。

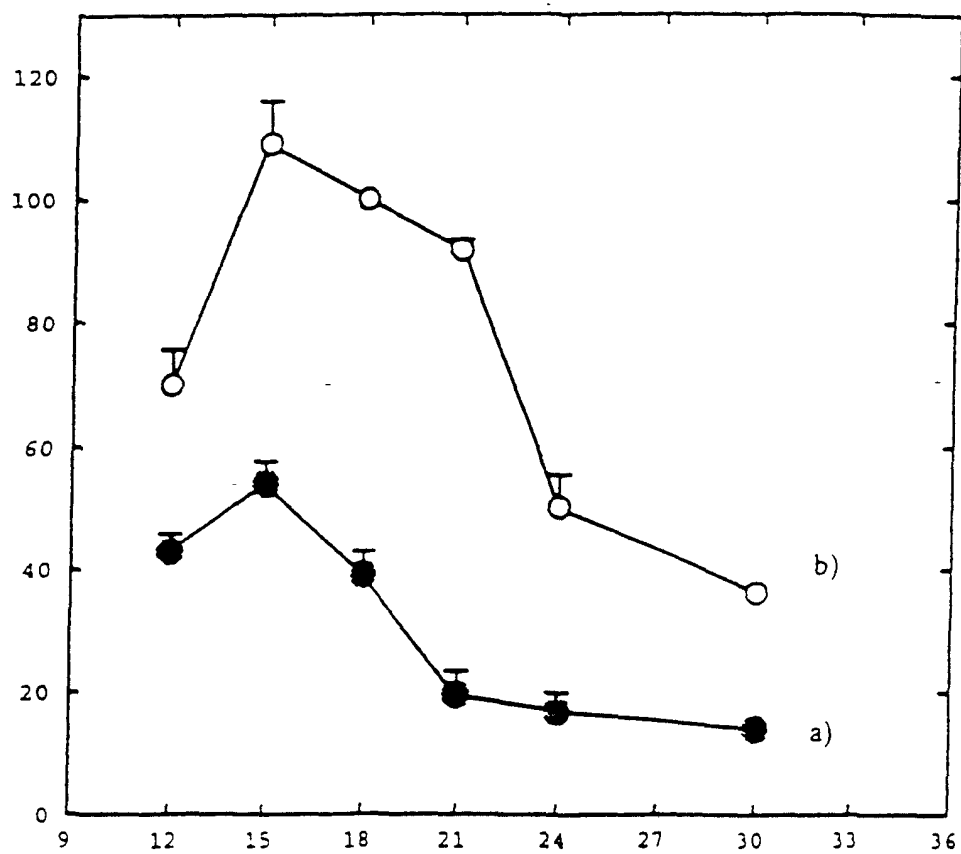


图 1