

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 19992070 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21)	Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application	19992070
(51)	Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification C08B 37/00 C12P 19/18	
(22)	Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date	28.09.1999
(23)	Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date	28.09.1999
(41)	Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public	29.03.2001
(43)	Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date	13.06.2019

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Carbion Oy, Viikinkaari 9, 00710 Helsinki, SUOMI - FINLAND, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Natunen, Jari, Helsinki, SUOMI - FINLAND, (FI)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Uudet fukosyloidut oligosakkaridit ja menetelmä niiden valmistamiseksi

Nya fukosylerade oligosackarider och förfarande för deras framställning

(57) Tiivistelmä - Sammandrag - Abstract

Tämä keksintö koskee menetelmää oligosakkaridien tai oligosakkarideja sisältävien yhdisteiden valmistamiseksi, erityisesti N-asetyyliikito-oligosakkaridien, joissa on fukosyloitu monosakkaridi. Keksintö liittyy myös uusiin oligosakkarideihin, erityisesti N-asetyyliikito-oligosakkarideihin, tai oligosakkarideja sisältäviin yhdisteisiin, jotka on fukosyloitu ja mahdollisesti sidottu kovalenttisesti kantajamolekyylisiin.

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av oligosackarider eller föreningar, som innehåller oligosackarider, speciellt N-acetyliikito-oligosackarider, som har en fukosylerad monosackarid. Uppfinningen avser också nya oligosackarider, speciellt N-acetyliikito-oligosackarider, eller föreningar, som innehåller oligosackarider och som är fukosylerade och eventuellt kovalentiskt bindade till en bäraremolekyl.

Uudet fukosyloidut oligosakkaridit ja menetelmä niiden valmistamiseksi

KEKSINNÖN ALA

5

Tämä keksintö koskee uusia fukosyloituvia oligosakkarideja tai oligosakkarideja sisältäviä yhdisteitä, jotka ovat analogisia luonnollisille oligosakkarideille ja jotka sisältävät ainakin yhden fukosyloidun monosakkaridiyksikön. Keksintö koskee myös menetelmää tällaisten oligosakkaridien tai oligosakkarideja sisältävien yhdisteiden valmistamiseksi.

10

KEKSINNÖN TAUSTAA

Fukosyloiduilla nisäkkäiden glykaaneilla on funktioita hedelmöittämisessä (1), aikaisessa alkion erilaistumisessa (2), aivojen kehityksessä (3,4) ja leukosyyttien ekstravasaatiossa (5,6), α 1-3/4fukosyloitujen oligo- ja polysakkaridien ollessa konjugoituneena lipideihin ja proteiineihin tai, kuten ihmisen maidon oligosakkaridit, vapaina oligosakkarideina. Fukosyloidut N-asetyllaktosamiinit (Lewis x, Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc ja Lewis a, Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc) ja fukosyloidut N-asetyllaktosdiamiinit (LexNAc, GalNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc) esiintyvät usein terminaalisisina sekvensseinä, kuten Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-2Man α -, Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-2Man α -, GalNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-2Man α -, Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β /GalNAc α -, Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β -, Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-4Man α -, Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-4Man α - ja Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-6Gal β -/GalNAc-/Man α -. Lewis x -sekvenssit, -GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal, ovat yleisiä laktosamiinityypisten ketjujen keskellä, mutta myös Lewis a -rakenteet, Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc, ovat läsnä, mahdollisesti myös toistuvina sekvenssiketjuina. Ihmisen maidosta löytyy pääasiassa vapaita oligosakkarideja, joiden α 1-3fukosyloitu epitooppi sokerin redusoivassa päässä on yleensä laktoosi (Gal β 1-4Glc) tai sen pidennetty/substituoitu muoto, kuten Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc, Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc, Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc ja

20

25

30

Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc. Näiden analogit voivat olla hyödyllisiä nisäkkäiden luonnollisten α 1-3/4fukosyloitujen sekvenssien biologisten aktiviteettien spesifisyyksien tutkimuksessa.

- 5 Näiden glykaanien biosynteesin fykosylaatiovaihe suoritetaan α 1-3/4fukosyylitransferaasi perheellä (Fuc-T:t). Ihmisessä ilmentyy ainakin Fuc-T:t III-VII ja IX (7-9), ja entsyymaattisesti aktiivisia homologeja tunnetaan muista eläimistä ja bakteereista.
- 10 α 1-3fukosyylitransferaasi siirtää fukoosin GlcNAc- tai Glc-tähteen paikkaan 3 sokeriketjuissa Gal β 1-4GlcNAc (LacNAc), GalNAc β 1-4GlcNAc (LacdiNAc) ja Gal β 1-4Glc (laktoosi) syntetisoiden bioaktiivit epitootit Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc (Lewis x, Lex), GalNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc (LexNAc), ja Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc. Kaikki ihmisen Fuc-T:t ovat tunnettuja siitä, että ne käyttävät Gal β 1-4GlcNAc-
- 15 tyyppisiä akseptoreja (7,9). GalNAc β 1-4GlcNAc toimii myös akseptorina ihmisen maidon Fuc-T:ille (10). Ihmisen Fuc-T:illä III ja V on myös α 1-4fukosyylitransferaasiaktiiviteettiä, jolloin ne käyttävät sellaisia akseptoreja kuin Gal β 1-3GlcNAc (tyyppi I N-asetyyliilaktosamiini) syntetisoiden Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc:n (Lewis a). Ainakin ihmisen Fuc-T:t III ja V ja (IV heikosti) kykenevät
- 20 fukosyloimaan laktoosia ja samansukuisia oligosakkarideja rakenteiksi, jotka sisältävät Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc -sekvenssejä.

- N-asetyylikitobioosin entsyymaattinen α 1-3fukosylaatio on kuvattu, kts. US 5,759,823, mutta sen tuotetta ei ole karakterisoitu. Pelkistävä N-asetyylikitobioosi sisältää myös
- 25 epimeerin, jossa on pelkistävässä päässä ManNAc, eikä se ole tunnettu kyseisen US-patentin aineistosta, jos N-asetyylikitobioosi tai sen pelkistävän pään epimeeri oli fukosyloitu. Fukosyloidun pelkistävän pään GlcNAc:n sisältäviä sakkarideja ei voida pitää käyttökelpoisina, koska ne ovat labiileja ja ne hajoavat jopa vesiliuoksissa lähellä neutraalia pH:ta. Pelkistävän pään fukosyloitu GlcNAc on hyvin harvinainen,
- 30 tai sitä ei esiinny lainkaan, nisäkkään luonnollisissa oligosakkarideissa, koska mahdollisesti sen labiileetti tekee siitä käyttökeltottoman biologisiin funktioihin myös *in vivo*.

Tämä keksintö kuvaa nisäkkäiden fukosyloitujen sakkaridiketjujen sakkaridiepitooppianalogeja sekä niiden synteesin. Tehokas menetelmä tällaisten epitooppien syntetisoimiseen on α 1-3 fukosyylitransferaasien tai α 1-3/4fukosyylitransferaasien käyttö uusien akseptorisekvenssien fukosylointiin. Jotkin

5 akseptorisekvensseistä voidaan syntetisoida halvoista luonnollisista polysakkarideista, kuten selluloosa, kitiini, kondroitiini/kondroitiinisulfaatit tai hyaluronihapoista, myös luonnollisia polysakkarideja sekvenssillä $\text{Glc}\beta 1-(3\text{Glc}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-)_n3\text{Glc}$ voidaan käyttää akseptorien syntetisoimiseen. β 1-4GlcNAc-transferaasia ja UDP-GlcNAc:ia voidaan käyttää Gal:iin, GalNAc:iin tai Man:iin kytketyn $\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-:n$

10 tuottamiseen (11) ja näitä voidaan käyttää muiden analogien valmistamiseen. Tiettyjen loisten on myös raportoitu sisältävän N-asetyylikito-oligosakkarideja, joita voitaisiin käyttää fukosylointireaktion akseptoreina (12).

Mielenkiintoisesti tässä kuvatut uudet N-asetyylikito-oligosakkaridien fukosylaatiot

15 (N-asetyylikitotrioosi ja suuremmat) tapahtuivat ei-pelkistävään subterminaaliseen tähteeseen (muodostaen terminaalisen Lewis x -tyyppisen rakenteen samanlaisella yhdistävällä rakenteella kuin ihmisen glykaaneilla) eivätkä pelkistävän pään GlcNAc:iin kuten kasvien N-glykaaneilla.

20 KEKSINNÖN YHTEENVETO

Ensimmäisessä näkökohdassaan tämä keksintö liittyy uusiin fukosyloituihin oligosakkarideihin ja oligosakkaridityyppeihin yhdisteisiin, erityisesti N-asetyylikito-oligosakkarideihin, jotka ovat α 1-3 fukosyloituja oligosakkaridin ei-pelkistävän pään

25 subterminaalisen aseman monosakkaridiin. Tämä keksintö liittyy myös menetelmään näiden yhdisteiden valmistamiseksi, minkä tuloksena on paikkaspesifinen fukosylaatio käyttäen α 1-3fukosyylitransferaasi- tai α 1-3/4fukosyylitransferaasientsyymiä oligosakkaridiakseptorisubstraatin glykosylointiin L-fukoosilla.

KUVIEN SELITYS

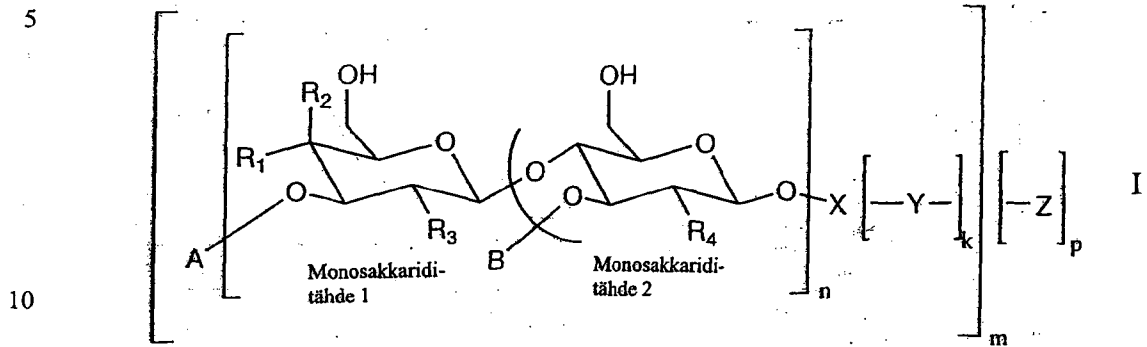
Kuvassa 1 (A) on HPAE-kromatografia neutraalin Fuc-TV:n fukosylaatiotuotteista N-asetyylikitotetraoosista. Fukosyloitu tuote (Glykaani 4, FGN₄; glykaanien 3-7
 5 rakenteille, katso Taulukko 1), joka eluoiitiin isokraattisessa ajossa 40 mM NaOH:lla
 kohdassa 7.62 min ja sen oletettu akseptori kohdassa 9.74 min. (B) esittää
 fukosyloidun N-asetyyli-kitoheksaoosin (FGN₆) eluoitumisen HPAE-
 kromatografiapuhdistuksessa kohdassa 7.09 min, ja oletetun N-
 asetyylikitoheksaoosiinkin kohdassa 9.04 min isokraattisessa ajossa 40 mM
 10 NaOH:lla. Sakkaridit olivat Fuc-TV-reaktiosta.

Kuva 2 esittää avainreaktioseosten ja puhdistettujen sakkaridituotteiden MALDI-
 TOF-massaspektrit. F on L-Fukoosi, GN on N-asetyyli-D-glukoosiamiini. (A) esittää
 ihmisen Fuc-TV:n tuottaman FGN₄- ja GN₄ -seoksen, (B) esittää Fuc-TV:n tuottaman
 15 FGN₆- ja GN₆ -seoksen. (C) esittää exo-β-N-asetyyliheksosamiinidaasi- ja uuden
 endokitinaasireaktion ("jack bean" -entsyymi, miedot olosuhteet) Fuc-TV:n
 tuottamalle FGN₆- ja GN₆ -seokselle. Päätuote on yllättäen FGN₅. (E) esittää
 puhdistetun FGN₆:n miedon pilkkomisen "jack bean" -valmisteella pääosin FGN₅:ksi.
 (F) esittää puhdistetun FGN₄:n miedon käsittelyn "jack bean" -valmisteella, 91 %
 20 substraatista säilyy koskemattomana.

Kuva 3. esittää pelkistetyn, permetyloidun ja fukosyloidun N-asetyylikitotrioosin 3
 (A) ja N-asetyylikitotetraoosin 4 (B) MS/MS spektrit. Domon ja Costellon fragmentti-
 ioninomenklatuuria käytetään valmistettujen fragmenttien esittämiseen.

KEKSINNÖN YKSITYISKOHTAINEN SELITYS

Tämä keksintö koskee erityisesti fukosyloituja oligosakkaridiyhdisteitä, joilla on kaava



Kaavassa I, A on H tai glykosidisesti β 1-3kytketty D-glukopyranosyyli-tähde (Glc β 1-3), R_1 on OH, R_2 on H, ja R_3 on OH tai asyyliamido, -NH-asyyli (so. monosakkaridi 1 on Glc tai GlcNA-syyli), tai R_1 on H, R_2 on OH, ja R_3 on asetamido -NHCOCH₃ (so. monosakkaridi 1 on GalNAc), B on H tai α -L-fukosyyli tai α -L-fukosyylianalogi, ja R_4 on OH tai asetamido -NHCOCH₃ (so. monosakkaridi 2 on mahdollisesti fukosyloitu Glc tai GlcNAc), käyrä viiva sakkaridiyksiköiden välillä ilmaisee, että monosakkaridi 1 on β 1-4kytketty monosakkaridiin 2, kun B on kytketty monosakkaridin 2 paikkaan 3, monosakkaridi 1 on β 1-3kytketty monosakkaridiin 2, kun B on kytketty monosakkaridin 2 paikkaan 4, monosakkaridi 1 on GalNAc vain, kun monosakkaridi 2 on Glc, n on 1-100, sillä ehdolla, että molekyylissä on aina läsnä ainakin yksi α -fukosyyli- tai α -fukosyylille analoginen ryhmä, ja

- 25 i) p ja k ovat 0 ja m on 1, missä tapauksessa X on H, aglykonitähde tai monosakkaridi, joka on Glc, GlcNAc, Gal tai GalNAc, mahdollisesti pelkistetyssä muodossa, tai oligosakkaridi, joka sisältää yhden tai useita monosakkaridiyksiköitä, monosakkaridi 2 on β 1-2-, β 1-3-, β 1-4- tai β 1-6-kytketty sakkaridiin X, sillä ehdolla, että X ei ole H kun sekä monosakkaridi 1 ja 2 ovat GlcNAc, B on L-fukosyyli ja n on 1, tai
- 30 ii) p on 1, k on 0 tai 1 ja $1 \leq m \leq 1000$, missä tapauksessa X on suora sidos, tai kohdassa i) kuvattu mono- tai oligosakkaridi, Y on välike tai kytkävä ryhmä, joka kykenee kytkemään Z:aan monosakkaridin 2 tai X:n, ja Z on mono- tai polyvalentti kantajamolekyyl.

Yllä olevassa kaavassa sekä alla Glc merkitsee D-glukoositähdettä ja Gal merkitsee D-galaktoositähdettä. Fuc tai F merkitsee L-fukoositähdettä. GlcNAc tai GN merkitsee N-asetyyli-D-glukoosiiniitähdettä. Monosakkaridit ovat pyranoosimuodossa, kun ne ovat glykosidisesti kytkettyjä.

5

B on L-fukosyylianalogina edullisesti yhdiste, joka sisältää hydroksimetyyliryhmän metyyliiryhmän sijasta fukosyylin 6 paikassa, se on L-galaktoosyyli tai L-fukosyylin deoksijohdannainen tai analogi, jonka C6 on kytketty disakkaridiin - tetrasakkaridiin. Edullisimmin B on kuitenkin H tai L-fukosyyli.

10

R₃ on asyyliamidoryhmänä edullisesti alkanoyyliamidoryhmä 2 - 24 hiiliatomilla ja 0 - 3 kaksoissidoksella hiiliatomien välissä suorassa ketjussa. Edullisesti R₃ on asetamido -NH-COCH₃ tai alkanoyyliamidoryhmä 8 - 24 hiiliatomilla ja 1 - 3 kaksoissidoksella. m on edullisesti 1 - 100 ja edullisimmin 1 - 10, ja n on edullisesti 1 - 10.

15

Oligosakkaridi X sisältää edullisesti 2 - 10 monosakkaridiyksikköä, jotka ovat edullisesti glykosidisesti β1-4- tai β1-3-kytkettyjä Glc- tai GlcNAc-tähteisiin.

20

Aglykoniryhmä on edullisesti hiilivetyryhmä, kuten C₁₋₂₀-alkyyli- tai C₂₋₂₀-alkenyyliryhmä, C₃₋₁₀-sykloalkyyli- tai sykloalkenyyliryhmä, aryyli- tai aralkenyyliryhmä sisältäen enintään 10 hiiliatomia aromaattisessa renkaassa, alkyyli, jolla on yllä annettu merkitys, esimerkiksi fenyyli- tai bentsoyliryhmä, tai heterosyklinen ryhmä, joka on sykloalkyyli tai aryyli- tai aralkenyyliryhmä, kuten on kuvattu, sisältäen renkaassa/renkaissa yhden tai useampia heteroatomeja O, S tai N.

25

Edullinen aglykoniryhmä on alempi alkyyli- 1 - 7 tai alkenyyliryhmä 2 - 7 hiiliatomilla tai fenyyli- tai bentsoyliryhmä. Edullinen heterosyklinen aglykoniryhmä on 4-metyyliumbelliferyyli.

30

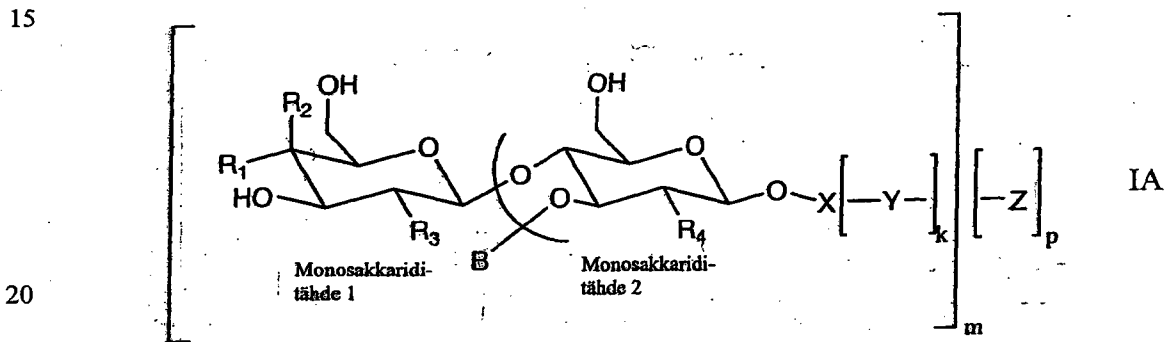
Välikeryhmä Y, jos sellainen on, voi olla mikä tahansa ryhmä, joka kykenee kytkemään ryhmän X tai sakkaridin 2 kantajamolekyylisiin Z, ja tällaiset ryhmät ja kytkemismenetelmät ovat alalla tunnettuja, ja niitä on myös kaupallisesti saatavilla. Kun X on esimerkiksi sakkaridi, X:n ja Y:n välisen sidoksen voi muodostaa, kun

aldehydi- tai karboksyylihappo reagoi X:n C₁:een tai kun sijoitetaan mikä tahansa aldehydi- tai karboksyylihapporyhmä X:ään hapetusreaktiolla, jolloin muodostuu sopiva sidos kuten -NH-, -N(R)-, missä R on alkyyliryhmä tai hydroksialkyyliamiini, amidi, esteri, thioesteri tai thioamidi. Sopiva sidos on myös -O- tai -S-, katso esim.

5 Stowell et al Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 37 (1980), 225-.

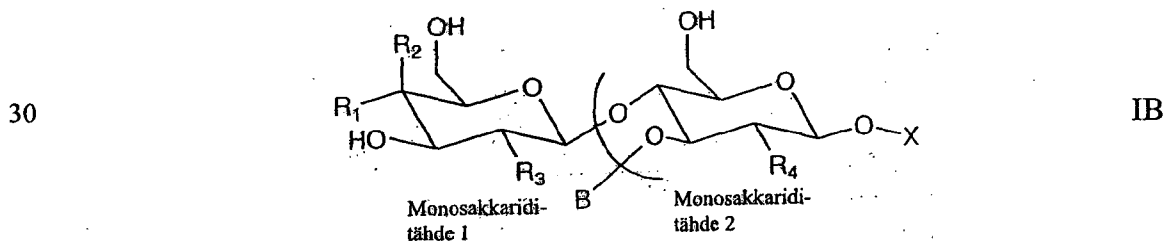
Tämä keksintö antaa siis käyttöön fukosyloituja oligosakkaridiyhdisteitä sellaisenaan tai kovalenttisesti sitoutuneina kantajamolekyylisiin. Kantajamolekyyli voi olla mono- tai polyvalentti, ja se on edullisesti polymeeri, kuten polyakryyliamidi, polyoli, polysakkaridi, kuten agarosi, biomolekyyli sisältäen peptidit ja proteiinit, naudan tai ihmisen seerumin albumiini, jotka ovat yleisesti käytettyjä kantajia esimerkiksi immunomäärityksissä.

Edullinen ryhmä kaavan I yhdisteitä käsittää seuraavaa



jossa symbolit merkitsevät mitä yllä on annettu kaavan I yhteydessä. Yllä olevassa kaavassa, monosakkaridit 1 ja 2 ovat edullisesti itsenäisesti Glc ja GlcNAc, B on L-fukosyyli, ja X on Glc tai GlcNAc tai β1-3- tai β1-4-kytketty oligomeeri käsittäen enintään 10 yksikköä Glc:a ja/tai GlcNAc:a. Kun p ja k = 0 ja m = 1, yhdisteillä on kaava

25



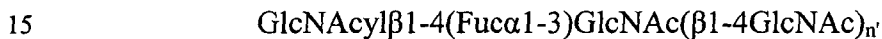
jossa symbolit merkitsevät mitä yllä on annettu kaavan IA yhteydessä, tai X voi olla myös H edellyttäen, että monosakkaridit 1 ja 2 ovat kummatkin Glc.

Kaavojen IA ja IB yhdisteet ovat siis oligosakkarideja, jotka on fukosyloitu subterminaaliseen tai viimeistä edelliseen ei-pelkistävän pään monosakkaridiin. Keksinnön mukaan on havaittu, että tämän spesifisen fukosylaation tuloksena on hyvin stabiileja oligosakkarideja, erityisesti N-asetyylikito-oligosakkarideja. Vielä edullisemman keksinnön suoritusmuodon mukaan sakkarideilla on kaava



Yllä olevassa kaavassa, n' on kokonaisluku 1 - 8, edullisesti 1 - 6.

Keksinnön erään suoritusmuodon mukaan sakkarideilla on kaava



jossa n' :lla on yllä annettu merkitys ja asyyli on alkanoyyliryhmä, joka sisältää edullisesti 8 - 24 hiiliatomia ja 1 - 3 kaksoissidosta. Edullisesti $1 < n' < 6$, edullisemmin $2 < n' < 4$.

20

Keksinnön mukaan kaavan I yhdisteet valmistetaan fukosyloimalla kaavan I yhdiste, jossa B on aina H, nukleotidisokeridonorilla, joka sisältää L-fukoosia tai sen analogia, fukosyyli transferaasin läsnäollessa, ja mahdollisesti talteen ottaen näin valmistettu fukosyloitu sakkaridi. Tällainen reaktio saatetaan suorittaa lähtöoligosakkaridilla ennen oligosakkaridin mahdollista sitomista kantajamolekyylisiin Y. Vaihtoehtoisesti on myös mahdollista fukosyloida kantajaan sidottu oligosakkaridi. Tällainen reaktio suoritetaan oleellisesti samalla tavalla kuin sitoutumattomilla oligosakkarideilla.

25

Esimerkiksi N-asetyylikito-oligosakkaridi, kuten N-asetyylikitotrioosi, voidaan kytkeä väliskeellä naudan seerumin albumiiniin BSA:han, tai se voidaan tunnetulla tavalla pelkistäen aminoida BSA:han, pelkistetyn tähteen muodostaessa väliskeen.

30

Fukosylaatioreaktiossa käytetään edullisesti ylimäärin GDP-Fuc:ia ja matalampaa akseptoripaikkojen konsentraatiota (0,1 - 1 mM). Jos kantaja on BSA, reaktiopuskuri ei sisällä glykosyloimatonta BSA:ta. Reaktiotuotteet voidaan puhdistaa

proteiinikemian menetelmillä ja fukosylaation taso voidaan tarkistaa MALDI-TOF-massaspektrometrialalla, kuten alla yksityiskohtaisemmin kuvataan. Fukosylaatio voidaan toistaa, jos reaktio on vaillinainen.

- 5 Oligosakkaridit aglykoniryhmällä, kuten X, voidaan fukosyloidia olennaisesti kuten on kuvattu, edullisesti käyttäen matalampia akseptorikonsentraatioita (0,1 - 1 mM). Reaktiotuotteet voidaan puhdistaa käyttäen kromatografisia menetelmiä, geelisuodatus mukaan lukien, ja osittaisella pilkkomisreaktiolla ”jack bean” N-asetyyliheksosaminidaasilla. Esimerkiksi GlcNAc β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1-bentsyyliä
- 10 saadaan GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-bentsyylistä, GlcNAc β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1-O-metyyliä GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-O-metyylistä ja GlcNAc β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-O-4-metyyliumbelliferyyliä GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-O-4-metyyliumbelliferyylistä.
- 15 Edullisen keksinnön suoritusmuodon mukaan fukosyyli transferaasi on ihmisen α 1-3-fukosyyli transferaasi tai ihmisen α 1-3/4fukosyyli transferaasi, erityisesti jokin ihmisen fukosyyli transferaaseista III-VII, IX tai ihmisen maidon α 1-3/4fukosyyli transferaasi. Keksinnön erään edullisen suoritusmuodon mukaan L-fukoosi on GDP-L-fukoosin muodossa.
- 20 Erään suoritusmuodon mukaan yllä kuvattujen edullisten yhdisteiden valmistamiseksi lähtöoligosakkaridi sisältää 3 - 10, erityisesti 3 - 8, β 1-4 sakkaridiyksikköä. Tällaiset yksiköt ovat edullisesti N-asetyyli-D-glukosamiinitähteitä, GlcNAc, vastaavat lähtömateriaalit ovat siten N-asetyylikito-oligomeerejä kaavalla (GlcNAc β 1-4)₃₋₁₀₍₈₎.
- 25 Toisen edullisen suoritusmuodon mukaan oligosakkaridit sisältävät 2 -10, erityisesti 2 - 6, β 1-4-D-glukoosiyksikköä, Glc, vastaavat lähtömateriaalit ovat siten sellooligomeerejä kaavalla (Glc β 1-4)₂₋₁₀₍₈₎.
- 30 Keksinnön mukaan on myös mahdollista sisällyttää lisävaihe, jossa saatua tuotetta käsitellään β -N-asetyyliheksosaminidaasilla riittävän voimakkaissa olosuhteissa ja riittävällä määrällä, jotta ei-pelkistävä terminaalinen monosakkaridi vapautuu. On myös mahdollista saada saatu tuote reagoimaan sen pelkistävästä terminaalista β -N-asetyyliheksosaminidaasin kanssa vähemmän ankarissa olosuhteissa monosakkaridin

vapauttamiseksi. Tällä tavalla saadaan tuote, joka sisältää yhden sakkaridiyksikön vähemmän kuin primaarinen oligosakkaridituote. Tämä jälkimmäinen reaktio saatetaan myös kontrolloida sellaisella tavalla, että entsyymi pääasiassa hajottaa kaiken jäljellä olevan ei-fukosyloidun substraatin. Tämä menetelmä antaa siten

5 tarkoituksenmukaisen tavan puhdistaa reaktioseos fukosylaatiovaiheen jälkeen.

Fukoosiyksikön vuoksi uudet oligosakkaridit ovat stabiileja yhdisteitä ja sellaisenaan käyttökelpoisia useissa sovelluksissa. Sellaisenaan niitä voidaan käyttää substraatteina esimerkiksi entsyymien, kuten kitinaasin, testaamisessa, tunnistamisessa ja

10 erottelemisessa, ja kun niitä sidotaan alustaan, niille löytyy käyttöä immunomäärityksissä ja affiniteettikromatografiassa. Niille löytyy käyttöä myös agrobiologiassa stabiileina kasvinsuojeluaineina, puolustusmekanismien aktivoijina ja kasvisolujen kasvun säätelijänä samalla tavalla kuin on kuvattu N-asetyylikito-

oligosakkaridien ja niiden asyylijohdannaisten kohdalla (13). Tällaisessa käytössä

15 fukoosiryhmän liittäminen oligosakkaridiin tulee käytännössä suojelemaan oligosakkaridia entsyymaattiselta hajotukselta.

Eläinten oligosakkareiden α 1-3/4fukosyloidut analogit ovat käyttökelpoisia niiden luonnollisten vastineiden biologisten vuorovaikutusten tutkimuksessa. Luonnolliset

20 α 1-3/4fukosyloidut oligosakkaridit ovat tunnettuja lektiinien ligandeja tai vastareseptoreja, ja ne välittävät soluadheesiota ja muita intersellulaarisia vuorovaikutuksia. Nämä sakkaridit ovat myös tärkeitä antigeeniepitooppeja, joita syövänvastaiset tai allergiaan liittyvät vasta-aineet tunnistavat. Jotkin näistä vuorovaikutuksista ovat erityisen lääketieteellisen kiinnostuksen kohteina, kuten

25 leukosyyttien kiinnittyminen verisuoniin, mitä välittää selektiiniproteiinien sitoutuminen niiden α 1-3/4fukosyloituun vastareseptorioligosakkaridiin, joka on kytketty proteiineihin tai lipideihin. Löytääkseen vapaiden oligosakkaridianalogien kyvyt inhiboida lektiinien ja niiden vastareseptoreiden välistä sitoutumista, niitä voidaan testata *in vitro* – tai *in vivo* –määrityksillä, tai vaihtoehtoisesti

30 oligosakkaridien suoraa sitoutumista lektiineihin voidaan mitata esimerkiksi affiniteettikromatografialla. Saatu aineisto, jossa analogeja verrataan vapaisiin sakkaridiepitooppeihin, jotka ovat identtisiä luonnollisiin vastareseptorioligosakkarideihin, paljastaa osan vuorovaikutuksen spesifiteetistä. Se

osoittaa mitkä modifikaatiot ovat molekyylissä käyttökelpoisia, ja mitä ei siedetä, kun suunnitellaan parempia lääkinällisiä johtoyhdisteitä vuorovaikutusten antagonisteille. Etsittäessä parempia lääkinällisiä oligosakkaridien johdannaisia voidaan oligosakkaridiketjun pelkistävää päätä modifioida lukemattomilla ei-

5 hiilihydraattirakenteilla, aglykoneilla. Vapaat oligosakkaridit voivat olla myös hyödyllisiä tunnettujen yhdisteiden seoksina (ns. kirjastoina) biologisia aktiviteetteja testattaessa. Paikallisten fukosyyli-isomeerien seos saadaan helposti inkuboimalla useita akseptorikohtia sisältävä oligosakkaridi pienemmällä määrällä GDP-Fuc:ia kuin on akseptorikohtien määrä, tai seuraamalla reaktiotasoa reaktioseoksen MALDI-TOF

10 -analyysillä ja rajoittamalla reaktioaikaa (14).

Oligosakkaridien multi- ja polyvalentit konjugaatit voivat olla biologisten vuorovaikutusten aktiivisempia antagonisteja, kun ne ovat luonnollista tai ei-antigeenistä tyyppiä. Antigeenisia polyvalenttikonjugantteja, kuten naudan seerumin

15 albumiiniin tai avaimenreikämaljakotilon hemosyaniiniin kytkettyjä oligosakkarideja, voidaan käyttää vasta-aineiden muodostamiseen sakkaridiepitoppeja vastaan. Polyvalentit konjugaatit konjugoituneina kiinteisiin alustoihin, kuten agarosiaffiniteettikromatografiamediaan tai muovisiin mikrotiitterilevyihin, ovat myös hyödyllisiä lektiinien ja muiden sakkarideihin sitoutuneiden proteiinien

20 määrittämiseen ja puhdistamiseen. Fukosyloidut N-asetyylikito-oligosakkaridiepitoot, kasvi- ja hyönteisproteiinien -Man β 1-4GlcNAc(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-Asn (15), ovat voimakkaita ja ristireagoivia ihmisen allergeeneja, ja GlcNAc(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-konjugaatit voivat olla hyödyllisiä määritettäessä allergiavasta-aineita, jotka tunnistavat tämän epitoopin.

25 Selektiiniproteiinit, jotka välittävät verisuonien leukosyyttiadheesiota ovat tunnettuja sitoutumisestaan sialyl-Lewis x -oligosakkarideihin [sLex, NeuNAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc], erityisesti oligosakkarideihin sLex- β 1-3Lex β 1- (16) ja sialyl-Lewis a [NeuNAc α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc] (17),

30 sitoutumista on raportoitu myös Lewis x -oligosakkarideihin [Lex, Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc] (18) tai VIM-2 -epitoppeihin [NeuNAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc] (19). Lewis x GalNAc

-analogin, GalNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc, on myös raportoitu olevan parempi selektiiniligandi kuin sialyl-Lewis x:n (20, 21).

Seuraavat esimerkit on tarkoitettu kuvaamaan keksintöä.

5

Keksinnön mukaiset tuotteet on karakterisoitu pilkkomalla, massaspektrometrialla ja NMR-kokeilla. Jälkimmäisen mukaan ei-pelkistävän pään monosakkaridi ja fukoosi ovat liuoksessa nipussa, konformaatioissa, joka muistuttaa vastaavaa dominoivaa konformaatiota Lex- ja LexNAc-determinanteissa. Tämä antaa merkittävää suojaa fukosyloidoille oligosakkarideille.

10

Esimerkeissä on käytetty seuraavia lyhenteitä.

DQFCOSY, (double quantum filtered correlation spectroscopy)

15 kaksoiskvanttisuodatettu korrelaatio-spektroskopia; ESI-CID, (electrospray ionization-collision induced decay) sähkösumutus-ionisaatio-kollisioindusoitu hajotus; Fuc & F, L-fukoosi; Fuc-T:t III-VIII ja IX, ihmisen α 1-3fukosyylitransferaasi/ α 1-3/4fukosyylitransferaasi III-VII ja IX; Fuc-Thm, ihmisen maidon α 1-3/ α 1-3/4fukosyylitransferaasi; Gal, D-galaktoosi; GalNAc, D-N-asetyyligalaktosamiini; 20 GlcNAc & GN, D-N-asetyyliglukosamiini; HPAEC-PAD, (high pH anion exchange chromatography – pulsed amperometric detection) korkean pH:n anionivaihtokromatografia – pulssiamperometrinen detektio; LacNAc, Gal β 1-4GlcNAc; LacdiNAc, GalNAc β 1-4GlcNAc; MALDI-TOF MS, (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry) matriisiavusteinen laser 25 desorptio/ionisaatio -lentoaikamassaspektrometria; m/z , massan suhde varaukseen; MOPS, 3-[N-morfolino]propanisulfonaattihappo; ROESY, (rotating frame nuclear Overhauser spectroscopy) pyörivä-koordinaatisto ydin Overhauser-spektroskopia; ROE, (rotating frame nuclear Overhauser) pyörivä-koordinaatisto ydin Overhauser; TOCSY, (total correlated spectroscopy) totaalikorreloitu spektroskopia

30

Esimerkeissä, N-asetyylikitotrioosi, N-asetyylikitetetraoosi ja N-asetyylikitoheksaoosi olivat Seikagakulta (Tokio, Japani). Sellobioosi oli Thomas Kerfoot and Co. Ltd:ltä, ja ”jack bean” β -N-asetyyliheksosaminidaasi oli Sigmaalta (St. Louis, MO, USA).

GDP-fukoosi (käytetty ihmisen maitoon liittyneissä kokeissa) oli ystävällinen lahja prof. B. Ernstiltä (Baselin yliopisto, Sveitsi). Ihmisen fukosyyli transferaasi V ja VI, *Spodoptera frugiperda*ssa ekspressoituneet rekombinantit proteiinit ja GDP-fukoosi olivat Calbiochemiltä (La Jolla, CA, USA). GDP-[U-¹⁴C]fukoosi oli Amersham Internationalilta (Buckinghamshire, England). Superdex Peptide HR 10/30 HPLC-kolumni oli Pharmaciaalta (Uppsala, Ruotsi). Dowex AG 1-X8 (AcO⁻, 200-400 mesh) ja Dowex AG 50W-X8 (H⁺, 200-400 mesh) ja Biogel P-2 olivat Bio-Radilta (Richmond, CA). D₂O oli Cambridge Isotope Laboratoriesilta (Woburn, MA). Osittain puhdistetut ihmisen maidon fukosyyli transferaasit valmistettiin kuten kuvataan (22):ssa ja määriteltiin kuten kuvataan (23):ssa, 1 mU vastaa 1 nmol fukoosin siirtämistä 190 mM laktoosia minuutissa 37 °C lämpötilassa, pH:ssa 7,5.

Fukosyyli transferaasireaktiot

N-asetyyli kito-oligosakkaridien fukosylaatio ihmisen maidon fukosyyli transferaaseilla (EC 2.4.1.152 ja EC 2.4.1.65) suoritettiin olennaisesti kuten on kuvattu (24):ssa, mutta entsyymiä käytettiin 2 * 360 µU (lisäten puolet entsyymistä kahden päivän jälkeen)/100 µl:aa reaktioseosta, akseptorikonsentraatioiden ollessa 5 mM, ja inkuboimalla reaktioita 37 °C lämpötilassa neljä päivää. Fukosyyli transferaasi V - reaktiot (Fuc-TV, EC 2.4.1.152, rekombinantti, Calbiochem) suoritettiin samanlaisissa olosuhteissa, mutta entsyymiä käytettiin 12,5 mU/100 µl:aa, ja reaktioseoksia inkuboitui huoneenlämpötilassa viisi päivää. Valtavaa GDP-Fuc ylijäämää käytettiin verrattuna tuotteiden odotettuun määrään. Fukosyyli transferaasi VI -reaktiot (EC 2.4.1.152, rekombinantti, Calbiochem) suoritettiin samoissa olosuhteissa kuin Fuc-TV:lla, paitsi 2 mM akseptori- ja 4 mM GDP-fukoosikonsentraatioilla ja 10 mU entsyymillä/100µl ja inkuboiden 3 päivän ajan 37°C lämpötilassa. Reaktio päätettiin keittämällä 3 minuuttia, reaktioseokset varastoitui pakastettuna, kunnes ne analysoitui.

β-N-asetyyli heksosaminidaasireaktiot

Miedoissa olosuhteissa ”jack bean” -β-N-asetyyli heksosaminidaasilla (EC 3.2.1.30) katalysoidut reaktiot suoritettiin kuten on kuvattu (25), käyttäen 0,3 mU entsyymiä / nmol vapautuvaa GlcNAc:ia, tai 6 nmol sakkarideja inkuboitui 38 mU entsyymillä 11 h endokitinaasireaktioissa Fuc₁GN_{4,6}:n kanssa.

- Reaktiot, perusteellisina reaktioina suoritettuina, sisälsivät 300 mU β -N-asetyyliheksosaminidaasia 4,8 μ l:ssa 2,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:sta, 2 nmol fukosyloitua N-asetyylikito-oligosakkaridia ja 40,2 μ l 50 mM natriumsitraattia, pH 4,0. Reaktioita
- 5 inkuboitii 37 °C lämpötilassa, 300 mU tuoretta entsyymiä 2,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:ssa lisättiin 2., 3., 5. ja 7. päivänä, ja reaktiot pysäytettiin 8. päivänä lisäämällä 1 tilavuus jääkylmää etanolia ja 8 tilavuutta jääkylmää vettä.

Oligosakkaridien pelkistys

- 10 Olikosakkaridit pelkistettiin NaBH_4 :llä oleellisesti kuten on kuvattu (26):ssa. Alditolit puhdistettiin geelisuodatuksella ja reaktioiden täydellisyys varmistettiin MALDI-TOF-massaspektometrialla.

Kromatografiset menetelmät

- 15 Entsymaattisista reaktioista saaduista näytteistä poistettiin suola kuljettamalla ne vedessä 1,5 ml Dowex AG-50:n (H^+ , 200-400 mesh) ja 1,5 ml Dowex AG-1:n (AcO^- , 200-4000 mesh) läpi, ja sitten näytteet puhdistettiin HPLC-geelisuodatuksella Superdex Peptide HR 10/30 –pylväällä, käyttäen eluentina erittäin puhdasta vettä tai 50 mM NH_4HCO_3 :a virtausnopeudella 1 ml/min. Geelisuodatus Biogel P-2 –
- 20 pylväässä suoritettiin käyttäen erittäin puhdasta vettä, UV-absorbanssi mitattiin aallonpituudella 214 nm. Korkean pH:n anioninvaihtokromatografia pulssiamperometrisellä detektiolla (HPAEC-PAD) suoritettiin (4x250 mm) Dionex CarboPac PA-1 –kolumnilla (Dionex, CA), näytteet ajettiin isokraattisesti 40 tai 60 mM NaOH:lla.

25

Massaspektometria

- MALDI-TOF-massaspektrometria suoritettiin positiivisessa ioniviiveuuttotilassa (positive ion delayed extraction mode) BIFLEX™-massaspektrometrillä (Bruker-Franzen Analytik, Bremen, Germany) käyttäen matriisina 2,5-
- 30 dihydrobentsoaattihappoa. Matriisipiikit matalan massan alueella ”suppressoitiin” käyttäen epätavallisen korkeaa näytekonsentraatiota (100 pmol/ μ l).

Sähkösumutusmassaspektrit (ESI-MS) kerättiin käyttäen kolmoiskvadrupoli API365-massaspektrometriä (Perkin-Elmer instruments, Thornhill, Ontario, Canada). Näytteet liuotettiin 50 % veteen laimennettuun metanoliin, joka sisälsi 0,5 mM natriumhydroksidia, ja injektointiin massaspektrometriin, joka oli varustettu

5 nanosähkösumutus-ionilähteellä (Protana A/S, Odense, Denmark), virtausnopeudella noin 30 nl/min. MS/MS-spektri saatiin törmäyttämällä valitut prekursori-ionit tyypikollisiokaasuun 35 V kiihdytetyllä virralla (kaksoisvarauksiset prekursorit) tai 55 V:lla (yksivarauksiset prekursorit).

10 *NMR spektroskopia*

Ennen NMR-kokeita sakkaridit lyofilisoitiin kahdesti D₂O:sta, minkä jälkeen ne liuotettiin 300 µl:aan D₂O:ta (99,996 atomi %, Cambridge Isotope Laboratories, Woburn, MA, USA). NMR-kokeet suoritettiin Varian Unity 500 spektrometrillä 23 °C lämpötilassa käyttäen Shigemi-putkia (Shigemi Co., Tokio, Japani). Tallennettaessa

15 1D-protonispektrejä käytettiin WEFT-sekvenssin modifikaatiota (27). DQFCOSY- (28) ja TOCSY-kokeita (29) (32 pyyhkäisyä per t₁-arvo) varten kerättiin 2k*256 ja 4k*256 pisteen matriiseja, jotka nollatäytettiin vastaaviksi 2k*512 ja 4k*512 matriiseiksi. 90° siirrettyä sinikellokäyräpainotusfunktiota käytettiin kummassakin ulottuvuudessa. TOCSY:ssa käytettiin 100 ms spinlukkokaikaa (MLEV-17). 1D

20 selektiiviset TOCSY-spektrit (30) tallennettiin sekoitusajoilla vaihdellen 10 ms:sta 140 ms:iin ja Gaussin mukaisella selektiivisellä pulssilla, jotta päällekkäiset spinsysteemit voitaisiin erottaa. Tallennettaessa ROESY-spektrejä (31, 32) lähetin oli säädetty signaalialueen ulkopuolelle 5,750 ppm:ään ja jatkuva-aaltoista spinlukkokaikaa käytettiin 300 ms spinlukkokaajalla. 2k*256-matriisi kerättiin ja nollatäytettiin 2k*512

25 pisteeseen. 90° siirrettyä sinikellokäyräpainotusfunktiota käytettiin kummassakin ulottuvuudessa. Lisäksi t₁-aikadomeeniaineisto kaksinkertaistettiin käyttämällä eteenpäin-taaksepäin lineaarista ennustetta.

DEPT(135)-spektrejä (33) varten tallennettiin 92 000 pistettä 18 000 Hz:n spektraalisella leveydellä. HSQC:tä (34) (48 pyyhkäisyä per t₁-arvo) ja 2D HSQC-TOCSY:a (35) (56 pyyhkäisyä per t₁-arvo) varten 2k*128 ja 2k*256 matriisit

30 tallennettiin ja nollatäytettiin vastaaviin 2k*256 ja 2k*512 pisteisiin, ja siirrettyä sinikellokäyräfunktiota käytettiin. 2D HSQC-TOCSY:ssa käytettiin 120 ms

sekoitusaikaa. ^1H :n kemiallista siirtymää verrattiin 2,225 ppm:n sisäiseen asetonikontrolliin ja ^{13}C :n vastaavaa siirtymää 31,55 ppm:n asetonikontrolliin.

ESIMERKKI 1

5

Ihmisen Fuc-TV:llä katalysoitu N-asetyylikitotrioozin ja GDP-fukoosin reaktio

- Oligosakkaridiseoksesta, joka oli muodostettu inkuboimalla N-asetyylikitotrioozia (1000 nmol, 5 mM) GDP-Fuc:n (1000 nM, 5 mM) ja 25 mU Fuc-TV:n kanssa huoneenlämpötilassa 5 päivän ajan, poistettiin suola, ja seos eristettiin HPLC-geelisuodatuksella. MALDI-TOF-MS paljasti että, seos sisälsi 32 mol % fukosyloitua N-asetyylikitotrioozia ja 68 % N-asetyylikitotrioozia. Tähän seokseen kohdistettiin ”mieto käsittely” ”jack bean” β -N-asetyyliheksosaminidaasilla, mikä pilkkoi suurimman osan ylimääräisestä N-asetyylikitotrioozista mutta vain pienen määrän fukosyloidusta N-asetyylikitotrioozituotteesta. Digestion 5 % alikvootista eristettiin HPLC-geelisuodatuksella edustava näyte kaikista oligosakkarideista. MALDI-TOF-analyysi osoitti, että se sisälsi fukosyloitua N-asetyylikitotrioozia 67 mol %, N-asetyylikitotrioozia 7 %, Fuc₁GlcNAc₂:a 12 % ja N-asetyylikitobioosia 13 %.

- Monofukosyloitu N-asetyylikitotrioozi puhdistettiin HPLC-geelisuodatuksella muusta β -N-asetyyliheksosaminidaasidigestiosta. Puhdistetun Fuc₁GlcNAc₃:n, Glykaani 3, MALDI-TOF-MS analyysi ilmaisi vain 5 % N-asetyylikitotrioozikontaminaation läsnäolon. Puhdistetun Glykaani 3:n kokonaissaanto oli 191 nmol (19%).

Fuc-TV:llä tuotetun Glykaani 3:n massaspektrometrinen karakterisointi

- Monofukosyloitu N-asetyylikitotrioozialikvotti pelkistettiin ja permetyloitiin ja se analysoitiin ESI-MS:llä. Ensimmäiseksi kaksoisvarauksinen $[\text{M}+2\text{Na}]^2$ -ioni (m/z 508,8) valittiin MS/MS:ää varten (Kuva 3A). Kaikki saadut fragmentit voitiin osoittaa olevan peräisin tetrasakkarideista, joiden keskiosan GlcNAc-yksikössä oli kiinnittyneenä fukoosiyksikkö, so. GlcNAc β 1-(Fuc α 1-)GlcNAc β 1-GlcNAc_{ol}. Terminaalisen substituoimattoman GlcNAc-yksikön menetys käy ilmeiseksi B₁-ioneista kohdassa m/z 282,2 (natrioitu) ja m/z 260,0 (protonoitu). Metanolin menetys ionista m/z 260,0 selviää ioneista m/z 228,2 ja m/z 196,2. Y₁-ionit kohdassa m/z 316,2 (kantaen yhtä natriumia) ja m/z 338,2 (kantaen kahta natriumia) osoittavat, että

GlcNAc-alditoli kantoj vain yhtä monosakkaridisubstituenttia. Lisäksi $Y_{2\alpha}/B_2$ -ioni kohdassa m/z 442,4 voi muodostua vain terminaalisen substituoimattoman GlcNAc:n tai pelkistetyn GlcNAc-tähteen menetyksen seurauksena. Lähemmässäkään tarkastelussa ei havaittu yhtään fragmenttia, joka vastaisi fukosyloitua pelkistävää

5 päättä (so. $Fuc\alpha$ -GlcNAccol, m/z 490,4) tai fukosyloitua ei-pelkistävän pään GlcNAc:ia (terminal $Fuc\alpha$ 1-GlcNAc, m/z 456,2). Melko intensiivisen fragmentin alkuperä kohdassa m/z 455,2 on jossain määrin monimutkainen. Sen olemus osoitettiin tuottamalla B_2^- , $Y_{2\alpha}$ ja $Y_{2\beta}$ -fragmentit korkealla purkausjännitteellä ja keräämällä MS/MS/MS-aineistoa näillä pintafragmenteilla (ei esitetty). Vain Y-ionit

10 tuottivat m/z 455-ionin, joten sen täytyy sisältää pelkistävän pään. Me ehdotamme, että tämä on $^{0,4}X_1$ -ioni, joka muodostuu viimeistä edellisen GlcNAc-renkaan ristiinleikkauksesta.

Fuc-TV:llä tuotetun Glykaani 3:n NMR-spektroskopia

15 Fuc-TV:llä tuotetun Glykaani 3:n 1D 1H -NMR-spektrien tulokset on esitetty Taulukossa 2. Taulukko 1 ilmaisee Taulukossa 2 käytetyn tähteiden numeroinnin. Fukoosin H1-, H5- ja H6-signaalit Glykaani 3:ssa muistuttavat niiden vastineita GlcNAc β 1-4($Fuc\alpha$ 1-3)GlcNAc-glykaaneissa (36) ja Glykaani 4:ssa, jotka analysoitiin 2D NMR:llä (Taulukko 2), mutta ne poikkeavat vastaavista -GlcNAc β 1-4($Fuc\alpha$ 1-

20 6)GlcNAc-sakkarideissa (37). Yhteenvetona NMR-aineisto vahvistaa, että fukosyloitu N-asetyylikitotriooosi, Glykaani 3, joka syntyy Fuc-TV:llä, on GlcNAc1-4($Fuc\alpha$ 1-3)GlcNAc β 1-4GlcNAc.

Ihmisen maidon Fuc-Ts:llä katasyloitu N-asetyylikitotriooosin ja GDP-fukoosin reaktio

25 N-asetyylikitotriooosia (1000 nmol, 5 mM), GDP-fukoosia (600 nmol, 3 mM) ja 1,4 mU entsyymiä inkuboitettiin neljä päivää 37 °C:ssa, mikä tuotti oligosakkaridiseoksen. Ioninvaihdolla suoritettua suolanpoistoa, miedon β -N-asetyyliheksosaminidaasikäsittelyn ja peräkkäisten HPLC-geelisuodatusten jälkeen saatiin 221 nmol puhdistettua fukosyloitu N-asetyylikitotriooosinäyte. MALDI-TOF MS

30 osoitti, että tämä tuote sisälsi 92 % fukosyloitua N-asetyylikitotriooosia ja 7 % N-asetyylikitotriooosia. Tuotteen 1D 1H -NMR-spektri oli melkein identtinen Fuc-TV:llä tuotetun Glykaani 3:n spektrin kanssa. Myös Glykaani 3:n pelkistetyn muodon ESI-

MS-tulokset oli identtistä vastaaviin tuloksiin, jotka oli saatu Fuc-TV:llä tuotetun Glykaani 3:n pelkistetyllä johdannaisella (ei esitetty).

ESIMERKKI 2

5

Fuc-TV:llä katasyloitu N-asetyyli-kitotetraosin ja GDP-fukoosin reaktio

- N-asetyylikitotetraosia (1000 nmol, 5 mM), GDP-fukoosia (1000 nmol, 5 mM) ja 25 mU ihmisen Fuc-TV:tä inkuboitui viisi päivää 37 °C:ssa, ja tuloksena olleen oligosakkaridiseoksen eristys HPLC-geelisuodatuksella johti tuotteeseen, joka sisälsi
- 10 32 mol % fukosyloitua N-asetyylikitotetraosia ja 68 % reagoimatonta N-asetyylikitotetraosia (Kuva 2A). Seoksen mieto käsittely "jack bean" β -N-aseyyliheksosaminidaasilla, ja sitä seurannut kromatografinen GlcNAc:sta vapautuneiden poistaminen, tuotti oligosakkaridiseoksen, joka sisälsi 50 %
- 15 Fuc₁GlcNAc₄:a, 6 % GlcNAc₄:a, 8 % Fuc₁GlcNAc₃:a, 14 % GlcNAc₃:a, 22 mol % GlcNAc₂:a. Tämän seoksen koostumus viittaa siihen, että β -N-
- asetyyliheksosaminidaasi pilkkoo myös fukosyloitua N-asetyylikitotetraosia paljon hitaammin kuin N-asetyylikitotetraosia, vahvistaen Glykaani 3:n pilkkomiseen liittyvän analogisen aineiston. Seuraavaksi oligosakkaridiseos fraktioitiin HPLC-
- 20 geelisuodatuksella, jolloin saatiin puhdistettua tuotetta (225 nmol), joka sisälsi 93 mol % fukosyloitua N-asetyylikitotetraosia ja 7 % N-asetyylikitotetraosia.

- 25 Toinen fukosylaatioseos sisältäen 11 % fukosyloitua N-asetyylikitotetraosia ja 89 % N-asetyylikitotetraosia erotettiin isokraattisella HPAE-ajolla (4 x 250 mm) Dionex CarboPac PA-1 -pylväällä (Dionex, Sunnyvale, CA) pylväällä käyttäen 40 mM NaOH:ia eluenttina (Kuva 1A). Eluointipiikki kohdassa 7,62 min sisälsi fukosyloitua N-asetyylikitotetraosia. Puhdistetun tuotteen, Fuc-TV:llä syntetisoidun Glykaani 4:n, 1D ¹H-NMR -spektri oli melkein identtinen ihmisen maidon Fuc-Ts:llä syntetisoidun Glykaani 4:n spektriin (katso alla).

- 30 Näyte puhdistettua Glykaani 4:ää pilkkottiin perusteellisella "jack bean" β -N-asetyyliheksosaminidaasikäsittelyllä ja tällöin saatiin oligosakkaridi, joka käyttäytyi geelisuodatuksessa kuin noin 1,5 glukoosiyksikköä N-asetyylikitotetraosia pienempi yhdiste, mikä viittaisi siihen, että se oli menettänyt GlcNAc-yksikön. Tämän

näkemyksen vahvasti MALDI-TOF-analyysi, jolloin nähtiin 89 mol % Fuc₁GlcNAc₃ ja 11 % Fuc₁GlcNAc₂. Vähäisemmät tuotelajit olivat luultavasti menettäneet perusteellisen pilkkoutumisen aikana sekä ei-pelkistävän pään GlcNAc:n että pelkistävän pään GlcNAc:n (katso alla kohta: fukosyloidun N-asetyyliheksosaminidaasikäsittely).

Yhteenvetona todettakoon, että Fuc-TV:llä tuotetun Glykaani 4:n analyttinen aineisto on yhtenevä rakenteen GlcNAcβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc kanssa.

Ihmisen maidon Fuc-T:iden katalysoima Glykaani 4 - synteesi

N-asetyylikitotetraosia (6,0 μmol, 5 mM), GDP-fukoosia (3,0 μmol, 2,5 mM) ja 8,7 mU entsyymiä inkuboitiin neljä päivää 37 °C:ssa. Suolan poiston ja HPLC-geelisuodatusajon jälkeen, fukosyloitu tuote erotettiin fukosyloimattomasta N-asetyylikitotetraosista isokraattisella HPAEC-ajolla, jossa käytettiin 40 mM NaOH:ia (ei esitetty). Puhdistetusta tuotteesta poistettiin suola ioninvaihdolla ja lisäksi sitä puhdistettiin HPLC-geelisuodatuksella, jolloin saatiin 744 nmol monofukosyloitua N-asetyylikitotetraosia. Tuotteen MALDI-TOF-massaspektrometria osoitti, että se ei ollut kontaminoitunut N-asetyylikitotetraosiakseptorilla (ei esitetty).

Ihmisen maidon Fuc-Ts:llä tuotettu puhdistettu Glykaani 4 –näyte käsiteltiin perusteellisesti ”jack bean” β-N-asetyyliheksosaminidaasilla. HPLC-puhdistetun oligosakkarididigestion MALDI-TOF-MS-analyysillä nähtiin 91 mol % Fuc₁GlcNAc₃:a ja 9 % Fuc₁GlcNAc₂:a.

Ihmisen maidon Fuc-T:illä tuotetun Glykaani 4:n massaspektrometrinen karakterisointi

Monofukosyloitu N-asetyylikitotetraosialikvotti pelkistettiin, permetyloitiin, ja se analysoitiin ESI-MS:llä. Kaksoisvarattu [M+2Na]²⁺-ioni (m/z 631,6) valittiin MS/MS:ää varten. MS/MS-spektrin matalan massan alue muistuttaa vastaavaa monofukosyloidun N-asetyylikitotrioozin spektriä omaten samat B₁-fragmentit substituomattoman terminaalin GlcNAc-yksiköstä (m/z 282,2, m/z 260,2) ja samat Y₁-ionit pelkistävän pään GlcNAc-alditolista (m/z 316,2, m/z 338,2). Lisäksi Y_{2α}/B₂-

ioni (m/z 442,4), B_3 -ioni (m/z 946,8), ja $Y_{3\alpha}$ -ioni (m/z 980,6) vahvistavat, että fukoosiyksikkö on kytkettynä toiseen keskiketjun GlcNAc-yksiköistä. Y_2 -ioni kohdassa m/z 561,4 viittaisi siihen, että tämä disakkaridifragmentti kantoi vain yhtä monosakkaridisubstituenttia, ja siten fukoosin täytyy sijaita viimeistä edellisessä

5 GlcNAc-tähteessä. Tämän vahvistaa suoraan kohdassa m/z 701,6 sijaitseva B_2 -ioni, joka kantaa ei-pelkistävän terminaalin rakennetta $\text{GlcNAc}\beta 1\text{-(Fuc}\alpha 1\text{)-GlcNAc}$. Jopa MS/MS-aineiston lähempi tarkastelu erittäin pienten fragmenttien osalta ei tuonut esiin mitään spesifistä muuta pentasakkaridi-isomeeria vastaavaa fragmenttia, ja siten me päättelemme, että N-asetyylikitotetraoosi fukosyloituu ainoastaan ei-redusoivan

10 pään viimeistä edelliseen GlcNAc-tähteeseen.

Ihmisen maidon Fuc-T:illä tuotetun Glykaani 4:n NMR-spektroskopinen analyysi

Puhdistetun tuotteen, glykaani 4:n (Taulukko 3), 1D ^1H -NMR-spektri toi ilmi fukoosi H_{1-} , H_{5-} ja H_{6-} signaalit, jotka ovat konjugoimattomissa N-glykaaneissa tyypillisiä

15 $\alpha 3$ -kytketylle fukoosille enemmän kuin $\alpha 6$ -kytketylle fukoosille (36, 37). Uloimman GlcNAc_6 :n H_4 -signaali oli samanlainen kuin sen Glykaani 3 –analogeilla, vahvistaen sen, että fukoosi on kytketty ei-pelkistävän pään viimeistä edelliseen GlcNAc-yksikköön. Fukoosin ja ei-pelkistävän pään GlcNAc_6 :n protonisignaali osoitettiin Glykaani 4:n DQFCOSY- ja TOCSY-spektreistä. 2D NMR-tulokset lujittivat sitä

20 huomiota, että Glykaani 4:n ei-pelkistävän pään elementit ovat samankaltaiset kuin Glykaani 3:lla.

Yhteenvetona todettakoon, että NMR-aineisto vahvisti MS-tulokset ja pilkkoutumistulokset, mikä todisti, että ihmisen maidon Fuc-T:illä tuotettu Glykaani 4

25 vastaa rakennetta $\text{GlcNAc}\beta 1\text{-4(Fuc}\alpha 1\text{-3)GlcNAc}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-4GlcNAc}$.

ESIMERKKI 3

N-asetyylikitoheksaoosin ja GDP-fukoosin ihmisen FucTV:llä katasyloitu reaktio

30 N-asetyylikitoheksaoosia (1,0 μmol , 5mM) fukosyloitiin GDP-fukoosilla (1,0 μmol , 5 mM) ja 25 mU:lla entsyymiä huoneenlämpötilassa viiden päivän ajan. Tyypillisen puhdistetun oligosakkaridituoteseoksen MALDI-TOF MS osoitti, että 31 % N-asetyyliheksaoosista oli fukosyloitu (Kuva 2B). Tuotesakkaridit puhdistettiin edelleen

HPAE-kromatografia-ajolla isokraattisesti 40 mM NaOH:lla (Kuva 1B). Eluutiopiikki kohdassa 7,09 min koottiin yhteen, siitä poistettiin suola ja se puhdistettiin edelleen HPLC-geelisuodatuksella. Heptasakkaridituote (195 nmol) sisälsi MALDI-TOF-analyysin mukaan 96 % monofukosyloitua N-asetyylikitoheksaoosia, Glykaani 6, ja 4 % N-asetyylikitoheksaoosia, kuva 2C. 1D 1H NMR-spektreistä nähdään, että H1 signaalit GlcNAc5:ssa, GlcNAc6:ssa ja Glykaani 6:n fukoosiyksikössä ovat melkein identtiset verrattuna vastaaviin Glykaani 4:ssa. Tämä viittaa siihen, että Glykaani 6 on GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc. Tätä käsitystä tukee edelleen identtiset ulomman GlcNAc6-yksikön H4-signaalit ja fukoosi H5 -resonanssit molemmissa glykaaneissa. Tämä jälkimmäisen signaaliparin samankaltaisuus molemmissa glykaaneissa on erityisen merkittävä, koska niiden väliset vuorovaikutukset Glykaani 4:ssa ovat tunnettuja (katso yllä), ja ne ovat todennäköisesti hyvin herkkiä rakenteellisille eroille. Samalla tavalla, Glykaani 6:n ja Glykaani 4:n fukoosi H5 -signaalien samankaltaisuus puhuu näiden kolmen sakkaridin ei-pelkistävän alueen identtisyyden puolesta.

Glykaani 6:n "jack bean" β -N-asetyyliheksosaminidaasikäsittely

Fuc-TV:llä tuotettuun Glykaani 6:n ja N-asetyylikitoheksaoosin seokseen (27:73 mol/mol (Kuva 2B)) kohdistettiin mieto "jack bean" β -N-asetyyliheksosaminidaasikäsittely kuten aiemmin on kuvattu. Saadut oligosakkaridit eristettiin tyypillisenä seoksena HPLC-geelisuodatuksella. MALDI-TOF MS toi esiin sen, että seos sisälsi Fuc₁GlcNAc₆:a (3.5 mol %), GlcNAc₆:a (1.7 %), Fuc₁GlcNAc₅:a (40 %), Fuc₁GlcNAc₄:a (3.5 %); myös pieniä N-asetyylikito-oligosakkaridejä, N-asetyylikitobioosista N-asetyylikitopentaoosiin, havaittiin (Kuva 2D). Digestion päätuote, monofukosyloitu N-asetyylikitopentaoosi, Glykaani 5, puhdistettiin HPLC-geelisuodatusajolla. MALDI-TOF MS viittasi siihen, että Glykaani 5:sta saatiin täten puhtaudella 83 %; se oli kontaminoitunut muutamilla penta- ja heksasakkarideilla. Kemiaalliset siirtymät on esitetty Taulukossa 2. NMR-aineisto esittää melkein identtiset H1-signaalit GlcNAc5:ssa, GlcNAc6:ssa ja Glykaani 5:n ja Glykaani 4:n fukoosiyksiköissä, viitaten siihen, että edellisen rakenne on GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc. Tätä käsitystä tukee edelleen molempien glykaanien identtiset ulomman GlcNAc-yksiköiden H4-signaalit ja fukoosi H6 -resonanssit. Siten mieto "jack bean" β -N-

asetyyliheksosaminidaasikäsittely vapautti yllättäen GlcNAc-yksikön Glykaani 6:n pelkistävästä päästä, mutta ei hyökännyt tuotteen, Glykaani 5:n, pelkistävään päähän yhtä tehokkaasti.

Puhdistetun Glykaani 6:n ja Glykaani 4:n käsittely "jack bean" β -N-

5 *asetyyliheksosaminidaasin endo-kitinaasi aktiviteetilla*

Kun puhdistettua Fuc-TV:llä tuotettua Glykaani 6:sta käsiteltiin miedolla "jack bean" β -N-aminidaasilla, saadussa digestiossa nähtiin MALDI-TOF MS:llä vain 5 mol % koskematon substraattia; 85 % materiaalista oli muunnettu Fuc₁GlcNAc₅:ksi ja 11 % Fuc₁GlcNAc₄:ksi (Kuva 2E). Tulokset vahvistavat, että endokitinaasi pilkkoo nopeasti
10 Glykaani 6:sta, vapauttaen pääasiassa yhden GlcNAc-yksikön pelkistävästä päästä, ja entsyymi saattaa olla kykenevä leikkaamaan pois myös N-asetyylikitobioosi-yksikön Glykaani 6:n pelkistävästä päästä, muodostaen näin Glykaani 4:n. Vaihtoehtoisesti, Glykaani 4 saattaa olla muodostunut GlcNAc-yksikön Fuc₁GlcNAc₅:n pelkistävästä päästä vapautumisen myötä.

15

Kun puhdistettua Fuc-TV:llä tuotettua Glykaani 4:sta käsiteltiin miedolla "jack bean" β -N-aminidaasilla, saadussa digestiossa nähtiin MALDI-TOF-MS:llä, että suurin osa substraatista (91 mol %) oli selviytynyt, ja vain 6 % Fuc₁GlcNAc₃:a oli muodostunut; 3 % materiaalista löytyi fukoosista vapaana N-asetyylikitotetraosina (Kuva 2F).

20 Siten endokitinaasiaktiviteetti näytti pilkkovan pois vain yhden GlcNAc-yksikön Glykaani 4:n pelkistävästä päästä.

ESIMERKKI 4

25 *Sellobioosin fukosylaatio*

Sellobioosia (4000 nmol, 20 mM, Thomas Kerfoot and Co. Ltd:ltä), GDP-[¹⁴C]Fuc:a (1000 nmol, 5 mM, 100 000 cpm) ja rekombinanttia fukosyylitransferaasia V (25 mU, 50 ml kaupallista entsyymivalmistetta Calbiochemiltä) inkuboitiin 50 mM MOPS-NaOH:ssa, pH 7,5, joka sisälsi 8 mM MnCl₂:a, 100 mM NaCl:a, 1 mg/ml BSA:ta ja
30 0,02 % NaN₃:sta, 200 ml:n kokonaistilavuudessa huoneenlämpötilassa 4 päivää ja 16 tuntia. Reaktiotuotteista poistettiin suola ajamalla näyte läpi 1,5 ml:n Dowex AG 1-X8- ja Dowex AG 50W-X8 –kerroksien läpi. Osalla tuotteista ajettiin paperikromatografia, jossa näkyi trisakkaridityyppinen tuote, joka kulkeutui lähelle

- maltrioosia (Rmaltotrioosi= 0,97 markkeri, näytteen sisältämä glyseroli saattaa vaikuttaa kulkeutumiseen), ja leveä piikki (näytteen sisältämän glyserolin leventämä), joka mahdollisesti vastaa vapaata [^{14}C]Fuc:a. Liuotin A:ta käytettiin kuten on kuvattu (38):ssa käyttäen n-butanoli-etikkahappo:veden (4:1:5, v/v, liuotin A) ylempää faasia, ja tuikelasku tehtiin pienistä paperisuikaleista. Suurin osa (75 %) tuotteesta ajettiin geelisuodatuskromatografiassa Biogel P-2 (Biorad) –pylväässä. Saatiin monofukosyloidulle sellobioosille odotettavassa kohdassa eluoitunut radioaktiivisten tuotteiden piikki (radioaktiivisuuden perusteella 256 nmol, laskettu kokonaissaanto 340 nmol) ja toinen radioaktiivinen piikki, joka sisälsi [^{14}C]Fuc-tyyppistä materiaalia.
- Tuotepiikin ensimmäisen puolikkaan fraktiot analysoitiin, ja ne sisälsivät sakkaridia, jonka koko vastasi fukosyloitua sellobioosia MALDI-TOF-massaspektrometriassa, monoisotooppinen m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ lähellä kohtaa 511,2 ja m/z $[\text{M}+\text{K}]^+$ lähellä kohtaa 527,2, fraktiot sisälsivät hyvin pieniä määriä tai eivät yhtään muita mahdollisia sakkarideja kuin sellobioosi tai sellotrioosi. Yhteenkoottu sakkaridi (radioaktiivisuuden perusteella 150 nmol) analysoitiin NMR-spektroskopialla. NMR-spektroskopia toi esiin Fuc H1 α :n signaalin kohdassa 5,425 ppm, Fuc H1 β :n signaalin kohdassa 5,369 ppm ja pelkistävän Glc H1a:n signaalin kohdassa 5,189 ppm ja Glc H1 β :n signaalin kohdassa 4,655 ppm samalla tavalla kuin on kuvattu -Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc:n yhteydessä (39).
- Tuote (<0,5 pmol), joka kulkeutuu samalla tavalla paperikromatografiassa (Rmaltotrioosi=1,04), voidaan saada inkuboimalla täyspitkää Fuc-TV:tä ekspressoivien CHO-solujen lysaattia, GDP-[^{14}C]Fuc:ia (1 nmol, 100 000 cpm) ja 100 nmol sellobioosia yhden tunnin ajan kuten on kuvattu (40):ssa.

ESIMERKKI 5

Laminaaribioosin ja laminaaritetraosin reaktiot

- Glc β 1-3Glc + GDP-Fuc -----> Glc β 1-3(Fuc α 1-4)Glc
- Glc β 1-3Glc β 1-3Glc β 1-3Glc + GDP-Fuc ----->
- Glc β 1-3(Fuc α 1-4)Glc β 1-3Glc β 1-3Glc
- +Glc β 1-3Glc β 1-3(Fuc α 1-4)Glc β 1-3Glc
- +Glc β 1-3Glc β 1-3Glc β 1-3(Fuc α 1-4)Glc

Laminaaribioosin (1000 nmol, 5 mM, Seikagu) ja laminaaritetraosin (1000 nmol, 5 mM, Seikagu) annettiin reagoida GDP-[¹⁴C]Fuc:n (1000 nmol, 5 mM, 100 000 cpm) ja rekombinantin fukosyylitransferaasi V:n kanssa (25 mU, 50 ml kaupallista entsyymivalmistetta Calbiochemiltä) kuten yllä. Molempien reaktioiden tuotteista
 5 poistettiin suola kuten yllä. Laminaaribioosista saadut tuotteet puhdistettiin P-2 geelisuodatuskromatografialla, jolloin saatiin radioaktiivinen trisakkaridityyppinen tuote.

Laminaaritetraosista saadut tuotteet, joista oli poistettu suola, puhdistettiin myös P-2
 10 geelisuodatuskromatografialla ja radioaktiivinen piikki (radioaktiivisuuden perusteella 174 nmol) saatiin pentasakkaridille oletetussa kohdassa. 131 nmol tuotetta monoisotooppisella m/z [M+Na]⁺ (ero pienempi kuin 0,1 %) lähellä kohtaa 835,3 ja m/z [M+K]⁺ lähellä kohtaa 851,3 yhdistettiin piikin etu- ja keskifraktioista, fraktiot sisälsivät vähemmän kuin 4 % akseptoria, mitään muita sakkaridituotteita ei havaittu
 15 MALDI-TOF-massaspektrometria-analyysissa. Puhdistetut sakkaridituotteet analysoitiin NMR-spektroskopiolla.

ESIMERKKI 6

20 *Kondroitiinisulfaatin desulfaatio, pelkistys ja fukosylaatio*

Kondroitiinisulfaatti (hain rusto, Sigma) pilkottiin hyaluronidaasilla (naudan kivekset, Sigma; kondroitiinisulfaatteja voidaan pilkkoa myös kondroitiiniaaseilla, jolloin saadaan olikosakkarideja, joilla on delta-uronihappo ei-pelkistävässä päässä) sulfoiduiksi oligosakkarideiksi

25 kuten[GlcAβ1-3(sulf-6)GalNAcβ1-4]_nGlcAβ1-3(sulf-6)GalNAc. Fraktiot, jotka sisälsivät tetrasakkaridityyppisiä materiaaleja, puhdistettiin ja desulfoitiin oleellisesti kuten on kuvattu (41):ssä. Tetrasakkaridi- ja heksasakkaridifraktiot puhdistettiin geelisuodatuksella ja ioninvaihtokromatografioilla. Samanlaisia oligosakkarideja tuotettiin myös aluksi desulfoimalla ja sitten pilkkomalla hyaluronidaasilla ja
 30 puhdistamalla tuotteet. Tetrasakkaridien GlcA-tähteet pelkistettiin Glc:ksi EDAC:lla (1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyyli)karbodimiidi) ja NaBH₄:lla. Pelkistetty tetrasakkaridi Glcβ1-3GalNAcβ1-4Glcβ1-3GalNAc_{ol} puhdistettiin ja fukosyloitiin käyttäen GDP-Fuc:ia ja ihmisen maidon fukosyylitransferaasia/transferaaseja.

MALDI-TOF-massaspektrometria toi esiin piikit kohdissa m/z 919,8 ja m/z 935,8, jotka vastaavat tuotetta $\text{Glc}\beta 1\text{-3GalNAc}\beta 1\text{-4(Fuc}\alpha 1\text{-3)Glc}\beta 1\text{-3GalNAc}$ (lask. m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ on kohdassa 919,7 ja m/z $[\text{M}+\text{K}]^+$ on kohdassa 935,7).

5 ESIMERKKI 7

$\text{GlcNAcyl}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-4GlcNAc}$:a, jossa asyyli on trans-9-oktadekenoyl, akseptorin synteesi on kuvattuna (13):ssa, voidaan inkuboida Fuc-TVI:n ja MnCl_2 :n kanssa olosuhteissa, jotka kuvataan yllä Fuc-TVI:lle, mutta edulliset akseptorikonsentraatiot ovat välillä 0,1 – 0,5 mM. Tuote $\text{GlcNAcyl}\beta 1\text{-4(Fuc}\alpha 1\text{-3)GlcNAc}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ puhdistetaan kromatografisesti ja analysoidaan NMR-spektroskopiolla ja massaspektrometrialla.

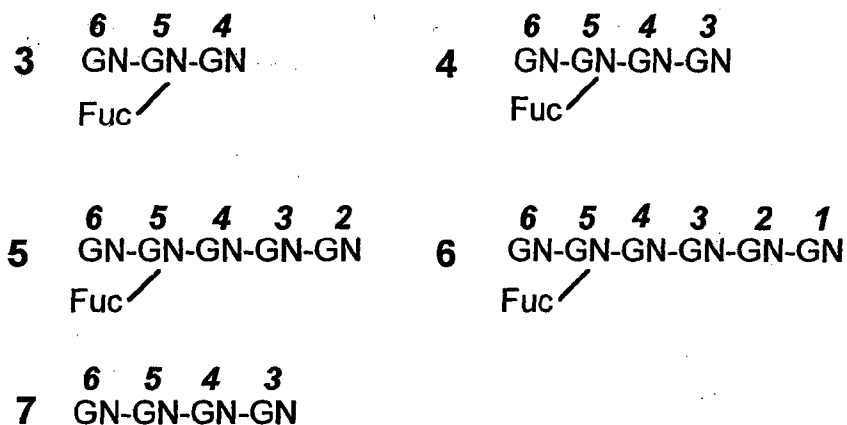
ESIMERKKI 8

15

N-asetyylikitotetraosia voidaan inkuboida Fuc-TVI:n ja MnCl_2 :n kanssa olosuhteissa, jotka kuvataan yllä Fuc-TVI:lle. Tuotetta $\text{GlcNAc}\beta 1\text{-4(Fuc}\alpha 1\text{-3)GlcNAc}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ voidaan saada melkein kvantitatiivinen saanto ja se puhdistetaan HPAE-kromatografiolla. Tuotteen NMR- ja massaspektrometritulokset ovat käytännöllisesti identtiset, Fuc-TV:llä saatavan, fukosyloidun N-asetyylikitotetraosin kanssa.



Taulukko 1. Fukosyloitujen N-asetyylikito-oligosakkaridien rakenteet tässä tutkimuksessa. GN on GlcNAc ja Fuc on L-fukoosi, viiva – merkitsee β 1-4-kytköstä ja viiva / on α 1-3-kytkös, tähteiden numerointi on kursivilla.



Taulukko 2. Rakenteellisten merkikiryhmien ^1H kemialliset siirtymät (ppm) Glykaaneille 3-7 23 °C:ssa.

n.d. = ei määritetty

Protonitähde		Glykaanit				
		3	4	5	6	7
H1	1	-	-	-	5.181(α)/4.688(β)	-
	2	-	-	5.182(α)/4.688(β)	4.578/4.565 ^a	-
	3	-	5.184(α)/4.689(β)	4.579/4.567 ^a	4.565	5.185(α)/4.689(β)
	4	5.185(α)/4.688(β)	4.579/4.570 ^a	4.567	4.565	4.58
	5	4.580/4.571 ^a	4.570	4.567	4.565	4.58
	6	4.522	4.519	4.517	4.516	4.58
H4	fukoosi	5.124	5.119	5.117	5.116	-
	6	3.238	3.237	3.236	3.235	n.d.
H5	fukoosi	4.764	4.762	4.762	4.758	-
CH3	fukoosi	1.268	1.267	1.265	1.264	-

^a Annetut kaksi kemiallisen siirtymän arvoa tulevat signaaleista, jotka vastaavat oligosakkaridien α - ja β -pyranoosimuotoja, ja jotka mainitaan tässä järjestyksessä.

Taulukko 3.
Glykaani 4:n NMR-tulokset

Protoni	GlcNAc6	Fukoosi
H1	4.519	5.119
H2	3.735	3.707
H3	3.535	3.938
H4	3.237	3.803
H5	3.428	4.762
H6	3.607	-
H6'	3.963	-
CH3	-	1.267

Kirjallisuus

1. Johnston, D. S., Wright, W. W., Shaper, J. H., Hokke, C. H., Van den Eijnden, D. H., and Joziase, D. H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**(4), 1888-1895
2. Gooi, H. C., Feizi, T., Kapadia, A., Knowles, B. B., Solter, D., and
5 Evans, M. J. (1981) *Nature* **292**, 156-158
3. Dodd, J., and Jessel, T. M. (1986) *J. Exp. Med.* **124**, 225-238
4. Oudega, M., Marani, E., and Thomeer, R. T. W. M. (1992) *Histochem. J.* **24**, 869-877
5. Butcher, E. C., and Picker, L. J. (1996) *Science* **272**, 60-66
- 10 6. McEver, R. P. (1997) *Glycoconjugate J.* **14**, 585-591
7. Natsuka, S., Gersten, K. M., Zenita, K., Kannagi, R., and Lowe, J. B. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 16789-16794
8. Edbrooke, M. R., Britten, C. J., Kelly, V. A. M., Martin, S. L., Smithers, N., Winder, A. J., Witham, S. J., and Bird, M. I. (1997) *Biochem. Soc. Transact.* **25**,
15 880-887
9. Kaneko, M., Kudo, T., Iwasaki, H., Ikehara, Y., Nishihara, S., Nakagawa, S., Sasaki, K., Shiina, T., Inoko, H., Saitou, N., and Narimatsu, H. (1999) *FEBS Lett.* **452**, 237-242
10. Bergwerff, A. A., van Kuik, J. A., Schiphorst, W. E. C. M., Koeleman, C. A. M., van den Eijnden, D. H., Kamerling, J. P., and Vliegthart, J. F. G. (1993) *FEBS Lett.* **334**, 133-138
20
11. Bakker, H., Scoebnakers, P.S., Koeleman, C.A.M., Joziase, D.H., van Die, I and van den Ejnden, D.H., (1997) *Glycobiology* **7**, 539-548
12. Haslam, S.M., Coles, G.C., Munn, E.A., Smith, T.S., Smith, H.F., Morris, H.R.,
25 and Dell, A., (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 30561-30570
13. Rohrig, H., Schmidt, J., Walden, R., Czaja, I., Miklasevics, E., Wieneke, U., Schell, J., and John, M. (1995) *Science* **269**, 841-843
14. Niemelä, R., Natunen, J., Penttilä, L., Salminen, H., Helin, J., Maaheimo, H., Costello, C. E., and Renkonen, O. (1999) *Glycobiology* **9**, 517-526
- 30 15. Wilson, I. B. H., Harthill, J. E., Mullin, N. P., Ashford, D. A., and Altman, F. (1998) *Glycobiology* **8**, 651-661
16. Wilkins, P. P., McEver, R. P., and Cummings, R. D. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 18732-18742
17. Varki, A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7390-7397
- 35 18. Larsen, E., Palabrica, T., Sajer, S., Gilbert, G. E., Wagner, D. D., Furie, B. C., and Furie, B. (1990) *Cell* **63**, 467-474
19. Stroud, M. R., Handa, K., Salyan, M. E. K., Ito, K., Levery, S. B., Hakomori, S., Reinhold, B. B., and Reinhold, V. N. (1996) *Biochemistry* **35**, 770-778

20. Jain, R. K., Piskorz, C. F., Huang, B.-G., Locke, R. D., Han, H.-L., Koenig, A., Varki, A., and Matta, K. L. (1998) *Glycobiology* **8**(7), 707-717
21. Grinnell, B. W., Hermann, R. B., and Yan, S. B. (1994) *Glycobiology* **4**(2), 221-225
- 5 22. Natunen, J., Niemelä, R., Penttilä, L., Seppo, A., Ruotula, T., and Renkonen, O. (1994) *Glycobiology* **4**, 577-583
23. Eppenberger-Castori, S., Lötscher, H., and Finne, J. (1989) *Glycoconjugate J.* **6**, 101-114
24. Palcic, M. M., Venot, A. P., Ratcliffe, R. M., and Hindsgaul, O. (1989) *Carbohydr. Res.* **190**, 1-11
- 10 25. Renkonen, O., Helin, J., Penttilä, L., Maaheimo, H., Niemelä, R., Leppänen, A., Seppo, A., and Hård, K. (1991) *Glycoconjugate J.* **8**, 361-367
26. Rasilo, M.-L., and Renkonen, O. (1982) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **363**, 89-93
- 15 27. Hård, K., van Zadelhoff, G., Moonen, P., Kamerling, J. P., and Vliegert, J. F. G. (1992) *Eur. J. Biochem.* **209**, 895-915
28. Marion, D., and Wüthrich, K. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 967-974
29. Bax, A., and Davis, D. G. (1985) *J. Magn. Reson.* **65**, 355-360
- 20 30. Xu, G. and Evans, J.S., (1966) *J. Magn. Reson.*, Ser. B **111**, 183-185
31. Bothner-By, A. A., Stephens, R. L., Lee, J., Warren, C. D., and Jeanloz, R. W. (1984) *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 811-813
32. Bax, A., and Davis, D. G. (1985) *J. Magn. Reson.* **63**, 207-213
33. Doddrell, D. M., Pegg, D. T., and Bendall, M. R. (1982) *J. Magn. Reson.* **48**, 323-327
- 25 34. Kay, L. E., Keifer, P., and Saarinen, T. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10663-10665
35. Wijmenga, S. S. (1989) *J. Magn. Res.* **84**, 634-642
36. Lhernould, S., Karamanos, Y., Bourgerie, S., Strecker, G., Julien, R., and Morvan, H. (1992) *Glycoconjugate J.* **9**, 191-197
- 30 37. Lawrence, C. W., Little, P. A., Little, B. W., Glushka, J., van Halbeek, H., and Alhadeff, J. A. (1993) *Glycobiology* **3**(3), 249-259
38. Renkonen, O., Penttilä, L., Makkonen, A., Niemelä, R., Leppänen, A., Helin, J. and Vainio, A. (1989) *Glycoconjugate J.*, **6**, 129-140.
- 35 39. de Vries, T., Srnka, C.A., Palcic, M.M., Swiedler, S.J., van den Ejnden, D.H. and Macher, B.A., (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 8712-8722
40. Niemelä, R., Natunen, J., Majuri, M.L., Maaheimo, H., Helin, J., Lowe, J.B., Renkonen, O. and Renkonen, R. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 4021-4026.

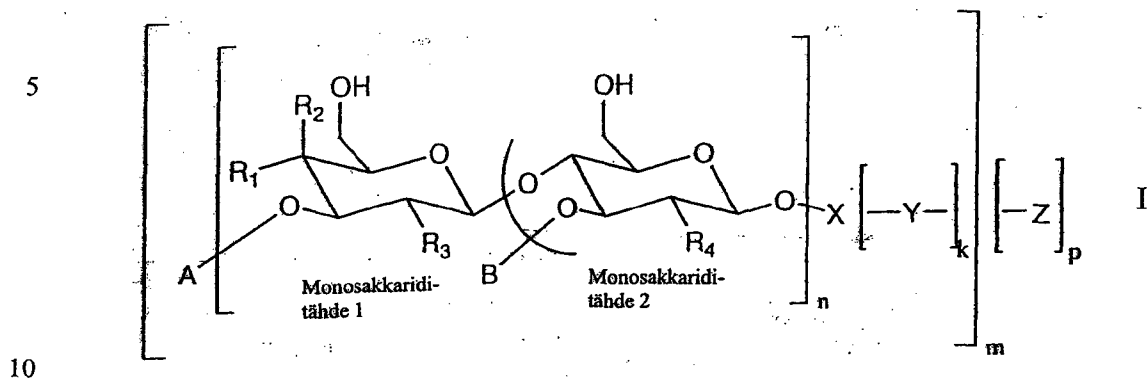
41. Nagasawa, K., Inoue, Y. and Kamata, T. (1977) *Carbohydrate Res.*, 58, 47-55.

2025

2025

Patenttivaatimukset:

1. Oligosakkaridit, joilla on kaava



jossa A on H tai glykosidisesti β 1-3-kytketty D-glukopyranosyyli-tähde (Glc β 1-3), R_1 on OH, R_2 on H, ja R_3 on OH tai asyyliamido, -NH-asyyli (so. monosakkaridi 1 on Glc tai GlcNAsyyli), tai R_1 on H, R_2 on OH, ja R_3 on asetamido -NHCOCH₃ (so. monosakkaridi 1 on GalNAc), B on H tai α -L-fukosyyli tai α -L-fukosyylianalogi, ja

15 R_4 on OH tai asetamido -NHCOCH₃ (so. monosakkaridi 2 on mahdollisesti fukosyloitu Glc tai GlcNAc), käyrä viiva sakkaridiyksiköiden välillä ilmaisee, että monosakkaridi 1 on β 1-4-kytketty monosakkaridiin 2, kun B on kytketty monosakkaridin 2 paikkaan 3, ja monosakkaridi 1 on β 1-3kytketty monosakkaridiin 2, kun B on kytketty monosakkaridin 2 paikkaan 4, monosakkaridi 1 on GalNAc vain,

20 kun monosakkaridi 2 on Glc, n on 1-100, sillä ehdolla, että molekyylissä on aina läsnä ainakin yksi α -fukosyyli- tai α -fukosyylianalogiryhmä, ja

i) p ja k ovat 0 ja m on 1, missä tapauksessa X on H, aglykonitähde tai monosakkaridi, joka on Glc, GlcNAc, Gal tai GalNAc, mahdollisesti pelkistettynä muotona, tai

25 oligosakkaridi, joka sisältää yhden tai useita kyseisiä monosakkaridiyksiköitä, jolloin monosakkaridi 2 on β 1-2-, β 1-3-, β 1-4- tai β 1-6-kytketty sakkaridiin X, sillä ehdolla, että X ei ole H kun sekä monosakkaridi 1 että 2 ovat GlcNAc, B on L-fukosyyli ja n on 1, tai

ii) p on 1, k on 0 tai 1 ja $1 \leq m \leq 1000$, missä tapauksessa X on suora sidos, tai

30 kohdassa i) kuvattu mono- tai oligosakkaridi,

Y on välike tai kytkävä ryhmä, joka kykenee kytkemään Z:aan monosakkaridin 2 tai X:n, ja Z on mono- tai polyvalentti kantajamolekyyl.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset oligosakkaridit, **tunnetut** siitä, että B on α -L-fukosyyli.

3. Patenttivaatimuksien 1 ja 2 mukaiset oligosakkaridit, **tunnetut** siitä, että A ja/tai X ovat/on H.

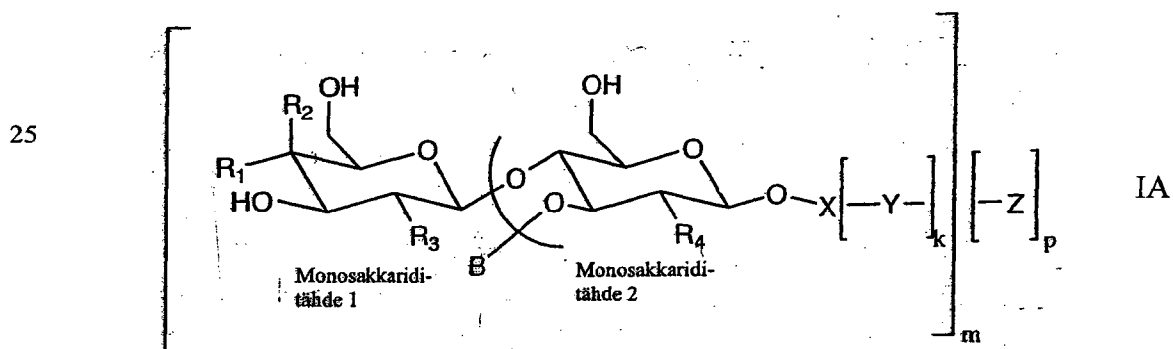
4. Patenttivaatimuksien 1, 2 tai 3 mukaiset oligosakkaridit, **tunnetut** siitä, että monosakkaridi 1 on Glc tai GlcNAc.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset oligosakkaridit, **tunnetut** siitä, että X on oligosakkaridi, joka sisältää 2 – 10 monosakkaridiyksikköä, jotka ovat glukosidisesti β 1-4- tai β 1-3-kytkettyjä Glc- tai GlcNAc-tähteisiin.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset oligosakkaridit, **tunnetut** siitä, että m on 1 – 100, edullisesti 1 – 10, ja n on 1 – 10.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset oligosakkaridit, **tunnetut** siitä, että X on aglykoniryhmä, joka on alempi alkyyli- tai fenyyliryhmä 1 – 7 hiiliatomilla tai alempi alkenyyli- tai bentsyyli- tai fenyyliryhmä 2 – 7 hiiliatomilla tai fenyyliryhmä tai 4-metyyliumbelliferyyli.

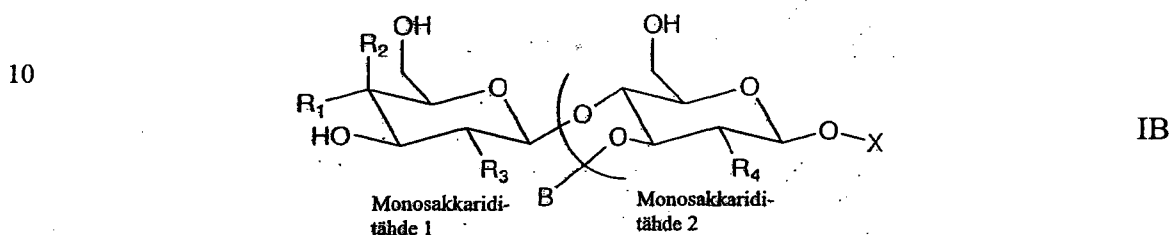
8. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset oligosakkaridit, **tunnetut** siitä, että niillä on kaava



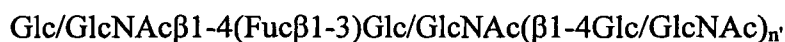
jossa symboleilla on patenttivaatimuksessa 1 kaavan I yhteydessä annetut merkitykset, edullisesti monosakkaridit 1 ja 2 ovat itsenäisesti Glc ja GlcNAc, B on L-fukosyyli ja

X on Glc tai GlcNAc tai β 1-3- tai β 1-4-kytketty oligomeeri käsittäen enintään 10 Glc- ja/tai GlcNAc-yksikköä.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset oligosakkaridit, **tunnetut** siitä, että A on H ja monosakkaridit 1 ja 2 ovat itsenäisesti Glc tai GlcNAc, B on L-fukosyyli, $p, k = 0$ ja $n = m = 1$ ja X on Glc tai GlcNAc tai β 1-3- tai β 1-4-kytketty oligomeeri käsittäen enintään 10 Glc- ja/tai GlcNAc-yksikköä, ja että niillä on kaava



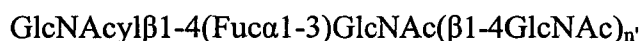
- 15 10. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset oligosakkaridit, joilla on kaava



jossa n' on kokonaisluku 1 – 8, edullisesti 1 – 6.

20

11. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset oligosakkaridit, joilla on kaava

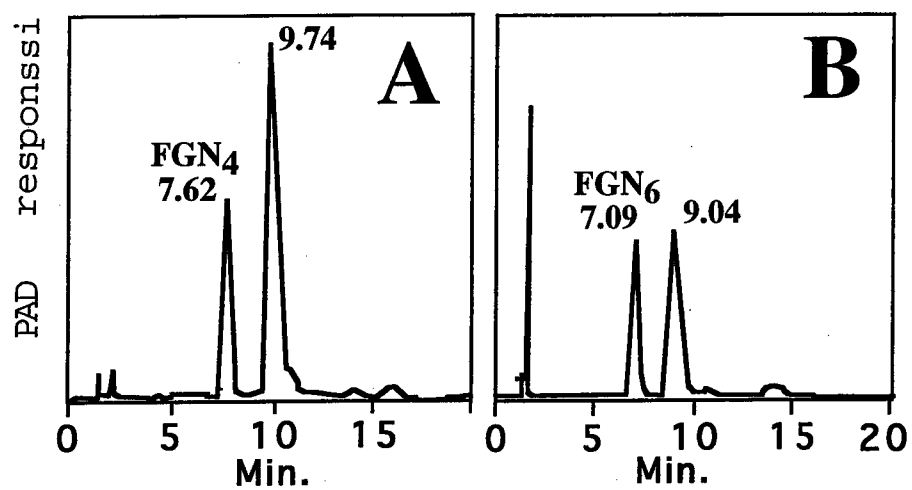


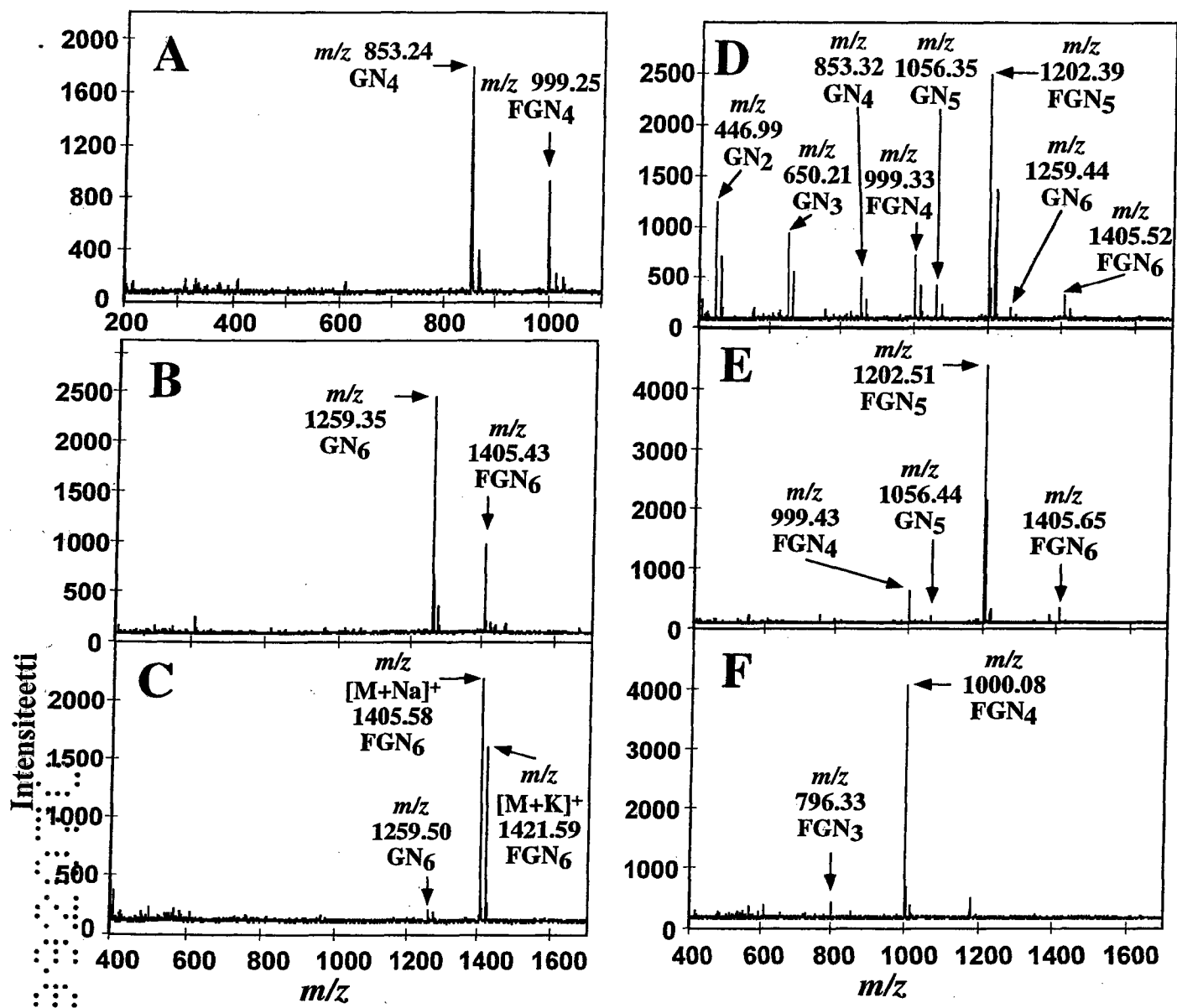
- 25 jossa n' :lla on yllä annettu merkitys ja asyyli on alkanoyyliryhmä, joka sisältää edullisesti 8 – 24 hiiliatomia ja 1 – 3 kaksoissidosta.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset oligosakkaridit, **tunnetut** siitä, että $1 \leq n \leq 1000$, monosakkariditähde 1 on GlcNAc tai GalNAc ja monosakkariditähde 2 on mahdollisesti fukosyloitu Glc, kuten yhdiste
- 30 $\text{Glc}\beta 1-(-3\text{GalNAc/GlcNAc}\beta 1-4(\text{Fuca}1-3/\text{H})\text{Glc}\beta 1-)_n-3\text{GalNAcol/GlcNAcol}$

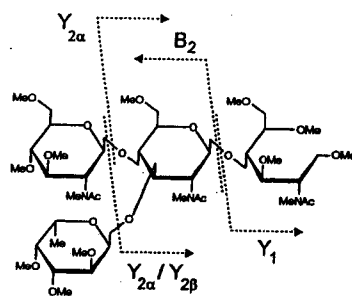
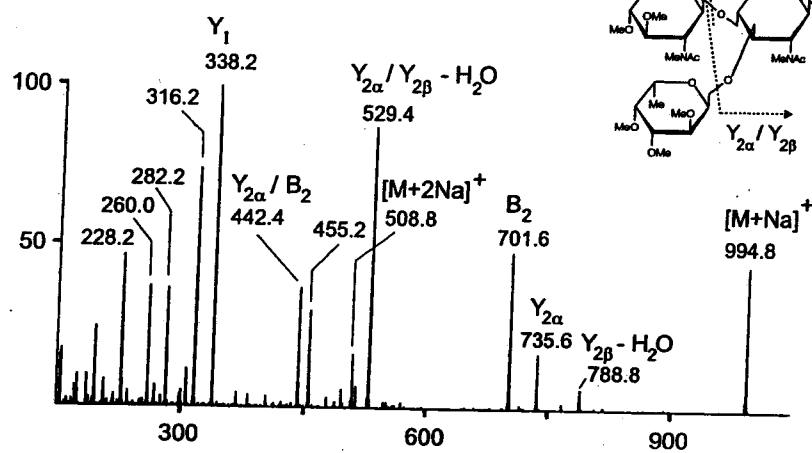
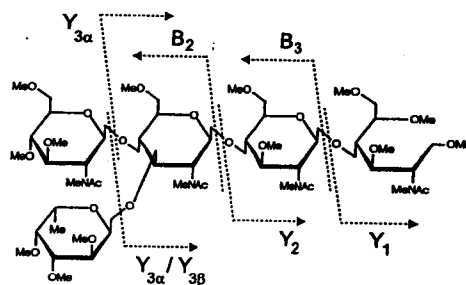
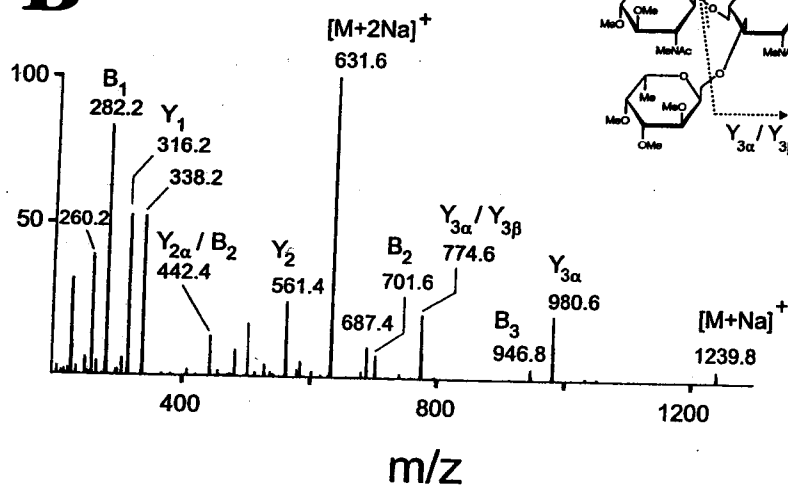
13. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisten oligosakkaridien valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että kaavan I yhdiste, jossa B on aina H, fukosyloidaan nukleotidisokeridonorilla, joka sisältää L-fukoosia tai sen analogia, fukosyylitransferaasientsyymien läsnäollessa, ja näin valmistettu fukosyloitu sakkaridi otetaan mahdollisesti talteen.
14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että fukosyylitransferaasi on lisäksi α 1-3- tai α 1-3/4fukosyylitransferaasi.
15. Patenttivaatimuksen 13 tai 14 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että N-asetyylikito-oligosakkaridia käytetään lähtöaineena.
16. Jonkin patenttivaatimuksista 13 – 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että nukleotidisokeridonori, joka sisältää L-fukoosia, on GDP-L-fukoosi.
17. Jonkin patenttivaatimuksista 14 – 16 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että fukosyylitransferaasi on ihmisen α 1-3fukosyylitransferaasi tai α 1-3/4fukosyylitransferaasi III-VII, IX tai ihmisen maidon α 1-3/ α 1-3/4fukosyylitransferaasi.
18. Jonkin edellä olevista patenttivaatimuksista 13 – 17 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että se sisältää lisävaiheen, jossa kaavalla I saatua tuotetta käsitellään β -N-asetyyliheksosaminidaasilla.







Suhteellinen intensiteetti (%)

A**B**

PATENTTIHAKEMUS NRO	LUOKITUS
19992070	C08B 37/00, C12P 19/18

TUTKITTU AINEISTO
Patenttijulkaisukokoelma (FI, SE, NO, DK), tutkitut luokat: C08B 37/00, C12P 19/18
Tiedonhaut ja muu aineisto Chemical Abstracts. American Chemical Society. 1967- [online] STN International Chemical Abstracts 1996-[CD-ROM]. American Chemical Society. EPO documentation, EPO, 1970- [online] EPOQUE

VIITEJULKAISUT		
Kategoria^{*)}	Julkaisun tunnistetiedot	Koskee vaatimuksia
X	Glycoconjugate Journal 15, 873-883 (1998)-Manfred Nimtz & al., "In vitro α 1-3 or α 1-4 fucosylation of type I and II oligosaccharides with secreted forms of recombinant human fucosyltransferases III and VI"	1-18
^{*)} X Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu yksinään tarkasteltuna Y Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu, kun otetaan huomioon tämä ja yksi tai useampi samaan kategoriaan kuuluva julkaisu A Yleistä tekniikan tasoa edustava julkaisu, ei kuitenkaan patentoitavuuden este		
Päiväys 12.5.2000	Tutkija Liisa Helle	