

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002 年 12 月 19 日 (19.12.2002)

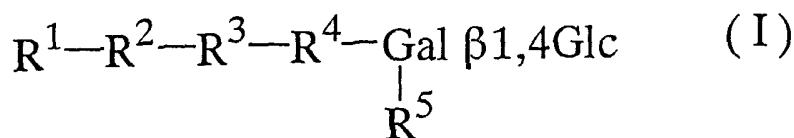
PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/100875 A1

- (51) 国際特許分類: C07H 5/06
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/05787
- (22) 国際出願日: 2002 年 6 月 11 日 (11.06.2002)
- (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2001-175930 2001 年 6 月 11 日 (11.06.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和
醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO.,
LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一
丁目 6 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 下瀬 強 (SHI-
MOSE, Tsuyoshi) [JP/JP]; 〒747-8522 山口県防府市協
和町 1 番 1 号 協和醸酵工業株式会社 生産技術研究所
内 Yamaguchi (JP). 長野 宏 (NAGANO, Hiroshi) [JP/JP];
〒747-8522 山口県防府市協和町 1 番 1 号 協和醸酵
工業株式会社 生産技術研究所内 Yamaguchi (JP). 有
本 勝 (ARIMOTO, Masaru) [JP/JP]; 〒530-8280 大阪府
- (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,
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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).
- 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: CRYSTALS OF OLIGOSACCHARIDES AND PROCESSES FOR PREPARATION THEREOF

(54) 発明の名称: オリゴ糖結晶およびオリゴ糖結晶の製造方法



(57) Abstract: The invention provides crystals of oligosaccharides which are useful as raw materials or intermediates for health foods, drugs, cosmetics and so on; and processes for preparation of the crystals which are suitable for mass or industrial production, that is, a process for

preparation of crystals of trisaccharides or higher saccharides, characterized by adding an aqueous solution of a trisaccharide or a higher saccharide to a water-miscible organic solvent; a process for preparation of crystals of oligosaccharides, characterized by adding an aqueous solution of an oligosaccharide represented by the general formula (I) to a water-miscible organic solvent; and crystals of oligosaccharides represented by the general formula (I): (I) wherein Gal is galactose; Glc is glucose; R¹ is a monosaccharide or amino sugar residue, or a derivative thereof; R², R³ and R⁴ are each independently a monosaccharide or amino sugar residue, a derivative thereof, -X(-Y)- (wherein X and Y are each independently a monosaccharide or amino sugar residue or a derivative thereof), or a single bond; and R⁵ is hydrogen, a monosaccharide or amino sugar residue, or a derivative thereof.

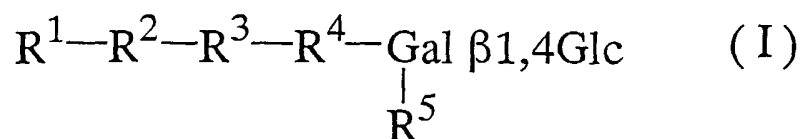
[続葉有]

WO 02/100875 A1



(57) 要約:

本発明は、健康食品、医薬品、化粧品等の原料または中間体等として有用なオリゴ糖結晶および大量合成または工業化に適したオリゴ糖結晶の製造方法を提供する。すなわち、3糖以上のオリゴ糖含有水溶液を、水混和性有機溶剤に添加することを特徴とする3糖以上のオリゴ糖結晶の製造方法、または、一般式 (I)



[式中、Gal はガラクトースを表し、Glc はグルコースを表し、 R^1 は単糖残基もしくはアミノ糖残基、またはそれらの誘導体を表し、 R^2 、 R^3 および R^4 は同一または異なって、単糖残基もしくはアミノ糖残基、それらの誘導体、 —X(—Y)— (式中、X および Y は同一または異なって、単糖残基もしくはアミノ糖残基、またはそれらの誘導体を表す) または単結合を表し、 R^5 は水素原子、単糖残基もしくはアミノ糖残基またはそれらの誘導体を表す] で表されるオリゴ糖含有水溶液を、水混和性有機溶剤に添加することを特徴とするオリゴ糖結晶の製造方法および上記一般式 (I) で表されるオリゴ糖結晶を提供する。

明 細 書

オリゴ糖結晶およびオリゴ糖結晶の製造方法

技術分野

本発明は、例えば健康食品、医薬品、化粧品等の原料または中間体等として有用であるオリゴ糖結晶およびオリゴ糖結晶の製造方法に関する。

背景技術

オリゴ糖は、例えば健康食品、医薬品、化粧品等の原料または中間体等として有用である。そのため、保存安定性が良好で、不純物や分解物等を含まない高純度のものが求められる。オリゴ糖の合成法または発酵法がいくつか報告されている [ケミカル・レビュー (Chem. Rev.)、100 巻、4465 頁 (2000 年)、カレント・オピニオン・イン・ドラッグ・ディスカバリー・アンド・ディベロップメント (Curr. Opin. in Drug Discovery & Develop.)、3 巻、756 頁 (2000 年)、WO98/12343、WO99/40205] が、通常、最終物は凍結乾燥処理で粉末 (非結晶アモルファス) として得られ、結晶としての取得は困難とされている。この凍結乾燥処理で得られる粉末 (非結晶アモルファス) は、一般的に吸湿性、潮解性 etc. があり、安定性に問題があることが知られている。そのため、例えば保存、輸送、流通等において、冷蔵または冷凍する必要がある、工業レベルでの大量供給には、常温で保存可能なオリゴ糖結晶およびその製造方法が求められる。

また、オリゴ糖結晶としては、ルイス・エックス [LewisX ; Gal β 1, 4 (Fuc α 1, 2) GlcNAc] の結晶が唯一知られており、その製造方法が知られている [グリコバイオロジー (Glycobiology)、6 巻、537 頁 (1996 年)]。しかしながら、該製造方法は、その結晶化に要する時間が 2 年間と極めて長く、大量合成または工業化には適さない。そのため、短時間で結晶化が可能なオリゴ糖結晶の製造方法が求められている。

発明の開示

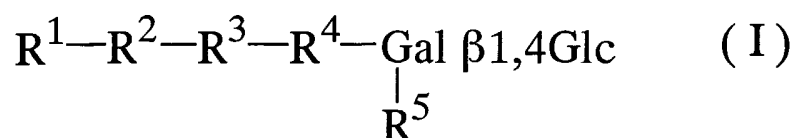
本発明の目的は、健康食品、医薬品、化粧品等の原料または中間体等として有用なオリゴ糖結晶を提供することおよび大量合成または工業化に適したオ

リゴ糖結晶の製造方法を提供することにある。

本発明は、以下の (1) ~ (24) に関する。

(1) 3糖以上のオリゴ糖含有水溶液を、水混和性有機溶剤に添加することを特徴とする3糖以上のオリゴ糖結晶の製造方法。

(2) 一般式 (I)



[式中、Galはガラクトースを表し（以下同様に略す）、Glcはグルコースを表し（以下同様に略す）、 R^1 は単糖残基もしくはアミノ糖残基またはそれらの誘導体を表し、 R^2 、 R^3 および R^4 は同一または異なって、単糖残基もしくはアミノ糖残基、それらの誘導体、 $-X(-Y)-$ （式中、XおよびYは同一または異なって、単糖残基もしくはアミノ糖残基またはそれらの誘導体を表す）または単結合を表し、 R^5 は水素原子、単糖残基もしくはアミノ糖残基またはそれらの誘導体を表す]で表されるオリゴ糖含有水溶液を、水混和性有機溶剤に添加することを特徴とするオリゴ糖結晶の製造方法。

(3) R^1 がGlcNAc（GlcNAcはN-アセチルグルコサミンを表し、以下同様に略す）、NeuAc（NeuAcはN-アセチルノイラミン酸を表し、以下同様に略す）、Gal、Fuc（Fucはフコースを表し、以下同様に略す）またはGalNAc（GalNAcはN-アセチルガラクトサミンを表し、以下同様に略す）であり、 R^2 、 R^3 および R^4 が同一または異なって、単結合、GlcNAc、NeuAc、Gal、FucまたはGalNAcであり、 R^5 が水素原子、GlcNAc、NeuAc、Gal、FucまたはGalNAcである上記

(2) 記載のオリゴ糖結晶の製造方法。

(4) R^2 、 R^3 および R^4 が同一または異なって、GlcNAc、NeuAc、Gal、FucまたはGalNAcである上記 (2) または (3) 記載のオリゴ糖結晶の製造方法。

(5) R^4 が単結合である上記 (2) または (3) 記載のオリゴ糖結晶の製造方法。

(6) R^3 および R^4 が単結合である上記 (2) または (3) 記載のオリゴ糖結晶

の製造方法。

(7) R^2 、 R^3 および R^4 が単結合である上記(2)または(3)記載のオリゴ糖結晶の製造方法。

(8) R^1 がGlcNAcであり、 R^2 がGalであり、 R^3 がGlcNAcであり、 R^5 が水素原子である上記(5)記載のオリゴ糖結晶の製造方法。

(9) R^1 がNeuAcまたはGalであり、 R^2 がGlcNAcまたはGalNAcであり、 R^5 が水素原子である上記(6)記載のオリゴ糖結晶の製造方法。

(10) R^1 がGlcNAc、Gal、NeuAcまたはFucであり、 R^5 が水素原子またはGalNAcである上記(7)記載のオリゴ糖結晶の製造方法。

(11) R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 のうち少なくともひとつがデオキシ糖残基であり、オリゴ糖含有水溶液が、合成吸着樹脂処理により得られる水溶液である上記(2)記載のオリゴ糖結晶の製造方法。

(12) デオキシ糖残基がFucである上記(11)記載のオリゴ糖結晶の製造方法。

(13) R^1 がFucであり、 R^2 、 R^3 および R^4 が単結合であり、 R^5 が水素原子である上記(11)記載のオリゴ糖結晶の製造方法。

(14) 水混和性有機溶剤が、アルコール類またはケトン類である上記(1)～(13)のいずれに記載のオリゴ糖結晶の製造方法。

(15) 水混和性有機溶剤が、メタノールまたはアセトンである上記(1)～(13)のいずれに記載のオリゴ糖結晶の製造方法。

(16) 上記(2)に記載の一般式(I)で表されるオリゴ糖結晶。

(17) R^1 がGlcNAc、NeuAc、Gal、FucまたはGalNAcであり、 R^2 、 R^3 および R^4 が同一または異なって、単結合、GlcNAc、NeuAc、Gal、FucまたはGalNAcであり、 R^5 が水素原子、GlcNAc、NeuAc、Gal、FucまたはGalNAcである上記(16)記載のオリゴ糖結晶。

(18) R^2 、 R^3 および R^4 が同一または異なって、GlcNAc、NeuAc、Gal、FucまたはGalNAcである上記(16)または(17)記載のオリゴ糖結晶。

(19) R^4 が単結合である上記(16)または(17)記載のオリゴ糖結晶。

(20) R^3 および R^4 が単結合である上記 (16) または (17) 記載のオリゴ糖結晶。

(21) R^2 、 R^3 および R^4 が単結合である上記 (16) または (17) 記載のオリゴ糖結晶。

(22) R^1 が GlcNAc であり、 R^2 が Gal であり、 R^3 が GlcNAc であり、 R^5 が水素原子である上記 (19) 記載のオリゴ糖結晶。

(23) R^1 が NeuAc または Gal であり、 R^2 が GlcNAc または GalNAc であり、 R^5 が水素原子である上記 (20) 記載のオリゴ糖結晶。

(24) R^1 が GlcNAc、Gal、NeuAc または Fuc であり、 R^5 が水素原子または GalNAc である上記 (21) 記載のオリゴ糖結晶。

以下、3 糖以上のオリゴ糖または一般式 (I) で表されるオリゴ糖をオリゴ糖 (I)、オリゴ糖 (I) の結晶をオリゴ糖結晶 (I) とそれぞれいう

一般式 (I) の各基の定義において、

(i) 単糖残基の単糖部分としては、例えば Gal、Glc、アロース (All)、アラビノース (Ara)、アルトロース (Alt)、グロース (Gul)、マンノース (Man)、タロース (Tal)、フルクトース (Fru)、リボース (Rib)、キシロース (Xyl) 等があげられる。

(ii) アミノ糖残基のアミノ糖部分としては、例えばノイラミン酸 (Neu)、ムラミン酸 (Mur)、グルコサミン (GlcN)、マンノサミン (ManN)、ガラクトサミン (GalN)、2-アミノ-2-デオキシグルコピラノース (GlcPn) 等があげられる。

(iii) 単糖残基もしくはアミノ糖残基の誘導体としては、例えばウロン酸、デオキシ糖、同一または異なって単糖残基 [該単糖残基は前記単糖残基 (i) と同義である] もしくはアミノ糖残基 [該アミノ糖残基は前記アミノ糖残基 (ii) と同義である] またはそれらの誘導体 (該単糖残基およびアミノ糖残基の誘導体としては、例えばデオキシ糖等があげられる) 等が2つ糖結合したものの、それらの有する水酸基またはアミノ基が、例えばアセチル等で保護されたもの等があげられる。

ここで示したウロン酸としては、例えばグルクロン酸 (GlcA)、ガラクトン酸 (GalA) 等、デオキシ糖としては、例えば Fuc、ラムノース (Rha) 等、それらの有する水酸基またはアミノ基がアセチル等で保護されたものとしては、例えば GlcNAc、NeuAc、GalNAc、N-アセチルマンノサミン (ManNAc) 等がそれぞれあげられる。

(iv) R^1-R^2 、 R^2-R^3 、 R^3-R^4 、 R^4-Gal および R^5-Gal (R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 は、それぞれ前記と同義である) のそれぞれの間の糖結合 (グリコシド結合) としては、同一または異なって、例えば $\alpha-1, 2$ 結合、 $\alpha-2, 3$ 結合、 $\alpha-1, 4$ 結合、 $\beta-1, 3$ 結合、 $\beta-1, 4$ 結合等があげられ、とりわけ好ましい糖結合で形成されるオリゴ糖 (I) としては、例えば GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc、Gal α 1, 4Gal β 1, 4Glc、NeuAc α 2, 3Gal β 1, 4Glc、Fuc α 1, 2Gal β 1, 4Glc 等の 3 糖類、Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc、NeuAc α 2, 3 (GalNAc β 1, 4) Gal β 1, 4Glc 等の 4 糖類、GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 等の 5 糖類等があげられる。

本発明において、

(v) 3 糖以上のオリゴ糖としては、例えば分岐状または直鎖状のオリゴ糖であり、単糖残基 [該単糖残基は前記単糖残基 (i) と同義である] もしくはアミノ糖残基 [該アミノ糖残基は前記アミノ糖残基 (ii) と同義である] またはそれらの誘導体 [該単糖残基もしくはアミノ糖残基の誘導体は、前記単糖残基もしくはアミノ糖残基の誘導体 (iii) と同義である] 等が、同一または異なって、例えば 3~20 個、互いに糖結合 (グリコシド結合; 該糖結合としては、同一または異なって、例えば、 $\alpha-1, 2$ 結合、 $\alpha-2, 3$ 結合、 $\alpha-1, 4$ 結合、 $\beta-1, 3$ 結合、 $\beta-1, 4$ 結合等があげられる) しているもの等があげられ、好ましくは 3~10 個、さらに好ましくは 3~6 個、互いに糖結合 (該糖結合は前記と同義である) しているものがあげられる。

(vi) オリゴ糖含有水溶液としては、オリゴ糖を含有する水溶液であればいずれでも良いが、オリゴ糖の糖純度が 50% 以上である水溶液が好ましく、さらには 70% 以上である水溶液がより好ましい。該水溶液は、例えばメタノー

ル、エタノール、イソプロピルアルコール等のアルコール類、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類等の他の有機溶剤を含んでいても良い。該水溶液中の水の含量としては 20%以上が好ましい。具体的には、例えばオリゴ糖の溶液（該オリゴ糖の溶液としては、例えば合成法または発酵法により得られるオリゴ糖の反応液、培養液、除菌液等があげられる）を前処理（該前処理法としては、例えば膜処理、ゲル濾過処理、活性炭処理、イオン交換樹脂処理、合成吸着樹脂処理、溶媒沈殿等、好ましくは活性炭処理、イオン交換樹脂処理、合成吸着樹脂処理、溶媒沈殿等、さらに好ましくは溶媒沈殿、合成吸着樹脂処理等があげられ、これらの処理法は適宜組み合わせてもよく、中でも、単糖残基の少なくともひとつが Fuc であるオリゴ糖 (I) を含有する水溶液を得るための前処理法としては、合成吸着樹脂処理がより好ましい）することにより調製される水溶液等があげられる。

(vii) 水混和性有機溶剤としては、水と混和する性質を有する有機溶剤であればいずれでも良いが、好ましくは、例えばメタノール、エタノール、イソプロピルアルコール等のアルコール類、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類等があげられる。

(viii) 合成吸着樹脂としては、非極性で多孔質の吸着樹脂等があげられ、例えばダイヤイオンHPシリーズ（例えばHP10、HP20、HP21、HP30、HP40、HP50等；三菱化学工業製）、ダイヤイオンSP800シリーズ（例えばSP800、SP825、SP850、SP875等；三菱化学工業製）、ダイヤイオンSP200シリーズ（例えばSP205、SP206、SP207、SP207SS等；三菱化学工業製）、アンバーライトXADシリーズ（例えばXAD4、XAD7HP、XAD16、XAD1600等；ローム アンド ハース社製）等があげられる。

(ix) オリゴ糖結晶はどのような結晶でもよいが、例えば柱状、板状、針状等の結晶があげられ、とりわけ柱状のものが好ましい。

次に、オリゴ糖結晶 (I) の製造方法について詳細に説明する。

製造法：

既知の方法〔例えば、ケミカル・レビュー (Chem. Rev.)、100 巻、4465 頁

(2000 年)、カレント・オピニオン・イン・ドラッグ・ディスカバリー・アンド・ディベロップメント (Curr. Opin. in Drug Discovery & Develop.)、3 巻、756 頁 (2000 年)、WO98/12343、WO99/40205 等] に準じて、合成法または発酵法により得られるオリゴ糖 (I) の反応液、培養液、または除菌液を前処理することにより、糖純度 50% 以上、好ましくは 70% 以上になるようにオリゴ糖 (I) 含有水溶液を調製する。このオリゴ糖 (I) 含有水溶液を用い、 -20°C から水混和性有機溶剤の沸点の間の温度または還流下で、貧溶媒である水混和性有機溶剤に、1 分間～10 時間、好ましくは 10 分間～2 時間かけて滴下し、滴下終了後、さらに 1～20 時間、好ましくは 2～4 時間、 -20°C から水混和性有機溶剤の沸点の間の温度または還流下で攪拌晶析して結晶を析出させる。析出する結晶を、例えば遠心濾過、デカンテーション等に付して結晶を分離し、水または水混和性有機溶剤で結晶を洗浄後、減圧下または通風下で取得した結晶を乾燥することにより、オリゴ糖結晶 (I) を得ることができる。また、さらに洗浄、乾燥、再結晶等の操作を行うことによりさらに精製することもできる。

オリゴ糖 (I) 含有水溶液を得るための前処理法としては、例えば膜処理、ゲル濾過処理、活性炭処理、イオン交換樹脂処理、合成吸着樹脂処理、溶媒沈殿等、好ましくは活性炭処理、イオン交換樹脂処理、合成吸着樹脂処理、溶媒沈殿等、さらに好ましくは溶媒沈殿、合成吸着樹脂処理等があげられ、これらの処理法を適宜組み合わせることも可能である。中でも、単糖残基の少なくともひとつが F u c であるオリゴ糖 (I) を含有する水溶液を得るための前処理法としては、合成吸着樹脂処理がより好ましい。

水混和性有機溶剤は、単独もしくは 2 種以上を混合して、または水と混合して用いることができる。

オリゴ糖結晶 (I) は、上記製造法により得られる以外に一般的な晶析法、例えばオリゴ糖 (I) 含有水溶液を、濃縮、冷却、中和しながら晶析する方法、またはオリゴ糖 (I) 含有水溶液に水混和性有機溶剤を貧溶媒として添加しながら晶析することにより、オリゴ糖結晶 (I) の成長を促す方法等によっても得ることができる。

上記製造方法で得られるオリゴ糖結晶 (I) は、水または各種水混和性有機溶剤との付加物として得られることもある。

また、上記製造方法で得られるオリゴ糖結晶 (I) には、異なった結晶形または異なった粒度のものが存在する場合もあり、これらが単独でまたは混合物として得られることもある。

上記製造方法で得られるオリゴ糖結晶 (I) の具体例を第 1 表に示す。

第 1 表

実施例 番号	結晶 番号	オリゴ糖結晶
1	1	GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc
2	2	Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc
3	3	GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc

次に、本発明のオリゴ糖結晶 (I) の保存安定性について、試験例により具体的に説明する。

試験例：オリゴ糖結晶 (I) とオリゴ糖 (I) の凍結乾燥粉末の安定性の比較

実施例 1～3 でそれぞれ得られたオリゴ糖結晶 (I) と参考例 1～3 でそれぞれ得られたオリゴ糖 (I) の凍結乾燥粉末について、105℃、大気中、常圧の条件下での 20 日間保存安定性を、オリゴ糖 (I) の残存率を測定することで追跡した。その結果を第 2 表に示す。

なお、試料中のオリゴ糖 (I) の残存率は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定し、HPLC 純度 (%) として表した。

HPLC の測定条件は以下の通りである。

分析機器：ダイオネクス社製

カラム：CarboPac PA 10

カラム温度：30℃

移動相：10～100% NaOH 水溶液 (500mmol/L) (11 分間でグラディエント操作)

流速：0.8mL/分

検出条件：電気化学検出（PAD 法）

第2表

	オリゴ糖残存率:HPLC 純度(%)				
	経過日数(日)				
	0	1	4	7	20
GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 結晶 (結晶番号1)	98.0	99.7	99.7	99.7	98.9
GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 凍結乾燥粉末	99.8	99.7	97.0	98.8	93.8
Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 結晶 (結晶番号2)	99.3	99.0	99.2	99.0	98.8
Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 凍結乾燥粉末	99.3	98.6	97.6	96.2	90.9
GlcNAc β 1,3Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc 結晶 (結晶番号3)	98.8	99.3	99.0	99.0	99.3
GlcNAc β 1,3Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc 凍結乾燥粉末	98.6	98.2	97.4	95.4	85.2

第2表から明らかなように、参考例で得られたオリゴ糖 (I) の凍結乾燥粉末では、HPLC 分析でオリゴ糖 (I) の残存率低下がみられ、著しい分解を生じた。これに対して、本発明の製造方法により得られたオリゴ糖結晶 (I) では、オリゴ糖 (I) の残存率低下は全くみられず、オリゴ糖結晶 (I) が極めて安定であることが判った。

発明を実施するための最良の形態

以下に、実施例および参考例により本発明を詳細に説明するが、いずれも本発明を限定するものではない。

実施例 1 : GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 結晶の製造

参考例 4 で得られた GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 反応液を、遠心分離により除菌操作後、ダイヤイオン SK-1B (H 型 ; 三菱化成工業製)、次いでダイヤイオン WA-30 (OH 型 ; 三菱化成工業製) に通塔して脱塩処理を行った。脱塩処理液を、HCl で pH6.5 に調整した後、減圧下で濃縮し、GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc

の処理溶液（水溶液；100mL，200g/L）を得た。該処理溶液を 60℃に加熱したメタノール（500mL）中に約 30 分かけて添加し、60℃で約 3 時間、還流条件下で晶析を行った。晶析液を 20℃まで冷却し、1 時間攪拌後、結晶を濾取し、結晶をメタノールで洗浄した。この結晶を通風乾燥し、GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 結晶 14g を取得した。

この結晶の粉末 X 線構造回析測定値を第 3 表に示す。

第3表

GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 結晶の粉末 X 線構造回析測定値

d 値 (Å)	I/I ₀ (%)	d 値 (Å)	I/I ₀ (%)
10.773	41	4.027	42
9.253	74	3.855	28
6.992	36	3.774	36
5.336	22	3.697	24
4.779	100	3.558	21
4.618	46	3.311	54
4.537	49	3.030	33
4.491	98	2.811	19
4.236	59	2.630	22
4.129	65		

実施例 2 : Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 結晶の製造

参考例 5 で得られた Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 反応液を、遠心分離により除菌操作後、ダイヤイオン SK-1B（H 型；三菱化成工業製）、次いでダイヤイオン WA-30（OH 型；三菱化成工業製）に通塔して脱塩処理を行った。脱塩処理液を、HCl で pH6.5 に調整した後、減圧下で濃縮し、Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc の処理溶液（水溶液；70mL，300g/L）を得た。該処理溶液を 58℃に加熱したアセトン（500mL）中に約 30 分かけて添加し、58℃で約 2 時間、還流条件下で晶析を行った。晶析液を 20℃まで冷却し、1 時間攪拌後、結晶を濾取し、結晶をアセトンで洗浄した。この結晶を通風乾燥し、Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 結晶 16g を取得した。

この結晶の粉末 X 線構造回析測定値を第 4 表に示す。

第4表

Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 結晶の粉末 X 線構造回析測定値

d 値 (Å)	I/I ₀ (%)	d 値 (Å)	I/I ₀ (%)
18.588	15	4.560	100
13.281	22	4.381	98
11.182	30	4.277	52
10.644	34	4.055	34
9.253	16	3.888	27
8.147	10	3.580	23
7.824	11	3.299	19
6.804	20	3.235	20
6.167	12	2.708	15
5.843	14	2.453	14
5.639	21	2.354	18
4.897	18	2.321	18
4.679	66		

実施例 3 : GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 結晶の製造

参考例 6 で得られた GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 反応液を、遠心分離により除菌操作後、ダイヤイオン SK-1B(H 型;三菱化成工業製)、次いでダイヤイオン WA-30 (OH 型;三菱化成工業製)に通塔して脱塩処理を行った。脱塩処理液を、HCl で pH6.5 に調整した後、減圧下で濃縮し、GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc の処理溶液 (水溶液;100mL, 200g/L)を得た。該処理溶液を 60°C に加熱したメタノール (500mL) 中に約 30 分かけて添加し、60°C で約 3 時間、還流条件下で晶析を行った。晶析液を 20°C まで冷却し、1 時間攪拌後、結晶を濾取し、結晶をメタノールで洗浄した。この結晶を通風乾燥し、GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 結晶 16g を取得した。

この結晶の粉末 X 線構造回析測定値を第 5 表に示す。

第5表

GlcNAc β 1,3Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc 結晶の粉末 X 線構造回析測定値

d 値 (Å)	I/I ₀ (%)	d 値 (Å)	I/I ₀ (%)
20.5322	8	3.5037	16
12.0996	16	3.4242	20
11.2531	15	3.3607	16
10.7084	17	3.2936	13
9.4509	40	3.1729	18
7.1037	8	3.1026	9
6.3887	7	3.0305	10
5.7863	9	2.8915	7
5.3042	9	2.8466	9
5.0350	8	2.8074	10
4.6189	100	2.6728	11
4.3710	28	2.6384	9
4.2874	32	2.5687	9
4.0920	26	2.5232	8
3.9397	20	2.4728	10
3.7985	18	2.3600	11
3.6672	14	2.3335	10
3.5729	13		

参考例 1 : GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 凍結乾燥粉末の製造

実施例 1 で得られた GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 結晶 5g を水に溶解し、GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 溶液を得た (10mL, 500g/L)。この溶液を -30°C で凍結させた後、凍結乾燥機にて乾燥させ、GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 凍結乾燥粉末 4.8g を得た。

参考例 2 : Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 凍結乾燥粉末の製造

実施例 2 で得られた Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 結晶 5g を水に溶解し、Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 溶液を得た (10mL, 500g/L)。この溶液を -30°C で凍結させた後、凍結乾燥機にて乾燥させ、Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 凍結乾燥粉末 4.5g を得た。

参考例 3 : GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 凍結乾燥粉末の製造

実施例 3 で得られた GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 結晶 5 g を水に溶解し、GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 溶液を得た (10mL, 500g/L)。その溶液を -30°C で凍結させた後、凍結乾燥機にて乾燥させ、GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 凍結乾燥粉末 4.7g を得た。

参考例 4 : GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 反応液

GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 反応液は、WO98/12343 に記載の方法で得られたウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミンとラクトースから、グリコバイオロジー (Glycobiology)、9 巻、1061 頁 (1999 年) に記載の酵素を高発現させた組み替え大腸菌を用い、WO98/12343 に記載の糖鎖生産方法に準じて得られた。

参考例 5 : Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc 反応液

Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 反応液は、参考例 4 で得られた GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 反応液とウリジン二リン酸-ガラクトースを用いて、参考例 4 に記載の方法に準じて得られた。

参考例 6 : GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 反応液

GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 反応液は、WO98/12343 に記載の方法で得られたウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミンと参考例 5 で得られた Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 3Gal β 1, 4Glc 反応液から、参考例 4 に記載の方法に準じて得る。

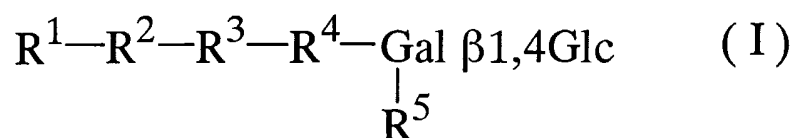
産業上の利用可能性

本発明により、健康食品、医薬品、化粧品等の原料または中間体等として有用なオリゴ糖結晶および大量合成または工業化に適したオリゴ糖結晶の製造方法が提供される。

請求の範囲

1. 3糖以上のオリゴ糖含有水溶液を、水混和性有機溶剤に添加することを特徴とする3糖以上のオリゴ糖結晶の製造方法。

2. 一般式 (I)



[式中、Galはガラクトースを表し（以下同様に略す）、Glcはグルコースを表し（以下同様に略す）、R¹は単糖残基もしくはアミノ糖残基またはそれらの誘導体を表し、R²、R³およびR⁴は同一または異なって、単糖残基もしくはアミノ糖残基、それらの誘導体、—X(—Y)—（式中、XおよびYは同一または異なって、単糖残基もしくはアミノ糖残基またはそれらの誘導体を表す）または単結合を表し、R⁵は水素原子、単糖残基もしくはアミノ糖残基またはそれらの誘導体を表す]で表されるオリゴ糖含有水溶液を、水混和性有機溶剤に添加することを特徴とするオリゴ糖結晶の製造方法。

3. R¹がGlcNAc（GlcNAcはN—アセチルグルコサミンを表し、以下同様に略す）、NeuAc（NeuAcはN—アセチルノイラミン酸を表し、以下同様に略す）、Gal、Fuc（Fucはフコースを表し、以下同様に略す）またはGalNAc（GalNAcはN—アセチルガラクトサミンを表し、以下同様に略す）であり、R²、R³およびR⁴が同一または異なって、単結合、GlcNAc、NeuAc、Gal、FucまたはGalNAcであり、R⁵が水素原子、GlcNAc、NeuAc、Gal、FucまたはGalNAcである請求の範囲2記載のオリゴ糖結晶の製造方法。

4. R²、R³ および R⁴ が同一または異なって、GlcNAc、NeuAc、Gal、FucまたはGalNAcである請求の範囲2または3記載のオリゴ糖結晶の製造方法。

5. R⁴が単結合である請求の範囲2または3記載のオリゴ糖結晶の製造方法。

6. R³ および R⁴ が単結合である請求の範囲2または3記載のオリゴ糖結晶の製造方法。

7. R^2 、 R^3 および R^4 が単結合である請求の範囲2または3記載のオリゴ糖結晶の製造方法。
8. R^1 がGlcNAcであり、 R^2 がGalであり、 R^3 がGlcNAcであり、 R^5 が水素原子である請求の範囲5記載のオリゴ糖結晶の製造方法。
9. R^1 がNeuAcまたはGalであり、 R^2 がGlcNAcまたはGalNAcであり、 R^5 が水素原子である請求の範囲6記載のオリゴ糖結晶の製造方法。
10. R^1 がGlcNAc、Gal、NeuAcまたはFucであり、 R^5 が水素原子またはGalNAcである請求の範囲7記載のオリゴ糖結晶の製造方法。
11. R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 のうち少なくともひとつがデオキシ糖残基であり、オリゴ糖含有水溶液が、合成吸着樹脂処理により得られる水溶液である請求の範囲2記載のオリゴ糖結晶の製造方法。
12. デオキシ糖残基がFucである請求の範囲11記載のオリゴ糖結晶の製造方法。
13. R^1 がFucであり、 R^2 、 R^3 および R^4 が単結合であり、 R^5 が水素原子である請求の範囲11記載のオリゴ糖結晶の製造方法。
14. 水混和性有機溶剤が、アルコール類またはケトン類である請求の範囲1～13のいずれに記載のオリゴ糖結晶の製造方法。
15. 水混和性有機溶剤が、メタノールまたはアセトンである請求の範囲1～13のいずれに記載のオリゴ糖結晶の製造方法。
16. 請求の範囲2に記載の一般式(I)で表されるオリゴ糖結晶。
17. R^1 がGlcNAc、NeuAc、Gal、FucまたはGalNAcであり、 R^2 、 R^3 および R^4 が同一または異なって、単結合、GlcNAc、NeuAc、Gal、FucまたはGalNAcであり、 R^5 が水素原子、GlcNAc、NeuAc、Gal、FucまたはGalNAcである請求の範囲16記載のオリゴ糖結晶。
18. R^2 、 R^3 および R^4 が同一または異なって、GlcNAc、NeuAc、Gal、FucまたはGalNAcである請求の範囲16または17記載のオリゴ糖結晶。
19. R^4 が単結合である請求の範囲16または17記載のオリゴ糖結晶。
20. R^3 および R^4 が単結合である請求の範囲16または17記載のオリゴ糖

結晶。

21. R^2 、 R^3 および R^4 が単結合である請求の範囲 16 または 17 記載のオリゴ糖結晶。

22. R^1 が GlcNAc であり、 R^2 が Gal であり、 R^3 が GlcNAc であり、 R^5 が水素原子である請求の範囲 19 記載のオリゴ糖結晶。

23. R^1 が NeuAc または Gal であり、 R^2 が GlcNAc または GalNAc であり、 R^5 が水素原子である請求の範囲 20 記載のオリゴ糖結晶。

24. R^1 が GlcNAc、Gal、NeuAc または Fuc であり、 R^5 が水素原子または GalNAc である請求の範囲 21 記載のオリゴ糖結晶。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05787

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C07H5/06

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 C07H5/06

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)
REGISTRY (STN), CAPLUS (STN), CAOLD (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Supervised by Tokuro SODA, Tatorui Kagaku, Kyoritsu Shuppan Co., Ltd., 15 December, 1955 (15.12.55), page 13 Particularly, refer to the item of "C. Levan"	1
A	JP 7-82287 A (The Calpis Food Industry Co., Ltd.), 28 March, 1995 (28.03.95), (Family: none)	1
X	A. J. ACHER, et al., Studies in the Ganglioside Series., V. Synthesis of 2-Acetamido-2-deoxy-0- β-D-glucopyranosyl-(1→3)-0-β-D-galactopyranosyl-	16, 17, 19-21, 24
A	(1→4)-D-glucose, J. Org. Chem., 1970, Vol.35, No.7, pages 2436 to 2437	1-15, 18, 22, 23



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
20 August, 2002 (20.08.02)

Date of mailing of the international search report
10 September, 2002 (10.09.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05787

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	EP 474046 A1 (THE HOKUREN FEDERATION OF AGRICULTURAL COOPERATIVES), 11 March, 1992 (11.03.92), & JP 6-70075 B2 & US 5463038 A & DE 69117231 E	16, 17, 19-21, 23, 24 1-15, 18, 22
Y A	JP 57-5239 B2 (Rikagaku Kenkyusho), 29 January, 1982 (29.01.82), (Family: none)	16, 17, 19-21, 23, 24 1-15, 18, 22
Y A	EP 670327 A1 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO), 06 September, 1995 (06.09.95), & JP 7-291987 A & DE 69505437 E & US 5922691 A	16, 17, 19-21, 23, 24 1-15, 18, 22
Y A	SERGE PEREZ, et al., Crystal and molecular structure of a histo-blood group antigen involved in cell adhesion: the Lewis x trisaccharide, Glycobiology, 1996, Vol.6, No.5, pages 537 to 542	16, 17, 19-21, 23, 24 1-15, 18, 22
Y A	NICHOLAS K. SAUTER, et al., Binding of Influenza Virus Hemagg lutinin to Analogues of Its Cell-Surface Receptor, Sialic Acid: Analysis by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and X-ray Crystallography, Biochemistry, 1992, Vol.31, No.40, pages 9609 to 9621	16, 17, 19-21, 24 1-15, 18, 22, 23
Y A	HANS PAULSEN, et al., REGIOSELEKTIVE GLYCOSYLIERUNG AN STELL UNGEN 3' UND 4' VON LACTOSE-DERIVATEN, Carbohydrate Research, 1987, Vol.169, pages 105 to 125	16, 17, 19, 20, 23 1-15, 18, 21, 22, 24
Y A	KERSTIN HERMANSSON, et al., A ¹ H and ¹³ C NMR study of oligosaccharides from human milk. Application of the computer program CASPER, Carbohydrate Research, 1992, Vol.235, pages 69 to 81	16, 17, 19, 20, 23 1-15, 18, 21, 22, 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05787

<Concerning the subject of search>

The general formula (I) set forth in claim 2 includes extremely many oligosaccharides, but only a small part of the claimed oligosaccharides are supported by the description within the meaning of PCT Article 6 and disclosed within the meaning of PCT Article 5.

Therefore, this international search has been made on the part supported by the description and disclosed, i.e., on oligosaccharides wherein the oligosaccharide structure of the reducing terminal is GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4Glc.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C07H5/06

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. Cl⁷ C07H5/06

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

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CAPLUS (STN), CAOLD (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	左右田徳郎監修, 多糖類化学, 共立出版株式会社, 1955. 12. 15, p. 13 特に「C. レバン」の項を参照。	1
A	JP 7-82287 A (カルピス食品工業株式会社) 1995. 03. 28 (ファミリーなし)	1

☒ 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

の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

20.08.02

国際調査報告の発送日

10.09.02

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)

中木 亜希



4P

9282

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

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
X	A. J. ACHER, et al., Studies in the Ganglioside Series. V. Synthesis of 2-Acetamido-2-deoxy- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- <i>O</i> - β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucose, J. Org. Chem., 1970, Vol. 35, No. 7, p. 2436-2437	16, 17, 19-21, 24
A		1-15, 18, 22, 23
Y	EP 474046 A1 (THE HOKUREN FEDERATION OF AGRICULTURAL COOPERATIVES) 1992. 03. 11	16, 17, 19-21, 23, 24
A	& JP 6-70075 B2 & US 5463038 A & DE 69117231 E	1-15, 18, 22
Y	JP 57-5239 B2 (理化学研究所) 1982. 01. 29 (ファミリーなし)	16, 17, 19-21, 23, 24
A		1-15, 18, 22
Y	EP 670327 A1 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) 1995. 09. 06	16, 17, 19-21, 23, 24
A	& JP 7-291987 A & DE 69505437 E & US 5922691 A	1-15, 18, 22
Y	SERGE PEREZ, et al., Crystal and molecular structure of a histo-blood group antigen involved in cell adhesion: the Lewis x trisaccharide, Glycobiology, 1996, Vol. 6, No. 5, p. 537-542	16, 17, 19-21, 23, 24
A		1-15, 18, 22
Y	NICHOLAS K. SAUTER, et al., Binding of Influenza Virus Hemagglutinin to Analogs of Its Cell-Surface Receptor, Sialic Acid: Analysis by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and X-ray Crystallography, Biochemistry, 1992, Vol. 31, No. 40, p. 9609-9621	16, 17, 19-21, 24
A		1-15, 18, 22, 23
Y	HANS PAULSEN, et al., REGIOSELEKTIVE GLYCOSYLIERUNG AN STELLUNGEN 3' UND 4' VON LACTOSE-DERIVATEN, Carbohydrate Research, 1987, Vol. 169, p. 105-125	16, 17, 19, 20, 23
A		1-15, 18, 21, 22, 24
Y	KERSTIN HERMANSSON, et al., A ^1H and ^{13}C NMR study of oligosaccharides from human milk. Application of the computer program CASPER, Carbohydrate Research, 1992, Vol. 235, p. 69-81	16, 17, 19, 20, 23
A		1-15, 18, 21, 22, 24

<調査の対象について>

請求の範囲2に記載の一般式(I)は非常に多数のオリゴ糖を包含している。しかしながら、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされたオリゴ糖のごくわずかな部分にすぎない。

よって、この国際調査は、明細書に裏付けられ、開示されている部分、すなわち、還元末端のオリゴ糖構造が $\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 3\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{Glc}$ であるオリゴ糖について行った。