

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年9月6日(06.09.2024)



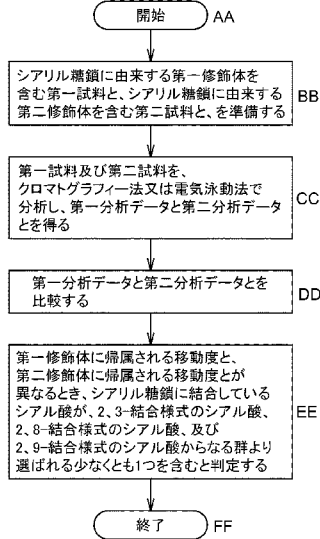
(10) 国際公開番号
WO 2024/180872 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 30/88 (2006.01) G01N 27/447 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/044979
- (22) 国際出願日: 2023年12月15日(15.12.2023)
- (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 2023-031067 2023年3月1日(01.03.2023) JP
- (71) 出願人: 株式会社島津製作所 (SHIMADZU CORPORATION) [JP/JP]; 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 西風 隆司 (NISHIKAZE, Takashi); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 渡邊 淳(WATANABE, Jun); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 曾我部 有司(SOGABE, Yuji); 〒6048511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 木下 充弘(KINOSHITA, Mitsuhiro); 〒5778502 大阪府東大阪市小若江3丁目4番1号 学校法人近畿大学内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 弁理士法人深見特許事務所(FUKAMI PATENT OFFICE, P.C.); 〒5300005 大阪府大阪

(54) Title: METHOD FOR ANALYZING SIALYL SUGAR CHAIN

(54) 発明の名称: シアリル糖鎖の分析方法

FIG.1



AA Start
BB Prepare first sample containing first modified material derived from sialyl sugar chain and second sample containing second modified material derived from sialyl sugar chain
CC Analyze first sample and second sample by chromatographic method or electrophoresis method to obtain first analysis data and second analysis data
DD Compare first analysis data with second analysis data
EE Determine that sialic acid bound to sialyl sugar chain comprises at least one selected from the group consisting of α 2,3-linked sialic acid, α 2,8-linked sialic acid and α 2,9-linked sialic acid when mobility attributed to first modified material and mobility attributed to second modified material are different from each other
FF End

(57) Abstract: Provided is a method for analyzing a sialyl sugar chain having sialic acid bound thereto, the method comprising: a step for preparing a first sample containing a first modified material derived from the sialyl sugar chain and a second sample containing a second modified material derived from the sialyl sugar chain; a step for analyzing each of the first sample and the second sample by a chromatographic method or an electrophoresis method to obtain first analysis data associated with the first sample and second analysis data associated with the second sample; a step for comparing the first analysis data with the second analysis data; and a step for determining that the sialic acid bound to the sialyl sugar chain comprises at least one selected from the group consisting of α 2,3-sialic acid, α 2,8-sialic acid and α 2,9-sialic acid when the mobility attributed to the first modified material, which is shown in the first analysis data, and the mobility

WO 2024/180872 A1

市北区中之島三丁目2番4号 中之島フェスティバルタワー・ウエスト Osaka (JP).

- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

attributed to the second modified material, which is shown in the second analysis data, are different from each other. In the method, the first modified material is a compound produced by the esterification or amidation or both thereof of the sialic acid bound to the sialyl sugar chain, and the second modified material is a compound produced by the esterification or amidation or both thereof of the sialic acid bound to the sialyl sugar chain, which is different from the α 2,3-sialic acid, the α 2,8-sialic acid and the α 2,9-sialic acid.

(57) 要約: シアル酸が結合しているシアリル糖鎖の分析方法であって、前記シアリル糖鎖に由来する第一修飾体を含む第一試料と、前記シアリル糖鎖に由来する第二修飾体を含む第二試料とを準備する工程と、前記第一試料及び前記第二試料それぞれを、クロマトグラフィー法又は電気泳動法によって分析し、前記第一試料に由来する第一分析データと前記第二試料に由来する第二分析データとを得る工程と、前記第一分析データと前記第二分析データとを比較する工程と、前記第一分析データにおいて示される前記第一修飾体に帰属される移動度と、前記第二分析データにおいて示される前記第二修飾体に帰属される移動度とが異なるとき、前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸が、 α 2, 3-シアル酸、 α 2, 8-シアル酸、及び α 2, 9-シアル酸からなる群より選ばれる少なくとも1つを含むと判定する工程と、を含み、前記第一修飾体は、前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸がエステル化、アミド化又はその両方によって生成された化合物であり、前記第二修飾体は、前記 α 2, 3-シアル酸、前記 α 2, 8-シアル酸、及び前記 α 2, 9-シアル酸以外の前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸がエステル化、アミド化又はその両方によって生成された化合物である、シアリル糖鎖の分析方法が提供される。

明 細 書

発明の名称：シアリル糖鎖の分析方法

技術分野

[0001] 本発明は、シアリル糖鎖の分析方法に関する。

背景技術

[0002] シアル酸は生体内において糖タンパク質にも含まれ、その場合、主に糖鎖の末端に存在する。シアル酸は糖タンパク質分子の外側に配置されやすいため、他の分子からの認識に関与しやすい。シアル酸は、隣接する糖との間の結合様式が異なる場合がある。例えば、ヒトのN-結合型糖鎖では主に $\alpha 2$, 3-および $\alpha 2$, 6-の結合様式が知られている。O-結合型糖鎖及びスフィンゴ糖脂質ではこれらに加えて $\alpha 2$, 8-および $\alpha 2$, 9-の結合様式が知られている。結合様式の違いによってシアル酸は異なる分子から認識され、異なる役割を有し得るため、シアル酸の結合様式の解析は重要である。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開2016-194500号公報

特許文献2：特開2019-152475号公報

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Nishikaze T., Tsumoto H., Sekiya S., Iwamoto S., Miura Y., Tanaka K., Analytical Chemistry, 2017, 89, 2353-2360.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] シアル酸は負電荷を有すること及びシアル酸は分解しやすいことから、シアル酸を含有するシアリル糖鎖を解析することは容易ではない。また、シアル酸の結合様式の違いによって糖鎖の質量（分子量）は変わらないため、質量分析により結合様式を区別して解析することはできない。

- [0006] シアル酸の結合様式を区別して解析するため、シアル酸に結合様式特異的な修飾を行う方法が提案されている。例えば、特許文献1には、試料中に含まれる糖鎖の分析を行うための分析用試料の調製方法であって、分析対象物質の糖鎖にシアル酸が結合している場合にシアル酸の結合様式に応じて異なる修飾体を生成する第一反応が行われ、前記第一反応において、糖鎖を含む分析対象物質と、炭素原子を2個以上含むアミンおよび脱水縮合剤とを反応させることを特徴とする、分析用試料の調製方法が開示されている。
- [0007] また、特許文献2には、糖鎖を含む試料の調製方法であって、前記糖鎖に含まれるシアル酸の少なくとも一部をラクトン化するラクトン化反応を行うことと、前記試料に、ラクトン化されている前記シアル酸と反応させるアンモニア、アミンおよびこれらの塩からなる群から選択される少なくとも一つを含む、アミド化反応溶液を加え、前記ラクトン化されている前記シアル酸のラクトンをアミド化するアミド化反応を行うことと、を備える試料の調製方法が開示されている。非特許文献1では、遊離したN-結合型糖鎖にイソプロピルアミンと脱水縮合剤とを含む溶液を加えて、 α 2,3-シアル酸をラクトン化し、 α 2,6-シアル酸をアミド化する、質量分析に用いられる試料の調製方法が開示されている。
- [0008] これらの方法では、 α 2,3-シアル酸が α 2,6-シアル酸よりも脱水縮合剤により分子内脱水を起こしやすい性質を利用し、シアル酸の結合様式に依存して異なる質量の分子が生成される。そのため、質量分析によりシアル酸の結合様式を区別して解析することができる。
- [0009] ところで、生体では、シアル酸の結合様式の相違が様々な生命現象に関与することが知られており、例えば、癌化に伴ってシアル酸の結合様式が変化することが知られている。そのため、上述のようなシアル酸の結合様式を判別することは、シアル酸のバイオマーカーとしての利用、及びバイオ医薬品の品質管理等においても注目されており、シアル酸糖鎖の分析方法のさらなる向上（例えば、迅速化、簡便化等）が期待されている。
- [0010] 本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであり、クロマトグラフィー法

又は電気泳動法によって、シアリル糖鎖に結合しているシアル酸の結合様式が判別可能なシアリル糖鎖の分析方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、鋭意研究を行った結果、シアル酸の結合様式の違いに応じて修飾の仕方が異なる2種類の試料をクロマトグラフィー法又は電気泳動法によって分析することで、シアリル糖鎖に結合しているシアル酸の結合様式が判別可能であることを見だし本発明を完成させた。

[0012] 本発明は、
シアル酸が結合しているシアリル糖鎖の分析方法であって、
前記シアリル糖鎖に由来する第一修飾体を含む第一試料と、前記シアリル糖鎖に由来する第二修飾体を含む第二試料とを準備する工程と、
前記第一試料及び前記第二試料それぞれを、クロマトグラフィー法又は電気泳動法によって分析し、前記第一試料に由来する第一分析データと前記第二試料に由来する第二分析データとを得る工程と、
前記第一分析データと前記第二分析データとを比較する工程と、
前記第一分析データにおいて示される前記第一修飾体に帰属される移動度と、前記第二分析データにおいて示される前記第二修飾体に帰属される移動度とが異なるとき、前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸が、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸、 $\alpha 2, 8$ -シアル酸、及び $\alpha 2, 9$ -シアル酸からなる群より選ばれる少なくとも1つを含むと判定する工程と、を含み、
前記第一修飾体は、前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸がエステル化、アミド化又はその両方によって生成された化合物であり、
前記第二修飾体は、前記 $\alpha 2, 3$ -シアル酸、前記 $\alpha 2, 8$ -シアル酸、及び前記 $\alpha 2, 9$ -シアル酸以外の前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸がエステル化、アミド化又はその両方によって生成された化合物である、シアリル糖鎖の分析方法、に関する。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、シアリル糖鎖に結合しているシアル酸の結合様式が判別

可能なシアリル糖鎖の分析方法を提供することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は、本発明の一実施形態に係る分析方法を示すフローチャートである。

[図2]図2は、実施例において行ったHPLC分析の結果を示す蛍光クロマトグラムである。

[図3]図3は、実施例において行ったマイクロチップ電気泳動法による分析の結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明の一実施形態（以下「本実施形態」と記す。）について説明する。ただし、本実施形態はこれに限定されるものではない。本明細書において「A～Z」という形式の表記は、範囲の上限下限（すなわちA以上Z以下）を意味し、Aにおいて単位の記載がなく、Zにおいてのみ単位が記載されている場合、Aの単位とZの単位とは同じである。

[0016] 《シアリル糖鎖の分析方法》

本発明の一実施形態に係るシアリル糖鎖の分析方法は、
シアル酸が結合しているシアリル糖鎖の分析方法であって、
前記シアリル糖鎖に由来する第一修飾体を含む第一試料と、前記シアリル糖鎖に由来する第二修飾体を含む第二試料とを準備する工程と、
前記第一試料及び前記第二試料それぞれを、クロマトグラフィー法又は電気泳動法によって分析し、前記第一試料に由来する第一分析データと前記第二試料に由来する第二分析データとを得る工程と、
前記第一分析データと前記第二分析データとを比較する工程と、
前記第一分析データにおいて示される前記第一修飾体に帰属される移動度と、前記第二分析データにおいて示される前記第二修飾体に帰属される移動度とが異なるとき、前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸が、 $\alpha 2$, 3-シアル酸、 $\alpha 2$, 8-シアル酸、及び $\alpha 2$, 9-シアル酸からなる群より選ばれる少なくとも1つを含むと判定する工程と、を含み、

前記第一修飾体は、前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸がエステル化、アミド化又はその両方によって生成された化合物であり、

前記第二修飾体は、前記 α 2, 3-シアル酸、前記 α 2, 8-シアル酸、及び前記 α 2, 9-シアル酸以外の前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸がエステル化、アミド化又はその両方によって生成された化合物である。

[0017] 図1は、本発明の一実施形態に係る分析方法の流れを示すフローチャートである。以下、各工程について説明する。

[0018] <第一試料と第二試料とを準備する工程>

本工程では、シアリル糖鎖に由来する第一修飾体を含む第一試料と、シアリル糖鎖に由来する第二修飾体を含む第二試料とを準備する。

[0019] (シアリル糖鎖)

本実施形態において、「シアリル糖鎖」とは、糖鎖を構成する糖としてシアル酸が少なくとも1つ含まれている糖鎖を意味する。上記シアリル糖鎖は、糖タンパク質の一部を構成するシアリル糖鎖であってもよいし、糖脂質の一部を構成するシアリル糖鎖であってもよいし、これらから遊離したシアリル糖鎖であってもよい。上記シアリル糖鎖が糖タンパク質の一部を構成する場合、当該シアリル糖鎖は、O-結合型糖鎖であってもよいし、N-結合型糖鎖であってもよい。本実施形態の一側面において、蛍光検出又はUV検出を可能にするために、遊離したシアリル糖鎖の還元末端をラベル化用の化合物で修飾したラベル化糖鎖であってもよい。上記ラベル化用の化合物としては、例えば、実施例で用いられている2-aminobenzoic acid (2-AA)、8-アミノピレン-1, 3, 6-トリスルホン酸 (APTS) 等が挙げられる。

[0020] (第一試料)

本実施形態において第一試料は、液体であってもよいし、固体であってもよい。後の工程を行いやすくする観点から上記第一試料は液体であることが好ましい。本実施形態の一側面において、上記第一試料は生体由来であって

もよいし、細胞由来であってもよい。

[0021] (第一修飾体)

本実施形態において第一修飾体は、分析の対象であるシアリル糖鎖に由来する。前記第一修飾体は、前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸がエステル化、アミド化又はその両方によって生成された化合物である。すなわち、第一修飾体においてエステル化又はアミド化されているシアル酸としては、 α 2, 3-シアル酸、 α 2, 6-シアル酸、 α 2, 8-シアル酸、及び α 2, 9-シアル酸が考えられる。本実施形態の一側面において、上記第一修飾体は、糖鎖の一種と把握することもできる。上記第一修飾体は、糖タンパク質の一部を構成していてもよいし、糖脂質の一部を構成していてもよいし、これらから遊離した化合物であってもよい。

[0022] 本明細書において、「タンパク質」は2以上のアミノ酸がペプチド結合した分子の総称を指す。本明細書において、タンパク質はアミノ酸残基数が少ない、例えばアミノ酸残基数が50未満であるペプチド（オリゴペプチド、ポリペプチドを含む。）およびアミノ酸残基数が多い、例えばアミノ酸残基数が50以上であるタンパク質を含んでよい。本明細書において、糖タンパク質は糖ペプチドを含んでよい。

[0023] 糖タンパク質を構成するペプチド鎖のアミノ酸残基数が多いものは、消化酵素等によりペプチド鎖を切断してもよい。例えば、液体クロマトグラフィー又は電気泳動用の試料を調製する場合、ペプチド鎖のアミノ酸残基数は30以下が好ましく、20以下がより好ましく、15以下がさらに好ましい。ペプチド鎖のアミノ酸残基数の下限は特に制限されないが、2以上が好ましく、3以上がより好ましい。

[0024] 糖タンパク質を構成するペプチド鎖を切断するときに用いる消化酵素としては、例えば、トリプシン、Lys-C、アルギニンエンドペプチダーゼ、キモトリプシン、ペプシン、サーモリシン、プロテイナーゼK、プロナーゼE等が挙げられる。これらの消化酵素は、1種を単独で用いてもよいし、2種以上を組み合わせて用いてもよい。ペプチド鎖の切断の際の条件は、測定

対象であるシアリル糖鎖に影響がなければ特に限定されず、使用する消化酵素に応じた適宜のプロトコールが採用される。ペプチド鎖の切断を行う前に、試料中のタンパク質に変性処理又はアルキル化処理が行われてもよい。変性処理又はアルキル化処理の条件は特に限定されない。ペプチド鎖の切断処理は、後述する第1反応の前後または第2反応後に行ってもよい。本実施形態の一側面において、酵素的切断ではなく、化学的切断等によりペプチド鎖を切断してもよい。

[0025] 試料中の糖タンパク質におけるアミノ基をブロックするための処理を適宜行ってもよい。このような処理としては、例えば、糖タンパク質のジメチルアミド化及びグアニジル化等が挙げられる。これにより、後述する第1反応または第2反応を行った際にタンパク質の主鎖の末端にあるアミノ基又はカルボキシ基との間で生じ得る分子内脱水縮合等の副反応を抑制することができる。

[0026] 上記第一修飾体は、シアリル糖鎖に結合しているシアル酸がエステル化、アミド化又はその両方を行うことによって生成できる。本実施形態の一側面において、上記第一修飾体は、上記シアリル糖鎖に対してシアル酸の結合様式特異的修飾を行うことで生成してもよい。ここで、「シアル酸の結合様式特異的な修飾」及び「結合様式特異的なシアル酸の修飾」とは、シアル酸に対して作用する修飾反応であって、当該シアル酸が $\alpha 2, 3$ -シアル酸である場合（又は $\alpha 2, 8$ -シアル酸、若しくは $\alpha 2, 9$ -シアル酸である場合）と $\alpha 2, 6$ -シアル酸である場合とで、当該修飾反応によって生成される化学構造が異なっている反応を意味する。具体的には、当該シアル酸の結合様式特異的修飾は、シアル酸をラクトン化する第1反応と、上記第1反応により生成されたラクトン構造をアミド化する第2反応を含むことが好ましい。以下、第1反応及び第2反応について説明する。

[0027] (第1反応)

第1反応においては、糖タンパク質にシアル酸が結合している場合、結合様式に応じて選択的にシアル酸がラクトン化される。第1反応においては、

好ましくは糖鎖中の α 2, 3-シアル酸に加えて α 2, 8-シアル酸および α 2, 9-シアル酸がラクトン化される。

[0028] 第1反応は、上記シアリル糖鎖を含む試料にシアル酸の結合様式特異的ラクトン化を行うための溶液（以下、「ラクトン化反応溶液」とも呼ぶ。）を接触させて行うことができる。接触方法の一例は、ラクトン化溶液を上記試料に添加すればよい。ラクトン化反応溶液は、好ましくは脱水縮合剤を含む。第1反応と同時に、 α 2, 6-シアル酸はラクトン化とは異なる修飾、好ましくはアミド化又はエステル化が行われることが好ましい。この場合、ラクトン化反応溶液は、脱水縮合剤に加え、さらにアルコール、アミンおよびこれらの塩からなる群から選択される少なくとも1つを含む求核剤を含むことが好ましい。

[0029] シアル酸の結合様式に基づいて選択的に脱水反応または求核反応を起こすように、脱水縮合剤および求核剤の種類及び濃度が調整されればよい。 α 2, 3-シアル酸のカルボキシ基の分子内脱水で生じるラクトンは六員環であり、 α 2, 6-シアル酸のカルボキシ基の分子内脱水により生じ得るラクトンは七員環となる。七員環より安定な六員環を生じる α 2, 3-シアル酸は α 2, 6-シアル酸よりラクトン化されやすい。また、 α 2, 3-シアル酸のカルボキシ基は α 2, 6-シアル酸のカルボキシ基に比べて立体障害が比較的大きい位置にあるため、大きな分子は、 α 2, 6-シアル酸と比べて α 2, 3-シアル酸とは反応しづらい。シアル酸の結合様式による分子構造の違いに基づいて、シアル酸の結合様式により異なる修飾がされるように脱水縮合剤および求核剤の種類及び濃度が調整される。

[0030] 脱水縮合剤は、カルボジイミドを含むことが好ましい。カルボジイミドを用いると、脱水縮合剤としてホスホニウム系脱水縮合剤（いわゆるBOP試薬）又はウロニウム系脱水縮合剤を用いた場合に比べて、立体障害が大きい部位に存在するカルボキシ基がアミド化されにくいからである。カルボジイミドの例としては、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド（E

DC)、N, N' -ジイソプロピルカルボジイミド (D I C)、1-tert-ブチル-3-エチルカルボジイミド (B E C)、N, N' -ジ-tert-ブチルカルボジイミド、1, 3-ジ-p-トルイルカルボジイミド、ビス (2, 6-ジイソプロピルフェニル) カルボジイミド、ビス (トリメチルシリル) カルボジイミド、1, 3-ビス (2, 2-ジメチル-1, 3-ジオキサラン-4-イルメチル) カルボジイミド (B D D C) およびこれらの塩 (塩酸塩等) が挙げられる。

[0031] 脱水縮合剤による脱水縮合を促進させ、かつ副反応を抑制するために、カルボジイミドに加えて、求核性の高い添加剤を用いることが好ましい。本実施形態の一側面において、「求核性の高い添加剤」は、脱水縮合剤の一種と把握することもできる。求核性の高い添加剤としては、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (H O B t)、1-ヒドロキシ-7-アザ-ベンゾトリアゾール (H O A t)、4-(ジメチルアミノ) ピリジン (D M A P)、2-シアノ-2-(ヒドロキシイミノ) 酢酸エチル (O x y m a)、N-ヒドロキシスクシンイミド (H O S u)、6-クロロ-1-ヒドロキシ-ベンゾトリアゾール (C l -H o B t)、N-ヒドロキシ-3, 4-ジヒドロ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン (H O O B t) 等が好ましく用いられる。

[0032] 求核剤として用いられるアミンは、炭素原子を2個以上含む第一級および/または第二級のアミンを含むことが好ましい。第一級のアミンは、エチルアミン、プロピルアミン、イソプロピルアミン、ブチルアミン、sec-ブチルアミン、tert-ブチルアミン等が好ましい。第二級アミンは、ジメチルアミン、エチルメチルアミン、ジエチルアミン、プロピルメチルアミン、イソプロピルメチルアミン等が好ましい。 α 2, 3-シアル酸のカルボキシ基のように立体障害が大きい部位に存在するカルボキシ基がアミド化されにくいようにする観点から、イソプロピルアミンのような分枝アルキル基を有するアミンを用いることが好ましい。すなわち、上記求核剤は、分枝アルキル基を有するアミン化合物又はその塩を含むこ

とが好ましい。ラクトン化反応溶液の求核剤にアミンを用いた場合、シアル酸の結合様式に基づいて、 α 2, 6-シアル酸等の一部のシアル酸のカルボキシ基がアミド化される。

[0033] 求核剤として用いられるアルコールは、特に限定されず、例えばメタノールおよびエタノール等を用いることができる。ラクトン化反応溶液の求核剤にアルコールを用いた場合、シアル酸の結合様式に基づいて、 α 2, 6-シアル酸等の一部のシアル酸のカルボキシ基がエステル化される。求核剤は、上述の求核剤の塩を含んでもよい。

[0034] ラクトン化反応溶液の脱水縮合剤の濃度は、例えば 1 mM 以上 5 M 以下であることが好ましく、10 mM 以上 3 M 以下であることがより好ましい。カルボジイミドと、求核性の高い添加剤（例えば、Oxyma、HOAt 及び HOBt 等）とを併用する場合は、それぞれの濃度が上記範囲であることが好ましい。ラクトン化反応溶液の求核剤の濃度は、例えば 0.01 M 以上 20 M 以下であることが好ましく、0.1 M 以上 10 M 以下であることがより好ましい。第 1 反応の反応温度は、 -20°C 以上 100°C 以下程度であってよく、 -10°C 以上 50°C 以下であることが好ましい。

[0035] 第 1 反応は、液相でも固相でも実施できる。液相で反応を行う場合、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ジメチルホルムアミド (DMF) 等の非水系溶媒中で反応を行うことが好ましい。非水系溶媒中で反応を行うことにより、副反応が抑制される傾向がある。液相反応における各成分の濃度は特に限定されず、脱水縮合剤及びアミンの種類等に応じて適宜に決定できる。

[0036] 固相で第 1 反応を行う場合、固相担体はシアリル糖鎖（タンパク質又は脂質に結合しているシアリル糖鎖を含む。）を固定可能であれば特に限定されない。シアリル糖鎖を固定するためには、例えばエポキシ基、トシル基、カルボキシ基、アミノ基等をリガンドとして有する固相担体を用いることができる。ヒドラジド基、アミノオキシ基等をリガンドとして有する固相担体を用いて、糖鎖を含む糖タンパク質を固定してもよい。シアリル糖鎖を固相担体に固定した状態で反応を行うことにより、反応後の反応溶液の除去が容易

となり、効率よくシアル酸の修飾を行うことができる。固相担体として磁気ビーズを用いた場合は、シアリル糖鎖が結合した磁気ビーズを磁石で集め、過剰な試薬を除去したり、ビーズを溶媒で洗浄することができる。固相担体として樹脂を用いた場合は、フィルタを通すことで過剰試薬を除去した後、樹脂を回収してもよく、遠心操作により樹脂を沈殿させて上清の過剰試薬を除去してもよい。液相で第1反応を行った場合は、限外濾過により過剰試薬を除去してもよい。

[0037] 第1反応後の生成物（以下、「中間体」という場合がある。）は、必要に応じて、公知の方法により精製、脱塩、可溶化、濃縮、乾燥等の処理を行い、ラクトン化反応溶液を除去またはラクトン化反応溶液の濃度を低下させてもよい。

[0038] （第2反応）

第2反応は、第1反応後の生成物（中間体）をアミド化のための溶液（以下、「アミド化反応溶液」とも呼ぶ。）と接触させることにより行えばよい。上記第1反応によってシアル酸の $\alpha 2, 3$ -結合と $\alpha 2, 6$ -結合とを区別して修飾することができるが、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸から生じるラクトン構造は不安定な場合があり、加水分解により元のカルボン酸構造に戻る傾向がある。第2反応によって、ラクトン構造を特異的にアミド化することで、ラクトン構造を安定化することができる。同時に、第2反応によって結合様式特異的にシアル酸は質量が異なる修飾を受けることで、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸と $\alpha 2, 6$ -シアル酸とを区別することができる。第2反応を行うことによって、より特異性が高く、かつ迅速にシアル酸を結合様式特異的に修飾することができる。第2反応の一例は、アミノリシスであってよい。アミノリシスは、アミノ基とラクトン構造との相互作用に基づく反応である。上記アミノリシスは、無水条件下でも好適に行われるため、加水分解とは異なる反応である。本明細書では、無水条件下でも可能な、アンモニア、アミンまたはこれらの塩によるラクトン構造の開環およびアミド化を「アミノリシス」と呼ぶ。本実施形態の一側面において、「ラクトン構造の安定化」及び「ラク

トン構造を安定化する」とは、不安定なラクトン構造を、アミノリシスを行うことで安定な他の構造（メチルアミド基等）に置き換えることと把握することもできる。

[0039] 第2反応の他の一例として、強力な脱水縮合剤を用いてラクトン構造をアミド化してもよい。第2反応に使用される脱水縮合剤としては、ホスホニウム系縮合剤、ウロニウム系縮合剤が挙げられ、具体的にはベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（BOP）、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス（ピロリジノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（PyBOP）、2-（1H-ベンゾトリアゾール-1-イル）-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HBTU）、2-（7-アザ-1H-ベンゾトリアゾール-1-イル）-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート（HATU）、（1-〔（1-（シアノ-2-エトキシ-2-オキソエチリデンアミノオキシ）ジメチルアミノモルホリノ）〕ウロニウムヘキサフルオロホスフェート（COMU）、2-（1H-ベンゾトリアゾール-1-イル）-1,1,3,3-テトラメチルアミニウムテトラフルオロボレート（TBTU）、テトラメチルフルオロホルムアミジニウムヘキサフルオロホスフェート（TFFH）、（7-アザベンゾトリアゾール-1-イルオキシ）トリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（PyAOP）等が挙げられる。これらの強力な脱水縮合剤によるアミド化の前に、ラクトンの開裂操作を挟んでもよい。

[0040] アミド化反応溶液は、アンモニア、アミンおよびこれらの塩からなる群から選択される少なくとも1つを含むことが好ましい。アミンを用いる場合、ラクトン化反応溶液に用いたアミンと異なるアミンを用いるか、安定同位体による修飾等で質量を変化させることが好ましい。第1反応と第2反応とで質量が異なるアミンを用いることで、結合様式によって質量が異なるようにシアル酸をアミド化することができる。アミノリシスには脱水縮合剤は必要でなく、アミド化反応溶液は脱水縮合剤を含まなくてよい。アミド化反応溶

液に脱水縮合剤が含まれていてもよく、例えば第1反応で試料に添加したラクトン化反応溶液を除去しないで、アンモニア、アミンまたはこれらの塩を加えることにより、アミド化反応溶液を調製してもよい。第2反応では、このような簡便な操作でラクトン構造を安定化させ得る。

[0041] アミド化反応溶液に含まれるアミンは、第一級アミンが好ましく、直鎖炭化水素基を有する第一級アミンがより好ましく、直鎖アルキル基を有する第一級アミンがさらに好ましい。アミド化反応溶液に含まれるアミンは、直鎖アルキル基を有する第一級アミンとしては、炭素数が10以下の第一級アミンが好ましく、炭素数が7以下の第一級アミンがより好ましく、メチルアミン、エチルアミン、プロピルアミン、ブチルアミンまたはペンチルアミンがさらに好ましく、メチルアミンが最も好ましい。より効率的にラクトン構造をアミド化する観点からは、アミド化反応溶液に含まれるアミンが分枝（以下、「分枝」は炭化水素鎖の分枝を示す）を有しない直鎖状の構造を有していたり、炭素数が少ないことが好ましい。

[0042] アミド化反応溶液に含まれるアミンが不飽和鎖式炭化水素基を有する第一級アミンの場合、不飽和鎖式炭化水素基は二重結合を含むことが好ましく、不飽和鎖式炭化水素基はアリル基を含むことがより好ましい。上記アミンは、アリルアミンであることが好ましい。アミド化反応溶液に含まれるアミンは、ヒドロキシ基を含む第一級アミンでもよく、エタノールアミンであってよい。アミド化反応溶液に含まれるアミンはアルキル基以外の様々な官能基を含んでもよい。アミド化反応溶液は、上述のアミンの塩を含んでもよい。アミド化反応の結果、糖鎖がこのような官能基を含むように修飾されることにより、当該修飾を受けた糖鎖は質量分析だけではなく、クロマトグラフィ等によってもより分離しやすくなる。

[0043] アミド化反応溶液におけるアンモニア、アミンおよびこれらの塩の濃度は、0.1M以上が好ましく、0.3M以上がより好ましく、0.5M以上がさらに好ましく、1.0M以上がさらに好ましく、3.0M以上が最も好ましい。好適な例として、アミド化反応溶液は、アンモニアまたは第一級アミ

ン、特にメチルアミンを含み、当該アンモニアまたはメチルアミン等の第一級アミンの濃度は、0.1 M以上が好ましく、0.3 M以上がより好ましく、0.5 M以上がさらに好ましく、1.0 M以上がさらに好ましく、3.0 M以上が最も好ましい。アミド化反応溶液におけるアンモニア、アミンおよびこれらの塩の濃度が高いほど、より効率よくラクトン構造をアミド化できる。アミド化反応溶液におけるアンモニア、アミンおよびこれらの塩の濃度の上限値は、特に制限されないが例えば、16 M以下であってもよい。

[0044] アミド化反応溶液の溶媒は、水系溶媒でも有機溶媒でもよいが、ラクトン構造の加水分解を防いで迅速なアミド化を確実に起こす観点から水含有量が少ない溶媒であることが好ましい。アミド化反応溶液の溶媒は、水含有量を抑える脱水操作が加えられた脱水溶媒が好ましく、無水溶媒がさらに好ましい。アミド化反応溶液の溶媒は、メタノールおよびアセトニトリルの少なくとも1つを含むことが好ましい。本実施形態の他の側面において、アミド化反応溶液は水を含んでいてもよく、アミド化反応溶液の溶媒は水であってもよい。

[0045] アミド化反応溶液は、好ましくはpH 7.7以上であり、より好ましくはpH 8.0以上であり、さらに好ましくはpH 8.8以上であり、最も好ましくはpH 10.3以上である。アミド化反応溶液のpHが高くなると、より効率良くラクトン構造をアミド化できる。アミド化反応溶液のpHの上限値は、特に制限されないが例えば、14以下であってもよい。強力な脱水縮合剤を用いてラクトン構造をアミド化する場合、そのpHは特に限定されず、用いる脱水縮合剤に応じてpHを調整すればよい。

[0046] 第2反応は、数秒～数分以内に完了できる。ラクトン構造をアミド化するために試料をアミド化反応溶液と接触させる時間は、1時間未満が好ましく、30分未満がより好ましく、15分未満がさらに好ましく、5分未満がさらに好ましく、1分未満が最も好ましい。好適には、試料をアミド化反応溶液で洗浄したり、担体等に保持されている試料に対して一時的にアミド化反応溶液を通液するだけでもよい。ラクトン構造をアミド化するために試料を

アミド化反応溶液と接触させる時間の下限値は、特に制限されないが例えば、1秒以上であってもよい。試料とラクトン化反応溶液との接触が終了した後から、試料とアミド化反応溶液との接触が終了するまでの時間は、1時間半未満が好ましく、1時間未満がより好ましく、30分未満がさらに好ましい。第2反応は短時間に完了するため、不安定なラクトン構造が分解し糖鎖の解析における定量性が損なわれることを防ぐことができる。また、第2反応の反応時間を短く設定することで、より効率的に試料の解析を行うことができる。試料とラクトン化反応溶液との接触が終了した後から、試料とアミド化反応溶液との接触が終了するまでの時間の下限値は、特に制限されないが例えば、1秒以上以上であってもよい。

[0047] 第2反応は、液相でも固相でも行うことができる。試料とアミド化反応溶液を接触させることができれば、アミド化反応を起こす際のサンプルの状態は特に限定されないが、糖タンパク質を固相担体に結合または吸着された状態でアミド化反応溶液を接触させることが好ましい。第2反応に用いられる固相担体は、糖タンパク質を固定可能なものであれば特に限定されず、第1反応に用いられ得る固相担体が挙げられる。

[0048] 第2反応後の試料は、必要に応じて、公知の方法により精製、脱塩、可溶化、濃縮、乾燥等の処理を行い、アミノ化反応溶液を除去またはアミノ化反応溶液の濃度を低下させてもよい。第2反応後の過剰試薬の除去は、固相または液相の反応方法に応じて第1反応の欄に記載の方法で行うことができる。

[0049] 上述した第1反応及び第2反応の内容を踏まえると、第一修飾体は、前記シアリル糖鎖が脱水縮合剤及び求核剤に接触することで生成された中間体に対して、アンモニア、アミンおよびこれらの塩からなる群から選択される少なくとも1つを接触させることで生成された化合物である、と把握することもできる。

[0050] (第二試料)

本実施形態において第二試料は、液体であってもよいし、固体であっても

よい。後の工程を行いやすくする観点から上記第二試料は液体であることが好ましい。本実施形態の一側面において、上記第二試料は生体由来であってもよいし、細胞由来であってもよい。

[0051] (第二修飾体)

本実施形態において第二修飾体は、分析の対象であるシアリル糖鎖に由来する。前記第二修飾体は、前記 $\alpha 2, 3$ -シアル酸、前記 $\alpha 2, 8$ -シアル酸、及び前記 $\alpha 2, 9$ -シアル酸以外の前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸がエステル化、アミド化又はその両方によって生成された化合物である。本実施形態の一側面において、上記第二修飾体は、糖鎖の一種と把握することもできる。上記第二修飾体は、糖タンパク質の一部を構成していてもよいし、糖脂質の一部を構成していてもよいし、これらから遊離した化合物であってもよい。なお、第二修飾体の由来となるシアリル糖鎖と、第一修飾体の由来となるシアリル糖鎖とは、通常同一である。本実施形態の一側面において、分析の対象であるシアリル糖鎖が $\alpha 2, 3$ -シアル酸、 $\alpha 2, 8$ -シアル酸、及び $\alpha 2, 9$ -シアル酸を含まない場合、上記第二修飾体は、上記第一修飾体と同じ化合物であってもよい。

[0052] 上記第二修飾体は、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸、 $\alpha 2, 8$ -シアル酸、及び $\alpha 2, 9$ -シアル酸以外の「シアリル糖鎖に結合しているシアル酸」がエステル化、アミド化又はその両方を行うことで生成できる。ここで、「 $\alpha 2, 3$ -シアル酸、 $\alpha 2, 8$ -シアル酸、及び $\alpha 2, 9$ -シアル酸以外のシアル酸」としては、例えば、 $\alpha 2, 6$ -シアル酸等が挙げられる。本実施形態の一側面において、上記第二修飾体は、上記第1反応と、上記第1反応により生成されたラクトン構造を開環する第3反応を含む方法によって生成された化合物であることが好ましい。本実施形態の他の側面において、上記第二修飾体は、上記シアリル糖鎖が脱水縮合剤及び求核剤に接触することで生成された中間体が塩基性環境下におかれることによって生成された化合物であると把握することもできる。第1反応については、上述した試薬、反応条件が用いられる。以下、第3反応について説明する。

[0053] (第3反応)

第3反応は、 α 2, 3-シアル酸から生じるラクトン構造を、加水分解により開環して元のカルボン酸構造に戻せばよい。第3反応は、第1反応後に生成された中間体を塩基性環境下におくことによって行うことが好ましい。

[0054] 上記塩基性環境は、第四級アンモニウムカチオン、第三級アミン、第二級アミン、アミノ基に結合した炭素原子に2以上の炭素原子が直接結合している分岐型第一級アミン、アルカリ金属の水酸化物、アルカリ土類金属の水酸化物、テトラアルキルアンモニウムの水酸化物、グアニジン、グアニジン誘導体、及びこれらの塩、並びに、アルカリ緩衝液からなる群より選択される少なくとも一つが存在する環境であることが好ましい。上記アルカリ緩衝液は、T r i s緩衝液、G o o d緩衝液、ホウ酸緩衝液および炭酸塩緩衝液からなる群より選択される少なくとも一つであることが好ましい。本実施形態の一側面において、上記塩基性環境は、*t*-ブチルアミン、トリメチルアミン又はその両方が存在する環境であることがより好ましい。このような立体障害が大きい化合物を用いることで、アミノリシスが抑制され、効率よくラクトン構造を元のカルボン酸構造に戻すことができる。

[0055] 上記塩基性環境は、好ましくはpH8以上であり、より好ましくはpH9以上であり、さらに好ましくはpH9.5以上であり、最も好ましくはpH10以上である。上記塩基性環境のpHが高くなると、より効率良くラクトン構造を開環できる。上記塩基性環境のpHの上限値は、特に制限されないが例えば、14以下であってもよい。

[0056] 第3反応は、数秒～数分以内に完了できる。第3反応の反応時間は、1時間以下が好ましく、30分以下がより好ましく、10分以下がさらに好ましく、5分以下がさらに好ましく、3分以下が最も好ましい。第3反応の反応時間の下限値は、特に制限されないが例えば、1秒以上であってもよい。

[0057] 第3反応は、液相でも固相でも行うことができる。試料を塩基性環境下であれば、試料の状態は特に限定されないが、シアル糖鎖を固相担体に結合または吸着された状態で塩基性環境下におくことが好ましい。第3反応に

用いられる固相担体は、シアリル糖鎖を固定可能なものであれば特に限定されず、第1反応に用いられ得る固相担体が挙げられる。

[0058] 第3反応後の試料は、必要に応じて、公知の方法により精製、脱塩、可溶化、濃縮、乾燥等の処理を行い、反応に用いた試薬を除去または反応に用いた試薬の濃度を低下させてもよい。第3反応後の過剰試薬の除去は、固相または液相の反応方法に応じて第1反応の欄に記載の方法で行うことができる。

[0059] 以上、第一試料及び第二試料の準備の方法を説明した。なお、シアリル糖鎖がタンパク質に結合した糖タンパク質の状態である場合、後述する糖タンパク質の精製、及び糖タンパク質からのシアリル糖鎖の遊離を行ってもよい。

[0060] (糖タンパク質の精製)

糖タンパク質を精製することにより、第1反応、第2反応、および／または第3反応に使用された溶液を除去し、下流の工程の効率を向上させることができる。糖タンパク質の精製方法および条件は、糖タンパク質の種類、性質、分子量等によって適宜選択することができる。糖タンパク質の精製は、タンパク質沈殿法によって行ってもよい。沈殿剤としては硫酸アンモニウム（硫安）等の塩；アセトン、アセトニトリル、及びクロロホルム等の有機溶媒；メタノール、プロパノール、及びエタノール等のアルコール；トリクロロ酢酸（TCA）、塩酸、及びメタリン酸等の酸；ポリエチレングリコール、及びデキストラン等の水溶性ポリマー、並びに、これらの組み合わせ等を用いることができる。タンパク質沈殿法においては、例えば糖タンパク質を含む試料に沈殿剤を添加し、 -20°C 以上 30°C 以下で適当な時間静置する。その後、静置した試料を遠心分離することで生じた沈殿物を回収すればよい。糖タンパク質の精製は、固相担体に糖タンパク質を固定して行ってもよく、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を利用してもよい。

[0061] (糖タンパク質からのシアリル糖鎖の遊離)

シアリル糖鎖を糖タンパク質から遊離させる方法としては、O-グリコシダーゼ、N-グリコシダーゼ、エンドグリコセラミダーゼなどを用いた酵素処理及び、ヒドラジン分解、 β 脱離等の化学的遊離法を用いることができる。糖鎖を遊離させる処理の前に、糖タンパク質のペプチド鎖の切断を行ってもよい。3-アミノキノリン(3AQ)、アントラニル酸(2AA)、1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン(PMP)、8-アミノピレン-1, 3, 6-トリスルホン酸(APTS)等により糖鎖の還元末端のラベル化等の修飾を糖鎖の遊離とともに行ってもよい。

[0062] 糖タンパク質のペプチド鎖からN-結合型糖鎖を遊離させる場合は、ペプチド-N-グリコシダーゼF(PNGase F)、ペプチド-N-グリコシダーゼA(PNGase A)、エンド- β -N-アセチルグルコサミナーゼ(Endo M)等による酵素処理が好適に用いられる。糖タンパク質のペプチド鎖からO-結合型糖鎖を遊離させる場合は、化学的遊離法が好適に用いられる。ヒドラジン分解法は、公知の方法に従って行えばよいが、例えば無水ヒドラジンまたは含水ヒドラジンを糖タンパク質を含むサンプルに添加し、加熱する。 β 脱離法は、公知の方法に従って行えばよいが、例えばカルバミン酸アンモニウム、飽和アンモニア、炭酸アンモニウム、無水トリフルオロメタンスルホン酸(無水TFMS)、水酸化ナトリウム、ジメチルアミン等を糖タンパク質を含む試料に添加し、アルカリ条件下で加熱する。ピーリングによる副反応を抑制する観点からは、カルバミン酸アンモニウム等のアンモニウム塩粉末を使用してO-結合型糖鎖を遊離させることが好ましい。アルカリ条件下で反応させる際にPMP等のピラゾロン試薬類を共存させておき、O-結合型糖鎖を遊離させると同時にラベル化し、ピーリングによる副反応を抑えてもよい。第2反応においてメチル化されたシアル酸のカルボン酸への転換を防ぐ観点から、および、O-結合型糖鎖の遊離効率の観点から、 β 脱離反応のpHは、好ましくはpH11.0以下であり、より好ましくはpH10.0以下である。シアル化糖鎖の分解およびピーリン

グ反応を抑制する観点からは、 β 脱離反応のpHは、pH 9.5以下であることが好ましい。 β 脱離反応を行う際のpHは、通常、pH 7.5以上である。

[0063] 糖鎖の遊離は、液相で行ってよく、固相で行ってもよい。例えば、固相担体に固定された糖タンパク質に対して上述の糖鎖の切断処理を行い、糖鎖を回収してもよい。ヒドラジド基を有する固相担体に結合している糖鎖タンパク質に対して、糖鎖の切断処理を行ったあと、弱酸性溶液により糖鎖を遊離させて回収してもよい。サンプルを固相担体に固定した状態で反応を行うことにより、反応溶液の除去又は脱塩精製がより容易となり、試料の調製を簡素化できる。

[0064] 遊離糖鎖は公知の方法に従って精製してよく、例えばクロロホルム等の有機溶媒を利用した液液抽出によってタンパク質と糖鎖とを分離してよい。遊離糖鎖は固相担体（カラム）によって簡便に精製することもできる。遊離糖鎖は、ヒドラジド基、アミノオキシ基を有する固相担体に結合させて、回収することもできる。ヒドラジド基を有する固相担体としては、住友ベークライト社製「B i o t G l y c o」等が挙げられる。親水性相互作用クロマトグラフィー（以下、H I L I Cとも呼ぶ）用の担体に糖鎖を吸着させて精製してもよい。H I L I C用の担体はアミド基を含むことが好ましい。遊離糖鎖は、カーボンカラムの他、C 1 8等の逆相系の担体を用いて精製してもよい。ラベル化した糖鎖をカーボン又はC 1 8に吸着させて精製してもよい。

[0065] <第一分析データと第二分析データとを得る工程>

本工程では、第一試料及び第二試料それぞれを、クロマトグラフィー法又は電気泳動法によって分析し、前記第一試料に由来する第一分析データと前記第二試料に由来する第二分析データとを得る。ここで、「第一試料に由来する第一分析データ」とは、上記第一試料をクロマトグラフィー法又は電気泳動法によって分析することで得られる分析データのことを意味する。「第二試料に由来する第二分析データ」とは、上記第二試料をクロマトグラフィー法又は電気泳動法によって分析することで得られる分析データのことを意

味する。なお、第一分析データを得るために用いた分析方法と、第二分析データを得るために用いた分析方法とが同一であることは言うまでもない。

[0066] 本工程で用いられるクロマトグラフィー法は、公知の手法であれば特に制限されず、いずれの手法も用いることができる。本実施形態の一側面において、上記クロマトグラフィー法は、液体クロマトグラフィー法、及び超臨界流体クロマトグラフィー法からなる群より選ばれる少なくとも1つであることが好ましく、液体クロマトグラフィー法であることがより好ましい。上記クロマトグラフィー法に用いる分析機器及び分析条件は特に制限無く、例えば、後述する実施例に記載の分析機器及び分析条件が挙げられる。液体クロマトグラフィーに用いるカラムは特に限定されず、C30、C18、C8、及びC4等の疎水性逆相カラム、カーボンカラム、並びに、HILIC用の順相カラムなどを適宜用いることができる。

[0067] クロマトグラフィー法によって得られる分析データは、特に制限無く、クロマトグラムチャートのチャートであってもよいし、上記クロマトグラムから求められた保持時間であってもよい。

[0068] 本工程で用いられる電気泳動法は、公知の手法であれば特に制限されず、いずれの手法も用いることができる。本実施形態の一側面において、上記電気泳動法は、キャピラリー電気泳動法、SDS-PAGE法、マイクロチップ電気泳動法、二次元電気泳動法及び等電点電気泳動法からなる群より選ばれる少なくとも1つであることが好ましく、キャピラリー電気泳動法、SDS-PAGE法及びマイクロチップ電気泳動法からなる群より選ばれる少なくとも1つであることがより好ましい。上記電気泳動法に用いる分析機器及び分析条件は特に制限無く、公知の分析機器及び分析条件を用いることができる。

[0069] 電気泳動法によって得られる分析データは、特に制限無く、電気泳動の結果を示すチャートであってもよいし、上記チャートから求められた移動度であってもよい。

[0070] <第一分析データと第二分析データとを比較する工程>

本工程では、第一分析データと第二分析データとを比較する。比較する方法は、特に制限されず、例えば、両者のクロマトグラムを重ね合わせて、位置が異なるピークの有無を検討する方法、及び両者の保持時間の差分を算出して検討する方法などが挙げられる。

[0071] <シアリル糖鎖に結合しているシアル酸が、所定の結合様式のシアル酸を含むと判定する工程>

本工程では、第一分析データにおいて示される第一修飾体に帰属される移動度と、第二分析データにおいて示される第二修飾体に帰属される移動度とが異なるとき、シアリル糖鎖に結合しているシアル酸が、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸、 $\alpha 2, 8$ -シアル酸、及び $\alpha 2, 9$ -シアル酸からなる群より選ばれる少なくとも1つを含むと判定する。ここで、上述の「移動度」とは、クロマトグラフィー法におけるクロマトグラムのピークの位置及び保持時間、並びに、電気泳動法における移動度及び移動時間を含む概念である。

[0072] 第一分析データ及び第二分析データにおける移動度の帰属の方法は、特に制限されない。例えば、分析対象の試料中に含まれる第一修飾体又は第二修飾体の化学構造が推測されていて、その推測された化学構造に由来する移動度が既知の移動度である場合、第一分析データ又は第二分析データそれぞれにおける、当該既知の移動度に対応する移動度が第一修飾体又は第二修飾体に帰属される移動度であると判断できる。分析対象の試料中に含まれる第一修飾体又は第二修飾体の化学構造が推測できない場合、第一修飾体及び第二修飾体の由来となるシアリル糖鎖を含む試料（後述する、「第三試料」に対応）に由来する分析データ（後述する「第三分析データ」に対応）と、第一分析データ又は第二分析データとを比較して、変化している移動度が第一修飾体又は第二修飾体に帰属される移動度であると判断できる。なお、第一分析データ、第二分析データ及び第三分析データの比較において、変化している移動度が見られない場合（3つの分析データ共に移動度が一致する場合）、分析対象の試料中にシアリル糖鎖が含まれていないと判断できる。

[0073] 本実施形態において、「第一分析データにおいて示される第一修飾体に帰

属される移動度と、第二分析データにおいて示される第二修飾体に帰属される移動度とが異なるとき」には、例えば、以下のような場合が挙げられる。

(1) クロマトグラフィー法によって分析データを得たときであって、第一分析データにおいて示される第一修飾体に帰属されるピークの位置と、第二分析データにおいて示される第二修飾体に帰属されるピークの位置がずれている場合、

(2) クロマトグラフィー法によって分析データを得たときであって、第一分析データにおいて示される第一修飾体に帰属される保持時間と、第二分析データにおいて示される第二修飾体に帰属されるピークの保持時間との差の絶対値が0より大きい場合、

(3) 電気泳動法によって分析データを得たときであって、第一分析データにおいて示される第一修飾体に帰属される移動度と、第二分析データにおいて示される第二修飾体に帰属される移動度との差の絶対値が0より大きい場合。

[0074] 分析対象のシアリル糖鎖が $\alpha 2, 3$ -シアリル酸、 $\alpha 2, 8$ -シアリル酸又は $\alpha 2, 9$ -シアリル酸を含む場合、上記第一修飾体と上記第二修飾体とは、化学的構造、分子量及び電荷の状態が異なっており、両者をクロマトグラフィー法又は電気泳動法によって分析すると、移動度の違いとなって現れる。すなわち、第一分析データにおいて示される第一修飾体に帰属される移動度と、第二分析データにおいて示される第二修飾体に帰属される移動度とが異なるとき、シアリル糖鎖に結合しているシアリル酸が、 $\alpha 2, 3$ -シアリル酸、 $\alpha 2, 8$ -シアリル酸、及び $\alpha 2, 9$ -シアリル酸からなる群より選ばれる少なくとも1つを含むと判定できる。一方で、分析対象のシアリル糖鎖が $\alpha 2, 3$ -シアリル酸、 $\alpha 2, 8$ -シアリル酸及び $\alpha 2, 9$ -シアリル酸以外のシアリル酸（例えば、 $\alpha 2, 6$ -シアリル酸）のみを含む場合、上記第一修飾体と上記第二修飾体とは、化学的構造、分子量及び電荷の状態が同じであり、両者をクロマトグラフィー法又は電気泳動法によって分析すると、移動度の違いは観察されない。すなわち、第一分析データにおいて示される第一修飾体に帰属さ

れる移動度と、第二分析データにおいて示される第二修飾体に帰属される移動度とが同じであるとき、シアリル糖鎖に結合しているシアル酸が、 $\alpha 2, 6$ -シアル酸であると判定できる。

[0075] <第三試料を含めた分析方法>

本実施形態に係るシアリル糖鎖の分析方法は、
前記シアリル糖鎖を含む第三試料を準備する工程と、
前記第三試料を、クロマトグラフィー法又は電気泳動法によって分析し、
前記第三試料に由来する第三分析データを得る工程と、
前記第三分析データを、前記第一分析データ及び前記第二分析データと比較する工程と、

前記第一分析データにおいて示される前記第一修飾体に帰属される移動度と、前記第二分析データにおいて示される前記第二修飾体に帰属される移動度と、前記第三分析データにおいて示される前記シアリル糖鎖に帰属される移動度とが異なるとき、前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸が、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸、 $\alpha 2, 8$ -シアル酸、及び $\alpha 2, 9$ -シアル酸からなる群より選ばれる少なくとも1つと、前記 $\alpha 2, 3$ -シアル酸、前記 $\alpha 2, 8$ -シアル酸及び前記 $\alpha 2, 9$ -シアル酸以外の前記シアル酸と、を含むと判定する工程と、を更に含んでもよい。

[0076] (第三試料を準備する工程)

本実施形態に係る第三試料は、シアリル糖鎖を含む。上記シアリル糖鎖は、上記第一修飾体及び上記第二修飾体の由来となるシアリル糖鎖である。上記第三試料は、液体であってもよいし、固体であってもよい。上記第三試料は液体であることが好ましい。本実施形態の一側面において、上記第三試料は生体由来であってもよいし、細胞由来であってもよい。上記第三試料は、上述の「第一試料と第二試料とを準備する工程」と同じタイミングで準備してもよいし、異なるタイミングで準備してもよい。

[0077] 第三試料を、クロマトグラフィー法又は電気泳動法によって分析し、第三試料に由来する第三分析データを得る工程では、上記第一試料及び上記第二

試料の分析に用いられた分析方法と同じ方法で分析を行い、第三分析データを得る。上記第三分析データは、上述の「第一分析データと第二分析データとを得る工程」と同じタイミングで得てもよいし、異なるタイミングで得てもよい。上記第三分析データを、上記第一分析データ及び上記第二分析データと比較する工程では、上述したのと同様の方法によって、各分析データ同士を比較することができる。

[0078] 第一分析データにおいて示される第一修飾体に帰属される移動度と、第二分析データにおいて示される第二修飾体に帰属される移動度と、第三分析データにおいて示されるシアリル糖鎖に帰属される移動度とが異なるとき、シアリル糖鎖に結合しているシアル酸が、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸、 $\alpha 2, 8$ -シアル酸、及び $\alpha 2, 9$ -シアル酸からなる群より選ばれる少なくとも1つと、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸、 $\alpha 2, 8$ -シアル酸及び $\alpha 2, 9$ -シアル酸以外のシアル酸（例えば、 $\alpha 2, 6$ -シアル酸）と、を含むと判定できる。

[0079] 本実施形態の一側面において、第一分析データにおいて示される第一修飾体に帰属される移動度と、第二分析データにおいて示される第二修飾体に帰属される移動度とが異なりかつ、第二分析データにおいて示される第二修飾体に帰属される移動度と、第三分析データにおいて示されるシアリル糖鎖に帰属される移動度とが同じであるとき（例えば、図2, 3におけるA1、A2、A3）、シアリル糖鎖に結合しているシアル酸が、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸、 $\alpha 2, 8$ -シアル酸、及び $\alpha 2, 9$ -シアル酸からなる群より選ばれる少なくとも1つを含むと判定できる。

[0080] 本実施形態の他の側面において、第一分析データにおいて示される第一修飾体に帰属される移動度と、第二分析データにおいて示される第二修飾体に帰属される移動度とが同じでありかつ、第二分析データにおいて示される第二修飾体に帰属される移動度と、第三分析データにおいて示されるシアリル糖鎖に帰属される移動度とが異なるとき（例えば、図2, 3におけるB1、B2、B3）、シアリル糖鎖に結合しているシアル酸が、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸、 $\alpha 2, 8$ -シアル酸及び $\alpha 2, 9$ -シアル酸以外のシアル酸（例えば、

α 2, 6-シアル酸)を含むと判定できる。

[0081] 以上、本実施形態に係るシアリル糖鎖の分析方法について説明した。従来、質量分析法、クロマトグラフィー法又は電気泳動法で測定対象分子の分子量、分子構造を分析する場合、当該測定対象分子が電荷を有していると、予想される測定結果が得られない場合があった。例えば、シアル酸が含まれるシアリル糖鎖をそのままキャピラリー電気泳法（CE）等で分析すると、上記シアル酸が負の電荷を帯びているため、上記シアリル糖鎖の分子量から想定される検出時間より早く検出されてしまい、正確な分子量、分子構造の評価ができなかった。そのため、シアリル糖鎖に含まれるシアル酸を、中性化（エステル化、アミド化等）してシアリル酸の電荷を中性にしてからキャピラリー電気泳動等の測定に供することも試みられていた。このように、従来の分析方法では測定対象分子の電荷を中性化してから分析することはあっても、一度中性化した測定対象分子を、あえて元の「電荷を有する状態」に戻してから分析に供する発想はなかった。本発明者らは、この点について再度検討を行ったところ。シアル酸には主に α 2, 3-シアル酸と α 2, 6-シアル酸の二種類が存在するが、これらをCEやマイクロチップ電気泳動法で区別するには、一度両者を中性化した後に α 2, 3-シアル酸を再び、電荷を有するシアル酸に戻す手法が簡便で、迅速に評価でき有効であることを見だし、本発明を完成するに至った。

[0082] シアル酸は他の分子から認識されやすい糖鎖末端に位置するため、シアル酸の結合様式を判別することで、ウイルス感染、又は細胞表面でのタンパク質間の相互作用を解明することができる。また、がん化に伴い、糖タンパク質におけるシアル酸の結合様式が変化することも知られており、がんのバイオマーカーとしてのシアル酸の利用も期待される。バイオ医薬品の効果は糖鎖修飾によって異なるため、シアル酸の結合様式を精度良くかつ迅速に判別することで、バイオ医薬品の品質管理を補助することもできる。

実施例

[0083] 以下、実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらに

限定されるものではない。％の記載は、特に言及が無い限り「質量％」を示す。

[0084] [実験1：HPLCを用いたシアリル糖鎖の分析方法]

<試薬>

以下の試薬を用いた。

(糖鎖)

α 2, 3-シアリル糖鎖： α 2, 3-A 2 (ACROSCALE Inc. 製)

α 2, 6-シアリル糖鎖： α 2, 6-A 2 GN 1 (東京化成工業株式会社製)

中性糖鎖：NA 2 (シグマ アルドリッチ製)

(反応試薬)

Reagent A：イソプロピルアミン塩酸塩（求核剤：15～23％）及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（求核性の高い添加剤：5.0～9.0％）のジメチルスルホキシド溶液（DMSO溶液）

Reagent B：N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩 (>98.0％) (EDC、脱水縮合剤)

Reagent C：メチルアミン(16％)の水溶液

上述のReagent A～Reagent Cは、SialoCapper™-ID Kit (株式会社島津製作所製)に含まれているものを用いた。

[0085] <第一試料と第二試料とを準備する工程>

(第一修飾体を含む第一試料の準備)

上述の3種類の糖鎖(1nmol)それぞれを、SialoCapper™-ID Kit (株式会社島津製作所製)を用いて、添付されている取扱説明書に従って反応させた。具体的には、まず各糖鎖に対してReagent AとReagent Bとの混合物を加えて一時間攪拌しながら反応させた(第1反応)。このとき、各反応液における脱水縮合剤及び求核性の高い

添加剤の濃度は500mMであり、求核剤の濃度は2Mであった。次に、各反応液にReagent Cを加えて数秒間ボルテックスミキサーで混合した(第2反応)。その後、取扱説明書に従ってHILIC microtipで精製し、SpeedVacで溶媒を除いた。本操作の結果、 α 2, 3-シアル酸(α 2, 8-シアル酸又は α 2, 9-シアル酸)はメチルアミド化され、 α 2, 6-シアル酸はイソプロピルアミド化される。すなわち、本操作によって、各糖鎖に由来する第一修飾体を得られる。

[0086] 15mgの2-aminobenzoic acid (2-AA)を30%酢酸(AcOH)/DMSO溶媒300 μ Lに溶解した。得られた溶液のうち200 μ Lを用いて12mgのシアノ水素化ホウ素ナトリウムを溶解して反応溶液を得た。上記反応溶液10 μ Lを各糖鎖に加えて良く攪拌した後、37度で18時間反応させることで各糖鎖の還元末端を2AA化した。2AA化した糖鎖を含む糖鎖サンプルに190 μ Lのアセトニトリルを加え、HILIC microtipで精製して過剰試薬を除いた。具体的には、HILIC microtipを水で洗浄した後、90%アセトニトリル0.1%トリフルオロ酢酸で平衡化した。平衡化したHILIC microtipに、アセトニトリルで希釈した上記糖鎖サンプルを加えて遠心操作により通液させた。その後、90%アセトニトリル0.1%トリフルオロ酢酸で洗浄し、最後に水で糖鎖をHILIC microtipから溶出させた。以上の手順で第一修飾体を含む第一試料を準備した。

[0087] (第二修飾体を含む第二試料の準備)

まず、上述の3種類の糖鎖(1nmol)それぞれに、Reagent AとReagent Bとの混合物を加えて一時間攪拌しながら反応させた(第1反応)。このとき、各反応液における脱水縮合剤及び求核性の高い添加剤の濃度は500mMであり、求核剤の濃度は2Mであった。次に、Reagent Cの代わりに同量の水を添加して数秒間ボルテックスミキサーで混合した。その後、取扱説明書に従ってHILIC microtipで精製した。HILIC microtipからの溶出液に対して、トリメチ

ルアミンの終濃度が14%になるように、トリメチルアミン水溶液を加えて数秒間ボルテックスミキサーで混合し、塩基性環境下（pH12~13）でラクトン構造を開裂した（第3反応）。その後、SpeedVacで反応液から溶媒を除いた。本操作の結果、 α 2,3-シアル酸はもとのカルボキシ基のままであるが、 α 2,6-シアル酸はイソプロピルアミド化される。すなわち、本操作によって、各糖鎖に由来する第二修飾体が得られる。

[0088] 15mgの2-aminobenzoic acid（2-AA）を30% AcOH/DMSO溶媒300 μ Lに溶解した。得られた溶液のうち200 μ Lを用いて12mgのシアノ水素化ホウ素ナトリウムを溶解して反応溶液を得た。上記反応溶液10 μ Lを各糖鎖に加えて良く攪拌した後、37度で18時間反応させることで各糖鎖の還元末端を2AA化した。2AA化した糖鎖を含む糖鎖サンプルに190 μ Lのアセトニトリルを加え、HILIC microtipで精製して過剰試薬を除いた。具体的には、HILIC microtipを水で洗浄した後、90%アセトニトリル0.1%トリフルオロ酢酸で平衡化した。平衡化したHILIC microtipに、アセトニトリルで希釈した上記糖鎖サンプルを加えて遠心操作により通液させた。その後、90%アセトニトリル0.1%トリフルオロ酢酸で洗浄し、最後に水で糖鎖をHILIC microtipから溶出させた。以上の手順で第二修飾体を含む第二試料の準備した。

[0089] また、上述の第1反応、第2反応及び第3反応を行わず、2AA化のみを行った糖鎖を第三試料として準備した。

[0090] <第一分析データと第二分析データとを得る工程>

得られた第一試料及び第二試料それぞれを、高速液体クロマトグラフィー法（HPLC法）によって分析し、第一試料に由来する第一分析データと第二試料に由来する第二分析データとを得た（図2）。また、第三試料をHPLC法によって分析し、第三試料に由来する第三分析データを得た（図2）。HPLCの分析条件を以下の表1に示す。

[0091]

[表1]

HPLC の分析条件

System :	Nexera XR (Shimadzu)
Column :	GlycanPac AXH-1, Analytical 1.9um, 150mm x 2.1mm (Thermo Fisher Scientific)
Mobile Phase:	A) 100 mM Ammonium formate (pH 4.5) B) Acetonitrile
Time Program : B.Conc.	80% (0-5 min) → 50% (40 min) → 20% (40.01-50 min) →80% (50.01-60 min)
Flow Rate :	0.2 mL/min
Column Temp. :	40 °C
Injection Vol. :	1 μL (ca. glycan 10pmol)
Detection :	RF-20A xs (Ex 360 nm, Em 420 nm)
Flow Cell :	Semi-micro cell

[0092] <第一分析データと第二分析データとを比較する工程>

図2は、上記HPLC分析の結果を示す蛍光クロマトグラムである。図2において、横軸は保持時間（分）を示し、縦軸は検出した蛍光強度（mV）を示す。図2の最上部において、測定対象分子の模式図を示している。当該模式図において、菱形はシアル酸（ここではN-アセチルノイラミン酸）を示し、白丸はガラクトースを示し、黒四角はN-アセチルグルコサミンを示し、灰色の丸はマンノースを示している。図2において、上段は修飾前の糖鎖の分析結果（第三試料に由来する第三分析データ）を示す。図2において、下段は第一修飾体の分析結果（第一分析データ）を示し、中段は第二修飾体の分析結果（第二分析データ）を示す。第一分析データと第二分析データとを比較すると、 α 2, 6-シアルル糖鎖（図2のB2、B3）及び中性糖鎖（図2のC2、C3）では、保持時間（移動度）に変化が見られなかった。一方、 α 2, 3-シアルル糖鎖（図2のA2、A3）では、第一分析データと第二分析データとを比較すると、保持時間（移動度）に変化が見られた。

[0093] <シアルル糖鎖に結合しているシアル酸が、所定の結合様式のシアル酸を含むと判定する工程>

以下、図2のクロマトグラムについて考察する。左列の α 2, 3-結合シアル酸を持つA2型糖鎖の場合、図2におけるA2とA3のクロマトグラムを比較すると保持時間がシフトしていることから、この糖鎖は α 2, 3-シアル酸を持つと判断できる。事前にDEAE（ジエチルアミノエチルセルロース）などの陰イオン交換クロマトグラフィー用カラムを用いて分画するなど対象の糖鎖がシアル酸を持つことが確定している場合、図2におけるA1とA2を比較して保持時間がシフトしていないことから、本糖鎖は α 2, 3-シアル酸を持つと判断することもできる。シアル酸の有無が不明な場合、A1とA2の比較のみだとシアル酸を持たない可能性があるため、A1、A2及びA3全てを比較して総合的に判断することが好ましい。シアル酸を含まない糖鎖の場合は、図2における右列のC1、C2及びC3の様に、シアル酸の修飾の有無により保持時間がシフトしないためである。

[0094] 図2における中列の α 2, 6-シアル酸を持つA2型糖鎖の場合、図2におけるB1とB2のクロマトグラムを比較すると保持時間がシフトしていることから、この糖鎖は α 2, 6-シアル酸を持つと判断できる。事前にDEAEなどの陰イオン交換クロマトグラフィー用カラムを用いて分画するなど対象の糖鎖がシアル酸を持つことが確定している場合、B2とB3を比較して保持時間がシフトしていないことから、本糖鎖は α 2, 6-シアル酸を持つと判断することもできる。シアル酸の有無が不明な場合、B2とB3の比較のみからはシアル酸の有無が判断できないので、その場合はB1、B2及びB3全てを比較して総合的に判断することが好ましい。B1、B2及びB3で全て同じ保持時間に糖鎖が検出される場合、シアル酸を持たない糖鎖であると判断できる。

[0095] 一つの糖鎖分子の中に α 2, 3-シアル酸と α 2, 6-シアル酸の両方を持つ場合は、シアル酸の修飾をしていない糖鎖（第三試料）、 α 2, 6-シアル酸のみをアミド化した糖鎖（第二修飾体、第二試料）、シアル酸全てをアミド化した糖鎖（第一修飾体、第一試料）の全てで保持時間がシフトすることになるため、三種類すべてのクロマトグラムを比較して判断することが

好ましい。

[0096] 尚、シアル酸には $\alpha 2, 3$ -シアル酸と $\alpha 2, 6$ -シアル酸以外に、サンプルによっては $\alpha 2, 8$ -シアル酸、 $\alpha 2, 9$ -シアル酸といったシアル酸結合様式も存在するが、 $\alpha 2, 8$ -シアル酸、 $\alpha 2, 9$ -シアル酸もシアル酸の修飾が可能であり、シアル酸修飾条件下における反応性は $\alpha 2, 3$ -シアル酸と同等である。したがって、本技術を用いることで、シアル酸の有無と、 $\alpha 2, 6$ -シアル酸か、それ以外のシアル酸（ $\alpha 2, 3$ -シアル酸、 $\alpha 2, 8$ -シアル酸及び $\alpha 2, 9$ -シアル酸）かの判別が可能である。

[0097] すなわち、上述の分析方法において、第一分析データにおいて示される第一修飾体に帰属される移動度と、第二分析データにおいて示される第二修飾体に帰属される移動度とが異なるとき、シアリル糖鎖に結合しているシアル酸が、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸、 $\alpha 2, 8$ -シアル酸、及び $\alpha 2, 9$ -シアル酸からなる群より選ばれる少なくとも1つを含むと判定することができる。

[0098] また、上述の分析方法において、第一分析データにおいて示される第一修飾体に帰属される移動度と、第二分析データにおいて示される第二修飾体に帰属される移動度と、第三分析データにおいて示されるシアリル糖鎖に帰属される移動度とが異なるとき、シアリル糖鎖に結合しているシアル酸が、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸、 $\alpha 2, 8$ -シアル酸、及び $\alpha 2, 9$ -シアル酸からなる群より選ばれる少なくとも1つと、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸、 $\alpha 2, 8$ -シアル酸及び $\alpha 2, 9$ -シアル酸以外のシアル酸（ $\alpha 2, 6$ -シアル酸）と、を含むと判定することができる。

[0099] [実験2：マイクロチップ電気泳動法を用いたシアリル糖鎖の分析方法]

<試薬>

実験1と同様の糖鎖、及び反応試薬を用いた。

[0100] <第一試料と第二試料とを準備する工程>

(第一修飾体を含む第一試料の準備)

上述の3種類の糖鎖(1nmol)それぞれを、SialoCapperTM M-1D Kit (株式会社島津製作所製)を用いて、添付されている取扱説

明書に従って反応させた。具体的には、まず各糖鎖に対して Reagent A と Reagent B との混合物を加えて一時間攪拌しながら反応させた（第1反応）。このとき、各反応液における脱水縮合剤及び求核性の高い添加剤の濃度は 500 mM であり、求核剤の濃度は 2 M であった。次に、各反応液に Reagent C を加えて数秒間ボルテックスミキサーで混合した（第2反応）。その後、取扱説明書に従って HILIC microtip で精製し、Speed Vac で溶媒を除いた。本操作の結果、 α 2, 3-シアル酸（ α 2, 8-シアル酸又は α 2, 9-シアル酸）はメチルアミド化され、 α 2, 6-シアル酸はイソプロピルアミド化される。すなわち、本操作によって、各糖鎖に由来する第一修飾体を得られる。

[0101] 各糖鎖を PCR thin-well tube（容量：0.2 mL）に移し、50 mM APTS（8-アミノピレン-1, 3, 6-トリスルホン酸）及び 500 mM クエン酸の水溶液（5 μ L）を更に加えて各糖鎖を溶解させた。次に 1.0 M シアノ水素化ホウ素ナトリウムの DMSO 溶液（5 μ L）を上記 tube に加え、55 $^{\circ}$ C で 50 分間反応させることで各糖鎖の還元末端を APTS でラベル化した。反応後、ラベル化した糖鎖を含む糖鎖サンプルに 140 μ L の水を加えることで反応を停止させた。

[0102] 水で希釈した上記糖鎖サンプルを 1.5 mL のチューブに移し、20% 臭化テトラブチルアンモニウム / 0.5% 酢酸-クロロホルム溶液（200 μ L）を加え、激しく攪拌した。この操作によって、水層からクロロホルム層に余剰なラベル化試薬が溶解する（液液抽出）。次に、上記チューブを 5000 \times g で 30 秒間遠心した後、クロロホルム層を除いた。この液液抽出をもう一度行い、回収した水層を 300 μ L の水で希釈し、HILIC-SPE：Monospin NH₂（GL Science）を加えた（HILIC-SPE：Monospin NH₂, GL Science）。5000 \times g で 60 秒間遠心した後、400 μ L の水で担体を洗浄し、その後ラベル化糖鎖を 50 μ L の 0.28% アンモニウム水溶液で上記担体から溶出した。ラベル化糖鎖は遠心濃縮器で乾固し、分析開始まで -20 $^{\circ}$ C で保存した。以上の手順で第一修飾体を含む第一試料を準備

した。

[0103] (第二修飾体を含む第二試料の作製)

まず、上述の3種類の糖鎖(1nmol)それぞれに、Reagent AとReagent Bとの混合物を加えて一時間攪拌しながら反応させた(第1反応)。このとき、各反応液における脱水縮合剤及び求核性の高い添加剤の濃度は500mMであり、求核剤の濃度は2Mであった。次に、Reagent Cの代わりに同量の水を添加して数秒間ボルテックスミキサーで混合した。その後、取扱説明書に従ってHILIC microtipで精製した。HILIC microtipからの溶出液に対して、トリメチルアミンの終濃度が14%になるように、トリメチルアミン水溶液を加えて数秒間ボルテックスミキサーで混合し、塩基性環境下(pH12~13)でラクトン構造を開裂した(第3反応)。その後、SpeedVacで反応液から溶媒を除いた。本操作の結果、 α 2,3-シアル酸はもとのカルボキシ基のままであるが、 α 2,6-シアル酸はイソプロピルアミド化される。すなわち、本操作によって、各糖鎖に由来する第二修飾体を得られる。

[0104] 各糖鎖をPCR thin-well tube(容量:0.2mL)に移し、50mM APTS(8-アミノピレン-1,3,6-トリスルホン酸)及び500mM クエン酸の水溶液(5 μ L)を更に加えて各糖鎖を溶解させた。次に1.0M シアノ水素化ホウ素ナトリウムのDMSO溶液(5 μ L)を上記tubeに加え、55 $^{\circ}$ Cで50分間反応させることで各糖鎖の還元末端をAPTSでラベル化した。反応後、ラベル化した糖鎖を含む糖鎖サンプルに140 μ Lの水を加えることで反応を停止させた。

[0105] 水で希釈した上記糖鎖サンプルを1.5mLのチューブに移し、20%臭化テトラブチルアンモニウム/0.5%酢酸-クロロホルム溶液(200 μ L)を加え、激しく攪拌した。この操作によって、水層からクロロホルム層に余剰なラベル化試薬が溶解する(液液抽出)。次に、上記チューブを5000 \times gで30秒間遠心した後、クロロホルム層を除いた。この液液抽出をもう一度行い、回収した水層を300 μ Lの水で希釈し、HILIC-SP

Eに加えた (HILIC-SPE: Monospin NH₂, GL-Science)。5000×gで60秒間遠心した後、400μLの水で担体を洗浄し、その後ラベル化糖鎖を50μLの0.28%アンモニウム水溶液で上記担体から溶出した。ラベル化糖鎖は遠心濃縮器で乾固し、分析開始まで-20℃で保存した。以上の手順で第二修飾体を含む第二試料の準備した。

[0106] また、上述の第1反応、第2反応及び第3反応を行わず、APTSのラベル化のみを行った糖鎖を第三試料として準備した。

[0107] <第一分析データと第二分析データとを得る工程>

まず、マイクロチップ上の4つのリザーバー (R1、R2、R3、およびR4) と分離チャンネルを超純水で自動的に洗浄した。次に、3つのリザーバー (R2、R3、およびR4; 「緩衝リザーバー」と呼ぶ場合がある) と分離チャンネルをポリマーゲル緩衝液 (Gel buffer) で満たした。得られた第一試料及び第二試料それぞれ (3μL) をリザーバーR1から45秒間かけて電氣的に注入し、その後R1=330V、R2=330V、R3=0V、R4=1485Vの条件で140秒間分離操作を行った。マイクロチップ電気泳動法の分析条件を以下の表2に示す。以上の方法でマイクロチップ電気泳動法による分析を行い、第一試料に由来する第一分析データと第二試料に由来する第二分析データとを得た (図3)。また、第三試料を上記と同様の条件でマイクロチップ電気泳動法によって分析し、第三試料に由来する第三分析データを得た (図3)。

[0108] [表2]

マイクロチップ電気泳動法の分析条件

System :	MCE-202 MultiNA (Shimadzu)
Gel buffer :	50 mM Tris-acetate buffer (pH 8.0) containing 14 % polyethylene glycol (PEG35K, average MW 35000)
Fluorescence Detector :	blue LED laser (470nm), long-pass filter (525 nm)

[0109] <第一分析データと第二分析データとを比較する工程>

図3は、上記マイクロチップ電気泳動法による分析の結果を示すグラフである。図3において、横軸は移動時間（秒）を示し、縦軸は検出した蛍光強度（単位mV）を示す。図3において、30～40秒付近で観察される大きいピークは、残存するAPTSに由来するピークであると考えられる。図3の最上部において、測定対象分子の模式図を示している。当該模式図において、菱形はシアル酸（ここではN-アセチルノイラミン酸）を示し、白丸はガラクトースを示し、黒四角はN-アセチルグルコサミンを示し、灰色の丸はマンノースを示している。図3において、上段は修飾前の糖鎖の分析結果（第三試料に由来する第三分析データ）を示す。図3において、下段は第一修飾体の分析結果（第一分析データ）を示し、中段は第二修飾体の分析結果（第二分析データ）を示す。第一分析データと第二分析データとを比較すると、 $\alpha 2, 6$ -シリアル糖鎖（図3のB2、B3）及び中性糖鎖（図3のC2、C3）では、移動時間（移動度）に変化が見られなかった。一方、 $\alpha 2, 3$ -シリアル糖鎖（図3のA2、A3）では、第一分析データと第二分析データとを比較すると、移動時間（移動度）に変化が見られた。

[0110] <シリアル糖鎖に結合しているシアル酸が、所定の結合様式のシアル酸を含むと判定する工程>

以下、図3のグラフについて考察する。左列の $\alpha 2, 3$ -結合シアル酸を持つA2型糖鎖の場合、図3におけるA2とA3のグラフを比較すると移動時間がシフトしていることから、この糖鎖は $\alpha 2, 3$ -シアル酸を持つと判断できる。事前にDEAE（ジエチルアミノエチルセルロース）などの陰イオン交換クロマトグラフィー用カラムを用いて分画するなど対象の糖鎖がシアル酸を持つことが確定している場合、図3におけるA1とA2を比較して移動時間がシフトしていないことから、本糖鎖は $\alpha 2, 3$ -シアル酸を持つと判断することもできる。シアル酸の有無が不明な場合、A1とA2の比較のみだとシアル酸を持たない可能性があるため、A1、A2及びA3全てを比較して総合的に判断することが好ましい。シアル酸を含まない糖鎖の場合は、図3における右列のC1、C2及びC3の様に、シアル酸の修飾の有

無により移動時間がシフトしないためである。

[0111] 図3における中列の $\alpha 2, 6$ -シアル酸を持つA2型糖鎖の場合、図3におけるB1とB2のグラフを比較すると移動時間がシフトしていることから、この糖鎖は $\alpha 2, 6$ -シアル酸を持つと判断できる。事前にDEAEなどの陰イオン交換クロマトグラフィー用カラムを用いて分画するなど対象の糖鎖がシアル酸を持つことが確定している場合、B2とB3を比較して移動時間がシフトしていないことから、本糖鎖は $\alpha 2, 6$ -シアル酸を持つと判断することもできる。シアル酸の有無が不明な場合、B2とB3の比較のみからはシアル酸の有無が判断できないので、その場合はB1、B2及びB3全てを比較して総合的に判断することが好ましい。B1、B2及びB3で全て同じ移動時間に糖鎖が検出される場合、シアル酸を持たない糖鎖であると判断できる。

[0112] 一つの糖鎖分子の中に $\alpha 2, 3$ -シアル酸と $\alpha 2, 6$ -シアル酸の両方を持つ場合は、シアル酸の修飾をしていない糖鎖（第三試料）、 $\alpha 2, 6$ -シアル酸のみをアミド化した糖鎖（第二修飾体、第二試料）、シアル酸全てをアミド化した糖鎖（第一修飾体、第一試料）の全てで移動時間がシフトすることになるため、三種類すべてのグラフを比較して判断することが好ましい。

[0113] 尚、シアル酸には $\alpha 2, 3$ -シアル酸と $\alpha 2, 6$ -シアル酸以外に、サンプルによっては $\alpha 2, 8$ -シアル酸、 $\alpha 2, 9$ -シアル酸といったシアル酸結合様式も存在するが、 $\alpha 2, 8$ -シアル酸、 $\alpha 2, 9$ -シアル酸もシアル酸の修飾が可能であり、シアル酸修飾条件下における反応性は $\alpha 2, 3$ -シアル酸と同等である。したがって、本技術を用いることで、シアル酸の有無と、 $\alpha 2, 6$ -シアル酸か、それ以外のシアル酸（ $\alpha 2, 3$ -シアル酸、 $\alpha 2, 8$ -シアル酸及び $\alpha 2, 9$ -シアル酸）かの判別が可能である。

[0114] すなわち、上述の分析方法において、第一分析データにおいて示される第一修飾体に帰属される移動度と、第二分析データにおいて示される第二修飾体に帰属される移動度とが異なるとき、シアリル糖鎖に結合しているシアル

酸が、 α 2, 3-シアル酸、 α 2, 8-シアル酸、及び α 2, 9-シアル酸からなる群より選ばれる少なくとも1つを含むと判定することができる。

[0115] また、上述の分析方法において、第一分析データにおいて示される第一修飾体に帰属される移動度と、第二分析データにおいて示される第二修飾体に帰属される移動度と、第三分析データにおいて示されるシアリル糖鎖に帰属される移動度とが異なるとき、シアリル糖鎖に結合しているシアル酸が、 α 2, 3-シアル酸、 α 2, 8-シアル酸、及び α 2, 9-シアル酸からなる群より選ばれる少なくとも1つと、 α 2, 3-シアル酸、 α 2, 8-シアル酸及び α 2, 9-シアル酸以外のシアル酸 (α 2, 6-シアル酸) と、を含むと判定することができる。

[0116] [態様]

上述した複数の例示的な実施形態および実施例は、以下の態様の具体例であることが当業者により理解される。

[0117] (第1項)

一態様に係るシアル酸が結合しているシアリル糖鎖の分析方法は、前記シアリル糖鎖に由来する第一修飾体を含む第一試料と、前記シアリル糖鎖に由来する第二修飾体を含む第二試料とを準備する工程と、前記第一試料及び前記第二試料それぞれを、クロマトグラフィー法又は電気泳動法によって分析し、前記第一試料に由来する第一分析データと前記第二試料に由来する第二分析データとを得る工程と、前記第一分析データと前記第二分析データとを比較する工程と、前記第一分析データにおいて示される前記第一修飾体に帰属される移動度と、前記第二分析データにおいて示される前記第二修飾体に帰属される移動度とが異なるとき、前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸が、 α 2, 3-シアル酸、 α 2, 8-シアル酸、及び α 2, 9-シアル酸からなる群より選ばれる少なくとも1つを含むと判定する工程と、を含み、前記第一修飾体は、前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸がエステル化、アミド化又はその両方によって生成された化合物であり、前記第二修飾体は、前記 α 2, 3-シアル酸、前記 α 2, 8-シアル酸、及び前記

α 2, 9-シアル酸以外の前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸がエステル化、アミド化又はその両方によって生成された化合物である。第1項に記載の方法によれば、クロマトグラフィー法又は電気泳動法によって、シアリル糖鎖に結合しているシアル酸の結合様式を判別することができる。

[0118] (第2項)

第1項に記載の方法において、前記第一分析データにおいて示される前記第一修飾体に帰属される移動度と、前記第二分析データにおいて示される前記第二修飾体に帰属される移動度とが同じであるとき、前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸が、 α 2, 6-シアル酸であると判定する工程を更に含む。第2項に記載の方法によれば、クロマトグラフィー法又は電気泳動法によって、シアリル糖鎖に結合しているシアル酸の結合様式をより詳細に判別することができる。

[0119] (第3項)

第1項に記載の方法において、前記シアリル糖鎖を含む第三試料を準備する工程と、前記第三試料を、クロマトグラフィー法又は電気泳動法によって分析し、前記第三試料に由来する第三分析データを得る工程と、前記第三分析データを、前記第一分析データ及び前記第二分析データと比較する工程と、前記第一分析データにおいて示される前記第一修飾体に帰属される移動度と、前記第二分析データにおいて示される前記第二修飾体に帰属される移動度と、前記第三分析データにおいて示される前記シアリル糖鎖に帰属される移動度とが異なるとき、前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸が、 α 2, 3-シアル酸、 α 2, 8-シアル酸、及び α 2, 9-シアル酸からなる群より選ばれる少なくとも1つと、前記 α 2, 3-シアル酸、前記 α 2, 8-シアル酸及び前記 α 2, 9-シアル酸以外の前記シアル酸と、を含むと判定する工程と、を更に含む。第3項に記載の方法によれば、クロマトグラフィー法又は電気泳動法によって、シアリル糖鎖に結合しているシアル酸の結合様式をより詳細に判別することができる。

[0120] (第4項)

第1項～第3項のいずれかに記載の方法において、前記第一修飾体は、前記シアリル糖鎖が脱水縮合剤及び求核剤に接触することで生成された中間体に対して、アンモニア、アミンおよびこれらの塩からなる群から選択される少なくとも1つを接触させることで生成された化合物である。第4項に記載の方法によれば、第一修飾体を効率よく生成することが可能である。

[0121] (第5項)

第4項に記載の方法において、前記脱水縮合剤は、カルボジイミドを含む。第5項に記載の方法によれば、更に第一修飾体を効率よく生成することが可能である。

[0122] (第6項)

第4項又は第5項に記載の方法において、前記求核剤は、分岐アルキル基を有するアミン化合物又はその塩を含む。第6項に記載の方法によれば、更に第一修飾体を効率よく生成することが可能である。

[0123] (第7項)

第1項～第6項のいずれかに記載の方法において、前記第二修飾体は、前記シアリル糖鎖が脱水縮合剤及び求核剤に接触することで生成された中間体が塩基性環境下におかれることによって生成された化合物である。第7項に記載の方法によれば、効率よく第二修飾体を生成することが可能である。

[0124] (第8項)

第7項に記載の方法において、前記塩基性環境は、*t*-ブチルアミン、トリメチルアミン又はその両方が存在する環境である。第8項に記載の方法によれば、更に効率よく第二修飾体を生成することが可能である。

[0125] (第9項)

第1項～第8項のいずれかに記載の方法において、前記クロマトグラフィー法は、液体クロマトグラフィー法である。第9項に記載の方法によれば、クロマトグラム上の保持時間によって、 $\alpha-2, 3$ シアル酸等と $\alpha-2, 6$ シアル酸とを区別することができる。

[0126] (第10項)

第1項～第9項のいずれかに記載の方法において、前記電気泳動法は、キャピラリー電気泳動法、SDS-PAGE法及びマイクロチップ電気泳動法からなる群より選ばれる少なくとも1つである。第10項に記載の方法によれば、電気泳動法による移動度によって、 α -2, 3シアル酸等と α -2, 6シアル酸とを区別することができる。

請求の範囲

[請求項1]

シアル酸が結合しているシアリル糖鎖の分析方法であって、
前記シアリル糖鎖に由来する第一修飾体を含む第一試料と、前記シアリル糖鎖に由来する第二修飾体を含む第二試料とを準備する工程と、
前記第一試料及び前記第二試料それぞれを、クロマトグラフィー法又は電気泳動法によって分析し、前記第一試料に由来する第一分析データと前記第二試料に由来する第二分析データとを得る工程と、
前記第一分析データと前記第二分析データとを比較する工程と、
前記第一分析データにおいて示される前記第一修飾体に帰属される移動度と、前記第二分析データにおいて示される前記第二修飾体に帰属される移動度とが異なるとき、前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸が、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸、 $\alpha 2, 8$ -シアル酸、及び $\alpha 2, 9$ -シアル酸からなる群より選ばれる少なくとも1つを含むと判定する工程と、を含み、
前記第一修飾体は、前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸がエステル化、アミド化又はその両方によって生成された化合物であり、
前記第二修飾体は、前記 $\alpha 2, 3$ -シアル酸、前記 $\alpha 2, 8$ -シアル酸、及び前記 $\alpha 2, 9$ -シアル酸以外の前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸がエステル化、アミド化又はその両方によって生成された化合物である、シアリル糖鎖の分析方法。

[請求項2]

前記第一分析データにおいて示される前記第一修飾体に帰属される移動度と、前記第二分析データにおいて示される前記第二修飾体に帰属される移動度とが同じであるとき、前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸が、 $\alpha 2, 6$ -シアル酸であると判定する工程を更に含む、請求項1に記載のシアリル糖鎖の分析方法。

[請求項3]

前記シアリル糖鎖を含む第三試料を準備する工程と、

前記第三試料を、クロマトグラフィー法又は電気泳動法によって分析し、前記第三試料に由来する第三分析データを得る工程と、

前記第三分析データを、前記第一分析データ及び前記第二分析データと比較する工程と、

前記第一分析データにおいて示される前記第一修飾体に帰属される移動度と、前記第二分析データにおいて示される前記第二修飾体に帰属される移動度と、前記第三分析データにおいて示される前記シアリル糖鎖に帰属される移動度とが異なるとき、前記シアリル糖鎖に結合している前記シアル酸が、 α 2, 3-シアル酸、 α 2, 8-シアル酸、及び α 2, 9-シアル酸からなる群より選ばれる少なくとも1つと、前記 α 2, 3-シアル酸、前記 α 2, 8-シアル酸及び前記 α 2, 9-シアル酸以外の前記シアル酸と、を含むと判定する工程と、を更に含む、請求項1に記載のシアリル糖鎖の分析方法。

[請求項4] 前記第一修飾体は、前記シアリル糖鎖が脱水縮合剤及び求核剤に接触することで生成された中間体に対して、アンモニア、アミンおよびこれらの塩からなる群から選択される少なくとも1つを接触させることで生成された化合物である、請求項1～請求項3のいずれか一項に記載のシアリル糖鎖の分析方法。

[請求項5] 前記脱水縮合剤は、カルボジイミドを含む、請求項4に記載のシアリル糖鎖の分析方法。

[請求項6] 前記求核剤は、分岐アルキル基を有するアミン化合物又はその塩を含む、請求項4に記載のシアリル糖鎖の分析方法。

[請求項7] 前記第二修飾体は、前記シアリル糖鎖が脱水縮合剤及び求核剤に接触することで生成された中間体が塩基性環境下におかれることによって生成された化合物である、請求項1～請求項3のいずれか一項に記載のシアリル糖鎖の分析方法。

[請求項8] 前記塩基性環境は、*t*-ブチルアミン、トリメチルアミン又はその両方が存在する環境である、請求項7に記載のシアリル糖鎖の分析方法。

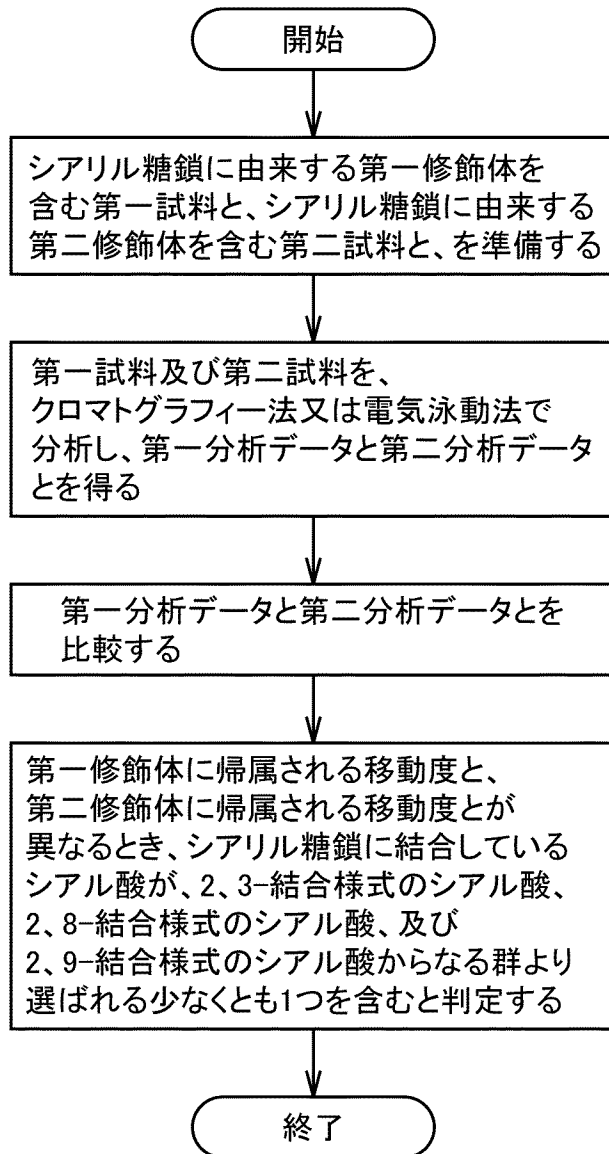
法。

[請求項9] 前記クロマトグラフィー法は、液体クロマトグラフィー法である、請求項1～請求項3のいずれか一項に記載のシアリル糖鎖の分析方法。

[請求項10] 前記電気泳動法は、キャピラリー電気泳動法、SDS-PAGE法及びマイクロチップ電気泳動法からなる群より選ばれる少なくとも1つである、請求項1～請求項3のいずれか一項に記載のシアリル糖鎖の分析方法。

[図1]

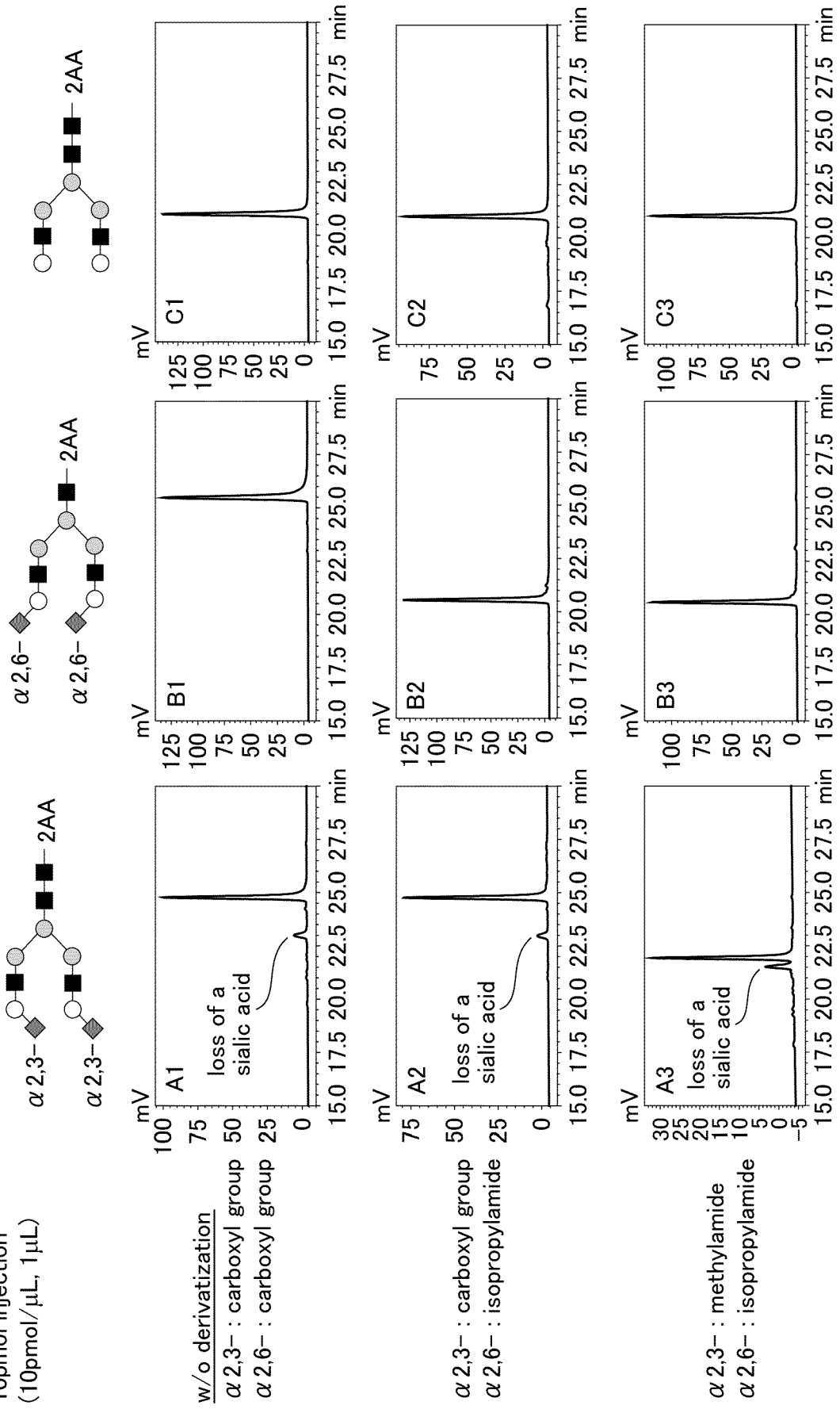
FIG.1



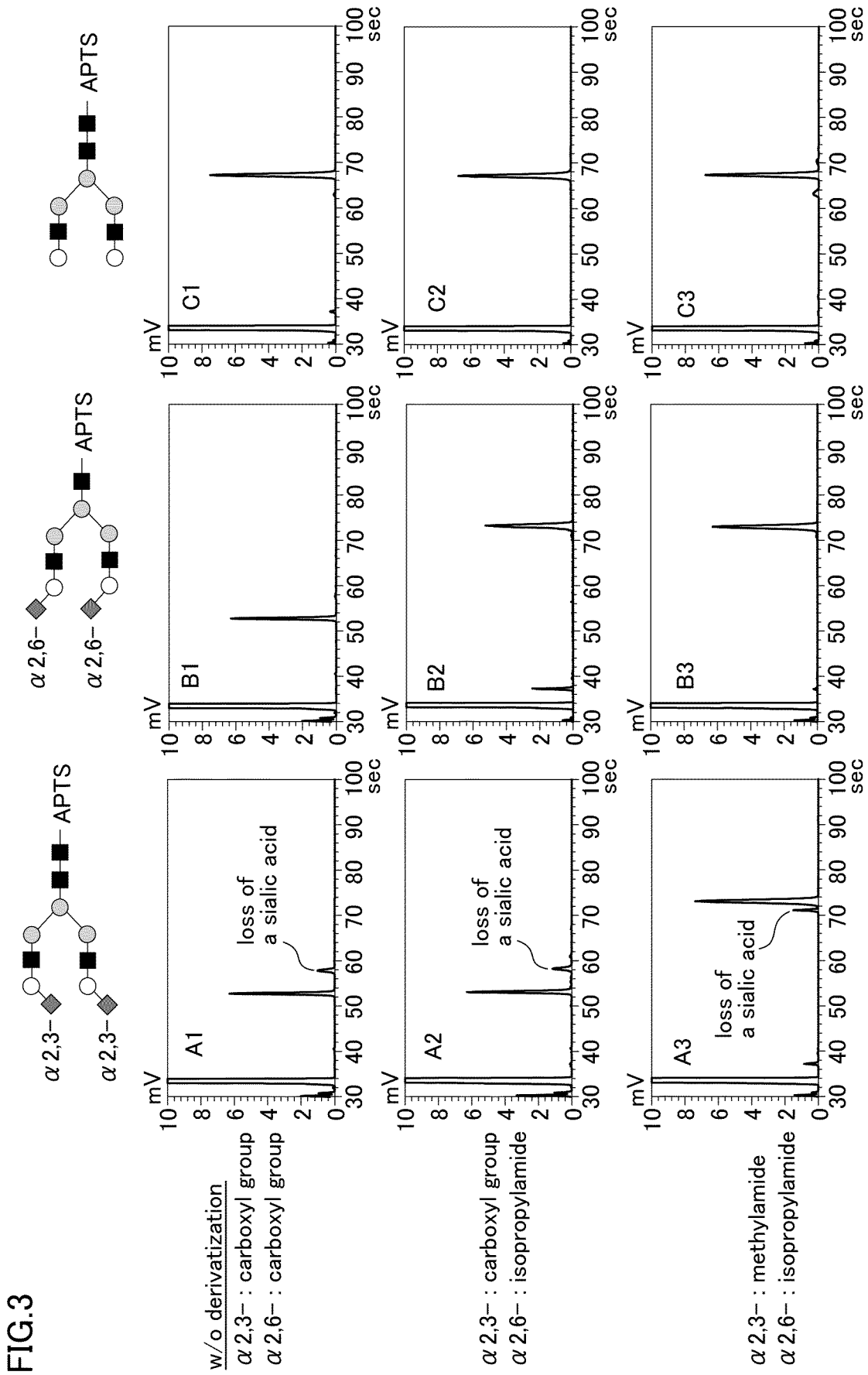
[2]

FIG.2

10pmol injection
(10pmol/ μ L, 1 μ L)



[3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/044979

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>G01N 30/88</i> (2006.01)i; <i>G01N 27/447</i> (2006.01)i FI: G01N30/88 J; G01N27/447 331E; G01N27/447 315K; G01N27/447 301A 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) G01N30/88; G01N27/447		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2021-67524 A (SHIMADZU CORPORATION) 30 April 2021 (2021-04-30) claims 1, 21-24, paragraphs [0024]-[0035], [0052], [0053], [0085]-[0089], fig. 3	1-5, 9-10 6-8
A	WO 2022/009095 A1 (DH TECHNOLOGIES DEVELOPMENT PTE. LTD.) 13 January 2022 (2022-01-13) entire text, all drawings	1-10
A	WO 2021/010221 A1 (SHIMADZU CORPORATION) 21 January 2021 (2021-01-21) entire text, all drawings	1-10
A	JP 2019-152475 A (SHIMADZU CORPORATION) 12 September 2019 (2019-09-12) entire text, all drawings	1-10
A	JP 2016-194500 A (SHIMADZU CORPORATION) 17 November 2016 (2016-11-17) entire text, all drawings	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent 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 08 February 2024		Date of mailing of the international search report 20 February 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	西風隆司. SialoCapper-ID Kitの開発と応用～質量分析を用いた糖鎖解析のための新しい誘導体化ツール～. ぶんせき. 2021, vol. 10, pp. 570-576, (NISHIKAZE, Takashi, INUZUKA, Mako. Development and Applications of SialoCapper-ID Kit: Novel Derivatization Tool for Chain Analysis Using Mass Spectrometry. Bunseki [Analysis].) entire text, all drawings	1-10
A	MORAN, Alan B. et al. Analytical Chemistry. 2022, vol. 94, pp. 6639-6648, https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02610 entire text, all drawings	1-10
A	SUZUKI, Noriko et al. Analytical Biochemistry. vol. 567, pp. 117-127, https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.11.014 entire text, all drawings	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/044979

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2021-67524	A	30 April 2021	US 2021/0164989 A1 claims 1, 21-24, paragraphs [0059]-[0072], [0093]-[0095], [0139]-[0143], fig. 3	
				EP 3812767 A1	
				CN 112763286 A	
WO	2022/009095	A1	13 January 2022	JP 2023-533493 A entire text, all drawings	
				US 2023/0251231 A1	
				CN 115777063 A	
WO	2021/010221	A1	21 January 2021	US 2022/0299408 A1 entire text, all drawings	
				EP 3998274 A1	
				CN 114127553 A	
JP	2019-152475	A	12 September 2019	US 2019/0271617 A1 entire text, all drawings	
				EP 3534158 A1	
				CN 110220985 A	
JP	2016-194500	A	17 November 2016	US 2018/0059094 A1	
				WO 2016/159291 A1	
				EP 3279655 A1	
				CN 107430113 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） G01N 30/88(2006.01)i; G01N 27/447(2006.01)i FI: G01N30/88 J; G01N27/447 331E; G01N27/447 315K; G01N27/447 301A		
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）） G01N30/88; G01N27/447 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 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2024年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2024年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2024年		
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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
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 請求項の番号
X A	JP 2021-67524 A (株式会社島津製作所) 30.04.2021 (2021 - 04 - 30) [請求項1]、[請求項2 1] - [請求項2 4]、[0 0 2 4] - [0 0 3 5]、[0 0 5 2] - [0 0 5 3]、[0 0 8 5] - [0 0 8 9]、[図3]	1-5,9-10 6-8
A	WO 2022/009095 A1 (DH TECHNOLOGIES DEVELOPMENT PTE. LTD.) 13.01.2022 (2022 - 01 - 13) 全文,全図	1-10
A	WO 2021/010221 A1 (株式会社島津製作所) 21.01.2021 (2021 - 01 - 21) 全文,全図	1-10
A	JP 2019-152475 A (株式会社島津製作所) 12.09.2019 (2019 - 09 - 12) 全文,全図	1-10
A	JP 2016-194500 A (株式会社島津製作所) 17.11.2016 (2016 - 11 - 17) 全文,全図	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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、一般的技术水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “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抵 触するものではなく、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	08.02.2024	国際調査報告の発送日 20.02.2024
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 大瀧 真理 2J 9812 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

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 請求項の番号
A	西風 隆司, SialoCapper - ID Kitの開発と応用～質量分析を用いた糖鎖解析のための新しい誘導体化ツール～, ぶんせき, 2021, vol.10, pp.570-576 全文, 全図	1-10
A	MORAN, Alan B. et al., Analytical Chemistry, 2022, vol.94, pp.6639-6648, https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02610 全文, 全図	1-10
A	SUZUKI, Noriko et al., Analytical Biochemistry, vol.567, pp.117-127, https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.11.014 全文, 全図	1-10

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/044979

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2021-67524 A	30.04.2021	US 2021/0164989 A1 [請求項1]、[請求項2 1] - [請求項24]、 [0059] - [00 72]、[0093] - [0095]、[013 9] - [0143]、[図 3]	
		EP 3812767 A1	
		CN 112763286 A	
WO 2022/009095 A1	13.01.2022	JP 2023-533493 A 全文, 全図	
		US 2023/0251231 A1	
		CN 115777063 A	
WO 2021/010221 A1	21.01.2021	US 2022/0299408 A1 全文, 全図	
		EP 3998274 A1	
		CN 114127553 A	
JP 2019-152475 A	12.09.2019	US 2019/0271617 A1 全文, 全図	
		EP 3534158 A1	
		CN 110220985 A	
JP 2016-194500 A	17.11.2016	US 2018/0059094 A1	
		WO 2016/159291 A1	
		EP 3279655 A1	
		CN 107430113 A	