



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104854135 B

(45)授权公告日 2018.06.22

(21)申请号 201380065899.9

(22)申请日 2013.12.16

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104854135 A

(43)申请公布日 2015.08.19

(30)优先权数据

61/740087 2012.12.20 US

61/740106 2012.12.20 US

61/740076 2012.12.20 US

61/740127 2012.12.20 US

61/740119 2012.12.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.06.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/075285 2013.12.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/099724 EN 2014.06.26

(73)专利权人 纳幕尔杜邦公司

地址 美国特拉华州威尔明顿

(72)发明人 J.L.波林 A.M.佩蒂科内

R.B.卡萨特 T.J.登内斯

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 邹雪梅 李炳爱

(51)Int.Cl.

C08B 37/00(2006.01)

C08L 5/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 1283633 A,2001.02.14,实施例1,权利要求1,3.

CN 1283632 A,2001.02.14,全文.

US 2006/0134417 A1,2006.06.22,全文.

TADASHI KIH0 et al..(1→3)-α-D-glucan from an alkaline extract of Agroclybe cylindracea, and antitumor activity of its O-(carboxymethyl)ated derivatives.《Carbohydrate Research》.2001,第189卷第273-279页.

Mariko Shida et al..A (1→3)-α-D-glucan isolated from the fruit bodies of Lentinus edodes.《Carbohydrate Research》.2001,第60卷(第1期),第117-127页.

Xingfeng Bao et al..Chemical modifications of the (1→3)-α-D-glucan from spores of Ganoderma lucidum and investigation of their physicochemical properties and immunological activity.《Carbohydrate Research》.2001,第336卷(第2期),第127-140页.

审查员 苏晓樱

权利要求书1页 说明书23页

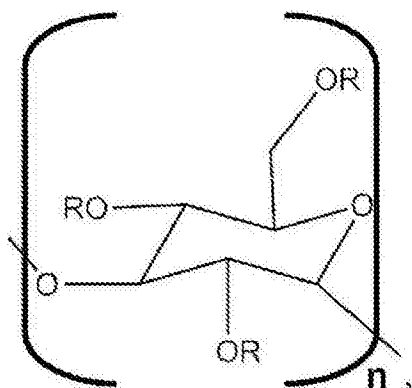
(54)发明名称

聚α-1,3-葡聚糖醚的制备

(57)摘要

本发明公开了具有约0.05至约3.0取代度的聚α-1,3-葡聚糖醚化合物。本发明还公开了制备聚α-1,3-葡聚糖醚化合物的方法。

1. 一种包含由以下结构表示的聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的组合物:



其中

- (i) n 为至少10,
- (ii) 每个R独立地为H或有机基团,并且
- (iii) 所述化合物具有0.05至3.0的取代度,并且该化合物包含两种或更多种类型的有机基团。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述两种或更多种类型的有机基团选自羟烷基、烷基、或羧烷基。

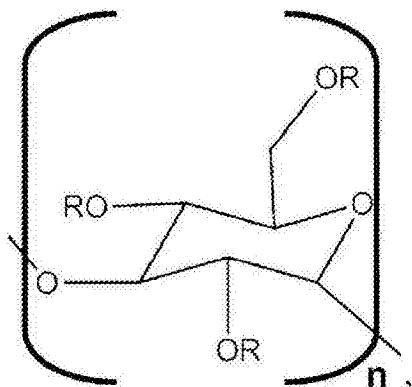
3. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述两种或更多种类型的有机基团选自羟丙基、二羟丙基、羟乙基、甲基、乙基、或羧甲基。

4. 根据权利要求1、2或3所述的组合物,其中 n 为至少800。

5. 根据权利要求1、2或3所述的组合物,其中所述取代度为0.2至2.0。

6. 一种制备聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的方法,所述方法包括:

(a) 在碱性条件下的反应中,使聚 α -1,3-葡聚糖与至少一种包含有机基团的醚化试剂接触,其中所述有机基团醚化至所述聚 α -1,3-葡聚糖,从而制得由以下结构表示的聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物:



其中

- (i) n 为至少10,
- (ii) 每个R独立地为H或有机基团,并且
- (iii) 所述化合物具有0.05至3.0的取代度,该化合物包含两种或更多种类型的有机基团;并且
- (b) 任选地分离出步骤(a)中制得的所述聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物。

聚 α -1,3-葡聚糖醚的制备

[0001] 本申请要求美国临时申请61/740,076;61/740,087;61/740,106;61/740,119和61/740,127的权益;每篇专利均提交于2012年12月20日,这些专利均全文以引用方式并入本文。

技术领域

[0002] 本发明为聚 α -1,3-葡聚糖衍生物领域。具体地,本发明涉及聚 α -1,3-葡聚糖醚及其制备方法。

背景技术

[0003] 受到利用微生物或植物宿主的酶促合成或基因工程以寻求新结构多糖的期望的驱动,研究人员已经发现了可生物降解并且可从可再生资源基原料经济地制备的多糖。一种此类多糖是聚 α -1,3-葡聚糖,其为特征在于具有 α -1,3-糖苷键的葡聚糖聚合物。通过使蔗糖水溶液与从唾液链球菌分离出的葡糖基转移酶接触,分离出该聚合物(Simpson等人, Microbiology 141:1451-1460, 1995)。由聚 α -1,3-葡聚糖制得的膜耐受至多150°C的温度,并且提供优于得自 β -1,4-连接的多糖的聚合物的优点(Ogawa等人, Fiber Differentiation Methods 47:353-362, 1980)。

[0004] 美国专利7,000,000公开了包含己糖单元的多糖纤维的制备,其中在聚合物内至少50%的己糖单元经由 α -1,3-糖苷键,利用唾液链球菌gtfJ酶连接。该酶利用蔗糖作为聚合反应的底物,生成聚 α -1,3-葡聚糖和果糖作为最终产物(Simpson等人, 1995)。在溶剂或包含溶剂的混合物中溶解超过临界浓度时,本发明所公开的聚合物形成液晶溶液。由该溶液纺出高度适用于纺织物的连续牢固的棉状纤维并且使用。

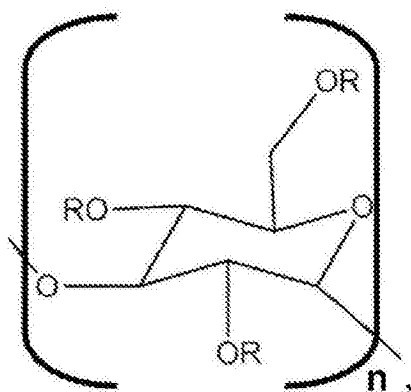
[0005] Kiho等人(Carb. Res. 189:273-270, 1989)公开了从真菌茶树菇碱提取并且分离出聚 α -1,3-葡聚糖,其被进一步衍生成羧甲基葡聚糖钠(CMG)。该醚衍生物表现出对恶性毒瘤的抗肿瘤特性。相似地,Zhang等人(Intl. Publ. No. CN1283633)描述了从药用真菌赤芝提取出的聚 α -1,3-葡聚糖及其衍生化成CMG。

[0006] 考虑到它们在许多应用中的潜在实用性,期望开发新型聚 α -1,3-葡聚糖醚衍生物和制备此类衍生物的方法。

发明内容

[0007] 在一个实施例中,本发明涉及包含由以下结构表示的聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的组合物:

[0008]



[0009] 其中

[0010] (i) n 为至少6,[0011] (ii) 每个 R 独立地为 H 或有机基团,并且

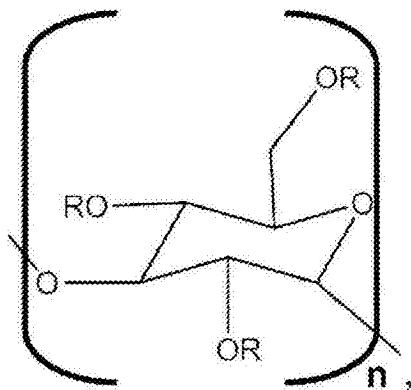
[0012] (iii) 所述化合物具有约0.05至约3.0的取代度。

[0013] 在第二实施例中,所述有机基团为羟烷基基团、烷基基团、或羧烷基基团。该实施例中的化合物可包含一种类型的有机基团,或两种或更多种类型的有机基团。所述有机基团可为例如羟丙基、二羟丙基、羟乙基、甲基、乙基、或羧甲基基团。在第三实施例中,所述化合物包含一种类型的有机基团,而在第四实施例中,所述化合物包含两种或更多种类型的有机基团。

[0014] 在第五实施例中,聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的取代度为约0.2至约2.0。

[0015] 在第六实施例中,本发明涉及制备聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的方法。该方法包括在碱性条件下的反应中,使聚 α -1,3-葡聚糖与至少一种包含有机基团的醚化试剂接触。在该接触步骤中,所述醚化试剂醚化至聚 α -1,3-葡聚糖,从而制得由以下结构表示的聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物:

[0016]



[0017] 其中

[0018] (i) n 为至少6,[0019] (ii) 每个 R 独立地为 H 或有机基团,并且

[0020] (iii) 所述化合物具有约0.05至约3.0的取代度。可任选分离出由该方法制得的聚 α -1,3-葡聚糖醚。

[0021] 在第七实施例中,反应的碱性条件包括碱性氢氧化物溶液。

[0022] 在第八实施例中,所述反应包含有机溶剂。在第九实施例中,所述有机溶剂为异丙醇。

[0023] 在第十实施例中,所述方法的接触步骤还包括加热反应,和/或中和反应pH。

[0024] 在所述方法的第十一实施例中,所述有机基团为羟烷基基团、烷基基团、或羧烷基基团。该实施例中的化合物可包含一种类型的有机基团,或两种或更多种类型的有机基团。

[0025] 在第十二实施例中,用于所述方法中的聚 α -1,3-葡聚糖为浆液形式。在所述方法的第十三实施例中,所述浆液包含聚 α -1,3-葡聚糖、蔗糖、葡萄糖、果糖和葡糖基转移酶。

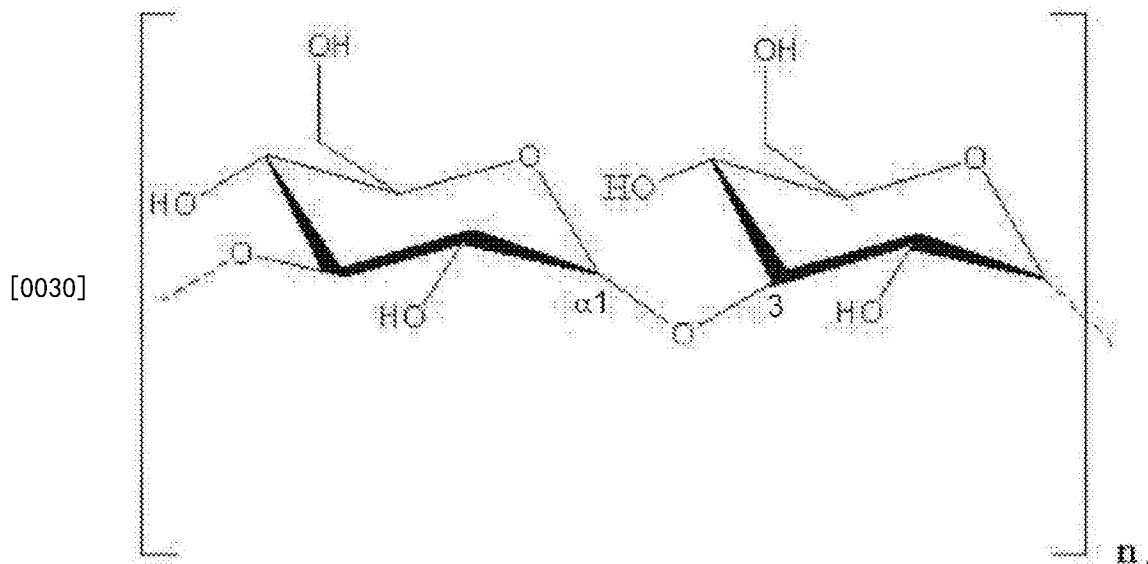
[0026] 在第十四实施例中,用于所述方法中的聚 α -1,3-葡聚糖为湿饼形式。

具体实施方式

[0027] 本文所引用的所有专利和非专利文献的公开内容均全文以引用方式并入本文中。

[0028] 如本文所用,术语“发明”或“本发明所公开的”不旨在限制但一般适用于权利要求中所限定的或本文所述的任何发明。本文可互换使用这些术语。

[0029] 本文中,术语“聚 α -1,3-葡聚糖”、“ α -1,3-葡聚糖聚合物”和“葡聚糖聚合物”互换使用。聚 α -1,3-葡聚糖是包含通过糖苷键连接在一起葡萄糖单体单元的聚合物,其中至少约50%的糖苷键是 α -1,3-糖苷键。聚 α -1,3-葡聚糖是多糖的一种类型。聚 α -1,3-葡聚糖的结构可描述如下:



[0031] 可用于制备本文聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的聚 α -1,3-葡聚糖可采用化学方法制得。另选地,它可通过从产生聚 α -1,3-葡聚糖的各种生物体如真菌中提取它来制备。还另选地,聚 α -1,3-葡聚糖可使用一种或多种葡糖基转移酶(gtf)(例如gtfJ),由蔗糖酶促产生,如美国专利7,000,000和美国专利申请公布2013/0244288和2013/0244287中所述(这些专利均以引用方式并入本文)。

[0032] 本文术语“葡糖基转移酶”、“gtf酶”、“gtf酶催化剂”、“gtf”、和“葡聚糖蔗糖酶”互换使用。本文中gtf酶的活性催化底物蔗糖生成产物聚 α -1,3-葡聚糖和果糖的反应。gtf反应的其它产物(副产物)可包括葡萄糖(在从葡糖基-gtf酶中间体复合物水解出葡萄糖的情况下)、各种可溶性低聚糖(DP2-DP7)、以及白菌二糖(在葡糖基-gtf酶中间体复合物的葡萄糖连接至果糖的情况下)。白菌二糖是由通过 α -1,5键连接的葡萄糖和果糖组成的二糖。葡糖基转移酶的野生型形式大体包含(N末端至C末端方向)信号肽、可变域、催化域和葡聚糖结合域。根据CAZy(碳水化合物-活性酶)数据库(Cantarel等人,Nucleic Acids Res.37:

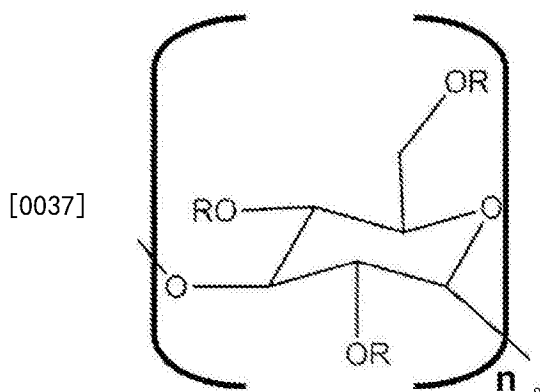
D233-238, 2009) 本文中gtf被归类为配糖水解酶家族70 (GH70)。

[0033] 用于制备本文聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的聚 α -1,3-葡聚糖的葡萄糖单体单元之间,为 α -1,3的糖苷键百分比为至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100% (或介于50%和100%之间的任何整数值)。因此在此类实施例中,聚 α -1,3-葡聚糖具有小于约50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、或0% (或介于0%和50%之间的任何整数值)的非 α -1,3的糖苷键。

[0034] 用于制备本文聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的聚 α -1,3-葡聚糖优选是直链的/非支链的。在某些实施例中,所述聚 α -1,3-葡聚糖没有分枝点,或分枝点占所述聚合物中糖苷键百分比小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、或1%。分枝点的示例包括 α -1,6分枝点,如存在于变形聚合物中的那些。

[0035] 本文术语“糖苷连接基”和“糖苷键”互换使用,并且是指将碳水化合物(糖)分子连接至另一个基团如另一个碳水化合物的共价键类型。如本文所用,术语“ α -1,3-糖苷键”是指将 α -D-葡萄糖分子通过相邻 α -D-葡萄糖环上的碳1和碳3彼此连接的共价键类型。这种键如上文提供的聚 α -1,3-葡聚糖结构图所示。本文中,“ α -D-葡萄糖”将被称为“葡萄糖”。

[0036] 本文术语“聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物”、“聚 α -1,3-葡聚糖醚”和“聚 α -1,3-葡聚糖醚衍生物”互换使用。本文聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物可由以下结构表示:



[0038] 就该结构的化学式而言, n 可为至少6,并且每个R可独立地为氢原子(H)或有机基团。本文聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物具有约0.05至约3.0的取代度。

[0039] 本文聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物由于包含亚结构 $-C_G-O-C-$ 而被称为“醚”,其中“ $-C_G-$ ”表示聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的葡萄糖单体单元的碳2、4或6,并且其中“ $-C-$ ”包含于有机基团中。

[0040] 本文所公开的聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物是人工合成的化合物。

[0041] 如本文所用,“有机基团”是指具有一个或多个碳的链,其(i)具有式 $-C_nH_{2n+1}$ (即完全饱和的烷基基团)或(ii)为大部分饱和的但是一个或多个氢被另一个原子或官能团取代 (即“取代的烷基基团”)。可采用一个或多个羟基基团、氧原子 (由此形成醛或酮基团)、羧基基团、或其它烷基基团进行此类取代。换言之,当R为有机基团时,R可为具有一个或多个饱和碳的链,或一个或多个氢被羟基基团、氧原子 (由此形成醛或酮基团)、羧基基团、或烷基基团取代的碳链。

[0042] 本文中,“羟烷基”基团是指其中烷基基团的一个或多个氢原子被羟基基团取代的取代的烷基基团。本文中,“羧烷基”基团是指其中烷基基团的一个或多个氢原子被羧基基

团取代的取代的烷基基团。

[0043] 本文中,“卤化物”是指包含一个或多个卤素原子(例如氟、氯、溴、碘)的化合物。本文卤化物可指包含一个或多个卤代基团如氟代、氯代、溴代或碘代的化合物。卤代基团可用作醚化试剂的反应性基团。

[0044] 本文术语“反应”、“反应组合物”和“醚化反应”互换使用,并且是指包含至少聚 α -1,3-葡聚糖和醚化试剂的反应。这些组分通常溶解和/或混合于含水碱性氢氧化物中。在对于醚化试剂适宜的条件(例如时间、温度)下进行反应以使具有有机基团的聚 α -1,3-葡聚糖的葡萄糖单元的一个或多个羟基基团醚化,从而获得聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物。

[0045] 本文术语“碱性条件”是指pH为至少11或12的溶液或混合物。碱性条件可由本领域已知的任何途径配制,如将碱性氢氧化物溶于溶液或混合物中。

[0046] 本文术语“醚化试剂”和“烷基化试剂”互换使用。本文醚化试剂是指可用于醚化具有有机基团的聚 α -1,3-葡聚糖的葡萄糖单元的一个或多个羟基基团的试剂。因此,醚化试剂包含有机基团。

[0047] 本文术语“聚 α -1,3-葡聚糖浆液”是指包含葡糖基转移酶酶促反应组分如聚 α -1,3-葡聚糖、蔗糖、一种或多种葡糖基转移酶、葡萄糖和果糖的含水混合物。

[0048] 本文术语“聚 α -1,3-葡聚糖湿饼”是指已从浆液中分离出来并且用水或水溶液洗涤的聚 α -1,3-葡聚糖。当制备湿饼时,聚 α -1,3-葡聚糖未干燥。

[0049] 如本文所用,术语“取代度”(DoS)是指聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物每个单体单元(葡萄糖)中被取代的羟基基团平均数。由于聚 α -1,3-葡聚糖每个单体单元中存在三个羟基基团,因此本文聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的取代度可不高于3。

[0050] 如本文所用,术语“摩尔取代度”(M.S.)是指聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物每单体单元的有机基团摩尔数。另选地,M.S.可指用于与聚 α -1,3-葡聚糖中每个单体单元反应的醚化试剂平均摩尔数(因此,M.S.可描述醚化试剂的衍生化程度)。注意到,聚 α -1,3-葡聚糖的M.S.值可能不具有上限。例如,当包含羟基基团的有机基团(例如羟乙基或羟丙基)醚化至聚 α -1,3-葡聚糖时,所述有机基团的羟基基团可经历进一步反应,从而将所述有机基团的更多部分连接至聚 α -1,3-葡聚糖。

[0051] 本文中,可经由本领域已知的任何途径,如溶解、混合、振荡、或均化进行“接触”。

[0052] 本文聚 α -1,3-葡聚糖和聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的“分子量”可表示为数均分子量(M_n)或重均分子量(M_w)。另选地,分子量能够表示为道尔顿(Dalton)、克/摩尔、DP_w(重均聚合度)、或DP_n(数均聚合度)。计算这些分子量量度的各种方法是本领域已知的,如高压液相色谱法(HPLC)、尺寸排阻色谱法(SEC)、或凝胶渗透色谱法(GPC)。

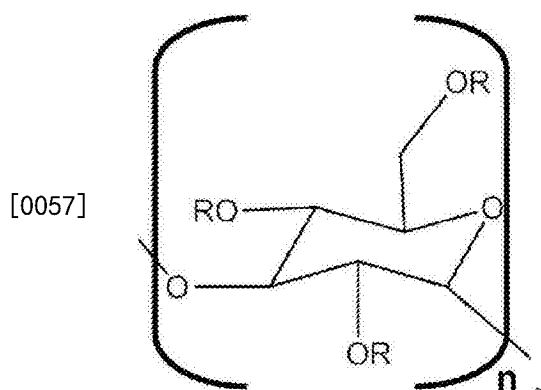
[0053] 本文术语“体积%”、“体积百分比”、“vol%”和“v/v%”互换使用。溶液中溶质的体积%可使用下式确定: $[(\text{溶质体积})/(\text{溶液体积})] \times 100\%$ 。

[0054] 本文术语“重量%”、“重量百分比(wt%)”、和“重量-重量百分比(%w/w)”互换使用。重量%是指包含在组合物、混合物或溶液中的材料按质量计的百分比。

[0055] 本文术语“增加的”、“增强的”和“改善的”互换使用。这些术语是指更大的数量或活性,诸如数量或活性比初始数量或活性稍大,或与初始数量或活性相比数量或活性大大超过,或包括在其中间的所有数量或活性。另选地,这些术语可指例如比增大的数量或活性所比较的数量或活性高至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、

40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、或200%的数量或活性(或介于1%和200%之间的任何整数)。

[0056] 所公开发明的实施例涉及包含由以下结构表示的聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的组合物:



[0058] 就该结构的化学式而言, n 可为至少6,并且每个R可独立地为H或有机基团。此外,聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物具有约0.05至约3.0的取代度。显著地,本文聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物可为聚 α -1,3-葡聚糖的烷基醚和/或羟烷基醚衍生物。

[0059] 本文所公开聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的取代度(DoS)可另选地为约0.2至约2.0。还另选地,所述DoS可为至少约0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、或3.0。本领域的技术人员将理解,由于本文所公开的聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物具有介于约0.05至约3.0之间的取代度,并且由于是醚,因此化合物的R基团不能仅为氢。

[0060] 聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物葡萄糖单体单元之间,为 α -1,3的糖苷键百分比为至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%(或介于50%和100%之间的任何整数)。因此在此类实施例中,所述化合物具有小于约50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、或0%(或介于0%和50%之间的任何整数值)的非 α -1,3的糖苷键。

[0061] 本文所公开聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的主链优选是直链的/非支链的。在某些实施例中,所述化合物没有分枝点,或分枝点占所述聚合物中糖苷键百分比小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、或1%。分枝点的示例包括 α -1,6分枝点。

[0062] 在某些实施例中,聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的化学式可具有至少6的 n 值。另选地, n 可具有至少10、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、或4000(或介于10和4000之间的任何整数)的值。

[0063] 本文所公开聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的分子量可量度为数均分子量(M_n)或重均分子量(M_w)。另选地,分子量可以道尔顿或克/摩尔为单位量度。其还可用于涉及化合物聚 α -1,3-葡聚糖聚合物组分的 DP_w (重均聚合度)或 DP_n (数均聚合度)。

[0064] 本文所公开聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的 M_n 或 M_w 可为至少约1000。另选地, M_n 或 M_w 可为至少约1000至约600000。还另选地, M_n 或 M_w 可为例如至少约10000、25000、50000、75000、

100000、150000、200000、250000、300000、350000、400000、450000、500000、550000、或600000 (或介于10000和600000之间的任何整数)。

[0065] 聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物化学式中的每个R基团可独立地为H或有机基团。有机基团可为例如烷基基团,诸如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、或癸基基团。

[0066] 另选地,有机基团可为取代的烷基基团,其中在烷基基团的一个或多个碳上存在取代基。一个或多个取代基可为一个或多个羟基、醛、酮、和/或羧基基团。例如,取代的烷基基团可为羟烷基基团、二羟烷基基团、或羧烷基基团。

[0067] 适宜羟烷基基团的示例为羟甲基($-\text{CH}_2\text{OH}$)、羟乙基(例如 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$)、羟丙基(例如 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_3$)、羟丁基和羟戊基基团。其它示例包括二羟烷基基团(二醇)如二羟甲基、二羟乙基(例如 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$)、二羟丙基(例如 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$)、二羟丁基和二羟戊基基团。

[0068] 适宜羧烷基基团的示例为羧甲基($-\text{CH}_2\text{COOH}$)、羧乙基(例如 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_3$)、羧丙基(例如 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_3$)、羧丁基和羧戊基基团。

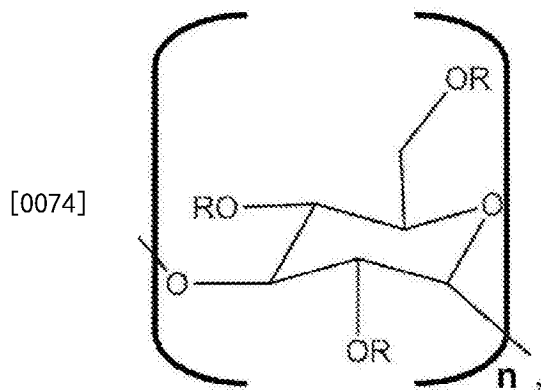
[0069] 还另选地,烷基基团的一个或多个碳可具有一个或多个另一个烷基基团取代基。此类取代基烷基基团的示例为甲基、乙基和丙基基团。为示例,R基团可为例如 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$,其均为具有甲基取代基的丙基基团。

[0070] 由上文各种取代的烷基基团的示例应当清楚,在某些实施例中,烷基基团上的取代基(例如羟基或羧基基团)可与烷基基团的末端碳原子键合,其中末端碳基团与上式中醚键连接葡萄糖基团的末端相对。该末端取代基的示例为羟丙基基团 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 。另选地,取代基可在烷基基团的内部碳原子上。内部取代基的示例为羟丙基基团 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 。烷基基团可具有一个或多个取代基,所述取代基可相同(例如两个羟基基团[二羟基])或不同(例如羟基基团和羧基基团)。

[0071] 在某些实施例中,本文所公开的聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物可包含一种类型的有机基团。例如,醚键连接至上式中葡萄糖基团的一个或多个R基团可为甲基基团;从而,该具体示例中的R基团独立地为氢和甲基基团。仅包含一种类型有机基团的聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的某些实施例不具有羧烷基基团(例如羧甲基基团)作为有机基团。

[0072] 另选地,本文所公开的聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物可包含两种或更多种不同类型的有机基团。此类化合物的示例包含(i)两种不同烷基基团作为R基团,(ii)烷基基团和羟烷基基团作为R基团(一般来讲为烷基羟烷基聚 α -1,3-葡聚糖),(iii)烷基基团和羧烷基基团作为R基团(一般来讲为烷基羧烷基聚 α -1,3-葡聚糖),(iv)羟烷基基团和羧烷基基团作为R基团(一般来讲为羟烷基羧烷基聚 α -1,3-葡聚糖),(v)两种不同的羟烷基基团作为R基团,或(vi)两种不同的羧烷基基团作为R基团。此类化合物的具体非限制性示例包括乙基羟乙基聚 α -1,3-葡聚糖(即其中R基团独立地为H、乙基、或羟乙基)、羟烷基甲基聚 α -1,3-葡聚糖(即其中R基团独立地为H、羟烷基、或甲基)、羧甲基羟乙基聚 α -1,3-葡聚糖(即其中R基团独立地为H、羧甲基、或羟乙基)、和羧甲基羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖(即其中R基团独立地为H、羧甲基、或羟丙基)。包含两种或更多种不同类型的有机基团的聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的某些实施例不具有羧烷基基团(例如羧甲基基团)作为有机基团之一。

[0073] 公开的本发明还涉及制备聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的方法。该方法包括：在碱性条件下的反应中，使聚 α -1,3-葡聚糖与至少一种包含有机基团的醚化试剂接触，其中所述醚化试剂醚化至聚 α -1,3-葡聚糖，从而制得由以下结构表示的聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物：



[0075] 其中

[0076] (i) n 为至少6，

[0077] (ii) 每个 R 独立地为 H 或有机基团，并且

[0078] (iii) 所述化合物具有约0.05至约3.0的取代度。可任选分离出由该方法制得的聚 α -1,3-葡聚糖醚。

[0079] 在碱性条件下的反应中，使聚 α -1,3-葡聚糖与至少一种包含有机基团的醚化试剂接触。可通过例如首先使聚 α -1,3-葡聚糖与溶剂和一种或多种碱性氢氧化物接触以提供溶液或混合物，配制碱性条件，来实施该步骤。因此，反应的碱性条件可包括碱性氢氧化物溶液。碱性条件的 pH 可为至少约11.0、11.2、11.4、11.6、11.8、12.0、12.2、12.4、12.6、12.8、或13.0。

[0080] 可使用各种碱性氢氧化物，如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化锂、和/或四乙基氢氧化铵。具有聚 α -1,3-葡聚糖和溶剂的制剂中碱性氢氧化物的浓度可为约1-70重量%、5-50重量%、10-50重量%、10-40重量%、或10-30重量%（或介于1和70重量%之间的任何整数）。另选地，碱性氢氧化物如氢氧化钠的浓度可为至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、或30重量%。用于配制碱性条件的碱性氢氧化物可存在于纯水溶液中或包含一种或多种水溶性有机溶剂如乙醇或异丙醇的水溶液中。另选地，碱性氢氧化物可以固体形式加入以提供碱性条件。

[0081] 配制反应时可任选包含的各种有机溶剂包括例如醇、丙酮、二氧杂环己烷、异丙醇和甲苯；这些溶剂均不溶解聚 α -1,3-葡聚糖。在某些实施例中可使用甲苯或异丙醇。有机溶剂可在加入碱性氢氧化物之前或之后加入。包含聚 α -1,3-葡聚糖和碱性氢氧化物的制剂中有机溶剂（例如异丙醇或甲苯）的浓度可为至少约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、或90重量%（或介于10和90重量%之间的任何整数）。

[0082] 另选地，当配制反应时，可使用可溶解聚 α -1,3-葡聚糖的溶剂。这些溶剂包括但不限于氯化锂（ $LiCl$ ）/ N,N -二甲基乙酰胺（DMAc）、 SO_2 /二乙胺（DEA）/二甲基亚砜（DMSO）、 $LiCl$ /1,3-二甲基-2-咪唑啉酮（DMI）、 N,N -二甲基甲酰胺（DMF）/ N_2O_4 、DMSO/四丁基氟化铵三水合物（TBAF）、 N -甲基吗啉- N -氧化物（NMO）、 $Ni(tren)(OH)_2$ [tren 1/4三(2-氨基乙基)胺]水溶液和 $LiClO_4 \cdot 3H_2O$ 熔融物、 $NaOH$ /脲水溶液、氢氧化钠水溶液、氢氧化钾水溶液、甲酸和离

子液体。

[0083] 聚 α -1,3-葡聚糖可通过混合与溶剂和一种或多种碱性氢氧化物接触。此类混合可在这些组分彼此加入期间或之后进行。可通过例如手动混合、使用顶置式混合器混合、使用磁力搅拌棒、或振荡,进行混合。在某些实施例中,聚 α -1,3-葡聚糖可首先混合于水或水溶液中,然后与溶剂和/或碱性氢氧化物混合。

[0084] 使聚 α -1,3-葡聚糖、溶剂和一种或多种碱性氢氧化物彼此接触后,所得的组合物可任选在环境温度下保持至多14天。如本文所用,术语“环境温度”是指介于约15-30℃或20-25℃之间的温度(或介于15和30℃之间的任何整数)。另选地,所述组合物可在约30℃至约150℃(或介于30和150℃之间的任何整数)温度下回流或不回流加热至多约48小时。在某些实施例中,所述组合物可在约55℃下加热约30分钟或60分钟。因此,通过聚 α -1,3-葡聚糖、溶剂和一种或多种碱性氢氧化物彼此混合获得的组合物可在约50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、或60℃下加热约30-90分钟。

[0085] 使聚 α -1,3-葡聚糖、溶剂和一种或多种碱性氢氧化物彼此接触后,所得的组合物可任选过滤(实施或不实施温度处理步骤)。可使用漏斗、离心机、压滤器、或本领域已知的能够将液体从固体中移除的任何其它方法和/或设备,进行此类过滤。虽然过滤将移除许多碱性氢氧化物,但是过滤后的聚 α -1,3-葡聚糖保持碱性(即碱化的聚 α -1,3-葡聚糖),从而提供碱性条件。

[0086] 在制备聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的本文方法中,在碱性条件下的反应中,使包含有机基团的醚化试剂与聚 α -1,3-葡聚糖接触。例如,可将醚化试剂加入到通过如上所述使聚 α -1,3-葡聚糖、溶剂和一种或多种碱性氢氧化物彼此接触而制得的组合物中。另选地,在配制碱性条件时可包含醚化试剂(例如醚化试剂可与聚 α -1,3-葡聚糖和溶剂混合,然后与碱性氢氧化物混合)。

[0087] 本文的醚化试剂是指可用于用如上定义的有机基团醚化聚 α -1,3-葡聚糖的葡萄糖单元的一个或多个羟基基团的试剂。此类有机基团的示例包括烷基基团、羟烷基基团、和羧烷基基团。一种或多种醚化试剂可用于反应中。

[0088] 适于制备烷基聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的醚化试剂包括例如硫酸二烷基酯、碳酸二烷基酯、烷基卤化物(例如烷基氯化物)、碘代烷、三氟甲磺酸烷基酯(三氟甲烷磺酸烷基酯)和氟磺酸烷基酯。因此,用于制备甲基聚 α -1,3-葡聚糖醚的醚化试剂示例包括硫酸二甲酯、碳酸二甲酯、氯甲烷、碘甲烷、三氟甲磺酸甲酯、和氟磺酸甲酯。用于制备乙基聚 α -1,3-葡聚糖醚的醚化试剂示例包括硫酸二乙酯、碳酸二乙酯、氯乙烷、碘乙烷、三氟甲磺酸乙酯、和氟磺酸乙酯。用于制备丙基聚 α -1,3-葡聚糖醚的醚化试剂示例包括硫酸二丙酯、碳酸二丙酯、氯丙烷、碘丙烷、三氟甲磺酸丙酯、和氟磺酸丙酯。用于制备丁基聚 α -1,3-葡聚糖醚的醚化试剂示例包括硫酸二丁酯、碳酸二丁酯、氯丁烷、碘丁烷、和三氟甲磺酸丁酯。

[0089] 适于制备羟烷基聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的醚化试剂包括例如环氧烷如环氧乙烷、环氧丙烷(例如1,2-环氧丙烷)、环氧丁烷(例如1,2-环氧丁烷;2,3-环氧丁烷;1,4-环氧丁烷)、或它们的组合。例如,环氧丙烷可用作醚化试剂用来制备羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖,而环氧乙烷可用作醚化试剂用来制备羟乙基聚 α -1,3-葡聚糖。另选地,羟烷基卤化物(例如羟烷基氯化物)可用作醚化试剂用来制备羟烷基聚 α -1,3-葡聚糖。羟烷基卤化物的示例包括羟乙基卤化物、羟丙基卤化物(例如2-羟丙基氯化物、3-羟丙基氯化物)和羟丁基卤化物。另

选地,可使用亚烷基氯乙醇作为醚化试剂制备羟烷基聚 α -1,3-葡聚糖。可使用的亚烷基氯乙醇包括但不限于亚乙基氯乙醇、亚丙基氯乙醇、亚丁基氯乙醇、或这些的组合。

[0090] 适于制备二羟烷基聚 α -1,3-葡聚糖醚化化合物的醚化试剂包括例如二羟烷基卤化物(例如二羟烷基氯化物),如二羟乙基卤化物、二羟丙基卤化物(例如2,3-二羟丙基氯化物[即3-氯-1,2-丙二醇])、或二羟丁基卤化物。2,3-二羟丙基氯化物可用于制备例如二羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0091] 适于制备羧烷基聚 α -1,3-葡聚糖醚化化合物的醚化试剂可包括卤代烷基化物(例如氯代烷基化物)。卤代烷基化物的示例包括卤代乙酸盐(例如氯乙酸盐)、3-卤代丙酸盐(例如3-氯丙酸盐)和4-卤代丁酸盐(例如4-氯丁酸盐)。例如氯乙酸盐(一氯乙酸盐)(例如氯乙酸钠)可用作醚化试剂以制备羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0092] 当制备具有两种或更多种不同有机基团的聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物时,将相应使用两种或更多种不同的醚化试剂。例如环氧烷和烷基氯化物均可用作醚化试剂以制备烷基羟烷基聚 α -1,3-葡聚糖醚。因此,本文所公开的任何醚化试剂均可组合以制备具有两种或更多种不同有机基团的聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物。此两种或更多种醚化试剂可同时用于反应中,或可相继用于反应中。当相继使用时,可在每次加料之间,任选使用下文公开的任何温度-处理(例如加热)步骤。可选择醚化试剂相继引入,以控制所期望的每个有机基团DoS。一般来讲,如果期望特定的醚化试剂在醚产物中形成的有机基团的DoS与待加入的另一个有机基团的DoS相比更高,则首先使用特定的醚化试剂。

[0093] 可基于所形成的聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物中所需的取代度,确定在碱性条件下的反应中与聚 α -1,3-葡聚糖接触的醚化试剂的量。可采用核磁共振(NMR),确定本文制得的聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物中每个单体单元上醚取代基团的量。聚 α -1,3-葡聚糖的摩尔取代度(MS)值没有上限。一般来讲,醚化试剂可以至少约0.05摩尔每摩尔聚 α -1,3-葡聚糖的量使用。可使用的醚化试剂的量没有上限。

[0094] 制备本文聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的反应可任选在压力容器如Parr反应器、高压釜、振荡管或本领域熟知的任何其它压力容器中实施。在某些实施例中,使用振荡管实施反应。

[0095] 使聚 α -1,3-葡聚糖与醚化试剂在碱性条件下接触的步骤之后,可任选加热本文反应。反应温度和施加此温度的时间可在广泛界限内变化。例如可任选在环境温度下将反应保持至多14天。另选地,可在回流或不回流下,在介于约25℃至约200℃之间(或介于25和200℃之间的任何整数),加热反应。反应时间可相应变化:低温下时间更长,而高温下时间更短。

[0096] 在制备羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖的某些实施例中,可将反应在约75℃下加热约3小时。可将制备羟乙基聚 α -1,3-葡聚糖的反应在例如约60℃下加热约6小时。因此,制备本文羟烷基聚 α -1,3-葡聚糖的反应可任选在例如约55℃至约80℃(或介于55和80℃之间的任何整数)下加热约2小时至约7小时。

[0097] 在制备甲基聚 α -1,3-葡聚糖的某些实施例中,可将反应在约55℃或70℃下加热约17小时。制备乙基聚 α -1,3-葡聚糖的反应可在例如约90℃下加热约17小时。因此,制备本文烷基聚 α -1,3-葡聚糖的反应混合物可在例如约55℃至约95℃(或介于55和95℃之间的任何整数)下加热约15小时至约20小时。

[0098] 在制备羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖的某些实施例中,可将反应在约55℃下加热约3小时。因此,制备本文羧烷基聚 α -1,3-葡聚糖的反应可在例如约50℃至约60℃(或介于50和60℃之间的任何整数)下加热约2小时至约5小时。

[0099] 在制备二羟烷基(例如二羟丙基)聚 α -1,3-葡聚糖醚的某些实施例中,将聚 α -1,3-葡聚糖加入到碱性氢氧化物溶液(例如四乙基氢氧化铵)(例如约20重量%溶液)中,达到约4、5、6、7、或8重量%(例如~6.5重量%)的聚 α -1,3-葡聚糖的最终浓度或质量分布。溶解聚 α -1,3-葡聚糖的加热/搅拌步骤后,可加入适宜的醚化试剂(例如二羟烷基氯化物如2,3-二羟丙基氯化物)至约7、8、9、10、或11重量%(例如~9.5重量%)的最终浓度。在中和反应之前,可将所得反应在例如约50℃至约60℃(或介于50和60℃之间的任何整数,例如55℃)下保持约1.5-2.5小时(例如约2小时)。可通过采用这些步骤,制得水溶性二羟烷基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0100] 任选地,可采用或不采用加热,将本文反应保持在惰性气体下。如本文所用,术语“惰性气体”是指在一组给定条件下不发生化学反应的气体,如所公开的用于配制本文反应的那些。

[0101] 可将本文所公开的所有反应组分同时混合在一起,并且达到所期望的反应温度,然后采用或不采用搅拌,保持温度直至形成所期望的聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物。另选地,可使混合组分处于如上所述的环境温度下。

[0102] 醚化后,可中和反应的pH。可使用一种或多种酸,进行反应中和。如本文所用,术语“中性pH”是指既不为显著酸性也不为显著碱性的pH(例如约6-8、或约6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、或8.0的pH)。可用于该用途的各种酸包括但不限于硫酸、乙酸、盐酸、硝酸、任何矿物(无机)酸、任何有机酸、或这些酸的任何组合。

[0103] 本文反应中制得的聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物可任选用不易于溶解所述化合物的液体洗涤一次或多次。例如聚 α -1,3-葡聚糖醚可用水、醇、丙酮、芳族化合物、或这些的任何组合洗涤,这取决于醚化合物在其中的溶解度(就洗涤而言,期望溶解度不佳)。一般来讲,包含有机溶剂如醇的溶剂优选用于洗涤聚 α -1,3-葡聚糖醚。聚 α -1,3-葡聚糖醚产物可用包含例如甲醇或乙醇的水溶液洗涤一次或多次。例如可使用70-95重量%的乙醇洗涤产物。在另一个实施例中,可用甲醇:丙酮(例如60:40)溶液洗涤聚 α -1,3-葡聚糖醚产物。在某些实施例中可使用热水(约95-100℃),如用于洗涤烷基聚 α -1,3-葡聚糖醚(例如乙基聚 α -1,3-葡聚糖)和烷基羟烷基聚 α -1,3-葡聚糖醚(例如乙基羟乙基聚 α -1,3-葡聚糖)。

[0104] 可分离所公开反应中制得的聚 α -1,3-葡聚糖醚。该步骤可在中和和/或洗涤步骤之前或之后,使用漏斗、离心机、压滤器、或本领域已知的能够将液体从固体中移除的任何其它方法或设备来进行。例如可使用布氏漏斗分离聚 α -1,3-葡聚糖醚产物。可采用本领域已知的任何方法如真空干燥、风干、或冷冻干燥,干燥分离出的聚 α -1,3-葡聚糖醚产物。

[0105] 可使用聚 α -1,3-葡聚糖醚产物作为原料重复任何上述醚化反应,以进一步改性。该方法可适于提高有机基团的DoS,和/或将一种或多种不同的有机基团加入到醚产物中。例如二羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖醚产物可用作底物以用二羟丙基基团进一步改性。

[0106] 可采用本领域已知的各种物理化学分析,如NMR光谱和尺寸排阻色谱(SEC),确证聚 α -1,3-葡聚糖醚产物的结构、分子量和取代度。

[0107] 用于制备本文聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的聚 α -1,3-葡聚糖的葡萄糖单体单元之

间,为 α -1,3的糖苷键百分比为至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%(或介于50%和100%之间的任何整数值)。因此在此类实施例中,聚 α -1,3-葡聚糖具有小于约50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、或0%(或介于0%和50%之间的任何整数值)的非 α -1,3的糖苷键。

[0108] 用于制备本文聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的聚 α -1,3-葡聚糖优选是直链的/非支链的。在某些实施例中,所述聚 α -1,3-葡聚糖没有分枝点,或分枝点占所述聚合物中糖苷键百分比小于约10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、或1%。分枝点的示例包括 α -1,6分枝点。

[0109] 用于制备本文聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的聚 α -1,3-葡聚糖的 M_n 或 M_w 可为至少约500至约300000。还另选地, M_n 或 M_w 可为例如至少约10000、25000、50000、75000、100000、125000、150000、175000、200000、225000、250000、275000、或300000(或介于10000和300000之间的任何整数)。

[0110] 如上文所公开的,用于制备本文聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的聚 α -1,3-葡聚糖可使用一种或多种葡糖基转移酶(gtf),由蔗糖酶促产生。该酶反应的聚 α -1,3-葡聚糖产物可在采用所公开的方法,使用其制备醚之前纯化。另选地,gtf反应中的聚 α -1,3-葡聚糖产物可几乎不或不处理,用于制备聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物。

[0111] 在任何上文方法中,聚 α -1,3-葡聚糖浆液可直接用于制备本文所公开的聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物。如本文所用,“聚 α -1,3-葡聚糖浆液”是指包含gtf酶反应组分的混合物。除了聚 α -1,3-葡聚糖自身以外,gtf酶反应还可包含各种组分如蔗糖、一种或多种gtf酶、葡萄糖、果糖、白菌二糖、缓冲剂、FermaSure[®]、可溶性低聚糖、低聚糖素、细菌酶提取组分、硼酸盐、氢氧化钠、盐酸、细胞裂解液、蛋白和/或核酸。除了聚 α -1,3-葡聚糖自身以外,gtf酶反应组分最低限度可包括例如蔗糖、一种或多种gtf酶、葡萄糖和果糖。又如,除了聚 α -1,3-葡聚糖自身以外,gtf酶反应组分可包括蔗糖、一种或多种gtf酶、葡萄糖、果糖、白菌二糖、和可溶性低聚糖(以及任选的细菌酶提取组分)。显而易见,当聚 α -1,3-葡聚糖为本文所公开的浆液形式时,未被纯化或洗涤。还显而易见,浆液表示gtf酶反应完成,或已制得可察觉量的聚 α -1,3-葡聚糖,这形成固体,因为它不溶于含水反应环境(具有例如5-7的pH)。可通过如美国专利7,000,000或美国专利申请公布2013/0244288和2013/0244287中所公开的,进行gtf反应,制备聚 α -1,3-葡聚糖浆液,这些专利均以引用方式并入本文。聚 α -1,3-葡聚糖浆液可进入例如反应中,以制备羧烷基聚 α -1,3-葡聚糖如羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0112] 另选地,在任何上文方法中,聚 α -1,3-葡聚糖湿饼可直接用于制备本文所公开的聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物。如本文所用,“聚 α -1,3-葡聚糖湿饼”是指已从浆液中分离(例如过滤)并且用水或水溶液洗涤过的聚 α -1,3-葡聚糖。湿饼可洗涤例如至少1、2、3、4、5或更多次。当制备湿饼时,聚 α -1,3-葡聚糖未干燥。考虑到洗涤过的聚 α -1,3-葡聚糖保留水,将湿饼称为“湿的”。

[0113] 可采用本领域已知的用于将固体从液体中分离出来的任何装置如过滤器或离心机,制备聚 α -1,3-葡聚糖湿饼。例如,可在滤纸上使用目筛网,在布氏漏斗上收集浆液中的聚 α -1,3-葡聚糖固体。可将过滤后的湿饼再悬浮于水(例如去离子水)中,并且过滤一次或多次,以移除可溶性浆液组分如蔗糖、果糖和白菌二糖。又如,为制备湿饼,可经由离心,从浆液中收集粒料形式的聚 α -1,3-葡聚糖固体,重新悬浮于水(例如去离子水)中,并且再次

粒化和再次悬浮一次或多次。聚 α -1,3-葡聚糖湿饼可进入反应中以制备本文的任何醚化合物,如羧烷基聚 α -1,3-葡聚糖(例如羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖)。

[0114] 实例

[0115] 本发明将在下面的实例中得到进一步阐述。应该理解,这些实例虽然说明了本发明的某些优选方面,但仅是以例证的方式给出的。从上文的讨论和这些实施例中,本领域的技术人员能够确定本发明的特性,并且在不脱离其实质和范围的情况下,能对本发明进行各种变化和修改以适应不同的用途和条件。

[0116] 材料

[0117] 丙酮、氢氧化钠、乙酸和异丙醇得自EMD Chemicals (Billerica, MA)。氯甲烷、乙酸、甲苯、硫酸二甲酯、乙醇和环氧丙烷得自Sigma Aldrich (St. Louis, MO)。甲醇和2-丙醇得自BDH Chemicals (Poole Dorset, UK)。

[0118] 制备聚 α -1,3-葡聚糖

[0119] 使用如美国专利申请公布2013/0244288中所述的gtfJ酶制剂,制备聚 α -1,3-葡聚糖,将所述文献全文以引用方式并入本文。

[0120] 测定聚 α -1,3-葡聚糖醚衍生物摩尔取代度的 ^1H 核磁共振(NMR)方法

[0121] 在分析天平上将约30mg聚 α -1,3-葡聚糖醚衍生物称量到小瓶中。将小瓶从天平上取下,并且将1.0mL氧化氙加入到小瓶中。将磁力搅拌棒加入到小瓶中,并且搅拌混合物以使固体悬浮。然后将1.0mL氙代硫酸(50% v/v于 D_2O 中)加入到小瓶中,并且将混合物在90°C下加热1小时以使聚合物解聚并且溶解。使溶液冷却至室温,然后使用玻璃吸移管将0.8mL份的溶液转移到5mm NMR管中。使用配备5mm自动转换四极探头的Agilent VNMRs 400MHz NMR光谱仪,采集定量 ^1H NMR光谱。以399.945MHz的光谱频率,使用6410.3Hz光谱窗口,3.744秒采集时间,10秒脉冲间延迟和64个脉冲,采集光谱。使用0.50Hz指数级倍增以转化时间域数据。

[0122] 将所得光谱的两个区域积分,以用于羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖的NMR分析:1.1ppm至1.4ppm的积分,代表存在的所有异丙基基团的三个甲基质子;和4.7ppm至5.6ppm的积分,代表葡萄糖环的异头质子。将异丙基甲基区域的积分除以3,获得存在的 $\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}$ 基团的量度。然后通过将 $\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}$ 基团量度除以存在的所有葡萄糖环的量度(异头质子积分值),计算出 $\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O}$ 基团摩尔取代度。

[0123] 将所得光谱的两个区域积分,以用于甲基聚 α -1,3-葡聚糖的NMR分析:3.0ppm至4.2ppm的积分,代表六个葡聚糖质子以及 OCH_3 质子,而4.6ppm至5.6ppm的积分代表葡萄糖环的异头质子。将该后一区域的积分乘以六,获得其它六个葡聚糖质子的积分。从3.0ppm至4.2ppm区域积分中减去所计算出的六个非异头葡聚糖质子的积分,获得 OCH_3 质子的积分贡献。将该积分值除以3.0,获得存在的 OCH_3 基团的量度。然后通过将 OCH_3 基团量度除以存在的所有葡萄糖环的量度(异头质子积分值),计算出甲基化程度。

[0124] 就羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖的NMR分析而言,光谱中谱线的化学位移以 C_2OH 处无取代的 α 异头质子的信号为基准。该信号应为光谱最左边缘起第三组峰。将该组峰最左边的信号设定为5.222ppm。将标准化光谱的五个区域积分:5.44ppm至4.60ppm的积分代表所有异头质子;4.46ppm至4.41ppm以及4.36ppm至4.32ppm的积分来自邻近 α 或 $\beta\text{C}_1\text{HOH}$ 的 C_2 位置处的羧甲基 CH_2 ;4.41ppm至4.36ppm的积分来自 C_4 位置处的羧甲基 CH_2 ;并且4.24ppm至4.17ppm

的积分来自C6位置处的羧甲基CH₂。然后将通过将OCH₂COOH基团的积分除以二,然后将那些结果除以所有异头质子的积分,计算出2、4和6位置处的羧甲基化度。通过将三个单独的取代度加在一起,获得总取代度。

[0125] 聚合度的测定

[0126] 经由尺寸排阻色谱法 (SEC) 测定聚合度 (DP)。对于SEC分析而言,将干燥的聚 α -1,3-葡聚糖醚衍生物溶于磷酸盐缓冲的盐水溶液 (PBS) (0.02-0.2mg/mL) 中。所用色谱分离体系为得自Waters Corporation (Milford,MA) 的Alliance™ 2695液相色谱仪,其联接三个在线检测器:得自Waters的微分折射仪410,得自Wyatt Technologies (Santa Barbara,CA) 的多角度光散射光度计Heleos™ 8+,和得自Wyatt Technologies的微分毛细管粘度计ViscoStar™。SEC所用的柱子为两根用于含水聚合物的Tosoh Haas Bioscience TSK GMPWXL g3K和g4K G3000PW以及G4000PW聚合物柱。移动相为PBS。所用色谱分离条件为柱室和检测器室30℃,样品室和注射室30℃,流速0.5mL/min,并且注射体积100 μ L。用于数据整理的软件包为得自Wyatt的Astra 6版(三合一检测方法以及柱校正)。

[0127] 实例1

[0128] 制备羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖

[0129] 该实例描述了制备葡聚糖醚衍生物羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0130] 将10g聚 α -1,3-葡聚糖(数均分子量[M_n]=71127)与101g甲苯和5mL 20%氢氧化钠混合。在磁力搅拌台上的500mL玻璃烧杯中,将该制剂在55℃下搅拌30分钟。然后将制剂转移至振荡管反应器中,然后加入34g环氧丙烷;然后将反应在75℃下搅拌3小时。然后用20g乙酸中和反应,并且用布氏漏斗过滤由此形成的羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖固体。然后在烧杯中用70%乙醇洗涤固体,并且在真空炉中,在轻微氮气吹扫下干燥,直至达到恒定干重。由NMR报导干燥产物的摩尔取代度(MS)为3.89。

[0131] 从而,制得并且分离出葡聚糖醚衍生物羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0132] 实例2

[0133] 制备羟乙基聚 α -1,3-葡聚糖

[0134] 该实例描述了制备葡聚糖醚衍生物羟乙基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0135] 将10g聚 α -1,3-葡聚糖(M_n=71127)与150mL异丙醇和40mL 30%氢氧化钠混合。在磁力搅拌台上的500mL玻璃烧杯中,将该制剂在55℃下搅拌1小时,然后在环境温度下搅拌过夜。然后将制剂转移至振荡管反应器中,然后加入15g环氧乙烷;然后将反应在60℃下搅拌6小时。然后使反应在密封的振荡管中保留过夜(约16小时),然后用20.2g乙酸将其中和,从而形成羟乙基聚 α -1,3-葡聚糖固体。使用布氏漏斗和35微米滤纸,滤出固体。然后通过加入甲醇:丙酮(60:40v/v)混合物,并且用搅拌棒搅拌20分钟,在烧杯中洗涤固体。然后将甲醇:丙酮混合物与固体过滤分离。将该洗涤步骤重复两次。在真空炉中,在氮气吹扫下干燥具有浅褐色/米色颜色的固体。将羟乙基聚 α -1,3-葡聚糖产物溶于10%NaOH溶液中。由NMR报导干燥产物的MS为0.72。

[0136] 从而,制得并且分离出葡聚糖醚衍生物羟乙基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0137] 实例3

[0138] 制备乙基聚 α -1,3-葡聚糖

[0139] 该实例描述了制备葡聚糖醚衍生物乙基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0140] 将聚 α -1,3-葡聚糖加入到振荡管中,之后加入氢氧化钠(1-70%溶液)和氯乙烷以提供反应。将反应加热至25-200℃,并且在该温度下保持1-48小时,之后用乙酸中和反应。将由此形成的固体经由真空过滤收集并且洗涤,在20-25℃下真空干燥,并且经由NMR和SEC分析以确定乙基聚 α -1,3-葡聚糖的分子量和取代度(DoS)。

[0141] 从而,制得并且分离出葡聚糖醚衍生物乙基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0142] 实例4

[0143] 制备乙基羟乙基聚 α -1,3-葡聚糖

[0144] 该实例描述了制备葡聚糖醚衍生物乙基羟乙基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0145] 将聚 α -1,3-葡聚糖加入到振荡管中,之后加入氢氧化钠(1-70%溶液)。然后加入氯乙烷,接着加入环氧乙烷/氯乙烷混合物以提供反应。将反应缓慢加热至25-200℃,并且在该温度下保持1-48小时,之后用乙酸中和。将由此形成的固体经由真空过滤收集并且用热水洗涤,在20-70℃下真空干燥,并且经由NMR和SEC分析以确定乙基羟乙基聚 α -1,3-葡聚糖的分子量和DoS。

[0146] 从而,制得并且分离出葡聚糖醚衍生物乙基羟乙基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0147] 实例5

[0148] 制备甲基聚 α -1,3-葡聚糖

[0149] 该实例描述了制备葡聚糖醚衍生物甲基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0150] 将10g聚 α -1,3-葡聚糖($M_n=71127$)与40mL 30%氢氧化钠和40mL 2-丙醇混合,并且在55℃下搅拌1小时,以提供碱性聚 α -1,3-葡聚糖。然后使用布氏漏斗将该制剂过滤。接着使碱性聚 α -1,3-葡聚糖与150mL 2-丙醇混合以制得浆液。向振荡管反应器中加入该浆液和15g氯甲烷,以提供反应。将反应在70℃下搅拌17小时。将所得甲基聚 α -1,3-葡聚糖固体过滤,并且用20mL 90%乙酸中和,接着用三份200mL乙醇洗涤剂洗涤。进行NMR分析,示出甲基聚 α -1,3-葡聚糖产物的DoS为1.2。

[0151] 表1提供了使用方法制得的甲基聚 α -1,3-葡聚糖各种样品的DoS量度列表,与上文方法相比,所述方法具有一定的改进(参见表1)。对于表1中所列的每一个方法,与上文一样将碱化步骤(加入甲基化试剂之前碱处理聚 α -1,3-葡聚糖)实施1小时。

[0152] 表1

[0153] 使用各种碱化和甲基化条件,制备甲基聚 α -1,3-葡聚糖

[0154]

碱化条件	甲基化条件	
------	-------	--

[0155]

葡聚糖 M _n	温度 (°C)	溶剂	试剂	时间 (小时)	温度 (°C)	DoS
71127	RT	甲苯 (140mL)	DMS ^a (50mL)	17	50	1.51
71127	55	2-丙醇 (150mL)	CH ₃ Cl (15g)	17	70	1.2
71127	55	2-丙醇 (150mL)	CH ₃ Cl (25g)	24	70	1.38
25084	55	2-丙醇 (150mL)	CH ₃ Cl (30g)	34	70	1.0
25084	55	2-丙醇 (150mL)	CH ₃ Cl (25g)	24	70	0.39

[0156] a硫酸二甲酯

[0157] 从而,制得并且分离出葡聚糖醚衍生物甲基聚 α -1,3-葡聚糖。[0158] 实例6[0159] 制备水溶性甲基聚 α -1,3-葡聚糖[0160] 该实例描述了水溶性甲基聚 α -1,3-葡聚糖的制备。

[0161] 将10g如实例5中(表1)制得的甲基聚 α -1,3-葡聚糖(DoS=1.38)与40mL 30%氢氧化钠和40mL 2-丙醇混合,并且在55°C下搅拌1小时。然后使用布氏漏斗将该混合物过滤。加入150mL 2-丙醇以制得浆液,然后将其置于振荡管反应器中。将15g氯甲烷加入到浆液中以提供反应。将反应在55°C下搅拌17小时,之后用10mL乙酸将其中和,并且与200mL丙酮混合以沉淀产物。然后用额外的两份200mL丙酮洗剂洗涤产物。甲基聚 α -1,3-葡聚糖产物的NMR分析示出,它具有为2的DoS。

[0162] 通过将0.2g产物溶于9.8g水中,并且在室温下混合,制备甲基聚 α -1,3-葡聚糖产物的水溶液。从而形成澄清的溶液,表明甲基聚 α -1,3-葡聚糖产物是水溶性的。

[0163] 从而制得并且分离出水溶性甲基聚 α -1,3-葡聚糖。[0164] 实例7[0165] 制备羟烷基甲基聚 α -1,3-葡聚糖[0166] 该实例描述了制备葡聚糖醚衍生物羟烷基甲基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0167] 将聚 α -1,3-葡聚糖加入到容器中,之后加入氢氧化钠(5-70%溶液)。将该制剂搅拌0.5-8小时。然后将甲基氯化物加入到容器中以提供反应,然后将其在30-100°C下加热至多14天。然后将环氧烷(例如环氧乙烷、环氧丙烷、环氧丁烷等)加入到反应中,同时控制温度。将反应在25-100°C下加热至多14天,然后用酸中和。将由此形成的固体产物过滤、洗涤并且干燥。

[0168] 从而,制得并且分离出葡聚糖醚衍生物羟烷基甲基聚 α -1,3-葡聚糖。根据甲基化步骤后所用的环氧烷,该衍生物实例包括羟乙基甲基聚 α -1,3-葡聚糖、羟丙基甲基聚 α -1,3-葡聚糖、和羟丁基甲基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0169] 实例8[0170] 制备羧甲基羟乙基聚 α -1,3-葡聚糖

[0171] 该实例描述了制备葡聚糖醚衍生物羧甲基羟乙基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0172] 在400mL容量的振荡管中,将聚 α -1,3-葡聚糖加入到物质如异丙醇或甲苯的等分试样中,然后加入氢氧化钠(1-70%溶液)。将该制剂搅拌至多48小时。然后加入一氯乙酸以提供反应,然后将其在25-100℃下加热至多14天。然后将环氧乙烷加入到反应中,然后将其在25-100℃下加热至多14天,接着用酸(例如乙酸、硫酸、硝酸、盐酸等)中和。将由此形成的固体产物经由真空过滤收集、洗涤并干燥。

[0173] 从而,制得并且分离出葡聚糖醚衍生物羧甲基羟乙基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0174] 实例9

[0175] 制备羧甲基羟乙基聚 α -1,3-葡聚糖钠

[0176] 该实例描述了制备葡聚糖醚衍生物羧甲基羟乙基聚 α -1,3-葡聚糖钠。

[0177] 在400mL容量的振荡管中,将聚 α -1,3-葡聚糖加入到醇如异丙醇的等分试样中,然后加入氢氧化钠(1-70%溶液)。将该制剂搅拌至多48小时。然后加入一氯乙酸钠以提供反应,然后将其在25-100℃下加热至多14天。然后将环氧乙烷加入到反应中,然后将其在25-100℃下加热至多14天,接着用酸(例如乙酸、硫酸、硝酸、盐酸等)中和。将由此形成的固体产物经由真空过滤收集、洗涤并干燥。

[0178] 从而,制得并且分离出葡聚糖醚衍生物羧甲基羟乙基聚 α -1,3-葡聚糖钠。

[0179] 实例10

[0180] 制备羧甲基羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖

[0181] 该实例描述了制备葡聚糖醚衍生物羧甲基羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0182] 在400mL容量的振荡管中,将聚 α -1,3-葡聚糖加入到物质如异丙醇或甲苯的等分试样中,然后加入氢氧化钠(1-70%溶液)。将该制剂搅拌至多48小时。然后加入一氯乙酸以提供反应,然后将其在25-100℃下加热至多14天。然后将环氧丙烷加入到反应中,然后将其在25-100℃下加热至多14天,接着用酸(例如乙酸、硫酸、硝酸、盐酸等)中和。将由此形成的固体产物经由真空过滤收集、洗涤并干燥。

[0183] 从而,制得并且分离出葡聚糖醚衍生物羧甲基羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0184] 实例11

[0185] 制备羧甲基羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖钠

[0186] 该实例描述了制备葡聚糖醚衍生物羧甲基羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖钠。

[0187] 在400mL容量的振荡管中,将聚 α -1,3-葡聚糖加入到物质如异丙醇或甲苯的等分试样中,然后加入氢氧化钠(1-70%溶液)。将该制剂搅拌至多48小时。然后加入一氯乙酸钠以提供反应,然后将其在25-100℃下加热至多14天。然后将环氧丙烷加入到反应中,然后将其在25-100℃下加热至多14天,接着用酸(例如乙酸、硫酸、硝酸、盐酸等)中和。将由此形成的固体产物经由真空过滤收集、洗涤并干燥。

[0188] 从而,制得并且分离出葡聚糖醚衍生物羧甲基羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖钠。

[0189] 实例12

[0190] 使用GtfJ酶制备聚 α -1,3-葡聚糖浆液和湿饼

[0191] 该示例描述了采用由葡糖基转移酶gtfJ催化的反应,制备聚 α -1,3-葡聚糖浆液或湿饼。这些组合物用于实例13和14中,以制备聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物。

[0192] 关于gtfJ酶的附加信息可见于美国专利7,000,000和美国专利申请公布2013/

0244288和2013/0244287中(这些专利均以引用方式并入本文)。

[0193] 为制备聚 α -1,3-葡聚糖浆液,制备包含蔗糖(100g/L)、磷酸钾缓冲液(20mM)、和 FermaSure[®] (500ppm)的水溶液(0.75L),并且调节至pH 6.8-7.0。然后向该溶液中加入 gtfJ酶提取物(50单元/L)。使酶反应溶液在20-25℃下保持48小时。形成浆液,因为反应中合成的聚 α -1,3-葡聚糖是水不溶性的。然后无任何过滤,使用该浆液,以制备羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖(参见实例13)。

[0194] 如上实施gtfJ酶反应以制得聚 α -1,3-葡聚糖湿饼。使用配有40微米滤纸上的325目筛网的布氏漏斗,收集反应中制得的聚 α -1,3-葡聚糖固体。将滤出的聚 α -1,3-葡聚糖固体重新悬浮于去离子水中,并且如上再过滤两次,以移除蔗糖、果糖和其它低分子量可溶性副产物。然后使用聚 α -1,3-葡聚糖固体湿饼制备羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖(参见实例14)。

[0195] 从而制得聚 α -1,3-葡聚糖的浆液和湿饼。可使用这些类型的聚 α -1,3-葡聚糖制剂作为底物,制备聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物。

[0196] 实例13

[0197] 由聚 α -1,3-葡聚糖浆液制备羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖

[0198] 该实例描述使用如实例12中制得的聚 α -1,3-葡聚糖浆液,制备醚化合物羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖。该浆液没有过滤或洗涤,所以包含用于合成聚 α -1,3-葡聚糖的葡糖基转移酶反应组分。

[0199] 将聚 α -1,3-葡聚糖浆液(500g)放置于1L带夹套的反应容器中,所述容器配有用于监测温度的热电偶、与再循环浴连接的冷凝器、和磁力搅拌棒。将固体氢氧化钠(75g)加入到浆液中以获得具有15重量%氢氧化钠的制剂。将该制剂在热板上加热至25℃。然后将制剂搅拌1小时,之后使温度升至55℃。将氯乙酸钠(227.3g)加入到制剂中,并且使反应温度在55℃下保持3小时。然后用乙酸(90%)中和反应。将该固体经由真空过滤收集并且用乙醇(70%)洗涤四次,在20-25℃下真空干燥,并且经由NMR和SEC分析以确定分子量和DoS。所得固体材料鉴定为水溶性羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖,具有0.3的DoS和140,000的M_w。

[0200] 因此,可使用包含葡糖基转移酶反应组分的聚 α -1,3-葡聚糖浆液,作为底物制备聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物。该结果表明,在用于制备聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的反应之前,用于合成聚 α -1,3-葡聚糖的葡糖基转移酶反应产物不需要任何处理(如洗涤或纯化聚 α -1,3-葡聚糖产物)。

[0201] 实例14

[0202] 由聚 α -1,3-葡聚糖湿饼制备羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖

[0203] 该实例描述使用如实例12中制得的聚 α -1,3-葡聚糖湿饼,制备醚化合物羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖。该湿饼在其用于该实例之前没有干燥。

[0204] 将聚 α -1,3-葡聚糖湿饼(500g)放置于1L带夹套的反应容器中,所述容器配有用于监测温度的热电偶、与再循环浴连接的冷凝器、和顶置式搅拌器。将异丙醇(500mL)和固体氢氧化钠(79.1g)加入到湿饼中以获得具有15重量%氢氧化钠的制剂。在热板上将该制剂加热至25℃,然后搅拌1小时,之后将温度升至55℃。将氯乙酸钠(227.3g)加入到制剂中,并且使反应温度在55℃下保持3小时。然后用乙酸(90%)中和反应。将该固体经由真空过滤收集并且用乙醇(70%)洗涤四次,在20-25℃下真空干燥,并且经由NMR和SEC分析以确定分子量和DoS。所得固体材料鉴定为水溶性羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖,具有0.7的DoS和250,000的

M_w 。

[0205] 因此,可使用聚 α -1,3-葡聚糖湿饼,作为底物制备聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物。该结果表明,葡糖基转移酶反应的聚 α -1,3-葡聚糖产物可几乎不处理(用水洗涤)而用于制备聚 α -1,3-葡聚糖醚化合物的反应中。

[0206] 实例15

[0207] 制备羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖钠

[0208] 该实例描述了制备葡聚糖醚衍生物羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖钠。

[0209] 在500mL容量圆底烧瓶内将10g聚 α -1,3-葡聚糖 (M_w [重均分子量] = 236,854) 加入到200mL异丙醇中,所述烧瓶配有用于监测温度的热电偶和与再循环浴连接的冷凝器以及磁力搅拌棒。将40mL氢氧化钠(15%溶液)滴加到制剂中,然后在热板上加热至25℃。将制剂搅拌1小时,之后使温度升至55℃。然后加入氯乙酸钠(12g) 以提供反应,将其在55℃下加热3小时,然后用90%乙酸中和。将由此形成的固体经由真空过滤收集并且用乙醇(70%)洗涤四次,在20-25℃下真空干燥,并且经由NMR和SEC分析以确定分子量和DoS。所得固体材料鉴定为水溶性羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖钠,具有0.5的DoS和580,000的 M_w 。

[0210] 表2提供了使用上文方法制得的羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖钠的各种样品的DoS量度列表。聚 α -1,3-葡聚糖原料具有各种分子量(表2)。

[0211] 表2

[0212] 由聚 α -1,3-葡聚糖制得的羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖钠的DoS

[0213]

CMG样品名称	聚 α -1,3-葡聚糖原料的 M_w	DoS
1A (35)	140287	0.5

[0214]

1B (36)	140287	0.9
1C (39)	140287	1
1D (44)	88445	0.7
1E (47)	278858	0.7
1F (58)	248006	
1G (67)	236854	0.5
1H (72)	236854	0.9
1I (-41)	200000	0.5
1J (-39)	168584	0.5

[0215] 从而,制得并且分离出葡聚糖醚衍生物羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖钠。

[0216] 实例16

[0217] 制备羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖钾

[0218] 该实例描述了制备葡聚糖醚衍生物羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖钾。

[0219] 在500mL容量圆底烧瓶内将10g聚 α -1,3-葡聚糖 (M_w = 168,000) 加入到200mL异丙醇中,所述烧瓶配有用于监测温度的热电偶和与再循环浴连接的冷凝器以及磁力搅拌棒。将40mL氢氧化钾(15%溶液)滴加到该制剂中,然后在热板上加热至25℃。将制剂搅拌1小时,之后使温度升至55℃。然后加入氯乙酸钠(12g) 以提供反应,将其在55℃下加热3小时,

然后用90%乙酸中和。将由此形成的固体经由真空过滤收集并且用乙醇(70%)洗涤四次,在20-25℃下真空干燥,并且经由NMR和SEC分析以确定分子量和DoS。所得固体材料鉴定为水溶性羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖钾,具有0.77的DoS。

[0220] 从而,制得并且分离出葡聚糖醚衍生物羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖钾。

[0221] 实例17

[0222] 制备羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖锂

[0223] 该实例描述了制备葡聚糖醚衍生物羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖锂。

[0224] 在500mL容量圆底烧瓶内将10g聚 α -1,3-葡聚糖($M_w=168,000$)加入到200mL异丙醇中,所述烧瓶配有用于监测温度的热电偶和与再循环浴连接的冷凝器以及磁力搅拌棒。将50mL氢氧化锂(11.3%溶液)滴加到该制剂中,然后在热板上加热至25℃。将制剂搅拌1小时,之后使温度升至55℃。然后加入氯乙酸钠(12g)以提供反应,将其在55℃下加热3小时,然后用90%乙酸中和。将由此形成的固体经由真空过滤收集并且用乙醇(70%)洗涤四次,在20-25℃下真空干燥,并且经由NMR和SEC分析以确定分子量和DoS。所得固体材料鉴定为水溶性CMG,具有0.79的DoS。

[0225] 调整试剂量以制备另一种CMG样品,其具有0.36的DoS。该实例中制得的CMG样品列于表3中。

[0226] 表3

[0227] CMG锂合成

[0228]

样品名称	DoS
2A (127)	0.79
2B (130)	0.36

[0229] 从而,制得并且分离出葡聚糖醚衍生物羧甲基聚 α -1,3-葡聚糖锂。

[0230] 实例18

[0231] 制备甲基聚 α -1,3-葡聚糖

[0232] 该实例描述了制备葡聚糖醚衍生物甲基聚 α -1,3-葡聚糖(MG)。该实例是描述MG的制备的实例5的补充。

[0233] 样品1

[0234] 在具有磁力搅拌棒的400mL烧杯中,将10g聚 α -1,3-葡聚糖($M_w=168584$)加入到40mL异丙醇和40mL 30重量%氢氧化钠中。在磁力搅拌台上,将烧杯以375rpm的速率搅拌一小时。然后将得自该制剂的固体经由真空过滤收集,与150mL异丙醇混合,并且放置于200mL容量的有盖广口瓶中。使该制剂静置过夜,然后转移到250mL容量的振荡管反应器中。将反应器加热至70℃并且加入10g氯甲烷。使反应在该温度下保持17小时,然后加入另外的20g氯甲烷,并且在该温度下保持17小时。冷却后,用90%乙酸中和反应。将得自该反应的固体经由真空过滤收集,用甲醇洗涤三次,在20-25℃下真空干燥,并且经由NMR分析以确定DoS。所得固体材料鉴定为MG,具有1.75的DoS。

[0235] 然后在具有磁力搅拌棒的400mL烧杯中,将8g该MG与50mL异丙醇和32mL 30重量%氢氧化钠混合。在磁力搅拌台上,将烧杯以375rpm的速率搅拌一小时。然后将该固体经由真空过滤收集,与150mL异丙醇混合,并且放置于200mL容量的有盖广口瓶中。使该制剂静置过

夜,然后转移到250mL容量的振荡管反应器中。将反应器加热至70℃并且加入12g氯甲烷。冷却后,用90%乙酸中和反应。将该固体经由真空过滤收集,并且用甲醇:丙酮(60:40)洗涤五次,在20-25℃下真空干燥,并且经由NMR分析以确定DoS。所得固体材料鉴定为MG,具有1.8的DoS。该MG代表样品1。

[0236] 样品2

[0237] 在具有磁力搅拌棒的400mL烧杯中,将20g聚 α -1,3-葡聚糖($M_w=245,000$)加入到50mL异丙醇和80mL 30重量%氢氧化钠中。在磁力搅拌台上,将烧杯以375rpm的速率搅拌一小时。然后将得自该制剂的固体经由真空过滤收集,与150mL异丙醇混合,并且放置于200mL容量的有盖广口瓶中。使该制剂静置过夜,然后转移到250mL容量的振荡管反应器中。将反应器加热至70℃并且加入30g氯甲烷。将反应在该温度下保持17小时。冷却后,用90%乙酸中和反应。将得自该反应的固体经由真空过滤收集,用甲醇:丙酮(60:40)洗涤五次,在20-25℃下真空干燥,并且经由NMR分析以确定DoS。所得固体材料鉴定为MG,具有1.39的DoS。

[0238] 然后在具有磁力搅拌棒的400mL烧杯中,将10g该MG与50mL异丙醇和40mL 30重量%氢氧化钠溶液混合。在磁力搅拌台上,将烧杯以375rpm的速率搅拌一小时。然后将得自该制剂的固体经由真空过滤收集,与100mL异丙醇混合,并且放置于200mL容量的有盖广口瓶中。使该制剂静置过夜,然后转移到250mL容量的振荡管反应器中。将反应器加热至70℃并且加入15g氯甲烷。冷却后,用90%乙酸中和反应。将该固体经由真空过滤收集,并且用甲醇:丙酮(60:40)洗涤五次,在20-25℃下真空干燥,并且经由NMR分析以确定DoS。所得固体材料鉴定为MG。该MG代表样品2。

[0239] 从而,制备并且分离出另外的葡聚糖醚衍生物甲基聚 α -1,3-葡聚糖样品。

[0240] 实例19

[0241] 制备乙基聚 α -1,3-葡聚糖

[0242] 该实例描述了制备葡聚糖醚衍生物乙基聚 α -1,3-葡聚糖(EG)。该实例是描述制备EG的方法的实例3的补充。

[0243] 在具有磁力搅拌棒的400mL烧杯中,将20g聚 α -1,3-葡聚糖($M_w=245,000$)加入到200mL异丙醇和109mL 15重量%氢氧化钠中。在磁力搅拌台上,将烧杯以375rpm的速率搅拌一小时。然后将得自该制剂的固体经由真空过滤收集,与100mL丙酮混合,并且放置于200mL容量的有盖广口瓶中。使该制剂静置过夜,然后转移到250mL容量的振荡管反应器中。将反应器加热至90℃并且加入85g氯乙烷。将反应在该温度下保持17小时。冷却后,用90%乙酸中和反应。将该固体经由真空过滤收集,用80%丙酮洗涤五次,在20-25℃下真空干燥,并且经由NMR分析以确定DoS。所得固体材料鉴定为EG,具有1.03的DoS。

[0244] 从而,制得并且分离出葡聚糖醚衍生物乙基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0245] 实例20

[0246] 制备羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖

[0247] 该实例描述了制备葡聚糖醚衍生物羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖(HPG)。该实例是描述制备HPG的方法的实例1的补充。

[0248] 在具有磁力搅拌棒的400mL烧杯中,将10g聚 α -1,3-葡聚糖($M_w=168584$)加入到101mL甲苯和5mL 20重量%氢氧化钠中。在磁力搅拌台上,将烧杯以375rpm的速率在55℃下搅拌一小时。然后将该制剂放置于200mL容量的有盖广口瓶中,并且使其静置过夜,之后转

移到250mL容量的振荡管反应器中。将反应器加热至75℃并且加入34g 1,2-环氧丙烷。将反应在该温度下保持4小时。冷却后,用90%乙酸中和反应。将该固体经由真空过滤收集,用热水洗涤三次,在20-25℃下真空干燥,并且经由NMR分析以确定DoS。固体材料确定为HPG。

[0249] 从而,制备并且分离出另外的葡聚糖醚衍生物羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖样品。

[0250] 实例21

[0251] 制备二羟烷基聚 α -1,3-葡聚糖

[0252] 该实例描述了制备聚 α -1,3-葡聚糖的二羟烷基醚衍生物。具体地,制得了二羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖。

[0253] 在500mL容量圆底烧瓶内将10g聚 α -1,3-葡聚糖 ($M_w=138,438$) 加入到100mL 20%四乙基氢氧化铵中,所述烧瓶配有用于监测温度的热电偶和与再循环浴连接的冷凝器以及磁力搅拌棒(获得~9.1重量%的聚 α -1,3-葡聚糖)。在热板上将该制剂搅拌并且加热至30℃。将制剂搅拌1小时以溶解固体,之后将温度升至55℃。然后加入3-氯-1,2-丙二醇(6.7g)和11g DI水以提供反应(包含~5.2重量%3-氯-1,2-丙二醇),将其在55℃下保持1.5小时,之后将5.6g DI水加入到反应中。将反应在55℃下再保持3小时45分钟,然后用乙酸中和。中和后,加入过量的异丙醇以沉淀固体。将由此形成的固体经由真空过滤收集并且用乙醇(95%)洗涤四次,并且在20-25℃下真空干燥。所得固体材料鉴定为二羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖,其是非水溶性的,并且具有0.6的取代度。

[0254] 重复上文方法,进行一些修改,并且这次使用上文制得的二羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖样品作为原料。简而言之,将5g葡聚糖醚加入到50mL 20%四乙基氢氧化铵中。将该制剂用磁力搅拌棒搅拌,直至固体溶解,然后在热板上在30℃下加热1小时。然后将制剂加热至55℃,并且加热3-氯-1,2-丙二醇(8g)以提供反应。然后将反应搅拌2小时,之后用乙酸将其中和。中和后,加入过量的异丙醇以沉淀固体。将由此形成的固体经由真空过滤收集并且用乙醇(95%)洗涤四次,并且在20-25℃下真空干燥。所得固体材料鉴定为二羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖,其是水溶性的,并且具有0.89的取代度。

[0255] 从而,制备并且分离出聚 α -1,3-葡聚糖的水溶性二羟烷基醚衍生物。

[0256] 实例22

[0257] 制备二羟烷基聚 α -1,3-葡聚糖

[0258] 该实例描述了制备二羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖。该实例是同样描述制备该葡聚糖醚衍生物的实例21的补充。

[0259] 在500mL容量圆底烧瓶内将10g聚 α -1,3-葡聚糖 ($M_w=138,438$) 加入到143g 20%四乙基氢氧化铵中,所述烧瓶配有用于监测温度的热电偶和与再循环浴连接的冷凝器以及磁力搅拌棒(获得~6.5重量%的聚 α -1,3-葡聚糖)。在热板上将该制剂搅拌并且加热至30℃。将制剂搅拌1小时以溶解固体,之后将温度升至55℃。然后加入3-氯-1,2-丙二醇(16g)以提供反应(包含~9.5重量%3-氯-1,2-丙二醇),将其在55℃下保持2小时,然后用乙酸中和。中和后,加入过量的异丙醇以沉淀固体。将由此形成的固体经由真空过滤收集并且用乙醇(95%)洗涤四次,并且在20-25℃下真空干燥。所得固体材料鉴定为二羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖,其是水溶性的,并且具有0.6的取代度。

[0260] 从而,制备并且分离出聚 α -1,3-葡聚糖的水溶性二羟烷基醚衍生物。注意到,即使该实例中制得的二羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖具有0.6的取代度,它也是水溶性的。该结果与上

文实例21中描述的第一方法中制得的二羟丙基聚 α -1,3-葡聚糖形成对比,其也具有0.6的取代度,但为水不溶性的。