

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6475673号
(P6475673)

(45) 発行日 平成31年2月27日 (2019. 2. 27)

(24) 登録日 平成31年2月8日 (2019. 2. 8)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 S
GO 1 N 37/00 (2006. 01)	GO 1 N 37/00 1 0 2
GO 1 N 33/553 (2006. 01)	GO 1 N 33/553
GO 1 N 33/543 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 C
	GO 1 N 33/543 5 2 5 G
請求項の数 23 外国語出願 (全 50 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2016-169045 (P2016-169045)	(73) 特許権者	596118493
(22) 出願日	平成28年8月31日 (2016. 8. 31)		アカデミア シニカ
(62) 分割の表示	特願2015-23510 (P2015-23510) の分割		ACADEMIA SINICA
原出願日	平成21年7月15日 (2009. 7. 15)		台湾, タイペイ 11529, ナンカン, アカデミア ロード 128, セクション 2
(65) 公開番号	特開2017-21039 (P2017-21039A)		128 Sec 2, Academia Road, Nankang, Taipei 11529 TW
(43) 公開日	平成29年1月26日 (2017. 1. 26)	(74) 代理人	100106518
審査請求日	平成28年9月29日 (2016. 9. 29)		弁理士 松谷 道子
(31) 優先権主張番号	61/080, 931	(74) 代理人	100156122
(32) 優先日	平成20年7月15日 (2008. 7. 15)		弁理士 佐藤 剛
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/107, 624		
(32) 優先日	平成20年10月22日 (2008. 10. 22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PTFE様のアルミニウム・コート・ガラススライド上のグリカンアレイおよび関連する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

金属酸化物でコートされた固体基材の上に炭水化物が固定化された炭水化物のアレイを含むスライドであって、前記アレイが金属酸化物でコートされた固体基材の表面上の別々の位置に固定化された複数の炭水化物を含み、前記炭水化物がホスホン酸官能基によって修飾され、前記ホスホン酸官能基が、前記金属酸化物でコートされた固体基材上の表面への共有結合を形成している、スライド。

【請求項 2】

前記金属酸化物でコートされた固体基材が電場について伝導性または半導性である、請求項 1 に記載のスライド。

【請求項 3】

前記金属酸化物でコートされた固体基材がガラスである、請求項 1 に記載のスライド。

【請求項 4】

前記炭水化物がグリカンである、請求項 1 に記載のスライド。

【請求項 5】

前記グリカンが多糖類、オリゴ糖、複合糖質の炭水化物部分、セロビオース、セロトリオース、セロテトラオース、G l o b o H、または G b 5 である、請求項 4 に記載のスライド。

【請求項 6】

前記金属酸化物が酸化アルミニウムであって、前記ホスホン酸官能基によって修飾され

た炭水化物が、前記酸化アルミニウムコート固体基材の表面上でのホスホン酸基と酸化アルミニウムとの間の共有結合によって、前記基材の表面上に固定化されている、請求項 1 に記載のスライド。

【請求項 7】

前記炭水化物に結合したタンパク質をさらに含む、請求項 1 に記載のスライド。

【請求項 8】

前記タンパク質がレクチンまたは抗体である、請求項 7 に記載のスライド。

【請求項 9】

前記タンパク質が検出可能な標識で標識されている、請求項 7 に記載のスライド。

【請求項 10】

前記標識が蛍光染料を含む、請求項 9 に記載のスライド。

10

【請求項 11】

前記蛍光染料がアミン反応性染料を含む、請求項 10 に記載のスライド。

【請求項 12】

前記金属酸化物が、自然酸化アルミニウムまたはアノード酸化された酸化アルミニウムである、請求項 1 ~ 11 いずれかに記載のスライド。

【請求項 13】

前記金属酸化物コートの厚さが 5 nm 以下である、請求項 1 ~ 12 いずれかに記載のスライド。

【請求項 14】

炭水化物と前記炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子との間の結合反応を分析するための方法であって：

20

(a) 請求項 1 に記載の炭水化物のアレイを含むスライドを提供するステップと；

(b) 前記アレイを、前記アレイ表面上に固定化された前記複数の炭水化物の 1 つ以上に結合する可能性がある 1 個以上の分子と接触させるステップと；

(c) 前記アレイ表面上の 1 つ以上の別々の位置での結合反応の存在または非存在を同定するステップと；

を含む、方法。

【請求項 15】

前記炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子が、検出可能な標識によって標識されたタンパク質である、請求項 14 に記載の方法。

30

【請求項 16】

前記タンパク質標識が蛍光染料を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記蛍光染料がアミン反応性シアニン染料を含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

分子の前記アレイ上の炭水化物への前記結合が、癌転移を表す、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記炭水化物が多糖類、オリゴ糖、複合糖質の炭水化物部分、セロピオース、セロトリオース、セロテトラオース、G l o b o H、または G b 5 である、請求項 14 に記載の方法。

40

【請求項 20】

金属酸化物でコートされた固体基材の上に炭水化物が固定化された炭水化物のアレイを含むスライドを製造するための方法であって：

金属酸化物でコートされた固体基材の表面上の別々の位置に複数の炭水化物をホスホン酸官能基で固定化するステップを含み、

前記炭水化物が共有結合によって固定化され、

前記基材が電場について伝導性または半導性である、方法。

【請求項 21】

50

前記アレイを炭水化物 - 結合タンパク質と接触させることによって、前記アレイに対して炭水化物結合アッセイを実行するステップをさらに含み、前記アレイ上の1つ以上の別々の位置における特異的結合の検出によって、前記アレイが前記炭水化物と前記炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子との間の結合反応の分析を実行するのに好適であることが示される、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

前記炭水化物が糖、糖タンパク質、糖脂質、またはマンノースから選択され、それぞれ内部または非還元性末端アルファ - マンノシル基を含み、前記炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子がコンカナバリンAである、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記金属酸化物が、自然酸化アルミニウムまたはアノード酸化された酸化アルミニウムである、請求項20～22いずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

この出願は、2008年7月15日に出願された米国仮出願第61/080,931号および2008年10月22日に出願された米国仮出願第61/107,624号(これらの内容は、その全体が参考として本明細書に援用される)の利益およびそれへの優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

ポリフルオロホスホン化アルミニウム・コート・ガラススライドを含む、新規アルミニウム・コート・ガラススライド上のグリカンアレイによって、マトリクスを用いない質量分析法による特徴づけ、糖タンパク質結合の蛍光評価、ならびに効率および特異性が異なる酵素の同定および研究が可能となる。

【0003】

SWISS-PROTタンパク質データベースに基づいて、ヒトタンパク質の50%超がグリコシル化されることが予測される。炭水化物はしばしば、糖タンパク質または糖脂質コンジュゲートとして細胞表面上に存在して、多くの生物学的認識プロセス、たとえばタンパク質折り畳み、分泌および安定化、ウイルスおよび細菌感染、癌転移、炎症反応、先天および適応免疫、ならびに多くの他の受容体媒介シグナル伝達プロセスにおいて、重要な構造的および機能的役割を果たす。さらに、生物活性にグリコシル化が必要である多くの例が存在する。その上、固着植物などの多くの生物は、有害な外因性生体異物を解毒する特異的グリコシル化機構を進化させてきた。

【0004】

炭水化物の生物学的重要性の認識が高まっているにもかかわらず、炭水化物 - タンパク質相互作用の研究は、炭水化物の複雑な構造および困難な合成ならびにグリカン結合タンパク質(GBP)とのその相互作用の低い親和性のために、なお多くの困難に直面している。通例、炭水化物 - タンパク質相互作用の単量体解離定数(K_D)は、ミリモルの範囲にある;それゆえ炭水化物に媒介された生物学的反応は、高い親和性および特異性を達成するために、細胞表面での多価相互作用を介することが多い。

【0005】

細胞生物学における主な課題は、多くの生物学的プロセスに關与する、オリゴ糖とタンパク質との相互作用を定義することである。しかし純粋なオリゴ糖を得ることは困難であり、各種の受容体によって認識される炭水化物の同定および結合の研究のための高感受性および高スループットの方法を開発する必要がある。

【0006】

炭水化物マイクロアレイは、糖鎖生物学の研究および流行病の高スループットバイオアッセイのための強力なツールである。この技術の根本的な問題は、表面に共有結合されて

10

20

30

40

50

いるオリゴ糖の特徴づけおよび定量をどのように行うかということである。表面への糖の効果的な固定化は、糖タンパク質結合を評価するときの連続的な基材洗浄に耐えるために不可欠である。質量分析法(MS)は、多孔性ガラススライドに固定化した糖の高スループット特徴づけに有用な分析方法であることが報告されてきた。

【0007】

グリカンアレイ用に多様な基材が市販されているが、これらの基材は直接質量分光分析には好適でない。これらの基材は、アミン、カルボキシラート、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、アビジン、エポキシ、アルデヒド、キレート化ニッケル基などでコートしたガラスおよびポリエチレンテレフタレート(PET)を含む。実際に、NHS官能化ガラススライドは、グリカンアレイの作製に一般に使用される。代表的な例はガラススライドの表面上に固定化された糖抗原の例であり、その後、糖結合モノクローナル抗体および蛍光タグ化2次抗体をタンパク質-炭水化物相互作用の研究のためにインキュベートした。これらのガラススライドは、有効であるが、結合した糖の質量分析法による特徴づけに使用するには理想的ではない。

10

【0008】

マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間(MALDI-TOF)MS用に選択される基材は、高真空下で均一な電場が生成できるように、伝導性または半導性であるべきである。標準ステンレス鋼板は通常、被検体を装填するための選択肢である。

【0009】

MALDI MSでは、パルス・レーザー・ビームのエネルギーをマトリクス(混和性有機化学薬品)が吸収して、試料の断片化を防止する。MALDI-TOF MSは、高分子量生体分子を分析するための優れたツールである。しかし有機マトリクス中の化学薬品は、低分子量オリゴ糖(通例2000Da未満)を妨害する;それゆえ、マトリクス化学薬品を添加せずにMSによって生体分子を分析するための基材として、多孔性ケイ素を選択した。ケイ素上での脱離イオン化(DIOS)MSでは、比較的 low 分子量の生体分子は、MSからの偽親ピークのm/z比に基づいて同定された。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本開示の特徴により、アルミニウムコート透明固体基材またはPTFE様アルミニウムコート透明固体基材の上に固定化された炭水化物のアレイが開示される。アレイはアルミニウムコート透明固体基材の表面上の別々の位置に固定化された複数の炭水化物を備え、アレイは(a)固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけを実行するために、および(b)炭水化物と炭水化物を特異的に結合する可能性がある(suspected of)分子との間の結合反応の分析を実行するために好適である。

30

【0011】

本開示の特徴により、基材は、電場について伝導性または半導性であり得る。

【0012】

本開示の特徴により、透明固体基材はガラスであり得る。

【0013】

本開示の特徴により、炭水化物はグリカンであり得る。

40

【0014】

本開示の特徴により、炭水化物は非共有結合によって固定化され得る。

【0015】

本開示の特徴により、炭水化物は $-C_nF_{2n+1}$ ($n \geq 4$)末端によってポリフッ素化(polyfluorinated)され得る。

【0016】

本開示の特徴により、ポリフッ素化炭水化物は、PTFE様アルミニウムコート透明固体基材の表面にスポットされ得る。

【0017】

50

本開示の特徴により、炭水化物は共有結合によって固定化され得る。

【0018】

本開示の特徴により、炭水化物はホスホン酸官能基によって修飾され得る。

【0019】

本開示の特徴により、ホスホニル化 (phosphonylated) 炭水化物は、アルミニウムコート透明固体基材の表面上でのホスホン酸基と酸化アルミニウムとの間のキレート化相互作用によって、基材の表面上に固定化され得る。

【0020】

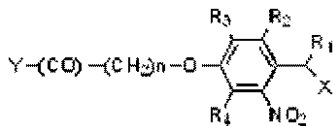
本開示の特徴により、炭水化物は、光切断型リンカーおよびシラン官能基によって修飾され得る。

【0021】

本開示の特徴により、光切断型リンカーは、一般式：

【0022】

【化1】



を有し、式中、 R^1 は、水素、 $C_1 - C_8$ アルキルであり； R^2 および R^4 はそれぞれ独立して、水素、 $C_1 - C_8$ アルコキシであり； R^3 は、 $C_1 - C_8$ アルコキシであり； X は、 $O(CO)N - (CH_2)_n - R^5$ であり、ここで $n \geq 3$ 、 R^5 は炭水化物であり、 Y は ACG スライドなどの固体支持体である。

【0023】

本開示の特徴により、固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけは、飛行時間質量分析法 (MS - TOF) を含む。

【0024】

本開示の特徴により、固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけは、マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間 (MALDI - TOF) 質量分析法を含む。

【0025】

本開示の特徴により、炭水化物は、多糖類、またはオリゴ糖、または複合糖質の炭水化物部分、またはセロピオース、またはセロトリオース、またはセロテトラオース、または GlcOH、または Gb5 である。

【0026】

本開示の特徴により、固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけは、セルラーゼ酵素反応の炭水化物生成物の特徴づけを含む。

【0027】

本開示の特徴により、セルラーゼ酵素反応はアレイ表面上に固定化された炭水化物に対して実行され、セルラーゼ酵素は、固定化された多糖類、またはオリゴ糖、または複合糖質の炭水化物部分、またはセロピオース、またはセロトリオース、またはセロテトラオース、または GlcOH、または Gb5 を分解可能である可能性がある。

【0028】

本開示の特徴により、マトリクスを加えることなく MS - TOF 特徴づけを実行できる。

【0029】

本開示の特徴により、MS - TOF 特徴づけの約 15 分後に、アレイに対して炭水化物結合アッセイを実行できる。

【0030】

本開示の特徴により、炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子はタンパク質である。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 1 】

本開示の特徴により、タンパク質はセルラーゼである。

【 0 0 3 2 】

本開示の特徴により、セルラーゼは、1, 4-β-Dグルコシダーゼ、エキソグルカナーゼ(1, 4-β-Dグルカンセロピオヒドロラーゼ)およびエンドグルカナーゼ(1, 4-β-Dグルカングルカノヒドロラーゼ)からなる群より選択される。

【 0 0 3 3 】

本開示の特徴により、アレイに固定化された炭水化物への結合について分析されるタンパク質は、検出可能な標識で標識される。

【 0 0 3 4 】

本開示の特徴により、タンパク質標識は蛍光染料を含む。

【 0 0 3 5 】

本開示の特徴により、蛍光染料はアミン反応性染料を含む。

【 0 0 3 6 】

本開示の特徴により、アレイ表面上に固定化された炭水化物の特徴づけを表すデータ、またはアレイ表面での炭水化物結合反応の分析を表すデータ、またはそれらの両方を含むコンピュータ可読媒体が開示される。

【 0 0 3 7 】

本開示の特徴により、PTFE様アルミニウムコート透明固体基材に固定化された炭水化物を特徴づけるための方法であって：

(a) PTFE様アルミニウムコート透明固体基材の表面上の別々の位置に固定化された複数の炭水化物を含むアレイを提供するステップと；

(b) 各々の別々の位置に固定化された炭水化物を特徴づけするための質量分光分析を実行するステップと；

を含む方法が開示される。

【 0 0 3 8 】

本開示の特徴により、固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけは、飛行時間質量分析法(MS-TOF)を含む。

【 0 0 3 9 】

本開示の特徴により、方法は：

(c) 疑わしい炭水化物結合部分の結合分析を実行するステップをさらに含む。

【 0 0 4 0 】

本開示の特徴により、疑わしい炭水化物結合部分は、セルラーゼタンパク質である。

【 0 0 4 1 】

本開示の特徴により、方法は：

(d) セルラーゼが炭水化物を加水分解するのに好適な条件下で、アレイ表面上に固定化された結合炭水化物とセルラーゼタンパク質とをインキュベートするステップ

をさらに含む。

【 0 0 4 2 】

本開示の特徴により、方法は：

(e) セルラーゼによる加水分解後にアレイ表面上に固定化されたままのセルラーゼタンパク質の生成物を特徴づけするステップ

をさらに含む。

【 0 0 4 3 】

本開示の特徴により、セルラーゼは、1, 4-β-Dグルコシダーゼ、エキソグルカナーゼ(1, 4-β-Dグルカンセロピオヒドロラーゼ)およびエンドグルカナーゼ(1, 4-β-Dグルカングルカノヒドロラーゼ)からなる群より選択される。

【 0 0 4 4 】

本開示の特徴により、炭水化物と炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子との間

10

20

30

40

50

の結合反応の分析方法であって：

(a) アルミニウムコート透明固体基材または P T F E 様アルミニウムコート透明固体基材の表面上の別々の位置に固定化された複数の炭水化物を含むアレイを提供するステップと；

(b) アレイを、アレイ表面上に固定化された複数の炭水化物の 1 つ以上に結合する可能性がある 1 個以上の分子と接触させるステップと；

(c) アレイ表面上の 1 つ以上の別々の位置での結合反応の存在または非存在を同定するステップと；

を含む方法が開示される。

【 0 0 4 5 】

本開示の特徴により、炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子は、検出可能な標識によって標識されたタンパク質である。

【 0 0 4 6 】

本開示の特徴により、タンパク質標識は蛍光染料を含む。

【 0 0 4 7 】

本開示の特徴により、蛍光染料はアミン反応性シアニン染料を含む。

【 0 0 4 8 】

本開示の特徴により、アレイ上の炭水化物への分子の結合は、生物学的プロセスを表している。

【 0 0 4 9 】

本開示の特徴により、生物学的プロセスは、タンパク質折り畳み、タンパク質分泌、タンパク質安定化、ウイルス感染、細菌感染、癌転移、炎症反応、先天免疫、適応免疫、受容体媒介シグナル伝達プロセス、およびバイオ燃料産生からなる群より選択される。

【 0 0 5 0 】

本開示の特徴により、炭水化物は、多糖類、またはオリゴ糖、または複合糖質の炭水化物部分、またはセロビオース、またはセロトリオース、またはセロテトラオース、または G l o b o H、または G b 5 である。

【 0 0 5 1 】

本開示の特徴により、アレイに固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけは、結合分析の前に実行される。

【 0 0 5 2 】

本開示の特徴により、アレイに固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけは、結合分析の前および後に実行され、アレイ表面上に固定化された複数の炭水化物の 1 つ以上に結合する可能性がある 1 個以上の分子は、アレイ上の 1 つ以上の炭水化物を加水分解できるセルロースタンパク質酵素を含み、結合反応は、セルロースが炭水化物を加水分解するのに好適な条件下で実行される。

【 0 0 5 3 】

本開示の特徴により、セルラーゼは、1, 4 - - グルコシダーゼ、エキソグルカナーゼ (1, 4 - - D グルカンセロビオヒドラーゼ) およびエンドグルカナーゼ (1, 4 - - D グルカングルカノヒドラーゼ) からなる群より選択される。

【 0 0 5 4 】

本開示の特徴により、アルミニウムコート透明固体基材または P T F E 様アルミニウムコート透明固体基材上に固定化された炭水化物のアレイの製造方法であって： (a) アルミニウムコート透明固体基材または P T F E 様アルミニウムコート透明固体基材の表面上の別々の位置に複数の炭水化物を固定化するステップを含み、基材が電場について伝導性または半導性であり、アレイが固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけを実行するのに好適であり、アレイが、炭水化物と炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子との間の結合反応の分析を実行するのに好適である、方法が開示される。

【 0 0 5 5 】

本開示の特徴により、炭水化物は非共有結合によって固定化される。

10

20

30

40

50

【0056】

本開示の特徴により、炭水化物はポリフッ素化される。

【0057】

本開示の特徴により、炭水化物は共有結合によって固定化される。

【0058】

本開示の特徴により、炭水化物はホスホン酸官能基によって修飾されている。

【0059】

本開示の特徴により、方法は：(b)アレイ表面上に固定化された炭水化物の特徴づけを質量分析法によって実行するステップをさらに含み、マトリクス材料の非存在下での高いシグナル/ノイズ(S/N)比、低いレーザーフルエンス率、またはシグナルの低い断片化の1つ以上の観察によって、アレイが固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけを実行するのに好適であることが示される。

10

【0060】

本開示の特徴により、方法は：(c)アレイを炭水化物-結合タンパク質と接触させることによって、アレイに対して炭水化物結合アッセイを実行するステップをさらに含み、アレイ上の1つ以上の別々の位置における特異的結合の検出は、アレイが炭水化物と炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子との間の結合反応の分析を実行するのに好適であることを示す。

【0061】

本開示の特徴により、炭水化物は糖、または糖タンパク質、または糖脂質、またはマンノースから選択され、それぞれ内部または非還元性末端アルファ-マンノシル基を含み、結合分子はコンカナバリンAである。

20

【0062】

本開示の特徴により、疾患診断および薬物送達で使用するためのアレイが開示され、アレイは、(a)アルミニウムコート透明固体基材またはPTFE様アルミニウムコート透明固体基材の表面上の別々の位置に複数の炭水化物を固定化することによって製造され、基材は電場について伝導性または半導性であり、アレイは固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけを実行するために好適であり、アレイは、炭水化物と炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子との間の結合反応の分析を実行するのに好適である。

【0063】

本開示の上述の特徴および目的は、同じ参照数字が同じ要素を示す添付図面と併せて解釈される以下の説明を参照すると、明らかになるであろう：

30

【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1】図1は、実施ならびに実験的アルミニウムコートガラス(ACG)スライドおよび関連実験技法のブロック図である；

【図2】図2は、光切断型リンカーを用いたマンノース-ACGおよびラクトース-ACGの合成の実施を示すスキームである；

【図3】図3は、アルミニウム・コート・ガラススライドの実施の顕微鏡写真である。

【図4】図4は、各種の方法によって作製したACGスライドの表面組成を示す実験データのグラフである；

40

【図5】図5は、マイクロガラススライド、半透明ACGスライド、および全反射(不透明)ACGスライドの光学特性の実施の視覚表示である；

【図6】図6は、ACGスライド上のAl-OHのATR/FTIRスペクトルを示す実験データのグラフの実施のグラフである。

【図7】図7は、活性の有効性を示すACGスライド上の水接触角の写真である；

【図8】図8は、選択的結合切断およびultraflex TOF質量分析法による糖(マンノース)誘導体の検出の実施スキームである；

【図9】図9は、純アルミニウム板およびACGスライドでの質量分析法データの実施を示す；

50

【図10】図10は、APDME Sグラフト化の前のa)酸素プラズマ(A1-1)、b)アルゴンプラズマ(A1-2)、ならびにc)酸素およびアルゴンの混合物のプラズマ(A1-3)による処理時の、カソードアーク蒸発によって形成されたACGスライドのタンパク質結合アッセイの実施を示す；

【図11】図11は、ガラススライドおよびACGスライドに固定化されたマンノースの蛍光タグ化タンパク質結合アッセイの実施の写真である；

【図12】図12は、ACGスライドにグラフトされた光切断型リンカー(PCR)を用いたマンノースのultraflex TOF質量スペクトルのピーク強度と、熱コーティングと続いてのスライド表面上での電気化学アノード酸化によって形成されたマンノース-タンパク質結合ACGスライドの蛍光強度との比較を示す実験データの実施のグラフである；

10

【図13】図13は、DMFおよびジイソプロピルエチルアミン中のスベリン酸ジスクシンイミジル(DSS)を用いた処理によるNHS-ACGへの変換によって修飾されたNH₂-ACG表面の利用の実施に関するデータを示す；

【図14】図14は、ACG質量分析法実験で使用される化合物の構造の化学式である；

【図15】図15は、PTFE様ACGスライド上での非共有結合型グリカンアレイの生成の実施のブロック図である；

【図16】図16は、ポリフッ化炭水化物4~7の実施の合成を示すスキームである；

【図17A】図17は、スライドにポリフッ化炭水化物が結合したPTFE様ACGスライドを使用する実験データの実施の表示である；

20

【図17B】図17は、スライドにポリフッ化炭水化物が結合したPTFE様ACGスライドを使用する実験データの実施の表示である；

【図17C】図17は、スライドにポリフッ化炭水化物が結合したPTFE様ACGスライドを使用する実験データの実施の表示である；

【図18】図18は、マトリクスを加えることなく、異なるレーザーフルエンス率を使用することによる、ACGスライド上のGlobo Hの質量スペクトルの実験データの実施のグラフである；

【図19】図19は、マトリクスを用いた、異なるレーザーフルエンス率を使用することによる、ACGスライド上のGlobo Hの質量スペクトルの実験データの実施のグラフである；

30

【図20A】図20は、A. Niger、T. Reesei、およびT. Virideによるセルラーゼタンパク質を用いた、溶解状態のおよびPTFE様ACGスライドに固定化されたポリフッ化セロピオースの酵素加水分解のMS-TOFデータの実施データのグラフである；

【図20B】図20は、A. Niger、T. Reesei、およびT. Virideによるセルラーゼタンパク質を用いた、溶解状態のおよびPTFE様ACGスライドに固定化されたポリフッ化セロピオースの酵素加水分解のMS-TOFデータの実施データのグラフである；

【図21】図21は、化学構造およびセロトリオースに対するセルラーゼ(cellulase)の効果を示す実験データの実施のグラフである；

40

【図22】図22は、溶解状態のポリフッ化セロピオース(A)、ポリフッ化セロトリオース(B)およびポリフッ化セロテトラオース(C)の酵素加水分解の実施MS-TOFデータの実施のグラフである；

【図23】図23は、ACGガラススライド上のポリフッ化セロピオース(A)、ポリフッ化セロトリオース(B)およびポリフッ化セロテトラオース(C)の酵素加水分解の実施MS-TOFデータの実施のグラフである；

【図24】図24は、マンノース誘導体21の合成のためのスキームである；

【図25】図25は、ACGスライド上での共有結合型グリカンアレイの生成方法の実施のブロック図である；

【図26A】図26は、シランベースPTFE様ACGスライドをMS-TOFおよびタ

50

ンパク質 - 糖結合によって特徴づけする実験データの実施のグラフである；

【図26B】図26は、シランベースPTFE様ACGスライドをMS-TOFおよびタンパク質 - 糖結合によって特徴づけする実験データの実施のグラフである；

【図27A】図27は、ホスホン酸ベースPTFE様ACGスライドをMS-TOFおよびタンパク質 - 糖結合によって特徴づけする実験データの実施のグラフである；

【図27B】図27は、ホスホン酸ベースPTFE様ACGスライドをMS-TOFおよびタンパク質 - 糖結合によって特徴づけする実験データの実施のグラフである；

【図28】図28は、実験の純化合物3 (HDFDPA, 3, 3, 4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, - 9, 9, 10, 10, 10 - ヘプタデカフルオロデシルホスホン酸) のFTIRスペクトルおよびACG表面グラフト化合物3のFTIRスペクトルの実施のグラフである。

10

【発明を実施するための形態】

【0065】

本開示の実施形態の以下の詳細な説明において、同じ参照が同様の要素を示し、例証のために、本開示が実施され得る詳細な実施形態が示されている、添付図面を参照する。これらの実施形態は、当業者が本開示を実施できるようにするために十分に詳細に説明されており、他の実施形態が利用され得ることと、本開示の範囲から逸脱することなく論理的、機械的、電氣的、機能的、および他の変更が行われ得ることが理解されるべきである。したがって以下の詳細な説明は、制限的な意味で解釈されるべきではなく、本開示の範囲は、添付請求項によってのみ定義される。本開示で使用する場合、「or」という用語は、論理和として定義されることが理解されるものとして、そのように別途明示的に指摘されない限り、または「xor」と記載されない限り、排他的論理和を示さないものとする。

20

【0066】

本開示は、参照により、2006年12月22日に出願された米国特許出願公開第2007/0213278号を組み込む。

【0067】

本明細書で使用する場合、テフロン（登録商標）またはPTFEという用語は、ポリテトラフルオロエチレンを指す。

【0068】

30

糖分子と基材表面との間の効果的な接着は、共有結合によって達成されてきた。糖誘導体のフルオラス表面への物理的吸着も、十分な接着のために実行可能であり得る。多孔性ケイ素板もDIOS MSでのマトリクスとして作用して、質量スペクトルは、断片化なしで高いシグナル対ノイズ(S/N)比で得られた。多孔性ケイ素板の調製には、環境に優しくない腐食酸の使用が必要であり、板の品質を管理することが困難である。他方、多孔性酸化アルミニウムは、アルミニウム表面に自然に存在する；アルミニウムコートガラス(ACG)スライドの電気化学アノード酸化は、弱酸性水溶液中で実施できる。ケイ素表面上でのシリル化反応も、適正な条件下でアルミニウム表面上で使用できる。板アルミニウムの新たに切断された表面は、光沢のある金属質感を有する。空気に暴露させると、表面は徐々に酸化して、酸化アルミニウム(自然酸化物と呼ばれる)の層が形成されると不透明に変わる。アルミニウム表面上で成長した自然酸化アルミニウム(NAO)は、アノード酸化された酸化アルミニウム(AAO)の配向と比較して、配向を有さない。アルミニウム表面上のNAOの厚さはわずか2、3ナノメートルである。これに対して、AAOの厚さは、急速に(15~20分以内)マイクロメートル範囲まで成長することができ、成長の方向は印加された電場に対して整列されている。2、3の試みの実験では、純アルミニウム板を製造して(厚さ1mm)、板の表面上でAAO層を2mmまで成長させた。厚いAAO層を備えたこの表面は非伝導性となり(セラミックのように)、本出願人らの研究には不適であった。しかしすべての場合で、アルミニウム表面上のアモルファス酸化物層は、化学的に修飾することが可能であり、表面上の酸化物層の厚さがナノメートル範囲にあるときにだけ、基材は導電性のままであった。

40

50

【 0 0 6 9 】

図 1 に図示した実施により、A C G スライドの表面上に酸化アルミニウムの薄層を備えた複数の新たな基材が、表面グラフトオリゴ糖の分子量を特徴づけすることを試みて、同時にその糖 - タンパク質結合能力を探索することを試みて製造された。図 2 に示す実施に従って図示されるように、光切断型リンカー (P C L) が組み込まれている設計されたマンノースおよびラクトース誘導体を合成し、活性化 A C G スライドに共有結合させた。混和性有機マトリクスを加えることなく、糖固定化 A C G スライドに分子量の同定およびタンパク質結合の評価を受けさせた。

【 0 0 7 0 】

セルラーゼは、バイオ燃料生産へのその応用のため、現在関心を集めている。蛍光発生または発色基を備えたセロピオースまたはセロトリオースは、セルラーゼの活性および特異性を調べるための基質として一般に使用されている。しかし酵素加水分解の間に、反応で発生した蛍光発生基または発色脱離基は高い pH でのみシグナルを示したが、セルラーゼは低い pH (4 ~ 6) でその最適活性を呈した。ポリフッ化セロピオースを P T F E 様 A C G スライドに非共有的に固定化して、pH 4 ~ 6 にてインサイチューで酵素加水分解を行った。次にスライド表面に残存する加水分解生成物を M S - T O F によって同定した。

10

【 0 0 7 1 】

さらに最近開発されたアルミニウムコートガラス (A C G) スライドを酸化して、官能化アルキルモノエトキシシランと反応させて共有結合型ハンドルを形成させ、光切断型リンカーを含有するグリカンとのカップリングを続けた。A C G スライド表面上の光切断型リンカーを有するこのグリカンアレイは、マトリクスなしで飛行時間質量分析法 (M S - T O F) によって特徴づけして、蛍光タグ化タンパク質の結合評価に使用することができる。A C G - スライド上の糖 - タンパク質複合体の蛍光強度は、ガラススライド上よりも高い。したがって安定なポリフッ化 (P T F E 様とも呼ばれる) A C G スライドを製造するための、および検出装置として質量分析法を使用することによるセルラーゼ活性の研究の基材として、グリカンに非共有結合的にアレイ化するこれらのスライドを使用するための、新たな方法が開示されている。さらに、ホスホン酸の特性を使用することによって、酸化アルミニウム表面と容易にキレート化する (c h a l e t e) ことが可能であり、ホスホン酸リンカーを有する炭水化物を使用して (t o r a p i d) 、共有結合性グリカンアレイを生成した。

20

30

【 0 0 7 2 】

実施により、糖を固定化するための、P T F E 様 A C G スライド上の新世代の炭水化物アレイが開発されてきた。A C G スライド表面上に固定化された、光切断型リンカーが組み込まれているマンノースおよびラクトースに M A L D I M S 分析を受けさせて、固定化された糖の分子量を特徴づけした。マンノースの量 (m / z) とそのタンパク質結合の蛍光強度との間の比例的相関が観察された。マンノース - A C G および G l o b o H - A C G スライドのタンパク質結合アッセイにおいて、おそらく材料特性、表面形態、およびタンパク質とスライド表面上に固定化された糖との間の結合部位アーキテクチャのために、ガラススライドよりも高い蛍光強度および感受性が観察された。

40

【 0 0 7 3 】

質量分析法を用いると、このグリカンアレイは、多様な種類のセルラーゼおよびその効率を同定および識別する有効な分析ツールとして使用することができる。酸化アルミニウム・コート・ガラススライドの独自特性によって、ホスホン酸塩の化学的性質によってグリカンを利用し、非共有結合的にまたは共有結合的にアレイ化することが可能となり、グリカンアレイは、マトリクスを使用せずに M S 分光法によって特徴づけできる。

【 0 0 7 4 】

実施により、図 1 は、新規の実験的 A C G スライドおよびその上での実験のための関連する方法を図示する。a) では、光切断型リンカーが組み込まれているマンノースなどの糖誘導体が、実施に従って生成される。b) では、表面上の酸化アルミニウムの層 (< 5

50

nm) およびガラススライド (1 mm) にコートされた純アルミニウムの層 (> 100 nm) を有する ACG スライド (75.5 × 25.4 × 1 mm³) を示す。c) では、ACG スライドを場合により活性化して、糖誘導体を表面上に固定化した (マイクロアレイ化して、手動でスポットした)。スライドは、d) の質量分析法によって糖の分子量の同定を受けて、e) の蛍光スキャナによってその糖-タンパク質結合がさらに評価された。

【0075】

実施によりおよび図 2 に図示するように、光切断型リンカーを用いたマンノース-ACG およびラクトース-ACG の合成のスキームを示す; DIPEA = N, N-ジイソプロピルエチルアミン、DSC = N, N'-炭酸ジスクシンイミジル、HBTU = 2-(1-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 (TBAF = テトラ-n-ブチルアンモニウムフロリド、TEA = トリエチルアミン)。

10

【0076】

実施によりおよび図 15 に図示するように、PTFE 様 ACG スライド上での非共有結合型グリカンアレイの生成の実施のブロック図を示す。実施により、糖は、ポリフッ化末端を介して ACG スライドに可逆的に結合される。そして各種の質量分光実験が実行される。たとえば MS-TOF は糖結合アッセイで実行され、または MS-TOF によるセルラーゼ活性および特異性アッセイが実行され得る。

【0077】

当業者は、本明細書で開示する装置の有用性ならびに本明細書で与える実施例および他の開示に基づく各種の実験方法の両方を同様に、ただちに認識するであろう。このようなデバイスおよび方法は、本開示で明示的に検討される。

20

【実施例】

【0078】

(実施例 1)

ACG スライドの表面特性

厚さが少なくとも 100 nm の純アルミニウム (99.999%) の層をマイクロガラススライド上に各種のコーティング技法、たとえばマグネトロンスパッタリング、カソードアーク蒸発、および熱コーティングによってコートした。これらのスライドは、さらに操作を行わずに使用するか、または使用前に電気的にアノード酸化を行うかのどちらかであった。実施により、図 3 は、ACG スライドの走査電子顕微鏡 (SEM)、原子間力顕微鏡 (AFM)、および X 線光電子分光法 (XPS) によって決定した、その表面形態、組成、およびあらさを示す。図 3 A は、カソードアーク蒸発によって蒸着されたアルミニウムを示す。図 3 B は、マグネトロンスパッタリングによって蒸着されたアルミニウムコーティングを示し、図 3 C は、熱コーティングと、続いての電気化学的アノード酸化によって得たアルミニウム AAO / ACG スライドを示す。

30

【0079】

見てわかるように、カソードアーク蒸発によって産生された ACG スライドは、大型顆粒のコーティングおよび高い表面あらさを有する。表面あらさが高いスライドは、表面濡れ特性に影響を及ぼす。マグネトロンスパッタリングした ACG スライドによって、許容される表面あらさが得られた; しかし、このスライドは、所望のコーティング厚を達成するために長いコーティング時間が必要であり、この研究の初期段階でのみ使用した。熱コート ACG スライドは、比較的短時間で所望のコーティング厚を達成した。このスライドによって、表面あらさが 10 nm の最も平滑な表面が得られた。続いての表面アノード酸化処理によって、ACG スライドではグラフト化のための安定な表面が得られた。アノード酸化したスライド表面のみが、図 4 に示すように、100% 酸化アルミニウムによって覆われていた。

40

【0080】

図 4 に示す実験データの実施により、a) カソードアーク蒸発によって得られた NAO / ACG スライド、b) マグネトロンスパッタリングによって得られた NAO / ACG ス

50

ライド、およびc)熱コーティングと続いての表面アノード酸化によって得られたAAO/ACGスライドの表面組成のXPSスペクトルが示されている。284.5 eVにおけるC(1s)および531 eVにおけるO(1s)の結合エネルギーを使用して、これらのスペクトルの結合エネルギーを校正した。ACGスライドの電気抵抗(両端間距離)は1.6~4 との間で測定された。これらのスライドは、酸化物層が厚くなったときに、非導電性となった。XPSの侵入深さは20~50 であり、本研究での酸化物層(NAOまたはAAOのどちらか)の厚さは、断面積から5 nm以下であることが推定された。

【0081】

ガラススライド上にコートされたアルミニウムの厚さは100 nm未満である必要があるため、基材は可視領域内で不透明のままである。透明基材を使用するとき、蛍光の一部が基材を通過して、スキャナはCy3蛍光の一部のみを検出した。不透明ACGスライドをバックグラウンド基材として使用したときには、装置はさらなる蛍光を検出した。

【0082】

図5は、マイクロガラススライドの光学特性と比較した、ACGスライドの光学特性のデータを示す。半透明ACGスライド上にコートしたアルミニウムの厚さはわずか2、3ナノメートルであり、反射性ACGスライド上のアルミニウムの厚さは約300 nmであった。図5は、マイクロガラススライド、半透明ACGスライド、および全反射(不透明)ACGスライドの光学特性を示す。図5Aでは、1000x、2000x、5000x、10000x、および20000xに希釈した1 mg/mLのCy3-ストレプトアビジンの一連の溶液をこれらのスライドそれぞれにスポットして、空気乾燥させて、アレイWorx蛍光分光計によって分析した。装置には波長540 nmの光源が装備されていた。波長595 nmの蛍光がスライド表面から放出され、検出装置によって検出した。スキャナによって、透明ガラススライドでは5000x希釈までしか蛍光が検出されなかったが、半透明ACGスライドおよび全反射ACGスライドでは、それぞれ10000xおよび20000x倍希釈まで検出され、コートされたアルミニウムの厚さは前者の2、3ナノメートルから後者の100 nm超まで変化した。図5Bは、各基材の実際に計算した蛍光強度が示されている実験データの実施を示す。

【0083】

(実施例2)

表面活性化

スクリーニング実験では、スライド表面活性化について、酸素、アルゴン、ならびに酸素およびアルゴンの混合ガスのプラズマを試験した。残留物(CO、CO₂、およびH₂O)を真空下で除去した。所望の有機化合物のグラフト化の化学的な成功に寄与しているのは、この表面汚染物質の除去である。表面は、全反射減衰フーリエ変換赤外(ATR/FTIR)分光計を使用して測定した。図6に示すように、ATR/FTIRスペクトルは、800~1100 cm⁻¹付近にAl-OHピークを示し、表面が表面洗浄プロセスの後にAl-OHに変換されたことを指摘した。実施により、プラズマ処理は、ACGスライドの表面を洗浄するおよび「軽くさする」のに十分なだけのプラズマエネルギーを使用して、有機汚染物質を除去するが、下にある表面をエッチングすることなくアルミナ層をなお保持している。活性化プロセスは、270~300 mTorrのガス流圧の下で、わずか6.8 W(680 Vにて)のエネルギーを10分間使用することによって正常に完了した。アルゴンプラズマは、後の実験で観察されるように、糖誘導体をグラフトするために最も有効であることが判明した。図6に示すように、800~1100 cm⁻¹領域におけるAl-OHピーク強度は、プラズマ処理の25~99分後に著しく低下した。

【0084】

プラズマ処理後の親水性表面は、おそらく表面上に酸化物層が再形成するために、徐々に疎水性となった。基材表面からのAl-OHの消失をATR/FTIR分光法によって追跡した。800~1100 cm⁻¹領域におけるAl-OHピーク強度は、図6に示すように、数時間にわたって著しく低下した。実施により、ACGスライドをプラズマ処理の直後に、3-アミノプロピルジメチルエトキシシラン(APDMS)によって活性化

する。この活性化された A C G 表面を使用して、反応の次のステップにおいて、P C L を用いてマンノースおよびラクトース糖誘導体を固定化した。

【 0 0 8 5 】

図 7 に示すように、表面の水接触角は表面活性化の間に変化した。図 7 により、A C G スライドの水接触角の代表的な変化を示す。図 7 A は、溶媒で洗浄した A C G スライドを示す；図 7 B は、プラズマで処理した A C G スライドを示す；および図 7 C は、3 - アミノ - プロピルジメチルエトキシシランによって活性化した A C G スライドを示す。これらの試料は、不透明マグネトロンでスパッタリングした A C G スライドを用いた例として作製および測定した。したがって、接触角の測定は、活性化プロセスの完了の迅速な確認手段として使用できる。表面あらしが高い基材は、より小さい接触角を与える傾向がある。

10

【 0 0 8 6 】

(実施例 3)

A C G スライドの活性化表面上に固定化された P C L を有するマンノース

図 2 に示すように、カルボキシ官能基を有する化合物 2 7 を合成した。H B T U および化合物 2 7 の溶液を、A C G スライドの活性化表面に手動でスポットして、マイクロアレイ化した。室温にて一晩で、A C G スライドの表面上でアミド形成が起こった。すべての塩残留物ならびに未結合マンノース誘導体をメタノールおよび脱イオン水によって完全に洗い流した。これらすべての調製の後、質量同定およびタンパク質結合評価のための物質の準備が整っていた。

【 0 0 8 7 】

20

(実施例 4)

A C G スライドにグラフトされた糖誘導体の質量分光分析

マトリクスを含まない多孔性ケイ素表面 (D I O S) によって、試料の断片化が無視できるほどの分子 - イオンピークが生じた。A C G スライドの寸法 (7 5 . 5 × 2 5 . 4 × 1 m m ³) は、u l t r a f l e x 質量分光装置に合致した；スライドは、図 8 および 9 に示すように、処理の各ステップで分析した。

【 0 0 8 8 】

図 8 は、u l t r a f l e x 質量分析法による糖 (マンノース) 誘導体の選択的結合切断および検出の実施スキームを示す。

【 0 0 8 9 】

30

図 9 A および 9 B は、純アルミニウム板および A C G スライドに対する早期実験の M S データを示し、これによりマンノースのピーク強度は比較的低かった。図 9 A は、(A) 9 9 . 9 9 % 純アルミニウム板 (厚さ 1 m m) および (B) カソードアーク蒸発によって形成された A C G スライドにグラフトされた、P C L を有するマンノースの U l t r a f l e x T O F 質量スペクトルを示す。(C) は、A C G スライドのカソードアーク蒸発のバックグラウンド信号を表す。図 9 B は、興味のある m / z 領域における図 9 A の U l t r a f l e x T O F 質量スペクトルを示す。

【 0 0 9 0 】

図 9 C は、興味のある m / z 領域における、カソードアーク蒸発によって形成された A C G スライド上にグラフトされた、P C L を有するマンノースの T O F 質量スペクトルを示す。さらに詳細には、図 9 C は、表面活性化条件が最適化され、マンノース誘導体のピーク強度が高かった、カソードアーク蒸発によって産生された A C G スライドの M S データを示す。基材によって m / z 4 1 5 および 4 5 1 における大きいバックグラウンドピークが与えられ (図 9 A および 9 C)、マンノース誘導体 (2 6 5) の分子量は、プロトン (m / z 2 6 6) イオン、リチウム (m / z 2 7 2) イオン、ナトリウム (m / z 2 8 8) イオン、および時にはカリウム (m / z 3 0 4) イオンを用いたその付加体によってきわめて容易に検出された。

40

【 0 0 9 1 】

高真空下では、U V エキシマ・レーザー・エネルギーが酸化アルミニウムクラスタを揮発させて気相とすること；紫外光子イオン化によって、比較的軽量の酸化アルミニウムク

50

ラスタを用いてわずかな質量スペクトルが生じることが理論化される。真空下での気相中の酸化物クラスタの大部分が Al_2O_3 から成るが、酸化アルミニウムクラスタが多く別の形でも存在することができる。図9Aおよび9Cにおいて、 m/z 451および415で生じた大きいバックグラウンドピークは、酸化物クラスタ $[(Al_2O_3)_4 + Li]^+$ および $[Al_2O_3]^+$ に属することが推測される。

【0092】

(実施例5)

マンノースの含有量とそのタンパク質結合能力との半定量的比較

同じ種類のACGスライドに対するプラズマガス処理の最適化を、固定化された糖-タンパク質結合の蛍光強度によって評価した。図10は、プラズマ洗浄に使用したガスの種類を選択することによって得た。カソードアーク蒸発によって産生されたACGスライドをアミノシラングラフト化の前に、酸素、アルゴン、または酸素およびアルゴン・プラズマ・ガスの混合物に暴露させた。マンノース誘導体(糖複合体溶液、160mm)の10×10ブロック(100スポット)は、基材表面へマイクロアレイ化された。糖複合体溶液も、特に質量同定のために、これらの各スライド(スポット当り1mL)に手動でスポットした。したがって、これらのスライドは、最初に質量分析法によって分析して、次にビオチン化ConA結合、続いてCy3タグ化ストレプトアビジン検出を受けさせた。図10Aa)~d)は、アレイ化されたスライドのタンパク質結合アッセイを示す;図10Cは、基材の蛍光強度対市販のガラススライドの蛍光強度を示す。図5に示す強度差は、基材の物理的特性の絶対効果を示す。図10Cの強度差は、特定の基材の物理的特性および固定化された糖とその結合タンパク質との間の結合部位アーキテクチャの両方の効果から生じた。どちらのデータのセットも、ACGスライド表面のアルゴンプラズマ処理によって、マンノースグラフト化にとって、それゆえマンノース-タンパク質結合にとって最良の基材が産生されたことを指摘している。

【0093】

図10Aは、APDME Sグラフト化の前のa)酸素プラズマ(Al-1)、b)アルゴンプラズマ(Al-2)、ならびにc)酸素およびアルゴンプラズマの混合物(Al-3)の処理時の、カソードアーク蒸発によって形成されたACGスライドのタンパク質結合アッセイを示す。d)では、Corning Glass製の市販のNH₂ガラススライド(#40004)のタンパク質結合アッセイを示す。図10Bは、糖の質量同定のためのMALDI質量スペクトルからのシグナル強度を示す。各物質から観察された最大強度スペクトル(70%フルエンス)を使用して、図10Bのスペクトルを生成した。図10Cは、アレイWorx蛍光分光計によって計算した標準誤差を含めた、a)~d)の蛍光強度を示す。アレイは、糖複合体の同じ水溶液のブロック当り10×10(100)個のスポットを用いて、スライド当り4個のブロックとして作製した。各スライドから最良のブロックのみを選択した(b)~d)に示すように);蛍光強度計算のために、最良のブロックの中で大きなスポットを除去した。

【0094】

固定化されたマンノースの含有量とマンノース-タンパク質結合の能力との半定量的比較を図11および12に示す。2種類の異なるスライド基材、すなわちNH₂官能化ガラススライドおよびアルミニウムで熱コートした後に、表面アノード酸化処理を行ったAPDME S活性化NH₂-ACGスライドを、PCLが組み込まれたマンノースを固定化するために使用した。マンノース-ACGスライドは、最初に分子量同定のためのMS分析を、次にマンノース-ガラススライドと共にタンパク質結合評価を受けさせた。図11は、2種類の異なるスライド基材から得たタンパク質結合データを示す。マンノース-ACGスライド(図11b)がガラススライド(図11a)よりも、Cy3の高い蛍光を高い感受性と共に示したことが、明確に示されている。ACGスライドによる蛍光強度を計算して、図12Bに示す。

【0095】

図11の蛍光強度の相違は、スライド基材の物理的特性の相違ならびにマンノース-C

10

20

30

40

50

on AおよびCy3 - ストレプトアビジンの結合度の相違によって引き起こされた。この相違は次に、基材表面上でのマンノースのグラフト密度の変動を示唆している。最近の報告により、基材表面上のマンノースの密度が約100 離れているときに、Con Aとマンノースとの間の相互作用が弱くなり、それゆえ多価相互作用の程度が反映されることが指摘された。

【0096】

同じマンノース - ACGスライドのMS分析(図11b)によって、親ピーク(m/z 265)ならびにプロトン(m/z 266)付加体およびリチウム(m/z 272)付加体が示された。このスライドを分析する際に、それぞれ手動でスポットした(段階希釈の)試料を、測定1回当たり500ショットで6回測定した。標準偏差を含む平均ピーク強度を図12Aに示し、図ではグラフト化のための溶液の濃度が15.6 nMまで希釈されたときでも、MSがなお糖を同定できることが明示されている。MS(図12A)によって測定したシグナル強度を図12Bの蛍光強度とさらに比較する。これら2つの異なる測定値の下降傾向は似ている。明らかに、固定化された糖の量がそのタンパク質結合能力を反映している。

10

【0097】

図11は、ガラススライドおよびACGスライドに固定化されたマンノースの蛍光タグ化タンパク質結合アッセイの実施の写真である。NH₂官能化ガラススライドは、Corning Glassから購入した(#40004)。ACGスライドを純アルミニウムで熱コートして、次に電気化学的にアノード酸化した。10×6(60)スポットのブロックでアレイを作製した。糖 - HB TU複合体の溶液(156 mM)を100×および10000×希釈で調製した。各溶液をグラフト化のためのブロック内の2個のカラム(20スポット)にスポットした。基材a)は、最初の2個のカラム(糖複合体の溶液)のみで蛍光を示すが、基材b)は、6番目のカラム(糖複合体の開始溶液の10000×希釈)までシグナルを示す。

20

【0098】

図12は、ACGスライドにグラフトしたPCLを有するマンノースのultrafl ex TOF質量スペクトルのピーク強度と、熱コーティングと、続いてのスライド表面での電気化学的アノード酸化とによって形成されたマンノース - タンパク質結合ACGスライドの蛍光強度との比較を示す、実験データの実施のグラフである。マンノース溶液の濃度は、156 mMから102(1.56 mM)および104×希釈(15.6 nM)まで変化した。図12Aでは、マンノース質量分光付加体の平均ピーク強度が m/z 265.1[M]⁺、266.1[M+1]⁺、および272.1[M+Li]⁺で得られた。図12Bでは、蛍光タグ化タンパク質 - 結合アッセイから得た同じマンノースACGスライド試料の対応する蛍光強度を示す。

30

【0099】

(実施例6)

炭水化物マイクロアレイでのACGスライドの有用性

図13Aに示すように、図2に示す合成経路を使用することによって、PCLを有するラクトースもACGスライドに固定化した。本試料のMS分析で見られるように(図13B)、415および451におけるわずかな酸化アルミニウムのピークから生じる干渉が発生した。しかし、ラクトース誘導体の分子量(m/z 427)は、プロトン(m/z 428)、ナトリウム(m/z 450)、およびカリウム(m/z 466)イオンとのその付加体によって、なお明らかに同定できる。

40

【0100】

この新たに製造した基材をさらに利用するために、NH₂ - ACG表面を、DMFおよびジイソプロピルエチルアミン中のスベリン酸ジスクシンイミジル(DSS)を用いた処理による、NHS - ACGへの変換によって修飾した。ガラススライドを参照として、アミン官能基を有するGlobo H誘導体をNHS - ACGスライド(図13C)上にアレイ化して、VK9(マウスIgG抗Globo Hモノクローナル抗体)タンパク質結

50

合評価を受けさせた。図13Dおよび13Eの結果は、ACGスライドが3つの試料すべてで最高の蛍光強度を示すことを指摘している。

【0101】

図13Aは、PCLを有するラクトース-ACGスライドを示す。図13Bは、PCLを有するラクトース-ACGスライドから得たUltraflex TOF質量スペクトルを示す。図13Cは、PCLのないGlobo H-ACGスライドを示す。図13Dは、NHS-ガラススライド、NH₂修飾ガラススライド(Corning #40004)、およびNHS-ACGスライドに固定化したGlobo Hの蛍光タグ化タンパク質結合アッセイを示す。最後に図13Eは、GenePix 4000蛍光スキャナを用いて図13Dから計算した対応する蛍光強度を示す。

10

【0102】

(実施例7)

蛍光強度に影響を及ぼす因子 - 基材の特性および表面形態

基材の光学特性は、蛍光強度に明らかに影響を及ぼす。蛍光(Cy3)は、タンパク質結合アッセイで唯一の光源である。ガラスならびに多孔性ケイ素はどちらも、光を異なる程度で通過させて反射する。これに対して、アルミニウムコートガラスは、ガラスが完全に不透明となり、光源から供給される光の「ムダ」を最小限に抑えるように製造することができる。

【0103】

基材の表面形態は、糖を固定化するときのグラフト化密度に影響を及ぼすことがある。NAO表面は、わずが75%の酸化物含有率を示した。これに対して、AAO表面は100%酸化アルミニウムを含有し、それゆえ安定な表面を与えて、アッセイのための最終スライドの安定な固定化密度を生じさせる。

20

【0104】

基材の安定性は、表面が化学処理される方法によっても影響を及ぼされ得る。一例は架橋アミンを有する表面对アミン官能基の単層を有する表面であり、このどちらもACGスライドを3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)または3-アミノプロピルジメチルエトキシシラン(APDMES)のどちらかで活性化することによって作製した。ACGスライド表面の各種の化学処理は、調査中である。

【0105】

(実施例8)

蛍光強度に影響を及ぼす因子 - 結合部位アーキテクチャ/タンパク質と基材表面上に固定化された糖との間の相互作用

本出願人らの実験条件下では、コンカナバリンAおよびストレプトアビジンはどちらも、その4級構造のテトラマーとして存在する。マンノースのConAに対する寸法の比は、約1:400である(265対104kDaのその分子量に相当する)。幾何的な制約のために、表面でのマンノース結合に利用できる結合部位は、ビオチン化ConAのテトラマー1個当りわずか2個である。高密度マンノースアレイ表面では、各ConAテトラマーは2個のマンノース分子を結合して、2個のマンノース分子はおそらく、互いにそれほど離れずに表面上にグラフトされるであろう。マンノース誘導体の鎖長が長くなるので、グラフト化密度および固定化された糖-タンパク質結合の量が両方が上昇するときに、グラフトされたマンノースは基材からさらに遠くなり、ランダム度の高い相互作用が生じ得る。さらに、ストレプトアビジン-Cy3複合体のビオチン化ConAへの可撓性の結合が可能となる。同様の幾何的な制約は、Globo H、IgGモノクローナル抗体VK9(マウスから)、およびそのヤギ抗マウスIgGタンパク質についても例証することができる。糖とタンパク質との間の結合部位アーキテクチャは、蛍光タグ化タンパク質の密度に、それゆえ糖-タンパク質結合の蛍光強度に影響を及ぼすことがある。

30

40

【0106】

糖の表面固定化を研究する1つの目的は、生物学的実体の細胞表面で起こるリガンド相互作用、たとえば正常および悪性細胞の表面上での糖抗原Globo Hの存在または過

50

剰発現を模倣することである。糖抗原は、細胞表面に過剰に存在するときに、大きな多価炭水化物-タンパク質相互作用を生じさせて、生体に備わっている生物学的機能に多大な影響を与えることがある。本研究は、このような生体系のより正確な定量的測定および比較を提供する。

【0107】

(実施例9)

PTFE様ACGスライドの調製

PTFE様ACGスライドを調製するために、トリエトキシシラン1およびホスホン酸誘導体3を合成して、酸化アルミニウム表面との反応に使用した。シランベースのスライドの製造には、2ステップの化学反応が含まれる。第1のステップは、化合物1(図14)をグラフト化試薬として使用することによって、酸化アルミニウム表面をアミノ基に官能化することであった。このステップは、副反応を避けるために水分を含まない環境で実施した。第2のステップでは、NHS活性化ポリフルオロ炭化水素化合物2(図14)とスライド表面上のアミノ基との間でアミド結合形成が起きた。これに対して、ホスホン酸ベースのPTFE様ACGスライドを1ステップ化学反応で作製した。3の水溶液を洗浄した酸化アルミニウム表面と超音波処理によって反応させると、表面上に共有結合されたパーフルオロホスホナートの単層が形成された。ホスホン酸の共有結合形成は、図28Bに示すように、FTIRおよび接触角によって確認できる。これらの2種類のスライドをバックグラウンド試験のためにMS-TOF分光法で確認すると、どちらもスライドのバックグラウンドの明瞭なベースラインを示した。本出願人らの以前のACGスライドで確認された望ましくないわずかな酸化アルミニウムピークは、本方法では見られなかった(図26および27を参照)。

【0108】

図28Aに図示するように、純粋化合物3(HDFDPA、3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-ヘプタデカフルオロデシルホスホン酸)のFTIRスペクトルおよびACG表面グラフト化合物3のFTIRスペクトル。図28Bは、ホスホン化ACGスライド表面の水接触角(〜120°)画像を図示する。

【0109】

図14に示すように、化合物は以下の通りである：アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES、1)；N-スクシンイミジル4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-ヘプタデカフルオロウンデシルカーボネート2；(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-ヘプタデカフルオロデシル)ホスホン酸(HDFDPA、3)、4~10は、マンノース(4)、ラクトース(5)、Gb5(6)、Globo H(7)、セロピオース(8)、セロトリオース(cellobiose)(9)およびセロテトラオース(10)のポリフッ化誘導体である。

【0110】

(実施例10)

PTFE様ACGスライド上での非共有結合型グリカンアレイの生成

この有望な結果を得て、リン酸ベースのスライドを使用して、図15に概略を示した実験手順のためのグリカンアレイを生成した。図16に示すスキームによって図示されるように、アミノリンカー11を有するマンノースを化合物2と反応させて、ポリフッ化(-C₈F₁₇)末端4を合成して、モデル化合物として使用した。この糖誘導体の溶液をPTFE様ACGスライド表面上にロボットによってスポットした。インキュベーションの後、スライドを蒸留水で繰り返しすすいで、MS-TOF分析を受けさせた。非常に明瞭な質量スペクトルが得られた。この単層の質量スペクトルによって、それぞれナトリウム付加体およびカリウム付加体の806および822のピークが明らかになる。MS分析の後に、Alexa 488標識コンカナバリンAをタンパク質源として用いて、同じスライドをタンパク質結合分析に使用した。この種のグリカンアレイの適用範囲をさらに拡大

するために、以前本出願人らの研究室で開始物質として合成した化合物12～14の使用。ポリフッ化G b 5 5、ならびにラクトース6およびG l o b o H 7を図16に図示するように合成して、本明細書で開示した方法による質量分析およびタンパク質結合アッセイの両方のために、P T F E様A C Gスライド表面上にこれらを固定化した。

【0111】

さらなるマトリクスを加えない、図17Aに示すデータによって図示された実験の実施で示すように、G l o b o - Hなどの不安定な糖の使用によっても、シグナルの断片化は見出されなかった。図17Aは、P T F E様A C Gスライドにそのナトリウム付加体 [M + N a] ⁺として固定化されたポリフッ化G l o b o H 7 (M W . 1 6 0 4 . 4 0)、G b 5 5 (M W . 1 4 5 8 . 3 9) およびラクトース6 (M W . 9 3 2 . 2 1) の M A L D I 質量分光分析データをそれぞれ1627.44、1481.39、および954.39に示す。マトリクスを加えないフルエンス率は12%である。

10

【0112】

図17Bの実験データの実施により、これらのグリカンアレイはその糖 - タンパク質結合パターンを維持した。図17Bは、G l o b o H / V K 9 / 抗V K 9 - C y 3のタンパク質結合アッセイである。図17Cは、G b 5 / 抗S S E A 3 - A 4 8 8のタンパク質結合アッセイである。マトリクスは、過フッ化G l o b o H (左4カラム)、ラクトース(5および6番目のカラム、陰性対照として)、およびG b 5 (右4カラム)の10×10(100スポット)アレイであった。

20

【0113】

この新たな表面に対するレーザーフルエンス率およびマトリクスの効果も調べた。不安定な炭水化物G l o b o Hを一例とすると、M A L D I - M Sで使用されるときにG l o b o Hはフコース部分が消失することが多い。質量分析法を検出装置として使用することによって、結果を表1に示した。マトリクスを加えることなく、非常に低いフルエンス率(9%)にて高いシグナル対ノイズ(S/N)比(22)が観察され、この低いレーザーフルエンス率の下では、シグナルの断片化は見出されなかった。フルエンス率が10%まで上昇するとき、S/N比は断片化を伴わずに40まで向上する。図18は、マトリクスを加えない各種のレーザーフルエンス条件下で得られた質量分析法データを図示する。

【0114】

図19は、同じ実験であるが、マトリクスを加えたものを図示する。D H Bをマトリクスとして加えて、A C G表面に対するマトリクスの効果を確認した。フルエンス率が11%であるとき、S/Nはわずか7.3である。フルエンス率を13%まで上昇させるためには、S/Nは61%であり、6%のシグナル断片化を有する。したがってD H Bマトリクスは、低いレーザーフルエンス率が使用されるときに、S/Nシグナルを上昇させない。しかし、表1に示すようにフルエンス率が25%を超えると、D H Bマトリクスは、S/Nを上昇させて、断片化を減少させる役割を果たすことができる。

30

【0115】

【表 1】

マトリクス支援 脱離/イオン化			マトリクスフリー 脱離/イオン化		
フルエンス率	GH S/N	Frag. S/N	フルエンス率	GH S/N	Frag. S/N
11%	7.3	0	9%	22	0
13%	61	6	10%	40	0
14%	157	13	12%	218	5
15%	316	25	16%	275	10
18%	1690	87	18%	375	17
19%	1956	108	19%	741	64
25%	3128	168	25%	2184	356
35%	1445	125	35%	1514	373

表1: マトリクスを加えたまたは加えない、異なるレーザーフルエンス率での
Globo HのS/N比(フルエンス:スライド表面に印加したレーザー出力
(またはフルエンス率);GH S/N:globo Hのシグナル/ノイズ比;Frag.
S/N:globo Hの断片化のピークのシグナル/ノイズ比)

(実施例 11) セルラーゼ活性の研究

以前の研究から、PTFE様ACGスライドに固定化したポリフッ化炭水化物は、低いレーザーエネルギーによって容易にイオン化/脱離される。したがって断片化のない高いS/N質量スペクトルが得られ、本開示のデバイスをグリコシダーゼ特異性および活性研究に好適なものとする。

【0116】

固定化されたポリフッ化セロピオース8の酵素加水分解(図14を参照)をインサイチュでホスホン酸スライド表面にて最初の実施した。3つの市販のセルラーゼである、アスペルギルス・ニガー(A. Niger)、トリコデルマ・リーセイ(T. Reesei)、およびトリコデルマ・ビリデ(T. Viride)を酢酸ナトリウム(25mM)緩衝溶液(pH5)によって別々に5U/mLで調製して、Fast Frame反応チャンバを使用して16ウェルに分割されている官能化スライド上に装填した。比較のために、酵素溶液の一定分量(100μL)をエッペンドルフ管内のフッ化セロピオースの溶液(0.5mMの100μL)に添加して、溶液中で酵素加水分解反応を実施した。反応後、これを同じスライドの空のウェルに移した。各ウェルを別々に、脱イオン水で3回すすいで、高真空下でスライドを再度乾燥させてから、MS-TOF分析を受けさせた。

【0117】

MS-TOF分析では、明瞭なバックグラウンドベースラインにより、各試料の加水分解成分のパーセンテージの計算が可能となった。図20のMS-TOFの結果に示すように、加水分解された生成物のパーセンテージを各スペクトルのピーク強度から計算する。図20に示す実験データの実施に従って、図20Aの溶解状態の、および図20BのPTFE様ACGスライドに固定化された、ポリフッ化セロピオースの酵素加水分解のMS-TOFデータ。対照は、(a)にて酵素なしで行った同じ実験条件である; (b)、(c)、および(d)は、A. Niger(b)、T. Reesei(c)、およびT. Viride(d)によるセルラーゼタンパク質を用いた実験条件である。

【0118】

これらの結果(図20)は、ACGスライド表面での加水分解の、溶液状態での加水分解に対する割合を示す。A. Niger、T. Reesei、およびT. Virideによるセルラーゼとそれぞれ反応させると、ACGスライド上の100%、69%、および77%の加水分解されていないセロピオースと比較して、溶解状態の加水分解されていないセロピオースは64%、7%、および3%であった(表2)。

【0119】

【表2】

	トリオース	ピオース	グルコース	F末端
<i>A. Niger</i>	18/0	64/1	18/0	0/0
<i>T. Reesei</i>	0/0	7/69	93/25	0/7
<i>T. Viride</i>	0/0	3/77	58/17	38/6

表2: ポリフッ化セロピオース8の酵素加水分解、パーセンテージは、溶解状態の/ACGスライド上の反応の加水分解パターンを示した。

図21Aに示す実験データの実施により、セロトリオース誘導体の加水分解された断片はPTFE様ACGスライド表面上に残存していた。図21Aは、考えられる各種誘導体をその分子量と共に示す。図21Bは、酵素を含まない対照操作の(a)、A. Niger(b)、T. Reesei(c)、およびA. ビリデ(d)によるセルラーゼタンパク質を用いた、ポリフッ化セロトリオースの酵素加水分解の実験MS-TOFデータの実施を示す。

【0120】

T. Virideによる酵素は、溶解状態のセロピオースに対して最も良好に機能して、スライド上の3つの酵素源の中で、T. Reeseiによる酵素は2糖を最も効果的に加水分解した。溶解状態では、全体の反応によって $1116.3[M+Na]^+$ のm/zのナトリウム付加体として検出されるセロトリオース(MW1093)が8%産生されたので、A. Nigerによる酵素はシンターゼとしても作用すると思われる。A. Nigerによる酵素は、長さ5グルコース単位を一度に切断する、代表的なエンド型セルロースとして特徴づけられた。その酵素はセロピオースもp-ニトロフェニル-D-グルコシドも加水分解しなかった。作用機序をさらに理解するために、ポリフッ化(-C₈F₁₇)セロトリオース9(図14)に溶解状態で酵素加水分解を受けさせた。

【0121】

同じ分析手順を使用すると、結果(図21B)によって、3つの異なる種による酵素の中でT. Reeseiによる酵素が、セロトリオース基質を最も効率的に加水分解することが指摘された。A. Nigerでは、図20および図21に示した結果によって、この酵素がセロピオースまたはセロトリオースの加水分解で十分に機能しないことが指摘された。しかし溶解状態では、酵素は、ポリフッ化セロピオース8、および1グルコース単位を有するセロトリオース9を一度に、非常に低い反応速度で加水分解した。この市販の酵素は純粋でないため、この現象は、混合物中の少量の-グリコシダーゼの汚染によるものであり得る。

【0122】

T. Virideによるセルラーゼは、新聞材料を効果的に分解することができ、T. Reeseiはセルロースの結晶形を加水分解することができる。図20のデータによって指摘されるように、一般にACGスライド表面上での酵素加水分解は、溶解状態の酵素加水分解よりも部位特異的であるが、はるかに低速である。

【0123】

(実施例12)

セルラーゼ特異性の研究およびグリカンアレイを質量分析法と併用することによるセルラーゼの種類定義

セルラーゼは通常、その機能に基づいて複数のサブクラスのアイソザイムに分類される

：セロビオースを個別のグルコース分子に切断する 1, 4 - - グルコシダーゼ [E C 3 . 2 . 1 . 7 4]、セルロース鎖の末端からセロビオース単位を切断する、エキソグルカナーゼ (1, 4 - - D - グルカンセロビオヒドロラーゼ [E C 3 . 2 . 1 . 9 1])、および鎖を内部位置でランダムに切断して、エキソグルカナーゼの新たな末端を生成する、エンドグルカナーゼ (1, 4 - - D - グルカングルカノヒドロラーゼ [E C 3 . 2 . 1 . 6])。MUF - グルコシドの加水分解の生成物の H P L C 分析は、これらの精製された酵素の加水分解特異性を決定するために使用されることが多い。上の結果から、本開示のデバイスおよび方法は、多様な種類のセルラーゼの特異性を研究するための別のプラットフォームとなる。

【 0 1 2 4 】

検証するために、わずかに変更を加えた、文献で周知の方法に従って、エキソグルカナーゼ (L 3) およびエンドグルカナーゼ (4 4 A) を調製した。最初に、基質 8、9 および 1 0 を使用して、精製した酵素による酵素加水分解反応を溶解状態で行った。反応の完了時に、溶解混合物を P T F E 様 A C G スライドに移し、M S - T O F アッセイを受けさせる前に以前と同じ洗浄手順を使用することによって調製した。

【 0 1 2 5 】

図 2 2 は、溶解状態のポリフッ化セロビオース (A)、ポリフッ化セロトリオース (B) およびポリフッ化セロテトラオース (C) の酵素加水分解の M S - T O F データを示す。各炭水化物に対して、特異的酵素を添加した：(a) は酵素を含まない対照操作であり、(b) はエキソグルカナーゼ L 3 であり、(c) はエンドグルカナーゼ 4 4 A である。図 2 3 は、A C G ガラススライド上のポリフッ化セロビオース (A)、ポリフッ化セロトリオース (B) およびポリフッ化セロテトラオース (C) の酵素加水分解の M S - T O F データを示す。各炭水化物に対して、特異的酵素を添加した：(a) は酵素を含まない対照操作であり、(b) はエキソグルカナーゼ L 3 であり、(c) はエンドグルカナーゼ 4 4 A である。

【 0 1 2 6 】

図 2 2 に示す実験データの実施により、エキソグルカナーゼ L 3 は、エキソグルカナーゼの定義と一致して、基質 8 の末端からセロビオース単位を低速で切断し、化合物 9 または 1 0 が基質であるときにはセロビオースを急速に切断する。エンドグルカナーゼ 4 4 A は、セロビオース基質 8 またはセロトリオース基質 9 を受容することはできないが、セロテトラオース基質 1 0 の 3 糖または 4 糖単位を切断する。

【 0 1 2 7 】

比較のために、そして図 2 3 に示した実施によって図示されるように、基質 8、9、および 1 0 を P T F E 様 A C G 表面上に固定化して、セルラーゼ加水分解を表面上で直接行い、同じ洗浄手順の後に、これらのスライドに M S - T O F アッセイを受けさせた。図 2 0 B に示すように、エキソグルカナーゼ L 3 は、2 4 時間のインキュベーションの後にセロビオース基質 8 の一部のみを切断して、基質が化合物 9 または 1 0 であるときにはセロビオースを急速に切断した。エンドグルカナーゼ 4 4 A は、化合物 8 または 9 を基質として受容できない。しかしエンドグルカナーゼは、基質が化合物 1 0 であるときに、セロテトラオースを急速に切断する。溶解状態での加水分解反応操作とは対照的に、エンドグルカナーゼ 4 4 A はセロテトラオースを一度に切断して、セロテトラオース 1 0 が基質であるときにはセロトリオースを切断しなかった。上の結果から、セロテトラオース基質 1 0 は、行った実験で P T F E 様 A C G 表面上にアレイを生成するのに最良の炭水化物であった。このアレイを使用することによって、未知のセルラーゼの活性および特異性が検査され得る。

【 0 1 2 8 】

(実施例 1 3)

P T F E 様 A C G スライド上での共有結合型グリカンアレイの生成

グリカンアレイのための複数の官能化ガラススライド、たとえば：アミン、カルボキシルート、N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S)、アビジン、エポキシ、アルデヒド、

10

20

30

40

50

キレート化ニッケル基などでコートしたガラススライドが市販されている。これらの表面上にグリカンアレイを生成するとき、好適な緩衝剤ならびに反復される遮断および洗浄ステップが必要である。実施により、ホスホン酸官能基を有する基質はACGスライド上でのキレート化が容易であり、反復される洗浄ステップに耐えることができる。したがって、有効なグリカンアレイ調製のための新規方法が本明細書で開示される。

【0129】

ホスホン酸化合物21を有するマンノースは、図24に図示したスキームによって合成された。市販の化合物15は、TBDP S基によって保護されて、次にアルブソフ反応を使用することによって、臭素がホスホン酸塩に変化した。脱シリル化の後、次のグリコシル化反応のための化合物18が得られた。BF₃・OEt₂をプロモータとして使用する

10

【0130】

化合物21をメタノールに溶解させた。この糖誘導体の溶液をPTFE様ACGスライド表面上にロボットによってスポットした。インキュベーションの後、遮断せずに、スライドを蒸留水で反復してすすぎ、Alexa 488標識コンカナバリンAをタンパク質源として使用することによって、タンパク質結合分析に使用した。各種のインキュベーション時間を評価して、糖誘導体がACGスライド上にキレート化するには15分で十分であることを判断した。各種濃度の化合物21をACGスライド上にスポットすると、結果は図25に図示するように、ACGスライドはNHSコートガラススライドに匹敵していた。

20

【0131】

(実施例14)

物質および方法

すべての化学薬品および無水溶媒は、販売元から購入して、さらに精製せずに使用した。グリコシル化のためのモレキュラーシーブ(MS)はAW-300(Aldrich)であった。FluoroFlash(登録商標)SPEカートリッジは、Sigmaより購入した。反応は、EMシリカゲル60 F254プレートによる分析用薄層クロマトグラフィー(TLC)を用いて監視して、UV(254nm)の下でおよび/またはKMnO₄もしくはp-アニスアルデヒドで染色することによって描出した。¹H NMRスペクトルは、Bruker ULTRASHIELD-600 PLUS(600MHz)分光計で298Kにて記録した。化学シフト(ppmでの)は、CDCl₃(δ = 7.24 ppm)の内部標準シグナルに従って割り当てた。¹³C NMRスペクトルは、Bruker ULTRASHIELD-600 PLUS分光計を用いて得て、CDCl₃(δ = 77.00 ppm)によって校正した。カップリング定数(J)は、ヘルツ(Hz)で報告する。分裂パターンは、以下の省略形を使用することによって説明する：s、1重線；brs、幅広1重線、2重線；t、3重線；m、多重線。

30

【0132】

基材物質

マイクロガラススライド(75.5 × 25.4 × 1 mm³)を濃H₂SO₄および30% H₂O₂(70:30 v/v)の混合物であるピラニア溶液中で、120℃にて30分間洗浄して、大量の脱イオン水によってpH7まですすぎ、高品質の窒素ガスによってパージ乾燥させた。高純度アルミニウムターゲット(純度99.999%)は、Summit-Tech Resource Corp.(Hsin-Chu, Taiwan)から入手した。これらの原料は、マグネトロンスパッタリング、カソードアーク蒸発、および熱蒸発などの各種のコーティング技法によるACCスライドの製造のために、ベンダーのCheng-Jen Corp.(Kao-Hsiung, Taiwan)およびYujay-Tech Corp.(Chin-Ju, Taiwan)に提供された。製造されたACGスライドは、直接使用するか、または20Vの直流電流(Keithley 24

40

50

00 Model)で48 にて、0.3 Mシュウ酸水溶液中で60~90秒間、アノード酸化するかのどちらかであった。製造したACGスライドの表面特性を図1に示す。表面を金でスパッタリングして、SEM(FEI XL30 SFE G, FEI Company)によって検査した。アルミニウムコーティングの表面あらさおよび厚さをAFM(Dimension 3100 Veeco Instruments, Inc.)によって測定した。これらのスライドの表面組成は、超高真空(1×10^{-10} Torr)下で単色Al X線(1486.6 eV)源を備えたOmicron ESCA分光計を使用することによって、XPSで分析した。すべてのスペクトルを284.5 eVの炭素1sスペクトルおよび532 eVの酸素1sスペクトルによって校正した。

【0133】

NH₂-ACGスライドの製造

ACGスライドは、アセトンおよび水を連続的に用いてマルチシェーカー(FMS 2 FINEPCR)で2~3分間洗浄して、高純度窒素ガスによってパージ乾燥させ、100 の乾燥器で10~15分間さらに乾燥させた。表面活性化は、プラズマクリーナー(Harrick PDC 32G、200~600mTorr)によって酸素、アルゴン、または混合ガスを用いて室温にて10分間行った。プラズマ処理の直後に、APDMES(0.8 mL)を表面上に(バルクで)均一に配置して、密閉したペトリ皿で覆い、ホットプレート上で直接、658 にて40分から1時間加熱した。反応が完了したときに、試料スライドを完全にすすぎ、メタノール中で3分間超音波処理して(出力20%)、高純度窒素ガスによってパージ乾燥させた。アミノシラングラフト基材を有する表面を、マンノース誘導体化合物27およびHBTUを用いたインサイチューでのアミド結合形成に使用した。市販のNH₂ガラススライド(#40004、Corning Inc.製)をタンパク質結合の比較のために使用した。

【0134】

NHS-ACGスライドの製造

熱蒸発によってコートしたACGスライドを0.2 Mシュウ酸中で90秒間アノード酸化して、脱イオン水ですすぎ、通常通りアルゴンプラズマで活性化した。汚染物質を一切含まない状態で、スライドは、設計されたPTFE密閉熱伝達型反応セル内で組み立てられて、セルにAPTES(1 mL、バルク)をただちに添加した。PTFEセルをガラス板で覆った。水分を含まない条件下で、セルを658 にて30分間加熱して、塩化メチレンおよびメタノールによって完全にすすいだ。次にスライドを窒素ガスによってパージ乾燥させた。事前に、DSS(0.5 g; CAS #68528-80-30)のDMF(4 mL)およびジイソプロピルエチルアミン(220 mL)による飽和溶液を調製した。この飽和溶液の一部(1.33 mL)を各反応セルに添加した。NHS-ACGスライドを、室温にて絶えず渦動させながら3時間以内に形成した。スライドを酢酸エチルで完全にすすいで、高品質窒素ガスによってパージ乾燥させた。PTFEセルを乾燥させて分解した後に、Globo H-NH₂マイクロアレイのためのスライドの準備が整っていた。

【0135】

ACGスライドの調製 - シランベースPTFE様ACGスライドの製造

水分を含まない条件下で、アルゴンプラズマ活性化ACGスライドをバルクの3-アミノプロピルトリエチルシランと65 にて30分間反応させて、次に塩化メチレンで完全に洗浄し、大気条件下で窒素ガスによって乾燥させた。シラン化ACGスライドをN-スクシンイミジル(succinimidyl)3-パーフルオロオクチルプロピオネート(0.05 wt%)溶液の溶媒混合物(DMF/IPA/DIPEA 12/6/1体積比)に、室温にて2時間浸漬した。反応後、スライドをIPAで完全にすすいで、窒素ガスによってパージ乾燥させた。スライド製造の完了について、水接触角(115°)測定を迅速に確認した。

【0136】

ACGスライドの調製 - ホスホン酸ベースPTFE様ACGスライドの製造

アルミニウム・コート・ガラススライドをアセトンおよび水で3回洗浄して、次に乾燥した清浄空気によって乾燥させた。次に清浄なスライドを酸素プラズマ(Harrick plasma, PDC-32G)によって15分間活性化および洗浄した。活性化の後、スライドを3, 3, 4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 10-ヘプタデカフルオロデシルホスホン酸(HDFDPA)3溶液(1M、H₂O中65% 2-プロパノール、pH = 6.17)にただちに浸漬した。溶液を弱い超音波処理(50W)によって15分間振動させた。超音波処理の後、スライドを溶液から取り出し、次に別の純2-プロパノール溶液中に15分間浸漬した。スライド表面上の過剰なホスホン酸の除去を促進するために、溶液も超音波処理した。スライドを乾燥窒素および減圧によって乾燥させた。反応の完了時に、スライドをIPAで完全にすすいで、窒素パーズ乾燥させた。スライド製造の完了に関して、水接触角(115°)測定を迅速に確認した。

10

【0137】

基準対照 NHS - ガラススライド

NHS - ガラススライド(SCHOTT製、North America)を直接使用した。NH₂ガラススライド(#40004、Corning, Inc.製)は、NHS-ACGスライドと同じ調製方法を使用して修飾した。スライドは、設計されたPTFE密閉熱伝達型反応セル内で組み立てられた。飽和DSS溶液の一部(1.33mL)をNH₂-ガラス表面との反応のために添加した。室温にて3時間絶えず渦動させた後、スライドを酢酸エチルで完全にすすぎ、高品質窒素ガスによってパーズ乾燥させた。PTFEセルを乾燥させて分解した後に、Globo H-NH₂マイクロアレイのためのスライドの準備が整っていた。

20

【0138】

化学物質

6の合成で使用したすべての化学薬品は、Aldrichまたは指定の個々の化学薬品会社から購入して、さらに精製せずに使用した。

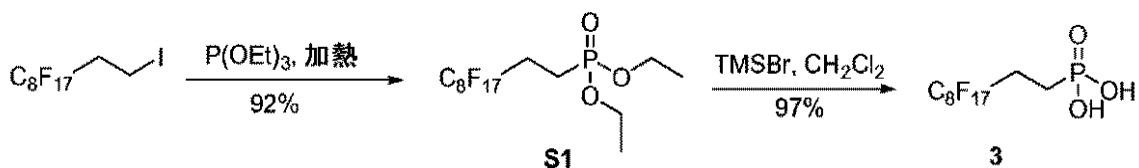
【0139】

合成

【0140】

【化2】

30



3の調製

ジエチル3, 3, 4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 10-ヘプタデカフルオロデシルホスホナート(S1): 1, 1, 1, 2, 2, 3, 3, 4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8-ヘプタデカフルオロ-10-ヨードデカン(1.02g、1.78mmol)およびP(OEt)₃(15mL、過剰)を50mL丸底フラスコに添加した。混合物を窒素下で120℃まで40時間加熱して、次にFluoroflash(登録商標)SPEカートリッジによって精製した。残存する淡黄色油を酢酸エチル/ヘキサンを用いてクロマトグラフにかけて生成物を得た(0.96g、92%)。¹H NMR (600MHz, CDCl₃): (ppm) 4.10-4.00(m, 4H, CH₂CH₃), 2.35-2.23(m, 2H, C H₂CF₂), 1.92-1.86(m, 2H, PCH₂), 1.25(t, J = 7.2 Hz, 6H, CH₂CH₃)。 ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): (ppm) 121-106(m, C-Fカップリングは未解析), 62.28(d, ²J_{Cp} = 6Hz, CH₂C H₃), 25.33(t, ²J_{Cp} = 23 Hz, CH₂CF₂), 17.24(d, ²J_{Cp} = 148Hz, PCH₂), 16.38, ³J_{Cp} = 6 Hz, CH₂CH₃)。 HRMS C₁₄H₁₄F₁₇O₃Pの計算値: [M + H]⁺, 585.0487; 実測値: 585.0433

40

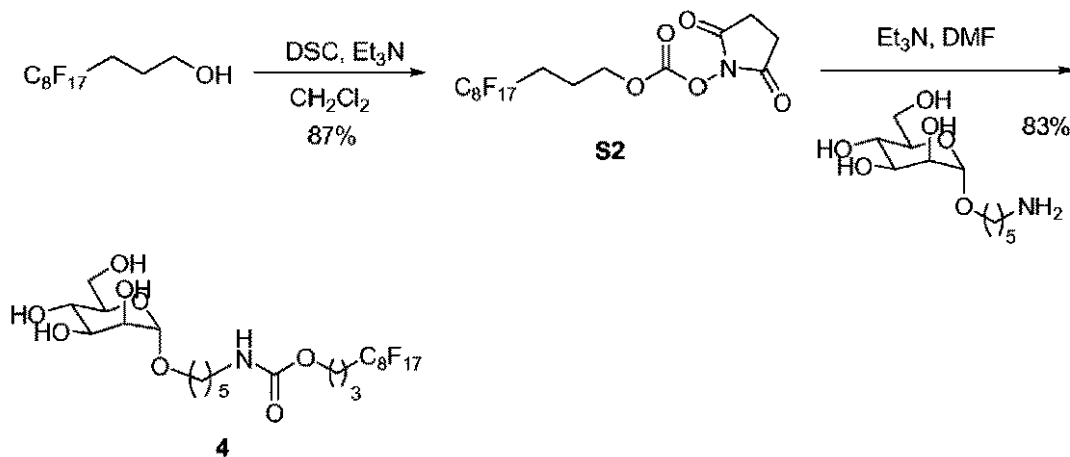
3, 3, 4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 10-ヘブ

50

タデカフルオロデシルホスホン酸 (3) : プロモトリメチルシラン (0.74 mL、5.75 mmol) を注射器によって、S1 (1.12 g、1.92 mmol) の無水 CH_2Cl_2 (15 mL) による溶液に窒素下で添加した。混合物を30時間攪拌した。揮発物を真空下で完全に除去して、白色粉末を得た。白色粉末はさらに精製せずに、次の実験で直接使用することができる (0.99 g、97%)。 $^1\text{H NMR}$ (600MHz, MeOD): (ppm) 2.48-2.42(m, 2H, CH_2CF_2), 1.99-1.96 (m, 2H, PCH_2). $^{13}\text{CNMR}$ (150 MHz, MeOD): (ppm) 121-106 (m, C-Fカップリングは未解析), 25.55 (t, $^2J_{\text{CF}}=23\text{Hz}$, CH_2CF_2), 18.26 (d, $^2J_{\text{CP}}=143\text{ Hz}$, PCH_2). HRMS $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{F}_{17}\text{O}_3\text{P}$ の計算値: $[\text{M}-\text{H}]^-$ 、526.9699; 実測値: 526.9669
【0141】

10

【化3】



20

ポリフッ化マンノース4の調製

2,5-ジオキソピロリジン-1-イル4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-ヘプタデカフルオロ-ウンデシルカーボネート (S2) : 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-ヘプタデカフルオロウンデカン-1-オール (214 mg、0.45 mmol) および DSC (184 mg、0.72 mmol) のアセトニトリルによる攪拌溶液に、0

30

のトリエチルアミン (0.5 mL、3.60 mmol) を窒素下で添加して、次に溶液を室温までゆっくり加温して、16時間攪拌した。反応物を H_2O で3回洗浄した。有機層を Na_2SO_4 で乾燥させて、濾過して、減圧下で濃縮した。生成物をフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、白色固体を得た (242 mg、87%)。 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): (ppm) 4.40 (t, 2H, $J=6.3\text{ Hz}$, CH_2O), 2.83 (s, 4H), 2.27-2.18 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$), 2.10-2.05 (m, 2H, FCH_2). $^{13}\text{CNMR}$ (150 MHz, CDCl_3): (ppm) 168.73 (NCO), 151.65 (OCO), 121-106 (m, C-Fカップリングは未解析), 69.87 (OCH_2), 25.66 (FCH_2), 20.12 (FCH_2CH_2)
[(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-ノナデカフルオロドデコキシカルボニル-アミノ)ペンチル] - D-マンノピラノシド (4) : S2 (250 mg、0.40 mmol) および 5-アミノペンチル - D-マンノピラノシド (112 mg、0.39 mmol) の CH_2Cl_2 による攪拌溶液に、0 のトリエチルアミン (0.2 mL) を窒素下で添加して、次に氷浴を取り外した。反応物を室温まで加温して、一晚攪拌した。溶媒を真空中で除去して、生成物を FluoroFlash (登録商標) SPEカートリッジおよびフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、白色固体を得た (253 mg、83%)。 $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3): (ppm) 7.97 (s, 1H, NH), 4.72 (d, $J=1.6\text{ Hz}$, 1H, Manの1-H), 4.10 (t, $J=6.2\text{ Hz}$, 2H, O- CH_2), 3.82-3.80 (m, 1H), 3.77-3.76 (m, 1H), 3.73-3.70 (m, 2H), 3.69-3.66 (m, 1H), 3.59 (t, $J=9.6\text{ Hz}$, 1H), 3.52-3.49 (m, 1H), 3.42-3.38 (m, 1H), 3.08 (t, $J=7.1\text{ Hz}$, 1H, O- CH_2), 2.32-2.23 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$), 1.94-1.89 (m, 2H, FCH_2),

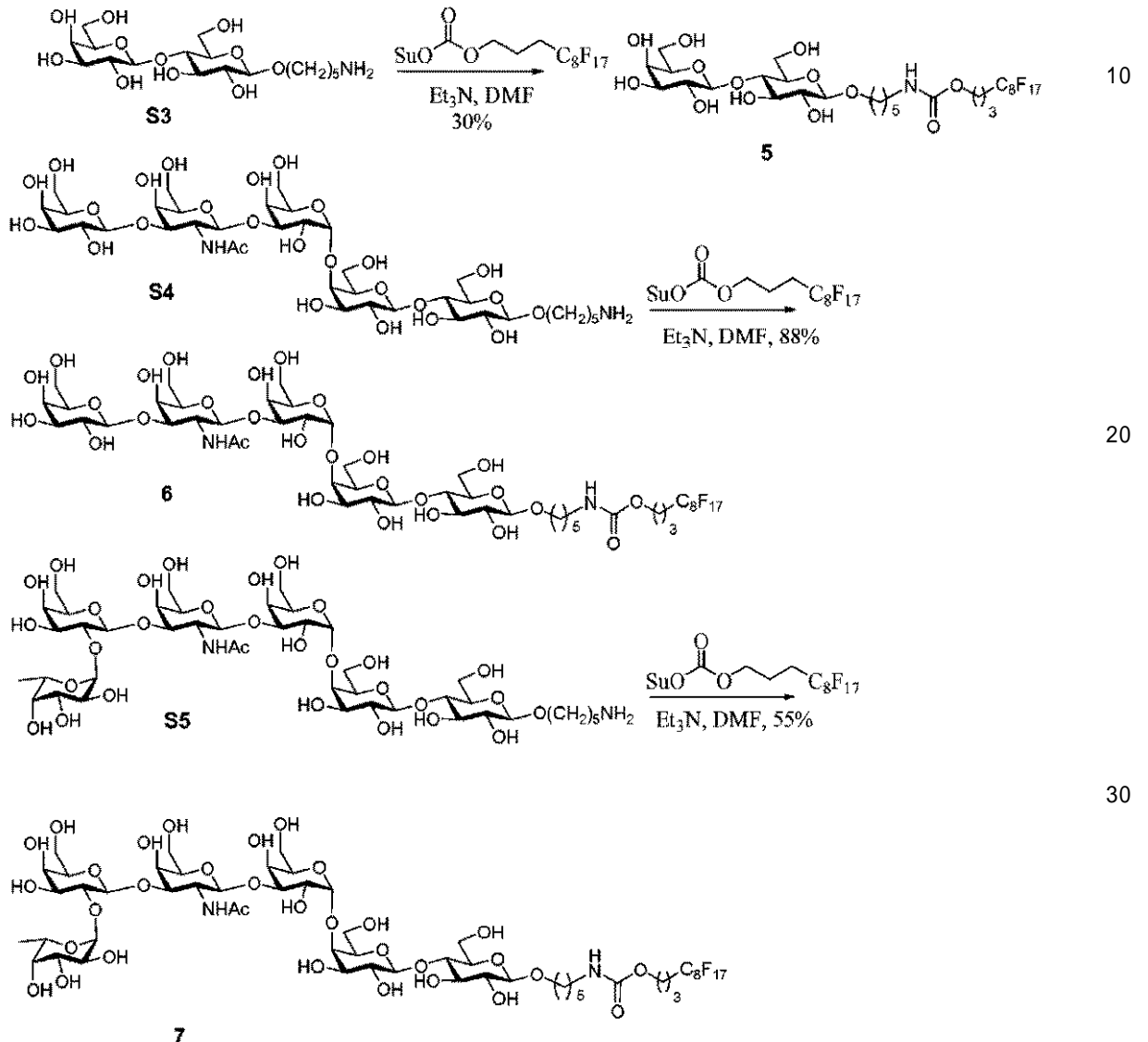
40

50

1.63-1.54 (m, 2H), 1.51-1.46 (m, 2H), 1.42-1.32 (m, 4H). ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): (ppm) 157.44 (NCO), 120-105 (m, C-Fカップリングは未解析), 100.12 (Manの1-C), 73.19, 71.25, 70.87, 67.22, 67.04, 62.80, 61.51, 40.27 (CH_2N), 29.41, 19.10, 26.20, 25.63, 24.86, 20.07. HRMS $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{F}_{17}\text{NO}_8$ の計算値: [M + Na] $^+$ 、806.1598; 実測値: 806.1643。

【0142】

【化4】



ポリフッ化5、6、および7の合成。

[(4 , 4 , 5 , 5 , 6 , 6 , 7 , 7 , 8 , 8 , 9 , 9 , 10 , 10 , 11 , 11 , 12 , 12 , 12 - ノナデカフルオロドデコキシカルボニル - アミノ) ペンチル] - D - ラクトシド (5) : S 3 (44 mg、0.10 mmol) および S 2 (76 mg、0.12 mmol) の DMF (5 mL) による溶液に 0 の Et₃N (28 μL、0.20 mmol) を添加した。室温にて一晩攪拌した後、反応混合物を真空中で濃縮して、カラムクロマトグラフィーおよび FluoroFlash (登録商標) SPE カートリッジによって精製して、5 を白色泡状固体 (29 mg、30%) として得た。R_f : 0.68 (EtOAc : MeOH = 5 : 1)。 ^1H NMR (600 MHz, MeOD): 4.36 (d, J=7.6 Hz, 1H), 4.27 (d, J=7.8 Hz, 1H), 4.15 (bt, 1H), 4.10 (t, J=6.0 Hz, 2H), 3.90-3.40 (m, 12H), 3.39 (m, 1H), 3.25 (t, J=8.1 Hz, 1H), 3.09 (t, J=6.9 Hz, 2H), 2.31-2.26 (m, 2H), 1.93-1.90 (m, 2H), 1.64-1.62 (m, 2H), 1.52-1.49 (m, 2H), 1.42-1.40 (m, 2H)。 ^{13}C NMR (150 MHz, MeOD): 157.53, 120.62-110.33 (m, C-Fカップリングは未解析), 103.79,

10

20

30

40

50

102.93, 79.38, 75.79, 75.16, 75.13, 73.52, 73.46, 71.26, 69.38, 69.00, 62.90, 61.19, 60.62, 40.36, 29.29, 29.05, 27.33 (t), 22.96, 20.18. MS (ESI) $C_{29}H_{38}F_{17}NO_{13}Na^+$ の計算値: 954.1970 [M+Na]⁺; 実測値: 954.1964。

【0143】

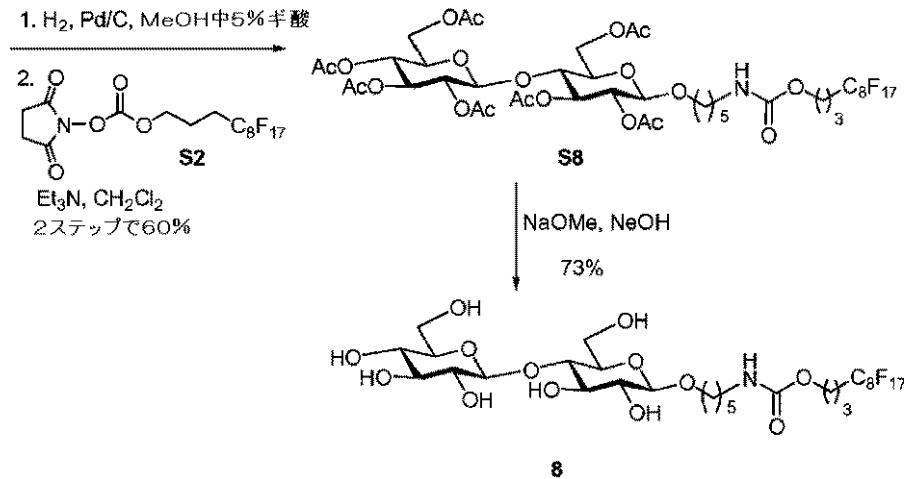
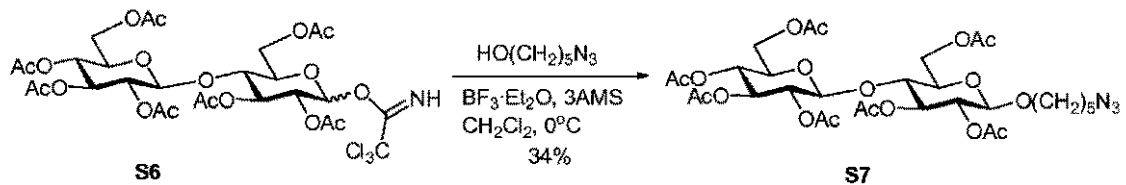
[(4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 11, 11, 12, 12, 12 - ノナデカフルオロドデコキシカルボニル - アミノ)ペンチル] - D - ガラクトピラノシル - (1 3) - 2 - アセトアミド - 2 - デオキシ - D - ガラクトピラノシル - (1 3) - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - D - グルコ - ピラノシド (6): 化合物 6 を化合物 S 4 から、5 について説明した手順に従って調製して、カラムクロマトグラフィーおよび FluoroFlash (登録商標) SPE カートリッジによる精製の後の収率は 55% であった。R_f: 0.18 (EtOAc:MeOH = 1:1)。白色泡状固体。¹H NMR (60 MHz, MeOD): 4.72 (d, J=8.4 Hz, 1H), 4.44 (d, J=7.0 Hz, 1H), 4.37 (d, J=7.4 Hz, 1H), 4.31 (d, J=7.7 Hz, 1H), 4.29 (m, 1H), 4.19 (d, J=2.1 Hz, 1H), 4.13 (t, d, J=6.0 Hz, 2H), 4.09 (m, 1H), 4.01 (bs, 1H), 3.95-3.67 (m, 20H), 3.60-3.42 (m, 11H), 3.26 (t, J=8.6 Hz, 1H), 3.12 (t, J=7.0 Hz, 2H), 2.34-2.26 (m, 2H), 2.01 (s, 3H), 1.98-1.91 (m, 2H), 1.69-1.64 (m, 2H), 1.55-1.52 (m, 2H), 1.46-1.43 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, MeOD): 173.69, 157.44, 120.11-108.43 (m, C-F カップリングは未解析), 105.22, 104.06, 102.91, 102.80, 101.38, 80.11, 79.83, 79.34, 78.55, 75.38, 75.11, 75.05, 74.97, 74.94, 73.46, 73.24, 73.17, 71.17, 71.07, 71.00, 69.31, 69.21, 68.87, 68.14, 68.07, 62.81, 61.21, 60.50, 60.16, 51.98, 40.26, 29.22, 28.97, 22.87, 21.95, 20.08, 19.47. MS (MALDI) $C_{49}H_{71}F_{17}N_2O_{28}Na^+$ の計算値: 1481.382 [M+Na]⁺; 実測値: 1481.452。

【0144】

[(4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 11, 11, 12, 12, 12 - ノナデカフルオロドデコキシカルボニル - アミノ)ペンチル] - L - フコピラノシル - (1 2) - D - ガラクトピラノシル - (1 3) - 2 - アセトアミド - 2 - デオキシ - D - ガラクトピラノシル - (1 3) - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - D - ガラクト - ピラノシル - (1 4) - D - グルコピラノシド (7): 化合物 7 を化合物 S 5 から、5 について説明した手順に従って調製して、カラムクロマトグラフィーおよび FluoroFlash (登録商標) SPE カートリッジによる精製の後の収率は 88% であった。R_f: 0.18 (EtOAc:MeOH = 1:1)。白色泡状固体。¹H NMR (600 MHz, MeOD): 5.26 (d, J=3.8 Hz, 1H), 4.96 (d, J=3.8 Hz, 1H), 4.58 (d, J=7.9 Hz, 1H), 4.44 (d, J=7.0 Hz, 1H), 4.30 (d, J=7.6 Hz, 1H), 4.29 (m, 1H), 4.17-4.10 (m, 5H), 4.01 (bs, 1H), 3.93-3.69 (m, 24H), 3.68-3.53 (m, 8H), 3.44-3.41 (m, 1H), 3.26 (t, J=8.6 Hz, 1H), 3.12 (t, J=7.0 Hz, 2H), 2.32-2.28 (m, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.97-1.93 (m, 2H), 1.69-1.64 (m, 2H), 1.56-1.52 (m, 2H), 1.47-1.42 (m, 2H), 1.27 (d, J=6.5 Hz, 3H). ¹³C NMR (150 MHz, MeOD): 173.17, 157.55, 104.20, 104.07, 102.93, 102.59, 101.54, 99.78, 80.05, 79.26, 78.81, 77.83, 76.82, 75.50, 75.21, 75.09, 74.23, 73.56, 73.41, 72.25, 71.33, 71.22, 70.25, 69.41, 69.32, 69.09, 68.37, 68.33, 66.83, 62.91, 61.31, 61.26, 60.65, 60.25, 51.82, 40.37, 29.32, 29.07, 22.97, 22.18, 20.19, 15.40. MS (MALDI) $C_{55}H_{81}F_{17}N_2O_{32}Na^+$ の計算値: 1627.440 [M+Na]⁺; 実測値: 1627.526。

【0145】

【化5】



10

20

ポリフルオロ-セロビオシド8の合成。

5 - アジドペンチル 2, 3, 6, 2, 3, 4, 6' - ヘプタ - O - アセチル - - D - セロビオシド

(S7) : 化合物 S6 (1.01 g、1.29 mmol)、5 - アジド - 1 - ペンタノール (0.84 g、6.47 mmol)、および 3 モレキュラーシーブの CH_2Cl_2 (10 mL) による懸濁物を室温にて 1 時間攪拌した。反応混合物を 0 まで冷却して、 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (33 μL 、0.26 mmol) を滴加して処理した。0 にて 2 時間攪拌した後、 NaHCO_3 飽和水溶液を添加して、反応混合物をセライトで濾過した。混合物を CH_2Cl_2 で希釈して、次に塩水で洗浄した。有機相を Na_2SO_4 で乾燥させ、溶媒を蒸発させて、クロマトグラフィー (ヘキサン : EtOAc = 3 : 1 2 : 1 1 : 1) によって精製して、S7 を白色泡状固体 (330 mg、34%) として得た。R_f : 0.48 (ヘキサン : EtOAc = 1 : 1)。¹H NMR (600MHz, CDCl_3): 5.16 (t, J=9.4 Hz, 1H), 5.13 (t, J=9.4 Hz, 1H), 5.04 (t, J=9.7 Hz, 1H), 4.91-4.85 (m, 2H), 4.50-4.47 (m, 2H), 4.42 (d, J=8.2 Hz, 1H), 4.34 (dd, J=12.5, 4.3 Hz, 1H), 4.06 (dd, J=12.0, 4.7 Hz, 1H), 4.01 (dd, J=12.3, 1.9 Hz, 1H), 3.81 (m, 1H), 3.74 (t, J=9.5 Hz, 1H), 3.64-3.62 (m, 1H), 3.56 (m, 1H), 3.43 (m, 1H), 3.23 (t, J=6.8 Hz, 2H), 2.10 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.59-1.54 (m, 4H), 1.40-1.35 (m, 2H)。¹³C NMR (150MHz, CDCl_3): 170.54, 170.34, 170.26, 169.86, 169.60, 169.34, 169.08, 100.81, 100.64, 76.51, 72.94, 72.67, 72.49, 71.96, 71.61, 71.56, 69.73, 67.76, 61.84, 61.54, 51.33, 28.94, 28.52, 23.14, 21.08, 20.90, 20.69, 20.57。HRMS (ESI) $\text{C}_{31}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_8\text{Na}^+$ の計算値 : 770.2590 [M+Na]⁺; 実測値 : 770.2570。

30

40

【0146】

[(4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 11, 11, 12, 12, 12 - ノナデカフルオロドデコキシカルボニル - アミノ) ペンチル] 2, 3, 6, 2, 3, 4, 6' - ヘプタ - O - アセチル - - D - セロビオシド (S8) : S7 (50 mg, 0.07 mmol)、触媒量の Pd/C の MeOH の 5% ギ酸 (5 mL) による懸濁物を H_2 バルーン下で 2 時間攪拌した。セライトによる濾過の後、濾過ケーキを M

50

eOHで洗浄した。濾液を蒸発させて、トルエンと共蒸発させた。残留物は精製せずに次のステップで使用した。

【0147】

上述の残留物をCH₂Cl₂ (5 mL) に溶解させて、次に化合物S2 (50 mg、0.08 mmol) を添加した。混合物を0℃まで冷却した。トリエチルアミン (19 μL、0.13 mmol) を添加して、溶液の攪拌を室温にて12時間続けた。反応混合物を濃縮して、クロマトグラフィー (ヘキサン : EtOAc = 1 : 1) によって精製して、S8を白色泡状固体 (49 mg、2ステップで60%) として得た。¹H NMR (600MHz, CDCl₃): 5.14 (t, J=9.5 Hz, 1H), 5.11 (t, J=9.5 Hz, 1H), 5.03 (t, J=, 9.5 Hz, 1H), 4.91-4.84 (m, 2H), 4.76 (br, 1H), 4.50 (dd, J=12.0, 1.7 Hz, 1H), 4.48 (d, J=7.9 Hz, 1H), 4.40 (d, J=8.0 Hz, 1H), 4.34 (dd, J=12.5, 4.3 Hz, 1H), 4.09 (t, J=6.1 Hz, 2H), 4.05 (dd, J=12.0, 4.9 Hz, 1H), 4.01 (dd, J=12.5, 2.2 Hz, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.73 (t, J=9.5 Hz, 1H), 3.64-3.61 (m, 1H), 3.55-3.53 (m, 1H), 3.43 (m, 1H), 3.12 (m, 2H), 2.18-2.13 (m, 2H), 2.09 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.00 (2xs, 6H), 1.98 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.92-1.88 (m, 2H), 1.56-1.52 (m, 2H), 1.49-1.44 (m, 2H), 1.34-1.29 (m, 2H). ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃): 170.51, 170.35, 170.25, 169.84, 169.62, 169.33, 169.06, 156.25, 120.18-108.01 (m, C-Fカップリングは未解析), 100.78, 100.62, 76.47, 72.91, 72.68, 72.45, 71.94, 71.60, 71.56, 69.77, 67.74, 63.17, 61.76, 61.52, 40.83, 29.68, 29.49, 28.92, 27.99, 27.84, 27.69, 23.02, 21.03, 20.84, 20.64, 20.53, 20.33. HRMS (ESI) C₄₃H₅₂F₁₇NO₂₀Na⁺ の計算値 : 1248.2703 [M+Na]⁺; 実測値 : 1248.2675

[(4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 11, 11, 12, 12, 12 - ノナデカフルオロドデコキシカルボニル - アミノ) ペンチル] - D - セロピオシド (8) : S8 (222 mg、0.18 mmol) および NaOMe (50 mg、0.09 mmol) の MeOH (7 mL) による溶液を室温にて一晩攪拌した。混合物を Amberlyst - 15 イオン交換樹脂 (resign) によって5分間中和して、セライトを充填した焼結漏斗によって濾過した。濾過後にフィルタパッドをメタノールですすいだ。合せた濾液を減圧下で濃縮して、次にフラッシュカラムクロマトグラフィー (EtOAc : MeOH = 10 : 1 8 : 1) によって精製して、8を白色固体 (123 mg、73%) として得た。R_f : 0.47 (EtOAc : MeOH = 5 : 1)。¹H NMR (600MHz, MeOD): 4.40 (d, J=7.9 Hz, 1H), 4.27 (d, J=7.8 Hz, 1H), 4.10 (t, J=6.1 Hz, 2H), 3.89-3.86 (m, 4H), 3.65 (dd, J=11.8, 5.7 Hz, 1H), 3.57-3.53 (m, 2H), 3.50 (t, J=9.0 Hz, 1H), 3.39-3.32 (m, 3H), 3.30 (m, 1H), 3.22 (m, 2H), 3.09 (t, J=6.7 Hz, 2H), 2.32-2.23 (m, 2H), 1.94-1.89 (m, 2H), 1.66-1.61 (m, 2H), 1.53-1.48 (m, 2H), 1.43-1.38 (m, 2H). ¹³C NMR (150MHz, MeOD): 157.51, 120.11-108.43 (m, C-Fカップリングは未解析), 103.20, 102.79, 79.31, 76.69, 76.43, 75.03, 73.47, 69.95, 69.29, 61.00, 60.74, 60.42, 40.32, 29.52, 28.95, 27.36, 27.21, 27.07, 22.86, 20.07. HRMS (ESI) C₂₉H₃₈F₁₇NO₁₃Na⁺ の計算値 : 954.1964 [M+Na]⁺; 実測値 : 954.1966。

【0148】

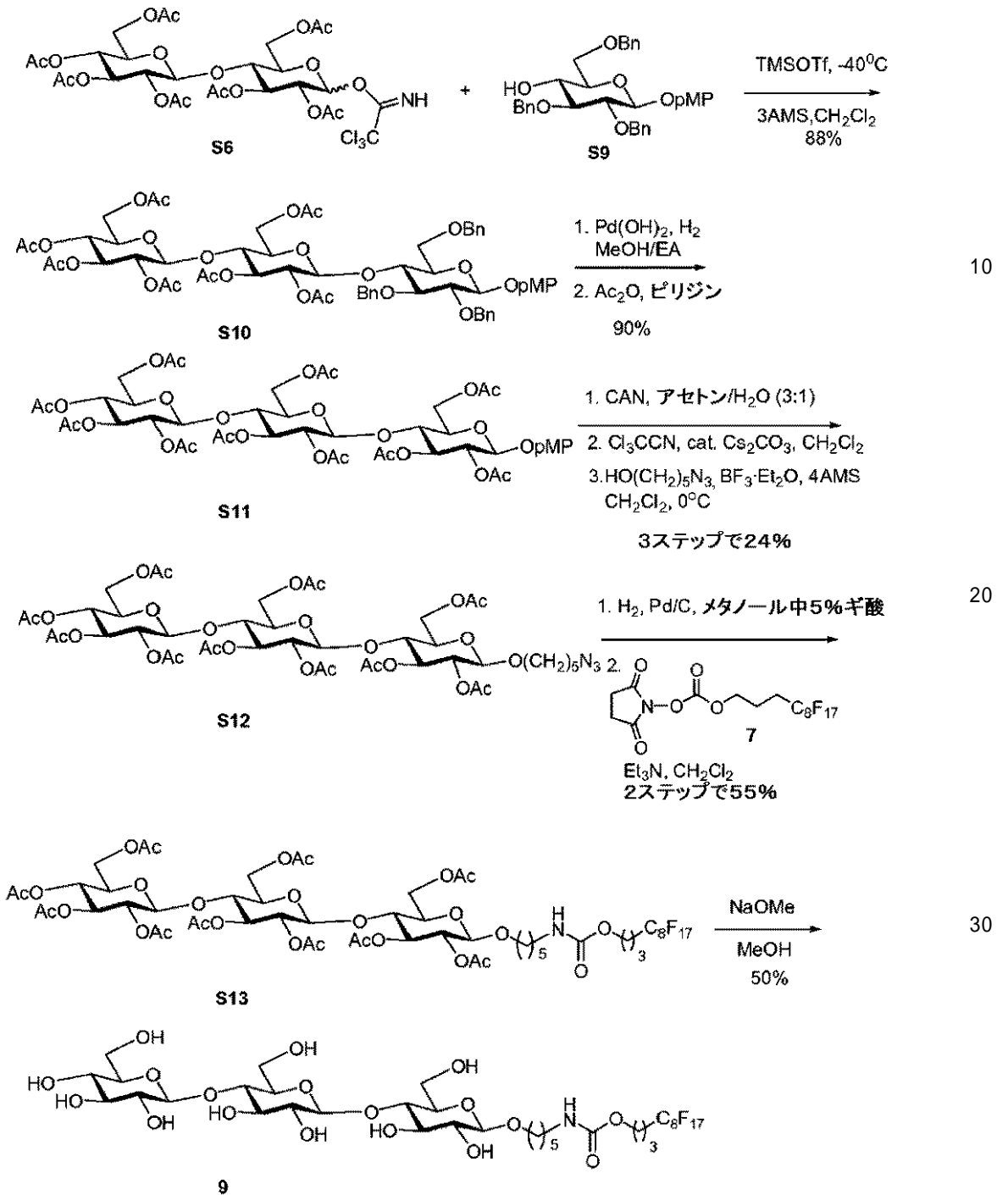
10

20

30

40

【化6】



ポリフルオロ-セロトリオシド9の合成。

パラ-メトキシフェニル 2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-D-グルコピラノシル-(1-4)-2, 3, 6-トリ-O-アセチル-D-グルコピラノシル-(1-4)-2, 3, 6-トリ-O-ベンジル-D-グルコピラノシド(S10) : Vesalla によって報告されたのと同様の手順に従って、S6 (1.68 g, 2.16 mmol)、S9 (1.0 g, 1.8 mmol) および 3 モレキュラーシーブの CH_2Cl_2 (20 mL) による懸濁物を室温にて1時間攪拌した。反応混合物を -40°C まで冷却して、TMSOTf (98 μl , 0.54 mmol) を滴加して処理した。 -40°C にて2時間攪拌した後、 NaHCO_3 飽和水溶液を添加して、反応混合物をセライトで濾過した。混合物を CH_2Cl_2 で希釈して、次に塩水で洗浄した。有機相を Na_2SO_4 で乾燥させ、溶媒を蒸発させて、クロマトグラフィー(ヘキサン : EtOAc = 3 : 1 2 : 1 1 : 1) によって精製して、S10を白色泡状固体(1.86 g, 88%)とし

10

20

30

40

50

て得た。R_f : 0 . 5 5 (ヘキサン : E t O A c = 1 : 1)。¹H NMR (600MHz, CDCl₃): 7.38-7.25(m, 15H), 7.00 (d, J=9.1Hz, 2H), 6.81 (d, J=9.1 Hz, 2H), 5.10-5.05 (m, 2H), 5.00-4.98 (m, 2H), 4.94-4.91 (m, 2H), 4.85-4.82 (m, 2H), 4.78 (d, J=11.6 Hz, 1H), 4.72 (d, J=11.6 Hz, 2H), 4.64 (d, J=8.2 Hz, 1H), 4.49 (d, J=12.0 Hz, 1H), 4.39 (d, J=7.9 Hz, 1H), 4.37 (dd, J=12.5, 4.3 Hz, 1H), 4.23 (dd, J=12.0, 2.0Hz, 1H), 4.01 (dd, J=12.0, 2.2 Hz, 1H), 3.95 (t, J=9.2 Hz, 1H), 3.90 (dd, J=12.0, 4.6 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.78-3.62 (m, 6H), 3.46-3.44 (m, 1H), 3.19-3.16 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.98(s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.95 (s, 3H). ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃): 170.71, 170.46, 170.42, 170.01, 169.68, 169.53, 169.22, 155.53, 151.64, 139.42, 138.34, 138.01, 128.79, 128.48, 128.38, 128.35, 128.26, 128.20, 127.86, 127.40, 127.13, 118.70, 114.71, 102.91, 101.04, 100.15, 82.77, 81.60, 76.39, 75.20, 74.92, 74.89, 73.85, 73.11, 72.67, 72.37, 72.09, 71.65, 67.99, 67.93, 61.98, 61.70, 55.85, 20.93, 20.88, 20.75. H R M S (E S I) C₆₀H₇₀O₂₄Na⁺の計算値 : 1197 . 4149 [M + Na]⁺; 実測値 : 1197 . 4142。

【 0 1 4 9 】

パラ - メトキシフェニル 2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - アセチル - - D - グルコピラノシル - (1 4) - 2 , 3 , 6 - トリ - O - アセチル - - D - グルコピラノシル - (1 4) - 2 , 3 , 6 - トリ - O - アセチル - - D - グルコピラノシド (S 1 1) : S 1 0 (1 . 0 1 g , 0 . 8 6 m m o l)、触媒量の Pd (OH)₂ の Me OH / EA (1 / 1、10 mL) による懸濁物を H₂ バルーン下で 1 2 時間攪拌した。セライトによる濾過の後、濾過ケーキを Me OH で洗浄した。濾液を蒸発させて、残留物は精製せずに次のステップで使用した。

【 0 1 5 0 】

上述の残留物をピリジン (5 mL) および無水酢酸 (5 mL) に溶解させた。混合物を室温にて一晚攪拌した。溶液に Me OH を添加して過剰な無水酢酸を破壊して、次に真空中で濃縮した。CH₂Cl₂ を添加して、反応混合物を 1 M HCl 水溶液、NaHCO₃ 飽和水溶液および塩水で洗浄した。有機相を Na₂SO₄ で乾燥させ、濃縮して、クロマトグラフィー (ヘキサン : E t O A c = 1 : 1) によって精製し、S 1 1 を白色泡状固体 (7 9 4 m g、2 ステップで 9 0 %) として得た。R_f : 0 . 2 4 (ヘキサン : E t O A c = 1 : 1)。¹H NMR (600MHz, CDCl₃): 6.88 (d, J=9.0 Hz, 2H), 6.76 (d, J=9.0 Hz, 2H), 5.19 (t, J=9.2 Hz, 1H), 5.11-5.07 (m, 3H), 5.02 (t, J=9.7 Hz, 1H), 4.88-4.81 (m, 4H), 4.50 (dd, J=12.0, 2.0 Hz, 1H), 4.46 (d, J=8.0 Hz, 1H), 4.44 (d, J=8.0 Hz, 1H), 4.37 (dd, J=12.0, 2.0 Hz, 1H), 4.32 (dd, J=12.5, 4.3 Hz, 1H), 4.10-4.06 (m, 2H), 4.00 (dd, J=12.5, 2.0 Hz, 1H), 3.80 (t, J=9.5 Hz, 1H), 3.73 (t, J=9.5 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.67-3.64 (m, 1H), 3.61-3.55 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.97 (2s, 6H), 1.96 (s, 3H), 1.94 (s, 3H). ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃): 170.53, 170.27, 170.23, 169.79, 169.57, 169.32, 169.10, 155.77, 150.88, 118.69, 114.53, 100.80, 100.57, 100.07, 76.44, 76.13, 72.89, 72.81, 72.77, 72.65, 72.41, 72.02, 71.75, 71.55, 71.52, 67.70, 62.15, 61.49, 55.67, 20.86, 20.80, 20.70, 20.57, 20.50. H R M S (E S I) C₄₅H₅₈O₂₇Na⁺の計算値 : 1053 . 3058 [M + Na]⁺; 実測値 : 1053 . 3051。

【 0 1 5 1 】

5 - アジドペンチル 2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - アセチル - - D - グルコピラノシル - (1 4) - 2 , 3 , 6 - トリ - O - アセチル - - D - グルコピラノシル - (1 4) - 2 , 3 , 6 - トリ - O - アセチル - - D - グルコピラノシド (S 1 2) : 化合物 S 1 1 (8 6 6 m g、0 . 8 4 m m o l) をアセトン - H₂O (2 0 m L 3 : 1) に溶解させて、混合物を冷却した (氷水浴)。CAN (2 . 3 g、4 . 2 0 m m o l) のアセトン / H₂O (1 0 m L 3 : 1) による溶液を添加して、混合物を室温にて 3 0 分間攪

拌した。混合物を体積10 mLまで濃縮して、 CH_2Cl_2 で希釈し、 NaHCO_3 飽和水溶液で洗浄して、乾燥させ(Na_2SO_4)、濾過して、濃縮した。次に残留物を CH_2Cl_2 に溶解させて、トリクロロアセトニトリル(1.0 mL)および Cs_2CO_3 (250 mg、0.77 mmol)で処理した。室温にて12時間攪拌した後、反応物を水、塩水で洗浄して、乾燥させ(Na_2SO_4)、濾過して、濃縮した。トリクロロアセトイミデート化合物、5-アジド-1-ペンタノール(0.54 g、4.20 mmol)、および3 モレキュラーシーブ(1.5 g)の CH_2Cl_2 (10 mL)による懸濁物を室温にて1時間攪拌した。反応混合物を0 まで冷却して、 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (0.11 mL、0.84 mmol)を滴加して処理した。0 にて2時間攪拌した後、 NaHCO_3 飽和水溶液を添加して、反応混合物をセライトで濾過した。混合物を CH_2Cl_2 で希釈して、次に塩水で洗浄した。有機相を Na_2SO_4 で乾燥させ、溶媒を蒸発させて、クロマトグラフィー(ヘキサン： EtOAc = 3 : 1 2 : 1 1 : 1)によって精製して、S12を白色泡状固体(210 mg、3ステップで24%)として得た。 R_f : 0.31 (ヘキサン： EtOAc = 1 : 1)。 $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3): 5.12-5.05 (m, 3H), 5.00 (t, $J=9.7$ Hz, 1H), 4.87-4.79 (m, 3H), 4.48 (dd, $J=11.8, 2.0$ Hz, 1H), 4.43 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 4.42 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 4.38 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 4.35 (dd, $J=12.0, 2.0$ Hz, 1H), 4.31 (dd, $J=12.5, 4.3$ Hz, 1H), 4.07 (dd, $J=12.1, 5.2$ Hz, 1H), 3.99 (dd, $J=12.5, 2.0$ Hz, 1H), 3.80-3.74 (m, 1H), 3.71(dt, $J=10.0, 9.5$ Hz, 2H), 3.60-3.58 (m, 2H), 3.55-3.52 (m, 2H), 3.45-3.40 (m, 1H), 3.21 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.09 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.94 (2xs, 6H), 1.60-1.52 (m, 4H), 1.42-1.33 (m, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (150MHz, CDCl_3): 170.52, 170.31, 170.21, 169.82, 169.79, 169.54, 169.31, 169.10, 100.79, 100.59, 100.55, 76.49, 76.14, 72.87, 72.67, 72.41, 71.75, 71.62, 71.53, 67.72, 62.14, 61.72, 61.48, 51.34, 28.91, 28.50, 23.12, 20.87, 20.68, 20.55, 20.48. HRMS (ESI) $\text{C}_{43}\text{H}_{61}\text{N}_3\text{O}_{26}\text{Na}^+$ の計算値 : 1058.3436 [M + Na]⁺; 実測値 : 1058.3419。

【0152】

[(4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 11, 11, 12, 12, 12 - ノナデカフルオロドデコキシカルボニル - アミノ)ペンチル]2, 3, 4, 6 - テトラ - O - アセチル - D - グルコピラノシル - (1 4) - 2, 3, 6 - トリ - O - アセチル - D - グルコピラノシル - (1 4) - 2, 3, 6 - トリ - O - アセチル - D - グルコピラノシド(S13) : 化合物S13を化合物S12から、S8について説明した手順に従って調製して、カラムクロマトグラフィー(ヘキサン： EtOAc = 1 : 1 2 : 3)の後の収率は55%(2ステップ)であった。白色固体。 R_f : 0.41 (ヘキサン： EtOAc = 1 : 1)。 $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3): 5.13-5.06 (m, 3H), 5.01 (t, $J=9.7$ Hz, 1H), 4.88-4.81 (m, 4H), 4.79 (br, 1H), 4.50 (dd, $J=11.8, 1.3$ Hz, 1H), 4.44 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 4.43 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 4.38 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 4.36 (dd, $J=12.0, 1.8$ Hz, 1H), 4.32 (dd, $J=12.5, 4.3$ Hz, 1H), 4.10-4.06 (m, 3H), 4.02 (dd, $J=12.0, 4.8$ Hz, 1H), 3.99 (dd, $J=12.4, 2.0$ Hz, 1H), 3.79-3.74 (m, 1H), 3.72 (dt, $J=11.5, 9.6$ Hz, 2H), 3.63-3.58 (m, 1H), 3.56-3.50 (m, 2H), 3.43-3.40 (m, 1H), 3.11 (m, 1H), 2.20-2.10 (m, 2H), 2.10 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.98 (2xs, 6H), 1.97 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.94 (2xs, 6H), 1.91-1.86 (m, 2H), 1.54-1.52 (m, 2H), 1.48-1.43 (m, 2H), 1.34-1.26 (m, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (150MHz, CDCl_3): 170.53, 170.35, 170.22, 169.81, 169.58, 169.32, 169.11, 153.25, 120.2-108.01 (m, C-Fカップリングは未解析), 100.79, 100.58, 100.55, 76.47, 76.14, 72.88, 72.70, 72.66, 72.39, 72.00, 71.75, 71.63, 71.54, 71.34, 69.76, 67.69, 63.67, 63.18, 62.13, 61.65, 61.48, 40.84, 29.50, 28.93, 27.99, 27.84, 27.70, 23.02, 20.89, 20.76, 20.67, 20.54, 20.48, 20.34. HRMS (ESI) $\text{C}_{55}\text{H}_{68}\text{F}_{17}\text{NO}_{28}\text{Na}^+$ の計算値 : 1536.3656 [M + Na]⁺; 実測値 : 1536.3548

10

20

30

40

50

[(4 , 4 , 5 , 5 , 6 , 6 , 7 , 7 , 8 , 8 , 9 , 9 , 1 0 , 1 0 , 1 1 , 1 1 , 1 2 , 1 2 , 1 2 - ノナデカフルオロドデコキシカルボニル - アミノ) ペンチル] - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド (9) : 化合物 9 は化合物 S 1 3 から、8 について説明した手順に従って調製して、カラムクロマトグラフィー (E t O A c : M e O H = 3 : 1 1 : 1) および F l u o r o F l a s h (登録商標) S P E カートリッジによる精製の後の収率は 5 5 % であった。白色固体。R_f : 0 . 6 6 (E t O A c : M e O H = 3 : 1) 。 ¹H NMR (600MHz , MeOD) : 4.44 (d , J=8.0 Hz , 1H) , 4.39 (d , J=7.8 Hz , 1H) , 4.27 (d , J=7.9 Hz , 1H) , 4.10 (t , J=6.1Hz , 1H) , 3.91-3.84 (m , 6H) , 3.67-3.63 (m , 3H) , 3.58-3.48 (m , 7H) , 3.39-3.32 (m , 3H) , 3.30 (m , 1H) , 3.22 (m , 2H) , 3.09 (t , J=6.9 Hz , 1H) , 2.31-2.26 (m , 2H) , 1.97-1.90 (m , 2H) , 1.65-1.61 (m , 2H) , 1.52-1.48 (m , 2H) , 1.43-1.37 (m , 2H) . ¹³CNMR (150MHz , MeOD) : 157.71 , 120.11-108.43 (m , C-Fカップリングは未解析) , 103.44 , 103.21 , 103.05 , 79.40 , 79.00 , 76.95 , 76.66 , 75.47 , 75.25 , 75.02 , 73.75 , 73.48 , 70.19 , 69.56 , 63.07 , 61.26 , 60.58 , 60.30 , 40.50 , 29.45 , 29.20 , 27.61 , 27.46 , 27.32 , 23.10 , 20.32 . H R M S (E S I) C₃₅H₄₈F₁₇N₁₈Na⁺ の計算値 : 1 1 1 6 . 2 4 9 2 [M + N a]⁺ ; 実測値 : 1 1 1 6 . 2 5 2 0 .

10

【 0 1 5 3 】

[(4 , 4 , 5 , 5 , 6 , 6 , 7 , 7 , 8 , 8 , 9 , 9 , 1 0 , 1 0 , 1 1 , 1 1 , 1 2 , 1 2 , 1 2 - ノナデカフルオロドデコキシカルボニル - アミノ) ペンチル] - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシル - (1 4) - - D - グルコピラノシド (1 0) : 化合物 1 0 は、9 について説明した手順に従って調製して、カラムクロマトグラフィーによる精製の後の収率は 8 6 % であった。 4.47 (d , J=8.0 Hz , 1H) , 4.46 (d , J=8.0 Hz , 1H) , 4.42 (d , J=7.8 Hz , 1H) , 4.30 (d , J=7.9 Hz , 1H) , 4.10 (t , J=6.1 Hz , 2H) , 3.91-3.89 (m , 9H) , 3.68-3.63 (m , 3H) , 3.60-3.50 (m , 14H) , 3.39-3.25 (m , 14H) , 3.12 (t , J=6.9 Hz , 2H) , 2.33-2.26 (m , 2H) , 1.96-1.90 (m , 2H) , 1.70-1.61 (m , 2H) , 1.55-1.52 (m , 2H) , 1.43-1.37 (m , 2H) . H R M S (E S I) C₄₁H₅₈F₁₇N₂₃Na⁺ の計算値 : 1 2 5 5 . 3 1 2 8 [M + N a]⁺ ; 実測値 : 1 2 5 5 . 3 2 2 5 .

20

【 0 1 5 4 】

質量分析法

固定化スライドを、窒素パルスレーザ (3 5 5 n m) を装備した B r u k e r U l t r a f l e x M A L D I - T O F 質量分光計によって分析した。各データポイントをレーザビーム平均 5 0 0 ~ 1 0 0 0 ショットで収集して、レーザフルエンスを 4 0 ~ 9 5 % で適用し、最良の結果はほぼ 5 0 ~ 8 0 % で得た。マンノース - N H₂ の標準水溶液を A C G スライドの規定の範囲に手動で配置して、同じスライド基材上に固定化された糖から得たデータを校正するのに使用した。各種の濃度でのグラフト化マンノース誘導体の定量的比較のために、すべての分析を 8 0 % フルエンスにて 5 0 0 ショットの 1 回の測定で行った。S / N 比に対する平均ピーク強度の変動をプロットした。

30

【 0 1 5 5 】

タンパク質結合アッセイ

固定化マンノースとビオチン化 C o n A および C y 3 タグ化ストレプトアビジンとのマンノース - タンパク質結合アッセイ。MS 分析に使用したのと同じスライドを弱い超音波処理の下で蒸留水で再度洗浄して、次に P B S (リン酸緩衝生理食塩水) 緩衝液ですすいだ。ビオチン標識 C o n A (I n v i t r o g e n C 2 1 4 2 0) を P B S T 緩衝液 (0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を含む P B S) で 5 0 0 ~ 1 0 0 0 倍に希釈した。タンパク質溶液 (5 0 m L) を各アレイ基材に加えて、W h a t m a n 1 6 パッド・インキュベーション・チャンパでインキュベートした。これらのスライドをフォイルで包み、室温にて振とう器で 1 時間インキュベートした。インキュベーションの後、スライドを P B S T 緩衝液で 3 回洗浄した。ストレプトアビジン - C y 3 (S i g m a S 6 4 0 2) を P B S 緩衝液で 1 0 0 倍に希釈して、スライドをアルミニウムフォイルで覆い、再度ストレプ

40

50

トアビジン - Cy 3 によってさらに 1 時間インキュベートした。2 回目のインキュベーションの後、スライドを P B S T 緩衝液および蒸留水で洗浄して、次に高品質窒素ガスでページ乾燥させた。アレイパターンは、Applied Precision 製の Array W o R x 蛍光スキャナを使用して、反射モードで 5 4 0 n m レーザ光によって分析した。統計的蛍光強度分析のために、各スライド上の最良のブロックを選択した。

【 0 1 5 6 】

固定化 G l o b o H とマウスによるモノクローナル抗体 V K 9 (I g G) および C y 3 タグ化 2 次抗体との G l o b o H - タンパク質結合アッセイ。G l o b o H マイクロアレイスライドをエタノールアミン水溶液 (5 0 m M) で遮断して、スライド表面上の未反応 N H S を除去した。スライドは再度反応セル内で組み立てられて、P B S 緩衝液 (p H 7 . 4) で洗浄した。次に、V K 9 (各セルに 1 m L 、 5 0 μ g / m L) 、マウスによる抗 G l o b o H モノクローナル抗体 (I g G) の P B S T (p H 7 . 4) による溶液をセルに添加した。1 時間絶えず振とうしながら結合実験を行った。スライドを P B S T 緩衝液 (p H 7 . 4) で 3 回 (毎回、絶えず渦動させながら 1 0 分間) 洗浄した。V K 9 のための C y 3 タグ化ヤギ抗マウス I g G をセルに添加して、混合物を暗所で 1 時間振とうしながらインキュベートした。タンパク質結合スライドをそれぞれ P B S T 緩衝液 (p H 7 . 4) 、 P B S 緩衝液 (p H 7 . 4) 、および水で 5 回洗浄して、次に窒素ガスによってページ乾燥させた。

【 0 1 5 7 】

4 の M S - T O F 分析およびグリカンアレイ調製 - P T F E 様 A C G スライド上に吸着されたポリフッ化マンノースの M S - T O F 分析
化合物 4 をメタノール / 水 (6 / 4) 溶媒混合物に、約 1 0 m M 、 1 m M 、 1 0 0 μ M にて順次溶解させた。溶液 (各 1 μ L) をスライド上に手でスポットして、BioDot AD 3 2 0 0 装置 (A g i l e n t T e c h n o l o g y) でロボットピン (A r r a y I t , S M P 4) を用いてマイクロアレイ化して、アレイのスポット当り溶液約 1 . 1 n L を配置した。スライドを湿度 3 0 % のチャンバに一晩保管して、次に質量分析法によって分析した。ブランクスライドおよびポリフッ化マンノーススライドは、どちらもシランベースおよびリン酸ベースの A C G スライドを含有しており、窒素パルスレーザ (3 5 5 n m) を装備した B r u k e r U l t r a f l e x M A L D I - T O F 質量分光計によって分析した。等体積の B S A トリプシン消化 (1 p m o e l / μ L) 溶液を D H B (ジヒドロキシ安息香酸、 1 : 1 アセトニトリル / 水中 1 0 m g) 溶液と均一に混合して、M S - T O F 質量校正の標準として使用した。各データポイントをレーザビーム平均 5 0 0 ショットで収集して、2 ~ 2 0 % のレーザーフルエンスを適用した。大半の実験は、正分極電場の下で行った。

【 0 1 5 8 】

図 2 6 A および図 2 7 A は、これらの新たに製造した P T F E 様 A C G スライドの M S - T O F バックグラウンド結果を示す。図 2 6 A において、(a) は、シランベース P T F E 様 A C G のバックグラウンドの M S - T O F 結果を示し ; (b) は、上の A C G スライドに吸着されたポリフッ化マンノースの M S - T O F の結果を示す。図 2 7 A において、(a) は、ホスホン酸ベース P T F E 様 A C G のバックグラウンドの M S - T O F の結果を示し、(b) は、上の A C G スライドに吸着されたポリフッ化マンノースの M S - T O F の結果を示す。マンノース誘導体 (M w . 7 8 3) の分子イオンは 8 0 6 [M + N a] ⁺、および 8 2 2 [M + K] ⁺ にて観察され、有機化学薬品は P T F E 様 A C G スライド表面に接着しないためベースラインは非常に明瞭であった。

【 0 1 5 9 】

図 2 6 B および図 2 7 B は、ポリフッ化マンノースのシランベースおよびホスホン酸ベーススライドの結果を与える。図 2 6 B は、シランベース P T F E 様 A C G スライドのマイクロアレイの実施を表す。マンノース溶液 (1 . 1 μ L / スポット) は濃度が様々であった (1 2 m M から 1 . 2 m M 、 1 2 0 μ M まで) 。同様に 2 7 B は、ホスホン酸ベース P T F E 様 A C G スライドのマイクロアレイを示す。マンノース溶液 (1 . 1 μ L / スポ

10

20

30

40

50

ット)は濃度が様々であった(14 mMから1.4 mM、140 μMまで)。マンノース誘導体がPTFE様ACGスライド上にマイクロアレイ化された、蛍光タグ化ConA-マンノース結合。

【0160】

PTFE様ACGスライド上に吸着されたポリフッ化マンノースの蛍光タグ化ConA/マンノース結合。

【0161】

リン酸BSA緩衝液(25 μg/mL、pH6.5)中のAlex488タグ化コンカナバリンA 100 μLをマンノース誘導体が固定化されたACGスライド表面上に加えた。ConA溶液を含むこれらのスライドを室温にて約2時間インキュベーションした。インキュベーションの後、スライドをペトリ皿内で静かに渦動させながら、それぞれ12 mlのリン酸BSA緩衝液、PBST緩衝液、および脱イオン水で3回洗浄した。次に窒素パーズ乾燥させて、ArrayWoRx(Applied Precision)によって蛍光スキャナの反射モードで530 nmにて分析した。図S1(c)および図S2(c)は、これらのバイオアッセイの結果を示す。

10

【0162】

MALDI-TOF(Ultra-Flex II)によるオンチップ分析(エッペンドルフ管内での反応)

セルラーゼを調製した(pH5.05の25 mM NaOAc緩衝溶液中5 U/mL)。基質をNaOAc緩衝液溶液(25 mM、pH5.05)に溶解させて、0.5 mM基質溶液を得た。セルラーゼ溶液100 μLをエッペンドルフ管内の基質溶液100 μLに添加して、0.25 mM基質を含む2.5 U/mLセルラーゼ溶液を得た。この溶液を37 °Cで18時間インキュベートした。インキュベートした溶液100 μLをFAST(登録商標)フレームに装填したスライド上に添加した。スライドを乾燥ボックスに入れて水を除去して、次に高真空を使用して微量の水を除去した。水100 μLを使用して、FAST(登録商標)フレーム・マルチスライド・プレートの各ウェルをすすいで、緩衝液溶液の塩を分解および除去した。高真空によってプレート上の残留水をすべて除去して、次にMALDI-TOF Ultra-Flex IIによってスライドを分析した。

20

【0163】

MALDI-TOF(Ultra-Flex II)によるオンチップ分析(チップ上での直接の反応)

セルラーゼを調製した(pH5.05の25 nM NaOAc緩衝溶液中5 U/mL)。基質をNaOAc緩衝液溶液(25 mM、pH5.05)に溶解させて、0.5 mM基質溶液を得た。セルラーゼ溶液50 μLをFAST(登録商標)フレーム・マルチスライド・プレートに装填されたガラススライド上の基質溶液50 μLに添加して、0.25 mM基質を含む2.5 U/mLセルラーゼ溶液を得た。プレートのウェルを密閉して、アセンブリ全体を37 °Cで18時間インキュベートした。スライドを乾燥ボックスに入れて水を除去して、次に高真空を使用して微量の水を除去した。水100 μLを使用して、FAST(登録商標)フレーム・マルチスライド・プレートの各ウェルをすすいで、緩衝液溶液の塩を分解および除去した。高真空によってプレート上の残留水をすべて除去して、次にMALDI-TOF Ultra-Flex IIによってスライドを分析した。

30

40

【0164】

セルラーゼ精製およびセルラーゼ活性のMS-TOF分析。

【0165】

エキソグルカナーゼおよびエンドグルカナーゼのクローニング、発現および精製
スルホロプス・ソルファタリカス(ATCC35092)およびクロストリジウム・サーモセラム(ATCC27405)のゲノムDNAをATCC biological resource centerから入手した。Sso7d(NCBIアクセション番号:AAK42090)遺伝子断片をスルホロプス・ソルファタリカスゲノムから、

【0166】

50

【化7】

フォワード 5' GGAATTCATATGGCAACAGTAAAGTTCAAG 3' (配列番号1)プライマーおよびリバース 5' CGGGATCCCTTCTTTTGCCTTCTCTAACATTTG 3' (配列番号2)プライマー

を用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって直接増幅した。S s o 7 d をコードする PCR 生成物を N d e I および B a m H I で消化して、続いて発現ベクター p E T - 2 8 a (N o v a g e n) 中にクローニングして、p E T - 2 8 - S s o 7 d を生成した。

【0167】

10

【化8】

5'

GATCTGATCTGTACGACGATGACGATAAGGGATCTATCGAAGGTCGTG 3' (配列番号3)プライマーおよび 5' GATCCACGACCTTCGATAGATCCCTTATCGTCATCGTCGTACAGATCA 3' (配列番号4)プライマー

を用いて変性およびアニーリングすることによって生成された、2粘着末端リンカーを B a m H I 切断 p E T - 2 8 - S s o 7 d 中に挿入して、p E T - 2 8 - S s o 7 d - F x a を生成した。C t C b h A (N C B I アクセション番号 : X 8 0 9 9 3) 遺伝子断片の機能性ドメインを、

20

【0168】

【化9】

フォワード 5'

GAAGATCTATACTTCCGCAGCCTGATG 3' (配列番号5)プライマーおよびリバース 5' ACGCGTCGACTTAGGTTTCACTGTCTGTGTACTG 3' (配列番号6)プライマー

を用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって、クロストリジウムサーモセラムゲノムから直接増幅した。C t C b h A をコードする PCR 生成物を B g l I I および S a l I によって消化して、続いて B a m H I および S a l I 切断 p E T - 2 8 - S s o 7 d - F x a 中にクローニングして、p E T - 2 8 - S s o 7 d - F x a - C t C b h A を生成した。C t C e l 4 4 A (N C B I アクセション番号 : D 8 3 7 0 4) 遺伝子断片の機能性ドメインを

30

【0169】

【化10】

フォワード 5'

GAAGATCTGAACCTGCAAAAGTGGTTGAC 3' (配列番号7)プライマーおよびリバース 5' ACGCGTCGACTTAGGGCTCCGCAGCTTCAAGCAC 3' (配列番号8)プライマー

40

を用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって、クロストリジウムサーモセラムゲノムから直接増幅した。

【0170】

C t C e l 4 4 A をコードする PCR 生成物を B g l I I および S a l I によって消化して、続いて B a m H I および S a l I 切断 p E T - 2 8 - S s o 7 d - F x a 中にクローニングして、p E T - 2 8 - S s o 7 d - F x a - C t C e l 4 4 A を生成した。すべての DNA 構築物をヌクレオチド配列決定によって検証した。正しい構築物をタンパク質発現のためのエシェキリアコリ株 B L 2 1 (D E 3) コンピテント細胞に形質転換した。単一形質転換体を一晩培養したもの 1 0 m l を使用して、3 0 の、3 0 μ g / m l カナ

50

マイシンを含有する新しいLB培地1リットルに接種した。細胞が $A_{600nm} = 0.8 \sim 1$ に増殖するまで、インキュベート温度を16℃に変更した。1時間後、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を最終濃度0.5mMまで添加した。16時間後、細胞を $7,000 \times g$ での15分間の遠心分離によって回収して、細胞ペーストを収集した。細胞ペレットを20mM Tris-HCl、400mM NaCl、10mMイミダゾールを含有する溶解緩衝液、pH7.5にただちに再懸濁させた。細胞懸濁をConstant Cell Disruption System(CONSTANT SYSTEM Ltd., UK)によって中断させて、 $17,000 \times g$ にて遠心分離して細胞片を除去した。細胞を含まない抽出物を、溶解緩衝液によって事前に平衡とされたNi²⁺-NTAカラムに装填した。カラムを溶解緩衝液によって洗浄して、続いてHis₆タグ化タンパク質を10mM~300mMイミダゾールの直線勾配によって溶離させた。精製His₆タグ化Sso7d融合CtCbhAおよびCtCel44Aタンパク質は、-80℃にて貯蔵するために、Amicon-Ultra-15(Millipore, MA, USA)の30kDaカットオフサイズ膜によって濃縮して、貯蔵緩衝液(50mM Tris-HCl、100mM NaCl、pH8.0)に変化させた。

【0171】

実施に従って、本開示のデバイスおよび用法(たとえば質量分析法)は、汎用または特殊目的のコンピューティングシステムまたは構成を含む環境で動作可能である。本発明での使用に好適であり得る周知のコンピューティングシステム、環境、または構成の例は、これに限定されるわけではないが、パーソナルコンピュータ、サーバコンピュータ、携帯型またはラップトップデバイス、マルチプロセッサシステム、マイクロプロセッサベースシステム、セット・トップ・ボックス、プログラマブル家庭用電化製品、ネットワークPC、ミニコンピュータ、メインフレームコンピュータ、電話技術システム、上のシステムまたはデバイスのいずれかを含む分散コンピューティング環境などを含む。

【0172】

本開示のデバイスおよび方法は、コンピュータによって実行される、プログラムモジュールなどのコンピュータ実行型命令の一般的な状況で説明され得る。一般にプログラムモジュールは、特定のタスクを実行する、または特定の抽象データ型を実装する、ルーチン、プログラム、オブジェクト、コンポーネント、データ構造などを含む。システムは、通信ネットワークを通じてリンクされているリモート処理デバイスによってタスクが実行される、分散コンピューティング環境でも実行され得る。分散コンピューティング環境では、プログラムモジュールは、メモリ記憶デバイスを含むローカルおよびリモートの両方のコンピュータ記憶媒体に配置され得る。コンピュータプログラムは、メモリ媒体もしくは記憶媒体に記憶されるか、またはネットワークもしくはI/Oバスを通じて処理ユニットに提供され得る。

【0173】

一態様において、本開示のデバイスおよび方法は、少なくとも1個の中央処理ユニット(CPU)またはプロセッサを含む。CPUは、コンピュータ実行型命令を含有するメモリ、ROMまたはコンピュータ可読媒体に接続できる。コンピュータ可読媒体は、システムがアクセスできる任意の利用可能な媒体であることが可能であり、コンピュータ可読命令、データ構造、プログラムモジュールまたは他のデータなどの情報の記憶のための任意の方法または技術で実装された、揮発性および不揮発性媒体、リムーバブルおよびノンリムーバブル媒体のどちらも含む。コンピュータ記憶媒体は、これに限定されるわけではないが、RAM、ROM、EEPROM、フラッシュメモリ、ポータブルメモリまたは他のメモリ技術、CD-ROM、デジタル多目的ディスク(DVD)もしくは他の光学ディスク記憶、磁気カセット、磁気テープ、磁気ディスク記憶もしくは他の磁気記憶デバイス、または所望のデータを記憶するのに使用可能であり、指紋生成一致システムがアクセスできる任意の他の媒体を含む。通信媒体は通例、コンピュータ可読命令、データ構造、プログラムモジュールまたは他のデータを、搬送波または他の運搬機構などの変調データシグナルとして具体化し、任意の情報送達媒体を含む。一例として、制限なく、通信媒体は、

有線ネットワークまたは直接配線接続などの有線媒体、ならびに音響、RF、赤外および他の無線媒体などの無線媒体を含む。上のいずれの組合せも、コンピュータ可読媒体の範囲内に含まれるべきである。コンピュータ可読媒体は、本明細書に記載するシステムの全部または一部を実装する命令またはデータを記憶し得る。

【0174】

装置および方法が現在最も実用的で好ましい実施形態であると思なされるものに関して説明されてきたが、本開示が開示された実施形態に限定される必要がないことが理解されるべきである。本開示は、請求項の精神および範囲に含まれる各種の変更および類似の構成を対象とすることを意図するものであり、請求項の範囲は、これらの変更および類似の構成をすべて含むために、最も広範な解釈を与えられるべきである。本開示は、以下の請求項のありとあらゆる実施形態を含む。

Academia-60451-Sequence_ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Wu, Chung-Yi
Wong, Chi-Huey

<120> GLYCAN ARRAYS ON PTFE-LIKE ALUMINUM COATED GLASS SLIDES AND
RELATED METHODS 10

<130> 37919.60451

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 1
ggaattccat atggcaacag taaagttcaa g 31

<210> 2
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 20

<220>
<223> Primer

<400> 2
cgggatccct tcttttgctt ctctaacatt tg 32

<210> 3
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Linker

<400> 3
gatctgatct gtacgacgat gacgataagg gatctatcga aggtcgtg 48 30

<210> 4
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Linker

<400> 4
gatccacgac cttcgataga tcccttatcg tcatcgtcgt acagatca 48

<210> 5

Academia-60451-Sequence_ST25.txt

```

<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 5
gaagatctat acttccgcag cctgatg
27
10

<210> 6
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 6
acgcgtcgac ttaggtttca ctgtctgtgt actg
34

<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
20

<220>
<223> Primer

<400> 7
gaagatctga acctgcaaaa gtggttgac
29

<210> 8
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 8
acgcgtcgac ttagggctcc gcagcttcaa gcac
34
30

```

【 図 1 】

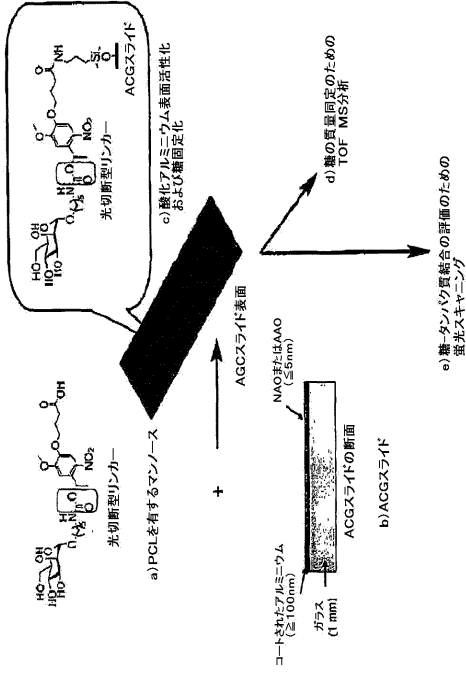


Fig. 1

【 図 2 】

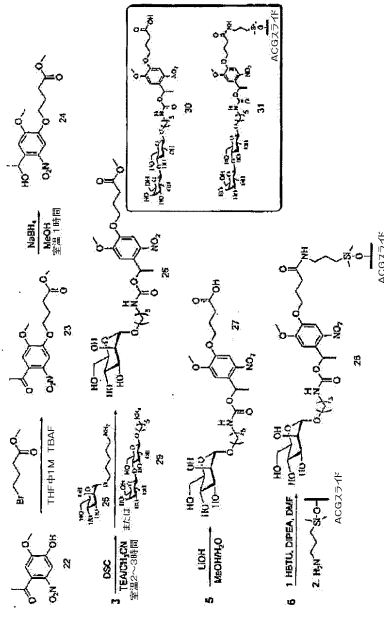


Fig. 2

【 図 3 】

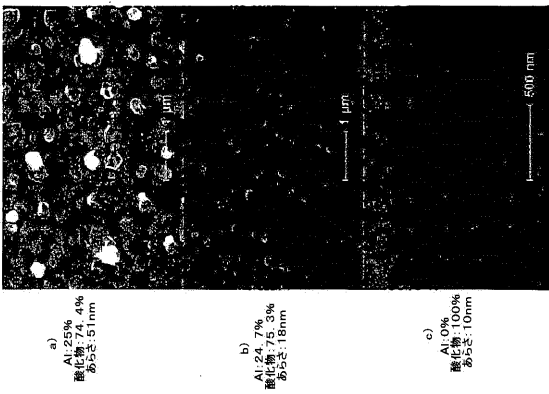


Fig. 3

【 図 4 】

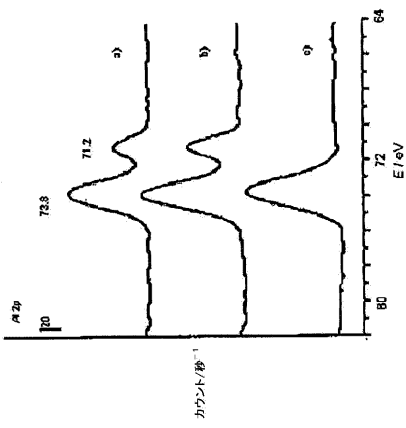


Fig. 4

【 図 5 】

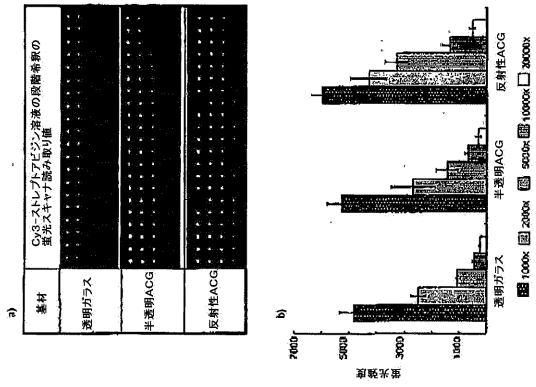


Fig. 5

【 図 6 】

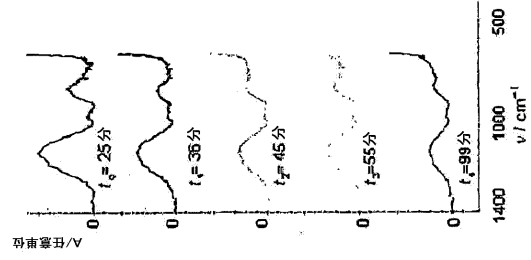


Fig. 6

【 図 7 】

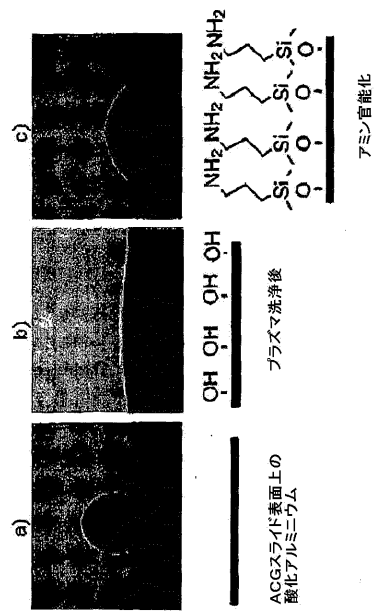


Fig. 7

【 図 8 】

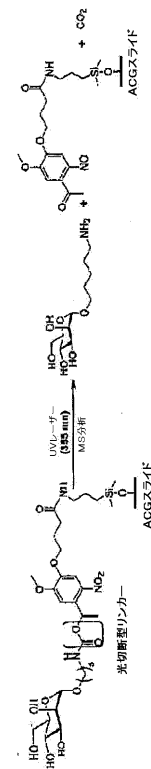


Fig. 8

【 図 9 】

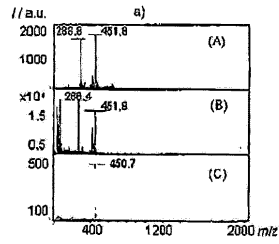


Fig. 9A

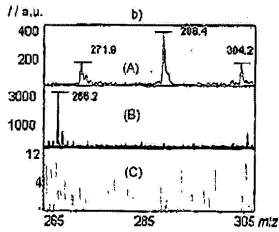


Fig. 9B

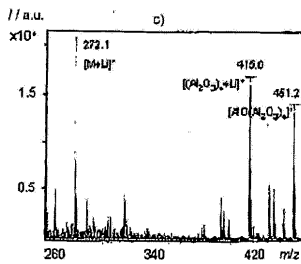


Fig. 9C

【 図 10 】

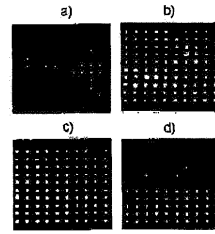


Fig. 10A

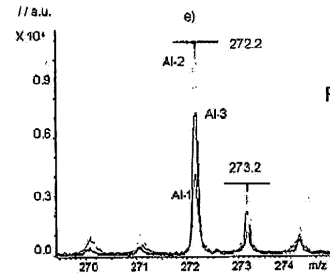


Fig. 10B

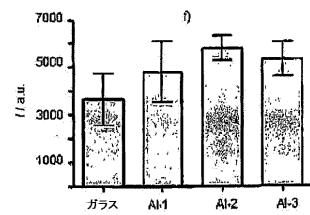


Fig. 10C

【 図 11 】

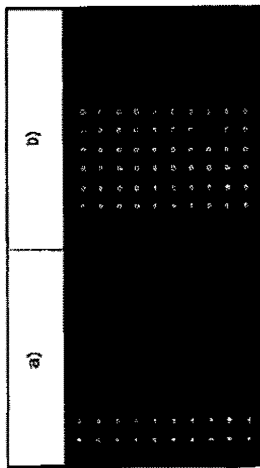


Fig. 11

【 図 12 】

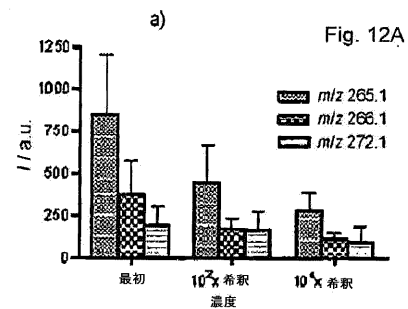


Fig. 12A

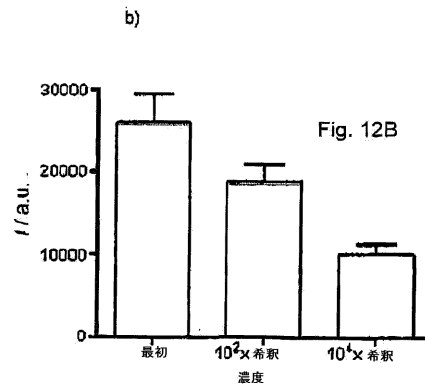


Fig. 12B

【 図 13 】

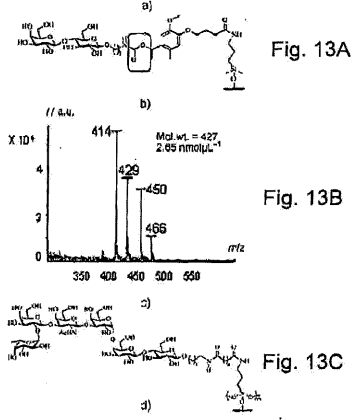
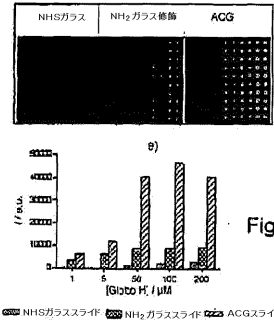
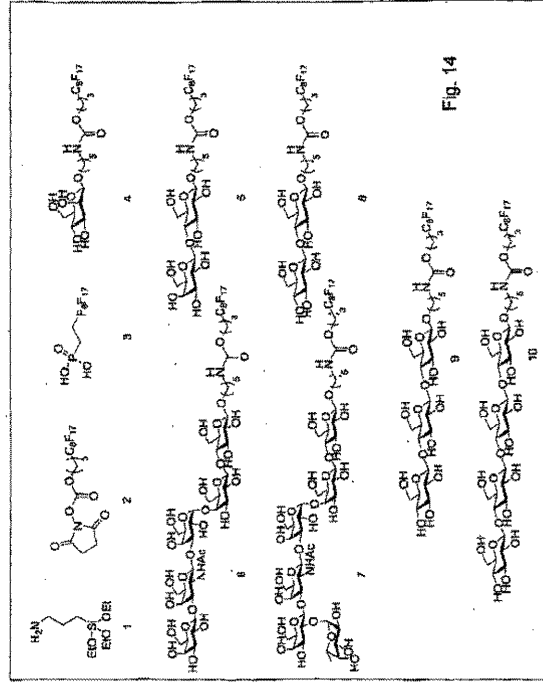


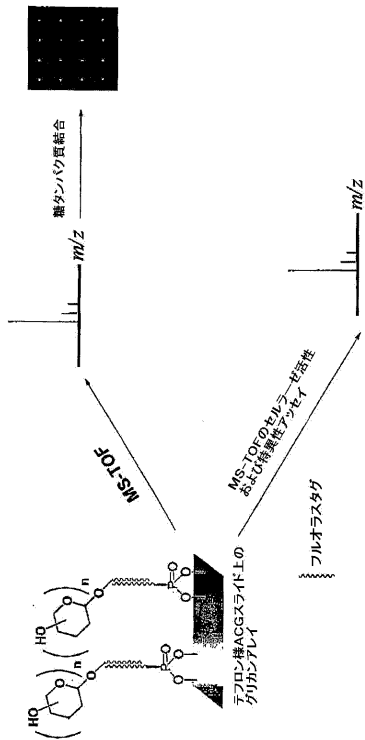
Fig. 13D



【 図 14 】



【 図 15 】



【 図 16 】

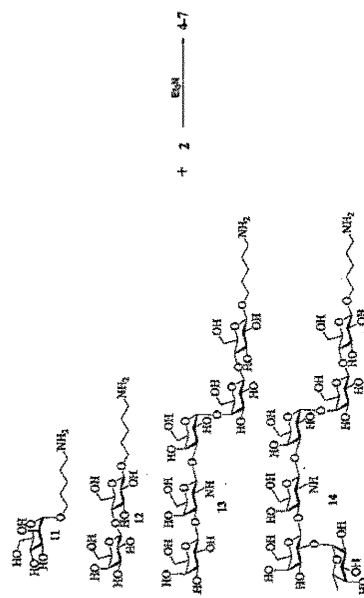


Fig. 16

【 20 A 】

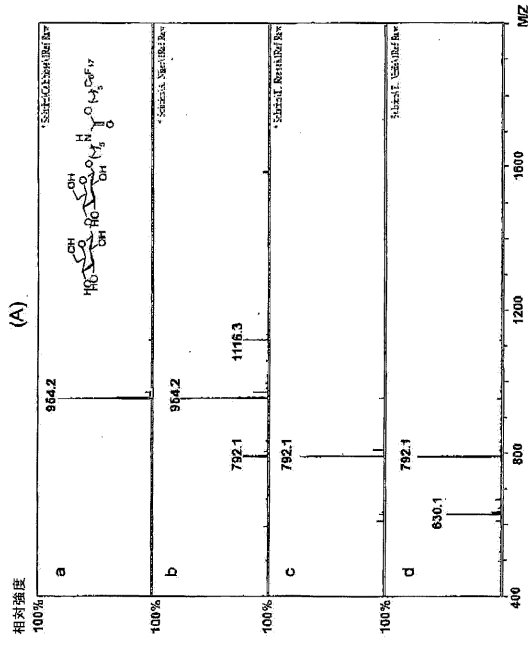


Fig. 20A

【 20 B 】

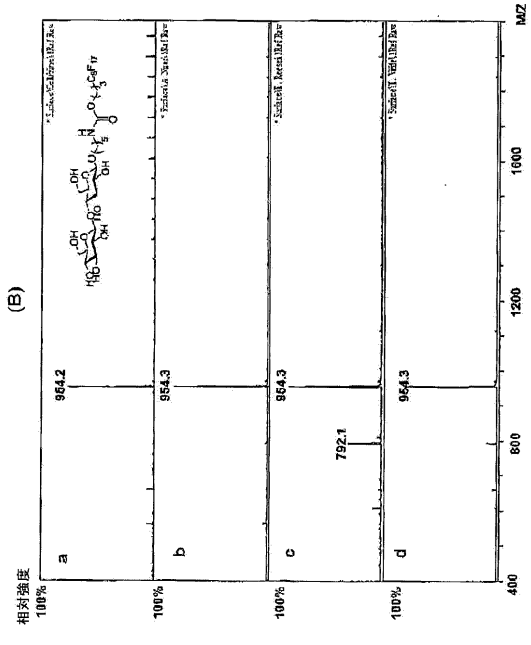


Fig. 20B

【 21 】

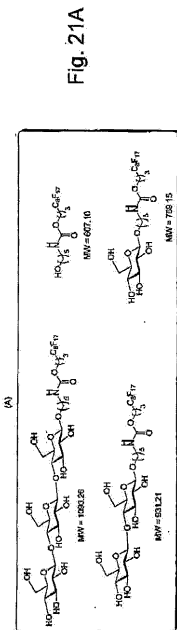


Fig. 21A

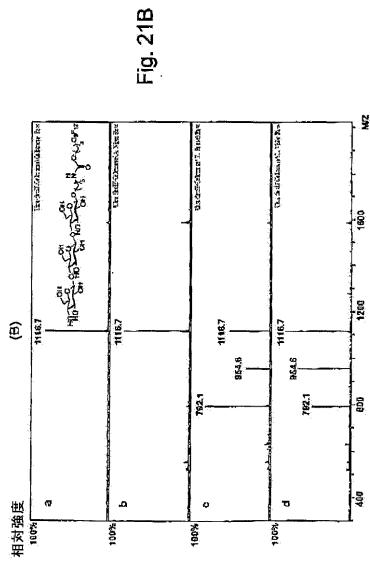


Fig. 21B

【 22 】

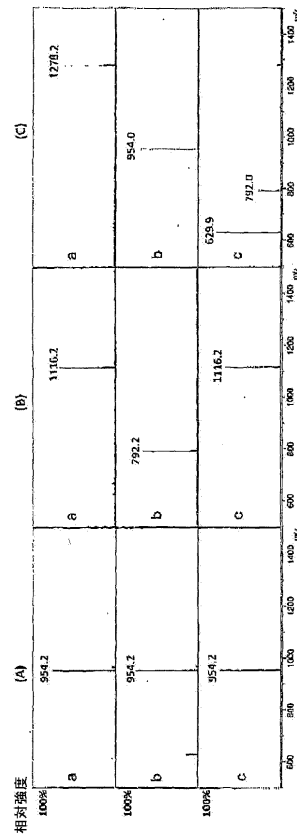


Fig. 22

【 図 26 B 】



Fig. 26B

【 図 27 A 】

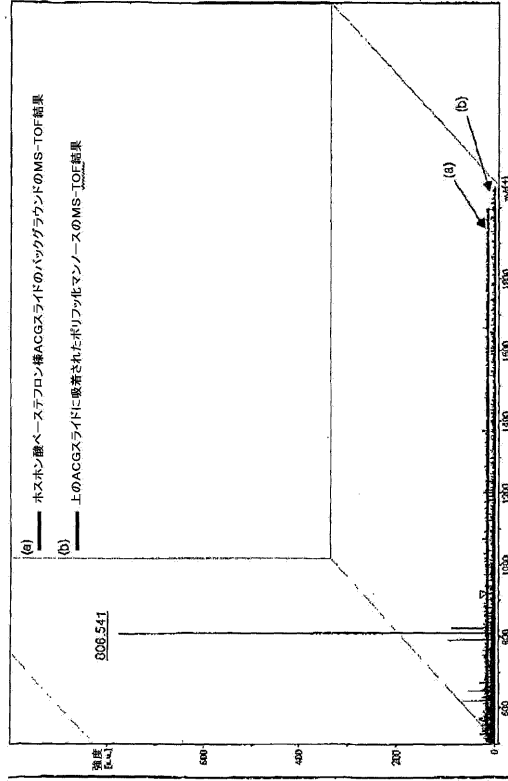


Fig. 27A

【 図 27 B 】

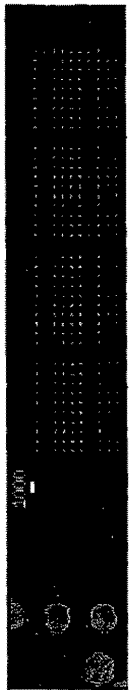


Fig. 27B

【 図 28 】

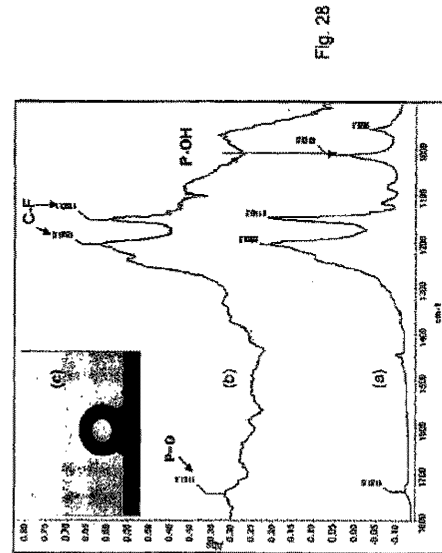


Fig. 28

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 G 0 1 N 33/543 5 7 5
 G 0 1 N 33/53 D

(72)発明者 チー - ヒュエイ・ワン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 3 7 , ラ ホーヤ , エヌ . トーリー パインズ
 ロード 1 0 5 5 0

(72)発明者 ウー・チャン - イー
 台湾 1 1 5 2 9 タイペイ , ナンカン , アカデミア ロード セクション 2 1 2 8 ,
 アカデミア シニカ 気付

(72)発明者 ツェン・スーザン・ワイ
 台湾 1 1 5 2 9 タイペイ , ナンカン , アカデミア ロード セクション 2 1 2 8 ,
 アカデミア シニカ 気付

審査官 西浦 昌哉

(56)参考文献 米国特許出願公開第2008/0145838 (US, A1)
 特開2002-371087 (JP, A)
 特開2008-025989 (JP, A)
 特表2008-504531 (JP, A)
 特開2006-112980 (JP, A)
 特表2009-522547 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
 G 0 1 N 3 7 / 0 0