

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 日本國 2005 年 7 月 19 日 特願 2005-209077 （主張優先權）

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於由糖鏈混合物製造糖鏈衍生物之方法以及糖鏈之構造解析方法。尚且亦關於依據本發明之糖鏈衍生物製造方法所製造之新穎糖鏈衍生物。

【先前技術】

咸認糖蛋白質中的糖鏈係擔任蛋白質立體構造之保持，防止源自蛋白酶的分解，而獲得抵抗性等作用。最近漸漸了解有關糖蛋白質中之糖鏈參與受精或分化，傳達訊號，癌化，蛋白質於細胞內之輸送及生理活性之調節等生命現象。此外，亦明瞭細胞表面之接著分子或糖蛋白質性荷爾蒙等之糖鏈與其機能的相互關係，而得到糖質科學共同研究開發之構想。目前，糖鏈機能研究中心係成為有關主司其生合成之糖轉移酶(糖鏈基因)的研究重心，惟保存糖轉移酶及基因情報，依據與其他蛋白質之協調作業，而考量生命機能之相關性時，有必要藉由補捉細胞組織中表現之糖鏈的全體像並加以解析之構造醣質體分析(glycomics)方法，進一步解析糖鏈之機能。

於糖鏈科學中構造糖質體分析之角色係網羅式地解析擔任多種生命現象重要角色的糖鏈認識機構，係機能構造醣質體分析不可缺少之要件。構造醣質體分析所要求之技術要件為：高度網羅性，高產率，高敏感度及高精確度。

目前，糖蛋白質糖鏈之構造解析法，係將由蛋白質切出之糖鏈經螢光標示後，使用高速液體層析法(HPLC)或質

量分析法(MS)進行解析之方法，由於質量分析顯著的進步而成為有力的手段(非專利文獻 1-4)唾液酸(sialo)糖鏈之分離至今係僅使用陰離子交換管柱層析法(非專利文獻 5)。

(非專利文獻 1)Biomed Chromatogr. 16: 103-115(2002 年)

(非專利文獻 2)Anal Biochem 206:278-287(1992 年)

(非專利文獻 3)Biochem Soc Trans. 21:121-125(1993 年)

(非專利文獻 4)Chem Rev. 102:321-369(2002 年)

(非專利文獻 5)Biochem Biophys Acta. 705:167-173(1982 年)

然而，網羅式解析細胞或組織中的糖鏈時，由於有唾液酸或海藻糖等非還原末端修飾之多樣性及糖鏈分支之問題存在，因而混合之糖鏈不能充分分離，而不能得到滿意的結果。特別是，使用離子交換管柱等時，由於不具有特異的分離能力，不僅不能得到充分的分離，且分離操作後必須施予脫鹽處理，不能稱為實用的方法。

因此，考慮這些糖鏈的不均一性情報的同時，熱切期待能夠詳細解析細胞，組織中特徵性糖鏈構造之實用方法。

本發明的課題係由於細胞或組織中如糖鏈般種種糖鏈為混合存在之狀態，而提供將各別糖鏈分離而取得的手段。

再者，本發明的課題為提供解析經分離之各糖鏈化合物構造之手段。

此外，本發明的課題為提供新穎之糖鏈衍生物。

【發明內容】

本發明係關於以下之發明。

1. 一種糖鏈衍生物之製造方法，係由糖鏈混合物製造糖鏈衍生物之方法，其特徵為具備：(a)將脂溶性基導入糖鏈混合物中的糖鏈而得糖鏈衍生物混合物之步驟，以及(b)以羥色胺(serotonine)親和性管柱層析法處理該糖鏈衍生物混合物之步驟。
2. 如上述記載的糖鏈衍生物之製造方法，係於(b)步驟之後，具備(c)以使用胺基管柱或醯胺基管柱之順相層析法進行處理之步驟。
3. 如上述記載的糖鏈衍生物之製造方法，係於(c)步驟之前，具備(d)以糖水解酶處理之步驟。
4. 一種糖鏈之構造解析方法，係解析糖鏈混合物中糖鏈構造之方法，其特徵為具備：(a)將脂溶性基導入糖鏈混合物中之糖鏈而得糖鏈衍生物混合物之步驟，(b)以羥色胺親和性管柱層析法處理該糖鏈衍生物混合物之步驟，(c)依質量分析法處理之步驟。
5. 如上述記載的糖鏈構造解析方法，係於(b)步驟之後，具備(c)以使用胺基管柱或醯胺基管柱之順相層析法處理之步驟。
6. 如上述記載的糖鏈構造解析方法，係於(c)步驟之前，具備(d)以糖水解酶處理之步驟。
7. 如上述 4 項記載的糖鏈構造解析方法，其中，質量分析法係依據 MALDI-TOF MS 之質量分析法。
8. 一種下列通式(1)至(6)所示之糖鏈衍生物[式中 R¹表示 2-羧基苯基，3-羧基苯基，4-羧基苯基，對-乙氧基羰基苯基，

源自天然糖蛋白質的糖鏈為非還原末端的糖殘基隨機式欠缺的糖鏈混合物，以使用此類糖鏈混合物為佳。以使用含有於糖鏈殘基中具有唾液酸殘基之糖鏈的糖鏈混合物為佳。

天然糖鏈的混合物，可例舉如天然原料，例如源自乳汁，源自牛之胎球蛋白(Fetuin)，蛋或生物組織或細胞的糖鏈混合物。特別以使用源自癌組織或癌細胞的糖鏈混合物，因為能期待非常有趣的結果而佳。

本發明能使用的天然糖鏈的混合物，以下文所例示的糖鏈混合物為佳，惟以包含唾液酸糖鏈的糖鏈混合物特別佳。

可使用由上述天然原料根據習知的方法，獲得之糖蛋白質及/或糖胜肽的混合物，以蛋白質分解酶等作用而切斷該混合物之胜肽部分，並使用凝膠過濾管柱和離子交換管柱等層析法精製所得的糖鏈結合天門冬醯胺的混合物。

例如可使用生物組織或細胞，特別是培養組織或培養細胞，並均勻化培養液中的組織或細胞，接著離心分離所得的細胞膜流份，以 2-巰乙醇處理之後，以 N-聚糖酶作用所得的糖鏈混合物。

再者，可使用將培養組織或培養細胞均勻化，並藉由採取離心分離後之上清液而得的游離糖鏈混合物。此類糖鏈中因含有中性糖鏈之高甘露糖型糖鏈和多種類的唾液酸糖鏈，而適合各種糖鏈的製造。

將脂溶性基導入所得糖鏈混合物中之糖鏈中作為糖鏈

衍生物的混合物。

脂溶性基係與糖鏈的還原末端的開環醛，糖鏈結合天門冬醯胺的天門冬醯胺之胺基或羧基反應而形成的具有脂溶性的取代基，例如 2-，3-或 4-羧基苯基胺基，對-乙氧基羰基苯基胺基，2-吡啶基胺基等通常作為螢光標識使用的取代基和 9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)基，第三-丁氧基羰基(BOC)基，苄基，烯丙基，烯丙氧基羰基，乙醯基等作為胺甲酸系或醯胺系保護基使用的取代基。

可根據習知的方法進行這些脂溶性基的導入，而就操作的簡便性，所得糖鏈衍生物的安定性而言，由於激發光係對應於水銀燈或雷射光源等，而以使用 2-羧基苯基胺基，Fmoc 基或 BOC 基為佳。

例如，使用 2-胺基苯甲酸，於氰基硼氫化鈉或二甲基胺化硼等還原劑的存在下與糖鏈反應，即可成為胺基糖醇衍生物。

又，例如可使用 9-芴基甲基-N-琥珀醯亞胺基碳酸酯，於碳酸氫鈉存在下，與糖鏈結合天門冬醯胺反應，即可於天門冬醯胺的胺基導入如胺甲酸酯般結合的 Fmoc 基。

依以上的操作，可得到導入脂溶性基的糖鏈衍生物的混合物。

以羥色胺親和性管柱層析法分離所得之糖鏈衍生物的混合物。

本發明的羥色胺親和性管柱層析法係使用與唾液酸具有親和性的羥色胺作為配位體的親和性管柱。

羥色胺親和性管柱，可使用在填充劑中使羥色胺固定化而作成者，也可使用市販管柱。市販管柱可列舉如 LA-羥色胺管柱(J-OIL MILLS 公司製)等。

層析法的分離條件係適宜地設定，舉一例而言，使用螢光檢測器，以激發波長 350nm，螢光波長 425nm，流速 0.5ml/min，並使用超純水和乙酸銨水溶液作為移動相進行直線梯度溶出即可達成分離。

藉由羥色胺親和性管柱層析法，可將糖鏈衍生物的混合物依據唾液酸殘基的數目進行分離，不具有唾液酸殘基的非唾液酸糖鏈衍生物最早溶出，接著依單唾液酸糖鏈衍生物，二唾液酸糖鏈衍生物的情形而與唾液酸殘基數目的增加成比例的分離溶出。

如上述，將經羥色胺親和性管柱分離的糖鏈衍生物，以使用聚合物基材的胺基管柱或氧化矽基材的醯胺管柱之順相 HPLC 處理，即可進行極為出色的糖鏈衍生物間的分離。所謂順相層析法，是使用胺基，胺基丙基，丙烯醯胺基等極性固定相作為填充劑的層析法，係按照相對於樣品成分的固定相-移動相的樣品成分之分配度的差異而達成分離。基本上為按照糖鏈的親水性而分離的方式，也可較佳地使用於結合唾液酸的糖鏈的異構體的分離。同時，也可較佳地使用於經稀酸或神經胺酸酶(neuraminidase)處理的非唾液酸型糖鏈的分離。

所使用的聚合物基材的胺基管柱，係使用使胺基與聚乙烯醇系基材凝膠等聚合物結合之固定相作為填充劑的管

柱，可以自行製作，或可以使用市販的管柱。

市販的胺基管柱，可例舉 Asahi Shodex NH2P-50 4E (昭和電工公司製)。

氧化矽基材的醯胺基管柱，係以化學結合將丙烯醯胺等醯胺基導入以氧化矽作為固定相的填充劑的管柱，可以自行製作，亦可使用市販管柱。

市販的醯胺基管柱，可列舉 TSK-GEL 醯胺-80 (TOSOH 公司製)。

層析法的分離條件係適當地設定，舉一例而言，使用螢光檢測器，於激發波長 350nm，螢光波長 425nm，流速 1ml/min，以含有乙酸的乙腈和含有乙酸及三乙胺的水溶液作為移動相進行直線梯度溶出，即可分離。

如以上分離所得的糖鏈衍生物，藉由適當使用糖水解酶，質量分析法的分析，即可解析其糖鏈構造。

糖水解酶，可使用習知酵素，例如可列舉唾液酸酶，半乳糖苷酶，甘露糖苷酶，N-乙醯基葡萄糖胺酶，岩藻糖酶等。

質量分析方法係根據採用以往習知的質量分析法之分析裝置測定，特別以近年來用於糖鏈分析的 MALDI-TOF MS 測定為佳。

於解析糖鏈構造時，使與特定的糖水解酶作用後，以使用聚合物基材的胺基管柱或氧化矽基材的醯胺管柱之順相 HPLC 處理，所得之流份進行質量分析，考慮消失的質量份及水解酶的特性，更進一步重覆此操作，即可解析糖

鏈構造。

所得的糖鏈衍生物，藉由除去其脂溶性基，即可人工地容易而且大量的得到種種糖鏈。

脂溶性基的去除可使用以往習知的方法。

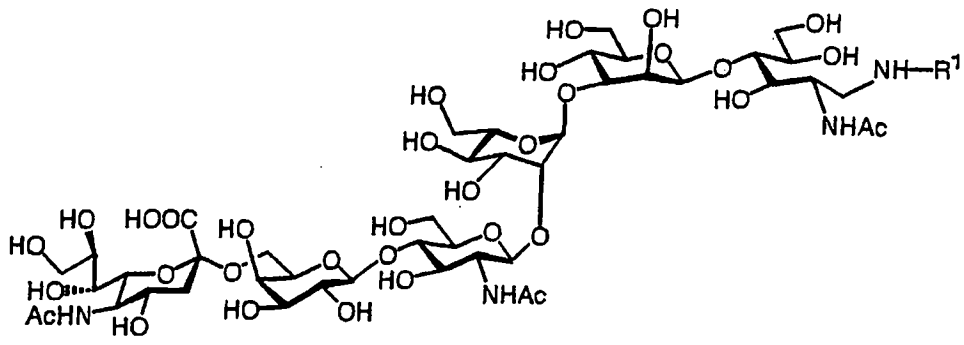
例如，2-羧基苯基胺基的去除係於乙酸中與過氧化氫在室溫反應而達成，可容易地回收游離型糖鏈。

Fmoc 基的去除係於 N, N-二甲基甲醯胺中，於糖鏈衍生物中加入嗎福啉使反應而達成，BOC 基的去除係與弱酸反應而達成。

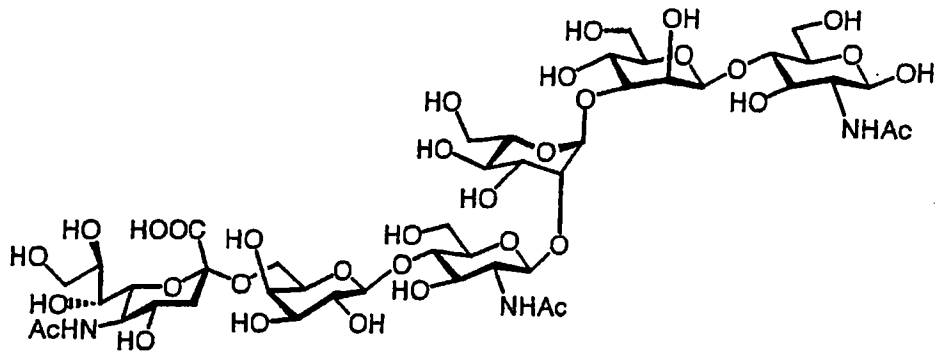
糖鏈係以糖鏈結合天門冬醯胺時，使與無水肼反應後，進行乙醯化的方法；或於鹼性水溶液中加熱回流後，進行乙醯化的方法等，即可除去天門冬醯胺殘基。

該糖鏈類，在醫藥品開發等領域中非常有用，可列舉如癌疫苗合成，將所得到的糖鏈類以組合化學反應或糖轉移酶的反應等，合成新穎糖殘基而衍生物化，而能開發新穎疫苗。

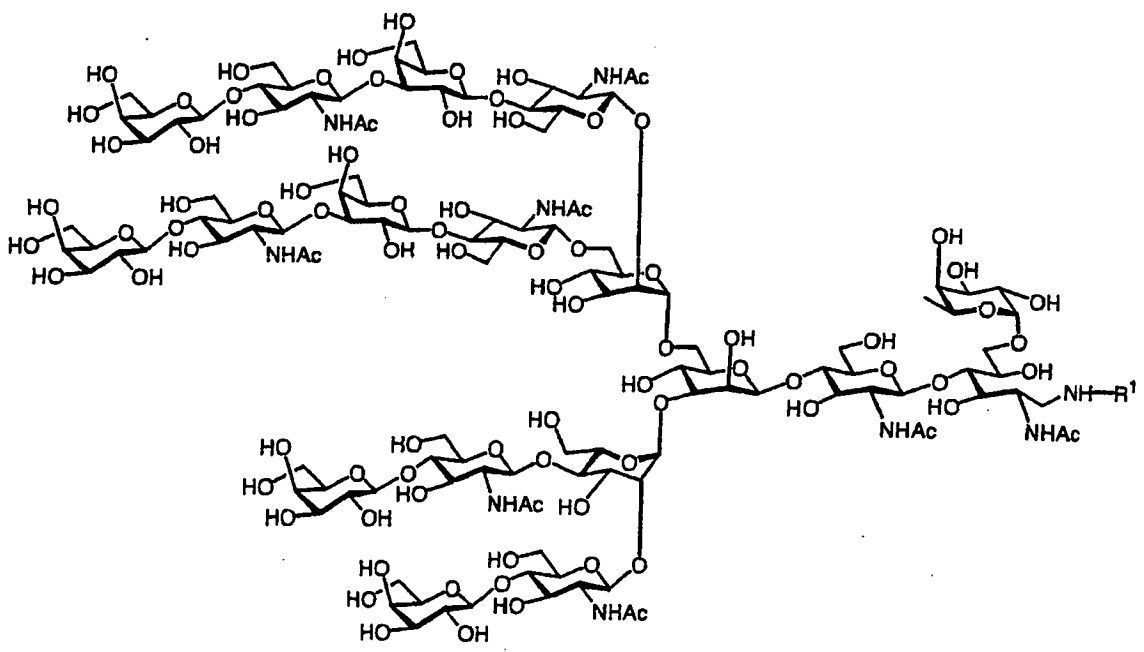
本發明者等，根據本發明的構造解析方法及製造方法，於各種癌細胞中成功的分離至今未發現到的下列通式(1)至(6)所示之糖鏈。



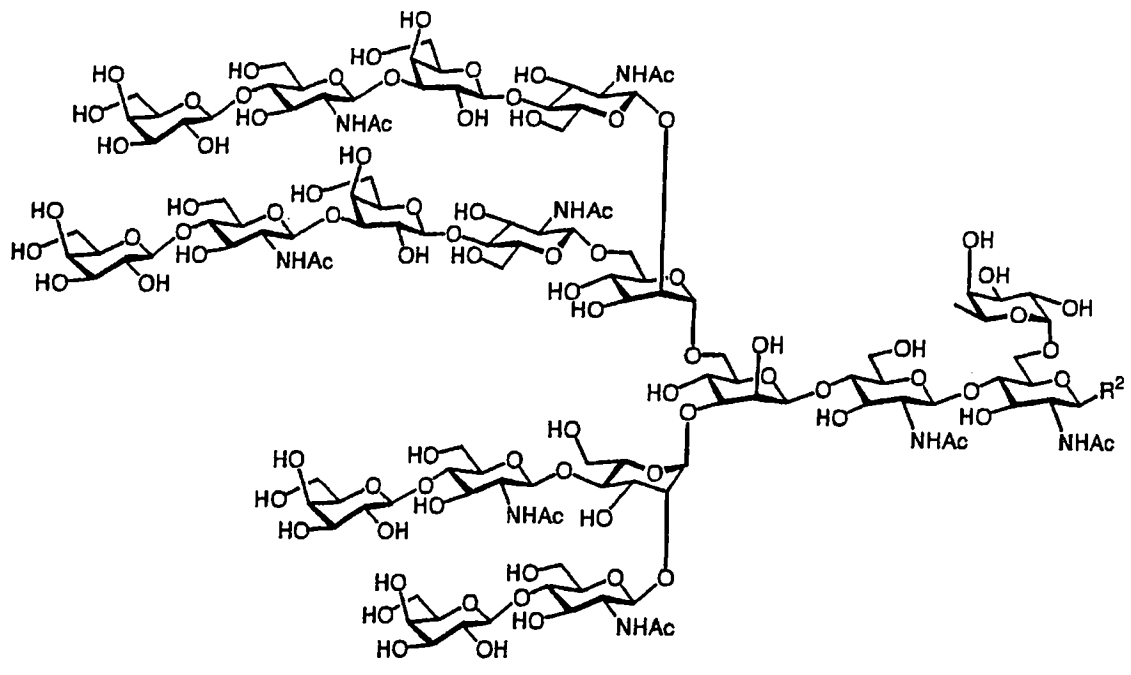
(1)



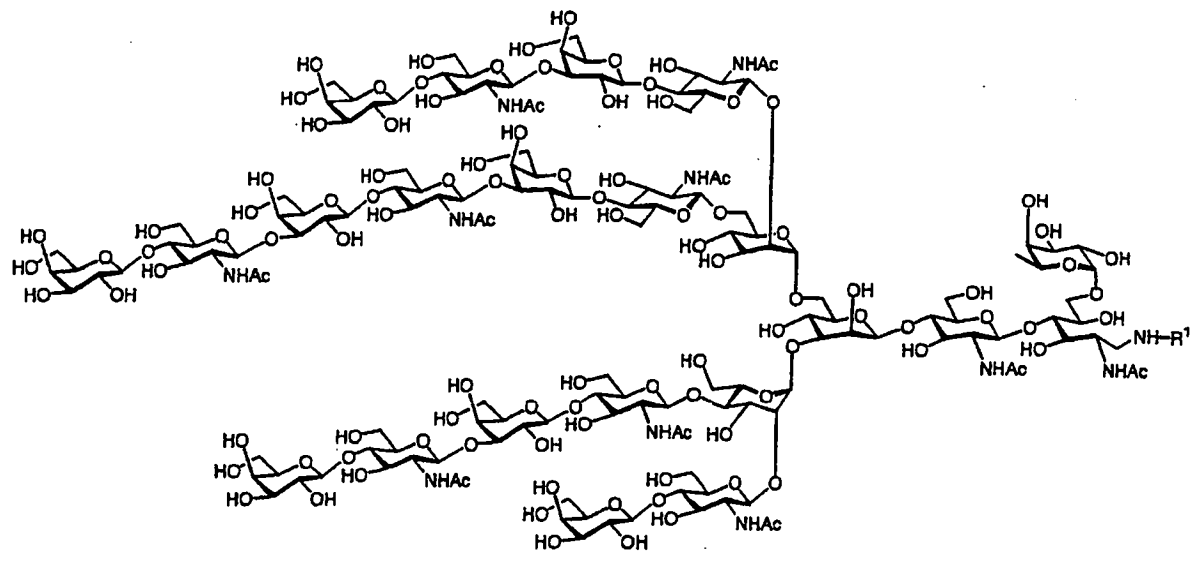
(2)



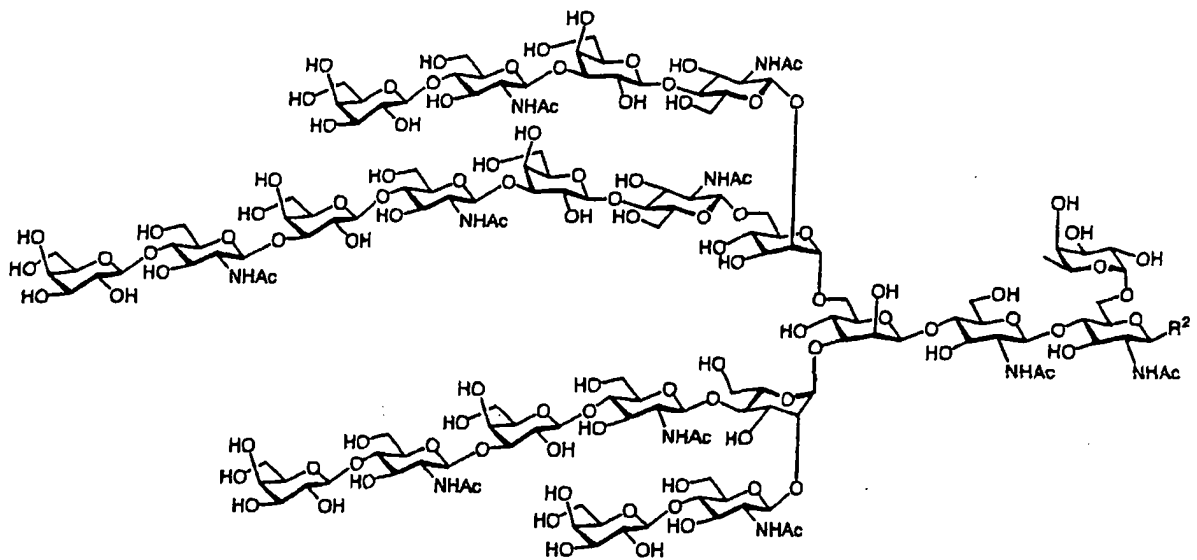
(3)



(4)



(5)



(6)

[式中 R^1 表示 2-羧基苯基，3-羧基苯基，4-羧基苯基，對-乙氧基羧基苯基，或 2-吡啶基。 R^2 表示羥基，基-Asn 或基-Asn- R^3 。於此，Asn 表示天門冬醯胺醯基， R^3 胺甲酸系或表示醯胺系保護基。Ac 表示乙醯基]。

咸認這些新穎糖鏈係於癌細胞中特異性地表現者，可利用這些糖鏈作為癌標記。

例如製作與這些癌細胞中的特異性糖鏈特異性地辨識的多株抗體或單株抗體，並根據免疫學手法即可進行該糖鏈的檢測。

多株抗體係以該糖鏈或該糖鏈的不完全抗原(hapten)與蛋白質等高分子化合物(載體)結合之結合體作為抗原，使小鼠，田鼠，天竺鼠，雞，大鼠，兔子，狗，山羊，羊，牛等哺乳動物進行免疫過敏反應，從該哺乳動物採取血液，即可調製含有多株抗體的抗血清。

單株抗體例如，可調製以抗體產生細胞和骨髓瘤的細胞融合所得之融合瘤細胞而得。培養如上述操作而得到的

融合瘤細胞，而可純化所得的單株抗體。

【實施方式】

[實施發明的最佳形態]

以下表示參考例及實施例，然而，本發明不受限於下列實施例。

實施例 1 以羥色胺親和性層析法分離源自人類血清之[1-酸性糖蛋白質(AGP)]糖鏈

將源自人類血清的 AGP(Sigma-Aldrich Japan 製)1mg 溶解於 20mM 磷酸緩衝溶液(pH7.5) 50 μ l，加入 N-聚糖酶 F(2 單位，4 μ l)，37°C 下反應 12 小時。反應後以 100°C 煮沸 3 分鐘並回收離心分離後之上清液。

溶解 2-胺基苯甲酸(2AA)和氫基硼氫化鈉於 2% 硼酸，4% 乙酸鈉之混合液(500 μ l)中使分別成為 3% 添加該溶液 100 μ l 至回收之上清液中，於 80°C 反應 1 小時。使用以 50% 甲醇水溶液平衡化之 Sephadex LH-20 管柱(0.7cm i.d., 30cm)對反應混合物進行區分，用分光光度計(日立製，F-4010 型)，以激發波長 335nm，螢光波長 410nm 測定各流份，回收最初溶出的螢光性流份，作為糖鏈衍生物的混合物。

製得的混合物提供於羥色胺親和性管柱層析，而得分離的糖鏈衍生物。第 1 圖表示以親和性管柱層析法的分離結果。

羥色胺親和性管柱層析的條件

管柱:LA-羥色胺管柱(4.6×150mm,Japan Oil mills 製)

泵: JASCO PU-980 型

流速: 0.5ml/min

檢測器: JASCO FP-920 型螢光檢測器

激發波長: 350nm

螢光波長: 425nm

移動相: 以超純水作為溶液 A, 40mM 乙酸銨水溶液作為溶液 B。

梯度條件: 以樣品注入後 2 分鐘溶液 B 為 5%, 37 分後乙酸銨濃度為 30mM, 進行直線梯度溶出, 然後以 10 分鐘成為 40mM 進行溶出。

再者, 羥色胺親和性層析法的分離條件係以下的實施例中亦同。

實施例 2(以羥色胺親和性層析法分離源自人類癌細胞之糖鏈)

細胞培養

使用人類腎腺癌細胞 ACHN, 人類肺癌細胞 A549, 人類胃癌細胞 MKN45 及人類組織球性淋巴腫 U937。使用含 10% 將 ACHN 及 A549 預先以 50°C 加熱 30 分鐘使不活化的牛血清 [NEWBORN CALF SERUM (NCS), Sigma-Aldrich Japan 製] 的 DMEM (Dulbecco's 修飾 Eagle 培養液, Sigma-Aldrich Japan 製), U937 及 MKN45 係採用包含 10% NCS 的 RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Japan 製), 於 5% CO₂ 存在下 37°C 下於組織培養皿中培養。將去除 U937 之細胞

在 80% 群集 (confluent) 狀態下，以等張化磷酸緩衝液 (PBS) 洗淨培養中的細胞後，加入胰蛋白酶溶液，以 37°C 處理 5 分鐘之後，回收脫離的細胞，以 PBS 洗淨後進行繼代培養。

細胞膜流份的製作

細胞膜流份的製作係使用 80% 群集狀態的細胞，採用細胞刮片，自培養皿回收。回收的細胞以 PBS 洗淨後，使於含 1% 蛋白酶抑制劑的 10mM Na_2HPO_4 (pH7.5) 中成為 1×10^8 細胞/5ml 的濃度，以玻璃均化器均化後，添加包含 0.5M 蔗糖的 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) 10ml，於 4°C，以 3000rpm 離心分離 15 分鐘後回收上清液後，於 4°C，以 19000rpm 離心分離，以所得的沉澱作為細胞膜流份。

來自細胞膜流份之糖鏈的分離

於細胞膜流份 (1×10^7 細胞) 中加入 1% SDS 溶液 40 μ l，添加成為 1% 之 2-巯乙醇後，在 100°C 的沸騰水浴上加熱 5 分鐘進行可溶解化。將包含膜流份的溶液冷卻至室溫，加入 NP-40 使成為 1%，加入磷酸緩衝液 (pH7.5) 使其最終濃度成為 20mM。並且，加入 N-聚糖酶 F 4 μ l (2 單位，Roche Diagnostics 製)，37°C 下培養一夜，在 100°C 的沸騰水浴上煮沸 5 分鐘，加入 95% 乙醇使其最終濃度成為 75% 後，於 4°C，以 15000rpm 離心分離，並將上清液減壓乾燥成固體，即為源自細胞膜之糖鏈。

調製的各種源自細胞膜的糖鏈，與上述實施例 1 同樣地導入 2-AA 後，用羥色胺親和性管柱層析法處理，得到各糖鏈衍生物的流份。第 2 圖表示以管柱層析法的分離結

果。

實施例 3(以順相型醯胺管柱對源自癌細胞之糖鏈的分離及構造解析)

將實施例 2 所得各流份的源自癌細胞之糖鏈衍生物(相當於 1×10^7 細胞), 以 20mM 乙酸緩衝液(pH5.0)20 μ l 溶解, 加入唾液酸酶 4 μ l (2 mU, Markin Bio 製)以 37°C 反應 24 小時。反應後以 100°C 煮沸 3 分鐘, 回收離心分離後之上清液。

所得的上清液供至使用醯胺基管柱的順相 HPLC, 分別取得糖鏈衍生物。第 3 圖至第 7 圖表示以 HPLC 分離之結果。

HPLC 條件

管柱:TSK-GEL 醯胺-80(TOSOH 公司,Japan;4.6x250mm)

管柱溫度:40°C

泵:JASCO PU-980 型

流速:1ml/min

檢測器:JASCO FP-920 型螢光檢測器

激發波長:350nm

螢光波長:425nm

移動相:使用含有 0.2% 乙酸的乙腈溶液作為溶液 A, 含有 0.1% 乙酸及 0.1% 三乙基胺的水溶液作為溶液 B。

梯度條件:以樣品注入 2 分鐘後溶液 B 成為 30%, 60 分後溶液 B 成為 65% 進行直線梯度溶出。

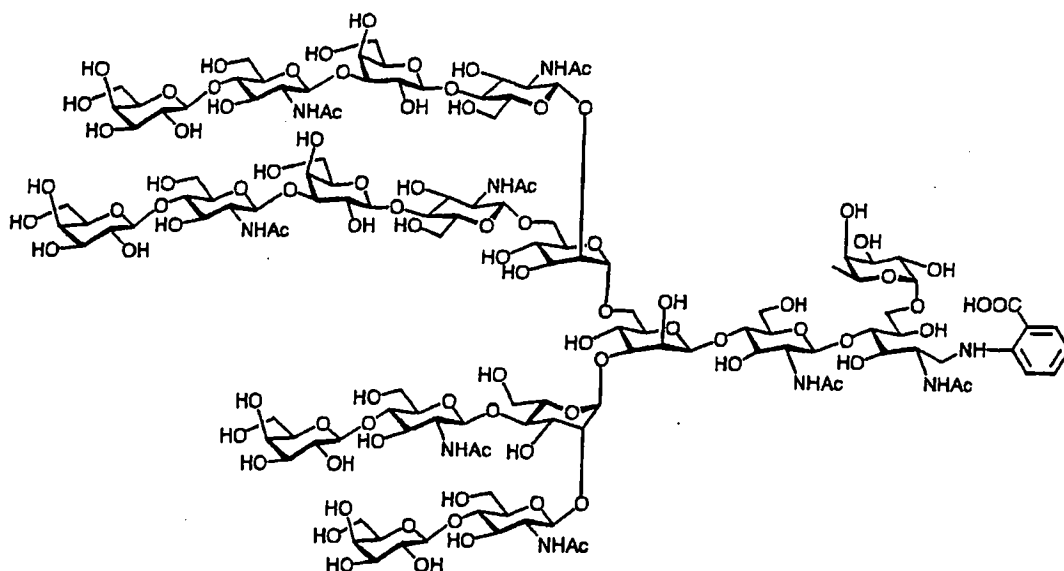
以糖水解酶及質量分析法的構造解析

將源自 U937 的波峰 31 的糖鏈衍生物以 20mM 檸檬酸緩衝液 (pH3.5) 20 μ l 溶解，添加 β -半乳糖酶 1 μ l (25 mU, 生化學工業公司製) 以 37°C 反應 24 小時。反應後以 100°C 煮沸 3 分鐘並回收離心分離後之上清液。將所得上清液供至使用醯胺基管柱的順相 HPLC 所得之一部份流份，以 MALDI-TOF MS 進行分析。結果，得到分子量 2718 之糖鏈衍生物 (a)。

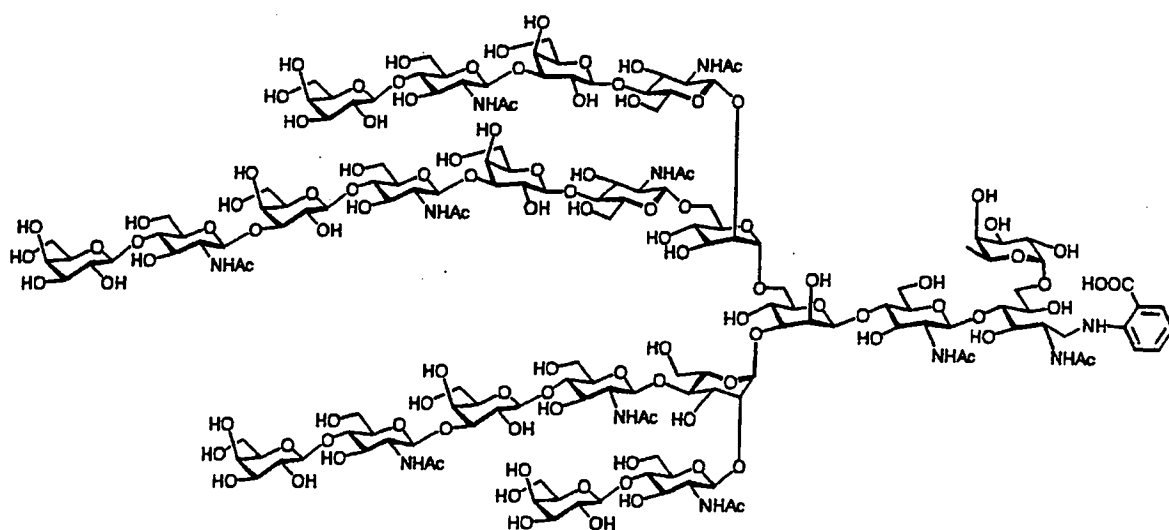
以 20mM 檸檬酸緩衝液 (pH5.0) 20 μ l 溶解上述糖鏈衍生物 (a)，加入 β -N-乙醯基己糖胺酶 (hexaminidase) 1 μ l (10 mU, 生化學工業公司製) 以 37°C 反應 24 小時。反應後以 100°C 煮沸 3 分鐘並以離心分離回收上清液，所得之上清液與上述同樣進行分析的結果，得到分子量 1906 之糖鏈衍生物 (b)。

再以 β -半乳糖酶處理糖鏈衍生物 (b) 的結果，得到分子量 1582 的糖鏈衍生物 (c)。

由以上的結果，判定波峰 31 係下式所示的糖鏈衍生物。



相同地，波峰 35 的糖鏈衍生物，以 β -半乳糖酶、 β -N-乙酰基己糖胺酶，接著以 β -半乳糖酶處理，也判定為下式所示的糖鏈衍生物。

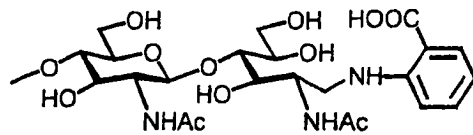


關於其他波峰的衍生物，適宜地使用水解酶，進行 MALDI-TOF MS 分析等，將相當於第 3 圖至第 7 圖所示波峰的糖鏈構造示於表 1 至 5。再者，表 1 至 14 中的分子量表示 2-氨基苯甲酸結合在糖鏈還原末端狀態的分子量 (MW)，記號係如下示。

Gal:D-半乳糖，GlcNAc:N-乙酰基葡萄糖胺 (acetyl glucosamine)，

Man:D-甘露糖，Fuc:海藻糖，2-AA:2-氨基苯甲酸，NeuAc:唾液酸。

於此，2-氨基苯甲酸結合於糖鏈還原末端的糖鏈，例如，如下式表示的糖鏈部分構造，係以 $-4\text{GlcNAc } \beta$ $1-4\text{GlcNAc}-2\text{-AA}$ 表示。



MALDI-TOF MS 分析

使用 Voyager DE-PRO(PE Biosystems, Framingham, MA)裝置，以線性—/負離子型式測定。以加速電壓 20kV，柵極電壓 96.3%，延遲時間 1000 nsec，Lens Off set 1.25，雷射強度(氮雷射)2700 測定之。溶解於水中的樣品 $0.5 \mu\text{L}$ 與 2,5-二羥基苯甲酸(DHB)的 20mg/mL 甲醇溶液 $0.5 \mu\text{L}$ 混合，乾燥後，作為測定用樣品。

【表 4】

波峰編號	MW	構造
29	2928	
30	3147	
31	3366	
32	1921	
33	2109	
34	3731	

實施例 4(細胞內存在的游離糖鏈 1)

人類胃癌細胞 MKN45 以 PBS 洗淨後，使成為 1×10^8 細胞/5ml 的濃度並使用玻璃均化器，於含 1% 的蛋白酶抑制劑的 10mM Na_2HPO_4 (pH7.5) 中均化後，加入含 0.5M 蔗糖的 20mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.5)10ml，於 4°C ，以 3000rpm 離心分離 15 分鐘後，收集上清液，並且，於 4°C ，以 19000rpm 離心分離，並將上清液減壓至乾固，得到游離型糖鏈混合物。

所得的游離型糖鏈混合物與實施例 1 記載的方法相同地，導入 2-AA 而得游離型糖鏈衍生物的混合物，用羥基親和性管柱層析法進行區分而得游離型糖鏈衍生物。

第 8 圖表示以親和性管柱層析的分離結果。

以使用胺基管柱之順相 HPLC 分離所得的各流份，得到游離型糖鏈衍生物。

HPLC 條件

管柱：Asahi Shodex NH2P-50 4E(Showa Denko, Tokyo, Japan;4.6×250mm)

管柱溫度： 50°C

泵：JASCO PU-980 型

流速：1ml/min

檢測器：JASCO FP-920 型螢光檢測器

激發波長：350nm

螢光波長：425nm

移動相：溶液 A 使用含有 2% 乙酸的乙腈溶液，溶液 B 使用

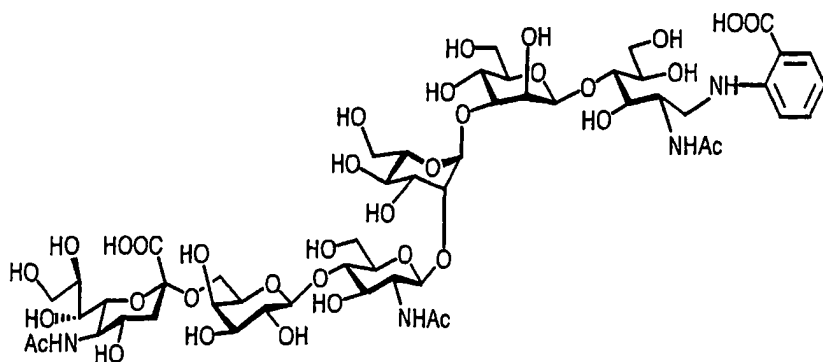
含有 5% 乙酸及 3% 三乙基胺的水溶液。

梯度條件:以樣品注入後 2 分鐘溶液 B 成為 30%，80 分後溶液 B 成為 95% 進行直線梯度溶出，至 100 分鐘止保持溶液 B 為 95%。

所得之游離型糖鏈衍生物以糖水解酶(唾液酸酶， α -甘露糖酶， β -半乳糖酶， β -N-乙酰基己糖胺酶等)適宜地作用，並以使用上述胺基管柱之順相 HPLC 分離後，凍結乾燥所得到的流份後，以 MALDI-TOF MS 分析，以解析游離型糖鏈衍生物的構造。

α -甘露糖酶的處理，係將糖鏈衍生物溶解於 20mM 檸檬酸緩衝液(pH4.5)20 μ l 中，加入 α -甘露糖酶 2 μ l (10mU, 生化學工業公司製)以 37°C 反應 24 小時，反應後以 100°C 煮沸 3 分鐘，回收離心分離後之上清液。以其他糖水解酶的處理係與上述實施例的記載相同。所得的糖鏈衍生物示於表 6 及 7。

表 6 及 7 之游離型糖鏈係新穎化合物，例如編號 1 之分子量 1321 的糖鏈衍生物係如下式所示。



【表 6】

MW	構造
1321	$\text{NeuAc-Gal}\beta\text{1-4GlcNAc-Man}\alpha\text{1} \begin{matrix} \nearrow 3 \\ \searrow 6 \end{matrix} \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc-2-AA}$
1483	$\text{NeuAc-Gal}\beta\text{1-4GlcNAc-Man}\alpha\text{1} \begin{matrix} \nearrow 3 \\ \searrow 6 \end{matrix} \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc-2-AA}$
1686	$\text{NeuAc-Gal}\beta\text{1-4GlcNAc-Man}\alpha\text{1} \begin{matrix} \nearrow 3 \\ \searrow 6 \end{matrix} \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc-2-AA}$
2140	$\text{NeuAc-Gal}\beta\text{1-4GlcNAc-Man}\alpha\text{1} \begin{matrix} \nearrow 3 \\ \searrow 6 \end{matrix} \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc-2-AA}$
2343	$\text{NeuAc-Gal}\beta\text{1-4GlcNAc-Man}\alpha\text{1} \begin{matrix} \nearrow 3 \\ \searrow 6 \end{matrix} \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc-2-AA}$
2505	$(\text{NeuAc}^-)_2 \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}\beta\text{1-4GlcNAc} \\ \text{Gal}\beta\text{1-4GlcNAc-Man}\alpha\text{1} \\ \text{Gal}\beta\text{1-4GlcNAc-Man}\alpha\text{1} \end{array} \right. \begin{matrix} \nearrow 3 \\ \searrow 6 \end{matrix} \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc-2-AA}$
2795	$\text{NeuAc-Gal}\beta\text{1-4GlcNAc-Man}\alpha\text{1} \begin{matrix} \nearrow 3 \\ \searrow 6 \end{matrix} \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc-2-AA}$
2999	$(\text{NeuAc}^-)_3 \left\{ \begin{array}{l} \text{GlcNAc} \\ \text{Gal}\beta\text{1-4GlcNAc-Man}\alpha\text{1} \\ \text{Gal}\beta\text{1-4GlcNAc-Man}\alpha\text{1} \\ \text{Gal}\beta\text{1-4GlcNAc} \end{array} \right. \begin{matrix} \nearrow 3 \\ \searrow 6 \end{matrix} \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc-2-AA}$
3160	$(\text{NeuAc}^-)_3 \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}\beta\text{1-4GlcNAc} \\ \text{Gal}\beta\text{1-4GlcNAc-Man}\alpha\text{1} \\ \text{Gal}\beta\text{1-4GlcNAc-Man}\alpha\text{1} \\ \text{Gal}\beta\text{1-4GlcNAc} \end{array} \right. \begin{matrix} \nearrow 3 \\ \searrow 6 \end{matrix} \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc-2-AA}$

流速:1ml/min

檢測器:JASCO FP-920 型螢光檢測器

激發波長:350nm

螢光波長:425nm

移動相:使用含有 1% 乙酸的乙腈溶液為溶液 A, 含有 0.2% 乙酸及 0.2% 三乙基胺的水溶液為溶液 B。

梯度條件:以樣品注入 2 分鐘後溶液 B 成為 30%, 60 分後溶液 B 成為 65% 進行直線梯度溶出。

● HPLC 的分離結果示於第 9 圖。

將所得的游離型糖鏈衍生物與實施例 4 同樣操作, 解析游離型糖鏈衍生物的構造。所得之糖鏈衍生物示於表 8。

【表 8】

波峰 編號	構 造
1	$\begin{array}{l} \text{Man} \\ \text{Man-Man} \\ \text{Man} \end{array} \begin{array}{l} / \\ / \\ / \end{array} \text{Man-GlcNAc-2-AA}$
2	$\begin{array}{l} \text{Man} \\ \text{Man-Man} \\ \text{Man-Man} \end{array} \begin{array}{l} / \\ / \\ / \end{array} \text{Man-GlcNAc-2-AA}$
3	$\text{Man} \left\{ \begin{array}{l} \text{Man} \\ \text{Man-Man} \\ \text{Man-Man} \end{array} \right. \begin{array}{l} / \\ / \\ / \end{array} \text{Man-GlcNAc-2-AA}$
4	$(\text{Man}^-)_2 \left\{ \begin{array}{l} \text{Man} \\ \text{Man-Man} \\ \text{Man-Man} \end{array} \right. \begin{array}{l} / \\ / \\ / \end{array} \text{Man-GlcNAc-2-AA}$
5	$\begin{array}{l} \text{Man-Man} \\ \text{Man-Man-Man} \\ \text{Man-Man-Man} \end{array} \begin{array}{l} / \\ / \\ / \end{array} \text{Man-GlcNAc-2-AA}$

實施例 6(人類子宮頸癌細胞的糖鏈)

將人類子宮頸癌細胞 HeLa 以含 10% 預先以 50°C 加熱 30 分鐘使不活化的 NCS 之 DMEM 進行培養。在 80% 群集狀態中，以 PBS 洗淨培養中的細胞後，加入胰蛋白酶溶液，以 37°C 處理 5 分鐘後，回收脫離的細胞，以 PBS 洗淨後進行繼代培養，以與實施例 2 記載的細胞膜流份的製作，及自細胞膜流份分離糖鏈的同樣操作進行處理，獲得源自細胞膜的糖鏈混合物，並與上述實施例 1 同樣地導入 2-AA 後，以羥色胺親和性管柱層析進行處理，而得各糖鏈衍生

物之流份。

管柱層析的分離結果示於第 10 圖。

將所得到的唾液酸糖鏈衍生物流份，單唾液酸糖鏈衍生物流份及二唾液酸糖鏈衍生物流份以唾液酸酶處理之後，以使用胺基管柱之順相 HPLC 分離，得到糖鏈衍生物。HPLC 條件與實施例 4 相同。

得到的糖鏈衍生物以糖水解酶(唾液酸酶， α -甘露糖酶， β -半乳糖酶， β -N-乙酰基己糖胺酶等)適宜地作用，並以使用上述胺基管柱之順相 HPLC 分離後，凍結乾燥得到的流份後，進行 MALDI-TOF MS 分析，以解析糖鏈衍生物的構造。

得到的糖鏈衍生物示於表 9 至 12。

【表 11】

二唾液酸糖鏈衍生物-1

MW	構造
2342	$\begin{array}{l} \text{NeuAc-Gal-GlcNAc-Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-2-AA} \\ \text{NeuAc-Gal-GlcNAc-Man}\alpha 1 \end{array}$
2545	$(\text{NeuAc}^-)_2 \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal-GlcNAc-Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-2-AA} \\ \text{Gal-GlcNAc-Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \begin{array}{l} \diagup 4 \\ \text{GlcNAc}\alpha 1 \end{array} \end{array} \right.$
2691	$(\text{NeuAc}^-)_2 \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal-GlcNAc-Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-2-AA} \\ \text{Gal-GlcNAc-Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \begin{array}{l} \diagup 4 \\ \text{GlcNAc}\alpha 1 \end{array} \end{array} \right. \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \text{Fuca} 1 \end{array}$
2748	$(\text{NeuAc}^-)_2 \left\{ \begin{array}{l} \text{GlcNAc} \\ \text{Gal-GlcNAc-Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-2-AA} \\ \text{Gal-GlcNAc-Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \begin{array}{l} \diagup 4 \\ \text{GlcNAc}\alpha 1 \end{array} \end{array} \right.$
2894	$(\text{NeuAc}^-)_2 \left\{ \begin{array}{l} \text{GlcNAc} \\ \text{Gal-GlcNAc-Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-2-AA} \\ \text{Gal-GlcNAc-Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \begin{array}{l} \diagup 4 \\ \text{GlcNAc}\alpha 1 \end{array} \end{array} \right. \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \text{Fuca} 1 \end{array}$
3056	$(\text{NeuAc}^-)_2 \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal-GlcNAc-Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-2-AA} \\ \text{Gal-GlcNAc-Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \begin{array}{l} \diagup 4 \\ \text{GlcNAc}\alpha 1 \end{array} \end{array} \right. \begin{array}{l} \diagup 6 \\ \text{Fuca} 1 \end{array}$
3113	$(\text{NeuAc}^-)_2 \left\{ \begin{array}{l} \text{GlcNAc-Gal-GlcNAc} \\ \text{Gal-GlcNAc-Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-2-AA} \\ \text{Gal-GlcNAc-Man}\alpha 1 \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} \begin{array}{l} \diagup 4 \\ \text{GlcNAc}\alpha 1 \end{array} \end{array} \right.$

【表 12】

二唾液酸糖鏈衍生物-2

MW	構造
3259	
3405	
3421	
3624	

實施例 7(癌細胞特異性抗原 CD98 的糖鏈)

以免疫沉澱法製作 CD98-HC

蛋白質 A-洋菜糖(Agarose)50 μ l(Sigma-Aldrich Japan 製)以 PBS 200 μ l 洗淨後，加入 PBS 50 μ l 和抗 CD98 抗體 10 μ g/10 μ l，於室溫反應 60 分鐘。反應後，以 PBS 1ml 除去非吸著成分，而得抗 CD98 抗體固定化洋菜糖。對抗 CD98 抗體固定化洋菜糖，以 1% NP-40(400 μ l)添加可溶

化之 HeLa 細胞的膜流份(2×10^7 細胞)，用旋轉振盪器 (Rotary shaker) 以 4°C 培養一夜。此後，以 1ml PBS 洗淨，除去非吸著成分，離心分離後，對抗 CD98 抗體固定化洋菜糖加入離解溶液 (250mM Tris-HCl 緩衝液 pH6.8/4.6% SDS, 20% 甘油) 及 2-巰乙醇的 9:1 混合液 $20 \mu\text{l}$ ，煮沸 5 分鐘，以 15000rpm 離心的上清液作為 CD98-HC，供至 SDS-PAGE。

SDS 聚丙烯醯胺凝膠電泳

凝膠電泳裝置及電源均同採用 Bio Rad 製品。電泳凝膠使用 7.5% 凝膠。電泳緩衝液使用 25mM Tris, 198mM 甘油，1% (w/v) SDS 進行。最初的 1 小時每片凝膠以 5mA，繼之以 10mA 進行電泳至凝膠下部。

考馬斯亮藍 (Coomassie Brilliant Blue) 染色

SDS-Page 結束後，於 40% (v/v) 甲醇，10% (v/v) 乙酸 / 0.2% 考馬斯亮藍 R250 中，進行蛋白質染色。1 小時後，用 甲醇:乙酸:水 (=4:1:5) 脫色。

西方墨點法 (Western Blot)

將 SDS-PAGE 後的凝膠以 BIO-RAD 製半乾式吸墨 (hemidry blotting) 裝置 (半乾轉印槽)，將凝膠中的蛋白質樣品轉印至 PVDF 膜。PVDF (Polyvinylidene Difluoride) 膜係預先以 甲醇浸泡 60 秒，然後使用 48mM Tris, 39mM 甘胺酸，20% 甲醇 (pH9.0) 浸泡 1 小時者，以 100mA 固定電流

施加電壓 1 小時進行轉印。轉印後，以含 5% 脫脂乳及 0.05 % Tween 20 的 PBS 對 PVDF 膜進行阻斷操作之後，加入含有抗 CD98 抗體 $5 \mu\text{g}$ 之 0.05 % Tween 20/PBS(5ml) 使其反應一夜。反應後，以含 0.05 % Tween 20 的 PBS(20ml) 洗淨 PVDF 膜 4 次後，加入含 HRP 標識蛋白質 A $5 \mu\text{l}$ 之 0.05 % Tween 20/PBS(5ml)，使其反應 1 小時。反應後，以含 0.05 % Tween 20 的 PBS(20ml) 洗淨 PVDF 膜 4 次，加入含 0.05 % DAB(3,3'-二氨基聯苯胺四鹽酸鹽)，0.0031 % 過氧化氫溶液 20ml，使其發色。

藉由 N-聚糖酶 F 的凝膠內分解

以 CBB 染色確認染色帶之後，以水取代染色液，切下目標帶，放入微試管內。然後加入乙腈 $100 \mu\text{l}$ 放置 30 分鐘使凝膠脫水，除去乙腈後加入含 2 單位 N-聚糖酶 F 的 Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) $100 \mu\text{l}$ ， 37°C 下培養一夜後，切出糖鏈。然後，回收提取液再加入水 $200 \mu\text{l}$ 攪拌 30 分鐘，由凝膠得到糖鏈混合物。

於以上所得的糖鏈混合物中，與上述實施例 1 相同地導入 2-AA 後，以羥色胺親和性管柱層析法處理，而得各糖鏈衍生物之流份。

管柱層析法的分離結果示於第 11 圖。

所得之單唾液酸糖鏈衍生物流份及二唾液酸糖鏈衍生物流份經唾液酸酶處理之後，以使用胺基管柱之順相 HPLC 分離，獲得糖鏈衍生物。HPLC 條件係與實施例 4 相同。HPLC 的分離結果示於第 12 圖。

得到的糖鏈衍生物以糖鏈水解酶(唾液酸酶, α -甘露糖酶, β -半乳糖酶, β -N-乙酰基己糖胺酶等)適當地作用, 以上述使用胺基管柱的順相 HPLC 分離後, 凍結乾燥所得的流份後, 以 MALDI-TOF MS 分析, 解析糖鏈衍生物的構造。

得到的糖鏈衍生物示於表 13 至 14。

【表 13】

波峰 編號	MW	構造
I	2051	$\text{NeuAc} - \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{Man}\alpha 1 \\ \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{Man}\alpha 1 \end{array} \right\} \begin{array}{l} 6 \\ 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}-2-\text{AA}$
II	2197	$\text{NeuAc} - \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{Man}\alpha 1 \\ \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{Man}\alpha 1 \end{array} \right\} \begin{array}{l} 6 \\ 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}-2-\text{AA}$ $\begin{array}{c} 6 \\ \\ \text{Fuc}\alpha 1 \end{array}$
III	2343	$\text{NeuAc} - \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{Man}\alpha 1 \\ \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{Man}\alpha 1 \end{array} \right\} \begin{array}{l} 6 \\ 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}-2-\text{AA}$ $\begin{array}{c} 3 \\ \\ \text{Fuc}\alpha 1 \end{array}$ $\begin{array}{c} 6 \\ \\ \text{Fuc}\alpha 1 \end{array}$
IV	2400	$\text{NeuAc} - \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{Man}\alpha 1 \\ \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{Man}\alpha 1 \end{array} \right\} \begin{array}{l} 6 \\ 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}-2-\text{AA}$ $\begin{array}{c} 4 \\ \\ \text{GlcNAc}\alpha 1 \end{array}$ $\begin{array}{c} 6 \\ \\ \text{Fuc}\alpha 1 \end{array}$
V	2562	$\text{NeuAc} - \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc} \\ \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{Man}\alpha 1 \\ \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{Man}\alpha 1 \end{array} \right\} \begin{array}{l} 6 \\ 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}-2-\text{AA}$ $\begin{array}{c} 6 \\ \\ \text{Fuc}\alpha 1 \end{array}$
VI	2781	$\text{NeuAc} - \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc} \\ \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{Man}\alpha 1 \\ \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{Man}\alpha 1 \\ \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc} \end{array} \right\} \begin{array}{l} 6 \\ 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}-2-\text{AA}$
VII	2927	$\text{NeuAc} - \left\{ \begin{array}{l} \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc} \\ \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{Man}\alpha 1 \\ \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{Man}\alpha 1 \\ \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc} \end{array} \right\} \begin{array}{l} 6 \\ 3 \end{array} \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}-2-\text{AA}$ $\begin{array}{c} 6 \\ \\ \text{Fuc}\alpha 1 \end{array}$

以往未知的糖鏈及其機能，對今後的糖鏈研究亦可期待有很大的貢獻。

【圖式簡單說明】

第 1 圖是實施例 1 所得糖鏈衍生物的親和性管柱層析圖。

第 2 圖是實施例 2 所得糖鏈衍生物的親和性管柱層析圖。

第 3 圖是實施例 3 所得糖鏈衍生物的 HPLC 的層析圖。

第 4 圖是實施例 3 所得糖鏈衍生物的 HPLC 的層析圖。

第 5 圖是實施例 3 所得糖鏈衍生物的 HPLC 的層析圖。

第 6 圖是實施例 3 所得糖鏈衍生物的 HPLC 的層析圖。

第 7 圖是實施例 3 所得糖鏈衍生物的 HPLC 的層析圖。

第 8 圖是實施例 4 所得糖鏈衍生物的親和性管柱層析圖。

第 9 圖是實施例 5 所得糖鏈衍生物的 HPLC 的層析圖。

第 10 圖是實施例 6 所得糖鏈衍生物的親和性管柱層析圖。

第 11 圖是實施例 7 所得糖鏈衍生物的親和性管柱層析圖。

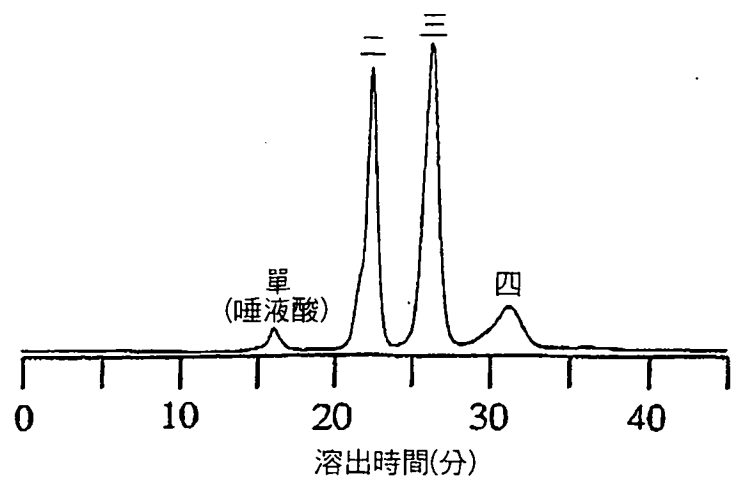
第 12 圖是實施例 7 所得糖鏈衍生物的 HPLC 的層析圖。

五、中文發明摘要：

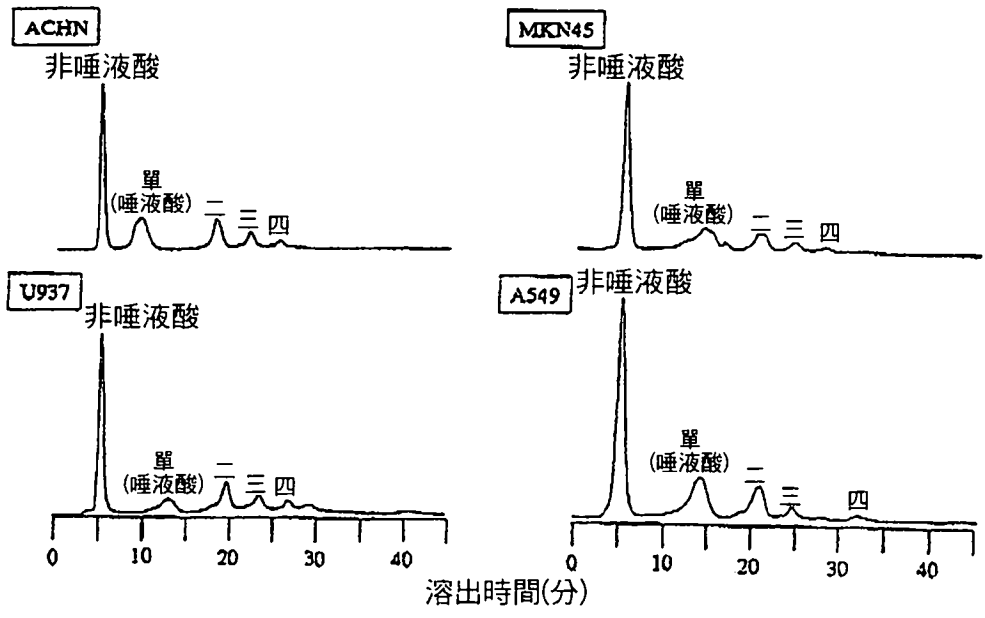
糖鏈衍生物之製造方法，係由糖鏈混合物製造糖鏈衍生物之方法，其特徵為具備：(a)將脂溶性基導入糖鏈混合物中的糖鏈而得糖鏈衍生物混合物之步驟，以及(b)以羥色胺(serotonine)親和性管柱層析法處理之步驟。

六、英文發明摘要：

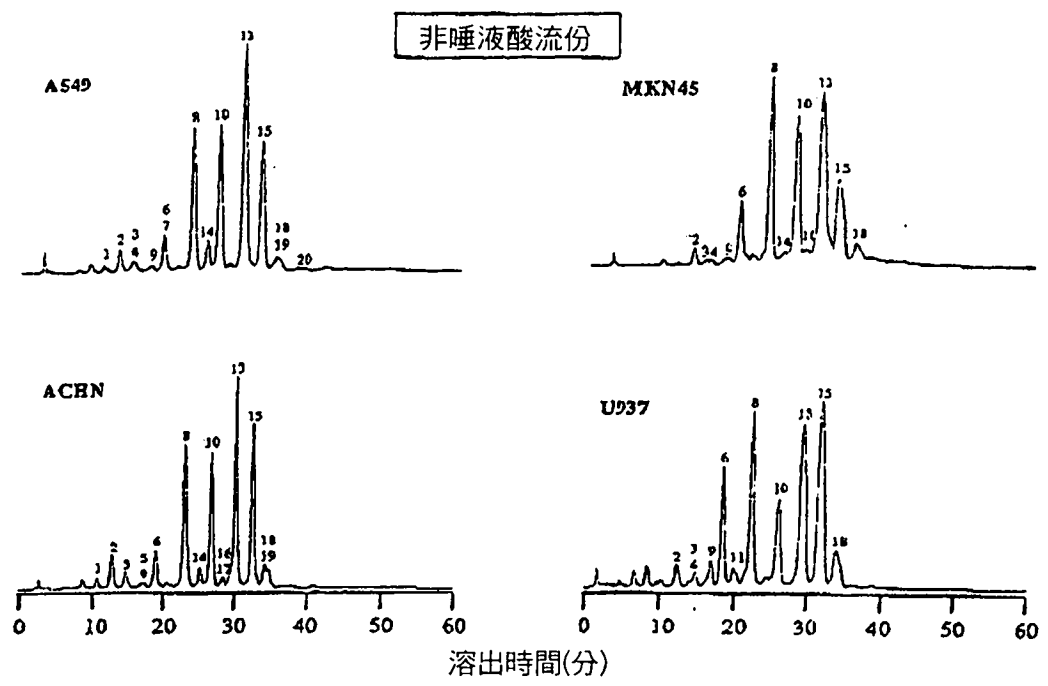
The present invention provides a method for producing the sugar chain derivatives from mixture of sugar chain, and a method for analyzing the structure of sugar chain. The present invention further provides a novel sugar chain derivative produced by the sugar chain derivative producing method of the present invention.



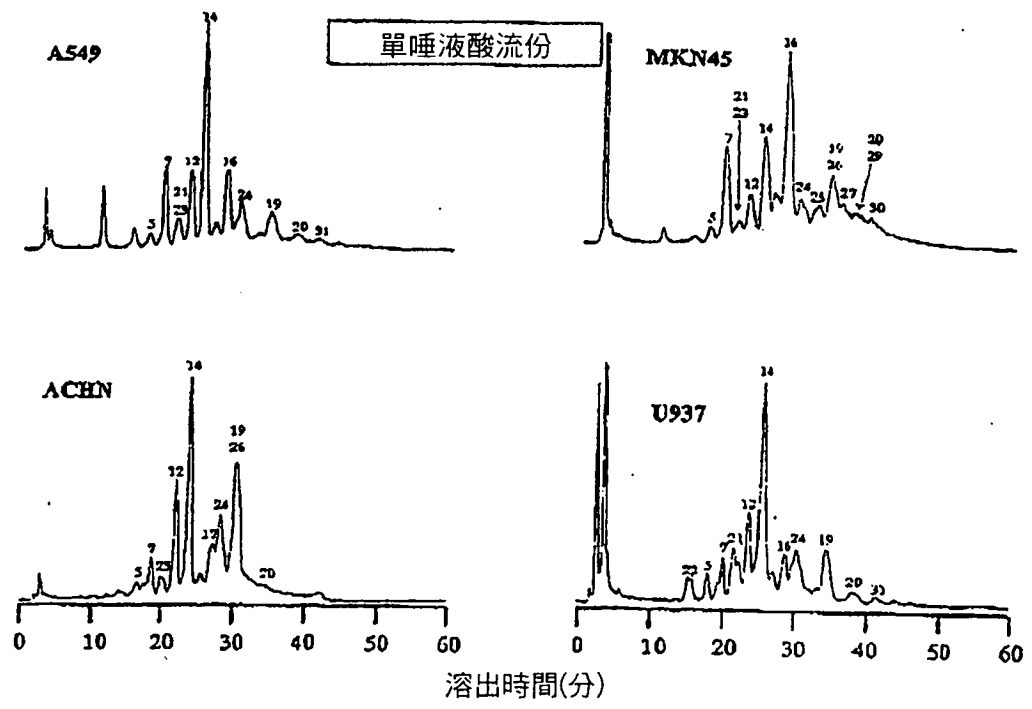
第1圖



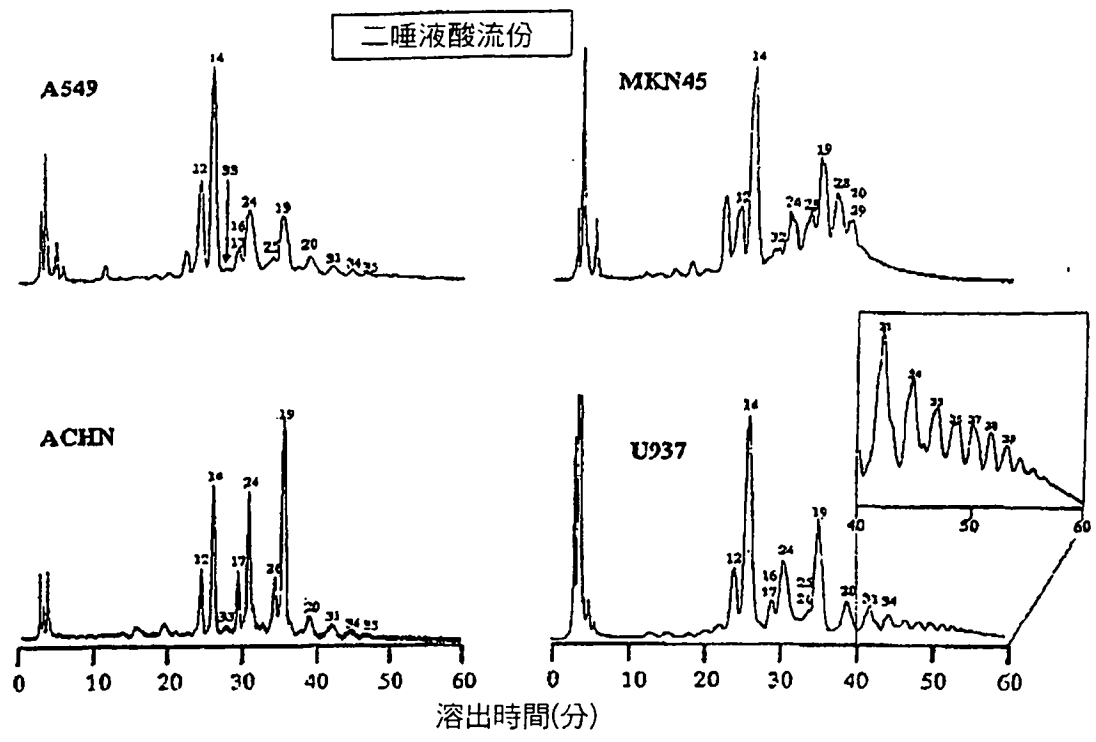
第2圖



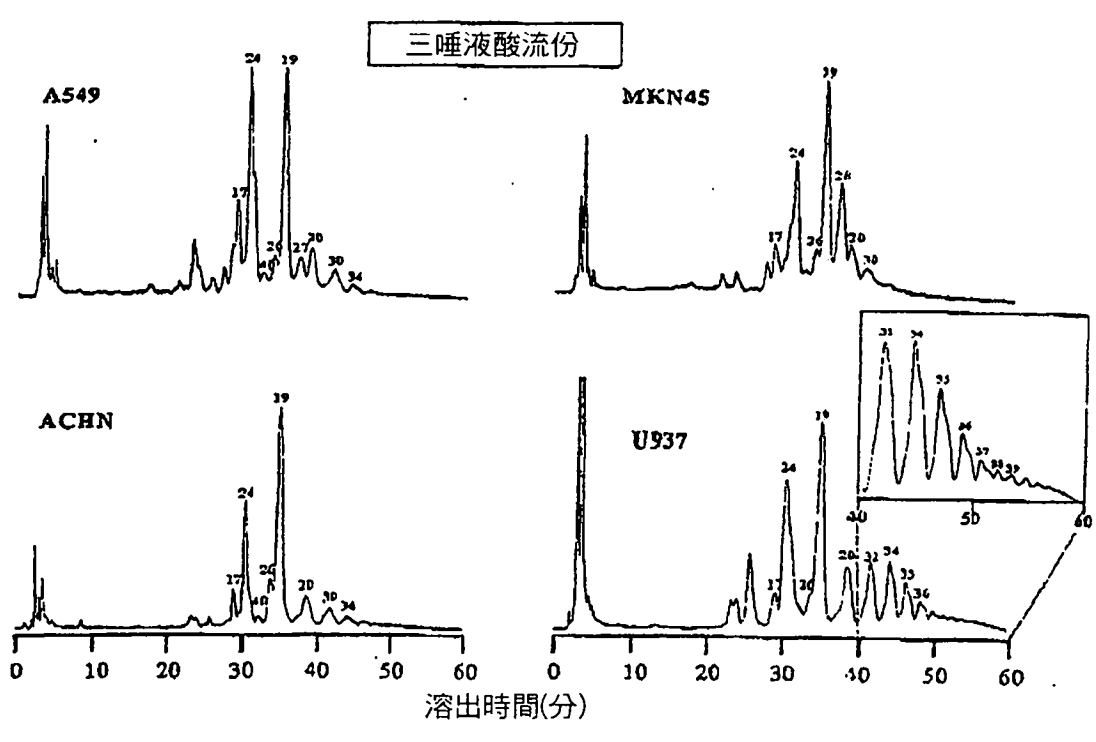
第3圖



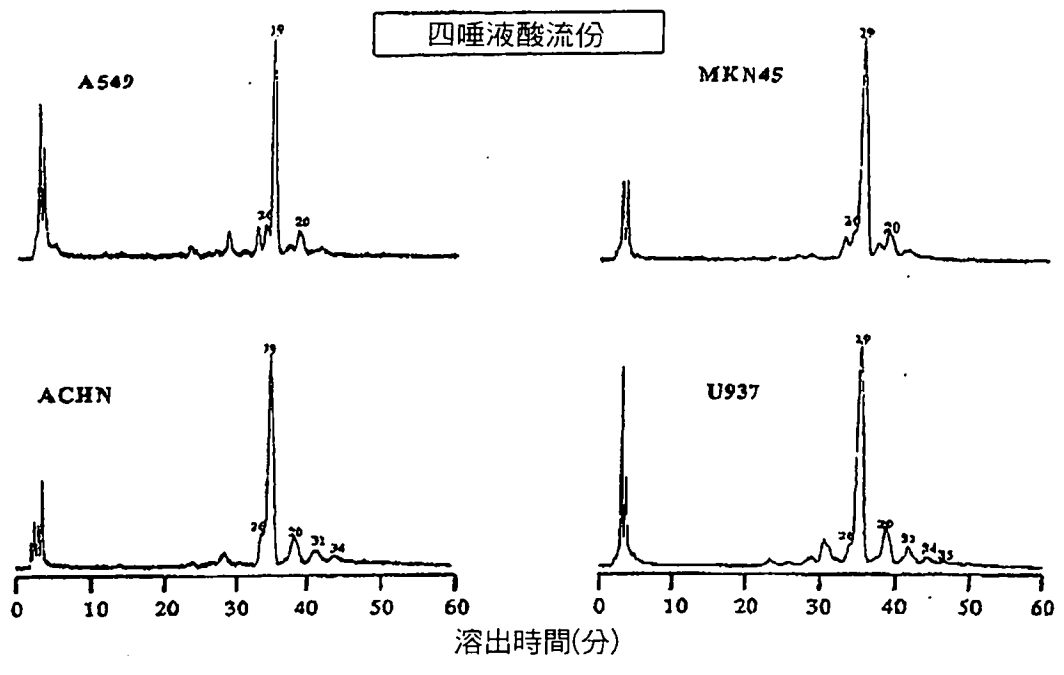
第4圖



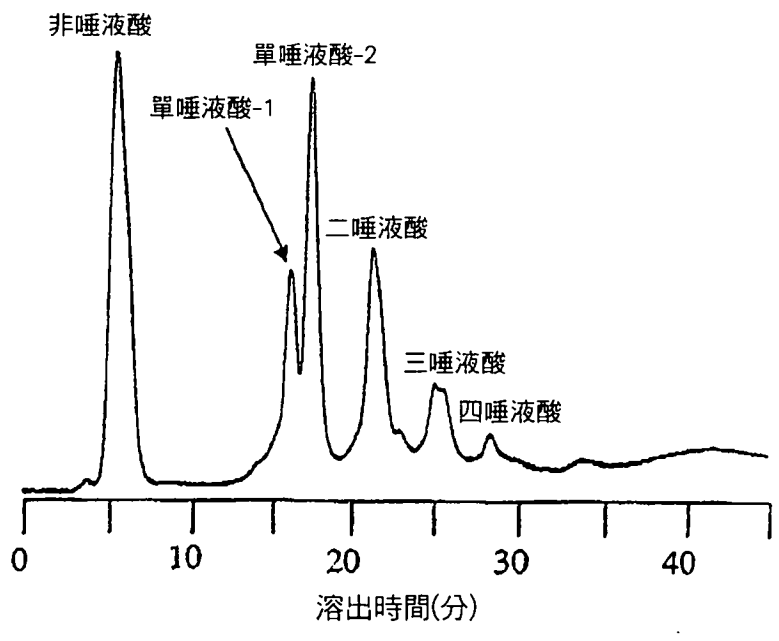
第5圖



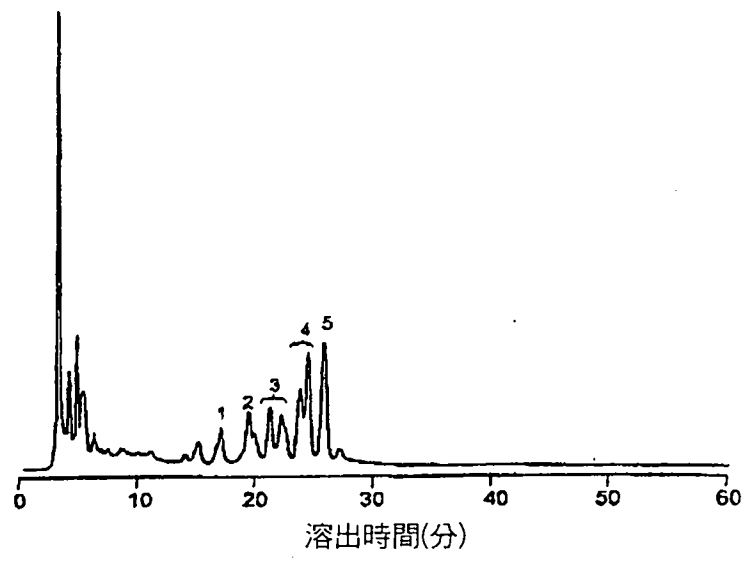
第6圖



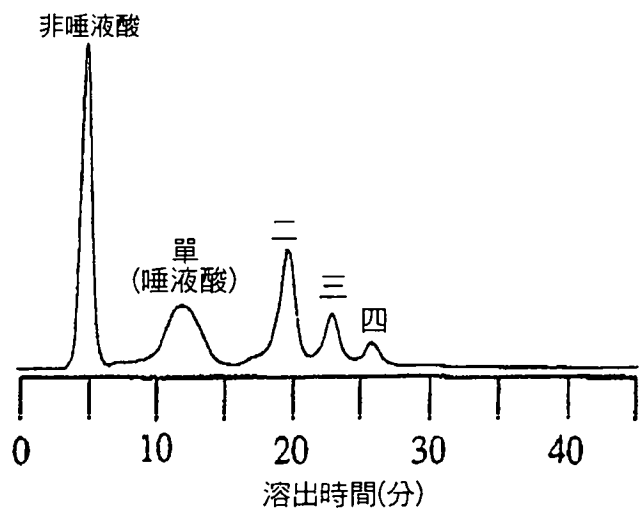
第7圖



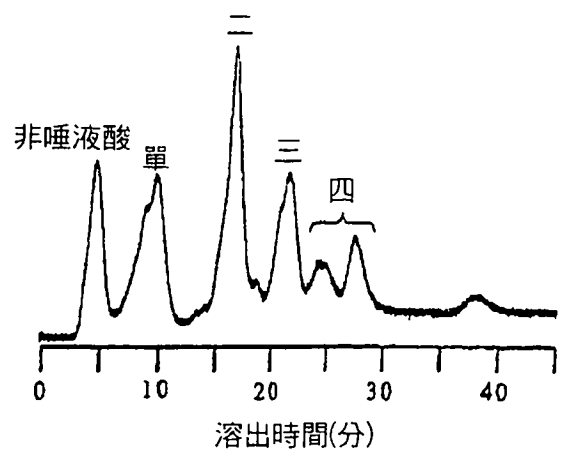
第8圖



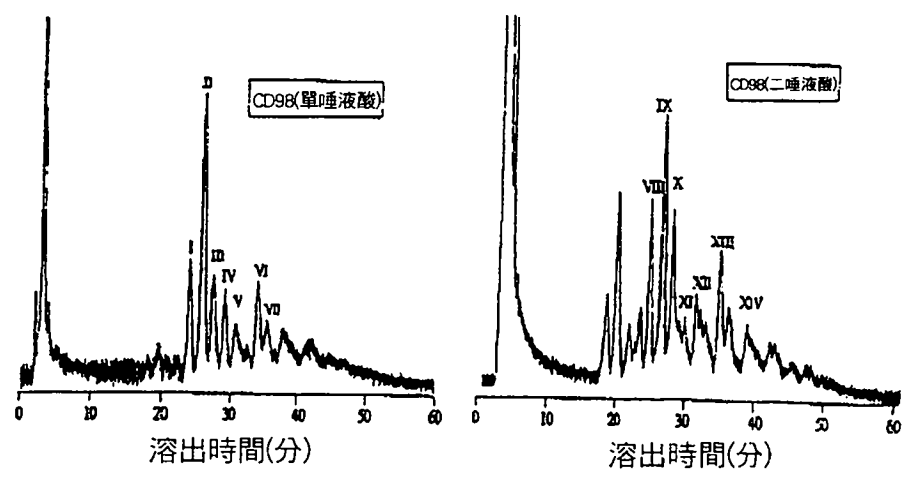
第9圖



第10圖



第11圖



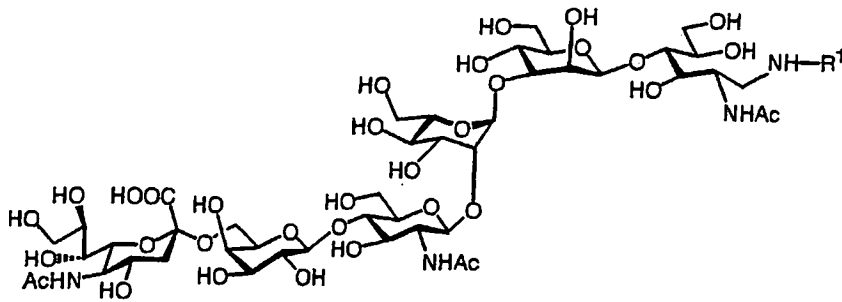
第12圖

七、指定代表圖：本案無代表圖

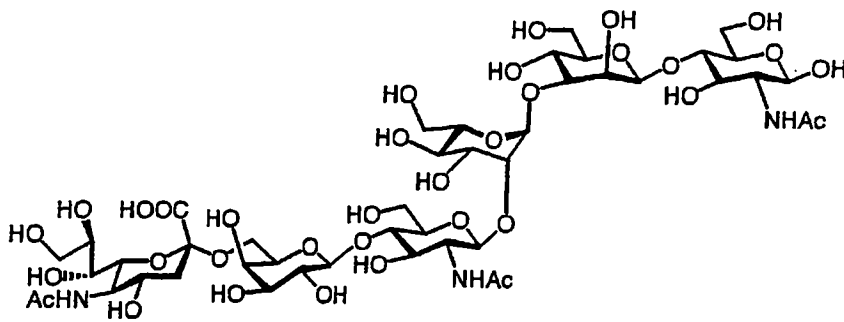
(一) 本案指定代表圖為：第 () 圖。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：

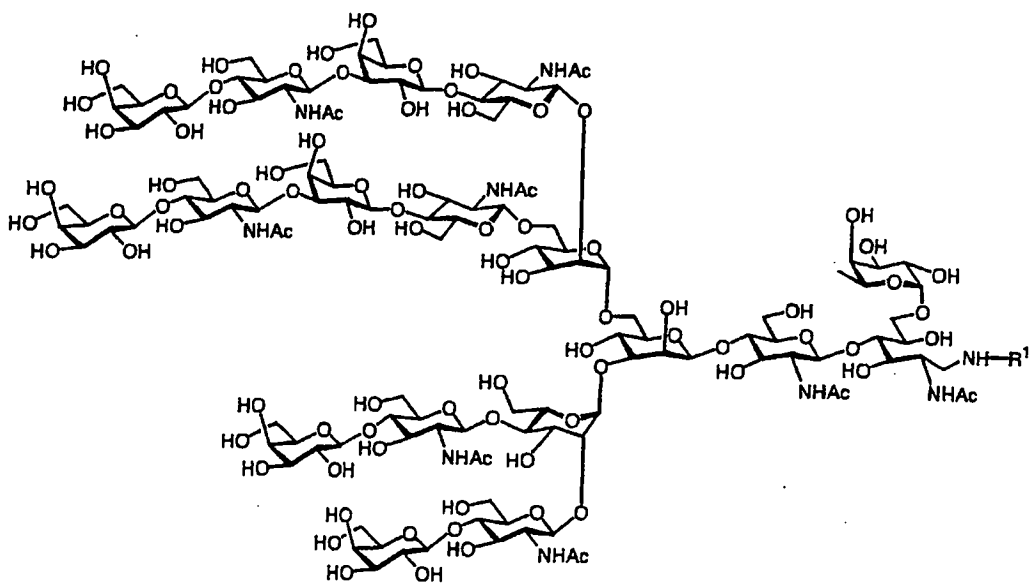
八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



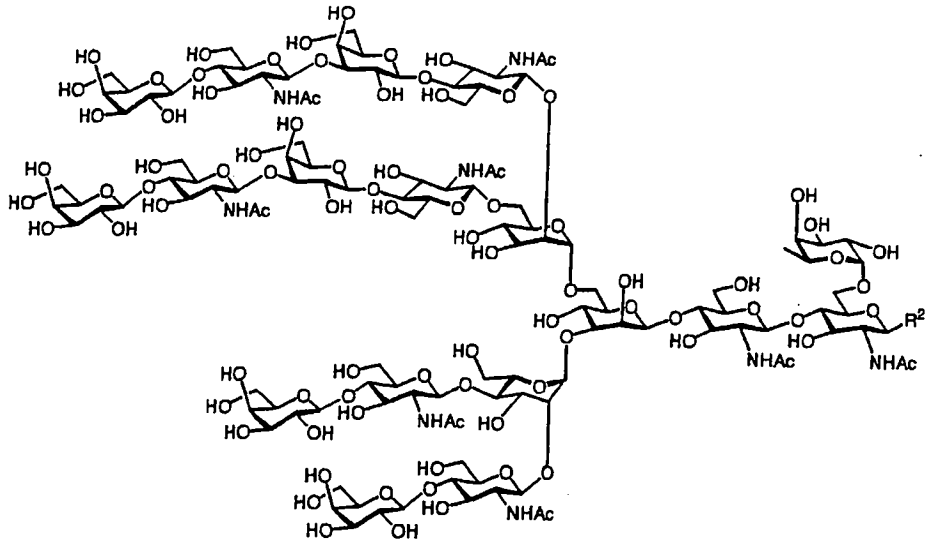
(1)



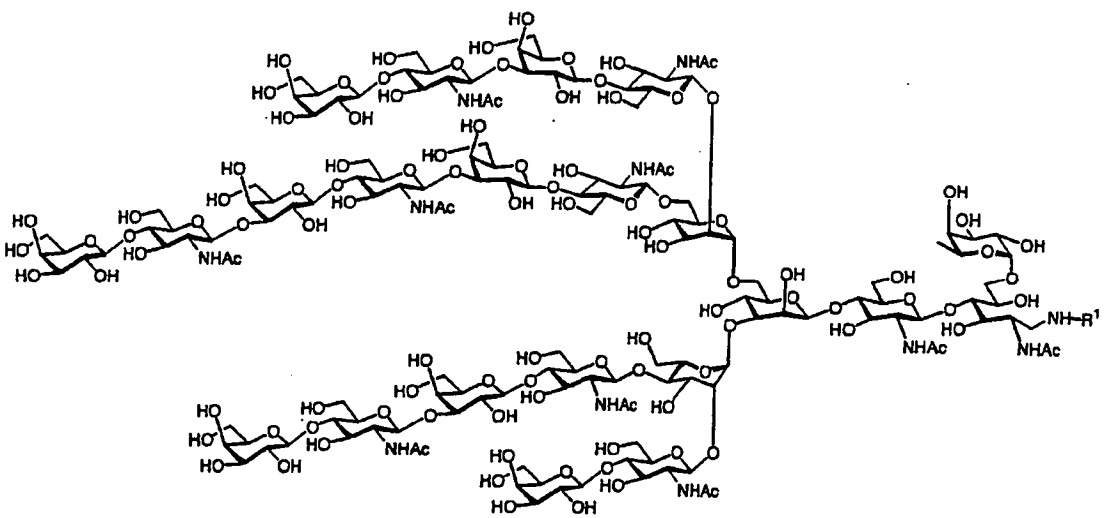
(2)



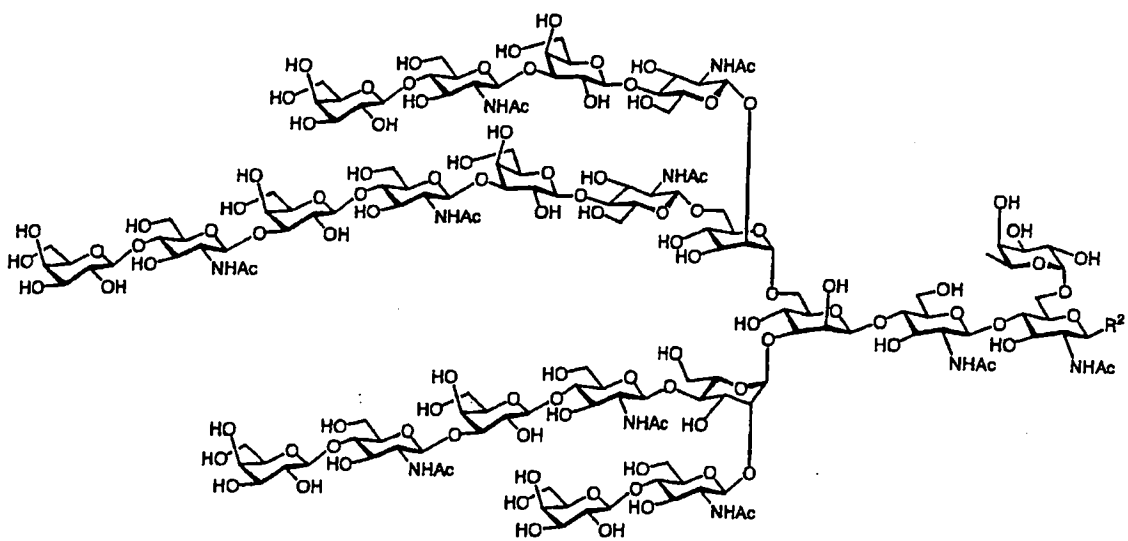
(3)



(4)

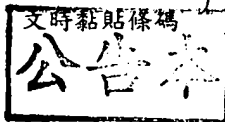


(5)



(6)

(此處由本局於收)



發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 95126175

※ 申請日期： 95-07-18

※IPC 分類： C08B³⁷/₀₀ (2006.01)C07H³/₀₆ (2006.01)G01N³⁰/₈₈ (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

糖鏈衍生物之製造方法以及糖鏈衍生物

METHOD FOR PRODUCING SUGAR CHAIN DERIVATIVES, AND SUGAR CHAIN
DERIVATIVES

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

大塚化學股份有限公司

OTSUKA CHEMICAL CO., LTD.

代表人：(中文/英文)(簽章) 戶部貞信 / TOBE, SADANOBU

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國大阪府大阪市中央區大手通 3 丁目 2 番 27 號

2-27, Otedori 3-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka, JAPAN

國 籍：(中文/英文) 日本國/JAPAN

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 掛樋一晃 / KAKEHI, KAZUAKI

2. 木下充弘 / KINOSHITA, MITSUHIRO

3. 松野裕樹 / MATSUNO, YUKI

國 籍：(中文/英文) 1. 至 3. 日本國/JAPAN

或 2-吡啶基； R^2 表示羥基，基-Asn 或者基-Asn- R^3 ；於此 Asn 表示天門冬醯胺醯基， R^3 表示胺甲酸系或者醯胺系保護基；Ac 表示乙醯基。]

9. 一種癌標識物，係由通式(1)至(6)所示之糖鏈衍生物誘導者。

本發明者等精心研究之結果，發現將脂溶性基導入糖鏈作成糖鏈衍生物之後，以與唾液酸(Sialic Acid)具有親和性之羥色胺作為配位體(ligand)的親和性管柱層析法處理，可分離非唾液酸(asialo)糖鏈及唾液酸糖鏈，並可將唾液酸糖鏈中之單唾液酸，二唾液酸，三唾液酸及四唾液酸糖鏈等依唾液酸殘基之數目加以分離。

另發現將以親和性管柱層析法分期而得之流份(fraction)，分別以使用胺基管柱或醯胺基管柱之層析法，即可進一步分離分枝構造不同的糖鏈衍生物，而大量製造單一構造的糖鏈。

再者，發現以適當的糖水解酶對經分離的各糖鏈衍生物作用，並以使用胺基管柱或醯胺基管柱的層析法進行分離，並以質量分析法處理所得到的糖鏈衍生物，即可高精度且網羅性地解析糖鏈構造，遂完成本發明。

在本發明的製造方法中使用的糖鏈混合物中的糖鏈，並無特別限制，包含天門冬醯胺結合型糖鏈(N-糖苷結合型糖鏈)，粘蛋白型糖鏈(O-糖苷結合型糖鏈)，游離型糖鏈，以及如糖鏈結合天門冬醯胺般與胺基酸結合的糖鏈。

此類糖鏈即使是根據化學手法調製的糖鏈亦可，例如

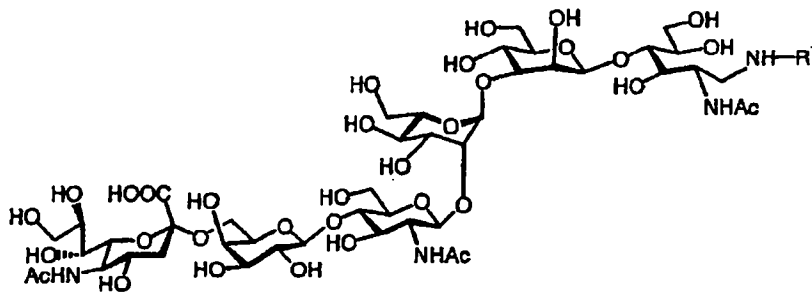
十、申請專利範圍：

1. 一種糖鏈衍生物之製造方法，係由糖鏈混合物製造式

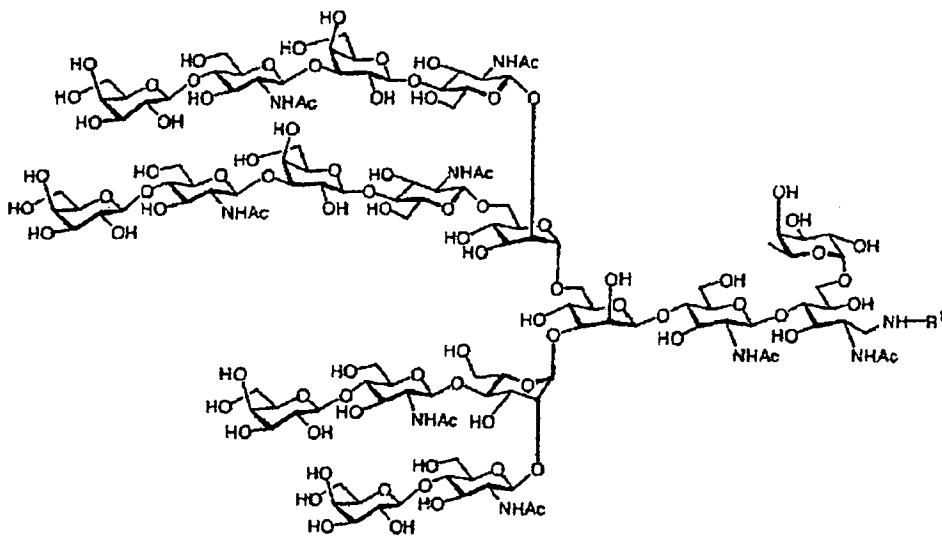
(1)、(3)至(6)所示糖鏈衍生物之方法，其特徵為具備：

(a)將脂溶性基導入糖鏈混合物中的糖鏈而得糖鏈衍生物混合物之步驟，以及

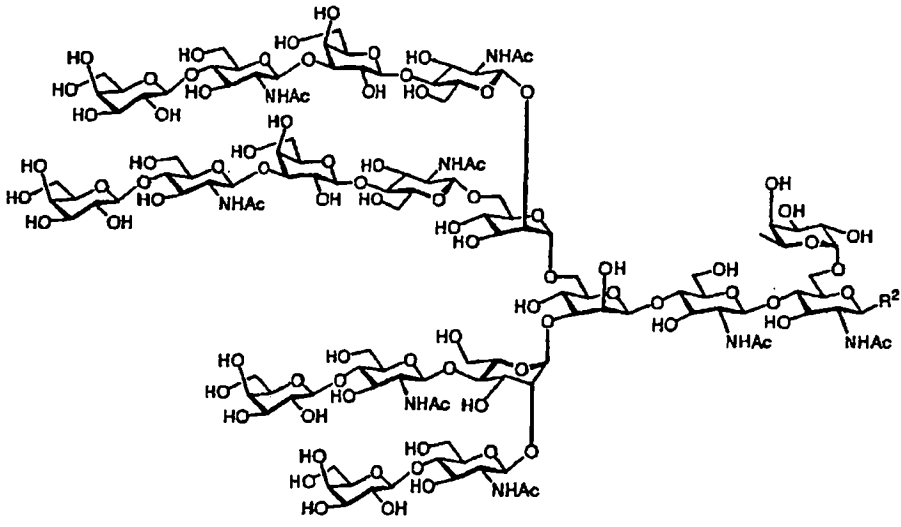
(b)以羥色胺(serotonine)親和性管柱層析法處理該糖鏈衍生物混合物之步驟，式中 R^1 表示 2-羧基苯基，3-羧基苯基，4-羧基苯基，對-乙氧基羰基苯基，或 2-吡啶基； R^2 表示羥基，基-Asn-或者基-Asn- R^3 ；於此 Asn 表示天門冬醯胺基， R^3 表示胺甲酸系或者醯胺系保護基；Ac 表示乙醯基



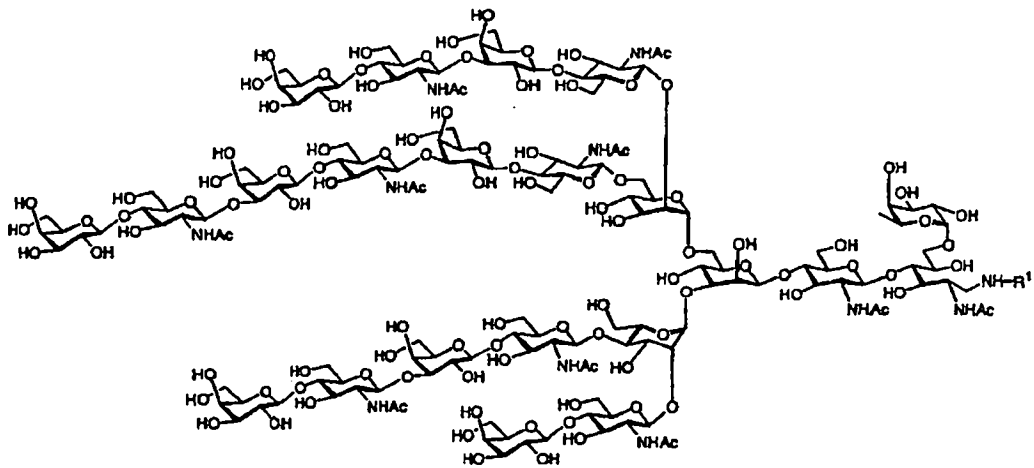
(1)



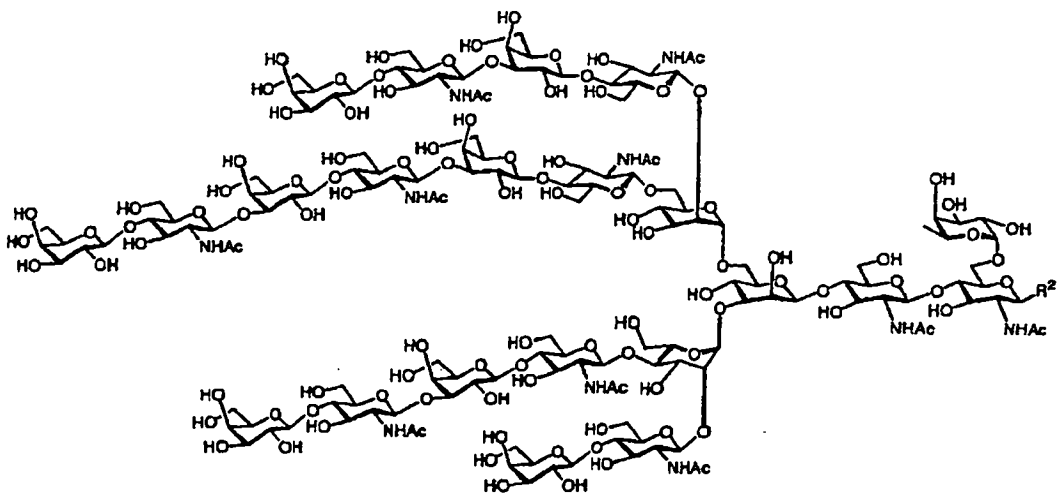
(3)



(4)



(5)

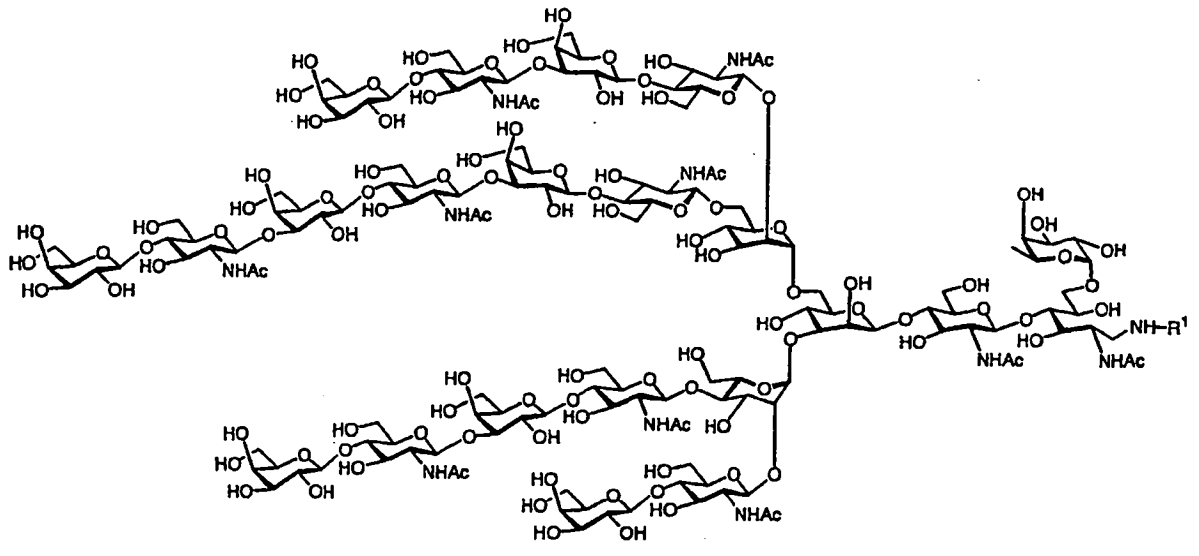


(6)

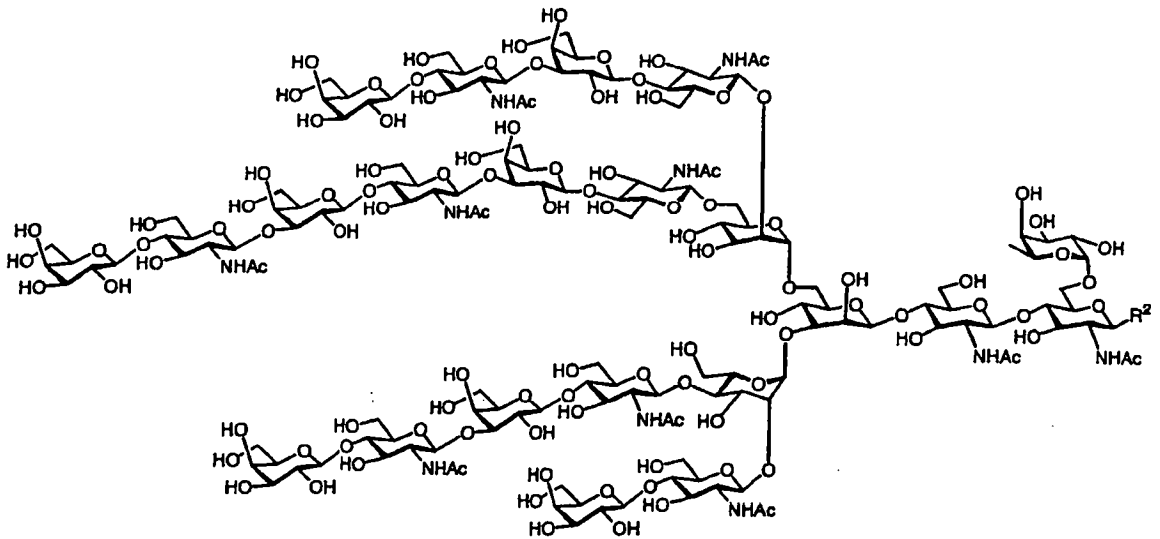
2. 如申請專利範圍第 1 項的糖鏈衍生物之製造方法，係於

- (b)步驟之後，具備(c)以使用胺基管柱或醯胺基管柱之順相層析法處理之步驟。
3. 如申請專利範圍第 2 項的糖鏈衍生物之製造方法，係於(c)步驟之前，具備(d)以糖水解酶處理之步驟。
 4. 如申請專利範圍第 1 項的糖鏈衍生物之製造方法，其中，該脂溶性基係 2-羧基苯基胺基或者苄基甲氧基羰基。
 5. 如申請專利範圍第 2 項的糖鏈衍生物之製造方法，其中，該胺基管柱係聚合物基材之胺基管柱。
 6. 如申請專利範圍第 2 項的糖鏈衍生物之製造方法，其中，該醯胺基管柱係氧化矽基材之醯胺基管柱。
 7. 如申請專利範圍第 1 項的糖鏈衍生物之製造方法，其中，該糖鏈混合物係天然糖鏈之混合物。
 8. 如申請專利範圍第 1 項的糖鏈衍生物之製造方法，其中，該糖鏈混合物係源自細胞糖鏈之混合物。
 9. 如申請專利範圍第 1 項的糖鏈衍生物之製造方法，其中，該糖鏈混合物係包含唾液酸糖鏈而成之糖鏈混合物。
 10. 一種糖鏈衍生物，係由式(1)、(3)至(6)所示，

式中 R^1 表示 2-羧基苯基，3-羧基苯基，4-羧基苯基，對-乙氧基羰基苯基，或 2-吡啶基； R^2 表示羥基，基-Asn-或者基-Asn- R^3 ；於此 Asn 表示天門冬醯胺基， R^3 表示胺甲酸系或者醯胺系保護基；Ac 表示乙醯基：



(5)



(6)