

公 告 本 發 明	96年10月2日修(成)正本
	專 利 說 明 書

(全本)

(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：93122362

※ 申請日期：93.7.27

※IPC 分類：C07K 9/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

胺化複合型糖鏈衍生物及其製造方法

AMINATED COMPLEX TYPE SUGAR CHAIN DERIVATIVE AND ITS PRODUCTION
METHOD

二、申請人：(共2人)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 梶原康宏 / KAJIHARA, YASUHIRO
2. 大塚化學股份有限公司 / OTSUKA CHEMICAL CO., LTD.

代表人：(中文/英文) 2. 森明平 / MORI, AKIHEI

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 日本國神奈川縣橫濱市都筑區牛久保東 2-4-2-205
4-2-205, Ushikubohigashi 2-chome, Tsuzuki-ku, Yokohama-shi,
Kanagawa, Japan
2. 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) 1. 2. 日本國 / JAPAN

三、發明人：(共2人)

姓 名：(中文/英文)

1. 梶原康宏 / KAJIHARA, YASUHIRO
2. 深江一博 / FUKAE, KAZUHIRO

國 籍：(中文/英文)

1. 2. 日本國 / JAPAN

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；2003年07月28日；特願2003-202594（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】

本發明係有關 1-胺基-複合型天冬醯胺(asparagine) 結合型糖鏈衍生物(以下稱為胺化複合型糖鏈衍生物)及糖鏈肽。

【先前技術】

存在於生體內之肽(蛋白質)大多具有糖鏈。糖鏈如第 1 圖所示，為單糖與單糖藉由所謂糖基結合之結合而成鏈狀者。

與肽(蛋白質)結合之糖鏈係從與該胺基酸結合之形式可分為 2 大類。分為在天冬醯胺(Asn)側鏈結合之天冬醯胺結合型(N-結合型)及在絲胺酸(Ser)、蘇胺酸(Thr)之側鏈羥基結合之黏蛋白結合型(O-結合型)。所有之天冬醯胺結合型糖鏈具有由 5 個糖殘基組成之基本骨架，根據所結合糖鏈非還原末端之糖殘基種類，可分類為如第 2 圖所示之高甘露糖型、複合型、混成型之亞群。

該等糖鏈與肽(蛋白質)結合，覆蓋在其分子之表面，不僅可調節肽(蛋白質)之溶解性，附加對蛋白酶之耐性，延遲從血中之代謝，還可維持肽(蛋白質)之 3 維構造。

代表例為人類之紅血球生成素(erythropoietin, EPO)之糖鏈肽(糖蛋白質)。該糖鏈肽(糖蛋白質)具有複合型天冬醯胺結合型糖鏈，作用於紅血球系前驅細胞，經由促進其增殖·分化，為具有維持末梢血中紅血球數機能之血球分化荷爾蒙。對於肽(蛋白質)上之糖鏈構造及生理活性之

相關性進行種種研究，明瞭在體外，未與糖鏈結合之紅血球生成素亦具有生理活性，在體內，若無糖鏈則不具生理活性。

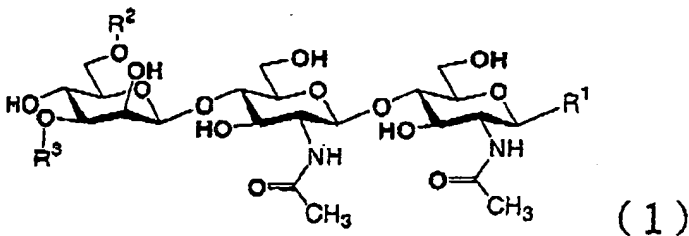
不僅對於該等糖鏈肽(糖蛋白質)，對種種肽(蛋白質)作為醫藥品使用展開研究，但是仍有須要解決之問題點。由於肽(蛋白質)製劑等在血中經由蛋白質分解酵素(肽酶)等可簡單地分解、代謝，所以不能維持充分之血中濃度。

本發明之目的為提供可維持充分血中濃度之胺化複合型糖鏈衍生物及糖鏈肽。

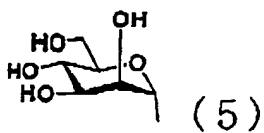
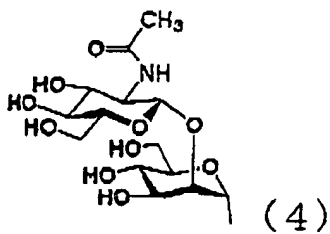
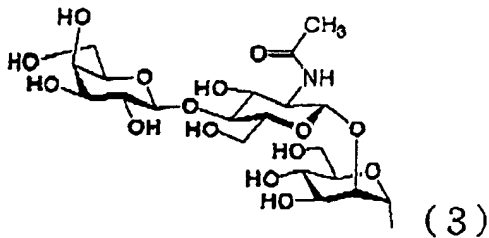
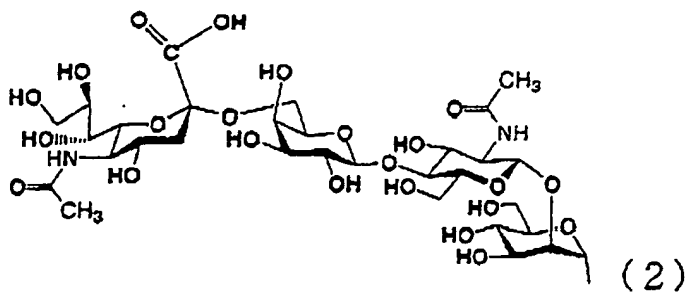
【發明內容】

本發明係為以下之發明。

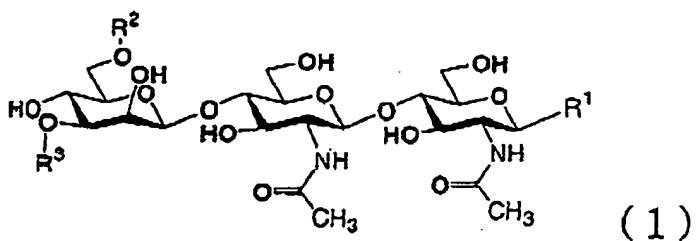
1. 一種糖鏈肽，係由式(1)所示之胺化複合型糖鏈衍生物與胺基酸之硫醇基結合而成者：



[式中， R^1 為 $-\text{NH}-(\text{CO})-\text{CH}_2\text{X}$ 、 $-\text{NH}-(\text{CO})-(\text{CH}_2)_b-\text{CH}_2\text{X}$ 、異硫氰酸酯基、 $-\text{NH}-(\text{CO})_a-(\text{CH}_2)_b-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NH}-(\text{CO})_a-(\text{CH}_2)_b-\text{CHO}$ ； X 為鹵素原子、 a 為 0 或 1， b 為 1 至 4 之整數； R^2 及 R^3 可相同或不同，為氫原子、式(2)至(5)所示之基]

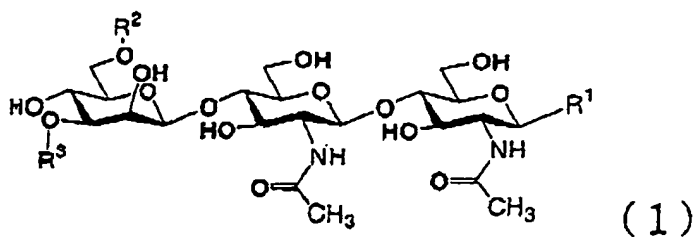


2. 一種糖鏈肽之製造方法，其特徵係：將式(1)所示之胺化複合型糖鏈衍生物與胺基酸之硫醇基結合者：



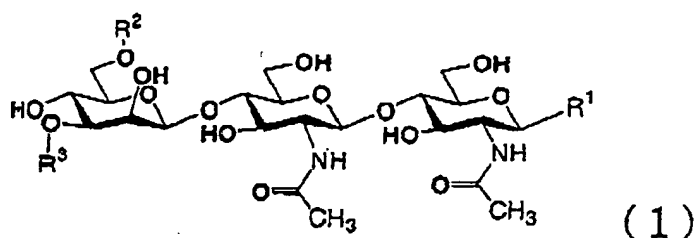
[式中， R^1 、 R^2 及 R^3 之意義如同上述]。

3. 如申請專利範圍第1項之糖鏈肽，其中，該糖鏈肽係抗體者：



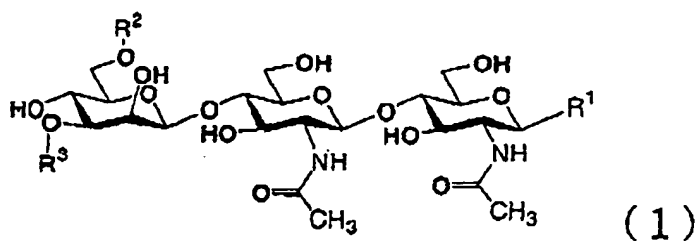
[式中， R^1 、 R^2 及 R^3 之意義如同上述]。

4. 一種糖鏈肽之製造方法，其特徵係：將糖鏈肽之糖從胺基酸切出，接著與式(1)所示之胺化複合型糖鏈衍生物結合者：



[式中， R^1 、 R^2 及 R^3 之意義如同上述]。

5. 一種糖鏈肽，其係抗體且係將糖鏈肽之糖從胺基酸切出，接著與式(1)所示之胺化複合型糖鏈衍生物結合所獲得者：

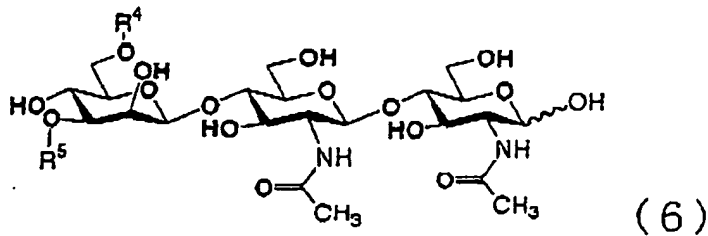


[式中， R^1 、 R^2 及 R^3 之意義如同上述]。

本發明之胺化複合型糖鏈衍生物為在複合型天冬醯胺結合型糖鏈1位之碳原子上結合之羥基，經 $-NH-(CO)-CH_2X$ 、 $-NH-(CO)-(CH_2)_b-CH_2X$ 、異硫氰酸酯基、 $-NH-(CO)_a-$

$(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NH}-(\text{CO})_a-(\text{CH}_2)_b\text{-CHO}$ (X 為鹵素原子、 a 為 0 或 1， b 為 1 至 4 之整數) 之任意基取代之化合物。

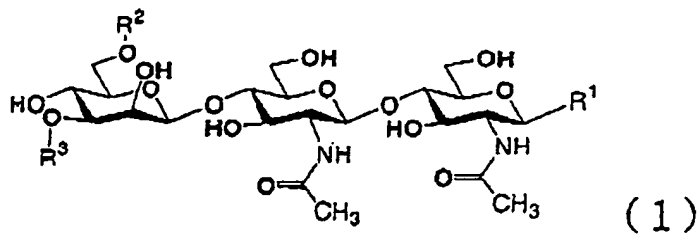
複合型天冬醯胺結合型糖鏈可列舉例如式(6)所示之糖鏈。



(式中， R^4 及 R^5 為氫原子、上述式(2)至(5)所示之基，可相同亦可不同。但是，排除 R^4 及 R^5 同為氫原子或同為式(5)之情況，以及 R^4 及 R^5 中之一者為氫原子且另一者為式(5)之情況。)

該複合型天冬醯胺結合型糖鏈可根據例如國際公開公報 WO 03/008431 號公報合成。又，亦可使用從糖蛋白質經由酵素將糖鏈切出之方法或用化學方式切斷之方法。酵素可使用糖肽酶或 N-切糖酶(PNGase)。化學切斷法可經由胼分解而製造糖鏈。

胺化複合型糖鏈衍生物為複合型天冬醯胺結合型糖鏈 1 位之碳原子上所結合之羥基經 $-\text{NH}-(\text{CO})-\text{CH}_2\text{X}$ 、 $-\text{NH}-(\text{CO})-(\text{CH}_2)_b-\text{CH}_2\text{X}$ 、異硫氰酸酯基、 $-\text{NH}-(\text{CO})_a-(\text{CH}_2)_b-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NH}-(\text{CO})_a-(\text{CH}_2)_b-\text{CHO}$ (X 為鹵素原子、 a 為 0 或 1， b 為 1 至 4 之整數。) 之任何一種基取代之化合物，例如下述式(1)所示。此處，鹵素原子可列舉氟原子、氯原子、溴原子、碘原子。



(式中，R¹ 至 R³ 與上述者相同)

胺化複合型糖鏈衍生物可根據公知之方法製造。例如只要將胺化複合型糖鏈衍生物中具有 $-\text{NH}-(\text{CO})-(\text{CH}_2)_b-$ CH_2X 、異硫氰酸酯基、 $-\text{NH}-(\text{CO})_a-(\text{CH}_2)_b-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NH}-(\text{CO})_a-(\text{CH}_2)_b-\text{CHO}$ (X 為鹵素原子、a 為 0 或 1, b 為 1 至 4 之整數。) 之化合物進行反應即可。具體而言，R¹ 為 $-\text{NH}$ -溴乙醯基時，在溶劑中、在縮合劑存在下將 1-胺基-複合型天冬醯胺結合型糖鏈與溴乙酸進行反應。溶劑只要能將 1-胺基-複合型天冬醯胺結合型糖鏈、溴乙酸等溶解者即可，可列舉例如水、DMF 等。縮合劑可列舉例如 1-均三甲苯基磺醯基-3-硝基-1,2,4-三唑 (MSNT)、二環己基碳化二亞胺 (DCC)、二異丙基碳化二亞胺 (DIPCDI) 等，對於 1-胺基-複合型天冬醯胺結合型糖鏈 1 莫耳之縮合劑最好使用 1 至 10 莫耳。又，對於 1-胺基-複合型天冬醯胺結合型糖鏈 1 莫耳之溴乙酸最好使用 1 至 10 莫耳。反應通常在 0 至 80°C，較好在 10 至 60°C，更好在 15 至 35°C 下進行，通常較好係進行 30 分鐘至 5 小時。反應完成後最好以適當、習知之方法 [例如高速液體管柱層析法 (HPLC)] 精製。

本發明結合 1-胺基-複合型天冬醯胺結合型糖鏈之糖鏈肽係使任意胺基酸以肽鍵結合而得之肽，經由該肽之硫

醇基與 1-胺基-複合型天冬醯胺結合型糖鏈結合而得之糖鏈肽。

本發明中之肽為 2 個或 2 個以上同種或不同種胺基酸，在互為一羧基與一為胺基之間進行脫水，可形成酸醯胺結合，亦即形成肽結合(-CO-NH-)，亦稱為肽鍵)之化合物。比由約 10 個以下胺基酸組成之肽小者稱為寡胜肽，比較大者稱為多胜肽。又，多胜肽係包括蛋白質。

肽可經由固相合成法、液相合成法、由細胞合成、將存在於自然中者進行分離萃取之方法等而獲得。

本發明結合 1-胺基-複合型天冬醯胺結合型糖鏈之糖鏈肽可經由將胺化複合型糖鏈衍生物與具有硫醇基之肽進行反應而製造。反應通常在 0 至 80°C，較好在 10 至 60°C，更好在 15 至 35°C 下進行，通常較好進行 30 分鐘至 5 小時。反應完成後較好以適當、習知之方法[例如高速液體管柱層析法(HPLC)]精製。具體而言，將胺化複合型糖鏈衍生物與具有硫醇基之肽在磷酸緩衝液中，於室溫下進行反應。反應完成後用 HPLC 精製，可獲得本發明之結合 1-胺基-複合型天冬醯胺結合型糖鏈之糖鏈肽。

又，根據上述之製造方法，在預先具有結合糖或糖鏈之硫醇基之糖鏈肽將胺化複合型糖鏈衍生物進行反應，可獲得結合有具有複數糖或糖鏈之 1-胺基-複合型天冬醯胺結合型糖鏈之糖鏈肽。在預先具有結合糖或糖鏈之硫醇基之糖鏈肽將胺化複合型糖鏈衍生物進行反應，將預先具有糖或糖鏈切斷，可獲得結合有 1-胺基-複合型天冬醯胺結

合型糖鏈之糖鏈肽。此時，將預先具有糖或糖鏈切斷較好為例如使用酵素切斷。又，以在胺化複合型糖鏈衍生物導入前，亦可在導入後在切斷之同時將胺化複合型糖鏈衍生物導入肽中較佳。進行切斷之酵素只要是可將肽及糖或糖鏈之還原末端切斷之酵素(糖水解酵素)即可，可使用例如 PNGase F (Peptide : N-glycosidase F) 等。反應通常在 0 至 80°C，較好在 10 至 60°C，更好在 15 至 35°C 下進行，通常較好進行 30 分鐘至 5 小時。反應完成後較好用適當、習知之方法 [例如高速液體管柱層析法 (HPLC)] 精製。

本發明之結合 1-胺基-複合型天冬醯胺結合型糖鏈之糖鏈肽與來自自然中所存在之複合型天冬醯胺結合型糖鏈肽相較，對於糖水解酵素之耐性亦優越(不易分解)。因此，可提昇在血中之安定性，延長血中壽命。

本發明之結合胺化複合型糖鏈衍生物之糖鏈肽由於肽之胺基酸排列、糖鏈之結合位置或糖鏈之構造或種類均一，所以，該糖鏈肽為生理活性分子時(例如抗體)，其生理活性分子之生理活性為均一。

本發明之結合胺化複合型糖鏈衍生物之糖鏈肽之製造方法為可在肽之硫醇基選擇性地將胺化複合型糖鏈衍生物在任意位置選擇性地導入複合型天冬醯胺結合型糖鏈。

本發明之結合胺化複合型糖鏈衍生物之糖鏈肽之製造方法可製造高分子量(例如分子量 1 萬以上)之糖鏈肽。

本發明之結合胺化複合型糖鏈衍生物之糖鏈肽之製造方法係可在不使糖鏈肽之折疊崩解下，在任意位置選擇性

地導入任意之複合型天冬醯胺結合型糖鏈。

【實施方式】

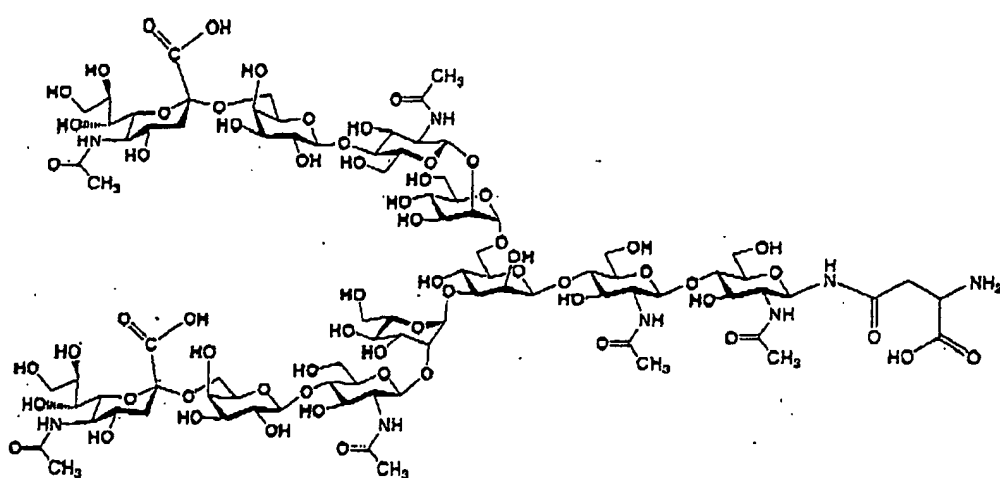
以下，列舉參考例及實施例對本發明作具體之說明，但是本發明並不只限於此。

參考例 1(二唾液基(disialo)糖鏈天冬醯胺之合成)

將粗精製之 SGP(唾液酸糖肽，sialylglycopeptide) 500 毫克及疊氮化鈉 10 毫克(319 微莫耳)溶解於 tris-鹽酸、氯化鈣緩衝溶液(TRIZMA BASE 0.05 莫耳/公升、氯化鈣 0.01 莫耳/公升、pH=7.5)25 毫升，加入溶有 50 毫克肌動蛋白酶-E(蛋白質分解酵素、科研製藥公司製造)之 Tris-鹽酸·氯化鈣緩衝溶液 5 毫升之溶液，於 37°C 下靜置。115 小時後將該溶液冷凍乾燥。殘留物用凝膠過濾管柱層析法精製 2 次，獲得二唾液基糖鏈天冬醯胺 252 毫克。

$^1\text{H-NMR}$ (30°C) δ 5.13 (s, 1H, Man 4-H-1), 5.07 (d, 1H, $J=9.5\text{ Hz}$, GlcNAc 1-H-1), 4.95 (s, 1H, Man 4-H-1), 4.77 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.61 (d, 1H, $J=7.6\text{ Hz}$, GlcNAc 2-H-1), 4.60 (d, 2H, $J=7.6\text{ Hz}$, GlcNAc 5, 5-H-1), 4.44 (d, 2H, $J=8.0\text{ Hz}$, G

a 16, 6-H-1), 4.25 (bd, 1H, Man 3-H-2), 4.20 (b
dd, 1H, Man 4-H-2), 4.12 (bd, 1H, Man 4-H-2)
2.94 (dd, 1H, $J=4.5\text{ Hz}$, 17.2 Hz , Asn- βCH), 2.8
5 (dd, 1H, $J=7.0\text{ Hz}$, 17.2 Hz , Asn- βCH), 2.67, 2.
66 (dd, 2H, $J=4.6\text{ Hz}$, 12.4 Hz , NeuAc 7, 7-H-3_a
,), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.06 (s, 6H, Ac $\times 2$), 2.02 (s,
6H, Ac $\times 2$), 2.01 (s, 3H, Ac), 1.71 (dd, 2H, $J=12.$
 4 Hz , 12.4 Hz , NeuAc 7, 7-H-3_{a,x})

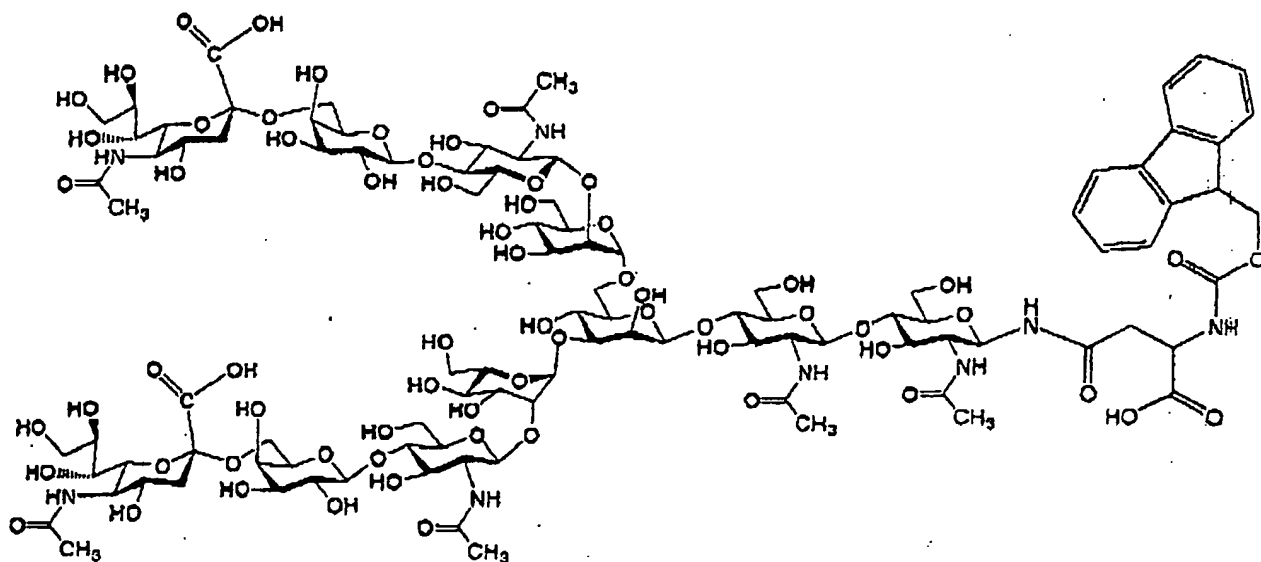


參考例 2(以 Fmoc 基保護天冬醯胺之胺基氮之二唾液基糖
鏈天冬醯胺之合成)

將參考例 1 所得之二唾液基糖鏈天冬醯胺 80 毫克
(0.034 毫莫耳)溶解於蒸餾水 2.7 毫升及丙酮 4.1 毫升之
混合溶液中，加入 9-芴基甲基-N-琥珀醯亞胺基碳酸酯
(Fmoc-OSu)347 毫克(0.103 毫莫耳)及碳酸氫鈉 11.5 毫克
(0.137 毫莫耳)，於室溫下攪拌 2 小時。用 TLC 確認反應
完成後將該溶液減壓濃縮，去除丙酮。殘渣用充填結合有
十八烷基甲矽烷基之矽膠管柱(ODS 管柱)精製，獲得目的
之 Fmoc-二唾液基糖鏈天冬醯胺 60.1 毫克，收率 68%。

$^1\text{H-NMR}$ (30°C)

8.01 (2H, d, $J=7.5\text{Hz}$, Fmoc), 7.80 (2H, d, $J=7.5\text{Hz}$, Fmoc), 7.60 (2H, dd, $J=7.5\text{Hz}$, Fmoc), 7.53 (2H, dd, $J=7.5\text{Hz}$, Fmoc), 5.23 (1H, s, Man4-H₁), 5.09 (1H, d, $J=9.4\text{Hz}$, GlcNAc1-H₁), 5.04 (1H, s, Man4-H₁), 4.86 (1H, s, Man3-H₁), 4.70 ~ 4.66 (m, GlcNAc2-H₁, GlcNAc5, 5-H₁), 4.54 (2H, d, $J=7.9\text{Hz}$, Gal6, 6-H₁), 4.44 (1H, d, FmocCH), 4.34 (1H, bd, Man3-H₂), 4.29, (1H, bd, Man4-H₂), 4.20 (1H, bd, Man4-H₂), 2.77 (2H, dd, NeuAc7, 7-H_{3_{eq}}), 2.80 (1H, bdd, Asn-βCH), 2.62 (1H, bdd, Asn-βCH), 2.14 (18H, s×6, -Ac), 1.80 (2H, dd, NeuAc7, 7-H_{3_{ax}})



参考例

3(HOOC-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Cys-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-NH₂之合成)

在固相合成用管柱放入 HMPA-PEGA 樹脂 370 毫克，以

CH_2Cl_2 、DMF 充分洗淨，在反應中使用。

將 Fmoc-Arg(OtBu)-OH、1-均三甲苯磺醯基-3-硝基-1,2,4-三唑 (MSNT)、N-甲基咪唑溶解於 CH_2Cl_2 ，攪拌 5 分鐘後放入裝有樹脂之固相合成用管柱，於室溫下攪拌 3 小時。攪拌後以二氯甲烷、異丙醇、DMF 將樹脂洗淨、乾燥後於 20 分鐘內用 20% 無水乙酸 DMF 溶液將固相上未反應之羥基乙醯化以封鎖 (capping)。以 DMF 將樹脂洗淨後用 20% 六氫吡啶 / DMF 溶液攪拌 20 分鐘，將 Fmoc 基脫保護，獲得樹脂-Arg-NH₂。用 DMF 洗淨後乾燥。

於該樹脂中將谷胺酸 (Glu)、谷胺酸 (Glu)、谷胺醯胺 (Gln)、酪胺酸 (Tyr)、半胱胺酸 (Cys)、絲胺酸 (Ser)、蘇胺酸 (Thr)、酪胺酸 (Tyr)、精胺酸 (Arg)、纈胺酸 (Val) 同樣地進行縮合及 Fmoc 基之脫保護。獲得樹脂-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Cys-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-NH₂。

谷胺酸 (Glu)、谷胺醯胺 (Gln)、酪胺酸 (Tyr)、半胱胺酸 (Cys)、絲胺酸 (Ser)、蘇胺酸 (Thr)、精胺酸 (Arg)、纈胺酸 (Val) 之胺基酸係使用將羧基 pfp 酯化之 Fmoc-AA-Opfp (AA=胺基酸)，經由 3,4-二氫-4-氧代-1,2,3-苯并三吡啶-3-基 (Dhbt) 進行縮合。縮合均在 DMF 溶液中進行。

將樹脂洗淨後加入 95% TFA 水溶液，於室溫下攪拌 3 小時，將樹脂切斷。將樹脂過濾去除，反應溶液於室溫下減壓濃縮後溶解於水，冷凍乾燥。

參考例 4 (H₂N-Ser-Ser-Asn (二唾液基寡 (disialooligo)))

-Cys-Leu-Leu-Ala-NH₂之合成)

在固相合成用管柱中放入 HMPA-PEGA 樹脂 370 毫克，以 CH₂Cl₂、DMF 充分洗淨，在反應中使用。

將 Fmoc-Ser(OtBu)-OH、1-均三甲苯磺醯基-3-硝基-1,2,4-三唑 (MSNT)、N-甲基咪唑溶解於 CH₂Cl₂，攪拌 5 分鐘後放入裝有樹脂之固相合成用管柱，於室溫下攪拌 3 小時。攪拌後將樹脂用二氯甲烷、異丙醇、DMF 洗淨、乾燥後於 20 分鐘內用 20% 無水乙酸 DMF 溶液將固相上未反應之羥基乙醯化以封鎖 (capping)。以 DMF 將樹脂洗淨後用 20% 六氫吡啶 / DMF 溶液攪拌 20 分鐘，將 Fmoc 基脫保護，獲得樹脂-Ser-NH₂。用 DMF 洗淨後乾燥。

接著，使用 Fmoc-Ser(OtBu)-OH 經由 HOBt · H₂O 及 DIPCDI 進行縮合。

再將參考例 2 之 Fmoc-二唾液基糖鏈天冬醯胺溶於 1 比 1 之 DMSO、DMF 混合溶劑，用 HATU 及 DIPEA 於室溫下攪拌 24 小時進行縮合。用 DMF 洗淨後以 10% 乙酸酐 / 2-異丙醇：甲醇攪拌 20 分鐘進行封鎖。將樹脂以 2-異丙醇、DMF 洗淨後用 20% 六氫吡啶 / DMF 攪拌 20 分鐘將 Fmoc 基脫保護，以 DMF 將樹脂洗淨。

於該樹脂中將半胱胺酸 (Cys)、白胺酸 (Leu)、白胺酸 (Leu)、丙胺酸 (Ala) 同樣地進行縮合及 Fmoc 基之脫保護，獲得樹脂-Ser-Ser-Asn(二唾液基寡 (disialooligo))-Cys-Leu-Leu-Ala-NH₂。

半胱胺酸 (Cys)、白胺酸 (Leu)、丙胺酸 (Ala) 之胺基酸

係使用將羧基 pfp 酯化之 Fmoc-AA-Opfp(AA=胺基酸)，經由 3,4-二氫-4-氧代-1,2,3-苯并三吡啶-3-基(Dhbt)進行縮合。縮合均在 DMF 溶液中進行。

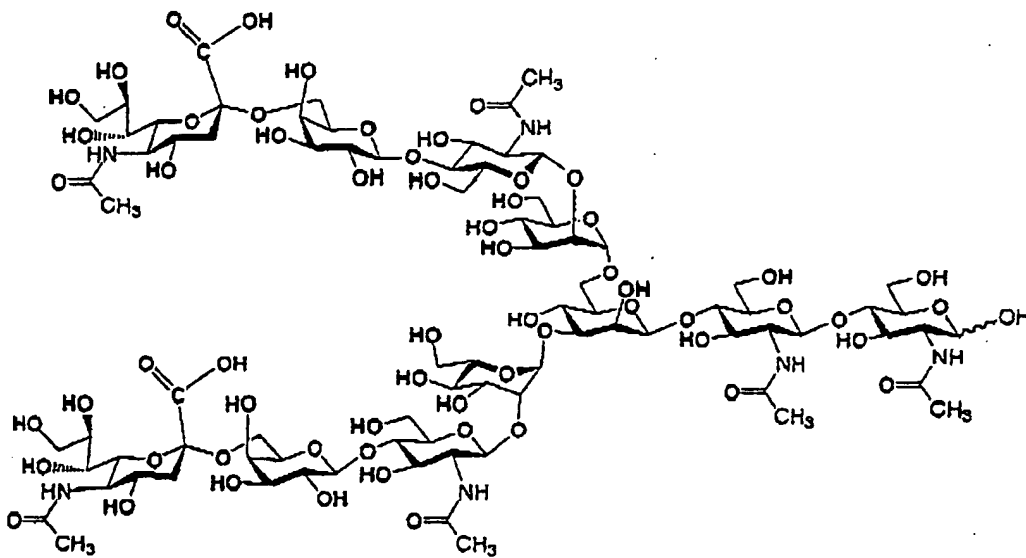
將樹脂洗淨後加入 95%TFA 水溶液，於室溫下攪拌 3 小時，將樹脂切斷。將樹脂過濾去除，反應溶液於室溫下減壓濃縮後溶解於水，冷凍乾燥。將冷凍乾燥品溶解於 pH11 之氫氧化鈉水溶液，將苄酯水解後用乙酸中和，用 HPLC 精製，獲得目的之 H₂N-Ser-Ser-Asn(二唾液基寡(disialooligo))-Cys-Leu-Leu-Ala-NH₂。(YMC-Pack A-314 S-5 ODS 300×6.0 毫米，展開溶劑：0.1%TFA 水溶液 B：0.1%TFA 乙腈：水=90：10 梯度 A 100% 0.60 毫升/分→B 100% 0.60 毫升/分 60 分鐘)

參考例 5(二唾液基糖鏈合成)

將 SGP(100 毫克)溶解於 50mM 磷酸緩衝液 pH 7.0 中，加入 PNGase F(BioLabs Inc. 1U)。於 37°C 保溫 24 小時，用 TLC(IPA：1M NH₄OAc=1：1)確認反應完成後冷凍乾燥。將冷凍乾燥品用凝膠過濾管柱層析法(Sephadex G25, 1.5 公分×30 公分，水，流速 1.0 毫升/分鐘)精製，得到收量 74 毫克之二唾液基糖鏈。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O)

δ 5.28 (bd, 1H, GlcNAc1-H-1a), 5.23 (s, 1H, Man4-H-1), 5.03 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.86 (s, 1H, Man3-H-1), 4.70 (m, 3H, GlcNAc2, 5, 5'-H-1), 4.53 (d, 2H, Gal6, 6'-H-1), 4.34 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.28 (bd, 1H, Man4-H-2), 4.20 (bd, 1H, Man4'-H-2), 2.76 (bdd, 2H, NeuAc7, 7'-H-3eq), 2.17 (s, 3H, Ac), 2.16 (s, 6H, Ac \times 2), 2.13 (s, 6H, Ac \times 3), 1.80 (dd, 2H, NeuAc7, 7'-H-3ax)

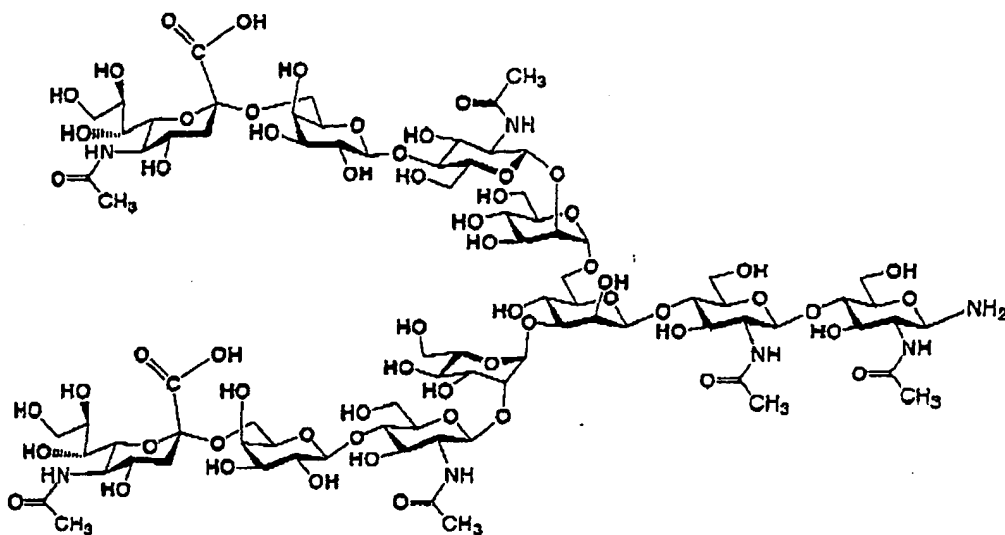


參考例 6(胺化)

將參考例 5 之二唾液基糖鏈(10 毫克)溶解於飽和碳酸氫銨水溶液，調製濃度為 30mM。於室溫下進行反應，經常維持飽和之狀態。進行反應 7 日，用 TLC(IPA:1M NH_4OAc =1:1)使反應大約完成後將反應溶液以原狀冷凍乾燥。為了去除碳酸氫銨，反覆進行冷凍乾燥 3 次，獲得收量為 9 毫克之在天然狀態胺化之二唾液基糖鏈。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, D_2O)

δ 5.22 (s, 1H, Man4-H-1), 5.03 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.86 (s, 1H, Man3-H-1), 4.69 (m, 3H, GlcNAc2, 5, 5'-H-1), 4.53 (d, 2H, Gal6, 6'-H-1), 4.34 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.28 (bd, 1H, Man4-H-2), 4.23 (bd, 1H, GlcNAc1-H-1), 4.20 (bd, 1H, Man4'-H-2), 2.76 (bdd, 2H, NeuAc7, 7'-H-3eq), 2.17 (s, 3H, Ac), 2.16 (s, 6H, Ac \times 2), 2.12 (s, 6H, Ac \times 3), 1.80 (dd, 2H, NeuAc7, 7'-H-3ax)



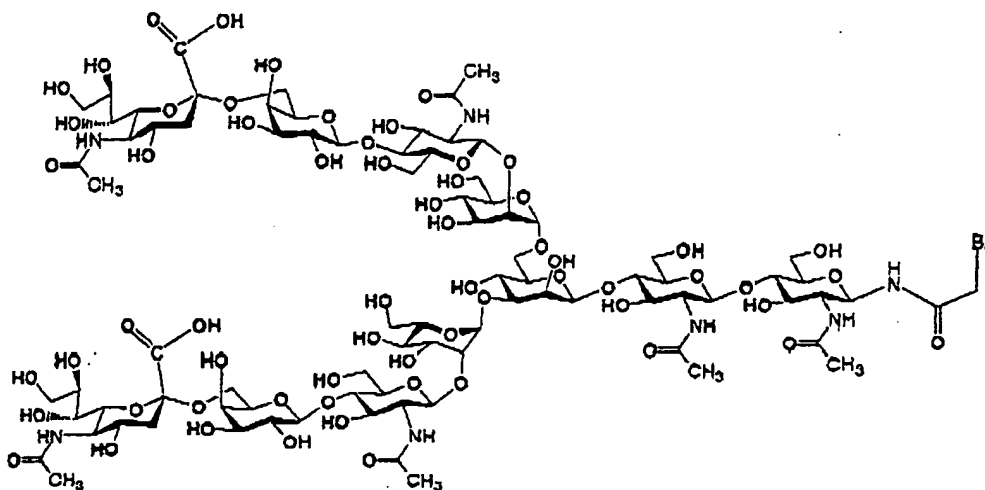
實施例 1(溴醯化)

將參考例 6 之胺化二唾液基糖鏈(未精製物 5 毫克)溶解於水 100 微升，加入碳酸氫鈉 2 毫克。加入溶解於 DMF (100 微升)之溴乙酸 6.2 毫克及 DCC4.6 毫克，於室溫下進行反應。1.5 小時後用 TLC(IPA: 1M NH_4OAc =2:1)確認反應完成，用碳酸氫鈉中和、過濾後減壓濃縮。接著，用凝膠過濾管柱層析法(Sephadex G25, 1.5 公分 \times 30 公分，水，流速 1.0 毫升/分鐘)精製，獲得收量 4 毫克之溴乙醯化之

二唾液基糖鏈。收率 77%。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, D_2O)

δ 5.22 (s, 1H, Man4-H-1), 5.16 (bd, 1H, GlcNAc1-H-1), 5.03 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.86 (s, 1H, Man3-H-1), 4.70 (m, 3H, GlcNAc2, 5, 5'-H-1), 4.53 (d, 2H, Gal6, 6'-H-1), 4.34 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.28 (bd, 1H, Man4-H-2), 4.20 (bd, 1H, Man4'-H-2), 2.77 (bdd, 2H, NeuAc7, 7'-H-3eq), 2.17 (s, 3H, Ac), 2.15 (s, 6H, Ac \times 2), 2.12 (s, 6H, Ac \times 2), 2.10 (s, 3H, Ac), 1.80 (dd, 2H, NeuAc7, 7'-H-3ax)



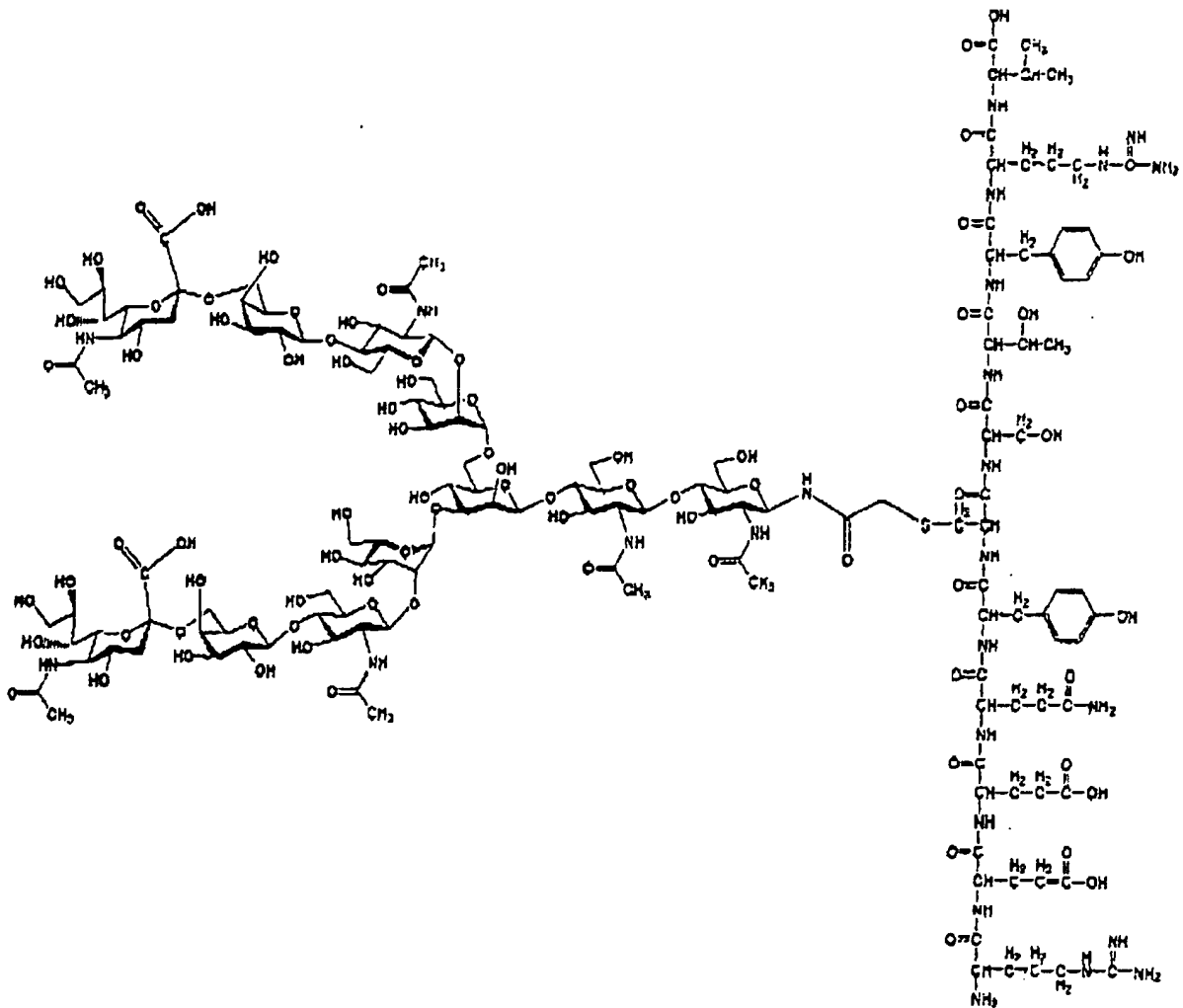
實施例 2

將實施例 1 之溴乙醯化二唾液基糖鏈 2 毫克及參考例 3 合成之肽鏈 1.8 毫克 (Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Cys-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val) 溶解於 100mM 磷酸緩衝液 pH7.0、170 微升中，於室溫下保溫。用 HPLC 確認原料消失後，直接用 HPLC [管柱：Mightysil-GP (5 微米)、 ϕ 10 \times 250 毫米、梯度：0.1% 三氟乙酸 / 水 100% 至 0.1% 三氟乙酸 乙腈 / 水 = 90 /

10 75%；60 分鐘，線狀(linear)、流速 2.5 毫升]精製，獲得收量 2 毫克之二唾液基糖鏈肽，收率 64%。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, D_2O)

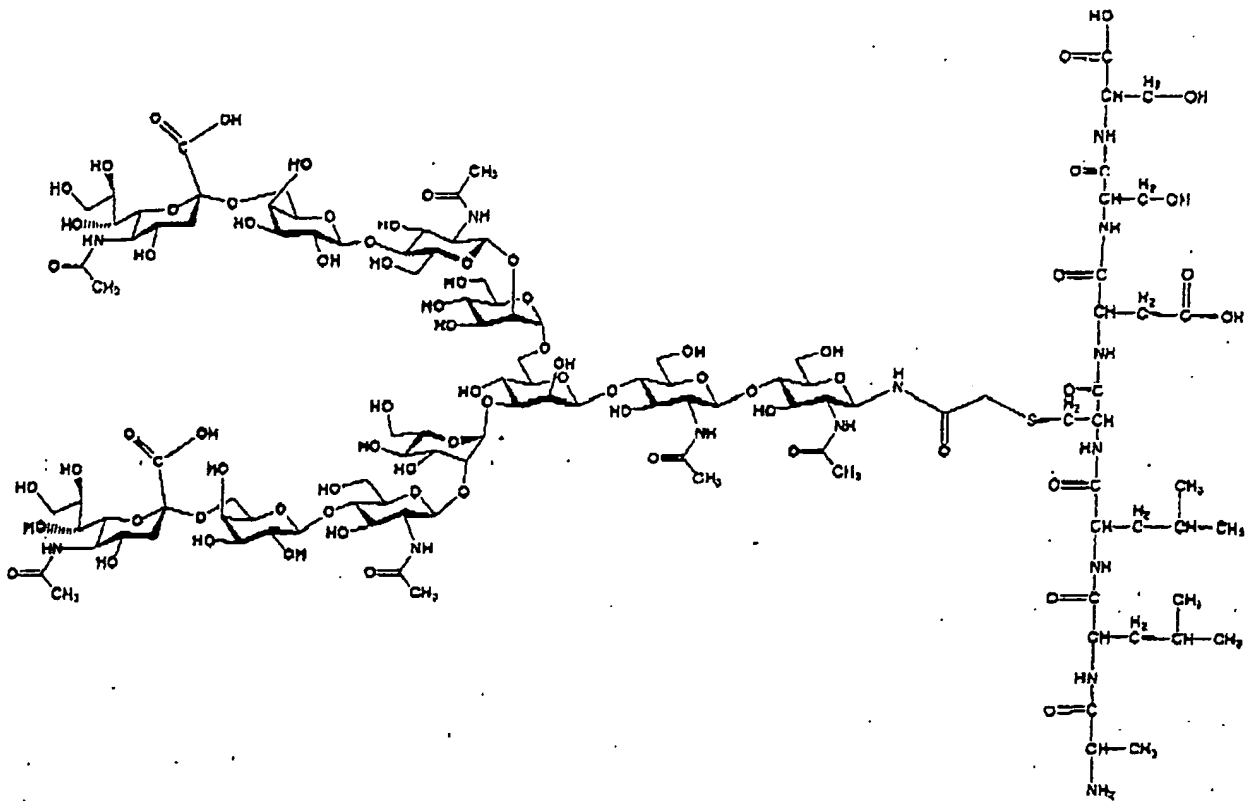
δ 7.18 (4H, Ph), 6.89 (4H, Ph), 5.22 (s, 1H, Man4-H-1), 5.14 (bd, 1H, GlcNAc1-H-1), 5.04 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.86 (s, 1H, Man3-H-1), 4.69-4.63 (m, 5H, GlcNAc2, 5, 5'-H-1, Tyr- α H, Cys- α H), 4.55-4.52 (m, 4H, Gal6, 6'-H-1, Gln- α H, Ser- α H), 4.44-4.38 (m, 4H, Glu- α H \times 2, Arg-H α , Thr- α H), 4.34 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.28 (m, 3H, Man4-H-2, Thr- β H), 4.23 (d, 1H, $J=59\text{Hz}$, Val- α H), 4.20 (bd, 1H, Man4'-H-2), 4.15 (1H, Arg- α H), 3.30, 3.25 (each 2H, Arg- δ CH $_2$), 3.14-2.99 (6H, Cys- β H, Tyr- β H \times 2), 2.76 (bdd, 2H, NeuAc7, 7'-H-3eq), 2.57 (2H, Gln- γ CH $_2$), 2.49, 2.35 (each 2H, Glu- γ CH $_2$), 2.23-2.10 (m, 3H, Val- β H, Gln- β H), 2.16 (s, 3H, Ac), 2.15 (s, 6H, Ac \times 2), 2.12 (s, 6H, Ac \times 2), 2.10-1.98 (m, 6H, Glu- β H \times 2, Arg- β H), 2.07 (s, 3H, Ac), 1.92-1.57 (m, 8H, NeuAc7, 7'-H-3ax, Arg- β H, Arg- γ CH $_2$ \times 2), 1.23 (d, 3H, Thr- γ CH $_3$), 1.04 (d, 6H, Val- γ CH $_3$)



實施例 3(使用 1-溴乙醯基-二唾液基糖鏈之替代)

將參考例 4 合成之二唾液基糖鏈肽 1 毫克及實施例 1 之溴乙醯化二唾液基糖鏈 1 毫克溶解於 10mM 磷酸緩衝液 200 微升，加入將天冬醯胺結合型糖鏈從天冬醯胺切斷之酵素 PNGase F(5U)，於室溫下進行反應。生成物用 HPLC 精製，獲得目的之在半胱胺酸結合二唾液基糖鏈之二唾液基糖鏈肽。

(YMC-Pack A-314 S-5 ODS 300×6.0 毫米，展開溶劑：0.1%TFA 水溶液 B: 0.1%TFA 乙腈：水 = 90:10 梯度 A 100% 0.60 毫升/分 → B 100% 0.60 毫升/分 60 分鐘)



試驗例 1 (對於糖水解酵素之耐性)

將實施例 3 獲得之二唾液基糖鏈肽 1 毫克溶解於 100mM 磷酸緩衝液 200 微升，加入將天冬醯胺結合型糖鏈從天冬醯胺切斷之酵素 PNGase F(5U)，於室溫下進行反應，測定二唾液基糖鏈從肽切斷之時間。至切斷為止之時間為 6 小時。

將參考例 4 獲得之二唾液基糖鏈肽 1 毫克溶解於 100mM 磷酸緩衝液 200 微升，加入將天冬醯胺結合型糖鏈從天冬醯胺切斷之酵素 PNGase F(5U)，於室溫下進行反應，測定二唾液基糖鏈從肽切斷之時間。至切斷為止之時間為 30 分鐘。

由該結果明瞭與天然結合型糖鏈肽(參考例 4)相比較，對於糖水解酵素之耐性高。

實施例 4

將抗 CD20 嵌合體 (Anti-CD20chimaera) 抗體 (Mutant) (醫學生物學研究所(股)公司製造：經由突變 (mutation) 技術，將胺基酸排列第 297 號之天冬醯胺轉換為半胱胺酸而得之抗體) 43.9 微克及實施例 1 之溴乙醯化二唾液基糖鏈 100 微克溶解於 100mM 磷酸緩衝液 300 微升，於室溫下保溫。反應完成後用蛋白質 A 管柱層析法及凝膠過濾層析法精製，獲得目的之在半胱胺酸結合二唾液基糖鏈之抗體。抗體經由電泳 (10% SDS-PAGE (附有 2-硫醇基乙醇 (2-mercaptoethanol))：分子量標記由為 BIO-RAD 公司製造之預染色 SDS-PAGE 廣範圍標準品 (型錄編號 161-0318)) 及藉由 MASS 確認。結果如第 3 圖所示。

[產業上之可利用性]

根據本發明可獲得可維持充分血中濃度之新穎胺化複合型糖鏈衍生物及糖鏈肽。

【圖式簡單說明】

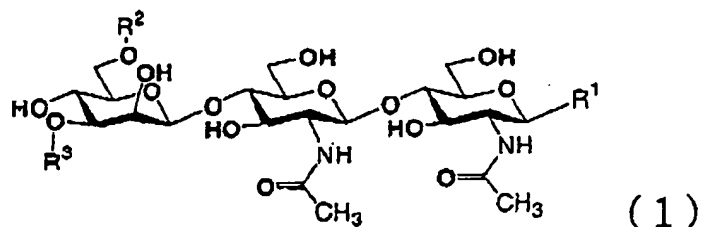
第 1 圖為糖鏈構造之 1 例之圖。

第 2 圖為天冬醯胺結合型糖鏈之分類之圖。

第 3 圖為抗 CD20 嵌合體 (Anti-CD20chimera) 抗體 (Mutant) 及抗 CD20 嵌合體抗體 (Mutant) 糖鏈修飾體之電泳圖。

五、中文發明摘要：

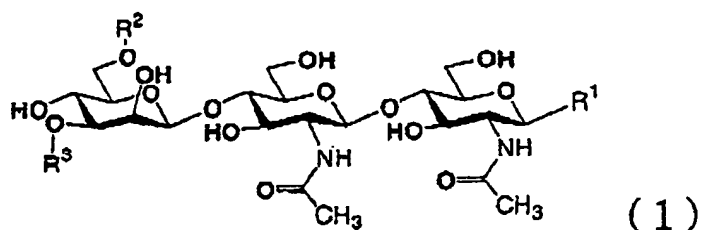
本發明係有關例如式(1)所示之胺化複合型糖鏈衍生物。



[式中，R¹ 為 -NH-(CO)-CH₂X、-NH-(CO)-(CH₂)_b-CH₂X、異硫氰酸酯基、-NH-(CO)_a-(CH₂)_b-CO₂H、-NH-(CO)_a-(CH₂)_b-CHO；X 為鹵素原子；a 為 0 或 1，b 為 1 至 4 之整數；R² 及 R³ 為氫原子、說明書中所示之式(2)至(5)所示之基，可相同亦可不同；但是，排除 R² 及 R³ 同為氫原子或式(5)之情況，以及 R² 及 R³ 中之一者為氫原子，且另一者為式(5)之情況。]

六、英文發明摘要：

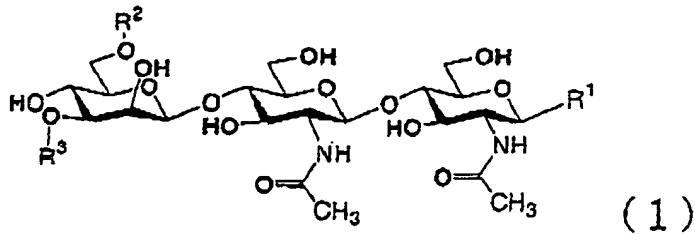
This invention provides an aminated complex type sugar chain derivative represented by the following formula (1):



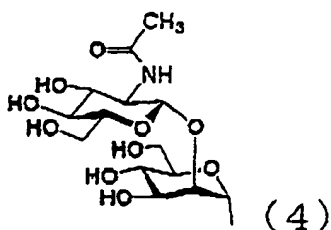
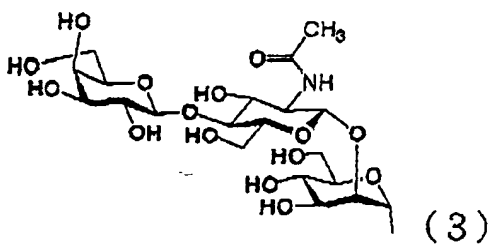
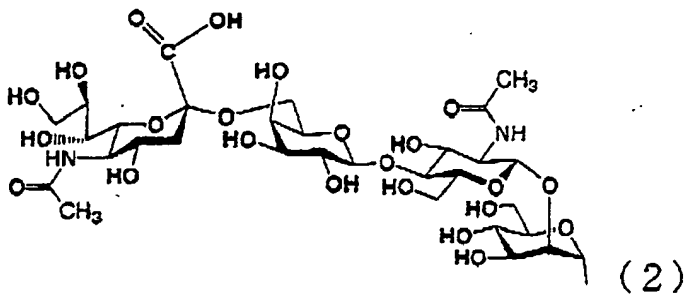
wherein R¹ represents -NH-(CO)-CH₂X, -NH-(CO)-(CH₂)_b-CH₂X, an isothiocyanate group, -NH-(CO)_a-(CH₂)_b-CO₂H, or -NH-(CO)_a-(CH₂)_b-CHO; X is a halogen atom; a is 0 or 1, b represents an integer of 1 to 4; R² and R³ are the same or different, representing a hydrogen atom, or a group represented by formulas (2)~(5) in the specification, provided that the compounds in which R² and R³ are both a hydrogen atom or a group of formula (5), and the compounds in which one of R² and R³ is a hydrogen atom and the other is a group of formula (5) are excluded.

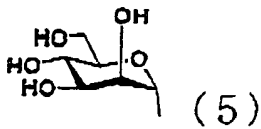
十、申請專利範圍：

1. 一種糖鏈肽，係由式(I)所示之胺化複合型糖鏈衍生物與具有硫醇基之肽的硫醇基結合而成者：

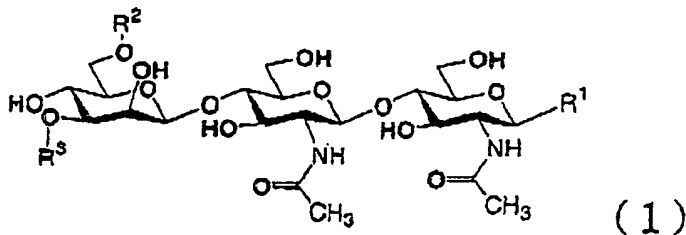


[式中， R^1 為 $-\text{NH}-(\text{CO})-\text{CH}_2\text{X}$ 、 $-\text{NH}-(\text{CO})-(\text{CH}_2)_b-\text{CH}_2\text{X}$ 、異硫氰酸酯基、 $-\text{NH}-(\text{CO})_a-(\text{CH}_2)_b-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NH}-(\text{CO})_a-(\text{CH}_2)_b-\text{CHO}$ ； X 為鹵素原子、 a 為 0 或 1， b 為 1 至 4 之整數； R^2 及 R^3 可相同或不同，為氫原子、式(2)至(5)所示之基]



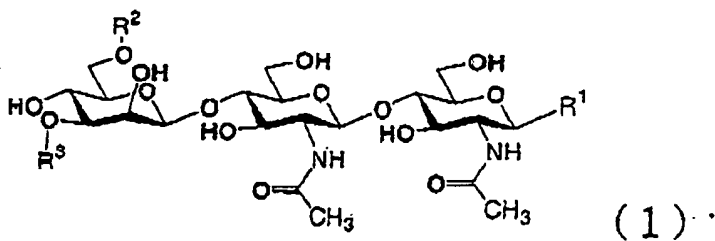


2. 一種糖鏈肽之製造方法，其特徵係：將式 (1) 所示之胺化複合型糖鏈衍生物與具有硫醇基之肽的硫醇基，於 0 至 80°C 之溫度下，反應 30 分至 5 小時而結合者：



[式中， R^1 、 R^2 及 R^3 之意義與申請專利範圍第 1 項相同]。

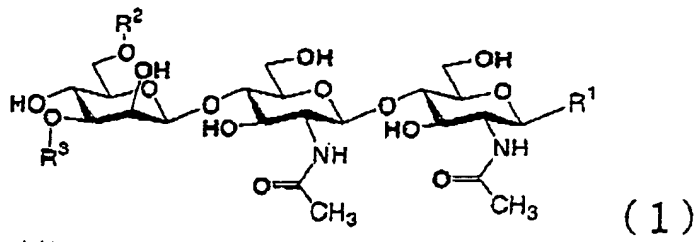
3. 如申請專利範圍第 1 項之糖鏈肽，其中，該糖鏈肽係抗體者。
4. 一種糖鏈肽之製造方法，其特徵係：使用糖水解酵素，於 0 至 80°C 之溫度下，將糖鏈肽之糖從胺基酸切出，接著與式 (1) 所示之胺化複合型糖鏈衍生物結合者：



[式中， R^1 、 R^2 及 R^3 之意義如同申請專利範圍第 1 項所述]。

5. 一種糖鏈肽，其係抗體且係使用糖水解酵素於 0 至 80°C 之溫度下，將糖鏈肽之糖從胺基酸切出，接著與式 (1)

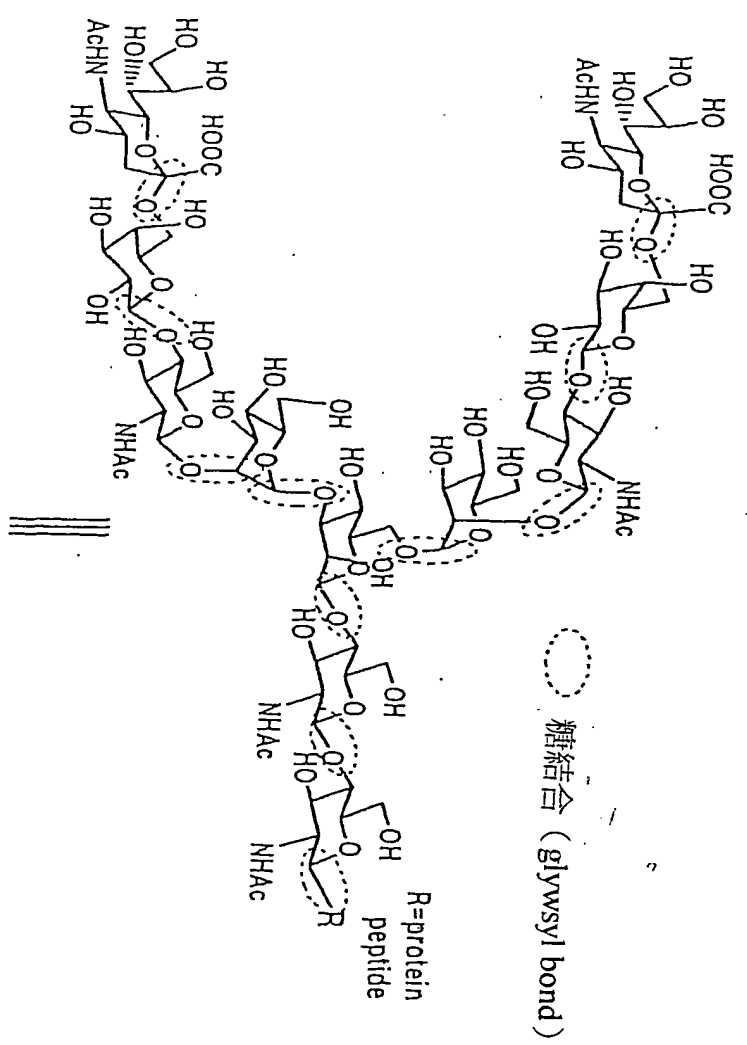
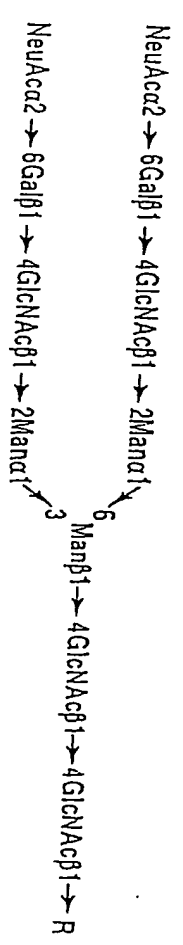
所示之胺化複合型糖鏈衍生物，於 0 至 80°C 之溫度下
反應 30 分鐘至 5 小時而結合所獲得者：



[式中，R¹、R²及 R³之意義如同申請專利範圍第 1 項]。

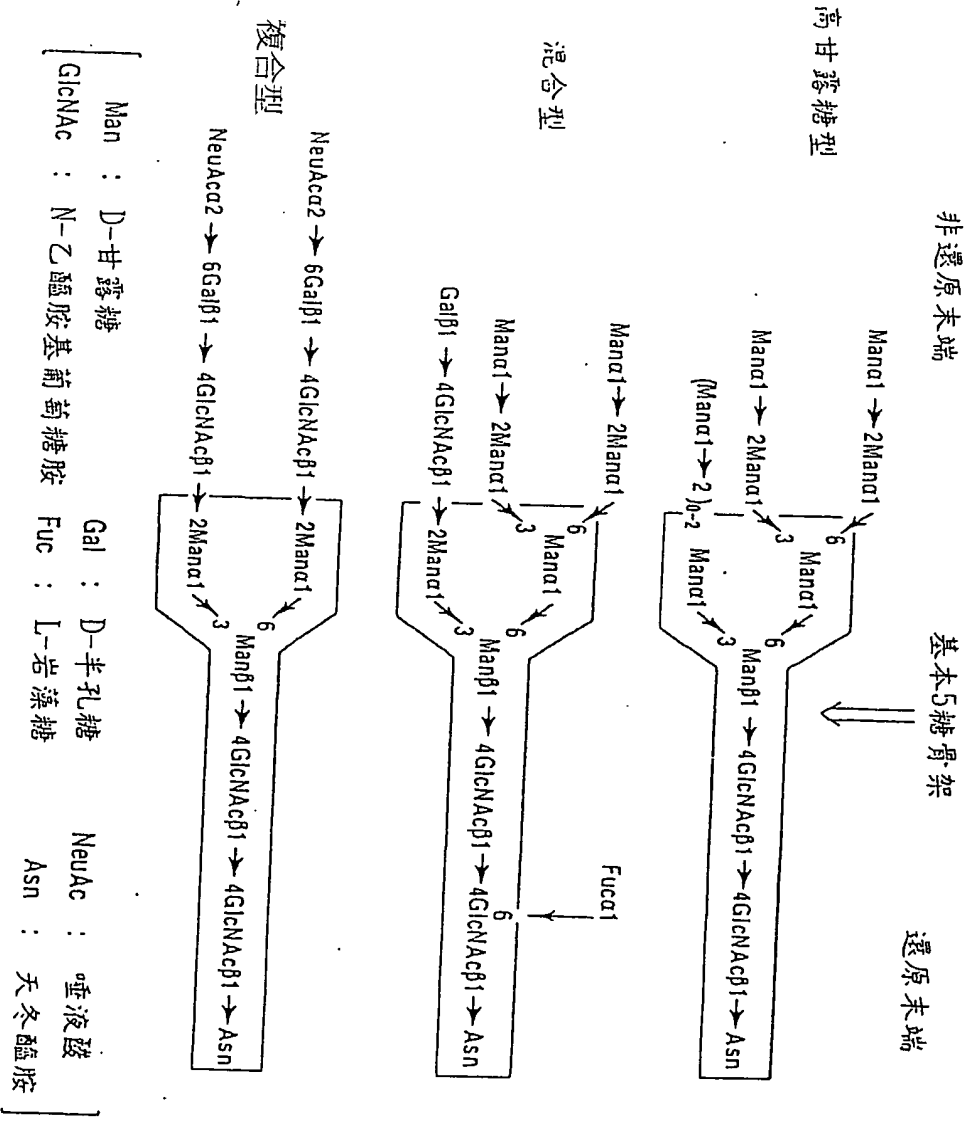
96年10月2日修(正)替换页

公告本



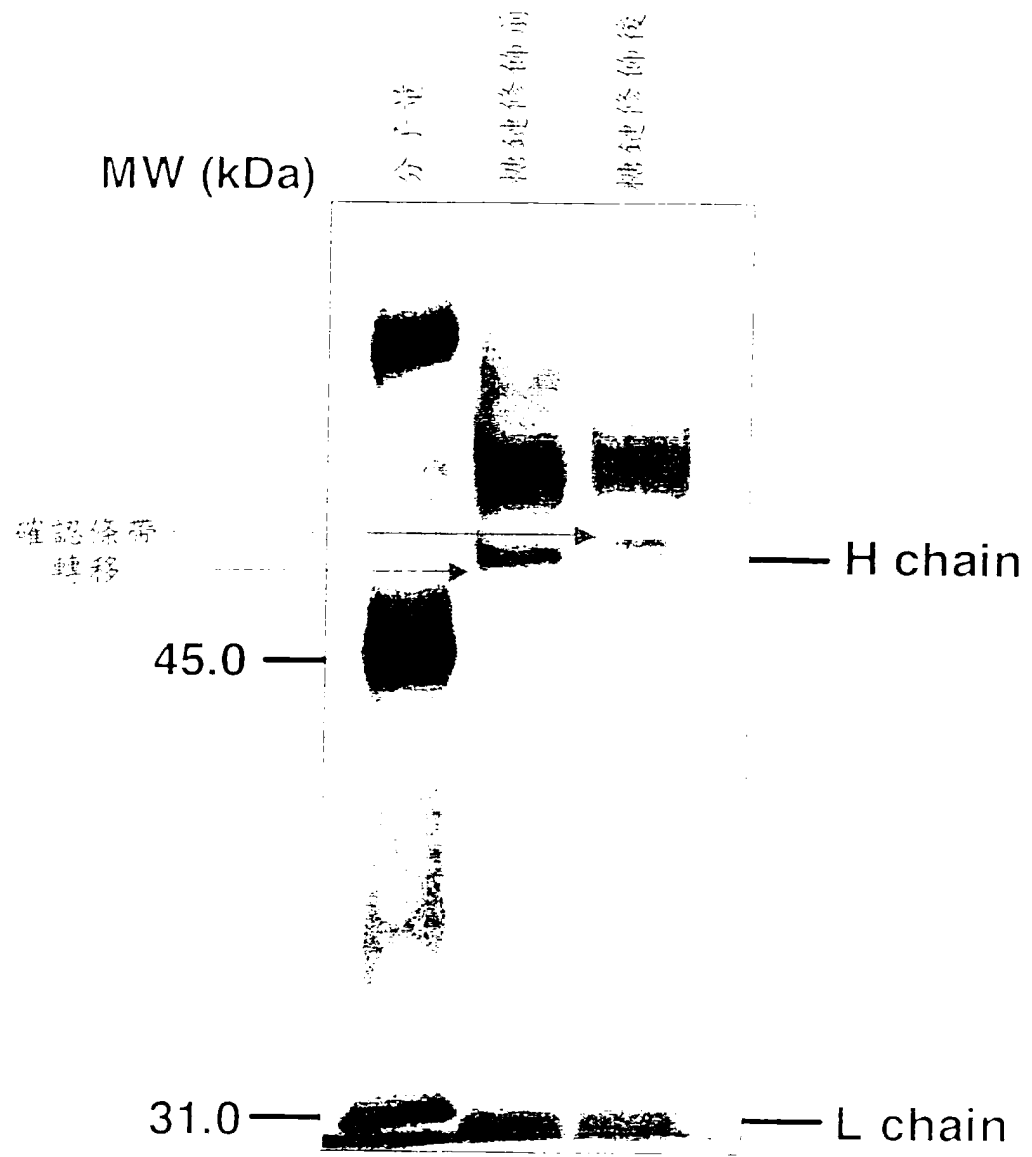
第1圖

天冬醯胺結合型糖鏈



96年10月2日(天)正替換頁

第2圖



第3圖

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

該代表圖無元件符號及其所代表之意義。

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

