



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108254231 B

(45) 授权公告日 2021.02.26

(21) 申请号 201711447438.4

G01N 27/62 (2006.01)

(22) 申请日 2017.12.27

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108254231 A

CN 103534276 A, 2014.01.22

CN 105308021 A, 2016.02.03

CN 105233298 A, 2016.01.13

(43) 申请公布日 2018.07.06

CN 103450483 A, 2013.12.18

CN 104334574 A, 2015.02.04

(30) 优先权数据
2016-256350 2016.12.28 JP

US 2012077758 A1, 2012.03.29

(73) 专利权人 株式会社岛津制作所
地址 日本国京都府京都市中京区西之京桑原町1番地

杜迎新等. 基于化学衍生的MALDI质谱法分析唾液酸化聚糖.《湖北第二师范学院学报》.2016, 全文.

(72) 发明人 西风隆司

Takashi Nishikaze. Negative-ion MALDI-MS2 for discrimination of 2,3- and 2,6-sialylation on glycopeptides labeled with a pyrene derivative.《Journal of Chromatography B》.2010, 1419-1428.

(74) 专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司 31300

代理人 肖华

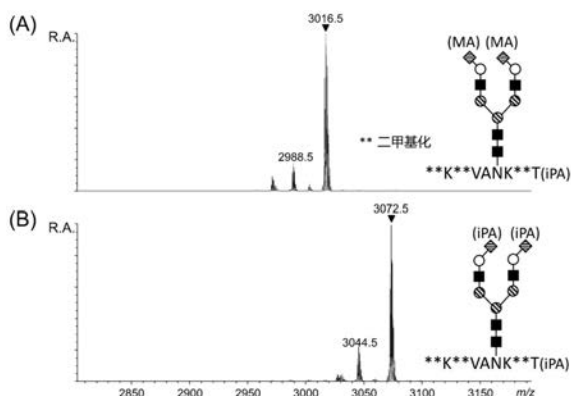
审查员 龚子涵

(51) Int. Cl.
G01N 1/28 (2006.01)
G01N 30/06 (2006.01)

权利要求书1页 说明书15页 附图6页

(54) 发明名称
分析用试样的调制方法以及分析方法

(57) 摘要
本发明的分析用试样的调制方法中, 依次实施修饰或除去糖肽或糖蛋白的肽部分中所含的至少1个伯氨基的第一反应以及可修饰糖链的唾液酸的羧基的第二反应。第二反应是 α 2,3-唾液酸和 α 2,6-唾液酸生成质量不同的衍生物的反应。



1. 一种分析用试样的调制方法, 其为糖肽或糖蛋白的分析用试样的调制方法, 其特征在于,

依次实施修饰或除去糖肽或糖蛋白的肽部分中所含的至少1个伯氨基的第一反应以及可修饰糖链的唾液酸的羧基的第二反应;

所述第二反应是 α 2,3-唾液酸和 α 2,6-唾液酸生成质量不同的衍生物的反应。

2. 根据权利要求1所述的试样的调制方法, 其特征在于, 所述第一反应包括使伯氨基的氮原子生成至少1个氮碳键的反应。

3. 根据权利要求1所述的试样的调制方法, 其特征在于, 所述第一反应包括伯氨基的胍基化以及二烷基化中的至少一方。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的分析用试样的调制方法, 其特征在于, 所述第一反应是修饰或除去至少肽部分中所含的赖氨酸残基的伯氨基的反应。

5. 根据权利要求1~3中任一项所述的分析用试样的调制方法, 其特征在于, 所述第一反应包括修饰或除去至少肽的N末端的伯氨基的反应。

6. 根据权利要求1~3中任一项所述的分析用试样的调制方法, 其特征在于, 所述第一反应是修饰肽部分中所含的全部伯氨基的反应。

7. 根据权利要求6所述的分析用试样的调制方法, 其特征在于, 所述修饰伯氨基的反应为二烷基化。

8. 根据权利要求1~3中任一项所述的分析用试样的调制方法, 其特征在于, 所述第二反应包括选择性地内酯化 α 2,3-唾液酸且选择性地酰胺化或酯化 α 2,6-唾液酸的反应。

9. 根据权利要求8所述的分析用试样的调制方法, 其特征在于,

所述第二反应还包括通过所述内酯与亲核剂的反应来生成别的衍生物的反应,

对所述亲核剂进行选择, 以使由所述内酯生成的衍生物和由所述 α 2,6-唾液酸生成的衍生物具有不同的质量。

10. 根据权利要求1~3中任一项所述的分析用试样的调制方法, 其特征在于, 在所述糖肽或糖蛋白固定于固相载体的状态下, 进行所述第一反应。

11. 根据权利要求1~3中任一项所述的分析用试样的调制方法, 其特征在于, 在所述第一反应后的糖肽或糖蛋白固定于固相载体的状态下, 进行所述第二反应。

12. 一种糖肽或糖蛋白的糖链构造的分析方法, 其特征在于, 通过权利要求1~11中任一项所述的方法来调制试样, 进而对调制后的试样进行质量分析。

分析用试样的调制方法以及分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及糖肽或糖蛋白的分析用试样的调制方法以及分析方法。

背景技术

[0002] 向肽链附加糖链是翻译后修饰中最重要的工序之一。肽链上附加有糖链的糖蛋白与各种各样的生命现象相关。一般认为,在生物体内,通过附加在蛋白质上的糖链的细微结构差异被精密识别,细胞间的信号传导和分子识别等得到控制,由此,糖蛋白质及糖肽的结构解析被期望会给生命现象的阐明、新药创制、生物标志物开发等方面带来巨大贡献。

[0003] 蛋白质上所结合的糖链大多具有唾液酸。由于糖链的唾液酸直接参与分子识别,故而分析唾液酸的有无(唾液酸的数量)及其结合模式在糖蛋白和糖肽的结构解析中是重要的。

[0004] 关于糖链中的唾液酸,与还原末端侧的糖残基的结合方式存在着 $\alpha 2,3$ -结合者和 $\alpha 2,6$ -结合者(结合异构)。已知在生物体中,唾液酸的结合方式的差异与各种各样的生命现象相关,例如已知随着癌化,唾液酸的结合方式会产生变化。因此,识别唾液酸的结合方式的差异,在作为生物标志物的利用和生物医药品的质量管理等方面也受到关注。

[0005] 作为识别糖链中的唾液酸的结合方式的方法,有人提出了下述方法:按照根据唾液酸的结合方式而具有不同的质量的方式进行衍生物化,进行质量分析的方法。例如,专利文献1中,有人提出了下述方法:在使用1-甲基-3-对甲苯基三氮烯(MTT)进行唾液酸的甲酯化后,设定为酸性条件的方法。该方法中,由于在酸性条件下 $\alpha 2,3$ -唾液酸的甲酯被选择性地脱甲基化,故而由 $\alpha 2,3$ -唾液酸与 $\alpha 2,6$ -唾液酸获得了质量不同的衍生物。非专利文献1以及非专利文献2公开了下述内容:通过在脱水缩合剂和甲醇或乙醇等亲核剂的存在下使糖链反应,由此 $\alpha 2,6$ -唾液酸藉由与亲核剂的反应从而羧基被酯化, $\alpha 2,3$ -唾液酸藉由分子内脱水从而生成内酯环。非专利文献3以及专利文献2公开了下述内容:通过在脱水缩合剂以及作为亲核剂的胺的存在下的反应, $\alpha 2,6$ -唾液酸藉由与亲核剂的反应从而羧基被酰胺化, $\alpha 2,3$ -唾液酸藉由分子内脱水从而生成内酯环。

[0006] 藉由 $\alpha 2,3$ -唾液酸糖链的分子内脱水而生成的内酯是不稳定的,有时候会出现由于与MALDI-MS的基质的混合而内酯开环,分析的定量性受损的情况。专利文献2中,在脱水缩合剂(N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)等碳二亚胺)以及异丙胺的存在下的反应之后,在磷(phosphonium)系脱水缩合剂和甲胺的存在下,进一步实施反应,内酯开环,进行甲酰胺化。像这样地,通过将由 $\alpha 2,3$ -唾液酸糖链生成的内酯进行开环而生成更稳定的衍生物,可以提高分析的定量性。

[0007] [现有技术文献]

[0008] [专利文献]

[0009] 专利文献1:日本专利特开第2013-76629号公报

[0010] 专利文献2:日本专利特开第2016-194500号公报

[0011] [非专利文献]

[0012] 非专利文献1:Wheeler,S.等,Rapid Commun.Mass Spectrom.,第23卷,第303-312页(2009年)

[0013] 非专利文献2:Reiding,K.等,Anal.Chem.,第86卷,第5784-5793页(2014年)

[0014] 非专利文献3:de Haan,N.等,Anal.Chem.,第87卷,第8284-8291页(2015年)

发明内容

[0015] [发明所要解决的问题]

[0016] 通过质量分析进行的唾液酸的结合方式的识别所涉及的以往报告,大半是涉及游离糖链的报告,适用于糖蛋白、糖肽的例子报告是有限的。在脱水缩合剂和亲核剂的存在下,有时会出现不仅是唾液酸的羧基,肽C末端、酸性氨基酸残基的羧基也与脱水缩合剂发生反应的情况。另外,有时还会出现肽N末端、赖氨酸残基的氨基与分子内的羧基进行脱水缩合的情况。

[0017] 它们的肽部分的副反应(脱水、羧基的修饰)与糖链的唾液酸的羧基的修饰反应并行进行。副反应依赖于肽部分的氨基酸序列、立体构象(conformation)等。因此,不容易预测发生何种副反应,质谱的峰的归属等数据解析变烦杂。另外,副反应进行到一半时,或者多个副反应竞争性地发生时,由离子量相对于各生成物的裂分(split)导致的灵敏度降低和糖链部分的构造的不均一性互相作用,带来极其烦杂的质谱。因此,不仅失去定量性,有时还会出现连峰的归属都变成不可能的情况。

[0018] 上述专利文献2记载了:在胺以及脱水缩合剂的存在下,糖肽的羧基难以被酰胺化,唾液酸的羧基被选择性地修饰(酰胺化或内酯化)。然而,为了不将糖肽的羧基酰胺化、选择性地修饰唾液酸的羧基,而存在根据糖链的构造、肽的氨基酸序列来具体地调整脱水缩合剂、胺的种类以及浓度、反应温度、以及反应时间等的必要。调整反应条件以使唾液酸的羧基的结合方式选择性反应率变高时,肽部分的羧基容易被酰胺化,不容易兼得唾液酸的结合方式的识别与肽部分的副反应的抑制。

[0019] 非专利文献3中,公开了识别源于IgG(免疫球蛋白G)的糖肽中的唾液酸的结合方式的例子,也明确确定了肽中存在的羧基的反应。具体地,公开了:肽N末端的谷氨酸分子内脱水(焦谷氨酰化(pyroglutamylation)),且与其C末端侧邻接的谷氨酸的羧基以及肽C末端的羧基被二甲基酰胺化。

[0020] 如后详述,可以控制肽部分的羧基的反应的是,限于如源于免疫球蛋白G(IgG)的肽那样地,肽部分具有特定的氨基酸序列的情况。大多数的氨基酸序列中,不容易预测在脱水缩合剂的存在下的肽部分的羧基、氨基的反应,难以控制竞争性发生的多个副反应。即,由糖链部分的 α 2,3-唾液酸与 α 2,6-唾液酸获得质量不同的衍生物的反应是基于竞争反应的控制,同时控制相对于唾液酸的羧基的竞争反应与相对于肽部分的羧基的竞争反应这两者,除了如源于IgG的肽那样地,肽部分具有特异性氨基酸序列的情况之外,是不容易的。

[0021] 鉴于上述情况,本发明的目的在于提供一种不依赖于肽部分的氨基酸序列,可识别糖蛋白或糖肽的糖链部分的唾液酸的有无和唾液酸的结合方式的通用分析方法。

[0022] [解决问题的手段]

[0023] 本发明涉及一种糖蛋白或糖肽的分析用试样的调制方法,其特征在于,在进行唾液酸的结合方式特异性反应之前,修饰或除去糖肽或糖蛋白的肽部分中所含的伯氨基,以

使其不与羧基反应。

[0024] 本发明的分析用试样的调制方法中,依次实施修饰或除去糖肽或糖蛋白的肽部分中所含的至少1个伯氨基的第一反应、以及可修饰糖链的唾液酸的羧基的第二反应。

[0025] 第二反应是 α 2,3-唾液酸和 α 2,6-唾液酸生成质量不同的衍生物的反应,例如包括选择性地内酯化 α 2,3-唾液酸,且选择性地酰胺化或酯化 α 2,6-唾液酸的反应。第二反应还可以包括通过由 α 2,3-唾液酸生成的内酯与亲核剂的反应来生成别的衍生物的反应。内酯与亲核剂的反应中,对亲核剂进行选择,以使得由内酯生成的衍生物具有与由 α 2,6-唾液酸生成的衍生物不同的质量。

[0026] 另外,第二反应只要是可修饰糖链的唾液酸的羧基的反应即可,在分析对象的糖肽的糖链上不含唾液酸时,实际上无需修饰糖链的唾液酸的羧基。此时,可以通过质量分析,来判别糖链不含唾液酸。糖链仅含 α 2,3-唾液酸、不含 α 2,6-唾液酸时,第二反应中,未进行 α 2,6-唾液酸的衍生物化。糖链仅含 α 2,6-唾液酸、不含 α 2,3-唾液酸时,第二反应中,未进行 α 2,3-唾液酸的衍生物化。

[0027] 作为肽部分中所含的伯氨基,可列举出赖氨酸残基的 ϵ -氨基以及肽N末端的 α -氨基。以下,只要无特别说明,伯氨基简写为“氨基”。

[0028] 第二反应之前进行的第一反应是修饰或除去这些氨基的反应,优选修饰氨基的反应。作为氨基的修饰反应,可列举出在氨基的氮原子上生成至少1个氮碳键的反应。其中,优选为胍基化和/或二烷基化。

[0029] 第一反应例如是修饰或除去肽部分中所含的赖氨酸残基的 ϵ -氨基的反应。选择性地修饰赖氨酸残基的 ϵ -氨基时,优选为胍基化。

[0030] 第一反应优选为修饰肽部分中所含的全部的氨基的反应,优选为氨基的二烷基化,其中,优选为二甲基化。

[0031] 上述第一反应可在将糖肽或糖蛋白固定于固相载体的状态下进行。可在将第一反应后的糖肽或糖蛋白固定于固相载体的状态下,进行第二反应。

[0032] 此外,本发明还涉及通过上述方法获得的试样的分析。通过藉由上述方法获得的试样的质量分析,可解析糖蛋白或糖肽的糖链构造。

[0033] [发明的效果]

[0034] 在通过第一反应来修饰或除去肽的伯氨基之后,通过实施第二反应,可以抑制第二反应中的羧基与肽的胺的副反应。因此,质谱中的峰裂分降低,并且可以通过质量分析简便且高精度地实施糖蛋白或糖肽的糖链的唾液酸的有无的判别和唾液酸的结合方式的识别。

附图说明

[0035] 图1是实验例1-1的SGP衍生物的质谱。

[0036] 图2是实验例1-2的SGP衍生物的质谱。

[0037] 图3是实验例1-3的SGP衍生物的质谱。

[0038] 图4是实验例1-4的SGP衍生物的质谱。

[0039] 图5是实施例2的转铁蛋白消化物及其衍生物的质谱。

[0040] 图6是实施例3的RNase B(核糖核酸酶B)消化物以及其衍生物的质谱。

具体实施方式

[0041] 本发明涉及用于进行糖肽或糖蛋白的糖链构造的解析的分析用试样的调制方法。通过本发明的方法调制的试样对唾液酸的有无、唾液酸的结合方式的分析是有用的。作为糖肽或糖蛋白,优选为含有N-结合型糖链、O-结合型糖链等可以具有唾液酸的糖链的物质。

[0042] 对于糖蛋白和糖肽,在肽链的氨基酸残基数多时,优选通过蛋白酶(protease)消化等,将肽链切断为适于分析的长度而使用。例如,在调制质量分析用试样时,肽链的氨基酸残基数优选在30以下,更优选在20以下,进一步优选在15以下。另一方面,在要求明确糖链所结合的肽的来源时,肽链的氨基酸残基数优选在2以上,更优选在3以上。

[0043] 通常,蛋白酶识别氨基酸序列,且选择性地切断特定的序列的特定结合。作为蛋白酶,可使用胰蛋白酶、赖氨酰肽链内切酶(lysyl endopeptidase)(Lys-C)、精氨酸肽链内切酶(arginine endopeptidase)、糜蛋白酶、胃蛋白酶等。另外,蛋白酶也可以组合2种以上使用。另外,还可使用嗜热菌蛋白酶(thermolysin)或蛋白酶K(proteinaseK)、链霉蛋白酶E(pronase E)这样的特异性低的蛋白酶(protease)。对蛋白酶消化的条件没有特别限定,可以采用与所使用的蛋白酶对应的适当的方案。在蛋白酶消化之前,可以进行试样中的蛋白质以及肽的变性处理、烷基化处理。对变性处理和烷基化处理的条件没有特别限定,可以适当采用公知条件。可以在实施第一反应和/或第二反应之后进行蛋白酶消化。

[0044] 在通过第一反应来修饰或除去分析对象的糖蛋白或糖肽的肽部分中所含的氨基之后,进行第二反应。为了容易理解,以下对第二反应进行说明之后,再对第一反应进行说明。

[0045] [第二反应]

[0046] 第二反应是可修饰糖链的唾液酸的羧基的反应,对于 α 2,3-唾液酸的羧基与 α 2,6-唾液酸的羧基,发生不同的反应(衍生物化)。其结果是,由 α 2,3-唾液酸生成的衍生物与由 α 2,6-唾液酸生成的衍生物具有不同的质量。

[0047] 作为 α 2,3-唾液酸与 α 2,6-唾液酸生成质量不同的衍生物的反应,具体地可列举出对唾液酸的羧基的羧基的亲核反应。与 α 2,6-唾液酸的羧基相比, α 2,3-唾液酸的羧基存在于空间障碍大的位置,通过亲核剂进行的亲核反应难以发生。因此,在与醇或胺等亲核剂的反应中, α 2,6-唾液酸优先被衍生物化,生成酯或酰胺。应用这样的反应性之差的话,由 α 2,6-唾液酸生成衍生物, α 2,3-唾液酸未被衍生物化,故生成质量不同的衍生物。

[0048] 除了选择性地仅使 α 2,6-唾液酸发生亲核反应, α 2,3-唾液酸不发生亲核反应的这样的方法之外,还可列举出使用脱水缩合剂,通过 α 2,3-唾液酸的分子内脱水来生成内酯的方法。在脱水缩合剂与亲核剂的并存下,通过分子内脱水进行的内酯环的生成和与亲核剂的反应竞争性地发生。由于在 α 2,6-唾液酸的羧基的近旁不存在可容易地分子内脱水的羟基,故而亲核剂的存在下,与亲核剂的缩合反应优先。另一方面,对于 α 2,3-唾液酸,因为亲核剂向羧基的接近由于空间障碍而受到阻碍,且在可容易地分子内脱水的位置上存在着羟基,故而通过分子内脱水进行的内酯的生成优先。因此,由 α 2,3-唾液酸优先生成内酯,由 α 2,6-唾液酸优先生成酰胺或酯。

[0049] 从对唾液酸的结合方式的选择性高的角度考虑,第二反应优选为:在脱水缩合剂与亲核剂的存在下,选择性地使 α 2,3-唾液酸内酯化,且选择性地使 α 2,6-唾液酸酰胺化或酯化的反应。特别优选为:使用胺作为亲核剂,选择性地使 α 2,6-唾液酸酰胺化的反应。

[0050] 在选择性地将 α 2,3-唾液酸内酯化,且选择性地将 α 2,6-唾液酸酰胺化的反应中,作为脱水缩合剂,优选使用碳二亚胺。作为碳二亚胺的例子,可列举出N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺(EDC)、N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)、1-叔丁基-3-乙基碳二亚胺(BEC)、N,N'-二叔丁基碳二亚胺、1,3-二对甲苯基碳二亚胺、双(2,6-二异丙基苯基)碳二亚胺、双(三甲基甲硅烷基)碳二亚胺、1,3-双(2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-基甲基)碳二亚胺(BDDC)、它们的盐。

[0051] 关于使用碳二亚胺作为脱水缩合剂、使用胺作为亲核剂的酰胺化反应,与作为脱水缩合剂使用磷系脱水缩合剂(所谓的BOP试剂)或脲(uronium)系脱水缩合剂时相比, α 2,3-唾液酸的酰胺化难以进行,通过分子内脱水进行的内酯化容易优先发生。另一方面,关于 α 2,6-唾液酸的羧基,即使在使用碳二亚胺作为脱水缩合剂的情况下,酰胺化也容易进行。

[0052] 为了促进脱水缩合,除了使用碳二亚胺之外,还优选使用亲核性高的添加剂。作为亲核性高的添加剂,优选使用1-羟基苯并三唑(HOBt)、1-羟基-7-氮杂-苯并三唑(HOAt)、4-(二甲基氨基)吡啶(DMAP)、2-氰基-2-(羟基亚氨基)乙酸乙酯(CHA;商标名:Oxyma Pure)、N-羟基-琥珀酰亚胺(HOSu)、6-氯-1-羟基-苯并三唑(Cl-HoBt)、N-羟基-3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪(HOObt)等。

[0053] 作为胺,优选使用氨;甲胺、乙胺、丙胺、异丙胺、丁胺、仲丁胺、叔丁胺等烷基伯胺;二甲胺、乙基甲胺、二乙基胺、丙基甲胺、异丙基甲胺等烷基仲胺;或者它们的盐。

[0054] 从对 α 2,6-唾液酸的羧基的反应性高的角度考虑,烷基胺的碳原子数(烷基仲胺时,2个烷基的碳原子数的合计)优选在5以下,更优选在4以下。另一方面,为了抑制 α 2,3-唾液酸的羧基的酰胺化,且提高内酯的生成特异性,从而烷基胺的碳原子数优选在2以上。

[0055] 上述胺中,在使用伯胺时,具有下述倾向:在可以缩短反应时间的同时,由 α 2,3-唾液酸生成的内酯的生成特异性变高。另外,在使用具有分枝烷基的烷基胺(特别是异丙胺)时,具有下述倾向:由 α 2,3-唾液酸生成的内酯的生成特异性变高。

[0056] 在脱水缩合剂以及胺的存在下,糖链的唾液酸被化学修饰,根据唾液酸的结合方式而生成不同的衍生物。在液相中进行反应的情况下,优选在二甲基亚砷(DMSO)或二甲基甲酰胺(DMF)等非水系溶剂中进行反应。通过非水溶剂中进行反应,从而具有副反应得到抑制的倾向。

[0057] 对液相反应中各成分的浓度并无特别限定,可以根据脱水缩合剂或胺的种类等适当决定。脱水缩合剂的浓度例如优选为1mM~5M,更优选为10mM~3M。在并用碳二亚胺与HOAt、HOBt等的亲核性高的添加剂的情况下,优选各自的浓度在上述范围。胺的浓度优选为0.01M~20M,更优选为0.1M~10M。反应温度优选为-20℃~100℃左右,更优选为-10℃~50℃。在降低反应温度时,存在由 α 2,3-唾液酸生成的内酯的生成特异性变高的倾向。另一方面,在反应温度过低时,反应速度降低,且未反应成分变得容易残留。因此,优选根据胺的种类等,调整反应温度、时间,以使生成特异性变高且未反应成分的残留量变少。反应时间只要根据试样或试剂的浓度、反应温度等决定即可。

[0058] 如上所述,第二反应中,优选选择脱水缩合剂以及亲核剂,以对唾液酸的羧基具有高反应率。在使用反应性高的脱水缩合剂以及亲核剂时,除了唾液酸的羧基之外,肽C末端的羧基、酸性氨基酸残基(谷氨酸以及天冬氨酸)的羧基也得到修饰。

[0059] 为了抑制肽部分的羧基的修饰,且选择性地将唾液酸的羧基衍生物化,故而要求

反应条件的严格控制。在为了严格控制反应而选择缓和的反应条件时,反应上需要较长时间。另外,对唾液酸的羧基显示出高反应率,且完全抑制肽C末端、酸性氨基酸残基等的肽部分中所含的羧基的修饰,这并不是容易的。在肽中所含的羧基的一部分未被修饰、未反应而残存时,有时会出现因为质谱的峰裂分而数据解析变困难的情况。因此,第二反应中,除了唾液酸的羧基之外,优选还将肽中所含的羧基进行修饰。例如,使用EDC作为脱水缩合剂时,可以使得由 α 2,3-唾液酸选择性地生成内酯衍生物,选择性地将 α 2,6-唾液酸以及肽中所含的羧基酰胺化,且降低未反应的残留成分。

[0060] 对于通过脱水缩合剂的作用而由 α 2,3-唾液酸生成的内酯,容易受到水解。例如,在质量分析中使用液体基质时,有时会出现测定前内酯一部分开环,定量性受损的情况。因此,从由 α 2,3-唾液酸生成的内酯,可以进行生成稳定性更高的衍生物的反应。

[0061] 对于由内酯生成的衍生物,只要是与通过 α 2,6-唾液酸的羧基与亲核剂的反应而生成的衍生物具有不同的质量即可,没有特别限定。从与内酯的反应性高的角度考虑,优选为与亲核剂的反应,其中,优选为使用胺的酰胺化。

[0062] 在进行内酯的开环酰胺化时使用的胺如果具有与先前的衍生物化中使用的胺不同的分子量的话,则通过 α 2,6-唾液酸与胺的反应而生成的衍生物、与通过内酯的开环酰胺化而生成的衍生物具有不同的质量。使用经同位素标记的胺,也可以获得质量不同的酰胺衍生物。

[0063] 从提高反应的简便性和定量性的角度考虑,在源于 α 2,3-唾液酸的内酯的开环酰胺化中,优选使用对内酯的羧基的亲核反应性高的胺。对于源于 α 2,3-唾液酸的内酯的羧基,由于存在于空间障碍大的部位上,故而为了提高胺对羧基的亲核反应效率,而优选使用分子体积小胺。因此,内酯的开环酰胺化中使用的胺优选为氮或者碳原子数在5个以下的烷基胺、或者它们的盐。另外,内酯的开环酰胺化中,优选使用比先前的反应中使用的胺的碳原子数更少的胺。

[0064] 作为内酯的开环酰胺化中使用的胺的例子,可列举出铵盐、甲胺、乙胺、丙胺、异丙胺、丁胺、仲丁胺、叔丁胺等烷基伯胺;二甲胺、乙基甲胺、二乙基胺、丙基甲胺、异丙基甲胺等烷基仲胺;或者它们的盐。烷基胺的碳原子数优选在4以下,更优选在3以下。上述胺中,优选为烷基伯胺或其盐,更优选为直链烷基伯胺或其盐,特别优选为甲胺或乙胺或者它们的盐。

[0065] 优选地,内酯的开环酰胺化在脱水缩合剂的存在下进行。作为脱水缩合剂,优选为即使对存在于空间障碍大的部位上的羧基也显示出高反应效率的脱水缩合剂,优选为磷系脱水缩合剂、脲系脱水缩合剂。

[0066] 作为磷系脱水缩合剂,可列举出(苯并三唑-1-基氧基)三-(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐(BOP)、苯并三唑-1-基氧基三(吡咯烷基)磷六氟磷酸盐(PyBOP)、溴代三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐(BroP)、溴代三(吡咯烷基)磷六氟磷酸盐(PyBroP)、(7-氮杂苯并三唑-1-基氧基)三(吡咯烷基)磷六氟磷酸盐(PyAOP)、氯代-三-吡咯烷基磷六氟磷酸盐(PyClOP)等。这些统称为“BOP试剂”,即使对存在于空间障碍大的部位中的羧基也仍带来高反应效率。因此,即使对如 α 2,3-唾液酸的羧基、源于 α 2,3-唾液酸的内酯的羧基之类的空间障碍大的部位,也可以以高反应速率进行酰胺化。

[0067] 作为脲系脱水缩合剂,可列举出(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代亚乙基氨基氧基)二甲

基氨基-吗啉代-碳鎓六氟磷酸盐 (COMU)、2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-六氟磷酸盐 (HBTU)、2-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-六氟磷酸盐 (HATU)、2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸盐 (TBTU)、2-(5-降冰片烯-2,3-二羧基酰亚胺)-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸盐 (TNTU)、O-(N-琥珀酰亚胺基(succinimidyl))-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸盐 (TSTU) 等。这些脲盐中,特别优选COMU。

[0068] 上述之中,从提高内酯的酰胺化效率的角度考虑,优选使用磷系脱水缩合剂。另外,为了使反应加速,优选相对于整个反应体系,以0.01~80重量%左右的浓度添加N-甲基吗啉等碱。通过在反应体系中添加上述浓度范围的碱,可以在反应效率提高的同时,还可以抑制副反应、其它的试剂的析出等。在反应体系中含有N-甲基吗啉作为碱的情况下,其浓度优选为1~50重量%,更优选为10~40重量%,进一步优选为15~30重量%。对酰胺化的条件(反应温度和反应时间等)并无特别限定,可以直接适用以往公知的唾液酸的酰胺化的条件。

[0069] 在进行通过源于 α 2,3-唾液酸的内酯的水解进行的开环反应之后,还可以进行通过与亲核剂的反应进行的衍生物化。如上所述,通过 α 2,3-唾液酸糖链的分子内脱水而产生的内酯在水中水解。为了促进内酯的开环,优选使用酸或碱。特别是,从内酯容易通过碱进行水解的角度考虑,优选使用碱。另外,在内酯的开环之后进行酰胺化时,优选残存的碱不发生酰胺化的阻碍、副反应。作为碱,如果使用与开环后的酰胺化中使用的胺相同的胺,则可以排除由于开环反应的残留碱而产生的上述问题。另外,酰胺化时优选使用盐酸盐,而作为用于促进内酯开环的碱,优选使用不形成盐的胺。

[0070] 通过在酰胺化之前进行内酯的开环,从而空间障碍降低,胺向唾液酸的羰基的接近变容易。因此,通过在酰胺化之前进行开环,从而酰胺化的反应效率得以提高,残留内酯减少,故而分析的定量性进一步被提高。

[0071] 如上所述,通过由 α 2,3-唾液酸与 α 2,6-唾液酸生成质量不同的衍生物,从而可以通过质量分析来分离两者,识别唾液酸的结合方式。另外,在糖链不具有唾液酸时,由于第二反应后的衍生物具有与由 α 2,3-唾液酸生成的衍生物以及由 α 2,6-唾液酸生成的衍生物均不同的质量,故而能够判定唾液酸的有无。

[0072] 然而,在对糖肽实施上述第二反应时,除了唾液酸的羧基与亲核剂的反应以及通过唾液酸的分子内脱水进行的内酯的生成以外,有时还会出现进行肽的氨基以及羧基的修饰反应的情况。在这样的副反应进行一半时,或者在多个副反应竞争性发生时,会导致由离子量相对于各生成物的裂分而造成的灵敏度降低、定量性降低。另外,由于峰裂分,有时会出现质谱变复杂,峰归属等解析变困难的情况。

[0073] 如前所述,肽C末端的羧基、酸性氨基酸残基的羧基通过在第二反应中使之与亲核剂反应,从而可以抑制峰裂分。另一方面,肽的氨基在第二反应中,有时会出现与唾液酸的羧基以及肽的羧基反应的情况。通过肽的氨基进行的对羧基的亲核反应、与第二反应中使用的亲核剂对羧基的亲核反应是竞争性的,成为质谱的峰裂分的原因。因此,以往的唾液酸结合方式的识别方法难以适用于糖蛋白和糖肽。

[0074] [第一反应]

[0075] 本发明中,在第二反应之前,对糖蛋白或糖肽进行第一反应,肽部分中所含的至少1个伯氨基被修饰或除去。由于肽部分中所含的氨基被修饰或除去,据此因为在随后的第二

反应中不发生氨基与羧基的分子内脱水等副反应,从而抑制峰裂分,可以提高通过质量分析进行的分析精度,同时数据解析变容易。

[0076] 作为氨基的除去,可列举出:霍夫曼消除(Hofmann elimination)等切断C-N键合的处理;通过使用赖氨酰肽链内切酶、胰蛋白酶等肽链内切酶、或者氨肽酶、羧肽酶等肽链端解酶的蛋白酶消化,从而在赖氨酸残基的C末端侧或N末端侧的近旁,切断肽,从肽链除去赖氨酸残基的处理。作为氨基的修饰,可列举出通过单烷基化、二烷基化、乙酰基等进行的酰胺化、胍基化、亚硝基化、重氮化、氰基化等。

[0077] 通过让肽的N末端的氨基结合标签(tag)或连接剂(linker),也可以修饰氨基。作为连接剂(linker),例如可列举出让固相载体表面选择性地结合肽的N末端的氨基的分子。作为标签,可列举出iTRAQ、iCAT、TMT(串联质谱标签(Tandem Mass Tag))等含有N-羟基琥珀酸酰亚胺(NHS)酯的标记试剂。

[0078] 从反应的容易性以及可靠性的角度考虑,第一反应优选为肽中所含的氨基的修饰反应。氨基的修饰反应中,优选单烷基化、二烷基化、酰胺化、胍基化、亚硝基化等让氨基的氮原子生成至少1个氮碳键的反应,特别优选胍基化以及二烷基化。

[0079] 氨基的胍基化可以使用公知的胍基化试剂来实施。作为胍基化试剂,可列举出氨脒(cyanamide)、O-烷基异脲、S-烷基异硫脲、氨基亚氨基甲烷磺酸、1,3-双(叔丁氧基羰基)-2-(三氟甲基磺酰基)胍(Goodman试剂)、1-脒基吡唑盐酸盐、N,N'-双(叔丁氧基羰基)-1H-吡唑-1-甲脒、N,N'-双(苄氧羰基)-1H-吡唑-1-甲脒等。

[0080] 在使用S-烷基异硫脲或O-烷基异脲等作为胍基化试剂时,只要在氢氧化钡、氢氧化钙、氢氧化镁、氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化锂、碳酸氢钠、碳酸钠、氨水;三乙胺、N,N-二甲基苯胺、N,N'-二甲基哌嗪、N-甲基哌啶等叔胺;吡啶等碱的存在下,在0℃~90℃程度下,进行反应即可。

[0081] 作为氨基的二烷基化,可列举出与卤代烷的反应、以及使用醛或酮的反应(还原性氨基化(reductive amination))。其中,从副反应少,且可以将反应性优异的肽中所含的全部氨基二烷基化的角度考虑,优选还原性氨基化。

[0082] 还原性氨基化是在氢化物还原剂的存在下的、醛或酮与胺的反应,在使用甲醛时,氨基被二甲基化。作为还原剂,可列举出氰基硼氢化钠、三乙酰氧基硼氢化钠、硼烷吡啶、蚁酸等。其中,使用氰基硼氢化钠作为还原剂的还原性氨基化(鲍奇(Borch)法)从反应效率和可靠性的角度考虑而优选。

[0083] 关于糖蛋白和糖肽,其在N末端具有氨基,其在脱水缩合剂的存在下,容易产生通过N末端的氨基对羰基的亲核反应进行的肽的分子内环化。另外,在氨基酸序列中包括赖氨酸时,不仅N末端的氨基,而且赖氨酸的 ϵ -氨基也与羰基发生亲核反应,产生分子内环化。特别是,赖氨酸的 ϵ -氨基远离 α 碳,自由度高,故而容易接近肽C末端、酸性氨基酸残基、唾液酸等羧基的羰基,容易产生分子内环化。

[0084] 在通过蛋白酶消化来调制肽碎片时,从氨基酸序列的识别性(序列特异性)高的角度考虑,使用胰蛋白酶、Lys-C的情况较多。胰蛋白酶选择性地切断精氨酸以及赖氨酸的C末端侧的肽键,Lys-C选择性地切断赖氨酸的C末端侧的肽键。因此,通过蛋白酶消化而获得的肽碎片在C末端上具有赖氨酸的情况较多。

[0085] 如果预先在第二反应之前除去或修饰赖氨酸残基的 ϵ -氨基,则在第二反应中,不

产生起因于赖氨酸残基的氨基的分子内脱水。因此,难以产生起因于副反应的峰裂分,可以提高通过质量分析进行的分析精度,同时数据解析变容易。

[0086] 例如,通过使用羧基肽链内切酶的蛋白酶消化,从而可以从在C末端具有赖氨酸的肽中除去赖氨酸残基。通过组合通过Lys-C、胰蛋白酶等进行的处理与通过羧基肽链内切酶进行的处理,除去肽的C末端的赖氨酸残基,获得不含赖氨酸残基的肽。

[0087] 作为选择性地修饰肽的赖氨酸残基的 ϵ -氨基的方法,上述胍基化是适合的。使用O-烷基异脲等的胍基化,可使相对于赖氨酸残基的 ϵ -氨基的反应率在大致100%,并且由于对肽N末端的氨基的反应几乎不发生,故而可以防止起因于第一反应的峰裂分。

[0088] 通过将赖氨酸残基的 ϵ -氨基进行胍基化,据此由于肽部分带正电荷,故而在质量分析中,肽部分的离子化受到促进。因此,存在质量分析的检测灵敏度提高的优点。

[0089] 优选地,第一反应中,除了肽部分中所含的赖氨酸残基的氨基之外,也修饰或除去肽N末端的氨基。即,第一反应中,优选修饰肽部分中所含的全部氨基。作为修饰肽部分中所含的全部氨基的方法,如前所述,优选通过还原性氨基化进行的氨基的二烷基化,其中,优选二甲基化。如前所述,通过让肽的N末端结合标签(tag)或NHS等,也可以修饰肽N末端的氨基。

[0090] 可以将赖氨酸残基的氨基进行胍基化,通过其它方法来修饰肽N末端的氨基。例如,可以在将赖氨酸残基的氨基进行胍基化之后,通过还原性氨基化等来修饰肽N末端的氨基。另外,还可以通过在使肽N末端的氨基与标签或连接等结合的状态下,将赖氨酸残基的氨基进行胍基化,以修饰肽中所含的全部氨基。如前所述,通过赖氨酸残基的氨基进行胍基化,质量分析中的离子化效率得以提高,具有检测灵敏度提高的倾向。

[0091] 如上所述,通过在第二反应之前实施第一反应,以抑制第二反应中的副反应、竞争性反应,并且据此可以降低质谱的峰裂分。因此,可以高精度地分析糖肽、糖蛋白中的糖链构造的解析,具体地,可以高精度地分析糖链的唾液酸的有无、唾液酸的结合方式的识别。

[0092] 上述非专利文献3(de Haan,N.等人)中报道了:尽管不实施相当于本发明的第一反应的反应,但是通过在ECD、HOBt以及二甲胺的存在下的源于IgG的肽的反应(相当于第二反应),据此几乎不发生副反应地,生成可识别唾液酸的结合方式的衍生物。人们认为其起因在于:分析对象的糖肽的氨基酸序列是满足(1)不具有赖氨酸残基以及(2)C末端的氨基酸为谷氨酸这两者的特异性序列。

[0093] 满足上述(1)(2)两者的氨基酸序列中,肽中所含的唯一伯氨基为N末端的谷氨酸的 α -氨基。肽N末端的谷氨酸的 α -氨基与谷氨酸的羧基反应,生成焦谷氨酸(焦谷氨酰基化)。因此,N末端的谷氨酸的氨基难以发生对其它羧基的亲核反应。特别是,在脱水缩合剂的存在下,由于N末端的谷氨酸大致100%进行焦谷氨酰基化,故而也不发生起因于N末端的 α -氨基的峰裂分。

[0094] 在糖蛋白或糖肽具有如上所述的特异性氨基酸序列时,即通常的糖蛋白以及糖肽中的大半,在脱水缩合剂的存在下,肽N末端的氨基与羧基反应,进行分子内环化。通过肽N末端的氨基的反应进行的分子内环化相比于通过赖氨酸残基的氨基的反应进行的分子内环化,更难以产生。然而,除了N末端为谷氨酸的情况(焦谷氨酰基化的情况)以外,还难以控制或抑制分子内环化。因此,优选如前所述,通过第一反应,修饰或除去肽部分中所含的全部伯氨基。

[0095] [其它反应形态]

[0096] 进行第一反应以及第二反应的试样,根据需要可以进行精制、脱盐、可溶化、浓缩、干燥等处理。这些处理可以利用公知方法进行。

[0097] 上述第一反应和/或第二反应也可以在固相中进行。在已将糖肽或糖蛋白固定于固相的状态下进行第一反应时,可以维持第一反应后的糖肽或糖蛋白固定于固相的状态,进行第二反应。另外,还可将第一反应后的糖肽或糖蛋白固定于固相,进行第二反应。

[0098] 作为固相载体,只要是可固定糖肽或糖蛋白的物质就可没有特别限定地使用。例如,为了固定糖肽或糖蛋白,可以利用具有环氧基、甲苯磺酰基、羧基、氨基等作为配体的固相载体。糖肽或糖蛋白与固相载体例如可以介由N末端、C末端、SH基等进行固定。如前所述,还可以介由具有NHS的连接剂(linker),将糖肽或糖蛋白的N末端的氨基固定于固相载体。为了固定糖肽的糖链,可以利用具有苯基硼酸等作为配体的固相载体。另外,还可以通过氧化糖链部分,以将糖肽固定于具有酰肼基、氨氧基等作为配体的固相载体。

[0099] 固定于固相载体的糖蛋白、糖肽在实施第一反应和/或第二反应之后,通过化学方法、酶反应等,从载体中使试样游离回收即可。例如,既可以通过蛋白酶等将固定于载体的糖蛋白、糖肽酶切回收,也可以通过酸、碱使配体与糖肽或糖蛋白的结合降低而游离回收。通过在已将糖蛋白、糖肽固定于固相载体的状态下进行反应,据此反应试剂的除去、脱盐精制变容易,可以简化试样的调制。

[0100] [试样的分析]

[0101] 通过藉由上述方法以将调制后的分析用试样用于质量分析,以获得唾液酸的结合方式的识别、结合方式之比率、唾液酸的有无等糖链构造信息。作为质量分析的离子化法,可列举出基质辅助激光解吸离子化(MALDI)法、电喷雾离子化(ESI)法或纳米电喷雾离子化(nano-ESI)法等。MALDI法特别适宜。通过本发明的方法获得的分析用试样无论是正离子模式还是负离子模式,均可以识别唾液酸的结合方式。

[0102] 另外,还可以将通过LC分离、作为峰而被检出的试样用于质量分析。在通过LC进行试样分离时,也可以使用具备LC的LC-MS作为质量分析的前段,将来自LC的洗脱液直接离子化,用于质量分析。另外,还可以将来自LC的洗脱液一次性分量取出之后,供于质量分析。对LC的柱没有特别限定,可以适当选用肽的分析中通常使用的C30、C18、C8、C4等疏水柱、适宜用于糖链分析的碳柱、亲水性亲和色谱用的载体等。

[0103] 质量分析可以以MS²以上的多阶段进行。通过进行MS²以上的多阶段质量分析,还可以进行除唾液酸的结合模式以外的糖链的结构、和糖链所结合的肽部分的结构的解析。还可以通过使用光谱数据的数据库检索等,进行结构解析。

[0104] [实施例]

[0105] 以下,列举实施例,具体地说明本发明,但本发明并不限于下述实施例。另外,以下, %的记载只要无特别说明,均表示重量%。

[0106] [实施例1:唾液酸糖肽(SGP)的衍生物化]

[0107] 实施例1中,进行 α 2,3-SGP以及 α 2,6-SGP的衍生物化,对通过质量分析进行的唾液酸结合方式的识别可否进行了研究。 α 2,3-SGP以及 α 2,6-SGP均使用株式会社伏见制药所的糖肽标准品(2865.8Da)。各分注1nmol的溶解于水中的SGP,通过离心浓缩(SpeedVac),以除去溶剂使之干燥固化,进行衍生物化。

[0108] <实验例1-1:不修饰氨基地将唾液酸衍生物化>

[0109] (在脱水缩合剂存在下的与异丙胺的反应)

[0110] 向经干燥固化后的SGP中,添加调制的DMSO溶液,以使异丙胺盐酸盐(iPA-HCl)、1-乙基-3-(3-(二甲基氨基)丙基)碳二亚胺(EDC)盐酸盐以及1-羟基苯并三唑(HOBt)最终浓度分别为2M、500mM以及500mM。在室温下搅拌1小时使之反应之后,添加130 μ L的乙腈(ACN)、以及30 μ L的80%ACN、0.4%三氟乙酸(TFA)进行稀释。

[0111] (试样的精制)

[0112] 作为精制用的载体,使用GL-Tip Amide(GL科学制造)。将GL-TipAmide装载于离心适配器上,添加100 μ L的90%ACN、0.1%TFA,通过离心排出。然后,添加100 μ L的水,并通过离心排出,反复进行3次。进一步地,添加100 μ L的90%ACN、0.1%TFA,通过离心排出,进行载体的平衡化。接着,添加180 μ L的经稀释过的反应溶液,使试样吸附于载体上,进行离心。然后,添加180 μ L的90%ACN、0.1%TFA,并通过离心排出,反复进行3次,进行洗涤。最后,添加10 μ L的水,并通过离心排出,反复进行2次,进一步地添加10 μ L的0.1%TFA水溶液,通过离心排出,使试样洗脱。向汇合有3次分量的洗脱液中,添加适量的40%甲胺水溶液,以使甲胺浓度为1%,通过SpeedVac使之干燥固化。

[0113] (与甲胺的反应以及精制)

[0114] 向经干燥固化后的试样中,添加调制的DMSO溶液,以使甲胺盐酸盐(MA-HCl)、苯并三唑-1-基氧基三(吡咯烷基)磷六氟磷酸盐(PyBOP)以及N-甲基吗啉(NMM)最终浓度分别为1M、250mM以及15%。在室温下搅拌1小时使之反应之后,添加130 μ L的ACN、以及30 μ L的80%ACN、0.4%TFA进行稀释。然后,使用GL-TipAmide,同与异丙胺的反应后一样地进行精制以及洗脱,通过SpeedVac使洗脱液干燥固化。

[0115] (质量分析)

[0116] 使经干燥固化的试样再次溶解于10 μ L的水中,在聚焦板中滴下1 μ L(100pmol),作为基质,添加0.5 μ L的溶解于50%ACN的10mg/mL的2,5-二羟基苯甲酸(DHBA)、0.1%亚甲基二膦酸(MDPNA)。通过自然干燥除去溶剂之后,通过MALDI-QIT-TOF-MS(AXIMA-Resonance, Shimadzu/Kratos),在正离子模式下进行质量分析。 α 2,3-SGP的反应物的质谱如图1(A)所示, α 2,6-SGP的反应物的质谱如图1(B)所示。

[0117] <实验例1-2:在赖氨酸残基的胍基化之后将唾液酸衍生物化>

[0118] (SGP的赖氨酸残基的胍基化)

[0119] 向经干燥固化的SGP中,添加10.5 μ L的3.5N氢氧化铵、以及1.5 μ L的50%O-甲基异脲水溶液,通过涡流使之溶解之后,在65 $^{\circ}$ C的微量恒温仪(Heat Block)上加热10分钟,使之反应。

[0120] (精制)

[0121] 向反应溶液中,添加15 μ L的10%TFA水溶液以及水,稀释至约50 μ L,使用碳柱进行脱盐精制。作为碳柱,使用将Empore Disk碳(3M制造)剪下直径约1mm,填塞到200 μ L的尖端中所得的Stage Tip Carbon。在将100 μ L的ACN添加到Stage Tip Carbon中后,通过离心排出。随后,使用100 μ L的1M NaOH、100 μ L的1M HCl、100 μ L的水、100 μ L的80%ACN、0.1%TFA(2次)、以及100 μ L的水(2次),依次进行同样的操作,进行柱载体的洗涤与平衡化。将稀释后的反应溶液加入平衡化后的柱中,通过离心排出溶液。进一步地,添加150 μ L的水,通过离心排

出,反复进行3次,进行洗涤。最后,添加20 μ L的80%ACN、0.1%TFA,通过离心排出,反复进行2次,使试样洗脱。合并2次分量的洗脱液,通过SpeedVac,使之干燥固化。

[0122] (衍生物化以及质量分析)

[0123] 使用与O-甲基异脲的反应后的试样,与实验例1-1一样地,进行通过与异丙胺的反应、以及与甲胺的反应进行的衍生物化,在正离子模式下进行质量分析。 α 2,3-SGP的反应物的质谱如图2(A)所示, α 2,6-SGP的反应物的质谱如图2(B)所示。

[0124] <实验例1-3:在将全部的氨基二甲基化之后进行衍生物化>

[0125] (氨基的二甲基化)

[0126] 向经干燥固化的SGP中,添加20 μ L的100mM三乙基碳酸氢铵(triethylammonium bicarbonate;TEAB)缓冲溶液(pH8.5)。通过涡流使之溶解之后,添加1.6 μ L的2%甲醛水溶液,轻轻地打涡流,旋转减慢。添加1.6 μ L的300mM氰基硼氢化钠水溶液,在室温的条件下,一边轻轻地打涡流,一边使之反应1小时。然后,添加3.2 μ L的1%氨水进行淬灭(quench),轻轻地打涡流,旋转减慢。添加1.6 μ L的蚁酸,轻轻地打涡流旋转减慢之后,添加72 μ L的水,与实验例1-2一样地,进行通过碳柱进行的脱盐精制。

[0127] (衍生物化以及质量分析)

[0128] 使用进行上述还原性氨基化反应的试样,与实验例1-1一样地,进行通过与异丙胺的反应、以及与甲胺的反应进行的衍生物化,在正离子模式下进行质量分析。 α 2,3-SGP的反应物的质谱如图3(A)所示, α 2,6-SGP的反应物的质谱如图3(B)所示。

[0129] <实验例1-4:与异丙胺的反应时间的变更>

[0130] 除了将还原性氨基化反应后的试样与异丙胺的反应时间从1小时变更为3小时以外,其余与实验例1-3同样地进行,调制试样,在正离子模式下进行质量分析。 α 2,3-SGP的反应物的质谱如图4(A)所示, α 2,6-SGP的反应物的质谱如图4(B)所示。

[0131] <质谱的评价>

[0132] 图1(A)中,在m/z 2932处确认到比衍生物化前的SGP大67Da的峰;图1(B)中,在m/z 2988处确认到比衍生物化前的SGP大123Da的峰(图中的▼)。这些峰的56Da的差是异丙基与甲基之差的2倍。可知, α 2,3-SGP的2个 α 2,3-唾液酸的羧基被甲酰胺化,而 α 2,6-SGP的2个 α 2,6-唾液酸的羧基被异丙酰胺化,据此在m/z上产生差值。

[0133] 具体地,在EDC、HOBT以及iPA-HCl的存在下, α 2,6-唾液酸的羧基以及肽C末端的羧基被异丙酰胺化,而 α 2,3-唾液酸通过分子内脱水而被内酯化。由 α 2,3-唾液酸生成的内酯,通过在PyBOP以及NMM的存在下的与MA-HCl的反应以开环,被甲酰胺化。 α 2,6-唾液酸以及肽C末端的羧基在被异丙酰胺化之后,不与甲胺反应。因此,每1个唾液酸,产生对应于异丙基与甲基之差的28Da的差异。

[0134] 像这样地,通过按照 α 2,3-唾液酸与 α 2,6-唾液酸生成不同的衍生物的方式进行衍生物化,能够识别唾液酸结合方式,图1(A)以及图1(B)中,除了通过如上所述的唾液酸的结合方式特异性衍生物化而形成的峰以外,还确认到许多夹杂峰。

[0135] 由MS/MS测定(数据未图示),可以确认这些夹杂峰全部源于肽部分的副反应生成物。可以确认:图1(A)的m/z 2873的峰以及图1(B)的m/z 2929的峰(图中的▽)源于在与异丙胺的反应时,肽C末端的羧基不被异丙酰胺化,通过与肽中的氨基的脱水缩合而经分子内环化的化合物。

[0136] 图2(A)中,在 m/z 3016处确认到比衍生物化前的SGP大151Da的峰;图2(B)中,在 m/z 3072处确认到比衍生物化前的SGP大207Da的峰(图中的▼)。可知,两者之差与实验例1-1一样为56Da,这是由于 α 2,3-唾液酸被甲酰胺化、 α 2,6-唾液酸被异丙酰胺化,而在衍生物分子量上产生差异。

[0137] 在与异丙胺的反应前,实施与0-甲基异脲的反应的实验例1-2(图2(A)以及图2(B))中,与实验例1-1(图1(A)以及图1(B))相比,衍生物的主峰的 m/z 大84。实施与0-甲基异脲的反应后、与异丙胺的反应前的SGP的质量分析后, α 2,3-SGP以及 α 2,6-SGP与反应前相比较, m/z 均增加84。可以确认:该84Da的差异是由肽中存在的2个赖氨酸残基的氨基的胍基化(每1个氨基,增加42Da)引起的,肽N末端的氨基未被衍生物化而是作为氨基残存。

[0138] 实验例1-2中,与实验例1-1相比,源于副反应的峰裂分得到抑制,由肽C末端的羧基的分子内环化产生的峰(图中的▽)大幅度降低。由这些结果可知,通过在实施唾液酸的衍生物化之前、将肽的赖氨酸残基的氨基进行胍基化,据此由肽的C末端与赖氨酸残基的氨基的脱水缩合而进行的分子内环化受到抑制。由于分子内环化受到抑制,故而因为起因于肽部分的副反应生成物的夹杂峰减少,所以峰的归属变容易,而且还可以提高分析的定量性。

[0139] 图3(A)中,在 m/z 3016处确认到比衍生物化前的SGP大151Da的峰;图3(B)中,在 m/z 3072处确认到比衍生物化前的SGP大207Da的峰(图中的▼)。可知,两者之差与实验例1-1以及1-2一样地为56Da,这是由于 α 2,3-唾液酸被甲酰胺化、 α 2,6-唾液酸被异丙酰胺化,而在衍生物分子量上产生差异。

[0140] 在与异丙胺的反应前,实施通过使用氰基硼氢化钠的还原性氨基化(Borch反应)进行的氨基的二甲基化的实验例1-3(图3(A)以及图3(B))中,与实验例1-1(图1(A)以及图1(B))相比,衍生物主峰的 m/z 大84。实施还原性氨基化后、与异丙胺的反应前的SGP的质量分析后, α 2,3-SGP以及 α 2,6-SGP与反应前相比较, m/z 均增加84,副反应生成物的峰没有被确认到。该84Da的差异源于肽中存在的2个赖氨酸残基的氨基以及肽N末端的氨基(计3个氨基)全部二甲基化(每1个氨基,增加28Da)。

[0141] 实验例1-3中,与实验例1-1相比,源于副反应的信号的分散被大幅地抑制。可知,由肽C末端的羧基的分子内环化产生的峰未被确认到,即使与实验例1-2相比较,信号的分散也进一步得到抑制。

[0142] 延长与异丙胺的反应时间的实验例1-4中,与实验例1-3相比,峰裂分进一步得到抑制。这是由于,与异丙胺的反应中的未反应的羧基减少,肽C末端以及 α 2,6-唾液酸的羧基被甲酰胺化的衍生物的生成得到抑制。

[0143] 由上述结果可知,在实施 α 2,3-唾液酸与 α 2,6-唾液酸生成质量不同的衍生物的第二反应之前,通过藉由第一反应来修饰肽中所含的氨基,质谱汇集于作为目标的 m/z 的主峰,且峰裂分得到抑制。

[0144] [实施例2:转铁蛋白的衍生物化]

[0145] 实施例2中,进行源于 α 2,6-唾液酸糖链为主成分的人转铁蛋白的糖肽的衍生物化,对通过质量分析进行的唾液酸结合方式的识别可否进行研究。

[0146] <源于转铁蛋白的糖肽的准备>

[0147] 在6M尿素、50mM碳酸氢铵以及5mM三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)的存在下,在室温

的条件下,使购自SIGMA的转铁蛋白反应45分钟,进行变性以及还原。接着,在10mM碘乙酰胺 (IAA) 的存在下,在室温遮光条件下,使之反应45分钟,进行烷基化之后,在10mM二硫苏糖醇 (DTT) 存在下,在室温遮光条件下,使之反应45分钟,将剩余的IAA惰性化。然后,添加胰蛋白酶,在37°C的条件下使之反应一夜,进行蛋白酶消化。分离蛋白酶消化后,通过液体色谱法来分离消化后的肽,获得表示图5 (A) 的正离子质谱的糖肽。

[0148] <实验例2-1:不修饰氨基地将唾液酸衍生物化>

[0149] 按照与上述实验例1-1同样的顺序,依次实施在异丙胺存在下的反应以及在甲胺存在下的反应,且在正离子模式下进行质量分析。质谱如图5 (B) 所示。

[0150] <实验例2-2:在将全部氨基二甲基化之后进行衍生物化>

[0151] 按照与上述实验例1-3同样的顺序,在进行通过还原性氨基化反应进行的氨基的二甲基化之后,依次实施在异丙胺存在下的反应以及在甲胺存在下的反应,且在正离子模式下进行质量分析。质谱如图5 (C) 所示。

[0152] <质谱的评价>

[0153] 实验例2-1 (图5 (B)) 中可以确认到:源于2个 α 2,6-唾液酸的羧基、谷氨酸残基的羧基以及肽C末端的羧基 (计4个羧基) 被异丙酰胺化的衍生物的m/z 3845的峰 (比衍生物化前的糖肽大164Da)。然而,除此之外,源于副反应生成物的许多夹杂峰被确认到,这些夹杂峰归属困难。

[0154] 另一方面,实施氨基的二甲基化的实验例2-2 (图5 (C)) 中,在比衍生物化前 (图5 (A)) 大220Da的m/z 3902处确认到强峰,源于副反应生成物的峰裂分几乎未被确认到。m/z 3902的峰归属于糖肽中计4个羧基被异丙酰胺化、赖氨酸残基的氨基以及肽N末端的氨基被二甲基化的衍生物。

[0155] 即使在实施例2中,也与实施例1同样地,在第二反应之前,通过藉由第一反应来修饰肽中所含的氨基,从而质谱汇集于作为目标的m/z的主峰,且峰裂分得到抑制。由实施例1以及实施例2的结果可知,本发明的试样调制方法即使在具有不同氨基酸序列的情况下,也仍能够抑制峰裂分,对唾液酸的结合方式的识别有用。

[0156] [实施例3:RNase B的衍生物化]

[0157] 实施例3中,进行源于RNase B的糖肽的衍生物化,对不含唾液酸的糖肽的衍生物化的影响进行研究。

[0158] <源于RNase B的糖肽的准备>

[0159] 以购自SIGMA的RNase B作为试样,按照与实施例2同样的顺序,进行还原烷基化之后,添加赖氨酰肽链内切酶 (Lys-C),在37°C的条件下,使之反应一晚,进行蛋白酶消化。蛋白酶消化后,进行通过碳柱进行的脱盐精制,接着使用GL-TipAmide来进行精制以及浓缩,获得表示图6 (A) 中所示的正离子质谱的由高甘露糖型的5种糖型 (甘露糖数:5~9,162Da间隔) 形成的糖肽。

[0160] <实验例3-1:不修饰氨基地将唾液酸衍生物化>

[0161] 按照与上述实验例1-1同样的顺序,依次实施在异丙胺存在下的反应以及在甲胺存在下的反应,且在正离子模式下进行质量分析。质谱如图6 (B) 所示。

[0162] <实验例3-2:在将全部氨基二甲基化之后进行衍生物化>

[0163] 按照与上述实验例1-3同样的顺序,在进行通过还原性氨基化反应进行的氨基的

二甲基化之后,依次实施在异丙胺存在下的反应以及在甲胺存在下的反应,且在正离子模式下进行质量分析。质谱如图6(C)所示。

[0164] <质谱的评价>

[0165] 实验例3-1(图6(B))中,反应前(图6(A))的 m/z 1935的峰强度减少,源于通过分子内环化而产生的衍生物的 m/z 1917(-18)的峰以及源于通过异丙酰胺化而产生的衍生物的 m/z 1976(+41)的峰被确认到。即使对其它糖型,未反应、分子内环化以及异丙酰胺化也混在一起。像这样地,多种糖型分别产生起因于的副反应的峰裂分时,光谱变得极其复杂,对从哪种糖型产生哪种峰进行归属是不容易的。因此,对唾液酸的有无和唾液酸的结合方式进行判别也是困难的。

[0166] 另一方面,实施氨基的二甲基化的实验例3-2(图6(C))中, m/z 分别比衍生物化前(图6(A))大97的5种衍生物被确认到。它们归属于肽C末端的羧基被异丙酰胺化、赖氨酸残基的氨基以及肽N末端的氨基被二甲基化的衍生物。源于分子内环化等的副反应生成物的峰几乎未被确认到。

[0167] 图6(C)中,关于5种糖型,衍生物前后的 m/z 之差为97,归属于肽部分的衍生物化(2个氨基的二甲基化以及1个羧基的iPA化),故而可以确认糖肽不具有唾液酸。

[0168] 实施例3中作为分析对象的糖肽在肽部分中,具有为碱性氨基酸的精氨酸残基。第一反应中不产生精氨酸的胍基的衍生物化,即使在第二反应后的质谱(图6(C))中,精氨酸的胍基的 NH_2 与羧基的分子内脱水生成物也未被确认到。由该结果可知,第一反应中,只要修饰或除去肽中所含的伯氨基、即赖氨酸残基的 ϵ -氨基与肽N末端的 α -氨基即可,没有必要进行胍基、仲氨基、叔氨基等的除去或衍生化。

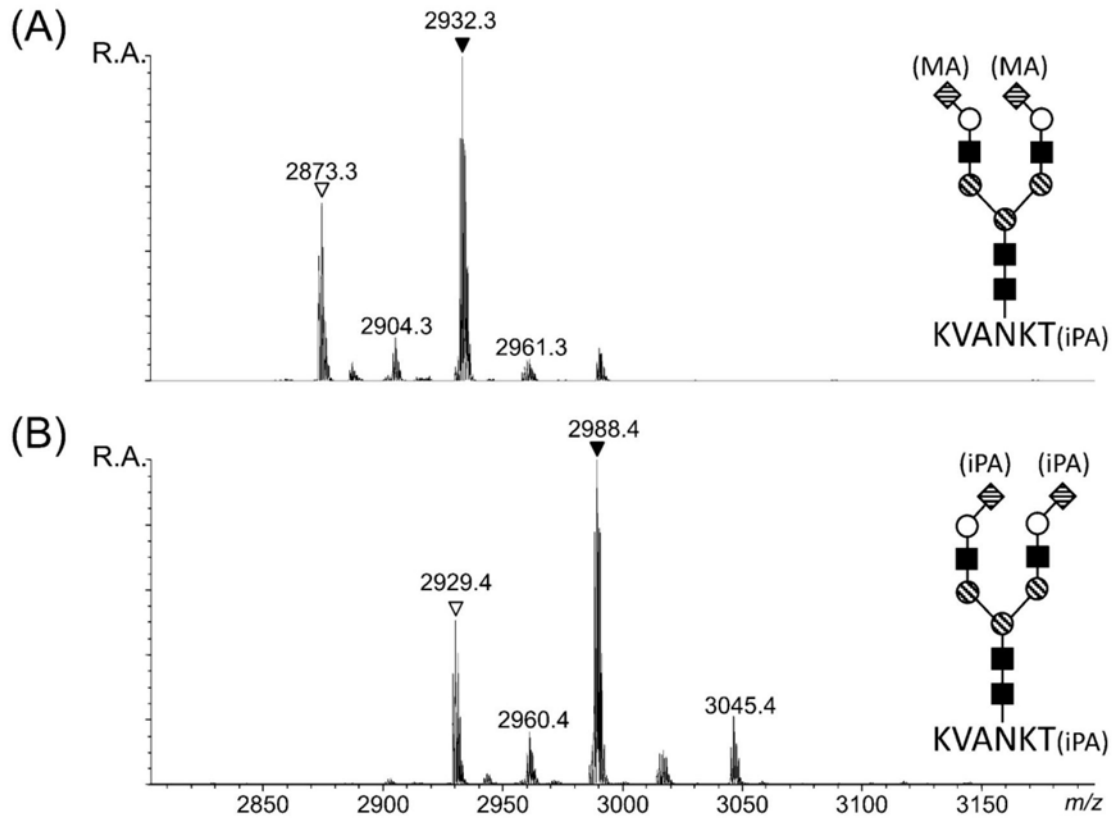


图1

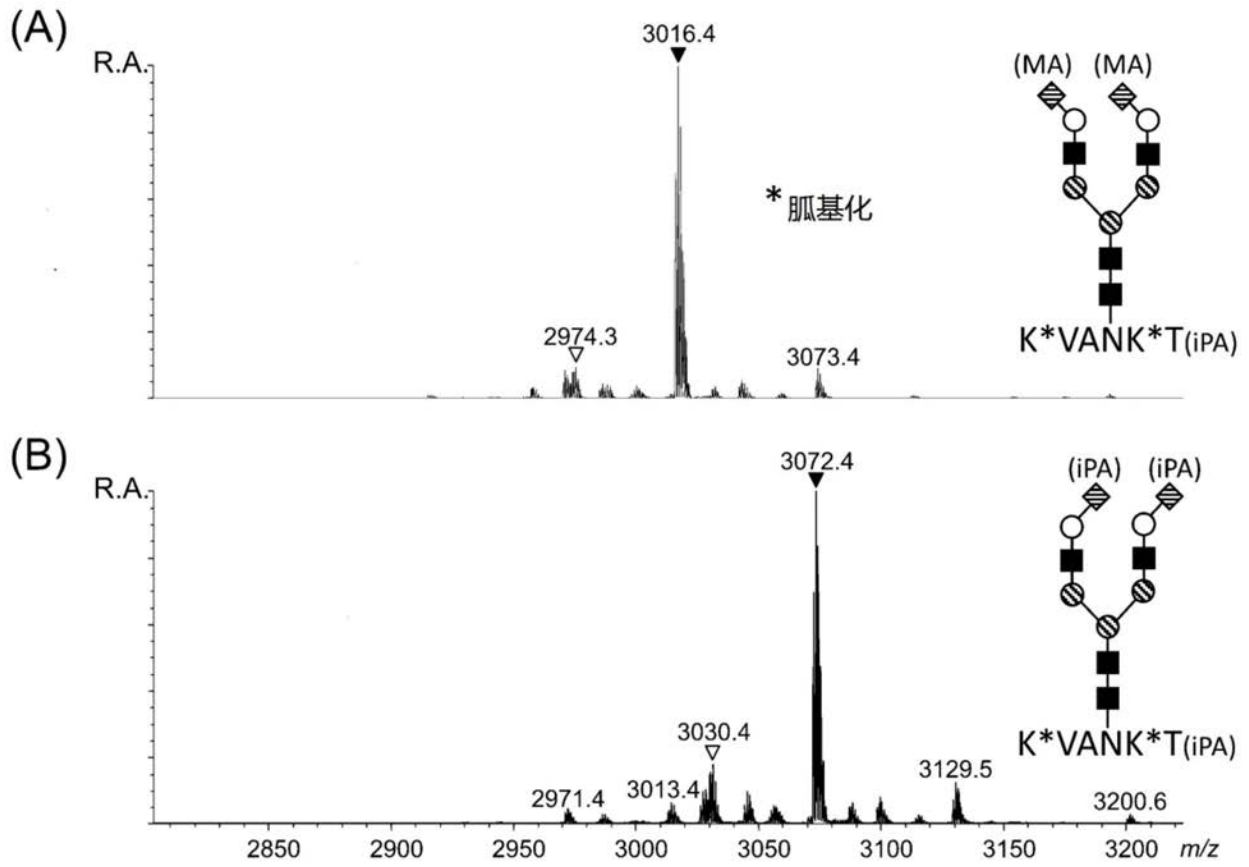


图2

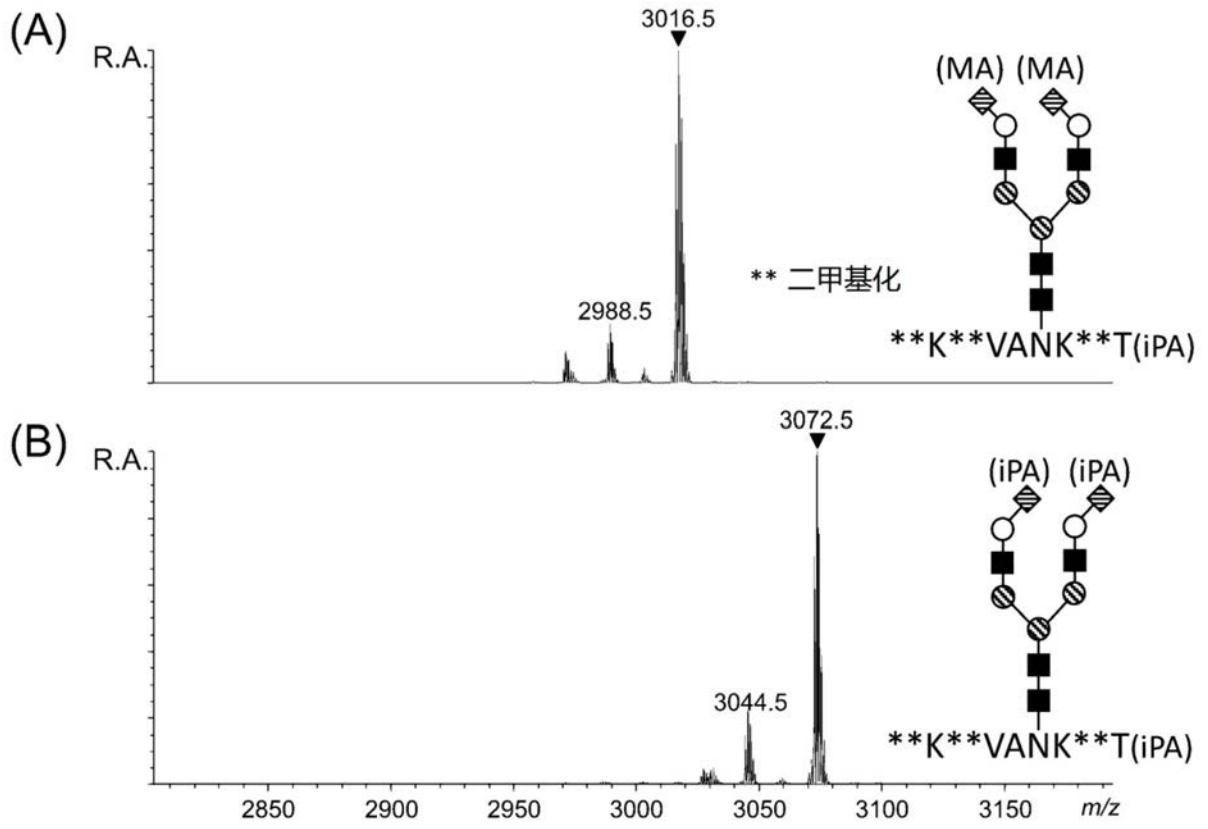


图3

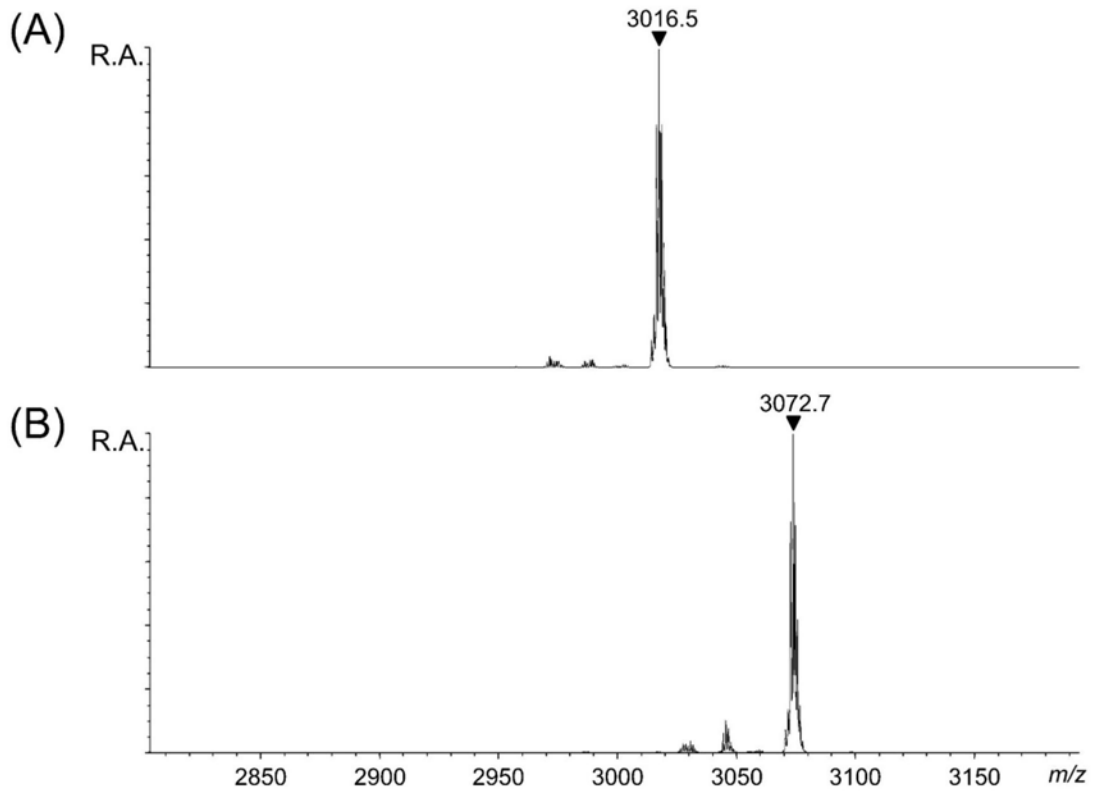


图4

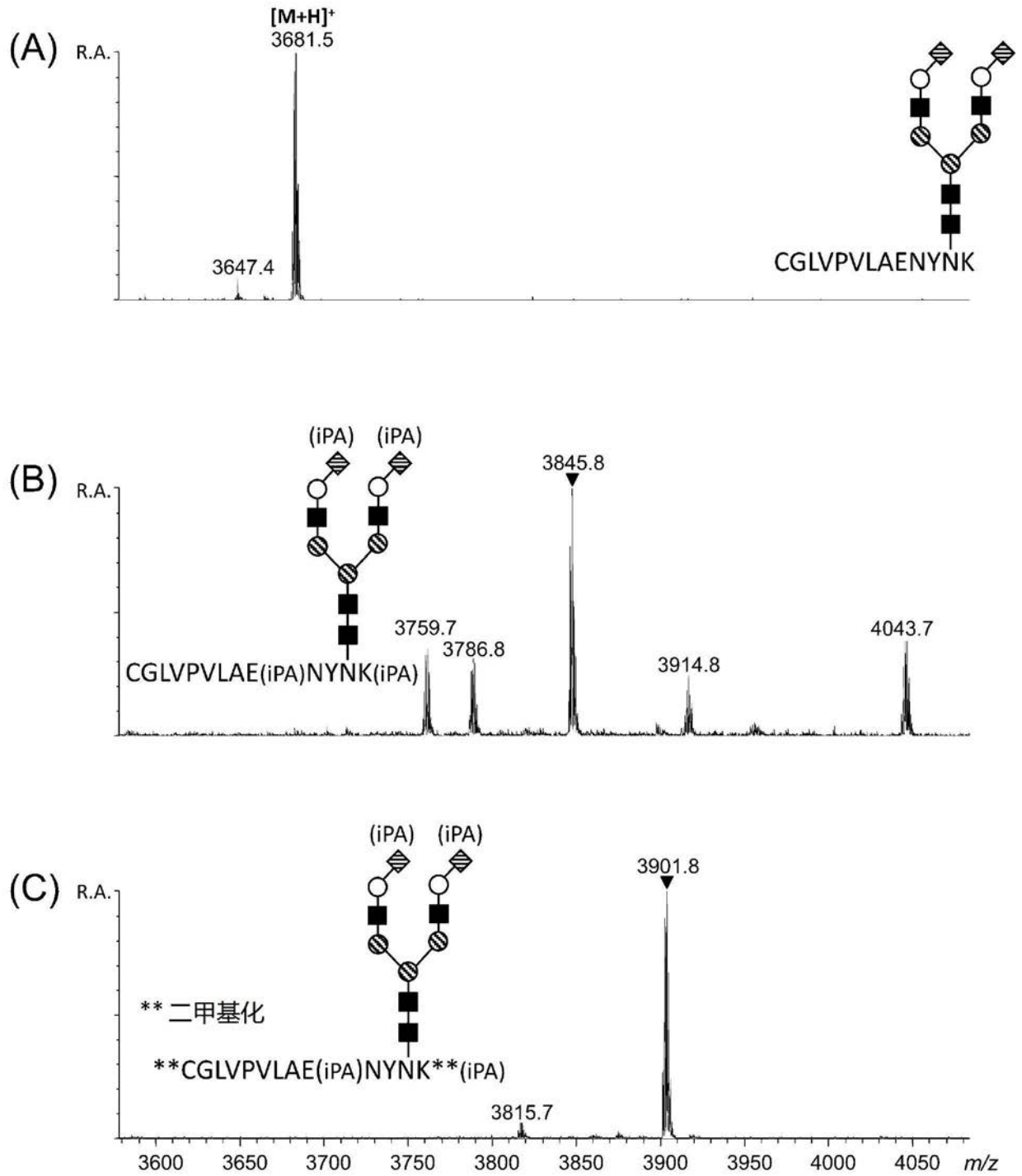


图5

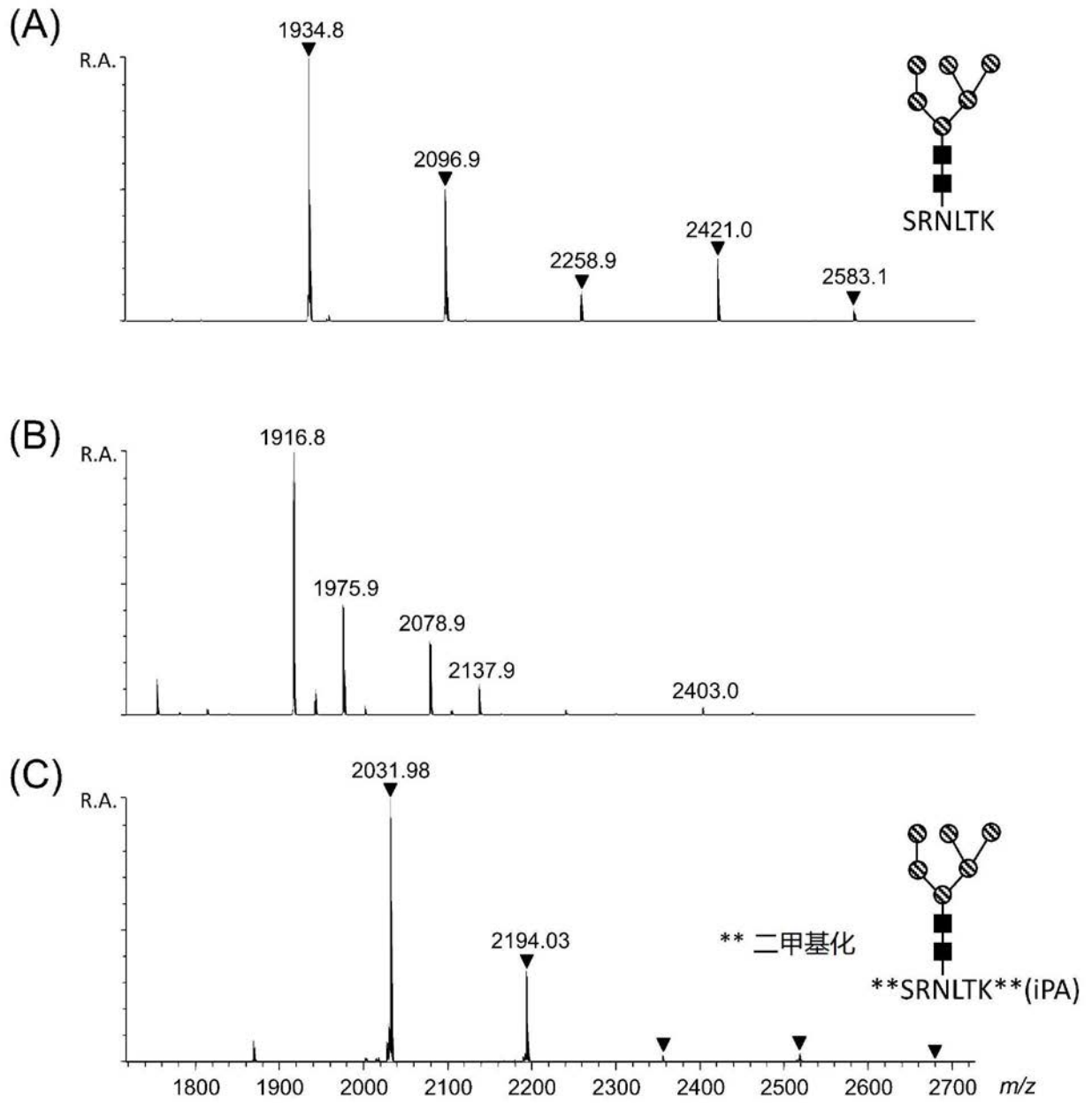


图6