



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 600 13 161 T2 2005.12.29

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 228 079 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 600 13 161.0

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/FI00/00803

(96) Europäisches Aktenzeichen: 00 960 731.8

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 01/023398

(86) PCT-Anmeldetag: 21.09.2000

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 05.04.2001

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 07.08.2002

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 18.08.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 29.12.2005

(51) Int Cl.⁷: C07H 3/06

C07H 15/04, C08B 37/00

(30) Unionspriorität:

992070 28.09.1999 FI

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Glykos Finland Oy, Helsinki, FI

(72) Erfinder:

NATUNEN, Jari, FIN-00170 Helsinki, FI

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: NEUE FUCOSYLIERTE OLIGOSACCHARIDE UND VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neue fucosyierte Oligosaccharide oder Oligosaccharid enthaltende Verbindungen, die Analoga zu natürlichen Oligosacchariden sind und die mindestens eine fucosyierte Monosaccharideinheit enthalten. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung solcher Oligosaccharide oder Oligosaccharid enthaltenden Verbindungen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Fucosyierte, von Säugern gewonnene Glykane weisen Wirkungen bei der Befruchtung (1), frühen Differenzierung des Embryo (2), Gehirnentwicklung (3, 4) und Leukozytenextravasation (5, 6) auf, wobei die α 1-3/4-fucosyierte Oligo- und Polysacharide an Lipide und Proteine konjugiert sind oder als freie Oligosaccharide, wie die Oligosaccharide aus menschlicher Milch. Die fucosyierte N-Acetyl-lactosamine (Lewis x, Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc und Lewis a, Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc) und fucosyierte N-Acetyl-lactosiamin (LexNAc, GalNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc) treten oft als terminale Sequenzen auf, wie Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-2Man α -, Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-2Man α -, Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-2Man α -, Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-3Gal β -/GalNAc α -, Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-4Man α -, Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β 1-4Man α - und Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-6Gal β -/GalNAc α /Man α - In der Mitte von Ketten des Lactosamin-Typs sind die Lewis x-Sequenzen -GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal üblich, aber auch Lewis a-Strukturen Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc sind vorhanden, wobei die Möglichkeit zur Wiederholung der Sequenzkette besteht. Bei den freien Oligosacchariden, die sich hauptsächlich in menschlicher Milch finden, ist da α 1-3-fucosyierte Epitop am reduzierenden Ende des Saccharids üblicherweise Lactose (Gal β 1-4Glc) oder seine verlängerte/substituierte Form, wie Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc, Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc, Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc, Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc und Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc. Analoga davon können für Untersuchungen der Spezifitäten von biologischen Wirkungen der natürlichen, von Säugern gewonnenen α 1-3/4-fucosyierten Sequenzen verwendbar sein.

[0003] Der Schritt der Fucosylierung in der Biosynthese dieser Glykane wird durch die Familie der α 1-3/4-Fucosyltransferasen (Fuc-Ts) erzielt. Beim Menschen werden mindestens Fuc-Ts III–VII und IX exprimiert (7–9) und enzymatisch aktive Homologe sind bei anderen Tieren und Bakterien bekannt.

[0004] α 1-3-Fucosyltransferase übertragen Fucose an die Position 3 von GlcNAc- oder Glc-Resten in Gal β 1-4GlcNAc (LacNAc), GalNAc β 1-4GlcNAc (LacdiNAc) bzw. Gal β 1-4Glc (Lactose), wodurch die bioaktiven Epitope Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc (Lewis x, Lex), GalNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc (LexNAc) bzw. Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc synthetisiert werden. Von allen menschlichen Fuc-Ts ist bekannt, dass sie Akzeptoren des Gal β 1-4GlcNAc-Typs verwenden (7, 9). GalNAc β 1-4GlcNAc dient auch als Akzeptor für die Fuc-Ts aus menschlicher Milch (10). Menschliche Fuc-Ts III und V weisen auch α 1-4-Fucosyltransferaseaktivität auf, wobei sie Akzeptoren verwenden, wie Gal β 1-3GlcNAc (Typ I N-Acetyl-lactosamin), um Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc (Lewis a) zu synthetisieren. Mindestens die menschlichen Fuc-Ts III und V und (schwach VI) können Lactose und verwandte Oligosaccharide zu Strukturen fucosylieren, die Gal β 1-4(Fuc α 1-3)Glc-Sequenzen enthalten.

[0005] Die enzymatische α 1-3-Fucosylierung von N-Acetyl-chitobiose ist beschrieben worden, siehe US 5,759,823, aber das Produkt wurde nicht charakterisiert. Die reduzierende N-Acetyl-chitobiose enthält auch das Epimer, bei dem ManNAc am reduzierenden Ende ist, und aus den Daten des US-Patents ist nicht bekannt, ob N-Acetyl-chitobiose oder ihr Epimer mit reduzierendem Ende fucosiert wurde. Saccharide mit fucosiertem GlcNAc am reduzierenden Ende werden nicht als verwendbar angesehen, da sie labil sind und sich selbst in wässrigen Lösungen bei nahezu neutralem pH-Wert zersetzen. Das fucosyierte GlcNAc am reduzierenden Ende ist sehr selten oder nicht existent bei von Säugern gewonnenen, natürlichen Oligosacchariden, möglicherweise wegen der Labilität, die es auch *in vivo* für biologische Wirkungen nutzlos machen könnte.

[0006] Die vorliegende Erfindung beschreibt auch Saccharidepitopanaloga der von Säugern gewonnenen, fucosyierte Saccharidketten ebenso wie deren Synthese. Ein effektives Verfahren zur Synthese solcher Epitope ist die Verwendung von α 1-3-Fucosyltransferasen oder α 1-3/4-Fucosyltransferasen zur Fucosylierung neuer Akzeptorsequenzen. Einige der Akzeptorsequenzen können aus billigen natürlichen Polysacchariden, wie Cellulose, Chitin, Chondroitin/Chondroitinsulfate oder Hyaluronsäure, synthetisiert werden, auch können na-

türliche Polysaccharide mit der Sequenz $\text{Glc}\beta 1-(3\text{Glc}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-)_n\text{Glc}$ zur Synthese von Akzeptoren verwendet werden. $\beta 1-4\text{GlcNAc}$ -Transferase und UDP-GlcNAc können zur Erzeugung von $\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-$, das an Gal, GalNac oder Man gebunden ist, verwendet werden (11) und diese können zur Herstellung anderer Analoga verwendet werden. Von bestimmten Parasiten wird auch berichtet, dass sie N-Acetylchitooligosaccharide enthalten, die als Akzeptoren für die Fucosylierung verwendet werden können (12).

[0007] Interessanterweise traten die hier beschriebenen neuen Fucosylierungen der N-Acetylchitooligosaccharide (N-Acetyl-chitotriose und größer) nicht am nicht reduzierenden subterminalen Rest (was eine terminale Lewis x-artige Struktur mit einer menschlichen Glykanen ähnlichen Bindungsstruktur ergibt) und nicht am GlcNAc des reduzierenden Endes auf wie bei pflanzlichen N-Glykanen.

[0008] U.S. Patent Nr. 5,922,577 offenbart die enzymatische Synthese glykosidischer Bindungen. U.S. Patent Nr. 5,374,655 offenbart Verfahren zur Synthese von monofucosyierte Oligosacchariden, die in Di-N-acetyl-lactosaminylstrukturen enden. Qian et al. (J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 2184–2185) offenbart die enzymatische Fucosylierung des gehinderten tertären Alkohols aus 3-C-Methyl-N-acetyllactosamin, was ein Analogon des LexX-Trisaccharids ergibt. Nimtz et al. (Glycoconjugate Journal, 1998, 15, 873–883) offenbart die $\alpha 1-3$ -oder $\alpha 1-4$ -Fucosylierung von Oligosacchariden des Typs I und II mit sekretierten Formen rekombinanter menschlicher Fucosyltransferasen III und VI.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0009] In einem ersten Gesichtspunkt zielt die vorliegende Erfindung auf neue fucosyierte Oligosaccharide und Verbindungen des Oligosaccharid-Typs ab, insbesondere N-Acetylchitooligosaccharide, die im Monosaccharid an der subterminalen Position zum nicht reduzierenden Ende des Oligosaccharids $\alpha 1-3$ -fucosyliert sind. Die vorliegende Erfindung zielt auch auf ein Verfahren zur Herstellung solcher Verbindungen ab, das zu einer sequenzspezifischen Fucosylierung durch Verwendung von $\alpha 1-3$ -Fucosyltransferase- oder $\alpha 1-3/4$ -Fucosyltransferaseenzym zur Glykosylierung des Oligosaccharidakzeptorsubstrats mit L-Fucose führt.

BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

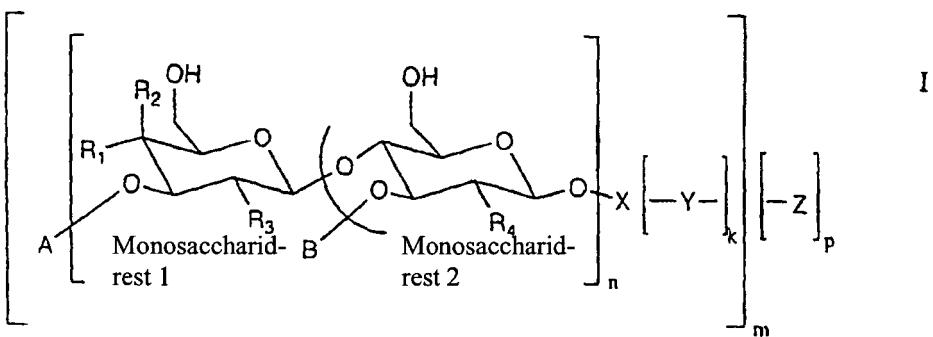
[0010] In den Zeichnungen ist **Fig. 1(A)** eine HPAE-Chromatographie der neutralen Fuc-TV-Fucosylierungsprodukte von N-Acetyl-chitotetraose. Das fucosyierte Produkt (Glykan 4, FGN_4 ; für die Strukturen der Glykane 3 bis 7 siehe Tabelle 1) eluierte bei 7,62 min und der mutmaßliche Akzeptor bei 9,74 min im isokratischen Durchlauf mit 40 mM NaOH. (B) zeigt die HPAE-chromatographische Reinigung von fucosylierter N-Acetyl-chitohexaose (FGN_6), die bei 7,09 min., mutmaßliches N-Acetyl-chitohexaosesignal bei 9,04 min eluiert im isokratischen Durchlauf mit 40 mM NaOH. Die Saccharide stammten aus der Reaktion mit Fuc-TV.

[0011] **Fig. 2** zeigt MALDI-TOF-Massenspektren der wesentlichen Reaktionsgemische und gereinigten Produktsaccharide. F ist L-Fucose, GN ist N-Acetyl-D-glucosamin. (A) zeigt ein Gemisch aus FGN_4 und GN_4 , das mit menschlichem Fuc-TV hergestellt wurde, (B) zeigt ein Gemisch aus FGN_6 und GN_6 , das mit Fuc-TV hergestellt wurde. (C) zeigt FGN_6 , das mit HPAE-Chromatographie gereinigt wurde. (D) zeigt die Reaktion von exo- β -N-Acetylhexosaminidase und neuer endo-Chitinase (das Jackbohnenenzym, sanfte Bedingungen) mit dem Gemisch von FGN_6 und GN_6 , das mit Fuc-TV hergestellt wurde. Das Hauptprodukt ist überraschenderweise FGN_5 . (E) zeigt die sanfte Spaltung des gereinigten FGN_6 zu hauptsächlich FGN_5 durch das Jackbohnenpräparat. (F) zeigt die sanfte Behandlung des gereinigten FGN_4 durch das Jackbohnenpräparat, 91% des Substrats verbleiben intakt.

[0012] **Fig. 3** zeigt MS/MS-Spektren von reduzierter und permethylierter fucosylierter N-Acetylchitotriose 3(A) und N-Acetyl-chitotetraose 4(B). Die Fragmentionennomenklatur von Domon und Costello wird zur Bezeichnung der erzeugten Fragmente verwendet.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0013] Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung fucosyierte Oligosaccharidverbindungen mit der Formel



[0014] In Formel I hat A die Bedeutung H oder ist ein glykosidisch β 1-3-gebundener D-Glucopyranosyl-Rest (Glc β 1-3), hat R₁ die Bedeutung OH, hat R₂ die Bedeutung H und hat R₃ die Bedeutung OH oder ist Acylamido -NH-Acyl (d. h. Monosaccharid 1 ist Glc oder GlcNAcyl) oder hat R₁ die Bedeutung H, hat R₂ die Bedeutung OH und ist R₃ Acetamido -NHCOCH₃ (d. h. Monosaccharid 1 ist GalNAc), hat B die Bedeutung H oder ist ein α -L-Fucosyl oder ein α -L-Fucosyl-Analogon und hat R₄ die Bedeutung OH oder ist Acetamido -NHCOCH₃ (d. h. Monosaccharid 2 ist optional fucosiertes Glc oder GlcNAc), wobei die gekrümmte Linie zwischen den Saccharid-Einheiten anzeigt, dass das Monosaccharid 1 an das Monosaccharid 2 β 1-4-gebunden ist, wenn B an die Position 3 des Monosaccharids 2 gebunden ist, und das Monosaccharid 1 an das Monosaccharid 2 β 1-3-gebunden ist, wenn B an die Position 4 des Monosaccharids 2 gebunden ist, das Monosaccharid 1 nur dann GalNAc ist, wenn das Monosaccharid 2 Glc ist, n gleich 1 bis 100 ist, mit der Maßgabe, dass immer mindestens ein α -Fucosyl oder eine α -Fucosyl-Analogongruppe in dem Molekül vorhanden ist, und

i) p und k gleich 0 sind und m gleich 1 ist, wobei in diesem Fall X die Bedeutung H hat Aglykon-Rest oder ein oder ein Monosaccharid, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Glc, GlcNAc, Gal oder GalNAc, optional in reduzierter Form, ist oder ein Oligosaccharid ist, das eine oder mehrere der erwähnten Monosaccharideinheiten enthält, wobei das Monosaccharid 2 mit dem Saccharid X β 1-2-, β 1-3-, β 1-4- oder β 1-6 gebunden ist, mit der Maßgabe, dass X nicht H ist, wenn beide Monosaccharide 1 und 2 GlcNAc sind, B die Bedeutung L-Fucosyl hat und n gleich 1 ist, oder

ii) p gleich 1 ist, k gleich 0 oder 1 ist und $1 \leq m \leq 1000$, wobei in diesem Fall X eine gerade Bindung oder ein Mono- oder Oligosacchaitd wie unter i) definiert ist, Y ein Spacer oder eine Bindungsgruppe ist, die in der Lage ist, das Saccharid 2 oder X an Z zu binden, und Z ein mono- oder polyvalentes Trägermoleköl ist.

[0015] In der vorstehenden Formel, ebenso wie nachstehend, bedeutet Glc einen D-Glucoserest und Gal bedeutet einen D-Galactoserest. Fuc oder F bedeutet einen L-Fucoserest. GlcNAc oder GN bedeutete einen N-Acetyl-D-glucosaminrest. Die Monosaccharide liegen in der Pyranoseform vor, wenn sie glykosidisch gebunden sind.

[0016] B als ein Analogon zum L-Fucosylrest ist vorzugsweise eine Verbindung, die eine Hydroxymethylgruppe an Stelle der Methylgruppe in der 6-Position von Fucosyl aufweist, das heißt L-Galactosyl, oder ein Desoxyderivat von L-Fucosyl oder ein Analogon, bei dem ein Di- bis Tetrasaccharide an C6 gebunden ist. Am stärksten bevorzugt jedoch ist B H oder L-Fucosyl.

[0017] R₃ als eine Acylamidogruppe ist vorzugsweise ein Alkanoylamidorest mit 2 bis 24 Kohlenstoffatomen und 0 bis 3 Doppelbindungen zwischen Kohlenstoffatomen in einer geraden Kette. Vorzugsweise ist R₃ Acetamido -NH-COCH₃ oder eine Alkanoylamidogruppe mit 8 bis 24 Kohlenstoffatomen und 1 bis 3 Doppelbindungen. m ist vorzugsweise 1 bis 100 und am stärksten bevorzugt 1 bis 10 und n ist vorzugsweise 1 bis 10.

[0018] Ein Oligosaccharid mit der Bedeutung von X enthält vorzugsweise 2 bis 10 Monosaccharideinheiten, wobei die Monosaccharideinheiten vorzugsweise glykosidisch β 1-4- oder β 1-3-gebundene Glc- oder GlcNAc-Reste sind.

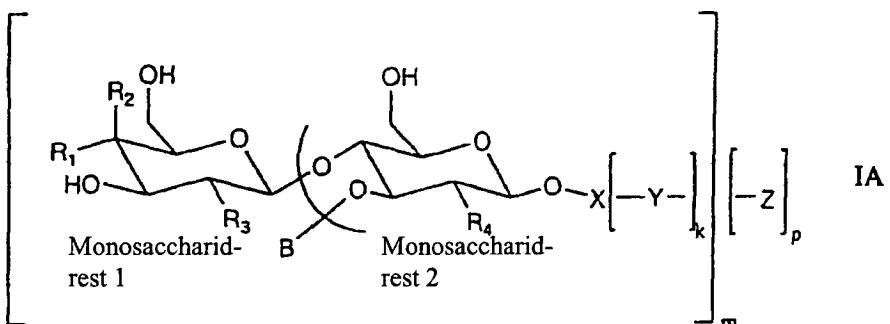
[0019] Eine Aglykongruppe ist vorzugsweise eine Kohlenwasserstoffgruppe, wie ein C₁₋₂₀-Alkylder C₂₋₂₀-Alkenylrest, ein C₃₋₁₀-Cycloalkyl- oder Cycloalkenylrest, ein Aryl- oder Aralkylrest, der bis zu 10 Kohlenstoffatome im aromatischen Ring enthält, wobei Alkyl die vorstehend angegebene Bedeutung hat, beispielsweise eine Phenylgruppe oder Benzylgruppe, oder ein heterocyclischer Rest, das heißt ein Cycloalkyl- oder eine Arylrest, wie definiert, die ein oder mehrere Heteroatome O, S oder N in dem/den Ringen) enthält.

[0020] Eine bevorzugte Aglykongruppe ist eine niedere Alkyl- oder Alkenylgruppe mit 1 bis 7 bzw. 2 bis 7 Kohlenstoffatomen oder eine Phenyl- oder Benzylgruppe. Eine bevorzugte heterocyclische Aglykongruppe ist 4-Methylumbelliferyl.

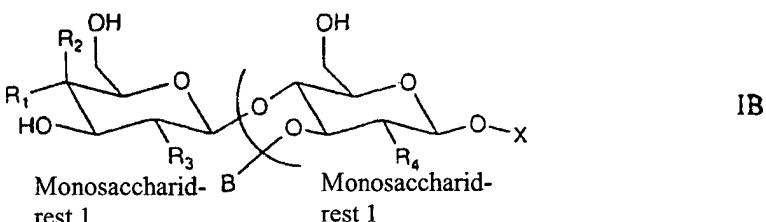
[0021] Die Spacergruppe Y, falls vorhanden, kann jede Gruppe sein, die die Gruppe X oder das Saccharid 2 an das Trägermolekül Z binden kann, und solche Gruppen und Verfahren des Bindens sind im Fachgebiet bekannt und auch im Handel erhältlich. Beispielsweise kann, wenn X ein Saccharid ist, eine Bindung zwischen X und Y erzeugt werden, indem ein Aldehyd oder eine Carbonsäure mit X an dessen C₁ umgesetzt wird oder indem eine beliebige Aldehyd- oder Carbonsäuregruppe in X mittels Oxidation eingeführt wird, wodurch eine geeignete Bindung erzeugt wird, wie -NH-, -N(R)-, wobei R eine Alkylgruppe ist, oder ein Hydroxyalkylamin, ein Amid, ein Ester, ein Thioester oder Thioamid. Eine geeignete Bindung ist auch -O- oder -S-, siehe z. B. Stowell et al., Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 37 (1980), 225.

[0022] Somit stellt die vorliegende Erfindung fucosyierte Oligosaccharidverbindungen als solche oder kovalent an ein Trägermolekül gebunden bereit. Das Trägermolekül kann mono- oder polyvalent sein und wird vorzugsweise aus Polymeren, wie Polyacrylamide, Polyolen, Polysacchariden, wie Agarose, Biomolekülen, einschließlich Peptiden und Proteinen, Rinder- oder menschlichem Serumalbumin, die üblicherweise verwendete Träger beispielsweise in Immunoassays sind, ausgewählt.

[0023] Eine bevorzugte Gruppe von Verbindungen mit der Formel I umfasst die folgende



wobei die Symbole die vorstehend in Verbindung mit der Formel I angegebene Bedeutung haben. In der vorstehenden Formel sind die Monosaccharide 1 und 2 vorzugsweise unabhängig voneinander Glc und GlcNAc, ist B L-Fucosyl und ist X Glc oder GlcNAc oder ein β 1-3- oder β 1-4-gebundenes Oligomer, das bis zu 10 Einheiten Glc und/oder GlcNAc umfasst. Wenn p und k = 0 und m = 1 ist, haben die Verbindungen die Formel

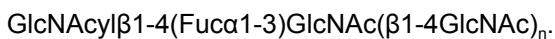


wobei die Symbole dieselben Bedeutungen haben, wie vorstehend in der Formel IA angegeben, oder X auch H sein kann, vorausgesetzt die Monosaccharide 1 und 2 sind beide Glc.

[0024] Die Verbindungen der Formel IA und IB sind also Oligosaccharide, die am subterminalen oder vorletzten Monosaccharid des nicht reduzierenden Endes fucosyliert sind. Gemäß der Erfindung wurde gefunden, dass diese spezifische Fucosylierung zu hochgradig stabilen Oligosacchariden, insbesondere N-Acetyl-chitooligosacchariden, führt. Gemäß einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform der Erfindung haben die Saccharide die Formel



[0025] In der vorstehenden Formel ist n' eine ganze Zahl von 1 bis 8, vorzugsweise 1 bis 6. Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung haben die Saccharide die Formel



wobei n' die vorstehende Bedeutung hat und Acyl eine Alkanoylgruppe ist, die vorzugsweise 8 bis 24 Kohlenstoffatome und 1 bis 3 Doppelbindungen enthält. Vorzugsweise ist 1 < n' < 6, stärker bevorzugt 2 < n' < 4.

[0026] Gemäß der Erfindung werden die Verbindungen der Formel I durch Fucosylieren einer Verbindung der Formel I, wobei B immer H ist, mit einem Donator-Nucleotidzucker, der L-Fucose oder ein Analogon davon ent-

hält, in Gegenwart eines Fucosyltransferaseenzyms und optionales Rückgewinnen des so hergestellten fucosylierten Saccharids hergestellt. Diese Reaktion kann am Ausgangsoligosaccharid vor dem optionalen Binden des Oligosaccharids an das Trägermolekül Y durchgeführt werden. In einer anderen Ausführungsform ist es auch möglich, ein an den Träger gebundenes Oligosaccharid zu fucosylieren. Diese Reaktion wird im Wesentlichen in der gleichen Weise wie mit nicht gebundenen Oligosacchariden durchgeführt. Beispielsweise kann ein N-Acetyl-chitooligosaccharid, wie eine N-Acetylchitotriose, über einen Spacer an Rinderserumalbumin BSA gebunden werden oder es kann auf bekannte Weise reduktiv an BSA aminiert werden, wobei der reduzierte Rest den Spacer bildet. Bei der Fucosylierung werden vorzugsweise ein Überschuss an GDP-Fuc und eine geringere Konzentration an Akzeptorstellen (0,1 bis 1 mM) verwendet. Wenn BSA der Träger ist, enthält der Reaktionspuffer kein nicht glykosyliertes BSA. Die Produkte können mit Verfahren der Proteinchemie gereinigt werden und der Grad der Fucosylierung kann mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie überprüft werden, wie nachstehend ausführlicher beschrieben. Die Fucosylierung kann wiederholt werden, falls die Umsetzung unvollständig ist.

[0027] Oligosaccharide mit einer Aglykongruppe als X können im Wesentlichen wie beschrieben fucosyliert werden, vorzugsweise unter Verwendung geringerer Akzeptorkonzentrationen (0,1 bis 1 mM). Die Produkte können unter Verwendung chromatographischer Verfahren, einschließlich Gelfiltration, und mit partieller Spaltung mit N-Acetylhexosaminidase aus Jackbohnen gereinigt werden. Als ein Beispiel erhält man
 $\text{GlcNAc}\beta\text{-}1\text{-}(Fuca1\text{-}3)\text{GlcNAc}\beta\text{-}1\text{-benzyl}$ aus $\text{GlcNAc}\beta\text{-}1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta\text{-}1\text{-benzyl}$,
 $\text{GlcNAc}\beta\text{-}1\text{-}(Fuca1\text{-}3)\text{GlcNAc}\beta\text{-}1\text{-O-methyl}$ aus $\text{GlcNAc}\beta\text{-}1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta\text{-}1\text{-O-methyl}$ und
 $\text{GlcNAc}\beta\text{-}1\text{-}(Fuca1\text{-}3)\text{GlcNAc}\beta\text{-}1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta\text{-}1\text{-O-}4\text{-methylumbelliferyl}$ aus
 $\text{GlcNAc}\beta\text{-}1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta\text{-}1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta\text{-}1\text{-O-}4\text{-methylumbelliferyl}$.

[0028] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Fucosyltransferase menschliche α 1-3-Fucosyltransferase oder menschliche α 1-3/4-Fucosyltransferase, insbesondere eine der menschlichen Fucosyltransferasen III-VII, IX oder α 1-3/4-Fucosyltransferase aus menschlicher Milch. Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform liegt die L-Fucose in Form von GDP-L-Fucose vor.

[0029] Gemäß einer Ausführungsform zur Herstellung der vorstehend beschriebenen bevorzugten Verbindungen enthält das Ausgangsoligosaccharid 3 bis 10, insbesondere 3 bis 8 β 1-4-Saccharideinheiten. Diese Einheiten sind vorzugsweise N-Acetyl-D-glucosaminreste GlcNAc, also sind die entsprechenden Ausgangsmaterialien N-Acetyl-chitooligomere der Formel $(\text{GlcNAc}\beta\text{-}1\text{-}4)_{3\text{-}10(8)}$. Gemäß einer zweiten bevorzugten Ausführungsform enthalten die Oligosaccharide 2 bis 10, insbesondere 2 bis 6 β 1-4-D-Glucoseeinheiten Glc, also sind die entsprechenden Ausgangsmaterialien Cellooligomere der Formel $(\text{Glc}\beta\text{-}1\text{-}4)_{2\text{-}10(8)}$.

[0030] Gemäß der Erfindung ist es auch möglich, einen weiteren Reaktionsschritt einzuschließen, bei dem das erhaltene Produkt mit einer β -N-Acetyl-hexosaminidase unter ausreichend harten Bedingungen und in einer ausreichenden Menge umgesetzt wird, so dass das nicht reduzierende terminale Monosaccharid frei gesetzt wird. Es ist auch möglich, das erhaltene Produkt mit einer β -N-Acetyl-hexosaminidase unter weniger harten Bedingungen umzusetzen, um ein Monosaccharid von seinem reduzierenden Ende frei zu setzen. Auf diese Weise wird ein Produkt erhalten, das eine Saccharideinheit weniger enthält als das primäre Oligosaccharidprodukt. Diese letztere Reaktion kann auch so gesteuert werden, dass das Enzym in erster Linie das verbliebene nicht fucosyierte Substrat zersetzt. Dieses Verfahren stellt also eine bequeme Art zur Reinigung des Reaktionsgemisches nach dem Fucosylierungsschritt bereit.

[0031] Auf Grund der Glucoseeinheit sind die neuen Oligosaccharide stabile Verbindungen und als solche bei einer Vielzahl von Anwendungen verwendbar. Als solche können sie beispielsweise als Substrate zum Testen, Identifizieren und Unterscheiden von Enzymen, wie Chitinasen, verwendet werden und, wenn sie an einen Träger gebunden sind, finden sie Anwendung bei Immunoassays und Affinitätschromatographie. Sie können auch Anwendung in der Agrobiologie als stabile Pflanzenschutzmittel, als Aktivatoren des Verteidigungsmechanismus und der Wachstumsregulatoren der Pflanzenzelle finden, ähnlich wie bei N-Acetyl-chitooligosaccharide und ihren Acylderivaten (13) beschrieben. Bei dieser Verwendung schützt das Einbringen der Fucosegruppe in das Oligosaccharid das Oligosaccharid in der Praxis vor dem enzymatischen Abbau.

[0032] Die α 1-3/4-fucosyierte Analoga tierischer Oligosaccharide sind für Untersuchungen der biologischen Wechselwirkungen, die ihre natürlichen Ebenbilder betreffen, verwendbar. Von den natürlichen α 1-3/4-fucosyierte Oligosacchariden ist bekannt, dass sie Liganden oder Gegenrezeptoren von Lektinen sind, die Zellhaftung und andere interzelluläre Wechselwirkungen vermitteln. Diese Saccharide sind auch wichtige Antigenepitope, die von Antikrebs- oder Allergie betreffenden Antikörpern erkannt werden. Einige dieser Wechselwirkungen sind von besonderem medizinischen Interesse, wie die Haftung von Leukozyten an Blutgefäßen, die

durch Bindung der Selektinproteine an ihre α1-3/4-fucosyierte Gegenrezeptoroligosaccharide, die an Proteine oder Lipide gebunden sind, vermittelt wird. Die Analoga zu den freien Oligosacchariden können in vitro oder in vivo-Assays getestet werden, um deren Fähigkeiten zur Verhinderung der Bindung zwischen den Lektinen und ihren Gegenrezeptoren herauszufinden, oder in einer anderen Ausführungsform kann die direkte Bindung der Oligosaccharide an die Lektine beispielsweise mittels Affinitätschromatographie gemessen werden. Die Daten, die mit den Analoga im Vergleich zu freien Saccharidepitopen erhalten wurden, die identisch mit den natürlichen Gegenrezeptoroligosacchariden sind, enthüllen einen Teil der Spezifität der Wechselwirkung. Sie zeigen, welche Modifikationen im Molekül verwendbar sind und welche nicht toleriert werden, wenn bessere medizinische Leitverbindungen für Antagonisten der Wechselwirkung entworfen werden. Bei der Suche nach besseren medizinischen Derivaten der Oligosaccharide kann das reduzierende Ende der Oligosaccharidkette mit zahlreichen Nicht-Kohlenhydrat-Strukturen, Aglykonen, modifiziert werden. Freie Oligosaccharide können auch als Gemische bekannter Zusammensetzung (so genannte Bibliotheken) bei Testen auf biologische Aktivitäten verwendbar sein. Gemische von Fucosyl-Positionsisomeren werden leicht dadurch erhalten, dass das Oligosaccharid mit mehrfachen Akzeptorstellen mit weniger GDP-Fuc als die Menge an Akzeptorstellen inkubiert wird, oder indem der Umsetzungsgrad mittels MALDI-TOF-Analyse des Reaktionsgemisches verfolgt und die Reaktionsdauer begrenzt wird (14).

[0033] Multi- oder polyvalente Konjugate der Oligosaccharide können auch aktiver Antagonisten der biologischen Wechselwirkungen sein, wenn sie vom natürlichen und nicht antigenen Typ sind. Antogene polyvalente Konjugate, wie Oligosaccharide, die an Rinderserumalbumin oder an Schlüssellochschnecken-Hämocyanin gekuppelt sind, können verwendet werden, um Antikörper gegen die Saccharidepitope zu züchten. Polyvalente Konjugate, die an feste Träger, wie Affinitätschromatographiemedien aus Agarose oder Kunststoffmikrotiterplatten, konjugiert sind auch zum Testen und zur Reinigung von Lektinen und anderen Proteinen, die die Saccharide binden, verwendbar. Fucosyierte N-Acetyl-chitooligosaccharidepitope -Man β 1-4GlcNAc(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-Asn aus Pflanzen- und Insektenproteinen (15) sind potente und reaktive menschliche Kreuzallergene und GlcNAc(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-Konjugate können zum Testen der Allergieantikörper, die auf das Epitop ansprechen, verwendbar sein.

[0034] Von den Selektinproteinen, die die vaskuläre Haftung der Leukozyten vermitteln, ist bekannt, dass sie Sialyl-Lewis x [sLex, NeuNAc α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc], insbesondere in sLex-β1-3Lexβ1- (16), und Sialyl-Lewis a [NeuNAc α 2-3Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc]-Oligosaccharide (17) und in einigen Berichten auch Lewis x [Lex, Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc] (18) oder VIM-2-Epitope [NeuNAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc] (19) binden. Vom GalNAc-Analogon von Lewis x, GalNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc, wurde berichtet, dass es ein besserer Selektinligand als Sialyl-Lewis x (20, 21) ist.

[0035] Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung veranschaulichen.

[0036] Die erfindungsgemäßen Produkte wurden durch Abbau, Massenspektrometrie und NMR-Experimente charakterisiert. Die letzteren legen nahe, dass das Monosaccharid am nicht reduzierend Ende und die Fucose in Lösung in einer Konformation gestapelt sind, die an diejenige erinnert, die in Lex- und LexNAc-Determinanten dominiert. Dies schützt die fucosyierte Oligosaccharide beträchtlich.

[0037] In den Beispielen werden die folgenden Abkürzungen verwendet:

DQFCOSY, Doppelquanten gefilterte Korrelationsspektroskopie (double quantum filtered correlation spectroscopy); ESI-CID, Elektrosprayionisation, kollisionsinduzierter Zerfall; Fuc & F, L-Fucose; Fuc-Ts III-VIII und IX, menschliche α1-3-Fucosyltransferasen/α1-3/4-Fucosyltransferasen III-VII und IX; Fuc-Thm, α1-3/α1-3/4-Fucosyltransferasen aus menschlicher Milch; Gal, D-Galactose; GalNAc, D-N-Acetylgalacosamin; GlcNAc & GN, D-N-Acetylglucosamin; HPAEC-PAD, Anionenaustauschchromatographie bei hohem pH-Wert – gepulste amperometrische Detektion; LacNAc, Gal β 1-4GlcNAc; LacdiNAc, GalNAc β 1-4GlcNAc; MALDI-TOF MS, Matrix unterstützte Laserdesorption/-ionisation, Flugzeitmassenspektrometrie; m/z, Masse-zu-Ladungs-Verhältnis; MOPS, 3-[N-Morpholino]propansulfonsäure; ROESY, Kern-Overhauser-Effekt-Spektroskopie im rotierenden Bezugssystem; ROE, Kern-Overhauser-Effekt im rotierenden Bezugssystem; TOCSY, gesamtkorrelierte Spektroskopie

[0038] In den Beispielen stammte N-Acetyl-chitotriose, N-Acetyl-chitotetraose und N-Acetylchitohexaose von Seikagaku (Tokyo, Japan). Cellobiose stammte von Thomas Kerfoot and Co., Ltd., und β-N-Acetylhexosaminidase aus Jackbohnen stammte Sigma (St. Louis, MO, USA). GDP-Fucose (in den Experimenten mit menschlicher Milch verwendet) wurde freundlicherweise von Prof. B. Ernst (Universität Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Menschliche Fucosyltransferasen V und VI, rekombinante Proteine, die in Spodoptera frugiperda ex-

primiert wurden, und GDP-Fucose stammten von Calbiochem (La Jolla, CA, USA). GDP-[U-¹⁴C]-Fucose stammte von Amersham International (Buckinghamshire, England). Die HPLC-Säule Superdex Peptide HR 10/30 stammte von Pharmacia (Uppsala, Schweden). Dowex AG 1-X8 (AcO⁻, 200–400 mesh) und Dowex AG 50W-X8 (H⁺, 200–400 mesh) und Biogel P-2 stammten von Bio-Rad (Richmond, CA). D₂O stammte von Cambridge Isotope Laboratories (Woburn, MA). Teilgereinigte Fucosyltransferasen aus menschlicher Milch wurden, wie in (22) beschrieben, hergestellt und getestet, wie in (23) beschrieben, 1 mU entspricht der Übertragung von 1 nmol Fucose auf 190 mM Lactose/Minute bei 37°C, pH-Wert 7,5.

Reaktionen mit Fucosyltransferase.

[0039] Die Fucosylierung von N-Acetyl-chitooligosacchariden mit Fucosyltransferasen aus menschlicher Milch (EC 2.4.1.152 und EC 2.4.1.65) wurde im Wesentlichen wie in (24) beschrieben durchgeführt, aber mit 2 * 360 µU Enzym (wobei die Hälfte des Enzyms nach 2 Tagen zugegeben wurde)/100 µl Reaktionsgemisch und die Akzeptorkonzentrationen betrugen 5 mM und durch vier Tage Inkubieren bei 37°C. Reaktionen mit Fucosyltransferase V (Fuc-TV, EC 2.4.1.152, rekombinant, Calbiochem) wurden unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt, aber mit 12,5 mU Enzym/100 µl, und die Reaktionsgemische wurden fünf Tage bei Zimmertemperatur inkubiert. Im Vergleich zu der erwarteten Menge an Produkten wurden große Überschüsse an GDP-Fuc verwendet. Reaktionen mit Fucosyltransferase VI (EC 2.4.1.152, rekombinant, Calbiochem) wurden unter denselben Reaktionsbedingungen wie bei Fuc-TV durchgeführt, mit der Ausnahme von 2 mM Akzeptor- und 4 mM GDP-Fucose-Konzentration und 10 mU Enzym/100 µl und 3 Tage Inkubation bei 37°C. Die Reaktionen wurden durch 3 Minuten Kochen terminiert, die Reaktionsgemische wurden bis zur Analyse gefroren gelagert.

Reaktionen mit β-N-Acetylhexosaminidase

[0040] Die Reaktionen, die durch β-N-Acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.30) aus Jackbohnen unter sanften Bedingungen katalysiert werden, wurden durchgeführt, wie in (25) beschrieben, wobei 0,3 mU Enzym/nmol freisetzbares GlcNAc verwendet wurden oder in Endochitinasereaktionen mit Fuc₁GN_{4,6} wurden 6 nmol Saccharide 11 h mit 38 mU Enzym inkubiert.

[0041] Reaktionen, die unter erschöpfenden Bedingungen durchgeführt wurden, enthielten 300 mU β-N-Acetylhexosaminidase in 4,8 µl 2,5 M (NH₄)₂SO₄, 2 nmol fucosyierte N-Acetyl-chitooligosaccharide und 40,2 µl 50 mM Natriumcitrat, pH-Wert 4,0. Die Reaktionen wurden bei 37°C inkubiert, 300 mU frisches Enzym in 2,5 M (NH₄)₂SO₄ wurde an den Tagen 2, 3, 5 und 7 zugegeben und die Reaktionen wurden am Tag 8 gestoppt, indem 1 vol eiskaltes Ethanol und 8 Volumina eiskaltes Wasser zugegeben wurden.

Reduktion der Oligosaccharide

[0042] Die Oligosaccharide wurden mit NaBH₄ im Wesentlichen, wie in (26) beschrieben, reduziert. Die Alditole wurden durch Gelfiltration gereinigt und die Vollständigkeit der Reaktionen wurde durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie verifiziert.

Chromatographische Verfahren

[0043] Die Proben aus den enzymatischen Reaktionen wurden entsalzt, indem sie in Wasser durch 1,5 ml Dowex AG-50 (H⁺, 200–400 mesh) und 1,5 ml of Dowex AG-1 (AcO⁻, 200–400 mesh) geleitet und dann durch Gelfiltrations-HPLC in einer Säule aus Superdex Peptide HR 10/30 mit ultrareinem Wasser oder 50 mM NH₄HCO₃ als Eluent bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min gereinigt wurden. Die Gelfiltration in einer Biogel P-2-Säule (1 × 142 cm) wurde mit ultrareinem Wasser durchgeführt, die UV-Absorption bei 214 nm wurde überwacht. Anionenaustauschchromatographie bei hohem pH-Wert mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) wurde an einer (4 × 250 mm) Dionex CarboPac PA-1-Säule (Dionex, CA) durchgeführt, die Proben wurden isokratisch mit 40 oder 60 mM NaOH laufen gelassen.

Massenspektrometrie

[0044] Matrix unterstützte Laserdesorptions-ionisations-Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF MS) wurde im verzögerten Extraktionsmodus für positive Ionen mit einem BIFLEX™ Massenspektrometer (Broker-Franzen Analytik, Bremen, Deutschland) durchgeführt, wobei 2,5-Dihydroxybenzoësäure als die Matrix verwendet wurde. Die Matrixpeaks im niederen Massenbereich wurden „unterdrückt“, indem unüblich hohe Probenkonzentrationen (100 pmol/µl) verwendet wurden.

[0045] Elektrospray-Massenspektren (ESI-MS) wurden unter Verwendung eines API365 Dreifachquadrupol-Massenspektrometers (Perkin-Elmer instruments, Thornhill, Ontario, Kanada) aufgezeichnet. Die Proben wurden in 50% wässrigem Methanol, das 0,5 mM Natriumhydroxid enthielt, gelöst und in das Massenspektrometer mit einer Nanoelektrosprayionenquelle (Protana A/S, Odense, Dänemark) mit einer Fließgeschwindigkeit von etwa 30 nl/min injiziert. MS/MS-Spektren wurden erhalten, indem die gewählten Vorläuferinnen mit Stickstoffkollisionsgas bei Beschleunigungsspannungen von 35 V (doppelt geladene Vorläufer) oder 55 V (einfach geladene Vorläufer) zur Kollision gebracht wurden.

NMR-Spektroskopie

[0046] Vor den NMR-Experimenten wurden die Saccharide zweimal aus D₂O lyophilisiert und dann in 300 µL D₂O (99,996 Atom%, Cambridge Isotope Laboratories, Woburn, MA, USA) gelöst. Die NMR-Experimente wurden an einem Spektrometer Varian Unity 500 bei 23°C unter Verwendung von Shigemi-Röhrchen (Shigemi Co., Tokyo, Japan) durchgeführt. Bei der Aufzeichnung der 1D-Protonenspektren wurde eine Modifikation der WEFT-Pulsfolge (27) verwendet. Bei den DQFCOSY- (28) und TOCSY- (29) Experimenten (32 Scans pro t₁-Wert) wurden Arrays von 2k*256 und 4k*256 Punkten aufgezeichnet und mit Nullen auf 2k*512 bzw. 4k*512 Punkte aufgefüllt. Eine um 90° verschobene Sinusglockengewichtungsfunktion wurde in beiden Dimensionen angewandt. Bei TOCSY wurde eine Spin-Lock-Dauer von 100 ms (MLEV-17) verwendet. Um die Überlappung innerhalb von Spinsystemen aufzulösen, wurden 1D selektive TOCSY- (30) Spektren bei Mischzeiten, die von 10 ms bis 140 ms variierten, und einem selektiven Gausspuls aufgezeichnet. Bei der Aufzeichnung des ROESY-Spektrums (31, 32) wurde der Transmitter außerhalb des Signalbereichs bei 5,750 ppm angeordnet und ein Continuous-Wave-Spin-Lock mit einer Spin-Lock-Dauer von 300 ms wurde eingesetzt. Ein Array von 2k*256 wurde aufgezeichnet und mit Nullen auf 2k*512 Punkte aufgefüllt. Eine um 90° verschobene Sinusglockengewichtungsfunktion wurde in beiden Dimensionen angewandt. Außerdem wurden die Daten aus der t₁-Zeitdomäne mittels FBLP (forward-backward linear prediction) verdoppelt.

[0047] Für das DEPT(135)- (33) Spektrum wurden 92.000 Punkte mit einer spektralen Breite von 18.000 Hz aufgezeichnet. Für das HSQC (34) und 2D HSQC-TOCSY (35) (48 bzw. 56 Scans pro t₁-Wert) wurden Arrays von 2k*128 und 2k*256 Punkten aufgezeichnet und mit Nullen auf 2k*256 bzw. 2k*512 Punkte aufgefüllt und eine verschobene Sinusglockenfunktion wurde verwendet. Beim 2D HSQC-TOCSY wurde eine Mischdauer von 120 ms eingesetzt. Die chemischen Verschiebungen im ¹H und ¹³C wurden auf internes Aceton, 2,225 bzw. 31,55 ppm, referenziert.

BEISPIEL 1

[0048] Durch menschliches Fuc-TV katalysierte Reaktion von N-Acetyl-chitotriose und GDP-Fucose

[0049] Das Oligosaccharidgemisch, das durch 5 Tage Inkubation von N-Acetyl-chitotriose (1000 nmol, 5 mM) mit GDP-Fuc (1000 nmol, 5 mM) und 25 mU Fuc-TV bei Zimmertemperatur erzeugt wurde, wurde entsalzt und durch Gelfiltrations-HPLC isoliert. MALDI-TOF-MS enthüllte, dass das Gemisch 32 mol% fucosyierte N-Acetyl-chitotriose und 68% N-Acetylchitotriose enthielt. Mit diesem Gemisch wurde die „sanfte Behandlung“ mit β-N-Acetylhexosaminidase aus Jackbohnen durchgeführt, was das meiste des überschüssigen N-Acetyl-chitotriose-Substrats spaltete, aber lediglich eine kleine Menge des fucosyierte N-Acetyl-chitotriose-Produkts. Eine repräsentative Probe aller Oligosaccharide wurde aus einem 5% Aliquot des Digestats unter Verwendung von Gelfiltrations-HPLC isoliert. MALDI-TOF-MS-Analyse zeigte, dass es aus fucosyierte N-Acetyl-chitotriose 67 mol%, N-Acetyl-chitotriose 7%, FuclGlcNAc₂ 12% und N-Acetyl-chitobiose 13% bestand.

[0050] Die monofucosyierte N-Acetyl-chitotriose wurde vom Rest des β-N-Acetylhexosaminidasedigestats durch Gelfiltrations-HPLC gereinigt. MALDI-TOF-MS-Analyse des gereinigten Fuc₁GlcNAc₃, Glykan 3, enthüllte das Vorhandensein einer lediglich 5%igen Verunreinigung durch N-Acetyl-chitotriose. Die Gesamtausbeute an gereinigtem Glykan 3 betrug 191 nmol(19%).

[0051] Massenspektrometrische Charakterisierung von durch Fuc-TV erzeugtem Glykan 3 Ein Aliquot der monofucosyierte N-Acetyl-chitotriose wurde reduziert und permethyliert und daran wurde ESI-MS durchgeführt. Das doppelt geladene [M+2Na]²⁺-Ion (m/z 508,8) wurde zuerst für MS/MS (**Fig. 3A**) ausgewählt. Die erhaltenen Fragmente konnten alle einem Tetrasaccharid, das die Fucoseeinheit an der mittleren GlcNAc-Einheit trägt, d. h. GlcNAcβ1-(Fucα1-)GlcNAcβ1-GlcNAcO1, zugeordnet werden. Der Verlust einer terminalen, nicht substituierten GlcNAc-Einheit ist aus den B₁-Ionen bei m/z 282,2 (mit Natrium) und m/z 260,0 (protoniert) ersichtlich. Der Verlust von Methanol aus den m/z 260,0 Ion erklärt die m/z 228,2 und m/z 196,2 Ionen. Die Y₁-Ionen bei m/z 316,2 und m/z 338,2 (die ein bzw. zwei Natrium tragen) zeigen, dass das GlcNAc-Alditol lediglich

einen Monosaccharidsubstituenten trug. Weiterhin kann das $Y_{2\alpha}/B_2$ -Ion bei m/z 442,4 nur durch Verlust von terminalem, unsubstituiertem GlcNAc und dem reduzierten GlcNAc-Rest auftreten. Selbst bei noch näherer Durchsicht wurden keine Fragmente beobachtet, die für ein fucosyierte reduzierendes Ende (d. h. Fuca1-GlcNAco1, m/z 490,4) oder ein fucosyierte nicht reduzierendes Ende GlcNAc (terminales Fuca1-GlcNAc, m/z 456,2) stehen. Der Ursprung des ziemlich intensiven Fragments bei m/z 455,2 ist etwas komplex. Seine Natur wurde dadurch enthüllt, dass die B_2 , $Y_{2\alpha}$ und $Y_{2\beta}-H_2O$ Fragmente bei hoher Auslassöffnungsspannung erzeugt wurden und MS/MS/MS-Daten mit diesen Skimmerfragmenten (nicht gezeigt) aufgezeichnet wurden. Nur die Y-Ionen erzeugten das m/z 455 Ion, also muss es das reduzierende Ende enthalten. Wir nehmen an, dass dies ein $^{0,4}X_1$ -Ion ist, das durch Kreuzringspaltung des vorletzten GlcNAc-Rings entsteht.

NMR-Spektroskopie von durch Fuc-TV erzeugtem Glykan 3

[0052] Die Daten aus dem 1D 1H -NMR-Spektrum von durch Fuc-TV erzeugtem Glykan 3 sind in Tabelle 2 angegeben. Tabelle 1 zeigt die in Tabelle 2 verwendete Nummerierung der Reste. Die H1-, H5- und H6-Signale von Fucose in Glykan 3 ähneln ihren Gegenstücken in GlcNAc β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc-Glykanen (36) und in Glykan 4, die mit 2D NMR (Tabelle 2) analysiert wurden, unterscheiden sich aber von denen in -GlcNAc β 1-4(Fuca1-6)GlcNAc-Sacchariden (37). Zusammengefasst bestätigen die NMR-Daten, dass es sich bei der durch Fuc-TV erzeugten, fucosyierte N-Acetyl-chitotriose, Glykan 3, um GlcNAc β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1-4GlcNAc handelt.

Die durch Fuc-Ts aus menschlicher Milch katalysierte Reaktion von N-Acetyl-chitotriose und GDP-Fucose

[0053] Die viertägige Inkubation von N-Acetyl-chitotriose (1000 nmol, 5 mM) mit GDP-Fucose (600 nmol, 3 mM) und 1,4 mU Enzym bei 37°C ergab ein Oligosaccharidgemisch. Nach Ionen austauschentsalzung, sanfter β -N-Acetylhexosaminidasebehandlung und wiederholten Gelfiltrations-HPLC-durchläufen wurde eine Probe von 221 nmol gereinigter, fucosyierte N-Acetyl-chitotriose erhalten. MALDI-TOF-MS enthüllte, dass das Produkt 92% fucosyierte N-Acetyl-chitotriose und 7% N-Acetyl-chitotriose enthielt. Das 1D 1H -NMR-Spektrum des Produkts war nahezu identisch mit dem von durch Fuc-TV erzeugtem Glykan 3. Die ESI-MS-Daten des Glykans 3 in reduzierter Form waren auch identisch mit denen, die mit dem reduzierten Derivat des durch Fuc-TV erzeugten Glykans 3 (nicht gezeigt) erhalten wurden.

BEISPIEL 2

Die durch Fuc-TV katalysierte Reaktion von N-Acetyl-chitotetraose und GDP-Fucose

[0054] Die 5-tägige Inkubation von N-Acetyl-chitotetraose (1000 nmol, 5 mM) mit GDP-Fuc (1000 nmol, 5 mM) und 25 mU menschlichem Fuc-TV bei Zimmertemperatur und Isolation des resultierenden Oligosaccharidgemisches durch Anwendung von Gelfiltrations-HPLC ergab ein Produkt, das aus 32 mol% fucosyierte N-Acetyl-chitotetraose und 68% unumgesetzter N-Acetyl-chitotetraose (**Fig. 2A**) bestand. Die sanfte Behandlung des Gemisches mit β -N-Acetylhexosaminidase aus Jackbohnen, gefolgt von chromatographischer Entfernung des frei gesetzten GlcNAc ergab ein Oligosaccharidgemisch, das aus Fuc₁GlcNAc₄ 50%, GlcNAc₄ 6%, Fuc₁GlcNAc₃ 8%, GlcNAc₃ 14%, GlcNAc₂ 22 mol% bestand. Die Zusammensetzung dieses Gemisches legt nahe, dass auch die fucosyierte N-Acetyl-chitotetraose viel langsamer als N-Acetyl-chitotetraose von der β -N-Acetylhexosaminidase gespalten wurde, was die analogen Daten beim Abbau von Glykan 3 bestätigt. Das Oligosaccharidgemisch wurde dann durch Gelfiltrations-HPLC fraktioniert, was ein gereinigtes Produkt (225 nmol) ergab, das aus 93 mol% fucosyierte N-Acetyl-chitotetraose und 7% N-Acetyl-chitotetraose bestand.

[0055] Ein weiteres Fucosylierungsgemisch, das aus 11% fucosyierte N-Acetyl-chitotetraose und 89% N-Acetyl-chitotetraose bestand, wurde in einem isokratischen HPAE-Durchlauf in einer (4 × 250 mm) Dionex CarboPac PA-1 Säule (Dionex, Sunnyvale, CA) getrennt, wobei 40 mM NaOH als Eluent (**Fig. 1A**) verwendet wurden. Der Peak, der bei 7,62 min eluiert, enthielt die fucosyierte N-Acetyl-chitotetraose. Das 1D 1H -NMR-Spektrum des gereinigten Produkts, durch Fuc-TV synthetisierte Glykan 4, war nahezu identisch mit dem von durch Fuc-Ts aus menschlicher Milch synthetisierte Glykan 4 (siehe unten).

[0056] Eine Probe des gereinigten Glykans 4 wurde durch erschöpfende Behandlung mit β -N-Acetylhexosaminidase aus Jackbohnen abgebaut, was ein Oligosaccharid ergab, das sich bei der Gelfiltration wie eine um etwa 1,5 Glucoseseinheiten kleinere Verbindung als N-Acetylchitotetraose verhielt, was nahelegt, dass es eine GlcNAc-Einheit verloren hatte. Diese Ansicht wurde durch Anwendung der MALDI-TOF-MS-Analyse bestätigt, die 89 mol% Fuc₁GlcNAc₃ und 11 mol% Fuc₁GlcNAc₂ enthielt. Die Nebenprodukte spezies hatte wahrscheinlich sowohl das GlcNAc am nicht reduzierenden Ende als auch das GlcNAc am reduzierenden Ende während der

erschöpfenden Spaltung verloren (siehe unten bei der sanften Behandlung der fucosylierten N-Acetyl-chitohexaose mit β -N-Acetylhexosaminidase aus Jackbohnen).

[0057] Zusammengefasst sind die analytischen Daten des durch Fuc-TV erzeugten Glykans 4 mit der Struktur GlcNAc β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1-4GlcNAc im Einklang.

Durch Fuc-Ts aus menschlicher Milch katalysierte Glykan 4-Synthese

[0058] N-Acetyl-chitotetraose (6,0 μ mol, 5 mM) und GDP-Fuc (3,0 μ mol, 2,5 mM) wurden vier Tage mit 8,7 mU Enzym bei 37°C inkubiert. Nach Entsalzung und Gelfiltrations-HPLC-durchlauf wurde das fucosyierte Produkt von der nicht fucosylierten N-Acetyl-chitotetraose durch HPAEC unter Verwendung eines isokratischen Durchlaufs mit 40 mM NaOH (nicht gezeigt) abgetrennt. Das gereinigte Produkt wurde durch Ionenaustausch entsalzt und weiter durch Gelfiltrations-HPLC gereinigt, was 744 nmol monofucosyierte N-Acetyl-chitotetraose ergab. MALDI-TOF-Massenspektrometrie des Produkts enthüllte, dass es nicht durch N-Acetyl-chitotetraose-Akzeptor (nicht gezeigt) verunreinigt war.

[0059] Eine Probe des gereinigten, durch Fuc-Ts aus menschlicher Milch erzeugten Glykans 4 wurde erschöpfend mit β -N-Acetylhexosaminidase aus Jackbohnen behandelt. MALDI-TOF-MS-Analyse der HPLC-reinigten Oligosaccharide des Digestats enthüllte 91 mol% Fuc₁GlcNAc₃ und 9% Fuc₁GlcNAc₂.

Massenspektrometrische Charakterisierung von durch Fuc-Ts aus menschlicher Milch erzeugtem Glykan 4

[0060] Ein Aliquot der monofucosyierten N-Acetyl-chitotetraose wurde reduziert und permethyliert und daran wurde ESI-MS durchgeführt. Das doppelt geladene $[M+2Na]^{2+}$ -Ion (m/z 631,6) wurde für MS/MS (**Fig. 3B**) ausgewählt. Der Bereich kleiner Massen im MS/MS-Spektrum ähnelt dem der monofucosyierten N-Acetyl-chitotriose, welches dieselben B₁-Fragmente für die unsubstituierte terminale GlcNAc-Einheit (m/z 282,2, m/z 260,2) und Y₁-Ionen für das GlcNAc-Alditol am reduzierenden Ende (m/z 316,2, m/z 338,2) zeigt. Außerdem verifizieren das Y_{2a}/B₂-Ion (m/z 442,4), das B₃-Ion (m/z 946,8) und das Y_{3a}-Ion (m/z 980,6), dass die Fucoseeinheit an eine der GlcNAc-Einheiten inmitten der Kette gebunden ist. Das Y₂-Ion bei m/z 561,4 zeigt an, dass dieses Disaccharidfragment lediglich einen Monosaccharidsubstituenten trug, und folglich muss die Fucose am vorletzten GlcNAc-Rest sitzen. Dies wird direkt durch das B₂-Ion bei m/z 701,6 bestätigt, das die nicht reduzierende Terminusstruktur GlcNAc β 1-(FUcal)-GlcNAc trägt. Noch nähere Untersuchung der winzigen Fragmente in den MS/MS-Daten enthüllte keine spezifischen Fragmente für andere Pentasaccharidisomere und wir schließen deshalb, dass N-Acetyl-chitotetraose einzig am vorletzten GlcNAc-Rest neben dem nicht reduzierenden Ende fucosiert wird.

NMR-spektroskopische Analyse von durch Fuc-Ts aus menschlicher Milch hergestelltem Glykan 4

[0061] Das 1D 1H-NMR-Spektrum des gereinigten Produkts, Glykan 4 (Tabelle 3) enthüllte Fucose-H1-, -H5- und -H6-Signale, die eher für eine α 3-gebundene Fucose als für α 6-gebundene Fucose in unkonjugierten N-Glykanen (36, 37) charakteristisch sind. Das H4-Signal des distalen GlcNAc6 war vergleichbar zu seinen Analoga in Glykan 3, was bestätigt, dass die Fucose an die vorletzte GlcNAc-Einheit in der Nähe des nicht reduzierenden Endes gebunden ist. Die Protonensignale der Fucose und des GlcNAc6 am nicht reduzierenden Ende wurden aus den DQFCOSY- und TOCSY-Spektren von Glykan 4 zugeordnet. Die 2D NMR-Daten stärken die Auffassung, dass die Elemente am nicht reduzierend Ende von Glykan 4 denen von Glykan 3 ähneln.

[0062] Zusammengefasst bestätigen die NMR-Daten die MS-Ergebnisse und die Abbaudaten, was zeigt, dass auch durch Fuc-Ts aus menschlicher Milch erzeugtes Glykan 4 für GlcNAc β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc stand.

BEISPIEL 3

Durch menschliches FucTV katalysierte Reaktion von N-Acetyl-chitohexaose und GDP-Fucose

[0063] N-Acetyl-chitohexaose (1,0 μ mol, 5 mM) wurde 5 Tage mit GDP-Fucose (1,0 μ mol, 5 mM) und 25 mU Fuc-TV bei Zimmertemperatur fucosiert. MALDI-TOF-MS des gereinigten repräsentativen Gemisches der Produktoligosaccharide zeigte, dass 31% der N-Acetylchitohexaose fucosiert wurde (**Fig. 2B**). Die Produktsaccharide wurde weiter in einem HPAE-Chromatographiedurchlauf isokratisch mit 40 mM NaOH (**Fig. 1B**) gereinigt. Der Peak, der bei 7,09 min eluierte, wurde gesammelt, wurde entsalzt und wurde weiter durch Gelfiltrations-HPLC gereinigt. Das Produktheptasaccharid (195 nmol) zeigte bei der MALDI-TOF-Analyse 96% mo-

nofucosyierte N-Acetyl-chitohexaose, Glykan 6, und 4% N-Acetyl-chitohexaose, **Fig. 2C**. Das 1D 1H-NMR-Spektrum (Tabelle 2) zeigt die H1-Signale in den GlcNAc5-, den GlcNAc6- und den Fucoseeinheiten in Glykan 6, welche nahezu identisch mit ihren Gegenstücken in Glykan 4 sind. Dies legt nahe, dass das Glykan 6 GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc ist. Diese Auffassung wird weiter durch die identischen H4-Signale der distalen GlcNAc6-Einheiten und die Fucose-H5-resonanzen in den zwei Glykanen gestützt. Die Ähnlichkeit dieses letzteren Signalpaars in den zwei Glykanen ist besonders bedeutsam, da von ihnen bekannt ist, dass sie in Glykan 4 (siehe oben) wechselwirken und wahrscheinlich sehr empfindlich für strukturelle Unterschiede sind. Gleichermaßen spricht die Ähnlichkeit der Fucose-H5-signale in Glykan 6 und Glykan 4 für die Identität des nicht reduzierenden Gebiets in diesen drei Sacchariden.

Behandlung von Glykan 6 mit β -Acetylhexosaminidase aus Jackbohnen

[0064] Mit einem durch Fuc-TV erzeugten Gemisch aus Glykan 6 und N-Acetyl-chitohexaose (27 : 73 mol/mol (**Fig. 2B**)) wurde die sanfte Behandlung mit β -N-Acetylhexosaminidase aus Jackbohnen durchgeführt, wie früher beschrieben. Die resultierenden Oligosaccharide wurden als ein repräsentatives Gemisch unter Verwendung von Gelfiltrations-HPLC isoliert.

[0065] MALDI-TOF-MS enthüllte, dass dieses Gemisch aus Fuc $_1$ GlcNAc $_6$ (3,5 mol%), GlcNAc $_6$ (1,7%), Fuc $_1$ GlcNAc $_5$ (40%), Fuc $_1$ GlcNAc $_4$ (3,5%) bestand; kleine N-Acetylchitooligosaccharide im Bereich von N-Acetyl-chitobiose bis N-Acetyl-chitopentaose wurden auch beobachtet (**Fig. 2D**). Das Hauptprodukt des Digestats, die monofucosierte N-Acetyl-chitopentaose, Glykan 5, wurde in einem Gelfiltrations-HPLC-durchlauf gereinigt. MALDI-TOF-MS legte nahe, dass Glykan 5 hierbei in einer Reinheit von 83% erhalten wurde; es war mit mehreren Penta- und Hexasacchariden verunreinigt. Die chemischen Verschiebungen werden in Tabelle 2 aufgeführt. Die NMR-Daten zeigen nahezu identische H1-Signale in den GlcNAc5-, den GlcNAc6- und den Fucoseeinheiten in Glykan 5 und Glykan 4, was nahe legt, dass die Struktur des ersten GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc ist. Diese Auffassung wird weiter durch die identischen H4-Signale der distalen GlcNAc6-Einheiten und die Fucose-H6-resonanzen in den zwei Glykanen gestützt. Somit hatte die sanfte Behandlung mit β -N-Acetylhexosaminidase aus Jackbohnen überraschenderweise eine GlcNAc-Einheit vom reduzierenden Ende von Glykan 6 freigesetzt, hatte aber das reduzierende Ende des Produkts, Glykan 5, nicht so wirksam angegriffen.

Behandlungen von gereinigtem Glykan 6 und Glykan 4 mit der endo-Chitinaseaktivität von β -N-Acetylhexosaminidase aus Jackbohnen

[0066] Als mit dem gereinigten, durch Fuc-TV erzeugten Glykan 6 die sanfte Behandlung mit β -N-Acetylhexosaminidase aus Jackbohnen durchgeführt wurde, zeigte das resultierende Digestat bei der MALDI-TOF-MS lediglich 5 mol% intaktes Substrat; 85% des Materials war in Fuc $_1$ GlcNAc $_5$ und 11% in Fuc $_1$ GlcNAc $_4$ (**Fig. 2E**) umgewandelt worden. Die Daten bestätigen, dass die endo-Chitinase Glykan 6 schnell spaltet, wobei hauptsächlich eine GlcNAc-Einheit vom reduzierenden Ende freigesetzt wird, und das Enzym kann auch in der Lage sein, eine N-Acetyl-chitobioseeinheit vom reduzierenden Ende von Glykan 6 abzuspalten, wodurch Glykan 4 erzeugt wird. Alternativ kann Glykan 4 durch Freisetzung einer GlcNAc-Einheit vom reduzierenden Ende von Fuc $_1$ GlcNAc $_5$ gebildet werden.

[0067] Als mit dem gereinigten, durch Fuc-TV erzeugten Glykan 4 die sanfte Behandlung mit β -N-Acetylhexosaminidase aus Jackbohnen durchgeführt wurde, zeigte das resultierende Digestat bei MALDI-TOF-MS, dass das meiste (91 mol%) Substrat überlebt hatte und lediglich 6% Fuc $_1$ GlcNAc $_3$ gebildet worden waren; 3% des Materials fand sich als Fucose-freie N-Acetylchitotetraose (**Fig. 2F**). Folglich schien die endo-Chitinaseaktivität langsam eine GlcNAc-Einheit vom reduzierenden Ende von Glykan 4 abzuspalten.

BEISPIEL 4

Fucosylierung von Cellobiose

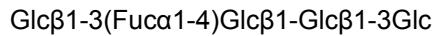
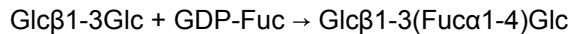
[0068] Cellobiose (4000 nmol, 20 mM, von Thomas Kerfoot and Co. Ltd.) wurde mit GDP-[¹⁴C]Fuc (1000 nmol, 5 mM, 100 000 cpm) und rekombinanter Fucosyltransferase V (25 mU, 50 ml kommerzielles Enzympräparat von Calbiochem) in 50 mM MOPS-NaOH, pH-Wert 7,5, das 8 mM MnCl $_2$, 100 mM NaCl, 1 mg/ml BSA und 0,02% NaN $_3$ enthielt, im Gesamtvolumen von 200 ml 4 Tage und 16 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden mittels Durchlaufen durch 1,5 ml Lagen von Dowex AG 1-X8 und Dowex AG 50W-X8 entsalzt. Ein Teil der Produkte wurde in Papierchromatographie laufen gelassen, was ein trisac-

charidartiges Produkt, das ähnlich wie Maltotriose ($R_{\text{maltotriose}} = 0,97$ Markierung, Glycerin in der Probe kann die Wanderung beeinflussen) wanderte, und ein breites Signal (verbreitert durch Glycerin in der Probe), das wahrscheinlich freiem [^{14}C]Fuc entspricht, zeigte. Lösungsmittel A wurde verwendet, wie in (38) beschrieben, wobei die obere Phase von n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 5, Vol./Vol., Lösungsmittel A) verwendet wurde, und die Szintillation wurde an kleinen Papierstreifen gezählt. Der Hauptteil (75%) der Produkte wurde in einer Gelfiltrationschromatographie in einer Biogel P-2 (Biorad) Säule laufen gelassen. Es wurden ein Peak von radioaktiven Produkten (256 nmol nach der Radioaktivität, berechnete Gesamtausbeute 340 nmol), der an der Position eluierte, die für monofucosyierte Cellobiose erwartet wird, und ein anderer radioaktiver Peak, der [^{14}C]Fucartiges Material enthält, erhalten. An den Fraktionen in der ersten Hälfte des Produktpeaks wurde analysiert, dass sie Saccharid mit einer Größe enthielten, die fucosylierter Cellobiose bei der MALDI-TOF-Massenspektrometrie, monoisotopem m/z [M+Na]⁺ nahe bei 511,2 und m/z [M+K]⁺ nahe bei 527,2, entsprachen, die Fraktionen enthielten sehr geringe Mengen oder keine anderen möglichen Saccharide, wie Cellobiose oder Cellotriose. Die gesammelten Saccharide (150 nmol nach Radioaktivität) wurden durch NMR-Spektroskopie analysiert. NMR-Spektroskopie enthüllte Signale von Fuc-H1 α bei 5,425 ppm, Fuc-H1 β bei 5,369 ppm und Signale des reduzierenden Glc-H1 α bei 5,189 ppm und Glc-H1 β bei 4,655 ppm in ähnlicher Weise, wie für -Gal β -4(Fuc α 1-3)Glc beschrieben (39).

[0069] Ein Produkt (< 0,5 pmol), das bei der Papierchromatographie ($R_{\text{maltotriose}}=1.04$) ähnlich wanderte, kann durch 1 Stunde Inkubieren von Lysat (40 mg Protein) von CHO-Zellen, die Fuc-TV in voller Länge exprimieren, mit GDP-[^{14}C]Fuc (1 nmol, 100 000 cpm) und 100 nmol Cellobiose, wie in (40) beschrieben, erhalten werden.

BEISPIEL 5

[0070] Reaktionen mit Laminaribiose und Laminaritetrose



[0071] Laminaribiose (1000 nmol, 5 mM, Seikagaku) und Laminaritetrose (1000 nmol, 5 mM, Seikagaku) wurden mit GDP-[^{14}C]Fuc (1000 nmol, 5 mM, 100 000 cpm) und rekombinanter Fucosyltransferase V (25 mU, 50 ml kommerzielles Enzympräparat von Calbiochem) wie oben umgesetzt. Die Produkte beider Reaktionen wurden wie oben entsalzt. Die Produkte aus Laminaribiose wurden durch P-2-Gelfiltrationschromatographie gereinigt und ein radioaktives trisaccharidartiges Produkt wurde erhalten.

[0072] Die entsalzten Produkte aus Laminaritetrose wurden auch durch P-2-Gelfiltrationschromatographie gereinigt und ein radioaktiver (174 nmol nach Radioaktivität) Peak, der wie erwartet ein Pentasaccharidprodukt eluierte, wurde erhalten. 131 nmol Produkt mit monoisotopem m/z [M+Na]⁺ nahe (Unterschied kleiner als 0,1%) bei 835,3 und m/z [M+K]⁺ nahe bei 851,3 wurden aus den Vor- und Mittelfraktionen des Peaks gesammelt, die Fraktionen enthielten weniger als 4% Akzeptor, keine weiteren Saccharidprodukte wurden bei der Analyse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie beobachtet. Die gereinigten Produktsaccharide wurden mit NMR-Spektroskopie analysiert.

BEISPIEL 6

Desulfatisierung, Reduktion und Fucosylierung von Chondroitinsulfat

[0073] Chondroitinsulfat (Haiknorpel, Sigma) wurde durch Hyaluronidase (Rinderhoden, Sigma; Chondroitinsulfate können auch mit Chondroitinasen gespalten werden, wobei sich Oligosaccharide mit delta-Uronsäure am nicht reduzierenden Ende ergeben) zu sulfatierten Oligosacchariden, wie [$\text{GlcA}\beta 1\text{-}3(\text{sulf-6})\text{GalNAc}\beta 1\text{-}4\text{nGlcA}\beta 1\text{-}3(\text{sulf-6})\text{GalNAc}$, gespalten. Fraktionen, die tetrasaccharidartige Materialien enthielten, wurden im Wesentlichen wie in (41) beschrieben, gereinigt und desulfatiert. Tetrasaccharid- und Hexasaccharidfraktionen wurden durch Gelfiltrations- und Anionenaustauschchromatographie gereinigt.

Ähnliche Oligosaccharide wurden auch hergestellt, indem zuerst desulfatiert und dann durch Hyaluronidase gespalten und die Produkte gereinigt wurden. Die GlcA-Reste des Tetrasaccharids wurden mit EDAC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) und NaBH₄ zu Glc reduziert. Das reduzierte Tetrasaccharid Glc β 1-3Ga1NAc β 1-4Glc β 1-3GalNAcol wurde gereinigt und unter Verwendung von GDP-Fuc und Fucosyltransferase(n) aus menschlicher Milch fucosyliert. Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie enthüllte Peaks bei m/z 919,8 und m/z 935,8, die dem Produkt Glc β 1-3GalNAc β 1-4(Fuc α 1-3)Glc β 1-3GalNAcol (ber. m/z [M+Na]⁺ 919,7 und m/z [M+K]⁺ 935,7) entsprechen.

BEISPIEL 7

[0074] GlcNAcyl β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc, in dem Acyl für trans-9-Octadecenoyl steht, wobei die Synthese des Akzeptors in (13) beschrieben ist, kann mit Fuc-TVI und MnCl₂ unter den oben für Fuc-TVI beschriebenen Bedingungen inkubiert werden, aber Akzeptorkonzentrationen zwischen 0,1 und 0,5 mM werden bevorzugt. Das Produkt GlcNAcyl β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc wird chromatographisch gereinigt und mit NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie analysiert.

BEISPIEL 8

[0075] N-Acetyl-chitotetraose kann mit menschlichem Fuc-TVI und MnCl₂ unter den oben für Fuc-TVI beschriebenen Bedingungen inkubiert werden. Das Produkt GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc kann in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten und mit HPAE-Chromatographie gereinigt werden. Die NMR-Daten und Massenspektrometriedaten des Produkts sind mit der durch Fuc-TV erhaltenen, fucosylierten N-Acetyl-chitotetraose praktisch identisch.

Tabelle 1

[0076] Strukturen der fucosylierten N-Acetyl-chito-oligosaccharide in der vorliegenden Untersuchung. GN steht für GlcNAc und Fuc steht für L-fucose, die Linie – zeigt eine β 1-4-Bindung an und die Linie / ist eine α 1-3-Bindung, wobei die Reste kursiv nummeriert sind.

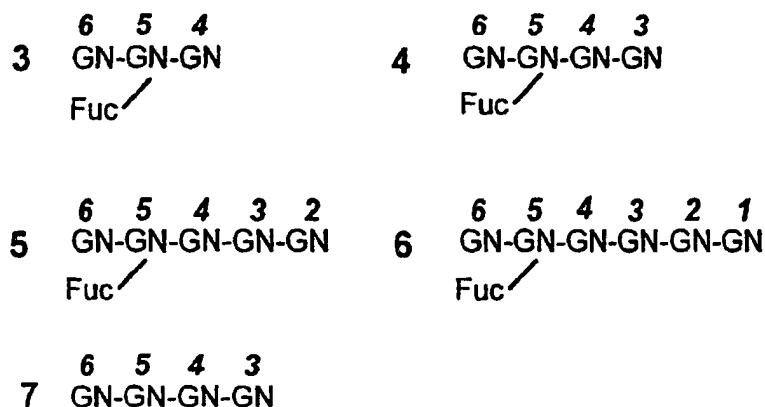


Tabelle 2

[0077] ¹H-Chemische Verschiebungen (ppm) der Strukturanzigegruppen für die Glykane 3 bis 7 bei 23°C.
n.b. = nicht bestimmt

Protonen-rest		Glykane				
		3	4	5	6	7
H1	I	-	-	-	5,181(α)/4,688(β)	-
	2	-	-	5,182(α)/4,688(β) 4,578/4,565 ^a	-	
	3	-	5,184(α)/4,689(β) 4,579/4,567 ^a	4,565	5,185(α)/4,689(β)	
	4	5,185(α)/4,688(β) 4,579/4,570 ^a	4,567	4,565	4,58	
	5	4,580/4,571 ^a	4,570	4,567	4,565	4,58
	6	4,522	4,519	4,517	4,516	4,58
	Fucose	5,124	5,119	5,117	5,116	-
H4	6	3,238	3,237	3,236	3,235	n.b.
H5	Fucose	4,764	4,762	4,762	4,758	-
CH3	Fucose	1,268	1,267	1,265	1,264	-

^a Die angegebenen zwei chemischen Verschiebungswerte stammen von Signalen, die für die α- bzw. β-Pyranoseformen der Oligosaccharide stehen.

Tabelle 3

[0078] NMR-Daten von Glykan 4.

Proton	GlcNAc6	Fucose
H1	4,519	5,119
H2	3,735	3,707
H3	3,535	3,938
H4	3,237	3,803
H5	3,428	4,762
H6	3,607	-
H6'	3,963	-
CH3	-	1,267

Literatur

- [0079] 1. D. S. Johnston, W. W. Wright, J. H. Shaper, C. H. Hokke, D. H. Van den Eijnden und D. H. Joziasse, (1998) J. Biol. Chem. 273(4), 1888–1895
- [0080] 2. H. C. Gooi, T. Feizi, A. Kapadia, B. B. Knowles, D. Solter und M. J. Evans, (1981) Nature 292, 156–158
- [0081] 3. J. Dodd und T. M. Jessel, (1986) J. Exp. Med. 124, 225–238
- [0082] 4. M. Oudega, E. Marani und R. T. W. M. Thomeer, (1992) Histochem. J. 24, 869–877
- [0083] 5. E. C. Butcher und L. J. Picker, (1996) Science 272, 60–66
- [0084] 6. R. P. McEver, (1997) Glycoconjugate J. 14, 585–591
- [0085] 7. S. Natsuka, K. M. Gersten, K. Zenita, R. Kannagi und J. B. Lowe, (1994) J. Biol. Chem. 269, 16789–16794
- [0086] 8. M. R. Edbrooke, C. J. Britten, V. A. M. Kelly, S. L. Martin, N. Smithers, A. J. Winder, S. J. Witham und M. I. Bird, (1997) Biochem. Soc. Transact. 25, 880–887
- [0087] 9. M. Kaneko, T. Kudo, H. Iwasaki, Y. Ikebara, S. Nishihara, S. Nakagawa, K. Sasaki, T. Shiina, H. Inoko, N. Saitou und H. Narimatsu, (1999) FEBS Lett. 452, 237–242
- [0088] 10. A. A. Bergwerff, J. A. van Kuik, W. E. C. M. Schiphorst, C. A. M. Koeleman, D. H. van den Eijnden,

J. P. Kamerling und J. F. G. Vliegenthart, (1993) FEBS Lett. 334, 133–138

- [0089] 11. H. Bakker, P. S. Scoebnakers, C. A. M. Koeleman, D. H. Joziasse, I. van Die und D. H. van den Ejnden, (1997) Glycobiology 7, 53–548
- [0090] 12. S. M. Haslam, G. C. Coles, E. A. Munn, T. S. Smith, H. F. Smith, H. R. Morris und A. Dell, (1996) J. Biol. Chem., 271, 30561–30570
- [0091] 13. H. Rohrig, J. Schmidt, R. Walden, I. Czaja, E. Miklasevics, U. Wieneke, J. Schell und M. John, (1995) Science 269, 841–843
- [0092] 14. R. Niemelä, J. Natunen, L. Penttilä, H. Salminen, J. Helin, H. Maaheimo, C. E. Costello und O. Renkonen, (1999) Glycobiology 9, 517–526
- [0093] 15. I. B. H. Wilson, J. E. Harthill, N. P. Mullin, D. A. Ashford und F. Altman, (1998) Glycobiology 8, 651–661
- [0094] 16. P. P. Wilkins, R. P. McEver und R. D. Cummings, (1996) J. Biol. Chem. 271, 18732–18742
- [0095] 17. A. Varki, (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 7390–7397
- [0096] 18. E. Larsen, T. Palabrica, S. Sajer, G. E. Gilbert, D. D. Wagner, B. C. Furie und B. Furie, (1990) Cell 63, 467–474
- [0097] 19. M. R. Stroud, K. Handa, M. E. K. Salyan, K. Ito, S. B. Levery, S. Hakomori, B. B. Reinhold und V. N. Reinhold, (1996) Biochemistry 35, 770–778
- [0098] 20. R. K. Jain, C. F. Piskorz, B.-G. Huang, R. D. Locke, H.-L. Han, A. Koenig, A. Varki und K. L. Matta, (1998) Glycobiology 8(7), 707–717
- [0099] 21. B. W. Grinnell, R. B. Hermann und S. B. Yan, (1994) Glycobiology 4(2), 221–225
- [0100] 22. J. Natunen, R. Niemelä, L. Penttilä, A. Seppo, T. Ruohutula und O. Renkonen, (1994) Glycobiology 4, 577–583
- [0101] 23. S. Eppenberger-Castori, H. Lötscher und J. Finne, (1989) Glycoconjugate J. 6, 101–114
- [0102] 24. M. M. Palcic, A. P. Venot, R. M. Ratcliffe und O. Hindsgaul, (1989) Carbohydr. Res. 190, 1–11
- [0103] 25. O. Renkonen, J. Helin, L. Penttilä, H. Maaheimo, R. Niemelä, A. Leppänen, A. Seppo und K. Hard, (1991) Glycoconjugate J. 8, 361–367
- [0104] 26. M.-L. Rasilo und O. Renkonen, (1982) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 89–93
- [0105] 27. K. Hård, G. van Zadelhoff P. Moonen, J. P. Kamerling und J. F. G. Vliegenthart, (1992) Eur. J. Biochem. 209, 895–915
- [0106] 28. D. Marion und K. Wüthrich, (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 117, 967–974
- [0107] 29. A. Bax und D. G. Davis, (1985) J. Magn. Reson. 65, 355–360
- [0108] 30. G. Xu und J. S. Evans, (1966) J. Magn. Reson., Ser. B 111, 183–185
- [0109] 31. A. A. Bothner-By, R. L. Stephens, J. Lee, C. D. Warren und R. W. Jeanloz, (1984) J. Am. Chem. Soc. 106, 811–813
- [0110] 32. A. Bax und D. G. Davis, (1985) J. Magn. Reson. 63, 207–213
- [0111] 33. D. M. Doddrell, D. T. Pegg und M. R. Bendall, (1982) J. Magn. Reson. 48, 323–327

[0112] 34. L. E. Kay, P. Keifer und T. Saarinen, (1992) J. Am. Chem. Soc. 114, 10663–10665

[0113] 35. S. S. Wijmenga, (1989) J. Magn. Res. 84, 634–642

[0114] 36. S. Lhernould, Y. Karamanos, S. Bourgerie, G. Strecker, R. Julien und H. Morvan, (1992) Glycoconjugate J. 9, 191–197

[0115] 37. C. W. Lawrence, P. A. Little, B. W. Little, J. Glushka, H. van Halbeek und J. A. Alhadeff (1993) Glycobiology 3(3), 249–259

[0116] 38. O. Renkonen, L. Penttilä, A. Makkonen, R. Niemelä, A. Leppänen, J. Helin und A. Vainio, (1989) Glycoconjugate J., 6, 129–140.

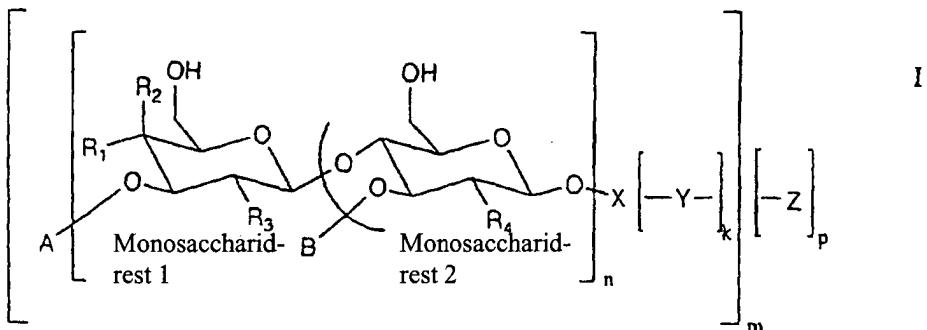
[0117] 39. T. de Vries, C. A. Srnka, M. M. Palcic, S. J. Swiedler, D. H. van den Ejnden und B. A. Macher, (1995) J. Biol. Chem. 270, 8712–8722

[0118] 40. R. Niemelä, J. Natunen, M. L. Majuri, H. Maaheimo, I. Helin, J. B. Lowe, O. Renkonen und R. Renkonen, (1998) J. Biol. Chem., 273, 4021–4026.

[0119] 41. K. Nagasawa, Y. Inoue und T. Kamata, (1977) Carbohydrate Res., 58, 47–55.

Patentansprüche

1. Oligosaccharide, die folgende Formel haben



wobei A die Bedeutung H hat oder ein glykosidisch β 1-3-gebundener D-Glucopyranosyl-Rest (Glc β 1-3) ist, R₁ die Bedeutung OH hat, R₂ die Bedeutung H hat und R₃ die Bedeutung OH hat oder Acylamido -NH-Acyl ist (d. h. Monosaccharid 1 ist Glc oder GlcNAcyl) oder R₁ die Bedeutung H hat, R₂ die Bedeutung OH hat und R₃ Acetamido -NHCOCH₃ ist (d. h. Monosaccharid 1 ist GalNAc), B die Bedeutung H hat oder ein α -L-Fucosyl oder ein α -L-Fucosyl-Analogon ist und R₄ die Bedeutung OH hat oder Acetamido -NHCOCH₃ ist (d. h. Monosaccharid 2 ist optional fucosyliertes Glc oder GlcNAc), wobei die gekrümmte Linie zwischen den Saccharid-Einheiten anzeigt, dass das Monosaccharid 1 an das Monosaccharid 2 β 1-4-gebunden ist, wenn B an die Position 3 des Monosaccharids 2 gebunden ist, und das Monosaccharid 1 an das Monosaccharid 2 β 1-3-gebunden ist, wenn B an die Position 4 des Monosaccharids 2 gebunden ist, das Monosaccharid 1 nur dann GalNAc ist, wenn das Monosaccharid 2 Glc ist, n gleich 1 bis 100 ist, mit der Maßgabe, dass immer mindestens ein α -Fucosyl oder eine α -Fucosyl-Analogengruppe in dem Molekül vorhanden ist, und

i) p und k gleich 0 sind und m gleich 1 ist, wobei in diesem Fall X die Bedeutung H hat oder ein Aglykon-Rest oder ein Monosaccharid, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Glc, GlcNAc, Gal oder GalNAc, optional in reduzierter Form, ist oder ein Oligosaccharid ist, das eine oder mehrere der erwähnten Monosaccharideinheiten enthält, wobei das Monosaccharid 2 mit dem Saccharid X β 1-2-, β 1-3-, β 1-4- oder β 1-6 gebunden ist, mit der Maßgabe, dass X nicht H ist, wenn beide Monosaccharide 1 und 2 GlcNAc sind, B die Bedeutung L-Fucosyl hat und n gleich 1 ist, oder

ii) p gleich 1 ist, k gleich 0 oder 1 ist und 15 m ≤ 1000, wobei in diesem Fall X eine gerade Bindung oder ein Mono- oder Oligosaccharid wie unter i) definiert ist, Y ein Spacer oder eine Bindungsgruppe ist, die in der Lage ist, das Saccharid 2 oder X an Z zu binden, und Z ein mono- oder polyvalentes Trägermolekül ist, ausgewählt aus Polymeren, Polysacchariden, Peptiden und Proteinen.

2. Oligosaccharide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass B die Bedeutung α -L-Fucosyl hat.

3. Oligosaccharide nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass A und/oder X die Bedeutung H

haben/hat.

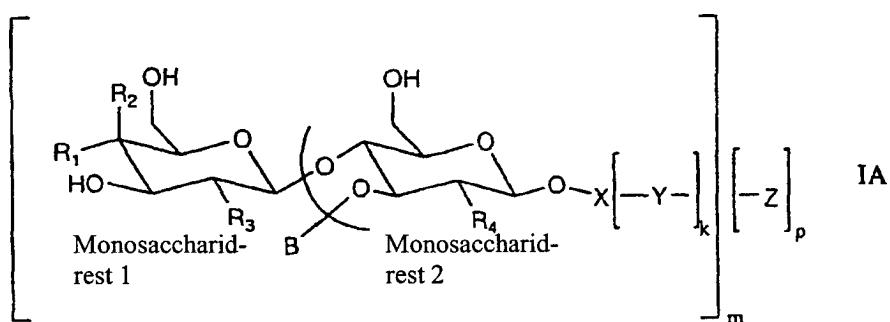
4. Oligosaccharide nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Monosaccharid 1 Glc oder GlcNAc ist.

5. Oligosaccharide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass X ein Oligosaccharid ist, das 2 bis 10 Monosaccharideinheiten enthält, wobei die Monosaccharideinheiten glucosidisch β 1-4- oder β 1-3-gebundene Glc- oder GlcNAc-Reste sind.

6. Oligosaccharide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass m gleich 1 bis 100 ist, vorzugsweise 1 bis 10, und n gleich 1 bis 10 ist.

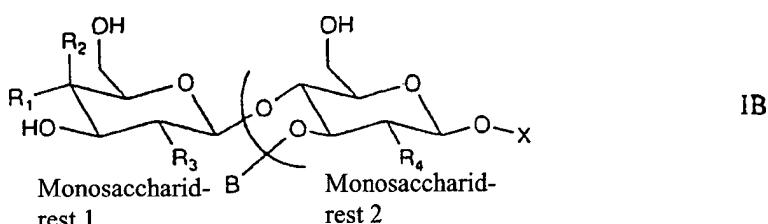
7. Oligosaccharide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass X eine Aglycongruppe ist, ausgewählt aus einer niederen Alkyl- oder Alkenylgruppe mit 1 bis 7 beziehungsweise 2 bis 7 Kohlenstoffatomen oder einer Phenyl- oder Benzylgruppe oder 4-Methylumbelliferyl.

8. Oligosaccharide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie folgende Formel haben



wobei die Symbole die Bedeutungen haben, die ihnen im Zusammenhang mit der Formel I in Anspruch 1 zugeschieden wurden, die Monosaccharide 1 und 2 vorzugsweise unabhängig voneinander Glc und GlcNAc sind, B die Bedeutung L-Fucosyl hat und X die Bedeutung Glc oder GlcNAc hat oder ein β 1-3- oder β 1-4-gebundenes Oligomer ist, das bis zu 10 Einheiten Glc und/oder GlcNAc umfasst.

9. Oligosaccharide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass A die Bedeutung H hat und die Monosaccharide 1 und 2 unabhängig voneinander Glc oder GlcNAc sind, B die Bedeutung L-Fucosyl hat, p, k = 0 und n = m = 1 und X die Bedeutung Glc oder GlcNAc hat oder ein β 1-3- oder β 1-4-gebundenes Oligomer ist, das bis zu 10 Einheiten Glc und/oder GlcNAc umfasst und die folgende Formel hat



10. Oligosaccharide nach Anspruch 1 mit der Formel

$\text{Glc/GlcNAc}\beta 1-4(\text{Fuc}\beta 1-3)\text{Glc/GlcNAc}(\beta 1-4\text{Glc/GlcNAc})_n$.

wobei n' eine ganze Zahl von 1 bis 8, vorzugsweise 1 bis 6, ist.

11. Oligosaccharide nach Anspruch 1 mit der Formel

$\text{GlcNAc}\beta 1-4(\text{Fuca}1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-4\text{GlcNAc})_n$.

wobei n' die obige Bedeutung hat und Acyl eine Alkanoylgruppe ist, die vorzugsweise 8 bis 24 Kohlenstoffatome und 1 bis 3 Doppelbindungen enthält.

12. Oligosaccharide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass $1 \leq n \leq 1000$, der Monosaccharidrest 1 GlcNAc oder GalNAc ist und der Monosaccharidrest 2 optional fucosyliertes Glc ist, wie die Verbindung

Glc β 1-(-3GalNAc/GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-3/H)Glc β 1-),_n-3GalNAcol/GlcNAcol

13. Verfahren zur Herstellung der Oligosaccharide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Verbindung der Formel I, wobei B immer H ist, in Gegenwart eines Fucosyltransferaseenzyms mit Donator-Nucleotidzucker fucosyliert wird, der L-Fucose oder ein Analogon davon enthält, und das so hergestellte fucosyierte Saccharid optional zurückgewonnen wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Fucosyltransferase eine von Säugern gewonnene α 1-3- oder α 1-3/4-Fucosyltransferase ist.

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass ein N-Acetylchitooligosaccharid als Ausgangsmaterial verwendet wird.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Donator-Nucleotidzucker, der L-Fucose enthält, GDP-L-Fucose ist.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16; dadurch gekennzeichnet, dass die Fucosyltransferase eine vom Menschen gewonnene α 1-3-Fucosyltransferase oder α 1-3/4-Fucosyltransferase III-VII, IX oder α 1-3/ α 1-3/4-Fucosyltransferase aus menschlicher Milch ist.

18. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass es den weiteren Schritt der Reaktion des nach der Formel I gewonnenen Produkts mit β -N-Acetylhexosaminidase umfasst.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

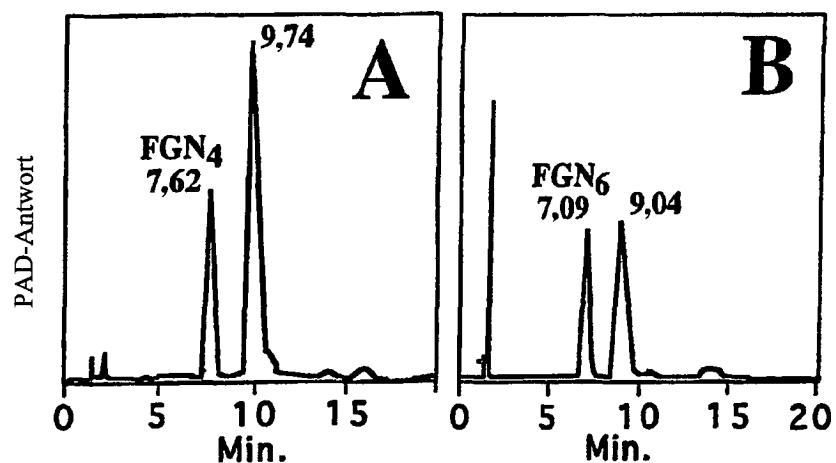


Fig. 1

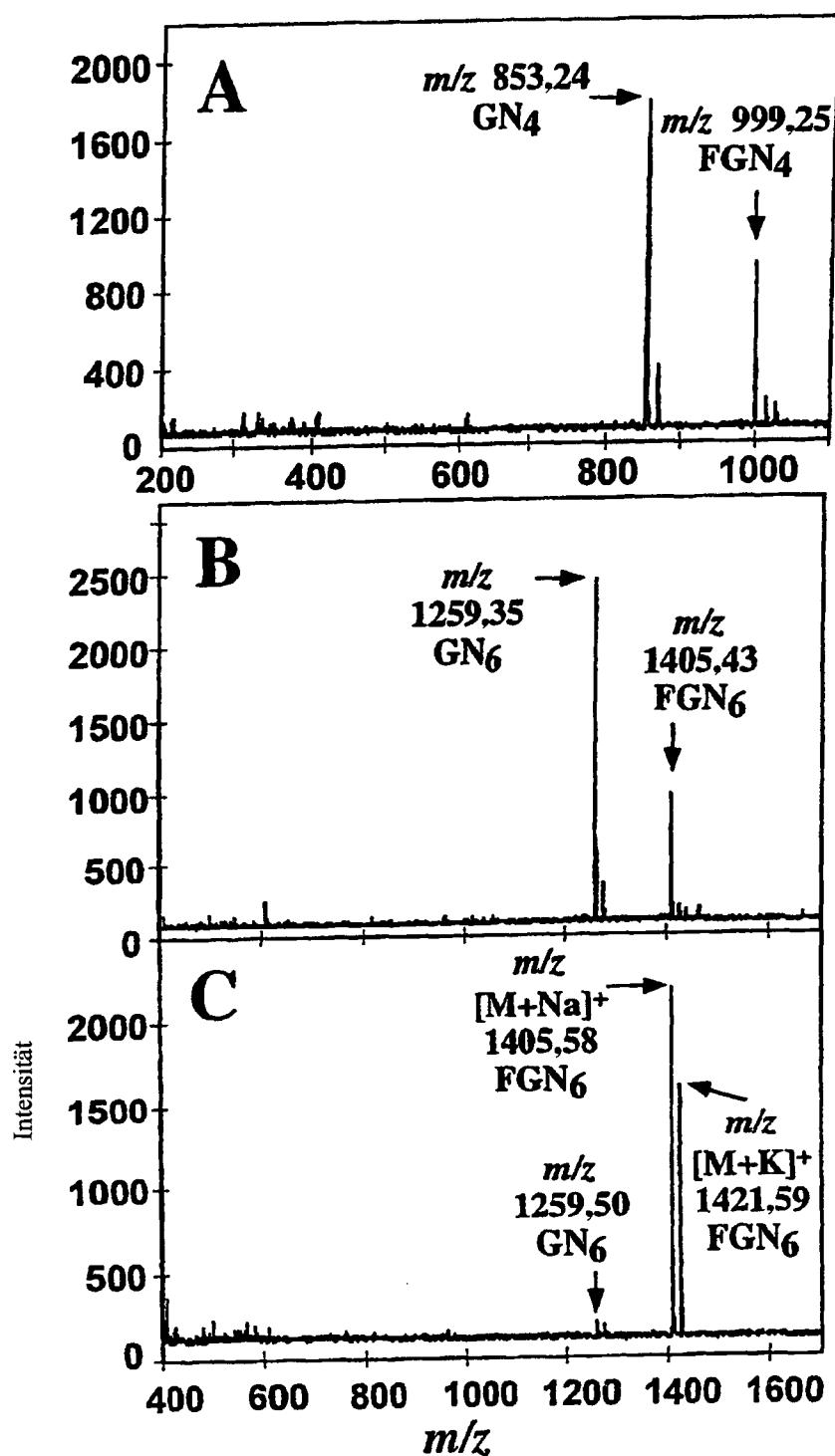


Fig. 2

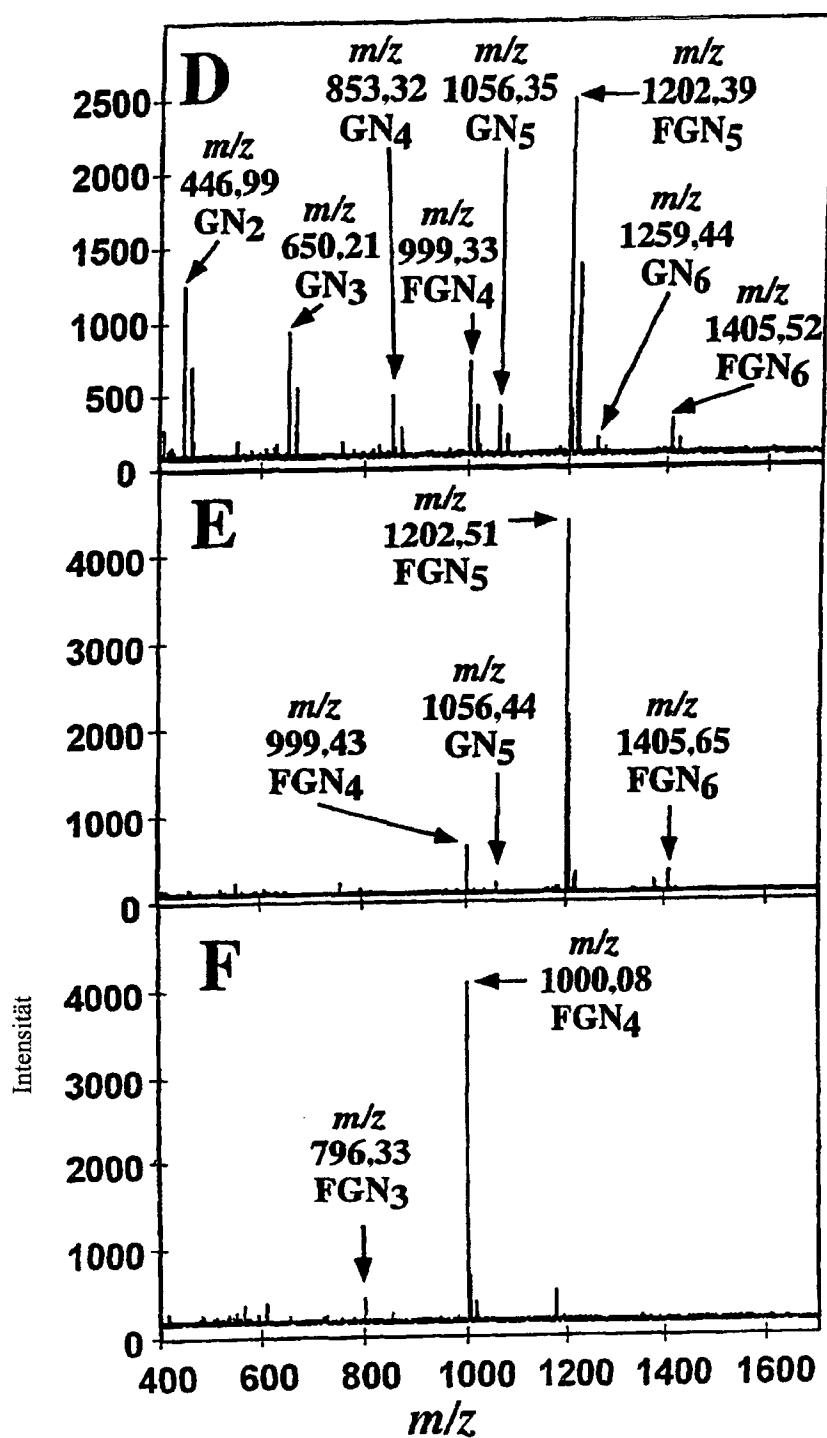


Fig. 2 (Fortsetzung)

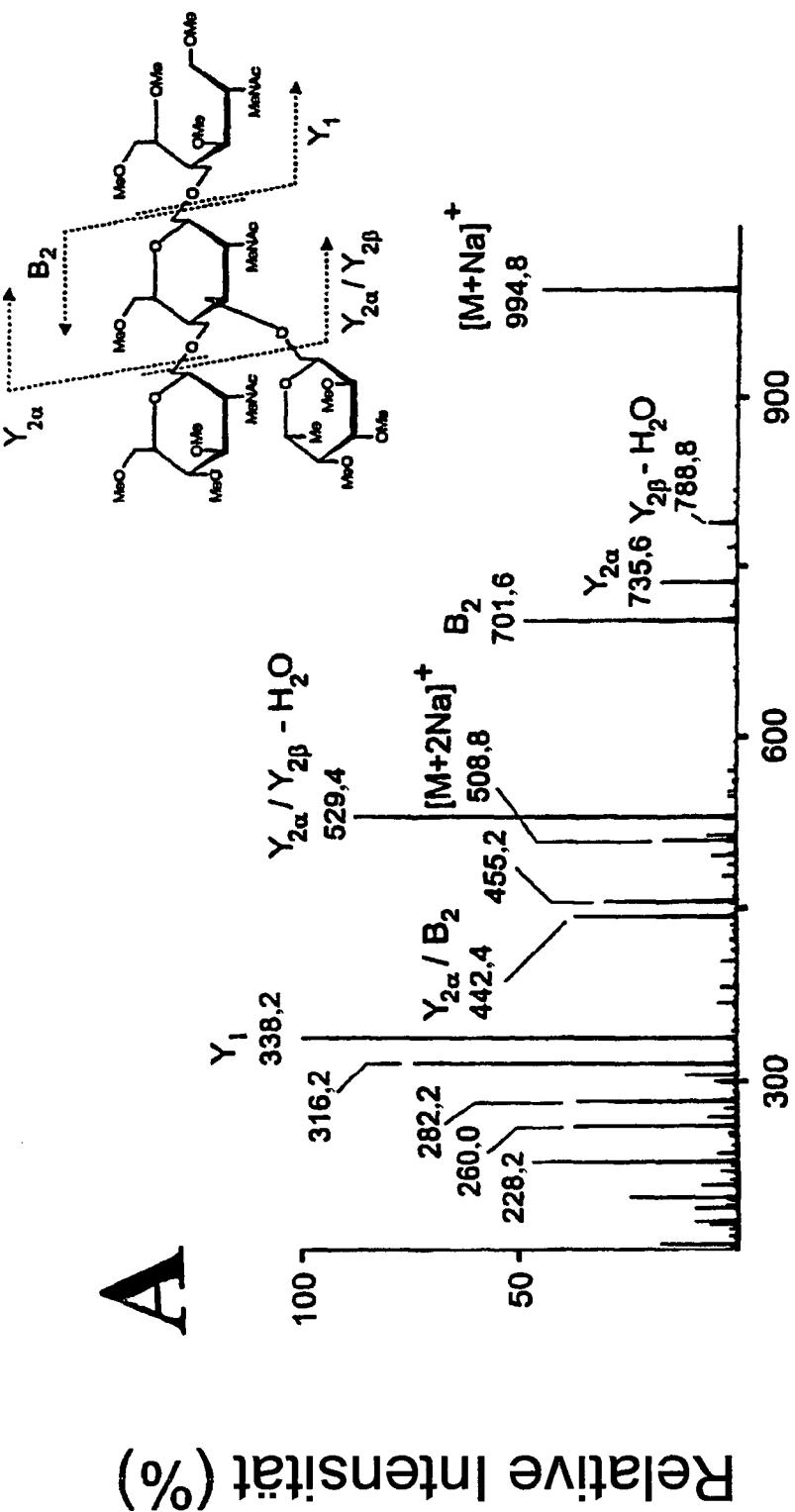


Fig. 3

Relative Intensität (%)

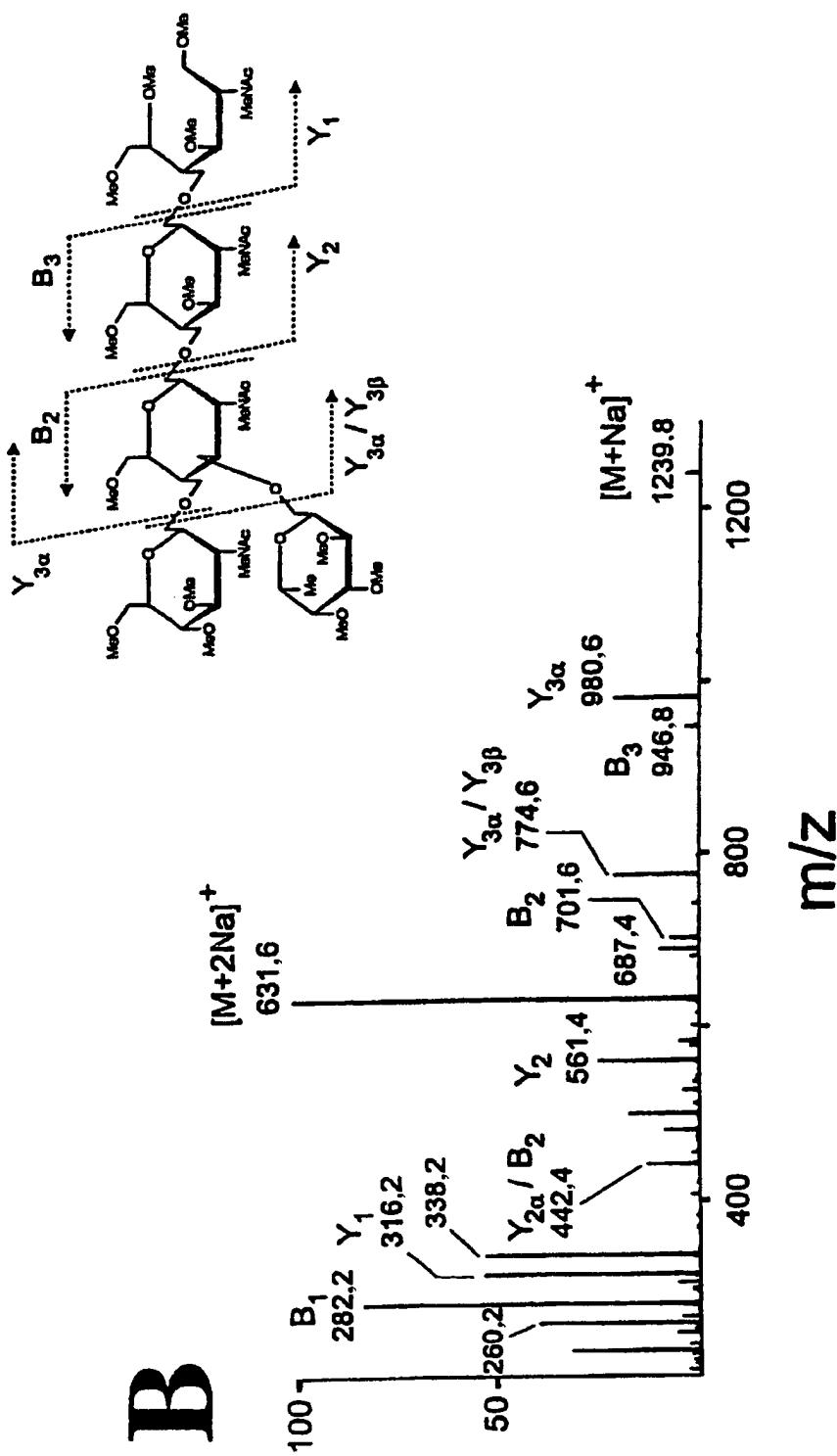


Fig. 3 (Fortsetzung)