



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103257223 B

(45) 授权公告日 2015.04.01

(21) 申请号 201310127407.6

审查员 肖吉

(22) 申请日 2007.08.06

(30) 优先权数据

2006-217165 2006.08.09 JP

(62) 分案原申请数据

200780029447.X 2007.08.06

(73) 专利权人 住友电木株式会社

地址 日本东京都

专利权人 国立大学法人北海道大学

(72) 发明人 岛冈秀行 西村绅一郎 篠原康郎

三浦嘉晃 古川润一

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

代理人 邹宗亮 吴小瑛

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

C07C 233/20(2006.01)

C07C 281/02(2006.01)

C08F 8/30(2006.01)

权利要求书1页 说明书39页 附图6页

(54) 发明名称

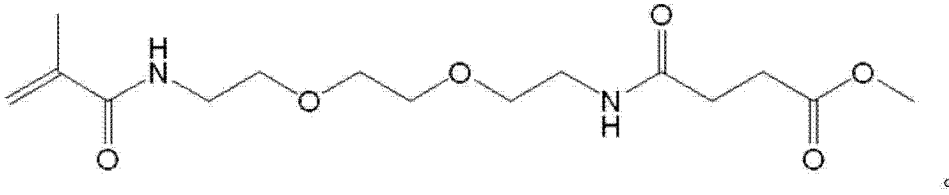
糖链捕获物及其用途

(57) 摘要

本发明提供了样品的制备方法,其特征是通过在物质A的酰肼基团与糖链和/或糖衍生物的还原末端之间形成腙,使包含酰肼基团的物质A与糖链和/或糖衍生物相结合,从而通过简单的操作从包含糖链和/或糖衍生物的生物样品中分离和纯化糖链和/或糖衍生物以获得分析样品。

1. 具有下式 (11) 所示结构的单体,

(式 11)



2. 通过聚合权利要求 1 所述的单体获得的聚合物。
3. 通过用浓度不小于 10 体积%的肼溶液处理权利要求 2 的所述聚合物使在所述聚合物的侧链末端处引入酰肼基团而获得的聚合物。

## 糖链捕获物及其用途

[0001] 本申请是申请日为 2007 年 8 月 6 日,申请号为 :200780029447. X,名称为 :“糖链捕获物及其用途”的发明专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及使用指定糖链捕获物制备样品的方法以及通过所述方法获得的分析样品。本发明涉及糖链捕获物的制备方法、所述方法中使用的化合物、以及通过聚合所述化合物获得的聚合物。此外,本发明还涉及所述糖链捕获物的应用,例如,所述糖链捕获物的应用方法、糖链微阵列 (sugar chain microarray)、所述糖链微阵列的应用、糖链亲和珠以及所述糖链亲和珠的应用。

### 背景技术

[0003] 生物聚合物是指一般概念上的糖链、糖蛋白、糖肽、肽、寡肽、蛋白质、核酸或脂质等。

[0004] 此外,这些生物聚合物在例如医学、细胞工程和器官和医学工程等的生物技术领域中起重要作用。阐明使用这些物质的生物反应的控制机理涉及到生物技术领域的发展。

[0005] 在这些生物聚合物中,糖链的多样性极为丰富,并且是参与天然存在生物体的多种功能的物质。在很多情况下,糖链在体内作为与蛋白质或脂质等相结合的糖偶联物存在,且是体内重要组分之一。现已确定体内的糖链与细胞间信息的传递和蛋白质功能或相互作用的调控等密切相关。

[0006] 此外,术语“糖链”是通过糖苷键与单糖(例如,葡萄糖、半乳糖、甘露糖、海藻糖、木糖、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺或唾液酸等)及其衍生物偶联的分子链的通称。

[0007] 具有糖链的生物聚合物的实例包括植物细胞的细胞壁中对细胞稳定性起作用的蛋白聚糖,影响细胞分化、群增长、粘附或迁移等的糖脂和参与细胞内相互作用或细胞识别的糖蛋白等。包含在这些生物聚合物中的糖链在控制高精度生物反应中的机理,及其与生物聚合物间功能上的相互辅助、放大、调节或妨碍的机理已逐渐明确。此外,在这些糖链与细胞分化、群增长、细胞粘附、免疫性和细胞中的恶性变化(癌化)的关系逐渐明确的情况下,预期新的研发计划能够通过这些糖链工程与医学科学、细胞工程或组织和医学工程间的密切关系得到部署。

[0008] 在专利文件 1 中,公开了能够与此类糖链发生特异性反应的物质,以及使用所述物质分离糖链的方法。

[0009] 专利文件 1 :国际公布小册第 2004/058687 号

### 发明内容

[0010] 此外,在专利文件 1 中描述了采用三氟乙酸或酸性树脂等通过酸处理从糖链捕获物中释放(切割)利用糖链捕

[0011] 获物捕获的糖链的方法。将糖链暴露在如此苛刻的条件下会导致糖链的降解,例

如导致生物样品中糖链末端结合的唾液酸残基的分离,其易于在酸性条件下发生分离。因此,要求在更温和的条件下切割糖链。此外,在很多情况下,待与糖链结合的唾液酸的存在以及结合位点与疾病相关,因此要求在唾液酸的理想状态下分析糖链。即使在分析前的预处理步骤中仅部分唾液酸发生分离,也不能获得糖链的正确信息。

[0012] 因而,本发明提供了制备样品的方法以及通过此方法获得的分析样品,所述方法能够通过简单的操作从包含糖链和/或糖衍生物的生物样品中分离和纯化糖链和/或糖衍生物以获得分析样品。此外,本发明还提供上述样品制备方法中所用的糖链捕获物的制备方法、可用于所述制备方法的单体、以及通过聚合此单体获得的聚合物。此外,本发明提供了上述样品制备方法的应用。

[0013] 本发明提供了:

[0014] (1)样品的制备方法,其中通过在物质 A 的酰肼基团(hydrazide group)与糖链和/或糖衍生物的还原末端之间形成腙,使包含酰肼基团的物质 A 与糖链和/或糖衍生物相结合;

[0015] (2)如(1)所述的样品的制备方法,其中物质 A 包括含有发色团或荧光团的部分;

[0016] (3)如(1)所述的样品的制备方法,其中物质 A 选自以下物质或其盐:

[0017] (物质 A):5-二甲基氨基萘-1-磺酰肼(丹磺酰肼,Dansylhydrazine);2-肼基比啉(2-hydrazinopyridine);9-芴甲氧羰基肼(Fmoc-肼,Fmoc-hydrazine);苄肼(benzylhydrazine);4,4-二氟-5,7-二甲基-4-硼-3a,4a-二氮杂-s-茛-3-丙酰肼(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-propionic acid,hydrazide);2-(6,8-二氟-7-羟基-4-甲基香豆素)乙酰肼(2-(6,8-difluoro-7-hydroxy-4-methylcoumarin)acetohydrazide);7-二乙氨基香豆素-3-甲酰肼(7-diethylaminocoumarin-3-carboxylic acid,hydrazide,DCCH);苯肼(phenylhydrazine);1-萘乙酰肼(1-naphthaleneacetylhydrazide);2-肼基苯甲酸(2-hydrazinobenzoic acid);生物素酰肼(biotin hydrazide);和苯乙酰肼(phenylacetic hydrazide);

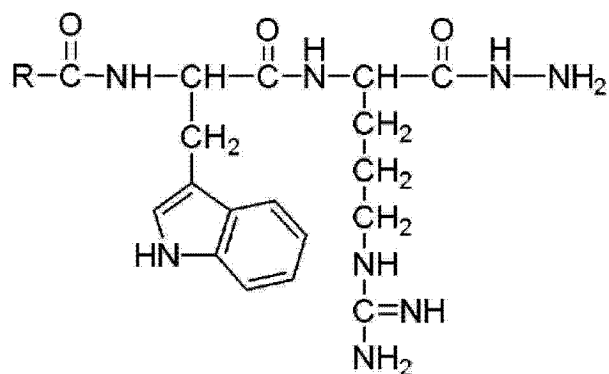
[0018] (4)如(1)所述的样品的制备方法,其中物质 A 包含由精氨酸残基、色氨酸残基、苯丙氨酸残基、酪氨酸残基、半胱氨酸残基及其衍生物中的至少之一组成的部分;

[0019] (5)如(4)所述的样品的制备方法,其中物质 A 是具有下式(1)结构的化合物,

[0020] [化学式 1]

[0021] (式 1)

[0022]



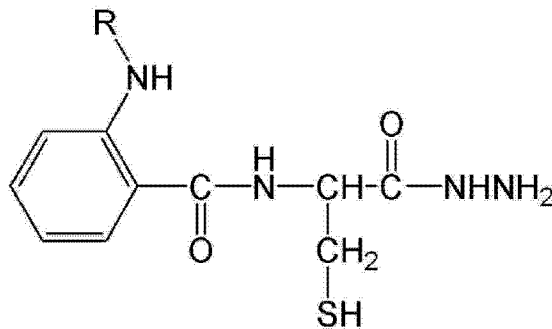
[0023] 其中,在上式中,R表示 $-\text{CH}_3$ 或 $-\text{CD}_3$ ;

[0024] (6) 如(1)所述的样品的制备方法,其中物质 A 具有下式(2)的结构,

[0025] [化学式 2]

[0026] (式 2)

[0027]



[0028] 其中,在上式中, R 表示 H、 $-\text{COCH}_3$  或  $-\text{COCD}_3$  ;

[0029] (7) 如(1)所述的样品的制备方法,其中物质 A 由下式(3)表示,

[0030] [化学式 3]

[0031] (式 3)

[0032] (载体) $-\text{R}-\text{NHNH}_2$

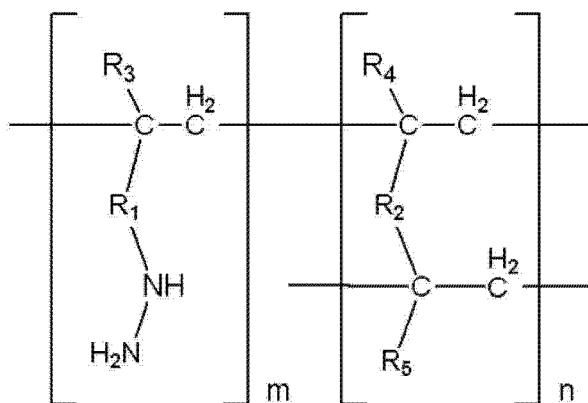
[0033] 其中,在上式中,所述载体表示聚合物基体;R 表示具有 1~20 个碳原子的烃链,在所述烃链中可插入  $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{CO}-$  或  $-\text{CONH}-$  ;

[0034] (8) 如(7)所述的样品的制备方法,其中物质 A 具有下式(4)所示的交联聚合物结构,

[0035] [化学式 4]

[0036] (式 4)

[0037]



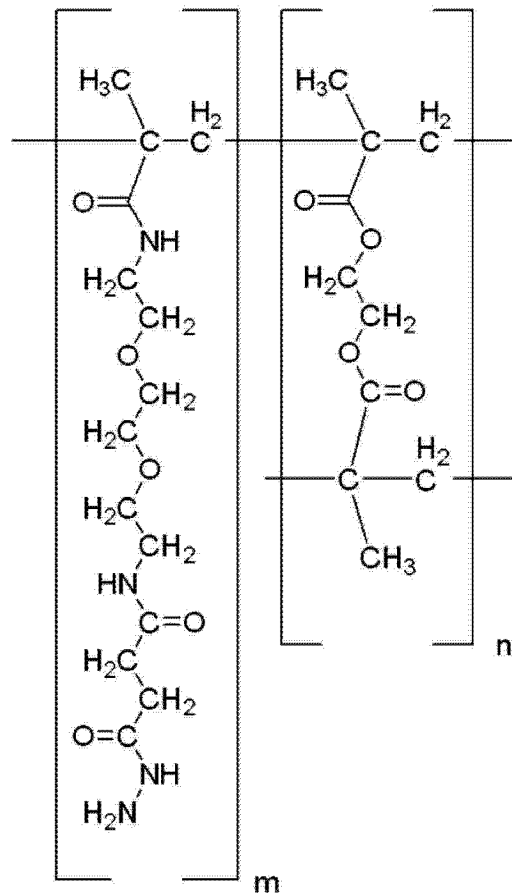
[0038] 其中,在上式中,  $\text{R}_1$  和  $\text{R}_2$  表示具有 1~20 个碳原子的烃链,在所述烃链中可插入  $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{CO}-$  或  $-\text{CONH}-$  ; $\text{R}_3$ 、 $\text{R}_4$  和  $\text{R}_5$  表示 H、 $\text{CH}_3$  或具有 2~5 个碳原子的烃链 ;m 和 n 表示单体单元数目 ;

[0039] (9) 如(7)所述的样品的制备方法,其中物质 A 具有下式(5)所示的交联聚合物结构,

[0040] [化学式 5]

[0041] (式 5)

[0042]



[0043] 其中,在上式中,  $m$  和  $n$  表示单体单元数目;

[0044] (10) 如(7)~(9)中任一项所述样品的制备方法,其中物质 A 是平均粒径等于或大于  $0.1 \mu\text{m}$  且等于或小于  $500 \mu\text{m}$  的聚合物颗粒;

[0045] (11) 如(7)~(10)中任一项所述样品的制备方法,其中物质 A 是每  $1\text{mg}$  干重具有不少于  $100\text{nmol}$  酰肼基团的聚合物颗粒;

[0046] (12) 如(7)~(10)中任一项所述样品的制备方法,其中物质 A 是每  $1\text{mg}$  干重具有不少于  $0.5 \mu\text{mol}$  酰肼基团的聚合物颗粒;

[0047] (13) 如(7)~(12)中任一项所述样品的制备方法,其中物质 A 在  $\text{pH}3 \sim 8$  下稳定。

[0048] (14) 如(7)~(12)中任一项所述样品的制备方法,其中物质 A 至少在不超过约  $1\text{MPa}$  的压力下稳定;

[0049] (15) 如(7)所述样品的制备方法,其中上式(3)中的载体是直接和固相基板或固相基板表面结合的物质;

[0050] (16) 样品的制备方法,其包括糖链捕获步骤和糖链释放步骤,

[0051] 其中所述糖链捕获步骤包括根据(1)~(15)中任一项所述的样品的制备方法将物质 A 与糖链和/或糖衍生物结合,和

[0052] 所述糖链释放步骤包括使含氨基或酰肼基团的物质 B 对糖链捕获步骤所捕获的糖链和/或糖衍生物与物质 A 的复合物发生作用,并通过所述复合物与物质 B 之间发生的脎-脎交换反应或脎-脎交换反应在从 A 切除所述糖链和/或糖衍生物的同时使该糖链和/或糖衍生物与物质 B 结合;(17) 如(16)所述的样品的制备方法,其中物质 B 包括含有

发色团或荧光团的部分；

[0053] (18) 如(16)所述的样品的制备方法,其中物质 B 选自如下物质或其盐,所述物质选自由包含酰肼基团的物质或包含氨氧基 (aminooxy group) 的物质组成的组,

[0054] (包含酰肼基团的物质):5-二甲基氨基萘-1-磺酰肼(丹磺酰肼);2-胍基比啉;9-芴甲氧羰基胍(Fmoc-胍);苄胍;4,4-二氟-5,7-二甲基-4-硼-3a,4a-二氮杂-s-茛-3-丙酰肼;2-(6,8-二氟-7-羟基-4-甲基香豆素)乙酰肼;7-二乙氨基香豆素-3-甲酰肼(DCCH);苄胍;1-萘乙酰肼;2-胍基苯甲酸;生物素酰肼;和苯乙酰肼;或

[0055] (包含氨氧基的物质):0-苄基羟胺;0-苄基羟胺;0-(2,3,4,5,6-五氟苄基)羟胺;0-(4-硝基苄基)羟胺;2-氨氧基比啉;2-氨氧基甲基比啉;4-[(氨氧基乙酰基)氨基]苯甲酸甲酯;4-[(氨氧基乙酰基)氨基]苯甲酸乙酯;和4-[(氨氧基乙酰基)氨基]苯甲酸正丁酯;

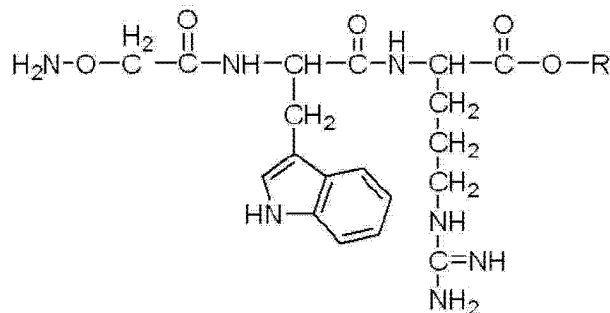
[0056] (19)如(16)所述的样品的制备方法,其中物质 B 包含由精氨酸残基、色氨酸残基、苯丙氨酸残基、酪氨酸残基、半胱氨酸残基及其衍生物中的至少之一组成的部分;

[0057] (20) 如(16)所述的样品的制备方法,其中物质 B 具有下式(7)所示的结构,

[0058] [化学式 6]

[0059] (式 7)

[0060]



[0061] 其中,在以上结构式中,R 表示  $-\text{CH}_3$  或  $-\text{CD}_3$ ;

[0062] (21) 如(16)所述的样品的制备方法,其中物质 B 为固相载体;

[0063] (22) 如(21)所述的样品的制备方法,其中物质 B 为包含氨氧基的固相载体;

[0064] (23) 如(22)所述的样品的制备方法,其中物质 B 由下式(12)表示,

[0065] [化学式 7]

[0066] (式 12)

[0067] (载体)  $-\text{R}-\text{ONH}_2$

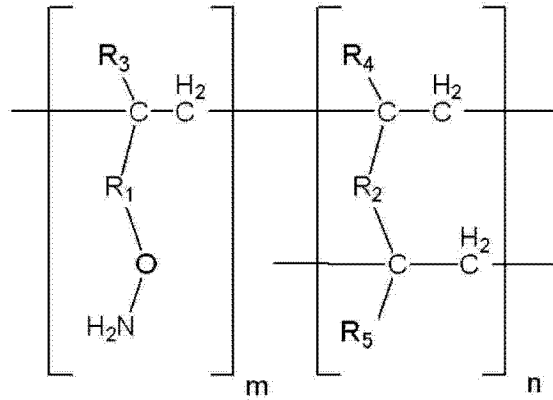
[0068] 其中,在上式中,所述载体表示聚合物基体;R 表示具有 1~20 个碳原子的烃链,在所述烃链中可插入  $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{CO}-$  或  $-\text{CONH}-$ ;

[0069] (24) 如(23)所述的样品的制备方法,其中物质 B 是具有下式(8)所示结构的聚合物颗粒,

[0070] [化学式 8]

[0071] (式 8)

[0072]



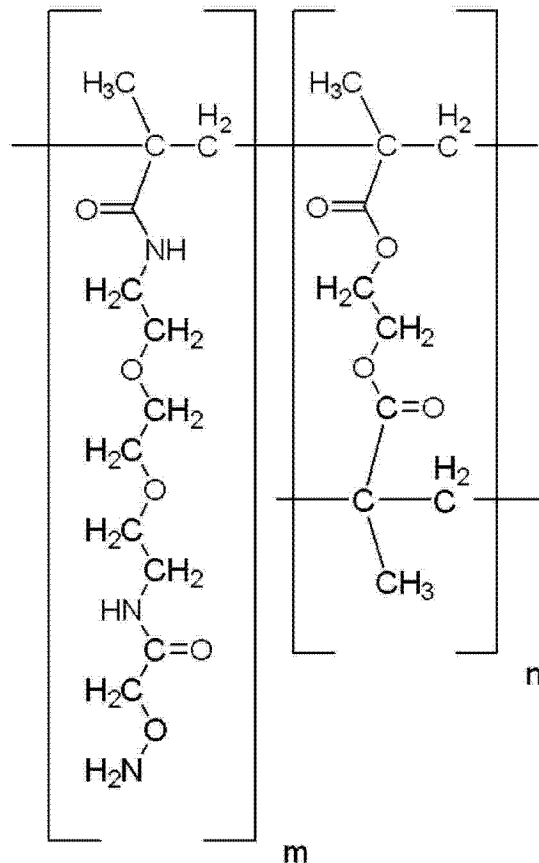
[0073] 其中,在上式中,  $R_1$  和  $R_2$  表示具有 1 ~ 20 个碳原子的烃链,在所述烃链中可插入 -O-、-S-、-NH-、-CO- 或 -CONH- ;  $R_3$ 、 $R_4$  和  $R_5$  表示 H、 $CH_3$  或具有 2 ~ 5 个碳原子的烃链 ;  $m$  和  $n$  表示单体单元数目 ;

[0074] (25) 如 (23) 所述的样品的制备方法,其中物质 B 是具有下式 (9) 所示结构的聚合物颗粒,

[0075] [ 化学式 9 ]

[0076] (式 9)

[0077]



[0078] 其中,在上式中,  $m$  和  $n$  表示单体单元数目 ;

[0079] (26) 如 (21) 所述的样品的制备方法,其中所述固相载体是直接固相基板或固相基板表面结合的物质 ;

[0080] (27) 如 (16) ~ (25) 中任一项所述的样品的制备方法,其中在完成糖链释放步骤



后,至少进行一次或多次的脞-脞交换反应或脞-脞交换反应;

[0081] (28) 样品的制备方法,其中在酸性条件下处理具有如下式(3)、式(4)或式(5)所示结构且与糖链和/或糖衍生物结合的物质 A,从而解离脞键并释放糖链和/或糖衍生物,

[0082] [化学式 10]

[0083] (式 3)

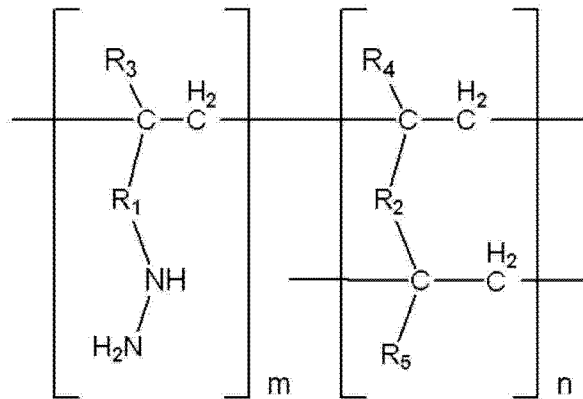
[0084] (载体)-R-NHNH<sub>2</sub>

[0085] 其中,在上式中,所述载体表示聚合物基体;R 表示具有 1~20 个碳原子的烃链,在所述烃链中可插入 -O-、-S-、-NH-、-CO- 或 -CONH-;

[0086] [化学式 11]

[0087] (式 4)

[0088]

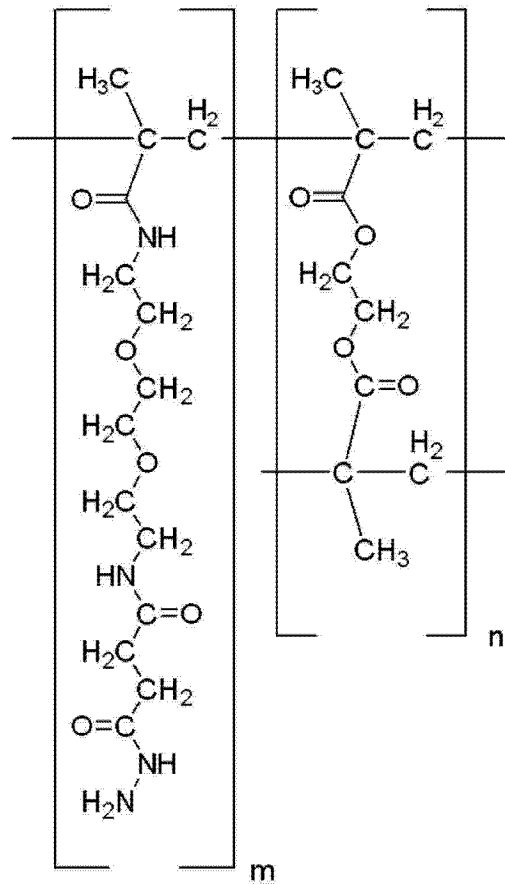


[0089] 其中,在上式中,R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>表示具有1~20个碳原子的烃链,在所述烃链中可插入-O-、-S-、-NH-、-CO-或-CONH-;R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>和R<sub>5</sub>表示H、CH<sub>3</sub>或具有2~5个碳原子的烃链;m和n表示单体单元数目;

[0090] [化学式 12]

[0091] (式 5)

[0092]



[0093] 其中,在上式中,  $m$  和  $n$  表示单体单元数目;

[0094] (29)如(28)所述的样品的制备方法,其中使用 0.01 ~ 10 体积%的三氟乙酸进行所述在酸性条件下的处理;

[0095] (30)如(29)所述的样品的制备方法,其中使用 0.01 ~ 1 体积%的三氟乙酸在 25 ~ 80℃下进行 5 ~ 60 分钟所述在酸性条件下的处理;

[0096] (31)通过(1)~(30)中任一项所述的样品的制备方法制备的分析样品;

[0097] (32)如下式(3)所示物质 A 的制备方法,其中在交联剂的存在下聚合包含羧酸酯单体的原料获得包含羧酸酯的聚合物颗粒,随后使用浓度不小于 10 体积%的胍溶液处理包含羧酸酯的聚合物颗粒,其中所述羧酸酯单体具有可聚合的基团,

[0098] [化学式 13]

[0099] (式 3)

[0100] (载体)-R-NHNH<sub>2</sub>

[0101] 其中,在上式中,所述载体表示聚合物基体;R 表示具有 1 ~ 20 个碳原子的烃链,在所述烃链中可插入 -O-、-S-、-NH-、-CO- 或 -CONH-;

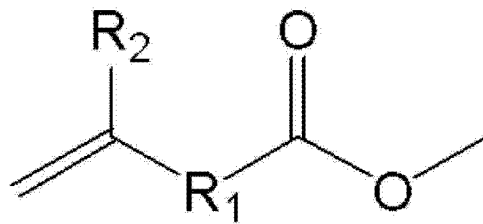
[0102] (33)如(32)所述的物质 A 的制备方法,其中所述羧酸酯单体是羧酸甲酯;

[0103] (34)具有下式(10)所示结构的单体,

[0104] [化学式 14]

[0105] (式 10)

[0106]



[0107] 其中,在上式中,  $R_1$  表示具有 1 ~ 20 个碳原子的烃链,在所述烃链中可插入 -O-、-S-、-NH-、-CO- 或 -CONH- ;  $R_2$  表示 H、 $CH_3$  或具有 2 ~ 5 个碳原子的烃链 ;

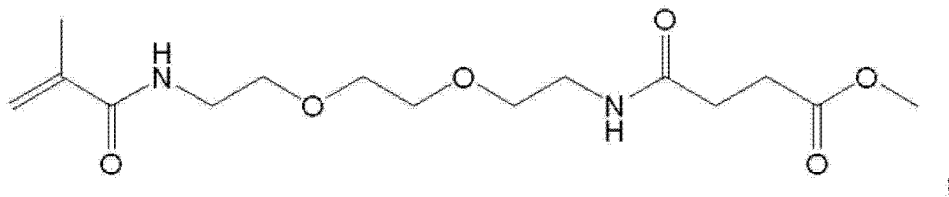
[0108] (35) 通过聚合 (34) 所述单体获得的聚合物 ;

[0109] (36) 具有下式 (11) 所示结构的单体,

[0110] [化学式 15]

[0111] (式 11)

[0112]



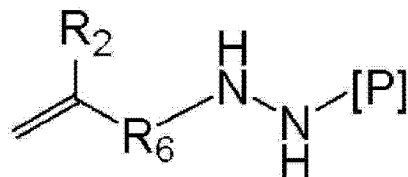
[0113] (37) 通过聚合 (36) 所述单体获得的聚合物 ;

[0114] (38) 具有下式 (13) 所示结构的单体,

[0115] [化学式 16]

[0116] (式 13)

[0117]



[0118] 其中,在上式中,  $R_2$  表示 H、 $CH_3$  或具有 2 ~ 5 个碳原子的烃链 ;  $R_6$  表示具有 1 ~ 20 个碳原子的烃链,在所述烃链中可插入 -O-、-S-、-NH-、-CO- 或 -CONH- ; [P] 表示保护基团 ;

[0119] (39) 通过聚合 (38) 所述单体获得的聚合物 ;

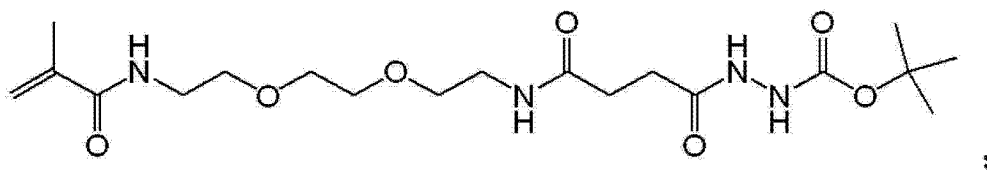
[0120] (40) 如 (39) 所述的聚合物,其通过酸处理脱去式 (13) 的保护基团 [P] 而获得 ;

[0121] (41) 具有下式 (14) 所示结构的单体,

[0122] [化学式 17]

[0123] (式 14)

[0124]



[0125] (42) 通过聚合 (41) 所述单体获得的聚合物 ;

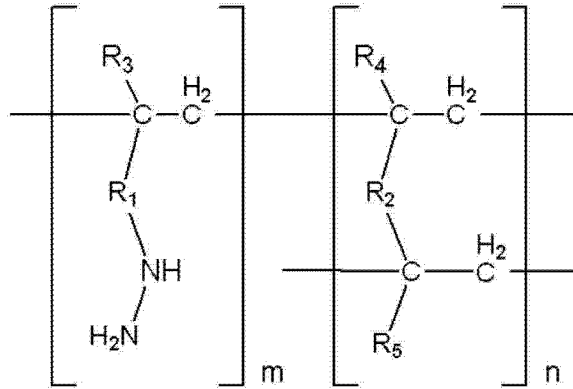
[0126] (43) 通过酸处理脱去 (42) 所述聚合物的叔丁氧羰基而获得的聚合物 ;

[0127] (44) 如下式(4)所示物质 A 的制备方法,其中在交联剂的存在下聚合具有下式(10)结构的单体获得包含羧酸酯的聚合物颗粒,随后使用浓度不小于 10 体积%的脬溶液处理包含羧酸酯的聚合物颗粒,

[0128] [化学式 18]

[0129] (式 4)

[0130]

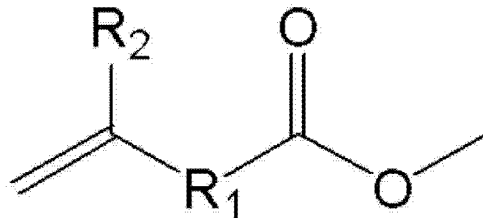


[0131] 其中,在上式中,  $R_1$  和  $R_2$  表示具有 1 ~ 20 个碳原子的烃链,在所述烃链中可插入 -O-、-S-、-NH-、-CO- 或 -CONH- ;  $R_3$ 、 $R_4$  和  $R_5$  表示 H、 $CH_3$  或具有 2 ~ 5 个碳原子的烃链 ;m 和 n 表示单体单元数目 ;

[0132] [化学式 19]

[0133] (式 10)

[0134]



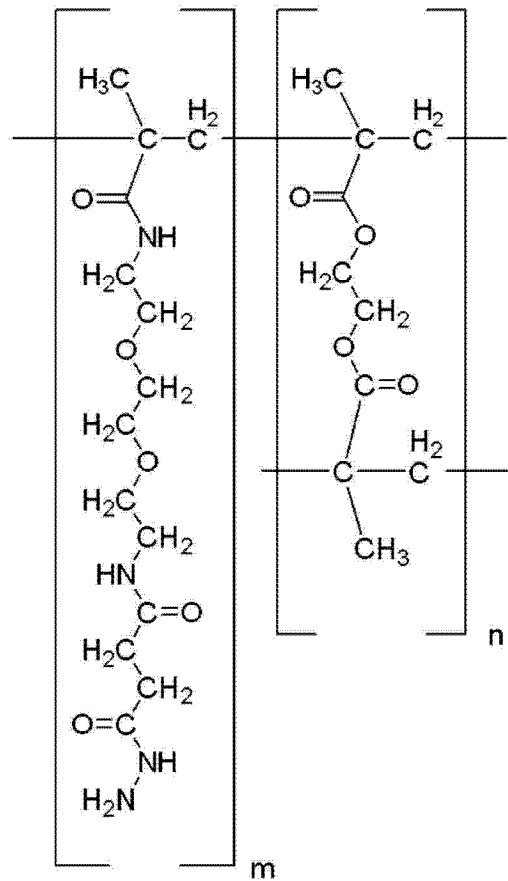
[0135] 其中,在上式中,  $R_1$  表示具有 1 ~ 20 个碳原子的烃链,在所述烃链中可插入 -O-、-S-、-NH-、-CO- 或 -CONH- ;  $R_2$  表示 H、 $CH_3$  或具有 2 ~ 5 个碳原子的烃链 ;

[0136] (45) 如下式(5)所示物质 A 的制备方法,其中在交联剂的存在下聚合具有下式(11)结构的单体获得包含羧酸酯的聚合物颗粒,随后使用浓度不小于 10 体积%的脬溶液处理包含羧酸酯的聚合物颗粒,

[0137] [化学式 20]

[0138] (式 5)

[0139]

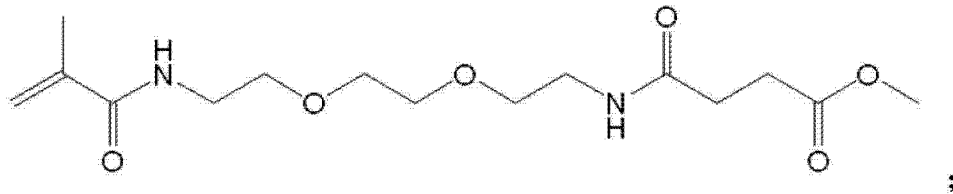


[0140] 其中,在上式中, m 和 n 表示单体单元数目,

[0141] [化学式 21]

[0142] (式 11)

[0143]



[0144] (46) 固相载体作为载体用以收集对糖链和 / 或糖衍生物具有结合性或亲和性的物质的应用方法,其中在所述固相载体上固定有通过分离和纯化混合物或混合物的特定部分 (specific fraction) 而得到的糖链和 / 或糖衍生物 ;

[0145] (47) 糖链微阵列的制备方法,其中根据以下步骤(1) ~ (4) 将糖链和 / 或糖衍生物固定到由包含物质 B 的固相载体组成的固相基板的表面,其中所述物质 B 具有下式(3)或(12)所示结构,

[0146] (步骤 1) 通过特定的分离方法 (specific separation means) 使糖链和 / 或糖衍生物与包含可溶性酰肼基团的化合物相结合,从而纯化和 / 或分离糖链和 / 或糖衍生物的步骤,

[0147] (步骤 2) 将步骤(1) 获得的化合物的液滴按行分散到固相基板上的步骤,

[0148] (步骤 3) 完成液滴分散后,在指定条件下通过温育固相基板进行糖链 - 物质 A 结合物与固相基板 - 糖链结合物的交换反应,并将糖链和 / 或糖衍生物固定到固相基板上的

步骤,和

[0149] (步骤4)清洗并除去固相基板上未反应物质的步骤,

[0150] [化学式22]

[0151] (式3)

[0152] (载体)-R-NHNH<sub>2</sub>

[0153] 其中,在上式中,所述载体表示聚合物基体;R表示具有1~20个碳原子的烃链,在所述烃链中可插入-O-、-S-、-NH-、-CO-或-CONH-;

[0154] [化学式23]

[0155] (式12)

[0156] (载体)-R-ONH<sub>2</sub>

[0157] 其中,在上式中,所述载体表示聚合物基体;R表示具有1~20个碳原子的烃链,在所述烃链中可插入-O-、-S-、-NH-、-CO-或-CONH-;

[0158] (48)通过(47)所述方法生产的糖链微阵列;

[0159] (49)糖结合物质的搜索系统,所述糖结合物质特异结合或吸附固定了的糖链和/或固定了的糖衍生物,其通过如下程序操作:将包含样本的溶液与(48)所述的糖链微阵列表面接触,在指定条件下温育和清洗,随后检测固相基板上的糖链和/或糖衍生物液滴分散部分所收集到的糖链结合物质;

[0160] (50)结合蛋白质的识别特异性评估系统,其通过如下程序操作:将包含样本的溶液与(48)所述的糖链微阵列表面接触,收集固相基板上糖链和/或糖衍生物液滴分散部分的样本中的糖结合蛋白质,并通过指定的定量方法对收集量进行定量分析;

[0161] (51)糖链亲和珠的制备方法,其中糖链和/或糖衍生物固定到由包含物质B的固相载体组成的聚合物表面,其中所述物质B具有下式(3)或(12)所示结构,

[0162] [化学式24]

[0163] (式3)

[0164] (载体)-R-NHNH<sub>2</sub>

[0165] 其中,在上式中,所述载体表示聚合物基体;R表示具有1~20个碳原子的烃链,在所述烃链中可插入-O-、-S-、-NH-、-CO-或-CONH-;

[0166] [化学式25]

[0167] (式12)

[0168] (载体)-R-ONH<sub>2</sub>

[0169] 其中,在上式中,所述载体表示聚合物基体;R表示具有1~20个碳原子的烃链,在所述烃链中可插入-O-、-S-、-NH-、-CO-或-CONH-;

[0170] (52)如51所述的糖链亲和珠的制备方法,其中根据以下步骤(1)~(3)将糖链和/或糖衍生物固定到聚合物颗粒表面,

[0171] (步骤1)通过特定的分离方法使糖链和/或糖衍生物与包含可溶性酰肼基团的化合物相结合,从而纯化和/或分离糖链和/或糖衍生物的步骤,

[0172] (步骤2)通过将步骤(1)所得的化合物与聚合物颗粒相接触,并在指定条件下进行温育使糖链-含酰肼基化合物结合物与糖链-聚合物颗粒结合物进行交换,从而将糖链和/或糖衍生物固定到聚合物颗粒上的步骤,和

[0173] (步骤3)清洗并除去聚合物颗粒上未反应物质的步骤;

[0174] (53)通过(51)或(52)所述方法制备的糖链亲和珠;和

[0175] (54)使包含样本的溶液与(53)所述的糖链亲和珠接触,在指定条件下进行温育和清洗,并随后分离被捕获的糖结合物质的系统。

[0176] 根据本发明,能够通过简单的操作从包含糖链和/或糖衍生物的生物样品中分离和纯化糖链和/或糖衍生物,以获得分析样品。

#### 附图说明

[0177] 通过参照附图以及对优选实施方案所作的详细说明,以上和其他的目的、特征和优点将变得更清晰。

[0178] 图1示出了反应物糖链和2-胍基比啉的MALDI-TOF-MS图谱。横轴代表分子量( $m/z$ ),纵轴代表强度。此外,对应峰(a)2668.421 ( $=m/z$ )、峰(b)2978.005 ( $=m/z$ )和峰(c)3263.785的糖链结构示意性地以●:半乳糖;■:N-乙酰葡萄糖胺;○:甘露糖;和◆:唾液酸表示。

[0179] 图2示出了反应物糖链和实施例物质A的MALDI-TOF-MS图谱。横轴代表分子量( $m/z$ ),纵轴代表强度。对应各个主峰的糖链结构示意性地以●:半乳糖;■:N-乙酰葡萄糖胺;○:甘露糖;◆:唾液酸;和▶:海藻糖表示。

[0180] 图3示出了实施例的糖链释放步骤中,pH与交换反应的交换效率之间的关系图。横轴表示pH,纵轴表示交换效率。脘到脘的交换以○标记,脘到脞的交换以●标记,脞到脘的交换以□标记,脞到脞的交换以■标记。

[0181] 图4示出了图3交换反应中获得的反应物的MALDI-TOF-MS图谱。横轴表示分子量( $m/z$ ),纵轴表示强度。从最上图开始,当释放剂(releasing reagent)是氨氧基化合物(aoWR)时,珠的官能团为酰肼;当释放剂是酰肼化合物(AcWRh)时,珠的官能团为酰肼;当释放剂是氨氧基化合物(aoWR)时,珠的官能团为氨氧基;以及当释放剂是酰肼化合物(AcWRh)时,珠的官能团为氨氧基。

[0182] 图5示出了在实验例7(B)(1)的方法中回收的糖链的MALDI-TOF-MS图谱。横轴代表分子量( $m/z$ ),纵轴代表强度。最上图表示对照(血清糖链+400 $\mu$ M内标),中间图表示通流样品(flow through sample)((珠和未反应的糖链)+400 $\mu$ M内标),最下图表示样品(血清糖链,被含酰肼基团的珠捕获,随后通过脘交换被回收+400 $\mu$ M内标)。当经定量分析的对照糖链的强度设为100%时,通流样品为12%(88%与珠结合),而样品为56%。

[0183] 图6示出了在实验例7(B)(2)的方法中回收的糖链的MALDI-TOF-MS图谱。横轴代表分子量( $m/z$ ),纵轴代表强度。从最上图开始分别表示:使用50 $\mu$ l(干重16.5mg)Affi-Gel Hz、100 $\mu$ l(干重33mg)Affi-Gel Hz、150 $\mu$ l(干重49.5mg)Affi-Gel Hz、和2.5mg含酰肼基团的珠时获得的结果。

[0184] 图7示出了实验例8(1)的方法中回收的糖链的MALDI-TOF-MS图谱。横轴代表分子量( $m/z$ ),纵轴代表强度。从最上图开始分别表示:反应前、与珠反应后和不使用珠(阴性对照)的结果。

[0185] 图8示出了实验例9(2)的凝集素捕获能力的验证结果。纵轴表示450nm下的吸光率。凝集素的浓度为1 $\mu$ g/ml,固定到单糖上的凝集素摩尔数为2.5 $\mu$ mol/g(饱和量)。

[0186] 图 9 示出了实验例 10 (2) 的凝集素捕获能力的验证结果。横轴代表分子量( $m/z$ ),纵轴代表强度。

[0187] 最佳实施方式

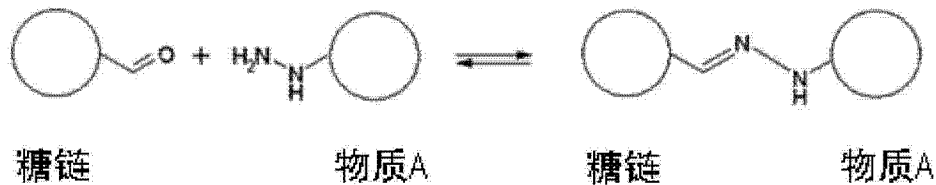
[0188] 下文描述了本发明的实施方式。

[0189] 一方面,本发明提供了制备样品的方法,其特征是通过物质 A 的酰肼基团和糖链和 / 或糖链衍生物的还原末端之间形成腙使包含酰肼基团的物质 A 与糖链和 / 或糖链衍生物相结合。

[0190] 只要其末端部分含有酰肼基团(-NHNH-),对样品制备方法中使用的包含酰肼基团的物质 A 没有特别的限制。此酰肼基团与溶液(例如水溶液或类似物等)中糖链在环状半缩醛式和非环状醛式平衡下形成的具有特异性和稳定性结合的醛基反应,从而捕获糖链。本文中,所述糖链捕获反应是指以下的反应:

[0191] [化学式 26]

[0192]



[0193] 在本文中,物质 A 可以是低分子量化合物或固相载体的形式。

[0194] 根据以下观点,使用低分子量化合物时,优选物质 A 包含由精氨酸残基、色氨酸残基、苯丙氨酸残基、酪氨酸残基、半胱氨酸残基及其衍生物中的至少一个组成的部分。

[0195] 更确切地说,已知当物质 A 包含精氨酸(R)残基时,可加快 MALDI-TOF-MS 检测时的离子化,并提高检测的灵敏度。此外,由于色氨酸(W)是疏水性的荧光氨基酸,因此能够改进反相 HPLC 的分离过程以及荧光检测的灵敏度。此外,在使用苯丙氨酸(F)和酪氨酸(Y)时,这样的样品适于利用 UV 吸收的检测。

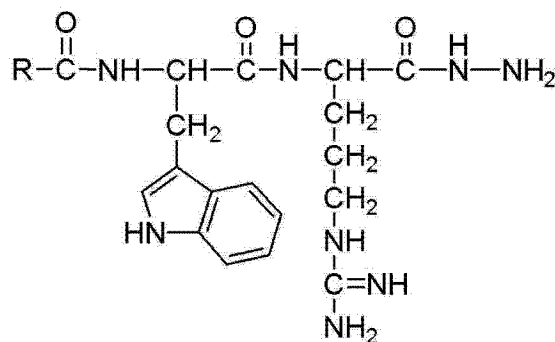
[0196] 此外,使用半胱氨酸时,含半胱氨酸的物质 A 能够利用侧链中的巯基形成 S-S 键,使与包含 -SH 基团的其他物质结合。例如,可将物质 A 固定到包含 -SH 基团的固相载体上。此外,在其它实例中,此类物质 A 可用于 ICAT 法(同位素亲和标签法)。

[0197] 可引用具有下式(1)结构的化合物作为此类物质 A 的实例,

[0198] [化学式 27]

[0199] (式 1)

[0200]



[0201] 其中,在上式中,R 表示 -CH<sub>3</sub> 或 -CD<sub>3</sub>。

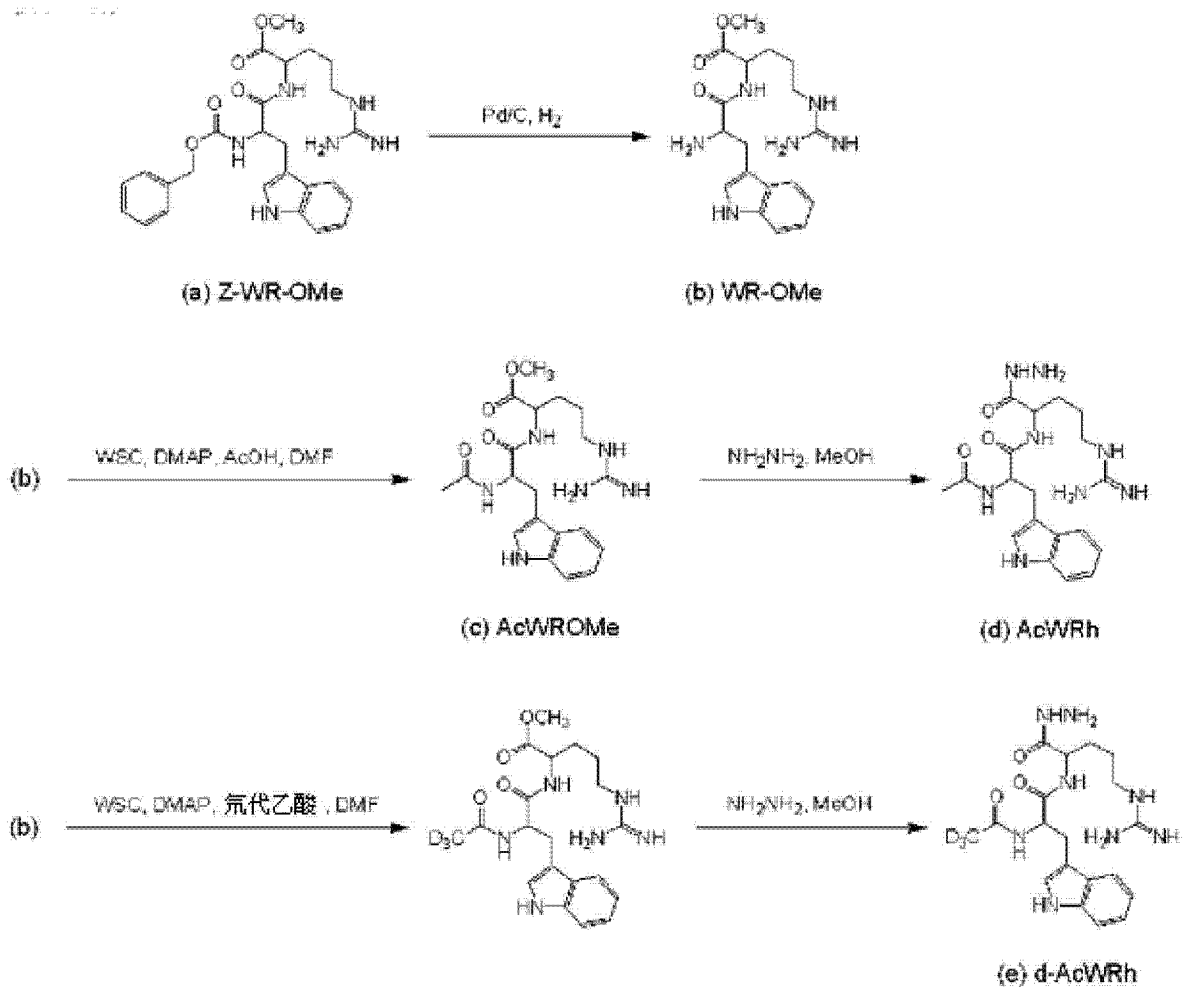


[0202] 可根据流程图 1 制备式(1)的化合物,

[0203] [化学式 28]

[0204] (流程图 1)

[0205]



[0206] 在流程图 1 中,能够在 Pd/C 的存在下对化合物(a) 进行氢化脱保护获得化合物(b),其中化合物(a) 中色氨酸部分的氨基团被苯基或类似物保护。在本文中,色氨酸部分也可被取代之为苯丙氨酸、酪氨酸或半胱氨酸等。

[0207] 随后,在存在水溶性碳二亚胺(carbodiimide, WSC) 和二甲基氨基比啉(DAMP) 的二甲基甲酰胺(DMF) 溶剂中,化合物(b) 色氨酸侧链的氨基作用于乙酸(AcOH) 使其乙酰化,从而获得化合物(c)。

[0208] 此外,使肼作用于甲醇(MeOH) 溶剂中的化合物(c),并将精氨酸侧链 C 末端的甲氧基取代之为酰肼基团,从而获得化合物(d) 作为式(1) 的所需化合物。

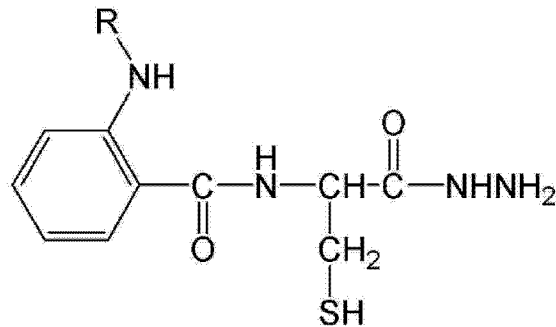
[0209] 向化合物(d) 引入氘(D) 时,在流程图 1 中,在存在水溶性碳二亚胺(WSC) 和二甲基氨基比啉(DMAP) 的二甲基甲酰胺(DMF) 溶剂中,用氘代乙酸( $\text{CD}_3\text{COOH}$ ) 将化合物(b) 乙酰化,从而获得色氨酸侧链中的氨基被氘代乙酰基乙酰化的化合物。此外,使肼作用于甲醇(MeOH) 溶剂中的化合物,并将精氨酸侧链 C 末端的甲氧基取代之为酰肼基团,从而获得化合物(e) 作为式(1) 的所需化合物。

[0210] 同时,可引用具有下式(2) 结构的化合物作为物质 A 的另一个实例,

[0211] [化学式 29]

[0212] (式 2)

[0213]

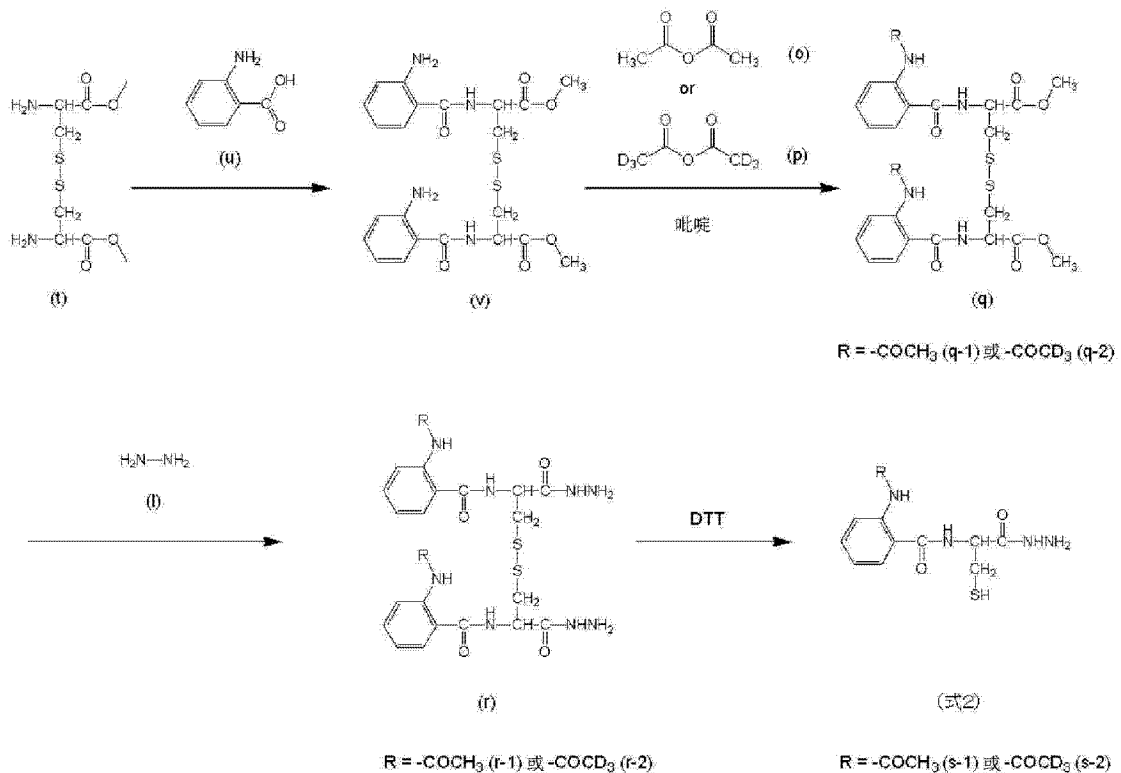
[0214] 其中,在上式中,R表示H、-COCH<sub>3</sub>或-<sup>13</sup>COCD<sub>3</sub>中的任何一种;

[0215] 可根据以下流程图 2 制备式(2)的化合物,

[0216] [化学式 30]

[0217] (流程图 2)

[0218]



[0219] 在流程图 2 中,首先使 2-氨基苯甲酸(化合物(u))作用于半胱氨酸二聚物(化合物(t))从而获得化合物(v)。

[0220] 使乙酸酐作用于此化合物(v)将 2-氨基苯甲酰基的氨基乙酰化,从而获得化合物(q)。此时,使用化合物(o)(即乙酸酐)获得氘代化合物(q-1)。另一方面,使用化合物(p)(即氚代乙酸酐)获得氚代化合物(q-2)。

[0221] 随后,使化合物(q-1)或(q-2)与肼反应,从而获得化合物(r)。此外,当化合物(r)中的 R 为乙酰基(-COCH<sub>3</sub>)时,可获得氘化物(hydride)(r-1)。当 R 为氚代乙酰基(-<sup>13</sup>COCD<sub>3</sub>)时,可获得氚化物(r-2)。

[0222] 此外,通过使用如 DTT 或类似的还原剂切断二硫键以还原化合物(r)从而获得式(2)的包含酰肼基团的化合物和半胱氨酸,在所述化合物中,2-氨基苯甲酰基团的氨基被乙酰化。此外,当化合物(r)中的 R 为乙酰基(-COCH<sub>3</sub>)时,可获得氘化物(s-1)。当 R 为氘代乙酰基(-COCD<sub>3</sub>)时,可获得氘化物(s-2)。

[0223] 如上所述,通过向物质 A 中引入精氨酸残基、色氨酸氨基、苯丙氨酸残基、酪氨酸残基、半胱氨酸残基及其衍生物,可向捕获的糖链提供例如高质谱灵敏度或荧光·UV 标记等功能。

[0224] 此外,如式(2)所示,分子中可包含 2-氨基苯甲酰基等基团的发色团或荧光团。除 2-氨基苯甲酰基外,此类基团的实例还包括具有苄基、萘基、蒽基和比啉基等典型实例的芳香族残基;以及包含丹磺酰基(Dansyl)或 Fmoc 基团的取代基。此类取代基是用于提供荧光的标记化合物,通常用于糖链的 HPLC 分析。因此,使用引入了此类取代基的物质 A 捕获的糖链和/或糖衍生物可作为标记样品。通过使用此类标记样品,即可通过采用反相柱的 HPLC 以高分辨率和高灵敏度分析被物质 A 捕获的糖链和/或糖衍生物。

[0225] 此外,根据式(1)和式(2)的说明,可包含氘代取代基,例如氘代乙酰基等。通过质谱增强的检测灵敏度,使得可对包含此类氘代官能团的样品进行定性和定量分析。

[0226] 例如,将使用式(1)或式(2)的物质 A 获得的氘代样品和氘代样品组合使用,从而通过质谱对例如含有未知糖链的样品(例如,通过血清处理获得的样品)中所含的糖链进行定性和定量分析。

[0227] 因此,例如当使用氘来标记成分和浓度已知的样品,而使用氘来标记未知的样品,并将两个样品混合进行质谱检测时,可发现,与氘代样品相应的各个峰相比,氘代样品的各个峰以近乎所引入氘的数量向较高分子量的方向位移。随后分析各个峰的位置(m/z 值)和强度,从而确定未知样品各个峰表示的糖链种类及其在样品中的浓度。此类分析也可通过使用氘标记已知样品并使用氘标记未知样品来进行。

[0228] 此外,可在此分析中使用氘标记从健康人提取的样品,并使用氘标记从疾病患者提取的样品,或使用氘标记从健康人提取的样品,并使用氘标记从疾病患者提取的样品,从而能够分析包含在两个样品中的糖链在种类和数量上的区别。因此,基于参与糖代谢的生物反应和调控此类生物反应的医学治疗等,此类分析样品适合用于病理诊断的目的。

[0229] 关于物质 A,下文描述了具有式(1)和式(2)结构的化合物,但物质 A 可以是选自如下的物质或其盐。

[0230] (物质 A):5-二甲基氨基萘-1-磺酰肼(丹磺酰肼);2-肼基比啉;9-芴甲氧羰基肼(Fmoc-肼);苄肼;4,4-二氟-5,7-二甲基-4-硼-3a,4a-二氮杂-s-茛-3-丙酰肼;2-(6,8-二氟-7-羟基-4-甲基香豆素)乙酰肼;7-二乙氨基香豆素-3-羧酰肼(DCCH);苯肼;1-萘乙酰肼;2-肼基苯甲酸;生物素酰肼;和苯乙酰肼。

[0231] 此外,为了以高精度和高灵敏度检测捕获的糖链,可向这些化合物引入包含发色团或荧光团的部分,或引入氘。

[0232] 在本文中,所述糖链捕获反应就是通过将物质 A 引入到包含糖链和/或糖衍生物的样品中使物质 A 与糖链和/或糖衍生物进行的反应。此反应在具有以下条件的反应系统中进行:pH4~8,反应温度4~90℃,优选25~90℃且更优选40~90℃,反应进行10分钟~24小时,优选10分钟~8小时且更优选10分钟~2小时。

[0233] 此外,使用固相载体时,物质 A 由下式(3)表示,

[0234] [化学式 31]

[0235] (式 3)

[0236] (载体)-R-NHNH<sub>2</sub>

[0237] 其中,在上式中,所述载体表示聚合物基体;R 表示具有 1~20 个碳原子的烃链,在所述烃链中可插入 -O-、-S-、-NH-、-CO- 或 -CONH-。

[0238] 在式(3)中,所述载体是由无机物或有机聚合物构成的聚合物基体,且所述载体以颗粒或固相基板(solid phase substrate)或与固相基板表面直接结合的物质形式使用。

[0239] 在本文中,可使用颗粒形式的物质作为可用作载体的无机物,其实例包括二氧化硅颗粒、氧化铝颗粒、玻璃颗粒和金属颗粒等。

[0240] 此外,有机聚合物的实例包括多聚糖凝胶(典型实例为琼脂糖和琼脂糖凝胶)、颗粒形式的乙烯基化合物的聚合物、以及固定到固相基板表面的物质。此外,可使用这些物质形成固相基板的表面。

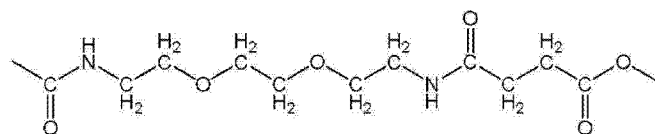
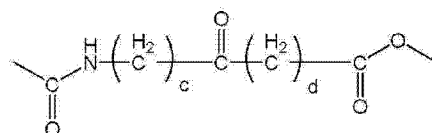
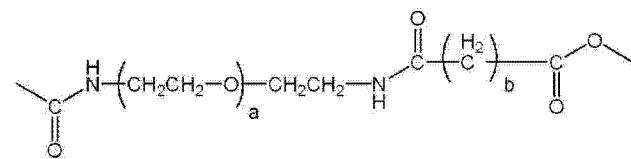
[0241] 同时,优选聚合物颗粒为球状,并且是平均粒径等于或大于 0.1 μm 且等于或小于 500 μm 的聚合物颗粒。粒径在此范围内的载体颗粒易于通过离心或过滤等进行回收,而且因为所述颗粒具有足够大的表面积,所以认为其与糖链间的反应效率较高。当粒径远远大于上述范围时,在一些情况下由于表面积变小使其与糖链间的反应效率下降。此外,当粒径远远小于上述范围时,在一些情况下很难回收这些颗粒。此外,将粒径过小的颗粒填充到柱中时,在一些情况下流体通过时的压降(pressure loss)较高。

[0242] 此外,所述固相基板的实例包括微板和平状基板。这样,可以通过向糖链微阵列用基板施用物质 A 来制备分析样品。

[0243] R 表示具有 1~20 个碳原子的烃链,在该烃链中可插入 -O-、-S-、-NH-、-CO- 或 -CONH-。例如,可引用如下所述的结构。在下式中,a、b 和 d 表示 1~5 的整数,而 c 表示 1~10 的整数,

[0244] [化学式 32]

[0245]



[0246] 在本文中,可通过将颗粒形式的上述物质 A 装入柱子或类似物中,并使包含糖链

和 / 或糖衍生物样品通过所述柱子(或类似物)以进行糖链捕获反应(连续反应),或通过将此颗粒加入到样品中并将其搅拌以进行糖链捕获反应(间歇反应)。此外,可通过将样品连续加入到预先装有颗粒的反应容器中并将其搅拌以进行所述反应(半间歇反应)。

[0247] 此外,可在交联剂的存在下聚合包含羧酸酯单体的原料从而获得包含羧酸酯的聚合物颗粒,随后使用浓度不小于 10 体积%的胼溶液处理包含羧酸酯的聚合物颗粒从而获得如上式(3)所示的物质 A,其中所述羧酸酯单体具有可聚合基团。因此,根据另一个观点,本发明提供了式(3)所示的物质 A 的制备方法。

[0248] 在本文中,羧酸酯单体的实例包括羧酸的 N- 羟基琥珀酰亚胺酯和羧酸甲酯。

[0249] 此外,多官能化合物以及与羧酸酯单体共聚合的化合物可适合用作交联剂。其实例包括(1)多元醇的二(甲基)丙烯酸酯或三(甲基)丙烯酸酯,例如其中所述多元醇可以是乙二醇、丙二醇、三羟甲基丙烷、甘油、聚氧乙二醇 (polyoxyethylene glycol)、聚氧丙二醇 (polyoxypropylene glycol) 或聚甘油等,(2)上述(1)中,多元醇的不饱和酸酯,其中所述不饱和酸是(甲基)丙烯酸以外的酸,例如马来酸或富马酸等,(3)双丙烯酰胺,例如, N, N' - 亚甲基双丙烯酰胺或类似物,(4)可通过聚环氧化物与(甲基)丙烯酸酯的反应获得的二(甲基)丙烯酸酯或三(甲基)丙烯酸酯,(5)可通过聚异氰酸酯与(甲基)丙烯酸羟基酯的反应获得的二(甲基)丙烯酸氨基甲酰酯,例如其中所述聚异氰酸酯为甲苯二异氰酸酯或六亚甲基二异氰酸酯等,和(6)多价烯丙基化合物,例如,烯丙基化淀粉、烯丙基化纤维素、邻苯二甲酸二烯丙酯、四烯丙氧基乙烷、季戊四醇三烯丙基醚、三羟甲基丙烷三烯丙基醚、二乙二醇二烯丙基醚或偏苯三酸三烯丙酯 (triallyl trimellitate) 等。其中,本发明优选使用乙二醇二(甲基)丙烯酸酯、丙二醇二(甲基)丙烯酸酯和 N, N' - 亚甲基双(甲基)丙烯酰胺。

[0250] 也就是说,可使用式(3)所示的具有以下结构的物质 A。

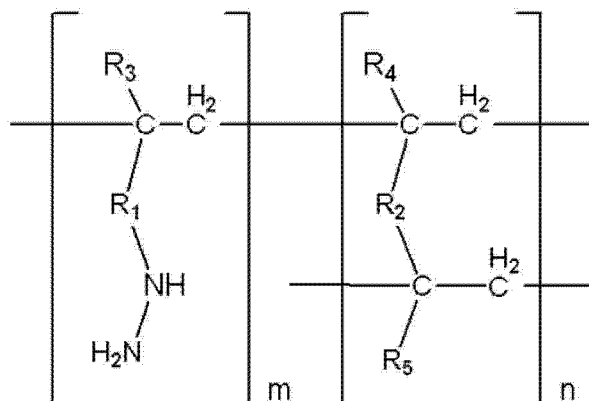
[0251]  $-(\text{含酰肼基团的化合物组分})_m-(\text{交联剂组份})_n-$

[0252] 可引用下式(4)所示具有交联聚合物结构的物质作为具有此类结构的物质 A,

[0253] [化学式 33]

[0254] (式 4)

[0255]



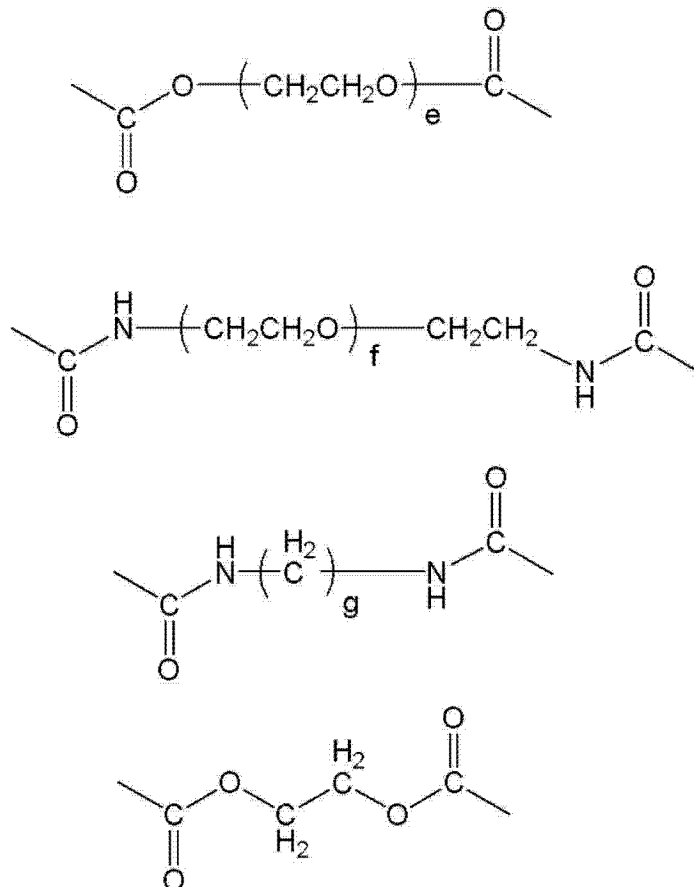
[0256] 其中,在上式中,  $R_1$  和  $R_2$  表示具有 1 ~ 20 个碳原子的烃链,在该烃链中可插入  $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $-CO-$  或  $-CONH-$ ;  $R_3$ 、 $R_4$  和  $R_5$  表示 H、 $CH_3$  或具有 2 ~ 5 个碳原子的烃链; m 和 n 表示单体单元数目。

[0257]  $R_1$  表示具有 1 ~ 20 个碳原子的烃链, 在该烃链中可插入 -O-、-S-、-NH-、-CO- 或 -CONH-, 其实例包括上述对 R 所引用的那些结构。

[0258]  $R_2$  表示具有 1 ~ 20 个碳原子的烃链, 在该烃链中可插入 -O-、-S-、-NH-、-CO- 或 -CONH-, 其实例包括如下所示的结构。在下式中, e 和 f 表示 1 ~ 5 的整数, 而 g 表示 1 ~ 10 的整数,

[0259] [化学式 34]

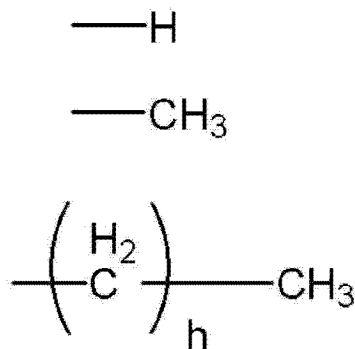
[0260]



[0261] 各个  $R_3$ 、 $R_4$  和  $R_5$  可相同或不同, 并表示 H、 $CH_3$  或具有 2 ~ 5 个碳原子的烃链。其实例包括如下所示的结构。在下式中, h 表示 1 ~ 4 的整数,

[0262] [化学式 35]

[0263]

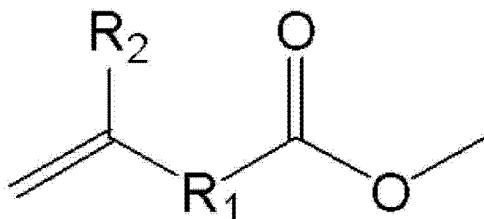


[0264] 在本文中, 作为含酰肼基团化合物组分前体的羧酸酯单体, 适合使用下式 (10) 所示的羧酸甲酯单体。此外, 可使用上述交联剂作为交联剂组分,

[0265] [化学式 36]

[0266] (式 10)

[0267]



[0268] 其中,在上式中, $R_1$ 表示具有1~20个碳原子的烃链,在该烃链中可插入-O-、-S-、-NH-、-CO-或-CONH-的; $R_2$ 表示H、 $CH_3$ 或具有2~5个碳原子的烃链。

[0269]  $R_1$ 和 $R_2$ 的具体实例包括上述对式(4)所引用的那些结构。

[0270] 更确切地说,可以在交联剂的存在下聚合具有式(10)结构的单体从而获得包含羧酸酯的聚合物颗粒,随后使用浓度不小于10体积%的脲溶液处理包含羧酸酯的聚合物颗粒,从而获得式(4)所示的物质A。

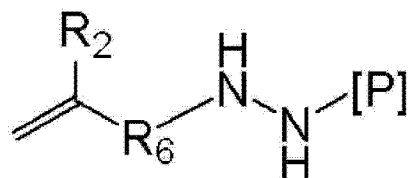
[0271] 从另一个观点来看,本发明提供了使用式(10)所示单体获得式(4)的物质A的制备方法、通过聚合此单体所得的聚合物、以及式(10)的物质。

[0272] 此外,在此制备方法中使用羧酸酯单体作为起始原料时,可在交联剂的存在下将单体聚合以获得聚合物颗粒,随后使用脲溶液处理聚合物颗粒以获得式(4)的物质A。然而,例如,在使用下式(13)的含酰脲基团的单体作为起始原料时,也可以在上述交联剂的存在下聚合此单体,随后进行脱保护,从而获得式(4)的物质A。

[0273] [化学式 37]

[0274] (式 13)

[0275]



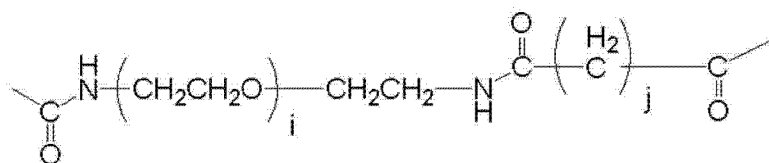
[0276] 其中,在上式中, $R_2$ 表示H、 $CH_3$ 或具有2~5个碳原子的烃链; $R_6$ 表示具有1~20个碳原子的烃链,在该烃链中可插入-O-、-S-、-NH-、-CO-或-CONH-; $[P]$ 表示保护基团。

[0277] 在本文中, $R_2$ 的具体实例包括上述在式(4)中引用的那些结构。

[0278] 此外, $R_6$ 表示具有1~20个碳原子的烃链,在该烃链中可插入-O-、-S-、-NH-、-CO-或-CONH-,且其实例包括如下所示的结构。在下式中, $i$ 和 $j$ 表示1~5的整数,

[0279] [化学式 38]

[0280]



[0281] 此外,式(13)中保护基团 $[P]$ 的实例包括Boc、Fmoc和Tmoc等。

[0282] 同时,可引用常规酸处理作为脱去保护基团 [P] 的方法。

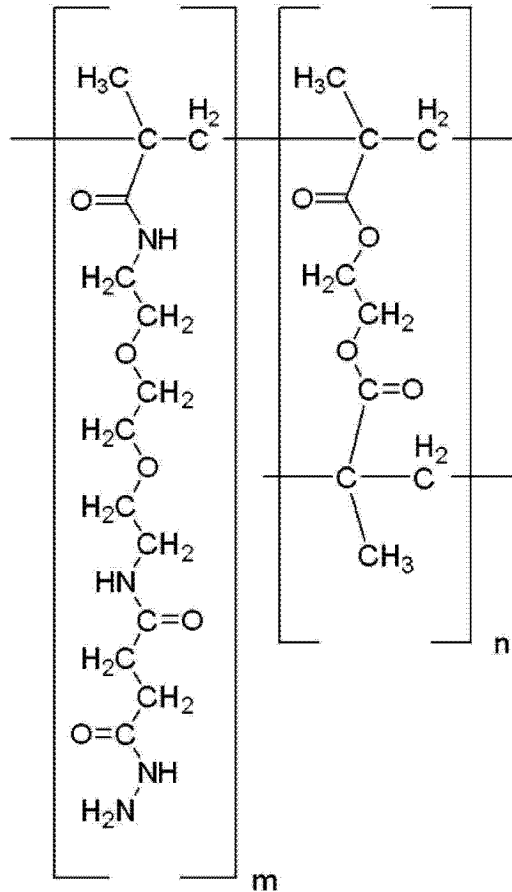
[0283] 从另一个观点来看,本发明提供了使用式(13)所示的单体获得如上述式(4)的物质 A 的制备方法、通过聚合此单体所得的聚合物、以及式(13)的物质。

[0284] 此外,在式(4)中,可引用具有下式(5)所示交联聚合物结构的那些物质作为特别适合的物质 A。

[0285] [化学式 39]

[0286] (式 5)

[0287]



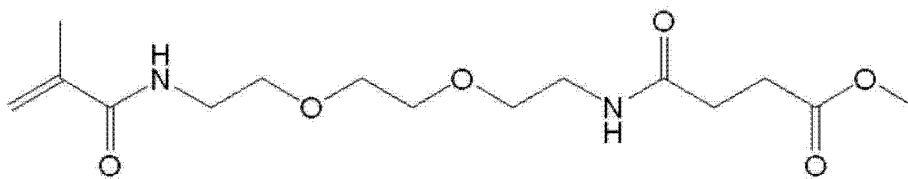
[0288] 其中,在上式中,  $m$  和  $n$  表示单体单元数目。

[0289] 在本文中,作为含酰肼基团化合物组分的前体羧酸酯单体,适合使用下式(11)所示的羧酸甲酯单体。此外,可使用乙二醇二(甲基)丙烯酸酯作为交联剂组分,

[0290] [化学式 40]

[0291] (式 11)

[0292]



[0293] 更确切地说,可以在交联剂的存在下聚合具有式(11)结构的单体从而获得包含羧酸酯的聚合物颗粒,随后使用浓度不小于 10 体积%的肼溶液处理包含羧酸酯的聚合物颗



粒,从而获得式(5)所示的物质 A。

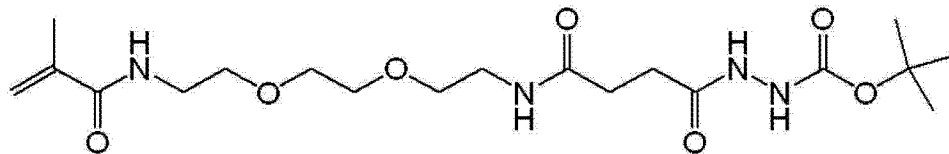
[0294] 从另一个观点来看,本发明提供了使用式(11)所示的单体获得如上述式(5)的物质 A 的制备方法、通过聚合此单体所得的聚合物、以及此式(11)物质。

[0295] 此外,在此制备方法中使用式(11)的羧酸酯单体作为起始原料时,可在交联剂的存在下将单体聚合以获得聚合物颗粒,随后使用胍溶液处理聚合物颗粒以获得式(5)的物质 A。然而,例如,在使用下式(14)的含酰肼基团的单体作为起始原料时,也可以在上述交联剂的存在下聚合此单体,随后进行脱保护,从而获得式(5)的物质 A。

[0296] [化学式 41]

[0297] (式 14)

[0298]



[0299] 此外,可引用常规酸处理作为脱去叔丁氧羰基(Boc)保护基团的方法。

[0300] 从另一个观点来看,本发明提供了使用式(14)所示的单体获得如上述式(5)的物质 A 的制备方法、通过聚合此单体所得的聚合物、以及此式(14)物质。

[0301] 此外,式(3)、式(4)或式(5)所示的物质 A 是每 1mg 干重具有不少于 100nmol,优选不少于 0.5  $\mu$ mol 的酰肼基团的聚合物颗粒。出于维持颗粒形状且基本不改变活性酰肼基团的含量考虑,优选所述物质在 pH3 ~ 8 下稳定,至少在不超过约 1MPa 的压力下稳定。此外,由于所述颗粒与交联剂共聚合,降低了其在溶剂中的溶解性,并获得十足的物理强度。此外,在 pH3 ~ 8 下没有结构部分被切除。

[0302] 从另一个观点来看,本发明提供了样品的制备方法,其包括糖链捕获步骤和糖链释放步骤,其中所述糖链捕获步骤包括根据上述样品制备方法将物质 A 与糖链和 / 或糖衍生物结合,所述糖链释放步骤包括使包含氨基或酰肼基团的物质 B 作用于糖链捕获步骤中被捕获的物质 A 与糖链和 / 或糖衍生物的复合物,并通过所述复合物与物质 B 之间发生的脎-脎交换反应或脎-脎交换反应使所述糖链和 / 或糖衍生物从物质 A 切除的同时与物质 B 结合。

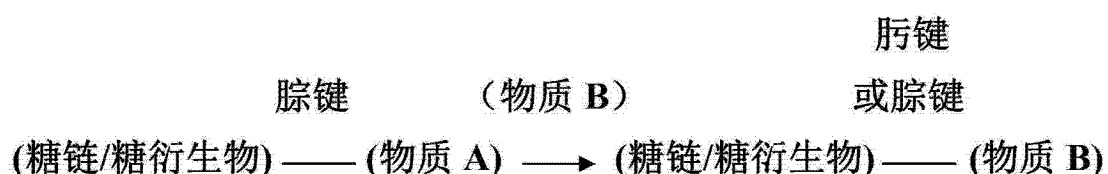
[0303] 如上所述,在此方法的糖链捕获步骤中,通过在物质 A 的酰肼基团与糖链和 / 或糖衍生物的还原末端间形成脎将物质 A 与糖链和 / 或糖衍生物相结合,从而使用物质 A 捕获糖链和 / 或糖衍生物。

[0304] 随后,如以下反应式(1)所示,在糖链释放步骤中进行脎-脎交换反应或脎-脎交换反应。

[0305] [化学式 42]

[0306] (反应式 1)

[0307]



[0308] 在本文中,可使用如上所述的物质作为物质 A。

[0309] 在本文中,物质 B 可以是低分子量化合物或固相载体的形式。

[0310] 从上述观点来看,与物质 A 类似,在使用低分子量化合物时优选物质 B 包含由精氨酸残基、色氨酸残基、苯丙氨酸残基、酪氨酸残基、半胱氨酸残基及其衍生物中的至少一个组成的部分。

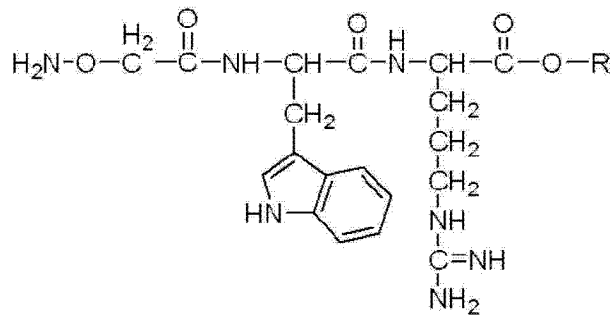
[0311] 更确切地说,通过在物质 B 中包含精氨酸残基或类似物等,可以提高糖链释放步骤中获得的物质 B 与糖链和 / 或糖衍生物的复合物在 MALDI-TOF-MS 测定中的检测灵敏度、反相 HPLC 分离性以及荧光检测灵敏度。

[0312] 此类物质 B 的实例包括对物质 A 所引用的低分子量化合物和具有下式 (7) 所示结构的化合物。此外,在式 (7) 中,也可将色氨酸部分取代为苯丙氨酸、酪氨酸或半胱氨酸等。

[0313] [化学式 43]

[0314] (式 7)

[0315]



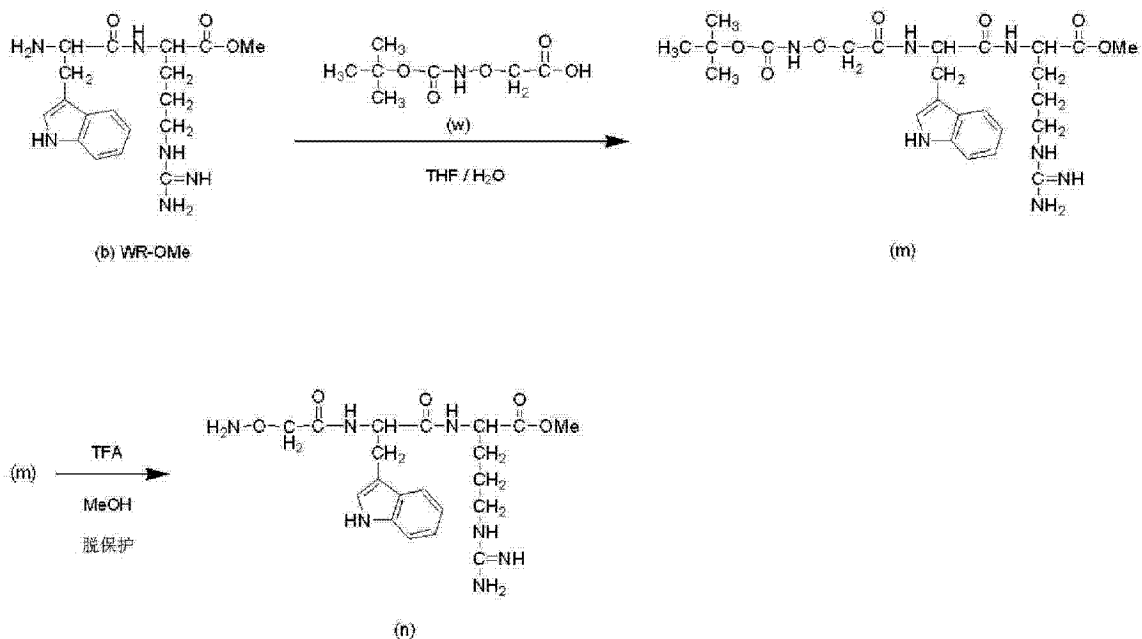
[0316] 其中,在上式中, R 表示  $-\text{CH}_3$  或  $-\text{CD}_3$ 。

[0317] 可根据以下流程图 3 制备式 (7) 的化合物。其中, R 是  $\text{CH}_3$ ,

[0318] [化学式 44]

[0319] (流程图 3)

[0320]



[0321] 在流程图 3 中,对其中色氨酸部分的氨基被苯基或类似物保护的化合物进行脱保护,从而获得化合物(b)(WR-OMe)。在本文中,也可将色氨酸部分取代为苯丙氨酸或酪氨酸等。随后,通过化合物(b)与 Boc-保护的羟胺(化合物(w))之间的缩合反应(例如混合酸酐法)等合成化合物(m)。所述羟胺的保护基团不限于如化合物(w)中的 Boc 基团,其也可以是 Fmoc 或 Troc 等。随后,通过对化合物(m)进行脱保护处理,获得如式(7)化合物的所需产物化合物(n)。例如,在保护基团是 Boc 时,可引用通过使用三氟乙酸(TFA)的方法作为此类脱保护的方法。

[0322] 如上所述,通过向物质 B 中引入精氨酸残基、色氨酸残基、苯丙氨酸残基、酪氨酸残基、半胱氨酸残基及其衍生物,能够以高精度和高灵敏度检测到捕获的糖链。

[0323] 此外,如式(7)所示,分子中可含有 2-氨基苯甲酰基团等的发色团或荧光团。除 2-氨基苯甲酰基基团外,此类基团的实例还包括例如苜基、萘基、葱基和比啉基等典型实例的芳香族残基;以及包含丹磺酰基或 Fmoc 基团的取代基。此类取代基是用于提供荧光的标记化合物,通常用于糖链的 HPLC 分析。因此,使用引入了此类取代基的物质 A 捕获的糖链和/或糖衍生物可被制成标记样品。通过使用此类标记样品,即可通过采用反相 HPLC 以高分辨率和高灵敏度分析被物质 A 捕获的糖链和/或糖衍生物。

[0324] 此外,如式(7)所述,可包含氘代取代基,例如氘代甲氧基酯基团或类似物。除了增强质谱检测灵敏度此作用外,利用质量数(mass numbers)的差异还能够对包含此类氘代官能团的样品进行定量分析,例如,通过在标准物带有重标记而样品带有轻标记的状态下混合标准物和样品来测量质量数的差异。

[0325] 因此,通过糖链释放步骤获得的物质 B 与糖链和/或糖衍生物的复合物也适于用作上述物质 A 与糖链和/或糖衍生物的复合物。

[0326] 对于物质 B,下文描述了具有式(7)所示结构的化合物,然而,物质 B 可以是如下物质或其盐,所述物质选自以下包含酰肼基团的物质或以下包含氨基的物质组成的组,

[0327] (包含酰肼基团的物质):5-二甲基氨基萘-1-磺酰肼(丹磺酰肼);2-胍基比啉;9-芴甲氧羰基胍(Fmoc-胍);苜基;4,4-二氟-5,7-二甲基-4-硼-3a,4a-二氮杂-s-茛-3-丙酰肼;2-(6,8-二氟-7-羟基-4-甲基香豆素)乙酰肼;7-二乙氨基香豆素-3-羧酰肼(DCCH);苜基;1-萘乙酰肼;2-胍基苯甲酸;和苯乙酰肼,或

[0328] (包含氨基的物质):0-苜基羟胺;0-苜基羟胺;0-(2,3,4,5,6-五氟苜基)羟胺;0-(4-硝基苜基)羟胺;2-氨基基比啉;2-氨基基甲基比啉;4-[(氨基基乙酰基)氨基]苯甲酸甲酯;4-[(氨基基乙酰基)氨基]苯甲酸乙酯;和 4-[(氨基基乙酰基)氨基]苯甲酸正丁酯。

[0329] 此外,为了以高精度和高灵敏度检测捕获的糖链,可向这些化合物引入包含发色团或荧光团的部分,或引入氘。

[0330] 在本文中,糖链释放步骤中的反应是通过将物质 B 引入到包含物质 A 与糖链和/或糖衍生物的复合物的样品中来进行的。将 pH 调整至 3~8,优选调整至 4~6,并在 4~90℃,优选 60~90℃的温度下,加热 15 分钟~16 小时,优选加热 15 分钟~5 小时,更优选加热 30 分钟~3 小时,从而进行所述反应。作为溶剂,优选使用水、挥发性有机溶剂(典型实例如乙腈和甲醇等)或其混合溶剂中的任何一种。更优选使用水和乙腈的混合溶剂,且最优选使用包含 2% 乙酸作为 pH 调节剂的水和乙腈(1:9)的混合溶剂。

[0331] 同时,在使用固相载体时,可使用上述对物质 A 所引用的物质,而作为物质 B,包含氨基的物质(例如,式(12)所示的物质)是适用的。

[0332] [化学式 45]

[0333] (式 12)

[0334] (载体)-R-OH<sub>2</sub>

[0335] 其中,在上式中,所述载体表示聚合物基体;R 表示具有 1~20 个碳原子的烃链,在该烃链中可插入 -O-、-S-、-NH-、-CO- 或 -CONH-。

[0336] 与式(3)中所述的载体类似,在式(12)中,所述载体是由无机物或有机聚合物组成的聚合物基体,且所述载体以颗粒或固相基板或与固相基板表面直接结合的物质形式使用。此外,R 的具体实例包括上述对式(3)所引用的那些结构。

[0337] 在本文中,通过向加入到容器或类似物中的捕获了糖链和/或糖衍生物的颗粒形式的物质 A 中添加低分子量化合物物质 B 的溶液进行糖链释放步骤的交换反应。此外,也可以将颗粒形式的上述物质 B 加入到容器或类似物中,并添加捕获了糖链和/或糖衍生物的低分子量化合物物质 A 的溶液,从而进行所述交换反应。或者,使低分子量化合物物质 B 的溶液通过填充有捕获了糖链和/或糖衍生物的颗粒状物质 A 的柱或类似物,从而进行所述交换反应。此外,也可以将颗粒形式的上述物质 B 装入柱或类似物中,并使捕获了糖链和/或糖衍生物的低分子量化合物物质 A 的溶液通过所述柱或类似物,从而进行所述交换反应。同样,也可以将低分子量化合物的物质 B 加入到捕获了糖链和/或糖衍生物的低分子量化合物物质 A 的溶液中,从而进行所述交换反应。

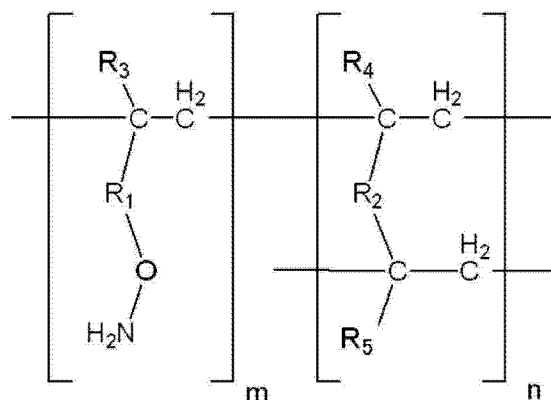
[0338] 在通过此交换反应获得的物质 B 与糖链和/或糖衍生物的复合物中,使用具有酰肼基团的物质作为物质 B 时,物质 B 与糖链和/或糖衍生物通过腙键结合;使用具有氨基的物质作为物质 B 时,物质 B 与糖链和/或糖衍生物通过脲键结合。

[0339] 作为式(12)所示的物质 B,具有下式(8)所示结构的聚合物颗粒是适用的,

[0340] [化学式 46]

[0341] (式 8)

[0342]



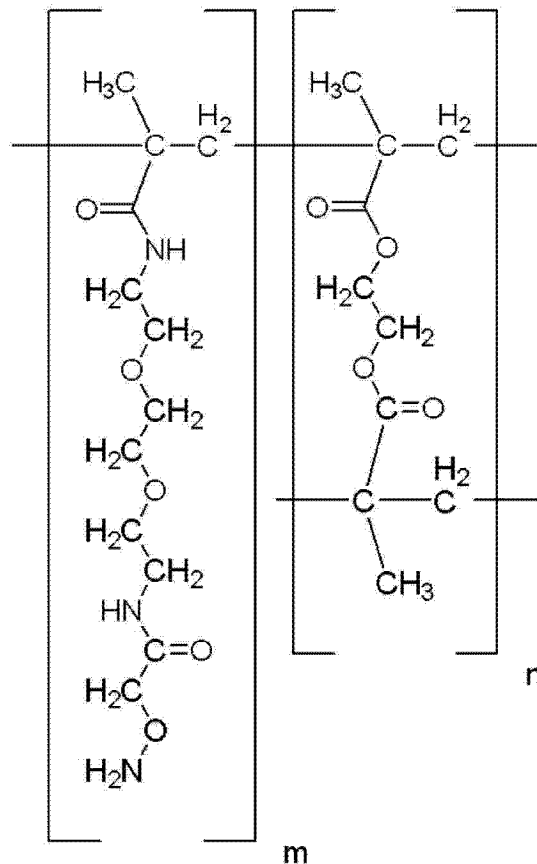
[0343] 其中,在上式中, $R_1$  和  $R_2$  表示具有 1~20 个碳原子的烃链,在该烃链中可插入 -O-、-S-、-NH-、-CO- 或 -CONH-;  $R_3$ 、 $R_4$  和  $R_5$  表示 H、CH<sub>3</sub> 或具有 2~5 个碳原子的烃链; m 和 n 表示单体单元数目。此外, $R_1 \sim R_5$  的具体实例包括上述对式(4)所引用的那些结构。

[0344] 此外,作为式(8)所示的聚合物颗粒,具有下式(9)所示结构的聚合物颗粒是适用的,

[0345] [化学式 47]

[0346] (式 9)

[0347]



[0348] 其中,在上式中,  $m$  和  $n$  表示单体单元数目。

[0349] 此外,从使用糖链捕获载体和使用固相基板的观点来看,优选式(12)、式(8)或式(9)所示的物质 B 在 pH3 ~ 8 下稳定,且至少在不超过 1MPa 的压力下稳定。

[0350] 此外,完成上述糖链释放步骤后,可进行至少一次或多次脘-脘交换反应或脘-脘交换反应。因此,可通过由任意任选的标记化合物构成的物质 B 对释放的糖链和 / 或释放的糖衍生物的作用获得标记样品,从而可将样品应用于预期的分析方法。

[0351] 在本文中提供了通过释放被糖链捕获物捕获的糖链获得标记样品的方法。然而,也可根据以下方法获得非标记样品,而且本发明也提供了此类样品的制备方法。

[0352] 此类样品的制备方法的特征在于:在酸性条件下处理具有如下式(3)、式(4)或式(5)所示结构且与糖链和 / 或糖衍生物结合的物质 A,从而解离脘键并释放糖链和 / 或糖衍生物。

[0353] 此时,使用 0.01 ~ 10 体积 % 的三氟乙酸溶液,优选 0.01 ~ 1 体积 % 的三氟乙酸溶液,在 25 ~ 80°C 下进行 5 ~ 60 分钟的所述酸性条件下的处理。

[0354] 由此获得的由糖链样品构成的分析样品没有被标记,且能够在不进行标记的用途中使用。

[0355] 这样,能够通过简单的操作从包含糖链和 / 或糖衍生物的生物样品中分离并纯化糖链和 / 或糖衍生物,以获得分析样品。从另一个观点来看,本发明提供了通过制备此分析样品的方法获得的分析样品。

[0356] 此外,从另一个观点来看,本发明提供了样品制备方法的应用,所述样品制备方法包括使用物质 A 捕获糖链的步骤。更确切地说,本发明提供了采用固相载体作为载体用以收集对糖链和 / 或糖衍生物具有结合性或亲和性的物质的应用方法,其中在所述固相载体上固定有通过分离和纯化混合物或混合物的特定部分而获得的糖链和 / 或糖衍生物。

[0357] 在此应用方法中,首先使用包含通过分离和纯化混合物或混合物的特定部分获得的糖链和 / 或糖衍生物的样品。进而,使用固相载体作为物质 A,使样品溶液通过此固相载体从而使样品中的糖链和 / 或糖衍生物与固相载体的酰肼基团或氨基结合,并被固定在固相载体上。

[0358] 然后,通过将用于进行诊断或检测的样本中收集的样品(下文中称为样本样品)作用于此固相载体,收集包含在此样本样品中对糖链和 / 或糖衍生物有结合性或亲和性的物质(例如,糖结合蛋白或类似物(如凝血素))。这样,可将固定有样本样品中的糖链和 / 或糖衍生物的固相载体用作收集样本样品中凝血素或类似物的载体。

[0359] 此外,对收集到的物质进行检测和定量分析,其中可对糖链与样本细胞分化、群增长、细胞粘附、免疫性以及细胞恶性变化(癌化)之间的关系作进一步分析。

[0360] 此外,从另一个观点来看,本发明提供了样品制备方法的应用,其中所述样品制备方法包括糖链捕获步骤和糖链释放步骤。

[0361] 从一个观点来看,本发明提供了糖链微阵列的制备方法。

[0362] 更确切地说,在此糖链微阵列的制备方法中,根据以下步骤(1)~(4)将糖链和 / 或糖衍生物固定到由包含物质 B 的固相载体组成的固相基板的表面,其中所述物质 B 具有下式(3)或式(12)所示的结构,

[0363] [化学式 48]

[0364] (式 3)

[0365] (载体)-R-NHNH<sub>2</sub>

[0366] 其中,在上式中,所述载体表示聚合物基体;R 表示具有 1~20 个碳原子的烃链,在该烃链中可插入 -O-、-S-、-NH-、-CO- 或 -CONH-;

[0367] [化学式 49]

[0368] (式 12)

[0369] (载体)-R-ONH<sub>2</sub>

[0370] 其中,在上式中,所述载体表示聚合物基体;R 表示具有 1~20 个碳原子的烃链,在该烃链中可插入 -O-、-S-、-NH-、-CO- 或 -CONH-。

[0371] 此外,这些物质的具体实例包括上述引用的那些物质。

[0372] (步骤 1)通过特定的分离方法使糖链和 / 或糖衍生物与包含可溶性酰肼基团的化合物相结合,从而纯化和 / 或分离糖链和 / 或糖衍生物的步骤,

[0373] (步骤 2)将步骤(1)获得的化合物的液滴按行分散(dispense)到上述固相基板的步骤,

[0374] (步骤 3)完成液滴分散后,在指定条件下通过温育固相基板进行糖链-物质 A 结合物与固相基板-糖链结合物的交换反应,并将糖链和 / 或糖衍生物固定到固相基板上的步骤,和

[0375] (步骤 4)清洗并除去固相基板上未反应物质的步骤。

[0376] 在步骤(1)中,通过上述糖链和 / 或糖衍生物与物质 A 的反应以利用物质 A 捕获糖链和 / 或糖衍生物,从而使用特定的分离方法(例如色谱或类似技术)纯化和 / 或分离糖链和 / 或糖衍生物。在步骤(2)中,将步骤(1)获得的糖链和 / 或糖衍生物的液滴按行分散到上述固相基板上。在步骤(3)中,通过在例如 pH5,温度 60 ~ 90℃且反应时间 1 ~ 16 小时的条件下温育固相基板,进行上述反应式(1)所示的交换反应。其结果是糖链和 / 或糖衍生物固定到固相基板上。在步骤(4)中,通过使用缓冲剂或类似物的常规方法进行清洗并除去步骤(3)中未反应的物质。

[0377] 从另一个观点来看,本发明提供了通过此方法获得的糖链微阵列。此糖链微阵列可被用作载体以收集例如与样本样品中所含的糖链和 / 或糖衍生物相互作用的物质。因此,能够对收集到的物质进行鉴定或定量分析等。

[0378] 从另一个观点来看,本发明提供了糖链微阵列的应用。

[0379] 例如,使含样本的溶液与此糖链微阵列的表面接触以在指定条件下进行温育并清洗,随后检测固相基板上糖链和 / 或糖衍生物液滴分布区域中收集的糖结合物质,由此提供用于搜索特异结合或吸附固定了的糖链和 / 或固定了的糖衍生物的糖结合物质的搜索系统。

[0380] 在此搜索系统中,根据上述方法,从进液管或类似物将包含样本(样品)的溶液加入到固定有糖链和 / 或糖衍生物的固相基板中,并且使样本样品与糖链和 / 或糖衍生物接触。

[0381] 此外,在样本样品与糖链和 / 或糖衍生物相接触的状态下温育固相基板。此时,在如 pH4 ~ 10、温度 37℃及反应时间 1 ~ 16 小时的条件下进行温育。

[0382] 作为温育的结果,可对被糖链和 / 或糖衍生物收集到的糖结合物质(例如,如凝集素的蛋白质或类似物)进行检测。此时作为检测方法和检测工具,当能够对糖结合物质进行直接荧光染色,则可以在完成染色后使用荧光扫描仪测定荧光,由此检测所述物质;当糖结合物质是已知的且与特定的抗体相结合,则进行抗体结合,由此检测所述物质。此外,当糖结合物质是蛋白质时,所述方法不限于此,可以应用检测蛋白质的其他常规方法。

[0383] 根据此系统可检测收集到的糖结合物质,由此能够搜索出特异结合或吸附固定了的糖链和 / 或固定了的糖衍生物的糖结合物质。因此,可以对糖链与样本细胞分化、群增长、细胞粘附、免疫以及细胞中的恶性变化(癌化)之间的关系作进一步分析。

[0384] 此外,例如本文提供了用于评估结合蛋白质的识别特异性评估系统作为上述糖链微阵列的应用。其通过如下程序操作:将包含样本的溶液与糖链微阵列表面相接触,收集固相基板上糖链和 / 或糖衍生物的液滴分散区的样本中的糖结合蛋白质,并通过指定方式(例如,荧光或显色等)对收集量进行定量分析。

[0385] 如上所述,使用由固定有糖链和 / 或糖衍生物的固相基板构成的糖链微阵列收集样本样品中的糖结合蛋白质,并对收集量进行定量分析。

[0386] 根据此系统,可基于所得结果评估结合蛋白质的识别特异性。

[0387] 此外,从另一观点来看,本发明提供了糖链亲和珠(sugar chain affinity beads)的制备方法作为包括糖链捕获步骤和糖链释放步骤的样品制备方法的应用。

[0388] 更确切地说,所述糖链亲和珠的制备方法包括将糖链和 / 或糖衍生物固定到构成固相载体的聚合物表面,其中所述固相载体由具有下式(3)或式(12)所示结构的物质 B 组

成,

[0389] [化学式 50]

[0390] (式 3)

[0391] (载体)-R-NHNH<sub>2</sub>

[0392] 其中,在上式中,所述载体表示聚合物基体;R 表示具有 1~20 个碳原子的烃链,在该烃链中可插入 -O-、-S-、-NH-、-CO- 或 -CONH-

[0393] [化学式 51]

[0394] (式 12)

[0395] (载体)-R-ONH<sub>2</sub>

[0396] 其中,在上式中,所述载体表示聚合物基体;R 表示具有 1~20 个碳原子的烃链,在该烃链中可插入 -O-、-S-、-NH-、-CO- 或 -CONH-

[0397] 此外,这些物质的具体实例包括如上所述的那些物质。

[0398] 此外,在糖链亲和珠的制备方法中,可通过以下步骤(1)~(3)将糖链和/或糖衍生物固定到聚合物颗粒表面上,

[0399] (步骤 1)通过特定的分离方法使糖链和/或糖衍生物与包含可溶性酰肼基团的化合物相结合,从而纯化和/或分离糖链和/或糖衍生物的步骤,

[0400] (步骤 2)通过将步骤(1)所得的化合物与聚合物颗粒相接触,并在指定条件下进行温育以使糖链-含酰肼化合物结合物和糖链-聚合物颗粒结合物进行交换,从而将糖链和/或糖衍生物固定到聚合物颗粒上的步骤,和

[0401] (步骤 3)清洗并除去聚合物颗粒上未反应物质的步骤。

[0402] 在步骤(1)中,通过上述糖链和/或糖衍生物与物质 A 的反应以用物质 A 捕获糖链和/或糖衍生物,从而使用特定的分离方法(例如色谱或类似技术)纯化和/或分离糖链和/或糖衍生物。此外,此时糖链捕获反应的条件的具体实例包括:pH4~7,反应温度 25~90℃和反应时间 1~16 小时的条件,特别是 pH5,反应温度 80℃和反应时间 1 小时。

[0403] 在步骤(2)中,通过使步骤(1)获得的糖链和/或糖衍生物与聚合物颗粒相接触且在特定条件下温育固相基板,从而进行上述反应式(1)中所示的交换反应,其中所述特定条件如 pH4~7,反应温度 25~90℃和反应时间 1~16 小时,特别是 pH5,反应温度 80℃和反应时间 1 小时。其结果是糖链和/或糖衍生物固定到聚合物颗粒上。在步骤(3)中,通过使用缓冲剂或类似物的常规方法进行清洗并除去步骤(2)中未反应的物质。

[0404] 此外,预先使用具有酰肼基团的物质 A 捕获糖链和/或糖衍生物,并使用物质 B 进行交换反应,由此制备糖链亲和珠。糖链亲和珠的制备方法不限于此。可以使包含糖链和/或糖衍生物样品与聚合物颗粒直接接触,由此制备糖链亲和珠,其中所述聚合物颗粒是使用由物质 B 组成的固相载体制备的。

[0405] 从另一个观点来看,本发明提供了通过此方法获得的糖链亲和珠。此外,本发明提供了作为糖链亲和珠的应用的糖链结合物的分离系统。

[0406] 更确切地说,在糖链结合物的分离系统中,包含样本(样品)的溶液与上述糖链亲和珠相接触,在指定条件下进行温育和清洗,随后将捕获的糖结合物质分离。

[0407] 在此系统中,首先使包含样本样品的溶液与糖链亲和珠相接触以在指定条件(例如, pH4~10,反应温度 37℃和反应时间 1~16 小时)下在含 Ca<sup>2+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup> 的缓冲液中进行



温育,由此在固定到糖链亲和珠表面的糖链和/或糖衍生物上收集糖结合物质。此外,通过使用缓冲剂或类似物的常规清洗工序清洗收集了糖结合物质的糖链亲和珠表面。

[0408] 此外,从糖链亲和珠分离收集到的糖结合物质。此时,从糖链亲和珠释放糖结合物质的方法可例示为:例如,包括添加有机溶剂(例如甲醇或类似物)并分离糖和糖结合物质的方法;包括添加高浓度(0.1至1M)半抗原糖溶液并分离糖结合物质(即,将凝集素转移至所添加的高浓度糖溶液)的方法;等等。

[0409] 如上所述,本发明的样品制备方法可在多种用途中应用。

## 实施例

[0410] 现参照以下实验例详细说明本发明。然而,本发明并不限于这些实验例。

[0411] 实验例 1

[0412] (A) 制备含酰肼基团的化合物

[0413] 低分子量酰肼化合物

[0414] 1. 使用商购产品作为以下的酰肼化合物,

[0415] 5-二甲基氨基萘-1-磺酰肼(丹磺酰肼);2-胍基比啶;9-芴甲氧羰基胍(Fmoc-胍);苜胍;4,4-二氟-5,7-二甲基-4-硼-3a,4a-二氮杂-s-茛-3-丙酰肼(BODIPY(tm)FL酰肼);2-(6,8-二氟-7-羟基-4-甲基香豆素)乙酰肼(Marina Blue(tm)酰肼);7-二乙氨基香豆素-3-羧酰肼(DCCH);苜胍;1-萘乙酰肼;和2-胍基苯甲酸。

[0416] 2. AcWRh (物质 A) 的合成

[0417] 通过上述流程图 1 (Ac 表示乙酰基团,W 表示色氨酸残基,R 表示精氨酸残基,h 表示酰肼基团) 所示途径合成 AcWRh。

[0418] (1) WR-OMe (化合物(b)) 的合成

[0419] 将甲醇(5ml)添加到 Z-WR-OMe (a) (10mg, 20mmol) 和 10%Pd/C (10mg) 中,在室温下氢气气氛中搅拌所得混合物 2 小时。使用水性膜滤器(aqueous membrane filter)过滤反应溶液以除去 Pd/C,减压下浓缩滤液,由此获得所需的化合物(b) (WR-OMe)。通过 MALDI-TOF-MS 分析,在 m/z :376 观测到预期产物  $[M+H]^+$  离子。

[0420] (2) AcWROMe (c) 的合成

[0421] 将 WR-OMe (b) (53mg, 0.14mmol) 溶于 1ml DMF,并向其中加入 WSC (40mg, 0.20mmol)、DMAP (5mg, 0.041mmol) 和乙酸(200  $\mu$ l)。在室温下搅拌所得混合物 3 小时。此外,再加入 WSC (50mg, 0.26mmol) 并搅拌过夜。将反应溶液浓缩,并通过硅胶柱层析(氯仿:甲醇=1:1)纯化所得残余物,由此获得预期的 AcWROMe。

[0422]  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.70-7.00 (m, 5H, 吡啶), 3.62 (s, 3H, OMe), 1.93 (s, 3H, Ac)

[0423] (3) AcWRh (d) 的合成

[0424] 将 10mg AcWROMe 溶于 10% 胍/甲醇(5ml) 中,并使所得溶液在室温下反应 12 小时,随后进行浓缩,由此制得 AcWRh (d)。通过 MALDI-TOF-MS 分析,在 m/z :416.89 观测到预期产物的  $[M+H]^+$  离子。

[0425] 另一方面,根据上述工序制备了乙酰基被氘取代的 d-AcWRh (e)。

[0426] d-AcWROMe : $^1\text{H NMR}$  (500MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.59-6.99 (m, 5H, 吡啶), 3.62 (s, 3H, OMe), 1

. 93(s, 3H, Ac), d-AcWRh :MALDI-TOF-MS  $[M+H]^+_{m/z}$  :419. 94

[0427] 含酰胺基团的聚合物珠的合成

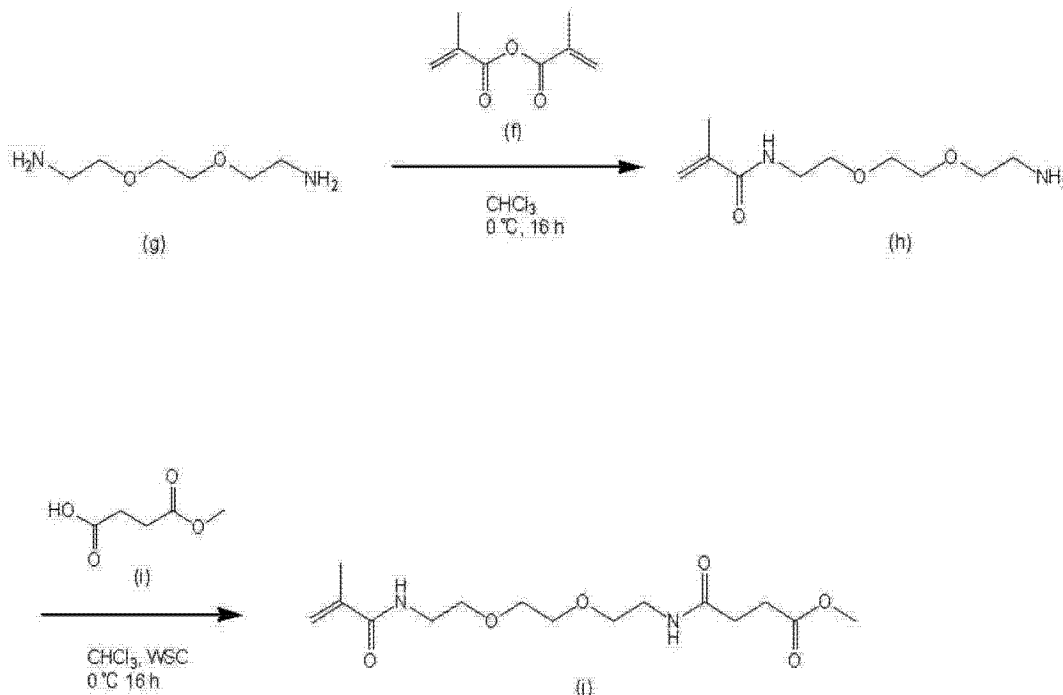
[0428] 1. 含甲酯的单体的合成

[0429] 通过以下流程图 4 所示途径合成含甲酯的单体,

[0430] [化学式 52]

[0431] (流程图 4)

[0432]



[0433] (1) 化合物(h)的合成

[0434] 在冰浴中,将通过在 100ml 氯仿中溶解甲基丙烯酸酐(MAH :5g, 0. 03mol) (f)制得的溶液滴加到通过在 100ml 氯仿中溶解 25g( 乙烯二氧) 双( 乙胺)(EDBEA :25g, 0. 17mol) (g)制得的溶液中。向所得物质中充入氮气,并搅拌内容物过夜。从所得反应溶液中蒸发除去溶剂获得残余物,利用硅胶柱层析(展开剂 :90 体积% 氯仿 /10 体积% 甲醇的混合溶剂)将其纯化,获取指定成分,从该成分中蒸发除去溶剂,由此获得化合物(h)。

[0435] (2) 化合物(j)的合成

[0436] 将 5g 化合物(h) (0. 023mol)溶于 100ml 氯仿中,并向由此制备的溶液中添加 1. 5 当量的丁二酸单甲酯(i)和 1. 5 当量的水溶性碳二亚胺化合物(WSC),即 1- 乙基 -3-(3- 二甲氨基丙基) 碳二亚胺。将反应容器密封并充入氮气,将内容物搅拌过夜。从所得反应溶液中蒸发除去溶剂,利用硅胶柱层析(展开剂 :90 体积% 氯仿 /10 体积% 甲醇的混合溶剂)将其纯化,获取指定成分,从该成分中蒸发除去溶剂,由此获得化合物(j)。

[0437] 此外,通过 NMR 和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)确认所得物质为化合物(j)。

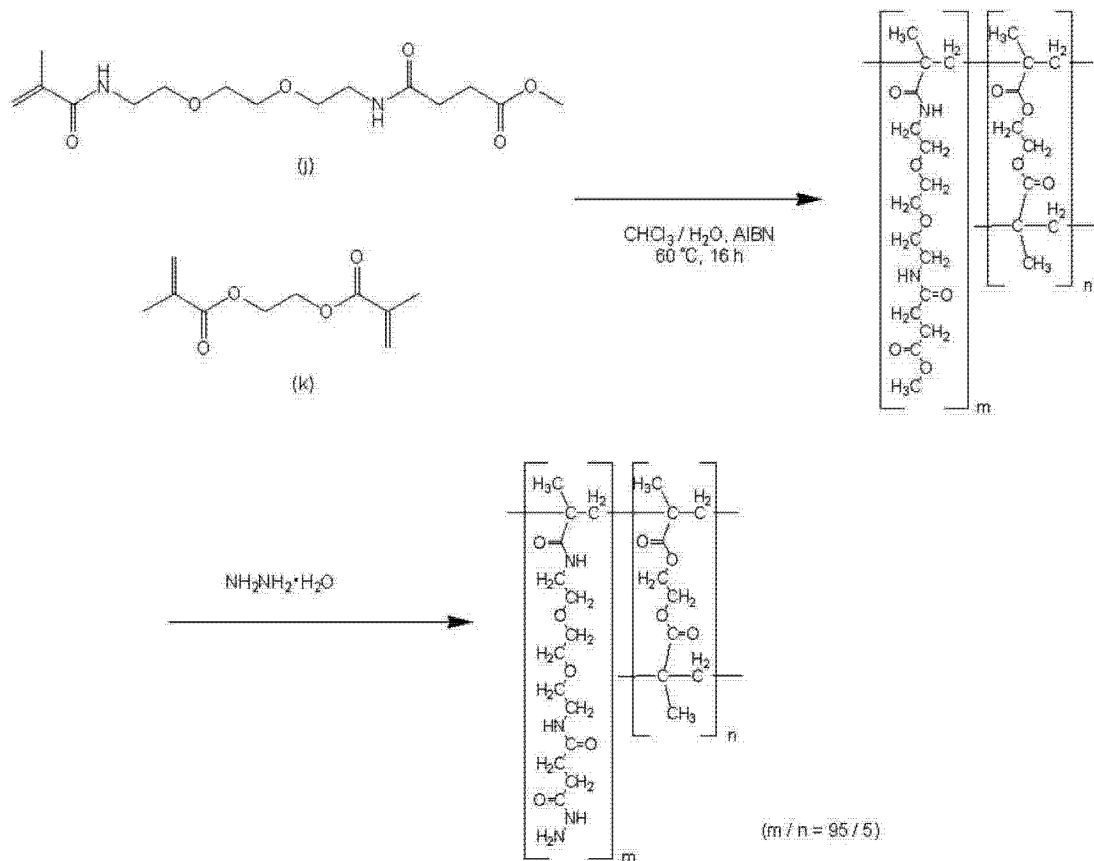
[0438] 2. 含甲酯的聚合物的合成

[0439] 通过以下流程图 5 所示途径合成含甲酯的聚合物颗粒,

[0440] [化学式 53]

[0441] (流程图 5)

[0442]



[0443] 向三颈烧瓶中加入 25ml 15% 聚乙烯醇 (PVA) 的水溶液并对其充氮冲洗。向所述三颈烧瓶中加入由 1g (2.6mmol) 化合物 (j)、二甲基丙烯酸乙二醇酯 (k) (EGDMA : 以化合物 (j) 计为 5 摩尔 %) 和 1ml 氯仿构成的混合物, 在  $60^\circ\text{C}$  的温度下搅拌反应溶液, 从而使化合物 (j) 和 EGDMA (混合物中含有的单体) 分散于 PVA 水溶液中。随后, 加入作为聚合引发剂的偶氮二异丁腈 (AIBN : 以单体计为 3 重量 %) 以引发聚合反应。在  $60^\circ\text{C}$  下反应 16 小时, 随后通过离心法收集所得聚合物颗粒, 并使用甲醇和水清洗。

[0444] 3. 酰肼基团的引入

[0445] 在容器中装入 400mg 聚合物颗粒, 加入 4ml 单水合肼 (hydrazine monohydrate), 搅拌所得混合物, 在室温下静置 2 小时。反应后, 除去单水合肼, 并使用甲醇清洗所得反应物, 随后使用 1M 盐酸进行漂洗。此后, 使用纯水进一步清洗所得反应物。

[0446] 4. 官能团量的定量分析

[0447] 在容器中装入 1mg 聚合物颗粒。向其中加入  $1\ \mu\text{mol}$  N-乙酰-D-乳糖胺 (LacNAc), 并进一步加入  $180\ \mu\text{l}$  含 2% 乙酸的乙腈。在  $80^\circ\text{C}$  下加热所得物 45 分钟, 由此使 LacNAc 与珠上的酰肼基团发生反应。使用纯水漂洗珠以回收未反应的糖链, 通过 MALDI-TOF-MS (内标法) 检测进行定量分析, 从而得知 LacNAc 与珠的结合量。发现每 1mg 珠上结合了  $0.86\ \mu\text{mol}$  ( $860\text{nmol}$ ) 的 LacNAc。

[0448] 含酰肼基团的商购珠

[0449] 直接使用 Bio-Rad Co., Ltd 生产的 Affi-Gel Hz。

[0450] 1. 官能团量的定量分析

[0451] 在容器中装入 50  $\mu$  l (以珠干重计为 16.5mg) Affi-Gel Hz 的分散体。向其中加入 1  $\mu$  mol LacNAc, 并进一步加入 180  $\mu$  l 含 2% 乙酸的乙腈。在 80°C 加热所得物 45 分钟, 由此使 LacNAc 与珠上的酰肼基团发生反应。使用纯水漂洗珠以回收未反应的糖链, 通过 MALDI-TOF-MS (内标法) 检测进行定量分析, 从而得知 LacNAc 与珠的结合量。发现每 1mg 珠(干重) 结合约 8nmol 的 LacNAc。

[0452] (B) 含氨基的化合物的合成

[0453] 含氨基的低分子量化合物 aoWR 的合成

[0454] 根据上述流程图 3 (ao 表示氨基) 合成 aoWR (化合物(n))。

[0455] (1) Boc-NHOCH<sub>2</sub>CO-W-R-OMe (化合物(m)) 的合成

[0456] 将 Boc-氨基乙酸(1) (2.5mmol) 的 THF (6ml) 溶液冷却至 -20°C。然后, 向其中加入 N-甲基吗啉(3.0mmol) 和甲酸异丁酯(3.0mmol), 并将所得混合物搅拌 15 分钟, 由此制备混合酸酐。将反应溶液置于 0°C 的温度下, 将化合物(b) (WR-OMe (3.0mmol)) 溶于水(3ml), 加入碳酸氢钠(3.0mmol) 以制备 WR-OMe 溶液。将 WR-OMe 溶液与另一反应溶液混合, 并将所得混合物搅拌 1 小时。减压下浓缩该反应溶液, 并通过硅胶柱层析纯化所得残余物, 由此获得所需的化合物(m) (Boc-NHOCH<sub>2</sub>CO-W-R-OMe)。通过 MALDI-TOF-MS 分析, 在 m/z :547 观测到预期产物 [M+H]<sup>+</sup> 离子。

[0457] (2) NH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CO-W-R-OMe (化合物(n)) 的合成

[0458] 向化合物(m) 添加三氟乙酸(TFA) (2ml), 并在 -20°C 下搅拌所得混合物 2 小时。减压下浓缩该反应溶液, 加入甲苯并重复共沸反应溶液以除去 TFA, 由此获得所需的化合物(n)。通过 MALDI-TOF-MS 分析, 在 m/z :448 观测到预期产物 [M+H]<sup>+</sup> 离子。

[0459] 另一方面, 根据上述方工序制备了甲基中的氢为氘的 aoWR (H) 以及氢为氘的 aoWR (D)。

[0460] 含氨基的聚合物珠的合成

[0461] 根据专利文献国际公布小册第 2005/097844 号中所述的方法制备含氨基的聚合物颗粒。

[0462] 实验例 2

[0463] 糖链样品的制备

[0464] (1) 糖蛋白糖链的制备

[0465] 使用胎球蛋白作为糖蛋白或使用核糖核酸酶 B 作为样品。在容器中装入 10mg 糖蛋白并将其溶于 50mM 碳酸氢铵溶液。向其中加入少量表面活性剂, 并在 60°C 下温育该反应溶液 30 分钟, 随后加入 10 单位的 N-糖苷酶 F (Roche 产品), 并在 37°C 下温育所得溶液 16 小时, 由此释放糖链。

[0466] (2) 血清中所含的糖蛋白糖链的制备

[0467] 在容器中装入 5mL 正常血清并将其溶于 50mM 碳酸氢铵溶液。向其中加入少量表面活性剂, 并在 60°C 下温育该反应溶液 30 分钟, 随后加入 5 单位的 N-糖苷酶 F (Roche 产品), 并在 37°C 下温育所得溶液 16 小时, 由此释放糖链。

[0468] 实验例 3

[0469] 低分子量酰肼化合物与糖链的反应

[0470] (1) 商购酰肼化合物与糖链的反应

[0471] 将实验例 1 (A) 的酰肼化合物以 10mM 的浓度溶于甲醇或乙腈, 从而获得酰肼化合物溶液。向实验例 2 (1) 的胎球蛋白糖链溶液(相当于 500pmol) 中添加 1  $\mu$  l 酰肼化合物溶液, 并进一步添加 100  $\mu$  l 乙腈。在 80 $^{\circ}$ C 下加热该反应溶液 45 分钟, 由此使糖链与酰肼化合物发生反应。反应完成后, 通过 MALDI-TOF-MS 对产物进行测定。

[0472] 图 1 示出的是一般性使用 2- 胍基比啶时的 MALDI-TOF-MS 图谱, 其中所示峰的位置表示相互结合的糖链(在图中, 结构以示意图表示)和 2- 胍基比啶的分子量。使用其他化合物时可获得相同的结果。

[0473] (2) AcWRh 与糖链的反应

[0474] 将实验例 1 (A) 的 AcWRh 溶于甲醇或乙腈至浓度为 10mM, 从而获得酰肼化合物溶液。在容器中装入实验例 2 (2) 的血清糖链溶液(相当于 5  $\mu$  l 血清)。向其中加入 1  $\mu$  l 酰肼化合物溶液, 并进一步加入 100  $\mu$  l 乙腈。在 80 $^{\circ}$ C 下加热所得物 45 分钟, 由此使糖链与酰肼化合物(AcWRh) 发生反应。反应完成后, 通过 MALDI-TOF-MS 对产物进行测定。

[0475] 图 2 示出的是 MALDI-TOF-MS 图谱, 其中所示峰的位置表示相互结合的糖链(在图中, 结构以示意图表示)和 AcWRh 的分子量。

[0476] 实验例 4

[0477] 含酰肼基团的聚合物珠与糖链的反应

[0478] 在容器中称取 2.5mg 实验例 1 (A) 的含酰肼基团的聚合物珠。加入实验例 2 (2) 的血清糖链溶液(相当于 5  $\mu$  l 血清), 并进一步添加 180  $\mu$  l 含 2% 乙酸的乙腈。在 80 $^{\circ}$ C 下加热所得物 45 分钟, 由此使糖链与珠上的酰肼基团发生反应。用少量纯水漂洗珠以回收未反应的糖链, 并通过 MALDI-TOF-MS (内标法) 检测进行定量分析。结果发现 80% ~ 90% 的糖链与珠结合。然后, 使用 0.5% 十二烷基硫酸钠(SDS) 水溶液、50% 甲醇、4M 胍水溶液和纯水清洗珠, 并将其应用于下文所述的糖链再释放实验中。

[0479] 实验例 5

[0480] 标记的糖链的制备

[0481] (1) AcWRh (d)、AcWRh (e) 与糖链的结合

[0482] 向壳三糖水溶液中加入 10 当量实验例 1 (A) 的 AcWRh (d) 或 d-AcWRh (e), 并使用乙酸将 pH 调至 5。在 90 $^{\circ}$ C 下加热该反应溶液 1 小时, 由此获得标记的壳三糖 -AcWRh(d) 和标记的壳三糖 -d-AcWRh (e)。

[0483] (2) aoWR (H)、aoWR (D) 与糖链的结合

[0484] 向壳三糖水溶液中加入 10 当量实验例 1 (B) 的 aoWR (H) 或 aoWR (D), 且用乙酸将其 pH 调至 5。在 90 $^{\circ}$ C 下加热该反应溶液 1 小时, 从而获得标记的壳三糖 -aoWR。

[0485] 实验例 6

[0486] 官能团的液相交换反应

[0487] 在以下交换反应中, 使以含酰肼基团的化合物标记的糖链与含氨基的化合物(或含酰肼基团的化合物) 反应, 由此通过脲 - 胍交换(或脲 - 脲交换) 将标记的转移。作为比较, 也尝试对以含氨基的化合物标记的糖链进行标记的转移。通过 MALDI-TOF-MS 确定反应的进程。

[0488] (A) 官能团的交换反应

[0489] (1) 脲 - 脲交换反应

[0490] 向实验例 5 (1) 的标记的壳三糖 -AcWRh (d) 溶液中加入 10 当量实验例 1 (A) 的 d-AcWRh (e), 并使用乙酸将其 pH 调至 5。在 90°C 下加热该反应溶液 1 小时, 随后取出部分反应溶液, 并与作为内标的已知浓度的实验例 5 (2) 的标记的壳三糖 -aoWR (H) 相混合。通过 MALDI-TOF-MS 分析所得混合物, 并计算出反应溶液中所含标记的壳三糖 -AcWRh (d) 与由此反应获得的标记的壳三糖 -d-AcWRh (e) 的比例。

[0491] (2) 脞 - 脞交换反应

[0492] 向实验例 5 (1) 的标记的壳三糖 -AcWRh (d) 溶液中加入 10 当量实验例 1 (B) 的 aoWR (H), 并使用乙酸将其 pH 调至 5。在 90°C 下加热该反应溶液 1 小时, 随后取出部分反应溶液, 并与作为内标的已知浓度的实验例 5 (2) 的标记的壳三糖 -aoWR (D) 相混合。通过 MALDI-TOF-MS 分析所得混合物, 并计算出反应溶液中所含标记的壳三糖 -AcWRh (d) 与由此反应获得的标记的壳三糖 -aoWR (H) 的比例。

[0493] (3) 脞 - 脞交换反应

[0494] 向实验例 5 (2) 的标记的壳三糖 -aoWR (H) 溶液中加入 10 当量实验例 1 (A) 的 AcWRh (d), 且用乙酸将其 pH 调至 5。在 90°C 下加热该反应溶液 1 小时, 随后取出部分反应溶液, 并与作为内标的已知浓度的实验例 5 (1) 的标记的壳三糖 -d-AcWRh (e) 相混合。通过 MALDI-TOF-MS 分析所得的混合物, 并计算出反应溶液中所含标记的壳三糖 -aoWR (H) 与由此反应获得的标记的壳三糖 -AcWRh (d) 的比例。

[0495] (4) 脞 - 脞交换反应

[0496] 向实验例 5 (2) 的标记的壳三糖 -aoWR (H) 溶液中加入 10 当量实验例 1 (B) 的 aoWR (D), 并使用乙酸将其 pH 调至 5。在 90°C 下加热该反应溶液 1 小时, 随后取出部分反应溶液, 并与作为内标的已知浓度的实验例 5 (1) 的标记的壳三糖 -AcWRh (d) 相混合。通过 MALDI-TOF-MS 分析所得混合物, 并计算出反应溶液中所含标记的壳三糖 -aoWR (H) 与由此反应获得的标记的壳三糖 -aoWR (D) 的比例。

[0497] (B) 官能团交换反应的研究

[0498] 图 3 是上述 4 种交换反应模式的产量的示意图。

[0499] 发现脞 - 脞交换反应和脞 - 脞交换反应的效率高于脞 - 脞交换反应和脞 - 脞交换反应。也就是说, 脞键比脞键更易于发生交换反应。此外, 还发现脞 - 脞交换的进行效率优于脞 - 脞交换。

[0500] 实验例 7

[0501] 固相至液相的交换反应

[0502] (A) 交换反应效率的比较

[0503] 从实验例 6 中液相交换反应的结果发现脞 - 脞交换的进行效率最高。如下所示, 以相同的方式比较固相至液相的交换反应的效率。

[0504] 为了比较, 使用实验例 4 捕获了血清糖链的包含酰肼基团的珠以及以实验例 4 的相同方式捕获了血清糖链的包含氨基的珠。向每种糖链捕获珠添加 20  $\mu$ l aoWR (H) 溶液 (20mM) 或 AcWRh (H) 溶液 (20mM), 以及 180  $\mu$ l 12% 乙酸 / 乙腈溶液, 并在 80°C 下加热所得混合物 45 分钟。反应完成后, 回收上清液并进行 MALDI-TOF-MS 检测。

[0505] 图 4 是 MALDI-TOF-MS 图谱。

[0506] 从图谱中的 S/N 比清楚得知, 当包含酰肼基团的珠捕获糖链且用氨基化合物释

放糖链时获得的效率最高。此结果与实验例 6 中液相反应效率的比较结果一致。

[0507] (B) 通过交换反应从珠再释放糖链

[0508] (1) 从包含酰肼基团的聚合物珠再释放糖链

[0509] 向实验例 4 中与糖链结合的包含酰肼基团的聚合物珠添加 20  $\mu$ l acWR (H) 溶液 (20mM) 和 180  $\mu$ l 2% 乙酸 / 乙腈溶液, 并在 80 $^{\circ}$ C 下加热所得混合物 45 分钟。反应完成后, 回收上清液并向其中添加内标物(壳三糖)以进行 MALDI-TOF-MS 测定, 由此计算出回收糖链的量。

[0510] (2) 从商购珠(Affi-Ge1 Hz)再释放糖链

[0511] 使用以实验例 4 的相同方式捕获血清糖链的 Affi-Ge1 Hz, 通过实验例 7 (B) (1) 中的相同方式释放糖链, 由此计算出回收糖链的量。

[0512] 图 5 示出在实验例 7 (B) (1) 的方法中回收的糖链的 MALDI-TOF-MS 图谱。

[0513] 根据由内标物信号量的计算结果, 发现能够回收使用的 56% 的糖链量。

[0514] 图 6 示出在实验例 7 (B) (2) 的方法中回收的糖链的 MALDI-TOF-MS 图谱。同时示出了实验例 7 (B) (1) 中回收的糖链的图谱。

[0515] 从质谱的 S/N 比值可明显看出, 使用商购珠时糖链的回收量较少。还发现, 即使将商购珠的使用量增加 3 倍, 仍然不能达到包含酰肼基团的聚合物珠的信号量。如上所述, 认为这是因为与本发明珠中官能团的量相比, 商购珠中官能团的量少(约 1/100)。

[0516] 实验例 8

[0517] 液相至固相的交换反应

[0518] 如下文所述, 使酰肼化合物标记的糖链(脎键)与包含氨基的聚合物珠相接触, 由此进行从液相到固相的脎-胍交换反应。例如, 可以通过如下工序实施此方法: 使用荧光酰肼化合物标记糖链, 随后通过 HPLC 等分离糖链, 并使其与珠反应, 由此将分离的糖链固定到珠上。简而言之, 此方法可被用作从糖链混合物(例如从糖蛋白回收的糖链)中随机选择糖链, 并将选取的糖链呈现在珠表面的方法。此外, 也可以使用固相基板代替珠作为应用实例。

[0519] (1) 脎化合物(AcWRh (d))与糖链的结合

[0520] 将实验例 1 (A) 的 AcWRh (d) 以 10mM 的浓度溶于甲醇。在容器中装入 10pmol 从糖蛋白胎球蛋白释放的糖链。向其中加入 1  $\mu$ l 脎化合物溶液, 并进一步加入 100  $\mu$ l 含 2% 乙酸的乙腈。在 80 $^{\circ}$ C 下加热所得物 45 分钟, 从而使糖链与 AcWRh (d) 发生反应。

[0521] (2) 脎化合物(d-AcWRh (e))与糖链的结合

[0522] 以实验例 8 (1) 的相同方式使糖链与 d-AcWRh (e) 进行反应。

[0523] (3) 交换反应

[0524] 在容器中装入 5mg 包含氨基的聚合物珠, 并向其中添加与 AcWRh (d) 结合的糖链。使用乙酸缓冲液将其 pH 调至 4, 并使所得溶液在 80 $^{\circ}$ C 下反应 1 小时。反应完成后, 回收上清液, 添加浓度已知的标记的 d-AcWRh (e) 糖链作为内标, 并进行 MALDI-TOF-MS 检测, 由此获得糖链的量(通常关注 NA3: 去唾液酸 (Asialo), 半乳糖苷化三天线多糖 (galactosylated triantennary glycan))。以相同的方式处理不含有所述包含氨基的聚合物珠的系统, 以作为阴性对照。

[0525] 图 7 是 MALDI-TOF-MS 图谱。

[0526] 在所述包含氨基的聚合物珠发生反应的系统中,观测到约 20% 的糖链量。另一方面,阴性对照中的糖链量几乎没有改变。由此现象发现约 80% 的糖链量与包含氨基的聚合物珠相结合。

[0527] 实验例 9

[0528] 单糖固定珠

[0529] (1) 单糖固定珠的制备

[0530] 在容器中装入 10mg 实验例 1 (B) 获得的含氨基的聚合物珠,并向其中添加 10  $\mu$  mol 半乳糖(Gal) 或 N-乙酰葡糖胺(GlcNAc)。向其中添加 200  $\mu$  l 含 2% 乙酸的乙腈,并在 80°C 下加热所得物 1 小时,由此将糖固定到珠上。然后,依次使用 0.5%SDS 溶液、甲醇和纯水清洗珠,由此除去杂质。

[0531] (2) 凝集素捕获能力的验证

[0532] 分别将三种 HRP (辣根过氧化物酶) 标记的凝集素:HRP-刀豆素 A (HRP-Concanavalin A, Con A)、HRP-麦胚凝集素(HRP-Wheat germ agglutinin, WGA) 和 HRP-蓖麻凝集素(HRP-Ricinus communis agglutinin, RCA120) (所有凝集素均由 Seikagaku Corporation 生产) 溶解于结合缓冲液(50mM Tris/HCl、100mM NaCl、10mM CaCl<sub>2</sub>、10mM MgCl<sub>2</sub>, pH7.6) 中,达到 1  $\mu$  g/ml 的浓度。在容器中装入 1mg 实验例 9 (1) 中的单糖固定珠,向其中添加 100  $\mu$  l 任意一种凝集素溶液,并在 37°C 下温和搅拌所得混合物 16 小时。然后,分别使用含 0.05% 吐温 20 的结合缓冲液和结合缓冲液清洗珠(各 1 小时)。使用过氧化物酶显色试剂盒(oxidase coloring kit) (Sumitomo Bakelite Co., Ltd. 产品)对结合在珠上的 HRP-标记的凝集素进行显色,测量溶液在 450nm 下的吸光率,由此评估凝集素的结合量。

[0533] 如图 8 所示,发现很多 WGA 与固定有 GlcNAc 的珠相结合,而很多 RCA120 与固定有 Gal 的珠相结合。已知 WGA 主要识别 GlcNAc,而 RCA120 主要识别 Gal。应用本发明方法获得的单糖固定珠确实能够识别并捕获相应的凝集素。

[0534] 实验例 10

[0535] 寡糖固定珠

[0536] (1) 寡糖固定珠的制备

[0537] 在容器中装入 10mg 实验例 1 (B) 的含氨基的聚合物珠,加入 1  $\mu$  mol 实验例 2 (1) 的胎球蛋白糖链或核糖核酸酶 B 糖链溶液(以糖链量计)。向其中添加 200  $\mu$  l 含 2% 乙酸的乙腈,并在 80°C 下加热所得物 1 小时,由此将糖链固定在珠上。然后,依次使用 0.5%SDS 溶液、甲醇和纯水清洗珠,由此除去杂质。

[0538] (2) 凝集素捕获能力的验证

[0539] 刀豆素 A (Con A) 的捕获

[0540] 在容器中装入 1mg 实验例 10 (1) 中固定有核糖核酸酶 B 糖链的珠。向其中添加 1  $\mu$  l Con A 溶液(10  $\mu$  g/ml) 和 100  $\mu$  l 结合缓冲液,并在 37°C 下温和搅拌所得物 16 小时,从而使 Con A 与珠上的糖链相结合。然后,分别使用含 0.05% 吐温 20 的结合缓冲液和结合缓冲液清洗珠(各 1 小时)。除去清洗溶液,加入 20  $\mu$  l 10.5M 甲基- $\alpha$ -比喃甘露糖苷(methyl- $\alpha$ -mannopyranoside) 作为半抗原,并在 37°C 下搅拌所得混合物 2 小时,从而释放与珠上的糖链相结合的 Con A。回收上清液,加入胰蛋白酶溶液(序列级胰蛋白酶, Promega



产品),在 37℃下静置该反应混合物 16 小时,并使释放的 Con A 片段化成为肽。取出部分反应溶液进行 MALDI-TOF-MS 检测。如下所示,将所得数据与已知的 Con A 氨基酸序列进行比较。

[0541] (1) 从 Con A 的氨基酸序列(已知)推断胰蛋白酶的切割位点,从而评估肽片段的质量数。此外,将其与测量的质谱数据相比较,从而确认二者的一致性。此时,使用肽质谱(PeptideMass,网站公开的工具)评估肽片段的质量数。

[0542] (2) 对所得图谱中的典型图谱进行 MS/MS 分析。根据使用 MASCOT MS/MS Ion Search (由肽片段 MS/MS 数据评估原始蛋白质的工具)分析的结果,确认所得肽确实衍生自 Con A。

[0543] 如图 9 所示,检测多个峰,衍生自 Con A 的肽与质量数一致。核糖核酸酶 B 中含有的主要糖链是高甘露糖式糖链(含有大量甘露糖残基),而 Con A 具有识别并结合甘露糖的性质。从这些现象可知,Con A 能够被珠上固定的糖链识别并捕获。

2-胍基吡啶和糖链的反应

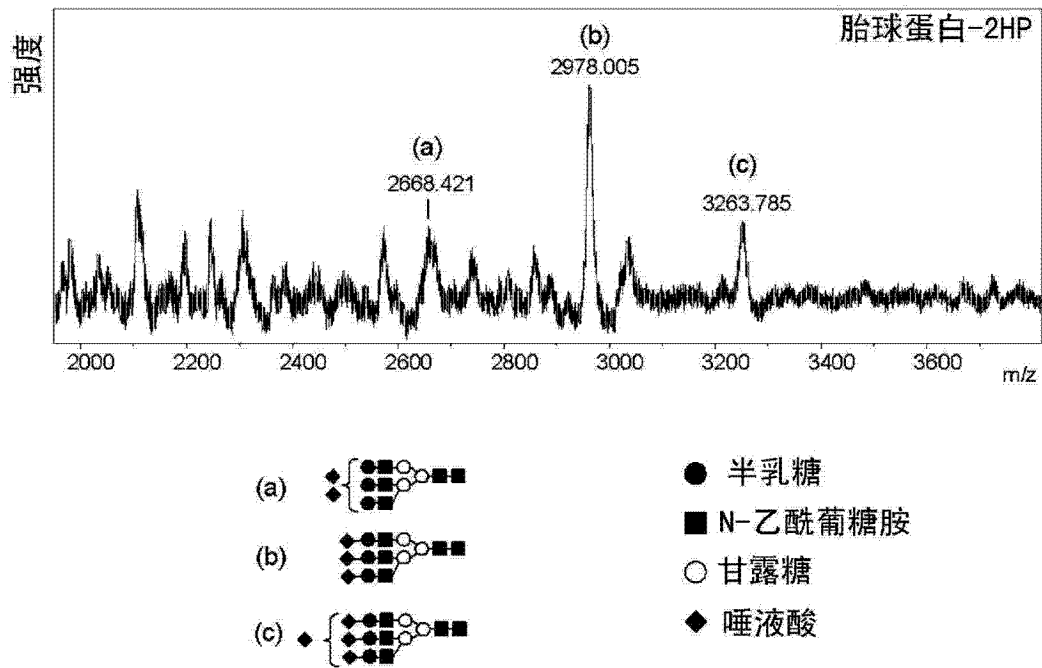


图 1

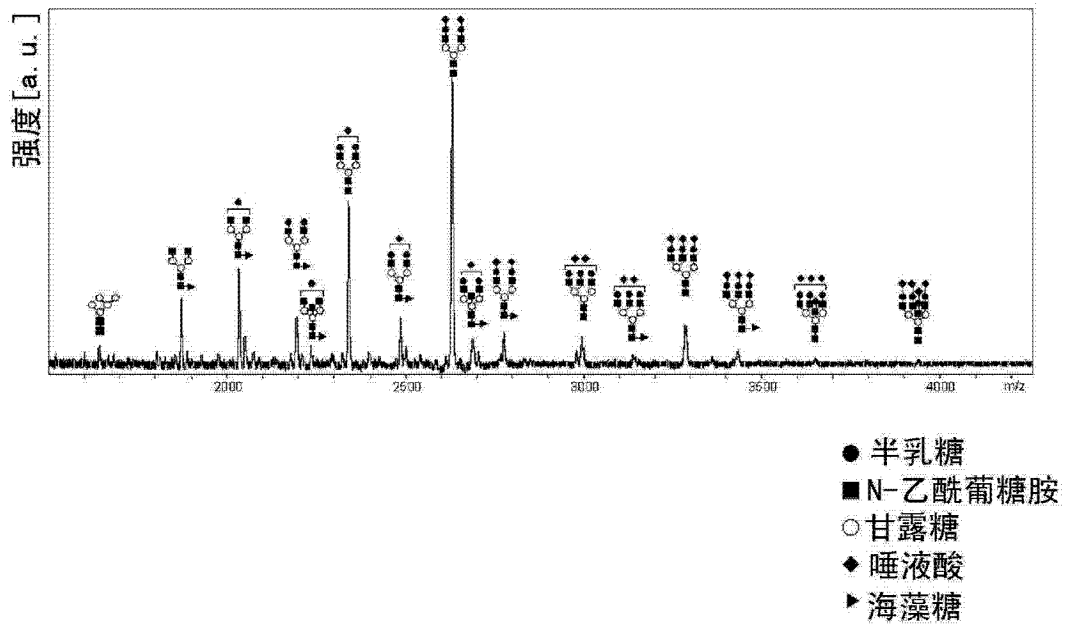


图 2

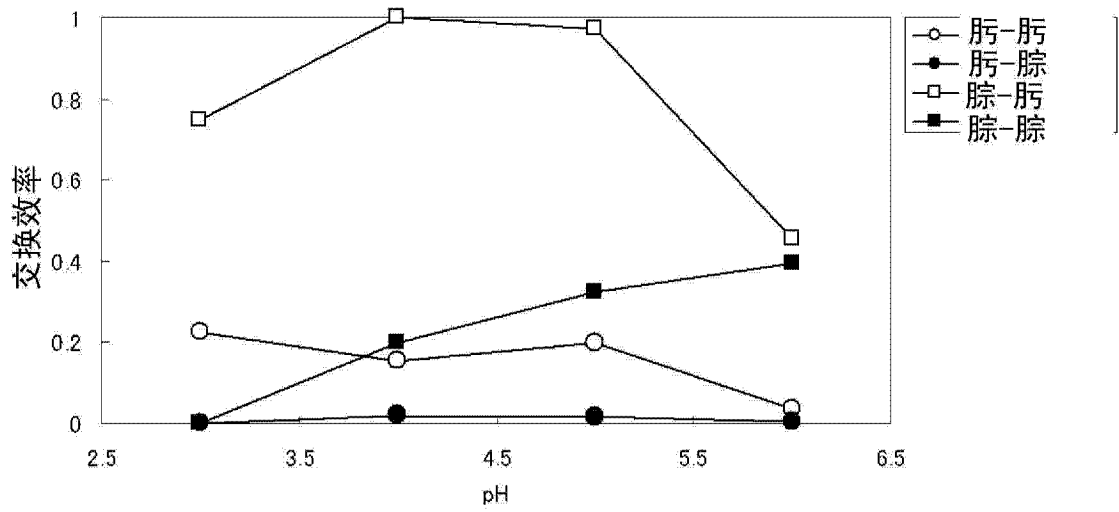


图 3

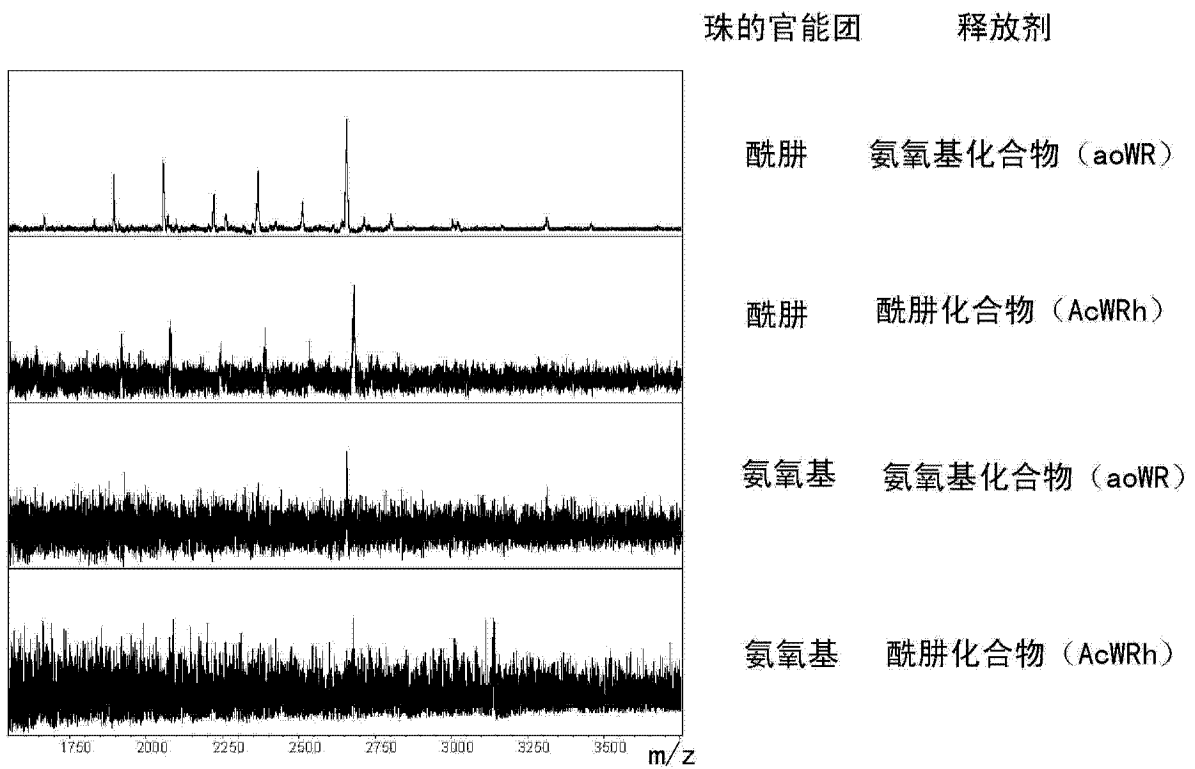


图 4

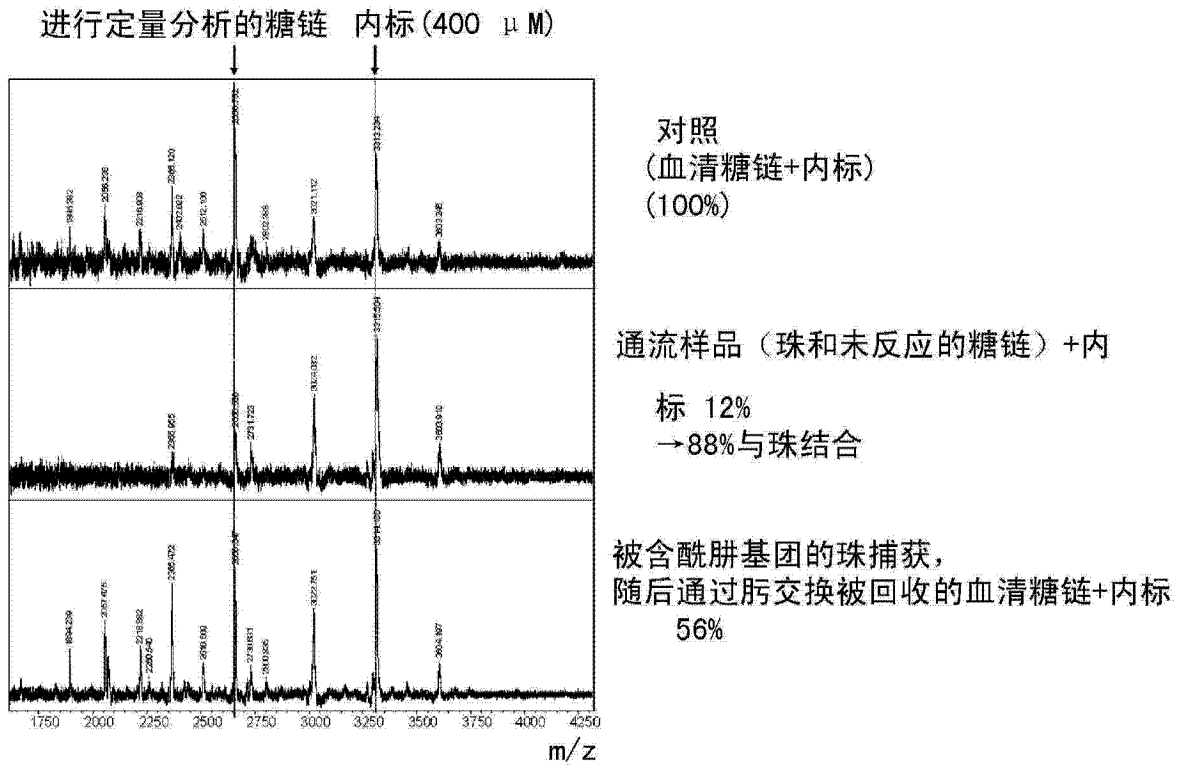


图 5

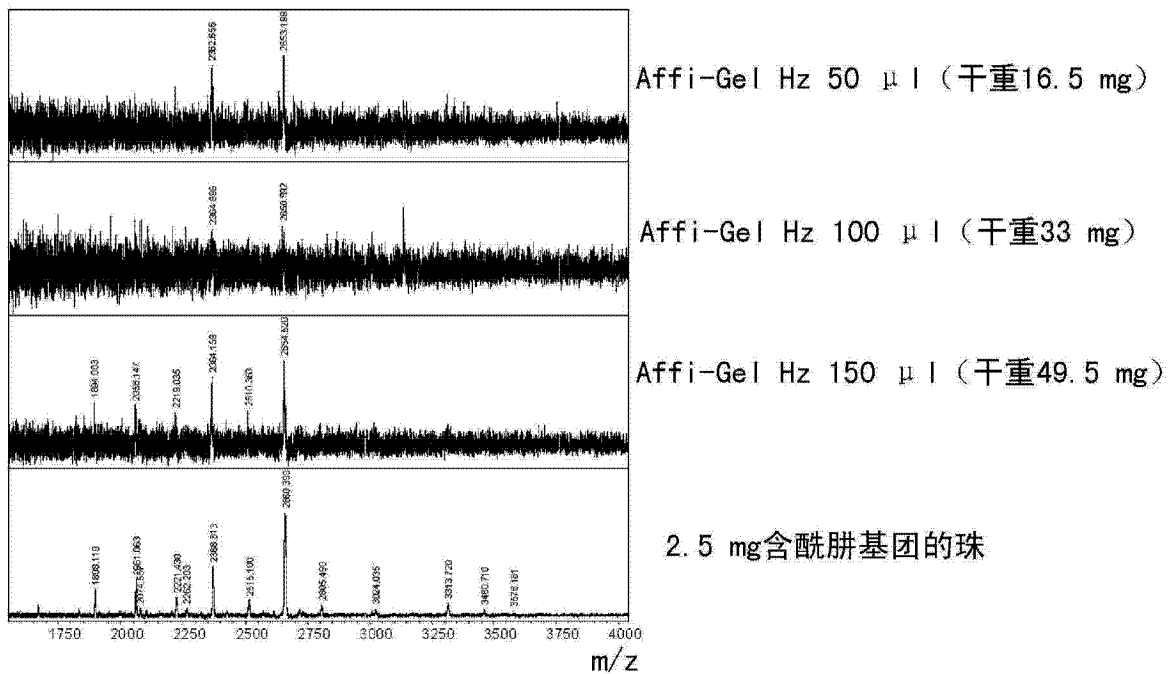


图 6

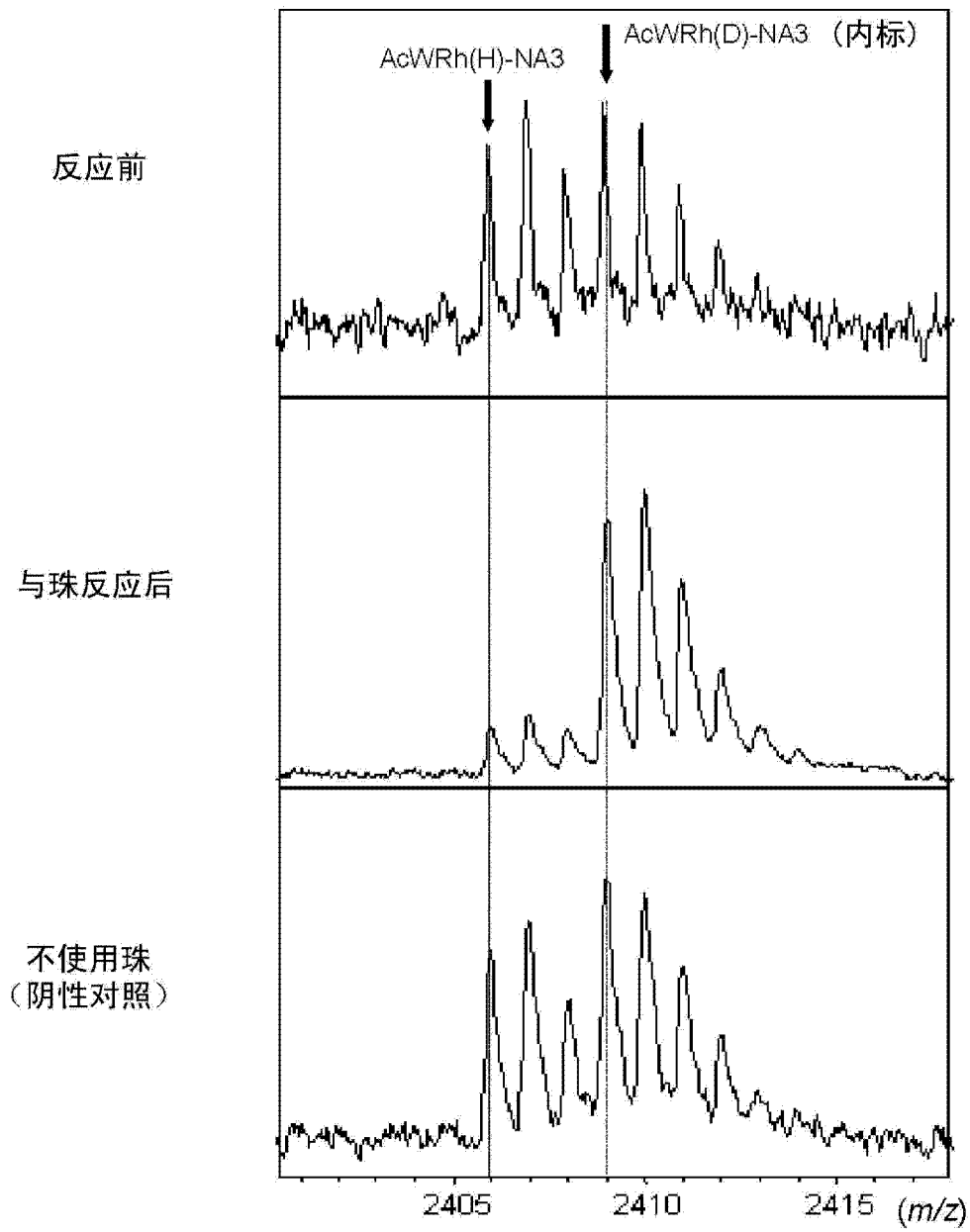
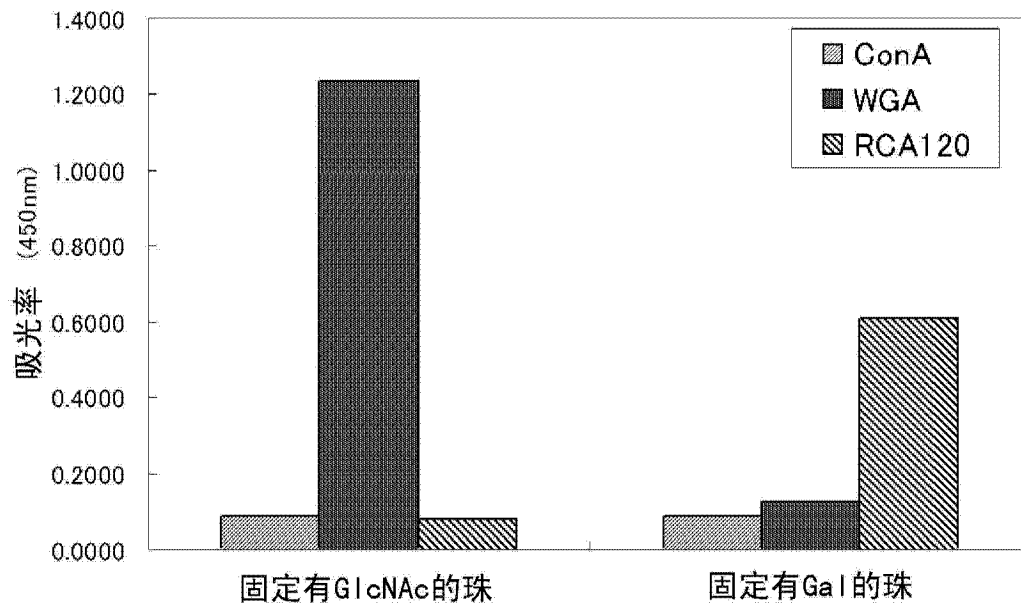
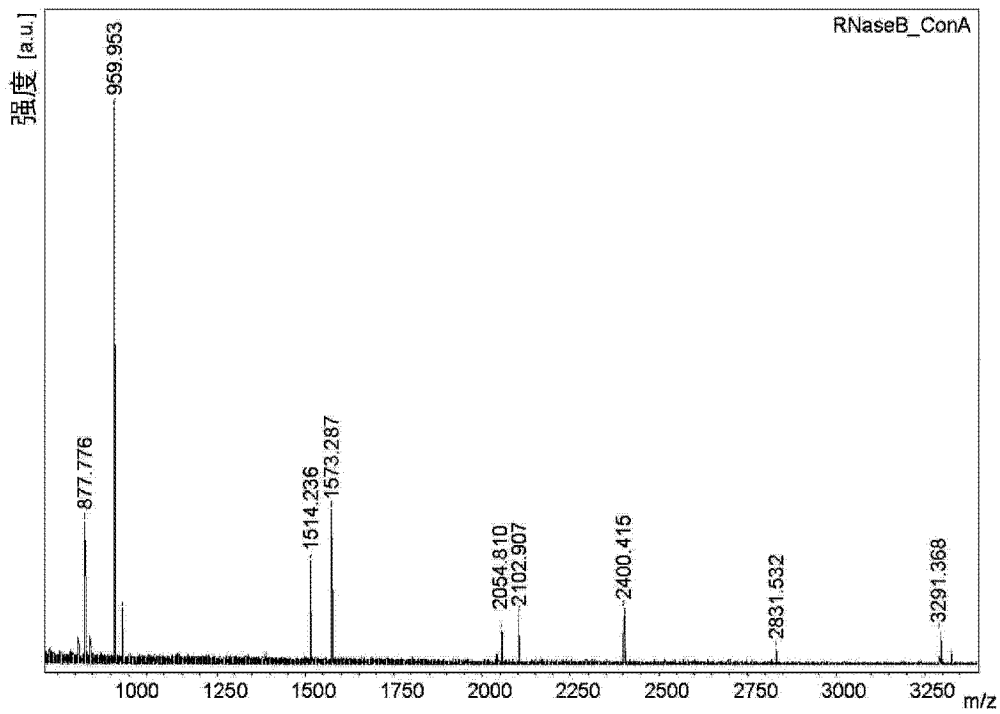


图 7



2.5  $\mu\text{mol/g}$  固定的单糖(饱和量)  
凝集素浓度: 1  $\mu\text{g/ml}$

图 8



测定m/z	评估的肽序列	计算的肽质量	来源
877.776	WNMQNGK	877.398	Con A (刀豆, 巴西刀豆)
959.953	LLGLFPDAN	959.519	Con A (巴西刀豆)
1514.236	ETNTILSWSFTSK	1513.753	Con A (刀豆, 巴西刀豆)
1573.287	VGTAHIINYNSVDKR	1572.849	Con A (刀豆)
2054.81	人造物		
2102.907	DLILQGDATTGTDGNLELTR	2103.056	Con A (刀豆)
2400.415	人造物		
2831.532	SPDSHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGR	282.343	Con A (刀豆, 巴西刀豆)
3291.368	LSAWSYPNADSATVSYDVLDNVLPWWR	3284.616	Con A (刀豆)

图 9