



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105308061 A

(43) 申请公布日 2016.02.03

(21) 申请号 201480028776.2 (51) Int. Cl.
(22) 申请日 2014.04.03 *C07H 13/00*(2006.01)
(30) 优先权数据 *A61K 31/715*(2006.01)
1305986.0 2013.04.03 GB *C08B 37/00*(2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 *G01N 33/532*(2006.01)
2015.11.17
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2014/056737 2014.04.03
(87) PCT国际申请的公布数据
W02014/161960 EN 2014.10.09
(71) 申请人 协会合作研究中心生物公司
地址 西班牙吉普斯夸省
(72) 发明人 尼尔斯-克里斯蒂安·赖夏特
贝戈尼亚-玛丽亚·埃切维里亚·贝
斯特吉
朱安·艾特克塞瓦里亚
哈维尔·卡尔沃 内雷亚·鲁伊斯
(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限
公司 11227
代理人 彭鲲鹏 郑斌

权利要求书5页 说明书40页 附图9页

(54) 发明名称
经同位素标记的聚糖的合成和用途

(57) 摘要
描述了经同位素标记的聚糖及其合成和在通过质谱法分析聚糖混合物中作为内标准物的用途。本文中描述的合成方法可以方便地用于制备用于定性和定量鉴定天然样品中之聚糖的重聚糖文库。

1. 用于合成经同位素标记的聚糖的方法,所述经同位素标记的聚糖用作质谱法内标准物,所述方法包括:

用经同位素标记的酰化剂使寡糖核心结构酰化,以获得经同位素标记的寡糖核心结构,其中所述寡糖核心结构任选地用一个或多个保护基保护;以及

使所得到的经同位素标记的寡糖酶促衍生化以获得所述经同位素标记的聚糖。

2. 权利要求 1 所述的方法,其中所述酶促衍生化包括酶促水解步骤以除去末端糖单元。

3. 权利要求 1 或权利要求 2 所述的方法,其中所述酶促衍生化包括利用糖基转移酶和适当糖供体的酶促延伸步骤,任选地,其中所述酶促延伸步骤掺入自身经同位素标记的糖单元。

4. 任意前述权利要求所述的方法,其中在酶促衍生化期间,所述经同位素标记的寡糖核心结构用一个或多个保护基保护。

5. 权利要求 4 所述的方法,其中所述经同位素标记的寡糖核心结构用一个或多个任选被取代的苄基保护。

6. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述寡糖核心结构包含二糖基序,所述二糖基序包含第一单糖单元和第二单糖单元,其中所述第一单糖单元和/或第二单糖单元中的至少一个包含氨基并且在所述氨基处发生酰化。

7. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述寡糖核心结构包含二糖基序,所述二糖基序包含第一单糖单元和第二单糖单元,其中所述第一单糖单元选自:

GlcN、GalN、ManN、FruN、FucN、Mur 或 Neu;

并且所述第二单糖单元选自:

Glc、Gal、Man、Rha、Fru、Fuc、GlcN、GalN、ManN、FruN、FucN、Mur、Neu、GlcNAc、GalNAc、ManNAc、FruNAc、FucNAc、MurNAc、NeuNAc、唾液酸或肌醇;

其中所述第一单糖糖单元和所述第二单糖糖单元以如下顺序连接:

第一单糖 - 第二单糖,或者

第二单糖 - 第一单糖。

8. 前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包括使包含选自以下之基序的寡糖核心结构与经同位素标记的酰化剂反应:

GlcN-GlcN

Gal-GalN

GalN-GlcN。

9. 前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包括使包含以下基序的寡糖核心结构:

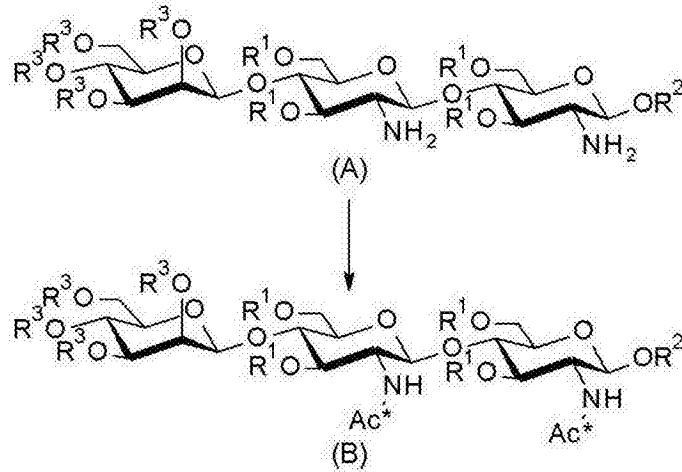
Man-GlcN-GlcN

与经同位素标记的酰化剂反应以获得包含以下基序的寡糖:

Man-GlcNAc * -GlcNAc *

其中 Ac * 为经同位素标记的乙酰基。

10. 前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法包括:在适于形成式 (B) 的经同位素标记的寡糖核心结构的条件下,使式 (A) 的寡糖与经同位素标记的酰化剂反应:



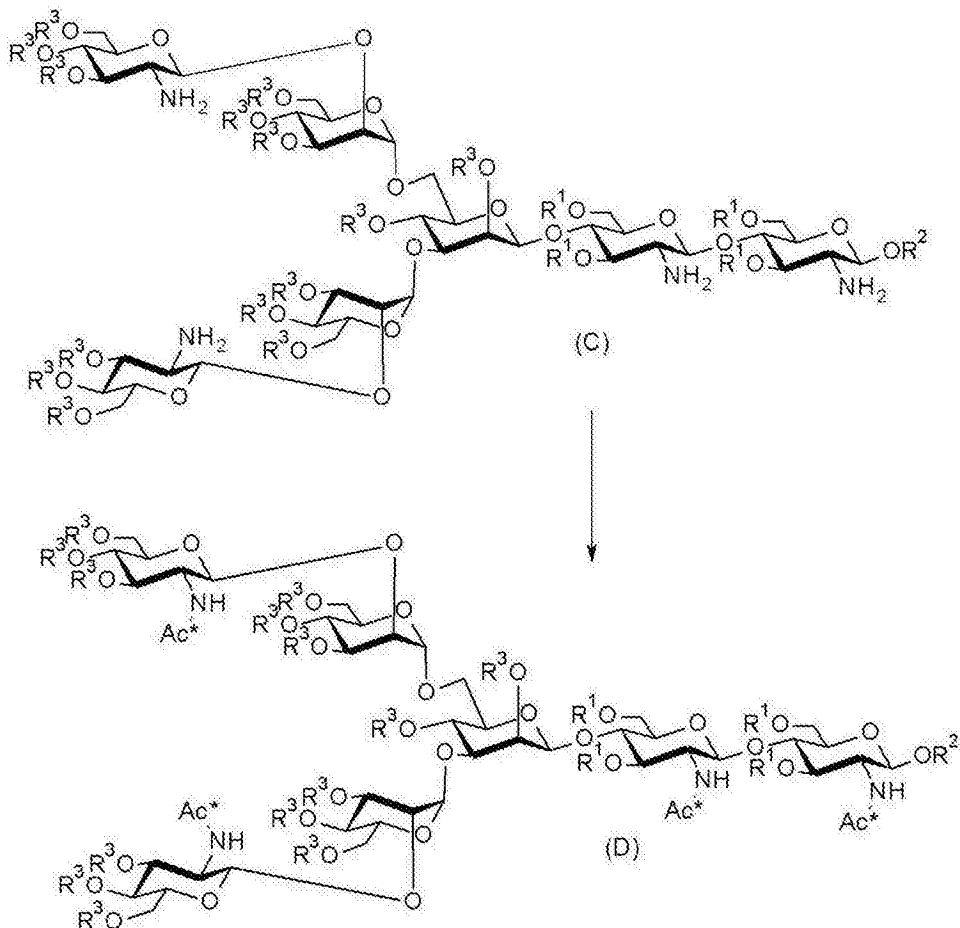
其中：

R^1 各自独立地为H或保护基；

R^2 独立地为H或保护基；

R^3 各自独立地为H、保护基或 $(Sac)_m$ ，其中 Sac 各自为单糖单元并且 m 为 1 至 5 的数字。

11. 前述权利要求中任一项所述的方法，所述方法包括：在适于形成式 (D) 的经同位素标记的寡糖核心结构的条件下，使式 (C) 的寡糖与经同位素标记的酰化剂反应：



其中：

R^1 各自独立地为H或保护基；

R^2 独立地为H或保护基；

$= {}^{17}\text{O}) {}^{13}\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C} = {}^{18}\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-({}^{13}\text{C} = {}^{18}\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C} = {}^{18}\text{O}) {}^{13}\text{CH}_3$ 、 $-({}^{13}\text{C} = {}^{18}\text{O}) {}^{13}\text{CH}_3$ 。

24. 根据权利要求 20 至 23 中任一项所述的聚糖,其中所述聚糖包含一个或更多个另外的单糖单元。

25. 鉴定样品中的聚糖的方法,所述方法包括:向所述样品中添加包含根据权利要求 19 至 24 中任一项所述的经同位素标记的聚糖的经标记的标准物以获得经掺杂的样品,以及使用质谱法分析所述经掺杂的样品。

26. 权利要求 25 所述的方法,其中向所述样品中添加已知量的所述经同位素标记的聚糖,使得可通过对与分析物聚糖和与所述经同位素标记的聚糖相关的离子峰的相对强度进行比较来定量所述样品中的所述聚糖。

27. 权利要求 25 或 26 所述的方法,所述方法包括:

- (i) 选择经标记的标准物,其包含一种或更多种经同位素标记的聚糖;
- (ii) 向所述样品中添加所述经标记的标准物以获得经掺杂的样品;
- (iii) 使用质谱法分析所述经掺杂的样品以获得离子峰;
- (iv) 对与所述经标记的标准物相关的离子峰与所述经掺杂的样品的谱中额外的离子峰的身份和强度进行比较。

28. 权利要求 27 所述的方法,其中所述经标记的标准物包含所述分析物聚糖的多种经同位素标记的“重”同位素体,并且其中所述方法的步骤 (iv) 包括以下步骤:

- (a) 将与每种重同位素体相关的离子峰的相对强度 (I_j^*) 与所述标准物中该聚糖的已知丰度 (m_j^*) 相关联以获得作为 m_j 之线性函数的 I_j ;
- (b) 任选地计算用于所述关联的确定系数 R^2 ,并且如果 R^2 值大于预定值,则扣减最大丰度离子峰;
- (c) 任选地将步骤 (ii) 重复一次或更多次;
- (d) 使用所述函数来计算所述分析物聚糖的“轻”同位素体的量;
- (e) 任选地使用所述分析物聚糖的“轻”同位素体的总量来确定所存在的分析物聚糖的总量。

29. 权利要求 28 所述的方法,所述方法还包括在分析所述经掺杂的样品之前使所述聚糖衍生化。

30. 权利要求 25 至 29 中任一项所述的方法,其中所述质谱法是 MALDI-ToF、直接输注 ESI-ToF 或 LC-MS。

31. 权利要求 25 至 30 中任一项所述的方法,所述方法还包括在使用质谱法分析期间通过串联质谱法进行片段化。

32. 权利要求 25 至 31 中任一项所述的方法,其中所述样品中的所述聚糖是由重组糖蛋白或抗体释放的聚糖。

33. 权利要求 25 至 32 中任一项所述的方法,其中所述样品中的所述聚糖是与医学疾病或障碍或者生物学过程相关的生物标志物。

34. 权利要求 25 至 33 中任一项所述的方法,所述方法还包括将一种或更多种所述聚糖的存在或量相关联作为医学疾病或障碍或者生物学过程的指标。

35. 权利要求 34 所述的方法,其中所述医学疾病或障碍选自:癌症、心血管病、炎性皮肤病、糖尿病、胃肠病、肝病、贫血、免疫性疾病或障碍、自身免疫病、包括类风湿性关节炎的

关节炎、感染性疾病、肾病、神经障碍、肺病或先天性糖基化障碍。

36. 根据权利要求 19 至 24 中任一项所述的经同位素标记的聚糖,其用于诊断方法,所述方法包括:

- (i) 从患者获得怀疑包含与疾病或障碍相关的聚糖的样品;
- (ii) 选择经标记的标准物,其包含对应于所述与疾病或障碍相关之聚糖的经同位素标记的聚糖;
- (iii) 向所述样品中添加所述经标记的标准物以获得经掺杂的样品;
- (iv) 使用质谱法分析所述经掺杂的样品以获得离子峰;
- (v) 对与所述经标记的标准物相关的离子峰与所述经掺杂样品的谱中额外的离子峰的身份和强度进行比较以鉴定和任选地定量所述样品中一种或更多种聚糖的存在;
- (vi) 使用所述一种或更多种聚糖的存在来诊断所述疾病或障碍。

37. 权利要求 36 所述的用于所述方法的聚糖,其中所述医学疾病或障碍选自:癌症、心血管病、炎性皮肤病、糖尿病、胃肠病、肝病、贫血、免疫性疾病或障碍、自身免疫病、包括类风湿性关节炎的关节炎、感染性疾病、肾病、神经障碍、肺病或先天性糖基化障碍。

38. 用于鉴定样品中的聚糖的试剂盒,所述试剂盒包含:

- (a) 经标记的标准物,所述经标记的标准物包含一种或更多种经同位素标记的聚糖;
- (b) 说明书,其用于将怀疑包含聚糖的样品用所述经标记的标准物掺杂以获得经掺杂的样品,并且使用质谱法分析所述经掺杂的样品。

39. 权利要求 38 所述的试剂盒,其中所述说明书包含所述经标记的标准物的质谱法数据。

40. 权利要求 38 或 39 所述的试剂盒,其中所述说明书包含将与所述经标记的标准物相关的离子峰与质谱中额外的离子峰进行比较的步骤。

41. 根据权利要求 19 至 24 中任一项所述的经同位素标记的聚糖在根据权利要求 38、39 或 40 中任一项所述的试剂盒中的用途。

经同位素标记的聚糖的合成和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及寡糖和多糖的同位素体 (isotopologue)。特别地,本发明涉及经同位素标记的聚糖的合成及其作为通过质谱法分析聚糖混合物中的标准物的用途。

背景技术

[0002] 在真核系统中,糖基化是最常见的蛋白质翻译后修饰之一。据估计全部哺乳动物蛋白质中超过一半都在它们的存在期间某些时候被糖基化,并且几乎所有的膜和分泌蛋白都被糖基化。糖基化是一种非模板驱动的过程并且被认为引入高水平可变性,这是高级生物体中复杂过程所必需的。除了参与关键大分子相互作用以外,聚糖已经显示出有助于蛋白质折叠、运输和稳定性。

[0003] N-聚糖通过天冬酰胺残基连接到蛋白质骨架上,所述天冬酰胺残基是三肽序列 Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr 的一部分,其中 X 是除脯氨酸以外的任何氨基酸。根据末端糖残基,N-聚糖被分类成复合型、高甘露糖型和杂交型 N-聚糖。这种分类基于大多数 N-聚糖共有的常规戊糖基序。O-聚糖通过丝氨酸残基或苏氨酸残基连接到蛋白质上。因此,存在大量 O-聚糖核心结构,最常见的为核心 1、核心 2、核心 3 和核心 4。

[0004] 已知许多疾病涉及糖基化和 / 或聚糖识别中获得的改变。例如,改变的糖基化是癌细胞的普遍特征并且一些聚糖结构是肿瘤和肿瘤进展的公知标记。因此,用于蛋白质糖基化和聚糖组分综合分析的方法引起了科学界的兴趣。

[0005] 对于大多数乙二醇分析 (glycol-profiling) 方法而言,聚糖被通过胍解或用特定肽糖苷酶 (例如, PNGase F) 处理从蛋白质中除去。由于其在低浓度下的高灵敏性,质谱法通常用于分析所得的复杂混合物。然而,在许多其他因素中,特定分析物的信号强度取决于分析物的物理性质 (离子化的可能性、片段化趋势等),所以进行任何相对定量甚至有时鉴定变得非常困难。

[0006] 鉴定两个样品共同的聚糖及其相对定量可通过使用聚糖混合物的掺入同位素标记物 (isotopic tag) 的衍生化来促进。两个样品用轻形式或重形式的标记试剂 (labelling reagent) 来标记,并且然后在使用质谱法分析之前进行混合。使用完全甲基化技术或聚糖还原同位素标记 (其中标记物使用还原胺化来引入),已经完成了将同位素标记物掺入到与从糖蛋白中分离的聚糖混合物中的衍生化 (Atwood, 2007 ;Bowman, 2007, 2010 ;Botelho, 2008 ;Hitchcock, 2006 ;Hsu, 2006 ;Kang, 2007 ;Lawrence, 2008 ;Ridlova, 2008 ;Yuan, 2005 ;Zhang, 2003)。

[0007] 还原胺化反应通常在聚糖的还原端发生并且可以使用经同位素标记的苯胺、氨基吡啶或邻氨基苯甲酸。例如, Xia 等 (2009) 已经证明将经同位素标记的苯胺标记物用于比较从人血清和小鼠血清中释放出来的聚糖混合物的差异。聚糖通过 PNGase F 释放,然后所得的混合物分别通过 $^{12}\text{C}_6$ -苯胺或 $^{13}\text{C}_6$ -苯胺的还原胺化反应来衍生。通过分析来自小鼠血清的聚糖 $^{12}\text{C}_6$ -苯胺-衍生化的混合物和来自人血清的聚糖 $^{13}\text{C}_6$ -苯胺-衍生化的混合物的等摩尔组合,作者报道它们能够鉴定由 6Da 质量差而分离的成对质量峰并且为两个样品的

共同聚糖的分配合理结构。作者报道这些峰相对强度的比较能够确定与另一个样品相比在一个样品中存在的特定共同聚糖的量。

[0008] 然而,这些方法只提供了半定量的结果。此外,结果受标记过程再现性和由副反应、氧化降解和“剥离反应”(在水性溶液中,其会由于某些反应条件而发生)所引起的问题的影响,并且在衍生化步骤期间会丢失重要的功能。

[0009] 同位素标记物还用于蛋白质组学中。Breidenbach 等 (2012) 已经证明使用过滤器辅助的样品制备方法将经同位素标记的 GlcNAc 以代谢的方式掺入酵母 N-聚糖中。使用包含比例为 1 : 2 : 1 的天然同位素丰度的 GlcNAc、 $^{13}\text{C}_2$ -GlcNAc 和 $^{13}\text{C}_4^{15}\text{N}_1$ -GlcNAc 的 GlcNAc isomix 以模拟二溴化物同位素三重模式。所得包含 isomix 的乙二醇缀合物进行 FASP 消化和 EndoH 去糖基化并且使用自动化同位素包络 (envelope) 模式搜索 (在 LC-MS/MS 实验中) 分析以便于糖苷鉴定。所述方法使作者能够使片段化优先在糖肽离子上进行,无论其对样品中的其他离子的相对强度。

[0010] 仍然急需迅速且容易地分析释放聚糖混合物含量的改进方法,并且特别地一种不具有现有技术中缺点的方法。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明基于发明人的见解:用作质谱法标准物的单独聚糖和糖缀合物的稳定同位素体可用于定性和定量分析复杂混合物。特别地,本发明解决了与本领域已知的同位素聚糖标记过程相关的再现性和功能信息损失的问题,其中在从蛋白质中除去期间或之后使聚糖混合物衍生化以掺入标记物。本发明人提供了用于合成地产生经同位素标记的聚糖的方法,其然后可以被掺入到分析物样品中并且通过质谱法分析。这些方法允许通过比较与其余质谱峰相关的 (和样品相关的) 质谱包络来鉴定分析物样品中已知结构的聚糖。

[0013] 此外,本发明允许通过添加已知量的标准物以绝对数值定量样品内的特定聚糖,其代表了与只提供了半定量数据的本领域中已知方法相比的显著优点。本发明提供了经同位素标记的聚糖标准物 (所谓的“经标记的标准物 (tagged standard)”) 的文库,其用于使用质谱法定性和定量分析复杂聚糖混合物。还提供了使用这些标准物定性和 / 或定量分析复杂聚糖混合物的组分的方法。这些分析方法可用于鉴定与特别障碍和疾病状态以及其他生物学过程相关的聚糖标志物。

[0014] 广泛地,本发明包括用于合成经同位素标记的聚糖 (包括糖缀合物) 的方法,所述方法包括用经同位素标记的酰化剂处理包含至少两个糖单元的聚糖以将同位素标记物掺入聚糖结构中。

[0015] 这些经同位素标记的寡糖是寡糖核心结构,其然后可以通过酶促衍生化步骤 (即通过一种或更多种酶催化的步骤多样化) 用于合成经同位素标记的聚糖标准物的文库。这代表了用于定性 (和定量) 检测特定聚糖的方法的显著改进。

[0016] 因此,在第一方面中,本发明涉及用于合成经同位素标记的寡糖的方法,所述方法包括:

[0017] 用经同位素标记的酰化剂使寡糖酰化,其中寡糖任选地用一个或更多个保护基保护。

[0018] 在第一方面中,本发明提供用于合成经同位素标记的聚糖的方法,所述经同位素标记的聚糖用作质谱法内标准物,所述方法包括:

[0019] 用经同位素标记的酰化剂使寡糖核心结构酰化,其中寡糖核心结构任选地用一个或更多个保护基保护,以获得经同位素标记的寡糖核心结构;以及

[0020] 使所得的经同位素标记的寡糖酶促衍生化以获得经同位素标记的聚糖。

[0021] 本文中使用的酶促衍生化(还可称为酶促多样化)是指使本文中所述的寡糖经受酶催化的反应。合适的酶促衍生化/多样化反应包括:

[0022] - 延伸:向寡糖中添加另外的糖单元,通常使用糖基转移酶通过与合适的糖供体的缩合反应进行。延伸可在寡糖的末端或中间糖单元上发生。

[0023] - 截短:从寡糖的末端除去糖单元。这通常通过使用水解酶的水解反应来进行。

[0024] - 差向异构化:分子中立体中心的全部反转或部分反转。这通常由表异构酶来催化。

[0025] - 转糖基作用(糖基转移反应):将糖单元从供体转移至受体;即,一个寡糖失去一个糖单元,即被截短,同时另一个寡糖得到一个糖单元(即,被延伸)。这些反应可以通过合成酶或转糖苷酶来催化。

[0026] - 翻译后的修饰:在酶促衍生化期间可以掺入其他功能。常规翻译后的修饰是本领域中已知的,并且可包括但不限于磷酸化、硫酸化和酰化反应。

[0027] 通常地,这样的酶催化的衍生化步骤是化学选择性的。应理解本发明的第一方面提供了方便产生许多经同位素标记的聚糖结构的方法,所述经同位素标记的聚糖结构用作质谱法内标准物,始于相对小的“核心”寡糖,如本文中所述。

[0028] 在一些实施方案中,酶促衍生化步骤包括除去末端糖单元的酶促水解步骤。这允许得到不对称标准物,所述不对称标准物衍生自例如本文中所述合成的双触角(biantennary)七糖 N-聚糖核心。

[0029] 在一些实施方案中,酶促衍生化步骤包括所得的聚糖用糖基转移酶和合适的糖供体的酶促延伸步骤。合适的酶促延伸方法是本领域中已知的(Blixt,2006;Ruiz,2001;Serna,2010,Zou,2011)并且在下面进一步描述。合适的糖供体可以是单糖、寡糖或多糖。在一些实施方案中,将酶促延伸步骤重复一次或更多次。在重复酶促延伸步骤的一些实施方案中,优选地,每个步骤中的糖供体是合适的单糖糖供体。

[0030] 在一些实施方案中,酶促延伸步骤中的糖供体是经同位素标记的。在重复酶促延伸步骤的一些实施方案中,酶促延伸步骤中的糖供体可以是经同位素标记的,其不依赖于任何其他酶促延伸步骤中的糖供体是否是经同位素标记的。糖供体可在任何合适位置用任何合适同位素形式的原子来进行同位素标记。这样,可将额外的经同位素标记的单糖单元掺入经同位素标记的寡糖中。这可以用于使用 MS-MS 方法中获得的片段化模式来分析聚糖并且用于产生特定聚糖结构的不同同位素体以有助于如下所述准确的定量分析。

[0031] 应该理解酶促衍生化步骤可包括单个酶催化的步骤,或者可依次包括多于一个的酶催化步骤。例如,酶促衍生化步骤可以是单个水解或延伸步骤,或者可包括多于一个的水解和/或延伸步骤以产生期望的聚糖结构。例如,经同位素标记的寡糖核心可按顺序进行延伸或截短并且然后(按顺序)延伸。经同位素标记的寡糖还可延伸并且然后在不同的位置截短。可期望不同顺序的步骤以适应所用酶的特异性。本文中提供了代表性的非限制性实例。

[0032] 本文中使用的术语寡糖涉及包含至少两个单糖(单糖单元)的糖聚合物。在一些

实施方案中,寡糖是二糖。在一些实施方案中,寡糖是三糖。在一些实施方案中,寡糖是四糖。在一些实施方案中,寡糖是戊糖。在一些实施方案中,寡糖是己糖。在一些实施方案中,寡糖是七糖。在一些实施方案中,寡糖是高级的低聚物。寡糖可以是直链或支链的(也称为触角)。

[0033] 寡糖可包含一个或更多个羟基或氨基,其可各自独立地用保护基保护。在一些实施方案中,自由羟基和/或氨基不被保护。在另一些实施方案,一些或所有存在的羟基被保护。在一些实施方案中,存在至少一个经保护的伯氨基和/或仲氨基。

[0034] 用于羟基和氨基的合适保护基是本领域中已知的。纯粹地作为实例而不限制,用于本发明的合适保护基如下进行讨论。在一些实施方案中,选择保护基彼此正交,从而便于在期望的位置对寡糖进行选择性地保护和化学处理。

[0035] 优选地,寡糖包含至少一个自由 $-NH_2$ 基团并且在自由 $-NH_2$ 基团上发生酰化。当存在多于一个自由 $-NH_2$ 基团时,可在每个自由 $-NH_2$ 基团上发生酰化。

[0036] 本发明人发现半保护的核心基序是用于化学选择性酶促衍生化的合适底物。此外,保护基的存在可具有特别的优点。例如,如本文中所述,在 HPLC 分析和纯化期间,苄基可充当峰值检测的发色团,并且可帮助不同产物(例如异构体聚糖)的分离。

[0037] 因此,在本文中所述的一些方法中,在酶促衍生化步骤期间,经同位素标记的核心寡糖被部分地保护。合适地,保护基为一个或更多个羟基上存在的任选经取代的苄基,优选 $-CH_2Ph$ 基团。

[0038] 例如,本文中所述的方法可包括经同位素标记的部分被保护的寡糖上的至少一个酶促衍生化步骤,随后是去保护步骤。此外,然后可紧跟着酶促衍生化步骤。例如,部分经保护的寡糖可部分地被苄基化。合适地,当寡糖具有一个或更多个苄基时,去保护步骤可以是氢化作用。

[0039] 在一些实施方案中,寡糖包含二糖基序,二糖基序包含第一单糖单元和第二单糖单元,其中第一单糖单元和/或第二单糖单元的至少一个包含氨基并且在所述氨基上发生酰化。在其中寡糖包含多于两个单糖单元的一些实施方案中,二糖基序可位于糖链的末端,其可以是还原端或非还原端。在其中寡糖包含多于四个单糖单元的一些实施方案中,二糖基序可位于糖链内的末端或中间位置。

[0040] 包含氨基的单糖优选为氨基糖单糖。广泛地,在本发明的第一方面的方法中,具有至少一个 $-NH_2$ 基团的任何氨基糖单糖可适合作为第一单糖单元和/或第二单糖单元的至少一个。合适氨基糖的实例包括但不限于己糖胺及其衍生物。合适氨基糖单糖的实例包括但不限于葡糖胺(GlcN)、半乳糖胺(GalN)、甘露糖胺(ManN)、果糖胺(FruN)、岩藻糖胺(FucN)、胞壁酸(Mur)、神经氨酸(Neu)、柔红糖胺和 perosamine。其他氨基糖衍生物也可适用于根据本发明的用途。因此,在一些实施方案中,第一单糖单元和/或第二单糖单元是 N-乙酰基氨基糖的脱乙酰基衍生物。除了上述列出的那些以外,合适的实例包括例如脱乙酰基天冬酰胺葡糖胺。单糖单元还可进一步被取代并且包含例如糖苷的一部分。

[0041] 第二单糖单元可以是第二氨基糖、N-乙酰基氨基糖或其他糖单元。例如,在不限制的情况下,第二单糖单元可以是己糖或戊糖或其氨基糖,并且可进一步用例如脂肪酸链来取代(例如,第二单糖单元可以是脂质 A)。

[0042] 在一些其中寡糖包含二糖基序的实施方案中,第一单糖单元选自:

[0043] GlcN、GalN、ManN、FruN、FucN、Mur 或 Neu ；

[0044] 并且第二单糖单元选自：

[0045] Glc、Gal、Man、Rha、Fru、Fuc、GlcN、GalN、ManN、FruN、FucN、Mur、Neu、GlcNAc、GalNAc、ManNAc、FruNAc、FucNAc、MurNAc、NeuNAc、唾液酸或肌醇。

[0046] 第一单糖糖单元和第二单糖糖单元可以以从还原端到非还原端的这样的顺序排列：第一单糖单元随后是第二单糖单元或者第二单糖单元随后是第一单糖单元。

[0047] 在一个实施方案中，序列是：

[0048] 第一单糖 - 第二单糖。

[0049] 在一个实施方案中，序列是：

[0050] 第二单糖 - 第一单糖。

[0051] 在一些优选实施方案中，寡糖的二糖基序的第一单糖单元和第二单糖单元选自与 N- 聚糖核心和 O- 聚糖核心相关的单糖单元及其脱乙酰基形式。因此，在一些实施方案中，第一单糖单元是葡糖胺或半乳糖胺并且第二单糖单元选自甘露糖、半乳糖、葡糖胺、半乳糖胺、N- 乙酰基 - 葡糖胺或 N- 乙酰基 - 半乳糖胺。在一些实施方案中，第一单糖单元是葡糖胺并且第二单糖单元选自甘露糖、半乳糖、葡糖胺、半乳糖胺、N- 乙酰基 - 葡糖胺或 N- 乙酰基 - 半乳糖胺，优选选自甘露糖或葡糖胺。在一些实施方案中，第一单糖单元是半乳糖胺并且第二单糖单元选自甘露糖、半乳糖、葡糖胺、半乳糖胺、N- 乙酰基 - 葡糖胺或 N- 乙酰基 - 半乳糖胺，优选地选自甘露糖或葡糖胺。

[0052] 在一些实施方案中，所述方法包括使包含选自以下基序的寡糖与经同位素标记的酰化剂反应：

[0053] GlcN-GlcN

[0054] Gal-GalN

[0055] GalN-GlcN。

[0056] 此外，单糖单元可以存在于还原端和 / 或非还原端。

[0057] 在一些实施方案中，所述方法包括使包含以下基序的寡糖与经同位素标记的酰化剂反应：

[0058] Man-GlcN-GlcN。

[0059] 此外单糖单元可以存在于还原端和 / 或非还原端。

[0060] 在一个优选实施方案中，所述方法包括使包含以下基序的寡糖与经同位素标记的酰化剂反应：

[0061] Man-GlcN-GlcN

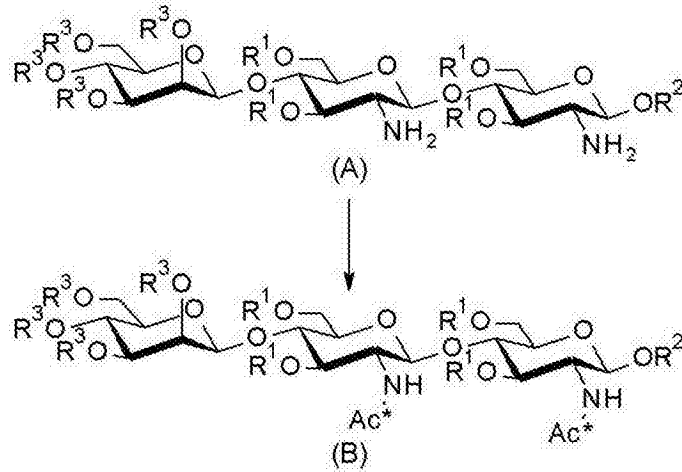
[0062] 以获得包含以下基序的寡糖：

[0063] Man-GlcNAc * -GlcNAc *

[0064] 其中 Ac * 是经同位素标记的乙酰基。

[0065] 在一些实施方案中，所述方法包括在适于形成式 (B) 的寡糖的条件下，使式 (A) 的寡糖与经同位素标记的酰化剂反应：

[0066]



[0067] 其中：

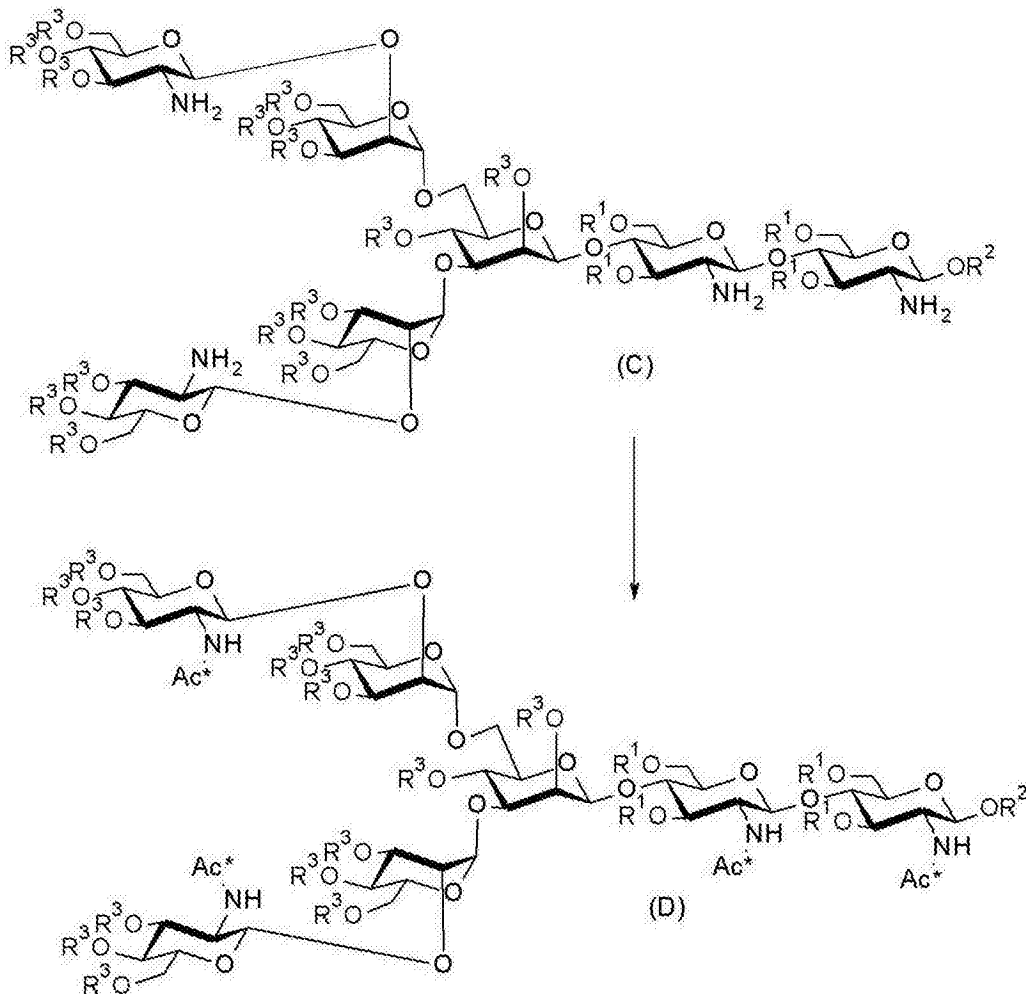
[0068] R^1 各自独立地为H或保护基；

[0069] R^2 独立地为H或保护基；

[0070] R^3 各自独立地为H、保护基或 $(Sac)_m$ ，其中 Sac 各自为单糖单元并且 m 为 1 至 50 的数字。

[0071] 在一些实施方案中，所述方法包括在适于形成式 (D) 的寡糖的条件下，使式 (C) 的寡糖与经同位素标记的酰化剂反应：

[0072]



[0073] 其中：

[0074] R^1 各自独立地为H或保护基；

[0075] R^2 独立地为H或保护基；

[0076] R^3 各自独立地为H、保护基或 $(\text{Sac})_m$ ，其中 Sac 各自为单糖单元并且 m 为 1 至 50 的数字。

[0077] 如上所述，在一些实施方案中， R^1 、 R^2 和 R^3 可各自独立地为保护基。保护基可以相同或不同。例如，如果多于一个 R^3 是保护基时， R^3 各自可以与任何其他保护基相同或不同。在一些实施方案中，至少一个 R^3 是 $(\text{Sac})_m$ ，其中 m 为 1 至 50 的数字。在其中多于一个 R^3 是 $(\text{Sac})_m$ 的一些实施方案中，在分子中， $(\text{Sac})_m$ 可各自独立地与任何其他 $(\text{Sac})_m$ 相同或不同。

[0078] 在一些实施方案中， m 为 1 至 20 的数字。

[0079] 在一些实施方案中， m 为 1 至 10 的数字。

[0080] 在一些实施方案中， m 为 1 至 5 的数字。

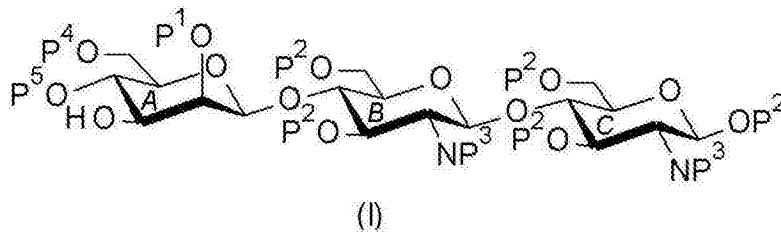
[0081] 在一些实施方案中， m 为 1 或 2。

[0082] 在一些实施方案中， R^2 为H。在一些实施方案中， R^3 各自为H。在一个优选实施方案中， R^1 各自为苄基， R^2 为H并且 R^3 各自为H。

[0083] 在一些实施方案中，所述方法包括：

[0084] 用通式 (II) 的糖供体使式 (I) 的寡糖糖基化以得到式 (III) 的寡糖：

[0085]

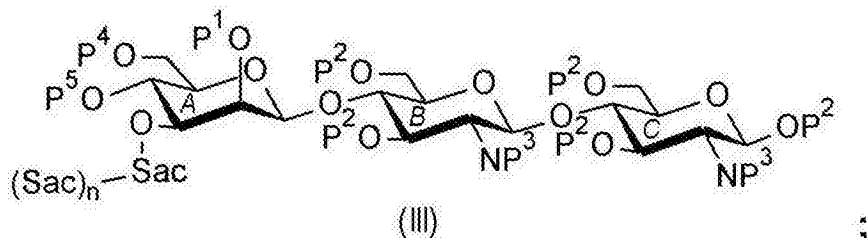


[0086] 其中， P^1 、 P^2 、 P^3 、 P^4 和 P^5 各自独立地为保护基，或者任选地 P^4 和 P^5 一起形成乙缩醛基团；

[0087] $(\text{Sac})_n\text{-Sac-LG}$ (II)

[0088] 其中，Sac 各自为单糖单元， n 为 0 至 50 的数字，并且 -LG 表示用合适离去基团引发的供体糖的非糖基化异头位；

[0089]



[0090] 除去 P^4 以露出羟基并且用通式 (II) 的糖供体使所得的羟基糖基化；

[0091] 除去每个 P^3 基团以露出自由的氨基并且用经同位素标记的酰化剂使每个所得的自由氨基乙酰化。

[0092] 在一些实施方案中， n 为 0 至 20 的数字。

[0093] 在一些实施方案中， n 为 0 至 10 的数字。

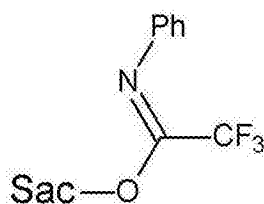
[0094] 在一些实施方案中, n 为 0 至 5 的数字。

[0095] 在一些实施方案中, n 为 0 或 1。

[0096] 合适的糖供体是本领域中已知的并且可包括但不限于: 糖基卤化物, 例如糖基氟化物和糖基溴化物; 糖基磷酸酯、糖基三卤乙酰亚胺酸酯、n-戊烯基糖苷(并且更通常地, 合适的半缩醛、原酸酯和 1-氧取代的糖基供体) 和硫苷。糖供体的反应性可取决于存在的任何保护基的性质。糖供体可以被缴械(例如, 通过用乙酰基保护)、被武装(例如, 通过用苄基保护) 或者被超级武装(例如, 通过用大体积甲硅烷基保护)。

[0097] 在一些优选实施方案中, 糖供体离去基团包含三卤乙酰亚胺酸酯基, 优选三氟乙酰亚胺酸酯基, 如, 例如:

[0098]



[0099] 在一些实施方案中, 所述方法包括使单糖单元 A 的 C2 位糖基化以获得双触角聚糖的步骤。在一些实施方案中, 所述方法包括使单糖单元 A 的 C4 位糖基化的步骤。C4 位处的糖基化可在 C2 位糖基化糖基化之后以产生三触角聚糖, 或者可在没有前面的 C2-糖基化步骤时发生以产生双触角聚糖。在其中所述方法包括在单糖单元 A 的 C2 和 C4 处糖基化的一些实施方案中, 糖基化步骤可以以任意顺序发生。

[0100] 化学选择性糖基化可以是酶促催化的和/或可通过选择性保护和/或保护基策略来促进。

[0101] 优选地, 用于酶促衍生化的寡糖核心包含 3 至 9 个单糖单元。

[0102] 在本发明方法的一些实施方案中, 经同位素标记的酰化剂可以是酰基卤或者合适羧酸的酸酐。在一些优选实施方案中, 经同位素标记的酰化剂是经同位素标记的乙酸酐, 优选地为 $(^{13}\text{CH}_3^{13}\text{C}=\text{O})_2$ 、 $(^{13}\text{CH}_3\text{C}=\text{O})_2$ 、 $(\text{CH}_3^{13}\text{C}=\text{O})_2$ 、 $(\text{CD}_3\text{C}=\text{O})_2$ 、 $(^{13}\text{CD}_3^{13}\text{C}=\text{O})_2$ 、 $(^{13}\text{CD}_3\text{C}=\text{O})_2$ 或 $(\text{CD}_3^{13}\text{C}=\text{O})_2$ 。在一些实施方案中, 经同位素标记的酰化剂是 $(^{13}\text{CH}_3^{13}\text{C}=\text{O})_2$ 。

[0103] 在本发明的一些实施方案中, 如果存在, Ac * 各自选自: $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ 、 $-(^{13}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C}=\text{O})\text{CD}_3$ 、 $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CD}_3$ 、 $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CD}_3$ 、 $-(^{13}\text{C}=\text{O})\text{CD}_3$ 、 $-(^{14}\text{C}=\text{O})^{14}\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C}=\text{O})^{14}\text{CH}_3$ 、 $-(^{14}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C}=\text{O})^{17}\text{O}\text{CH}_3$ 、 $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{17}\text{O}\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C}=\text{O})^{17}\text{O}\text{CH}_3$ 、 $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{17}\text{O}\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C}=\text{O})^{18}\text{O}\text{CH}_3$ 、 $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{18}\text{O}\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C}=\text{O})^{18}\text{O}\text{CH}_3$ 。

[0104] 在本发明的一些实施方案中, 如果存在, Ac * 各自选自: $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ 、 $-(^{13}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C}=\text{O})\text{CD}_3$ 、 $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CD}_3$ 、 $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CD}_3$ 、 $-(^{13}\text{C}=\text{O})\text{CD}_3$ 、 $-(^{14}\text{C}=\text{O})^{14}\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C}=\text{O})^{14}\text{CH}_3$ 、 $-(^{14}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ 或 $-(\text{C}=\text{O})^{18}\text{O}\text{CH}_3$ 。

[0105] 在本发明的一些实施方案中, 如果存在, Ac * 各自选自: $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ 、 $-(^{13}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C}=\text{O})\text{CD}_3$ 、 $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CD}_3$ 、 $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CD}_3$ 或 $-(^{13}\text{C}=\text{O})\text{CD}_3$ 。在本发明的一些实施方案中, 如果存在, Ac * 各自选自 $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ 或 $-(^{13}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ 。在所述方法的一些实施方案中, 如果存在, Ac * 各自是 $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ 。

[0106] 在一些实施方案中, 根据第一方面的方法还包括在经同位素标记的寡糖中乙酰

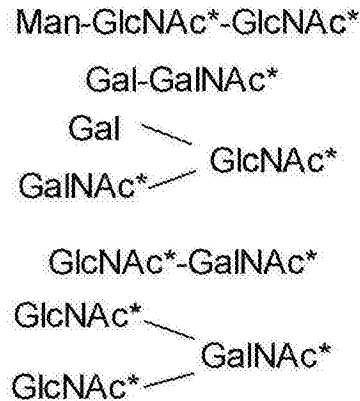
基-己糖胺单元的自由异头位处形成咪唑啉。然后,可将所得的经同位素标记的聚糖咪唑啉用于制备经同位素标记的糖缀合物。

[0107] 在一些实施方案中,根据第一方面的方法还包括使肽、脂质或蛋白质糖基化以获得包含经同位素标记的寡糖之经同位素标记的糖肽、肽聚糖、糖脂、糖蛋白。

[0108] 在另一方面,本发明提供了可通过根据第一方面的方法获得的经同位素标记的寡糖或糖缀合物。

[0109] 在另一方面,本发明提供了包含选自以下基序的聚糖:

[0110]



[0111] 其中,Ac * 各自是经同位素标记的。本文中使用的术语聚糖是指自由形式或者形成糖缀合物的碳水化合物部分的任何糖。

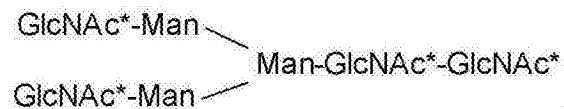
[0112] 在一些实施方案中,基序是:

[0113] Man-GlcNAc * -GlcNAc *。

[0114] 其中,Ac * 各自是经同位素标记的。

[0115] 在一些实施方案中,聚糖包含基序:

[0116]



[0117] 其中,Ac * 各自是经同位素标记的。

[0118] 在一些实施方案中,如果存在,Ac * 各自选自 $-(^{13}\text{C} = \text{O})^{13}\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C} = \text{O})^{13}\text{CH}_3$ 、 $-(^{13}\text{C} = \text{O})\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C} = \text{O})\text{CD}_3$ 、 $-(^{13}\text{C} = \text{O})^{13}\text{CD}_3$ 、 $-(\text{C} = \text{O})^{13}\text{CD}_3$ 、 $-(^{13}\text{C} = \text{O})\text{CD}_3$ 、 $-(^{14}\text{C} = \text{O})^{14}\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C} = \text{O})^{14}\text{CH}_3$ 、 $-(^{14}\text{C} = \text{O})\text{CH}_3$ 或 $-(\text{C} = ^{18}\text{O})\text{CH}_3$ 。

[0119] 在一些实施方案中,聚糖包含一个或更多个另外的单糖单元,其中如果存在,每种另外的单糖可独立地为经同位素标记的。

[0120] 在一些实施方案中,另外的单糖单元的数量大于 10。

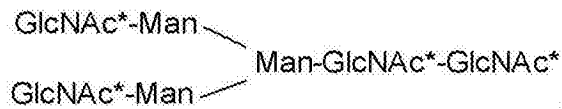
[0121] 在一些实施方案中,另外的单糖单元的数量大于 30。

[0122] 在一些实施方案中,另外的单糖单元的数量大于 50。

[0123] 在一些实施方案中,另外的单糖单元的数量大于 100。

[0124] 在一些实施方案中,本发明提供了具有以下结构的聚糖:

[0125]



[0126] 该结构是用于酶促衍生化以提供多种经同位素标记的 N-聚糖的尤其合适的核心寡糖底物。

[0127] 其中, Ac * 各自是 $-(^{13}\text{C} = \text{O})^{13}\text{CH}_3$, 该结构在本文称为 $^{13}\text{C}_8\text{-G0}$ 。如本文中所述, 使用半保护的核心寡糖作为用于酶促衍生化的底物可能具有优势。因此, 在一些实施方案中, 在 $\text{GlcNAc}^*-\text{GlcNAc}^*$ 还原端的五个羟基部分携带任选取代的苄基。当 Ac * 各自是 $-(^{13}\text{C} = \text{O})^{13}\text{CH}_3$ 并且这五个羟基各自都携带 PhCH_2- 部分时, 该结构在本文被称为 $^{13}\text{C}_8\text{-G0}(\text{Bn}_5)$ 。

[0128] 在另一方面, 本发明提供了鉴定样品中聚糖的方法, 所述方法包括向样品中添加包含经同位素标记的聚糖的经标记的标准物以获得经掺杂的样品 (doped sample), 以及使用质谱法分析经掺杂的样品。在一些优选的实施方案中, 经同位素标记的聚糖是根据本发明和 / 或可如本文中所述获得的经同位素标记的聚糖。

[0129] 优选地, 经标记的标准物包含经同位素标记的聚糖, 其是怀疑存在于样品中的聚糖的同位素体。在一些实施方案中, 经标记的标准物包含多于一种的经同位素标记的聚糖。在一些实施方案中, 可将多于一种的经标记的标准物添加至样品中获得经掺杂的样品。在一些实施方案中, 可添加多于一种的经同位素标记的聚糖以促进同时鉴定样品中的多种聚糖。

[0130] 本发明的方法与本领域已知方法相比的优点在于不需要标记样品中聚糖以掺入标记物, 避免了标记过程的重现性和副反应的问题。此外, 当经同位素标记的聚糖 (在经标记标准物中) 和分析物两者在相同实验中分析并使用相同过程处理时, 取消可存在于本领域中已知方法中的实验可变性的来源。每种经同位素标记的聚糖以与相应分析物相同的效率电离, 但是可容易地通过其固定质量增量来鉴定。在一些实施方案中, 经标记的标准物具有预定的质谱, 其可以通过能够容易地鉴定与经同位素标记的聚糖相关的离子峰来有助于分析经掺杂的样品。

[0131] 在一些优选的实施方案中, 向样品中添加已知量的经同位素标记的聚糖使得样品的聚糖含量可通过比较与聚糖和经同位素标记的聚糖相关的离子峰的相对强度来定量。下面提供了关于定量聚糖含量的另外的细节。因此, 虽然添加了已知量的经同位素标记的聚糖, 但是分析物可以绝对数值定量, 甚至在复杂生物流体中定量。在一些实施方案中, 可以添加已知量的多于一种经同位素标记的聚糖以便于同时鉴定和定量样品中的多种聚糖。

[0132] 在一些实施方案中, 所述方法包括:

[0133] (i) 选择经标记的标准物, 其包含一种或更多种经同位素标记的聚糖;

[0134] (ii) 向样品中添加经标记的标准物以获得经掺杂的样品;

[0135] (iii) 使用质谱法分析经掺杂的样品以获得离子峰;

[0136] (iv) 对与经标记的标准物相关的离子峰与经掺杂的样品谱中额外的离子峰的身份 (identity) 和强度进行比较。

[0137] 在一些优选实施方案中, 选择经标记的标准物对应于怀疑含有聚糖的样品。例如但不限于, 如果怀疑样品包含三种聚糖种类的组合, 则可以选择包含这三种聚糖之同位素体的经标记标准物。

[0138] 在分析经掺杂的样品之前可将聚糖衍生化。衍生化步骤可包括例如，唾液酸残基（如果存在的话）的完全甲基化或者衍生化可包括清除步骤。在一些实施方案中，衍生化包括用于除去唾液酸或其他末端糖单元的糖苷酶处理。

[0139] 在一些优选实施方案中，质谱法是 MALDI-ToF、直接输注 ESI-ToF 或 LC-MS，并且还可包括通过串联质谱法（有时称为 MS-MS）片段化，其可有助于分析物的鉴定并且能够在复杂混合物中区分同量异位的分析物（isobaric analyte）。可使用例如碰撞诱导解离（CID）、电子捕获解离（ECD）、电子转移离解（ETD）、红外多光子解离（IRMPD）、黑体红外辐射解离（BIRD）、电子分离解离（EDD）或表面诱导解离（SID）或者任何其他合适的方法实现片段化。

[0140] 在一些实施方案中，样品是复杂生物流体，而样品中的聚糖可以例如是从重组糖蛋白或抗体中释放出来的聚糖。样品中的聚糖可以是与医学疾病或障碍或者生物学过程相关的生物标志物，并且在一些优选实施方案中，所述方法还包括将一种或更多种聚糖的存在或量相关作为医学疾病或障碍或者生物学过程的指标。在没有限制的情况下，医学疾病或障碍可选自：癌症、心血管病、炎性皮肤病、糖尿病、胃肠病、肝病、贫血、免疫性疾病或障碍、自身免疫病、关节炎（包括类风湿性关节炎）、感染性疾病、肾病、神经障碍、肺病或先天性糖基化障碍。

[0141] 这些方法可在体外进行。

[0142] 因此，在另一方面，本发明提供了用于诊断怀疑患有与聚糖相关疾病的患者的方法，所述方法包括：

[0143] (i) 获得怀疑包含聚糖的样品；

[0144] (ii) 选择经标记的标准物，其包含对应于与疾病相关的聚糖的经同位素标记的聚糖；

[0145] (iii) 向样品中添加经标记的标准物以获得经掺杂的样品；

[0146] (iv) 使用质谱法分析经掺杂的样品以获得离子峰；

[0147] (v) 对与经标记的标准物相关的离子峰与经掺杂的样品的谱中额外离子峰的身份和强度进行比较；

[0148] (vi) 使用所述聚糖的存在来帮助诊断所述疾病或障碍。

[0149] 在另一方面，本发明提供了本文中所述的经同位素标记的聚糖，其用于诊断方法，所述方法包括：

[0150] (i) 从患者获得怀疑包含与疾病或障碍相关的聚糖的样品；

[0151] (ii) 选择经标记的标准物，其包含对应于与疾病或障碍相关的聚糖的经同位素标记的聚糖；

[0152] (iii) 向样品中添加经标记的标准物以获得经掺杂的样品；

[0153] (iv) 使用质谱法分析经掺杂的样品以获得离子峰；

[0154] (v) 对与经标记标准物相关的离子峰与被鉴定的经掺杂的样品的谱中额外的离子峰的身份和强度进行比较，并且任选地定量样品中一种或更多种聚糖的存在；

[0155] (vi) 使用所述一种或更多种聚糖的存在来诊断所述疾病或障碍。

[0156] 在另一些方面，本发明提供了用于诊断方法的本文中所述的经同位素标记的聚糖和诊断方法，所述方法包括：

[0157] (i) 选择经标记的标准物,其包含对应于与疾病或障碍相关的聚糖的经同位素标记的聚糖;

[0158] (iii) 向从患者中获得的样品中添加经标记的标准物以获得经掺杂的样品;

[0159] (iv) 使用质谱法分析经掺杂的样品以获得离子峰;

[0160] (v) 将与经标记的标准物相关的离子峰与被鉴定的经掺杂的样品的谱中额外的离子峰的身份和强度进行比较,并且任选地定量样品中一种或更多种聚糖的存在;

[0161] (vi) 使用所述一种或更多种聚糖的存在来诊断疾病或障碍。

[0162] 可使用本领域中已知的方法得到获自患者的样品。合适地,当可将取自患者的生物材料中的聚糖与蛋白质骨架缀合时,样品可通过从患者中取生物材料并通过酶促或化学(胨解)处理从蛋白质骨架中除去聚糖材料来获得。合适地,可对所得的材料进行纯化。

[0163] 在另一方面,本发明提供了用于鉴定样品中聚糖的试剂盒,所述试剂盒包含:

[0164] (a) 经标记的标准物,其包含一种或更多种经同位素标记的聚糖;

[0165] (b) 说明书:用经标记标准物掺杂怀疑包含聚糖的样品以获得经掺杂的样品并且使用质谱法分析经掺杂的样品。

[0166] 任选地,试剂盒可包含用于经标记标准物的质谱法数据,其可有助于通过容易鉴定的与经标记标准物相关的离子峰来鉴定样品中的分析物。

[0167] 说明书还可包含将与经标记标准物相关的离子峰与质谱中额外的离子峰进行比较的步骤。

[0168] 在一些实施方案中,经标记的标准物是已知与特定疾病、障碍或生物学过程相关之组合的经同位素标记的聚糖的混合物。

[0169] 现在将参照附图通过举例但非限制性地描述本发明的一些实施方案。然而,鉴于本公开内容,多种另外的方面和本发明的一些实施方案对于本领域的技术人员而言将是明显的。

[0170] 本文所用的“和/或”被认为是具体公开了两个指定特征或组分的每一个具有或不具有另一个。例如“A和/或B”被认为是具体公开了(i)A、(ii)B以及(iii)A和B中的每一种,就如同每一种在本文中被单独提出。

[0171] 除非上下文中另外指明,否则上述特征的说明和定义不限于本发明的任何特别方面或实施方案并且同样适用于所描述的所有方面和实施方案。

[0172] 附图简述

[0173] 图1. 经掺杂样品的质谱的代表性部分显示出与经同位素标记的聚糖和相应分析物相关的离子峰。峰指示显示与经标记标准物的经同位素标记的聚糖和样品的相应分析物聚糖相关的离子峰的所测量的强度。

[0174] 图2. 提供经同位素标记的N-聚糖的酶促延伸步骤的可能组合的示意图。

[0175] 图3. 合成经同位素标记的[(2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-α-D-吡喃甘露糖基)-(1→6)]-[2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-α-D-吡喃甘露糖基-(1→3)]-β-D-吡喃甘露糖基-(1→4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-α,β-D-吡喃葡萄糖,其中乙酰基各自是经¹³C₂-同位素标记的。

[0176] 图4. 合成经同位素标记的三触角[(2-乙酰氨基-β-D-吡喃葡萄糖

基)-(1 → 2)-α-D-吡喃甘露糖基]-(1 → 6)-[二-(2-乙酰氨基-β-D-吡喃葡萄糖基)-(1 → 2)-(1 → 4)-α-D-吡喃甘露糖基]-(1 → 3)-β-D-吡喃甘露糖基-(1 → 4)-2-乙酰氨基-3,6-二-O-苄基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1 → 4)-2-乙酰氨基-1,3,6-三-O-苄基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖苷,其中乙酰基各自是经¹³C₂-同位素标记的。

[0177] 图 5. 通过化学酶促合成获得的聚糖:¹³C₈-G0 的酶促截短。

[0178] 图 6. 通过化学酶促合成获得的聚糖:¹³C₆-MGn3 的岩藻糖基化。

[0179] 发明详述

[0180] 定义

[0181] 经同位素标记的

[0182] 本文中使用的同位素标记、经同位素标记的以及其他类似术语如本领域中所理解来使用。特别地,经同位素标记的化合物是这样的化合物:已知位置的至少一个原子富集有所述元素的天然存在的最大丰度同位素以外的同位素。例如,甲烷可以是经¹³C-同位素标记的(并且具有结构¹³CH₄)或者经氘标记。经氘标记的甲烷可以指这样的化合物:其中与甲烷相关的四个氢原子位置的一个或更多个富集有²H(D)。常见的经氘标记的甲烷结构包括 CDH₃和 CD₄。

[0183] 同位素标记是指高于天然丰度的同位素富集。优选地,富集位置的同位素纯度大于 50%。例如,在经¹³C-同位素标记的甲烷中,这意味着单个分子的 50%或更多包含¹³C 原子。在本发明的一些实施方案中,富集位置的同位素纯度优选大于 80%。更优选地,富集位置的同位素纯度大于 90%。

[0184] 在一些优选实施方案中,富集位置的同位素纯度大于 95%。

[0185] 在一些优选实施方案中,富集位置的同位素纯度大于 97%。

[0186] 在一些优选实施方案中,富集位置的同位素纯度大于 98%。

[0187] 在一些优选实施方案中,富集位置的同位素纯度大于 99%。

[0188] 酰基

[0189] 本文中使用的酰基是通过将羟基从羧酸中除去而获得的官能团。常规酰基包括甲酰基、乙酰基、丙酰基、苯甲酰基和丙烯酰基。生物相关的其他酰基包括但不限于:羟乙酰基和衍生自 C₄₋₁₈-脂肪酸的酰基(例如,丁酰基、己酰基、辛酰基、癸酰基等)和衍生自羟基化脂肪酸的酰基。

[0190] 酰化是使用酰化剂将酰基添加至化合物中的过程。在本发明的上下文中,酰化发生在亲核官能团(例如氨基或羟基)上。当存在多于一个亲核基团时,其中使基团酰化的顺序由亲核性和位阻因素确定。常见酰化剂包括酰氯和酸酐。

[0191] 如本文中所定义的,经同位素标记的酰基是其中已知位置的至少一个原子富集有所述元素的天然存在的最大丰度同位素以外的同位素的那些。实例包括但不限于可用的甲酰基、乙酰基、丙酰基、苯甲酰基和丙烯酰基的¹²C、¹³C、¹⁴C、¹⁶O、¹⁸O、H 和 D 的所有组合。根据情况,其他经同位素标记的酰基也可用于本发明的方法中。例如,经同位素标记的羟基乙酰基(如例如,1-¹³C₁-或¹³C₂-羟基乙酰基)可用于提供包含 N-羟乙酰神经氨酸单元的聚糖的同位素体。类似地,衍生自脂肪酸的经同位素标记的酰基可用于提供例如脂质 A 的同位素体。

[0192] 在一些实施方案中,经同位素标记的酰基是经同位素标记的乙酰基。优选的经同

位素标记的乙酰基 Ac * 包括 :

[0193] $-(^{13}\text{C} = \text{O})^{13}\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C} = \text{O})^{13}\text{CH}_3$ 、 $-(^{13}\text{C} = \text{O})\text{CH}_3$ 、

[0194] $-(\text{C} = \text{O})\text{CD}_3$ 、 $-(^{13}\text{C} = \text{O})^{13}\text{CD}_3$ 、 $-(\text{C} = \text{O})^{13}\text{CD}_3$ 、 $-(^{13}\text{C} = \text{O})\text{CD}_3$ 、

[0195] $-(^{14}\text{C} = \text{O})^{14}\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C} = \text{O})^{14}\text{CH}_3$ 、 $-(^{14}\text{C} = \text{O})\text{CH}_3$ 、

[0196] $-(\text{C} = ^{17}\text{O})\text{CH}_3$ 或 $-(\text{C} = ^{18}\text{O})\text{CH}_3$ 。

[0197] 在本发明优选的一些实施方案中,经同位素标记的乙酰基 Ac * 选自: $-(^{13}\text{C} = \text{O})^{13}\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C} = \text{O})^{13}\text{CH}_3$ 或 $-(^{13}\text{C} = \text{O})\text{CH}_3$ 。在本发明特别优选的一些实施方案中,经同位素标记的乙酰基 Ac * 是 $-(^{13}\text{C} = \text{O})^{13}\text{CH}_3$ 。

[0198] 本文中使用的酰化剂如本领域所理解来使用,即作为提供酰基的化学试剂。常用的酰化剂包括酰氯和羧酸的酸酐,但是其他酰化剂和方法对于本领域的技术人员也是明显的,可以包括例如,羧基与合适偶联剂之间反应的产物。在一些实施方案中,经同位素标记的酰化剂是酰氯。合适酰氯可以商业上购买或者可以使用本领域已知的方法来获得,例如通过用亚硫酰氯或乙二酰氯处理相应的羧酸。

[0199] 在另一些实施方案中,经同位素标记的酰化剂是羧酸的酸酐,优选地为乙酸的酸酐。在一些实施方案中,经同位素标记的酰化剂选自: $(^{13}\text{CH}_3^{13}\text{C} = \text{O})_2$ 、 $(^{13}\text{CH}_3\text{C} = \text{O})_2$ 、 $(\text{CH}_3^{13}\text{C} = \text{O})_2$ 、 $(\text{CD}_3\text{C} = \text{O})_2$ 、 $(^{13}\text{CD}_3^{13}\text{C} = \text{O})_2$ 、 $(^{13}\text{CD}_3\text{C} = \text{O})_2$ 或 $(\text{CD}_3^{13}\text{C} = \text{O})_2$ 。在一些优选实施方案中,经同位素标记的酰化剂是 $(^{13}\text{CH}_3^{13}\text{C} = \text{O})_2$ 。

[0200] 在一些实施方案中,可使用 ^{14}C -酰化剂,优选 ^{14}C -标记的乙酸酐。所得的聚糖(用 ^{14}C 标记)可用作使用放射自显影定量聚糖的标准物。

[0201] 保护基

[0202] 本文中使用的保护基是指为了在后续反应期间获得化学选择性或者在后续反应期间防止不期望的降解或副反应而通过官能团的化学修饰引入分子中的部分。保护基还可指被掩蔽或掩蔽基团或者被阻断或阻断基团。通过保护反应性官能团,在不影响被保护的基团的情况下,可进行涉及其他未被保护的反应性官能团的反应;通常在后续步骤中,在不显著影响分子的其余部分的情况下,可以除去保护基。参见,例如, 'Protective Groups in Organic Synthesis' (T.Green 和 P.Wuts, Wiley, 1999)。

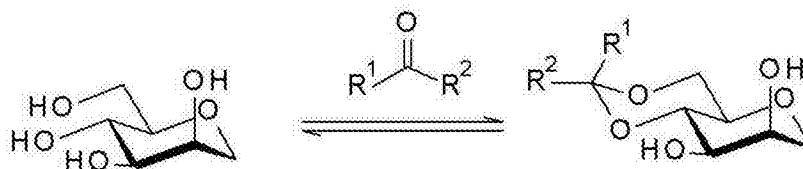
[0203] 保护基的实例是本领域中公知的,并且出于举例说明而非限制的目的提供以下实例。

[0204] 例如,羟基可作为醚(-OR)或酯($-\text{OC}(=\text{O})\text{R}$)被保护,例如,作为:叔丁基醚;甲氧甲基(MOM)或甲氧基乙氧基甲基(MEM)醚;苄基(Bn)、二苯甲基或三苯甲基醚;三甲基甲硅烷基或叔丁基二甲基甲硅烷基醚;或者乙酰基酯($-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_3$, -OAc)或苯甲酰基酯($-\text{OC}(=\text{O})\text{Ph}$, Bz)。

[0205] 例如,醛基团或酮基团可分别作为缩醛或缩酮被保护,其中通过与例如伯醇反应将糖基($>\text{C}=\text{O}$)转化成二醚($>\text{C}(\text{OR})_2$)。硫缩醛和硫缩酮也是本领域中已知的。

[0206] 例如,多羟基部分可作为乙缩醛基团被保护,其中例如彼此相邻的碳原子上的两个羟基($\text{HO}-\text{CR}_2\text{CR}_2-\text{OH}$;通常称为乙二醇基团)与醛或酮反应形成包含 $-\text{O}-\text{CR}_2-\text{O}-$ 键的环,如下所示。

[0207]



[0208] 缩醛通常在酸催化的脱水条件（例如，在 Dean-Stark 条件下或使用索氏提取器）下形成并且可通过酸催化 and 过量的水或者通过本领域已知的其它方法来除去。

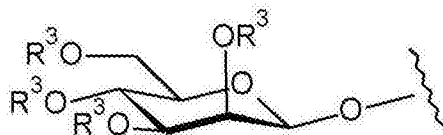
[0209] 例如，胺基可作为酰胺或尿烷来保护，例如，作为：甲基酰胺（ $-\text{NHCO}-\text{CH}_3$ ）；苄氧基酰胺（ $-\text{NHCO}-\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ， $-\text{NH}-\text{Cbz}$ ）；作为叔丁氧基酰胺（ $-\text{NHCO}-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ， $-\text{NH}-\text{Boc}$ ）；2- 联苯基-2- 丙氧基酰胺（ $-\text{NHCO}-\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4\text{C}_6\text{H}_5$ ， $-\text{NH}-\text{Bpoc}$ ），作为 9- 苄基甲氧基酰胺（ $-\text{NH}-\text{Fmoc}$ ），作为 6- 硝基苄基氧基酰胺（ $-\text{NH}-\text{Nvoc}$ ），作为 2- 三甲基甲硅烷基乙氧基酰胺（ $-\text{NH}-\text{Teoc}$ ），作为 2,2,2- 三氯乙氧基酰胺（ $-\text{NH}-\text{Troc}$ ），作为烯丙氧基酰胺（ $-\text{NH}-\text{Alloc}$ ），作为 2-（苯磺酰基）乙氧基酰胺（ $-\text{NH}-\text{Psec}$ ）；或者在合适的情况下，作为 N- 氧化物（ $> \text{NO}$ ）或叠氮化物。

[0210] 在本发明的一些实施方案中，己糖胺糖供体中的胺官能团由邻苯二甲酰亚胺、Troc、三氯乙酰基、二甲基乙酰基来保护。这便于 β - 选择性形成糖苷键并且防止在这些反应中形成不期望的咪唑。在一些实施方案中，胺官能团可作为叠氮化物来保护，其可以便于立体选择性形成 α - 糖苷键。

[0211] 例如，羧酸基团可作为酯来保护，例如，作为： C_{1-7} 烷基酯（例如，甲基酯；叔丁基酯）； C_{1-7} 卤代烷基酯（例如， C_{1-7} 三卤代烷基酯）；三 C_{1-7} 烷基甲硅烷基- C_{1-7} 烷基酯；或者 C_{5-20} 芳基- C_{1-7} 烷基酯（例如，苄基酯；硝基苄基酯）；或者作为酰胺，例如，作为甲基酰胺。

[0212] 在一些实施方案中，本发明使用正交保护基策略来组装寡糖和包含寡糖的结构。正交保护是本领域中已知的策略，并且涉及慎重选择多个保护基以能够使用影响分子中另外其他保护基的专用反应条件组对分子的一个或更多个官能团去保护。例如，所使用的一个保护基可以是酸不稳定的（例如，缩醛），所使用的另一个保护基可以是碱不稳定的（例如，Fmoc 基团），同时所使用的另外的保护基可使用氢化条件（例如，苄基醚）来除去。如本文中所述，当结构中多个位置可各自独立地为保护基时，所述保护基可以相同或不同。不同的保护基可彼此正交并且因此便于在另一个的存在下通过对一个保护基选择性去保护来进行化学选择性反应。纯粹作为示例，在包含以下基序的寡糖中，

[0213]



[0214] 其中， R^3 各自独立地为保护基， R^3 可各自为相同类型的保护基，或者 R^3 可各自独立地与任何其他 R^3 基团相同或不同。通过使用正交的 R^3 保护基，选择性的去保护和反应可以在 C2、C3、C4 或 C6 处发生。

[0215] 使用同位素稀释计算浓度

[0216] 可根据本发明的方法和由本发明提供的经同位素标记的聚糖用于确定样品中目标分析物（例如天然聚糖）的浓度。合适的样品可包含从蛋白质中释放的聚糖、天然糖缀合物和重组蛋白生产的产物。

[0217] 在根据本发明的一些方法中,如下来获得怀疑包含至少一种聚糖的样品:例如,通过胨解或者用肽糖苷酶酶促裂解从蛋白质中释放。向该样品中添加已知量的“经标记的标准物”以获得经掺杂的样品。经标记的标准物包含已知浓度的至少一种经同位素标记的聚糖,并且在一些实施方案中,包含经同位素标记的聚糖和已知浓度的所有组分的混合物。

[0218] 然后使用质谱法分析经掺杂的样品以获得谱。任选地,在分析和获得期间,可以获得关于所选离子的片段化的信息。该片段化分析可有助于确定目标聚糖的总体结构并且确定所存在的键的相对和绝对弱点。这与本发明的实施方案和方法尤其相关,其中例如已使用本文中所述的化学酶促的方法,在寡糖序列中的一个或多个预定位置处将同位素标记的单糖单元引入到经同位素标记的聚糖中。

[0219] 然后对所获得的谱中的离子峰进行归属(因固定质量增量而可鉴定)并且可通过与已知与经标记标准物相关的离子峰进行比较来定量。

[0220] 例如,具有[(2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-α-D-吡喃甘露糖基)-(1→6)]-[2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-α-D-吡喃甘露糖基-(1→3)]-β-D-吡喃甘露糖基-(1→4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-α,β-D-吡喃葡萄糖基序的特别天然的N-聚糖可通过使用包含同位素体的经标记的标准物来鉴定,其中该七糖基序中的乙酰基各自为经¹³C₂-同位素标记的,其可以如本文中所述来获得。相对于天然N-聚糖,这导致质量增量为8Da的经同位素标记的N-聚糖,但是具有相应相关质谱离子包络(如图1所示)。

[0221] 此外,通过比较离子峰强度,可定量分析物聚糖的量,由此使得分析物聚糖的量被定量(每种同位素体的峰强度与其在样品中的量成比例)。当经同位素标记的聚糖以与相应分析物聚糖相同的效率电离时,相对强度与其相对浓度成比例(等式1)。所述方法还允许在量和相对丰度(等式2、3和4)这两个方面来定量包含多种聚糖的复杂混合物中的分析物。使用本发明的方法和这些等式,可以定量复杂混合物中的分析物。应该理解使用等式1至4通常适用于本发明的方法,并且在不限参考该示例性方法下对等式1至4进行解释。为了简单起见,“轻(light)”是指非经同位素标记的聚糖并且“重(heavy)”是指相应较高分子量的经同位素标记的聚糖。

[0222] I_i “轻”同位素体 i 的峰强度

[0223] I_j^* “重”同位素体 j 的峰强度

[0224] m_i “轻”同位素体 i 的量

[0225] m_j^* “重”同位素体 j 的量

[0226] m_T “轻”聚糖在样品中的总量

[0227] m_T^* “重”聚糖在样品中的总量

[0228] X_i “轻”同位素体 i 在非同位素分析物聚糖中的相对丰度

[0229] X_j^* “重”同位素体 j 在经同位素标记的聚糖中的相对丰度

[0230] [等式 1] $\frac{I_i}{m_i} = \frac{I_j^*}{m_j^*}$

[0231] [等式 2] $m_i = m_T \times X_i$

[0232] [等式 3] $m_j^* = m_r^* \times X_j^*$

[0233] [等式 4] $m_r^* = \frac{I_j^* \times m_j^* \times S_j^*}{I_j^* \times X_j^*}$

[0234] 应该理解当上述等式通过与聚糖的“重”相应同位素体标准物进行比较提供了对样品中的聚糖的合理定量时,对于复杂混合物和其中某些峰是在饱和的浓度下检测的谱而言,更详细的方法可能是期望的。例如,如果标准物的最大丰度峰是饱和的,则简单地使用上述等式中的峰可能会得到不精确的定量。为了解决这个问题,下面提供了同位素稀释分析的细节(为了计算样品中聚糖的浓度而研究内标准物同位素体的线性度和选择性)。该方法使用与不同“重”同位素体相关的离子峰来计算函数。该函数可用于将待定量的峰的峰强度和与该峰相关的同位素体的量关联起来,由此减轻这种潜在的不精确性。再次,以下是出于举例说明而非限制来提供。

[0235] 线性度确定

[0236] 已知添加至样品中的给定聚糖的“重”同位素体的总量(m_r^*)和其成分“重”同位素体中每一种的相应相对丰度(X_j^*),能够使用等式 3 计算每种“重”同位素体在样品中的量(m_j^*)。这可以说明不同合成“重”同位素体(例如,具有不同地经同位素标记的乙酰基)和/或与给定“重”聚糖的同位素包络相关的多种峰。合适地,使用与同位素包络相关的多种峰。这些同位素包络峰的理论丰度可来自多种同位素的已知天然丰度,被计算为分子经验式所给出的概率。

[0237] 通过使用经同位素标记的标准物中用于聚糖的这些不同“重”同位素体所获得的离子峰强度(I_j^*)及其相对丰度(m_j^*),关于峰强度和聚糖量的函数可通过线性回归来计算(I 为 m 的函数):

[0238] [等式 5]: $I = bm + a$

[0239] 其中系数 b 和 a 分别对应于斜率和截距,其通过最小化最小二乘法拟合来计算(等式 6 和等式 7)。

[0240] [等式 6]: $b = \frac{\sum(m_j^* - \overline{m_j^*})(I_j^* - \overline{I_j^*})}{\sum(m_j^* - \overline{m_j^*})^2}$

[0241] [等式 7]: $a = \overline{I_j^*} - b \overline{m_j^*}$

[0242] 还可计算确定系数 R^2 并将其用作拟合质量的量度。如果 R^2 低于所给的值,例如,如果 R^2 小于 0.99,则可以丢弃对应于最大丰度“重”同位素体的数据点并且通过线性回归再次计算函数和 R^2 。可以重复该过程直到所有 R^2 定义的线性度条件相匹配。这种迭代过程提高了函数的准确性。

[0243] 一旦获得适当 R^2 的函数,所定义的线性度范围是最大和最小峰强度以及相应聚糖同位素体量值的限制。在该线性范围内的所有峰可被认为具有足够的品质以允许非常准确的定量。

[0244] II. 计算样品中非标记的聚糖的量

[0245] 如所述的,可使用已知性质的经标记标准物“重”聚糖同位素体混合物获得线性函数。这些“重”聚糖必须在先前建立的线性范围中给出峰强度并且具有合适的最小信噪比(例如,高于五)。

[0246] 这样,满足上述标准的每种“轻”聚糖同位素体的量(在最大和最小峰强度内)(m_i)可由上述获得的函数来计算并且通过上述线性回归迭代改进来改进。

[0247] [等式 8]: $m_i = \frac{I_i - a}{b}$

[0248] 因为“轻”聚糖自身具有与其母体质谱峰相关的同位素包络(例如, ^{13}C 的天然丰度),分析物聚糖总量更准确分析使用“准确质量”同位素体的理论天然丰度(X_i)(可使用这些存在的同位素的统计概率容易地通过理论来计算)对其进行校正。

[0249] 因此,一旦“轻”同位素体的量(m_i)被计算,并且已知该同位素体的相对丰度(X_i),可以计算样品中的分析物聚糖(m_T):

[0250] [等式 9]: $m_T = \frac{(I_i - a)}{b \times X_i}$

[0251] 因此,在一些实施方案中,定量确定样品的分析物聚糖含量的方法可使用包含所述分析物聚糖的多种“重”同位素体的经标记的标准物,所述方法包括以下步骤:

[0252] (i) 将与每种“重”同位素体相关的离子峰的相对强度(I_j^*)与标准物中该聚糖的已知丰度(m_j^*)相关联以获得作为 m_j 之线性函数的 I_j ;

[0253] (ii) 如果 R^2 值大于预定值,则任选地计算用于相关联的确定系数 R^2 , 并且扣减最大丰度离子峰;

[0254] (iii) 任选地将步骤 (ii) 重复一次或更多次;

[0255] (iv) 使用所述函数来计算分析物聚糖的“轻”同位素体的量;

[0256] (v) 任选地使用分析物聚糖的“轻”同位素体的总量来确定所存在的分析物聚糖的总量。

[0257] 合适地, R^2 值可大于或等于 0.99。

[0258] 此外,本发明还提供了鉴定样品中“轻”同位素体的方法,所述方法包括添加已知量的包含多种相应“重”同位素体的经标记的标准物(所述“重”同位素体是经同位素标记的),通过质谱法分析混合物并且通过比较与“重”同位素体和与“轻”同位素体相关的离子峰的相对强度定量“轻”同位素体的量。

[0259] 该定量可包括以下的步骤:

[0260] (a) 将与每种“重”同位素体相关的离子峰的相对强度(I_j^*)与标准物中该同位素体的已知丰度(m_j^*)相关联以获得作为 m_j 之线性函数的 I_j ;

[0261] (b) 如果 R^2 值大于预定值,则任选地计算用于相关联的确定系数 R^2 , 并且扣减最大丰度离子峰;

[0262] (c) 任选地重复步骤 (ii) 一次或更多次;

[0263] (d) 使用所述函数来计算分析物样品中分析物“轻”同位素体的量;

[0264] (v) 任选地用“轻”同位素体的总量来确定所存在的分析物聚糖的总量。

[0265] 应该理解可将所述方法应用于可以以经同位素标记的形式使用的任何合适分子中,所述方法适用于本文中所述的聚糖标准物但并不一定限于聚糖分子。

[0266] 片段化

[0267] 质谱法实验期间分子碎片离子的产生和分析在结构确定中大量使用。用于产生和检测这种碎片离子的多种技术是本领域中已知的,并且包括但不限于碰撞诱导的解离

(CID) 和串联质谱法 (也被不同地称作 MS/MS 和 MS²)。这些碎片的分析和定量可有助于部分或完全的结构确定,并且在相同概念分子量的其他分子的存在下可尤其地用于检测给定的分子。在本发明领域的情况下,碎片分析还可用于鉴定分析物中较弱的键连接并且区别同量异位结构。

[0268] 在本发明的一些实施方案中,例如使用本文中所述的酶促延伸方法将经同位素标记的单糖单元以化学酶促的方式掺入聚糖结构中。使用这些用于产生片段化模式的聚糖对使用质谱法技术用于区分同量异位聚糖结构特别有价值。这可以通过在特定异构体中鉴定和 / 或归属诊断碎片和 / 或确定最弱键来实现。

[0269] 糖的缩写

[0270] 本文中使用的糖缩写被用作本领域通常所理解的。后缀“N”表示相应的氨基糖,而“NAc”表示相应的 N-乙酰基氨基糖。

[0271] Glc- 葡萄糖

[0272] Gal- 半乳糖

[0273] Man- 甘露糖

[0274] Rha- 鼠李糖

[0275] Fru- 果糖

[0276] Fuc- 岩藻糖

[0277] Mur- 胞壁酸

[0278] Neu- 神经氨酸

[0279] Kdo- 酮基 - 去氧辛酮糖酸 (keto-deoxyoctulosonate)

[0280] 聚糖

[0281] 术语聚糖可用于指代游离形式或形成糖缀合物分子 (如糖蛋白、蛋白聚糖或糖脂) 的碳水化合物部分的任何糖 (单糖、寡糖或多糖)。聚糖是涉及几乎每种生物结构和过程中的重要分子。组成单糖产生比核酸或氨基酸大很多的组合的多样性,并且此外多样性由聚糖的共价修饰引起。因此,给定生物体的总聚糖库 (glycan repertoire) (糖组 (glycome)) 远比基因组或蛋白质组更加复杂和动态。

[0282] 单糖之间的键可以是 α -形式或 β -形式,链可以是直链或支链的并且聚糖修饰可包括乙酰化和硫酸化。糖蛋白携带一个或更多个通过 N 或 O 键与多肽共价连接的聚糖。

[0283] 将 O-聚糖连接至丝氨酸或苏氨酸残基的羟基上。N-聚糖是通过侧链氮 (N) 与天冬酰胺残基连接的糖链。它们共享两个甘露糖残基的共同戊糖区域,分别通过 α 1-3 和 α 1-6 键连接至中心甘露糖,其依次通过 β 1-4 键连接至由两个 β 1-4-连接的 GlcNAc 残基组成的壳二糖核心上。基于戊糖的进一步加工,将 N-聚糖分成三个主要类别:(i) 高甘露糖型 (ii) 复杂型 (iii) 杂交型。

[0284] 高甘露糖 N-聚糖只有连接至壳二糖核心上的未被取代的甘露糖残基 (通常 5 至 9 个)。杂交型 N-聚糖包含未被取代的末端甘露糖残基和具有 GlcNAc 的甘露糖残基,其发起可添加另外的单糖的“触角”。复杂型 N-聚糖具有在 α 3 和 α 6 甘露糖位点处添加的 GlcNAc 残基,不具有额外的戊糖甘露糖残基并且见于双触角、三触角和四触角形式中。

[0285] 蛋白聚糖具有一个或更多个糖胺聚糖 (GAG) 链,所述糖胺聚糖 (GAG) 链通过用木糖结束的核心区域连接至丝氨酸残基的羟基。最重要的糖脂是糖鞘脂,其由通常通过葡萄

糖或半乳糖连接至神经酰胺脂质部分的末端羟基的聚糖组成,其由长链氨基醇鞘氨醇和脂肪酸构成。

[0286] 聚糖结合蛋白质

[0287] 聚糖的许多特定生物作用通过聚糖结合蛋白 (glycan binding protein, GBP) 的识别来介导。GBP 包含凝集素、糖胺聚糖结合蛋白质和聚糖特异性抗体。凝集素通常通过碳水化合物识别结构域结合至聚糖链的末端区域。由于低亲和性结合,多价 CRD-聚糖相互作用通常需要生物相关性的相互作用。

[0288] 聚糖加工

[0289] 聚糖主要通过将单糖部分组装成聚糖链的糖基转移酶来合成。糖基转移酶具有共同的性质:能够将简单核苷酸糖供体(例如,UDP-Gal、GDP-Fuc 或 CMP-Sia)的单糖催化转移至接受体底物。

[0290] 糖缀合物生物合成由将糖连接至多肽侧链或鞘脂碱的糖基转移酶来引发。例如,在 N-聚糖情况中,寡糖转移酶将聚糖 Glc3Man9GlcNAc2 转移到天冬酰胺的侧链上。

[0291] 大多数糖基转移酶延伸聚糖链。直链或支链通过顺序的糖基化,通常通过不同的糖基转移酶来构建。即,通过一种酶的糖基化的产物产生另一个的优选底物。糖基转移酶的实例包括半乳糖-1-磷酸尿苷酰-转移酶 (GalT)、N-乙酰氨基半乳糖-转移酶 (GalNAcT)、岩藻糖基转移酶 (FuT) 和唾液酸转移酶 (SialT),其分别催化添加半乳糖、N-乙酰基葡萄糖胺、岩藻糖和唾液酸残基。

[0292] 糖苷酶是聚糖加工酶,其除去单糖部分以形成中间体,然后所述中间体被糖基转移酶作用。这种类型的加工在 N-聚糖的生物合成中特别重要;糖苷酶对 Glc3Man9GlcNAc2 的作用允许加工所必需的中间体最终形成上述高甘露糖型、复杂型和杂交型 N-聚糖。

[0293] 化学酶促合成经同位素标记的聚糖

[0294] 开发微生物资源和提高哺乳动物酶生产中的进步已经建立了使用糖基转移酶作为用于聚糖合成的高效工具 (Blixt, 2006 ;Ruiz, 2001 ;Serna, 2010, Zou, 2011)。使用区域特异性转移酶和立体特异性转移酶以及糖供体结构单元的适当顺序,可通过顺序酶促延伸组装复杂聚糖结构。类似地,可以期望首先截短核心基序,例如,以便于制备衍生自双触角七糖的不对称的经同位素标记的聚糖标准物 $18^{13}\text{C}_8\text{G}_0(\text{Bn}_5)$ 。该截短可通过酶促水解来实现。

[0295] 因此,用于合成用作质谱法标准物的经同位素标记的聚糖的本文中所述的方法包括酶促衍生化步骤。

[0296] 在一些实施方案中,用于合成经同位素标记的聚糖的方法包括在本文中所述经同位素标记的寡糖上使用适当水解酶来截短所述经同位素标记的寡糖。换言之,本发明可提供用于酶促截短来自经同位素标记的寡糖核心基序的一个或更多个糖单元的方法。

[0297] 然后,所得的截短的寡糖可自身经历酶促延伸以掺入一个或更多个另外的糖单元。在本发明的一些实施方案中,将与合适糖供体组合的合适转移酶以逐步的方式顺序用于组装经同位素标记的聚糖。转移酶可以是重组糖基转移酶、转糖苷酶、内切糖苷酶或突变的糖苷酶。所得的聚糖可用于本文中所述的本发明的方法。在一些实施方案中,酶促延伸步骤在包含本文中所述的经同位素标记的基序的寡糖上发生,其可以不同地被称为核心寡糖、核心基序和经同位素标记的起始寡糖。换言之,在本发明的一些方法中,将经同位素标

记的起始寡糖进行化学选择性延伸以掺入额外的糖单元,由此提供另外用于质谱法的经同位素标记的聚糖标准物。

[0298] 用于每个延伸步骤的糖供体可任选地为经同位素标记的。在一些实施方案中,在所得的聚糖中,只有原始经同位素标记的基序是经同位素标记的。在另一些实施方案,在酶促延伸步骤期间,掺入至少一种经同位素标记的糖单元。如上所讨论的,在特定位置处掺入特定经同位素标记的糖单元用于分析质谱法中的片段化模式。

[0299] 或者,酶促延伸在不是经同位素标记的基序上发生。相反,在酶促延伸步骤期间掺入一个或更多个经同位素标记的糖单元以提供经同位素标记的聚糖,其可适当地用于鉴定在本文中所述样品中聚糖的方法。

[0300] 化学酶促延伸步骤可以重复多次。例如,使用单糖糖供体,20个循环的化学酶促延伸可引入额外20个单糖单元。应该理解可在触角的末端掺入另外的单元或者可以掺入到核心寡糖的一种糖单元上。

[0301] 在一些实施方案中,化学酶促延伸步骤可使用糖供体,所述糖供体是二糖或寡糖和/或与脂质、肽或蛋白质缀合的。

[0302] 在一些实施方案中,酶促衍生化步骤可包括差向异构化步骤、转糖基化步骤或翻译后修饰步骤中的一个或更多个。此外,这些可以是延伸或截短。

[0303] 图2说明了使用所述方法来组装多种聚糖和聚糖混合物。任何糖单元可以是经同位素标记的。在一些优选实施方案中,起始七糖[(2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-α-D-吡喃甘露糖基)-(1→6)]-[2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-α-D-吡喃甘露糖基-(1→3)]-β-D-吡喃甘露糖基-(1→4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-α,β-D-吡喃葡萄糖中的每个乙酰基是经同位素标记的。下面描述了这种经同位素标记的起始材料的化学合成。该经同位素标记的起始核心寡糖在本文称为¹³C₈-G0。

[0304] 图2示出了一系列由这种起始七糖¹³C₈-G0开始的序列。重组核心α-1,6岩藻糖基转移酶的孵育提供了核心岩藻糖基化结构A,其可被进一步半乳糖基化(图C)和唾液酸化(图D)。在UDP-半乳糖的存在下,用牛乳半乳糖基转移酶使起始的七糖直接半乳糖基化获得单半乳糖基化的异构体和完全半乳糖基化的N-聚糖(图E)。用重组α-2,6SialylIT进一步处理提供了化合物图F。借助重组GnTIII可以引入等分GlcNAc残基(化合物B)。然后,该产物的半乳糖基化导致图G等分化合物,并且后续唾液酸化提供了化合物图H。等分化合物A的α-1,6岩藻糖基化导致等分和核心岩藻糖基化聚糖I,其可朝向图J进行半乳糖基化并且最终唾液酸化以得到化合物(图K)。

[0305] 在酶促衍生化步骤期间可以保护合成提供的经同位素标记的核心寡糖,即,它们可具有一个或更多个保护基。例如,如本文中所述,可通过¹³C₈-苄基[(2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-α-D-吡喃甘露糖基)-(1→6)]-[2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-α-D-吡喃甘露糖基-(1→3)]-β-D-吡喃甘露糖基-(1→4)-2-乙酰氨基-3,6-二-O-苄基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-2-乙酰氨基-3,6-二-O-苄基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖苷(本文称作¹³C₈-G0(Bn₅))获得¹³C₈-G0。这种苄基化七糖自身可作用于酶促衍生化步骤的经同位素标记的核心基序。如本文中所述,半保护的核心基序可以是用于化学选择性酶促延伸的合适底物并且存在保护

基可具有特别的优点,例如,充当 HPLC 分析和纯化期间用于峰检测的发色团以及有助于不同产物(例如异构体聚糖)的分离。

[0306] 应理解,其他非人(例如植物或寄生虫)特有聚糖可以以相似的方式来评估,并且通过从上述经同位素标记的基序开始,获得作为具有固定质量增量的经同位素标记的化合物,其可以容易地在质谱实验中检测到。同样地,包含具有系统变异数量的触角的较高分支的复杂型、杂交型和高甘露糖型聚糖,支化模式和核心修饰的较大文库 N-聚糖的化学合成制备可以从非常少数量的核心结构开始获得,其优选为经同位素标记的并且可使用根据本发明的方法获得。基于这些核心结构的文库反映了见于真核糖蛋白中 N-聚糖的结构变异和重组糖蛋白上出现的最常规的聚糖结构。

[0307] 以下讨论涉及本文中称作 $^{13}\text{C}_8\text{-G0}$ 的七糖 N-聚糖核心的修饰。提供举例说明而不旨在限制本发明。同等地可以考虑其他聚糖核心。

[0308] 部分去保护的经 ^{13}C -标记的 N-聚糖 $^{13}\text{C}_8\text{-G0}(\text{Bn}_5)$ (13) 作为用于制备和隔离不对称 N-聚糖结构的前体来评估。通过利用五苄基化聚糖的疏水性和 UV 吸光度,本发明人发现核心 N-聚糖结构中这些 5 苄基的存在在部分酶促延伸之后促进不同聚糖和甚至异构体结构的色谱分离。

[0309] 为了控制采用牛乳 β -1,4-半乳糖基转移酶进行的底物的部分半乳糖基化,进行了一系列的实验,不仅显示出半保护的 N-聚糖 $^{13}\text{C}_8\text{-G0}(\text{Bn}_5)$ 是用于所述酶合适底物而且显示出获得 G0-G1-G2 结构的混合物(所有都是 ^{13}C -标记的)的可能性。在使用 C18 柱的反相中,通过 UPLC-MS 分析该混合物,允许不同化合物的分离并且也允许单半乳糖基化 N-聚糖 $^{13}\text{C}_8\text{-G1}(\text{Bn}_5)$ 的两个异构体的分离,并且还通过使用 UV-检测器定量其相对组成。在 $^{13}\text{C}_8\text{-G0}(\text{Bn}_5)$ 的酶促转化期间,使用适当的条件产生单半乳糖基化双触角 N-聚糖 $^{13}\text{C}_8\text{-G1}(\text{Bn}_5)$,多于 45% 是其两种不同的异构体 3-LacNAc 和 6-LacNAc 的形式。

[0310] 这两种单半乳糖基化异构体分别通过毫克规模的半制备型 HPLC 的纯化通过 MALDI 分析和 NMR 分析确证来实现。通过氢解使核心完全去保护,提供两种异构体的经 ^{13}C -标记的标准物 $^{13}\text{C}_8\text{-G13}$ 和 $^{13}\text{C}_8\text{-G16}$,用于 N-聚糖定量分析。异构体 $^{13}\text{C}_8\text{-G16}$ 还可进行酶促岩藻糖基化用于制备标准物 $^{13}\text{C}_8\text{-G16F}$,其通过 MALDI-Tof MS 来确证。

[0311] 获得用作质谱法标准物的异构体不对称经同位素标记的 N-聚糖的另一种策略包括将来自米曲菌 (*Aspergillus oryzae*) 的 β -半乳糖苷酶用在双半乳糖基化的 $^{13}\text{C}_8\text{-G2}(\text{Bn}_5)$ 化合物(表 1)上。在该转化期间观察到聚糖的不同分布,其中本发明人可以确定两种异构体单半乳糖基化结构上水解酶的不同活性。酶的这种不同特异性仅提供了一个接近 50% 产率的单半乳糖基化化合物和非半乳糖基化化合物 $^{13}\text{C}_8\text{-G0}(\text{Bn}_5)$ 。

[0312] 表 1

[0313]

	BE4-61-G2	Galase	时间	T(°C)	G2	G1	G1(*)	G0
1	5 μ g	30mU	5h	30	14	9	44	33
2	5 μ g	15mU	5h	30	18	10	46	25

3	5 μ g	8mU	5h	30	35	10	43	12
4	5 μ g	15mU	18h	30	6	4	38	52

[0314] 使用来自大肠杆菌 (*E. coli*) 中表达的多杀巴斯德菌 (*Pasteurella multocida*) 的 α -2,3-唾液酸基转移酶, 相同的策略用于由双半乳糖基化的 $^{13}\text{C}_8$ -G2(Bn_5) 制备多种经 ^{13}C -标记的唾液酸化标准物以得到两种衍生自双触角结构的单唾液酸化聚糖和双唾液酸化聚糖。这种半保护的化合物的混合物通过 UPLC-MS 来分辨, 其允许本发明人确定其相对组成 (表 2)。

[0315] 表 2

[0316]

	G2 (Bn_5)	CMP- NeuNAc	2,3- SialT (新的)	时间	T ($^{\circ}\text{C}$)	G2	G2A1	G2A1 (*)	G2A2
1	10 μg / 5 nmol	4 eq	5 mU	30 min	37	16	25	23	36
2	20 μg / 10 nmol	4 eq	10 mU	30 min	37	22	23	23	32

[0317] 该反应还用于先前获得的部分半乳糖基化化合物 G0/G1/G2 的混合物。该混合物的部分 α -2,3-唾液酸化产生了 9 种结构的混合物, 其可通过 UPLC-MS 来分辨, 鉴定 $^{13}\text{C}_8$ -G0(Bn_5) 和 $^{13}\text{C}_8$ -G2(Bn_5) 的存在、单半乳糖基化化合物 $^{13}\text{C}_8$ -G1(Bn_5) 的两种异构体、单唾液酸化化合物 $^{13}\text{C}_8$ -G1A1(Bn_5) 的两种异构体、单唾液酸化化合物 $^{13}\text{C}_8$ -G2A1(Bn_5) 的两种异构体以及双唾液酸化双触角结构 $^{13}\text{C}_8$ -G2A2(Bn_5)。因此, 该策略可用于在纯化和去保护之后获得高达 5 个新的唾液酸化 ^{13}C -标记的 N-聚糖。

[0318] 然后以 mg 规模进行唾液酸化反应以获得相应的唾液酸化标准物。先前制备的半保护的 $^{13}\text{C}_8$ -G1 3 Bn_5 来自多杀巴斯德菌的 α -2,3-唾液酸转移酶进行唾液酸化获得唾液酸化化合物 $^{13}\text{C}_8$ -G1 3 Bn_5 。反应没有完成但是唾液酸化化合物可通过半制备型 HPLC 来分离。同样, $^{13}\text{C}_8$ -G2(Bn_5) 以 mg 规模的唾液酸化提供了唾液酸化标准物 $^{13}\text{C}_8$ -G2A1 3 (Bn_5)、 $^{13}\text{C}_8$ -G2A1 6 (Bn_5) 和 $^{13}\text{C}_8$ -G2A2(Bn_5) 的混合物, 其可以通过半制备型 HPLC 分离。

[0319] 还控制 $^{13}\text{C}_8$ -G2(Bn_5) 用重组 CHO 细胞中表达的人 α -2,6-唾液酸基转移酶的唾液酸化反应以获得相应的单唾液酸化结构和双唾液酸化结构。反应使用部分保护的 $^{13}\text{C}_8$ -G2(Bn_5) 作为底物并且只有 1 当量的唾液酸供体产生 26% 的单唾液酸化化合物。相比之下, 使用过量的供体得到双唾液酸化化合物作为唯一的产物。这两种化合物 (单唾液酸化和双唾液酸化) 可以通过 UPLC-MS 来分辨。该反应还在先前通过部分半乳糖基化获得的 G0/G1/G2 混合物上进行。与 α -2,3-唾液酸转移酶的先前结果类似, 包含 3 个半乳糖基化化合物的混合物的部分唾液酸化提供了 4 种新的经 ^{13}C -标记的 2,6-唾液酸化 N-聚糖的混合物, 其可以通过 UPLC-MS 来分辨。分别鉴定双-2,6-唾液酸化双触角 N-聚糖 $^{13}\text{C}_8$ -G2S2(Bn_5)、单-2,6-唾液酸化化合物 $^{13}\text{C}_8$ -G1S1(Bn_5) 成为其两种异构体形式和其他单唾液酸化化合物 $^{13}\text{C}_8$ -G2S1(Bn_5) 来确定混合物的相对组成 (表 3)。

[0320] 表 3

[0321]

	G2 (Bn ₅)	CMP- NeuNAc	2,6-SialT	时间	G2S2	G2S1	G2
1	10 μg / 5 mmol	4 eq	1 mU	2h	98	1	1
2	10 μg / 5 mmol	1 eq	0.25 mU (0.25 nmol/min)	30 min	-	10	90
				1h	-	15	85
				4h	2	28	72
				24h	7	40	53

[0322] 核心寡糖 ¹³C₈-G0 (Bn₅) 也可进行修饰用于制备衍生自双触角结构但是仅有一个末端 GlcNAc 的其他不对称聚糖标准物。这些截短的单触角结构可通过 ¹³C₈-G0 (Bn₅) 中末端葡萄糖胺的酶促水解获得。存在于起始分子中的苄基再次有助于酶促水解之后所得结构的纯化。出于这个目的,在部分保护的底物 ¹³C₈-G0 (Bn₅) 内使用来自 *Conavalia ensiformis* 的 N-乙酰基氨基葡萄糖苷酶。反应的优化使得本发明人能够获得起始材料、单-触角结构的分别两个异构体 ¹³C₆-Mn³ (Bn₅) 和 ¹³C₆-Mn⁶ (Bn₅) 以及双水解产物 ¹³C₄-Man3 (Bn₅) 的混合物。当氨基葡萄糖苷酶除去经 ¹³C- 标记的 GlcNAc 部分时,所得的聚糖具有不同程度的标记,获得携带 6 个 ¹³C 原子的两种异构体单触角结构和具有 4 个 ¹³C 原子而不是最初的 8 个原子的三甘露糖聚糖。

[0323] 使用 3mg 的 ¹³C₈-G0 (Bn₅) 放大水解反应。该混合物可通过半制备型 HPLC 分辨并且将 3 个新化合物以 mg 规模进行分离。这些化合物经受氢解用于除去苄基,提供相应的经 ¹³C- 标记的聚糖 ¹³C₆-Mn³、¹³C₆-Mn⁶ 和 ¹³C₄-Man3 (图 5)。同样,¹³C₆-Mn³ 的酶促岩藻糖基化定量产生标准物 ¹³C₆-Mn³F (图 6)。

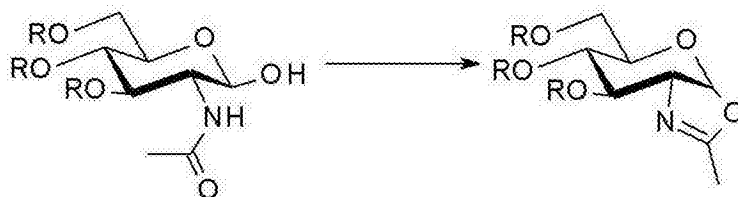
[0324] 如前所述,部分苄基化合物可通过酶促反应衍生化。例如,在部分半乳糖基化中,当相应反应得到多于一种的产物时,这种部分保护尤其有用,因为这种部分保护允许通过 HPLC 分离所得的混合物。

[0325] 三触角 N-聚糖 22 具有可以被半乳糖基化的三个不同的位置。部分半乳糖基化在单一反应中产生七种新的经同位素标记的聚糖标准物:完全半乳糖基化的 N-聚糖 (G3)、三种具有两个半乳糖残基的化合物 (G2a、G2b 和 G2c) 和三种具有单个半乳糖残基的化合物 (G1a、G1b、G1c)。

[0326] 任选择的咪唑形成

[0327] 在本发明的一些实施方案中,合成方法还包括在寡糖中于乙酰基己糖胺单元的自由异头位处形成咪唑的步骤。

[0328]



[0329] 用于这种合成步骤的合适方法是本领域中已知的并且包括使用偶联剂 (例如

CDI、DCC、EDC 和 DMC) ;或者使用合适的路易斯酸试剂。还可使用其他脱水试剂或条件,包括但不限于氯甲酰胺型试剂(chloroformamidium-type reagent) 和酸组合。

[0330] 然后,可将所得的经同位素标记的聚糖咪唑啉用于制备经同位素标记的糖缀合物。合适的方案是本领域中已知的(参见,例如,Rising,2008)。优选的糖缀合物包含糖蛋白、糖型(glycoform)、糖肽、肽聚糖、糖脂、糖苷和脂质多糖。

[0331] 在一些优选实施方案中,合成方法涉及包含基序[(2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-α-D-吡喃甘露糖基)-(1→6)][2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-α-D-吡喃甘露糖基-(1→3)]-β-D-吡喃甘露糖基-(1→4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-α,β-D-吡喃葡萄糖的聚糖,其中基序中的乙酰基各自是经同位素标记的。聚糖可包含另外的触角糖单元。该聚糖的自由异头位处形成咪唑啉使得能够制备相对于天然糖缀合物的固定质量增量至少为 8Da 的糖缀合物同位素体。在一些优选实施方案中,另外的触角糖单元都不是经同位素标记的并且所得的经同位素标记的糖缀合物相对于天然糖缀合物的固定质量增量为 8Da。

[0332] 疾病和障碍中的聚糖标志物

[0333] 聚糖的生物合成依赖于涉及糖基转移酶的许多高度竞争的过程。结果,糖基化对于生化环境的性质高度敏感,并且糖基化和糖基化的改变涉及许多疾病和障碍。因此,在一些方面中,本发明涉及方便地鉴定所谓的聚糖标志物(已知与疾病或障碍相关的特定聚糖结构)的方法。而在一些实施方案中,本发明提供了在复杂混合物中鉴定和定量单个聚糖标记物,在另一些实施方案中,许多与一种或更多种疾病或障碍相关的聚糖标记物可在单个实验中鉴定和定量。

[0334] 为了有助于鉴定与特定疾病或障碍相关的聚糖标记物的标记组合(signature combination),在一些优选的实施方案中,经标记的标准物是包含已知与疾病或障碍相关的组合(并且任选地以适当比例的量)的经同位素标记的同位素体的混合物。这样,可将包含一种或更多种经同位素标记的聚糖的预混合的经标记标准物用于本发明用于确定特定聚糖标记存在的方法中,并且随后用于诊断与那些标记相关的疾病和障碍的方法中。

[0335] 可使用包含一种或更多种经同位素标记的聚糖的合适的经标记标准物的疾病和障碍包括:

[0336] 癌症;

[0337] 心血管病,例如卒中、心肌梗死、低血容量性卒中、动脉粥样硬化;

[0338] 炎性皮肤病;

[0339] 糖尿病;

[0340] 胃肠病,包括溃疡性结肠炎;

[0341] 肝障碍和疾病;

[0342] 贫血;

[0343] 免疫性疾病和障碍,例如威斯科特-奥尔德里奇综合征(Wiskott-Aldrich Syndrome);

[0344] 自身免疫病;

[0345] 关节炎,包括类风湿性关节炎;

[0346] 感染性疾病;

[0347] 肾病;

[0348] 神经障碍,包括阿尔茨海默病;

[0349] 肺病;以及

[0350] 先天性糖基化障碍。

[0351] 上面列出的内容不是以限制的方式提供的,并且应该理解,本文中所述的方法与已知与疾病或障碍相关的任何聚糖生物标志物的检测、鉴定和/或定量相关。

[0352] 应该理解本发明提供了生物制药乙二醇分析中许多有用的应用。提供以下举例说明性实例以举例说明可应用本文中所述的同位素体和方法的多种用途:

[0353] ●通过给定产物的单个聚糖指纹的定量,迅速鉴定生产批次和生产位置。这可有助于鉴定打包为原件的生物仿制药并追踪批次原件和身份。

[0354] ●精确和定量检测具有已知效应子功能(影响Fc部分与Fc受体的结合)或对循环半衰期有重要影响的mAb聚糖。这些包括具有核心岩藻糖、末端半乳糖、末端唾液酸的聚糖以及高甘露糖聚糖(后者将优先与例如导致药物从循环中除去的巨噬细胞的甘露糖受体结合)。

[0355] ●生物制药行业中高通量应用中的通常迅速和定量的聚糖分析以及单糖组成、分支的程度、唾液酸化、岩藻糖含量等,例如IND申请的克隆选择、过程开发、分批释放。

[0356] ●特别使用岩藻糖基化和唾液酸化聚糖标准物或任何其他不稳定聚糖作为通过MALDI-TofMS的聚糖分析中的内标准物,以定量和监测这些单糖的损失或迁移并且优化获得参数以避免这些残基损失。

[0357] ●生产具有起始治疗性mAb或糖蛋白的精确聚糖组成的试剂盒以指导克隆选择和过程开发中的生物仿制药生产者。

[0358] ●使用内标准物来绝对定量混合物内的糖型以有助于将效力实验与糖基化相关联,并且在最后情况中确定特定糖型的效力。

实施例

[0359] 列举以下实施例是为了向本领域普通技术人员提供关于如何实践本发明的完整公开内容和描述,并且不旨在限制本发明的范围。

[0360] 合成N-聚糖七糖核心

[0361] 以下合成将参考图3所示的相应化学结构来编号。

[0362] 苄基 4-O-乙酰基 -3,6-二-O-苄基 -2-脱氧 -2-苯二甲酰亚氨基 -β-D-吡喃葡萄糖苷(2)。

[0363] 在室温下,将苄基醇(54 μL, 0.525mmol, 1.5当量)和1(250mg, 0.350mmol, 根据Serna S., Kardak B., Reichardt N., Martin-Lomas M., Tetrahedron Asymmetry, 2009, 20, 851-856合成)与分子筛的无水DCM溶液搅拌45分钟。使混合物冷却至0°C并且添加TMSOTf(6 μL, 0.035mmol, 0.1当量)。1h之后,反应用三乙胺淬灭,经硅藻土塞过滤并浓缩。通过快速色谱(己烷:EtOAc 9:1)对粗制残余物进行纯化以得到标题化合物(198mg, 90%)。

[0364] Rf 0.39(甲苯:EtOAc 9:1); $[\alpha]_D^{20} = +9.2$ ($c = 0.5, \text{CHCl}_3$); $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.87-7.48(m, 4H, Phth), 7.40-7.27(m, 5H, Ph), 7.13-6.96(m, 7H, Ph), 6.95-6.85(m, 3H, Ph), 5.19-5.09(m, 2H, H-1, H-4), 4.81(d, $J = 12.3\text{Hz}$, 1H, CH_2Bn), 4.61-4.54(m, 3H, CH_2Bn), 4.50(d, $J = 12.4\text{Hz}$, 1H, CH_2Bn), 4.42(dd, $J = 10.7, 8.9\text{Hz}$, 1H, H-3), 4.34-4.27(m, 2H, H-2, CH_2Bn), 3.75(dt, $J = 9.7, 4.6\text{Hz}$, 1H, H-5), 3.68-3.60(m, 2H, H-6), 1.94(s, 3H, CH_3Ac); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ : 169.8, 138.1, 137.9, 137.1, 133.9, 131.7, 128.5, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 127.8, 127.8, 127.8, 127.5, 123.4, 123.4, 97.3(C-1), 73.9, 73.8, 73.6, 72.6, 71.0, 69.9, 55.6, 21.0; HRMS(ESI) m/z : 算得 $\text{C}_{37}\text{H}_{35}\text{NO}_8\text{Na}$: 644.2260 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 实测 644.2294.

[0365] 苄基 3,6-二-O-苄基-2-脱氧-2-苯二甲酰亚氨基- β -D-吡喃葡萄糖苷(3)。

[0366] 向 2(608mg, 0.978mmol) 的 MeOH : CH_2Cl_2 : 1(6mL) 溶液中添加 NaOMe 0.25M(300 μL , 20%)。搅拌 1h 之后, 添加酸性离子交换树脂直到 pH 为 7。过滤溶液、浓缩并通过快速色谱纯化以得到标题化合物(430mg, 76%)。

[0367] Rf(己烷:EtOAc); $[\alpha]_D^{20} = +9.4$ ($c = 0.5, \text{CHCl}_3$); $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.89-7.50(m, 4H, Phth), 7.42-7.29(m, 5H, Ph), 7.13-7.01(m, 7H, Ph), 6.98-6.89(m, 3H, Ph), 5.20-5.12(m, 1H, H-1), 4.79(d, $J = 12.3\text{Hz}$, 1H, CH_2Bn), 4.73(d, $J = 12.2\text{Hz}$, 1H, CH_2Bn), 4.67(d, $J = 11.9\text{Hz}$, 1H, CH_2Bn), 4.61(d, $J = 12.0\text{Hz}$, 1H, CH_2Bn), 4.52(d, $J = 12.3\text{Hz}$, 1H, CH_2Bn), 4.48(d, $J = 12.3\text{Hz}$, 1H, CH_2Bn), 4.29-4.19(m, 2H, H-2, H-3), 3.90-3.78(m, 3H, H-6, H-6, H-4), 3.65(dt, $J = 9.7, 4.9\text{Hz}$, 1H, H-5), 2.96(br s, 1H, OH); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ : 168.1, 167.8, 138.3, 137.8, 137.2, 133.8, 131.7, 128.6, 128.2, 128.0, 128.0, 127.9, 127.7, 127.7, 127.5, 123.4, 123.3, 97.5(C-1), 78.7, 74.4, 73.9, 73.7, 70.9, 70.8, 55.5; HRMS(ESI) m/z : 算得 $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{NO}_7\text{Na}$: 602.2155 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 实测 602.2128.

[0368] 苄基 2-O-乙酰基-4,6-O-苯亚甲基-3-O-(2-萘基甲基)- β -D-吡喃甘露糖基-(1 \rightarrow 4)-3,6-二-O-苄基-2-脱氧-2-苯二甲酰亚氨基- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4)-3,6-二-O-苄基-2-脱氧-2-苯二甲酰亚氨基- β -D-吡喃葡萄糖苷(5)。

[0369] 在室温下, 将 1(400mg, 0.69mmol) 和 4(905mg, 0.83mmol, 1.2 当量, 根据 Serna S., Kardak B., Reichardt N., Martin-Lomas M., Tetrahedron Asymmetry, 2009, 20, 851-856 合成) 的无水 CH_2Cl_2 溶液与 **3A** 分子筛搅拌 1h。在室温下, 向该混合物中添加 TMSOTf(12 μL , 0.07mmol, 10%) 并搅拌反应直到 TLC 显示起始材料完全转化(1h)。反应通过添加三乙胺(20 μL) 来淬灭, 经硅藻土塞过滤并浓缩。通过快速色谱对粗制残余物进行纯化以得到标题化合物(750mg, 73%)。

[0370] Rf 0.17(己烷:EtOAc 3:1); $[\alpha]_D^{20} = -4.9$ ($c = 0.5, \text{CHCl}_3$); $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.91-7.58(m, 10H), 7.57-7.28(m, 12H), 7.23-7.13(m, 4H), 7.12-6.87(m, 13H), 6.81-6.68(m, 3H), 5.53(s, 1H, CHPh), 5.51(dd, $J = 3.3, 1.3\text{Hz}$, 1H, H-2C), 5.27(d, $J = 8.3\text{Hz}$, 1H, H-1B), 4.95(d, $J = 8.4\text{Hz}$, 1H, H-1A), 4.88(d, $J = 12.1\text{Hz}$, 1H, CH_2Bn), 4.83(d, $J = 12.8\text{Hz}$, 2H, 2x CH_2Bn), 4.7-4.67(m, 3H, 2x CH_2Bn , H-1C), 4.57-4.47(m, 4H, 2x CH_2Bn), 4.42(d, $J = 12.1\text{Hz}$, 1H, 1x CH_2Bn), 4.40-4.35(m, 2H, 2x CH_2Bn), 4.29(dd, $J = 10.7, 8.5\text{Hz}$, 1H, H-3B), 4.25-4.08(m, 6H, H2A, H2B, H-4A, H-4B, H-3A, H-6Ca), 3.90(t, $J = 9.6\text{Hz}$, 1H, H-4C), 3.68-3.59(m, 2H, H-6Ba, H-6Bb), 3.59-3.50(m, 3H, H-6C-b, H-6Aa, H-3C), 3.43(dd,

$J = 11.1, 3.8\text{Hz}$, 1H, H-6Ab), 3.30 (ddd, $J = 9.9, 3.9, 1.7\text{Hz}$, 1H, H-5A), 3.23 (dt, $J = 9.9, 2.2\text{Hz}$, 1H, H-5B), 3.13 (td, $J = 9.7, 4.9\text{Hz}$, 1H, H-5C), 2.22 (s, 3H, CH_3Ac); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 170.3, 168.6, 167.7, 167.6, 138.7, 138.7, 138.5, 137.9, 137.6, 137.3, 135.4, 134.1, 133.9, 133.5, 133.4, 133.1, 131.9, 131.8, 131.5, 129.1, 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 128.1, 127.9, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6, 127.6, 127.5, 127.3, 126.9, 126.3, 126.1, 126.0, 125.5, 123.8, 123.2, 101.7, 99.4 (C-1C), 97.2 (C-1A), 97.1 (C-1B), 79.0, 77.9, 77.0, 76.6, 75.9, 75.8, 74.7, 74.6, 74.4, 74.3, 73.2, 72.9, 71.6, 70.6, 69.2, 68.5, 68.3, 67.9, 67.0, 56.6, 55.8, 21.2; HRMS (ESI) : m/z : 算得 $\text{C}_{89}\text{H}_{82}\text{N}_2\text{O}_{19}\text{Na}$: 1506.5443 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 实测 1506.5481.

[0371] 苄基-2-乙酰基-4,6-二-苄亚甲基- β -D-吡喃甘露糖基-(1 \rightarrow 4)-3,6-二-苄基-2-脱氧-2-苄二甲酰亚氨基- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4)-3,6-二-苄基-2-脱氧-2-苄二甲酰亚氨基- β -D-吡喃葡萄糖苷 (6)。

[0372] 向 5 (300mg, 0.202mmol) 的 CH_2Cl_2 : MeOH 4 : 1 (1.2mL) 溶液中添加 DDQ (138mg, 0.606mmol, 3 当量)。2h 之后, 混合物用 EtOAc 稀释并且用饱和的 NaHCO_3 、水和盐水洗涤。浓缩溶液并且通过快速色谱纯化以得到标题化合物 (176mg, 65%)。

[0373] R_f 0.37 (己烷 : EtOAc 3 : 2); $[\alpha]_D^{20} = -4.6$ ($c = 1$, CHCl_3); ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 7.94-7.57 (m, 8H, Phth), 7.50-7.27 (m, 15H, Ph), 7.11-6.88 (m, 12H, Ph), 6.82-6.68 (m, 3H, Ph), 5.47 (s, 1H, CHPh), 5.31 (dd, $J = 3.1, 1.2\text{Hz}$, 1H, H-2C), 5.26 (d, $J = 8.2\text{Hz}$, 1H, H-1B), 4.95 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 1H, H-1A), 4.85 (t, $J = 12.4\text{Hz}$, 2H, CH_2Ph), 4.76 (d, $J = 1.3\text{Hz}$, 1H, H-1C), 4.70 (d, $J = 12.4\text{Hz}$, 1H, CH_2Ph 异头物), 4.62 (d, $J = 12.0\text{Hz}$, 1H, CH_2Ph), 4.50 (d, $J = 13.3\text{Hz}$, 3H, CH_2Ph), 4.47 (d, $J = 12.0\text{Hz}$, 1H, CH_2Ph), 4.41 (d, $J = 12.1\text{Hz}$, 1H, CH_2Ph 异头物), 4.37 (d, $J = 12.4\text{Hz}$, 1H, CH_2Ph), 4.30-4.23 (m, 1H, H-3B), 4.23-4.08 (m, 6H, H-2B, H-4A, H-2A, H-4B, H-3A, H-6Ca), 3.75-3.67 (m, 2H, H-4C, H-3C), 3.63 ($\alpha\alpha$, $J = 7.2, 2.3\text{Hz}$, 2H, H-6Ba, H-ABb), 3.59-3.50 (m, 2H, H-6Cb, H-6Aa), 3.43 (dd, $J = 11.1, 3.8\text{Hz}$, 1H, H-6Ab), 3.33-3.27 (m, 1H, H-5A), 3.23-3.18 (m, 1H, H-5B), 3.15 (dd, $J = 15.0, 8.2\text{Hz}$, 1H, H-5C), 2.20 (s, 3H, CH_3Ac); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 170.6, 168.5, 167.7, 138.7, 138.4, 138.0, 137.3, 137.1, 134.1, 133.9, 133.5, 131.8, 131.5, 129.3, 128.6, 128.4, 128.4, 128.1, 128.1, 127.9, 127.9, 127.7, 127.6, 127.5, 127.3, 126.9, 126.3, 123.7, 123.2, 102.1, 99.3 (C-1C), 97.2 (C-1A), 97.0 (C-1B), 79.1, 78.6, 76.6, 75.7, 74.6, 74.6, 74.4, 74.4, 73.3, 72.9, 71.4, 70.5, 69.9, 68.5, 68.3, 67.8, 66.7, 56.6, 55.8, 21.1; HRMS (ESI) : m/z : 算得 $\text{C}_{78}\text{H}_{74}\text{N}_2\text{O}_{19}\text{Na}$: 1365.4784 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 实测 1365.4840.

[0374] 苄基 (3,4,6-三-乙酰基-2-脱氧-2-苄二甲酰亚氨基- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-三-乙酰基- α -D-吡喃甘露糖基)-(1 \rightarrow 3)-2-乙酰基-4,6-二-苄亚甲基- β -D-吡喃甘露糖基-(1 \rightarrow 4)-3,6-二-苄基-2-脱氧-2-苄二甲酰亚氨基- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4)-3,6-二-苄基-2-脱氧-2-苄二甲酰亚氨基- β -D-吡喃葡萄糖苷 (8)。

[0375] 在室温下, 将 6 (100mg, 0.074mmol) 和 7 (80mg, 0.089mmol, 1.2 当量, 根据 Unverzagt, C.; Eller, S.; Mezzato, S.; Schuberth, R. Chem. Eur. J. 2007, 14, 1304-1311 合成) 的无水 CH_2Cl_2 溶液与分子筛搅拌 1h。向该混合物中添加 TMSOTf (1.6 μL , 0.007mmol,

10%) 并且搅拌直到 TLC 显示起始材料完全转化 (1h)。反应通过添加三乙胺 (20 μ L) 来淬灭, 经硅藻土塞过滤并浓缩滤液。通过快速色谱对粗制残余物进行纯化以得到标题化合物 (116mg, 76%)。

[0376] Rf 0.13 (己烷 : EtOAc 1 : 1); $[\alpha]_D^{20} = -15.8$ (c = 0.5, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.95–7.51 (m, 16H), 7.51–7.27 (m, 11H), 7.08–6.89 (m, 12H), 6.84–6.68 (m, 3H), 5.48–5.40 (m, 2H, H-3E, CHPh), 5.23 (d, J = 7.9Hz, 1H, H-1B), 5.16 (d, J = 4.0Hz, 1H, H-2C), 5.02 (t, J = 10.2Hz, 1H, H-4D), 4.99–4.89 (m, 3H, H-4D, H-1A, H-1D), 4.89–4.77 (m, 4H, H-1E, 2x CH_2Ph , H-3D), 4.68 (d, J = 12.2Hz, 2H, CH_2Ph 异头物, CH_2Ph), 4.54–4.46 (m, 4H, 3x CH_2Ph , H-1C), 4.41–4.30 (m, 3H, CH_2Ph 异头物, 2x CH_2Ph), 4.28–4.05 (m, 8H, H-2E, H-3B, H-4A, H-2B, H-2A, H-3A, H-4B, H-6Ca), 4.00 (dd, J = 3.0, 1.7Hz, 1H, H-2D), 3.93 (dd, J = 12.3, 3.3Hz, 1H, H-6Ea), 3.83 (dt, J = 9.8, 3.7Hz, 1H, H-5D), 3.73 (t, J = 9.6Hz, 1H, H-4C), 3.70–3.62 (m, 4H, H-6Eb, H-6Da, H-6Db, H-6Ba), 3.60–3.51 (m, 3H, H-6Bb, H-6Aa, H-3C), 3.48 (t, J = 10.3Hz, 1H, H-6Cb), 3.38 (dd, J = 11.1, 3.6Hz, 1H, H-6Ab), 3.29 (dd, J = 9.8, 3.1Hz, 1H, H-5A), 3.15 (dd, J = 9.9, 2.1Hz, 1H, H-5B), 3.00 (td, J = 9.7, 5.0Hz, 1H, H-5C), 2.15 (s, 4H, CH_3Ac , H-5E), 2.05 (d, J = 5.8Hz, 6H, CH_3Ac), 1.99 (d, J = 11.5Hz, 5H, CH_3Ac), 1.86 (d, J = 4.8Hz, 6H, CH_3Ac); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ : 170.6, 170.6, 170.5, 170.2, 170.1, 169.5, 169.2, 167.7, 167.6, 138.8, 138.7, 138.5, 137.9, 137.4, 137.3, 134.3, 134.1, 133.9, 133.5, 131.8, 131.8, 131.5, 130.2, 129.0, 128.8, 128.6, 128.3, 128.1, 128.1, 127.9, 127.7, 127.6, 127.6, 127.6, 127.3, 127.0, 126.9, 123.8, 123.7, 123.2, 102.4, 98.5 (C-1C), 98.0 (C-1D), 97.2 (C-1A, C-1B), 95.8 (C-1E), 78.8, 78.3, 76.7, 76.5, 75.9, 75.3, 74.6, 74.5, 74.4, 74.3, 73.5, 72.9, 71.2, 70.6, 70.6, 70.5, 69.4, 68.9, 68.6, 68.5, 68.3, 67.5, 66.2, 65.5, 62.9, 61.1, 56.6, 55.8, 54.1, 20.9, 20.7, 20.6, 20.6; HRMS (ESI): m/z: 算得 $\text{C}_{110}\text{H}_{109}\text{N}_3\text{O}_{36}\text{Na}$: 2070.6689 [M+Na] $^+$, 实测 2070.6689。

[0377] 苄基 (3,4,6-三-O-乙酰基-2-脱氧-2-苯二甲酰亚氨基- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 2))-3,4,6-三-O-乙酰基- α -D-吡喃甘露糖基)-(1 \rightarrow 3)2-O-乙酰基- β -D-吡喃甘露糖基-(1 \rightarrow 4))-3,6-二-O-苄基-2-脱氧-2-苯二甲酰亚氨基- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4))-3,6-二-O-苄基-2-脱氧-2-苯二甲酰亚氨基- β -D-吡喃葡萄糖基 (9)。

[0378] 在 0 $^\circ\text{C}$ 下, 向 8 (100mg, 0.046mmol) 的 CH_2Cl_2 (1mL) 溶液中添加乙硫醇 (17 μ L, 0.244mmol, 5 当量) 和三氟化硼乙醚 (1 μ L, 20%)。2h 之后, 添加三乙胺。浓缩混合物并通过快速色谱 (己烷 : EtOAc, 3 : 1) 纯化以得到标题化合物 (75mg, 83%)。

[0379] Rf 0.1 (己烷 : EtOAc 1 : 2); $[\alpha]_D^{20} = -3.9$ (c = 0.5, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 7.94–7.41 (m, 12H, Phth), 7.35–7.22 (m, 10H, Phth, Ph), 7.16 (m, 1H, Ph), 7.07–6.93 (m, 12H, Ph), 6.74 (m, 3H, Ph), 5.72 (dd, J = 10.7, 9.1Hz, 1H, H-3E), 5.36 (d, J = 8.5Hz, 1H, H-1E), 5.25 (d, J = 8.1Hz, 1H, H-1B), 5.18–5.10 (m, 3H, H-4D, H-4E, H-2C), 4.96–4.91 (m, 2H, H-1D, H-1A), 4.91–4.81 (m, 3H, 2x CH_2Bn , H-3D), 4.68 (d, J = 12.4Hz, 1H, CH_2Ph), 4.60 (d, J = 12.1Hz, 1H, CH_2Ph), 4.54 (s, 1H, H-1D), 4.53–4.46 (m, 3H, 3x CH_2Bn), 4.43–4.34 (m, 4H, 3x CH_2Bn , H-2E), 4.29 (dd, J = 12.3, 4.8Hz, 1H, H-6E), 4.27–4.13 (m, 5H, H-2B, H-3B, H-4A, H-2D, H-2A), 4.13–4.06 (m, 3H, H-6E, H-3A, H-4B), 3.85–3.77 (m, 4H, H-5E, H-5D, H-6Da, H-6Db), 3.75 (t, J = 9.5Hz, 1H, H-4C), 3.68 (dd, J = 11.8, 3.4Hz, 1H,

H-6Ca), 3.62(dd, $J = 11.6, 1.7$ Hz, 1H, H-6Ba), 3.57-3.50(m, 3H, H-6Aa, H-6Bb, H-6Cb), 3.42(dd, $J = 11.1, 3.8$ Hz, 1H, H-6Ab), 3.34(dd, $J = 9.4, 3.5$ Hz, 1H, H-3C), 3.31-3.26(m, 1H, H-5A), 3.22-3.16(m, 1H, H-5B), 2.98(dt, $J = 8.9, 4.1$ Hz, 1H, H-5C), 2.11(2xs, $J = 1.3$ Hz, 6H, 2xCH₃Ac), 2.06-2.00(3xs, 9H, 3xCH₃Ac), 1.98(s, 3H, CH₃Ac), 1.86(s, 3H, CH₃Ac); ¹³C NMR(CDCl₃) δ : 170.9, 170.8, 170.7, 170.3, 170.2, 169.5, 169.5, 168.6, 167.7, 138.7, 138.5, 138.4, 137.8, 137.3, 134.5, 133.5, 131.8, 131.4, 128.7, 128.4, 128.3, 128.2, 128.2, 128.1, 127.9, 127.6, 127.6, 127.5, 127.4, 126.9, 123.8, 123.7, 123.3, 123.2, 98.4(C-1D), 97.7(C-1C), 97.2(C-1E), 97.2(C-1A), 97.1(C-1B), 77.6, 77.5, 76.7, 75.4, 74.6, 74.6, 74.5, 74.5, 74.4, 73.4, 72.9, 72.0, 70.7, 70.6, 70.5, 69.9, 69.1, 69.0, 68.5, 68.2, 65.5, 62.5, 62.1, 62.1, 56.5, 55.8, 54.4, 21.0, 20.9, 20.8, 20.7, 20.7, 20.5; HRMS(ESI): m/z : 算得 C₁₀₃H₁₀₅N₃O₃₆Na: 1982.6376[M+Na]⁺, 实测 1982.6331.

[0380] 苄基[(3,4,6-三-O-乙酰基-2-脱氧-2-苯二甲酰亚氨基- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 2))-3,4,6-三-O-乙酰基- α -D-吡喃甘露糖基)-(1 \rightarrow 6)]-[(3,4,6-三-O-乙酰基-2-脱氧-2-苯二甲酰亚氨基- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 2))-3,4,6-三-O-乙酰基- α -D-吡喃甘露糖基)-(1 \rightarrow 3)]-2-O-乙酰基- β -D-吡喃甘露糖基-(1 \rightarrow 4))-3,6-二-O-苄基-2-脱氧-2-苯二甲酰亚氨基- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4))-3,6-二-O-苄基-2-脱氧-2-苯二甲酰亚氨基- β -D-吡喃葡萄糖苷(11)。

[0381] 在室温下,将9(45mg,0.023mmol)和10(30mg,0.034mmol,1.2当量,根据Unverzagt, C.;Eller, S.;Mezzato, S.;Schuberth, R.Chem.Eur.J.2007,14,1304-1311合成)的无水CH₂Cl₂(6mL)溶液与分子筛搅拌1h。使该混合物冷却至-40℃,添加TMSOTf(1 μ L,0.007mmol,25%)并将反应在该温度下搅拌直到TLC显示起始材料完全转化(1h)。反应通过添加三乙胺(5 μ L)来淬灭,经硅藻土塞过滤并浓缩。通过快速色谱和制备型板对粗制残余物进行纯化以得到标题化合物(45mg,74%)。

[0382] R_f 0.28(己烷:丙酮1:1); $[\alpha]_D^{20} = -2.8$ ($c = 0.5$, CHCl₃); ¹H NMR(500MHz, CDCl₃) δ 7.88-7.55(m, 15H, Phth), 7.40(m, $J = 7.1$ Hz, 1H Phth), 7.33-7.20(m, 9H, Ph), 7.14(m, $J = 5.3, 2.8$ Hz, 1H, Ph), 7.06-6.97(m, 3H, Ph), 6.98-6.88(m, 6H, Ph), 6.84(m, $J = 7.3$ Hz, 2H, Ph), 6.81-6.67(m, 4H, Ph), 5.69(dd, $J = 10.8, 9.1$ Hz, 1H, H-1E), 5.61(dd, $J = 10.8, 9.2$ Hz, 1H, H-1E'), 5.40(d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-1E), 5.22-5.14(m, 4H, H-4D, H-4E, H-1B, H-1E'), 5.14-5.05(m, 3H, H-4D', H-2C, H-4E'), 4.94(dd, $J = 10.2, 3.4$ Hz, 1H, H-3D'), 4.90-4.86(m, 2H, H-1D, H-1A), 4.83(dd, $J = 10.2, 3.2$ Hz, 1H, H-3D), 4.78(d, $J = 12.9$ Hz, 1H, CH₂Bn), 4.72(d, $J = 12.7$ Hz, 1H, CH₂Bn), 4.68-4.60(m, 2H, CH₂Bn), 4.53(s, 1H, H-1C), 4.52-4.36(m, 7H, 5xCH₂Bn, H-2E, H-1D'), 4.36-4.25(m, 4H, H-2E', H-6aE CH₂Bn 异头物, H-4D), 4.23-4.14(m, 3H, H-3B, H-4A, H-6aE'), 4.14-4.00(m, 6H, H-2A, H-2B, H-2D', H-3A, H-4B, H-6bE), 3.90-3.83(m, 2H, H-5E, H-6aD), 3.84-3.70(m, 7H, H-6bE', H-4C, H-5D, H-6bD, H-6aD', H-6bD', H-6aC), 3.67(d, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-5D), 3.62-3.45(m, 3H, H-6aB, H-6bB, H-6aA), 3.36-3.27(m, 4H, H-6BA, H-6BC, H-3C, H-5E'), 3.24(d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5A), 3.15(d, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-5B), 3.10(dt, $J = 8.4, 3.9$ Hz, 1H, H-5C), 2.13(s, 3H, CH₃Ac), 2.09(s, 3H, CH₃Ac), 2.02(3xs, 9H, 3xCH₃Ac), 2.01-1.97(m, 15H, 5xCH₃Ac), 1.93(s, 3H, CH₃Ac), 1.85(d, $J = 2.3$ Hz, 6H, CH₃Ac); ¹³C NMR(CDCl₃) δ : 171.0, 170.9, 170.8, 170.8,

170. 7, 170. 4, 170. 3, 170. 2, 169. 5, 169. 4, 168. 3, 167. 7, 167. 5, 138. 8, 138. 7, 138. 4, 138. 0, 137. 2, 134. 5, 134. 1, 133. 8, 133. 5, 131. 8, 131. 7, 131. 5, 131. 4, 128. 7, 128. 3, 128. 2, 128. 1, 128. 1, 128. 0, 127. 9, 127. 6, 127. 5, 127. 3, 126. 9, 123. 7, 123. 7, 123. 6, 123. 2, 99. 0 (C-1D), 98. 1 (C-1C), 97. 8 (C-1D'), 97. 2 (C-1E), 97. 2, 97. 1, 97. 0, (C-1A, C-1B, C-1E') / 8. 2, / 8. 1, 76. 7, 75. 8, 74. 5, 74. 4, 74. 4, 74. 3, 73. 3, 73. 2, 72. 8, 71. 8, 71. 7, 70. 7, 70. 6, 70. 5, 70. 4, 70. 0, 69. 3, 69. 1, 68. 9, 68. 5, 68. 1, 68. 1, 67. 3, 65. 7, 65. 4, 62. 5, 62. 4, 61. 8, 61. 6, 56. 5, 55. 7, 54. 5, 20. 9, 20. 9, 20. 8, 20. 7, 20. 7, 20. 5; HRMS (ESI) : m/z : 算得 $C_{135}H_{140}N_4O_{53}Na$: 2687. 8275 [M+Na]⁺, 实测 2687. 8379.

[0383] 苄基 [(2-氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-α-D-吡喃甘露糖基)-(1→6)]-[2-氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-α-D-吡喃甘露糖基-(1→3)]-β-D-吡喃甘露糖基-(1→4)-2-氨基-3,6-二-O-苄基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-2-氨基-3,6-二-O-苄基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖苷 (12)。

[0384] 向七糖 11 (32mg, 12 μmol) 的 MeOH : CH₂Cl₂ : 1 溶液中添加 NaOM (30 μL, 0. 5M, 1. 25 当量)。在室温下搅拌 1h 之后, 添加 MeOH (400 μL) 和乙二胺 (300 μL) 并且混合物在微波中于 120°C 下加热 3 个 30 分钟的循环。使用甲苯和乙醇将混合物浓缩至干燥。通过 Sephadex LH-2 柱对粗制残余物进行纯化 (MeOH : DCM 2 : 1) 以得到标题化合物 (17mg, 83%)。

[0385] ¹H NMR (500MHz, MeOD) δ 7. 52 (d, J = 7. 1Hz, 2H, Ph), 7. 46-7. 25 (m, 21, Ph), 7. 21 (dd, J = 4. 7, 2. 0Hz, 2H, Ph), 5. 22 (dd, J = 6. 8, 4. 8Hz, 2H, CH₂Bn, H-1Man), 5. 17 (d, J = 11. 5Hz, 1H, CH₂Bn), 4. 98 (d, J = 1. 9Hz, 1H, H-1Man), 4. 70-4. 56 (m, 5H, 4CH₂Bn, H-1Man), 4. 50 (s, 2H, CH₂Bn), 4. 47 (d, J = 8. 2Hz, 1H, H-1GlcN), 4. 43 (d, J = 7. 8Hz, 1H, H-1GlcN), 4. 39 (d, J = 7. 9Hz, 1H, H-1GlcN), 4. 30 (d, J = 8. 1Hz, 1H, H-1GlcN), 4. 25-4. 12 (m, 3H), 4. 08 (t, J = 9. 2Hz, 1H, H-4GlcN), 4. 02-3. 96 (m, 1H, H-6Glc), 3. 96-3. 76 (m, 12H), 3. 76-3. 61 (m, 10H), 3. 58 (m, 2H), 3. 52 (m, 1H), 3. 48-3. 42 (m, 1H), 3. 41-3. 32 (m, 5H), 3. 31-3. 19 (m, 4H), 2. 83 (td, J = 10. 7, 8. 1Hz, 2H, H-2GlcN), 2. 77 (d, J = 8. 4Hz, 1H, H-2, GlcN), 2. 67 (dd, J = 9. 7, 8. 0Hz, 1H, H-2GlcN); HSQC 实验的 ¹³C NMR (126MHz, MeOD) δ 128. 48, 127. 90, 127. 93, 127. 38, 127. 89, 100. 48, 74. 34, 74. 41, 97. 67, 70. 66, 74. 24, 72. 70, 99. 85, 70. 73, 74. 33, 72. 71, 72. 90, 101. 50, 101. 71, 101. 96, 101. 48, 77. 11, 74. 70, 70. 40, 76. 35, 77. 63, 70. 20, 66. 17, 61. 22, 73. 63, 70. 36, 66. 15, 68. 17, 61. 02, 68. 29, 66. 25, 60. 84, 67. 52, 72. 89, 68. 48, 75. 01, 82. 05, 82. 63, 82. 33, 76. 99, 70. 04, 75. 54, 75. 27, 76. 85, 56. 82, 56. 18, 56. 16, 56. 22.

[0386] 苄基 [(2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-α-D-吡喃甘露糖基)-(1→6)]-[2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-α-D-吡喃甘露糖基-(1→3)]-β-D-吡喃甘露糖基-(1→4)-2-乙酰氨基-3,6-二-O-苄基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-2-乙酰氨基-3,6-二-O-苄基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖苷 (¹³C₈) 13 (¹³C₈-G0 (Bn₅))。

[0387] 在 0°C 下, 向七糖 12 (100mg, 62. 5 μmol) 的无水 MeOH (2mL) 溶液中添加乙酸酐 ¹³C₄ (42 μL, 444 μmol) 和 NaOMe 0. 5M (0. 8mL)。在 0°C 下 2h 之后, 浓缩混合物并且通过 HPLC Sepadex LH-20 (MeOH) 纯化以得到标题化合物 (80mg, 72%)。

[0388] ^1H NMR (500MHz, MeOD) δ 7.40-7.21 (m, 22H, arom), 7.21-7.14 (m, 3H, arom), 5.07 (d, $J = 1.9\text{Hz}$, 1H, H-1D), 4.99 (dd, $J = 16.3, 12.0\text{Hz}$, 2H, 2CH₂Bn), 4.82 (d, $J = 12.5\text{Hz}$, 1H, CH₂Bn), 4.79 (d, $J = 1.8\text{Hz}$, 1H, H-1D'), 4.75 (d, $J = 12.1\text{Hz}$, 1H, CH₂Bn), 4.70-4.66 (m, 2H, H-1C, H-1B), 4.66-4.54 (m, 4H, CH₂Bn), 4.46 (dd, $J = 13.9, 8.2\text{Hz}$, 4H, H-1A, H-1E, 2CH₂Bn), 4.31 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 1H, H-1E), 4.11 (d, $J = 3.1\text{Hz}$, 1H, H-2C), 4.08 (dd, $J = 3.4, 1.8\text{Hz}$, 1H, H-2D), 3.99 (t, $J = 8.5\text{Hz}$, 2H, H-4A, H-4B), 3.96-3.86 (m, 3H, H-2A, H-6Ca, H-6Da), 3.86-3.75 (m, 9H, H-6Ea, H-2B, H-4C, H-6Aa, H-6Ab, H-3D, H-3D', H-2D', H-5D), 3.75-3.53 (m, 14H, H-6E' a, H-6E' b, H-6Eb, H-6D' a, H-6Ba, H-3B, H-2E', H-2E, H-6Db, H-6D' b, H-6Cb, H-6Bb, H-5D', H-3A), 3.53-3.41 (m, 6H, H-4D', H-4D, H-5A, H-3E, H-3E', H-3C), 3.37-3.24 (m, 4H, H-4E', H-4E, H-5B, H-5E), 3.20-3.13 (m, 2H, H-3E', H-5C), 2.11 (t, $J = 5.7\text{Hz}$, 3H, Ac), 1.95 (dd, $J = 18.2, 6.1\text{Hz}$, 3H, Ac), 1.88-1.83 (m, 3H, Ac), 1.70 (dd, $J = 18.1, 5.9\text{Hz}$, 3H, Ac); HSQC 实验的 ^{13}C NMR (126MHz, MeOD): 127.9, 127.8, 127.7, 127.4, 100.5 (C-1E'), 100.1 (C-1A, C-1B, C-1C, C-1E), 99.6 (C-1D), 97.2 (C-1D'), 81.5, 80.8, 80.4, 77.6, 77.1, 76.6, 76.1, 75.9, 74.9, 74.9, 74.0, 73.9, 73.8, 73.5, 73.1, 73.0, 72.9, 70.5, 70.3, 70.3, 70.2, 70.2, 68.5, 68.4, 67.8, 65.8, 61.9, 61.7, 61.5, 61.0, 55.8, 55.8, 54.5, 22.1, 22.1, 21.6.

[0389] [(2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 2)- α -D-吡喃甘露糖基)-(1 \rightarrow 6)]-[2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 2)- α -D-吡喃甘露糖基-(1 \rightarrow 3)]- β -D-吡喃甘露糖基-(1 \rightarrow 4)-2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4)-2-乙酰氨基-2-脱氧- α, β -D-吡喃葡萄糖 ($^{13}\text{C}_8$) (14) ($^{13}\text{C}_8$ -G0 (Bn₅)).

[0390] 将七糖 13 (13mg, 7.3 μmol) 溶解在 1mL 的 MeOH 中并通过使用 10% Pd/C 盒 (cartridge) 和 MeOH 作为溶剂以及流量为 1mL/min, 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下使用完全氢气条件的氢化器。浓缩所得的混合物, 再次溶解在水中并在石墨盒上纯化以得到标题化合物 (7mg, 72%)。

[0391] ^1H NMR (500MHz, D₂O) δ 5.20 (d, $J = 2.5\text{Hz}$, 0.6H, H-1A _{α} G1cNAc), 5.13 (d, $J = 1.8\text{Hz}$, 1H, H-1D _{α} 1,3 Man), 4.93 (d, $J = 1.8\text{Hz}$, 1H, H-1D' _{α} 1,6 Man), 4.71 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 0.4H, H-1A _{β} G1cNAc), 4.62 (dd, $J = 7.8, 4.4\text{Hz}$, 1H, H-1B _{β} G1cNAc), 4.57 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H, H-1E _{β} G1cNAc, H-1E' _{β} G1cNAc), 4.26 (d, $J = 2.5\text{Hz}$, 1H, H-2C), 4.20 (dd, $J = 3.4, 1.6\text{Hz}$, 1H, H-2D), 4.12 (dd, $J = 3.4, 1.7\text{Hz}$, 1H, H-2D'), 4.04-3.85 (m, 10H), 3.85-3.39 (m, 30H), 2.25-2.13 (m, 6H, 2Ac), 1.98-1.88 (m, 6H, 2Ac). ^{13}C NMR (126MHz, D₂O) δ 101.4 (C-1B _{β} G1cNAc), 100.4 (C-1C _{β} 1,4 Man), 99.6 (C-1D _{α} 1,3 Man, C-1E _{β} G1cNAc, C-1E' _{β} G1cNAc), 97.0 (C-1D' _{α} 1,6 Man), 94.8 (C-1A _{β} G1cNAc), 90.4 (C-1A _{α} G1cNAc), 80.4, 79.6, 79.5, 79.2, 76.4, 76.3, 75.8, 75.8, 74.6, 74.4, 74.3, 73.5, 73.4, 73.3, 72.8, 72.5, 72.0, 70.2, 70.0, 69.9, 69.6, 69.4, 69.4, 69.2, 67.3, 67.3, 65.8, 65.7, 61.7, 61.6, 60.6, 60.1, 60.0, 59.9, 56.1, 55.3, 54.9, 53.6; HRMS (ESI) : m/z 算得 C₄₂H₈₄N₄O₃₆Na : 1347.5031 [M+Na]⁺, 实测 1347.5131.

[0392] 合成三触角复杂 N-聚糖核心

[0393] 以下合成关于图 4 中所示的相应化学结构编号。

[0394] 苄基 [二-(0-3,4,6-三-0-乙酰基-2-脱氧-2-苯二甲酰亚胺基- β -D-吡喃葡萄糖基)-(1 \rightarrow 2)-(1 \rightarrow 4)-3,6-二-0-乙酰基- α -D-吡喃甘露糖基]-(1 \rightarrow 3)-2-0-乙酰基-4,6-0-苯亚甲基- β -D-吡喃甘露糖基-(1 \rightarrow 4)-3,6-二-0-苄基-2-脱氧-2-苯

二甲酰亚胺基- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4)-3,6-二-O-苄基-2-脱氧-2-苯二甲酰亚胺基- β -D-吡喃葡萄糖苷(18)。

[0395] 将受体7(0.18g, 0.13mmol)和供体17(0.21g, 0.16mmol, 1.2当量)的无水DCM(2mL)溶液与分子筛在室温下搅拌1h。添加TMSOTf(2 μ L, 13 μ mol, 10%)并在室温下将反应搅拌1h。反应通过添加Et₃N(25 μ L)来淬灭,经硅藻土塞过滤并浓缩滤液。通过快速柱色谱(己烷:EtOAc 2:3)对粗制残余物进行纯化以得到标题化合物(0.27g, 82%)。

[0396] $[\alpha]_D^{20}$: -24.0(c 1.05, CH₃Cl). ¹H NMR(500MHz, CDCl₃): 7.90-7.65(m, 17H, H-arom), 7.54(m, 2H, H-arom), 7.42-7.26(m, 13H, H-arom), 7.06-6.96(m, 11H, H-arom), 6.79(m, 3H, H-arom), 5.76(dd, J = 9.0, 10.7Hz, 1H, H-3E'), 5.44(m, 3H, H-1E', H-3E, CHPh), 5.27(d, J = 7.8Hz, 1H, H-1A), 5.18(m, 2H, H-2C, H-4E'), 4.96(d, J = 8.5Hz, 1H, H-1B), 4.83(m, 6H, H-4E, 2xCH₂Bn, H-3D, H-1D, H-1E), 4.71, 4.65(d, J = 12.0Hz, 1H, CH₂Bn), 4.52(m, 4H, H-1C, 3xCH₂Bn), 4.39(m, 3H, 3xCH₂Bn), 4.29-4.07(m, 13H, H-2E', 2xH-6E', H-2A, H-2B, H-3A, H-3B, H-4A, H-4B, H-6Ca, H-5E', H-2E, H-6Da), 3.98(m, 3H, H-5D, H-6Ea, H-2D), 3.82(t, J = 10.3Hz, 1H, H-4D), 3.73(t, J = 8.5Hz, 1H, H-4C), 3.75-3.39(m, 8H, 2xH-6A, H-6Eb, 2xH-6B, H-3C, H-6Cb, H-6Db), 3.32(m, 1H, H-5B), 3.19(m, 1H, H-5A), 2.99(m, 1H, H-5C), 2.26, 2.12(s, 3H, CH₃Ac), 2.08(m, 1H, H-5E), 2.04, 2.03, 2.02, 1.84, 1.83, 1.72, 1.54(s, 3H, CH₃Ac). ¹³C NMR(126MHz, CDCl₃): 170.8, 170.5, 170.4, 170.2, 170.1, 170.0, 169.5, 169.2, 167.3, 138.7, 138.6, 138.4, 137.8, 137.3, 137.2, 134.3, 134.0, 133.5, 131.7, 131.4, 128.9, 128.7, 128.5, 128.2, 128.1, 127.0, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4, 127.2, 126.9, 126.8, 123.8, 123.4, 102.3, 98.1(C-1C), 97.6(C-1D), 97.1(C-1A, C-1B), 95.8(C-1E), 94.8(C-1E'), 78.8, 77.8, 76.6, 75.9, 75.1, 74.5, 74.3, 74.2, 73.3, 72.8, 72.7, 71.8, 71.0, 70.8, 70.5, 70.4, 68.6, 68.5, 68.4, 68.1, 67.4, 66.0, 63.6, 61.6, 61.1, 56.5, 55.7, 54.8, 54.0, 20.9, 20.7, 20.6, 20.4, 20.2.

[0397] 苄基[二-(0-3,4,6-三-O-乙酰基-2-脱氧-2-苯二甲酰亚胺基- β -D-吡喃葡萄糖基)-(1 \rightarrow 2)-(1 \rightarrow 4)-3,6-二-O-乙酰基- α -D-吡喃甘露糖基]-(1 \rightarrow 3)-2-O-乙酰基- β -D-吡喃甘露糖基-(1 \rightarrow 4)-3,6-二-O-苄基-2-脱氧-2-苯二甲酰亚胺基- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4)-3,6-二-O-苄基-2-脱氧-2-苯二甲酰亚胺基- β -D-吡喃葡萄糖苷(19)。

[0398] 在0 $^{\circ}$ C下,向己糖18(0.14g, 0.05mmol)的DCM(2mL)溶液中添加EtSH(31 μ L, 0.25mmol, 5当量)和BF₃·OEt₂(2 μ L, 10 μ mol, 20%)。反应混合物在室温下搅拌直到完全转化(2小时)。然后,其用Et₃N淬灭,浓缩并通过快速柱色谱(己烷:EtOAc 1:3)纯化,获得标题化合物(0.12g, 88%)。

[0399] $[\alpha]_D^{20}$: +1.9(c 0.93, CDCl₃). ¹H NMR(500MHz, CDCl₃): 7.90-7.66(m, 15H, H-arom), 7.32-7.24(m, 12H, H-arom), 7.17(m, 1H, H-arom), 7.02-6.98(m, 10H, H-arom), 6.76(m, 3H, H-arom), 5.78(dd, J = 9.1, 10.7Hz, 1H, H-3E), 5.73(m, dd, J = 9.1, 10.8Hz, 1H, H-3E'), 5.48(d, J = 7.8Hz, 1H, H-1E'), 5.27(m, 2H, H-1E, H-1A), 5.22(t, J = 9.8Hz, 1H, H-4E'), 5.15(d, J = 3.4Hz, 1H, H-2C), 5.10(t, J = 9.7Hz, 1H, H-4E), 5.05(dd, J = 3.0, 8.5Hz, 1H, H-3D), 4.96(d, 1H, J = 8.2Hz, H-1B), 4.86(m, 3H, CH₂Bn, H-1D), 4.70(d, J = 12.0Hz, 1H, 1xCH₂Bn), 4.58(d, J = 12.0Hz, 1H, 1xCH₂Bn), 4.52(m, 4H, H-1C, 3xCH₂Bn), 4.45(m, 1H,

H-6E' a), 4.39 (m, 3H, 3xCH₂Bn), 4.34-4.04 (m, 15H, H-2E, H-2E', 2xH-6E, H-6E' b, H-2A, H-2B, H-3A, H-3B, H-4A, H-4B, H-2D, H-5E', H-6Da, H-4D), 3.82 (m, 1H, H-5E), 3.78 (m, 1H, H-5D), 3.69 (m, 2H, H-4C, H-6Ca), 3.62-3.48 (m, 5H, H-6Aa, H-6Ba, H-6Cb, H-6Ab, H-6Db), 3.44 (dd, J = 3.9, 11.3 Hz, 1H, H-6Bb), 3.31 (m, 2H, H-5B, H-3C), 3.20 (m, 1H, H-5A), 2.94 (m, 1H, H-5C), 2.19, 2.15, 2.11, 2.07, 2.04, 2.02, 1.88, 1.85 (s, 3H, CH₃Ac). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): 170.7, 170.2, 170.1, 170.0, 169.5, 167.6, 138.6, 138.5, 138.3, 137.8, 137.2, 134.4, 134.3, 131.6, 131.3, 128.6, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.5, 127.4, 127.3, 127.2, 126.8, 123.7, 123.1, 98.1 (C-1D), 97.4 (C_{1E}, C-1C), 97.1 (C-1A, C-1B), 95.9 (C-1E'), 77.2, 76.5, 75.9, 75.3, 75.2, 74.5, 74.4, 74.3, 73.1, 72.8, 71.8, 71.3, 70.7, 70.5, 70.4, 68.9, 68.8, 68.5, 68.3, 68.1, 67.1, 62.7, 62.0, 61.1, 56.5, 55.7, 54.8, 54.4, 20.8, 20.7, 20.6, 20.4.

[0400] 苄基 [二-(0-3,4,6-三-O-乙酰基-2-脱氧-2-苯二甲酰亚胺基-β-D-吡喃葡萄糖基)-(1→2)-(1→4)-3,6-二-O-乙酰基-α-D-吡喃甘露糖基]-(1→3)-[0-3,4,6-三-O-乙酰基-2-脱氧-2-苯二甲酰亚胺基-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-3,4,6-三-O-乙酰基-α-D-吡喃甘露糖基]-(1→6)-2-O-乙酰基-β-D-吡喃甘露糖基-(1→4)-3,6-二-O-苄基-2-脱氧-2-苯二甲酰亚胺基-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-3,6-二-O-苄基-2-脱氧-2-苯二甲酰亚胺基-β-D-吡喃葡萄糖基 (20)。

[0401] 将受体 19 (75 mg, 0.03 mmol)、供体 11 (41 mg, 0.05 mmol, 1.5 当量, 根据 Unverzagt, C.; Eller, S.; Mezzato, S.; Schubert, R. Chem. Eur. J. 2007, 14, 1304-1311 合成) 与分子筛的无水 DCM 混悬液 (9.8 mL) 在室温下搅拌 1 h。使混合物冷却至 -40 °C 并添加 TfOH (1 μL, 0.01 μmol, 33%)。在 -40 °C 下搅拌反应混合物直到供体消失 (1 h)。然后, 反应应用 Et₃N 淬灭, 经硅藻土塞过滤并浓缩, 通过快速柱色谱对残余物进行纯化, 获得标题化合物 (60 mg, 62%)。

[0402] [α]_D²⁰: +2.1 (c 0.53, CH₃Cl). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 7.88-7.61 (m, 19H, H-arom), 7.30-7.23 (m, 11H, H-arom), 7.18, 7.04 (m, 1H, H-arom), 7.01-6.93 (m, 7H, H-arom), 6.85, 6.75 (m, 3H, H-arom), 5.79 (dd, J = 9.0, 10.7 Hz, 1H, H-3E'), 5.70 (m, 2H, H-3E, H-3E''), 5.45 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-1E'), 5.33 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-1E), 5.24-5.09 (m, 7H, H-1E'', H-1A, H-4E', H-4D', H-2C, H-4E, H-4E''), 4.98 (m, 2H, H-3D, H-3D'), 4.94 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-1B), 4.83 (d, J = 12.0 Hz, 1H, 1xCH₂Bn), 4.78 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-1D), 4.71 (m, 2H, 2xCH₂Bn), 4.59 (d, J = 12.0 Hz, 1H, 1xCH₂Bn), 4.51-3.98 (m, 27H, H-1C, 6xCH₂Bn, 2xH-6E', H-1D', H-2E'', H-2E, 2xH-6E, H-2E', H-6E'' a, H-2D, H-2D', H-2B, H-3B, H-4B, H-2A, H-3A, H-4A, H-5E', H-6Da, H-4D), 3.87 (m, 2H, H-6E'' b, H-5E), 3.81-3.69 (m, 6H, H-5D, H-6D' a, H-4C, H-6Ca, H-6Db, H-5D'), 3.59-3.45 (m, 5H, 2xH-6Aa, H-6Ba, H-6D' b, H-5E''), 3.39 (dd, J = 4.0, 11.5 Hz, 1H, H-6Bb), 3.33 (dd, J = 5.0, 10.3 Hz, 1H, H-6Cb), 3.26 (m, 2H, H-5B, H-3C), 3.17 (m, 1H, H-5A), 3.01 (m, 1H, H-5C), 2.15, 2.09, 2.09, 2.05, 2.04, 2.01, 2.01, 2.00, 1.95, 1.89, 1.88, 1.87, 1.85, 1.85 (s, 3H, CH₃Ac). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): 170.8, 170.7, 170.6, 170.5, 170.3, 170.2, 170.1, 170.0, 169.9, 169.4, 169.3, 169.2, 167.6, 167.4, 138.8, 138.6, 138.3, 138.0, 137.2, 134.3, 133.4, 131.7, 131.3, 128.5, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7,

127.4, 127.2, 126.8, 123.7, 123.5, 123.0, 98.6 (C-1D), 97.7 (C-1C, C-1D'), 97.3 (C-1E), 97.2 (C-1E''), 97.1 (C-1A, C-1B), 93.9 (C-1E'), 77.7, 76.5, 75.8, 75.0, 74.5, 74.3, 73.0, 72.8, 72.4, 71.7, 71.2, 70.7, 70.6, 70.4, 70.2, 70.0, 69.6, 69.0, 68.9, 68.8, 68.6, 68.3, 68.1, 65.5, 62.7, 62.4, 61.9, 61.7, 61.5, 61.2, 56.5, 55.7, 54.9, 54.4, 20.7, 20.6, 20.5, 20.4, 20.3.

[0403] [(2-乙酰氨基-β-D-吡喃葡萄糖基)-(1→2)-α-D-吡喃甘露糖基)-(1→6)-[二-(2-乙酰氨基-β-D-吡喃葡萄糖基)-(1→2)-(1→4)-α-D-吡喃甘露糖基)-(1→3)-β-D-吡喃甘露糖基-(1→4)-2-乙酰氨基-3,6-二-O-苄基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-2-乙酰氨基-1,3,6-三-O-苄基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖苷 (¹³C₁₀) (22)].

[0404] 向化合物 20 (43mg, 14.1 μmol) 的 MeOH : DCM 2 : 1 (300 : 150 μL) 溶液中添加 NaOMe (42 μL, 21.2 μL, 1.5 当量)。在室温下搅拌 1h 之后, 添加 MeOH (300 μL) 和乙二胺 (300 μL) 并在微波中 120°C 下将混合物加热 3 个 30 分钟的循环。使用甲苯和乙醇将混合物浓缩至干燥。通过 Sephadex LH-20 柱 (MeOH) 对粗制残余物进行纯化以得到化合物 21。在 0°C 下, 化合物 21 溶解在 MeOH (200 μL) 并添加乙酸酐 ¹³C₄。2h 之后, 添加 EtOH 并浓缩混合物并且通过 Sephadex LH-20 柱 (MeOH) 纯化以得到标题化合物 (11mg, 40%, 2 个步骤)。

[0405] [α]²⁰_D: +2.1 (c 0.53, CH₃Cl). ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): 7.88-7.61 (m, 19H, H-arom), 7.30-7.23 (m, 11H, H-arom), 7.18, 7.04 (m, 1H, H-arom), 7.01-6.93 (m, 7H, H-arom), 6.85, 6.75 (m, 3H, H-arom), 5.79 (dd, J = 9.0, 10.7Hz, 1H, H-3E'), 5.70 (m, 2H, H-3E, H-3E''), 5.45 (d, J = 8.2Hz, 1H, H-1E'), 5.33 (d, J = 8.4Hz, 1H, H-1E), 5.24-5.09 (m, 7H, H-1E'', H-1A, H-4E', H-4D', H-2C, H-4E, H-4E''), 4.98 (m, 2H, H-3D, H-3D'), 4.94 (d, J = 8.5Hz, 1H, H-1B), 4.83 (d, J = 12.0Hz, 1H, 1xCH₂Bn), 4.78 (d, J = 1.8Hz, 1H, H-1D), 4.71 (m, 2H, 2xCH₂Bn), 4.59 (d, J = 12.0Hz, 1H, 1xCH₂Bn), 4.51-3.98 (m, 27H, H-1C, 6xCH₂Bn, 2xH-6E', H-1D', H-2E'', H-2E, 2xH-6E, H-2E', H-6E'' a, H-2D, H-2D', H-2B, H-3B, H-4B, H-2A, H-3A, H-4A, H-5E', H-6Da, H-4D), 3.87 (m, 2H, H-6E'' b, H-5E), 3.81-3.69 (m, 6H, H-5D, H-6D' a, H-4C, H-6Ca, H6Db, H5D'), 3.59-3.45 (m, 5H, 2xH-6Aa, H-6Ba, H-6D' b, H-5E''), 3.39 (dd, J = 4.0, 11.5Hz, 1H, H-6Bb), 3.33 (dd, J = 5.0, 10.3Hz, 1H, H-6Cb), 3.26 (m, 2H, H-5B, H-3C), 3.17 (m, 1H, H-5A), 3.01 (m, 1H, H-5C), 2.15, 2.09, 2.09, 2.05, 2.04, 2.01, 2.01, 2.00, 1.95, 1.89, 1.88, 1.87, 1.85, 1.85 (s, 3H, CH₃Ac). ¹³C NMR (126MHz, CDCl₃): 170.8, 170.7, 170.6, 170.5, 170.3, 170.2, 170.1, 170.0, 169.9, 169.4, 169.3, 169.2, 167.6, 167.4, 138.8, 138.6, 138.3, 138.0, 137.2, 134.3, 133.4, 131.7, 131.3, 128.5, 128.2, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.7, 127.4, 127.2, 126.8, 123.7, 123.5, 123.0, 98.6 (C-1D), 97.7 (C-1C, C-1D'), 97.3 (C-1E), 97.2 (C-1E''), 97.1 (C-1A, C-1B), 99.9 (C-1E'), 77.7, 76.5, 75.8, 75.0, 74.5, 74.3, 73.0, 72.8, 72.4, 71.7, 71.2, 70.7, 70.6, 70.4, 70.2, 70.0, 69.6, 69.0, 68.9, 68.8, 68.6, 68.3, 68.1, 65.5, 62.7, 62.4, 61.9, 61.7, 61.5, 61.2, 56.5, 55.7, 54.9, 54.4, 20.7, 20.6, 20.5, 20.4, 20.3.

[0406] 酶促延伸

[0407] [β-D-吡喃半乳糖苷-(1→4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖

基-(1 → 2)- α -D-吡喃甘露糖基)-(1 → 6)]-[β -D-吡喃半乳糖基-(1 → 4)-2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 → 2)- α -D-吡喃甘露糖基-(1 → 3)]- β -D-吡喃甘露糖基-(1 → 4)-2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 → 4)-2-乙酰氨基-2-脱氧- α , β -D-吡喃葡萄糖 (15)。

[0408] 将 14(2.126mg, 1.6 μ mol)、尿苷 5'-二磷酸- α -D-半乳糖二钠盐 UDP-Gal(2.280mg, 3.74 μ mol, 2.4 当量)、牛血清白蛋白 BSA(1mg)、200mU 的牛乳 β -1, 4-半乳糖基转移酶 2.4.4.22、9.2U 的碱性磷酸酶 3.1.3.1. 和 MnCl_2 (10mM) 的 770 μ L Hepes 缓冲液 (50mM, pH = 7.4) 溶液 (1mL) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 18h。所得的混合物在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 5 分钟以沉淀出酶。离心之后, 上清液通过石墨盒纯化以得到标题化合物 (2.09, 78%)。

[0409] ^1H NMR(500MHz, D_2O) δ 5.12(d, J = 2.7Hz, 0.6H, H-1_{α} GlcNAc), 5.05(d, J = 1.4Hz, 1H, H-1_{α} 1,3 Man), 4.86(d, J = 1.6Hz, 1H, H-1_{α} 1,6 Man), 4.66-4.59(m, 0.4H, H-1_{β} GlcNAc), 4.53(dd, J = 15.9, 7.9Hz, 3H, H-1_{β} GlcNAc), 4.40(dd, J = 7.8, 3.1Hz, 2H, H-1_{β} Gal), 4.18(d, J = 2.7Hz, 1H), 4.12(dd, J = 3.3, 1.6Hz, 1H), 4.08-4.00(m, 1H), 3.95-3.36(m, 60H), 2.17-2.04(m, 6H, Ac), 1.93-1.78(m, 6H, Ac). ^{13}C NMR 从 HSQC 实验选择的峰 (126MHz, D_2O) δ = 102.9(C-1_{β} Gal), 101.3(H-1_{β} GlcNAc), 100.4(C-1_3 Man), 99.6(C-1_{α} 1,3 Man), 99.5(C-1_{β} GlcNAc), 97.1(C-1_{α} 1,6 Man), 94.8(C-1_{β} GlcNAc), 90.4(C-1_{α} GlcNAc)。

[0410] [(2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 → 2)- α -D-吡喃甘露糖基)-(1 → 6)]-[2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 → 2)- α -D-吡喃甘露糖基-(1 → 3)]- β -D-吡喃甘露糖基-(1 → 4)-2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 → 4)-[α -L-吡喃岩藻糖基-(1 → 6)]-2-乙酰氨基-2-脱氧- α , β -D-吡喃葡萄糖 (16)。

[0411] 将 14(3.030mg, 2.28 μ mol)、鸟苷 5'-二磷酸- β -L-岩藻糖二钠盐 GDP-Fuc(1.760mg, 2.77 μ mol, 1.2 当量)、牛血清白蛋白 BSA(1mg)、核心 α -1,6-岩藻糖基转移酶 (50 μ L, 0.66mg/mL) 和 MnCl_2 (20mM) 的 770 μ L MES 缓冲液 (80mM, pH = 6.5) 溶液 (1mL) 在室温下孵育 18h。使所得的混合物在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 5 分钟以沉淀出酶。在离心之后, 上清液通过石墨盒纯化以得到标题化合物 (2.73mg, 82%)。

[0412] ^1H NMR(500MHz, D_2O) δ 5.11(d, J = 3.2Hz, 0.6H, H-1_{α} GlcNAc), 5.04(d, J = 1.8Hz, 1H, H-1_{α} 1,3 Man), 4.88-4.79(m, 2H, H-1_{α} 1,6 Man, H-1_{α} Fuc), 4.64-4.55(m, 0.4H+1H, H-1_{β} GlcNAc), 4.48(d, J = 8.4Hz, 2H, H-1_{β} GlcNAc), 4.18(d, J = 2.4Hz, 1H), 4.11(dd, J = 3.3, 1.6Hz, 1H), 4.09-3.98(m, 2H), 3.98-3.75(m, 11H), 3.75-3.31(m, 33H), 2.25-2.04(m, 6H, Ac), 1.95-1.78(m, 6H, Ac), 1.14(dd, J = 6.6, 4.8Hz, 3H, CH_3Fuc). ^{13}C NMR 从 HSQC 实验选择的峰 (126MHz, D_2O) δ = 101.0(C-1_3 GlcNAc), 100.3(C-1_{β} Man), 99.6(C-1_{β} GlcNAc), 99.5(C-1_{α} 1,3 Man), 99.5(C-1_{α} Fuc), 97.0(C-1_{α} 1,6 Man), 94.8(C-1_{β} GlcNAc), 90.4(C-1_{α} GlcNAc), 15.4(CH_3Fuc)。

[0413] [β -D-吡喃半乳糖基-(1 → 4)-2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 → 2)- α -D-吡喃甘露糖基)-(1 → 6)]-[β -D-吡喃半乳糖基-(1 → 4)-2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 → 2)- α -D-吡喃甘露糖基-(1 → 3)]- β -D-吡喃甘露糖基-(1 → 4)-2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 → 4)-[α -L-吡喃岩藻糖基-(1 → 6)]-2-乙酰氨基-2-脱氧- α , β -D-吡喃葡萄糖 (17)。

[0414] 将 16(1.836mg, 1.6 μ mol)、尿苷 5'-二磷酸- α -D-半乳糖二钠盐

UDP-Gal (2.210mg, 3.62 μ mol, 2.9 当量)、牛血清白蛋白 BSA(1mg)、200mU 的牛乳 β -1,4-半乳糖基转移酶 2.4.4.22、9.2U 的碱性磷酸酶 3.1.3.1 和 $MnCl_2$ (10mM) 在 450 μ L Hepes 缓冲液 (50mM, pH = 7.4) 中的溶液 (0.5mL) 在 37°C 下孵育 18h。使所得的混合物在 95°C 下加热 5 分钟以沉淀出酶。在离心之后, 上清液通过石墨盒纯化以得到标题化合物 (1.80mg, 80%)。

[0415] 1H NMR (500MHz, D_2O) δ 5.11 (d, $J = 3.1$ Hz, 0.6H, $H-1_{\alpha}$ GlcNAc), 5.05 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, $H-1_{\alpha}$ 1,3 Man), 4.85 (s, 1H, $H-1_{\alpha}$ 1,6 Man), 4.82 (t, $J = 3.7$ Hz, 1H, $H-1_{\alpha}$ Fuc), 4.62 (d, $J = 7.9$ Hz, 0.4H, $H-1_{\beta}$ GlcNAc), 4.59 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, $H-1_{\beta}$ GlcNAc), 4.51 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, $H-1_{\beta}$ GlcNAc), 4.40 (dd, $J = 7.8, 2.7$ Hz, 2H, $H-1_{\beta}$ Gal), 4.18 (s, 1H), 4.12 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 4.08-4.00 (m, 2H), 3.97-3.39 (m, 54H), 2.18-2.07 (m, 6H), 1.92-1.81 (m, 6H, Ac), 1.14 (dd, $J = 6.6, 5.0$ Hz, 3H, CH_3 Fuc). ^{13}C NMR 从 HSQC 实验选择的峰 (126MHz, D_2O) $\delta = 102.9$ ($H-1_{\beta}$ Gal), 101.0 ($H-1_{\beta}$ GlcNAc), 100.4 ($H-1_{\beta}$ Man), 99.5 ($H-1_{\beta}$ GlcNAc), 99.5 ($H-1_{\alpha}$ 1,3 Man), 99.3 ($H-1_{\alpha}$ Fuc), 96.8 ($H-1_{\alpha}$ 1,6 Man), 94.8 ($H-1_{\beta}$ GlcNAc), 90.4 ($C-1_{\alpha}$ GlcNAc), 15.5 (CH_3 , Fuc).

[0416] 制备不对称单半乳糖基化聚糖标准物

[0417] $^{13}C_8$ -G0 (Bn_5) 的半乳糖基化

[0418] 部分去保护的 $^{13}C_8$ -G0 (Bn_5) 标准物 13 (1.1mg) 用 pH 为 7.4 的 HEPES 缓冲液 50mM (包含 $MnCl_2$ 2mM 和 BSA) 中的 β -1,4-半乳糖基转移酶 (200mU) 和尿苷二磷酸半乳糖 (UDP-Gal, 1.25 当量) 处理。在 37°C 下反应 1h 之后, 蛋白质级分通过在 95°C 下加热 5 分钟来沉淀并通过过滤除去。该溶液通过 UPLC-MS 直接分析, 分别显示 23% 和 26% 转化成 $^{13}C_8$ -G1⁶ (Bn_5) 和 $^{13}C_8$ -G1³ (Bn_5)。可以将该反应放大以使用 10mg 的 $^{13}C_8$ -G0 (Bn_5) 作为接受体。

[0419] 反应粗品在蛋白质从 10mg $^{13}C_8$ -G0 (Bn_5) 的酶促延伸沉淀出之后被蒸发并且然后在反相水/ACN 中通过 HPLC 的 C18 半制备型柱对不同化合物进行纯化以产生纯形式的化合物 $^{13}C_8$ -G1³ (Bn_5) (2.4mg)、 $^{13}C_8$ -G1⁶ (Bn_5) (2.2mg) 和 $^{13}C_8$ -G2 (Bn_5) (2.0mg) (其中, G1³ 和 G1⁶ 表示各自单半乳糖基化化合物以及 G2 表示双半乳糖基化化合物)。

[0420] 在具有 10% Pd/C 盒的 H-Cube 流动反应器中, 使用 1 大气压的 H_2 气体, 两个异构体单半乳糖基化化合物经受 MeOH 中的氢解, 获得纯形式的 ^{13}C -标记的 N-聚糖 $^{13}C_8$ -G1³ (1.2mg) 和 $^{13}C_8$ -G1⁶ (1.1mg)。

[0421] $^{13}C_8$ -G1⁶ 的岩藻糖基化

[0422] 化合物 $^{13}C_8$ -G1⁶ (1.1mg) 用 pH 为 6.5 的 MES 缓冲液 50mM (包含 $MgCl_2$ 2mM) 中的核心 α -1,6-岩藻糖基转移酶和鸟苷二磷酸岩藻糖 (GDP-Fuc, 1.10 当量) 处理。在 30°C 下反应 18h 之后, 蛋白质级分通过在 95°C 下加热 5 分钟来沉淀并过滤掉。聚糖 $^{13}C_8$ -G1⁶F 用石墨化碳盒纯化。

[0423] $^{13}C_8$ -G0 (Bn_5) 的半乳糖基化

[0424] 部分去保护的 $^{13}C_8$ -G0 (Bn_5) 标准物 (20 μ g) 用 pH 为 7.4 的 HEPES 缓冲液 50mM (包含 $MnCl_2$ 2mM 和 BSA) 中的 β -1,4-半乳糖基转移酶 (200mU) 和尿苷二磷酸半乳糖 (UDP-Gal, 6.0 当量) 处理。在 37°C 反应 1h 之后, 蛋白质级分通过在 95°C 下加热 5 分钟来沉淀并过滤掉。该溶液通过 UPLC-MS 直接分析, 显示完全转化成 $^{13}C_8$ -G2 (Bn_5)。

[0425] 在 30°C 下, 双半乳糖基化化合物 $^{13}C_8$ -G2 (Bn_5) (20 μ g) 用 pH 4.5 磷酸盐缓冲液 / 柠檬酸盐缓冲液 50mM 中的来自米曲霉的 β -1,4-半乳糖苷酶 (15mU) 处理 18h 并且反应通过

添加 MeOH(20 μ L) 淬灭。该溶液通过 UPLC-MS 直接分析,显示 10%和 46%分别转化成单半乳糖基化化合物 $^{13}\text{C}_8\text{-G1}^6(\text{Bn}_5)$ 和 $^{13}\text{C}_8\text{-G1}^3(\text{Bn}_5)$ 。

[0426] 制备不对称 α -2,3- 甲硅烷基化聚糖标准物

[0427] $^{13}\text{C}_8\text{-G2}(\text{Bn}_5)$ 的甲硅烷基化

[0428] 在分析规模由先前制备的双半乳糖基化双触角 $^{13}\text{C}_8\text{-G2}(\text{Bn}_5)$ (10nmol) 进行反应。在 37 $^\circ\text{C}$ 下,该化合物用 pH 为 8.0 的 Tris.HCl 缓冲液 100mM(包含 20mM MgCl_2) 中的 10mU 的来自多杀巴斯德菌的 α -2,3- 唾液酸转移酶和单磷酸胞苷 N- 乙酰基神经氨酸 (CMP-NeuNAc, 4 当量) 处理 30 分钟。反应通过添加 MeOH(20 μ L) 淬灭。该溶液通过 UPLC-MS 直接分析,显示 46%转化成单唾液酸化化合物 $^{13}\text{C}_8\text{-G2A1}(\text{Bn}_5)$, 分离成两个异构体峰(这些为相应的 3- 单甲硅烷基化产物和 6- 单甲硅烷基化产物),并且 32%转化成双甲硅烷基化化合物 $^{13}\text{C}_8\text{-G2A2}(\text{Bn}_5)$ 。

[0429] 在制备型规模下由先前制备的双半乳糖基化双触角 $^{13}\text{C}_8\text{-G2}(\text{Bn}_5)$ 进行反应。将 $^{13}\text{C}_8\text{-G2Bn}_5$ (1.0mg, 0.48 μ mol)、胞苷 -5' - 单磷酸 -N- 乙酰基神经氨酸钠盐 CMP-NeuAc (0.72mg, 0.96 μ mol, 2 当量)、100mU 的来自多杀巴斯德菌的 α -2,3- 唾液酸转移酶 2.4.99.4 和 MgCl_2 (100mM) 在 500 μ L Tris.HCl 缓冲液 (1M, pH = 8) 中的溶液 (100 μ L) 在 37 $^\circ\text{C}$ 下孵育 30 分钟。向所得的混合物中添加 MeOH(500 μ L) 以沉淀出酶。离心之后,上清液在反相水/ACN 中通过 HPLC 的 C18 半制备型柱纯化以得到三种新的经同位素标记的聚糖标准物,两个 $^{13}\text{C}_8\text{-G2A1}(\text{Bn}_5)$ 化合物和 $^{13}\text{C}_8\text{-G2A2}(\text{Bn}_5)$ 。

[0430] 合成 $^{13}\text{C}_8\text{-G1A1}^3\text{Bn}_5$

[0431] 将 $^{13}\text{C}_8\text{-G1}^3(\text{Bn}_5)$ (1.0mg, 0.52 μ mol)、胞苷 -5' - 单磷酸 -N- 乙酰基神经氨酸钠盐 CMP-NeuAc (0.78mg, 1.04 μ mol, 2 当量)、100mU 的来自多杀巴斯德菌的 α -2,3- 唾液酸转移酶 2.4.99.4 和 MgCl_2 (100mM) 在 500 μ L Tris.HCl 缓冲液 (1M, pH = 8) 中的溶液 (100 μ L) 在 37 $^\circ\text{C}$ 下孵育 30 分钟。向所得的混合物中添加 MeOH(500 μ L) 以沉淀出酶。离心之后,上清液在反相水/ACN 中通过 HPLC 的 C18 半制备型柱纯化,获得化合物 $^{13}\text{C}_8\text{-G1A1}^3(\text{Bn}_5)$ (0.68mg, 59% 产率)。

[0432] 制备 α -2,6- 甲硅烷基化聚糖标准物

[0433] 以分析规模由先前制备的双半乳糖基化双触角 $^{13}\text{C}_8\text{-G2}(\text{Bn}_5)$ (5nmol) 进行反应。该化合物用 pH 6.1 的二甲胍酸盐缓冲液 50mM(包含 2mM MnCl_2) 中的 0.25mU 的人 α -2,6- 唾液酸转移酶和单磷酸胞苷 N- 乙酰基神经氨酸 (CMP-NeuNAc, 1 当量至 4 当量) 在 37 $^\circ\text{C}$ 下处理 2 至 4 小时。反应通过添加 MeOH(20 μ L) 淬灭。该溶液通过 UPLC-MS 直接分析并且结果列于表 3 中。

[0434] 制备截短的 N- 聚糖标准物

[0435] 在室温下, $^{13}\text{C}_8\text{-G0}(\text{Bn}_5)$ (3mg) 用 pH 为 4.5 乙酸铵缓冲液 50mM 中的 100mU 的来自 *Conavalia ensiformis* 的 N- 乙酰基氨基葡萄糖苷酶处理 6h。反应通过添加 MeOH(20 μ L) 淬灭。该溶液通过 UPLC-MS 直接分析,获得转化率分别为 20%、26%和 25%的 $^{13}\text{C}_6\text{-MGn}^3(\text{Bn}_5)$ 、 $^{13}\text{C}_6\text{-MGn}^6(\text{Bn}_5)$ 和 $^{13}\text{C}_4\text{-Man3}(\text{Bn}_5)$ 。在半制备型 HPLC 纯化之后,获得纯化合物 $^{13}\text{C}_6\text{-MGn}^3(\text{Bn}_5)$ (2.2mg)、 $^{13}\text{C}_6\text{-MGn}^6(\text{Bn}_5)$ (2.0mg) 和 $^{13}\text{C}_4\text{-Man3}(\text{Bn}_5)$ (1.7mg)。

[0436] 在具有 10% Pd/C 盒的 H-Cube 流动反应器中使用 1 大气压的 H_2 气体,在 MeOH 中三种分离的化合物经受氢解,获得纯形式的经 ^{13}C - 标记的 N- 聚糖 $^{13}\text{C}_6\text{-MGn}^3$ (1.2mg) 和

$^{13}\text{C}_6\text{-Mn}^6$ (1.1mg) 和 $^{13}\text{C}_4\text{-Man}3$ (0.7mg)。

[0437] $^{13}\text{C}_6\text{-Mn}^3$ 的岩藻糖基化

[0438] 化合物 $^{13}\text{C}_6\text{-Mn}^3$ (1.2mg) 用 pH 为 6.5 的包含 MgCl_2 2mM 的 MES 缓冲液 50mM 中的核心 α -1,6-岩藻糖基转移酶和鸟苷二磷酸岩藻糖 (GDP-Fuc, 1.10 当量) 处理。在 30°C 下反应 18h 之后, 蛋白质部分通过在 95°C 下加热 5 分钟来沉淀并过滤出。聚糖 $^{13}\text{C}_6\text{-Mn}^3\text{F}$ 用石墨化碳盒纯化。

[0439] 部分保护的三触角核心 22 的半乳糖基化

[0440] 将三触角 22 (120 μg , 0.06 μmol)、尿苷 5'-二磷酸 α -D-半乳糖二钠盐 UDP-Gal (55 μg , 0.09 μmol , 1.5 当量)、24mU 的牛乳 β -1,4-半乳糖基转移酶 2.4.4.22 和 MnCl_2 (10mM) 在 300 μL HEPES 缓冲液 (50mM, pH = 7.4) 中的溶液 (24 μL) 在 37°C 下孵育 1h。所得的混合物在 95°C 下加热 5 分钟以沉淀酶。离心之后, 上清液通过 UPLC-MS 直接分析。除了非半乳糖基化起始材料以外, 检测到所有七种可能的半乳糖基化产物 (三触角、所有三种双触角和所有三种单触角)。

[0441] 参考文献

[0442] 本文中引用的或与本申请一起提交的所有出版物、专利和专利申请 (包括作为信息公开声明的一部分而提交的参考文献) 通过引用整体并入本文。

[0443] J. A. Atwood III, L. Cheng, G. Alvarez-Manilla, N. L. Warren, W. S. York, R. Orlando, Journal of proteome research 2007, 7, 367-374. O. Blixt, N. Razi, Method in Enzymology 2006, 415, 137-153. J. C. Botelho, J. A. Atwood III, L. Cheng, G. Alvaez-Manilla, W. S. York, R. Orlando, International Journal of Mass Spectrometry 2008, 278, 137-142.

[0444] M. J. Bowman, J. Zaia, Analytical chemistry 2007, 79, 5777-5784.

[0445] M. J. Bowman, J. Zaia, Analytical chemistry 2010, 82, 3023-3031.

[0446] M. A. Breidenbach, K. K. Palaniappan, A. A. Pitcher, C. R. Bertozzi, Molecular&Cellular Proteomics 11.6, 2012.

[0447] A. M. Hitchcock, C. E. Costello, J. Zaia, Biochemistry 2006, 45, 2350-2361.

[0448] J. Hsu, S. J. Chang, A. H. Franz, American Society for Mass Spectrometry 2006, 17, 194-204.

[0449] P. Kang, Y. Mechref, Z. Kyselova, J. A. Goetz, M. V. Novotny, Analytical chemistry 2007, 79, 6064-6073.

[0450] R. Lawrence, S. K. Olson, R. E. Steele, L. Wang, R. Warrior, R. D. Cummings, J. D., Esko Journal of biological chemistry 2008, 283, 33674-33684.

[0451] G. Ridlova, J. C. Mortimer, S. L. Maslen, P. Dupree, e. Stephens, Rapid Communications in Mass Spectrometry 2008, 22, 2723-2730.

[0452] T. W. D. F. Rising, C. D. Heidecke, J. W. B. Moir, Z. Ling, A. J.

[0453] Fairbanks, Chemistry-A European Journal 2008, 14, 6444-6464.

[0454] N. Ruiz, S. S. Ferreira, D. Padro, N. -C. Reichardt, M. Martin-Lomas, Carbohydrate Research 2011, 246, 1581-1591.

[0455] S. Serna, J. Etxebarria, N. Ruiz, M. Martin-Lomas, N. -C. Reichardt, Chemistry-A

European Journal 2010,16,13163-13175.

[0456] B. Xia, C. L. Feasley, G. P. Sachdev, D. F. Smith, R. D. Cummings, Analytical biochemistry 2009,387,162-170.

[0457] J. Yuan, N. Hashii, N. Kawasaki, S. Itoh, T. Kawanishi, T. Hayakawa, journal of chromatography A 2005,1067,145-152.

[0458] H. Zhang, X. -J. Li, D. B. Martin, R. Aebersold, Nature biotechnology 2003,21, 660-6.

[0459] G. Zou, H. Ochiai, W. Huang, Q. Yang, C. Li, L. -X. Wang, Journal of the American Chemical Society 2011,133,18975-18991.

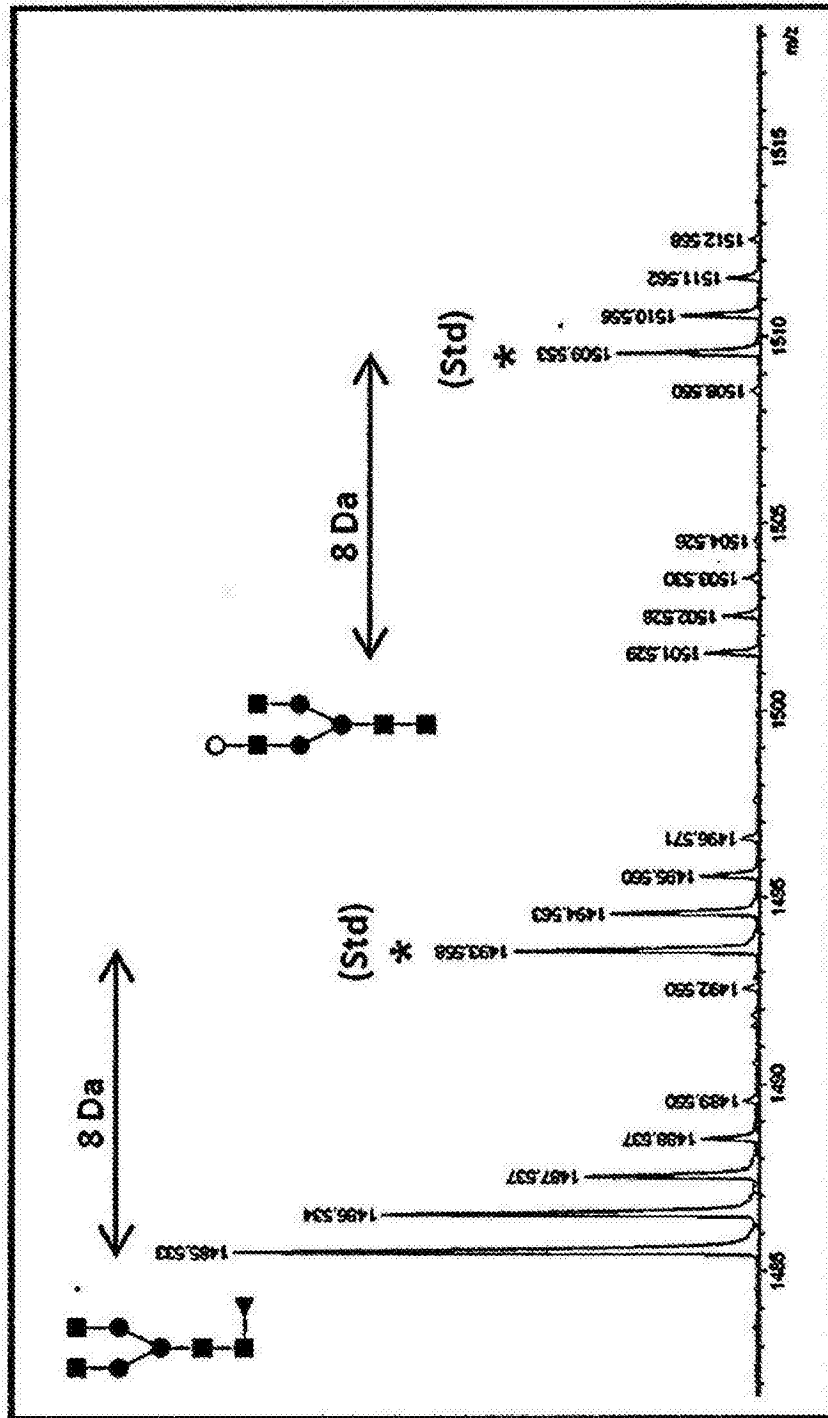


图 1

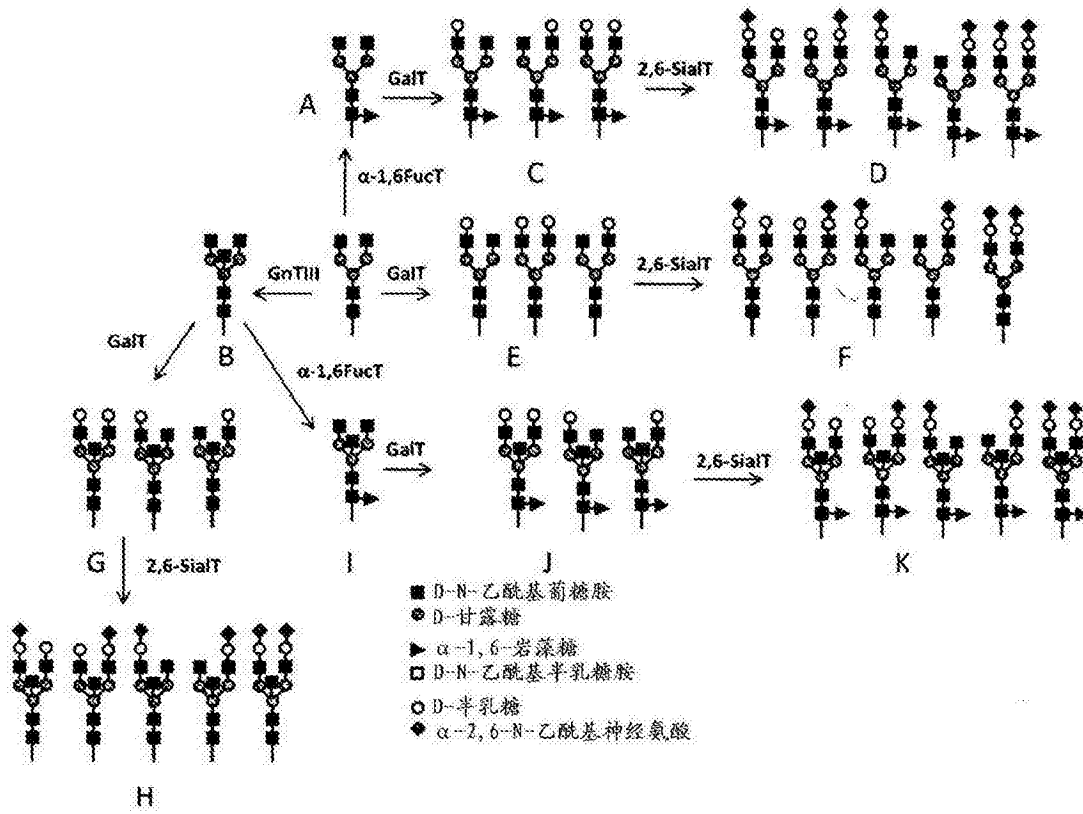


图 2

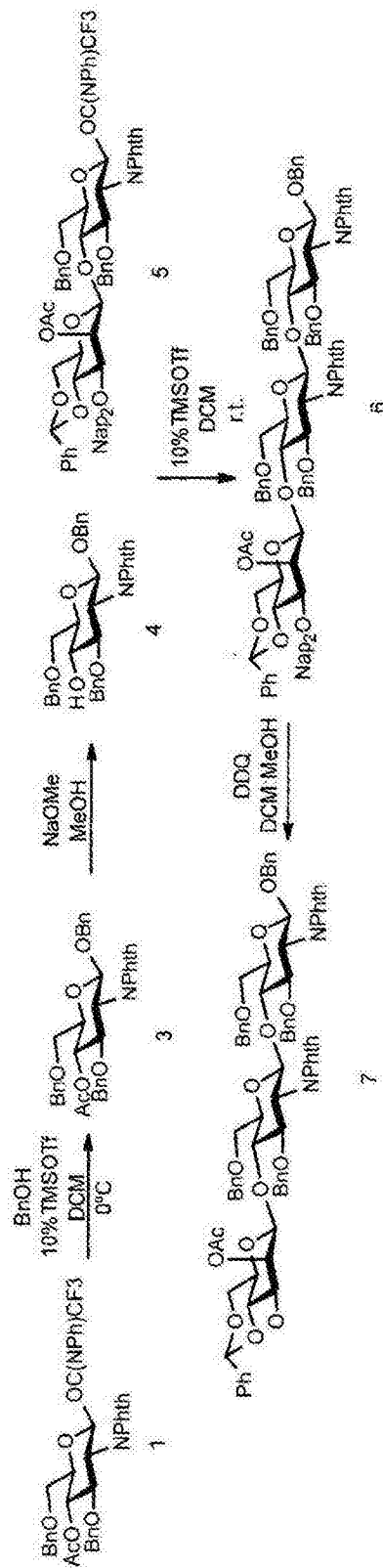


图 3a

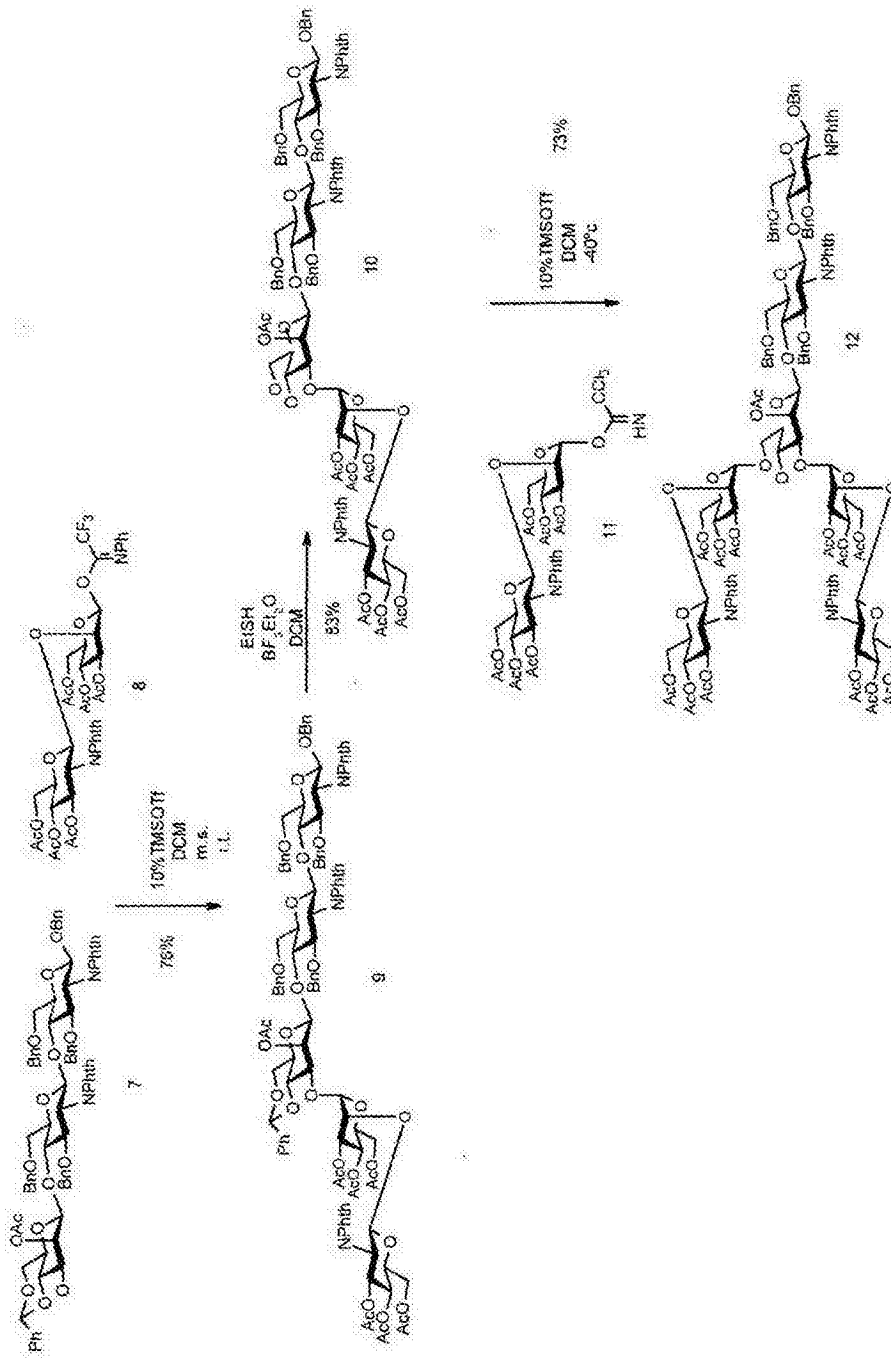


图 3b

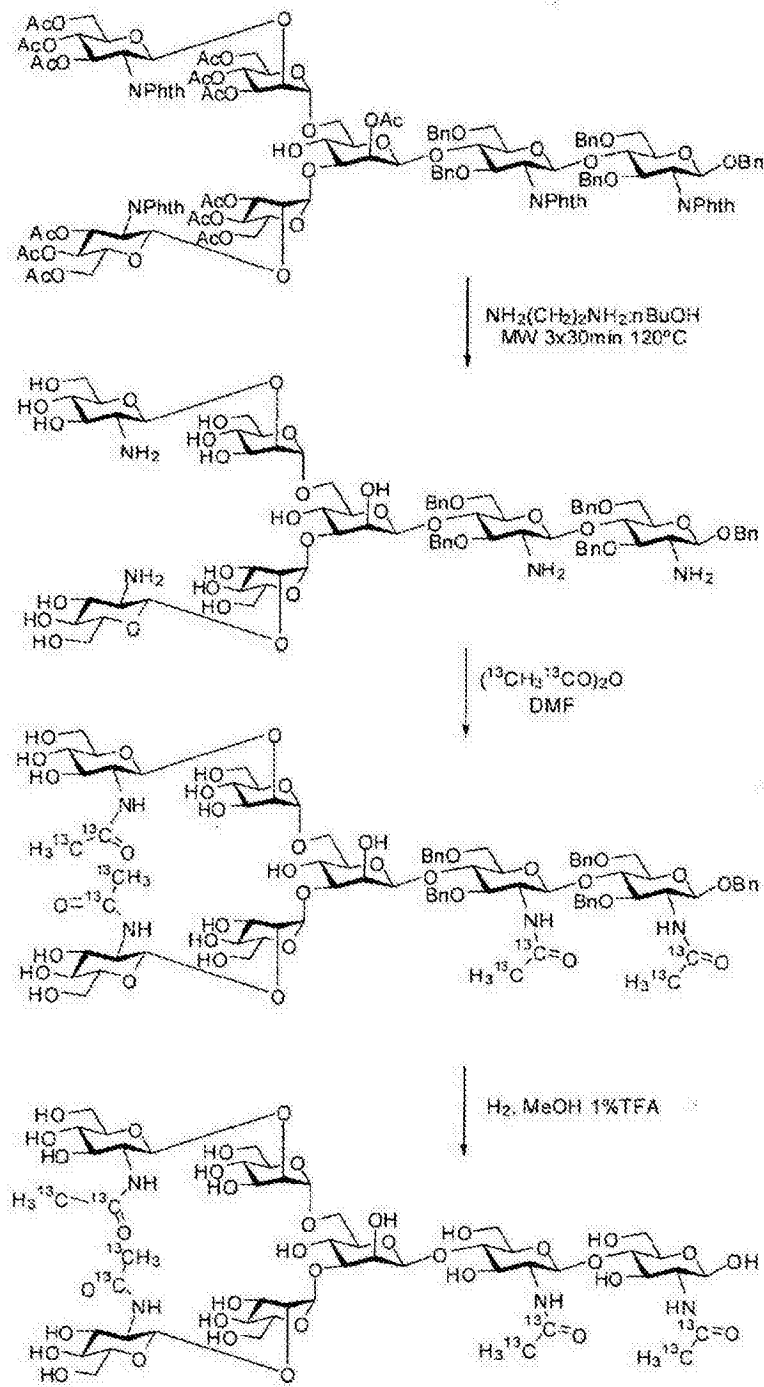


图 3c

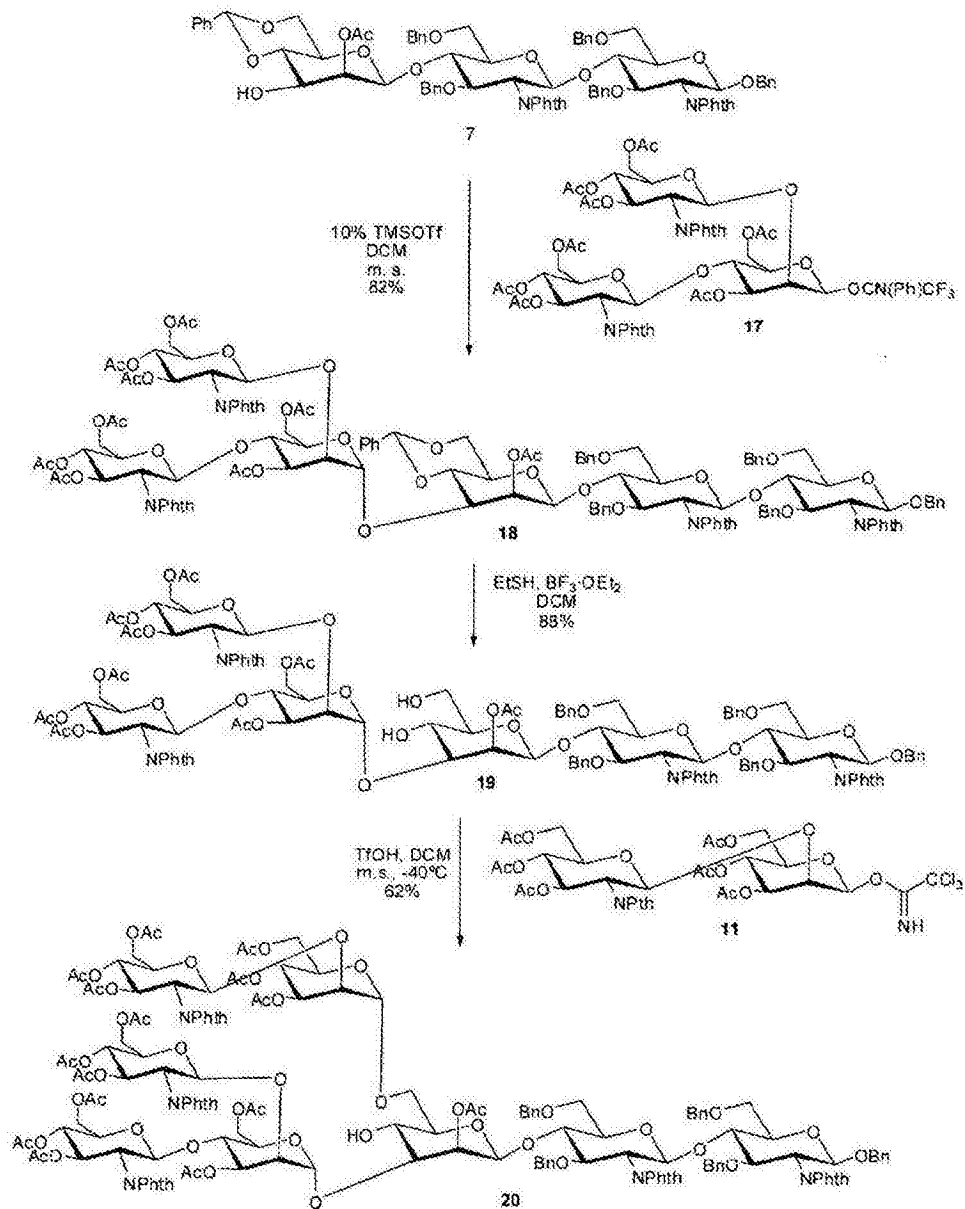


图 4a

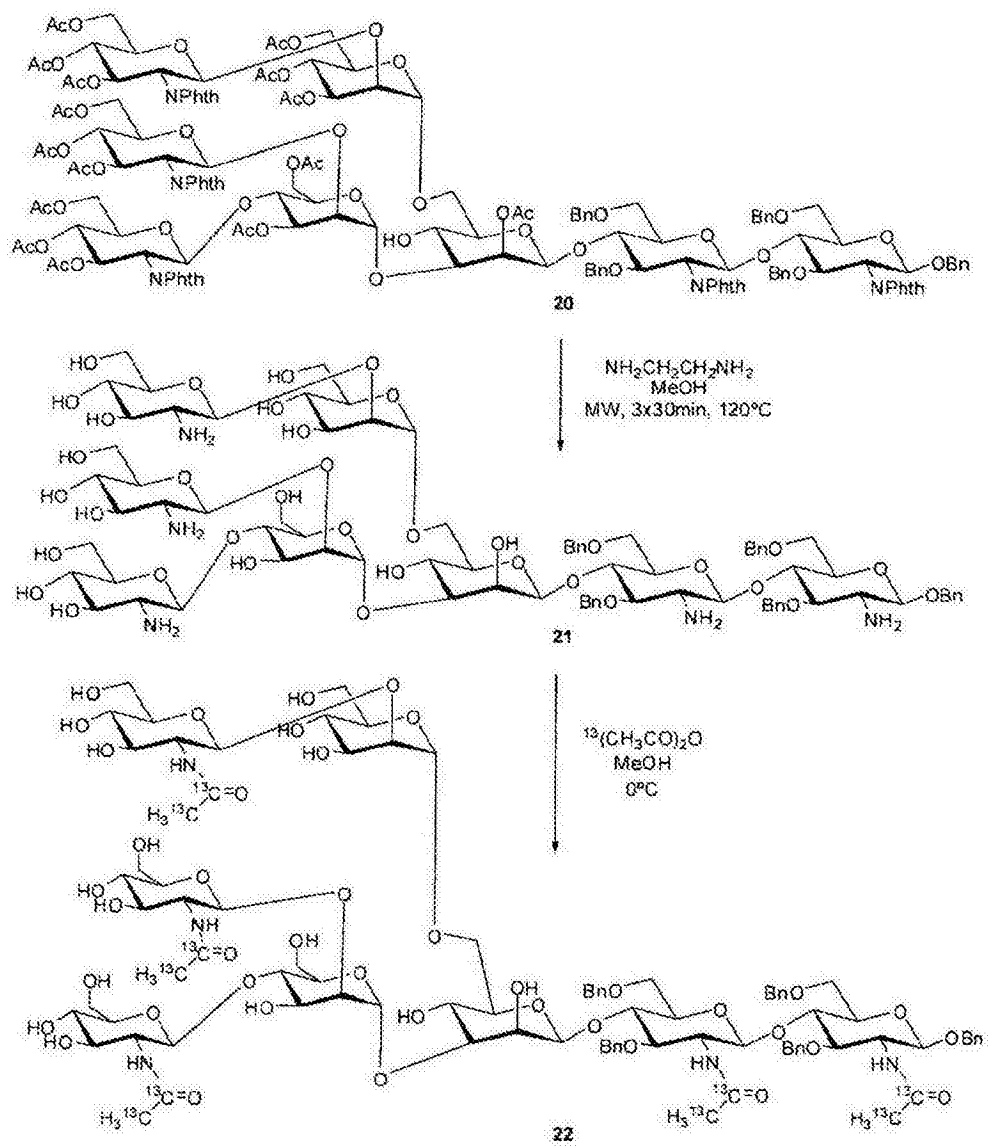


图 4b

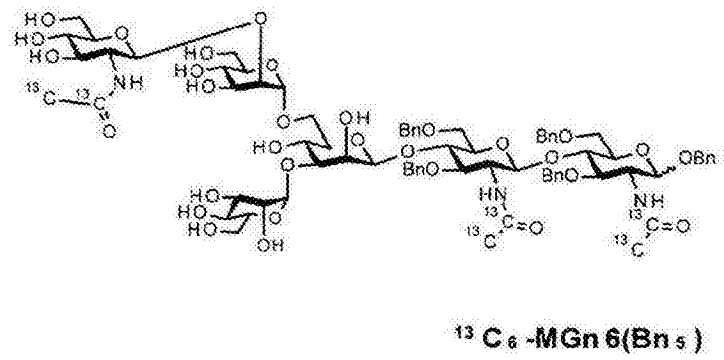
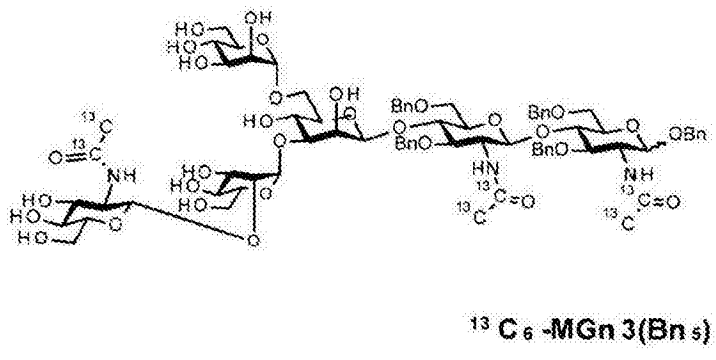
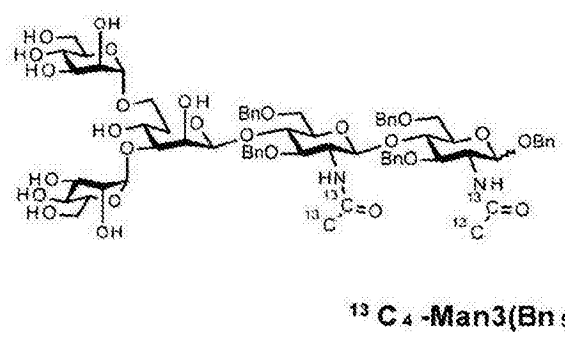
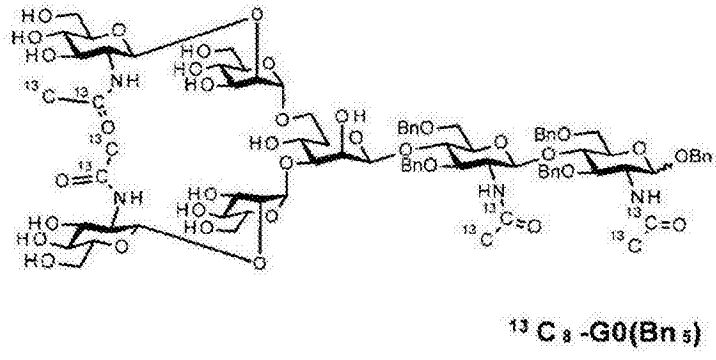


图 5

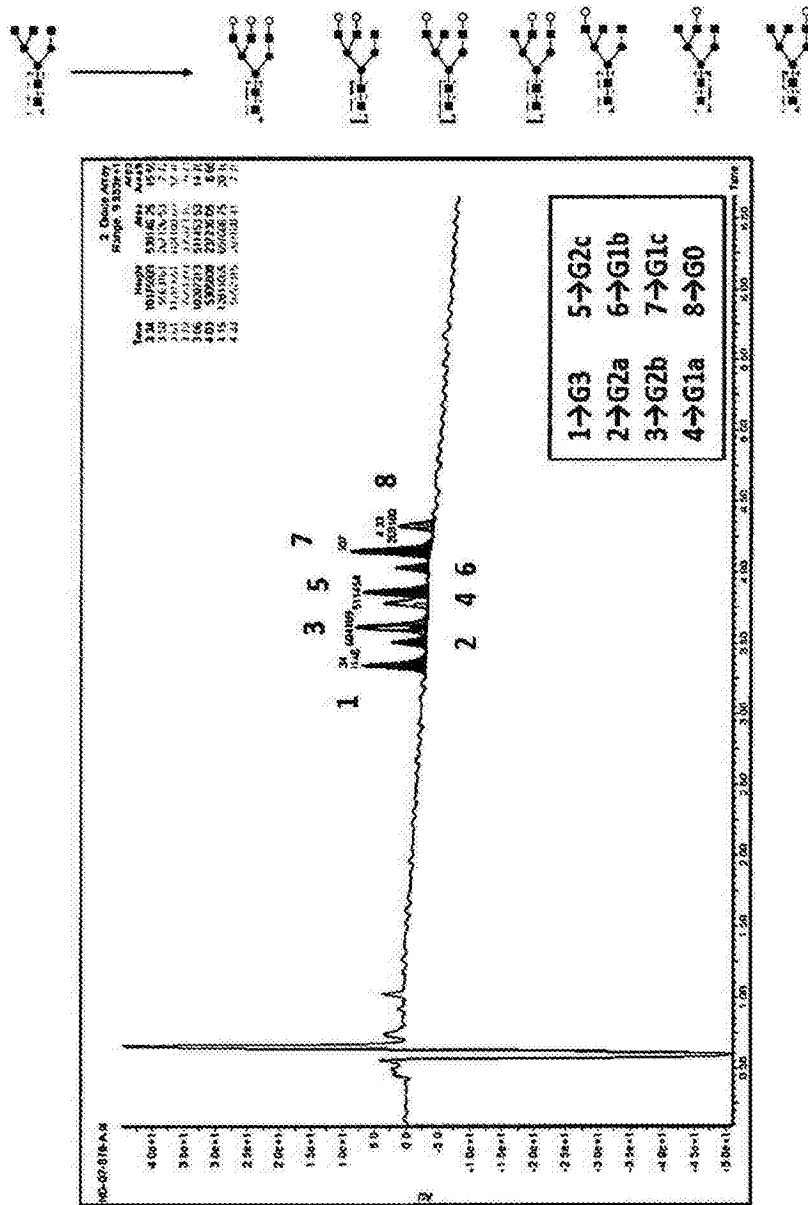


图 6

专利名称(译)	经同位素标记的聚糖的合成和用途		
公开(公告)号	CN105308061A	公开(公告)日	2016-02-03
申请号	CN201480028776.2	申请日	2014-04-03
[标]发明人	尼尔斯克里斯蒂安赖夏特 贝戈尼亚玛丽亚埃切维里亚贝斯特吉 朱安艾特克塞瓦里亚 哈维尔卡尔沃 内雷亚鲁伊斯		
发明人	尼尔斯-克里斯蒂安·赖夏特 贝戈尼亚-玛丽亚·埃切维里亚·贝斯特吉 朱安·艾特克塞瓦里亚 哈维尔·卡尔沃 内雷亚·鲁伊斯		
IPC分类号	C07H13/00 A61K31/715 C08B37/00 G01N33/532		
CPC分类号	C07H5/04 C07H13/00 C07H15/203 C08B37/0063 G01N33/50 G01N2400/00 G01N2458/15 C12P19/04 C12P19/18 G01N33/6848 G01N2458/20 H01J49/0036		
代理人(译)	郑斌		
优先权	2013005986 2013-04-03 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

描述了经同位素标记的聚糖及其合成和在通过质谱法分析聚糖混合物中作为内标准物的用途。本文中描述的合成方法可以方便地用于制备用于定性和定量鉴定天然样品中之聚糖的重聚糖文库。

