

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

**特許第6618176号
(P6618176)**

(45) 発行日 令和1年12月11日(2019. 12. 11)

(24) 登録日 令和1年11月22日(2019. 11. 22)

(51) Int. Cl. F 1
CO8B 37/00 (2006.01) CO8B 37/00 G
C12P 19/26 (2006.01) C12P 19/26

請求項の数 4 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2015-234188 (P2015-234188)	(73) 特許権者	000173924
(22) 出願日	平成27年11月30日(2015. 11. 30)		公益財団法人野口研究所
(65) 公開番号	特開2017-101130 (P2017-101130A)		東京都板橋区加賀一丁目9番7号
(43) 公開日	平成29年6月8日(2017. 6. 8)	(72) 発明者	大隅 賢二
審査請求日	平成30年11月29日(2018. 11. 29)		東京都板橋区加賀一丁目8番1号 公益財団法人野口研究所内
		(72) 発明者	黒河内 政樹
			東京都板橋区加賀一丁目8番1号 公益財団法人野口研究所内
		(72) 発明者	森 昌子
			東京都板橋区加賀一丁目8番1号 公益財団法人野口研究所内
		(72) 発明者	白井 孝
			東京都板橋区加賀一丁目8番1号 公益財団法人野口研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 7糖オリゴ糖の製造方法

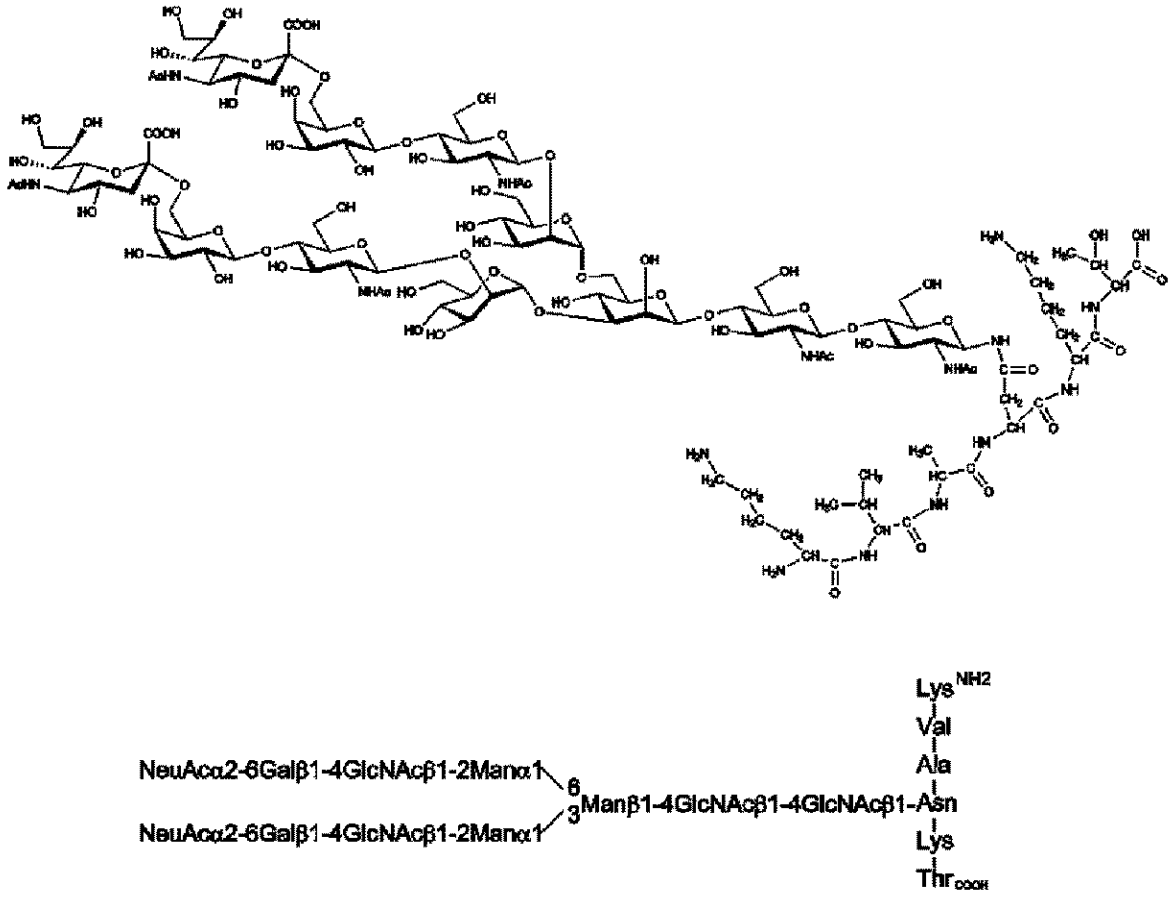
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(1) 下記式3で表される11糖シアリルオリゴ糖ペプチドを加水分解して下記式4と下記式5で表される2種類の10糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドを得る工程、(2)前記2種類の10糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドのそれぞれを単離精製する工程、および(3)前記単離精製した2種類の10糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドのそれぞれについて、非還元末端のガラクトースを加水分解し、シアル酸を加水分解し、還元末端のN、N'-ジアセチルキトピオースを加水分解して、2種類の7糖オリゴ糖を得る工程を含む、7糖オリゴ糖の製造方法。

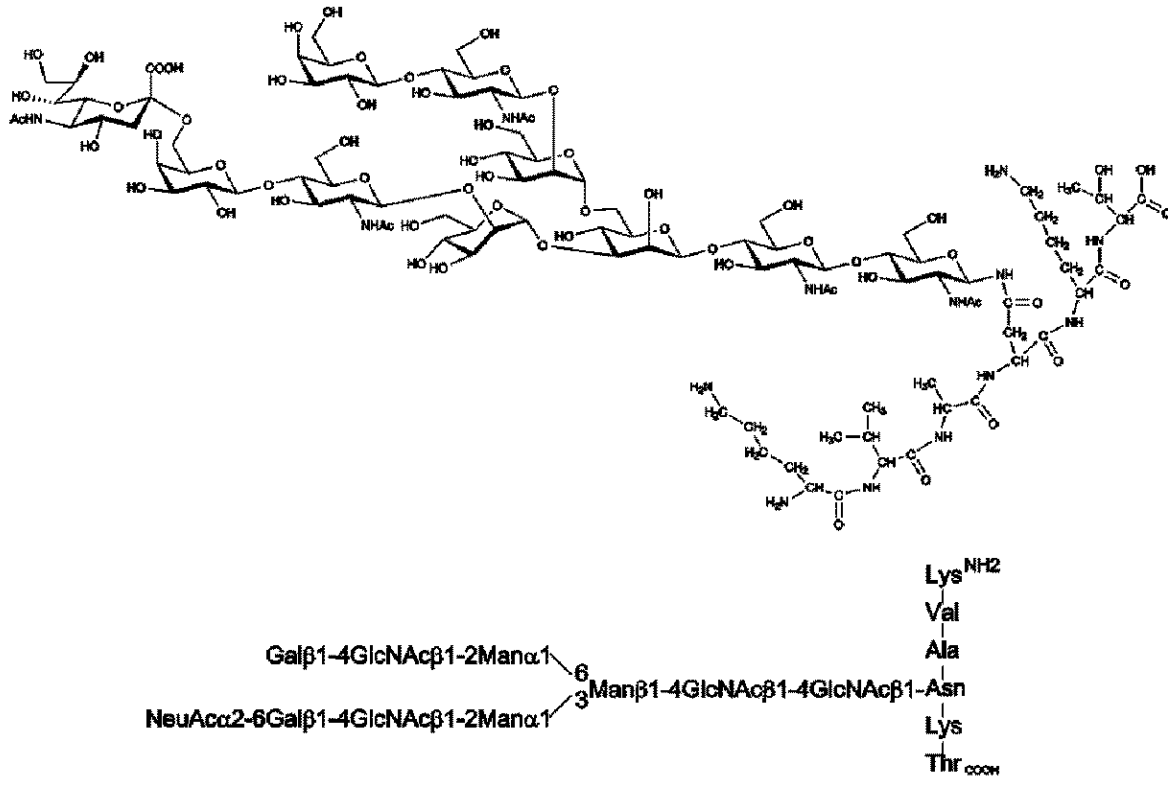
式3：

【化 1 4】



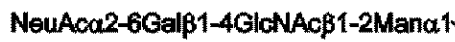
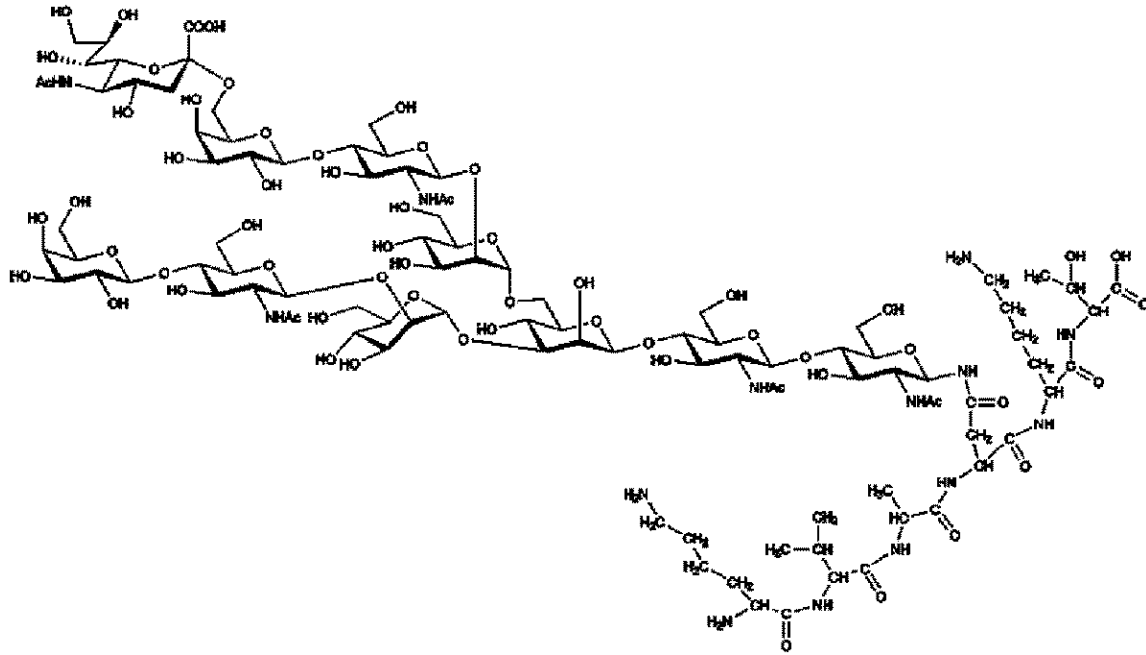
式 4 :

【化 1 5】



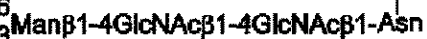
式 5 :

【化 1 6】



6

3

Lys^{NH₂}

Val

Ala

Lys

Thr^{COOH}

【請求項 2】

前記単離精製を逆相分配クロマトグラフィーで行う、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 3】

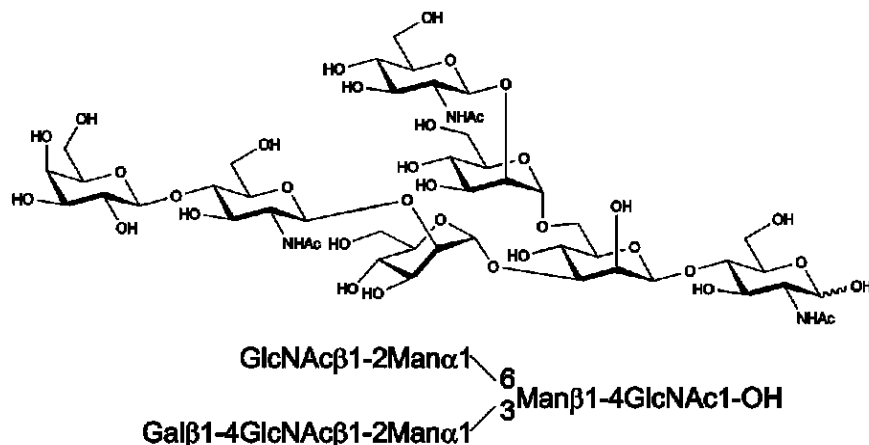
前記工程 (3) が、前記単離精製した 2 種類の 10 糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドのそれぞれについて、(a) ガラクトシダーゼを添加し反応させる工程、(b) ガラクトシダーゼを不活性化する工程、(c) ノイラミニダーゼを添加し反応させる工程、および (d) エンド-N-アセチルグルコサミニダーゼを添加し反応させる工程、を順次ワンポットで行い 2 種類の 7 糖オリゴ糖を得る工程である、請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 4】

前記 2 種類の 7 糖オリゴ糖が下記式 1、および式 2 で表される糖鎖である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の製造方法。

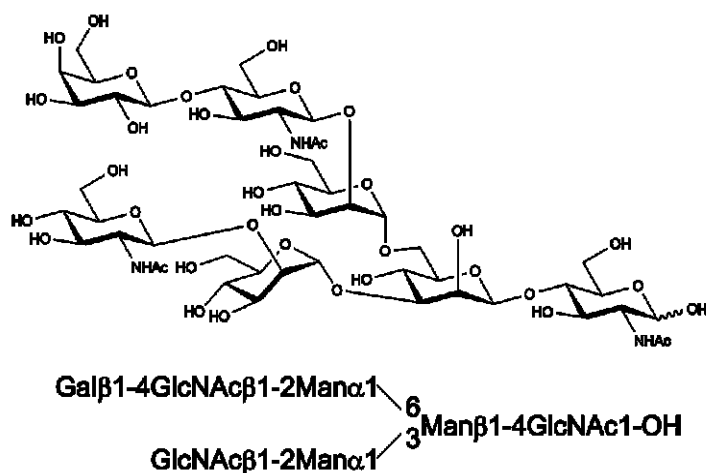
式 1 :

【化 1 2】



式 2 :

【化 1 3】



【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、1糖シアルリオリゴ糖ペプチドから2種類の7糖オリゴ糖を製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

抗体医薬品の構成成分である糖鎖の構造は、抗体医薬品の薬効や安全性に影響を与える。たとえば、フコースの無い2本鎖アスパラギン結合型糖鎖を有する抗体では、薬効発現において重要な役割を果たす抗体依存性細胞障害活性が高くなる（非特許文献1）。また、非還元末端にガラクトース残基が結合した糖鎖を有する抗体では、一部の患者においてアナフィラキシー症状が引き起こされることが報告された（非特許文献2）。

【0003】

近年、抗体医薬品において、2本鎖アスパラギン結合型糖鎖の一方の側鎖の非還元末端にガラクトースが結合した糖鎖（G1糖鎖）が、主要な糖鎖であることが報告された（非特許文献3）。G1糖鎖には、2本鎖アスパラギン結合型糖鎖の5糖母核であるMan1-6（Man1-3）Man1-4GlcNAc1-4GlcNAcにおいて、Man1-3側鎖の非還元末端にガラクトースが1残基結合した糖鎖と、Man1-6側鎖の非還元末端にガラクトースが1残基結合した糖鎖の二種類がある。非特許文献3に記載された報告では、これらの二種類の糖鎖の存在比は抗体によって異なることも明らかにされた。

【0004】

このようなG1糖鎖を有する抗体の機能や安全性を明らかにするためには、均一なG1糖鎖を有する抗体を作成する必要がある。

均一なG1糖鎖を有する抗体の作成法として、特許文献1には、抗体に糖転移酵素と糖加水分解酵素を作用させて糖鎖構造を改変し調製する方法が開示されている。

【0005】

また、均一な糖鎖構造を有する抗体を作成する手法として糖鎖リモデリング法が開発され、様々な抗体の作成に広く利用されている(非特許文献4)。この糖鎖リモデリング法によって均一なG1糖鎖を有する抗体を作成するためには、糖鎖供給源として7糖オリゴ糖、すなわちGlcNAc 1-2Man 1-6(Gal 1-4GlcNAc 1-2Man 1-3)Man 1-4GlcNAc 1-OHと、Gal 1-4GlcNAc 1-2Man 1-6(GlcNAc 1-2Man 1-3)Man 1-4GlcNAc 1-OHが必要になる。そこで、これら7糖オリゴ糖の合成や、7糖オリゴ糖を用いたG1糖鎖を有する抗体の作成に関する研究が行われている。たとえば、非特許文献5には7糖オリゴ糖を化学的に合成し、糖鎖リモデリング法によってG1糖鎖を有する抗体を作成する方法が報告されている。また、特許文献2には、卵由来粗精製11糖シアリルオリゴ糖ペプチドから、非還元末端の構造が7糖オリゴ糖と同じで、8糖から成る糖鎖アスパラギン誘導体を調製する方法が開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特表2014-531215号公報

【特許文献2】特開2003-128703号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】R. L. Shields, et al., J. Biol. Chem., 2002年, 277巻, p. 26733 26740.

【非特許文献2】C. H. Chung, et al., N. Engl. J. Med., 2008年, 358巻, p. 1109 1117.

【非特許文献3】T. Song, et al., Anal. Chem., 2014年, 86巻, p. 5661 5666.

【非特許文献4】W. Huang, et al., J. Am. Chem. Soc., 2012年, 134巻, p. 12308 12318.

【非特許文献5】C. W. Lin, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2015年, 112巻, p. 10611 10616.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかしながら特許文献1に開示された方法では、合成された抗体に結合したG1糖鎖は、2本鎖アスパラギン結合型糖鎖の5糖母核におけるMan 1-3側鎖の非還元末端にガラクトースが結合した糖鎖か、Man 1-6側鎖の非還元末端にガラクトースが結合したかについては言及されていない。

【0009】

また非特許文献5に開示された方法では、糖鎖を調製するために多工程に及ぶ煩雑な合成操作と精製操作を繰り返す必要がある。さらにこの報告では、2本鎖アスパラギン結合型糖鎖の5糖母核におけるMan 1-3側鎖の非還元末端にガラクトースが結合したG1糖鎖を有する抗体しか合成されていない。

【0010】

また特許文献2に開示された方法では、11糖シアリルオリゴ糖ペプチドから5工程で、非還元末端の構造が7糖オリゴ糖と同じで、8糖から成る糖鎖アスパラギン誘導体(特許文献2、化合物37、化合物42)を調製している。しかしこの方法では、各中間体化

10

20

30

40

50

合物をゲルろ過カラムクロマトグラフィーやHPLCにより精製する必要がある。また8糖から成る糖鎖アスパラギン誘導体の7糖オリゴ糖への変換については言及されていない。

【0011】

以上のように従来技術では、2本鎖アスパラギン結合型糖鎖の5糖母核におけるMan 1-6側鎖の非還元末端にガラクトースが結合したG1糖鎖を有する抗体の作成は達成されていない。また、糖鎖リモデリング法によってG1糖鎖を有する抗体を作成する際に必要となる、2種類の7糖オリゴ糖の簡便な調製は報告されていない。

【0012】

本発明が解決しようとする課題は、2本鎖アスパラギン結合型糖鎖の5糖母核におけるMan 1-3側鎖と、Man 1-6側鎖のそれぞれの非還元末端ガラクトースが結合した均一なG1糖鎖構造を有する抗体の作成に利用できる2種類の7糖オリゴ糖、すなわちGlcNAc 1-2Man 1-6(Gal 1-4GlcNAc 1-2Man 1-3)Man 1-4GlcNAc 1-OHと、Gal 1-4GlcNAc 1-2Man 1-6(GlcNAc 1-2Man 1-3)Man 1-4GlcNAc 1-OHを簡便に収率良く製造する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、(1)11糖シアリルオリゴ糖ペプチドを加水分解して2種類の10糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドを得る工程、(2)前記2種類の10糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドのそれぞれを単離精製する工程、および(3)前記単離精製した2種類の10糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドのそれぞれについて、非還元末端のガラクトースを加水分解し、シアル酸を加水分解し、還元末端のN、N'-ジアセチルキトピオースを加水分解して、2種類の7糖オリゴ糖を得る工程を含む、7糖オリゴ糖の製造方法により、上記課題を解決できることを見出した。

【0014】

特に、前記単離精製を逆相分配クロマトグラフィーで行い、前記工程(3)が、前記単離精製した2種類の10糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドのそれぞれについて、(a)ガラクトシダーゼを添加し反応させる工程、(b)ガラクトシダーゼを不活性化する工程、(c)ノイラミニダーゼを添加し反応させる工程、および(d)エンド-N-アセチルグルコサミニダーゼを添加し反応させる工程、を順次ワンポットで行い2種類の7糖オリゴ糖を得る工程である、7糖オリゴ糖の製造方法により、上記課題を解決できることを見出して、本発明を完成するに至った。

【0015】

すなわち、本発明は、以下のとおりである。

[1]

(1)11糖シアリルオリゴ糖ペプチドを加水分解して2種類の10糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドを得る工程、(2)前記2種類の10糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドのそれぞれを単離精製する工程、および(3)前記単離精製した2種類の10糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドのそれぞれについて、非還元末端のガラクトースを加水分解し、シアル酸を加水分解し、還元末端のN、N'-ジアセチルキトピオースを加水分解して、2種類の7糖オリゴ糖を得る工程を含む、7糖オリゴ糖の製造方法。

[2]

前記単離精製を逆相分配クロマトグラフィーで行う、[1]に記載の製造方法。

[3]

前記工程(3)が、前記単離精製した2種類の10糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドのそれぞれについて、(a)ガラクトシダーゼを添加し反応させる工程、(b)ガラクトシダーゼを不活性化する工程、(c)ノイラミニダーゼを添加し反応させる工程、および(d)エンド-N-アセチルグルコサミニダーゼを添加し反応させる工程、を順次ワンポットで行い2種類の7糖オリゴ糖を得る工程である、[1]または[2]に記載の製造

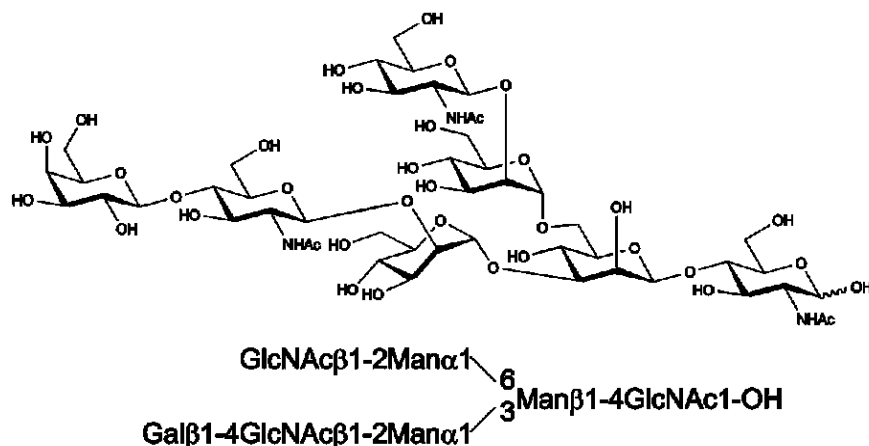
方法。

[4]

前記 2 種類の 7 糖オリゴ糖が下記式 1、および式 2 で表される糖鎖である、[1] ~ [3] のいずれかに記載の方法。

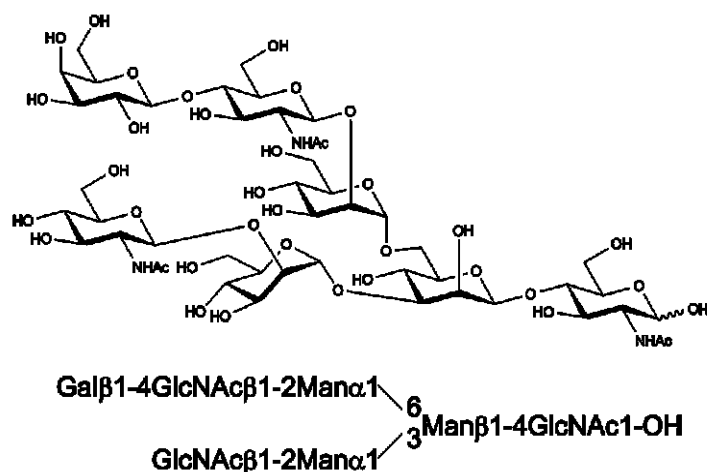
式 1 :

【化 1】



式 2 :

【化 2】



20

【発明の効果】

【 0 0 1 6 】

本発明によれば、11糖シアリルオリゴ糖ペプチドから、簡便に収率良く上記式 1、および式 2 で表される 2 種類の 7 糖オリゴ糖を製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 7 】

【図 1】実施例 1 において、11糖シアリルオリゴ糖ペプチドの酸加水分解後の HPLC チャートを示す。 40

【図 2】実施例 1 において製造された 10 糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドの HPLC チャートを示す。

【図 3】実施例 1 において製造された 10 糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドの HPLC チャートを示す。

【図 4】実施例 2、実施例 3 において糖鎖構造の解析に用いた衝突誘起解離スペクトル (MS³ スペクトル) を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 8 】

以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。なお、本発明は以下の実 50

【 0 0 2 7 】

1 1 糖シアリルオリゴ糖ペプチドを加水分解する方法としては、ノイラミニダーゼを用いる方法であっても、酸性水溶液を用いる方法であってもよいが、酸性水溶液を用いる方法が好ましい。

1 1 糖シアリルオリゴ糖ペプチドの加水分解に用いる酸性水溶液としては、特に限定されるものではないが、たとえば、塩酸水溶液、酢酸水溶液、硫酸水溶液などが挙げられる。

【 0 0 2 8 】

1 1 糖シアリルオリゴ糖ペプチドの酸性水溶液を用いた加水分解において、酸性水溶液の水素イオン濃度として、特に限定されるものではないが、 $pH = 1 \sim 5$ の塩酸水溶液を用いることにより 1 0 糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドを得ることができる。

1 1 糖シアリルオリゴ糖ペプチドの酸性水溶液を用いた加水分解は、特に限定されるものではないが、 $10 \sim 100$ の温度で行うことができる。

1 1 糖シアリルオリゴ糖ペプチドの酸性水溶液を用いた加水分解は、特に限定されるものではないが、30分～10時間で行うことができる。

【 0 0 2 9 】

(2) 前記 2 種類の 1 0 糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドのそれぞれを単離精製する工程とは、2本鎖のうち一方の側鎖の非還元末端にシアル酸が1残基結合した2種類の10糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドのそれぞれを単離精製する工程である。

【 0 0 3 0 】

前記 2 種類の 1 0 糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドのそれぞれを単離精製する方法としては、順相カラムクロマトグラフィーや逆相分配クロマトグラフィー、そして多孔性グラファイトカーボンを充填したカラムクロマトグラフィーを用いる方法などが挙げられるが、逆相分配クロマトグラフィーを用いる方法が好ましい。

【 0 0 3 1 】

逆相分配クロマトグラフィーで 2 種類の 1 0 糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドを単離精製する工程とは、前記 2 種類の 1 0 糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドを、逆相分配クロマトグラフィーを備えた HPLC と、HPLC 送液の移動相に緩衝溶液を用いて単離精製する工程である。

【 0 0 3 2 】

逆相カラムクロマトグラフィーの充填剤としては、特に限定されるものではないが、オクタデシル基が化学結合したシリカゲルを用いることにより 1 0 糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドを単離精製することができる。

HPLC 送液の移動相としては、特に限定されるものではないが、ギ酸アンモニウム緩衝液、ギ酸 - トリエチルアミン緩衝液、酢酸アンモニウム緩衝液、酢酸 - トリエチルアミン緩衝液などの移動相 A と、移動相 A に 0 . 0 1 ~ 5 % (v / v) のメタノール、エタノール、または n - ブタノールを加えた移動相 B の混合液を用いることができるが、100 mM 酢酸 - トリエチルアミン緩衝液から成る移動相 A と、移動相 A に 0 . 0 5 % (v / v) の n - ブタノールを加えた移動相 B の混合液を用いることが好ましい。

HPLC 送液の移動相の組成は、移動相 A に対する移動相 B の割合が少ない状態から、徐々に移動相 B の割合が多くなるように変化させることが好ましい。

【 0 0 3 3 】

(3) 前記単離精製した 2 種類の 1 0 糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドのそれぞれについて、非還元末端のガラクトースを加水分解し、シアル酸を加水分解し、還元末端の N、N' - ジアセチルキトピオースを加水分解して、2種類の7糖オリゴ糖を得る工程とは、非還元末端のガラクトース1残基を除去する工程、非還元末端のシアル酸1残基を除去する工程、および還元末端の N - アセチルグルコサミン - ペプチドを除去する工程からなる。

【 0 0 3 4 】

非還元末端のガラクトースを加水分解する方法としては、ガラクトシダーゼを用いる方

法が好ましい。

シアル酸を加水分解する方法としては、ノイラミニダーゼを用いる方法であっても、酸性水溶液を用いる方法であってもよい。

還元末端のN、N'-ジアセチルキトビオースを加水分解する方法としては、アルカリ加水分解やエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼを用いる方法などが挙げられるが、エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼを用いる方法が好ましい。

【0035】

前記工程(3)としては、前記単離精製した2種類の10糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドのそれぞれについて、(a)ガラクトシダーゼを添加し反応させる工程、(b)ガラクトシダーゼを不活性化する工程、(c)ノイラミニダーゼを添加し反応させる工程、および(d)エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼを添加し反応させる工程、を順次ワンポットで行い2種類の7糖オリゴ糖を得る工程が好ましい。

【0036】

前記単離精製した2種類の10糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドのそれぞれについて、(a)ガラクトシダーゼを添加し反応させる工程、(b)ガラクトシダーゼを不活性化する工程、(c)ノイラミニダーゼを添加し反応させる工程、および(d)エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼを添加し反応させる工程、を順次ワンポットで行い2種類の7糖オリゴ糖を得る工程とは、2種類の10糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドのそれぞれをガラクトシダーゼで処理して非還元末端のガラクトース1残基を除去したのち、それ以上ガラクトシダーゼを反応させないようにガラクトシダーゼを不活性化し、引き続きノイラミニダーゼで処理することで非還元末端のシアル酸1残基を除去し、最後にエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼで処理して還元末端のN-アセチルグルコサミンペプチドを除去する反応を、同一緩衝液中ワンポットで行い2種類の7糖オリゴ糖を得る工程である。

【0037】

緩衝液としては、pHが4.0~8.0の緩衝液が好ましく、特に好ましくはpH6.0の50mMリン酸緩衝液が好ましい。

反応温度としては、10~50で行うことができる。

【0038】

ガラクトシダーゼとしては特に限定されるものではないが、*Bacteroides fragilis*由来のガラクトシダーゼや、*Bacteroides thetaiotaomicron*由来のガラクトシダーゼなどを挙げることができる。ガラクトシダーゼを用いる加水分解は、特に限定されるものではないが、たとえば5μmolの10糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドに対して20~80μgのガラクトシダーゼ、または400~1000ユニットのガラクトシダーゼを用いて、20~50の温度で、1~72時間で行うことができる。なおここで1ユニットとは、37、1時間で、1nmolのGal1-4GlcNAc1-3Gal1-4Glc-7-amino-4-methyl-coumarinから非還元末端のガラクトースを0.95nmol以上遊離させるために必要な酵素量である。

【0039】

ガラクトシダーゼを不活性化する方法としては、エタノール処理やフェノール処理、そして加熱処理などが挙げられるが、好ましくは65~90で30分~1時間加熱することによって達成される。

【0040】

ノイラミニダーゼとしては特に限定されるものではないが、*Clostridium perfringens*由来のノイラミニダーゼを利用できる。ノイラミニダーゼを用いる加水分解は、特に限定されるものではないが、たとえば5μmolの10糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドに対して100~300ユニットのノイラミニダーゼを用いて、20~50の温度で、1~5時間で行うことができる。なおここで1ユニットとは、37、5分間で、1nmolのNeu5Ac2-3Gal1-3GlcNAc1-3G

α-1-4-Glc-7-amino-4-methyl-coumarin から非還元末端のシアル酸を 0.95 nmol 以上遊離させるために必要な酵素量である。

【0041】

エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼとしては特に限定されるものではないが、Streptococcus pyogenes 由来のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼを利用できる。エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼを用いる加水分解は、特に限定されるものではないが、たとえば 5 μmol の 10 糖モノシアルオリゴ糖ペプチドに対して 5 ~ 20 μg のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼを用いて、20 ~ 50 °C の温度で、1 ~ 24 時間で行うことができる。

【実施例】

【0042】

以下、本発明を実施例によってさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。なお、本発明の実施に用いられる測定方法は以下のとおりである。

【0043】

[HPLC分析]

カラム (Mightysil RP-18 GP Aqua (関東化学株式会社、150 × 2 mm)) を備えた GLサイエンス製 HPLC GL-7400 システムを用いて、以下の測定条件により HPLC 分析を行った。

測定条件：

移動相；(A) 100 mM 酢酸 - トリエチルアミン 緩衝液 (pH 4.0)，(B) A + 0.05% (v/v) n-ブタノール

グラジエント；B, 8% → 25% (25 min)

流速；0.2 mL/min

カラム温度；40

UV；220 nm

【0044】

[HPLC分取]

カラム (Mightysil RP-18 GP Aqua (関東化学株式会社、250 × 10 mm)) を備えた GLサイエンス製 HPLC GL-7400 システムを用いて、以下の分取条件により HPLC 分取を行った。

分取条件：

移動相；(A) 100 mM 酢酸 - トリエチルアミン 緩衝液 (pH 4.0)，(B) A + 0.05% (v/v) n-ブタノール

グラジエント；B, 10% → 100% (25 min)、100% (25 min → 30 min)

流速；2.5 mL/min

カラム温度；40

UV；220 nm

【0045】

[¹H-NMR測定]

D₂O 0.4 mL に試料 2 mg を溶解して、JEOL 製 JNM-600 (600 MHz) で ¹H-NMR を測定した。

【0046】

[MS測定]

以下の測定条件で測定を行った。

AXIMA TOF², Shimadzu Biotech

イオン化：MALDI

マトリックス：2,5-dihydroxybenzoic acid

モード：Positive

10

20

30

40

50

【 0 0 4 7 】

[MS - MS 測定]

以下の測定条件で測定を行った。

AXIMA Resonance, Shimadzu Biotech

イオン化: MALDI

マトリックス: 2, 5-dihydroxybenzoic acid

モード: Negative

【 実施例 1 】

【 0 0 4 8 】

[10 糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドの調製]

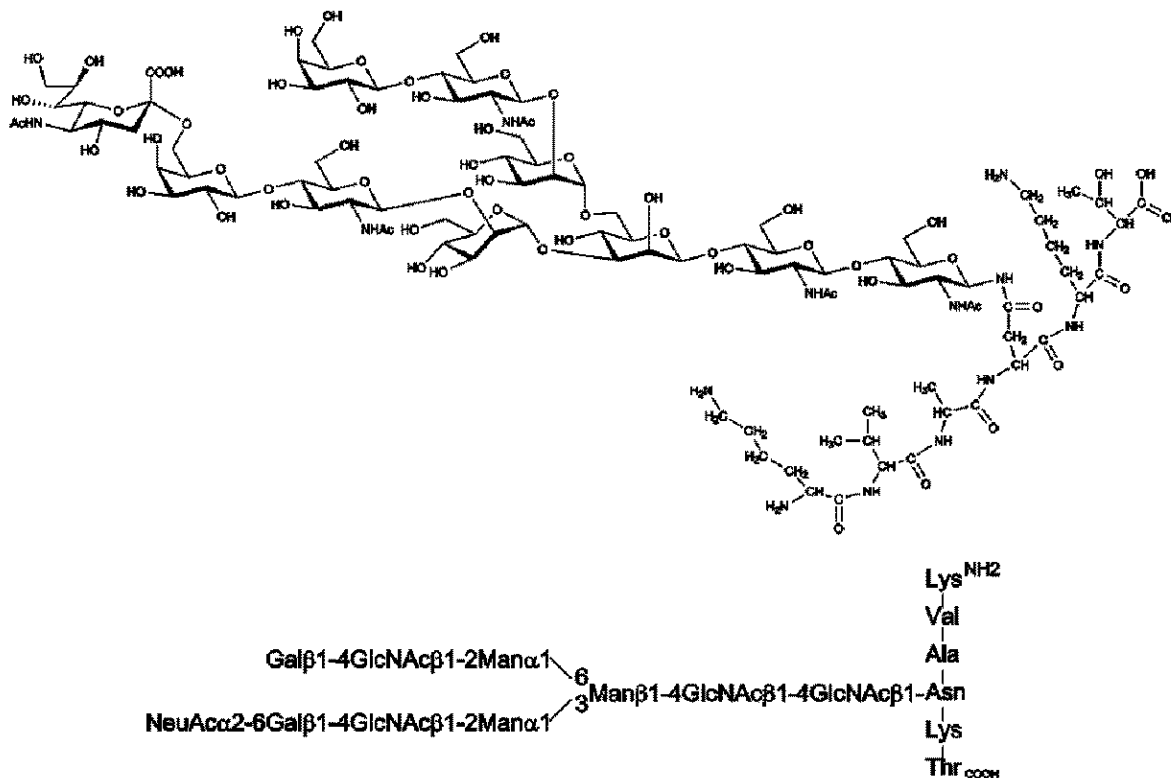
11 糖シアリルオリゴ糖ペプチド (262.7 mg, 91.7 mmol) を 10 mM 塩酸水溶液 (12 mL) に溶解し、60 で 3.5 時間加熱撹拌した。この反応液に 1 M Na_2CO_3 水溶液を 150 μL 加え反応液の水素イオン濃度を $\text{pH} = 8$ にし、凍結乾燥することで白色粉末状化合物を得た。この白色粉末状化合物を 720 μL の水に溶解し、15 ~ 30 μL ずつ HPLC で精製したところ、7.5 分後に下記式 4 で表される 10 糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドが、10 分後に下記式 5 で表される 10 糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドが溶出した。これらの溶出液に 1 M Na_2CO_3 水溶液を加え中和し、減圧濃縮したのち、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Sephadex G-25、20 mm \times 770 mm、展開溶媒は 0.05 % アンモニア水溶液) で脱塩し、下記式 4 で表される 10 糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドを 39.5 mg (収率 17%)、および下記式 5 で表される 10 糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドを 44.9 mg (収率 19%) 得た。

【 0 0 4 9 】

11 糖シアリルオリゴ糖ペプチドの酸加水分解後の HPLC による測定結果を図 1 に、精製後の下記式 4 で表される 10 糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドの HPLC による測定結果を図 2 に、精製後の下記式 5 で表される 10 糖モノシアリルオリゴ糖ペプチドの HPLC による測定結果を図 3 に示す。

式 4 :

【 化 6 】

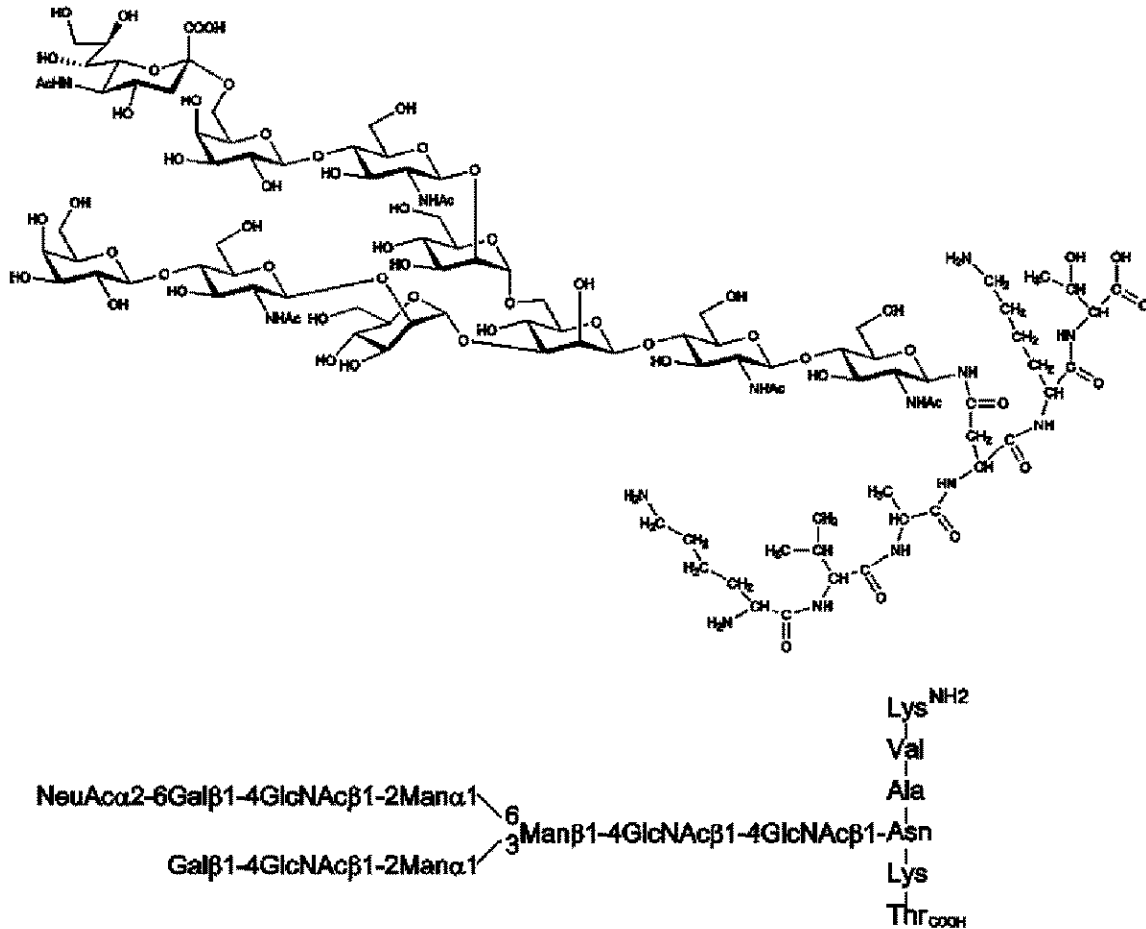


10

20

式 5 :

【化 7】



【 0 0 5 0】

得られた式 4 で表される 10 糖モノシアルリオリゴ糖ペプチドの物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) 5.14 (s, 1H), 5.05 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 4.94 (s, 1H), 4.72 - 4.66 (m, 1H), 4.66 - 4.56 (m, 3H), 4.48 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 4.46 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 4.41 (dd, 1H), 4.32 (q, 1H, $J = 6.9$ Hz), 4.27 (bs, 1H), 4.26 - 4.20 (m, 1H), 4.21 (bd, 1H, $J = 3.4$ Hz), 4.15 (d, 1H, $J = 4.1$ Hz), 4.14 - 4.10 (m, 2H), 4.07 - 3.45 (m, 59H), 3.06 - 2.96 (m, 4H), 2.87 (dd, 1H, $J = 5.5, 16.5$ Hz), 2.76 (dd, 1H, $J = 7.6, 16.5$ Hz), 2.68 (dd, 1H, $J = 4.1, 12.4$ Hz), 2.10 - 2.00 (m, 1H), 2.09 (s, 3H, Ac), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.06 (s, 3H, Ac), 2.04 (s, 3H, Ac), 2.01 (s, 3H, Ac), 1.96 - 1.85 (m, 1H), 1.85 - 1.57 (m, 8H), 1.52 - 1.35 (m, 4H), 1.39 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.18 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz), 0.98 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz); MALDI TOF MS Calcd for $\text{C}_{101}\text{H}_{173}\text{N}_{14}\text{O}_{62}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 2574.1, found 2574.1

【 0 0 5 1】

式 5 で表される 10 糖モノシアルリオリゴ糖ペプチドの物理的データは以下の通りである。

30

40

50

^1H -NMR (D_2O) 5.12 (s, 1H), 5.05 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 4.95 (s, 1H), 4.78 (s, 1H), 4.68 (dd, 1H, $J = 5.5, 7.6$ Hz), 4.64 - 4.56 (m, 3H), 4.49 - 4.44 (d \times 2, 2H), 4.41 (dd, 1H), 4.31 (q, 1H, $J = 6.9$ Hz), 4.28 - 4.18 (m, 1H), 4.25 (bs, 1H), 4.20 (bd, 1H, $J = 3.4$ Hz), 4.14 (d, 1H, $J = 4.1$ Hz), 4.13 - 4.10 (m, 2H), 4.02 - 3.47 (m, 5H), 3.04 - 2.97 (m, 4H), 2.86 (bd, 1H, $J = 4.8, 16.5$ Hz), 2.76 (bd, 1H, $J = 8.2, 16.5$ Hz), 2.68 (dd, 1H, $J = 4.8, 12.4$ Hz), 2.11 - 1.99 (m, 1H), 2.09 (s, 3H, Ac), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.06 (s, 3H, Ac), 2.03 (s, 3H, Ac), 2.01 (s, 3H, Ac), 1.94 - 1.85 (m, 1H), 1.82 - 1.60 (m, 8H), 1.52 - 1.34 (m, 4H), 1.38 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.17 (d, 3H, $J = 6.2$ Hz), 0.97 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz); MALDI TOF MS Calcd for $\text{C}_{101}\text{H}_{173}\text{N}_{14}\text{O}_{62}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 2574.1, found 2574.3

【実施例2】

【0052】

[式1で表される7糖オリゴ糖の調製と構造決定]

実施例1で得られた式4で表される10糖モノシリアルオリゴ糖ペプチド(15.0mg, 6.2 μ mol)を100mM NaCl含有50mMクエン酸ナトリウム緩衝液(pH=6.0)500 μ Lに溶解させ、*Bacteroides fragilis*由来のガラクトシダーゼ(8000Units/mL)を50 μ L加えた。この溶液を37で加熱攪拌し、22時間後*Bacteroides fragilis*由来のガラクトシダーゼ(8000Units/mL)を75 μ L追加し、37で加熱攪拌を続けた。45時間後で反応液を凍結乾燥したのち、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー(Sephadex G-25、20mm \times 770mm、展開溶媒は0.1%アンモニア水溶液)で脱塩し、式6で表される9糖オリゴ糖ペプチドを15.2mg(quant.)得た。

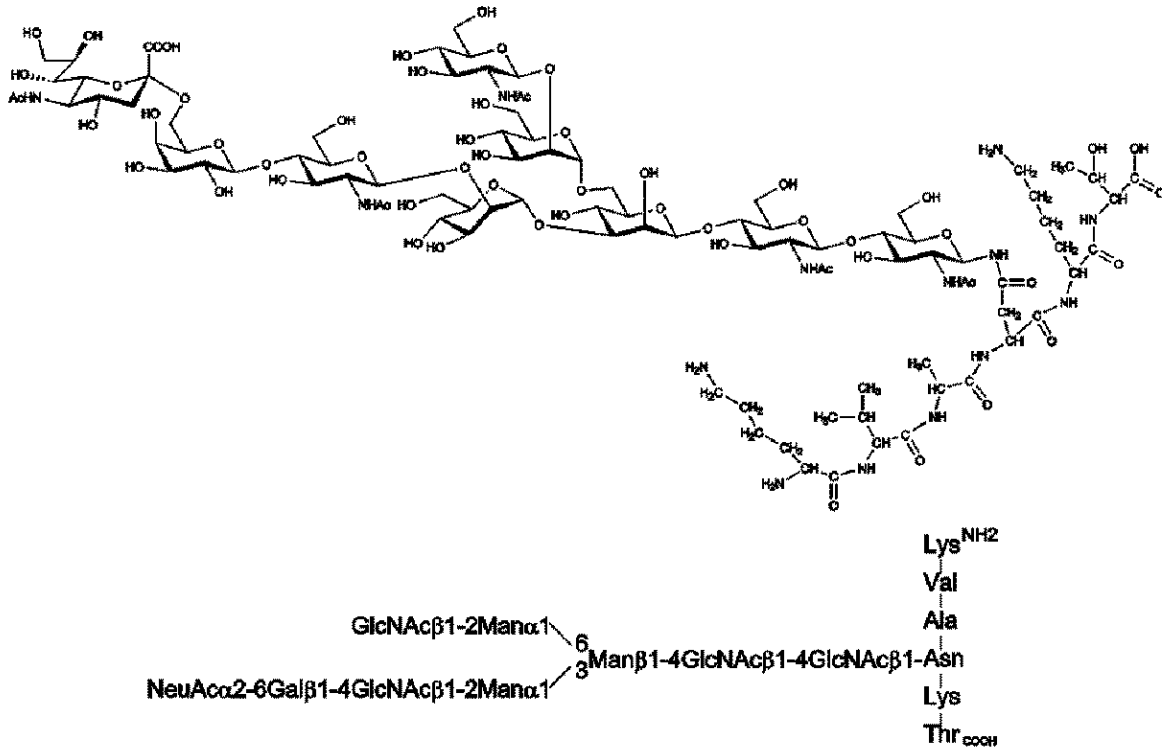
式6:

10

20

30

【化 8】



【0053】

式6で表される9糖オリゴ糖ペプチドの物理的データは以下の通りである。

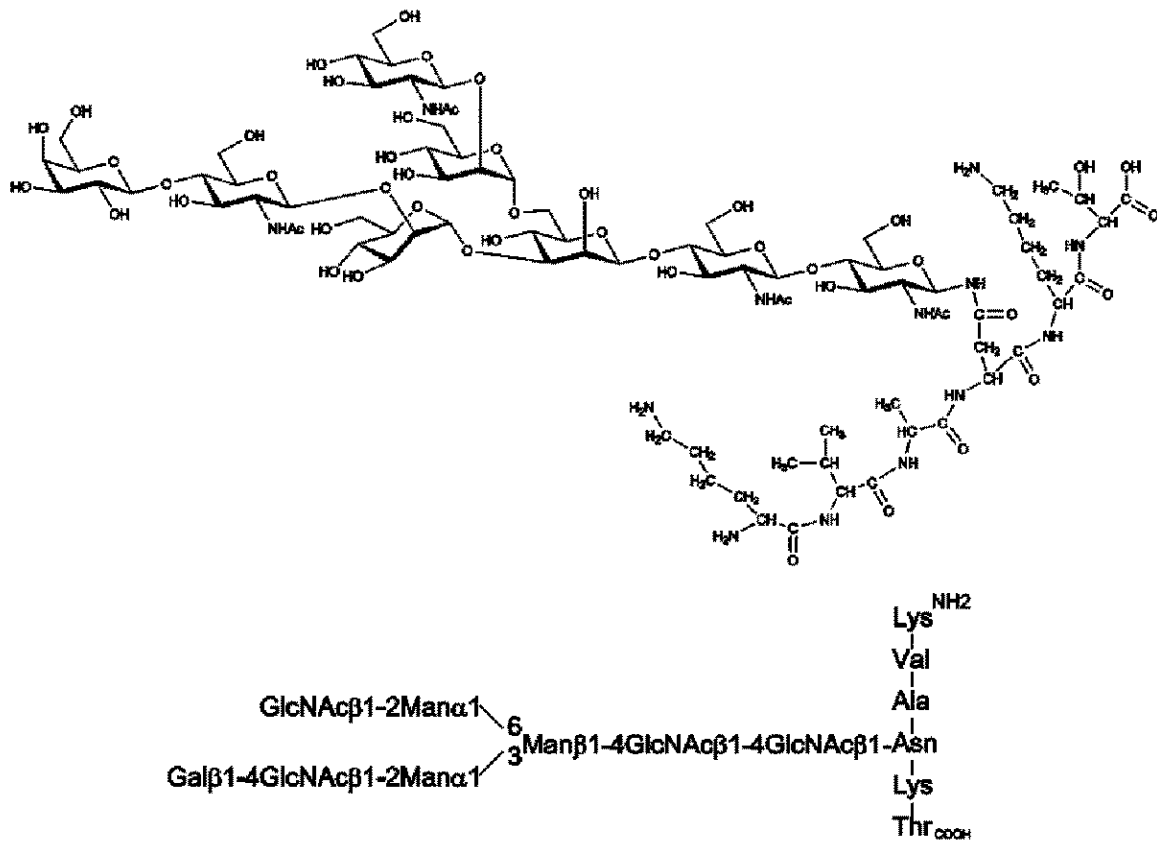
$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) 5.13 (s, 1H), 5.04 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 4.92 (s, 1H), 4.73 - 4.67 (m, 1H), 4.65 - 4.58 (m, 2H), 4.56 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 4.45 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 4.42 - 4.37 (m, 1H), 4.34 - 4.27 (m, 1H), 4.26 (bs, 1H), 4.24 - 4.17 (m, 2H), 4.17 - 4.08 (m, 3H), 4.05 - 3.39 (m, 53H), 3.05 - 2.92 (m, 4H), 2.91 - 2.81 (m, 1H), 2.75 (dd, 1H, $J = 8.2, 15.8$ Hz), 2.67 (dd, 1H, $J = 4.8, 12.4$ Hz), 2.11 - 1.99 (m, 1H), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.05 (s, 3H, Ac), 2.03 (s, 3H, Ac), 2.00 (s, 3H, Ac), 1.93 - 1.84 (m, 1H), 1.83 - 1.54 (m, 7H), 1.53 - 1.32 (m, 4H), 1.38 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.17 (d, 3H, $J = 6.2$ Hz), 1.04 - 0.89 (m, 6H); MALDI TOF MS Calcd for $\text{C}_{95}\text{H}_{163}\text{N}_{14}\text{O}_{57}^+ [\text{M} + \text{H}]^+$: 2412.0, found 2413.1

【0054】

式6で表される9糖オリゴ糖ペプチド(15.2mg, 6.2 μmol)を40mM塩酸水溶液600 μL に溶解し、80 $^\circ\text{C}$ で2.5時間過熱撹拌した。反応液に1M Na_2CO_3 水溶液を30 μL 加えpH=8としたのち、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー(Sephadex G-25、17mm x 540mm、展開溶媒は0.1%アンモニア水溶液)で脱塩し、式7で表される8糖オリゴ糖ペプチドを13.8mg(quant.)得た。下記式7で表される8糖オリゴ糖ペプチドの衝突誘起解離スペクトル(MS^3 スペクトル)を図4(下段)に示す。図4(下段)に示すスペクトルにおいてMan 1-6分岐側のGlcNAc 1-2Man残基が解離したフラグメントイオンの脱水イオンに由来するシグナルm/z 508が観測されたことから、ガラクトース残基がMan 1-3側鎖の非還元末端に結合していることを確認した。

式 7 :

【化 9】



【 0 0 5 5 】

式 7 で表される 8 糖オリゴ糖ペプチドの物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) 5.15 (s, 1H), 5.07 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 4.95 (s, 1H), 4.76 - 4.69 (m, 1H), 4.64 (bd, 1H, $J = 6.9$ Hz), 4.61 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 4.59 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 4.50 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 4.47 - 4.40 (m, 1H), 4.37 - 4.30 (m, 1H), 4.28 (bs, 1H), 4.25 (dd, 1H, $J = 4.1, 6.2$ Hz), 4.22 (bd, 1H, $J = 2.7$ Hz), 4.20 - 4.11 (m, 3H), 4.05 - 3.42 (m, 46H), 3.07 - 2.85 (m, 5H), 2.82 - 2.71 (m, 1H), 2.17 - 2.02 (m, 1H), 2.11 (s, 3H, Ac), 2.08 (s, 6H, $\text{Ac} \times 2$), 2.03 (s, 3H, Ac), 1.97 - 1.87 (m, 1H), 1.86 - 1.74 (m, 1H), 1.74 - 1.57 (m, 6H), 1.55 - 1.34 (m, 4H), 1.41 (d, 3H, $J = 7.6$ Hz), 1.20 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.04 - 0.94 (m, 6H); MALDI TOF MS Calcd for $\text{C}_{84}\text{H}_{145}\text{N}_{13}\text{NaO}_{49}^+ [\text{M} + \text{Na} + \text{H}]^+$: 2142.9, found 2142.5

【 0 0 5 6 】

式 7 で表される 8 糖オリゴ糖ペプチド (13.8 mg, 6.5 μmol) をリン酸緩衝生理食塩水 225 μL に溶解し、*Streptococcus pyogenes* 由来のエンド - N - アセチルグルコサミニダーゼ (1 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$) を 25 μL 加えた。反応液を 37 で 25 時間過熱攪拌し、凍結乾燥した。凍結乾燥後の残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (イアトロピーズ 6RS - 8060 (30 mL)、展開溶媒 0.1% $\text{NH}_4\text{OH} : \text{MeOH} : \text{EtOAc} = 1 : 1 : 2$ (250 mL) を溶出したのち、0.1% $\text{NH}_4\text{OH} : \text{MeOH} = 1 : 1$ (200 mL) を溶出)。溶出液を TLC で追跡し (発

色液はアニスアルデヒド)、Rf値=0.8にスポットが確認された溶出液を減圧濃縮した。濃縮後の残渣をゲルろ過カラムクロマトグラフィー(Sephadex G-25、17mm×600mm、展開溶媒は0.1%アンモニア水溶液)で脱塩し、前記式1で表される7糖オリゴ糖を7.7mg(94%)得た。

【0057】

式1で表される7糖オリゴ糖の物理的データは以下の通りである。

¹H-NMR(D₂O) 5.22(d, 1H, J=3.4 Hz), 5.13(s, 1H), 4.93(s, 1H), 4.59(d, 1H, J=7.6 Hz), 4.57(d, 1H, J=8.9 Hz), 4.48(d, 1H, J=8.2 Hz), 4.29-4.25(m, 1H), 4.22-4.19(m, 1H), 4.14-4.10(m, 1H), 4.02-3.41(m, 39H), 2.08-2.05(m, 9H, Ac); MALDI TOF MS Calcd for C₈₄H₁₄₅N₁₃NaO₄₉⁺[M+Na]⁺: 1298.4, found 1299.4

10

【実施例3】

【0058】

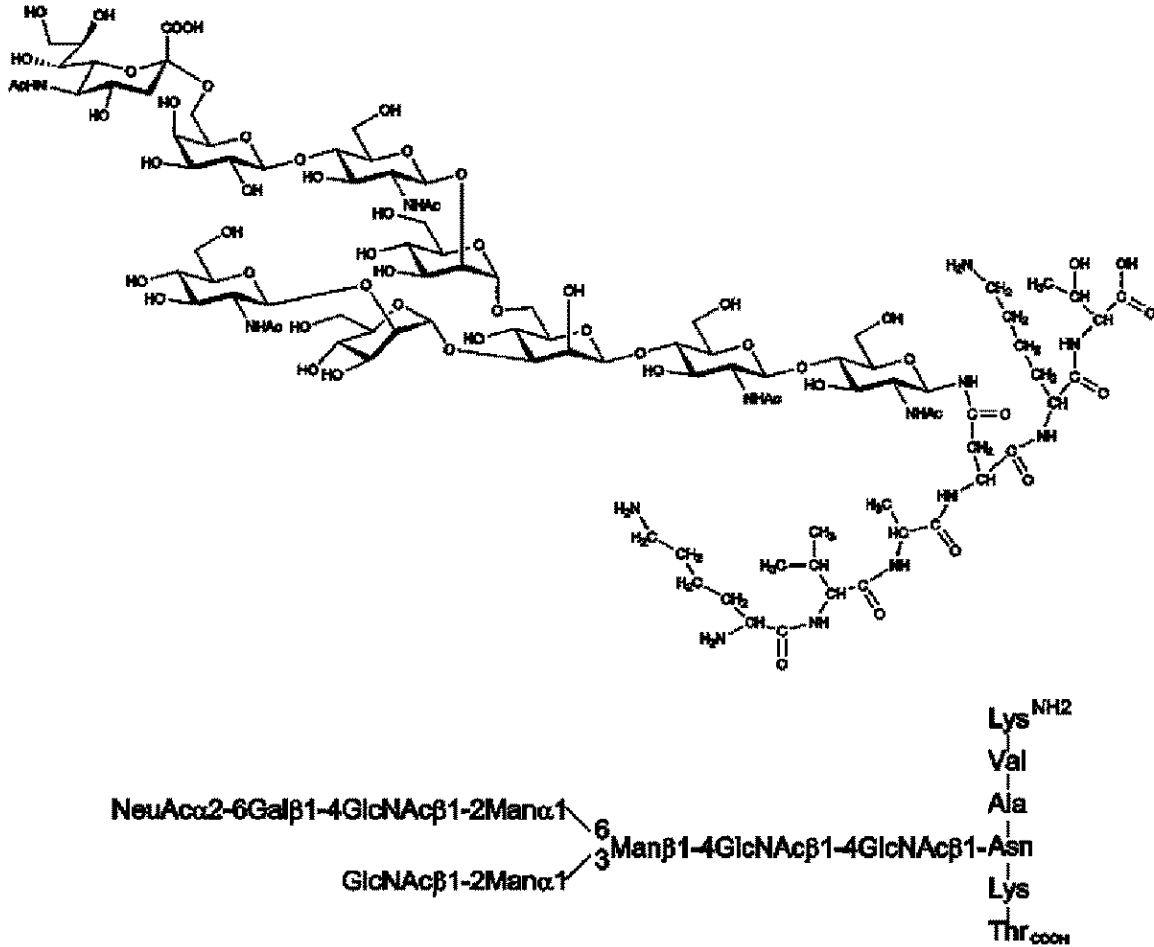
[式2で表される7糖オリゴ糖の調製と構造決定]

実施例1で得られた前記式5で表される10糖モノシリアルオリゴ糖ペプチド(16.1mg, 6.7μmol)を100mM NaCl含有50mMクエン酸ナトリウム緩衝液(pH=6.0)500μLに溶解させ、Bacteroides fragilis由来のガラクトシダーゼ(8000Units/mL)を50μL加えた。この溶液を37で加熱攪拌し、22時間後Bacteroides fragilis由来のガラクトシダーゼ(8000Units/mL)を75μL追加し、37で加熱攪拌を続けた。47時間後で反応液を凍結乾燥したのち、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー(Sephadex G-25、20mm×770mm、展開溶媒は0.1%アンモニア水溶液)で脱塩し、下記式8で表される8糖オリゴ糖ペプチド15.7mg(収率97%)得た。

20

式8:

【化10】



【0059】

前記式8で表される9糖オリゴ糖ペプチドの物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) 5.12 (s, 1H), 5.05 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 4.95 (s, 1H), 4.71 - 4.66 (m, 1H), 4.65 - 4.59 (m, 2H), 4.56 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 4.46 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 4.43 - 4.38 (m, 1H), 4.35 - 4.28 (m, 1H), 4.26 (bs, 1H), 4.23 (dd, 1H, $J = 4.1, 6.2$ Hz), 4.21 - 4.18 (m, 1H), 4.16 - 4.13 (m, 1H), 4.13 - 4.09 (m, 2H), 4.03 - 3.41 (m, 53H), 3.04 - 2.94 (m, 4H), 2.90 - 2.82 (m, 1H), 2.80 - 2.72 (m, 1H), 2.71 - 2.65 (dd, 1H, $J = 4.8, 12.4$ Hz), 2.11 - 2.02 (m, 1H), 2.09 (s, 3H, Ac), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.06 (s, 3H, Ac), 2.04 (s, 3H, Ac), 2.01 (s, 3H, Ac), 1.94 - 1.85 (m, 1H), 1.83 - 1.55 (m, 8H), 1.52 - 1.38 (m, 4H), 1.38 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.17 (d, 3H, $J = 6.2$ Hz), 1.02 - 0.92 (m, 6H); MALDI TOF MS Calcd for $\text{C}_{95}\text{H}_{163}\text{N}_{14}\text{O}_{57}^+ [\text{M} + \text{H}]^+$: 2412.0, found 2412.6

【0060】

前記式8で表される9糖オリゴ糖ペプチド(15.7mg, 6.5 μmol)を40mM塩酸水溶液600 μL に溶解し、80 $^\circ\text{C}$ で4時間過熱撹拌した。反応液に1M Na_2CO_3 水溶液を加えpH = 8としたのち、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー(Sephadex G-25、17mm \times 600mm、展開溶媒は0.1%アンモニア水溶液)で脱塩し、下記式9で表される8糖オリゴ糖ペプチド13.7mg(97%)を得た。下記

30

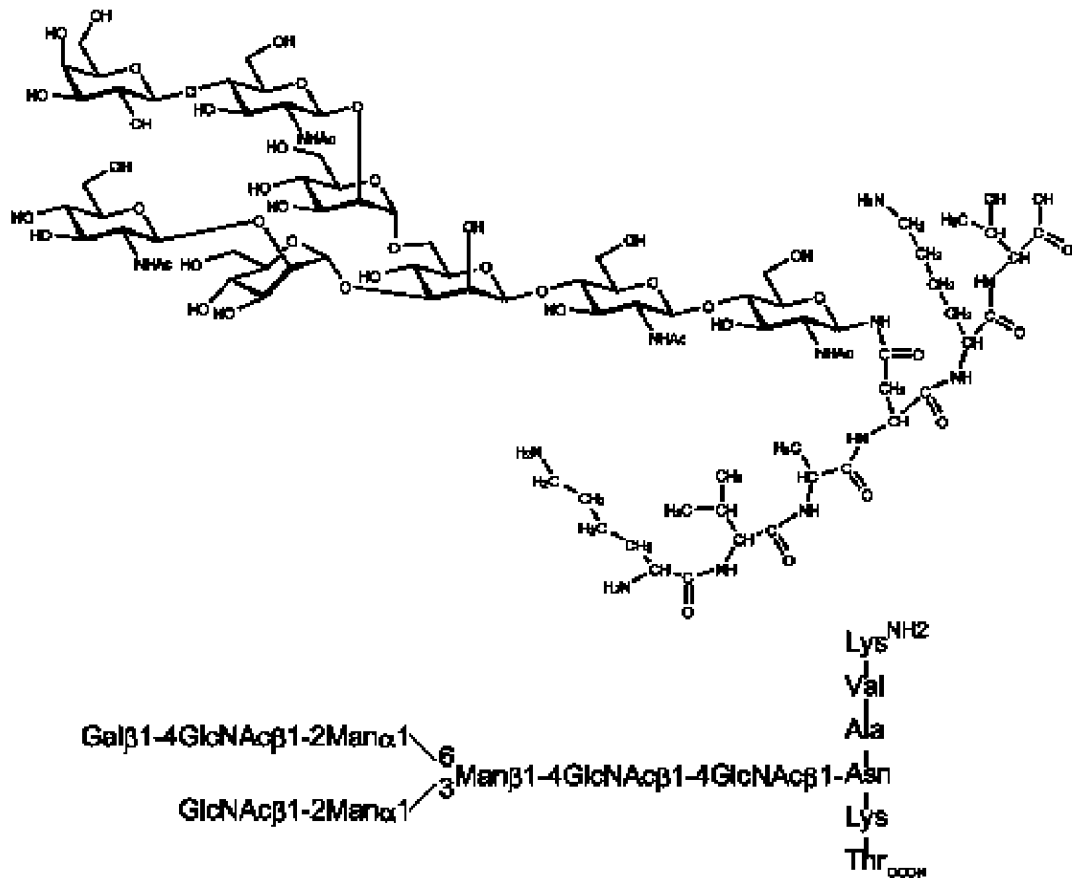
40

50

式 9 で表される 8 糖オリゴ糖ペプチドの衝突誘起解離スペクトル (MS 3 スペクトル) を図 4 (上段) に示す。図 4 (上段) のスペクトルにおいて Man 1 - 6 分岐側の Gal 1 - 4 GlcNAc 1 - 2 Man 残基が解離したフラグメントイオンの脱水イオンに由来するシグナル m/z 670 が観測されたことから、ガラクトース残基が Man 1 - 6 側鎖の非還元末端に結合していることを確認した。

式 9 :

【化 1 1】



【0061】

前記式 9 で表される 8 糖オリゴ糖ペプチドの物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) 5.15 (s, 1H), 5.07 (d, 1H, $J=9.6$ Hz), 4.96 (s, 1H), 4.74-4.69 (m, 1H), 4.64 (bd, 1H, $J=7.6$ Hz), 4.61 (d, 1H, $J=8.2$ Hz), 4.58 (d, 1H, $J=8.2$ Hz), 4.50 (d, 1H, $J=8.2$ Hz), 4.46-4.39 (m, 1H), 4.37-4.30 (m, 1H), 4.28 (bs, 1H), 4.27-4.20 (m, 1H), 4.22 (bd, 1H, $J=2.1$ Hz), 4.20-4.10 (m, 3H), 4.08-3.42 (m, 46H), 3.06-2.85 (m, 5H), 2.82-2.70 (m, 1H), 2.17-2.02 (m, 1H), 2.11 (s, 3H, Ac), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.03 (s, 3H, Ac), 1.96-1.86 (m, 1H), 1.85-1.74 (m, 1H), 1.74-1.57 (m, 6H), 1.55-1.34 (m, 7H), 1.19 (d, 3H, $J=6.2$ Hz), 1.04-0.94 (m, 6H); MALDI-TOF MS Calcd for $\text{C}_{84}\text{H}_{145}\text{N}_{13}\text{NaO}_{49}^+ [\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^+$: 2142.9, found 2143.8

【0062】

前記式 9 で表される 8 糖オリゴ糖ペプチド (13.7 mg, 6.5 μmol) をリン酸緩衝生理食塩水 225 μL に溶解し、Streptococcus pyogenes 由

来のエンド - - N - アセチルグルコサミニダーゼ ($1 \mu\text{g} / \mu\text{L}$) を $25 \mu\text{L}$ 加えた。反応液を 37°C で 24 時間過熱攪拌し、凍結乾燥した。凍結乾燥後の残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (イアトロビーズ $6\text{RS} - 8060$ (30mL)、展開溶媒 $0.1\% \text{NH}_4\text{OH} : \text{MeOH} : \text{EtOAc} = 1 : 1 : 2$ (400mL) を溶出したのち、 $0.1\% \text{NH}_4\text{OH} : \text{MeOH} = 1 : 1$ (200mL) を溶出)。溶出液を TLC で追跡し (発色液はアニスアルデヒド)、 R_f 値 = 0.8 にスポットが確認された溶出液を減圧濃縮した。濃縮後の残渣をゲルろ過カラムクロマトグラフィー (S e p h a d e x G - 25、 $17\text{mm} \times 540\text{mm}$ 、展開溶媒は 0.1% アンモニア水溶液) で脱塩し、前記式 2 で表される 7 糖オリゴ糖を 7.9mg (96%) 得た。

【0063】

式 2 で表される 7 糖オリゴ糖の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H} - \text{NMR}$ (D_2O) 5.22 (d, 1H , $J = 3.4 \text{ Hz}$), 5.12 (s, 1H), $4.94 - 4.92$ (m, 1H), $4.81 - 4.76$ (m, 1H), 4.59 (d, 1H , $J = 8.2 \text{ Hz}$), 4.56 (d, 1H , $J = 8.2 \text{ Hz}$), 4.47 (d, 1H , $J = 7.6 \text{ Hz}$), $4.29 - 4.24$ (m, 1H), $4.21 - 4.18$ (m, 1H), 4.12 (dd, 1H , $J = 1.4, 3.4 \text{ Hz}$), $4.03 - 3.41$ (m, 39H), $2.08 - 2.04$ (m, 9H , $\text{Ac} \times 3$); MALDI TOF MS Calcd for $\text{C}_{84}\text{H}_{145}\text{N}_{13}\text{NaO}_4$ $9^+ [\text{M} + \text{Na}]^+$: 1298.4 , found 1297.3

【実施例 4】

【0064】

[式 1 で表される 7 糖オリゴ糖のワンポット合成]

実施例 1 で得られた前記式 4 で表される 10 糖モノシアリルオリゴ糖ペプチド (3.0mg , $1.2 \mu\text{mol}$) を 50mM リン酸緩衝液 ($\text{pH} 6.0$) $115.83 \mu\text{L}$ に溶解し、*Bacteroides thetaiotaomicron* 由来のガラクトシダーゼ ($3 \mu\text{g} / \mu\text{L}$) を $1.17 \mu\text{L}$ 加えた。反応液を 37°C で 21 時間過熱攪拌したのち、 70°C で 1 時間加熱しガラクトシダーゼを失活させた。次に、*Clostridium perfringens* 由来のノイラミニダーゼ ($5000 \text{ units} / \text{mL}$) を $10 \mu\text{L}$ 加えた。 37°C で 2 時間加熱攪拌したのち、*Streptococcus pyogenes* 由来のエンド - - N - アセチルグルコサミニダーゼ ($1 \mu\text{g} / \mu\text{L}$) を $5 \mu\text{L}$ 加えた。反応液を 37°C で 20 時間過熱攪拌したのち、凍結乾燥した。凍結乾燥後の残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (イアトロビーズ $6\text{RS} - 8060$ (10mL)、展開溶媒 $0.1\% \text{NH}_4\text{OH} : \text{MeOH} : \text{EtOAc} = 1 : 1 : 2$ (45mL) ~ $0.1\% \text{NH}_4\text{OH} : \text{MeOH} = 1 : 1$ (30mL) を溶出)。溶出液を TLC で追跡し (発色液はアニスアルデヒド)、 R_f 値 = 0.8 にスポットが確認された溶出液を減圧濃縮した。濃縮後の残渣をゲルろ過カラムクロマトグラフィー PD - 10 (GEヘルスケアジャパン (株)、製品コード 17085101 、展開溶媒は脱イオン水) で脱塩し、前記式 1 で表される 7 糖オリゴ糖を 1.2mg (86%) 得た。実施例 2 で合成した 7 糖オリゴ糖と $^1\text{H} - \text{NMR}$ スペクトルが一致したことから、構造を決定した。

【実施例 5】

【0065】

[式 2 で表される 7 糖オリゴ糖のワンポット合成]

実施例 1 で得られた前記式 5 で表される 10 糖モノシアリルオリゴ糖ペプチド (3.4mg , $1.3 \mu\text{mol}$) を 50mM リン酸緩衝液 ($\text{pH} 6.0$) $130.68 \mu\text{L}$ に溶解し、*Bacteroides thetaiotaomicron* 由来のガラクトシダーゼ ($3 \mu\text{g} / \mu\text{L}$) を $1.32 \mu\text{L}$ 加えた。反応液を 37°C で 21 時間過熱攪拌したのち、 70°C で 1 時間加熱しガラクトシダーゼを失活させた。次に、*Clostridium perfringens* 由来のノイラミニダーゼ ($5000 \text{ units} / \text{mL}$) を $10 \mu\text{L}$ 加えた。 37°C で 2 時間加熱攪拌したのち、*Streptococcus pyogenes* 由来のエンド - - N - アセチルグルコサミニダーゼ ($1 \mu\text{g} / \mu\text{L}$) を $5 \mu\text{L}$

10

20

30

40

50

L 加えた。反応液を 37 で 20 時間過熱攪拌したのち、凍結乾燥した。凍結乾燥後の残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（イアトロビーズ 6RS - 8060 (10 mL)、展開溶媒 0.1% NH₄OH : MeOH : EtOAc = 1 : 1 : 2 (45 mL) ~ 0.1% NH₄OH : MeOH = 1 : 1 (30 mL) を溶出)。溶出液を TLC で追跡し（発色液はアニスアルデヒド）、R_f 値 = 0.8 にスポットが確認された溶出液を減圧濃縮した。濃縮後の残渣をゲルろ過カラムクロマトグラフィー PD-10 (GEヘルスケアジャパン (株)、製品コード 17085101、展開溶媒は脱イオン水) で脱塩し、前記式 2 で表される 7 糖オリゴ糖 1.7 mg (quant.) 得た。実施例 3 で合成した 7 糖オリゴ糖と ¹H-NMR スペクトルが一致したことから、構造を決定した。

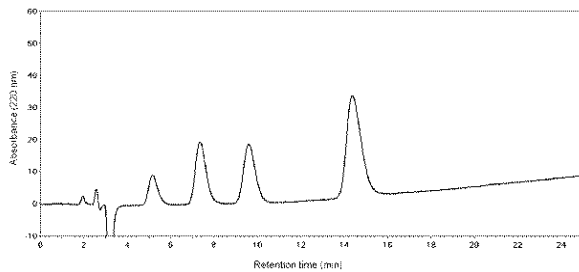
【産業上の利用可能性】

【0066】

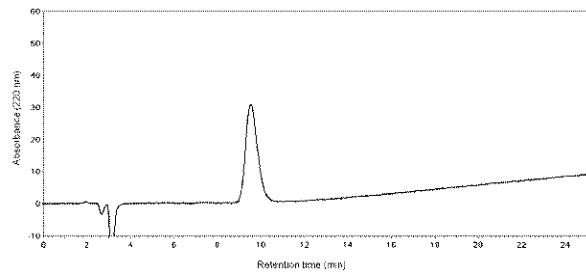
本発明によれば、2 本鎖のうち一方の側鎖の非還元末端にガラクトースが 1 残基結合した 2 種類の 7 糖オリゴ糖を簡便かつ収率良く製造する方法を提供することができる。7 糖オリゴ糖は、抗体医薬品の主要構成成分である G1 糖鎖を有する抗体の糖鎖供給源であり、新しい医薬品を製造するための原料として利用できる可能性がある。

10

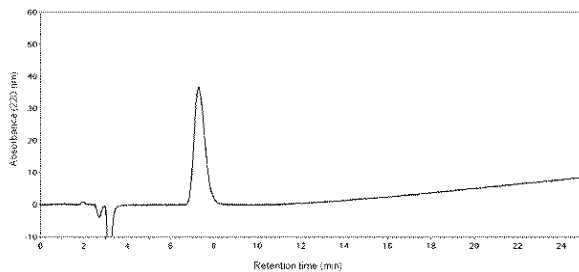
【図 1】



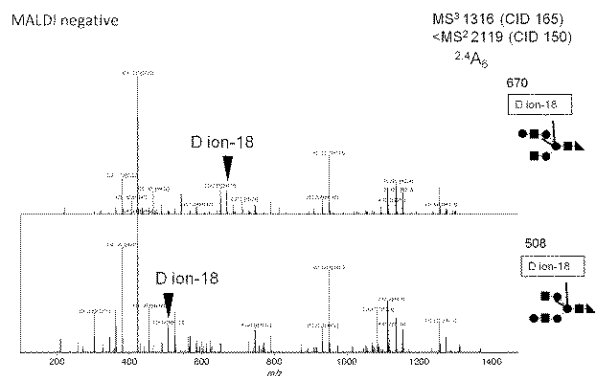
【図 3】



【図 2】



【図 4】



【配列表】

0006618176000001.app

フロントページの続き

審査官 伊藤 佑一

(56)参考文献 特開2003-128703(JP,A)
特表2015-507925(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C08B

CAplus/REGISTRY(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)