

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
28. September 2006 (28.09.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2006/100253 A3

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12P 19/18 (2006.01) C08B 37/00 (2006.01)  
C07H 3/06 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2006/060932

(22) Internationales Anmeldedatum:  
22. März 2006 (22.03.2006)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
05102284.6 22. März 2005 (22.03.2005) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): Technische Universität Braunschweig [DE/DE]; Pockelsstr. 14, 38106 Braunschweig (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BUCHHOLZ, Klaus

[DE/DE]; Rüniger Weg 44, 38124 Braunschweig (DE). SEIBEL, Jürgen [DE/DE]; Siedlung 16, 37276 Meinhard (DE). JÖRDENING, Hans-Joachim [DE/DE]; Schulstr. 7, 38172 Erkerode (DE). BEINE, Raphael [DE/DE]; Hagenring 63, 38106 Braunschweig (DE).

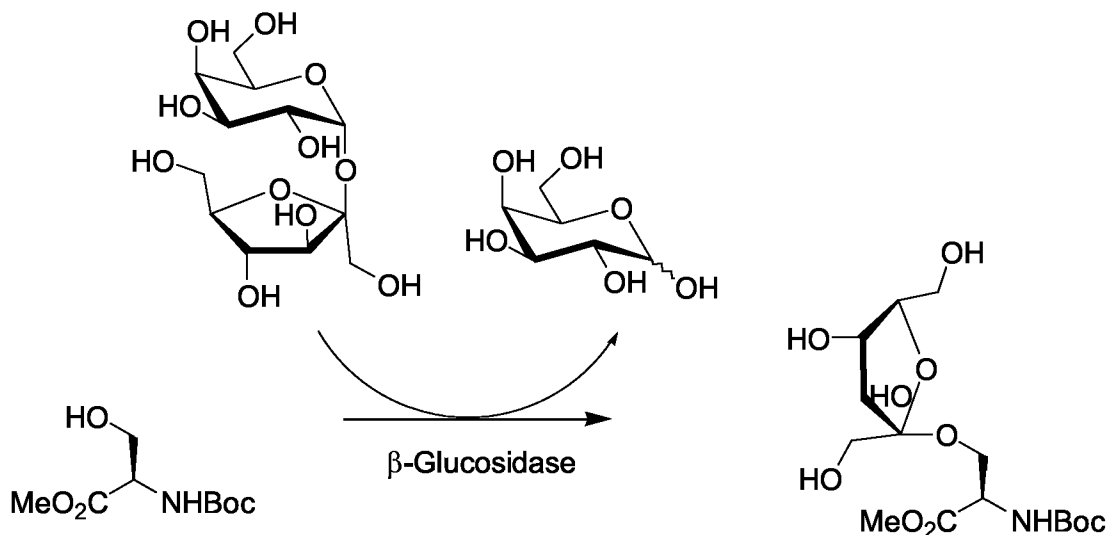
(74) Anwalt: TARUTTIS, Stefan; Vahrenwalder Str. 7, 30165 Hannover (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR SYNTHESIZING OLIGOSACCHARIDES OR FOR GLYCOSYLATION USING GLYCOSYL TRANSFERASES AND SUCROSE ANALOGUES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR OLIGOSACCHARIDSYNTHESE ODER ZUR GLYKOSYLIERUNG UNTER VERWENDUNG VON GLYCOSYLTRANSFERASEN UND SACCHAROSE-ANALOGA



(57) Abstract: The invention relates to an enzymatic method for synthesizing oligosaccharides, whereby one saccharide group of a sucrose analogue each is transferred onto an acceptor molecule, for example for glycosylating a hydroxyl compound, a saccharide, peptide, or a drug. According to the inventive method, an enzymatic synthesis of β-D-fructofuranosyl-α-D-aldopyranoside is carried out in a first step, and in a second step one of the saccharide groups is enzymatically transferred onto the acceptor molecule.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein enzymatisches Verfahren zur Synthese von Oligosacchariden, bei dem jeweils eine Saccharidgruppe eines Saccharose-Analogons auf ein Akzeptormolekül übertragen wird, beispielsweise zur Glykosylierung einer Hydroxylverbindung, eines Saccharids, Peptids, oder eines Arzneimittels. Das erfindungsgemäße Verfahren nutzt in einem ersten Schritt die enzymatische Synthese eines β-D-Fructofuranosyl-α-D-Aldopyranosids, in einem zweiten Schritt die enzymatische Übertragung eines der Saccharidreste auf das Akzeptormolekül.

WO 2006/100253 A3



**(84) Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

— mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

**(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen**

**Recherchenberichts:**

26. April 2007

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2006/060932

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12P19/18 C07H3/06 C08B37/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12P C07H C08B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, FSTA, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FEINGOLD, D.S. ET AL.: "Enzymatic synthesis and reactions of a sucrose isomer alpha-D-galactopyranosyl-beta-D-fructofuranoside" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 224, no. 1, 1957, pages 295-307, XP002415395	1-4, 8-14, 16-18
A	page 295, line 1 - page 296, line 11 page 297, line 26 - page 298, line 36 page 300, line 12 - line 27 page 306, line 10 - line 21 ----- -/--	5-7,15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  18 January 2007		Date of mailing of the international search report  30/01/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Fuchs, Ulrike

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2006/060932

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEETHAM, P.S.J. ET AL.: "Synthesis of novel disaccharides by a newly isolated fructosyl transferase from <i>Bacillus subtilis</i> " ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, vol. 11, no. 4, 1989, pages 212-219, XP002415396	1-4, 8-11,13, 14
A	the whole document  siehe insbesondere: abstract page 216, column 1, line 44 - page 217, column 1, line 20; tables 3,4	5-7,12, 15-18
X	MAZZA, J.C. ET AL.: "Synthesis of alpha-D-glycopyranosyl alpha-L-sorbofuranoside, and its use as a D-glucosyl donor" CARBOHYDRATE RESEARCH, vol. 40, no. 2, 1975, pages 402-406, XP002415397	1-3,5-7, 10,11,14
A	the whole document  siehe insbesondere: abstract page 403, line 30 - line 37 page 404, line 26 - line 42 page 405, line 26 - line 34	4,8,9, 12,13, 15-18
X	TANAKA, T. ET AL.: "Structures of Heterooligosaccharides Synthesized by Levansucrase" JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 90, no. 2, 1981, pages 521-526, XP008073464	16-18
A	page 522, column 2, line 26 - page 523, column 1, line 16 page 524; tables I,II page 525, column 1, line 7 - column 2, line 38; table III	1-15
X	WO 01/90319 A2 (NEDERLANDSE ORGANISATIE VOOR TOEGEPASTWETENSCHAPPELIJK ONDERZOEK) 29 November 2001 (2001-11-29)	16-18
A	page 6, paragraphs 18,19 page 21; claims 1-9	1-15
A	BÖKER, M. ET AL.: "Kinetics of leucrose formation from sucrose by dextransucrase" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 43, no. 9, 1994, pages 856-864, XP002415398 cited in the application the whole document	1-18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2006/060932

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DEMUTH, K. ET AL.: "Oligosaccharide synthesis by dextransucrase: new unconventional acceptors" CARBOHYDRATE RESEARCH, vol. 337, no. 20, 2002, pages 1811-1820, XP004392177 the whole document -----	1-18

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/060932

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0190319	A2	AU 6079101 A CA 2409965 A1	03-12-2001 29-11-2001

---

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C12P19/18 C07H3/06 C08B37/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C12P C07H C08B		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, FSTA, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FEINGOLD, D.S. ET AL.: "Enzymatic synthesis and reactions of a sucrose isomer alpha-D-galactopyranosyl-beta-D-fructofuranoside" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 224, Nr. 1, 1957, Seiten 295-307, XP002415395	1-4, 8-14, 16-18
A	Seite 295, Zeile 1 - Seite 296, Zeile 11 Seite 297, Zeile 26 - Seite 298, Zeile 36 Seite 300, Zeile 12 - Zeile 27 Seite 306, Zeile 10 - Zeile 21 ----- -/--	5-7, 15
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</li> <li>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</li> <li>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</li> <li>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</li> <li>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</li> <li>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</li> <li>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</li> <li>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</li> <li>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</li> <li>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</li> </ul>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
18. Januar 2007	30/01/2007	
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Fuchs, Ulrike	

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEETHAM, P.S.J. ET AL.: "Synthesis of novel disaccharides by a newly isolated fructosyl transferase from Bacillus subtilis" ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, Bd. 11, Nr. 4, 1989, Seiten 212-219, XP002415396	1-4, 8-11,13, 14
A	das ganze Dokument  siehe insbesondere: Zusammenfassung Seite 216, Spalte 1, Zeile 44 - Seite 217, Spalte 1, Zeile 20; Tabellen 3,4	5-7,12, 15-18
X	MAZZA, J.C. ET AL.: "Synthesis of alpha-D-glycopyranosyl alpha-L-sorbofuranoside, and its use as a D-glucosyl donor" CARBOHYDRATE RESEARCH, Bd. 40, Nr. 2, 1975, Seiten 402-406, XP002415397	1-3,5-7, 10,11,14
A	das ganze Dokument  siehe insbesondere: Zusammenfassung Seite 403, Zeile 30 - Zeile 37 Seite 404, Zeile 26 - Zeile 42 Seite 405, Zeile 26 - Zeile 34	4,8,9, 12,13, 15-18
X	TANAKA, T. ET AL.: "Structures of Heterooligosaccharides Synthesized by Levansucrase" JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 90, Nr. 2, 1981, Seiten 521-526, XP008073464	16-18
A	Seite 522, Spalte 2, Zeile 26 - Seite 523, Spalte 1, Zeile 16 Seite 524; Tabellen I,II Seite 525, Spalte 1, Zeile 7 - Spalte 2, Zeile 38; Tabelle III	1-15
X	WO 01/90319 A2 (NEDERLANDSE ORGANISATIE VOOR TOEGEPASTWETENSCHAPPELIJK ONDERZOEK) 29. November 2001 (2001-11-29)	16-18
A	Seite 6, Absätze 18,19 Seite 21; Ansprüche 1-9	1-15
A	BÖKER, M. ET AL.: "Kinetics of leucrose formation from sucrose by dextransucrase" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, Bd. 43, Nr. 9, 1994, Seiten 856-864, XP002415398 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-18
	----- -/--	

## C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DEMUTH, K. ET AL.: "Oligosaccharide synthesis by dextransucrase: new unconventional acceptors" CARBOHYDRATE RESEARCH, Bd. 337, Nr. 20, 2002, Seiten 1811-1820, XP004392177 das ganze Dokument -----	1-18

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/060932

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0190319	A2 29-11-2001	AU 6079101 A CA 2409965 A1	03-12-2001 29-11-2001
-----			