I510627

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I510627 B**

(45)公告日： 中華民國 104 (2015) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：102129714 (22)申請日： 中華民國 102 (2013) 年 08 月 19 日

(51)Int. Cl.： *C12P19/18 (2006.01)* *C07H3/06 (2006.01)*
C07H15/02 (2006.01)

(30)優先權：2012/08/20 美國 61/684,974

(71)申請人：中央研究院 (中華民國) ACADEMIA SINICA (TW)
臺北市南港區研究院路 2 段 128 號

(72)發明人：翁啟惠 WONG, CHI HUEY (TW) ；吳宗益 WU, CHUNG TI (TW) ；蔡宗義 TSAI, TSUNG I (TW)

(74)代理人：李國光；張仲謙

(56)參考文獻：

US 6319695B1 US 2007202578A1

Zhang J. et al. "Large-scale synthesis of globotriose derivatives through recombinant E. coli." Org Biomol Chem. 2003, 1(17): 3048-53.

審查人員：吳姵諄

申請專利範圍項數：48 項 圖式數：10 共 134 頁

(54)名稱

寡醣之大規模酵素合成

LARGE SCALE ENZYMATIC SYNTHESIS OF OLIGOSACCHARIDES

(57)摘要

本發明係提供一種 UDP-Gal 再生的方法及其與半乳糖基轉移酶的組合使用，將半乳糖添加至適當的受體基質。本發明進一步揭露大規模生產 Globo 系列寡醣的合成方法，其中該方法可涉及糖基轉移酶反應與核苷酸糖再生方法的組合。

A novel UDP-Gal regeneration process and its combined use with a galactosyltransferease to add galactose to a suitable acceptor substrate. Also described herein are synthetic methods for generating Globo-series oligosaccharides in large scale, wherein the methods may involve the combination of a glycosyltransferase reaction and a nucleotide sugar regeneration process.

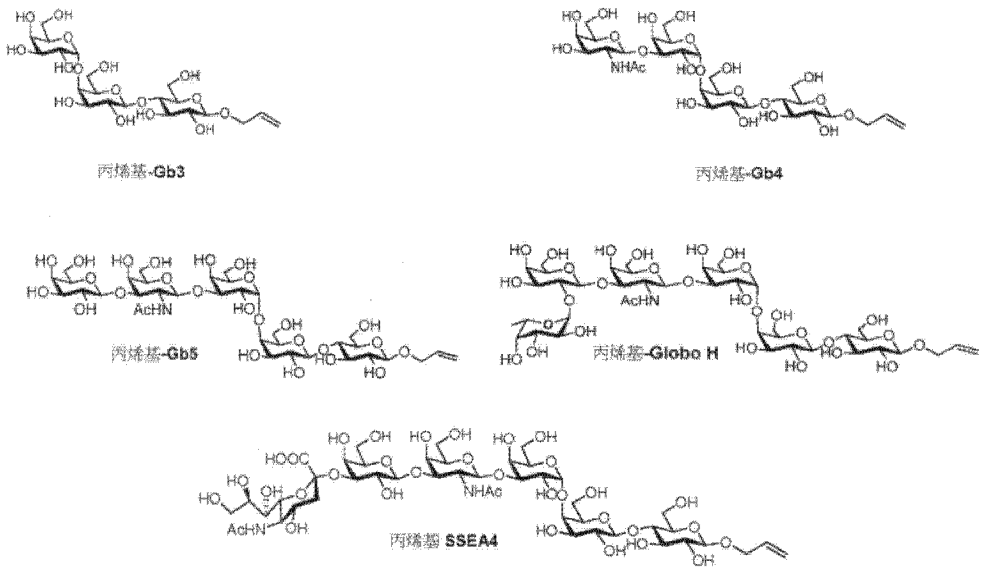


圖 1

104年 09月 07日 修正替換頁

【發明說明書】

【中文發明名稱】 寡醣之大規模酵素合成

【英文發明名稱】 LARGE SCALE ENZYMATIC SYNTHESIS OF OLIGOSACCHARIDES

【技術領域】

【0001】 本發明係提供一種UDP-Gal再生的方法及其與半乳糖基轉移酶的組合使用，將半乳糖添加至適當的受體基質。本發明進一步揭露大規模生產Globo系列寡醣的合成方法，其中該方法可涉及醣基轉移酶反應與核苷酸醣再生方法的組合。

【先前技術】

【0002】 Globo五醣(Globopentaose (Gb5))、岩藻糖-Gb5 (Globo H)及唾液酸-Gb5 (SSEA4)係Globo系列的鞘醣脂(glycosphingolipid)，其係於1983年首次在經培養人類畸胎癌細胞株中被發現[1]，其後陸續在數種惡性腫瘤中被發現[2,3]。報告顯示，在乳癌患者身上Globo H的過度表現高達61%，Gb5的過度表現達77.5%及SSEA4 的過度表現達95%。[4]另一方面，基因HER2 (一種與治療性單株抗體Trastuzumab (Herceptin)HER2/neu受體具有交互作用的標靶)在乳癌患者身上的過度表現僅達25%。[5]該等比較清楚顯示鞘醣脂抗原(Gb5及其衍生物，Globo H及SSEA4)乃作為發展癌症疫苗的更佳選擇。因此，目前在一些國家業已將 Globo H共軛至血藍蛋白(KLH)作為癌症疫苗，並已進入第三期臨床試驗。[6]

【0003】現行用來合成Gb5、Globo H及SSEA4的方法存在一些缺點。傳統化學合成法過於繁瑣且費力，需要一些保護及去保護步驟才能獲致高純度及正確的型式，因此往往導致產量極低。迄今雖有諸多關於化學合成Globo H的相關報告。[7] [8] [9] [10] [11] [12] [13] [14] 然而，僅有兩篇被發表的報告是關於SSEA4 的合成。Hsu等人發表1鍋法(one-pot)化學合成法來製備SSEA-4的多醣部分，其產其產率為24%[15] Zhen等人發表利用化學酵素方法合成毫克規模之SSEA-4。[16]另一方面，基於Leloir-type醣基轉移酶之酵素性合成Globo H僅需將活化核苷酸醣為供體來催化醣化反應。然而，醣核苷酸成本過高，不適合大規模的合成。再者，副產物焦糖酸鹽(pyrophosphate)及核苷二磷酸鹽(nucleoside diphosphate)會抑制焦醣酸化酶及Leloir-type 醣基轉移酶在核苷酸醣的形成；因此，需要發展新的策略以克服現行技術的限制，並且可將核苷酸再充電來達到核苷酸醣產物之構建，進而使反應的完成。過去數年間，有許多團隊致力於解決醣核苷酸再生的主要問題，且大部分有關醣核苷酸再生的問題業已獲得解決。然而，關於醣核苷酸再生的技術仍有進步改善的空間，特別在於UDP-Gal的再生非常困難。例如，UDP-Gal的再生首次於1982年由Wong以及Whiteside所提出，其係藉由UDP-Glc C4 表異構酶(epimerase)來將UDP-Glc與UDP-Gal交互轉換。[17]十年過後，本發明團隊發展出二級UDP-Gal再生方法。其並不使用UDP-Glc C4 表異構酶，而是利用位於大腸桿菌乳糖操縱子中的Glc-1-磷酸尿苷醯轉移酶(uridylyltransferase)將Gal-1-磷酸鹽及UDP-Glc交換為Glc-1-磷酸鹽及UDP-Gal。[18]然而，在缺少適合的酵素下，最後直接將UTP 及Gal-1-磷酸鹽縮合形成UDP-Gal的步驟確無法完成。由

於標的化合物Gb5、Globo H及SSEA4為Gal有關分子，故如何克服UDP-Gal再生的主要困難並增加其效率即為大規模酵素合成Gb5、Globo H及SSEA4的關鍵。

【0004】綜上，現行大規模合成Gb5、Globo H及SSEA4仍存在諸多限制。因此，仍需要提供一種新穎的合成方法，能更有效率製備Gb5、Globo H、SSEA4及其中間物。

【發明內容】

【0005】本發明係關於一種核苷酸醣再生的方法及其於醣類合成的應用。該醣類合成方法涉及至少一種核苷酸醣再生系統(例如本文所描述之UDP-Gal再生系統)與至少一種醣基轉移酶(例如半乳糖基轉移酶)之組合，且該醣類合成方法以不可預期的高效率被用於合成各種寡糖(尾式(tailed))，包括丙烯基-尾式Gb3、Gb4、Gb5 (亦被認知為SSEA3)、岩藻糖-Gb5 (亦被認知為Globo H)及唾液酸-Gb5 (亦被認知為SSEA4)。特言之，本發明合成方法允許鏈式反應生成諸如Globo H及SSEA4等終產物，而無純化中間物之必要。

【0006】因此，本發明某一方面關於一種將半乳糖殘基添加至基質中的方法，其係藉由連結半乳糖轉移酶與UDP-Gal再生方法之反應而達成。本發明方法包括：(i)在UDP-Gal再生酵素組存在下，自半乳糖生成UDP-Gal，其中該UDP-Gal再生酵素組包含半乳糖激酶、UDP-醣焦磷酸化酶(UDP-sugar pyrophosphorylase)、丙酮酸激酶及視情況之焦磷酸化酶；(ii)將UDP-Gal與基質分子(例如多醣、寡醣、醣蛋白、醣脂或配醣基

(aglycone))藉由半乳糖轉移酶(例如α-1,4-半乳糖轉移酶、β-1,4-半乳糖轉移酶、α-1,3-半乳糖轉移酶或β-1,3-半乳糖轉移酶)進行反應，在該基質分子上添加半乳糖殘基；及視需要(iii)分離所生成的半乳糖化產物。步驟(i)及(ii)可在一包含該UDP-Gal再生酵素組、該半乳糖轉移酶、該基質分子、半乳糖、ATP及UTP的反應混合物中進行。在某些實例中，該基質分子為神經醯胺或鞘糖脂。

【0007】 本發明另一方面關於合成寡糖的方法，其係涉及至少一種核苷酸醣再生方法(例如UDP-Gal再生)及至少一種藉由醣基轉移酶(例如半乳糖轉移酶、岩藻糖轉移酶、唾液酸轉移酶或N-乙醯半乳糖胺轉移酶)之活性將單糖(例如半乳糖(Gal)、N-乙醯半乳糖胺(GalNAc)、岩藻糖(Fuc)及唾液酸(Neu5Ac))添加至合適之受體的反應。

【0008】 在某些實例中，本發明方法係利用乳糖(例如尾式)作為起始物，以酵素性方式合成寡醣。該方法包括：(i)在UDP-Gal再生酵素組之存在下，自半乳糖生成UDP-Gal，其中該UDP-Gal再生酵素組包含半乳糖激酶(例如來自大腸桿菌)、UDP-醣焦磷酸化酶(例如來自擬南芥(*A. thaliana*))、丙酮酸激酶(例如來自大腸桿菌)及視情況之焦磷酸化酶(例如來自大腸桿菌)；(ii)在UDP-Gal及α-1,4半乳糖轉移酶(例如LgtC (諸如來自腦膜炎雙球菌(*N. meningitides*))存在下，將Lac-OR^{1A}轉換為Gb3-OR^{1A}，其中R^{1A}為氫、經取代或未經取代之烷基、經取代或未經取代之烯基、經取代或未經取代之炔基、經取代或未經取代之環碳基、經取代或未經取代之雜環基、經取代或未經取代之芳基、經取代或未經取代之雜芳基或氧保護基團。

【0009】 R^{1A}的實例包括，但不限於氫、丙烯基、生物素、神經醯胺、或非氫基團(如烷基)，其係進一步被經取代或未經取代之硫、經取代或未經取代之胺基、羰基(例如，羧酸)、疊氮、烯基(例如，丙烯基)、炔基(例如，丙炔基)、生物素或神經醯胺所取代。某些特定的實例中，R^{1A}係氫、丙烯基、經取代之烷基、生物素或神經醯胺。

【0010】 如需要，Gb3-OR^{1A}可自反應混合物中分離。

【0011】 步驟(i)及(ii)可在Gb3-合成反應混合物中進行，該Gb3-合成反應混合物包括半乳糖、PEP、ATP、UTP、Lac-OR^{1A}、α-1,4-半乳糖轉移酶及UDP-Gal再生酵素組。一實例中，在任何酵素反應發生前，Lac-OR^{1A}與半乳糖在Gb3-合成反應混合物中的莫耳比為1：1。

【0012】 上述任一方法可進一步包括：(iii)在UDP-GalNAc及β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶(例如LgtD，其係來自適當生物體(如流感嗜血桿菌(*H. influenza*))存在下將Gb3-OR^{1A}轉換成Gb4-OR^{1A}，該步驟可與步驟(iv)結合，步驟(iv)包括在UDP-GalNAc再生酵素組存在下，自GalNAc生成UDP-GalNAc，其中該UDP-GalNAc再生酵素組包含N-乙醯己糖胺1-激酶(N-acetylhexosamine 1-kinase) (如來自龍根菌(*B. longum*))、N-乙醯己糖胺1-磷酸尿苷醯轉移酶(例如來自大腸桿菌)及丙酮酸激酶(例如來自大腸桿菌)，及視需要之焦磷酸化酶(例如來自大腸桿菌)。步驟(iii)及(iv)可在Gb-4合成反應混合物中進行，該反應混合物包含GalNAc、PEP、ATP、UTP、Gb3-OR^{1A}、β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶及UDP-GalNAc再生酵素組。本發明之一實例中，Gb-4合成反應混合物係藉由將Gb-3合成反應混合物至少與GalNAc、β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶、N-乙醯己糖胺1-激酶及

N-乙醯葡萄糖胺1-磷酸尿苷醯轉移酶混合製得。如需要，Gb4-OR^{1A}可自反應混合物中分離。

【0013】 Gb4-OR^{1A}合成之後，上述方法可進一步包括：(v)在UDP-Gal及β-1,3-半乳糖轉移酶(例如LgtD，其係來自如流感嗜血桿菌)存在下，將Gb4-OR^{1A}轉換為Gb5-OR^{1A}，該步驟可與步驟(vi)結合，步驟(vi)包括在本發明所述UDP-Gal再生酵素組存在下，自半乳糖生成UDP-Gal。本發明之一實例中，步驟(v)及(vi)係在Gb5-合成反應混合物中進行，該反應混合物包含半乳糖、PEP、ATP、UTP、Gb4-OR^{1A}、β-1,3-半乳糖轉移酶及UDP-Gal再生酵素組。產物Gb5-OR^{1A}可自反應混合物中分離。

【0014】 上述方法可進一步包括轉換Gb5-OR^{1A}之步驟，以獲致岩藻糖-Gb5-OR^{1A} (Globo H)或唾液酸-Gb5- OR^{1A} (SSEA4)。

【0015】 有關Globo H之合成，本發明方法可進一步包括：(vii)在GDP-Fuc及α-1,2-岩藻糖基轉移酶(如來自幽門螺旋桿菌(*H. pylor*))存在下，將Gb5-OR^{1A}轉換為岩藻糖基-Gb5-OR^{1A}，該步驟可與步驟(viii)結合，步驟(viii)包括在GDP-Fuc再生酵素組存在下，自岩藻糖生成GDP-Fuc，其中該GDP-Fuc再生酵素組包含L-岩藻糖激酶/GDP-岩藻糖焦磷酸化酶(例如來自脆弱擬桿菌(*B. fragilis*))、丙酮酸激酶(例如來自大腸桿菌)及焦磷酸化酶(例如來自大腸桿菌)。本發明之一實例中，步驟(vii)及(viii)係在岩藻糖基-Gb5-合成反應混合物中進行，該反應混合物包含岩藻糖、ATP、GTP、PEP、Gb5-OR^{1A}、α-1,2-岩藻糖基轉移酶及GDP-Fuc再生酵素組。岩藻糖基-Gb5-合成反應混合物係將Gb5-合成反應混合物與至少岩藻糖、GTP、

α-1,2-岩藻糖基轉移酶及L-岩藻糖激酶/GDP-岩藻糖焦磷酸化酶混合而得。如需要，產物岩藻糖基-Gb5-OR^{1A}可自反應混合物中分離。

【0016】 有關SSEA4之合成，本發明方法可進一步包括：(ix)在CMP-Neu5Ac及α-2,3-唾液酸轉移酶(例如來自海洋細菌(*M. bacteria*))存在下，將Gb5-OR^{1A}轉換為唾液酸-Gb5-OR^{1A}，及(x)：在CMP-Neu5Ac再生酵素組存在下，自Neu5Ac生成CMP-Neu5Ac，其中該CMP-Neu5Ac再生酵素組包含胞苷單磷酸激酶(例如來自大腸桿菌)、CMP-唾液酸合成酶(例如來自多殺性巴氏桿菌(*P. multocida*))、丙酮酸激酶(例如來自大腸桿菌)及視需要之焦磷酸化酶(例如來自大腸桿菌)。步驟(ix)及(x)可在唾液酸-Gb5-合成反應混合物中實施，該反應混合物包含Neu5Ac、CTP、PEP、Gb5-OR^{1A}、α-2,3-唾液酸轉移酶及CMP-Neu5Ac再生酵素組。唾液酸-Gb5-合成反應混合物係將Gb5-合成反應混合物與至少Neu5Ac、CTP、α-2,3-唾液酸轉移酶、胞苷單磷酸激酶及CMP-唾液酸合成酶混合而得。唾液酸-Gb5-OR^{1A}可自反應混合物中分離。

【0017】 本發明之一實例中，Globo H合成方法之實施方式如下：(i)在本發明所述UDP-Gal再生酵素存在下，自半乳糖生成UDP-Gal；(ii)在Gb3-合成反應混合物中將本發明所述之Lac-OR^{1A}轉換為Gb3-OR^{1A}，其中該反應混合物包含至少UDP-Gal、α-1,4半乳糖基轉移酶及UDP-Gal 再生酵素；(iii)將Gb3-合成反應混合物與至少GalNAc、β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶、N-乙醯己糖胺1-激酶及N-乙醯葡萄糖胺1-磷酸尿苷醯轉移酶混合以形成Gb4-合成混合物；(iv)在允許轉換Gb3-OR^{1A}為Gb4-OR^{1A} 之條件下，培養Gb4-合成反應混合物；(v)進一步在允許Gb4-OR^{1A}轉換為Gb5-OR^{1A}

之條件下，在1,3-半乳糖轉移酶存在下培養Gb4-合成反應混合物；(vi)將含有Gb5-OR^{1A}之反應混合物與至少岩藻糖、GTP、α-1,2-岩藻糖轉移酶及L-岩藻糖激酶/GDP-岩藻糖焦磷酸化酶混合以形成岩藻糖-Gb5-OR^{1A}反應混合物；(vii)在允許轉換Gb5-OR^{1A}為岩藻糖-Gb5-OR^{1A}之條件下，培養岩藻糖-Gb5-OR^{1A}反應混合物；及視需要(viii)分離岩藻糖-Gb5-OR^{1A}。

【0018】本發明另一實例中，Globo H之合成方法之實施方式如下：(i)如本發明所述，在UDP-Gal再生酵素存在下，自半乳糖生成UDP-Gal；(ii)如本發明所述，在Gb3-合成反應混合物中將Lac-OR^{1A}轉換為Gb3-OR^{1A}，其中該反應混合物包含至少UDP-Gal、α-1,4 半乳糖轉移酶及UDP-Gal再生酵素；(iii)將Gb3-合成反應混合物與至少GalNAc、β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶、N-乙醯己糖胺1-激酶及N-乙醯葡萄糖胺1-磷酸尿苷醯轉移酶混合以形成Gb4-合成混合物；(iv)在允許轉換Gb3-OR^{1A}為Gb4-OR^{1A}之條件下，培養Gb4-合成反應混合物；(v)分離Gb4-OR^{1A}；(vi)將Gb4-OR^{1A} 與β-1,3-半乳糖轉移酶及UDP-Gal再生酵素組予以混合以形成Gb5-合成反應混合物；(vii)在允許轉換Gb4-OR^{1A}為Gb5-OR^{1A}之條件下，培養Gb5-合成反應混合物；(viii)將Gb5-合成反應混合物與至少岩藻糖、GTP、α-1,2-岩藻糖轉移酶及L-岩藻糖激酶/GDP-岩藻糖焦磷酸化酶混合以形成岩藻糖-Gb5-OR^{1A}反應混合物；(ix)在允許轉換Gb5-OR^{1A}為岩藻糖-Gb5-OR^{1A}之條件下，培養岩藻糖-Gb5-OR^{1A}反應混合物；及視需要(x)分離岩藻糖-Gb5-OR^{1A}。

【0019】一種合成SSEA4方法的實施方式係如下：(i)如本發明所述，在UDP-Gal再生酵素存在下，自半乳糖生成UDP-Gal；(ii)如本發明所

述，在Gb3-合成反應混合物中，將Lac-OR^{1A}轉換為Gb3-OR^{1A}，其中該反應混合物包含至少UDP-Gal、α-1,4半乳糖轉移酶及UDP-Gal再生酵素；(iii)將Gb3-合成反應混合物與至少GalNAc、β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶、N-乙醯己糖胺1-激酶及N-乙醯葡萄糖胺1-磷酸尿苷醯轉移酶予以混合以形成Gb4-合成反應混合物；(iv)在允許轉換Gb3-OR^{1A}為Gb4-OR^{1A}之條件下，培養Gb4-合成反應混合物；(v)在允許轉換Gb4-OR^{1A} 為Gb5-OR^{1A}之條件下，在1,3-半乳糖轉移酶存在下，進一步培養Gb4-合成反應混合物；(vi)將Gb4-合成反應混合物與至少 Neu5Ac、CTP、α-2,3-唾液酸轉移酶、胞苷單磷酸激酶及CMP-唾液酸合成酶予以混合以形成唾液酸-Gb5-OR^{1A}反應混合物；(vii)在允許轉換Gb5-OR^{1A}為唾液酸-Gb5-OR^{1A}之條件下，培養唾液酸-Gb5-OR^{1A}反應混合物；及視需要(viii)分離唾液酸-Gb5-OR^{1A}。

【0020】 另一方面，一種合成SSEA4方法的實施方式係如下：(i)如本發明所述，在UDP-Gal再生酵素存在下，自半乳糖生成UDP-Gal；(ii)如本發明所述，在Gb3-合成反應混合物中將Lac-OR^{1A}轉換為Gb3-OR^{1A}，其中該反應混合物包含至少UDP-Gal、α-1,4半乳糖轉移酶及UDP-Gal再生酵素；(iii)將Gb3-合成反應混合物與至少GalNAc、β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶、N-乙醯己糖胺1-激酶及N-乙醯葡萄糖胺1-磷酸尿苷醯轉移酶予以混合以形成Gb4-合成反應混合物；(iv)在允許轉換Gb3-OR^{1A}為Gb4-OR^{1A}之條件下，培養Gb4-合成反應混合物；(v)分離Gb4-OR^{1A}；(vi)將Gb4-OR^{1A}與β-1,3-半乳糖轉移酶及UDP-Gal再生酵素組予以混合以形成Gb5-合成反應混合物；(vii)在允許轉換Gb4-OR^{1A}為Gb5-OR^{1A}之條件下，培養Gb5-合成反應混合物；(viii)將Gb5-OR^{1A}與α-2,3唾液酸轉移酶及CMP-Neu5Ac再

生酵素組予以混合以形成唾液酸-Gb5-合成反應混合物，其中該CMP-Neu5Ac再生酵素組包含胞苷單磷酸激酶、CMP-唾液酸合成酶、丙酮酸激酶及焦磷酸化酶；(ix)在允許轉換Gb4-OR^{1A}為唾液酸-Gb5-OR^{1A}之條件下，培養唾液酸-Gb5-合成反應混合物；及視需要(x)分離唾液酸-Gb5-OR^{1A}。

【0021】在一些實例中，本發明所述之方法係使用Gb3(例如，尾式)作為酵素性合成寡糖的起始材料。該方法包括：(i)如前所述，在UDP-GalNAc再生酵素組存在下，自GalNAc生成UDP-GalNAc，並在UDP-GalNAc及β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶存在下，將Gb3-OR^{1A}轉換為Gb4-OR^{1A}，其中R^{1A}為氫、經取代或未經取代之烷基、經取代或未經取代之烯基、經取代或未經取代之炔基、經取代或未經取代之環碳基、經取代或未經取代之雜環基、經取代或未經取代之芳基、經取代或未經取代之雜芳基或氧保護基團。R^{1A}的實例包括，但不限於氫、丙烯基、生物素、神經醯胺或一非氫基團(如烷基)，其係進一步被經取代或未經取代之硫、經取代或未經取代之胺基、羰基(例如，羧酸)、疊氮、烯基(例如，丙烯基)、炔基(例如，丙炔基)、生物素或神經醯胺基團所取代。某些特定的實例中，R^{1A}係氫、丙烯基、經取代之烷基、生物素或神經醯胺。步驟(i)及(ii)可在Gb4-合成反應混合物中進行，其中該反應混合物包含GalNAc、PEP、ATP、UTP、Gb3-OR1A、β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶及UDP-GalNAc再生酵素組。如需要，可分離Gb4-OR^{1A}。

【0022】上述方法可進一步包括：(iii)在UDP-Gal及β-1,3-半乳糖轉移酶存在下，將Gb4-OR^{1A}轉換為Gb5-OR^{1A}，該步驟可與步驟(iv)結合，步

驟(iv)包括如本發明所述的，在UDP-Gal再生酵素存在下，自半乳糖生成UDP-Gal。步驟(iii)及(iv)可在Gb5-合成反應混合物中進行，其中該反應混合物包含半乳糖、PEP、ATP、UTP、Gb4-OR^{1A}、β-1,3-半乳糖轉移酶及UDP-Gal再生酵素組。產物Gb5-OR^{1A} 可自反應混合物中分離而得。

【0023】根據本發明之一實例，可將Gb5-OR^{1A}再轉換為岩藻糖-Gb5-OR^{1A}，其方法如下：(v)在GDP-Fuc及α-1,2-岩藻糖轉移酶存在下，將Gb5-OR^{1A}轉換為岩藻糖-Gb5-OR^{1A}，該步驟可與步驟(vi)結合，步驟(vi)包括在本發明所述之GDP-Fuc再生酵素組存在下，自岩藻糖生成GDP-Fuc。步驟(v)及(vi)可在岩藻糖-Gb5-合成反應混合物中進行，該反應混合物包含岩藻糖、ATP、GTP、PEP、Gb5-OR^{1A}、α-1,2-岩藻糖轉移酶及GDP-Fuc再生酵素組。如需要，岩藻糖-Gb5-合成反應混合物係將Gb5-合成反應混合物與至少岩藻糖、GTP、α-1,2-岩藻糖轉移酶及L-岩藻糖激酶/GDP-岩藻糖焦磷酸化酶混合而得。本發明方法可進一步包括分離岩藻糖-Gb5-OR^{1A}。

【0024】本發明之另一實例，可將Gb5-OR^{1A}再轉換為唾液酸-Gb5-OR^{1A}，其方法如下：(vii)在CMP-Neu5Ac及α-2,3-唾液酸轉移酶存在下，將Gb5-OR^{1A}轉換為唾液酸-Gb5-OR^{1A}，該步驟可與步驟(viii)結合，步驟(viii)包括在本發明所述之CMP-Neu5Ac再生酵素組存在下，自Neu5Ac生成CMP-Neu5Ac。步驟(vii)及(viii)可在唾液酸-Gb5-合成反應混合物中進行，該反應混合物包含Neu5Ac、CTP、PEP、Gb5-OR^{1A}、α-2,3-唾液酸轉移酶及CMP-Neu5Ac再生酵素組。在特定實例中，唾液酸-Gb5-生成反應混合物係將Gb5-合成反應混合物與至少Neu5Ac、CTP、α-2,3-唾液酸轉移

酶、胞苷單磷酸激酶及CMP-唾液酸合成酶混合而得。產物唾液酸-Gb5-OR^{1A}可分離自反應混合物中。

【0025】根據本發明之其他實例，此處所述的方法係關於使用Gb4(例如，尾式)作為起始物以合成寡糖。該方法包括：(i)如本發明所述之UDP-Gal再生酵素組存在下，自半乳糖生成UDP-Gal；及(ii)在UDP-Gal及β-1,3-半乳糖轉移酶存在下，將Gb4-OR^{1A}轉換為Gb5-OR^{1A}，其中R^{1A}為氫、經取代或未經取代之烷基、經取代或未經取代之烯基、經取代或未經取代之炔基、經取代或未經取代之環碳基、經取代或未經取代之雜環基、經取代或未經取代之芳基、經取代或未經取代之雜芳基或氧保護基團。R^{1A}的實例包括，但不限於氫、丙烯基、生物素、神經醯胺或一非氫基團(如烷基)，其係進一步被經取代或未經取代之硫、經取代或未經取代之胺基、羰基(例如，羧酸)、疊氮、烯基(例如，丙烯基)、炔基(例如，丙炔基)、生物素或神經醯胺基團所取代。某些特定的實例中，R^{1A}係氫、丙烯基、經取代之烷基、生物素或神經醯胺。根據本發明方法，步驟(i)及(ii)可在Gb5-合成反應混合物中實施，該反應混合物包含半乳糖、PEP、ATP、UTP、Gb4-OR^{1A}、β-1,3-半乳糖轉移酶及UDP-Gal再生酵素組。另一方面或額外需要，Gb5-OR^{1A}可藉由分離而得。

【0026】上述方法可進一步包括：(iii)在GDP-Fuc及α-1,2-岩藻糖轉移酶存在下，將Gb5-OR^{1A}轉換為岩藻糖-Gb5-OR^{1A}，該步驟可與步驟(iv)結合，步驟(iv)包括如本發明所述之GDP-Fuc再生酵素組存在下，自岩藻糖生成GDP-Fuc。步驟(iii)及(iv)可在岩藻糖-Gb5-合成反應混合物中進行，該反應混合物包含岩藻糖、ATP、GTP、PEP、Gb5-OR^{1A}、α-1,2-岩

藻糖轉移酶及GDP-Fuc再生酵素組。岩藻糖-Gb5-合成反應混合物係將Gb5-合成反應混合物與至少岩藻糖、GTP、α-1,2-岩藻糖轉移酶及L-岩藻糖激酶/GDP-岩藻糖焦磷酸化酶混合而得。產物岩藻糖-Gb5-OR^{1A} 可自反應混合物中分離。

【0027】另一方面，上述方法可進一步包括：(v)在CMP-Neu5Ac及α-2,3-唾液酸轉移酶存在下，將Gb5-OR^{1A}轉換為唾液酸-Gb5-OR^{1A}，該步驟可與步驟(v)結合，步驟(v)包括在如本發明所述之CMP-Neu5Ac再生酵素套組存在下，自Neu5Ac生成CMP-Neu5Ac。步驟(v)及(vi)可在唾液酸-Gb5-合成反應混合物中進行，該反應混合物包含Neu5Ac、CTP、PEP、Gb5-OR^{1A}、α-2,3-唾液酸轉移酶及CMP-Neu5Ac再生酵素組。唾液酸-Gb5-合成反應混合物係將Gb5-合成應混合物與至少Neu5Ac、CTP、α-2,3-唾液酸轉移酶、胞苷單磷酸激酶及CMP-唾液酸合成酶混合而得。根據本發明方法所得之唾液酸-Gb5-OR^{1A} 可自反應混合物中分離。

【0028】根據本發明其他實例，此處所述方法係關於自Gb5合成岩藻糖-Gb5寡糖(Globo H)。該方法包括：(i)在如本發明所述之GDP-Fuc再生酵素套組存在下，自岩藻糖生成GDP-Fuc；(ii)在GDP-Fuc及α-1,2-岩藻糖轉移酶存在下，將Gb5-OR^{1A}轉換為岩藻糖-Gb5-OR^{1A}；及視需要(iii)分離岩藻糖-Gb5-OR^{1A}。步驟(i)及(ii)可在岩藻糖-Gb5-合成反應混合物中進行，該反應混合物包含岩藻糖、ATP、GTP、PEP、Gb5-OR^{1A}、α-1,2-岩藻糖轉移酶及GDP-Fuc再生酵素組。

【0029】根據本發明之其他實例，此處所述之方法係關於自Gb5合成唾液酸-Gb5寡糖(Globo H)。該方法包括：(i)在如本發明所述之

CMP-Neu5Ac再生酵素套組存在下，自Neu5Ac生成CMP-Neu5Ac；(ii)在CMP-Neu5Ac及α-2,3-唾液酸轉移酶存在下，將Gb5-OR^{1A}轉換為唾液酸-Gb5-OR^{1A}；及視需要(iii)分離唾液酸-Gb5-OR^{1A}。步驟(i)及(ii)可在唾液酸-Gb5-合成反應混合物中進行，該反應混合物包含Neu5Ac、CTP、PEP、Gb5-OR、α-2,3-唾液酸轉移酶及CMP-Neu5Ac再生酵素組。

【0030】 前述任一合成方法，不論所涉及之任一酵素或反應中之任一基質(例如，乳糖、Gb3、Gb4或Gb5)，其可固定於一支持體(support member)上。

【0031】 本發明之另一方面係有關於用於本發明寡糖合成方法之酵素反應器(emzymatic reactor)。該酵素反應器可包含一或多個下述之反應室(reaction chamber):

【0032】 合成Gb3-OR^{1A}之反應室，其中該室包含α-1,4-半乳糖轉移酶及UDP-Gal再生酵素組，其包含半乳糖激酶、UDP-糖焦磷酸化酶、丙酮酸激酶及視需要之焦磷酸化酶；

【0033】 合成Gb4-OR^{1A}之反應室，其中該室包含β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶及UDP-GalAc再生酵素組，其包含N-乙醯己糖胺1-激酶、N-乙醯葡萄糖胺1-磷酸尿苷醯轉移酶、丙酮酸激酶及視需要之焦磷酸化酶；

【0034】 合成Gb5-OR^{1A}之反應室，其中該室包含β-1,3-半乳糖轉移酶及UDP-Gal再生酵素組；

【0035】 合成岩藻糖-Gb5-OR^{1A}之反應室，其中該室包含α-1,2-岩藻糖轉移酶及GDP-Fuc再生酵素組，其包含L-岩藻糖激酶/GDP-岩藻糖焦磷酸化酶、丙酮酸激酶及視需要之焦磷酸化酶；及

【0036】 合成唾液酸-Gb5-OR^{1A}之反應室，其中該室包含α-2,3-唾液酸轉移酶及CMP-Neu5Ac再生酵素組，其包含胞苷單磷酸激酶、CMP-唾液酸合成酶、丙酮酸激酶及視需要之焦磷酸化酶。

【0037】 根據本發明之一些實例，該酵素反應器包含反應室如下：(a)及(b)；(a)、(b)及(c)；(a)、(b)、(c)及(d)；(a)、(b)、(c)及(e)；(b)及(c)；(b)、(c)及(d)；(b)、(c)及(e)；(c)及(d)或(c)及(e)。

【0038】 根據本發明之其他實例，此處所述之酵素反應器包含一反應室，該反應室包含半乳糖轉移酶(例如，α-1,4-半乳糖轉移酶、β-1,4-半乳糖轉移酶、α-1,3-半乳糖轉移酶或β-1,3-半乳糖轉移酶)及本發明所述之UDP-Gal再生酵素組，其可包含半乳糖激酶、UDP焦磷酸化酶、丙酮酸激酶及視需要之焦磷酸化酶。

【0039】 在任一反應室中，一或多種酵素可固定於一支持體上。根據本發明之特定實例，該一或多個UDP-Gal再生酵素組、UDP-GalNAc再生酵素組、GDP-Fuc再生酵素組及CMP-Neu5Ac再生酵素組係各自固定於一支持體上。根據本發明之其他實例，一反應室中之所有酵素係固定於一支持體上。

【0040】 本發明亦涵蓋根據上述合成方法所製得之寡糖。

【0041】 本案所請發明之一或多種實例係詳載於以下詳細說明中。本發明之其他特徵、目的及優勢將清楚揭露於以下之定義、圖式、實例及申請專利範圍中。

【0042】 化學式之定義

【0043】本發明相關之特定功能基團及化學名詞的定義係說明如后。化學元素之鑑別係根據週期表(CAS version, Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed.)封頁內部，而特定功能基團亦據此作定義。此外，有機化學之一般原則以及特殊官能基團及其活性係如Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999; Smith and March March's Advanced Organic Chemistry, 5th Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001; Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Inc., New York, 1989; and Carruthers, Some Modern Methods of Organic Synthesis, 3rd Edition, Cambridge University Press, Cambridge, 1987所描述者。

【0044】本發明所述化合物可包含一或多個非對稱中心，因而存在多種異構體形式，諸如對映體及/或非對映異構體。例如，本發明所述化合物可呈個別對映體、非對映異構體或幾何異構體等形式，或可呈混合異構體形式，包括外消旋混合物及富含一或多種異構體之混合物。可利用包括掌性高效液相層析(HPLC)以及掌性鹽類之形成與結晶等習知技藝，自混合物中分離同分異構物；或利用非對稱合成法製備較佳之異構物。請參Jacques等人, Enantiomers, Racemates and Resolutions (Wiley Interscience, New York, 1981); Wilen 等人, Tetrahedron 33:2725 (1977); Eliel, E.L. Stereochemistry of Carbon Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962); and Wilen, S.H. Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972)。本發

明另包括實質上不含其他異構物之個別異構物；另一方面，本發明包括多種異構物之混合物。

【0045】 根據本案說明書所載數值之範圍，其係意指包括每一各別數值及該範圍內之次範圍。例如，“C_{1-6}烷基”意指包含C_1、C_2、C_3、C_4、C_5、C_6、C_{1-6}、C_{1-5}、C_{1-4}、C_{1-3}、C_{1-2}、C_{2-6}、C_{2-5}、C_{2-4}、C_{2-3}、C_{3-6}、C_{3-5}、C_{3-4}、C_{4-6}、C_{4-5}及C_{5-6}烷基。

【0046】 本文所指「烷基」為一具有1至30個碳原子之直鏈或支鏈之飽和烴基團(“C_{1-30}烷基”)。某些特定實例，該烷基具有1至20個碳原子(“C_{1-20}烷基”)。某些特定實例，該烷基具有1至10個碳原子(“C_{1-10}烷基”)。某些特定實例，該烷基具有1至9個碳原子(“C_{1-9}烷基”)。某些特定實例，該烷基具有1至8個碳原子(“C_{1-8}烷基”)。某些特定實例，該烷基具有1至7個碳原子(“C_{1-7}烷基”)。某些特定實例，該烷基具有1至6個碳原子(“C_{1-6}烷基”)。某些特定實例，該烷基具有1至5個碳原子(“C_{1-5}烷基”)。某些特定實例，該烷基具有1至4個碳原子(“C_{1-4}烷基”)。某些特定實例，該烷基具有1至3個碳原子(“C_{1-3}烷基”)。某些特定實例，該烷基具有1至2個碳原子(“C_{1-2}烷基”)。某些特定實例，該烷基具有1個碳原子(“C_1烷基”)。某些特定實例，該烷基具有2至6個碳原子 (“C_{2-6}烷基”)。C_{1-6}烷基的實例包括甲基(C_1)、乙基(C_2)、正丙基(C_3)、異丙基(C_3)、正丁基(C_4)、第三丁基(C_4)、第二丁基(C_4)、異丁基(C_4)、正戊基(C_5)、3-戊基(C_5)、戊基(C_5)、新戊基(C5)、3-甲基-2-丁基(C_5)、第三戊基(C_5)及正己基(C_6)。烷基之其他實例包括正庚基(C_7)、正辛基(C_8)及其類似物。除非另有定義，否則如本文所指之烷基係各自獨立地未經取代 (未經取代之烷基)或經一或多個取代基所取代(經取代之烷

基)。某些特定實例，烷基係未經取代之C_{1-10}烷基(例如-CH_3)。其他特定實例，烷基係經取代之C_{1-10}烷基。

【0047】 本文所指「烯基」或「烯類」為一具有2至30個碳原子及一或多個雙鍵(例如1、2、3或4個雙鍵)之直鏈或支鏈烴基團。某些特定實例，該烯基具有2至20個碳原子("C_{2-20}烯基")。某些特定實例，該烯基具有2至10個碳原子("C_{2-10}烯基")。某些特定實例，該烯基具有2至9個碳原子("C_{2-9}烯基")。某些特定實例，該烯基具有2至8個碳原子("C_{2-8}烯基")。某些特定實例，該烯基具有2至7個碳原子("C_{2-7}烯基")。某些特定實例，該烯基具有2至6個碳原子("C_{2-6}烯基")。某些特定實例，該烯基具有2至5個碳原子("C_{2-5}烯基")。某些特定實例，該烯基具有2至4個碳原子("C_{2-4}烯基")。某些特定實例，該烯基具有2至3個碳原子("C_{2-3}烯基")。某些特定實例，該烯基具有2個碳原子("C_2烯基")。其中一或多個C=C雙鍵可存在於內部(如2-丁烯基)或末端(如1-丁烯基)。C_{2-4}烯基包括乙烯基(C_2)、1-丙烯基(C_3)、2-丙烯基(C_3)、1-丁烯基(C_4)、2-丁烯基(C_4)、丁間二烯基(C_4)及其類似物。C_{2-6}烯基之實例包括前述之C_{2-4}烯基以及戊烯基(C_5)、戊間二烯基(C_5)、己烯基(C_6)及其類似物。烯基之其他實例包括庚烯基(C_7)、辛烯基(C_8)、辛間三烯基(C_8)及其類似物。除非另有定義，否則如本文所指之烯基係各自獨立地未經取代(未經取代之烯基)或經一或多個取代基所取代(經取代之烯基)。某些特定實例，烷基係未經取代之C_{2-10}烯基。其他特定實例，烯基係經取代之C_{2-10}烯基。

【0048】 本文所指「炔基」或「炔類」為一具有2至30個碳原子及一或多個參鍵(例如1、2、3或4個參鍵)之直鏈或支鏈烴基團("C_{2-10}炔基")。

某些特定實例，該炔基具有2至20個碳原子(“C_{2-20}炔基”)。某些特定實例，該炔基具有2至10個碳原子(“C_{2-10}炔基”)。某些特定實例，該炔基具有2至9個碳原子(“C_{2-9}炔基”)。某些特定實例，該炔基具有2至8個碳原子(“C_{2-8}炔基”)。某些特定實例，該炔基具有2至7個碳原子(“C_{2-7}炔基”)。某些特定實例，該炔基具有2至6個碳原子(“C_{2-6}炔基”)。某些特定實例，該炔基具有2至5個碳原子(“C_{2-5}炔基”)。某些特定實例，該炔基具有2至4個碳原子(“C_{2-4}炔基”)。某些特定實例，該炔基具有2至3個碳原子(“C_{2-3}炔基”)。某些特定實例，該炔基具有2個碳原子(“C_2炔基”)。其中一或多個C≡C參鍵可存在於內部(如2-炔基)或末端(如1-炔基)。C_{2-4}炔基之實例包括，但不限於乙炔基(C2)、1-丙炔基(C3)、2-丙炔基(C3)、1-丁炔基(C4)、2-丁炔基(C4)及其類似物。C2-6炔基之實例包括前述之C_{2-4}炔基以及戊炔基(C_5)、己炔基(C_6)及其類似物。炔基之其他實例包括庚炔基(C_7)、辛炔基(C_8)及其類似物。除非另有定義，否則如本文所指之炔基係各自獨立地未經取代(未經取代之炔基)或經一或多個取代基所取代(經取代之炔基)。某些特定實例，炔基係未經取代之C_{2-10}炔基。其他特定實例，炔基係經取代之C_{2-10}炔基。

【0049】 本文所指「環碳基」為一具有3至10個環碳原子之非芳族環烴基團(“C_{3-10}環碳基”)，且該非芳族環系統中不含雜原子。某些特定實例，該環碳基具有3至8個環碳原子(“C_{3-8}環碳基”)。某些特定實例，該環碳基具有3至7個環碳原子(“C_{3-7}環碳基”)。某些特定實例，該環碳基具有3至6個環碳原子(“C_{3-6}環碳基”)。某些特定實例，該環碳基具有5至10個環碳原子(“C_{5-10}環碳基”)。C_{3-6}環碳基之實例包括，但不限於環丙基(C_3)、環丙烯基(C_3)、環丁基(C_4)、環丁烯基(C_4)、環戊基(C_5)、環戊烯基(C_5)、環己基(C_6)、

環己烯基(C_6)、環己間二烯基(C_6)及其類似物。C_{3-8}環碳基之例包括，但不限於前述之C_{3-6}環碳基及環庚基(C_7)、環庚烯基(C_7)、環庚間二烯基(C_7)、環庚間三烯基(C_7)、環辛基(C_8)、環辛烯基(C_8)、二環[2.2.1]庚基(C_7)、二環[2.2.2]辛基(C_8)及其類似物。C_{3-10}環碳基之實例包括，但不限於前述之C_{3-8}環碳基及環壬基(C_9)、環壬烯基(C_9)、環癸基(C_{10})、環癸烯基(C10)、八氫-1H-茚基(C_9)、十氫萘基(C_{10})、螺環[4.5]癸基(C_{10})及其類似物。如前述實例所例示者，某些特定實例，環碳基係單環("單環環碳基")或多環(例如包含一稠環、螺環或橋環系統，諸如雙環系統("雙環環碳基")或三環系統("三環環碳基"))，且其係呈飽和或可包含一或多個碳-碳雙鍵或三鍵。「環碳基」亦包含環系統，其中如前所述之環碳與一或多個芳基或雜芳基稠合，且其中連接點係位於該環碳上，在此情形下，在該環碳系統下繼續標記其碳數。除非另有定義，否則如本文所指之環碳基係各自獨立地未經取代(未經取代之環碳基)或經一或多個取代基所取代(經取代之環碳基)。某些特定實例，環碳基係未經取代之C_{3-10}環碳基。其他特定實例，環碳基係經取代之C_{3-10}環碳基。

【0050】 某些特定實例，「環碳基」係一具有3-10個環碳原子("C_{3-10}環烷基")之飽和單環。某些特定實例，環烷基具有3至8個環碳原子("C_{3-8}環烷基")。某些特定實例，環烷基具有3至6個環碳原子("C_{3-6}環烷基")。某些特定實例，環烷基具有5至6個環碳原子("C_{5-6}環烷基")。某些特定實例，環烷基具有5至10個環碳原子("C_{5-10}環烷基")。C_{5-6}環烷基之實例包括環戊基(C_5)及環己基(C_6)。C_{3-6}環烷基之實例包括前述之C_{5-6}環烷基及環丙基(C_3)及環丁基(C_4)。C_{3-8}環烷基之實例包括前述之C3-6環烷基及環庚基(C_7)

及環辛基(C_8)。除非另有定義，否則如本文所指之環烷基係各自獨立地未經取代(未經取代之環烷基)或經一或多個取代基所取代(經取代之環烷基)。某些特定實例，環烷基係未經取代之C_{3-10}環烷基。其他特定實例，環烷基係經取代之C_{3-10}環烷基。

【0051】 本文所指「3-14員雜環基」為一具有1至4個雜原子之3-至14-員非芳族環系統，其中每一雜原子各自獨立地選自氮、氧及硫。該雜環基包含一或多個氮原子，其連接點可為碳原子或氮原子，如價數允許者。雜環基可為單環或多環(例如稠環、橋環或螺環形成雙環系統或三環系統)，且該雜環基可為飽和或包含一或多個C=C雙鍵或C≡C參鍵。多環雜環系統在其中一或兩個環中包含一或多個雜原子。雜環基亦包括如上所定義之環系統，其係與一或多個環碳基稠合，其中連接點可位於環碳基或雜環上。

【0052】 多環之雜環基系統，在其一或兩個環系統上可包括一或多個雜原子。「雜環基」亦包含環系統，其中如前所述之雜環與一或多個環碳基稠合，且其中連接點係位於環碳上或雜環基環上，或如前所定義之環系統，其中該雜環與一或多個芳基或雜芳基稠合，且其中連接點係位於雜環上，在此情形下，在該雜環系統下繼續標記其碳數。除非另有定義，否則如本文所指之雜環基係各自獨立地未經取代(未經取代之雜環基)或經一或多個取代基所取代(經取代之雜環基)。某些特定實例，雜環基係未經取代之3-14員雜環基。其他特定實例，雜環基係經取代之3-14員雜環基。

【0053】 某些特定實例中，該雜環基為具有環碳原子及1-4個雜環原子之5-10員非芳族環系統，其中該雜環原子係獨立地選自氮、氧及硫。某些特定實例中，該雜環基為具有環碳原子及1-4個雜環原子之5-8員非芳族

環系統，其中該雜環原子係獨立地選自氮、氧及硫。某些特定實例中，該雜環基為具有環碳原子及1-4個雜環原子之5-6員非芳族環系統，其中該雜環原子係獨立地選自氮、氧及硫。某些特定實例中，該5-6原雜環基具有1-3個選自氮、氧及硫之雜環原子。某些特定實例中，該5-6原雜環基具有1-2個選自氮、氧及硫之雜環原子。某些特定實例中，該5-6原雜環基具有1個選自氮、氧及硫之雜環原子。

【0054】 包含一個雜原子之3員雜環基的實例包括，但不限於氮雜環丙烯基(azirdinyl)、環氧乙烷基(oxiranyl)、環硫乙烷基(thiorenyl)。4員雜環基(包含一雜原子)之實例包括，但不限於氮雜環丁烷基(azetidinyl)、氧雜環丁烷基(oxetanyl)及硫雜環丁烷基(thietanyl)。5員雜環基(包含一雜原子)之實例包括，但不限於四氫呋喃基、二氫呋喃基、四氫苯硫基、二氫苯硫基、吡咯啶基、二氫吡咯基及吡咯基-2,5-二酮。5員雜環基(包含2個雜原子)之實例包括，但不限於二氧戊環基(dioxolanyl)、氧硫環己烷基(oxathiolanyl)及二硫戊環(dithiolanyl)。5員雜環基(包含2個雜原子)之實例包括，但不限於三唑啉基(triazolinyl)、 二唑啉基(oxadiazolinyl)、噻二唑啉基(thiadiazolinyl)。6員雜環基(包含1個雜原子)之實例包括，但不限於哌啶基, 四氫哌喃基、二氫哌喃基及噻烷基(thianyl)。6員雜環基(包含2個雜原子)之實例包括，但不限於哌 基、嗎啉基、二噻烷基(dithianyl)及二氧雜環己烷基(dioxanyl)。6員雜環基(包含2個雜原子)之實例包括，但不限於三 基。7員雜環基(包含1個雜原子)之實例包括，但不限於氮雜環庚烷基(azepanyl)、氧雜環丁烷基(oxepanyl)及硫雜環庚烷基(thiepanyl)。8員雜環基(包含1個雜原子)之實例包括，但不限於氮雜環辛烷基(azocanyl)、氧

雜環辛烷基(oxecanyl)及硫雜環辛烷基(thiocanyl)。雙環雜環基之實例包括，但不限於吲哚啉基(indolinyl)、異吲哚啉基、二氫苯并呋喃基、二氫苯并噻吩基、四氫苯并噻吩基、四氫苯并呋喃基、四氫吲哚基、四氫喹啉基、四氫異喹啉基、十氫喹啉基、十氫異喹啉基、八氫苯并哌喃基、八氫異苯并哌喃基、十氫　啶基、十氫-1,8-　啶基、八氫吡咯并[3,2-b]吡咯、吲哚基、鄰苯二甲醯亞胺基、　二甲醯亞胺基、　基(chromanyl)、　烯基(chromenyl)、1H-苯并[e][1,4]二氮呼(1H-benzo[e][1,4]diazepinyl)、1,4,5,7-四氫-哌喃并[3,4-b]吡咯基、5,6-二氫-4H-呋喃并[3,2-b]吡咯基、6,7-二氫-5H-呋喃并[3,2-b]哌喃基、5,7-二氫-4H-噻吩并[2,3-c]哌喃基、2,3-二氫-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶基、2,3-二氫呋喃并[2,3-b]吡啶基、4,5,6,7-四氫-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶基、4,5,6,7-四氫呋喃并[3,2-c]吡啶基、4,5,6,7-四氫噻吩并[3,2-b]吡啶基、1,2,3,4-四氫-1,6-　啶基及其類似物。

【0055】 本文所指「芳基」係指一具有6-14個環碳原子且不含雜原子之單或多(例如雙環或三環)之4n+2芳香環系統(例如6、10或14個電子分享在一個環狀陣列中)“C_{6-14}芳基”。某些特定實例中，該芳基具有6個環碳原子(“C_6芳基”；例如苯基)。某些特定實例中，該芳基具有10個環碳原子(“C_{10}芳基”；例如萘基，特定如1-萘基或2-萘基)。某些特定實例中，該芳基具有14個環碳原子(“C_{14}芳基”；如蒽基(anthracyl))。「芳基」也包括環系統，如前所定義者，該芳基環係與一或多個環碳基或雜環基縐合，其中該連接點係位於芳基環上，在此情形下，在該芳環系統下繼續標記其碳數。除非另有定義，否則如本文所指之芳基係各自獨立地未經取代(未經取代之芳

基)或經一或多個取代基所取代(經取代之芳基)。某些特定實例中，芳基係未經取代之C_{6-14}芳基。其他特定實例中，芳基係經取代之C_{6-14}芳基。

【0056】 本文所指「雜芳基」係指一5-14員單或多環(例如雙環)之4n+2芳族環系統(例如6、10或14個電子分享在一個環狀陣列中)，該芳族環系統具有碳原子及1-4個雜原子，其中該雜原子係各自獨立地選自氮、氧及硫。("5-14員雜芳基")。在包含一或多個氮原子之雜芳基中，如價數允許者，其連接點可為碳原子或氮原子。多環雜芳基環系統在其中一或兩個環中包含一或多個雜原子。「雜芳基」亦包括環系統，其中如上所述之雜芳環係與一或多個碳環或雜環基稠合，其中連接點係位於雜芳基環上，且在此情形下，在該雜芳環系統下繼續標記其碳數。「雜芳基」亦包括環系統，其中如上所述之雜芳環係與一或多個芳基稠合，其中連接點係位於芳基或雜芳基環上，且在此情形下，在該經稠合多環(芳基/雜芳基)系統下繼續標記其碳數。其中一環不包含雜原子多環雜芳基團(例如吲哚基、喹啉基、咔唑基(carbazolyl)及其類似物)，其連接點可位於環上，即，該環包含雜原子(如2-吲哚基)或該環不包含雜原子(如5-吲哚基)。

【0057】 某些特定實例中，該雜芳基為5-10員芳族環系統，具有環碳原子及1-4個雜環原子，其中該雜環原子係各自獨立地選自氮、氧及硫("5-10員雜芳基")。某些特定實例中，該雜芳基為5-8員芳族環系統，具有環碳原子及1-4個雜環原子，其中該雜環原子係各自獨立地選自氮、氧及硫("5-8員雜芳基")。某些特定實例中，該雜芳基為5-6員芳族環系統，具有環碳原子及1-4個雜環原子，其中該雜環原子係各自獨立地選自氮、氧及硫("5-6員雜芳基")。某些特定實例中，5-6員雜芳基具有1-3個各自獨立地選

自氮、氧及硫之雜環原子。某些特定實例，5-6員雜芳基具有1-2個各自獨立地選自氮、氧及硫之雜環原子。某些特定實例，5-6員雜芳基具有1個選自氮、氧及硫之雜環原子。除非另有定義，否則如本文所指之雜芳基係各自獨立地未經取代(未經取代之雜芳基)或經一或多個取代基所取代(經取代之雜芳基)。某些特定實例，雜芳基係未經取代之5-14員雜芳基。其他特定實例，雜芳基係經取代之5-14員雜芳基。

【0058】 5員雜芳基(包含一雜原子)之實例包括，但不限於吡咯基、呋喃基及噻吩基。含有2個雜子之5員雜芳基之實例包括，但不限於咪唑基、吡唑基、　唑基、異　唑基、噻唑基及異噻唑基。含有3個雜子之5員雜芳基之實例包括，但不限於三唑、　二唑及噻二唑基。含有4個雜子之5員雜芳基之實例包括，但不限於四唑基。含有1個雜子之6員雜芳基之實例包括，但不限於吡啶基。含有2個雜子之6員雜芳基之實例包括，但不限於嗒　基、嘧啶基及吡　基。含有3或4個雜子之6員雜芳基之實例分別包括，但不限於三　基及四　基。含有1個雜子之7員雜芳基之實例包括，但不限於氮呯基、呯基及噻呯基。5,6-雙環雜芳基之實例包括，但不限於吲哚基、異吲哚基、吲唑基、苯并三唑基、苯并噻吩基、異苯并噻吩基、苯并呋喃基、苯并異呋喃基、苯并咪唑基、苯并　唑基、苯并異　唑基、苯并　二唑基、苯并噻唑基、苯并異噻唑基、苯并噻二唑基、吲哚　基(indolizinyl)及嘌呤基。6,6-雙環雜芳基之實例包括，但不限於　啶基、喋啶基、喹啉基、異喹啉基、　啉基、喹　啉基、酞　基及喹唑啉基。三環雜芳基之實例包括，但不限於啡啶基、二苯并呋喃基、咔唑基、吖啶基、啡噻　基、啡　基及啡　基.

【0059】 本文所用之術語「部份不飽和」係指一環部份包含至少一個雙鍵或一個三鍵，該術語「部份不飽和」意圖涵括具有多處不飽和位置之環，但不包括如本文所定義之芳基(例如苯基或雜芳基部份)。

【0060】 本文所用之術語「飽和」係指一環部份不具有任一雙鍵或三鍵，即，該環結構全為單鍵。

【0061】 本文所指之烷基、烯基、炔基、雜烷基、雜烯基、雜炔基、環碳基、雜環基、芳基及雜芳基係視需要可經取代(例如，經取代或未經取代烷基，經取代或未經取代烯基，經取代或未經取代炔基，經取代或未經取代雜烷基，經取代或未經取代雜烯基，經取代或未經取代雜炔基，經取代或未經取代環碳基，經取代或未經取代雜環基，經取代或未經取代芳基或經取代或未經取代雜芳基)。一般而言，本文所用「取代」之術語(不論前面是否帶有「視需要」此一術語)，意指基團中至少一個氫原子經一允許之取代基所取代，例如在取代的過程中取代基會導致一穩定化合物，該穩定化合物不致自動進行諸如重排、環化、脫除或其他轉化反應。除非另有定義，否則一經取代之基團在一或多個適當位置具有取代基，且當超過一個位置經取代時，每一取代位置的取代基可為相同或不同。本文所用「取代」之術語包括所有可允許之有機化合物，任何本文所指導致形成穩定化合物之任何取代基。本發明包括任何及所有之組合以獲致穩定化合物。基於本發明之目的，諸如氮之雜原子可被氫及/或任何如本文所述之適當之取代基所取代，其係滿足該雜原子之價數，以致形成穩定基團。

【0062】 碳原子取代基之實例包括，但不限於鹵素、-CN、$-NO_2$、$-N_3$、$-SO_2H$、$-SO_3H$、-OH、$-OR^{aa}$、$-ON(R^{bb})_2$、$-N(R^{bb})_2$、$-N(R^{bb})_3{}^+X^-$、

$-N(OR^{cc})R^{bb}$、$-SH$、$-SR^{aa}$、$-SSR^{cc}$、$-C(=O)R^{aa}$、$-CO_2H$、$-CHO$、$-C(OR^{cc})_2$、$-CO_2R^{aa}$、$-OC(=O)R^{aa}$、$-OCO_2R^{aa}$、$-C(=O)N(R^{bb})_2$、$-OC(=O)N(R^{bb})_2$、$-NR^{bb}C(=O)R^{aa}$、$-NR^{bb}CO_2R^{aa}$、$-NR^{bb}C(=O)N(R^{bb})_2$、$-C(=NR^{bb})R^{aa}$、$-C(=NR^{bb})OR^{aa}$、$-OC(=NR^{bb})R^{aa}$、$-OC(=NR^{bb})OR^{aa}$、$-C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$、$-OC(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$、$-NR^{bb}C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$、$-C(=O)NR^{bb}SO_2R^{aa}$、$-NR^{bb}SO_2R^{aa}$、$-SO_2N(R^{bb})_2$、$-SO_2R^{aa}$、$-SO_2OR^{aa}$、$-OSO_2R^{aa}$、$-S(=O)R^{aa}$、$-OS(=O)R^{aa}$、$-Si(R^{aa})_3$、$-OSi(R^{aa})_3$ $-C(=S)N(R^{bb})_2$、$-C(=O)SR^{aa}$、$-C(=S)SR^{aa}$、$-SC(=S)SR^{aa}$、$-SC(=O)SR^{aa}$、$-OC(=O)SR^{aa}$、$-SC(=O)OR^{aa}$、$-SC(=O)R^{aa}$、$-P(=O)_2R^{aa}$、$-OP(=O)_2R^{aa}$、$-P(=O)(R^{aa})_2$、$-OP(=O)(R^{aa})_2$、$-OP(=O)(OR^{cc})_2$、$-P(=O)_2N(R^{bb})_2$、$-OP(=O)_2N(R^{bb})_2$、$-P(=O)(NR^{bb})_2$、$-OP(=O)(NR^{bb})_2$、$-NR^{bb}P(=O)(OR^{cc})_2$、$-NR^{bb}P(=O)(NR^{bb})_2$、$-P(R^{cc})_2$、$-P(R^{cc})_3$、$-OP(R^{cc})_2$、$-OP(R^{cc})_3$、$-B(R^{aa})_2$、$-B(OR^{cc})_2$、$-BR^{aa}(OR^{cc})$、C_{1-10}烷基、C_{1-10}全鹵烷基、C_{2-10}烯基、C_{2-10}炔基、C_{1-10}雜烷基、C_{2-10}雜烯基、C_{2-10}雜炔基、C_{3-14}環碳基、3-14員雜環基、C_{6-14}芳基及5-14員雜芳基，其中每一烷基、烯基、炔基、雜烷基、雜烯基、雜炔基、環碳基、雜環基、芳基及雜芳基係各自獨立地經0、1、2、3、4或5個R^{dd}基團所取代；

【0063】 或在一碳原子上之兩個相偕氫原子被以下基團所取代=O、=S、$=NN(R^{bb})_2$、$=NNR^{bb}C(=O)R^{aa}$、$=NNR^{bb}C(=O)OR^{aa}$、$=NNR^{bb}S(=O)_2R^{aa}$、$=NR^{bb}$或$=NOR^{cc}$；

【0064】 每一R^{aa}係獨立地選自C_{1-10}烷基、C_{1-10}全鹵烷基、C_{2-10}烯基、C_{2-10}炔基、C_{1-10}雜烷基、C_{2-10}雜烯基、C_{2-10}雜炔基、C_{3-10}環碳基、3-14員雜環基、C_{6-14}芳基及5-14員雜芳基，或兩個R^{aa}基團結合形成一個3-14員雜

環基或5-14員雜芳基環，其中每一烷基、烯基、炔基、雜烷基、雜烯基、雜炔基、環碳基、雜環基、芳基及雜芳基係各自獨立地經0、1、2、3、4或5個R^{dd}基團所取代；

【0065】 每一R^{bb}係獨立地選自氫、-OH、$-OR^{aa}$、$-N(R^{cc})_2$、-CN、$-C(=O)R^{aa}$、$-C(=O)N(R^{cc})_2$、$-CO_2R^{aa}$、$-SO_2R^{aa}$、$-C(=NR^{cc})OR^{aa}$、$-C(=NR^{cc})N(R^{cc})_2$、$-SO_2N(R^{cc})_2$、$-SO_2R^{cc}$、$-SO_2OR^{cc}$、$-SOR^{aa}$、$-C(=S)N(R^{cc})_2$、$-C(=O)SR^{cc}$、$-C(=S)SR^{cc}$、$-P(=O)_2R^{aa}$、$-P(=O)(R^{aa})_2$、$-P(=O)_2N(R^{cc})_2$、$-P(=O)(NR^{cc})_2$、C_{1-10}烷基、C_{1-10}全鹵烷基、C_{2-10}烯基、C_{2-10}炔基、C_{1-10}雜烷基、C_{2-10}雜烯基、C_{2-10}雜炔基、C_{3-10}環碳基、3-14員雜環基、C_{6-14}芳基及5-14員雜芳基，或兩個R^{bb}基團結合形成一個3-14員雜環基或5-14員雜芳基環，其中每一烷基、烯基、炔基、雜烷基、雜烯基、雜炔基、環碳基、雜環基、芳基及雜芳基係各自獨立地經0、1、2、3、4或5個R^{dd}基團所取代；

【0066】 每一R^{cc}係獨立地選自氫、C_{1-10}烷基、C_{1-10}全鹵烷基、C_{2-10}烯基、C_{2-10}炔基、C_{1-10}雜烷基、C_{2-10}雜烯基、C_{2-10}雜炔基、C_{3-10}環碳基、3-14員雜環基、C_{6-14}芳基及5-14員雜芳基，或兩個R^{cc}基團結合形成一個3-14員雜環基或5-14員雜芳基環，其中每一烷基、烯基、炔基、雜烷基、雜烯基、雜炔基、環碳基、雜環基、芳基及雜芳基係各自獨立地經0、1、2、3、4或5個R^{dd}基團所取代；

【0067】 每一R^{dd}係獨立地選自鹵素、-CN、$-NO_2$、$-N_3$、$-SO_2H$、$-SO_3H$、-OH、$-OR^{ee}$、$-ON(R^{ff})_2$、$-N(R^{ff})_2$、$-N(R^{ff})_3{}^+X^-$、$-N(OR^{ee})R^{ff}$、-SH、$-SR^{ee}$、$-SSR^{ee}$、$-C(=O)R^{ee}$、$-CO_2H$、$-CO_2R^{ee}$、$-OC(=O)R^{ee}$、$-OCO_2R^{ee}$、

$-C(=O)N(R^{ff})_2$、$-OC(=O)N(R^{ff})_2$、$-NR^{ff}C(=O)R^{ee}$、$-NR^{ff}CO_2R^{ee}$、$-NR^{ff}C(=O)N(R^{ff})_2$、$-C(=NR^{ff})OR^{ee}$、$-OC(=NR^{ff})R^{ee}$、$-OC(=NR^{ff})OR^{ee}$、$-C(=NR^{ff})N(R^{ff})_2$、$-OC(=NR^{ff})N(R^{ff})_2$、$-NR^{ff}C(=NR^{ff})N(R^{ff})_2$,$-NR^{ff}SO_2R^{ee}$、$-SO_2N(R^{ff})_2$、$-SO_2R^{ee}$、$-SO_2OR^{ee}$、$-OSO_2R^{ee}$、$-S(=O)R^{ee}$、$-Si(R^{ee})_3$、$-OSi(R^{ee})_3$、$-C(=S)N(R^{ff})_2$、$-C(=O)SR^{ee}$、$-C(=S)SR^{ee}$、$-SC(=S)SR^{ee}$、$-P(=O)_2R^{ee}$、$-P(=O)(R^{ee})_2$、$-OP(=O)(R^{ee})_2$、$-OP(=O)(OR^{ee})_2$、$C_{1-6}$烷基、$C_{1-6}$全鹵烷基、$C_{2-6}$烯基、$C_{2-6}$炔基、$C_{1-6}$雜烷基、$C_{2-6}$雜烯基、$C_{2-6}$雜炔基、$C_{3-10}$環碳基、3-10員雜環基、$C_{6-10}$芳基及5-10員雜芳基，其中每一烷基、烯基、炔基、雜烷基、雜烯基、雜炔基、環碳基、雜環基、芳基及雜芳基係各自獨立地經0、1、2、3、4或5個R^{gg}基團所取代，或兩個相偕R^{dd}基團可結合形成=O或=S；

【0068】 每一R^{ee}係獨立地選自C_{1-6}烷基、C_{1-6}全鹵烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}雜烷基、C_{2-6}雜烯基、C_{2-6}雜炔基、C_{3-10}環碳基、3-10員雜環基、C_{6-10}芳基及3-10員雜芳基，其中每一烷基、烯基、炔基、雜烷基、雜烯基、雜炔基、環碳基、雜環基、芳基及雜芳基係各自獨立地經0、1、2、3、4或5個R^{gg}基團所取代；

【0069】 每一R^{ff}係獨立地選自氫、C_{1-6}烷基、C_{1-6}全鹵烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}雜烷基、C_{2-6}雜烯基、C_{2-6}雜炔基、C_{3-10}環碳基、3-10員雜環基、C_{6-10}芳基及5-10員雜芳基，其中每一烷基、烯基、炔基、雜烷基、雜烯基、雜炔基、環碳基、雜環基、芳基及雜芳基係各自獨立地經0、1、2、3、4或5個R^{gg}基團所取代；及

【0070】 每一R^{gg}係獨立地選自鹵素、-CN、$-NO_2$、$-N_3$、$-SO_2H$、$-SO_3H$、-OH、$-OC_{1-6}$烷基、$-ON(C_{1-6}$烷基$)_2$、$-N(C_{1-6}$烷基$)_2$、$-N(C_{1-6}$烷基$)_3{}^+X^-$、$-NH(C_{1-6}$烷基$)_2{}^+X^-$、$-NH_2(C_{1-6}$烷基$){}^+X^-$、$-NH_3{}^+X^-$、$-N(OC_{1-6}$烷基$)(C_{1-6}$烷基)、$-N(OH)(C_{1-6}$烷基)、-NH(OH)、-SH、$-SC_{1-6}$烷基、$-SS(C_{1-6}$烷基)、$-C(=O)(C_{1-6}$烷基)、$-CO_2H$、$-CO_2(C_{1-6}$烷基)、$-OC(=O)(C_{1-6}$烷基)、$-OCO_2(C_{1-6}$烷基)、$-C(=O)NH_2$、$-C(=O)N(C_{1-6}$烷基$)_2$、$-OC(=O)NH(C_{1-6}$烷基)、$-NHC(=O)(C_{1-6}$烷基)、$-N(C_{1-6}$烷基$)C(=O)(C_{1-6}$烷基)、$-NHCO_2(C_{1-6}$烷基)、$-NHC(=O)N(C_{1-6}$烷基$)_2$、$-NHC(=O)NH(C_{1-6}$烷基)、$-NHC(=O)NH_2$、$-C(=NH)O(C_{1-6}$烷基)、$-OC(=NH)(C_{1-6}$烷基)、$-OC(=NH)OC_{1-6}$烷基、$-C(=NH)N(C_{1-6}$烷基$)_2$、$-C(=NH)NH(C_{1-6}$烷基)、$-C(=NH)NH_2$、$-OC(=NH)N(C_{1-6}$烷基$)_2$、$-OC(NH)NH(C_{1-6}$烷基)、$-OC(NH)NH_2$、$-NHC(NH)N(C_{1-6}$烷基$)_2$、$-NHC(=NH)NH_2$、$-NHSO_2(C_{1-6}$烷基)、$-SO_2N(C_{1-6}$烷基$)_2$、$-SO_2NH(C_{1-6}$烷基)、$-SO_2NH_2$,$-SO_2C_{1-6}$烷基、$-SO_2OC_{1-6}$烷基、$-OSO_2C_{1-6}$烷基、$-SOC_{1-6}$烷基、$-Si(C_{1-6}$烷基$)_3$、$-OSi(C_{1-6}$烷基$)_3$ $-C(=S)N(C_{1-6}$烷基$)_2$、C(=S)NH(C_{1-6}烷基)、$C(=S)NH_2$、$-C(=O)S(C_{1-6}$烷基)、$-C(=S)SC_{1-6}$烷基、$-SC(=S)SC_{1-6}$烷基、$-P(=O)_2(C_{1-6}$烷基)、$-P(=O)(C_{1-6}$烷基$)_2$、$-OP(=O)(C_{1-6}$烷基$)_2$、$-OP(=O)(OC_{1-6}$烷基$)_2$、C_{1-6}烷基、C_{1-6}全鹵烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}雜烷基、C_{2-6}雜烯基、C_{2-6}雜炔基、C_{3-10}環碳基、3-10員雜環基、C_{6-10}芳基及5-10員雜芳基；或兩個相偕R^{gg}取代基可結合形成=O或=S; 其中X-為相對離子。

【0071】 本文所指之「鹵基」或「鹵素」係指氟基(-F)、氯基(-Cl)、溴基(-Br)或碘基(-I)。

【0072】 本文所指之「相對離子」係指一負電荷基團，其與正電荷四級胺連結來維持其電中性。相對離子的實例包括鹵梨子(如，F^-、Cl^-、Br^-、I^-)、NO_3^-、ClO_4^-、OH^-、$H_2PO_4^-$、HSO_4^-、磺酸離子(如，甲磺酸鹽、三氟甲磺酸鹽、p-甲苯磺酸鹽、苯磺酸鹽、10-樟腦磺酸鹽、萘-2-磺酸鹽、萘-1-磺酸-5-磺酸鹽、乙烷-1-磺酸-2-磺酸鹽及其類似物)及羧酸離子(例如，乙酸鹽、醋酸鹽、丙酸鹽、苯甲酸鹽、甘油酸鹽、酒石酸鹽、甘醇酸鹽及其類似物)。

【0073】 本文所指「羰基」係指一基團，其中直接連結至母分子的碳係為sp2混成(hybridized)，且可經氧、氮或硫原子取代，例如選自酮類(-C(=O)R^{aa})、羧酸類(-CO_2H)、醛類(-CHO)、酯類(-CO2R^{aa}、-C(=O)SR^{aa}、-C(=S)SR^{aa})、醯胺類(-C(=O)N(R^{bb})$_2$、-C(=O)NR^{bb}SO_2R^{aa}、-C(=S)N(R^{bb})2)及亞胺類(-C(=NR^{bb})R^{aa}、-C(=NR^{bb})OR^{aa})、-C(=NR^{bb})N(R^{bb})$_2$)之基團，其中R^{aa}及R^{bb}係如本文所定義者。

【0074】 本文所指「疊氮基」係指-N_3基團。

【0075】 本文所指「硫基」係指-SH基團。「經取代之硫基」延伸所指為一硫基團，其中直接附著於母分子上之硫原子係經取代(但取代基不為氫)，且包含選自-SR^{aa}、-S=SR^{cc}、-SC(=S)SR^{aa}、-SC(=O)SR^{aa}、-SC(=O)OR^{aa}及-SC(=O)R^{aa}之基團，其中R^{aa}及R^{cc}係如本文所定義者。

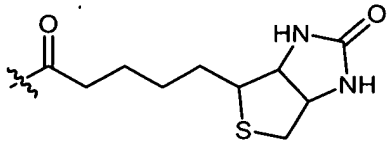
【0076】 本文所指「胺基」係指-NH_2基團。「經取代之胺基」延伸所指為一單一取代之胺基，雙取代之胺基或三取代之胺基。某些特定實例中，「經取代之胺基」為單一取代之胺基或雙取代之胺基基團。

【0077】 本文所指「經取代之胺基」係指一胺基基團，其中直接附著於母分子上之氮原子係經一個氫原子及一個非為氫之基團所取代，其包括選自 $-NH(R^{bb})$ 、 $-NHC(=O)R^{aa}$ 、 $-NHCO_2R^{aa}$ 、 $-NHC(=O)N(R^{bb})_2$ 、 $-NHC(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$ 、 $-NHSO_2R^{aa}$ 、 $-NHP(=O)(OR^{cc})_2$ 及 $-NHP(=O)(NR^{bb})_2$ 之基團，其中 R^{aa} 、 R^{bb} 及 R^{cc} 係如本文所定義者，且其中 $-NH(R^{bb})$ 基團之 R^{bb} 部份不為氫。

【0078】 本文所指「經雙取代之胺基」係指一胺基基團，其中直接附著於母分子上之氮原子係經兩個不為氫之基團所取代，其包括選自 $-N(R^{bb})_2$ 、 $-NR^{bb}C(=O)R^{aa}$ 、 $-NR^{bb}CO_2R^{aa}$ 、 $-NR^{bb}C(=O)N(R^{bb})_2$ 、 $-NR^{bb}C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$ 、 $-NR^{bb}SO_2R^{aa}$ 、 $-NR^{bb}P(=O)(OR^{cc})_2$ 及 $-NR^{bb}P(=O)(NR^{bb})_2$ 之基團，其中 R^{aa} 、 R^{bb} 及 R^{cc} 係如本文所定義者，其限制條件為該直接附著於母分子上之氮原子不被氫所取代。

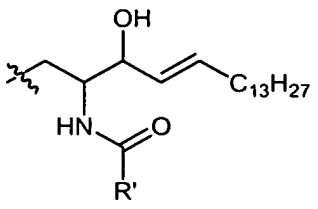
【0079】 本文所指「經三取代之胺基」係指一胺基基團，其中直接附著於母分子上之氮原子係經三個基團所取代，其包括選自 $-N(R^{bb})_3$ 及 $-N(R^{bb})_3{}^+X^-$ 之基團，其中 R^{bb} 及 X^- 係如本文所定義者。

【0080】 本文所指「生物素」，例如 R^{1A} 基團，其包含以下結構:



。

【0081】 本文所指「神經醯胺」，例如 R^{1A} 基團，其包含以下結構:



【0082】 其中R'係視需要經取代之C_6-C_{30}烷基(例如C_6、C_7、C_8、C_9、C_{10}、C_{11}、C_{12}、C_{13}、C_{14}、C_{15}、C_{16}、C_{17}、C_{18}、C_{19}、C_{20}、C_{21}、C_{22}、C_{23}、C_{24}、C_{25}、C_{26}、C_{27}、C_{28}、C_{29}或C_{30}烷基)、視需要經取代之C_6-C_{30}烯基(例如C_6、C_7、C_8、C_9、C_{10}、C_{11}、C_{12}、C_{13}、C_{14}、C_{15}、C_{16}、C_{17}、C_{18}、C_{19}、C_{20}、C_{21}、C_{22}、C_{23}、C_{24}、C_{25}、C_{26}、C_{27}、C_{28}、C_{29}或C_{30}烯基)、或視需要經取代之C_6-C_{30}炔基(例如C_6、C_7、C_8、C_9、C_{10}、C_{11}、C_{12}、C_{13}、C_{14}、C_{15}、C_{16}、C_{17}、C_{18}、C_{19}、C_{20}、C_{21}、C_{22}、C_{23}、C_{24}、C_{25}、C_{26}、C_{27}、C_{28}、C_{29}或C_{30}炔基)基團。

【0083】 在價數允許下，氮原子可經取代或未經取代，且其包含初級、二級、三級及四級之氮原子。氮原子取代基之實例包括，但不限於氫、-OH、$-OR^{aa}$、$-N(R^{cc})_2$、-CN、$-C(=O)R^{aa}$、$-C(=O)N(R^{cc})_2$、$-CO_2R^{aa}$、$-SO_2R^{aa}$、$-C(=NR^{bb})R^{aa}$、$-C(=NR^{cc})OR^{aa}$、$-C(=NR^{cc})N(R^{cc})_2$、$-SO_2N(R^{cc})_2$、$-SO_2R^{cc}$、$-SO_2OR^{cc}$、$-SOR^{aa}$、$-C(=S)N(R^{cc})_2$、$-C(=O)SR^{cc}$、$-C(=S)SR^{cc}$、$-P(=O)_2R^{aa}$、$-P(=O)(R^{aa})_2$、$-P(=O)_2N(R^{cc})_2$、$-P(=O)(NR^{cc})_2$、C_{1-10}烷基、C_{1-10}全鹵烷基、C_{2-10}烯基、C_{2-10}炔基、C_{1-10}雜烷基、C_{2-10}雜烯基、C_{2-10}雜炔基、C_{3-10}環碳基、3-14員雜環基、C_{6-14}芳基及5-14員雜芳基，或兩個R^{cc}基團結合形成一個3-14員雜環基或5-14員雜芳基環，其中每一烷基、烯基、炔基、雜烷基、雜烯基、雜炔基、環碳基、雜環基、芳基及雜芳基係各自獨立地經0、1、2、3、4或5個R^{dd}基團所取代，且其中R^{aa}、R^{bb}、R^{cc}及R^{dd}係如本文定義者。

【0084】 某些特定實例中，位於氮原子上之取代基係氮保護基團(本文中亦稱之胺基保護基團)。氮保護基團包括，但不限於-OH、$-OR^{aa}$、$-N(R^{cc})_2$、$-C(=O)R^{aa}$、$-C(=O)N(R^{cc})_2$、$-CO_2R^{aa}$、$-SO_2R^{aa}$、$-C(=NR^{cc})R^{aa}$、

$-C(=NR^{cc})OR^{aa}$、$-C(=NR^{cc})N(R^{cc})_2$、$-SO_2N(R^{cc})_2$、$-SO_2R^{cc}$、$-SO_2OR^{cc}$、$-SOR^{aa}$、$-C(=S)N(R^{cc})_2$、$-C(=O)SR^{cc}$、$-C(=S)SR^{cc}$、C_{1-10}烷基(例如，芳烷基或雜芳烷基)，C_{2-10}烯基、C_{2-10}炔基、C_{1-10}雜烷基、C_{2-10}雜烯基、C_{2-10}雜炔基、C_{3-10}環碳基、3-14員雜環基、C_{6-14}芳基及5-14員雜芳基，其中每一烷基、烯基、炔基、雜烷基、雜烯基、雜炔基、環碳基、雜環基、芳基及雜芳基係各自獨立地經0、1、2、3、4或5個R^{dd}基團所取代，且其中R^{aa}、R^{bb}、R^{cc}及R^{dd}係如本文定義者。氮保護基團係熟習此技藝人士所熟知，且揭露於Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd edition, John Wiley & Sons，其細節亦併入本文中。

【0085】 例如，氮保護基團可為諸如醯胺基團(如$-C(=O)R^{aa}$)，其包括(但不限定為)甲醯胺、乙醯胺、氯乙醯胺、三氯乙醯胺、三氟乙醯胺、苯乙醯胺、3-苯丙醯胺、吡啶醯胺(picolinamide)、3-吡啶羧醯胺、N-苯甲醯基苯丙胺醯基衍生物、苯甲醯胺、p-苯甲醯苯胺、o-硝基苯乙醯胺、o-硝基苯氧基乙醯胺、乙醯乙醯胺、(N'-二硫苄氧胺醯基)乙醯胺、3-(p-羥苯基)丙醯胺、3-(o-硝基苯基)丙醯胺、2-甲基-2-(o-硝基苯氧基)丙醯胺、2-甲基-2-(o-苯偶氮苯氧基)丙醯胺、4-氯丁醯胺、3-甲基-3-硝基丁醯胺、o-硝基桂皮醯胺、N-乙醯基甲硫胺酸衍生物、o-硝基苯甲醯胺及o-(苯甲醯氧基甲基)苯甲醯胺。

【0086】 氮保護基團可為諸如胺甲酸酯基團(如$-C(=O)OR^{aa}$)，其包括(但不限定為)胺甲酸甲酯、胺甲酸乙酯、9-芴甲氧羰醯胺(9-fluorenylmethyl carbamate；(Fmoc))、9-(2-磺基)芴甲氧羰醯胺、9-(2,7-二溴)芴甲氧羰醯胺、2,7-二-t-丁基-[9-(10,10-二氧-10,10,10,10-四氫噻吨基)]甲基胺甲酸酯

(DBD-Tmoc)、4-甲氧基苯甲醯甲基胺甲酸酯(Phenoc)、2,2,2-三氯乙基胺甲酸酯(Troc)、2-三甲基矽烷基乙基胺甲酸酯(Teoc)、2-苯基乙基胺甲酸酯(hZ)、1-(1-金剛烷)-1-甲基乙基胺甲酸酯(Adpoc)、1,1-二甲基-2-鹵乙基胺甲酸酯、1,1-二甲基-2,2-二溴乙基胺甲酸酯(DB-t-BOC)、1,1-二甲基-2,2,2-三氯乙基胺甲酸酯(TCBOC)、1-甲基-1-(4-聯苯基)乙基胺甲酸酯(Bpoc)、1-(3,5-二-t-丁基苯基)-1-甲基乙基胺甲酸酯(t-Bumeoc)、2-(2'-4'-吡啶基)乙基胺甲酸酯(Pyoc)、2-(N,N-二環己烷甲醯胺基)乙基胺甲酸酯、t-丁基胺甲酸酯(BOC)、1-金剛烷胺甲酸酯(Adoc)、乙烯基胺甲酸酯(Voc)、丙烯基胺甲酸酯(Alloc)、1-異丙基丙烯基胺甲酸酯(Ipaoc)、桂醯基胺甲酸酯(Coc)、4-硝基桂醯基胺甲酸酯(Noc)、8-喹啉基胺甲酸酯、N-羥基六氫吡啶基胺甲酸酯、烷基二硫代胺甲酸酯、苯甲基胺甲酸酯(Cbz)、p-甲氧基苯甲基胺甲酸酯(Moz)、p-硝基苯甲基胺甲酸酯、p-溴苯甲基胺甲酸酯、p-氯苯甲基胺甲酸酯、2,4-二氯苯甲基胺甲酸酯、4-甲基亞磺醯基苯甲基胺甲酸酯(Msz)、9-蒽基甲基胺甲酸酯、二苯基甲基胺甲酸酯、2-甲基硫乙基胺甲酸酯、2-甲基磺醯基乙基胺甲酸酯、2-(p-甲苯磺醯基)乙基胺甲酸酯、[2-(1,3-二硫雜環己基)]甲基胺甲酸酯(Dmoc)、4-甲基苯硫基胺甲酸酯(Mtpc)、2,4-二甲基苯硫基胺甲酸酯(Bmpc)、2-磷鎓基乙基胺甲酸酯(Peoc)、2-三苯基磷鎓基異丙基胺甲酸酯(Ppoc)、1,1-二甲基-2-氰基乙基胺甲酸酯、m-氯-p-醯氧基苯甲基胺甲酸酯、p-(二羥氧硼基)苯甲基胺甲酸酯、5-苯異　唑基甲基胺甲酸酯、2-(三氟甲基)-6-色酮基甲基胺甲酸酯(Tcroc)、m-硝基苯基胺甲酸酯、3,5-二甲氧基苯甲基胺甲酸酯、o-硝基苯甲基胺甲酸酯、3,4-二甲氧基-6-硝基苯甲基胺甲酸酯、苯基(o-硝基苯基)

甲基胺甲酸酯、t-戊基胺甲酸酯、S-苯甲基硫胺甲酸酯、p-氯基苯甲基胺甲酸酯、環丁基胺甲酸酯、環己基胺甲酸酯、環戊基胺甲酸酯、環丙基甲基胺甲酸酯、p-癸氧基苯甲基胺甲酸酯、2,2-二甲氧基醯基乙烯基胺甲酸酯、o-(N,N-二甲基甲醯胺基)苯甲基胺甲酸酯、1,1-二甲基-3-(N,N-二甲基甲醯胺基)丙基胺甲酸酯、1,1-二甲基丙炔基胺甲酸酯、二(2-吡啶基)甲基胺甲酸酯、2-呋喃基甲基胺甲酸酯、2-碘乙基胺甲酸酯、異茨醇基胺甲酸酯、異丁基胺甲酸酯、異菸鹼基胺甲酸酯、p-(p'-甲氧基苯偶氮基)苯甲基胺甲酸酯、1-甲基環丁基胺甲酸酯、1-甲基環己基胺甲酸酯、1-甲基-1-環丙基甲基胺甲酸酯、1-甲基-1-(3,5-二甲氧基二甲氧基苯基)乙基胺甲酸酯、1-甲基-1-(p-苯基偶氮苯基)乙基 胺甲酸酯、1-甲基-1-苯基乙基 胺甲酸酯、1-甲基-1-(4-吡啶基)乙基胺甲酸酯、苯基胺甲酸酯、p-(苯基偶氮)苯甲基胺甲酸酯、2,4,6-三-t-丁基苯基胺甲酸酯、4-(三甲基銨基)苯甲基胺甲酸酯及2,4,6-三甲基苯甲基胺甲酸酯。

【0087】 氮保護基團可為諸如磺醯胺基團(如-$S(=O)_2R^{aa}$)，其包括(但不限定為)p-甲苯磺醯胺(Ts)、苯磺醯胺、2,3,6,-三甲基-4-甲氧基苯磺醯胺(Mtr)、2,4,6-三甲氧基苯磺醯胺(Mtb)、2,6-二甲基-4-甲氧基苯磺醯胺(Pme)、2,3,5,6-四甲基-4-甲氧基苯磺醯胺(Mte)、4-甲氧基苯磺醯胺(Mbs)、2,4,6-三甲基苯磺醯胺(Mts)、2,6-二甲氧基-4-甲基苯磺醯胺(iMds)、2,2,5,7,8-五甲基　基-6-磺醯胺(Pmc)、甲烷磺醯胺(Ms)、β-三甲基矽烷乙烷磺醯胺(SES)、9-蒽磺醯胺、4-(4',8'-二甲氧基萘基甲基)苯磺醯胺(DNMBS)、苯甲基磺醯胺、三氟甲基磺醯胺、及苯甲基甲醯磺醯胺。

【0088】其他氮保護基團可為包括(但不限定為)啡噻　基-(10)-醯基衍生物、N'-p-甲苯磺醯基胺醯基衍生物、N'-苯基胺基硫醯基衍生物、N-苯甲醯基苯基丙胺醯基衍生物、N-乙醯基甲硫胺酸衍生物、4,5-二苯基-3-唑啉-2-酮、N-鄰苯二甲醯亞胺、N-二硫雜丁二醯亞胺(Dts)、N-2,3-二苯基順丁烯二醯亞胺、N-2,5-二甲基吡咯、N-1,1,4,4-四甲基二矽烷氮雜環戊烷加合物(STABASE)、5-經取代1,3-二甲基-1,3,5-三氮雜環己-2-酮、5-經取代 1,3-二苯甲基-1,3,5-三氮雜環己-2-酮、1-經取代3,5-二硝基-4-吡啶酮、N-甲基胺、N-丙烯基胺、N-[2-(三甲基矽烷)乙氧基]甲基胺(SEM)、N-3-乙醯氧基丙基胺、N-(1-異丙基-4-硝基-2-氧基-3-吡咯啉-3-基)胺、四級銨基鹽類、N-苯甲基胺、N-二(4-甲氧基苯基)甲基胺、N-5-二苯并環庚基胺、N-三苯基甲基胺(Tr)、N-[(4-甲氧基苯基)二苯基甲基]胺(MMTr)、N-9-苯基茀基胺(PhF)、N-2,7-二氯-9-茀基甲烯胺、N-二茂鐵基甲基胺(Fcm)、N-2-胺甲基吡啶基N'-氧化物、N-1,1-二甲基硫甲烯胺、N-苯甲基亞胺(ideneamine)、N-p-甲氧基苯甲基亞胺、N-二苯基甲烯胺、N-[(2-吡啶基)異亞丙基]甲烯胺、N-(N',N'-二甲基胺基亞甲基)胺、N,N'-異亞丙基二胺、N-p-硝基苯甲基亞胺、N-柳基亞胺、N-5-氯柳基亞胺、N-(5-氯-2-羥苯基)苯基甲烯胺、N-環己基亞胺、N-(5,5-二甲基-3-氧基-1-環己烯基)胺、N-硼烷衍生物、N-二苯基硼酸衍生物、N-[苯基(五醯基鉻-或鎢)醯基]胺、N-銅螯合物、N-鋅螯合物、N-硝基胺、N-硝基對胺苯砷酸鈉、胺N-氧化物、二苯基膦醯胺(Dpp)、二甲基硫基膦醯胺(Mpt)、二苯基硫基膦醯胺(Ppt)、二烷基磷醯胺鹽、二苯甲基磷醯胺鹽、二苯基磷醯胺鹽、苯亞磺醯胺、o-硝基苯亞磺醯胺(Nps)、2,4-二硝基苯亞磺醯胺、五氯苯亞磺醯胺、

2-硝基-4-甲氧基苯亞磺醯胺、三苯基甲基亞磺醯胺及3-硝基吡啶亞磺醯胺(Npys)。

【0089】某些特定實例，位於氧原子上之取代基係氧保護基團(本文中亦稱之羥基保護基團)。氧保護基團包括，但不限於$-R^{aa}$、$-N(R^{bb})_2$、$-C(=O)SR^{aa}$、$-C(=O)R^{aa}$、$-CO_2R^{aa}$、$-C(=O)N(R^{bb})_2$、$-C(=NR^{bb})R^{aa}$、$-C(=NR^{bb})OR^{aa}$、$-C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$、$-S(=O)R^{aa}$、$-SO_2R^{aa}$、$-Si(R^{aa})_3$、$-P(R^{cc})_2$、$-P(R^{cc})_3$、$-P(=O)_2R^{aa}$、$-P(=O)(R^{aa})_2$、$-P(=O)(OR^{cc})_2$、$-P(=O)_2N(R^{bb})_2$及$-P(=O)(NR^{bb})_2$，其中R^{aa}、R^{b}、及R^{cc}係如本文定義者。氧保護基團係熟習此技藝人士所熟知，且揭露於Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd edition, John Wiley & Sons，其之細節係併入本文中。

【0090】氧保護基團之實例包括，但不限於甲基、甲氧基甲基(MOM)、甲基硫基甲基(MTM)、t-丁基硫基甲基、(苯基二甲基矽烷)甲氧基甲基(SMOM)、苯甲氧基甲基(BOM)、p-甲氧基苯甲氧基甲基(PMBM)、(4-甲氧基苯氧基)甲基(p-AOM)、癒傷木酚甲基(GUM)、t-丁氧基甲基、4-戊烯氧基甲基(POM)、矽烷氧基甲基、2-甲氧基乙氧基甲基(MEM)、2,2,2-三氯乙氧基甲基、雙(2-氯乙氧基)甲基、2-(三甲基矽烷)乙氧基甲基(SEMOR)、四氫哌喃基(THP)、3-溴四氫哌喃基、四氫硫基哌喃基、1-甲氧基環己基、4-甲氧基四氫哌喃基(MTHP)、4-甲氧基四氫硫基哌喃基、4-甲氧基四氫硫基哌喃基S,S-二氧化物、1-[(2-氯-4-甲基)苯基]-4-甲氧基哌啶-4-基(CTMP)、1,4-二氧己環-2-基、四氫呋喃基、四氫硫基呋喃基、2,3,3a,4,5,6,7,7a-八氫-7,8,8-三甲基-4,7-甲醇苯并呋喃-2-基、1-乙氧基乙

基、1-(2-氯乙氧基)乙基、1-甲基-1-甲氧基乙基、1-甲基-1-苯甲氧基乙基、1-甲基-1-苯甲氧基-2-氟乙基、2,2,2-三氯乙基、2-三甲基矽烷乙基、2-(苯硒基)乙基、t-丁基、丙烯基、p-氯苯基、p-甲氧基苯基、2,4-二硝基苯基、苯甲基(Bn)、p-甲氧基苯甲基、3,4-二甲氧基苯甲基、o-硝基苯甲基、p-硝基苯甲基、p-鹵苯甲基、2,6-二氯苯甲基、p-氰基苯甲基、p-苯基苯甲基、2-甲基吡啶、4-甲基吡啶、3-甲基-2-甲基吡啶N-氧化物、二苯基甲基、p,p'-二硝基二苯甲基、5-二苯并環庚基、三苯基甲基、α-萘基二苯基甲基、p-甲氧基苯基二苯基甲基、二(p-甲氧基苯基)苯基甲基、三(p-甲氧基苯基)甲基、4-(4'-溴苯甲基醯氧苯基)二苯基甲基、4,4',4"-參(4,5-二氯酞醯亞胺基苯基)甲基、4,4',4"-參(乙醯丙醯氧基苯基)甲基、4,4',4"-參(苯甲醯氧基苯基)甲基、3-(咪唑-1-基)雙(4',4"-二甲氧基苯基)甲基、1,1-雙(4-甲氧基苯基)-1'-芘基甲基、9-蒽基、9-(9-苯基)　基、9-(9-苯基-10-氧基)蒽基、1,3-苯并二硫戊環-2-基、苯并異噻唑S,S-二氧化物、三甲基矽烷(TMS)、三乙基矽烷(TES)、三異丙基矽烷(TIPS)、二甲基異丙基矽烷(IPDMS)、二乙基異丙基矽烷(DEIPS)、二甲基叔己基矽烷、t-丁基二甲基矽烷(TBDMS)、t-丁基二苯基矽烷(TBDPS)、三苯甲基矽烷、三-p-二甲苯基矽烷、三苯基矽烷、二苯基甲基矽烷(DPMS)、t-丁基甲氧基苯基矽烷 (TBMPS)、甲酸鹽、苯甲醯基甲酸鹽、乙酸鹽、氯乙酸鹽、二氯乙酸鹽、三氯乙酸鹽、三氟乙酸鹽、甲氧基乙酸鹽、三苯基甲氧基乙酸鹽、苯氧基乙酸鹽、p-氯苯氧基乙酸鹽、3-苯基丙酸鹽、4-氧基戊酸鹽(戊酮酸鹽)、4,4-(乙烯二硫基)戊酸鹽 (戊酮基二硫基縮醛)、新戊酸鹽(pivaloate)、金剛酸鹽、巴豆酸鹽(crotonate)、4-甲氧基巴豆酸鹽、苯甲酸鹽、p-苯基苯甲酸鹽、2,4,6-三甲

基苯甲酸鹽 (mesitoate)、烷基甲基碳酸鹽、9-芴基甲基碳酸鹽(Fmoc)、烷基乙基碳酸鹽、烷基2,2,2-三氯乙基碳酸鹽(Troc)、2-(三甲基矽烷)乙基碳酸鹽(TMSEC)、2-(苯基磺醯基)乙基碳酸鹽(Psec)、2-(三苯基磷鎓基)乙基碳酸鹽(Peoc)、烷基異丁基碳酸鹽、烷基乙烯基碳酸鹽、烷基丙烯基碳酸鹽、烷基p-硝基苯基碳酸鹽、烷基苯甲基碳酸鹽、烷基p-甲氧基苯甲基碳酸鹽、烷基3,4-二甲氧基苯甲基碳酸鹽、烷基o-硝基苯甲基碳酸鹽、烷基p-硝基苯甲基碳酸鹽、烷基S-苯甲基硫基碳酸鹽、4-乙氧基-1-萘基碳酸鹽、甲基 二硫基碳酸鹽、2-碘基苯甲酸鹽、4-疊氮丁酸鹽、4-硝基-4-甲基戊酸鹽、o-(二溴甲基)苯甲酸鹽、2-甲醯基苯磺酸鹽、2-(甲基硫基甲氧基)乙基、4-(甲基硫基甲氧基)丁酸鹽、2-(甲基硫基甲氧基甲基)苯甲酸鹽、2,6-二氯-4-甲基苯氧基乙酸鹽、2,6-二氯-4-(1,1,3,3-四甲基丁基)苯氧基乙酸鹽、2,4-雙(1,1-二甲基丙基)苯氧基乙酸鹽、氯二苯基乙酸鹽、異丁酸鹽、單琥珀酸鹽、(E)-2-甲基-2-丁烯酸鹽、o-(甲氧基醯基)苯甲酸鹽、α-萘甲酸鹽、硝酸鹽、烷基 N,N,N',N'-四甲基偶磷基二醯胺鹽、烷基N-苯基胺甲酸鹽、硼酸鹽、二甲基硫膦基、烷基2,4-二硝基苯基次磺酸鹽、硫酸鹽、甲烷磺酸鹽(甲磺酸鹽)、苯甲基磺酸鹽及甲苯磺酸鹽 (Ts)。

【0091】 取代基之其他實例係更詳細地揭露於本文之發明說明、實施例及申請專利範圍。不應將上述所例示之取代基以任何方式限制本發明之範疇。

【0092】 本文所指「鹽」係指任何及所有鹽類。

【0093】 本文所指 「醫藥學上可接受之鹽」係指在良好醫藥評估下，適用於人類及低等動物之組織之接觸而不具過度的毒性、刺激性、過敏反

應及類似之反應之鹽類，且在合理利益/風險比例上具有相稱性。醫藥學上可接受之鹽屬習知技藝之範疇，例如Berge等人，describes pharmaceutically acceptable salts in detail in J. Pharmaceutical Sciences (1977) 66:1-19。根據本發明之化合物之醫藥學上可接受之鹽包括彼等衍生自適當無機及有機酸及鹼。醫藥學上可接受之鹽之實例包括無毒酸加成鹽，其係胺基基團的鹽與諸如鹽酸、氫溴酸、磷酸、硫酸及過氯酸之無機酸形成或與諸如乙酸、草酸、順丁烯二酸、酒石酸、檸檬酸、琥珀酸或丙二酸之有機酸形成，或利用習知技藝之其它方法，例如離子交換法。其他醫藥學上可接受之鹽包括己二酸鹽、海藻酸鹽、抗壞血酸鹽、天冬胺酸鹽、苯磺酸鹽、苯甲酸鹽、重硫酸鹽、硼酸鹽、丁酸鹽、樟腦酸鹽、樟腦磺酸鹽、檸檬酸鹽、環戊烷丙酸鹽、二葡萄糖酸鹽、十二烷基磺酸鹽、乙烷磺酸鹽、甲酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡萄庚酸鹽、甘油磷酸鹽、葡萄糖酸鹽、半硫酸鹽、庚酸鹽、己酸鹽、氫碘酸鹽、2-羥-乙烷磺酸鹽、乳糖酸鹽、乳酸鹽、月桂酸鹽、月桂基硫酸鹽、蘋果酸鹽、馬來酸鹽、丙二酸鹽、甲烷磺酸鹽、2-萘磺酸鹽、菸鹼酸鹽、亞硝酸鹽、十八烯酸鹽、草酸鹽、棕櫚酸鹽、雙羥萘酸鹽(pamoate)、果凍酸鹽、過硫酸鹽、3-苯基丙酸鹽、磷酸鹽、苦味酸鹽、三甲基乙酸酸鹽、丙酸鹽、硬脂酸鹽、琥珀酸鹽、硫酸鹽、酒石酸鹽、硫基氰酸鹽、p-甲苯磺酸鹽、十一酸鹽、戊酸鹽及其類似物。衍生自適當鹼的醫藥學上可接受之鹽包括鹼金屬、鹼土金屬、銨基及$N^+(C_{1-4}烷基)_4$鹽類。代表性的鹼金屬或鹼土金屬包括鈉、鋰、鉀、鈣、鎂及其類似物。在適當的情況下，醫藥學上可接受之鹽可進一步包括無毒性銨基、四級銨基及胺陽離子，其係使用諸如鹵化物、氫氧化物、羧酸鹽、

硫酸鹽、磷酸鹽、亞硝酸鹽、低級烷基磺酸鹽及芳基磺酸鹽之相對離子來形成。

【圖式簡單說明】

【0094】 圖1表示尾式丙烯基Gb3、Gb4、Gb5、Globo H及SSEA4之化學結構式。

【0095】 圖2表示糖基化反應結合核苷酸糖再生及合成之TLC監測結果。A:結合半乳糖基化反應及核苷酸糖再生之合成，例如丙烯基-Gb3。B:結合乙酉半乳糖胺基化反應及UDP-Gal再生之合成，例如丙烯基-Gb4。C:結合半乳糖基化反應及UDP-Gal再生之合成，例如丙烯基-Gb5。D: 結合岩藻糖基化反應及GDP-Fuc再生之合成，例如丙烯基-Globo H。E: 結合唾液酸反應及CMP-Neu5Ac再生之合成，例如丙烯基-SSEA4。

【0096】 圖3表示鞘糖脂之生物合成途徑，其涉及半乳糖殘基之加成，可經由本發明所述組合半乳糖轉移酶與UDP-Gal再生方法所催化而得。

【0097】 圖4表示利用核苷酸糖再生系統，以酵素性合成方法經由Lac→ Gb3→ Gb4→ Gb5途徑製備Globo H。

【0098】 圖5表示利用核苷酸糖再生系統，以酵素性合成方法經由Lac→ Gb3→ Gb4→ Gb5途徑製備SSEA4。

【0099】 圖6表示利用核苷酸糖再生系統，以酵素性合成方法經由丙烯基-Lac→丙烯基-Gb3→丙烯基-Gb4→丙烯基-Gb5途徑製備丙烯基-Globo H。

【0100】 圖7表示利用核苷酸糖再生系統，以酵素性合成方法經由丙烯基-Lac→丙烯基-Gb3→丙烯基-Gb4→丙烯基-Gb5途徑製備丙烯基-SSEA4。

【0101】 圖8表示生化合成過程中所得高純度之中間物丙烯基-Gb3、丙烯基-Gb4及丙烯基-Gb5。

【0102】 圖9表示利用未經修飾及經修飾之FutC經由生化合成而得高純度之丙烯基-Globo H。

【0103】 圖10表示利用JT-FAJ-16經由生化合成而得高純度之丙烯基-SSEA4。

【實施方式】

【0104】 以下係關於一種新發展之核苷酸糖再生方法，及其藉由一合適糖基轉移酶之反應，將糖基載入一適當受體之用途。本發明所採的策略在無須純化中間物下，即允許鏈反應來合成糖基化分子，例如Gb3、Gb4、Gb5、Globo H及SSEA4等寡糖，進而快速且大量生成糖基化產物。此外，本發明之方法可用於大規模製備所欲之寡糖及糖共軛物(glycoconjugates)。

【0105】 UDP-Gal再生系統及其半乳糖化之用途

【0106】 UDP-Gal再生系統係例示於圖2A，且所涉及之酵素則如下表1所例：

【0107】 表1：用於UDP-Gal再生系統之酵素

酵素	活性	實例
半乳糖激酶(GalK)	在ATP存在下，催化α-D-半乳糖之磷酸化反應，以生成半乳糖-1-磷酸(Gal-1-P)	大腸桿菌（如GenBank accession no. AP012306.1 智人(如GenBank accession no. NP_000145) 熱水海嗜熱菌(*M. hydrothermalis*)（如GenBank accession no. YP_004368991)) 生痰二氧化碳嗜纤维菌(*S. sputigena*)（如GenBank accession no. AEC00832) 軟髮菌(*H. hydrossis*)（如GenBank accession no. YP_004451189)
UDP-糖焦磷酸化酶(USP)	在UTP存在下，催化Gal-1-P轉換為UDP-Gal	擬南芥(如GenBank accession no. AF360236.1 利什曼原蟲(*L. major*)（如GenBank accession no. ABY79093) 克氏錐蟲(*T. cruzi*) (如GenBank accession no. ADD10758) 杜氏利什曼原蟲(*L. donovani*)（如GenBank accession no. XP_00385998) 大豆 (如GenBank accession no. NP_001237434)
丙酮酸激酶(PykF)	催化將源自磷酸烯醇丙酮酸鹽(PEP)的磷酸基團轉移成ADP的過程，以生成丙酮酸及ATP或UTP	大腸桿菌(如GenBank accession no. U00096.2) 漢堡硝化桿菌(*N. hamburgensis*)（如GenBank accession no. YP_576506) 紫色非硫光合菌(*R. palustris*)

酵素	活性	實例
		(如 GenBank accession no. YP_7830161) 威廉港鼠尾菌(*M. ruestringensis*) (如 GenBank accession no. YP_004787669) 軟髮菌(如GenBank accession no. YP_004450514) 球狀螺旋體(*S. coccoides*) (如 GenBank accession no. YP_00441096)
焦磷酸化酶(PPA)(視需要存在)	作用於二磷酸鹽鍵之酸酐水解酶	大腸桿菌 (如 GenBank accession no. U00096.2 藍隱藻(*G. theta*) (如GenBank accession no. CAI77906) 丁酸梭狀芽孢桿菌(*C. butyricum*) (如 GenBank accession no. ZP_04525837) 胚芽乳酸桿菌(*L. plantarum*) (如 GenBank accession no. EFK28054) 豬雙臼乳酸桿菌(*L. suebicus*) (如 GenBan accession no. ZP_09451344)

【0108】 如本文所定義用於UDP-Gal再生系統之酵素可以是野生型酵素。本文所指野生型酵素係一見於適當物種之自然存在之酵素。某些特定實例中，GalK、USP、PykF及PPA酵素可分別見於大腸桿菌、擬南芥、大腸桿菌及大腸桿菌。來自這些物種之酵素之實例業已見於表1。其他則可由熟習此項技藝人士鑑別而得，例如搜尋公開之基因資料庫，例如GenBank。根據本發明之其他實例，酵素可以是上述酵素的同系物

(homologs)，其亦屬熟習此項技藝人士所習知的範圍。例如，該等同系物可利用一實例酵素之胺基酸序列或編碼核苷酸序列作為搜尋索引，比對基因庫而得。

【0109】另一方面，涉及UDP-Gal再生系統之酵素可以是一對應野生型之功能性變異體。本文所指對應野生型之功能性變異體具有與對應野生型相同的酵素活性，且基本上與該對應野生型具有高度胺基酸序列相似性，例如至少與對應野生型具有80%、85%、90%、95或98%之胺基酸序列同一性。兩胺基酸序列之「同一性百分比」係利用Karlin及Altschul的運算方法來獲得(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990)，或經Karlin及Altschul修飾的運算方法來獲得(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993)。此種運算方法已被併入NBLAST及XBLAST程式(2.0版)(Altschul, 等人 J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990)。可使用XBLAST程式(score=50、wordlength=3)下進行BLAST蛋白質搜尋，來獲得所欲胺基酸序列之類似物。當兩個序列間有間斷時，可使用Altschul等人(Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997)所揭示的Gapped BLAST。當使用BLAST及Gapped BLAST程式時，可使用個別程式(如，XBLAST and NBLAST)所提供的預設參數。

【0110】功能性變異體可以有多種突變，其包括一或多個胺基酸殘基之插入、刪除或取代。該變異體之突變通常位於對野生型酵素之活性不具關鍵影響性之部位，即在功能性區域未產生突變或僅包含保守胺基酸之取代。對於熟習此項技藝之人士瞭解，可對硫辛酸連接酶突變體進行保守胺基酸取代能獲得功效相等之變異體，即，該等變異體保有該特定硫辛酸連

接酶突變體之功效。本文所指「保守胺基酸取代」係指一胺基酸取代不致改變該蛋白質之相對電荷或其大小特徵。熟習此項技藝之人士可利用習知的方法來改變多肽序列以製備變異體，彼等製備方法可參考以下文獻：例如，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, 等人, eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989或Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel,等人, eds., John Wiley & Sons, Inc., New York。胺基酸之保守性取代包括在以下胺基酸之間的取代:(a) M、I、L、V；(b) F、Y、W；(c) K、R、H；(d) A、G；(e) S、T；(f) Q、N及(g) E、D。

【0111】 任何涉及UDP-Gal再生系統的酵素均可藉由一般技術而製得。根據本發明之實例，酵素係分離自天然資源。根據本發明之其他實例，酵素係藉由一般重組技術而製得。如需要，標靶酵素的編碼序列可以根據其寄主細胞，作最適化之編碼調整。例如，藉由大腸桿菌細胞作為寄主製備酵素時，編碼該酵素之基因可經修飾使之所含密碼適用於大腸桿菌細胞中。

【0112】 如圖2A所示，UDP-Gal再生系統可與半乳糖化反應共軛，藉由半乳糖轉移酶的活性將半乳糖殘基添加至適當的基質上。半乳糖轉移酶的實例係例示於表2。

【0113】 表2 半乳糖轉移酶

半乳糖轉移酶	**酵素活性**	**實例**
β-1,4-半乳糖轉移酶(β4GalT)，包括異構型1-7(β-1,4-半乳糖轉移酶1-7)	自UDP-Gal催化轉移半乳糖至適當受體，例如在β-1,4連接方式下，末	*智人*[如，GI: 903740] 褐鼠[如GI: 3258653] 海洋桿菌 (*Zobellia*

半乳糖轉移酶	酵素活性	實例
	端具有2-乙醯胺-2-去氧-D-葡糖-基團之糖蛋白或糖脂質受體	*galactanivorans*) [如 GI: 340619721] *產氣莢膜梭狀芽孢桿菌* [如GI: 18309463]
β-1,3-半乳糖轉移酶 (β3GalT)	自UDP-Gal催化轉移半乳糖至適當的受體，例如在β-1,3-連接方式下，末端具有2-乙醯胺-2-去氧-D-葡糖-基團或GalNAc殘基之糖蛋白或糖脂質受體	致倦庫蚊 (*Culex quinquefasciatus*) [如 GI:167873909] 熱帶家蚊(*Zea mays*) [如 GI: 195643406] 腸道螺旋體(*Brachyspira pilosicoli*) [如 GI: 300871377] 尿腸球菌 (*Enterococcus faecium*) [如 GI: 257822935] 來自如流行性感冒嗜血桿菌[L42023.1]的LgtD
α-1,4-半乳糖轉移酶 (α4GalT) 例如： 乳糖醯基鞘胺醇 (Lactosylceramide) 4-α-半乳糖轉移酶	自UDP-Gal催化轉移半乳糖至適當的受體，例如在α-1,4連接方式下，具有末端半乳糖殘基或GlcNAc殘基上之糖蛋白或糖脂質受體	智人[如GI:55956926] 地中海雪貂 (*Mustela putorius furo*) [如 GI: 355666115] 家鼷鼠(*Mus musculus*) [如 GI: 51921295] 溝鼠 (*Rattus norvegicus*) [如GI: 67677925] 來自如腦膜炎雙球菌[如 AF355193.1]之LgtC
α-1,3-半乳糖轉移酶 (α3GalT) **例如：** α-1,3-半乳糖轉移酶1	自UDP-Gal催化轉移半乳糖至適當的受體，例如在α-1,3連接方式下，末端具有半乳糖殘	家鼷鼠[如GI:224922807] 地中海雪貂 [如 GI: 355690122] 僧帽猴(*Cebus paella*) [如

半乳糖轉移酶	酵素活性	實例
α-1,3-半乳糖轉移酶2	基或GlcNAc殘基之糖蛋白或糖脂質受體	GI: 19698748] 溝鼠[如GI: 28625949]

【0114】 如前所述之野生型半乳糖轉移酶及功能性變異體均屬於本案說明之範疇。該等半乳糖轉移酶可藉由一般方法而製得。

【0115】 UDP-Gal再生系統與一或多種半乳糖轉移酶之組合可在高產率下將半乳糖殘基添加至適當的基質(受體)。用於半乳糖轉移酶之基質係為此項技藝者所熟知者(如上述表2所示者)。較佳者，該基質具有一個末端糖殘基(例如，Gal、GalNAc或GlcNAc)，故半乳糖殘基可被添加至其上。某些實例中，該基質為多醣(具有大於50個單醣單元)、寡醣(具有2-50個單醣單元)、醣蛋白或醣多肽或醣脂質。用於本文所述半乳糖化方法之半乳糖轉移酶的形式係根據所欲終產物及合成該終產物之基質而定，其係此項技藝者所熟知之範疇。本文所述有關於組合UDP-Gal再生系統/半乳糖轉移酶之策略可用於醣鞘脂之合成。實例係例示於圖3。

【0116】 其他實例中，該等組合UDP-Gal再生系統/半乳糖轉移酶之策略可用於合成Globo系列寡糖，例如自乳糖合成 Gb3，或自Gb4合成Gb5。請參圖2A及2C。亦請參以下說明。

【0117】 UDP-GalNAc再生系統及其N-乙醯半乳糖胺化之用途

【0118】 UDP-GalNAc 再生系統可與N-乙醯半乳糖胺轉移酶(GalNAcT)(例如β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶)合併使用，在適當受體上加入GalNAc殘基。

【0119】 UDP-GalNAc再生系統所涉及之酵素的例子係如表3所示：

【0120】 表3: 用於UDP-GalNAc 再生系統之酵素

酵素	活性	實例
N-乙醯己糖胺1-激酶(GalNAcK)	藉連續兩基質-兩產物機制，將ATP及N-乙醯己糖胺轉換為ADP及N-乙醯-α-D-己糖胺1-磷酸	來自龍根菌(如GenBank accession no. CP000246.1)之GalNAcK 短雙歧桿菌(如GenBank accession no. ZP_06596651) 血溶性隱密桿菌(*A. haemolyticum*) (如GenBank accession no. YP_003696399 雙歧乳桿菌(如GenBank accession no. YP_003938776)
N-乙醯葡萄糖胺1-磷酸尿苷醯轉移酶(GlmU)	催化UTP及N-乙醯-α-D-葡萄糖胺1-磷酸轉換為二磷酸及UDP-N-乙醯-D-葡萄糖胺	來自大腸桿菌 (如GenBank accession no. U00096.2)之GlmU 擬南芥(如GenBank accession no. AEE31311) 比米琴吉歐菌(*G. bemidjiensis*) (如GenBank accession no. ACH37122) 幽門螺旋菌(如GenBank accession no. YP_003728906)
丙酮酸激酶(PykF)	自磷酸烯醇丙酮酸(PEP)催化轉移磷酸基團至ADP，以生成丙酮酸及ATP或UTP	大腸桿菌(如GenBank accession no. U00096.2) 漢堡硝化桿菌(如GenBank accession no. YP_576506) 紫色非硫光合菌(如GenBank accession no. YP_7830161) 威廉港鼠尾菌(如GenBank accession no.

酵素	活性	實例
		YP_004787669) 軟髮菌(如GenBank accession no. YP_004450514) 球狀螺旋體(如GenBank accession no. YP_00441096)
焦磷酸化酶(PPA) (視需要存在)	作用於二磷酸鹽鍵之酸酐水解酶	大腸桿菌(如GenBank accession no. U00096.2 藍隱藻(如GenBank accession no. CAI77906) 丁酸梭狀芽孢桿菌(如GenBank accession no. ZP_04525837) 胚芽乳酸桿菌(如GenBank accession no. EFK28054) 豬雙臼乳酸桿菌(如GenBan accession no. ZP_09451344)

【0121】N-乙烯半乳糖胺轉移酶(例如，β-1,3-GalNAcT或β-1,4-GalNAcT)係用於催化反應之酵素，該反應係將GalNAc殘基添加至適當的受體，例如胜肽或寡糖。實例包括來自流感嗜血桿菌(GenBank accession no. L42023.1.)的LgtD。其他實例包括，但不限於萊姆病螺旋體(*B. garinii*) (如GenBank accession no. AEW68905)的LgtD、乳糖奈瑟菌(*N. lactamica*) (如GenBank accession no. AAN08512)的LgtD及貓立克次體(*R. felis*) (如GenBank accession no. YP_246702) 的LgtD。

【0122】UDP-GalNAc再生系統/GalNAcT組合策略中所使用之任何酵素可為如本文所述之野生型酵素或其功能性變異體。任何傳統方法可用

於製備該等酵素。根據本發明之一實例，該策略係用於自Gb3合成Gb4，請參圖2B。

【0123】 GDP-Fuc再生系統及其岩藻糖化之用途

【0124】 GDP-Fuc再生系統可與岩藻糖轉移酶(例如，α-1,2-岩藻糖轉移酶、α-1,3-岩藻糖轉移酶或α-2,6-岩藻糖轉移酶)合併使用，將岩藻糖殘基添加至適當的受體(例如寡糖)，該受體可共軛至另一分子，例如脂肪或多肽。

【0125】 GDP-Fuc再生系統所涉及之酵素的例子係如表4所示：

【0126】 表4：用於GDP-Fuc再生系統之酵素

酵素	活性	實例
L-岩藻糖激酶/GDP-岩藻糖焦磷酸化酶(FKP)	可將岩藻糖及ATP產生Fuc-1-P及GDP-Fuc之生物功能性酵素	脆弱擬桿菌 (如GenBank accession no. CR626927.1) 智人(如GenBank accession no. NP_003829) 溝鼠(如GenBank accession no. NP_955788)
丙酮酸激酶(PykF)	自磷酸烯醇丙酮酸(PEP)催化轉移磷酸基團至ADP，以生成丙酮酸及ATP或UTP	大腸桿菌(如GenBank accession no. U00096.2) 漢堡硝化桿菌(如GenBank accession no. YP_576506) 紫色非硫光合菌(如GenBank accession no. YP_7830161) 威廉港鼠尾菌(如GenBank accession no. YP_004787669) 軟髮菌(如GenBank accession no.

酵素	活性	實例
		YP_004450514) 球狀螺旋體(如 GenBank accession no. YP_00441096)
焦磷酸化酶(PPA) (視需要存在)	作用於二磷酸鹽鍵之酸酐水解酶	大腸桿菌(如 GenBank accession no. U00096.2 藍隱藻(如 GenBank accession no. CAI77906) 丁酸梭狀芽孢桿菌(如 GenBank accession no. ZP_04525837) 胚芽乳酸桿菌(如GenBank accession no. EFK28054) 豬雙臼乳酸桿菌(如GenBan accession no. ZP_09451344)

【0127】岩藻糖轉移酶可將來自GDP-岩藻糖(鳥苷二磷酸鹽-岩藻糖)供體基質之L-岩藻糖轉移至適當的受體，該受體可為另一糖。在N-連結糖化反應下，岩藻糖轉移酶可將岩藻糖殘基添加至核心GlcNAc (N-乙醯葡萄糖胺)糖，或在O-連結醣化反應下，將該岩藻糖添加至蛋白質。岩藻糖轉移酶包括α-1,3-岩藻糖轉移酶、α-1,2-岩藻糖轉移酶及α-1,6-岩藻糖轉移酶。根據本發明之實例包括來自大腸桿菌 (如GenBank accession no. U00096.2)之α-1,2-岩藻糖轉移酶、來自脆弱擬桿菌(如GenBank accession no. YP_213404)之α-1,3-岩藻糖轉移酶及來自有爪蟾蜍(*X. laevis*) (如GenBank accession no. NP_001083664)之α-1,6-岩藻糖轉移酶。GDP-Fuc再生系統/FucT組合策略中所使用之任何酵素可為如本文所述之野生型酵素或其功能性變異體。該等酵素可用任何傳統方法製備。根據本發明之實例，該策略係用於自Gb3合成Gb4，請參圖2D。

【0128】 CMP-Neu5Ac再生系統及其唾液酸化(Sialylation)之用途

【0129】 CMP-Neu5Ac再生系統可與唾液酸轉移酶(如α-2,3-唾液酸轉移酶)組合以將唾液酸殘基(Neu5Ac)家至適當受體基質(如寡糖)。

【0130】 CMP-Neu5Ac再生系統所涉及之酵素例示於表5：

【0131】 表5：用於CMP-Neu5Ac再生系統之酵素

酵素	活性	實例
胞苷單磷酸激酶(CMK)	催化CMP之磷酸化反應以生成CDP	大腸桿菌（如GenBank accession no. U00096.2) 芽孢枯草桿菌(*B. amyloliquefaciens*)（如GenBank accession no. ABS74466) 麻瘋分枝桿菌(*M. leprae*)(如，GenBank accession no. CAB08279) 鳥結核桿菌(*M. avium*)（如GenBank accession no. AAS03731) 萊姆病螺旋體（如GenBank accession no. AEW68468)
CMP-唾液酸合成酶(Css)	將CTP及唾液酸催化合成CMP唾液酸	多殺性巴氏桿菌 (如GenBank accession no. AE004439.1 腦膜炎雙球菌（如GenBank accession no. AAB60780) 虹鱒(*O. mykiss*)（如GenBank accession no. BAB47150) 艾歐翰氏海洋菌(*I. ioihiensis*)（如GenBank accession no. AAV81361) 空腸曲桿菌(*C. jejuni*)（如

酵素	活性	實例
		GenBank accession no. ABI32334)
丙酮酸激酶(PykF)	自磷酸烯醇丙酮酸(PEP)催化轉移磷酸基團至ADP，以生成丙酮酸及ATP或UTP	大腸桿菌（如GenBank accession no. U00096.2) 漢堡硝化桿菌（如GenBank accession no. YP_576506) 紫色非硫光合菌 (如GenBank accession no. YP_7830161) 威廉港鼠尾菌（如GenBank accession no. YP_004787669) 軟髮菌 (如GenBank accession no. YP_004450514) 球狀螺旋體（如GenBank accession no. YP_00441096)
焦磷酸化酶(PPA) (視需要存在)	作用於二磷酸鹽鍵之酸酐水解酶	大腸桿菌（如GenBank accession no. U00096.2 藍隱藻 (如GenBank accession no. CAI77906) 丁酸梭狀芽孢桿菌（如GenBank accession no. ZP_04525837) 胚芽乳酸桿菌（如GenBank accession no. EFK28054) 豬雙臼乳酸桿菌 (如GenBan accession no. ZP_09451344)

【0132】唾液酸轉移酶係將唾液酸轉移至初生(nascent)寡醣之酵素。該酵素家族將唾液酸添添加至唾液酸化糖脂(神經節苷脂)之末端部位添加至糖蛋白之N-或O-聯糖鏈。約有20種不同的唾液酸轉移酶，包括以α-2,3鍵結唾液酸至半乳糖之唾液酸轉移酶(例如，α-2,3-唾液酸轉移酶)及

以α-2,6鍵結唾液酸至半乳糖或N-乙醯半乳糖胺之唾液酸轉移酶(例如，α-2,6-唾液酸轉移酶)。根據本發明之實例包括來自海洋細菌(*M. bacteria*) (GenBank accession no. AB308042.1)、小家鼠(如GenBank accession no. BAA06068)或多殺性巴氏桿菌(如GenBank accession no. AET17056)之α-2,3-唾液酸轉移酶以及來自家牛(*B. Taurus*) (如GenBank accession no. NP_001008668)、灰倉鼠(*C. griseus*) (如GenBank accession no. NP_001233744)或溝鼠(如GenBank accession no. AAC42086)之α-2,6-唾液酸轉移酶。

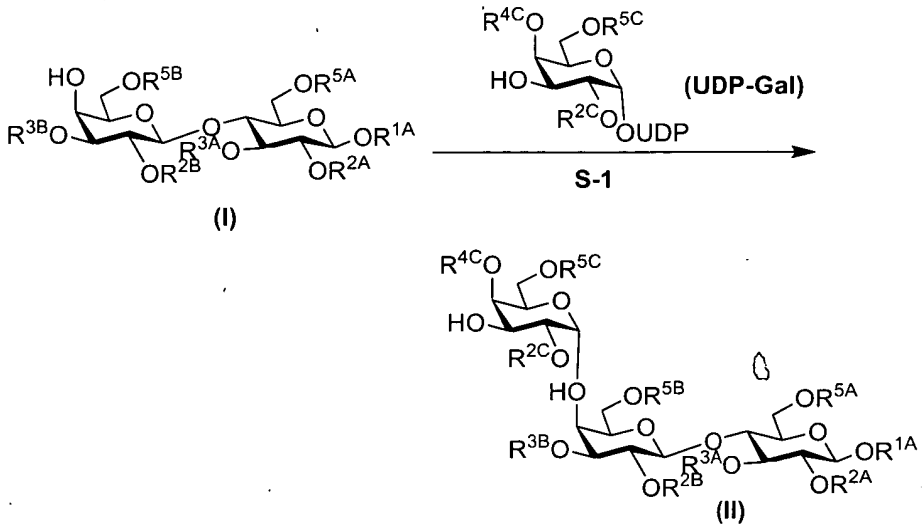
【0133】 CMP-Neu5Ac再生系統/唾液酸轉移酶組合策略所使用之酵素可為如本文所述之野生型酵素或其功能性變異體。該等酵素可用任何傳統方法製備。根據本發明之實例，該策略係用於自Gb3合成Gb4，請參圖2E。

【0134】 Globo系列寡醣之合成

【0135】 上述組合策略包括UDP-Gal再生/半乳糖轉移酶、UDP-GalNAc再生/GalNAcT、GDP-Fuc再生/岩藻糖轉移酶及CMP-Neu5Ac再生/唾液酸轉移酶，其可單獨地或經組合地應用，以合成Globo系列寡醣，包括Gb3、Gb4、Gb5、Globo H (岩藻糖-Gb5)及SSEA4 (唾液酸-Gb5)。如同下述更詳細的說明，所有 Globo-系列寡醣可以是未經取代或經取代的。

【0136】 步驟S-1

【0137】 生物合成方法中之第一步驟(S-1)係將式(I)化合物或其鹽經酵素性反轉為式(II)化合物或其鹽:



【0138】 其中R^{1A}為氫、經取代或未經取代之烷基、經取代或未經取代之烯基、經取代或未經取代之炔基、經取代或未經取代之環碳基、經取代或未經取代之雜環基、經取代或未經取代之芳基、經取代或未經取代之雜芳基或氧保護基團。R^{2A}、R^{3A}、R^{5A}、R^{2B}、R^{3B}、R^{5B}、R^{2C}、R^{4C}及R^{5C}係各自獨立地為氫、經取代或或經取代之C_{1-6}烷基或氧保護基團。

【0139】 因此，本發明之一方面係提供一種自式(I)化合物或其鹽酵素性合成式(II)化合物或其鹽之方法，其包括在尿苷二磷酸-Gal (UDP-Gal)及α-1,4半乳糖轉移酶存在下，轉換式(I)化合物為式(II)化合物，以及在上述表1所示之酵素組存在下，自半乳糖生成UDP-Gal，請見圖2A。為實施該酵素性反應，可將必要成份(如半乳糖、半乳糖轉移酶、UDP-Gal再生酵素組、ATP、UTP及其他(例如Mg^{++}))混合成一反應混合物，置於允許生成式(II)化合物的條件下培養。該等條件係此項技藝人士所熟知者。請參以下實例說明。

【0140】 R^{1A}基團可作為一功能性基團，允許Globo-系列寡糖共軛至另一分子，例如蛋白質或脂質。另一方面，其可作為一保護基團。

【0141】 某些特定實例中，R^{1A}為氫。

【0142】 在其他實例中，R^{1A}為經取代或未經取代之烷基，例如經取代或未經取代之C_{1-6}烷基、經取代或未經取代之C_{2-6}烷基、經取代或未經取代之C_{3-6}烷基、經取代或未經取代之C_{4-6}烷基、經取代或未經取代之C_{5-6}烷基、經取代或未經取代之C_{2-5}烷基、經取代或未經取代之C_{2-4}烷基、經取代或未經取代之C_{2-3}烷基、經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。如本文所定義之生物素及神經醯胺係被經取代之烷基所涵括。某些特定實例中，R^{1A}為未經取代之烷基。例如在一些特定實例中，R^{1A}為甲基、乙基、丙基、異丙基、第二丁基、異丁基或第三丁基。另一方面，某些特定實例中，R^{1A}為經取代之烷基。在一些特定實例中，R^{1A}係進一步被經取代或未經取代之硫、經取代或未經取代之胺基、羰基(例如，羧酸)、疊氮、烯基(例如，丙烯基)、炔基(例如，丙炔基)、生物素或神經醯胺基團所取代。某些特定實例中，該等取代基的取代位置係位於烷基之末端(最後一個碳原子)。某些特定實例中，R^{1A}係為經一或多個胺基(-NH2)基團所取代之烷基。某些特定實例中，R^{1A}係為在末端位置(最後一個碳原子)經胺基($-NH_2$)基團取代之烷基。某些特定實例中，R^{1A}為$-(CH_2)_n-NH_2$，其中n為1、2、3、4、5或6。某些特定實例中，R^{1A}為5-戊基胺基($-(CH_2)_5-NH_2$)。

【0143】 某些特定實例中，R^{1A}為經取代或未經取代之烯基，例如經取代或未經取代之C_{2-6}烯基、經取代或未經取代之C_{3-6}烯基、經取代或未經取代之C_{4-6}烯基、經取代或未經取代之C_{5-6}烯基、經取代或未經取代之C_{2-5}

烯基、經取代或未經取代之C_{2-4}烯基、經取代或未經取代之C_{2-3}烯基、經取代或未經取代之C_2烯基、經取代或未經取代之C_3烯基、經取代或未經取代之C_4烯基、經取代或未經取代之C_5烯基或經取代或未經取代之C_6烯基。某些特定實例中，R^{1A}係為$-(CH_2)_m-CH=CH_2$，其中n為1、2或3。某些特定實例中，R^{1A}係為丙烯基($-CH_2CH=CH_2$)。某些特定實例中，R^{1A}為進一步被經取代或未經取代之硫、經取代或未經取代之胺基、羰基(例如，羧酸)、疊氮、烯基(例如，丙烯基)、炔基(例如，丙炔基)、生物素或神經醯胺基團所取代之烯基。某些特定實例中，該等取代基的取代位置係位於烯基之末端(最後一個碳原子)。

【0144】 某些特定實例中，R^{1A}為經取代或未經取代之炔基，例如經取代或未經取代之C_{2-6}炔基、經取代或未經取代之C_{3-6}炔基、經取代或未經取代之C_{4-6}炔基、經取代或未經取代之C_{5-6}炔基、經取代或未經取代之C_{2-5}炔基、經取代或未經取代之C_{2-4}炔基、經取代或未經取代之C_{2-3}炔基、經取代或未經取代之C_2炔基、經取代或未經取代之C_3炔基、經取代或未經取代之C_4炔基、經取代或未經取代之C_5炔基或經取代或未經取代之C_6炔基。某些特定實例中，R^{1A}為進一步被經取代或未經取代之硫、經取代或未經取代之胺基、羰基(例如，羧酸)、疊氮、烯基(例如，丙烯基)、炔基(例如，丙炔基)、生物素或神經醯胺基團所取代之炔基。某些特定實例中，該等取代基的取代位置係位於炔基之末端(最後一個碳原子)。

【0145】 某些特定實例中，R^{1A}為經取代或未經取代之雜環基，例如經取代或未經取代之5-至8-員雜環基、經取代或未經取代之5-至7-員雜環基、經取代或未經取代之5-至6-員雜環基、經取代或未經取代之5-員雜環

基、經取代或未經取代之6-員雜環基、經取代或未經取代之7-員雜環基或經取代或未經取代之8-員雜環基。某些特定實例中，R^{1A}為進一步被經取代或未經取代之硫、經取代或未經取代之胺基、羰基(例如，羧酸)、疊氮、烯基(例如，丙烯基)、炔基(例如，丙炔基)、生物素或神經醯胺基團所取代之雜環基。

【0146】 某些特定實例中，R^{1A}為經取代或未經取代之環碳基，例如經取代或未經取代之C_{3-6}碳環基、經取代或未經取代之C_{3-5}碳環基、經取代或未經取代之C_{3-4}碳環基、經取代或未經取代之C_3碳環基、經取代或未經取代之C_4碳環基、經取代或未經取代之C_5碳環基或經取代或未經取代之C_6碳環基。某些特定實例中，R^{1A}為進一步被經取代或未經取代之硫、經取代或未經取代之胺基、羰基(例如，羧酸)、疊氮、烯基(例如，丙烯基)、炔基(例如，丙炔基)、生物素或神經醯胺基團所取代之碳環基。

【0147】 某些特定實例中，R^{1A}為經取代或未經取代之芳基，例如經取代或未經取代之C_6芳基(苯基)或經取代或未經取代之C_{10}芳基(萘基)。某些特定實例中，R^{1A}為進一步被經取代或未經取代之硫、經取代或未經取代之胺基、羰基(例如，羧酸)、疊氮、烯基(例如，丙烯基)、炔基(例如，丙炔基)、生物素或神經醯胺基團所取代之芳基。

【0148】 某些特定實例中，R^{1A}為經取代或未經取代之雜芳基，例如經取代或未經取代之5-員雜芳基或經取代或未經取代之6-員雜芳基。某些特定實例中，R^{1A}為進一步被經取代或未經取代之硫、經取代或未經取代之胺基、羰基(例如，羧酸)、疊氮、烯基(例如，丙烯基)、炔基(例如，丙炔基)、生物素或神經醯胺基團所取代之雜芳基。

【0149】 某些特定實例中，R^{1A}為氫、丙烯基、經取代之烷基、生物素或神經醯胺。

【0150】 本文進一步有關於，R^{1A}可為上述任一非氫基團之混合物，例如經取代或未經取代之烷基、經取代或未經取代之烯基、經取代或未經取代之炔基、經取代或未經取代之碳環基、經取代或未經取代之雜環基、經取代或未經取代之芳基、經取代或未經取代之雜芳基，以提供由包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10種不同基團所組合之鍵結基團。一非限制性之實例，R^{1A}可為由包含烷基及芳基基團所組合之鍵結基團，例如烷基-芳基-烷基，且其係視需要進一步在該鍵結基團之任一位置(例如末端位置)被經取代或未經取代之硫、經取代或未經取代之胺基、羰基(例如，羧酸)、疊氮、烯基(例如，丙烯基)、炔基(例如，丙炔基)、生物素或神經醯胺基團所取代。

【0151】 某些特定實例中，R^{1A}係如本文所定義之氧保護基團。

【0152】 某些特定實例中，R^{2A}為氫。某些特定實例中，R^{2A}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{2A}為氧保護基團。

【0153】 某些特定實例中，R^{3A}為氫。某些特定實例中，R^{3A}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷

基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{3A}為氧保護基團。

【0154】某些特定實例中，R^{5A}為氫。某些特定實例中，R^{5A}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{5A}為氧保護基團。

【0155】某些特定實例中，R^{2B}為氫。某些特定實例中，R^{2B}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{2B}為氧保護基團。

【0156】某些特定實例中，R^{3B}為氫。某些特定實例中，R^{3B}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{3B}為氧保護基團。

【0157】某些特定實例中，R^{5B}為氫。某些特定實例中，R^{5B}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{5B}為氧保護基團。

【0158】某些特定實例中，R^{2C}為氫。某些特定實例中，R^{2C}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{2C}為氧保護基團。

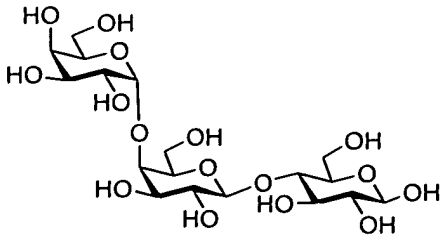
【0159】某些特定實例中，R^{4C}為氫。某些特定實例中，R^{4C}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{4C}為氧保護基團。

【0160】某些特定實例中，R^{5C}為氫。某些特定實例中，R^{5C}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{5C}為氧保護基團。

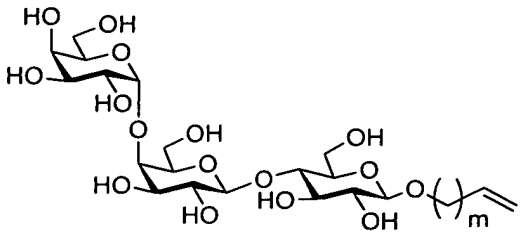
【0161】某些特定實例中，R^{2A}、R^{3A}、R^{5A}、R^{2B}、R^{3B}、R^{5B}、R^{2C}、R^{4C}及R^{5C}係各自獨立地為氫。某些特定實例中，R^{1A}為經取代或未經取代之烯基，且R^{2A}、R^{3A}、R^{5A}、R^{2B}、R^{3B}、R^{5B}、R^{2C}、R^{4C}及R^{5C}係各自獨立地為氫。某些特定實例中，R^{1A}為經取代或未經取代之烷基，且R^{2A}、R^{3A}、R^{5A}、R^{2B}、R^{3B}、R^{5B}、R^{2C}、R^{4C}及R^{5C}係各自獨立地為氫。

【0162】式(I)化合物之實例包括，但不限於其鹽類。

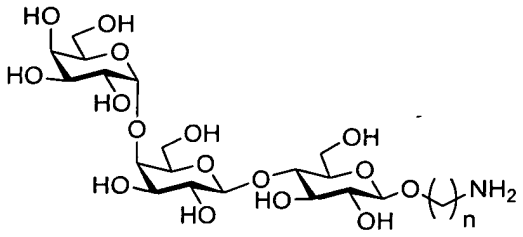
【0163】式(II)化合物之實例包括，但不限於以下：



，



，及

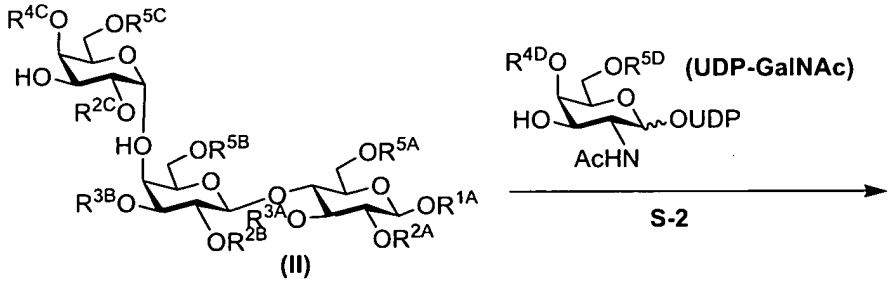


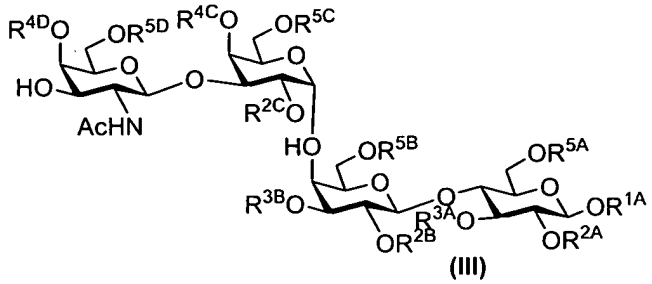
，

及其鹽類。

【0164】 步驟S-2

【0165】 生物合成方法之第二步驟(S-2)係將式(II)化合物或其鹽經酵素性轉換為式(III)化合物或其鹽：





【0166】 其中R^{1A}、R^{2A}、R^{3A}、R^{5A}、R^{2B}、R^{3B}、R^{5B}、R^{2C}、R^{4C}及R^{5C}係如本文所定義者，且其中R^{4D}及R^{5D}係各自獨立地為氫、經取代或未經取代之C_{1-6}烷基或氧保護基團。

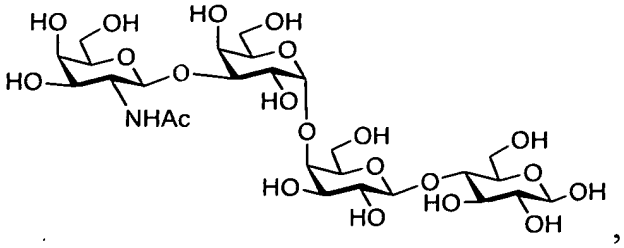
【0167】 某些特定實例中，R^{2D}為氫。某些特定實例中，R^{2D}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{2D}為氮保護基團，例如乙醯基(Ac；-C=OCH3)。

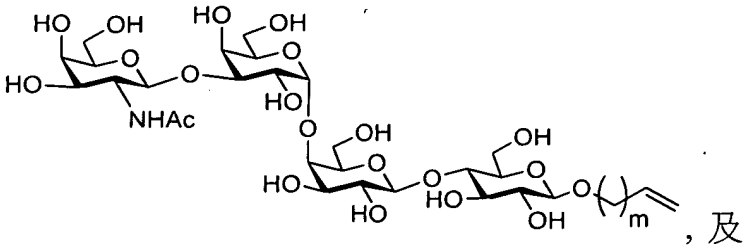
【0168】 某些特定實例中，R^{4D}為氫。某些特定實例中，R^{4D}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{4D}為氧保護基團。

【0169】 某些特定實例中，R^{5D}為氫。某些特定實例中，R^{5D}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{5D}為氧保護基團。

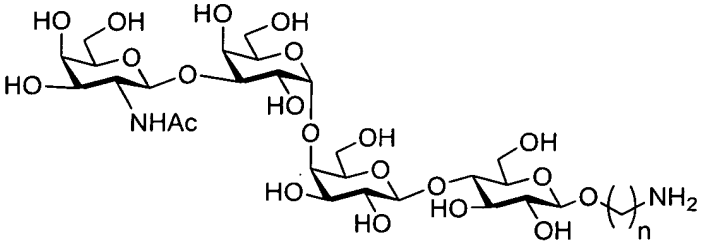
【0170】 某些特定實例中，R^{4D}及R^{5D}均為氫。某些特定實例中，R^{2D}為氮保護基團，例如乙醯基(Ac；-C=OCH3)，且R^{4D}及R^{5D}各自為氫。

【0171】 式(III)化合物之實例包括，但不限於以下：





，及



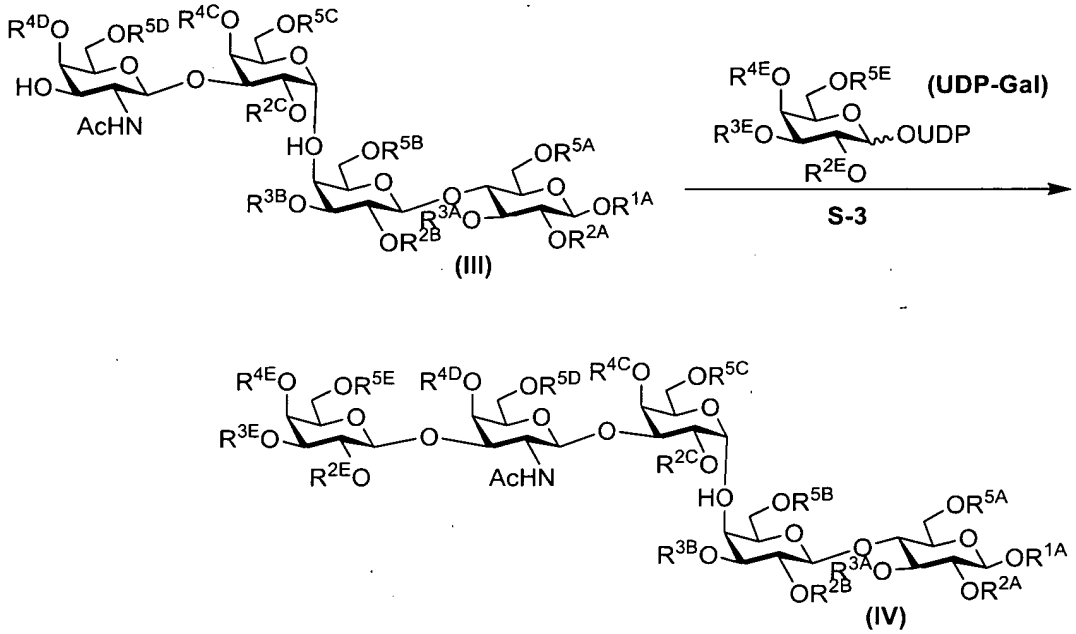
，

及其鹽。

【0172】 步驟(S-2)的方法，係在合適的條件下，將式(II)化合物或其鹽進行酵素性合成式(III)化合物或其鹽。式(II)化合物之基質可由任何此項技藝中習知的方法或本文所述的方法製得。某些實例中，式(II)化合物係分離自上述步驟S-1中的反應混合物。其他實例中，在無須純化式(II)化合物的情形下，可直接使用步驟S-1之整個反應混合物。在GalNAcT (例如，β-1,3-GalNAcT)存在及下，式(II)化合物可與UDP-GalNAc培養在允許式(II)化合物轉換為式(III)化合物的條件下。某些實例中，該GalNAcT-催化反應係與如本文所述之UDP-GalNAc再生方法予以結合。如圖2B所示。請見以下實例說明。

【0173】 步驟S-3

【0174】 生物合成方法之第三步驟(S-3)係將式(III)化合物或其鹽經酵素性轉換為式(IV)化合物或其鹽：



【0175】 其中R^{1A}、R^{2A}、R^{3A}、R^{5A}、R^{2B}、R^{3B}、R^{5B}、R^{2C}、R^{4C}、R^{5C}、R^{2D}、R^{4D}及R^{5D}係如本文所定義者，且R^{2E}、R^{3E}、R^{4E}及R^{5E}係各自獨立地為氫、經取代或未經取代之C_{1-6}烷基或氧保護基團。

【0176】 某些特定實例中，R^{2E}為氫。某些特定實例中，R^{2E}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例，R^{2E}為氧保護基團。

【0177】 某些特定實例中，R^{3E}為氫。某些特定實例中，R^{3E}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷

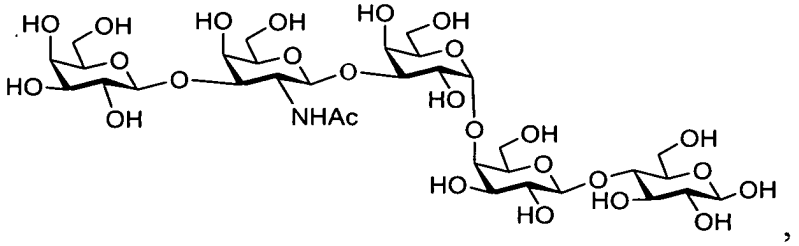
基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例，R^{3E}為氧保護基團。

【0178】 某些特定實例中，R^{4E}為氫。某些特定實例中，R^{4E}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{4E}為氧保護基團。

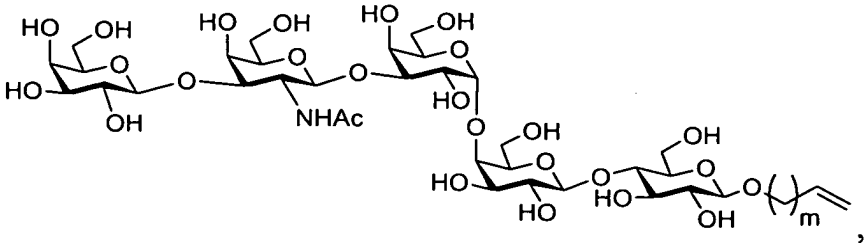
【0179】 某些特定實例中，R^{5E}為氫。某些特定實例中，R^{5E}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{5E}為氧保護基團。

【0180】 某些特定實例中，R^{2E}、R^{3E}、R^{4E}及R^{5E}各自為氫。

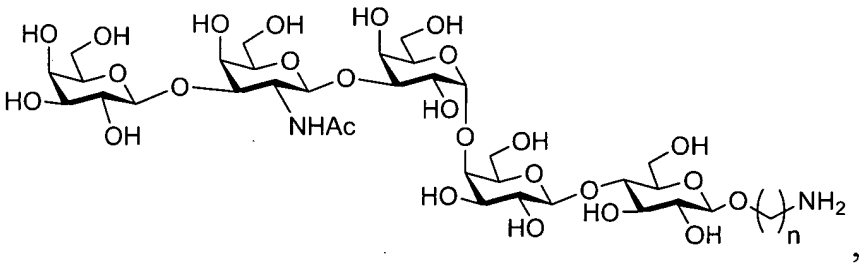
【0181】 式(IV)化合物之實例包括，但不限於以下：



，



，及



，

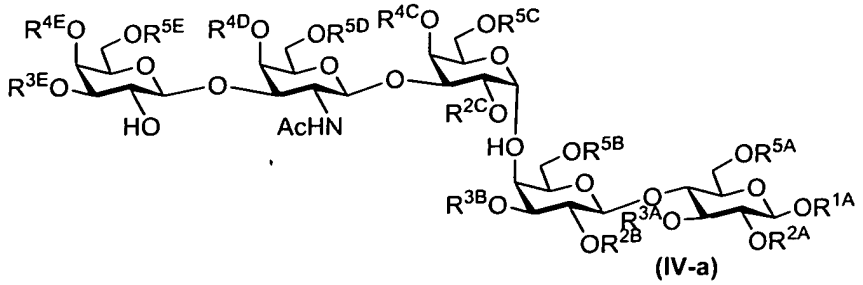
及其鹽。

【0182】 步驟S-3係有關β-1,3-半乳糖轉移酶活性所致之酵素反應，其係在此項技藝者所習知的條件下進行。式(III)化合物之基質，例如Gb4，可由任何此項技藝中習知的方法或本文所述的方法製得。某些實例中，式(III)化合物係分離自上述步驟S-2中的反應混合物。其他實例中，在無須純化式(III)化合物的情形下，可直接使用步驟S-2之整個反應混合物。在β-1,3-半乳糖轉移酶存在下，式(III)化合物可與UDP-Gal培養在允許轉換式(III)化合物為式(IV)化合物的條件下。某些實例中，該GalT-催化反應係與如本文所述之UDP-Gal再生方法予以結合。如圖2A所示。請見以下實例說明。

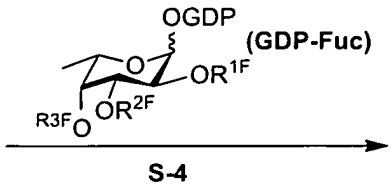
【0183】 某些特定實例中，β-1,3-GalNAcT/β-1,3-GalT雙功能性酵素(例如來自如流感嗜血桿菌之LgtD)可用於步驟S-2及步驟S-3。

【0184】 步驟S-4

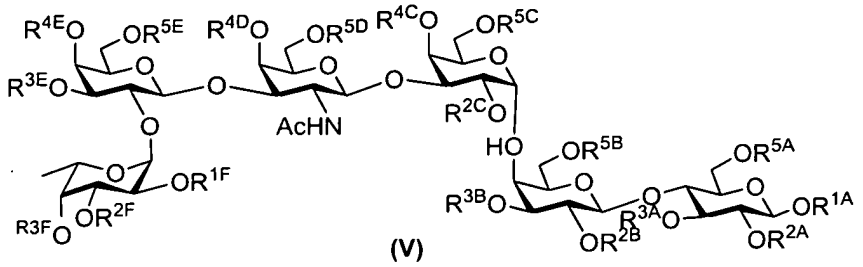
【0185】 式(IV)化合物可在其末端環E之不同位置上進行取代。例如，式(IV)化合物之某些特定態樣，其中R^{2E}為氫，在步驟S-4生物合成過程之一視需要步驟，涉及轉換式(IV-a)化合物或其鹽為式(V)化合物或其鹽。



(IV-a)



S-4



(V)

【0186】 其中R^{1A}、R^{2A}、R^{3A}、R^{5A}、R^{2B}、R^{3B}、R^{5B}、R^{2C}、R^{4C}、R^{5C}、R^{2D}、R^{4D}、R^{5D}、R^{3E}、R^{4E}及R^{5E}如本文所定義者，且R^{1F}、R^{2F}及R^{3F}係各自獨立地為氫、經取代或未經取代之C_{1-6}烷基或氧保護基團。

【0187】 某些特定實例中，R^{1F}為氫。某些特定實例中，R^{1F}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{1F}為氧保護基團。

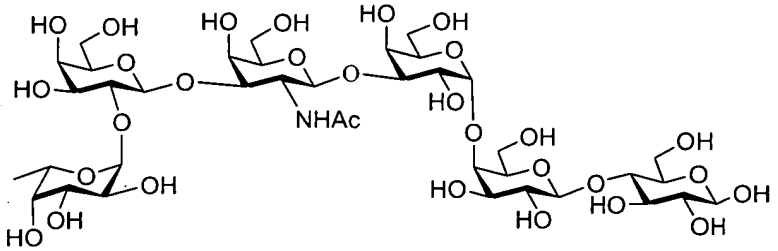
【0188】 某些特定實例中，R^{2F}為氫。某些特定實例中，R^{2F}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷

基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{2F}為氧保護基團。

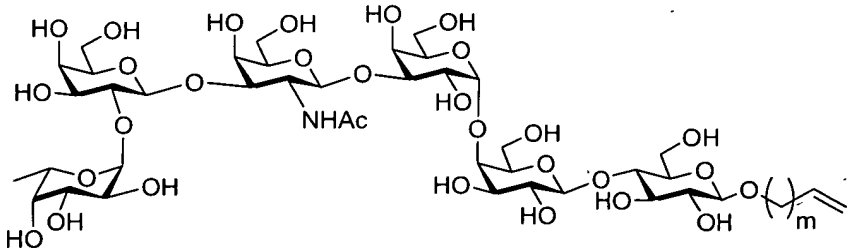
【0189】 某些特定實例中，R^{3F}為氫。某些特定實例中，R^{3F}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{3F}為氧保護基團。

【0190】 某些特定實例中，R^{1F}、R^{2F}及R^{3F}各自為氫。

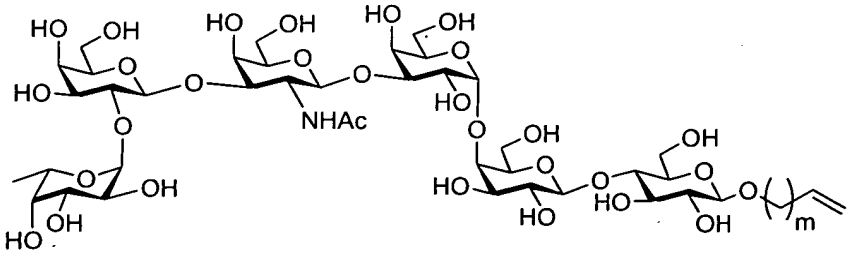
【0191】 式(V)化合物之實例包括，但不限於以下：



，



，及



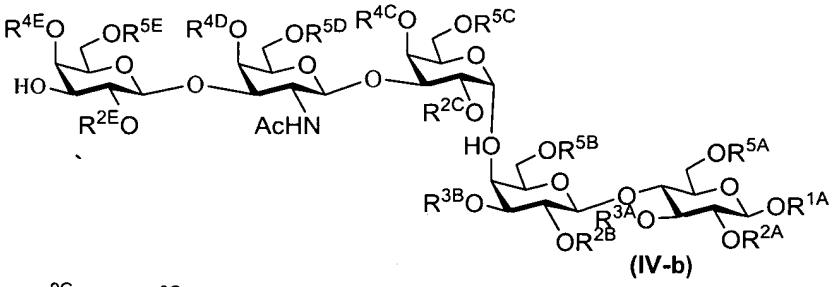
，

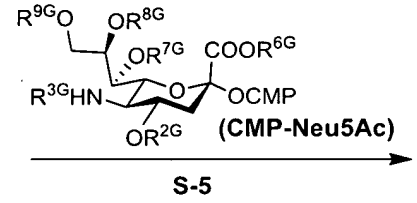
及其鹽。

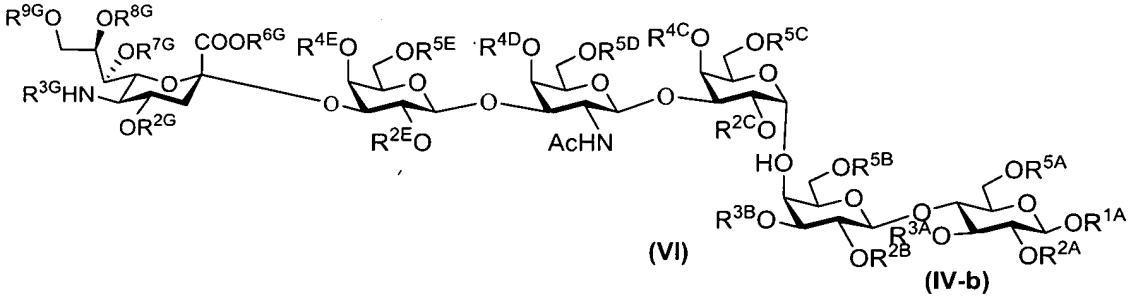
【0192】 步驟S-4涉及有關α-1,2-岩藻糖轉移酶活性所致之酵素反應，其係在此項技藝者所習知的條件下進行。式(IV)化合物之基質，例如Gb5，可由任何此項技藝中習知的方法或本文所述的方法製得。某些實例中，式(IV)化合物係分離自上述步驟S-3中的反應混合物。其他實例中，在無須純化式(V)化合物的情形下，可直接使用步驟S-3之整個反應混合物。在岩藻糖轉移酶存在下，式(IV)化合物可與GDP-Fuc培養在允許轉換式(IV)化合物為式(V)化合物的條件下。某些實例中，該FucT-催化反應係與如本文所述之UDP-Fuc再生方法予以結合，如圖2D所示。請見以下實例說明。

【0193】 步驟S-5

【0194】 式(IV)化合物之其他態樣，其中R^{3E}為氫，在步驟S-5生物合成過之一視需要步驟，涉及轉換式(IV-b)化合物或其鹽為式(VI)化合物或其鹽：







【0195】 其中R^{1A}、R^{2A}、R^{3A}、R^{5A}、R^{2B}、R^{3B}、R^{5B}、R^{2C}、R^{4C}、R^{5C}、R^{2D}、R^{4D}、R^{5D}、R^{2E}、R^{4E}及R^{5E}如本文所定義者；R^{3G}為氫、經取代或未經取代之C_{1-6}烷基或氮保護基團；且R^{6G}、R^{7G}、R^{8G}及R^{9G}各自獨立地為氫、經取代或未經取代之C_{1-6}烷基或氧保護基團。

【0196】 某些特定實例中，R^{3G}為氫。某些特定實例中，R^{3G}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{3G}為氮保護基團，例如乙醯基(Ac；-C=OCH3)。

【0197】 某些特定實例中，R^{6G}為氫。某些特定實例中，R^{6G}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷

基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{6G}為氧保護基團。

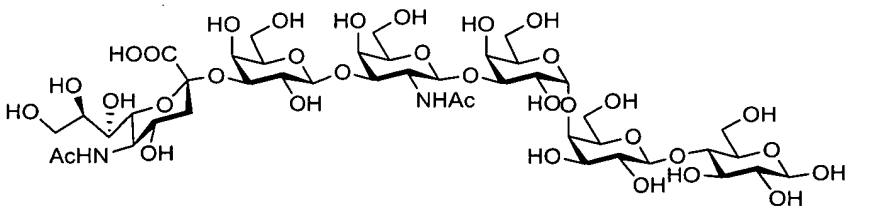
【0198】某些特定實例中，R^{7G}為氫。某些特定實例中，R^{7G}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{7G}為氧保護基團。

【0199】某些特定實例中，R^{8G}為氫。某些特定實例中，R^{8G}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{8G}為氧保護基團。

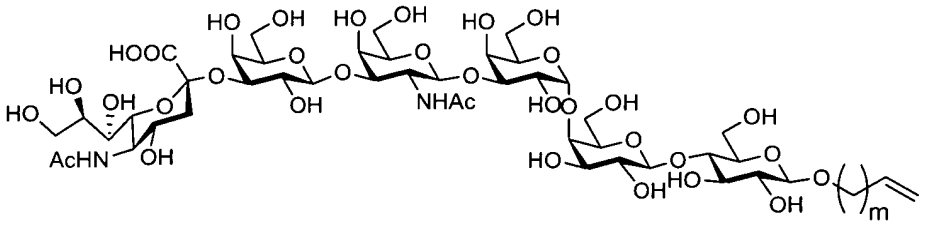
【0200】某些特定實例中，R^{9G}為氫。某些特定實例中，R^{9G}為經取代或未經取代之C_{1-6}烷基，例如經取代或未經取代之C_1烷基、經取代或未經取代之C_2烷基、經取代或未經取代之C_3烷基、經取代或未經取代之C_4烷基、經取代或未經取代之C_5烷基或經取代或未經取代之C_6烷基。某些特定實例中，R^{9G}為氧保護基團。

【0201】某些特定實例中，R^{6G}、R^{7G}、R^{8G}及R^{9G}各自為氫。某些特定實例中，R^{3G}為氮保護基團，例如乙醯基(Ac；-C=OCH3)；且R^{6G}、R^{7G}、R^{8G}及R^{9G}各自為氫。

【0202】式(V)化合物之實例包括，但不限於以下：

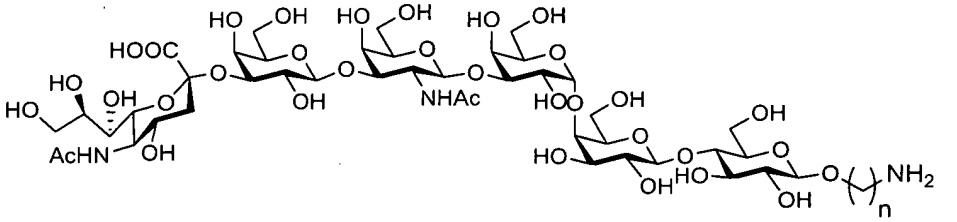


，



，

及



，

及其鹽。

【0203】 步驟S-5有關α-2,3-唾液酸轉移酶活性所致之酵素反應，其係在此項技藝者所習知的條件下進行。式(IV)化合物之基質，例如Gb5，可由任何此項技藝中習知的方法或本文所述的方法製得。某些實例中，式(IV)化合物係分離自上述步驟S-3中的反應混合物。其他實例中，在無須純化式(IV)化合物的情形下，可直接使用步驟S-3之整個反應混合物。在唾液酸轉移酶存在下，式(IV)化合物可與CMP-Neu5Ac培養在允許轉換式(IV)化合物為式(V)化合物的條件下。某些實例中，該唾液酸轉移酶-催化反應係與如本文所述之CMP-Neu5Ac再生方法予以結合。如圖2E所示。請見本文以下之實例說明。

【0204】 步驟S-1至S-5之個別及如上所述之任何組合均屬本發明所揭示之範疇。本發明亦包括以上述任何合成方法所製得之任何化合物，例如以上所述之化合物。

【0205】 根據本發明某些特定實例，本發明揭示一種自乳糖經由包括上述步驟S-1、S-2、S-3及S-4之鏈反應，或經由上述步驟S-1、S-2、S-3、S-4或S-5來合成Globo H或SSEA4。該Globo H或SSEA4可以是非尾式(untailed)(R^{1A}為氫；請見圖3及4)或尾式(例如，R^{1A}為丙烯基；請見圖5及6)。在每一步驟中，半乳糖轉移酶反應可與對應之核苷酸糖再生方法結合。請見圖3-6。根據本發明之一實例，上述方法係以一爐式(one-pot manner)來實施，即，每一個前反應混合物直接用於下一步反應，而無需將前一反應所得之基質予以純化。換言之，該一爐式方法免除純化任何中間物之步驟。或者，步驟S-1及步驟S-2係以一爐式在無須純化任何中間物的情形下實施。步驟S-2之後，Gb4係分離自反應混合物，且將該純化之GB4用於接著的步驟S-3、S-4及/或S-5。無須進一步純化其他中間物。

【0206】 用於每一反應步驟之酵素可各自溶解於反應混合物中，或固定於一或多個支持體上。如需要，在鏈反應過程中可添加額外的酵素。

【0207】 酵素反應器

【0208】 包括上述二或以上步驟之任何組合之酵素性鏈反應，可以在酵素反應器中進行，該反應器包括一或多個反應室。每個反應室係設計為進行該鏈反應之一個步驟。特言之，每個反應室各自包含上述步驟S-1至S-5中所涉及之酵素。

【0209】某些實例中，每個反應室中的一或多種酵素，或全部的酵素係固定於適當之支持體上(例如支持膜)。如需要，連續反應步驟的反應室可以連結，以至於當前反應室的酵素反應完成後，所得之反應混合物可流動至下一反應室來進行下個反應步驟。某些實例中，前反應之產物係未經純化，將包括產物之整個反應混合物加入至下個反應室中，來進行下個酵素性反應。請見圖3及4。

【0210】例如，步驟1-S之反應可在酵素反應器中的第一個反應室中進行，其中涉及步驟S-1的一或多種酵素係固定於支持體上。步驟S-1結束後，將第一反應室中的反應混合物(包括Gb3產物)置入第二反應室(包含步驟S-2合成Gb4所需之所有酵素及試劑)。在一實例中，將Gb4純化後用於下個反應步驟。在另一實例中，將第二反應室中的整個反應混合物(包括Gb4)置入第三反應室(包含步驟S-3合成Gb5所需之所有酵素及試劑)。此後，可將第三反應室中的反應混合物置入第四反應室(包含步驟S-4所需之所有酵素及試劑)，或置入第五反應室(包含步驟S-5所需之所有酵素及試劑)。

【0211】其他實例中，酵素反應器包含一個反應室，該反應室含有上述合成步驟之一所需之酵素、試劑及適當之基質。該基質係固定於支持體上。根據本發明之特定實例，反應室含有步驟S-1所需之酵素及試劑，其中基質(Lac-丙烯基)係固定於支持體上。Gb3-丙烯基在步驟S-1中被合成後，反應室中之反應混合物被第二反應混合物取代，該第二反應混合物包含步驟S-2所需之酵素及試劑。Gb4-丙烯基在步驟S-2中被合成後，第二反應混合物被包含步驟S-3 (合成Gb5-丙烯基)所需之所有酵素及試劑之第三反應混合物所取代。此後，第三反應混合物係被包含步驟S-4 (合成Globo H-丙

烯基)所需之酵素及試劑之第四反應物，或包含步驟S-5 (合成SSEA4-丙烯基)所需之酵素及試劑之第五反應物所取代。

【0212】 無須進一步的闡述，熟習此項技術者即可根據上述之說明實施本發明至最寬廣的範圍。因此，以下特定實例係用以說明，而非以任何方式限制本發明。本文中所揭示之所有參考文獻係根據其目的或內容以引用的方式併入本文中。

【0213】 實施例

【0214】 以下提供之實例有助於更瞭解本發明之此部份及其他部份，該等實例係說明本發明之特定實施態樣，並非限制本案所請之申請專利範圍。

【0215】 實例1：Globo系列寡醣之合成

【0216】 UDP-Gal再生之新方法

【0217】 在2004年，Kotake氏等人自豌豆苗發現UDP-糖焦磷酸化酶，該酵素對於不同單糖-1-磷酸具有寬廣的基質特異性，可形成UDP-糖。[19] 兩年後，Kotake氏等人及Somers氏等人分別發表類似功能之酵素，USP，其係存在於阿拉伯芥(*Arabidopsis*)中。[20],[21] 最近，同源酵素也被證實存在於寄生生物利什曼原蟲(*Leishmania*)及錐蟲(*Trypanosoma*)中。[22],[23] USP酵素備受矚目，因為它不僅保有使UTP與Glc-1-磷酸及Gal-1-磷酸濃縮(condense)的能力，尚具有可與其他單糖-1-P、GlcA-1-磷酸及Xyl-1-磷酸濃縮的能力。因此，我們選擇USP來直接將Gal-1-磷酸與UTP濃縮後進行UDP-Gal再生，進而達成UDP-Gal合成之第三再生。

【0218】 丙烯基-Gb3之合成

【0219】 反應混合物(200 mL)包含溶在100 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.0)中的丙烯基-Lac (10 mmol)、半乳糖(10 mmol)、磷酸烯醇丙酮酸(PEP) (22 mmol)、ATP (0.05 mmol)、UTP (0.125 mmol)及10 mM $MgCl_2$。將1,4-半乳糖轉移酶(LgtC) (100 U)、半乳糖激酶(GalK) (50 U)、UDP-糖焦磷酸化酶(USP) (150 U)、丙酮酸激酶(PykF) (200 U)及焦磷酸化酶(PPA) (200 U)加入其中以啟動反應。將燒瓶置於25°C下培養，並以TLC監測反應過程，以對-茴香醛染色標記。如任一反應尚未完成，則加入更多酵素直到反應完成。以TLC及ESI-MS確定產物。

【0220】 丙烯基-Gb4之合成

【0221】 在丙烯基-Gb3合成之後，再加入其他成分，該成分包括溶在220mL溶液中之N-乙醯半乳糖胺(GalNAc) (9.9 mmol)、PEP (22 mmol)、1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶(1,3GalNAcT, LgtD) (100 U)、N-乙醯己糖胺1-激酶(GalNAcK)(50 U)、N-乙醯葡萄糖胺1-磷酸尿苷醯轉移酶(GlmU) (200 U)、PykF (100 U)及PPA (100 U)。將混合物置於25°C下培養，並以TLC及ESI-MS 監測直到反應完全。進一步以C-18凝膠管柱純化該產物並以NMR確定特徵。

【0222】 丙烯基-Gb5之合成

【0223】 反應混合物(250 mL)包含溶在100 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.0)中的丙烯基-Gb4(9 mmol)、半乳糖(9 mmol)、PEP (22 mmol)、ATP (0.05 mmol)、UTP (0.125 mmol)及10 mM $MgCl_2$。在反應混合物中加入1,3-半乳糖轉移酶(1,3GalT, LgtD) (200 U)、GalK (50 U)、USP (150 U)、

PykF (100 U)及PPA (100 U)以啟動反應，並置於25°C下培養，直到反應完全。

【0224】 丙烯基-Globo H之合成

【0225】 將丙烯基-Gb5反應產物的一半量(~4.5 mmol)，在未經額外純化下即直接用來製備丙烯基-globo H。將包含岩藻糖(5 mmol)、ATP (0.05 mmol)、GTP (0.5 mmol)及PEP (11 mmol) (溶於100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0))之溶液加入L-岩藻糖激酶/GDP-岩藻糖焦磷酸化酶(FKP) (200 U)、PykF (200 U)、PPA (200 U)及1,2-岩藻糖轉移酶(FutC) (200 U)中，並置於25°C下培養直到反應完全，另以C-18凝膠層析純化該產物並確定其特徵。

【0226】 丙烯基-SSEA4之合成

【0227】 將丙烯基-Gb5反應混合物之另一半的量(4.5 mmol)用於合成丙烯基-SSEA4。於其中加入溶於100 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)中之N-乙醯基神經胺糖酸(Neu5Ac) (5 mmol)、ATP (0.05 mmol)、CTP (0.25 mmol)、PEP (11 mmol)及10 mM $MgCl_2$，接著加入胞苷單磷酸激酶(CMK) (50 U)、CMP-唾液酸合成酶(Css) (120 U)、PykF (100 U)、PPA (100 U)及α-2,3-唾液酸轉移酶(JT-FAJ-16) (150 U)。其過程由TLC監控，且如上述方法純化並確定該產物之特徵。

【0228】 寡醣之純化與特徵確定

【0229】 加熱反應混合物至90°C並維持30分鐘，續進行離心(5000 rpm，20分鐘)以去除反應混合物中的蛋白質。濾液續以C-18凝膠層析法純化並以梯度液(自100%水至10%甲醇(在水中))洗滌。收集餾分並以TLC [丁

醇/氫氧化銨/水=5:3:2 (v/v/v)]監測，收集丙烯基-寡糖的餾分並予以凍乾。藉由HPLC (使用Cosmosil 5SL-II管柱，在(H_2O/乙腈=19/81)下，在等度模式(isocratic mode)下)可獲得純度高於99%之產物。以1H NMR、^{13}C NMR及質譜儀(Avance 600及APEX-ultra 9.4 T FTICR-MS, Bruker Daltonics)分析丙烯基-Lac、丙烯基-Gb3、丙烯基-Gb4、丙烯基-Gb5、烯基丙基-Globo H及丙烯基-SSEA4之結構。

【0230】 用於核苷酸糖合成、糖基轉移酶及ATP再生之基因的選殖

【0231】 所有基因係藉由基因組DNA或cDNA庫，以個別引子(表6)經PCR而獲得，且將該PCR產物接入經修飾之pET47b載體。ATG之後，接著為His-tag、AcTEV 蛋白酶切割位置、及側接特別限制識別酶之ccdB正選擇基因(positive selection gene)，或在C-末端His-tag之pET28a。為了增加基因表現量，使用對大腸桿菌最優化的密碼來合成該四個糖基轉移酶。藉由化學轉形方法，將帶有正確序列的質體轉殖到ArcticExpress/RIL勝任細胞。挑選單一菌落，並將其接種至具有康黴素的TB培養基，隔夜培養後使用新鮮TB培養基更新細胞培養物。當OD600達到0.5時，以最中濃度為0.1 mM之IPTG誘發標的蛋白質的表現。接著繼續在16°C下生長24小時候，收集該大腸桿菌，並在含有50mM磷酸鈉緩衝液(pH8.0)、300mM氯化納及10mM咪唑的緩衝液中，以微液化器將細胞打破。將該細胞在4°C及10,000 rpm下離心30分鐘。將懸浮液倒入經平衡的Ni-NTA瓊脂，且將沉澱物丟棄。使用相同的緩衝液(惟所含咪唑的濃度較高(250mM))將結合的蛋白質洗提出來。使用Qubit Protein Quantitation (Invitrogen, CA)測量蛋白質濃度，並用SDS-PAGE確認其純度。

【0232】 表6：用於在大腸桿菌中表現唾液酸酶的引子

SEQ ID NO	引子[a]	序列 (5′→3′)	限制酶位置	來自基因組或 cDNA 庫的基因源
SEQ ID NO: 1	*galK*-F	CTGTATTTTCAGGGAGCGATCGCTATGAGTCTGAAAGAAAAAACA[b]	AsiSI	大腸桿菌 MG1655 ATCC 700926
SEQ ID NO: 2	*galK*-R	GCCTCGAGTCATTACGTTTAAACTCAGCACTGTCCTGCTCCTTG	PmeI	
SEQ ID NO: 3	*usp*-F	CTGTATTTTCAGGGAGCGATCGCTATGGCTTCTACGGTTGATTC	AsiSI	擬南芥的 cDNA 庫
SEQ ID NO: 4	*usp*-R	GCCTCGAGTCATTACGTTTAAACTCAATCTTCAACAGAAAATTTGC	PmeI	
SEQ ID NO: 5	*lgtC*-F[b]	GATATACCATGGAAATGGACATCGTTTTCGCGGCG	NcoI	最優化基因
SEQ ID NO: 6	*lgtC*-R[b]	GTGGTGCTCGAGGTAGATTTTACGCAGGAAACG	XhoI	
SEQ ID NO: 7	*galnacK*-F	CTGTATTTTCAGGGAGCGATCGCTATGAACAAGACTTATGATTTTAAAAG	AsiSI	龍根菌 ATCC 15697
SEQ ID NO: 8	*galnacK*-R	GCCTCGAGTCATTACGTTTAAACTTAAATGTATGAATATACTATCTTC	PmeI	
SEQ ID NO: 9	*glmU*-F	CTGTATTTTCAGGGAGCGATCGCTATGTTGAATAATGCTATGAGC	AsiSI	大腸桿菌 MG1655 ATCC 700926
SEQ ID NO: 10	*glmU*-R	GCCTCGAGTCATTACGTTTAAACTCACTTTTTCTTTACCGGACG	PmeI	
SEQ ID NO: 11	*lgtD*-F[b]	GATATACCATGGAAAACTGCCCGCTGGTTTCT	NcoI	最優化基因
SEQ ID NO: 12	*lgtD*-R[b]	GTGGTGCTCGAGGAAGATAACGTTGATTTTACGG	XhoI	
SEQ ID NO: 13	*fkp*-F	CAGGGAGCGATCGCTATGCAAAAACTACTATCTTTA	AsiSI	脆弱擬桿菌 9343 ATCC 25285
SEQ ID NO: 14	*fkp*-R	CATTACGTTTAAACTTATGATCGTGATACTTGGAA	PmeI	
SEQ ID NO: 15	*futC*-F[b]	CTGTATTTTCAGGGAGCGATCGCTATGGCGTTCAAAGTTGTTCAG	AsiSI	最優化基因
SEQ ID NO: 16	*futC*-R[b]	GCCTCGAGTCATTACGTTTAAACTTACGCGTTGTATTTCTGAGAT	PmeI	
SEQ ID NO: 17	*cmk*-F	CAGGGAGCGATCGCTATGACGGCAATTGCCCCGGTT	AsiSI	大腸桿菌 MG1655

SEQ ID NO	引子[a]	序列 (5'→3')	限制酶位置	來自基因組或 cDNA 庫的基因源
SEQ ID NO: 18	*cmk*-R	CATTACGTTTAAACTTATGCGAGAGCCAATTTCTG	PmeI	ATCC 700926
SEQ ID NO: 19	*css*-F	GATATACCATGGAAACAAATATTGCGATCATTCCTG	NcoI	多殺性巴氏桿菌 ATCC BAA-1113
SEQ ID NO: 20	*css*-R	GTGGTGCTCGAGTTTATTGGATAAAATTTCCGCGAG	XhoI	
SEQ ID NO: 21	*jt-faj-16*-F[b]	GATATACCATGGAAATGAACAACGACAACTCTACC	NcoI	最優化基因
SEQ ID NO: 22	*jt-faj-16*-R[b]	GTGGTGCTCGAGGATGTCAGAGATCAGTTTGATG	XhoI	
SEQ ID NO: 23	*pykF*-F	CTGTATTTTCAGGGAGCGATCGCTATGAAAAAGACC AAAATTGTTTG	AsiSI	大腸桿菌 MG1655 ATCC 700926
SEQ ID NO: 24	*pykF*-R	GCCTCGAGTCATTACGTTTAAACTTACAGGACGTGA ACAGATG	PmeI	
SEQ ID NO: 25	*ppa*-F	CAGGGAGCGATCGCTATGAGCTTACTCAACGTCCCT	AsiSI	大腸桿菌 MG1655 ATCC 700926
SEQ ID NO: 26	*ppa*-R	CATTACGTTTAAACTTATTTATTCTTTGCGCGCTC	PmeI	

[a]用於正向(F)及逆向(R) PCR反應以放大各基因之編碼序列的引子對。

[b] 粗底線意表限制酶識別位置。

[c] 用於大腸桿菌之最優化密碼。見如 Puigbò等人, *Nucleic Acids Research* (2007) 35(S2):W126-W130。

【0233】 酵素分析

【0234】 為維持恆定的分析條件，所有活性測定均在37°C，以10mM $MgCl_2$、100mM Tris以及pH為7.5的條件下進行。

【0235】 (i)半乳糖激酶(GalK)、N-乙醯己糖胺1-激酶(GalNAcK)、岩藻糖激酶(FKP)及胞苷單磷酸激酶(CMK)活性測定

【0236】 螢光分析法係基於ADP產量(ATP消耗量)的監測，其係使用測量NADH消耗量的丙酮酸激酶/乳酸脫氫酶結合酵素分析。見如，Murray

等人, "Mechanism of Human α-1,3-Fucosyltransferase V: Glycosidic Cleavage Occurs Prior to Nucleophilic Attack" Biochemistry (1997) 36:823-831; 及Gosselin等人, "A Continuous Spectrophotometric Assay for Glycosyltransferases" Analytical Biochemistry (1994) 220:92-97。NADH的螢光特性為具有340 nm的激發波長及450 nm的放射波長。調配100 uL的反應混合物，其含有在100 mM Tris (pH 7.5)中之該結合酵素(來自兔子肌肉的丙酮酸激酶(5單位)及乳酸脫氫酶(7單位))、基質及輔助因子(0.2 mM NADH、0.8 mM PEP及10 mM $MgCl_2$)。藉由加入個別的糖來啟動反應。Kcat及Km動力參數係使用Grafit version 7 (Erithacus Software, Middlesex, UK)的理論方程式，藉由適用該實驗數據的曲線來計算。一單位糖激酶活性的定義為，在25°C下，每分鐘可形成1 umol糖-1-P的量。

【0237】 (ii) UDP-糖焦磷酸化酶(USP)、N-乙醯葡萄糖胺1-磷酸尿苷醯轉移酶(GlmU)、GDP-L-岩藻糖焦磷酸化酶(FKP)及CMP-唾液酸合成酶(Css)活性的測量

【0238】 焦糖酸鹽的產量係使用EnzCheck Pyrophosphate Assay Kit (Invitrogen, CA, USA)來測量。分析成分包括：在UV-Star微盤(Greiner Bio One, Germany)中的200 uM 2-胺基-6-巯基-7-甲基嘌呤核糖核苷、1單位核苷磷酸化酶、0.03單位無機焦磷酸化酶、10 mM $MgCl_2$及50 mM Tris (pH 7.5於100uL規模)。除FKP外，所有的成分皆在微盤中混合並使其平衡，直到形成平基礎線。藉由加入酵素來啟動反應。除CMP-唾液酸合成酶外，一單位酵素活性的定義為，在25°C下，每分鐘可由個別糖-1-P形成1 umol核

苷糖的量；至於CMP-唾液酸合成酶，其一單位酵素活性係定義為，在25°C下，每分鐘可形成1 umol焦糖酸鹽的量。

【0239】(iii)糖基轉移酶的測量：α-1,4-半乳糖轉移酶(LgtC)、β1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶(β1,3GalNAcT，LgtD)、β-1,3-半乳糖轉移酶(LgtD),α-1,2-岩藻糖轉移酶(FutC)及α-2,3-唾液酸轉移酶(JT-FAJ-16)。

【0240】使用螢光分析法監測UDP、GDP或CDP的生產，其係使用測量NADH消耗量的丙酮酸激酶/乳酸脫氫酶結合酵素分析。見如，Murray等人，"Mechanism of Human α-1,3-Fucosyltransferase V: Glycosidic Cleavage Occurs Prior to Nucleophilic Attack" Biochemistry (1997) 36:823-831; 及Gosselin等人，"A Continuous Spectrophotometric Assay for Glycosyltransferases" Analytical Biochemistry (1994) 220:92-97。除了核苷糖，所有的分析成分係在25°C下，同時置於多孔盤螢光劑量儀(SpectraMax M2 Readers, Molecular Devices)中培養。藉由加入對應的核苷糖來啟動反應。Kcat及Km動力參數係使用Grafit version 7 (Erithacus Software, Middlesex, UK)的理論方程式，藉由適用該實驗數據的曲線來計算。一單位活性的定義為，在25°C下，每分鐘可自各別核苷糖中，催化轉移1 umol糖至受體的酵素量。

【0241】(iv)丙酮酸激酶(PyrK)的量測

【0242】丙酮酸激酶分析法係將前述的糖基酶稍作修改而來，且亦為基於NADH的消耗量。製備100 uL的反應混合物，其包含在100 mM Tris (pH 7.5)中之0.8 mM ADP、0.8 mM PEP、0.2 mM NADH、10 mM $MgCl_2$及來自兔子肌肉的乳酸脫氫酶(5單位)，該混合物係置於黑色多孔盤。

NADH具有340 nm的激發波長及450 nm的放射波長。藉由加入適當量之重組大腸桿菌丙酮酸激酶來啟動反應。一單位酵素活性的定義為，在25°C下，每分鐘可由個別糖-1-P形成1 umol核苷糖的量；至於CMP-唾液酸合成酶，其一單位的丙酮酸激酶係定義為，在25°C下，每分鐘能將1 umol磷酸(烯醇)丙酮酸轉成丙酮酸的量。

【0243】 (v)焦磷酸化酶(PPA)的量測

【0244】 焦磷酸化酶分析法係將來自EnzCheck Pyrophosphate Assay Kit (Invitrogen, CA, USA)套組所提供的磷酸化酶測量法，稍作修改而來。分析成分包括：1mM焦糖酸鹽、200 uM 2-胺基-6-巯基-7-甲基嘌呤核糖核苷、1單位核苷磷酸化酶、10 mM $MgCl_2$及50 mM Tris (pH of 7.5)，其係與適當量之重組大腸桿菌焦磷酸化酶，以100 uL規模置於UV-Star微盤(Greiner Bio One, Germany)中。一單位之焦磷酸化酶活性係定義為，在25°C下，每分鐘能釋放1.0 umole無機焦糖酸鹽的量。

【0245】 (vi)最佳pH之量測

【0246】 酵素活性的最佳pH係在4.0-10.0的範圍內，使用前述的標準酵素分析方法來量測，其包括醋酸鈉、MES、MOPS、HEPES、Tris-HCl及CHES緩衝液。該緩衝液的pH值係在培養溫度下調整。所有的反應皆進行三重複以利統計評估。

【0247】 (vii)最佳二價金屬離子的量測

【0248】 所需金屬的分析係在標準分析條件下進行。在EDTA的存在或不存在下，將酵素與金屬離子(Mg^{2+}、Mn^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ca^{2+}、Zn^{2+}、

Co^{2+}或Ni^{2+})混合(最終濃度10 mM)。所有的反應皆進行三重複以利統計評估。

【0249】 (viii)最佳溫度的量測

【0250】 溫度對酵素活性的影響力之評估,係將適當量的純酵素培養在MOPS緩衝液(pH 7.0)、10 mM $MgCl_2$及個別基質中。為維持分析的一致性,先將所有的成分混和好,且在分析溫度下預熱5分鐘,再於恆定的溫度下,將酵素加入來啟動反應,並以多模態平盤讀取機(SpectraMax M5, Molecular Devices)來記錄。溫度範圍在20至60°C間。所有的反應皆進行三重複以利統計評估。

【0251】 酵素組合物

【0252】 UDP-Gal再生/半乳糖基化

【0253】 GalK:源自大腸桿菌之半乳糖激酶

【0254】 USP:源自擬南芥之UDP-糖焦磷酸化酶

【0255】 LgtC:源自腦膜炎雙球菌之1,4半乳糖轉移酶,但其密碼對大腸桿菌最優化

【0256】 PykF:源自大腸桿菌之丙酮酸激酶

【0257】 PPA:源自大腸桿菌之焦磷酸化酶

【0258】 密碼最優化之LgtC酵素的編碼序列係如下所示(SEQ ID NO: 27):

ATGGACATCGTTTTCGCGGCGGACGACAACTACGCGGCGTAC
CTGTGCGTTGCGGCGAAATCTGTTGAAGCGGCGCACCCGGACACC
GAAATCCGTTTCCACGTTCTGGACGCGGGTATCTCTGAAGCGAAC

CGTGCGGCGGTTGCGGCGAACCTGCGTGGTGGTGGTGGTAACATC
CGTTTCATCGACGTTAACCCGGAAGACTTCGCGGGTTTCCCGCTGA
ACATCCGTCACATCTCTATCACCACCTACGCGCGTCTGAAACTGG
GTGAATACATCGCGGACTGCGACAAAGTTCTGTACCTGGACATCG
ACGTTCTGGTTCGTGACTCTCTGACCCCGCTGTGGGACACCGACCT
GGGTGACAACTGGCTGGGTGCGTGCATCGACCTGTTCGTTGAACG
TCAGGAAGGTTACAAACAGAAAATCGGTATGGCGGACGGTGAAT
ACTACTTCAACGCGGGTGTTCTGCTGATCAACCTGAAAAAATGGC
GTCGTCACGACATCTTCAAAATGTCTTGCGAATGGGTTGAACAGT
ACAAAGACGTTATGCAGTACCAGGACCAGGACATCCTGAACGGTC
TGTTCAAAGGTGGTGTTTGCTACGCGAACTCTCGTTTCAACTTCAT
GCCGACCAACTACGCGTTCATGGCGAACCGTTTCGCGTCTCGTCA
CACCGACCCGCTGTACCGTGACCGTACCAACACCGTTATGCCGGT
TGCGGTTTCTCACTACTGCGGTCCGGCGAAACCGTGGCACCGTGA
CTGCACCGCGTGGGGTGCGGAACGTTTCACCGAACTGGCGGGTTC
TCTGACCACCGTTCCGGAAGAATGGCGTGGTAAACTGGCGGTTCC
GCACCGTATGTTCTCTACCAAACGTATGCTGCAGCGTTGGCGTCGT
AAACTGTCTGCGCGTTTCCTGCGTAAAATCTACTGA

【0259】 UDP-GalNAc再生/乙醯半乳糖胺化

【0260】 GalNAcK：源自龍根菌之N-乙醯己糖胺1-激酶

【0261】 GlmU：源自大腸桿菌之N-乙醯葡萄糖胺1-磷酸尿苷醯轉移酶

【0262】 LgtD：源自流感嗜血桿菌之 1,3半乳糖轉移酶，但其密碼對大腸桿菌最優化

【0263】 PykF：源自大腸桿菌之丙酮酸激酶

【0264】 PPA：源自大腸桿菌之焦磷酸化酶

【0265】 密碼最優化之LgtD酵素的編碼序列係如下所示(SEQ ID NO: 28)：

ATGGAAAACTGCCCGCTGGTTTCTGTTATCGTTTGCGCGTAC
AACGCGGAACAGTACATCGACGAATCTATCTCTTCTATCATCAAC
CAGACCTACGAAAACCTGGAAATCATCGTTATCAACGACGGTTCT
ACCGACCTGACCCTGTCTCACCTGGAAGAAATCTCTAAACTGGAC
AAACGTATCAAAATCATCTCTAACAAATACAACCTGGGTTTCATC
AACTCTCTGAACATCGGTCTGGGTTGCTTCTCTGGTAAATACTTCG
CGCGTATGGACGCGGACGACATCGCGAAACCGTCTTGGATCGAAA
AAATCGTTACCTACCTGGAAAAAAACGACCACATCACCGCGATGG
GTTCTTACCTGGAAATCATCGTTGAAAAAGAATGCGGTATCATCG
GTTCTCAGTACAAAACCGGTGACATCTGGAAAAACCCGCTGCTGC
ACAACGACATCTGCGAAGCGATGCTGTTCTACAACCCGATCCACA
ACAACACCATGATCATGCGTGCGAACGTTTACCGTGAACACAAAC
TGATCTTCAACAAAGACTACCCGTACGCGGAAGACTACAAATTCT
GGTCTGAAGTTTCTCGTCTGGGTTGCCTGGCGAACTACCCGGAAG
CGCTGGTTAAATACCGTCTGCACGGTAACCAGACCTCTTCTGTTTA
CAACCACGAACAGAACGAAACCGCGAAAAAAATCAAACGTGAAA
ACATCACCTACTACCTGAACAAAATCGGTATCGACATCAAAGTTA
TCAACTCTGTTTCTCTGCTGGAAATCTACCACGTTGACAAATCTAA
CAAAGTTCTGAAATCTATCCTGTACGAAATGTACATGTCTCTGGAC
AAATACACCATCACCTCTCTGCTGCACTTCATCAAATACCACCTGG

AACTGTTCGACCTGAAACAGAACCTGAAAATCATCAAAAAATTCA
TCCGTAAAATCAACGTTATCTTCTAG

【0266】 GDP-FKP再生/岩藻糖基化

【0267】 FKP：源自脆弱擬桿菌之L-岩藻糖激酶/GDP-岩藻糖焦磷酸化酶

【0268】 FutC：源自幽門螺旋桿菌之α-1,2岩藻糖轉移酶，但其密碼對大腸桿菌最優化

【0269】 PykF：源自大腸桿菌之丙酮酸激酶

【0270】 PPA：源自大腸桿菌之焦磷酸化酶

【0271】 密碼最優化之FutC酵素的編碼序列係如下所示(SEQ ID NO: 29)：

ATGGCGTTCAAAGTTGTTCAGATCTGCGGTGGTCTGGGTAAC
CAGATGTTCCAGTACGCGTTCGCGAAATCTCTGCAGAAACACTCT
AACACCCCGGTTCTGCTGGACATCACCTCTTTCGACTGGTCTGACC
GTAAAATGCAGCTGGAACTGTTCCCGATCGACCTGCCGTACGCGT
CTGCGAAAGAAATCGCGATCGCGAAAATGCAGCACCTGCCGAAA
CTGGTTCGTGACGCGCTGAAATGCATGGGTTTCGACCGTGTTTCTC
AGGAAATCGTTTTCGAATACGAACCGAAACTGCTGAAACCGTCTC
GTCTGACCTACTTCTTCGGTTACTTCCAGGACCCGCGTTACTTCGA
CGCGATCTCTCCGCTGATCAAACAGACCTTCACCCTGCCGCCGCC
GCCGGAAAACAACAAAAACAACAACAAAAAAGAAGAAGAATACC
AGTGCAAACTGTCTCTGATCCTGGCGGCGAAAAACTCTGTTTTCGT
TCACATCCGTCGTGGTGACTACGTTGGTATCGGTTGCCAGCTGGGT
ATCGACTACCAGAAAAAAGCGCTGGAATACATGGCGAAACGTGTT

CCGAACATGGAACTGTTCGTTTTCTGCGAAGACCTGGAATTCACC
CAGAACCTGGACCTGGGTTACCCGTTCATGGACATGACCACCCGT
GACAAAGAAGAAGAAGCGTACTGGGACATGCTGCTGATGCAGTCT
TGCCAGCACGGTATCATCGCGAACTCTACCTACTCTTGGTGGGCG
GCGTACCTGATCGAAAACCCGGAAAAAATCATCATCGGTCCGAAA
CACTGGCTGTTCGGTCACGAAAACATCCTGTGCAAAGAATGGGTT
AAAATCGAATCTCACTTCGAAGTTAAATCTCAGAAATACAACGCG
TAA

【0272】 CMP-Neu5Ac再生/唾液酸化

【0273】 CMK：源自大腸桿菌之胞苷單磷酸激酶

【0274】 Css：源自多殺性巴氏桿菌之CMP-唾液酸合成酶

【0275】 JT-FAJ-16：源自海洋細菌之α2,3唾液酸轉移酶，但其密碼對大腸桿菌最優化

【0276】 PykF：源自大腸桿菌之丙酮酸激酶

【0277】 PPA：源自大腸桿菌之焦磷酸化酶

【0278】 密碼最優化之JT-FAJ-16酵素的編碼序列係如下所示 (SEQ ID NO: 30)：

ATGAACAACGACAACTCTACCACCACCAACAACAACGCGAT
CGAAATCTACGTTGACCGTGCGACCCTGCCGACCATCCAGCAGAT
GACCAAAATCGTTTCTCAGAAAACCTCTAACAAAAAACTGATCTC
TTGGTCTCGTTACCCGATCACCGACAAATCTCTGCTGAAAAAAAT
CAACGCGGAATTCTTCAAAGAACAGTTCGAACTGACCGAATCTCT
GAAAAACATCATCCTGTCTGAAAACATCGACAACCTGATCATCCA
CGGTAACACCCTGTGGTCTATCGACGTTGTTGACATCATCAAAGA

AGTTAACCTGCTGGGTAAAAACATCCCGATCGAACTGCACTTCTA
CGACGACGGTTCTGCGGAATACGTTCGTATCTACGAATTCTCTAA
ACTGCCGGAATCTGAACAGAAATACAAAACCTCTCTGTCTAAAAA
CAACATCAAATTCTCTATCGACGGTACCGACTCTTTCAAAAACAC
CATCGAAAACATCTACGGTTTCTCTCAGCTGTACCCGACCACCTAC
CACATGCTGCGTGCGGACATCTTCGACACCACCCTGAAAATCAAC
CCGCTGCGTGAACTGCTGTCTAACAACATCAAACAGATGAAATGG
GACTACTTCAAAGACTTCAACTACAAACAGAAAGACATCTTCTAC
TCTCTGACCAACTTCAACCCGAAAGAAATCCAGGAAGACTTCAAC
AAAAACTCTAACAAAAACTTCATCTTCATCGGTTCTAACTCTGCGA
CCGCGACCGCGGAAGAACAGATCAACATCATCTCTGAAGCGAAA
AAAGAAAACTCTTCTATCATCACCAACTCTATCTCTGACTACGACC
TGTTCTTCAAAGGTCACCCGTCTGCGACCTTCAACGAACAGATCAT
CAACGCGCACGACATGATCGAAATCAACAACAAAATCCCGTTCGA
AGCGCTGATCATGACCGGTATCCTGCCGGACGCGGTTGGTGGTAT
GGGTTCTTCTGTTTTCTTCTCTATCCCGAAAGAAGTTAAAAACAAA
TTCGTTTTCTACAAATCTGGTACCGACATCGAAAACAACTCTCTGA
TCCAGGTTATGCTGAAACTGAACCTGATCAACCGTGACAACATCA
AACTGATCTCTGACATCTAA

【0279】 材料及化學品

【0280】 所有的核苷酸、糖、核苷糖及化學品皆係購自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。限制酶及T4 DNA接合酶係或自NEB (Beverly, MA)。引子係訂購自Proligo Singapore Pte Ltd (Singapore)。Ni-NTA Agarose來自Qiagen (Santa Clarita, CA)。Bio-Gel P2凝膠係購自Bio-Rad (Hercules, CA)。質體pET28a、pET47b及經保護的TLC玻璃平盤(被厚度為0.25 mm

之Silica Gel 60及F254所覆蓋)係購自EMD Chemicals Inc (Carlsbad, CA)。ArcticExpress/RIL勝任細胞係獲自Agilent Genomics (La Jolla, CA)。以上未提及的其他物質皆係採購盡可能高品質者。

【0281】 所有的反應皆以薄膜層析法(TLC)監控(流動相:丁醇:乙酸鹽:水=5:3:2)。TLC係以p-甲氧苯甲醛來染色。

【0282】 丙烯基-Lac之合成

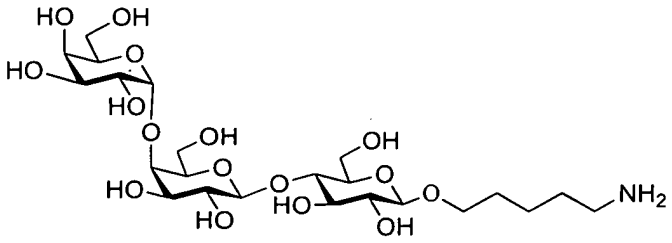
【0283】 帶有連接子(linker)之不同乳糖係根據學術報導的方法[Carbohydrate Research 2004, 339, 2415-2424.]來合成。^{1}H NMR (600 MHz, D2O) δ 6.01 (m, 1H), 5.40-5.37 (dd, J = 17.3, 1.4 Hz, 1H), 5.30-5.28 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 4.54 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.41-4.38 (m, 1H), 4.25-4.22 (m, 1H), 4.00-3.97 (dd, J = 12.3, 2.1 Hz, 1H), 3.93 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 3.80-3.71 (m, 4 H), 3.67-3.53 (m, 5H), 3.35-3.33 (m, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, D2O) δ 133.3, 118.7, 102.9, 101.0, 78.3, 75.3, 74.7, 74.4, 72.8, 72.5, 70.9, 70.6, 68.5, 60.9, 60.1; HRMS (ESI-TOF, MNa^+) $C_{15}H_{26}O_{11}Na^+$ 計算值 405.1367, 測量值405.1346。

【0284】 帶有連接子之Gb3的大規模製備

【0285】 將5 mmol帶有連接子之乳糖、5 mmol半乳糖、12 mmol磷酸烯醇丙酮酸(PEP)、0.25 mmol ATP、0.25 mmol UTP及10 mM $MgCl_2$加入100 mM Tris-HCl緩衝溶液(pH 7.5)。藉由加入適當量的α-1,4-半乳糖轉移酶(LgtC)、半乳糖激酶(GalK)、UDP-糖焦磷酸化酶(USP)、丙酮酸激酶(PykF)及焦磷酸化酶(PPA)來啟動反應。將錐形瓶在溫和搖盪下，置於16~50°C的培養箱中。利用TLC觀察反應。如果反應停止，則加入更多的

酵素。當TLC發現其中沒有起始物時，則表示該反應停止了。使用18C逆相管柱分離該Gb3產物，其產率為99%。

【0286】 丙烯基-Gb3: ^{1}H NMR (600 MHz, D2O) δ 6.00 (m, 1H), 5.42 (d, J = 17.2 Hz, 1H), 5.32 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 4.97 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 4.56 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.53 (d, J = 7.7 Hz, 1H)、4.43-4.37 (m, 2H), 4.27-4.24 (m, 1H), 4.06-3.58 (m, 16H), 3.37-3.34 (t, J = 8.0 Hz, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, D2O) δ 133.3, 118.7, 103.3, 100.9, 100.3, 78.6, 77.3, 75.4, 74.8, 74.5, 72.9, 72.2, 70.9, 70.8, 70.6, 69.1, 68.9, 68.5, 60.5, 60.4, 60.0; HRMS (ESI-TOF, MNa^{+}) $C_{21}H_{36}O_{16}Na^{+}$計算值567.1896, 測量值567.1858。



5-胺基戊基-Gb3

【0287】 ^{1}H NMR (600 MHz, D2O) ä 4.97 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 4.56 (d, J = 7.9 Hz, 1H)、4.54-4.50 (m, 2H), 4.37 (dd, J = 6.0 Hz, J = 0.6 Hz, 1H), 4.27-4.24 (m, 1H), 4.06-3:59 (m, 18H), 3.35 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 3.03 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.75-1.68 (m, 4H), 1.51-1.46 (m, 2H); ^{13}C NMR (150 MHz, D2O) ä 103.3, 101.9, 100.3, 78.7, 77.3, 75.4, 74.8, 74.5, 72.9, 72.2, 70.9, 70.8, 70.6, 69.1, 68.9, 68.5, 60.5, 60.4, 60.0, 39.3, 28.1, 26.4, 22.1。

【0288】 帶有連接子之Gb4的大規模製備

【0289】 將5 mmol帶有連接子之Gb3、5 mmol N-乙醯基半乳糖胺(GalNAc)、12 mmol磷酸烯醇丙酮酸(PEP)、0.25 mmol ATP、0.25 mmol UTP及10 mM $MgCl_2$加入100 mM Tris-HCl緩衝溶液(pH 7.5)。藉由加入適

當量之β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶(LgtD)、N-乙醯己糖胺1-激酶(GalNAcK)、N-乙醯葡萄糖胺1-磷酸尿苷醯轉移酶(GlmU)、丙酮酸激酶(PykF)及焦磷酸化酶(PPA)來啟始反應。將錐形瓶在溫和搖盪下，置於16~50°C的培養箱中。利用TLC觀察反應。如果反應停止，則加入更多的酵素。當TLC發現其中沒有起始物時，則表示該反應停止了。使用18C逆相管柱分離該Gb4產物，其產率為96%。

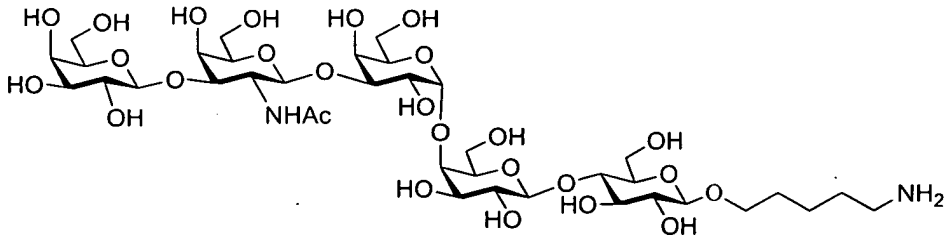
【0290】 丙烯基-Gb4: ^{1}H NMR (600 MHz, D2O) δ 6.01 (m, 1H), 5.40-5.38 (dd, J = 17.3, 1.4 Hz, 1H), 5.30 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 4.92 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 4.64 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.54 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.53 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.42-4.38 (m, 2H), 4.26-4.22 (m, 2H), 4.05 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 4.01-3.99 (dd, J = 12.3, 1.8 Hz, 1H), 3.98-3.89 (m, 5H), 3.86-3.74(m, 7H), 3.72-3.57 (m, 7H), 3.37-3.34 (t, J = 8.6 Hz, 1H), 2.05 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, D2O) δ 133.2, 118.7, 103.3, 103.2, 100.9, 100.4, 78.7, 78.6, 77.2, 75.4, 74.9, 74.8, 74.5, 72.9, 72.1, 70.9, 70.8, 70.6, 70.2, 68.9, 67.7, 67.6, 60.9, 60.5, 60.3, 60.2, 60.0, 52.6, 22.2; HRMS (MALDI, MNa^{+}) $C_{29}H_{49}NO_{21}Na^{+}$計算值770.2689, 測量值770.2654。

【0291】 帶有連接子之Gb5的大規模製備

【0292】 將5 mmol丙烯基-Gb4、5 mmo半乳糖、12 mmol磷酸烯醇丙酮酸(PEP)、0.25 mmol ATP、0.25 mmol UTP與10 mM $MgCl_2$加入100 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.5)。藉由加入適當量之β-1,3-半乳糖轉移酶、半乳糖激酶(GalK)、UDP-糖焦磷酸化酶(USP)、丙酮酸激酶(PykF)及焦磷酸化酶(PPA)來啟始反應。將錐形瓶在溫和搖盪下，置於16~50°C的培養箱

中。利用TLC觀察反應。如果反應停止，則加入更多的酵素。當TLC發現其中沒有起始物時，則表示該反應停止了。使用18C逆相管柱分離該Gb5產物，其產率為95%。

【0293】 丙烯基-Gb5: ^{1}H NMR (600 MHz, D2O) δ 6.01 (m, 1H), 5.41-5.38 (dd, J = 17.3, 1.4 Hz, 1H), 5.31 (d, J = 10.6 Hz, 1H), 4.93 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 4.71 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.55 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.53 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.47 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 4.42-4.39 (m, 2H), 4.27-4.23 (m, 2H), 4.20 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 4.09-3.90 (m, 8H), 3.87-3.59(m, 17H), 3.55-3.52 (m, 1H), 3.36-3.33 (t, J = 8.6 Hz, 1H), 2.04 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, D2O) δ 175.1, 133.2, 118.7, 104.8, 103.3, 102.9, 100.9, 100.4, 79.6, 78.7, 78.6, 77.2, 75.4, 74.9, 74.8, 74.6, 74.5, 72.9, 72.4, 72.1, 70.9, 70.6 (2C), 70.2, 68.9, 68.5, 67.9, 67.6, 60.9 (2C), 60.33, 60.28, 60.0, 51.5, 22.2; HRMS (ESI-TOF, MNa^{+}) $C_{35}H_{59}NO_{26}Na^{+}$計算值932.3218, 測量值932.3235。



5-胺基戊基-Gb5

【0294】 ^{1}H NMR (600 MHz, D2O), 4.47 (d, 1H, J = 8.42 Hz), 4.30 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 4.28 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 4.24 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 4.19 (t, 1H J = 7.0 Hz), 4.04 (d, 1H, J = 2.8 Hz), 3.97 (d, 1H, J = 2.98 Hz), 3.87-3.35 (m, 32H), 3.30 (t, 1H, J = 7.7 Hz), 3.09 (t, 1H, J = 8.5 Hz), 2.79 (t, 2H, J = 7.6 Hz), 1.82 (s, 3H), 1.51-1.43, (m, 4H), 1.28-1.21 (m, 2H) ^{13}C

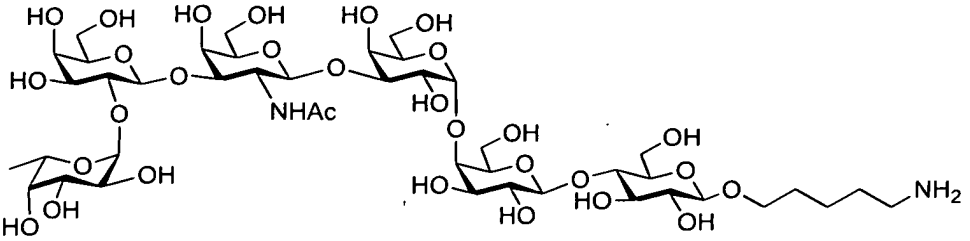
NMR (150 MHz, D2O), ä 175.0, 104.7, 103.1, 102.8, 101.8, 100.2, 79.4, 78.5, 78.4, 76.9, 75.3, 74.8, 74.7, 74.4, 74.3, 72.8, 72.2, 71.9, 70.6, 70.4, 70.0, 69.9, 68.7, 68.4, 67.8, 67.4, 60.82, 60.77, 60.13, 60.1, 59.8, 51.3, 39.1, 28.0, 26.3, 22.1, 21.9 MALDI-TOF: $C_{37}H_{66}N_2O_{26}$ $[M+H]^+$計算值955.3904; 測量值955.3972。

【0295】 帶有連接子之Globo H的大規模製備

【0296】 將5 mmol帶有連接子之Gb5、5 mmol 岩藻糖、12 mmol磷酸烯醇丙酮酸(PEP)、0.25 mmol ATP、0.25 mmol GTP 與10 mM $MgCl_2$ 加入100 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.5)。藉由加入α-1,2-岩藻糖轉移酶、L-岩藻糖激酶/GDP-岩藻糖焦磷酸化酶(FKP)、丙酮酸激酶(PykF)及焦磷酸化酶(PPA)來啟始反應。將錐形瓶在溫和搖盪下，置於16~50°C的培養箱中。利用TLC觀察反應。如果反應停止，則加入更多的酵素。當TLC發現其中沒有起始物時，則表示該反應停止了。使用18C逆相管柱分離該Globo H產物，其產率為94%。

【0297】 丙烯基-Globo H: ^{1}H NMR (600 MHz, D2O) δ 6.01 (m, 1H), 5.41-5.38 (dd, J = 17.3, 1.4 Hz, 1H), 5.31 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 5.24 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 4.91 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 4.63 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 4.56-4.52 (m, 3H), 4.42-4.40 (m, 2H), 4.26-4.23 (m, 3H), 4.12 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 4.05 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 4.03-3.59 (m, 28 H), 3.36-3.33 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 2.06 (s, 3H), 1.24 (d, J = 6.5 Hz, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, D2O) δ 174.3, 133.2, 118.7,103.9, 103.2, 102.0, 100.9, 100.4, 99.3, 78.7, 78.3, 77.1, 76.3, 76.1, 75.5, 75.0, 74.8, 74.6, 74.5, 73.5, 72.9, 72.1, 71.8, 70.8, 70.6,

70.1, 69.5, 69.2, 69.1, 68.5, 68.0, 67.8, 66.8, 60.95, 60.93, 60.3 (2C), 60.0, 51.6, 22.2, 15.3; HRMS (MALDI, MNa^+) $C_{41}H_{70}NO_{30}Na^+$ 計算值1079.3875, 測量值1078.4145.



5-胺基戊基-Globo H

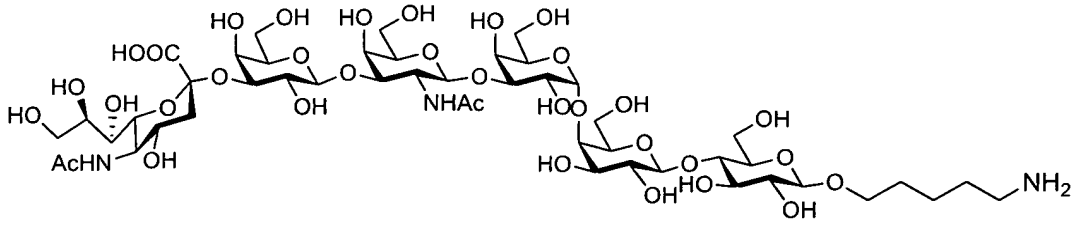
【0298】 ^1H NMR (600 MHz, D2O) ä5.12 (d, 1H, J = 3.9 Hz), 4.78 (d, 1H, J = 3.6 Hz), 4.50 (d, 1H, J = 7.7 Hz),4.43 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 4.40 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 4.37 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 4.30 (t, 1H, J = 6.2 Hz), 4.15-4.10 (m, 2H), 3.99 (d, 1H, J = 1.8 Hz), 3.92 (d, 1H, J = 2.2 Hz), 3.90-3.47 (m, 33H), 3.19 (t, 1H, J = 8.3 Hz), 2.89 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 1.94 (s, 3H), 1.60-1.55 (m, 4H), 1.38-1.31 (m, 2H), 1.11 (d, 3H, J = 6.4 Hz). ^{13}C NMR (150 MHz, D2O) ä176.1, 105.7, 105.0, 103.74, 103.65, 102.1, 100.97, 80.5, 79.9, 78.8, 78.0, 77.8, 77.2, 76.76, 76.5, 76.3, 76.2, 75.3, 74.6, 73.8, 73.5, 72.5, 71.81, 71.78, 71.2, 71.1, 70.9, 70.8, 70.2, 69.7, 69.5, 68.5, 62.66, 62.64, 62.0, 61.7, 53.3, 41.0, 29.9, 28.1, 23.9, 23.8, 17.0 MALDI-TOF: $C_{43}H_{76}N_2O_{30}$ $[M+Na]^+$計算值1123.4381, 測量值1123.4385

【0299】 帶有連接子之SSEA4的大規模製備

【0300】 將5 mmol帶有連接子之Gb5、5 mmol岩藻糖、12 mmol磷酸烯醇丙酮酸(PEP)、0.25 mmol ATP、0.25 mmol CTP與10 mM $MgCl_2$ 加入100 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.5)。藉由加入適當量之α-2,3-唾液酸轉移酶、胞苷單磷酸激酶(CMK)、CMP-唾液酸合成酶(Css)、丙酮酸激酶

(PykF)及焦磷酸化酶(PPA)來啟始反應。將錐形瓶在溫和搖盪下，置於16~50°C的培養箱中。利用TLC觀察反應。如果反應停止，則加入更多的酵素。當TLC發現其中沒有起始物時，則表示該反應停止了。使用18C逆相管柱分離該SSEA4產物，其產率為45%。

【0301】 丙烯基-SSEA4: ^{1}H NMR (600 MHz, D2O) δ 6.00 (m, 1H), 5.40-5.37 (d, J = 17.3 Hz, 1H), 5.30-5.28 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 4.92 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 4.70 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.54-4.51 (m, 3H)、4.40-4.38 (m, 2H), 4.25-4.18 (m, 3H), 4.10-3.52 (m, 34 H), 3.35-3.32 (t, J = 8.6 Hz, 1H), 2.77 (dd, J = 12.5, 4.6 Hz, 1H), 2.03 (s, 6H), 1.80 (t, J = 12.1 Hz, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, D2O) δ 175.2, 175.1, 174.1, 133.4, 121.6, 118.9, 104.7,103.4, 103.1, 101.1, 100.5, 99.8, 79.9, 78.9, 78.8, 77.3, 75.7, 75.5, 75.0, 74.7, 74.6, 73.0, 72.9,72.2, 72.1, 71.9, 71.0, 70.8, 70.4, 69.1, 69.0, 68.5, 68.2, 68.0, 67.7, 67.5, 62.6, 61.1, 60.5, 60.4, 60.1, 51.7,51.4, 39.8, 22.4, 22.1; HRMS (ESI-TOF, M-H) $C_{46}H_{75}N_2O_{34}$- 計算值 1199.4196, 測量值 1199.4208。



5-胺基戊基-SSEA4

【0302】 ^{1}H NMR (600 MHz, D2O) δ 4.94 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 4.72 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.54-4.50 (m, 3H), 4.40 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 4.27 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.20 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 4.10-3.54 (m, 37 H), 3.34-3.31 (m, 1H), 3.02 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.78 (dd, J = 12.4, 4.6 Hz, 1H), 2.05 (m, 6H),

1.80 (t, 12.2 Hz, 1H), 1.74-1.67 (m, 4H), 1.51-1.45 (m, 2H); ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ175.0, 174.9, 173.9,104.5, 103.2, 102.9, 101.9, 100.3, 99.6, 79.7, 78.8、78.7, 77.1, 75.5, 75.4, 74.8, 74.7, 74.6, 74.5, 72.9, 72.7, 72.1, 71.8, 70.8, 70.2, 70.0, 68.9, 68.9, 68.3, 68.0, 67.8, 67.5, 67.3, 62.4, 60.9, 60.3, 60.3, 60.0, 51.6, 51.3, 39.7, 39.3, 28.1, 26.5, 22.3, 22.0, 22.0; HRMS (ESI-TOF, MNa^+)計算值$C_{48}H_{83}N_3O_{34}Na$ 1268.4756, 測量值1268.4760.

表 7 鞘糖脂類之基本組合物

	Gal	Glc	GalNAc	GlcNAc	Neu5Ac	Fuc
Globo 系列						
Globo 四糖 (Gb4)	2	1	1	0	0	0
Globo 五糖 (Gb5)	3	1	1	0	0	0
Globo H (岩藻糖-Gb5)	3	1	1	0	0	1
SSEA4 (唾液酸-Gb5)	3	1	1	0	1	0
異 globo 四糖	2	1	1	0	0	0
新乳糖系列	2	1	0	1	1	0
乳糖系列	2	1	0	1	1	0
鞘糖脂系列	2	1	1	0	2	0

表8 糖基化反應與再生反應之各步驟的產率

	涉及之酵素	產物	產率
步驟 1.	GalK, USP, PykF, PPA, LgtC*	丙烯基-Gb3	99%
步驟 2.	GalNAcK, GlmU, PykF, PPA, LgtD*	丙烯基-Gb4	96%

表8 糖基化反應與再生反應之各步驟的產率			
	涉及之酵素	產物	產率
步驟 3.	GalK, USP, PykF, PPA, LgtD*	丙烯基-Gb5	95%**
步驟 4a.	FKP, PykF, PPA, FutC*	丙烯基-Globo H	94%
步驟 4b.	Css, CMK, PykF, PPA, JT-FAJ-16*	丙烯基-SSEA4	45%

* DNA序列對大腸桿菌表現最優化.

** 當使用純丙烯基-Gb4作為受體.

【0303】 實例2：從丙烯基-乳糖以一步驟(One-Step)合成丙烯基-Gb5 (SSEA3)

【0304】 在無需純化任何中間物下，自丙烯基-乳糖一步驟(one-step)合成丙烯基-Gb5的鏈反應係例示於圖6。

【0305】 在錐形瓶中，將5 mmol丙烯基-乳糖、5 mmol 半乳糖、12 mmol PEP、0.25 mmol ATP、0.25 mmol UTP及10 mM $MgCl_2$在100 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.5)中混合。在錐形瓶中加入適當的α1,4-半乳糖轉移酶(LgtC)、GalK、USP、PykF及PPA來啟動酵素反應並合成丙烯基-Gb3。將含有反應混合物的錐形瓶在溫和搖盪下，置於16~50°C的培養箱中。利用TLC分析法監測合成過程。當發現不再合成丙烯基-Gb3時，則加入更多的酵素。

【0306】 於合成丙烯基-Gb3後，將其他組的組分(包括5 mmol GalNAc、12 mmol PEP及適當量之N-乙醯己糖胺1-激酶(GalNAcK)、N-乙醯葡萄糖胺1-磷酸尿苷醯轉移酶(GlmU)、PykF、PPA 及β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶(LgtD))加入錐形瓶中。在與合成丙烯基-Gb3的相同條件下培

養所形成的反應混合物。當發現不合成丙烯基-Gb4時，則加入更多量的酵素。

【0307】 於合成丙烯基-Gb4後，於未將丙烯基-Gb4純化的情況下，將5 mmol半乳糖及12 mmol PEP加入錐形瓶中。藉由加入適當的β-1,3-半乳糖轉移酶(LgtD)、GalK、USP、PykF及PPA來啟動下個半乳糖苷化反應來合成丙烯基-Gb5。將含有反應混合物的錐形瓶在溫和搖盪下，置於16~50°C的培養箱中。利用TLC分析法監測合成過程。若發現不再合成丙烯基-Gb5時，可加入更多的酵素。此由丙烯基-乳糖一步驟合成丙烯基-Gb5的產率為約40%。

【0308】 參考文獻：

1. Kannagi, R., et al., *Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells.* EMBO J, 1983. 2(12): p. 2355-61.
2. Shengle, Z., et al., *Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: I. Focus on gangliosides.* International Journal of Cancer, 1997. 73(1): p. 42-49.
3. Shengle, Z., et al., *Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: II. Blood group-related antigens.* International Journal of Cancer, 1997. 73(1): p. 50-56.
4. Chang, W.-W., et al., *Expression of Globo H and SSEA3 in breast cancer stem cells and the involvement of fucosyl transferases 1 and 2 in Globo H synthesis.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. 105(33): p. 11667-11672.

5. Slamon, D.J., et al., *Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2.* New England Journal of Medicine, 2001. 344(11): p. 783-792.

6. Wang, Z.-G., et al., *Polyclonal antibodies from patients immunized with a globo H-keyhole limpet hemocyanin vaccine: Isolation, quantification, and characterization of immune responses by using totally synthetic immobilized tumor antigens.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. 97(6): p. 2719-2724.

7. Bilodeau, M.T., et al., *Total Synthesis of a Human Breast Tumor Associated Antigen.* Journal of the American Chemical Society, 1995. 117(29): p. 7840-7841.

8. Park, T.K., et al., *Total Synthesis and Proof of Structure of a Human Breast Tumor (Globo-H) Antigen.* Journal of the American Chemical Society, 1996. 118(46): p. 11488-11500.

9. Slovin, S.F., et al., *Carbohydrate vaccines in cancer: Immunogenicity of a fully synthetic globo H hexasaccharide conjugate in man.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. 96(10): p. 5710-5715.

10. Bosse, F., L.A. Marcaurelle, and P.H. Seeberger, *Linear Synthesis of the Tumor-Associated Carbohydrate Antigens Globo-H, SSEA-3, and Gb3.* The Journal of Organic Chemistry, 2002. 67(19): p. 6659-6670.

11. Werz, D.B., B. Castagner, and P.H. Seeberger, *Automated Synthesis of the Tumor-Associated Carbohydrate Antigens Gb-3 and Globo-H: Incorporation of á-Galactosidic Linkages.* Journal of the American Chemical Society, 2007. 129(10): p. 2770-2771.

12. Wang, Z., et al., *Multi-Component One-Pot Synthesis of the Tumor-Associated Carbohydrate Antigen Globo-H Based on Preactivation of Thioglycosyl Donors.* The Journal of Organic Chemistry, 2007. 72(17): p. 6409-6420.

13. Jeon, I., K. Iyer, and S.J. Danishefsky, *A Practical Total Synthesis of Globo-H for Use in Anticancer Vaccines.* The Journal of Organic Chemistry, 2009. 74(21): p. 8452-8455.

14. Fred, B., et al., *Synthesis of the Globo H Hexasaccharide Using the Programmable Reactivity-Based One-Pot Strategy.* Angewandte Chemie International Edition, 2001. 40(7): p. 1274-1277.

15. Hsu, C.-H., et al., *Highly Alpha-Selective Sialyl Phosphate Donors for Efficient Preparation of Natural Sialosides.* Chemistry – A European Journal, 2010. 16(6): p. 1754-1760.

16. Zhen, W., et al., *Chemoenzymatic Syntheses of Tumor-Associated Carbohydrate Antigen Globo-H and Stage-Specific Embryonic Antigen 4.* Advanced Synthesis & Catalysis, 2008. 350(11-12): p. 1717-1728.

17. Wong, C.H., S.L. Haynie, and G.M. Whitesides, *Enzyme-catalyzed synthesis of N-acetyllactosamine with in situ regeneration of uridine 5'-diphosphate glucose and uridine 5'-diphosphate galactose.* The Journal of Organic Chemistry, 1982. 47(27): p. 5416-5418.

18. Wong, C.H., R. Wang, and Y. Ichikawa, *Regeneration of sugar nucleotide for enzymic oligosaccharide synthesis: use of Gal-1-phosphate uridyltransferase in the regeneration of UDP-galactose, UDP-2-deoxygalactose, and UDP-galactosamine.* The Journal of Organic Chemistry, 1992. 57(16): p. 4343-4344.

19. Kotake, T., et al., *UDP-sugar Pyrophosphorylase with Broad Substrate Specificity Toward Various Monosaccharide 1-Phosphates from Pea Sprouts.* Journal of Biological Chemistry, 2004. 279(44): p. 45728-45736.

20. Litterer, L.A., et al., *Characterization and expression of Arabidopsis UDP-sugar pyrophosphorylase.* Plant Physiology and Biochemistry, 2006. 44(4): p. 171-180.

21. Kotake, T., et al., *Properties and Physiological Functions of UDP-Sugar Pyrophosphorylase in Arabidopsis.* Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007. 71(3): p. 761-771.

22. Damerow, S., et al., *Leishmania UDP-sugar Pyrophosphorylase.* Journal of Biological Chemistry, 2010. 285(2): p. 878-887.

23. Yang, T. and M. Bar - Peled, *Identification of a novel UDP-sugar pyrophosphorylase with a broad substrate specificity in Trypanosoma cruzi.* Biochemical Journal, 2010. 429(3): p. 533-543.

24. Persson, K., et al., *Crystal structure of the retaining galactosyltransferase LgtC from Neisseria meningitidis in complex with donor and acceptor sugar analogs.* Nat Struct Mol Biol, 2001. 8(2): p. 166-175.

25. Koto, S., et al., *Simple preparations of alkyl and cycloalkyl á-glycosides of maltose, cellobiose, and lactose.* Carbohydrate Research, 2004. 339(14): p. 2415-2424.

26. Antoine, T., et al., *Large scale in vivo synthesis of globotriose and globotetraose by high cell density culture of metabolically engineered Escherichia coli.* Biochimie, 2005. 87(2): p. 197-203.

27. Zhang, J., et al., *Efficient chemoenzymatic synthesis of globotriose and its derivatives with a recombinant [alpha]-(1-->4)-galactosyltransferase.* Carbohydrate Research, 2002. 337(11): p. 969-976.

28. Shao, J., et al., *Efficient synthesis of globoside and isogloboside tetrasaccharides by using â(1→3)N-acetylgalactosaminyltransferase/UDP-N-acetylglucosamine C4 epimerase fusion protein.* Chemical Communications, 2003(12): p. 1422-1423.

29. Shao, J., et al., *Donor Substrate Regeneration for Efficient Synthesis of Globotetraose and Isoglobotetraose.* Appl. Environ. Microbiol., 2002. 68(11): p. 5634-5640.

30. Vanessa, B., et al., *Efficient Enzymatic Glycosylation of Peptides and Oligosaccharides from GalNAc and UTP.* ChemBioChem, 2007. 8(1): p. 37-40.

31. Nishimoto, M. and M. Kitaoka, *Identification of N-Acetylhexosamine 1-Kinase in the Complete Lacto-N-Biose I/Galacto-N-Biose Metabolic Pathway in Bifidobacterium longum.* Appl. Environ. Microbiol., 2007. 73(20): p. 6444-6449.

32. Fang, J., et al., *Systematic study on the broad nucleotide triphosphate specificity of the pyrophosphorylase domain of the N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase from Escherichia coli K12.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009. 19(22): p. 6429-6432.

33. Hood, D.W., et al., *Genetic basis for expression of the major globotetraose-containing lipopolysaccharide from H. influenzae strain Rd (RM118).* Glycobiology, 2001. 11(11): p. 957-967.

34. Shao, J., et al., *Overexpression and biochemical characterization of [beta]-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase LgtD from Haemophilus*

influenzae strain Rd. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. 295(1): p. 1-8.

35. Randriantsoa, M., et al., *Synthesis of globopentaose using a novel [beta]1,3-galactosyltransferase activity of the Haemophilus influenzae [beta]1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase LgtD.* FEBS Letters, 2007. 581(14): p. 2652-2656.
36. Coyne, M.J., et al., *Human Symbionts Use a Host-Like Pathway for Surface Fucosylation.* Science, 2005. 307(5716): p. 1778-1781.
37. Wang, W., et al., *Chemoenzymatic synthesis of GDP-l-fucose and the Lewis X glycan derivatives.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. 106(38): p. 16096-16101.
38. Koizumi, S., et al., *Large-scale production of GDP-fucose and Lewis X by bacterial coupling.* Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2000. 25(4): p. 213-217.
39. Stein, Daniel B., Y.-N. Lin, and C.-H. Lin, *Characterization of Helicobacter pylori alpha1,2-Fucosyltransferase for Enzymatic Synthesis of Tumor-Associated Antigens.* Advanced Synthesis & Catalysis, 2008. 350(14-15): p. 2313-2321.
40. Tanner, M.E., *The enzymes of sialic acid biosynthesis.* Bioorganic Chemistry, 2005. 33(3): p. 216-228.
41. Li, Y., et al., *Pasteurella multocida CMP-sialic acid synthetase and mutants of Neisseria meningitidis CMP-sialic acid synthetase with improved substrate promiscuity.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2011: p. 1-13.
42. Kushi, Y., et al., *Sialyltransferases of marine bacteria efficiently utilize glycosphingolipid substrates.* Glycobiology, 2010. 20(2): p. 187-198.

43. Yamamoto, T., *Marine Bacterial Sialyltransferases.* Marine Drugs, 2010. 8(11): p. 2781-2794.

44. Takakura, Y., H. Tsukamoto, and T. Yamamoto, *Molecular Cloning, Expression and Properties of an á/â-Galactoside á2,3-Sialyltransferase from Vibrio sp. JT-FAJ-16.* Journal of Biochemistry, 2007. 142(3): p. 403-412.

【0309】 其他實施態樣

【0310】 除非上下文中另有相反或其他說明，申請專利範圍中所述的「一」、「一個」及「該」可表一或大於一個。除非上下文中另有關於產物或方法之相反或其他說明，當申請專利範圍或說明書中，在一組之一或多個成員間出現「或」時，則視為其中出現或使用一個、大於一個或所有的成員。關於本發明所提供的產物或方法中之態樣包含出現或使用剛好一個成員。關於本發明所提供的產物或方法中之態樣包含出現或使用大於一個或所有的成員。

【0311】 再者，本發明包含所有的變異物、組合及替換，所列請求項中的一或多個限制、元件、子句及描述的術語亦被引入另一請求項中。例如，依附至另一請求項的任何任何請求項可經修飾，進而包括依附至相同基礎請求項的其他請求項中的一或多個限制。當請求項中列有元件時(如馬庫西型式)，所有元件的各次群亦包括於內，且任意元件皆可自該群中移除。咸知，一般而言，當發明或發明態樣係包含特定元件及/或特徵、該發明的特定態樣或由該元件及/或特徵所組成或實質上組成的發明態樣。為達簡化的目的，該等未特定揭示的態樣亦包含於本發明中。另須注意者，「包含」及「包括」為開放性用語，其容許含有額外的元件或步驟。當提供一

範圍時，其亦包含端點值。再者，除非上下文中另有相反或其他說明，技藝人士所能瞭解，在不同發明態樣中，該數值範圍可包含特定值或於所述範圍內的次範圍，且除非上下文中另有相反或其他說明，該範圍最低值的單位的十分之一亦包含於其中。

【0312】本案中所提及之不同專利案件、公開之專利申請案、文獻資料及其他的公開，皆以全文的方式併入本案。若所併入之參考文件與本案說明書有衝突時，以本案說明書之內容為準。再者，本發明中落入先前技藝之任何特定態樣，可自本案之一或多個請求項中排除。因該態樣被視為技藝人士所知者，故即使其未明確地被排除，其可被排除。不論是基於任何理由或是否與先前技術有關，本發明中的任何特定態樣皆可移除。

【0313】技藝人士經由例行實驗即可瞭解或推知的對等物皆為本發明的一部份。上述說明書的內容並非用於侷限本發明的範圍，請求項所請者方為本發明之範圍。技藝人士在不悖離下示申請專利範圍所定義本發明之精神或範疇之情況下可對本文所揭露之態樣進行修改及改變。

【符號說明】

【0314】(無)

I510627 專利案號：102129714

公告本

104年 09月 07日 修正替換頁

申請日：102.8.19

IPC分類：C12P 19/18 (2006.01)
C07H 3/06 (2006.01)
C07H 15/04 (2006.01)

【發明摘要】

【中文發明名稱】　寡醣之大規模酵素合成

【英文發明名稱】　LARGE SCALE ENZYMATIC SYNTHESIS OF OLIGOSACCHARIDES

【中文】

本發明係提供一種 UDP-Gal 再生的方法及其與半乳糖基轉移酶的組合使用，將半乳糖添加至適當的受體基質。本發明進一步揭露大規模生產 Globo 系列寡醣的合成方法，其中該方法可涉及糖基轉移酶反應與核苷酸糖再生方法的組合。

【英文】

A novel UDP-Gal regeneration process and its combined use with a galactosyltransferease to add galactose to a suitable acceptor substrate. Also described herein are synthetic methods for generating Globo-series oligosaccharides in large scale, wherein the methods may involve the combination of a glycosyltransferase reaction and a nucleotide sugar regeneration process.

【指定代表圖】　第（1）圖。

【代表圖之符號簡單說明】

(無)

【特徵化學式】

(無)

公告本

104年 09月 07日 修正替換頁

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種以酵素性方式合成寡糖之方法，其包含：

(i) 在UDP-Gal再生酵素組之存在下，將半乳糖製成UDP-Gal，其中該 UDP-Gal 再生酵素組包含半乳糖激酶、UDP-糖焦磷酸化酶及丙酮酸激酶；

(ii) 在 UDP-Gal 及 α-1,4 半乳糖轉移酶存在下，將 Lac-OR^{1A} 轉換為 Gb3-OR^{1A}，其中 R^{1A} 為氫、經取代或未經取代之烷基、經取代或未經取代之烯基、經取代或未經取代之炔基、經取代或未經取代之環碳基、經取代或未經取代之雜環基、經取代或未經取代之芳基、經取代或未經取代之雜芳基或氧保護基團；

(iii) 在UDP-GalNAc及β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶存在下，將 Gb3-OR^{1A} 轉換成 Gb4-OR^{1A}；及

(iv) 在UDP-Gal及β-1,3-半乳糖轉移酶存在下，將Gb4-OR^{1A} 轉換為 Gb5-OR^{1A}；

其中，該方法無純化中間物之步驟。

【第2項】 如請求項 1 之方法，其中該 UDP-Gal 再生酵素組包含焦磷酸化酶。

【第3項】 如請求項 1 或 2 之方法，其中(i)及(ii)發生於 Gb3-合成反應混合物中，該 Gb3-合成反應混合物包括半乳糖、PEP、ATP、UTP、Lac-OR^{1A}、α-1,4-半乳糖轉移酶及 UDP-Gal 再生酵素組。

【第4項】 如請求項 3 之方法，其中在任何酵素反應發生前，Lac-OR^{1A} 與半乳糖在 Gb3-合成反應混合物中的莫耳比為 1：1。

【第5項】 如請求項 1 之方法，其中 R^{1A} 為氫、丙烯基、經取代之烷基、生物素或神經醯胺。

【第6項】 如請求項 2 之方法，其中該 α-1,4 半乳糖轉移酶係來自腦膜炎雙球菌之 LgtC，該半乳糖激酶係來自大腸桿菌，該 UDP-糖焦磷酸化酶係來自擬南芥，該丙酮酸激酶係來自大腸桿菌，或該焦磷酸化酶係來自大腸桿菌。

【第7項】 如請求項 1 之方法，其進一步包含分離 Gb3-OR^{1A}。

【第8項】 如請求項 1 之方法，其進一步包含：

(v) 在 UDP-GalNAc 再生酵素組存在下，將 GalNAc 製成 UDP-GalNAc，其中該 UDP-GalNAc 再生酵素組包含 N-乙醯己糖胺 1-激酶、N-乙醯己糖胺 1-磷酸尿苷醯轉移酶及丙酮酸激酶、及視需要之焦磷酸化酶。

【第9項】 如請求項 8 之方法，其中(iii)及(v)在 Gb-4 合成反應混合物中進行，該 Gb-4 合成反應混合物包含 GalNAc、PEP、ATP、UTP、Gb3-OR^{1A}、β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶及 UDP-GalNAc 再生酵素組。

【第10項】 如請求項 9 之方法，其中該 Gb-4 合成反應混合物係藉由將 Gb-3 合成反應混合物至少與 GalNAc、β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶、N-乙醯己糖胺 1-激酶及 N-乙醯葡萄糖胺 1-磷酸尿苷醯轉移酶混合製得。

【第11項】 如請求項 10 之方法，其中該 β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶係來自流感嗜血桿菌之 LgtD，N-乙醯己糖胺 1-激酶係來自龍根菌、或 N-乙醯己糖胺 1-磷酸尿苷醯轉移酶係來自大腸桿菌。

【第12項】 如請求項 1 之方法，其進一步包含分離 Gb4-OR^{1A}。

【第13項】如請求項 1 之方法，其中(iv)係在 Gb5-合成反應混合物中進行，該 Gb5-合成反應混合物包含半乳糖、PEP、ATP、UTP、Gb4-OR^{1A}、β-1,3-半乳糖轉移酶及 UDP-Gal 再生酵素組。

【第14項】如請求項 1 之方法，其中該 β-1,3-半乳糖轉移酶係來自流感嗜血桿菌之 LgtD。

【第15項】如請求項 1 之方法，其進一步包含分離 Gb5-OR^{1A}。

【第16項】如請求項 1 之方法，其進一步包含：

(vi) 在 GDP-Fuc 及 α-1,2-岩藻糖基轉移酶存在下，將 Gb5-OR^{1A}轉換為岩藻糖基-Gb5-OR^{1A}。

【第17項】如請求項 16 之方法，其進一步包含：

(vii)在 GDP-Fuc 再生酵素組存在下，自岩藻糖生成 GDP-Fuc，其中該 GDP-Fuc 再生酵素組包含 L-岩藻糖激酶/GDP-岩藻糖焦磷酸化酶、丙酮酸激酶及視需要之焦磷酸化酶。

【第18項】如請求項 17 之方法，其中(vi)及(vii)係在岩藻糖基-Gb5-合成反應混合物中進行，該岩藻糖基-Gb5-合成反應混合物包含岩藻糖、ATP、GTP、PEP、Gb5-OR^{1A}、α-1,2-岩藻糖基轉移酶及 GDP-Fuc 再生酵素組。

【第19項】如請求項 18 之方法，其中該 α-1,2-岩藻糖轉移酶係來自幽門螺旋桿菌。

【第20項】如請求項 17 之方法，其中該岩藻糖基-Gb5-合成反應混合物係將 Gb5-合成反應混合物與至少岩藻糖、GTP、α-1,2-岩藻糖基轉移酶及 L-岩藻糖激酶/GDP-岩藻糖焦磷酸化酶混合而得。

【第21項】如請求項 17 之方法，其中該 L-岩藻糖激酶/GDP-岩藻糖焦磷

酸化酶係來自脆弱擬桿菌。

【第22項】如請求項 16 之方法，其進一步包含分離岩藻糖基-Gb5-OR^{1A}。

【第23項】如請求項 1 之方法，其進一步包含：

(viii) 在 CMP-Neu5Ac 及 α-2,3-唾液酸轉移酶存在下，將 Gb5-OR^{1A} 轉換為唾液酸-Gb5-OR^{1A}。

【第24項】如請求項 23 之方法，其進一步包含：

(ix) 在 CMP-Neu5Ac 再生酵素組存在下，自 Neu5Ac 生成 CMP-Neu5Ac，其中該 CMP-Neu5Ac 再生酵素組包含胞苷單磷酸激酶、CMP-唾液酸合成酶、丙酮酸激酶及視需要之焦磷酸化酶。

【第25項】如請求項 24 之方法，其中(viii)及(ix)係在唾液酸-Gb5-合成反應混合物中進行，該唾液酸-Gb5-合成反應混合物包含 Neu5Ac、CTP、PEP、Gb5-OR^{1A}、α-2,3-唾液酸轉移酶及 CMP-Neu5Ac 再生酵素組。

【第26項】如請求項 25 之方法，其中該唾液酸-Gb5-合成反應混合物係將 Gb5-合成反應混合物與至少 Neu5Ac、CTP、α-2,3-唾液酸轉移酶、胞苷單磷酸激酶及 CMP-唾液酸合成酶混合而得。

【第27項】如請求項 26 之方法，其中該 α-2,3-唾液酸轉移酶係來自海洋細菌(*M. bacteria*)，該胞苷單磷酸激酶係來自大腸桿菌，或該 CMP-唾液酸合成酶係來自多殺性巴氏桿菌。

【第28項】如請求項 23 之方法，其進一步包含分離唾液酸-Gb5-OR^{1A}。

【第29項】如請求項 3 之方法，其進一步包含：

(a) 將 Gb3-合成反應混合物與至少 GalNAc、β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶、N-乙醯己糖胺 1-激酶及 N-乙醯葡萄糖胺 1-磷酸尿苷醯轉移酶予以混合以形成 Gb4-合成反應混合物；

(b) 在允許轉換 Gb3-OR^{1A} 為 Gb4-OR^{1A} 之條件下，培養 Gb4-合成反應混合物；

(c) 在允許轉換 Gb4-OR^{1A} 為 Gb5-OR^{1A} 之條件下，在 β-1,3-半乳糖轉移酶存在下，進一步培養 Gb4-合成反應混合物；

(d) 將(c)中所製備含有 Gb5-OR^{1A} 之反應混合物與至少岩藻糖、GTP、α-1,2-岩藻糖基轉移酶及 L-岩藻糖激酶/GDP-岩藻糖焦磷酸化酶混合來形成岩藻糖基-Gb5-OR^{1A} 反應混合物；及

(e) 在允許轉換 Gb5-OR^{1A} 為岩藻糖基-Gb5-OR^{1A} 之條件下，培養岩藻糖基-Gb5-OR^{1A} 反應混合物。

【第30項】如請求項 3 之方法，其進一步包含：

(a) 將 Gb3-合成反應混合物與至少 GalNAc、β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶、N-乙醯己糖胺 1-激酶及 N-乙醯葡萄糖胺 1-磷酸尿苷醯轉移酶混合來形成 Gb4-合成反應混合物；

(b) 在允許轉換 Gb3-OR^{1A} 為 Gb4-OR^{1A} 之條件下，培養 Gb4-合成反應混合物；

(c) 分離 Gb4-OR^{1A}；

(d) 將 Gb4-OR^{1A} 與 β-1,3-半乳糖轉移酶及 UDP-Gal 再生酵素組混合來形成 Gb5-合成反應混合物；

(e) 在允許轉換 Gb4-OR^{1A} 為 Gb5-OR^{1A} 之條件下，培養 Gb5-合成反應混合物；

(f)將 Gb5-合成反應混合物與至少岩藻糖、GTP、α-1,2-岩藻糖轉移酶及 L-岩藻糖激酶/GDP-岩藻糖焦磷酸化酶混合以形成岩藻糖-Gb5-OR^{1A} 反應混合物；及

(g) 在允許轉換 Gb5-OR^{1A} 為岩藻糖-Gb5-OR^{1A} 之條件下，培養岩藻糖-Gb5-OR^{1A} 反應混合物。

【第31項】如請求項 3 之方法，其進一步包含：

(a) 將 Gb3-合成反應混合物與至少 GalNAc、β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶、N-乙醯己糖胺 1-激酶及 N-乙醯葡萄糖胺 1-磷酸尿苷醯轉移酶予以混合以形成 Gb4-合成反應混合物；

(b) 在允許轉換 Gb3-OR^{1A} 為 Gb4-OR^{1A} 之條件下，培養 Gb4-合成反應混合物；

(c) 在允許轉換 Gb4-OR^{1A} 為 Gb5-OR^{1A} 之條件下，在 β-1,3-半乳糖轉移酶存在下，進一步培養 Gb4-合成反應混合物；

(d) 將(c)中所製備含有 Gb5-OR^{1A} 之反應混合物與至少 Neu5Ac、CTP、α-2,3-唾液酸轉移酶、胞苷單磷酸激酶及 CMP-唾液酸合成酶予以混合以形成唾液酸-Gb5-OR^{1A} 反應混合物；及

(e) 在允許轉換 Gb5-OR^{1A} 為唾液酸-Gb5-OR^{1A} 之條件下，培養唾液酸-Gb5-OR^{1A} 反應混合物。

【第32項】如請求項 3 之方法，其進一步包含：

(a) 將 Gb3-合成反應混合物與至少 GalNAc、β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶、N-乙醯己糖胺 1-激酶及 N-乙醯葡萄糖胺 1-磷酸尿苷醯轉移酶予以混合以形成 Gb4-合成反應混合物；

(b) 在允許轉換 Gb3-OR^{1A} 為 Gb4-OR^{1A} 之條件下，培養 Gb4-合成反應混合物；

(c) 分離 Gb4-OR^{1A}；

(d) 將 Gb4-OR^{1A} 與 β-1,3-半乳糖轉移酶及 UDP-Gal 再生酵素組混合以形成 Gb5-合成反應混合物；

(e) 在允許轉換 Gb4-OR^{1A} 為 Gb5-OR^{1A} 之條件下，培養 Gb5-合成反應混合物；

(f)將 Gb5-OR^{1A} 與 α-2,3 唾液酸轉移酶及 CMP-Neu5Ac 再生酵素組混合以形成唾液酸-Gb5-合成反應混合物，其中該 CMP-Neu5Ac 再生酵素組包含胞苷單磷酸激酶、CMP-唾液酸合成酶、丙酮酸激酶及視需要之焦磷酸化酶；及

(g) 在允許轉換 Gb4-OR^{1A} 為唾液酸-Gb5-OR^{1A} 之條件下，培養唾液酸-Gb5-合成反應混合物。

【第33項】如請求項 1 之方法，其中至少一個酵素係固定於支持體上。

【第34項】如請求項 1 之方法，其中該 Lac-OR^{1A}、Gb3-OR^{1A}、Gb4-OR^{1A} 或 Gb5-OR^{1A} 係固定於支持體上。

【第35項】一種酵素反應器，其包含：

(a) 用於合成 Gb3-OR^{1A} 之反應室，其中該室包含 α-1,4-半乳糖轉移酶及 UDP-Gal 再生酵素組，其包含半乳糖激酶、UDP-糖焦磷酸化酶、丙酮酸激酶及視需要之焦磷酸化酶；

(b) 用於合成 Gb4-OR^{1A} 之反應室，其中該室包含 β-1,3-N-乙醯半乳糖胺轉移酶及 UDP-GalAc 再生酵素組，其包含 N-乙醯己糖胺 1-激酶、N-乙醯葡萄糖胺 1-磷酸尿苷醯轉移酶、丙酮酸激酶及視需要之焦磷酸化酶；

(c) 用於合成 Gb5-OR^{1A} 之反應室，其中該室包含 β-1,3-半乳糖轉移酶及 UDP-Gal 再生酵素組；

(d) 用於合成岩藻糖-Gb5-OR^{1A} 之反應室，其中該室包含 α-1,2-岩藻糖轉移酶及 GDP-Fuc 再生酵素組，其包含 L-岩藻糖激酶/GDP-岩藻糖焦磷酸化酶、丙酮酸激酶及視需要之焦磷酸化酶；

(e) 合成唾液酸-Gb5-OR^{1A} 之反應室，其中該室包含 α-2,3-唾液酸轉移酶及 CMP-Neu5Ac 再生酵素組，其包含胞苷單磷酸激酶、CMP-唾液酸合成酶、丙酮酸激酶及視需要之焦磷酸化酶；或

(f)其組合。

【第36項】如請求項 35 之酵素反應器，其中於至少一個該反應室中的至少一個酵素係固定於一支持體上。

【第37項】如請求項 35 或 36 之酵素反應器，其中該反應器包含：

(i)反應室(a)及(b)；

(ii) 反應室(a)、(b)及(c)；

(iii) 反應室(a)、(b)、(c)及(d)；

(iv) 反應室(a)、(b)、(c)及(e)；

(v) 反應室(b)及(c)；

(vi) 反應室(b)、(c)及(d)；

(vii) 反應室(b)、(c)及(e)；

(viii) 反應室(c)及(d)；或

(ix) 反應室(c)及(e)。

【第38項】如請求項 37 之酵素反應器，其中一或多個 UDP-Gal 再生酵素組、UDP-GalNAc 再生酵素組、GDP-Fuc 再生酵素組及 CMP-Neu5Ac 再生酵素組係各自固定於支持體上。

【第39項】如請求項 35 或 36 之酵素反應器，其中各反應室中之所有酵素係固定於支持體上。

【第40項】一種將半乳糖殘基添加至基質中的方法，其包含：

(i) 在 UDP-Gal 再生酵素組存在下，自半乳糖生成 UDP-Gal，其中該 UDP-Gal 再生酵素組包含半乳糖激酶、UDP-糖焦磷酸化酶及丙酮酸激酶；及

(ii) 將 UDP-Gal 與基質分子藉由半乳糖轉移酶進行反應，在該基質分子上添加半乳糖殘基。

【第41項】如請求項 40 之方法，其中該 UDP-Gal 再生酵素組進一步包含焦磷酸化酶。

【第42項】如請求項 40 之方法，其中(i)及(ii)可在包含該 UDP-Gal 再生酵素組、該半乳糖轉移酶、該基質分子、半乳糖、ATP 及 UTP 的反應混合物中進行。

【第43項】如請求項 40 之方法，其中該基質分子係為多醣、寡醣、醣蛋白、醣脂或配醣基。

【第44項】如請求項 40 之方法，其中該基質分子係為神經醯胺或鞘醣脂。

【第45項】如請求項 40 之方法，其中該半乳糖轉移酶係為 α-1,4-半乳糖轉移酶、β-1,4-半乳糖轉移酶、α-1,3-半乳糖轉移酶或 β-1,3-半乳糖轉移酶。

【第46項】一種酵素反應器，其包含反應室，該反應室包含半乳糖轉移酶及 UDP-Gal 再生酵素組，其包含半乳糖激酶、UDP-糖焦磷酸化酶、丙酮酸激酶及視需要之焦磷酸化酶。

【第47項】如請求項 46 之酵素反應器，其中該半乳糖轉移酶係為 α-1,4-半乳糖轉移酶、β-1,4-半乳糖轉移酶、α-1,3-半乳糖轉移酶或 β-1,3-半乳糖轉移酶。

【第48項】如請求項 46 或 47 之酵素反應器，其中至少一個酵素係固定於一支持體上。

I510627 專利案號：102129714

公告本

104年 09月 07日 修正替換頁

申請日：102.8.19

IPC分類：C12P 19/18 (2006.01)
C07H 3/06 (2006.01)
C07H 15/04 (2006.01)

【發明摘要】

【中文發明名稱】　寡醣之大規模酵素合成

【英文發明名稱】　LARGE SCALE ENZYMATIC SYNTHESIS OF OLIGOSACCHARIDES

【中文】

本發明係提供一種 UDP-Gal 再生的方法及其與半乳糖基轉移酶的組合使用，將半乳糖添加至適當的受體基質。本發明進一步揭露大規模生產 Globo 系列寡醣的合成方法，其中該方法可涉及糖基轉移酶反應與核苷酸糖再生方法的組合。

【英文】

A novel UDP-Gal regeneration process and its combined use with a galactosyltransferease to add galactose to a suitable acceptor substrate. Also described herein are synthetic methods for generating Globo-series oligosaccharides in large scale, wherein the methods may involve the combination of a glycosyltransferase reaction and a nucleotide sugar regeneration process.

【指定代表圖】　第（1）圖。

【代表圖之符號簡單說明】

(無)

【特徵化學式】

(無)