(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118995846 A
(43)申请公布日 2024.11.22

(21)申请号 202410958399.8
(22)申请日 2019.07.02
(30)优先权数据
62/695508 2018.07.09 US
62/822320 2019.03.22 US
(62)分案原申请数据
201980058723.8 2019.07.02
(71)申请人 默沙东有限责任公司
地址 美国新泽西州
(72)发明人 M·A·哈夫曼
A·弗雷斯科夫斯卡
J·N·柯列夫 P·N·德维纳
K·R·坎波斯 M·特鲁普
C·C·纳威
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 郭慧 彭昶
(51)Int.Cl.
C12P 9/00(2006.01)
C07C 29/92(2006.01)
C07C 33/042(2006.01)
C07F 9/09(2006.01)
C07F 9/655(2006.01)
C12P 7/18(2006.01)

权利要求书3页 说明书42页
序列表（电子公布）

(54)发明名称

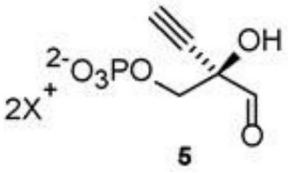
4'-乙炔基核苷类似物的酶促合成

(57)摘要

本发明涉及4'-乙炔基核苷类似物的酶促合成。本发明涉及4'-乙炔基-2'-脱氧核苷及其类似物例如EFdA的酶促合成,其排除了中间体上保护基的使用,改善了糖基化的立体选择性并减少了制造所述化合物所需的过程步骤的数量。它还涉及该过程中使用的新型中间体。

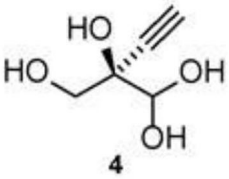
CN 118995846 A

1.一种合成化合物5的方法



5

所述方法包括将化合物4



4

与泛酸激酶在缓冲溶液中,

在二价金属盐的存在下,

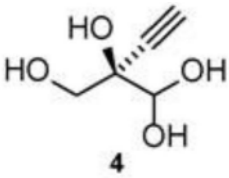
在以ATP作为磷酸源的情况下组合,其中ATP原位再生,

其中$2X^+$为(a)两个质子,(b)一个质子和一个一价阳离子,(c)两个一价阳离子,其中每个阳离子相同或不同,或(d)一个二价阳离子。

2.权利要求1的方法,其中采用(a)乙酰磷酸和乙酸激酶,或(b)丙酮酸氧化酶、过氧化氢酶和乙酸激酶,在丙酮酸、磷酸和氧气的存在下,或(c)其组合,原位再生ATP。

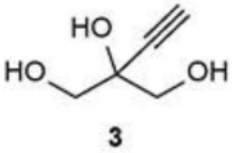
3.权利要求2的方法,其中(a)所述泛酸激酶是固定化的或(b)所述泛酸激酶和所述乙酸激酶是固定化的。

4.一种合成化合物4的方法



4

所述方法包括将化合物3



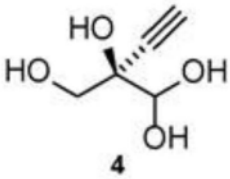
3

与半乳糖氧化酶、铜、过氧化氢酶和过氧化物酶或氧化剂,

在氧气的存在下在缓冲溶液中组合以产生化合物4。

5.权利要求4的方法,其中所述半乳糖氧化酶是固定化的。

6.一种分离化合物4的方法



4

所述方法包括

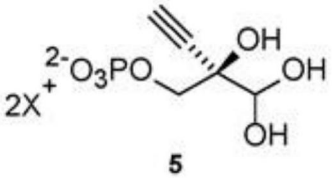
(1)使化合物4与形成稳定的N,N-缩醛或N,O-缩醛的胺、二胺或氨基醇在不与水混溶的

有机溶剂中，

在不存在氧气的情况下反应以形成缩醛胺；和

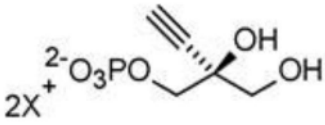
(2)使所述缩醛胺与有机酸或无机酸在不与水混溶的有机溶剂的存在下反应以再生化合物4。

7.一种合成化合物5的方法



5

所述方法包括将化合物9



9

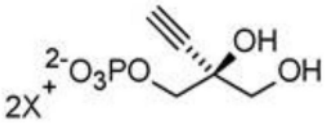
与半乳糖氧化酶在缓冲溶液中，

在氧气、过氧化氢酶以及或者过氧化物酶或者化学氧化剂的存在下组合，

以产生化合物5，

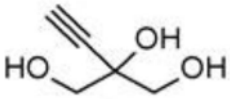
其中$2X^+$为(a)两个质子，(b)一个质子和一个一价阳离子，(c)两个一价阳离子，其中每个所述阳离子相同或不同，或(d)一个二价阳离子。

8.一种合成化合物9的方法



9

所述方法包括将化合物3



3

与泛酸激酶在缓冲溶液中，

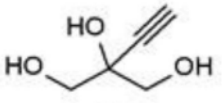
在二价金属盐的存在下，

在以ATP作为磷酸源的情况下组合，其中ATP原位再生，

以产生化合物(9)，

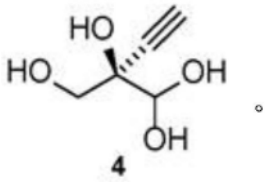
其中$2X^+$为(a)两个质子，(b)一个质子和一个一价阳离子，(c)两个一价阳离子，其中每个所述阳离子相同或不同，或(d)一个二价阳离子。

9.化合物



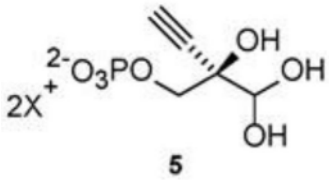
3 。

10.化合物



4

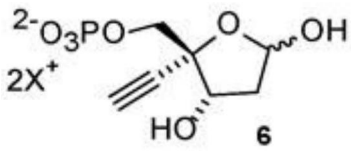
11.化合物



5

其中$2X^+$为(a)两个质子,(b)一个质子和一个一价阳离子,(c)两个一价阳离子,其中每个所述阳离子相同或不同,或(d)一个二价阳离子。

12.化合物



6

其中$2X^+$为(a)两个质子,(b)一个质子和一个一价阳离子,(c)两个一价阳离子,其中每个所述阳离子相同或不同,或(d)一个二价阳离子。

4'-乙炔基核苷类似物的酶促合成

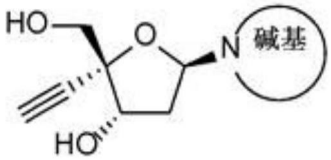
[0001] 本申请是申请日为2019年7月2日、申请号为201980058723.8、发明名称为"4'-乙炔基核苷类似物的酶促合成"的发明专利申请的分案申请。

[0002] 电子提交的序列表的引用

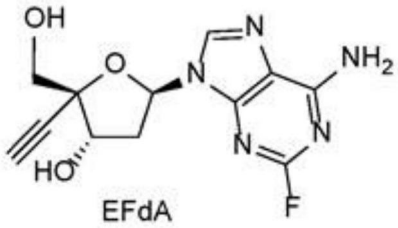
[0003] 本申请的序列表通过EFS-Web以ASCII格式的序列表电子提交,文件名为"24608WOPCT-SEQLIST-02JUl2019.txt",创建日期为2019年7月2日,并且大小为80.5kb。通过EFS-Web提交的此序列表是说明书的一部分,并且通过引用以其整体并入本文。

发明背景

[0005] 已知4'-乙炔基-2'-脱氧核苷类似物具有抗HIV、AIDS和相关疾病的活性。

[0006] 

[0007] 4'-乙炔基核苷类似物的一个实例是4'-乙炔基-2-氟-2'-脱氧腺苷(EFdA,也称为MK-8591),它是一种核苷逆转录酶易位抑制剂,在体外(Kawamoto,A.,Kodama,E.,Sarafianos S.F.等人,Int.J.Biochem.Cell Biol.;40(11):2410-20[2008];Ohrui,H.,Kohgo,S.,Hayakawa,H.等人,Nucleosides,Nucleotides&Nucleic Acids,26,1543-1546[2007])和体内(Hattori,S.,Ide,K.,Nakata,H.等人Antimicrobial.Agents and Chemotherapy,53,3887-3893[2009])阻断HIV-1和SIV病毒复制。EFdA在美国专利号7,339,053中要求保护(在'053专利中称为2'-脱氧-4'-C-乙炔基-2-氟腺苷)。EFdA具有以下化学结构:

[0008] 

EFdA

[0009] EFdA在细胞中代谢为其活性三磷酸合成代谢物,该合成代谢物抑制HIV逆转录酶。与目前可用于治疗HIV感染的缺少3'-OH基团来阻止进入核苷酸的掺入的核苷逆转录酶抑制剂(NsRTIs)和核苷酸逆转录酶抑制剂(NtRTIs)相比,EFdA保留了3'OH基团并通过防止引物:模板在逆转录酶(RT)活性位点易位和防止进入脱氧核糖核苷酸三磷酸(dNTP)结合来作为链终止剂。另外,据信通过将3'-OH置于载体中,EFdA的修饰的核糖环的褶皱有助于抑制逆转录酶,其中来自进入核苷酸的磷酸转移无效。(Michailidis E,等人,Mechanismofinhibition ofHIV-1reverse transcriptase by 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine triphosphate,J Biol Chem 284:35681-35691[2009];Michailidis E,等人,4'-Ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine(EFdA)inhibits HIV-1reverse transcriptase with multiple mechanisms,J Biol Chem 289:24533-24548[2014])。

[0010] 在体外HIV复制试验中,EFdA是有效的抗逆转录病毒,并且针对已评估的所有亚型的临床分离株均表现出相当的抗病毒活性。在体外,它在淋巴来源的细胞系和外周血单核细胞中均迅速合成代谢为活性三磷酸,并且EFdA三磷酸(EFdA-TP)的细胞内半衰期超过72hrs。(Stoddart,C.A.,Galkina,等人,Oral Administration of the Nucleoside EFdA (4'-Ethynyl-2-Fluoro-2'-Deoxyadenosine)Provides Rapid Suppression of HIV Viremia in Humanized Mice and Favorable Pharmacokinetic Properties in Mice and the Rhesus Macaque,Antimicrob Agents Chemother,2015Jul;59(7):4190-4198,2015年5月4日线上公布)。

[0011] 已显示EFdA在HIV感染的动物模型中具有功效,包括人源化的小鼠模型和SIV感染的恒河猴模型。在小鼠和恒河猴中口服施用EFdA的药代动力学研究表明吸收迅速且血浆浓度高。药物施用后24hr,从恒河猴分离的外周血单核细胞难于感染SIV的事实证明了长细胞内半衰期。(同上)

[0012] 先前的包括EFdA在内的4'-乙炔基核苷类似物的合成在乙炔基-脱氧核糖糖和2-氟腺嘌呤(也称为2-氟-9H-嘌呤-6-胺)核碱基之间的C-N键形成中具有适度的立体选择性。先前的合成还需要保护基进行糖基化反应,这降低了合成效率。

[0013] Kei Fukuyama,等人,Synthesis ofEFdA via a Diastereoselective Aldol Reaction of a Protected 3-Keto Furanose,Organic Letters 2015,17(4),pp.828-831;DOI:10.1021/ol5036535)中描述的合成是从D-葡萄糖二丙酮化物的14步合成,其使用非对映选择性反应设定三个立体中心。异头中心的立体化学通过具有2'-乙酰氧基引导基团来控制,随后通过水解和脱氧将其除去。该途径需要4次色谱纯化,并且化学计量地使用有毒的有机锡试剂进行后期脱氧。

[0014] 在另一种途径(参见Mark McLaughlin,等人,Enantioselective Synthesis of4'-Ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine(EFdA)via Enzymatic Desymmetrization,Organic Letters 2017,19(4),pp.926-929)中,完全取代的4'-甲醇通过酶促不对称化立体选择性生成。通过催化不对称转移氢化设定3'-立体中心,并使用底物控制以适度的立体选择性建立异头1'-键,并通过中间体的结晶实现立体化学纯度的提高。该过程需要15个步骤,需要使用若干保护基,并以低的立体选择性(1.8:1)在核碱基和糖片段之间产生糖基键。

[0015] 由R-甘油醛丙酮化物制备EFdA的12步合成描述于Kageyama,M.,等人,Concise Synthesis of the Anti-HIV Nucleoside EFdA,Biosci.Biotechnol.Biochem,2012,76,pp.1219-1225;和Enantioselective Total Synthesis ofthe Potent Anti-HIV Nucleoside EFdA,Masayuki Kageyama,等人,Organic Letters 2011 13(19),pp.5264-5266[DOI:10.1021/ol202116k]中。合成使用手性原料以中等非对映立体选择性设定3'-立体中心。色谱分离立体异构体后,新的立体中心用于引导非对映选择性炔烃添加,以设定完全取代的4'-立体中心。在几乎没有立体控制的情况下建立异头1'-位,并需要色谱法来分离端基异构体。该途径需要在两个不同阶段进行非对映异构体的色谱分离,并从昂贵的手性原料开始。

[0016] Kohgo,S.,等人,Design,Efficient Synthesis,and Anti-HIV Activity of4'-C-Cyano-and4'-C-Ethynyl-2'-deoxy Purine Nucleosides,Nucleosides,Nucleotides

and Nucleic Acids,2004,23,pp.671-690[DOI:10.1081/NCN-120037508]描述了一种从现有核苷开始并修饰糖和核碱基部分的合成途径。这是一个从2-氨基-2'-脱氧腺苷开始的18步合成,总收率低,为2.5%。

[0017] 已知诸如嘌呤核苷磷酸化酶(PNP,EC 2.4.2.1)的酶可以高立体选择性且不使用保护基在核苷和核苷类似物中形成糖基键。参见例如综述:New Trends inNucleoside Biotechnology,Mikhailopulo,I.A.,Miroshnikov,A.I,.Acta Naturae 2010,2,pp.36-58。然而,目前能够进行通过PNP催化的反应的糖片段的范围限于天然核糖和脱氧核糖的α-1-磷酸(phosphate)以及在C2'和C3'位置处具有小H、NH_2或F取代基和C5'OH基团替代的少量类似物。尚无使用环上具有碳取代基或C4'位置有任何取代的糖通过PNP催化成功进行糖基化的报道。

[0018] 已通过用酶磷酸戊糖变位酶(PPM,EC 5.4.2.7)将磷酸基团从5'-羟基移位到1'-羟基位证明了PNP催化糖基化可利用核糖和脱氧核糖α-1-磷酸底物(参见Mikhailopulo,I.A.等人,同上)。然而,PPM能够催化该反应的糖的范围限于核糖、阿拉伯糖、2-脱氧核糖和2,3-二脱氧核糖。没有报道用含有任何其他取代基的糖磷酸成功反应的实例。

[0019] 已知脱氧核糖磷酸醛缩酶(DERA,EC 4.1.2.4)酶催化乙醛醛醇加成到其他短链醛上(参见综述:Stephen M.Dean,等人,Recent Advances in Aldolase-Catalyzed Asymmetric Synthesis,Adv.Synth.Catal.2007,349,pp.1308-1320;DOI:10.1002/adsc.200700115)。然而,没有报道带有完全取代的碳α的醛向所述醛的实例。

[0020] 美国专利7,229,797描述了通过使用嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)并且另外使用诸如蔗糖磷酸化酶的酶以除去无机磷酸盐副产物并驱动平衡来从天然的未取代的脱氧核糖1-磷酸形成脱氧核糖核苷。它没有公开用于产生可以从非天然的4-乙炔基-D-2-脱氧核糖1-磷酸生成核苷的PNP酶的酶工程化,也没有公开通过PPM和DERA酶的工程化作用于非天然底物,可以生成4-乙炔基-D-2-脱氧核糖1-磷酸。

[0021] 鉴于迄今为止开发的用于生产4'-乙炔基核苷类似物的困难而漫长的合成选择,期望开发用于4'-乙炔基核苷类似物如EFdA的改善的酶促合成,其减少过程步骤的数量,最小化使用保护基,改善糖基化的立体选择性,并避免使用有毒物质。

[0022] 令人惊讶地发现,PPM酶具有对核糖4'位上3-原子乙炔基取代基的一些活性,并且可以通过将突变引入酶中来改善PPM酶的活性以成功开发用于PPM催化的4-乙炔基-D-2-脱氧核糖5-磷酸(6)向4-乙炔基-D-2-脱氧核糖1-磷酸(6.5)异构化的反应,使生产4'-乙炔基-2'-脱氧核苷的更有效方法成为可能。

[0023] 此外,还发现PNP酶具有对脱氧核糖4位上3原子乙炔基取代基的一些活性,并且可以通过将突变引入酶中来改善PNP酶的活性以成功开发PNP催化的糖基化反应,使生产4'-乙炔基-2'-脱氧核苷的更有效方法成为可能。

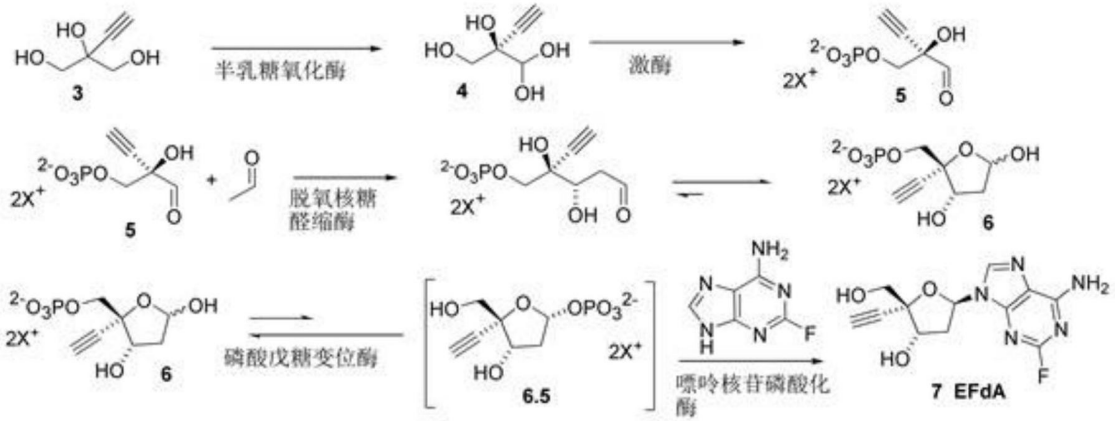
[0024] 对整个合成方法的甚至进一步改善来自以下发现:DERA酶,特别是来自哈里法克斯希瓦氏菌(Shewanellahalifaxensis)的DERA对与具有完全取代的α-碳的2-乙炔基-甘油醛3-磷酸的醛醇缩合反应具有活性。该发现允许有效合成4-乙炔基-D-2-脱氧核糖5-磷酸,它是例如包括EFdA的4'-乙炔基-2'-脱氧核苷类似物的前体。

发明概述

[0026] 本发明涉及工程化酶在4'-乙炔基-2'-脱氧核苷类似物(包括EFdA)的新型酶促合成中的用途,与现有方法相比,其排除了中间体上保护基的使用,改善了糖基化的立体选择性并大大减少了制备所述化合物所需的过程步骤的数量,以及其他过程改善。本发明进一步涉及新型中间体,其是酶促过程的组成部分。

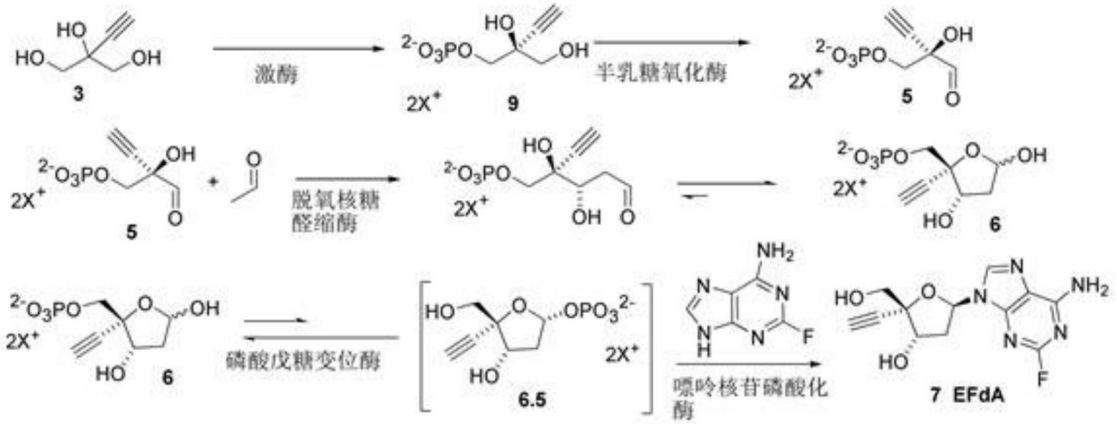
[0027] 整个过程总结在以下方案1和方案2中;后一种方案提供了制备化合物5的替代方法:

[0028] 方案1



[0029]

[0030] 方案1A

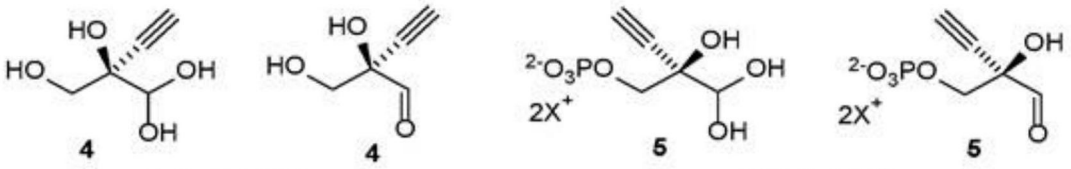


[0031]

[0032] 磷酸中间体的酸形式或盐可以用于本文所述的过程中,并且不限于本文中的过程步骤的示例中提供的特定酸或盐形式。对于本文所述的所有磷酸中间体,$2X^+$表示两个质子、一个质子与一个其他一价阳离子、两个一价阳离子(相同或不同)或一个二价阳离子的任何组合。本文中用$^-HO_3PO-$绘制的磷酸中间体同样可以具有与磷酸基团缔合的两个质子、一个质子与一个其他一价阳离子、两个一价阳离子(相同或不同)或一个二价阳离子的任何组合。实例包括但不限于钙、镁或锌的盐;单或二钠盐,单或二钾盐,单或二锂盐;单或二铵盐;与伯、仲或叔胺的一价或二价盐。

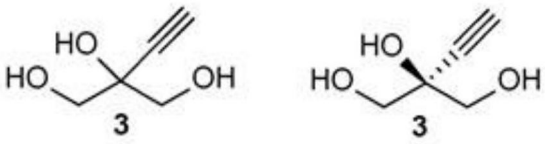
[0033] 如本领域很好理解的,在本文合成步骤中本文显示或命名为醛或水合物的中间体化合物可以本文所述反应中的形式或这种形式的混合物存在。例如,化合物(4)和(5)在方案1中分别描绘为水合物和醛,但在它们各自存在的反应步骤中,它们各自可以以水合物或醛的形式或其混合物存在。在本文的过程步骤中,通过引用化合物编号(4)或(5)涵盖每种

这样的形式：

[0034] 

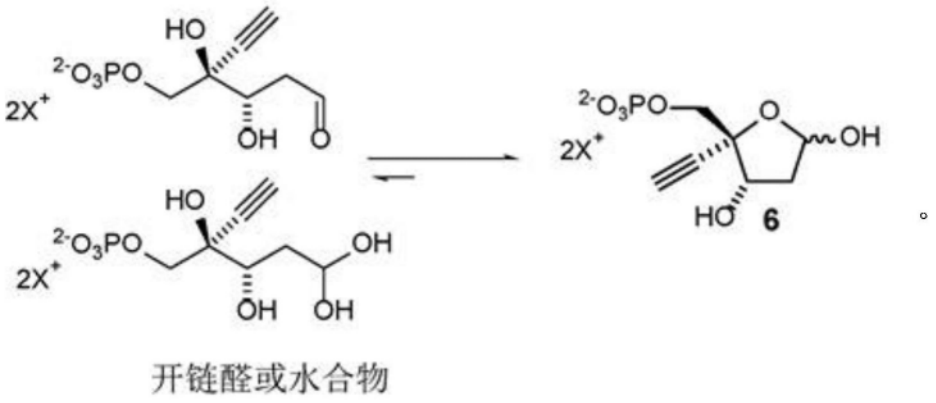
。

[0035] 化合物(3)是非手性的,并且在本文中可以显示为以下中的任一种：

[0036] 

。

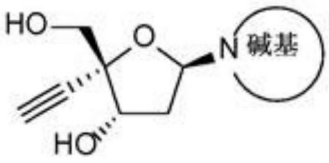
[0037] 在其存在的反应步骤中,化合物(6)可以以其环形式或作为开链醛或水合物存在(各自作为酸或其盐)：

[0038] 

。

发明详述

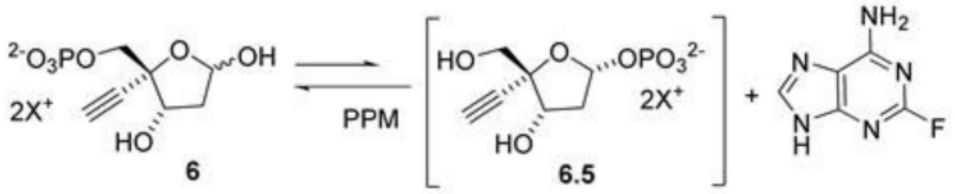
[0040] 已探索具有异头C-N键的4'-乙炔基-2'-脱氧核苷及其类似物

[0041] 

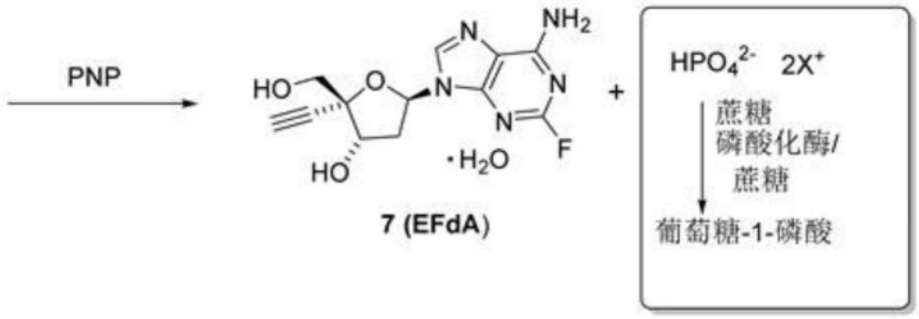
[0042] 用于抗HIV、AIDS和相关疾病的活性。4'-乙炔基-2'-脱氧核苷及其类似物包含通过异头C-N键连接到嘌呤或嘧啶核碱基(腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶或尿嘧啶)或修饰的嘌呤或嘧啶核碱基上的4'-乙炔基-2'-脱氧核糖。

[0043] 已经发现,可以通过将4-乙炔基-D-2-脱氧核糖5-磷酸(6)与两种酶磷酸戊糖变位酶(PPM)[例如但不限于SEQ ID NO.:8]和嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)[例如但不限于SEQ ID NO.:9、SEQ ID NO.:15]组合采用最后步骤一锅法来合成4'-乙炔基-2'-脱氧核苷类似物如EFdA,如方案2中所示。

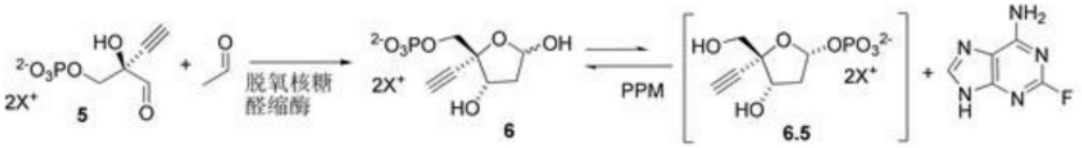
[0044] 方案2



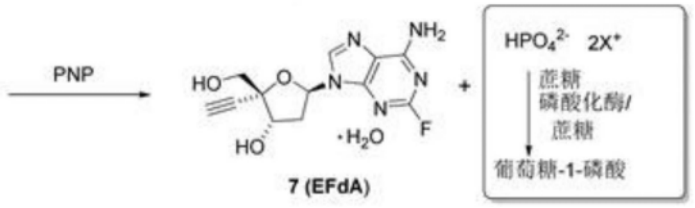
[0045]



[0046] 方案2A



[0047]



。

[0048] 如方案2中所示,合成的最后步骤采用2-酶反应与任选的第三酶,以驱动反应平衡朝向所需的最终产物。最后步骤以化合物(6)或其盐开始,其中(6)为如上所示的环形式或其开链醛或水合物形式的4-乙炔基-2-脱氧核糖5-磷酸。

[0049] 将化合物(6)与磷酸戊糖变位酶(PPM)、嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)、蔗糖磷酸化酶、蔗糖和核碱基(例如未取代或取代的腺嘌呤)在含有锰(II)盐并根据需要调节至约6.5至8.0,或更特别是约7.0至7.5的pH范围的缓冲溶液中组合。蔗糖:化合物(6)的摩尔比可以是但不限于约1:1至4:1。该一锅反应的组分可以以任何顺序组合。

[0050] 在不使酶变性的温度范围内搅拌反应,例如约30至45℃,并且更特别是约35至45℃。至多到某个点,较冷的温度可能有效,但将减慢反应速度。

[0051] 反应中可以使用任何具有合适pH且含有锰(II)盐的缓冲剂。此类缓冲剂的实例包括但不限于:三乙醇胺;PIPES,例如哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸);MOPS,例如3-(N-吗啉代)丙磺酸或3-吗啉代丙烷-1-磺酸;HEPES,例如4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸或2-[4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸;TRIS,例如三(羟甲基)氨基甲烷或2-氨基-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇;和BIS-TRIS甲烷,例如2-[双(2-羟乙基)氨基]-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇。更特别地,缓冲剂是三乙醇胺。缓冲剂中的锰(II)盐可以是例如氯化锰、氯化锰水合物、溴化锰、碘化锰、硝酸锰和/或硫酸锰。缓冲剂中的锰浓度范围可以是约0.05mM至约10mM,并且特别是约5mM。

[0052] 可以通过由添加到反应混合物中的蔗糖磷酸化酶(EC 2.4.1.7)催化的将蔗糖磷

酸分解为D-果糖和α-D-葡萄糖-1-磷酸来消耗副产物无机磷酸盐,从而驱动平衡反应朝向最终产物的高转化。然而,可以采用在反应过程中除去磷酸的任何其他选择,例如向反应中添加钙、镁或锰以沉淀磷酸盐,而不是使用蔗糖磷酸化酶和蔗糖。这种高效且生态友好的过程的优势在于,无需使用保护基或有机溶剂即可在糖和核碱基之间以非常高的立体选择性形成异头键,并且可以作为一锅反应进行。

[0053] 一旦反应完成,就可以使用本领域普通技术人员已知的标准程序来分离最终产物,例如但不限于通过使最终产物结晶来分离并通过过滤收集,或萃取到适当的溶剂中随后结晶。

[0054] 如方案2A中所示,合成的最后步骤可以替代地采用3-酶反应与任选的第四酶,以驱动反应平衡朝向所需的最终产物。最后步骤以化合物(5)或其盐开始,其中(5)为(R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸或其水合物形式。

[0055] 将化合物(5)与脱氧核糖磷酸醛缩酶(DERA)、乙醛、磷酸戊糖变位酶(PPM)、嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)、蔗糖磷酸化酶、蔗糖和核碱基或其类似物(例如未取代或取代的腺嘌呤)在含有锰(II)盐并根据需要调节至约4至10,或特别是约6.5至8.0,或更特别是约7.0至7.5的pH范围的缓冲溶液中组合。蔗糖:化合物(5)的摩尔比可以是但不限于约1:1至4:1。该一锅反应的组分可以以任何顺序组合。

[0056] 反应在不使酶变性的温度范围内进行,例如约30至45℃,或特别是约35至45℃。至多到某个点,较冷的温度可能有效,但将减慢反应速度。

[0057] 乙醛以溶液的形式,并且更特别是以异丙醇中40wt%的溶液形式添加。反应中可以使用任何合适的乙醛溶液或纯乙醛。此类溶液的实例包括但不限于:异丙醇中的乙醛溶液、乙醇中的乙醛溶液、水中的乙醛溶液、THF中的乙醛溶液。醛:化合物(5)的摩尔比可以是但不限于约0.5:1至4:1,并且更特别是1.5:1。

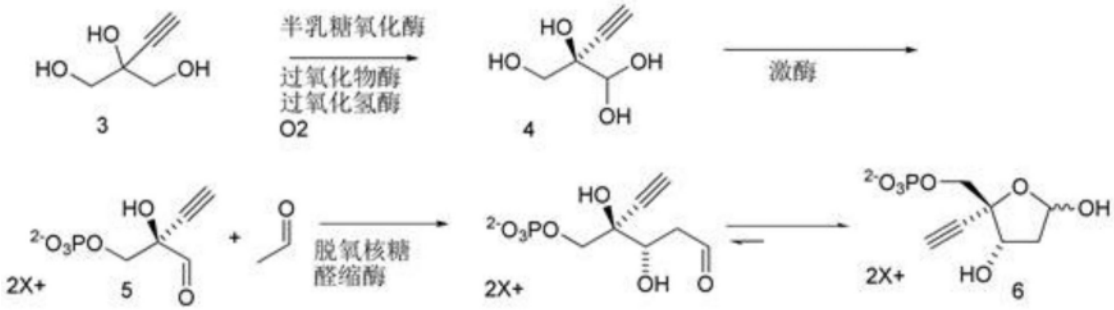
[0058] 反应中可以使用任何具有合适pH且含有锰(II)盐的缓冲剂。此类缓冲剂的实例包括但不限于:三乙醇胺;PIPES,例如哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸);MOPS,例如3-(N-吗啉代)丙磺酸或3-吗啉代丙烷-1-磺酸;HEPES,例如4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸或2-[4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸;TRIS,例如三(羟甲基)氨基甲烷或2-氨基-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇;和BIS-TRIS甲烷,例如2-[双(2-羟乙基)氨基]-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇。更特别地,缓冲剂是三乙醇胺。缓冲剂中的锰(II)盐可以是例如氯化锰、氯化锰水合物、溴化锰、碘化锰、硝酸锰和/或硫酸锰。缓冲剂中的锰浓度范围可以是约0.05mM至约10mM,并且特别是约5mM。

[0059] 可以通过由添加到反应混合物中的蔗糖磷酸化酶(EC 2.4.1.7)催化的将蔗糖磷酸分解为D-果糖和α-D-葡萄糖-1-磷酸来消耗副产物无机磷酸盐,从而驱动平衡反应朝向最终产物的高转化。然而,可以采用在反应过程中除去磷酸的任何其他选择,例如向反应中添加钙、镁或锰以沉淀磷酸盐,而不是使用蔗糖磷酸化酶和蔗糖。这种高效且生态友好的过程的优势在于,无需使用保护基或有机溶剂即可在糖和核碱基之间以非常高的立体选择性形成异头键,并且可以作为一锅反应进行。

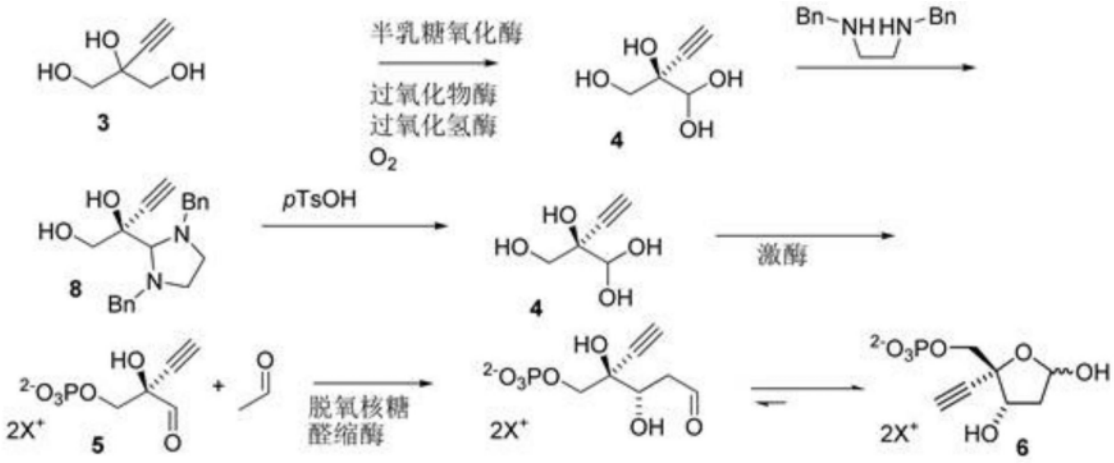
[0060] 一旦反应完成,就可以使用本领域普通技术人员已知的标准程序来分离最终产物,例如但不限于通过使最终产物结晶来分离并通过过滤收集,或萃取到适当的溶剂中随后结晶。

[0061] 如方案3;方案3A和方案3B中所示,还使用酶促反应方法制备了在本过程中用于合成最终产物4'-乙炔基-2'-脱氧核苷及其类似物的若干上游中间体。

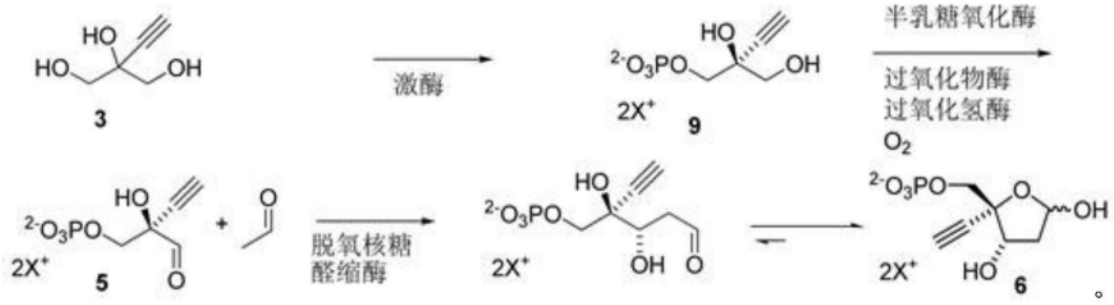
[0062] 方案3

[0063] 

[0064] 方案3A

[0065] 

[0066] 方案3B

[0067] 

[0068] 化合物4:氧化酶反应

[0069] 如方案3中所示,通过使半乳糖氧化酶与2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇(3)在根据需要调节至约3至10,或更特别是约6至8的pH范围的缓冲溶液中反应来制备(R)-2-乙炔基-甘油醛(4)。可以使用任何具有合适pH范围的缓冲剂,例如但不限于磷酸钠;乙酸钠;PIPES,例如哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸);MOPS,例如3-(N-吗啉代)丙磺酸或3-吗啉代丙烷-1-磺酸;HEPES,例如4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸或2-[4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸;TRIS,例如三(羟甲基)氨基甲烷或2-氨基-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇;和BIS-TRIS甲烷,例如2-[双(2-羟乙基)氨基]-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇;硼酸盐;CAPS,例如N-环己基-3-氨基丙磺酸;MES,例如2-(N-吗啉代)乙磺酸;CHES,例如N-环己基-2-氨基乙磺酸;甘氨酸;或Bicine(N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸);其中磷酸钠是优选的。

[0070] 反应中使用铜和过氧化物酶二者来激活半乳糖氧化酶(GOase)。可以通过添加$CuSO_4$、$Cu(OAc)_2$、$CuCl_2$或Cu(II)或Cu(I)的其他盐将铜供应至反应混合物。过氧化物酶可以是辣根过氧化物酶,或衍生自其他生物体的过氧化物酶,或者其可以被氧化剂代替,例如铁氰化物、铱酸盐、锰(III)盐、过硫酸盐和其他一个电子或两个电子氧化剂,或无机或有机氧化剂。优选地,过氧化物酶是辣根过氧化物酶。还添加过氧化氢酶以帮助防止GOase失活。过氧化氢酶可以来自哺乳动物来源(牛)或来自细菌或真菌来源,例如棒杆菌属(Corynebacterium)、曲霉菌属(Aspergillus)或本领域已知的用于此目的的其他生物体。

[0071] 反应在存在氧气的情况下进行。一种方便的方法是用空气鼓泡反应。替代地,可以采用其他生成氧气的系统,例如过氧化氢/过氧化氢酶、超氧化物或使用本领域已知的用于此目的的其他方法。

[0072] 反应可以在约10至180g/L,并且特别是20至50g/L的底物浓度下进行。反应可以在约0至40℃,并且特别是约10至30℃的温度下运行。

[0073] 化合物8:缩醛胺形成

[0074] 如方案3A所例示,(R)-2-乙炔基-甘油醛(4)可以通过使其与形成稳定的N,N-缩醛或N,O-缩醛的任何胺、二胺或氨基醇(例如但不限于N,N'-二苄基乙烷-1,2-二胺、N,N'-二甲基乙烷-1,2-二胺、N,N'-二苯基乙烷-1,2-二胺和N-苄基乙醇胺;其中N,N'-二苄基乙烷-1,2-二胺是优选的)反应,以(R)-2-乙炔基-甘油醛(4)的缩醛胺形式(例如,化合物8)分离。反应在有机溶剂中于约50℃或低于约50℃,优选20至30℃的温度下进行,以避免缩醛胺的分解。可以使用与水不混溶的任何溶剂,例如但不限于MTBE、2-MeTHF、CPME、乙醚、二异丙醚、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、甲苯、DCM或其混合物,其中MTBE是优选的。反应可以在约10至100g/L,并且特别是20至50g/L的底物浓度下进行。

[0075] 任选地,可以通过从有机溶剂(例如但不限于MTBE、2-MeTHF、CPME、乙醚、二异丙醚、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、甲苯、DCM或其混合物,其中MTBE是优选的)中结晶来进一步纯化该缩醛胺。结晶在50℃或低于50℃下进行,例如在约40℃下进行,以避免缩醛胺的分解。

[0076] 反应在不存在氧气的情况下进行。一种方便的方法是用N_2鼓泡反应。替代地,可以采用其他排除氧气的系统,例如氩气、氦气,或使用本领域已知的用于此目的的其他方法。

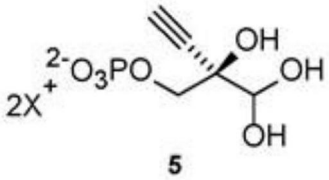
[0077] 化合物4:从缩醛胺8再生醛4

[0078] (R)-2-乙炔基-甘油醛(4)可通过使其与有机或无机酸反应从其相应的缩醛胺再生,所述反应在不与水混溶的有机溶剂存在下,在50℃或低于50℃的温度下,例如约0至15℃进行,以避免缩醛胺的分解。可以使用任何有机或无机酸,例如但不限于对甲苯磺酸、甲磺酸、樟脑磺酸、乙酸、盐酸、磷酸、硫酸。由于N,N'-二苄基乙烷-1,2-二胺双对甲苯磺酸盐在水中的溶解度低,因此在与缩醛胺8的反应中优选对甲苯磺酸。可以使用与水不混溶的任何溶剂,例如但不限于MTBE、2-MeTHF、CPME、乙醚、二异丙醚、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、甲苯、DCM或其混合物;其中MTBE和2-MeTHF是优选的。反应可以在约5至100g/L,并且特别是20至50g/L的底物浓度下进行。

[0079] 任选地,可以用树脂进一步对醛4溶液进行处理,以除去过量的有机或无机酸。可以用碱性树脂如DOWEX™ MARATHON™ A树脂(氢氧型)和AMBERLYST® 15树脂(氢型)或其混合物进行树脂处理,优选DOWEX™ MARATHON™ A树脂(氢氧型)和AMBERLYST® 15树脂的混合物。

[0080] 任选地,可以在真空下或在用气体吹扫下进一步蒸发醛4溶液,以除去过量的有机溶剂。

[0081] 化合物5:激酶反应

[0082] 

5

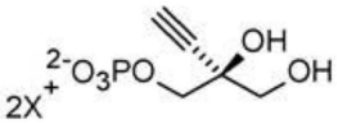
[0083] 如方案3和方案3A所示,通过使来自大肠杆菌的泛酸激酶(PanK)野生型或其变体与化合物(4)在根据需要调节至约4至10,或特别是约6.5至8.5或更特别是5.5至8.5的pH范围的缓冲溶液中反应来制备(R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸水合物(5)。可以使用具有合适pH范围的任何缓冲剂,例如但不限于磷酸钠、PIPES,例如哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸);BIS-TRIS甲烷,例如2-[双(2-羟乙基)氨基]-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇;硼酸盐;HEPES,例如4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸或2-[4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸;三乙醇胺和TRIS,例如TRIS,例如三(羟甲基)氨基甲烷或2-氨基-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇;其中磷酸钠是优选的。反应可以在任何合适的二价金属盐的存在下进行,例如但不限于镁盐,例如氯化镁,以及钴、锰、锌或钙的盐。

[0084] 该反应利用5'-二磷酸腺苷(ADP)作为磷酸源,其需要再生为5'-三磷酸(ATP)。ATP可以原位生成,并且随后通过本领域已知的任何方法从ADP、5'-单磷酸腺苷(AMP)或腺苷再生。例如,乙酰磷酸与乙酸激酶的组合可用于将ADP再生为ATP。例如,在丙酮酸、磷酸和氧气的存在下,丙酮酸氧化酶和过氧化氢酶的组合生成乙酰磷酸,并且因此在乙酸激酶的存在下,可用于将ADP再生为ATP。

[0085] 反应可以在约10至100g/L,并且特别是约20至40g/L的底物浓度下进行。反应可以在约0至40℃,并且特别是在约10至25℃的温度下运行。

[0086] 反应也可以用固定在树脂上的泛酸激酶(PanK)或固定在树脂上的PanK和乙酸激酶二者进行。可以使用本领域已知的任何合适的酶固定化方法,例如但不限于固定化金属离子亲和色谱法(IMAC)树脂,或使用其他生物标签的亲和树脂固定化,共价固定化,在离子树脂上固定化,通过吸附、包封和/或交联酶固定化。例如,可以使用金属离子亲和色谱法(IMAC)树脂,或者可以使用IMAC树脂和二价阳离子的任何合适的组合,其中阳离子可以是例如但不限于镍、钴、铜、锌、铁和/或铝。特别是,可以使用带镍的IMAC树脂。优选地,乙酸激酶和泛酸激酶(PanK)都固定在树脂上。

[0087] 化合物9:激酶反应

[0088] 

9

[0089] 如方案3B所示,通过使来自大肠杆菌的泛酸激酶(PanK)野生型或其变体与化合物(3)在根据需要调节至约4至10,或特别是约6.5至8.5或更特别是5.5至8.5的pH范围的缓冲溶液中反应来制备(S)-2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇1-磷酸(9)。可以使用具有合适pH范围的任何缓冲剂,例如但不限于磷酸钠;PIPES,例如哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸);BIS-TRIS甲

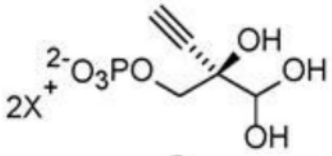
烷,例如2-[双(2-羟乙基)氨基]-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇;硼酸盐;HEPES,例如4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸或2-[4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸;三乙醇胺和TRIS,例如三(羟甲基)氨基甲烷或2-氨基-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇,其中磷酸钠是优选的。反应可以在任何合适的二价金属盐的存在下进行,例如但不限于镁盐,例如氯化镁,以及钴、锰、锌或钙的盐。

[0090] 该反应利用5'-二磷酸腺苷(ADP)作为磷酸源,其需要再生为5'-三磷酸(ATP)。ATP可以原位生成,并且随后通过本领域已知的任何方法从ADP、5'-单磷酸腺苷(AMP)或腺苷再生。例如,乙酰磷酸与乙酸激酶的组合可用于将ADP再生为ATP。替代地,(a)在丙酮酸、磷酸和氧气的存在下,丙酮酸氧化酶、过氧化氢酶和乙酸激酶的组合可用于将ADP再生为ATP,或(b)在丙酮酸、磷酸和氧气的存在下丙酮酸氧化酶、过氧化氢酶和乙酸激酶的组合与乙酰磷酸和乙酸激酶结合可用于从ADP再生ATP。

[0091] 反应可以在约10至100g/L,并且特别是约20至40g/L的底物浓度下进行。反应可以在约0至40℃,并且特别是在约10至25℃的温度下运行。

[0092] 反应也可以用固定在树脂上的泛酸激酶(PanK)或固定在树脂上的PanK和乙酸激酶二者进行。可以使用本领域已知的任何合适的酶固定化方法,例如但不限于固定化金属离子亲和色谱法(IMAC)树脂,或使用其他生物标签的亲和树脂固定化,共价固定化,在离子树脂上固定化,通过吸附、包封和/或交联酶固定化。例如,可以使用金属离子亲和色谱法(IMAC)树脂,或者可以使用IMAC树脂和二价阳离子的任何合适的组合,其中阳离子可以是例如但不限于镍、钴、铜、锌、铁和/或铝。特别是,可以使用带镍的IMAC树脂。优选地,乙酸激酶和泛酸激酶(PanK)都固定在树脂上。

[0093] 化合物5:氧化酶反应

[0094] 

5

[0095] 如方案3B中所示,通过使半乳糖氧化酶与(S)-2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇1-磷酸(9)在根据需要调节至约3至10,或更特别是约6至8的pH范围的缓冲溶液中反应制备(R)-2-乙炔基-甘油醛水合物3-磷酸(5)。可以使用具有合适pH范围的任何缓冲剂,例如但不限于磷酸钠;乙酸钠;PIPES,例如哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸);MOPS,例如3-(N-吗啉代)丙磺酸或3-吗啉代丙烷-1-磺酸;HEPES,例如4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸或2-[4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸;TRIS,例如三(羟甲基)氨基甲烷或2-氨基-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇;和BIS-TRIS甲烷,例如2-[双(2-羟乙基)氨基]-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇;硼酸盐;CAPS,例如N-环已基-3-氨基丙磺酸;MES,例如2-(N-吗啉代)乙磺酸;CHES,例如N-环已基-2-氨基乙磺酸;甘氨酸;或Bicine(N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸);其中磷酸钠是优选的。

[0096] 反应中使用铜和过氧化物酶二者来激活半乳糖氧化酶(GOase)。可以通过添加$CuSO_4$、$Cu(OAc)_2$、$CuCl_2$或Cu(II)或Cu(I)的其他盐将铜供应至反应混合物。过氧化物酶可以是辣根过氧化物酶,或衍生自其他生物体的过氧化物酶,或者其可以被氧化剂代替,例如铁氰化物、铱酸盐、锰(III)盐、过硫酸盐和其他一个电子或两个电子氧化剂,或无机或有机氧化剂。优选地,过氧化物酶是辣根过氧化物酶。还添加过氧化氢酶以帮助防止GOase失活。过

氧化氢酶可以来自哺乳动物来源(牛)或来自细菌或真菌来源,例如棒杆菌属、曲霉菌属或本领域已知的用于此目的的其他生物体。

[0097] 反应在氧气存在下进行。一种方便的方法是用空气鼓泡反应。替代地,可以采用其他生成氧气的系统,例如过氧化氢/过氧化氢酶、超氧化物或使用本领域已知的用于此目的的其他方法。

[0098] 反应可以在约10至180g/L,并且特别是20至50g/L的底物浓度下进行。反应可以在约0至40℃,并且特别是约10至30℃的温度下运行。

[0099] 化合物6:脱氧核糖磷酸醛缩酶(DERA)反应

[0100] 与现有的已知过程相比,这种用于生产化合物(6)的新途径的重要优点在于,它在不使用保护基的情况下以正确的氧化态产生糖骨架。

[0101] 通过使脱氧核糖磷酸醛缩酶(DERA)与(R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸(5)(作为酸或其盐)和乙醛在根据需要调节至约5至9,或更特别是约6至8的pH范围的水溶液中反应来制备4-乙炔基-D-2-脱氧核糖5-磷酸(6)。(5)的盐的实例包括但不限于钙、镁、锌、一或二钠盐、一或二钾盐或一或二锂盐;一或二铵或盐;或伯、仲或叔胺的一价或二价盐。反应可以在敞口容器中进行或优选在密封容器中进行以防止乙醛蒸发。

[0102] 反应可以在约10至100g/L,特别是约30至60g/L的底物浓度下进行。它可以在约0至40℃,并且特别是约25至35℃的温度下运行。

[0103] 反应可以在没有任何缓冲剂的情况下运行。替代地,可以使用缓冲剂,例如但不限于三乙醇胺;磷酸盐;MOPS,例如3-(N-吗啉代)丙磺酸或3-吗啉代丙烷-1-磺酸;HEPES,例如4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸或2-[4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸;BIS-TRIS甲烷,例如2-[双(2-羟乙基)氨基]-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇;硼酸盐;PIPES,例如哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸);MES,例如2-(N-吗啉代)乙磺酸;和硼酸盐;或具有合适pH范围的不具有任何伯胺基团的其他缓冲剂。

[0104] 包括使用一种或多种酶的本文所述过程的每个步骤和方法在不使所述一种或多种酶变性的温度下进行。包括使用一种或多种酶的本文所述过程的每个步骤和方法可以在约3至10或约4至10的pH范围下进行。

[0105] “核碱基”(或“含氮碱基”或“碱基”)是核酸例如DNA和RNA的嘧啶或嘌呤杂环。如本文所用,核碱基包括腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶或尿嘧啶,以及具有非天然修饰的核碱基,例如,其中所述碱基具有一个或多个非天然取代基,或影响碱基中杂原子的修饰,不包括异头C-N键的任何变化。

[0106] 4'-乙炔基-2'-脱氧核苷含有核碱基。如本文所用,4'-乙炔基-2'-脱氧核苷的类似物是指核苷碱基的非天然修饰,例如其中碱基具有一个或多个非天然取代基,或影响碱基中杂原子的修饰,不包括异头C-N键的任何变化。

[0107] 如本文所用,“磷酸戊糖变位酶”(“PPM”)酶(例如EC 5.4.2.7)是催化核糖1-磷酸可逆异构化为核糖5-磷酸和相关化合物如脱氧核糖磷酸以及核糖磷酸和脱氧核糖磷酸的类似物的酶。

[0108] 如本文所用,“嘌呤核苷磷酸化酶”(“PNP”)酶(EC 2.4.2.2)是催化嘌呤核糖核苷和相关化合物(例如,脱氧核糖核苷以及核糖核苷和脱氧核糖核苷的类似物)可逆磷酸解为游离嘌呤碱基和核糖-1-磷酸(及其类似物)的酶。

[0109] 如本文所用,“蔗糖磷酸化酶”(“SP”)酶(EC 2.4.1.7)是催化蔗糖可逆磷酸解为D-果糖碱基和葡萄糖-1-磷酸(及其类似物)的酶。蔗糖磷酸化酶(SP)与蔗糖的组合,与嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)和磷酸变位酶(PPM)结合采用以从反应中除去游离的磷酸根离子,其中酶的组合催化核苷MK-8591(EFdA)的形成,而在一些实施方案中,可以用本领域已知的其他方法代替它。

[0110] 如本文所用,“脱氧核糖磷酸醛缩酶”(“DERA”)(例如,EC 4.1.2.4)是指可逆地裂解或产生碳-碳键的裂解酶家族中的酶。本文所用的脱氧核糖磷酸醛缩酶包括天然存在的(野生型)脱氧核糖磷酸醛缩酶以及通过人为操作生成的非天然存在的工程化多肽。野生型脱氧核糖磷酸醛缩酶催化2-脱氧-D-核糖5-磷酸到D-甘油醛3-磷酸和乙醛的可逆反应。

[0111] 如本文所用,“泛酸激酶”(“PanK”)是指酶(EC 2.7.1.33),其本质上使泛酸磷酸化以形成4’-磷酸泛酸。衍生自此类PanK酶的变体酶可显示出对D-乙炔基甘油醛的3’OH-基团的活性和立体选择性的改善,无论此类变体是否保留其对泛酸的天然功能。

[0112] 如本文所用,“半乳糖氧化酶”(“GOase”;EC 1.1.3.9)酶是铜依赖性酶,其在双分子氧存在下催化伯醇氧化为相应的醛。它们以区域特异性和对映特异性方式起作用,从而使合成方法能够几乎不需要官能团保护并产生所需的立体异构体。氧化的方式是温和的和受控的,使得活性不会导致醇过度氧化为其相应的羧酸。

[0113] 如本文所用,“辣根过氧化物酶”(HRP,EC 1.11.1.7)酶是铁依赖性酶,其通过氧化在正常GOase催化循环期间发生的活性位点的非活性氧化还原状态来激活和维持GOase催化活性。I型HRP在本文包括的实施例中以催化方式采用,然而并不意味着其在该作用中是排他性的,因为存在其他属于该类和其他酶类的其他电子转移酶,以及可以实现该作用的化学试剂。

[0114] 如本文所用,“过氧化氢酶”是指作用于过氧化氢的血红素依赖酶(EC 1.11.1.6),过氧化氢是半乳糖氧化酶或丙酮酸氧化酶反应的副产物,其可在高于一定水平的过氧化氢下使酶失活。过氧化氢酶在本文的实施例中用作催化维持酶以将过氧化氢转化为水和氧气,而在一些实施方案中,它可以被其他方法代替,例如过氧化氢的电化学分解。血红素依赖性过氧化氢酶在本文包括的实施例中以催化方式使用,然而并不意味着其在该作用中是排他性的,因为存在属于该类可以实现该作用的其他酶。

[0115] 如本文所用,“乙酸激酶”(“AcK”)是指酶(EC 2.7.2.1),其催化由乙酸和三磷酸腺苷(ATP)形成乙酰磷酸。它也可以催化逆反应,其中在乙酰磷酸存在下将5’-二磷酸腺苷(ADP)磷酸化为5’-三磷酸腺苷(ATP)。在本文的实施例中,采用乙酸激酶来再循环泛酸激酶(PanK)所需的ATP,而在一些实施方案中,可以用本领域已知的其他方法代替乙酰磷酸-乙酸激酶的再循环组合。

[0116] 如本文所用,“丙酮酸氧化酶”(“PO”)是指依赖于黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)和硫胺素二磷酸的酶(EC 1.2.3.3)。丙酮酸氧化酶是属于氧化还原酶家族的一种酶,特别是那些以氧为受体作用于供体的醛或氧代基团的酶,并且它催化丙酮酸、磷酸根离子和双分子氧之间的化学反应,以形成乙酰磷酸、二氧化碳和过氧化氢。在本文的实施例中,丙酮酸氧化酶(PO)与乙酸激酶(AcK)和过氧化氢酶组合用作催化的ATP再生组合,其中所述酶的组合在氧、丙酮酸和磷酸根离子的存在下催化由ADP形成ATP,而在一些实施方案中,它可以被本领域已知的其他方法代替。

[0117] 如本文所用,“野生型”和“天然存在的”酶是指在自然界中发现的形式。例如,野生型多肽序列是存在于生物体中的序列,其可以从自然界中的来源中分离,并且还没有由人为操作有意识地修饰。

[0118] 如本文所用,“工程化的”、“变体”、“突变体”和“非天然存在的”当涉及包括多肽的酶使用时,是指材料,或者对应于所述材料的自然(natural)或天然(native)形式的材料,其已经以自然界中不另外存在的方式进行了修饰。在一些实施方案中,该多肽与天然存在的多肽相同,但由合成材料和/或通过使用重组技术进行操作而产生或衍生。

[0119] 关于酶的“序列同一性的百分比”、“百分比同一性”和“百分比同一的”在本文中用于指多核苷酸序列之间或多肽序列之间的比较,并且通过在比较窗口上比较两条最佳比对的序列来确定,其中为了两条序列的最佳比对,比较窗口内的多核苷酸或多肽序列的部分可以包含与参考序列相比的添加或缺失(即缺口)。百分比是这样计算的,通过确定在两条序列中出现相同的核酸碱基或氨基酸残基的位置的数目或者核酸碱基或氨基酸残基与缺口对齐的位置的数目以产生匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以比较窗口中的位置总数并将结果乘以100以产生序列同一性的百分比。使用BLAST和BLAST 2.0算法进行最佳比对和百分比序列同一性的确定(参见例如,Altschul等人,1990,J.Mol.Biol.215:403-410和Altschul等人,1977,Nucleic Acids Res.3389-3402)。进行BLAST分析的软件从National Center forBiotechnologyInformation网站上是公众可获得的。

[0120] 简而言之,BLAST分析包括首先通过确定查询序列中长度W的短字符来确定高评分序列对(HSPs),当与数据库序列中相同长度的字符比对时,其匹配或满足某些正值的阈值分值T。T称为邻近字符分值阈值(Altschul等人,见上文)。这些初始的邻近字符匹配作为种子用于开始检索以发现包含它们的更长HSPs。字符匹配随后沿每一序列在两个方向上延伸,远至累积比对分值能够增加。对于核苷酸序列,使用参数M(对匹配残基对的奖励分值;始终>0)和N(对错配残基的惩罚分值;始终<0)计算累积分值。对于氨基酸序列,使用评分矩阵计算累积分值。当出现以下情况时,在每一方向上字符匹配的延伸停止:累积比对分值以数量X从它的最大实现值掉落;由于积累了一个或多个负评分残基比对,累积分值变为零或低于零;或到达任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X确定了比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列)使用字符长(W)为11、期望值€为10、M=5、N=-4和两条链的比较作为缺省值。对于氨基酸序列,BLASTP程序使用字符长(W)为3、期望值€(E)为10、和BLOSUM62评分矩阵作为缺省值(参见Henikoff和Henikoff,1989,Proc Natl Acad Sci USA 89:10915)。

[0121] 在提供两条序列的百分比同一性方面,与BLAST功能类似的大量其他算法是可得的。可以通过以下进行用于比较的序列最佳比对,例如,通过Smith和Waterman,1981,Adv.Appl.Math.2:482的局部同源性算法、通过Needleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48:443的同源性比对算法、通过Pearson和Lipman,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444的相似性检索方法、通过这些算法的计算机化执行(在GCG Wisconsin Software Package中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA)、或通过目检(通常参见,Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel等人编辑,Current Protocols,Greene Publishing Associates,Inc.和John Wiley&Sons,Inc.,的合资企业,(1995Supplement)(Ausubel))。此外,序列比对和百分比序列同一性的确定可以使用GCG Wisconsin Software package

(Accelerys,Madison WI)中的BESTFIT或GAP程序,使用提供的缺省值参数。

[0122] “基本上的同一性”指在至少20个残基位置的比较窗口上、通常在至少30-50个残基的窗口上与参考序列比较时,具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同一性的多核苷酸或多肽序列,其中通过比较参考序列与包括在比较窗口上参考序列的总计20%或更少的缺失或添加的序列来计算序列同一性的百分比。在应用于多肽的具体实施方案中,术语“基本上的同一性”表示当最佳比对时,例如通过程序GAP或BESTFIT使用缺省值缺口权重时,两条多肽序列共有至少80%序列同一性,优选至少89%序列同一性、更优选至少95%序列同一性或更多(例如,99%序列同一性)。优选地,不相同的残基位置通过保守氨基酸取代而不同。

[0123] “立体选择性”指化学或酶促反应中一种立体异构体超过另一个的优选形成。立体选择性可以是部分的,其中一种立体异构体的形成优于另一种,或者立体选择性可以是完全的,其中仅形成一种立体异构体。当立体异构体是对映异构体时,立体选择性称为对映选择性,即一种对映异构体在两者的总和中的分数(通常报道为百分比)。可替代地,它通常在本领域中报道为根据公式[主要对映异构体-次要对映异构体]/[主要对映异构体+次要对映异构体]从中计算的对映体过量(e.e.)(通常为百分比)。在立体异构体是非对映异构体的情况下,立体选择性称为非对映立体选择性,即一种非对映异构体在两种非对映异构体的混合物中的分数(通常报道为百分比),通常替代地报道为非对映体过量(d.e.)。对映体过量和非对映体过量是立体异构体过量的类型。

[0124] 短语“合适的反应条件”是指在酶促转化反应溶液中的那些条件(例如,酶负载范围、底物负载、温度、pH、缓冲剂、助溶剂等),在这些条件下本发明中使用的各多肽能够将底物转化为所需的产物化合物。本文提供了一些示例性的合适的反应条件。

[0125] 如本文所用,在酶促转化反应过程的上下文中,“底物”是指被本文所用的工程化酶作用的化合物或分子。

[0126] 如本文所用,在酶促转化过程的上下文中,“产物”是指由酶促多肽在底物上的作用产生的化合物或分子。

[0127] 如本文所用,当与在相同条件下用相同底物但不存在目标组分的条件下进行的反应相比,反应过程中存在的特定组分(例如酶)导致产生更多的产物时,反应的产物(例如,4’-乙炔基-2’-脱氧核糖磷酸类似物或4’-乙炔基-2’-脱氧核苷类似物)的收率“增加”。

[0128] 如本文所用,本文所用的“平衡(equilibration)”或“平衡(equilibrium)”是指在化学或酶促反应中导致化学物质稳态浓度的过程(例如,两种物质A和B的相互转化),包括立体异构体的相互转化,由化学或酶促反应的正向速率常数和反向速率常数确定。

[0129] “对映体过量”(ee)是用于手性物质的纯度的量度。它反映了样品中含有一种对映异构体的量高于另一种对映异构体的程度。例如,外消旋混合物具有0%的e.e.,而单一的完全纯对映异构体具有100%的e.e.;并且含有70%一种对映异构体和30%另一种对映异构体的样品具有40%(70%-30%)的e.e.。当混合物中仅存在两种非对映异构体时,非对映体过量(de)的计算方法与e.e.相同。

[0130] “蛋白质”、“酶”、“多肽”和“肽”在本文中可互换使用,以表示通过酰胺键共价连接的至少两个氨基酸的聚合物,而不论其长度或翻译后修饰(例如,糖基化、磷酸化、脂质化、肉豆蔻酰化、10泛素化等)。该定义中包括D-和L-氨基酸,以及D-和L-氨基酸的混合物。

[0131] 如本文所用,术语“约”是指对于特定值的可接受的误差。在一些情况下,“约”是指在给定值范围的下端和上端在0.05%、0.5%、1.0%或2.0%之内。关于pH,“约”是指加或减0.5。

[0132] 如本文所用,“基本上纯的”多肽或“纯化的”蛋白质是指一种组合物,其中多肽物质是存在的主要物质(即,以摩尔或重量计,其比组合物中的任何其他单独的大分子物质更丰富),并且当目标物质包含以摩尔或%重量计至少约50%的存在的大分子物质时,该组合物通常是基本上纯化的组合物。然而,在一些实施方案中,包含多肽的组合物包含纯度小于50%(例如,约10%、约20%、约30%、约40%或约50%)的多肽。通常,基本上纯的多肽组合物包含以摩尔或%重量计约60%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约90%或更多、约95%或更多、以及约98%或更多的组合物中存在的所有大分子物质。在一些实施方案中,将多肽纯化至基本均质(即,不能通过常规检测方法在组合物中检测到污染物质),其中组合物基本上由单个大分子物质组成。溶剂物质、小分子(<500道尔顿)和元素离子物质不被认为是大分子物质。在一些实施方案中,分离的多肽是基本上纯的多肽组合物。

[0133] 如本文所用,酶的“改善的性质”是指酶的至少一种改善的性质。在一些实施方案中,本发明采用工程化的PPM、PNP、DERA、PanK、AcK、SP和/或GOase多肽,分别与参考PPM、PNP、DERA、PanK、AcK、SP或GOase多肽,和/或分别与野生型PPM、PNP、DERA、PanK、AcK、SP或GOase多肽,和/或分别与另一种工程化的PPM、PNP、DERA、PanK、AcK、SP或GOase多肽相比,其在任一酶性质上表现出改善。因此,可以确定“改善”水平并在各种多肽之间进行比较,包括野生型以及工程化的多肽。改善的性质包括但不限于诸如以下的性质:蛋白质表达增加、预期产物的产生增加、底物特异性或亲和力增加(即,对底物的活性增加)、热活性增加、热稳定性增加、pH活性增加、稳定性增加、酶促活性增加、比活性增加、对底物或终产物抑制的抗性增加、化学稳定性增加、化学选择性改善、溶剂稳定性改善、对酸性pH的耐受性增加、对蛋白水解活性的耐受性增加(即,对蛋白水解的敏感性减少)、聚集减少、溶解度增加和温度曲线改变。在另外的实施方案中,该术语用于指PPM、PNP、DERA、PanK、AcK、SP和/或GOase酶的至少一种改善的性质。在一些实施方案中,本发明采用工程化的PPM、PNP、DERA、PanK、AcK、SP和/或GOase多肽,分别与参考PPM、PNP、DERA、PanK、AcK、SP和/或GOase多肽;和/或与野生型多肽,和/或分别与另一种工程化的PPM、PNP、DERA、PanK、AcK、SP和/或GOase多肽相比,其在任一酶性质上表现出改善。因此,可以确定“改善”水平并在各种多肽之间进行比较,包括野生型以及工程化的多肽。

[0134] 如本文所用,“转化”(“conv”或“conv.”)是指底物向相应产物的酶促转化(或生物转化)。转化“百分比”是指在指定条件下一定时间段内转化为产物的底物百分比。因此,多肽的“酶促活性”或“活性”可以表示为在特定时间段内底物向产物的转化百分比。

[0135] 如本文所用,“立体选择性”指化学或酶促反应中一种立体异构体超过另一个的优选形成。立体选择性可以是部分的,其中一种立体异构体的形成优于另一种,或者立体选择性可以是完全的,其中仅形成一种立体异构体。当立体异构体是对映异构体时,立体选择性称为对映选择性,即一种对映异构体在两者的总和中的分数(通常报道为百分比)。可替代地,它通常在本领域中报道为根据公式[主要对映异构体-次要对映异构体]/[主要对映异构体+次要对映异构体]从中计算的对映体过量(“e.e.”)(通常为百分比)。在立体异构体是非对映异构体的情况下,立体选择性称为非对映立体选择性,即一种非对映异构体在两种

非对映异构体的混合物中的分数(通常报道为百分比),通常替代地报道为非对映体过量(“d.e.”)。对映体过量和非对映体过量是立体异构体过量的类型。

[0136] 本发明过程包括使用工程化的PPM、PNP、DERA、PanK、AcK、SP和GOase多肽,特别是具有SEQ ID NO.s 1至21的多肽,以及包含一个或多个保守氨基酸取代的所述序列,其可以被称为SEQ ID NO.s 1至21中每个的保守修饰的变体。

[0137] 如本文所用,“保守”氨基酸取代是指蛋白质中的氨基酸被具有相似特征(例如酸性、碱性、带正电或负电、极性或非极性、侧链大小、疏水性/亲水性、骨架构象和刚性等)的其他氨基酸替代,使得可以经常进行更改而不会改变蛋白质的生物学活性。这包括用相同或相似定义的氨基酸类别内的不同氨基酸对多肽中的氨基酸进行一个或多个替代。本领域技术人员认识到,通常,多肽非必需区域中的单个氨基酸取代基本上不会改变生物学活性(参见,例如,Watson等人(1987)Molecular Biology ofthe Gene,The Benjamin/Cummings Pub.Co.,p.224(4th Ed.))。另外,结构或功能上相似的氨基酸的取代不太可能破坏生物学活性。作为示例而非限制,在一些实施方案中,具有脂族侧链的氨基酸被另一脂族氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)替代;具有羟基侧链的氨基酸被另一具有羟基侧链的氨基酸(例如,丝氨酸和苏氨酸)替代;具有芳族侧链的氨基酸被另一具有芳族侧链的氨基酸(例如,苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和组氨酸)替代;具有碱性侧链的氨基酸被另一具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸和精氨酸)替代;具有酸性侧链的氨基酸被另一具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸或谷氨酸)替代;和/或疏水性或亲水性氨基酸分别被另一疏水性或亲水性氨基酸代替。表1列出了其他示例性的保守氨基酸取代。

[0138] 表1.示例性的保守氨基酸取代

[0139]

原始残基	保守取代
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn

[0140]

原始残基	保守取代
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

。

[0141] 术语“氨基酸取代组”或“取代组”是指与参考序列相比,多肽序列中的一组氨基酸取代。取代组可以具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多个氨基酸取代。

[0142] “功能片段”是指具有氨基末端和/或羧基末端缺失和/或内部缺失,但其中剩余的氨基酸序列与和其相比的序列(例如,本发明中使用的全长工程化的PPM、PNP、DERA、PanK、AcK、SP或GOase酶)中的相应位置相同,并且基本上保留了全长多肽的所有活性的多肽。

[0143] 如本文所用,“缺失”是指通过从参考多肽除去一个或多个氨基酸来对多肽进行的修饰。缺失可包括除去1个或更多个氨基酸、2个或更多个氨基酸、5个或更多个氨基酸、10个或更多个氨基酸、15个或更多个氨基酸或20个或更多个氨基酸,最多是构成参考酶的氨基酸总数的10%,或最多是构成参考酶的氨基酸总数的20%,同时保留了酶促活性和/或保留了工程化PPM、PNP、DERA、PanK、AcK、SP或GOase酶的改善性质。缺失可以针对多肽的内部部分和/或末端部分。在各种实施方案中,缺失可以包含连续片段或可以是不连续的。缺失通常在氨基酸序列中用“-”表示。

[0144] 如本文所用,“插入”是指通过从参考多肽添加一个或多个氨基酸来对多肽进行的修饰。插入可以在多肽的内部部分,或者在羧基或氨基末端。本文所用的插入包括如本领域已知的融合蛋白。插入可以是氨基酸的邻近片段或被天然存在的多肽中的一个或多个氨基酸隔开。

[0145] 本文使用的其他首字母缩略词和缩写如下：

[0146]

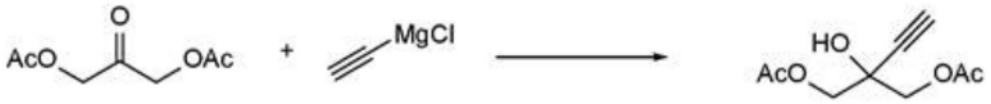
LC-MS	液相色谱法-质谱法	g/L	克/升
THF	四氢呋喃	mL	毫升
NMR	核磁共振光谱法	mmol	毫摩尔
RT或rt	室温(环境,约25℃)	mg	毫克
sccm	标准立方厘米/分钟	kg	千克
rpm	转数/分钟	N	当量浓度
M	摩尔/摩尔浓度	conv	转化率
mM	毫摩尔浓度	NMR	核磁共振
μL	微升	aq	含水的
DMSO	二甲基亚砜	hr,h	小时
TsOH	对甲苯磺酸	HPLC	高效液相色谱法
Bn	苄基	DCM	二氯甲烷
CPME	环戊基甲基醚	2-MeTHF	2-甲基四氢呋喃
MTBE	甲基叔丁基醚	ESI	电喷雾电离
HR-MS	高分辨质谱法		

。

[0147] 实验程序

[0148] 二乙酸2-乙炔基-2-羟基丙烷-1,3-二酯(2)的制备

[0149] 方法A：

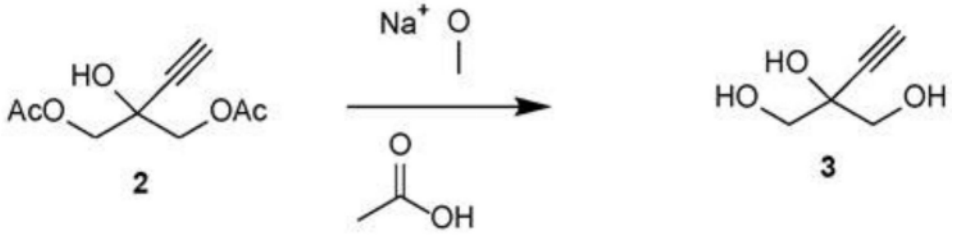
[0150] 

1 2

[0151] 向二乙酰氧基丙酮(1)(159g,914.0mmol)在THF(1000mL)中的-35℃溶液中添加1600mL的乙炔基氯化镁在THF中的0.5M溶液,保持温度低于-20℃。反应达到完成后,滴加在400mL甲基叔丁基醚(MTBE)中的乙酸(78mL),保持温度低于-20℃。然后添加MTBE(800mL),并将混合物温热至室温。添加饱和NaCl水溶液(1000mL),随后添加饱和NH_4Cl水溶液(1050mL)。分离有机层,经Na_2SO_4干燥并蒸发,得到化合物(2),为油状物(160g,88%)。^{1}HNMR($CDCl_3$,500MHz):δ4.26(dd,4H),2.55(s,1H),2.14(s,6H)。

[0152] 2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇(3)的制备

[0153] 方法B：

[0154] 

2 3

[0155] 在室温(rt)下向二乙酸2-乙炔基-2-羟基丙烷-1,3-二酯(2)(70g,350mmol)在乙醇中的溶液中添加甲氧基钠(sodium methoxylate)在甲醇中的0.5M溶液(69.9mL,

35.0mmol)。将反应在室温搅拌2小时(h)以达到完成。蒸发溶剂,并将残余物重新溶于100mL水中,并用3×50mL MTBE萃取。用氮气鼓泡水层以除去残留的溶剂,得到如通过核磁共振(NMR)(马来酸作为内标)测定的2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇(3)的40.9%溶液(108g,100%收率)。^{1}HNMR(D_2O,500MHz):δ3.60(dd,4H),2.85(s,1H)。

[0156] (R)-2-乙炔基-甘油醛(4)的替代制备

[0157] 方法C1:

[0158] 

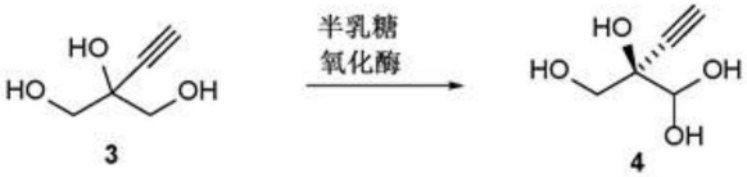
3 4

[0159] 在搅拌的反应器中,将含有消泡剂204(SigmaA6426,1滴~20μL)的磷酸钠缓冲剂(30mL,100mM,pH 7.0)中的2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇(3)(1.1g,9.47mmol)在12.5sccm的空气鼓泡下温热至30℃。将溶于磷酸钠缓冲剂(5mL 100mM,pH 7.0)中的半乳糖氧化酶(GOase,SEQ ID NO.:1)(250mg)、辣根过氧化物酶*(I型,5mg)和牛过氧化氢酶**(5mg)添加到反应器中,随后添加$CuSO_4$水溶液(100mM,150μL)。将反应混合物在空气鼓泡下以600rpm搅拌47h,以47%转化率(经由NMR)和72%e.e.得到(R)-2-乙炔基-甘油醛(4)。(未分离产物)。^{1}HNMR(D_2O,500MHz):δ4.29(s,1H),3.65(dd,2H),2.83(s,1H)。

[0160] *辣根过氧化物酶:来自I型辣根的野生型过氧化物酶,可商购自SIGMA(P8125),从辣根(horseradish root)(Amoracia rusticana)分离。

[0161] **牛过氧化氢酶:来自牛源的血红素依赖性过氧化氢酶,可商购自Sigma(C1345)。

[0162] 方法C2:

[0163] 

3 4

[0164] 在装有去离子水(56.2kg)的搅拌的100L夹套反应器中,添加磷酸二氢钠(1.212kg,10摩尔)。在25℃下使用10N氢氧化钠溶液(852.6g)将pH调节至7.02。向反应器中装入消泡剂204(A6426,10mL),随后装入$CuSO_4 \cdot 5H_2O$(6.5g)。添加半乳糖氧化酶(451.2g)(SEQ ID NO.:10)并搅拌15min,同时用空气鼓泡。添加辣根过氧化物酶*(200.2g)和过氧化氢酶**(502.6g),并将反应器用水(2.0kg)冲洗。接下来添加2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇(3)水溶液(9.48%,30.34kg,24.72mol),随后添加另一部分的消泡剂204(A6426,10mL)。用空气鼓泡反应并搅拌过夜,以66%转化率(经由NMR)和84%e.e.以及60%测定收率得到94.0kg的(R)-2-乙炔基-甘油醛(4):^{1}H NMR(D_2O,500MHz):δ4.29(s,1H),3.65(dd,2H),2.83(s,1H)。

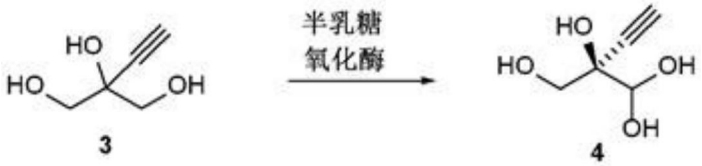
[0165] *辣根过氧化物酶:纯化的来自辣根的野生型过氧化物酶,可商购自Toyobo(PEO-301),从辣根(Amoracia rustican)分离。

[0166] **牛过氧化氢酶:来自牛源的血红素依赖性过氧化氢酶,可商购自Sigma(C1345)。

[0167] 还使用半乳糖氧化酶(SEQ ID NO.:11)进行上述反应,并以67%转化率(经由NMR)和88%e.e.以及59%测定收率获得产物(4):^{1}H NMR(D_2O,500MHz):δ4.29(s,1H),3.65(dd,

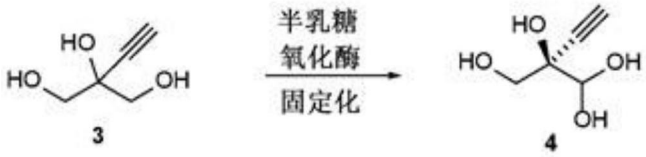
2H),2.83(s,1H)。

[0168] 方法C3:

[0169] 

[0170] 在装有鼓泡器和流量控制器的100mL EasyMax容器中,装入水(82mL)和PIPES钾缓冲剂(5mL,0.5M)。在25℃下使用5M KOH溶液将pH调节至7.5。添加消泡剂204(200μL),随后添加进化的半乳糖氧化酶(SEQ ID NO.:17,450mg酶粉)和五水合硫酸铜(II)(100μL,100mM)。用125标准立方厘米/分钟(sccm)的空气鼓泡反应混合物15min。装入牛过氧化氢酶(C1345,Sigma-Aldrich,150mg,2000-5000U/mg,0.75MU),随后装入辣根过氧化物酶(HRP,Toyobo PEO-301,100mg,130U/mg,1.3kU)和2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇(3)的水溶液(25wt%,12mL,25.8mmol)。将反应混合物在30℃下在125sccm的通气下搅拌,并使用EasySampler经20h取样,以得到70%转化率并以58%测定收率和99%e.e.形成化合物(4)((R)-2-乙炔基-甘油醛)。^{1}HNMR(D_2O,500MHz):δ4.29(s,1H),3.65(dd,2H),2.83(s,1H)。将粗反应流直接带入随后的磷酸化步骤。

[0171] 方法C4:用固定化半乳糖氧化酶氧化

[0172] 

[0173] 酶固定化程序:

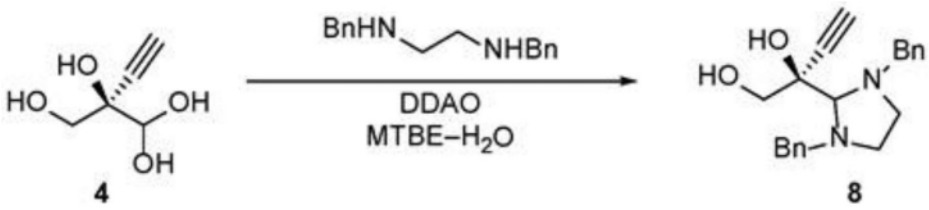
[0174] 将Nuvia IMAC带镍树脂(16mL,基于沉降体积)添加到过滤漏斗中,并用结合缓冲剂(10柱体积,160mL;500mM氯化钠,50mM磷酸钠,15mM咪唑,pH 8.0)洗涤以除去树脂储存溶液。在容器中,将进化的半乳糖氧化酶(SEQ ID NO.:17,2.00g)冻干粉重悬浮于硫酸铜(II)溶液(100μM;5.00mL)中,随后添加结合缓冲剂(50mL)和树脂。使用旋转混合器在20℃下将溶液混合5h。过滤树脂,并用结合缓冲剂(10柱体积,160mL)和PIPES钾缓冲剂(10柱体积,160mL;50mM,pH7.5)洗涤,并将其直接用于反应中。

[0175] 反应程序:

[0176] 在装有鼓泡器和流量控制器的100mL EasyMax容器中,装入水(82mL)和PIPES钾缓冲剂(5mL,1M)。使用5M KOH溶液在25℃下将pH调节至7.5。添加消泡剂204(200μL),随后添加固定在树脂上的进化的半乳糖氧化酶(SEQ ID NO.:17,每6mL树脂750mg酶粉)和五水硫酸铜(II)(100μL,100mM)。用125标准立方厘米/分钟(sccm)的空气鼓泡反应混合物15min。装入牛过氧化氢酶(C1345,Sigma-Aldrich,210mg,2000-5000U/mg,1.05MU),随后装入辣根过氧化物酶(HRP,Toyobo PEO-301,100mg,130U/mg,1.3kU)和2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇(3)的水溶液(25wt%,13mL,29.4mmol)。将反应混合物在25℃下在125sccm的通气下搅拌。22h后,反应达到91%转化率,得到200mM(R)-2-乙炔基-甘油醛(4)溶液(100mL,68%测定收率,97%e.e.)。^{1}HNMR(D_2O,500MHz):δ4.29(s,1H),3.65(dd,2H),2.83(s,1H)。将粗反应流直接带入随后的磷酸化步骤。

[0177] 方法C5:通过形成缩醛胺(8)任选分离醛

[0178] 步骤1:(S)-2-(1,3-二苄基咪唑烷-2-基)丁-3-炔-1,2-二醇的制备

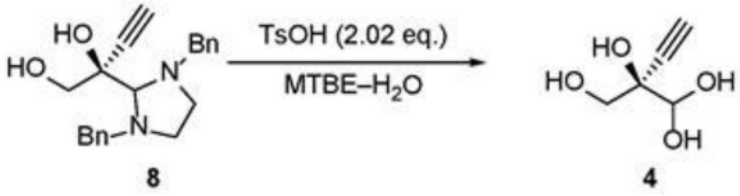
[0179] 

[0180] 在装有氮气鼓泡器、机械搅拌器和热电偶的100L带夹套的圆柱形容器中装入含有(R)-2-乙炔基-甘油醛((4),26.0kg,1.85wt%醛,3.64mol)的粗氧化酶反应流并用N_2气氛惰化。将水溶液温热至20℃,并添加N,N-二甲基十二-1-胺氧化物(DDAO)(30wt%,于水中,798g,0.96mol),随后添加MTBE(55.3kg,76L)和N,N'-二苄基乙烷-1,2-二胺(1.55kg,6.43mol)。将棕色两相混合物在氮气气氛下于20℃搅拌过夜。17小时后,停止搅拌,并除去有机相并弃去。获得(S)-2-(1,3-二苄基咪唑烷-2-基)丁-3-炔-1,2-二醇的浅棕色MTBE溶液(56.5kg,2.02wt%缩醛胺,3.39mmol,93%测定收率)。

[0181] 在单个蒸馏和结晶步骤中一起处理六个相似的MTBE溶液(总计374.4kg溶液,含有7.91kg缩醛胺)。

[0182] 在装有机械搅拌器、蒸馏头(冷凝器,在-20℃下)和热电偶的50L带夹套的圆柱形容器中装入缩醛胺溶液(45L)。对容器施加真空(65-95托),并将夹套设置为40℃。通过蒸馏除去溶剂,直到达到35L的体积。此时,内部温度为6.1℃,并且灰白色固体开始结晶。缓慢添加剩余的MTBE溶液,保持恒定体积为35-40L,且内部温度为0-10℃。一旦已添加所有MTBE溶液,就将体积降低至25L。停止蒸馏,将容器用氮气惰化,并将夹套温度降低至10℃。将所得的淡黄色悬浮液在该温度下老化2小时,并通过过滤收集固体。滤饼用冷(-2℃)MTBE(12.7kg)洗涤,并且然后在氮气流下干燥7小时。获得(S)-2-(1,3-二苄基咪唑烷-2-基)-丁-3-炔-1,2-二醇,为灰白色结晶固体(5.75kg)。^{1}H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ7.42-7.35(m,4H),7.32(td,J=7.5,1.6Hz,4H),7.27-7.21(m,2H),5.10(t,J=5.6Hz,1H),5.03(s,1H),4.28(d,J=13.3Hz,1H),4.16(d,J=13.3Hz,1H),3.76(s,1H),3.70-3.58(m,4H),3.21(d,J=0.9Hz,1H),2.90-2.80(m,2H),2.60-2.51(m,2H).^{13}C NMR(126MHz,DMSO-d_6)δ140.0,140.0,128.5,128.3,128.2,128.1,126.8,126.8,88.6,86.9,75.0,74.0,66.4,60.7,60.5,50.4,50.3,39.5.HR-MS(ESI)缩醛胺(M+H$^+$)$C_{21}H_{25}N_2O_2^+$计算值337.1911;实测值337.1922。

[0183] 步骤2:由缩醛胺(8)制备(R)-2-乙炔基-甘油醛(4)

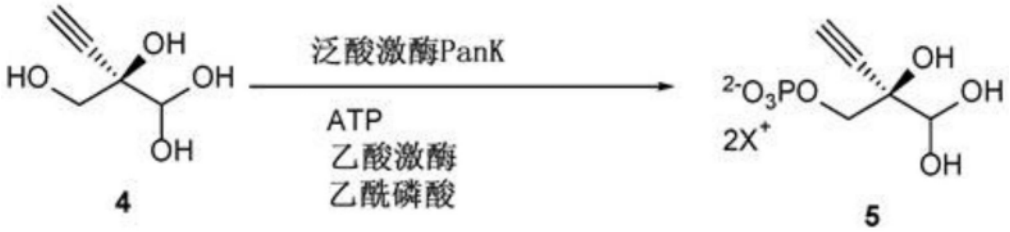
[0184] 

[0185] 在装有氮气鼓泡器和机械搅拌器的4L带夹套的圆柱形容器中装入TsOH·H_2O(12.0g,63.1mmol)、水(60mL)、(S)-2-(1,3-二苄基咪唑烷-2-基)丁-3-炔-1,2-二醇(110g,327mmol)和MTBE(1700mL)。将两相混合物置于氮气下,并将夹套温度设定为15℃。经1.5小时在顶置式(overhead)搅拌(200rpm)下滴加TsOH·H_2O(114g,599.3mmol)在水(600mL)中的溶液。添加完成后,将夹套温度降低至5℃,并将所得的浆料老化1小时。通过过滤除去固

体,并用冷水(270mL)洗涤。将两相溶液转移至分液漏斗中,并将有机相除去并丢弃。用DOWEX™ MARATHON™ A树脂(氢氧型,11.0g)和AMBERLYST®15树脂(氢型,11.0g)处理水相,同时以200sccm的速率用N_2鼓泡24小时以除去残留的MTBE。通过过滤除去树脂,得到(R)-2-羟基-2-(羟甲基)丁-3-炔醛的无色水溶液(774g,4.6wt%醛,82%收率)。^{1}HNMR(500MHz,D_2O)δ5.01(s,1H),3.77(d,J=11.7Hz,1H),3.73(d,J=11.7Hz,1H),2.92(s,1H)。^{13}C NMR(126MHz,D_2O)δ129.4,125.4,90.3,81.0,76.0,73.9,65.3。HRMS(ESI)醛二聚体(2M+Na^+)$C_{10}H_{12}NaO_6^+$计算值251.0526;实测值251.0530。

[0186] (R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸(5)的替代制备:

[0187] 方法D1:乙酸激酶:ATP再生系统

[0188] 

[0189] 在搅拌的反应器中,向二磷酸腺苷二钠盐(40mg,0.087mmol)和氯化镁(38mg,0.400mmol)在HEPES缓冲剂(66mM,pH 7.5,30mL)中的溶液中添加(R)-2-乙炔基-甘油醛(4)(1.9mL,210g/L水溶液,3.51mmol),随后添加乙酸激酶(SEQ ID NO.:3)(40mg)和泛酸激酶(SEQ ID NO.:2)(120mg)。将反应混合物温热至25℃,并经4小时滴加乙酰磷酸锂钾盐(1.3g,7.01mmol)在HEPES缓冲剂(50mM,pH 7.5,10mL)中的溶液,其中使用5M氢氧化钠将pH维持在7.5。将反应搅拌18小时,以85%转化率(经由HPLC)得到(R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸(5)(未分离产物)。^{1}H NMR(D_2O,400MHz):δ5.02(s,1H),4.00(dq,2H),2.88(s,1H)。LC-MS:(ES,m/z):$C_5H_7O_6P$(M^-H)的计算值:193.1;实测值193.0。

[0190] 方法D2:丙酮酸氧化酶ATP再生系统

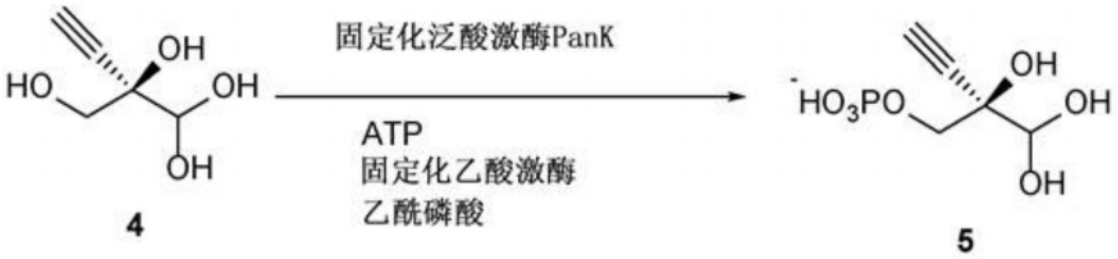
[0191] 

[0192] 在搅拌的反应器中,向丙酮酸钠(3.11g,28mmol)和磷酸(0.523mL,7.71mmol)在76mL水pH 7.5中的溶液中装入(R)-2-乙炔基-甘油醛(4)(3.8mL,210g/L水溶液,7.01mmol)、二磷酸腺苷二钠盐(80mg,0.174mmol)、硫胺素焦磷酸(40mg,0.086mmol)、黄素腺嘌呤二核苷酸二钠盐水合物(64mg,0.077mmol)和氯化镁(400μL,1M水溶液,0.4mmol)。用5M氢氧化钠水溶液将pH重新调节至7.5,并用水将反应体积重新调节至80mL。添加乙酸激酶(SEQ ID NO.:3)(80mg)、丙酮酸氧化酶(SEQ ID NO.:4)(80mg,冻干的无细胞提取物)、泛酸激酶(SEQ ID NO.:2)(400mg)和过氧化氢酶(800μL,硫酸铵悬浮液CAT-101,Biocatalytics)。将反应在空气鼓泡下于500rpm和30℃搅拌72小时,以95%转化率(经由

HPLC)得到(R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸5(未分离产物)。^{1}HNMR(D_2O,400MHz):δ5.02(s,1H),4.00(dq,2H),2.88(s,1H)。LC-MS:(ES,m/z):$C_5H_7O_6P$(M^-H)的计算值:193.1;实测值193.0。

[0193] 也使用泛酸激酶(SEQ ID NO.:13)进行上述反应,并以66%转化率获得产物5。(未分离产物)。^{1}HNMR(D_2O,400MHz):δ5.02(s,1H),4.00(dq,2H),2.88(s,1H)。

[0194] 方法D3:乙酸激酶:ATP再生系统,其使用固定化酶

[0195] 

4 5

[0196] 酶固定化程序:

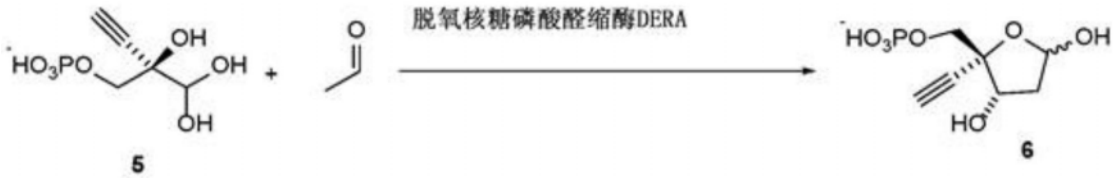
[0197] 将NUVIA™固定化金属离子亲和色谱法(IMAC)带镍树脂(168mL,基于沉降体积)添加到过滤漏斗中,并用结合缓冲剂(1.6L;500mM氯化钠,50mM磷酸钠,pH 8.0)洗涤。在容器中,将泛酸激酶(8.4g)(SEQ ID NO.:12)和乙酸激酶(2.8g)(SEQ ID NO.:3)溶解在结合缓冲剂(500mL)中。将洗涤过的树脂装入容器中,并将溶液在20℃下搅拌4小时。过滤树脂并首先用结合缓冲剂(1.6L)洗涤,随后用哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)(PIPES)缓冲剂(840mL;50mM,pH 6.5)洗涤。洗涤过的树脂直接用于下一步。

[0198] 反应程序:

[0199] 向1L反应器中,装入(R)-2-乙炔基-甘油醛(4)在水中的溶液(608.7g,4.6wt%、212mmol),并冷却至5℃。向冷却的溶液中添加哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)(PIPES)缓冲剂(32.7mL,1M,pH 6.5,32.7mmol)、氯化镁(9.33mL,1M,9.33mmol)、乙酰磷酸二铵盐(51.8g,265mmol)、二磷酸腺苷二钠盐水合物(1.17g,2.12mmol)和水(192mL)。使溶液搅拌,并使用5NKOH将pH调节至6.4。将反应温热至20℃,并添加168mL具有共同固定化泛酸激酶(SEQ ID NO.:12)和乙酸激酶(SEQ ID NO.:3)的树脂。将反应物与5N KOH(用于保持pH为6.4)一起搅拌10小时,以92%转化率(经由HPLC)和91%收率(经由^{31}PNMR,其中四苯基氯化鏻作为内标)得到(R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸(5)(未分离产物)。^{1}HNMR(D_2O,400MHz):δ5.02(s,1H),4.00(dq,2H),2.88(s,1H)。LC-MS:(ES,m/z):$C_5H_7O_6P$(M^-H)的计算值:193.1;实测值193.0。

[0200] 4-乙炔基-D-2-脱氧核糖5-磷酸(6)的制备

[0201] 方法E:

[0202] 

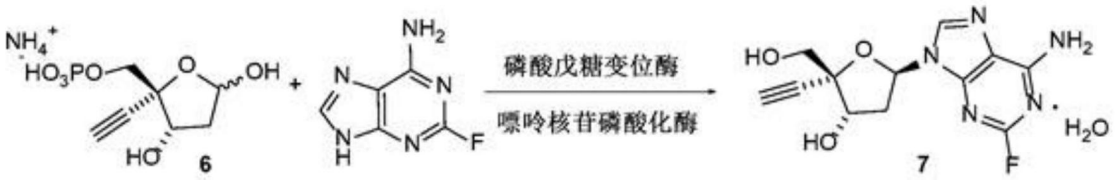
5 6

[0203] 在室温下向(R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸(5)(5,20mL,5.3mmol)在水中的溶液中添加乙醛在水中的溶液(40wt.%,2.02mL,15.9mmol),随后添加25mg脱氧核糖磷酸醛缩酶(DERA)(SEQ ID NO.:6)在三乙醇胺盐酸盐缓冲剂中的溶液(1mL,1M,pH 7.0)。密封反应器,并将混合物在30℃和600rpm下搅拌过夜,以99%转化率和99%e.e.,99%d.e.得到呈1:1端基异构体混合物形式的4-乙炔基-D-2-脱氧核糖5-磷酸(6)(未分离产物)。α-端基异构体:

^{1}HNMR(D_2O,600MHz)δ5.31(t,1H),4.13(t,1H),3.81-3.72(m,2H),2.89(s,1H),2.42-2.34(m,1H),1.87-1.79(m,1H);^{13}C NMR(D_2O,151MHz)δ97.7(s),81.4(d),79.4(s),78.9(s),71.1(s),67.7(d),39.6(s)。β-端基异构体:^{1}H NMR(D_2O,600MHz)δ5.40(dd,1H),4.28(t,1H),3.88-3.80(m,2H),2.87(s,1H),2.13-2.06(m,1H),2.04-1.97(m,1H);^{13}C NMR(D_2O,151MHz)δ97.3(s),82.2(d),78.7(s),78.5(s),71.3(s),68.4(d),39.6(s)。LC-MS:(ES,m/z):$C_7H_{10}O_7P$(M-H)的计算值:237.0;实测值237.0。

[0204] (2R,3S,5R)-5-(6-氨基-2-氟-9H-嘌呤-9-基)-2-乙炔基-2-(羟甲基)四氢呋喃-3-醇一水合物(7)[替代名称4'-乙炔基-2-氟-2'-脱氧腺苷或EFdA]的替代制备

[0205] 方法F1:

[0206] 

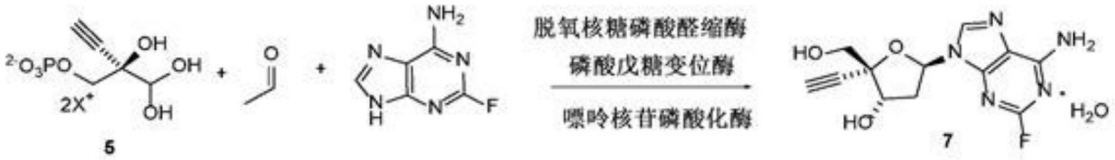
6 7

[0207] 将(((2R,3S)-2-乙炔基-3,5-二羟基四氢呋喃-2-基)甲基磷酸氢铵(1.00g,3.91mmol)溶于10mL的pH 7.5缓冲剂(含有5mM $MnCl_2$的100mM三乙醇胺•HCl)中。用5NNaOH将溶液pH调节至7.3。向溶液中添加2-氟腺嘌呤(0.599g,3.91mmol)和蔗糖(2.68g,7.82mmol)。通过将磷酸戊糖变位酶(SEQ ID NO.:8)(100mg)、嘌呤核苷磷酸化酶(SEQ ID NO.:9)(50mg)和蔗糖磷酸化酶(SEQ ID NO.:7)(10mg)溶于10mL的pH 7.5缓冲剂中制备酶溶液。将酶溶液添加到试剂混合物中,并将得到的悬浮液在40℃下摇动。20h后,将悬浮液冷却至0℃并过滤,用冷水冲洗。将固体抽吸干燥,得到标题化合物(1.12g,92%),为单一异构体。

[0208] ^{1}H NMR:(300MHz,DMSO-d6,ppm):δ7.68(br s,2H),7.32(d,J=2.0Hz,1H),6.44(t,J=5.8Hz,1H),5.52(d,J=5.6Hz,1H),5.27(t,J=6.0Hz,1H),4.44(q,J=6.4Hz,1H),3.60(q,J=6.0Hz,1H),3.53(q,J=6.4Hz,1H),3.48(s,1H),2.48-2.41(m,1H),2.37-2.30(m,1H)。^{13}C NMR(150.92MHz,DMSO-d6,ppm)δ158.5(d,JCF=203.5),157.6(d,JCF=21.2),150.2(d,JCF=20.2),139.7(d,JCF=2.4),117.4(d,JCF=4.0),85.1,82.0,81.4,78.7,70.1,64.2,38.1.LC-MS:(ES,m/z):$C_{12}H_{12}FN_5O_3$(M+Na)的计算值:316.0822;实测值316.0818。

[0209] 此步骤中使用的PPM和PNP酶各自衍生自起始于来自大肠杆菌(Escherichia coli)的酶的突变。此步骤中使用的蔗糖磷酸化酶(SP)衍生自Alloscardovia omnicolens;也可以使用衍生自其他生物体的SP。

[0210] 方法F2:

[0211] 

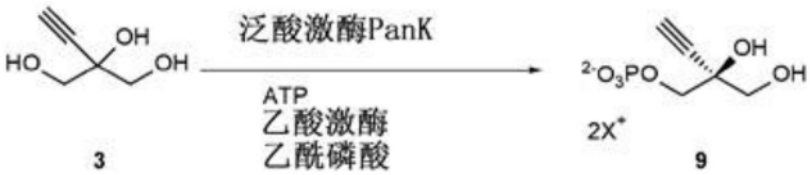
5 7

[0212] 向含有pH约5.5至6.0的哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)(PIPES)缓冲剂的(R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸(5)的水溶液(950mL,157mmol)中添加三乙醇胺(7.09g,47.5mmol)。使用氢氧化钾(8mL,8M)将溶液的pH从7.1调节至7.6。添加氯化锰(II)水合物(0.592g,

4.70mmol),随后添加蔗糖(161g,470mmol),得到7.5的pH。向该溶液中添加以下酶:脱氧核糖磷酸醛缩酶(SEQ ID NO.:14)(461mg)、蔗糖磷酸化酶(SEQ ID NO.:7)(494mg)、磷酸戊糖变位酶(SEQ ID NO.:8)(2.63g)和嘌呤核苷磷酸化酶(SEQ ID NO.:15)(659mg)。一旦酶溶解,就添加2-氟腺嘌呤(19.80g,125mmol)。将反应加热至35℃,并添加乙醛(40wt%于异丙醇中,29.8mL,235mmol)。反应2h后,用EFdA结晶产物(0.96g,2mol%)接种混合物。在35℃下反应26h后,将浆料冷却至0℃,并通过过滤收集固体,用水洗涤两次(每次40mL)。固体在氮气吹扫下干燥。收率43.2g,92wt%,校正96.2%。^{1}H NMR:(300MHz,DMSO-d6,ppm):δ7.68(brs,2H),7.32(d,J=2.0Hz,1H),6.44(t,J=5.8Hz,1H),5.52(d,J=5.6Hz,1H),5.27(t,J=6.0Hz,1H),4.44(q,J=6.4Hz,1H),3.60(q,J=6.0Hz,1H),3.53(q,J=6.4Hz,1H),3.48(s,1H),2.48-2.41(m,1H),2.37-2.30(m,1H)。^{13}C NMR(150.92MHz,DMSO-d6,ppm)δ158.5(d,JCF=203.5),157.6(d,JCF=21.2),150.2(d,JCF=20.2),139.7(d,JCF=2.4),117.4(d,JCF=4.0),85.1,82.0,81.4,78.7,70.1,64.2,38.1.LC-MS:(ES,m/z):$C_{12}H_{12}FN_5O_3$(M+Na)的计算值:316.0822;实测值316.0818。

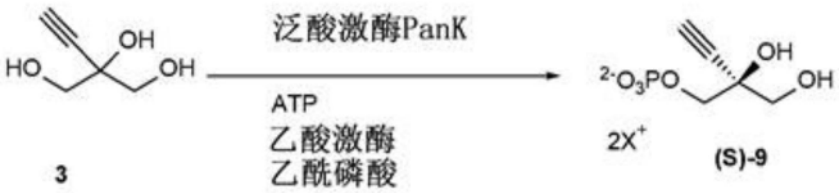
[0213] (S)-2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇11-磷酸(9)的替代制备:

[0214] 方法G1:乙酸激酶:ATP再生系统,其使用酶SEQ.IDNo.:2和SEQ.ID No.:3

[0215] 

[0216] 在50mL反应器中装入2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇(3)在水中的溶液(9.29g,9.46wt%、7.57mmol)、PIPES钾缓冲剂(1.02mL,1M,pH 6.5,1.02mmol)、氯化镁(292μL,1M,0.292mmol)、乙酰磷酸二铵盐(1.851g,89wt%、9.46mmol)、二磷酸腺苷二钠盐水合物(ADP,42mg,0.076mmol,0.01eq)和水(28mL)。使用5M KOH将pH调节至6.4,将溶液温热至20℃,并添加进化的泛酸激酶PanK SEQ.ID NO.:2(264mg)和乙酸激酶AcK SEQ.ID No.:3(88mg)。将反应搅拌16小时,其中使用5N KOH将pH维持在6.4。最终反应内容物以>95%e.e.和99%转化率(经由^{31}P NMR)提供(S)-2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇1-磷酸(9)。未分离产物。^{1}H NMR(D_2O,500MHz)δ3.89(m,2H),3.72(d,J=11.6Hz,1H),3.65(d,J=11.6Hz,1H),2.93(s,1H)。^{13}C NMR(D_2O,126MHz)δ82.9(s),75.1(s),71.0(d,J=6.9Hz),67.0(d,J=4.5Hz),64.7(s)。31PNMR(D_2O,202MHz)δ3.39.HRMS:(ESI,m/z):$[M-1]^-C_5H_8O_6P$的计算值:195.0058;实测值195.0068$[M-H]^-$:195.0058。

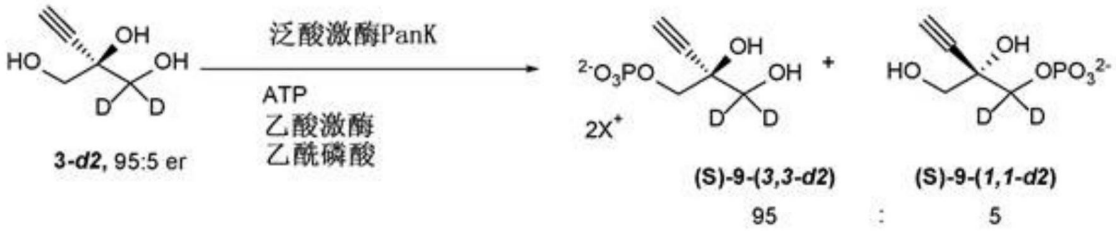
[0217] 方法G2:乙酸激酶:ATP再生系统,其使用酶SEQ.ID No.:20和酶SEQ.ID No.:21

[0218] 

[0219] 向夹套反应器中装入水溶液2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇(3)(11.47kg,8.7%wt,8.61mol)和水(7.5kg),随后装入1MBIS-TRIS甲烷缓冲剂pH6.5(1L)和氯化镁(41.4g)。添加ATP(48g,0.086mol,0.01当量)和乙酰磷酸二铵(2.021kg,89%,10.33mmol),将溶液温热至20℃,并使用KOH(270.4g)将溶液的pH重新调节至6.8。然后装入作为固体的进化的泛酸激

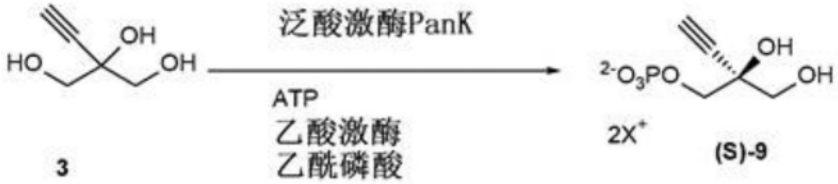
酶SEQ.ID NO.:20(20.4g)和进化的乙酸激酶SEQ.ID No.:21(3g)。将反应在20℃下搅拌16h,在此期间pH降至5.5。如通过^{1}H和31P NMR所判断的,获得2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇(3)的定量转化率。如此制备的(S)-2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇1-磷酸(9)溶液(397mM,22.5kg,98%收率)不经任何进一步纯化即用于随后的氧化步骤。^{1}HNMR(D_2O,500MHz)δ3.89(m,2H),3.72(d,J=11.6Hz,1H),3.65(d,J=11.6Hz,1H),2.93(s,1H)。

[0220] 方法G3:乙酸激酶:ATP再生系统,其使用酶SEQ.IDNo.:20和酶SEQ.IDNo.:21与氘化化合物(3),以分配绝对立体化学并证实去对称化磷酸化。

[0221] 

[0222] 将进化的泛酸激酶SEQ.ID NO.:20(100μL的10g/L水溶液)和进化的乙酸激酶SEQ.IDNo.:21(100μL的2g/L水溶液)添加到溶液中,该溶液含有乙酰磷酸二铵(41mg)、2-乙炔基-丙烷-1,1-d2-1,2,3-三醇((R)-3-d2,20mg,170μmol)、氯化镁(10μL的1M水溶液)、ADP(10μL的100g/L水溶液)和磷酸钠缓冲剂(10μL的1M水溶液)(于水(800μL)中)(pH 6.5)。将反应在室温下温育24h,以95:5比例和99%总收率得到氘化的2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇1-磷酸类似物(S)-9-(3,3-d2)和(S)-9-(1,1-d2)。通过^{31}PNMR确定磷酸化化合物的比例为~95:5,这证实了2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇(3)在前(S)羟基的立体选择性磷酸化(即去对称化磷酸化)。^{1}HNMR(D_2O,500MHz)δ3.89(m,2H),3.72(d,J=11.6Hz,1H),3.65(d,J=11.6Hz,1H),2.93(s,1H)。^{13}C NMR(D_2O,126MHz)δ82.9(s),75.1(s),71.0(d,J=6.9Hz),67.0(d,J=4.5Hz),64.7(s)。

[0223] 方法G4:乙酸激酶:ATP再生系统,其使用固定化酶SEQ.IDNo.:20和酶SEQ.ID No.:21

[0224] 

[0225] 酶固定化程序:

[0226] 将Nuvia IMAC带镍树脂(75mL,基于沉降体积)添加到过滤漏斗中,并用水(9柱体积,3×225mL)和结合缓冲剂(1柱体积,75mL;500mM氯化钠,50mM磷酸钠,15mM咪唑,pH 8.0)洗涤。在容器中,将泛酸激酶(SEQ ID NO.:20,6.0g)冻干粉重悬于结合缓冲剂(200mL)中,并添加洗涤过的树脂。使用旋转混合器在25℃下将溶液混合6h。过滤树脂,并用结合缓冲剂(6柱体积,6×225mL)和BIS-TRIS缓冲剂(8柱体积,600mL;50mM,pH 6.2)洗涤。

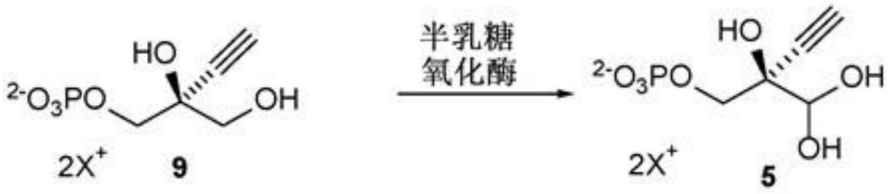
[0227] 反应程序:

[0228] 将2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇(3)(574g,8.7%wt,0.430mol)和水(350mL)的水溶液装入夹套反应器中,随后装入1M BIS-TRIS甲烷缓冲剂pH 6.5(50mL)和氯化镁(2.033g,0.01mol)。添加ATP(2.37g,0.0043mol,0.01当量)和乙酰磷酸二铵(101g,89%、0.530mmol,1.2eq),将溶液温热至20℃,并使用5M KOH将溶液的pH重新调节至6.8。然后装入作为固体

的具有固定化泛酸激酶SEQ.ID NO.:20的树脂(25mL)和进化的乙酸激酶SEQ.IDNo.:21(0.15g)。将反应在20℃下搅拌16h,在此期间pH降至5.5。如通过^{1}H和^{31}P NMR所判断的,获得2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇(3)到(S)-2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇1-磷酸(9)的定量转化率。^{1}H NMR(D_2O,500MHz)δ3.89(m,2H),3.72(d,J=11.6Hz,1H),3.65(d,J=11.6Hz,1H),2.93(s,1H)。

[0229] (R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸(5)的替代制备

[0230] 方法H1:固定化半乳糖氧化酶SEQ ID No.:16

[0231] 

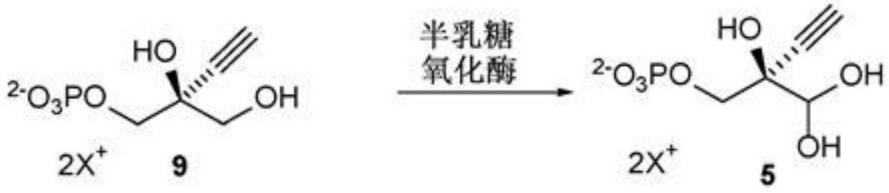
[0232] 酶固定化程序:

[0233] 将Nuvia IMAC带镍树脂(10mL,基于沉降体积)添加到过滤漏斗中,并用结合缓冲剂(10柱体积,100mL;500mM氯化钠,50mM磷酸钠,15mM咪唑,pH 8.0)洗涤以除去树脂储存溶液,并得到16g洗涤过的树脂。在容器中,将进化的半乳糖氧化酶(SEQ ID NO.:16,750mg)冻干粉重悬于硫酸铜(II)溶液(100μM;5.00mL)中,随后添加结合缓冲剂(20mL)和洗涤过的树脂(3.0g)。使用旋转混合器在20℃下将溶液混合5h。过滤树脂,并用结合缓冲剂(10柱体积,100mL)和BIS-TRIS缓冲剂(10柱体积,100mL;50mM,pH 7.5)洗涤,并将其直接用于糖基化反应。

[0234] 反应程序:

[0235] 将具有固定化半乳糖氧化酶SEQ ID NO.:16的树脂(3.0g)添加到(S)-2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇1-磷酸(9,5.4mmol,270mM,20mL)在BIS-TRIS甲烷缓冲剂(35mM,pH调节至7.2)中的溶液中,随后添加硫酸铜(II)水溶液(30μL,100mM)和重悬于水(600μL)中的辣根过氧化物酶(PEO-301,18mg)和牛过氧化氢酶(C1345,120mg)。用透气膜密封反应,并在22℃下剧烈摇动4天,以达到77%的最终转化率,并以95%e.e.得到(R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸(5)。滤出酶树脂,并将(R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸(5)的溶液直接用于糖基化反应。^{1}H NMR(D_2O,400MHz):δ5.02(s,1H),4.00(dq,2H),2.88(s,1H)。LC-MS:(ES,m/z):$C_5H_7O_6P$(M^-H)的计算值:193.1;实测值193.0。

[0236] 方法H2:固定化半乳糖氧化酶SEQ ID No.:17

[0237] 

[0238] 酶固定化程序:

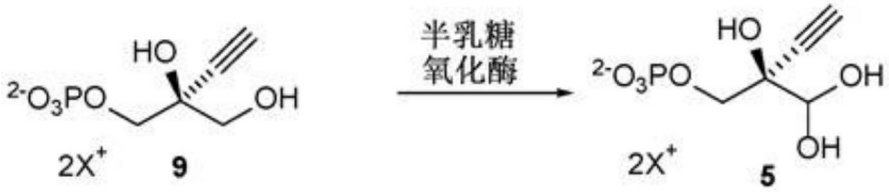
[0239] 将Nuvia IMAC带镍树脂(10mL,基于沉降体积)添加到过滤漏斗中,并用结合缓冲剂(10柱体积,100mL;500mM氯化钠,50mM磷酸钠,15mM咪唑,pH 8.0)洗涤以除去树脂储存溶液,并得到16g洗涤过的树脂。在容器中,将进化的半乳糖氧化酶(SEQ ID NO.:16,750mg)冻干粉重悬于硫酸铜(II)溶液(100μM;5.00mL)中,随后添加结合缓冲剂(20mL)和洗涤过的树

脂(3.0g)。使用旋转混合器在20℃下将溶液混合5h。过滤树脂,并用结合缓冲剂(10柱体积,100mL)和BIS-TRIS甲烷缓冲剂(10柱体积,100mL;50mM,pH 7.5)洗涤,并将其直接用于反应。

[0240] 反应程序:

[0241] 将具有固定化的进化的半乳糖氧化酶SEQ ID NO.:17的树脂(3.0g)添加到(S)-2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇1-磷酸(9,5.4mmol,270mM,20mL)在BIS-TRIS甲烷缓冲剂(35mM,pH调节至7.2)中的溶液中,随后添加硫酸铜(II)水溶液(30μL,100mM)和重悬于水(600μL)中的辣根过氧化物酶(PEO-301,18mg)和牛过氧化氢酶(C1345,120mg)。用透气膜密封反应,并在22℃下剧烈摇动4天,以达到77%的最终转化率,并以95%e.e.得到(R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸(5)。滤出酶树脂,并将(R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸(5)的溶液直接用于糖基化反应。^{1}H NMR(D_2O,400MHz):δ5.02(s,1H),4.00(dq,2H),2.88(s,1H)。LC-MS:(ES,m/z):$C_5H_7O_6P$(M^-H)的计算值:193.1;实测值193.0。

[0242] 方法H3:固定化半乳糖氧化酶SEQ ID No.:18

[0243] 

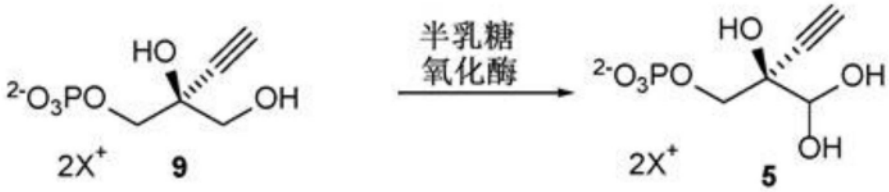
[0244] 酶固定化程序:

[0245] 将Nuvia IMAC带镍树脂(3mL,基于沉降体积)添加到过滤漏斗中,并用结合缓冲剂(10柱体积,30mL;500mM氯化钠,50mM磷酸钠,15mM咪唑,pH 8.0)洗涤以除去树脂储存溶液,并得到2.4g洗涤过的树脂。在小瓶中将进化的半乳糖氧化酶(SEQ ID NO.:18,75mg)冻干粉重悬于硫酸铜(II)溶液(100μM;1.00mL)中,随后添加结合缓冲剂(5mL)和洗涤过的树脂(400mg)。使用旋转混合器在20℃下将溶液混合5h。过滤树脂,并用结合缓冲剂(10柱体积,4mL)和BIS-TRIS甲烷缓冲剂(10柱体积,4mL;50mM,pH 7.5)洗涤,并将其直接用于反应。

[0246] 反应程序:

[0247] 将固定化的进化的GOase SEQ ID NO.:18(400mg)添加到(S)-2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇1-磷酸溶液((9),5.4mmol,270mM,1mL)在BIS-TRIS甲烷缓冲剂(35mM,pH调节至7.2)中的溶液中,随后添加重悬于水(100μL)中的辣根过氧化物酶(PEO-301,1mg)和来自谷氨酸棒杆菌(Corynebacterium glutamicum)的过氧化氢酶(Roche,冻干产物,#11650645103,3mg)。用透气膜密封反应,并在30℃下剧烈摇动48h。2天后最终转化率达到90%转化率并且(R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸(5)>99%e.e.。滤出酶树脂,并不经进一步纯化直接使用(R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸(5)的溶液。^{1}H NMR(D_2O,400MHz):δ5.02(s,1H),4.00(dq,2H),2.88(s,1H)。LC-MS:(ES,m/z):$C_5H_7O_6P$(M^-H)的计算值:193.1;实测值193.0。

[0248] 方法H4:固定化半乳糖氧化酶SEQ ID No.:19

[0249] 

[0250] 酶固定化程序:

[0251] 将Nuvia IMAC带镍树脂(3mL,基于沉降体积)添加到过滤漏斗中,并用结合缓冲剂(10柱体积,30mL;500mM氯化钠,50mM磷酸钠,15mM咪唑,pH 8.0)洗涤以除去树脂储存溶液,并得到2.4g洗涤过的树脂。在小瓶中将进化的半乳糖氧化酶(SEQ ID NO.:19,75mg)冻干粉重悬于硫酸铜(II)溶液(100μM;1.00mL)中,随后添加结合缓冲剂(5mL)和洗涤过的树脂(400mg)。使用旋转混合器在20℃下将溶液混合5h。过滤树脂,并用结合缓冲剂(10柱体积,4mL)和BIS-TRIS甲烷缓冲剂(10柱体积,4mL;50mM,pH 7.5)洗涤,并将其直接用于反应。

[0252] 反应程序:

[0253] 将固定化的进化的GOase SEQ ID NO.:18(400mg)添加到(S)-2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇1-磷酸溶液(9,5.4mmol,270mM,1mL)在BIS-TRIS甲烷缓冲剂(35mM,pH调节至7.2)中的溶液中,随后添加重悬在水(100μL)中的辣根过氧化物酶(PEO-301,1mg)和来自谷氨酸棒杆菌的过氧化氢酶(Roche,冻干产物,#11650645103,3mg)。用透气膜密封反应,并在30℃下剧烈摇动48h。2天后最终转化率达到100%转化率,并以>99%e.e.获得(R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸(5)。滤出酶树脂,并不经进一步纯化直接使用(R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸(5)的溶液。^{1}H NMR(D_2O,400MHz):δ5.02(s,1H),4.00(dq,2H),2.88(s,1H)。LC-MS:(ES,m/z):$C_5H_7O_6P$(M-H)的计算值:193.1;实测值193.0。

[0254] 在本文中通过任一其通常已知的IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号提及“氨基酸”。出于本文描述的目的,用于本文方法中使用的酶的遗传编码氨基酸的代码在表2中是常规的:

[0255] 表2

[0256]

氨基酸	单字母代码	氨基酸	单字母代码
丙氨酸	A	异亮氨酸	I
精氨酸	R	亮氨酸	L
天冬酰胺	N	赖氨酸	K
天冬氨酸	D	蛋氨酸	M
天冬酰胺或天冬氨酸	B	苯丙氨酸	F
半胱氨酸	C	脯氨酸	P
谷氨酸	E	丝氨酸	S
谷氨酰胺	Q	苏氨酸	T
谷氨酰胺或谷氨酸	Z	色氨酸	W
甘氨酸	G	酪氨酸	Y
组氨酸	H	缬氨酸	V

。

[0257] 提供了本文所述的合成EFdA的过程和本文所述的实验程序中的示例性过程步骤中所采用或可能采用的酶的序列ID号,但其不限于表3中的那些。

[0258] 表3

[0259]

SEQ ID NO:	酶和氨基酸序列
1	半乳糖氧化酶(GOase)=来自禾谷镰刀菌(Fusarium graminearum) (以前称为树状指孢霉(Dactylium dendroides))的半乳糖氧化酶的变体 MASAPIGSAIPRNNWAVTCDSAQSGNECNKAIDGNKDTFWHTFYGANGDPKPP HTYTIDMKTTQNVNGLSVLPRQDGNQNGWIGRHEVYLSSDGTNWGSPVASGS WFADSTTKYSNFETRPARYVRLVAITEANGQPWTSIAEINVFQASSYTAPQPGL GRWGPTIDLPIVPAAAAIEPTSGRVLMWSSYRNDAFEGSPGGITLTSSWDPSTGI VSDRTSTVTKHDMFCPGISMDGNGQIVVDETATGGNDAKKTSLYDSSSDSWIP GPDMQVARGYQSSATMSDGRVFTIGGSFSGGRVEKNGEVYSPSSKTWTSLPNA KVNPMLTADKQGLYRSDNHAWLFGWKKGSVFQAGPSTAMNWYYTSGSGDV KSAGKRQSNRGVAPDAMCGNAVMYDAVKGKILTFGGSPDYEDSDATTNAHIIT LGEPGTSPNTVFASNGLYFARTFHTSVVLPDGSTFITGGQRRGIPTEDSTPVFTPE IYVPEQDTFYKQNPNSIVRAYHSISLLLPDGRVFNGGGGLCGDCTTNHFDAQIFT PNYLYDSNGNLATRPKITRTSTQSVKVGGRITISTDSSISKASLIRYGTATHTVNT DQRRIPLTLTNNGGNSYSFQVPSDSGVALPGYWMLFVMNSAGVPSVASTIRVT QGGGGSWSHPQFEK
2	泛酸激酶(PanK)=来自大肠杆菌的泛酸激酶的变体 MSIKEQTLMTPYLQFDRNQWAALRDSVPMTLSEDEIARLKGINEDLSLEEVAEI YLPLSRLLNFYISSNLRRQAVLEQFLGTNGQRIPYIISIAGSVAVGKSTTARVLQA LLSRWPEHRRVELITTDGFLHPNQVLKERGLMKKKGFPESYDMHRLVKFVSDL KSGVPNVTAPVYSHLIYDVIPDGDKTVVQPDILILEGLNVLQSGMDYPHDPHHV FVSDFVDFSIYVDAPEDLLQTWYINRFLKFREGAFTDPDSYFHNYAKLTKEEAIK TAMTIWKEMNWLNLKQNILPTRERASLILTKSANHAVEEVRLRK

[0260]

SEQ ID NO:	酶和氨基酸序列
3	乙酸激酶(AcK)=来自海栖热袍菌(Thermotoga maritima)的野生型乙酸激酶 MGSHHHHHHGSRVLVINSGSSSIKYQLIEMEGEKVLCKGIAERIGIEGSRLVHRV GDEKHVIERELPDHEEALKLILNTLVDEKLGVIKDLKEIDAVGHRVVHGGERFK ESVLVDEEVLKAIEEVSPLAPLHNPANLMGIKAAMKLLPGVPNVAVFDTAFHQ TIPQKAYLYAIPYEYYEKYKIRRYGFHGTSHRYVSKRAAEILGKKLEELKIITCHI GNGASVAAVKYGKCVDTSMGFTPLEGLVMGTRSGDLDPAIPFFIMEKEGISPQE MYDILNKKSGVYGLSKGFSSDMRDIEEAALKGDEWCKLVLEIYDYRIAKYIGA YAAAMNGVDAIVFTAGVGENSPITREDVCSYLEFLGVKLDKQKNEETIRGKEGI ISTPDSRVKVLVVPTNEELMIARDTKEIVEKIGR
4	丙酮酸氧化酶(PO)=来自嗜热链球菌(Streptococcus thermophilus)的野生型丙酮酸氧化酶 MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMTVGKTKVSTASLKVLAGWGIDTIYGIPSGTLA PLMEALGEQEETDIKFLQVKHEEVGAMAAVMQWKFGGKLGVCVGSGGPGAS HLINGLYDAAMDNTPVLAILGSPPQRELNMDAFQELNQNPMYDHIAVYNRRVA YAEQLPKLIDDAIRTAISKRGVAVLEVPGDFGYKEIANDAFYSSGHSYRDYVSS AINEVDIDAAVEVLNKSKRAVIYAGIGTMGHGPAVQELSRKIKAPIITTAKNFET FDYDFEGLTGSTYRVGWKPANEAVKEADTVLFVGSNFPFAEVEGTFSNVENFIQ IDNNPTMLGKRHNADVAILGDAGEAVQMLLEKVAPVEESAWWNANLKNIQN WRDYMTKLETKENGPLQLYQVYNAINKYADEDAIYSIDVGNTTQTSIRHLHMT PKNMWRTSPLFASMGIALPGGIGAKNVYPERQVFNLMGDGAFSMNYQDIVTN VRYNMPVINVVFTNTEYGFIKNKYEDTNTNTFGTEFTDVDYAMIGEAQGAVGF TVSRIEDMDQVMAAAVKANKEGKTVVIDAKITKDRPIPVETLKLDPALYSEEEI KAYKERYEAEELVPFSEFLKAEGLESKVAK
5	脱氧核糖磷酸醛缩酶(DERA)=来自哈里法克斯希瓦氏菌(Shewanella halifaxensis)的野生型脱氧核糖磷酸醛缩酶 MSDLKKAAQQAISLMDLTTLNDDDTDQKVIELCHKAKTPAGDTAAICIYPRFIPI ARKTLNEIGGDDIKIATVTNFPHGNDDIAIAVLETRAAVAYGADEVDVVFPYRA LMEGNETVGFELVKACKEACGEDTILKVIIESGVLADPALIRKASELSIDAGADFI KTSTGKVAVNATLEAAEIMMTVISEKNPKVGFKPAGGVKDAAAAAEFLGVAA RLLGDDWATPATFRFGASSLLTNLLHTLELADAPQGAQGY

[0261]

SEQ ID NO:	酶和氨基酸序列
6	脱氧核糖磷酸醛缩酶(DERA)=来自哈里法克斯希瓦氏菌的脱氧核糖磷酸醛缩酶(DERA)的变体 MCDLKKAAQRAISLMDLTTLNDDDTDQKVIELCHKAKTPAGDTAAIVIYPRFIPI ARKTLNEIGGLDIKIVTVTNFPHGNDDIAIAVLETRAAVAYGADEVDVVFPYRA LMEGNETVGFELVKACKEACGEDTILKVIIESGVLKDPALIRKASEISIDAGADFI KTSTGKVAVNATLEAAEIIMTVISEKNPKVGFKPAGGIKDAAAAAEFLGVAARL LGDDWATPATFRFGATDLLTNLLHTLELADAPQGAQGY
7	蔗糖磷酸化酶(SP)=来自Alloscardovia omnicolens的野生型蔗糖磷酸化酶 MKNKVQLITYADRLGDGTLKSMTETLRKHFEGVYEGVHILPFFTPFDGADAGF DPVDHTKVDPRLGSWDDVAELSTTHDIMVDTIVNHMSWESEQFQDVMAKGED SEYYPMFLTMSSIFPDGVTEEDLTAIYRPRPGLPFTHYNWGGKTRLVWTTFTPQ QVDIDTDSEMGWNYLLSILDQLSQSHVSQIRLDAVGYGAKEKNSSCFMTPKTF KLIERIKAEGEKRGLETLIEVHSYYKKQVEIASKVDRVYDFAIPGLLLHALEFGK TDALAQWIDVRPNNAVNVLDTHDGIGVIDIGSDQMDRSLAGLVPDEEVDALVE SIHRNSKGESQEATGAAASNLDLYQVNCTYYAALGSDDQKYIAARAVQFFMPG VPQVYYVGALAGSNDMDLLKRTNVGRDINRHYYSAAEVASEVERPVVQALNA LGRFRNTLSAFDGEFSYSNADGVLTMTWADDATRATLTFAPKANSNGASVARL EWTDAAGEHATDDLIANPPVVA
8	磷酸戊糖变位酶(PPM)=来自大肠杆菌的磷酸戊糖变位酶的变体 MKRAFIMVLDSFGIGATEDAERFGDVGADTLGHIAEACAKGEADNGRKGPLNL PNLTRLGLAKAHEGSTGFIPAGMDGNAEVIGAYAWAHEMSSGKDSVSGHWEI AGVPVLFEWGYFSDHENSFPQELLDKLVERANLPGYLGNCRSSGTVILDQLGEE HMKTGKPIFYTSAASVFQIACHEETFGLDKLYELCEIAREELTNGGYNIGRVIAR PFIGDKAGNFQRTGNRRDLAVEPPAPTVLQKLVDEKHGQVVSVGKIADIYANC GITKKVKATGLDALFDATIKEMKEAGDNTIVFTNFVDFDSSWGHRRDVAGYAA GLELFDRRLPELMSLLRDDDILILTADHGCDPTWTGTDHTREHIPVLVYGPKVK PGSLGHRETFADIGQTLAKYFGTSDMEYGKAMF

[0262]

SEQ ID NO:	酶和氨基酸序列
9	嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)=来自大肠杆菌的嘌呤核苷磷酸化酶的变体 MATPHINAEMGDFADVVLMPGDPLRAKYIAETFLEDAREVNNVRGMLGFTGT YKGRKISVMGHGAGIPSCSIYTKELITDFGVKKIIRVGSCGAVLPHVKLRDVVIG MGACTDSKVNRIRFKDHDFAAIADFDMVRNAVDAAKALGIDARVGNLFSADL FYSPDGEMFDVMEKYGILGVEMEAAGIYGVAAEFGAKALTICTVSDHIRTHEQ TTAAERQTTFNDMIKIALESVLLGDKE
10	半乳糖氧化酶(G0ase)=来自禾谷镰刀菌(以前称为树状指孢霉)的半乳糖氧化酶的变体 MASAPIGVAIPRNNWAVTCDSAQSGNECNKAIDGNKDTFWHTQYGVNGDPKP PHTITIDMKTVQNVNGLSVLPRQDGNQNGWIGRHEVYLSSDGVNWGSPVASGS WFADSTTKYSNFETRPARYVRLVAITEANGQPWTSIAEINVFQASSYTAPQPGL GRWGPTIDLPIVPSAAAIEPTSGRVLMWSSYRQDAFEGSPGGITLTSSWDPSTGI VSDRTSTVTKHDMFCPGISMDGNGQIVVSGGNDAKKTSLYDSSSDSWIPGPDM QVARGYQSSATMSDGRVFTIGGSFSGGQVEKNGEVYSPSSKTWTSLPNAKVNP MLTADKQGLYRSDNHAWLFGWKKGSVFQAGPSTAMNWYYTSGSGDVKSAG KRQSNRGVAPDAMCGNAVMYDAVKGKILTFGGSPDYEDSDATTNAHIITLGEP GTSPNTVFASNGLYFARTFHTSVVLPDGSTFITGGQQRGIPTEDSTPVFTPEIYVP EQDTFYKQNPNSIVRAYHSISLLLPDGRVFNGGGGLCGDCTTNHFDAQIFTPNY LYDSNGNLATRPKITRTSTQSVVVGGWITIWTDMSISAASLIRYGTATHTVNTD QRRIPLTLTNNGGNSYSFQVPSDSGVALPGYWMLFVMNSAGVPSVASTIRVTQ GQTGHHHHHH

[0263]

SEQ ID NO:	酶和氨基酸序列
11	半乳糖氧化酶(GOase)=来自禾谷镰刀菌(以前称为树状指孢霉)的半乳糖氧化酶的变体 MASAPIGVAIPRNNWAVTCDSAQSGNECNKAIDGNKDTFWHTQYGVNGDPKP PHTITIDMKTVQNVNGLSVLPRQDGNQNGWIGRHEVYLSSDGVNWGSPVASGS WFADSTTKYSNFETRPARYVRLVAITEANGQPWTSIAEINVFQASSYTAPQPGL GRWGPTIDLPIVPSAAAIEPTSGRVLMWSSYRQDAFEGSPGGITLTSSWDPSTGI VSDRTSTVTGHDMFCPGISMDGNGQIVVSGGNDAKKTSLYDSSSDSWIPGPDM QVARGYNSSATMSDGRVFTIGGSFSGGQVEKNGEVYSPSSKTWTSLPNAKVNP MLTADKQGLYRSDNHAWLFGWKKGSVFQAGPSTAMNWYYTSGSGDVKSAG KRQSNRGVAPDAMCGNAVMYDAVKGKILTFGGSPDYQDSDATTNAHIITLGEP GTSPNTVFASNGLLFARTFHTSVVLPDGSTFITGGQQRGIPTEDSTPVFTPEIYVP EQDTFYKQNPNSIVRAYHSISLLLPDGRVFNGGGGLCGDCETNHFDAQIFTPNY LYDSNGNLATRPKITRTSTQSVVVGGWITIWTDMSISAASLIRYGTATHTVNTD QRRIPLTLTNNGGNSYSFQVPSDSGVALPGYWMLFVMNSAGVPSVASTINVTQ GQTGHHHHHH
12	泛酸激酶(PanK)=来自大肠杆菌的泛酸激酶的变体 MSIKEQTLMTPYLQLDRNQWAALRDSNPMTLSEDEIARLKGINEDLSLEEVAEV YLPLSRLLNFYISSNLRRQAVLEQFLGTNGQRIPYIISIAGSVAVGKSTTARVLQA LLSRWPEHRRVELITTDGFLHPNQVLKERGLMKKKGFPESYDMHRLMKFVKDL KSGVPNVTAPVYSHLIYDVIPDGDKTVVQPDILILEGLNVLQSGMDYPHDPHHV FVSDFVDFSIYVDAPEDLLQTWYINRFLKFREGAFTDPDSYFHGYAKLTKEEAIK TAMTIWKEMNHLNLKQNILPTRERASLILTKSANHIVEEVRLRK
13	泛酸激酶(PanK)=来自大肠杆菌的泛酸激酶的变体 MHHHHHHGGMSIKEQTLMTPYLQLDRNQWAALRDSNPMTLSEDEIARLKGIN EDLSLEEVAEVYLPLSRLLNFYISSNLRRQAVLEQFLGTNGQRIPYIISIAGSVAV GKSTTARVLQALLSRWPEHRRVEHITTDGFLHPNQVLKERGLMGKKGFPESYD MHRLMKFVKDLKSGVPNVTAPVYSHLIYDVIPDGDKTVVQPDILILEGLNVLQS GMDYPHDPHHVFVSDFVDFSIYVDAPEDLLQTWYINRFLKFREGAFTDPDSYFH GYAKLTKEEAIKTAMTIWKEMNHLNLKQNILPTRERASLILTKSANHIVEEVRL RK

SEQ ID NO:	酶和氨基酸序列
14	脱氧核糖磷酸醛缩酶(DERA)=来自哈里法克斯希瓦氏菌的脱氧核糖磷酸醛缩酶(DERA)的变体 MHHHHHHCDLKKAAQRAISLMDLTTLNDDDTDQKVIELCHKAKTPAGDTAAI VIYPRFIPIARKTLNEIGGLDIKIVTVTNFPHGNDDIAIAVLETRAAVAYGADEVD VVFPYRALMEGNETVGFELVKACKEACGEDTILKVIIESGVLKDPALIRKASEISI DAGADFIKTSTGKVAVNATLEAAEIIMTVISEKNPKVGFKPAGGIKDAAAAAEF LGVAARLLGDDWATPATFRFGATDLLTNLLHTLELADAPQGAQGY
15	嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)=来自大肠杆菌的嘌呤核苷磷酸化酶的变体 MATPHINAEMGDFADVVLMPGDPLRAKYIAETFLEDAREVNNVRGMLGFTGT YKGRKISVMGHGMGIPSCSIYTKELITDFGVKKIIRVGSCGAVLPHVKLRDVVIG MGACTDSKVNRIRFKDHDFAAIADFDMVRNAVDAAKALGIDARVGNLFSADL FYSPDGEMFDVMEKYGILGVEMEAAGIYGVAAEFGAKALTICTVSDHIRTHEQ TTAAERQTTFNDMIKIALESVLLGDKE
16	半乳糖氧化酶(GOase)=来自禾谷镰刀菌(以前称为树状指孢霉)的半乳糖氧化酶的变体 MASAPIGVAIPRNNWAVTCDSAQSGNECNKAIDGNKDTFWHTQYGVNGDPKP PHTITIDMKTVQNVNGLSVLPRQDGNQNGWIGRHEVYLSSDGVNWGSPVASGS WFADSTTKYSNFETRPARYVRLVAITEANGQPWTSIAEINVFQASSYTAPQPGL GRWGPTIDLPIVPSAAAIEPTSGRVLMWSSYRQDAFEPSPGGITLTSSWDPSTGIV SDRTSTVTGHDMFCPGISMDGNGQIVVSGGNDAKKTSLYDSSSDSWIPGPDMQ VARGYNSSATMSDGRVFTIGGSYSGGQVEKNGEVYSPSSKTWTSLPNAKVNPM LTADKQGLYRSDNHAWLFGWKKGSVFQAGPSTAMNWYYTSGSGDVKSAGKR QSDRGVAPDAMCGNAVMYDAVKGKILTFGGSPDYQDSDATTNAHIITLGEPGT SPNTVFASNGLLFARTFHTSVVLPDGSVFITGGQQRGVPLEDSTPVFTPEIYVPEQ DTFYKQNPNSIVRAYHSISLLLPDGRVFNGGGGLCGDCETNHFDAQIFTPNYLY DSNGNLATRPKITRTSTQSVVVGGWITIWTDMSISAASLIRYGTATHTVNTDQR RIGLTLTNNGGNSYSFQVPSDSGVALPGYWMLFVMNSAGVPSVASTINVTQGQ TGHHHHHH
17	半乳糖氧化酶(GOase)=来自禾谷镰刀菌(以前称为树状指孢霉)的半乳糖氧化酶的变体

[0264]

[0265]

SEQ ID NO:	酶和氨基酸序列
	MASAPIGVAIPRNNWAVTCDSAQSGNECIKAIDGNKDTFWHTQYGVNGDPKPP HTITIDMKTVQNVNGLSVLPRQDGNQNGWIGRHEVYLSSDGVNWGSPVASGS WFADSTTKYSNFETRPARYVRLVAITEANGQPWTSIAEINVFQASSYTAPQPGL GRWGPTIDLPIVPSAAAIEPTSGRVLMWSSYRQDAFEDSPGGITLTSSWDPSTGI VSDRTSTVTGHDMFCPGISMDGNGQIVVSGGNDAKKTSLYDSSSDSWIPGPDM QVARGYNSSATMSDGRVFTIGGSYSGGQVEKNGEVYSPSSKTWTSLPNAKVNP MLTADKQGLYRSDNHAWLFGWKKGSVFQAGPSTAMNWYYTSGSGDVKSAG KRQSDRGVAPDAMCGNAVMYDAVKGKILTFGGSPDYQDSDATTNAHIITLGEP GTSPNTVFASNGLLFARTFHTSVVLPDGSVFITGGQQRGVPLEDSTPVFTPEIYVP EQDTFYKQNPNSIVRAYHSISLLLPDGRVFNGGGGLCGDCETNHFDAQIFTPNY LYDSNGNLATRPKITRTSTQSVVVGGWITIWTDMSISAASLIRYGTATHTVNTD QRRIGLTLTNNGGNSYSFQVPSDSGVALPGYWMLFVMNSAGVPSVASTINVTQ GQTGHHHHHH
18	半乳糖氧化酶(G0ase)=来自禾谷镰刀菌(以前称为树状指孢霉)的半乳糖氧化酶的变体 MASAPIGVAIPRNNWAVTCDSAQSGNECIKAIDGNKDTFWHTQYGVNGDPKPP HTITIDMKTVQNVNGLSVLPRQDGNQNGWIGRHEVYLSSDGVNWGSPVASGS WFADSTTKYSNFETRPARYVRLVAITEANGQPWTSIAEINVFQASSYTAPQPGL GRWGPTIDLPIVPSAAAIEPTSGRVLMWSSYRQDAFEDSPGGITLTSSWDPSTGI VSDRTSTVTGHDMFCPGISMDGNGQIVVSGGNDAKKTSLYDSSSDSWIPGPDM QVARGYNSSATMSDGRVFTIGGSYSGGQVEKNGEVYSPSSKTWTSLPNAKVNP MLTADKRGLYRSDNHAWLFGWKKGSVFQAGPSTAMNWYYTSGSGDVKSAG KRQSDRGVAPDAMCGNAVMYDAVKGKILTFGGSPDYQDSDATTNAHIITLGEP GTSPNTVFASNGLLFARTFHTSVVLPDGSVFITGGQQRGVPLEDSTPVFTPEIYVP EQDTFYKQNPNSIVRAYHSISLLLPDGRVFNGGGGLCGDCETNHFDAQIFTPNY LYDSNGNLATRPKITRTSTQSVVVGGWITIWTDMSISAASLIRYGTATHTVNTD QRRIGLTLTNNGGNSYSFQVPSDSGVALPGYWMLFVMNSAGVPSVASTINVTQ GQTGHHHHHH
19	半乳糖氧化酶(G0ase)=来自禾谷镰刀菌(以前称为树状指孢霉)的半乳糖氧化酶的变体

[0266]

SEQ ID NO:	酶和氨基酸序列
	MASAPIGVAIPRNNWAVTCDSAQSGNECIKAIDGNKDTFWHTQYGVNGDPKPP HTITIDMKTVQNVNGLSVLPRQDGNQNGWIGRHEVYLSSDGVNWGSPVASGS WFADSTTKYSNFETRPARYVRLVAITEANGQPWTSIAEINVFQASSYTAPQPGL GRWGPTIDLPIVPSAAAIEPTSGRVLMWSSYRQDAFRDSPGGITLTSSWDPSTGI VSDRTSTVTGHDMFCPGISMDGNGQIVVSGGNDAKKTSLYDSSSDSWIPGPDM QVARGYNSSATMSDGRVFTIGGSYSGGQVEKNGEVYSPSSKTWTSLPNAKVNP MLTADKQGLYRSDNHAWLFGWKKGSVFQAGPSTAMNWYYTSGSGDVKSAG KRQSDRGVAPDAMCGNAVMYDAVKGKILTFGGSPDYQDSDATTNAHIITLGEP GTSPNTVFASNGLLFARTFHTSVVLPDGSVFITGGQQRGVPLEDSTPVFTPEIYVP EQDTFYKQNPNSIVRAYHSISLLLPDGRVFNGGGGLCGDCETNHFDAQIFTPNY LYDSNGNLATRPKITRTSTQSVVVGGWITIWTDMSISAASLIRYGTATHTVNTD QRRIGLTLTNNGGNSYSFQVPSDSGVALPGYWMLFVMNSAGVPSVASTINVTQ GQTGHHHHHH
20	泛酸激酶(PanK)=来自大肠杆菌的泛酸激酶的变体 MHHHHHHGGSGSIKEQTLMTPYLQLDRNQWAALRDSNPMTLSEDEIARLKGIN EDLSLEEVAEVYLPLSRLLNFYISSNLRRQAQLEQFLGTNGQRIPYIISIAGSVAV GKSTFARVLQALLSRWPEHRRVEHITTDGFLHPNQVLKERGLMGKKGFPESYD MHRLMKFVKDLKSGVPNVTAPVYSHLIYDVIPDGDKTVVQPDILILEGLNVLQS GMDYPHDPHHVFVSDFVDFSIYVDAPEDLLQTWYINRFLKFREGAFTDPDSYFH GYAKLTKEEAIKTAMTIWKEMNHVNLKQNILPTRERASLILTKSANHIVEEVRL RK
21	乙酸激酶(AcK)=来自海栖热袍菌的乙酸激酶的变体 MGSHHHHHHGSRVLNINSGSSSIKYQLIEMEGEKVLCKGIAERIGIEGSRLVHRV GDEKHVIERELPDHEEALKLILNTLVDEKLGVIKDLKEIDAVGHRVVHGGERFK ESVLVDEEVLKAIEEVSPLAPLHNPANLMGIKAAMKLLPGVPNVQVFDTAFHQ TIPQKAYLYAIPYEYYEKYKIRRYGFHGISHRYVSKRAAEILGKKLEELKIITCHI GNGASVAAVKYGKCVDTSMGFTPLEGLVMGTRSGDLDPAIPFFIMEKEGISPQE MYDILNKKSGVYGLSKGFSSDMRDNLEAALKGDEWCKLVLEIYDYRIAKYIGA YAAAMNGVDAIVFTAGVGENSPITREDVCKYLEFLGVKLDKQKNEETIRGKEGI ISTPDSRVKVLVVPTNEELMIARDTKEIVEKIGR

[0267] 辣根过氧化物酶:来自I型辣根的野生型过氧化物酶,可商购自SIGMA(P8125),从辣根(Amoracia rusticana)分离。

[0268] 过氧化氢酶:(1)来自牛肝的野生型过氧化氢酶,可商购自SIGMA(C1345);或(2)CAT-101,Biocatalytics;或(3)来自谷氨酸棒杆菌(Roche,#11650645103)。

[0269] 本发明的其他实施方案包括但不限于以下酶在本文所述的合成过程步骤中用于产生4'-乙炔基2'-脱氧核苷或其类似物例如EFdA的用途。

[0270] A.嘌呤核苷磷酸化酶。

[0271] 1A.工程化的嘌呤核苷磷酸化酶,其包含与SEQ ID NO.:9或SEQ ID NO.:15具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的多肽序列或其功能片段,其中与SEQ ID NO:9或SEQ ID NO.:15相比,所述工程化的嘌呤核苷磷酸化酶的多肽序列包含至少一个氨基酸取代或氨基酸取代组。

[0272] 2A.1A的工程化的嘌呤核苷磷酸化酶,其中所述工程化的嘌呤核苷磷酸化酶包含与SEQ ID NO:9或SEQ ID NO.:15具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性的多肽序列。

[0273] 3A.工程化的嘌呤核苷磷酸化酶,其包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO.:15中所示的多肽序列。

[0274] A4.1A至3A中任一项的工程化的嘌呤核苷磷酸化酶,其与野生型大肠杆菌嘌呤核苷磷酸化酶相比包含至少一种改善的性质。

[0275] 5A.4A的工程化的嘌呤核苷磷酸化酶,其中与野生型大肠杆菌嘌呤核苷磷酸化酶相比,所述改善的性质包含对底物化合物6.5(以其环形式或作为开链醛或水合物,或前述任何一种的盐)的活性改善。

[0276] 6A.4A的工程化的嘌呤核苷磷酸化酶,其中与野生型大肠杆菌嘌呤核苷磷酸化酶相比,所述改善的性质包含EFdA(化合物7)的产生改善。

[0277] 7A.A1至6A中任一项的工程化的嘌呤核苷磷酸化酶,其中所述工程化的嘌呤核苷磷酸化酶是纯化的。

[0278] 8A.1A至7A中任一项的工程化的嘌呤核苷磷酸化酶,其中所述至少一个氨基酸取代(即,一个或多个氨基酸取代)是保守氨基酸取代。

[0279] B.磷酸戊糖变位酶。

[0280] 1B.工程化的磷酸戊糖变位酶,其包含与SEQ ID NO:8具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的多肽序列或其功能片段,其中与SEQ ID NO:8相比,所述工程化的磷酸戊糖变位酶的多肽序列包含至少一个氨基酸取代或氨基酸取代组。

[0281] 2B.1B的工程化的磷酸戊糖变位酶,其中所述工程化的磷酸戊糖变位酶包含与SEQ ID NO.:8具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性的多肽序列。

[0282] 3B.工程化的磷酸戊糖变位酶,其包含SEQ ID NO.:8中所示的多肽序列。

[0283] 4B.1B至3B中任一项的工程化的磷酸戊糖变位酶,其与野生型大肠杆菌磷酸戊糖变位酶相比包含至少一种改善的性质。

[0284] 5B.4B的工程化的磷酸戊糖变位酶,其中与野生型大肠杆菌磷酸戊糖变位酶相比,所述改善的性质包含对底物化合物6(以其环形式或作为开链醛或水合物,或前述任何一种的盐)的活性改善。

[0285] 6B.4B的工程化的磷酸戊糖变位酶,其中与野生型大肠杆菌磷酸戊糖变位酶相比,所述改善的性质包含化合物6.5或化合物7(EFdA)的产生改善。

[0286] 7B.1B至6B中任一项的工程化的磷酸戊糖变位酶,其中所述工程化的磷酸戊糖变位酶是纯化的。

[0287] 8B.1B至7B中任一项的工程化的磷酸戊糖变位酶,其中所述至少一个氨基酸取代(即,一个或多个氨基酸取代)是保守氨基酸取代。

[0288] C.脱氧核糖磷酸醛缩酶。

[0289] 1C.脱氧核糖磷酸醛缩酶,其包含来自哈里法克斯希瓦氏菌的SEQ ID NO:5中所示的野生型多肽序列。

[0290] 2C.工程化的脱氧核糖磷酸醛缩酶,其包含SEQ ID NO.:6或SEQ ID NO.:14中所示的多肽序列。

[0291] 3C.工程化的脱氧核糖磷酸醛缩酶,其中所述工程化的脱氧核糖磷酸醛缩酶包含与SEQ ID NO.:5、SEQ ID NO.:6或SEQ ID NO.:14具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性的多肽序列。

[0292] 4C.工程化的脱氧核糖磷酸醛缩酶,其包含与SEQ ID NO.:5、SEQ ID NO.:6或SEQ ID NO.:14具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的多肽序列或其功能片段,其中与SEQ ID NO.:5、SEQ ID NO.:6或SEQ ID NO.:14相比,所述工程化的脱氧核糖磷酸醛缩酶的多肽序列包含至少一个氨基酸取代或氨基酸取代组。

[0293] 5C.1C至4C中任一项的脱氧核糖磷酸醛缩酶,其对底物化合物5((R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸,其水合物或前述任何一种的盐)具有活性。

[0294] 6C.1C至5C中任一项的脱氧核糖磷酸醛缩酶,其包含在反应过程中在不需要底物化合物5((R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸,其水合物或前述任何一种的盐)上的保护基的情况下产生化合物6(4-乙炔基-D-2-脱氧核糖5-磷酸,或其开链醛或水合物形式,或前述任何一种的盐)的能力。

[0295] 7C.2C至6C中任一项的工程化的脱氧核糖磷酸醛缩酶,其中与野生型哈里法克斯希瓦氏菌脱氧核糖磷酸醛缩酶相比,所述脱氧核糖磷酸醛缩酶具有改善的性质,所述改善的性质包含化合物6(4-乙炔基-D-2-脱氧核糖5-磷酸,或其开链醛或水合物形式,或前述任何一种的盐)的产生改善。

[0296] 8C.1C至7C中任一项的脱氧核糖磷酸醛缩酶,其中所述脱氧核糖磷酸醛缩酶是纯化的。

[0297] 9C.2C至7C中任一项的工程化的脱氧核糖磷酸醛缩酶,其中所述至少一个氨基酸取代(即,一个或多个氨基酸取代)是保守氨基酸取代。

[0298] D.泛酸激酶。

[0299] 1D.工程化的泛酸激酶,其包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO.:12、SEQ ID NO.:13或SEQ ID NO.:20具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的多肽序列或其功能片段,其中与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO.:12、SEQ ID NO.:13或SEQ ID NO.:20相比,所述工程化的泛酸激酶的多肽序列包含至少一个氨基酸取代或氨基酸取代组。

[0300] 2D.1D的工程化的泛酸激酶,其中所述工程化的泛酸激酶包含与SEQ ID NO.:2、SEQ ID NO.:12、SEQ ID NO.:13或SEQ ID NO.:20具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性的多肽序列。

[0301] 3D.工程化的泛酸激酶,其包含SEQ ID NO.:2、SEQ ID NO.:12、SEQ ID NO.:13或

SEQ ID NO.:20中所示的多肽序列。

[0302] 4D.1D至3D中任一项的工程化的泛酸激酶,其与野生型大肠杆菌泛酸激酶相比包含至少一种改善的性质。

[0303] 5D.4D的工程化的泛酸激酶,其中与野生型大肠杆菌泛酸激酶相比,所述改善的性质包含对底物化合物4((R)-2-乙炔基-甘油醛或其水合物形式)的活性改善。

[0304] 6D.5D的工程化的泛酸激酶,其中与野生型泛酸激酶相比,所述改善的性质包含化合物5((R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸)的产生改善。

[0305] 7D.4D的工程化的泛酸激酶,其中与野生型大肠杆菌泛酸激酶相比,所述改善的性质包含对底物化合物3(2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇)的活性改善。

[0306] 8D.7D的工程化的泛酸激酶,其中与野生型泛酸激酶相比,所述改善的性质包含化合物9((S)-2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇1-磷酸)的产生改善。

[0307] 9D.1D至8D中任一项的工程化的泛酸激酶,其中所述泛酸激酶是纯化的。

[0308] 10D.1D至9D中任一项的工程化的泛酸激酶,其中所述至少一个氨基酸取代(即,一个或多个氨基酸取代)是保守氨基酸取代。

[0309] E.半乳糖氧化酶。

[0310] 1E.工程化的半乳糖氧化酶,其包含与SEQ ID NOs:1、10、11、16、17、18或19具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的多肽序列或其功能片段,其中与SEQ ID NOs.:1、10、11、16、17、18或19相比,所述工程化的半乳糖氧化酶的多肽序列包含至少一个氨基酸取代或氨基酸取代组。

[0311] 2E.1E的工程化的半乳糖氧化酶,其中所述工程化的半乳糖氧化酶包含与SEQ ID NO.:1、10、11、16、17、18或19具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性的多肽序列。

[0312] 3E.工程化的半乳糖氧化酶,其包含SEQ ID NO:1、10、11、16、17、18或19中所示的多肽序列。

[0313] 4E.1E至3E中任一项的工程化的半乳糖氧化酶,其与野生型禾谷镰刀菌半乳糖氧化酶相比包含至少一种改善的性质。

[0314] 5E.4E的工程化的半乳糖氧化酶,其中与野生型禾谷镰刀菌半乳糖氧化酶相比,所述改善的性质包含对作为伯醇的底物的活性改善。

[0315] 6E.4E的工程化的半乳糖氧化酶,其中与野生型禾谷镰刀菌半乳糖氧化酶相比,所述改善的性质包含对底物化合物3(2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇)的活性改善。

[0316] 7E.6E的工程化的半乳糖氧化酶,其中与野生型禾谷镰刀菌半乳糖氧化酶相比,所述改善的性质包含化合物4((R)-2-乙炔基-甘油醛或其水合物形式)的产生改善。

[0317] 8E.4E的工程化的半乳糖氧化酶,其中与野生型禾谷镰刀菌半乳糖氧化酶相比,所述改善的性质包含对底物化合物9((S)-2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇1-磷酸)的活性改善。

[0318] 9E.8E的工程化的半乳糖氧化酶,其中与野生型禾谷镰刀菌半乳糖氧化酶相比,所述改善的性质包含化合物5((R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸或其水合物形式)的产生改善。

[0319] 10E.1E至9E中任一项的工程化的半乳糖氧化酶,其中所述半乳糖氧化酶是纯化的。

[0320] 11E.1E至10E中任一项的工程化的半乳糖氧化酶,其中所述至少一个氨基酸取代

(即,一个或多个氨基酸取代)是保守氨基酸取代。

[0321] F.乙酸激酶。

[0322] 1F.乙酸激酶,其包含来自海栖热袍菌的SEQ ID NO.:3或SEQ ID NO.:21中所示的野生型多肽序列。

[0323] 2F.工程化的乙酸激酶,其中所述工程化的乙酸激酶包含与SEQ ID NO.:3或SEQ ID NO.:21具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同一性的多肽序列。

[0324] 3F.工程化的乙酸激酶,其包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:21具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的多肽序列或其功能片段,其中与SEQ ID NO.:3或SEQ ID NO:21相比,所述工程化的乙酸激酶的多肽序列包含至少一个氨基酸取代或氨基酸取代组。

[0325] 4F.2F或3F的乙酸激酶,其与野生型海栖热袍菌乙酸激酶相比包含至少一种改善的性质。

[0326] 5F.4F的乙酸激酶,其中与野生型海栖热袍菌乙酸激酶相比,所述改善的性质包含在对底物化合物4((R)-2-乙炔基-甘油醛或其水合物形式)的磷酸化反应中ATP-辅因子再循环的活性改善。

[0327] 6F.5F的乙酸激酶,其中与野生型海栖热袍菌乙酸激酶相比,所述改善的性质包含化合物5((R)-2-乙炔基-甘油醛3-磷酸或其水合物形式或前述任何一种的盐)的产生改善。

[0328] 7F.4F的乙酸激酶,其中与野生型海栖热袍菌乙酸激酶相比,所述改善的性质包含在对底物化合物3(2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇)的磷酸化反应中ATP-辅因子再循环的活性改善。

[0329] 8F.7F的乙酸激酶,其中与野生型海栖热袍菌乙酸激酶相比,所述改善的性质包含化合物9((S)-2-乙炔基-丙烷-1,2,3-三醇1-磷酸或前述任何一种的盐)的产生改善。

[0330] 9F.1F至8F中任一项的乙酸激酶,其中所述乙酸激酶是纯化的。

[0331] 10F.2F至7F中任一项的工程化的乙酸激酶,其中至少一个氨基酸取代(即,一个或多个氨基酸取代)是保守氨基酸取代。