

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 9/00

[12] 发明专利申请公开说明书

C07B 61/00 C07H 19/06

C07H 19/16 C12Q 1/48

A61K 38/14

[21] 申请号 99809486.2

[43] 公开日 2001 年 9 月 26 日

[11] 公开号 CN 1314913A

[22] 申请日 1999.6.10 [21] 申请号 99809486.2

[30] 优先权

[32] 1998.6.10 [33] US [31] 60/088,828

[32] 1999.2.17 [33] US [31] 60/120,562

[86] 国际申请 PCT/CA99/00550 1999.6.10

[87] 国际公布 WO99/64378 英 1999.12.16

[85] 进入国家阶段日期 2001.2.8

[71] 申请人 格里科设计公司

地址 加拿大安大略省

[72] 发明人 J·卡弗 J·登尼斯

F·D·特罗佩尔 U·萨哈

L·兹瑟尔 A·达蒂

R·多诺范

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 王景朝 杨丽琴

权利要求书 5 页 说明书 42 页 附图页数 12 页

[54] 发明名称 有针对性的组合化合物库及其进行筛选
所用的高效测定方法

[57] 摘要

一种组合库,含有预先确定收集来的用于抑制碳水化合物加工酶 将糖从所选择的糖核苷酸供体转移到所选择的受体的核苷肽分子。该 核苷肽分子包含(a)核苷单体;(b)偶合到核苷单体上包含一个或多个 氨基酸的间隔单体,其中的间隔单体包含一个或多个酰胺连接的氨基 酸残基,或拟肽;和(c)连接到间隔单体上的封端单体。在核苷单体、间隔单体或封端单体中至少有一个要素有同一性的情况下,所述核苷 肽分子彼此不同。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



权 利 要 求 书

1、一种组合库，含有预先确定收集来的用于抑制碳水化合物加工酶所进行的将糖从所选择的糖核苷酸供体转移到所选择的受体的核苷肽分子，其中核苷肽分子包含(a)核苷单体；(b)偶合到该核苷单体上、包含一个或多个酰胺连接的氨基酸残基，或其类似物的间隔单体；和(c)连接到间隔单体上的封端单体；其中在核苷单体、间隔单体或封端单体中至少有一个要素有同一性的情况下所述核苷肽分子彼此不同。

2、权利要求1的组合库，其中碳水化合物加工酶是涉及糖蛋白、糖脂、糖基磷脂酰肌醇生物合成的糖基转移酶。

3、权利要求2的组合库，其中碳水化合物加工酶是N-乙酰氨基葡萄糖转移酶I、II、III、IV或V或 β -1,3-半乳糖基-0-糖基-糖蛋白 β 1,6-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(核2 GlcNAc)。

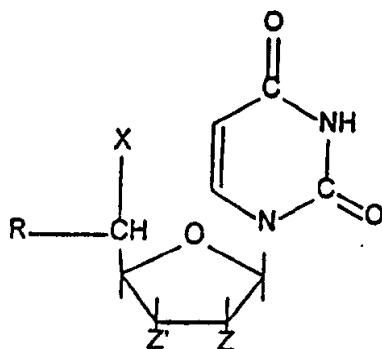
4、权利要求1、2或3的组合库，其中核苷单体是尿苷、2'-脱氧尿苷或5'-氨基-5'-脱氧-2',3'-O-亚异丙基尿苷。

5、上述权利要求的任一组合库，其中封端单体是甲基(Me)、甲酰基(CHO)、乙基(Et)、乙酰基(Ac)、叔丁基(t-bu)、茴香基、三氟乙酰基(Tfa)、苯甲酰基(Bz)、4-甲基苄基(Meb)、硫代茴香基、硫代羟甲苯基、苄氧基甲基、4-硝基苄基(Pnp)、苄氧基羰基(Z)、2-硝基苯甲酰基(NBz)、2-硝基苄基硫苯基(Nps)、4-甲苯磺酰基(Tos)、五氟苄基(Pfp)、二苄基甲基(Dpm)、2-氯苄氧基羰基(Cl-Z)、2,4,5-三氯苄基、2-溴苄氧基羰基(Br-Z)、三苄基甲基(Trt)、2,2,5,7,8-五甲基-苯并二氢吡喃-6-磺酰基(Pmc)、叔丁氧羰基(Boc)、苄基(Bzl)、苄氧基甲基(Bom)和9-芴基甲氧羰基(Fmoc)。

6、上述权利要求的任一组合库，其中间隔单体是单一酰胺连接的氨基酸、酰胺连接的二肽或酰胺连接的三肽或其相似物。

7、一种核苷肽分子，包含核苷单体；与核苷单体偶合的间隔单体，其中间隔单体包含一个或多个酰胺连接的氨基酸残基或其相似物；而封端单体与间隔单体相连。

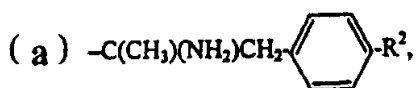
8、下式I的核苷肽分子：



其中 X 是 H、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 、 $(\text{CH}_2)_q\text{SO}_3\text{H}$ ，其中 q 是 0 或 1，并且 R 代表 $(\text{Y})_m$ ，其中 Y 是连接到氨基酸残基上的酰胺，并且 m 是 1-3，Z' 和 Z 相同或不相同，代表羟基或烷氧基，或者 Z' 和 Z 一起形成丙酮化合物基团，并且式 I 化合物中游离的 NH_2 基用封端单体封端。

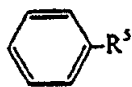
9、权利要求 8 的式 I 核苷酸分子，其中 X 是 H、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 或 $(\text{CH}_2)_q\text{SO}_3\text{H}$ ，其中 q 是 0 或 1，Z' 和 Z 都是羟基或者一起形成丙酮化合物基团，R 代表 $-\text{NHCOR}^1$ ，其中 R^1 代表

10



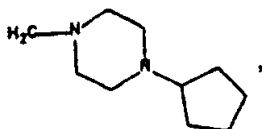
其中 R^2 是烷氧基；或

(b) $-\text{CHR}^3\text{R}^4$ ，其中 R^3 是氢或 $-\text{NH}_2$ 并且 R^4 是

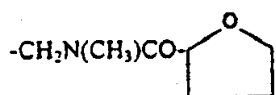


15

其中 R^5 是卤素、烷基或烷氧基，

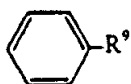


$-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}^6$ 或 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}^6$ ，其中 R^6 是卤素，

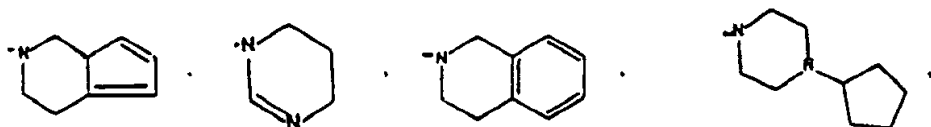


$-\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ 或 $-\text{CH}_2\text{NHCOCH}(\text{CH}_3)_2$ 或者 R^4 代表 $(\text{CH}_2)_n\text{R}^8$, 其中 $n=0-5$, R^8 是卤素,

5



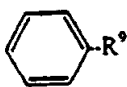
其中 R^9 是烷氧基,



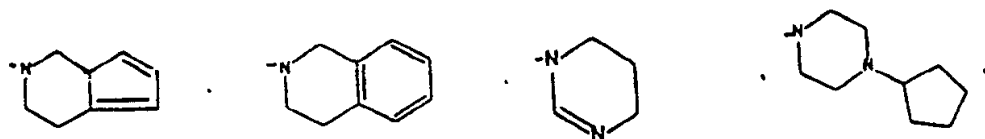
10 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}^{10}$, 其中 R^{10} 是卤素、 $-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ 或 $-\text{NHCOCH}(\text{CH}_3)_2$ 并且其中用封端单体将游离的氨基保护起来。

10、权利要求 8 的式 I 核苷肽分子, 其中 X 是 $-\text{COOH}$, 并且 R 代表 $-\text{NHCOR}^1$, 其中 R^1 代表 $-\text{CHR}^3\text{R}^4$, 其中 R^3 是氢, 并且 R^4 是 $(\text{CH}_2)_n\text{R}^8$, 其中 $n=0-5$, 优选 1-4, R^8 是卤素、

15



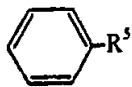
其中 R^9 是烷氧基、卤素或烷基,



20 或 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}^{10}$, 其中 R^{10} 是卤素、 $-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ 或 $-\text{NHCOCH}(\text{CH}_3)_2$ 。

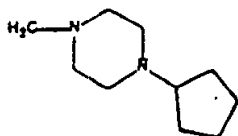
11、权利要求 8 的式 I 核苷肽分子, 其中 X 是 $-\text{COOH}$, 并且 R 表

示 $-\text{NHCOR}^1$ ，其中 R^1 代表 $-\text{CHR}^3\text{R}^4$ ，其中 R^3 代表 $-\text{NH}_2$ ，而 R^4 是

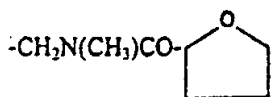


其中 R^5 是卤素、烷基或烷氧基，

5

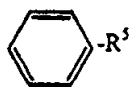


$-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}^6$ ，其中 R^6 是卤素、 $-\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHCOCH}(\text{CH}_3)_2$ 或



10

12、权利要求 8 的式 I 核苷肽分子，其中 X 是 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 或 $(\text{CH}_2)_q\text{SO}_3\text{H}$ ，其中 q 是 0 或 1，R 代表 $-\text{NHCOR}^1$ ，其中 R^1 代表 $-\text{CHR}^3\text{R}^4$ ，其中 R^3 代表 $-\text{NH}_2$ ，并且 R^4 是



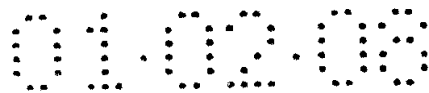
15

其中 R^5 是卤素、烷基或烷氧基、 $-\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ 或 $-\text{CH}_2\text{NHCOCH}(\text{CH}_3)_2$ 。

13、一种制备组合库的方法，所述组合库包含预先确定收集来的用于抑制碳水化合物加工酶所进行的将糖从所选择的具有杂环胺碱基的糖核苷酸供体转移到所选择的受体的核苷肽分子，所述方法包括：

20

(a) 将一个或多个氨基酸或相似物偶合到核苷单体单元上，所述核苷单体单元包含偶合到糖上的杂环胺碱基，其中所述碱基与所述糖核苷酸供体的杂环胺碱基相应，或者是该碱基的改性形式或其类似物；和



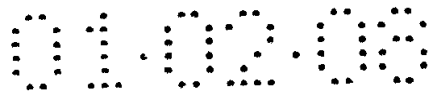
(b)用封端单体单元将任何游离官能团或胺基封端。

14、一种使用权利要求 1 的组合库来筛选药物活性分子的方法。

5 15、一种用于鉴定对碳水化合物加工酶有抑制活性的化合物的固相生物测定方法，该方法包括(a)使碳水化合物加工酶的受体与聚合物偶合，并涂敷到载体上；(b)加入碳水化合物加工酶、用可检测的物质标记的糖核苷酸供体和试验化合物；(c)测量由可检测物质产生的可测出的变化；和(d)与不存在试验化合物的对照样比较，其中有试验化合物的试样中，可检测物的量减少，表明该试验化合物对酶具有抑制活性。

10 16、一种用于鉴别能抑制 N-连接的低聚糖加工作用的化合物的方法，包括(a)在 L-PHA 存在下，使试验化合物与细胞表达的 N-连接低聚糖反应，并测量碱性磷酸酯酶的活性；和(b)与不存在化合物的对照样比较，其中碱性磷酸酯酶活性提高表明该化合物能抑制 N-连接的低聚糖加工作用。

15 17、一种药物组合物，含有由权利要求 14、15 或 16 任一方法鉴定出的化合物。



说明书

有针对性的组合化合物库及其进行筛选所用的高效测定方法

5

本发明领域

本发明涉及预先确定的化合物库、用于制备该库的相关化合物和包含所述化合物的组合物。

本发明背景

10 在大量生物识别中涉及蛋白质和碳水化合物之间的相互作用，所述生物识别包括受精、靶分子、细胞内识别和病毒、细菌及真菌的发病机理。糖蛋白和糖脂的低聚糖部分，介导细胞与细胞之间、细胞与配体之间、细胞与细胞外基质之间和细胞与病原体之间的识别。

抑制低聚糖的合成、转运和裂解中涉及的碳水化合物加工酶，可用作抑制蛋白质和低聚糖之间相互作用和抑制识别现象的手段。特别是可将与低聚糖体内合成有关的两组酶作为靶子。Leloir 氏途径中涉及的酶将活化成糖核苷酸的糖转移到不断增长的低聚糖链上。在 Leloir 氏途径中涉及的核苷酸结构单元包括：UDP-Glc, UDP-GlcUA, UDP-GlcNAc, UDP-Gal, UDP-GalNAc, UDP-Idua, GDP-Man, GDP-Fuc 和 CMP-NeuAc。与低聚糖体内合成有关的其他酶类是转移碳水化合物单元活化为糖磷酸，而非糖核苷酸的非 Leloir 氏途径酶。

20 糖基转移酶催化以分步方式将活化的糖从核苷酸加成到蛋白质或脂质上，或者加成到不断增长的低聚糖的非还原末端。据推测，由哺乳动物细胞编码的糖基转移酶超过 200 个，其中很多显示出受发育控制，产生组织特异性-糖基化模式 (Schachter, H. 《结构生物学现代评论》(Curr. Opin. Struct. Biol.) 1:755-765, 1991; 和 Paulson, J. C. 和 Colley, K. J. 《生物化学杂志》264:17615-17618, 1989)。各 NDP-糖残基需要特殊种类的糖基转移酶，并且看来各糖基转移酶可能催化形成独特的糖苷键。低聚糖可通过 N-糖苷键或 O-糖苷键连接到蛋白质上。在 N-连接中，N-乙酰基葡萄糖胺残基以 β -连接方式连接到 Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr (X 是任何氨基酸) 序列中 Asn 的酰胺氮上。在 O-连接中，二糖 β -半乳糖-(1,3)- α -N-乙酰基半乳糖胺以 α -连接方式连接到丝氨酸或苏氨酸的羟基上。



Golgi 氏酶 β (T1-6)N-乙酰基葡萄糖转移酶 V(即 GlcNAc-TV)和核心 2 β (T1-6)N-乙酰基氨基葡萄糖转移酶(即核心 2GlcNAc-T)负责细胞表面糖蛋白的 GlcNAc β (T1-6)支化 N-和 O-连接碳水化合物侧链的延伸。这些侧链在人肿瘤细胞的表面被发现,并且它们与恶性肿瘤侵入和转移有关(Dennis 等人,《科学》236:582,1987; Demetriou 等人,《细胞生物学》130:383,1995)。在人癌中显示 GlcNAc-TV 和核心 2 GlcNAc-T 上升(Fernandes 等人,《癌症研究》51:718-723,1991; Shimodaira, K 等人《癌症研究》57:5201,1997),这是一种与激活 ras 信号发出途径有关的迹象(Dennis 等人,《科学》236:582-585, 1987; Dennis 等人《致癌基因》4:853-860, 1989)。已经发现,在上皮细胞中 GlcNAc-TV 的过度表达导致老鼠的形态变化和肿瘤形成(Demetriou 等人, J. Cell Biol. 130:383,1995)。因此, GlcNAc-TV 以及对 GlcNAc-TV 供给受体底物的酶(即 O-连接途径的 GlcNAc-T1、 α -甘露糖苷酶 II 和核心 2 GlcNAc-T)用作抗癌药物的靶。

在测定血细胞表面唾液酸 Lewis^x (sLe^x)抗原中涉及岩藻糖基转移酶。在炎性过程中,选择蛋白-sLex^x介导的白细胞附着是白细胞激活和透皮迁移的关键步骤。对 sLex^x合成起作用的岩藻糖基转移酶的抑制将阻止选择蛋白-碳水化合物复合物的形成,并因此将干扰炎性过程的第一步。抑制剂将用于治疗慢性炎症,如哮喘、类风湿性关节炎、炎性肠道疾病和动脉硬化。所有这些疾病都涉及不适宜的炎性反应症状,需要加以抑制。

阻断碳水化合物加工途径中的某些酶导致免疫细胞对 Th1 细胞因子(干扰素和白细胞介素)的敏感性提高,因此进一步促进 T1 的免疫反应。尽管 α -干扰素本身具有抗病毒活性,但它自己似乎不能足以消除慢性感染,如肝炎。因此,酶抑制剂可用于在很多病毒、细菌、真菌和寄生虫感染,包括肝炎 B 和 C 治疗中加强 Th1 细胞作用。

合成在致病性方面发挥重要作用的细菌的特异性碳水化合物结构的酶的抑制剂,可用于加强所述细菌对宿主免疫系统的敏感性和抑制细菌进入人细胞和组织中。例如,一种称作低分子量低聚糖(LOS),并且与人糖蛋白和糖脂中所发现的碳水化合物结构类似的特异性细菌碳水化合物结构,保护细菌避免被宿主免疫系统识别和清除。而所述负责合成 LOS 结构的酶的抑制剂,便可降低细菌(如 N.



gonorrhoea) 逃脱宿主免疫监视的能力。

显然，人们需要碳水化合物加工酶的小分子抑制剂，所述碳水化合物加工酶包括结构和构象多样性的 GlcNAc-转移酶 I-V、半乳糖基转移酶、唾液酸转移酶、岩藻糖基转移酶和核心 2 GlcNAc。也需要用于筛选该抑制剂识别“先导”药用化合物的高效方法。

本发明概述

本发明利用组合化学的方法。组合化学法通常涉及以分步方式、将称之为“单体单元”或“化学基团”的相同或不同结构单元连接在一起。利用该方法，本发明者开发了能将糖从特定糖核苷酸供体转移到特定受体的碳水化合物加工酶的小分子抑制剂组合库。小分子抑制剂具有结构和构象多样性。可被小分子抑制剂抑制的酶包括真核和原核糖基转移酶。该分子可利用能够识别先导药物的高效方法进行筛选。

广义地说，本发明涉及组合库，它包含预先确定收集的核苷肽分子，用于抑制借助碳水化合物加工酶所进行的将糖从所选择的糖核苷酸供体转移到所选择的受体的作用，其中所述核苷肽分子包含(a)核苷单体；(b)偶合到核苷单体上、包含一个或多个氨基酸、或拟肽或肽类似物的间隔单体；和(c)连接到间隔单体上的封端单体；其中，在核苷单体、间隔单体或封端单体中至少一个要素有同一性的情况下所述核苷肽分子彼此不同。

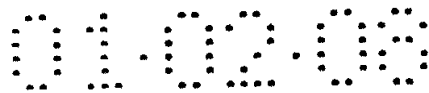
另外，核苷肽分子可能包含(a)核苷单体；(b)偶合到核苷单体上、包含一个或多个氨基酸、或拟肽或肽类似物的间隔单体；和(c)连接到间隔单体上的封端单体。

本发明也涉及制备该组合库的方法，所述组合库包含用于抑制碳水化合物加工酶将糖从所选择的具有杂环胺碱基的糖核苷酸供体，转移到所选择的受体的预定核苷肽分子的汇集，所述方法包括：

(a) 将一个或多个氨基酸或拟肽或肽类似物偶合到核苷单体单元上，所述核苷单体单元包含偶合到糖上的杂环胺碱基，其中所述碱基与所述糖核苷酸供体的杂环胺碱基相应，或是该碱基的改性形式或其类似物；和

(b) 用封端单体单元将任何游离官能团或胺基封端。

本发明也涉及利用所述组合库来筛选具有药理学活性分子的方



法；并涉及含有通过本发明方法识别的化合物的药物组合物。

另外，本发明关注用于鉴别对碳水化合物加工酶有抑制作用的化合物的固相生物测定方法，该方法包括(a)使碳水化合物加工酶的受体与聚合物偶合并涂敷到载体上；(b)加入碳水化合物加工酶、用可检测物质标记的糖核苷酸供体和试验化合物；和(c)测量由可检测物质产生的可测出的变化。

本发明也涉及用于鉴别抑制 N-连接的低聚糖加工的化合物的方法，包括(a)在白细胞凝集植物凝集素(L-PHA)存在下，试验化合物与细胞表达的 N-连接低聚糖反应，并测量碱性磷酸酯酶的活性；和(b)与不存在化合物的对照物比较，其中碱性磷酸酯酶活性的增加表明该化合物能抑制 N-连接低聚糖的加工。该方法用于鉴别在 β 1-4Gal-转移酶之前抑制 N-连接低聚糖途径中所有步骤的化合物，包括抑制本文详细描述碳水化合物加工酶的化合物和抑制 Golgi α -甘露糖苷酶的化合物。

本发明关注的对碳水化合物加工酶有抑制活性的化合物可用于治疗和预防肿瘤生长和肿瘤转移；防止手术后肿瘤复发；治疗其他抑制增殖疾病，如病毒感染；刺激骨髓细胞增殖，治疗免疫缺损患者，如 HIV 或其他病毒或感染剂，包括细菌和真菌感染的患者；防止和治疗由致病菌引起的疾病，所述致病菌在其表面有与毒力有关的碳水化合物结构，所述致病菌如萘瑟球菌、嗜血杆菌、大肠杆菌、芽孢杆菌、沙门氏菌、弯曲菌、克雷伯氏杆菌、假单胞杆菌、链球菌、衣原体、疏螺旋体、考克斯氏体、螺杆菌和分枝杆菌；或者治疗炎症性疾病，如哮喘、类风湿关节炎、肠炎和动脉粥样硬化。本发明化合物也可用于骨髓移植患者，并在因化学物质或肿瘤诱导的免疫抑制患者中用作血项恢复剂或化学保护剂。

通过下列详细说明，本发明的其他目的、特征和优点会变得显而易见。然而，应当理解，本发明的详细说明和具体实施例以及所述的优选实施方案，仅仅是以举例说明的方式给出的，因为在本发明的主题和范围内，对本发明详细描述的内容进行各种改变和修饰，对本领域技术人员来说是显而易见的。

本发明附图简述

现描述相关的附图：



图 1 显示由尿苷制备 2,3-0-亚异丙基尿苷的方法示意图;

图 2 显示由 2,3-0-亚异丙基尿苷制备 2,3-0-亚异丙基-5-0-甲磺酰基尿苷的方法示意图;

5 图 3 显示由 2,3-0-亚异丙基-5-0-甲磺酰基尿苷制备 5-脱氧-5-叠氨基-2,3-0-亚异丙基尿苷的方法示意图;

图 4 显示由母体叠氮化物制备 5-脱氧-5-氨基-2,3-0-亚异丙基尿苷的方法示意图;

图 5 显示 N-Boc 保护的间隔单体单元与核苷单体单元偶合法的示意图;

10 图 6 显示与核苷单体单元偶合的 N-Boc 保护的间隔单体单元脱保护法的示意图;

图 7 显示 Fmoc-保护的间隔单体单元与核苷单体单元反复偶合法的示意图;

图 8 是使与核苷单体单元偶合的间隔单体单元封端的示意图;

15 图 9 显示合成用于固相核 2GlcNAc-T 分析法的糖聚合物的示意图;

图 10 显示合成用于固相 GlcNAc-T V 分析法的糖聚合物的示意图;

20 图 11 显示以对照物百分数表示的 1600 次核 2GlcNAc-T 分析结果的规范化分布图; 和

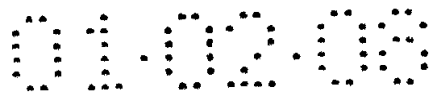
图 12 显示高效筛选结果图, 所述筛选是检测对 MDAY-D2 细胞中 N-连接的低聚糖加工具有抑制作用的微生物提取物。

本发明详细描述

核苷肽分子

25 本文所使用的“单体单元”指与另一单体单元偶合或结合之前的分子。“单体”指偶合或结合后形成核苷肽分子的分子。本发明用于形成预定核苷肽分子的单体单元包括核苷单体单元、间隔单体单元和封端单体单元。

30 根据所要抑制的碳水化合物加工酶类型, 特别是用于将糖转化为受体所需酶的糖核苷酸供体, 来选择核苷单体单元。“糖核苷酸供体”指包含有糖成分、杂环胺碱基和磷酸根单元的核苷酸分子, 与选择的可被碳水化合物加工酶转化为受体的糖偶合。“受体”指碳水化合物



结构部分(如糖蛋白、糖脂),其中所选择的糖可被碳水化合物加工酶转化。

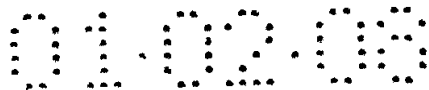
5 根据本发明制备的用于碳水化合物加工酶的组合库,包括糖蛋白、糖脂、糖基磷脂酰肌醇和其他复合糖共轭物生物合成中所涉及的真核生物糖基转移酶,和细菌和病毒的碳水化合物结构合成中所涉及的原核生物糖基转移酶,包括 LOS 和脂多糖生物合成中所涉及的酶。酶的实例包括糖基转移酶,如 N-乙酰氨基葡糖转移酶,包括 N-乙酰氨基葡糖转移酶 I-V 和 β -1,3-半乳糖基-0-葡萄糖基-糖蛋白 β 1,6-N-乙酰氨基葡糖转移酶(核 2 GlcNAc); 岩藻糖基转移酶; N-乙酰氨基半乳糖转移酶; 半乳糖基转移酶; 甘露糖基转移酶和葡糖醛酸基转移酶, 10 优选 N-乙酰氨基葡糖转移酶。表 1 提供真核碳水化合物加工酶及其糖核苷酸供体和受体的实例。表 2 列出原核生物碳水化合物加工酶。

15 在本发明分子中使用的核苷单体单元由以 β -N-配糖键与糖连接的杂环胺碱基组成。一般来说,所述糖为核糖或脱氧核糖,并且杂环胺碱基是相当于所选择的碳水化合物加工酶的糖核苷酸供体的杂环胺碱基。例如,可选择尿嘧啶用于 N-乙酰氨基葡糖转移酶和半乳糖基转移酶; 胞嘧啶用于脱唾液酸转移酶,而鸟嘌呤用于岩藻糖基转移酶。

20 也可使用杂环胺碱的结构类似物。例如,当碱基是尿嘧啶时,可以在 C-5 位上有基团,包括(但不限于)具有供电子和吸电子基团的烷基或芳基。碱基中的羟基也可被保护。糖可被修饰,例如 2'和 3'羟基可用丙酮化合物封端、酰化或烷基化、或用其他基团如卤素取代。

25 核苷单体单元的具体例子分别包括尿苷、2'-脱氧尿苷和 5'-氨基-5'-脱氧-2',3'-0-亚异丙基尿苷(用于半乳糖基转移酶和 GlcNAc 转移酶)、胞苷、2'-脱氧胞苷、5'-氨基-5'-脱氧-2',3'-0-亚异丙基胞苷(用于唾液酸转移酶)和鸟苷、2'-脱氧鸟苷、5'-氨基-5'-脱氧-2',3'-0-亚异丙基鸟苷(用于岩藻糖基转移酶)。

30 通过将适宜的反应基,如羧酸或其活化酯(例如羟基苯并三唑、五氟苯酚或 N-羟基琥珀酰亚胺酯)、羧酸酐(混合的或对称的)、酰卤、氯甲酸酯、卤化物、酮、醛、磺酰氯、异氰酸酯或异硫氰酸盐与



其他反应官能团，如胺偶合，形成稳定的键，如酰胺、氨基甲酸酯、氨基、氨磺酰、脲或异脲，优选酰胺键。每个单体单元可以有一个或多个相同或不相同的反应基。

5 本发明中所使用的间隔单体单元可以包括摹拟碳水化合物加工酶的糖核苷酸供体中磷酸根/糖键的任何官能团，或者通过其他机理与所述酶相互作用。所述间隔单体单元可以有一个带电中心。可在本发明分子中使用的间隔单体单元的实例包括一个或多个氨基酸、优选单氨基酸、二肽或三肽，或拟肽/肽类似物。

10 间隔单体单元中所使用的氨基酸可以是天然存在的或合成的氨基酸，并且可以是脂肪族的或芳香族的。间隔单体单元中的氨基酸可以是手性的非手性的氨基酸，包括(但不限于)L-氨基酸、D-氨基酸、 α -氨基酸、 β -氨基酸或氨基酸的类似物。另外间隔单体单元中的一个或多个氨基酸可以被取代基取代，所述取代基如酰胺、烷基、胺、卤素、醚、杂环或酸基团，如-COOH或SO₃H。所述氨基酸可用本文所
15 描述的适宜的保护基封端。所述氨基酸和肽可包含酸性氨基酸残基，包括天门冬氨酸或谷氨酸，和天门冬氨酸和谷氨酸的单苄基酯或叔丁基酯(例如前者的 α -和 β -位，后者的 α -和 γ -位)。

可在间隔单体单元中使用的氨基酸实例包括 L-天门冬氨酸- α -苄基酯、L-谷氨酸- γ -苄基酯、D-天门冬氨酸- β -苄基酯、L-天门冬氨酸- β -苄基酯、L-谷氨酸- α -苄基酯、L-色氨酸、6-氨基己酸、L-缬氨酸、*m*-甲苯磺酰基-L-组氨酸、L-亮氨酸、*p*-甲氧基-苄基-L-半胱氨酸、肌氨酸、L-异亮氨酸、L-天门冬酰胺、 ω -*p*-甲苯磺酰基-L-精氨酸、 ω -硝基-L-精氨酸、N- ϵ -CBz-L-赖氨酸、L-谷氨酰胺、L-丙氨酸、O-苄基-L-苏氨酸、O-苄基-L-酪氨酸、L-甲硫氨酸、O-苄基-L-
25 丝氨酸、L-脯氨酸、L-苯丙氨酸、 β -丙氨酸、 α -氨基异丁酸、高精氨酸、高脯氨酸、高丝氨酸、正精氨酸、正亮氨酸、鸟氨酸(ornithine)和 *p*-硝基苯丙氨酸。

间隔单体单元中也可以使用拟肽或肽类似物。通常，拟肽在结构上类似于典型肽，如天然存在的肽，但有一个或多个肽键可通过本领域已知的、并且在下列参考文献中描述的方法，由选自下列基团的键替代，所述基团如-CH₂NH-、-CH₂S-、CH₂CH₂-、-CH=CH-(顺式和反式)、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂-和-CH₂SO-，所述参考文献包括：Spatola, A.
30

F.的《氨基酸、肽和蛋白质的化学和生物化学》(CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS), B. Weinstein. eds., Marcel Dekker, New York, p. 267(1983); Spatola, A. F., Vega Data(March 1983), Vol. 1, Issue 3. 《肽主链修饰》[PEPTIDE BACKBONE MODIFICATIONS(综述评论)]; Morley. 《药理学发展趋势》(Trends Pharm Sci)(1980)pp. 463-468(综述); Gaute(1994) Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 33:1699-1720; Giannis 和 Kolter(1993). Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 32:1244-1267; Hudson. D.等人, (1979)《国际肽、蛋白研究杂志》(Int J Pept Prot Res) 14:177-185(--CH₂NH--, --CH₂CH₂--); Spatola 等人, (1986)《生命科学》(Life Sci) 38:1243-1249(--CH₂--S); Hann(1982)《化学会志》(J. Chem. Soc.) Perkin Trans. 1 307-314(-CH=CH-, 顺式和反式); Almquist 等人, (1980)《医药化学杂志》(J Med Chem) 23:1392-1398 (-COCH₂-); Jennings-White 等人, (1982)《四面体通讯》(Tetrahedron Lett)23:2533 (-COCH₂-); Szelke 等人, (1982) European Appln. EP 45665 CA: 97:39405 (1982) (-CH(OH)CH₂-); Holladay 等人, (1983)《四面体通讯》(Tetrahedron Lett) 24:4401-4404(-C(OH)CH₂-); 和 Hruby (1982)《生命科学》(Life Sci) 31:189-199 (-CH₂-S-); 将各文献引入本文供参考。拟肽或肽类似物也包括其中 N 端衍生为-NXX₁基、-NXC(O)X基、--NXC(O)OX基、--NXS(O)₂X基、--NHC(O)NHX基(其中 X 和 X₁是氢或低级烷基, 前提条件是 X 和 X₁不同时为氢)、琥珀酰亚胺基、苯环上有 1-3 个选自低级烷基、低级烷氧基、氯和溴取代基的苄氧基羰基-NH--(CBZ--NH--)基、苄氧基羰基-NH--基的肽, 和其中 C 端衍生为--C(O)X₂(其中 X₂选自低级烷氧基)和--NX₃X₄(其中 X₃和 X₄独立地选自氢和低级烷基)的肽。

在核苷酸肽分子上游离的官能团, 特别是间隔单体上游离的氨基, 可利用与偶合到核苷酸单体单元上的间隔单体单元所使用的相同或不相同的化学反应基封端。封端单体单元的实例包括脲、硫脲、氨基甲酸酯和酰胺残基, 它们可以是芳环、非芳环、杂环、碳环或稠合环系统的部分。天然存在的生物碱, 如八氢吲哚三醇或栗籽豆胺的反应衍生物也可以用作封端单体。可用于形成封端单体的市售试剂的实

例包括：苯甲酰氯、苯磺酰基异氰酸酯、4-甲苯磺酰基异氰酸酯、2-咪喃丙酰氯、(R)- α -甲基苄基异氰酸酯、4-(三氟甲硫基)苯基异氰酸酯、2-甲氧基羰基苯基异氰酸酯、4-吗啉碳酰氯、1-异硫氰酸根合-4-(反式-4-辛基环己基)苯、3-(三氟甲基)苯基异氰酸酯、1-金刚烷

5 碳酰氯、4-氯苯磺酰基异氰酸酯、喹噁啉氯 (quinoxay chloride)、2-噻吩乙酰氯、1-金刚烷基异氰酸酯、3-环戊基丙酰氯、吡咯烷碳酰氯、4-三氟甲氧基苯甲酰氯、3-甲氧基苯甲酰氯、4-(4-异硫氰酸根合苯基偶氮)N,N-二甲基苯胺、氯乙酸酐、4-氯苯甲酰基异氰酸酯、吡啶甲酸、烟酸、异烟酸、6-甲基烟酸、3-吡啶乙酸、反式-3-(3-

10 吡啶基)丙烯酸、(4-吡啶硫基)乙酸、2-氯烟酸、6-氯烟酸、5,6-二氯烟酸、6-羟基吡啶甲酸、6-羟基烟酸、3-羟基吡啶甲酸、5-氯-6-羟基烟酸、4-吡哆酸、柠檬酸、2-咪喃基丙酸、3-咪喃基丙酸、5-溴-2-咪喃基丙酸、2-噻吩羧酸、3-噻吩羧酸、4-硝基-3-吡唑羧酸、5-硝基-3-吡唑羧酸、4-羟基-7-氟甲基-3-喹啉羧酸和 4,8-二羟基喹

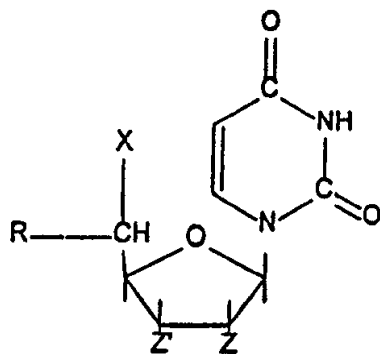
15 啉-2-羧酸。可用于封端游离 NH_2 并形成核苷肽分子之部分的封端单体的实例，包括（但不限于）甲基(Me)、甲酰基(CHO)、乙基(Et)、乙酰基(Ac)、叔丁基(t-bu)、茴香基、三氟乙酰基(Tfa)、苯甲酰基(Bz)、4-甲基苄基(Meb)、硫代茴香基(thioanizyl)、硫代羟甲苯基、苄氧基甲基、4-硝基苄基(Pnp)、苄氧基羰基(Z)、2-硝基苯甲酰基

20 (NBz)、2-硝基苄基硫苄基(Nps)、4-甲苯磺酰基(Tos)、五氟苄基(Pfp)、二苄基甲基(Dpm)、2-氯苄氧基羰基(Cl-Z)、2,4,5-三氟苄基、2-溴苄氧基羰基(Br-Z)、三苄基甲基(Trt)、2,2,5,7,8-五氟甲基-苯并二氢吡喃-6-磺酰基(Pmc)、叔丁氧基羰基(Boc)、苄基(Bzl)、苄氧基甲基(Bom)和 9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)。

25 糖过渡态类似物(例如 GlcNAc 类似物)可以偶合到核苷肽分子上，偶合的位置靠近相应的糖核苷酸供体中糖-磷酸根键可断裂的部位。

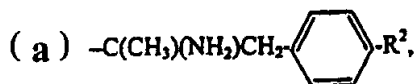
本发明核苷肽分子的具体实例如式 I 结构：

I



其中 X 是 H、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 、 $(\text{CH}_2)_q\text{SO}_3\text{H}$ ，其中 q 是 0 或 1，或者 $-\text{OPO}_3\text{H}$ ，并且 R 代表 $(\text{Y})_m$ ，其中 Y 是取代的酰胺基（例如连接到氨基酸残基上的酰胺），并且 m 是 1-3，Z' 和 Z 相同或不相同，代表羟基或烷氧基，或者 Z' 和 Z 一起形成丙酮化合物基团，并且优选用本文所提到的封端单体，优选 Fmoc 或 Boc 将式 I 化合物中游离的 NH_2 基封端。

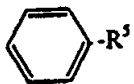
本发明核苷肽分子的具体实例有式 I 结构，其中 X 是 H、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 或 $(\text{CH}_2)_q\text{SO}_3\text{H}$ ，其中 q 是 0 或 1，Z' 和 Z 都是羟基或者一起形成丙酮化合物基团，R 代表 $-\text{NHCOR}^1$ ，其中 R^1 代表



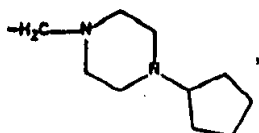
其中 R^2 是烷氧基；或

(b) $-\text{CHR}^3\text{R}^4$ ，其中 R^3 是氢或 $-\text{NH}_2$ 并且 R^4 是

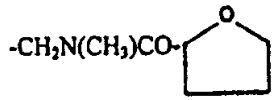
15



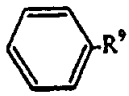
其中 R^5 是卤素、烷基或烷氧基，



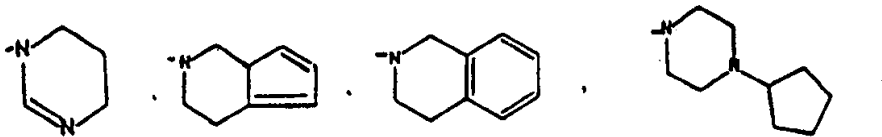
$-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}^6$ 或 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}^6$, 其中 R^6 是卤素,



5 $-\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ 或 $-\text{CH}_2\text{NHCOCH}(\text{CH}_3)_2$ 或者 R^4 代表 $(\text{CH}_2)_n\text{R}^8$, 其中 $n=0-5$, R^8 是卤素,



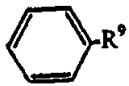
其中 R^9 是烷氧基,



10

$-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}^{10}$, 其中 R^{10} 是卤素、 $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ 或 $-\text{NHCOCH}(\text{CH}_3)_2$, 并且其中用封端单体将游离的氨基保护起来.

15 本发明式 I 化合物的实施方案中, X 是 $-\text{COOH}$, 并且 R 代表 $-\text{NHCOR}^1$, 其中 R^1 代表 $-\text{CHR}^3\text{R}^4$, 其中 R^3 是氢, 并且 R^4 是 $(\text{CH}_2)_n\text{R}^8$, 其中 $n=0-5$, 优选 1-4, R^8 是卤素,



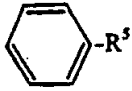
其中 R^9 是烷氧基、卤素或烷基,



20

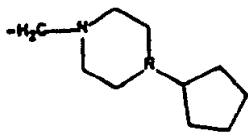
或 $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}^{10}$, 其中 R^{10} 是卤素、 $-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ 或 $-\text{NHCOCH}(\text{CH}_3)_2$.

在本发明另一实施方案中，提供式 I 化合物，其中 X 是 -COOH，并且 R 代表 -NHCOR¹，其中 R¹ 代表 -CHR³R⁴，其中 R³ 代表 -NH₂，并且 R⁴ 是

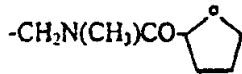


5

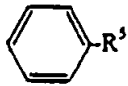
其中 R⁵ 是卤素、烷基或烷氧基，



-CH₂N(CH₃)CH₂CH₂R⁶，其中 R⁶ 是卤素、-CH₂N(C₂H₅)CH₂CH(CH₃)OH、
10 CH₂NHCOCH(CH₃)₂ 或

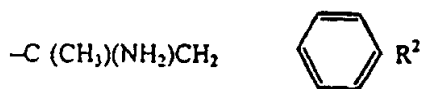


在本发明另一实施方案中，提供式 I 化合物，其中 X 是 -OSO₃H 或 (CH₂)_qSO₃H，其中 q 是 0 或 1，R 代表 -NHCOR¹，其中 R¹ 代表 -CHR³R⁴，其
15 中 R³ 代表 -NH₂ 并且 R⁴ 是



其中 R⁵ 是卤素、烷基或烷氧基、-CH₂N(C₂H₅)CH₂CH(CH₃)OH 或 -CH₂NHCOCH(CH₃)₂。

20 在特定实施方案中，提供式 I 核苷胺分子，其中 X 是 -COOH，R 代表 -NHCOR¹，R¹ 代表



其中 R^2 是烷氧基。

本文单独或联合使用的术语“烷基”是指支链或直链烃基，典型地含 1-10 个碳原子，优选 1-5 个碳原子。典型的烷基包括（但不限于）甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、1-丁基、2-丁基、叔丁基或戊基，优选甲基或乙基。

术语“烷氧基”是指通过氧原子连接到母体分子部分上的烷基。烷氧基的实例包括 0-甲基，即甲氧基，0-烯丙基，即烯丙氧基，0-丙基，即丙氧基，0-丁基，即丁氧基等，优选甲氧基和烯丙氧基。

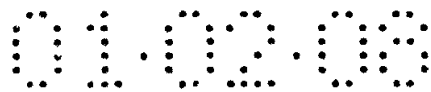
单独或联合术语的所谓“卤”或“卤素”是指氟、氯、溴或碘族的成员。

核苷肽分子的具体实例显示于表 3、4 和 5 中。

在本发明核苷肽分子中，在核苷单体单元、间隔单体单元或封端单体单元中的手性碳原子的立体化学，可各自以 R 或 S 构型存在或以二者混合物的形式存在。例如间隔单体的氨基酸可以以 L-或 D-构型存在，产生仅在其立体化学方面有改变的相同的氨基酸。因此，本发明包括以非对映异构体混合物形式存在，以及以单独的非对映异构体形式存在的本发明核苷肽分子，并且本发明还包括以对映异构体混合物形式存在以及以单独的对映异构体形式存在的核苷肽分子。本文涉及本发明核苷肽分子的所有旋光异构体及其消旋体形式，并且本文所显示的核苷肽分子预期包括所描述化合物的所有可能的异构体。

在合成过程中，可使用 L 和/或 D 氨基酸在将间隔单元连接到核苷单体单元上之前或之后，或者在间隔单元与碱基连接或构成后，通过将手性中心外消旋，而形成非对映异构体。

本发明核苷肽分子可以以可药用盐形式存在。术语“可药用盐”包括由碱性基团与有机酸或无机酸，或者酸性基团与碱按照标准酸-碱反应进行反应形成的盐。酸的实例包括盐酸、硫酸、磷酸、乙酸、琥珀酸、柠檬酸、乳酸、马来酸、富马酸、棕榈酸、胆酸、扑酸(pamoic)、粘液酸、D-谷氨酸、d-樟脑酸、戊二酸、邻苯二甲酸、酒石酸、月桂



酸、硬脂酸、水杨酸、甲磺酸、苯磺酸、山梨酸、苯甲酸、肉桂酸等酸。碱的实例包括 LiOH、NaOH、KOH 和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 。在间隔单体单元中的碱性氨基酸(例如甘氨酸、鸟氨酸、组氨酸、苯基甘氨酸、赖氨酸和精氨酸)可以是质子化形式。

5 制备组合库

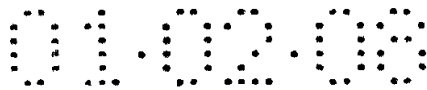
将单体单元通过化学方式结合,即共价连接或偶合到毗邻的单体单元或结构单元来制备本发明的组合库。结合后,单体单元改变了,例如通过反应形成共价键,单体可失去水分子,或者可形成脲或氨基甲酸酯基团。在单体单元性质上和可用于以化学方式结合单体的化学
10 反应类型中,有无数变化。另外,可使用固相和溶液相化学法来合成本发明的组合库。

本发明库中所包含的化合物中使用的结构单元或单体,可被“逆向”装配,即加到“生长链”上的最终结构单元可以与肽或多肽的 5' 末端类似。例如,在表示为尿苷-间隔基团-封端基团的库中,可以将
15 尿苷结构单元或单体单元最后通过化学方法结合到毗邻的间隔单元上。在该合成方案中,通常将封端单体单元附着在固相基体上,直到最终化学结合反应后再释放出尿苷-间隔基团-封端基团。

下文描述制备本发明组合库中化合物的方法实例。

可以使用丙酮化合物或者其他合适的保护基团暂时保护化学活
20 性部位,来制备核苷单体单元的反应基团为本发明的组合库。尤其是,可使用 5'-脱氧-5'-氨基-2',3'-O-亚异丙基尿苷模板来制备以尿苷结构为基础的化合物库。模板可通过下列步骤来制备:以丙酮化合物封闭 2'-和 3'-羟基,通过甲磺酰化、甲苯磺酰化或三氟甲磺酰化来使 5'羟基活化、然后与叠氮化钠反应,并还原(例如参见附图
25 1-4)。包含被适当保护,例如 N-叔丁氧基羰基(Boc)或 N-9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)-保护的氨基酸、二肽或三肽的间隔单体单元可与游离碱形式的尿苷模板偶合(例如参见附图 5)。然后脱保护(如参见附图 6)。使用常规方法纯化核苷肽单体单元和间隔单元,并且可使游离胺碱基端封闭,例如用羧酸、酸酐、酯、异氰酸酯、异硫氰酸酯、
30 酰氯或醛(如参见图 7)。

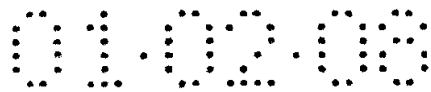
本发明也关注本发明方法中使用的中间体,包括杂环胺碱基中有保护的羟基和/或 2'或 3'羟基被封闭的本发明组合库的核苷肽分子。



使用由三个化学步骤和两个纯化步骤组成的合成策略来将间隔单体单元与核苷单体单元偶合，所有步骤都是自动化的。在附图 5 和 6 中显示了加合间隔单体单元的反应方案实例。反应可以在深孔 (1 或 2ml)、96-孔格式的微滴定板中进行。第一步将 Boc 保护的氨基酸、
5 二肽或三肽偶合到游离碱形式的尿苷模板上。然后使用过量的 TFA 使相伴的 N-脱保护和丙酮化合物脱封闭。使用 Polyfiltronics™ 单滤板 (以 96 孔格式) 通过离子交换淤浆来中和 TFA 盐，产生游离胺残基。例如用异氰酸酯、异硫氰酸酯、羧酸、磺酰氯和酰氯使游离胺基封端，以获得产品的 5 个库。如果需要，纯化可通过用氨基甲基树脂淤浆来进行，该树脂可清除任何过量的封端试剂，或者用氧化铝硅胶或保留过量的试剂和副产品的 Florisil™ 进行纯化。淤浆化可在
10 Polyfiltronics™ 板中进行。也可在还原性胺化条件下用醛使游离的末端胺基封端。对于苯甲基酯保护的衍生物 (如间隔单体单元为天冬氨酸和谷氨酸) 来说，使用甲酸铵、Pd-C (10% 湿度) 和甲醇手工转移氢化，如果需要，可进行水解 (TFA, H₂O) 或皂化 (甲醇, KOH, H₂O) 以释放羧化物和外消旋手性氨基酸片段。

在附图 7 中显示了使用 Fmoc 策略加合间隔单体单元的另一反应方案。如果需要，反应可以在深孔 (1 或 2ml)、96-孔格式的微滴定板中进行。第一步是将 Fmoc 保护的氨基酸、二肽或三肽偶合到尿苷
20 单体模板的游离胺基上。然后使用吗啉在作为溶剂的 DMF 中使 Fmoc 脱保护。该方法不用除去亚异丙基保护基即可释出游离的末端胺。不需要中和步骤，并且吗啉易于在减压下通过蒸发来除去。然后，通过上文所述方法，按需要将末端胺封端。通过在室温下用 TFA 处理，可从最终反应序列中全部或选择性封端或未封端的尿苷肽中除去丙酮
25 化合物保护基，然后减压蒸发试剂和溶剂 (参见附图 8)。

可通过形成式 I 化合物来制备酰胺基团与核苷单体单元和间隔单体单元连接的本发明组合库，式 I 中 R 代表 -NHCOCHR³R⁴，其中 R³ 是 NH₂，式 I 化合物采用 N. P. Damodaran 等人在《美国化学会志》
30 93. 3812. 1971 中所述的方法来制备。在 N-甲基吗啉存在于合适温度下，将游离氨基形式的化合物与 R³ 的相应酯在水性 DMF 中缩合。也可以使用其他反应性酯，如 N-羟基琥珀酰亚胺、羟基苯并三唑或五氟苯基酯或其他肽合成中常用的反应性酯。例如使用 1-氟丁酸的



甲基酯来合成 R^4 为 $(CH_2)_nR^8$ 的式 I 化合物，其中 n 为 2 并且 R^8 为卤素（表 3 中的化合物 A）。类似地，使用相应酸的酯可合成表 3 中的化合物 B、C 和 D，所述酸的酯可通过常规方法来合成。使用相应酸的合适酯来合成表 3 中的化合物 E 到 J，所述酸的酯可购得。对于表 3 中化合物 F 到 H 来说，缩合前，用合适的基团封闭酯化剂中的游离氨基。

可通过类似的酯与游离胺缩合来合成表 4 和 5 中所示其中 X 是硫的所选化合物的组合库。

可通过用醋酸汞将市售 UDP 汞化，得出 UDP-C-5-醋酸汞，来制备组合库中，其中尿苷的 C-5 具有不同的烷基和芳基的预定化合物，当在四氯钯酸钾（potassium tetrachloropalladate）存在下，用适宜的链烯烃化合物处理时，所述化合物产生相应的 C-5-链烯烃衍生物。当选择性还原时，这些化合物产生 C-5-烷基化合物。这种类型的衍生称作 Heck 反应，并且可以本领域已知的多种方法进行（Ryabov, 《合成》（1985）233-252; 和 Heck, 《有机反应》（1982）27:345-390）。

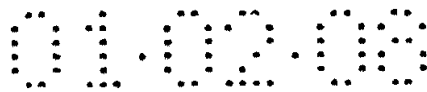
通过糖核苷酸供体转移的过渡态糖类似物，可偶合到本发明核苷胺分子上。例如，GlcNAc 阳离子类似物可产生，并且可以制备成一种使其可偶合到本发明尿苷核糖分子上的形式。

生物测定

本发明组合库包括推定的碳水化合物加工酶抑制剂。具有适宜的选择性和足够活性的抑制特定碳水化合物加工酶的抑制剂，可利用常规的生物测定和本文所描述的生物测定进行选择。由于结合自动化和机器人技术，使得能够在相对短的时间内测定成千上百万的化合物，因此生物测定适应于高效筛选。从本发明库中初步筛选 5408 个化合物，结果表面在常规的核心 2 GlcNAc-T、GlcNAc-TV 和 GlcNAc-TI 测定中 2-3% 的化合物具有抑制活性。

一旦利用筛选技术鉴定出“先导”化合物，那么组合化学法可用于使初始先导化合物最优化。优化的类似物/变体可用确定初始先导化合物相同的筛选方法来鉴定。

本文所描述的本发明人设计的方法，使用简单并且快速的功能测定，该测定方法可鉴定测试库中一个或多个活性组分而不需要较长过程理清头绪。该测定用于机器人系统中，该系统能够将大量样品按比



例分配、混合和进行样品处理。因此，本发明制造有效的机器人技术，它能够在可变的温度下进行多种化学反应，并随后进行整理和确定生物活性先导化合物的特性。该选择方法能够鉴定组合库内的可产生亲和富集或亲和选择的活性化合物，这种富集和选择后接着可进行任何生物活性化合物的质谱鉴定。

5 本发明关注固相生物测定法，该方法用于鉴定本发明组合库中的具有抑制碳水化合物加工酶(包括糖基转移酶或糖苷酶)活性的化合物。该方法对于药物筛选特别有用。固相生物测定法包括将碳水化合物加工酶的碳水化合物受体与聚合物偶合，并涂敷在载体(或支持体)上。加入碳水化合物加工酶、用可检测的物质标记的糖核苷酸供体和试验化合物，并测量由可检测物质产生的可检测性变化。

10 可与受体偶合的聚合物的实例包括聚丙烯酰胺。载体例如可以是硝基纤维素、玻璃、辉长岩或磁铁矿。载体材料可具有任何可能的构型，包括球形(如珠粒)、圆柱(如试管或孔的内表面，或棒的外表面)、或平面(如薄片、试验条)。

15 可检测物质的实例包括(但不限于)放射性同位素(如， ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、荧光标记物(如 FITC、罗丹明、磷化镧系元素)、发光标记物，如鲁米诺、酶标记物(如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酯酶、乙酰胆碱酯酶)和生物素类(可通过标记的抗生物素蛋白来检测，如含有荧光标记物或酶活性物的链霉抗生物素蛋白，以光学方法或量热法来测量)。在本发明的实施方案中，可检测物质是放射性材料，最优选氚。

20 本发明方法中所使用的碳水化合物加工酶，可用常规提取方法从天然物质中获得，可以是重组酶，或者可以从商业渠道获得。

25 在本发明实施方案中，测定方法包括将碳水化合物受体与聚合物(如聚丙烯酰胺)偶合并涂敷在载体上，如 96 孔塑料板的表面。用重组酶和含氚糖核苷酸供体进行糖基转移酶反应，然后洗涤，加入闪烁计数液并用 β -计数器测量放射性。构建糖聚合物并涂敷塑料板，使用 UDP-GlcNAc:Gal β 1-3GalNAc-R β 1-6-N-乙酰基氨基葡萄糖转移酶(GlcNAc 到 GalNAc)(即核 2GlcNAc-T)来使酶和底物浓度与时间的线性关系最佳化，限速进行表达聚乳糖胺的反应，并选择配体唾液酸 Lewis^x。聚乳糖胺与肿瘤转移(Itzkowiz, SH 等人《癌症研究》，46,

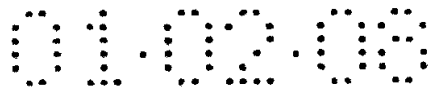
2627-2632, 1986; Kim YS 等人,《癌症研究》, 46, 5985-5992, 1986)、发展(Pennington JE 等人,《胚胎学杂志》, 90, 335-361, 1985)和淋巴细胞的增殖激活(Higgins EA 等人,《生物化学杂志》, 266, 6280-6290, 1991)有关。已经显示聚乳糖胺在细胞-细胞和细胞-底物粘5 合过程中起重要作用(Zhu BC 和 Laine RA.《生物化学杂志》, 260, 4041-4045, 1985; Laferte' S 和 Dennis JW.《癌症研究》, 48, 4743-4748, 1988)。另外,它们可作为哺乳动物凝集素的配体(Merkle RK 和 Cumming RD.,《生物化学杂志》, 263, 16143-16149, 1988)。

在检测微生物提取库的核 2GlcNAc-T 抑制剂的筛选中,阳性对照的 CV 是 +/-9.4%,并且在固相测定和标准溶液测定之间观察选中有效性的完全一致性。10

可使用糖基转移酶测定法来鉴定各种碳水化合物加工酶的抑制剂,包括本文所述的酶,优选核 2GlcNAc-T、GlcNAc-TI 和 GlcNAc-TV。

15 凝集素敏感性测定法被大量地用于研究细胞系的碳水化合物模式。通过与细胞表面的低聚糖结构的特异性结合,凝集素常产生使生长不利的细胞毒性作用。L-PHA 是一种识别三-和四-触角的载有结构 (Gal β 1,4GlcNAc β 1,6) Gal β 1,4- GlcNAc β 1,2Man α 的 N 连接低聚糖的凝集素,因此代表检测 β 1,6 分支的复合型低聚糖的有效探针。20 这些结构与肿瘤发展有关,并且显露在有恶性细胞上(Dennis 等人)[例如鼠淋巴网状内皮细胞、高度转移的肿瘤模型 MDAY-D2 系上(VanderElst 和 Dennis. 1991)]. MDAY-D2 细胞中细胞表面 N 连接的碳水化合物链的还原和/或截断与 L-PHA 敏感性水平的降低直接相关,进而甚至与凝集素存在下改善细胞增殖也有关。因此,这样的系25 统可被用于揭示阻断 1,6 分支的 N 连接结构的生物合成的手段。由于给出了恶性转化过程中复合 N-低聚糖的功能的意义,本发明人开发了大规模的 L-PHA 测定法来鉴定 N 连接低聚糖加工途径新抑制剂的组合库中的化合物。

术语“N 连接低聚糖加工”或“N 连接低聚糖加工途径”指用 N 30 连接低聚糖于体内合成糖蛋白的生物合成途径。将 N 连接低聚糖体连接到蛋白部分共有序列 Asn-X-Ser/Thr 中 Asn 侧链的酰胺 N 上,其中 X 可以是任何氨基酸。本发明的方法尤其是可用于鉴定抑制复合型



N 连接的低聚糖，尤其是与肿瘤生长和转移相关的 β 1,6-分支的复合型低聚糖。N 连接低聚糖加工包括合成前体分子、通过低聚糖基转移酶将前体转化到 Asn，然后进一步通过膜结合的葡糖苷酶和内质网 α 1,2-甘露糖苷酶加工，并且由粗面内质网转运到高尔基叠层结构。

5 在高尔基叠层结构中，依据最终获得的糖蛋白进行进一步加工，并可包括溶酶体酶或非溶酶体酶。通过第二非溶酶体加工途径合成复合和杂交型低聚糖链，并可借助酶加上残基，所述酶包括高尔基甘露糖苷酶 I (α 1,2 特异性) 和 N-乙酰基氨基葡糖转移酶 I、II 和 III (可在 <http://www.uni.mainz.de/~frosc000/STRU22.html> 发现对 N 连接加工途径的描述)。

10 可使用本发明的 L-PHA 法来鉴定抑制 β 1,4Gal 转移酶之前 N 连接低聚糖途径中所有步骤的化合物，包括抑制本文所述的碳水化合物加工酶和高尔基 α -甘露糖苷酶的化合物。

15 在本发明的实施方案中，包括基于测量碱性磷酸酯酶活性的完全自动化的酶测法。该方法基于细胞数量和其碱性磷酸酯酶活性水平之间密切相关的观察。该方法采用比色法来检测 L-PHA 处理后转化细胞的细胞增殖。就反应混合物直接加到在其本身介质中生长的细胞中。因此，该方法可以一步进行，不用除去培养介质或沉淀和洗涤细胞，所以允许使用完全自动化的方法。该测定方法也具有高度的再现性

20 (CV=4%) 并且不昂贵，因此在进行大规模实验时代表有价值的工具。反应与时间在很宽时间间隔(5-180 分钟)中是线性的，并且底物对-硝基苯基磷酸酯的酶的 K_m 值较低(0.81mM)。可改变培养时间和底物浓度，以便调节反应速度，并且为了自动化和定时的目的而针对样品数量调节该方案。使用自动化的平台也允许同时进行很多样品处理，

25 例如三十六个 96 孔板。

所以，提供对化合物抑制 N 连接低聚糖加工能力的自动化试验方法，该方法包括 (a) 将化合物与表达 N 连接低聚糖 (优选 β 1,6-分支的复合型低聚糖) 细胞在 L-PHA 存在下进行培养，并测量碱性磷酸酶的活性；和 (b) 与不存在化合物的对照样比较，其中较高碱性磷酸酶活性表明化合物具有抑制 N 连接低聚糖加工的能力。可使用来鉴定

30 β 1,4Gal 转移酶之前 N 连接低聚糖途径中抑制所有步骤的化合物的方法，包括抑制本文所述的碳水化合物加工酶，特别是 N-乙酰基氨基

葡糖转移酶，包括 N-乙酰基氨基葡糖转移酶 I、II 和 V 的化合物。该方法也可用于鉴定抑制高尔基 α -甘露糖苷酶的化合物。

通常可使用本发明的自动化法鉴定细胞生长抑制剂(如 TGF- β 、IL-1 γ 、TNF α 和 IFN)的拮抗剂。所以，本发明广义上包括一种下述方法，该方法包括：(a) 试验化合物与表达 N 连接低聚糖的细胞在细胞生长抑制剂存在下反应；(b) 测量碱性磷酸酯酶的活性；和(c) 与不存在试验化合物的对照样进行比较，其中碱性磷酸酯酶活性增加表明化合物具有拮抗细胞生长抑制剂的能力。

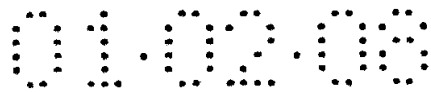
本发明方法中可使用的细胞包括 MDAY-D2、L1210、黑素肿瘤细胞和人肿瘤细胞，如 SW480、LS174T、HT-29、WiDr、T2、MDA-231、MCF7、BT-20、Hs578T、K562、Hs578T、SK-BR-3、CY6T、MDA-468、H23、H157、H358、H1334、H1155、H28、H460、Hmesol、H187、H510A、N417、H146、H1092、H82 (Restifo, N. P. 等人, J. Exper. Med. 177:265-272, 1993)。这些细胞系可包含组成酶或诱导酶活性，如成骨细胞系。

通过测量碱性磷酸酯酶活性来测量细胞的增殖。可使用常规方法来测量检测碱性磷酸酯酶，例如通过使用对硝基苯基磷酸酯作为底物，并在 405nm 测量吸收度。

进行该方法的条件将依据化合物的性质和所采用的细胞来选择。例如，如果细胞是 MDAY-D2 肿瘤细胞，可使用约 $1-6 \times 10^3$ ，优选 5×10^3 细胞浓度。通常将 MDAY-D2 细胞培养约 10 到 30 小时，优选 16 到 20 小时，然后以大约 50 到 150 μ g/ml，优选 100 μ g/ml 的浓度加入 L-PHA。碱性磷酸酯酶测定混合物可含有缓冲剂，如二乙醇胺缓冲剂，和初始浓度约为 1.5-4mM，优选 2-3mM，最优选 2.5mM 的对硝基苯基磷酸酯。

抑制剂的实用性

对特定碳水化合物加工酶具有合适选择性和活性的小分子抑制剂，可使用高效筛选生物测定法从本发明的组合库中挑选。所选择的小分子抑制剂会有重要价值的药理特性，具体来说，该抑制剂可用于治疗和预防肿瘤生长和肿瘤转移。可使用肺移生测定法证明抑制剂的抗转移作用。例如，可以将用抑制剂处理的黑素瘤细胞注射给小鼠，并且可通过记录死后肺上的肿瘤结节来检测黑素瘤细胞在小鼠肺上



移生的能力。通过测量肿瘤的面积可检测口服或静脉给予抑制剂对小鼠肿瘤生长的抑制作用。

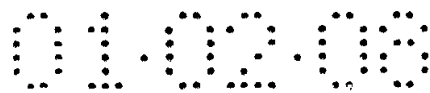
小分子抑制剂在防止外科手术后肿瘤复发中有特别的应用，即作为辅助治疗剂。

5 该小分子抑制剂在治疗各种类型的肿瘤中特别有用，例如白血病、淋巴瘤、黑素瘤、腺瘤、肉瘤和固体组织癌患者。具体来说，该小分子抑制剂可用于治疗恶性黑素瘤、前列腺癌、宫颈癌、卵巢癌、肾癌，如转移的肾细胞癌、胃、肺、直肠、乳房、肠、消化道、肝、甲状腺、头和颈癌，如不可切除的头和颈癌、淋巴管炎、子宫颈癌、
10 乳房、唾液腺、腿、舌、唇、胆管、骨盆、纵隔、尿道、支气管、膀胱、食道和结肠癌、非小细胞肺癌和卡波济肉瘤(是一种与 HIV 感染患获得性免疫缺乏综合症(AIDS)患者有关的癌形式)。该抑制剂也可用于其他抗增殖疾病，如细菌和病毒感染，特别是 AIDS。

15 本发明的小分子抑制剂可用于治疗免疫受损的患者。例如，可用于感染了 HIV 或其他病毒或感染剂(包括细菌、真菌和寄生虫)的患者、骨髓移植后的患者和化学或肿瘤诱导的免疫抑制患者。

20 该小分子抑制剂可用作血项恢复剂，特别是刺激骨髓细胞增殖，尤其是化疗或放疗之后。本发明抑制剂的骨髓增殖活性可通过下列方法来证明，将抑制剂注射给小鼠、处死小鼠、取出骨髓细胞，并通过直接计数骨髓细胞数和以甲基纤维素测定法测量克隆发生的祖代细胞，来测定抑制剂刺激骨髓增殖的能力。抑制剂也可用作化学保护剂，特别是化疗后保护粘膜上皮细胞。

25 本发明小分子抑制剂也可用作抗病毒剂，特别是膜包被病毒，如逆转录病毒、流行性感冒病毒、巨细胞病毒和疱疹病毒。该小分子抑制剂也可用于治疗细菌、真菌和寄生虫感染。例如，该小分子抑制剂可用于预防或治疗由下列微生物引起的感染：萘瑟球菌属，如脑膜炎萘瑟球菌和淋病萘瑟球菌；衣原体种属，如肺炎衣原体、鹦鹉热衣原体、砂眼衣原体；大肠杆菌，嗜血杆菌属，如流感嗜血杆菌；小肠结肠炎耶尔森氏菌；沙门氏菌属，如鼠伤寒沙门氏菌；志贺氏菌属，如
30 弗氏志贺氏菌；链球菌属，如无乳链球菌和肺炎链球菌；芽孢杆菌属，如枯草芽孢杆菌；粘膜布兰汉氏球菌；布氏疏螺旋体；铜绿假单胞菌；伯氏考克斯氏体；弯曲杆菌属，如猪肠弯曲杆菌；幽门螺旋杆菌



和克雷伯氏菌属，如肺炎克雷伯氏菌。

该小分子抑制剂也可用于治疗炎性疾病，如类风湿性关节炎、哮喘、炎性肠病和动脉粥样硬化。

5 该小分子抑制剂也可用于增加抗癌剂效果，如白细胞介素-2 和聚-IC 的抗癌作用、增加天然杀伤细胞和巨噬细胞杀肿瘤的活性、诱导细胞因子合成和分泌、增强 LAK 和 HLA 1 类特异性抗原的表达；激活蛋白激酶 C，刺激骨髓细胞增殖，包括造血祖代细胞增殖，并且增加移植效率和集落形成单位活性，避免化疗和放疗的损伤(如化学保护和放射保护剂)，并促进骨髓细胞特性的恢复，特别是在与人疾病
10 (包括癌和获得性免疫缺乏综合症(AIDS))治疗中常用的化学活性剂联合使用时。例如，该小分子抑制剂可作为化学保护剂与抗癌剂联合使用，抗癌剂包括阿霉素、5-氟尿嘧啶、环磷酰胺和甲氨蝶呤，并且可与异烟肼或 NSAID 结合使用。

15 本文中的术语“患者”，指受本文所述特定病态或疾病影响的温血动物，如哺乳动物。所述意义范围内的动物的例子是狗、猫、大鼠、小鼠、马、牛、羊和人。

20 该小分子抑制剂可使用常规方法转化为药物组合物。药物组合物含有单一的或与其他活性物质组合在一起的抑制剂。这些药物组合物可口服、外用、直肠、非胃肠道、局部、吸入或脑内使用。所以该药物组合物为固体或半固体形式，例如，丸剂、片剂、霜剂、明胶胶囊、
25 胶囊、栓剂、软明胶胶囊、脂质体(如参见美国专利 5376452)、凝胶、膜和小管。非胃肠道和脑内使用时，可使用肌内或皮下给药的形式，或者使用输注或静脉或脑内注射的形式，因此可与一种或多种可药用的赋形剂或稀释剂混合制成适于上述使用、并有与生理液体相容渗透性的抑制剂溶液或抑制剂粉剂。局部使用时，应当考虑外部使用的霜剂或油膏形式的制剂或喷雾形式的制剂；吸入使用时，应当考虑喷雾使用的制剂。

30 药物组合物可通过本身已知的配制可对病人施用的药物组合物的方法来制备，为此，将有效量的活性物质与可药用载体的混合物混合。例如，Remington's《药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA 1985)中描述过合适的载体。基于此，药物组合物包括(但不限于)与一种



或多种可药用载体或稀释剂混合的抑制剂，并且含有具有合适 pH 的缓冲溶液和具有生理液体的等渗剂。

5 该抑制剂可作为治疗剂单独使用或者与其他治疗剂或其他治疗形式(如化疗或放疗)一起使用。该抑制剂在癌症和免疫抑制疾病的治疗中可用于增强巨噬细胞、T 细胞和 NK 细胞的激活。举例来说，抑制剂可与抗增殖剂、抗微生物剂、免疫刺激剂或抗炎剂联合使用。尤其是抑制剂可与抗病毒剂和/或抗增殖剂联合使用，如 Th1 细胞因子，包括白细胞介素-2、白细胞介素-12 和干扰素- γ 和核苷类似物，如 AZT 和 3TC。本发明化合物可与其他治疗剂或治疗方法同时、分别
10 或按顺序给药。

可给予含有小分子抑制剂的组合物来进行预防和/或治疗。在治疗使用时，以足以治疗或至少缓解疾病及其并发症症状的量，将组合物给予已经患有上述疾病或病症的患者。足以完成治疗的量被定义为“治疗有效量”。使用的有效量取决于疾病的严重性、患者的体重和
15 总体状况、给药途径的性质、制剂的特性和给药的时间或间隔。

在预防使用时，将含有该小分子抑制剂的组合物给予易感特定疾病或处于特定疾病危险状态的患者。这样的剂量被定义为“预防有效量”，在使用时，精确的量取决于患者的健康状态和体重、给药途径的性质、制剂的特性和给药的时间或间隔。

20 若给予较大量来进行治疗或预防时，在一天的时间内分数次给药是可取的。

下列实施例用于说明本发明。

实施例 1

GnT-V 抑制剂的组合合成

25 下面描述 5'-去氧-5'-氨基-2', 3'-O-亚异丙基尿苷和 5'-去氧-5'-氨基-2', 3'-O-亚异丙基尿苷的肽支链衍生物的合成。本发明也关注中间体、2, 3-O-亚异丙基-5-O-甲磺酰尿苷和 5-去氧-5-叠氨基-2, 3-O-亚异丙基尿苷衍生物。

I、5'-去氧-5'-氨基-2', 3'-O-亚异丙基尿苷的合成

30 A、2, 3-O-亚异丙基尿苷的制备(图 1)

在室温下，将尿苷(65.0g, 266.2mmol)、樟脑磺酸(1.0g, 4.3mmol)、2, 2-二甲氧基丙烷(98.0mL, 798.5mmol)和丙酮(无

水, 1000mL) 一起剧烈搅拌 24 小时。通过 TLC(溶剂系统 7:93, MeOH:CHCl₃) 监测该反应。一旦起始物质消耗尽, 加入三乙胺 (1.12mL, 8.6mmol) 并将该混合物再搅拌 1 小时。将丙酮减压 (<40℃) 蒸发掉得到白色粉末 (77.0g), 该白色粉末不必进一步纯化即可用于下一步中。

B、2, 3-0-亚异丙基-5-0-甲磺酰尿苷的制备 (图 2)

将粗品 2, 3-0-亚异丙基尿苷 (77.0g; 在步骤 A 中得到) 溶解在 DMF 中, 加入三乙胺 (74.2mL), 并将该混合物冷却至 0℃。然后在 30-60 分钟的时间内滴加甲磺酰氯 (31.2mL) 同时继续快速搅拌。在室温下再搅拌 1 小时后, 将 DMF 蒸发掉。将残渣溶解在乙酸乙酯 (2.0L) 中, 并用水 (3 × 250mL) 洗涤 3 次。将有机层用硫酸镁干燥, 过滤, 将滤饼用一些 EtOAc 冲洗并将溶剂蒸发掉。所得到的淡黄色残渣 (粘稠的糖浆状) 不纯化即可直接用于下一步中。通过 TLC (7:3, 乙酸乙酯:己烷) 监测该反应。

C、5-叠氨基-5-去氧-2, 3-0-亚异丙基尿苷的制备 (图 3)

将粗品甲磺酸盐 (上述步骤 B 得到的) 溶解在 DMF (400mL, 试剂级) 中, 并在 60℃ 下与叠氮化钠 (34.6g, 532mmol) 一起搅拌 12 小时, 直至通过 TLC (TLC 7:3, 乙酸乙酯:己烷) 观察甲磺酸盐全部消耗尽。将该混合物通过硅藻土滤床过滤。将滤液蒸发至干。将残渣溶解在乙酸乙酯 (2.0L) 中, 并用水 (3 × 250mL) 洗涤 3 次。将有机层用硫酸镁干燥并在 30℃ 下减压蒸发。将固体残渣从乙酸乙酯/己烷 (1:1) 中结晶, 得到 65.0g 所需叠氨基尿苷的白色结晶固体 (mp 118℃)。

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): 1.34, 1.53 (2s, 6H); 3.52 (dd, 1H, J = 4.4, 12.9 Hz); 3.6 (dd, 1H, J = 5.9, 12.9 Hz); 4.2 (ddd, 1H, J = 4.4, 4.4, 6.2 Hz); 4.8 (dd, 1H, J = 4.2, 6.2 Hz); 5.06 (dd, 1H, 2.3, 6.2 Hz); 5.7 (d, 1H, J = 7.8 Hz); 5.78 (d, 1H, J = 2.2 Hz); 7.65 (d, 1H, J = 8.0 Hz).

D、5-氨基-5-去氧-2, 3-0-亚异丙基尿苷的制备 (图 4)

将 5.0g 叠氮化物溶解在乙醇 (150-200mL) 中。向该溶液中加入 Pd(OH)₂ 和 NaHCO₃。将反应瓶中的空气排出并填充氢气。将该过程重复 3 次并将该混合物在室温氢气环境下搅拌 3-6 小时。将该混合物通过硅藻土滤床过滤并蒸发。将残渣用于封端和肽偶合反应。

¹H NMR

(500 MHz, CDCl₃): 1.35, 1.57 (2s, 6H); 2.95 (dd, 1H, J = 6.0, 13.6 Hz); 3.06 (dd, 1H, J = 4.6, 13.6 Hz); 4.1 (appear as dd, in fact it is ddd, 1H, J = 4.3, 4.35, 6.4 Hz); 4.76 (dd, 1H, J = 4.5, 6.4 Hz); 4.95 (dd, 1H, 2.6, 6.4 Hz); 5.7 (d, 1H, J = 2.4 Hz); 5.73 (d, 1H, J = 8.1 Hz); 7.38 (d, 1H, J = 8.2 Hz).

II、偶合过程(图 5)

将游离胺(图 5)溶解在二氯甲烷(250mL)中并加入 WSC. HCl [1-乙
 5 基-3-(3'-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺.HCl, 1.2 eq]。向该澄清的
 溶液中加入 N-叔丁氧基羰基保护的氨基酸(1.0 eq)并在氩气下搅拌
 1-3 小时。通过 TLC(7:3, MeOH/CHCl₃) 监测该反应。反应结束后, 再
 加入二氯甲烷并将该溶液用水洗涤(有少数氨基酸, 如谷氨酰胺、ω-
 10 硝基精氨酸、天冬酰胺来说, 用水洗涤是不可能的, 因为衍生物是水
 溶性的), 将有机层用硫酸镁干燥并蒸发。将残渣通过柱色谱层析(洗
 脱剂 2-5%的 MeOH/CH₂Cl₂) 纯化得到白色固体。产率为 75-85%。该过
 程以 25.0g 的规模进行。按照类似的方式, 将游离胺(1 eq)、N-FMOC-
 保护的氨基酸(1.1 eq)和 HBTU 在 DMF(1.1 eq) 中反应, 得到 N-FMOC
 保护的尿苷单肽。

15 III、N-Boc 脱保护基(图 6)

将尿苷肽(图 6)在室温下分别用 TFA/CHCl₃/H₂O(3:4:1)处理 12
 小时。将过量的试剂和溶剂减压蒸发。将残渣溶解在甲醇中, 用 OH
 树脂处理直至中性, 过滤并蒸发至干。

IV、封端(图 8)

20 在室温下, 在 DMF 中, 将完全脱保护基的尿苷单肽和二肽衍生物
 分别用封端试剂(例如酰氯、异氰酸酯和硫代异氰酸酯, 1.2 eq)和二
 异丙基乙胺(1.5 eq)处理。12 小时后, 将溶剂除掉, 并将残渣溶解
 在甲醇中。将这些溶液用氨基甲基化的聚苯乙烯树脂处理 48 小时,
 将过量的封端试剂猝灭。将混合物过滤、蒸发并溶解在 DMSO 中。

25 在 DMF 中, 在 HBTU(1.05-1.2 eq)存在下, 将 N-t-Boc 和 N-FMOC-
 脱保护的二肽(1 eq)也用各种羧酸封端试剂(1.05-1.2 eq)封端。
 将溶剂减压蒸发(温度≤60℃)。将残渣溶解在 8/8/1[MeCN/MeOH/H₂O]
 中, 然后通过使用 polytronic 滤板, 各自通过 96-孔碱性氧化铝垫
 板过滤。再次将溶剂减压蒸发(≤40℃), 并将残渣稀释在 DMSO 中, 以

便于贮存和测试。

完全脱保护的单肽和二肽衍生物也分别用 DMF 中的各种羧酸 (1.1 当量) 与乙基二异丙基胺封端, 借助带有或不带有 HOBT 的碳化二亚胺, 或通过 HBTU 辅助法进行。

5

实施例 2

缩写

	Gal	D-半乳糖
	GalNAc	D-N-乙酰半乳糖胺
	GlcNAc	D-N-乙酰葡萄糖胺
10	FCS	胎牛血清
	T	转移酶

开发固相糖基转移酶测定法用于筛选药物。糖基转移酶催化糖核苷酸供给的单糖和特异的低聚糖受体之间形成配糖键。以核 2GlcNAc-T 为例说明该固相测定法, 并且也适合于其他糖基转移酶。该测定法采用与涂敷于塑料板上的聚合物连接的多价低聚糖受体, 因此不需要进行产物的色谱分离。

材料和方法

化学物质: 按 Mammen 等人 (Mammen 等人, 《医药化学杂志》, 38, 4179-4190, 1995) 所述方法制备粘均分子量 M_v 为 42.1kDa (DP 约 250) 的聚 [N-(丙烯酰氧基)琥珀酰亚胺] (pNAS) (1. 图 9)。按 Roy 和 Tropper (R. Roy 和 F. D. Tropper, 《化学会志化学通报》1058 (1988); 《配糖共轭物》5:203 (1988)) 所述方法, 由相应的烯丙基糖甙制备二糖 Gal β 1-3GalNAc α -O(CH₂)₃S(CH₂)₂NH₂ (2) (核 2GlcNAc-T 受体) 和 [GlcNAc(β 1-2)Man(β 1-6)Glc(β -O(CH₂)₃S(CH₂)NH₂)]. 从 Toronto Research Chemical 公司 (Toronto, Canada) 购得 Gal β 1-3GalNAc α -pNp 和 GalNAc α -聚合物 UDP-6-[³H]-N-乙酰基葡萄糖胺 (16.0Ci/mmol), 而未标记的 UDP-6- N-乙酰基葡萄糖胺从 Sigma Chemical 购得。

糖聚合物的合成: 首先在室温下用 DMSO 中的有胺末端的 T-抗原的二糖 2 处理聚 [N-(丙烯酰氧基)琥珀酰亚胺] (1) (16h), 来提供每 10 个 N-取代的丙烯酰胺残基含有一个糖残基的核共聚物。然后在室温下用过剩伯胺 (氨、甲胺、乙胺或丙胺) 处理含活性酯的聚合物 3 小

时，以获得四种不同的共聚物 3-6，它们具有相同的共聚单体配比，但共聚物主链亲油性有差别。用水作洗脱剂通过 BioGel P-10 分子量排阻色谱纯化该糖聚合物。另外，用甲基丙烯酰氯处理二糖 2，并将所得单体与甲基丙烯酰胺共聚，提供共聚物 8，同时丙烯基糖甙前体 2 与丙烯酰胺直接共聚得到共聚物 10。使用相同的策略，用相同的核 pNAS1 和 10:1 的丙烯酰胺:糖摩尔比制备 GlcNAc-T V 的共聚物受体 11-14(图 10)。

重组的核 2 GlcNAc-T: 通过 PCR 制备截短形式的核 2 GlcNAc-T cDNA，其中从 N-末端的 37 号氨基酸缺失。在读框中将截短的 cDNA 克隆到 pPROTA 载体 (Sanchez-Lopez 等人, J. Biol. Chem. 263, 11892-11899, 1988) 作为分泌蛋白 A 嵌合蛋白表达。使用磷酸钙法，将 10:1 摩尔比的表达载体和 pSV2neo. 共同转染到 CHO 细胞中。在 800 μ g/ml 的 G418 存在下培养细胞，并选择耐受的细胞系在培养介质中试验核 2 GlcNAc-T 的活性。代表性的克隆 614C2 显示核 2 GlcNAc-T 活性物稳定表达，并被选择用于酶的产生。将细胞按常规方法在含有 5% 胎牛血清和 G418 (0.2mg/ml) 的 MEM 介质中繁殖。加入 IgG-Sepharose Fast FlowTM 珠 (Pharmacia Biotech)，其比例为每 ml 培养介质 5 μ l 50% 珠浆、2.5 μ l 2M Tris•HCl pH8.0 和 5 μ l 10% 吐温-20。在振动平台上于 4 $^{\circ}$ C 下培养 20 小时后，通过离心收集该珠粒，用 10 倍体积的 TST 缓冲液 (50mM Tris•HCl pH8.0、150mM NaCl、0.05% 吐温-20) 和 2 倍体积的 5mM NH₄Ac pH5.0 洗涤。然后用 1 倍体积的 0.5M 乙酸 pH3.4 洗脱重组 ProtA-核 2 GlcNAc-T 酶，并悬浮在 3 倍体积的 0.5M MES pH7.5 (Calbiochem) 中。1 μ U 的酶活性被定义为形成 1pmol/分钟反应产物的蛋白质的量。

固相核 2 GlcNAc-T 的测定: 通过重新悬浮受体在水中来将核 2 受体糖聚合物 3 的储备溶液制成 1.25mg/ml 的浓度，并在 60 $^{\circ}$ C 温度下培养 1 小时。在该段时间内以 15 分钟的间隔轻轻混合溶液，以使聚合物解开并使其充分溶解。糖聚合物溶液不被涡流，因为强烈的搅拌会使聚合物主链剪切。加入叠氮化钠 (0.05%) 作为防腐剂，并在室温下储存糖聚合物的储备溶液。在所有的固相测定中都使用 Wallac 96-孔 Printed Rigid Sample Plate (1450-511; Wallac, FI)。为了制备用受体涂敷的板，用 100 μ l 的甲醇洗涤各孔，然后用 200 μ l



水漂洗。使板在室温下干燥后，通过加入 60 μ l 的 33.3 μ g/ml 的糖聚合物溶液来使受体涂敷各孔，并在室温下培养过夜。培养后，用 200 μ l 水洗涤 3 次来除去未结合的糖聚合物，并在 37 $^{\circ}$ C (或室温)下将板培养大约 1 小时来使各孔中剩余的液体蒸发。干燥涂敷的板，可立即使用或密封并储存，以备日后使用。

HTS 核 2 GlcNAc-T 测定中，96 孔板中每个反应物由 20 μ l 试验化合物、20 μ l 由 90mM MES pH6.7, 10mM EDTA(Sigma), 0.0075mM UDP-GlcNAc(Sigma) 和 0.1 μ Ci 的 UDP-[3 H] GlcNAc (16Ci/mmol; Toronto Research Chemical)组成的 3 \times 测定缓冲液和 20 μ l 的重组核 2 GlcNAc-T(含 8-10 μ U/ μ l)组成。为了最大限度地减小吸移，通常将酶和 3 \times 缓冲液合并，并在加入试验化合物后，将 40 μ l 的酶-缓冲液混合物加到孔中。将板在 25 $^{\circ}$ C 温度下培养 60 分钟后，通过在每孔中加入 175 μ l 水使反应停止，抽吸内容物并用 190 μ l 水洗涤 4 次，在每个孔中加入 100 μ l OptiPhase Supermix 闪烁混合物(Walllac)，并培养>2 小时使其混合，用 MicroBeta 板计数器(Wallac, FI)测量放射性的信号。HTS 中的每个板有 4 个对照样，其中加入载体而不加试验提取物，每个板也有 4 个孔不加酶来确定本底。每个板减去本底，并且 HTS 结果表示为板上对照样反应的百分数。使用 Biomek 200 移液装置和 Zymark 旋转自动臂在 Beckman 整合自动平台上进行 HTS 测定。PanLabs(Seattle, WA)用于收集 96 孔板中的 30000 细菌和真菌提取物。干燥的提取物再悬浮在 DMSO 中并在水中稀释，对于核 2 GlcNAc-T HTS 来说 DMSO 为 0.15%。

溶液相核 2 GlcNAc-T 测定：核 2 GlcNAc-T 溶液相测定混合物类似于早期研究中使用的(Yousefi 等人，《生物化学杂志》. 266:1772-1783, 1991; Williams 等人，《生物化学杂志》255:11253-11261, 1980)但适于在 Beckman 自动平台上自动进行。对于 HTS 测定，在滴定板的孔中加入 10 μ l 试验提取物、10 μ l 3 \times 测定缓冲液(90mM MES pH6.7, 10mM EDTA), 3mM Gal β 1-3GalNAc α -pNp 作为受体，3mM UDP-GlcNAc(Sigma)和 0.1 μ Ci 的 UDP-[3 H] GlcNAc (16Ci/mmol; Toronto Research Chemical)) 和 10 μ l 重组核 2 GlcNAc-T 酶(4-5 μ U 活性)。总体积 30 μ l 的反应物在 37 $^{\circ}$ C 温度下培养 1-2 小时，并加入 200 μ l 冷水停止反应。立即制板或者在-20 $^{\circ}$ C 温度

下储存。为了回收产品，将测定的混合物抽吸通过 C18 装填的吸管嘴 (BGBS96C18 Biotips™, National Scientific)，并将装填物用 200μl 水洗涤 3 次。用 100μl 100% 乙醇洗涤 C18 装填物来将结合的产品洗脱到 β-闪烁计数板 (Wallac 96-孔 Printed Rigid Sample Plate; 1450-511) 中。然后在室温下将洗脱液干燥过夜，以除去乙醇并在加入计数液后在 β-闪烁计数器中计数放射信号。发现反应产物在长达 2 小时的培养中以线性方式累积。清洗 C18 填充的嘴，此后用 200μl 乙醇、并用 100μl 水 3 次依次洗涤来使之再生。

结果

10 固相糖基转移酶测定中的糖聚合物：按常规方式在溶液核 2 GlcNAc-T 测定中使用 R 为辛基甲基或对硝基苯基的二糖受体 Galβ1-3GalNAcα-R，测定中 UDP-[³H] GlcNAc 是糖-核苷酸供体。产物 Galβ1-3([³H] GlcNAcβ1-6)GalNAcα-R 在 C18 固体载体上截留，用乙醇洗涤，并在 β-计数器中测量 (Yousefi 等人, J. Biol. Chem. 15 266:1772-1783, 1991)。该方法已被小型化和自动化，但与高效 (HTS) ELISA-式测定相比仍较慢。通过化学合成来制备具有 Galβ1-3GalNAcα-基团的糖聚合物，并与重组 ProtA-核 2 GlcNAc-T 反应，来建立固相糖基转移酶测定的条件。在固相糖基转移酶测定中使用的水溶性糖聚合物受体 (图 9 中 3-8, 10 和 11-14) 是多价底物，该底物 20 由 N-取代的聚丙烯酰胺主链组成，每 10 个丙烯酰胺主链单体含有一个二糖 Galβ1-3GalNAcα-0(CH₂)₃S(CH₂)₂(2) 或三糖 [GlcNAc(β1-2)]Man(β1-6)Glc(β-0(CH₂)₃S(CH₂)) 残基。以用氨水单独处理由 1 衍生的聚丙烯酰胺为基础来确定，该核聚合物的粘均分子量 M_v 是 42.1kDa。用高场 ¹H-NMR 谱确定糖与丙烯酰胺的比例为 1:10，并且 25 以酶-连接凝集素测定 (ELLA) 中使用类似糖聚合物的以前最佳实验为基础 (Roy, Trends in Glycoscience and Glycotech. 8:79-99 1996)。用各种烷基胺修饰共聚物主链来增强其亲油性，并且因此增加其与聚苯乙烯微滴定板表面的吸附性。

30 共聚物 6 和 14 (具有最亲油的 N-丙基丙烯酰胺主链) 比 N-乙基 (5, 13) 或丙烯酰胺 (3, 11) 共聚物敏感大约 8 倍，而共聚物 4 和 12 (有 N-甲基取代基) 是最无效的涂敷受体。也发现共聚物 10 (含有较短的烯丙基间隔基) 不适于酶的糖基化，可能因为酶活性部位中 GalNAc 残基

的隐蔽性。类似地，共聚物 7 共聚生物素或 8(共聚丙烯酰胺)产生不良涂敷或弱的酶糖基化。含有生物素的共聚物 7 最初设计为由链霉抗生物素蛋白/抗生物素蛋白预涂敷俘获后用作涂敷底物。糖聚合物 6(具有最亲油的 N-丙基丙烯酰胺主链) 比 N-乙基(5)或丙烯酰胺(3) 5 糖聚合物敏感大约 8 倍, 而糖聚合物 4(有 N-甲基取代基)是涂敷效果最低的受体。

用糖聚合物涂敷的塑料孔: 在开发固相测定的早期, 用不同批号的塑料板观察各种不同结果。试验了许多预洗溶液改善核 2 GlcNAc-T 反应的一致性能力。用有机溶剂预洗塑料板改善信号 2-4 倍并消除不同批号板之间的可变性。用非离子洗涤剂洗涤降低反应的效率。基于 10 这些结果, 用甲醇按常规方式将 96 孔塑料板洗涤两次, 然后用水洗涤两次, 并在用糖聚合物 3 涂敷前贮存干燥。在具有自动臂的 Beckman200 工作站上洗涤塑料板。确定用糖聚合物涂敷孔的时间和温度之间的依赖关系并且确定用 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 在 20°C 下涂敷过夜是最佳的。确定糖聚合物 3 是过量的, 因为随后用回收的聚合物溶液涂敷各孔, 并产生第一次涂敷所产生反应产物的 80-90%。然而, 按常规方式糖聚合物溶液仅仅使用一次。

核 2 GlcNAc-T 固相测定的特征: 在起初的实验中, 以 $2\mu\text{l}/\text{孔}$ 糖聚合物受体 3 溶液涂敷 96 孔板, 并且观察到反应产物在 60 分钟内与 20 加入的酶是成比例的。然而, 在溶液测定中使用 ProtA 核 2 GlcNAc-T, 确定 UDP-GlcNAc 和受体的 K_m 分别是 1.75mM 和 $146\mu\text{M}$ 。相反地, 固相糖基转移酶反应条件采用大大低于 K_m 浓度的底物, 因为与塑料结合的糖聚合物 3 的量是有限的。所以, 将糖-核苷酸浓度调节到最佳检测放射产物的程度, 并且也低于 K_m 浓度。为了使 60 分钟 25 钟期间反应底物不被耗竭, 在 37°C 下进行并滴定 UDP-GlcNAc。UDP-GlcNAc 在较高浓度时, 反应在少于 5 分钟的时间内进行完全。然而, $2.5\mu\text{M}$ 的 UDP-GlcNAc 和 $200\mu\text{U}$ 的酶活性下, 核 2 GlcNAc-T 反应产物在 30-60 分钟内以时间依赖性方式积累。每孔形成的最多产物是 6-10pmole, 并且在反应中若使用 $2.5\mu\text{M}$ 的 UDP-GlcNAc 时, 表明糖-核苷酸 30 供体的利用率大约为 4%。为了简化 HTS 的方法, 进一步在室温(大约 20°C)下试验这些条件($2.5\mu\text{M}$ UDP-GlcNAc 和 $200\mu\text{U}$ 酶)。在这些条件下, 发现产物的积聚在大约 60 分钟的时间内是线性的, 并

因此可在室温下按常规方法进行 HTS 测定。

也使用重组酶制备和试验 GlcNAc-TV 的糖聚合物受体 (图 10)。类似于核 2GlcNAc-T, 糖聚合物 14 (具有最亲油的 N-丙基丙烯酰胺主链) 观察到的情况, 比 N-乙基 (13) 或丙烯酰胺 (11) 糖聚合物更有效。糖聚合物 12 (有 N-甲基取代基连接基) 是最低效率的涂敷受体。使用糖聚合物 14 的 GlcNAc-TV 反应产物以时间和酶依赖性方式积聚。

微生物提取物的核 2GlcNAc-T 高效筛选 (HTS): 使用核 2GlcNAc-T 固相测定法来对 30000 提取物的微生物库进行 HTS, 作为初筛 (即糖聚合物 3)。一般进行 1600 次测定的标准化结果显示在图 11 中。信噪比是 20 倍, 并且阳性对照的 CV 是 $\pm 9.4\%$ 测定。将一系列 48 个选中的提取物 (选自总的初筛数据, 即 $>50\%$ 的抑制作用) 和 88 个其他无活性提取物置于板上, 并使用固相和溶液的核 2GlcNAc-T 测定法重新试验 5 个点稀释系列。94.4% (17/18) 在溶液测定中鉴定选中的在固相测定中也被选中。观察了固相测定中另外 3 个具有良好效果和 8 个未得出结论的滴定结果。可将核 2GlcNAc-T HTS 鉴定的活性提取物进行分馏, 以便以细胞培养和疾病的动物模型进一步试验来鉴定该活性分子。

讨论

用重组核 2GlcNAc-T 使固相糖基转移酶测定最佳化。用 GlcNAc-TV 和 GlcNAc-TI 的糖聚合物受体也试验了该测定方法, 并显示对于其他糖基转移酶来说是可以接受的。在微生物提取物库的 HTS 中使用固相核 2GlcNAc-T 测定法, 并确定活性提取物在固相和常规的溶液测定中具有高度的一致性。固相测定法与溶液相测定相比效率提高 5-6 倍, 每天的测定速度是 7500 个。

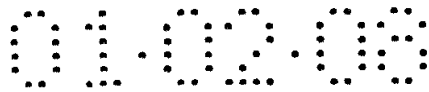
在溶液测定中, 30000 微生物提取物的核 2GlcNAc-T HTS 以 1.5% 频率选中。也使用固相测定筛选库中的三分之一, 并且与前面溶液测定所得结果高度一致。

实施例 3

高效 L-PHA 测定法

30 材料和方法

化学物质: 从 Sigma 获得 L-PHA、Triton X-100 和对硝基苯基磷酸酯; 从 Fisher 购得二乙醇胺。



细胞: DBA-2 菌株淋巴网状肿瘤 MDAY-D2 的来源和特性已有描述 (Kerbel, RS. Florian. M. Man. MS. Dennis. J 和 McKenzie IF (1980) J. Natl. Cancer Inst., 64. 1221-1230)。细胞在含有 2% 加热失活的胎牛血清 (Gibo BRL) 的 α -改性 Eagle's 介质中, 于 37°C 和 95 % O₂/5% CO₂ 湿润的环境下培养。

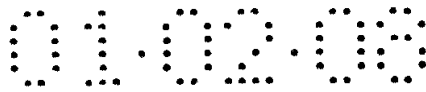
碱性磷酸酯酶测定: 使用 96 孔板进行测定。含有不同数目 MDAY-D2 细胞的各孔维持在 125 μ l 补充有 2% 胎牛血清的培养介质中。加入 75 μ l 测定混合物 (1M 二乙醇胺缓冲液, pH 9.8、2mM MgCl₂、1% Triton X-100 和 2.5mM 对硝基苯基磷酸酯) 来引发碱性磷酸酯酶反应并在 37°C 下保温直到 90 分钟。用 80 μ l 的 3.5M 氢氧化钠使反应停止。显色 15-30 分钟后, 使用多孔扫描光度计 (Thermomax Multiplate Reader, Molecular Devicies) 在 405nm 处测量色物对硝基苯酚的吸收度。在不存在细胞只有培养介质下进行测定来确定本底值并按常规减去。405nm 处的吸收度和对硝基苯酚浓度之间的线性关系是在 0-2.5 范围内 ($\epsilon=17.23\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。

通过 L-PHA 测定来筛选: 该过程通过使用能够同时进行 9 个 96 孔板测定的自动化工作站 (Biomek2000, Beckman) 完全自动化操作。在平底 96 孔板中进行测定 (每板中 88 个样品和 8 个对对照样)。每孔 (1-11 列) 加入 10 μ l 化合物 (在 2.5%DMSO), 而第 12 列中加入 10 μ l 2.5%DMSO 的水溶液。全部 96 个孔中加入 90 μ l 的培养介质中的 5×10^3 个 MDAY-D2 细胞, 培养介质中补充有 2% 的 FCS。在 37°C 温度下培养 16-20 小时后, 将 25 μ l L-PHA (100 μ g/ml 在培养介质中) 加到前 11 列和第 12 列的 4 个孔 (阳性对对照样) 中。其他 4 个孔中加入 25 μ l 补充有 2% FCS 的介质 (阴性对对照样)。测定板在 37°C 下保持 30-36 小时, 并按使用 1 小时培养时间的上述方法测量碱性磷酸酯酶的活性。在整个测定过程中细胞密度是次融合的。增殖指数以百分数值表示, 按下式计算:

$$\text{标准化信号} = (\text{样品的 } A_{405} - \text{阳性对照的平均 } A_{405}) / (\text{阴性对照的平均 } A_{405} - \text{阳性对照的平均 } A_{405})$$

30 结果

在同质筛选测定中, 不用洗涤或从测定板中转移靶蛋白或细胞、反应物和试验化合物而获得测定结果。同质测定法节省测定时间并很



少手工操作，观察误差低。这说明大量筛选中对假定选中的继续测定次数较少。开发以同质细胞为基础的测定法，以便使用内源性碱性磷酸酯酶活性测量细胞生长和易变性。

5 在组织培养物中，维持对数生长期的 MDAY-D2 肿瘤细胞以 40-80nmol/h/10 细胞的范围显示碱性磷酸酯酶活性。在至少 90 分钟的时间内，碱性磷酸酯酶测量是线性的，并且与细胞数直接成比例，允许检测 1500 个细胞。经碱性磷酸酯酶活性累积计算的 MDAY-D2 加倍时间是约 14 小时，类似于通过细胞计数测量的。该碱性磷酸酯酶测定在再现性和敏感性方面与商用化学发光分析法相类似。

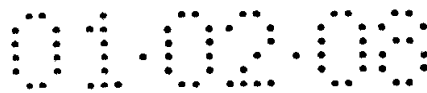
10 在 MDAY-D2 全细胞测定中测量的碱性磷酸酯酶的表观 K_m 为 0.86mM，而在胎牛血清中存在下由可溶性酶显示的值为 0.21mM。在含有 2% FCS 的培养介质中存在的本底活性在培养 1 小时后产生 0.2 的 A_{405} ，并代表大约标准测定条件 10% 的信号。

15 八氢吡嗪三醇封闭的 α -甘露糖苷酶 II，作为复合型 N-低聚糖生物合成抑制剂起作用，导致对 L-PHA 凝集素毒性的抗性。八氢吡嗪三醇保护 MDAY-D2 细胞免受 L-PHA 毒性， IC_{50} 值 $0.0528 \pm 0.0087 \mu M$ ($n=8$)。以前使用胸腺嘧啶核甙结合按细胞生长测量报导的 IC_{50} 值为 $0.2 \mu M$ (Dennis 等人, 1993, 《生物化学及药理学》，46, 1459-1466)。

20 碱性磷酸酯酶细胞测定用于高效筛选微生物提取物库。信噪比 (即 L-PHA 处理的/对照 MDAY-D2 细胞的生长) 是 5，并且阴性和阳性对照样品的变异系数分别是 4.2% 和 2.4%。30000 个样品的 20 个微生物提取物使 L-PHA 存在下细胞的存活率增加到超过平均值 $3 \times SD$ 的程度。落在标准化分布的右侧 (图 12)。再进行试验时，进一步分级
25 确定 20 个提取物中有 4 个选中。很多提取物抑制生长作用低于 L-PHA 存在下观察的结果 (即落在标准化分布的左侧)。这似乎含具有一般毒性的化合物并且不是我们感兴趣的。

讨论

30 通过采用碱性磷酸酯酶活性测定法来检测 MDAY-D2 细胞的增殖速度。该研究的动机是建立简单、可再现和有价值的方法来用于借助 L-PHA 测定进行的高效筛选。发现进行磷酸酯酶活性比色测定适于测量淋巴因子依赖性的 B 细胞增殖 (Hashimoto N 和 Zubler RH (1986))



《免疫法杂志》90, 97-103); 本文所述方法的优点是该方法可以一步法进行, 不用移出培养介质或细胞沉淀和洗涤, 因此可采用完全自动化的方法。而且, 使用自动化平台可同时测定 36 个 96 孔板。该方法是非常有价值的, 特别是与其他商用测定试剂盒相比时, 更有效。

5 基于下面几方面的观察来确定碱性磷酸酯酶法的灵敏度和精确度: i) MDAY-D2 细胞表达较高水平的酶, 然而胎牛血清(2%)中的本底活性较低; ii) 发现 A_{405} 的读数与反应产物的浓度成比例; iii) 在长达 1.5 小时的较宽间隔内, 反应与时间呈线性关系; 和 iv) MDAY-D2 细胞的数目(未处理的和 L-PHA 处理的)在较宽的范围内(即 1×10^3 到
10 2.5×10^5 个细胞)与酶活性相关。测定使用 1mM 底物(最终浓度)、 K_m 相差 4 倍以上血清酶(即 0.21mM)和类似倍数的细胞酶(即 0.86mM)来进行。由于 K_m 值有 4 倍的差别, 可通过增加底物浓度到 1mM 以上来扩大信号与本底的比。

通过一些指标证明测定是可靠的。例如, 八氢吡嗪三醇(一种已
15 知的 N 连接低聚糖加工抑制剂)与 L-PHA/碱性磷酸酯酶测定法结合使用时, 药物的 IC_{50} 与以前使用胸腺嘧啶核贰结合测量细胞生长所报导的结果非常相似。另外, 细胞增殖测量结果与使用另一单一步骤、即商用化学发光分析试剂盒所获得的结果相应。最后, 筛选提取物库期间(30000 样品), 碱性磷酸酯酶活性的对对照测量($n=3200$)显示变
20 异系数明显低。

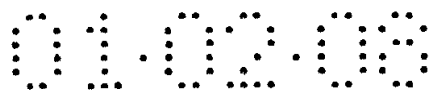
尽管参考目前认为是优选的实施例描述了本发明, 但应明确, 本发明并不限于所公开的实施例。相反地, 本发明应覆盖包括在所附权利要求的精神和范围之中的各种修改和等效方案。

所有出版物、专利和专利申请的全部内容均引入本文供参考, 其
25 引用范围等同于各公开物、专利或专利申请具体而分别表示的引用参考范围。

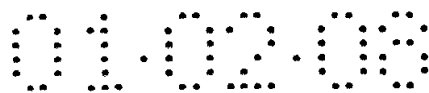


表 1

酶	供体	受体
糖蛋白-岩藻糖基半乳糖苷 α -N-乙酰基氨基半乳糖转移酶 (EC2.4.1.40)	UDP D-GalNAc	糖蛋白 α -L 岩藻糖基-(1,2)-D-半乳糖
(N-乙酰基神经氨基)-半乳糖基葡糖神经酰胺 N-乙酰基氨基半乳糖转移酶 (EC2.4.1.92)	UDP D-GalNAc	(N-乙酰基神经氨基)D-半乳糖基-D-葡糖基神经酰胺
β -1,4-N-乙酰基氨基半乳糖转移酶 (鼠 T-淋巴细胞 CT 抗原合成) (SwissProt Q09199)	UDP D-GalNAc	(N-乙酰基神经氨基)D-半乳糖基-D-R
N-乙酰基氨基乳糖苷 α -1,3-半乳糖转移酶 (半乳糖基转移酶) (EC2.4.1.151)	UDP D-Gal	β -D-半乳糖基 (1,4)N-乙酰基-D-氨基葡糖基-R
糖蛋白-岩藻糖基半乳糖苷- α -半乳糖转移酶 (EC2.4.1.37)	UDP D-Gal	糖蛋白- α -L-岩藻糖基 (1,2)-D-半乳糖
N-乙酰基乳糖胺合酶 (EC2.4.1.90)	UDP -Gal	N-乙酰基-D-葡糖胺
2-羟基酰基鞘氨醇 1-半乳糖转移酶 2- (EC2.4.1.45)	UDP -Gal	2-(2-羟基酰基)鞘氨醇
UDP-半乳糖-葡萄糖半乳糖转移酶 N 乙酰基乳糖胺合酶	UDP D-Gal	D-葡萄糖
岩藻糖基糖蛋白 α -N-乙酰基氨基半乳糖转移酶	UDP-D-GalNAc	糖蛋白 α -L-岩藻糖基-(1,2)-D-半乳糖
半乳糖苷-2-L-岩藻糖转移酶 (EC2.4.1.69)	GDP-L-岩藻糖	β -D-半乳糖基-R



半乳糖苷 3(4)-L 岩藻糖转移酶 (EC2.4.1.65); 岩藻糖转移酶 6 (SWISS PROT P51993); 岩藻糖转移酶 5 (SWISS PROT Q11128)	GDP-L-岩藻糖	1,3-β-D-半乳糖基 N-乙酰基-D-氨基葡萄糖基-R
α-1,3-甘露糖基-糖蛋白 β-1,2-N-乙酰基氨基葡萄糖转移酶 (GnT I) (EC 2.4.1.101)	UDP-D-GlcNAc	α-D-甘露糖基-1,3(R1)-β-D-甘露糖基-R2
α-1,6-甘露糖基-糖蛋白 β-1,2-N-乙酰基氨基葡萄糖转移酶 (GnT II) (EC 2.4.1.143)	UDP-D-GlcNAc	α-D-甘露糖基-1,6(N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖基-1,2-α-D-(甘露糖基-1,3-))β-D-甘露糖基-R
α-1,3(6)-甘露糖基-糖蛋白 β-1,6-N-乙酰基氨基葡萄糖转移酶 (EC 2.4.1.155) (GnT V)	UDP-D-GlcNAc	N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖基-1,2-α-D-甘露糖基-1,3(6)-(N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖基-1,2-α-D-甘露糖基-1,6(3)-βD-甘露糖基-1,4-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖基-R
多肽-N-乙酰基氨基半乳糖转移酶 (EC 2.4.1.41)	UDP-D-GalNAc	多肽
β-1,4-甘露糖基-糖蛋白 β-1,4-N-乙酰基氨基葡萄糖转移酶 (GnT III) (EC 2.4.1.144)	UDP-D-GlcNAc	N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖基-1,2-α-D-甘露糖基-1,3-(N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖基-1,2-α-D-甘露糖基-1,6)-β-D-甘露糖基-1,4-N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖基-R
壳多糖合酶 (EC2.4.1.16)	UDP-D-GlcNAc	{(1,4)-(N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖基)}(N)



β-1, 3-半乳糖基-O-糖基糖蛋白 β-1, 6-N-乙酰基氨基葡萄糖转移酶 (EC2. 4. 1. 102) (β-1, 6(O-连接, 核 2))	UDP-D-GlcNAc	β-D-半乳糖基-1, 3-N-乙酰基-D-氨基半乳糖基-R
UDP-N-乙酰基葡萄糖胺-多萜基-磷酸 N-乙酰基-葡萄糖胺磷酸转移酶 (EC2. 7. 8. 15)	UDP-D-GlcNAc	多萜基-磷酸盐
半乳糖苷 3-岩藻糖转移酶 (EC2. 4. 1. 152)	GDP-L-岩藻糖	1, 4-β-D-半乳糖基-N-乙酰基-D-氨基葡萄糖基-R
岩藻糖转移酶 7 (SWISS PROT Q 11130)	GDP-L-岩藻糖	α-2, 3-Neu-N-乙酰基-1, 4-β-D-半乳糖基-N-乙酰基-D-氨基葡萄糖基-R

表 2

3-去氧-D-甘露-辛酮糖酸 (KDO) 转移酶

肺炎衣原体 KDO 转移酶 gb:z31593

5 鸚鵡热衣原体 KDO 转移酶 gb:x80061

鸚鵡热衣原体 gseA 转移酶 gb:x69476

砂眼衣原体 KDO 转移酶 gb:m64618

砂眼衣原体 gseA 转移酶 gb: z22653 gb: z22654 gb: z22655

gb: z22656 gb: z22659

10 大肠杆菌 kdtA gb:m60670 gb:m86305 gb:u00039 sw:p23282 (kdtA_ecoli)

流感杆菌 kdtA gb:145293 gb:u32748 sw:p44806(kdtA_haein)

O-抗原 Gal-2-岩藻糖基转移酶

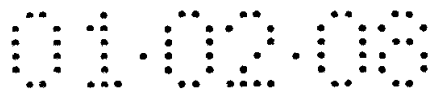
小肠结肠炎耶尔森氏菌属岩藻糖基转移酶基因 gb:u18647

15 gb:u25113 gb:u46859

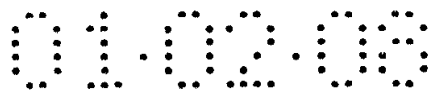
cld(链长度测定)(类似于推定的十一异戊二烯基-P-GlcNAc 转移酶)

大肠杆菌 cld1 gb:z17241 sw:q05032(cld1_ecoli)

大肠杆菌 cld2 gb:m89934 sw:p35272(cld2_ecoli)



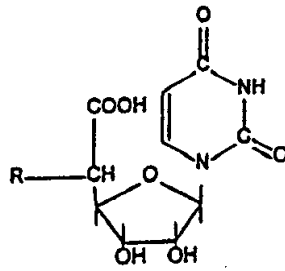
- 鼠伤寒杆菌 cld gb:z17278 sw:q04866(cld_salty)
费氏志贺菌 cld gb:x71970 sw:p37792(cld_shif1)
cpsD 半乳糖基转移酶
无乳链球菌 cps D 基因 gb:109116
- 5 IgtA 半乳糖基转移酶
豌豆根瘤菌 Allaway 等人(1996)未公开 gb:x94963
murG N-乙酰基氨基葡萄糖基转移酶
枯草芽孢杆菌 murG 基因 gb:s56399gb:x64259
mraY 磷基-N-乙酰基胞壁酰五肽合酶 EC2. 7. 8. 13
- 10 枯草芽孢杆菌 mraY 基因 gb:z15056sw:q03521(mray_bacsu)
大肠杆菌 mraY 基因 gb:x51584gb:55034gb:d10483sw:p15876
(mray_ecoli)
mtfA, mtfB, mtfC 甘露糖基转移酶
大肠杆菌 mtfA, mtfB, mtfC 基因 gb:d13231gb:d43637
- 15 neuS2, 8-唾液酸转移酶
大肠杆菌 neuS 基因 gb:x60598
nodC N-乙酰基氨基葡萄糖基转移酶
Azotorhizobium caulinodans gb:118897sw:q07740(nodc_azoca)
埃氏慢生根瘤菌 gb:u04609
- 20 rfaB1, 6-半乳糖基转移酶
大肠杆菌 rfaB 基因 gb:m80599gb:u00039sw:p27127(rfab_ecoli)
鼠伤寒沙门氏菌 rfaB 基因 gb:s56361sw:q06994(rfab_salty)
rfaC 庚酮糖基转移酶 1
大肠杆菌 rfaC 基因 gb:u0039sw:p24173(rfac_ecoli)
- 25 rfaG 葡糖基转移酶
大肠杆菌 rfaG 基因 sw:p25740(rfag_ecoli)
rfaI 1, 3-半乳糖基转移酶 EC2. 4. 1. 44
大肠杆菌 rfaI 基因 gb:m80599gb:u00039sw:p27128 (rfai_ecoli)
鼠伤寒沙门氏菌 rfaI 基因 gb:x53847sw:p19816(rfai_salty)
- 30 rfaJ 1, 2-葡糖基转移酶 EC2. 4. 1. 58
大肠杆菌 rfaJ 基因 sw:p27129(rfaj_ecoli)
鼠伤寒沙门氏菌 rfaJ 基因 sw:p19817(rfaj_salty)

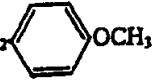
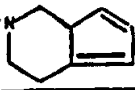
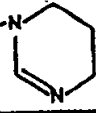

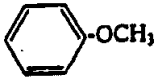
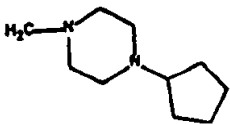

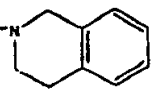


- rfaK 1,2-N-乙酰基氨基葡萄糖基转移酶 EC2.4.1.56
大肠杆菌 rfaI 基因 gb:u00039sw:p27242(rfai_ecoli)
- rfbF 半乳糖基转移酶
猪肠弯曲杆菌 rfbF 基因 gb:x91081
- 5 肺炎克雷伯氏菌 rfbF 基因 gb:131762gb:141518
- rfbN 鼠李糖基转移酶
鼠伤寒沙门氏菌 rfbN 基因 gb:x56793
- rfbP 半乳糖基转移酶
小肠结肠炎耶尔森氏菌 rfbP 基因 gb:u18674gb:u25113gb: u46859
- 10 肠沙门氏菌 rfbP 基因 gb:x61917
- rfbQ 鼠李糖基转移酶
肠沙门氏菌 rfbQ 基因 gb:x61917
- rfbU 甘露糖基转移酶
鼠伤寒沙门氏菌 rfbU 基因 gb:x56793sw:p26402(rfbu_salty)
- 15 rfbW 二级甘露糖基转移酶
肠沙门氏菌 rfbW 基因 gb:x61917
- rfbZ 一级甘露糖基转移酶
肠沙门氏菌 rfbZ 基因 gb:x61917
- rfe 十一异戊二烯基-P-GlcNAc 转移酶
- 20 大肠杆菌 rfe 基因 gb:s75640gb:m87049gb:m76129 sw:p24235
(rfe_ecoli)
麻疯霉菌 rfe 基因 gb:u15186sw:p45830(rfe_mycele)
- rffM 可能的 N-乙酰基-D-甘露糖胺糖醛酸转移酶
大肠杆菌 rffM 基因 gb:m87049sw:p27836(rffm_salty)
- 25 鼠伤寒沙门氏菌 rffM 基因 gb:m95047sw:p37457(rffm_salty)
- rffT 可能的 4-岩藻糖基转移酶
大肠杆菌 rffT 基因 gb:m87049sw:p27835(rfft_ecoli)
鼠伤寒沙门氏菌 rffT 基因 gb:m95047sw:p37458(rfft_salty)
- RhlAB 鼠李糖基转移酶
- 30 绿脓杆菌 rhlAB 基因 gb:128170
- N. 淋病的糖基转移酶基因座
Gotschlich 的美国专利 5703367

01.02.08

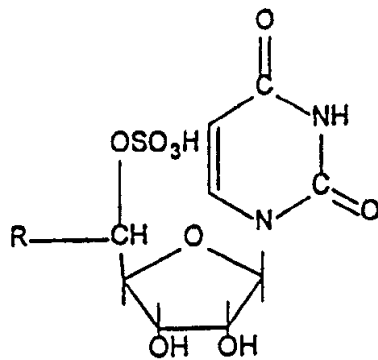
表 3



编号	R	R'	R''	R'''
A	-NHCOR ¹	-CHR ³ R ⁴	H	-(CH ₂) ₂ F
B	-NHCOR ¹	-CHR ³ R ⁴	H	-CH ₂ -  -OCH ₃
C	-NHCOR ¹	-CHR ³ R ⁴	H	-(CH ₂) ₂ - 
D	-NHCOR ¹	-CHR ³ R ⁴	H	-(CH ₂) ₂ - 
E	-NHCOR ¹	-CHR ³ R ⁴	H	-CH ₂ N(CH ₃)CH ₂ CH ₂ F
F	-NHCOR ¹	-CHR ³ R ⁴	-NH ₂	
G	-NHCOR ¹	-C(CH ₃)(NH ₂)CH ₂ -  -OCH ₃	-	-
H	-NHCOR ¹	-CHR ³ R ⁴	-NH ₂	
I	-NHCOR ¹	-CHR ³ R ⁴	-NH ₂	-CH ₂ N(CH ₃)CH ₂ CH ₂ F
J	-NHCOR ¹	-CHR ³ R ⁴	-NH ₂	-CH ₂ N(CH ₃)CO- 
U.	-NHCOR ¹	-CHR ³ R ⁴	H	-N(CH ₃)CH ₂ CH ₂ F
V	-NHCOR ¹	-CHR ³ R ⁴	H	-(CH ₂) ₂ - 

01.02.08

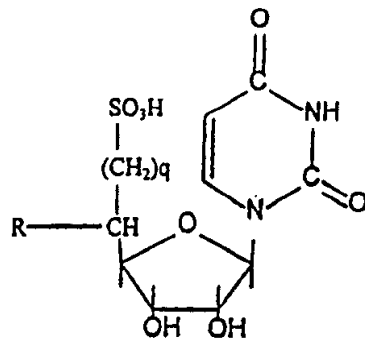
表 4



编号	R	R'	R''	R'''
K	-NHCOR ¹	-CHR ³ R ⁴	-NH ₂	
L	-NHCOR ¹	-CHR ³ R ⁴	-NH ₂	
M	-NHCOR ¹	-CHR ³ R ⁴	-NH ₂	
N	-NHCOR ¹	-CHR ³ R ⁴	-NH ₂	-CH ₂ N(C ₂ H ₅)CH ₂ CH(CH ₃)OH
O	-NHCOR ¹	-CHR ³ R ⁴	-NH ₂	-CH ₂ NHCOCH(CH ₃) ₂

01.02.08

表 5



q = 0 or 1

编号	R	R'	R''	R ^a
P	-NHCOR ¹	-CHR ¹ R ⁴	-NH ₂	
Q	-NHCOR ¹	-CHR ¹ R ⁴	-NH ₂	
R	-NHCOR ¹	-CHR ¹ R ⁴	-NH ₂	
S	-NHCOR ¹	-CHR ¹ R ⁴	-NH ₂	-CH ₂ N(C ₂ H ₅)CH ₂ CH(CH ₃)OH
T	-NHCOR ¹	-CHR ¹ R ⁴	-NH ₂	-CH ₂ NHCOCH(CH ₃) ₂

01.02.08

说明书附图

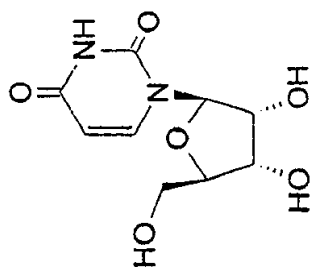
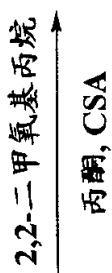
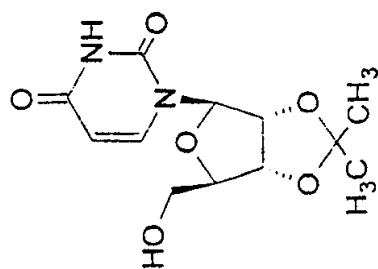


图 1

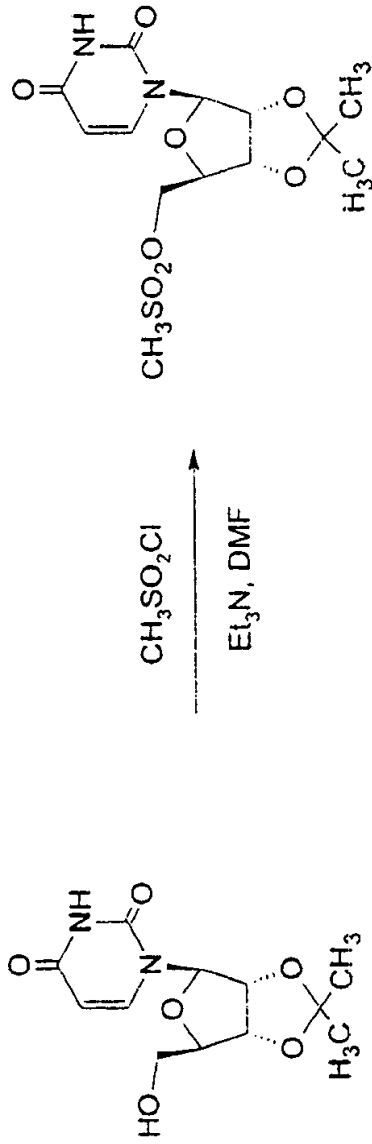


图 2

010908

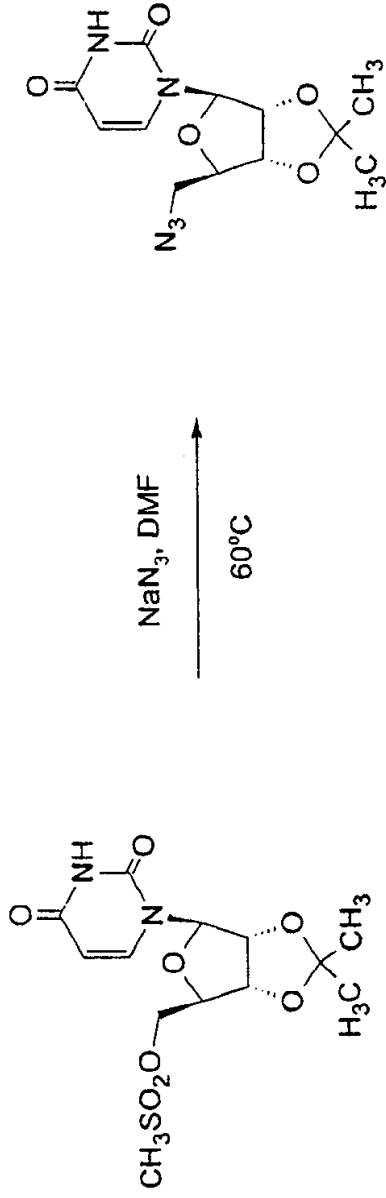


图 3

01.02.08

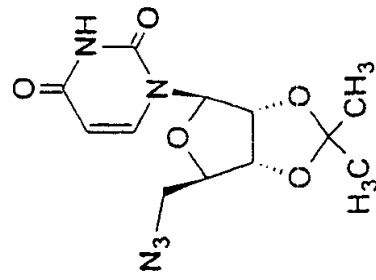
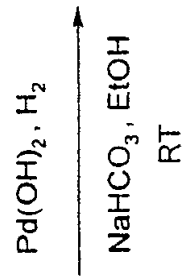
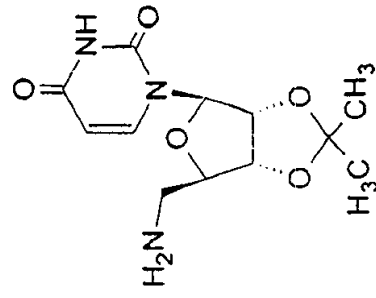


图 4

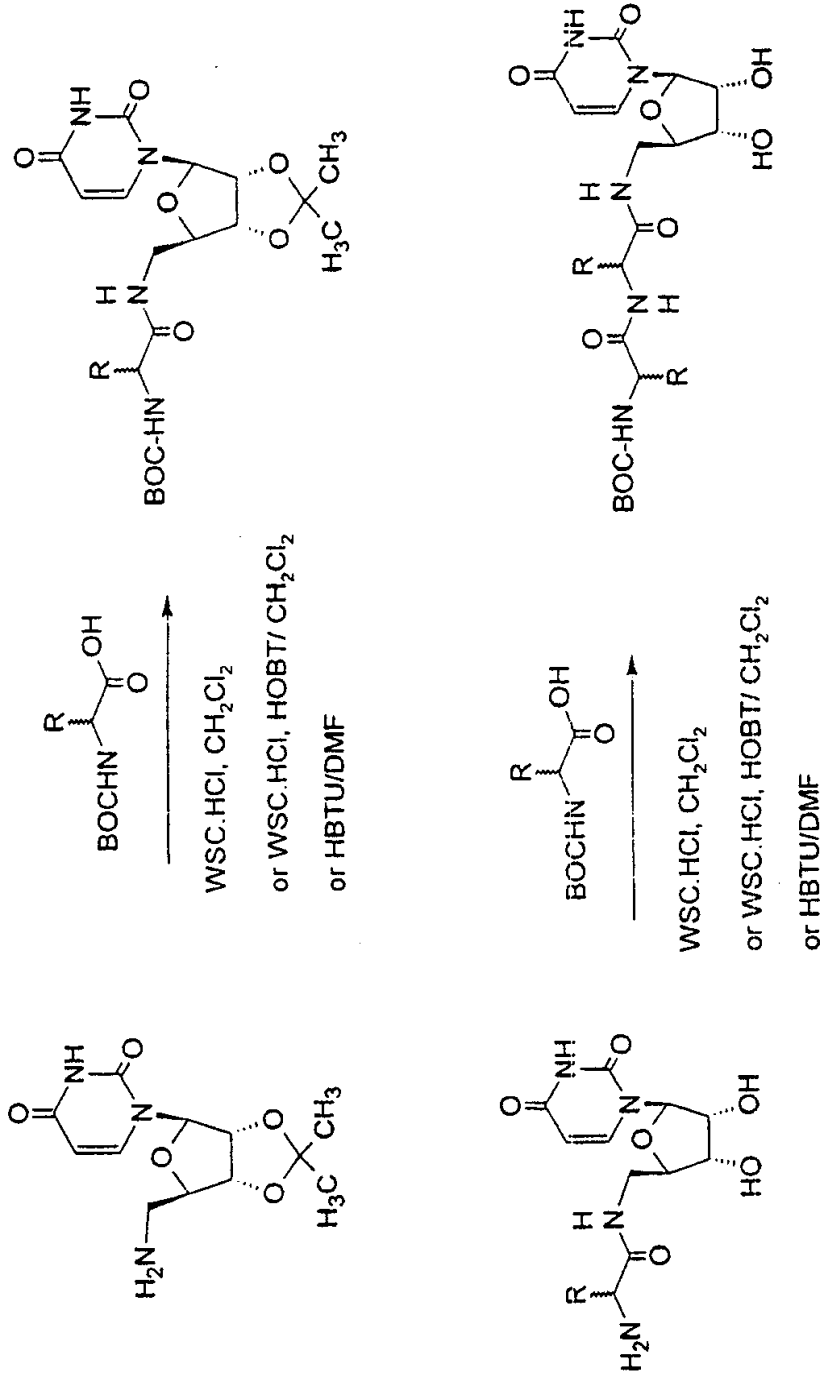


图 5

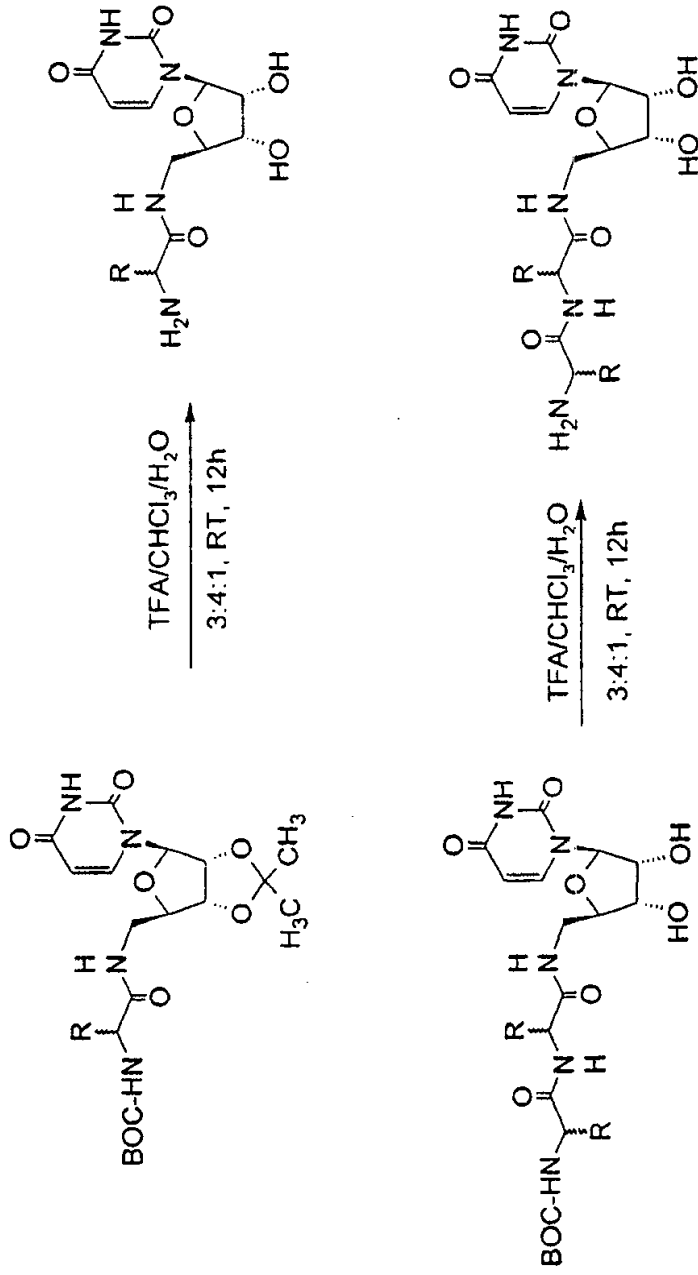


图 6

01.02.08

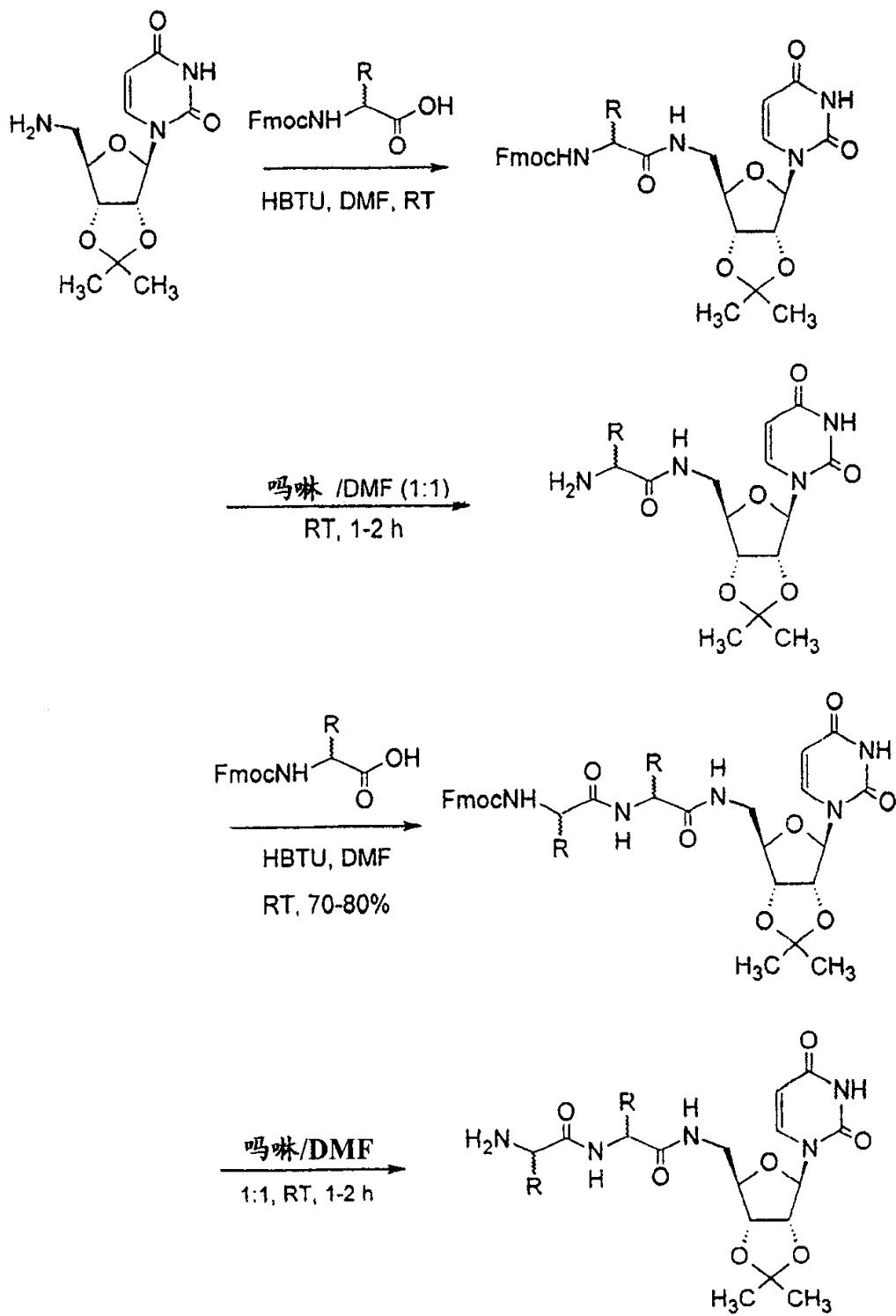


图 7

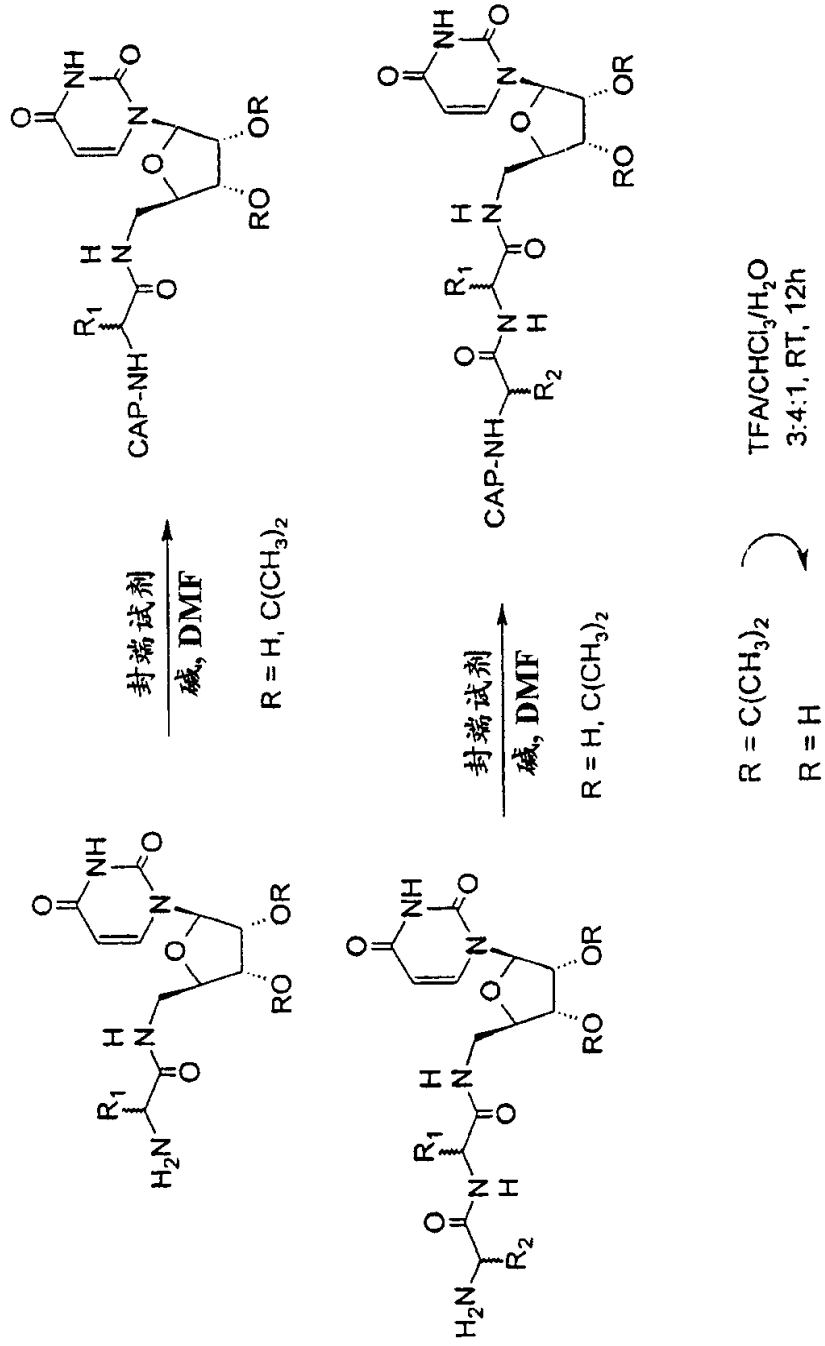
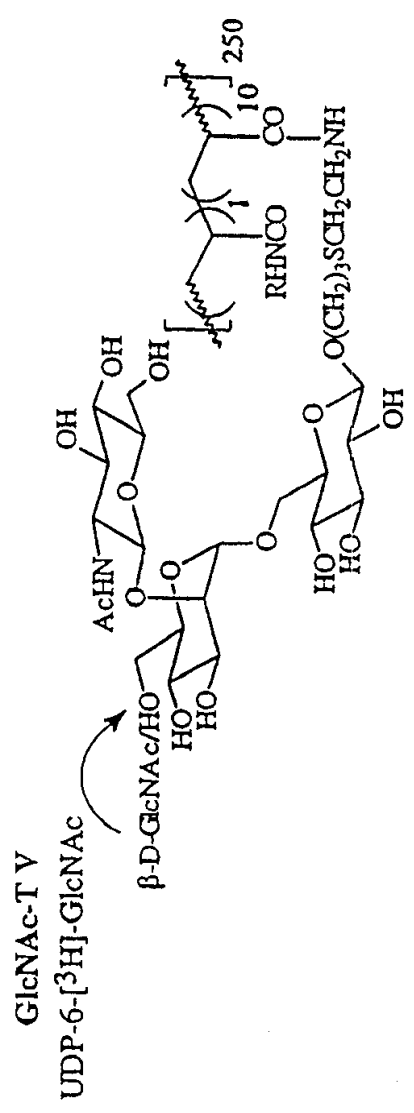


图 8



受体

11 R = H 12 R = Me
 13 R = Et 14 R = Pr

具有 β -D-GlcNAc的产物

15 R = H 16 R = Me
 17 R = Et 18 R = Pr

图 10

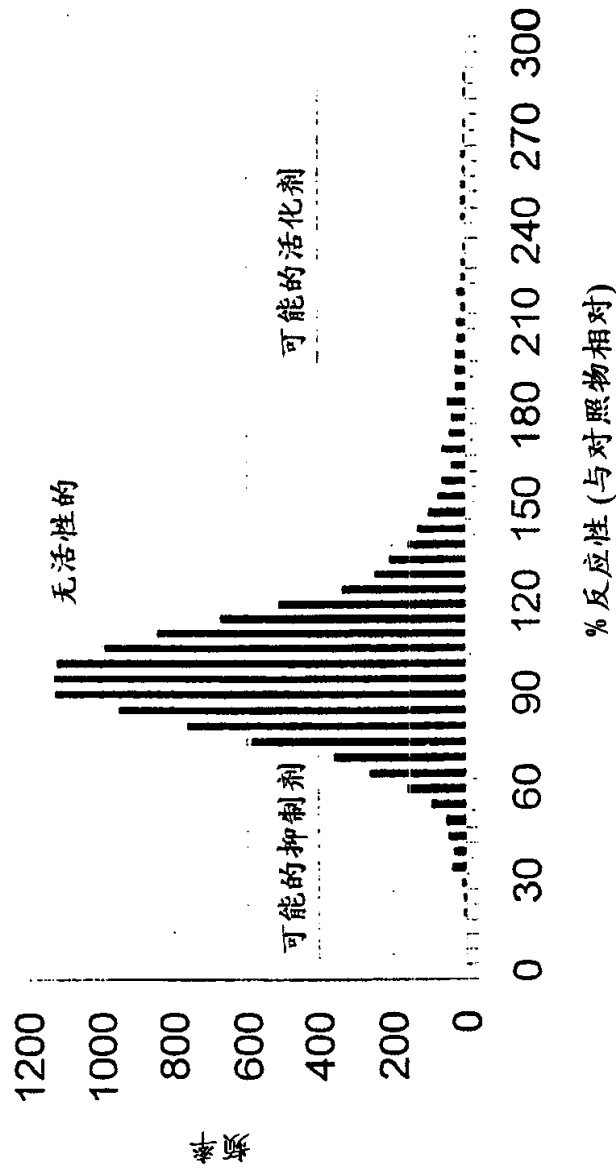


图 11

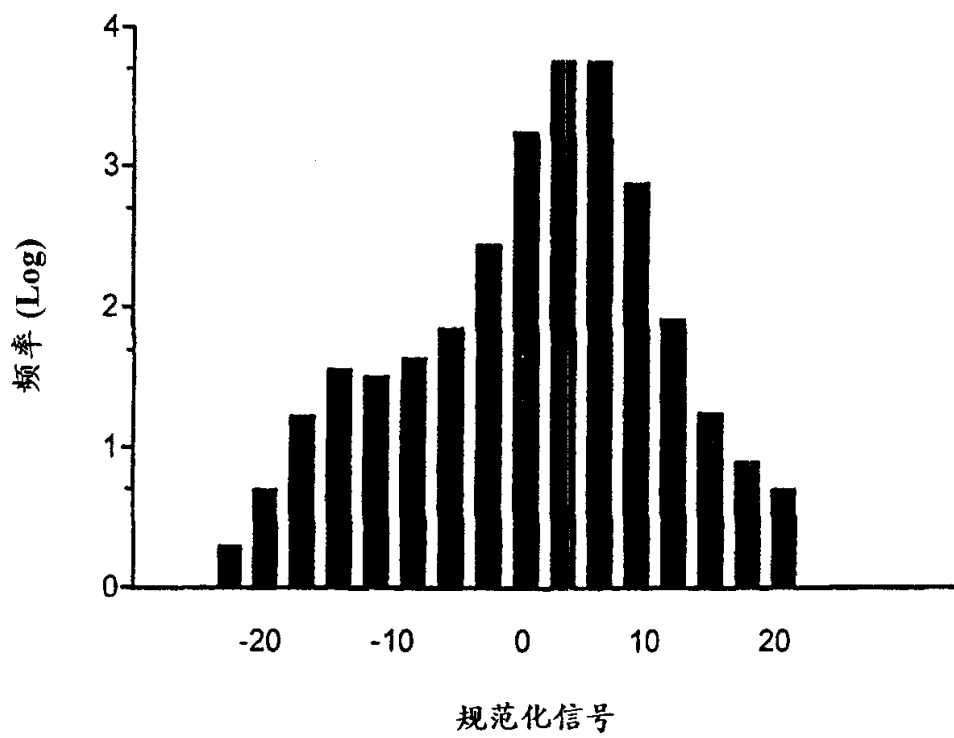


图 12