(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113748212 B
(45)授权公告日 2023.04.25

(21)申请号 202080026075.0
(22)申请日 2020.03.31
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113748212 A
(43)申请公布日 2021.12.03
(30)优先权数据
19166549.6 2019.04.01 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.09.29
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2020/059182 2020.03.31
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/201315 EN 2020.10.08

(73)专利权人 马克斯·普朗克科学促进学会
地址 德国慕尼黑
(72)发明人 R·马霍尔 T·F·T·莱克瑟
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 张小勇

(51)Int.Cl.
C12P 19/32(2006.01)
审查员 张金丽

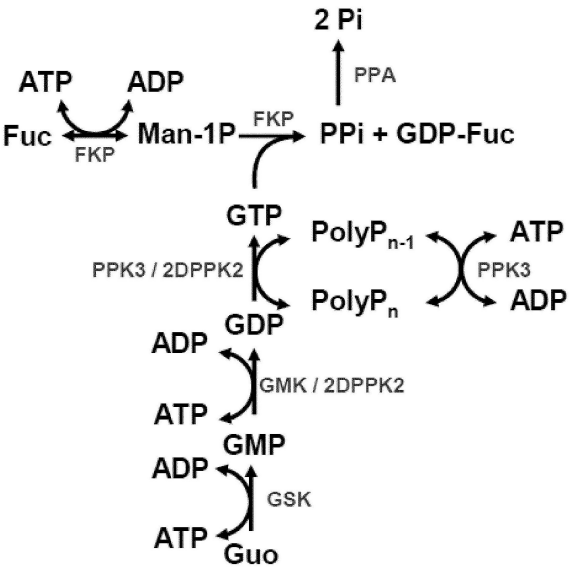
权利要求书2页 说明书80页
序列表26页 附图19页

(54)发明名称

用于制备GDP-岩藻糖的酶促方法

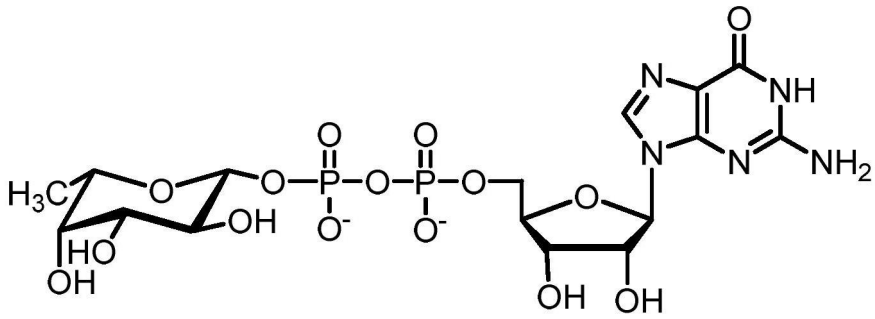
(57)摘要

本发明涉及在单一反应混合物中从低成本底物鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖产生GDP-岩藻糖的酶催化方法。所述方法能够(半)连续地或以分批模式操作。此外,所述方法能够适于产生岩藻糖基化的分子和生物分子,包括聚糖,例如人乳寡糖、蛋白质、肽、糖蛋白或糖肽。



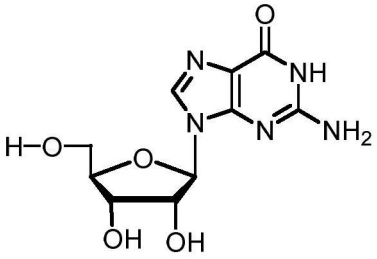
CN 113748212 B

1.一种从鸟苷和L-岩藻糖或D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

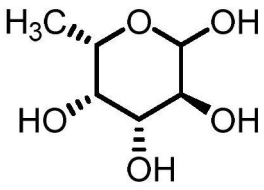


A)提供一种溶液,其包含

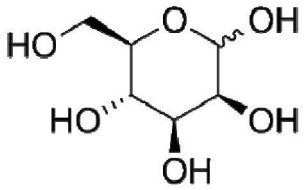
(i)由以下式表示的鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖



鸟苷



L-岩藻糖



D-甘露糖

(ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

在L-岩藻糖和鸟苷是反应底物的情况下:

提供一组酶,其为鸟苷激酶、多磷酸激酶、L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶和焦磷酸酶;或

在D-甘露糖和鸟苷是反应底物的情况下:

(a)提供一组酶,其为鸟苷激酶、鸟苷酸激酶、多磷酸激酶、葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶、GDP-L-岩藻糖合酶、焦磷酸酶和谷氨酸脱氢酶;或

(b)提供一组酶,其为鸟苷激酶、鸟苷酸激酶、多磷酸激酶、N-乙酰己糖胺-1-激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶、GDP-L-岩藻糖合酶、焦磷酸酶和谷氨酸脱氢酶;

B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

其中

共溶剂是二甲亚砜,并且基于步骤A)中提供的溶液的总体积,共溶剂的量为1体积%至10体积%。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述溶液包含

鸟苷和L-岩藻糖;和

该组酶为鸟苷激酶、多磷酸激酶、L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶和焦磷酸酶。

3.根据权利要求1所述的方法,其中所述溶液包含

鸟苷和D-甘露糖;和

该组酶为鸟苷激酶、鸟苷酸激酶、多磷酸激酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶、GDP-L-岩藻糖合酶、焦磷酸酶和谷氨酸脱氢酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶、GDP-L-岩藻糖合酶、焦磷酸酶和谷氨酸脱氢酶。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中该组酶被共同固定在固体支持物上。

5.根据权利要求4所述的方法,其中所述至少一种酶被固定在来自细胞裂解物的固体支持物上,或者该组酶被共同固定在来自细胞裂解物的固体支持物上。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖在单一反应混合物中产生。

7.根据权利要求1或3至6中任一项所述的方法,其中该方法还包括步骤

在存在岩藻糖基转移酶且不存在受体的情况下,从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖产生L-岩藻糖;或者

通过在80至100℃的范围内的温度下加热鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖来产生L-岩藻糖。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的方法,还包括以下步骤:

C)分离鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的方法,还包括以下步骤:

D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或小分子。

用于制备GDP-岩藻糖的酶促方法

发明领域

[0001] 本发明涉及在单一反应混合物中从低成本底物鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖产生GDP-岩藻糖的酶催化方法。所述方法能够半连续地、甚至连续地或以分批补料模式操作。此外,所述方法能够适于产生岩藻糖基化的分子和生物分子,包括聚糖,例如人乳寡糖、蛋白质、肽、糖蛋白或糖肽。

[0002] 发明背景

[0003] 鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖(GDP-岩藻糖或GDP-Fuc)是大量生物技术应用和食品技术的关键底物。它是用于治疗自身免疫性疾病的抗炎抗体的核心岩藻糖基化的底物。此外,产生碳水化合物疫苗和不断发展的个性化医疗领域(即制备用于药物递送的糖纳米材料)需要GDP-岩藻糖。在婴儿食品(人乳)中,岩藻糖基化的寡糖占糖的大部分,因此,非常需要在合成产生的婴儿乳制品中包含岩藻糖基化的糖。

[0004] 然而,尽管对GDP-岩藻糖的需求很高(每年以吨计),但GDP-岩藻糖的可用性非常有限,即使对于研究人员也是如此。截至目前,低内毒素GDP-岩藻糖的价格在每克3000欧元以上。由于GDP-岩藻糖的高价格,不仅基础和应用研究活动受到阻碍,而且工业应用也受到阻碍。

[0005] 合成GDP-岩藻糖的生物过程的工程化策略可分为体内和体外过程:微生物经过代谢工程化以在细胞内或细胞外产生GDP-岩藻糖,作为其代谢的一部分。然而,低产率、高水平的不想要的副产品、细胞系设计所需的时间和复杂的按比例放大都是缺点。考虑到监管方面,特别是婴儿食品,遗传修饰生物(GMO)的应用可严重延迟审批过程。

[0006] GDP-岩藻糖也可以通过使用生物催化(酶促)过程在体外产生(见APMIS 2006,114,539-548)。例如,Zhao等人(Nat Protoc.2010 5(4):636-646)报道了使用双功能酶L-岩藻糖焦磷酸化酶(FKP)从L-岩藻糖和鸟苷三磷酸酶促合成GDP-岩藻糖。Wittmann等人(J.Org.Chem.1997,62,2144-2147)描述了使用亚磷酰胺化学从岩藻糖-1-磷酸和鸟苷5'-单磷-吗啉酸盐合成GDP-岩藻糖。Tonetti等人(J.Biol.Chem.1996,271(44),27274-27279)报告了同型二聚体NADP(H)结合蛋白FX,其明显催化组合的差向异构酶和NADPH依赖性还原酶活性,从而将GDP-4-酮-6-D-脱氧甘露糖转化为GDP-L-岩藻糖。Sullivan等人(J.Biol.Chem.1998,273(14),8193-8202)描述了使用重组人GDP-甘露糖4,6-脱水酶和FX蛋白从GDP-甘露糖体外制备GDP-岩藻糖。Lau等人报告了从GDP-D-甘露糖的GDP-L-岩藻糖生物合成,并研究了参与合成的酶GDP-岩藻糖合酶。该酶将GDP-4-酮-6-脱氧-D-甘露糖转化为GDP-L-岩藻糖(J.Am.Chem.Soc.2008,130,17593-17602)。Rexer等人报道了通过在大肠杆菌中表达的葡萄糖激酶(Glk)、磷酸甘露糖变位酶(ManB)、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶(ManC)、无机焦磷酸酶(PmPpA)和1-结构域多磷酸激酶2(1D-Ppk2)的多酶级联反应从甘露糖一锅合成GDP-甘露糖(Biotechnology and Bioengineering 2018,115,192-205)。长期以来一直需要一种从低成本和容易获得的底物开始以具有成本效益的方式产生GDP岩藻糖的方法。

[0007] 因此,本发明的目的是提供一种用于制备GDP-岩藻糖的具有成本效益且有效的方

法。

[0008] 本发明的目的通过独立权利要求的教导来解决。本发明的其他有利特征、方面和细节从本申请的从属权利要求、说明书、附图和实施例中是清晰易见的。

[0009] 发明描述

[0010] 在生物化学中，众所周知核苷酸糖是单糖的活性形式，并且在糖基化反应中，已知核苷酸糖用为糖基供体。糖基转移酶(GTF)是催化糖部分从活化的核苷酸糖转移到亲核糖基受体分子的酶。因此，在生物化学中，糖基化反应是由糖基转移酶催化的。

[0011] 为了充当糖基供体，相应的单糖必须以高能量形式存在，例如以核苷酸糖的形式存在，特别是衍生自尿苷二磷酸、鸟苷二磷酸或胞嘧啶二磷酸等的核苷酸二磷酸糖。众所周知的核苷酸糖的例子是UDP-葡萄糖、UDP-半乳糖、UDP-GlcNAc、UDP-GalNac、UDP-木糖、UDP-葡萄糖醛酸、GDP-甘露糖和GDP-岩藻糖。众所周知，简单的单糖转化为活化的核苷酸糖可以通过核苷三磷酸(NTP)和糖基单磷酸的酶催化反应来实现，其中糖基单磷酸在异头碳上含有磷酸基团。

[0012] 为了获得核苷二磷酸(NDP)-单糖，需要将使用的单糖转化为糖基单磷酸衍生物。通常，如果需要，可以通过应用特定的酶如磷酸转移酶和另外的磷酸变位酶来完成所述反应以获得所需的单糖-1-磷酸。磷酸转移酶是分类在EC编号2.7下的催化磷酸化反应的酶。磷酸转移酶根据其受体分子进一步分类。例如，EC 2.7.1下的磷酸转移酶是以醇基为受体的磷酸转移酶。磷酸变位酶是异构酶，即可以催化磷酸基团的内部转移的酶。如果底物通过磷酸转移酶的磷酸化产生单糖-6-磷酸，如在D-甘露糖或D-葡萄糖例如分别地甘露糖-6-磷酸或葡萄糖-6-磷酸的情况下，则需要磷酸变位酶。然后相应的磷酸变位酶催化磷酸基团的内部转移，这导致分别将甘露糖-6-磷酸转化为甘露糖-1-磷酸或将葡萄糖-6-磷酸转化为葡萄糖-1-磷酸。

[0013] 激酶是形成磷酸转移酶家族一部分的酶。激酶是催化磷酸基团从高能量的提供磷酸酯的分子转移到特定底物的酶。这个过程被称为磷酸化，其中底物获得磷酸基团，而高能量的三磷酸腺苷(ATP)分子提供磷酸基团。这种酯基转移产生磷酸化底物和ADP。因此，为了获得单糖-1-磷酸，合适的激酶如岩藻糖激酶或N-乙酰己糖胺-1-激酶可用于分别从L-岩藻糖获得岩藻糖-1-磷酸或从D-甘露糖获得甘露糖-1-磷酸。

[0014] 通过使用核苷酸转移酶，可以将核苷三磷酸(NTP)和单糖-1-磷酸转化为相应的核苷二磷酸(NDP)-单糖。核苷酸转移酶是含磷基团的转移酶，并且分类在EC编号2.7.7下。对于不同的天然存在的核苷酸，核苷酸特异性核苷酸转移酶是本领域已知的，例如尿苷基转移酶转移尿苷基，腺苷酸转移酶转移腺苷基，鸟苷基转移酶转移鸟苷基，胞苷基转移酶转移胞苷基，胸苷基转移酶转移胸苷基。因此，核苷酸转移酶适用于催化单糖-1-磷酸与三磷酸核苷的反应，例如岩藻糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸(GTP)的反应以获得GDP-岩藻糖或甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸(GTP)的反应以获得GDP-甘露糖。在GDP-岩藻糖和GDP-甘露糖的情况下，鸟苷酸转移酶适用于催化与鸟苷三磷酸(GTP)的反应。

[0015] 与天然存在的GDP-单糖相关的鸟苷二磷酸(GDP)-单糖是GDP-甘露糖和GDP-岩藻糖。在GDP-甘露糖和岩藻糖-1-磷酸(Fuc-1-P)的情况下，上述获得GDP-单糖的一般反应方案可以用鸟苷三磷酸和在GDP-甘露糖的情况下甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)和在GDP-岩藻糖的情况下岩藻糖-1-磷酸(Fuc-1-P)进行，其中使用催化反应以分别获得所需的GDP-甘露糖

或GDP-岩藻糖的特定鸟苷酸转移酶。

[0016] 然而,获得核苷二磷酸(NDP)-单糖的酶催化反应方案的一个缺点是基于这样一个事实,即起始材料(特别是相应的三磷酸核苷)非常昂贵,因此合成途径导致NDP-单糖和特别是GDP-岩藻糖或GDP-甘露糖的成本密集型合成。如上文对于GDP-岩藻糖所述,本领域需要提供用于制备核苷二磷酸单糖如GDP-岩藻糖或GDP-甘露糖的具有成本效益和高效的方法,特别是需要提供用于从低成本和易得的起始材料制备GDP-岩藻糖的具有成本效益和高效的方法。

[0017] 至于GDP-单糖,GDP-岩藻糖和GDP-甘露糖与哺乳动物中天然存在的活化GDP-糖有关。因此,鸟苷已被鉴定为合适的核苷酸,并且L-岩藻糖和D-甘露糖已被鉴定为用于制备GDP-岩藻糖的合适单糖。应该清楚的是对于酶催化反应,至少必须提供合适的酶。因此,发明人已鉴定鸟苷和容易获得的单糖例如L-岩藻糖或D-甘露糖作为在酶促一锅级联反应中产生GDP-岩藻糖的合适起始材料。

[0018] 迄今尚未建立用于从鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖开始生物催化产生GDP-岩藻糖的方法。

[0019] 为了提供用于制备GDP-岩藻糖鸟苷的具有成本效益和高效的方法,L-岩藻糖被鉴定为用于在如图1所示的酶促级联反应中产生GDP-岩藻糖的适合起始材料,该酶促级联反应包括(a)从L-岩藻糖和三磷酸腺苷(ATP;催化量)形成岩藻糖-1-磷酸(Fuc-1-P),(b)从鸟苷和多磷酸盐形成鸟苷三磷酸(GTP),以及(c)岩藻糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸(GTP)反应以生成GDP-岩藻糖。设想可以在鸟苷激酶、多磷酸激酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶存在的情况下在合适的缓冲液中从L-岩藻糖和鸟苷产生GDP-岩藻糖(图2)。

[0020] 此外,鸟苷和D-甘露糖被鉴定为用于在如图3所示的酶促级联反应中产生GDP-岩藻糖的适合起始材料,该酶促级联反应包括(a)从D-甘露糖和三磷酸腺苷(ATP)形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P),(b)从鸟苷和多磷酸盐形成鸟苷三磷酸(GTP),以及(c)甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸(GTP)反应以生成GDP-甘露糖和(d)GDP-甘露糖转化为GDP-岩藻糖。考虑了可以在鸟苷激酶、多磷酸激酶和葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶存在的情况下在合适的缓冲液中从D-甘露糖和鸟苷产生GDP-岩藻糖。

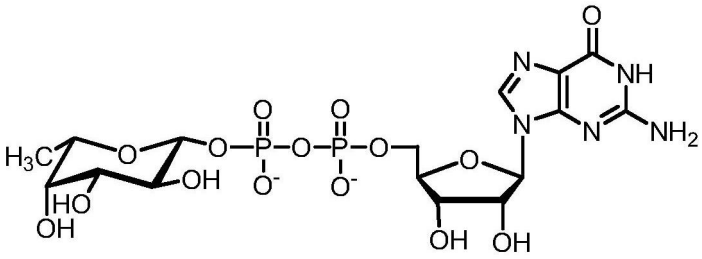
[0021] 然而,在该酶促级联反应中从L-岩藻糖和鸟苷或D-甘露糖和鸟苷产生GDP-岩藻糖的任何尝试都是不成功的并且未观察到GDP-岩藻糖的形成(实施例3)。

[0022] 令人惊讶的是,本发明人发现通过将鸟苷溶解在共溶剂如二甲亚砜中,在三个小时后达到鸟苷和L-岩藻糖向GDP-岩藻糖的几乎完全转化(实施例2)。此外,共溶剂不影响用于制备GDP-岩藻糖的酶的活性。滴度高于底物的溶解度,这是通过使用共溶剂实现的。此外,发明人已经发现,通过将鸟苷溶解在共溶剂如二甲亚砜中,鸟苷和D-甘露糖几乎完全转化为GDP-岩藻糖。此外,共溶剂不影响用于从鸟苷和D-甘露糖制备GDP-岩藻糖的酶的活性。

[0023] 例如,如本文所述,本发明的方法优于本领域已知的用于从L岩藻糖和鸟苷三磷酸酶促合成GDP-岩藻糖的上述方法,因为可以避免昂贵的鸟苷三磷酸起始材料并将其替换为更简单的核苷鸟苷,这导致用于制备GDP-岩藻糖的具有成本效益且高效的方法。

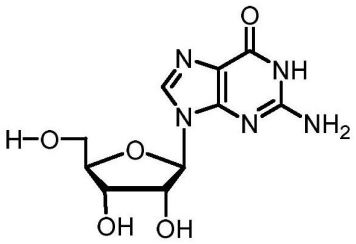
[0024] 因此,本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷

酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

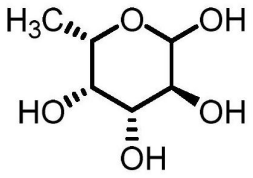
[0025] 

[0026] A)提供一种溶液,其包含

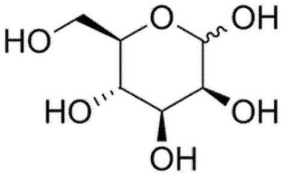
[0027] (i)由以下式表示的鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[0028] 

鸟苷



L-岩藻糖



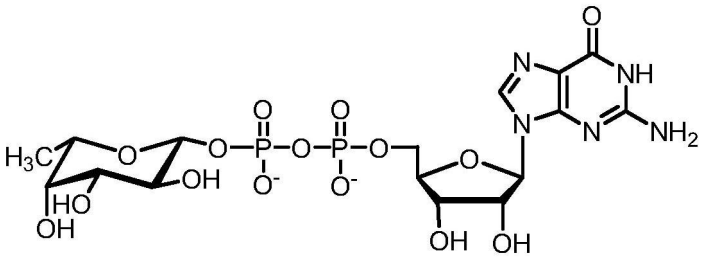
D-甘露糖

[0029] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0030] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

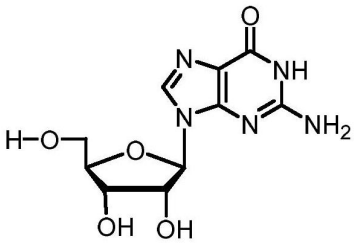
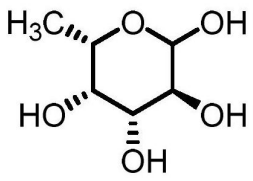
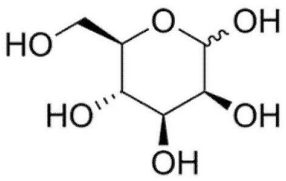
[0031] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0032] 本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0033] 

[0034] A)提供一种溶液,其包含

[0035] (i)由以下式表示的鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[0036]   

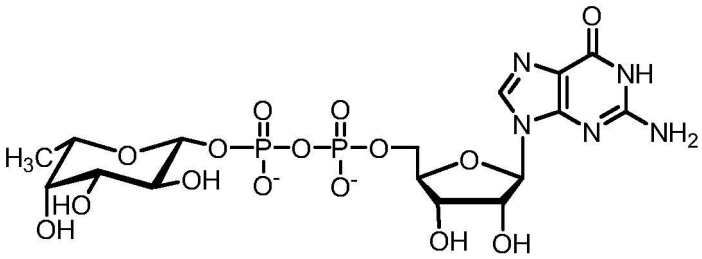
鸟苷 L-岩藻糖 D-甘露糖

[0037] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷、用于溶解鸟苷的共溶剂和在D-甘露糖的情况下NADPH;和

[0038] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

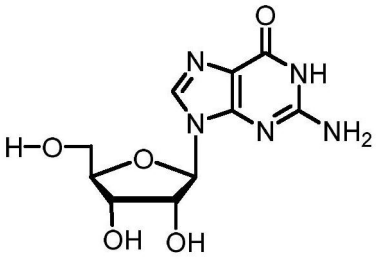
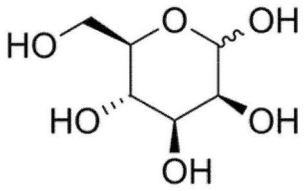
[0039] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0040] 在一个优选的实施方案中,本发明涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0041] 

[0042] A)提供一种溶液,其包含

[0043] (i)由以下式表示的鸟苷和D-甘露糖

[0044]  

鸟苷 D-甘露糖

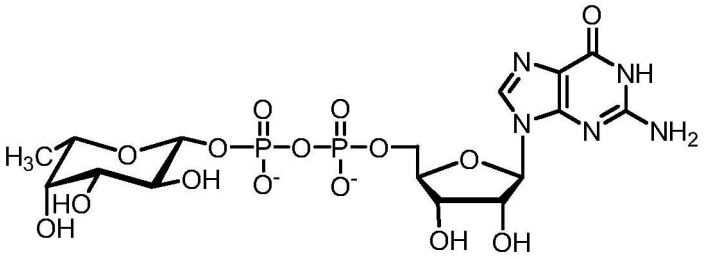
[0045] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0046] 提供一组酶,其包含(a)鸟苷激酶、多磷酸激酶和葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0047] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟

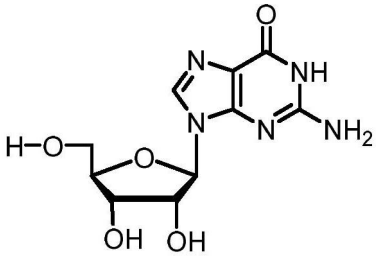
苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0048] 在一个优选的实施方案中,本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

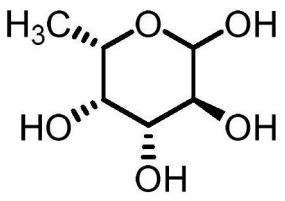
[0049] 

[0050] A)提供一种溶液,其包含

[0051] (i)以下式表示的鸟苷和L-岩藻糖

[0052] 

鸟苷



L-岩藻糖;

[0053] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0054] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶;

[0055] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0056] 或者,本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖或D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0057] A)提供一种溶液,其包含

[0058] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖,

[0059] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0060] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0061] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0062] 或者,本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0063] A)提供一种溶液,其包含

[0064] (i)鸟苷和L-岩藻糖；

[0065] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0066] 提供以下酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶；

[0067] B)在酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0068] 此外，本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0069] A)提供一种溶液，其包含

[0070] (i)鸟苷和L-岩藻糖；

[0071] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0072] 提供以下酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶；

[0073] B)在酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0074] 其中鸟苷转化为鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的转化率在3小时后为至少78％。

[0075] 根据本发明的从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的步骤B)包括

[0076] (a)从L-岩藻糖和三磷酸腺苷在L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的催化下形成岩藻糖-1-磷酸(Fuc-1-P)，

[0077] (b)从鸟苷、三磷酸腺苷和多磷酸盐在鸟苷激酶和多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸(GTP)；和

[0078] (c)在L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下，使岩藻糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-岩藻糖。

[0079] 显然，步骤(a)和(b)可以同时或相继进行。此外，它们的顺序可以恢复为(b)→(a)→(c)。

[0080] 因此，本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0081] A)提供一种溶液，其包含

[0082] (i)鸟苷和L-岩藻糖；

[0083] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0084] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶；

[0085] B)通过以下步骤在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖

[0086] (a)从L-岩藻糖和三磷酸腺苷在L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的催化下形成岩藻糖-1-磷酸，

[0087] (b)从鸟苷、三磷酸腺苷和多磷酸盐在鸟苷激酶和多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸；和

[0088] (c)在L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下，使岩藻糖-1-磷酸

与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-岩藻糖。

[0089] 更具体地,根据本发明的从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的步骤B)包括

[0090] (a)从L-岩藻糖和三磷酸腺苷在L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的催化下形成岩藻糖-1-磷酸(Fuc-1-P),

[0091] (b1)从鸟苷和三磷酸腺苷在鸟苷激酶的催化下形成单磷酸鸟苷(GMP);

[0092] (b2)从单磷酸鸟苷和多磷酸盐在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸(GTP);和

[0093] (c)在L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下,使岩藻糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-岩藻糖。

[0094] 显然,步骤(a)可以在步骤(b1)或(b2)之前、同时或之后进行。因此,步骤顺序也可以恢复为(b1)→(b2)→(a)→(c)。

[0095] 因此,本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0096] A)提供一种溶液,其包含

[0097] (i)鸟苷和L-岩藻糖;

[0098] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0099] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶;

[0100] B)通过以下步骤在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖

[0101] (a)从L-岩藻糖和三磷酸腺苷在L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的催化下形成岩藻糖-1-磷酸,

[0102] (b1)从鸟苷和三磷酸腺苷在鸟苷激酶的催化下形成单磷酸鸟苷;

[0103] (b2)从单磷酸鸟苷和多磷酸鸟苷在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸;和

[0104] (c)在L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下,使岩藻糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-岩藻糖。

[0105] 甚至更具体地,根据本发明的从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的步骤B)包括

[0106] (a)从L-岩藻糖和三磷酸腺苷在L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的催化下形成岩藻糖-1-磷酸(Fuc-1-P),

[0107] (b1)从鸟苷和三磷酸腺苷在鸟苷激酶的催化下形成单磷酸鸟苷(GMP);

[0108] (b2')从单磷酸鸟苷和多磷酸盐在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷二磷酸(GDP)

[0109] (b2")从鸟苷二磷酸和多磷酸鸟苷在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸(GTP);和

[0110] (c)在L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下,使岩藻糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-岩藻糖。

[0111] 显然,步骤(a)可以在步骤(b1)、(b2')和(b2")之前、同时或之后进行。因此,步骤顺序也可以恢复为(b1)→(b2')→(b2")→(a)→(c)。

[0112] 因此,本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方

法,包括以下步骤:

[0113] A)提供一种溶液,其包含

[0114] (i)鸟苷和L-岩藻糖;

[0115] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0116] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶;

[0117] B)通过以下步骤在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖

[0118] (a)从L-岩藻糖和三磷酸腺苷在L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的催化下形成岩藻糖-1-磷酸,

[0119] (b1)从鸟苷和三磷酸腺苷在鸟苷激酶的催化下形成单磷酸鸟苷;

[0120] (b2')从单磷酸鸟苷和多磷酸盐在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷二磷酸

[0121] (b2")从鸟苷二磷酸和多磷酸盐在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸;和

[0122] (c)在L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下,使岩藻糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-岩藻糖。

[0123] 根据本发明的从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-α-D-甘露糖的步骤B)包括

[0124] (a)从D-甘露糖和三磷酸腺苷在N-乙酰己糖胺-1-激酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0125] 或者

[0126] 从D-甘露糖和三磷酸腺苷在葡萄糖激酶的催化下形成甘露糖-6-磷酸(Man-6-P),和从甘露糖-6-磷酸在磷酸甘露糖变位酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0127] (b)从鸟苷、三磷酸腺苷和多磷酸盐在鸟苷激酶和多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸(GTP);和

[0128] (c)在D-甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下,使甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-甘露糖。

[0129] 根据本发明的从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的步骤B)包括

[0130] (a)从D-甘露糖和三磷酸腺苷在N-乙酰己糖胺-1-激酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0131] 或者

[0132] 从D-甘露糖和三磷酸腺苷在葡萄糖激酶的催化下形成甘露糖-6-磷酸(Man-6-P),和从甘露糖-6-磷酸在磷酸甘露糖变位酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0133] (b)从鸟苷、三磷酸腺苷和多磷酸盐在鸟苷激酶和多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸(GTP);和

[0134] (c)在D-甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下,将甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-甘露糖

[0135] (d)从GDP-甘露糖在GDP-甘露糖-4,6-脱水酶的催化下形成GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖;和

[0136] (e)从GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖和NADPH在GDP-L-岩藻糖合酶的催化下形成GDP-岩藻糖。

[0137] 显然,步骤(a)和(b)可以同时或相继进行。此外,它们的顺序可以恢复为(b)→(a)→(c)。

[0138] 因此,本发明涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0139] A)提供一种溶液,其包含

[0140] (i)鸟苷和D-甘露糖;

[0141] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0142] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0143] B)通过以下步骤在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖

[0144] (a)从D-甘露糖和三磷酸腺苷在N-乙酰己糖胺-1-激酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0145] 或者

[0146] 从D-甘露糖和三磷酸腺苷在葡萄糖激酶的催化下形成甘露糖-6-磷酸(Man-6-P),和从甘露糖-6-磷酸在磷酸甘露糖变位酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0147] (b)从鸟苷、三磷酸腺苷和多磷酸盐在鸟苷激酶和多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸(GTP);和

[0148] (c)在D-甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下,将甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-甘露糖

[0149] (d)从GDP-甘露糖在GDP-甘露糖-4,6-脱水酶的催化下形成GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖;和

[0150] (e)从GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖和NADPH在GDP-L-岩藻糖合酶的催化下形成GDP-岩藻糖。

[0151] 更具体地,根据本发明的从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的步骤B)包括

[0152] (a)从D-甘露糖和三磷酸腺苷在N-乙酰己糖胺-1-激酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0153] 或者

[0154] 从D-甘露糖和三磷酸腺苷在葡萄糖激酶的催化下形成甘露糖-6-磷酸(Man-6-P),和从甘露糖-6-磷酸在磷酸甘露糖变位酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0155] (b1)从鸟苷和三磷酸腺苷在鸟苷激酶的催化下形成单磷酸鸟苷(GMP);

[0156] (b2)从单磷酸鸟苷和多磷酸盐在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸(GTP);和

[0157] (c)在D-甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下,将甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-甘露糖

[0158] (d)从GDP-甘露糖在GDP-甘露糖-4,6-脱水酶的催化下形成GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖;和

[0159] (e)从GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖和NADPH在GDP-L-岩藻糖合酶的催化下形成GDP-岩藻糖。

[0160] 显然,步骤(a)可以在步骤(b1)或(b2)之前、同时或之后进行。因此,步骤顺序也可以恢复为(b1)→(b2)→(a)→(c)。

[0161] 因此,本发明涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0162] A)提供一种溶液,其包含

[0163] (i)鸟苷和D-甘露糖;

[0164] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0165] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0166] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖

[0167] (a)从D-甘露糖和三磷酸腺苷在N-乙酰己糖胺-1-激酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0168] 或者

[0169] 从D-甘露糖和三磷酸腺苷在葡萄糖激酶的催化下形成甘露糖-6-磷酸(Man-6-P),和从甘露糖-6-磷酸在磷酸甘露糖变位酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0170] (b1)从鸟苷和三磷酸腺苷在鸟苷激酶的催化下形成单磷酸鸟苷(GMP);

[0171] (b2)从单磷酸鸟苷和多磷酸盐在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸(GTP);和

[0172] (c)在D-甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下,将甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-甘露糖

[0173] (d)从GDP-甘露糖在GDP-甘露糖-4,6-脱水酶的催化下形成GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖;和

[0174] (e)从GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖和NADPH在GDP-L-岩藻糖合酶的催化下形成GDP-岩藻糖。

[0175] 甚至更具体地,根据本发明的从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的步骤B)包括

[0176] (a)从D-甘露糖和三磷酸腺苷在N-乙酰己糖胺-1-激酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0177] 或者

[0178] 从D-甘露糖和三磷酸腺苷在葡萄糖激酶的催化下形成甘露糖-6-磷酸(Man-6-P),和从甘露糖-6-磷酸在磷酸甘露糖变位酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0179] (b1)从鸟苷和三磷酸腺苷在鸟苷激酶的催化下形成单磷酸鸟苷(GMP);

[0180] (b2')从单磷酸鸟苷和多磷酸盐在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷二磷酸(GDP)

[0181] (b2")从鸟苷二磷酸和多磷酸鸟苷在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸(GTP);和

[0182] (c)在D-甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下,将甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-甘露糖

[0183] (d)从GDP-甘露糖在GDP-甘露糖-4,6-脱水酶的催化下形成GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖;和

[0184] (e)从GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖和NADPH在GDP-L-岩藻糖合酶的催化下形成GDP-岩藻糖。

[0185] 显然,步骤(a)可以在步骤(b1)、(b2')和(b2")之前、同时或之后进行。因此,步骤顺序也可以恢复为(b1)→(b2')→(b2")→(a)→(c)。

[0186] 因此,本发明涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0187] A)提供一种溶液,其包含

[0188] (i)鸟苷和D-甘露糖;

[0189] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0190] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0191] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖

[0192] (a)从D-甘露糖和三磷酸腺苷在N-乙酰己糖胺-1-激酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0193] 或者

[0194] 从D-甘露糖和三磷酸腺苷在葡萄糖激酶的催化下形成甘露糖-6-磷酸(Man-6-P),和从甘露糖-6-磷酸在磷酸甘露糖变位酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0195] (b1)从鸟苷和三磷酸腺苷在鸟苷激酶的催化下形成单磷酸鸟苷(GMP);

[0196] (b2')从单磷酸鸟苷和多磷酸盐在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷二磷酸(GDP)

[0197] (b2")从鸟苷二磷酸和多磷酸鸟苷在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸(GTP);和

[0198] (c)在D-甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下,将甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-甘露糖

[0199] (d)从GDP-甘露糖在GDP-甘露糖-4,6-脱水酶的催化下形成GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖;和

[0200] (e)从GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖和NADPH在GDP-L-岩藻糖合酶的催化下形成GDP-岩藻糖。

[0201] 本发明的产生GDP-岩藻糖的方法与现有技术中描述的方法相比具有以下显著优点:

[0202] • 显著降低起始材料的成本,即不需要昂贵的GDP或GTP,

[0203] • 该方法可以连续进行,从而有可能每年提供吨级的GDP-岩藻糖,

[0204] • 无细胞过程,从而避免不利的GMO方面(监管、标记),

[0205] • 直接使用无细胞提取物，没有生物催化剂纯化的成本，

[0206] • 酶可以固定在低成本、市售且即用型的固体支持物上，

[0207] • 对于鸟苷的几乎定量的产率，

[0208] • 高可扩展性使本发明的方法可用于工业应用。

[0209] 由于添加了少量用于溶解鸟苷的共溶剂，发明人能够建立从鸟苷到鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的多酶级联反应，具有高转化率。优选地，共溶剂是选自包括以下各项的组的有机溶剂：甲醇、乙醇、异丙醇、正丙醇、异丁醇、正丁醇、叔丁醇、乙腈、丙酮和二甲亚砜。优选地，共溶剂是极性非质子溶剂，例如二甲基亚砜或二甲基甲酰胺。优选地，共溶剂不抑制酶活性。更优选地，共溶剂是二甲亚砜。

[0210] 因此，本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0211] A)提供一种溶液，其包含

[0212] (i)鸟苷和L-岩藻糖，

[0213] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0214] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶；

[0215] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0216] 其中用于溶解鸟苷的共溶剂是二甲亚砜。

[0217] 因此，本发明涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括

[0218] A)提供一种溶液，其包含

[0219] (i)鸟苷和D-甘露糖；

[0220] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0221] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[0222] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖

[0223] 其中用于溶解鸟苷的共溶剂是二甲亚砜。

[0224] 发明详述

[0225] 定义

[0226] 如本文所用，术语“多磷酸盐”是指含有几个由六个或更多个磷酸(PO_4)四面体共有的角产生的P-O-P键(导致形成长链)的任何盐。术语“$PolyP_n$”是同义词，其中n代表磷酸残基数目的平均链长，例如$PolyP_{25}$是指具有约25个磷酸残基的多磷酸盐，$PolyP_{14}$是指具有约14个磷酸残基的多磷酸盐。

[0227] 如本文所用，术语“鸟苷激酶”或“肌苷激酶”是指具有鸟苷激酶活性的多肽，即鸟苷激酶在三磷酸腺苷的存在下催化鸟苷到鸟苷5'-单磷酸的反应。鸟苷激酶属于EC类别

2.7.1.73。

[0228] 如本文所用，术语“多磷酸激酶”是指具有多磷酸激酶活性的多肽，即多磷酸激酶催化以下反应：

[0229] **ADP+多磷酸盐(n+1)⇌ATP+多磷酸盐(n)**

[0230] **NMP+多磷酸盐(n+1)⇌NDP+多磷酸盐(n)**

[0231] **NDP+多磷酸盐(n+1)⇌NTP+多磷酸盐(n)**

[0232] 其中N为核苷酸例如鸟苷、腺苷、尿苷等，NMP为单磷酸核苷，NDP为二磷酸核苷，NTP为三磷酸核苷。

[0233] 在鸟苷的情况下，多磷酸激酶催化以下反应：

[0234] **ADP+多磷酸盐(n+1)⇌ATP+多磷酸盐(n)**

[0235] **GMP+多磷酸盐(n+1)⇌GDP+多磷酸盐(n)**

[0236] **GDP+多磷酸盐(n+1)⇌GTP+多磷酸盐(n)**

[0237] 多磷酸激酶属于EC类别2.7.4.1。用于本文所述的本发明的方法的多磷酸激酶的代表包括但不限于多磷酸激酶1(PPK1)、多磷酸激酶2(PPK2)、2-结构域多磷酸激酶2(2D-PPK2)、1-结构域多磷酸激酶2(1D-PPK2)、多磷酸激酶3(PPK3)和鸟苷酸激酶(EC类别2.7.4.8)。

[0238] 如本文所用，术语“L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶”是指具有L-岩藻糖激酶活性和L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶活性的双功能多肽，即催化以下反应的多肽：

[0239] **Fuc+ATP⇌Fuc-1-P+ADP**

[0240] **Fuc-1-P+GTP⇌GDP-Fuc+PPi**

[0241] L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶属于EC类别2.7.1.52和2.7.7.30。

[0242] 应该清楚的是，还有两种单独的功能性多肽(一种具有L-岩藻糖激酶活性和另一种具有L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶活性)可能适用于本发明的方法。

[0243] 如本文所用，术语“焦磷酸酶”是指具有焦磷酸酶活性的多肽，即催化以下反应的多肽：

[0244] **$PPi+H_2O⇌2Pi$**

[0245] 其中PPi是指焦磷酸盐，而Pi是指磷酸盐。

[0246] 焦磷酸酶属于EC类别3.6.1.1。

[0247] 如本文所用，术语“葡萄糖激酶”是指具有激酶活性的多肽，即催化以下反应的激酶：

[0248] **Man+ATP⇌Man-6-P+ADP**

[0249] 葡萄糖激酶属于EC类别2.7.1.1。

[0250] 如本文所用，术语“磷酸甘露糖变位酶”是指具有磷酸甘露糖变位酶活性的多肽，即催化以下反应的磷酸甘露糖变位酶：

[0251] **Man-6-P⇌ Man-1-P**

[0252] 磷酸甘露糖变位酶属于EC类别5.4.2.8。

[0253] 如本文所用,术语“N-乙酰己糖胺-1-激酶”是指具有激酶活性的多肽,即催化以下反应的多肽:

[0254] **Man+ATP⇌ Man-1-P+ADP**

[0255] N-乙酰己糖胺-1-激酶属于EC类别2.7.1.162。

[0256] 如本文所用,术语“甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶”是指具有D-甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶活性的多肽,即催化以下反应的多肽:

[0257] **Man-1-P+GTP⇌GDP-Man+PPi**

[0258] 甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶属于EC类别2.7.7.13。

[0259] 如本文所用,术语“GDP-甘露糖4,6-脱水酶”是指具有GDP-甘露糖4,6-脱水酶活性的多肽,即催化以下反应的多肽:

[0260] **GDP-Man⇌GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖**

[0261] GDP-甘露糖4,6-脱水酶属于EC类别4.2.1.47。

[0262] 如本文所用,术语“GDP-L-岩藻糖合酶”是指具有GDP-L-岩藻糖合酶活性的多肽,即催化以下反应的多肽:

[0263] **GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖+NADPH⇌GDP-Fuc+$NADP^+$**

[0264] GDP-L-岩藻糖合酶属于EC类别1.1.1.271,并且具有以下同义词和缩写GDP-4-酮-6-脱氧甘露糖-3,5-差向异构酶-4-还原酶(WCAG)、GDP-4-酮-6-脱氧-D-甘露糖差向异构酶-还原酶、GDP-4-酮-6-脱氧-D-甘露糖差向异构酶/还原酶、GDPFuc合酶、GER、GFS、GMER、鸟苷二磷酸岩藻糖合酶。

[0265] 如本文所用,术语“共溶剂”是指增加或增强鸟苷在水中的溶解度的有机化合物或有机化合物的混合物,特别是有机溶剂或不同溶剂的混合物。本领域技术人员可以容易地想到合适的共溶剂是鸟苷在其中具有高溶解度的溶剂,包括甲醇、乙醇、异丙醇、正丙醇、异丁醇、正丁醇、叔丁醇、乙腈、丙酮或二甲基亚砜。优选地,共溶剂是极性非质子溶剂,例如二甲基亚砜或二甲基甲酰胺。特别优选的共溶剂是二甲亚砜。

[0266] 如本文所用,“糖”是指但不限于单糖、二糖、三糖、四糖、五糖、六糖、七糖、八糖……、寡糖、聚糖和多糖。糖优选包含选自以下的单糖单元:

[0267] D-阿拉伯糖、D-来苏糖、D-核糖、D-木糖、L-阿拉伯糖、L-来苏糖、L-核糖、L-木糖、D-核酮糖、D-木酮糖、L-核酮糖、L-木酮糖、D-脱氧核糖、L-脱氧核糖、D-赤藓糖、D-苏糖、L-甘油-D-甘露糖-庚糖、D-甘油-D-甘露糖-庚糖、D-阿洛糖、D-阿卓糖、D-葡萄糖、D-甘露糖、D-古洛糖、D-艾多糖、D-半乳糖、D-塔洛糖、D-阿洛酮糖、D-果糖、D-山梨糖、D-塔格糖、6-脱氧-L-阿卓糖、6-脱氧-D-塔洛糖、D-岩藻糖、L-岩藻糖、D-鼠李糖、L-鼠李糖、D-奎诺糖、橄榄糖、泰维糖、蚓糖、阿比可糖、泊雷糖、洋地黄毒糖、可立糖、D-葡糖胺、D-半乳糖胺、D-甘露糖胺、D-阿洛糖胺、L-阿卓糖胺、D-古洛糖胺、L-艾多糖胺、D-塔洛糖胺、N-乙酰-d-葡糖胺、N-乙酰-D-半乳糖胺、N-乙酰-D-甘露糖胺、N-乙酰-D-阿洛糖胺、N-乙酰基-L-海藻糖胺、N-乙酰基-D-谷糖胺、N-乙酰基-L-艾多糖胺、N-乙酰基-D-海藻糖胺、N-乙酰基-D-岩藻糖胺、N-乙酰基-L-岩藻糖胺、N-乙酰-L-鼠李糖胺、N-乙酰-D-奎诺糖胺、D-葡萄糖醛酸、D-半乳糖醛

酸、D-甘露糖醛酸、D-阿洛糖醛酸、L-阿鲁糖醛酸、D-古洛糖醛酸、L-古洛糖醛酸、L-艾杜糖醛酸、D-牛磺酸、神经氨酸、N-乙酰神经氨酸、N-甘醇神经氨酸、芹菜糖、Bacillosamine、脱氧甲基葡糖、阿可弗里糖、磁麻糖、胞壁酸、N-乙酰胞壁酸、N-甘醇胞壁酸、3-脱氧-lyxo-庚糖酸、酮脱氧辛酸和酮脱氧壬酸。优选地，单糖单元属于α-和β-D/L-碳水化合物的以下组，其包括或由以下组成：

[0268] α-D-吡喃核糖、α-D-阿拉伯吡喃糖、α-D-吡喃木糖、α-D-吡喃来苏糖、α-D-吡喃阿洛糖、α-D-吡喃阿卓糖、α-D-吡喃葡萄糖、α-D-吡喃甘露糖、α-D-吡喃葡萄糖、α-D-吡喃艾多糖、α-D-吡喃半乳糖、α-D-吡喃塔洛糖、α-D-吡喃阿洛酮糖、α-D-吡喃果糖、α-D-吡喃山梨糖、α-D-吡喃塔格糖、α-D-呋喃核糖、α-D-呋喃阿拉伯糖、α-D-呋喃木糖、α-D-呋喃来苏糖、α-D-呋喃阿洛糖、α-D-呋喃阿卓糖、α-D-呋喃葡萄糖、α-D-呋喃甘露糖、α-D-呋喃古洛糖、α-D-呋喃艾多糖、α-D-呋喃半乳糖、α-D-呋喃塔洛糖、α-D-呋喃阿洛酮糖、α-D-呋喃果糖、α-D-呋喃山梨糖、α-D-呋喃塔格糖、α-D-呋喃木糖、α-D-呋喃核糖、α-D-呋喃苏糖、α-D-吡喃鼠李糖、α-D-呋喃红糖、α-D-葡糖胺、α-D-吡喃葡萄糖醛酸、β-D-吡喃核糖、β-D-阿拉伯吡喃糖、β-D-吡喃木糖、β-D-吡喃来苏糖、β-D-吡喃阿洛糖、β-D-吡喃阿卓糖、β-D-吡喃葡萄糖、β-D-吡喃甘露糖、β-D-吡喃葡萄糖、β-D-吡喃艾多糖、β-D-吡喃半乳糖、β-D-吡喃塔洛糖、β-D-吡喃阿洛酮糖、β-D-吡喃果糖、β-D-吡喃山梨糖、β-D-吡喃塔格糖、β-D-呋喃核糖、β-D-呋喃阿拉伯糖、β-D-呋喃木糖、β-D-呋喃来苏糖、β-D-呋喃阿洛糖、β-D-呋喃阿卓糖、β-D-呋喃葡萄糖、β-D-呋喃甘露糖、β-D-呋喃葡萄糖、β-D-呋喃艾多糖、β-D-呋喃半乳糖、β-D-呋喃塔洛糖、β-D-呋喃阿洛酮糖、β-D-呋喃果糖、β-D-呋喃山梨糖、β-D-呋喃塔格糖、β-D-呋喃木糖、β-D-呋喃核糖、β-D-呋喃苏糖、β-D-呋喃红糖、β-D-葡糖胺、β-D-吡喃葡萄糖醛酸、α-L-吡喃核糖、α-L-阿拉伯吡喃糖、α-L-吡喃木糖、α-L-吡喃来苏糖、α-L-吡喃阿洛糖、α-L-吡喃阿卓糖、α-L-吡喃葡萄糖、α-L-吡喃甘露糖、α-L-吡喃葡萄糖、α-L-吡喃艾多糖、α-L-吡喃半乳糖、α-L-吡喃塔洛糖、α-L-吡喃阿洛酮糖、α-L-吡喃果糖、α-L-吡喃山梨糖、α-L-吡喃塔格糖、α-L-吡喃鼠李糖、α-L-呋喃核糖、α-L-阿拉伯呋喃糖、α-L-呋喃木糖、α-L-呋喃来苏糖、α-L-呋喃阿洛糖、α-L-呋喃阿卓糖、α-L-呋喃葡萄糖、α-L-呋喃甘露糖、α-L-呋喃古洛糖、α-L-呋喃艾多糖、α-L-呋喃半乳糖、α-L-呋喃塔洛糖、α-L-呋喃葡萄糖、α-L-呋喃果糖、α-L-呋喃山梨糖、α-L-呋喃塔格糖、α-L-呋喃木糖、α-L-呋喃核糖、α-L-呋喃苏糖、α-L-呋喃红糖、α-L-葡糖胺、α-L-吡喃葡萄糖醛酸、β-L-吡喃核糖、β-L-阿拉伯吡喃糖、β-L-吡喃木糖、β-L-吡喃来苏糖、β-L-吡喃阿洛糖、β-L-吡喃阿卓糖、β-L-吡喃葡萄糖、β-L-吡喃甘露糖、β-L-吡喃葡萄糖、β-L-吡喃艾多糖、β-L-吡喃半乳糖、β-L-吡喃塔洛糖、、β-L-吡喃阿洛酮糖、β-L-吡喃果糖、β-L-吡喃山梨糖、β-L-吡喃塔格糖、β-L-呋喃核糖、β-L-呋喃阿拉伯糖、β-L-呋喃木糖、β-L-呋喃来苏糖、β-L-呋喃阿洛糖、β-L-呋喃阿卓糖、β-L-呋喃葡萄糖、β-L-呋喃甘露糖、β-L-呋喃古洛糖、β-L-呋喃艾多糖、β-L-呋喃半乳糖、β-L-呋喃塔洛糖、β-L-呋喃阿洛酮糖、β-L-呋喃果糖、β-L-呋喃山梨糖、β-L-呋喃塔格糖、β-L-呋喃木糖、β-L-呋喃核糖、β-L-呋喃苏糖、β-L-呋喃红糖、β-L-葡糖胺、β-L-吡喃葡萄糖醛酸和β-L-吡喃鼠李糖。

[0269] 糖进一步任选地被修饰以携带酰胺、碳酸酯、氨基甲酸酯、羰基、硫代羰基、羧基、硫代羧基、酯、硫酯、醚、环氧基、羟烷基、亚烷基、亚苯基、烯基、亚氨基、酰亚胺、异脲、硫代氨基甲酸酯、硫脲和/或尿素部分。

[0270] 如本文所用，术语“糖肽”是指含有共价附着于构成肽的氨基酸残基侧链的碳水化

合物部分的肽。碳水化合物部分形成侧链并且是连接到丝氨酸或苏氨酸残基的羟基的O-糖苷或连接到天冬酰胺残基的酰氨基氮的N-糖苷。

[0271] 如本文所用，术语“糖蛋白”是指含有共价附着于构成多肽的氨基酸残基侧链的碳水化合物部分的多肽。碳水化合物部分形成侧链并且是连接到丝氨酸或苏氨酸残基的羟基的O-糖苷或连接到天冬酰胺残基的酰氨基氮的N-糖苷。

[0272] 如本文所用，术语“蛋白质”是指含有或缺乏共价附着于构成多肽的氨基酸残基侧链的碳水化合物部分的多肽，包括非糖基化蛋白质和糖基化蛋白质。

[0273] 如本文所用，术语“肽”是指含有或缺乏共价附着于构成肽的氨基酸残基侧链的碳水化合物部分的肽，包括非糖基化肽和糖基化肽。

[0274] 辅因子再生

[0275] GDP-L-岩藻糖合酶在从GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖形成GDP-岩藻糖时消耗辅因子NADPH。因此，在本文描述的本发明的方法中，尽管没有明确说明，但是GDP-岩藻糖是在辅因子NADPH的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生的。

[0276] 由于辅助因子NADPH和$NADP^+$非常昂贵，如果它们在系统中再生以将它们保持在催化量并开发具有成本效益的过程是有利的。

[0277] 可用于NADPH再生的酶是：

[0278] 亚磷酸脱氢酶EC编号1.20.1.1:

[0279] **亚磷酸盐+$NADP^+$⇌磷酸盐+NADPH**

[0280] 葡萄糖脱氢酶EC编号1.1.1.47或1.1.1.118：

[0281] **D-葡萄糖+$NADP^+$⇌D-葡萄糖酸-1,5-内酯+NADPH**

[0282] 甘油脱氢酶EC编号1.1.1.72:

[0283] **甘油+$NADP^+$⇌甘油醛+NADPH**

[0284] 葡萄糖6-磷酸脱氢酶(G6PDH)EC编号1.1.1.49：

[0285] **D-葡萄糖-6-磷酸盐+$NADP^+$⇌6-磷酸-D-葡萄糖酸-1,5-内酯+NADPH+H^+**

[0286] 谷氨酸脱氢酶(GLDH)EC编号1.4.1.4：

[0287] **L-谷氨酸+H_2O +$NADP^+$⇌2-氧代戊二酸+NH_3+NADPH+H^+**

[0288] 因此，在优选的实施方案中，该组酶还包括可用于NADPH再生的上述酶之一，即亚磷酸脱氢酶、甘油脱氢酶、葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶或谷氨酸脱氢酶。更优选地，该组酶还包括选自葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶的酶。

[0289] 因此，本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖或D-甘露糖产生鸟苷5’-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0290] A)提供一种溶液，其包含

[0291] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[0292] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷、用于溶解鸟苷的共溶剂和在D-甘露糖的情况下NAPDH;和

[0293] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/

L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;和亚磷酸脱氢酶、葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶中的任一种;

[0294] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷、NAPDH和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0295] 在一个优选的实施方案中,从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤:

[0296] A)提供一种溶液,其包含

[0297] (i)鸟苷和D-甘露糖

[0298] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0299] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;以及选自亚磷酸脱氢酶、葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸-脱氢酶和谷氨酸脱氢酶的酶;

[0300] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0301] 在一个特别优选的实施方案中,从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤:

[0302] A)提供一种溶液,其包含

[0303] (i)鸟苷和D-甘露糖

[0304] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH、L-谷氨酸和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0305] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、谷氨酸脱氢酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0306] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH、L-谷氨酸和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0307] 在一个特别优选的实施方案中,从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤:

[0308] A)提供一种溶液,其包含

[0309] (i)鸟苷和D-甘露糖

[0310] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH、D-葡萄糖和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0311] 提供包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0312] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH、D-葡萄糖和共溶剂的存在下从鸟苷和

D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0313] 如本文所用,术语"固体支持物"是指酶或其他试剂可直接或通过带有锚定基团的接头附接或固定于的不溶性、官能化材料,使酶易于与过量试剂、可溶性反应产物、副产物或溶剂分离(通过洗涤、过滤、离心等)。固体支持物可以由有机聚合物(例如聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚氟乙烯、聚氧乙烯和聚丙烯酰胺,以及它们的共聚物和接枝物)组成。固体载体也可以是无机物,例如玻璃、二氧化硅、可控孔玻璃(CPG)、反相二氧化硅或金属,例如金或铂。固体支持物也可以由磁性颗粒组成。有关适用于酶固定化的支持材料的概述,请参阅Zdarta等人,Catalysts 2018,8,92和Datta等人,Biotech 2013 3:1-9。

[0314] 固体支持物的配置可以是珠子、整料、球体、颗粒、颗粒床、纤维垫、粒子、凝胶、膜、中空纤维膜、混合基质膜或表面的形式。表面可以是平面的、基本平面的或非平面的。固体支持物可以是多孔的或无孔的,并且可以具有溶胀或非溶胀特性。固体支持物可以以孔、凹陷或其他容器、器皿、特征或位置的形式配置。

[0315] 令人惊讶的是,本发明人发现通过将鸟苷溶解在诸如二甲亚砜的共溶剂中,在已经三小时后实现了鸟苷向GDP-岩藻糖的几乎完全转化(实施例2)。此外,共溶剂不影响用于制备GDP-岩藻糖的酶的活性。作为共溶剂,任何增加或增强鸟苷在水或缓冲液中的溶解度的化合物都是合适的。

[0316] 优选地,共溶剂是选自包括以下各项的组的有机溶剂:甲醇、乙醇、异丙醇、正丙醇、异丁醇、正丁醇、叔丁醇、乙腈、丙酮和二甲亚砜。优选地,共溶剂是极性非质子溶剂,例如二甲基亚砜或二甲基甲酰胺。更优选地,共溶剂是二甲亚砜。因此,本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0317] A)提供一种溶液,其包含

[0318] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[0319] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0320] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0321] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0322] 其中用于溶解鸟苷的共溶剂选自甲醇、乙醇、异丙醇、正丙醇、异丁醇、正丁醇、叔丁醇、乙腈、丙酮和二甲亚砜。

[0323] 优选地,共溶剂是选自包括以下各项的组的有机溶剂:甲醇、乙醇、异丙醇、正丙醇、异丁醇、正丁醇、叔丁醇、乙腈、丙酮和二甲亚砜。更优选地,共溶剂是二甲亚砜。因此,本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0324] A)提供一种溶液,其包含

[0325] (i)鸟苷和L-岩藻糖,

[0326] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0327] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶;

[0328] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0329] 其中用于溶解鸟苷的共溶剂选自甲醇、乙醇、异丙醇、正丙醇、异丁醇、正丁醇、叔丁醇、乙腈、丙酮和二甲亚砜。

[0330] 优选地,用于溶解鸟苷的共溶剂的量保持尽可能低以能够溶解鸟苷。因此,优选共溶剂的量足以使鸟苷完全溶解在本文所述的本发明的方法的步骤A)中提供的溶液中。或者,共溶剂的量足以溶解本文所述的本发明的方法的步骤A)中提供的溶液中鸟苷的量的至少一半。

[0331] 此外,基于步骤A)中提供的溶液的总体积,共溶剂的量为0.01体积%至30体积%。更优选地,基于步骤A)中提供的溶液的总体积,共溶剂的量为0.05体积%至25体积%。甚至更优选地,基于步骤A)中提供的溶液的总体积,共溶剂的量为0.1体积%至15体积%。更优选地,基于步骤A)中提供的溶液的总体积,共溶剂的量为0.1体积%至10体积%。最优选地,基于步骤A)中提供的溶液的总体积,共溶剂的量为1体积%至5体积%。

[0332] 因此,本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0333] A)提供一种溶液,其包含

[0334] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[0335] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0336] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0337] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0338] 其中用于增溶鸟苷的共溶剂的量基于步骤A)中提供的溶液的总体积为1体积%至5体积%。

[0339] 因此,本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0340] A)提供一种溶液,其包含

[0341] (i)鸟苷和L-岩藻糖,

[0342] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0343] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶;

[0344] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0345] 其中用于增溶鸟苷的共溶剂的量基于步骤A)中提供的溶液的总体积为1体积%至5体积%。

[0346] 在一个实施方案中,从鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤:

[0347] A)提供一种溶液,其包含

[0348] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[0349] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0350] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0351] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0352] 其中共溶剂为二甲亚砜并且共溶剂的量基于步骤A)中提供的溶液的总体积为1体积%至5体积%。

[0353] 在一个实施方案中,从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤:

[0354] A)提供一种溶液,其包含

[0355] (i)鸟苷和L-岩藻糖,

[0356] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0357] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶;

[0358] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0359] 其中共溶剂为二甲亚砜并且共溶剂的量基于步骤A)中提供的溶液的总体积为1体积%至5体积%。

[0360] 随着溶解度的增加,能够实现更高浓度的反应混合物,从而降低工艺成本。因此,步骤A)中提供的溶液中鸟苷和L-岩藻糖的浓度优选在0.01mM至100,000mM的范围内。更优选地,鸟苷和L-岩藻糖的浓度优选在0.05mM至50,000mM的范围内。更优选地,鸟苷和L-岩藻糖的浓度优选在0.1mM至10,000mM的范围内。更优选地,鸟苷和L-岩藻糖的浓度优选在0.2mM至5,000mM的范围内。

[0361] 因此,本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0362] A)提供一种溶液,其包含

[0363] (i)鸟苷和L-岩藻糖,

[0364] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0365] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷

酸转移酶；

[0366] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0367] 其中步骤A)提供的溶液中鸟苷和L-岩藻糖的浓度在0.2mM至5,000mM的范围内。

[0368] 随着溶解度的增加，能够实现更高浓度的反应混合物，从而降低工艺成本。因此，步骤A)中提供的溶液中的鸟苷和D-甘露糖的浓度优选在0.01mM至100,000mM的范围内。更优选地，鸟苷和D-甘露糖的浓度优选在0.05mM至50,000mM的范围内。更优选地，鸟苷和D-甘露糖的浓度优选在0.1mM至10,000mM的范围内。更优选地，鸟苷和D-甘露糖的浓度优选在0.2mM至5,000mM的范围内。

[0369] 因此，本发明涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0370] A)提供一种溶液，其包含

[0371] (i)鸟苷和D-甘露糖

[0372] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0373] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[0374] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0375] 其中步骤A)提供的溶液中鸟苷和D-甘露糖的浓度在0.2mM至5,000mM的范围内。

[0376] 优选地，基于步骤A)中提供的溶液的总体积，该组酶中酶的浓度为0.0001mg/mL和100mg/mL。

[0377] 作为岩藻糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-岩藻糖的反应中以及甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-甘露糖的反应中的副产物，形成焦磷酸盐(PPi)。虽然焦磷酸盐在水溶液中不稳定，但它只会缓慢水解成无机磷酸盐(Pi)。高浓度的焦磷酸盐还可能降低参与GDP-岩藻糖形成的L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶和甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的活性。焦磷酸酶能够催化焦磷酸水解为磷酸，从而有效地使GDP-岩藻糖/GDP-甘露糖的形成不可逆。因此，在本发明的优选实施方案中，该组酶进一步包含焦磷酸酶。

[0378] 从鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤：

[0379] A)提供一种溶液，其包含

[0380] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[0381] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0382] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和焦磷酸酶以及并且在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水

酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[0383] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0384] 本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0385] A)提供一种溶液，其包含

[0386] (i)鸟苷和L-岩藻糖，

[0387] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0388] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶和焦磷酸酶；

[0389] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0390] 换言之，本发明的从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤：

[0391] A)提供一种溶液，其包含

[0392] (i)鸟苷和L-岩藻糖；

[0393] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0394] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶和焦磷酸酶；

[0395] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖

[0396] (a)从L-岩藻糖和三磷酸腺苷在L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的催化下形成岩藻糖-1-磷酸，

[0397] (b1)从鸟苷和三磷酸腺苷在鸟苷激酶的催化下形成单磷酸鸟苷；

[0398] (b2')从单磷酸鸟苷和多磷酸盐在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷二磷酸

[0399] (b2")从鸟苷二磷酸和多磷酸盐在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸，

[0400] (c')在L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下，使岩藻糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-岩藻糖和焦磷酸；和

[0401] (c")在焦磷酸酶的存在下将焦磷酸盐转化为磷酸盐。

[0402] 因此，本发明涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0403] A)提供一种溶液，其包含

[0404] (i)鸟苷和D-甘露糖；

[0405] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0406] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶和焦磷酸酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶和焦磷酸酶；

[0407] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖

[0408] (a)从D-甘露糖和三磷酸腺苷在N-乙酰己糖胺-1-激酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0409] 或者

[0410] 从D-甘露糖和三磷酸腺苷在葡萄糖激酶的催化下形成甘露糖-6-磷酸(Man-6-P)，和从甘露糖-6-磷酸在磷酸甘露糖变位酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0411] (b1)从鸟苷和三磷酸腺苷在鸟苷激酶的催化下形成单磷酸鸟苷(GMP)；

[0412] (b2')从单磷酸鸟苷和多磷酸盐在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷二磷酸(GDP)

[0413] (b2")从鸟苷二磷酸和多磷酸鸟苷在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸(GTP)；和

[0414] (c')在D-甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下，使甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-甘露糖和焦磷酸盐

[0415] (c")在焦磷酸酶的存在下将焦磷酸盐转化为磷酸盐。

[0416] (d)从GDP-甘露糖在GDP-甘露糖-4,6-脱水酶的催化下形成GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖;和

[0417] (e)从GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖和NADPH在GDP-L-岩藻糖合酶的催化下形成GDP-岩藻糖。

[0418] 优选地，本发明的从鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤：

[0419] A)提供一种溶液，其包含

[0420] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[0421] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0422] 提供一组包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和焦磷酸酶的酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[0423] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0424] 其中共溶剂是二甲亚砜。

[0425] 优选地，本发明的从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤：

[0426] A)提供一种溶液，其包含

[0427] (i)鸟苷和L-岩藻糖；

[0428] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0429] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶和焦磷酸酶；

[0430] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0431] 其中共溶剂是二甲亚砜。

[0432] 优选地，本文所述的本发明的方法中使用的焦磷酸酶是无机焦磷酸酶。优选地，焦磷酸酶是来自多杀巴斯德氏菌(Pasteurella multocida)的无机焦磷酸酶(PmPpA)。

[0433] 多磷酸盐能够与最初溶解在水介质中的金属离子(例如Ca^{2+}、Mg^{2+}、$Fe^{2+/3+}$)形成稳定的水溶性络合物。这种效应称为螯合，并且防止结合的金属离子参与反应，尤其是酶促反应。因此，螯合的金属离子，特别是Mg^{2+}和Mn^{2+}，不能作为本文所述的本发明的方法中涉及的酶的辅助因子。由于特定多磷酸盐螯合特定金属离子的能力随着多磷酸盐链长的增加而降低，因此在本发明中优选长链多磷酸盐。更优选的是具有至少14个磷酸残基的多磷酸盐。最优选的是具有至少25个磷酸残基的多磷酸盐。

[0434] 因此，本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0435] A)提供一种溶液，其包含

[0436] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[0437] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0438] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[0439] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0440] 其中多磷酸盐是具有至少25个磷酸残基的长链多磷酸盐。

[0441] 因此，本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0442] A)提供一种溶液，其包含

[0443] (i)鸟苷和L-岩藻糖，

[0444] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0445] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶；

[0446] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖；

[0447] 其中多磷酸盐是具有至少25个磷酸残基的长链多磷酸盐

[0448] 优选地，从鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤：

[0449] A)提供一种溶液，其包含

[0450] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[0451] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0452] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0453] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0454] 其中多磷酸盐是具有至少25个磷酸残基的长链多磷酸盐,并且共溶剂是二甲亚砜。

[0455] 优选地,从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤:

[0456] A)提供一种溶液,其包含

[0457] (i)鸟苷和L-岩藻糖,

[0458] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0459] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶和任选地焦磷酸酶;

[0460] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖;

[0461] 其中多磷酸盐是具有至少25个磷酸残基的长链多磷酸盐,并且共溶剂是二甲亚砜。

[0462] 优选地,酶与其他底物存在于单一反应混合物中。混合物可以是均质的(溶液)或异质的。酶可以固定在或不固定在固体支持物上。因此,根据本发明的方法的另一方面,在单一反应混合物中产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0463] 因此,从鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤:

[0464] A)提供一种混合物,其包含

[0465] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[0466] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0467] (iii)一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0468] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0469] 因此,从鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方

法包括以下步骤：

[0470] A)提供一种混合物，其包含

[0471] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[0472] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷、用于溶解鸟苷的共溶剂和在D-甘露糖的情况下NADPH；和

[0473] (iii)一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[0474] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0475] 因此，从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤：

[0476] A)提供一种混合物，其包含

[0477] (i)鸟苷和L-岩藻糖；

[0478] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0479] (iii)一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶；

[0480] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0481] 另外，从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤：

[0482] A)提供一种溶液，其包含

[0483] (i)鸟苷和L-岩藻糖；

[0484] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0485] (iii)一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶；

[0486] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0487] 换言之，从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤：

[0488] A)提供一种混合物，其包含

[0489] (i)鸟苷和L-岩藻糖；

[0490] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0491] (iii)至少三种酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶；

[0492] B)在该至少三种酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0493] 优选地，从鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的

方法包括以下步骤：

[0494] A)提供一种溶液，其包含

[0495] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[0496] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0497] (iii)一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、任选地焦磷酸酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和一种GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[0498] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0499] 其中共溶剂是二甲亚砜。

[0500] 优选地，从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤：

[0501] A)提供一种溶液，其包含

[0502] (i)鸟苷和L-岩藻糖；

[0503] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0504] (iii)一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶和任选地焦磷酸酶；

[0505] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖；

[0506] 其中共溶剂是二甲亚砜。

[0507] 从鸟苷和D-甘露糖合成GDP-岩藻糖需要NADPH。如果在级联中再循环昂贵的NADPH，则级联特别经济。此外，通过从$NADP^+$连续再循环NADPH，能够将反应平衡推向GDP-岩藻糖。

[0508] 以下任何酶均可用于从$NADP^+$再循环NADPH：亚磷酸脱氢酶、甘油脱氢酶、葡萄糖脱氢酶(GlcDH)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)和谷氨酸脱氢酶(GLDH)。

[0509] 因此，在一个优选的实施方案中，该组酶还包括葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶中的任一种。

[0510] 本发明涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0511] A)提供一种溶液，其包含

[0512] (i)鸟苷和D-甘露糖

[0513] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0514] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和

[0515] (a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶，以及选自葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶的酶；或者

[0516] (b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶，以及选自葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶的

酶；

[0517] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，优选共溶剂是二甲亚砜。

[0518] 因此，本发明涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0519] A)提供一种溶液，其包含

[0520] (i)鸟苷和D-甘露糖

[0521] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0522] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和

[0523] (a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶，以及葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶中的任一种；或者

[0524] (b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶，以及葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶中的任一种；

[0525] B)通过以下步骤在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂优选二甲亚砜的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖

[0526] (a)从D-甘露糖和三磷酸腺苷在N-乙酰己糖胺-1-激酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0527] 或者

[0528] 从D-甘露糖和三磷酸腺苷在葡萄糖激酶的催化下形成甘露糖-6-磷酸(Man-6-P)，和从甘露糖-6-磷酸在磷酸甘露糖变位酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)；

[0529] (b1)从鸟苷和三磷酸腺苷在鸟苷激酶的催化下形成单磷酸鸟苷(GMP)；

[0530] (b2')从单磷酸鸟苷和多磷酸盐在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷二磷酸(GDP)；

[0531] (b2")从鸟苷二磷酸和多磷酸鸟苷在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸(GTP)；

[0532] (c')在D-甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下，使甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-甘露糖和焦磷酸盐盐

[0533] (d)从GDP-甘露糖在GDP-甘露糖-4,6-脱水酶的催化下形成GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖；

[0534] (e)从GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖和NADPH在GDP-L-岩藻糖合酶的催化下形成GDP-岩藻糖；和

[0535] (f)从$NADP^+$在葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸-脱氢酶和谷氨酸脱氢酶中的任一种的催化下再生NADPH。

[0536] 优选地，本发明涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0537] A)提供一种溶液，其包含

[0538] (i)鸟苷和D-甘露糖

[0539] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0540] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和

[0541] (a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶、焦磷酸酶,以及葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸-脱氢酶和谷氨酸脱氢酶中的任一种;或者

[0542] (b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶、焦磷酸酶,以及葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸-脱氢酶和谷氨酸脱氢酶中的任一种;

[0543] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,优选共溶剂是二甲亚砜。

[0544] 因此,本发明涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0545] A)提供一种溶液,其包含

[0546] (i)鸟苷和D-甘露糖;

[0547] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0548] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和

[0549] (a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶、焦磷酸酶,以及葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸-脱氢酶和谷氨酸脱氢酶中的任一种;或者

[0550] (b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶、焦磷酸酶,以及葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸-脱氢酶和谷氨酸脱氢酶中的任一种;

[0551] B)通过以下步骤在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂优选二甲亚砜的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖

[0552] (a)从D-甘露糖和三磷酸腺苷在N-乙酰己糖胺-1-激酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0553] 或者

[0554] 从D-甘露糖和三磷酸腺苷在葡萄糖激酶的催化下形成甘露糖-6-磷酸(Man-6-P),和从甘露糖-6-磷酸在磷酸甘露糖变位酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P);

[0555] (b1)从鸟苷和三磷酸腺苷在鸟苷激酶的催化下形成单磷酸鸟苷(GMP);

[0556] (b2')从单磷酸鸟苷和多磷酸盐在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷二磷酸(GDP),

[0557] (b2")从鸟苷二磷酸和多磷酸鸟苷在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸(GTP);和

[0558] (c')在D-甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下,甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-甘露糖和焦磷酸盐

[0559] (c")在焦磷酸酶的存在下将焦磷酸盐转化为磷酸盐。

[0560] (d)从GDP-甘露糖在GDP-甘露糖-4,6-脱水酶的催化下形成GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖;和

[0561] (e)从GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖和NADPH在GDP-L-岩藻糖合酶的催化下形成GDP-岩藻糖;和

[0562] (f)从$NADP^+$在葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸-脱氢酶和谷氨酸脱氢酶中的任一种

的催化下再生NADPH。

[0563] 在从鸟苷和D-甘露糖合成GDP-岩藻糖的过程中,GDP可以通过鸟苷酸激酶(GMK)从GMP原位产生。

[0564] 因此,本发明涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0565] A)提供一种溶液,其包含

[0566] (i)鸟苷和D-甘露糖

[0567] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0568] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、鸟苷酸激酶(GMK)和

[0569] (a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;或者

[0570] (b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0571] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,优选共溶剂是二甲亚砜。

[0572] 因此,本发明涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0573] A)提供一种溶液,其包含

[0574] (i)鸟苷和D-甘露糖;

[0575] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0576] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、鸟苷酸激酶(GMK)和

[0577] (a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;或者

[0578] (b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶、焦磷酸酶;

[0579] B)通过以下步骤在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH和共溶剂优选二甲亚砜的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖

[0580] (a)从D-甘露糖和三磷酸腺苷在N-乙酰己糖胺-1-激酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0581] 或者

[0582] 从D-甘露糖和三磷酸腺苷在葡萄糖激酶的催化下形成甘露糖-6-磷酸(Man-6-P),和从甘露糖-6-磷酸在磷酸甘露糖变位酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P);

[0583] (b1)从鸟苷和三磷酸腺苷在鸟苷激酶的催化下形成单磷酸鸟苷(GMP);

[0584] (b2')从单磷酸鸟苷和多磷酸鸟苷在鸟苷酸激酶(GMK)的催化下形成鸟苷二磷酸(GDP),

[0585] (b2")从鸟苷二磷酸和多磷酸鸟苷在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸(GTP);和

[0586] (c')在D-甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下,使甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-甘露糖和焦磷酸盐

[0587] (d)从GDP-甘露糖在GDP-甘露糖-4,6-脱水酶的催化下形成GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖;和

[0588] (e)从GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖和NADPH在GDP-L-岩藻糖合酶的催化下形成GDP-岩藻糖。

[0589] 优选地,本发明涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0590] A)提供一种溶液,其包含

[0591] (i)鸟苷和D-甘露糖

[0592] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0593] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、鸟苷酸激酶(GMK)和

[0594] (a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶、焦磷酸酶;或者

[0595] (b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶、焦磷酸酶;

[0596] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,优选共溶剂是二甲亚砜。

[0597] 因此,本发明涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0598] A)提供一种溶液,其包含

[0599] (i)鸟苷和D-甘露糖

[0600] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0601] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、鸟苷酸激酶(GMK)和

[0602] (a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶、焦磷酸酶;或者

[0603] (b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶、焦磷酸酶;

[0604] B)通过以下步骤在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH和共溶剂优选二甲亚砜的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖

[0605] (a)从D-甘露糖和三磷酸腺苷在N-乙酰己糖胺-1-激酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0606] 或者

[0607] 从D-甘露糖和三磷酸腺苷在葡萄糖激酶的催化下形成甘露糖-6-磷酸(Man-6-P),和从甘露糖-6-磷酸在磷酸甘露糖变位酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P);

[0608] (b1)从鸟苷和三磷酸腺苷在鸟苷激酶的催化下形成单磷酸鸟苷(GMP);

[0609] (b2')从单磷酸鸟苷和多磷酸鸟苷在鸟苷酸激酶(GMK)的催化下形成鸟苷二磷酸(GDP),

[0610] (b2")从鸟苷二磷酸和多磷酸鸟苷在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸(GTP);和

[0611] (c')在D-甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下,使甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸

反应以产生GDP-甘露糖和焦磷酸盐

[0612] (c")在焦磷酸酶的存在下将焦磷酸盐转化为磷酸盐。

[0613] (d)从GDP-甘露糖在GDP-甘露糖-4,6-脱水酶的催化下形成GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖;和

[0614] (e)从GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖和NADPH在GDP-L-岩藻糖合酶的催化下形成GDP-岩藻糖。

[0615] 优选地,本发明涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0616] A)提供一种溶液,其包含

[0617] (i)鸟苷和D-甘露糖

[0618] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0619] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、鸟苷酸激酶(GMK)和

[0620] (a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶,以及葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶中的任一种;或者

[0621] (b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶,以及葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶中的任一种;

[0622] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,优选共溶剂是二甲亚砜。

[0623] 因此,本发明涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0624] A)提供一种溶液,其包含

[0625] (i)鸟苷和D-甘露糖

[0626] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0627] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、鸟苷酸激酶(GMK)和

[0628] (a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶,以及葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶中的任一种;或者

[0629] (b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶,以及葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶中的任一种;

[0630] B)通过以下步骤在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂优选二甲亚砜的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0631] (a)从D-甘露糖和三磷酸腺苷在N-乙酰己糖胺-1-激酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0632] 或者

[0633] 从D-甘露糖和三磷酸腺苷在葡萄糖激酶的催化下形成甘露糖-6-磷酸(Man-6-P),和从甘露糖-6-磷酸在磷酸甘露糖变位酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P);

[0634] (b1)从鸟苷和三磷酸腺苷在鸟苷激酶的催化下形成单磷酸鸟苷(GMP)；

[0635] (b2')从单磷酸鸟苷和多磷酸鸟苷在鸟苷酸激酶(GMK)的催化下形成鸟苷二磷酸(GDP)，

[0636] (b2")从鸟苷二磷酸和多磷酸鸟苷在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸(GTP)；和

[0637] (c')在D-甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下，使甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-甘露糖和焦磷酸盐；

[0638] (d)从GDP-甘露糖在GDP-甘露糖-4,6-脱水酶的催化下形成GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖；

[0639] (e)从GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖和NADPH在GDP-L-岩藻糖合酶的催化下形成GDP-岩藻糖；和

[0640] (f)从$NADP^+$在葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸-脱氢酶和谷氨酸脱氢酶中的任一种的催化下再生NADPH。

[0641] 还优选地，本发明涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0642] A)提供一种溶液，其包含

[0643] (i)鸟苷和D-甘露糖

[0644] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0645] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、鸟苷酸激酶(GMK)和

[0646] (a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶、焦磷酸酶，以及葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸-脱氢酶和谷氨酸脱氢酶中的任一种；或者

[0647] (b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶、焦磷酸酶，以及葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸-脱氢酶和谷氨酸脱氢酶中的任一种；

[0648] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，优选共溶剂是二甲亚砜。

[0649] 因此，本发明涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0650] A)提供一种溶液，其包含

[0651] (i)鸟苷和D-甘露糖；

[0652] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0653] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、鸟苷酸激酶(GMK)和

[0654] (a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶、焦磷酸酶，以及葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸-脱氢酶和谷氨酸脱氢酶中的任一种；或者

[0655] (b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶、焦磷酸酶，以及葡萄糖脱氢酶，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶中的任一种；

[0656] B)通过以下步骤在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂优选二甲亚砜的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖

[0657] (a)从D-甘露糖和三磷酸腺苷在N-乙酰己糖胺-1-激酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[0658] 或者

[0659] 从D-甘露糖和三磷酸腺苷在葡萄糖激酶的催化下形成甘露糖-6-磷酸(Man-6-P)，和从甘露糖-6-磷酸在磷酸甘露糖变位酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)；

[0660] (b1)从鸟苷和三磷酸腺苷在鸟苷激酶的催化下形成单磷酸鸟苷(GMP)；

[0661] (b2')从单磷酸鸟苷和多磷酸鸟苷在鸟苷酸激酶(GMK)的催化下形成鸟苷二磷酸(GDP)，

[0662] (b2")从鸟苷二磷酸和多磷酸鸟苷在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸(GTP)；和

[0663] (c')在D-甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下，使甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-甘露糖和焦磷酸盐

[0664] (c")在焦磷酸酶的存在下将焦磷酸盐转化为磷酸盐。

[0665] (d)从GDP-甘露糖在GDP-甘露糖-4,6-脱水酶的催化下形成GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖；和

[0666] (e)从GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖和NADPH在GDP-L-岩藻糖合酶的催化下形成GDP-岩藻糖；和

[0667] (f)从$NADP^+$在葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸-脱氢酶和谷氨酸脱氢酶中的任一种的催化下再生NADPH。

[0668] 由于在本文描述的用于从鸟苷和D-甘露糖产生GDP-岩藻糖的本发明的方法中副产物$NADP^+$的再循环，在步骤A)中提供的溶液中需要较低量的NADPH。因此，在一个实施方案中，NADPH与D-甘露糖的摩尔比为0.01和0.5，更优选为0.02和0.5，更优选为0.03和0.4，更优选为0.03和0.3，最优选为0.05和0.2。在一个实施方案中，NADPH与D-甘露糖的摩尔比为0.05。在一个实施方案中，NADPH与D-甘露糖的摩尔比为0.1。在一个实施方案中，NADPH与D-甘露糖的摩尔比为0.2。在一个实施方案中，NADPH与D-甘露糖的摩尔比为0.5。

[0669] 本发明的产生GDP-岩藻糖的方法也可以用一组经固定的酶进行。然后将酶固定在固体支持物上，使得其保持其活性、底物特异性、立体选择性和/或其他特性。合适的固体支持物是例如珠子、整料、球体、颗粒、颗粒床、纤维垫、粒子、凝胶、膜、中空纤维膜、混合基质膜、表面或其他固相材料。在一个实施方案中，每种酶(即鸟苷激酶、多磷酸激酶、L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶和任选地焦磷酸酶)被固定在固体支持物上。在另一个实施方案中，每种酶(即鸟苷激酶、多磷酸激酶、葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶、GDP-L-岩藻糖合酶、任选地焦磷酸酶、任选地鸟苷酸激酶和任选地选自葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶的酶)被固定在固体支持物上。在另一个实施方案中，每种酶(即鸟苷激酶、多磷酸激酶、N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶、GDP-L-岩藻糖合酶、任选地焦磷酸酶、任选地鸟苷酸激酶和任选地选自葡萄糖脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和谷氨酸脱氢酶的酶)被固定在固体支持物上。

[0670] 在一个实施方案中，该组酶中仅一些酶固定在固体支持物上。在进一步的实施方案中，选自包含鸟苷激酶、多磷酸激酶或多磷酸激酶的组合例如1D和2D-ppk2和ppk3的组合、L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶和任选地焦磷酸酶的该组酶的仅一种酶被固定在固体支持物上。在又一个实施方案中，选自包括鸟苷激酶、多磷酸激酶、L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶和任选地焦磷酸酶的该组酶的至少一种酶被固定在固体支持物上。优选地，多磷酸激酶被固定在固体支持物上。优选地，鸟苷激酶被固定在固体支持物上。优选地，L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶被固定在固体支持物上。优选地，焦磷酸酶被固定在固体支持物上。

[0671] 因此，本发明还涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0672] A)提供一种溶液，其包含

[0673] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖，

[0674] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0675] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[0676] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0677] 其中该组酶结合或固定在固体支持物上。

[0678] 因此，本发明还涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0679] A)提供一种溶液，其包含

[0680] (i)鸟苷和L-岩藻糖，

[0681] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0682] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶；

[0683] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0684] 其中该组酶结合或固定在固体支持物上。

[0685] 因此，本发明还涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0686] A)提供一种溶液，其包含

[0687] (i)鸟苷和D-甘露糖，

[0688] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0689] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰

己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[0690] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0691] 其中该组酶结合或固定在固体支持物上。

[0692] 此外，本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0693] A)提供一种溶液，其包含

[0694] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖，

[0695] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0696] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、焦磷酸酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[0697] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0698] 其中该组酶结合或固定在固体支持物上。

[0699] 此外，本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0700] A)提供一种溶液，其包含

[0701] (i)鸟苷和L-岩藻糖，

[0702] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0703] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶和焦磷酸酶；

[0704] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0705] 其中该组酶固定在固体支持物上。

[0706] 此外，本发明涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0707] A)提供一种溶液，其包含

[0708] (i)鸟苷和D-甘露糖，

[0709] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0710] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、焦磷酸酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[0711] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟

苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0712] 其中该组酶固定在固体支持物上。

[0713] 本发明还涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0714] A)提供一种溶液，其包含

[0715] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖，

[0716] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0717] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶，磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[0718] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0719] 其中该组酶中的至少一种酶固定在固体支持物上。

[0720] 因此，本发明还涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0721] A)提供一种溶液，其包含

[0722] (i)鸟苷和L-岩藻糖，

[0723] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0724] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶；

[0725] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0726] 其中该组酶中的至少一种酶固定在固体支持物上。

[0727] 因此，本发明还涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0728] A)提供一种溶液，其包含

[0729] (i)鸟苷和D-甘露糖，

[0730] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0731] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[0732] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0733] 其中该组酶中的至少一种酶固定在固体支持物上。

[0734] 优选地，本文所述的本发明的方法中使用的酶共同固定在固体支持物上。由于底物扩散时间的显著减少，将连续作用的酶固定在有限空间内提高转化的催化效率。此外，底

物的原位形成产生高局部浓度,从而导致动力学增强,并可以节省大量成本。共同固定通常是通过在固定在固体支持物上之前将酶混合来实现的。

[0735] 因此,本发明还涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0736] A)提供一种溶液,其包含

[0737] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖,

[0738] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0739] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶,磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0740] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0741] 其中该组酶被共同固定在固体支持物上。

[0742] 因此,本发明还涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0743] A)提供一种溶液,其包含

[0744] (i)鸟苷和L-岩藻糖,

[0745] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0746] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶;

[0747] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0748] 其中该组酶被共同固定在固体支持物上。

[0749] 因此,本发明还涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0750] A)提供一种溶液,其包含

[0751] (i)鸟苷和D-甘露糖,

[0752] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0753] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0754] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0755] 其中该组酶被共同固定在固体支持物上。

[0756] 本发明还涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0757] A)提供一种溶液,其包含

[0758] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖,

[0759] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0760] 提供一组共同固定在固体支持物上的酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0761] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0762] 因此,本发明还涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0763] A)提供一种溶液,其包含

[0764] (i)鸟苷和L-岩藻糖,

[0765] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0766] 提供一组共同固定在固体支持物上的酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶;

[0767] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0768] 因此,本发明还涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0769] A)提供一种溶液,其包含

[0770] (i)鸟苷和D-甘露糖,

[0771] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0772] 提供一组共同固定在固体支持物上的酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0773] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0774] 本发明还涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0775] A)提供一种溶液,其包含

[0776] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖,

[0777] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0778] 提供一组共同固定在固体支持物上的酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和

GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[0779] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0780] 其中共溶剂是二甲亚砜。

[0781] 因此，本发明还涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0782] A)提供一种溶液，其包含

[0783] (i)鸟苷和L-岩藻糖，

[0784] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0785] 提供一组共同固定在固体支持物上的酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶；

[0786] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0787] 其中共溶剂是二甲亚砜。

[0788] 因此，本发明还涉及一种从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0789] A)提供一种溶液，其包含

[0790] (i)鸟苷和D-甘露糖，

[0791] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0792] 提供一组共同固定在固体支持物上的酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[0793] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0794] 其中共溶剂是二甲亚砜。

[0795] 本发明还涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0796] A)提供一种溶液，其包含

[0797] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖，

[0798] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0799] 提供一组共同固定在固体支持物上的酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[0800] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟

苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0801] 其中固体支持物具有珠子、整料、球、颗粒、颗粒床、纤维垫、粒子、凝胶、膜、中空纤维膜、混合基质膜或表面的形式。

[0802] 在此类实施方案中，经固定的酶可促进从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，并且在反应完成后，经固定的酶容易保留(例如，通过保留酶被固定在其上的珠子)，然后在后续运行中重复使用或再循环。这种固定化生物催化过程可以进一步提高效率和降低成本。此外，本发明的方法可以通过使步骤A)的进料溶液通过含有固定在固体支持物上的该组酶的反应器以连续方式进行。

[0803] 因此，在一个实施方案中，从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤：

[0804] A)提供一种进料溶液，其包含

[0805] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖，

[0806] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0807] 提供一组固定在固体支持物上的酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶，其中包含经固定的该组酶的固体支持物位于化学反应器中，

[0808] B)通过使来自步骤A)的进料溶液连续通过装载有包含经固定的该组酶的固体支持物的化学反应器，在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0809] 此外，从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤：

[0810] A)提供一种进料溶液，其包含

[0811] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖，

[0812] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0813] 提供一组共同固定在固体支持物上的酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶，其中包含经共同固定的该组酶的固体支持物位于化学反应器中，

[0814] B)通过使来自步骤A)的进料溶液连续通过装载有包含经共同固定的该组酶的固体支持物的化学反应器，在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[0815] 其中共溶剂是二甲亚砜。

[0816] 因此,从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤:

[0817] A)提供一种进料溶液,其包含

[0818] (i)鸟苷和L-岩藻糖,

[0819] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0820] 提供一组共同固定在固体支持物上的酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶,其中包含经共同固定的该组酶的固体支持物位于化学反应器中,

[0821] B)通过使来自步骤A)的进料溶液连续通过装载有包含经共同固定的该组酶的固体支持物的化学反应器,在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0822] 其中共溶剂是二甲亚砜。

[0823] 因此,从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤:

[0824] A)提供一种进料溶液,其包含

[0825] (i)鸟苷和L-D-甘露糖,

[0826] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0827] 提供一组共同固定在固体支持物上的酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶,其中包含经共同固定的该组酶的固体支持物位于化学反应器中,

[0828] B)通过使来自步骤A)的进料溶液连续通过装载有包含经共同固定的该组酶的固体支持物的化学反应器,在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0829] 其中共溶剂是二甲亚砜。

[0830] 酶固定化方法是本领域公知的。酶能够非共价或共价结合,例如吸附、共价结合、离子结合、金属结合、交联或结晶。将酶缀合和固定到固体支持物(例如,树脂、膜、珠子、玻璃等)的各种方法是本领域众所周知的并且描述于例如:Yi等人,Process Biochemistry 2007,42,895;Martin等人,Applied Microbiology and Biotechnology 2007,76,843;Koszelewski等人,Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic,2010,63,39;Truppo等人,Org.Process Res.Dev.,2011,15,1033;Hermanson,G.T.,Bioconjugate Techniques,Second Edition,Academic Press(2008);Mateo等人,Biotechnology Progress,2002,18,629;和Bioconjugation Protocols:Strategies and Methods,In Methods in Molecular Biology,C.M.Niemeyer ed.,Humana Press(2004)。

[0831] 本文所述的本发明的方法中使用的酶可以通过重组方法从细菌如大肠杆菌制备。从细胞裂解获得的含酶溶液(其通常经过离心和过滤以去除细胞碎片)可直接用于将酶固定在固体支持物上。因此,不需要进一步的纯化步骤或分离步骤,并且粗细胞裂解物可用于将酶固定在固体支持物上,使得它们保留其活性、底物特异性、立体选择性和/或其他特性。

[0832] 因此,本发明进一步涉及从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0833] A)提供一种溶液,其包含

[0834] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖,

[0835] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0836] 提供一组固定在固体支持物上的酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0837] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖酶,

[0838] 其中该组酶被固定在来自细胞裂解物的固体支持物上。

[0839] 此外,本发明涉及从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0840] A)提供一种溶液,其包含

[0841] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖,

[0842] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0843] 提供一组固定在固体支持物上的酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0844] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖酶,

[0845] 其中该组酶被固定在来自粗细胞裂解物的固体支持物上。

[0846] 此外,本发明涉及从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0847] A)提供一种溶液,其包含

[0848] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖,

[0849] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0850] 提供一组共同固定在固体支持物上的酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、任选地焦磷酸酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0851] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖酶,

[0852] 其中该组酶被共同固定在来自细胞裂解物的固体支持物上。

[0853] 此外，本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0854] A)提供一种溶液，其包含

[0855] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖，

[0856] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0857] 提供一组共同固定在固体支持物上的酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、任选地焦磷酸酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶，甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[0858] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖酶，其中该组酶共同固定在来自细胞裂解物的固体支持物上，并且共溶剂是二甲亚砜。

[0859] 此外，本发明涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法，包括以下步骤：

[0860] A)提供一种溶液，其包含

[0861] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖，

[0862] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[0863] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、任选地焦磷酸酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[0864] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖酶，

[0865] 其中该组酶中的至少一种酶共同固定在来自细胞裂解物的固体支持物上。

[0866] 用于固定本发明的方法中使用的酶的固体支持物包括但不限于珠子或树脂，其包含具有环氧化物官能团的聚甲基丙烯酸酯、具有环氧化物官能团的聚甲基丙烯酸酯、具有氨基环氧化物官能团的聚甲基丙烯酸酯、具有乙二胺官能团的聚甲基丙烯酸酯、具有环氧官能团的聚丙烯酸、具有阴离子/氨基C6间隔官能团的聚丙烯酸、具有阴离子/叔胺官能团的聚丙烯酸、具有阴离子/季胺官能团的聚苯乙烯、具有阳离子/磺酸官能团的聚苯乙烯、具有羧酸酯官能团的聚丙烯酸、具有苯基官能团的聚苯乙烯、具有十八烷基官能团的聚甲基丙烯酸酯、具有苯乙烯/甲基官能团的聚苯乙烯、具有Ni-NTA官能团的磁性二氧化硅颗粒，或具有磁铁矿核和具有Ni-NTA官能团的葡聚糖壳的磁性纳米颗粒。用于固定本发明的方法中使用的酶的示例性固体支持物包括但不限于sepabeads(Resindion)：EC-EP、EP403/M、EC-HFA、EC-EA/M和EC-HA；immobeads(ChiralVision)IB-COV1、IB-COV2、IB-COV3、IB-ANI1、

IB-ANI2、IB-ANI3、IB-ANI4、IB-CAT1、IB-ADS1、IB-ADS2、IB-ADS3和IB-ADS4;Eupergit(**Röhm** GmbH&Co.KG)和磁性颗粒(micromod GmbH):Nano-mag、Sicastar-6和Sicastar-1.5。

[0867] 优选地,固体支持物由选自以下的树脂或珠子组成:sepabeads(Resindion):EC-EP、EP403/M、EC-EA/M和EC-HA;immobeads(ChiralVision)IB-COV1、IB-COV2、IB-COV3、IB-ANI1、IB-CAT1、IB-ADS1、IB-ADS2、IB-ADS3和IB-ADS4;Eupergit(**Röhm**GmbH&Co.KG)和磁性颗粒(micromod GmbH):Nano-mag、Sicastar-6和Sicastar-1.5。

[0868] 因此,本发明进一步涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0869] A)提供一种溶液,其包含

[0870] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖,

[0871] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0872] 提供一组固定在固体支持物上的酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0873] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖酶,

[0874] 其中固体支持物由选自以下的树脂或珠子组成:sepabeads:EC-EP、EP403/M、EC-EA/M和EC-HA;immobeads:IB-COV1、IB-COV2、IB-COV3、IB-ANI1、IB-CAT1、IB-ADS1、IB-ADS2、IB-ADS3和IB-ADS4;Eupergit和磁性颗粒:Nano-mag、Sicastar-6和Sicastar-1.5。

[0875] 此外,本发明还涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0876] A)提供一种溶液,其包含

[0877] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖,

[0878] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0879] 提供一组固定在固体支持物上的酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0880] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖酶,

[0881] 其中所述固体支持物由选自以下的树脂或珠子组成:sepabeads:EC-EP、EP403/M、EC-EA/M和EC-HA;immobeads:IB-COV1、IB-COV2、IB-COV3、IB-ANI1、IB-CAT1、IB-ADS1、IB-ADS2、IB-ADS3和IB-ADS4;Eupergit和磁性颗粒:Nano-mag、Sicastar-6和Sicastar-1.5;和

[0882] 其中共溶剂是二甲亚砜。

[0883] 此外,本发明还涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0884] A)提供一种溶液,其包含

[0885] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖,

[0886] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0887] 提供一组固定在固体支持物上的酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0888] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖酶,

[0889] 其中所述固体载体包括珠子或树脂,其包含具有环氧化物官能团的聚甲基丙烯酸酯、具有环氧化物官能团的聚甲基丙烯酸酯、具有氨基环氧化物官能团的聚甲基丙烯酸酯、具有乙二胺官能团的聚甲基丙烯酸酯、具有环氧官能团的聚丙烯酸、具有阴离子/氨基C6间隔官能团的聚丙烯酸、具有阴离子/叔胺官能团的聚丙烯酸、具有阴离子/季胺官能团的聚苯乙烯、具有阳离子/磺酸官能团的聚苯乙烯、具有羧酸酯官能团的聚丙烯酸、具有苯基官能团的聚苯乙烯、具有十八烷基官能团的聚甲基丙烯酸酯、具有苯乙烯/甲基官能团的聚苯乙烯、具有Ni-NTA官能团的磁性二氧化硅颗粒,或具有磁铁矿核和具有Ni-NTA官能团的葡聚糖壳的磁性纳米颗粒。

[0890] 在本发明的另一个实施方案中,产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括额外的步骤C):

[0891] C)分离鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0892] 在本发明的另一个实施方案中,产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括额外的步骤C):

[0893] C)通过离子交换色谱分离鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0894] 因此,本发明进一步涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0895] A)提供一种溶液,其包含

[0896] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[0897] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0898] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0899] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟

苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0900] C)分离鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0901] 因此,本发明进一步涉及一种从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法,包括以下步骤:

[0902] A)提供一种溶液,其包含

[0903] (i)鸟苷和L-岩藻糖,

[0904] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0905] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶;

[0906] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖;和

[0907] C)分离鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0908] 优选地,从鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤:

[0909] A)提供一种溶液,其包含

[0910] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[0911] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0912] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;和焦磷酸酶;

[0913] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0914] C)分离鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0915] 优选地,从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤:

[0916] A)提供一种溶液,其包含

[0917] (i)鸟苷和L-岩藻糖,

[0918] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0919] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶;和焦磷酸酶;

[0920] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖;和

[0921] C)分离鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0922] 优选地,从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤:

[0923] A)提供一种溶液,其包含

[0924] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖,

[0925] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0926] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、任选地焦磷酸酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0927] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖酶;和

[0928] C)分离鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0929] 其中该组酶中的至少一种酶固定在固体支持物上。

[0930] 优选地,从鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤:

[0931] A)提供一种溶液,其包含

[0932] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[0933] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0934] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶,磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶,GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;和任选地焦磷酸酶;

[0935] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0936] C)分离鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0937] 优选地,从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤:

[0938] A)提供一种溶液,其包含

[0939] (i)鸟苷和L-岩藻糖,

[0940] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0941] 提供一组固定在固体支持物上的酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶;和任选地焦磷酸酶;

[0942] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖;和

[0943] C)分离鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖。

[0944] 优选地,从鸟苷和L-岩藻糖或从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤:

[0945] A)提供一种溶液,其包含

[0946] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖,

[0947] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0948] 提供一组经共同固定的酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、任选地焦磷酸酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0949] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖酶;和

[0950] C)分离鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0951] 其中该组酶被共同固定在来自细胞裂解物的固体支持物上。

[0952] 优选地,从鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤:

[0953] A)提供一种溶液,其包含

[0954] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[0955] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0956] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;和焦磷酸酶;

[0957] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0958] C)分离鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0959] 其中共溶剂是二甲亚砜。

[0960] 优选地,基于步骤A)中提供的溶液的总体积,共溶剂的量为0.01体积%至30体积%。优选地,共溶剂为二甲亚砜并且基于步骤A)中提供的溶液的总体积,二甲亚砜的量为0.01体积%至30体积%。

[0961] 优选地,多磷酸盐是具有至少25个磷酸残基的长链多磷酸盐。

[0962] 优选地,在步骤A)中提供的溶液中鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖的浓度是在0.2mM至5000mM的范围内。

[0963] 优选地,从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖的方法包括以下步骤:

[0964] A)提供一种溶液,其包含

[0965] (i)鸟苷和L-岩藻糖,

[0966] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0967] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶;和任选地焦磷酸酶;

[0968] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖;和

[0969] C)分离鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[0970] 其中共溶剂是二甲亚砜。

[0971] 优选地,基于步骤A)中提供的溶液的总体积,共溶剂的量为0.01体积%至30体积%。优选地,共溶剂为二甲亚砜并且基于步骤A)中提供的溶液的总体积,二甲亚砜的量为0.01体积%至30体积%。

[0972] 优选地,多磷酸盐是具有至少25个磷酸残基的长链多磷酸盐。

[0973] 优选地,步骤A)中提供的溶液中鸟苷和L-岩藻糖的浓度在0.2mM至5,000mM的范围内。

[0974] 岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽和岩藻糖基化的小分子,例如甜叶菊。

[0975] 在本发明的另一方面,本文所述的本发明的方法可用于产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子,例如甜叶菊。

[0976] 因此,在本发明的一个实施方案中,用于产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子的方法包括以下步骤:

[0977] A)提供一种溶液,其包含

[0978] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[0979] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0980] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶,磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶,GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0981] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖酶,和

[0982] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或小分子。

[0983] 因此,在本发明的一个实施方案中,用于产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子的方法包括以下步骤:

[0984] A)提供一种溶液,其包含

[0985] (i)鸟苷和L-岩藻糖，

[0986] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0987] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、岩藻糖基转移酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶;

[0988] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖;和

[0989] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或小分子。

[0990] 因此,在本发明的一个实施方案中,用于产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子的方法包括以下步骤:

[0991] A)提供一种溶液,其包含

[0992] (i)鸟苷和D-甘露糖，

[0993] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[0994] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[0995] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖;和

[0996] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或小分子。

[0997] 在本发明的一个实施方案中,用于产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子的方法包括以下步骤:

[0998] A)提供一种溶液,其包含

[0999] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[1000] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[1001] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[1002] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和

D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[1003] C)分离鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖;和

[1004] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或小分子。

[1005] 在本发明的一个实施方案中,产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子的方法包括以下步骤：

[1006] A)提供一种溶液,其包含

[1007] (i)鸟苷和L-岩藻糖，

[1008] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[1009] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、岩藻糖基转移酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷基转移酶；

[1010] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖；

[1011] C)分离鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖;和

[1012] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或小分子。

[1013] 在本发明的一个实施方案中,产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子的方法包括以下步骤：

[1014] A)提供一种溶液,其包含

[1015] (i)鸟苷和D-甘露糖，

[1016] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[1017] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[1018] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖；

[1019] C)分离鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖;和

[1020] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或小分子。

[1021] 岩藻糖基转移酶催化GDP-岩藻糖与糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子的可用

羟基反应,从而形成岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子和鸟苷二磷酸(GDP)作为副产物。作为在步骤B)中特别是在步骤(b2')中形成的中间产品的GDP然后可以被再利用或再循环。

[1022] 因此,在本发明的一个实施方案中,用于产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子的方法包括以下步骤:

[1023] A)提供一种溶液,其包含

[1024] (i)鸟苷和L-岩藻糖,

[1025] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[1026] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、岩藻糖基转移酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶;

[1027] B)通过以下步骤在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖

[1028] (a)从L-岩藻糖和三磷酸腺苷在L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的催化下形成岩藻糖-1-磷酸,

[1029] (b1)从鸟苷和三磷酸腺苷在鸟苷激酶的催化下形成单磷酸鸟苷;

[1030] (b2')从单磷酸鸟苷和多磷酸盐在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷二磷酸

[1031] (b2")从鸟苷二磷酸和多磷酸盐在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸;和

[1032] (c)在L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下,使岩藻糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-岩藻糖;

[1033] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-1-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或小分子;和

[1034] E)将原位形成的鸟苷二磷酸再循环以形成鸟苷三磷酸。

[1035] 因此,在本发明的一个实施方案中,用于产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子的方法包括以下步骤:

[1036] A)提供一种溶液,其包含

[1037] (i)鸟苷和D-甘露糖;

[1038] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[1039] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶和焦磷酸酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶,

[1040] B)通过以下步骤在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖

[1041] (a)从D-甘露糖和三磷酸腺苷在N-乙酰己糖胺-1-激酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[1042] 或者

[1043] 从D-甘露糖和三磷酸腺苷在葡萄糖激酶的催化下形成甘露糖-6-磷酸(Man-6-P)，和从甘露糖-6-磷酸在磷酸甘露糖变位酶的催化下形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P)

[1044] (b1)从鸟苷和三磷酸腺苷在鸟苷激酶的催化下形成单磷酸鸟苷(GMP)；

[1045] (b2')从单磷酸鸟苷和多磷酸盐在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷二磷酸(GDP)

[1046] (b2")从鸟苷二磷酸和多磷酸鸟苷在多磷酸激酶的催化下形成鸟苷三磷酸(GTP)；和

[1047] (c')在D-甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的存在下，使甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-甘露糖和焦磷酸盐

[1048] (c")在焦磷酸酶的存在下将焦磷酸盐转化为磷酸盐。

[1049] (d)从GDP-甘露糖在GDP-甘露糖-4,6-脱水酶的催化下形成GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖;和

[1050] (e)从GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖和NADPH在GDP-L-岩藻糖合酶的催化下形成GDP-岩藻糖。

[1051] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或小分子;和

[1052] E)将原位形成的鸟苷二磷酸再循环以形成鸟苷三磷酸。

[1053] 由于在本文所述的本发明的岩藻糖基化的方法中副产物鸟苷二磷酸的再循环，在步骤A)中提供的溶液中需要较低量的鸟苷。因此，在一个实施方案中，鸟苷与L-岩藻糖或鸟苷与D-甘露糖的摩尔比为0.01至0.5，更优选0.02至0.5，更优选0.03至0.4，更优选0.03至0.3并且最优选0.05至0.2。在一个实施方案中，鸟苷与L-岩藻糖或鸟苷与D-甘露糖的摩尔比为0.05。在一个实施方案中，鸟苷与L-岩藻糖或鸟苷与D-甘露糖的摩尔比为0.1。在一个实施方案中，鸟苷与L-岩藻糖或鸟苷与D-甘露糖的摩尔比为0.2。在一个实施方案中，鸟苷与L-岩藻糖或鸟苷与D-甘露糖的摩尔比为0.5。

[1054] 优选地，用于产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子的方法包括以下步骤：

[1055] A)提供一种溶液，其包含

[1056] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[1057] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[1058] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶，磷酸甘露糖变位酶、甘露糖1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖1-磷酸鸟苷酸转移酶,GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[1059] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[1060] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或小分子，

[1061] F)分离岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子。

[1062] 优选地，用于产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子的方法包括以下步骤：

[1063] A)提供一种溶液，其包含

[1064] (i)鸟苷和L-岩藻糖，

[1065] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[1066] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、岩藻糖基转移酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶；

[1067] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖；

[1068] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或小分子；和

[1069] F)分离岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子。

[1070] 优选地，用于产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子的方法包括以下步骤：

[1071] A)提供一种溶液，其包含

[1072] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[1073] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[1074] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶，磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶,GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[1075] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[1076] C)分离鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖；和

[1077] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或小分子，

[1078] 其中共溶剂是二甲亚砜。

[1079] 优选地，基于步骤A)中提供的溶液的总体积，共溶剂的量为0.01体积％至30体积％。优选地，共溶剂为二甲亚砜并且基于步骤A)中提供的溶液的总体积，二甲亚砜的量为0.01体积％至30体积％。

[1080] 优选地，多磷酸盐是具有至少25个磷酸残基的长链多磷酸盐。

[1081] 优选地，步骤A)中提供的溶液中的鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖的浓度在0.2mM至5,000mM的范围内。

[1082] 优选地，基于步骤A)中提供的溶液的总体积，该组酶中酶的浓度为0.0001mg/mL至100mg/mL。

[1083] 优选地，用于产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子的方法包括以下步骤：

[1084] A)提供一种溶液，其包含

[1085] (i)鸟苷和L-岩藻糖，

[1086] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[1087] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、岩藻糖基转移酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶；

[1088] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖；和

[1089] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或小分子，

[1090] 其中共溶剂是二甲亚砜。

[1091] 优选地，用于产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子的方法包括以下步骤：

[1092] A)提供一种溶液，其包含

[1093] (i)鸟苷和D-甘露糖，

[1094] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[1095] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[1096] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖；和

[1097] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或小分子，

[1098] 其中共溶剂是二甲亚砜。

[1099] 优选地，基于步骤A)中提供的溶液的总体积，共溶剂的量为0.01体积％至30体积％。优选地，共溶剂为二甲亚砜并且基于步骤A)中提供的溶液的总体积，二甲亚砜的量为0.01体积％至30体积％。

[1100] 优选地，多磷酸盐是具有至少25个磷酸残基的长链多磷酸盐。

[1101] 优选地，步骤A)中提供的溶液中鸟苷和L-岩藻糖的浓度在0.2mM至5,000mM的范围内。

[1102] 优选地，基于步骤A)中提供的溶液的总体积，该组酶中酶的浓度为0.0001mg/mL至100mg/mL。

[1103] 优选地，用于产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子的方法包括以下步骤：

[1104] A)提供一种溶液，其包含

[1105] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[1106] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[1107] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶，磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶，GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；和焦磷酸酶；

[1108] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[1109] C)分离鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖；和

[1110] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或小分子。

[1111] 优选地，用于产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子的方法包括以下步骤：

[1112] A)提供一种溶液，其包含

[1113] (i)鸟苷和L-岩藻糖，

[1114] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[1115] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、岩藻糖基转移酶和焦磷酸酶；

[1116] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖；和

[1117] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或小分子。

[1118] 优选地，用于产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子的方法包括以下步骤：

[1119] A)提供一种溶液，其包含

[1120] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖，

[1121] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[1122] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶，磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[1123] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖；和

[1124] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或小分子，

[1125] 其中该组酶中的至少一种酶固定在固体支持物上。

[1126] 在一个实施方案中，用于产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子的方法包括以下步骤：

[1127] A)提供一种溶液，其包含

[1128] (i)鸟苷和L-岩藻糖，

[1129] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[1130] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶和任选地焦磷酸酶；

[1131] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖；和

[1132] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或小分子，

[1133] 其中该组酶中的至少一种酶固定在固体支持物上。

[1134] 在一个实施方案中，用于产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白、岩藻糖基化的肽或岩藻糖基化的小分子的方法包括以下步骤：

[1135] A)提供一种溶液，其包含

[1136] (i)鸟苷和D-甘露糖，

[1137] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[1138] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或N-乙酰己糖

胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[1139] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖；和

[1140] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和糖、糖肽、糖蛋白、蛋白质、肽或小分子产生岩藻糖基化的糖、岩藻糖基化的糖肽、岩藻糖基化的糖蛋白、岩藻糖基化的蛋白质、岩藻糖基化的肽或小分子，

[1141] 其中该组酶中的至少一种酶固定在固体支持物上。

[1142] 在一个实施方案中，岩藻糖基乳糖通过本文所述的本发明的方法产生。因此，在一个实施方案中，本发明的方法包括以下步骤：

[1143] A)提供一种溶液，其包含

[1144] (i)鸟苷和L-岩藻糖，

[1145] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[1146] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、岩藻糖基转移酶和L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶；

[1147] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖；和

[1148] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖产生岩藻糖基乳糖。

[1149] 在一个实施方案中，岩藻糖基乳糖通过本文所述的本发明的方法产生。因此，在一个实施方案中，本发明的方法包括以下步骤：

[1150] A)提供一种溶液，其包含

[1151] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[1152] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[1153] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶，磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖-合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[1154] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[1155] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖产生岩藻糖基乳糖。

[1156] 优选地，岩藻糖基乳糖选自包括2'-岩藻糖基乳糖、3-岩藻糖基乳糖、乳-N-岩藻糖基五糖I、乳-N-岩藻糖基五糖III、乳-N-二岩藻糖基六糖I和乳-N-二岩藻糖基六糖II的组(参见图6)。

[1157] 在一个优选的实施方案中，2'-岩藻糖基乳糖通过本文所述的本发明的方法产生(图10)。因此，在一个实施方案中，本发明的方法包括以下步骤：

[1158] A)提供一种溶液,其包含

[1159] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[1160] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[1161] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶,磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶,GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[1162] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[1163] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖产生2'-岩藻糖基乳糖。

[1164] 在优选的实施方案中,2'-岩藻糖基乳糖通过本文所述的本发明的方法产生。因此,在一个实施方案中,本发明的方法包括以下步骤:

[1165] A)提供一种溶液,其包含

[1166] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[1167] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[1168] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶,磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶,GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[1169] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[1170] D)通过在1型半乳糖苷-α-(1,2)-岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖产生2'-岩藻糖基乳糖。

[1171] 在优选的实施方案中,产生2'-岩藻糖基乳糖的方法包括以下步骤:

[1172] A)提供一种溶液,其包含

[1173] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[1174] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[1175] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶,磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶,GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[1176] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟

苷5’-二磷酸-β-L-岩藻糖，或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5’-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[1177] D)通过在1型半乳糖苷-α-(1,2)-岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5’-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5’-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖产生2’-岩藻糖基乳糖；和

[1178] E)将原位形成的鸟苷二磷酸再循环以形成鸟苷三磷酸。

[1179] 在一个优选的实施方案中，3-岩藻糖基乳糖通过本文所述的本发明的方法产生(图18和19)。因此，在一个实施方案中，本发明的方法包括以下步骤：

[1180] A)提供一种溶液，其包含

[1181] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[1182] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[1183] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶，磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶，GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[1184] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5’-二磷酸-β-L-岩藻糖，或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5’-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[1185] D)通过在岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5’-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5’-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖产生3-岩藻糖基乳糖。

[1186] 在优选的实施方案中，3-岩藻糖基乳糖通过本文所述的本发明的方法产生。因此，在一个实施方案中，本发明的方法包括以下步骤：

[1187] A)提供一种溶液，其包含

[1188] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[1189] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[1190] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶，磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶，GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[1191] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5’-二磷酸-β-L-岩藻糖，或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5’-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[1192] D)通过在3/4-岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5’-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5’-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖产生3-岩藻糖基乳糖。

[1193] 在优选的实施方案中，3-岩藻糖基乳糖通过本文所述的本发明的方法产生。因此，在一个实施方案中，本发明的方法包括以下步骤：

[1194] A)提供一种溶液，其包含

[1195] (i)鸟苷和D-甘露糖

[1196] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[1197] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[1198] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[1199] D)通过在3/4-岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖产生3-岩藻糖基乳糖。

[1200] 在优选的实施方案中,产生3-岩藻糖基乳糖的方法包括以下步骤:

[1201] A)提供一种溶液,其包含

[1202] (i)鸟苷和L-岩藻糖或鸟苷和D-甘露糖

[1203] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[1204] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶和在L-岩藻糖的情况下L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶或在D-甘露糖的情况下(a)葡萄糖激酶,磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶,GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶;

[1205] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和L-岩藻糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖,

[1206] D)通过在3/4-岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖产生3-岩藻糖基乳糖;和

[1207] E)将原位形成的鸟苷二磷酸再循环以形成鸟苷三磷酸。

[1208] 由于在本文所述的本发明的岩藻糖基化的方法中副产物鸟苷二磷酸的再循环,在步骤A)中提供的溶液中需要较低量的鸟苷。因此,在一个实施方案中,鸟苷与L-岩藻糖或鸟苷与D-甘露糖的摩尔比为0.01至0.5,更优选0.02至0.5,更优选0.03至0.4,更优选0.03至0.3并且最优选0.05至0.2。在一个实施方案中,鸟苷与L-岩藻糖或鸟苷与D-甘露糖的摩尔比为0.05。在一个实施方案中,鸟苷与L-岩藻糖或鸟苷与D-甘露糖的摩尔比为0.1。在一个实施方案中,鸟苷与L-岩藻糖或鸟苷与D-甘露糖的摩尔比为0.2。在一个实施方案中,鸟苷与L-岩藻糖或鸟苷与D-甘露糖的摩尔比为0.5。

[1209] 在一个优选的实施方案中,本发明的方法包括以下步骤:

[1210] A)提供一种溶液,其包含

[1211] (i)鸟苷和D-甘露糖

[1212] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH、L-谷氨酸盐和用于溶解鸟苷的共溶剂;和

[1213] 提供一组酶,其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、谷氨酸脱氢酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合

酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[1214] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[1215] D)通过在3/4-岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖产生3-岩藻糖基乳糖，

[1216] E)将原位形成的鸟苷二磷酸再循环以形成鸟苷三磷酸，

[1217] F)由谷氨酸脱氢酶催化的原位形成的$NADP^+$再生NADPH。

[1218] 在一个优选的实施方案中，本发明的方法包括以下步骤：

[1219] A)提供一种溶液，其包含

[1220] (i)鸟苷和D-甘露糖

[1221] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH、D-葡萄糖和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[1222] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖-1-磷酸基转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶、甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[1223] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷、NADPH、D-葡萄糖和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖或在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[1224] D)通过在3/4-岩藻糖基转移酶的存在下在鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖的可用羟基之间形成O-糖苷键从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖和乳糖产生3-岩藻糖基乳糖，

[1225] E)将原位形成的鸟苷二磷酸再循环以形成鸟苷三磷酸，

[1226] F)在谷氨酸脱氢酶的催化下从原位形成的$NADP^+$再生NADPH。

[1227] 由于在本文描述的用于从鸟苷和D-甘露糖产生GDP-岩藻糖的本发明的方法中副产物$NADP^+$的再循环，在步骤A)中提供的溶液中需要较低量的NADPH。因此，在一个实施方案中，NADPH与D-甘露糖的摩尔比为0.01和0.5，更优选为0.02和0.5，更优选为0.03和0.4，更优选为0.03和0.3，最优选为0.05和0.2。在一个实施方案中，NADPH与D-甘露糖的摩尔比为0.05。在一个实施方案中，NADPH与D-甘露糖的摩尔比为0.1。在一个实施方案中，NADPH与D-甘露糖的摩尔比为0.2。在一个实施方案中，NADPH与D-甘露糖的摩尔比为0.5。

[1228] L-岩藻糖的产生

[1229] 由于L-岩藻糖可以被认为是一种昂贵的糖(以非常大的规模)，因此本发明的方法进一步提供了从D-甘露糖合成L-岩藻糖。首先如本文所述从D-甘露糖和鸟苷产生GDP-岩藻糖。之后，通过添加岩藻糖基转移酶(EC2.4.1.344或EC2.4.1.69)或岩藻糖苷酶(EC3.2.1.51)而不添加任何受体，GDP-岩藻糖将水解为岩藻糖，因为转移酶可以可逆地工作。反应方案如图9所示。因此，L-岩藻糖可以从低成本底物如D-甘露糖和鸟苷产生。

[1230] 或者，如实施例10中所述，通过在80至100℃范围内的温度下加热鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖简单地产生L-岩藻糖。优选鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖在该温度下加热0.5至3小时，优选0.5至2小时，更优选0.5至1.5小时，最优选1小时。

[1231] 因此，在一个实施方案中，L-岩藻糖通过如本文所述的本发明的方法从鸟苷和D-甘露糖开始产生。因此，在一个实施方案中，本发明的方法包括以下步骤：

[1232] A)提供一种溶液，其包含

[1233] (i)鸟苷和D-甘露糖

[1234] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[1235] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶；和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶，甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[1236] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[1237] D)在存在岩藻糖基转移酶且不存在受体的情况下，从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖产生L-岩藻糖；或者

[1238] 通过在80至100℃范围内的温度下加热鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖来产生L-岩藻糖。

[1239] 因此，在一个实施方案中，L-岩藻糖通过如本文所述的本发明的方法从鸟苷和D-甘露糖开始产生。因此，在一个实施方案中，本发明的方法包括以下步骤：

[1240] A)提供一种溶液，其包含

[1241] (i)鸟苷和D-甘露糖

[1242] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[1243] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶；和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶，甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[1244] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[1245] D)在存在1型半乳糖苷-α-(1,2)-岩藻糖基转移酶和不存在受体的情况下，从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖产生L-岩藻糖，或

[1246] 通过在80至100℃范围内的温度下加热鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖来产生L-岩藻糖。

[1247] 因此，在一个实施方案中，本发明的方法包括以下步骤：

[1248] A)提供一种溶液，其包含

[1249] (i)鸟苷和D-甘露糖

[1250] (ii)多磷酸盐、三磷酸腺苷和用于溶解鸟苷的共溶剂；和

[1251] 提供一组酶，其包含鸟苷激酶、多磷酸激酶；和(a)葡萄糖激酶、磷酸甘露糖变位酶、甘露糖1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖-4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶或(b)N-乙酰己糖胺-1-激酶，甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶、GDP-甘露糖4,6-脱水酶和GDP-L-岩藻糖合酶；

[1252] B)在该组酶、多磷酸盐、三磷酸腺苷和共溶剂的存在下从鸟苷和D-甘露糖产生鸟

苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖，

[1253] D)在存在1型半乳糖苷-α-(1,2)-岩藻糖基转移酶和不存在受体的情况下，从鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖产生L-岩藻糖，或

[1254] 通过在80至100℃范围内的温度下加热鸟苷5'-二磷酸-β-L-岩藻糖来产生L-岩藻糖，和

[1255] E)将原位形成的鸟苷二磷酸再循环以形成鸟苷三磷酸。

[1256] 由于在本文所述的本发明的岩藻糖基化的方法中副产物鸟苷二磷酸的再循环，在步骤A)中提供的溶液中需要较低量的鸟苷。因此，在一个实施方案中，鸟苷与L-岩藻糖或鸟苷与D-甘露糖的摩尔比为0.01和0.5，更优选为0.02和0.5，更优选为0.03和0.4，更优选为0.03和0.3，最优选为0.05和0.2。在一个实施方案中，鸟苷与L-岩藻糖或鸟苷与D-甘露糖的摩尔比为0.05。在一个实施方案中，鸟苷与L-岩藻糖或鸟苷与D-甘露糖的摩尔比为0.1。在一个实施方案中，鸟苷与L-岩藻糖或鸟苷与D-甘露糖的摩尔比为0.2。在一个实施方案中，鸟苷与L-岩藻糖或鸟苷与D-甘露糖的摩尔比为0.5。

[1257] 如本文所用，术语“受体”是指任何分子或大分子，包括能够被岩藻糖基转移酶岩藻糖基化的糖、肽或蛋白质，即在如本文所述的岩藻糖基转移酶催化的反应中充当底物。因此，受体防止GDP-岩藻糖在水性介质中被岩藻糖基转移酶水解。特别地，受体是亲核的糖基受体。优选地，糖基受体具有氧-碳-、氮-或硫-基亲核基团，其可以与GDP-岩藻糖的岩藻糖基部分形成共价糖苷键。

[1258] 在任何上述发明方法中，优选地，葡萄糖激酶包含至少85％的如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列；磷酸甘露糖变位酶包含至少85％的如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列；N-乙酰己糖胺-1-激酶包含至少85％的如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列；甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶包含至少85％的如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列；GDP-甘露糖-4,6-脱水酶包含至少85％的如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列；GDP-L-岩藻糖合酶包含至少85％的如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列；L-岩藻糖激酶包含至少85％的如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列；鸟苷激酶包含至少85％的如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列；多磷酸激酶包含至少85％的如SEQ ID NO:9(2D-PPK2)和SEQ ID NO:14(PPK3)中所示的氨基酸序列中的任一个；焦磷酸酶包含至少85％的如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列；鸟苷酸激酶(GMK)包含至少85％的如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列；谷氨酸脱氢酶包含至少85％的如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列；葡萄糖-6-磷酸脱氢酶包含至少85％的如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列；葡萄糖脱氢酶包含至少85％的如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列；岩藻糖基转移酶包含至少85％的如SEQ ID NO:16(3/4FT)的氨基酸序列。

[1259] 还优选地，在任何上述发明方法中，葡萄糖激酶包含至少90％的如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列；磷酸甘露糖变位酶包含至少90％的如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列；N-乙酰己糖胺-1-激酶包含至少90％的如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列；甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶包含至少90％的如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列；GDP-甘露糖-4,6-脱水酶包含至少90％的如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列；GDP-L-岩藻糖合酶包含至少90％的如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列；L-岩藻糖激酶包含至少90％的如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列；鸟苷激酶包含至少90％的如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列；多磷酸激酶包含至少90％的SEQ ID NO:9(2D-PPK2)和SEQ ID NO:14(PPK3)所示的氨基酸序列中的任一个；焦磷酸酶

包含至少90％的如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列;鸟苷酸激酶(GMK)包含至少90％的如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列;谷氨酸脱氢酶包含至少90％的如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列;葡萄糖-6-磷酸脱氢酶包含至少90％的如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列;葡萄糖脱氢酶包含至少90％的如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列;岩藻糖基转移酶包含至少90％的如SEQ ID NO:16(3/4FT)所示的氨基酸序列。

[1260] 更优选地,在任何上述发明方法中,葡萄糖激酶包含至少95％的如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;磷酸甘露糖变位酶包含至少95％的如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列;N-乙酰己糖胺-1-激酶包含至少95％的如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶包含至少95％的如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;GDP-甘露糖-4,6-脱水酶包含至少95％的如SEQ ID NO:5所示氨基酸序列;GDP-L-岩藻糖合酶包含至少95％的如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列;L-岩藻糖激酶包含至少95％的如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列;鸟苷激酶包含至少95％的如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;多磷酸激酶包含至少95％的如SEQ ID NO:9(2D-PPK2)和SEQ ID NO:14(PPK3)所示的氨基酸序列中的任一个;焦磷酸酶包含至少95％的如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列;鸟苷酸激酶(GMK)包含至少95％的如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列;谷氨酸脱氢酶包含至少95％的如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列;葡萄糖-6-磷酸脱氢酶包含至少95％的如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列;葡萄糖脱氢酶包含至少95％的如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列;岩藻糖基转移酶包含至少95％的如SEQ ID NO:16(3/4FT)的氨基酸序列。

[1261] 更优选地,在任何上述发明方法中,葡萄糖激酶包含至少98％的如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;磷酸甘露糖变位酶包含至少98％的如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列;N-乙酰己糖胺-1-激酶包含至少98％的如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶包含至少98％的如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;GDP-甘露糖-4,6-脱水酶包含至少98％的如SEQ ID NO:5所示氨基酸序列;GDP-L-岩藻糖合酶包含至少98％的如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列;L-岩藻糖激酶包含至少98％的如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列;鸟苷激酶包含至少98％的如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;多磷酸激酶包含至少98％的如SEQ ID NO:9(2D-PPK2)和SEQ ID NO:14(PPK3)所示的氨基酸序列中的任一个;焦磷酸酶包含至少85％的如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列;鸟苷酸激酶(GMK)包含至少98％的如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列;谷氨酸脱氢酶包含至少98％的如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列;葡萄糖-6-磷酸脱氢酶包含至少98％的如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列;葡萄糖脱氢酶包含至少98％的如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列;岩藻糖基转移酶包含至少98％的如SEQ ID NO:16(3/4FT)的氨基酸序列。

[1262] 最优选地,在任何上述发明方法中,葡萄糖激酶包含如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;磷酸甘露糖变位酶包含如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列;N-乙酰己糖胺-1-激酶包含如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;GDP-甘露糖-4,6-脱水酶包含如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列;GDP-L-岩藻糖合酶包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列;L-岩藻糖激酶包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列;鸟苷激酶包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;多磷酸激酶包含如SEQ ID NO:9(2D-PPK2)和SEQ ID NO:14(PPK3)所示的氨基酸序列中的任一个;焦磷酸酶包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列;鸟苷酸激酶(GMK)包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列;谷

氨酸脱氢酶包含如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列;葡萄糖-6-磷酸脱氢酶包含如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列;葡萄糖脱氢酶包含如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列;岩藻糖基转移酶包含如SEQ ID NO:16(3/4FT)所示的氨基酸序列。

附图说明

[1263] 图1:显示了用于产生GDP-岩藻糖的本发明的方法的反应途径,其由以下组成:(a)从L-岩藻糖和ATP形成岩藻糖-1-磷酸(Fuc-1-P),(b)从鸟苷和多磷酸盐形成鸟苷三磷酸(GTP),以及(c)岩藻糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-岩藻糖。

[1264] 图2:显示了用于产生GDP-岩藻糖的本发明的方法的示例性反应方案,其由以下组成:(a)从L-岩藻糖和ATP在岩藻糖激酶的催化下形成岩藻糖-1-磷酸(Fuc-1-P)(9),(b)从鸟苷和多磷酸在鸟苷激酶/肌苷激酶(7)和多磷酸激酶(8)的催化下形成鸟苷三磷酸(GTP),以及(c)在岩藻糖-1-磷酸转移酶(9)的催化下岩藻糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸反应以产生GDP-岩藻糖

[1265] 图3:显示了用于产生GDP-岩藻糖的本发明的方法的示例性反应方案,其由以下组成:(a)在葡萄糖激酶(1)和磷酸甘露糖变位酶(2)或N-乙酰己糖胺-1-激酶(3)的催化下从D-甘露糖和ATP形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P),(b)在鸟苷激酶/肌苷激酶(7)和多磷酸激酶(8)的催化下从鸟苷和多磷酸形成鸟苷三磷酸(GTP)和(c)甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸在甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶(4)的催化下反应以产生GDP-甘露糖和(d)在GDP-甘露糖-4,6-脱水酶(5)的催化下从GDP-甘露糖形成GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖和(e)在GDP-L-岩藻糖合酶(6)的催化下从GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖和NADPH形成GDP-岩藻糖。

[1266] 图4A:显示了在不同时间点通过本发明的方法制备的GDP-岩藻糖的浓度(参见实施例3)。

[1267] 图4B:显示了在不同时间点使用经固定的酶通过本发明的方法制备的GDP-岩藻糖的浓度(参见实施例5)。

[1268] 图5A:显示了t=0时起始材料的色谱图。

[1269] 图5B:显示了48小时后反应混合物的色谱图。

[1270] 图6:显示了示例性岩藻糖基乳糖。

[1271] 图7:显示了在4℃下孵育24小时后固体支持物上结合的酶的量(参见实施例4)。

[1272] 图8:显示了在30℃下与经固定的酶反应24小时后形成的GDP-岩藻糖的量(参见实施例4)。

[1273] 图9:显示了从鸟苷和D-甘露糖产生L-岩藻糖的本发明的方法的示例性反应方案,其由以下组成:(a)在葡萄糖激酶(1)和磷酸甘露糖变位酶(2)或N-乙酰己糖胺-1-激酶(3)的催化下从D-甘露糖和ATP形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P),(b)从鸟苷和多磷酸鸟苷在鸟苷激酶/肌苷激酶(7)和多磷酸激酶(8)的催化下形成鸟苷三磷酸(GTP),以及(c)甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸在甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的催化下反应以产生GDP-甘露糖和(d)在GDP-甘露糖-4,6-脱水酶的催化下从GDP-甘露糖形成GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖和(e)在GDP-L-岩藻糖合酶的催化下从GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖和NADPH形成GDP-岩藻糖和在没有受体分子的情况下在1型半乳糖苷α-(1,2)-岩藻糖基转移酶的催化下从GDP-L-岩藻糖形成L-岩藻糖。

[1274] 图10:显示了从鸟苷和D-甘露糖产生2'岩藻糖基乳糖的本发明的方法的示例性反应方案,其由以下组成:(a)在葡萄糖激酶(1)和磷酸甘露糖变位酶(2)或N-乙酰己糖胺-1-激酶(3)的催化下从D-甘露糖和ATP形成甘露糖-1-磷酸(Man-1-P),(b)在鸟苷激酶/肌苷激酶(7)和多磷酸激酶(8)的催化下从鸟苷和多磷酸鸟苷形成鸟苷三磷酸(GTP),以及(c)甘露糖-1-磷酸与鸟苷三磷酸在甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶的催化下反应以产生GDP-甘露糖和(d)在GDP-甘露糖-4,6-脱水酶的催化下从GDP-甘露糖形成GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖和(e)在GDP-L-岩藻糖合酶的催化下从GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖和NADPH形成GDP-岩藻糖,以及在1型半乳糖苷α-(1,2)-岩藻糖基转移酶的催化下从GDP-L-岩藻糖和乳糖形成2'-岩藻糖基乳糖。

[1275] 图11:显示了在实施例6-A1中进行的从(A1)GDP-甘露糖到GDP-岩藻糖;(A2)如实施例6-A2中所进行的在葡萄糖和G6PDH的存在下从GDP-甘露糖到GDP-岩藻糖;和(A3)如实施例6-A3中进行的在谷氨酸盐和GLDH的存在下从甘露糖和GTP到GDP-岩藻糖的反应级联。进行反应以证明NADPH再循环能够将多酶反应平衡驱动向GDP-岩藻糖一侧。

[1276] 图12:显示了过夜孵育后反应A1、A2和A3的反应等分试样的色谱图。色谱图(A1)显示反应平衡在GDP-甘露糖一侧。当实施NADPH再循环时,反应平衡能够被驱动向GDP-岩藻糖(见A2和A3)。

[1277] 图13:显示了如实施例7中进行的从甘露糖和鸟苷到GDP-岩藻糖的反应级联的反应级联。

[1278] 图14:显示了通过离子色谱法测量的实施例7中反应的反应时间进程。

[1279] 图15:显示如实施例8中进行的从甘露糖和鸟苷到GDP-岩藻糖的反应级联。

[1280] 图16:显示了通过离子色谱法测量的实施例8中反应的反应时间进程。

[1281] 图17:显示如实施例9中进行的从甘露糖和鸟苷到3-岩藻糖基-乳糖的反应级联。

[1282] 图18:显示了从甘露糖和鸟苷合成3-岩藻糖基乳糖。反应48小时后提取的反应等分试样(黑色)和3-岩藻糖基乳糖标准样品的反应色谱图。通过电流检测检测峰。

[1283] 图19:显示了从鸟苷和岩藻糖合成3-岩藻糖基乳糖(实施例9的反应D2)。反应48小时后得到的反应等分试样的色谱图。通过电流检测检测峰。

[1284] 图20:显示了从D-甘露糖产生L-岩藻糖。将实施例8中样品的反应在95℃加热1小时(参见实施例10)。取出加热样品的等分试样,并通过离子色谱和电流检测(黑色)进行测量,并与岩藻糖标准品(Fuc)进行比较。

[1285] 包括以下实施例以举例说明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当理解,以下实施例中公开的技术代表了发明人发现的在本发明的实践中发挥良好作用的技术,因此可以认为构成了其实践的优选模式。然而,本领域的技术人员根据本发明的公开内容应当理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对所公开的具体实施方案进行多种改变并且仍然获得相似或类似的结果。

[1286] 鉴于该描述,本发明的各个方面的进一步修改和替代实施方案对于本领域技术人员来说将是明显的。因此,该描述仅被解释为举例说明性的并且是为了教导本领域技术人员实施本发明的一般方式。应当理解,本文所示和描述的本发明的形式将被视为实施方案的示例。元件和材料可以代替在此示出和描述的那些,部件和过程可以颠倒,并且本发明的某些特征可以独立使用,所有这些对于本领域技术人员在受益于本发明的描述之后将是明

显的。在不脱离如所附权利要求书中所描述的本发明的精神和范围的情况下，可以对本文描述的元素进行改变。

实施例

[1287] 缩写与首字母简缩词

[1288] ADP 腺苷5'-二磷酸

[1289] ATP 腺苷5'-三磷酸

[1290] Fuc L-岩藻糖

[1291] GSK 鸟苷激酶

[1292] GDP 鸟苷5'-二磷酸

[1293] GDH 葡萄糖脱氢酶;葡萄糖-1-脱氢酶

[1294] GLDH 谷氨酸脱氢酶

[1295] G6PDH 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶

[1296] GMD GDP-D-甘露糖-4,6-脱水酶

[1297] GMK 鸟苷酸激酶

[1298] GMP 鸟苷5'-单磷酸

[1299] GLK 葡萄糖激酶

[1300] GTP 鸟苷5'-三磷酸

[1301] GUO 鸟苷

[1302] Lac D-乳糖

[1303] Man D-甘露糖

[1304] ManB 磷酸甘露糖变位酶

[1305] ManC 甘露糖1-磷酸鸟苷酸转移酶

[1306] NADP 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸

[1307] NADPH 还原的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸

[1308] NAHK N-乙酰己糖胺-1-激酶

[1309] PolyP 多磷酸盐

[1310] PPi 焦磷酸盐

[1311] Pi 磷酸盐

[1312] PPK2 多磷酸激酶2

[1313] PPK3 多磷酸激酶3

[1314] 2D-PPK2 2-结构域多磷酸激酶2

[1315] FKP L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶

[1316] PmPpA 多杀巴斯德氏菌无机焦磷酸酶(PPA)

[1317] WCAG GDP-4-酮-6-脱氧甘露糖-3,5-差向异构酶-4-还原酶

[1318] 3/4FT α-1-3/4-岩藻糖基转移酶

[1319] 化学品和试剂

[1320] 除非另有说明，否则所有化学品和试剂均从Sigma-Aldrich获得，并且具有可用的最高纯度。固体支持物获自Resindion、ChiralVision、**Röhm** GmbH&Co.KG和micromod

GmbH。

[1321] 实施例1:酶的制备

[1322] 将编码酶GSK、PPK2、FKP和PmPpA的基因克隆到表1所示的标准表达载体中。将表达载体转化到大肠杆菌BL21 Gold(DE3)中。

[1323] 表1

[1324]

酶	来源	质粒	诱导剂	表达宿主
鸟苷激酶(GSK)	乙酰微小杆菌(*Exiguobacterium acetylicum*)	pET-28a(+)	IPTG	*大肠杆菌* BL21 Gold (DE3)
多磷酸激酶(2D-PPK2)	铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)	pET-28a(+)	IPTG	*大肠杆菌* BL21 Gold (DE3)
L-岩藻糖激酶/L-岩藻糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶(FKP)	脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)	pET-100/D-TOPO	IPTG	*大肠杆菌* BL21 Gold (DE3)
无机焦磷酸酶(PmPpA)	多杀巴斯德氏菌(*Pasteurella multocida*)	pET-28a(+)	IPTG	*大肠杆菌* BL21 Gold (DE3)

[1325] 转化体在带有挡板的1L摇瓶中在补充有50μg/ml卡那霉素的体积为500ml的LB培养基(溶原性肉汤)生长。培养物在37℃下生长至OD_{600}=0.8。通过向培养物中加入终浓度为0.5mM的IPTG来诱导表达。在20℃下12-18小时后终止表达时间。通过以6,000×g离心10分钟从培养基中分离生物质。按照标准操作程序(Laemmli,Nature1970,227,680-685)通过SDS-PAGE分析相应酶的成功表达。湿生物质储存在-20℃。

[1326] 为了纯化,通常将30ml平衡缓冲液添加到3g冷冻生物质中。平衡缓冲液包含pH7.5的cOmplete™蛋白酶抑制剂混合物:100mM HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)、10mM $MgCl_2$、5mM $MnSO_4$、300mM NaCl和5体积%甘油。在4℃下搅拌解冻后,通过四次穿过1,000bar的高压匀浆器(Emulsiflex C5,Avestin Inc.,Ottawa,Canada)破坏细胞,其间在冰上冷却。离心(45分钟,20,000×g)后,将上清液加到经平衡的固定的金属亲和色谱(IMAC)柱(10ml CV)上,该柱含有来自Amersham Biosciences(Uppsala,Sweden)的Ni^{2+}Sepharose™高效色谱材料。使用平衡缓冲液洗掉未结合的蛋白质。使用洗脱缓冲液将固定的蛋白质洗脱为1ml级分。最后,酶溶液通过来自Merck Millipore(Darmstadt,Germany)的具有50kDa截留值的离心过滤装置**Amicon®**Ultra-15浓缩。在超滤过程中没有观察到酶损失。酶在-20℃下储存在50%甘油中。使用BSA作为标准品,通过Bradford测定法(Bradford,Analytical Biochemistry 1976,72(1),248-254)测定蛋白质浓度。

[1327] 实施例2:GDP-岩藻糖的均相制备

[1328] 将纯化的酶(表1)与鸟苷、L-岩藻糖、ATP、多磷酸盐和HEPES缓冲液混合至表2中所列的浓度。在低结合蛋白小瓶中进行实验。在加入混合物之前,将鸟苷溶解在6体积%二甲亚砜(DMSO)中。反应在热混合器中在30℃下进行。

[1329] 表2

[1330]

反应物	浓度[mmol/L]
鸟苷	2
多磷酸盐(n=14或25)	4
L-岩藻糖	2
ATP	2

HEPES缓冲液	50
Mg^{2+}	2.5
Mn^{2+}	2.5
酶	浓度[mg/mL]
GSK	0.3
2D-PPK2	0.7
FKP	0.2
PmPpA	0.2

[1331] 近三小时后,获得了底物(鸟苷)向GDP-岩藻糖的90%的转化(参见图4A)。未检测到其他终产物(参见图5B,其显示48小时后反应混合物的色谱图)。

[1332] 实施例3:GDP-岩藻糖合成失败

[1333] GDP-岩藻糖的合成如实施例2中所述进行,但没有添加DMSO。反应在30℃下在热混合器中进行,所得反应混合物保持混浊。三小时后没有观察到底物(鸟苷)转化为GDP-岩藻糖。

[1334] 该实施例表明,仅将两种酶促途径组合并不能提供GDP-岩藻糖。

[1335] 实施例4:将酶固定在固体支持物上

[1336] 酶被固定在固体支持物上以允许酶的多次使用。

[1337] 将实施例1中通过高压匀浆获得的细胞裂解物离心并过滤以去除细胞碎片。树脂:sepabeads(Resindion):EC-EP、EP403/M、EC-HFA、EC-EA/M和EC-HA;immobeads(ChiralVision)IB-COV1、IB-COV2、IB-COV3、IB-ANI1、IB-ANI2、IB-ANI3、IB-ANI4、IB-CAT1、IB-ADS1、IB-ADS2、IB-ADS3和IB-ADS4;Eupergit(**Röhm** GmbH&Co.KG)和磁性颗粒(micromod GmbH):Nano-mag、Sicastar-6和Sicastar-1.5与酶一起在4℃下孵育24小时。

[1338] 蛋白质测定通过BCA测定进行。总结合蛋白的结果如图7所示。

[1339] 固定后,如实施例1所述用缓冲液洗涤负载有酶的树脂。将树脂与表3所示的反应物溶液在30℃下孵育24小时。

[1340] 表3

[1341]

反应物	浓度[mmol/L]
鸟苷	3.9(4体积%DMSO)
多磷酸盐(n=25)	12.5
L-岩藻糖	5.3
ATP	12
HEPES缓冲液	120
$MgCl_2$	8
$MnCl_2$	8
NaCl	200

[1342] 如图8所示,对于所有负载的树脂,均观察到GDP-岩藻糖的形成。

[1343] 实施例5:在磁性颗粒上异相制备GDP-岩藻糖

[1344] 为此,将135mL FKP、45mL PmPpA、90mL GSK和90mL2D-PPK2的发酵液(见实施例1)合并并在含有10mM咪唑的25mL缓冲液(如实施例1中所述)中裂解,以获得0.5mL酶混合物,

将其与12.5mg Sicastar-6磁性树脂孵育。在10℃下孵育1小时后，用缓冲液洗涤树脂，并合并于装有0.25mL试剂溶液的小瓶中(参见表4)。混合物在30℃孵育48小时。

[1345] 表4

[1346]

反应物	浓度[mmol/L]
鸟苷	6 (4 体积% DMSO)
多磷酸盐(n=25)	9.3
L-岩藻糖	6
ATP	9.6
HEPES 缓冲液	50
$MgCl_2$	15
$MnCl_2$	5
NaCl	30
KCl	30

[1347] 48小时后，获得了底物(鸟苷)向GDP-岩藻糖的几乎定量(98％)转化(参见图4B)。

[1348] 实施例6:NADPH的再循环

[1349] 进行一锅反应(参见表5中反应A1的反应条件)以显示GDP-甘露糖4,6-脱水酶(GMD,EC4.2.1.47)和GDP-L-岩藻糖合酶(wcaG,EC1.1.1.271)的平衡催化的从GDP-甘露糖到GDP-岩藻糖的反应在GDP-甘露糖一侧(参见图11-A1和12-A1)。在该实验中，首先将酶按表5中提到的量分配到小瓶中。按此顺序添加缓冲液、辅因子、GDP-Man、NADPH，直至达到表5中提到的浓度。在Eppendorf舒适型恒温混匀仪中以37℃和550rpm在1.5mL Eppendorf小瓶中进行反应。在不同时间点取等分试样并通过在90℃加热3分钟淬灭并通过离子交换色谱法测量。可以看出，平衡是在GDP-Man一侧(参见图12-A1)。

[1350] 为了将反应的平衡推向GDP-Fuc，需要工程化为与另一个反应偶联(以不断去除$NADP^+$的方式)。在反应A2中，酶Glk、PPK3和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(购自Merck-10165875001)(G6PDH,E.C:1.1.1.49)用于再循环NAPDH并提高GDP-岩藻糖产率。在该实验中，首先将酶按表6中提到的量分配到小瓶中。加入酶后，按此顺序加入缓冲液、辅因子、GDP-Man、NADPH、葡萄糖、ATP和多磷酸盐，直至达到表6中提到的浓度。在Eppendorf舒适型恒温混匀仪中以37℃和550rpm在1.5mL Eppendorf小瓶中进行反应。在不同时间点取等分试样并通过在90℃加热3分钟淬灭，然后通过离子交换色谱法测量。为了再循环，廉价的底物葡萄糖和多磷酸盐作为底物(见图11-A2和12-A2)。

[1351] 进行了另一个实验以用于从Man、ATP、GTP和多磷酸盐产生GDP-Fuc，以及用于再生NADPH并将平衡转移向GDP-Fuc的L-谷氨酸。在该实验中，首先将酶按表7中提到的量分配到小瓶中。加入酶后，按此顺序加入缓冲液、辅因子、Man、GTP、ATP和L-谷氨酸以及多磷酸盐，直至达到表7中提到的浓度。在Eppendorf舒适型恒温混匀仪中以37℃和550rpm在1.5mL Eppendorf小瓶中进行反应。在不同时间点取等分试样并通过在90℃加热3分钟淬灭，然后通过离子交换色谱法测量。在反应A3(参见表7中反应A3的反应条件)中，谷氨酸脱氢酶(购自Merck-10197734001)(GLDH,E.C.1.4.1.4)用于从L-谷氨酸和水再循环NADPH。(参见图11-A3和12-A3)。

[1352] 表5:实施例A1的反应条件。

[1353]

酶	**浓度**
WCAG	1.03 μg/μL
GMD	1.75 μg/μL
底物	
GDP-Man	2 mM
NADPH	2 mM
缓冲液和辅因子	
Tris-HCl (pH=8)	100 mM
$MgCl_2$	10 mM
体积	40 μL

[1354] 表6:反应A2的反应条件。

[1355]

酶	**浓度**
WCAG	0.8 μg/μL
GMD	1.4 μg/μL
GLK	0.129 μg/μL
PPK3	0.07 μg/μL
G6PDH	0.28 μg/μL
底物	
GDP-Man	4 mM
NADPH	0.5 mM
葡萄糖	10 mM
ATP	1 mM
$PolyP_{25}$	2 mM
缓冲液和辅因子	
Tris-HCl (pH=8)	100 mM
$MgCl_2$	10 mM
体积	50 μL

[1356] 表7:反应A3的反应条件。

[1357]

酶	浓度
WCAG	0.3 μg/μL
GMD	0.52 μg/μL
GLK	0.09 μg/μL
PPK3	0.27 μg/μL
GLDH	2.99 μg/μL
ManB/C	0.046 μg/μL
PPA	0.047 μg/μL
底物	
Man	20 mM
GTP	20 mM
ATP	2 mM
$PolyP_{25}$	5 mM
L-谷氨酸	50 mM
NADPH	1 mM
缓冲液和辅因子	
Tris-HCl (pH=9)	150 mM
$MgCl_2$	50 mM
体积	200 μL

[1358]

[1359] 实施例7:使用Glk从D-甘露糖合成GDP-岩藻糖

[1360] 进行一锅酶促反应以验证通过图13所示的级联从甘露糖合成GDP-岩藻糖。在该实验中,首先将酶分配到小瓶中,直至达到表8中提到的量。添加酶后,按此顺序加入缓冲液、辅因子、甘露糖、ATP、L-谷氨酸、NADPH、鸟苷(来自含有DMSO的储备液)和多磷酸盐,直至达到表8中提到的浓度。在Eppendorf舒适型恒温混匀仪中以37℃和550rpm在1.5mL Eppendorf小瓶中进行反应。在不同时间点取等分试样并通过在90℃加热3分钟淬灭,然后通过离子交换色谱法测量。实施例7中反应的反应时程通过离子色谱法测量,如图14所示。

[1361] 表8-如实施例7中使用的反应条件。

[1362]

酶	**浓度**
GSK	0.128 μg/μL
GMK	0.034 μg/μL
PPK3	0.2 μg/μL
GLK	0.11 μg/μL
MANB/C	0.071 μg/μL
WCAG	0.24 μg/μL
GMD	0.4 μg/μL
GLDH	3.45 μg/μL
PPA	0.04 μg/μL
底物	
Man	11.5 mM
乌苷(在 DMSO 中)	11.5 mM
ATP	2.9 mM
$PolyP_{25}$	5.17 mM
L-谷氨酸	86 mM
NADPH	2.8 mM
缓冲液和辅因子	
Tris-HCl (pH=8)	115 mM
$MgCl_2$	29 mM
体积	**175 μL**

[1363]

[1364] 实施例8:使用NahK从D-甘露糖合成GDP-岩藻糖

[1365] 进行一锅酶促反应以验证通过图15所示的级联从甘露糖合成GDP-岩藻糖。在该实

验中，首先将酶分配到小瓶中，直到达到表9中提到的量。添加酶后，按此顺序加入缓冲液、辅因子、甘露糖、ATP、L-谷氨酸、NADPH、鸟苷(储备液在DMSO中制备)和多磷酸盐，直至达到表9中提到的浓度。在Eppendorf舒适型恒温混匀仪中以37℃和550rpm在1.5mL Eppendorf小瓶中进行反应。在不同时间点取等分试样并通过在90℃加热3分钟淬灭，然后通过离子交换色谱法测量。实施例8中反应的反应时程通过离子色谱法测量，如图16所示。

[1366] 表9-实施例8的反应条件。

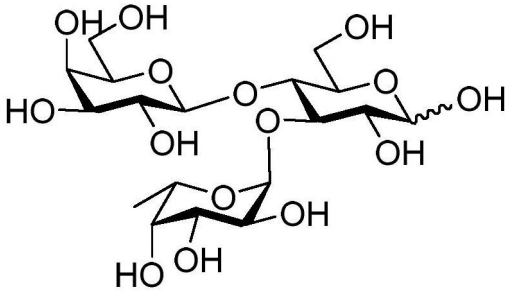
[1367]

酶	**浓度**
GSK	0.12 μg/μL
GMK	0.03 μg/μL
PPK3	0.19 μg/μL
NAHK	0.14 μg/μL
MANB/C	0.06 μg/μL
WCAG	0.22 μg/μL
GMD	0.38 μg/μL
GLDH	3.26 μg/μL
PPA	0.03 μg/μL
底物	
Man	10.9 mM
鸟苷(在 DMSO 中)	10.9 mM
ATP	2.75 mM
$PolyP_{25}$	4.9 mM
L-谷氨酸	81 mM
NADPH	2.6 mM
缓冲液和辅因子	
Tris-HCl (pH=8)	108 mM
$MgCl_2$	27 mM
体积	185 μL

[1368] 实施例9:3-岩藻糖基乳糖的合成

[1369] GDP-岩藻糖产生的级联反应可以与岩藻糖基转移酶偶联以岩藻糖基化分子或生物分子，例如人乳寡糖和治疗性蛋白质。偶联是在一锅反应中进行的(见图17)。进行反应，其中GDP-岩藻糖级联与3/4-岩藻糖基转移酶偶联以从D-甘露糖开始产生3-岩藻糖基乳糖(反应D1;参见图18)。在该实验中，首先将酶分配到小瓶中，直到达到表10中提到的量。添加酶后，按此顺序加入缓冲液、辅因子、甘露糖、ATP、L-谷氨酸、NADPH、乳糖、鸟苷(储备液在DMSO中制备))和多磷酸盐，直至达到表10中提到的浓度。在Eppendorf舒适型恒温混匀仪中以37℃和550rpm在1.5mL Eppendorf小瓶中进行反应。取等分试样并通过在90℃下加热3分钟来淬灭，然后通过离子交换色谱法测量。进行另一个实验以产生3-岩藻糖基乳糖，其中从

鸟苷、L-岩藻糖产生GDP-Fuc(反应D2;参见图19)。在该实验中,首先添加酶至表11中提及的量。添加酶后,按此顺序加入缓冲液、辅因子、L-岩藻糖、ATP、乳糖、鸟苷(储备液在DMSO中制备)和多磷酸盐,直至达到表11中提到的浓度。在Eppendorf舒适型恒温混匀仪中以37℃和550rpm在1.5mL Eppendorf小瓶中进行反应。取等分试样并通过在90℃下加热3分钟来淬灭,然后通过离子交换色谱法测量。

[1370] 

[1371] 3-岩藻糖基乳糖(3-FL;Galβ4(Fucα3)Glc)

[1372] 表10-反应D1的反应条件。

[1373]

酶	**浓度**
GSK	0.128 μg/μL
GMK	0.034 μg/μL
PPK3	0.2 μg/μL
GLK	0.11 μg/μL
MANB/C	0.071 μg/μL
WCAG	0.24 μg/μL
GMD	0.4 μg/μL
GLDH	3.45 μg/μL
PPA	0.04 μg/μL
3/4FT	0.07 μg/μL
底物	
Man	8.7 mM
鸟苷(在 DMSO 中)	2.9 mM
ATP	2.9 mM
$PolyP_{25}$	5.2 mM
L-谷氨酸	29 mM
NADPH	1.45 mM
乳糖	11.6 mM
缓冲液和辅因子	
Tris-HCl (pH=8)	116 mM
$MgCl_2$	43 mM
体积	172 μL

[1375] 表11-反应D2的反应条件。

[1376]

酶	**浓度**
GSK	0.16 μg/μL
GMK	0.042 μg/μL
PPK3	0.25 μg/μL
FKP	0.42 μg/μL
PPA	0.05 μg/μL
3/4FT	0.07 μg/μL
底物	
岩藻糖	14.1 mM
鸟苷(在 DMSO 中)	3.5 mM
ATP	3.6 mM
$PolyP_{25}$	6.3 mM
乳糖	14.1 mM
缓冲液和辅因子	
Tris-HCl (pH=8)	141 mM
$MgCl_2$	35 mM
体积	141 μL

[1377] 实施例10:从D-甘露糖产生L-岩藻糖

[1378] 实施例7和8中描述的级联可用于从D-甘露糖和鸟苷产生L-岩藻糖。将实施例8中的反应在95℃加热1小时。加热后取等分试样通过离子色谱法测量(参见图20)。

[1379] 本申请附有序列表,包括下表中的序列:

[1380]

SEQ ID	描述
1	葡萄糖激酶
2	磷酸甘露糖变位酶
3	N-乙酰己糖胺-1-激酶
4	甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶
5	GDP-甘露糖4,6-脱水酶
6	GDP-L-岩藻糖合酶
7	L-岩藻糖激酶
8	鸟苷激酶
9	2-结构域多磷酸激酶2
10	无机焦磷酸酶
11	鸟苷酸激酶
12	谷氨酸脱氢酶1(GLDH)
13	葡萄糖-6-磷酸1-脱氢酶(G6PDH)

14	磷酸转移酶3(PPK3)
15	葡萄糖/半乳糖1-脱氢酶(GDH)
16	α-1,3/4-岩藻糖基转移酶(3/4FT)

[0001] 序列表

[0002] <110> 马克斯·普朗克科学促进学会

[0003] <120> 用于制备GDP-岩藻糖的酶促方法

[0004] <130> GAR-P04116WO

[0005] <160> 16

[0006] <170> PatentIn version 3.5

[0007] <210> 1

[0008] <211> 321

[0009] <212> PRT

[0010] <213> 大肠杆菌

[0011] <220>

[0012] <221> 肽

[0013] <222> (1)..(321)

[0014] <223> 葡萄糖激酶

[0015] <400> 1

[0016] Met Thr Lys Tyr Ala Leu Val Gly Asp Val Gly Gly Thr Asn Ala Arg

[0017] 1 5 10 15

[0018] Leu Ala Leu Cys Asp Ile Ala Ser Gly Glu Ile Ser Gln Ala Lys Thr

[0019] 20 25 30

[0020] Tyr Ser Gly Leu Asp Tyr Pro Ser Leu Glu Ala Val Ile Arg Val Tyr

[0021] 35 40 45

[0022] Leu Glu Glu His Lys Val Glu Val Lys Asp Gly Cys Ile Ala Ile Ala

[0023] 50 55 60

[0024] Cys Pro Ile Thr Gly Asp Trp Val Ala Met Thr Asn His Thr Trp Ala

[0025] 65 70 75 80

[0026] Phe Ser Ile Ala Glu Met Lys Lys Asn Leu Gly Phe Ser His Leu Glu

[0027] 85 90 95

[0028] Ile Ile Asn Asp Phe Thr Ala Val Ser Met Ala Ile Pro Met Leu Lys

[0029] 100 105 110

[0030] Lys Glu His Leu Ile Gln Phe Gly Gly Ala Glu Pro Val Glu Gly Lys

[0031] 115 120 125

[0032] Pro Ile Ala Val Tyr Gly Ala Gly Thr Gly Leu Gly Val Ala His Leu

[0033] 130 135 140

[0034] Val His Val Asp Lys Arg Trp Val Ser Leu Pro Gly Glu Gly Gly His

[0035] 145 150 155 160

[0036] Val Asp Phe Ala Pro Asn Ser Glu Glu Glu Ala Ile Ile Leu Glu Ile

[0037] 165 170 175

[0038] Leu Arg Ala Glu Ile Gly His Val Ser Ala Glu Arg Val Leu Ser Gly

[0039] 180 185 190

[0040] Pro Gly Leu Val Asn Leu Tyr Arg Ala Ile Val Lys Ala Asp Asn Arg

[0041] 195 200 205

[0042] Leu Pro Glu Asn Leu Lys Pro Lys Asp Ile Thr Glu Arg Ala Leu Ala

[0043] 210 215 220

[0044] Asp Ser Cys Thr Asp Cys Arg Arg Ala Leu Ser Leu Phe Cys Val Ile

[0045] 225 230 235 240

[0046] Met Gly Arg Phe Gly Gly Asn Leu Ala Leu Asn Leu Gly Thr Phe Gly

[0047] 245 250 255

[0048] Gly Val Phe Ile Ala Gly Gly Ile Val Pro Arg Phe Leu Glu Phe Phe

[0049] 260 265 270

[0050] Lys Ala Ser Gly Phe Arg Ala Ala Phe Glu Asp Lys Gly Arg Phe Lys

[0051] 275 280 285

[0052] Glu Tyr Val His Asp Ile Pro Val Tyr Leu Ile Val His Asp Asn Pro

[0053] 290 295 300

[0054] Gly Leu Leu Gly Ser Gly Ala His Leu Arg Gln Thr Leu Gly His Ile

[0055] 305 310 315 320

[0056] Leu

[0057] <210> 2

[0058] <211> 456

[0059] <212> PRT

[0060] <213> 大肠杆菌

[0061] <220>

[0062] <221> 肽

[0063] <222> (1)..(456)

[0064] <223> 磷酸甘露糖变位酶

[0065] <400> 2

[0066] Met Lys Lys Leu Thr Cys Phe Lys Ala Tyr Asp Ile Arg Gly Lys Leu

[0067] 1 5 10 15

[0068] Gly Glu Glu Leu Asn Glu Asp Ile Ala Trp Arg Ile Gly Arg Ala Tyr

[0069] 20 25 30

[0070] Gly Glu Phe Leu Lys Pro Lys Thr Ile Val Leu Gly Gly Asp Val Arg

[0071] 35 40 45

[0072] Leu Thr Ser Glu Thr Leu Lys Leu Ala Leu Ala Lys Gly Leu Gln Asp

[0073] 50 55 60

[0074] Ala Gly Val Asp Val Leu Asp Ile Gly Met Ser Gly Thr Glu Glu Ile

[0075] 65 70 75 80

[0076] Tyr Phe Ala Thr Phe His Leu Gly Val Asp Gly Gly Ile Glu Val Thr

[0077] 85 90 95

[0078] Ala Ser His Asn Pro Met Asp Tyr Asn Gly Met Lys Leu Val Arg Glu
[0079] 100 105 110
[0080] Gly Ala Arg Pro Ile Ser Gly Asp Thr Gly Leu Arg Asp Val Gln Arg
[0081] 115 120 125
[0082] Leu Ala Glu Ala Asn Asp Phe Pro Pro Val Asp Glu Thr Lys Arg Gly
[0083] 130 135 140
[0084] Arg Tyr Gln Gln Ile Asn Leu Arg Asp Ala Tyr Val Asp His Leu Phe
[0085] 145 150 155 160
[0086] Gly Tyr Ile Asn Val Lys Asn Leu Thr Pro Leu Lys Leu Val Ile Asn
[0087] 165 170 175
[0088] Ser Gly Asn Gly Ala Ala Gly Pro Val Val Asp Ala Ile Glu Ala Arg
[0089] 180 185 190
[0090] Phe Lys Ala Leu Gly Ala Pro Val Glu Leu Ile Lys Val His Asn Thr
[0091] 195 200 205
[0092] Pro Asp Gly Asn Phe Pro Asn Gly Ile Pro Asn Pro Leu Leu Pro Glu
[0093] 210 215 220
[0094] Cys Arg Asp Asp Thr Arg Asn Ala Val Ile Lys His Gly Ala Asp Met
[0095] 225 230 235 240
[0096] Gly Ile Ala Phe Asp Gly Asp Phe Asp Arg Cys Phe Leu Phe Asp Glu
[0097] 245 250 255
[0098] Lys Gly Gln Phe Ile Glu Gly Tyr Tyr Ile Val Gly Leu Leu Ala Glu
[0099] 260 265 270
[0100] Ala Phe Leu Glu Lys Asn Pro Gly Ala Lys Ile Ile His Asp Pro Arg
[0101] 275 280 285
[0102] Leu Ser Trp Asn Thr Val Asp Val Val Thr Ala Ala Gly Gly Thr Pro
[0103] 290 295 300
[0104] Val Met Ser Lys Thr Gly His Ala Phe Ile Lys Glu Arg Met Arg Lys
[0105] 305 310 315 320
[0106] Glu Asp Ala Ile Tyr Gly Gly Glu Met Ser Ala His His Tyr Phe Arg
[0107] 325 330 335
[0108] Asp Phe Ala Tyr Cys Asp Ser Gly Met Ile Pro Trp Leu Leu Val Ala
[0109] 340 345 350
[0110] Glu Leu Val Cys Leu Lys Asp Lys Thr Leu Gly Glu Leu Val Arg Asp
[0111] 355 360 365
[0112] Arg Met Ala Ala Phe Pro Ala Ser Gly Glu Ile Asn Ser Lys Leu Ala
[0113] 370 375 380
[0114] Gln Pro Val Glu Ala Ile Asn Arg Val Glu Gln His Phe Ser Arg Glu
[0115] 385 390 395 400
[0116] Ala Leu Ala Val Asp Arg Thr Asp Gly Ile Ser Met Thr Phe Ala Asp

[0117] 405 410 415

[0118] Trp Arg Phe Asn Leu Arg Thr Ser Asn Thr Glu Pro Val Val Arg Leu

[0119] 420 425 430

[0120] Asn Val Glu Ser Arg Gly Asp Val Pro Leu Met Glu Ala Arg Thr Arg

[0121] 435 440 445

[0122] Thr Leu Leu Thr Leu Leu Asn Glu

[0123] 450 455

[0124] <210> 3

[0125] <211> 359

[0126] <212> PRT

[0127] <213> 长双歧杆菌 (Bifidobacterium longum)

[0128] <220>

[0129] <221> 肽

[0130] <222> (1)..(359)

[0131] <223> N-乙酰己糖胺-1-激酶

[0132] <400> 3

[0133] Met Thr Glu Ser Asn Glu Asp Leu Phe Gly Ile Ala Ser His Phe Ala

[0134] 1 5 10 15

[0135] Leu Glu Gly Ala Val Thr Gly Ile Glu Pro Tyr Gly Asp Gly His Ile

[0136] 20 25 30

[0137] Asn Thr Thr Tyr Leu Val Thr Thr Asp Gly Pro Arg Tyr Ile Leu Gln

[0138] 35 40 45

[0139] Gln Met Asn Thr Ser Ile Phe Pro Asp Thr Val Asn Leu Met Arg Asn

[0140] 50 55 60

[0141] Val Glu Leu Val Thr Ser Thr Leu Lys Ala Gln Gly Lys Glu Thr Leu

[0142] 65 70 75 80

[0143] Asp Ile Val Pro Thr Thr Ser Gly Ala Thr Trp Ala Glu Ile Asp Gly

[0144] 85 90 95

[0145] Gly Ala Trp Arg Val Tyr Lys Phe Ile Glu His Thr Val Ser Tyr Asn

[0146] 100 105 110

[0147] Leu Val Pro Asn Pro Asp Val Phe Arg Glu Ala Gly Ser Ala Phe Gly

[0148] 115 120 125

[0149] Asp Phe Gln Asn Phe Leu Ser Glu Phe Asp Ala Ser Gln Leu Thr Glu

[0150] 130 135 140

[0151] Thr Ile Ala His Phe His Asp Thr Pro His Arg Phe Glu Asp Phe Lys

[0152] 145 150 155 160

[0153] Ala Ala Leu Ala Ala Asp Lys Leu Gly Arg Ala Ala Ala Cys Gln Pro

[0154] 165 170 175

[0155] Glu Ile Asp Phe Tyr Leu Ser His Ala Asp Gln Tyr Ala Val Val Met

[0156] 180 185 190

[0157] Asp Gly Leu Arg Asp Gly Ser Ile Pro Leu Arg Val Thr His Asn Asp

[0158] 195 200 205

[0159] Thr Lys Leu Asn Asn Ile Leu Met Asp Ala Thr Thr Gly Lys Ala Arg

[0160] 210 215 220

[0161] Ala Ile Ile Asp Leu Asp Thr Ile Met Pro Gly Ser Met Leu Phe Asp

[0162] 225 230 235 240

[0163] Phe Gly Asp Ser Ile Arg Phe Gly Ala Ser Thr Ala Leu Glu Asp Glu

[0164] 245 250 255

[0165] Lys Asp Leu Ser Lys Val His Phe Ser Thr Glu Leu Phe Arg Ala Tyr

[0166] 260 265 270

[0167] Thr Glu Gly Phe Val Gly Glu Leu Arg Gly Ser Ile Thr Ala Arg Glu

[0168] 275 280 285

[0169] Ala Glu Leu Leu Pro Phe Ser Gly Asn Leu Leu Thr Met Glu Cys Gly

[0170] 290 295 300

[0171] Met Arg Phe Leu Ala Asp Tyr Leu Glu Gly Asp Ile Tyr Phe Ala Thr

[0172] 305 310 315 320

[0173] Lys Tyr Pro Glu His Asn Leu Val Arg Thr Arg Thr Gln Ile Lys Leu

[0174] 325 330 335

[0175] Val Gln Glu Met Glu Gln Lys Ala Ser Glu Thr Arg Ala Ile Val Ala

[0176] 340 345 350

[0177] Asp Ile Met Glu Ala Ala Arg

[0178] 355

[0179] <210> 4

[0180] <211> 478

[0181] <212> PRT

[0182] <213> 大肠杆菌

[0183] <220>

[0184] <221> 肽

[0185] <222> (1)..(478)

[0186] <223> 甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶

[0187] <400> 4

[0188] Met Ala Gln Ser Lys Leu Tyr Pro Val Val Met Ala Gly Gly Ser Gly

[0189] 1 5 10 15

[0190] Ser Arg Leu Trp Pro Leu Ser Arg Val Leu Tyr Pro Lys Gln Phe Leu

[0191] 20 25 30

[0192] Cys Leu Lys Gly Asp Leu Thr Met Leu Gln Thr Thr Ile Cys Arg Leu

[0193] 35 40 45

[0194] Asn Gly Val Glu Cys Glu Ser Pro Val Val Ile Cys Asn Glu Gln His

[0195] 50 55 60

[0196] Arg Phe Ile Val Ala Glu Gln Leu Arg Gln Leu Asn Lys Leu Thr Glu

[0197] 65 70 75 80

[0198] Asn Ile Ile Leu Glu Pro Ala Gly Arg Asn Thr Ala Pro Ala Ile Ala

[0199] 85 90 95

[0200] Leu Ala Ala Leu Ala Ala Lys Arg His Ser Pro Glu Ser Asp Pro Leu

[0201] 100 105 110

[0202] Met Leu Val Leu Ala Ala Asp His Val Ile Ala Asp Glu Asp Ala Phe

[0203] 115 120 125

[0204] Arg Ala Ala Val Arg Asn Ala Met Pro Tyr Ala Glu Ala Gly Lys Leu

[0205] 130 135 140

[0206] Val Thr Phe Gly Ile Val Pro Asp Leu Pro Glu Thr Gly Tyr Gly Tyr

[0207] 145 150 155 160

[0208] Ile Arg Arg Gly Glu Val Ser Ala Gly Glu Gln Asp Met Val Ala Phe

[0209] 165 170 175

[0210] Glu Val Ala Gln Phe Val Glu Lys Pro Asn Leu Glu Thr Ala Gln Ala

[0211] 180 185 190

[0212] Tyr Val Ala Ser Gly Glu Tyr Tyr Trp Asn Ser Gly Met Phe Leu Phe

[0213] 195 200 205

[0214] Arg Ala Gly Arg Tyr Leu Glu Glu Leu Lys Lys Tyr Arg Pro Asp Ile

[0215] 210 215 220

[0216] Leu Asp Ala Cys Glu Lys Ala Met Ser Ala Val Asp Pro Asp Leu Asn

[0217] 225 230 235 240

[0218] Phe Ile Arg Val Asp Glu Glu Ala Phe Leu Ala Cys Pro Glu Glu Ser

[0219] 245 250 255

[0220] Val Asp Tyr Ala Val Met Glu Arg Thr Ala Asp Ala Val Val Val Pro

[0221] 260 265 270

[0222] Met Asp Ala Gly Trp Ser Asp Val Gly Ser Trp Ser Ser Leu Trp Glu

[0223] 275 280 285

[0224] Ile Ser Ala His Thr Ala Glu Gly Asn Val Cys His Gly Asp Val Ile

[0225] 290 295 300

[0226] Asn His Lys Thr Glu Asn Ser Tyr Val Tyr Ala Glu Ser Gly Leu Val

[0227] 305 310 315 320

[0228] Thr Thr Val Gly Val Lys Asp Leu Val Val Val Gln Thr Lys Asp Ala

[0229] 325 330 335

[0230] Val Leu Ile Ala Asp Arg Asn Ala Val Gln Asp Val Lys Lys Val Val

[0231] 340 345 350

[0232] Glu Gln Ile Lys Ala Asp Gly Arg His Glu His Arg Val His Arg Glu

[0233] 355 360 365

[0234] Val Tyr Arg Pro Trp Gly Lys Tyr Asp Ser Ile Asp Ala Gly Asp Arg
[0235] 370 375 380
[0236] Tyr Gln Val Lys Arg Ile Thr Val Lys Pro Gly Glu Gly Leu Ser Val
[0237] 385 390 395 400
[0238] Gln Met His His His Arg Ala Glu His Trp Val Val Val Ala Gly Thr
[0239] 405 410 415
[0240] Ala Lys Val Thr Ile Asp Gly Asp Ile Lys Leu Leu Gly Glu Asn Glu
[0241] 420 425 430
[0242] Ser Ile Tyr Ile Pro Leu Gly Ala Thr His Cys Leu Glu Asn Pro Gly
[0243] 435 440 445
[0244] Lys Ile Pro Leu Asp Leu Ile Glu Val Arg Ser Gly Ser Tyr Leu Glu
[0245] 450 455 460
[0246] Glu Asp Asp Val Val Arg Phe Ala Asp Arg Tyr Gly Arg Val
[0247] 465 470 475
[0248] <210> 5
[0249] <211> 373
[0250] <212> PRT
[0251] <213> 大肠杆菌
[0252] <220>
[0253] <221> 肽
[0254] <222> (1)..(373)
[0255] <223> GDP-甘露糖-4,6-脱水酶
[0256] <400> 5
[0257] Met Ser Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Val Thr Gly Gln Asp Gly Ser
[0258] 1 5 10 15
[0259] Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr Glu Val His Gly Ile
[0260] 20 25 30
[0261] Lys Arg Arg Ala Ser Ser Phe Asn Thr Glu Arg Val Asp His Ile Tyr
[0262] 35 40 45
[0263] Gln Asp Pro His Thr Cys Asn Pro Lys Phe His Leu His Tyr Gly Asp
[0264] 50 55 60
[0265] Leu Ser Asp Thr Ser Asn Leu Thr Arg Ile Leu Arg Glu Val Gln Pro
[0266] 65 70 75 80
[0267] Asp Glu Val Tyr Asn Leu Gly Ala Met Ser His Val Ala Val Ser Phe
[0268] 85 90 95
[0269] Glu Ser Pro Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp Ala Met Gly Thr Leu Arg
[0270] 100 105 110
[0271] Leu Leu Glu Ala Ile Arg Phe Leu Gly Leu Glu Lys Lys Thr Arg Phe
[0272] 115 120 125

[0273] Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly Leu Val Gln Glu Ile Pro
[0274] 130 135 140
[0275] Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg Ser Pro Tyr Ala Val Ala
[0276] 145 150 155 160
[0277] Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Thr Val Asn Tyr Arg Glu Ser Tyr Gly
[0278] 165 170 175
[0279] Met Tyr Ala Cys Asn Gly Ile Leu Phe Asn His Glu Ser Pro Arg Arg
[0280] 180 185 190
[0281] Gly Glu Thr Phe Val Thr Arg Lys Ile Thr Arg Ala Ile Ala Asn Ile
[0282] 195 200 205
[0283] Ala Gln Gly Leu Glu Ser Cys Leu Tyr Leu Gly Asn Met Asp Ser Leu
[0284] 210 215 220
[0285] Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val Lys Met Gln Trp Met Met
[0286] 225 230 235 240
[0287] Leu Gln Gln Glu Gln Pro Glu Asp Phe Val Ile Ala Thr Gly Val Gln
[0288] 245 250 255
[0289] Tyr Ser Val Arg Gln Phe Val Glu Met Ala Ala Ala Gln Leu Gly Ile
[0290] 260 265 270
[0291] Lys Leu Arg Phe Glu Gly Thr Gly Val Glu Glu Lys Gly Ile Val Val
[0292] 275 280 285
[0293] Ser Val Thr Gly His Asp Ala Pro Gly Val Lys Pro Gly Asp Val Ile
[0294] 290 295 300
[0295] Ile Ala Val Asp Pro Arg Tyr Phe Arg Pro Ala Glu Val Glu Thr Leu
[0296] 305 310 315 320
[0297] Leu Gly Asp Pro Thr Lys Ala His Glu Lys Leu Gly Trp Lys Pro Glu
[0298] 325 330 335
[0299] Ile Thr Leu Arg Glu Met Val Ser Glu Met Val Ala Asn Asp Leu Glu
[0300] 340 345 350
[0301] Ala Ala Lys Lys His Ser Leu Leu Lys Ser His Gly Tyr Asp Val Ala
[0302] 355 360 365
[0303] Ile Ala Leu Glu Ser
[0304] 370
[0305] <210> 6
[0306] <211> 321
[0307] <212> PRT
[0308] <213> 大肠杆菌
[0309] <220>
[0310] <221> 肽
[0311] <222> (1)..(321)

[0312] <223> GDP-L-岩藻糖合成酶

[0313] <400> 6

[0314] Met Ser Lys Gln Arg Val Phe Ile Ala Gly His Arg Gly Met Val Gly

[0315] 1 5 10 15

[0316] Ser Ala Ile Lys Arg Gln Leu Glu Gln Arg Gly Asp Val Glu Leu Val

[0317] 20 25 30

[0318] Leu Arg Thr Arg Asp Glu Leu Asn Leu Leu Asp Ser Arg Ala Val His

[0319] 35 40 45

[0320] Asp Phe Phe Ala Ser Glu Ser Ile Asp Gln Val Tyr Leu Ala Ala Ala

[0321] 50 55 60

[0322] Lys Val Gly Gly Ile Val Ala Asn Asn Thr Tyr Pro Ala Asp Phe Ile

[0323] 65 70 75 80

[0324] Tyr Gln Asn Met Met Ile Glu Ser Asn Ile Ile His Ala Ala His Gln

[0325] 85 90 95

[0326] Asn Asp Val Asn Lys Leu Leu Phe Leu Gly Ser Ser Cys Ile Tyr Pro

[0327] 100 105 110

[0328] Lys Leu Ala Lys Gln Pro Met Ala Glu Ser Glu Leu Leu Gln Gly Thr

[0329] 115 120 125

[0330] Leu Glu Pro Thr Asn Glu Pro Tyr Ala Ile Ala Lys Ile Ala Gly Ile

[0331] 130 135 140

[0332] Lys Leu Cys Glu Ser Tyr Asn Arg Gln Tyr Gly Arg Asp Tyr Arg Ser

[0333] 145 150 155 160

[0334] Val Met Pro Thr Asn Leu Tyr Gly Pro His Asp Asn Phe His Pro Ser

[0335] 165 170 175

[0336] Asn Ser His Val Ile Pro Ala Leu Leu Arg Arg Phe His Glu Ala Thr

[0337] 180 185 190

[0338] Ala Gln Asn Ala Pro Asp Val Val Val Trp Gly Ser Gly Thr Pro Met

[0339] 195 200 205

[0340] Arg Glu Phe Leu His Val Asp Asp Met Ala Ala Ala Ser Ile His Val

[0341] 210 215 220

[0342] Met Glu Leu Ala His Glu Val Trp Leu Glu Asn Thr Gln Pro Met Leu

[0343] 225 230 235 240

[0344] Ser His Ile Asn Val Gly Thr Gly Val Asp Cys Thr Ile Arg Glu Leu

[0345] 245 250 255

[0346] Ala Gln Thr Ile Ala Lys Val Val Asp Tyr Lys Gly Arg Val Val Phe

[0347] 260 265 270

[0348] Asp Ala Ser Lys Pro Asp Gly Thr Pro Arg Lys Leu Leu Asp Val Thr

[0349] 275 280 285

[0350] Arg Leu His Gln Leu Gly Trp Tyr His Glu Ile Ser Leu Glu Ala Gly

[0351] 290 295 300

[0352] Leu Ala Ser Thr Tyr Gln Trp Phe Leu Glu Asn Arg Asp Arg Phe Arg

[0353] 305 310 315 320

[0354] Gly

[0355] <210> 7

[0356] <211> 949

[0357] <212> PRT

[0358] <213> 脆弱拟杆菌(Bacteroides fragilis)

[0359] <220>

[0360] <221> 肽

[0361] <222> (1)..(949)

[0362] <223> L-fucokinase

[0363] <400> 7

[0364] Met Gln Lys Leu Leu Ser Leu Pro Ser Asn Leu Val Gln Ser Phe His

[0365] 1 5 10 15

[0366] Glu Leu Glu Arg Val Asn Arg Thr Asp Trp Phe Cys Thr Ser Asp Pro

[0367] 20 25 30

[0368] Val Gly Lys Lys Leu Gly Ser Gly Gly Gly Thr Ser Trp Leu Leu Glu

[0369] 35 40 45

[0370] Glu Cys Tyr Asn Glu Tyr Ser Asp Gly Ala Thr Phe Gly Glu Trp Leu

[0371] 50 55 60

[0372] Glu Lys Glu Lys Arg Ile Leu Leu His Ala Gly Gly Gln Ser Arg Arg

[0373] 65 70 75 80

[0374] Leu Pro Gly Tyr Ala Pro Ser Gly Lys Ile Leu Thr Pro Val Pro Val

[0375] 85 90 95

[0376] Phe Arg Trp Glu Arg Gly Gln His Leu Gly Gln Asn Leu Leu Ser Leu

[0377] 100 105 110

[0378] Gln Leu Pro Leu Tyr Glu Lys Ile Met Ser Leu Ala Pro Asp Lys Leu

[0379] 115 120 125

[0380] His Thr Leu Ile Ala Ser Gly Asp Val Tyr Ile Arg Ser Glu Lys Pro

[0381] 130 135 140

[0382] Leu Gln Ser Ile Pro Glu Ala Asp Val Val Cys Tyr Gly Leu Trp Val

[0383] 145 150 155 160

[0384] Asp Pro Ser Leu Ala Thr His His Gly Val Phe Ala Ser Asp Arg Lys

[0385] 165 170 175

[0386] His Pro Glu Gln Leu Asp Phe Met Leu Gln Lys Pro Ser Leu Ala Glu

[0387] 180 185 190

[0388] Leu Glu Ser Leu Ser Lys Thr His Leu Phe Leu Met Asp Ile Gly Ile

[0389] 195 200 205

[0390] Trp Leu Leu Ser Asp Arg Ala Val Glu Ile Leu Met Lys Arg Ser His
[0391] 210 215 220
[0392] Lys Glu Ser Ser Glu Glu Leu Lys Tyr Tyr Asp Leu Tyr Ser Asp Phe
[0393] 225 230 235 240
[0394] Gly Leu Ala Leu Gly Thr His Pro Arg Ile Glu Asp Glu Glu Val Asn
[0395] 245 250 255
[0396] Thr Leu Ser Val Ala Ile Leu Pro Leu Pro Gly Gly Glu Phe Tyr His
[0397] 260 265 270
[0398] Tyr Gly Thr Ser Lys Glu Leu Ile Ser Ser Thr Leu Ser Val Gln Asn
[0399] 275 280 285
[0400] Lys Val Tyr Asp Gln Arg Arg Ile Met His Arg Lys Val Lys Pro Asn
[0401] 290 295 300
[0402] Pro Ala Met Phe Val Gln Asn Ala Val Val Arg Ile Pro Leu Cys Ala
[0403] 305 310 315 320
[0404] Glu Asn Ala Asp Leu Trp Ile Glu Asn Ser His Ile Gly Pro Lys Trp
[0405] 325 330 335
[0406] Lys Ile Ala Ser Arg His Ile Ile Thr Gly Val Pro Glu Asn Asp Trp
[0407] 340 345 350
[0408] Ser Leu Ala Val Pro Ala Gly Val Cys Val Asp Val Val Pro Met Gly
[0409] 355 360 365
[0410] Asp Lys Gly Phe Val Ala Arg Pro Tyr Gly Leu Asp Asp Val Phe Lys
[0411] 370 375 380
[0412] Gly Asp Leu Arg Asp Ser Lys Thr Thr Leu Thr Gly Ile Pro Phe Gly
[0413] 385 390 395 400
[0414] Glu Trp Met Ser Lys Arg Gly Leu Ser Tyr Thr Asp Leu Lys Gly Arg
[0415] 405 410 415
[0416] Thr Asp Asp Leu Gln Ala Val Ser Val Phe Pro Met Val Asn Ser Val
[0417] 420 425 430
[0418] Glu Glu Leu Gly Leu Val Leu Arg Trp Met Leu Ser Glu Pro Glu Leu
[0419] 435 440 445
[0420] Glu Glu Gly Lys Asn Ile Trp Leu Arg Ser Glu His Phe Ser Ala Asp
[0421] 450 455 460
[0422] Glu Ile Ser Ala Gly Ala Asn Leu Lys Arg Leu Tyr Ala Gln Arg Glu
[0423] 465 470 475 480
[0424] Glu Phe Arg Lys Gly Asn Trp Lys Ala Leu Ala Val Asn His Glu Lys
[0425] 485 490 495
[0426] Ser Val Phe Tyr Gln Leu Asp Leu Ala Asp Ala Ala Glu Asp Phe Val
[0427] 500 505 510
[0428] Arg Leu Gly Leu Asp Met Pro Glu Leu Leu Pro Glu Asp Ala Leu Gln

[0429] 515 520 525

[0430] Met Ser Arg Ile His Asn Arg Met Leu Arg Ala Arg Ile Leu Lys Leu

[0431] 530 535 540

[0432] Asp Gly Lys Asp Tyr Arg Pro Glu Glu Gln Ala Ala Phe Asp Leu Leu

[0433] 545 550 555 560

[0434] Arg Asp Gly Leu Leu Asp Gly Ile Ser Asn Arg Lys Ser Thr Pro Lys

[0435] 565 570 575

[0436] Leu Asp Val Tyr Ser Asp Gln Ile Val Trp Gly Arg Ser Pro Val Arg

[0437] 580 585 590

[0438] Ile Asp Met Ala Gly Gly Trp Thr Asp Thr Pro Pro Tyr Ser Leu Tyr

[0439] 595 600 605

[0440] Ser Gly Gly Asn Val Val Asn Leu Ala Ile Glu Leu Asn Gly Gln Pro

[0441] 610 615 620

[0442] Pro Leu Gln Val Tyr Val Lys Pro Cys Lys Asp Phe His Ile Val Leu

[0443] 625 630 635 640

[0444] Arg Ser Ile Asp Met Gly Ala Met Glu Ile Val Ser Thr Phe Asp Glu

[0445] 645 650 655

[0446] Leu Gln Asp Tyr Lys Lys Ile Gly Ser Pro Phe Ser Ile Pro Lys Ala

[0447] 660 665 670

[0448] Ala Leu Ser Leu Ala Gly Phe Ala Pro Ala Phe Ser Ala Val Ser Tyr

[0449] 675 680 685

[0450] Ala Ser Leu Glu Glu Gln Leu Lys Asp Phe Gly Ala Gly Ile Glu Val

[0451] 690 695 700

[0452] Thr Leu Leu Ala Ala Ile Pro Ala Gly Ser Gly Leu Gly Thr Ser Ser

[0453] 705 710 715 720

[0454] Ile Leu Ala Ser Thr Val Leu Gly Ala Ile Asn Asp Phe Cys Gly Leu

[0455] 725 730 735

[0456] Ala Trp Asp Lys Asn Glu Ile Cys Gln Arg Thr Leu Val Leu Glu Gln

[0457] 740 745 750

[0458] Leu Leu Thr Thr Gly Gly Gly Trp Gln Asp Gln Tyr Gly Gly Val Leu

[0459] 755 760 765

[0460] Gln Gly Val Lys Leu Leu Gln Thr Glu Ala Gly Phe Ala Gln Ser Pro

[0461] 770 775 780

[0462] Leu Val Arg Trp Leu Pro Asp His Leu Phe Thr His Pro Glu Tyr Lys

[0463] 785 790 795 800

[0464] Asp Cys His Leu Leu Tyr Tyr Thr Gly Ile Thr Arg Thr Ala Lys Gly

[0465] 805 810 815

[0466] Ile Leu Ala Glu Ile Val Ser Ser Met Phe Leu Asn Ser Ser Leu His

[0467] 820 825 830

[0468] Leu Asn Leu Leu Ser Glu Met Lys Ala His Ala Leu Asp Met Asn Glu
[0469] 835 840 845
[0470] Ala Ile Gln Arg Gly Ser Phe Val Glu Phe Gly Arg Leu Val Gly Lys
[0471] 850 855 860
[0472] Thr Trp Glu Gln Asn Lys Ala Leu Asp Ser Gly Thr Asn Pro Pro Ala
[0473] 865 870 875 880
[0474] Val Glu Ala Ile Ile Asp Leu Ile Lys Asp Tyr Thr Leu Gly Tyr Lys
[0475] 885 890 895
[0476] Leu Pro Gly Ala Gly Gly Gly Gly Tyr Leu Tyr Met Val Ala Lys Asp
[0477] 900 905 910
[0478] Pro Gln Ala Ala Val Arg Ile Arg Lys Ile Leu Thr Glu Asn Ala Pro
[0479] 915 920 925
[0480] Asn Pro Arg Ala Arg Phe Val Glu Met Thr Leu Ser Asp Lys Gly Phe
[0481] 930 935 940
[0482] Gln Val Ser Arg Ser
[0483] 945
[0484] <210> 8
[0485] <211> 303
[0486] <212> PRT
[0487] <213> 乙酰微小杆菌(Exiguobacterium acetylicum)
[0488] <220>
[0489] <221> 肽
[0490] <222> (1)..(303)
[0491] <223> 鸟苷激酶
[0492] <400> 8
[0493] Met Asn Lys Ile Ala Val Ile Gly Lys Val Phe Val Asp Ile Lys Gly
[0494] 1 5 10 15
[0495] Thr Ser Phe Ala Pro Leu His Lys Asp Ala Lys Asn Val Gly Asp Ile
[0496] 20 25 30
[0497] Thr Phe Ser Asn Gly Gly Thr Gly Arg Asn Val Ala Gln Asn Leu Ala
[0498] 35 40 45
[0499] Val Leu Gly Asn Glu Val Arg Phe Ile Ser Thr Val Thr Asn Asp Gln
[0500] 50 55 60
[0501] Ile Gly Val Gly Val Leu Asp Glu Leu Lys Ser Tyr Gly Ala Asn Val
[0502] 65 70 75 80
[0503] Asp His Val Glu Met Leu Glu Asp His Gly Met Gly Met Trp Leu Ala
[0504] 85 90 95
[0505] Val Met Asp Asn Glu Gly Asp Leu Gln Thr Ser Ile Ser Lys Gln Pro
[0506] 100 105 110

[0507] Asp Ala Lys Leu Leu Glu Glu Ala Ile Leu Arg Gln Ser Ile Tyr Ala
[0508] 115 120 125
[0509] Leu Asp Gly Val Asp Ala Val Ala Ile Asp Leu Asp Leu Ser Val Thr
[0510] 130 135 140
[0511] Val Leu Glu Arg Leu Ile His Leu Cys Arg Lys Met Glu Leu Pro Leu
[0512] 145 150 155 160
[0513] Phe Gly Val Cys Gly His Leu Ser Val Ile Glu Arg Asn Arg His Leu
[0514] 165 170 175
[0515] Leu Gln Gly Phe Thr Gly Phe Ile Cys Ser Arg Glu Glu Ala Glu Ile
[0516] 180 185 190
[0517] Leu Ser Asp Leu Ser Ile Val Thr Val Glu Asp Ala Ile His Val Ala
[0518] 195 200 205
[0519] Asn Glu Leu Ala Lys Lys Gly Ala Pro Phe Thr Val Val Thr Met Ser
[0520] 210 215 220
[0521] Glu Leu Gly Ala Val Tyr Val Asp Arg Arg Thr Ala Thr Ser Gly His
[0522] 225 230 235 240
[0523] Val Gly Thr Lys Lys Val Lys Val Val Asp Ser Thr Gly Ala Gly Asp
[0524] 245 250 255
[0525] Ser Phe Phe Ser Ala Val Leu Ser Glu Leu Thr Gln Glu Lys Ser Ala
[0526] 260 265 270
[0527] Glu Glu Ala Leu Lys Leu Gly Met Lys Val Ala Ala Glu Val Ile Ala
[0528] 275 280 285
[0529] Ser Thr Glu Asn Gly Leu Val Pro Glu Met Leu Asp Ala Leu Gln
[0530] 290 295 300
[0531] <210> 9
[0532] <211> 496
[0533] <212> PRT
[0534] <213> 铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)
[0535] <220>
[0536] <221> 肽
[0537] <222> (1)..(496)
[0538] <223> 2-结构域多磷酸激酶2
[0539] <400> 9
[0540] Met Phe Glu Ser Ala Glu Val Gly His Ser Ile Asp Lys Asp Thr Tyr
[0541] 1 5 10 15
[0542] Glu Lys Ala Val Ile Glu Leu Arg Glu Ala Leu Leu Glu Ala Gln Phe
[0543] 20 25 30
[0544] Glu Leu Lys Gln Gln Ala Arg Phe Pro Val Ile Ile Leu Ile Asn Gly
[0545] 35 40 45

[0546] Ile Glu Gly Ala Gly Lys Gly Glu Thr Val Lys Leu Leu Asn Glu Trp
[0547] 50 55 60
[0548] Met Asp Pro Arg Leu Ile Glu Val Gln Ser Phe Leu Arg Pro Ser Asp
[0549] 65 70 75 80
[0550] Glu Glu Leu Glu Arg Pro Pro Gln Trp Arg Phe Trp Arg Arg Leu Pro
[0551] 85 90 95
[0552] Pro Lys Gly Arg Thr Gly Ile Phe Phe Gly Asn Trp Tyr Ser Gln Met
[0553] 100 105 110
[0554] Leu Tyr Ala Arg Val Glu Gly His Ile Lys Glu Ala Lys Leu Asp Gln
[0555] 115 120 125
[0556] Ala Ile Asp Ala Ala Glu Arg Phe Glu Arg Met Leu Cys Asp Glu Gly
[0557] 130 135 140
[0558] Ala Leu Leu Phe Lys Phe Trp Phe His Leu Ser Lys Lys Gln Leu Lys
[0559] 145 150 155 160
[0560] Glu Arg Leu Lys Ala Leu Glu Lys Asp Pro Gln His Ser Trp Lys Leu
[0561] 165 170 175
[0562] Ser Pro Leu Asp Trp Lys Gln Ser Glu Val Tyr Asp Arg Phe Val His
[0563] 180 185 190
[0564] Tyr Gly Glu Arg Val Leu Arg Arg Thr Ser Arg Asp Tyr Ala Pro Trp
[0565] 195 200 205
[0566] Tyr Val Val Glu Gly Ala Asp Glu Arg Tyr Arg Ala Leu Thr Val Gly
[0567] 210 215 220
[0568] Arg Ile Leu Leu Glu Gly Leu Gln Ala Ala Leu Ala Thr Lys Glu Arg
[0569] 225 230 235 240
[0570] Ala Lys Arg Gln Pro His Ala Ala Pro Leu Val Ser Ser Leu Asp Asn
[0571] 245 250 255
[0572] Arg Gly Leu Leu Asp Ser Leu Asp Leu Gly Gln Tyr Leu Asp Lys Asp
[0573] 260 265 270
[0574] Ala Tyr Lys Glu Gln Leu Ala Ala Glu Gln Ala Arg Leu Ala Gly Leu
[0575] 275 280 285
[0576] Ile Arg Asp Lys Arg Phe Arg Gln His Ser Leu Val Ala Val Phe Glu
[0577] 290 295 300
[0578] Gly Asn Asp Ala Ala Gly Lys Gly Gly Ala Ile Arg Arg Val Thr Asp
[0579] 305 310 315 320
[0580] Ala Leu Asp Pro Arg Gln Tyr His Ile Val Pro Ile Ala Ala Pro Thr
[0581] 325 330 335
[0582] Glu Glu Glu Arg Ala Gln Pro Tyr Leu Trp Arg Phe Trp Arg His Ile
[0583] 340 345 350
[0584] Pro Ala Arg Arg Gln Phe Thr Ile Phe Asp Arg Ser Trp Tyr Gly Arg

[0585] 355 360 365

[0586] Val Leu Val Glu Arg Ile Glu Gly Phe Cys Ala Pro Ala Asp Trp Leu

[0587] 370 375 380

[0588] Arg Ala Tyr Gly Glu Ile Asn Asp Phe Glu Glu Gln Leu Ser Glu Tyr

[0589] 385 390 395 400

[0590] Gly Ile Ile Val Val Lys Phe Trp Leu Ala Ile Asp Lys Gln Thr Gln

[0591] 405 410 415

[0592] Met Glu Arg Phe Lys Glu Arg Glu Lys Thr Pro Tyr Lys Arg Tyr Lys

[0593] 420 425 430

[0594] Ile Thr Glu Glu Asp Trp Arg Asn Arg Asp Lys Trp Asp Gln Tyr Val

[0595] 435 440 445

[0596] Asp Ala Val Gly Asp Met Val Asp Arg Thr Ser Thr Glu Ile Ala Pro

[0597] 450 455 460

[0598] Trp Thr Leu Val Glu Ala Asn Asp Lys Arg Phe Ala Arg Val Lys Val

[0599] 465 470 475 480

[0600] Leu Arg Thr Ile Asn Asp Ala Ile Glu Ala Ala Tyr Lys Lys Asp Lys

[0601] 485 490 495

[0602] <210> 10

[0603] <211> 177

[0604] <212> PRT

[0605] <213> 多杀巴斯德氏菌(Pasteurella multocida)

[0606] <220>

[0607] <221> 肽

[0608] <222> (1)..(177)

[0609] <223> 无机焦磷酸酶

[0610] <400> 10

[0611] Met Gly Leu Glu Thr Val Pro Ala Gly Lys Ala Leu Pro Asp Asp Ile

[0612] 1 5 10 15

[0613] Tyr Val Val Ile Glu Ile Pro Ala Asn Ser Asp Pro Ile Lys Tyr Glu

[0614] 20 25 30

[0615] Val Asp Lys Glu Ser Gly Ala Leu Phe Val Asp Arg Phe Met Ala Thr

[0616] 35 40 45

[0617] Ala Met Phe Tyr Pro Ala Asn Tyr Gly Tyr Val Asn Asn Thr Leu Ser

[0618] 50 55 60

[0619] Leu Asp Gly Asp Pro Val Asp Val Leu Val Pro Thr Pro Tyr Pro Leu

[0620] 65 70 75 80

[0621] Gln Pro Gly Ser Val Ile Arg Cys Arg Pro Val Gly Val Leu Lys Met

[0622] 85 90 95

[0623] Thr Asp Glu Ala Gly Ser Asp Ala Lys Val Val Ala Val Pro His Ser

[0624] 100 105 110

[0625] Lys Leu Thr Lys Glu Tyr Asp His Ile Lys Asp Val Asn Asp Leu Pro

[0626] 115 120 125

[0627] Ala Leu Leu Lys Ala Gln Ile Gln His Phe Phe Glu Ser Tyr Lys Ala

[0628] 130 135 140

[0629] Leu Glu Ala Gly Lys Trp Val Lys Val Asp Gly Trp Glu Gly Val Asp

[0630] 145 150 155 160

[0631] Ala Ala Arg Gln Glu Ile Leu Asp Ser Phe Glu Arg Ala Lys Lys Leu

[0632] 165 170 175

[0633] Glu

[0634] <210> 11

[0635] <211> 198

[0636] <212> PRT

[0637] <213> 野猪(Sus scrofa)

[0638] <220>

[0639] <221> 肽

[0640] <222> (1)..(198)

[0641] <223> 乌苷酸激酶

[0642] <400> 11

[0643] Met Gly Ser Pro Arg Pro Val Val Leu Ser Gly Pro Ser Gly Ala Gly

[0644] 1 5 10 15

[0645] Lys Ser Thr Leu Leu Lys Lys Leu Leu Gln Glu His Ser Ser Ile Phe

[0646] 20 25 30

[0647] Gly Phe Ser Val Ser His Thr Thr Arg Asp Pro Arg Pro Gly Glu Glu

[0648] 35 40 45

[0649] Asn Gly Lys Asp Tyr Tyr Phe Val Thr Arg Glu Val Met Gln Arg Asp

[0650] 50 55 60

[0651] Ile Ala Ala Gly Asp Phe Ile Glu His Ala Glu Phe Ser Gly Asn Leu

[0652] 65 70 75 80

[0653] Tyr Gly Thr Ser Lys Ala Ala Val Arg Ala Val Gln Ala Met Asn Arg

[0654] 85 90 95

[0655] Ile Cys Val Leu Asp Val Asp Leu Gln Gly Val Arg Asn Ile Lys Lys

[0656] 100 105 110

[0657] Thr Asp Leu Gln Pro Ile Tyr Ile Phe Val Gln Pro Pro Ser Leu Asp

[0658] 115 120 125

[0659] Val Leu Glu Gln Arg Leu Arg Gln Arg Asn Thr Glu Thr Glu Glu Ser

[0660] 130 135 140

[0661] Leu Ala Lys Arg Leu Ala Ala Ala Lys Ala Asp Met Glu Ser Ser Lys

[0662] 145 150 155 160

[0663] Glu Pro Gly Leu Phe Asp Leu Ile Ile Ile Asn Asp Ser Leu Asp Lys
[0664] 165 170 175
[0665] Ala Tyr Trp Ala Leu Lys Glu Ala Leu Ser Glu Glu Ile Lys Lys Ala
[0666] 180 185 190
[0667] Gln Ala Thr Gly His Ser
[0668] 195
[0669] <210> 12
[0670] <211> 558
[0671] <212> PRT
[0672] <213> 牛(Bos taurus)
[0673] <220>
[0674] <221> 肽
[0675] <222> (1)..(558)
[0676] <223> 谷氨酸脱氢酶1 (GLDH)
[0677] <400> 12
[0678] Met Tyr Arg Tyr Leu Gly Glu Ala Leu Leu Leu Ser Arg Ala Gly Pro
[0679] 1 5 10 15
[0680] Ala Ala Leu Gly Ser Ala Ser Ala Asp Ser Ala Ala Leu Leu Gly Trp
[0681] 20 25 30
[0682] Ala Arg Gly Gln Pro Ala Ala Ala Pro Gln Pro Gly Leu Val Pro Pro
[0683] 35 40 45
[0684] Ala Arg Arg His Tyr Ser Glu Ala Ala Ala Asp Arg Glu Asp Asp Pro
[0685] 50 55 60
[0686] Asn Phe Phe Lys Met Val Glu Gly Phe Phe Asp Arg Gly Ala Ser Ile
[0687] 65 70 75 80
[0688] Val Glu Asp Lys Leu Val Glu Asp Leu Lys Thr Arg Glu Thr Glu Glu
[0689] 85 90 95
[0690] Gln Lys Arg Asn Arg Val Arg Ser Ile Leu Arg Ile Ile Lys Pro Cys
[0691] 100 105 110
[0692] Asn His Val Leu Ser Leu Ser Phe Pro Ile Arg Arg Asp Asp Gly Ser
[0693] 115 120 125
[0694] Trp Glu Val Ile Glu Gly Tyr Arg Ala Gln His Ser Gln His Arg Thr
[0695] 130 135 140
[0696] Pro Cys Lys Gly Gly Ile Arg Tyr Ser Thr Asp Val Ser Val Asp Glu
[0697] 145 150 155 160
[0698] Val Lys Ala Leu Ala Ser Leu Met Thr Tyr Lys Cys Ala Val Val Asp
[0699] 165 170 175
[0700] Val Pro Phe Gly Gly Ala Lys Ala Gly Val Lys Ile Asn Pro Lys Asn
[0701] 180 185 190

[0702] Tyr Thr Asp Asn Glu Leu Glu Lys Ile Thr Arg Arg Phe Thr Met Glu
[0703] 195 200 205
[0704] Leu Ala Lys Lys Gly Phe Ile Gly Pro Gly Val Asp Val Pro Ala Pro
[0705] 210 215 220
[0706] Asp Met Ser Thr Gly Glu Arg Glu Met Ser Trp Ile Ala Asp Thr Tyr
[0707] 225 230 235 240
[0708] Ala Ser Thr Ile Gly His Tyr Asp Ile Asn Ala His Ala Cys Val Thr
[0709] 245 250 255
[0710] Gly Lys Pro Ile Ser Gln Gly Gly Ile His Gly Arg Ile Ser Ala Thr
[0711] 260 265 270
[0712] Gly Arg Gly Val Phe His Gly Ile Glu Asn Phe Ile Asn Glu Ala Ser
[0713] 275 280 285
[0714] Tyr Met Ser Ile Leu Gly Met Thr Pro Gly Phe Gly Asp Lys Thr Phe
[0715] 290 295 300
[0716] Val Val Gln Gly Phe Gly Asn Val Gly Leu His Ser Met Arg Tyr Leu
[0717] 305 310 315 320
[0718] His Arg Phe Gly Ala Lys Cys Ile Thr Val Gly Glu Ser Asp Gly Ser
[0719] 325 330 335
[0720] Ile Trp Asn Pro Asp Gly Ile Asp Pro Lys Glu Leu Glu Asp Phe Lys
[0721] 340 345 350
[0722] Leu Gln His Gly Thr Ile Leu Gly Phe Pro Lys Ala Lys Ile Tyr Glu
[0723] 355 360 365
[0724] Gly Ser Ile Leu Glu Val Asp Cys Asp Ile Leu Ile Pro Ala Ala Ser
[0725] 370 375 380
[0726] Glu Lys Gln Leu Thr Lys Ser Asn Ala Pro Arg Val Lys Ala Lys Ile
[0727] 385 390 395 400
[0728] Ile Ala Glu Gly Ala Asn Gly Pro Thr Thr Pro Glu Ala Asp Lys Ile
[0729] 405 410 415
[0730] Phe Leu Glu Arg Asn Ile Met Val Ile Pro Asp Leu Tyr Leu Asn Ala
[0731] 420 425 430
[0732] Gly Gly Val Thr Val Ser Tyr Phe Glu Trp Leu Asn Asn Leu Asn His
[0733] 435 440 445
[0734] Val Ser Tyr Gly Arg Leu Thr Phe Lys Tyr Glu Arg Asp Ser Asn Tyr
[0735] 450 455 460
[0736] His Leu Leu Met Ser Val Gln Glu Ser Leu Glu Arg Lys Phe Gly Lys
[0737] 465 470 475 480
[0738] His Gly Gly Thr Ile Pro Ile Val Pro Thr Ala Glu Phe Gln Asp Arg
[0739] 485 490 495
[0740] Ile Ser Gly Ala Ser Glu Lys Asp Ile Val His Ser Gly Leu Ala Tyr

[0741] 500 505 510

[0742] Thr Met Glu Arg Ser Ala Arg Gln Ile Met Arg Thr Ala Met Lys Tyr

[0743] 515 520 525

[0744] Asn Leu Gly Leu Asp Leu Arg Thr Ala Ala Tyr Val Asn Ala Ile Glu

[0745] 530 535 540

[0746] Lys Val Phe Arg Val Tyr Asn Glu Ala Gly Val Thr Phe Thr

[0747] 545 550 555

[0748] <210> 13

[0749] <211> 486

[0750] <212> PRT

[0751] <213> 肠系膜明串珠菌(Leuconostoc mesenteroides)

[0752] <220>

[0753] <221> 肽

[0754] <222> (1)..(486)

[0755] <223> 葡萄糖-6-磷酸1-脱氢酶(G6PDH)

[0756] <400> 13

[0757] Met Val Ser Glu Ile Lys Thr Leu Val Thr Phe Phe Gly Gly Thr Gly

[0758] 1 5 10 15

[0759] Asp Leu Ala Lys Arg Lys Leu Tyr Pro Ser Val Phe Asn Leu Tyr Lys

[0760] 20 25 30

[0761] Lys Gly Tyr Leu Gln Glu His Phe Ala Ile Val Gly Thr Ala Arg Gln

[0762] 35 40 45

[0763] Gln Leu Ser Asp Glu Glu Phe Lys Gln Leu Val Arg Asp Ser Ile Lys

[0764] 50 55 60

[0765] Asp Phe Thr Glu Asp Gln Ala Gln Ala Glu Ala Phe Ile Ala His Phe

[0766] 65 70 75 80

[0767] Ser Tyr Arg Ala His Asp Val Thr Asp Ala Ala Ser Tyr Gly Ile Leu

[0768] 85 90 95

[0769] Lys Ser Ala Ile Glu Glu Ala Ala Thr Lys Phe Asp Ile Asp Gly Asn

[0770] 100 105 110

[0771] Arg Ile Phe Tyr Met Ser Val Ala Pro Arg Phe Phe Gly Thr Ile Ala

[0772] 115 120 125

[0773] Lys Tyr Leu Lys Ser Glu Gly Leu Leu Ala Asp Thr Gly Tyr Asn Arg

[0774] 130 135 140

[0775] Leu Met Ile Glu Lys Pro Phe Gly Thr Ser Tyr Ala Thr Ala Glu Glu

[0776] 145 150 155 160

[0777] Leu Gln Ser Asp Leu Glu Asn Ala Phe Asp Asp Asp Gln Leu Phe Arg

[0778] 165 170 175

[0779] Ile Asp His Tyr Leu Gly Lys Glu Met Val Gln Asn Ile Ala Ala Leu

[0780] 180 185 190

[0781] Arg Phe Gly Asn Pro Ile Phe Asp Ala Ala Trp Asn Lys Asp Tyr Ile

[0782] 195 200 205

[0783] Lys Asn Val Gln Val Thr Leu Ser Glu Val Leu Gly Val Glu Glu Arg

[0784] 210 215 220

[0785] Ala Gly Tyr Tyr Asp Thr Thr Gly Ala Leu Leu Asp Met Ile Gln Asn

[0786] 225 230 235 240

[0787] His Thr Met Gln Ile Val Gly Trp Leu Ala Met Glu Lys Pro Glu Ser

[0788] 245 250 255

[0789] Phe Asn Asp Lys Asp Ile Arg Ala Ala Lys Asn Ala Ala Phe Asn Ala

[0790] 260 265 270

[0791] Leu Lys Ile Tyr Asn Glu Glu Glu Val Asn Lys Tyr Phe Val Arg Ala

[0792] 275 280 285

[0793] Gln Tyr Gly Ala Gly Asp Thr Ala Asp Tyr Lys Pro Tyr Leu Glu Glu

[0794] 290 295 300

[0795] Ala Asp Val Pro Ala Asp Ser Lys Asn Asn Thr Phe Ile Ala Gly Glu

[0796] 305 310 315 320

[0797] Leu Gln Phe Asp Leu Pro Arg Trp Glu Gly Val Pro Phe Tyr Val Arg

[0798] 325 330 335

[0799] Ser Gly Lys Arg Leu Ala Ala Lys Gln Thr Arg Val Asp Ile Val Phe

[0800] 340 345 350

[0801] Lys Ala Gly Thr Phe Asn Phe Gly Ser Glu Gln Glu Ala Gln Glu Ser

[0802] 355 360 365

[0803] Val Leu Ser Ile Ile Ile Asp Pro Lys Gly Ala Ile Glu Leu Lys Leu

[0804] 370 375 380

[0805] Asn Ala Lys Ser Val Glu Asp Ala Phe Asn Thr Arg Thr Ile Asn Leu

[0806] 385 390 395 400

[0807] Asp Trp Ala Val Ser Asp Glu Asp Lys Lys Asn Thr Pro Glu Pro Tyr

[0808] 405 410 415

[0809] Glu Arg Met Ile His Asp Thr Met Asn Gly Asp Gly Ser Asn Phe Ala

[0810] 420 425 430

[0811] Asp Trp Asn Gly Val Ser Ile Ala Trp Lys Phe Val Asp Ala Ile Thr

[0812] 435 440 445

[0813] Ala Val Tyr Asp Ala Asp Lys Ala Pro Leu Glu Thr Tyr Lys Ser Gly

[0814] 450 455 460

[0815] Ser Met Gly Pro Glu Ala Ser Asp Lys Leu Leu Ala Glu Asn Gly Asp

[0816] 465 470 475 480

[0817] Ala Trp Val Phe Lys Gly

[0818] 485

[0819] <210> 14

[0820] <211> 301

[0821] <212> PRT

[0822] <213> Ruegeria pomerovi

[0823] <220>

[0824] <221> 肽

[0825] <222> (1)..(301)

[0826] <223> 磷酸转移酶3 (PPK3)

[0827] <400> 14

[0828] Met Asn Arg Asn Gly Ser Thr Lys Asp Pro Arg Arg Met Thr Gly Ala

[0829] 1 5 10 15

[0830] Ala Thr Gly Glu Ile Ser Arg Tyr Phe Asn Asp Lys Ala Pro Lys Asp

[0831] 20 25 30

[0832] Ile Arg Arg Ala Ile Glu Lys Ala Asp Lys Asp Asp Ile Leu Ser Thr

[0833] 35 40 45

[0834] Thr Tyr Pro Tyr Asp Ala Glu Met Thr Ala Lys Asp Tyr Arg Ala Gln

[0835] 50 55 60

[0836] Met Glu Ala Leu Gln Ile Glu Leu Val Lys Leu Gln Ala Trp Ile Lys

[0837] 65 70 75 80

[0838] Gln Ser Gly Ala Arg Val Ala Leu Leu Phe Glu Gly Arg Asp Ala Ala

[0839] 85 90 95

[0840] Gly Lys Gly Gly Thr Ile Lys Arg Phe Arg Glu Asn Leu Asn Pro Arg

[0841] 100 105 110

[0842] Gly Ala Arg Val Val Ala Leu Ser Lys Pro Thr Glu Ala Glu Arg Ser

[0843] 115 120 125

[0844] Gln Trp Tyr Phe Gln Arg Tyr Ile Gln His Leu Pro Ser Ala Gly Glu

[0845] 130 135 140

[0846] Leu Val Phe Tyr Asp Arg Ser Trp Tyr Asn Arg Gly Val Val Glu His

[0847] 145 150 155 160

[0848] Val Phe Gly Trp Cys Asp Glu Glu Gln Arg Glu Arg Phe Phe Arg Gln

[0849] 165 170 175

[0850] Val Met Pro Phe Glu His Asp Leu Val Asp Asp Gly Ile His Leu Phe

[0851] 180 185 190

[0852] Lys Phe Trp Leu Asn Val Gly Arg Ala Glu Gln Leu Arg Arg Phe His

[0853] 195 200 205

[0854] Asp Arg Glu Arg Asp Pro Leu Lys Gln Trp Lys Leu Ser Pro Val Asp

[0855] 210 215 220

[0856] Ile Ala Gly Leu Asp Lys Trp Glu Ala Tyr Thr Thr Ala Ile Ser Gln

[0857] 225 230 235 240

[0858] Thr Leu Thr Arg Ser His Ser Asp Arg Ala Pro Trp Thr Val Ile Arg
[0859] 245 250 255
[0860] Ser Asp Asp Lys Lys Arg Ala Arg Leu Ala Ala Ile Arg Thr Val Leu
[0861] 260 265 270
[0862] Ser Gly Ile Asp Tyr Asp Asn Lys Asp Arg Ala Ala Val Gly Gln Pro
[0863] 275 280 285
[0864] Asp Ala Ala Ile Cys Gly Gly Pro Asp Ile Trp Asp Ala
[0865] 290 295 300
[0866] <210> 15
[0867] <211> 359
[0868] <212> PRT
[0869] <213> Picrophilus torridus
[0870] <220>
[0871] <221> 肽
[0872] <222> (1)..(359)
[0873] <223> 葡萄糖/半乳糖1-脱氢酶(GDH)
[0874] <400> 15
[0875] Met Val Arg Ala Ile Ile Thr Asn Ala Pro Asn Gly Gly Val Lys Ile
[0876] 1 5 10 15
[0877] Glu Asn Val Asn Ile Asn Glu Pro Glu His Tyr Glu Val Lys Leu Arg
[0878] 20 25 30
[0879] Pro Val Tyr Thr Gly Leu Cys Gly Thr Asp Arg Gly Glu Val Leu Gly
[0880] 35 40 45
[0881] Asn Leu Ser Phe Ala Tyr Asn Glu Pro Gly Tyr Asn Tyr Leu Val Leu
[0882] 50 55 60
[0883] Gly His Glu Ala Ile Cys Gln Val Ile Glu Ala Ser Glu Asn Pro Tyr
[0884] 65 70 75 80
[0885] Lys Ile Lys Pro Gly Asp Tyr Val Val Pro Val Val Arg Arg Pro Gly
[0886] 85 90 95
[0887] Lys Cys Val Asn Cys Arg Ile Gly Arg Glu Asp Asp Cys Ser Asp Gly
[0888] 100 105 110
[0889] Asp Lys His Glu Ala Gly Ile Thr Gly Leu His Gly Phe Met Arg Asp
[0890] 115 120 125
[0891] Tyr Phe Tyr Asp Glu Ala Lys Asn Leu Val Lys Ile Asn Asp Lys Asn
[0892] 130 135 140
[0893] Met Val Lys Val Ala Val Leu Thr Glu Pro Thr Lys Asn Val Met Lys
[0894] 145 150 155 160
[0895] Ala Phe Glu Val Phe Asp Thr Val Ser Lys Arg Ser Ile Phe Gln Gly
[0896] 165 170 175

[0897] Asp Asp Ser Thr Asn Leu Thr Lys Asn Cys Leu Ile Ile Gly Thr Gly
[0898] 180 185 190
[0899] Ser Glu Ala Phe Leu Tyr Ala Phe Met Ala Arg Glu Tyr Arg Phe Asn
[0900] 195 200 205
[0901] Val Phe Met Thr Asn Arg His Pro Val Gly Glu Glu Lys Leu Ser Ile
[0902] 210 215 220
[0903] Ile Ser Arg Ile Asn Ala Asp Phe Tyr Asp Tyr Thr Arg Glu Asp Pro
[0904] 225 230 235 240
[0905] Leu Lys Gly Ile Asp Leu Leu Ile Asp Thr Ser Gly Asp Pro Gly Thr
[0906] 245 250 255
[0907] Ile Phe Arg Phe Val Arg Lys Met Asn Tyr Asn Gly Val Val Ile Leu
[0908] 260 265 270
[0909] Phe Gly Thr Asn Gly Arg Ala Pro Ala Thr Ser Ile Asp Gly Glu Asp
[0910] 275 280 285
[0911] Ile Asp Tyr Ile Ile Glu Arg Asn Ile Ser Leu Val Gly Ser Val Asp
[0912] 290 295 300
[0913] Gly Ala Lys Arg His Tyr Leu Arg Ala Val Glu Tyr Leu Glu Lys Trp
[0914] 305 310 315 320
[0915] Asn Tyr Ser Glu Gly Ser Val Ile Asn Arg Leu Ile Thr Gly Val Phe
[0916] 325 330 335
[0917] Glu Pro Glu Asp Val Ser Ile Phe Thr Lys Lys Pro Glu Asn Glu Ile
[0918] 340 345 350
[0919] Lys Ser Val Ile Lys Trp Ser
[0920] 355
[0921] <210> 16
[0922] <211> 462
[0923] <212> PRT
[0924] <213> 幽门螺杆菌(Helicobacter pylori)
[0925] <220>
[0926] <221> 肽
[0927] <222> (1)..(462)
[0928] <223> α-1,3/4-岩藻糖基转移酶(3/4FT)
[0929] <400> 16
[0930] Met Phe Gln Pro Leu Leu Asp Ala Phe Ile Asp Ser Thr His Leu Asp
[0931] 1 5 10 15
[0932] Glu Thr Thr His Lys Pro Pro Leu Asn Val Ala Leu Ala Asn Trp Trp
[0933] 20 25 30
[0934] Pro Leu Lys Asn Ser Glu Lys Lys Gly Phe Arg Asp Phe Ile Leu His
[0935] 35 40 45

[0936] Phe Ile Leu Lys Gln Arg Tyr Lys Ile Ile Leu His Ser Asn Pro Asn
[0937] 50 55 60
[0938] Glu Pro Ser Asp Leu Val Phe Gly Asn Pro Leu Glu Gln Ala Arg Lys
[0939] 65 70 75 80
[0940] Ile Leu Ser Tyr Gln Asn Thr Lys Arg Val Phe Tyr Thr Gly Glu Asn
[0941] 85 90 95
[0942] Glu Val Pro Asn Phe Asn Leu Phe Asp Tyr Ala Ile Gly Phe Asp Glu
[0943] 100 105 110
[0944] Leu Asp Phe Asn Asp Arg Tyr Leu Arg Met Pro Leu Tyr Tyr Ala Tyr
[0945] 115 120 125
[0946] Leu His Tyr Lys Ala Met Leu Val Asn Asp Thr Thr Ser Pro Tyr Lys
[0947] 130 135 140
[0948] Leu Lys Ala Leu Tyr Thr Leu Lys Lys Pro Ser His Lys Phe Lys Glu
[0949] 145 150 155 160
[0950] Asn His Pro Asn Leu Cys Ala Leu Ile His Asn Glu Ser Asp Pro Trp
[0951] 165 170 175
[0952] Lys Arg Gly Phe Ala Ser Phe Val Ala Ser Asn Pro Asn Ala Pro Ile
[0953] 180 185 190
[0954] Arg Asn Ala Phe Tyr Asp Ala Leu Asn Ala Ile Glu Pro Val Ala Ser
[0955] 195 200 205
[0956] Gly Gly Ser Val Lys Asn Thr Leu Gly Tyr Lys Val Lys Asn Lys Asn
[0957] 210 215 220
[0958] Glu Phe Leu Ser Gln Tyr Lys Phe Asn Leu Cys Phe Glu Asn Ser Gln
[0959] 225 230 235 240
[0960] Gly Tyr Gly Tyr Val Thr Glu Lys Ile Leu Asp Ala Tyr Phe Ser His
[0961] 245 250 255
[0962] Thr Ile Pro Ile Tyr Trp Gly Ser Pro Ser Val Ala Lys Asp Phe Asn
[0963] 260 265 270
[0964] Pro Lys Ser Phe Val Asn Val His Asp Phe Asn Asn Phe Asp Glu Ala
[0965] 275 280 285
[0966] Ile Asp Tyr Ile Arg Tyr Leu His Ala His Gln Asn Ala Tyr Leu Asp
[0967] 290 295 300
[0968] Met Leu Tyr Glu Asn Pro Leu Asn Thr Ile Asp Gly Lys Ala Gly Phe
[0969] 305 310 315 320
[0970] Tyr Gln Asp Leu Ser Phe Glu Lys Ile Leu Asp Phe Phe Lys Asn Ile
[0971] 325 330 335
[0972] Leu Glu Asn Asp Thr Ile Tyr His Cys Asn Asp Ala His Tyr Ser Ala
[0973] 340 345 350
[0974] Leu His Arg Asp Leu Asn Glu Pro Leu Val Ser Val Asp Asp Leu Arg

[0975] 355 360 365

[0976] Arg Asp His Asp Asp Leu Arg Val Asn Tyr Asp Asp Leu Arg Val Asn

[0977] 370 375 380

[0978] Tyr Asp Asp Leu Arg Val Asn Tyr Asp Asp Leu Arg Val Asn Tyr Asp

[0979] 385 390 395 400

[0980] Asp Leu Arg Val Asn Tyr Asp Asp Leu Arg Arg Asp His Asp Asp Leu

[0981] 405 410 415

[0982] Arg Arg Asp His Glu Arg Leu Leu Ser Lys Ala Thr Pro Leu Leu Glu

[0983] 420 425 430

[0984] Leu Ser Gln Asn Thr Ser Phe Lys Ile Tyr Arg Lys Ala Tyr Gln Lys

[0985] 435 440 445

[0986] Ser Leu Pro Leu Leu Arg Ala Ile Arg Arg Trp Val Arg Lys

[0987] 450 455 460

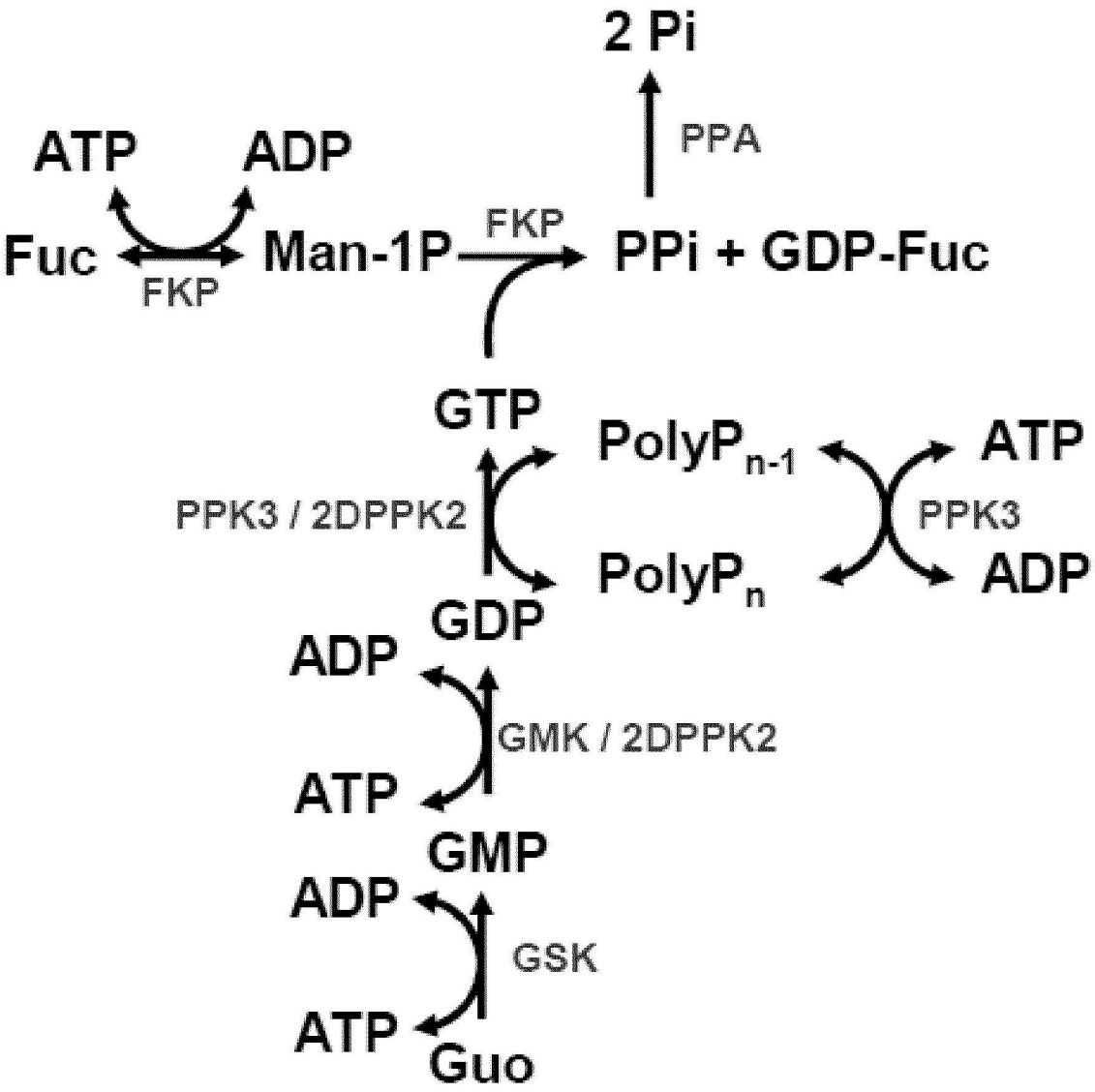

2 Pi
PPA
ATP
ADP
Fuc
FKP
Man-1P
FKP
PPi + GDP-Fuc
GTP
PolyP$_{n-1}$
ATP
PPK3 / 2DPPK2
PPK3
PolyP$_n$
ADP
GDP
ADP
GMK / 2DPPK2
ATP
GMP
ADP
GSK
ATP
Guo

图1

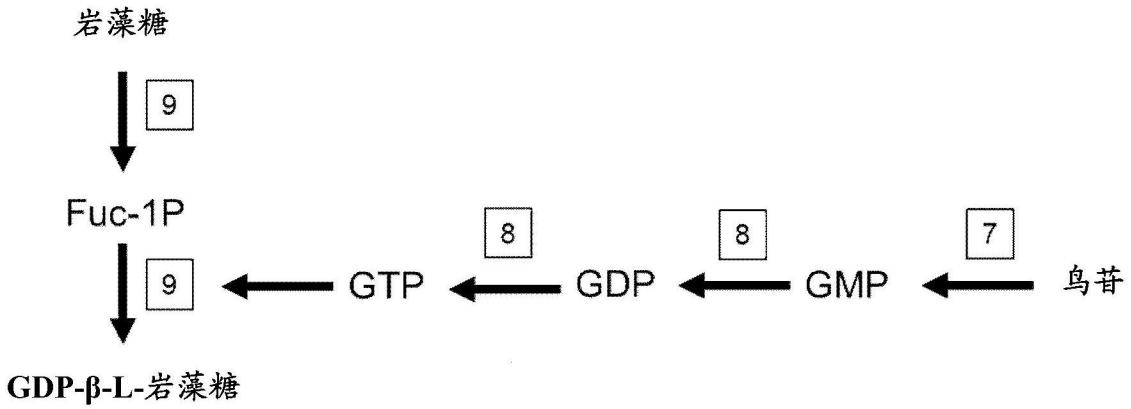

岩藻糖
9
Fuc-1P
9
GTP
8
GDP
8
GMP
7
鸟苷
GDP-β-L-岩藻糖

图2

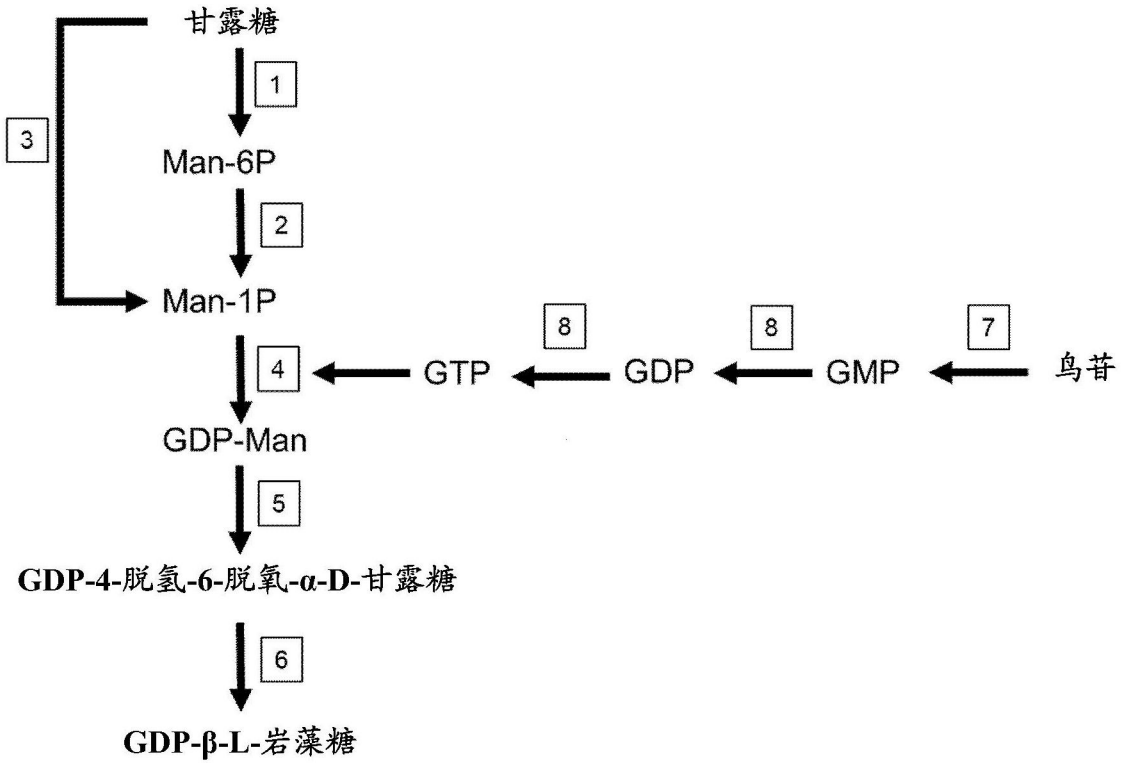
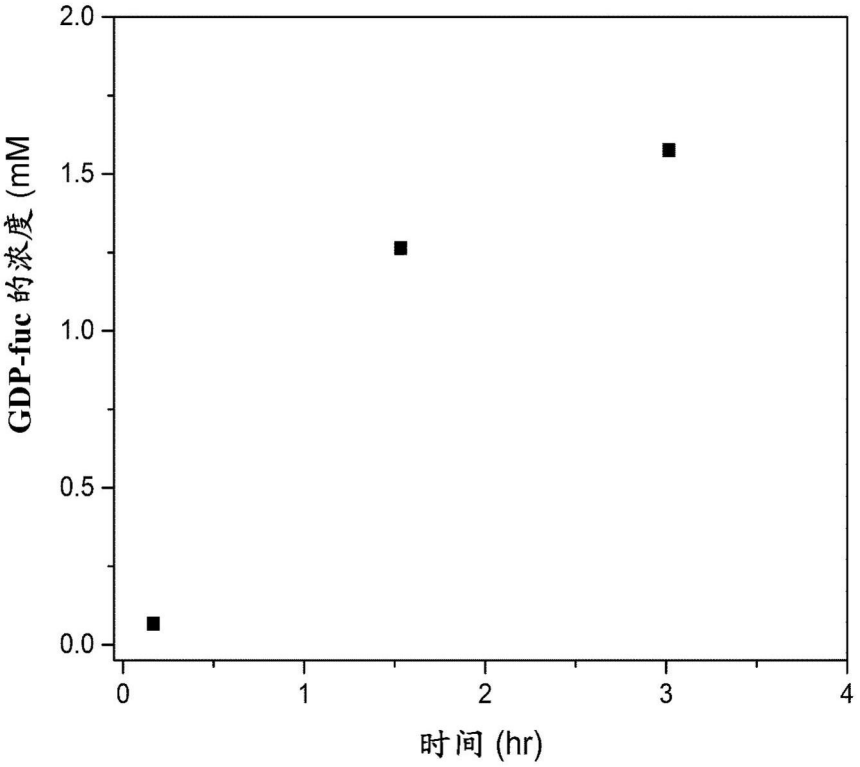

甘露糖
1
3
Man-6P
2
Man-1P
8
8
7
4
GTP
GDP
GMP
鸟苷
GDP-Man
5
GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖
6
GDP-β-L-岩藻糖

图3

A


GDP-fuc 的浓度 (mM
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
4
时间 (hr)

B

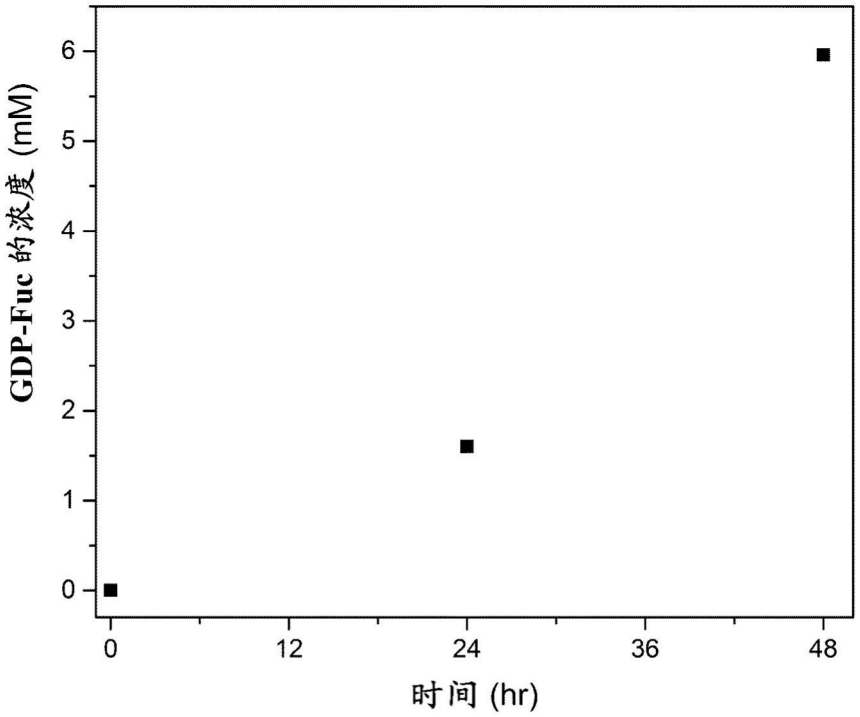
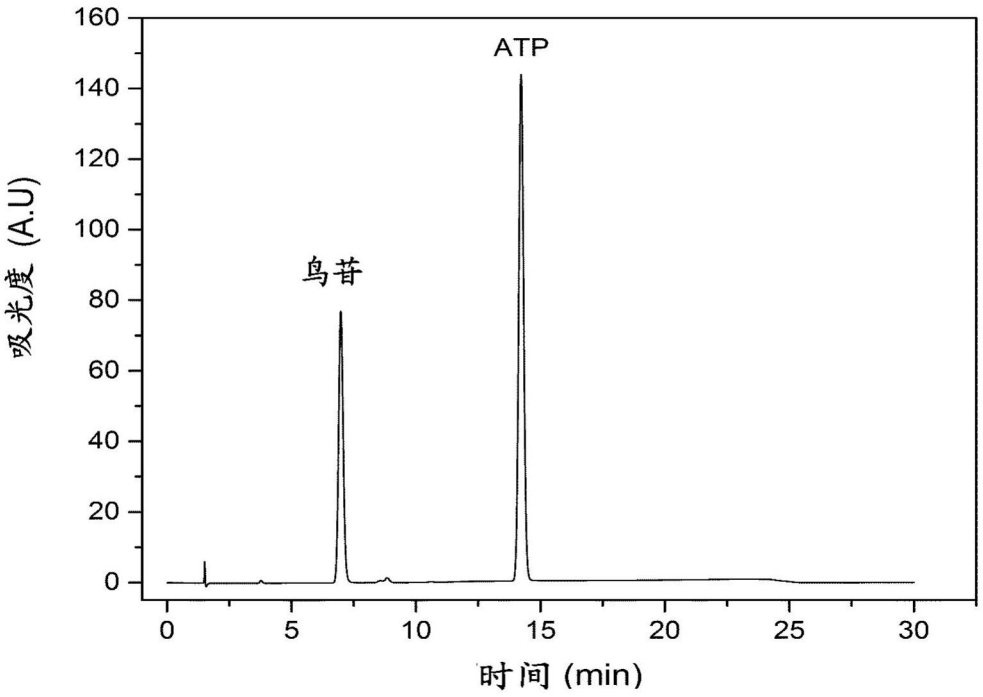

GDP-Fuc 的浓度 (mM)
6
5
4
3
2
1
0
0
12
24
36
48
时间 (hr)

图4

A



B

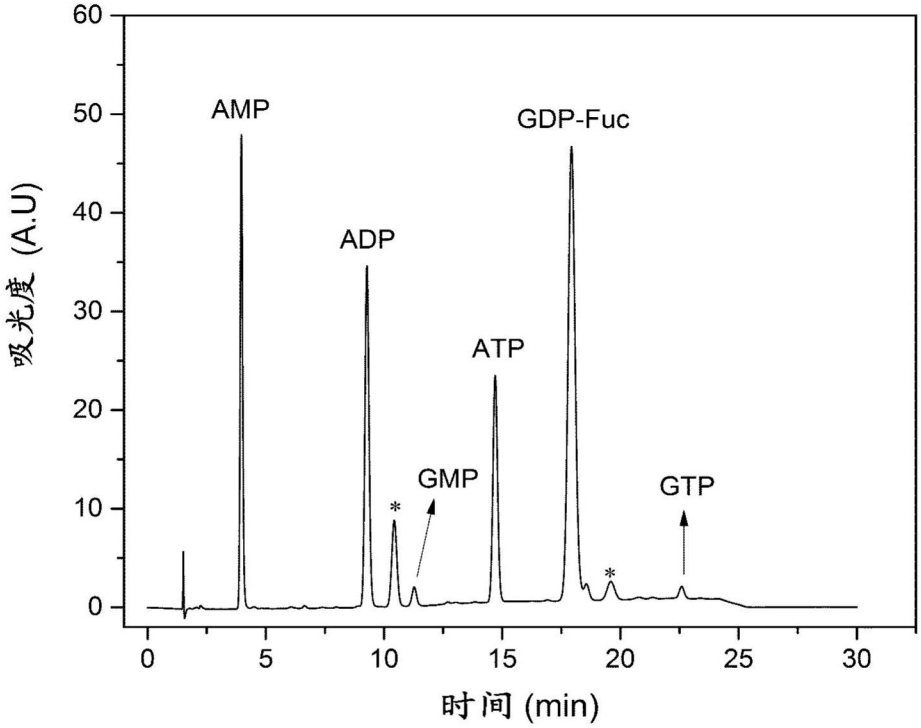
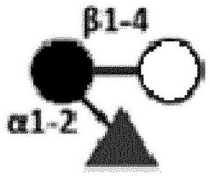
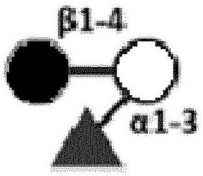


图5



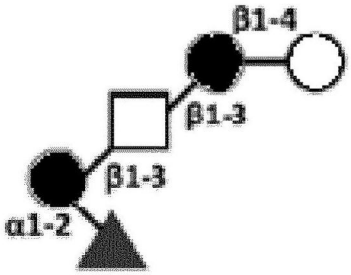
2'-岩藻糖基乳糖

(2'-FL)



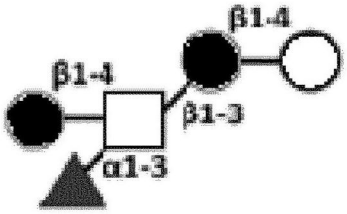
3-岩藻糖基乳糖

(3-FL)



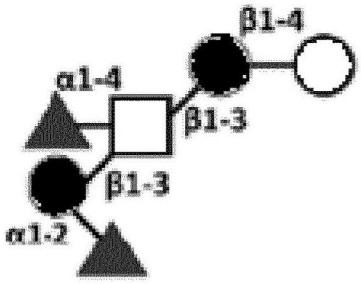
乳-N-岩藻糖基五糖 I

(LNFP I)



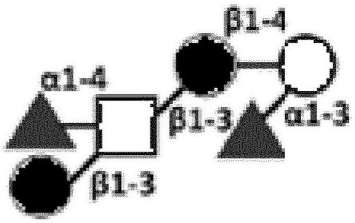
乳-N-岩藻糖基五糖 III

(LNFP III)



乳-N-二岩藻糖基六糖 I

(LNDFH I)



乳-N-二岩藻糖基六糖 II

(LNDFH II)



图6

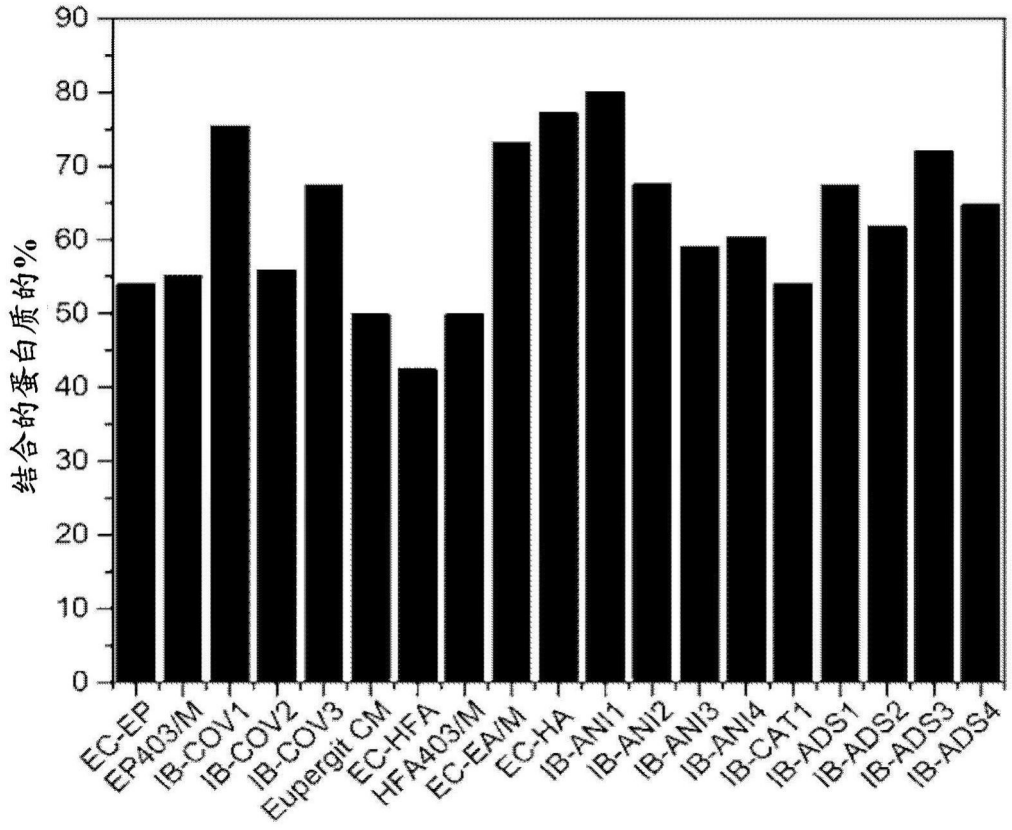

结合的蛋白质的%
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
EC-EP
EP403/M
IB-COV1
IB-COV2
IB-COV3
Eupergit CM
EC-HFA
HFA403/M
EC-EA/M
EC-HA
IB-ANI1
IB-ANI2
IB-ANI3
IB-ANI4
IB-CAT1
IB-ADS1
IB-ADS2
IB-ADS3
IB-ADS4

图7

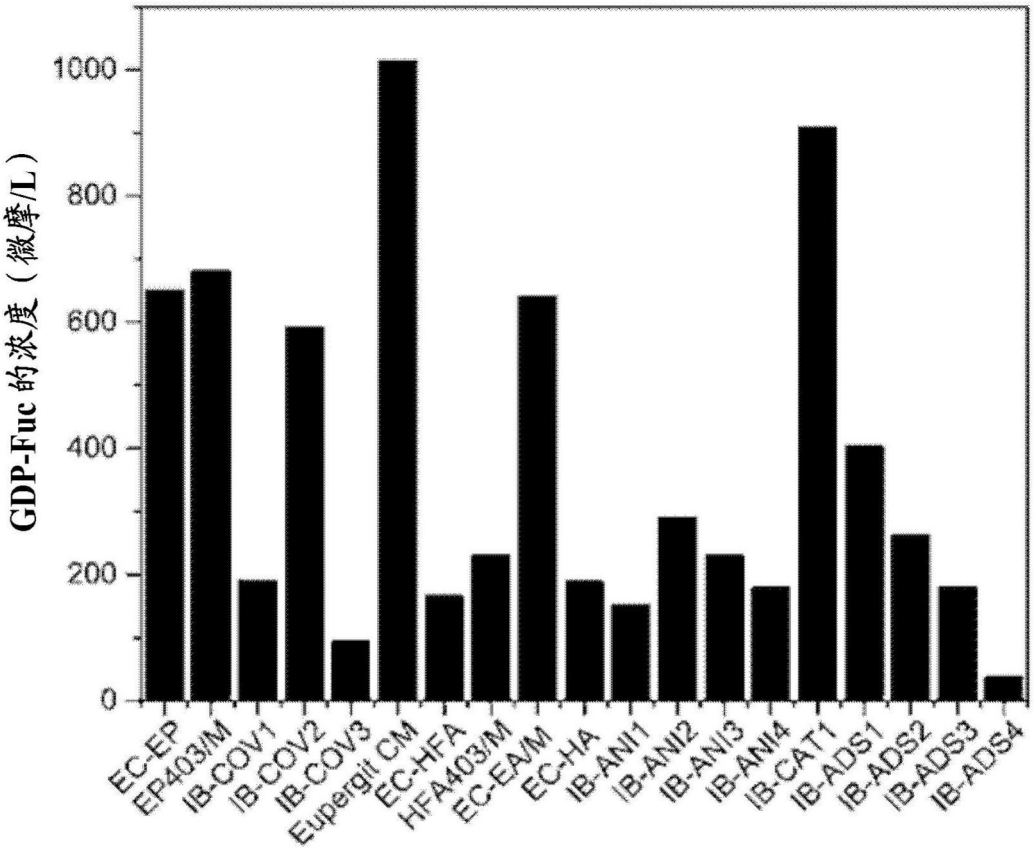

GDP-Fuc 的浓度（微摩/L）
1000
800
600
400
200
0
EC-EP
EP403/M
IB-COV1
IB-COV2
IB-COV3
Eupergit CM
EC-HFA
HFA403/M
EC-EA/M
EC-HA
IB-ANI1
IB-ANI2
IB-ANI3
IB-ANI4
IB-CAT1
IB-ADS1
IB-ADS2
IB-ADS3
IB-ADS4

图8

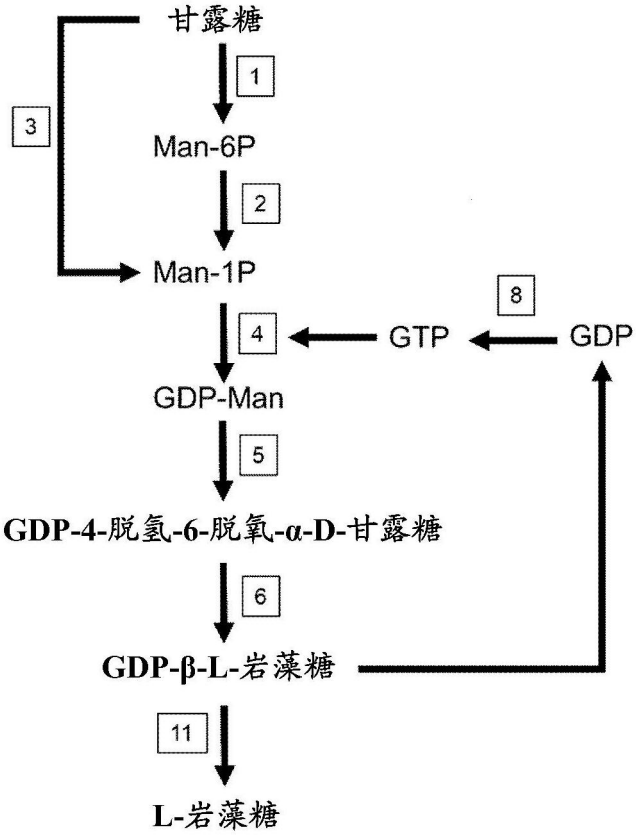

甘露糖
1
Man-6P
2
Man-1P
3
8
4
GTP
GDP
GDP-Man
5
GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖
6
GDP-β-L-岩藻糖
11
L-岩藻糖

图9

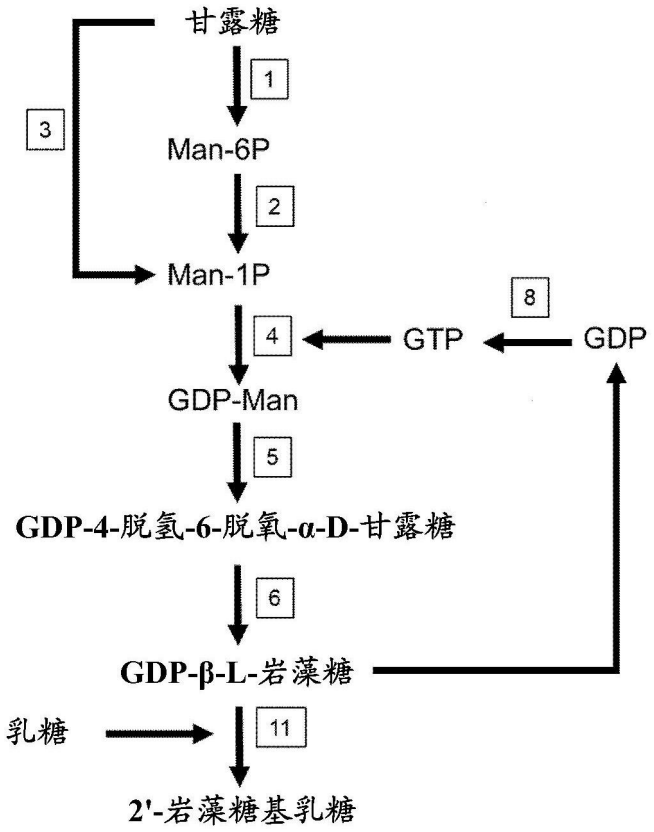

甘露糖
1
3
Man-6P
2
Man-1P
8
4
GTP
GDP
GDP-Man
5
GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖
6
GDP-β-L-岩藻糖
乳糖
11
2'-岩藻糖基乳糖

图10

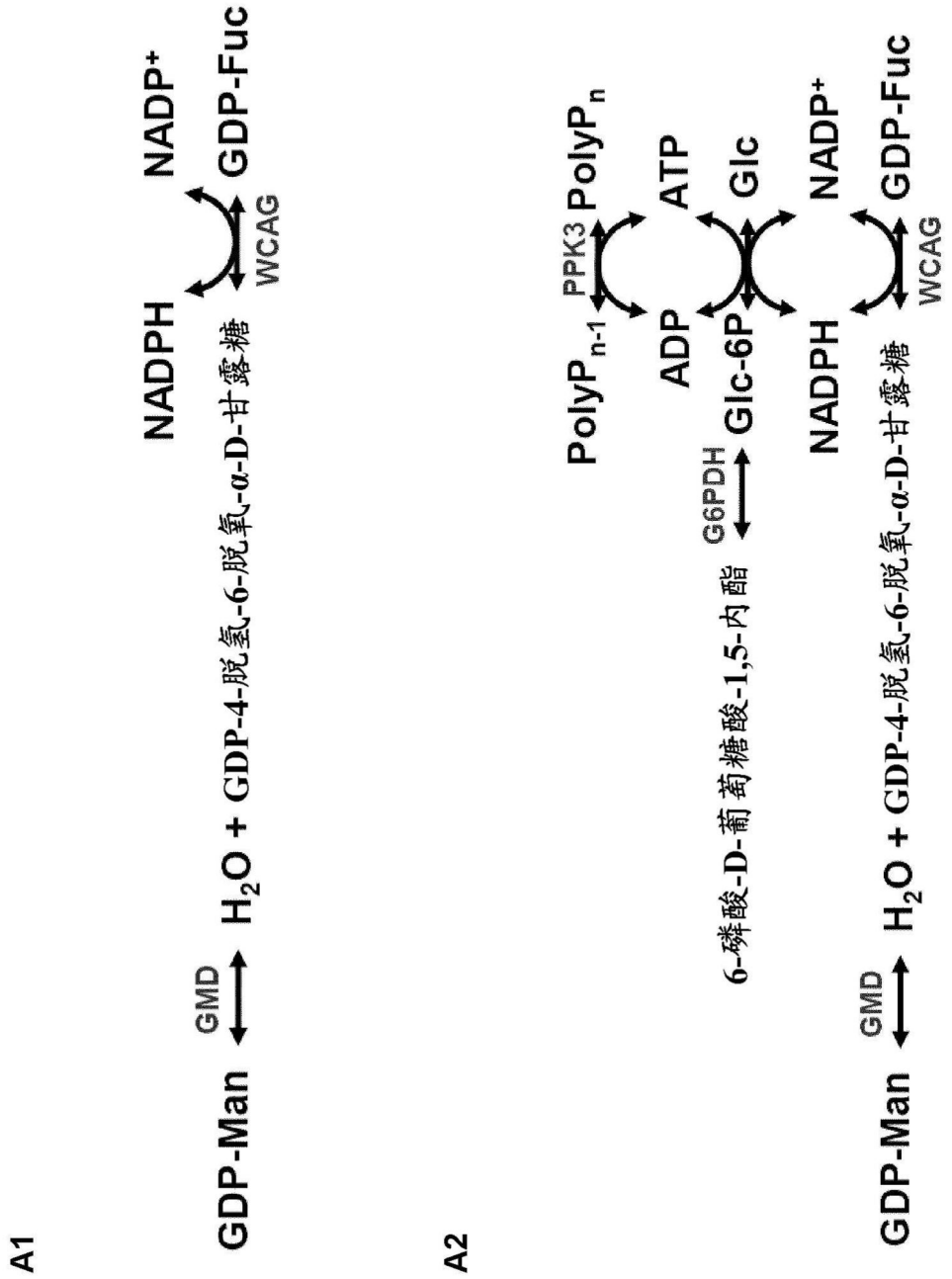

A1
GDP-Man
GMD
H2O + GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖
NADPH
NADP+
WCAG
GDP-Fuc
A2
PolyPn-1
PPK3
PolyPn
ADP
ATP
6-磷酸-D-葡萄糖酸-1,5-内酯
G6PDH
Glc-6P
Glc
NADPH
NADP+
GDP-Man
GMD
H2O + GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖
WCAG
GDP-Fuc

图11

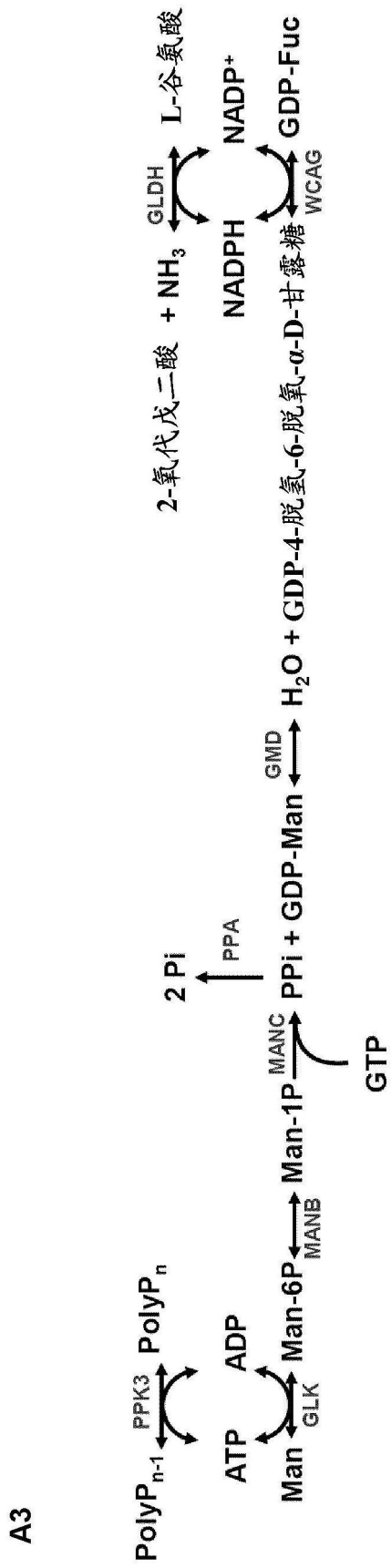

A3
PolyP$_{n-1}$
PPK3
PolyP$_n$
ATP
ADP
Man
GLK
Man-6P
MANB
Man-1P
MANC
GTP
PPi + GDP-Man
GMD
H_2O + GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖
WCAG
NADPH
NADP$^+$
GDP-Fuc
2-氧代戊二酸 + NH_3
GLDH
L-谷氨酸
2 Pi
PPA

图11续

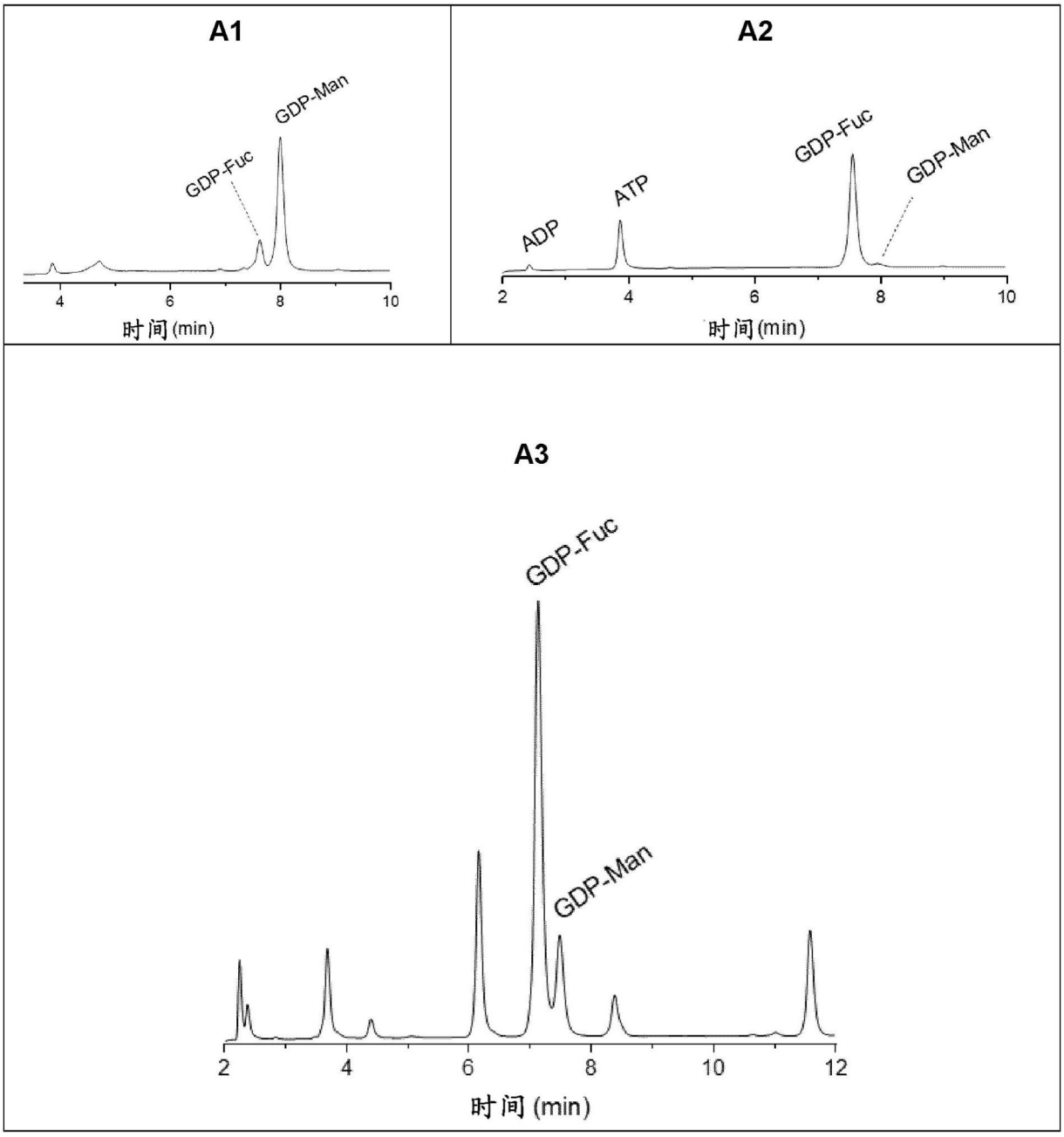

A1
GDP-Man
GDP-Fuc
4
6
8
10
时间(min)
A2
ADP
ATP
GDP-Fuc
GDP-Man
2
4
6
8
10
时间(min)
A3
GDP-Fuc
GDP-Man
2
4
6
8
10
12
时间 (min)

图12

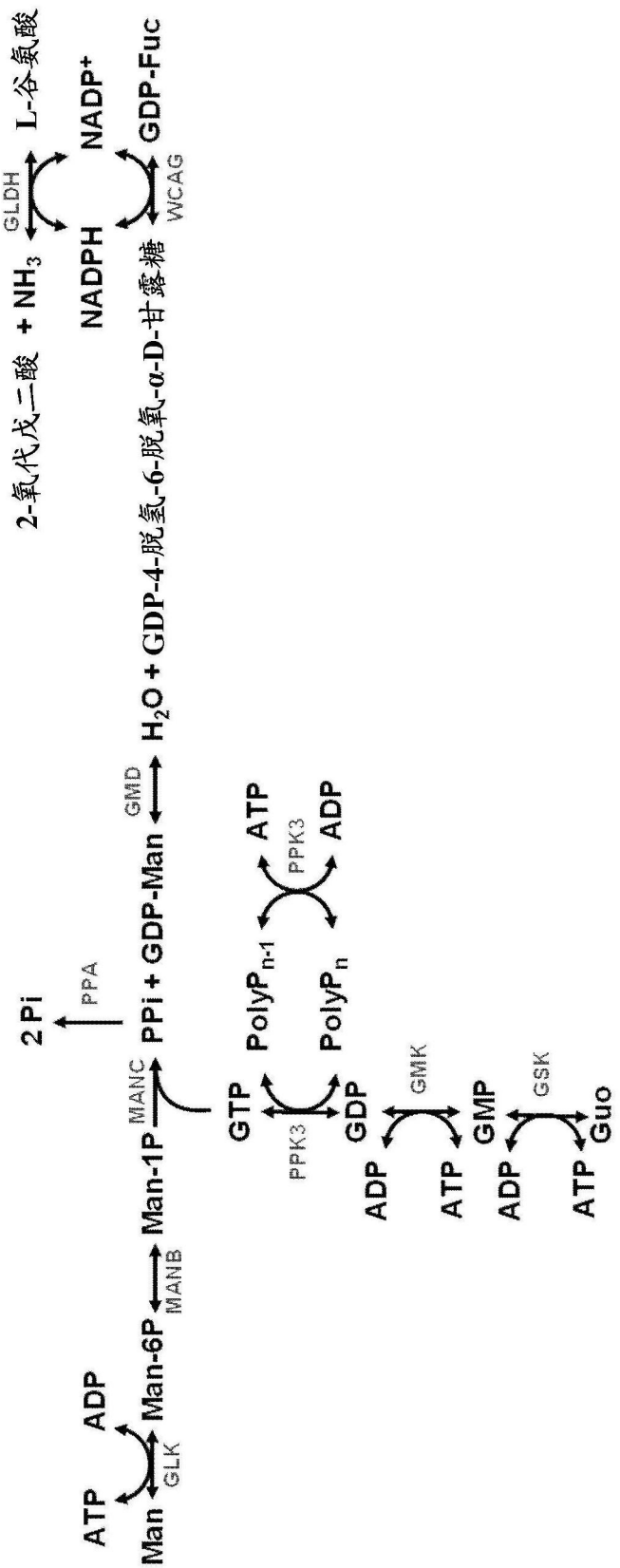

2-氧代戊二酸 + NH3
GLDH
L-谷氨酸
NADPH
NADP+
WCAG
GDP-Fuc
H2O + GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖
GMD
PPi + GDP-Man
2 Pi
PPA
MANC
Man-1P
MANB
Man-6P
GLK
ATP
ADP
Man
GTP
PPK3
GDP
PolyPn-1
PolyPn
PPK3
ATP
ADP
GMK
ADP
ATP
GMP
GSK
ADP
ATP
Guo

图13

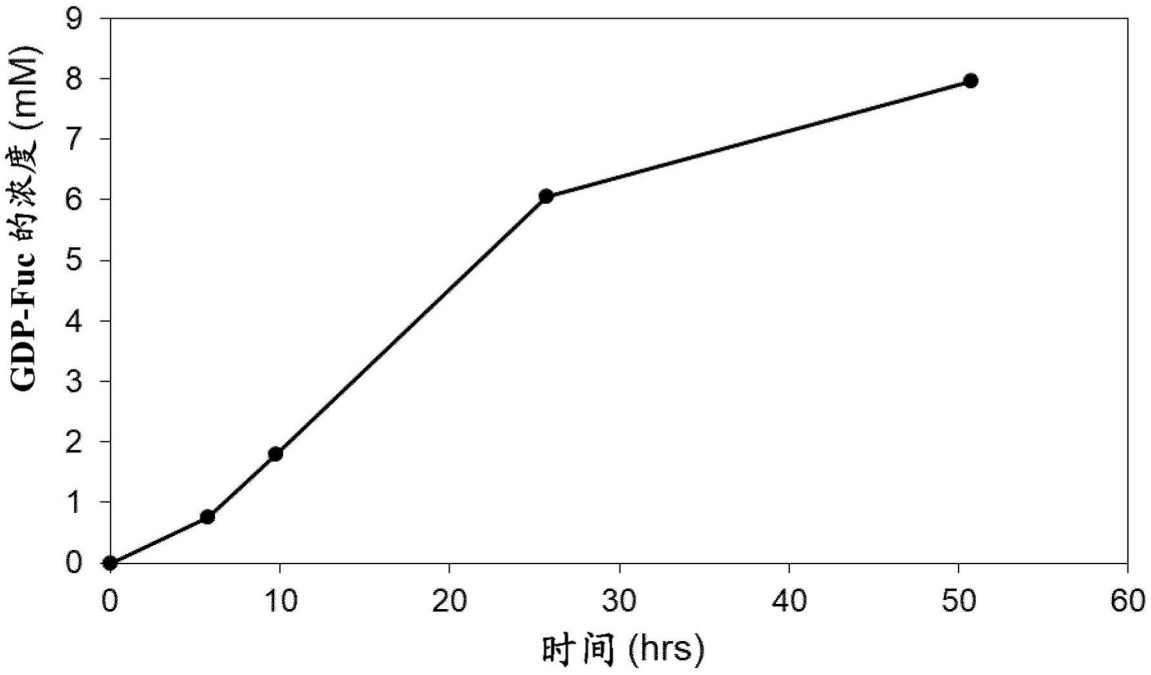


图14

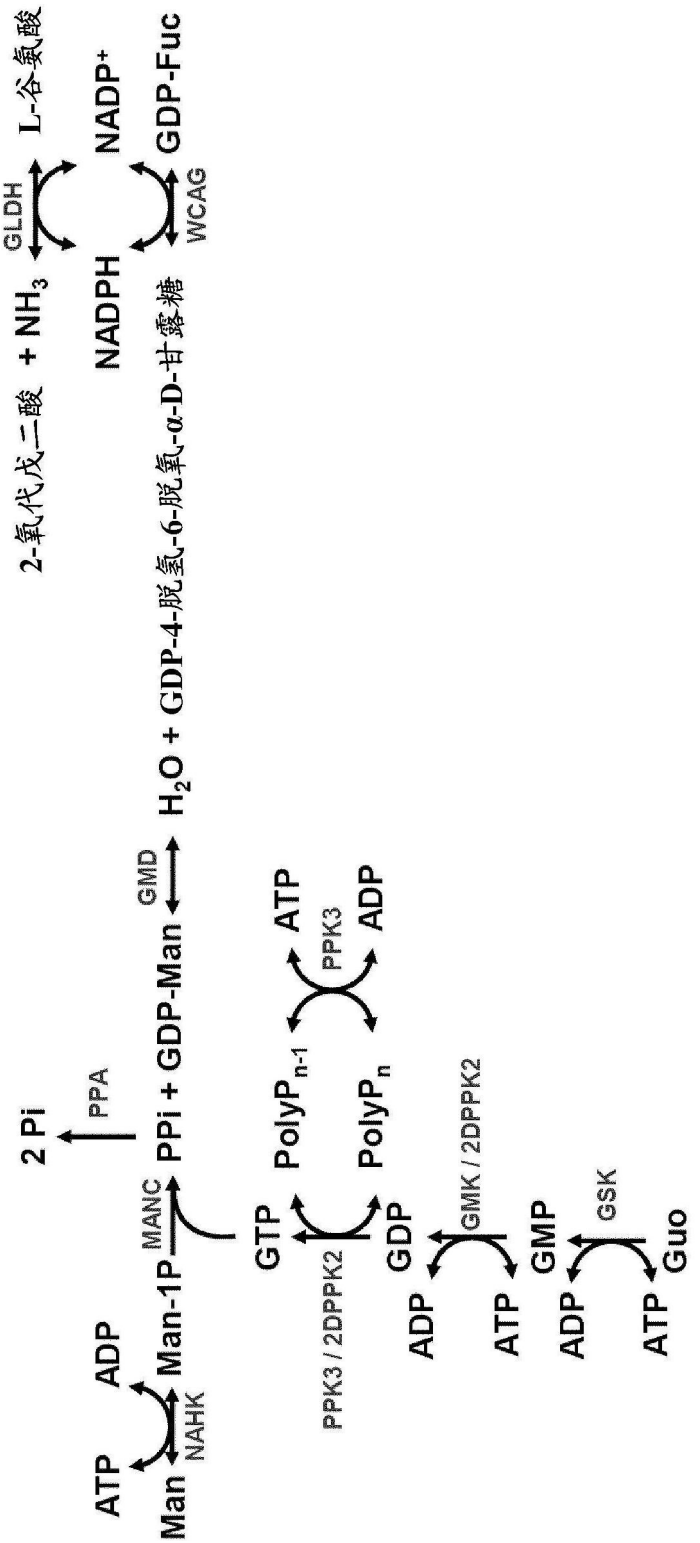

2-氧代戊二酸 + NH3
GLDH
L-谷氨酸
NADPH
NADP+
WCAG
GDP-Fuc
H2O + GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖
GMD
PPi + GDP-Man
MANC
Man-1P
2 Pi
PPA
ATP
ADP
NAHK
Man
GTP
PolyPn-1
PolyPn
PPK3 / 2DPPK2
ATP
PPK3
ADP
GDP
ADP
GMK / 2DPPK2
ATP
GMP
ADP
GSK
ATP
Guo

图15

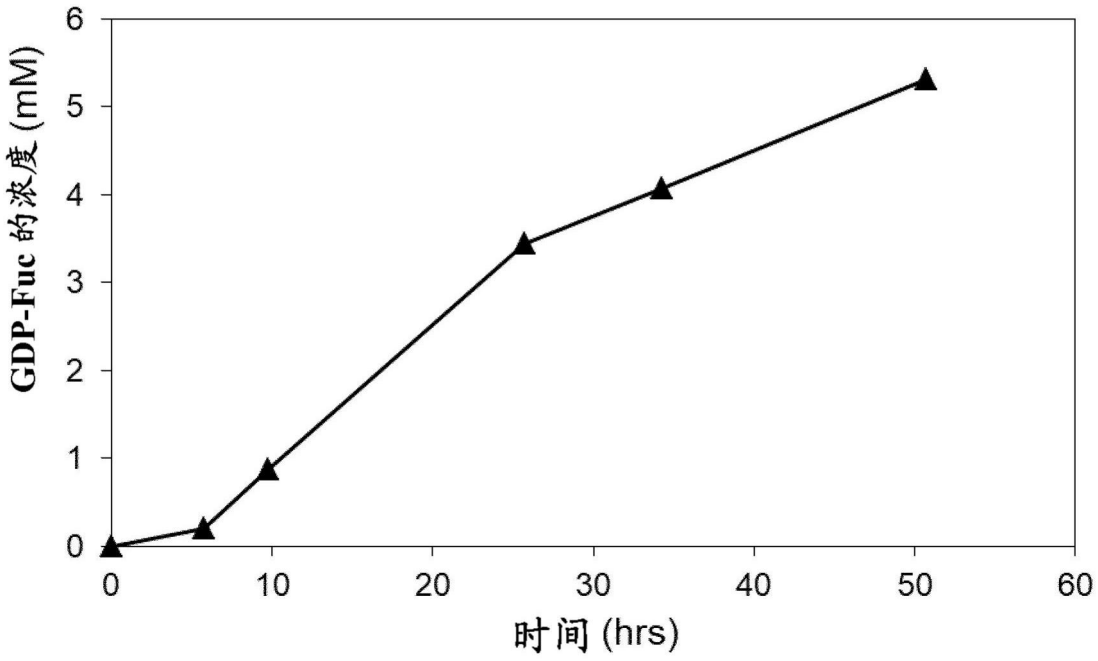


图16

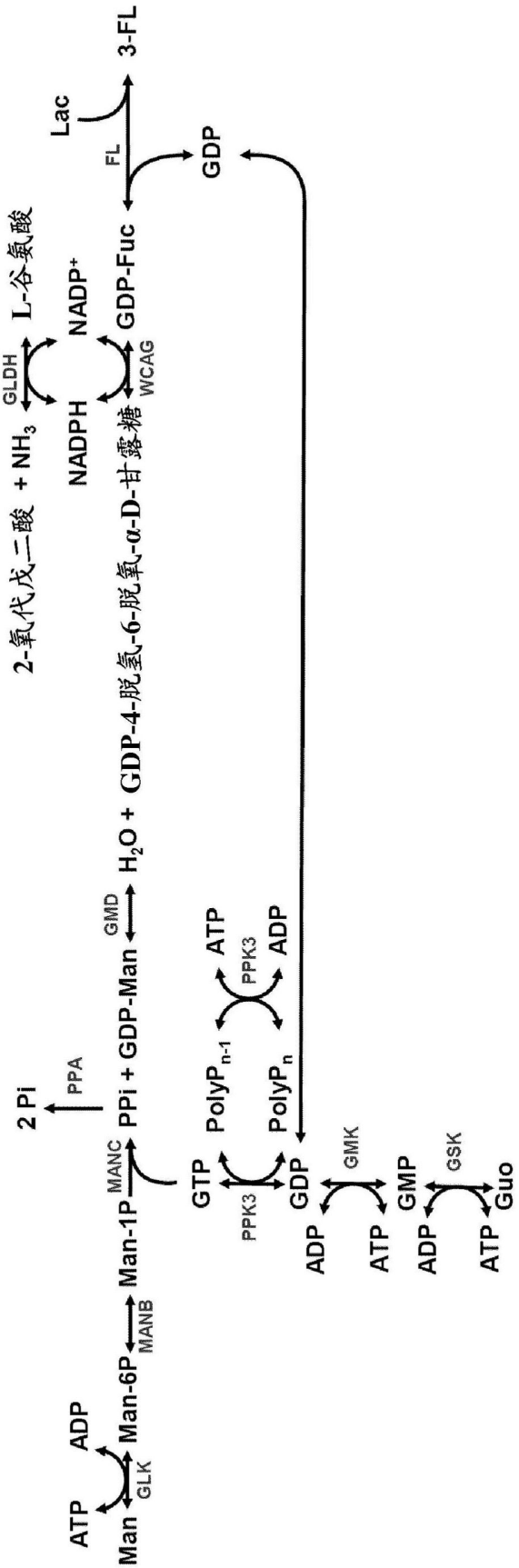

3-FL
Lac
FL
GDP
GDP-Fuc
NADP+
WCAG
L-谷氨酸
GLDH
NADPH
2-氧代戊二酸 + NH3
GDP-4-脱氢-6-脱氧-α-D-甘露糖
H2O +
GMD
GDP-Man
PPi +
PPA
2 Pi
ATP
PPK3
ADP
PolyPn-1
PolyPn
GTP
PPK3
GDP
GMK
ADP
ATP
GMP
GSK
ADP
ATP
Guo
MANC
Man-1P
MANB
Man-6P
GLK
ADP
ATP
Man

图17

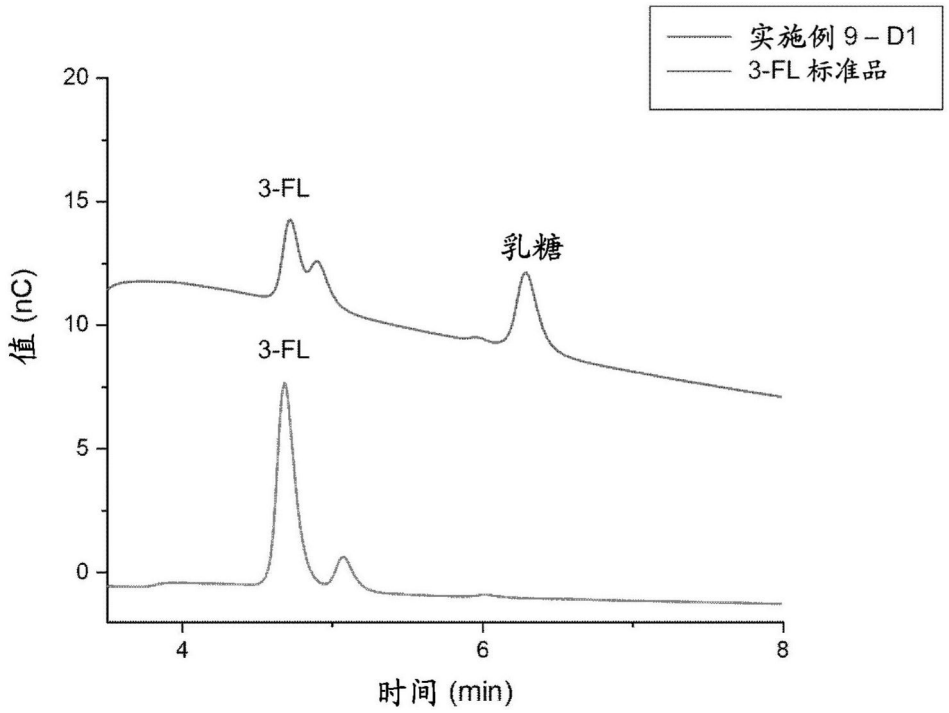

实施例 9 – D1
3-FL 标准品
3-FL
乳糖
3-FL
值 (nC)
时间 (min)
20
15
10
5
0
4
6
8

图18

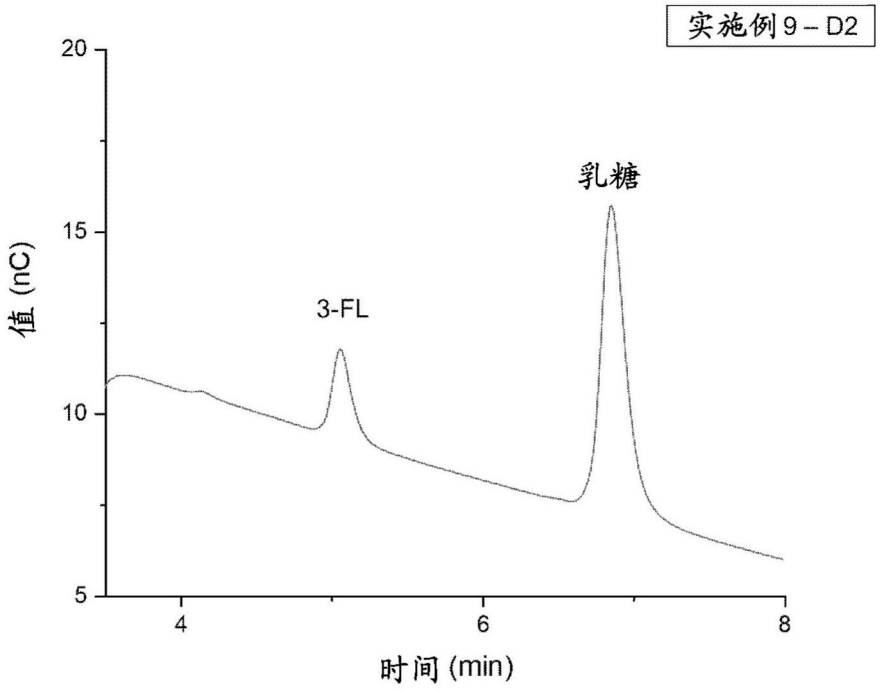

实施例 9 – D2
乳糖
3-FL
值 (nC)
时间 (min)
20
15
10
5
4
6
8

图19

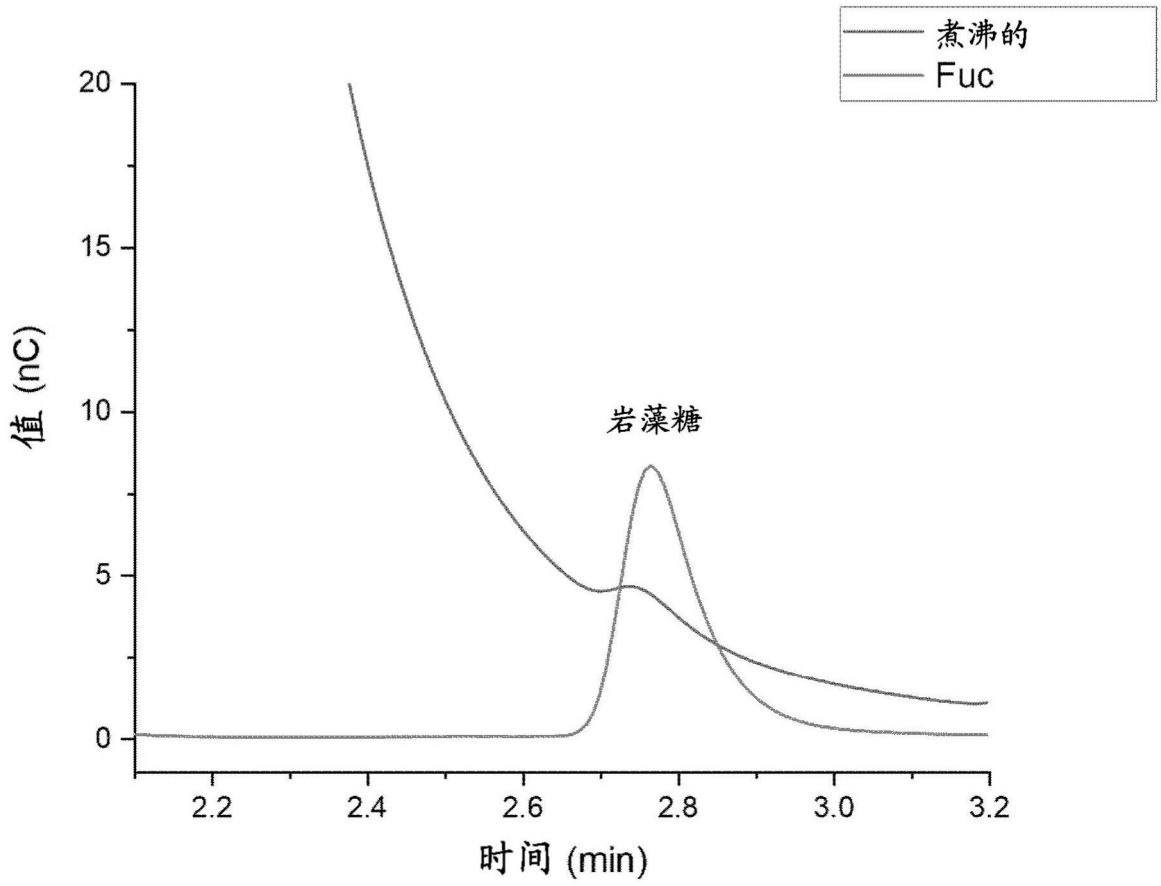


图20