



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201245444 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：100115748

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 05 月 05 日

(51)Int. Cl. : C12N15/63 (2006.01)

C12N15/74 (2006.01)

C12P19/02 (2006.01)

(71)申請人：國立交通大學(中華民國) NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY (TW)

新竹市大學路 1001 號

(72)發明人：李耀坤 LI, YAW KUEN (TW)；邱惜禾 CHIU, HIS HO (TW)；傅于烈 FU, YU LIEH

(TW)；呂佳諭 LU, CHIA YU (TW)；邱鈺安 CHIU, YU AN (TW)

(74)代理人：蘇建太；陳聰浩；蘇清澤

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：19 項 圖式數：0 共 32 頁

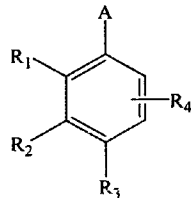
(54)名稱

利用酵素法合成醣基化合物

AN ENZYMATIC METHOD TO SYNTHESIZE GLYCOSIDIC COMPOUNDS

(57)摘要

本發明係有關於一種利用廣效性醣基轉移酶合成醣基化合物之方法，包括：提供一醣基提供者、一醣基接受者及一金屬離子之混合溶液；以及加入一廣效性醣基轉移酶至該混合溶液中，以合成一醣基化合物。其中，本發明之醣基接受者可為一苯酚類、硫酚類或芳香族胺化合物，且醣基化之後可改變原化合物之溶解度、生物利用性、化學穩定度等多種性質，大幅提高其應用性。



其中，A 係為羥基、硫醇基、或胺基，且 R₁、R₂、R₃、及 R₄ 之定義係如說明書中所示。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：100115348

C12N15/63 (2006.01)

※ 申請日：100.5.05

※IPC 分類：

C12N15/74 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

C12P19/02 (2006.01)

利用酵素法合成醣基化合物/

An enzymatic method to synthesize glycosidic compounds

二、中文發明摘要：

本發明係有關於一種利用廣效性醣基轉移酶合成醣基化合物之方法，包括：提供一醣基提供者、一醣基接受者及一金屬離子之混合溶液；以及加入一廣效性醣基轉移酶至該混合溶液中，以合成一醣基化合物。其中，本發明之醣基接受者可為一苯酚類、硫酚類或芳香族胺化合物，且醣基化之後可改變原化合物之溶解度、生物利用性、化學穩定度等多種性質，大幅提高其應用性。

三、英文發明摘要：

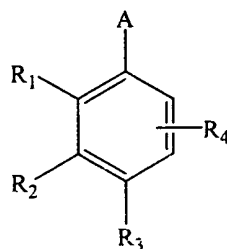
The present invention relates to a method of synthesizing glycosidic compounds by using a broad-spectrum glucosyltransferase, including the following steps: providing a glucose donor, a glucose acceptor, and a metal ion to form a mixing solution; and adding a glucosyltransferase to the mixing solution to synthesize a glycosidic compound. The glucose acceptor of the present invention can be a phenolic, a thiophenolic or an aromatic amine compound. As described in the present invention, the solubility, bioavailability and chemical stability of the glycosidic compounds can be changed after glycosylation, and thereby the application of the glycosidic compounds will be increased by the method of the present invention.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：無。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



其中，A 係為羥基、硫醇基、或胺基，且 R₁、R₂、R₃、及 R₄ 之定義係如說明書中所示。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種利用醣基轉移酶(glycosyltransferase)合成醣基化合物之方法，尤指一種將醣基接上苯酚類(phenolic compound)、硫酚類(thiophenolic compound)或芳香族胺(aromatic amine)化合物以形成醣基化衍生物之合成方法，可改變原化合物之水溶性、生物可利用率及化學穩定度，進而增加其應用性。

【先前技術】

苯酚類化合物泛指結構式中具有苯環，其上接有羥基之化合物，硫酚類化合物則將苯環上羥基以硫醇基取代之，芳香族胺類化合物則將苯環上羥基以胺基取代之。此三類構造常存在於多種人造及天然化合物中，其應用範圍涵蓋醫藥、染料、食品、化粧品等多種產業。

近年來，已證實苯酚類化合物具有保護人體健康之功效，例如：抗氧化、抗發炎、保護神經細胞、抑制氧化破壞、降低氧化壓力、抑制癌細胞活化、促進抗氧化酵素的活性等，因此，苯酚類化合物常作為治療心血管疾病、動脈粥狀硬化、癌症等疾病之醫藥組成物。然而，此類化合物常因為溶解度不佳，導致生物體無法有效利用，因而降低該類化合物醫治上述疾病的治療功效。

傳統用於提高疏水性化合物之溶解度的方法包括：(1)物理性方法，如：將疏水性化合物奈米化以增加化合物之

分散性；(2)加入各種增溶劑，如：加入聚乙二醇(PEG)、環糊精(cyclodextrin)、或將疏水性化合物包覆在界面活性劑形成的微胞中，以增加其溶解度；(3)加入可溶性官能基於疏水性化合物上，形成磷酸鹽(phosphate)、硫酸鹽(sulfate)等衍生物，藉此提高疏水性化合物的溶解度。

然而，使用上述(1)(2)兩種方法增加疏水性化合物的溶解度仍存在著有幾種問題需要被克服，如：奈米化的化合物之間仍會存在分子間作用力，久置後依然會互相聚集而產生沉澱；加入各種增溶劑以提高分子溶解度，於服用藥物時會同時攝取其增溶劑，長期使用之安全性仍有待評估。因此，加入可溶性官能基便成為提高化合物溶解度最好的方法，理想的可溶性官能基除了提高藥物溶解度之外，還要能具備促進藥物吸收、分佈及代謝之功效。

在自然界中，存在著許多具有生物活性的天然藥物，其中許多皆為含醣基的分子。常見的醣基化形式有三種，包括氧-醣基化(O-glycosylation)、硫-醣基化(S-glycosylation)與氮-醣基化(N-glycosylation)。所形成的醣基化合物分別為O-glycoside, S-glycoside與N-glycoside。

醣基具有高度水溶性，並與生物體內分子辨識有關，因此，在疏水性化合物中加入醣基基團，不僅可以提供分子辨識的專一性，亦可同時增進藥物分子的溶解度，進而提升這些藥物分子的生物利用性，提升藥物分子的應用性。先前已有文獻報導證實，透過人體試驗發現攝取槲黃素-O-葡萄糖苷(querletin-O-glucoside)，其吸收率可達

52±15%，遠高於直接攝取槲黃素(querletin)的吸收率(24±9%)及蘆丁素(rutin; quercetin-O-rutinoside)的吸收率(17±15%)，顯示葡萄糖基可大幅增加槲黃素的生物吸收率。

因此，透過糖基化之手段可提高藥物的水溶性，而使藥物具有更佳生物利用率與吸收率，並進而降低其服用劑量。尤其，針對一些毒副作用較大的藥物而言，降低其服用劑量象徵引起較小的毒副作用，進而提升藥物的使用安全性。

S-glycoside相較於對應的O-glycoside常具有較佳的化學穩定性，對酸及酵素水解的耐受性較高，因此成為競爭性抑制劑藥物設計重要的類型，其獨特的化學穩定性亦使其可被當成配位基(ligand)，應用於純化與醣類有關之酵素，或作為醣化學合成的中間體，以進一步合成O-glycoside或C-glycoside。

N-glycoside的應用主要在中樞神經藥物的結構修飾上。因為血腦障壁(Blood Brain Barrier)的原因，某些含有胺基的中樞神經藥物無法進入腦中，如果將胺基做成N-glycoside,則可利用細胞上glucose transporter進行運送，有助於使藥物分子吸收進入腦細胞。

然而，傳統糖基化合物的合成皆是使用有機化學合成方法得到，該方法需經過複雜的保護-去保護合成步驟，不僅需耗費較多時間，也產生多量化學廢棄物，需投入更多工廠防護措施，明顯不符合綠色環保需求，且透過此合成方法所獲得的糖基化合物之合成產率也不高。此外，目前

醣基合成尚無一套通用的方法，不同的醣基受質結構或不同的醣基化形式，常需個別開發一套合成方法，大大限制了醣基化合物的產業應用性。

自然界存在一類酵素稱為醣基轉移酶，在水溶液中可以利用活化後之醣基(例:UDP-glucose)作為醣基提供者，將醣基轉移到醣基受質的羥基上。大部分的醣基轉移酶具有高度受質專一性，必須為某些結構上非常相似的化合物才能夠進入酶的活性中心，而進行化學反應。此種受質專一性大大限制了其應用性。因此，必須發展一種具有廣效性的醣基轉移酶系統，才能應用於多種結構迥異的受質，也才能具有廣泛的應用性。

因此，目前亟需發展一種兼具有效性、廣用性及環保性的方法，最好可在溫和的水溶液反應系統中，透過單一反應步驟得到醣基化合物，並可適用於多種不同結構的受質及不同的醣基化形式，由此，可提供一種十分簡便的合成各種醣基化合物之製備方法。

【發明內容】

本發明之主要目的係在提供一種能適用於多種不同結構的受質及不同的醣基化形式之醣基化合物之合成方法。本發明利用一種廣效性醣基轉移酶，能在多種結構迥異的受質上進行醣基化反應，也能形成不同的醣基化形式之醣基化合物，使其能透過簡單的反應步驟，在苯酚類化合物、硫酚類化合物或芳香胺類化合物上接上醣基，形成具有一

個或更多醣基之醣基化合物，進而改善化合物的水溶性、生物利用率或化學穩定度。

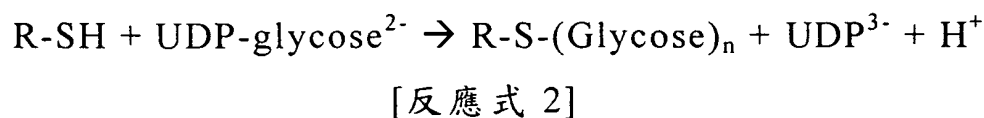
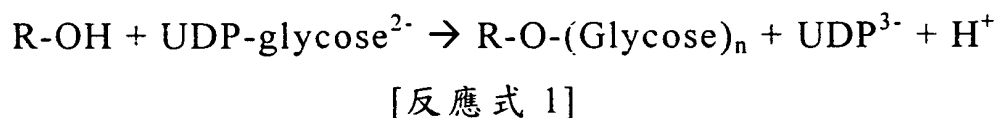
本發明之另一目的係在提供一種利用醣基轉移酶形成醣基化合物之合成方法，俾能透過簡單的反應步驟合成具有一個或更多醣基之醣基化合物，藉此修飾苯酚類、硫酚類或芳香胺類化合物之結構，提供具多樣性及新穎性的衍生物結構以擴大其應用層面。

為達成上述目的，本發明提供一種利用廣效性醣基轉移酶形成醣基化合物之合成方法，此合成方法包括：提供一醣基提供者、一醣基接受者及一金屬離子之混合溶液；並且加入一廣效性醣基轉移酶至該混合溶液中，此醣基轉移酶將催化醣基提供者的醣基轉移至醣基接受者，藉此合成一醣基化合物；其中，此醣基提供者係為一包含一醣基及一離去基之化合物；且醣基接受者係為一苯酚類化合物、硫酚類化合物或芳香族胺類化合物；而金屬離子係與醣基提供者之離去基鍵結，且該醣基係連接至該苯酚類化合物之氧原子、該硫酚類化合物之硫原子或該芳香族胺類化合物之氮原子，而形成醣基化合物。

其中，本發明合成醣基化合物所使用之廣效性醣基轉移酶可為枯草桿菌(*Bacillus cereus*)之醣基轉移酶。此種醣基轉移酶可接受多種結構迥異的受質，催化單一步驟的醣基化反應，於溫和的反應環境中將醣基提供給醣基接受者，如：苯酚類、硫酚類或芳香族胺類化合物。本發明之合成方法可大幅降低醣基化反應之複雜性，不需透過繁複

的保護-去保護化學反應，不需隨受質結構而改變反應步驟，也無須隨醣基化形式而改變製程，即可將醣基基團取代在醣基接受者之苯環上的羥基、硫醇基或胺基基團上，形成醣基化合物。於此，醣基提供者所含之醣基較佳係選自以下所組成之群組：葡萄糖 (glucose)、鼠李糖 (rhamnose)、半乳糖 (galactose)、木糖 (xylose)、甘露糖 (mannose)，更佳為葡萄糖或半乳糖。該醣基提供者可為尿苷二磷酸-葡萄糖 (Uridine-5'-diphosphate-glucose, UDP-glucose)、尿苷二磷酸-鼠李糖 (UDP-rhamnose)、尿苷二磷酸-半乳糖 (UDP-galactose)、尿苷二磷酸-木糖 (UDP-xylose)、尿苷二磷酸-甘露糖 (UDP-mannose)。

於本發明中，醣基係連接至該苯酚類化合物之氧原子、該硫酚類化合物之硫原子或該芳香族胺類化合物之氮原子，以形成一醣基化合物。其中，醣基提供者較佳為尿苷二磷酸-葡萄糖，醣基接受者可為苯酚類化合物以利用廣效性醣基轉移酶合成 O-glycoside (如反應式 1 所示)；或醣基接受者可為硫酚類化合物以合成 S-glycoside (如反應式 2 所示)；或醣基接受者可為芳香族胺類化合物以合成 N-glycoside (如反應式 3 所示)。上述之醣基接受者形成醣基化合物之反應係如下列反應式 1 至反應式 3 所示：





[反應式 3]

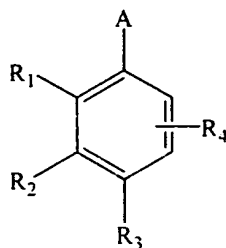
於上述反應式中，R為芳香族取代基。

醣基接受者可為一苯酚類化合物，該苯酚類化合物可包含至少一苯環以及一羥基取代基取代該苯環上的氫，如：單酚類化合物、雙酚類化合物、三酚類化合物、萘酚類化合物、蔥酚類化合物、醌酚類化合物、菲酚類化合物等，亦即，任何含有至少一苯酚基團的化合物皆可作為本發明之醣基接受者。

醣基接受者亦可為一硫酚類化合物，該硫酚類化合物可包含至少一苯環以及一硫醇取代基取代該苯環上的氫，亦即，任何含有至少一硫酚基團的化合物皆可作為本發明之醣基接受者。

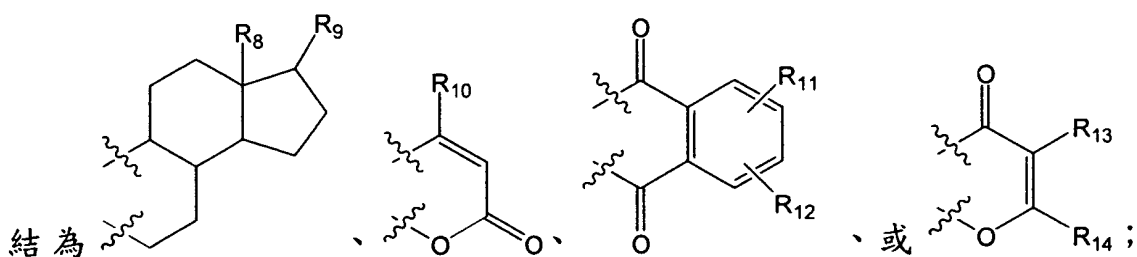
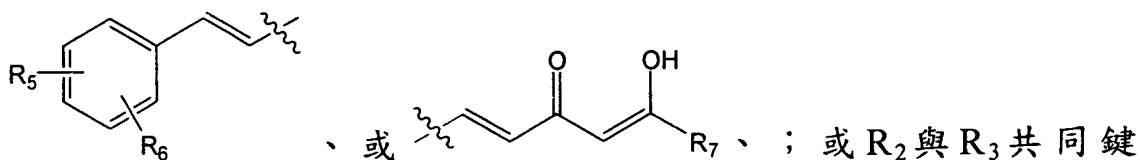
醣基接受者又可為一芳香族胺類化合物，該芳香族胺類化合物可包含至少一苯環以及一胺基取代基取代該苯環上的氫，亦即，任何含有至少一苯環上接有胺基取代基的化合物皆可作為本發明之醣基接受者。

據此，本發明之醣基接受者的結構較佳係如化學式 1 所示：

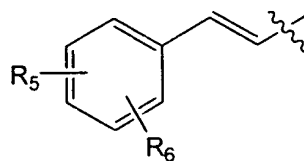


[化學式 1]

其中，A較佳為羥基(OH)、硫醇基(SH)、或胺基(NH₂)；
 R₁較佳為氫、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烯基、C₁₋₆炔基、羥基、C₁₋₆烷
 氧基、硝基、氰基、胺基、苯環、酯基、醛基、酮基、羧
 基、醯胺基(amide)、鹵素、硫烷基(SR)、硫醇基、SSR、
 SO₂R、SO₃R、或OSO₃R；R₂與R₃較佳係各自獨立為氫、C₁₋₆
 烷基、C₁₋₆烯基、C₁₋₆炔基、羥基、C₁₋₆烷氧基、硝基、氰基、
 胺基、苯環、酯基、醛基、酮基、羧基、醯胺基(amide)、
 鹵素、硫烷基(SR)、硫醇基、SSR、SO₂R、SO₃R、OSO₃R、



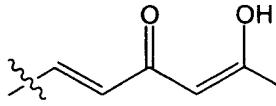
R₄較佳為氫、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烯基、C₁₋₆炔基、羥基、C₁₋₆烷
 氧基、硝基、或氰基、胺基、苯環、酯基、醛基、酮基、
 羧基、醯胺基(amide)、鹵素、硫烷基(SR)、硫醇基、SSR、
 SO₂R、SO₃R、OSO₃R；R₅與R₆較佳係各自獨立為氫、羥基、
 C₁₋₆烷氧基、硝基或氰基、胺基、苯環、酯基、醛基、酮基、
 羧基、醯胺基(amide)、鹵素、硫烷基(SR)、硫醇基、SSR、
 SO₂R、SO₃R、OSO₃R；R₇較佳為氫、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烯基、
 C₁₋₆炔基、羥基、C₁₋₆烷氧基、硝基、或氰基、胺基、苯環、
 酯基、醛基、酮基、羧基、醯胺基(amide)、鹵素、硫烷基

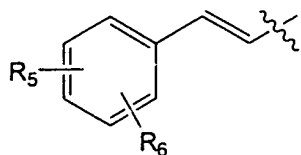


(SR)、硫醇基、SSR、SO₂R、SO₃R、OSO₃R或

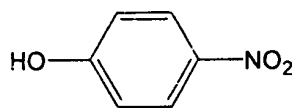
R₈、R₉、R₁₀、R₁₁、R₁₂、R₁₃及R₁₄較佳為氫、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烯基、C₁₋₆炔基、或羥基、C₁₋₆烷氧基、硝基、或氰基、胺基、苯環、酯基、醛基、酮基、羧基、醯胺基(amide)、鹵素、硫烷基(SR)、硫醇基、SSR、SO₂R、SO₃R、OSO₃R。上述之硫基取代基中，R可為C₁₋₁₂烷基、C₁₋₁₂烯基、C₁₋₁₂炔基，但並非僅限於此。

於本發明之一實施態樣中，A係為羥基，R₁與R₂可各自獨立為氫、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烯基、或C₁₋₃烷氧基，且R₃可為羥

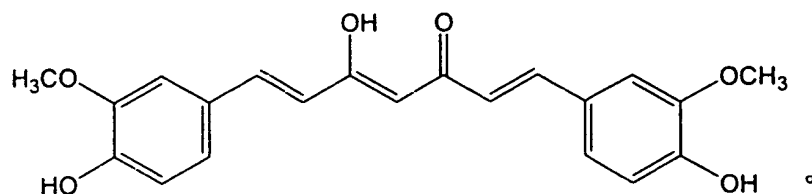
基、、或硝基，其中，R₇可為



，R₅與R₆可各自獨立為氫、羥基或C₁₋₃烷氧基，如化學式3或化學式7所示：

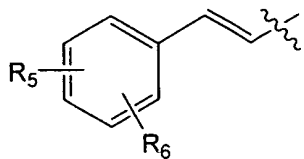


[化學式3]



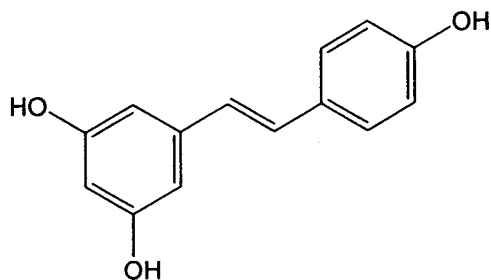
[化學式7]

於本發明之另一實施態樣中，A可為羥基， R_3 可為



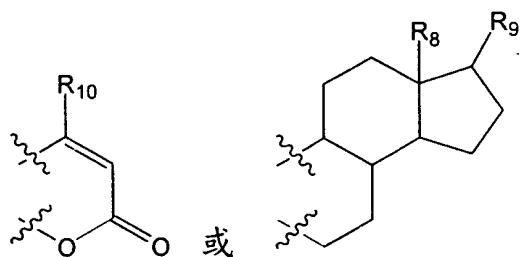
，且 R_5 與 R_6 可各自獨立為氫或羥基，如化學

式4所示：

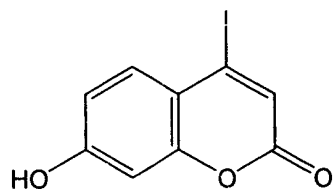


[化學式4]

於本發明之又一實施態樣中， R_2 與 R_3 可共同鍵結為

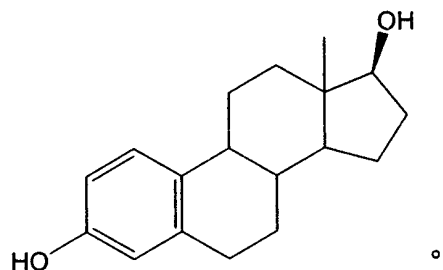


，其中， R_{10} 可為氫或 C_{1-3} 烷基；而 R_8 可為氫或 C_{1-3} 烷基，且 R_9 可為羥基，如化學式5或化學式6所示：



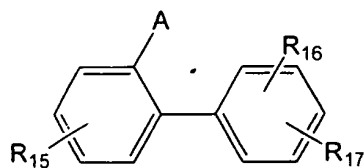
[化學式5]

或



[化學式6]

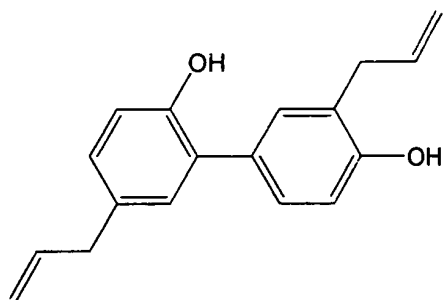
或者，本發明中醣基接受者之結構較佳係如化學式2所示：



[化學式 2]

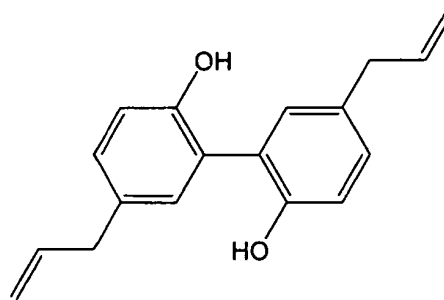
其中，A係為羥基(OH)、硫醇基(SH)、或胺基(NH₂)，R₁₅與R₁₆較佳係各自獨立為氫、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烯基、C₁₋₆炔基、羥基、C₁₋₆烷氧基、硝基或氰基、胺基、苯環、酯基、醛基、酮基、羧基、醯胺基(amide)、鹵素、硫烷基(SR)、硫醇基、SSR、SO₂R、SO₃R、或OSO₃R；以及R₁₇較佳為氫、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烯基、C₁₋₆炔基、羥基、C₁₋₆烷氧基、硝基、氰基、胺基、苯環、酯基、醛基、酮基、羧基、醯胺基(amide)、鹵素、硫烷基(SR)、硫醇基、SSR、SO₂R、SO₃R、或OSO₃R。上述之硫基取代基中，R可為C₁₋₁₂烷基、C₁₋₁₂烯基、C₁₋₁₂炔基，但並非僅限於此。

於本發明之再一實施態樣中，A可為羥基，R₁₅與R₁₆可各自獨立為氫或丙烯基(allyl group)，且R₁₇可為氫或羥基，如化學式8或化學式9所示：



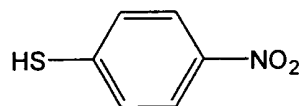
[化學式 8]

或



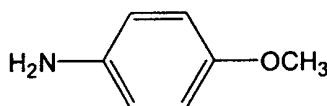
[化學式 9]

於本發明之更一實施態樣中，A可為硫醇基， R_1 與 R_2 可為氫、 C_{1-6} 烷基、或 C_{1-6} 烯基，且 R_3 可為羥基或硝基，如化學式10所示：



[化學式10]

於本發明再更一實施態樣中，A可為胺基， R_1 與 R_2 可為氫、 C_{1-6} 烷基、或 C_{1-6} 烯基，且 R_3 可為氫或 C_{1-6} 烷氧基，如化學式11所示：



[化學式11]

本發明合成醣基化合物之合成方法中，需加入適量的金屬離子參與反應，該金屬離子可為正二價之金屬陽離子，較佳為鎂離子(Mg^{2+})、鈣離子(Ca^{2+})、錳離子(Mn^{2+})或鋅離子(Zn^{2+})，更佳為鎂離子(Mg^{2+})或錳離子(Mn^{2+})。進行此合成方法之pH值範圍較佳為5至11，更佳為6至10，再更佳為6至8。另外，醣基接受者與醣基提供者之莫耳數比可為1：0.1以上之任何比例，較佳為1：0.1至1：24.9，更佳為1:1至1:24。

本發明利用廣效性醣基轉移酶可以合成多種型態之醣基化合物，該合成之醣基化合物可為經過至少一醣基取代之苯酚類、硫酚類或芳香族胺類化合物，其結構係如上所述之任何一種苯酚類、硫酚類或芳香族胺類化合物。此外，

該合成之醣基化合物亦可作為一醣基接受者，再次利用醣基轉移酶與金屬離子進行轉醣反應，將醣基提供者之醣基再次轉移至已具有至少一個醣基取代基的醣基化合物，藉此合成具有一個以上醣基之化合物。使用本發明之酵素合成法進行醣基化反應具有下列多種優點：(1) 產率較一般化學合成製程高；(2) 可減少化學合成製程所衍生之環保、廢棄物、工安等種種問題；(3) 適用於多種結構迥異之受質，只要結構式中具有苯環，苯環上接有羥基、硫醇基或胺基等取代基均可作為醣基接受者；(4) 適用於多種醣基化形式，無論 O-glycosylation, S-glycosylation 與 N-glycosylation 均可進行；(5) 利用本發明可快速合成多種結構新穎之醣基化衍生物，可做為藥物開發標的新來源，加快藥物分子的開發速度。

本發明所製備之醣基化產物則具有以下多種用途：(1) 提高化合物之溶解度，當化合物作為醫藥組成物時，由於醣基化可增加其水溶性，因此能提升生物體對化合物的吸收，進而提高其生物利用率，進一步降低此類化合物作為醫藥成份所需之劑量，並且同時維持相同程度之療效，達到降低藥物成本之優點；(2) O-glycoside 之醣基基團可透過體內醣類水解酶自然水解，釋放出具有療效之化合物，同時釋出的醣基係為生物體既有之成份，因此，並不會對個體的代謝作用造成負擔；(3) 形成 S-glucoside 後可形成對酸及酵素水解具有抵抗力之穩定結構，進一步可作為競爭性酵素抑制劑或酵素純化製程之配位基，具有產業應用價

值；(4) 形成N-glucoside後可改變中樞神經藥物在腦細胞的吸收率，具有醫藥應用價值。

總而言之，本發明提供了一種快速簡便合成醣基化合物之酵素合成方法，該方法可適用之範圍亦十分廣泛，並且具備上述之多項優點與用途，可取代傳統化學合成方法製備醣基化合物，故極具產業發展價值。

【實施方式】

《製備醣基轉移酶》

首先，將枯草桿菌的醣基轉移酶基因插入pRSET A載體對應的切位中，形成表現質體。將表現質體轉殖到大腸桿菌中表現蛋白質。取單一菌落接種在LB培養液中，於28℃下加入IPTG進行誘導培養。待培養完成後，將菌體離心，加入磷酸鈉緩衝溶液均勻懸浮該菌體，再以超音波震盪，使菌體破裂。然後，將上清液與細胞殘骸分開，得到之上層液即為胞內粗提液，再使用其胞內粗提液進行酵素純化。

之後，透過陰離子交換樹脂管柱，使用磷酸緩衝溶液沖提進行純化，於鹽類濃度約為100 mM至150 mM時沖提可獲得醣基轉移酶。

《合成醣基化合物》

本發明之實施例係透過廣效性醣基轉移酶之催化反應，將醣基提供者之醣基轉移至醣基接受者。於反應中，亦額外加入金屬離子作為路易斯酸，與醣基提供者之離去

基結合，形成提供給醣基接受者的醣基取代基。本發明之醣基接受者可為一苯酚類、硫酚類或芳香族胺類化合物，將一個或更多醣基取代苯酚類化合物上的羥基、硫酚類化合物的硫醇基或芳香族胺類化合物上的胺基，以合成醣基化合物。最後，透過液相層析質譜儀分析合成之醣基化合物。

第一實施例-合成對硝基苯酚之醣基化合物

取10 μl 適當濃度($0.3\pm 0.03 \text{ mg/mL}$)的醣基轉移酶加入1 mM的對硝基苯酚、4 mM的尿苷二磷酸-葡萄糖及5 mM的氯化鎂，再加入25 mM的磷酸鈉緩衝溶液(pH 7)至100 μl 。接著，於室溫下持續反應16小時，待反應完成後加入200 μl 的甲醇以中止反應，再透過液相層析質譜儀偵測合成的醣基化合物之分子量。

由液相層析質譜儀之分析結果得到醣基化之對硝基苯酚化合物之m/z值約為302、464，可得知利用醣基轉移酶確實可成功將尿苷二磷酸-葡萄糖之葡萄糖基轉移至對硝基苯酚，得到具有單一或兩個醣基之對硝基苯酚醣基化合物。由此可知，醣基轉移酶可進行多次醣化步驟，將合成的產物(對硝基苯酚醣基化合物)當作醣基接受者，再次進行轉醣反應，合成具有多個醣基之醣基化產物。

第二實施例-合成白藜蘆醇之醣基化合物

如同第一實施例之合成方法，於室溫及pH值為7的環境中持續反應16小時，且白藜蘆醇(resveratrol)與尿苷二磷

酸-葡萄糖之莫耳比為1:4，使用10 μ l適當濃度之醣基轉移酶，將1 mM的白藜蘆醇進行轉醣反應，合成白藜蘆醇之醣基化合物。

由液相層析質譜儀之分析結果得到醣基化之白藜蘆醇化合物之m/z值約為391、553、715，可得知利用醣基轉移酶確實可成功將尿苷二磷酸-葡萄糖之葡萄糖基轉移至白藜蘆醇，得到具有單一、兩個或三個醣基之白藜蘆醇之醣基化合物。

第三實施例-合成7-羥基-4-甲基香豆素之醣基化合物

如同第一實施例之合成方法，於室溫及pH值為7的環境中持續反應16小時，且7-羥基-4-甲基香豆素(4-methyl-7-hydroxycoumarin)與尿苷二磷酸-葡萄糖之莫耳比為1:4，使用10 μ l適當濃度之醣基轉移酶，將1 mM的7-羥基-4-甲基香豆素進行轉醣反應，合成7-羥基-4-甲基香豆素之醣基化合物。

由液相層析質譜儀之分析結果得到醣基化之7-羥基-4-甲基香豆素化合物之m/z值約為339，可得知利用醣基轉移酶確實可成功將尿苷二磷酸-葡萄糖之葡萄糖基轉移至7-羥基-4-甲基香豆素，得到具有單一醣基之7-羥基-4-甲基香豆素之醣基化合物。

第四實施例-合成17 β -雌二醇之醣基化合物

如同第一實施例之合成方法，於室溫及pH值為7的環境中持續反應16小時，且17 β -雌二醇(17 β -estradiol)與尿苷

二磷酸-葡萄糖之莫耳比為1:4，使用10 μ l適當濃度之醣基轉移酶，將1 mM的17 β -雌二醇進行轉醣反應，合成17 β -雌二醇之醣基化合物。

由液相層析質譜儀之分析結果得到醣基化之17 β -雌二醇化合物之m/z值約為435、597、759，可得知利用醣基轉移酶確實可成功將尿苷二磷酸-葡萄糖之葡萄糖基轉移至17 β -雌二醇，得到具有單一、兩個或三個醣基之17 β -雌二醇之醣基化合物。

第五實施例-合成薑黃素之醣基化合物

如同第一實施例之合成方法，於室溫及pH值為7的環境中持續反應2小時，且薑黃素(curcumin)與尿苷二磷酸-葡萄糖之莫耳比為1:4，使用10 μ l適當濃度之醣基轉移酶，將1 mM的薑黃素進行轉醣反應，合成薑黃素之醣基化合物。

由液相層析質譜儀之分析結果得到醣基化之薑黃素化合物之m/z值約為531、693、855，可得知利用醣基轉移酶確實可成功將尿苷二磷酸-葡萄糖之葡萄糖基轉移至薑黃素，得到具有單一、兩個或三個醣基之薑黃素醣基化合物。

第六實施例-合成異厚朴酚之醣基化合物

如同第一實施例之合成方法，於37 $^{\circ}$ C及pH值為7的環境中持續反應2小時，且異厚朴酚(honokiol)與尿苷二磷酸-葡萄糖之莫耳比為1:1，使用10 μ l適當濃度之醣基轉移酶，將1 mM的異厚朴酚進行轉醣反應，合成異厚朴酚之醣基化合物。

由液相層析質譜儀之分析結果得到醣基化之異厚朴酚化合物之 m/z 值約為429、591，可得知利用醣基轉移酶確實可成功將尿苷二磷酸-葡萄糖之葡萄糖基轉移至異厚朴酚，得到具有單一醣基或兩個醣基之異厚朴酚之醣基化合物。

第七實施例-合成厚朴酚之醣基化合物

如同第一實施例之合成方法，於37°C及pH值為7的環境中持續2小時，且厚朴酚(magnolol)與尿苷二磷酸-葡萄糖之莫耳比為1:1，使用10 μ l適當濃度之醣基轉移酶，將1 mM的厚朴酚進行轉醣反應，合成厚朴酚之醣基化合物。

由液相層析質譜儀之分析結果得到醣基化之厚朴酚化合物之 m/z 值約為429、591，可得知利用醣基轉移酶確實可成功將尿苷二磷酸-葡萄糖之葡萄糖基轉移至厚朴酚，得到具有單一醣基或兩個醣基之厚朴酚之醣基化合物。

第八實施例-合成4-硝基苯硫醇之醣基化合物

如同第一實施例之合成方法，於28°C及pH值為7的磷酸鈉緩衝溶液(50 mM)中持續反應16-18小時，且4-硝基苯硫醇(4-nitrothiophenol)與尿苷二磷酸-葡萄糖之莫耳比為1:4，使用10 μ l適當濃度之醣基轉移酶，將1 mM的4-硝基苯硫醇進行轉醣反應，合成4-硝基苯硫醇之醣基化合物。

由液相層析質譜儀之分析結果得到醣基化之4-硝基苯硫醇化合物之 m/z 值約為318、480，可得知利用醣基轉移酶確實可成功將尿苷二磷酸-葡萄糖之葡萄糖基轉移至4-硝基

苯硫醇，得到具有單一醣基或兩個醣基之4-硝基苯硫醇之醣基化合物。

第九實施例-合成對-甲氧苯胺之醣基化合物

如同第一實施例之合成方法，於28°C及pH值為7的磷酸鈉緩衝溶液(50 mM)中持續反應16-18小時，且對-甲氧苯胺(p-anisidine)與尿苷二磷酸-葡萄糖之莫耳比為1:4，使用10 μ l適當濃度之醣基轉移酶，將1 mM的對-甲氧苯胺進行轉醣反應，合成對-甲氧苯胺之醣基化合物。

由液相層析質譜儀之分析結果得到醣基化之對-甲氧苯胺化合物之m/z值約為286，可得知利用醣基轉移酶確實可成功將尿苷二磷酸-葡萄糖之葡萄糖基轉移至對-甲氧苯胺，得到具有單一醣基之對-甲氧苯胺之醣基化合物。

綜上所述，本發明透過廣效性醣基轉移酶進行轉醣反應，可順利在苯酚類、硫酚類或芳香族胺類化合物上合成具有至少一醣基之醣基化合物，形成O-glycoside, S-glycoside或N-glycoside等不同的醣基化形式之醣基化合物，透過簡單的合成步驟，可於苯酚類化合物、硫酚類化合物或芳香族胺類化合物上接上醣基，形成具有一個或以上醣基之醣基化合物，進而改善化合物的水溶性、生物利用率或化學穩定度，提供具多樣性及新穎性的衍生物結構，以擴大此類化合物之應用領域。

上述實施例僅係為了方便說明而舉例而已，本發明所主張之權利範圍自應以申請專利範圍所述為準，而非僅限於上述實施例。

【圖式簡單說明】

無。

【主要元件符號說明】

無。

七、申請專利範圍：

1. 一種利用廣效性醣基轉移酶形成醣基化合物之合成方法，包括：

提供一醣基提供者、一醣基接受者及一金屬離子之混合溶液；以及

加入一廣效性醣基轉移酶至該混合溶液中，該醣基轉移酶係催化該醣基提供者之醣基轉移至該醣基接受者，以合成一醣基化合物；

其中，該醣基提供者係為一包含一醣基及一離去基之化合物；且該醣基接受者係為一苯酚類化合物、一硫酚類化合物或一芳香族胺類化合物；該金屬離子係與該醣基提供者之離去基鍵結；且該醣基係連接至該苯酚類化合物之氧原子、該硫酚類化合物之硫原子或該芳香族胺類化合物之氮原子。

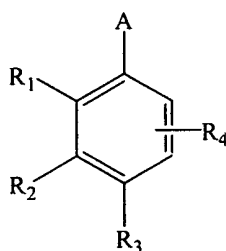
2. 如申請專利範圍第1項所述之合成方法，其中，該廣效性醣基轉移酶係為一枯草桿菌(*Bacillus cereus*)之醣基轉移酶。

3. 如申請專利範圍第1項所述之合成方法，其中，該醣基化合物係為一包含至少一醣基之化合物。

4. 如申請專利範圍第1項所述之合成方法，其中，該醣基提供者所含之醣基係選自以下所組成之群組：葡萄糖(glucose)、鼠李糖(rhamnose)、半乳糖(galactose)、木糖(xylose)、及甘露糖(mannose)。

5.如申請專利範圍第1項所述之合成方法，其中，該醣基提供者係為尿苷二磷酸-葡萄糖(UDP-glucose)、尿苷二磷酸-鼠李糖(UDP-rhamnose)、尿苷二磷酸-半乳糖(UDP-galactose)、尿苷二磷酸-木糖(UDP-xylose)、及尿苷二磷酸-甘露糖(UDP-mannose)。

6.如申請專利範圍第1項所述之合成方法，其中，該醣基接受者之結構係如化學式1所示：



[化學式1]

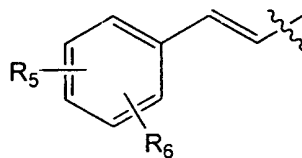
其中，

A係為羥基(OH)、硫醇基(SH)、或胺基(NH₂)；

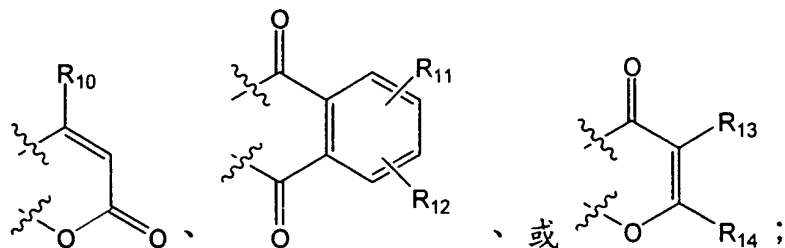
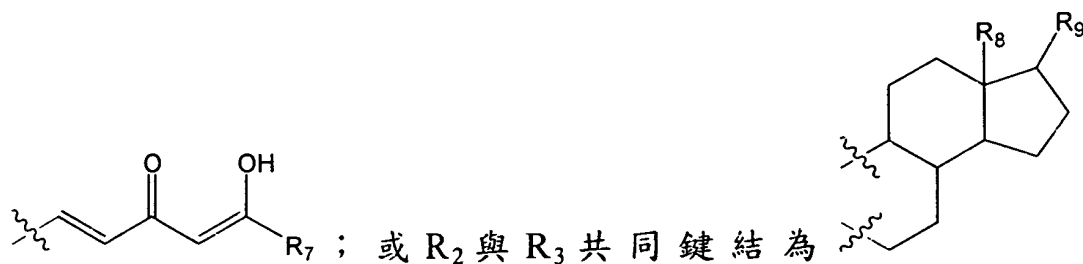
R₁係為氫、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烯基、C₁₋₆炔基、羥基、C₁₋₆烷氧基、硝基、氰基、胺基、苯環、酯基、醛基、酮基、羧基、醯胺基(amide)、鹵素、硫烷基(SR)、硫醇基、SSR、SO₂R、SO₃R、或OSO₃R；

R₂與R₃係各自獨立為氫、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烯基、C₁₋₆炔基、羥基、C₁₋₆烷氧基、硝基、氰基、胺基、苯環、酯基、醛基、酮基、羧基、醯胺基(amide)、鹵素、硫烷基(SR)、硫醇基、

SSR、SO₂R、SO₃R、OSO₃R、



、或



R₄ 係為氫、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烯基、C₁₋₆ 炔基、羥基、C₁₋₆ 烷氧基、硝基、或氰基、胺基、苯環、酯基、醛基、酮基、羧基、醯胺基 (amide)、鹵素、硫烷基 (SR)、硫醇基、SSR、SO₂R、SO₃R、或 OSO₃R；

R₅ 與 R₆ 係各自獨立為氫、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烯基、C₁₋₆ 炔基、羥基、C₁₋₆ 烷氧基、硝基、氰基、胺基、苯環、酯基、醛基、酮基、羧基、醯胺基 (amide)、鹵素、硫烷基 (SR)、硫醇基、SSR、SO₂R、SO₃R、或 OSO₃R；

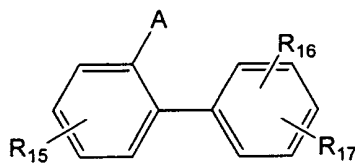
R₇ 係為氫、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烯基、C₁₋₆ 炔基、羥基、C₁₋₆ 烷氧基、硝基、或氰基、胺基、苯環、酯基、醛基、酮基、羧基、醯胺基 (amide)、鹵素、硫烷基 (SR)、硫醇基、SSR、



R₈、R₉、R₁₀、R₁₁、R₁₂、R₁₃ 及 R₁₄ 係各自獨立為氫、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烯基、C₁₋₆ 炔基、羥基、C₁₋₆ 烷氧基、硝基、或氰基、胺基、苯環、酯基、醛基、酮基、羧基、醯胺基

(amide)、鹵素、硫烷基(SR)、硫醇基、SSR、SO₂R、SO₃R、或OSO₃R。

7.如申請專利範圍第1項所述之合成方法，其中，該醴基接受者之結構係如化學式2所示：



[化學式 2]

其中，

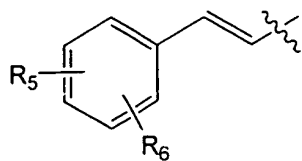
A係為羥基(OH)、硫醇基(SH)、或胺基(NH₂)；


R₁₅與R₁₆係各自獨立為氫、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烯基、C₁₋₆炔基、羥基、C₁₋₆烷氧基、硝基、氰基、胺基、苯環、酯基、醛基、酮基、羧基、醯胺基(amide)、鹵素、硫烷基(SR)、硫醇基、SSR、SO₂R、SO₃R、或OSO₃R；以及

R₁₇係為氫、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烯基、C₁₋₆炔基、羥基、C₁₋₆烷氧基、硝基、氰基、胺基、苯環、酯基、醛基、酮基、羧基、醯胺基(amide)、鹵素、硫烷基(SR)、硫醇基、SSR、SO₂R、SO₃R、或OSO₃R。

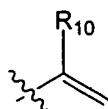
8.如申請專利範圍第6項所述之合成方法，其中，A係為羥基，R₁與R₂係為氫、C₁₋₆烷基、或C₁₋₆烯基，且R₃係為羥基或硝基。


9. 如申請專利範圍第6項所述之合成方法，其中，A係



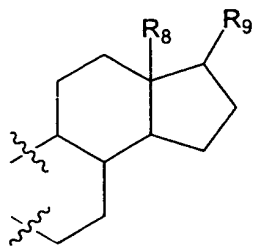
為羥基， R_3 係為 ，且 R_5 與 R_6 係各自獨立為氫或羥基。


10. 如申請專利範圍第6項所述之合成方法，其中，A



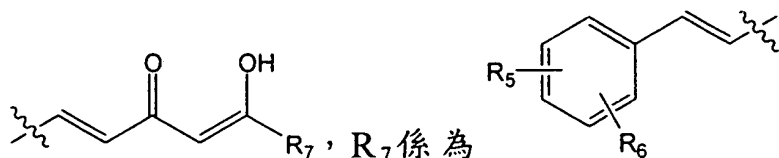
係為羥基， R_2 與 R_3 係共同鍵結為 ，且 R_{10} 係為氫或 C_{1-3} 烷基。


11. 如申請專利範圍第6項所述之合成方法，其中，A



係為羥基， R_2 與 R_3 係共同鍵結為 ， R_8 係為氫或 C_{1-3} 烷基，且 R_9 係為羥基。

12. 如申請專利範圍第6項所述之合成方法，其中，A係為羥基， R_1 與 R_2 係各自獨立為氫或 C_{1-3} 烷氧基， R_3 係為



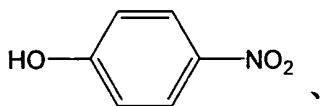
R_7 係為 ， R_5 與 R_6 係各自獨立為氫、羥基或 C_{1-3} 烷氧基。

13. 如申請專利範圍第7項所述之合成方法，其中，A係為羥基， R_{15} 與 R_{16} 係各自獨立為氫或丙烯基(allyl group)，且 R_{17} 係為氫或羥基。

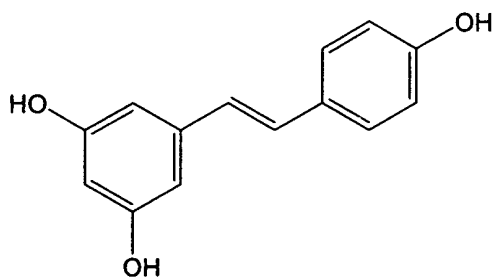
14. 如申請專利範圍第6項所述之合成方法，其中，A係為硫醇基， R_1 與 R_2 係為氫、 C_{1-6} 烷基、或 C_{1-6} 烯基，且 R_3 係為羥基或硝基。

15. 如申請專利範圍第6項所述之合成方法，其中，A係為胺基， R_1 與 R_2 係為氫、 C_{1-6} 烷基、或 C_{1-6} 烯基，且 R_3 係為氫或 C_{1-6} 烷氧基。

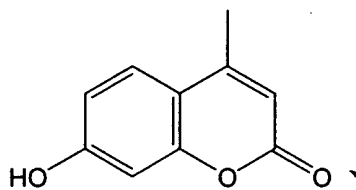
16. 如申請專利範圍第6項所述之合成方法，其中，該醣基接受者係如化學式3至化學式11所示：



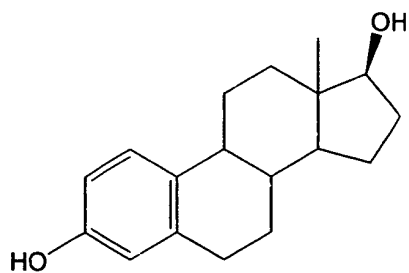
[化學式3]



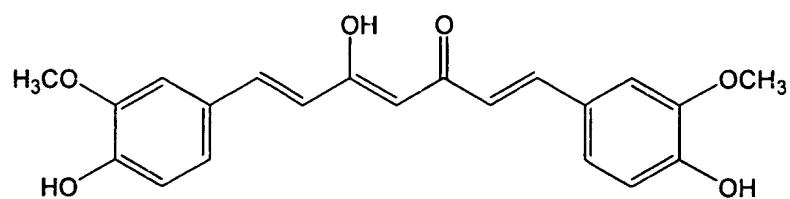
[化學式4]



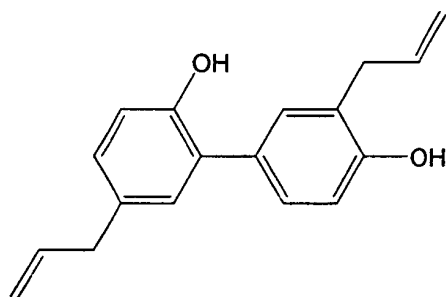
[化學式5]



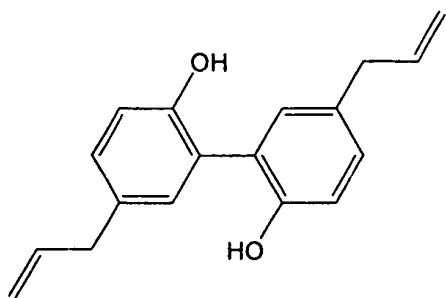
[化學式 6]



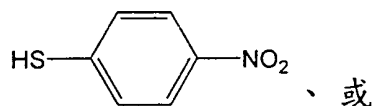
[化學式 7]



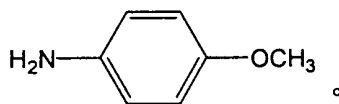
[化學式 8]



[化學式 9]



[化學式 10]



[化學式 11]

17. 如申請專利範圍第1項所述之合成方法，其中，該金屬離子係為正二價之金屬離子。

18. 如申請專利範圍第17項所述之合成方法，其中，該金屬離子係為鎂離子(Mg²⁺)、鈣離子(Ca²⁺)、錳離子(Mn²⁺)或鋅離子(Zn²⁺)。

19. 如申請專利範圍第1項所述之合成方法，其中，該合成方法係於pH值介於5至11下進行。

如申請專利範圍第1項所述之合成方法，其中，該醱基接受者與醱基提供者之莫耳數比係為1：0.1至1：24.9。