

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-21039

(P2017-21039A)

(43) 公開日 平成29年1月26日(2017.1.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	S
<b>GO 1 N 37/00 (2006.01)</b>	GO 1 N 37/00	1 0 2
<b>GO 1 N 33/553 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/553	
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 2 5 C
	GO 1 N 33/543	5 2 5 G

審査請求 有 請求項の数 22 O L 外国語出願 (全 129 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-169045 (P2016-169045)	(71) 出願人	596118493
(22) 出願日	平成28年8月31日 (2016. 8. 31)		アカデミア シニカ
(62) 分割の表示	特願2015-23510 (P2015-23510)		ACADEMIA SINICA
	の分割		台湾, タイペイ 11529, ナンカン,
原出願日	平成21年7月15日 (2009. 7. 15)		アカデミア ロード 128, セクション
(31) 優先権主張番号	61/080, 931		2
(32) 優先日	平成20年7月15日 (2008. 7. 15)		128 Sec 2, Academia
(33) 優先権主張国	米国 (US)		Road, Nankang, Taipei
(31) 優先権主張番号	61/107, 624		11529 TW
(32) 優先日	平成20年10月22日 (2008.10.22)	(74) 代理人	100081422
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田中 光雄
		(74) 代理人	100084146
			弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100156122
			弁理士 佐藤 剛

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PTFE様のアルミニウム・コート・ガラススライド上のグリカンアレイおよび関連する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】金属酸化物コート固体基材の上に炭水化物が固定化された炭水化物のアレイを提供する。

【解決手段】アレイが、金属酸化物コート固体基材の表面上の別々の位置に固定化された複数の炭水化物を含み、炭水化物と炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子との間の結合反応の分析を実行するために好適である。炭水化物がグリカンであり、多糖類、オリゴ糖、複合糖質の炭水化物部分、セロピオース、セロトリオース、セロテトラオース、G l o b o H、またはG b 5である。炭水化物がホスホン酸官能基によって修飾されており、金属酸化物が酸化アルミニウムであって、ホスホニル炭水化物が、前記酸化アルミニウムコート固体基材の表面上でのホスホン酸基と酸化アルミニウムとの間の共有結合によって、前記基材の表面上に固定化される。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アルミニウムコート透明固体基材または P T F E 様アルミニウムコート透明固体基材の上に固定化された炭水化物のアレイであって、前記アレイがアルミニウムコート透明固体基材の表面上の別々の位置に固定化された複数の炭水化物を含み、前記アレイが：

( a ) 前記固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけを実行するために、および

( b ) 前記炭水化物と前記炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子との間の結合反応の分析を実行するために

好適である、炭水化物のアレイ。

10

## 【請求項 2】

前記基材が電場について伝導性または半導性である、請求項 1 に記載のアレイ。

## 【請求項 3】

前記透明固体基材がガラスである、請求項 1 に記載のアレイ。

## 【請求項 4】

前記炭水化物がグリカンである、請求項 1 に記載のアレイ。

## 【請求項 5】

前記炭水化物が非共有結合によって固定化されている、請求項 1 に記載のアレイ。

## 【請求項 6】

前記炭水化物が  $-C_n F_{2n+1}$  ( $n \geq 4$ ) 末端によってポリフッ素化されている、請求項 5 に記載のアレイ。

20

## 【請求項 7】

前記ポリフッ化炭水化物が前記 P T F E 様アルミニウムコート透明固体基材の表面にスポットされる、請求項 6 に記載のアレイ。

## 【請求項 8】

前記炭水化物が共有結合によって固定化されている、請求項 1 に記載のアレイ。

## 【請求項 9】

前記炭水化物がホスホン酸官能基によって修飾されている、請求項 8 に記載のアレイ。

## 【請求項 10】

前記ホスホニル化炭水化物が、前記アルミニウムコート透明固体基材の表面上でのホスホン酸基と酸化アルミニウムとの間のキレート化相互作用によって、前記基材の表面上に固定化される、請求項 8 に記載のアレイ。

30

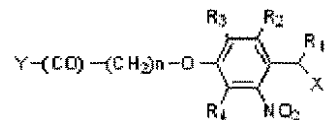
## 【請求項 11】

前記炭水化物が光切断型リンカーおよびシラン官能基によって修飾されている、請求項 8 に記載のアレイ。

## 【請求項 12】

前記光切断型リンカーが一般式：

## 【化 1】



40

を有し、式中、 $R^1$  は、水素、 $C_1 - C_8$  アルキルであり； $R^2$  および  $R^4$  はそれぞれ独立して、水素、 $C_1 - C_8$  アルコキシであり； $R^3$  は、 $C_1 - C_8$  アルコキシであり； $X$  は  $O(CO)N - (CH_2)_n - R^5$  であり、ここで  $n \geq 3$  であり、 $R^5$  は炭水化物であり、 $Y$  は、A C G スライドなどの固体支持体である、請求項 11 に記載のアレイ。

## 【請求項 13】

前記固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけが、飛行時間質量分析法 ( M S - T O F ) を含む、請求項 1 に記載のアレイ。

## 【請求項 14】

50

前記固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけが、マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間 (MALDI-TOF) 質量分析法を含む、請求項 13 に記載のアレイ。

【請求項 15】

前記炭水化物が多糖類、またはオリゴ糖、または複合糖質の炭水化物部分、またはセロビオース、またはセロトリオース、またはセロテトラオース、または G l o b o H、または G b 5 である、請求項 13 に記載のアレイ。

【請求項 16】

前記固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけが、セルラーゼ酵素反応の炭水化物生成物の特徴づけを含む、請求項 15 に記載のアレイ。

10

【請求項 17】

前記セルラーゼ酵素反応が前記アレイ表面上に固定化された炭水化物に対して実行され、前記セルラーゼ酵素が固定化された多糖類、またはオリゴ糖、または複合糖質の炭水化物部分、またはセロビオース、またはセロトリオース、またはセロテトラオース、または G l o b o H、または G b 5 を分解可能である可能性がある、請求項 16 に記載のアレイ。

【請求項 18】

マトリクスを加えずに前記 MS - T O F 特徴づけを実行できる、請求項 13 に記載のアレイ。

【請求項 19】

MS - T O F 特徴づけの約 15 分後に、炭水化物結合アッセイを前記アレイに対して実行できる、請求項 13 に記載のアレイ。

20

【請求項 20】

前記炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子がタンパク質である、請求項 1 に記載のアレイ。

【請求項 21】

前記タンパク質がセルラーゼである、請求項 20 に記載のアレイ。

【請求項 22】

前記セルラーゼが 1, 4 - - グルコシダーゼ、エキソグルカナーゼ ( 1, 4 - - D グルカンセロビオヒドロラーゼ ) およびエンドグルカナーゼ ( 1, 4 - - D グルカンゲルカノヒドロラーゼ ) からなる群より選択される、請求項 21 に記載のアレイ。

30

【請求項 23】

前記アレイに固定化された炭水化物への結合について分析される前記タンパク質が検出可能な標識で標識される、請求項 20 に記載のアレイ。

【請求項 24】

前記タンパク質標識が蛍光染料を含む、請求項 23 に記載のアレイ。

【請求項 25】

前記蛍光染料がアミン反応性染料を含む、請求項 24 に記載のアレイ。

【請求項 26】

前記アレイ表面上に固定化された炭水化物の特徴づけを表すデータ、または前記アレイ表面での炭水化物結合反応の分析を表すデータ、またはそれらの両方を含むコンピュータ可読媒体。

40

【請求項 27】

P T F E 様アルミニウムコート透明固体基材に固定化された炭水化物を特徴づけるための方法であって：

( a ) P T F E 様アルミニウムコート透明固体基材の表面の別々の位置に固定化された複数の炭水化物を含むアレイを提供するステップと；

( b ) 各々の別々の位置に固定化された前記炭水化物を特徴づけするための質量分光分析を実行するステップと；

を含む、方法。

50

## 【請求項 28】

前記固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけが、飛行時間質量分析法 (MS - TOF) を含む、請求項 27 に記載の方法。

## 【請求項 29】

(c) 次に疑わしい炭水化物結合部分の結合分析を実行するステップをさらに含む、請求項 27 に記載の方法。

## 【請求項 30】

前記疑わしい炭水化物結合部分がセルラーゼタンパク質である、請求項 29 に記載の方法。

## 【請求項 31】

(d) 前記セルラーゼが前記炭水化物を加水分解するのに好適な条件下で、前記アレイ表面上に固定化された結合炭水化物と前記セルラーゼタンパク質とをインキュベートするステップをさらに含む、請求項 30 に記載の方法。

## 【請求項 32】

(e) 前記セルラーゼによる加水分解後に前記アレイ表面上に固定されたままの前記セルラーゼタンパク質の生成物を特徴づけするステップをさらに含む、請求項 31 に記載の方法。

## 【請求項 33】

前記セルラーゼが 1, 4 -  $\beta$ -グルコシダーゼ、エキソグルカナーゼ (1, 4 -  $\beta$ -D グルカンセロビオヒドロラーゼ) およびエンドグルカナーゼ (1, 4 -  $\beta$ -D グルカングルカノヒドロラーゼ) からなる群より選択される、請求項 31 に記載の方法。

## 【請求項 34】

炭水化物と前記炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子との間の結合反応を分析するための方法であって：

(a) アルミニウムコート透明固体基材または PTFE 様アルミニウムコート透明固体基材の表面上の別々の位置に固定化された複数の炭水化物を含むアレイを提供するステップと；

(b) 前記アレイを、前記アレイ表面上に固定化された前記複数の炭水化物の 1 つ以上に結合する可能性がある 1 個以上の分子と接触させるステップと；

(c) 前記アレイ表面上の 1 つ以上の別々の位置での結合反応の存在または非存在を同定

を含む、方法。

## 【請求項 35】

前記炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子が、検出可能な標識によって標識されたタンパク質である、請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 36】

前記タンパク質標識が蛍光染料を含む、請求項 35 に記載の方法。

## 【請求項 37】

前記蛍光染料がアミン反応性シアニン染料を含む、請求項 36 に記載の方法。

## 【請求項 38】

分子の前記アレイ上の炭水化物への前記結合が、生物学的プロセスを表す、請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 39】

前記生物学的プロセスは、タンパク質折り畳み、タンパク質分泌、タンパク質安定化、ウイルス感染、細菌感染、癌転移、炎症反応、先天免疫、適応免疫、受容体媒介シグナル伝達プロセス、およびバイオ燃料産生からなる群より選択される、請求項 38 に記載の方法。

## 【請求項 40】

前記炭水化物が多糖類、またはオリゴ糖、または複合糖質の炭水化物部分、またはセロビオース、またはセロトリオース、またはセロテトラオース、または Glucose、また

10

20

30

40

50

は G b 5 である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記アレイに固定化された前記炭水化物の質量分析法による特徴づけが、前記結合分析の前に実行される、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記アレイに固定化された前記炭水化物の質量分析法による特徴づけが、前記結合分析の前および後に実行され、前記アレイ表面上に固定化された前記複数の炭水化物の 1 つ以上に結合する可能性がある 1 個以上の分子が、前記アレイ上の 1 つ以上の炭水化物を加水分解できるセルロースタンパク質酵素を含み、さらに前記結合反応が、前記炭水化物を加水分解するために、前記セルロースに好適な条件下で実行される、請求項 3 4 に記載の方法。

10

【請求項 4 3】

前記セルラーゼが 1, 4 -  $\beta$ -グルコシダーゼ、エキソグルカナーゼ (1, 4 -  $\beta$ -D-グルカンセロビオヒドロラーゼ) およびエンドグルカナーゼ (1, 4 -  $\beta$ -D-グルカングルカノヒドロラーゼ) からなる群より選択される、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

アルミニウムコート透明固体基材または P T F E 様アルミニウムコート透明固体基材の上に固定化された炭水化物のアレイを製造するための方法であって：

( a ) アルミニウムコート透明固体基材または P T F E 様アルミニウムコート透明固体基材の表面上の別々の位置に複数の炭水化物を固定化するステップを含み、

20

前記基材が電場について伝導性または半導性であり、

前記アレイが前記固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけを実行するのに好適であり、

前記アレイが前記炭水化物と前記炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子との間の結合反応の分析を実行するのに好適である、

方法。

【請求項 4 5】

前記炭水化物が非共有結合によって固定化されている、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記炭水化物がポリフッ素化されている、請求項 4 5 に記載の方法。

30

【請求項 4 7】

前記炭水化物が共有結合によって固定化されている、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記炭水化物がホスホン酸官能基によって修飾されている、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 9】

( b ) 前記アレイ表面上に固定化された炭水化物の特徴づけを質量分析法によって実行するステップをさらに含み、マトリクス材料の非存在下での高いシグナル/ノイズ ( S / N ) 比、低いレーザーフルエンス率、またはシグナルの低い断片化の 1 つ以上の観察によって、前記アレイが前記固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけを実行するのに好適であることが示される、請求項 4 4 に記載の方法。

40

【請求項 5 0】

( c ) 前記アレイを炭水化物 - 結合タンパク質と接触させることによって、前記アレイに対して炭水化物結合アッセイを実行するステップをさらに含み、前記アレイ上の 1 つ以上の別々の位置における特異的結合の検出によって、前記アレイが前記炭水化物と前記炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子との間の結合反応の分析を実行するのに好適であることが示される、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記炭水化物が糖、または糖タンパク質、または糖脂質、またはマンノースから選択され、それぞれ内部または非還元性末端アルファ - マンノシル基を含み、結合分子がコンカナバリン A である、請求項 5 0 に記載の方法。

50

## 【請求項 5 2】

請求項 4 4 に記載の方法によって製造される、疾患の診断および薬物の発見に使用するためのアレイ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願

この出願は、2008年7月15日に出願された米国仮出願第61/080,931号および2008年10月22日に出願された米国仮出願第61/107,624号（これらの内容は、その全体が参考として本明細書に援用される）の利益およびそれへの優先権を主張する。

10

## 【背景技術】

## 【0002】

ポリフルオロホスホン化アルミニウム・コート・ガラススライドを含む、新規アルミニウム・コート・ガラススライド上のグリカンアレイによって、マトリクスを用いない質量分析法による特徴づけ、糖タンパク質結合の蛍光評価、ならびに効率および特異性が異なる酵素の同定および研究が可能となる。

## 【0003】

SWISS-PROTタンパク質データベースに基づいて、ヒトタンパク質の50%超がグリコシル化されることが予測される。炭水化物はしばしば、糖タンパク質または糖脂質コンジュゲートとして細胞表面上に存在して、多くの生物学的認識プロセス、たとえばタンパク質折り畳み、分泌および安定化、ウイルスおよび細菌感染、癌転移、炎症反応、先天および適応免疫、ならびに多くの他の受容体媒介シグナル伝達プロセスにおいて、重要な構造的および機能的役割を果たす。さらに、生物活性にグリコシル化が必要である多くの例が存在する。その上、固着植物などの多くの生物は、有害な外因性生体異物を解毒する特異的グリコシル化機構を進化させてきた。

20

## 【0004】

炭水化物の生物学的重要性の認識が高まっているにもかかわらず、炭水化物-タンパク質相互作用の研究は、炭水化物の複雑な構造および困難な合成ならびにグリカン結合タンパク質(GBP)とのその相互作用の低い親和性のために、なお多くの困難に直面している。通例、炭水化物-タンパク質相互作用の単量体解離定数( $K_D$ )は、ミリモルの範囲にある；それゆえ炭水化物に媒介された生物学的反応は、高い親和性および特異性を達成するために、細胞表面での多価相互作用を介することが多い。

30

## 【0005】

細胞生物学における主な課題は、多くの生物学的プロセスに關与する、オリゴ糖とタンパク質との相互作用を定義することである。しかし純粋なオリゴ糖を得ることは困難であり、各種の受容体によって認識される炭水化物の同定および結合の研究のための高感受性および高スループットの方法を開発する必要がある。

## 【0006】

炭水化物マイクロアレイは、糖鎖生物学の研究および流行病の高スループットバイオアッセイのための強力なツールである。この技術の根本的な問題は、表面に共有結合されているオリゴ糖の特徴づけおよび定量をどのように行うかということである。表面への糖の効果的な固定化は、糖タンパク質結合を評価するときの連続的な基材洗浄に耐えるために不可欠である。質量分析法(MS)は、多孔性ガラススライドに固定化した糖の高スループット特徴づけに有用な分析方法であることが報告されてきた。

40

## 【0007】

グリカンアレイ用に多様な基材が市販されているが、これらの基材は直接質量分光分析には好適でない。これらの基材は、アミン、カルボキシラート、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、アビジン、エポキシ、アルデヒド、キレート化ニッケル基などでコートしたガラスおよびポリエチレンテレフタレート(PET)を含む。実際に、NHS官能

50

化ガラススライドは、グリカンアレイの作製に一般に使用される。代表的な例はガラススライドの表面上に固定化された糖抗原の例であり、その後、糖結合モノクローナル抗体および蛍光タグ化2次抗体をタンパク質-炭水化物相互作用の研究のためにインキュベートした。これらのガラススライドは、有効であるが、結合した糖の質量分析法による特徴づけに使用するには理想的ではない。

【0008】

マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間(MALDI-TOF)MS用に選択される基材は、高真空下で均一な電場が生成できるように、伝導性または半導性であるべきである。標準ステンレス鋼板は通常、被検体を装填するための選択肢である。

【0009】

MALDI MSでは、パルス・レーザー・ビームのエネルギーをマトリクス(混和性有機化学薬品)が吸収して、試料の断片化を防止する。MALDI-TOF MSは、高分子量生体分子を分析するための優れたツールである。しかし有機マトリクス中の化学薬品は、低分子量オリゴ糖(通例2000Da未満)を妨害する;それゆえ、マトリクス化学薬品を添加せずにMSによって生体分子を分析するための基材として、多孔性ケイ素を選択した。ケイ素上での脱離イオン化(DIOS)MSでは、比較的 low 分子量の生体分子は、MSからの偽親ピークのm/z比に基づいて同定された。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本開示の特徴により、アルミニウムコート透明固体基材またはPTFE様アルミニウムコート透明固体基材の上に固定化された炭水化物のアレイが開示される。アレイはアルミニウムコート透明固体基材の表面上の別々の位置に固定化された複数の炭水化物を備え、アレイは(a)固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけを実行するために、および(b)炭水化物と炭水化物を特異的に結合する可能性がある(suspected of)分子との間の結合反応の分析を実行するために好適である。

【0011】

本開示の特徴により、基材は、電場について伝導性または半導性であり得る。

【0012】

本開示の特徴により、透明固体基材はガラスであり得る。

【0013】

本開示の特徴により、炭水化物はグリカンであり得る。

【0014】

本開示の特徴により、炭水化物は非共有結合によって固定化され得る。

【0015】

本開示の特徴により、炭水化物は $-C_nF_{2n+1}$  ( $n \geq 4$ )末端によってポリフッ素化(polyfluorinated)され得る。

【0016】

本開示の特徴により、ポリフッ素化炭水化物は、PTFE様アルミニウムコート透明固体基材の表面にスポットされ得る。

【0017】

本開示の特徴により、炭水化物は共有結合によって固定化され得る。

【0018】

本開示の特徴により、炭水化物はホスホン酸官能基によって修飾され得る。

【0019】

本開示の特徴により、ホスホニル化(phosphonylated)炭水化物は、アルミニウムコート透明固体基材の表面上でのホスホン酸基と酸化アルミニウムとの間のキレート化相互作用によって、基材の表面上に固定化され得る。

【0020】

本開示の特徴により、炭水化物は、光切断型リンカーおよびシラン官能基によって修飾

10

20

30

40

50

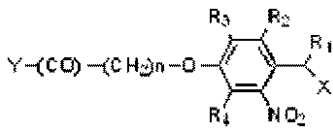
され得る。

【0021】

本開示の特徴により、光切断型リンカーは、一般式：

【0022】

【化1】



を有し、式中、 $R^1$  は、水素、 $C_1 - C_8$  アルキルであり； $R^2$  および  $R^4$  はそれぞれ独立して、水素、 $C_1 - C_8$  アルコキシであり； $R^3$  は、 $C_1 - C_8$  アルコキシであり； $X$  は、 $O(CO)N - (CH_2)_n - R^5$  であり、ここで  $n \geq 3$ 、 $R^5$  は炭水化物であり、 $Y$  は ACG スライドなどの固体支持体である。

【0023】

本開示の特徴により、固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけは、飛行時間質量分析法 (MS - TOF) を含む。

【0024】

本開示の特徴により、固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけは、マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間 (MALDI - TOF) 質量分析法を含む。

【0025】

本開示の特徴により、炭水化物は、多糖類、またはオリゴ糖、または複合糖質の炭水化物部分、またはセロビオース、またはセロトリオース、またはセロテトラオース、または GlbOH、または Gb5 である。

【0026】

本開示の特徴により、固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけは、セルラーゼ酵素反応の炭水化物生成物の特徴づけを含む。

【0027】

本開示の特徴により、セルラーゼ酵素反応はアレイ表面上に固定化された炭水化物に対して実行され、セルラーゼ酵素は、固定化された多糖類、またはオリゴ糖、または複合糖質の炭水化物部分、またはセロビオース、またはセロトリオース、またはセロテトラオース、または GlbOH、または Gb5 を分解可能である可能性がある。

【0028】

本開示の特徴により、マトリクスを加えることなく MS - TOF 特徴づけを実行できる。

【0029】

本開示の特徴により、MS - TOF 特徴づけの約 15 分後に、アレイに対して炭水化物結合アッセイを実行できる。

【0030】

本開示の特徴により、炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子はタンパク質である。

【0031】

本開示の特徴により、タンパク質はセルラーゼである。

【0032】

本開示の特徴により、セルラーゼは、1, 4 -  $\beta$ -グルコシダーゼ、エキソグルカナーゼ (1, 4 -  $\beta$ -D-グルカンセロビオヒドロラーゼ) およびエンドグルカナーゼ (1, 4 -  $\beta$ -D-グルカングルカノヒドロラーゼ) からなる群より選択される。

【0033】

本開示の特徴により、アレイに固定化された炭水化物への結合について分析されるタンパク質は、検出可能な標識で標識される。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 4 】

本開示の特徴により、タンパク質標識は蛍光染料を含む。

## 【 0 0 3 5 】

本開示の特徴により、蛍光染料はアミン反応性染料を含む。

## 【 0 0 3 6 】

本開示の特徴により、アレイ表面上に固定化された炭水化物の特徴づけを表すデータ、またはアレイ表面での炭水化物結合反応の分析を表すデータ、またはそれらの両方を含むコンピュータ可読媒体が開示される。

## 【 0 0 3 7 】

本開示の特徴により、P T F E 様アルミニウムコート透明固体基材に固定化された炭水化物を特徴づけるための方法であって：

( a ) P T F E 様アルミニウムコート透明固体基材の表面上の別々の位置に固定化された複数の炭水化物を含むアレイを提供するステップと；

( b ) 各々の別々の位置に固定化された炭水化物を特徴づけするための質量分光分析を実行するステップと；

を含む方法が開示される。

10

## 【 0 0 3 8 】

本開示の特徴により、固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけは、飛行時間質量分析法 ( M S - T O F ) を含む。

## 【 0 0 3 9 】

本開示の特徴により、方法は：

( c ) 疑わしい炭水化物結合部分の結合分析を実行するステップ

をさらに含む。

20

## 【 0 0 4 0 】

本開示の特徴により、疑わしい炭水化物結合部分は、セルラーゼタンパク質である。

## 【 0 0 4 1 】

本開示の特徴により、方法は：

( d ) セルラーゼが炭水化物を加水分解するのに好適な条件下で、アレイ表面上に固定化された結合炭水化物とセルラーゼタンパク質とをインキュベートするステップ

をさらに含む。

30

## 【 0 0 4 2 】

本開示の特徴により、方法は：

( e ) セルラーゼによる加水分解後にアレイ表面上に固定化されたままのセルラーゼタンパク質の生成物を特徴づけするステップ

をさらに含む。

## 【 0 0 4 3 】

本開示の特徴により、セルラーゼは、1, 4 -  $\beta$  - グルコシダーゼ、エキソグルカナーゼ ( 1, 4 -  $\beta$  - D グルカンセロビオヒドラーゼ ) およびエンドグルカナーゼ ( 1, 4 -  $\beta$  - D グルカングルカノヒドラーゼ ) からなる群より選択される。

## 【 0 0 4 4 】

本開示の特徴により、炭水化物と炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子との間の結合反応の分析方法であって：

( a ) アルミニウムコート透明固体基材または P T F E 様アルミニウムコート透明固体基材の表面上の別々の位置に固定化された複数の炭水化物を含むアレイを提供するステップと；

( b ) アレイを、アレイ表面上に固定化された複数の炭水化物の 1 つ以上に結合する可能性がある 1 個以上の分子と接触させるステップと；

( c ) アレイ表面上の 1 つ以上の別々の位置での結合反応の存在または非存在を同定するステップと；

を含む方法が開示される。

40

50

## 【0045】

本開示の特徴により、炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子は、検出可能な標識によって標識されたタンパク質である。

## 【0046】

本開示の特徴により、タンパク質標識は蛍光染料を含む。

## 【0047】

本開示の特徴により、蛍光染料はアミン反応性シアニン染料を含む。

## 【0048】

本開示の特徴により、アレイ上の炭水化物への分子の結合は、生物学的プロセスを表している。

10

## 【0049】

本開示の特徴により、生物学的プロセスは、タンパク質折り畳み、タンパク質分泌、タンパク質安定化、ウイルス感染、細菌感染、癌転移、炎症反応、先天免疫、適応免疫、受容体媒介シグナル伝達プロセス、およびバイオ燃料産生からなる群より選択される。

## 【0050】

本開示の特徴により、炭水化物は、多糖類、またはオリゴ糖、または複合糖質の炭水化物部分、またはセロビオース、またはセロトリオース、またはセロテトラオース、またはG l o b o H、またはG b 5である。

## 【0051】

本開示の特徴により、アレイに固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけは、結合分析の前に実行される。

20

## 【0052】

本開示の特徴により、アレイに固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけは、結合分析の前および後に実行され、アレイ表面上に固定化された複数の炭水化物の1つ以上に結合する可能性がある1個以上の分子は、アレイ上の1つ以上の炭水化物を加水分解できるセルロースタンパク質酵素を含み、結合反応は、セルロースが炭水化物を加水分解するのに好適な条件下で実行される。

## 【0053】

本開示の特徴により、セルラーゼは、1, 4 - - グルコシダーゼ、エキソグルカナーゼ (1, 4 - - Dグルカンセロビオヒドロラーゼ) およびエンドグルカナーゼ (1, 4 - - Dグルカングルカノヒドラーゼ) からなる群より選択される。

30

## 【0054】

本開示の特徴により、アルミニウムコート透明固体基材またはP T F E 様アルミニウムコート透明固体基材上に固定化された炭水化物のアレイの製造方法であって：( a ) アルミニウムコート透明固体基材またはP T F E 様アルミニウムコート透明固体基材の表面上の別々の位置に複数の炭水化物を固定化するステップを含み、基材が電場について伝導性または半導性であり、アレイが固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけを実行するのに好適であり、アレイが、炭水化物と炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子との間の結合反応の分析を実行するのに好適である、方法が開示される。

## 【0055】

本開示の特徴により、炭水化物は非共有結合によって固定化される。

40

## 【0056】

本開示の特徴により、炭水化物はポリフッ素化される。

## 【0057】

本開示の特徴により、炭水化物は共有結合によって固定化される。

## 【0058】

本開示の特徴により、炭水化物はホスホン酸官能基によって修飾されている。

## 【0059】

本開示の特徴により、方法は：( b ) アレイ表面上に固定化された炭水化物の特徴づけを質量分析法によって実行するステップをさらに含み、マトリクス材料の非存在下での高

50

いシグナル/ノイズ(S/N)比、低いレーザーフルエンス率、またはシグナルの低い断片化の1つ以上の観察によって、アレイが固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけを実行するのに好適であることが示される。

【0060】

本開示の特徴により、方法は：(c)アレイを炭水化物-結合タンパク質と接触させることによって、アレイに対して炭水化物結合アッセイを実行するステップをさらに含み、アレイ上の1つ以上の別々の位置における特異的結合の検出は、アレイが炭水化物と炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子との間の結合反応の分析を実行するのに好適であることを示す。

【0061】

本開示の特徴により、炭水化物は糖、または糖タンパク質、または糖脂質、またはマンノースから選択され、それぞれ内部または非還元性末端アルファ-マンノシル基を含み、結合分子はコンカナバリンAである。

【0062】

本開示の特徴により、疾患診断および薬物送達で使用するためのアレイが開示され、アレイは、(a)アルミニウムコート透明固体基材またはPTFE様アルミニウムコート透明固体基材の表面上の別々の位置に複数の炭水化物を固定化することによって製造され、基材は電場について伝導性または半導性であり、アレイは固定化された炭水化物の質量分析法による特徴づけを実行するために好適であり、アレイは、炭水化物と炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子との間の結合反応の分析を実行するのに好適である。

【0063】

本開示の上述の特徴および目的は、同じ参照数字が同じ要素を示す添付図面と併せて解釈される以下の説明を参照すると、明らかになるであろう：

【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1】図1は、実施ならびに実験的アルミニウムコートガラス(ACG)スライドおよび関連実験技法のブロック図である；

【図2】図2は、光切断型リンカーを用いたマンノース-ACGおよびラクトース-ACGの合成の実施を示すスキームである；

【図3】図3は、アルミニウム・コート・ガラススライドの実施の顕微鏡写真である。

【図4】図4は、各種の方法によって作製したACGスライドの表面組成を示す実験データのグラフである；

【図5】図5は、マイクロガラススライド、半透明ACGスライド、および全反射(不透明)ACGスライドの光学特性の実施の視覚表示である；

【図6】図6は、ACGスライド上のAl-OHのATR/FTIRスペクトルを示す実験データの実施のグラフである。

【図7】図7は、活性の有効性を示すACGスライド上の水接触角の写真である；

【図8】図8は、選択的結合切断およびultraflex TOF質量分析法による糖(マンノース)誘導体の検出の実施スキームである；

【図9】図9は、純アルミニウム板およびACGスライドでの質量分析法データの实施を示す；

【図10】図10は、APDMSグラフト化の前のa)酸素プラズマ(A1-1)、b)アルゴンプラズマ(A1-2)、ならびにc)酸素およびアルゴンの混合物のプラズマ(A1-3)による処理時の、カソードアーク蒸発によって形成されたACGスライドのタンパク質結合アッセイの実施を示す；

【図11】図11は、ガラススライドおよびACGスライドに固定化されたマンノースの蛍光タグ化タンパク質結合アッセイの実施の写真である；

【図12】図12は、ACGスライドにグラフトされた光切断型リンカー(PLL)を用いたマンノースのultraflex TOF質量スペクトルのピーク強度と、熱コーティングと続いてのスライド表面上での電気化学アノード酸化によって形成されたマンノ-

10

20

30

40

50

ス - タンパク質結合 A C G スライドの蛍光強度との比較を示す実験データの実施のグラフである ;

【図 1 3】図 1 3 は、D M F およびジイソプロピルエチルアミン中のスベリン酸ジスクシンイミジル ( D S S ) を用いた処理による N H S - A C G への変換によって修飾された N H <sub>2</sub> - A C G 表面の利用の実施に関するデータを示す ;

【図 1 4】図 1 4 は、A C G 質量分析法実験で使用される化合物の構造の化学式である ;

【図 1 5】図 1 5 は、P T F E 様 A C G スライド上での非共有結合型グリカンアレイの生成の実施のブロック図である ;

【図 1 6】図 1 6 は、ポリフッ化炭水化物 4 ~ 7 の実施の合成を示すスキームである ;

【図 1 7 A】図 1 7 は、スライドにポリフッ化炭水化物が結合した P T F E 様 A C G スライドを使用する実験データの実施の表示である ;

【図 1 7 B】図 1 7 は、スライドにポリフッ化炭水化物が結合した P T F E 様 A C G スライドを使用する実験データの実施の表示である ;

【図 1 7 C】図 1 7 は、スライドにポリフッ化炭水化物が結合した P T F E 様 A C G スライドを使用する実験データの実施の表示である ;

【図 1 8】図 1 8 は、マトリクスを加えることなく、異なるレーザーフルエンス率を使用することによる、A C G スライド上の G l o b o H の質量スペクトルの実験データの実施のグラフである ;

【図 1 9】図 1 9 は、マトリクスを用いた、異なるレーザーフルエンス率を使用することによる、A C G スライド上の G l o b o H の質量スペクトルの実験データの実施のグラフである ;

【図 2 0 A】図 2 0 は、A . N i g e r , T . R e e s e i , および T . V i r i d e によるセルラーゼタンパク質を用いた、溶解状態のおよび P T F E 様 A C G スライドに固定化されたポリフッ化セロピオースの酵素加水分解の M S - T O F データの実験データの実施のグラフである ;

【図 2 0 B】図 2 0 は、A . N i g e r , T . R e e s e i , および T . V i r i d e によるセルラーゼタンパク質を用いた、溶解状態のおよび P T F E 様 A C G スライドに固定化されたポリフッ化セロピオースの酵素加水分解の M S - T O F データの実験データの実施のグラフである ;

【図 2 1】図 2 1 は、化学構造およびセロトリオースに対するセルラーゼ ( c e l l u s l a s e s ) の効果を示す実験データの実施のグラフである ;

【図 2 2】図 2 2 は、溶解状態のポリフッ化セロピオース ( A ) 、ポリフッ化セロトリオース ( B ) およびポリフッ化セロテトラオース ( C ) の酵素加水分解の実験 M S - T O F データの実施のグラフである ;

【図 2 3】図 2 3 は、A C G ガラススライド上のポリフッ化セロピオース ( A ) 、ポリフッ化セロトリオース ( B ) およびポリフッ化セロテトラオース ( C ) の酵素加水分解の実験 M S - T O F データの実施のグラフである ;

【図 2 4】図 2 4 は、マンノース誘導体 2 1 の合成のためのスキームである ;

【図 2 5】図 2 5 は、A C G スライド上での共有結合型グリカンアレイの生成方法の実施のブロック図である ;

【図 2 6 A】図 2 6 は、シランベース P T F E 様 A C G スライドを M S - T O F およびタンパク質 - 糖結合によって特徴づけする実験データの実施のグラフである ;

【図 2 6 B】図 2 6 は、シランベース P T F E 様 A C G スライドを M S - T O F およびタンパク質 - 糖結合によって特徴づけする実験データの実施のグラフである ;

【図 2 7 A】図 2 7 は、ホスホン酸ベース P T F E 様 A C G スライドを M S - T O F およびタンパク質 - 糖結合によって特徴づけする実験データの実施のグラフである ;

【図 2 7 B】図 2 7 は、ホスホン酸ベース P T F E 様 A C G スライドを M S - T O F およびタンパク質 - 糖結合によって特徴づけする実験データの実施のグラフである ;

【図 2 8】図 2 8 は、実験の純化合物 3 ( H D F D P A , 3 , 3 , 4 , 4 , 5 , 5 , 6 , 6 , 7 , 7 , 8 , 8 , - 9 , 9 , 1 0 , 1 0 , 1 0 - ヘプタデカフルオロデシルホスホン

10

20

30

40

50

酸)のFTIRスペクトルおよびACG表面グラフト化合物3のFTIRスペクトルの実施のグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0065】

本開示の実施形態の以下の詳細な説明において、同じ参照が同様の要素を示し、例証のために、本開示が実施され得る詳細な実施形態が示されている、添付図面を参照する。これらの実施形態は、当業者が本開示を実施できるようにするために十分に詳細に説明されており、他の実施形態が利用され得ることと、本開示の範囲から逸脱することなく論理的、機械的、電氣的、機能的、および他の変更が行われ得ることが理解されるべきである。したがって以下の詳細な説明は、制限的な意味で解釈されるべきではなく、本開示の範囲は、添付請求項によってのみ定義される。本開示で使用する場合、「or」という用語は、論理和として定義されることが理解されるものとして、そのように別途明示的に指摘されない限り、または「xor」と記載されない限り、排他的論理和を示さないものとする。

10

【0066】

本開示は、参照により、2006年12月22日に出願された米国特許出願公開第2007/0213278号を組み込む。

【0067】

本明細書で使用する場合、テフロン(登録商標)またはPTFEという用語は、ポリテトラフルオロエチレンを指す。

20

【0068】

糖分子と基材表面との間の効果的な接着は、共有結合によって達成されてきた。糖誘導体のフルオラス表面への物理的吸着も、十分な接着のために実行可能であり得る。多孔性ケイ素板もDIOSMSでのマトリクスとして作用して、質量スペクトルは、断片化なしで高いシグナル対ノイズ(S/N)比で得られた。多孔性ケイ素板の調製には、環境に優しくない腐食酸の使用が必要であり、板の品質を管理することが困難である。他方、多孔性酸化アルミニウムは、アルミニウム表面に自然に存在する;アルミニウムコートガラス(ACG)スライドの電気化学アノード酸化は、弱酸性水溶液中で実施できる。ケイ素表面上でのシリル化反応も、適正な条件下でアルミニウム表面上で使用できる。板アルミニウムの新たに切断された表面は、光沢のある金属質感を有する。空気に暴露させると、表面は徐々に酸化して、酸化アルミニウム(自然酸化物と呼ばれる)の層が形成されると不透明に変わる。アルミニウム表面上で成長した自然酸化アルミニウム(NAO)は、アノード酸化された酸化アルミニウム(AAO)の配向と比較して、配向を有さない。アルミニウム表面上のNAOの厚さはわずか2、3ナノメートルである。これに対して、AAOの厚さは、急速に(15~20分以内)マイクロメートル範囲まで成長することができ、成長の方向は印加された電場に対して整列されている。2、3の試みの実験では、純アルミニウム板を製造して(厚さ1mm)、板の表面上でAAO層を2mmまで成長させた。厚いAAO層を備えたこの表面は非伝導性となり(セラミックのように)、本出願人らの研究には不適であった。しかしすべての場合で、アルミニウム表面上のアモルファス酸化物層は、化学的に修飾することが可能であり、表面上の酸化物層の厚さがナノメートル範囲にあるときにだけ、基材は導電性のままであった。

30

40

【0069】

図1に図示した実施により、ACGスライドの表面上に酸化アルミニウムの薄層を備えた複数の新たな基材が、表面グラフトオリゴ糖の分子量を特徴づけることを試みて、同時にその糖-タンパク質結合能力を探ることを試みて製造された。図2に示す実施に従って図示されるように、光切断型リンカー(PLL)が組み込まれている設計されたマンノースおよびラクトース誘導体を合成し、活性化ACGスライドに共有結合させた。混和性有機マトリクスを加えることなく、糖固定化ACGスライドに分子量の同定およびタンパク質結合の評価を受けさせた。

【0070】

50

セルラーゼは、バイオ燃料生産へのその応用のため、現在関心を集めている。蛍光発生または発色基を備えたセロピオースまたはセロトリオースは、セルラーゼの活性および特異性を調べるための基質として一般に使用されている。しかし酵素加水分解の間に、反応で発生した蛍光発生基または発色脱離基は高いpHでのみシグナルを示したが、セルラーゼは低いpH(4~6)でその最適活性を呈した。ポリフッ化セロピオースをPTFE様ACGスライドに非共有的に固定化して、pH4~6にてインサイチューで酵素加水分解を行った。次にスライド表面に残存する加水分解生成物をMS-TOFによって同定した。

#### 【0071】

さらに最近開発されたアルミニウムコートガラス(ACG)スライドを酸化して、官能化アルキルモノエトキシシランと反応させて共有結合型ハンドルを形成させ、光切断型リンカーを含有するグリカンとのカップリングを続けた。ACGスライド表面上の光切断型リンカーを有するこのグリカンアレイは、マトリクスなしで飛行時間質量分析法(MS-TOF)によって特徴づけして、蛍光タグ化タンパク質の結合評価に使用することができる。ACG-スライド上の糖-タンパク質複合体の蛍光強度は、ガラススライド上よりも高い。したがって安定なポリフッ化(PTFE様とも呼ばれる)ACGスライドを製造するための、および検出装置として質量分析法を使用することによるセルラーゼ活性の研究の基材として、グリカンを非共有結合的にアレイ化するこれらのスライドを使用するための、新たな方法が開示されている。さらに、ホスホン酸の特性を使用することによって、酸化アルミニウム表面と容易にキレート化する(challete)ことが可能であり、ホスホン酸リンカーを有する炭水化物を使用して(torapid)、共有結合性グリカンアレイを生成した。

10

20

#### 【0072】

実施により、糖を固定化するための、PTFE様ACGスライド上の新世代の炭水化物アレイが開発されてきた。ACGスライド表面上に固定化された、光切断型リンカーが組み込まれているマンノースおよびラクトースにMALDI-MS分析を受けさせて、固定化された糖の分子量を特徴づけた。マンノースの量(m/z)とそのタンパク質結合の蛍光強度との間の比例的相関が観察された。マンノース-ACGおよびGloboH-ACGスライドのタンパク質結合アッセイにおいて、おそらく材料特性、表面形態、およびタンパク質とスライド表面上に固定化された糖との間の結合部位アーキテクチャのために、ガラススライドよりも高い蛍光強度および感受性が観察された。

30

#### 【0073】

質量分析法を用いると、このグリカンアレイは、多様な種類のセルラーゼおよびその効率を同定および識別する有効な分析ツールとして使用することができる。酸化アルミニウム・コート・ガラススライドの独自の特性によって、ホスホン酸塩の化学的性質によってグリカンを便利におよび非共有結合的にまたは共有結合的にアレイ化することが可能となり、グリカンアレイは、マトリクスを使用せずにMS分光法によって特徴づけできる。

#### 【0074】

実施により、図1は、新規の実験的ACGスライドおよびその上での実験のための関連する方法を図示する。a)では、光切断型リンカーが組み込まれているマンノースなどの糖誘導体が、実施に従って生成される。b)では、表面上の酸化アルミニウムの層(<5nm)およびガラススライド(1mm)にコートされた純アルミニウムの層(>100nm)を有するACGスライド(75.5x25.4x1mm<sup>3</sup>)を示す。c)では、ACGスライドを場合により活性化して、糖誘導体を表面上に固定化した(マイクロアレイ化して、手でスポットした)。スライドは、d)の質量分析法によって糖の分子量の同定を受けて、e)の蛍光スキャナによってその糖-タンパク質結合がさらに評価された。

40

#### 【0075】

実施によりおよび図2に図示するように、光切断型リンカーを用いたマンノース-ACGおよびラクトース-ACGの合成のスキームを示す; DIPEA = N, N-ジイソプロピルエチルアミン、DSC = N, N'-炭酸ジスクシンイミジル、HBTU = 2-(1-

50

ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (T B A F = テトラ - n - ブチルアンモニウムフロリド、T E A = トリエチルアミン)。

【0076】

実施によりおよび図15に図示するように、PTFE様ACGスライド上での非共有結合型グリカンアレイの生成の実施のブロック図を示す。実施により、糖は、ポリフッ化末端を介してACGスライドに可逆的に結合される。そして各種の質量分光実験が実行される。たとえばMS - TOFは糖結合アッセイで実行され、またはMS - TOFによるセルラーゼ活性および特異性アッセイが実行され得る。

【0077】

当業者は、本明細書で開示する装置の有用性ならびに本明細書で与える実施例および他の開示に基づく各種の実験方法の両方を同様に、ただちに認識するであろう。このようなデバイスおよび方法は、本開示で明示的に検討される。

【実施例】

【0078】

(実施例1)

ACGスライドの表面特性

厚さが少なくとも100nmの純アルミニウム(99.999%)の層をマイクロガラススライド上に各種のコーティング技法、たとえばマグネトロンスパッタリング、カソードアーク蒸発、および熱コーティングによってコートした。これらのスライドは、さらに操作を行わずに使用するか、または使用前に電気的にアノード酸化を行うかのどちらかであった。実施により、図3は、ACGスライドの走査電子顕微鏡(SEM)、原子間力顕微鏡(AFM)、およびX線光電子分光法(XPS)によって決定した、その表面形態、組成、およびあらさを示す。図3Aは、カソードアーク蒸発によって蒸着されたアルミニウムを示す。図3Bは、マグネトロンスパッタリングによって蒸着されたアルミニウムコーティングを示し、図3Cは、熱コーティングと、続いての電気化学的表面アノード酸化によって得たアルミニウムAAO/ACGスライドを示す。

【0079】

見てわかるように、カソードアーク蒸発によって産生されたACGスライドは、大型顆粒のコーティングおよび高い表面あらさを有する。表面あらさが高いスライドは、表面濡れ特性に影響を及ぼす。マグネトロンスパッタリングしたACGスライドによって、許容される表面あらさが得られた；しかし、このスライドは、所望のコーティング厚を達成するために長いコーティング時間が必要であり、この研究の初期段階でのみ使用した。熱コートACGスライドは、比較的短時間で所望のコーティング厚を達成した。このスライドによって、表面あらさが10nmの最も平滑な表面が得られた。続いての表面アノード酸化処理によって、ACGスライドではグラフト化のための安定な表面が得られた。アノード酸化したスライド表面のみが、図4に示すように、100%酸化アルミニウムによって覆われていた。

【0080】

図4に示す実験データの実施により、a)カソードアーク蒸発によって得られたNAO/ACGスライド、b)マグネトロンスパッタリングによって得られたNAO/ACGスライド、およびc)熱コーティングと続いての表面アノード酸化によって得られたAAO/ACGスライドの表面組成のXPSスペクトルが示されている。284.5eVにおけるC(1s)および531eVにおけるO(1s)の結合エネルギーを使用して、これらのスペクトルの結合エネルギーを校正した。ACGスライドの電気抵抗(両端間距離)は1.6~4との間で測定された。これらのスライドは、酸化物層が厚くなったときに、非導電性となった。XPSの侵入深さは20~50であり、本研究での酸化物層(NAOまたはAAOのどちらか)の厚さは、断面積から5nm以下であることが推定された。

【0081】

ガラススライド上にコートされたアルミニウムの厚さは100nm未満である必要があ

10

20

30

40

50

るため、基材は可視領域内で不透明のままである。透明基材を使用するとき、蛍光の一部が基材を通過して、スキャナはCy3蛍光の一部のみを検出した。不透明ACGスライドをバックグラウンド基材として使用したときには、装置はさらなる蛍光を検出した。

#### 【0082】

図5は、マイクロガラススライドの光学特性と比較した、ACGスライドの光学特性のデータを示す。半透明ACGスライド上にコートしたアルミニウムの厚さはわずか2、3ナノメートルであり、反射性ACGスライド上のアルミニウムの厚さは約300nmであった。図5は、マイクロガラススライド、半透明ACGスライド、および全反射（不透明）ACGスライドの光学特性を示す。図5Aでは、1000x、2000x、5000x、10000x、および20000xに希釈した1mg/mLのCy3-ストレプトアビジンの一連の溶液をこれらのスライドそれぞれにスポットして、空気乾燥させて、アレイWorx蛍光分光計によって分析した。装置には波長540nmの光源が装備されていた。波長595nmの蛍光がスライド表面から放出され、検出装置によって検出した。スキャナによって、透明ガラススライドでは5000x希釈までしか蛍光が検出されなかったが、半透明ACGスライドおよび全反射ACGスライドでは、それぞれ10000xおよび20000x倍希釈まで検出され、コートされたアルミニウムの厚さは前者の2、3ナノメートルから後者の100nm超まで変化した。図5Bは、各基材の実際に計算した蛍光強度が示されている実験データの実施を示す。

10

#### 【0083】

(実施例2)

20

表面活性化

スクリーニング実験では、スライド表面活性化について、酸素、アルゴン、ならびに酸素およびアルゴンの混合ガスのプラズマを試験した。残留物(CO、CO<sub>2</sub>、およびH<sub>2</sub>O)を真空下で除去した。所望の有機化合物のグラフト化の化学的成功に寄与しているのは、この表面汚染物質の除去である。表面は、全反射減衰フーリエ変換赤外(ATR/FTIR)分光計を使用して測定した。図6に示すように、ATR/FTIRスペクトルは、800~1100cm<sup>-1</sup>付近にAl-OHピークを示し、表面が表面洗浄プロセスの後にAl-OHに変換されたことを指摘した。実施により、プラズマ処理は、ACGスライドの表面を洗浄するおよび「軽くさする」のに十分なだけのプラズマエネルギーを使用して、有機汚染物質を除去するが、下にある表面をエッチングすることなくアルミナ層をなお保持している。活性化プロセスは、270~300mTorrのガス流圧の下で、わずか6.8W(680Vにて)のエネルギーを10分間使用することによって正常に完了した。アルゴンプラズマは、後の実験で観察されるように、糖誘導体をグラフトするために最も有効であることが判明した。図6に示すように、800~1100cm<sup>-1</sup>領域におけるAl-OHピーク強度は、プラズマ処理の25~99分後に著しく低下した。

30

#### 【0084】

プラズマ処理後の親水性表面は、おそらく表面上に酸化物層が再形成するために、徐々に疎水性となった。基材表面からのAl-OHの消失をATR/FTIR分光法によって追跡した。800~1100cm<sup>-1</sup>領域におけるAl-OHピーク強度は、図6に示すように、数時間にわたって著しく低下した。実施により、ACGスライドをプラズマ処理の直後に、3-アミノプロピルジメチルエトキシシラン(APDMS)によって活性化する。この活性化されたACG表面を使用して、反応の次のステップにおいて、PCLを用いてマンノースおよびラクトース糖誘導体を固定化した。

40

#### 【0085】

図7に示すように、表面の水接触角は表面活性化の間に変化した。図7により、ACGスライドの水接触角の代表的な変化を示す。図7Aは、溶媒で洗浄したACGスライドを示す；図7Bは、プラズマで処理したACGスライドを示す；および図7Cは、3-アミノ-プロピルジメチルエトキシシランによって活性化したACGスライドを示す。これらの試料は、不透明マグネトロンでスパッタリングしたACGスライドを用いた例として作製および測定した。したがって、接触角の測定は、活性化プロセスの完了の迅速な確認手

50

段として使用できる。表面あらしが高い基材は、より小さい接触角を与える傾向がある。

【0086】

(実施例3)

ACGスライドの活性化表面上に固定化されたPCLを有するマンノース

図2に示すように、カルボキシ官能基を有する化合物27を合成した。HBTUおよび化合物27の溶液を、ACGスライドの活性化表面に手でスポットして、マイクロアレイ化した。室温にて一晩で、ACGスライドの表面上でアミド形成が起こった。すべての塩残留物ならびに未結合マンノース誘導体をメタノールおよび脱イオン水によって完全に洗い流した。これらすべての調製の後、質量同定およびタンパク質結合評価のための物質の準備が整っていた。

10

【0087】

(実施例4)

ACGスライドにグラフトされた糖誘導体の質量分光分析

マトリクスを含まない多孔性ケイ素表面(DIOS)によって、試料の断片化が無視できるほどの分子-イオンピークが生じた。ACGスライドの寸法(75.5×25.4×1mm<sup>3</sup>)は、ultraflex質量分光装置に合致した;スライドは、図8および9に示すように、処理の各ステップで分析した。

【0088】

図8は、ultraflex質量分析法による糖(マンノース)誘導体の選択的結合切断および検出の実施スキームを示す。

20

【0089】

図9Aおよび9Bは、純アルミニウム板およびACGスライドに対する早期実験のMSデータを示し、これによりマンノースのピーク強度は比較的低かった。図9Aは、(A)99.999%純アルミニウム板(厚さ1mm)および(B)カソードアーク蒸発によって形成されたACGスライドにグラフトされた、PCLを有するマンノースのUltraflex TOF質量スペクトルを示す。(C)は、ACGスライドのカソードアーク蒸発のバックグラウンド信号を表す。図9Bは、興味のあるm/z領域における図9AのUltraflex TOF質量スペクトルを示す。

【0090】

図9Cは、興味のあるm/z領域における、カソードアーク蒸発によって形成されたACGスライド上にグラフトされた、PCLを有するマンノースのTOF質量スペクトルを示す。さらに詳細には、図9Cは、表面活性化条件が最適化され、マンノース誘導体のピーク強度が高かった、カソードアーク蒸発によって産生されたACGスライドのMSデータを示す。基材によってm/z415および451における大きいバックグラウンドピークが与えられ(図9Aおよび9C)、マンノース誘導体(265)の分子量は、プロトン(m/z266)イオン、リチウム(m/z272)イオン、ナトリウム(m/z288)イオン、および時にはカリウム(m/z304)イオンを用いたその付加体によってきわめて容易に検出された。

30

【0091】

高真空下では、UVエキシマ・レーザー・エネルギーが酸化アルミニウムクラスタを揮発させて気相とすること;紫外光子イオン化によって、比較的軽量の酸化アルミニウムクラスタを用いてわずかな質量スペクトルが生じることが理論化される。真空下での気相中の酸化物クラスタの大部分がAlO(Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)<sub>n</sub>から成るが、酸化アルミニウムクラスタが多く別の形でも存在することができる。図9Aおよび9Cにおいて、m/z451および415で生じた大きいバックグラウンドピークは、酸化物クラスタ[(Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)<sub>4</sub>+Li]<sup>+</sup>および[AlO(Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]<sup>+</sup>に属することが推測される。

40

【0092】

(実施例5)

マンノースの含有量とそのタンパク質結合能力との半定量的比較

同じ種類のACGスライドに対するプラズマガス処理の最適化を、固定化された糖-タ

50

ンパク質結合の蛍光強度によって評価した。図10は、プラズマ洗浄に使用したガスの種類を選択することによって得た。カソードアーク蒸発によって産生されたACGスライドをアミノシラングラフト化の前に、酸素、アルゴン、または酸素およびアルゴン・プラズマ・ガスの混合物に暴露させた。マンノース誘導体（糖複合体溶液、160mm）の10×10ブロック（100スポット）は、基材表面へマイクロアレイ化された。糖複合体溶液も、特に質量同定のために、これらの各スライド（スポット当り1mL）に手でスポットした。したがって、これらのスライドは、最初に質量分析法によって分析して、次にビオチン化ConA結合、続いてCy3タグ化ストレプトアビジン検出を受けさせた。図10Aa)~d)は、アレイ化されたスライドのタンパク質結合アッセイを示す；図10Cは、基材の蛍光強度対市販のガラススライドの蛍光強度を示す。図5に示す強度差は、基材の物理的特性の絶対効果を示す。図10Cの強度差は、特定の基材の物理的特性および固定化された糖とその結合タンパク質との間の結合部位アーキテクチャの両方の効果から生じた。どちらのデータのセットも、ACGスライド表面のアルゴンプラズマ処理によって、マンノースグラフト化にとって、それゆえマンノース-タンパク質結合にとって最良の基材が産生されたことを指摘している。

10

#### 【0093】

図10Aは、APDME Sグラフト化の前のa)酸素プラズマ(A1-1)、b)アルゴンプラズマ(A1-2)、ならびにc)酸素およびアルゴンプラズマの混合物(A1-3)の処理時の、カソードアーク蒸発によって形成されたACGスライドのタンパク質結合アッセイを示す。d)では、Corning Glass製の市販のNH<sub>2</sub>ガラススライド(#40004)のタンパク質結合アッセイを示す。図10Bは、糖の質量同定のためのMALDI質量スペクトルからのシグナル強度を示す。各物質から観察された最大強度スペクトル(70%フルエンス)を使用して、図10Bのスペクトルを生成した。図10Cは、アレイWorx蛍光分光計によって計算した標準誤差を含めた、a)~d)の蛍光強度を示す。アレイは、糖複合体の同じ水溶液のブロック当り10×10(100)個のスポットを用いて、スライド当り4個のブロックとして作製した。各スライドから最良のブロックのみを選択した(b)~d)に示すように)；蛍光強度計算のために、最良のブロックの中で大きなスポットを除去した。

20

#### 【0094】

固定化されたマンノースの含有量とマンノース-タンパク質結合の能力との半定量的比較を図11および12に示す。2種類の異なるスライド基材、すなわちNH<sub>2</sub>官能化ガラススライドおよびアルミニウムで熱コートした後に、表面アノード酸化処理を行ったAPDME S活性化NH<sub>2</sub>-ACGスライドを、PCLが組み込まれたマンノースを固定化するために使用した。マンノース-ACGスライドは、最初に分子量同定のためのMS分析を、次にマンノース-ガラススライドと共にタンパク質結合評価を受けさせた。図11は、2種類の異なるスライド基材から得たタンパク質結合データを示す。マンノース-ACGスライド(図11b)がガラススライド(図11a)よりも、Cy3の高い蛍光を高い感受性と共に示したことが、明確に示されている。ACGスライドによる蛍光強度を計算して、図12Bに示す。

30

#### 【0095】

図11の蛍光強度の相違は、スライド基材の物理的特性の相違ならびにマンノース-ConAおよびCy3-ストレプトアビジンの結合度の相違によって引き起こされた。この相違は次に、基材表面上でのマンノースのグラフト密度の変動を示唆している。最近の報告により、基材表面上のマンノースの密度が約100離れているときに、ConAとマンノースとの間の相互作用が弱くなり、それゆえ多価相互作用の程度が反映されることが指摘された。

40

#### 【0096】

同じマンノース-ACGスライドのMS分析(図11b)によって、親ピーク(m/z 265)ならびにプロトン(m/z 266)付加体およびリチウム(m/z 272)付加体が見られた。このスライドを分析する際に、それぞれ手でスポットした(段階希釈

50

の) 試料を、測定 1 回当たり 500 ショットで 6 回測定した。標準偏差を含む平均ピーク強度を図 12 A に示し、図ではグラフト化のための溶液の濃度が 15.6 nM まで希釈されたときでも、MS がなお糖を同定できることが明示されている。MS (図 12 A) によって測定したシグナル強度を図 12 B の蛍光強度とさらに比較する。これら 2 つの異なる測定値の下降傾向は似ている。明らかに、固定化された糖の量がそのタンパク質結合能力を反映している。

【0097】

図 11 は、ガラススライドおよび ACG スライドに固定化されたマンノースの蛍光タグ化タンパク質結合アッセイの実施の写真である。NH<sub>2</sub> 官能化ガラススライドは、Corning Glass から購入した (#40004)。ACG スライドを純アルミニウムで熱コートして、次に電気化学的にアノード酸化した。10×6 (60) スポットのブロックでアレイを作製した。糖-HBTU 複合体の溶液 (156 mM) を 100×および 10000×希釈で調製した。各溶液をグラフト化のためのブロック内の 2 個のカラム (20 スポット) にスポットした。基材 a) は、最初の 2 個のカラム (糖複合体の溶液) のみで蛍光を示すが、基材 b) は、6 番目のカラム (糖複合体の開始溶液の 10000×希釈) までシグナルを示す。

10

【0098】

図 12 は、ACG スライドにグラフトした PCL を有するマンノースの ultraflex TOF 質量スペクトルのピーク強度と、熱コーティングと、続いてのスライド表面での電気化学的アノード酸化とによって形成されたマンノース-タンパク質結合 ACG スライドの蛍光強度との比較を示す、実験データの実施のグラフである。マンノース溶液の濃度は、156 mM から 102 (1.56 mM) および 104×希釈 (15.6 nM) まで変化した。図 12 A では、マンノース質量分光付加体の平均ピーク強度が  $m/z$  265.1 [M]<sup>+</sup>、266.1 [M+1]<sup>+</sup>、および 272.1 [M+Li]<sup>+</sup> で得られた。図 12 B では、蛍光タグ化タンパク質-結合アッセイから得た同じマンノース ACG スライド試料の対応する蛍光強度を示す。

20

【0099】

(実施例 6)

炭水化物マイクロアレイでの ACG スライドの有用性

図 13 A に示すように、図 2 に示す合成経路を使用することによって、PCL を有するラクトースも ACG スライドに固定化した。本試料の MS 分析で見られるように (図 13 B)、415 および 451 におけるわずかな酸化アルミニウムのピークから生じる干渉が発生した。しかし、ラクトース誘導体の分子量 ( $m/z$  427) は、プロトン ( $m/z$  428)、ナトリウム ( $m/z$  450)、およびカリウム ( $m/z$  466) イオンとのその付加体によって、なお明らかに同定できる。

30

【0100】

この新たに製造した基材をさらに利用するために、NH<sub>2</sub>-ACG 表面を、DMF およびジイソプロピルエチルアミン中のスベリン酸ジスクシンイミジル (DSS) を用いた処理による、NHS-ACG への変換によって修飾した。ガラススライドを参照として、アミン官能基を有する Globo H 誘導体を NHS-ACG スライド (図 13 C) 上にアレイ化して、VK9 (マウス IgG 抗 Globo H モノクローナル抗体) タンパク質結合評価を受けさせた。図 13 D および 13 E の結果は、ACG スライドが 3 つの試料すべてで最高の蛍光強度を示すことを指摘している。

40

【0101】

図 13 A は、PCL を有するラクトース-ACG スライドを示す。図 13 B は、PCL を有するラクトース-ACG スライドから得た Ultraflex TOF 質量スペクトルを示す。図 13 C は、PCL のない Globo H-ACG スライドを示す。図 13 D は、NHS-ガラススライド、NH<sub>2</sub> 修飾ガラススライド (Corning #40004)、および NHS-ACG スライドに固定化した Globo H の蛍光タグ化タンパク質結合アッセイを示す。最後に図 13 E は、GenePix 4000 蛍光スキャナを用い

50

て図13Dから計算した対応する蛍光強度を示す。

【0102】

(実施例7)

蛍光強度に影響を及ぼす因子 - 基材の特性および表面形態

基材の光学特性は、蛍光強度に明らかに影響を及ぼす。蛍光(Cy3)は、タンパク質結合アッセイで唯一の光源である。ガラスならびに多孔性ケイ素はどちらも、光を異なる程度で通過させて反射する。これに対して、アルミニウムコートガラスは、ガラスが完全に不透明となり、光源から供給される光の「ムダ」を最小限に抑えるように製造することができる。

【0103】

基材の表面形態は、糖を固定化する際のグラフト化密度に影響を及ぼすことがある。NAO表面は、わずが75%の酸化物含有率を示した。これに対して、AAO表面は100%酸化アルミニウムを含有し、それゆえ安定な表面を与えて、アッセイのための最終ライドの安定な固定化密度を生じさせる。

【0104】

基材の安定性は、表面が化学処理される方法によっても影響を及ぼされ得る。一例は架橋アミンを有する表面对アミン官能基の単層を有する表面であり、このどちらもACGスライドを3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)または3-アミノプロピルジメチルエトキシシラン(APDMS)のどちらかで活性化することによって作製した。ACGスライド表面の各種の化学処理は、調査中である。

【0105】

(実施例8)

蛍光強度に影響を及ぼす因子 - 結合部位アーキテクチャ/タンパク質と基材表面上に固定化された糖との間の相互作用

本出願人らの実験条件下では、コンカナバリンAおよびストレプトアビジンはどちらも、その4級構造のテトラマーとして存在する。マンノースのConAに対する寸法の比は、約1:400である(265対104kDaのその分子量に相当する)。幾何的な制約のために、表面でのマンノース結合に利用できる結合部位は、ビオチン化ConAのテトラマー1個当たりわずか2個である。高密度マンノースアレイ表面では、各ConAテトラマーは2個のマンノース分子を結合して、2個のマンノース分子はおそらく、互いにそれほど離れずに表面上にグラフトされるであろう。マンノース誘導体の鎖長が長くなるので、グラフト化密度および固定化された糖-タンパク質結合の量が両方が上昇するときに、グラフトされたマンノースは基材からさらに遠くなり、ランダム度の高い相互作用が生じ得る。さらに、ストレプトアビジン-Cy3複合体のビオチン化ConAへの可撓性の結合が可能となる。同様の幾何的な制約は、Globo H、IgGモノクローナル抗体VK9(マウスから)、およびそのヤギ抗マウスIgGタンパク質についても例証することができる。糖とタンパク質との間の結合部位アーキテクチャは、蛍光タグ化タンパク質の密度に、それゆえ糖-タンパク質結合の蛍光強度に影響を及ぼすことがある。

【0106】

糖の表面固定化を研究する1つの目的は、生物学的実体の細胞表面で起こるリガンド相互作用、たとえば正常および悪性細胞の表面上での糖抗原Globo Hの存在または過剰発現を模倣することである。糖抗原は、細胞表面に過剰に存在するときに、大きな多価炭水化物-タンパク質相互作用を生じさせて、生体に備わっている生物学的機能に多大な影響を与えることがある。本研究は、このような生体系のより正確な定量的測定および比較を提供する。

【0107】

(実施例9)

PTFE様ACGスライドの調製

PTFE様ACGスライドを調製するために、トリエトキシシラン1およびホスホン酸誘導体3を合成して、酸化アルミニウム表面との反応に使用した。シランベースのスライ

10

20

30

40

50

ドの製造には、2ステップの化学反応が含まれる。第1のステップは、化合物1(図14)をグラフト化試薬として使用することによって、酸化アルミニウム表面をアミノ基に官能化することであった。このステップは、副反応を避けるために水分を含まない環境で実施した。第2のステップでは、NH<sub>2</sub>活性化ポリフルオロ炭化水素化合物2(図14)とスライド表面上のアミノ基との間でアミド結合形成が起きた。これに対して、ホスホン酸ベースのPTFE様ACGスライドを1ステップ化学反応で作製した。3の水溶液を洗浄した酸化アルミニウム表面と超音波処理によって反応させると、表面上に共有結合されたパーフルオロホスホナートの単層が形成された。ホスホン酸の共有結合形成は、図28Bに示すように、FTIRおよび接触角によって確認できる。これらの2種類のスライドをバックグラウンド試験のためにMS-TOF分光法で確認すると、どちらもスライドのバックグラウンドの明瞭なベースラインを示した。本出願人らの以前のACGスライドで確認された望ましくないわずかな酸化アルミニウムピークは、本方法では見られなかった(図26および27を参照)。

10

## 【0108】

図28Aに図示するように、純粋化合物3(HDFDPA、3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-ヘプタデカフルオロデシルホスホン酸)のFTIRスペクトルおよびACG表面グラフト化合物3のFTIRスペクトル。図28Bは、ホスホン化ACGスライド表面の水接触角(〜120°)画像を図示する。

20

## 【0109】

図14に示すように、化合物は以下の通りである：アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES、1)；N-スクシンイミジル4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-ヘプタデカフルオロウンデシルカーボネート2；(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-ヘプタデカフルオロデシル)ホスホン酸(HDFDPA、3)、4~10は、マンノース(4)、ラクトース(5)、Gb5(6)、Globo H(7)、セロピオース(8)、セロトリオース(cellobiose)(9)およびセロテトラオース(10)のポリフッ化誘導体である。

30

## 【0110】

(実施例10)

PTFE様ACGスライド上での非共有結合型グリカンアレイの生成

この有望な結果を得て、リン酸ベースのスライドを使用して、図15に概略を示した実験手順のためのグリカンアレイを生成した。図16に示すスキームによって図示されるように、アミノリンカー11を有するマンノースを化合物2と反応させて、ポリフッ化(-C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>)末端4を合成して、モデル化合物として使用した。この糖誘導体の溶液をPTFE様ACGスライド表面上にロボットによってスポットした。インキュベーションの後、スライドを蒸留水で繰り返しすすいで、MS-TOF分析を受けさせた。非常に明瞭な質量スペクトルが得られた。この単層の質量スペクトルによって、それぞれナトリウム付加体およびカリウム付加体の806および822のピークが明らかになる。MS分析の後、Alexa 488標識コンカナバリンAをタンパク質源として用いて、同じスライドをタンパク質結合分析に使用した。この種のグリカンアレイの適用範囲をさらに拡大するために、以前本出願人らの研究室で開始物質として合成した化合物12~14の使用。ポリフッ化Gb5、ならびにラクトース6およびGlobo H7を図16に図示するように合成して、本明細書で開示した方法による質量分析およびタンパク質結合アッセイの両方のために、PTFE様ACGスライド表面上にこれらを固定化した。

40

## 【0111】

さらなるマトリクスを加えない、図17Aに示すデータによって図示された実験の実施で示すように、Globo-Hなどの不安定な糖の使用によっても、シグナルの断片化は見出されなかった。図17Aは、PTFE様ACGスライドにそのナトリウム付加体[M+Na]<sup>+</sup>として固定化されたポリフッ化Globo H7(MW.1604.40)、

50

G b 5 5 ( M W . 1 4 5 8 . 3 9 ) およびラクトース 6 ( M W . 9 3 2 . 2 1 ) の M A L D I 質量分光分析データをそれぞれ 1 6 2 7 . 4 4、1 4 8 1 . 3 9、および 9 5 4 . 3 9 に示す。マトリクスを加えないフルエンス率は 1 2 % である。

【 0 1 1 2 】

図 1 7 B の実験データの実施により、これらのグリカンアレイはその糖 - タンパク質結合パターンを維持した。図 1 7 B は、G l o b o H / V K 9 / 抗 V K 9 - C y 3 のタンパク質結合アッセイである。図 1 7 C は、G b 5 / 抗 S S E A 3 - A 4 8 8 のタンパク質結合アッセイである。マトリクスは、過フッ化 G l o b o H ( 左 4 カラム)、ラクトース ( 5 および 6 番目のカラム、陰性対照として)、および G b 5 ( 右 4 カラム) の 1 0 × 1 0 ( 1 0 0 スポット) アレイであった。

10

【 0 1 1 3 】

この新たな表面に対するレーザーフルエンス率およびマトリクスの効果も調べた。不安定な炭水化物 G l o b o H を一例とすると、M A L D I - M S で使用されるときに G l o b o H はフコース部分が消失することが多い。質量分析法を検出装置として使用することによって、結果を表 1 に示した。マトリクスを加えることなく、非常に低いフルエンス率 ( 9 % ) にて高いシグナル対ノイズ ( S / N ) 比 ( 2 2 ) が観察され、この低いレーザーフルエンス率の下では、シグナルの断片化は見出されなかった。フルエンス率が 1 0 % まで上昇するとき、S / N 比は断片化を伴わずに 4 0 まで向上する。図 1 8 は、マトリクスを加えない各種のレーザーフルエンス条件下で得られた質量分析法データを図示する。

20

【 0 1 1 4 】

図 1 9 は、同じ実験であるが、マトリクスを加えたものを図示する。D H B をマトリクスとして加えて、A C G 表面に対するマトリクスの効果を確認した。フルエンス率が 1 1 % であるとき、S / N はわずか 7 . 3 である。フルエンス率を 1 3 % まで上昇させるためには、S / N は 6 1 % であり、6 % のシグナル断片化を有する。したがって D H B マトリクスは、低いレーザーフルエンス率が使用されるときに、S / N シグナルを上昇させない。しかし、表 1 に示すようにフルエンス率が 2 5 % を超えるとき、D H B マトリクスは、S / N を上昇させて、断片化を減少させる役割を果たすことができる。

【 0 1 1 5 】

【表 1】

マトリクス支援 脱離/イオン化			マトリクスフリー 脱離/イオン化		
フルエンス率	GH S/N	Frag. S/N	フルエンス率	GH S/N	Frag. S/N
11%	7.3	0	9%	22	0
13%	61	6	10%	40	0
14%	157	13	12%	218	5
15%	316	25	16%	275	10
18%	1690	87	18%	375	17
19%	1956	108	19%	741	64
25%	3128	168	25%	2184	356
35%	1445	125	35%	1514	373

表1: マトリクスを加えたまたは加えない、異なるレーザーフルエンス率での Globo HのS/N比(フルエンス:スライド表面に印加したレーザー出力(またはフルエンス率));GH S/N:globo Hのシグナル/ノイズ比;Frag. S/N:globo Hの断片化のピークのシグナル/ノイズ比)

#### (実施例 11) セルラーゼ活性の研究

以前の研究から、PTFE様ACGスライドに固定化したポリフッ化炭水化物は、低いレーザーエネルギーによって容易にイオン化/脱離される。したがって断片化のない高いS/N質量スペクトルが得られ、本開示のデバイスをグリコシダーゼ特異性および活性研究に好適なものとする。

#### 【0116】

固定化されたポリフッ化セロピオース8の酵素加水分解(図14を参照)をインサイチュでホスホン酸スライド表面にて最初の実施した。3つの市販のセルラーゼである、アスペルギルス・ニガー(A. Niger)、トリコデルマ・リーセイ(T. Reesei)、およびトリコデルマ・ビリデ(T. Viride)を酢酸ナトリウム(25mM)緩衝溶液(pH5)によって別々に5U/mLで調製して、Fast Frame反応チャンバを使用して16ウェルに分割されている官能化スライド上に装填した。比較のために、酵素溶液の一定分量(100μL)をエッペンドルフ管内のフッ化セロピオースの溶液(0.5mMの100μL)に添加して、溶液中で酵素加水分解反応を実施した。反応後、これを同じスライドの空のウェルに移した。各ウェルを別々に、脱イオン水で3回すすいで、高真空下でスライドを再度乾燥させてから、MS-TOF分析を受けさせた。

#### 【0117】

MS-TOF分析では、明瞭なバックグラウンドベースラインにより、各試料の加水分解成分のパーセンテージの計算が可能となった。図20のMS-TOFの結果に示すように、加水分解された生成物のパーセンテージを各スペクトルのピーク強度から計算する。図20に示す実験データの実施に従って、図20Aの溶解状態の、および図20BのPTFE様ACGスライドに固定化された、ポリフッ化セロピオースの酵素加水分解のMS-TOFデータ。対照は、(a)にて酵素なしで行った同じ実験条件である; (b)、(c)、および(d)は、A. Niger(b)、T. Reesei(c)、およびT. Viride(d)によるセルラーゼタンパク質を用いた実験条件である。

## 【0118】

これらの結果（図20）は、ACGスライド表面での加水分解の、溶液状態での加水分解に対する割合を示す。A. Niger、T. Reesei、およびT. Virideによるセルラーゼとそれぞれ反応させると、ACGスライド上の100%、69%、および77%の加水分解されていないセロピオースと比較して、溶解状態の加水分解されていないセロピオースは64%、7%、および3%であった（表2）。

## 【0119】

## 【表2】

	トリオース	ピオース	グルコース	F末端
<i>A. Niger</i>	18/0	64/1	18/0	0/0
<i>T. Reesei</i>	0/0	7/69	93/25	0/7
<i>T. Viride</i>	0/0	3/77	58/17	38/6

10

表2:ポリフッ化セロピオース8の酵素加水分解、パーセンテージは、溶解状態の/ACGスライド上の反応の加水分解パターンを示した。

図21Aに示す実験データの実施により、セロトリオース誘導体の加水分解された断片はPTFE様ACGスライド表面上に残存していた。図21Aは、考えられる各種誘導体をその分子量と共に示す。図21Bは、酵素を含まない対照操作の(a)、A. Niger(b)、T. Reesei(c)、およびA. ビリデ(d)によるセルラーゼタンパク質を用いた、ポリフッ化セロトリオースの酵素加水分解の実験MS-TOFデータの実施を示す。

20

## 【0120】

T. Virideによる酵素は、溶解状態のセロピオースに対して最も良好に機能して、スライド上の3つの酵素源の中で、T. Reeseiによる酵素は2糖を最も効果的に加水分解した。溶解状態では、全体の反応によって $1116.3[M+Na]^+$ のm/zのナトリウム付加体として検出されるセロトリオース(MW1093)が8%産生されたので、A. Nigerによる酵素はシテターゼとしても作用すると思われる。A. Nigerによる酵素は、長さ5グルコース単位を一度に切断する、代表的なエンド型セルロースとして特徴づけされた。その酵素はセロピオースもp-ニトロフェニル-D-グルコシドも加水分解しなかった。作用機序をさらに理解するために、ポリフッ化(-C<sub>6</sub>F<sub>17</sub>)セロトリオース9(図14)に溶解状態で酵素加水分解を受けさせた。

30

## 【0121】

同じ分析手順を使用すると、結果(図21B)によって、3つの異なる種による酵素の中でT. Reeseiによる酵素が、セロトリオース基質を最も効率的に加水分解することが指摘された。A. Nigerでは、図20および図21に示した結果によって、この酵素がセロピオースまたはセロトリオースの加水分解で十分に機能しないことが指摘された。しかし溶解状態では、酵素は、ポリフッ化セロピオース8、および1グルコース単位を有するセロトリオース9を一度に、非常に低い反応速度で加水分解した。この市販の酵素は純粋でないため、この現象は、混合物中の少量の-D-グリコシダーゼの汚染によるものであり得る。

40

## 【0122】

T. Virideによるセルラーゼは、新聞材料を効果的に分解することができ、T. Reeseiはセルロースの結晶形を加水分解することができる。図20のデータによって指摘されるように、一般にACGスライド表面上での酵素加水分解は、溶解状態の酵素加水分解よりも部位特異的であるが、はるかに低速である。

## 【0123】

## (実施例12)

セルラーゼ特異性の研究およびグリカンアレイを質量分析法と併用することによるセルラーゼの種類定義

セルラーゼは通常、その機能に基づいて複数のサブクラスのアイソザイムに分類される

50

：セロビオースを個別のグルコース分子に切断する 1, 4 -  $\alpha$ -グルコシダーゼ [ E C 3 . 2 . 1 . 7 4 ]、セルロース鎖の末端からセロビオース単位を切断する、エキソグルカナーゼ ( 1, 4 -  $\beta$ -D-グルカンセロビオヒドロラーゼ [ E C 3 . 2 . 1 . 9 1 ] )、および鎖を内部位置でランダムに切断して、エキソグルカナーゼの新たな末端を生成する、エンドグルカナーゼ ( 1, 4 -  $\beta$ -D-グルカングルカノヒドロラーゼ [ E C 3 . 2 . 1 . 6 ] )。M U F - グルコシドの加水分解の生成物の H P L C 分析は、これらの精製された酵素の加水分解特異性を決定するために使用されることが多い。上の結果から、本開示のデバイスおよび方法は、多様な種類のセルラーゼの特異性を研究するための別のプラットフォームとなる。

#### 【 0 1 2 4 】

検証するために、わずかに変更を加えた、文献で周知の方法に従って、エキソグルカナーゼ ( L 3 ) およびエンドグルカナーゼ ( 4 4 A ) を調製した。最初に、基質 8、9 および 1 0 を使用して、精製した酵素による酵素加水分解反応を溶解状態で行った。反応の完了時に、溶解混合物を P T F E 様 A C G スライドに移し、M S - T O F アッセイを受けさせる前に以前と同じ洗浄手順を使用することによって調製した。

#### 【 0 1 2 5 】

図 2 2 は、溶解状態のポリフッ化セロビオース ( A )、ポリフッ化セロトリオース ( B ) およびポリフッ化セロテトラオース ( C ) の酵素加水分解の M S - T O F データを示す。各炭水化物に対して、特異的酵素を添加した：( a ) は酵素を含まない対照操作であり、( b ) はエキソグルカナーゼ L 3 であり、( c ) はエンドグルカナーゼ 4 4 A である。図 2 3 は、A C G ガラススライド上のポリフッ化セロビオース ( A )、ポリフッ化セロトリオース ( B ) およびポリフッ化セロテトラオース ( C ) の酵素加水分解の M S - T O F データを示す。各炭水化物に対して、特異的酵素を添加した：( a ) は酵素を含まない対照操作であり、( b ) はエキソグルカナーゼ L 3 であり、( c ) はエンドグルカナーゼ 4 4 A である。

#### 【 0 1 2 6 】

図 2 2 に示す実験データの実施により、エキソグルカナーゼ L 3 は、エキソグルカナーゼの定義と一致して、基質 8 の末端からセロビオース単位を低速で切断し、化合物 9 または 1 0 が基質であるときにはセロビオースを急速に切断する。エンドグルカナーゼ 4 4 A は、セロビオース基質 8 またはセロトリオース基質 9 を受容することはできないが、セロテトラオース基質 1 0 の 3 糖または 4 糖単位を切断する。

#### 【 0 1 2 7 】

比較のために、そして図 2 3 に示した実施によって図示されるように、基質 8、9、および 1 0 を P T F E 様 A C G 表面上に固定化して、セルラーゼ加水分解を表面上で直接行い、同じ洗浄手順の後に、これらのスライドに M S - T O F アッセイを受けさせた。図 2 0 B に示すように、エキソグルカナーゼ L 3 は、2 4 時間のインキュベーションの後にセロビオース基質 8 の一部のみを切断して、基質が化合物 9 または 1 0 であるときにはセロビオースを急速に切断した。エンドグルカナーゼ 4 4 A は、化合物 8 または 9 を基質として受容できない。しかしエンドグルカナーゼは、基質が化合物 1 0 であるときに、セロテトラオースを急速に切断する。溶解状態での加水分解反応操作とは対照的に、エンドグルカナーゼ 4 4 A はセロテトラオースを一度に切断して、セロテトラオース 1 0 が基質であるときにはセロトリオースを切断しなかった。上の結果から、セロテトラオース基質 1 0 は、行った実験で P T F E 様 A C G 表面上にアレイを生成するのに最良の炭水化物であった。このアレイを使用することによって、未知のセルラーゼの活性および特異性が検査され得る。

#### 【 0 1 2 8 】

##### ( 実施例 1 3 )

P T F E 様 A C G スライド上での共有結合型グリカンアレイの生成

グリカンアレイのための複数の官能化ガラススライド、たとえば：アミン、カルボキシル、N - ヒドロキシスクシンイミド ( N H S )、アビジン、エポキシ、アルデヒド、

10

20

30

40

50

キレート化ニッケル基などでコートしたガラススライドが市販されている。これらの表面上にグリカンアレイを生成するとき、好適な緩衝剤ならびに反復される遮断および洗浄ステップが必要である。実施により、ホスホン酸官能基を有する基質はACGスライド上でのキレート化が容易であり、反復される洗浄ステップに耐えることができる。したがって、有効なグリカンアレイ調製のための新規方法が本明細書で開示される。

#### 【0129】

ホスホン酸化合物21を有するマンノースは、図24に図示したスキームによって合成された。市販の化合物15は、TBDPS基によって保護されて、次にアルブソフ反応を使用することによって、臭素がホスホン酸塩に変化した。脱シリル化の後、次のグリコシル化反応のための化合物18が得られた。BF<sub>3</sub>・OEt<sub>2</sub>をプロモータとして使用する

10

#### 【0130】

化合物21をメタノールに溶解させた。この糖誘導体の溶液をPTFE様ACGスライド表面上にロボットによってスポットした。インキュベーションの後に、遮断せずに、スライドを蒸留水で反復してすすぎ、Alexa 488標識コンカナバリンAをタンパク質源として使用することによって、タンパク質結合分析に使用した。各種のインキュベーション時間を評価して、糖誘導体がACGスライド上にキレートするには15分で十分であることを判断した。各種濃度の化合物21をACGスライド上にスポットすると、結果は図25に図示するように、ACGスライドはNHSコートガラススライドに匹敵していた。

20

#### 【0131】

(実施例14)

物質および方法

すべての化学薬品および無水溶媒は、販売元から購入して、さらに精製せずに使用した。グリコシル化のためのモレキュラーシーブ(MS)はAW-300(Aldrich)であった。FluoroFlash(登録商標)SPEカートリッジは、Sigmaより購入した。反応は、EMシリカゲル60 F254プレートによる分析用薄層クロマトグラフィー(TLC)を用いて監視して、UV(254nm)の下でおよび/またはKMnO<sub>4</sub>もしくはp-アニスアルデヒドで染色することによって描出した。<sup>1</sup>H NMRスペクトルは、Bruker ULTRASHIELD-600 PLUS(600MHz)分光計で298Kにて記録した。化学シフト(ppmでの)は、CDCl<sub>3</sub>(=7.24 ppm)の内部標準シグナルに従って割り当てた。<sup>13</sup>C NMRスペクトルは、Bruker ULTRASHIELD-600 PLUS分光計を用いて得て、CDCl<sub>3</sub>(=77.00 ppm)によって校正した。カップリング定数(J)は、ヘルツ(Hz)で報告する。分裂パターンは、以下の省略形を使用することによって説明する：s、1重線；brs、幅広1重線、2重線；t、3重線；m、多重線。

30

#### 【0132】

基材物質

マイクロガラススライド(75.5×25.4×1mm<sup>3</sup>)を濃H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>および30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(70:30 v/v)の混合物であるピラニア溶液中で、120℃にて30分間洗浄して、大量の脱イオン水によってpH7まですすぎ、高品質の窒素ガスによってパージ乾燥させた。高純度アルミニウムターゲット(純度99.999%)は、Summit-Tech Resource Corp.(Hsin-Chu, Taiwan)から入手した。これらの原料は、マグネトロンスパッタリング、カソードアーク蒸発、および熱蒸発などの各種のコートング技法によるACCスライドの製造のために、ベンダーのCheng-Jen Corp.(Kao-Hsiung, Taiwan)およびYuja-Y-Tech Corp.(Chin-Ju, Taiwan)に提供された。製造されたACGスライドは、直接使用するか、または20Vの直流電流(Keithley 24

40

50

00 Model)で48にて、0.3Mシュウ酸水溶液中で60~90秒間、アノード酸化するかのどちらかであった。製造したACGスライドの表面特性を図1に示す。表面を金でスパッタリングして、SEM(FEI XL30 SFE G, FEI Company)によって検査した。アルミニウムコーティングの表面あらさおよび厚さをAFM(Dimension 3100 Veeco Instruments, Inc.)によって測定した。これらのスライドの表面組成は、超高真空( $1 \times 10^{-10}$  Torr)下で単色Al X線(1486.6 eV)源を備えたOmicron ESCA分光計を使用することによって、XPSで分析した。すべてのスペクトルを284.5 eVの炭素1sスペクトルおよび532 eVの酸素1sスペクトルによって校正した。

#### 【0133】

##### NH<sub>2</sub>-ACGスライドの製造

ACGスライドは、アセトンおよび水を連続的に用いてマルチシェーカー(FMS 2 FINE PCR)で2~3分間洗浄して、高純度窒素ガスによってパージ乾燥させ、100の乾燥器で10~15分間さらに乾燥させた。表面活性化は、プラズマクリーナー(Harrick PDC 32G, 200~600 mTorr)によって酸素、アルゴン、または混合ガスを用いて室温にて10分間行った。プラズマ処理の直後に、APDMES(0.8 mL)を表面上に(バルクで)均一に配置して、密閉したペトリ皿で覆い、ホットプレート上で直接、658にて40分から1時間加熱した。反応が完了したときに、試料スライドを完全にすすぎ、メタノール中で3分間超音波処理して(出力20%)、高純度窒素ガスによってパージ乾燥させた。アミノシラングラフト基材を有する表面を、マンノース誘導体化合物27およびHBTUを用いたインサイチューでのアミド結合形成に使用した。市販のNH<sub>2</sub>ガラススライド(#40004, Corning Inc. 製)をタンパク質結合の比較のために使用した。

#### 【0134】

##### NHS-ACGスライドの製造

熱蒸発によってコートしたACGスライドを0.2Mシュウ酸中で90秒間アノード酸化して、脱イオン水ですすぎ、通常通りアルゴンプラズマで活性化した。汚染物質を一切含まない状態で、スライドは、設計されたPTFE密閉熱伝達型反応セル内で組み立てられて、セルにAPTES(1 mL, バルク)をただちに添加した。PTFEセルをガラス板で覆った。水分を含まない条件下で、セルを658にて30分間加熱して、塩化メチレンおよびメタノールによって完全にすすいだ。次にスライドを窒素ガスによってパージ乾燥させた。事前に、DSS(0.5 g; CAS #68528-80-30)のDMF(4 mL)およびジイソプロピルエチルアミン(220 mL)による飽和溶液を調製した。この飽和溶液の一部(1.33 mL)を各反応セルに添加した。NHS-ACGスライドを、室温にて絶えず渦動させながら3時間以内に形成した。スライドを酢酸エチルで完全にすすいで、高品質窒素ガスによってパージ乾燥させた。PTFEセルを乾燥させて分解した後に、Globe H-NH<sub>2</sub>マイクロアレイのためのスライドの準備が整っていた。

#### 【0135】

##### ACGスライドの調製 - シランベースPTFE様ACGスライドの製造

水分を含まない条件下で、アルゴンプラズマ活性化ACGスライドをバルクの3-アミノプロピルトリエチルシランと65にて30分間反応させて、次に塩化メチレンで完全に洗浄し、大気条件下で窒素ガスによって乾燥させた。シラン化ACGスライドをN-スクシンイミジル(succinimidyl)3-パーフルオロオクチルプロピオネート(0.05 wt%)溶液の溶媒混合物(DMF/IPA/DIPEA 12/6/1体積比)に、室温にて2時間浸漬した。反応後、スライドをIPAで完全にすすいで、窒素ガスによってパージ乾燥させた。スライド製造の完了について、水接触角(115°)測定を迅速に確認した。

#### 【0136】

##### ACGスライドの調製 - ホスホン酸ベースPTFE様ACGスライドの製造

アルミニウム・コート・ガラススライドをアセトンおよび水で3回洗浄して、次に乾燥した清浄空気によって乾燥させた。次に清浄なスライドを酸素プラズマ (Harrick plasma, PDC-32G) によって15分間活性化および洗浄した。活性化の後、スライドを3, 3, 4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 10-ヘプタデカフルオロデシルホスホン酸 (HDFDPA) 3溶液 (1M、H<sub>2</sub>O中65% 2-プロパノール、pH = 6.17) にただちに浸漬した。溶液を弱い超音波処理 (50W) によって15分間振動させた。超音波処理の後、スライドを溶液から取り出し、次に別の純2-プロパノール溶液中に15分間浸漬した。スライド表面上の過剰なホスホン酸の除去を促進するために、溶液も超音波処理した。スライドを乾燥窒素および減圧によって乾燥させた。反応の完了時に、スライドをIPAで完全にすすいで、窒素パージ乾燥させた。スライド製造の完了に関して、水接触角 (115°) 測定を迅速に確認した。

10

## 【0137】

## 基準対照 NHS - ガラススライド

NHS - ガラススライド (SCHOTT製、North America) を直接使用した。NH<sub>2</sub> ガラススライド (#40004、Corning, Inc. 製) は、NHS - ACGスライドと同じ調製方法を使用して修飾した。スライドは、設計されたPTFE密閉熱伝達型反応セル内で組み立てられた。飽和DSS溶液の一部 (1.33mL) をNH<sub>2</sub> - ガラス表面との反応のために添加した。室温にて3時間絶えず渦動させた後、スライドを酢酸エチルで完全にすすぎ、高品質窒素ガスによってパージ乾燥させた。PTFEセルを乾燥させて分解した後に、Globo H - NH<sub>2</sub> マイクロアレイのためのスライドの準備が整っていた。

20

## 【0138】

## 化学物質

6の合成で使用したすべての化学薬品は、Aldrichまたは指定の個々の化学薬品会社から購入して、さらに精製せずに使用した。

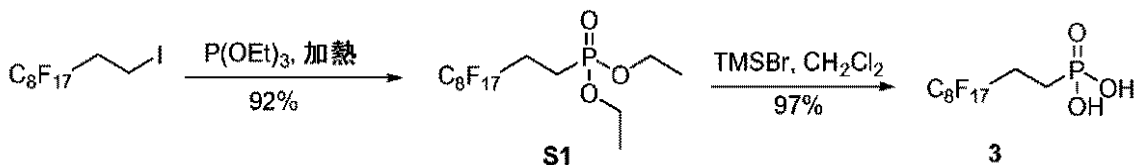
## 【0139】

## 合成

## 【0140】

## 【化2】

30



## 3の調製

ジエチル3, 3, 4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 10-ヘプタデカフルオロデシルホスホナート (S1) : 1, 1, 1, 2, 2, 3, 3, 4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8-ヘプタデカフルオロ-10-ヨードデカン (1.02g、1.78mmol) およびP(OEt)<sub>3</sub> (15mL、過剰) を50mL丸底フラスコに添加した。混合物を窒素下で120℃まで40時間加熱して、次にFluoroflash (登録商標) SPEカートリッジによって精製した。残存する淡黄色油を酢酸エチル/ヘキサンを用いてクロマトグラフにかけて生成物を得た (0.96g、92%)。<sup>1</sup>H NMR (600MHz, CDCl<sub>3</sub>): (ppm) 4.10-4.00(m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.35-2.23 (m, 2H, C H<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>), 1.92-1.86 (m, 2H, PCH<sub>2</sub>), 1.25 (t, J = 7.2 Hz, 6H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)。 <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): (ppm) 121-106 (m, C-Fカップリングは未解析), 62.28 (d, <sup>2</sup>J<sub>Cp</sub>=6Hz, CH<sub>2</sub>C H<sub>3</sub>), 25.33 (t, <sup>2</sup>J<sub>Cp</sub>=23 Hz, CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>), 17.24 (d, <sup>2</sup>J<sub>Cp</sub>=148Hz, PCH<sub>2</sub>), 16.38, <sup>3</sup>J<sub>Cp</sub>=6 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)。 HRMS C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>F<sub>17</sub>O<sub>3</sub>Pの計算値: [M+H]<sup>+</sup>、585.0487; 実測値: 585.0433

40

3, 3, 4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 10-ヘブ

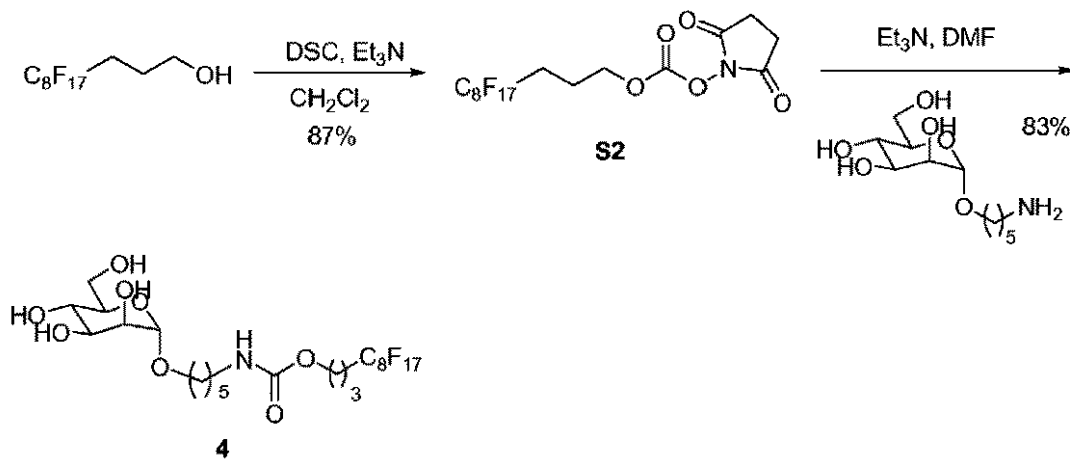
50

タデカフルオロデシルホスホン酸(3) : プロトトリメチルシラン(0.74 mL、5.75 mmol)を注射器によって、S1(1.12 g、1.92 mmol)の無水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(15 mL)による溶液に窒素下で添加した。混合物を30時間攪拌した。揮発物を真空下で完全に除去して、白色粉末を得た。白色粉末はさらに精製せずに、次の実験で直接使用することができる(0.99 g、97%)。<sup>1</sup>H NMR (600MHz, MeOD): (ppm) 2.48-2.42(m, 2H, CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>), 1.99-1.96 (m, 2H, PCH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>CNMR (150 MHz, MeOD): (ppm) 121-106 (m, C-Fカップリングは未解析), 25.55 (t, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub>=23Hz, CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>), 18.26 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-P</sub>=143 Hz, PCH<sub>2</sub>). HRMS C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>F<sub>17</sub>O<sub>3</sub>Pの計算値: [M-H]<sup>-</sup>、526.9699; 実測値: 526.9669

【0141】

【化3】

10



20

#### ポリフッ化マンノース4の調製

2,5-ジオキソピロリジン-1-イル4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-ヘプタデカフルオロ-ウンデシルカーボネート(S2) : 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-ヘプタデカフルオロウンデカン-1-オール(214 mg、0.45 mmol)およびDSC(184 mg、0.72 mmol)のアセトニトリルによる攪拌溶液に、0

30

のトリエチルアミン(0.5 mL、3.60 mmol)を窒素下で添加して、次に溶液を室温までゆっくり加温して、16時間攪拌した。反応物をH<sub>2</sub>Oで3回洗浄した。有機層をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥させて、濾過して、減圧下で濃縮した。生成物をフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、白色固体を得た(242 mg、87%)。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): (ppm) 4.40 (t, 2H, J=6.3 Hz, CH<sub>2</sub>O), 2.83 (s, 4H), 2.27-2.18 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F), 2.10-2.05 (m, 2H, FCH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>CNMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): (ppm) 168.73 (NCO), 151.65 (OCO), 121-106(m, C-Fカップリングは未解析), 69.87 (OCH<sub>2</sub>), 25.66 (FCH<sub>2</sub>), 20.12(FCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)

[ (4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-ノナデカフルオロドデコキシカルボニル-アミノ)ペンチル ] - D-マンノピラノシド(4) : S2(250 mg、0.40 mmol)および5-アミノペンチル-D-マンノピラノシド(112 mg、0.39 mmol)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>による攪拌溶液に、0

40

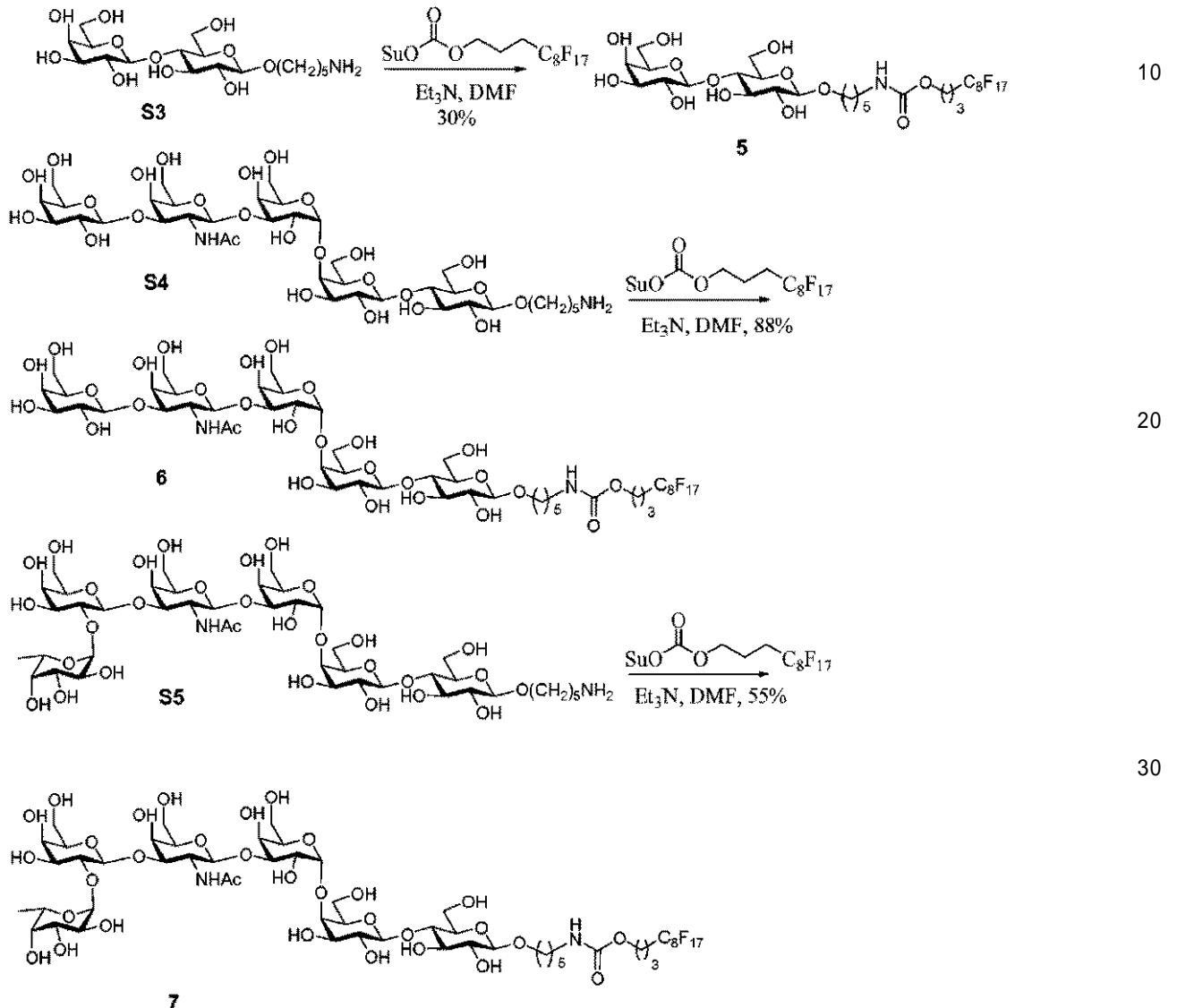
のトリエチルアミン(0.2 mL)を窒素下で添加して、次に氷浴を取り外した。反応物を室温まで加温して、一晚攪拌した。溶媒を真空中で除去して、生成物をFluoroflash(登録商標)SPEカートリッジおよびフラッシュクロマトグラフィーによって精製して、白色固体を得た(253 mg、83%)。<sup>1</sup>H NMR (600MHz, CDCl<sub>3</sub>): (ppm) 7.97 (s, 1H, NH), 4.72 (d, J=1.6 Hz, 1H, Manの1-H), 4.10 (t, J=6.2 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 3.82-3.80 (m, 1H), 3.77-3.76 (m, 1H), 3.73-3.70 (m, 2H), 3.69-3.66 (m, 1H), 3.59 (t, J=9.6 Hz, 1H), 3.52-3.49 (m, 1H), 3.42-3.38 (m, 1H), 3.08 (t, J=7.1 Hz, 1H, O-CH<sub>2</sub>), 2.32-2.23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F), 1.94-1.89 (m, 2H, FCH<sub>2</sub>),

50

1.63-1.54 (m, 2H), 1.51-1.46 (m, 2H), 1.42-1.32 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): (ppm) 157.44 (NCO), 120-105 (m, C-Fカップリングは未解析), 100.12 (Manの1-C), 73.19, 71.25, 70.87, 67.22, 67.04, 62.80, 61.51, 40.27 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ), 29.41, 19.10, 26.20, 25.63, 24.86, 20.07. HRMS  $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{F}_{17}\text{NO}_8$  の計算値: [M + Na]<sup>+</sup>, 806.1598; 実測値: 806.1643.

【0142】

【化4】



ポリフッ化5、6、および7の合成。

[(4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 11, 11, 12, 12, 12-ノナデカフルオロドデコキシカルボニル-アミノ)ペンチル] - D-ラクチド(5): S3 (44 mg, 0.10 mmol) および S2 (76 mg, 0.12 mmol) の DMF (5 mL) による溶液に 0 の Et<sub>3</sub>N (28 μL, 0.20 mmol) を添加した。室温にて一晩攪拌した後、反応混合物を真空中で濃縮して、カラムクロマトグラフィーおよび FluoroFlash (登録商標) SPE カートリッジによって精製して、5 を白色泡状固体 (29 mg, 30%) として得た。R<sub>f</sub>: 0.68 (EtOAc: MeOH = 5:1)。 $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, MeOD): 4.36 (d, J=7.6 Hz, 1H), 4.27 (d, J=7.8 Hz, 1H), 4.15 (bt, 1H), 4.10 (t, J=6.0 Hz, 2H), 3.90-3.40 (m, 12H), 3.39 (m, 1H), 3.25 (t, J=8.1 Hz, 1H), 3.09 (t, J=6.9 Hz, 2H), 2.31-2.26 (m, 2H), 1.93-1.90 (m, 2H), 1.64-1.62 (m, 2H), 1.52-1.49 (m, 2H), 1.42-1.40 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, MeOD): 157.53, 120.62-110.33 (m, C-Fカップリングは未解析), 103.79,

102.93, 79.38, 75.79, 75.16, 75.13, 73.52, 73.46, 71.26, 69.38, 69.00, 62.90, 61.19, 60.62, 40.36, 29.29, 29.05, 27.33 (t), 22.96, 20.18. MS (ESI)  $C_{29}H_{38}F_{17}NO_{13}Na^+$  の計算値: 954.1970 [M+Na]<sup>+</sup>; 実測値: 954.1964。

【0143】

[(4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 11, 11, 12, 12, 12 - ノナデカフルオロドデコキシカルボニル - アミノ) ペンチル] - D - ガラクトピラノシル - (1 3) - 2 - アセトアミド - 2 - デオキシ - D - ガラクトピラノシル - (1 3) - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - D - グルコ - ピラノシド (6): 化合物 6 を化合物 S 4 から、5 について説明した手順に従って調製して、カラムクロマトグラフィーおよび FluoroFlash (登録商標) SPE カートリッジによる精製の後の収率は 55% であった。R<sub>f</sub>: 0.18 (EtOAc:MeOH = 1:1)。白色泡状固体。<sup>1</sup>H NMR (60 MHz, MeOD): 4.72 (d, J=8.4 Hz, 1H), 4.44 (d, J=7.0 Hz, 1H), 4.37 (d, J=7.4 Hz, 1H), 4.31 (d, J=7.7 Hz, 1H), 4.29 (m, 1H), 4.19 (d, J=2.1 Hz, 1H), 4.13 (t, d, J=6.0 Hz, 2H), 4.09 (m, 1H), 4.01 (bs, 1H), 3.95-3.67 (m, 20H), 3.60-3.42 (m, 11H), 3.26 (t, J=8.6 Hz, 1H), 3.12 (t, J=7.0 Hz, 2H), 2.34-2.26 (m, 2H), 2.01 (s, 3H), 1.98-1.91 (m, 2H), 1.69-1.64 (m, 2H), 1.55-1.52 (m, 2H), 1.46-1.43 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, MeOD): 173.69, 157.44, 120.11-108.43 (m, C-F カップリングは未解析), 105.22, 104.06, 102.91, 102.80, 101.38, 80.11, 79.83, 79.34, 78.55, 75.38, 75.11, 75.05, 74.97, 74.94, 73.46, 73.24, 73.17, 71.17, 71.07, 71.00, 69.31, 69.21, 68.87, 68.14, 68.07, 62.81, 61.21, 60.50, 60.16, 51.98, 40.26, 29.22, 28.97, 22.87, 21.95, 20.08, 19.47. MS (MALDI)  $C_{49}H_{71}F_{17}N_2O_{28}Na^+$  の計算値: 1481.382 [M+Na]<sup>+</sup>; 実測値: 1481.452。

10

20

【0144】

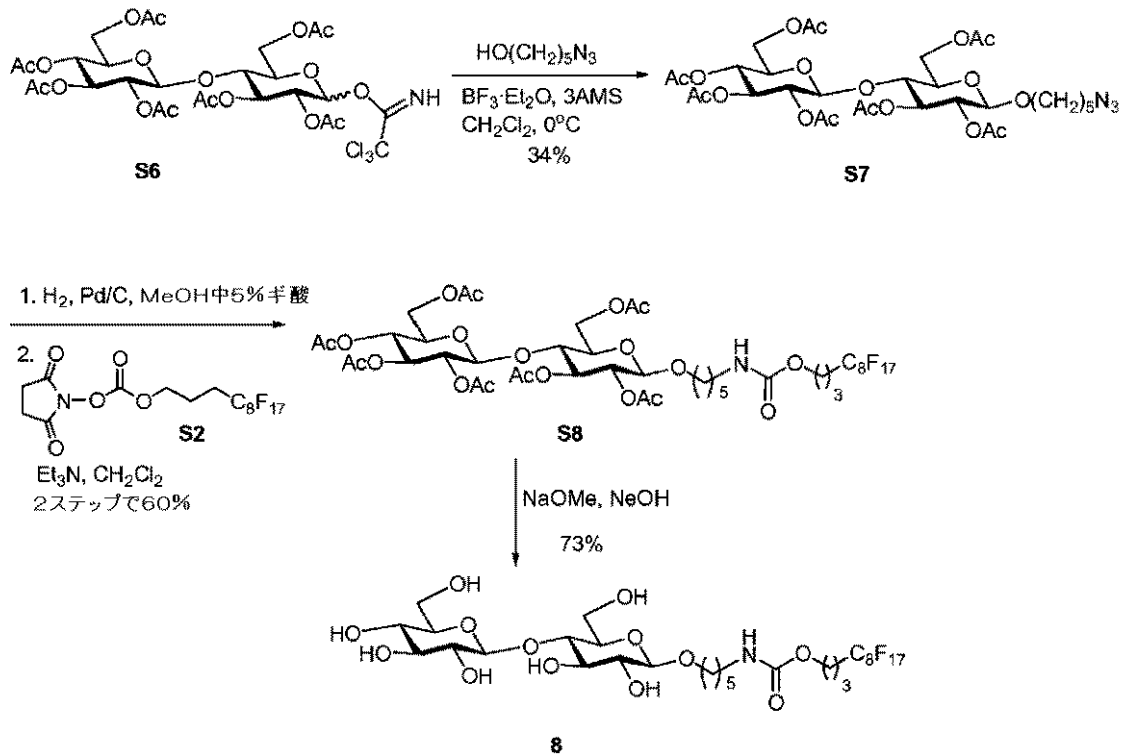
[(4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 11, 11, 12, 12, 12 - ノナデカフルオロドデコキシカルボニル - アミノ) ペンチル] - L - フコピラノシル - (1 2) - D - ガラクトピラノシル - (1 3) - 2 - アセトアミド - 2 - デオキシ - D - ガラクトピラノシル - (1 3) - D - ガラクトピラノシル - (1 4) - D - ガラクト - ピラノシル - (1 4) - D - グルコピラノシド (7): 化合物 7 を化合物 S 5 から、5 について説明した手順に従って調製して、カラムクロマトグラフィーおよび FluoroFlash (登録商標) SPE カートリッジによる精製の後の収率は 88% であった。R<sub>f</sub>: 0.18 (EtOAc:MeOH = 1:1)。白色泡状固体。<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, MeOD): 5.26 (d, J=3.8 Hz, 1H), 4.96 (d, J=3.8 Hz, 1H), 4.58 (d, J=7.9 Hz, 1H), 4.44 (d, J=7.0 Hz, 1H), 4.30 (d, J=7.6 Hz, 1H), 4.29 (m, 1H), 4.17-4.10 (m, 5H), 4.01 (bs, 1H), 3.93-3.69 (m, 24H), 3.68-3.53 (m, 8H), 3.44-3.41 (m, 1H), 3.26 (t, J=8.6 Hz, 1H), 3.12 (t, J=7.0 Hz, 2H), 2.32-2.28 (m, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.97-1.93 (m, 2H), 1.69-1.64 (m, 2H), 1.56-1.52 (m, 2H), 1.47-1.42 (m, 2H), 1.27 (d, J=6.5 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, MeOD): 173.17, 157.55, 104.20, 104.07, 102.93, 102.59, 101.54, 99.78, 80.05, 79.26, 78.81, 77.83, 76.82, 75.50, 75.21, 75.09, 74.23, 73.56, 73.41, 72.25, 71.33, 71.22, 70.25, 69.41, 69.32, 69.09, 68.37, 68.33, 66.83, 62.91, 61.31, 61.26, 60.65, 60.25, 51.82, 40.37, 29.32, 29.07, 22.97, 22.18, 20.19, 15.40. MS (MALDI)  $C_{55}H_{81}F_{17}N_2O_{32}Na^+$  の計算値: 1627.440 [M+Na]<sup>+</sup>; 実測値: 1627.526。

30

40

【0145】

## 【化5】



10

20

## ポリフルオロ-セロビオシド8の合成。

5 - アジドペンチル 2 , 3 , 6 , 2 , 3 , 4 , 6 ' - ヘプタ - O - アセチル - - D - セロビオシド

( S 7 ) : 化合物 S 6 ( 1 . 0 1 g 、 1 . 2 9 m m o l ) 、 5 - アジド - 1 - ペンタノール ( 0 . 8 4 g 、 6 . 4 7 m m o l ) 、 および 3 モレキュラーシーブの  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( 1 0 m L ) による懸濁物を室温にて 1 時間攪拌した。反応混合物を 0 まで冷却して、 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  ( 3 3  $\mu\text{L}$  、 0 . 2 6 m m o l ) を滴加して処理した。0 にて 2 時間攪拌した後、 $\text{NaHCO}_3$  飽和水溶液を添加して、反応混合物をセライトで濾過した。混合物を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で希釈して、次に塩水で洗浄した。有機相を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させ、溶媒を蒸発させて、クロマトグラフィー (ヘキサン :  $\text{EtOAc}$  = 3 : 1 2 : 1 1 : 1 ) によって精製して、S 7 を白色泡状固体 ( 3 3 0 m g 、 3 4 % ) として得た。  $R_f$  : 0 . 4 8 (ヘキサン :  $\text{EtOAc}$  = 1 : 1 ) 。  $^1\text{H NMR}$  ( 6 0 0 M H z ,  $\text{CDCl}_3$  ) : 5 . 1 6 ( t , J = 9 . 4 H z , 1 H ) , 5 . 1 3 ( t , J = 9 . 4 H z , 1 H ) , 5 . 0 4 ( t , J = 9 . 7 H z , 1 H ) , 4 . 9 1 - 4 . 8 5 ( m , 2 H ) , 4 . 5 0 - 4 . 4 7 ( m , 2 H ) , 4 . 4 2 ( d , J = 8 . 2 H z , 1 H ) , 4 . 3 4 ( d d , J = 1 2 . 5 , 4 . 3 H z , 1 H ) , 4 . 0 6 ( d d , J = 1 2 . 0 , 4 . 7 H z , 1 H ) , 4 . 0 1 ( d d , J = 1 2 . 3 , 1 . 9 H z , 1 H ) , 3 . 8 1 ( m , 1 H ) , 3 . 7 4 ( t , J = 9 . 5 H z , 1 H ) , 3 . 6 4 - 3 . 6 2 ( m , 1 H ) , 3 . 5 6 ( m , 1 H ) , 3 . 4 3 ( m , 1 H ) , 3 . 2 3 ( t , J = 6 . 8 H z , 2 H ) , 2 . 1 0 ( s , 3 H ) , 2 . 0 6 ( s , 3 H ) , 2 . 0 1 ( s , 3 H ) , 2 . 0 0 ( s , 3 H ) , 1 . 9 9 ( s , 3 H ) , 1 . 9 8 ( s , 3 H ) , 1 . 9 6 ( s , 3 H ) , 1 . 5 9 - 1 . 5 4 ( m , 4 H ) , 1 . 4 0 - 1 . 3 5 ( m , 2 H ) 。  $^{13}\text{C NMR}$  ( 1 5 0 M H z ,  $\text{CDCl}_3$  ) : 1 7 0 . 5 4 , 1 7 0 . 3 4 , 1 7 0 . 2 6 , 1 6 9 . 8 6 , 1 6 9 . 6 0 , 1 6 9 . 3 4 , 1 6 9 . 0 8 , 1 0 0 . 8 1 , 1 0 0 . 6 4 , 7 6 . 5 1 , 7 2 . 9 4 , 7 2 . 6 7 , 7 2 . 4 9 , 7 1 . 9 6 , 7 1 . 6 1 , 7 1 . 5 6 , 6 9 . 7 3 , 6 7 . 7 6 , 6 1 . 8 4 , 6 1 . 5 4 , 5 1 . 3 3 , 2 8 . 9 4 , 2 8 . 5 2 , 2 3 . 1 4 , 2 1 . 0 8 , 2 0 . 9 0 , 2 0 . 6 9 , 2 0 . 5 7 . H R M S ( E S I )  $\text{C}_{31}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_8$   $\text{Na}^+$  の計算値 : 7 7 0 . 2 5 9 0 [  $\text{M} + \text{Na}$  ]  $^+$  ; 実測値 : 7 7 0 . 2 5 7 0 。

30

40

## 【 0 1 4 6 】

[ ( 4 , 4 , 5 , 5 , 6 , 6 , 7 , 7 , 8 , 8 , 9 , 9 , 1 0 , 1 0 , 1 1 , 1 1 , 1 2 , 1 2 , 1 2 - ノナデカフルオロドデコキシカルボニル - アミノ ) ペンチル ] 2 , 3 , 6 , 2 , 3 , 4 , 6 ' - ヘプタ - O - アセチル - - D - セロビオシド ( S 8 ) : S 7 ( 5 0 m g , 0 . 0 7 m m o l ) 、 触媒量の Pd / C の MeOH の 5 % ギ酸 ( 5 m L ) による懸濁物を  $\text{H}_2$  バルーン下で 2 時間攪拌した。セライトによる濾過の後、濾過ケーキを M

50

eOHで洗浄した。濾液を蒸発させて、トルエンと共蒸発させた。残留物は精製せずに次のステップで使用した。

【0147】

上述の残留物をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL)に溶解させて、次に化合物S2 (50 mg、0.08 mmol)を添加した。混合物を0℃まで冷却した。トリエチルアミン (19 μL、0.13 mmol)を添加して、溶液の攪拌を室温にて12時間続けた。反応混合物を濃縮して、クロマトグラフィー (ヘキサン : EtOAc = 1 : 1) によって精製して、S8を白色泡状固体 (49 mg、2ステップで60%) として得た。<sup>1</sup>H NMR (600MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5.14 (t, J=9.5 Hz, 1H), 5.11 (t, J=9.5 Hz, 1H), 5.03 (t, J=, 9.5 Hz, 1H), 4.91-4.84 (m, 2H), 4.76 (br, 1H), 4.50 (dd, J=12.0, 1.7 Hz, 1H), 4.48 (d, J=7.9 Hz, 1H), 4.40 (d, J=8.0 Hz, 1H), 4.34 (dd, J=12.5, 4.3 Hz, 1H), 4.09 (t, J=6.1 Hz, 2H), 4.05 (dd, J=12.0, 4.9 Hz, 1H), 4.01 (dd, J=12.5, 2.2 Hz, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.73 (t, J=9.5 Hz, 1H), 3.64-3.61 (m, 1H), 3.55-3.53 (m, 1H), 3.43 (m, 1H), 3.12 (m, 2H), 2.18-2.13 (m, 2H), 2.09 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.00 (2xs, 6H), 1.98 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.92-1.88 (m, 2H), 1.56-1.52 (m, 2H), 1.49-1.44 (m, 2H), 1.34-1.29 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (150MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170.51, 170.35, 170.25, 169.84, 169.62, 169.33, 169.06, 156.25, 120.18-108.01 (m, C-Fカップリングは未解析), 100.78, 100.62, 76.47, 72.91, 72.68, 72.45, 71.94, 71.60, 71.56, 69.77, 67.74, 63.17, 61.76, 61.52, 40.83, 29.68, 29.49, 28.92, 27.99, 27.84, 27.69, 23.02, 21.03, 20.84, 20.64, 20.53, 20.33. HRMS (ESI) C<sub>43</sub>H<sub>52</sub>F<sub>17</sub>NO<sub>20</sub>Na<sup>+</sup>の計算値: 1248.2703 [M+Na]<sup>+</sup>; 実測値: 1248.2675

10

20

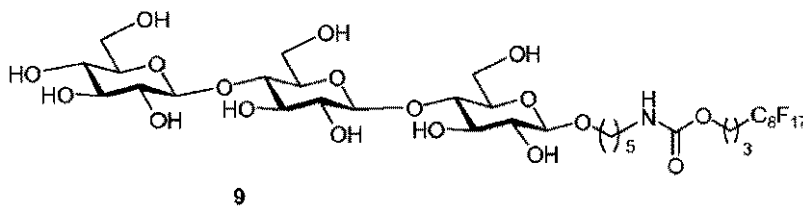
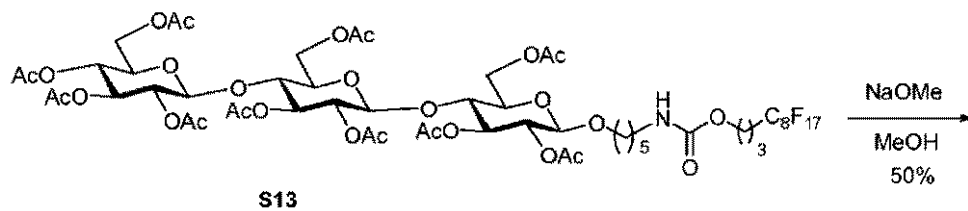
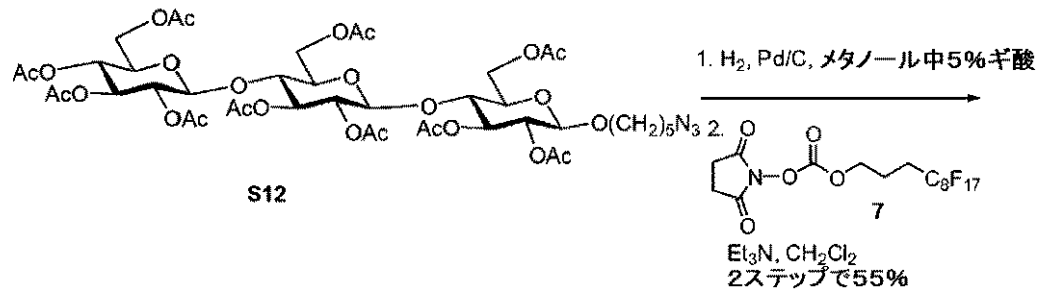
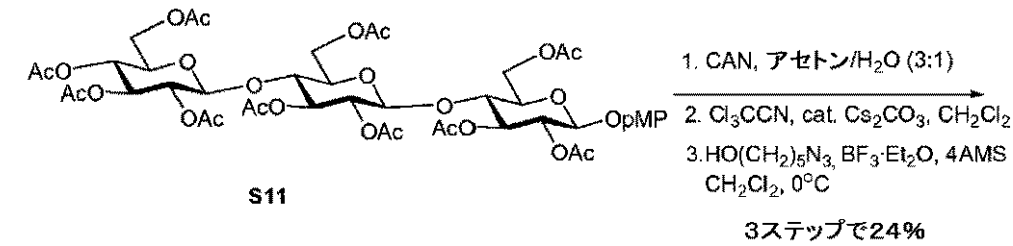
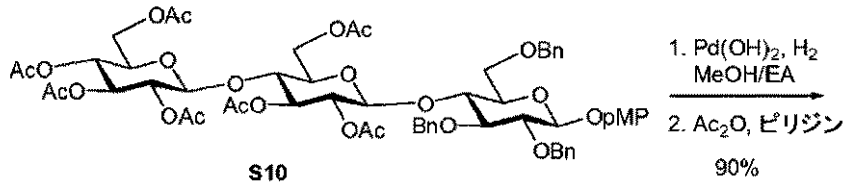
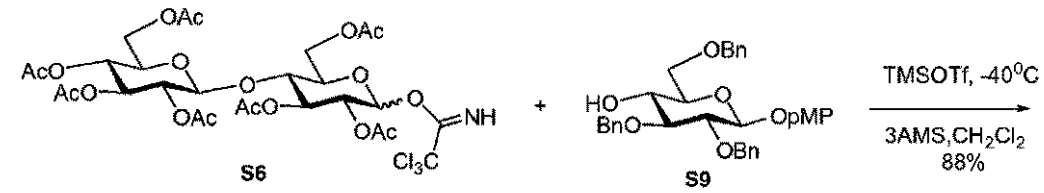
[(4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 11, 11, 12, 12, 12 - ノナデカフルオロドデコキシカルボニル - アミノ) ペンチル] - D - セロピオシド (8) : S8 (222 mg、0.18 mmol) および NaOMe (50 mg、0.09 mmol) の MeOH (7 mL) による溶液を室温にて一晩攪拌した。混合物を Amberlyst - 15 イオン交換樹脂 (resign) によって5分間中和して、セライトを充填した焼結漏斗によって濾過した。濾過後にフィルタパッドをメタノールですすいだ。合せた濾液を減圧下で濃縮して、次にフラッシュカラムクロマトグラフィー (EtOAc : MeOH = 10 : 1 8 : 1) によって精製して、8を白色固体 (123 mg、73%) として得た。R<sub>f</sub> : 0.47 (EtOAc : MeOH = 5 : 1)。<sup>1</sup>H NMR (600MHz, MeOD): 4.40 (d, J=7.9 Hz, 1H), 4.27 (d, J=7.8 Hz, 1H), 4.10 (t, J=6.1 Hz, 2H), 3.89-3.86 (m, 4H), 3.65 (dd, J=11.8, 5.7 Hz, 1H), 3.57-3.53 (m, 2H), 3.50 (t, J=9.0 Hz, 1H), 3.39-3.32 (m, 3H), 3.30 (m, 1H), 3.22 (m, 2H), 3.09 (t, J=6.7 Hz, 2H), 2.32-2.23 (m, 2H), 1.94-1.89 (m, 2H), 1.66-1.61 (m, 2H), 1.53-1.48 (m, 2H), 1.43-1.38 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (150MHz, MeOD): 157.51, 120.11-108.43 (m, C-Fカップリングは未解析), 103.20, 102.79, 79.31, 76.69, 76.43, 75.03, 73.47, 69.95, 69.29, 61.00, 60.74, 60.42, 40.32, 29.52, 28.95, 27.36, 27.21, 27.07, 22.86, 20.07. HRMS (ESI) C<sub>29</sub>H<sub>38</sub>F<sub>17</sub>NO<sub>13</sub>Na<sup>+</sup>の計算値: 954.1964 [M+Na]<sup>+</sup>; 実測値: 954.1966。

30

【0148】

40

## 【化6】



## ポリフルオロ-セロトリオイド9の合成。

パラ-メトキシフェニル 2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-D-グルコピラノシル-(1-4)-2, 3, 6-トリ-O-アセチル-D-グルコピラノシル-(1-4)-2, 3, 6-トリ-O-ベンジル-D-グルコピラノシド (S10) : Vesal1a によって報告されたのと同様の手順に従って、S6 (1.68 g、2.16 mmol)、S9 (1.0 g、1.8 mmol) および 3 モレキュラーシーブの  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) による懸濁物を室温にて1時間攪拌した。反応混合物を  $-40^\circ\text{C}$  まで冷却して、TMSOTf (98  $\mu\text{l}$ 、0.54 mmol) を滴加して処理した。 $-40^\circ\text{C}$  にて2時間攪拌した後、 $\text{NaHCO}_3$  飽和水溶液を添加して、反応混合物をセライトで濾過した。混合物を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で希釈して、次に塩水で洗浄した。有機相を  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥させ、溶媒を蒸発させて、クロマトグラフィー (ヘキサン : EtOAc = 3 : 1 : 1) によって精製して、S10を白色泡状固体 (1.86 g、88%) とし

10

20

30

50

て得た。R<sub>f</sub> : 0 . 5 5 (ヘキサン : E t O A c = 1 : 1)。<sup>1</sup>H NMR (600MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.38-7.25(m, 15H), 7.00 (d, J=9.1Hz, 2H), 6.81 (d, J=9.1 Hz, 2H), 5.10-5.05 (m, 2H), 5.00-4.98 (m, 2H), 4.94-4.91 (m, 2H), 4.85-4.82 (m, 2H), 4.78 (d, J=11.6 Hz, 1H), 4.72 (d, J=11.6 Hz, 2H), 4.64 (d, J=8.2 Hz, 1H), 4.49 (d, J=12.0 Hz, 1H), 4.39 (d, J=7.9 Hz, 1H), 4.37 (dd, J=12.5, 4.3 Hz, 1H), 4.23 (dd, J=12.0, 2.0Hz, 1H), 4.01 (dd, J=12.0, 2.2 Hz, 1H), 3.95 (t, J=9.2 Hz, 1H), 3.90 (dd, J=12.0, 4.6 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.78-3.62 (m, 6H), 3.46-3.44 (m, 1H), 3.19-3.16 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.95 (s, 3H)。<sup>13</sup>C NMR (150MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170.71, 170.46, 170.42, 170.01, 169.68, 169.53, 169.22, 155.53, 151.64, 139.42, 138.34, 138.01, 128.79, 128.48, 128.38, 128.35, 128.26, 128.20, 127.86, 127.40, 127.13, 118.70, 114.71, 102.91, 101.04, 100.15, 82.77, 81.60, 76.39, 75.20, 74.92, 74.89, 73.85, 73.11, 72.67, 72.37, 72.09, 71.65, 67.99, 67.93, 61.98, 61.70, 55.85, 20.93, 20.88, 20.75。H R M S ( E S I ) C<sub>60</sub>H<sub>70</sub>O<sub>24</sub>Na<sup>+</sup>の計算値 : 1 1 9 7 . 4 1 4 9 [ M + N a ]<sup>+</sup>; 実測値 : 1 1 9 7 . 4 1 4 2。

【 0 1 4 9 】

パラ - メトキシフェニル 2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - アセチル - - D - グルコピラノシル - ( 1 4 ) - 2 , 3 , 6 - トリ - O - アセチル - - D - グルコピラノシル - ( 1 4 ) - 2 , 3 , 6 - トリ - O - アセチル - - D - グルコピラノシド ( S 1 1 ) : S 1 0 ( 1 . 0 1 g、0 . 8 6 m m o l )、触媒量の P d ( O H )<sub>2</sub>の M e O H / E A ( 1 / 1、1 0 m L ) による懸濁物を H<sub>2</sub> バルーン下で 1 2 時間攪拌した。セライトによる濾過の後、濾過ケーキを M e O H で洗浄した。濾液を蒸発させて、残留物は精製せずに次のステップで使用した。

【 0 1 5 0 】

上述の残留物をピリジン ( 5 m L ) および無水酢酸 ( 5 m L ) に溶解させた。混合物を室温にて一晚攪拌した。溶液に M e O H を添加して過剰な無水酢酸を破壊して、次に真空中で濃縮した。C H<sub>2</sub> C l<sub>2</sub> を添加して、反応混合物を 1 M H C l 水溶液、N a H C O<sub>3</sub> 飽和水溶液および塩水で洗浄した。有機相を N a<sub>2</sub> S O<sub>4</sub> で乾燥させ、濃縮して、クロマトグラフィー (ヘキサン : E t O A c = 1 : 1) によって精製し、S 1 1 を白色泡状固体 ( 7 9 4 m g、2 ステップで 9 0 % ) として得た。R<sub>f</sub> : 0 . 2 4 (ヘキサン : E t O A c = 1 : 1)。<sup>1</sup>H NMR (600MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6.88 (d, J=9.0 Hz, 2H), 6.76 (d, J=9.0 Hz, 2H), 5.19 (t, J=9.2 Hz, 1H), 5.11-5.07 (m, 3H), 5.02 (t, J=9.7 Hz, 1H), 4.88-4.81 (m, 4H), 4.50 (dd, J=12.0, 2.0 Hz, 1H), 4.46 (d, J=8.0 Hz, 1H), 4.44 (d, J=8.0 Hz, 1H), 4.37 (dd, J=12.0, 2.0 Hz, 1H), 4.32 (dd, J=12.5, 4.3 Hz, 1H), 4.10-4.06 (m, 2H), 4.00 (dd, J=12.5, 2.0 Hz, 1H), 3.80 (t, J=9.5 Hz, 1H), 3.73 (t, J=9.5 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.67-3.64 (m, 1H), 3.61-3.55 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.97 (2s, 6H), 1.96 (s, 3H), 1.94 (s, 3H)。<sup>13</sup>C NMR (150MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170.53, 170.27, 170.23, 169.79, 169.57, 169.32, 169.10, 155.77, 150.88, 118.69, 114.53, 100.80, 100.57, 100.07, 76.44, 76.13, 72.89, 72.81, 72.77, 72.65, 72.41, 72.02, 71.75, 71.55, 71.52, 67.70, 62.15, 61.49, 55.67, 20.86, 20.80, 20.70, 20.57, 20.50。H R M S ( E S I ) C<sub>45</sub>H<sub>58</sub>O<sub>27</sub>Na<sup>+</sup>の計算値 : 1 0 5 3 . 3 0 5 8 [ M + N a ]<sup>+</sup>; 実測値 : 1 0 5 3 . 3 0 5 1。

【 0 1 5 1 】

5 - アジドペンチル 2 , 3 , 4 , 6 - テトラ - O - アセチル - - D - グルコピラノシル - ( 1 4 ) - 2 , 3 , 6 - トリ - O - アセチル - - D - グルコピラノシル - ( 1 4 ) - 2 , 3 , 6 - トリ - O - アセチル - - D - グルコピラノシド ( S 1 2 ) : 化合物 S 1 1 ( 8 6 6 m g、0 . 8 4 m m o l ) をアセトン - H<sub>2</sub> O ( 2 0 m L 3 : 1 ) に溶解させて、混合物を冷却した (氷水浴)。C A N ( 2 . 3 g、4 . 2 0 m m o l ) のアセトン / H<sub>2</sub> O ( 1 0 m L 3 : 1 ) による溶液を添加して、混合物を室温にて 3 0 分間攪

10

20

30

40

50

拌した。混合物を体積10 mLまで濃縮して、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ で希釈し、 $\text{NaHCO}_3$ 飽和水溶液で洗浄して、乾燥させ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、濾過して、濃縮した。次に残留物を $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ に溶解させて、トリクロロアセトニトリル(1.0 mL)および $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ (250 mg、0.77 mmol)で処理した。室温にて12時間攪拌した後、反応物を水、塩水で洗浄して、乾燥させ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、濾過して、濃縮した。トリクロロアセトイミデート化合物、5-アジド-1-ペンタノール(0.54 g、4.20 mmol)、および3-モレキュラーシープ(1.5 g)の $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (10 mL)による懸濁物を室温にて1時間攪拌した。反応混合物を0°Cまで冷却して、 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (0.11 mL、0.84 mmol)を滴加して処理した。0°Cにて2時間攪拌した後、 $\text{NaHCO}_3$ 飽和水溶液を添加して、反応混合物をセライトで濾過した。混合物を $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ で希釈して、次に塩水で洗浄した。有機相を $\text{Na}_2\text{SO}_4$ で乾燥させ、溶媒を蒸発させて、クロマトグラフィー(ヘキサン： $\text{EtOAc}$  = 3 : 1 : 2 : 1 : 1)によって精製して、S12を白色泡状固体(210 mg、3ステップで24%)として得た。 $R_f$  : 0.31 (ヘキサン： $\text{EtOAc}$  = 1 : 1)。 $^1\text{H NMR}$  (600MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 5.12-5.05 (m, 3H), 5.00 (t,  $J=9.7$  Hz, 1H), 4.87-4.79 (m, 3H), 4.48 (dd,  $J=11.8, 2.0$  Hz, 1H), 4.43 (d,  $J=7.9$  Hz, 1H), 4.42 (d,  $J=7.9$  Hz, 1H), 4.38 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H), 4.35 (dd,  $J=12.0, 2.0$  Hz, 1H), 4.31 (dd,  $J=12.5, 4.3$  Hz, 1H), 4.07 (dd,  $J=12.1, 5.2$  Hz, 1H), 3.99 (dd,  $J=12.5, 2.0$  Hz, 1H), 3.80-3.74 (m, 1H), 3.71 (dt,  $J=10.0, 9.5$  Hz, 2H), 3.60-3.58 (m, 2H), 3.55-3.52 (m, 2H), 3.45-3.40 (m, 1H), 3.21 (t,  $J=6.8$  Hz, 2H), 2.09 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.94 (2xs, 6H), 1.60-1.52 (m, 4H), 1.42-1.33 (m, 2H).  $^{13}\text{C NMR}$  (150MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 170.52, 170.31, 170.21, 169.82, 169.79, 169.54, 169.31, 169.10, 100.79, 100.59, 100.55, 76.49, 76.14, 72.87, 72.67, 72.41, 71.75, 71.62, 71.53, 67.72, 62.14, 61.72, 61.48, 51.34, 28.91, 28.50, 23.12, 20.87, 20.68, 20.55, 20.48. HRMS (ESI)  $\text{C}_{43}\text{H}_{61}\text{N}_3\text{O}_{26}\text{Na}^+$  の計算値 : 1058.3436 [M + Na]<sup>+</sup>; 実測値 : 1058.3419.

【0152】

[(4, 4, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 11, 11, 12, 12, 12-ノナデカフルオロドデコキシカルボニル-アミノ)ペンチル]2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-D-グルコピラノシル-(1, 4)-2, 3, 6-トリ-O-アセチル-D-グルコピラノシル-(1, 4)-2, 3, 6-トリ-O-アセチル-D-グルコピラノシド(S13): 化合物S13を化合物S12から、S8について説明した手順に従って調製して、カラムクロマトグラフィー(ヘキサン： $\text{EtOAc}$  = 1 : 1 : 2 : 3)の後の収率は55%(2ステップ)であった。白色固体。 $R_f$  : 0.41 (ヘキサン： $\text{EtOAc}$  = 1 : 1)。 $^1\text{H NMR}$  (600MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 5.13-5.06 (m, 3H), 5.01 (t,  $J=9.7$  Hz, 1H), 4.88-4.81 (m, 4H), 4.79 (br, 1H), 4.50 (dd,  $J=11.8, 1.3$  Hz, 1H), 4.44 (d,  $J=7.2$  Hz, 1H), 4.43 (d,  $J=7.6$  Hz, 1H), 4.38 (d,  $J=8.1$  Hz, 1H), 4.36 (dd,  $J=12.0, 1.8$  Hz, 1H), 4.32 (dd,  $J=12.5, 4.3$  Hz, 1H), 4.10-4.06 (m, 3H), 4.02 (dd,  $J=12.0, 4.8$  Hz, 1H), 3.99 (dd,  $J=12.4, 2.0$  Hz, 1H), 3.79-3.74 (m, 1H), 3.72 (dt,  $J=11.5, 9.6$  Hz, 2H), 3.63-3.58 (m, 1H), 3.56-3.50 (m, 2H), 3.43-3.40 (m, 1H), 3.11 (m, 1H), 2.20-2.10 (m, 2H), 2.10 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.98 (2xs, 6H), 1.97 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.94 (2xs, 6H), 1.91-1.86 (m, 2H), 1.54-1.52 (m, 2H), 1.48-1.43 (m, 2H), 1.34-1.26 (m, 2H).  $^{13}\text{C NMR}$  (150MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 170.53, 170.35, 170.22, 169.81, 169.58, 169.32, 169.11, 153.25, 120.2-108.01 (m, C-Fカップリングは未解析), 100.79, 100.58, 100.55, 76.47, 76.14, 72.88, 72.70, 72.66, 72.39, 72.00, 71.75, 71.63, 71.54, 71.34, 69.76, 67.69, 63.67, 63.18, 62.13, 61.65, 61.48, 40.84, 29.50, 28.93, 27.99, 27.84, 27.70, 23.02, 20.89, 20.76, 20.67, 20.54, 20.48, 20.34. HRMS (ESI)  $\text{C}_{55}\text{H}_{68}\text{F}_{17}\text{NO}_{28}\text{Na}^+$  の計算値 : 1536.3656 [M + Na]<sup>+</sup>; 実測値 : 1536.3548

10

20

30

40

50

[ ( 4 , 4 , 5 , 5 , 6 , 6 , 7 , 7 , 8 , 8 , 9 , 9 , 1 0 , 1 0 , 1 1 , 1 1 , 1 2 , 1 2 , 1 2 - ノナデカフルオロドデコキシカルボニル - アミノ ) ペンチル ] - D - グルコピラノシル - ( 1 4 ) - - D - グルコピラノシル - ( 1 4 ) - - D - グルコピラノシド ( 9 ) : 化合物 9 は化合物 S 1 3 から、8 について説明した手順に従って調製して、カラムクロマトグラフィー ( E t O A c : M e O H = 3 : 1 1 : 1 ) および F l u o r o F l a s h ( 登録商標 ) S P E カートリッジによる精製の後の収率は 5 5 % であった。白色固体。R<sub>f</sub> : 0 . 6 6 ( E t O A c : M e O H = 3 : 1 ) 。<sup>1</sup>H NMR ( 600MHz , MeOD ) : 4.44 ( d , J=8.0 Hz , 1H ) , 4.39 ( d , J=7.8 Hz , 1H ) , 4.27 ( d , J=7.9 Hz , 1H ) , 4.10 ( t , J=6.1Hz , 1H ) , 3.91-3.84 ( m , 6H ) , 3.67-3.63 ( m , 3H ) , 3.58-3.48 ( m , 7H ) , 3.39-3.32 ( m , 3H ) , 3.30 ( m , 1H ) , 3.22 ( m , 2H ) , 3.09 ( t , J=6.9 Hz , 1H ) , 2.31-2.26 ( m , 2H ) , 1.97-1.90 ( m , 2H ) , 1.65-1.61 ( m , 2H ) , 1.52-1.48 ( m , 2H ) , 1.43-1.37 ( m , 2H ) . <sup>13</sup>CNMR ( 150MHz , MeOD ) : 157.71 , 120.11-108.43 ( m , C-Fカップリングは未解析 ) , 103.44 , 103.21 , 103.05 , 79.40 , 79.00 , 76.95 , 76.66 , 75.47 , 75.25 , 75.02 , 73.75 , 73.48 , 70.19 , 69.56 , 63.07 , 61.26 , 60.58 , 60.30 , 40.50 , 29.45 , 29.20 , 27.61 , 27.46 , 27.32 , 23.10 , 20.32 . H R M S ( E S I ) C<sub>35</sub>H<sub>48</sub>F<sub>17</sub>NO<sub>18</sub>Na<sup>+</sup> の計算値 : 1 1 1 6 . 2 4 9 2 [ M + N a ]<sup>+</sup> ; 実測値 : 1 1 1 6 . 2 5 2 0 .

10

## 【 0 1 5 3 】

[ ( 4 , 4 , 5 , 5 , 6 , 6 , 7 , 7 , 8 , 8 , 9 , 9 , 1 0 , 1 0 , 1 1 , 1 1 , 1 2 , 1 2 , 1 2 - ノナデカフルオロドデコキシカルボニル - アミノ ) ペンチル ] - D - グルコピラノシル - ( 1 4 ) - - D - グルコピラノシル - ( 1 4 ) - - D - グルコピラノシル - ( 1 4 ) - - D - グルコピラノシド ( 1 0 ) : 化合物 1 0 は、9 について説明した手順に従って調製して、カラムクロマトグラフィーによる精製の後の収率は 8 6 % であった。4.47 ( d , J=8.0 Hz , 1H ) , 4.46 ( d , J=8.0 Hz , 1H ) , 4.42 ( d , J=7.8 Hz , 1H ) , 4.30 ( d , J=7.9 Hz , 1H ) , 4.10 ( t , J=6.1 Hz , 2H ) , 3.91-3.89 ( m , 9H ) , 3.68-3.63 ( m , 3H ) , 3.60-3.50 ( m , 14H ) , 3.39-3.25 ( m , 14H ) , 3.12 ( t , J=6.9 Hz , 2H ) , 2.33-2.26 ( m , 2H ) , 1.96-1.90 ( m , 2H ) , 1.70-1.61 ( m , 2H ) , 1.55-1.52 ( m , 2H ) , 1.43-1.37 ( m , 2H ) . H R M S ( E S I ) C<sub>41</sub>H<sub>58</sub>F<sub>17</sub>NO<sub>23</sub>Na<sup>+</sup> の計算値 : 1 2 5 5 . 3 1 2 8 [ M + N a ]<sup>+</sup> ; 実測値 : 1 2 5 5 . 3 2 2 5 .

20

## 【 0 1 5 4 】

## 質量分析法

固定化スライドを、窒素パルスレーザ ( 3 5 5 n m ) を装備した B r u k e r U l t r a f l e x M A L D I - T O F 質量分光計によって分析した。各データポイントをレーザビーム平均 5 0 0 ~ 1 0 0 0 ショットで収集して、レーザフルエンスを 4 0 ~ 9 5 % で適用し、最良の結果はほぼ 5 0 ~ 8 0 % で得た。マンノース - N H<sub>2</sub> の標準水溶液を A C G スライドの規定の範囲に手動で配置して、同じスライド基材上に固定化された糖から得たデータを校正するのに使用した。各種の濃度でのグラフト化マンノース誘導体の定量的比較のために、すべての分析を 8 0 % フルエンスにて 5 0 0 ショットの 1 回の測定で行った。S / N 比に対する平均ピーク強度の変動をプロットした。

30

## 【 0 1 5 5 】

## タンパク質結合アッセイ

固定化マンノースとビオチン化 C o n A および C y 3 タグ化ストレプトアビジンとのマンノース - タンパク質結合アッセイ。MS 分析に使用したのと同じスライドを弱い超音波処理の下で蒸留水で再度洗浄して、次に P B S ( リン酸緩衝生理食塩水 ) 緩衝液ですすいだ。ビオチン標識 C o n A ( I n v i t r o g e n C 2 1 4 2 0 ) を P B S T 緩衝液 ( 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を含む P B S ) で 5 0 0 ~ 1 0 0 0 倍に希釈した。タンパク質溶液 ( 5 0 m L ) を各アレイ基材に加えて、W h a t m a n 1 6 パッド・インキュベーション・チャンバでインキュベートした。これらのスライドをフォイルで包み、室温にて振とう器で 1 時間インキュベートした。インキュベーションの後、スライドを P B S T 緩衝液で 3 回洗浄した。ストレプトアビジン - C y 3 ( S i g m a S 6 4 0 2 ) を P B S 緩衝液で 1 0 0 倍に希釈して、スライドをアルミニウムフォイルで覆い、再度ストレプ

40

50

トアビジン - Cy 3 によってさらに 1 時間インキュベートした。2 回目のインキュベーションの後、スライドを P B S T 緩衝液および蒸留水で洗浄して、次に高品質窒素ガスでパーズ乾燥させた。アレイパターンは、Applied Precision 製の Array W o R x 蛍光スキャナを使用して、反射モードで 5 4 0 n m レーザ光によって分析した。統計的蛍光強度分析のために、各スライド上の最良のブロックを選択した。

#### 【 0 1 5 6 】

固定化 G l o b o H とマウスによるモノクローナル抗体 V K 9 ( I g G ) および C y 3 タグ化 2 次抗体との G l o b o H - タンパク質結合アッセイ。G l o b o H マイクロアレイスライドをエタノールアミン水溶液 ( 5 0 m M ) で遮断して、スライド表面上の未反応 N H S を除去した。スライドは再度反応セル内で組み立てられて、P B S 緩衝液 ( p H 7 . 4 ) で洗浄した。次に、V K 9 ( 各セルに 1 m L 、 5 0 μ g / m L ) 、マウスによる抗 G l o b o H モノクローナル抗体 ( I g G ) の P B S T ( p H 7 . 4 ) による溶液をセルに添加した。1 時間絶えず振とうしながら結合実験を行った。スライドを P B S T 緩衝液 ( p H 7 . 4 ) で 3 回 ( 毎回、絶えず渦動させながら 1 0 分間 ) 洗浄した。V K 9 のための C y 3 タグ化ヤギ抗マウス I g G をセルに添加して、混合物を暗所で 1 時間振とうしながらインキュベートした。タンパク質結合スライドをそれぞれ P B S T 緩衝液 ( p H 7 . 4 ) 、 P B S 緩衝液 ( p H 7 . 4 ) 、および水で 5 回洗浄して、次に窒素ガスによってパーズ乾燥させた。

10

#### 【 0 1 5 7 】

4 の M S - T O F 分析およびグリカンアレイ調製 - P T F E 様 A C G スライド上に吸着されたポリフッ化マンノースの M S - T O F 分析  
化合物 4 をメタノール / 水 ( 6 / 4 ) 溶媒混合物に、約 1 0 m M 、 1 m M 、 1 0 0 μ M にて順次溶解させた。溶液 ( 各 1 μ L ) をスライド上に手でスポットして、BioDot AD 3 2 0 0 装置 ( Agilent Technology ) でロボットピン ( Array I t , S M P 4 ) を用いてマイクロアレイ化して、アレイのスポット当り溶液約 1 . 1 n L を配置した。スライドを湿度 3 0 % のチャンバに一晩保管して、次に質量分析法によって分析した。ブランクスライドおよびポリフッ化マンノーススライドは、どちらもシランベースおよびリン酸ベースの A C G スライドを含有しており、窒素パルスレーザ ( 3 5 5 n m ) を装備した Bruker Ultraflex MALDI - T O F 質量分光計によって分析した。等体積の B S A トリプシン消化 ( 1 p m o e l / μ L ) 溶液を D H B ( ジヒドロキシ安息香酸、 1 : 1 アセトニトリル / 水中 1 0 m g ) 溶液と均一に混合して、M S - T O F 質量校正の標準として使用した。各データポイントをレーザビーム平均 5 0 0 ショットで収集して、2 ~ 2 0 % のレーザフルエンスを適用した。大半の実験は、正分極電場の下で行った。

20

30

#### 【 0 1 5 8 】

図 2 6 A および図 2 7 A は、これらの新たに製造した P T F E 様 A C G スライドの M S - T O F バックグラウンド結果を示す。図 2 6 A において、( a ) は、シランベース P T F E 様 A C G のバックグラウンドの M S - T O F 結果を示し ; ( b ) は、上の A C G スライドに吸着されたポリフッ化マンノースの M S - T O F の結果を示す。図 2 7 A において、( a ) は、ホスホン酸ベース P T F E 様 A C G のバックグラウンドの M S - T O F の結果を示し、( b ) は、上の A C G スライドに吸着されたポリフッ化マンノースの M S - T O F の結果を示す。マンノース誘導体 ( M w . 7 8 3 ) の分子イオンは 8 0 6 [ M + N a ] <sup>+</sup>、および 8 2 2 [ M + K ] <sup>+</sup> にて観察され、有機化学薬品は P T F E 様 A C G スライド表面に接着しないためベースラインは非常に明瞭であった。

40

#### 【 0 1 5 9 】

図 2 6 B および図 2 7 B は、ポリフッ化マンノースのシランベースおよびホスホン酸ベーススライドの結果を与える。図 2 6 B は、シランベース P T F E 様 A C G スライドのマイクロアレイの実施を表す。マンノース溶液 ( 1 . 1 μ L / スポット ) は濃度が様々であった ( 1 2 m M から 1 . 2 m M 、 1 2 0 μ M まで ) 。同様に 2 7 B は、ホスホン酸ベース P T F E 様 A C G スライドのマイクロアレイを示す。マンノース溶液 ( 1 . 1 μ L / スポ

50

ット)は濃度が様々であった(14 mMから1.4 mM、140 μMまで)。マンノース誘導体がPTFE様ACGスライド上にマイクロアレイ化された、蛍光タグ化ConA-マンノース結合。

【0160】

PTFE様ACGスライド上に吸着されたポリフッ化マンノースの蛍光タグ化ConA/マンノース結合。

【0161】

リン酸BSA緩衝液(25 μg/mL、pH6.5)中のAlex488タグ化コンカナバリンA 100 μLをマンノース誘導体が固定化されたACGスライド表面上に加えた。ConA溶液を含むこれらのスライドを室温にて約2時間インキュベーションした。インキュベーションの後、スライドをペトリ皿内で静かに渦動させながら、それぞれ12 mlのリン酸BSA緩衝液、PBST緩衝液、および脱イオン水で3回洗浄した。次に窒素パーズ乾燥させて、ArrayWorx(Applied Precision)によって蛍光スキャナの反射モードで530 nmにて分析した。図S1(c)および図S2(c)は、これらのバイオアッセイの結果を示す。

10

【0162】

MALDI-TOF(Ultra-Flex II)によるオンチップ分析(エッペンドルフ管内での反応)

セルラーゼを調製した(pH5.05の25 mM NaOAc緩衝溶液中5 U/mL)。基質をNaOAc緩衝液溶液(25 mM、pH5.05)に溶解させて、0.5 mM基質溶液を得た。セルラーゼ溶液100 μLをエッペンドルフ管内の基質溶液100 μLに添加して、0.25 mM基質を含む2.5 U/mLセルラーゼ溶液を得た。この溶液を37 °Cで18時間インキュベートした。インキュベートした溶液100 μLをFAST(登録商標)フレームに装填したスライド上に添加した。スライドを乾燥ボックスに入れて水を除去して、次に高真空を使用して微量の水を除去した。水100 μLを使用して、FAST(登録商標)フレーム・マルチスライド・プレートの各ウェルをすすいで、緩衝液溶液の塩を分解および除去した。高真空によってプレート上の残留水をすべて除去して、次にMALDI-TOF Ultra-Flex IIによってスライドを分析した。

20

【0163】

MALDI-TOF(Ultra-Flex II)によるオンチップ分析(チップ上での直接の反応)

セルラーゼを調製した(pH5.05の25 nM NaOAc緩衝溶液中5 U/mL)。基質をNaOAc緩衝液溶液(25 mM、pH5.05)に溶解させて、0.5 mM基質溶液を得た。セルラーゼ溶液50 μLをFAST(登録商標)フレーム・マルチスライド・プレートに装填されたガラススライド上の基質溶液50 μLに添加して、0.25 mM基質を含む2.5 U/mLセルラーゼ溶液を得た。プレートのウェルを密閉して、アセンプリ全体を37 °Cで18時間インキュベートした。スライドを乾燥ボックスに入れて水を除去して、次に高真空を使用して微量の水を除去した。水100 μLを使用して、FAST(登録商標)フレーム・マルチスライド・プレートの各ウェルをすすいで、緩衝液溶液の塩を分解および除去した。高真空によってプレート上の残留水をすべて除去して、次にMALDI-TOF Ultra-Flex IIによってスライドを分析した。

30

40

【0164】

セルラーゼ精製およびセルラーゼ活性のMS-TOF分析。

【0165】

エキソグルカナーゼおよびエンドグルカナーゼのクローニング、発現および精製  
スルホロプス・ソルファタリカス(ATCC35092)およびクロストリジウム・サーモセラム(ATCC27405)のゲノムDNAをATCC biological resource centerから入手した。Sso7d(NCBIアクセション番号:AAK42090)遺伝子断片をスルホロプス・ソルファタリカスゲノムから、

【0166】

50

【化7】

フォワード 5' GGAATTCCATATGGCAACAGTAAAGTTCAAG 3' (配列番号1)プライマーおよびリバース 5' CGGGATCCCTTCCTTTGCTTCTCFAACATTTG 3' (配列番号2)プライマー

を用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって直接増幅した。S s o 7 d をコードする PCR 生成物を N d e I および B a m H I で消化して、続いて発現ベクター p E T - 2 8 a ( N o v a g e n ) 中にクローニングして、p E T - 2 8 - S s o 7 d を生成した。

【0167】

10

【化8】

5'

GATCTGATCTGTACGACGATGACGATAAGGGATCTATCGAAGGTCGTG 3' (配列番号3)プライマーおよび 5' GATCCACGACCTTCGATAGATCCCTTATCGTCATCGTCGTACAGATCA 3' (配列番号4)プライマー

を用いて変性およびアニーリングすることによって生成された、2 粘着末端リンカーを B a m H I 切断 p E T - 2 8 - S s o 7 d 中に挿入して、p E T - 2 8 - S s o 7 d - F x a を生成した。C t C b h A ( N C B I アクセション番号: X 8 0 9 9 3 ) 遺伝子断片の機能性ドメインを、

20

【0168】

【化9】

フォワード 5'

GAAGATCTATACTTCCGCAGCCTGATG 3' (配列番号5)プライマーおよびリバース 5' ACGCGTCGACTTAGGTTTCACTGTCTGTGTACTG 3' (配列番号6)プライマー

を用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって、クロストリジウムサーモセラムゲノムから直接増幅した。C t C b h A をコードする PCR 生成物を B g l I I および S a l I によって消化して、続いて B a m H I および S a l I 切断 p E T - 2 8 - S s o 7 d - F x a 中にクローニングして、p E T - 2 8 - S s o 7 d - F x a - C t C b h A を生成した。C t C e l 4 4 A ( N C B I アクセション番号: D 8 3 7 0 4 ) 遺伝子断片の機能性ドメインを

30

【0169】

【化10】

フォワード 5'

GAAGATCTGAACCTGCAAAAGTGTTGAC 3' (配列番号7)プライマーおよびリバース 5' ACGCGTCGACTTAGGGCTCCGCAGCTTCAAGCAC 3' (配列番号8)プライマー

40

を用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって、クロストリジウムサーモセラムゲノムから直接増幅した。

【0170】

C t C e l 4 4 A をコードする PCR 生成物を B g l I I および S a l I によって消化して、続いて B a m H I および S a l I 切断 p E T - 2 8 - S s o 7 d - F x a 中にクローニングして、p E T - 2 8 - S s o 7 d - F x a - C t C e l 4 4 A を生成した。すべての DNA 構築物をヌクレオチド配列決定によって検証した。正しい構築物をタンパク質発現のためのエシェキリアコリ株 B L 2 1 ( D E 3 ) コンピテント細胞に形質転換した。単一形質転換体を一晚培養したもの 1 0 m l を使用して、3 0 の、3 0 μ g / m l カナ

50

マイシンを含有する新しいLB培地1リットルに接種した。細胞が $A_{600nm} = 0.8 \sim 1$ に増殖するまで、インキュベート温度を16℃に変更した。1時間後、イソプロピル- $\beta$ -チオガラクトピラノシド(IPTG)を最終濃度0.5mMまで添加した。16時間後、細胞を $7,000 \times g$ での15分間の遠心分離によって回収して、細胞ペーストを収集した。細胞ペレットを20mM Tris-HCl、400mM NaCl、10mMイミダゾールを含有する溶解緩衝液、pH7.5にただちに再懸濁させた。細胞懸濁をConstant Cell Disruption System(CONSTANT SYSTEM Ltd., UK)によって中断させて、 $17,000 \times g$ にて遠心分離して細胞片を除去した。細胞を含まない抽出物を、溶解緩衝液によって事前に平衡とされたNi<sup>2+</sup>-NTAカラムに装填した。カラムを溶解緩衝液によって洗浄して、続いてHis<sub>6</sub>タグ化タンパク質を10mM~300mMイミダゾールの直線勾配によって溶離させた。精製His<sub>6</sub>タグ化Sso7d融合CtCbhAおよびCtCel44Aタンパク質は、-80℃にて貯蔵するために、Amicon-Ultra-15(Millipore, MA, USA)の30kDaカットオフサイズ膜によって濃縮して、貯蔵緩衝液(50mM Tris-HCl、100mM NaCl、pH8.0)に変化させた。

#### 【0171】

実施に従って、本開示のデバイスおよび用法(たとえば質量分析法)は、汎用または特殊目的のコンピューティングシステムまたは構成を含む環境で動作可能である。本発明での使用に好適であり得る周知のコンピューティングシステム、環境、または構成の例は、これに限定されるわけではないが、パーソナルコンピュータ、サーバコンピュータ、携帯型またはラップトップデバイス、マルチプロセッサシステム、マイクロプロセッサベースシステム、セット・トップ・ボックス、プログラマブル家庭用電化製品、ネットワークPC、ミニコンピュータ、メインフレームコンピュータ、電話技術システム、上のシステムまたはデバイスのいずれかを含む分散コンピューティング環境などを含む。

#### 【0172】

本開示のデバイスおよび方法は、コンピュータによって実行される、プログラムモジュールなどのコンピュータ実行型命令の一般的な状況で説明され得る。一般にプログラムモジュールは、特定のタスクを実行する、または特定の抽象データ型を実装する、ルーチン、プログラム、オブジェクト、コンポーネント、データ構造などを含む。システムは、通信ネットワークを通じてリンクされているリモート処理デバイスによってタスクが実行される、分散コンピューティング環境でも実行され得る。分散コンピューティング環境では、プログラムモジュールは、メモリ記憶デバイスを含むローカルおよびリモートの両方のコンピュータ記憶媒体に配置され得る。コンピュータプログラムは、メモリ媒体もしくは記憶媒体に記憶されるか、またはネットワークもしくはI/Oバスを通じて処理ユニットに提供され得る。

#### 【0173】

一態様において、本開示のデバイスおよび方法は、少なくとも1個の中央処理ユニット(CPU)またはプロセッサを含む。CPUは、コンピュータ実行型命令を含有するメモリ、ROMまたはコンピュータ可読媒体に接続できる。コンピュータ可読媒体は、システムがアクセスできる任意の利用可能な媒体であることが可能であり、コンピュータ可読命令、データ構造、プログラムモジュールまたは他のデータなどの情報の記憶のための任意の方法または技術で実装された、揮発性および不揮発性媒体、リムーバブルおよびノンリムーバブル媒体のどちらも含む。コンピュータ記憶媒体は、これに限定されるわけではないが、RAM、ROM、EEPROM、フラッシュメモリ、ポータブルメモリまたは他のメモリ技術、CD-ROM、デジタル多目的ディスク(DVD)もしくは他の光学ディスク記憶、磁気カセット、磁気テープ、磁気ディスク記憶もしくは他の磁気記憶デバイス、または所望のデータを記憶するのに使用可能であり、指紋生成一致システムがアクセスできる任意の他の媒体を含む。通信媒体は通例、コンピュータ可読命令、データ構造、プログラムモジュールまたは他のデータを、搬送波または他の運搬機構などの変調データシグナルとして具体化し、任意の情報送達媒体を含む。一例として、制限なく、通信媒体は、

10

20

30

40

50

有線ネットワークまたは直接配線接続などの有線媒体、ならびに音響、RF、赤外および他の無線媒体などの無線媒体を含む。上のいずれの組合せも、コンピュータ可読媒体の範囲内に含まれるべきである。コンピュータ可読媒体は、本明細書に記載するシステムの全部または一部を実装する命令またはデータを記憶し得る。

【 0 1 7 4 】

装置および方法が現在最も実用的で好ましい実施形態であると思なされるものに関して説明されてきたが、本開示が開示された実施形態に限定される必要がないことが理解されるべきである。本開示は、請求項の精神および範囲に含まれる各種の変更および類似の構成を対象とすることを意図するものであり、請求項の範囲は、これらの変更および類似の構成をすべて含むために、最も広範な解釈を与えられるべきである。本開示は、以下の請求項のありとあらゆる実施形態を含む。

Academia-60451-Sequence\_ST25.txt  
SEQUENCE LISTING

<110> Wu, Chung-Yi  
Wong, Chi-Huey

<120> GLYCAN ARRAYS ON PTFE-LIKE ALUMINUM COATED GLASS SLIDES AND RELATED METHODS 10

<130> 37919.60451

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Primer

<400> 1  
ggaattccat atggcaacag taaagttcaa g 31 20

<210> 2  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Primer

<400> 2  
cgggatccct tcttttgctt ctctaacatt tg 32

<210> 3  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 30

<220>  
<223> Linker

<400> 3  
gatctgatct gtacgacgat gacgataagg gatctatcga aggtcgtg 48

<210> 4  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Linker

<400> 4  
gatccacgac cttcgataga tcccttatcg tcatcgtcgt acagatca 48 40

<210> 5

Academia-60451-Sequence\_ST25.txt

<211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer 10

<400> 5  
 gaagatctat acttccgcag cctgatg 27

<210> 6  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer

<400> 6  
 acgcgtcgac ttaggtttca ctgtctgtgt actg 34

<210> 7  
 <211> 29 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer

<400> 7  
 gaagatctga acctgcaaaa gtggttgac 29

<210> 8  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer

<400> 8 30  
 acgcgtcgac ttagggctcc gcagcttcaa gcac 34

【 図 1 】

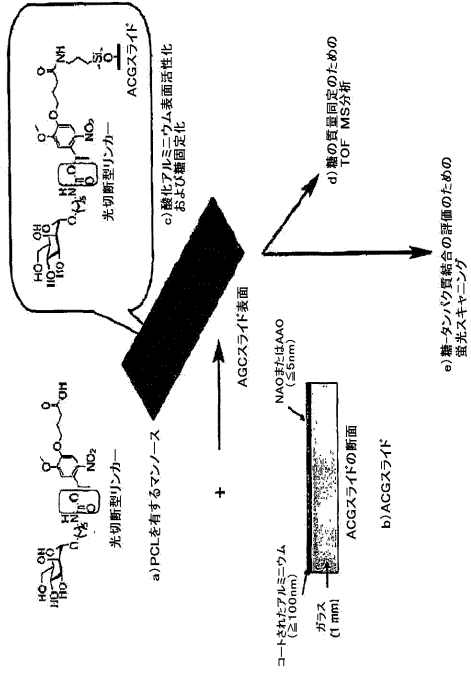


Fig. 1

【 図 2 】

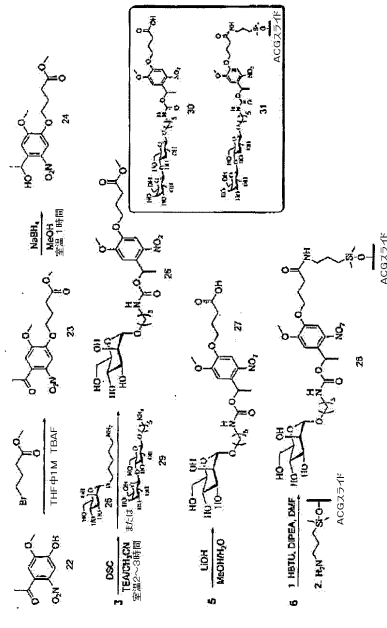


Fig. 2

【 図 3 】

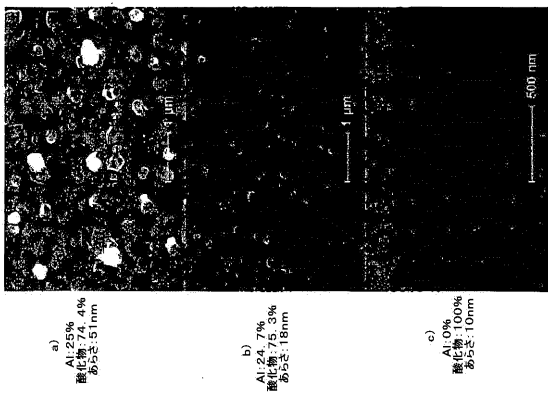


Fig. 3

【 図 4 】

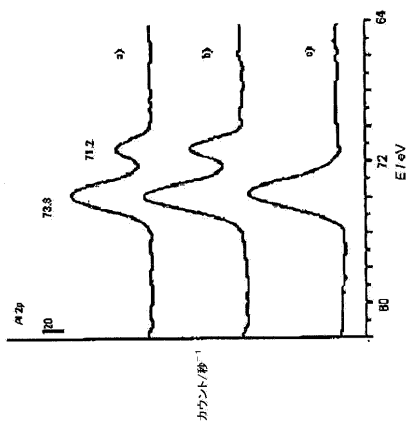


Fig. 4



【 図 9 】

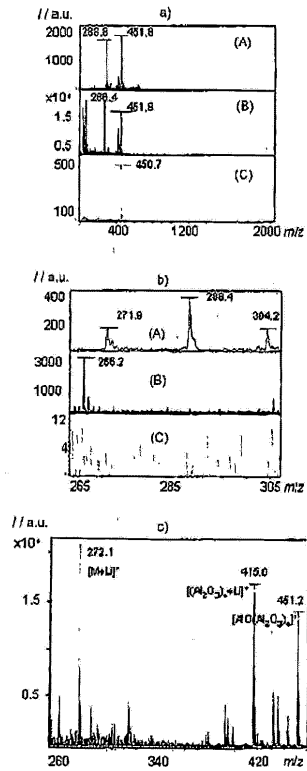


Fig. 9A

Fig. 9B

Fig. 9C

【 図 10 】

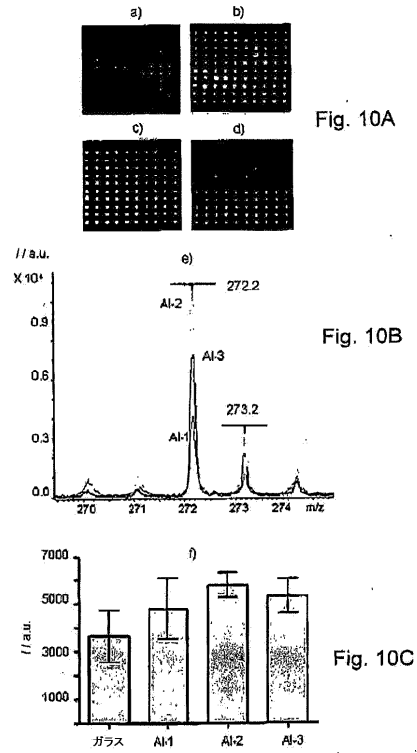


Fig. 10A

Fig. 10B

Fig. 10C

【 図 11 】

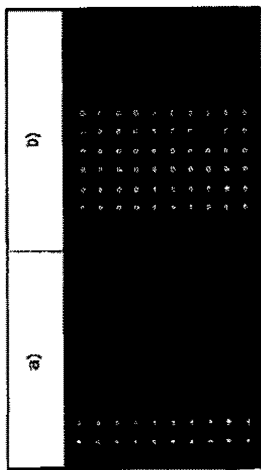


Fig. 11

【 図 12 】

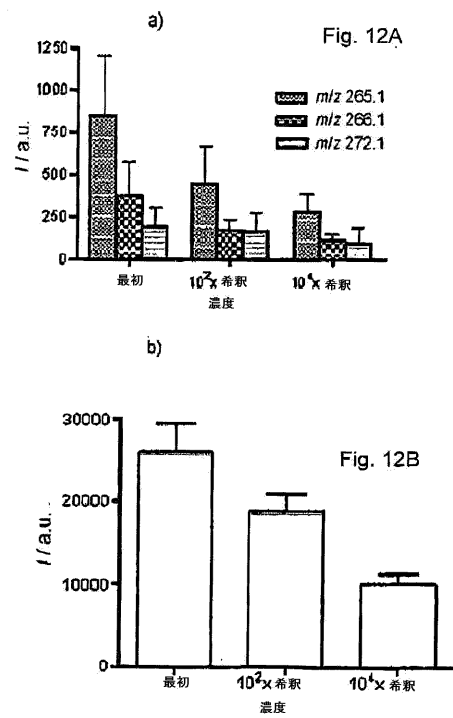


Fig. 12A

Fig. 12B

【 図 1 3 】

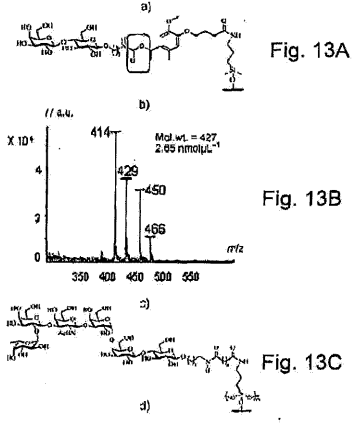
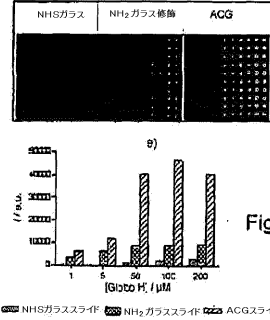


Fig. 13D

Fig. 13E



■ NHISガラススライフ ■ NH<sub>2</sub>ガラススライフ ■ ACGスライフ

【 図 1 4 】

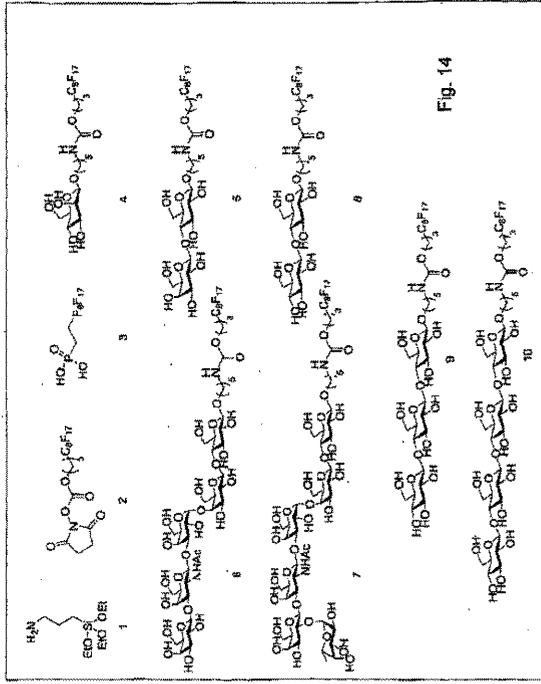


Fig. 14

【 図 1 5 】

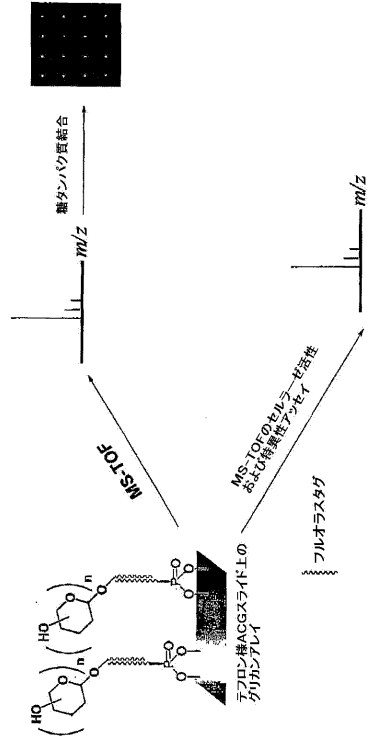


Fig. 15

【 図 1 6 】

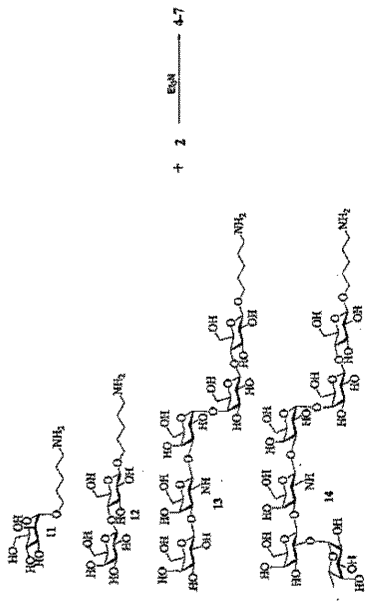


Fig. 16



【 20A 】

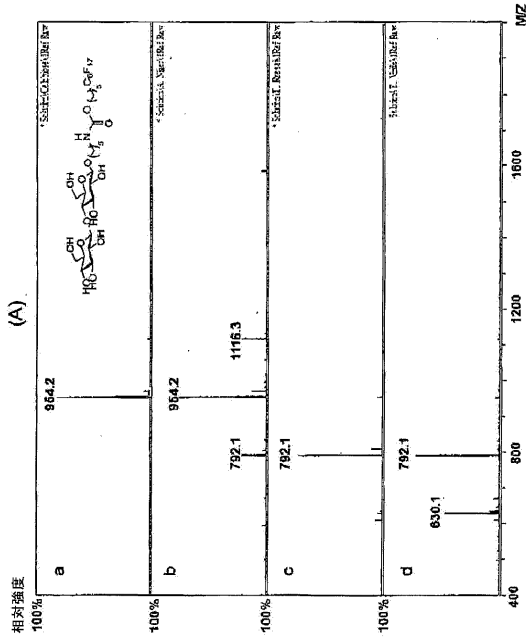


Fig. 20A

【 20B 】

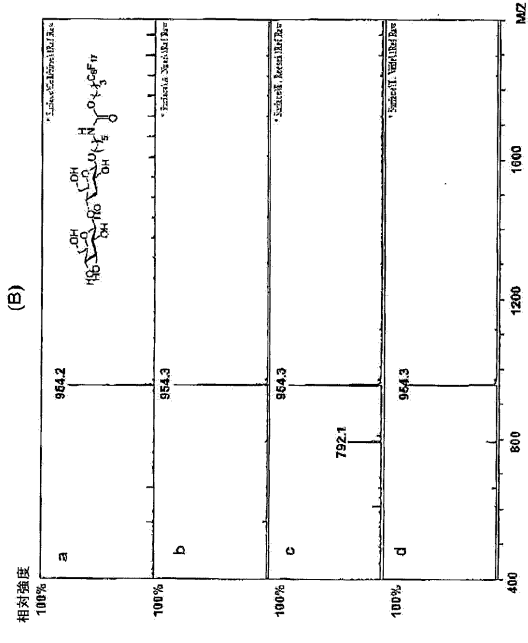


Fig. 20B

【 21 】

Fig. 21A

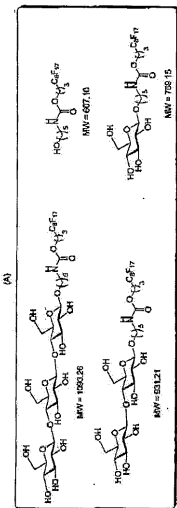
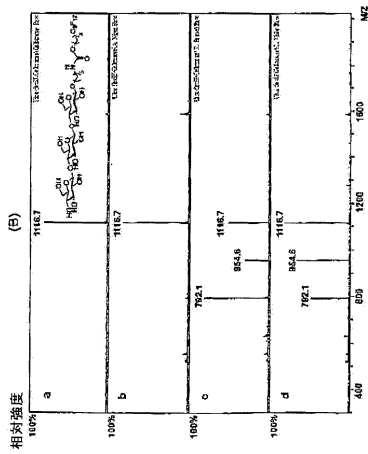


Fig. 21B



【 22 】

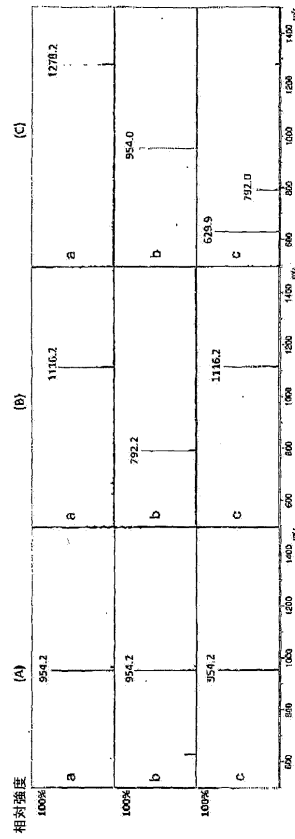


Fig. 22

【 図 2 3 】

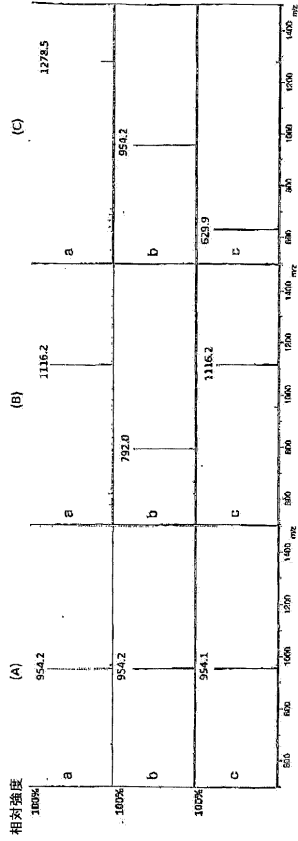


Fig. 23

【 図 2 4 】

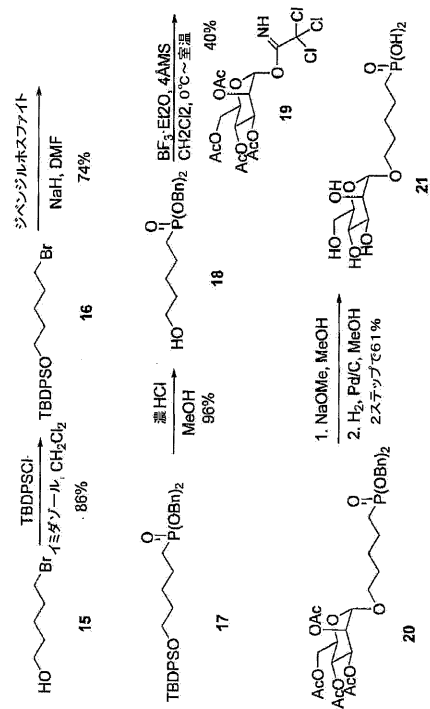


Fig. 24

【 図 2 5 】

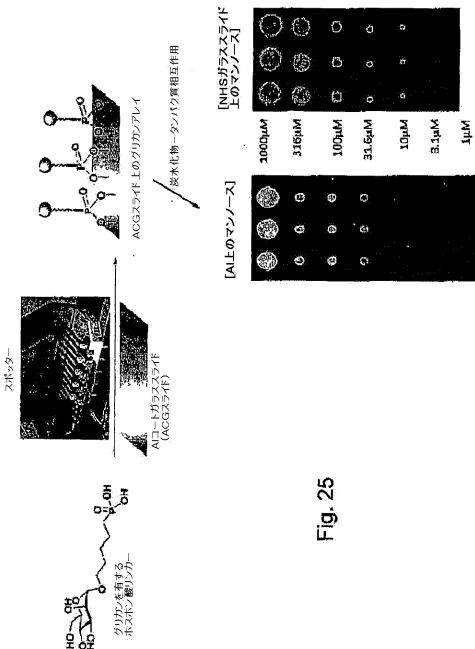


Fig. 25

【 図 2 6 A 】

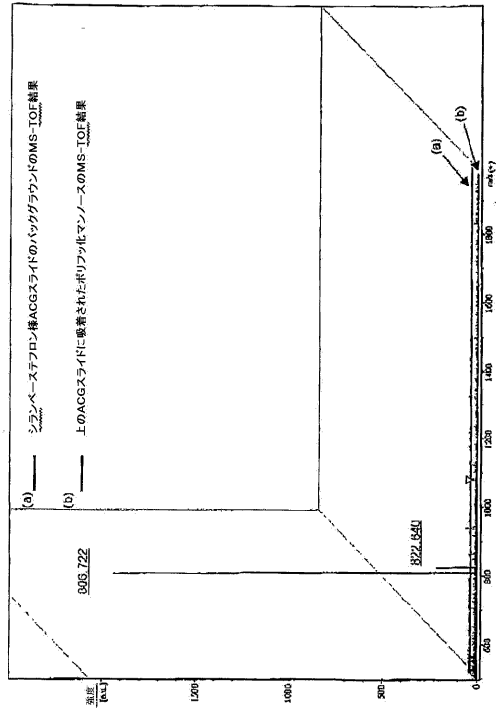


Fig. 26A

【 図 2 6 B 】



Fig. 26B

【 図 2 7 A 】

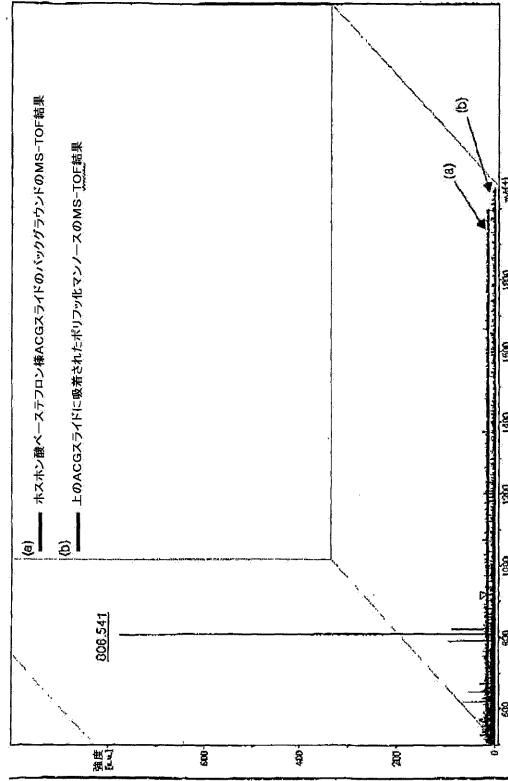


Fig. 27A

【 図 2 7 B 】

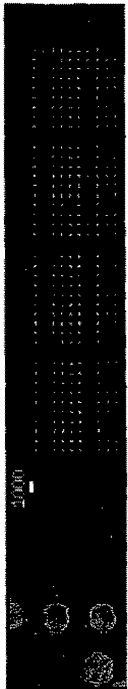


Fig. 27B

【 図 2 8 】

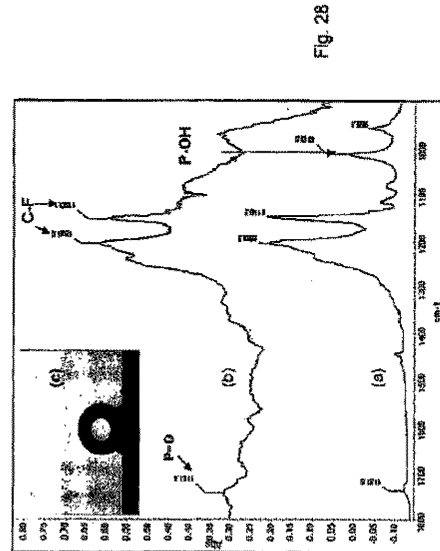


Fig. 28

## 【手続補正書】

【提出日】平成28年9月29日(2016.9.29)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

金属酸化物コート固体基材の上に炭水化物が固定化された炭水化物のアレイであって、前記アレイが金属酸化物コート固体基材の表面上の別々の位置に固定化された複数の炭水化物を含み、前記アレイが：

前記炭水化物と前記炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子との間の結合反応の分析を実行するために好適である、炭水化物のアレイ。

【請求項2】

前記基材が電場について伝導性または半導性である、請求項1に記載のアレイ。

【請求項3】

前記固体基材がガラスである、請求項1に記載のアレイ。

【請求項4】

前記炭水化物がグリカンである、請求項1に記載のアレイ。

【請求項5】

前記炭水化物が多糖類、オリゴ糖、複合糖質の炭水化物部分、セロビオース、セロトリオース、セロテトラオース、G l o b o H、またはG b 5である、請求項4に記載のアレイ。

【請求項6】

前記炭水化物がホスホン酸官能基によって修飾されている、請求項1に記載のアレイ。

【請求項7】

前記金属酸化物が酸化アルミニウムであって、前記ホスホニル化炭水化物が、前記酸化アルミニウムコート固体基材の表面上でのホスホン酸基と酸化アルミニウムとの間の共有結合によって、前記基材の表面上に固定化される、請求項1に記載のアレイ。

【請求項8】

前記炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子がタンパク質である、請求項1に記載のアレイ。

【請求項9】

前記タンパク質がレクチンまたは抗体である、請求項8に記載のアレイ。

【請求項10】

前記アレイに固定化された炭水化物への結合について分析される前記タンパク質が検出可能な標識で標識される、請求項8に記載のアレイ。

【請求項11】

前記タンパク質標識が蛍光染料を含む、請求項10に記載のアレイ。

【請求項12】

前記蛍光染料がアミン反応性染料を含む、請求項11に記載のアレイ。

【請求項13】

炭水化物と前記炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子との間の結合反応を分析するための方法であって：

(a) 請求項1に記載の炭水化物のアレイを提供するステップと；

(b) 前記アレイを、前記アレイ表面上に固定化された前記複数の炭水化物の1つ以上に結合する可能性がある1個以上の分子と接触させるステップと；

(c) 前記アレイ表面上の1つ以上の別々の位置での結合反応の存在または非存在を同定

するステップと；  
を含む、方法。

【請求項 1 4】

前記炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子が、検出可能な標識によって標識されたタンパク質である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記タンパク質標識が蛍光染料を含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記蛍光染料がアミン反応性シアニン染料を含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

分子の前記アレイ上の炭水化物への前記結合が、生物学的プロセスを表す、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記生物学的プロセスは、タンパク質折り畳み、タンパク質分泌、タンパク質安定化、ウイルス感染、細菌感染、癌転移、炎症反応、先天免疫、適応免疫、受容体媒介シグナル伝達プロセス、およびバイオ燃料産生からなる群より選択される、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記炭水化物が多糖類、オリゴ糖、複合糖質の炭水化物部分、セロビオース、セロトリオース、セロテトラオース、G l o b o H、または G b 5 である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 0】

請求項 1 ~ 3 いずれかに記載の炭水化物のアレイを製造するための方法であって：

金属酸化物固体基材の表面上の別々の位置に複数の炭水化物をホスホン酸官能基で固定化するステップを含み、

前記炭水化物が共有結合によって固定化され、

前記基材が電場について伝導性または半導性であり、

前記アレイが前記炭水化物と前記炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子との間の結合反応の分析を実行するのに好適である、  
方法。

【請求項 2 1】

前記アレイを炭水化物 - 結合タンパク質と接触させることによって、前記アレイに対して炭水化物結合アッセイを実行するステップをさらに含み、前記アレイ上の 1 つ以上の別々の位置における特異的結合の検出によって、前記アレイが前記炭水化物と前記炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子との間の結合反応の分析を実行するのに好適であることが示される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記炭水化物が糖、糖タンパク質、糖脂質、またはマンノースから選択され、それぞれ内部または非還元性末端アルファ - マンノシル基を含み、前記炭水化物を特異的に結合する可能性がある分子がコンカナバリン A である、請求項 1 4 に記載の方法。

---

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
	G 0 1 N 33/543 5 7 5	
	G 0 1 N 33/53 D	
(72)発明者	チー - ヒュエイ・ワン	
	アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 3 7 , ラ ホーヤ , エヌ . トーリー パインズ	
	ロード 1 0 5 5 0	
(72)発明者	ウー・チャン - イー	
	台湾 1 1 5 2 9 タイペイ , ナンカン , アカデミア ロード セクション 2 1 2 8 ,	
	アカデミア シニカ 気付	
(72)発明者	ツェン・スーザン・ワイ	
	台湾 1 1 5 2 9 タイペイ , ナンカン , アカデミア ロード セクション 2 1 2 8 ,	
	アカデミア シニカ 気付	

【 外国語明細書 】

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

## GLYCAN ARRAYS ON PTFE-LIKE ALUMINUM COATED GLASS SLIDES AND RELATED METHODS

### RELATED APPLICATION

**[0001]** This application claims the benefit of and priority to U.S. Provisional Application Serial No. 61/080,931, filed July 15, 2008 and U.S. Provisional Application Serial No. 61/107,624, filed October 22, 2008, the contents of which are incorporated by reference herein in their entirety.

### BACKGROUND

**[0002]** Glycan arrays on novel aluminum coated glass slides, including poly-fluorophosphonated aluminum coated glass slides, allow characterization by mass spectrometry without matrix, fluorescence assessment of sugar-protein binding, and identification and study of enzymes with different efficiency and specificity.

**[0003]** Based on the SWISS-PROT protein database, more than 50% of human proteins are predicted to be glycosylated. Carbohydrates often exist on cell surfaces as glycoprotein or glycolipid conjugates and play important structural and functional roles in numerous biological recognition processes, for example, protein folding, secretion and stabilization, viral and bacterial infection, cancer metastasis, inflammatory response, innate and adaptive immunity, and many other receptor mediated signaling processes. Moreover, there exist many examples in which glycosylation is required for biological activities. Furthermore, many organisms such as sessile plants have evolved specific glycosylation mechanisms to detoxify harmful exogenous xenobiotics.

**[0004]** Despite the increasing awareness of the biological significance of carbohydrates, the study of carbohydrate-protein interactions still encounters much difficulty, largely because of the structure complexity and synthetic difficulty of carbohydrates and the low affinity of their interactions with glycan-binding proteins (GBPs). Typically the monomeric dissociation constant ( $K_D$ ) in a carbohydrate-protein interaction is in the millimolar range; thus, carbohydrate-mediated biological responses

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

are often through multivalent interaction on the cell surface in order to achieve high affinity and specificity.

**[0005]** A major challenge in cell biology is to define the interaction of oligosaccharides and proteins involved in many biological processes. However, pure oligosaccharides are difficult to obtain and there is a need for development of highly sensitive and high-throughput methods for identification and binding study of carbohydrates recognized by various receptors.

**[0006]** Carbohydrate microarrays are a powerful tool for the study of glycobiology and the high-throughput bioassay of epidemic diseases. A fundamental problem of this technology is how to characterize and quantify the oligosaccharides that are covalently bound to the surface. Effective immobilization of sugars on the surface is essential for surviving consecutive substrate washing when evaluating sugar–protein binding. Mass spectrometry (MS) has been reported to be a useful analytical method for the high-throughput characterization of immobilized sugars on porous glass slides.

**[0007]** Although a variety of substrates are commercially available for glycan arrays, they are not suitable for direct mass spectrometric analysis. These substrates include glass and polyethylene terephthalate (PET) coated with amine, carboxylate, N-hydroxysuccinimide (NHS), avidin, epoxy, aldehyde, chelating nickel groups, and so on. In fact, NHS-functionalized glass slides are commonly used for the preparation of glycan arrays. A typical example is that of sugar antigens immobilized on the surface of the glass slide, after which a sugar-binding monoclonal antibody and a fluorescence-tagged secondary antibody were incubated for studies of protein–carbohydrate interaction. Although effective, these glass slides are not ideal for use to characterize the bound sugars by mass spectrometry.

**[0008]** Substrates selected for matrix-assisted laser desorption–ionization time-of-flight (MALDI-TOF) MS should be conductive or semiconductive so that a uniform electric field can be produced under high vacuum. Standard stainless-steel plates are usually the choice for loading the analytes.

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

**[0009]** In MALDI MS, the energy of the pulse laser beam is absorbed by the matrix (miscible organic chemicals) to prevent sample fragmentation. MALDI-TOF MS is an excellent tool for analyzing high-molecular-weight biomolecules. However, the chemicals in the organic matrix interfere with low-molecular-weight oligosaccharides (typically less than 2000 Da); thus, porous silicon was chosen as the substrate for analyzing biomolecules by MS without the addition of matrix chemicals. In desorption-ionization on silicon (DIOS) MS, biomolecules of relatively low molecular weight were identified on the basis of the m/z ratio of the pseudoparent peak from MS.

#### **SUMMARY**

**[0010]** According to a feature of the present disclosure, an array of carbohydrates immobilized on an aluminum-coated transparent solid substrate or a PTFE-like aluminum-coated transparent solid substrate is disclosed. The array comprises a plurality of carbohydrates immobilized at discrete locations on a surface of an aluminum-coated transparent solid substrate, wherein the array is suitable for (a) performing mass spectroscopic characterization of the immobilized carbohydrates, and (b) performing analysis of binding reactions between the carbohydrates and molecules suspected of specifically binding the carbohydrates.

**[0011]** According to features of the present disclosure, the substrate may be conductive or semiconductive of an electrical field.

**[0012]** According to a feature of the present disclosure, the transparent solid substrate may be glass.

**[0013]** According to a feature of the present disclosure, the carbohydrate may be a glycan.

**[0014]** According to a feature of the present disclosure, the carbohydrates may be immobilized by a non-covalent bond.

**[0015]** According to a feature of the present disclosure, the carbohydrates may be polyfluorinated with a  $-C_nF_{2n+1}$  ( $n \geq 4$ ) tail.

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

**[0016]** According to a feature of the present disclosure, the polyfluorinated carbohydrates may be spotted on the surface of the PTFE-like aluminum-coated transparent solid substrate.

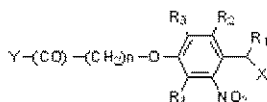
**[0017]** According to a feature of the present disclosure, the carbohydrates may be immobilized by a covalent bond.

**[0018]** According to a feature of the present disclosure, the carbohydrates may be modified with a phosphonic acid functional group.

**[0019]** According to a feature of the present disclosure, the phosphonylated carbohydrates may be immobilized on the surface of the substrate by a chelating interaction between the phosphonic acid group and the aluminum oxide on the surface of the aluminum-coated transparent solid substrate.

**[0020]** According to a feature of the present disclosure, the carbohydrates may be modified with a photocleavable linker and a silane functional group.

**[0021]** According to a feature of the present disclosure, the photocleavable linker has the general formula:



in which R<sup>1</sup> is hydrogen, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> alkyl; R<sup>2</sup> and R<sup>4</sup> are each independently hydrogen, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> alkoxy; R<sup>3</sup> is C<sup>1</sup>C<sup>8</sup> alkoxy; X is O(CO)N-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>5</sup>, in which n ≥ 3, R<sup>5</sup> is carbohydrates, Y is the solid support, like ACG slide.

**[0022]** According to a feature of the present disclosure, the mass spectroscopic characterization of the immobilized carbohydrates comprises a time-of-flight mass spectrometry (MS-TOF).

**[0023]** According to a feature of the present disclosure, the mass spectroscopic characterization of the immobilized carbohydrates comprises a matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry.

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

**[0024]** According to a feature of the present disclosure, the carbohydrates are polysaccharides, or oligosaccharides, or carbohydrate portions of a glycoconjugate, or cellobiose, or cellotriose, or cellotetraose, or GloboH, or Gb5.

**[0025]** According to a feature of the present disclosure, the mass spectroscopic characterization of the immobilized carbohydrates comprises characterization of the carbohydrate products of a cellulase enzyme reaction.

**[0026]** According to a feature of the present disclosure, the cellulase enzyme reaction is performed on immobilized carbohydrates on the array surface, wherein the cellulase enzyme is suspected of being capable of degrading the immobilized polysaccharides, or oligosaccharides, or carbohydrate portions of a glycoconjugate, or cellobiose, or cellotriose, or cellotetraose, or GloboH, or Gb5.

**[0027]** According to a feature of the present disclosure, the MS-TOF characterization can be performed without adding matrix.

**[0028]** According to a feature of the present disclosure, a carbohydrate binding assay can be performed on the array about 15 minutes following an MS-TOF characterization.

**[0029]** According to a feature of the present disclosure, the molecules suspected of specifically binding the carbohydrates are proteins.

**[0030]** According to a feature of the present disclosure, the proteins are cellulases.

**[0031]** According to a feature of the present disclosure, the cellulases are selected from the group consisting of 1,4- $\beta$ -glucosidases, exoglucanases (1,4- $\beta$ -D glucan cellobiohydrolases) and endoglucanases (1,4- $\beta$ -D glucan glucanohydrolases).

**[0032]** According to a feature of the present disclosure, the proteins analyzed for binding to the carbohydrates immobilized on the array are labeled with a detectable label.

**[0033]** According to a feature of the present disclosure, the protein labels comprise fluorescent dyes.

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

**[0034]** According to a feature of the present disclosure, the fluorescent dyes comprise amine-reactive dyes.

**[0035]** According to a feature of the present disclosure, disclosed is a computer readable medium comprising data representing the characterization of immobilized carbohydrates on the surface of the array, or data representing the analysis of the carbohydrate binding reactions on the array surface, or both.

**[0036]** According to a feature of the present disclosure, a method for characterization of carbohydrates immobilized on a PTFE-like aluminum-coated transparent solid substrate is disclosed comprising:

(a) providing an array comprising a plurality of carbohydrates immobilized at discrete locations on a surface of a PTFE-like aluminum-coated transparent solid substrate; and

(b) performing mass spectroscopic analysis to characterize the carbohydrates immobilized at each discrete location.

**[0037]** According to a feature of the present disclosure, the mass spectroscopic characterization of the immobilized carbohydrates comprises a time-of-flight mass spectrometry (MS-TOF).

**[0038]** According to a feature of the present disclosure, the method further comprises:

(c) performing a binding analysis of suspected carbohydrate binding moieties.

**[0039]** According to a feature of the present disclosure, the suspected carbohydrate binding moieties are cellulase proteins.

**[0040]** According to a feature of the present disclosure, the method further comprises:

(d) incubating the cellulase proteins with the bound carbohydrates immobilized on the array surface under conditions suitable for the cellulases to hydrolyze the carbohydrates.

**[0041]** According to a feature of the present disclosure, the method further comprises:

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

(e) characterizing the products of the cellulase proteins remaining immobilized on the array surface following hydrolysis by the cellulases.

**[0042]** According to a feature of the present disclosure, the cellulases are selected from the group consisting of 1,4- $\beta$ -glucosidases, exoglucanases (1,4- $\beta$ -D glucan cellobiohydrolases) and endoglucanases (1,4- $\beta$ -D glucan glucanohydrolases).

**[0043]** According to a feature of the present disclosure, a method for analysis of binding reactions between the carbohydrates and molecules suspected of specifically binding the carbohydrates is disclosed comprising:

(a) providing an array comprising a plurality of carbohydrates immobilized at discrete locations on a surface of an aluminum-coated transparent solid substrate or a PTFE-like aluminum-coated transparent solid substrate;

(b) contacting the array with one or more molecules suspected of binding to one or more of the plurality of carbohydrates immobilized on the array surface; and

(c) identifying the presence or absence of binding reactions at one or more discrete locations on the array surface.

**[0044]** According to a feature of the present disclosure, the molecules suspected of specifically binding the carbohydrates are proteins labeled with a detectable label.

**[0045]** According to a feature of the present disclosure, the protein labels comprise fluorescent dyes.

**[0046]** According to a feature of the present disclosure, the fluorescent dyes comprise amine-reactive cyanine dyes.

**[0047]** According to a feature of the present disclosure, the binding of a molecule to a carbohydrate on the array is representative of a biological process.

**[0048]** According to a feature of the present disclosure, the biological process is selected from the group consisting of protein folding, protein secretion, protein stabilization, viral infection, bacterial infection, cancer metastasis, inflammatory response, innate immunity, adaptive immunity, a receptor-mediated signaling process, and biofuel production.

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

**[0049]** According to a feature of the present disclosure, the carbohydrates are polysaccharides, or oligosaccharides, or carbohydrate portions of a glycoconjugate, or cellobiose, or cellotriose, or cellotetraose, or GloboH, or Gb5.

**[0050]** According to a feature of the present disclosure, a mass spectroscopic characterization of the carbohydrates immobilized on the array is performed prior to the binding analysis.

**[0051]** According to a feature of the present disclosure, a mass spectroscopic characterization of the carbohydrates immobilized on the array is performed prior to and following the binding analysis, wherein the one or more molecules suspected of binding to one or more of the plurality of carbohydrates immobilized on the array surface comprises a cellulose protein enzyme capable of hydrolyzing one or more carbohydrates on the array, and wherein the binding reaction is performed under conditions suitable for the cellulose to hydrolyze the carbohydrate.

**[0052]** According to a feature of the present disclosure, the cellulases are selected from the group consisting of 1,4- $\beta$ -glucosidases, exoglucanases (1,4- $\beta$ -D glucan cellobiohydrolases) and endoglucanases (1,4- $\beta$ -D glucan glucanohydrolases).

**[0053]** According to a feature of the present disclosure, a method for fabricating an array of carbohydrates immobilized on an aluminum coated transparent solid substrate or a PTFE-like aluminum-coated transparent solid substrate is disclosed comprising: (a) immobilizing a plurality of carbohydrates at discrete locations on a surface of an aluminum coated transparent solid substrate or a PTFE-like aluminum-coated transparent solid substrate, wherein the substrate is conductive or semiconductive of an electrical field, wherein the array is suitable for performing mass spectroscopic characterization of the immobilized carbohydrates, and wherein the array is suitable for performing analysis of binding reactions between the carbohydrates and molecules suspected of specifically binding the carbohydrates.

**[0054]** According to a feature of the present disclosure, the carbohydrates are immobilized by a non-covalent bond.

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

**[0055]** According to a feature of the present disclosure, the carbohydrates are polyfluorinated.

**[0056]** According to a feature of the present disclosure, the carbohydrates are immobilized by a covalent bond.

**[0057]** According to a feature of the present disclosure, the carbohydrates are modified with a phosphonic acid functional group.

**[0058]** According to a feature of the present disclosure, the method further comprises (b) performing a characterization of carbohydrates immobilized on the array surface by mass spectrometry, wherein observation of one or more of a high signal/noise (S/N) ratio, low laser fluence rate, or a low fragmentation of signal, in an absence of matrix material is indicative of the array being suitable for performing mass spectroscopic characterization of the immobilized carbohydrates.

**[0059]** According to a feature of the present disclosure, the method further comprises (c) performing a carbohydrate binding assay on the array by contacting the array with a carbohydrate-binding protein, wherein detection of specific binding at one or more discrete locations on the array is indicative of the array being suitable for performing analysis of binding reactions between the carbohydrates and molecules suspected of specifically binding the carbohydrates

**[0060]** According to a feature of the present disclosure, the carbohydrate is selected from a sugar, or a glycoprotein, or a glycolipid, or mannose, each comprising internal or nonreducing terminal alpha-mannosyl groups and the binding molecule is Concanavalin A.

**[0061]** According to a feature of the present disclosure, an array for use in disease diagnosis and drug discovery is disclosed, wherein the array is fabricated by (a) immobilizing a plurality of carbohydrates at discrete locations on a surface of an aluminum coated transparent solid substrate or a PTFE-like aluminum-coated transparent solid substrate, wherein the substrate is conductive or semiconductive of an electrical field, wherein the array is suitable for performing mass spectroscopic

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

characterization of the immobilized carbohydrates, and wherein the array is suitable for performing analysis of binding reactions between the carbohydrates and molecules suspected of specifically binding the carbohydrates..

#### **DRAWINGS**

**[0062]** The above-mentioned features and objects of the present disclosure will become more apparent with reference to the following description taken in conjunction with the accompanying drawings wherein like reference numerals denote like elements and in which:

**[0063]** Fig. 1 is a block diagram of implementations and experimental aluminum coated glass (ACG) slide and related experimental techniques;

**[0064]** Fig. 2 is a scheme showing an implementation of the synthesis of mannose–ACG and lactose–ACG with a photocleavable linker;

**[0065]** Fig. 3 are microscopy photographs of implementations of aluminum coated glass slides;

**[0066]** Fig. 4 are graphs of experimental data illustrating the surface composition of ACG slides made by various methods;

**[0067]** Fig. 5 are visual representations of implementations of the optical properties of the micro glass slide, the semitransparent ACG slide, and the totally reflective (nontransparent) ACG slide;

**[0068]** Fig. 6 are graphs of implementations of experimental data showing ATR/FTIR spectra of Al–OH on an ACG slide;

**[0069]** Fig. 7 are photographs of the water contact angle on ACG slides demonstrating the efficacy of activation;

**[0070]** Fig. 8 is an implementation of a scheme for selective bond cleavage and detection of a sugar (mannose) derivative by ultraflex TOF mass spectrometry;

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

**[0071]** Fig. 9 shows implementations of mass spectroscopy data on a pure aluminum plate and an ACG slide;

**[0072]** Fig. 10 shows implementations of protein-binding assays of ACG slides formed by cathode arc evaporation upon treatment with a) oxygen plasma (Al-1), b) argon plasma (Al-2), and c) a mixture of oxygen and argon plasma (Al-3) prior to APDMES grafting;

**[0073]** Fig. 11 are photographs of implementations of a fluorescence-tagged protein-binding assay of mannose immobilized on a glass slide and an ACG slide;

**[0074]** Fig. 12 are graphs of implementations of experimental data showing comparison of the peak intensities of the ultraflex TOF mass spectra of mannose with a photo cleavable linker (PCL) grafted on ACG slides with the fluorescence intensities of mannose-protein-bound ACG slide formed by thermal coating followed by electrochemical anodization on the slide surface;

**[0075]** Fig. 13 shows data related to implementations of utilization of  $\text{NH}_2$ -ACG surfaces modified through conversion into NHS-ACG by treatment with disuccinimidyl suberate (DSS) in DMF and diisopropylethylamine;

**[0076]** Fig. 14 are chemical formulae of structures of compounds used in ACG-mass spectroscopy experiments;

**[0077]** Fig. 15 is a block diagram of an implementation of the creation of non-covalent bond glycan array on the PTFE-like ACG slide;

**[0078]** Fig. 16 is a scheme illustrating the synthesis of implementations of poly-fluorinated carbohydrates 4-7;

**[0079]** Fig. 17 are representations of implementations of experimental data using the PTFE-like ACG slides having poly-flourinated carbohydraytes bound to them;

**[0080]** Fig. 18 are graphs of implementations of experimental data of mass spectra of Globo H on ACG slide by using different laser fluence rate without matrix addition;

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

**[0081]** Fig. 19 are graphs of implementations of experimental data of mass spectra of Globo H on ACG slide by using different laser fluence rate with matrix;

**[0082]** Fig. 20 are graphs of implementations of experimental data of MS-TOF data of enzymatic hydrolysis of poly-fluorinated cellobiose in solution and immobilized on PTFE-like ACG slide with the cellulase proteins from *A. niger*, *T. reesei*, and *T. viride*;

**[0083]** Fig. 21 are chemical structures and graphs of implementations of experimental data showing the effect of cellulases on cellotriose;

**[0084]** Fig. 22 is a graph of an implementation of experimental MS-TOF data of enzymatic hydrolysis of poly-fluorinated cellobiose (A), poly-fluorinated cellotriose (B) and poly-fluorinated cellotetraose (C) in solution;

**[0085]** Fig. 23 is a graph of an implementation of experimental MS-TOF data of enzymatic hydrolysis of poly-fluorinated cellobiose (A), poly-fluorinated cellotriose (B) and poly-fluorinated cellotetraose (C) on an ACG glass slide;

**[0086]** Fig. 24 is a scheme for the synthesis of mannose derivative **21**;

**[0087]** Fig. 25 is a block diagram of an implementations of a method of creation of covalent bonding glycan array on the ACG slide;

**[0088]** Fig. 26 are graphs of implementations of experimental data characterizing silane-based PTFE-like ACG slide by MS-TOF and protein-sugar binding;

**[0089]** Fig. 27 are graphs of implementations of experimental data characterizing phosphonic acid-based PTFE-like ACG slides by MS-TOF and protein-sugar binding;

**[0090]** Fig. 28 are graphs of implementations of experimental an FTIR spectrum of Pure Compound **3** (HDFDPA, 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,- 9,9,10,10,10-heptafluorodecylphosphonic acid) and an FTIR spectrum of ACG surface grafted compound **3**.

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

**DETAILED DESCRIPTION**

**[0091]** In the following detailed description of embodiments of the present disclosure, reference is made to the accompanying drawings in which like references indicate similar elements, and in which is shown by way of illustration specific embodiments in which the present disclosure may be practiced. These embodiments are described in sufficient detail to enable those skilled in the art to practice the present disclosure, and it is to be understood that other embodiments may be utilized and that logical, mechanical, electrical, functional, and other changes may be made without departing from the scope of the present disclosure. The following detailed description is, therefore, not to be taken in a limiting sense, and the scope of the present disclosure is defined only by the appended claims. As used in the present disclosure, the term “or” shall be understood to be defined as a logical disjunction and shall not indicate an exclusive disjunction unless expressly indicated as such or notated as “xor.”

**[0092]** This disclosure incorporates by reference U.S. Patent Publication No. 2007/0213278, filed December 22, 2006.

**[0093]** As used herein, the term Teflon or PTFE refers to polytetrafluoroethylene.

**[0094]** Effective adhesion between sugar molecules and the substrate surfaces have been achieved through covalent bonding. Physical adsorption of sugar derivatives on fluorinated surfaces may also be feasible for sufficient adhesion. Porous silicon plates also acted as a matrix in DIOS MS, and mass spectra were obtained with a high signal-to-noise (S/N) ratio without fragmentation. The preparation of porous silicon plates requires the usage of corrosive acid, which is not environmentally friendly, and the quality of the plates is difficult to control. On the other hand, porous aluminum oxide exists naturally on the surface of aluminum; the electrochemical anodization of aluminum-coated glass (ACG) slides can be carried out in mildly acidic aqueous solution. Silylation reactions on silicon surfaces can also be used on aluminum surfaces under proper conditions. The freshly cut surface of plate aluminum has a shiny metallic texture. When exposed to air, the surface gradually oxidizes and turns opaque as a layer of aluminum oxide (called native oxide) is formed. Native aluminum oxide (NAO)

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

grown on aluminum surfaces has no orientation compared to that of anodized aluminum oxide (AAO). The thickness of NAO on aluminum surfaces is just a few nanometers. In contrast, the thickness of AAO could grow quickly (within 15–20 min) to the micrometer range with the growing direction aligned to an applied electric field. In a few trial experiments, pure aluminum plates were fabricated (with a thickness of 1 mm) and the AAO layer was grown to 2 mm on the surface of the plate. This surface with a thick layer of AAO became nonconductive (like ceramics) and was not suitable for our study. However, in all cases, the amorphous oxide layers on the aluminum surfaces could be modified chemically, and the substrate remained electrically conductive only when the thickness of the oxide layer on the surface was in the nanometer range.

**[0095]** According to implementations illustrated in Fig. 1, several new substrates with a thin layer of aluminum oxide on the surface of ACG slides were fabricated in an attempt to characterize the molecular weight of the surface-grafted oligosaccharide and simultaneously to look for its sugar–protein binding capability. Designed mannose and lactose derivatives with a built-in photocleavable linker (PCL) were synthesized and covalently bound to the activated ACG slides, as illustrated according to implementations shown in Fig. 2. Without addition of a miscible organic matrix, the sugar-immobilized ACG slides were subjected to molecular-weight identification and protein-binding evaluation.

**[0096]** Cellulases are of current interest because of their application to biofuel production. Cellobiose or celotriose with fluorogenic or chromogenic groups are commonly used as substrates for the investigation of cellulase activity and specificity. However, during enzymatic hydrolysis, the fluorogenic or chromogenic leaving group generated in the reaction showed signal only at high pH, but, cellulases exhibit their optimum activity at low pH (4–6). Poly-fluorinated cellobiose was immobilized non-covalently on the PTFE-like ACG slides, and conducted the enzymatic hydrolysis at pH 4–6 *in situ*. The hydrolyzed products remaining on the slide surface were then identified by MS-TOF.

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

**[0097]** Moreover, the recently developed aluminum coated glass (ACG) slides were oxidized and reacted with a functionalized alkyl monoethoxysilane to form a covalent handle, followed by coupling with a glycan containing the photo-cleavable linker. This glycan array with a photo-cleavable linker on the ACG slide surfaces can be characterized by time-of-flight mass spectrometry (MS-TOF) without matrix, and used for binding evaluation of fluorescence-tagged proteins. The fluorescence intensity of sugar-protein complex on ACG-slide is higher than on glass slides. A new method is therefore disclosed for fabricating stable poly-fluorinated (also called the PTFE-like) ACG slides, and the use of these slides for non-covalent arraying glycans as substrates for the study of cellulase activities by using mass spectrometry as a detector. Moreover, by using the property of phosphonic acid can chaete with the aluminum oxide surface easily, the carbohydrate with a phosphonic acid linker to rapid was used to create covalent bonding glycan array.

**[0098]** According to implementations, a new generation of carbohydrate array on PTFE-like ACG slides have been developed for immobilizing sugars. Mannose and lactose with a built-in photocleavable linker immobilized on the ACG slide surfaces were subjected to MALDI MS analysis to characterize the molecular weight of the immobilized sugars. A proportional correlation was observed between the quantity of mannose (m/z) and the fluorescence intensity of its protein binding. In protein-binding assays of mannose-ACG and Globo H-ACG slides, higher fluorescence intensity and sensitivity was observed than with glass slides, perhaps due to the material properties, surface morphologies, and binding-site architectures between proteins and the immobilized sugars on the slide surfaces.

**[0099]** With mass spectrometry, this glycan array can be used as an effective analytical tool to identify and differentiate various types of cellulases and their efficiency. The unique properties of aluminum oxide coated glass slides make it possible to conveniently and non-covalently or covalently array glycans via phosphonate chemistry and the glycan array can be characterized with MS spectrometry without the use of matrix.

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

**[00100]** According to implementations, Fig. 1 illustrates a novel experimental ACG slide and related methods for experimentation thereon. In a), a sugar derivative such as mannose with a built-in photocleavable linker is created, according to implementations. In b) ACG slide (75.5 x 25.4 x 1 mm<sup>3</sup>) with layers of aluminum oxide (<5 nm) on the surface and pure aluminum (>100 nm) coated on the glass slide (1 mm) is shown. In c) the ACG slide was optionally activated, and the sugar derivatives were immobilized (microarrayed and manually spotted) on the surface. The slide was subjected to molecular-weight identification of the sugar by mass spectrometry in d) or further evaluated for its sugar-protein binding by a fluorescence scanner in e).

**[00101]** According to implementations and as illustrated in Fig. 2, a scheme is shown the synthesis of mannose-ACG and lactose-ACG with a photocleavable linker; DIPEA=N,N-diisopropylethylamine, DSC=N,N'-disuccinimidyl carbonate, HBTU=2-(1-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (TBAF=tetra-n-butylammonium fluoride, TEA=triethylamine).

**[00102]** According to implementations and as illustrated in Fig. 15, a block diagram of an implementation of the creation of non-covalent bond glycan array on the PTFE-like ACG slide is shown. According to the implementation, sugars are reversibly bonded via a poly-fluorinated tail to an ACG slide. Various mass spectroscopy experiments are then performed. For example, MS-TOF is performed in a sugar-binding assay, or cellulase activity and specificity assay by MS-TOF may be performed.

**[00103]** Artisans will readily appreciate both the utility of the apparatuses disclosed herein, as well as the various experimental methods based on the Examples and other disclosure provided here. Such devices and methods are expressly contemplated in this disclosure.

## EXAMPLES

### Example 1: Surface Properties of ACG Slides

**[00104]** A layer of pure aluminum (99.999%) at least 100 nm thick was coated onto the micro glass slides by using various coating techniques, such as magnetron

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

sputtering, cathode arc evaporation, and thermal coating. These slides were either used without further manipulation or electrically anodized before usage. According to implementations, Fig. 3 shows their surface morphology, composition, and roughness as determined by scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) of an ACG slide. Fig. 3A shows aluminum deposited by cathode arc evaporation, Fig. 3B shows an aluminum coating deposited by magnetron sputtering, and Fig. 3C shows aluminum AAO/ACG slide obtained by thermal coating followed by electrochemical surface anodization.

**[00105]** As can be seen, the ACG slide produced by cathode arc evaporation has a coating of large granules and a high surface roughness. Slides with high surface roughness affect the surface-wetting property. The magnetron-sputtered ACG slide gave an acceptable surface roughness; however, it required a long coating time to achieve the desired coating thickness and was used only at the early stages of this study. Thermal coated ACG slides achieved the desired coating thickness in a relatively short time. It gave the smoothest surface with a surface roughness of 10 nm. With subsequent surface-anodization treatment, the ACG slide provided a stable surface for grafting. Only the anodized slide surfaces were covered with 100% aluminum oxide, as shown in Fig. 4.

**[00106]** According to implementations of experimental data shown in Fig. 4, XPS spectra of the surface composition of a) an NAO/ACG slide obtained by cathode arc evaporation, b) an NAO/ACG slide obtained by magnetron sputtering, and c) an AAO/ACG slide obtained by thermal coating followed by surface anodization are shown. The binding energy for C(1s) at 284.5 eV and O(1s) at 531 eV were used to calibrate the binding energy of these spectra. The electrical resistance of the ACG slide (end-to-end distance) was measured between 1.6 and 4  $\Omega$ . These slides became electrically nonconductive when the oxide layer grew thick. The depth of penetration for XPS was 20–50 Å, and the thickness of the oxide layer (either NAO or AAO) in this study was estimated from the cross-section to be no more than 5 nm.

**[00107]** The thickness of coated aluminum on the glass slide needs to be >100 nm so that the substrate remains non-transparent within the visible region. When a

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

transparent substrate was used, part of the fluorescent light passed through the substance, and the scanner detected only a portion of the Cy3 fluorescence. The instrument detected more fluorescent light when a nontransparent ACG slide was used as the background substrate.

**[00108]** Fig. 5 shows data the optical properties of ACG slides compared to those of the micro glass slide. The thickness of the coated aluminum on the semitransparent ACG slides was just a few nanometers, and that of the reflective ACG slides was approximately 300 nm. Fig. 5 shows the optical properties of the micro glass slide, the semitransparent ACG slide, and the totally reflective (nontransparent) ACG slide. In Fig. 5A, a series of Cy3-streptavidin solutions of 1 mg/mL diluted 1000x, 2000x, 5000x, 10000x, and 20000x was spotted on each of these slides, air-dried, and analyzed with an arrayWoRx fluorescence spectrometer. A light source of wavelength 540 nm was provided by the instrument. Fluorescence of wavelength 595 nm was emitted from the slide surface and detected by the detector. The scanner detected the fluorescence only up to 5000x dilution for the transparent micro glass slide, but up to 10000x and 20000x times dilution, respectively, for the semitransparent ACG slide and the totally reflective ACG slide, in which the thickness of the coated aluminum varied from a few nanometers in the former to greater than 100 nm in the latter. Fig. 5B shows implementations of experimental data wherein the actual calculated fluorescence intensity for each substrate is shown.

#### **Example 2: Surface Activation**

**[00109]** In the screening experiments, plasma of oxygen, argon, and mixed gases of oxygen and argon were tested for slide-surface activation. The residues (CO, CO<sub>2</sub>, and H<sub>2</sub>O) were removed under vacuum. It is the removal of this surface contamination that contributed to the success of grafting the desired organic compounds chemically. The surface was gauged with an attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR/FTIR) spectrometer. The ATR/FTIR spectra showed Al-OH peaks at around 800–1100 cm<sup>-1</sup>, as illustrated in Fig. 6, indicating that the surface had converted into Al-OH after the surface-cleaning process. According to implementations, the plasma treatment

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

uses just enough plasma energy to clean and “tickle” the surface of the ACG slide to remove the organic contamination, but still hold the alumina layer without etching the underlying surface. The activation process was successfully completed by using a mere 6.8 W (at 680 V) of energy for 10 min under a gas-flow pressure of 270–300 mTorr. Argon plasma turned out to be the most effective for grafting sugar derivatives, as observed in later experiments. As shown in Fig. 6, the Al–OH peak intensity in the 800–1100  $\text{cm}^{-1}$  region decreased significantly from 25 to 99 min after plasma treatment.

**[00110]** The hydrophilic surface after plasma treatment gradually became hydrophobic, possibly because the oxide layer on the surface reforms. Disappearance of Al–OH from the substrate surface was traced by ATR/FTIR spectroscopy. The Al–OH peak intensity in the 800–1100  $\text{cm}^{-1}$  region decreased significantly over a matter of hours, as shown in Fig. 6. According to implementations, the ACG slides are activated with 3-aminopropyltrimethylethoxysilane (APDMES) immediately after plasma treatment. This activated ACG surface was used to immobilize the sugar derivative of mannose and lactose with a PCL in the next step of the reaction.

**[00111]** As shown in Fig. 7, the water contact angle on the surface changed during surface activation. According to Fig. 7, the typical changes in water contact angle for ACG slides are shown. Fig. 7A shows a solvent-cleaned ACG slide; Fig. 7B shows an ACG slide treated with plasma; and Fig. 7C shows an ACG slide activated with 3-aminopropyltrimethylethoxysilane. These samples were made and measured as an example with the nontransparent magnetron-sputtered ACG slide. Therefore, measurement of the contact angle can be used as a quick check of the completion of the activation process. Substrates with a high surface roughness tend to give smaller contact angles.

### **Example 3: Mannose with PCL Immobilized on the Activated Surface of the ACG Slide**

**[00112]** As shown in Fig. 2, compound **27**, which has a carboxy functional group, was synthesized. A solution of HBTU and compound **27** was manually spotted and microarrayed on the activated surface of the ACG slide. Amide formation on the surface of the ACG slide took place overnight at room temperature. All salt residues, as well as

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

unbound mannose derivative, were washed away thoroughly with methanol and deionized water. After all these preparations, the substance was ready for mass identification and protein-binding evaluation.

#### **Example 4: Mass Spectrometric Analysis of the Sugar Derivative Grafted on the ACG Slides**

**[00113]** The matrix-free porous silicon surfaces (DIOS) produced molecular-ion peaks with negligible sample fragmentation. The ACG slide dimensions (75.5 x 25.4 x 1 mm<sup>3</sup>) fit well in the ultraflex mass spectrometry instrument; slides at each step of the treatment were analyzed, as shown in Figs. 8 and 9.

**[00114]** Fig. 8 is an implementation of a scheme for selective bond cleavage and detection of a sugar (mannose) derivative by ultraflex mass spectrometry.

**[00115]** Figs. 9A and 9B show the MS data for the early experiments on a pure aluminum plate and ACG slide, whereby the mannose peak intensities were relatively low. Fig. 9A shows the Ultraflex TOF mass spectra of mannose with PCL grafted on (A) a 99.999% pure aluminum plate (1 mm thick) and (B) an ACG slide formed by cathode arc evaporation. (C) represents the background signal for cathode arc evaporation of the ACG slide. Fig. 9B shows the Ultraflex TOF mass spectra of Fig. 9A at the m/z region of interest.

**[00116]** Fig. 9C shows TOF mass spectrum of mannose with PCL grafted on an ACG slide formed by cathode arc evaporation at the m/z region of interest. More specifically, Fig. 9C shows the MS data of the ACG slide produced by cathode arc evaporation, for which the surface-activation conditions were optimized and the peak intensity of the mannose derivative was high. Although the substrates gave large background peaks at m/z 415 and 451 (Figs. 9A and 9C), the molecular weight of the mannose derivative (265) was detected quite easily by its adducts with proton (m/z 266), lithium (m/z 272), sodium (m/z 288), and sometimes potassium (m/z 304) ions.

**[00117]** It is theorized that under high vacuum, UV excimer laser energy vaporizes aluminum oxide clusters to the gas phase; ultraviolet photon ionization produces sparse mass spectra with relatively light aluminum oxide clusters. The majority of the oxide

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

clusters in the gas phase under vacuum consisted of  $\text{AlO}(\text{Al}_2\text{O}_3)_n$ , even though the aluminum oxide clusters could exist in many different forms. In Figs. 9A and 9C, the large background peaks that occurred at  $m/z$  451 and 415 are speculated to belong to the oxide clusters  $[(\text{Al}_2\text{O}_3)_4 + \text{Li}]^+$  and  $[\text{AlO}(\text{Al}_2\text{O}_3)_4]^+$ .

**Example 5: Semiquantitative Comparison of the Content of Mannose with Its Protein-Binding Capability**

**[00118]** The optimization of the plasma gas treatment on the same type of ACG slide was evaluated by the fluorescence intensity of the immobilized sugar–protein binding. Fig. 10 was obtained by selecting the type of gas used for plasma cleaning. ACG slides produced by cathode arc evaporation were exposed to oxygen, argon, or a mixture of oxygen and argon plasma gases prior to aminosilane grafting. A 10 x 10 block (100 spots) of the mannose derivative (sugar complex solution, 160 mm) was microarrayed onto the substrate surfaces. The sugar complex solution was also manually spotted on each of these slides (1 mL per spot) specifically for mass identification. Therefore, these slides were analyzed first by mass spectrometry and then subjected to biotinylated ConA binding followed by Cy3-tagged streptavidin detection. Fig. 10A a)–d) shows the protein-binding assays of the arrayed slides; Figure 10C shows the fluorescence intensities of substrates versus those of the commercially available glass slide. The intensity difference shown in Fig. 5 demonstrates the absolute effect of the physical properties of the substrate. The intensity difference in Fig. 10C resulted from the effects of both the physical properties of the specific substrates and the binding-site architectures between the immobilized sugar and its binding proteins. Both sets of data indicate that argon plasma treatment of the ACG slide surface produced the best substrate for mannose grafting, hence the mannose–protein binding.

**[00119]** Figs. 10A shows protein-binding assays of ACG slides formed by cathode arc evaporation upon treatment with a) oxygen plasma (Al-1), b) argon plasma (Al-2), and c) a mixture of oxygen and argon plasma (Al-3) prior to APDMES grafting. In d), protein-binding assay of the commercially available  $\text{NH}_2$ –glass slide from Corning Glass (#40004) are shown. Fig. 10B shows the signal intensities from MALDI mass spectra for

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

the mass identification of sugar. The maximum-intensity spectra (70% fluence) observed from each substance was used to create the spectra of Fig 10B. Fig. 10C shows fluorescence intensities of a)–d) with standard errors calculated with an arrayWoRx fluorescence spectrometer. The array was made in four blocks per slide with 10 x 10 (100) spots per block of the same aqueous solution of sugar complex. Only the best block from each slide was chosen (as shown in b)–d)); large spots among the best blocks were eliminated for fluorescence-intensity calculations.

**[00120]** A semiquantitative comparison of the content of the immobilized mannose and the mannose–protein binding capability are given in Figs. 11 and 12. Two different types of slide substrates were used for immobilizing mannose with the built-in PCL, that is, the NH<sub>2</sub> functionalized glass slide and the APDMES-activated NH<sub>2</sub>–ACG slides that were thermally coated with aluminum followed by surface-anodization treatment. The mannose–ACG slide was first subjected to MS analysis for molecular-weight identification and then to protein-binding evaluation along with the mannose–glass slide. Fig. 11 shows the protein-binding data resulting from the two different types of slide substrates. It clearly indicates that the mannose–ACG slide (Figure 11 b)) showed higher fluorescence of Cy3 with a better sensitivity than the glass slide (Fig. 11 a)). The fluorescence intensity from the ACG slide was calculated and is given in Fig. 12B.

**[00121]** The differences in fluorescence intensity in Fig. 11 were caused by the difference in physical properties of the slide substrates and the difference in the degree of mannose–ConA and Cy3–streptavidin binding. This difference in turn, implies a variation in the grafting density of mannose on the substrate surface. A recent report indicated that the interaction between ConA and mannose becomes weak when the density of mannose on the substrate surface is about 100 Å apart, thus reflecting the degree of polyvalent interaction.

**[00122]** MS analysis of the same mannose–ACG slide (Fig. 11 b)) revealed the parent peak (m/z 265) as well as the proton (m/z 266) and lithium (m/z 272) adducts. In analyzing this slide, each manually spotted (in the series of dilutions) sample was measured six times with 500 shots per measurement. The average peak intensity with

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

standard deviation is given in Fig. 12A, which demonstrates that MS could still identify the sugar, even when the concentration of the solution for grafting was diluted to 15.6 nM. The signal intensities measured by MS (Fig. 12A) are further compared to the fluorescence intensities shown in Fig. 12B. The descending trends of these two different measurements are similar. Apparently, the quantity of immobilized sugar reflects its protein-binding capability.

**[00123]** Fig. 11 are photographs of implementations of a fluorescence-tagged protein-binding assay of mannose immobilized on a glass slide and an ACG slide. The NH<sub>2</sub>-functionalized glass slide was purchased from Corning Glass (#40004). The ACG slide was thermally coated with pure aluminum and then electrochemically anodized. The array was made in a block of 10 x 6 (60) spots. The solution of sugar-HBTU complex (156 nM) was prepared to 100x and 10000x dilution. Each solution was spotted in two columns (20 spots) in the block for grafting. Substrate a) shows fluorescence only in the first two columns (the solution of sugar complex), but substrate b) shows signals up to the sixth column (10000x dilution of the starting solution of sugar complex).

**[00124]** Fig. 12 are graphs of implementations of experimental data showing comparison of the peak intensities of the ultraflex TOF mass spectra of mannose with PCL grafted on ACG slides with the fluorescence intensities of mannose-protein-bound ACG slide formed by thermal coating followed by electrochemical anodization on the slide surface. The concentration of the mannose solution varied from 156 nM to 102 (1.56 nM) and 104x dilution (15.6 nM). In Fig. 12A, average peak intensities of mannose mass spectrometric adducts obtained at m/z 265.1 [M]<sup>+</sup>, 266.1 [M + 1]<sup>+</sup>, and 272.1 [M + Li]<sup>+</sup>. In Fig. 12B, corresponding fluorescence intensities of the same mannose-ACG slide sample obtained from the fluorescence-tagged protein-binding assay is shown.

#### **Example 6: Utility of ACG Slides on Carbohydrate Microarrays**

**[00125]** By using the synthetic route shown in Fig. 2, lactose with PCL was also immobilized on an ACG slide, as shown in Fig. 13A. As seen in the MS analysis of this sample (Fig. 13B), the interference occurred resulting from the sparse aluminum oxide

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

peaks at 415 and 451. However, the molecular weight of the lactose derivative ( $m/z$  427) could still be clearly identified by its adducts with proton ( $m/z$  428), sodium ( $m/z$  450), and potassium ( $m/z$  466) ions.

**[00126]** For further utilization of this newly fabricated substrate, the  $\text{NH}_2$ -ACG surface was modified through conversion into NHS-ACG by treatment with disuccinimidyl suberate (DSS) in DMF and diisopropylethylamine. With glass slides as reference, a Globo H derivative with an amine functional group was arrayed on the NHS-ACG slide (Fig. 13C) and subjected to VK9 (a mouse IgG anti-Globo H monoclonal antibody) protein-binding evaluation. The results in Figs. 13D and 13E indicate that the ACG slide shows the highest fluorescence intensity among all three samples.

**[00127]** Fig. 13A shows Lactose-ACG slide with PCL. Fig. 13B shows Ultraflex TOF mass spectra obtained from the lactose-ACG slide with PCL. Fig. 13C shows Globo H-ACG slide with no PCL. Fig. 13D shows fluorescence-tagged protein-binding assay of Globo H immobilized on NHS-glass slide,  $\text{NH}_2$ -modified glass slide (Corning #40004), and NHS-ACG slide. Finally, Fig. 13E shows corresponding fluorescence intensities calculated from Fig. 13D with a GenePix 4000 fluorescence scanner.

#### **Example 7: Factors Affecting Fluorescence Intensity—Substrate Property and Surface Morphology**

**[00128]** The optical properties of substrates apparently affect the fluorescence intensity. Fluorescence (Cy3) is the sole light source in a protein-binding assay. Glass as well as porous silicon both pass and reflect light to different extents. On the contrary, aluminum-coated glass can be fabricated such that it becomes completely nontransparent and minimizes the “waste” of light provided by the light source.

**[00129]** The surface morphology of the substrate could affect the grafting density in immobilizing sugars. The NAO surface showed only 75% oxide content. On the contrary, the AAO surface contains 100% aluminum oxide, thus providing a stable surface and leading to a steady immobilizing density of the final slide for assay.

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

**[00130]** Substrate stability may also be affected by the way in which the surface is chemically treated. An example is the surface with cross-linked amines versus that with a monolayer of amine functional groups, both of which were made by activating the ACG slide with either 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) or 3-aminopropyltrimethylethoxysilane (APDMES). Various chemical treatments of the ACG slide surface are under investigation.

**Example 8: Factors Affecting Fluorescence Intensity—Binding-Site Architectures/Interactions of Proteins with Sugars Immobilized on the Substrate Surface**

**[00131]** Under our experimental conditions, both concanavalin A and streptavidin exist as tetramers of their quaternary structures. The ratio of the dimensions of mannose to ConA is about 1:400 (corresponding to their molecular weight of 265 vs. 104 kDa). Owing to the geometric constraint, only two binding sites per tetramer of biotinylated ConA are available for mannose binding on the surface. On the high-density mannose array surface, each ConA tetramer would bind two molecules of mannose, and the two mannose molecules would probably be grafted on the surface not too far away from each other. As the chain length of the mannose derivative increases, the grafted mannose becomes further away from the substrate, and a high degree of randomness of the interaction could occur when both the grafting density and the amount of immobilized sugar–protein binding increase. Furthermore, the flexible docking of the streptavidin–Cy3 complex to biotinylated ConA was allowed. A similar geometric restriction can also be illustrated for Globo H, IgG monoclonal antibody VK9 (from mouse), and its goat anti-mouse IgG protein. The binding-site architecture between sugar and proteins could affect the density of the fluorescence-tagged protein and, thus, the fluorescence intensity in the sugar–protein-binding assay.

**[00132]** One purpose of studying the surface immobilization of sugars is to mimic the ligand interactions that occur on the cell surface of biological entities, for example, the existence and overexpression of the sugar antigen Globo H on the surfaces of normal and malignant cells. The sugar antigens, when overly populated on the cell surfaces,

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

could result in massive polyvalent carbohydrate–protein interactions and greatly impact the provided biological function of the living entities. This study provides a more precise quantitative measurement and comparison of such a biological system.

#### **Example 9: Preparation of PTFE-like ACG Slides**

**[00133]** To prepare the PTFE-like ACG slides, triethoxysilane **1** and phosphonic acid derivatives **3** were synthesized and used for reaction with the oxidized aluminum surface. Fabrication of silane based slide involves a two-step chemical reaction. The first step was to functionalize the aluminum oxide surface to amino groups by using compound **1** (Fig. 14) as a grafting reagent. This step was conducted under a moisture-free environment to avoid side reactions. In the second step, amide bond formation took place between NHS activated polyfluoro hydrocarbon compound **2** (Fig. 14) and the amino group on the surface of the slide. On the contrary, the phosphonic acid based PTFE-like ACG slide was made in a one-step chemical reaction. An aqueous solution of **3** was reacted by sonication with the cleaned aluminum oxide surface to form a monolayer of perfluorophosphonate covalently bonded onto the surface. The covalent bond formation of phosphonic acid can be confirmed by FTIR and contact angle, as shown in Fig. 28B. These two types of slides were checked with MS-TOF spectrometry for background test, and both showed a clean baseline of the slide background. The unwanted sparse aluminum oxide peaks observed in our previous ACG slides were not seen with this method (see Figs. 26 and 27).

**[00134]** As illustrated in Fig. 28A, FTIR spectrum of Pure Compound **3** (HDFDPA, 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluorodecylphosphonic acid) and an FTIR spectrum of ACG surface grafted compound **3**. Fig. 28B illustrates the water Contact Angle ( $\approx 120^\circ$ ) image of the phosphonated ACG slide surface.

**[00135]** As shown in Fig. 14, the compounds are as follows: aminopropyltriethoxysilane (APTES, **1**); N-Succinimidyl 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptadecafluoroundecyl carbonate **2**; (3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluorodecyl) phosphonic Acid (HDFDPA, **3**), **4** to **10** are poly-fluorinated

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

derivatives of mannose (4), lactose (5), Gb5 (6), Globo H (7), cellobiose (8), cellotriose (9) and cellotetraose (10).

**Example 10: Creation of non-covalent bond glycan array on the PTFE-like ACG slides.**

**[00136]** With this encouraging result, the phosphoric acid based slide was used to create the glycan array for the experimental procedures outlined in Fig. 15. Mannose with an amino linker 11 was reacted with compound 2 to synthesize the poly-fluorinated (-C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>) tail 4 and used as the model compound, as illustrated by the scheme shown in Fig. 16. A solution of this sugar derivative was spotted robotically onto the PTFE-like ACG slide surface. After incubation, the slides were rinsed repeatedly with distilled water and subjected to MS-TOF analysis. A very clean mass spectrum was obtained. The mass spectrum of this monolayer reveals peaks at 806 and 822 for the sodium and potassium adducts, respectively. Following the MS analysis, the same slide was used for protein binding analysis by using Alexa 488-labeled Concanavalin A as a protein source. To further extend the scope of this type of glycan array, use of the compounds 12-14 that were synthesized by our laboratory previously as the starting materials. Poly-fluorinated Gb5 5, lactose 6 and Globo H 7 were synthesized, as illustrated in Fig. 16 and immobilized them onto the PTFE-like ACG slide surface for both mass analysis and protein binding assays according to the methods disclosed herein.

**[00137]** As shown in experimental implementations illustrated by the data shown in Fig. 17A, without adding additional matrix, no fragmented signal was found, even with the use of such labile sugar as Globo-H. Fig. 17A illustrates MALDI mass spectrometric analysis data of polyfluorinated Globo H 7 (MW. 1604.40), Gb5 5 (MW. 1458.39) and lactose 6 (MW. 932.21) immobilized on PTFE-like ACG slide as their sodium adducts [M+Na]<sup>+</sup> at 1627.44, 1481.39, and 954.39, respectively. The fluence rate is 12% without matrix addition.

**[00138]** According to implementations of experimental data in Fig. 17B, these glycan arrays retained their sugar-protein binding patterns. Fig. 17B is a protein-binding assay of GloboH/VK9/anti-VK9-Cy3. Fig. 17C is a protein-binding assay of Gb5/anti-

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

SSEA3-A488. The matrix was a 10 x 10 (100 spots) array of perfluorinated Globo H (left 4 columns), lactose (5<sup>th</sup> & 6<sup>th</sup> columns, served as the negative control), and Gb5 (right 4 columns).

**[00139]** The effect of laser fluence rate and matrix on this new surface was also investigated. Taking the labile carbohydrate Globo H as an example, it often loses a fucose moiety when used in MALDI-MS. By using mass spectrometry as a detector, the results were showed in table 1. Without adding matrix, a high signal to noise (S/N) ratio (22) in very low laser fluence rate (9%) is observed, and under this low laser fluence rate, no fragmented signal was found. When the fluence rate increase to 10%, the S/N ratio enhance to 40 without any fragmentation. Fig. 18 illustrates the resulting mass spectroscopy data under various laser fluence conditions without matrix added.

**[00140]** Fig. 19 illustrates the same experiments, but with matrix. DHB was added as a matrix to check the matrix effect on the ACG surface. The S/N is only 7.3 when the fluence rate is 11%. To increase the fluence rate to 13%, the S/N is 61% with 6% fragmentation signal. The DHB matrix therefore doesn't enhance the S/N signal when low laser fluence rate be used. However, it can play a role to enhance S/N and reduce the fragmentation when the fluence rate over 25%, as shown in Table 1.

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

Matrix-assisted Desorption/Ionization			Matrix-free Desorption/Ionization		
Fluence Rate	GH S/N	Frag. S/N	Fluence Rate	GH S/N	Frag. S/N
11%	7.3	0	9%	22	0
13%	61	6	10%	40	0
14%	157	13	12%	218	5
15%	316	25	16%	275	10
18%	1690	87	18%	375	17
19%	1956	108	19%	741	64
25%	3128	168	25%	2184	356
35%	1445	125	35%	1514	373

**Table 1:** S/N ratio of Globo H under different laser fluence rate with or without matrix addition. (Fluence: the laser power (or fluence rate) applied on the slide surface; GH S/N: the Signal/Noise ratio for globo H; Frag. S/N: the Signal/Noise ratio for the peak of fragmentation of globo H.)

#### Example 11: Cellulase activity studies

**[00141]** From the previous studies, poly-fluorinated carbohydrate immobilized on the PTFE-like ACG slide is easily ionized/desorbed by low laser energy. High S/N mass spectrum without fragmentation is therefore obtained, making the devices of the present disclosure suitable for glycosidase specificity and activity studies.

**[00142]** Enzymatic hydrolysis of the immobilized poly-fluorinated cellobiose **8** (see Fig. 14) was first conducted *in situ* on the phosphonic acid slide surface. Three commercially available cellulases, *Aspergillus niger* (*A. niger*), *Trichoderma reesei* (*T. reesei*), and *Trichoderma viride* (*T. viride*) were prepared separately at 5U/mL in a sodium acetate (25 mM) buffer solution (pH 5) and loaded onto the functionalized slide

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

which has been divided into 16 wells using Fast Frame reaction chambers. For comparison, an aliquot of enzyme solution (100  $\mu$ L) was added to the solution of fluorinated cellobiose (100  $\mu$ L of 0.5 mM) in eppendorfs to carry out the enzymatic hydrolysis reactions in solution. After the reaction, it was transferred to the empty wells of the same slide. Each well was rinsed separately three times with de-ionized water and the slide was dried again under high vacuum before subjecting to MS-TOF analysis.

**[00143]** Under MS-TOF analysis, the clean background baseline allowed calculation of the percentage of hydrolyzed components for each sample. As shown in the MS-TOF results in Fig. 20, percentages of hydrolyzed products are calculated from the peak intensities of each spectrum. According to implementations of experimental data shown in Fig. 20, MS-TOF data of enzymatic hydrolysis of poly-fluorinated cellobiose in solution in Fig. 20A and immobilized on PTFE-like ACG slide in Fig. 20B. The control are the same experimental conditions run without enzymes in (a); (b), (c), and (d) are experimental conditions with the cellulase proteins from *A. niger* (b), *T. reesei* (c), and *T. viride* (d).

**[00144]** These results (Fig. 20) show the rate of hydrolysis on the ACG slide surface versus hydrolysis in solution. The un-hydrolyzed cellobiose in solution were 64%, 7%, and 3%, as compared to those of 100%, 69%, and 77% on the ACG slide reacting with the cellulase from *A. niger*, *T. reesei*, and *T. viride*, respectively (Table 2).

	Triose	Biose	Glucose	F-tail
<i>A. Niger</i>	18/0	64/1	18/0	0/0
<i>T. Reesei</i>	0/0	7/69	93/25	0/7
<i>T. Viride</i>	0/0	3/77	58/17	38/6

**Table 2:** Enzymatic hydrolysis of poly-fluorinated cellobiose **8**, the percentage showed hydrolyzed patterns of the reaction in solution/on the ACG slide.

**[00145]** According to implementations of experimental data shown in Fig. 21A, hydrolyzed fragments of cellotriose derivatives remained on the PTFE-like ACG slide surface. Fig. 21A shows the various derivates that are possible, together with their molecular weights. Fig. 21B shows implementations of experimental MS-TOF data of

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

enzymatic hydrolysis of poly-fluorinated cellotriose of the control run without enzymes (a), and with the cellulase proteins from *A. niger* (b), *T. reesei* (c), and *A. viride* (d).

**[00146]** The enzyme from *T. viride* functions the best for cellobiose in solution, and that from *T. reesei* hydrolyzed the disaccharide most effectively among the three enzyme sources on the slide. In solutions, the enzyme from *A. niger* seems to also act as a synthetase that the overall reaction produced 8% of cellotriose (MW 1093) detected as sodium adduct at  $m/z$  of 1116.3  $[M+Na]^+$ . The enzyme from *A. niger* was characterized as a typical *endo*-type cellulose which cleaved five glucose units in length at a time. It did not hydrolyze either cellobiose or *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside. To further understand the mode of action, poly-fluorinated ( $-C_8F_{17}$ ) cellotriose **9** (Fig. 14) was subjected to enzymatic hydrolysis in solution.

**[00147]** Using the same analytical procedure, the results (Fig. 21B) indicated that the enzyme from *T. reesei* hydrolyzed the cellotriose substrate most efficiently among the enzymes from three different species. For *A. niger*, the result shown in Fig. 20 and Fig. 21 indicated that this enzyme does not function well in hydrolyzing cellobiose or cellotriose. However, in solution, it hydrolyzed the poly-fluorinated cellobiose **8**, and cellotriose **9** with one glucose unit at a time at a very slow reaction rate. Since this commercial enzyme is not pure, this phenomena may be due to the contamination of a small quantity of  $\beta$ -glucosidase in the mixture.

**[00148]** The cellulase from *T. viride* could effectively degrade the newspaper material and *T. reesei* could hydrolyze the crystalline form of cellulose. In general, the enzymatic hydrolysis on the ACG slide surface is more site-specific but much slower than that in solution, as indicated by the data shown in Fig. 20.

**Example 12: Cellulase specificity studies and define the cellulase type by using glycan array combined with mass spectrometry**

**[00149]** Cellulases are usually divided into several subclasses of isozymes based upon their function: 1,4- $\beta$ -glucosidases [EC 3.2.1.74], which cleave cellobiose into individual glucose molecule, exoglucanases (1,4- $\beta$ -D-glucan cellobiohydrolase [EC

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

3.2.1.91]), which cleaves cellobiose units from the end of the cellulose chain, and endoglucanases (1,4- $\beta$ -D-glucan glucanohydrolase [EC 3.2.1.6]), which cleave the chain randomly at internal positions, creating new ends for exoglucanases. HPLC analysis of the products of hydrolysis of MUF-glucosides is often used to determine the hydrolytic specificity of these purified enzymes. From the above results, the devices and methods of this disclosure serve as another platform for studying the specificity of various types of cellulases.

**[00150]** To verify, the exoglucanases (L3) and endoglucanase (44A) were prepared according methods well known in the literature with minor modifications. First, enzymatic hydrolysis reactions were conducted in solution with the purified enzymes using substrates **8**, **9** and **10**. At the completion of the reaction, the solution mixtures were transferred to the PTFE-like ACG slide, and prepared by using the same washing procedures before being subjected to MS-TOF assay.

**[00151]** Fig. 22 shows MS-TOF data of enzymatic hydrolysis of poly-fluorinated cellobiose (A), poly-fluorinated cellotriose (B) and poly-fluorinated cellotetraose (C) in solution. For each carbohydrate, a specific enzyme was added: (a) is the control run without enzymes, (b) is exoglucanase L3, and (c) is endoglucanase 44A. Fig. 23 shows MS-TOF data of enzymatic hydrolysis of poly-fluorinated cellobiose (A), poly-fluorinated cellotriose (B) and poly-fluorinated cellotetraose (C) on an ACG glass slide. For each carbohydrate, a specific enzyme was added: (a) is the control run without enzymes, (b) is exoglucanase L3, and (c) is endoglucanase 44A.

**[00152]** As shown according to the implementations of experimental data shown in Fig. 22, exoglucanase L3 cleaves cellobiose units slowly from the end of substrate **8** and cleave cellobiose quickly when compound **9** or **10** is the substrate, consistent with the definition of the exoglucanase. Endoglucanase 44A can't accept the cellobiose substrate **8** or cellotriose substrate **9**, but cleaves the trisaccharide or tetrasaccharide unit of cellotetraose substrate **10**.

**[00153]** For comparison and as illustrated according to implementations shown in Fig. 23, substrate **8**, **9**, and **10** were immobilized on the PTFE-like ACG surface and

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

carried out the cellulase hydrolysis on the surface directly, after the same washing procedures, these slides were subjected to MS-TOF assay. As shown in Fig. 20B, exoglucanase L3 only cleaved a fraction of cellobiose substrate **8** after 24 hours of incubation and cleaved the cellobiose quickly when compound **9** or **10** as the substrate. The endoglucanase 44A can't accept compound **8** or **9** as a substrate. However, it cleaved cellotetraose quickly when compound **10** as a substrate. In contrast to the hydrolysis reaction run in solution, endoglucanase 44A cleaved cellotetraose at a time and did not cleave cellotriose when cellotetraose **10** as a substrate. From the above results, the cellotetraose substrate **10** was the best carbohydrate to create array on the PTFE-like ACG surface for the experiments conducted. By using this array, the activity and specificity of unknown cellulase may be examined.

**Example 13: Creation of covalent bond glycan array on PTFE-like ACG slides.**

**[00154]** There are several functionalized glass slides are commercial available for glycan array, for example glass slides coated with: amine, carboxylate, N-hydroxysuccinimide (NHS), avidin, epoxy, aldehyde, chelating nickel group, etc. When creating glycan array on these surfaces, suitable buffer and repeated blocking and washing steps are needed. According to implementations, substrates with a phosphonic acid functional group are easy to chelating on the ACG slide and can tolerate repeated washing steps. Accordingly, a novel method for effective glycan array preparation is hereby disclosed.

**[00155]** Mannose with phosphonic acid compound **21** was synthesized via the scheme illustrated in Fig. 24. Commercial available compound **15** was protected with TBDPS group, and then bromide was changed to phosphonate by using Arbuzov reaction. After desilylation, compound **18** was obtained for the following glycosylation reaction. By using  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  as a promoter, compound **19** was used as the sugar donor, which yielded mannose molecule with the phosphonate group derivative **20**. After global deprotection, mannose with a phosphonic acid compound **21** was obtained.

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

**[00156]** Compound **21** was dissolved in methanol. A solution of this sugar derivative was spotted robotically onto the PTFE-like ACG slide surface. After incubation, without blocking, the slides were rinsed repeatedly with distilled water, and used for protein binding analysis by using Alexa 488-labeled Concanavalin A as a protein source. Different incubation times were evaluated and 15 minutes was determined to be enough for the sugar derivative to chelate on the ACG slide. Different concentrations of compound **21** were also spotted on the ACG slide wherein the result was an ACG slide comparable to the NHS coated glass slide, as illustrated in Fig. 25.

#### **Example 14: Materials and Methods**

**[00157]** All chemicals and anhydrous solvents were purchased from a commercial source and used without further purification. Molecular Sieves (MS) for glycosylation were AW-300 (Aldrich). FluoroFlash® SPE cartridge was purchased from Sigma. Reactions were monitored with analytical thin-layer chromatography (TLC) in EM silica gel 60 F254 plates and visualized under UV (254 nm) and/or by staining with KMnO<sub>4</sub> or p-Anisadehyde. <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded on a Bruker ULTRASHIELD-600 PLUS (600 MHz) spectrometer at 298K. Chemical shifts (in ppm) were assigned according to the internal standard signal of CDCl<sub>3</sub> ( $\delta$  = 7.24 ppm). <sup>13</sup>C NMR spectra were obtained with Bruker ULTRASHIELD-600 PLUS spectrometer and were calibrated with CDCl<sub>3</sub> ( $\delta$  = 77.00 ppm). Coupling constants (*J*) are reported in hertz (Hz) Splitting patterns are described by using the following abbreviations: s, singlet; brs, broad singlet, doublet; t, triplet; m, multiplet.

#### **Substrate Materials**

**[00158]** Micro glass slides (75.5 x 25.4 x 1 mm<sup>3</sup>) were cleaned in piranha solution, a mixture of concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (70:30 v/v), at 120 °C for 30 min, rinsed with plenty of deionized water until pH 7, and purgedried with high-quality nitrogen gas. The high-purity aluminum targets (99.999% pure) were obtained from Summit-Tech Resource Corp. (Hsin-Chu, Taiwan). These raw materials were provided to vendors Cheng-Jen Corp. (Kao-Hsiung, Taiwan) and Yujay-Tech Corp. (Chin-Ju, Taiwan) for the fabrication of ACG slides by using different coating techniques such as magnetron

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

sputtering, cathode arc evaporation, and thermal evaporation. The fabricated ACG slides were either used directly or anodized with a DC current at 20 V (Keithley 2400 Model) at 48°C in 0.3M aqueous oxalic acid for 60-90 s. The surface properties of the fabricated ACG slides are shown in Figure 1. The surfaces were sputtered with gold and examined by SEM (FEI XL30 SFEG, FEI Company). The surface roughness and thickness of the aluminum coating were measured by AFM (Dimension 3100 Veeco Instruments, Inc.). The surface compositions of these slides were analyzed by XPS by using an Omicron ESCA spectrometer with a monochromatic  $Al_{K\alpha}$  X-ray (1486.6 eV) source under ultrahigh vacuum ( $1 \times 10^{-10}$  Torr). All spectra were calibrated by the carbon 1s spectrum at 284.5 eV and the oxygen 1s spectrum at 532 eV.

#### **Fabrication of $NH_2$ -ACG Slides**

**[00159]** The ACG slide was washed with acetone and water consecutively on a multishaker (FMS2 FINEPCR) for 2-3 min, purge-dried with high-purity nitrogen gas, and further dried in an oven at 100 °C for 10-15 min. Surface activation was conducted by a plasma cleaner (Harrick PDC 32 G, 200-600 mTorr) with oxygen, argon, or mixed gases at room temperature for 10 min. Immediately after plasma treatment, APDMES (0.8 mL) was placed evenly on the surface (in bulk), which was covered with a sealed petri dish and heated directly on a hot plate at 65°C for 40 min-1 h. When the reaction was completed, the sample slide was rinsed thoroughly, sonicated in methanol for 3 min (20% power), and purge-dried with high-purity nitrogen gas. The surface with aminosilane-grafted substrate was used for amide-linkage formation in situ with the mannose derivative compound 27 and HBTU. The commercial  $NH_2$ -glass slides (#40004 from Corning Inc.) were used for comparison of protein binding.

#### **Fabrication of NHS-ACG Slides**

**[00160]** ACG slides coated by thermal evaporation were further anodized in 0.2M oxalic acid for 90 s, rinsed with deionized water, and activated by argon plasma as usual. Without any contamination, the slide was assembled in a designed PTFE sealed, heat-transferable reaction cell, and APTES (1 mL, bulk) was immediately added to the cell. The PTFE cell was covered with a glass plate. Under moisture-free conditions, the cell

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

was heated at 65°C for 30 min and rinsed thoroughly with methylene chloride and methanol. The slides were then purge-dried with nitrogen gas. Beforehand, a saturated solution of DSS (0.5 g; CAS #68528-80-30) in DMF (4 mL) and diisopropylethylamine (220 mL) was prepared. A portion (1.33 mL) of this saturated solution was added to each reaction cell. The NHS-ACG slide was formed within 3 h with constant swirling at room temperature. The slide was rinsed thoroughly with ethyl acetate and purge-dried with high-quality nitrogen gas. After the PTFE cell was dried and disassembled, the slide was ready for Globo H-NH<sub>2</sub> microarray.

#### **ACG Slides preparation—Fabrication of the silane based PTFE-like ACG Slides**

**[00161]** In a moisture-free condition, the argon plasma activated ACG slide was reacted with 3-aminopropyltriethylsilane in bulk at 65°C for 30 minutes then washed with methylene chloride thoroughly and dried by nitrogen gas under atmospheric condition. The silanated ACG slide was immersed in a solvent mixture (DMF/IPA/DIPEA 12/6/1 volume ratio) of N-succinimidyl 3-perfluorooctylpropionate (0.05 wt %) solution for two hours at room temperature. After the reaction, the slide was rinsed with IPA thoroughly, and purged dried with nitrogen gas. Water contact angle ( $\geq 115^\circ$ ) measurement was quickly checked for the completion of the slide fabrication.

#### **ACG Slides preparation—Fabrication of the phosphonic acid based PTFE-like ACG Slides.**

**[00162]** The aluminum coated glass slide was washed by acetone and water for three times, and then dried by dry clean air. The clean slide was then activated and cleaned by oxygen plasma (Harrick plasma, PDC-32G) for 15 mins. After activation, the slide was immersed into 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptafluorodecylphosphonic acid (HDFDPA) **3** solution (1M, 65% 2-propanol in H<sub>2</sub>O, pH=6.17) immediately. The solution was vibrated by gentle sonication (50W) for 15 mins. Following the ultrasonic treatment, the slide was removed from the solution and then immersed into another pure 2-propanol solution for 15 mins. The solution was also sonicated to assist the removal of excess phosphonic acid on the slide surface. The

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

slide was dried by dry nitrogen and reduced pressure. Upon the completion of the reaction, the slide was washed thoroughly with IPA, and nitrogen purge dried. Water contact angle ( $\geq 115^\circ$ ) measurement was quickly checked for the completion of the slide fabrication.

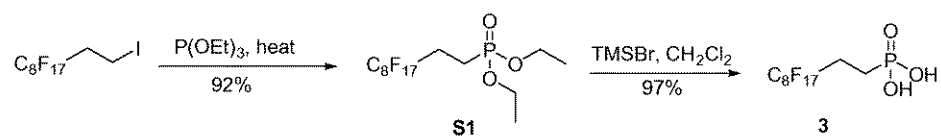
### Reference-Controlled NHS–Glass Slides

**[00163]** NHS-glass slides (from SCHOTT, North America) were used directly. The  $\text{NH}_2$ -glass slide (#40004 from Corning, Inc.) was modified by using the same preparation method for the NHS-ACG slide. The slide was assembled in a designed PTFE sealed, heat-transferable reaction cell. A portion (1.33 mL) of saturated DSS solution was added for reaction with the  $\text{NH}_2$ -glass surface. After constant swirling at room temperature for 3 h, the slide was rinsed thoroughly with ethyl acetate and purge-dried with high-quality nitrogen gas. After the PTFE cell was dried and disassembled, the slides were ready for Globo H- $\text{NH}_2$  microarray.

### Chemical Materials

**[00164]** All chemicals employed in the synthesis of **6** were purchased from Aldrich or the specified individual chemical companies and used without any further purification.

### Synthesis



Preparation of **3**.

**[00165]** **Diethyl 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptafluorodecylphosphonate (S1):** 1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-heptafluoro-10-iododecane (1.02 g, 1.78 mmol) and  $\text{P(OEt)}_3$  (15 ml, excess) was added to 50ml round bottom flask. The mixture was heated to 120 °C under nitrogen for 40 hours and then purified with FluoroFlash® SPE cartridge. The remaining light yellow oil was chromatographed with Ethyl Acetate/Hexane to give product. (0.96 g, 92%).  $^1\text{H}$

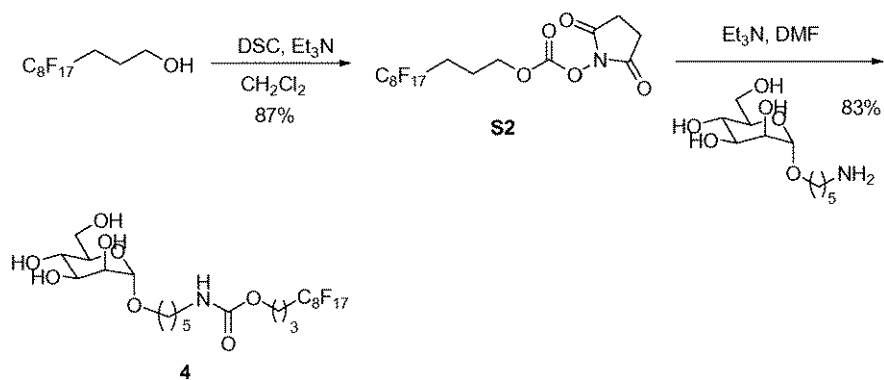
WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

NMR (600MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 4.10-4.00(m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.35-2.23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>), 1.92-1.86 (m, 2H, PCH<sub>2</sub>), 1.25 (t, *J*= 7.2 Hz, 6H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 121-106 (m, C-F coupling unsolved), 62.28 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>cp</sub>=6 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 25.33 (t, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=23 Hz, CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>), 17.24 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>cp</sub>= 148Hz, PCH<sub>2</sub>), 16.38, <sup>3</sup>*J*<sub>cp</sub>=6 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). HRMS calcd for C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>F<sub>17</sub>O<sub>3</sub>P: [M+H]<sup>+</sup>, 585.0487; found: 585.0433

**[00166] 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-**

**heptadecafluorodecylphosphonic acid (3):** Bromotrimethylsilane (0.74 mL, 5.75 mmol) was added *via* syringe to a solution of **S1** (1.12 g, 1.92 mmol) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 ml) under nitrogen. The mixture was stirred for 30 hours. Volatiles were removed *in vacuo* completely to give white powder. The white powder can be used for next experiment directly without further purification. (0.99 g, 97%). <sup>1</sup>H NMR (600MHz, MeOD): δ (ppm) 2.48-2.42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>), 1.99-1.96 (m, 2H, PCH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, MeOD): δ (ppm) 121-106 (m, C-F coupling unsolved), 25.55 (t, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub>=23 Hz, CH<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>), 18.26 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>cp</sub>=143 Hz, PCH<sub>2</sub>). HRMS calcd for C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>F<sub>17</sub>O<sub>3</sub>P: [M-H]<sup>-</sup>, 526.9699; found: 526.9669



Preparation of polyfluorinated mannose **4**.

**[00167] 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptadecafluoro- undecyl carbonate (S2):** To a stirred solution of 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-heptadecafluoroundecan-1-ol (214 mg, 0.45 mmol) and DSC (184 mg, 0.72mmol) in acetonitrile was added triethylamine (0.5ml, 3.60

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

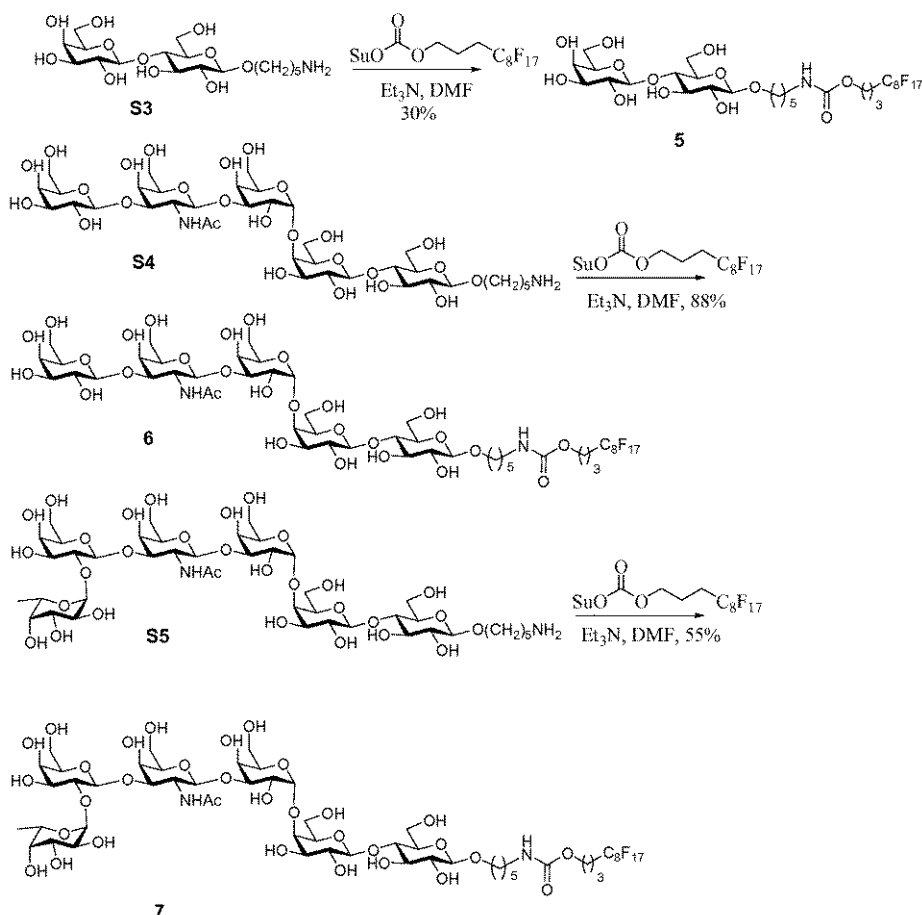
mmol) at 0 °C under nitrogen and then the solution warmed up slowly to room temperature and stirred for 16 hours. The reaction was washed with H<sub>2</sub>O three times. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was purified by flash chromatography to give white solid. (242 mg, 87%). <sup>1</sup>H NMR (600MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 4.40 (t, 2H, *J*= 6.3 Hz, CH<sub>2</sub>O), 2.83 (s, 4H), 2.27-2.18 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F), 2.10-2.05 (m, 2H, FCH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 168.73 (NCO), 151.65 (OCO), 121-106 (m, C-F coupling unsolved), 69.87 (OCH<sub>2</sub>), 25.66 (FCH<sub>2</sub>), 20.12(FCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)

**[00168] [(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-nonadecafluorododecoxy-carbonyl-amino)pentyl] α-D-mannopyranoside**

**(4):** To a stirred solution of **S2** (250 mg, 0.40 mmol) and 5-Aminopentyl α-D-mannopyranoside (112 mg, 0.39 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added triethylamine (0.2mL) at 0 °C under nitrogen and then the ice bath was removed. The reaction warmed up to room temperature and stirred overnight. The solvent was removed *in vacuo* and the product was purified by FluoroFlash® SPE cartridge and flash chromatography to give white solid. (253 mg, 83%). <sup>1</sup>H NMR (600MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 7.97 (s, 1H, NH), 4.72 (d, *J*= 1.6 Hz, 1H, 1-H of Man), 4.10 (t, *J*= 6.2 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 3.82-3.80 (m, 1H), 3.77-3.76 (m, 1H), 3.73-3.70 (m, 2H), 3.69-3.66 (m, 1H), 3.59 (t, *J*= 9.6 Hz, 1H), 3.52-3.49 (m, 1H), 3.42-3.38 (m, 1H), 3.08 (t, *J*=7.1 Hz, 1H, O-CH<sub>2</sub>), 2.32-2.23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>F), 1.94-1.89 (m, 2H, FCH<sub>2</sub>), 1.63-1.54 (m, 2H), 1.51-1.46 (m, 2H), 1.42-1.32 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 157.44 (NCO), 120-105 (m, C-F coupling unsolved), 100.12 (1-C of Man), 73.19, 71.25, 70.87, 67.22, 67.04, 62.80, 61.51, 40.27 (CH<sub>2</sub>N), 29.41, 19.10, 26.20, 25.63, 24.86, 20.07. HRMS calcd for C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>F<sub>17</sub>NO<sub>8</sub>: [M+Na]<sup>+</sup>, 806.1598; found: 806.1643.

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754



Synthesis of polyfluorinated **5**, **6**, and **7**.

**[00169] [(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-nonadecafluorododecoxy-carbonyl-amino)pentyl]  $\beta$ -D-lactoside (5):** The solution of **S3** (44 mg, 0.10 mmol) and **S2** (76 mg, 0.12 mmol) in DMF (5 mL) was added  $\text{Et}_3\text{N}$  (28  $\mu\text{L}$ , 0.20 mmol) at  $0^\circ\text{C}$ . After stirring at room temperature overnight, the reaction mixture was concentrated in vacuo and purified by column chromatography and FluoroFlash® SPE cartridge to give **5** as white foamy solid (29 mg, 30%).  $R_f$ : 0.68 (EtOAc:MeOH=5:1).  $^1\text{H}$  NMR (600MHz, MeOD):  $\delta$  4.36 (d,  $J=7.6$  Hz, 1H), 4.27 (d,  $J=7.8$  Hz, 1H), 4.15 (bt, 1H), 4.10 (t,  $J=6.0$  Hz, 2H), 3.90-3.40 (m, 12H), 3.39 (m, 1H),

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

3.25 (t,  $J=8.1$  Hz, 1H), 3.09 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H), 2.31-2.26 (m, 2H), 1.93-1.90 (m, 2H), 1.64-1.62 (m, 2H), 1.52-1.49 (m, 2H), 1.42-1.40 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (150MHz, MeOD):  $\delta$  157.53, 120.62-110.33 (m, C-F coupling unresolved), 103.79, 102.93, 79.38, 75.79, 75.16, 75.13, 73.52, 73.46, 71.26, 69.38, 69.00, 62.90, 61.19, 60.62, 40.36, 29.29, 29.05, 27.33 (t), 22.96, 20.18. MS (ESI) Calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{F}_{17}\text{NO}_{13}\text{Na}^+$ : 954.1970  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; found: 954.1964.

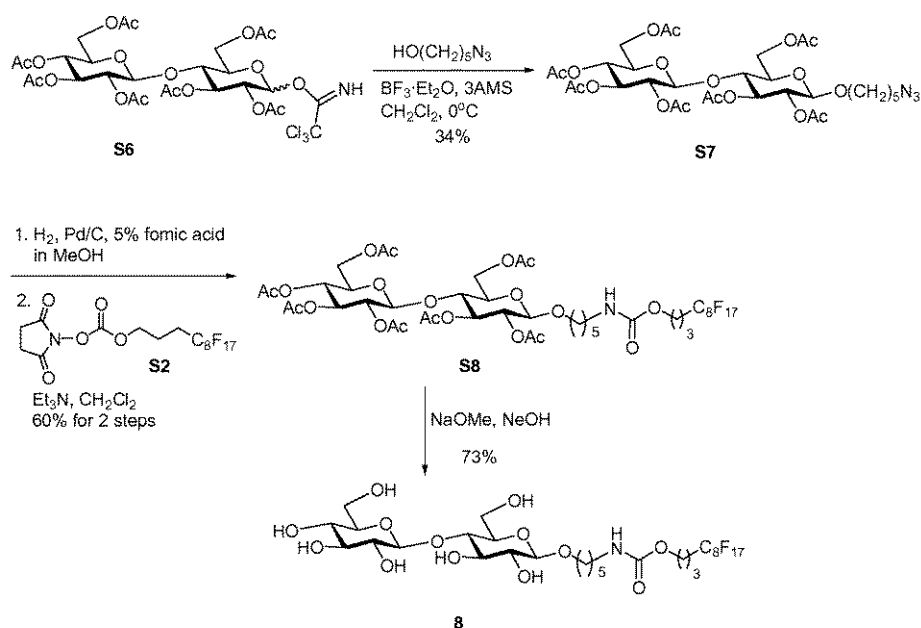
**[00170] [(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-nonafluorododecoxycarbonyl-amino)pentyl]  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranoside (6):** Compound 6 was prepared from compound S4 according to the procedure as described for 5 in 55 % yields after purification by column chromatography and FluoroFlash<sup>®</sup> SPE cartridge. R<sub>f</sub>: 0.18 (EtOAc:MeOH=1:1). White foamy solid.  $^1\text{H}$  NMR (600MHz, MeOD):  $\delta$  4.72 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H), 4.44 (d,  $J=7.0$  Hz, 1H), 4.37 (d,  $J=7.4$  Hz, 1H), 4.31 (d,  $J=7.7$  Hz, 1H), 4.29 (m, 1H), 4.19 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 4.13 (t, d,  $J=6.0$  Hz, 2H), 4.09 (m, 1H), 4.01 (bs, 1H), 3.95-3.67 (m, 20H), 3.60-3.42 (m, 11H), 3.26 (t,  $J=8.6$  Hz, 1H), 3.12 (t,  $J=7.0$  Hz, 2H), 2.34-2.26 (m, 2H), 2.01 (s, 3H), 1.98-1.91 (m, 2H), 1.69-1.64 (m, 2H), 1.55-1.52 (m, 2H), 1.46-1.43 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (150MHz, MeOD):  $\delta$  173.69, 157.44, 120.11-108.43 (m, C-F coupling unresolved), 105.22, 104.06, 102.91, 102.80, 101.38, 80.11, 79.83, 79.34, 78.55, 75.38, 75.11, 75.05, 74.97, 74.94, 73.46, 73.24, 73.17, 71.17, 71.07, 71.00, 69.31, 69.21, 68.87, 68.14, 68.07, 62.81, 61.21, 60.50, 60.16, 51.98, 40.26, 29.22, 28.97, 22.87, 21.95, 20.08, 19.47. MS (MALDI) Calcd for  $\text{C}_{49}\text{H}_{71}\text{F}_{17}\text{N}_2\text{O}_{28}\text{Na}^+$ : 1481.382  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; found: 1481.452.

**[00171] [(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-nonafluorododecoxycarbonyl-amino)pentyl]  $\alpha$ -L-fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranoside (7):** Compound 7 was prepared from compound S5 according to the procedure as described for 5 in 88 % yields after purification by column

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

chromatography and FluoroFlash® SPE cartridge.  $R_f$ : 0.18 (EtOAc:MeOH=1:1). White foamy solid.  $^1\text{H}$  NMR (600MHz, MeOD):  $\delta$  5.26 (d,  $J=3.8$  Hz, 1H), 4.96 (d,  $J=3.8$  Hz, 1H), 4.58 (d,  $J=7.9$  Hz, 1H), 4.44 (d,  $J=7.0$  Hz, 1H), 4.30 (d,  $J=7.6$  Hz, 1H), 4.29 (m, 1H), 4.17-4.10 (m, 5H), 4.01 (bs, 1H), 3.93-3.69 (m, 24H), 3.68-3.53 (m, 8H), 3.44-3.41 (m, 1H), 3.26 (t,  $J=8.6$  Hz, 1H), 3.12 (t,  $J=7.0$  Hz, 2H), 2.32-2.28 (m, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.97-1.93 (m, 2H), 1.69-1.64 (m, 2H), 1.56-1.52 (m, 2H), 1.47-1.42 (m, 2H), 1.27 (d,  $J=6.5$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (150MHz, MeOD):  $\delta$  173.17, 157.55, 104.20, 104.07, 102.93, 102.59, 101.54, 99.78, 80.05, 79.26, 78.81, 77.83, 76.82, 75.50, 75.21, 75.09, 74.23, 73.56, 73.41, 72.25, 71.33, 71.22, 70.25, 69.41, 69.32, 69.09, 68.37, 68.33, 66.83, 62.91, 61.31, 61.26, 60.65, 60.25, 51.82, 40.37, 29.32, 29.07, 22.97, 22.18, 20.19, 15.40. MS (MALDI) Calcd for  $\text{C}_{55}\text{H}_{81}\text{F}_{17}\text{N}_2\text{O}_{32}\text{Na}^+$ : 1627.440  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; found: 1627.526.



Synthesis of polyfluoro-cellobioside **8**.

**[00172]** 5-Azidopentyl 2,3,6,2',3',4',6'-hepta-O-acetyl- $\beta$ -D-cellobioside

**(S7):** A suspension of the compound **S6** (1.01 g, 1.29 mmol), 5-azido-1-pentanol (0.84 g, 6.47 mmol), and 3Å molecular sieves in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) was stirred at room

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

temperature for 1h. The reaction mixture was cooled to 0 °C and treated dropwise with  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (33  $\mu\text{L}$ , 0.26 mmol). After stirring at 0 °C for 2h, saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  was added and the reaction mixture was filtered with Celite. The mixture was diluted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and then washed with brine. The organic phase was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated the solvent and purified by chromatography (Hexane:EtOAc = 3:1→2:1→1:1) to give **S7** as a white foamy solid (330mg, 34%).  $R_f$ : 0.48 (Hexane:EtOAc = 1:1).  $^1\text{H}$  NMR (600MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.16 (t,  $J=9.4$  Hz, 1H), 5.13 (t,  $J=9.4$  Hz, 1H), 5.04 (t,  $J=9.7$  Hz, 1H), 4.91-4.85 (m, 2H), 4.50-4.47 (m, 2H), 4.42 (d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 4.34 (dd,  $J=12.5$ , 4.3 Hz, 1H), 4.06 (dd,  $J=12.0$ , 4.7 Hz, 1H), 4.01 (dd,  $J=12.3$ , 1.9 Hz, 1H), 3.81 (m, 1H), 3.74 (t,  $J=9.5$  Hz, 1H), 3.64-3.62 (m, 1H), 3.56 (m, 1H), 3.43 (m, 1H), 3.23 (t,  $J=6.8$  Hz, 2H), 2.10 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.59-1.54 (m, 4H), 1.40-1.35 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (150MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.54, 170.34, 170.26, 169.86, 169.60, 169.34, 169.08, 100.81, 100.64, 76.51, 72.94, 72.67, 72.49, 71.96, 71.61, 71.56, 69.73, 67.76, 61.84, 61.54, 51.33, 28.94, 28.52, 23.14, 21.08, 20.90, 20.69, 20.57. HRMS (ESI) Calcd for  $\text{C}_{31}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_{18}\text{Na}^+$ : 770.2590  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; found: 770.2570

**[00173]** [(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-nonadecafluorododecoxycarbonyl-amino)pentyl] 2,3,6,2',3',4',6'-hepta-O-acetyl- $\beta$ -D-cellobioside (**S8**): A suspension of **S7** (50 mg, 0.07 mmol), catalytic amount of Pd/C in 5% formic acid in MeOH (5 mL) was stirred under  $\text{H}_2$  balloon for 2h. After filtration through Celite, the filter cake was washed with MeOH. The filtrate was evaporated and co-evaporated with toluene. The residue underwent to next step without purification.

**[00174]** The residue described above was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) and then Compound **S2** (50 mg, 0.08 mmol) was added. The mixture was cooled to 0°C. Triethylamine (19  $\mu\text{L}$ , 0.13 mmol) was added and the solution continued stirring at room temperature for 12h. The reaction mixture was concentrated and purified by chromatography (Hexane:EtOAc = 1:1) to give **S8** as a white foamy solid (49 mg, 60% in two steps).  $^1\text{H}$  NMR (600MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.14 (t,  $J=9.5$  Hz, 1H), 5.11 (t,  $J=9.5$  Hz, 1H), 5.03 (t,  $J=9.5$  Hz, 1H), 4.91-4.84 (m, 2H), 4.76 (br, 1H), 4.50 (dd,  $J=12.0$ , 1.7 Hz, 1H),

WO 2010/009271

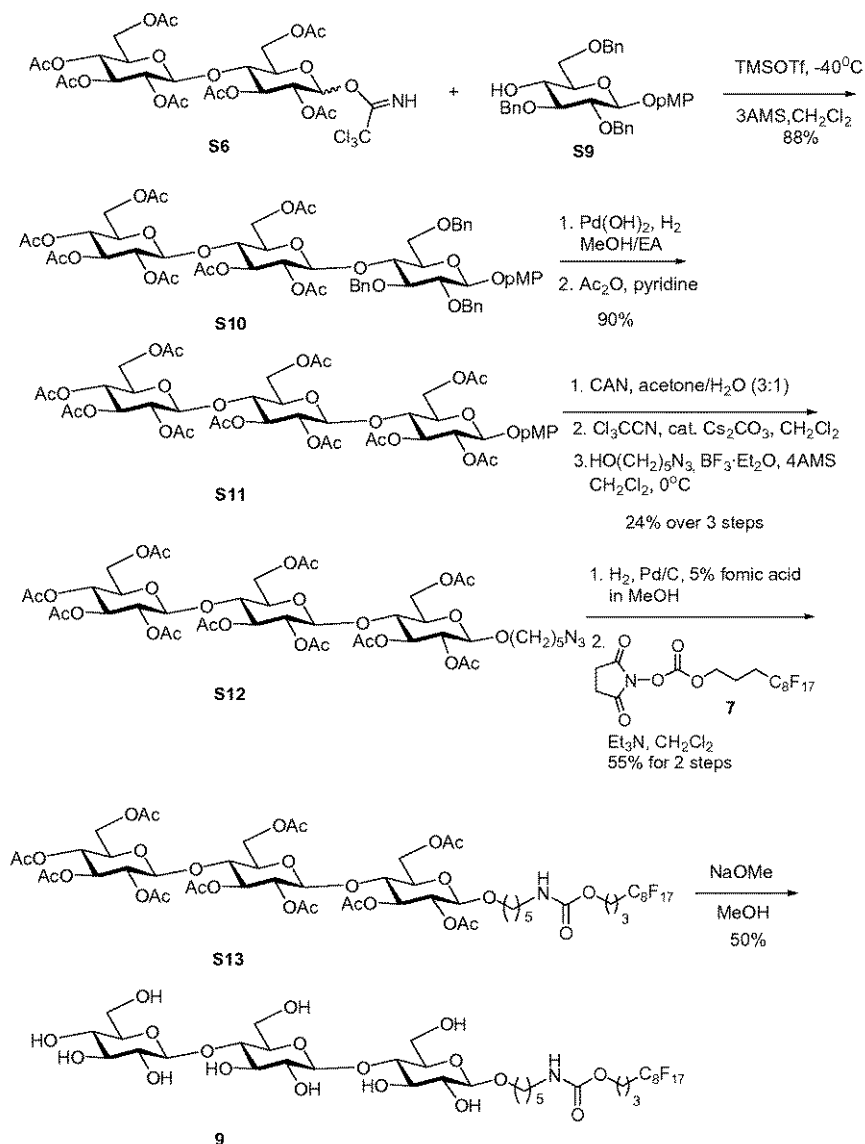
PCT/US2009/050754

4.48 (d,  $J=7.9$  Hz, 1H), 4.40 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H), 4.34 (dd,  $J=12.5, 4.3$  Hz, 1H), 4.09 (t,  $J=6.1$  Hz, 2H), 4.05 (dd,  $J=12.0, 4.9$  Hz, 1H), 4.01 (dd,  $J=12.5, 2.2$  Hz, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.73 (t,  $J=9.5$  Hz, 1H), 3.64-3.61 (m, 1H), 3.55-3.53 (m, 1H), 3.43 (m, 1H), 3.12 (m, 2H), 2.18-2.13 (m, 2H), 2.09 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.00 (2xs, 6H), 1.98 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.92-1.88 (m, 2H), 1.56-1.52 (m, 2H), 1.49-1.44 (m, 2H), 1.34-1.29 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (150MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.51, 170.35, 170.25, 169.84, 169.62, 169.33, 169.06, 156.25, 120.18-108.01 (m, C-F coupling unresolved), 100.78, 100.62, 76.47, 72.91, 72.68, 72.45, 71.94, 71.60, 71.56, 69.77, 67.74, 63.17, 61.76, 61.52, 40.83, 29.68, 29.49, 28.92, 27.99, 27.84, 27.69, 23.02, 21.03, 20.84, 20.64, 20.53, 20.33. HRMS (ESI) Calcd for  $\text{C}_{43}\text{H}_{52}\text{F}_{17}\text{NO}_{20}\text{Na}^+$ : 1248.2703 [M+Na] $^+$ ; found: 1248.2675

**[00175] [(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-nonafluorododecoxycarbonyl-amino)pentyl]  $\beta$ -D-cellobioside (8):** The solution of **S8** (222 mg, 0.18 mmol) and NaOMe (50 mg, 0.09 mmol) in MeOH (7 mL) was stirred at room temperature overnight. The mixture was neutralized with Amberlyst-15 ion-exchange resin for 5 min and filtered through a sintered funnel packed with Celite. The filter pad was rinsed with methanol after filtration. The combined filtrates were concentrated under reduced pressure and then purified by flash column chromatography (EtOAc:MeOH = 10:1 $\rightarrow$ 8:1) to give **8** as a white solid (123 mg, 73%). R<sub>f</sub>: 0.47 (EtOAc:MeOH = 5:1).  $^1\text{H}$  NMR (600MHz, MeOD):  $\delta$  4.40 (d,  $J=7.9$  Hz, 1H), 4.27 (d,  $J=7.8$  Hz, 1H), 4.10 (t,  $J=6.1$  Hz, 2H), 3.89-3.86 (m, 4H), 3.65 (dd,  $J=11.8, 5.7$  Hz, 1H), 3.57-3.53 (m, 2H), 3.50 (t,  $J=9.0$  Hz, 1H), 3.39-3.32 (m, 3H), 3.30 (m, 1H), 3.22 (m, 2H), 3.09 (t,  $J=6.7$  Hz, 2H), 2.32-2.23 (m, 2H), 1.94-1.89 (m, 2H), 1.66-1.61 (m, 2H), 1.53-1.48 (m, 2H), 1.43-1.38 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (150MHz, MeOD):  $\delta$  157.51, 120.11-108.43 (m, C-F coupling unresolved), 103.20, 102.79, 79.31, 76.69, 76.43, 75.03, 73.47, 69.95, 69.29, 61.00, 60.74, 60.42, 40.32, 29.52, 28.95, 27.36, 27.21, 27.07, 22.86, 20.07. HRMS (ESI) Calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{F}_{17}\text{NO}_{13}\text{Na}^+$ : 954.1964 [M+Na] $^+$ ; found: 954.1966.

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

Synthesis of polyfluoro-celotrioside **9**.

[00176] *para*-Methoxyphenyl **2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-benzyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (S10)**: According to similar procedures

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

reported by Vesalla, a suspension of **S6** (1.68 g, 2.16 mmol), **S9** (1.0 g, 1.8 mmol) and 3Å mol. sieves in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) was stirred at room temperature for 1h. The reaction mixture was cooled to -40 °C and treated dropwise with TMSOTf (98 µL, 0.54 mmol). After stirring at -40 °C for 2h, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> was added and the reaction mixture was filtered with Celite. The mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and then washed with brine. The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated the solvent and purified by chromatography (Hexane:EtOAc = 3:1→2:1→1:1) to give **S10** as a white foamy solid (1.86g, 88%). R<sub>f</sub>: 0.55 (Hexane:EtOAc =1:1). <sup>1</sup>H NMR (600MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.38-7.25 (m, 15H), 7.00 (d, *J*=9.1Hz, 2H), 6.81 (d, *J*=9.1 Hz, 2H), 5.10-5.05 (m, 2H), 5.00-4.98 (m, 2H), 4.94-4.91 (m, 2H), 4.85-4.82 (m, 2H), 4.78 (d, *J*=11.6 Hz, 1H), 4.72 (d, *J*=11.6 Hz, 2H), 4.64 (d, *J*=8.2 Hz, 1H), 4.49 (d, *J*=12.0 Hz, 1H), 4.39 (d, *J*=7.9 Hz, 1H), 4.37 (dd, *J*=12.5, 4.3 Hz, 1H), 4.23 (dd, *J*=12.0, 2.0 Hz, 1H), 4.01 (dd, *J*=12.0, 2.2 Hz, 1H), 3.95 (t, *J*=9.2 Hz, 1H), 3.90 (dd, *J*=12.0, 4.6 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.78-3.62 (m, 6H), 3.46-3.44 (m, 1H), 3.19-3.16 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.95 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (150MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.71, 170.46, 170.42, 170.01, 169.68, 169.53, 169.22, 155.53, 151.64, 139.42, 138.34, 138.01, 128.79, 128.48, 128.38, 128.35, 128.26, 128.20, 127.86, 127.40, 127.13, 118.70, 114.71, 102.91, 101.04, 100.15, 82.77, 81.60, 76.39, 75.20, 74.92, 74.89, 73.85, 73.11, 72.67, 72.37, 72.09, 71.65, 67.99, 67.93, 61.98, 61.70, 55.85, 20.93, 20.88, 20.75. HRMS (ESI) Calcd for C<sub>60</sub>H<sub>70</sub>O<sub>24</sub>Na<sup>+</sup>: 1197.4149 [M+Na]<sup>+</sup>; found: 1197.4142.

**[00177]para-Methoxyphenyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranoside (S11)**: A suspension of **S10** (1.01 g, 0.86 mmol), catalytic amount of Pd(OH)<sub>2</sub> in MeOH/EA (1/1, 10mL) was stirred under H<sub>2</sub> balloon for 12h. After filtration through Celite, the filter cake was washed with MeOH. The filtrate was evaporated and the residue underwent to next step without purification.

**[00178]** The residue described above was dissolved in pyridine (5 mL) and acetic anhydride (5 mL). The mixture was stirred at room temperature overnight. The solution was added MeOH to destroy the excess acetic anhydride and then concentrated in

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

vacuo. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added and the reaction mixture was washed with 1M aqueous HCl, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and brine. The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrated and purified by chromatography (Hexane:EtOAc = 1:1) to give **S11** as a white foamy solid (794 mg, 90% in two steps). R<sub>f</sub>: 0.24 (Hexane:EtOAc = 1:1). <sup>1</sup>H NMR (600MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.88 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 6.76 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 5.19 (t, *J*=9.2 Hz, 1H), 5.11-5.07 (m, 3H), 5.02 (t, *J*=9.7 Hz, 1H), 4.88-4.81 (m, 4H), 4.50 (dd, *J*=12.0, 2.0 Hz, 1H), 4.46 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 4.44 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 4.37 (dd, *J*=12.0, 2.0 Hz, 1H), 4.32 (dd, *J*=12.5, 4.3 Hz, 1H), 4.10-4.06 (m, 2H), 4.00 (dd, *J*=12.5, 2.0 Hz, 1H), 3.80 (t, *J*=9.5 Hz, 1H), 3.73 (t, *J*=9.5 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.67-3.64 (m, 1H), 3.61-3.55 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.97 (2s, 6H), 1.96 (s, 3H), 1.94 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (150MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.53, 170.27, 170.23, 169.79, 169.57, 169.32, 169.10, 155.77, 150.88, 118.69, 114.53, 100.80, 100.57, 100.07, 76.44, 76.13, 72.89, 72.81, 72.77, 72.65, 72.41, 72.02, 71.75, 71.55, 71.52, 67.70, 62.15, 61.49, 55.67, 20.86, 20.80, 20.70, 20.57, 20.50. HRMS (ESI) Calcd for C<sub>45</sub>H<sub>58</sub>O<sub>27</sub>Na<sup>+</sup>: 1053.3058 [M+Na]<sup>+</sup>; found: 1053.3051.

**[00179] 5-Azidopentyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranoside (S12):** Compound **S11** (866 mg, 0.84 mmol) was dissolved in acetone-H<sub>2</sub>O (20 mL 3:1), and the mixture was cooled (ice-water bath). A solution of CAN (2.3 g, 4.20 mmol) in acetone/H<sub>2</sub>O (10 mL 3:1) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 30 min. The mixture was concentrated to a volume of 10 mL, diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>, dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered, and concentrated. The residue was then dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and treated with trichloroacetonitrile (1.0 mL) and Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (250 mg, 0.77 mmol). After stirring at room temperature for 12h, the reaction was washed with water, brine, dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtered, and concentrated. A suspension of the trichloroacetimidate compound, 5-azido-1-pentanol (0.54 g, 4.20 mmol), and 3Å molecular sieves (1.5 g) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) was stirred at room temperature for 1h. The reaction mixture was cooled to 0 °C and treated dropwise with BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (0.11 mL, 0.84 mmol). After stirring at 0 °C for 2h, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> was added and the reaction mixture was filtered with Celite. The

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and then washed with brine. The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated the solvent and purified by chromatography (Hexane:EtOAc = 3:1→2:1→1:1) to give **S12** as a white foamy solid (210mg, 24% in three steps). R<sub>f</sub>: 0.31 (Hexane:EtOAc =1:1). <sup>1</sup>H NMR (600MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.12-5.05 (m, 3H), 5.00 (t, *J*=9.7 Hz, 1H), 4.87-4.79 (m, 3H), 4.48 (dd, *J*=11.8, 2.0 Hz, 1H), 4.43 (d, *J*=7.9 Hz, 1H), 4.42 (d, *J*=7.9 Hz, 1H), 4.38 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 4.35 (dd, *J*=12.0, 2.0 Hz, 1H), 4.31 (dd, *J*=12.5, 4.3 Hz, 1H), 4.07 (dd, *J*=12.1, 5.2 Hz, 1H), 3.99 (dd, *J*=12.5, 2.0 Hz, 1H), 3.80-3.74 (m, 1H), 3.71 (dt, *J*=10.0, 9.5 Hz, 2H), 3.60-3.58 (m, 2H), 3.55-3.52 (m, 2H), 3.45-3.40 (m, 1H), 3.21 (t, *J*=6.8 Hz, 2H), 2.09 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.94 (2xs, 6H), 1.60-1.52 (m, 4H), 1.42-1.33 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (150MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.52, 170.31, 170.21, 169.82, 169.79, 169.54, 169.31, 169.10, 100.79, 100.59, 100.55, 76.49, 76.14, 72.87, 72.67, 72.41, 71.75, 71.62, 71.53, 67.72, 62.14, 61.72, 61.48, 51.34, 28.91, 28.50, 23.12, 20.87, 20.68, 20.55, 20.48. HRMS (ESI) Calcd for C<sub>43</sub>H<sub>61</sub>N<sub>3</sub>O<sub>26</sub>Na<sup>+</sup>: 1058.3436 [M+Na]<sup>+</sup>; found: 1058.3419.

**[00180] [(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-nonadecafluorododecoxycarbonyl-amino)pentyl] 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranoside (S13):** Compound **S13** was prepared from compound **S12** according to the procedure as described for **S8** in 55% yields (two steps) after column chromatography (Hexane:EtOAc = 1:1→2:3). White solid. R<sub>f</sub>: 0.41 (Hexane:EtOAc =1:1). <sup>1</sup>H NMR (600MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.13-5.06 (m, 3H), 5.01 (t, *J*=9.7 Hz, 1H), 4.88-4.81 (m, 4H), 4.79 (br, 1H), 4.50 (dd, *J*=11.8, 1.3 Hz, 1H), 4.44 (d, *J*=7.2 Hz, 1H), 4.43 (d, *J*=7.6 Hz, 1H), 4.38 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 4.36 (dd, *J*=12.0, 1.8 Hz, 1H), 4.32 (dd, *J*=12.5, 4.3 Hz, 1H), 4.10-4.06 (m, 3H), 4.02 (dd, *J*=12.0, 4.8 Hz, 1H), 3.99 (dd, *J*=12.4, 2.0 Hz, 1H), 3.79-3.74 (m, 1H), 3.72 (dt, *J*=11.5, 9.6 Hz, 2H), 3.63-3.58 (m, 1H), 3.56-3.50 (m, 2H), 3.43-3.40 (m, 1H), 3.11 (m, 1H), 2.20-2.10 (m, 2H), 2.10 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.98 (2xs, 6H), 1.97 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.94 (2xs, 6H), 1.91-1.86 (m, 2H), 1.54-1.52 (m, 2H), 1.48-1.43 (m, 2H), 1.34-1.26 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (150MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.53, 170.35, 170.22, 169.81, 169.58, 169.32, 169.11, 153.25,

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

120.2-108.01 (m, C-F coupling unresolved), 100.79, 100.58, 100.55, 76.47, 76.14, 72.88, 72.70, 72.66, 72.39, 72.00, 71.75, 71.63, 71.54, 71.34, 69.76, 67.69, 63.67, 63.18, 62.13, 61.65, 61.48, 40.84, 29.50, 28.93, 27.99, 27.84, 27.70, 23.02, 20.89, 20.76, 20.67, 20.54, 20.48, 20.34. HRMS (ESI) Calcd for  $C_{55}H_{68}F_{17}NO_{28}Na^+$ : 1536.3656 [M+Na]<sup>+</sup>; found: 1536.3548

**[00181] [(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-nonadecafluorododecoxycarbonyl-amino)pentyl]  $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranoside (9):** Compound **9** was prepared from compound **S13** according to the procedure as described for **8** in 50 % yields after purification by column chromatography (EtOAc:MeOH = 3:1 $\rightarrow$ 1:1) and FluoroFlash<sup>®</sup> SPE cartridge. White solid. R<sub>f</sub>: 0.66 (EtOAc:MeOH =3:1). <sup>1</sup>H NMR (600MHz, MeOD):  $\delta$  4.44 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H), 4.39 (d,  $J=7.8$  Hz, 1H), 4.27 (d,  $J=7.9$  Hz, 1H), 4.10 (t,  $J=6.1$  Hz, 1H), 3.91-3.84 (m, 6H), 3.67-3.63 (m, 3H), 3.58-3.48 (m, 7H), 3.39-3.32 (m, 3H), 3.30 (m, 1H), 3.22 (m, 2H), 3.09 (t,  $J=6.9$  Hz, 1H), 2.31-2.26 (m, 2H), 1.97-1.90 (m, 2H), 1.65-1.61 (m, 2H), 1.52-1.48 (m, 2H), 1.43-1.37 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (150MHz, MeOD):  $\delta$  157.71, 120.11-108.43 (m, C-F coupling unresolved), 103.44, 103.21, 103.05, 79.40, 79.00, 76.95, 76.66, 75.47, 75.25, 75.02, 73.75, 73.48, 70.19, 69.56, 63.07, 61.26, 60.58, 60.30, 40.50, 29.45, 29.20, 27.61, 27.46, 27.32, 23.10, 20.32. HRMS (ESI) Calcd for  $C_{35}H_{48}F_{17}NO_{18}Na^+$ : 1116.2492 [M+Na]<sup>+</sup>; found: 1116.2520.

**[00182] [(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,12-nonadecafluorododecoxycarbonyl-amino)pentyl]  $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranoside (10):** Compound **10** was prepared from according to the procedure as described for **9** in 86 % yields after purification by column chromatography.  $\delta$  4.47 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H), 4.46 (d,  $J=8.0$  Hz, 1H), 4.42 (d,  $J=7.8$  Hz, 1H), 4.30 (d,  $J=7.9$  Hz, 1H), 4.10 (t,  $J=6.1$  Hz, 2H), 3.91-3.89 (m, 9H), 3.68-3.63 (m, 3H), 3.60-3.50 (m, 14H), 3.39-3.25 (m, 14H), 3.12 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H), 2.33-2.26 (m, 2H), 1.96-1.90 (m, 2H), 1.70-1.61 (m, 2H), 1.55-1.52 (m, 2H), 1.43-1.37 (m, 2H). HRMS (ESI) Calcd for  $C_{41}H_{58}F_{17}NO_{23}Na^+$ : 1255.3128 [M+Na]<sup>+</sup>; found: 1255.3225.

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

### Mass Spectrometry

**[00183]** The immobilized slide was analyzed with a Bruker Ultraflex MALDI-TOF mass spectrometer equipped with a nitrogen pulsed laser (355 nm). Each data point was collected at the average of 500-1000 shots of the laser beam, and the laser fluence was applied at 40-95%, with the best results obtained mostly at 50-80%. A standard aqueous solution of mannose-NH<sub>2</sub> was manually deposited on a defined area of the ACG slide and used to calibrate the data obtained from the immobilized sugars on the same slide substrate. For quantitative comparison of the grafted mannose derivatives at different concentrations, all analyses were made at a single measurement of 500 shots at 80% fluence. The variation in average peak intensity with S/N ratio was plotted.

### Protein-Binding Assay

**[00184]** Mannose-protein-binding assay of immobilized mannose with biotinylated ConA and Cy3-tagged streptavidin. The same slide used for MS analysis was washed again with distilled water under mild sonication and then rinsed with PBS (phosphate-buffered saline) buffer. Biotin-labeled ConA (Invitrogen C 21420) was diluted 500-1000 times in PBST buffer (PBS with 0.05% Tween 20). The protein solution (50 mL) was applied to each array substrate and incubated in a Whatman 16-pad incubation chamber. These slides were wrapped with foil and incubated for 1 h in a shaker at room temperature. After the incubation, the slides were washed three times with PBST buffer. Streptavidin-Cy3 (Sigma S 6402) was diluted in PBS buffer 100 times, and the slides were covered with aluminum foil and incubated again with streptavidin-Cy3 for another hour. After the second incubation, the slides were washed with PBST buffer and distilled water and then purge-dried with high-quality nitrogen gas. The array pattern was analyzed in reflective mode with 540-nm laser light by using the fluorescence light scanner, ArrayWoRx, made by Applied Precision. The best block on each slide was selected for statistical fluorescence-intensity analysis.

**[00185]** Globo H-protein-binding assay of immobilized Globo H with monoclonal antibody VK9 (IgG) from mouse and Cy3-tagged secondary antibody. The Globo H microarray slides were blocked with aqueous ethanalamine (50 mM) to remove the

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

unreacted NHS on the slide surface. The slides were assembled again in the reaction cell and washed with PBS buffer (pH 7.4). Next, a solution of VK9 (1 mL, 50 µg/mL in each cell), the anti-Globo H monoclonal antibody (IgG) from mouse, in PBST (pH 7.4) was added to the cell. The binding experiment was conducted with constant shaking for 1 h. The slide was washed three times (with 10 minutes constant swirling each time) with PBST buffer (pH 7.4). Cy3-tagged goat anti-mouse IgG for VK9 was added to the cell, and the mixture was incubated with shaking in the dark for 1 h. The protein-bound slides were washed five times each with PBST buffer (pH 7.4), PBS buffer (pH 7.4), and water and then purge-dried with nitrogen gas.

#### **MS-TOF analysis and Glycan array preparation of 4—MS-TOF Analysis of the poly-fluorinated mannose adsorbed on the PTFE-like ACG Slides**

**[00186]** Compound **4** was dissolved in methanol/water (6/4) solvent mixture at approximately 10 mM, 1mM, 100 uM in series. The solutions (1µL each) were spotted manually, and also, microarrayed on the slides with the BioDot AD3200 instrument (Agilent Technology) by robotic pin (Array It, SMP4), a deposition of approximately 1.1 nL of the solution per spots of the array. The slides were stored in 30% humidity chamber overnight then analyzed by mass spectroscopy. The blank and poly-fluorinated mannose slides, which contain both silane based and phosphonic acid based ACG slides, were analyzed with Bruker Ultraflex MALDI-TOF mass spectrometer equipped with a nitrogen pulsed laser (355 nm). Equal volume of BSA Trypsin digested (1 pmol/µL) solution was mixed homogeneously with DHB (dihydroxybenzoic acid, 10 mg in 1:1 acetonitrile/water) solution, and was used as the standard for MS-TOF mass calibration. Each data point was collected at the average of 500 shots of the laser beam, and the laser fluence between 2 to 20% was applied. Most of the experiments were carried out under positive polarized electrical field.

**[00187]** Fig. 26A and Fig. 27A show the MS-TOF background results of these newly fabricated PTFE-like ACG slides. In Fig. 26A, (a) represents an MS-TOF result of the background of silane based PTFE-Like ACG; (b) represents an MS-TOF result of poly-fluorinated mannose adsorbed on the above ACG slide. In Fig. 27A, (a) represents

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

an MS-TOF result of the background of phosphonic acid based PTFE-Like ACG and (b) represents MS-TOF result of poly-fluorinated mannose adsorbed on the above ACG slide. Molecular ions of mannose derivatives (Mw. 783) were observed at 806 [M+Na]<sup>+</sup>, and 822 [M+K]<sup>+</sup> with very clean baseline since organic chemicals do not adhere to the PTFE-like ACG slide surface.

**[00188]** Fig. 26B and Fig. 27B give the results of poly-fluorinated mannose silane based and phosphonic acid based slides. Fig. 26B represents implementations of a microarray of silane based PTFE-like ACG slide. The mannose solutions (1.1μL /spot) varied in concentration (from 12 mM, 1.2 mM, to 120 μM). Similarly, 27B shows a microarray of a phosphonic acid based PTFE-like ACG slide. The mannose solutions (1.1μL /spot) varied in concentration (from 14 mM, 1.4 mM, to 140μM). The fluorescence-tagged Con A-Mannose binding where the mannose derivatives were micro arrayed on the PTFE-like ACG Slide.

**Fluorescence-tagged Con A/Mannose binding of the poly-fluorinated mannose adsorbed on the PTFE-Like ACG Slides.**

**[00189]** 100 μL of Alex 488-tagged Concanavalin A in phosphate-BSA buffer (25 μg/mL, pH 6.5) was applied on the ACG slide surface immobilized with mannose derivative. These slides with Con A solution were incubated at room temperature for approximately 2 hours. After incubation, the slides were washed three times each with 12 ml of Phosphate-BSA buffer, PBST buffer, and de-ionized water in petri dishes with gentle swirling. Then nitrogen purge dried and analyzed by Array WoRx (Applied Precision) in reflective mode of the fluorescence light scanner at 530 nm. Figure S1(c) and Figure S2(c) show the results of these bioassay.

**On-chip analysis by MALDI-TOF (Ultra-Flex II) (reaction in eppendorf)**

**[00190]** Cellulase was prepared (5U/mL in 25mM pH 5.05 NaOAc buffer solution). Substrate was also dissolved in NaOAc buffer solution (25mM, pH 5.05) to give 0.5mM substrate solution. Add 100uL cellulase solution to 100uL substrate solution in eppendorf to have a 2.5U/mL cellulase solution with 0.25mM substrate. This solution was incubated in 37 °C for 18 hours. Add 100μL incubated solution onto the

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

slide loaded in FAST® Frame. Put the slide in dry box to remove the water, and then use high vacuum to remove trace water. 100µL water was used to rinse each well of the FAST® Frame multi-slide plate to solve and remove the salt of the buffer solution. Remove any residual water on the plate by high vacuum and then analyzed the slide by MALDI-TOF Ultra-Flex II.

**On-chip analysis by MALDI-TOF (Ultra-Flex II) (reaction on chip directly)**

**[00191]** Cellulase was prepared (5U/mL in 25mM pH 5.05 NaOAc buffer solution). Substrate was also dissolved in NaOAc buffer solution (25mM, pH 5.05) to give 0.5mM substrate solution. Add 50µL cellulase solution to 50µL substrate solution onto the glass slide which was loaded in FAST® Frame multi-slide plate to have a 2.5U/mL cellulase solution with 0.25 mM substrate. The well of the plate was sealed and the whole assembly was incubated in 37 °C for 18 hours. Put the slide in dry box to remove the water, and then use high vacuum to remove trace water. 100µL water was used to rinse each well of the FAST® Frame multi-slide plate to solve and remove the salt of the buffer solution. Remove any residual water on the plate by high vacuum and then analyzed the slide by MALDI-TOF Ultra-Flex II.

**Cellulase purification and MS-TOF analysis of Cellulase activity.  
Cloning, expression and purification of exoglucanase and endoglucanase**

**[00192]** The genomic DNA of *Sulfolobus solfataricus* (ATCC 35092) and *Clostridium thermocellum* (ATCC 27405) were obtained from the ATCC biological resource center. The *Sso7d* (NCBI accession number: AAK42090) gene fragment was amplified directly from the *Sulfolobus solfataricus* genome by polymerase chain reaction (PCR) with forward 5' GGAATTCCATATGGCAACAGTAAAGTTC AAG 3' (SEQ ID NO: 1) and reverse 5' CGGGATCCCITTCITTTGCTTCTCTAACATTTG 3' (SEQ ID NO: 2) primers. The PCR product encoding *Sso7d* was digested with *NdeI* and *BamHI* and subsequently cloned into expression vector pET-28a (Novagen) to generate pET-28-*Sso7d*. A two sticky-ends linker, generated by denaturing and annealing with 5' GATCTGATCTGTACGACGATGACGATAAGGGATCTATCGAAGGTCGTG 3' (SEQ ID NO: 3) and 5' GATCCACGACCTTCGATAGATCCCTTATCGTCATCGTCGTACAGATCA 3' (SEQ ID NO: 4) primers, was inserted into the *BamHI* cleaved pET-28-*Sso7d* to

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

generate pET-28-Sso7d-Fxa. The functional domains of *CtCbhA* (NCBI accession number: X80993) gene fragment was amplified directly from the *Clostridium thermocellum* genome by polymerase chain reaction (PCR) with forward 5' GAAGATCTATACTTCCGCAGCCTGATG 3' (SEQ ID NO: 5) and reverse 5' ACGCGTCGACTTAGGTTTCACTGTCTGTGFACTG 3' (SEQ ID NO: 6) primers. The PCR product encoding CtCbhA was digested with *Bgl*III and *Sal*I and subsequently cloned into *Bam*HI and *Sal*I cleaved pET-28-Sso7d-Fxa to generate pET-28-Sso7d-Fxa-CtCbhA. The functional domains of *CtCel44A* (NCBI accession number: D83704) gene fragment was amplified directly from the *Clostridium thermocellum* genome by polymerase chain reaction (PCR) with forward 5' GAAGATCTGAACCTGCAAAAGTGGTTGAC 3' (SEQ ID NO: 7) and reverse 5' ACGCGTCGACTTAGGGCTCCGCAGCTTCAAGCAC 3' (SEQ ID NO: 8) primers.

**[00193]** The PCR product encoding CtCel44A was digested with *Bgl*III and *Sal*I and subsequently cloned into *Bam*HI and *Sal*I cleaved pET-28-Sso7d-Fxa to generate pET-28-Sso7d-Fxa-CtCel44A. All DNA constructs were verified by nucleotide sequencing. The correct constructs were transformed into *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) competent cell for protein expression. The 10 ml overnight culture of a single transformant was used to inoculate 1 liter of fresh LB medium containing 30 µg/ml kanamycin at 30 °C. The incubated temperature was changed to 16 °C until the cells were grown to  $A_{600nm} = 0.8 \sim 1$ . One hour later isopropyl β-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to a final concentration of 0.5 mM. After 16 h, the cells were harvested by centrifugation at 7,000 x g for 15 min to collect the cell paste. The cell pellet was resuspended immediately in the lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.5. The cell suspension was disrupted by Constant Cell Disruption System (CONSTANT SYSTEM Ltd., UK) and centrifuged at 17,000 x g to remove cell debris. The cell-free extract was loaded onto a Ni<sup>2+</sup>-NTA column, which had been previously equilibrated with lysis buffer. The column was washed with lysis buffer, subsequently the His<sub>6</sub>-tagged protein was eluted by a linear gradient from 10 mM to 300 mM imidazole. The purified His<sub>6</sub>-tagged Sso7d fusion CtCbhA and CtCel44A proteins were concentrated and changed to stored buffer (50 mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

8.0) by 30 kDa cut-off size membrane of Amicon-Ultra-15 (Millipore, MA, USA) for storage at -80 °C.

**[00194]** According to implementations, the devices and methods (e.g., mass spectroscopy) of the present disclosure are operational in an environment comprising numerous general purpose or special purpose computing systems or configurations. Examples of well known computing systems, environments, or configurations that may be suitable for use with the invention include, but are not limited to, personal computers, server computers, hand-held or laptop devices, multiprocessor systems, microprocessor-based systems, set top boxes, programmable consumer electronics, network PCs, minicomputers, mainframe computers, telephony systems, distributed computing environments that include any of the above systems or devices, and the like.

**[00195]** The devices and methods of the present disclosure may be described in the general context of computer-executable instructions, such as program modules, being executed by a computer. Generally, program modules include routines, programs, objects, components, data structures, etc., that perform particular tasks or implement particular abstract data types. The system may also be practiced in distributed computing environments where tasks are performed by remote processing devices that are linked through a communications network. In a distributed computing environment, program modules may be located in both local and remote computer storage media including memory storage devices. The computer programs are stored in a memory medium or storage medium or they may be provided to a processing unit through a network or I/O bus.

**[00196]** In one aspect, the devices and methods of the present disclosure include at least one central processing unit (CPU) or processor. The CPU can be coupled to a memory, ROM or computer readable media containing the computer-executable instructions. Computer readable media can be any available media that can be accessed by the system and includes both volatile and nonvolatile media, removable and non-removable media implemented in any method or technology for storage of information such as computer readable instructions, data structures, program modules or other

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

data. Computer storage media includes, but is not limited to, RAM, ROM, EEPROM, flash memory, portable memory or other memory technology, CD-ROM, digital versatile disks (DVD) or other optical disk storage, magnetic cassettes, magnetic tape, magnetic disk storage or other magnetic storage devices, or any other medium which can be used to store the desired information and which can be accessed by the fingerprint generation and matching systems. Communication media typically embodies computer readable instructions, data structures, program modules or other data in a modulated data signal such as a carrier wave or other transport mechanism and includes any information delivery media. By way of example, and not limitation, communication media includes wired media such as a wired network or direct-wired connection, and wireless media such as acoustic, RF, infrared and other wireless media. Combinations of any of the above should also be included within the scope of computer readable media. The computer readable media may store instructions or data which implement all or part of the system described herein.

**[00197]** While the apparatus and method have been described in terms of what are presently considered to be the most practical and preferred embodiments, it is to be understood that the disclosure need not be limited to the disclosed embodiments. It is intended to cover various modifications and similar arrangements included within the spirit and scope of the claims, the scope of which should be accorded the broadest interpretation so as to encompass all such modifications and similar structures. The present disclosure includes any and all embodiments of the following claims.

Academia-60451-Sequence\_ST25.txt  
SEQUENCE LISTING

<110> Wu, Chung-Yi  
Wong, Chi-Huey

<120> GLYCAN ARRAYS ON PTFE-LIKE ALUMINUM COATED GLASS SLIDES AND  
RELATED METHODS

<130> 37919.60451

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Primer

<400> 1  
ggaattccat atggcaacag taaagttcaa g 31

<210> 2  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Primer

<400> 2  
cgggatccct tcttttgctt ctctaacatt tg 32

<210> 3  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Linker

<400> 3  
gatctgatct gtacgacgat gacgataagg gatctatcga aggtcgtg 48

<210> 4  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Linker

<400> 4  
gatccacgac cttcgataga tcccttatcg tcatcgtcgt acagatca 48

<210> 5

Academia-60451-Sequence\_ST25.txt

<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Primer

<400> 5  
gaagatctat acttccgcag cctgatg 27

<210> 6  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Primer

<400> 6  
acgcgtcgac ttaggtttca ctgtctgtgt actg 34

<210> 7  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Primer

<400> 7  
gaagatctga acctgcaaaa gtggttgac 29

<210> 8  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Primer

<400> 8  
acgcgtcgac ttagggctcc gcagcttcaa gcac 34

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

**CLAIMS**

1. An array of carbohydrates immobilized on an aluminum-coated transparent solid substrate or a PTFE-like aluminum-coated transparent solid substrate, the array comprising:

a plurality of carbohydrates immobilized at discrete locations on a surface of an aluminum-coated transparent solid substrate, wherein the array is suitable for:

(a) performing mass spectroscopic characterization of the immobilized carbohydrates, and

(b) performing analysis of binding reactions between the carbohydrates and molecules suspected of specifically binding the carbohydrates.

2. The array of claim 1, wherein the substrate is conductive or semiconductive of an electrical field.

3. The array of claim 1, wherein the transparent solid substrate is glass.

4. The array of claim 1, wherein the carbohydrate is a glycan.

5. The array of claim 1, wherein the carbohydrates are immobilized by a non-covalent bond.

6. The array of claim 5, wherein the carbohydrates are polyfluorinated with a  $-C_nF_{2n+1}$  ( $n \geq 4$ ) tail.

7. The array of claim 6, wherein the polyfluorinated carbohydrates are spotted on the surface of the PTFE-like aluminum-coated transparent solid substrate.

8. The array of claim 1, wherein the carbohydrates are immobilized by a covalent bond.

9. The array of claim 8, wherein the carbohydrates are modified with a phosphonic acid functional group.

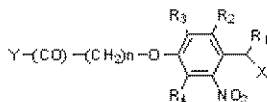
WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

10. The array of claim 8, wherein the phosphonylated carbohydrates are immobilized on the surface of the substrate by a chelating interaction between the phosphonic acid group and the aluminum oxide on the surface of the aluminum-coated transparent solid substrate.

11. The array of claim 8, wherein the carbohydrates are modified with a photocleavable linker and a silane functional group.

12. The array of claim 11, wherein the photocleavable linker has the general formula:



in which R<sup>1</sup> is hydrogen, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> alkyl; R<sup>2</sup> and R<sup>4</sup> are each independently hydrogen, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> alkoxy; R<sup>3</sup> is C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> alkoxy; X is O(CO)N-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>5</sup>, in which n ≥ 3, R<sup>5</sup> is carbohydrates, Y is the solid support, like ACG slide.

13. The array of claim 1, wherein the mass spectroscopic characterization of the immobilized carbohydrates comprises a time-of-flight mass spectrometry (MS-TOF).

14. The array of claim 13, wherein the mass spectroscopic characterization of the immobilized carbohydrates comprises a matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry.

15. The array of claim 13, wherein the carbohydrates are polysaccharides, or oligosaccharides, or carbohydrate portions of a glycoconjugate, or cellobiose, or cellotriose, or cellotetraose, or GloboH, or Gb5.

16. The array of claim 15, wherein the mass spectroscopic characterization of the immobilized carbohydrates comprises characterization of the carbohydrate products of a cellulase enzyme reaction.

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

17. The array of claim 16, wherein the cellulase enzyme reaction is performed on immobilized carbohydrates on the array surface, wherein the cellulase enzyme is suspected of being capable of degrading the immobilized polysaccharides, or oligosaccharides, or carbohydrate portions of a glycoconjugate, or cellobiose, or cellotriase, or cellotetraose, or GloboH, or Gb5.

18. The array of claim 13, wherein the MS-TOF characterization can be performed without adding matrix.

19. The array of claim 13, wherein a carbohydrate binding assay can be performed on the array about 15 minutes following an MS-TOF characterization.

20. The array of claim 1, wherein the molecules suspected of specifically binding the carbohydrates are proteins.

21. The array of claim 20, wherein the proteins are cellulases.

22. The array of claim 21 wherein the cellulases are selected from the group consisting of 1,4- $\beta$ -glucosidases, exoglucanases (1,4- $\beta$ -D glucan cellobiohydrolases) and endoglucanases (1,4- $\beta$ -D glucan glucanohydrolases).

23. The array of claim 20, wherein the proteins analyzed for binding to the carbohydrates immobilized on the array are labeled with a detectable label.

24. The array of claim 23, wherein the protein labels comprise fluorescent dyes.

25. The array of claim 24, wherein the fluorescent dyes comprise amine-reactive dyes.

26. A computer readable medium comprising data representing the characterization of immobilized carbohydrates on the surface of the array, or data representing the analysis of the carbohydrate binding reactions on the array surface, or both.

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

27. A method for characterization of carbohydrates immobilized on a PTFE-like aluminum-coated transparent solid substrate, the method comprising:

(a) providing an array comprising a plurality of carbohydrates immobilized at discrete locations on a surface of a PTFE-like aluminum-coated transparent solid substrate; and

(b) performing mass spectroscopic analysis to characterize the carbohydrates immobilized at each discrete location.

28. The method of claim 27, wherein the mass spectroscopic characterization of the immobilized carbohydrates comprises a time-of-flight mass spectrometry (MS-TOF).

29. The method of claim 27, further comprising:

(c) then performing a binding analysis of suspected carbohydrate binding moieties.

30. The method of claim 29, wherein the suspected carbohydrate binding moieties are cellulase proteins.

31. The method of claim 30, further comprising:

(d) incubating the cellulase proteins with the bound carbohydrates immobilized on the array surface under conditions suitable for the cellulases to hydrolyze the carbohydrates.

32. The method of claim 31, further comprising:

(e) characterizing the products of the cellulase proteins remaining immobilized on the array surface following hydrolysis by the cellulases.

33. The method of claim 31, wherein the cellulases are selected from the group consisting of 1,4- $\beta$ -glucosidases, exoglucanases (1,4- $\beta$ -D glucan cellobiohydrolases) and endoglucanases (1,4- $\beta$ -D glucan glucanohydrolases).

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

34. A method for analysis of binding reactions between the carbohydrates and molecules suspected of specifically binding the carbohydrates, the method comprising:

(a) providing an array comprising a plurality of carbohydrates immobilized at discrete locations on a surface of an aluminum-coated transparent solid substrate or a PTFE-like aluminum-coated transparent solid substrate;

(b) contacting the array with one or more molecules suspected of binding to one or more of the plurality of carbohydrates immobilized on the array surface; and

(c) identifying the presence or absence of binding reactions at one or more discrete locations on the array surface.

35. The method of claim 34, wherein the molecules suspected of specifically binding the carbohydrates are proteins labeled with a detectable label.

36. The method of claim 35, wherein the protein labels comprise fluorescent dyes.

37. The method of claim 36, wherein the fluorescent dyes comprise amine-reactive cyanine dyes.

38. The method of claim 34, wherein the binding of a molecule to a carbohydrate on the array is representative of a biological process.

39. The method of claim 38, wherein the biological process is selected from the group consisting of protein folding, protein secretion, protein stabilization, viral infection, bacterial infection, cancer metastasis, inflammatory response, innate immunity, adaptive immunity, a receptor-mediated signaling process, and biofuel production.

40. The method of claim 34, wherein the carbohydrates are polysaccharides, or oligosaccharides, or carbohydrate portions of a glycoconjugate, or cellobiose, or cellotriose, or cellotetraose, or GloboH, or Gb5.

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

41. The method of claim 34, wherein a mass spectroscopic characterization of the carbohydrates immobilized on the array is performed prior to the binding analysis.

42. The method of claim 34, wherein a mass spectroscopic characterization of the carbohydrates immobilized on the array is performed prior to and following the binding analysis,

wherein the one or more molecules suspected of binding to one or more of the plurality of carbohydrates immobilized on the array surface comprises a cellulose protein enzyme capable of hydrolyzing one or more carbohydrates on the array, and

further wherein the binding reaction is performed under conditions suitable for the cellulose to hydrolyze the carbohydrate.

43. The method of claim 42, wherein the cellulases are selected from the group consisting of 1,4- $\beta$ -glucosidases, exoglucanases (1,4- $\beta$ -D glucan cellobiohydrolases) and endoglucanases (1,4- $\beta$ -D glucan glucanohydrolases).

44. A method for fabricating an array of carbohydrates immobilized on an aluminum coated transparent solid substrate or a PTFE-like aluminum-coated transparent solid substrate, the method comprising:

(a) immobilizing a plurality of carbohydrates at discrete locations on a surface of an aluminum coated transparent solid substrate or a PTFE-like aluminum-coated transparent solid substrate,

wherein the substrate is conductive or semiconductive of an electrical field,

wherein the array is suitable for performing mass spectroscopic characterization of the immobilized carbohydrates, and

wherein the array is suitable for performing analysis of binding reactions between the carbohydrates and molecules suspected of specifically binding the carbohydrates.

45. The method of claim 44, wherein the carbohydrates are immobilized by a non-covalent bond.

WO 2010/009271

PCT/US2009/050754

46. The method of claim 45, wherein the carbohydrates are polyfluorinated.
47. The method of claim 44, wherein the carbohydrates are immobilized by a covalent bond.
48. The method of claim 48, wherein the carbohydrates are modified with a phosphonic acid functional group.
49. The method of claim 44, further comprising:  
(b) performing a characterization of carbohydrates immobilized on the array surface by mass spectrometry, wherein observation of one or more of a high signal/noise (S/N) ratio, low laser fluence rate, or a low fragmentation of signal, in an absence of matrix material is indicative of the array being suitable for performing mass spectroscopic characterization of the immobilized carbohydrates.
50. The method of claim 49, further comprising:  
(c) performing a carbohydrate binding assay on the array by contacting the array with a carbohydrate-binding protein, wherein detection of specific binding at one or more discrete locations on the array is indicative of the array being suitable for performing analysis of binding reactions between the carbohydrates and molecules suspected of specifically binding the carbohydrates
51. The method of claim 50, wherein the carbohydrate is selected from a sugar, or a glycoprotein, or a glycolipid, or mannose, each comprising internal or nonreducing terminal alpha-mannosyl groups and the binding molecule is Concanavalin A.
52. An array for use in disease diagnosis and drug discovery, wherein the array is fabricated by the method according to claim 44.

**(57) Abstract:** Aluminum coated glass slides provide a novel glycan array platform. Specifically, aluminum coated glass slides increase sensitivity of fluorescent based assay methods. Additionally, aluminum coated glass slides allows for mass spectroscopic analysis of carbohydrates and provide a platform for examining activity of cellulases. The unique properties of ACG slides include: 1) the metal oxide layer on the surface can be activated for grafting organic compounds such as modified oligosaccharides; 2) the surface remains electrically conductive, and the grafted oligosaccharides can be simultaneously characterized by mass spectrometry and carbohydrate-binding assay; and 3) the slides are more sensitive than transparent glass slides in binding analysis.

WO 2010/009271

1/32

PCT/US2009/050754

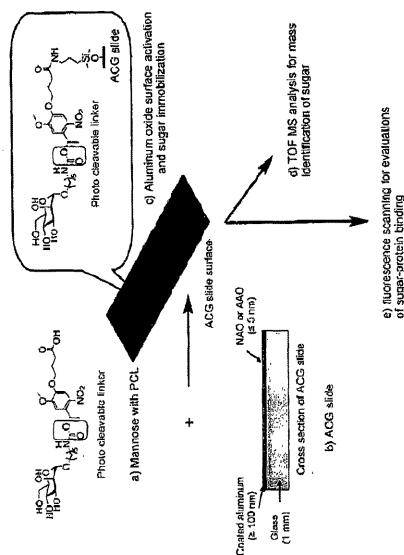


Fig. 1

WO 2010/009271

2/32

PCT/US2009/050754

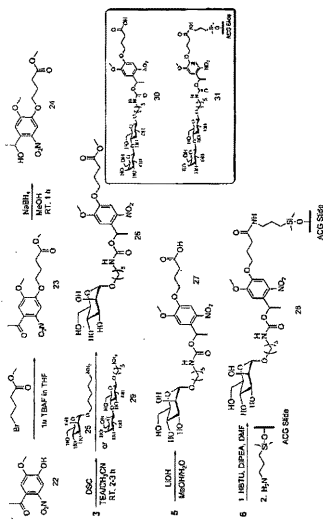


Fig. 2

WO 2010/009271

3/32

PCT/US2009/050754

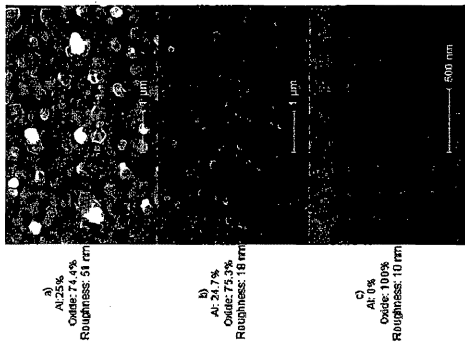


Fig. 3

WO 2010/009271

4/32

PCT/US2009/050754

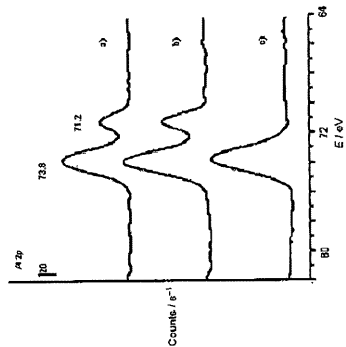


Fig. 4

WO 2010/009271

5/32

PCT/US2009/050754

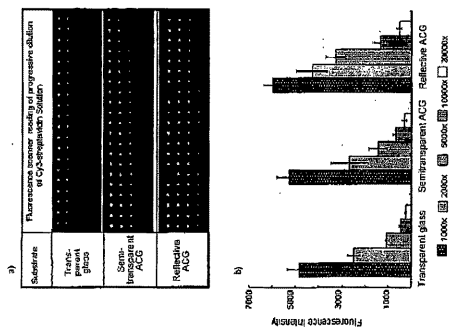


Fig. 5

WO 2010/009271

6/32

PCT/US2009/050754

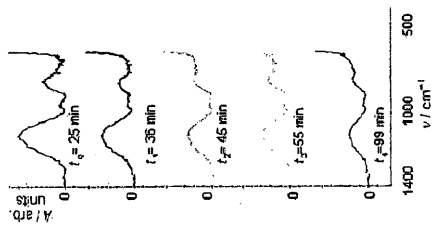


Fig. 6

WO 2010/009271

7/32

PCT/US2009/050754

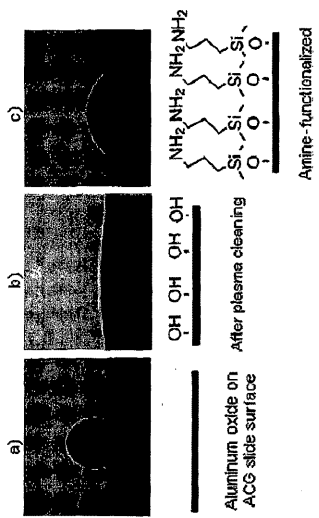


Fig. 7

WO 2010/009271

8/32

PCT/US2009/050754

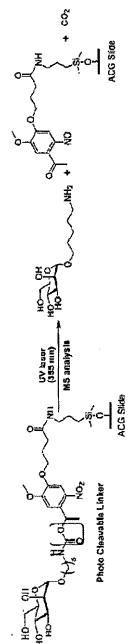


Fig. 8

WO 2010/009271

9/32

PCT/US2009/050754

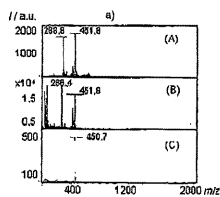


Fig. 9A

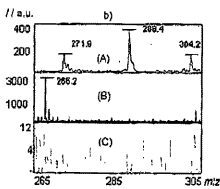


Fig. 9B

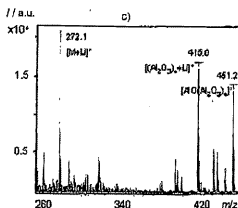


Fig. 9C

WO 2010/009271

10/32

PCT/US2009/050754

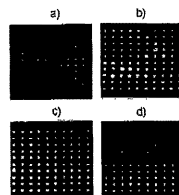


Fig. 10A

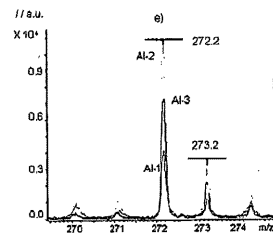


Fig. 10B

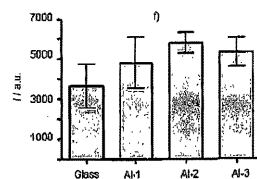


Fig. 10C

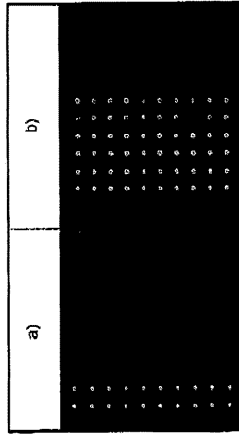


Fig. 11

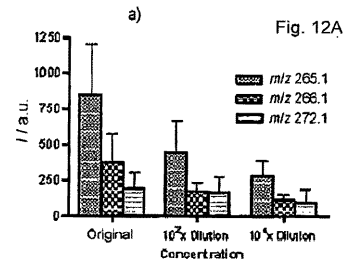


Fig. 12A

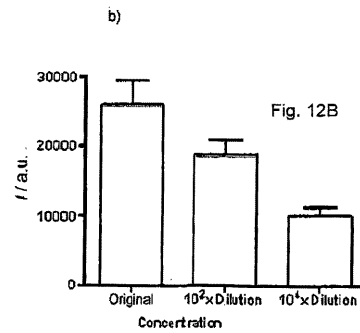


Fig. 12B

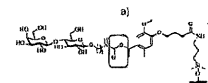


Fig. 13A

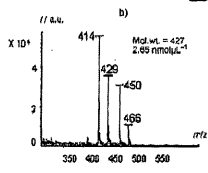


Fig. 13B

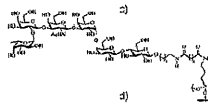


Fig. 13C

Fig. 13D

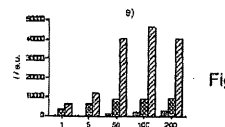
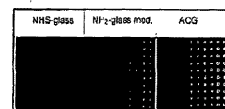


Fig. 13E

□ NHS-glass slide □ NHS-glass slide □ ACG slide

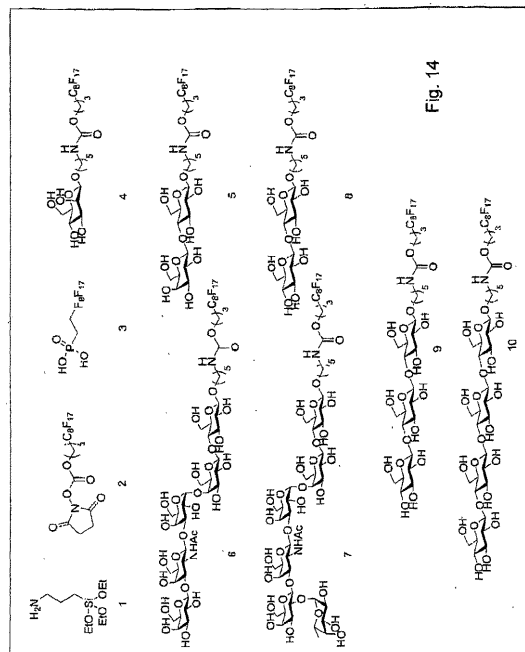


Fig. 14

WO 2010/009271

15/32

PCT/US2009/050754

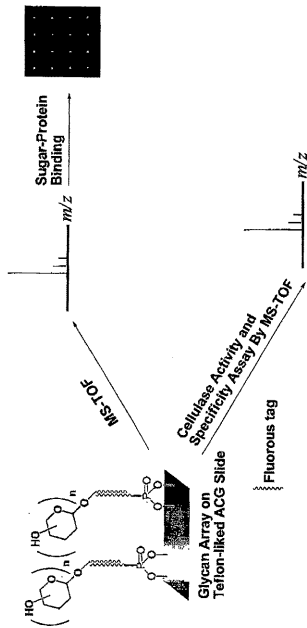


Fig. 15

WO 2010/009271

16/32

PCT/US2009/050754

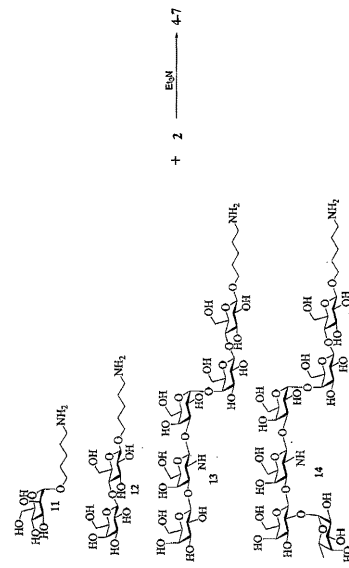


Fig. 16

WO 2010/009271

17/32

PCT/US2009/050754

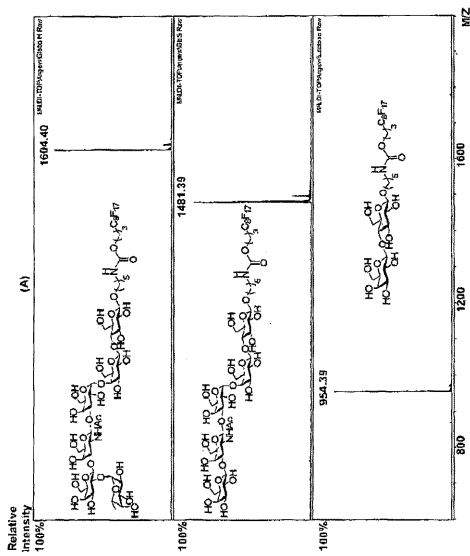


Fig. 17A

WO 2010/009271

18/32

PCT/US2009/050754

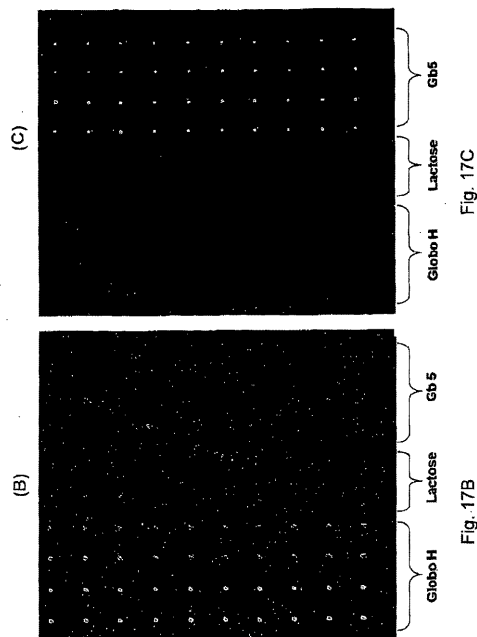


Fig. 17C

Fig. 17B

WO 2010/009271

19/32

PCT/US2009/050754

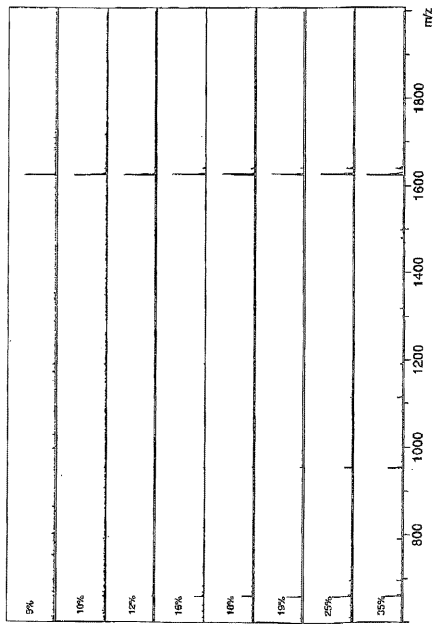


Fig. 18

WO 2010/009271

20/32

PCT/US2009/050754

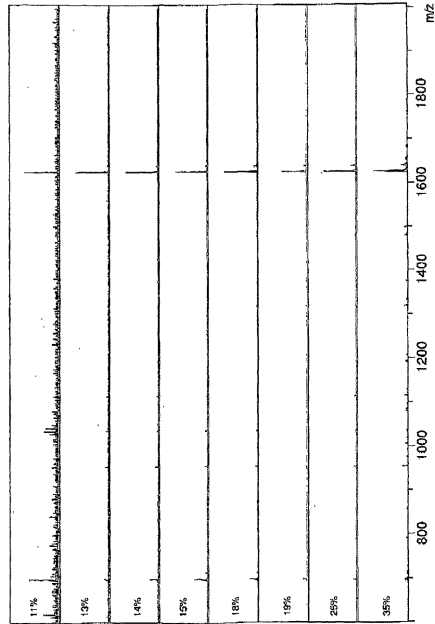


Fig. 19

WO 2010/009271

21/32

PCT/US2009/050754

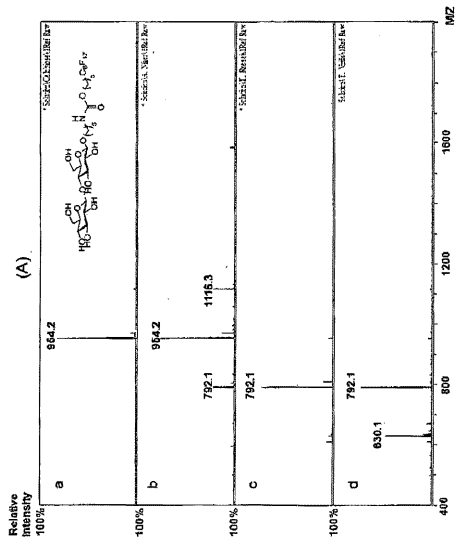


Fig. 20A

WO 2010/009271

22/32

PCT/US2009/050754

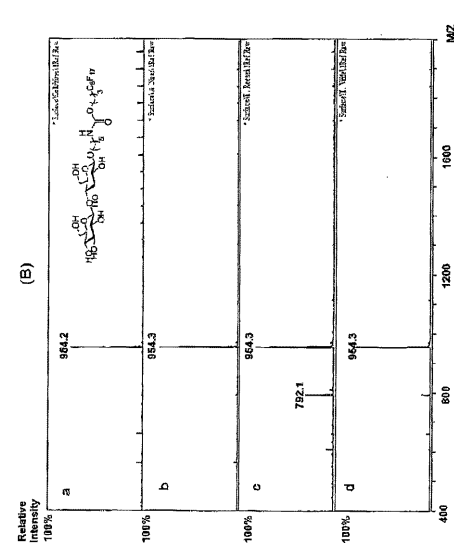
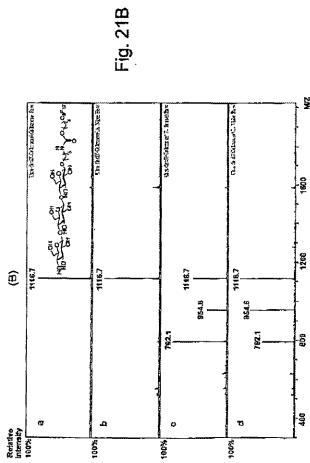
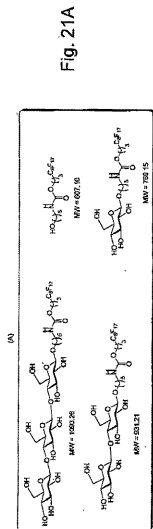


Fig. 20B

WO 2010/009271

23/32

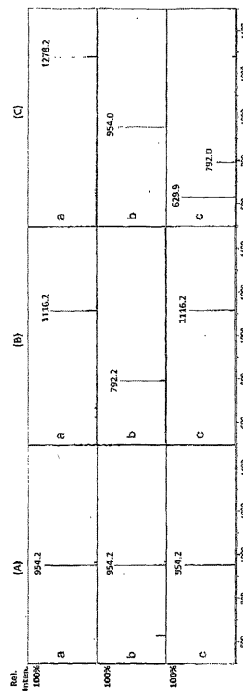
PCT/US2009/050754



WO 2010/009271

24/32

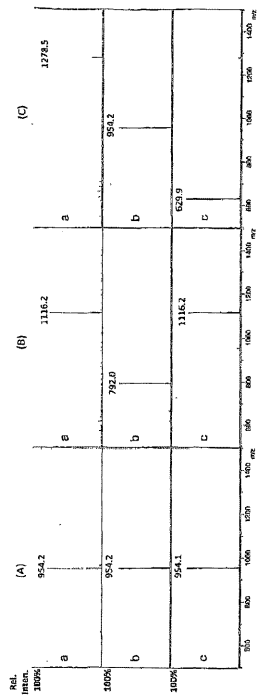
PCT/US2009/050754



WO 2010/009271

25/32

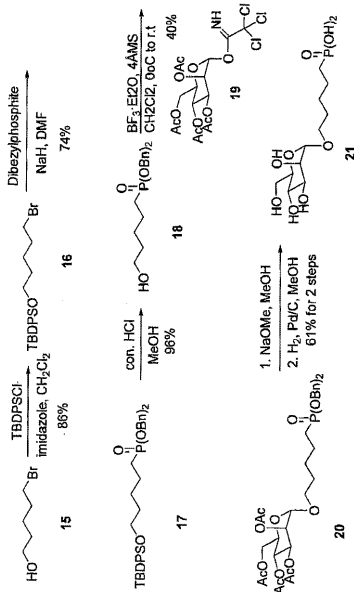
PCT/US2009/050754



WO 2010/009271

26/32

PCT/US2009/050754



WO 2010/009271

27/32

PCT/US2009/050754

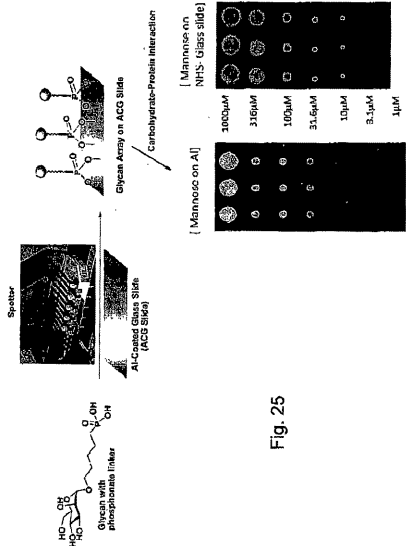


Fig. 25

WO 2010/009271

29/32

PCT/US2009/050754

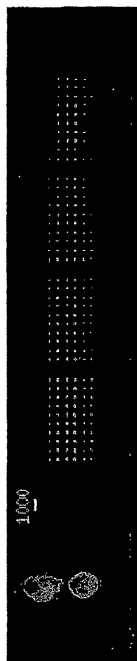


Fig. 26B

WO 2010/009271

28/32

PCT/US2009/050754

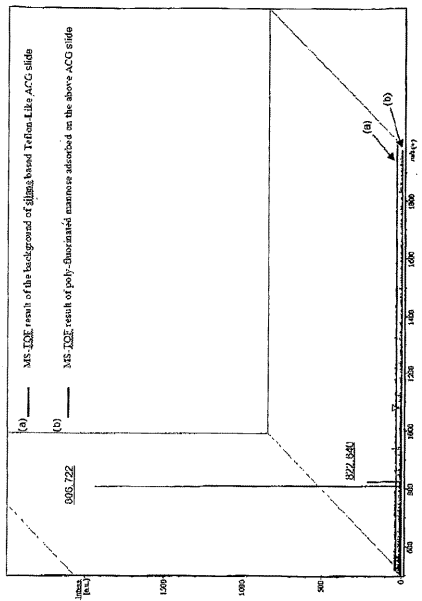


Fig. 26A

WO 2010/009271

30/32

PCT/US2009/050754

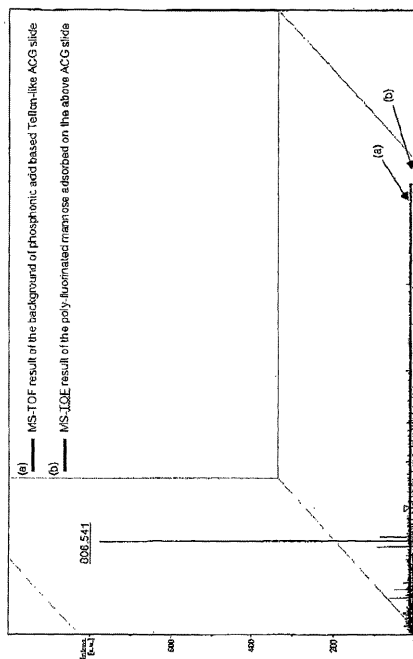


Fig. 27A



Fig. 27B

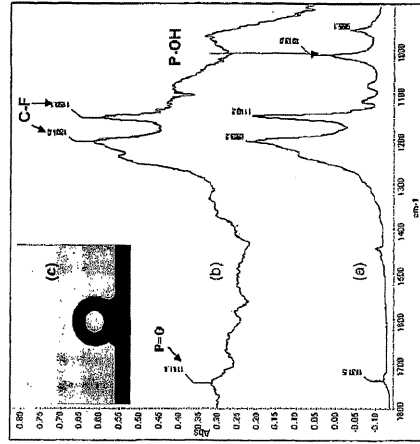


Fig. 28

专利名称(译)	聚四氟乙烯 ( PTFE ) 涂层玻璃载玻片上的聚糖阵列及相关方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017021039A</a>	公开(公告)日	2017-01-26
申请号	JP2016169045	申请日	2016-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	中央研究院		
申请(专利权)人(译)	中央研究院		
[标]发明人	チーヒュエイワン ウーチャンイー ツェンスーザンワイ		
发明人	チーヒュエイワン ウーチャンイー ツェン・スーザン・ワイ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N37/00 G01N33/553 G01N33/543		
CPC分类号	C40B40/12 C40B50/14 G01N2400/10 G01N33/553 G01N33/582 G01N2333/942 H01J49/40		
FI分类号	G01N33/53.S G01N37/00.102 G01N33/553 G01N33/543.525.C G01N33/543.525.G G01N33/543.575 G01N33/53.D		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 佐藤 剛		
优先权	61/080931 2008-07-15 US 61/107624 2008-10-22 US		
其他公开文献	JP6475673B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一系列碳水化合物，碳水化合物固定在金属氧化物涂层固体基质上。该阵列包含多个固定在金属氧化物涂覆的固体基质表面上的不连续位置的碳水化合物和碳水化合物与能够特异性结合碳水化合物的分子之间的分子。它适用于进行结合反应的分析。碳水化合物是聚糖，多糖，寡糖，碳水化合物结合糖，纤维二糖，纤维三糖，纤维四糖，一个GloboH或GB5的部分，。碳水化合物是由磷酸官能团改性，金属氧化物为氧化铝，氧化铝的涂覆有氧化铝的固体基材的表面上磷酸化碳水化合物，磷酸基团之间的共用通过粘合将其固定在基板表面上。

【选择图】无

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公開特許公報 (A)	(11) 特許出願公開番号 特開2017-21039 (P2017-21039A) (43) 公開日 平成29年1月26日 (2017.1.26)
(5) Int. Cl.	FI	テーマコード (参考)
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 S	
G01N 37/00 (2006.01)	G01N 37/00 102	
G01N 33/553 (2006.01)	G01N 33/553	
G01N 33/543 (2006.01)	G01N 33/543 525C	
	G01N 33/543 525G	
	審査請求 有 請求項の数 22 O.L. 外国語出願 (全 129 頁) 最終頁に続く	
(2) 出願番号 特願2016-169045 (P2016-169045)	(7) 出願人 596118493	
(2) 出願日 平成28年8月31日 (2016.8.31)	アカデミア シニカ	
(6) 分割の表示 特願2015-23510 (P2015-23510) の分割	ACADEMIA SINICA	
原出願日 平成21年7月15日 (2009.7.15)	台湾、タイペイ 11529, ナンカン、アカデミア ロード 128, セクション 2	
(3) 優先権主張番号 61/080,931	128 Sec 2, Academia Road, Nankang, Taipei 11529 TW	
(3) 優先日 平成20年7月15日 (2008.7.15)	(7) 代理人 100081422	
(3) 優先権主張国 米国 (US)	弁理士 田中 光雄	
(3) 優先権主張番号 61/107,624	(7) 代理人 100084146	
(3) 優先日 平成20年10月22日 (2008.10.22)	弁理士 山崎 宏	
(3) 優先権主張国 米国 (US)	(7) 代理人 100156122	
	弁理士 佐藤 剛	
	最終頁に続く	

(5) 【発明の名称】 PTFE 様のアルミニウム・コート・ガラススライド上のグリカンアレイおよび関連する方法