

簡介醣晶片在醫藥上的應用

◎ 梁碧惠

近幾年在醣生物學領域，新的技術進展已經引起學術界很大的關注。¹

醣分子不論是寡醣分子(free oligosaccharides)或是醣類接合劑(glycoconjugates)，在生物體皆扮演重要的角色。像是細菌或病毒的感染、免疫反應、分生或發育、癌細胞擴散等等，都和蛋白質和醣類之間的作用有關。所以，若能解析醣分子與蛋白質體到底是如何的產生作用，就可以解決許許多多的生物醫學的問題。²

雖然說目前大家已經對醣生物學的重要性有很多的警覺，不過此研究仍然有很多的障礙，主要的原因是醣類結構太過複雜，合成又很困難，它不同於蛋白質或核酞酸具有線性的結構，可以用模板來複製並大量製造，醣分子就好似樂高玩具般，可以從多個角度堆疊成一個有許多分支的大分子，包括許多的接合點。然而醣分子學的困難點在於這些接合點的緊密度一點也不像樂高玩具。相較於抗原與抗體的結合力，醣類與蛋白間的結合力十分的脆弱，其比例達103–109分之一倍之低度。因其作用力弱，所以在生理反應中常常醣類都是以多效價交互作用(multivalent interaction)來啟動生理反應。³因此，在實驗室內以化學方法合成足夠數量的醣分子來檢測分析，有其不可行的困難度。若以目前一般的方法，必須使用至少毫克至微克的化合物，花一天的時間，才能測出一種醣分子與蛋白質結合的程度。若是亦酵素合成的方法，醣類通常在後轉譯階段生成，目前已知有超過兩千個轉醣(glycosyltransferase)基因參其中，因此要找出每一個酵素合成各種寡醣或多醣，仍然有其困難性。

「醣晶片」即為「多醣體微陣列分析法」，是在2002年開始發產出來的一個強大的分析平台。這種以晶片為主體的平台，牽涉有以下幾個技術：一、糖類分子庫的獲得。二、如何將這些糖分子黏著在晶片表面(鍵結或是吸附)。三、高效能表現醣類和蛋白質的作用。四、使用螢光分析或是質譜儀分析醣類和蛋白質的作用。(如圖一)⁴

由於醣晶片在製作的過程，像是醣類分子庫的建構和如何黏著在晶片表面的技術，牽涉很多化學反應。所以在這裡我省略這一部分，直接就近年科學家在醣晶片醫藥應用的發展為大家介紹。

一、偵測糖類和凝集素(lectin)的作用關係

凝集素是一種具有高度特質性的糖類接合蛋白或糖蛋白，在這方面的研究最完整的資料庫在功能性醣質體學協會中 (the Consortium of Functional Glycomics, www.functionalglycomics.org)，科學界的相關研究人員，蒐集或合成數百種醣類結構貢獻給此協會，因此在協會中可以找到各種哺乳類、植物、病毒、細菌的凝集素的作用關係圖，找出這些凝集素的特異性接合。⁵

二、醣胺多醣 (glycosaminoglycans) 中生長激素與細胞激素的探討

醣胺多醣是很複雜的醣類，與調節生長激素、病毒的入侵、血管新生等作用有關，PH Seeberger等人建構了肝素(heparin)相關的晶片，發現了2,4-sulfated單體即可與纖維組織母細胞生長激素(FGF-1)有作用，⁶因此有利於找出小分子的抑制劑，或許可以找出新型的抗癌藥物。LC Hsieh-Wilson團隊建構了軟骨素(chondroitin)晶片，發現四硫酸化四醣體(tetrasulfated tetrasaccharide)，可以與干擾素 α 在一般生理濃度下即可達到很強的接合作用，而這個四醣體在刺激腦神經細胞的測試生長可以達到50%增長。⁷



Z

A

C

“杏輝”
艾益康[®]

靜脈輸注液20公絲/公撮

“*Sinphar*”
IRICAN[®]

Solution for I.V. Infusion 20MG/ML

晚期性大腸直腸癌之第一線治療藥物

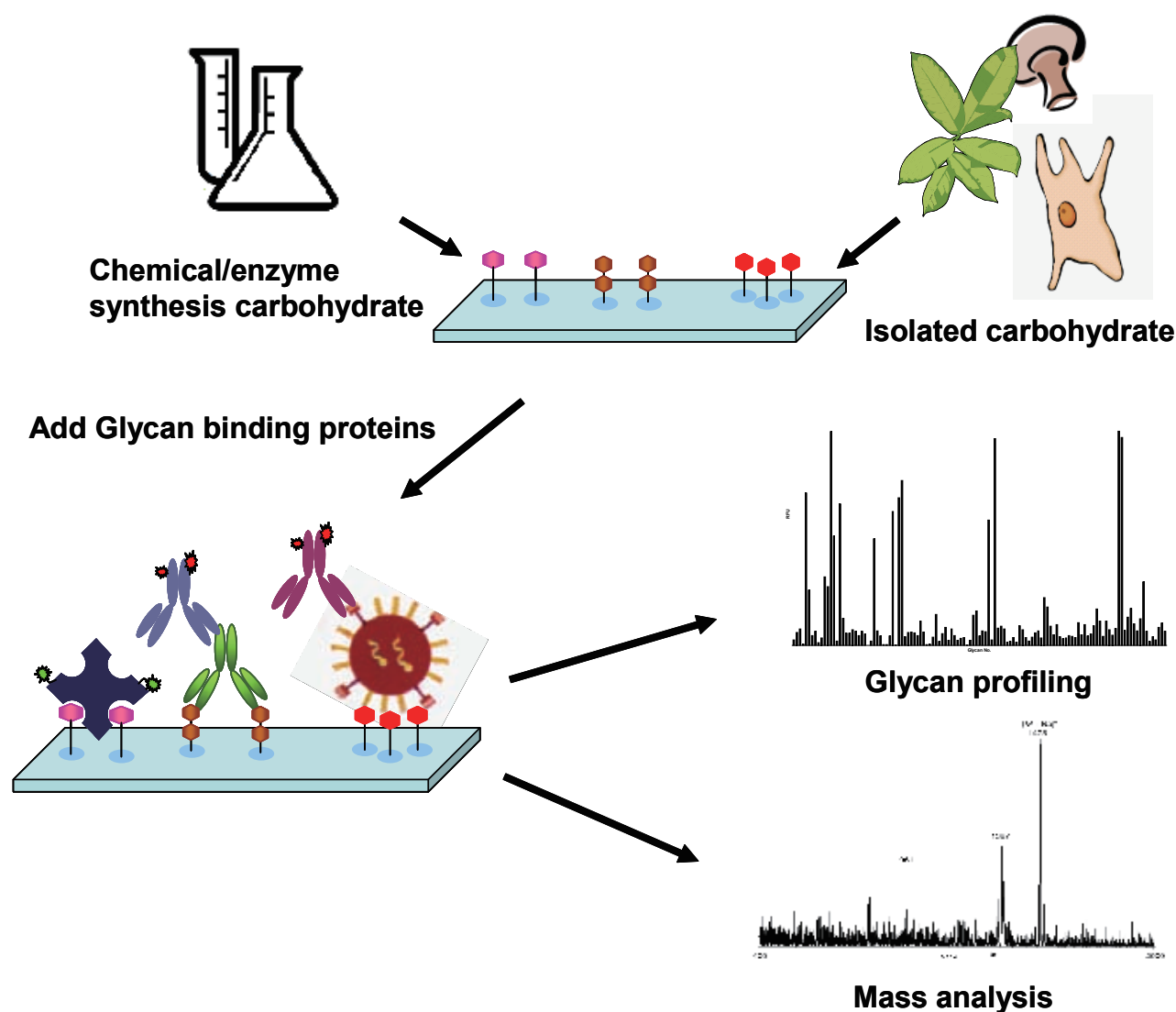
成分名：IRINOTECAN HYDROCHLORIDE TRIHYDRATE

R



健保代號：2ml→A048587212 5ml→A048587221

本藥限由醫師使用 衛署藥製字第048587、G-9503號、衛署藥廣字第9611025號



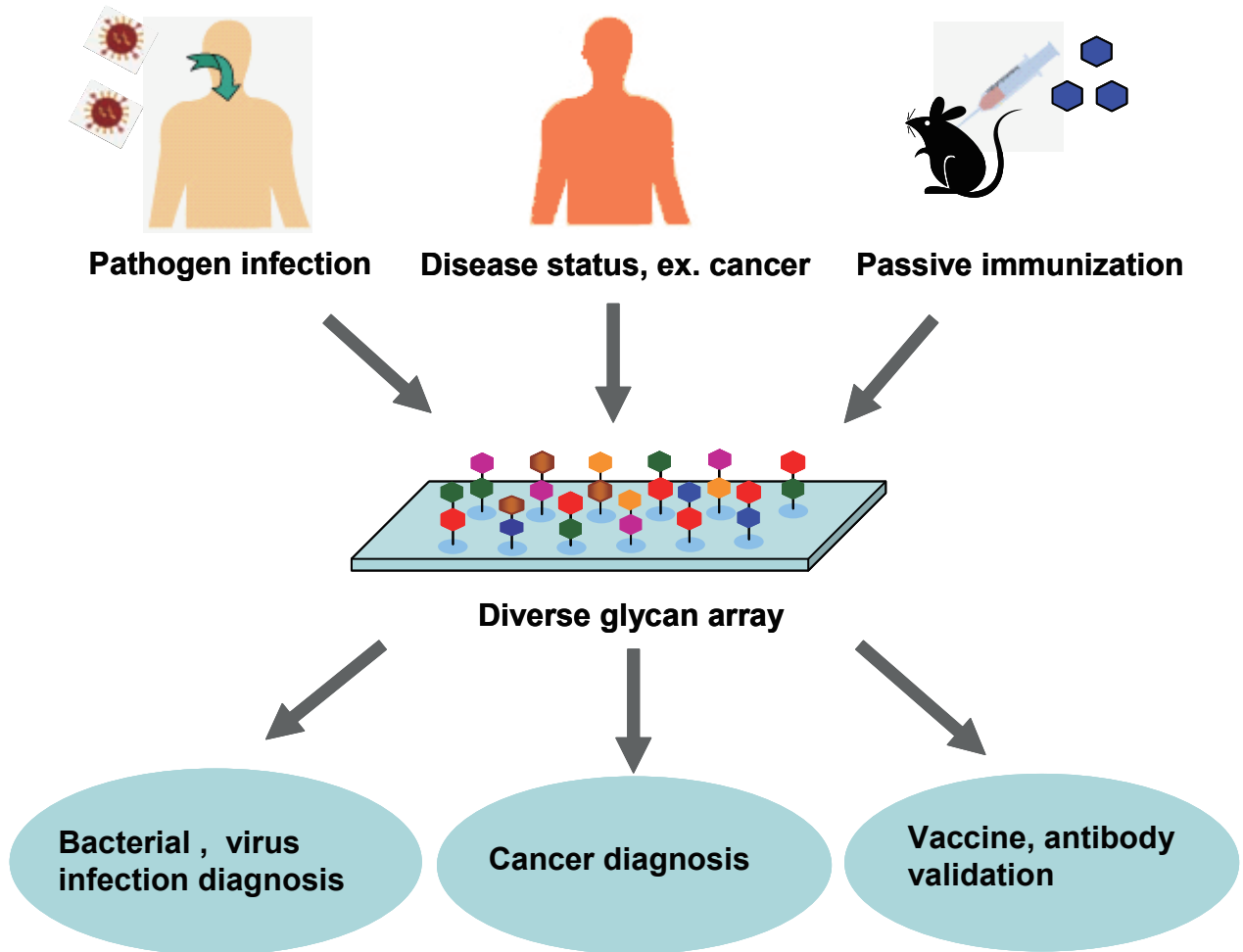
圖一、醣晶片製作的程序：從天然或是化合合成的醣類，黏著在晶片表面上後與帶有發光集團的蛋白質作用，然後用螢光分析儀或是質普儀偵測。

三、醣類和抗體的作用

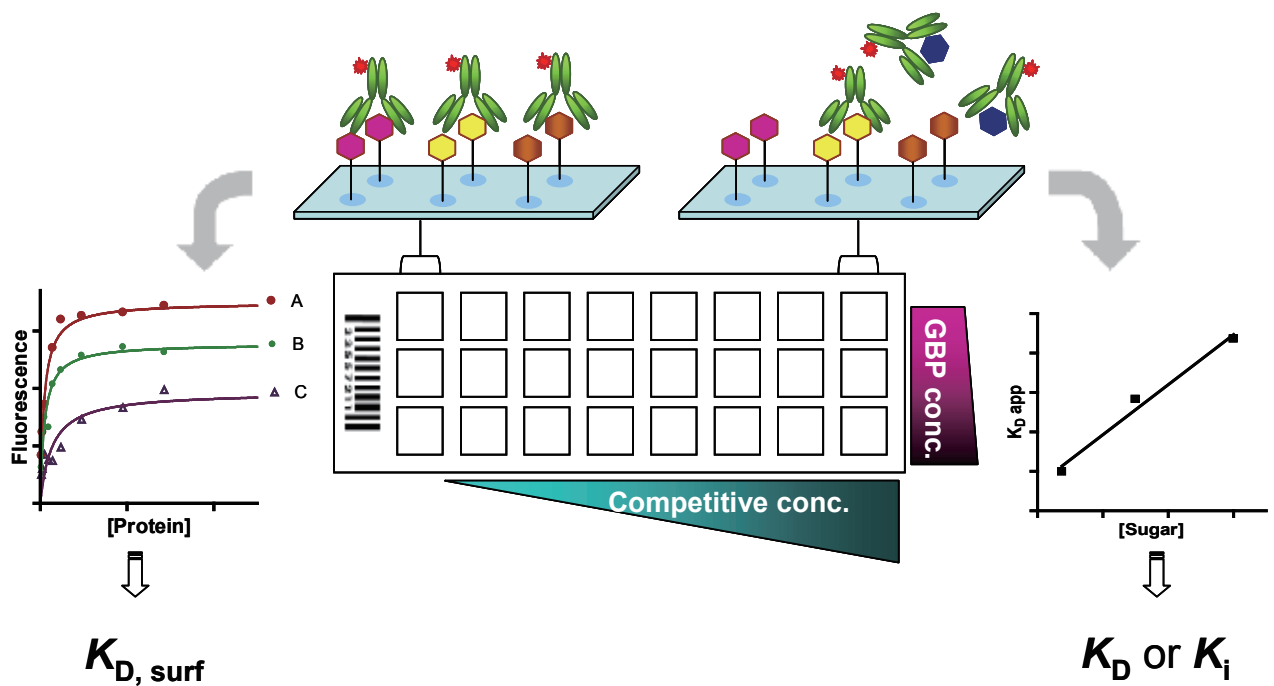
這也是醣晶片最常被提及的作用（圖二）。

病原體的抗體測試：

病原體在其細胞表面含有特異的醣類結構，這樣的結構可以在人體引發免疫反應而產生抗體，因此使用病人的血液樣品在微生物相關的醣晶片偵測下，就有機會診斷其感染病源的種類。如對後天免疫不全病毒（HIV）的偵測中，科學家發現，在奧地利有些帶有HIV病毒但不得愛滋病的人，體內有一種抗體，稱之2G12，會針對HIV病毒發出免疫攻擊，此抗體主要是能夠辨識HIV表面的膜蛋白gp120。經過全醣晶片的測試後發現此抗體能接受的抗原決定基最小的結構是四個甘露醣組合成之oligomannose [Man(α-1,2)Man(α-1,2)Man(α-1,3)Man, Man4]，其效能與Man9GlcNAc2相當，⁸因這樣的結果促使筆者也參與合成了以Man4為基本抗原決定基所設計發明的化合物，稱之『樹突狀醣物』(glycodendrons)，這個化合物再細部的研究中發現可以一箭雙雕，一方面將HIV阻隔，避免其侵入體內後感染免疫細胞；另一方面，可以製成疫苗，針對病毒表面之一種獨特的醣分子結構，啟動免疫機制針對它產生抗體。⁹全球



圖二、醣晶片在抗體的分析上的應用：病毒或是細菌感染的偵測、癌症的偵測、以及用來作為疫苗或是抗體的確效。



圖三、醣晶片量化分析糖類和蛋白質作用關係，而得到表面和溶液中的解離常數的方法。

Creating hope in patients' lives

We are a global leader in pharmaceutical innovation, dedicated to improving health and adding to the balance of life for patients worldwide. By continuing to improve our research and development processes, we strive to discover and develop new therapies that address unmet medical needs. We take our responsibility to our patients seriously, and we are committed to being a trusted partner in helping patients focus on improving their health so they can better balance their lives. At Daiichi-Sankyo, we do more than develop pharmaceuticals – we create hope in patients' lives.



Daiichi-Sankyo

Down Right
Effective **BP** Control

Olmotec®

提供優異的降壓效果，以達到積極的血壓目標
臨床研究顯示降壓效果優於其他同類藥



【成分】 每盒含Olmotec (mesololol) 20mg。

【適應症】 Olmotec用於治療高血壓。可單獨或與其他降壓藥物一起使用。

【用法用量】 Olmotec一般的建議初始劑量為每日口服，每次一片。治療期間，在醫生的

建議下可調整劑量。Olmotec的劑量可增加至每日口服。

【副作用】 Olmotec用於治療高血壓的副作用包括：

1. 眩暈、頭痛、

2. 疲勞、

3. 心跳、

4. 咳嗽、

5. 哮喘、

6. 腎臟功能障礙、

7. 心臟衰竭、

8. 低血壓、

9. 陽萎、

10. 過敏反應、

11. 其他副作用。

請參閱說明書以瞭解副作用及注意事項。



Olmotec® 20mg
Olmotec mesololol

總代理：第一三共
地址：台北市信義路五段8號12樓
電話：(02)8786-2568
傳真：(02)8786-2569



台灣第一三共股份有限公司

台北市信義路五段8號12樓
電話：(02)8786-2568
傳真：(02)8786-2569

*A Consideration of the Balance Between
Efficacy and Safety*



● 新廣效抗菌劑
● 優異的臨床效果

每盒裝有200mg 200mg 錠
每盒裝有200mg 200mg 錠
每盒裝有200mg 200mg 錠

使用說明書說明書及注意事項



INTRODUCING

TYGACIL 50 mg

老虎黴素 凍晶注射劑

A POWERFUL NEW PARTNER

New first-in-class antibiotic

- 具有超廣效的抗菌活性包括了G(+)、G(-)、厭氧菌及MRSA。^{1a}

Simplified management of polymicrobial infections

- 對於腎功能不好者不需要調整劑量。¹ (針對14位受試者)
- 較不會有藥物交互作用，不會被cytochrome P450代謝，也不會誘發或抑制 cytochrome P450。¹

TYGACIL 可用於：

- 由以下菌種感染之複雜性皮膚及皮膚軟組織感染：
E. coli, *E. faecalis* (vancomycin - susceptible isolates only), *S. aureus* (methicillin - susceptible and - resistant isolates), *S. agalactiae*, *S. anginosus* grp. (包含 *S. anginosus*, *S. intermedius* 及 *S. constellatus*), *S. pyogenes* 及 *B. fragilis*.
- 由以下菌種感染之複雜性腹腔內感染：
C. freundii, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* (vancomycin - susceptible isolates only), *S. aureus* (methicillin - susceptible isolates only), *S. anginosus* grp. (包含 *S. anginosus*, *S. intermedius* 及 *S. constellatus*), *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*, *B. vulgatus*, *C. perfringens* 及 *P. micros*.

^aThe clinical significance of in vitro activity is unknown.

Tygacil 網址: www.TYGACIL.com

使用劑量:

起始劑量100毫克，再每12小時投予50毫克。

Important Safety Information

- To reduce the development of drug-resistant bacteria and maintain the effectiveness of TYGACIL and other antibacterial drugs, TYGACIL should be used only to treat infections proven or strongly suspected to be caused by susceptible bacteria.
- TYGACIL is contraindicated in patients with known hypersensitivity to tigecycline.
- TYGACIL should be administered with caution in patients with known hypersensitivity to tetracycline class antibiotics.
- Glycylcycline class antibiotics are structurally similar to tetracycline class antibiotics and may have similar adverse effects. Such effects may include: photosensitivity, pseudotumor cerebri, pancreatitis, and anti-anabolic action (which has led to increased BUN, azotemia, acidosis, and hypophosphatemia).

- In clinical trials, the most common treatment-emergent adverse events in patients treated with TYGACIL were nausea (29.5%) and vomiting (19.7%).
- **TYGACIL may cause fetal harm when administered to a pregnant woman.**
- The safety and effectiveness of TYGACIL in patients below age 18 and lactating women have not been established.
- **Pseudomembranous colitis has been reported with nearly all antibacterial agents and may range in severity from mild to life threatening.**
- **The use of TYGACIL during tooth development may cause permanent discoloration of the teeth.** TYGACIL should not be used during tooth development unless other drugs are not likely to be effective or are contraindicated.

Please see brief summary of local Prescribing Information on adjacent page.

使用前詳閱說明書之警語及注意事項

Reference: 1. TYGACIL® (tigecycline) Prescribing Information, Wyeth Pharmaceuticals Inc.

北市衛藥廣字第97070021號
衛署藥輸字第02443號

NEW
Tygacil^{*}
tigecycline IV

Reducing treatment complexity

^{*}trademark

© 2005. Wyeth Pharmaceuticals

AB20071101Tygacil

醫藥科學界已經非常多種運用免疫力提昇來預防愛病毒的疫苗，在臨床實驗過程中都相繼失敗。根據醣區塊來設計之疫苗研究，這個新法在愛滋病毒疫苗的研發之路，及時提供一新方向。相類似的研究也在對抗SARS-CoV¹⁰和炭疽病毒¹¹等病毒的研究，醣晶片可以幫助找到其抗原決定基團，藉由此基團的確認將有利於疫苗的發展。

癌症引發的抗體測試：

目前發現癌症細胞表面有一些特異的醣化現象，這些多醣的結構促使我們相信可以當作診斷癌細胞或當作癌症治療的標靶。Globo H為乳癌組織中表現特多的六分子醣脂質，已知存在於卵巢癌、攝護腺癌、乳癌、大腸癌、胰腺癌、及肺癌等癌細胞表面。目前已有以Globo H做為對象所開發出的乳癌治療性疫苗，可刺激患者免疫系統產生針對Globo H的抗體反應，利用自體的免疫力量消滅癌細胞。雖該疫苗仍處於臨床實驗期，中研院翁啟惠院是團隊更以乳癌病患的血液，針對Globo H及其類似物，進行生物晶片的研究。目標在於用晶片上的多醣分子測驗檢體血清中是否含有Globo H的抗體。因為，如果患者體內有乳癌細胞或乳癌幹細胞，則患者就會產生較一般健康者為高的Globo H抗體。實驗結果證實，只要血液內有極微量的抗體(以atto-mole濃度單位計，即10-18莫耳)，該晶片都能檢測出來。¹²此外醣晶片亦曾經針對何杰金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)和胰臟癌做篩選，也可以看出癌症病患與正常人的抗醣抗體的分布的不同。¹³相信在醣晶片的研究有機會找到更明確的癌細胞標記，與現在的DNA或蛋白質生物標記相輔，將有利於癌症的早期發現。

四、醣類與病毒細菌的作用關係

這部分在醣晶片的應用上，最成功的例子就是IA Wilson等人，利用醣晶片發現可以區別禽流感病毒與人流感病毒之血液凝集素(hemagglutinin, HA)，辨識醣區塊的不同。¹⁴因為病毒感染的途徑，是經由對血液凝集素認識宿主的唾液酸(sialic acid)，然後經過吞噬作用進入細胞，再利用宿主細胞進行複製。經過醣晶片的篩選，發現禽流感的HA會辨識 α -2,3鍵結的唾液酸，而人流感會辨識 α -2, 6唾液酸的結構。值得一提的是在西元1918年造成恐慌的流感病毒，其本來是禽流感的性質不會感染人，不過其在流行期間病毒蛋白質上產生二個突變，因而改變成會辨識 α -2, 6唾液酸的結構，因而大傳染，造成很多人死亡。另外，科學家也曾經報導利用醣晶片偵測幽門桿菌¹⁵和大腸桿菌¹⁶結合的醣類，以了解其感染的途徑。醣晶片的研究，讓科學界了解病毒或細菌是如何演化的過程，透過人體細胞與病毒或細菌間的作用的瞭解，極其細微的變種也都可以完全現形。

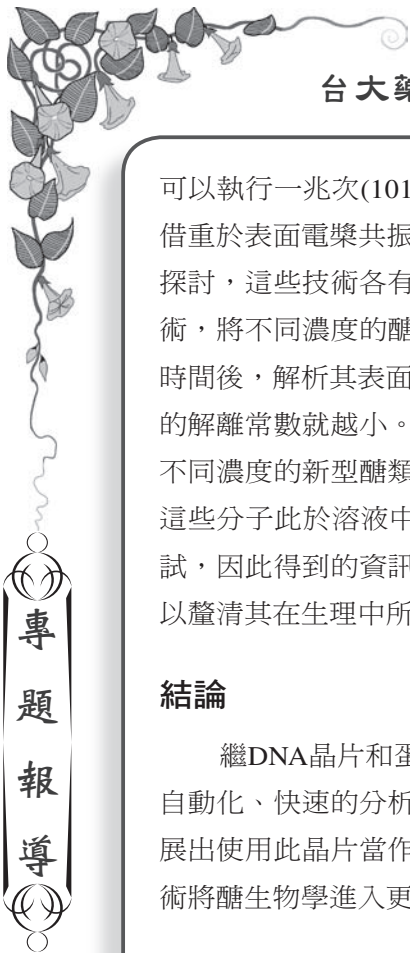
五、醣晶片用在新藥開發的應用

尋找醣酵素抑制劑或是酵素基質的特異結構

使用醣晶片可以高通量篩選與醣作用相關的酵素之抑制劑，例如轉岩藻糖酵素(α -(2,3)-fucosyltransferase)可以將GDP-fucose轉到sialyl lactosamine 上變成sialyl Lewis x，這個基轉與發炎反應有關。¹⁷醣晶片上配置不同種類之多醣體，經過酵素的作用，可以知道此一種酵素需要的基質(substrate)，以了解人體內此酵素能夠作用的範圍。加入另一個物質來干擾其轉醣的作用，可以發現新的抑制劑，這些新的化合物也許可以用來抑制發炎反應。在筆者的研究中也曾經在在Con A和甘露醣的結合中加入不同的抑制劑，並計算這些抑制劑的解離常數(Ki)，因此微孔盤能夠提供的分析，晶片技術也可以達成，而且僅需極少的分析物。

量化分析醣類和蛋白質的作用關係¹⁸

在筆者的這個研究中，我們首先發現醣晶片可以達到極低的偵測極限，只要有一毫克的醣分子，就



可以執行一兆次(10¹²)的測試。由於過去在探討醣類和蛋白質之間的分子辨識或是作用力的探討，皆是借重於表面電漿共振(surface plasmon resonance, SPR)或是熱量計 (Isothermal titration calorimetry, ITC) 來探討，這些技術各有其優點，不過共同的缺點就是無法做高通量的分析。我們便想出了運用醣晶片的技術，將不同濃度的醣化合物以區塊方式鍵結在玻璃晶片的表面，然後加上不同濃度的蛋白質在經過一段時間後，解析其表面解離常數 (surface dissociation constant)，通常兩個分子之間的結合力越高，所測得到的解離常數就越小。依此單晶片法，在一個小時之內就可將所有必要的數據都測出來了。假如我們加入不同濃度的新型醣類或是其他分子，於晶片上蛋白質所結合而成的晶片去做競爭性的研究，即可量測出這些分子此於溶液中的解離常數值。(圖三)這個研究相信可以彌補過去研究只針對一個蛋白質濃度做測試，因此得到的資訊常常會有誤判的情形，而量化分析的技術，可以知道兩個物質之間真正的作用力，以釐清其在生理中所扮演的角色。

結論

繼DNA晶片和蛋白質晶片發展後，醣晶片發明至今數年，已經證實其為一個高度敏感性、專一性、自動化、快速的分析平台，我們已經知道此技術可以用來偵測外來病原體或是癌症的診斷，進一步也發展出使用此晶片當作新藥開發的工具，因其所需的材料微乎其微，相信未來將有更多的科學家利用此技術將醣生物學進入更新的領域。

參考文獻：

1. Paulson JC, Blixt O, Collins BE: Sweet spots in functional glycomics. *Nat Chem Biol* 2007, 2: 238-248.
2. Varki A, Cummings R, Esko JD, Freeze H, Hart GW, Marth J (1999) in *Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, NY), pp 1-635.
3. Weis WI, Drickamer K: Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu Rev Biochem* 1996, 65: 441-473.
4. Liang PH, Wu CY, Greenberg W, Wong CH: Glycan arrays: biological and medical applications. *Curr Opin Chem Biol*. 2008, 12: 86-92.
5. Blixt O, Head S, Mondala T, Scanlan C, Huflejt ME, Alvarez R, Bryan MC, Fazio F, Calarese D, Stevens J, Razi N, Stevens DJ, Skehel JJ, van Die I, Burton DR, Wilson IA, Cummings R, Bovin N, Wong CH, Paulson JC: Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101: 17033-8.
6. de Paz JL, Noti C, Seeberger PH: Microarray of synthetic heparin oligosaccharides. *J Am Chem Soc* 2006, 128: 2766-2767.
7. Gama CI, Tully SE, Sotogaku N, Clark PM, Rawat M, Vaidehi N, Goddard WA 3rd, Nishi A, Hsieh-Wilson LC: Sulfation patterns of glycosaminoglycans encode molecular recognition and activity. *Nat Chem Biol* 2006, 2: 467-73.
8. Calarese DA, Lee HK, Huang CY, Best MD, Astronomo RD, Stanfield RL, Kattinger H, Burton DR, Wong CH, Wilson IA: Dissection of the carbohydrate specificity of the broadly neutralizing anti-HIV-1 antibody 2G12. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102: 13372-13377.
9. Wang SK, Liang PH, Astronomo RD, Hsu TL, Hsieh SL, Burton DR, Wong CH: Targeting the carbohydrates

- on HIV-1: Interaction of oligomannose dendrons with human monoclonal antibody 2G12 and DC-SIGN. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105: 3690-5.
10. Wang D, Lu J: Glycan arrays lead to the discovery of autoimmunogenic activity of SARS-CoV. *Physiol Genomics* 2004, 18: 245-248.
11. Wang D, Carroll GT, Turro NJ, Koberstein JT, Kovac P, Saksena R, Adamo R, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Steinman L: Photogenerated glycan arrays identify immunogenic sugar moieties of *Bacillus anthracis* exosporium. *Proteomics* 2007, 7:180-184.
12. Wang CC, Huang YL, Ren CT, Lin CW, Hung JT, Yu JC, Yu AL, Wu CY, Wong CH: Glycan microarray of Globo H and related structures for quantitative analysis of breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 105: 11661-6.
13. Lawrie CH, Marafioti T, Hatton CSR, Dirnhofer S, Roncador G, Went P, Tzankov A, Pileri SA, Pulford K, Banham AH: Cancer-associated carbohydrate identification in Hodgkin's lymphoma by carbohydrate array profiling. *Int J Cancer* 2006, 118: 3161-3166.
14. Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, Taubenberger JK, Paulson JC, Wilson IA: Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *J Mol Biol* 2006, 355: 1143-1155.
15. Disney MD, Seeberger PH. The use of carbohydrate microarrays to study carbohydrate-cell interactions and to detect pathogens. *Chem Biol* 2004, 11: 1701-1707.
16. Walz A, Odenbreit S, Mahdavi J, Boren T, Ruhl S: Identification and characterization of binding properties of *Helicobacter pylori* by glycoconjugate arrays. *Glycobiology* 2005, 15: 700-708.
17. Bryan MC, Lee LV, Wong CH: High-throughput identification of fucosyltransferase inhibitors using carbohydrate microarrays. *Bioorg Med Chem Lett* 2004, 14: 3185-3188.
18. Liang PH, Wang SK, Wong CH: Quantitative analysis of carbohydrate-protein interactions using glycan microarrays: determination of surface and solution dissociation constants. *J Am Chem Soc* 2007, 129: 11177-11184.

(本篇作者為藥學系新聘教師，第41屆畢業系友)