



การพัฒนาวิธีสังเคราะห์โกลโบ เฮช แอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์มะเร็ง

Developments in Synthesis of Tumor-associated Antigen Globo H

กัมปนาท ฉายจรัส^{*1} และ กัลย์ชัญญา อริยะเชาว์กุล²

¹ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 34190

²ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 34190

*Corresponding Author, E-mail: kampanart.c@ubu.ac.th

Received: 9 July 2019 | Revised: 15 September 2019 | Accepted: 15 November 2019

บทคัดย่อ

โกลโบ เฮช เป็นแอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งซึ่งพบว่ามีการแสดงออกสูงกว่าปกติบนผิวเซลล์มะเร็งหลายชนิด แอนติเจนชนิดนี้สามารถใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับศึกษาการตอบสนองที่เฉพาะทางระบบภูมิคุ้มกันได้ จากรายงานการทดสอบประสิทธิภาพทางคลินิกแสดงให้เห็นว่าวัคซีนคอนจูเกตโกลโบ เฮช มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการตอบสนองของสารภูมิคุ้มกัน ด้วยคุณสมบัติทางชีวภาพที่สำคัญของโกลโบ เฮช จึงทำให้เกิดความพยายามในการสังเคราะห์สารเฮกซะแซ็กคาไรด์โกลโบเฮชด้วยวิธีการทางเคมีและการประยุกต์ใช้เอนไซม์สำหรับการพัฒนาการรักษาด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัดต่อไป

ABSTRACT

Globo H is a tumor-associated antigen which is found overexpressed on the cell surface of most cancers. This antigen can be used as an important biomarker for the specific study of the immune response. In clinical trials demonstrated that globo H-conjugate vaccine was effective in inducing humoral antibody response. The significant biological property of globo H have prompted many synthetic efforts toward this hexasaccharide glycosphingolipid as a therapeutic target. This review describes recent progresses in chemical and enzymatic synthesis of globo H for further developments of cancer immunotherapy.

คำสำคัญ: โกลโบ เฮช แอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็ง โกลโบเฮกซะแซ็กคาไรด์โกลโบ

Keywords: Globo H, Tumor-associated antigen, Glycosphingolipid

1. บทนำ

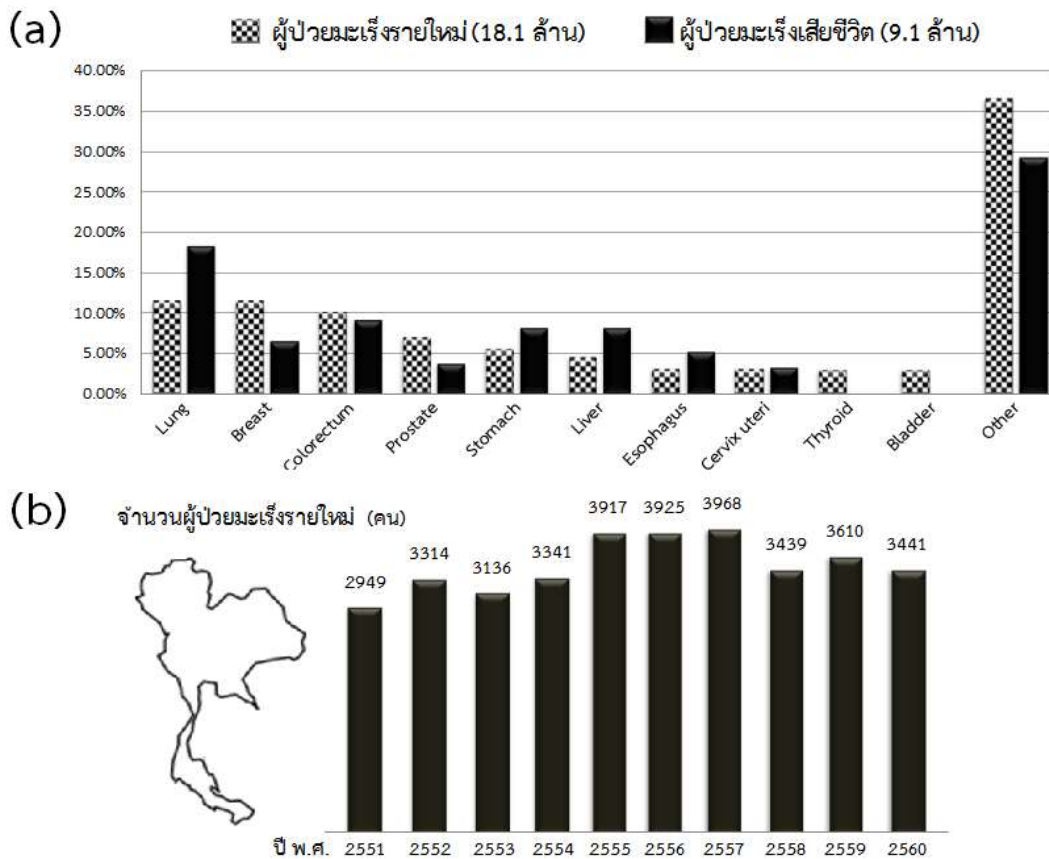
โรคมะเร็งจัดเป็นโรคไม่ติดต่อเรื้อรังซึ่งเป็นปัญหาด้านสุขภาพสำคัญอันดับต้นๆ ของทุกประเทศทั่วโลก ในปี พ.ศ. 2561 องค์การอนามัยโลกประมาณการณ์จำนวนผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งทั่วโลกสูงถึง 9.6 ล้านคน คิดเป็นร้อยละ 16.7 จาก

สาเหตุการเสียชีวิตของประชากรโลก (WHO, 2018) และพบแนวโน้มจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่เพิ่มขึ้นจำนวนมาก (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2019) ในประเทศไทยข้อมูลเชิงสถิติของโรคมะเร็งตั้งแต่ปี พ.ศ. 2551 เป็นต้นมา พบแนวโน้ม

จำนวนผู้ป่วยรายใหม่ในระดับสูงเช่นกัน (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2561; Imsamran et al., 2018) ดังรูปที่ 1

เนื่องจากโรคมะเร็งยังไม่มียาสำหรับรักษาให้หายขาด ปัจจุบันยังคงใช้วิธีการบำบัดรักษาโรคมะเร็งแบบดั้งเดิม (traditional method) ด้วยวิธีเคมีบำบัด (chemotherapy)

การฉายรังสี (ionizing radiation) และการผ่าตัด (surgery) โดยการรักษาจะขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรค ดังนั้นการเข้าใจชีววิทยาของเซลล์มะเร็งและการศึกษาวิจัยเชิงบูรณาการวิทยาศาสตร์แขนงต่าง ๆ เพื่อพัฒนาแนวทางใหม่หรือทางเลือกใหม่สำหรับการรักษาโรคมะเร็งจึงเป็นเรื่องที่จำเป็นอย่างยิ่ง



รูปที่ 1 (a) ข้อมูลเชิงสถิติจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่และผู้ป่วยมะเร็งเสียชีวิตทั่วโลกปี ค.ศ. 2018
(b) จำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่ในประเทศไทยปี พ.ศ. 2551-2560

สารอนุพันธ์คาร์โบไฮเดรตประเภทไกลโคสฟิงโกลิพิด (glycosphingolipid) จัดเป็นเครื่องหมาย (marker) สำคัญที่พบได้บนผิวเซลล์มะเร็ง (Hakomori, 1983; 1984; 1998) โดยเฉพาะสารไกลโคสฟิงโกลิพิดโกลโบ เฮซ (glycosphingolipid globo H) พบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นหรือมากเกินไป (overexpression) ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ มะเร็งระบบทางเดินอาหาร มะเร็งตับ มะเร็งปอด และมะเร็งต่อมลูกหมาก เป็นต้น (Zhang et al., 1997) จากรายงานการศึกษาวิจัยของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมพบปริมาณสารภูมิคุ้มกันต้านทานหรือแอนติบอดีต้านโกลโบ เฮซ (anti-globo H antibody) ในระดับสูง (Gilewski et al., 2001; Wang et al.,

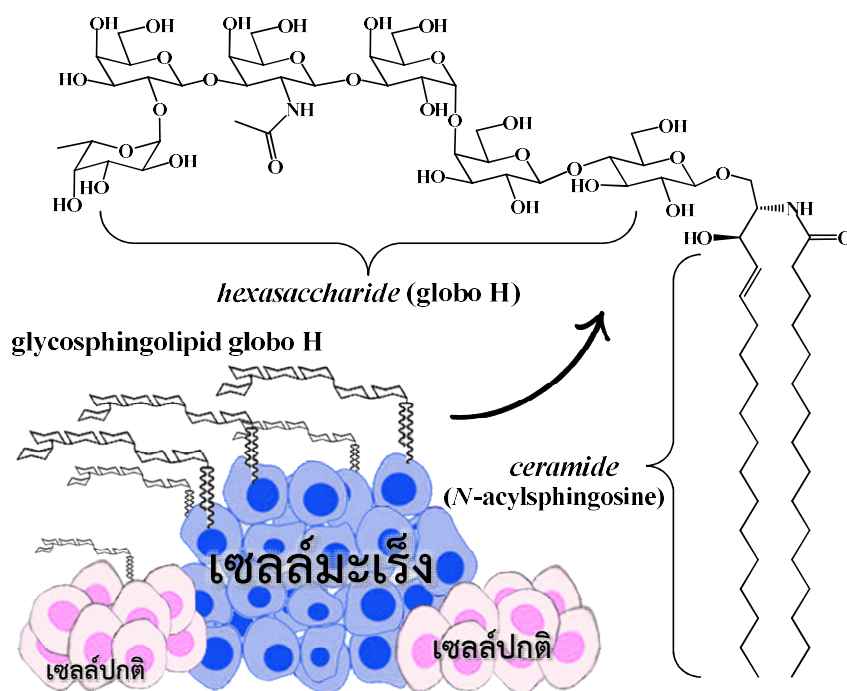
2008) สารโกลโบ เฮซ จึงกลายเป็นแอนติเจนเป้าหมายสำคัญสำหรับเซลล์มะเร็ง (tumor-targeting antigen) ที่ได้รับความสนใจในการศึกษาวิจัยพัฒนาวัคซีนรักษามะเร็ง (cancer vaccine) เพื่อใช้ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้ทำลายเซลล์มะเร็ง โดยมีรายงานการศึกษาทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนรักษามะเร็งทางคลินิก (clinical trial) เฟส 1 เฟส 2 และเฟส 3 (OBI Pharma, Inc., 2012; 2014; O'Cearbhaill et al., 2016) ดังนั้นบทความปริทัศน์นี้จึงได้รวบรวมรายงานวิจัยทางเคมีอินทรีย์สังเคราะห์ของแอนติเจนน้ำตาลเฮกซะแซ็กคาไรด์โกลโบ เฮซ ซึ่งได้รับความสนใจศึกษาพัฒนาวิธีการสังเคราะห์อย่างต่อเนื่องตลอดช่วงทศวรรษที่ผ่านมาเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับ

เชื่อมต่อพันธะกับโปรตีนพาหะในการชักนำการสร้างภูมิคุ้มกัน (immunogenic protein carrier) ที่เหมาะสมเพื่อใช้ศึกษาวิจัยแนวทางในการบำบัดรักษาและเพิ่มประสิทธิภาพทางเวชปฏิบัติสำหรับวินิจฉัยผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อไป

2. โครงสร้างทางเคมีของโกลโบ เฮก แอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์มะเร็ง

หลักฐานทางวิทยาศาสตร์สำคัญที่ทำให้เชื่อได้ว่าไกลโคสฟิงโกลิพิดโกลโบ เฮก เป็นแอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็ง (tumor-associated antigen) นั้นมาจากรายงานที่ผ่านมาพบว่าการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) โคลน MBr1 (clone MBr1) ที่จำเพาะต่อไกลโคสฟิงโกลิพิดโกลโบ เฮก ซึ่งพบ

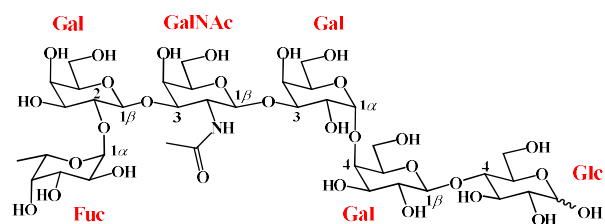
บนผิวเซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer cell line MCF-7) (Kannagi et al., 1983; Ménard et al., 1983) ต่อมา Bremer และคณะ (1984) ได้ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของโกลโบ เฮก พบว่าภายในโมเลกุลประกอบด้วยลิพิดเซราไมด์ (ceramide) ต่อพันธะกับสายโซ่น้ำตาลเฮกซะแซ็กคาไรด์ (hexasaccharide chain) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วเราสามารถพบไกลโคสฟิงโกลิพิดโกลโบ เฮก ได้บนผิวเซลล์ปกติ แต่มีกพบว่ามีแสดงออกในปริมาณมากกว่าปกติบนผิวเซลล์มะเร็ง (รูปที่ 2) โดยส่วนของโมเลกุลไกลโคสฟิงโกลิพิดที่เป็นสายโซ่น้ำตาลเฮกซะแซ็กคาไรด์โกลโบ เฮก จึงจัดเป็นเครื่องหมายบ่งชี้แอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์มะเร็ง (tumor-associated antigenic marker) ซึ่งทำให้สามารถแยกแยะเซลล์มะเร็งออกจากเซลล์ปกติได้



รูปที่ 2 ไกลโคสฟิงโกลิพิดโกลโบ เฮก บนผิวเซลล์มะเร็ง

3. การสังเคราะห์น้ำตาลเฮกซะแซ็กคาไรด์ของโมเลกุลไกลโคสฟิงโกลิพิดโกลโบ เฮก

สายโซ่น้ำตาลเฮกซะแซ็กคาไรด์โกลโบ เฮก (รูปที่ 3) มีลำดับการเชื่อมต่อพันธะเคมีระหว่างหน่วยย่อยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวบนสายโซ่เฮกซะแซ็กคาไรด์เป็น $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 4\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}\beta 1$



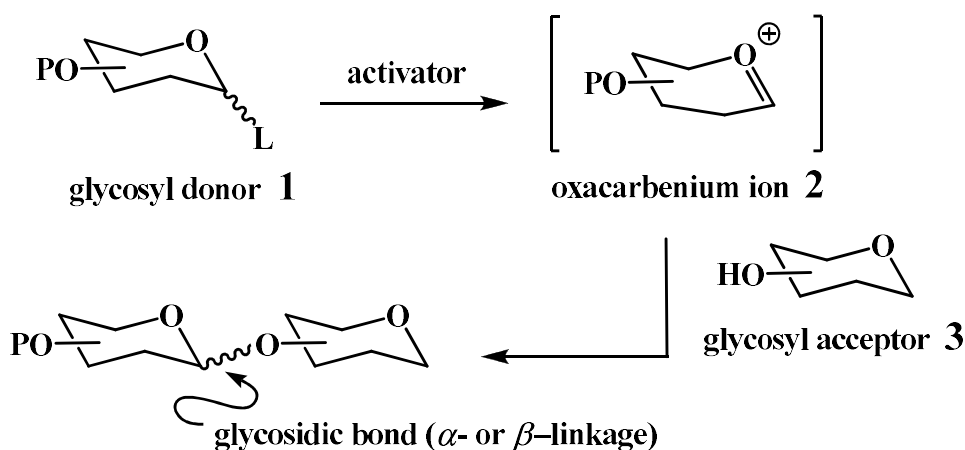
รูปที่ 3 สายโซ่น้ำตาลเฮกซะแซ็กคาไรด์ไกลโบ เฮซ

ด้วยบทบาททางชีวภาพที่สำคัญของไกลโบ เฮซ จึงทำให้นักเคมีอินทรีย์สังเคราะห์ให้ความสนใจศึกษาและพัฒนาวิธีการสังเคราะห์ทั้งด้วยวิธีทางเคมี (chemical synthesis) และการประยุกต์ใช้เอนไซม์ร่วมในการสังเคราะห์ (enzymatic synthesis)

3.1 การสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี

ปฏิกิริยาไกลโคซิเลชันด้วยวิธีทางเคมี (chemical O-glycosylation) เป็นการสร้างพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) ระหว่างสารอนุพันธ์น้ำตาล glycosyl donor **1** และ glycosyl acceptor **3** โดยการเร่งปฏิกิริยาของตัวกระตุ้น (activator) ภายใต้สภาวะเคมีที่เหมาะสม (รูปที่ 4) โดยทั่วไปสาร glycosyl donor มักจะเป็นอนุพันธ์น้ำตาลที่มีหมู่หลุดออกที่ดี (good leaving group) ณ ตำแหน่งแอนอเมอริก (anomeric

position) ในขณะที่สาร glycosyl acceptor จะเป็นอนุพันธ์น้ำตาลที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ (free hydroxyl group) ณ ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งบนวงน้ำตาล นอกจากนี้แล้วเรายังสามารถปกป้อง (protection) หมู่ไฮดรอกซิลบนวงน้ำตาลทั้งสารน้ำตาล donor และ acceptor ด้วยหมู่ปกป้อง (protecting group) ที่เหมาะสมเพื่อควบคุมการทำปฏิกิริยาไกลโคซิเลชันระหว่างหน่วยน้ำตาลให้เป็นแบบเลือกเฉพาะตำแหน่ง (regioselective) โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดผ่านสารมัธยันตร์ oxocarbenium ion **2** ซึ่งได้มาจากการกระตุ้นหมู่หลุดออกบนสาร glycosyl donor **1** ให้หลุดออกไปด้วยตัวกระตุ้น ภายใต้สภาวะเคมีที่เหมาะสมแล้วตามด้วยการเข้าทำปฏิกิริยาแทนที่ด้วยนิวคลีโอไฟล์ของ glycosyl acceptor **3** ทำให้ได้สารผลิตภัณฑ์น้ำตาลโมเลกุลสายโซ่ยาวขึ้น (Mydock and Demchenko, 2010)



รูปที่ 4 กลไกทั่วไปของการเกิดปฏิกิริยาไกลโคซิเลชันด้วยวิธีทางเคมี (เมื่อ L = หมู่หลุดออกที่ดี, P = หมู่ปกป้อง)

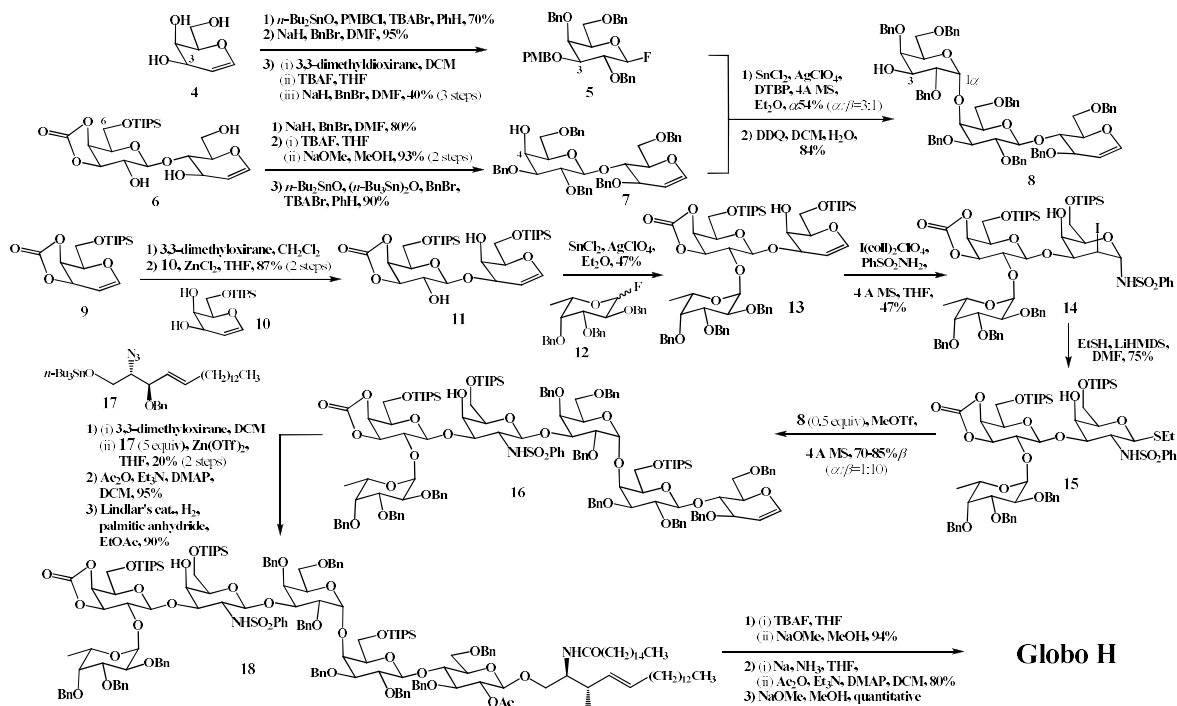
สำหรับการสังเคราะห์แอนติเจนไกลโบ เฮซ นั้นมีรายงานครั้งแรกด้วยวัตถุประสงค์เพื่อการพิสูจน์ยืนยันคุณสมบัติในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunogen) และใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับศึกษาพัฒนาไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่อาจมีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunogenicity) (Bilodeau et al., 1995; Park et al., 1996) โดยประยุกต์ใช้องค์ความรู้ปฏิกิริยาเคมีของสารไกลคาล (Seeberger et al., 1997) ในการสังเคราะห์เริ่มจากการเตรียมสาร fluorosugar donor **5** จากการทำปฏิกิริยาปกป้องหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ (free-OH group) แบบเลือกเฉพาะที่ตำแหน่ง C-3 ของสารตั้งต้น

galactal **4** ด้วยรีเอเจนต์โลหะอินทรีย์ Bu_2SnO โดยผ่านสารมัธยันตร์ stannylene complex (Zhang and Wong, 2002) และปฏิกิริยา benzylation จากนั้นทำปฏิกิริยา epoxidation แล้วตามด้วยปฏิกิริยาเปิดวงสารมัธยันตร์ epoxide ด้วยรีเอเจนต์ tetrabutylammonium fluoride (TBAF) แล้วทำปฏิกิริยา benzylation จะได้น้ำตาล fluorosugar **5** ในขณะที่น้ำตาล glycal acceptor **7** เตรียมได้จากปฏิกิริยา benzylation และปฏิกิริยากำจัดหมู่ปกป้อง silyl ($-\text{SiR}_3$) ที่ตำแหน่ง C-6 ของวงน้ำตาลแล้วตามด้วยปฏิกิริยาเปิดวง cyclic carbonate ของสารตั้งต้น disaccharide glycal **6** ภายใต้สภาวะเบส จากนั้นทำ

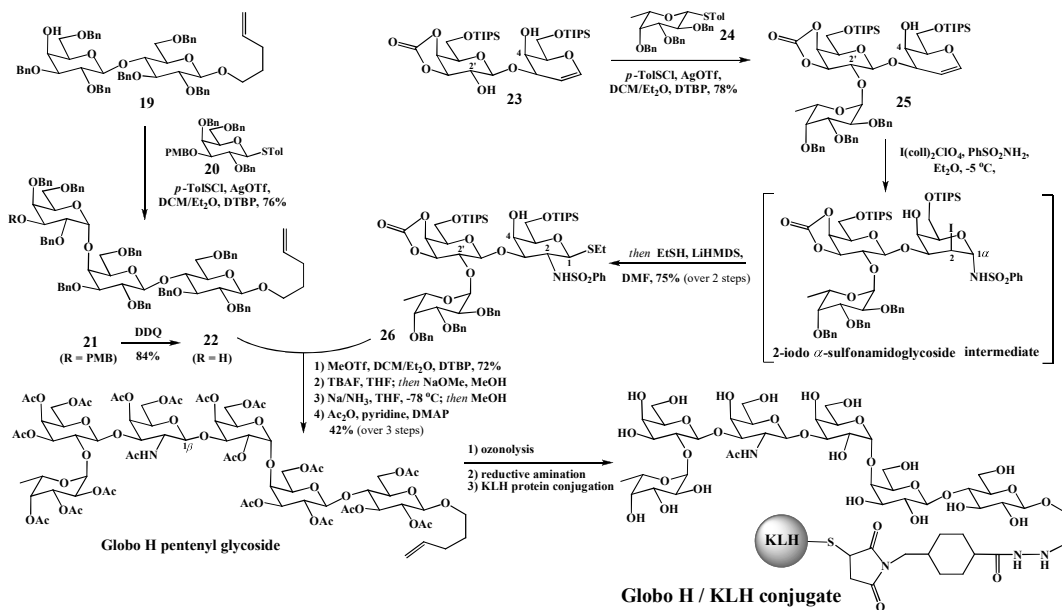
ปฏิกิริยาปกป้องหมู่ไฮดรอกซิลแบบเลือกเฉพาะที่ตำแหน่ง C-3 ด้วยรีเอเจนต์โลทอนทรีย์ $(\text{Bu}_3\text{Sn})_2\text{O}/\text{Bu}_2\text{SnO}$ เมื่อเตรียมสารตั้งต้นน้ำตาลทั้ง donor **5** และ acceptor **7** ได้แล้วจึงนำมาทำปฏิกิริยาไกลโคไซด์ขึ้นภายใต้สภาวะตัวกระตุ้น $\text{SnCl}_2/\text{AgClO}_4/\text{DTBP}$ และปฏิกิริยากำจัดหมู่ปกป้องที่ตำแหน่ง C-3 ของวงน้ำตาลกลาแลคโตสด้วยรีเอเจนต์ DDQ จะได้สารผลิตภัณฑ์ผสมของน้ำตาล trisaccharide glycal **8** ($\alpha:\beta = 3:1$) ต่อมาทำการสังเคราะห์น้ำตาล thioglycoside **15** จากสารตั้งต้น cyclic carbonate galactal **9** โดยทำปฏิกิริยา epoxidation และปฏิกิริยาไกลโคไซด์แบบเลือกเฉพาะตำแหน่ง (regio-selective glycosylation) กับน้ำตาล **10** ด้วยกรดคลอริก ZnCl_2 จะได้น้ำตาล disaccharide glycal **11** ซึ่งนำมาทำปฏิกิริยา selective fucosylation กับน้ำตาล fluorofucose **12** ด้วยตัวกระตุ้น $\text{SnCl}_2/\text{AgClO}_4$ ได้สารผลิตภัณฑ์น้ำตาล trisaccharide glycal **13** ที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยา iodosulfonamidation และปฏิกิริยากับ lithium ethanethioate โดยผ่านสารมัธยันตร์ **14** (Griffith and Danishefsky, 1990) จะได้สารผลิตภัณฑ์น้ำตาล thioglycoside donor **15** ที่สามารถนำมาทำปฏิกิริยาไกลโคไซด์แบบเลือกเฉพาะแบบ β -selective sulfonamidogalactosylation ทำให้ได้น้ำตาล hexasaccharide glycal **16** ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างน้ำตาลเฮกซะแซ็กคาไรด์ไกลโอบีเอซ จากนั้นทำปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยรีเอเจนต์ 3,3-dimethyloxirane แล้วทำปฏิกิริยาไกลโคไซด์ขึ้นกับสารอนุพันธ์ azide **17** ตามด้วยปฏิกิริยา acetylation และปฏิกิริยารีดักชันหมู่ฟังก์ชันไฮไดรไรด์ ($-\text{N}_3$) ให้กลายเป็นหมู่เอมีน ($-\text{NH}_2$) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับกรด palmitic anhydride ได้สารผลิตภัณฑ์ ceramide **18** และภายหลังกำจัดหมู่ปกป้องทั้งหมดในขั้นตอนสุดท้ายจะทำให้ได้สารไกลโคสฟิงไกลิพิดไกลโอบีเอซ (รูปที่ 5)

ต่อมากลุ่มวิจัยนี้ (Jeon et al., 2009) ได้ปรับปรุงวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี (รูปที่ 6a) โดยประยุกต์ใช้สารตั้งต้น

อนุพันธ์ thioglycosyl donors **20** และ **24** ทำปฏิกิริยาไกลโคไซด์ขึ้นกับอนุพันธ์น้ำตาลไตรแซ็กคาไรด์ **19** และ **23** ตามลำดับพบว่าภายใต้สภาวะตัวกระตุ้น $p\text{-TolSCL}/\text{AgOTf}/\text{TTBP}$ ปฏิกิริยาไกลโคไซด์แบบเลือกเฉพาะ (selective glycosylation) เกิดได้ดีขึ้นและให้ร้อยละผลิตภัณฑ์น้ำตาลไตรแซ็กคาไรด์ **21** และ **25** ในปริมาณสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเดิม (Bilodeau et al., 1995) นอกจากนี้ยังพบว่าปฏิกิริยา fucosylation ของสาร acceptor **23** ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ (free OH) ที่ตำแหน่ง C-4 และ C-2' บนหน่วยน้ำตาลย่อยกลาแลคโตสและกลูโคสตามลำดับ สามารถเกิดปฏิกิริยาไกลโคไซด์แบบเลือกเฉพาะตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลอิสระที่ตำแหน่ง C-2' เท่านั้น ในรูปที่ 6 ปฏิกิริยาไกลโคไซด์ขึ้นระหว่างสาร O-pentenyl disaccharide **19** และน้ำตาล galactosyl donor **20** ให้อนุพันธ์น้ำตาล PMB trisaccharide **21** ซึ่งภายหลังการกำจัดหมู่ปกป้อง $p\text{-methoxybenzyl}$ (PMB) ด้วยตัวออกซิไดส์ DDQ จะได้น้ำตาลไตรแซ็กคาไรด์ acceptor **22** ในขณะที่ปฏิกิริยาไกลโคไซด์ขึ้นระหว่างน้ำตาล disaccharide glycal **23** และ thiofucosyl donor **24** ให้สารผลิตภัณฑ์อนุพันธ์ trisaccharide glycal **25** ซึ่งเมื่อนำมาทำปฏิกิริยา iodosulfonation ด้วยรีเอเจนต์ $(\text{coll})_2\text{ClO}_4/\text{PhSO}_2\text{NH}_2$ จะเกิดสารมัธยันตร์ 2-iodo α -sulfonamidoglycoside (รูปที่ 6) จากนั้นทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ ethyl thiol (EtSH) ภายใต้สภาวะเบส (LiHMDS) จะได้สารผลิตภัณฑ์น้ำตาล sulfonamido thioglycosyl donor **26** เมื่อนำสารน้ำตาล sulfonamido thioglycosyl donor **26** ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับทำปฏิกิริยา sulfonamide-galactosylation กับน้ำตาลไตรแซ็กคาไรด์ acceptor **22** ภายใต้สภาวะตัวกระตุ้น methyl triflate (MeOTf) โดยการเกิดปฏิกิริยาไกลโคไซด์แบบเลือกเฉพาะที่เชื่อมหน่วยน้ำตาลสารตั้งต้น **22** และ **26** ด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบบีต้า (β -glycosidic linkage) ในสารผลิตภัณฑ์น้ำตาล O-pentenyl hexasaccharide



รูปที่ 5 การสังเคราะห์สารโกลโบ เฮช จากสารตั้งต้นอนุพันธ์ไกลคอล



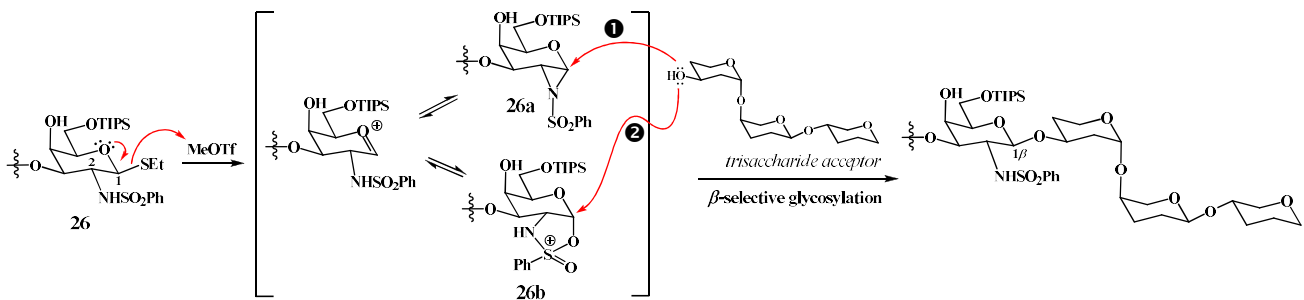
รูปที่ 6 การเตรียมสารอนุพันธ์โกลโบ เฮซ และการสังเคราะห์ globo H/KLH conjugate

กลไกการเกิดปฏิกิริยาไกลโคไซด์เช่นแบบเลือกกระหว่าง น้ำตาลไตรแซ็กคาไรด์ **22** และ **26** อาจอธิบายด้วยผลการมีส่วนร่วมของหมู่ข้างเคียง (neighboring participation effect) โดย ภายหลังการทำปฏิกิริยาของน้ำตาล **26** กับตัวกระตุ้น MeOTf แล้วอาจเกิดสารมัธยันตร์ *N*-sulfonylaziridine **26a** หรือสาร

มัยันตร์ 26b (รูปที่ 7) ซึ่งทำให้การเข้าทำปฏิกิริยาของน้ำตาล acceptor ทั้งวิถี ① หรือ ② ในทิศทางด้านบนได้ดีกว่า (Spijker and van Boeckel, 1991; Danishefsky et al., 1992; Allen et al., 2000) จึงทำให้เกิดการเลือกเฉพาะแบบปีต้า (β -selective glycosylation) ให้สารผลิตภัณฑ์อนุพันธ์เฮกซะ

แซ็กคาไรด์ซึ่งเมื่อนำมาจัดหมู่ปกป้องด้วยปฏิกิริยา desilylation และ debenzoylation แล้วตามด้วยการทำปฏิกิริยา peracetylation ด้วยรีเอเจนต์ $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Py}/\text{DMAP}$ จะให้สารผลิตภัณฑ์อนุพันธ์ globo-H pentenyl glycoside ซึ่งนำมาทำปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันด้วยปฏิกิริยา ozonolysis และปฏิกิริยา reductive amination จะได้สารมัธยันตร์สำหรับทำปฏิกิริยาไกลโคไซเลชันกับโปรตีนพาหะ keyhole limpet hemocyanin (KLH) จากหอยทะเล *Megathura crenulata*

จะได้สารผลิตภัณฑ์ globo H/KLH conjugate (รูปที่ 6) เมื่อใช้สารไกลโคโปรตีนสังเคราะห์ชนิดนี้สำหรับทดสอบการใช้เป็นวัคซีน (vaccine candidate) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพก่อนการทดสอบในคน (pre-clinical phase) และการทดสอบทางคลินิก (clinical phase) พบว่ามีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันโดยผลิตแอนติบอดี IgM และ IgG ในระดับสูงและปานกลาง ตามลำดับ (Slovin et al., 1999; Gilewski et al., 2001; Ouerfelli et al., 2005; Danishefsky et al., 2015)

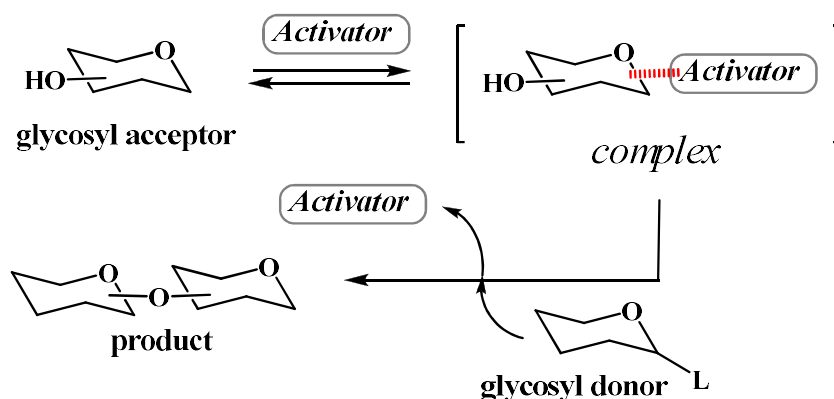


รูปที่ 7 ผลการมีส่วนร่วมของหมู่ข้างเคียงที่มีต่อกลไกการเกิดปฏิกิริยาไกลโคไซเลชันแบบเลือกเฉพาะ

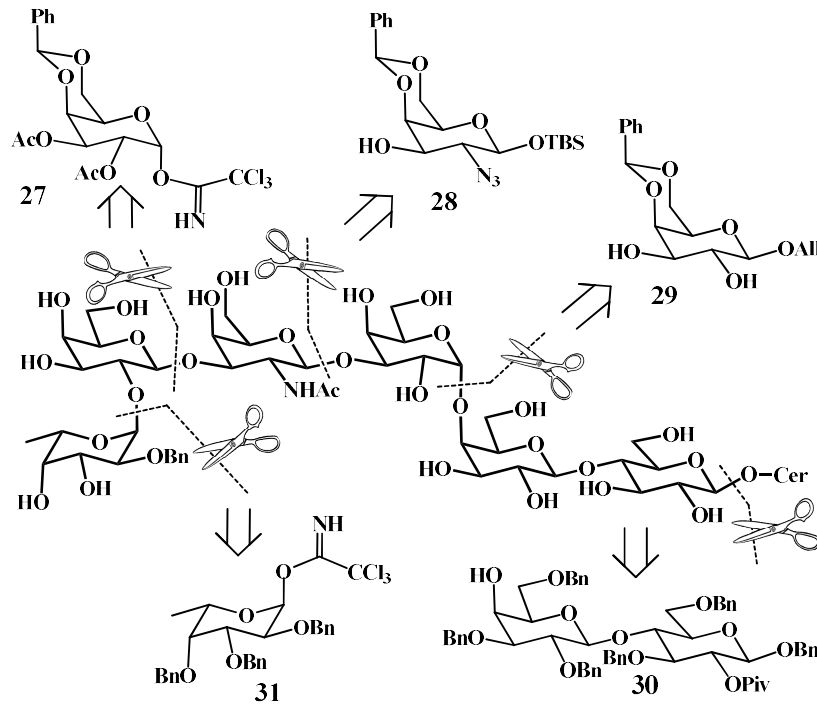
Lassaletta และ Schmidt (1996) รายงานการสังเคราะห์น้ำตาลเฮกซะแซ็กคาไรด์โกลโบ เฮช โดยใช้วิธีสังเคราะห์สารด้วยเคมีของน้ำตาลอนุพันธ์ไตรคลอโรแอซิทิเมเตด (trichloroacetimidate methodology) และกระบวนการทำปฏิกิริยาไกลโคไซเลชันที่เรียกว่า inverse glycosylation procedure โดยภายใต้สภาวะเคมีที่เหมาะสมจะเกิดสารเชิงซ้อนของ acceptor/ตัวกระตุ้น (activator) จากนั้นค่อยๆ เติม glycosyl donor ที่มีสภาพวงไวสูงลงในของผสมปฏิกิริยา ตัวกระตุ้นในสารเชิงซ้อนจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไกลโคไซเลชัน

ทำให้สารมัธยันตร์ glycosylating species ต่างๆ ที่เกิดขึ้นอยู่ใกล้กันจึงส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาไกลโคไซเลชันดำเนินได้ดี (Schmidt and Toepfer, 1991) (รูปที่ 8)

สำหรับการวางแผนสังเคราะห์สารโมเลกุลเป้าหมายนั้นใช้แนวคิดวิเคราะห์สังเคราะห์ย้อนกลับ (retrosynthetic analysis) พิจารณาตัดพันธะ (bond disconnection) ที่เหมาะสมของโมเลกุลน้ำตาลโกลโบ เฮช จะให้ได้สารตั้งต้น 27-31 (รูปที่ 9)



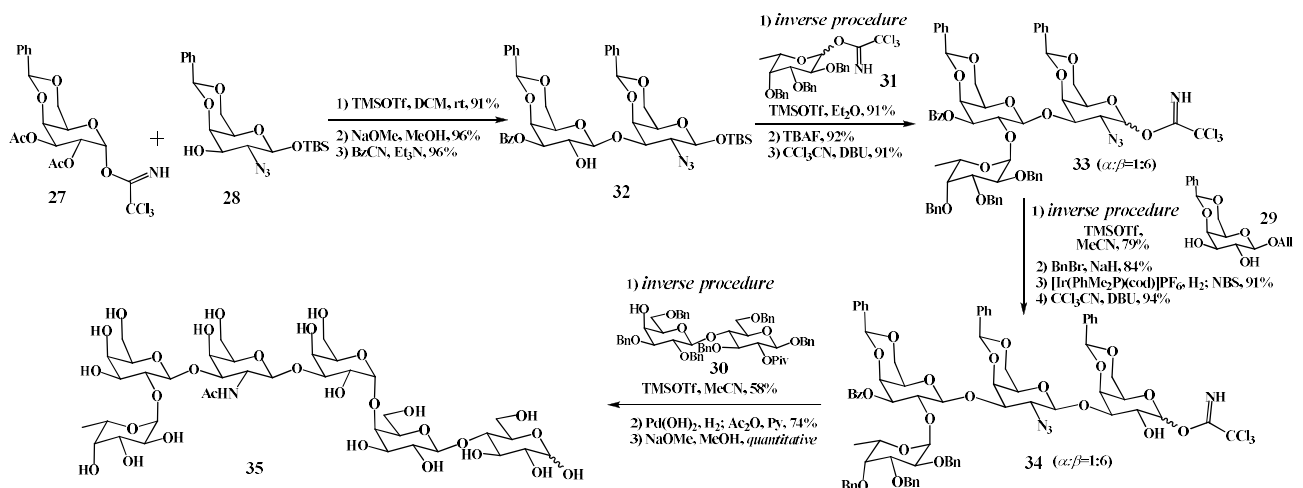
รูปที่ 8 กระบวนการ inverse glycosylation



รูปที่ 9 การวิเคราะห์สังเคราะห์ย้อนกลับของไกลโบ เฮซ

เมื่อทำปฏิกิริยาไกลโคไซเลชันของสารตั้งต้น galactosyl donor **27** และสาร azidogalactosyl acceptor **28** แล้วตามด้วยปฏิกิริยา deacetylation และปฏิกิริยา regioselective benzylation ให้สารผลิตภัณฑ์น้ำตาล $\beta(1,3)$ -linked disaccharide **32** จากนั้นทำปฏิกิริยา fucosylation กับอนุพันธ์ trichloroacetimidate **31** แล้วเพิ่มหมู่หลุดออกที่

ตำแหน่งแอนอเมอริกจะได้น้ำตาล trisaccharide donor **33** ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ acceptor **29** แล้วตามด้วยการทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ trichloroacetimidate เกิดเป็นสาร glycosyl donor **34** ที่สามารถทำปฏิกิริยาไกลโคไซเลชันกับอนุพันธ์แลคโตส **30** ให้น้ำตาลเฮกซะแซ็กคาไรด์ซึ่งเมื่อกำจัดหมู่ปกป้องต่างๆ แล้วจะได้สารโมเลกุลเป้าหมาย (รูปที่ 10)

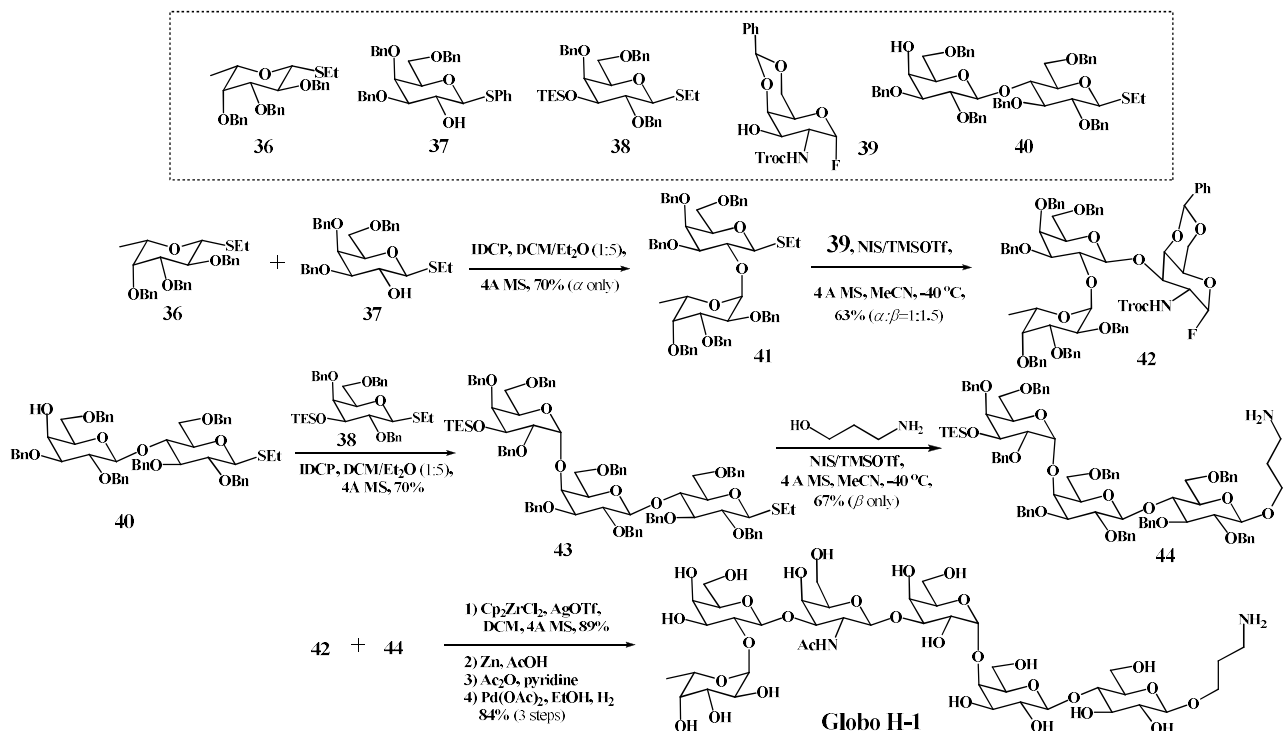


รูปที่ 10 การสังเคราะห์สารไกลโบ เฮซ ด้วยปฏิกิริยา inverse glycosylation

Zhu และ Boons (1999) รายงานการสังเคราะห์อนุพันธ์โกลโบ เฮช โดยประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาไกลโคไซด์แบบเลือกเฉพาะทางเคมี (chemoselective) และแบบออร์โทโกนาล (orthogonal) ด้วยวิธีการเหล่านี้ทำให้ความแตกต่างของสภาพว่องไว (reactivity disparity) ระหว่าง glycosyl donor และ acceptor ปรากฏได้เด่นชัดภายใต้ปฏิกิริยาไกลโคไซด์ ในขณะที่ยังคงสามารถควบคุมสภาพนิวคลีโอไฟล์ของหมู่ไฮดรอกซิลของน้ำตาลและหมู่ปกป้อง silyl ether ได้ ในรูปที่ 11 น้ำตาลไตรแซ็กคาไรด์ **43** ทำปฏิกิริยาการแทนที่กับสาร amino propanol สำหรับเป็นส่วนเชื่อมต่อ (spacer) ปลายสายโซ่น้ำตาลกับโปรตีนนำพา (carrier protein) นอกจากนี้แล้วน้ำตาล **44** สามารถเป็นได้ทั้ง glycosyl donor และ acceptor สำหรับปฏิกิริยาไกลโคไซด์ขึ้นอยู่กับการใช้สภาวะเคมีที่ใช้ โดยหมู่ปกป้อง triethylsilyl ether (TES) มีเสถียรภาพภายใต้สภาวะตัวกระตุ้น NIS/TMSOTf แต่เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะ $[Cp_2ZrCl_2]/AgOTf$ หมู่

ปกป้อง TES จะหลุดออกได้เกิดเป็นหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ (-OH) บนวงน้ำตาลซึ่งจะสามารถทำหน้าที่เป็น acceptor ได้ เมื่อนำมาทำปฏิกิริยาไกลโคไซด์กับ glycosyl fluoride **42** ให้สารผลิตภัณฑ์อนุพันธ์เฮกซะแซ็กคาไรด์ globo H-1

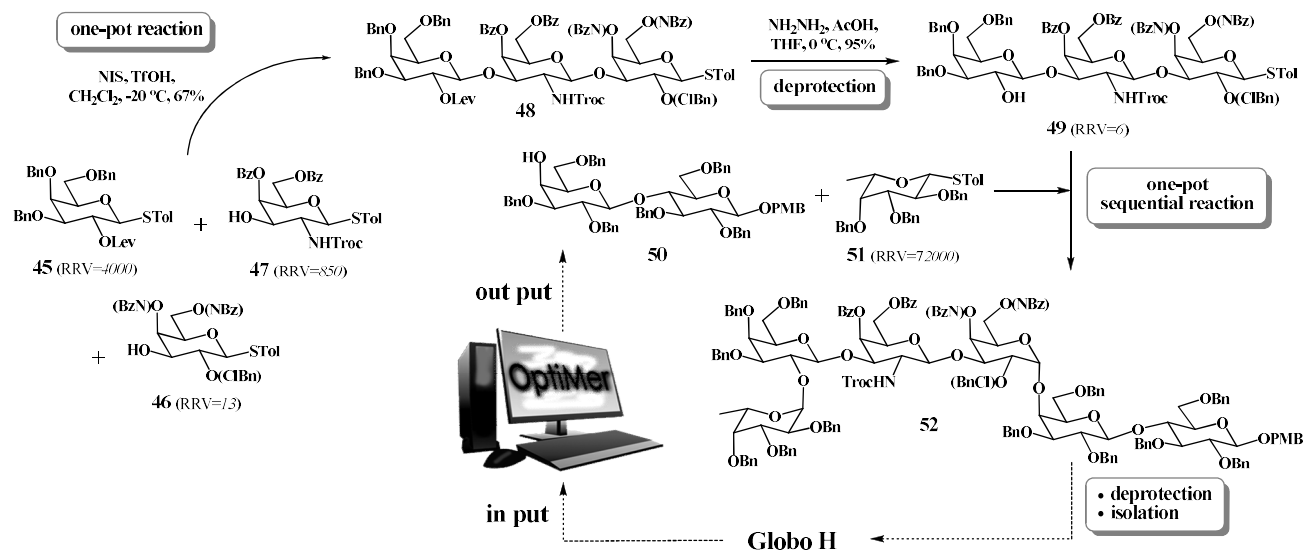
Burkhardt และคณะ (2001) ได้รายงานการสังเคราะห์อนุพันธ์น้ำตาลเฮกซะแซ็กคาไรด์โกลโบ เฮช โดยการพิจารณาค่าสภาพว่องไวสัมพัทธ์ (relative reactivity value, RRV) ของสารตั้งต้นน้ำตาล glycosyl donor และ acceptor ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ *p*-methylphenyl thioglycoside ที่มีหมู่ปกป้องต่างชนิดกัน (Zhang et al., 1999) จนนำไปสู่การพัฒนากระบวนการประมวลข้อมูลด้วยคอมพิวเตอร์ (OptiMer™) ซึ่งช่วยให้นักเคมีสามารถออกแบบและวางแผนการสังเคราะห์โกลโบแซ็กคาไรด์ด้วยปฏิกิริยาไกลโคไซด์ที่ดำเนินภายในภาชนะเดียวเรียกวิธีการนี้ว่า programmable one-pot glycosylation



รูปที่ 11 การสังเคราะห์สารโกลโบ เฮช ด้วยปฏิกิริยาไกลโคไซด์แบบเลือกเฉพาะทางเคมีและแบบออร์โทโกนาล

รูปที่ 12 แสดงการออกแบบและวางแผนสังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมายโกลโบ เฮช ด้วยคอมพิวเตอร์โดยการวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลโกลโบ เฮช เพื่อประเมินค่าสภาพว่องไวสัมพัทธ์ระหว่างสารตั้งต้นอนุพันธ์น้ำตาลไทโอไกลโคไซด์ (thioglycosyl building blocks) พบว่าควรใช้สารอนุพันธ์น้ำตาล trisac-

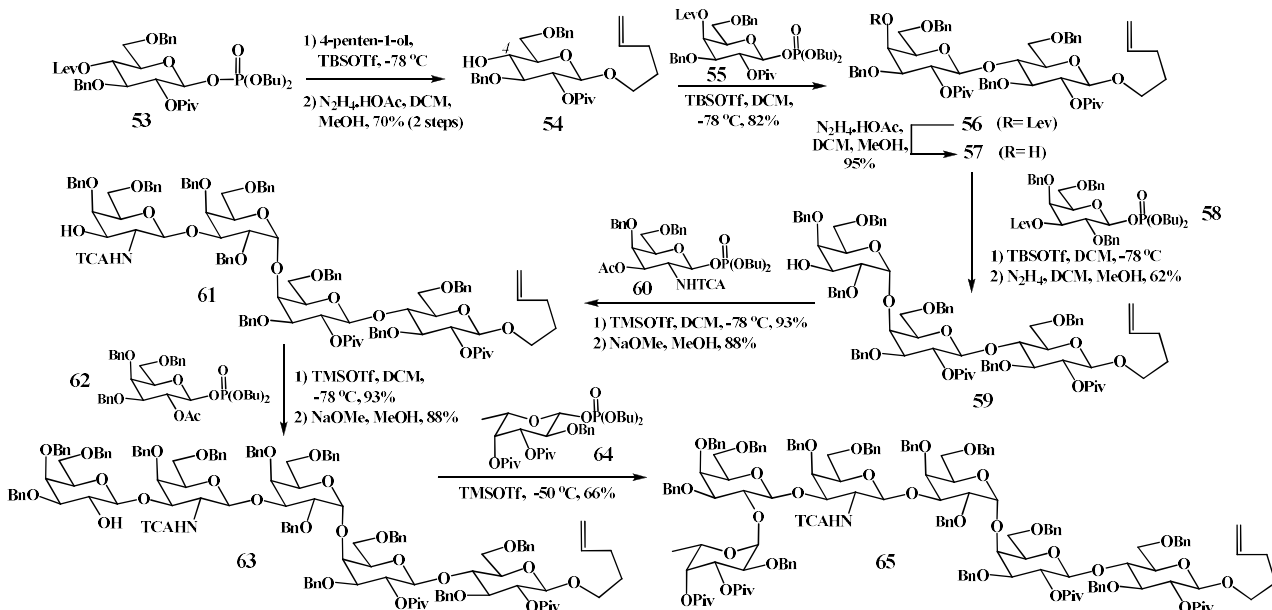
charide **49** น้ำตาล disaccharide **50** และน้ำตาล **51** สำหรับทำปฏิกิริยาไกลโคไซด์ที่ดำเนินภายในภาชนะเดียว เมื่อกำจัดหมู่ปกป้องต่าง ๆ ในโมเลกุลน้ำตาล **52** จะทำให้ได้สารโกลโบ เฮช ตามต้องการ



รูปที่ 12 การใช้คอมพิวเตอร์สำหรับออกแบบและวางแผนการสังเคราะห์โกลโบ เฮช

Bosse และคณะ (2002) รายงานการประยุกต์ใช้สารตั้งต้นน้ำตาลอนุพันธ์ glycosyl phosphates สำหรับสังเคราะห์แอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งในอนุกรมโกลโบ (globo series) โดยเริ่มจากปฏิกิริยาการแทนที่หมู่ฟังก์ชันฟอสเฟตของสารตั้งต้น glucosyl phosphate donor **53** แล้วตามด้วยการกำจัดหมู่ปกป้องที่ตำแหน่ง C-4 ของวงน้ำตาลได้สาร pentenyl glucosyl acceptor **54** ซึ่งทำปฏิกิริยาไกลโคไซด์กับสาร galactosyl phosphate donor **55** จะได้สารอนุพันธ์ lactose disaccharide **56** ภายหลังการจัดหมู่ปกป้องจะได้หมู่ไฮดรอกซิลอิสระ (-OH) บน C-4 แล้วนำมาทำปฏิกิริยาไกลโคไซด์กับสาร galactosyl phosphate donor **58** เกิดการเลือกเฉพาะแบบแอลฟา (α -selectivity) ได้ดีให้สารผลิตภัณฑ์น้ำตาล trisaccharide **59** ที่สามารถทำปฏิกิริยา

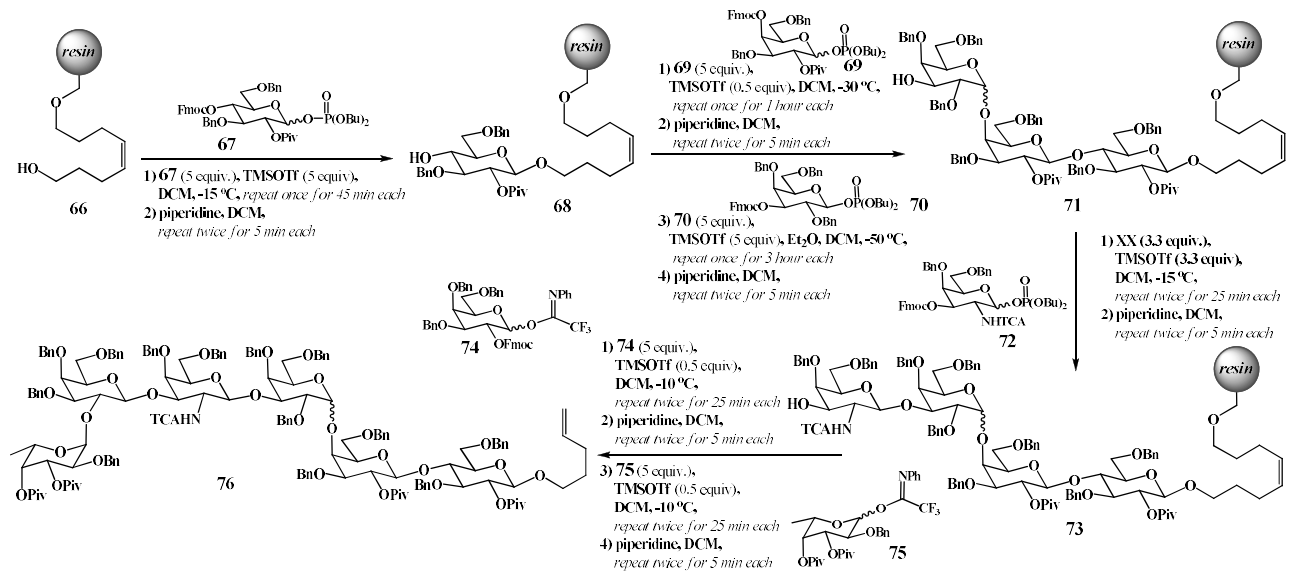
ไกลโคไซด์กับน้ำตาล galactosamine phosphate **60** ซึ่งมีหมู่ปกป้อง *N*-trichloroacetyl (*N*-TCA) บน C-2 ของวงน้ำตาล โดยพบว่าหมู่ปกป้อง *N*-TCA เอื้อต่อการเกิดปฏิกิริยาไกลโคไซด์เลือกชนิดเลือกเฉพาะแบบบีต้า (β -selective glycosylation) ได้ดีกว่าการใช้หมู่ปกป้องชนิดอื่นๆ ทำให้ได้สารผลิตภัณฑ์น้ำตาล tetrasaccharide **61** ซึ่งมีสเตอริโอเคมีตามต้องการ จากนั้นทำปฏิกิริยาเพิ่มหน่วยย่อยน้ำตาลอนุพันธ์แลคโตส **62** เข้าทางด้านปลายหน่วยย่อย galactosamine ของน้ำตาล **61** จะได้น้ำตาล pentasaccharide **63** ในขั้นตอนสุดท้ายนำ **63** มาทำปฏิกิริยาไกลโคไซด์กับน้ำตาล fucosyl phosphate **64** ได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาล globo H hexaccharide **65** (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 การสังเคราะห์สารไกลโบ เฮซ จากสารตั้งต้นน้ำตาลอนุพันธ์ glycosyl phosphates

ต่อมากลุ่มวิจัยเดียวกันนี้ได้รายงานการประยุกต์ใช้เทคนิคการสังเคราะห์โอลิโกแซ็กคาไรด์บนวัสดุของแข็ง (solid phase oligosaccharide synthesis) เพื่อสังเคราะห์น้ำตาลเฮกซะแซ็กคาไรด์ไกลโบ เฮซ (Werz et al., 2007) โดยเริ่มจากการสร้างพันธะไกลโคซิดิกเชื่อมต่อกันระหว่างตัวค้ำจุน Merrifield resin **66** กับน้ำตาล glucosyl phosphate **67** แล้วกำจัดหมู่ปกป้อง fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) บน C-3 จะได้น้ำตาล resin-bound disaccharide **68** ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยาไกลโคซิเลชันกับน้ำตาล galactosyl phosphates **69** และ **70** ตามลำดับ ได้สารผสมของ resin-bound trisaccharide **71** แล้วทำปฏิกิริยาไกลโคซิเลชันกับอนุพันธ์น้ำตาล galactosamine phosphate **72** จะได้น้ำตาล resin-bound tetrasaccharide **73** จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับน้ำตาล galactosyl donor **74**

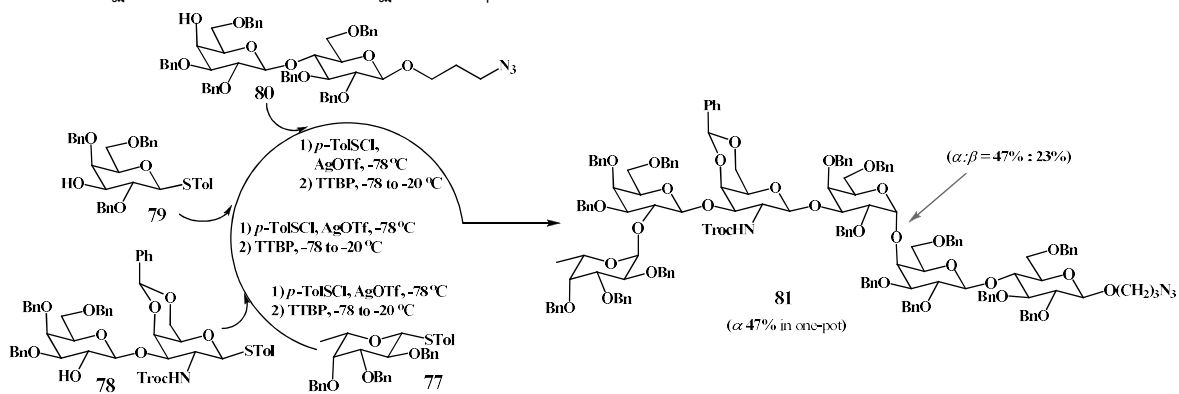
ตามด้วยปฏิกิริยา fucosylation กับน้ำตาล fucosyl trifluoroacetimidate **75** แล้วทำปฏิกิริยา olefin cross-metathesis ด้วยตัวเร่งปฏิกิริยา Grubbs' catalyst ภายใต้บรรยากาศแก๊สเอทิลีน (C_2H_4) เพื่อตัดพันธะออกจากตัวค้ำจุนเรซินจะได้สารผสมอนุพันธ์น้ำตาลเฮกซะแซ็กคาไรด์ไกลโบ เฮซ **76** ที่มีหมู่แทนที่ *n*-pentenyl อยู่ด้านปลายซึ่งสามารถแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC (รูปที่ 14) ด้วยวิธีการนี้ทำให้สามารถวางแผนการสังเคราะห์ของลำดับหน่วยน้ำตาลย่อยบนสายโซ่โอลิโกแซ็กคาไรด์ได้สะดวก นอกจากนี้แล้วการพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีของสารโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนสามารถกระทำได้อย่างรวดเร็วด้วยเทคนิคการแยกวิเคราะห์ลิควิดโครมาโทกราฟีและแมสสเปกโตรเมตรี (LC-MS analysis)



รูปที่ 14 การสังเคราะห์สารไกลโบ เฮซ ด้วยเทคนิคการสังเคราะห์โอลิโกแซ็กคาไรด์บนวัสดุของแข็ง

Wang และคณะ (2007) ประยุกต์ใช้วิธีการทำปฏิกิริยาซ้ำเป็นลำดับภายในภาชนะเดียว (iterative one-pot strategy) เพื่อสังเคราะห์น้ำตาลเฮกซะแซ็กคาไรด์ไกลโบ เฮซ โดยเริ่มแรกทำการกระตุ้นสารตั้งต้น *p*-tolyl thiofucosyl donor 77 ด้วยระบบตัวกระตุ้น *p*-TolSCL/AgOTf ก่อนแล้วตามด้วยการเติมน้ำตาล disaccharide acceptor 78 ณ อุณหภูมิต่ำภายใต้สภาวะที่มีเบส 2,4,6-tri-*tert*-butyl-pyrimidine (TTBP) เพื่อช่วยสะเทินกรด trifluoromethane sulfonic acid (TfOH) ที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยาไกลโคไซเลชัน เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดแล้วทำ

ปฏิกิริยาซ้ำโดยปราศจากการแยกบริสุทธิ์สารมัธยันตร์ ต่อมาทำปฏิกิริยาไกลโคไซเลชันกับน้ำตาล thiogalactosyl acceptor 79 ด้วยระบบตัวกระตุ้น *p*-TolSCL/AgOTf ภายใต้สภาวะเคมีเช่นเดิมเมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดก็ทำปฏิกิริยาซ้ำอีกครั้งแล้วตามด้วยการเติมน้ำตาล lactosyl acceptor 80 ซึ่งมีสายโซ่ azidopropyl อยู่ด้านปลายรีดิวซ์ของน้ำตาล เมื่อปฏิกิริยาไกลโคไซเลชันดำเนินสิ้นสุดแล้วจะได้ของผสมของน้ำตาลเฮกซะแซ็กคาไรด์อนุพันธ์ไกลโบ เฮซ 81 (รูปที่ 15)

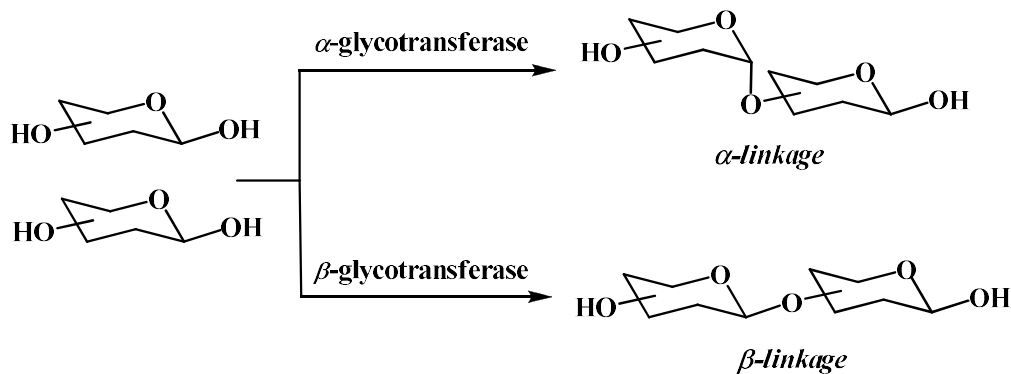


รูปที่ 15 การสังเคราะห์สารไกลโบ เฮซ ด้วยวิธีการ iterative one-pot glycosylation

3.2 การสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์

ในระบบสิ่งมีชีวิตกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารคาร์โบไฮเดรตมีเอนไซม์ช่วยเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดสภาพจำเพาะทางสเตอริโอเคมี (stereospecificity) ของพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) บนสายโซ่น้ำตาลพอลิแซ็กคาไรด์ (รูปที่ 16)

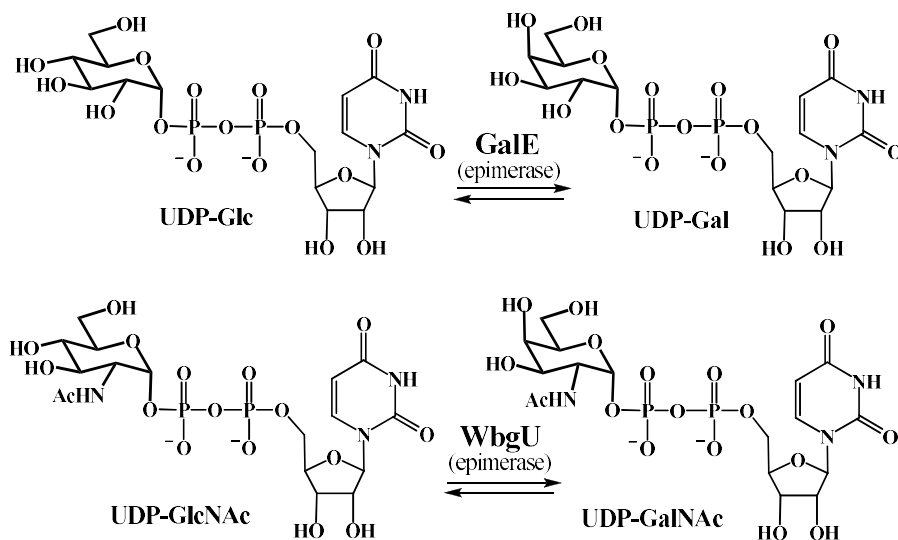
ดังนั้นการประยุกต์ใช้เอนไซม์สำหรับสังเคราะห์สารพอลิแซ็กคาไรด์และไกลโคคอนจูเกตจึงเป็นอีกหนึ่งแนวทางที่ได้รับความสนใจศึกษาและพัฒนาวิธีการสังเคราะห์ในระดับห้องปฏิบัติการอย่างต่อเนื่อง (Koeller and Wong, 2000, 2001; Muthana et al., 2009)



รูปที่ 16 การสังเคราะห์น้ำตาลไดแซ็กคาไรด์ด้วยเอนไซม์

Su และคณะ (2008) ได้รายงานการใช้เอนไซม์ไกลโคซิลทรานสเฟอร์เรสสามชนิดสำหรับสังเคราะห์ไกลโบ เฮช ได้แก่ เอนไซม์ α 1,4-galactosyltransferase (LgtC) เอนไซม์ bifunctional β 1,3-galactosyl/ β 1,3-N-acetylgalactosami-

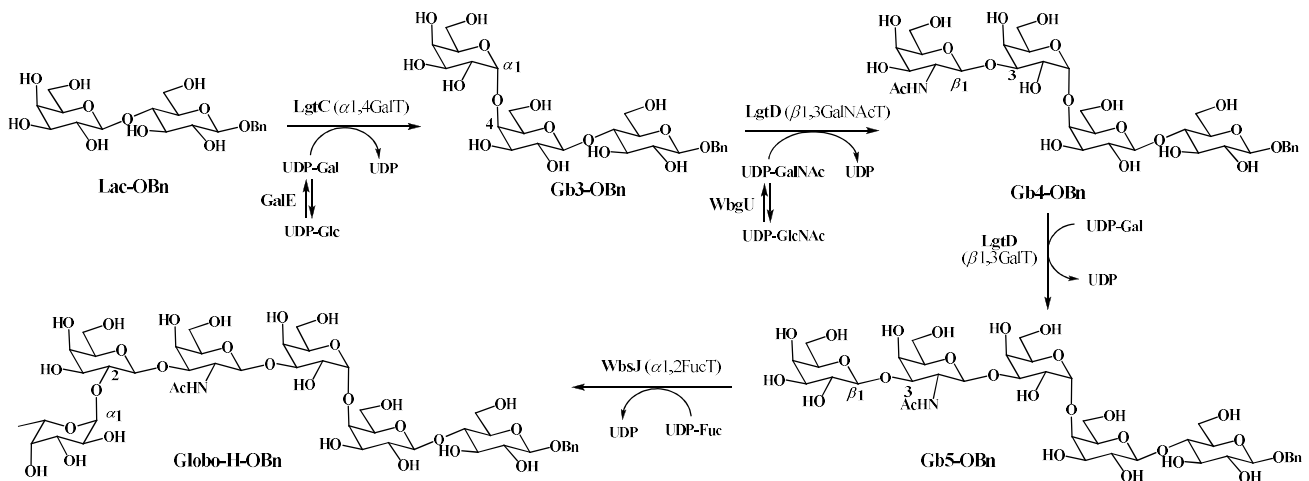
nyltransferase (LgtD) และเอนไซม์ α 1,2-fucosyltransferase (WbsJ) โดยสารตั้งต้นสำคัญสองชนิดคือน้ำตาลนิวคลีโอไทด์ UDP-Gal และ UDP-GalNAc เตรียมได้จากการใช้เอนไซม์ อีพิเมอร์เรส GalE และ WbgU ตามลำดับ (รูปที่ 17)



รูปที่ 17 การสังเคราะห์น้ำตาลนิวคลีโอไทด์ UDP-Gal และ UDP-GalNAc ด้วยเอนไซม์อีพิเมอร์เรส

ปฏิกิริยาไกลโคซิเลชันระหว่างสารตั้งต้นน้ำตาลแลคโตส Lac-OBn กับน้ำตาล UDP-Gal มีเอนไซม์ LgtC เร่งปฏิกิริยา จะเกิดน้ำตาล trisaccharide Gb3-OBn ซึ่งทำปฏิกิริยาไกลโคซิเลชันกับน้ำตาล UDP-Gal และมีเอนไซม์ LgtC เร่งปฏิกิริยาได้ น้ำตาล tetrasaccharide Gb4-OBn ซึ่งนำมาทำปฏิกิริยาไกลโค-

ซิเลชันด้วยเอนไซม์ LgtD จะได้น้ำตาล pentasaccharide Gb5-OBn และในขั้นตอนสุดท้ายทำปฏิกิริยาฟิวโคซิเลชัน (fucosylation) ระหว่างน้ำตาล Gb5-OBn กับน้ำตาล UDP-Fuc ที่มีเอนไซม์ WbsJ เร่งปฏิกิริยาจะได้โมเลกุลเป้าหมายอนุพันธ์ globo H-OBn (รูปที่ 18)



รูปที่ 18 การสังเคราะห์สารไกลโบ เฮซ ด้วยเอ็นไซม์

โดยทั่วไปเอนไซม์มักจะทำงานได้ดีภายใต้สภาวะกรด-เบสที่เป็นกลาง (pH=7) ณ อุณหภูมิห้องในสารละลายน้ำ ดังนั้นการประยุกต์ใช้พหุเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาซึ่งดำเนินภายในภาชนะเดียว (one-pot multienzyme reaction) จึงสามารถกระทำได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ในปี ค.ศ. 2013 Tsai และคณะได้รายงานวิธีการใช้พหุเอนไซม์ลักษณะนี้สำหรับการทำปฏิกิริยาไกลโคซิเลชันสังเคราะห์น้ำตาลเฮกซะแซ็กคาไรด์ของแอนติเจนไกลโบ เฮซ ด้วยเอนไซม์ glycosyltransferases วิธี Leloir (Leloir pathway glycosyltransferases) ซึ่งมีน้ำตาลนิวคลีโอไทด์สามชนิดทำหน้าที่เป็น glycosyl donor ได้แก่ น้ำตาล UDP-Gal น้ำตาล UDP-GalNAc และน้ำตาล UDP-Glc โดยน้ำตาลนิวคลีโอไทด์เหล่านี้สามารถเกิดขึ้นซ้ำ (regeneration) ได้ด้วยเอนไซม์ AtUSP (เปลี่ยน Gal-1-P → UDP-Gal) เอนไซม์ GlmU (เปลี่ยน GalNAc-1-P → UDP-GalNAc) และเอนไซม์ FKP

(เปลี่ยน Fuc-1-P → GDP-Fuc) จึงทำให้สามารถสังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมายในปริมาณระดับกรัมได้และยังช่วยลดปัญหาสารผลิตภัณฑ์พลอยได้นิวคลีโอไซด์ฟอสเฟต (nucleoside phosphate byproducts) ซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ glycotransferase โดยรูปที่ 19 แสดงปฏิกิริยาไกลโคซิเลชันแบบจำเพาะด้วยเอนไซม์ α1,4-GalT ระหว่างสารตั้งต้นน้ำตาลไตรแซ็กคาไรด์ allyl-Lac กับน้ำตาลนิวคลีโอไทด์ UDP-Gal เกิดน้ำตาลเตตระแซ็กคาไรด์ allyl-Gb3 ที่ทำปฏิกิริยาไกลโคซิเลชันแบบจำเพาะด้วยเอนไซม์ α1,3-GalNAcT ในขั้นตอนถัดไปจะได้น้ำตาลเตตระแซ็กคาไรด์ allyl-Gb4 ในขณะที่เอนไซม์ α1,3-GalNAcT และเอนไซม์ α1,3-GalNAcT จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไกลโคซิเลชันแบบจำเพาะเกิดสารผลิตภัณฑ์ allyl-Gb5 และสารโมเลกุลเป้าหมาย allyl-Globo H ตามลำดับ

- Allen, J. R.; Allen, J. G.; Zhang, X.-F.; Williams, L. J.; Zatorski, A.; Ragupathi, G.; Livingston, P. O.; Danishefsky, S. J. (2000). A second generation synthesis of the MBr1 (globo-H) breast tumor antigen: New application of the n-pentenyl glycoside method for achieving complex carbohydrate protein linkages. *Chem Eur J.* 6(8): 1366–1375.
- Bilodean, M. T.; Park, T. K.; Hu, S.; Randolph, J. T.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O.; Zhang, S. (1995). Total synthesis of a human breast tumor associated antigen. *J Am Chem Soc.* 117(29): 7840-7841.
- Bosse, F.; Marcaurelle, L. A.; Seeberger, P. H. (2002). Linear synthesis of the tumor-associated carbohydrate antigens Globo-H, SSEA-3, and Gb3. *J Org Chem.* 67: 6659-6670.
- Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer J Clin.* 5-31.
- Bremer, E. G.; Levery, S. B.; Sonnino, S.; Ghidoni, R.; Canevari, S.; Kannagi, R.; Hakomori, S. (1984). Characterization of a glycosphingolipid antigen defined by the monoclonal antibody MBr1 expressed in normal and neoplastic epithelial cells of human mammary gland. *J Biol Chem.* 259: 14773-14777.
- Burkhart, F.; Zhang, Z.; Wacowich-Sgarbi, S.; Wong, C.-H. (2001). Synthesis of the globo H hexasaccharide using the programmable reactivity-based one-pot strategy. *Angew Chem Int Ed Engl.* 40(7): 1274-1277.
- Danishefsky, S. J.; Koseki, K.; Griffith, D. A.; Gervay, J.; Peterson, J. M.; McDonald, F. E.; Oriyama, T. (1992). Azaglycosylation of complex stannyl alkoxides with glycal-derived iodo sulfonamides: a straightforward synthesis of sialyl-Lewis X antigen and other oligosaccharide domains. *J Am Chem Soc.* 114(21): 8331–8333.
- Danishefsky, S. J.; Shue, Y.-K.; Chang, M. N.; Wong, C.-H. (2015). Development of globo-H cancer vaccine. *Acc Chem Res.* 48: 643-652.
- Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Mathers, C.; Parkin, D. M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer.* 144(8): 1941–1953.
- Gilewski, T.; Ragupathi, G.; Bhuta, S.; Williams, L. J.; Musselli, C.; Zhang, X.-F.; Bencsath, K. P.; Panageas, K. S.; Chin, J.; Hudis, C. A.; Norton, L.; Houghton, A. N.; Livingston, P. O.; Danishefsky, S. J. (2001). Immunization of metastatic breast cancer patients with a fully synthetic globo H conjugate: A phase I trial. *Proc Natl Acad Sci.* 98(6): 3270–3275.
- Griffith, D. A.; Danishefsky, S. J. (1990). Sulfonamidoglycosylation of glycals. A route to oligosaccharides with 2-amino-hexose subunits. *J Am Chem Soc.* 112(15): 5811–5819.
- Hakomori, S. (1983). Tumor-associated glycolipid antigens defined by monoclonal antibodies. *Bull Cancer.* 70(2): 118-26.
- Hakomori, S. (1984). Tumor-associated carbohydrate antigens. *Annu Rev Immunol.* 2: 103-26.
- Hakomori, S. (1998). Cancer-associated glycosphingolipid antigens: their structure, organization, and function. *Acta Anat.* 161: 79-90.
- Huang, C.-S.; Yu, A. L.; Tseng, L.-M.; Chow, L. W. C.; Hou, M.-F.; Hurvitz, S. A.; Schwab, R. B.; Wong, C.-H.; Murray, J. L.; Chang, H.-K.; Chang, H.-T.; Chen, S.-C.; Kim, S.-B.; Shue, Y.-K.; Rugo, H. S. (2016). Randomized phase II/III trial of active immunotherapy with OPT-822/OPT-821 in patients with metastatic breast cancer. แหล่งข้อมูล: http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.1003. ค้นเมื่อวันที่ 1 ธันวาคม 2561.
- Imsamran, W.; Pattatang, A.; Supattagorn, P.; Chaiwiriabunya, I.; Namthiasong, K.; Wongsena, M.; Puttawibul, P.; Chitaparux, I.; Suwanrungrung, K.; Sangrajan, S.; Buason, R. (2018). Cancer in Thailand vol. IX, 2013-2015, Thai cancer base: National cancer institute. แหล่งข้อมูล: http://bps.moph.go.th/new_bps/sites/default/files/stratistics60.pdf. ค้นเมื่อวันที่ 1 ธันวาคม 2561.
- Jeon, I.; Iyer, K.; Danishefsky, S. J. (2009). A practical total synthesis of globo-H for use in anticancer vaccines. *J Org Chem.* 74: 8452-8455.
- Kannagi, R.; Levery, S. B.; Ishigami, F.; Hakomori, S.; Shevinsky, L. H.; Knowles, B. B.; Solter, D. (1983). New globo series glycosphingolipids in human teratocarcinoma reactive with the monoclonal antibody directed to a

- developmentally regulated antigen, stage-specific embryonic antigen 3. *J Biol Chem.* 258: 8934-9842.
- Koeller, K. M.; Wong, C.-H. (2000). Synthesis of complex carbohydrates and glycoconjugates: enzyme-based and programmable one-pot strategies. *Chem Rev.* 100: 4465-4494.
- Koeller, K. M.; Wong, C.-H. (2001). Enzymes for chemical synthesis. *Nature* 409: 232-240.
- Lassalletta, J. M.; Schmidt, R. R. (1995). 1,2-*O*-Silyl group rearrangements in carbohydrates-convenient synthesis of important lactose building blocks. *Synlett.* 925-927.
- Lassalletta, J. M.; Schmidt, R. R. (1996). Synthesis of the hexasaccharide moiety of globo H (human breast cancer) antigen. *Liebigs Ann.* 9: 1417-1423.
- Ménard S, Tagliabue E, Canevari S, Fossati G, Colnaghi MI. (1983). Generation of monoclonal antibodies reacting with normal and cancer cells of human breast. *Cancer Res.* 43(3): 1295-1300.
- Mydock, L. K.; Demchenko, A. V. (2010). Mechanism of chemical *O*-glycosylation: from early studies to recent discoveries. *Org Biomol Chem.* 8: 497-510.
- Muthana, S.; Cao, H.; Chen, X. (2009). Recent progress in chemical and chemoenzymatic synthesis of carbohydrates. *Curr Opin Chem Biol.* 13: 573-581.
- OBI Pharma, Inc. (2012). Trial of active immunotherapy with globo H-KLH (OPT-822) in metastatic breast cancer subjects. clinical trial information: NCT01516307 แหล่งข้อมูล <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01516307>. ค้นเมื่อวันที่ 1 ธันวาคม 2561.
- OBI Pharma, Inc. (2014). Trial of active immunotherapy with OBI-833 (Globo H-CRM197) in advanced/metastatic gastric, lung, colorectal or breast cancer subjects. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02310464. แหล่งข้อมูล <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02310464>. ค้นเมื่อวันที่ 1 ธันวาคม 2561.
- O'Cearbhaill, R.; Ragupathi, G.; Zhu, J.; Wan, Q.; Mironov, S.; Yang, G.; Spassova, M. K.; Iasonos, A.; Kravetz, S.; Ouerfelli, O.; Spriggs, D. R.; Danishefsky, S. J.; Sabbatini, P. (2016). A phase I study of unimolecular pentavalent (Globo-H-GM2 - sTn-TF-Tn) immunization of patients with epithelial ovarian, fallopian tube, or peritoneal cancer in first remission. *Cancers* 8(4): 46-54.
- Ouerfelli, O.; Warren, J. D.; Wilson, R. M.; Danishefsky, S. J. (2005). Synthetic carbohydrate-based antitumor vaccines: challenges and opportunities. *Expert Rev Vaccines.* 4(5): 677-685.
- Park, T. K.; Kim, I. J.; Hu, S.; Bilodeau, M. T.; Randolph, J. T.; Kwon, O.; Danishefsky, S. J. (1996). Total synthesis and proof of structure of a human breast tumor (globo-H) antigen. *J Am Chem Soc.* 118: 11488-11500.
- Schmidt, R. R.; Toepfer, A. (1991). Glycosylation with highly reactive glycosyl donors: efficiency of the inverse procedure. *Tetrahedron Lett.* 32(28): 3353-3356.
- Seeberger, P. H.; Bilodeau, M. T.; Danishefsky, S. J. (1997). Synthesis of biologically important oligosaccharides and other glycoconjugates by the glycal assembly method. *Aldrichimica Acta.* 30: 75-92.
- Slovin, S. F.; Ragupathi, G.; Adluri, S.; Ungers, G.; Terry, K.; Kim, S.; Spassova, M.; Bornmann, W. G.; Fazzari, M.; Dantis, L.; Olkiewicz, K.; Lloyd, K. O.; Livingston, P. O.; Danishefsky, S. J.; Scher, H. I. (1999). Carbohydrate vaccines in cancer: Immunogenicity of a fully synthetic globo H hexasaccharide conjugate in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(10): 5710-5715.
- Spijker, N. M.; van Boeckel, C. A. A. (1991). Double stereodifferentiation in carbohydrate coupling reactions: The mismatched interaction of donor and acceptor as an unprecedented factor governing the α/β Ratio of glycoside formation. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 30(2): 180-183.
- Su, D. M.; Eguchi, H.; Yi, W.; Li, L.; Wang, P. G.; Xia, C. (2008). Enzymatic synthesis of tumor-associated carbohydrate antigen globo-H hexasaccharide. *Org Lett.* 10: 1009-1012.
- Tsai, T.-I.; Lee, H.-Y.; Chang, S.-H.; Wang†, C.-C.; Tu, Y.-C.; Lin, Y.-C.; Hwang, D.-R.; Wu, C.-Y.; Wong, C.-H. (2013). Effective sugar nucleotide regeneration for the large-scale enzymatic synthesis of globo H and SSEA4. *J Am Chem Soc.* 135: 14831-14839.
- Wang, Z.; Zhou, L.; El-Boubbou, K.; Ye, X.-S.; Huang, X. (2007). Multi-component one-pot synthesis of the tumor-associated carbohydrate antigen globo-H based on preactivation of thioglycosyl donors. *J Org Chem.* 72: 6409-6420.

- Wang, C.-C.; Huang, Y.-L.; Ren, C.-T.; Lin, C.-W.; Hung, J.-T.; Yu, J.-C.; Alice L. Yu, A. L.; Wu, C.-Y.; Wong, C.-H. (2008). Glycan microarray of globo H and related structures for quantitative analysis of breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(33): 11661–11666.
- World Health Organization. Cancer key facts. แหล่งข้อมูล: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. ค้นเมื่อวันที่ 1 ธันวาคม 2561.
- Werz, D. B.; Castagner, B.; Seeberger, H. P. (2007). Automated synthesis of the tumor-associated carbohydrate antigens Gb-3 and globo-H: Incorporation of α -galactosidic linkages. *J Am Chem Soc.* 129: 2770-2771.
- Zhang, S.; Cordon-Cardo, C.; Zhang, H. S.; Reuter, V. E.; Adluri, S.; Hamilton, W. B.; Lloyd, K. O.; Livingston, P. O. (1997). Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: I. Focus on gangliosides. *Int J Cancer.* 73(1): 42–9.
- Zhang, Z.; Ollmann, I. R.; Ye, X.-S.; Wischnat, R.; Baasov, T.; Wong, C.-H. (1999). Programmable one-pot oligosaccharide synthesis. *J Am Chem Soc.* 121(4): 734–753.
- Zhang, Z.; Wong, C.-H. (2002). Regioselective benzylation of sugars mediated by excessive Bu_2SnO : observation of temperature promoted migration. *Tetrahedron.* 58(32): 6513–6519.
- Zhu, T.; Boons, G. J. (1999). A two-directional and high convergent approach for the synthesis of the tumor-associated antigen globo-H. *Angew Chem Int Ed.* 38: 3495-3497.

