

Die vorliegende Erfindung stellt verbesserte Verfahren zur Übertragung eines Monosaccharids von einem Donor-Substrat zu einem Akzeptor-Zucker bereit. Insbesondere umfassen die Verfahren:

(a) das Bereitstellen eines Reaktionsmediums, das zumindest eine Glykosyl-Transferase, ein Donor-Substrat, einen Akzeptor-Zucker und ein lösliches zweiwertiges Metallkation umfasst; und

(b) das Ergänzen der Konzentration des löslichen zweiwertigen Metallkations, um zu ersetzen, was durch Fällung verloren geht, wodurch eine Konzentration im Reaktionsmedium zwischen etwa 1 mM und etwa 75 mM für einen Zeitraum erzielt wird, der ausreicht, um die Übertragung des Monosaccharids im Wesentlichen abzuschließen. Das Ergänzen des zweiwertigen Metallkations kann entweder intermittierend oder kontinuierlich erfolgen.

Das bei den Verfahren verwendete zweiwertige Metallkation kann  $Mn^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Zn^{++}$  oder eine Kombination davon sein. Typischerweise ist das Kation  $Mn^{++}$ . Die Glykosyltransferase kann eine Sialyltransferase, eine Galactosyltransferase, eine Fucosyltransferase, eine Glucosyltransferase oder eine N-Acetylglucosaminyltransferase sein.

Die Verfahren basieren auf der Verwendung einer Glykosyl-Transferase zur Katalyse der Addition eines Saccharids an ein Substratsaccharid. Die Addition findet am nicht-reduzierenden Ende einer Oligosaccharid- oder Kohlenhydrat-Gruppe auf einem Biomolekül statt. Biomoleküle sind hierin so definiert, daß sie biologisch signifikante Moleküle, wie z.B. Proteine (z.B. Glykoproteine) und Lipide (z.B. Glykolipide, Phospholipide, Sphingolipide und Ganglioside) umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein. Bei den erfindungsgemäßen Verfahren wird die Konzentration an zweiwertigem Metallion während der Bildung der glykosydischen Bindung ergänzt, um die Konzentration des löslichen zweiwertigen Metallkations im Reaktionsmedium zwischen 1 mM und 75 mM wieder einzustellen.

Alle in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Oligosaccharide werden mit dem Namen oder der Abkürzung für das nicht-reduzierende Saccharid (z.B. Gal) gefolgt von der Konfiguration der glykosydischen Bindung ( $\alpha$  oder  $\beta$ ), der Ringbindung, der Ringposition des an der Bindung beteiligten reduzierenden Saccharids und dann dem Namen oder der Abkürzung des reduzierenden Saccharids (z.B. GlcNAc) beschrieben. Die Bindung zwischen zwei Zuckern kann beispielsweise als 2,3, 2→3, oder (2,3) ausgedrückt sein.