(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년12월12일
(11) 등록번호 10-1685628
(24) 등록일자 2016년12월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/04 (2006.01) *C12P 19/18* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/04 (2013.01)
C12P 19/18 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7007054
(22) 출원일자(국제) 2013년08월20일
심사청구일자 2016년03월07일
(85) 번역문제출일자 2015년03월19일
(65) 공개번호 10-2015-0042859
(43) 공개일자 2015년04월21일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/055731
(87) 국제공개번호 WO 2014/031602
국제공개일자 2014년02월27일
(30) 우선권주장
61/684,974 2012년08월20일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20070202578 A1
WO2007023348 A2*
Zhang J. et al, Org. Biomol. Chem. 1:pp.3048-3053 (2003. 6.30.).*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
아카데미아 시니카
대만 11529 타이페이 난캉 섹션 2 아카데미아 로드 128
(72) 발명자
웡, 치-휴
미국 92067 캘리포니아 란초 산타 페 피.오.박스 8154
우, 청-이
대만 115 타이페이 난캉 섹션 2 아카데미아 로드 128
차이, 청-아이
대만 115 타이페이 난방 섹션 2 아카데미아 로드 128
(74) 대리인
특허법인 남앤드남

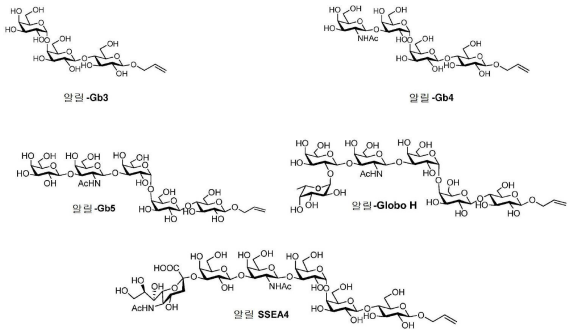
전체 청구항 수 : 총 33 항 심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **올리고사카라이드의 대규모 효소 합성**

(57) 요 약

본 발명은 신규한 UDP-Gal 재생 공정 및 갈락토스를 적합한 수용체 기질에 첨가하기 위한 이의 갈락토실트랜스퍼라제와의 조합 이용에 관한 것이다. Globo-시리즈 올리고사카라이드를 대규모로 생성하기 위한 합성 방법이 또한 본원에 기재되며, 상기 방법은 글리코실트랜스퍼라제 반응과 뉴클레오티드 당 재생 공정의 조합을 수반할 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12Y 204/01 (2013.01)
C12Y 204/99 (2013.01)
C12Y 207/01006 (2013.01)
C12Y 207/0104 (2013.01)
C12Y 207/07009 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

(i) UDP-Gal 재생 효소의 세트의 존재 하에 갈락토스로부터 UDP-Gal을 생성하고;

(ii) UDP-Gal 및 알파-1,4 갈락토실트랜스퍼라제의 존재 하에 Lac-OR^{1A} (락토스-OR^{1A})를 Gb3-OR^{1A} (글로보트리오스-OR^{1A})로 전환시키고;

(iii) UDP-GalNAc 및 베타-1,3-N-아세틸갈락토스아미닐트랜스퍼라제의 존재 하에 Gb3-OR^{1A}를 Gb4-OR^{1A} (글로보테트라오스-OR^{1A})로 전환시키며;

(iv) UDP-Gal 및 베타-1,3-N-갈락토실트랜스퍼라제의 존재 하에 Gb4-OR^{1A}를 Gb5-OR^{1A} (글로보펜타오스-OR^{1A})로 전환시키는 것을 포함하는 올리고사카라이드를 효소적으로 합성하는 방법으로서,

여기서 UDP-Gal 재생 효소의 세트는 갈락토키나제, UDP-당 피로포스포릴라제, 및 피루베이트 키나제를 포함하고,

R^{1A}는 수소, 치환되거나 치환되지 않은 알킬, 치환되거나 치환되지 않은 알케닐, 치환되거나 치환되지 않은 알키닐, 치환되거나 치환되지 않은 카르보사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 아릴, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로아릴, 또는 산소 보호기이고,

중간체의 정제 없이 수행되며,

모든 효소가 세포를 벗어난 상태 (free of cells)에서 수행되는, 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, UDP-Gal 재생 효소의 세트가 피로포스파타제를 추가로 포함하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, (i) 및 (ii)가 갈락토스, PEP, ATP, UTP, Lac-OR^{1A}, 알파-1,4-갈락토실트랜스퍼라제, 및 UDP-Gal 재생 효소의 세트를 포함하는 Gb3-합성 반응 혼합물에서 일어나는 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 어떠한 효소 반응의 발생 전에, Gb3-합성 반응 혼합물에서 Lac-OR^{1A}와 갈락토스의 몰 비가 1:1인 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, R^{1A}가 수소, 알릴, 치환된 알킬, 바이오틴, 또는 세라마이드인 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 알파-1,4 갈락토실트랜스퍼라제가 *N. 메닌지티데스* (*N. meningitides*)로부터의 LgtC이거나, 갈락토키나제가 *E. 콜라이* (*E. coli*)로부터 비롯되거나, UDP-당 피로포스포릴라제가 *A. 탈리아나* (*A. thaliana*)에서 비롯되거나, 피루베이트 키나제가 *E. 콜라이*로부터 비롯되거나, 피로포스파타제가 *E. 콜라이*로부터 비롯되는 방법.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, Gb3-OR^{1A} 를 분리시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

제 1항에 있어서,

(v) UDP-GalNAc 재생 효소의 세트의 존재 하에 GalNAc로부터 UDP-GalNAc를 생성하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 UDP-GalNAc 재생 효소의 세트는 N-아세틸헥소사민 1-키나제, N-아세틸글루코사민 1-포스페이트 우리딜트랜스퍼라제, 피루베이트 키나제, 및 피로포스파타제를 포함하는 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, (iii) 및 (v)가 GalNAc, PEP, ATP, UTP, Gb3-OR^{1A}, 베타-1,3-N-아세틸갈락토스아미닐트랜스퍼라제, 및 UDP-GalNAc 재생 효소의 세트를 포함하는 Gb4-OR^{1A}-합성 반응 혼합물에서 일어나는 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, Gb4-합성 반응 혼합물이 Gb3-OR^{1A}-합성 반응 혼합물을 GalNAc, 베타-1,3-N-아세틸갈락토스아미닐트랜스퍼라제, N-아세틸헥소사민 1-키나제, N-아세틸글루코사민 1-포스페이트 우리딜트랜스퍼라제 또는 이들의 조합과 혼합시킴에 의해 제조되는 방법.

청구항 12

제 1항에 있어서, 베타-1,3-N-아세틸갈락토스아미닐트랜스퍼라제가 *H. 인플루엔자* (*H. influenza*)로부터의 LgtD이거나, N-아세틸헥소사민 1-키나제가 *B. 롱굼* (*B. longum*)으로부터 비롯되거나, N-아세틸글루코사민 1-포스페이트 우리딜트랜스퍼라제가 *E. 콜라이* (*E. coli*)로부터 비롯되는 방법.

청구항 13

제 1항에 있어서, Gb4-OR^{1A}를 분리시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

제 1항에 있어서, (iv)가 갈락토스, PEP, ATP, UTP, Gb4-OR^{1A}, 베타-1,3-갈락토실트랜스퍼라제, 및 UDP-Gal 재생 효소의 세트를 포함하는 Gb5-OR^{1A}-합성 반응 혼합물에서 일어나는 방법.

청구항 17

제 1항에 있어서, 베타-1,3-갈락토실트랜스퍼라제가 *H. 인플루엔자*로부터의 LgtD인 방법.

청구항 18

제 1항에 있어서, Gb5-OR^{1A}를 분리시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 19

제 1항에 있어서,

(vi) GDP-Fuc 및 알파-1,2-푸코실트랜스퍼라제의 존재 하에 Gb5-OR^{1A}를 푸코실-Gb5-OR^{1A}로 전환시키는 것을 추가

로 포함하는 방법.

청구항 20

제 19항에 있어서,

(vii) GDP-Fuc 재생 효소의 세트의 존재 하에 푸코스로부터 GDP-Fuc를 생성하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 GDP-Fuc 재생 효소의 세트는 L-푸코키나제/GDP-푸코스 피로포스포릴라제, 피루베이트 키나제, 및 피로포스파타제를 포함하는 방법.

청구항 21

제 20항에 있어서, (vi) 및 (vii)이 푸코스, ATP, GTP, PEP, Gb5-OR, 알파-1,2-푸코실트랜스퍼라제, 및 GDP-Fuc 재생 효소의 세트를 포함하는 푸코실-Gb5-합성 반응 혼합물에서 일어나는 방법.

청구항 22

제 21항에 있어서, 푸코실-Gb5-합성 반응 혼합물이 Gb5-합성 반응 혼합물을 푸코스, GTP, 알파-1,2-푸코실트랜스퍼라제, L-푸코키나제/GDP-푸코스 피로포스포릴라제 또는 이들의 조합과 혼합시킴에 의해 제조되는 방법.

청구항 23

제 20항에 있어서, L-푸코키나제/GDP-푸코스 피로포스포릴라제가 *B. 프라질리스* (*B. fragilis*)로부터 비롯되거나, 알파-1,2-푸코실트랜스퍼라제가 *헬리코박터 파일로리 (Helicobacter pylori)*에서 비롯되는 방법.

청구항 24

제 19항에 있어서, 푸코실-Gb5-OR^{1A}를 분리시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 25

제 1항에 있어서,

(viii) CMP-Neu5Ac 및 알파-2,3-시알릴트랜스퍼라제의 존재 하에 Gb5-OR^{1A}를 시알릴-Gb5-OR^{1A}로 전환시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 26

제 25항에 있어서,

(ix) CMP-Neu5Ac 재생 효소의 세트의 존재 하에 Neu5Ac로부터 CMP-Neu5Ac를 생성하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 CMP-Neu5Ac 재생 효소의 세트는 시티딘 모노포스페이트 키나제, CMP-시알산 합성효소, 피루베이트 키나제, 및 피로포스파타제를 포함하는 방법.

청구항 27

제 26항에 있어서, (viii) 및 (ix)가 Neu5Ac, CTP, PEP, Gb5-OR^{1A}, 알파-2,3-시알릴트랜스퍼라제, 및 CMP-Neu5Ac 재생 효소의 세트를 포함하는 시알릴-Gb5-합성 반응 혼합물에서 일어나는 방법.

청구항 28

제 27항에 있어서, 시알릴-Gb5-합성 반응 혼합물이 Gb5-합성 반응 혼합물을 Neu5Ac, CTP, 알파-2,3-시알릴트랜스퍼라제, 시티딘 모노포스페이트 키나제, CMP-시알산 합성효소 또는 이들의 조합과 혼합시킴에 의해 제조되는 방법.

청구항 29

제 25항에 있어서, 알파-2,3-시알릴트랜스퍼라제가 *M. 박테리아* (*M. bacteria*)에서 비롯되거나, 시티딘 모노포스페이트 키나제가 *E. 콜라이*로부터 비롯되거나, CMP-시알산 합성효소가 *P. 물토시다* (*P. Multocida*)로부터 비롯되는 방법.

청구항 30

제 25항에 있어서, 시알릴-Gb5-OR^{1A}를 분리시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 31

제 3항에 있어서,

(a) Gb3-합성 반응 혼합물을 GalNAc, 베타-1,3-N-아세틸갈락토스아미닐트랜스퍼라제, N-아세틸헥소사민 1-키나제, N-아세틸글루코사민 1-포스페이트 우리딜트랜스퍼라제 또는 이들의 조합과 혼합시켜 Gb4-합성 반응 혼합물을 형성하고,

(b) Gb4-합성 반응 혼합물을 Gb3-OR^{1A}에서 Gb4-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건 하에 인큐베이션시키고,

(c) Gb4-합성 반응 혼합물을 베타-1,3-갈락토실트랜스퍼라제의 존재 하에 Gb4-OR^{1A}에서 Gb5-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건 하에 추가로 인큐베이션시키고,

(d) (c)에서 생성된 Gb5-OR^{1A}-함유 반응 혼합물을 푸코스, GTP, 알파-1,2-푸코실트랜스퍼라제, L-푸코키나제/GDP-푸코스 피로포스포릴라제 또는 이들의 조합과 혼합시켜 푸코실-Gb5-OR^{1A} 반응 혼합물을 형성하고;

(e) 푸코실-Gb5-OR^{1A} 반응 혼합물을 Gb5-OR^{1A}에서 푸코실-Gb5-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건 하에 인큐베이션시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 32

제 3항에 있어서,

(a) Gb3-합성 반응 혼합물을 GalNAc, 베타-1,3-N-아세틸갈락토스아미닐트랜스퍼라제, N-아세틸헥소사민 1-키나제, N-아세틸글루코사민 1-포스페이트 우리딜트랜스퍼라제 또는 이들의 조합과 혼합시켜 Gb4-합성 반응 혼합물을 형성하고,

(b) Gb4-합성 반응 혼합물을 Gb3-OR^{1A}에서 Gb4-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건 하에 인큐베이션시키고,

(c) Gb4-OR^{1A}를 베타-1,3-갈락토실트랜스퍼라제 및 UDP-Gal 재생 효소의 세트와 반응시켜 Gb5-합성 반응 혼합물을 형성하고,

(d) Gb5-합성 반응 혼합물을 Gb4-OR^{1A}에서 Gb5-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건 하에 인큐베이션시키고,

(e) (d)에서 생성된 Gb5-OR^{1A}-함유 반응 혼합물을 푸코스, GTP, 알파-1,2-푸코실트랜스퍼라제, L-푸코키나제/GDP-푸코스 피로포스포릴라제 또는 이들의 조합과 혼합시켜 푸코실-Gb5-OR^{1A} 반응 혼합물을 형성하고;

(f) 푸코실-Gb5-OR^{1A} 반응 혼합물을 Gb5-OR^{1A}에서 푸코실-Gb5-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건 하에 인큐베이션시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 33

제 3항에 있어서,

(a) Gb3-합성 반응 혼합물을 GalNAc, 베타-1,3-N-아세틸갈락토스아미닐트랜스퍼라제, N-아세틸헥소사민 1-키나제, N-아세틸글루코사민 1-포스페이트 우리딜트랜스퍼라제 또는 이들의 조합과 혼합시켜 Gb4-합성 반응 혼합물을 형성하고,

(b) Gb4-합성 반응 혼합물을 Gb3-OR^{1A}에서 Gb4-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건 하에 인큐베이션시키고,

(c) Gb4-합성 반응 혼합물을 베타-1,3-갈락토실트랜스퍼라제의 존재 하에 Gb4-OR^{1A}에서 Gb5-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건 하에 추가로 인큐베이션시키고,

(d) (c)에서 생성된 Gb5-OR^{1A}-함유 반응 혼합물을 Neu5Ac, CTP, 알파-2,3-시알릴트랜스퍼라제, 시티딘 모노포스페이트 키나제, CMP-시알산 합성효소 또는 이들의 조합과 혼합시켜 시알릴-Gb5-OR^{1A} 반응 혼합물을 형성하고;

(e) 시알릴-Gb5-OR^{1A} 반응 혼합물을 Gb5-OR^{1A}에서 시알릴-Gb5-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건 하에 인큐베이션시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 34

제 3항에 있어서,

(a) Gb3-합성 반응 혼합물을 GalNAc, 베타-1,3-N-아세틸갈락토스아미닐트랜스퍼라제, N-아세틸헥소사민 1-키나제, N-아세틸글루코사민 1-포스페이트 우리딜트랜스퍼라제 또는 이들의 조합과 혼합시켜 Gb4-합성 반응 혼합물을 형성하고,

(b) Gb4-합성 반응 혼합물을 Gb3-OR^{1A}에서 Gb4-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건 하에 인큐베이션시키고;

(c) Gb4-OR^{1A}를 베타-1,3-갈락토실트랜스퍼라제 및 UDP-Gal 재생 효소의 세트와 혼합시켜 Gb5-합성 반응 혼합물을 형성하고;

(d) Gb5-합성 반응 혼합물을 Gb4-OR^{1A}에서 Gb5-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건 하에 인큐베이션시키고;

(e) Gb5-OR^{1A}를 알파-2,3-시알릴트랜스퍼라제 및 CMP-Neu5Ac 재생 효소의 세트와 혼합시켜 시알릴-Gb5-합성 반응 혼합물을 형성하고;

(f) 시알릴-Gb5-합성 반응 혼합물을 Gb5-OR^{1A}에서 시알릴-Gb5-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건 하에 인큐베이션시키는 것을 추가로 포함하며,

여기서 CMP-Neu5Ac 재생 효소의 세트는 시티딘 모노포스페이트 키나제, CMP-시알산 합성효소, 피루베이트 키나제, 및 피로포스파타제를 포함하는 방법.

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

제 1항에 있어서, 하나 이상의 효소가 지지 부재 상에 고정되어 있는 방법.

청구항 85

제 1항에 있어서, Lac-OR^{1A}, Gb3-OR^{1A}, Gb4-OR^{1A}, 또는 Gb5-OR^{1A}가 지지 부재 상에 고정되어 있는 방법.

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e)하에서, 2012년 8월 20일 출원되고 그 전문이 본원에 참조로서 포함된 미국 가특허출원 61/684,974호에 대한 우선권을 주장한다.

배 경 기 술

[0003] 글로보펜타오스 (Gb5), 푸코실-Gb5 (Globo H), 및 시알릴-Gb5 (SSEA4)은 글로보-시리즈 글리코스핑고리피드이고, 배양된 인간 기형암종 세포주에서 1983년에 최초로 발견되었고[1] 이어서 여러 악성 암에서 발견되었다.[2],[3] 보고서는 유방암 환자에서 61% 이하의 Globo H 과발현, 77.5%의 Gb5 과발현 및 95%의 SSEA4 과발현을 나타내었다.[4] 반면 HER2/neu 수용체를 간섭하는 치료용 모노클로날 항체 트라스투주맙 (헤르셉틴)에 대한 표적인 HER2 유전자는 유방암 환자에서 단지 25% 과발현된다.[5] 이러한 비교로부터 글리코스핑고리피드 항원 (Gb5 및 이의 유도체, Globo H 및 SSEA4)이 암 백신으로 개발되기에 양호한 후보임이 명백하게 입증되었다. 따라서, Globo H는 암 백신으로서 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH)에 컨쥬게이션되었고, 이는 현재 몇몇 국가에서 III기 임상 시험 중에 있다.[6]

[0004] Gb5, Globo H 및 SSEA4의 합성에 이용되는 현행 방법들은 여러 단점을 지닌다. 전통적인 화학적 합성은 장황하고 노동-소비적이며, 고순도 및 정확한 혈청형을 달성하는데 여러 보호 및 탈보호 단계가 필요하지만, 항상 매

우 낮은 총 수율을 발생시킨다. 지금까지 Globo H의 화학적 합성을 위한 많은 보고서가 존재한다.[7] [8] [9] [10] [11] [12] [13] [14] 그러나, 단 2개의 보고서만이 SSEA4 합성을 위해 공개되었다. Hsu 등은 SSEA-4의 글리칸 부분을 모으는 24% 수율의 원-포트 화학적 합성 접근방법을 보고하였다.[15] Zhen 등은 밀리그램 규모로 SSEA-4를 합성하는 화학효소적 방법의 이용을 보고하였다.[16] 반면, 를루아르-형 글리코실트랜스퍼라제에 기반한 Globo H의 효소적 합성은 글리코실화 반응을 촉매화하기 위한 공여체로서 활성 뉴클레오티드 당만을 필요로 한다. 그럼에도 불구하고, 뉴클레오티드 당은 대규모로 합성하기에 지나치게 고가이다. 더욱이, 부산물 피로포스페이트 및 뉴클레오시드 디포스페이트는 피로포스포릴라제[15] 및 를루아르-형 글리코실트랜스퍼라제의 뉴클레오티드 당 형성을 억제하므로; 재생 전략을 개발하는 방법은 그 한계를 극복하고 뉴클레오티드를 재부하시켜 반응을 계속하기 위한 구성 뉴클레오티드 당 생성물을 달성할 필요가 있다. 지난 몇 년 동안, 많은 그룹은 뉴클레오티드 당 재생의 주요 문제를 해결하기 위해 노력하였고 대부분의 당 뉴클레오티드 재생은 해결되었다. 그러나, 당 뉴클레오티드 재생의 기술을 향상시킬 약간의 여지가 여전히 존재하며, 특히 UDP-Gal 재생은 훨씬 어렵다. 예를 들어, UDP-Gal 재생은 UDP-Glc C4 에피머라제를 통해 UDP-Glc 및 UDP-Gal을 상호전환시키기 위해 Wong 및 Whiteside에 의해 1982년에 최초로 제안되었다.([17]). 10년 후, 우리 그룹은 이차 UDP-Gal 재생 방법을 개발하였다. UDP-Glc C4 에피머라제를 이용하는 대신, E. 콜라이(*E. coli*)의 갈락토스 오페론에 위치한 Glc-1-포스페이트 우리딜릴트랜스퍼라제를 이용하여 Gal-1-포스페이트 및 UDP-Glc를 Glc-1-포스페이트 및 UDP-Gal으로 교환시켰다.[18] 그러나, UTP 및 Gal-1-포스페이트를 직접 축합시켜 UDP-Gal을 형성하는 최종 경로는 적합한 효소의 부재로 인해 달성되지 못 했다. 표적 화합물 Gb5, Globo H 및 SSEA4가 Gal-관련 화합물이므로, UDP-Gal 재생의 주요 어려움을 극복하고 이의 효율을 증가시키는 방법은 Gb5, Globo H 및 SSEA4의 대규모 효소적 합성을 위한 중요한 포인트가 될 것이다.

[0005] 요약해 보면, 당 분야에서 Gb5, Globo H 및 SSEA4를 대규모 합성하는 현행 방법에는 여러 한계가 존재한다. 따라서, Gb5, Globo H, SSEA4, 및 이에 대한 중간체를 효율적인 방식으로 생성하는 신규한 합성 절차가 요구된다.

발명의 내용

[0006] **발명의 개요**

[0007] 본 발명은 신규한 뉴클레오티드 당 재생 공정의 개발 및 당 합성에서의 이의 적용에 기반한다. 적어도 하나의 뉴클레오티드 당 재생 시스템 (예컨대, 본원에 기재된 UDP-Gal 재생 시스템) 및 적어도 하나의 글리코실트랜스퍼라제 (예컨대, 갈락토실트랜스퍼라제)의 조합을 수반하는 그러한 당 합성 방법은 알릴-테일드 Gb3, Gb4, Gb5 (SSEA3로도 공지됨), 푸코실-Gb5 (Globo H로도 공지됨), 및 시알릴-Gb5 (SSEA4로도 공지됨)를 포함하는 다양한 올리고사카라이드 (테일드(tailed))를 예기치 않게 높은 효율과 수율로 합성하는데 이용되었다. 보다 구체적으로, 본원에 기재된 합성 접근방법은 뜻밖에도 연쇄 반응이 중간체를 정제할 필요 없이 Globo H 및SSEA4와 같은 최종 생성물을 생성하는 것을 가능케 한다.

[0008] 따라서, 본 발명의 한 양태는 UDP-Gal 재생 공정과 커플링된 갈락토실트랜스퍼라제의 작용을 통해 기질에 갈락토스를 첨가하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 (i) 일련의 UDP-Gal 재생 효소의 존재하에 갈락토스로부터 UDP-Gal을 생성하고 (여기서 UDP-Gal 재생 효소의 세트는 갈락토키나제, UDP-당 피로포스포릴라제, 피루베이트 키나제, 및 임의로, 피로포스파타제를 포함한다); (ii) UDP-Gal과 기질 분자 (예컨대, 다당류, 올리고사카라이드, 당단백질, 당지질, 또는 아글리콘)를 갈락토실트랜스퍼라제 (예컨대, 알파1,4-갈락토실트랜스퍼라제, 베타1,4-갈락토실트랜스퍼라제, 알파1,3-갈락토실트랜스퍼라제, 또는 베타1,3-갈락토실트랜스퍼라제)의 작용을 통해 반응시켜 갈락토스 잔기를 기질 분자에 첨가하고; 임의로, (iii) 이렇게 생성된 갈락토실화 생성물을 분리시키는 것을 포함한다. 단계 (i) 및 (ii)는 UDP-Gal 재생 효소의 세트, 갈락토실트랜스퍼라제, 기질 분자, 갈락토스, ATP, 및 UTP를 포함하는 반응 혼합물에서 일어날 수 있다. 일부 예에서, 기질 분자는 세라마이드 또는 글리코스핑고리피드이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 양태는 적어도 하나의 뉴클레오티드 당 재생 공정 (예컨대, UDP-Gal 재생) 및 단당류, 예컨대, 갈락토스 (Gal), N-아세틸갈락토코아민 (GalNAc), 푸코스 (Fuc), 및 시알산 (Neu5Ac)을 글리코실트랜스퍼라제, 예컨대, 갈락토실트랜스퍼라제, 푸코실트랜스퍼라제, 시알릴트랜스퍼라제, 및 N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제의 작용을 통해 적합한 수용체 상에 첨가하는 적어도 하나의 반응을 수반하는 올리고사카라이드를 합성하는 방법에 관한 것이다.

[0010] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 올리고사카라이드를 효소적으로 합성하는 방법은 출발 물질로서 락토스 (예컨대, 테일드)를 이용한다. 상기 방법은 (i) 일련의 UDP-Gal 재생 효소의 존재하에 갈락토스로부터 UDP-Gal을 생성하고 (여기서 UDP-Gal 재생 효소의 세트는 갈락토키나제 (예컨대, E. 콜라이로부터), UDP-당 피로포스포릴라제 (예컨대, A. 탈리아나(*A. 탈리아나*)로부터), 피루베이트 키나제 (예컨대, E. 콜라이로부터), 및 임의로, 피로포스파타제 (예컨대, E. 콜라이로부터)를 포함한다); (ii) UDP-Gal 및 알파-1,4 갈락토실트랜스퍼라제 (예컨대, N. 메닌지티데스(*N. meningitides*)에서 유래된 것과 같은 LgtC)의 존재하에 Lac-OR^{1A}를 Gb3-OR^{1A}로 전환시키는 것을 포함한다 (여기서 R^{1A}는 수소, 치환되거나 치환되지 않은 알킬, 치환되거나 치환되지 않은 알케닐, 치환되거나 치환되지 않은 알키닐, 치환되거나 치환되지 않은 카르보사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 아릴, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로아릴, 또는 산소 보호기이다). Lac-OR^{1A}는 락토스 (β-D-갈락토피라노실-(1→4)-D-글루코스) (예컨대, 또한 화학식 (I)에 포함되며, 각각의 R^{2A}, R^{3A}, R^{5A}, R^{2B}, R^{3B}, 및 R^{5B}는 수소이다)를 지칭하고, 여기서 락토스의 아노머 탄소에 부착된 기는 $-OR^{1A}$ 기이고, R^{1A}는 본원에 정의된 바와 같다.

[0011] R^{1A}의 예는 수소, 알릴, 바이오틴, 세라마이드, 또는 치환되거나 치환되지 않은 티오, 치환되거나 치환되지 않은 아미노, 카르보닐 (예컨대, 카르복실산), 아지도, 알케닐 (예컨대, 알릴), 알키닐 (예컨대, 프로파질), 바이오틴, 또는 세라마이드 기로 추가로 치환된 비-수소 기 (예컨대, 알킬)를 포함하지만 이로 한정되는 것은 아니다. 특정 구체예에서, R^{1A}는 수소, 알릴, 치환된 알킬, 바이오틴, 또는 세라마이드이다.

[0012] 필요한 경우, Gb3-OR^{1A}는 반응 혼합물로부터 분리될 수 있다.

[0013] 단계 (i) 및 (ii)는 갈락토스, PEP, ATP, UTP, Lac-OR^{1A}, 알파-1,4-갈락토실트랜스퍼라제, 및 UDP-Gal 재생 효소의 세트를 포함하는 Gb3-합성 반응 혼합물에서 일어날 수 있다. 일례에서, Gb3-합성 반응 혼합물 중 Lac-OR^{1A}와 갈락토스의 몰 비는 어떠한 효소 반응의 발생 전에 1:1이다.

[0014] 상기 기재된 임의의 방법은 하기를 추가로 포함할 수 있다: (iii) UDP-GalNAc 및 베타1,3-N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제 (예컨대, H. 인플루엔자(*H. influenza*)와 같은 적합한 유기체에서 유래된 LgtD)의 존재하에 Gb3-OR^{1A}를 Gb4-OR^{1A}로 전환시키고, 이는 (iv) 일련의 UDP-GalNAc 재생 효소의 존재하에 GalNAc로부터 UDP-GalNAc를 생성하는 것과 커플링될 수 있으며, 여기서 UDP-GalNAc 재생 효소의 세트는 N-아세틸헥소사민 1-키나제 (예컨대, B. 롱굼(*B. longum*)으로부터), N-아세틸글루코사민 1-포스페이트 우리딜트랜스퍼라제 (예컨대, E. 콜라이로부터), 및 피루베이트 키나제 (예컨대, E. 콜라이로부터), 및 임의로, 피로포스파타제 (예컨대, E. 콜라이로부터)를 포함한다. 단계 (iii) 및 (iv)는 GalNAc, PEP, ATP, UTP, Gb3-OR^{1A}, 베타1,3-N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제, 및 UDP-GalNAc 재생 효소의 세트를 포함하는 Gb4-합성 반응 혼합물에서 수행될 수 있다. 일례에서, Gb4-합성 반응 혼합물은 Gb3-합성 반응 혼합물을 적어도 GalNAc, 베타1,3-N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제, N-아세틸헥소사민 1-키나제, 및 N-아세틸글루코사민 1-포스페이트 우리딜트랜스퍼라제와 혼합시킴에 의해 제조된다. 필요한 경우, Gb4-OR^{1A}는 반응 혼합물로부터 분리될 수 있다.

[0015] Gb4-OR^{1A}의 합성 후에, 상기 기재된 방법은 하기를 추가로 포함할 수 있다: (v) UDP-Gal 및 베타1,3-갈락토실트랜스퍼라제 (예컨대, H. 인플루엔자로부터 유래된 것과 같은 LgtD)의 존재하에 Gb4-OR^{1A}를 Gb5-OR^{1A}로 전환시키고, 이는 (vi) 본원에 기재된 UDP-Gal 재생 효소의 세트의 존재하에 갈락토스로부터 UDP-Gal을 생성하는 것과 커플링될 수 있다. 일례에서, (v) 및 (vi)는 갈락토스, PEP, ATP, UTP, Gb4-OR^{1A}, 베타1,3-갈락토실트랜스퍼라제, 및 UDP-Gal 재생 효소의 세트를 포함하는 Gb5-합성 반응 혼합물에서 일어날 수 있다. 생성된 Gb5-OR^{1A}는 반응 혼합물로부터 분리될 수 있다.

[0016] 상기 방법은 이렇게 수득된 Gb5-OR^{1A}를 전환시켜 푸코실-Gb5-OR^{1A} (Globo H) 또는 시알릴-Gb5-OR^{1A} (SSEA4)를 수득하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0017] Globo H 합성이 경우, 상기 방법은 하기를 포함할 수 있다: (vii) GDP-Fuc 및 알파1,2-푸코실트랜스퍼라제 (예컨대, H. 파일로르(*H. pylor*)로부터)의 존재하에 Gb5-OR^{1A}를 푸코실-Gb5-OR^{1A}로 전환시키고, 이는 (viii) 일련의

GDP-Fuc 재생 효소의 존재하에 푸코스로부터 GDP-Fuc를 생성하는 것과 커플링될 수 있으며, 여기서 GDP-Fuc 재생 효소의 세트는 L-푸코키나제/GDP-푸코스 피로포스포릴라제 (예컨대, B. 프라질리스(*B. fragilis*)로부터), 피루베이트 키나제 (예컨대, E. 콜라이로부터), 및 피로포스파타제 (예컨대, E. 콜라이로부터)를 포함한다. 일례에서, 단계 (vii) 및 (viii)은 푸코스, ATP, GTP, PEP, Gb5-OR, 알파1,2-푸코실트랜스퍼라제, 및 GDP-Fuc 재생 효소의 세트를 포함하는 푸코실-Gb5-합성 반응 혼합물에서 일어난다. 푸코실-Gb5-합성 반응 혼합물은 Gb5-합성 반응 혼합물을 적어도 푸코스, GTP, 알파1,2-푸코실트랜스퍼라제, 및 L-푸코키나제/GDP-푸코스 피로포스포릴라제를 혼합시킴에 의해 제조될 수 있다. 필요한 경우, 생성된 푸코실-Gb5-OR^{1A}는 반응 혼합물로부터 분리될 수 있다.

[0018] SSEA4 합성의 경우, 상기 방법은 (ix) CMP-Neu5Ac 및 알파2,3-시알릴트랜스퍼라제 (예컨대, M. 박테리아(*M. bacteria*)로부터)의 존재하에 Gb5-OR^{1A}를 시알릴-Gb5-OR^{1A}로 전환시키고, (x) 일련의 CMP-Neu5Ac 재생 효소의 존재하에 Neu5Ac로부터 CMP-Neu5Ac를 생성하는 것을 추가로 포함할 수 있고, 여기서 CMP-Neu5Ac 재생 효소의 세트는 시티딘 모노포스페이트 키나제 (예컨대, E. 콜라이로부터), CMP-시알산 합성효소 (예컨대, P. 물토시다(*P. Multocida*)로부터), 피루베이트 키나제 (예컨대, E. 콜라이로부터), 및 임의로 피로포스파타제 (예컨대, E. 콜라이로부터)를 포함한다. 단계 (ix) 및 (x)는 Neu5Ac, CTP, PEP, Gb5-OR^{1A}, 알파2,3-시알릴트랜스퍼라제, 및 CMP-Neu5Ac 재생 효소의 세트를 포함하는 시알릴-Gb5-합성 반응 혼합물에서 일어날 수 있다. 시알릴-Gb5-합성 반응 혼합물은 Gb5-합성 반응 혼합물을 적어도 Neu5Ac, CTP, 알파2,3-시알릴트랜스퍼라제, 시티딘 모노포스페이트 키나제, 및 CMP-시알산 합성효소와 혼합시킴에 의해 제조된다. 시알릴-Gb5-OR^{1A}는 그 후에 반응 혼합물로부터 분리될 수 있다.

[0019] 일례에서, Globo H를 합성하는 방법은 하기와 같이 수행될 수 있다: (i) 본원에 기재된 대로 UDP-Gal 재생 효소의 존재하에 갈락토스로부터 UDP-Gal을 생성하고, (ii) 적어도 UDP-Gal, 알파-1,4 갈락토실트랜스퍼라제, 및 UDP-Gal 재생 효소를 포함하는 Gb3-합성 반응 혼합물에서 본원에 기재된 Lac-OR^{1A}를 Gb3-OR^{1A}로 전환시키고, (iii) Gb3-합성 반응 혼합물을 적어도 GalNAc, 베타1,3-N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제, N-아세틸헥소사민 1-키나제, 및 N-아세틸글루코사민 1-포스페이트 우리딜트랜스퍼라제와 혼합시켜 Gb4-합성 반응 혼합물을 형성하고, (iv) Gb4-합성 반응 혼합물을 Gb3-OR^{1A}에서 Gb4-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건하에 인큐베이션시키고, (v) Gb4-합성 반응 혼합물을 β-1,3-갈락토실트랜스퍼라제의 존재하에 Gb4-OR^{1A}에서 Gb5-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건하에 추가로 인큐베이션시키고, (vi) Gb5-OR^{1A}-함유 반응 혼합물을 적어도 푸코스, GTP, 알파1,2-푸코실트랜스퍼라제, 및 L-푸코키나제/GDP-푸코스 피로포스포릴라제와 혼합시켜 푸코실-Gb5-OR^{1A} 반응 혼합물을 형성하고; (vii) 푸코실-Gb5-OR^{1A} 반응 혼합물을 Gb5-OR^{1A}에서 푸코실-Gb5-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건하에 인큐베이션시키고, 및 임의로, (viii) 푸코실-Gb5-OR^{1A}를 분리시킨다.

[0020] 또 다른 예에서, Globo H를 합성하는 방법은 다음과 같이 수행될 수 있다: (i) 본원에 기재된 대로 UDP-Gal 재생 효소의 존재하에 갈락토스로부터 UDP-Gal을 생성하고, (ii) 적어도 UDP-Gal, 알파-1,4 갈락토실트랜스퍼라제, 및 UDP-Gal 재생 효소를 포함하는 Gb3-합성 반응 혼합물에서 본원에 기재된 Lac-OR^{1A}를 Gb3-OR^{1A}로 전환시키고, (iii) Gb3-합성 반응 혼합물을 적어도 GalNAc, 베타1,3-N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제, N-아세틸헥소사민 1-키나제, 및 N-아세틸글루코사민 1-포스페이트 우리딜트랜스퍼라제와 혼합시켜 Gb4-합성 반응 혼합물을 형성하고, (iv) Gb4-합성 반응 혼합물을 Gb3-OR^{1A}에서 Gb4-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건하에 인큐베이션시키고, (v) Gb4-OR^{1A}를 분리시키고; (vi) Gb4-OR^{1A}를 베타1,3-갈락토실트랜스퍼라제 및 UDP-Gal 재생 효소의 세트와 혼합시켜 Gb5-합성 반응 혼합물을 형성하고; (vii) Gb5-합성 반응 혼합물을 Gb4-OR^{1A}에서 Gb5-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건하에 인큐베이션시키고, (viii) Gb5-합성 반응 혼합물을 적어도 푸코스, GTP, 알파1,2-푸코실트랜스퍼라제, 및 L-푸코키나제/GDP-푸코스 피로포스포릴라제와 혼합시켜 푸코실-Gb5-OR^{1A} 반응 혼합물을 형성하고; (ix) 푸코실-Gb5-OR^{1A} 반응 혼합물을 Gb5-OR^{1A}에서 푸코실-Gb5-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건하에 인큐베이션시키고, 임의로, (x) 푸코실-Gb5-OR^{1A}를 분리시킨다.

[0021] SSEA4를 합성하는 방법은 다음과 같이 수행될 수 있다: (i) 본원에 기재된 대로 UDP-Gal 재생 효소의 존재하에

갈락토스로부터 UDP-Gal을 생성하고, (ii) 적어도 UDP-Gal, 알파-1,4 갈락토실트랜스퍼라제, 및 UDP-Gal 재생 효소를 포함하는 Gb3-합성 반응 혼합물에서 본원에 기재된 Lac-OR^{1A}를 Gb3-OR^{1A}로 전환시키고, (iii) Gb3-합성 반응 혼합물을 적어도 GalNAc, 베타1,3-N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제, N-아세틸헥소사민 1-키나제, 및 N-아세틸글루코사민 1-포스페이트 우리딜트랜스퍼라제와 혼합시켜 Gb4-합성 반응 혼합물을 형성하고, (iv) Gb4-합성 반응 혼합물을 Gb3-OR^{1A}에서 Gb4-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건하에 인큐베이션시키고, (v) Gb4-합성 반응 혼합물을 β-1,3-갈락토실트랜스퍼라제의 존재하에 Gb4-OR^{1A}에서 Gb5-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건하에 추가로 인큐베이션시키고, (vi) Gb4-합성 반응 혼합물을 적어도 Neu5Ac, CTP, 알파2,3-시알릴트랜스퍼라제, 시티딘 모노포스페이트 키나제, 및 CMP-시알산 합성효소와 혼합시켜 시알릴-Gb5-OR^{1A} 반응 혼합물을 형성하고; (vii) 시알릴-Gb5-OR^{1A} 반응 혼합물을 Gb5-OR^{1A}에서 시알릴-Gb5-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건하에 인큐베이션시키고, 임의로, (viii) 시알릴-Gb5-OR^{1A}를 분리시킨다.

[0022] 대안적으로, SSEA4를 합성하는 방법은 다음과 같이 수행될 수 있다: (i) 본원에 기재된 대로 UDP-Gal 재생 효소의 존재하에 갈락토스로부터 UDP-Gal을 생성하고, (ii) 적어도 UDP-Gal, 알파-1,4 갈락토실트랜스퍼라제, 및 UDP-Gal 재생 효소를 포함하는 Gb3-합성 반응 혼합물에서 본원에 기재된 Lac-OR^{1A}를 Gb3-OR^{1A}로 전환시키고, (iii) Gb3-합성 반응 혼합물을 적어도 GalNAc, 베타1,3-N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제, N-아세틸헥소사민 1-키나제, 및 N-아세틸글루코사민 1-포스페이트 우리딜트랜스퍼라제와 혼합시켜 Gb4-합성 반응 혼합물을 형성하고, (iv) Gb4-합성 반응 혼합물을 Gb3-OR^{1A}에서 Gb4-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건하에 인큐베이션시키고, (v) Gb4-OR^{1A}를 분리시키고; (vi) Gb4-OR^{1A}를 베타1,3-갈락토실트랜스퍼라제 및 UDP-Gal 재생 효소의 세트와 혼합시켜 Gb5-합성 반응 혼합물을 형성하고; (vii) Gb5-합성 반응 혼합물을 Gb4-OR^{1A}에서 Gb5-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건하에 인큐베이션시키고, (viii) Gb5-OR^{1A}를 알파2,3시알릴트랜스퍼라제 및 일련의 CMP-Neu5Ac 재생 효소와 혼합시켜 시알릴-Gb5-합성 반응 혼합물을 형성하고 (여기서 CMP-Neu5Ac 재생 효소의 세트는 시티딘 모노포스페이트 키나제, CMP-시알산 합성효소, 피루베이트 키나제, 및 피로포스파타제를 포함한다); (ix) 시알릴-Gb5-합성 반응 혼합물을 Gb4-OR^{1A}에서 시알릴-Gb5-OR^{1A}로의 전환을 허용하는 조건하에 인큐베이션시키고, 임의로, (x) 시알릴-Gb5-OR^{1A}를 분리시킨다.

[0023] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 올리고사카라이드를 효소적으로 합성하는 방법은 출발 물질로서 Gb3 (예컨대, 테일드)을 이용한다. 상기 방법은 (i) 상기 기재된 UDP-GalNAc 재생 효소의 세트의 존재하에 GalNAc로부터 UDP-GalNAc를 생성하고, UDP-GalNAc 및 베타1,3-N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제의 존재하에 Gb3-OR^{1A}를 Gb4-OR^{1A}로 전환시키는 것을 포함한다 (여기서 R^{1A}은 수소, 치환되거나 치환되지 않은 알킬, 치환되거나 치환되지 않은 알케닐, 치환되거나 치환되지 않은 알키닐, 치환되거나 치환되지 않은 카르보사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 아릴, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로아릴, 또는 산소 보호기이다). R^{1A}의 예는 수소, 알릴, 바이오틴, 세라마이드, 또는 치환되거나 치환되지 않은 티오, 치환되거나 치환되지 않은 아미노, 카르보닐 (예컨대, 카르복실산), 아지도, 알케닐 (예컨대, 알릴), 알키닐 (예컨대, 프로파질), 바이오틴, 또는 세라마이드 기로 추가로 치환된 비-수소 기 (예컨대, 알킬)를 포함하지만 이로 한정되는 것은 아니다. 특정 구체예에서, R^{1A}는 수소, 알릴, 치환된 알킬, 바이오틴, 또는 세라마이드이다. 단계 (i) 및 (ii)는 GalNAc, PEP, ATP, UTP, Gb3-OR^{1A}, 베타1,3-N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제, 및 UDP-GalNAc 재생 효소의 세트를 포함하는 Gb4-합성 반응 혼합물에서 일어날 수 있다. Gb4-OR^{1A}는 필요한 경우 분리될 수 있다.

[0024] 상기 방법은 하기를 추가로 포함할 수 있다: (iii) UDP-Gal 및 베타1,3-갈락토실트랜스퍼라제의 존재하에 Gb4-OR^{1A}를 Gb5-OR^{1A}로 전환시키고, 이는 (iv) 본원에 기재된 UDP-Gal 재생 효소의 세트의 존재하에 갈락토스로부터 UDP-Gal을 생성하는 것과 커플링될 수 있다. (iii) 및 (iv)는 갈락토스, PEP, ATP, UTP, Gb4-OR^{1A}, 베타1,3-갈락토실트랜스퍼라제, 및 UDP-Gal 재생 효소의 세트를 포함하는 Gb5-합성 반응 혼합물에서 일어날 수 있다. 생성된 Gb5-OR^{1A}는 반응 혼합물로부터 분리될 수 있다.

[0025] 일례에서, Gb5-OR^{1A}는 이어서 다음과 같이 푸코실-Gb5-OR^{1A}로 전환된다: (v) GDP-Fuc 및 알파1,2-푸코실트랜스퍼

라제의 존재하에 Gb5-OR^{1A}를 푸코실-Gb5-OR^{1A}로 전환시키고, 이는 본원에 기재된 GDP-Fuc 재생 효소의 세트의 존재하에 푸코스로부터 GDP-Fuc를 생성하는 것과 커플링될 수 있다. 단계 (v) 및 (vi)은 푸코스, ATP, GTP, PEP, Gb5-OR^{1A}, 알파1,2-푸코실트랜스퍼라제, 및 GDP-Fuc 재생 효소의 세트를 포함하는 푸코실-Gb5-합성 반응 혼합물에서 수행될 수 있다. 요망되는 경우, 푸코실-Gb5-합성 반응 혼합물은 Gb5-합성 반응 혼합물을 적어도 푸코스, GTP, 알파1,2-푸코실트랜스퍼라제, 및 L-푸코키나제/GDP-푸코스 피로포스포릴라제와 혼합시킴에 의해 제조된다. 상기 방법은 푸코실-Gb5-OR^{1A}를 분리시키는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0026] 또 다른 예에서, 그 후 Gb5-OR^{1A}는 다음과 같이 시알릴-Gb5-OR^{1A}로 전환된다: (vii) CMP-Neu5Ac 및 알파2,3-시알릴트랜스퍼라제의 존재하에 Gb5-OR^{1A}를 시알릴-Gb5-OR^{1A}로 전환시키고, 이는 본원에 기재된 CMP-Neu5Ac 재생 효소의 세트의 존재하에 Neu5Ac로부터 CMP-Neu5Ac를 생성하는 것과 커플링될 수 있다. 단계 (vii) 및 (viii)은 Neu5Ac, CTP, PEP, Gb5-OR^{1A}, 알파2,3-시알릴트랜스퍼라제, 및 CMP-Neu5Ac 재생 효소의 세트를 포함하는 시알릴-Gb5-합성 반응 혼합물에서 일어날 수 있다. 일부 예에서, 시알릴-Gb5-합성 반응 혼합물은 Gb5-합성 반응 혼합물을 적어도 Neu5Ac, CTP, 알파2,3-시알릴트랜스퍼라제, 시티딘 모노포스페이트 키나제, 및 CMP-시알산 합성효소와 혼합시킴에 의해 제조된다. 생성된 시알릴-Gb5-OR^{1A}는 반응 혼합물로부터 분리될 수 있다.

[0027] 또한 다른 구체예에서, 본원에 기재된 방법은 Gb4 (예컨대, 테일드)를 출발 물질로서 이용하여 올리고사카라이드를 합성하는 것에 관한 것이다. 그러한 방법은 (i) 본원에 기재된 UDP-Gal 재생 효소의 세트의 존재하에 갈락토스로부터 UDP-Gal을 생성하고, (ii) UDP-Gal 및 베타1,3-갈락토실트랜스퍼라제의 존재하에 Gb4-OR^{1A}를 Gb5-OR^{1A}로 전환시키는 것을 포함한다 (여기서 R^{1A}는 수소, 치환되거나 치환되지 않은 알킬, 치환되거나 치환되지 않은 알케닐, 치환되거나 치환되지 않은 알키닐, 치환되거나 치환되지 않은 카르보사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 아릴, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로아릴, 또는 산소 보호기이다). R^{1A}의 예는 수소, 알릴, 바이오틴, 세라마이드, 또는 치환되거나 치환되지 않은 티오, 치환되거나 치환되지 않은 아미노, 카르보닐 (예컨대, 카르복실산), 아지도, 알케닐 (예컨대, 알릴), 알키닐 (예컨대, 프로파질), 바이오틴, 또는 세라마이드 기로 추가로 치환된 비-수소 기 (예컨대, 알킬)를 포함하지만 이로 한정되는 것은 아니다. 특정 구체예에서, R^{1A}는 수소, 알릴, 치환된 알킬, 바이오틴, 또는 세라마이드이다. 이러한 방법에서, 단계 (i) 및 (ii)는 갈락토스, PEP, ATP, UTP, Gb4-OR^{1A}, 베타1,3-갈락토실트랜스퍼라제, 및 UDP-Gal 재생 효소의 세트를 포함하는 Gb5-합성 반응 혼합물에서 일어날 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 이렇게 생성된 Gb5-OR^{1A}는 분리될 수 있다.

[0028] 상기 방법은 하기를 추가로 포함할 수 있다: (iii) GDP-Fuc 및 알파1,2-푸코실트랜스퍼라제의 존재하에 Gb5-OR^{1A}를 푸코실-Gb5-OR^{1A}로 전환시키고, 이는 역시 본원에 기재된, (iv) GDP-Fuc 재생 효소의 세트의 존재하에 푸코스로부터 GDP-Fuc를 생성하는 것과 커플링될 수 있다. 단계 (iii) 및 (iv)는 푸코스, ATP, GTP, PEP, Gb5-OR^{1A}, 알파1,2-푸코실트랜스퍼라제, 및 GDP-Fuc 재생 효소의 세트를 포함하는 푸코실-Gb5-합성 반응 혼합물에서 일어날 수 있다. 푸코실-Gb5-합성 반응 혼합물은 Gb5-합성 반응 혼합물을 적어도 푸코스, GTP, 알파1,2-푸코실트랜스퍼라제, 및 L-푸코키나제/GDP-푸코스 피로포스포릴라제와 혼합시킴에 의해 제조된다. 생성된 푸코실-Gb5-OR^{1A}는 반응 혼합물로부터 분리될 수 있다.

[0029] 대안적으로, 상기 방법은 하기를 추가로 포함할 수 있다: (v) CMP-Neu5Ac 및 알파2,3-시알릴트랜스퍼라제의 존재하에 Gb5-OR^{1A}를 시알릴-Gb5-OR^{1A}로 전환시키고, 이는 (v) 본원에 기재된 CMP-Neu5Ac 재생 효소의 세트의 존재하에 Neu5Ac로부터 CMP-Neu5Ac를 생성하는 것과 커플링될 수 있다. 단계 (v) 및 (vi)은 Neu5Ac, CTP, PEP, Gb5-OR^{1A}, 알파2,3-시알릴트랜스퍼라제, 및 CMP-Neu5Ac 재생 효소의 세트를 포함하는 시알릴-Gb5-합성 반응 혼합물에서 일어날 수 있다. 시알릴-Gb5-합성 반응 혼합물은 Gb5-합성 반응 혼합물을 적어도 Neu5Ac, CTP, 알파2,3-시알릴트랜스퍼라제, 시티딘 모노포스페이트 키나제, 및 CMP-시알산 합성효소를 혼합시킴에 의해 제조된다. 이러한 방법으로 생성된 시알릴-Gb5-OR^{1A}는 반응 혼합물로부터 분리될 수 있다.

[0030] 일부 다른 구체예에서, 본원에 기재된 방법은 Gb5로부터 푸코실-Gb5 올리고사카라이드 (Globo H)의 합성에 관한 것이다. 상기 방법은 (i) 본원에 기재된 GDP-Fuc 재생 효소의 세트의 존재하에 푸코스로부터 GDP-Fuc를 생성하

고, (ii) GDP-Fuc 및 알파1,2-푸코실트랜스퍼라제의 존재하에 Gb5-OR^{1A}을 푸코실-Gb5-OR^{1A}로 전환시키고, 임의로, (iii) 푸코실-Gb5-OR^{1A}. 분리시키는 것을 포함한다. 단계 (i) 및 (ii)는 푸코스, ATP, GTP, PEP, Gb5-OR^{1A}, 알파1,2-푸코실트랜스퍼라제, 및 GDP-Fuc 재생 효소의 세트를 포함하는 푸코실-Gb5-합성 반응 혼합물에서 일어날 수 있다.

[0031] 일부 다른 구체예에서, 본원에 기재된 방법은 Gb5로부터 시알릴-Gb5 올리고사카라이드 (Globo H)의 합성에 관한 것이다. 상기 방법은 (i) 본원에 기재된 CMP-Neu5Ac 재생 효소의 세트의 존재하에 Neu5Ac로부터 CMP-Neu5Ac를 생성하고, (ii) CMP-Neu5Ac 및 알파2,3-시알릴트랜스퍼라제의 존재하에 Gb5-OR^{1A}를 시알릴-Gb5-OR^{1A}로 전환시키고, 임의로, (iii) 시알릴-Gb5-OR^{1A}를 분리시키는 것을 포함한다. 단계 (i) 및 (ii)는 Neu5Ac, CTP, PEP, Gb5-OR, 알파2,3-시알릴트랜스퍼라제, 및 CMP-Neu5Ac 재생 효소의 세트를 포함하는 시알릴-Gb5-합성 반응 혼합물에서 일어날 수 있다.

[0032] 본원에 기재된 임의의 합성 방법에서, 수반된 효소들 중 적어도 하나 및 각 반응의 기질들 중 적어도 하나 (예컨대, 락토스, Gb3, Gb4, 또는 Gb5)는 지지 부재에 고정될 수 있다.

[0033] 본 발명의 또 다른 양태는 본원에 기재된 방법을 이용하여 올리고사카라이드를 합성하기 위한 효소 반응기를 특징으로 한다. 그러한 효소 반응기는 하기 반응 챔버들 중 하나 이상을 포함할 수 있다:

[0034] (a) Gb3-OR^{1A}를 합성하기 위한 반응 챔버 (여기서 챔버는 알파1,4-갈락토실트랜스퍼라제, 및 갈락토키나제, UDP-당 피로포스포릴라제, 피루베이트 키나제, 및 임의로 피로포스파타제를 포함하는 일련의 UDP-Gal 재생 효소를 포함한다);

[0035] (b) Gb4-OR^{1A}를 합성하기 위한 반응 챔버 (여기서 챔버는 베타1,3-N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제, 및 N-아세틸헥소사민 1-키나제, N-아세틸글루코사민 1-포스페이트 우리딜릴트랜스퍼라제, 피루베이트 키나제, 및 임의로 피로포스파타제를 포함하는 일련의 UDP-GalNAc 재생 효소를 포함한다);

[0036] (c) Gb5-OR^{1A}를 합성하기 위한 반응 챔버 (여기서 챔버는 베타1,3-갈락토실트랜스퍼라제, 및 UDP-Gal 재생 효소의 세트를 포함한다);

[0037] (d) 푸코실-Gb5-OR^{1A}를 합성하기 위한 반응 챔버 (여기서 챔버는 알파1,2-푸코실트랜스퍼라제, 및 L-푸코키나제/GDP-푸코스 피로포스포릴라제, 피루베이트 키나제, 및 임의로 피로포스파타제를 포함하는 일련의 GDP-Fuc 재생 효소를 포함한다); 및

[0038] (e) 시알릴-Gb5-OR^{1A}를 합성하기 위한 반응 챔버 (여기서 챔버는 알파2,3-시알릴트랜스퍼라제, 및 시티딘 모노포스페이트 키나제, CMP-시알산 합성효소, 피루베이트 키나제, 및 임의로 피로포스파타제를 포함하는 일련의 CMP-Neu5Ac 재생 효소를 포함한다).

[0039] 일부 예에서, 효소 반응기는 반응 챔버 (a) 및 (b); (a), (b), 및 (c); (a), (b), (c), 및 (d); (a), (b), (c), 및 (e); (b) 및 (c); (b), (c), 및 (d); (b), (c), 및 (e); (c) 및 (d); 또는 (c) 및 (e)를 포함한다.

[0040] 또 다른 예에서, 본원에 기재된 효소 반응기는 갈락토실트랜스퍼라제 (예컨대, 알파1,4-갈락토실트랜스퍼라제, 베타1,4-갈락토실트랜스퍼라제, 알파1,3-갈락토실트랜스퍼라제, 또는 베타1,3-갈락토실트랜스퍼라제), 및 갈락토키나제, UDP 피로포스포릴라제, 피루베이트 키나제, 및 임의로 피로포스파타제를 포함할 수 있는 본원에 기재된 일련의 UDP-Gal 재생 효소를 포함하는 반응 챔버를 포함한다.

[0041] 임의의 반응 챔버에서, 효소들 중 하나 이상은 지지 부재 상에 고정될 수 있다. 일부 예에서, UDP-Gal 재생 효소의 세트, UDP-GalNAc 재생 효소의 세트, GDP-Fuc 재생 효소의 세트, 및 CMP-Neu5Ac 재생 효소의 세트 중 하나 이상은 각각 지지 부재 상에 고정된다. 다른 예에서, 반응 챔버에 있는 효소 전부가 지지 부재 상에 고정된다.

[0042] 또한 본원에 기재된 임의의 합성 방법으로부터 수득된 올리고사카라이드가 본 발명의 범위 내에 있다.

[0043] 본 발명의 하나 이상의 구체예의 설명은 하기 기재된 특정 구체예의 상세한 설명에 개시된다. 본 발명의 그 밖의 특징, 목적, 및 장점은 정의, 도면, 실시예, 및 청구항으로부터 자명할 것이다.

[0044] **화학적 정의**

[0045] 특수한 작용기 및 화학적 용어의 정의는 하기에 보다 상세하게 기재된다. 화학 원소는 원소 주기율표[CAS version, Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed., 표지 뒷면]에 따라 식별되고, 특수한 작용기는 그 안에 기재된 바와 같이 일반적으로 정의된다. 추가로, 유기 화학의 일반적인 원리 뿐만 아니라 특정 기능 모이어티 및 반응성은 문헌[*Organic Chemistry*, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999; Smith and March *March's Advanced Organic Chemistry*, 5th Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001; Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers, Inc., New York, 1989; and Carruthers, *Some Modern Methods of Organic Synthesis*, 3rd Edition, Cambridge University Press, Cambridge, 1987]에 기재되어 있다.

[0046] 본원에 기재된 화합물은 하나 이상의 비대칭 중심을 포함할 수 있으므로, 다양한 입체이성질체 형태, 예컨대, 거울상이성질체 및/또는 부분입체이성질체로 존재할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 화합물은 개별적인 거울상이성질체, 부분입체이성질체 또는 기하이성질체의 형태일 수 있거나, 라세미 혼합물 및 하나 이상의 부분입체이성질체가 풍부한 혼합물을 포함하는, 입체이성질체의 혼합물의 형태일 수 있다. 이성질체는 키랄 고압 액체 크로마토그래피(HPLC) 및 키랄 염의 형성 및 결정화를 포함하는 당업자에게 공지된 방법에 의해 혼합물로부터 분리될 수 있거나; 바람직한 이성질체는 비대칭 합성에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Jacques *et al., Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley Interscience, New York, 1981); Wilen *et al., Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, E.L. *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGraw-Hill, NY, 1962); and Wilen, S.H. *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972)]을 참조하라. 본 발명은 추가로 다른 이성질체가 실질적으로 없는 개별적인 이성질체, 및 대안적으로 다양한 이성질체의 혼합물로서의 화합물을 포함한다.

[0047] 값의 범위가 열거된 경우, 각각의 값 및 그 범위 내에 있는 부분 범위를 포함하고자 한다. 예를 들어 "C_{1-6} 알킬"은 C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_{1-6}, C_{1-5}, C_{1-4}, C_{1-3}, C_{1-2}, C_{2-6}, C_{2-5}, C_{2-4}, C_{2-3}, C_{3-6}, C_{3-5}, C_{3-4}, C_{4-6}, C_{4-5}, 및 C_{5-6} 알킬을 포함하기 위한 것이다.

[0048] 본원에서 사용된 "알킬"은 1 내지 30개의 탄소 원자를 지니는 직쇄 또는 분지된 포화된 탄화수소기의 라디칼을 지칭한다 ("C_{1-30} 알킬"). 일부 구체예에서, 알킬기는 1 내지 20개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{1-20} 알킬"). 일부 구체예에서, 알킬기는 1 내지 10개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{1-10} 알킬"). 일부 구체예에서, 알킬기는 1 내지 9개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{1-9} 알킬"). 일부 구체예에서, 알킬기는 1 내지 8개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{1-8} 알킬"). 일부 구체예에서, 알킬기는 1 내지 7개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{1-7} 알킬"). 일부 구체예에서, 알킬기는 1 내지 6개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{1-6} 알킬"). 일부 구체예에서, 알킬기는 1 내지 5개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{1-5} 알킬"). 일부 구체예에서, 알킬기는 1 내지 4개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{1-4} 알킬"). 일부 구체예에서, 알킬기는 1 내지 3개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{1-3} 알킬"). 일부 구체예에서, 알킬기는 1 내지 2개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{1-2} 알킬"). 일부 구체예에서, 알킬기는 1개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_1 알킬"). 일부 구체예에서, 알킬기는 2 내지 6개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{2-6} 알킬"). C_{1-6} 알킬기의 예는 메틸 (C_1), 에틸 (C_2), n-프로필 (C_3), 이소프로필 (C_3), n-부틸 (C_4), 3차-부틸 (C_4), 2차-부틸 (C_4), 이소-부틸 (C_4), n-펜틸 (C_5), 3-펜타닐 (C_5), 아밀 (C_5), 네오펜틸 (C_5), 3-메틸-2-부타닐 (C_5), 3차 아밀 (C_5), 및 n-헥실 (C_6)을 포함한다. 알킬기의 추가의 예는 n-헵틸 (C_7), n-옥틸 (C_8) 등을 포함한다. 달리 명시되지 않는 한, 알킬기의 각각의 예는 독립적으로 치환되지 않거나 ("치환되지 않은 알킬") 하나 이상의 치환기로 치환된다 ("치환된 알킬"). 특정 구체예에서, 알킬기는 치환되지 않은 C_{1-10} 알킬이다 (예컨대, $-CH_3$). 특정 구체예에서, 알킬기는 치환된 C_{1-10} 알킬이다.

[0049] 본원에서 사용된 "알케닐" 또는 "알켄"은 2 내지 30개의 탄소 원자 및 하나 이상의 이중 결합 (예컨대, 1, 2, 3, 또는 4개 이중 결합)을 지니는 직쇄 또는 분지된 탄화수소기의 라디칼을 지칭한다. 일부 구체예에서, 알케닐기는 2 내지 20개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{2-20} 알케닐"). 일부 구체예에서, 알케닐기는 2 내지 10개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{2-10} 알케닐"). 일부 구체예에서, 알케닐기는 2 내지 9개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{2-9}

알케닐"). 일부 구체예에서, 알케닐기는 2 내지 8개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{2-8} 알케닐"). 일부 구체예에서, 알케닐기는 2 내지 7개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{2-7} 알케닐"). 일부 구체예에서, 알케닐기는 2 내지 6개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{2-6} 알케닐"). 일부 구체예에서, 알케닐기는 2 내지 5개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{2-5} 알케닐"). 일부 구체예에서, 알케닐기는 2 내지 4개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{2-4} 알케닐"). 일부 구체예에서, 알케닐기는 2 내지 3개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{2-3} 알케닐"). 일부 구체예에서, 알케닐기는 2개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_2 알케닐"). 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합은 내부에 있거나 (예컨대, 2-부테닐에서) 말단에 있을 수 있다 (예컨대, 1-부테닐에서). C_{2-4} 알케닐기의 예는 에테닐 (C_2), 1-프로페닐 ("알릴", C_3), 2-프로페닐 (C_3), 1-부테닐 (C_4), 2-부테닐 (C_4), 부타디에닐 (C_4) 등을 포함한다. C_{2-6} 알케닐기의 예는 상기 언급된 C_{2-4} 알케닐기 뿐만 아니라 펜테닐 (C_5), 펜타디에닐 (C_5), 헥세닐 (C_6) 등을 포함한다. 알케닐의 추가의 예는 헵테닐 (C_7), 옥테닐 (C_8), 옥타트리에닐 (C_8) 등을 포함한다. 달리 명시되지 않는 한, 알케닐기의 각각의 예는 독립적으로 치환되지 않거나 ("치환되지 않은 알케닐") 하나 이상의 치환기로 치환된다 ("치환된 알케닐"). 특정 구체예에서, 알케닐기는 치환되지 않은 C_{2-10} 알케닐이다. 특정 구체예에서, 알케닐기는 치환된 C_{2-10} 알케닐이다.

[0050] 본원에서 사용된 "알키닐" 또는 "알킨"은 2 내지 30개의 탄소 원자 및 하나 이상의 삼중 결합 (예컨대, 1, 2, 3, 또는 4개 삼중 결합)을 지니는 직쇄 또는 분지된 탄화수소기의 라디칼을 지칭한다 ("C_{2-10} 알키닐"). 일부 구체예에서, 알키닐기는 2 내지 20개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{2-20} 알키닐"). 일부 구체예에서, 알키닐기는 2 내지 10개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{2-10} 알키닐"). 일부 구체예에서, 알키닐기는 2 내지 9개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{2-9} 알키닐"). 일부 구체예에서, 알키닐기는 2 내지 8개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{2-8} 알키닐"). 일부 구체예에서, 알키닐기는 2 내지 7개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{2-7} 알키닐"). 일부 구체예에서, 알키닐기는 2 내지 6개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{2-6} 알키닐"). 일부 구체예에서, 알키닐기는 2 내지 5개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{2-5} 알키닐"). 일부 구체예에서, 알키닐기는 2 내지 4개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{2-4} 알키닐"). 일부 구체예에서, 알키닐기는 2 내지 3개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_{2-3} 알키닐"). 일부 구체예에서, 알키닐기는 2개의 탄소 원자를 지닌다 ("C_2 알키닐"). 하나 이상의 탄소-탄소 삼중 결합은 내부에 있거나 (예컨대, 2-부티닐에서) 말단에 있을 수 있다 (예컨대, 1-부티닐에서). C_{2-4} 알키닐기의 예는 에티닐 (C_2), 1-프로피닐 (C_3), 2-프로피닐 (C_3), 1-부티닐 (C_4), 2-부티닐 (C_4) 등을 포함하지만 이로 한정되는 것은 아니다. C_{2-6} 알케닐기의 예는 상기 언급된 C_{2-4} 알키닐 뿐만 아니라 펜티닐 (C_5), 헥시닐 (C_6) 등을 포함한다. 알키닐의 추가의 예는 헵티닐 (C_7), 옥티닐 (C_8) 등을 포함한다. 달리 명시되지 않는 한, 알키닐기의 각각의 예는 독립적으로 치환되지 않거나 ("치환되지 않은 알키닐") 하나 이상의 치환기로 치환된다 ("치환된 알키닐"). 특정 구체예에서, 알키닐기는 치환되지 않은 C_{2-10} 알키닐이다. 특정 구체예에서, 알키닐기는 치환된 C_{2-10} 알키닐이다.

[0051] 본원에서 사용된 "카르보사이클릴"은 비-방향족 고리 시스템에 3 내지 10개의 고리 탄소 원자 ("C_{3-10} 카르보사이클릴") 및 0개의 헤테로원자를 지니는 비-방향족 사이클릭 탄화수소기의 라디칼을 지칭한다. 일부 구체예에서, 카르보사이클릴기는 3 내지 8개의 고리 탄소 원자를 지닌다 ("C_{3-8} 카르보사이클릴"). 일부 구체예에서, 카르보사이클릴기는 3 내지 7개의 고리 탄소 원자를 지닌다 ("C_{3-7} 카르보사이클릴"). 일부 구체예에서, 카르보사이클릴기는 3 내지 6개의 고리 탄소 원자를 지닌다 ("C_{3-6} 카르보사이클릴"). 일부 구체예에서, 카르보사이클릴기는 5 내지 10개의 고리 탄소 원자를 지닌다 ("C_{5-10} 카르보사이클릴"). 예시적인 C_{3-6} 카르보사이클릴는 사이클로프로필 (C_3), 사이클로프로페닐 (C_3), 사이클로부틸 (C_4), 사이클로부테닐 (C_4), 사이클로펜틸 (C_5), 사이클로펜테닐 (C_5), 사이클로헥실 (C_6), 사이클로헥세닐 (C_6), 사이클로헥사디에닐 (C_6) 등을 포함하지만 이로 한정되는 것은 아니다. 예시적인 C_{3-8} 카르보사이클릴기는 상기 언급된 C_{3-6} 카르보사이클릴기 뿐만 아니라 사이클로헵틸 (C_7), 사이클로헵테닐 (C_7), 사이클로헵타디에닐 (C_7), 사이클로헵타트리에닐 (C_7), 사이클로옥틸 (C_8), 사이클로옥테닐 (C_8), 바이사이클로[2.2.1]헵타닐 (C_7), 바이사이클로[2.2.2]옥타닐 (C_8) 등을 포함하지만 이로 한정되는

것은 아니다. 예시적인 C_{3-10} 카르보사이클릴기는 상기 언급된 C_{3-8} 카르보사이클릴기 뿐만 아니라 사이클로노닐 (C_9), 사이클로노네닐 (C_9), 사이클로데실 (C_{10}), 사이클로데세닐 (C_{10}), 옥타하이드로-1H-인데닐 (C_9), 데카하이드로나프탈레닐 (C_{10}), 스피로[4.5]데카닐 (C_{10}) 등을 포함하지만 이로 한정되는 것은 아니다. 전술한 예에서 설명한 대로, 특정 구체예에서, 카르보사이클릴기는 모노사이클릭이거나 ("모노사이클릭 카르보사이클릴") 폴리사이클릭이고 (예컨대, 바이사이클릭 시스템 ("바이사이클릭 카르보사이클릴") 또는 트리사이클릭 시스템 ("트리사이클릭 카르보사이클릴")과 같은 융합, 브릿징 또는 스피로 고리 시스템 함유) 포화될 수 있거나 하나 이상의 탄소-탄소 이중 또는 삼중 결합을 함유할 수 있다. "카르보사이클릴"은 또한 카르보사이클릴 고리가, 상기 정의된 바와 같이, 하나 이상의 아릴 또는 헤테로아릴기와 융합된 고리 시스템을 포함하고, 이 때 부착 지점은 카르보사이클릴 고리 상에 있으며, 그러한 예에서, 탄소의 수는 카르보사이클릭 고리 시스템에서의 탄소의 수를 계속하여 지정한다. 달리 명시되지 않는 한, 카르보사이클릴기의 각각의 예는 독립적으로 치환되지 않거나 ("치환되지 않은 카르보사이클릴") 하나 이상의 치환기로 치환된다 ("치환된 카르보사이클릴"). 특정 구체예에서, 카르보사이클릴기는 치환되지 않은 C_{3-10} 카르보사이클릴이다. 특정 구체예에서, 카르보사이클릴기는 치환된 C_{3-10} 카르보사이클릴이다.

[0052] 일부 구체예에서, "카르보사이클릴"은 3 내지 10개의 고리 탄소 원자를 지니는 모노사이클릭, 포화된 카르보사이클릴기이다 ("C_{3-10} 사이클로알킬"). 일부 구체예에서, 사이클로알킬기는 3 내지 8개의 고리 탄소 원자를 지닌다 ("C_{3-8} 사이클로알킬"). 일부 구체예에서, 사이클로알킬기는 3 내지 6개의 고리 탄소 원자를 지닌다 ("C_{3-6} 사이클로알킬"). 일부 구체예에서, 사이클로알킬기는 5 내지 6개의 고리 탄소 원자를 지닌다 ("C_{5-6} 사이클로알킬"). 일부 구체예에서, 사이클로알킬기는 5 내지 10개의 고리 탄소 원자를 지닌다 ("C_{5-10} 사이클로알킬"). C_{5-6} 사이클로알킬기의 예는 사이클로펜틸 (C_5) 및 사이클로헥실 (C_5)을 포함한다. C_{3-6} 사이클로알킬기의 예는 상기 언급된 C_{5-6} 사이클로알킬기 뿐만 아니라 사이클로프로필 (C_3) 및 사이클로부틸 (C_4)을 포함한다. C_{3-8} 사이클로알킬기의 예는 상기 언급된 C_{3-6} 사이클로알킬기 뿐만 아니라 사이클로헵틸 (C_7) 및 사이클로옥틸 (C_8)을 포함한다. 달리 명시되지 않는 한, 사이클로알킬기의 각각의 예는 독립적으로 치환되지 않거나 ("치환되지 않은 사이클로알킬") 하나 이상의 치환기로 치환된다 ("치환된 사이클로알킬"). 특정 구체예에서, 사이클로알킬기는 치환되지 않은 C_{3-10} 사이클로알킬이다. 특정 구체예에서, 사이클로알킬기는 치환된 C_{3-10} 사이클로알킬이다.

[0053] 본원에서 사용된 "헤테로사이클릴"은 고리 탄소 원자 및 1 내지 4개의 고리 헤테로원자를 지니는 3- 내지 14-원의 비-방향족 고리 시스템의 라디칼을 지칭하고, 여기서 각각의 헤테로원자는 질소, 산소, 및 황으로부터 독립적으로 선택된다 ("3-14원 헤테로사이클릴"). 하나 이상의 질소 원자를 함유하는 헤테로사이클릴기에서, 부착 지점은 원자가가 허용하는 바에 따라, 탄소 또는 질소 원자일 수 있다. 헤테로사이클릴기는 모노사이클릭이거나 ("모노사이클릭 헤테로사이클릴") 폴리사이클릭이고 (예컨대, 바이사이클릭 시스템 ("바이사이클릭 헤테로사이클릴") 또는 트리사이클릭 시스템 ("트리사이클릭 헤테로사이클릴")과 같은 융합, 브릿징 또는 스피로 고리 시스템) 포화될 수 있거나 하나 이상의 탄소-탄소 이중 또는 삼중 결합을 함유할 수 있다. 헤테로사이클릴 폴리사이클릭 고리 시스템은 하나 또는 둘 모두의 고리에 하나 이상의 헤테로원자를 포함할 수 있다. "헤테로사이클릴"은 또한 헤테로사이클릴 고리가, 상기 정의된 대로, 하나 이상의 카르보사이클릴기와 융합되고, 이 때 부착 지점은 카르보사이클릴 또는 헤테로사이클릴 고리 상에 있는 고리 시스템, 또는 헤테로사이클릴 고리가, 상기 정의된 대로, 하나 이상의 아릴 또는 헤테로아릴기와 융합되고, 이 때 부착 지점은 헤테로사이클릴 고리 상에 있는 고리 시스템을 포함하고, 이러한 예에서 고리 구성원의 수는 헤테로사이클릴 고리 시스템에서 고리 구성원의 수를 계속하여 지정한다. 달리 명시되지 않는 한, 헤테로사이클릴의 각각의 예는 독립적으로 치환되지 않거나 ("치환되지 않은 헤테로사이클릴") 하나 이상의 치환기로 치환된다 ("치환된 헤테로사이클릴"). 특정 구체예에서, 헤테로사이클릴기는 치환되지 않은 3-14원 헤테로사이클릴이다. 특정 구체예에서, 헤테로사이클릴기는 치환된 3-14원 헤테로사이클릴이다.

[0054] 일부 구체예에서, 헤테로사이클릴기는 고리 탄소 원자 및 1-4개의 고리 헤테로원자를 지니는 5-10원 비-방향족 고리 시스템이고, 여기서 각각의 헤테로원자는 독립적으로 질소, 산소, 및 황으로부터 선택된다 ("5-10원 헤테로사이클릴"). 일부 구체예에서, 헤테로사이클릴기는 고리 탄소 원자 및 1-4개의 고리 헤테로원자를 지니는 5-8원 비-방향족 고리 시스템이고, 여기서 각각의 헤테로원자는 독립적으로 질소, 산소, 및 황으로부터 선택된다 ("5-8원 헤테로사이클릴"). 일부 구체예에서, 헤테로사이클릴기는 고리 탄소 원자 및 1-4개의 고리 헤테로원자를 지니는 5-6원 비-방향족 고리 시스템이고, 여기서 각각의 헤테로원자는 독립적으로 질소, 산소, 및 황으로부

터 선택된다 ("5-6원 헤테로사이클릴"). 일부 구체예에서, 5-6원 헤테로사이클릴은 질소, 산소, 및 황으로부터 선택된 1-3개의 고리 헤테로원자를 지닌다. 일부 구체예에서, 5-6원 헤테로사이클릴은 질소, 산소, 및 황으로부터 선택된 1-2개의 고리 헤테로원자를 지닌다. 일부 구체예에서, 5-6원 헤테로사이클릴은 질소, 산소, 및 황으로부터 선택된 1개의 고리 헤테로원자를 지닌다.

[0055] 1개의 헤테로원자를 함유하는 예시적인 3-원 헤테로사이클릴기는 비제한적으로 아지르디닐, 옥시라닐, 티오레닐을 포함한다. 1개의 헤테로원자를 함유하는 예시적인 4-원 헤테로사이클릴기는 비제한적으로 아제티디닐, 옥세타닐 및 티에타닐을 포함한다. 1개의 헤테로원자를 함유하는 예시적인 5-원 헤테로사이클릴기는 비제한적으로 테트라하이드로퓨라닐, 디하이드로퓨라닐, 테트라하이드로티오페닐, 디하이드로티오페닐, 피롤리디닐, 디하이드로피롤릴 및 피롤릴-2,5-디온을 포함한다. 2개의 헤테로원자를 함유하는 예시적인 5-원 헤테로사이클릴기는 비제한적으로 디옥솔라닐, 옥사티올라닐 및 디티올라닐을 포함한다. 3개의 헤테로원자를 함유하는 예시적인 5-원 헤테로사이클릴기는 비제한적으로 트리아졸리닐, 옥사디아졸리닐, 및 티아디아졸리닐을 포함한다. 1개의 헤테로원자를 함유하는 예시적인 6-원 헤테로사이클릴기는 비제한적으로 피페리디닐, 테트라하이드로피라닐, 디하이드로피리디닐, 및 티아닐을 포함한다. 2개의 헤테로원자를 함유하는 예시적인 6-원 헤테로사이클릴기는 비제한적으로 피페라지닐, 모르폴리닐, 디티아닐, 디옥사닐을 포함한다. 2개의 헤테로원자를 함유하는 예시적인 6-원 헤테로사이클릴기는 비제한적으로 트리아지나닐을 포함한다. 1개의 헤테로원자를 함유하는 예시적인 7-원 헤테로사이클릴기는 비제한적으로 아제파닐, 옥세파닐 및 티에파닐을 포함한다. 1개의 헤테로원자를 함유하는 예시적인 8-원 헤테로사이클릴기는 비제한적으로 아조카닐, 옥세카닐 및 티오카닐을 포함한다. 예시적인 바이사이클릭 헤테로사이클릴기는 비제한적으로 인돌리닐, 이소인돌리닐, 디하이드로벤조퓨라닐, 디하이드로벤조티에닐, 테트라하이드로벤조티에닐, 테트라하이드로벤조퓨라닐, 테트라하이드로인돌릴, 테트라하이드로퀴놀리닐, 테트라하이드로이소퀴놀리닐, 데카하이드로퀴놀리닐, 데카하이드로이소퀴놀리닐, 옥타하이드로크로메닐, 옥타하이드로이소크로메닐, 데카하이드로나프티리디닐, 데카하이드로-1,8-나프티리디닐, 옥타하이드로피롤로[3,2-b]피롤, 인돌리닐, 프탈리미딜, 나프탈리미딜, 크로마닐, 크로메닐, 1H-벤조[e][1,4]디아제피닐, 1,4,5,7-테트라하이드로피라노[3,4-b]피롤릴, 5,6-디하이드로-4H-푸로[3,2-b]피롤릴, 6,7-디하이드로-5H-푸로[3,2-b]피라닐, 5,7-디하이드로-4H-티에노[2,3-c]피라닐, 2,3-디하이드로-1H-피롤로[2,3-b]피리디닐, 2,3-디하이드로푸로[2,3-b]피리디닐, 4,5,6,7-테트라하이드로-1H-피롤로[2,3-b]피리디닐, 4,5,6,7-테트라하이드로푸로[3,2-c]피리디닐, 4,5,6,7-테트라하이드로티에노[3,2-b]피리디닐, 1,2,3,4-테트라하이드로-1,6-나프티리디닐 등을 포함한다.

[0056] 본원에서 사용된, "아릴"은 방향족 고리 시스템에 제공된 6-14개의 고리 탄소 원자 및 0개의 헤테로원자를 지니는 모노사이클릭 또는 폴리사이클릭 (예컨대, 바이사이클릭 또는 트리사이클릭) 4n+2 방향족 고리 시스템 (예컨대, 사이클릭 어레이에 공유된 6, 10, 또는 14π 전자를 지님)의 라디칼을 지칭한다 ("C_{6-14} 아릴"). 일부 구체예에서, 아릴기는 6개의 고리 탄소 원자를 지닌다 ("C_6 아릴"; 예컨대, 페닐). 일부 구체예에서, 아릴기는 10개의 고리 탄소 원자를 지닌다 ("C_{10} 아릴"; 예컨대, 나프틸, 예컨대 1-나프틸 및 2-나프틸). 일부 구체예에서, 아릴기는 14개의 고리 탄소 원자를 지닌다 ("C_{14} 아릴"; 예컨대, 안트라실). "아릴"은 또한 아릴 고리가, 상기 정의된 바와 같이, 하나 이상의 카르보사이클릴 또는 헤테로사이클릴기와 융합되고, 이 때 부착 라디칼 또는 지점은 아릴 고리 상에 있는 고리 시스템을 포함하고, 그러한 예에서, 탄소 원자의 수는 아릴 고리 시스템에서의 탄소 원자의 수를 계속하여 지정한다. 달리 명시되지 않는 한, 아릴기의 각각의 예는 독립적으로 치환되지 않거나 ("치환되지 않은 아릴") 하나 이상의 치환기로 치환된다 ("치환된 아릴"). 특정 구체예에서, 아릴기는 치환되지 않은 C_{6-14} 아릴이다. 특정 구체예에서, 아릴기는 치환된 C_{6-14} 아릴이다.

[0057] 본원에서 사용된 "헤테로아릴"은 방향족 고리 시스템에 제공된 고리 탄소 원자 및 1-4개의 고리 헤테로원자를 지니는 5-14원 모노사이클릭 또는 폴리사이클릭 (예컨대, 바이사이클릭, 트리사이클릭) 4n+2 방향족 고리 시스템 (예컨대, 사이클릭 어레이에 공유된 6, 10, 또는 14π 전자를 지님)의 라디칼을 지칭하고, 여기서 각각의 헤테로원자는 독립적으로 질소, 산소 및 황으로부터 선택된다 ("5-14원 헤테로아릴"). 하나 이상의 질소 원자를 함유하는 헤테로아릴기에서, 부착 지점은 원자가가 허용하는 바에 따라, 탄소 또는 질소 원자일 수 있다. 헤테로아릴 폴리사이클릭 고리 시스템은 하나 또는 둘 모두의 고리에 하나 이상의 헤테로원자를 포함할 수 있다. "헤테로아릴"은 헤테로아릴 고리가, 상기 정의된 대로, 하나 이상의 카르보사이클릴 또는 헤테로사이클릴기와 융합되고, 이 때 부착 지점은 헤테로아릴 고리 상에 있는 고리 시스템을 포함하고, 이러한 예에서 고리 구성원의 수는 헤테로아릴 고리 시스템에서 고리 구성원의 수를 계속하여 지정한다. "헤테로아릴"은 또한 헤테로아릴 고리가, 상기 정의된 대로, 하나 이상의 아릴기와 융합되고, 이 때 부착 지점은 아릴 또는 헤테로아릴 고리 상에 있는 고리 시스템을 포함하고, 이러한 예에서 고리 구성원의 수는 융합된 폴리사이클릭 (아릴/헤테로아릴)

고리 시스템에서 고리 구성원의 수를 지정한다. 한 고리가 헤테로원자를 함유하지 않는 폴리사이클릭 헤테로아릴기 (예컨대, 인돌릴, 퀴놀리닐, 카르바졸릴 등)에서 부착 지점은 어느 한 고리, 즉 헤테로원자를 지니는 고리 (예컨대, 2-인돌릴) 또는 헤테로원자를 함유하지 않는 고리 (예컨대, 5-인돌릴) 상에 있을 수 있다.

[0058] 일부 구체예에서, 헤테로아릴기는 방향족 고리 시스템에 제공된 고리 탄소 원자 및 1-4개의 고리 헤테로원자를 지니는 5-10원 방향족 고리 시스템이고, 여기서 각각의 헤테로원자는 독립적으로 질소, 산소, 및 황으로부터 선택된다 ("5-10원 헤테로아릴"). 일부 구체예에서, 헤테로아릴기는 방향족 고리 시스템에 제공된 고리 탄소 원자 및 1-4개의 고리 헤테로원자를 지니는 5-8원 방향족 고리 시스템이고, 여기서 각각의 헤테로원자는 독립적으로 질소, 산소, 및 황으로부터 선택된다 ("5-8원 헤테로아릴"). 일부 구체예에서, 헤테로아릴기는 방향족 고리 시스템에 제공된 고리 탄소 원자 및 1-4개의 고리 헤테로원자를 지니는 5-6원 방향족 고리 시스템이고, 여기서 각각의 헤테로원자는 독립적으로 질소, 산소, 및 황으로부터 선택된다 ("5-6원 헤테로아릴"). 일부 구체예에서, 5-6원 헤테로아릴은 질소, 산소, 및 황으로부터 선택된 1-3개의 고리 헤테로원자를 지닌다. 일부 구체예에서, 5-6원 헤테로아릴은 질소, 산소, 및 황으로부터 선택된 1-2개의 고리 헤테로원자를 지닌다. 일부 구체예에서, 5-6원 헤테로아릴은 질소, 산소, 및 황으로부터 선택된 1개의 고리 헤테로원자를 지닌다. 달리 명시되지 않는 한, 헤테로아릴기의 각각의 예는 독립적으로 치환되지 않거나 ("치환되지 않은 헤테로아릴") 하나 이상의 치환기로 치환된다 ("치환된 헤테로아릴"). 특정 구체예에서, 헤테로아릴기는 치환되지 않은 5-14원 헤테로아릴이다. 특정 구체예에서, 헤테로아릴기는 치환된 5-14원 헤테로아릴이다.

[0059] 1개의 헤테로원자를 함유하는 예시적인 5-원 헤테로아릴기는 비제한적으로 피롤릴, 퓨라닐 및 티오페닐을 포함한다. 2개의 헤테로원자를 함유하는 예시적인 5-원 헤테로아릴기는 비제한적으로 이미다졸릴, 피라졸릴, 옥사졸릴, 이속사졸릴, 티아졸릴, 및 이소티아졸릴을 포함한다. 3개의 헤테로원자를 함유하는 예시적인 5-원 헤테로아릴기는 비제한적으로 트리아졸릴, 옥사디아졸릴, 및 티아디아졸릴을 포함한다. 4개의 헤테로원자를 함유하는 예시적인 5-원 헤테로아릴기는 비제한적으로 테트라졸릴을 포함한다. 1개의 헤테로원자를 함유하는 예시적인 6-원 헤테로아릴기는 비제한적으로 피리디닐을 포함한다. 2개의 헤테로원자를 함유하는 예시적인 6-원 헤테로아릴기는 비제한적으로 피리다지닐, 피리미디닐, 및 피라지닐을 포함한다. 3 또는 4개의 헤테로원자를 함유하는 예시적인 6-원 헤테로아릴기는 비제한적으로 각각 트리아지닐 및 테트라지닐을 포함한다. 1개의 헤테로원자를 함유하는 예시적인 7-원 헤테로아릴기는 비제한적으로 아제피닐, 옥세피닐, 및 티에피닐을 포함한다. 예시적인 5,6-바이사이클릭 헤테로아릴기는 비제한적으로 인돌릴, 이소인돌릴, 인다졸릴, 벤조트리아졸릴, 벤조티오페닐, 이소벤조티오페닐, 벤조퓨라닐, 벤조이소퓨라닐, 벤즈이미다졸릴, 벤족사졸릴, 벤즈이속사졸릴, 벤족사디아졸릴, 벤즈티아졸릴, 벤즈이소티아졸릴, 벤즈티아디아졸릴, 인돌리지닐, 및 푸리닐을 포함한다. 예시적인 6,6-바이사이클릭 헤테로아릴기는 비제한적으로 나프티리디닐, 프테리디닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 신놀리닐, 퀴녹살리닐, 프탈라지닐, 및 퀴나졸리닐을 포함한다. 예시적인 트리사이클릭 헤테로아릴기는 비제한적으로 페난트리디닐, 디벤조퓨라닐, 카르바졸릴, 아크리디닐, 페노티아지닐, 페녹사지닐 및 페나지닐을 포함한다.

[0060] 본원에서 사용된 용어 "부분적으로 불포화된"은 적어도 하나의 이중 또는 삼중 결합을 포함하는 고리 모이어티를 지칭한다. 용어 "부분적으로 불포화된"은 다수의 불포화 부위를 지니는 고리를 포함하기 위한 것이며 본원에 정의된 방향족기 (예컨대, 아릴 또는 헤테로아릴 모이어티)를 포함하려는 것은 아니다.

[0061] 본원에서 사용된 용어 "포화된"은 이중 또는 삼중 결합을 함유하지 않는 고리 모이어티를 지칭하고, 즉 고리는 모두 단일 결합을 함유한다.

[0062] 본원에서 정의된 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로알킬, 헤테로알케닐, 헤테로알키닐, 카르보사이클릴, 헤테로사이클릴, 아릴, 및 헤테로아릴기는 치환되거나 치환되지 않는다 (예컨대, "치환되거나" "치환되지 않은" 알킬, "치환되거나" "치환되지 않은" 알케닐, "치환되거나" "치환되지 않은" 알키닐, "치환되거나" "치환되지 않은" 헤테로알킬, "치환되거나" "치환되지 않은" 헤테로알케닐, "치환되거나" "치환되지 않은" 헤테로알키닐, "치환되거나" "치환되지 않은" 카르보사이클릴, "치환되거나" "치환되지 않은" 헤테로사이클릴, "치환되거나" "치환되지 않은" 아릴 또는 "치환되거나" "치환되지 않은" 헤테로아릴기). 일반적으로, 용어 "치환된"은, "임의로"라는 용어가 선행되든 선행되지 않든 간에, 기(예컨대, 탄소 또는 질소 원자) 상에 존재하는 적어도 하나의 수소가 허용가능한 치환기, 예컨대, 치환시에, 재배열, 고리화, 제거, 또는 그 밖의 반응에 의한 것과 같은 변형을 자발적으로 일으키지 않는 화합물과 같은 안정한 화합물을 발생시키는 치환기로 대체되는 것을 의미한다. 달리 지시되지 않는 한, "치환된" 기는 기의 하나 이상의 치환가능한 위치에 치환기를 지니고, 임의의 주어진 구조에서 하나를 초과하는 위치가 치환될 때, 치환기는 각각의 위치에서 동일하거나 상이하다. 용어 "치환된" 유기 화합물의 모든 허용가능한 치환기로의 치환을 포함하도록 고려되며, 본원에 기재된 임의의 치환기는 안정한 화합물의 형성을 발생시킨다. 본 발명은 안정한 화합물에 도달하기 위한 임의의 그리고 모든 그러한 조합을 고려

한다. 본 발명의 목적을 위해, 질소와 같은 헤테로원자는 수소 치환기 및/또는 헤테로원자의 원자가를 충족시키고 안정한 모이어티의 형성을 발생시키는 본원에 기재된 임의의 적합한 치환기를 지닐 수 있다.

[0063] 예시적인 탄소 원자 치환기는 비제한적으로 할로겐, -CN, $-NO_2$, $-N_3$, $-SO_2H$, $-SO_3H$, -OH, $-OR^{aa}$, $-ON(R^{bb})_2$, $-N(R^{bb})_2$, $-N(R^{bb})_3^+X^-$, $-N(OR^{cc})R^{bb}$, -SH, $-SR^{aa}$, $-SSR^{cc}$, $-C(=O)R^{aa}$, $-CO_2H$, -CHO, $-C(OR^{cc})_2$, $-CO_2R^{aa}$, $-OC(=O)R^{aa}$, $-OCO_2R^{aa}$, $-C(=O)N(R^{bb})_2$, $-OC(=O)N(R^{bb})_2$, $-NR^{bb}C(=O)R^{aa}$, $-NR^{bb}CO_2R^{aa}$, $-NR^{bb}C(=O)N(R^{bb})_2$, $-C(=NR^{bb})R^{aa}$, $-C(=NR^{bb})OR^{aa}$, $-OC(=NR^{bb})R^{aa}$, $-OC(=NR^{bb})OR^{aa}$, $-C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$, $-OC(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$, $-NR^{bb}C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$, $-C(=O)NR^{bb}SO_2R^{aa}$, $-NR^{bb}SO_2R^{aa}$, $-SO_2N(R^{bb})_2$, $-SO_2R^{aa}$, $-SO_2OR^{aa}$, $-OSO_2R^{aa}$, $-S(=O)R^{aa}$, $-OS(=O)R^{aa}$, $-Si(R^{aa})_3$, $-OSi(R^{aa})_3$ $-C(=S)N(R^{bb})_2$, $-C(=O)SR^{aa}$, $-C(=S)SR^{aa}$, $-SC(=S)SR^{aa}$, $-SC(=O)SR^{aa}$, $-OC(=O)SR^{aa}$, $-SC(=O)OR^{aa}$, $-SC(=O)R^{aa}$, $-P(=O)_2R^{aa}$, $-OP(=O)_2R^{aa}$, $-P(=O)(R^{aa})_2$, $-OP(=O)(R^{aa})_2$, $-OP(=O)(OR^{cc})_2$, $-P(=O)_2N(R^{bb})_2$, $-OP(=O)_2N(R^{bb})_2$, $-P(=O)(NR^{bb})_2$, $-OP(=O)(NR^{bb})_2$, $-NR^{bb}P(=O)(OR^{cc})_2$, $-NR^{bb}P(=O)(NR^{bb})_2$, $-P(R^{cc})_2$, $-P(R^{cc})_3$, $-OP(R^{cc})_2$, $-OP(R^{cc})_3$, $-B(R^{aa})_2$, $-B(OR^{cc})_2$, $-BR^{aa}(OR^{cc})$, C_{1-10} 알킬, C_{1-10} 퍼할로알킬, C_{2-10} 알케닐, C_{2-10} 알키닐, C_{1-10} 헤테로알킬, C_{2-10} 헤테로알케닐, C_{2-10}헤테로알키닐, C_{3-14} 카르보사이클릴, 3-14원 헤테로사이클릴, C_{6-14} 아릴, 및 5-14원 헤테로아릴 (여기서 각각의 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로알킬, 헤테로알케닐, 헤테로알키닐, 카르보사이클릴, 헤테로사이클릴, 아릴, 및 헤테로아릴은 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 R^{dd} 기로 치환된다)을 포함하거나;

[0064] 탄소 원자 상의 2개의 같은 자리 수소는 =O, =S, $=NN(R^{bb})_2$, $=NNR^{bb}C(=O)R^{aa}$, $=NNR^{bb}C(=O)OR^{aa}$, $=NNR^{bb}S(=O)_2R^{aa}$, $=NR^{bb}$, 또는 $=NOR^{cc}$ 기로 대체되며;

[0065] R^{aa}의 각각의 예는 독립적으로 C_{1-10} 알킬, C_{1-10} 퍼할로알킬, C_{2-10} 알케닐, C_{2-10} 알키닐, C_{1-10} 헤테로알킬, C_{2-10} 헤테로알케닐, C_{2-10}헤테로알키닐, C_{3-10} 카르보사이클릴, 3-14원 헤테로사이클릴, C_{6-14} 아릴, 및 5-14원 헤테로아릴으로부터 선택되거나, 2개의 R^{aa} 기는 결합하여 3-14원 헤테로사이클릴 또는 5-14원 헤테로아릴 고리를 형성하고, 여기서 각각의 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로알킬, 헤테로알케닐, 헤테로알키닐, 카르보사이클릴, 헤테로사이클릴, 아릴, 및 헤테로아릴은 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 R^{dd} 기로 치환되고;

[0066] R^{bb}의 각각의 예는 독립적으로 수소, -OH, $-OR^{aa}$, $-N(R^{cc})_2$, -CN, $-C(=O)R^{aa}$, $-C(=O)N(R^{cc})_2$, $-CO_2R^{aa}$, $-SO_2R^{aa}$, $-C(=NR^{cc})OR^{aa}$, $-C(=NR^{cc})N(R^{cc})_2$, $-SO_2N(R^{cc})_2$, $-SO_2R^{cc}$, $-SO_2OR^{cc}$, $-SOR^{aa}$, $-C(=S)N(R^{cc})_2$, $-C(=O)SR^{cc}$, $-C(=S)SR^{cc}$, $-P(=O)_2R^{aa}$, $-P(=O)(R^{aa})_2$, $-P(=O)_2N(R^{cc})_2$, $-P(=O)(NR^{cc})_2$, C_{1-10} 알킬, C_{1-10} 퍼할로알킬, C_{2-10} 알케닐, C_{2-10} 알키닐, C_{1-10} 헤테로알킬, C_{2-10} 헤테로알케닐, C_{2-10}헤테로알키닐, C_{3-10} 카르보사이클릴, 3-14원 헤테로사이클릴, C_{6-14} 아릴, 및 5-14원 헤테로아릴로부터 선택되거나, 2개의 R^{bb} 기는 결합하여 3-14원 헤테로사이클릴 또는 5-14원 헤테로아릴 고리를 형성하고, 여기서 각각의 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로알킬, 헤테로알케닐, 헤테로알키닐, 카르보사이클릴, 헤테로사이클릴, 아릴, 및 헤테로아릴은 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 R^{dd} 기로 치환되고;

[0067] R^{cc}의 각각의 예는 독립적으로 수소, C_{1-10} 알킬, C_{1-10} 퍼할로알킬, C_{2-10} 알케닐, C_{2-10} 알키닐, C_{1-10} 헤테로알킬, C_{2-10} 헤테로알케닐, C_{2-10}헤테로알키닐, C_{3-10} 카르보사이클릴, 3-14원 헤테로사이클릴, C_{6-14} 아릴, 및 5-14원 헤테로아릴로부터 선택되거나, 2개의 R^{cc} 기는 결합하여 3-14원 헤테로사이클릴 또는 5-14원 헤테로아릴 고리를 형성하고, 여기서 각각의 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로알킬, 헤테로알케닐, 헤테로알키닐, 카르보사이클릴, 헤테로사이클릴, 아릴, 및 헤테로아릴은 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 R^{dd} 기로 치환되고;

[0068] R^{dd}의 각각의 예는 독립적으로 할로겐, -CN, $-NO_2$, $-N_3$, $-SO_2H$, $-SO_3H$, -OH, $-OR^{ee}$, $-ON(R^{ff})_2$, $-N(R^{ff})_2$, $-N(R^{ff})_3^+X^-$, $-N(OR^{ee})R^{ff}$, -SH, $-SR^{ee}$, $-SSR^{ee}$, $-C(=O)R^{ee}$, $-CO_2H$, $-CO_2R^{ee}$, $-OC(=O)R^{ee}$, $-OCO_2R^{ee}$, $-C(=O)N(R^{ff})_2$, $-OC(=O)N(R^{ff})_2$, $-NR^{ff}C(=O)R^{ee}$, $-NR^{ff}CO_2R^{ee}$, $-NR^{ff}C(=O)N(R^{ff})_2$, $-C(=NR^{ff})OR^{ee}$, $-OC(=NR^{ff})R^{ee}$, $-OC(=NR^{ff})OR^{ee}$, $-C(=NR^{ff})N(R^{ff})_2$, $-OC(=NR^{ff})N(R^{ff})_2$, $-NR^{ff}C(=NR^{ff})N(R^{ff})_2$, $-NR^{ff}SO_2R^{ee}$, $-SO_2N(R^{ff})_2$, $-SO_2R^{ee}$, $-SO_2OR^{ee}$, $-OSO_2R^{ee}$, $-S(=O)R^{ee}$, $-Si(R^{ee})_3$, $-OSi(R^{ee})_3$, $-C(=S)N(R^{ff})_2$, $-C(=O)SR^{ee}$, $-C(=S)SR^{ee}$, $-SC(=S)SR^{ee}$, $-P(=O)_2R^{ee}$, $-P(=O)(R^{ee})_2$, $-OP(=O)(R^{ee})_2$, $-OP(=O)(OR^{ee})_2$, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 퍼할로알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{1-6} 헤테로알킬, C_{2-6} 헤테로알케닐, C_{2-6} 헤테로알키닐, C_{3-10} 카르보사이클릴, 3-10원 헤테로사이클릴, C_{6-10} 아릴, 5-10원 헤테로아릴로부터 선택되거나 (여기서 각각의 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로알킬, 헤테로알케닐, 헤테로알키닐, 카르보사이클릴, 헤테로사이클릴, 아릴, 및 헤테로아릴은 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 R^{gg} 기로 치환된다), 2개의 같은 자리 R^{dd} 치환기는 결합하여 =O 또는 =S를 형성할 수 있고;

[0069] R^{ee}의 각각의 예는 독립적으로 C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 퍼할로알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{1-6} 헤테로알킬, C_{2-6} 헤테로알케닐, C_{2-6}헤테로알키닐, C_{3-10} 카르보사이클릴, C_{6-10} 아릴, 3-10원 헤테로사이클릴, 및 3-10원 헤테로아릴로부터 선택되고 (여기서 각각의 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로알킬, 헤테로알케닐, 헤테로알키닐, 카르보사이클릴, 헤테로사이클릴, 아릴, 및 헤테로아릴은 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 R^{gg} 기로부터 치환된다);

[0070] R^{ff}의 각각의 예는 독립적으로 수소, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 퍼할로알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{1-6} 헤테로알킬, C_{2-6} 헤테로알케닐, C_{2-6}헤테로알키닐, C_{3-10} 카르보사이클릴, 3-10원 헤테로사이클릴, C_{6-10} 아릴 및 5-10원 헤테로아릴로부터 선택되거나, 2개의 R^{ff} 기는 결합하여 3-14원 헤테로사이클릴 또는 5-14원 헤테로아릴 고리를 형성하고 (여기서 각각의 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로알킬, 헤테로알케닐, 헤테로알키닐, 카르보사이클릴, 헤테로사이클릴, 아릴, 및 헤테로아릴은 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 R^{gg} 기로 치환된다);

[0071] R^{gg}의 각각의 예는 독립적으로 할로겐, -CN, $-NO_2$, $-N_3$, $-SO_2H$, $-SO_3H$, -OH, $-OC_{1-6}$ 알킬, $-ON(C_{1-6}$ 알킬$)_2$, $-N(C_{1-6}$ 알킬$)_2$, $-N(C_{1-6}$ 알킬$)_3^+X^-$, $-NH(C_{1-6}$ 알킬$)_2^+X^-$, $-NH_2(C_{1-6}$ 알킬$)^+X^-$, $-NH_3^+X^-$, $-N(OC_{1-6}$ 알킬$)(C_{1-6}$ 알킬), $-N(OH)(C_{1-6}$ 알킬), -NH(OH), -SH, $-SC_{1-6}$ 알킬, $-SS(C_{1-6}$ 알킬$)$, $-C(=O)(C_{1-6}$ 알킬$)$, $-CO_2H$, $-CO_2(C_{1-6}$ 알킬$)$, $-OC(=O)(C_{1-6}$ 알킬$)$, $-OCO_2(C_{1-6}$ 알킬$)$, $-C(=O)NH_2$, $-C(=O)N(C_{1-6}$ 알킬$)_2$, $-OC(=O)NH(C_{1-6}$ 알킬$)$, $-NHC(=O)(C_{1-6}$ 알킬$)$, $-N(C_{1-6}$ 알킬$)C(=O)(C_{1-6}$ 알킬$)$, $-NHCO_2(C_{1-6}$ 알킬$)$, $-NHC(=O)N(C_{1-6}$ 알킬$)_2$, $-NHC(=O)NH(C_{1-6}$ 알킬$)$, $-NHC(=O)NH_2$, $-C(=NH)O(C_{1-6}$ 알킬$)$, $-OC(=NH)(C_{1-6}$ 알킬$)$, $-OC(=NH)OC_{1-6}$ 알킬, $-C(=NH)N(C_{1-6}$ 알킬$)_2$, $-C(=NH)NH(C_{1-6}$ 알킬$)$, $-C(=NH)NH_2$, $-OC(=NH)N(C_{1-6}$ 알킬$)_2$, $-OC(NH)NH(C_{1-6}$ 알킬$)$, $-OC(NH)NH_2$, $-NHC(NH)N(C_{1-6}$ 알킬$)_2$, $-NHC(=NH)NH_2$, $-NHSO_2(C_{1-6}$ 알킬$)$, $-SO_2N(C_{1-6}$ 알킬$)_2$, $-SO_2NH(C_{1-6}$ 알킬$)$, $-SO_2NH_2$, $-SO_2C_{1-6}$ 알킬, $-SO_2OC_{1-6}$ 알킬, $-OSO_2C_{1-6}$ 알킬, $-SOC_{1-6}$ 알킬, $-Si(C_{1-6}$ 알킬$)_3$, $-OSi(C_{1-6}$ 알킬$)_3$ $-C(=S)N(C_{1-6}$ 알킬$)_2$, $C(=S)NH(C_{1-6}$ 알킬$)$, $C(=S)NH_2$, $-C(=O)S(C_{1-6}$ 알킬$)$, $-C(=S)SC_{1-6}$ 알킬, $-SC(=S)SC_{1-6}$ 알킬, $-P(=O)_2(C_{1-6}$ 알킬$)$, $-P(=O)(C_{1-6}$ 알킬$)_2$, $-OP(=O)(C_{1-6}$ 알킬$)_2$, $-OP(=O)(OC_{1-6}$ 알킬$)_2$, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 퍼할로알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{1-6}헤테로알킬, C_{2-6} 헤테로알케닐, C_{2-6}헤테로알키닐, C_{3-10} 카르보사이클릴, C_{6-10} 아릴, 3-10원 헤테로사이클릴, 5-10원 헤테로아릴이거나; 2개의 같은 자리 R^{gg} 치환기는 결합하여 =O 또는 =S를 형성할 수 있고; 여기서 X^-는 반대이온이다.

[0072] 본원에서 사용된 용어 "할로" 또는 "할로겐"은 플루오린(플루오로, -F), 클로린 (클로로, -Cl), 브로민 (브로모, -Br), 또는 아이오딘 (아이오도, -I)을 지칭한다.

[0073] 본원에서 사용된, "반대이온"은 전자 중립을 유지하기 위해 양으로 하전된 사차 아민과 결합되는 음으로 하전된 기이다. 예시적인 반대이온은 할라이드 이온 (예컨대, F^-, Cl^-, Br^-, I^-), NO_3^-, ClO_4^-, OH^-, $H_2PO_4^-$, HSO_4^-, 설포

네이트 이온 (예컨대, 메탄설포네이트, 트리플루오로메탄설포네이트, p-톨루엔설포네이트, 벤젠설포네이트, 10-캄포르 설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트, 나프탈렌-1-설폰산-5-설포네이트, 에탄-1-설폰산-2-설포네이트 등), 및 카르복실레이트 이온 (예컨대, 아세테이트, 에타노에이트, 프로파노에이트, 벤조에이트, 글리세레이트, 락테이트, 타르트레이트, 글리콜레이트 등)을 포함한다.

[0074] 본원에서 사용된 용어 "카르보닐"은 모 분자에 직접 부착된 탄소가 sp^2 하이브리드화되고, 산소, 질소 또는 황 원자로 치환된 기, 예컨대 케톤 ($-C(=O)R^{aa}$), 카르복실산 ($-CO_2H$), 알데하이드 ($-CHO$), 에스테르 ($-CO_2R^{aa}$, $-C(=O)SR^{aa}$, $-C(=S)SR^{aa}$), 아미드 ($-C(=O)N(R^{bb})_2$, $-C(=O)NR^{bb}SO_2R^{aa}$, $-C(=S)N(R^{bb})_2$), 및 이민 ($-C(=NR^{bb})R^{aa}$, $-C(=NR^{bb})OR^{aa}$), $-C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$)을 지칭하고, 여기서 R^{aa} 및 R^{bb}는 본원에서 정의된 바와 같다.

[0075] 본원에서 사용된 "아지드" 또는 "아지도"는 $-N_3$ 기를 지칭한다.

[0076] 본원에서 사용된 용어 "티올" 또는 "티오"는 -SH 기를 지칭한다. 용어 "치환된 티올" 또는 "치환된 티오"는, 확장하여, 모 분자에 직접 부착된 황 원자가 수소 이외의 기로 치환된 티올기를 지칭하고, $-SR^{aa}$, $-S=SR^{cc}$, $-SC(=S)SR^{aa}$, $-SC(=O)SR^{aa}$, $-SC(=O)OR^{aa}$, 및 $-SC(=O)R^{aa}$로부터 선택된 기를 포함하며, 여기서 R^{aa} 및 R^{cc}는 본원에서 정의된 바와 같다.

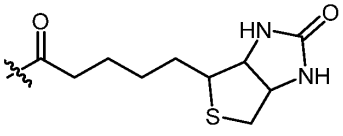
[0077] 본원에서 사용된 용어 "아미노" 또는 "아민"은 $-NH_2$ 기를 지칭한다. 용어 "치환된" 아미노 또는 아민은, 확장하여, 본원에 정의된 대로 일치환된 아미노, 이치환된 아미노, 또는 삼치환된 아미노를 지칭한다. 특정 구체예에서, "치환된 아미노"는 일치환된 아미노 또는 이치환된 아미노기이다.

[0078] 본원에서 사용된 용어 "일치환된 아미노" 또는 "일치환된 아민"은 모 분자에 직접 부착된 질소 원자가 하나의 수소 및 하나의 수소 이외의 기로 치환된 아미노기를 지칭하고, $-NH(R^{bb})$, $-NHC(=O)R^{aa}$, $-NHCO_2R^{aa}$, $-NHC(=O)N(R^{bb})_2$, $-NHC(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$, $-NHSO_2R^{aa}$, $-NHP(=O)(OR^{cc})_2$, 및 $-NHP(=O)(NR^{bb})_2$로부터 선택된 기를 포함하며, 여기서 R^{aa}, R^{bb} 및 R^{cc} 본원에서 정의된 바와 같고, $-NH(R^{bb})$ 기의 R^{bb}는 수소가 아니다.

[0079] 본원에서 사용된 용어 "이치환된 아미노" 또는 "이치환된 아민"은 모 분자에 직접 부착된 질소 원자가 2개의 수소가 아닌 기로 치환된 아미노기를 지칭하고, $-N(R^{bb})_2$, $-NR^{bb}C(=O)R^{aa}$, $-NR^{bb}CO_2R^{aa}$, $-NR^{bb}C(=O)N(R^{bb})_2$, $-NR^{bb}C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$, $-NR^{bb}SO_2R^{aa}$, $-NR^{bb}P(=O)(OR^{cc})_2$, 및 $-NR^{bb}P(=O)(NR^{bb})_2$로부터 선택된 기를 포함하며, 여기서 R^{aa}, R^{bb}, 및 R^{cc}는 본원에서 정의된 바와 같고, 단, 모 분자에 직접 부착된 질소 원자는 수소로 치환되지 않는다.

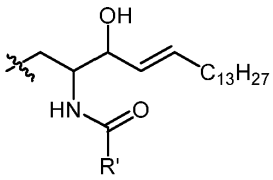
[0080] 본원에서 사용된 용어 "삼치환된 아미노" 또는 "삼치환된 아민"은 모 분자에 직접 부착된 질소 원자가 3개의 기로 치환된 아미노기를 지칭하고, $-N(R^{bb})_3$ 및 $-N(R^{bb})_3^+X^-$로부터 선택된 기를 포함하며, 여기서 R^{bb} 및 X^-는 본원에서 정의된 바와 같다.

[0081] 본원에서 사용된 "바이오틴"은, 예컨대, 예시적인 R^{1A} 기로서, 하기 구조를 포함한다:

[0082] 

.

[0083] 본원에서 사용된, "세라마이드"는, 예컨대, 예시적인 R^{1A} 기로서, 하기 구조를 포함한다:



[0084]

[0085] 상기 식에서, R'은 치환되거나 치환되지 않은 C_6-C_{30} 알킬 (예컨대, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}, C_{14}, C_{15}, C_{16}, C_{17}, C_{18}, C_{19}, C_{20}, C_{21}, C_{22}, C_{23}, C_{24}, C_{25}, C_{26}, C_{27}, C_{28}, C_{29}, 또는 C_{30} 알킬), 치환되거나 치환되지 않은 C_6-C_{30} 알케닐 (예컨대, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}, C_{14}, C_{15}, C_{16}, C_{17}, C_{18}, C_{19}, C_{20}, C_{21}, C_{22}, C_{23}, C_{24}, C_{25}, C_{26}, C_{27}, C_{28}, C_{29}, 또는 C_{30} 알케닐), 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6-C_{30} 알키닐 (예컨대, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}, C_{14}, C_{15}, C_{16}, C_{17}, C_{18}, C_{19}, C_{20}, C_{21}, C_{22}, C_{23}, C_{24}, C_{25}, C_{26}, C_{27}, C_{28}, C_{29}, 또는 C_{30} 알키닐) 기이다.

[0086] 질소 원자는 원자가가 허용하는 대로 치환되거나 치환되지 않을 수 있고, 1차, 2차, 3차, 및 4차 질소 원자를 포함한다. 예시적인 질소 원자 치환기는 비제한적으로 수소, -OH, $-OR^{aa}$, $-N(R^{cc})_2$, -CN, $-C(=O)R^{aa}$, $-C(=O)N(R^{cc})_2$, $-CO_2R^{aa}$, $-SO_2R^{aa}$, $-C(=NR^{bb})R^{aa}$, $-C(=NR^{cc})OR^{aa}$, $-C(=NR^{cc})N(R^{cc})_2$, $-SO_2N(R^{cc})_2$, $-SO_2R^{cc}$, $-SO_2OR^{cc}$, $-SOR^{aa}$, $-C(=S)N(R^{cc})_2$, $-C(=O)SR^{cc}$, $-C(=S)SR^{cc}$, $-P(=O)_2R^{aa}$, $-P(=O)(R^{aa})_2$, $-P(=O)_2N(R^{cc})_2$, $-P(=O)(NR^{cc})_2$, C_{1-10} 알킬, C_{1-10} 퍼할로알킬, C_{2-10} 알케닐, C_{2-10} 알키닐, C_{1-10} 헤테로알킬, C_{2-10} 헤테로알케닐, C_{2-10} 헤테로알키닐, C_{3-10} 카르보사이클릴, 3-14원 헤테로사이클릴, C_{6-14} 아릴, 및 5-14원 헤테로아릴을 포함하거나, N 원자에 부착된 2개의 R^{cc} 기는 결합하여 3-14원 헤테로사이클릴 또는 5-14원 헤테로아릴 고리를 형성하고, 여기서 각각의 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로알킬, 헤테로알케닐, 헤테로알키닐, 카르보사이클릴, 헤테로사이클릴, 아릴, 및 헤테로아릴은 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 R^{dd} 기로 치환되고, 여기서 R^{aa}, R^{bb}, R^{cc} 및 R^{dd}는 상기 정의된 바와 같다.

[0087] 특정 구체예에서, 질소 원자 상에 존재하는 치환기는 질소 보호기이다 (본원에서 "아미노 보호기"로도 지칭됨). 질소 보호기는 비제한적으로 -OH, $-OR^{aa}$, $-N(R^{cc})_2$, $-C(=O)R^{aa}$, $-C(=O)N(R^{cc})_2$, $-CO_2R^{aa}$, $-SO_2R^{aa}$, $-C(=NR^{cc})R^{aa}$, $-C(=NR^{cc})OR^{aa}$, $-C(=NR^{cc})N(R^{cc})_2$, $-SO_2N(R^{cc})_2$, $-SO_2R^{cc}$, $-SO_2OR^{cc}$, $-SOR^{aa}$, $-C(=S)N(R^{cc})_2$, $-C(=O)SR^{cc}$, $-C(=S)SR^{cc}$, C_{1-10} 알킬 (예컨대, 아르알킬, 헤테로아르알킬), C_{2-10} 알케닐, C_{2-10} 알키닐, C_{1-10} 헤테로알킬, C_{2-10} 헤테로알케닐, C_{2-10} 헤테로알키닐, C_{3-10} 카르보사이클릴, 3-14원 헤테로사이클릴, C_{6-14} 아릴, 및 5-14원 헤테로아릴기를 포함하고, 여기서 각각의 알킬, 알케닐, 알키닐, 헤테로알킬, 헤테로알케닐, 헤테로알키닐, 카르보사이클릴, 헤테로사이클릴, 아르알킬, 아릴, 및 헤테로아릴은 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 R^{dd} 기로 치환되고, 여기서 R^{aa}, R^{bb}, R^{cc} 및 R^{dd}는 본원에서 정의된 바와 같다. 질소 보호기는 당 분야에 잘 알려져 있고, 본원에 참조로서 포함된 문헌[*Protecting groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd edition, John Wiley & Sons, 1999]에 상세하게 기재된 것들을 포함한다.

[0088] 예를 들어, 아미드기 (예컨대, $-C(=O)R^{aa}$)와 같은 질소 보호기는 비제한적으로 포름아미드, 아세트아미드, 클로로아세트아미드, 트리클로로아세트아미드, 트리플루오로아세트아미드, 페닐아세트아미드, 3-페닐프로판아미드, 피콜린아미드, 3-피리딜카르복스아미드, N-벤조일페닐알라닐 유도체, 벤즈아미드, p-페닐벤즈아미드, o-니토페닐아세트아미드, o-니트로페녹시아세트아미드, 아세토아세트아미드, (N'-디티오벤질옥시아실아미노)아세트아미드, 3-(p-하이드록시페닐)프로판아미드, 3-(o-니트로페닐)프로판아미드, 2-메틸-2-(o-니트로페녹시)프로판아미드, 2-메틸-2-(o-페닐아조페녹시)프로판아미드, 4-클로로부탄아미드, 3-메틸-3-니트로부탄아미드, o-니트로신나미드, N-아세틸메티오닌 유도체, o-니트로벤즈아미드 및 o-(벤조일옥시메틸)벤즈아미드를 포함한다.

[0089] 카르바메이트기 (예컨대, -C(=O)OR^{aa})와 같은 질소 보호기는 비제한적으로 메틸 카르바메이트, 에틸 카르바메이트, 9-플루오레닐메틸 카르바메이트 (Fmoc), 9-(2-설포)플루오레닐메틸 카르바메이트, 9-(2,7-디브로모)플루오로에닐메틸 카르바메이트, 2,7-디-t-부틸-[9-(10,10-디옥소-10,10,10,10-테트라하이드로티오크산틸)]메틸 카르바메이트 (DBD-Tmoc), 4-메톡시페나실 카르바메이트 (Phenoc), 2,2,2-트리클로로에틸 카르바메이트 (Troc), 2-트리메틸실릴에틸 카르바메이트 (Teoc), 2-페닐에틸 카르바메이트 (hZ), 1-(1-아다만틸)-1-메틸에틸 카르바메이트 (Adpoc), 1,1-디메틸-2-할로에틸 카르바메이트, 1,1-디메틸-2,2-디브로모에틸 카르바메이트 (DB-t-BOC), 1,1-디메틸-2,2,2-트리클로로에틸 카르바메이트 (TCBOC), 1-메틸-1-(4-바이페닐릴)에틸 카르바메이트 (Bpoc), 1-(3,5-디-t-부틸페닐)-1-메틸에틸 카르바메이트 (t-Bumeoc), 2-(2'- 및 4'-피리딜)에틸 카르바메이트 (Pyoc), 2-(N,N-디사이클로헥실카르복사미도)에틸 카르바메이트, t-부틸 카르바메이트 (BOC), 1-아다만틸 카르바메이트 (Adoc), 비닐 카르바메이트 (Voc), 알릴 카르바메이트 (Alloc), 1-이소프로필알릴 카르바메이트 (Ipaoc), 신나밀 카르바메이트 (Coc), 4-니트로신나밀 카르바메이트 (Noc), 8-퀴놀릴 카르바메이트, N-하이드록시피페리디닐 카르바메이트, 알킬디티오 카르바메이트, 벤질 카르바메이트 (Cbz), p-메톡시벤질 카르바메이트 (Moz), p-니토벤질 카르바메이트, p-브로모벤질 카르바메이트, p-클로로벤질 카르바메이트, 2,4-디클로로벤질 카르바메이트, 4-메틸설피닐벤질 카르바메이트 (Msz), 9-안트릴메틸 카르바메이트, 디페닐메틸 카르바메이트, 2-메틸티오에틸 카르바메이트, 2-메틸설포닐에틸 카르바메이트, 2-(p-톨루엔설포닐)에틸 카르바메이트, [2-(1,3-디티아닐)]메틸 카르바메이트 (Dmoc), 4-메틸티오페닐 카르바메이트 (Mtpc), 2,4-디메틸티오페닐 카르바메이트 (Bmpc), 2-포스포니오에틸 카르바메이트 (Peoc), 2-트리페닐포스포니오이소프로필 카르바메이트 (Ppoc), 1,1-디메틸-2-시아노에틸 카르바메이트, m-클로로-p-아실옥시벤질 카르바메이트, p-(디하이드록시보릴)벤질 카르바메이트, 5-벤즈이속사졸릴메틸 카르바메이트, 2-(트리플루오로메틸)-6-크로모닐메틸 카르바메이트 (Tcroc), m-니트로페닐 카르바메이트, 3,5-디메톡시벤질 카르바메이트, o-니트로벤질 카르바메이트, 3,4-디메톡시-6-니트로벤질 카르바메이트, 페닐(o-니트로페닐)메틸 카르바메이트, t-아밀 카르바메이트, S-벤질 티오카르바메이트, p-시아노벤질 카르바메이트, 사이클로부틸 카르바메이트, 사이클로헥실 카르바메이트, 사이클로펜틸 카르바메이트, 사이클로프로필메틸 카르바메이트, p-데실옥시벤질 카르바메이트, 2,2-디메톡시아실비닐 카르바메이트, o-(N,N-디메틸카르복사미도)벤질 카르바메이트, 1,1-디메틸-3-(N,N-디메틸카르복사미도)프로필 카르바메이트, 1,1-디메틸프로피닐 카르바메이트, 디(2-피리딜)메틸 카르바메이트, 2-퓨라닐메틸 카르바메이트, 2-아이오도에틸 카르바메이트, 이소보르닐 카르바메이트, 이소부틸 카르바메이트, 이소니코티닐 카르바메이트, p-(p'-메톡시페닐아조)벤질 카르바메이트, 1-메틸사이클로부틸 카르바메이트, 1-메틸사이클로헥실 카르바메이트, 1-메틸-1-사이클로프로필메틸 카르바메이트, 1-메틸-1-(3,5-디메톡시페닐)에틸 카르바메이트, 1-메틸-1-(p-페닐아조페닐)에틸 카르바메이트, 1-메틸-1-페닐에틸 카르바메이트, 1-메틸-1-(4-피리딜)에틸 카르바메이트, 페닐 카르바메이트, p-(페닐아조)벤질 카르바메이트, 2,4,6-트리-t-부틸페닐 카르바메이트, 4-(트리메틸암모늄)벤질 카르바메이트, 및 2,4,6-트리메틸벤질 카르바메이트를 포함한다.

[0090] 설폰아미드기 (예컨대, -S(=O)$_2R^{aa}$)와 같은 질소 보호기는 비제한적으로 p-톨루엔설폰아미드 (Ts), 벤젠설폰아미드, 2,3,6,-트리메틸-4-메톡시벤젠설폰아미드 (Mtr), 2,4,6-트리메톡시벤젠설폰아미드 (Mtb), 2,6-디메틸-4-메톡시벤젠설폰아미드 (Pme), 2,3,5,6-테트라메틸-4-메톡시벤젠설폰아미드 (Mte), 4-메톡시벤젠설폰아미드 (Mbs), 2,4,6-트리메틸벤젠설폰아미드 (Mts), 2,6-디메톡시-4-메틸벤젠설폰아미드 (iMds), 2,2,5,7,8-펜타메틸크로만-6-설폰아미드 (Pmc), 메탄설폰아미드 (Ms), β-트리메틸실릴에탄설폰아미드 (SES), 9-안트라센설폰아미드, 4-(4',8'-디메톡시나프틸메틸)벤젠설폰아미드 (DNMBS), 벤질설폰아미드, 트리플루오로메틸설폰아미드, 및 페나실설폰아미드를 포함한다.

[0091] 그 밖의 질소 보호기는 비제한적으로 페노티아지닐-(10)-아실 유도체, N'-p-톨루엔설포닐아미노아실 유도체, N'-페닐아미노티오아실 유도체, N-벤조일페닐알라닐 유도체, N-아세틸메티오닌 유도체, 4,5-디페닐-3-옥사졸린-2-온, N-프탈이미드, N-디티아숙신이미드 (Dts), N-2,3-디페닐말레이미드, N-2,5-디메틸피롤, N-1,1,4,4-테트라메틸디실릴아자사이클로펜탄 부가물 (STABASE), 5-치환된 1,3-디메틸-1,3,5-트리아자사이클로헥산-2-온, 5-치환된 1,3-디벤질-1,3,5-트리아자사이클로헥산-2-온, 1-치환된 3,5-디니트로-4-피리돈, N-메틸아민, N-알릴아민, N-[2-(트리메틸실릴)에톡시]메틸아민 (SEM), N-3-아세톡시프로필아민, N-(1-이소프로필-4-니트로-2-옥소-3-피롤린-3-일)아민, 4차 암모늄 염, N-벤질아민, N-디(4-메톡시페닐)메틸아민, N-5-디벤조수베릴아민, N-트리페닐메틸아민 (Tr), N-[(4-메톡시페닐)디페닐메틸]아민 (MMTr), N-9-페닐플루오레닐아민 (PhF), N-2,7-디클로로-9-플루오레닐메틸렌아민, N-페로세닐메틸아미노 (Fcm), N-2-피콜릴아미노 N'-옥사이드, N-1,1-디메틸티오메틸렌아민, N-벤질리덴아민, N-p-메톡시벤질리덴아민, N-디페닐메틸렌아민, N-[(2-피리딜)메시틸]메틸렌아민, N-(N',N'-디메틸아미노메틸렌)아민, N,N'-이소프로필리덴디아민, N-p-니트로벤질리덴아민, N-

살리실리덴아민, N-5-클로로살리실리덴아민, N-(5-클로로-2-하이드록시페닐)페닐메틸렌아민, N-사이클로헥실리덴아민, N-(5,5-디메틸-3-옥소-1-사이클로헥세닐)아민, N-보란 유도체, N-디페닐보린산 유도체, N-[페닐(펜타아실크로뮴- 또는 텅스텐)아실]아민, N-구리 킬레이트, N-아연 킬레이트, N-니트로아민, N-니트로소아민, 아민 N-옥사이드, 디페닐포스핀아미드 (Dpp), 디메틸티오포스핀아미드 (Mpt), 디페닐티오포스핀아미드 (Ppt), 디알킬포스포르아미데이트, 디벤질 포스포르아미데이트, 디페닐 포스포르아미데이트, 벤젠설펜아미드, o-니트로벤젠설펜아미드 (Nps), 2,4-디니트로벤젠설펜아미드, 펜타클로로벤젠설펜아미드, 2-니트로-4-메톡시벤젠설펜아미드, 트리페닐메틸설펜아미드, 및 3-니트로피리딘설펜아미드 (Npys)를 포함한다.

[0092] 특정 구체예에서, 산소 원자 상에 존재하는 치환기는 산소 보호기이다 ("하이드록실 보호기"로도 지칭됨). 산소 보호기는 비제한적으로 $-R^{aa}$, $-N(R^{bb})_2$, $-C(=O)SR^{aa}$, $-C(=O)R^{aa}$, $-CO_2R^{aa}$, $-C(=O)N(R^{bb})_2$, $-C(=NR^{bb})R^{aa}$, $-C(=NR^{bb})OR^{aa}$, $-C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$, $-S(=O)R^{aa}$, $-SO_2R^{aa}$, $-Si(R^{aa})_3$, $-P(R^{cc})_2$, $-P(R^{cc})_3$, $-P(=O)_2R^{aa}$, $-P(=O)(R^{aa})_2$, $-P(=O)(OR^{cc})_2$, $-P(=O)_2N(R^{bb})_2$, 및 $-P(=O)(NR^{bb})_2$를 포함하고, 여기서 R^{aa}, R^{bb}, 및 R^{cc}는 본원에서 정의된 바와 같다. 산소 보호기는 당 분야에 잘 알려져 있고, 본원에 참조로서 포함된 문헌[*Protecting groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd edition, John Wiley & Sons, 1999]에 상세하게 설명된 것들을 포함한다.

[0093] 예시적인 산소 보호기는 비제한적으로 메틸, 메톡실메틸 (MOM), 메틸티오메틸 (MTM), t-부틸티오메틸, (페닐디메틸실릴)메톡시메틸 (SMOM), 벤질옥시메틸 (BOM), p-메톡시벤질옥시메틸 (PMBM), (4-메톡시페녹시)메틸 (p-AOM), 구아야콜메틸 (GUM), t-부톡시메틸, 4-펜테닐옥시메틸 (POM), 실록시메틸, 2-메톡시에톡시메틸 (MEM), 2,2,2-트리클로로에톡시메틸, 비스(2-클로로에톡시)메틸, 2-(트리메틸실릴)에톡시메틸 (SEMOR), 테트라하이드로피라닐 (THP), 3-브로모테트라하이드로피라닐, 테트라하이드로티오피라닐, 1-메톡시사이클로헥실, 4-메톡시테트라하이드로피라닐 (MTHP), 4-메톡시테트라하이드로티오피라닐, 4-메톡시테트라하이드로티오피라닐 S,S-디옥사이드, 1-[(2-클로로-4-메틸)페닐]-4-메톡시피페리딘-4-일 (CTMP), 1,4-디옥산-2-일, 테트라하이드로퓨라닐, 테트라하이드로티오퓨라닐, 2,3,3a,4,5,6,7,7a-옥타하이드로-7,8,8-트리메틸-4,7-메타노벤조퓨란-2-일, 1-에톡시에틸, 1-(2-클로로에톡시)에틸, 1-메틸-1-메톡시에틸, 1-메틸-1-벤질옥시에틸, 1-메틸-1-벤질옥시-2-플루오로에틸, 2,2,2-트리클로로에틸, 2-트리메틸실릴에틸, 2-(페닐셀레닐)에틸, t-부틸, 알릴, p-클로로페닐, p-메톡시페닐, 2,4-디니트로페닐, 벤질 (Bn), p-메톡시벤질, 3,4-디메톡시벤질, o-니트로벤질, p-니트로벤질, p-할로벤질, 2,6-디클로로벤질, p-시아노벤질, p-페닐벤질, 2-피콜릴, 4-피콜릴, 3-메틸-2-피콜릴 N-옥사이도, 디페닐메틸, p,p'-디니트로벤즈하이드릴, 5-디벤조수베릴, 트리페닐메틸, α-나프틸디페닐메틸, p-메톡시페닐디페닐메틸, 디(p-메톡시페닐)페닐메틸, 트리(p-메톡시페닐)메틸, 4-(4'-브로모페나실옥시페닐)디페닐메틸, 4,4',4"-트리스(4,5-디클로로프탈이미도페닐)메틸, 4,4',4"-트리스(레불리노일옥시페닐)메틸, 4,4',4"-트리스(벤조일옥시페닐)메틸, 3-(이미다졸-1-일)비스(4',4"-디메톡시페닐)메틸, 1,1-비스(4-메톡시페닐)-1'-피레닐메틸, 9-안트릴, 9-(9-페닐)크산테닐, 9-(9-페닐-10-옥소)안트릴, 1,3-벤조디티올란-2-일, 벤즈이소티아졸릴 S,S-디옥사이도, 트리메틸실릴 (TMS), 트리에틸실릴 (TES), 트리이소프로필실릴 (TIPS), 디메틸이소프로필실릴 (IPDMS), 디에틸이소프로필실릴 (DEIPS), 디메틸텍실실릴, t-부틸디메틸실릴 (TBDMS), t-부틸디페닐실릴 (TBDPS), 트리벤질실릴, 트리-p-크실릴실릴, 트리페닐실릴, 디페닐메틸실릴 (DPMS), t-부틸메톡시페닐실릴 (TBMPS), 포르메이트, 벤조일포르메이트, 아세테이트, 클로로아세테이트, 디클로로아세테이트, 트리클로로아세테이트, 트리플루오로아세테이트, 메톡시아세테이트, 트리페닐메톡시아세테이트, 페녹시아세테이트, p-클로로페녹시아세테이트, 3-페닐프로피오네이트, 4-옥소펜타노에이트 (레불리네이트), 4,4-(에틸렌디티오)펜타노에이트 (레불리노일디티오아세탈), 피발로에이트, 아다만토에이트, 크로토네이트, 4-메톡시크로토네이트, 벤조에이트, p-페닐벤조에이트, 2,4,6-트리메틸벤조에이트 (메시토에이트), 알킬 메틸 카르보네이트, 9-플루오레닐메틸 카르보네이트 (Fmoc), 알킬 에틸 카르보네이트, 알킬 2,2,2-트리클로로에틸 카르보네이트 (Troc), 2-(트리메틸실릴)에틸 카르보네이트 (TMSEC), 2-(페닐설포닐) 에틸 카르보네이트 (Psec), 2-(트리페닐포스포니오) 에틸 카르보네이트 (Peoc), 알킬 이소부틸 카르보네이트, 알킬 비닐 카르보네이트 알킬 알릴 카르보네이트, 알킬 p-니트로페닐 카르보네이트, 알킬 벤질 카르보네이트, 알킬 p-메톡시벤질 카르보네이트, 알킬 3,4-디메톡시벤질 카르보네이트, 알킬 o-니트로벤질 카르보네이트, 알킬 p-니트로벤질 카르보네이트, 알킬 S-벤질 티오카르보네이트, 4-에톡시-1-나프틸 카르보네이트, 메틸 디티오카르보네이트, 2-아이오도벤조에이트, 4-아지도부티레이트, 4-니트로-4-메틸펜타노에이트, o-(디브로모메틸)벤조에이트, 2-포르밀벤젠설포네이트, 2-(메틸티오메톡시)에틸, 4-(메틸티오메톡시)부티레이트, 2-(메틸티오메톡시메틸)벤조에이트, 2,6-디클로로-4-메틸페녹시아세테이트, 2,6-디클로로-4-(1,1,3,3-테트라메틸부틸)페녹시아세테이트, 2,4-비스(1,1-디메틸프로필)페녹시

아세테이트, 클로로디페닐아세테이트, 이소부티레이트, 모노숙시노에이트, (E)-2-메틸-2-부테노에이트, o-(메톡시아실)벤조에이트, α-나프토에이트, 니트레이트, 알킬 N,N,N',N'-테트라메틸포스포로디아미데이트, 알킬 N-페닐카르바메이트, 보레이트, 디메틸포스피노티오일, 알킬 2,4-디니트로페닐설페네이트, 설페이트, 메탄설포네이트 (메실레이트), 벤질설포네이트, 및 토실레이트 (Ts)를 포함한다.

[0094] 이러한 및 그 밖의 예시적인 치환기는 상세한 설명, 실시예, 및 청구범위에 보다 상세하게 기재되어 있다. 본 발명은 상기 예시적인 치환기의 목록에 의해 어떠한 방식으로든 제한되지 않는다.

[0095] 본원에서 사용된 용어 "염"은 임의의 그리고 모든 염을 지칭한다.

[0096] 용어 "약학적으로 허용되는 염"은, 올바른 의학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 등 없이 인간 및 하등 동물의 조직과 접촉하여 이용하기에 적합하고 합리적인 이익/위험 비에 상응하는 염을 지칭한다. 약학적으로 허용되는 염은 당 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, Berge 등은 약학적으로 허용되는 염을 문헌[*J. Pharmaceutical Sciences* (1977) 66:1-19]에서 상세하게 기재한다. 본 발명의 화합물의 약학적으로 허용되는 염은 적합한 무기 및 유기산 및 염기로부터 유래된 것들을 포함한다. 약학적으로 허용되는 무독성 산부가염의 예는 무기산, 예컨대 염산, 브롬화수소산, 인산, 황산 및 과염소산 또는 유기산, 예컨대 아세트산, 옥살산, 말레산, 타르타르산, 시트르산, 숙신산 또는 말론산으로 형성되거나 이온 교환과 같은 당 분야에서 이용되는 다른 방법을 이용하여 형성된 아미노기의 염이다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 염은 아디페이트, 알기네이트, 아스코르베이트, 아스파르테이트, 벤젠설포네이트, 벤조에이트, 바이설페이트, 보레이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포르설포네이트, 시트레이트, 사이클로펜탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실설페이트, 에탄설포네이트, 포르메이트, 푸마레이트, 글루코헵토네이트, 글리세로포스페이트, 글루코네이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 하이드로아이오다이드, 2-하이드록시-에탄설포네이트, 락토바이오네이트, 락테이트, 라우레이트, 라우릴 설페이트, 말레이트, 말레에이트, 말로네이트, 메탄설포네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 니트레이트, 올레에이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 펙티네이트, 퍼설페이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스페이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 스테아레이트, 숙시네이트, 설페이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, p-톨루엔설포네이트, 운데카노에이트, 발레레이트 염 등을 포함한다. 적절한 염기로부터 유래된 약학적으로 허용되는 염은 알칼리 금속, 알칼리성 토금속, 암모늄 및 $N^+(C_{1-4}$알킬$)_4$ 염을 포함한다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리성 토금속염은 소듐, 리튬, 포타슘, 칼슘, 마그네슘 등을 포함한다. 추가의 약학적으로 허용되는 염은, 적절한 경우, 무독성 암모늄, 사차 암모늄, 및 할라이드, 하이드록사이드, 카르복실레이트, 설페이트, 포스페이트, 니트레이트, 저급 알킬 설포네이트, 및 아릴 설포네이트와 같은 반대이온을 이용하여 형성된 아민 양이온을 포함한다.

[0097] **도면의 간단한 설명**

[0098] 도 1은 알릴-테일드 Gb3, Gb4, Gb5, Globo H, 및 SSEA4의 화학 구조를 도시한다.

[0099] 도 2a-e는 뉴클레오티드 당 재생과 조합된 글리코실화 반응 및 TLC에 의해 모니터된 합성 결과를 도시한다. A: 예컨대, 알릴-Gb3을 합성하기 위해 UDP-Gal 재생과 조합된 갈락토실화. B: 예컨대, 알릴-Gb4를 합성하기 위해 UDP-GalNAc 재생과 조합된 아세틸갈락토스아민화. C: 예컨대, 알릴-Gb5를 합성하기 위해 UDP-Gal 재생과 조합된 갈락토실화. D: 예컨대, 알릴-Globo H를 합성하기 위해 GDP-Fuc 재생과 조합된 푸코실화. E: 예컨대, 알릴-SSEA4를 합성하기 위해 CMP-Neu5Ac 재생과 조합된 시알릴화.

[0100] 도 3은 본원에 기재된 UDP-Gal 재생 공정과 커플링된 갈락토실트랜스퍼라제에 의해 촉매화될 수 있는, 갈락토스 잔기의 첨가를 수반하는, 글리코스핑고리피드의 생합성 경로를 도시한다.

[0101] 도 4는 뉴클레오티드 당 재생 시스템을 이용한 락토스 (Lac) → Gb3 → Gb4 → Gb5 경로를 통한 Globo H의 제조에서의 효소 합성 전략을 도시한다.

[0102] 도 5는 뉴클레오티드 당 재생 시스템을 이용한 Lac → Gb3 → Gb4 → Gb5 경로를 통한 SSEA4의 제조에서의 효소 합성 전략을 도시한다.

[0103] 도 6은 뉴클레오티드 당 재생 시스템을 이용한 알릴-Lac → 알릴-Gb3 → 알릴-Gb4 → 알릴-Gb5 경로를 통한 알릴-Globo H의 제조에서의 효소 합성 전략을 도시한다.

[0104] 도 7은 뉴클레오티드 당 재생 시스템을 이용한 알릴-Lac → 알릴-Gb3 → 알릴-Gb4 → 알릴-Gb5 경로를 통한 알릴-SSEA4의 제조에서의 효소 합성 전략을 도시한다.

[0105] 도 8은 중간체 알릴-Gb3, 알릴-Gb4, 및 알릴-Gb5의 생합성에서 수득된 고순도를 도시한다.

[0106] 도 9는 변형되지 않은 FutC 및 변형된 FutC를 이용하여 알릴-Gb5로부터 알릴-Globo H의 생합성에서 수득된 고순도를 도시한다.

[0107] 도 10은 JT-FAJ-16을 이용하여 알릴-Gb5로부터 알릴-SSEA4의 생합성에서 수득된 고순도를 도시한다.

[0108] **본 발명의 상세한 설명**

[0109] 신규하게 개발된 뉴클레오티드 당 재생 공정 및 적합한 글리코실트랜스퍼라제의 작용을 통해 당 잔기를 적합한 수용체에 첨가함에 있어서 이들의 용도가 본원에 기재된다. 이러한 접근방법은 연쇄 반응이 중간체를 정제할 필요 없이 올리고사카라이드 (예컨대, Gb3, Gb4, Gb5, Globo H, 및 SSEA4)와 같은 글리코실화 분자를 합성하는 것을 가능케 하여, 뜻밖에도 고수율로 글리코실화 생성물의 예상치 못한 신속한 생성을 발생시킨다. 또한, 본원에 기재된 합성 방법은 요망되는 올리고사카라이드 및 글리코컨쥬게이트의 대규모 생성에 이용될 수 있다.

[0110] **UDP-Gal 재생 시스템 및 갈락토실화에서의 이의 용도**

[0111] UDP-Gal 재생 시스템은 하기 표 1에 열거된 효소를 수반하여, 도 2a에 예시된다:

[0112] **표 1: UDP-Gal 재생 시스템에 이용된 효소**

[0113]

효소	활성	예
갈락토키나제 (GalK)	ATP 의 존재하에 갈락토스-1-포스페이트 (Gal-1-P)를 생성하기 위해 알파-D-갈락토스의 포스포릴화를 촉매화	*E. 콜라이* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 AP012306.1 *H. 사피엔스* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 NP_000145) *M. 하이드로서말리스* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_004368991) *S. 스푸티게나* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 AEC00832) *H. 하이드로시스* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_004451189)
UDP-당 피로포스포릴라제 (USP)	UTP 의 존재하에 Gal-1-P 에서 UDP-Gal로의 전환을 촉매화	*A. 탈리아나* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 AF360236.1 *L. 메이저* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 ABY79093) *T. 크루지* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 ADD10758) *L. 도노바니* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 XP_00385998) *G. 맥스* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 NP_001237434)

효소	활성	예
피루베이트 키나제 (PykF)	포스포에놀피루베이트 (PEP)로부터 ADP로 포스페이트기의 수송을 촉매화하여, 피루베이트 및 ATP 또는 UTP 생성	*E. 콜라이* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 U00096.2) *N. 함부르겐시스* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_576506) *R. 팔루스트리스* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_7830161) *M. 루에스트링겐시스* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_004787669) *H. 하이드로시스* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_004450514) *S. 코코이데스* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_00441096)
피로포스파타제 (PPA) (임의적)	디포스페이트 결합에 대해 작용하는 산 무수물 하이드롤라제	*E. 콜라이* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 U00096.2 *G. 세타* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 CAI77906) *C. 부티리쿰* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 ZP_04525837) *L. 플란타룸* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 EFK28054) *L. 수에비쿠스* (*에컨대*, GenBan 수탁 번호 ZP_09451344)

[0114]

[0115] 본원에 기재된 UDP-Gal 재생 시스템에 이용되는 효소는 야생형 효소일 수 있다. 본원에서 사용된 야생형 효소는 적합한 종에서 발견되는 자연 발생 효소이다. 일부 예에서, GalK, USP, PykF, 및 PPA 효소는 각각 E. 콜라이, A. 탈리아나(*A. thaliana*), E. 콜라이, 및 E. 콜라이로부터 비롯될 수 있다. 이러한 종으로부터의 효소의 예는 상기 표 1에 열거된다. 다른 것들은 당업자에 의해 용이하게 확인될 수 있고, 예컨대, GenBank와 같은 공개적으로 이용가능한 유전자 데이터베이스를 검색할 수 있다. 다른 예에서, 이러한 효소는 당업자의 지식 내에 있는 방금 언급한 종으로부터의 것들의 동족체이다. 예를 들어, 이러한 동족체는 검색 질문으로서 예시적인 효소의 아미노산 서열 또는 코딩 뉴클레오티드 서열을 이용하여 GenBank를 검색함에 의해 확인될 수 있다.

[0116] 대안적으로, UDP-Gal 재생 시스템에 수반되는 효소는 야생형 대응부의 기능성 변이체일 수 있다. 본원에서 사용된, 야생형 효소의 기능성 변이체는 야생-부 대응부와 동일한 효소 활성을 소유하고 전형적으로 높은, 예컨대, 야생형 대응부의 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95, 또는 98% 동일한 아미노산 서열 상동성을 공유한다. 2개의 아미노산 서열의 "퍼센트 동일성"은 문헌[Karlin and Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 90:5873-77, 1993]에서와 같이 변형된, 문헌[Karlin and Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 87:2264-68, 1990]의 알고리듬을 이용하여 결정된다. 그러한 알고리듬은 문헌[Altschul, et al. *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램 (버젼 2.0)에 통합된다. BLAST 단백질 검색은 관심 단백질 분자와 상동인 아미노산 서열을 얻기 위해 XBLAST 프로그램, 점수=50, 단어길이=3으로 수행될 수 있다. 2개의 서열 사이에 갭이 존재하는 경우, 문헌[Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402, 1997]에 기재된 대로 갭을 가진 BLAST를 활용할 수 있다. BLAST 및 갭을 가진 BLAST 프로그램을 활용할 때, 개개 프로그램 (예컨대, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터를 이용할 수 있다.

[0117] 기능성 변이체는 하나 이상의 아미노산 잔기의 첨가, 결실, 또는 치환을 포함하는, 다양한 돌연변이를 지닐 수 있다. 그러한 변이체는 종종 야생형 효소의 효소 활성에 필수적이지 않은 영역에 돌연변이를 함유하고 기능성 도메인에는 돌연변이를 함유하지 않거나 보존적인 아미노산 치환만을 함유할 수 있다. 당업자는 기능적으로 동등한 변이체를 제공하기 위해 리포산 리가제 돌연변이체에서 보존적 아미노산 치환이 이루어질 수 있음을 깨달을 것이고, 즉, 변이체는 특정 리포산 리가제 돌연변이체의 기능적 능력을 유지한다. 본원에서 사용된 "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 치환이 이루어지는 단백질의 상대적인 전하 또는 크기 특성을 변경시키지 않는 아미노산 치환을 지칭한다. 변이체는 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989), 또는 Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York)와 같은 방법을 수집한 참조문헌에서 발견되는 바와 같이 당업자에게 공지된 폴리펩티드 서열을 변경시키는 방법에 따라 제조될 수 있다. 아미노산의 보존적 치환은 하기 그룹 내의 아미노산 중에서 이루어진 치환을 포함한다: (a)

M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; 및 (g) E, D.

[0118] UDP-Gal 재생 시스템에 수반되는 임의의 효소는 통상적인 기법을 통해 제조될 수 있다. 일례에서, 효소는 자연원으로부터 분리된다. 다른 예에서, 효소는 통상적인 재조합 기법에 의해 제조된다. 필요한 경우, 표적 효소의 코딩 서열은 효소를 생성하기 위해 이용된 숙주 세포에 기반하여 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, E. 콜라이 세포가 재조합 기법을 통해 효소를 생성하기 위한 숙주로서 이용되는 경우, 그 효소를 엔코딩하는 유전자는 E. 콜라이에서 일반적으로 이용되는 코돈을 함유하도록 변형될 수 있다.

[0119] 도 2a에 예시된 대로, UDP-Gal 재생 시스템은 갈락토스 잔기를 적합한 기질에 첨가하기 위한 갈락토실트랜스퍼라제의 활성을 통해 갈락토실화 반응과 함께 이용될 수 있다. 갈락토실트랜스퍼라제의 예는 하기 표 2에 열거된다:

[0120] **표 2. 갈락토실트랜스퍼라제**

갈락토실트랜스퍼라제	효소 활성	예
아이소형 1-7 (베타-1,4-갈락토실트랜스퍼라제 1-7)을 포함하는 베타-1,4-갈락토실트랜스퍼라제 (B4GALT)	UDP-Gal로부터 말단 2-아세트아미도-2-데옥시-D-글루코실-기를 지니는 당단백질 또는 당지질 수용체와 같은 적합한 수용체로, 베타 1,4-연결로, 갈락토스의 수송을 촉매화	*호모 사피엔스* [*에컨대*, GI: 903740] *라투스 노르베기쿠스* [*에컨대*, GI: 3258653] *조벨리아 갈락타니보란스* [*에컨대*, GI: 340619721] *클로스트리듐 퍼프린겐스* [*에컨대*, GI: 18309463]
베타-1,3-갈락토실트랜스퍼라제 (B3GALNT)	UDP-Gal로부터 말단 2-아세트아미도-2-데옥시-D-글루코실- 기, 또는 GalNAc 잔기를 지니는 당단백질 또는 당지질 수용체와 같은 적합한 수용체로, 베타 1,3-연결로, 갈락토스의 수송을 촉매화	*쿨렉스 퀸케파시아투스* [*에컨대*, GI:167873909] *제아 메이스* [*에컨대*, GI: 195643406] *브라키스피라 필로시콜리* [*에컨대*, GI: 300871377] *엔테로코쿠스 파에시움* [*에컨대*, GI: 257822935] *에컨대, 헤모필루스 인플루엔자* [L42023.1] 로부터의 LgtD
알파-1,4-갈락토실트랜스퍼라제 (A4GALT) ***에컨대:*** 락토실세라마이드 4-알파-갈락토실트랜스퍼라제	UDP-Gal로부터 *에컨대*, 말단 갈락토스 잔기 또는 GlcNAc 잔기를 지니는 당단백질 또는 당지질과 같은 적합한 수용체로 알파 1,4-연결로 갈락토스의 수송을 촉매화	*호모 사피엔스* [*에컨대*, GI:55956926] *무스텔라 푸토리우스 푸로* [*에컨대*, GI: 355666115] *무스 무스쿨루스* [*에컨대*, GI: 51921295] *라투스 노르베기쿠스* [*에컨대*, GI: 67677925] *에컨대, 네이세리아 메닌지티데스* [*에컨대*, AF355193.1] 로부터의 LgtC
알파-1,3-갈락토실트랜스퍼라제 (A3GALT) ***에컨대:*** 알파-1,3-갈락토실트랜스퍼라제 1 알파-1,3-갈락토실트랜스퍼라제 2	UDP-Gal로부터 *에컨대*, 말단 갈락토스 잔기 또는 GlcNAc 잔기를 지니는 당단백질 또는 당지질과 같은 적합한 수용체로 알파 1,3-연결로 갈락토스의 수송을 촉매화	*무스 무스쿨루스* [*에컨대*, GI:224922807] *무스텔라 푸토리우스 푸로* [*에컨대*, GI: 355690122] *세부스 파엘라* [*에컨대*, GI: 19698748] *라투스 노르베기쿠스* [*에컨대*, GI: 28625949]

[0121]

[0122] 상기 기재된 야생형 갈락토실트랜스퍼라제 및 기능성 변이체 둘 모두는 본 설명의 범위 내에 있다. 이러한 글리코실트랜스퍼라제는 임의의 통상적인 방법을 통해 제조될 수 있다.

[0123] UDP-Gal 재생 시스템과 하나 이상의 갈락토실트랜스퍼라제의 조합은 갈락토스 잔기를 적합한 기질 (수용체)에 고수율로 첨가하는데 이용될 수 있다. 예컨대, 상기 표 2에 기재된 갈락토실트랜스퍼라제용 기질은 당업자에게 잘 알려져 있다. 바람직하게는, 기질은 갈락토스 잔기가 첨가될 수 있는 말단 당 잔기 (예컨대, Gal, GalNAc, 또는 GlcNAc)를 지닌다. 일부 예에서, 기질은 다당류 (> 50 단당류 유닛을 지님), 올리고사카라이드 (2-50 단

당류 유닛을 지님), 당단백질 또는 당펩티드, 또는 당지질이다. 본원에 기재된 갈락토실화 방법에 이용되는 갈락토실트랜스퍼라제의 유형은 관심 최종 생성물 및 최종 생성물을 합성하기 위한 기질에 의존적이며, 이는 충분히 당업자의 지식 범위 내에 있다. 본원에 기재된 조합된 UDP-Gal 재생 시스템/갈락토실트랜스퍼라제 접근방법은 글리코스핑고리피드를 합성하기 위해 이용될 수 있다. 예가 도 3에 예시되어 있다.

[0124] 다른 예에서, 조합된 UDP-Gal 생성 시스템/갈락토실트랜스퍼라제 접근방법을 락토스로부터 Gb3의 합성 또는 Gb4로부터 Gb5의 합성과 같은, Globo-시리즈 올리고사카라이를 합성하는데 이용할 수 있다. 도 2a 및 2c. 또한 하기 설명을 참조하라.

[0125] **UDP-GalNAc 재생 시스템 및 N-아세틸갈락토아민화에서의 이의 용도**

[0126] UDP-GalNAc 재생 시스템은, 적합한 수용체 상에 GalNAc 잔기의 첨가를 위한, 베타1,3-N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제와 같은 N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제 (GalNAcT)와 함께-이용될 수 있다.

[0127] 예시적인 UDP-GalNAc 재생 시스템에 수반되는 효소는 하기 표 3에 제시된다:

[0128] **표 3: UDP-GalNAc 재생 시스템에 이용된 효소**

효소	활성	예
N-아세틸헥소사민 1-키나제 (GalNAcK)	ATP 및 N-아세틸헥소사민을 ADP 및 N-아세틸-알파-D-헥소사민 1-포스페이트로 전환시키기 위한 연속적인 2 기질-2 생성물 메커니즘에 의한 작용.	*B.롱검*으로부터의 GalNAcK(*예컨대*, GenBank 수탁번호 CP000246.1) *B. 브레베* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 ZP_06596651) *A. 헤몰리티쿰* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_003696399 *B. 비피둠* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_003938776)으로부터의 NahK
N-아세틸글루코사민 1-포스페이트 우리딜릴트랜스퍼라제 (GlmU)	UTP 및 N-아세틸-알파-D-글루코사민 1-포스페이트의 디포스페이트 및 UDP-N-아세틸-D-글루코사민으로의 전환을 촉매화	*E. 콜라이* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 U00096.2) *A. 탈리아나* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 AEE31311) *G. 베미드지엔시스* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 ACH37122) *H. 파일로리* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_003728906)로부터의 GlmU
피루베이트 키나제 (PykF)	포스포에놀피루베이트 (PEP)에서 ADP 로의 포스페이트 기의 수송을 촉매화하여, 피루베이트 및 ATP 또는 UTP 생성	*E. 콜라이* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 U00096.2) *N. 함부르겐시스* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_576506) *R. 팔루스트리스* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_7830161) *M. 루에스트링겐시스* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_004787669) *H. 하이드로시스* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_004450514) *S. 코코이데스* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_00441096)

[0129]

효소	활성	예
피로포스파타제 (PPA) (임의적)	디포스페이트 결합에 대해 작용하는 산 무수물 하이드롤라제	*E. 콜라이* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 U00096.2 *G. 세타* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 CAI77906) *C. 부티리쿰* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 ZP_04525837) *L. 플란타룸* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 EFK28054) *L. 수에비쿠스* (*예컨대*, GenBan 수탁 번호 ZP_09451344)

[0130]

[0131] N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제(예컨대, 베타-1,3-GalNAcT 또는 베타-1,4-GalNAcT)는 GAlNAc 잔기가 펩티드 또는 올리고사카라이드와 같은 적합한 수용체 상에 첨가되는 반응을 촉매화하는 효소이다. 예는 H. 인플루엔자(GenBank 수탁 번호 L42023.1)로부터의 LgtD를 포함한다. 그 밖의 예는 B. 가리니이(*B. garinii*) (예컨대, GenBank 수탁 번호 AEW68905)로부터의 LgtD, N. 락타미카(*N. lactamica*)(예컨대, GenBank 수탁 번호 AAN08512)로부터의 LgtD, 및 R. 펠리스(*R. felis*)(예컨대, GenBank 수탁 번호 YP_246702)로부터의 LgtD를 포함하지만 이로 한정되는 것은 아니다.

[0132] 조합된 UDP-GalNAc 재생 시스템/GalNAcT 접근방법에서 이용되는 임의의 효소는 본원에 기재된 대로 야생형 효소 또는 이의 기능성 변이체일 수 있다. 그러한 효소를 제조하기 위해 임의의 통상적인 방법을 이용할 수 있다. 일례에서, 이러한 접근방법은 Gb3으로부터 Gb4를 합성하는데 이용된다. 예컨대, 도 2b를 참조하라.

[0133] **GDP-Fuc 재생 시스템 및 푸코실화에서의 이의 용도**

[0134] GDP-Fuc 재생 시스템은 지질 또는 폴리펩티드와 같은 또 다른 분자에 컨쥬게이션될 수 있는 올리고사카라이드와 같은 적합한 수용체에 푸코스 잔기를 첨가하기 위해 푸코실트랜스퍼라제 (예컨대, 알파1,2-푸코실트랜스퍼라제, 알파1,3-푸코실트랜스퍼라제, 또는 알파2,6-푸코실트랜스퍼라제)와 함께-이용될 수 있다.

[0135] 예시적인 GDP-Fuc 재생 시스템에 수반되는 효소는 하기 표 4에 제시된다:

[0136] **표 4: GDP-Fuc 재생 시스템에 이용된 효소**

효소	활성	예
L-푸코키나제/GDP-푸코스 피로포스포릴라제 (FKP)	푸코스 및 ATP 로부터 Fuc-1-P 및 GDP-Fuc 를 생성하는 이작용기성 효소	*B. 프라질리스* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 CR626927.1 *H. 사피엔스* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 NP_003829) *R. 노르베기쿠스* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 NP_955788)
피루베이트 키나제 (PykF)	포스포에놀피루베이트 (PEP)에서 ADP 로의 포스페이트 기의 수송을 촉매화하여, 피루베이트 및 ATP 또는 UTP 생성	*E. 콜라이* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 U00096.2) *N. 함부르겐시스* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_576506) *R. 팔루스트리스* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_7830161) *M. 루에스트링겐시스* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_004787669) *H. 하이드로시스* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_004450514) *S. 코코이데스* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_00441096)
피로포스파타제 (PPA) (임의적)	디포스페이트 결합에 대해 작용하는 산 무수물 하이드롤라제	*E. 콜라이* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 U00096.2 *G. 세타* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 CAI77906) *C. 부티리쿰* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 ZP_04525837) *L. 플란타룸* (*예컨대*, GenBank 수탁 번호 EFK28054) *L. 수에비쿠스* (*예컨대*, GenBan 수탁 번호 ZP_09451344)

[0137]

[0138] 푸코실트랜스퍼라제는 L-푸코스 당을 GDP-푸코스 (구아노신 디포스페이트-푸코스) 공여체 기질로부터 또 다른 당일 수 있는 수용체 기질로 수송한다. 푸코실트랜스퍼라제는 푸코스 잔기를 N-결합된 글리코실화의 경우에 코어 GlcNAc (N-아세틸글루코사민) 당에 첨가하거나, O-결합된 글리코실화의 경우에 단백질에 첨가할 수 있다. 푸코실트랜스퍼라제는 알파1,3-푸코실트랜스퍼라제, 알파1,2-푸코실트랜스퍼라제, 및 알파1,6-푸코실트랜스퍼라제를 포함한다. 예는 E. 콜라이(예컨대, GenBank 수탁 번호 U00096.2)로부터의 알파1,2-푸코실트랜스퍼라제, B. 프라질리스(*B. fragilis*)(예컨대, GenBank 수탁 번호 YP_213404) 및 X. 라에비스(*X. laevis*)(예컨대, GenBank 수탁 번호 NP_001083664)로부터의 알파 1,3-푸코실트랜스퍼라제, X로부터의 알파 1,6-푸코실트랜스퍼라제를 포함한다.

[0139] 조합된 GDP-Fuc 재생 시스템/FucT 접근방법에 이용된 임의의 효소는 본원에 기재된 대로 야생형 효소 또는 이의 기능성 변이체일 수 있다. 임의의 통상적인 방법을 그러한 효소를 제조하는데 이용할 수 있다. 일례에서, 이러한 접근방법은 Gb3으로부터 Gb4를 합성하는데 이용된다. 예컨대, 도 2d를 참조하라.

[0140] **CMP-Neu5Ac 재생 시스템 및 시알릴화에서의 이의 용도**

[0141] CMP-Neu5Ac 재생 시스템은 올리고사카라이드와 같은 적합한 수용체 기질에 시알산 잔기 (Neu5Ac)를 첨가하기 위해 알파2,3-시알릴트랜스퍼라제와 같은 시알릴트랜스퍼라제와 커플링될 수 있다.

[0142] 예시적인 CMP-Neu5Ac 재생 시스템에 수반되는 효소는 하기 표 5에 제시된다:

[0143] **표 5: CMP-Neu5Ac 재생 시스템에 이용된 효소**

효소	활성	예
시티딘모노포스페이트 키나제 (CMK)	CMP 의 포스포릴화를 촉매화하여 CDP 생성	*E. 콜라이* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 U00096.2 *B. 아밀로리케파시엔스* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 ABS74466) *M. 레프라에* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 CAB08279) *M. 아비움* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 AAS03731) *B. 가리니이* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 AEW68468)
CMP-시알산 합성효소 (Css)	CTP 및 시알산으로부터 CMP 시알산의 합성을 촉매화.	*P. 물토시다* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 AE004439.1 *N. 메닌지티디스* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 AAB60780) *O. 마이키스* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 BAB47150) *I. 이오이히엔시스* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 AAV81361) *C. 제주니* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 ABI32334)
피루베이트 키나제 (PykF)	포스포에놀피루베이트 (PEP)에서 ADP 로의 포스페이트 기의 수송을 촉매화하여, 피루베이트 및 ATP 또는 UTP 생성	*E. 콜라이* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 U00096.2) *N. 함부르겐시스* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_576506) *R. 팔루스트리스* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_7830161) *M. 루에스트링겐시스* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_004787669) *H. 하이드로시스* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_004450514) *S. 코코이데스* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 YP_00441096)

[0144]

효소	활성	예
피로포스파타제 (PPA) (임의적)	디포스페이트 결합에 대해 작용하는 산 무수물 하이드롤라제	*E. 콜라이* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 U00096.2 *G. 세타* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 CAI77906) *C. 부티리쿰* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 ZP_04525837) *L. 플란타룸* (*에컨대*, GenBank 수탁 번호 EFK28054) *L. 수에비쿠스* (*에컨대*, GenBan 수탁 번호 ZP_09451344)

[0145]

[0146] 시알릴트랜스퍼라제는 시알산을 초기 올리고사카라이드에 수송하는 효소이다. 이러한 패밀리의 효소는 시알산을 시알릴화 당지질 (강글리오사이드)의 말단 부분 또는 당단백질의 N- 또는 O-연결된 당 사슬에 부가시킨다. 시알산을 알파2,3 연결을 통해 갈락토스에 부가하는 시알릴트랜스퍼라제 (예컨대, 알파2,3-시알릴트랜스퍼라제), 및 시알산을 알파2,6 연결을 통해 갈락토스 또는 N-아세틸갈락토사민에 부가시키는 시알릴트랜스퍼라제 (예컨대, 알파2,6-시알릴트랜스퍼라제)를 포함하여, 약 20개의 상이한 시알릴트랜스퍼라제가 존재한다. 예는 예컨대, M. 박테리아(*M. bacteria*)(GenBank 수탁 번호 AB308042.1), M. 무스쿨루스(*M. musculus*)(예컨대, GenBank 수탁 번호 BAA06068), 또는 P. 물토시다(*P. multocida*)(예컨대, GenBank 수탁 번호 AET17056)로부터의 알파2,3-시알릴트랜스퍼라제; 및 예컨대, B. 타우루스(*B. taurus*)(예컨대, GenBank 수탁 번호 NP_001008668), C. 그리세우스(*C. griseus*)(예컨대, GenBank 수탁 번호 NP_001233744), 또는 R. 노르베기쿠스(*R. norvegicus*)(예컨대, GenBank 수탁 번호 AAC42086)로부터의 알파2,6-시알릴트랜스퍼라제를 포함한다.

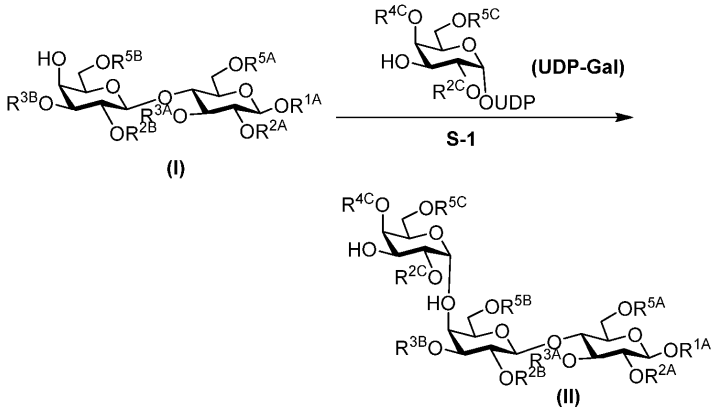
[0147] 조합된 CMP-Neu5Ac 재생 시스템/시알릴트랜스퍼라제 접근방법에 이용된 임의의 효소는 본원에 기재된 대로 야생형 효소 또는 이의 기능성 변이체일 수 있다. 그러한 효소를 제조하기 위해 임의의 통상적인 방법을 이용할 수 있다. 일례에서, 이러한 접근방법은 Gb3으로부터 Gb4를 합성하는데 이용된다. 도 2e.

[0148] **Globo-시리즈 올리고사카라이드의 합성**

[0149] UDP-Gal 재생/갈락토실트랜스퍼라제, UDP-GalNAc 재생/GalNAcT, GDP-Fuc 재생/푸코실트랜스퍼라제, 및 CMP-Neu5Ac 재생/시알릴트랜스퍼라제를 수반하는 상기 기재된 조합된 접근방법은 Gb3. Gb4, Gb5, Globo H (푸코실-Gb5), 및 SSEA4 (시알릴-Gb5)를 포함하는 Globo-시리즈 올리고사카라이드를 합성하기 위해 독립적으로 또는 조합하여 이용될 수 있다. 하기에 더욱 상세하게 논의되는 대로, 이러한 모든 Globo-시리즈 올리고사카라이드는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

[0150] *단계 S-1*

[0151] 생합성 접근방법의 첫 번째 단계 (S-1)는 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 염의 화학식 (II)의 화합물 또는 이의 염으로의 효소적 전환을 수반한다:



[0152]

[0153] 상기 식에서, R^{1A}는 수소, 치환되거나 치환되지 않은 알킬, 치환되거나 치환되지 않은 알케닐, 치환되거나 치환되지 않은 알키닐, 치환되거나 치환되지 않은 카르보사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 아릴, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로아릴, 또는 산소 보호기이고; R^{2A}, R^{3A}, R^{5A}, R^{2B}, R^{3B}, R^{5B}, R^{2C}, R^{4C}, 및 R^{5C}의 각각의 예는 독립적으로 수소, 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 또는 산소 보호기이다.

[0154] 따라서, 한 양태에서, 화학식 (I)의 화합물을 우리딘 디포스페이트-Gal (UDP-Gal) 및 알파-1,4 갈락토실트랜스퍼라제의 존재하에 화학식 (II)의 화합물 또는 이의 염으로 전환시키고, 상기 표 1에 열거된 효소의 세트의 존재하에 갈락토스로부터 UDP-Gal을 재생시키는 것을 포함하는, 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 염으로부터 화학식 (II)의 화합물 또는 이의 염을 효소적으로 합성하는 방법이 제공된다. 예컨대, 도 2a를 참조하라. 이러한 효소 반응을 수행하기 위해, 갈락토스, 갈락토실트랜스퍼라제, UDP-Gal 재생 효소의 세트, ATP, UTP 등 (예컨대, Mg^{++})과 같은 필수적인 구성요소를 혼합시켜 반응 혼합물을 형성할 수 있고, 이를 화학식 (II)의 화합물의 생성을 허용하는 적합한 조건하에 인큐베이션시킬 수 있다. 이러한 조건은 당업자에게 잘 알려져 있다. 또한 하기 예를 참조하라.

[0155] R^{1A} 기는 Globo-시리즈 올리고사카라이드의 다른 분자, 예컨대 단백질 또는 지질로의 컨쥬게이션을 허용하는 작용기로서 기능할 수 있다. 대안적으로, 이는 보호기로서 기능할 수 있다.

[0156] 특정 구체예에서, R^{1A}는 수소이다.

[0157] 다른 구체예에서, R^{1A}는 치환되거나 치환되지 않은 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6}알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_{2-6}알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_{3-6}알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_{4-6}알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_{5-6}알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_{2-5}알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_{2-4}알킬, 치환되거나 치

환되지 않은 C_{2-3}알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 본원에 정의된 바이오틴 및 세라마이드는 치환된 알칼에 포함된다. 특정 구체예에서, R^{1A}는 치환되지 않은 알킬이고, 예컨대, 특정 구체예에서, R^{1A}는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 2차-부틸, 이소-부틸, 또는 3차-부틸이다. 대안적으로, 특정 구체예에서, R^{1A}는 치환된 알킬이다. 특정 구체예에서, R^{1A}는 치환되거나 치환되지 않은 티오, 치환되거나 치환되지 않은 아미노, 카르보닐 (예컨대, 카르복실산), 아지도, 알케닐 (예컨대, 알릴), 알키닐 (예컨대, 프로파질), 바이오틴, 또는 세라마이드 기로 추가로 치환된 알킬이다. 특정 구체예에서, 그러한 치환기는 알킬기의 말단 위치 (마지막 탄소 원자)에서 치환된다. 특정 구체예에서, R^{1A}는 하나 이상의 아미노 ($-NH_2$) 기로 치환된 알킬이다. 특정 구체예에서, R^{1A}는 아미노 ($-NH_2$) 기로 말단 위치 (마지막 탄소 원자)에서 치환된다. 특정 구체예에서, R^{1A}는 $-(CH_2)_n-NH_2$이고, 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6이다. 특정 구체예에서, R^{1A}는 5-펜틸아미노 ($-(CH_2)_5-NH_2$)이다.

[0158] 특정 구체예에서, R^{1A}는 치환되거나 치환되지 않은 알케닐, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_{2-6}알케닐, 치환되거나 치환되지 않은 C_{3-6}알케닐, 치환되거나 치환되지 않은 C_{4-6}알케닐, 치환되거나 치환되지 않은 C_{5-6}알케닐, 치환되거나 치환되지 않은 C_{2-5}알케닐, 치환되거나 치환되지 않은 C_{2-4}알케닐, 치환되거나 치환되지 않은 C_{2-3}알케닐, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알케닐, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알케닐, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알케닐, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알케닐, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알케닐이다. 특정 구체예에서, R^{1A}는 $-(CH_2)_m-CH=CH_2$이고, 여기서 n은 1, 2, 또는 3이다. 특정 구체예에서, R^{1A}는 알릴 ($-CH_2CH=CH_2$)이다. 특정 구체예에서, R^{1A}는 치환되거나 치환되지 않은 티오, 치환되거나 치환되지 않은 아미노, 카르보닐 (예컨대, 카르복실산), 아지도, 알케닐 (예컨대, 알릴), 알키닐 (예컨대, 프로파질), 바이오틴, 또는 세라마이드 기로 추가로 치환된 알케닐이다. 특정 구체예에서, 그러한 치환기는 알케닐기의 말단 위치 (마지막 탄소 원자)에서 치환된다.

[0159] 특정 구체예에서, R^{1A}는 치환되거나 치환되지 않은 알키닐, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_{2-6}알키닐, 치환되거나 치환되지 않은 C_{3-6}알키닐, 치환되거나 치환되지 않은 C_{4-6}알키닐, 치환되거나 치환되지 않은 C_{5-6}알키닐, 치환되거나 치환되지 않은 C_{2-5}알키닐, 치환되거나 치환되지 않은 C_{2-4}알키닐, 치환되거나 치환되지 않은 C_{2-3}알키닐, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알키닐, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알키닐, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알키닐, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알키닐, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알키닐이다. 특정 구체예에서, R^{1A}는 치환되거나 치환되지 않은 티오, 치환되거나 치환되지 않은 아미노, 카르보닐 (예컨대, 카르복실산), 아지도, 알케닐 (예컨대, 알릴), 알키닐 (예컨대, 프로파질), 바이오틴, 또는 세라마이드 기로 추가로 치환된 알키닐이다. 특정 구체예에서, 그러한 치환기는 알키닐기의 말단 위치 (마지막 탄소 원자)에서 치환된다.

[0160] 특정 구체예에서, R^{1A}는 치환되거나 치환되지 않은 헤테로사이클릴, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 5- 내지 8-원 헤테로사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 5- 내지 7-원 헤테로사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 5- 내지 6-원 헤테로사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 5-원 헤테로사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 6-원 헤테로사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 7-원 헤테로사이클릴, 또는 치환되거나 치환되지 않은 8-원 헤테로사이클릴이다. 특정 구체예에서, R^{1A}는 치환되거나 치환되지 않은 티오, 치환되거나 치환되지 않은 아미노, 카르보닐 (예컨대, 카르복실산), 아지도, 알케닐 (예컨대, 알릴), 알키닐 (예컨대, 프로파질), 바이오틴, 또는 세라마이드 기로 추가로 치환된 헤테로사이클릴이다.

[0161] 특정 구체예에서, R^{1A}는 치환되거나 치환되지 않은 카르보사이클릴, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_{3-6} 카르보사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 C_{3-5} 카르보사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 C_{3-4} 카르보사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 C_3 카르보사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 C_4 카르보사이클릴, 치환되거나 치환되지

않은 C_5 카르보사이클릴, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6 카르보사이클릴이다. 특정 구체예에서, R^{1A}는 치환되거나 치환되지 않은 티오, 치환되거나 치환되지 않은 아미노, 카르보닐 (예컨대, 카르복실산), 아지도, 알케닐 (예컨대, 알릴), 알키닐 (예컨대, 프로파질), 바이오틴, 또는 세라마이드 기로 추가로 치환된 카르보사이클릴이다.

[0162] 특정 구체예에서, R^{1A}는 치환되거나 치환되지 않은 아릴, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_6 아릴 (페닐) 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_{10} 아릴 (나프틸)이다. 특정 구체예에서, R^{1A}는 치환되거나 치환되지 않은 티오, 치환되거나 치환되지 않은 아미노, 카르보닐 (예컨대, 카르복실산), 아지도, 알케닐 (예컨대, 알릴), 알키닐 (예컨대, 프로파질), 바이오틴, 또는 세라마이드 기로 추가로 치환된 아릴이다.

[0163] 특정 구체예에서, R^{1A}는 치환되거나 치환되지 않은 헤테로아릴, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 5-원 헤테로아릴 또는 치환되거나 치환되지 않은 6-원 헤테로아릴이다. 특정 구체예에서, R^{1A}는 치환되거나 치환되지 않은 티오, 치환되거나 치환되지 않은 아미노, 카르보닐 (예컨대, 카르복실산), 아지도, 알케닐 (예컨대, 알릴), 알키닐 (예컨대, 프로파질), 바이오틴, 또는 세라마이드 기로 추가로 치환된 헤테로아릴이다.

[0164] 특정 구체예에서, R^{1A}는 수소, 알릴, 치환된 알킬, 바이오틴, 또는 세라마이드이다.

[0165] R^{1A}는 기들의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 상이한 조합을 포함하는 링커기를 제공하기 위해, 임의의 상기 언급된 비-수소 기, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 알킬, 치환되거나 치환되지 않은 알케닐, 치환되거나 치환되지 않은 알키닐, 치환되거나 치환되지 않은 카르보사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로사이클릴, 치환되거나 치환되지 않은 아릴, 치환되거나 치환되지 않은 헤테로아릴의 혼합물일 수 있는 것으로 추가로 고려된다. 비제한적인 예로서, R^{1A}는 기들의 알킬과 아릴 조합, 예컨대, 알킬-아릴-알킬을 포함하고, 링커기 상의 임의의 위치 (예컨대, 말단 위치)에서 치환되거나 치환되지 않은 티오, 치환되거나 치환되지 않은 아미노, 카르보닐 (예컨대, 카르복실산), 아지도, 알케닐 (예컨대, 알릴), 알키닐 (예컨대, 프로파질), 바이오틴, 또는 세라마이드 기로 임의로 추가로 치환될 수 있는 링커기일 수 있다.

[0166] 특정 구체예에서, R^{1A}는 본원에 정의된 대로 산소 보호기이다.

[0167] 특정 구체예에서, R^{2A}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{2A}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{2A}는 산소 보호기이다.

[0168] 특정 구체예에서, R^{3A}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{3A}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{3A}는 산소 보호기이다.

[0169] 특정 구체예에서, R^{5A}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{5A}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{5A}는 산소 보호기이다.

[0170] 특정 구체예에서, R^{2B}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{2B}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구

체예에서, R^{2B}는 산소 보호기이다.

[0171] 특정 구체예에서, R^{3B}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{3B}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{3B}는 산소 보호기이다.

[0172] 특정 구체예에서, R^{5B}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{5B}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{5B}는 산소 보호기이다.

[0173] 특정 구체예에서, R^{2C}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{2C}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{2C}는 산소 보호기이다.

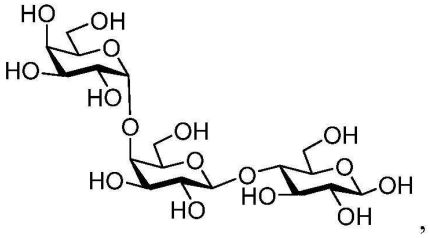
[0174] 특정 구체예에서, R^{4C}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{4C}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{4C}는 산소 보호기이다.

[0175] 특정 구체예에서, R^{5C}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{5C}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{5C}는 산소 보호기이다.

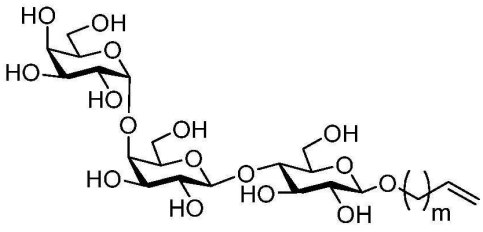
[0176] 특정 구체예에서, R^{2A}, R^{3A}, R^{5A}, R^{2B}, R^{3B}, R^{5B}, R^{2C}, R^{4C}, 및 R^{5C}의 각각의 예는 독립적으로 수소이다. 특정 구체예에서, R^{1A}는 치환되거나 치환되지 않은 알케닐이고, R^{2A}, R^{3A}, R^{5A}, R^{2B}, R^{3B}, R^{5B}, R^{2C}, R^{4C}, 및 R^{5C}의 각각의 예는 독립적으로 수소이다. 특정 구체예에서, R^{1A}는 치환되거나 치환되지 않은 알킬이고, R^{2A}, R^{3A}, R^{5A}, R^{2B}, R^{3B}, R^{5B}, R^{2C}, R^{4C}, 및 R^{5C}의 각각의 예는 독립적으로 수소이다.

[0177] 화학식 (I)의 예시적인 화합물은 비제한적으로 하기 화합물 및 이의 염을 포함한다.

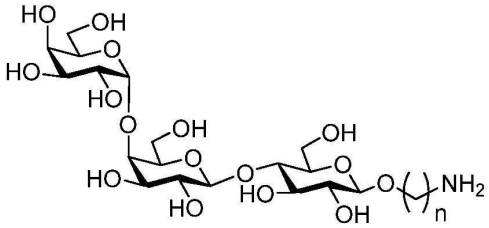
[0178] 화학식 (II)의 예시적인 화합물은 비제한적으로 하기 화합물 및 이의 염을 포함한다:



,



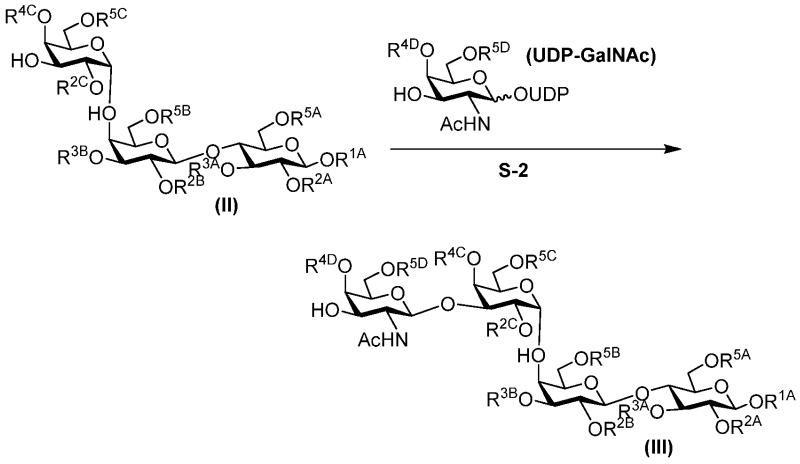
, 및



[0179] .

[0180] *단계 S-2*

[0181] 생합성 접근방법의 두 번째 단계 (S-2)는 화학식 (II)의 화합물 또는 이의 염의 화학식 (III)의 화합물 또는 이의 염으로의 효소적 전환을 수반한다:



[0182]

[0183] 상기 식에서, R^{1A}, R^{2A}, R^{3A}, R^{5A}, R^{2B}, R^{3B}, R^{5B}, R^{2C}, R^{4C}, 및 R^{5C}는 본원에서 정의된 바와 같다; 그리고 R^{4D} 및 R^{5D}의 각각의 예는 독립적으로 수소, 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 또는 산소 보호기이다.

[0184] 특정 구체예에서, R^{2D}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{2D}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{2D}는 질소 보호기, 예컨대, 아세틸 (Ac, $-C{=}OCH_3$)이다.

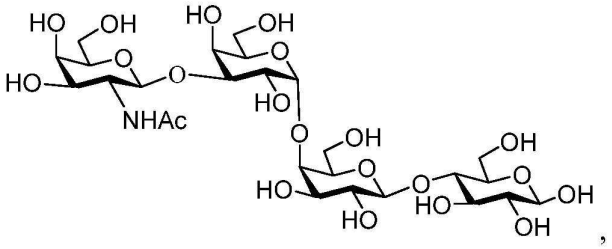
[0185] 특정 구체예에서, R^{4D}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{4D}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나

치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{4D}는 산소 보호기이다.

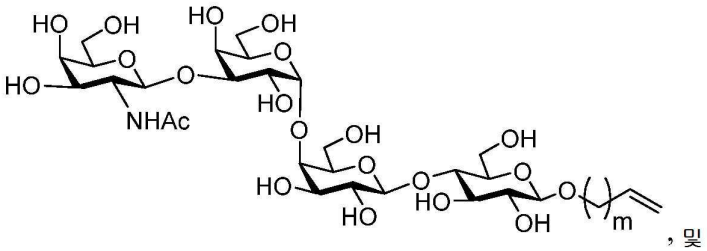
[0186] 특정 구체예에서, R^{5D}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{5D}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{5D}는 산소 보호기이다.

[0187] 특정 구체예에서, R^{4D} 및 R^{5D} 둘 모두는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{2D}는 질소 보호기, 예컨대, 아세틸 (Ac, $-C=OCH_3$)이고, R^{4D} 및 R^{5D}는 각각 수소이다.

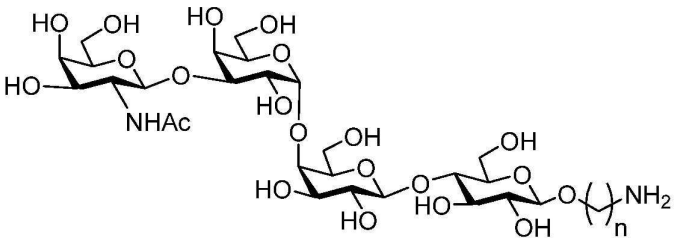
[0188] 화학식 (III)의 예시적인 화합물은 비제한적으로 하기 화합물 및 이의 염을 포함한다:



,



, 및

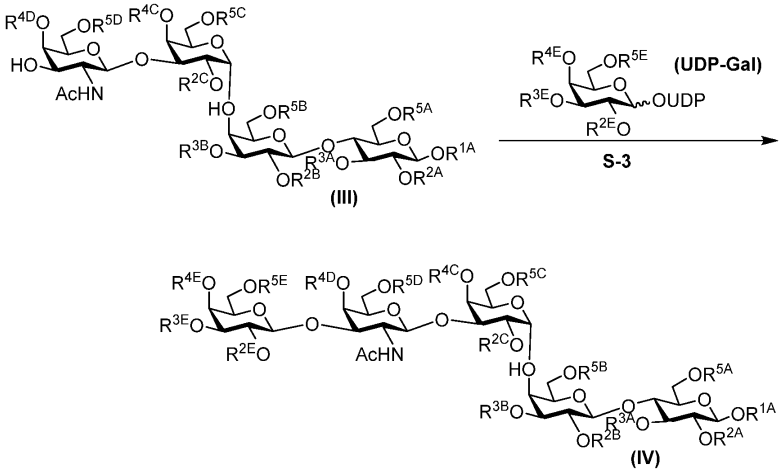


[0189] .

[0190] 단계 S-2에서, 화학식 (II)의 화합물 또는 이의 염으로부터 화학식 (III)의 화합물 또는 이의 염을 효소적으로 합성하는 방법은 적합한 조건하에 수행된다. 화학식 (II)의 기질은 당 분야에 공지되거나 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일부 예에서, 화학식 (II)의 화합물은 상기 단계 S-1에 기재된 반응 혼합물로서 분리된다. 다른 예에서, 단계 S-1의 전체 반응 혼합물은 본원에서 생성된 화학식 (II)의 화합물의 정제 없이 이용된다. 화학식 (II)의 화합물은 GalNAcT (예컨대, 베타1,3-GalNAcT)의 존재하에 화학식 (II) 화합물의 화학식 (III) 화합물로의 전환을 허용하는 조건하에 UDP-GalNAc와 인큐베이션될 수 있다. 일부 예에서, 이러한 GalNAcT-촉매화된 반응은 본원에 기재된 UDP-GalNAc 재생 공정과 커플링된다. 도 2b. 또한 하기 실시예를 참조하라.

[0191] *단계 S-3*

[0192] 생합성 접근방법의 세 번째 단계 (S-3)는 화학식 (III)의 화합물 또는 이의 염의 화학식 (IV)의 화합물 또는 이의 염으로의 효소적 전환을 수반한다:



[0193]

[0194] 상기 식에서, R^{1A}, R^{2A}, R^{3A}, R^{5A}, R^{2B}, R^{3B}, R^{5B}, R^{2C}, R^{4C}, R^{5C}, R^{2D}, R^{4D} 및 R^{5D}는 본원에서 정의된 바와 같다; 그리고 R^{2E}, R^{3E}, R^{4E} 및 R^{5E}의 각각의 예는 독립적으로 수소, 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 또는 산소 보호기이다.

[0195] 특정 구체예에서, R^{2E}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{2E}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{2E}는 산소 보호기이다.

[0196] 특정 구체예에서, R^{3E}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{3E}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{3E}는 산소 보호기이다.

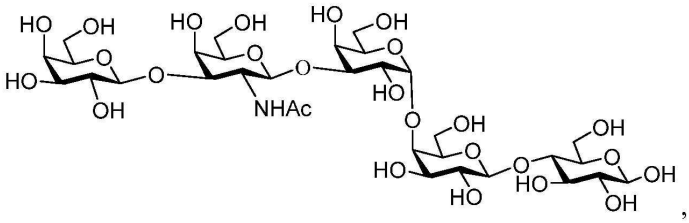
[0197] 특정 구체예에서, R^{4E}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{4E}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{4E}는 산소 보호기이다.

[0198] 특정 구체예에서, R^{5E}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{5E}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{5E}는 산소 보호기이다.

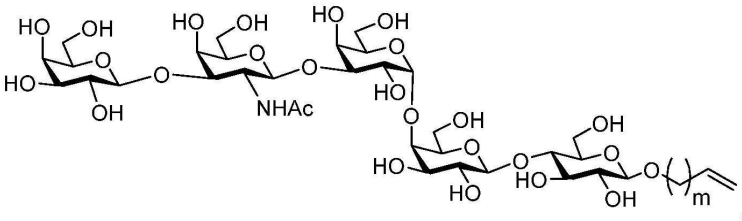
[0199] 특정 구체예에서, R^{3E}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{3E}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{3E}는 산소 보호기이다.

[0200] 특정 구체예에서, R^{2E}, R^{3E}, R^{4E} 및 R^{5E}의 각각의 예는 수소이다.

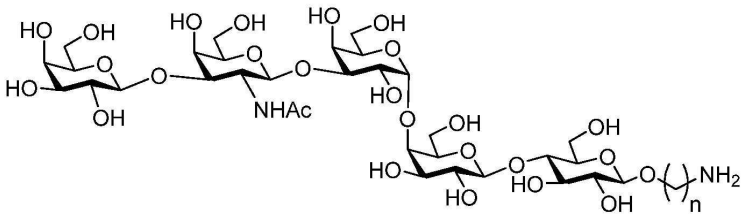
[0201] 화학식 (IV)의 예시적인 화합물은 비제한적으로 하기 화합물 및 이의 염을 포함한다:



,



, 및



.

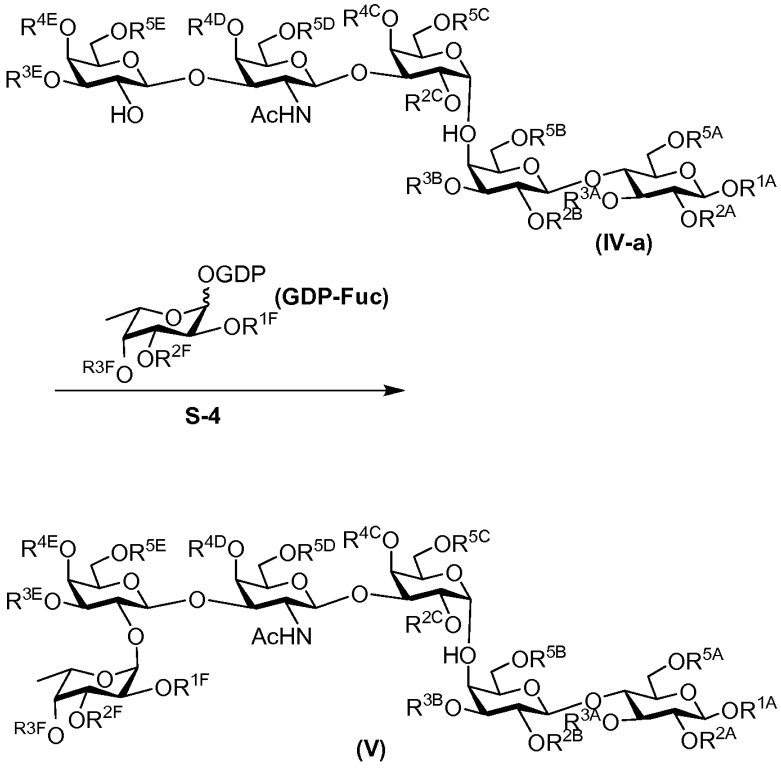
[0202]

[0203] 단계 S-3은 베타1,3-갈락토실트랜스퍼라제의 활성을 통한 효소 반응을 수반하며, 이는 당업자에게 공지된 적합한 조건하에 수행된다. 화학식 (III)의 기질, 예컨대 Gb4는 당 분야에 공지되거나 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일부 예에서, 화학식 (III)의 화합물은 상기 단계 S-2에 기재된 반응 혼합물로부터 분리된다. 다른 예에서, 단계 S-2의 전체 반응 혼합물은 본원에서 생성된 화학식 (III)의 화합물의 정제 없이 이용된다. 화학식 (III)의 화합물은 베타1,3-갈락토실트랜스퍼라제의 존재하에 화학식 (III) 화합물의 화학식 (IV) 화합물로의 전환을 허용하는 조건하에 UDP-Gal과 인큐베이션될 수 있다. 일부 예에서, 이러한 GalT-촉매화된 반응은 본원에 기재된 UDP-Gal 재생 공정과 커플링된다. 도 2a. 또한 하기 실시예를 참조하라.

[0204] 일부 구체예에서, 예컨대, H. 인플루엔자(*H. influenza*)로부터의 LgtD와 같은 베타1,3-GalNAcT/베타1,3-GalT 이작용기성 효소를 단계 S-2 및 S-3 둘 모두에 이용한다.

[0205] *단계 S-4*

[0206] 그 후 화학식 (IV)의 화합물은 말단 고리 E 상의 다양한 위치에서 치환될 수 있다. 예를 들어, R^{2E}가 수소인 화학식 (IV)의 특정 구체예에서, 생합성 접근방법에서의 임의의 단계 (S-4)는 화학식 (IV-a)의 화합물 또는 이의 염의 화학식 (V)의 화합물 또는 이의 염으로의 효소적 전환을 수반한다:



[0207]

[0208] 상기 식에서, R^{1A}, R^{2A}, R^{3A}, R^{5A}, R^{2B}, R^{3B}, R^{5B}, R^{2C}, R^{4C}, R^{5C}, R^{2D}, R^{4D}, R^{5D}, R^{3E}, R^{4E} 및 R^{5E}는 본원에서 정의된 바와 같다; 그리고 R^{1F}, R^{2F} 및 R^{3F}의 각각의 예는 독립적으로 수소, 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 또는 산소 보호기이다.

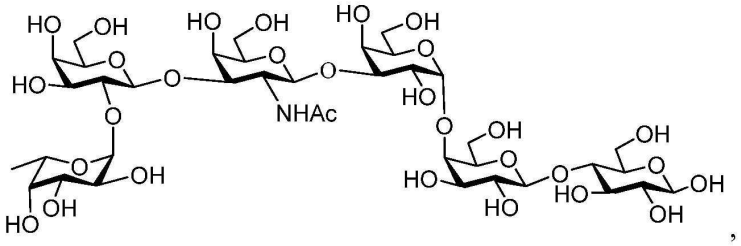
[0209] 특정 구체예에서, R^{1F}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{1F}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{1F}는 산소 보호기이다.

[0210] 특정 구체예에서, R^{2F}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{2F}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{2F}는 산소 보호기이다.

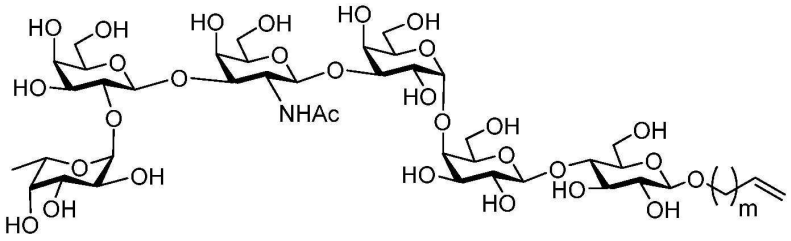
[0211] 특정 구체예에서, R^{3F}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{3F}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{3F}는 산소 보호기이다.

[0212] 특정 구체예에서, R^{1F}, R^{2F} 및 R^{3F}의 각각의 예는 수소이다.

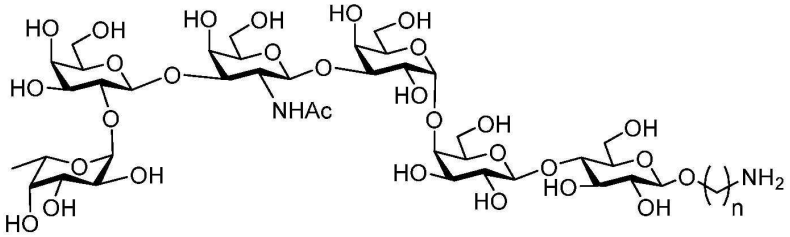
[0213] 화학식 (V)의 예시적인 화합물은 비제한적으로 하기 화합물 및 이의 염을 포함한다:



,



, 및

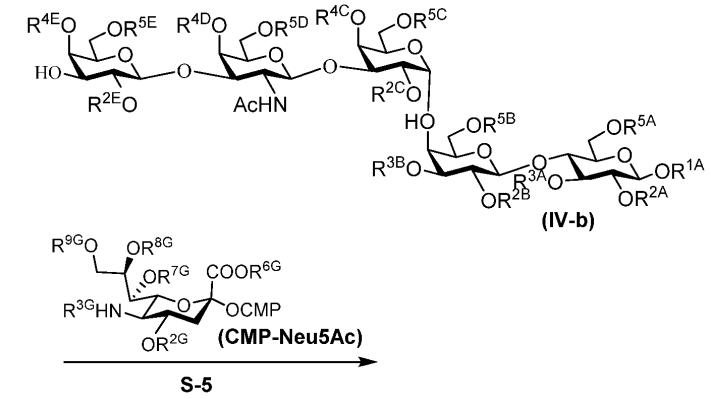


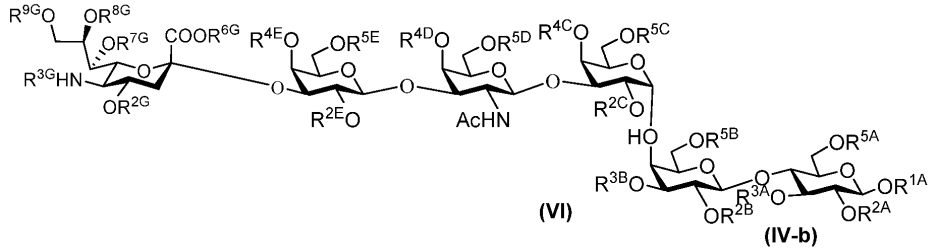
[0214] .

[0215] 단계 S-4는 알파1,2-푸코실트랜스퍼라제의 활성을 통한 효소 반응을 수반하며, 이는 당업자에게 공지된 적합한 조건하에 수행된다. 화학식 (IV)의 기질, 예컨대 Gb5는 당 분야에 공지되거나 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일부 예에서, 화학식 (IV)의 화합물은 상기 단계 S-3에 기재된 반응 혼합물로부터 분리된다. 다른 예에서, 단계 S-3의 전체 반응 혼합물은 본원에서 생성된 화학식 (V)의 화합물의 정제 없이 이용된다. 화학식 (IV)의 화합물은 푸코실트랜스퍼라제의 존재하에 화학식 (IV) 화합물의 화학식 (V) 화합물로의 전환을 허용하는 조건하에 GDP-Fuc와 인큐베이션될 수 있다. 일부 예에서, 이러한 FucT-촉매화된 반응은 본원에 기재된 GDP-Fuc 재생 공정과 커플링된다. 도 2d. 또한 하기 실시예를 참조하라.

[0216] *단계 S-5*

[0217] R^{3E}가 수소인 화학식 (IV)의 다른 구체예에서, 생합성 접근방법에서의 임의의 단계 (S-5)는 화학식 (IV-b)의 화합물 또는 이의 염의 화학식 (VI)의 화합물 또는 이의 염으로의 효소적 전환을 수반한다:





[0218]

[0219] 상기 식에서, R^{1A}, R^{2A}, R^{3A}, R^{5A}, R^{2B}, R^{3B}, R^{5B}, R^{2C}, R^{4C}, R^{5C}, R^{2D}, R^{4D}, R^{5D}, R^{2E}, R^{4E} 및 R^{5E}는 본원에서 정의된 바와 같다; R^{3G}는 수소, 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 또는 질소 보호기이다; 그리고 R^{6G}, R^{7G}, R^{8G}, 및 R^{9G}의 각각의 예는 독립적으로 수소, 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 또는 산소 보호기이다.

[0220] 특정 구체예에서, R^{3G}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{3G}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{3G}는 질소 보호기, 예컨대, 아세틸 (Ac, $-C=OCH_3$)이다.

[0221] 특정 구체예에서, R^{6G}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{6G}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{6G}는 산소 보호기이다.

[0222] 특정 구체예에서, R^{7G}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{7G}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{7G}는 산소 보호기이다.

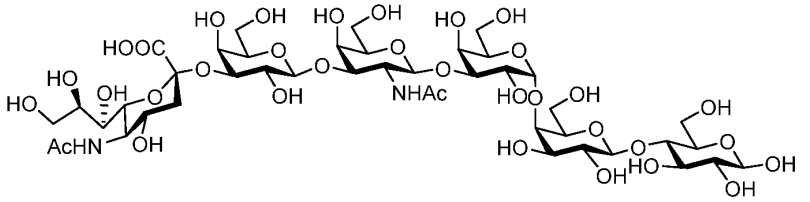
[0223] 특정 구체예에서, R^{8G}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{8G}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{8G}는 산소 보호기이다.

[0224] 특정 구체예에서, R^{9G}는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{9G}는 치환되거나 치환되지 않은 C_{1-6} 알킬, 예컨대, 치환되

거나 치환되지 않은 C_1알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_2알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_3알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_4알킬, 치환되거나 치환되지 않은 C_5알킬, 또는 치환되거나 치환되지 않은 C_6알킬이다. 특정 구체예에서, R^{9G}는 산소 보호기이다.

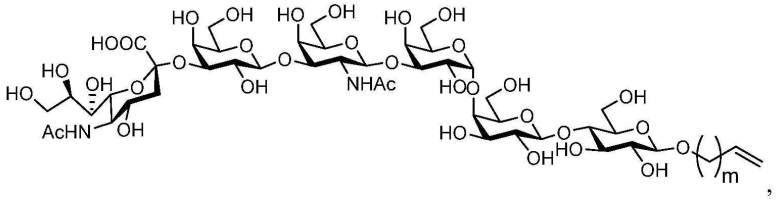
[0225] 특정 구체예에서, R^{6G}, R^{7G}, R^{8G}, 및 R^{9G}의 각각의 예는 수소이다. 특정 구체예에서, R^{3G}는 질소 보호기, 예컨대, 아세틸 (Ac, $-C=OCH_3$)이고, R^{6G}, R^{7G}, R^{8G}, 및 R^{9G}의 각각의 예는 수소이다.

[0226] 화학식 (V)의 예시적인 화합물은 비제한적으로 하기 화합물 및 이의 염을 포함한다:



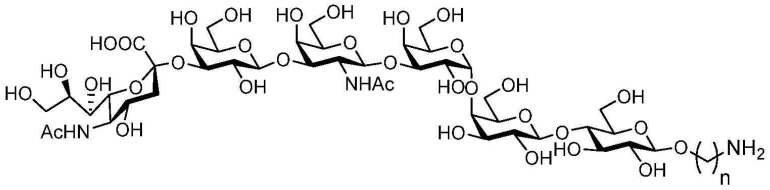
,

[0227]



,

및



.

[0228]

[0229] 단계 S-5는 알파2,3-시알릴트랜스퍼라제의 활성을 통한 효소 반응을 수반하며, 이는 당업자에게 공지된 적합한 조건하에 수행된다. 화학식 (IV)의 기질, 예컨대 Gb5는 당 분야에 공지되거나 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일부 예에서, 화학식 (IV)의 화합물은 상기 단계 S-3에 기재된 반응 혼합물로부터 분리된다. 다른 예에서, 단계 S-3의 전체 반응 혼합물은 본원에서 생성된 화학식 (IV)의 화합물의 정제 없이 이용된다. 화학식 (IV)의 화합물은 시알릴트랜스퍼라제의 존재하에 화학식 (IV) 화합물의 화학식 (V) 화합물로의 전환을 허용하는 조건하에 CMP-Neu5Ac와 인큐베이션될 수 있다. 일부 예에서, 이러한 시알릴트랜스퍼라제-촉매화된 반응은 본원에 기재된 CMP-Neu5Ac 재생 공정과 커플링된다. 도 2e. 또한 하기 실시예를 참조하라.

[0230] 단계 S1-S5의 각각, 뿐만 아니라 상기 기재된 연속적인 단계들의 임의의 조합은 본 발명의 범위 내에 있다. 본원에 기재된 임의의 합성 방법, 예컨대 상기 기재된 방법에서 생성된 임의의 화합물도 본 발명의 범위 내에 있다.

[0231] 일부 구체예에서, 본 발명은 상기 기재된 단계 S-1, S-2, S-3, 및 S-4 또는 단계 S-1, S-2, S-3, 또는 S-5를 포함하는 연쇄 반응을 통해 락토스로부터 Globo H 또는 SSEA4를 합성하는 방법을 특징으로 한다. Globo H 또는 SSEA4는 언테일드 (R^{1A}는 수소이다; 도 3 및 4를 참조하라)거나 테일드 (예컨대, R^{1A}는 알릴이다; 도 5 및 6을 참조하라)일 수 있다. 각각의 단계에서, 글리코실트랜스퍼라제 반응은 상응하는 뉴클레오티드 당 재생 공정과 커플링될 수 있다. 도 3-6. 일례에서, 상기 기재된 방법은 원-포트 방식으로 수행되며, 즉 각각의 이전 반응 혼합물은 이전 반응에서 생성된 기질을 정제하지 않고 다음 단계 반응에 직접 이용된다. 다시 말해, 원-포트 접근방법에는 어떠한 중간체를 제조하기 위한 임의의 단계가 없다. 대안적으로, 단계 S-1 및 S-2는 임의의 중간체의 정제 없이 원-포트 방식으로 수행된다. 단계 S-2 이후에, Gb4는 반응 혼합물로부터 분리되고 정제된

GB4는 다음 단계 S3, S4, 및/또는 S5에 이용된다. 다른 중간체를 분리하기 위한 추가의 정제 단계는 수행되지 않는다.

[0232] 각각의 반응 단계에 이용된 효소는 각각의 반응 혼합물에 용해될 수 있거나, 하나 이상의 지지 부재에 고정될 수 있다. 필요한 경우, 추가의 효소를 연쇄 반응 동안 첨가할 수 있다.

[0233] **효소 반응기**

[0234] 상기 기재된 둘 이상의 연속적인 단계의 임의의 조합을 포함하는 연쇄 효소 반응은 하나 이상의 반응 챔버를 포함하는 효소 반응기에서 수행될 수 있다. 각각의 반응 챔버는 연쇄 반응의 한 단계를 수행하도록 설계된다. 특히, 각각의 반응 챔버는 상기 기재된 단계 1-S 내지 5-S 각각을 포함하는 반응의 한 단계에 수반되는 효소를 포함한다.

[0235] 일부 구체예에서, 각각의 반응 챔버에 있는 하나 이상의 효소 또는 모든 효소는 적합한 지지 부재 (예컨대, 지지 막) 상에 고정된다. 필요한 경우, 연속적인 반응 단계용 반응 챔버는, 이전 반응 챔버에서의 효소 반응의 종료 후, 생성된 반응 혼합물이 다음 반응 챔버로 흘러서 다음 반응 단계가 일어날 수 있도록 연결될 수 있다. 일부 예에서, 이전 반응으로부터의 생성물은 정제되지 않으며 그 생성물을 포함하는 전체 반응 혼합물이 다음 효소 반응이 발생하도록 다음 반응 챔버에 첨가된다. 예컨대, 도 3 및 4를 참조하라.

[0236] 예를 들어, 단계 1-S의 반응은 효소 반응기의 제 1 반응 챔버에서 수행될 수 있고, 이 때 단계 1-S에 수반되는 하나 또는 효소는 지지 부재 상에 고정되어 있다. 단계 1-S의 종료 후, 제 1 반응 챔버의 반응 혼합물 (Gb3 생성물 포함)은 Gb4를 합성하기 위한 단계 2-S에 필수적인 모든 효소 및 시약을 함유하는 제 2 반응 챔버에 배치된다. 일례에서, Gb4는 정제되어 다음 반응 단계에 이용된다. 또 다른 예에서, Gb4를 포함하는 제 2 반응 챔버의 전체 반응 혼합물은 Gb5가 합성되는 단계 3-S에 필요한 효소 및 시약을 함유하는 제 3 반응 챔버에 배치된다. 그 후에, 제 3 반응 챔버로부터의 반응 혼합물은 단계 4-S에 필요한 효소 및 시약을 함유하는 제 4 반응 챔버에 배치되거나 단계 5-S에 필요한 효소 및 시약을 함유하는 제 5 반응 챔버에 배치된다.

[0237] 다른 구체예에서, 효소 반응기는 상기 기재된 합성 단계들 중 하나에 필요한 효소, 시약, 및 적합한 기질을 포함하는 하나의 반응 챔버를 포함한다. 기질은 지지 부재 상에 고정된다. 일례에서, 반응 챔버는 단계 1-S에 필요한 효소 및 시약을 함유하며, 이 때 기질인 Lac-알릴은 지지 부재 상에 고정되어 있다. Gb3-알릴이 합성되는 단계 1-S 후에, 반응 챔버의 반응 혼합물은 단계 2-S에 필요한 효소 및 시약을 함유하는 제 2 반응 혼합물로 교체된다. 단계 2-S에서 Gb4-알릴의 합성 후에, 제 2 반응 혼합물은 Gb5-알릴이 합성되는 단계 3-S를 위한 효소 및 시약을 함유하는 제 3 반응 혼합물로 교체된다. 그 후에, 제 3 반응 혼합물은 단계 4-S (Globo H-알릴을 합성하기 위한)를 위한 효소 및 시약을 함유하는 제 4 반응 혼합물 또는 단계 5-S ($SSEA_4$-알릴을 합성하기 위한)를 위한 효소 및 시약을 함유하는 제 5 반응 혼합물로 교체된다.

[0238] 추가의 상술 없이도, 당업자는 상기 기재에 기반하여 본 발명을 그 최대 범위로 활용할 수 있을 것으로 여겨진다. 따라서, 하기 특수한 구체예는 단지 예시적인 것이며, 어떠한 방식으로든 나머지 기재를 한정하지 않는 것으로 해석되어야 한다. 본원에 인용된 모든 공개문헌은 본원에 언급된 목적이나 요지에 대한 참조로서 포함된다.

[0239] **실시예**

[0240] 본 발명의 이러한 및 그 밖의 양태는, 본 발명의 어떤 특정 실시예를 설명하기 위한 것이며 청구범위에 정의된 그 범위를 제한하려는 것이 아닌 하기 실시예를 고려하여 추가로 이해될 것이다.

[0241] 실시예 1: Globo-시리즈 올리고사카라이드의 합성

[0242] *UDP-Gal 재생을 위한 신규한 방법*

[0243] 2004년에, Kotake 그룹은 UDP-당을 형성하기 위해 상이한 단당류-1-포스페이트에 광범한 기질 특이성을 지닌 Pea Sprout로부터의 효소인 UDP-당 피로포스포릴라제를 발견하였다.[19] 2년 후, Kotake 및 Somers 그룹은 독립적으로 아라비돕시스(Arabidopsis)에 존재하는 유사한 기능 효소인 USP를 공개하였다.[20],[21] 매우 최근에, 유사한 효소가 기생충, 레이슈마니아(Leishmania) 및 트리파노소마(Trypanosoma)에도 존재함이 입증되었다.[22],[23] USP 효소는 UTP를 Glc-1-포스페이트 및 Gal-1-포스페이트 뿐만 아니라 그 밖의 단당류-1-P, GlcA-1-포스페이트, 및 Xyl-1-포스페이트와도 축합시키는 그 고유의 능력으로 인해 흥미롭다. 따라서, 본 발명자들은 Gal-1-포스페

이트를 UTP와 직접 축합시켜 UDP-Gal이 재생되게 하고 UDP-Gal 합성의 제 3 재생을 충족시키기 위해 USP를 선택한다.

[0244] *알릴-Gb3의 합성*

[0245] 반응 혼합물 (200 mL)은 100 mM 트리스-HCl 완충제 (pH 7.0)에 10 mM $MgCl_2$와 함께 10 mmol의 알릴-lac, 10 mmol의 갈락토스, 22 mmol의 포스포에놀피루브산 (PEP), 0.05 mmol의 ATP, 0.125 mmol의 UTP를 함유하였다. 100 U의 α-1,4-갈락토실트랜스퍼라제 (LgtC), 50 U의 갈락토키나제 (GalK), 150 U의 UDP-당 피로포스포릴라제 (USP), 200 U의 피루베이트 키나제 (PykF) 및 200 U의 피로포스파타제 (PPA)를 첨가함에 의해 반응을 개시하였다. 플라스크를 25℃에서 인큐베이션하고 반응 진행을 TLC에 의해 모니터하고, p-아니스알데하이드로 염색하였다. 임의의 반응이 불완전한 경우 반응이 완료될 때까지 효소를 더 첨가하고, 생성물을 TLC 및 ESI-MS에 의해 확인하였다.

[0246] *알릴-Gb4의 합성*

[0247] 알릴-Gb3 합성 후에, 9.9 mmol의 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc), 22 mmol의 PEP, 100 U의 β-1,3-N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제 (β1,3GalNAcT, LgtD), 50 U의 N-아세틸헥소사민 1-키나제 (GalNAcK), 200 U의 N-아세틸글루코사민 1-포스페이트 우리딜릴트랜스퍼라제 (GlmU), 100 U의 PykF 및 100 U의 PPA를 220mL의 용액에 포함하는 추가의 구성요소를 첨가하였다. 혼합물을 25℃에서 인큐베이션하고 반응이 완전해질 때까지 전과 같이 TLC 및 ESI-MS에 의해 모니터하였다. 생성물을 C-18 겔 컬럼에 의해 추가로 정제시키고 NMR에 의해 특성규명하였다.

[0248] *알릴-Gb5의 합성*

[0249] 반응 혼합물 (250 mL)은 100 mM 트리스-HCl 완충제 (pH 7.0)에 10 mM $MgCl_2$와 함께 9 mmol의 알릴-Gb4, 9 mmol의 갈락토스, 22 mmol의 PEP, 0.05 mmol의 ATP, 0.125 mmol의 UTP를 함유하였다. 200 U의 β-1,3-갈락토실트랜스퍼라제 (β1,3GalT, LgtD), 50 U의 GalK, 150 U의 USP, 100 U의 PykF 및 100 U의 PPA의 첨가에 의해 반응을 개시하고, 완료시까지 25℃에서 인큐베이션하였다.

[0250] *알릴-Globo H의 합성*

[0251] 알릴-Gb5 (~4.5 mmol)의 반응 생성물의 절반 양을 추가 정제 없이 알릴-globo H를 생성하는데 직접 이용하였다. 100 mM 트리스-HCl 완충제 (pH 7.0)에 10 mM $MgCl_2$와 함께 5 mmol의 푸코스, 0.05 mmol의 ATP, 0.5 mmol의 GTP, 11 mmol PEP를 함유하는 용액을 25℃에서 인큐베이션된 200 U의 L-푸코키나제/GDP-푸코스 피로포스포릴라제 (FKP), 200 U의 PykF, 200 U의 PPA 및 200 U의 α-1,2-푸코실트랜스퍼라제 (FutC)에 반응이 완료될 때까지 첨가하고, 생성물을 C-18 겔 크로마토그래피에 의해 전과 같이 정제하고 특성규명하였다.

[0252] *알릴-SSEA4의 합성*

[0253] 또 다른 절반의 알릴-Gb5 (4.5 mmol) 반응 혼합물을, 100 mM 트리스-HCl 완충제 (pH 8.0)에서 10 mM $MgCl_2$와 함께 5 mmol의 N-아세틸뉴라민산 (Neu5Ac), 0.05 mmol의 ATP, 0.25 mmol의 CTP, 11 mmol의 PEP에 첨가한 후 50 U의 시티딘 모노포스페이트 키나제 (CMK), 120 U의 CMP-시알산 합성효소 (Css), 100 U의 PykF, 100 U의 PPA 및 150 U의 α-2,3-시알릴트랜스퍼라제 (JT-FAJ-16)를 첨가함에 의해, 알릴-SSEA4를 합성하는데 이용하였다. 진행을 TLC에 의해 모니터하고, 생성물을 상기 기재된 대로 정제하고 특성규명하였다.

[0254] *올리고사카라이드의 정제 및 특성규명*

[0255] 반응 혼합물 중의 단백질을 30분 동안 90℃로 가열시킴에 의해 제거한 후 원심분리시켰다 (5000 rpm, 20분). 이어서 여과액을 C-18 겔 크로마토그래피에 의해 정제하고, 100% H_2O에서 H_2O 중 10% 메탄올의 구배에 의해 용리시켰다. 분획을 수집하고 TLC에 의해 모니터하고 [부탄올/암모늄 하이드록사이드/물 = 5:3:2 (v/v/v)] 알릴-올리고사카라이드를 지닌 분획을 풀링시키고 동결건조시켰다. 순도가 99%를 초과하는 생성물을 등용매 방식으로 (H_2O/아세토니트릴 = 19/81) 중 Cosmosil 5SL-II 컬럼을 이용한 HPLC에 의해 모을 수 있었다. 알릴-Lac, 알릴-Gb3, 알릴-Gb4, 알릴-Gb5, 알릴-Globo H 및 알릴-SSEA4의 구조를 ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, 및 질량 분광분석법 (Avance 600 and APEX-ultra 9.4 T FTICR-MS, Bruker Daltonics)에 의해 분석하였다.

[0256] *뉴클레오티드 당 합성을 위한 유전자 클로닝, 글리코실트랜스퍼라제 및 ATP 재생*

[0257] 모든 유전자를 개개의 프라이머(표 6)에 의해 유전체 DNA 또는 cDNA 라이브러리로부터 PCR을 통해 수득하고, PCR 생성물을 변형된 pET47b 벡터에 라이게이션시켰다. ATG 후에, 다음은 His-tag, AcTEV 프로테아제 절단 부위 및 특수한 제한 인식 효소에 인접한 ccdB 양성 선택 유전자, 또는 C-말단 His-tag에 pET28a이다. 유전자 발현 수준을 증가시키기 위해, 4개의 글리코실트랜스퍼라제를 E. 콜라이에 대한 코돈 최적화를 위해 합성하였다. 올바른 서열을 지닌 플라스미드를 화학적 형질전환 방법에 의해 ArcticExpress/RIL 적격 세포로 형질전환시켰다. 단일 콜로니를 골라서 카나마이신 항생제를 지닌 TB 배지로 밤새 접종하고, 세포 배양액을 신선한 TB 배지로 다시 채운 다음, OD600이 0.5에 도달하는 0.1 mM IPTG의 최종 농도까지 표적 단백질 발현을 유도하였다. 그 후에, 16℃에서 24 h 동안 성장하게 하였다. E. 콜라이 세포를 회수하고, 50mM 소듐 포스페이트 완충제, pH8.0, 300mM 소듐 클로라이드, 및 10mM 이미다졸을 함유하는 완충제에서 미세유동화기에 의해 파괴하였다. 세포를 10,000 rpm에서 4℃로 30분 동안 원심분리하였다. 그 후에, 상청액을 평형화된 Ni-NTA 아가로스에 붓고 침전물을 폐기하였다. 결합된 단백질을 동일한 완충제이지만 더 높은 농도의 이미다졸 (250mM)을 함유하는 완충제에서 용리시켰다. 단백질 농도를 Qubit Protein Quantitation (Invitrogen, CA)에 의해 결정하고, 순도를 SDS-PAGE에 의해 확인하였다.

[0258] **표 6.** E. 콜라이에서 시알리다제 발현에 이용된 프라이머.

SEQ ID NO	프라이머[a]	서열 (5'→3')	제한 효소 부위	유전체 또는 cDNA 풀로부터 유전자 공급원
SEQ ID NO: 1	*galK*-F	CTGTATTTTCAGGGA**GCGATCGC**TATGAGTCTGAAAGAAAA AACA[b]	AsiSI	*E. 콜라이* MG1655 ATCC 700926
SEQ ID NO: 2	*galK*-R	GCCTCGAGTCATTAC**GTTTAAAC**TCAGCACTGTCCTGCTCC TTG	PmeI	
SEQ ID NO: 3	*usp*-F	CTGTATTTTCAGGGA**GCGATCGC**TATGGCTTCTACGGTTGAT TC	AsiSI	아라비돕시스 탈리아나의 cDNA 풀
SEQ ID NO: 4	*usp*-R	GCCTCGAGTCATTAC**GTTTAAAC**TCAATCTTCAACAGAAAA TTTGC	PmeI	
SEQ ID NO: 5	*lgtC*-F[b]	GATATA**CCATGG**AAATGGACATCGTTTTCGCGGCG	NcoI	유전자 최적화
SEQ ID NO: 6	*lgtC*-R[b]	GTGGTG**CTCGAG**GTAGATTTTACGCAGGAAACG	XhoI	
SEQ ID NO: 7	*galnacK*-F	CTGTATTTTCAGGGAGCGATCGCTATGAACAAGACTTATGAT TTTAAAAG	AsiSI	*비피도박테리움 롱굼* ATCC 15697
SEQ ID NO: 8	*galnacK*-R	GCCTCGAGTCATTACGTTTAAACTTAAATGTATGAATATACTA TCTTC	PmeI	
SEQ ID NO: 9	*glmU*-F	CTGTATTTTCAGGGA**GCGATCGC**TATGTTGAATAATGCTATG AGC	AsiSI	*E. 콜라이* MG1655 ATCC 700926
SEQ ID NO: 10	*glmU*-R	GCCTCGAGTCATTAC**GTTTAAAC**TCACTTTTTCTTTACCGGA CG	PmeI	
SEQ ID NO: 11	*lgtD*-F[b]	GATATA**CCATGG**AAAACTGCCCGCTGGTTTCT	NcoI	유전자 최적화
SEQ ID NO: 12	*lgtD*-R[b]	GTGGTG**CTCGAG**GAAGATAACGTTGATTTTACGG	XhoI	
SEQ ID NO: 13	*fkp*-F	CAGGGA**GCGATCGC**TATGCAAAAACTACTATCTTTA	AsiSI	박테리오데스 프라질리스 9343 ATCC 25285
SEQ ID NO: 14	*fkp*-R	CATTAC**GTTTAAAC**TTATGATCGTGATACTTGGAA	PmeI	
SEQ ID NO: 15	*futC*-F[b]	CTGTATTTTCAGGGA**GCGATCGC**TATGGCGTTCAAAGTTGT TCAG	AsiSI	유전자 최적화
SEQ ID NO: 16	*futC*-R[b]	GCCTCGAGTCATTAC**GTTTAAAC**TTACGCGTTGTATTTCTGA GAT	PmeI	
SEQ ID NO: 17	*cmk*-F	CAGGGA**GCGATCGC**TATGACGGCAATTGCCCCGGTT	AsiSI	*E. 콜라이* MG1655 ATCC 700926
SEQ ID NO: 18	*cmk*-R	CATTAC**GTTTAAAC**TTATGCGAGAGCCAATTTCTG	PmeI	
SEQ ID NO: 19	*css*-F	GATATA**CCATGG**AAACAAATATTGCGATCATTCCTG	NcoI	파스퇴렐라 물토시다 ATCC BAA-1113
SEQ ID NO: 20	*css*-R	GTGGTG**CTCGAG**TTTATTGGATAAAATTTCCGCGAG	XhoI	
SEQ ID NO: 21	*jt-faj-16*-F[b]	GATATA**CCATGG**AAATGAACAACGACAACTCTACC	NcoI	유전자 최적화
SEQ ID NO: 22	*jt-faj-16*-R[b]	GTGGTG**CTCGAG**GATGTCAGAGATCAGTTTGATG	XhoI	
SEQ ID NO: 23	*pykF*-F	CTGTATTTTCAGGGA**GCGATCGC**TATGAAAAAGACCAAAAT TGTTTG	AsiSI	*E. 콜라이* MG1655 ATCC 700926
SEQ ID NO: 24	*pykF*-R	GCCTCGAGTCATTAC**GTTTAAAC**TTACAGGACGTGAACAGA TG	PmeI	
SEQ ID NO: 25	*ppa*-F	CAGGGA**GCGATCGC**TATGAGCTTACTCAACGTCCCT	AsiSI	*E. 콜라이* MG1655 ATCC 700926
SEQ ID NO: 26	*ppa*-R	CATTAC**GTTTAAAC**TTATTTATTCTTTGCGCGCTC	PmeI	

[0259]

[0260] [a] 각각의 유전자의 코딩 서열을 증폭하기 위한 정(F) 및 역(R) PCR 반응을 위한 한 쌍의 프라이머.

[0261] [b] 굵게 밑줄친 부분은 제한 효소 인식 부위를 의미한다.

[0262] [c] E. 콜라이에 대해 코돈 최적화. 예컨대, 문헌[Puigbo et al., *Nucleic Acids Research* (2007) 35(S2):W126-W130]을 참조하라.

[0263] *효소 검정*

[0264] 일정한 검정 조건을 유지하기 위해, 모든 활성은 10mM $MgCl_2$, 100mM 트리스와 함께 37℃에서 7.5의 pH로 측정되었다.

[0265] *(i) 갈락토키나제 (GalK), N-아세틸헥소사민 키나제 (GalNAcK), 푸코키나제 (FKP) 및 시티딘 모노포스페이트 키나제 (CMK) 활성의 측정*

[0266] 형광 검정 방법은 NADH 소비에 대해 피루베이트 키나제/락테이트 데하이드로게나제 커플링된 효소 검정을 이용함에 의해 ADP 생산 (ATP 소비)의 모니터에 기반하였다. 예컨대, 문헌[Murray et al., "Mechanism of Human α-1,3-Fucosyltransferase V: Glycosidic Cleavage Occurs Prior to Nucleophilic Attack" *Biochemistry* (1997) 36:823-831; and Gosselin et al., "Continuous Spectrophotometric Assay for Glycosyltransferases" *Analytical Biochemistry* (1994) 220:92-97]을 참조하라. NADH의 형광 특성은 340 nm의 여기 파장 및 450 nm의 방출 파장을 지닌다. 100 mM 트리스 (pH 7.5)에 커플링 효소 (토끼 근육으로부터의 5 유닛의 피루베이트 키나제 및 7 유닛의 락트산 데하이드로게나제) 및 기질 및 보조인자 (0.2 mM NADH, 0.8 mM PEP, 10 mM $MgCl_2$)를 함유하는 100uL의 반응 혼합물을 제조하였다. 개별적인 당의 첨가에 의해 반응을 개시하였다. Grafit version 7 (Erithacus Software, Middlesex, UK)을 이용하여, 실험 데이터를 이론 방정식에 곡선 맞춤시킴에 의해 동역학적 파라미터인 K_{cat} 및 K_m을 산출하였다. 1 유닛의 당 키나제 활성은 25℃에서 분당 1 umol의 당-1-P 형성으로서 정의된다.

[0267] *(ii) UDP-당 피로포스포릴라제 (USP), N-아세틸 글루코사민-1-포스페이트 우리딜트랜스퍼라제 (GlmU), GDP-L-푸코스 피로포스포릴라제 (FKP) 및 CMP-시알산 합성효소 (Css) 활성의 측정*

[0268] 피로포스페이트의 생성을 EnzCheck 피로포스페이트 검정 키트 (Invitrogen, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 검정 구성요소는 UV-Star 마이크로플레이트 (Greiner Bio One, Germany)에 100uL의 규모로 200 uM 2-아미노-6-메르캅토-7-메틸퓨린 리보뉴클레오시드, 1 유닛의 뉴클레오시드 포스포릴라제, 0.03 유닛의 무기 피로포스파타제, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM 트리스, pH 7.5를 포함한다. FKP를 제외한 모든 구성요소를 마이크로플레이트에서 혼합시키고, 편평한 기준선이 달성될 때까지 평형화되게 하였다. 효소의 첨가에 의해 반응을 개시하였다. 1 유닛의 효소 활성은, 25℃에서 분당 1 umol의 피로포스페이트 형성으로서 정의되는 CMP-시알산 합성효소를 제외하고, 25℃에서 분당 개별적인 당-1-Ps로부터 1 umol의 뉴클레오티드 당을 생성하는 것으로서 정의된다.

[0269] *(iii) 글리코실트랜스퍼라제의 측정: α-1,4-갈락토실트랜스퍼라제(LgtC), β 1,3-N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제 (β1,3GalNAcT, LgtD), β-1,3-갈락토실트랜스퍼라제 (LgtD), α-1,2-푸코실트랜스퍼라제 (FutC) 및 α-2,3-시알릴트랜스퍼라제 (JT-FAJ-16)*

[0270] 형광 검정 방법은 NADH 소비에 대해 피루베이트 키나제/락테이트 데하이드로게나제 커플링된 효소 검정을 이용하는 UDP, GDP, 또는 CDP 생산을 모니터하였다. 예컨대, 문헌[Murray et al., "Mechanism of Human α-1,3-Fucosyltransferase V:- Glycosidic Cleavage Occurs Prior to Nucleophilic Attack" *Biochemistry* (1997) 36:823-831; and Gosselin et al., "Continuous Spectrophotometric Assay for Glycosyltransferases" *Analytical Biochemistry* (1994) 220:92-97]을 참조하라. 뉴클레오티드 당을 제외한 검정 구성요소를 다수의 플레이트 형광광도계 (SpectraMax M2 Readers, Molecular Devices)에서 25℃로 동시에 인큐베이션시켰다. 상응하는 뉴클레오티드 당의 첨가에 의해 반응을 개시하였다. Grafit version 7 (Erithacus Software, Middlesex, UK)을 이용하여, 실험 데이터를 이론 방정식에 곡선 맞춤시킴에 의해 동역학적 파라미터인 K_{cat} 및 K_m을 산출하였다. 1 유닛의 활성은 25℃에서 분당 개별적인 뉴클레오티드 당으로부터의 1umol의 당을 수용체로 수송하는 것을 촉매화하는 효소의 양으로서 정의된다.

[0271] *(iv) 피루베이트 키나제 (PyrK)의 측정*

[0272] 피루베이트 키나제 검정도 역시 NADH 소비에 기반하며, 앞서 언급된 당 키나제 측정으로부터 다소 변형되었다. 블랙 멀티플레이트에서 100 mM 트리스 (pH 7.5) 중 0.8 mM ADP, 0.8 mM PEP, 0.2 mM NADH, 10 mM $MgCl_2$, 및 토끼 근육으로부터의 5 유닛의 락트산 데하이드로게나제를 함유하는 100uL의 반응 혼합물을 제조하였다. NADH는 340 nm의 여기 파장 및 450 nm의 방출 파장을 지닌다. 적합한 양의 재조합 E. 콜라이 피루베이트 키나제를 첨가함에 의해 반응을 개시하였다. 1 유닛의 피루베이트 키나제는 25℃에서 분당 1.0 μmole의 포스포(에놀)피루베이트의 피루베이트로의 전환으로서 정의된다.

[0273] *(v) 피로포스파타제 (PPA)의 측정*

[0274] 피로포스파타제 검정은 시판용 키트인 EnzCheck 피로포스페이트 검정 키트로부터의 피로포릴라제 프로토콜에서 다소 변형되었다 (Invitrogen, CA, USA). 검정 구성요소는 적합한 양의 재조합 E. 콜라이 피로포스파타제와 함께 UV-Star 마이크로플레이트 (Greiner Bio One, Germany)에 100uL 규모의 1mM 피로포스페이트, 200 uM 2-아미노-6-메르캅토-7-메틸퓨린 리보뉴클레오시드, 1 유닛의 뉴클레오시드 포스포릴라제, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM 트리스 (pH 7.5)를 포함한다. 1 유닛의 피로포스파타제 활성은 25℃에서 분당 1.0 umole의 유기 피로포스페이트의 유리로서 정의된다.

[0275] *(vi) 최적 pH의 측정*

[0276] 효소 활성을 위한 최적 pH를 소듐 아세테이트, MES, MOPS, HEPES, 트리스-HCl, CHES 완충제를 포함하는 4.0-10.0의 pH 범위의 상기 언급된 표준 효소 검정에서 측정하였다. 완충제의 pH를 인큐베이션의 온도에서 조정하였다. 통계적 평가를 위해 모든 반응은 3중으로 수행되었다.

[0277] *(vii) 최적 이가 금속 이온의 측정*

[0278] 금속 요건에 대한 검정은 표준 검정 조건으로 수행하였다. 효소를 EDTA의 존재 및 부재하에 10mM의 최종 농도로 금속 이온 (Mg^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}+Mn^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, 또는 Ni^{2+})과 혼합시켰다. 통계적 평가를 위해 모든 반응은 3중으로 수행되었다.

[0279] *(viii) 최적 온도의 측정*

[0280] MOPS 완충제 (pH 7.0)에서 적절한 양의 정제된 효소, 10 mM $MgCl_2$ 및 개별적인 기질을 인큐베이션시킴에 의해 효소의 활성에 대한 온도 효과를 확인하였다. 검정 구성을 유지하기 위해, 모든 구성요소를 잘 혼합시키고 검정 온도에서 5분 동안 예열하고, 효소를 첨가시킴에 의해 반응을 시작하고, 다중모드 플레이트 리더 (SpectraMax M5, Molecular Devices)에 의해 일정한 온도에서 기록하였다. 온도는 20 내지 60℃의 범위였다. 통계적 평가를 위해 모든 반응은 3중으로 수행되었다.

[0281] *효소 조성*

[0282] UDP-Gal 재생/갈락토실화

[0283] 1. GalK: 갈락토키나제, E. 콜라이로부터

[0284] 2. USP: 아라비돕시스 탈리아나로부터의 UDP-당 피로포스포릴라제

[0285] 3. LgtC: α1,4갈락토실트랜스퍼라제, 네이세리아 메닌지티디스(*Neisseria meningitidis*)로부터, 그러나 E. 콜라이에 대해 코돈 최적화

[0286] 4. PykF: 피루베이트 키나제, E. 콜라이로부터

[0287] 5. PPA: 피로포스파타제, E. 콜라이로부터

[0288] 코돈-최적화 LgtC 효소의 코딩 서열이 하기에 제공된다 (SEQ ID NO: 27):

```
ATGGACATCGTTTTCGCGGCGGACGACAACTACGCGGCGTACCTGTGCGTTGCGGCGAAA
TCTGTTGAAGCGGCGCACCCGGACACCGAAATCCGTTTCCACGTTCTGGACGCGGGTATC
TCTGAAGCGAACCGTGCGGCGGTTGCGGCGAACCTGCGTGGTGGTGGTGGTAACATCCGT
TTCATCGACGTTAACCCGGAAGACTTCGCGGGTTTCCCGCTGAACATCCGTCACATCTCT
ATCACCACCTACGCGCGTCTGAAACTGGGTGAATACATCGCGGACTGCGACAAAGTTCTG
TACCTGGACATCGACGTTCTGGTTCGTGACTCTCTGACCCCGCTGTGGGACACCGACCTG
GGTGACAACTGGCTGGGTGCGTGCATCGACCTGTTCGTTGAACGTCAGGAAGGTTACAAA
CAGAAAATCGGTATGGCGGACGGTGAATACTACTTCAACGCGGGTGTTCTGCTGATCAAC
CTGAAAAAATGGCGTCGTCACGACATCTTCAAAATGTCTTGCGAATGGGTTGAACAGTAC
AAAGACGTTATGCAGTACCAGGACCAGGACATCCTGAACGGTCTGTTCAAAGGTGGTGTT
TGCTACGCGAACTCTCGTTTCAACTTCATGCCGACCAACTACGCGTTCATGGCGAACCGT
TTCGCGTCTCGTCACACCGACCCGCTGTACCGTGACCGTACCAACACCGTTATGCCGGTT
GCGGTTTCTCACTACTGCGGTCCGGCGAAACCGTGGCACCGTGACTGCACCGCGTGGGGT
GCGGAACGTTTCACCGAACTGGCGGGTTCTCTGACCACCGTTCCGGAAGAATGGCGTGGT
AAACTGGCGGTTCCGCACCGTATGTTCTCTACCAAACGTATGCTGCAGCGTTGGCGTCGT
AAACTGTCTGCGCGTTTCCTGCGTAAAATCTACTGA
```

[0289]

[0290] UDP-GalNAc 재생/아세틸갈락토아민화

[0291] 1. GalNAcK: N-아세틸헥소사민 1-키나제, B. 롱굼(*B. longum*)으로부터

[0292] 2. GlmU: E. 콜라이로부터의 N-아세틸글루코사민 1-포스페이트 우리딜릴트랜스퍼라제

[0293] 3. LgtD: β1,3갈락토실트랜스퍼라제, 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenza*)로부터, 그러나 E. 콜라이에 대해 코돈 최적화

[0294] 4. PykF: 피루베이트 키나제, E. 콜라이로부터

[0295] 5. PPA: 피로포스파타제, E. 콜라이로부터

[0296] 코돈-최적화 LgtD 효소의 코딩 서열이 하기에 제공된다 (SEQ ID NO: 28):

```
ATGGAAAACTGCCCGCTGGTTTCTGTTATCGTTTGCGCGTACAACGCGGAACAGTACATCGACGAATC
TATCTCTTCTATCATCAACCAGACCTACGAAAACCTGGAAATCATCGTTATCAACGACGGTTCTACCG
ACCTGACCCTGTCTCACCTGGAAGAAATCTCTAAACTGGACAAACGTATCAAAATCATCTCTAACAAA
TACAACCTGGGTTTCATCAACTCTCTGAACATCGGTCTGGGTTGCTTCTCTGGTAAATACTTCGCGCG
TATGGACGCGGACGACATCGCGAAACCGTCTTGGATCGAAAAAATCGTTACCTACCTGGAAAAAAACG
ACCACATCACCGCGATGGGTTCTTACCTGGAAATCATCGTTGAAAAAGAATGCGGTATCATCGGTTCT
CAGTACAAAACCGGTGACATCTGGAAAAACCCGCTGCTGCACAACGACATCTGCGAAGCGATGCTGTT
CTACAACCCGATCCACAACAACACCATGATCATGCGTGCGAACGTTTACCGTGAACACAAACTGATCT
TCAACAAAGACTACCCGTACGCGGAAGACTACAAATTCTGGTCTGAAGTTTCTCGTCTGGGTTGCCTG
GCGAACTACCCGGAAGCGCTGGTTAAATACCGTCTGCACGGTAACCAGACCTCTTCTGTTTACAACCA
CGAACAGAACGAAACCGCGAAAAAAATCAAACGTGAAAACATCACCTACTACCTGAACAAAATCGGTA
TCGACATCAAAGTTATCAACTCTGTTTCTCTGCTGGAAATCTACCACGTTGACAAATCTAACAAAGTT
CTGAAATCTATCCTGTACGAAATGTACATGTCTCTGGACAAATACACCATCACCTCTCTGCTGCACTT
CATCAAATACCACCTGGAACTGTTCGACCTGAAACAGAACCTGAAAATCATCAAAAAATTCATCCGTA
AAATCAACGTTATCTTCTAG
```

[0297]

[0298] GDP-FKP 재생/푸코실화

[0299] 1. FKP: L-푸코키나제/GDP-푸코스 피로포스포릴라제, 박테로이데스 프라질리스(*Bacteroides fragilis*)로부터

[0300] 2. FutC: α1,2푸코실트랜스퍼라제, 헬리코박터 파일로르(*Helicobacter pylor*)로부터, 그러나 E. 콜라이에 대해 코돈 최적화

[0301] 3. PykF: 피루베이트 키나제, E. 콜라이로부터

[0302] 4. PPA: 피로포스파타제, E. 콜라이로부터

[0303] 코돈-최적화 FutC 효소의 코딩 서열이 하기에 제공된다 (SEQ ID NO: 29):

```
ATGGCGTTCAAAGTTGTTCAGATCTGCGGTGGTCTGGGTAACCAGATGTTCCAGTACGCGTTCGCGAA
ATCTCTGCAGAAACACTCTAACACCCCGGTTCTGCTGGACATCACCTCTTTCGACTGGTCTGACCGTA
AAATGCAGCTGGAACTGTTCCCGATCGACCTGCCGTACGCGTCTGCGAAAGAAATCGCGATCGCGAAA
ATGCAGCACCTGCCGAAACTGGTTCGTGACGCGCTGAAATGCATGGGTTTCGACCGTGTTTCTCAGGA
AATCGTTTTCGAATACGAACCGAAACTGCTGAAACCGTCTCGTCTGACCTACTTCTTCGGTTACTTCC
AGGACCCGCGTTACTTCGACGCGATCTCTCCGCTGATCAAACAGACCTTCACCCTGCCGCCGCCGCCG
GAAAACAACAAAAACAACAACAAAAAAGAAGAAGAATACCAGTGCAAACTGTCTCTGATCCTGGCGGC
GAAAAACTCTGTTTTCGTTCACATCCGTCGTGGTGACTACGTTGGTATCGGTTGCCAGCTGGGTATCG
ACTACCAGAAAAAAGCGCTGGAATACATGGCGAAACGTGTTCCGAACATGGAACTGTTCGTTTTCTGC
GAAGACCTGGAATTCACCCAGAACCTGGACCTGGGTTACCCGTTCATGGACATGACCACCCGTGACAA
AGAAGAAGAAGCGTACTGGGACATGCTGCTGATGCAGTCTTGCCAGCACGGTATCATCGCGAACTCTA
CCTACTCTTGGTGGGCGGCGTACCTGATCGAAAACCCGGAAAAAATCATCATCGGTCCGAAACACTGG
CTGTTCGGTCACGAAAACATCCTGTGCAAAGAATGGGTTAAAATCGAATCTCACTTCGAAGTTAAATC
TCAGAAATACAACGCGTAA
```

[0304]

[0305] CMP-Neu5Ac 재생/시알릴화

[0306] 1. CMK: 시티딘 모노포스페이트 키나제, E. 콜라이로부터

[0307] 2. Css: CMP-시알산 합성효소, 파스퇴렐라 물토시다(*Pasteurella multocida*)로부터

[0308] 3. JT-FAJ-16: α2,3시알릴트랜스퍼라제, 마린 박테리아(*marine bacteria*)로부터, 그러나 E. 콜라이에 대해 코돈 최적화

[0309] 4. PykF: 피루베이트 키나제, E. 콜라이로부터

[0310] 5. PPA: 피로포스파타제, E. 콜라이로부터

[0311] 코돈-최적화 JT-FAJ-16 효소의 코딩 서열이 하기에 제공된다 (SEQ ID NO: 30):

```
ATGAACAACGACAACTCTACCACCACCAACAACAACGCGATCGAAATCTACGTTGACCGTGCGACCCT
GCCGACCATCCAGCAGATGACCAAAATCGTTTCTCAGAAAACCTCTAACAAAAAACTGATCTCTTGGT
CTCGTTACCCGATCACCGACAAATCTCTGCTGAAAAAAATCAACGCGGAATTCTTCAAAGAACAGTTC
GAACTGACCGAATCTCTGAAAAACATCATCCTGTCTGAAAACATCGACAACCTGATCATCCACGGTAA
CACCCTGTGGTCTATCGACGTTGTTGACATCATCAAAGAAGTTAACCTGCTGGGTAAAAACATCCCGA
TCGAACTGCACTTCTACGACGACGGTTCTGCGGAATACGTTCGTATCTACGAATTCTCTAAACTGCCG
GAATCTGAACAGAAATACAAAACCTCTCTGTCTAAAAACAACATCAAATTCTCTATCGACGGTACCGA
CTCTTTCAAAAACACCATCGAAAACATCTACGGTTTCTCTCAGCTGTACCCGACCACCTACCACATGC
TGCGTGCGGACATCTTCGACACCACCCTGAAAATCAACCCGCTGCGTGAACTGCTGTCTAACAACATC
AAACAGATGAAATGGGACTACTTCAAAGACTTCAACTACAAACAGAAAGACATCTTCTACTCTCTGAC
CAACTTCAACCCGAAAGAAATCCAGGAAGACTTCAACAAAAACTCTAACAAAAACTTCATCTTCATCG
GTTCTAACTCTGCGACCGCGACCGCGGAAGAACAGATCAACATCATCTCTGAAGCGAAAAAAGAAAAC
TCTTCTATCATCACCAACTCTATCTCTGACTACGACCTGTTCTTCAAAGGTCACCCGTCTGCGACCTT
CAACGAACAGATCATCAACGCGCACGACATGATCGAAATCAACAACAAAATCCCGTTCGAAGCGCTGA
TCATGACCGGTATCCTGCCGGACGCGGTTGGTGGTATGGGTTCTTCTGTTTTCTTCTCTATCCCGAAA
GAAGTTAAAAACAAATTCGTTTTCTACAAATCTGGTACCGACATCGAAAACAACTCTCTGATCCAGGT
TATGCTGAAACTGAACCTGATCAACCGTGACAACATCAAACTGATCTCTGACATCTAA
```

[0312]

[0313] *재료 및 화학물질*

[0314] 모든 뉴클레오티드, 당, 뉴클레오티드 당 및 화학물질은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)로부터 구입하였다. 제한 효소 및 T4 DNA 리가제는 NEB (Beverly, MA)로부터 얻었다. 프라이머는 Proligo Singapore Pte Ltd (Singapore)에 주문하였다. Ni-NTA 아가로스는 Qiagen (SantClarita, CA)에서 얻었다. Bio-Gel P2 겔은 Bio-Rad (Hercules, CA)로부터 구입하였다. 플라스미드 pET28a, pET47b 및 0.25mm 층 두께로 Silica Gel 60, F254에 덮인 미리 코팅된 유리 플레이트 TLC는 EMD Chemicals Inc (Carlsbad, CA)로부터 구입하였다. ArcticExpress/RIL 적격 세포는 Agilent Genomics (La Jolla, CA)로부터 입수하였다. 상기 언급되지 않은 모든 그 밖의 재료는 가능한 한 고품질로 구입하였다.

[0315] 모든 반응은 박층 크로마토그래피 (이동상: 부탄올:아세테이트:물=5:3:2)에 의해 모니터되었다. p-아니스알데하이드에 의해 TLC를 염색하였다.

[0316] *알릴-Lac의 합성*

[0317] 링커를 지닌 상이한 락토스의 합성은 문헌에 보고된 방법에 따랐다 [Carbohydrate Research 2004, 339, 2415-2424.].

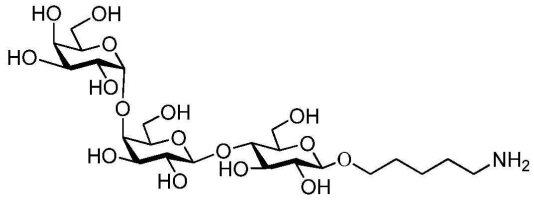
^{1}H NMR (600 MHz, D2O) δ 6.01 (m, 1H), 5.40-5.37 (dd, *J* = 17.3, 1.4 Hz, 1H), 5.30-5.28 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 4.54 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.46 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.41-4.38 (m, 1H), 4.25-4.22 (m, 1H), 4.00-3.97 (dd, *J* = 12.3, 2.1 Hz, 1H), 3.93 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 3.80-3.71 (m, 4 H), 3.67-3.53 (m, 5H), 3.35-3.33 (m, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, D2O) δ 133.3, 118.7, 102.9, 101.0, 78.3, 75.3, 74.7, 74.4, 72.8, 72.5, 70.9, 70.6, 68.5, 60.9, 60.1; HRMS (ESI-TOF, MNa^{+}) $C_{15}H_{26}O_{11}Na^{+}$ 계산치 405.1367, 실측치 405.1346.

[0318]

[0319] *링커를 지닌 Gb3의 대규모 생성*

[0320] 링커를 지닌 5 mmol 락토스, 5 mmol 갈락토스, 12 mmol 포스포에놀피루브산(PEP), 0.25 mmol ATP, 0.25 mmol UTP 및 10 mM $MgCl_2$를 100 mM 트리스-HCl 완충제 (pH 7.5) 용액에 첨가하였다. 적합한 양의 α-1,4-갈락토실트랜스퍼라제 (LgtC), 갈락토키나제 (GalK), UDP-당 피로포스포릴라제 (USP), 피루베이트 키나제 (PykF) 및 피로포스파타제 (PPA)의 첨가에 의해 반응을 개시하였다. 플라스크를 부드럽게 진탕시키며 16~50℃의 인큐베이터에 두었다. 반응을 TLC에 의해 모니터하였다. 반응이 중단되면 효소를 더 첨가하였다. 더 이상의 출발 물질이 TLC에 의해 관찰되지 않을 때 반응을 중단시켰다. Gb3 생성물을 ^{18}C 역상 컬럼에 의해 99% 수율로 분리시켰다.

알릴 -Gb3: ^{1}H NMR (600 MHz, D_2O) δ 6.00 (m, 1H), 5.42 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H), 5.32 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 4.97 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 4.56 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.53 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.43-4.37 (m, 2H), 4.27-4.24 (m, 1H), 4.06-3.58 (m, 16H), 3.37-3.34 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, D2O) δ 133.3, 118.7, 103.3, 100.9, 100.3, 78.6, 77.3, 75.4, 74.8, 74.5, 72.9, 72.2, 70.9, 70.8, 70.6, 69.1, 68.9, 68.5, 60.5, 60.4, 60.0; HRMS (ESI-TOF, MNa^{+}) $C_{21}H_{36}O_{16}Na^{+}$ 계산치 567.1896, 실측치 567.1858.



5- 아미노펜틸 -Gb3

^{1}H NMR (600 MHz, D_2O) δ 4.97 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 4.56 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.54-4.50 (m, 2H), 4.37 (dd, *J* = 6.0 Hz, *J* = 0.6 Hz, 1H), 4.27-4.24 (m, 1H), 4.06-3.59 (m, 18H), 3.35 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.03 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.75-1.68 (m, 4H), 1.51-1.46 (m, 2H); ^{13}C NMR (150 MHz, D2O) δ 103.3, 101.9, 100.3, 78.7, 77.3, 75.4, 74.8, 74.5, 72.9, 72.2, 70.9, 70.8, 70.6, 69.1, 68.9, 68.5, 60.5, 60.4, 60.0, 39.3, 28.1, 26.4, 22.1.

[0321]

[0322] *링커를 지닌 Gb4의 대규모 생성*

[0323] 링커를 지닌 5 mmol Gb3, 5 mmol N-아세틸갈락토사민 (GalNAc), 12 mmol 포스포에놀피루브산 (PEP), 0.25 mmol ATP, 0.25 mmol UTP 및 10 mM $MgCl_2$를 100 mM 트리스-HCl 완충제 (pH 7.5) 용액에 첨가하였다. 적합한 양의 β-1,3-N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제 (LgtD), N-아세틸헥소사민 1-키나제 (GalNAcK), N-아세틸글루코사민 1-포스페이트 우리딜릴트랜스퍼라제 (GlmU), 피루베이트 키나제 (PykF) 및 피로포스파타제 (PPA)의 첨가에 의해 반응을 개시하였다. 플라스크를 부드럽게 진탕시키며 16~50℃의 인큐베이터에 두었다. 반응을 TLC에 의해 모니터하였다. 반응이 중단되면 효소를 더 첨가하였다. 더 이상의 출발 물질이 TLC에 의해 관찰되지 않을 때 반응을 중단시켰다. Gb4 생성물을 ^{18}C 역상 컬럼에 의해 96% 수율로 분리시켰다.

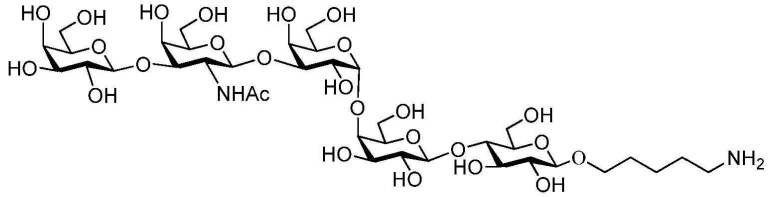
알릴 -Gb4: ^{1}H NMR (600 MHz, D_2O) δ 6.01 (m, 1H), 5.40-5.38 (dd, *J* = 17.3, 1.4 Hz, 1H), 5.30 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 4.92 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 4.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.54 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.53 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.42-4.38 (m, 2H), 4.26-4.22 (m, 2H), 4.05 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 4.01-3.99 (dd, *J* = 12.3, 1.8 Hz, 1H), 3.98-3.89 (m, 5H), 3.86-3.74(m, 7H), 3.72-3.57 (m, 7H), 3.37-3.34 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 2.05 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, D2O) δ 133.2, 118.7, 103.3, 103.2, 100.9, 100.4, 78.7, 78.6, 77.2, 75.4, 74.9, 74.8, 74.5, 72.9, 72.1, 70.9, 70.8, 70.6, 70.2, 68.9, 67.7, 67.6, 60.9, 60.5, 60.3, 60.2, 60.0, 52.6, 22.2; HRMS (MALDI, MNa^+) $C_{29}H_{49}NO_{21}Na^+$ 계산치 770.2689, 실측치 770.2654.

[0324]

[0325] *링커를 지닌 Gb5의 대규모 생성*

[0326] 5 mmol 알릴-Gb4, 5 mmol 갈락토스, 12 mmol 포스포에놀피루브산(PEP), 0.25 mmol ATP, 0.25 mmol UTP를 10 mM $MgCl_2$와 함께 100 mM 트리스-HCl 완충제 (pH 7.5)에 첨가하였다. 적합한 양의 β-1,3-갈락토실트랜스퍼라제, 갈락토키나제 (GalK), UDP-당 피로포스포릴라제 (USP), 피루베이트 키나제 (PykF) 및 피로포스파타제 (PPA)의 첨가에 의해 반응을 개시하였다. 플라스크를 부드럽게 진탕시키며 16~50℃의 인큐베이터에 두었다. 반응을 TLC에 의해 모니터하였다. 반응이 중단되면 효소를 더 첨가하였다. 더 이상의 출발 물질이 TLC에 의해 관찰되지 않을 때 반응을 중단시켰다. Gb5 생성물을 ^{18}C 역상 컬럼에 의해 95% 수율로 분리시켰다.

알릴 -Gb5: ^{1}H NMR (600 MHz, D_2O) δ 6.01 (m, 1H), 5.41-5.38 (dd, *J* = 17.3, 1.4 Hz, 1H), 5.31 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 4.93 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.71 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.55 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.53 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.47 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.42-4.39 (m, 2H), 4.27-4.23 (m, 2H), 4.20 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 4.09-3.90 (m, 8H), 3.87-3.59(m, 17H), 3.55-3.52 (m, 1H), 3.36-3.33 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 2.04 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, D2O) δ 175.1, 133.2, 118.7, 104.8, 103.3, 102.9, 100.9, 100.4, 79.6, 78.7, 78.6, 77.2, 75.4, 74.9, 74.8, 74.6, 74.5, 72.9, 72.4, 72.1, 70.9, 70.6 (2C), 70.2, 68.9, 68.5, 67.9, 67.6, 60.9 (2C), 60.33, 60.28, 60.0, 51.5, 22.2; HRMS (ESI-TOF, MNa^+) $C_{35}H_{59}NO_{26}Na^+$ 계산치 932.3218, 실측치 932.3235.



5- 아미노펜틸 -Gb5

^{1}H NMR (600 MHz, D_2O), 4.47 (d, 1H, *J* = 8.42 Hz), 4.30 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 4.28 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 4.24 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 4.19 (t, 1H *J* = 7.0 Hz), 4.04 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz), 3.97 (d, 1H, *J* = 2.98 Hz), 3.87-3.35 (m, 32H), 3.30 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz), 3.09 (t, 1H, *J* = 8.5 Hz), 2.79 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 1.82 (s, 3H), 1.51-1.43, (m, 4H), 1.28-1.21 (m, 2H) ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O), δ 175.0, 104.7, 103.1, 102.8, 101.8, 100.2, 79.4, 78.5, 78.4, 76.9, 75.3, 74.8, 74.7, 74.4, 74.3, 72.8, 72.2, 71.9, 70.6, 70.4, 70.0, 69.9, 68.7, 68.4, 67.8, 67.4, 60.82, 60.77, 60.13, 60.1, 59.8, 51.3, 39.1, 28.0, 26.3, 22.1, 21.9 MALDI-TOF: $C_{37}H_{66}N_2O_{26}$ $[M+H]^+$ 계산치 955.3904; 실측치 955.3972

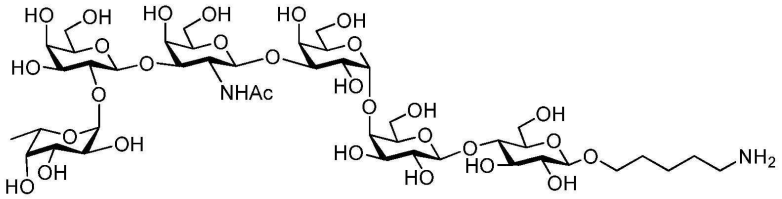
[0327]

[0328] *링커를 지닌 Globo H의 대규모 생성*

[0329] 링커를 지닌 5 mmol Gb5, 5 mmol 푸코스, 12 mmol 포스포에놀피루브산(PEP), 0.25 mmol ATP, 0.25 mmol GTP를 10 mM $MgCl_2$와 함께 100 mM 트리스-HCl 완충제 (pH 7.5)에 첨가하였다. 적합한 양의 α-1,2-푸코실트랜스퍼라제, L-푸코키나제/GDP-푸코스 피로포스포릴라제 (FKP), 피루베이트 키나제 (PykF) 및 피로포스파타제 (PPA)의 첨가에 의해 반응을 개시하였다. 플라스크를 부드럽게 진탕시키며 16~50℃의 인큐베이터에 두었다. 반응을 TLC에 의해 모니터하였다. 반응이 중단되면 효소를 더 첨가하였다. 더 이상의 출발 물질이 TLC에 의해 관찰되

지 않을 때 반응을 중단시켰다. Globo H 생성물을 ^{18}C 역상 컬럼에 의해 94% 수율로 분리시켰다.

알릴 -Globo H: ^{1}H NMR (600 MHz, D_2O) δ 6.01 (m, 1H), 5.41-5.38 (dd, *J* = 17.3, 1.4 Hz, 1H), 5.31 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 5.24 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.91 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 4.63 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.56-4.52 (m, 3H), 4.42-4.40 (m, 2H), 4.26-4.23 (m, 3H), 4.12 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 4.05 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 4.03-3.59 (m, 28 H), 3.36-3.33 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 2.06 (s, 3H), 1.24 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, D2O) δ 174.3, 133.2, 118.7,103.9, 103.2, 102.0, 100.9, 100.4, 99.3, 78.7, 78.3, 77.1, 76.3, 76.1, 75.5, 75.0, 74.8, 74.6, 74.5, 73.5, 72.9, 72.1, 71.8, 70.8, 70.6, 70.1, 69.5, 69.2, 69.1, 68.5, 68.0, 67.8, 66.8, 60.95, 60.93, 60.3 (2C), 60.0, 51.6, 22.2, 15.3; HRMS (MALDI, MNa+) $C_{41}H_{70}NO_{30}Na^+$ 계산치 1079.3875, 실측치 1078.4145.



5- 아미노펜틸 -Globo H

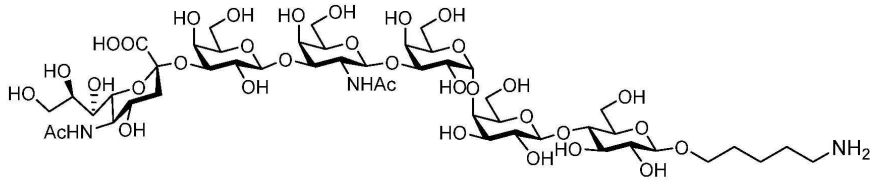
^{1}H NMR (600 MHz, D_2O) δ 5.12 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz), 4.78 (d, 1H, *J* = 3.6 Hz), 4.50 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz),4.43 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 4.40 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 4.37 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 4.30 (t, 1H, *J* = 6.2 Hz), 4.15-4.10 (m, 2H), 3.99 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 3.92 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 3.90-3.47 (m, 33H), 3.19 (t, 1H, *J* = 8.3 Hz), 2.89 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 1.94 (s, 3H), 1.60-1.55 (m, 4H), 1.38-1.31 (m, 2H), 1.11 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz). ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ 176.1, 105.7, 105.0, 103.74, 103.65, 102.1, 100.97, 80.5, 79.9, 78.8, 78.0, 77.8, 77.2, 76.76, 76.5, 76.3, 76.2, 75.3, 74.6, 73.8, 73.5, 72.5, 71.81, 71.78, 71.2, 71.1, 70.9, 70.8, 70.2, 69.7, 69.5, 68.5, 62.66, 62.64, 62.0, 61.7, 53.3, 41.0, 29.9, 28.1, 23.9, 23.8, 17.0 MALDI-TOF: $C_{43}H_{76}N_2O_{30}$ $[M+Na]^+$ 계산치 1123.4381, 실측치 1123.4385

[0330]

[0331] *링커를 지닌 SSEA4의 대규모 생성*

[0332] 링커를 지닌 5 mmol Gb5, 5 mmol 푸코스, 12 mmol 포스포에놀피루브산 (PEP), 0.25 mmol ATP, 0.25 mmol CTP를 10 mM $MgCl_2$와 함께 100 mM 트리스-HCl 완충제 (pH 7.5)에 첨가하였다. α-2,3-시알릴트랜스퍼라제, 시티딘 모노포스페이트 키나제 (CMK), CMP-시알산 합성효소 (Css), 피루베이트 키나제 (PykF) 및 피로포스파타제 (PPA)의 첨가에 의해 반응을 개시하였다. 플라스크를 부드럽게 진탕시키며 16~50℃의 인큐베이터에 두었다. 반응을 TLC에 의해 모니터하였다. 반응이 중단되면 효소를 더 첨가하였다. 더 이상의 출발 물질이 TLC에 의해 관찰되지 않을 때 반응을 중단시켰다. SSEA4 생성물을 ^{18}C 역상 컬럼에 의해 45% 수율로 분리시켰다.

알릴 -SSEA$_4$: ^{1}H NMR (600 MHz, D_2O) δ 6.00 (m, 1H), 5.40-5.37 (d, J = 17.3 Hz, 1H), 5.30-5.28 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 4.92 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 4.70 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.54-4.51 (m, 3H), 4.40-4.38 (m, 2H), 4.25-4.18 (m, 3H), 4.10-3.52 (m, 34 H), 3.35-3.32 (t, J = 8.6 Hz, 1H), 2.77 (dd, J = 12.5, 4.6 Hz, 1H), 2.03 (s, 6H), 1.80 (t, J = 12.1 Hz, 1H); ^{13}C NMR (150 MHz, D2O) δ 175.2, 175.1, 174.1, 133.4, 121.6, 118.9, 104.7,103.4, 103.1, 101.1, 100.5, 99.8, 79.9, 78.9, 78.8, 77.3, 75.7, 75.5, 75.0, 74.7, 74.6, 73.0, 72.9,72.2, 72.1, 71.9, 71.0, 70.8, 70.4, 69.1, 69.0, 68.5, 68.2, 68.0, 67.7, 67.5, 62.6, 61.1, 60.5, 60.4, 60.1, 51.7,51.4, 39.8, 22.4, 22.1; HRMS (ESI-TOF, M-H) $C_{46}H_{75}N_2O_{34}^-$ 계산치 1199.4196, 실측치 1199.4208.



5- 아미노펜틸 -SSEA4

^{1}H NMR (600 MHz, D_2O) δ 4.94 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 4.72 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.54-4.50 (m, 3H), 4.40 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 4.27 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.20 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 4.10-3.54 (m, 37 H), 3.34-3.31 (m, 1H), 3.02 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.78 (dd, J = 12.4, 4.6 Hz, 1H), 2.05 (m, 6H), 1.80 (t, 12.2 Hz, 1H), 1.74-1.67 (m, 4H), 1.51-1.45 (m, 2H); ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ 175.0, 174.9, 173.9, 104.5, 103.2, 102.9, 101.9, 100.3, 99.6, 79.7, 78.8, 78.7, 77.1, 75.5, 75.4, 74.8, 74.7, 74.6, 74.5, 72.9, 72.7, 72.1, 71.8, 70.8, 70.2, 70.0, 68.9, 68.9, 68.3, 68.0, 67.8, 67.5, 67.3, 62.4, 60.9, 60.3, 60.3, 60.0, 51.6, 51.3, 39.7, 39.3, 28.1, 26.5, 22.3, 22.0, 22.0; HRMS (ESI-TOF, MNa^+) 계산치 $C_{48}H_{83}N_3O_{34}Na$ 1268.4756, 실측치 1268.4760.

[0333]

표 7. 글리코스핑고리피드의 기본 조성

	Gal	Glc	GalNAc	GlcNAc	Neu5Ac	Fuc
Globo 시리즈						
Globo 테트라오스 (Gb4)	2	1	1	0	0	0
Globo 펜타오스 (Gb5)	3	1	1	0	0	0
Globo H (푸코실-Gb5)	3	1	1	0	0	1
SSEA4 (시알릴-Gb5)	3	1	1	0	1	0
이소글로보테트라오스	2	1	1	0	0	0
네오락토시리즈	2	1	0	1	1	0
락토시리즈	2	1	0	1	1	0
강글리오시리즈	2	1	1	0	2	0

[0334]

표 8.재생을 이용한 글리코실화의 각 단계의 수율

	효소 관여	생성물	수율
단계 1.	GalK, AtUSP, PykF, PPA, LgtC*	알릴-Gb3	99%
단계 2.	NahK, GlmU, PykF, PPA, LgtD*	알릴 -Gb4	96%
단계 3.	GalK, USP, PykF, PPA, LgtD*	알릴 -Gb5	95%**
단계 4a.	FKP, PykF, PPA, FutC*	알릴 -Globo H	94%
단계 4b.	Css, CMK, PykF, PPA, JT-FAJ-16*	알릴 -SSEA4	45%

[0335]

[0336] * DNA 서열은 E. 콜라이 발현에 대해 최적화되었다.

[0337] ** 수용체로서 순수한 알릴-Gb4를 이용하는 경우

[0338] 실시예 2: 알릴-락토스로부터 알릴-Gb5(SSEA3)의 한-단계 합성

[0339] 알릴-Gb5를, 임의의 중간체의 정제 없이, 도 6에 예시된 대로 한-단계 연쇄 반응을 통해 알릴-lac로부터 합성하였다.

[0340] 100 mM 트리스-HCl 완충제 (pH 7.5)에서 10 mM $MgCl_2$와 함께 5 mmol 알릴-lac, 5 mmol 갈락토스, 12 mmol PEP, 0.25 mmol ATP, 0.25 mmol UTP를 플라스크에서 혼합시켰다. 알릴-Gb3을 합성하기 위해 적합한 α1,4-갈락토실트랜스퍼라제 (LgtC), GalK, USP, PykF 및 PPA를 플라스크에 첨가시킴에 의해 효소 반응을 개시하였다. 반응 혼합물을 함유하는 플라스크를 부드럽게 진탕시키며 16~50℃의 인큐베이터에 두었다. 합성 과정을 모니터하기 위해 TLC 분석을 수행하였다. 추가의 알릴-Gb3 합성이 관찰되지 않는 경우, 추가의 효소를 첨가하였다.

[0341] 알릴-Gb3의 합성 후에, 5 mmol의 GalNAc, 12 mmol PEP, 및 적합한 양의 N-아세틸헥소사민 1-키나제 (GalNAcK), N-아세틸글루코사민 1-포스페이트 우리딜릴트랜스퍼라제 (GlmU), PykF, PPA 및 β 1,3-N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제 (LgtD)를 포함하는 또 다른 세트의 구성요소를 플라스크에 첨가하였다. 이렇게 형성된 반응 혼합물을 알릴-Gb3가 합성되는 것과 동일한 조건하에서 인큐베이션시켰다. 추가의 알릴-Gb4 합성이 관찰되지 않는 경우, 추가량의 효소를 첨가할 수 있다.

[0342] 알릴-Gb4의 합성 후에, 5 mmol 갈락토스 및 12 mmol PEP를 알릴-Gb4의 정제 없이 플라스크에 첨가하였다. 이어서 갈락토실화 반응을 알릴-Gb5를 합성하기에 적합한 β1,3-갈락토실트랜스퍼라제 (LgtD), GalK, USP, PykF 및 PPA의 첨가에 의해 개시하였다. 반응 혼합물을 함유하는 플라스크를 부드럽게 진탕시키며 16~50℃의 인큐베이터에 두었다. 합성 과정을 모니터하기 위해 TLC 분석을 수행하였다. 추가의 알릴-Gb5 합성이 관찰되지 않는 경우, 추가량의 효소를 첨가할 수 있다. 알릴-lac으로부터 알릴-Gb5의 이러한 한-단계 합성의 수율은 약 40%이다.

[0343] **참고문헌**

1. Kannagi, R., et al., *Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells.* EMBO J, 1983. 2(12): p. 2355-61.
2. Shengle, Z., et al., *Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: I. Focus on gangliosides.* International Journal of Cancer, 1997. 73(1): p. 42-49.
3. Shengle, Z., et al., *Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: II. Blood group-related antigens.* International Journal of Cancer, 1997. 73(1): p. 50-56.
4. Chang, W.-W., et al., *Expression of Globo H and SSEA3 in breast cancer stem cells and the involvement of fucosyl transferases 1 and 2 in Globo H synthesis.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. 105(33): p. 11667-11672.
5. Slamon, D.J., et al., *Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2.* New England Journal of Medicine, 2001. 344(11): p. 783-792.
6. Wang, Z.-G., et al., *Polyclonal antibodies from patients immunized with a globo H-keyhole limpet hemocyanin vaccine: Isolation, quantification, and characterization of immune responses by using totally synthetic immobilized tumor antigens.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. 97(6): p. 2719-2724.
7. Bilodeau, M.T., et al., *Total Synthesis of a Human Breast Tumor Associated Antigen.* Journal of the American Chemical Society, 1995. 117(29): p. 7840-7841.
8. Park, T.K., et al., *Total Synthesis and Proof of Structure of a Human Breast Tumor (Globo-H) Antigen.* Journal of the American Chemical Society, 1996. 118(46): p. 11488-11500.
9. Slovin, S.F., et al., *Carbohydrate vaccines in cancer: Immunogenicity of a fully synthetic globo H hexasaccharide conjugate in man.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. 96(10): p. 5710-5715.
10. Bosse, F., L.A. Marcaurelle, and P.H. Seeberger, *Linear Synthesis of the Tumor-Associated Carbohydrate Antigens Globo-H, SSEA-3, and Gb3.* The Journal of Organic Chemistry, 2002. 67(19): p. 6659-6670.
11. Werz, D.B., B. Castagner, and P.H. Seeberger, *Automated Synthesis of the Tumor-Associated Carbohydrate Antigens Gb-3 and Globo-H: Incorporation of α-Galactosidic Linkages.* Journal of the American Chemical Society, 2007. 129(10): p. 2770-2771.
12. Wang, Z., et al., *Multi-Component One-Pot Synthesis of the Tumor-Associated Carbohydrate Antigen Globo-H Based on Preactivation of Thioglycosyl Donors.* The Journal of Organic Chemistry, 2007. 72(17): p. 6409-6420.
13. Jeon, I., K. Iyer, and S.J. Danishefsky, *A Practical Total Synthesis of Globo-H for Use in Anticancer Vaccines.* The Journal of Organic Chemistry, 2009. 74(21): p. 8452-8455.

[0344]

14. Fred, B., et al., *Synthesis of the Globo H Hexasaccharide Using the Programmable Reactivity-Based One-Pot Strategy.* Angewandte Chemie International Edition, 2001. 40(7): p. 1274-1277.

15. Hsu, C.-H., et al., *Highly Alpha-Selective Sialyl Phosphate Donors for Efficient Preparation of Natural Sialosides.* Chemistry – A European Journal, 2010. 16(6): p. 1754-1760.

16. Zhen, W., et al., *Chemoenzymatic Syntheses of Tumor-Associated Carbohydrate Antigen Globo-H and Stage-Specific Embryonic Antigen 4.* Advanced Synthesis & Catalysis, 2008. 350(11-12): p. 1717-1728.

17. Wong, C.H., S.L. Haynie, and G.M. Whitesides, *Enzyme-catalyzed synthesis of N-acetyllactosamine with in situ regeneration of uridine 5'-diphosphate glucose and uridine 5'-diphosphate galactose.* The Journal of Organic Chemistry, 1982. 47(27): p. 5416-5418.

18. Wong, C.H., R. Wang, and Y. Ichikawa, *Regeneration of sugar nucleotide for enzymic oligosaccharide synthesis: use of Gal-1-phosphate uridyltransferase in the regeneration of UDP-galactose, UDP-2-deoxygalactose, and UDP-galactosamine.* The Journal of Organic Chemistry, 1992. 57(16): p. 4343-4344.

19. Kotake, T., et al., *UDP-sugar Pyrophosphorylase with Broad Substrate Specificity Toward Various Monosaccharide 1-Phosphates from Pea Sprouts.* Journal of Biological Chemistry, 2004. 279(44): p. 45728-45736.

20. Litterer, L.A., et al., *Characterization and expression of Arabidopsis UDP-sugar pyrophosphorylase.* Plant Physiology and Biochemistry, 2006. 44(4): p. 171-180.

21. Kotake, T., et al., *Properties and Physiological Functions of UDP-Sugar Pyrophosphorylase in Arabidopsis.* Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007. 71(3): p. 761-771.

22. Damerow, S., et al., *Leishmania UDP-sugar Pyrophosphorylase.* Journal of Biological Chemistry, 2010. 285(2): p. 878-887.

23. Yang, T. and M. Bar-Peled, *Identification of a novel UDP-sugar pyrophosphorylase with a broad substrate specificity in Trypanosoma cruzi.* Biochemical Journal, 2010. 429(3): p. 533-543.

24. Persson, K., et al., *Crystal structure of the retaining galactosyltransferase LgtC from Neisseria meningitidis in complex with donor and acceptor sugar analogs.* Nat Struct Mol Biol, 2001. 8(2): p. 166-175.

25. Koto, S., et al., *Simple preparations of alkyl and cycloalkyl α-glycosides of maltose, cellobiose, and lactose.* Carbohydrate Research, 2004. 339(14): p. 2415-2424.

26. Antoine, T., et al., *Large scale in vivo synthesis of globotriose and globotetraose by high cell density culture of metabolically engineered Escherichia coli.* Biochimie, 2005. 87(2): p. 197-203.

27. Zhang, J., et al., *Efficient chemoenzymatic synthesis of globotriose and its derivatives with a recombinant [alpha]-(1-->4)-galactosyltransferase.* Carbohydrate Research, 2002. 337(11): p. 969-976.

[0345]

28. Shao, J., et al., *Efficient synthesis of globoside and isogloboside tetrasaccharides by using β(1→3)N-acetylgalactosaminyltransferase/UDP-N-acetylglucosamine C4 epimerase fusion protein.* Chemical Communications, 2003(12): p. 1422-1423.

29. Shao, J., et al., *Donor Substrate Regeneration for Efficient Synthesis of Globotetraose and Isoglobotetraose.* Appl. Environ. Microbiol., 2002. 68(11): p. 5634-5640.

30. Vanessa, B., et al., *Efficient Enzymatic Glycosylation of Peptides and Oligosaccharides from GalNAc and UTP.* ChemBioChem, 2007. 8(1): p. 37-40.

31. Nishimoto, M. and M. Kitaoka, *Identification of N-Acetylhexosamine 1-Kinase in the Complete Lacto-N-Biose I/Galacto-N-Biose Metabolic Pathway in Bifidobacterium longum.* Appl. Environ. Microbiol., 2007. 73(20): p. 6444-6449.

32. Fang, J., et al., *Systematic study on the broad nucleotide triphosphate specificity of the pyrophosphorylase domain of the N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase from Escherichia coli K12.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009. 19(22): p. 6429-6432.

33. Hood, D.W., et al., *Genetic basis for expression of the major globotetraose-containing lipopolysaccharide from H. influenzae strain Rd (RM118).* Glycobiology, 2001. 11(11): p. 957-967.

34. Shao, J., et al., *Overexpression and biochemical characterization of [beta]-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase LgtD from Haemophilus influenzae strain Rd.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. 295(1): p. 1-8.

35. Randriantsoa, M., et al., *Synthesis of globopentaose using a novel [beta]1,3-galactosyltransferase activity of the Haemophilus influenzae [beta]1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase LgtD.* FEBS Letters, 2007. 581(14): p. 2652-2656.

36. Coyne, M.J., et al., *Human Symbionts Use a Host-Like Pathway for Surface Fucosylation.* Science, 2005. 307(5716): p. 1778-1781.

37. Wang, W., et al., *Chemoenzymatic synthesis of GDP-l-fucose and the Lewis X glycan derivatives.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. 106(38): p. 16096-16101.

38. Koizumi, S., et al., *Large-scale production of GDP-fucose and Lewis X by bacterial coupling.* Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2000. 25(4): p. 213-217.

39. Stein, Daniel B., Y.-N. Lin, and C.-H. Lin, *Characterization of Helicobacter pylori alpha1,2-Fucosyltransferase for Enzymatic Synthesis of Tumor-Associated Antigens.* Advanced Synthesis & Catalysis, 2008. 350(14-15): p. 2313-2321.

40. Tanner, M.E., *The enzymes of sialic acid biosynthesis.* Bioorganic Chemistry, 2005. 33(3): p. 216-228.

41. Li, Y., et al., *Pasteurella multocida CMP-sialic acid synthetase and mutants of Neisseria meningitidis CMP-sialic acid synthetase with improved substrate promiscuity.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2011: p. 1-13.

42. Kushi, Y., et al., *Sialyltransferases of marine bacteria efficiently utilize glycosphingolipid substrates.* Glycobiology, 2010. 20(2): p. 187-198.

43. Yamamoto, T., *Marine Bacterial Sialyltransferases.* Marine Drugs, 2010. 8(11): p. 2781-2794.

[0346]

44. Takakura, Y., H. Tsukamoto, and T. Yamamoto, *Molecular Cloning, Expression and Properties of an α/β-Galactoside α2,3-Sialyltransferase from Vibrio sp. JT-FAJ-16.* Journal of Biochemistry, 2007. 142(3): p. 403-412.

[0347]

[0348] **그 밖의 구체예**

[0349] 청구범위에서 단수형태는 문맥으로부터 달리 명백하거나 반대로 지시되지 않는 한 하나 또는 하나를 초과하는 것을 의미할 수 있다. 그룹의 하나 이상의 구성원들 사이에 "또는"을 포함하는 청구항 또는 설명은 문맥으로부터 달리 명백하거나 반대로 지시되지 않는 한, 그룹 구성원들 중 하나, 하나 초과 또는 전부가 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 이용되거나, 달리 적절한 지를 충족하는 것으로 고려된다. 본 발명은 그룹의 정확히 한 구성원이 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 이용되거나, 달리 적절한 구체예를 포함한다. 본 발명은 그룹 구성원들 중 하나 초과 또는 전부가 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 이용되거나, 달리 적절한 구체예를 포함한다.

[0350] 더욱이, 본 발명은 열거된 청구항들 중 하나 이상으로부터의 하나 이상의 제한, 요소, 조항, 및 기술적인 묘사가 또 다른 청구항에 도입되는 모든 변경, 조합, 및 치환을 포함한다. 예를 들어, 또 다른 청구항을 인용하는

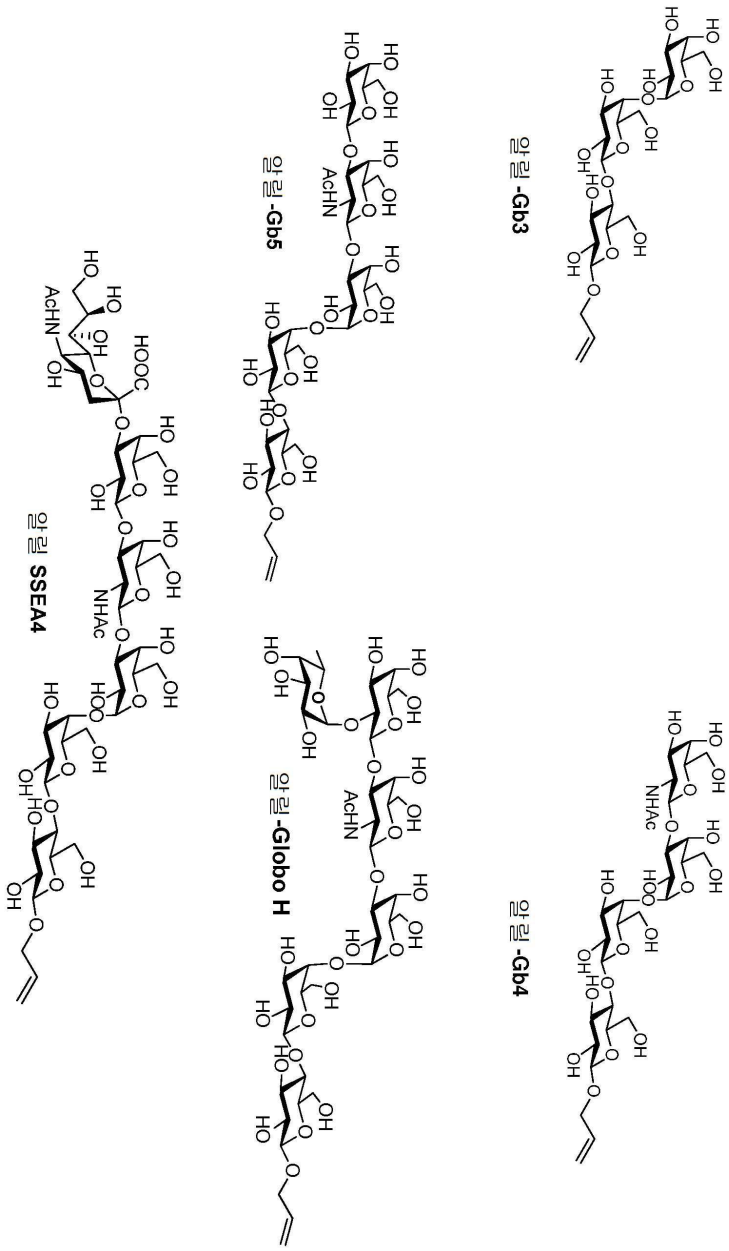
임의의 청구항은 동일한 기본 청구항을 인용하는 임의의 다른 청구항에서 발견되는 하나 이상의 제한을 포함하도록 변경될 수 있다. 요소들이 마쿠시 그룹 포맷에서와 같은 목록으로서 제공되는 경우, 요소들의 각각의 하위그룹 또한 기재된 것이며, 임의의 요소(들)는 그룹에서 제거될 수 있다. 일반적으로, 본 발명, 또는 본 발명의 양태가 특정 요소 및/또는 특징을 포함한다고 언급되는 경우, 본 발명의 특정 구체예 또는 본 발명의 양태는 그러한 요소 및/또는 특징으로 구성되거나, 본질적으로 구성되는 것으로 이해되어야 한다. 단순화하기 위해, 그러한 구체예는 본원에서 그러한 말로 구체적으로 기재되지 않았다. 용어 "포함하는" 및 "함유하는"은 열려 있으며 추가의 요소 또는 단계의 포함을 허용하는 것임에 또한 유의해야 한다. 범위가 주어진 경우, 종말점이 포함된다. 게다가, 달리 지시되거나 문맥 및 당업자의 이해로부터 달리 명백하지 않는 한, 범위로서 표현된 값은 본 발명의 상이한 구체예에서 언급된 범위내의 어떠한 특수한 값 또는 부분-범위, 문맥에서 달리 명백하게 언급하지 않는 한, 그 범위의 하한의 10분의 1 단위까지 가정할 수 있다.

[0351] 본 출원은 다양한 발행 특허, 공개된 특허 출원, 저널 기사, 및 기타 간행물을 참조하며, 이들 모두는 본원에 참조로서 포함된다. 포함된 임의의 참고문헌 및 본 명세서 간에 충돌이 있는 경우, 본 명세서가 우선할 것이다. 또한, 종래 기술 내에 있는 본 발명의 임의의 특정 구체예는 청구범위의 어떠한 하나 이상의 항으로부터 명백히 제외될 수 있다. 그러한 구체예는 당업자에게 공지된 것으로 간주되므로, 이들은 제외된다고 본원에 명백하게 개시되지 않은 경우에도 제외될 수 있다. 본 발명의 임의의 특정 구체예는 종래 기술의 실존과 관련이 있든 없든 간에, 임의의 이유로, 어떠한 청구항으로부터 제외될 수 있다.

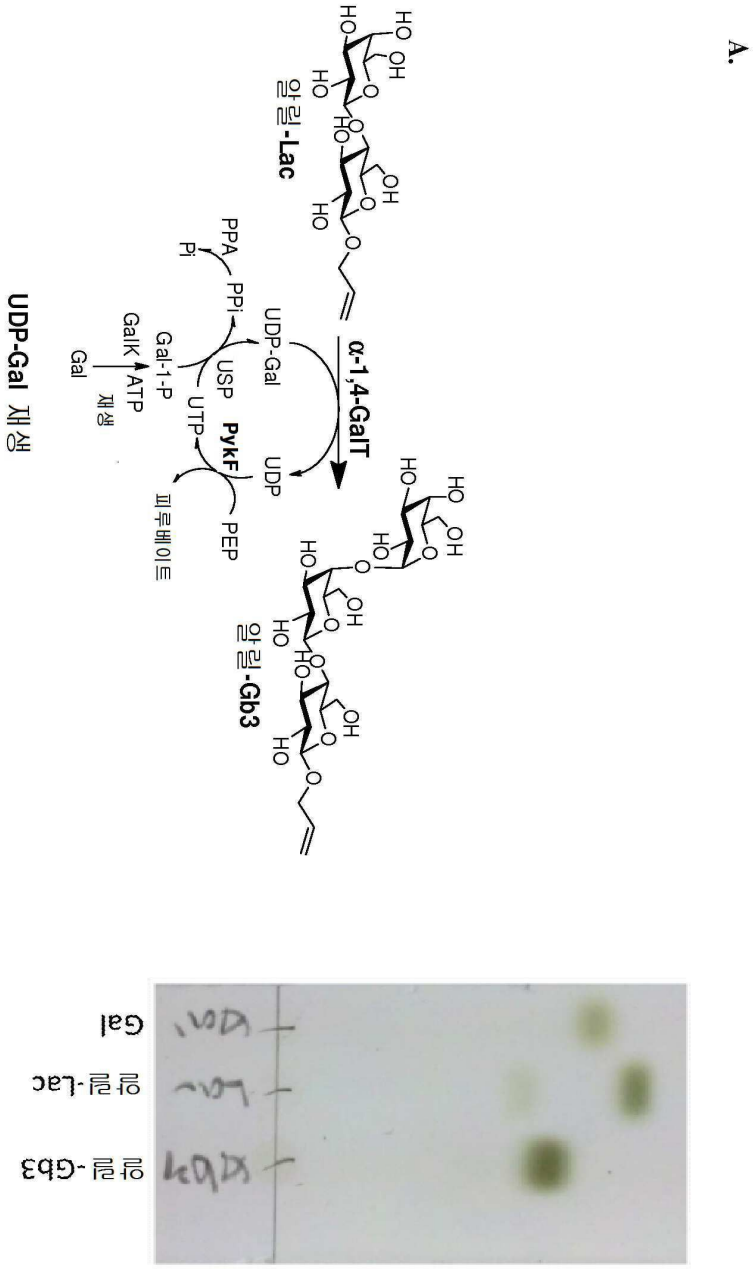
[0352] 당업자는 본원에 기재된 특수한 구체예에 대한 다수의 등가물을 통상의 실험만을 이용하여 인지하거나 확인할 수 있을 것이다. 본원에 기재된 본 구체예의 범위는 상기 설명으로 제한되지 않으며, 오히려 첨부된 청구범위에 기재된다. 당업자는 하기 청구범위에 정의된 본 발명의 정신 또는 범위로부터 벗어나지 않으며 이러한 설명을 다양하게 변화시키고 변경시킬 수 있음을 이해할 것이다.

도면

도면1

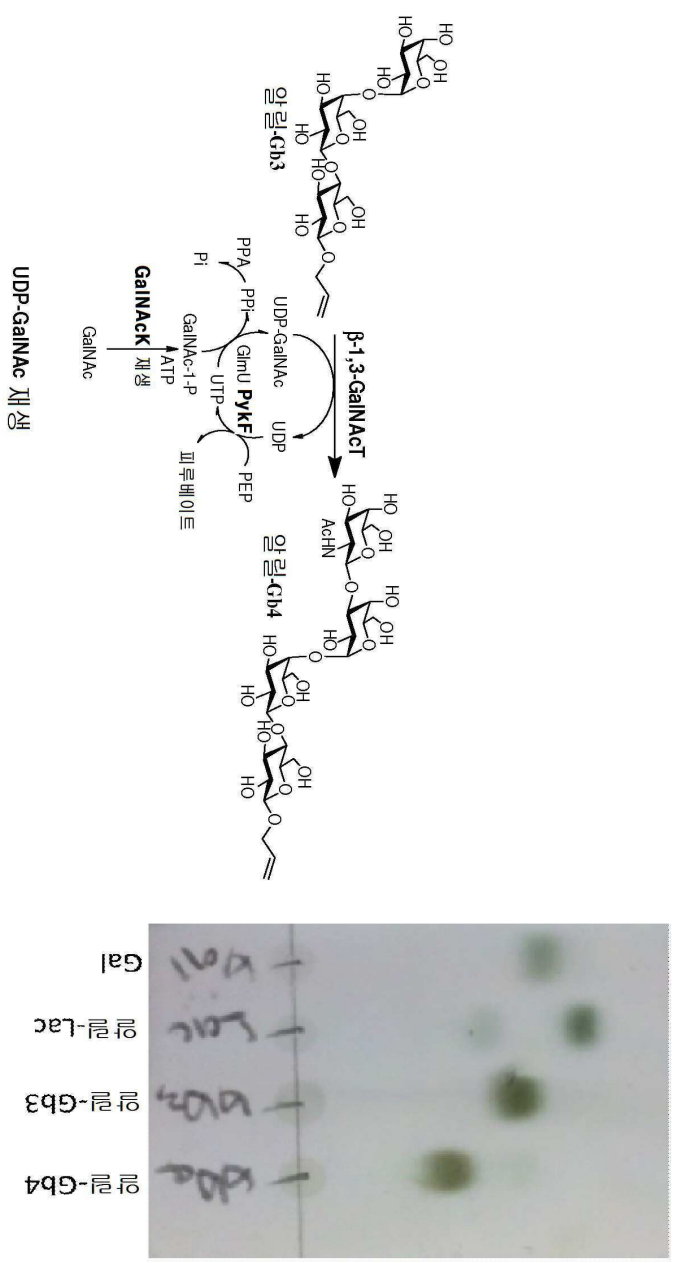


도면2a

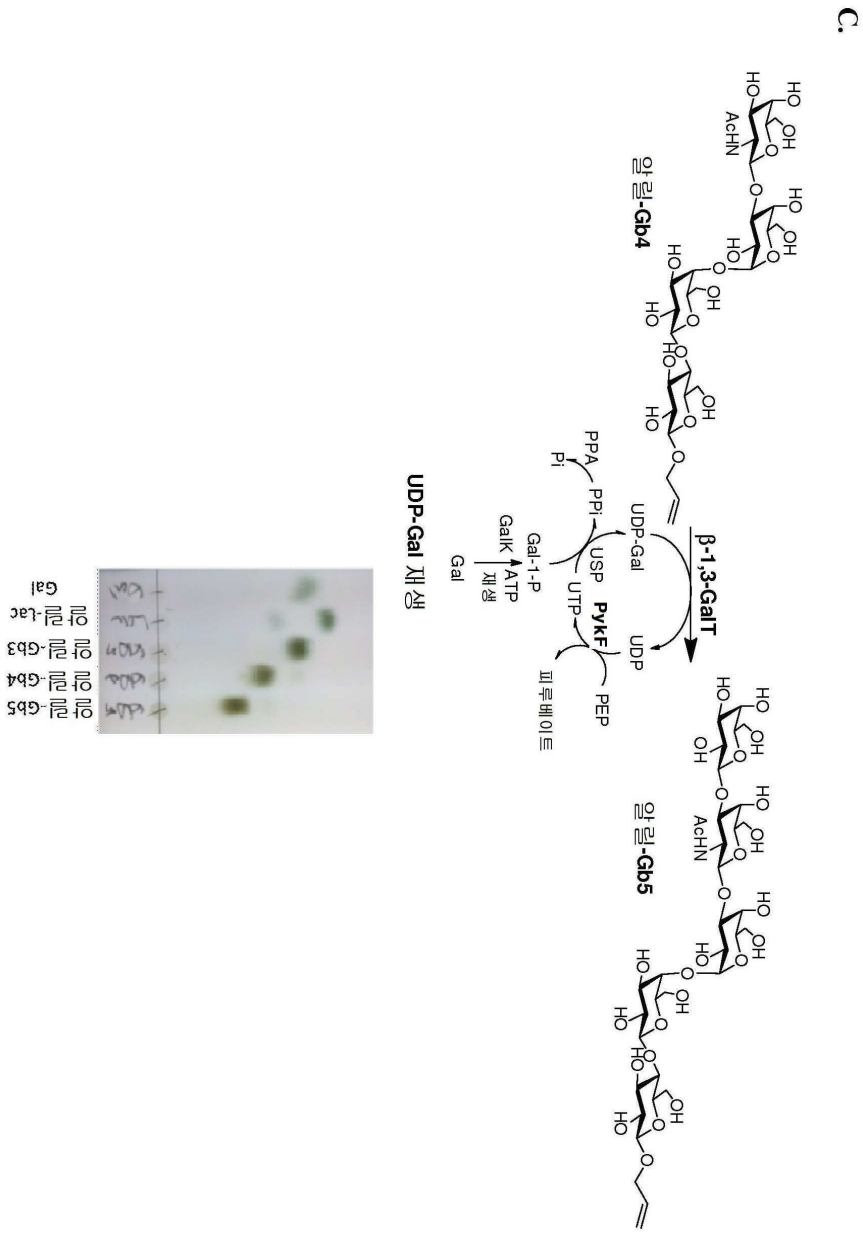

A.
알릴-Lac
α-1,4-GalT
UDP-Gal
UDP
알릴-Gb3
UDP-Gal 재생
PPA
Pi
PPi
USP
UTP
PykF
PEP
피루베이트
Gal-1-P
GalK
ATP
Gal
재생

알릴-Gb3
알릴-Lac
Gal

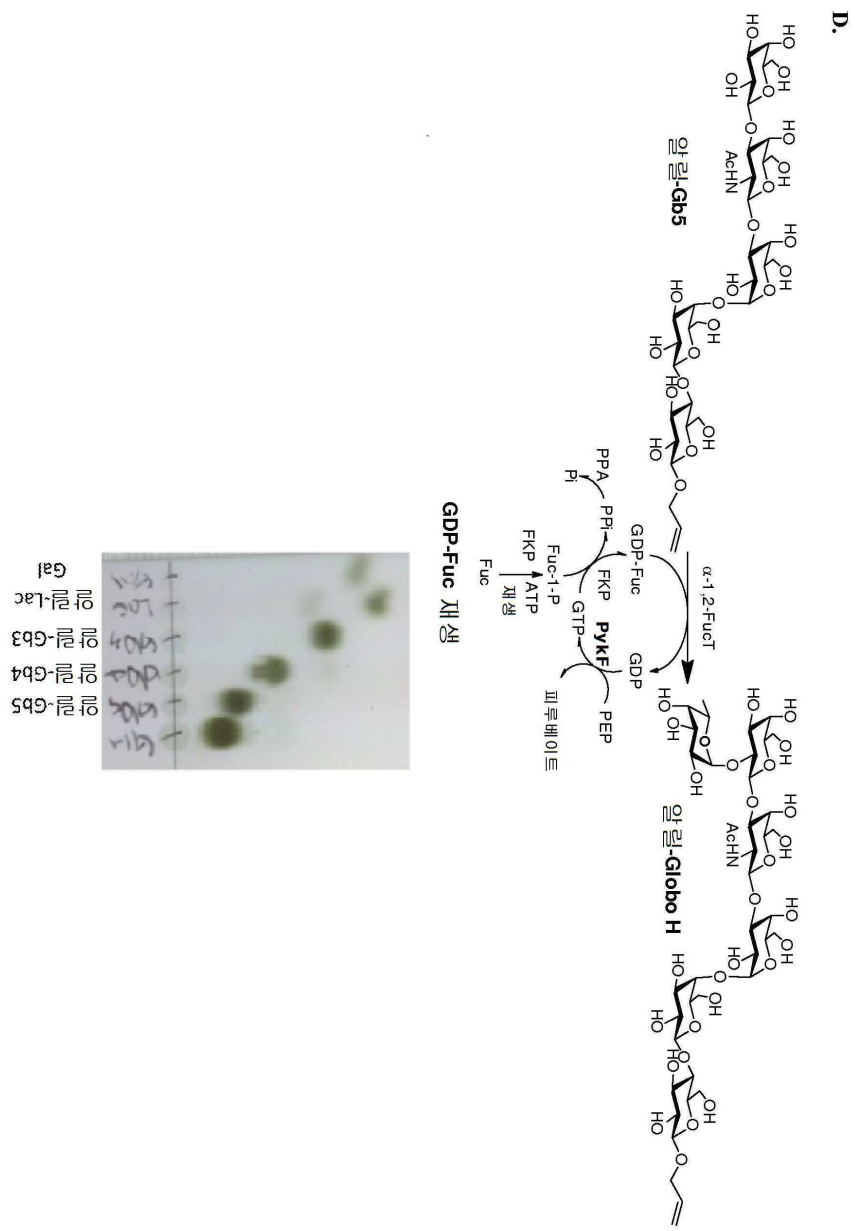
도면2b


B.
알릴-Gb3
β-1,3-GalNAcT
UDP-GalNAc
UDP
GlmU PykF
PPA
PPi
Pi
GalNAc-1-P
UTP
ATP
피루베이트
PEP
GalNAcK 재생
GalNAc
UDP-GalNAc 재생
AcHN
알릴-Gb4
Gal
알릴-Lac
알릴-Gb3
알릴-Gb4

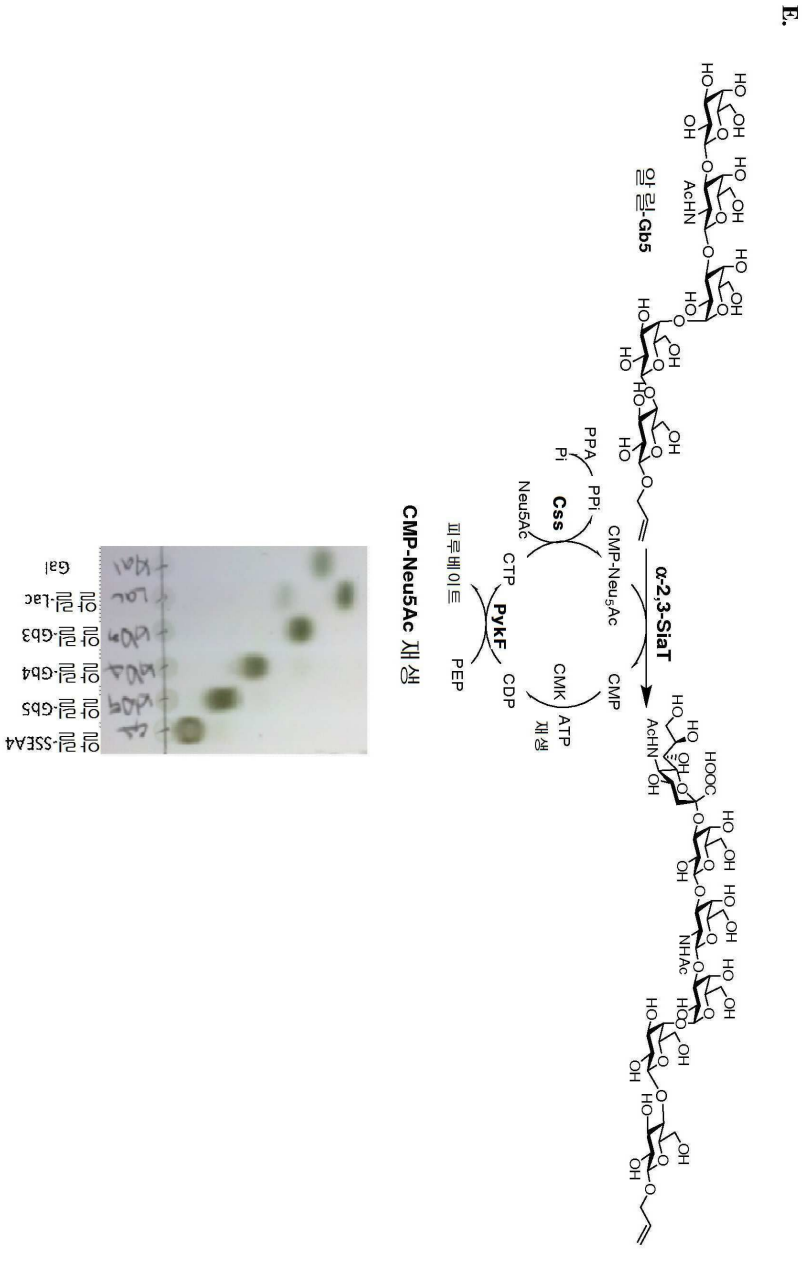
도면2c


c
알릴-Gb4
β-1,3-GalT
UDP-Gal
UDP
PPA
Pi
PPi
USP
PykF
UTP
PEP
피루베이트
Gal-1-P
GalK
ATP
재생
Gal
UDP-Gal 재생
알릴-Gb5
AcHN
알릴-Gb5
알릴-Gb4
알릴-Gb3
알릴-Lac
Gal

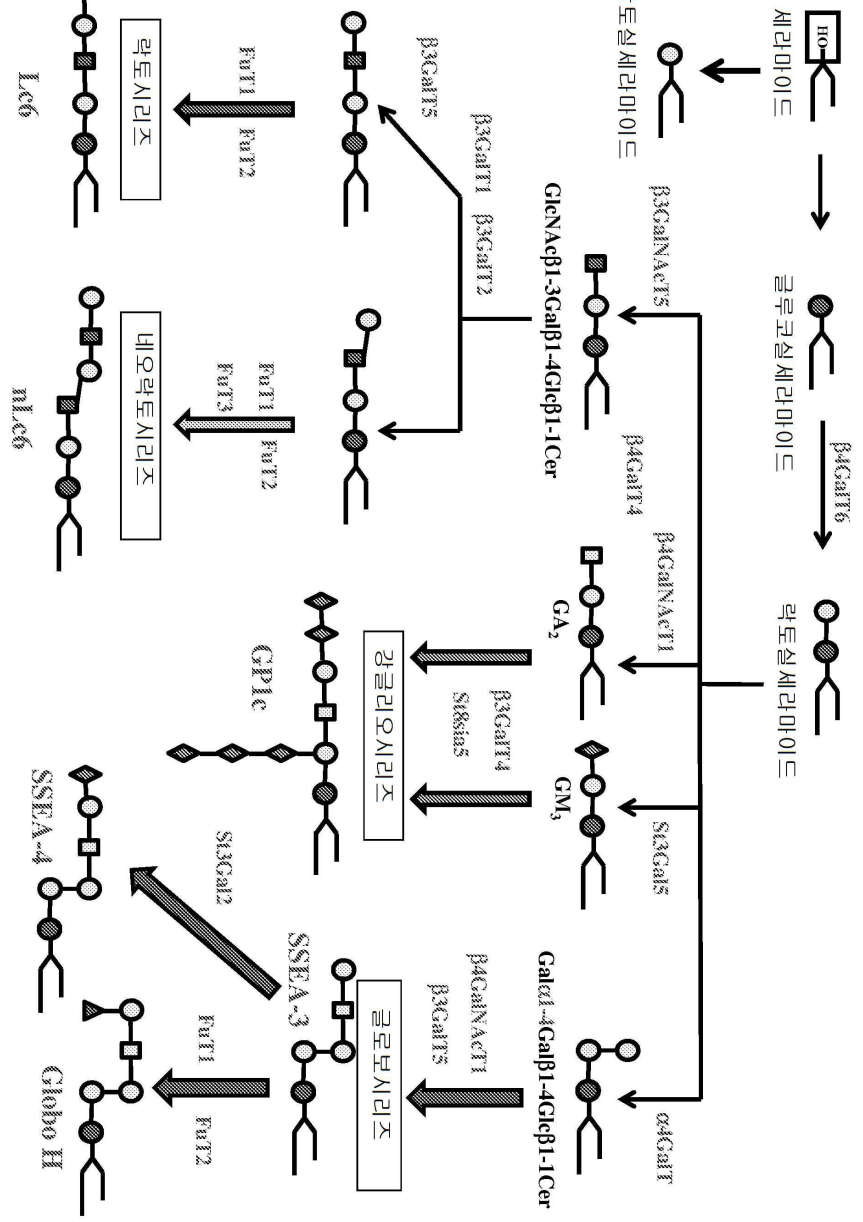
도면2d


D.
알릴-Gb5
AcHN
α-1,2-FucT
GDP-Fuc
GDP
PykF
PEP
피루베이트
GTP
FKP
Fuc-1-P
ATP
재생
Fuc
PPA
PPi
Pi
GDP-Fuc 재생
알릴-Globo H
알릴-Gb5
알릴-Gb4
알릴-Gb3
알릴-Lac
Gal

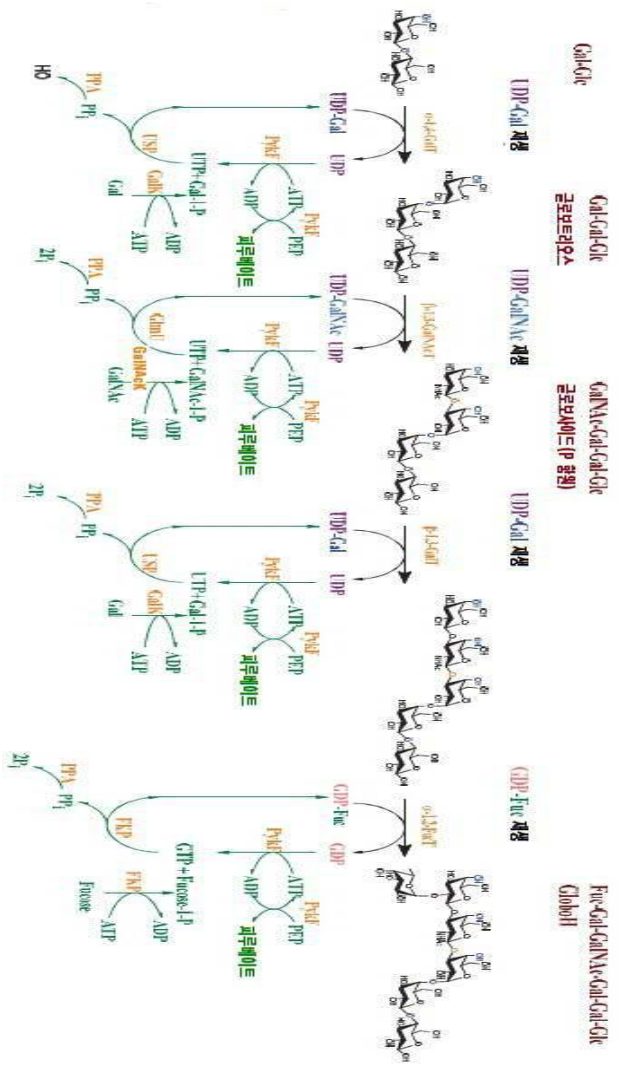
도면2e


E.
알릴-Gb5
α-2,3-SiaT
CMP-Neu5Ac 재생
Css
PykF
CMK
피루베이트
PEP
CTP
CDP
ATP
재생
PPi
PPA
Pi
CMP-Neu5Ac
CMP
Neu5Ac
AcHN
NHAc
HOOC
알릴-SSEA4
알릴-Gb5
알릴-Gb4
알릴-Gb3
알릴-Lac
Gal

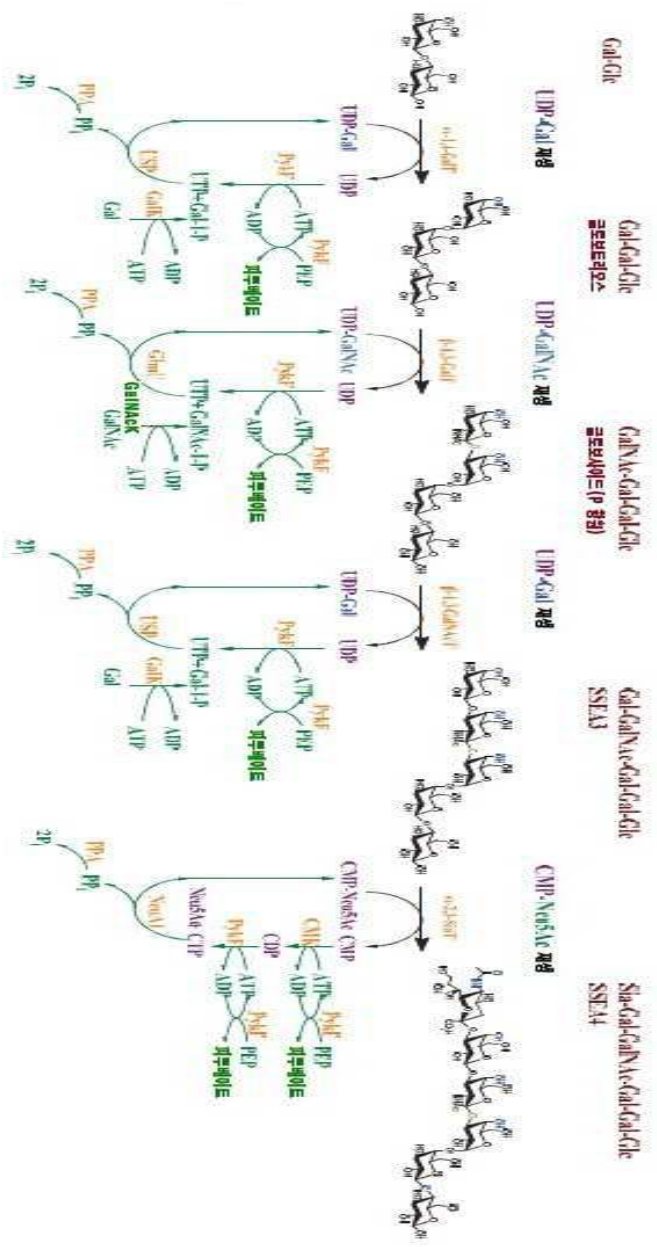
도면3


세라마이드
글루코실 세라마이드
β4GalT6
락토실 세라마이드
갈락토실 세라마이드
β3GalNAcT5
β4GalT4
β4GalNAcT1
St3Gal5
α4GalT
GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer
GA2
GM3
Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1Cer
β3GalT1 β3GalT2
β3GalT5
β3GalT4 St8sia5
β4GalNAcT1 β3GalT5
FuT1 FuT2
FuT1 FuT3 FuT2
락토시리즈
네오락토시리즈
갈글리오시리즈
글로보시리즈
Le6
nLc6
GP1c
SSEA-3
SSEA-4
Globo H
St3Gal2
FuT1 FuT2

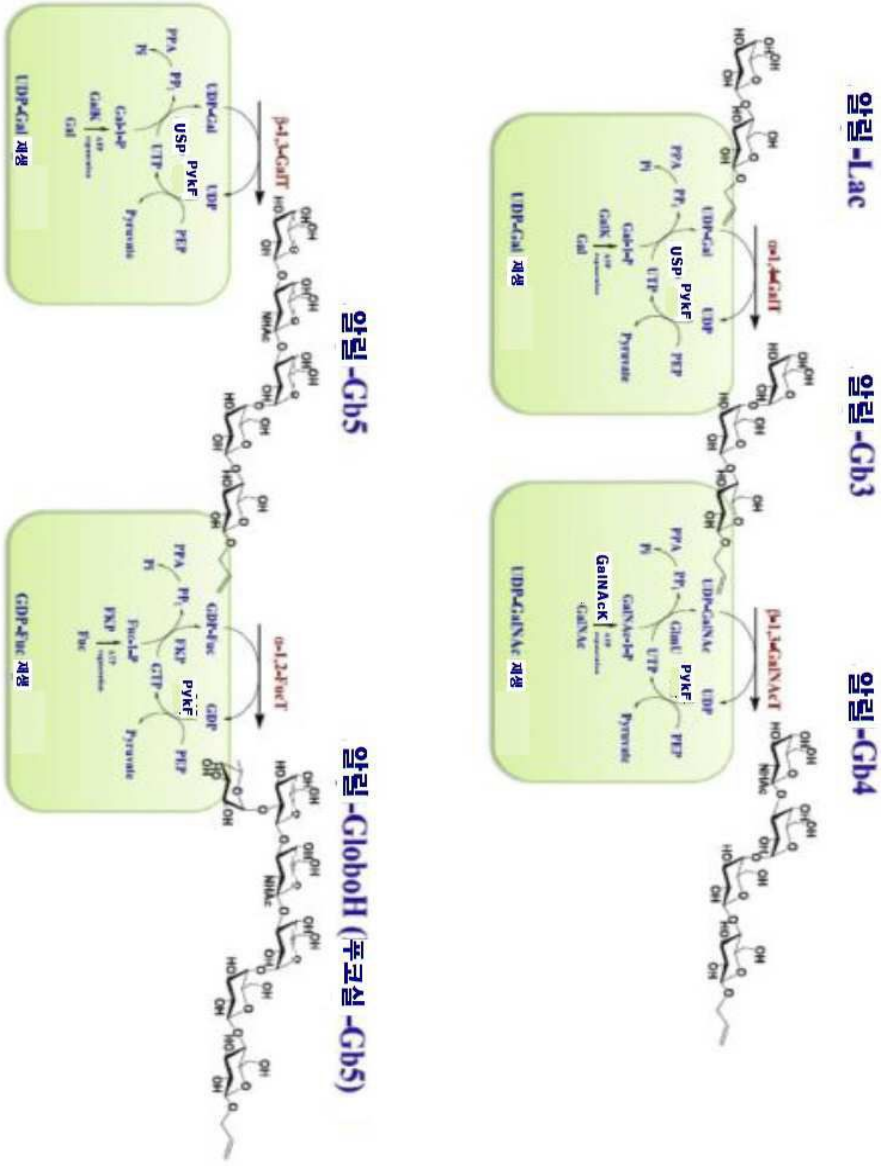
도면4


Gal-Glc
UDP-Gal 제생
Gal-Gal-Glc
글로보트리오스
UDP-GalNAc 제생
GalNAc-Gal-Gal-Glc
글로보사이드(P 항원)
UDP-Gal 제생
GDP-Fuc 제생
Fuc-Gal-GalNAc-Gal-Gal-Glc
GloboH
UDP-Gal
UDP
UTP+Gal-1-P
UTP+GalNAc-1-P
GTP+Fucose-1-P
ATP
ADP
PEP
PykF
GalK
GalNAc
FKP
Fucose
PPA
PPi
2Pi
H2O

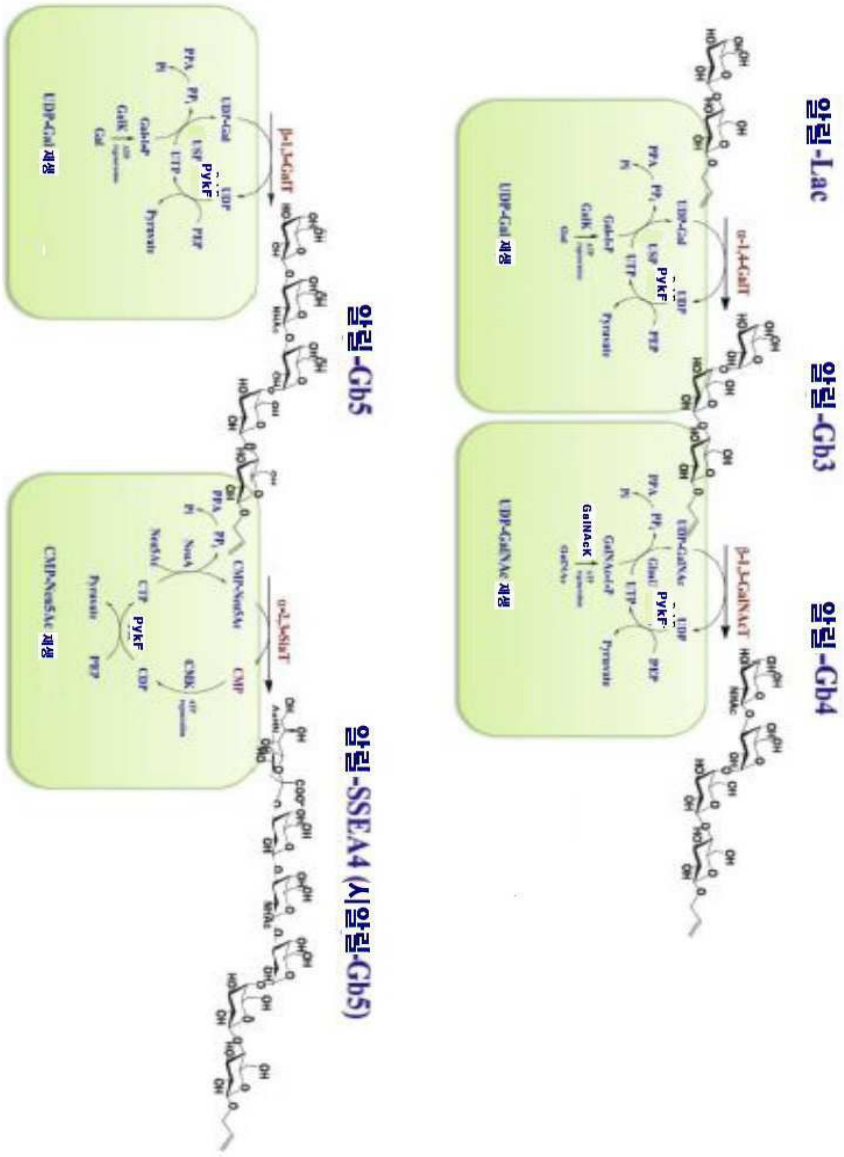
도면5


Gal-Glc
UDP-Gal 제성
Gal-Gal-Glc
글로보트리오스
UDP-GalNAc 제성
GalNAc-Gal-Gal-Glc
글로보시이드 (P 항원)
UDP-Gal 제성
Gal-GalNAc-Gal-Gal-Glc
SSEA3
CMP-Neu5Ac 제성
Sia-Gal-GalNAc-Gal-Gal-Glc
SSEA4
UDP-Gal
UDP
UTP-Gal-1-P
UTP+GalNAc-1-P
UTP+Gal-1-P
CMP-Neu5Ac
CMP
CDP
ATP
ADP
PEP
PyKF
GalNAcK
GalNAc
Gal
Neu5Ac
CTP
PP
2P

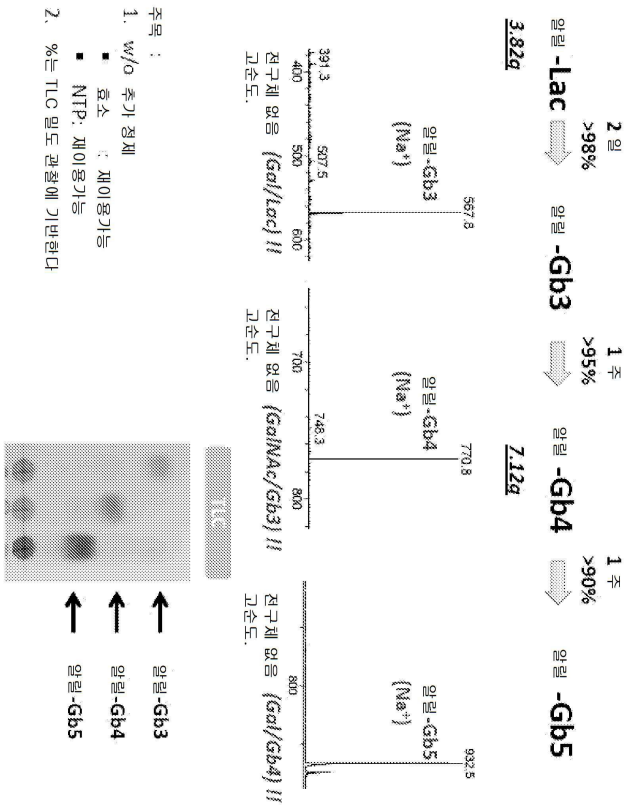
도면6


알릴-Lac
알릴-Gb3
알릴-Gb4
알릴-Gb5
알릴-GloboH (푸코실-Gb5)
UDP-Gal 재생
UDP-GalNAc 재생
GDP-Fuc 재생

도면7



도면8


알릴-Lac
2 일
>98%
알릴 -Gb3
1 주
>95%
알릴 -Gb4
1 주
>90%
알릴 -Gb5
3.82g
7.12g
알릴-Gb3
(Na+)
567.8
전구체 없음
고순도.
(Gal/Lac) II
391.3
400
507.5
500
600
알릴-Gb4
(Na+)
770.8
전구체 없음
고순도.
(GalNAc/Gb3) II
700
748.3
800
알릴-Gb5
(Na+)
932.5
전구체 없음
고순도.
(Gal/Gb4) II
800
TLC
주목 :
1. w/o 추가 정제
■ 효소 : 제이웅기능
■ NTP: 제이웅기능
2. %는 TLC 밀도 곤율에 기반합다
알릴-Gb3
알릴-Gb4
알릴-Gb5

도면9

Globo H (푸코실 -Gb5)
12hr
알릴-Gb5
FutC
(버울되지 않음)
알릴 -Globo H
GloboH
(Na+)
932.5
1079.4
800
1000
4 일
>95%
알릴-Gb5
FutC-MBP
(버울됨)
알릴-Globo H
GloboH
(Na+)
1078.1
769.8
946.3
800
1000
1200

도면10



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Academia Sinica

Wong, Chi-Huey

Tsai, Tsung-I

Wu, Chung-Yi

<120> Large Scale Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides

<130> A0988.70035WO00

<140> N/A

<141> 2013-08-20

<150> US 61/684,974

<151> 2012-08-20

<160> 30

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 1

ctgtattttc agggagcgat cgctatgagt ctgaaagaaa aaacab 46

<210> 2

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 2

gcctcgagtc attacgttta aactcagcac tgtcctgctc cttg 44

<210> 3

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 3

ctgtattttc agggagcgat cgctatggct tctacggttg attc 44

<210> 4

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 4

gcctcgagtc attacgttta aactcaatct tcaacagaaa atttgc 46

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 5

gatataccat ggaaatggac atcgttttcg cggcg 35

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 6

gtggtgctcg aggtagattt tacgcaggaa acg 33

<210> 7

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 7

ctgtattttc agggagcgat cgctatgaac aagacttatg attttaaaag 50

<210> 8

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 8

gcctcgagtc attacgttta aacttaaatg tatgaatata ctatcttc 48

<210> 9

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 9

ctgtattttc agggagcgat cgctatgttg aataatgcta tgagc 45

<210> 10

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 10

gcctcgagtc attacgttta aactcacttt ttctttaccg gacg 44

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 11

gatataccat ggaaaactgc ccgctggttt ct 32

<210> 12

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 12

gtggtgctcg aggaagataa cgttgatttt acgg 34

<210> 13

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 13

cagggagcga tcgctatgca aaaactacta tcttta 36

<210> 14

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 14

cattacgttt aaacttatga tcgtgatact tggaa 35

<210> 15

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 15

ctgtattttc agggagcgat cgctatggcg ttcaaagttg ttcag 45

<210> 16

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 16

gcctcgagtc attacgttta aacttacgcg ttgtatttct gagat 45

<210> 17

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 17

cagggagcga tcgctatgac ggcaattgcc ccggtt 36

<210> 18

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 18

cattacgttt aaacttatgc gagagccaat ttctg 35

<210> 19

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 19

gatataccat ggaaacaaat attgcgatca ttcctg 36

<210> 20

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 20

gtggtgctcg agtttattgg ataaaatttc cgcgag 36

<210> 21

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 21

gatataccat ggaaatgaac aacgacaact ctacc 35

<210> 22

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 22

gtggtgctcg aggatgtcag agatcagttt gatg 34

<210> 23

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 23

ctgtattttc agggagcgat cgctatgaaa aagaccaaaa ttgtttg 47

<210> 24

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 24

gcctcgagtc attacgttta aacttacagg acgtgaacag atg 43

<210> 25

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 25

cagggagcga tcgctatgag cttactcaac gtccct 36

<210> 26

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 26

cattacgttt aaacttattt attctttgcg cgctc 35

<210> 27

<211> 936

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 27

atggacatcg ttttcgcggc ggacgacaac tacgcggcgt acctgtgcgt tgcggcgaaa 60

tctgttgaag cggcgcaccc ggacaccgaa atccgtttcc acgttctgga cgcgggtatc 120

tctgaagcga accgtgcggc ggttgcggcg aacctgcgtg gtggtggtgg taacatccgt 180

ttcatcgacg ttaacccgga agacttcgcg ggtttcccgc tgaacatccg tcacatctct 240

atcaccacct acgcgcgtct gaaactgggt gaatacatcg cggactgcga caaagttctg 300

tacctggaca tcgacgttct ggttcgtgac tctctgaccc cgctgtggga caccgacctg 360

ggtgacaact ggctgggtgc gtgcatcgac ctgttcgttg aacgtcagga aggttacaaa 420

cagaaaatcg gtatggcgga cggtgaatac tacttcaacg cgggtgttct gctgatcaac 480

ctgaaaaaat ggcgtcgtca cgacatcttc aaaatgtctt gcgaatgggt tgaacagtac 540

aaagacgtta tgcagtacca ggaccaggac atcctgaacg gtctgttcaa aggtggtgtt 600

tgctacgcga actctcgttt caacttcatg ccgaccaact acgcgttcat ggcgaaccgt 660

ttcgcgtctc gtcacaccga cccgctgtac cgtgaccgta ccaacaccgt tatgccggtt 720

gcggtttctc actactgcgg tccggcgaaa ccgtggcacc gtgactgcac cgcgtggggt 780

gcggaacgtt tcaccgaact ggcgggttct ctgaccaccg ttccggaaga atggcgtggt 840

aaactggcgg ttccgcaccg tatgttctct accaaacgta tgctgcagcg ttggcgtcgt 900

aaactgtctg cgcgtttcct gcgtaaaatc tactga 936

<210> 28

<211> 972

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 28

atggaaaact gcccgctggt ttctgttatc gtttgcgcgt acaacgcgga acagtacatc 60

gacgaatcta tctcttctat catcaaccag acctacgaaa acctggaaat catcgttatc 120

aacgacggtt ctaccgacct gaccctgtct cacctggaag aaatctctaa actggacaaa 180

cgtatcaaaa tcatctctaa caaatacaac ctgggtttca tcaactctct gaacatcggt 240

ctgggttgct tctctggtaa atacttcgcg cgtatggacg cggacgacat cgcgaaaccg 300

tcttggatcg aaaaaatcgt tacctacctg gaaaaaaacg accacatcac cgcgatgggt 360

tcttacctgg aaatcatcgt tgaaaaagaa tgcggtatca tcggttctca gtacaaaacc 420

ggtgacatct ggaaaaaccc gctgctgcac aacgacatct gcgaagcgat gctgttctac 480

aacccgatcc acaacaacac catgatcatg cgtgcgaacg tttaccgtga acacaaactg 540

atcttcaaca aagactaccc gtacgcggaa gactacaaat tctggtctga agtttctcgt 600

ctgggttgcc tggcgaacta cccggaagcg ctggttaaat accgtctgca cggtaaccag 660

acctcttctg tttacaacca cgaacagaac gaaaccgcga aaaaaatcaa acgtgaaaac 720

atcacctact acctgaacaa aatcggtatc gacatcaaag ttatcaactc tgtttctctg 780

ctggaaatct accacgttga caaatctaac aaagttctga aatctatcct gtacgaaatg 840

tacatgtctc tggacaaata caccatcacc tctctgctgc acttcatcaa ataccacctg 900

gaactgttcg acctgaaaca gaacctgaaa atcatcaaaa aattcatccg taaaatcaac 960

gttatcttct ag 972

<210> 29

<211> 903

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 29

atggcgttca aagttgttca gatctgcggt ggtctgggta accagatgtt ccagtacgcg 60

ttcgcgaaat ctctgcagaa acactctaac accccggttc tgctggacat cacctctttc 120

gactggtctg accgtaaaat gcagctggaa ctgttcccga tcgacctgcc gtacgcgtct 180

gcgaaagaaa tcgcgatcgc gaaaatgcag cacctgccga aactggttcg tgacgcgctg 240

aaatgcatgg gtttcgaccg tgtttctcag gaaatcgttt tcgaatacga accgaaactg 300

ctgaaaccgt ctcgtctgac ctacttcttc ggttacttcc aggacccgcg ttacttcgac 360

gcgatctctc cgctgatcaa acagaccttc accctgccgc cgccgccgga aaacaacaaa 420

aacaacaaca aaaaagaaga agaataccag tgcaaactgt ctctgatcct ggcggcgaaa 480

aactctgttt tcgttcacat ccgtcgtggt gactacgttg gtatcggttg ccagctgggt 540

atcgactacc agaaaaaagc gctggaatac atggcgaaac gtgttccgaa catggaactg 600

ttcgttttct gcgaagacct ggaattcacc cagaacctgg acctgggtta cccgttcatg 660

gacatgacca cccgtgacaa agaagaagaa gcgtactggg acatgctgct gatgcagtct 720

tgccagcacg gtatcatcgc gaactctacc tactcttggt gggcggcgta cctgatcgaa 780

aacccggaaa aaatcatcat cggtccgaaa cactggctgt tcggtcacga aaacatcctg 840

tgcaaagaat gggttaaaat cgaatctcac ttcgaagtta aatctcagaa atacaacgcg 900

taa 903

<210> 30

<211> 1146

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 30

atgaacaacg acaactctac caccaccaac aacaacgcga tcgaaatcta cgttgaccgt 60

gcgaccctgc cgaccatcca gcagatgacc aaaatcgttt ctcagaaaac ctctaacaaa 120

aaactgatct cttggtctcg ttacccgatc accgacaaat ctctgctgaa aaaaatcaac 180

gcggaattct tcaaagaaca gttcgaactg accgaatctc tgaaaaacat catcctgtct 240

gaaaacatcg acaacctgat catccacggt aacaccctgt ggtctatcga cgttgttgac 300

atcatcaaag aagttaacct gctgggtaaa aacatcccga tcgaactgca cttctacgac 360

gacggttctg cggaatacgt tcgtatctac gaattctcta aactgccgga atctgaacag 420

aaatacaaaa cctctctgtc taaaaacaac atcaaattct ctatcgacgg taccgactct 480

ttcaaaaaca ccatcgaaaa catctacggt ttctctcagc tgtacccgac cacctaccac 540

atgctgcgtg cggacatctt cgacaccacc ctgaaaatca acccgctgcg tgaactgctg 600

tctaacaaca tcaaacagat gaaatgggac tacttcaaag acttcaacta caaacagaaa 660

gacatcttct actctctgac caacttcaac ccgaaagaaa tccaggaaga cttcaacaaa 720

aactctaaca aaaacttcat cttcatcggt tctaactctg cgaccgcgac cgcggaagaa 780

cagatcaaca tcatctctga agcgaaaaaa gaaaactctt ctatcatcac caactctatc 840

tctgactacg acctgttctt caaaggtcac ccgtctgcga ccttcaacga acagatcatc 900

aacgcgcacg acatgatcga aatcaacaac aaaatcccgt tcgaagcgct gatcatgacc 960

ggtatcctgc cggacgcggt tggtggtatg ggttcttctg ttttcttctc tatcccgaaa 1020

gaagttaaaa acaaattcgt tttctacaaa tctggtaccg acatcgaaaa caactctctg 1080

atccaggtta tgctgaaact gaacctgatc aaccgtgaca acatcaaact gatctctgac 1140

atctaa 1146