(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 974 096**

(51) Int. Cl.:

C12P 19/04 (2006.01)
C12P 19/18 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2013 PCT/US2013/055731**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2014 WO14031602**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2013 E 13830306 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2024 EP 2885416**

(54) Título: **Síntesis enzimática de oligosacáridos a gran escala**

(30) Prioridad:

20.08.2012 US 201261684974 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.06.2024

(73) Titular/es:

ACADEMIA SINICA (100.0%)
128, Academia Road, Section 2 Nankang
Taipei 11529, TW

(72) Inventor/es:

WONG, CHI-HUEY;
WU, CHUNG-YI y
TSAI, TSUNG-I

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Síntesis enzimática de oligosacáridos a gran escala

Antecedentes

La globopentaosa (Gb5), la fucosil-Gb5 (Globo H) y la sialil-Gb5 (SSEA4) son glicoesfingolípidos de la serie globo y se descubrieron por primera vez en 1983 en una línea celular cultivada de teratocarcinoma humano[1] y posteriormente se encontró en varios cánceres malignos. [2],[3] El informe mostró la sobreexpresión de Globo H en hasta un 61%, la sobreexpresión de Gb5 en un 77,5% y la sobreexpresión de SSEA4 en un 95% en pacientes con cáncer de mama. [4] Por otro lado, el gen HER2, el objetivo del anticuerpo monoclonal terapéutico Trastuzumab (Herceptin) que interfiere con el receptor HER2/neu, está sobreexpresado sólo en el 25% de los pacientes con cáncer de mama[5]. La comparación demostró claramente que los antígenos glicoesfingolípidos (Gb5 y su derivado, Globo H y SSEA4) son mejores candidatos para desarrollar una vacuna contra el cáncer. Por lo tanto, Globo H se ha conjugado con la hemocianina de la lapa californiana (KLH) como vacuna contra el cáncer, y ahora se encuentra en ensayo clínico en fase III en algún país.[6]

Existen varias desventajas de los métodos actuales utilizados para la síntesis de Gb5, Globo H y SSEA4. La síntesis química tradicional es tediosa y requiere mucho trabajo, y son necesarias varias etapas de protección y desprotección para lograr una alta pureza y un estereotipo correcto y siempre conducen a rendimientos totales muy bajos. Hasta ahora existen muchos informes sobre la síntesis química de Globo H. [7] [8] [9] [10] [11] [12] [13] [14] Sin embargo, sólo se han publicado dos informes para la síntesis de SSEA4. Hsu et al. informaron sobre un enfoque de síntesis química en un solo recipiente para ensamblar la parte de glicano de SSEA-4 con un rendimiento del 24 %.[15] Zhen et al. reportaron el uso de un método quimioenzimático para sintetizar SSEA-4 en escala de miligramos. [16] Por otro lado, la síntesis enzimática de Globo H basada en glicosiltransferasa de tipo Leloir sólo requiere del azúcar de nucleótido activo como donante para catalizar la reacción de glicosilación. Sin embargo, el azúcar de nucleótido es demasiado caro para la síntesis a gran escala. Además, el subproducto pirofosfato y nucleósido difosfato inhiben la formación de azúcares de nucleótidos de la pirofosforilasa[15] y glicosiltransferasa de tipo Leloir; por lo tanto, es necesario desarrollar una estrategia de regeneración para superar la limitación y recargar el nucleótido para lograr constituir un producto de azúcar de nucleótido para poder continuar la reacción. Durante los últimos años, muchos grupos trabajaron para abordar el principal problema de la regeneración de azúcar de nucleótidos y la mayor parte de la regeneración de azúcar de nucleótidos se ha resuelto. Sin embargo, todavía hay algo de espacio para mejorar la tecnología de regeneración de azúcares de nucleótidos, especialmente la regeneración de UDP-Gal es mucho más difícil. Por ejemplo, la regeneración de UDP-Gal fue propuesta por primera vez en 1982 por Wong y Whiteside a través de la epimerasa UDP-Glc C4 para interconvertir UDP-Glc y UDP-Gal ([17]). Diez años después, nuestro grupo desarrolló el método de regeneración de UDP-Gal secundario. En lugar de usar UDP-Glc C4 epimerasa, se usó Glc-1-fosfato uridililtransferasa localizada en el operón galactosa en E. coli para intercambiar Gal-1-fosfato y UDP-Glc por Glc-1-fosfato y UDP-Gal. [18]Sin embargo, la vía final para condensar directamente UTP y Gal-1-fosfato para formar UDP-Gal no se estableció debido a la ausencia de una enzima adecuada. Debido a que los compuestos objetivo Gb5, Globo H y SSEA4 son moléculas relacionadas con Gal, cómo superar la principal dificultad de la regeneración de UDP-Gal y aumentar su eficiencia será el punto clave para la síntesis enzimática a gran escala de Gb5, Globo H y SSEA4.

Oris M. Su, et al. describieron la síntesis enzimática de un importante antígeno carbohidrato asociado a tumores, el hexasacárido de Globo-H. Comenzando con Lac-OBn como aceptor inicial, este enfoque emplea tres glicosiltransferasas: LgtC, una α1,4-galactosiltransferasa; LgtD, una β1,3-galactosil/β1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa bifuncional; y WbsJ, una α1,2-fucosiltransferasa. Además, también se emplearon dos epimerasas, GalE y WbgU, para la generación de nucleótidos de azúcar más caros, UDP-Gal y UDP-GalNAc, a partir de sus correspondientes epímeros C4 económicos. Este estudio representa una síntesis enzimática fácil del antígeno de Globo-H. [45]

Musleh M. Muthana, et al. describieron que se clonó una UDP-azúcar pirofosforilasa promiscua (BLUSP) a partir de la cepa ATCC55813 de Bifidobacterium longum y se usó eficientemente con una pirofosfatasa inorgánica de Pasteurella multocida (PmPpA) con o sin un monosacárido 1-quinasa para la síntesis multienzimática en un solo recipiente de UDP-galactosa, UDP-glucosa, UDP-manosa y sus derivados. Una diversificación química adicional de un derivado de UDP-manosa dio como resultado la formación de UDP-N-acetilmanosamina. [46]

En resumen, existen varias limitaciones a los métodos actuales de síntesis a gran escala de Gb5, Globo H y SSEA4 en la técnica. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos procedimientos sintéticos que produzcan Gb5, Globo H, SSEA4 y productos intermedios de los mismos de manera eficiente.

Compendio de la invención

La invención proporciona un método para sintetizar enzimáticamente un oligosacárido, que comprende: (i) producir UDP-Gal a partir de galactosa en presencia de un conjunto de enzimas de regeneración de UDP-Gal, galactosa, UTP, PEP y ATP, en donde el conjunto de enzimas de regeneración de UDP-Gal comprende una galactoquinasa, una UDP-azúcar pirofosforilasa, una piruvato quinasa y opcionalmente pirofosfatasa; (ii) convertir la lactosa-OR1A (Lac-OR1A) en globotriosa-OR1A (Gb3-OR1A) en presencia de UDP-Gal y una alfa-1,4 galactosiltransferasa, en donde R1A es

hidrógeno, alilo, alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, carbociclilo sustituido o no sustituido, heterociclilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, un grupo protector de oxígeno, biotina o ceramida; (iii) convertir Gb3-OR1A en Globotetraosa-OR1A (Gb4-OR1A) en presencia de UDP-GalNAc y una beta-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa; y (iv) convertir Gb4-OR1A en Globopentaosa-OR1A (Gb5-OR1A) en presencia de UDP-Gal y una beta-1,3-galactosiltransferasa.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 representa las estructuras químicas de Gb3, Gb4, Gb5, Globo H y SSEA4 con cola de alilo.

Figura 2 representa reacciones de glicosilación combinadas con regeneración de azúcares de nucleótidos y resultados de síntesis monitoreados por TLC. A: galactosilación combinada con regeneración de UDP-Gal para sintetizar, *por ejemplo,* alil-Gb3. B: acetilgalactosaminación combinada con regeneración de UDP-GalNAc para sintetizar, *por ejemplo,* alil-Gb4. C: galactosilación combinada con regeneración de UDP-Gal para sintetizar, *por ejemplo,* alil-Gb5. D: fucosilación combinada con regeneración de GDP-Fuc para sintetizar, *por ejemplo,* alil-Globo H. E: sialilación combinada con regeneración de CMP-Neu5Ac para sintetizar, *por ejemplo,* alil-SSEA4.

Figura 3 representa la vía biosintética de los glicoesfingolípidos, que implica la adición de restos de galactosa, que pueden ser catalizados mediante una galactosiltransferasa acoplada con el proceso de regeneración de UDP-Gal descrito en la presente memoria.

***Figura* 4** representa la estrategia sintética enzimática en la fabricación de Globo H a través de la vía lactosa (Lac) → Gb3 → Gb4 → Gb5 utilizando un sistema de regeneración de azúcar de nucleótidos.

***Figura* 5** representa la estrategia sintética enzimática en la fabricación de SSEA4 a través de la vía Lac→ Gb3→ Gb4→ Gb5 utilizando un sistema de regeneración de azúcares de nucleótidos.

***Figura* 6** representa la estrategia sintética enzimática en la fabricación de alil-Globo H a través de la vía alil-Lac → alil-Gb3 → alil-Gb4 → alil-Gb5 utilizando un sistema de regeneración de azúcares de nucleótidos.

***Figura* 7** representa la estrategia sintética enzimática en la fabricación de alil-SSEA4 a través de la vía alil-Lac → alil-Gb3 → alil-Gb4 → alil-Gb5 utilizando un sistema de regeneración de azúcares de nucleótidos.

Figura 8 representa la alta pureza obtenida en la biosíntesis de los intermedios alil-Gb3, alil-Gb4 y alil-Gb5.

Figura 9 representa la alta pureza obtenida en la biosíntesis de alil-Globo H a partir de alil-Gb5 utilizando FutC modificado y no modificado.

Figura 10 representa la alta pureza obtenida en la biosíntesis de alil-SSEA4 a partir de alil-Gb5 utilizando JT-FAJ-16.

Descripción detallada del invento

La presente divulgación se basa en el desarrollo de nuevos procesos de regeneración de azúcares de nucleótidos y sus aplicaciones en la síntesis de azúcares. Dichos métodos de síntesis de azúcar, que implican la combinación de al menos un sistema de regeneración de azúcar de nucleótido (el sistema de regeneración de UDP-Gal descrito en la presente memoria) y al menos una glicosiltransferasa (galactosiltransferasa), se usaron para sintetizar varios oligosacáridos (con cola), incluyendo Gb3 con cola de alilo, Gb4, Gb5 (también conocido como SSEA3), Fucosil-Gb5 (también conocido como Globo H) y Sialil-Gb5 (también conocido como SSEA4), con eficiencia y rendimientos inesperadamente altos. Más específicamente, los enfoques sintéticos descritos en la presente memoria permiten inesperadamente reacciones en cadena para producir productos finales, tales como Globo H y SSEA4, sin la necesidad de purificar intermedios.

En algunas realizaciones, el método descrito en la presente memoria para sintetizar enzimáticamente un oligosacárido utiliza lactosa (*por ejemplo*, con cola) como material de partida. El método comprende: (i) producir UDP-Gal a partir de galactosa en presencia de un conjunto de enzimas de regeneración de UDP-Gal, galactosa, UTP, PEP y ATP, en donde el conjunto de enzimas de regeneración de UDP-Gal comprende una galactoquinasa (*por ejemplo*, de *E. coli),* una UDP-azúcar pirofosforilasa (*por ejemplo*, de *A. thaliana*), una piruvato quinasa (*por ejemplo*, de *E. coli),* y opcionalmente, una pirofosfatasa (*por ejemplo*, de *E. coli*); (ii) convertir Lac-OR^{1A} en Gb3-OR^{1A} en presencia de UDP-Gal y una alfa-1,4 galactosiltransferasa (*por ejemplo*, una LgtC como la de *N. meningitides*), en donde R^{1A} es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, carbociclilo sustituido o no sustituido, heterociclilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, o un grupo protector de oxígeno. Lac-O^{1A} se refiere a lactosa (β-D-galactopiranosil-(1→**4**)-D-glucosa) (*por ejemplo*, también abarcado por la Fórmula (**I**), en donde cada uno de R^{2A}, R^{3A}, R^{5A}, R^{2B}, R^{3B} y R^{5B} es hidrógeno) en donde el grupo unido al carbono anomérico de la lactosa es un grupo -OR^{1A}, y en donde R^{1A} es como se define en la presente memoria.

Ejemplos de R^{1A} incluyen, pero no se limitan a, hidrógeno, alilo, biotina, una ceramida o un grupo distinto de hidrógeno

(*por ejemplo*, alquilo) que además está sustituido con un tio sustituido o no sustituido, amino sustituido o no sustituido, carbonilo (*por ejemplo*, ácido carboxílico), azido, alquenilo (*por ejemplo*, alilo), alquinilo (*por ejemplo*, propargilo), biotina o un grupo ceramida. En ciertas realizaciones, R^{1A} es hidrógeno, alilo, alquilo sustituido, biotina o una ceramida.

Cuando sea necesario, Gb3-OR^{1A} puede aislarse de la mezcla de reacción.

Las etapas (i) y (ii) pueden ocurrir en una mezcla de reacción de síntesis de Gb3 que comprende galactosa, PEP, ATP, UTP, Lac-OR^{1A}, la alfa-1,4-galactosiltransferasa y el conjunto de enzimas de regeneración de UDP-Gal. La relación molar del Lac-OR^{1A} y la galactosa en la mezcla de reacción de síntesis de Gb3 es 1:1 antes de que se produzca cualquier reacción enzimática.

Cualquiera de los métodos descritos anteriormente comprende además: (iii) convertir el Gb3-OR^{1A} en Gb4-OR^{1A} en presencia de UDP-GalNAc y una beta-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa *(por ejemplo,* una LgtD de un organismo adecuado tal como *H. influenza*), que se puede acoplar con la producción de UDP-GalNAc a partir de GalNAc en presencia de un conjunto de enzimas de regeneración de UDP-GalNAc, en donde el conjunto de enzimas de regeneración de UDP-GalNAc comprende una N-acetilhexosamina 1-quinasa (*por ejemplo*, de *B. longum*), una N-acetilglucosamina 1-fosfato uridiltransferasa (*por ejemplo*, de *E. coli*), y una piruvato quinasa *(por ejemplo,* de *E. coli),* y opcionalmente, una pirofosfatasa (*por ejemplo*, de *E. coli).* Las etapas anteriores se pueden llevar a cabo en una mezcla de reacción de síntesis de Gb4 que comprende GalNAc, PEP, ATP, UTP, el Gb3-OR^{1A}, la beta-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa y el conjunto de enzimas de regeneración de UDP-GalNAc. En un ejemplo, la mezcla de reacción de síntesis de Gb4 se prepara mezclando la mezcla de reacción de síntesis de Gb3 con al menos GalNAc, la beta-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa, la N-acetilhexosamina 1-quinasa y la N-acetilglucosamina 1-fosfato uridiltransferasa. Cuando sea necesario, Gb4-OR^{1A} puede aislarse de la mezcla de reacción.

Después de la síntesis de Gb4-OR^{1A}, el método descrito anteriormente comprende además: (iv) convertir Gb4-OR^{1A} en Gb5-OR^{1A} en presencia de UDP-Gal y una beta-1,3-galactosiltransferasa (*por ejemplo*, una LgtD tal como la de *H. influenza*), que se puede acoplar con la producción de UDP-Gal a partir de galactosa en presencia del conjunto de enzimas de regeneración de UDP-Gal descritas en la presente memoria. En un ejemplo, estas etapas tienen lugar en una mezcla de reacción de síntesis de Gb5 que comprende galactosa, PEP, ATP, UTP, el Gb4-OR^{1A}, la beta-1,3-galactosiltransferasa y el conjunto de enzimas de regeneración de UDP-Gal. El Gb5-OR^{1A} resultante puede aislarse de la mezcla de reacción.

El método anterior puede comprender además etapas para convertir el Gb5-OR^{1A} así obtenido en Fucosil-Gb5-OR^{1A} (Globo H) o en Sialil-Gb5-OR^{1A} (SSEA4).

Para la síntesis de Globo H, el método puede comprender además: convertir el Gb5-OR^{1A} en fucosil-Gb5-OR^{1A} en presencia de GDP-Fuc y una alfa-1,2-fucosiltransferasa *(por ejemplo,* de *H. pylori*), que se acopla con la producción de GDP-Fuc a partir de fucosa en presencia de un conjunto de enzimas de regeneración de GDP-Fuc, en donde el conjunto de enzimas de regeneración de GDP-Fuc comprende una L-fucoquinasa/ GDP-fucosa pirofosforilasa (*por ejemplo, B. fragilis*), una piruvato quinasa (*por ejemplo*, de *E. coli),* y una pirofosfatasa (*por ejemplo*, de *E. coli).* Estas etapas ocurren en una mezcla de reacción de síntesis de Fucosil-Gb5 que comprende fucosa, ATP, GTP, PEP, el Gb5-OR, alfa-1,2-fucosiltransferasa y el conjunto de enzimas de regeneración de GDP-Fuc. La mezcla de reacción de síntesis de Fucosil-Gb5 se prepara mezclando la mezcla de reacción de síntesis de Gb5 con al menos fucosa, GTP, la alfa-1,2-fucosiltransferasa y la L-fucoquinasa/GDP-fucosa pirofosforilasa. Cuando sea necesario, el Fucosil-Gb5-OR^{1A} resultante puede aislarse de la mezcla de reacción.

Para la síntesis de SSEA4, el método puede comprender además: convertir el Gb5-OR^{1A} en Sialil-Gb5-OR^{1A} en presencia de CMP-Neu5Ac y una alfa-2,3-sialiltransferasa (*por ejemplo*, de *M. bacteria*), y producir CMP-Neu5Ac a partir de Neu5Ac en presencia de un conjunto de enzimas de regeneración de CMP-Neu5Ac, en donde el conjunto de enzimas de regeneración de CMP-Neu5Ac comprende una citidina monofosfato quinasa (*por ejemplo*, de *E. coli),* una CMP-ácido siálico sintetasa *(por ejemplo,* de *P. Multocida*), una piruvato quinasa (*por ejemplo*, de *E. coli),* y opcionalmente una pirofosfatasa (*por ejemplo*, de *E. coli).* Las etapas (ix) y (x) ocurren en una mezcla de reacción de síntesis de Sialil-Gb5 que comprende Neu5Ac, CTP, PEP, Gb5-OR^{1A}, la alfa-2,3-sialiltransferasa y el conjunto de enzimas de regeneración de CMP-Neu5Ac. La mezcla de reacción de síntesis de Sialil-Gb5 se prepara mezclando la mezcla de reacción de síntesis de Gb5 con al menos Neu5Ac, CTP, la alfa-2,3-sialiltransferasa, la citidina monofosfato quinasa y la CMP-ácido siálico sintetasa. El Sialil-Gb5-OR^{1A} después se puede aislar de la mezcla de reacción.

La descripción proporciona además un método para sintetizar Globo H realizado de la siguiente manera: producir UDP-Gal a partir de galactosa en presencia de las enzimas de regeneración de UDP-Gal tal y como se describe en la presente memoria, convertir Lac-OR^{1A} como se describe en la presente memoria en Gb3-OR^{1A} en una mezcla de reacción de síntesis de Gb3 que comprende al menos la UDP-Gal, una alfa-1,4 galactosiltransferasa y las enzimas de regeneración de UDP-Gal, mezclar la mezcla de reacción de síntesis de Gb3 con al menos GalNAc, la beta-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa, la N-acetilhexosamina 1-quinasa y la N-acetilglucosamina 1-fosfato uridiltransferasa para formar una mezcla de reacción de síntesis de Gb4, incubar la mezcla de reacción de síntesis de Gb4 en condiciones que permitan la conversión de Gb3-OR^{1A} a Gb4-OR^{1A}, incubar adicionalmente la mezcla de reacción de síntesis de Gb4 en presencia de una β-1,3-galactosiltransferasa en condiciones que permitan la conversión de Gb4-OR^{1A} a Gb5-OR^{1A}, mezclar la mezcla de reacción que contiene Gb5-OR^{1A} con al menos fucosa, GTP, la alfa-1,2-

fucosiltransferasa y la L-fucoquinasa/GDP-fucosa pirofosforilasa para formar la mezcla de reacción de Fucosil-Gb5-OR^{1A}; incubar la mezcla de reacción de Fucosil-Gb5-OR^{1A} en condiciones que permitan la conversión de Gb5-OR^{1A} a Fucosil-Gb5-OR^{1A} y, opcionalmente, aislar el Fucosil-Gb5-OR^{1A}.

La descripción proporciona además un método para sintetizar Globo H realizado de la siguiente manera: producir UDP-Gal a partir de galactosa en presencia de las enzimas de regeneración de UDP-Gal tal y como se describe en la presente memoria, convertir Lac-OR^{1A} tal y como se describe en la presente memoria en Gb3-OR^{1A} en una mezcla de reacción de síntesis de Gb3 que comprende al menos la UDP-Gal, una alfa-1,4 galactosiltransferasa y las enzimas de regeneración de UDP-Gal, mezclar la mezcla de reacción de síntesis de Gb3 con al menos GalNAc, la beta-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa, la N-acetilhexosamina 1-quinasa y la N-acetilglucosamina 1-fosfato uridiltransferasa para formar una mezcla de reacción de síntesis de Gb4, incubar la mezcla de reacción de síntesis de Gb4 en condiciones que permitan la conversión de Gb3-OR^{1A} a Gb4-OR^{1A}; aislar el Gb4-OR^{1A}; mezclar el Gb4-OR^{1A} con una beta-1,3-galactosiltransferasa y el conjunto de enzimas de regeneración de UDP-Gal para formar una mezcla de reacción de síntesis de Gb5; incubar la mezcla de reacción de síntesis de Gb5 en condiciones que permitan la conversión del Gb4-OR^{1A} a Gb5-OR^{1A}, mezclar la mezcla de reacción de síntesis de Gb5 con al menos fucosa, GTP, la alfa-1,2-fucosiltransferasa y la L-fucoquinasa/GDP-fucosa pirofosforilasa para formar una mezcla de reacción de Fucosil-Gb5-OR^{1A}; incubar la mezcla de reacción del Fucosil-Gb5-OR^{1A} en condiciones que permitan la conversión del Gb5-OR^{1A} a Fucosil-Gb5-OR^{1A}; y opcionalmente, (x) aislar el Fucosil-Gb5-OR^{1A}.

La descripción proporciona además un método para sintetizar SSEA4 realizado de la siguiente manera: producir UDP-Gal a partir de galactosa en presencia de las enzimas de regeneración de UDP-Gal tal y como se describe en la presente memoria, convertir Lac-OR^{1A} tal y como se describe en la presente memoria en Gb3-OR^{1A} en una mezcla de reacción de síntesis de Gb3 que comprende al menos la UDP-Gal, una alfa-1,4 galactosiltransferasa y las enzimas de regeneración de UDP-Gal, mezclar la mezcla de reacción de síntesis de Gb3 con al menos GalNAc, la beta-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa, la N-acetilhexosamina 1-quinasa y la N-acetilglucosamina 1-fosfato uridiltransferasa para formar una mezcla de reacción de síntesis de Gb4, incubar la mezcla de reacción de síntesis de Gb4 en condiciones que permitan la conversión de Gb3-OR^{1A} a Gb4-OR^{1A}, incubar adicionalmente la mezcla de reacción de síntesis de Gb4 en presencia de una β-1,3-galactosiltransferasa en condiciones que permitan la conversión de Gb4-OR^{1A} a Gb5-OR^{1A}, mezclar la mezcla de reacción de síntesis de Gb4 con al menos Neu5Ac, CTP, la alfa-2,3-sialiltransferasa, la citidina monofosfato quinasa y la CMP-ácido siálico sintetasa para formar una mezcla de reacción de Sialil-Gb5-OR^{1A}; incubar la mezcla de reacción de Sialyl-Gb5-OR^{1A} en condiciones que permitan la conversión del Gb5-OR^{1A} a Sialil-Gb5-OR^{1A}; y opcionalmente, aislar el Sialil-Gb5-OR^{1A}.

La descripción proporciona además un método para sintetizar SSEA4 realizado de la siguiente manera: producir UDP-Gal a partir de galactosa en presencia de las enzimas de regeneración de UDP-Gal tal y como se describe en la presente memoria, convertir Lac-OR^{1A} como se describe en la presente memoria en Gb3-OR^{1A} en una mezcla de reacción de síntesis de Gb3 que comprende al menos la UDP-Gal, una alfa-1,4 galactosiltransferasa y las enzimas de regeneración de UDP-Gal, mezclar la mezcla de reacción de síntesis de Gb3 con al menos GalNAc, la beta-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa, la N-acetilhexosamina 1-quinasa y la N-acetilglucosamina 1-fosfato uridiltransferasa para formar una mezcla de reacción de síntesis de Gb4, incubar la mezcla de reacción de síntesis de Gb4 en condiciones que permitan la conversión de Gb3-OR^{1A} a Gb4-OR^{1A}; aislar el Gb4-OR^{1A}; mezclar el Gb4-OR^{1A} con una beta-1,3-galactosiltransferasa y el conjunto de enzimas de regeneración de UDP-Gal para formar una mezcla de reacción de síntesis de Gb5; incubar la mezcla de reacción de síntesis de Gb5 en condiciones que permitan la conversión del Gb4-OR^{1A} a Gb5-OR^{1A}; mezclar el Gb5-OR^{1A} con una alfa-2,3-sialiltransferasa y un conjunto de enzimas de regeneración de CMP-Neu5Ac para formar una mezcla de reacción de síntesis de Sialil-Gb5, en donde el conjunto de enzimas de regeneración de CMP-Neu5Ac comprende una citidina monofosfato quinasa, una CMP-ácido siálico sintetasa, una piruvato quinasa y una pirofosfatasa; incubar la mezcla de reacción de síntesis de Sialil-Gb5 en condiciones que permitan la conversión del Gb4-OR^{1A} a Sialil-Gb5-OR^{1A}; y opcionalmente, aislar el Sialyl-Gb5-OR^{1A}.

En uno cualquiera de los métodos de síntesis descritos en la presente memoria, al menos una de las enzimas implicadas o al menos uno de los sustratos de cada reacción (*por ejemplo*, lactosa, Gb3, Gb4 o Gb5) pueden inmovilizarse en un miembro de soporte.

Se describen además reactores enzimáticos para sintetizar oligosacáridos usando los métodos descritos en la presente memoria. Un reactor enzimático de este tipo puede comprender una o más de las siguientes cámaras de reacción:

(a) una cámara de reacción para sintetizar Gb3-OR^{1A}, en donde la cámara comprende una alfa-1,4-galactosiltransferasa y un conjunto de enzimas de regeneración de UDP-Gal, que comprende una galactoquinasa, una UDP-azúcar pirofosforilasa, una piruvato quinasa y opcionalmente una pirofosfatasa;

(b) una cámara de reacción para sintetizar Gb4-OR^{1A}, en donde la cámara comprende una beta-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa y un conjunto de enzimas de regeneración de UDP-GalNAc, que comprende una N-acetilhexosamina 1-quinasa, una N-acetilglucosamina 1-fosfato uridililtransferasa, una piruvato quinasa y opcionalmente una pirofosfatasa;

(c) una cámara de reacción para sintetizar Gb5-OR^{1A}, en donde la cámara comprende una beta-1,3-

galactosiltransferasa y el conjunto de enzimas de regeneración de UDP-Gal;

(d) una cámara de reacción para sintetizar Fucosil-Gb5-OR^{1A}, en donde la cámara comprende una alfa-1,2-fucosiltransferasa y un conjunto de enzimas de regeneración de GDP-Fuc, que comprende una L-fucoquinasa/GDP-fucosa pirofosforilasa, una piruvato quinasa y opcionalmente una pirofosfatasa; y

(e) una cámara de reacción para sintetizar Sialil-Gb5-OR^{1A}, en donde la cámara comprende una alfa-2,3-sialiltransferasa y un conjunto de enzimas de regeneración de CMP-Neu5Ac, que comprende una citidina monofosfato quinasa, una CMP-ácido siálico sintetasa, una piruvato quinasa y opcionalmente una pirofosfatasa.

En algunos ejemplos, el reactor enzimático comprende las cámaras de reacción: (a) y (b); (a), (b) y (c); (a), (b), (c) y (d); (a), (b), (c) y (e); (b) y (c); (b), (c) y (d); (b), (c) y (e); (c) y (d); o (c) y (e).

En otro ejemplo, el reactor enzimático descrito en la presente memoria comprende una cámara de reacción que comprende una galactosiltransferasa (*por ejemplo*, una alfa-1,4-galactosiltransferasa, una beta-1,4-galactosiltransferasa, una alfa-1,3-galactosiltransferasa o una beta-1,3-galactosiltransferasa) y un conjunto de enzimas de regeneración de UDP-Gal tal y como se describe en la presente memoria, que puede comprender una galactoquinasa, una UDP pirofosfoilasa, una piruvato quinasa y opcionalmente una pirofosfatasa.

En una cualquiera de las cámaras de reacción, una o más de las enzimas pueden inmovilizarse sobre un miembro de soporte. En algunos ejemplos, uno o más del conjunto de enzimas de regeneración de UDP-Gal, el conjunto de enzimas de regeneración de UDP-GalNAc, el conjunto de enzimas de regeneración de GDP-Fuc y el conjunto de enzimas de regeneración de CMP-Neu5Ac están inmovilizados cada uno sobre un miembro de soporte. En otros ejemplos, todas las enzimas en una cámara de reacción están inmovilizadas sobre un miembro de soporte.

Definiciones químicas

Las definiciones de grupos funcionales específicos y términos químicos se describen con más detalle a continuación. Los elementos químicos se identifican según the Periodic Table of the Elements, CAS versión, Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed., cubierta interior y los grupos funcionales específicos se definen generalmente como se describe en el mismo. Además, los principios generales de la química orgánica, así como los restos funcionales específicos y la reactividad, se describen en Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999; Smith y 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; y Carruthers Some Modern Methods of Organic Chemistry, 3rd Edition, Cambridge University Press, Cambridge, 1987.

Los compuestos descritos en la presente memoria pueden comprender uno o más centros asimétricos y, por lo tanto, pueden existir en diversas formas estereoisoméricas, *por ejemplo,* enantiómeros y/o diastereómeros. Por ejemplo, los compuestos descritos en la presente memoria pueden estar en forma de un enantiómero, diastereómero o isómero geométrico individual, o pueden estar en forma de una mezcla de estereoisómeros, incluyendo mezclas racémicas y mezclas enriquecidas en uno o más estereoisómeros. Los isómeros se pueden aislar a partir de mezclas mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo la cromatografía líquida quiral de alta presión (HPLC) y la formación y cristalización de sales quirales; o los isómeros preferidos pueden prepararse mediante síntesis asimétricas. Véase, por ejemplo, Jacques et al., Enantiomers, Racemates and Resolutions (Wiley Interscience, Nueva York, 1981); Wilen et al., Tetrahedron 33:2725 (1977); Eliel, E.L. Stereochemistry of Carbon Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962); y 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). Se describen además compuestos como isómeros individuales sustancialmente libres de otros isómeros y, alternativamente, como mezclas de varios isómeros.

Cuando se enumera un intervalo de valores, se pretende abarcar cada valor y sub-intervalo dentro del intervalo. Por ejemplo, "alquilo de C_{1-6} " pretende abarcar, alquilo de 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}, y C_{5-6}.

Tal y como se usa en la presente memoria, "alquilo" se refiere a un radical de un grupo hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 30 átomos de carbono ("alquilo de C_{1-30} "). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 20 átomos de carbono ("alquilo de C_{1-20}"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 10 átomos de carbono ("alquilo de C_{1-10} "). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 9 átomos de carbono ("alquilo de C_{1-9}"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 8 átomos de carbono ("alquilo de C_{1-8}"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 7 átomos de carbono ("alquilo de C_{1-7}"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 6 átomos de carbono ("alquilo de C_{1-6}"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 5 átomos de carbono ("alquilo de C_{1-5}"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 4 átomos de carbono ("alquilo de C_{1-4}"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 3 átomos de carbono ("alquilo de C_{1-3}"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 1 a 2 átomos de carbono ("alquilo de C_{1-2}"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene 1 átomo de carbono ("alquilo de C_1"). En algunas realizaciones, un grupo alquilo tiene de 2 a 6 átomos de carbono ("alquilo de C_{2-6}"). Ejemplos de grupos alquilo de C_{1-6} incluyen metilo (C_1), etilo (C_2), n-propilo (C_3), isopropilo (C_3), n-butilo (C_4), terc-butilo (C_4), sec-butilo (C_4), isobutilo (C_4), n-pentilo (C_5), 3-pentanilo (C_5), amilo (C_5), neopentilo (C_5), 3-metil-2-butanilo (C_5), amilo terciario (C_5), y n-hexilo (C_6). Ejemplos adicionales de grupos alquilo incluyen n-heptilo (C_7), n-octilo (C_8) y similares. A menos que se especifique lo contrario,

cada caso de un grupo alquilo está independientemente no sustituido (un "alquilo no sustituido") o sustituido (un "alquilo sustituido") con uno o más sustituyentes. En ciertas realizaciones, el grupo alquilo es un alquilo de C_{1-10} no sustituido *(por ejemplo,* $-CH_3$). En ciertas realizaciones, el grupo alquilo es un alquilo de C_{1-10} sustituido.

Como se usa en la presente memoria, "alquenilo" o "alqueno" se refiere a un radical de un grupo hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene de 2 a 30 átomos de carbono y uno o más dobles enlaces (*por ejemplo,* 1, 2, 3, o 4 dobles enlaces). En algunas realizaciones, un grupo alquenilo tiene de 2 a 20 átomos de carbono ("alquenilo de C_{2-20}"). En algunas realizaciones, un grupo alquenilo tiene de 2 a 10 átomos de carbono ("alquenilo de C_{2-10}"). En algunas realizaciones, un grupo alquenilo tiene de 2 a 9 átomos de carbono ("alquenilo de C_{2-9}"). En algunas realizaciones, un grupo alquenilo tiene de 2 a 8 átomos de carbono ("alquenilo de C_{2-8}"). En algunas realizaciones, un grupo alquenilo tiene de 2 a 7 átomos de carbono ("alquenilo de C_{2-7}"). En algunas realizaciones, un grupo alquenilo tiene de 2 a 6 átomos de carbono ("alquenilo de C_{2-6}"). En algunas realizaciones, un grupo alquenilo tiene de 2 a 5 átomos de carbono ("alquenilo de C_{2-5}"). En algunas realizaciones, un grupo alquenilo tiene de 2 a 4 átomos de carbono ("alquenilo de C_{2-4}"). En algunas realizaciones, un grupo alquenilo tiene de 2 a 3 átomos de carbono ("alquenilo de C_{2-3}"). En algunas realizaciones, un grupo alquenilo tiene 2 átomos de carbono ("alquenilo de C_2"). Los uno o más dobles enlaces carbono-carbono pueden ser internos (tal como en 2-butenilo) o terminales (tal como en 1-butenilo). Ejemplos de grupos alquenilo de C_{2-4} incluyen etenilo (C_2), 1-propenilo ("alilo", C_3), 2-propenilo (C_3), 1-butenilo (C_4), 2-butenilo (C_4), butadienilo (C_4), y similares. Ejemplos de grupos alquenilo de C_{2-6} incluyen los grupos alquenilo de C_{2-4} antes mencionados así como pentenilo (C_5), pentadienilo (C_5), hexenilo (C_6), y similares. Ejemplos adicionales de alquenilo incluyen heptenilo (C_7), octenilo (C_8), octatrienilo (C_8), y similares. A menos que se especifique lo contrario, cada caso de un grupo alquenilo está independientemente no sustituido (un "alquenilo no sustituido") o sustituido (un "alquenilo sustituido") con uno o más sustituyentes. En ciertas realizaciones, el grupo alquenilo es un alquenilo de C_{2-10} no sustituido. En determinadas realizaciones, el grupo alquenilo es un alquenilo de C_{2-10} sustituido .

Como se usa en la presente memoria, "alquinilo" o "alquino" se refiere a un radical de un grupo hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene de 2 a 30 átomos de carbono y uno o más triples enlaces (*por ejemplo,* 1, 2, 3, o 4 triples enlaces) ("alquinilo de C_{2-10}"). En algunas realizaciones, un grupo alquinilo tiene de 2 a 20 átomos de carbono ("alquinilo de C_{2-20}"). En algunas realizaciones, un grupo alquinilo tiene de 2 a 10 átomos de carbono ("alquinilo de C_{2-10}"). En algunas realizaciones, un grupo alquinilo tiene de 2 a 9 átomos de carbono ("alquinilo de C_{2-9}"). En algunas realizaciones, un grupo alquinilo tiene de 2 a 8 átomos de carbono ("alquinilo de C_{2-8}"). En algunas realizaciones, un grupo alquinilo tiene de 2 a 7 átomos de carbono ("alquinilo de C_{2-7}"). En algunas realizaciones, un grupo alquinilo tiene de 2 a 6 átomos de carbono ("alquinilo de C_{2-6} "). En algunas realizaciones, un grupo alquinilo tiene de 2 a 5 átomos de carbono ("alquinilo de C_{2-5}"). En algunas realizaciones, un grupo alquinilo tiene de 2 a 4 átomos de carbono ("alquinilo de C_{2-4}"). En algunas realizaciones, un grupo alquinilo tiene de 2 a 3 átomos de carbono ("alquinilo de C_{2-3}"). En algunas realizaciones, un grupo alquinilo tiene 2 átomos de carbono ("alquinilo de C_2"). Los uno o más triples enlaces carbono-carbono pueden ser internos (tal como en 2-butinilo) o terminales (tal como en 1-butinilo). Ejemplos de grupos alquinilo de C_{2-4} incluyen, sin limitación, etinilo (C_2), 1-propinilo (C_3), 2-propinilo (C_3), 1-butinilo (C_4), 2-butinilo (C_4), y similares. Ejemplos de grupos alquenilo de C_{2-6} incluyen los grupos alquinilo de C_{2-4} antes mencionados así como pentinilo (C_5), hexinilo (C_6), y similares. Ejemplos adicionales de alquinilo incluyen heptinilo (C_7), octinilo (C_8), y similares. A menos que se especifique lo contrario, cada caso de un grupo alquinilo está independientemente no sustituido (un "alquinilo no sustituido") o sustituido (un "alquinilo sustituido") con uno o más sustituyentes. En ciertas realizaciones, el grupo alquinilo es un alquinilo de C_{2-10} no sustituido. En ciertas realizaciones, el grupo alquinilo es un alquinilo de C_{2-10} sustituido.

Tal y como se usa en la presente memoria, "carbociclilo" se refiere a un radical de un grupo hidrocarburo cíclico no aromático que tiene de 3 a 10 átomos de carbono en el anillo ("carbociclilo de C_{3-10}") y cero heteroátomos en el sistema de anillos no aromáticos. En algunas realizaciones, un grupo carbociclilo tiene de 3 a 8 átomos de carbono en el anillo ("carbociclilo de C_{3-8}"). En algunas realizaciones, un grupo carbociclilo tiene de 3 a 7 átomos de carbono en el anillo ("carbociclilo de C_{3-7}"). En algunas realizaciones, un grupo carbociclilo tiene de 3 a 6 átomos de carbono en el anillo ("carbociclilo de C_{3-6}"). En algunas realizaciones, un grupo carbociclilo tiene de 5 a 10 átomos de carbono en el anillo ("carbociclilo de C_{5-10}"). Ejemplos de grupos carbociclilo de C_{3-6} incluyen, sin limitación, ciclopropilo (C_3), ciclopropenilo (C_3), ciclobutilo (C_4), ciclobutenilo (C_4), ciclopentilo (C_5), ciclopentenilo (C_5), ciclohexilo (C_6), ciclohexenilo (C_6), ciclohexadienilo (C_6), y similares. Ejemplos de grupos carbociclilo de C_{3-8} incluyen, sin limitación, los grupos carbociclilo de C_{3-6} antes mencionados así como cicloheptilo (C_7), cicloheptenilo (C_7), cicloheptadienilo (C_7), cicloheptatrienilo (C_7), ciclooctilo (C_8), ciclooctenilo (C_8), biciclo[2.2.1]heptanilo (C_7), biciclo[2.2.2]octanilo (C_8), y similares. Ejemplos de grupos carbociclilo de C_{3-10} incluyen, sin limitación, los grupos carbociclilo de C_{3-8} antes mencionados así como ciclononilo (C_9), ciclononenilo (C_9), ciclodecilo (C_{10}), ciclodecenilo (C_{10}), octahidro-1*H*-indenilo (C_9), decahidronaftalenilo (C_{10}), espiro[4,5]decanilo (C_{10}), y similares. Como lo ilustran los ejemplos anteriores, en ciertas realizaciones, el grupo carbociclilo es monocíclico ("carbociclilo monocíclico") o policíclico (por ejemplo, que contiene un sistema de anillo condensado, con puente o espiro tal como un sistema bicíclico ("carbociclilo bicíclico") o un sistema tricíclico ("carbociclilo tricíclico")) y puede estar saturado o puede contener uno o más dobles o triples enlaces carbono-carbono. "Carbociclilo" también incluye sistemas de anillos en donde el anillo de carbociclilo, como se define anteriormente, está fusionado con uno o más grupos arilo o heteroarilo en donde el punto de unión está en el anillo de carbociclilo y, en dichos casos, el número de carbonos continúa designando el número de carbonos en el sistema de anillos carbocíclicos. A menos que se especifique lo contrario, cada caso de un grupo carbociclilo está independientemente no sustituido (un "carbociclilo no sustituido") o sustituido (un "carbociclilo sustituido") con uno o

más sustituyentes. En ciertas realizaciones, el grupo carbociclilo es un carbociclilo de C_{3-10} no sustituido. En determinadas realizaciones, el grupo carbociclilo es un carbociclilo de C_{3-10} sustituido.

En algunas realizaciones, "carbociclilo" es un grupo carbociclilo saturado monocíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono en el anillo ("cicloalquilo de C_{3-10} "). En algunas realizaciones, un grupo cicloalquilo tiene de 3 a 8 átomos de carbono en el anillo ("cicloalquilo de C_{3-8}"). En algunas realizaciones, un grupo cicloalquilo tiene de 3 a 6 átomos de carbono en el anillo ("cicloalquilo de C_{3-6}"). En algunas realizaciones, un grupo cicloalquilo tiene de 5 a 6 átomos de carbono en el anillo ("cicloalquilo de C_{5-6}"). En algunas realizaciones, un grupo cicloalquilo tiene de 5 a 10 átomos de carbono en el anillo ("cicloalquilo de C_{5-10}"). Ejemplos de grupos cicloalquilo de C_{5-6} incluyen ciclopentilo (C_5) y ciclohexilo (C_5). Ejemplos de grupos cicloalquilo de C_{3-6} incluyen los grupos cicloalquilo de C_{5-6} antes mencionados así como ciclopropilo (C_3) y ciclobutilo (C_4). Ejemplos de grupos cicloalquilo de C_{3-8} incluyen los grupos cicloalquilo de C_{3-6} antes mencionados así como cicloheptilo (C_7) y ciclooctilo (C_8). A menos que se especifique lo contrario, cada caso de un grupo cicloalquilo está independientemente no sustituido (un "cicloalquilo no sustituido") o sustituido (un "cicloalquilo sustituido") con uno o más sustituyentes. En ciertas realizaciones, el grupo cicloalquilo es un cicloalquilo de C_{3-10} no sustituido. En ciertas realizaciones, el grupo cicloalquilo es un cicloalquilo de C_{3-10} sustituido.

Tal y como se usa en la presente memoria, "heterociclilo" se refiere a un radical de un sistema de anillos no aromáticos de 3 a 14 miembros que tiene átomos de carbono en el anillo y de 1 a 4 heteroátomos en el anillo, en donde cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre ("heterociclilo de 3 a 14 miembros"). En los grupos heterociclilo que contienen uno o más átomos de nitrógeno, el punto de unión puede ser un átomo de carbono o nitrógeno, según lo permita la valencia. Un grupo heterociclilo puede ser monocíclico ("heterociclilo monocíclico") o policíclico (*por ejemplo,* un sistema de anillo condensado, con puente o espiro tal como un sistema bicíclico ("heterociclilo bicíclico") o un sistema tricíclico ("heterociclilo tricíclico")), y puede estar saturado o puede contener uno o más dobles o triples enlaces carbono-carbono. Los sistemas de anillos policíclicos de heterociclilo pueden incluir uno o más heteroátomos en uno o ambos anillos. "Heterociclilo" también incluye sistemas de anillos en donde el anillo de heterociclilo, como se define anteriormente, está fusionado con uno o más grupos carbociclilo en donde el punto de unión está en el anillo de carbociclilo o heterociclilo, o sistemas de anillos en donde el anillo de heterociclilo, como se define anteriormente, está fusionado con uno o más grupos arilo o heteroarilo, en donde el punto de unión está en el anillo de heterociclilo y, en dichos casos, el número de miembros del anillo continúa designando el número de miembros del anillo en el sistema de anillos de heterociclilo. A menos que se especifique lo contrario, cada caso de heterociclilo está independientemente no sustituido (un "heterociclilo no sustituido") o sustituido (un "heterociclilo sustituido") con uno o más sustituyentes. En determinadas realizaciones, el grupo heterociclilo es un heterociclilo de 3 a 14 miembros no sustituido. En determinadas realizaciones, el grupo heterociclilo es un heterociclilo de 3 a 14 miembros sustituido.

En algunas realizaciones, un grupo heterociclilo es un sistema de anillos no aromáticos de 5 a 10 miembros que tiene átomos de carbono en el anillo y de 1 a 4 heteroátomos en el anillo, en donde cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre ("heterociclilo de 5 a 10 miembros"). En algunas realizaciones, un grupo heterociclilo es un sistema de anillos no aromáticos de 5 a 8 miembros que tiene átomos de carbono en el anillo y de 1 a 4 heteroátomos en el anillo, en donde cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre ("heterociclilo de 5 a 8 miembros"). En algunas realizaciones, un grupo heterociclilo es un sistema de anillos no aromáticos de 5-6 miembros que tiene átomos de carbono en el anillo y de 1 a 4 heteroátomos en el anillo, en donde cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre ("heterociclilo de 5-6 miembros"). En algunas realizaciones, el heterociclilo de 5 a 6 miembros tiene de 1 a 3 heteroátomos en el anillo seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre. En algunas realizaciones, el heterociclilo de 5-6 miembros tiene de 1 a 2 heteroátomos en el anillo seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre. En algunas realizaciones, el heterociclilo de 5-6 miembros tiene 1 heteroátomo en el anillo seleccionado de nitrógeno, oxígeno y azufre.

Ejemplos de grupos heterociclilo de 3 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, azirdinilo, oxiranilo y tiorenilo. Ejemplos de grupos heterociclilo de 4 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, azetidinilo, oxetanilo y tietanilo. Ejemplos de grupos heterociclilo de 5 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, tetrahidrofuranilo, dihidrofuranilo, tetrahidrotiofenilo, dihidrotiofenilo, pirrolidinilo, dihidropirrolilo y pirrolil-2,5-diona. Ejemplos de grupos heterociclilo de 5 miembros que contienen 2 heteroátomos incluyen, sin limitación, dioxolanilo, oxatiolanilo y ditiolanilo. Ejemplos de grupos heterociclilo de 5 miembros que contienen 3 heteroátomos incluyen, sin limitación, triazolinilo, oxadiazolinilo y tiadiazolinilo. Ejemplos de grupos heterociclilo de 6 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, piperidinilo, tetrahidropiranilo, dihidropiridinilo y tianilo. Ejemplos de grupos heterociclilo de 6 miembros que contienen 2 heteroátomos incluyen, sin limitación, piperazinilo, morfolinilo, ditianilo, dioxanilo. Ejemplos de grupos heterociclilo de 6 miembros que contienen 2 heteroátomos incluyen, sin limitación, triazinanilo. Ejemplos de grupos heterociclilo de 7 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, azepanilo, oxepanilo y tiepanilo. Ejemplos de grupos heterociclilo de 8 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, azocanilo, oxecanilo y tiocanilo. Ejemplos de grupos heterociclilo bicíclicos incluyen, sin limitación, indolinilo, isoindolinilo, dihidrobenzofuranilo, dihidrobenzotienilo, tetrahidrobenzotienilo, tetrahidrobenzofuranilo, tetrahidroindolilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, decahidroisoquinolinilo, octahidrocromenilo, octahidroisocromenilo, decahidronaftiridinilo, decahidro-1,8-naftiridinilo, octahidropirrolo[3,2-b]pirrol, indolinilo, ftalimidilo, naftalimidilo, cromanilo, cromenilo, 1H-benzo[e][1,4]diazepinilo, 1,4,5,7-tetrahidropiran[3,4-b]pirrolilo, 5,6-dihidro-4H-furo[3,2-b]pirrolilo, 6,7-dihidro-5H-

furo[3,2-b]piranilo, 5,7-dihidro-4H-tieno[2,3-c]piranilo, 2,3-dihidro-1H-pirrolo[2,3-b]piridinilo, 2,3-dihidrofuro[2,3-b]piridinilo, 4,5,6,7-tetrahidro-1H-pirrolo[2,3-b]piridinilo, 4,5,6,7-tetra-hidrofuro[3,2-c]piridinilo, 4,5,6,7-tetrahidrotien[3,2-b]piridinilo, 1,2,3,4- tetrahidro-1,6-naftiridinilo y similares.

Tal y como se usa en la presente memoria, "arilo" se refiere a un radical de un sistema de anillos aromático 4n+2 (*por ejemplo*, que tiene 6, 10 o 14 electrones π compartidos en una matriz cíclica) monocíclico o policíclico (*por ejemplo*, bicíclico o tricíclico) que tiene de 6 a 14 átomos de carbono en el anillo y cero heteroátomos proporcionados en el sistema de anillos aromáticos ("arilo de C_{6-14}"). En algunas realizaciones, un grupo arilo tiene 6 átomos de carbono en el anillo ("arilo de C_6"; *por ejemplo,* fenilo). En algunas realizaciones, un grupo arilo tiene 10 átomos de carbono en el anillo ("arilo de C_{10}"; *por ejemplo,* naftilo tal como 1-naftilo y 2-naftilo). En algunas realizaciones, un grupo arilo tiene 14 átomos de carbono en el anillo ("arilo de C_{14}"; *por ejemplo,* antracilo). "Arilo" también incluye sistemas de anillos en donde el anillo de arilo, como se define anteriormente, está fusionado con uno o más grupos carbociclilo o heterociclilo en donde el radical o punto de unión está en el anillo de arilo y, en dichos casos, el número de átomos de carbono continúa designando el número de átomos de carbono en el sistema de anillos de arilo. A menos que se especifique lo contrario, cada caso de un grupo arilo está independientemente no sustituido (un "arilo no sustituido") o sustituido (un "arilo sustituido") con uno o más sustituyentes. En ciertas realizaciones, el grupo arilo es un arilo de C_{6-14} no sustituido. En determinadas realizaciones, el grupo arilo es un arilo de C_{6-14} sustituido.

Tal y como se usa en la presente memoria, "heteroarilo" se refiere a un radical de un sistema de anillos aromáticos 4n+2 (*por ejemplo,* que tiene 6, 10 o 14 electrones π compartidos en una matriz cíclica) monocíclico o policíclico de 5-14 miembros (*por ejemplo,* bicíclico, tricíclico) que tiene átomos de carbono en el anillo y de 1 a 4 heteroátomos en el anillo proporcionados en el sistema de anillo aromático, en donde cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre ("heteroarilo de 5-14 miembros"). En los grupos heteroarilo que contienen uno o más átomos de nitrógeno, el punto de unión puede ser un átomo de carbono o nitrógeno, según lo permita la valencia. Los sistemas de anillos policíclicos de heteroarilo pueden incluir uno o más heteroátomos en uno o ambos anillos. "Heteroarilo" incluye sistemas de anillos en donde el anillo heteroarilo, como se define anteriormente, está fusionado con uno o más grupos carbociclilo o heterociclilo en donde el punto de unión está en el anillo heteroarilo y, en dichos casos, el número de miembros del anillo continúa designando el número de miembros del anillo en el sistema de anillos heteroarilo. "Heteroarilo" también incluye sistemas de anillos en donde el anillo de heteroarilo, como se define anteriormente, está fusionado con uno o más grupos arilo en donde el punto de unión está en el anillo de arilo o heteroarilo, y en dichos casos, el número de miembros del anillo designa el número de miembros del anillo en el sistema de anillos policíclicos (arilo/heteroarilo) fusionados. Grupos heteroarilo policíclicos en donde un anillo no contiene un heteroátomo (*por ejemplo*, indolilo, quinolinilo, carbazolilo y similares) el punto de unión puede estar en uno cualquiera de los anillos, *es decir,* ya sea el anillo que lleva un heteroátomo *(por ejemplo,* 2-indolilo) o el anillo que no contiene un heteroátomo (*por ejemplo,* 5-indolilo).

En algunas realizaciones, un grupo heteroarilo es un sistema de anillos aromáticos de 5 a 10 miembros que tiene átomos de carbono en el anillo y de 1 a 4 heteroátomos en el anillo proporcionados en el sistema de anillos aromáticos, en donde cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre ("heteroarilo de 5 a 10 miembros"). En algunas realizaciones, un grupo heteroarilo es un sistema de anillos aromáticos de 5 a 8 miembros que tiene átomos de carbono en el anillo y de 1 a 4 heteroátomos en el anillo proporcionados en el sistema de anillos aromáticos, en donde cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre ("heteroarilo de 5 a 8 miembros"). En algunas realizaciones, un grupo heteroarilo es un sistema de anillos aromáticos de 5-6 miembros que tiene átomos de carbono en el anillo y de 1-4 heteroátomos en el anillo proporcionados en el sistema de anillos aromáticos, en donde cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre ("heteroarilo de 5 a 6 miembros"). En algunas realizaciones, el heteroarilo de 5 a 6 miembros tiene de 1 a 3 heteroátomos en el anillo seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre. En algunas realizaciones, el heteroarilo de 5 a 6 miembros tiene de 1 a 2 heteroátomos en el anillo seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre. En algunas realizaciones, el heteroarilo de 5-6 miembros tiene 1 heteroátomo en el anillo seleccionado de nitrógeno, oxígeno y azufre. A menos que se especifique lo contrario, cada caso de un grupo de heteroarilo está independientemente no sustituido (un "heteroarilo no sustituido") o sustituido (un "heteroarilo sustituido") con uno o más sustituyentes. En determinadas realizaciones, el grupo heteroarilo es un heteroarilo no sustituido de 5 a 14 miembros. En determinadas realizaciones, el grupo heteroarilo es un heteroarilo sustituido de 5 a 14 miembros.

Ejemplos de grupos heteroarilo de 5 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, pirrolilo, furanilo y tiofenilo. Ejemplos de grupos heteroarilo de 5 miembros que contienen 2 heteroátomos incluyen, sin limitación, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo e isotiazolilo. Ejemplos de grupos heteroarilo de 5 miembros que contienen 3 heteroátomos incluyen, sin limitación, triazolilo, oxadiazolilo y tiadiazolilo. Ejemplos de grupos heteroarilo de 5 miembros que contienen 4 heteroátomos incluyen, sin limitación, tetrazolilo. Ejemplos de grupos heteroarilo de 6 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, piridinilo. Ejemplos de grupos heteroarilo de 6 miembros que contienen 2 heteroátomos incluyen, sin limitación, piridazinilo, pirimidinilo y pirazinilo. Ejemplos de grupos heteroarilo de 6 miembros que contienen 3 o 4 heteroátomos incluyen, sin limitación, triazinilo y tetrazinilo, respectivamente. Ejemplos de grupos heteroarilo de 7 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, azepinilo, oxepinilo y tiepinilo. Ejemplos de grupos heteroarilo 5,6-bicíclicos incluyen, sin limitación, indolilo, isoindolilo, indazolilo, benzotriazolilo, benzotiofenilo, isobenzotiofenilo, benzofuranilo, benzoisofuranilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, benzoxazolilo, benzoxadiazolilo, benzotiazolilo, benzoisotiazolilo, benzotiadiazolilo, indolizinilo y

purinilo. Ejemplos de grupos heteroarilo 6,6-bicíclicos incluyen, sin limitación, naftiridinilo, pteridinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, cinolinilo, quinoxalinilo, ftalazinilo y quinazolinilo. Ejemplos de grupos heteroarilo tricíclicos incluyen, sin limitación, fenantridinilo, dibenzofuranilo, carbazolilo, acridinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo y fenazinilo.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "parcialmente insaturado" se refiere a un resto de anillo que incluye al menos un doble o triple enlace. El término "parcialmente insaturado" pretende abarcar anillos que tienen múltiples sitios de insaturación, pero no pretende incluir grupos aromáticos (*por ejemplo,* restos arilo o heteroarilo) como se define en la presente memoria.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "saturado" se refiere a un resto de anillo que no contiene un doble o triple enlace, *es decir,* el anillo contiene todos enlaces simples.

Los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo, tal y como se definen en la presente memoria, están opcionalmente sustituidos (*por ejemplo*, grupo alquilo "sustituido" o "no sustituido", alquenilo "sustituido" o "no sustituido", alquinilo "sustituido" o "no sustituido", heteroalquilo "sustituido" o "no sustituido", heteroalquenilo "sustituido" o "no sustituido", heteroalquinilo "sustituido" o "no sustituido", carbociclilo "sustituido" o "no sustituido", heterociclilo "sustituido" o "no sustituido", arilo "sustituido" o "no sustituido" o heteroarilo "sustituido" o "no sustituido"). En general, el término "sustituido", precedido o no por el término "opcionalmente", significa que al menos un hidrógeno presente en un grupo (*por ejemplo,* un átomo de carbono o nitrógeno) se sustituye con un sustituyente permitido, *por ejemplo,* un sustituyente que tras la sustitución da como resultado un compuesto estable, *por ejemplo,* un compuesto que no sufre transformación espontánea, tal como por reordenamiento, ciclación, eliminación u otra reacción. A menos que se indique lo contrario, un grupo "sustituido" tiene un sustituyente en una o más posiciones sustituibles del grupo, y cuando se sustituye más de una posición en cualquier estructura dada, el sustituyente es el mismo o diferente en cada posición. Se contempla que el término "sustituido" incluya la sustitución con todos los sustituyentes permitidos de compuestos orgánicos, cualquiera de los sustituyentes descritos en la presente memoria que dé como resultado la formación de un compuesto estable. La presente divulgación contempla todas y cada una de dichas combinaciones para llegar a un compuesto estable. Para los fines de esta invención, los heteroátomos tales como el nitrógeno pueden tener sustituyentes de hidrógeno y/o cualquier sustituyente adecuado como se describe en la presente memoria que satisfaga las valencias de los heteroátomos y dé como resultado la formación de un resto estable.

Ejemplos de sustituyentes de átomos de carbono incluyen, pero no se limitan a, halógeno, -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, $-C(OR^{cc})_2$, $-CO_2R^{aa}$, $-OC(=O)R^{aa}$, $-OCO_2R^{aa}$, $-C(=O)N(R^{bb})_2$, $-OC(=O)N(R^{bb})_2$, $-NR^{bb}C(=O)R^{aa}$, $-NR^{bb}CO_2R^{aa}$, $-NR^{bb}C(=O)N(R)^{bb})_2$, $-C(=NR^{bb})R^{aa}$, $-C(=NR^{bb})OR^{aa}$, $-OC(=NR^{bb})R^{aa}$, $-OC(=NR^{bb})OR^{aa}$, $-C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$, $-OC(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$, $-NR^{bb}C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$, $-C(=O)NR^{bb}SO_2R^{aa}$, $-NR^{bb}SO_2R^{aa}$, $-SO_2N(R)^{bb})_2$, $-SO_2R^{aa}$, $-SO_2OR^{aa}$, $-OSO_2R^{aa}$, $-S(=O)R^{aa}$, $-OS(=O)R^{aa}$, $-Si(R^{aa})_3$, $-OSi(R^{aa})_3$ $-C(=S)N(R)^{bb})_2$, $-C(=O)SR^{aa}$, $-C(=S)SR^{aa}$, $-SC(=S)SR^{aa}$, $-SC(=O)SR^{aa}$, $-OC(=O)SR^{aa}$, $-SC(=O)OR^{aa}$, $-SC(=O)R^{aa}$, $-P(=O)_2R^{aa}$, $-OP(=O)_2R^{aa}$, $-P(=O)(R^{aa})_2$, $-OP(=O)(R^{aa})_2$, $-OP(=O)(OR^{cc})_2$, $-P(=O)_2N(R)^{bb})_2$, $-OP(=O)_2N(R)^{bb})_2$, $-P(=O)(NR)^{bb})_2$, $-OP(=O)(NR^{bb})_2$, $-NR^{bb}P(=O)(OR^{cc})_2$, $-NR^{bb}P(=O)(NR^{bb})_2$, $-P(R^{cc})_2$, $-P(R^{cc})_3$, $-OP(R^{cc})_2$, $-OP(R^{cc})_3$, $-B(R^{aa})_2$, $-B(OR^{cc})_2$, $-BR^{aa}(OR^{cc})$, alquilo de C_{1-10}, perhaloalquilo de C_{1-10}, alquenilo de C_{2-10}, alquinilo de C_{2-10}, heteroalquilo de C_{1-10}, heteroalquenilo de C_{2-10}, heteroalquinilo de C_{2-10}, carbociclilo de C_{3-14}, heterociclilo de 3 a 14 miembros, arilo de C_{6-14} y heteroarilo de 5 a 14 miembros, en donde cada alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo está sustituido independientemente con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 grupos R^{dd};

o dos hidrógenos geminales en un átomo de carbono se sustituyen con el grupo =O, =S, $=NN(R^{bb})_2$, $=NNR^{bb}C(=O)R^{aa}$, $=NNR^{bb}C(=O)OR^{aa}$, $=NNR^{bb}S(=O)_2R^{aa}$, $=NR^{bb}$, o $=NOR^{cc}$;

cada caso de R^{aa} se selecciona, independientemente, de alquilo de C_{1-10}, perhaloalquilo de C_{1-10}, alquenilo de C_{2-10}, alquinilo de C_{2-10}, heteroalquilo de C_{1-10}, heteroalquenilo de C_{2-10}, heteroalquinilo de C_{2-10}, carbociclilo de C_{3-10}, heterociclilo de 3 a 14 miembros, arilo de C_{6-14} y heteroarilo de 5 a 14 miembros, o dos grupos R^{aa} se unen para formar un anillo heterociclilo de 3-14 miembros o heteroarilo de 5-14 miembros, en donde cada alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo se sustituye independientemente con 0, 1, 2. , 3, 4 o 5 grupos R^{dd};

cada caso de R^{bb} se selecciona, independientemente, de hidrógeno, -OH, $-OR^{aa}$, $-N(R^{cc})_2$, -CN, $-C(=O)R^{aa}$, $-C(=O)N(R^{cc})_2$, $-CO_2R^{aa}$, $-SO_2R^{aa}$, $-C(=NR^{cc})OR^{aa,}$ $-C(=NR^{cc})N(R^{cc})_2$, $-SO_2N(R)^{cc})_2$, $-SO_2R^{cc}$, $-SO_2OR^{cc}$, $-SOR^{aa}$, $-C(=S)N(R^{cc})_2$, $-C(=O)SR^{cc}$, $-C(=S)SR^{cc}$, $-P(=O)_2R^{aa}$, $-P(=O)(R^{aa})_2$, $-P(=O)_2N(R)^{cc})_2$, $-P(=O)(NR)^{cc})_2$, alquilo de C_{1-10}, perhaloalquilo de C_{1-10}, alquenilo de C_{2-10}, alquinilo de C_{2-10}, heteroalquilo de C_{1-10}, heteroalquenilo de C_{2-10}, heteroalquinilo de C_{2-10}, carbociclilo de C_{3-10}, heterociclilo de 3 a 14 miembros, arilo de C_{6-14} y heteroarilo de 5 a 14 miembros, o dos grupos R^{bb} se unen para formar un anillo heterociclilo de 3-14 miembros o heteroarilo de 5-14 miembros, en donde cada alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo se sustituye independientemente con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 grupos R^{dd};

cada caso de R^{cc} se selecciona, independientemente, de hidrógeno, alquilo de C_{1-10}, perhaloalquilo de C_{1-10}, alquenilo de C_{2-10}, alquinilo de C_{2-10}, heteroalquilo de C_{1-10}, heteroalquenilo de C_{2-10}, heteroalquinilo de C_{2-10}, carbociclilo de C_{3-10}, heterociclilo de 3 a 14 miembros, arilo de C_{6-14} y heteroarilo de 5 a 14 miembros, o dos grupos R^{cc} se unen para formar

un anillo heterociclilo de 3-14 miembros o heteroarilo de 5-14 miembros, en donde cada alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo se sustituye independientemente con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 grupos R^{dd};

cada caso de R^{dd} se selecciona, independientemente, de halógeno, -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, $-SR^{ee}$, $-SSR^{ee}$, $-C(=O)R^{ee}$, $-CO_2H$,$-CO_2R^{ee}$, $-OC(=O)R^{ee}$, $-OCO_2R^{ee}$, $-C(=O)N(R^{ff})_2$, $-OC(=O)N(R^{ff})_2$, $-NR^{ff}C(=O)R^{ee}$, $-NR^{ff}CO_2R^{ee}$, $-NR^{ff}C(=O)N(R)^{ff})_2$, $-C(=NR^{ff})OR^{ee}$, $-OC(=NR^{ff})R^{ee}$, $-OC(=NR^{ff})OR^{ee}$, $-C(=NR^{ff})N(R^{ff})_2$, $-OC(=NR^{ff})N(R^{ff})_2$, $-NR^{ff}C(=NR^{ff})N(R^{ff})_2$, $-NR^{ff}SO_2R^{ee}$, $-SO_2N(R)^{ff})_2$, $-SO_2R^{ee}$, $-SO_2OR^{ee}$, $-OSO_2R^{ee}$, $-S(=O)R^{ee}$, $-Si(R^{ee})_3$, $-OSi(R^{ee})_3$, $-C(=S)N(R^{ff})_2$, $-C(=O)SR^{ee}$, $-C(=S)SR^{ee}$, $-SC(=S)SR^{ee}$, $-P(=O)_2R^{ee}$, $-P(=O)(R^{ee})_2$, $-OP(=O)(R^{ee})_2$, $-OP(=O)(OR^{ee})_2$, alquilo de C_{1-6}, perhaloalquilo de C_{1-6}, alquenilo de C_{2-6}, alquinilo de C_{2-6}, heteroalquilo de C_{1-6}, heteroalquenilo de C_{2-6}, heteroalquinilo de C_{2-6}, carbociclilo de C_{3-10}, heterociclilo de 3 a 10 miembros, arilo de C_{6-10}, heteroarilo de 5-10 miembros, en donde cada alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo se sustituye independientemente con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 grupos R^{gg}, o dos sustituyentes R^{dd} geminales se pueden unir para formar =O o =S;

cada caso de R^{ee} se selecciona, independientemente, de alquilo de C_{1-6}, perhaloalquilo de C_{1-6}, alquenilo de C_{2-6}, alquinilo de C_{2-6}, heteroalquilo de C_{1-6}, heteroalquenilo de C_{2-6}, heteroalquinilo de C_{2-6}, carbociclilo de C_{3-10}, arilo de C_{6-10}, heterociclilo de 3-10 miembros y heteroarilo de 3-10 miembros, en donde cada alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo se sustituye independientemente con 0, 1, 2, 3, 4, o 5 grupos R^{gg};

cada caso de R^{ff} se selecciona, independientemente, de hidrógeno, alquilo de C_{1-6}, perhaloalquilo de C_{1-6}, alquenilo de C_{2-6}, alquinilo de C_{2-6}, heteroalquilo de C_{1-6}, heteroalquenilo de C_{2-6}, heteroalquinilo de C_{2-6}, carbociclilo de C_{3-10}, heterociclilo de 3 a 10 miembros, arilo de C_{6-10} y heteroarilo de 5 a 10 miembros, o dos grupos R^{ff} se unen para formar un anillo de heterociclilo de 3-14 miembros o heteroarilo de 5-14 miembros, en donde cada alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo se sustituye independientemente con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 grupos R^{gg}; y

cada caso de R^{gg} es, independientemente, halógeno, -CN, $-NO_2$, $-N_3$, $-SO_2H$, $-SO_3H$, -OH, -O-alquilo de C_{1-6}, $-ON(\text{alquilo de } C_{1-6})_2$, $-N(\text{alquilo de } C_{1-6})_2$, $-N(\text{alquilo de } C_{1-6})_3^+X^-$, $-NH(\text{alquilo de } C_{1-6})_2^+X^-$, $-NH_2(\text{alquilo de } C_{1-6})^+X^-$, $-NH_3^+X^-$, $-N(\text{O-alquilo de } C_{1-6})(\text{alquilo de } C_{1-6})$, $-N(OH)(\text{alquilo de } C_{1-6})$, -NH(OH), -SH, -S-alquilo de C_{1-6}, $-SS(\text{alquilo de } C_{1-6})$, $-C(=O)(\text{alquilo de } C_{1-6})$, $-CO_2H$, $-CO_2(\text{alquilo de } C_{1-6})$, $-OC(=O)(\text{alquilo de } C_{1-6})$, $-OCO_2(\text{alquilo de } C_{1-6})$, $-C(=O)NH_2$, $-C(=O)N(\text{alquilo de } C_{1-6})_2$, $-OC(=O)NH(\text{alquilo de } C_{1-6})$, $-NHC(=O)(\text{alquilo de } C_{1-6})$, $-N(\text{alquilo de } C_{1-6})C(=O)(\text{alquilo de } C_{1-6})$, $-NHCO_2(\text{alquilo de } C_{1-6})$, $-NHC(=O)N(\text{alquilo de } C_{1-6})_2$, $-NHC(=O)NH(\text{alquilo de } C_{1-6})$, $-NHC(=O)NH_2$, $-C(=NH)O(\text{alquilo de } C_{1-6})$, $-OC(=NH)(\text{alquilo de } C_{1-6})$, $-OC(=NH)O\text{-alquilo de } C_{1-6}$, $-C(=NH)N(\text{alquilo de } C_{1-6})_2$, $-C(=NH)NH(\text{alquilo de } C_{1-6})$, $-C(=NH)NH_2$, $-OC(=NH)N(\text{alquilo de } C_{1-6})_2$, $-OC(NH)NH(\text{alquilo de } C_{1-6})$, $-OC(NH)NH_2$, $-NHC(NH)N(\text{alquilo de } C_{1-6})_2$, $-NHC(=NH)NH_2$, $-NHSO_2(\text{alquilo de } C_{1-6})$, $-SO_2N(\text{alquilo de } C_{1-6})_2$, $-SO_2NH(\text{alquilo de } C_{1-6})$, $-SO_2NH_2$, $-SO_2\text{-alquilo de } C_{1-6}$, $-SO_2O\text{-alquilo de } C_{1-6}$, $-OSO_2\text{-alquilo de } C_{1-6}$, $-SO\text{-alquilo de } C_{1-6}$, $-Si(\text{alquilo de } C_{1-6})_3$, $-OSi(\text{alquilo de } C_{1-6})_3$ $-C(=S)N(\text{alquilo de } C_{1-6})_2$, $C(=S)NH(\text{alquilo de } C_{1-6})$, $C(=S)NH_2$, $-C(=O)S(\text{alquilo de } C_{1-6})$, $-C(=S)S\text{-alquilo de } C_{1-6}$, $-SC(=S)S\text{-alquilo de } C_{1-6}$, $-P(=O)_2(\text{alquilo de } C_{1-6})$, $-P(=O)(\text{alquilo de } C_{1-6})_2$, $-OP(=O)(\text{alquilo de } C_{1-6})_2$, $-OP(=O)(O\text{-alquilo de } C_{1-6})_2$, alquilo de C_{1-6}, perhaloalquilo de C_{1-6}, alquenilo de C_{2-6}, alquinilo de C_{2-6}, heteroalquilo de C_{1-6}, heteroalquenilo de C_{2-6}, heteroalquinilo de C_{2-6}, carbociclilo de C_{3-10}, arilo de C_{6-10}, heterociclilo de 3 a 10 miembros, heteroarilo de 5 a 10 miembros; o dos sustituyentes R^{gg} geminales se pueden unir para formar =O o =S; en donde X^- es un contraión.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "halo" o "halógeno" se refiere a flúor (fluoro, -F), cloro (cloro, -Cl), bromo (bromo, -Br) o yodo (yodo, -I).

Tal y como se usa en la presente memoria, un "contraión" es un grupo cargado negativamente asociado con una amina cuaternaria cargada positivamente para mantener la neutralidad electrónica. Ejemplos de contraiones incluyen iones haluro (*por ejemplo,* F^-, Cl^-, Br^-, I^-), NO_3^-, ClO_4^-, OH^-, $H_2PO_4^-$, HSO_4^-, iones sulfonato (*por ejemplo*, metansulfonato, trifluorometanosulfonato, p-toluensulfonato, bencenosulfonato, 10-alcanforsulfonato, naftalen-2-sulfonato, ácido naftalen-1-sulfónico-5-sulfonato, ácido etan-1-sulfónico-2-sulfonato y similares), e iones carboxilato (*por ejemplo,* acetato, etanoato, propanoato, benzoato, glicerato, lactato, tartrato, glicolato y similares).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "carbonilo" se refiere a un grupo en donde el carbono directamente unido a la molécula original tiene hibridación sp^2 y está sustituido con un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre, *por ejemplo,* un grupo seleccionado de cetonas ($-C(=O)R^{aa}$), ácidos carboxílicos ($-CO_2H$), aldehídos (-CHO), ésteres ($-CO_2R^{aa}$, $-C(=O)SR^{aa}$, $-C(=S)SR^{aa}$), amidas ($-C(=O)N(R^{bb})_2$, $-C(=O)NR^{bb}SO_2R^{aa}$, $-C(=S)N(R^{bb})_2$), e iminas ($-C(=NR^{bb})R^{aa}$, $-C(=NR^{bb})OR^{aa}$), $-C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$), en donde R^{aa} y R^{bb} son como se definen en la presente memoria.

Tal y como se usa en la presente memoria, "azida" o "azido" se refiere al grupo $-N_3$.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "tiol" o "tio" se refiere al grupo -SH. El término "tiol sustituido" o "tio sustituido", por extensión, se refiere a un grupo tiol en donde el átomo de azufre directamente unido a la molécula original está sustituido con un grupo distinto de hidrógeno, e incluye grupos seleccionados de $-SR^{aa}$, $-S=SR^{cc}$, -

$SC(=S)SR^{aa}$, $-SC(=O)SR^{aa}$, $-SC(=O)OR^{aa}$, y $-SC(=O)R^{aa}$, en donde R^{aa} y R^{cc} son como se definen en la presente memoria.

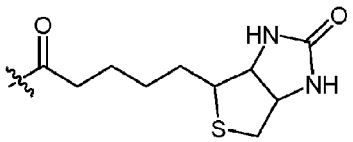
Tal y como se usa en la presente memoria, el término "amino" o "amina" se refiere al grupo $-NH_2$. El término amino o amina "sustituido", por extensión, se refiere a un amino monosustituido, un amino disustituido o un amino trisustituido, como se define en la presente memoria. En determinadas realizaciones, el "amino sustituido" es un grupo amino monosustituido o un grupo amino disustituido.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "amino monosustituido" o "amina monosustituida" se refiere a un grupo amino en donde el átomo de nitrógeno directamente unido a la molécula original se sustituye con un hidrógeno y un grupo distinto de hidrógeno, e incluye grupos seleccionados de $-NH(R^{bb})$, $-NHC(=O)R^{aa}$, $-NHCO_2R^{aa}$, $-NHC(=O)N(R^{bb})_2$, $-NHC(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$, $-NHSO_2R^{aa}$, $-NHP(=O)(OR^{cc})_2$, y $-NHP(=O)(NR^{bb})_2$, en donde R^{aa}, R^{bb} y R^{cc} son como se definen en la presente memoria, y en donde R^{bb} del grupo $-NH(R^{bb})$ no es hidrógeno.

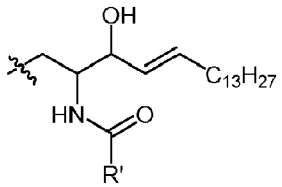
Tal y como se usa en la presente memoria, el término "amino disustituido" o "amina disustituida" se refiere a un grupo amino en donde el átomo de nitrógeno directamente unido a la molécula original está sustituido con dos grupos distintos de hidrógeno, e incluye grupos seleccionados de $-N(R^{bb})_2$, $-NR^{bb}C(=O)R^{aa}$, $-NR^{bb}CO_2R^{aa}$, $-NR^{bb}C(=O)N(R)^{bb})_2$, $-NR^{bb}C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$, $-NR^{bb}SO_2R^{aa}$, $-NR^{bb}P(=O)(OR^{cc})_2$ y $-NR^{bb}P(=O)(NR^{bb})_2$, en donde R^{aa}, R^{bb} y R^{cc} son como se definen en la presente memoria, con la condición de que el átomo de nitrógeno directamente unido a la molécula original no esté sustituido con hidrógeno.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "amino trisustituido" o "amina trisustituida" se refiere a un grupo amino en donde el átomo de nitrógeno directamente unido a la molécula original está sustituido con tres grupos, e incluye grupos seleccionados de $-N(R^{bb})_3$ y $-N(R^{bb})_3{}^+X^-$, en donde R^{bb} y X^- son como se definen en la presente memoria.

Tal y como se usa en la presente memoria, "biotina", por ejemplo, como un ejemplo del grupo R^{1A}, comprende la estructura:



Tal y como se usa en la presente memoria, una "ceramida", por ejemplo, como un ejemplo del grupo R^{1A}, comprende la estructura:



en donde R' es un grupo alquilo de C_6-C_{30} opcionalmente sustituido (*por ejemplo*, alquilo de 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}, o C_{30}), alquenilo de C_6-C_{30} opcionalmente sustituido (*por ejemplo*, alquenilo de 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}, o C_{30}), o alquinilo de C_6-C_{30} opcionalmente sustituido (*por ejemplo*, alquinilo de 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}, o C_{30}).

Los átomos de nitrógeno pueden estar sustituidos o no sustituidos según lo permita la valencia, e incluyen átomos de nitrógeno primarios, secundarios, terciarios y cuaternarios. Ejemplos de sustituyentes de átomos de nitrógeno incluyen, pero no se limitan a, hidrógeno, -OH, $-OR^{aa}$, $-N(R^{cc})_2$, -CN, $-C(=O)R^{aa}$, $-C(=O)N(R^{cc})_2$, $-CO_2R^{aa}$, $-SO_2R^{aa}$, $-C(=NR^{bb})R^{aa}$, $-C(=NR^{cc})OR^{aa}$, $-C(=NR^{cc})N(R^{cc})_2$, $-SO_2N(R)^{cc})_2$, $-SO_2R^{cc}$, $-SO_2OR^{cc}$, $-SOR^{aa}$, $-C(=S)N(R^{cc})_2$, $-C(=O)SR^{cc}$, $-C(=S)SR^{cc}$, $-P(=O)_2R^{aa}$, $-P(=O)(R^{aa})_2$, $-P(=O)_2N(R)^{cc})_2$, $-P(=O)(NR)^{cc})_2$, alquilo de $C_{1\text{-}10}$, perhaloalquilo de $C_{1\text{-}10}$, alquenilo de $C_{2\text{-}10}$, alquinilo de $C_{2\text{-}10}$, heteroalquilo de $C_{1\text{-}10}$, heteroalquenilo de $C_{2\text{-}10}$, heteroalquinilo de $C_{2\text{-}10}$, carbociclilo de $C_{3\text{-}10}$, heterociclilo de 3 a 14 miembros, arilo de $C_{6\text{-}14}$ y heteroarilo de 5 a 14 miembros, o dos grupos R^{cc} unidos a un átomo de N se unen para formar un anillo de heterociclilo de 3-14 miembros o heteroarilo de 5-14 miembros, en donde cada alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo se sustituye independientemente con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 grupos R^{dd}, y en donde R^{aa}, R^{bb}, R^{cc} y R^{dd} son como se definen anteriormente.

En determinadas realizaciones, el sustituyente presente en el átomo de nitrógeno es un grupo protector de nitrógeno (también denominado en la presente memoria "grupo protector de amino"). Los grupos protectores de nitrógeno incluyen, pero no se limitan a, -OH, $-OR^{aa}$, $-N(R^{cc})_2$, $-C(=O)R^{aa}$, $-C(=O)N(R^{cc})_2$, $-CO_2R^{aa}$, $-SO_2R^{aa}$, $-C(=NR^{cc})R^{aa}$, $-C(=NR^{cc})OR^{aa}$, $-C(=NR^{cc})N(R^{cc})_2$, $-SO_2N(R)^{cc})_2$, $-SO_2R^{cc}$, $-SO_2OR^{cc}$, $-SOR^{aa}$, $-C(=S)N(R^{cc})_2$, $-C(=O)SR^{cc}$, $-C(=S)SR^{cc}$, alquilo de $C_{1\text{-}10}$ (*por ejemplo*, aralquilo, heteroaralquilo), alquenilo de $C_{2\text{-}10}$, alquinilo de $C_{2\text{-}10}$, heteroalquilo de $C_{1\text{-}10}$,

heteroalquenilo de C_{2-10}, heteroalquinilo de C_{2-10}, carbociclilo de C_{3-10}, heterociclilo de 3 a 14 miembros, arilo de C_{6-14} y grupos heteroarilo de 5-14 miembros, en donde cada alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, carbociclilo, heterociclilo, aralquilo, arilo y heteroarilo se sustituye independientemente con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 grupos R^{dd}, y en donde R^{aa}, R^{bb}, R^{cc} y R^{dd} son como se definen en la presente memoria. Los grupos protectores de nitrógeno son bien conocidos en la técnica e incluyen los descritos en detalle en Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene y P. G. M. Wuts, 3rd Edition, John Wiley & Sons, 1999.

Por ejemplo, grupos protectores de nitrógeno tales como grupos amida (*por ejemplo,* -C(=O)R^{aa}) incluyen, pero no se limitan a, formamida, acetamida, cloroacetamida, tricloroacetamida, trifluoroacetamida, fenilacetamida, 3-fenilpropanamida, picolinamida, 3-piridilcarboxamida, derivado de *N*-benzoilfenilalanilo, benzamida, p-fenilbenzamida, o-nitofenilacetamida, *o*-nitrofenoxiacetamida, acetoacetamida, (*N*'-ditiobenciloxiacilamino)acetamida, 3-(*p*-hidroxifenil)propanamida, 3-(*o*-nitrofenil)propanamida, 2-metil-2-(*o*-nitrofenoxi)propanamida, 2-metil-2-(*o*-fenilazofenoxi)propanamida, 4-clorobutanamida, 3-metil-3-nitrobutanamida, *o*-nitrocinamida, derivado de *N*-acetilmetionina, *o*-nitrobenzamida y *o*-(benzoiloximetil)benzamida.

Grupos protectores del nitrógeno tal como los grupos carbamato (*por ejemplo*, -C(=O)OR^{aa}) incluyen, pero no se limitan a, carbamato de metilo, carbamato de etilo, carbamato de 9-fluorenilmetilo (Fmoc), carbamato de 9-(2-sulfo)fluorenilmetilo, carbamato de 9-(2,7-dibromo)fluoroenilmetilo, carbamato de 2,7-di-*t*-butil-[9-(10,10-dioxo-10,10,10,10-tetrahidrotioxantil)]metilo (DBD-Tmoc), carbamato de 4-metoxifenacilo (Phenoc), carbamato de 2,2,2-tricloroetilo (Troc), carbamato de 2-trimetilsililetilo (Teoc), carbamato de 2-feniletilo (hZ), carbamato de 1-(1-adamantil)-1-metiletilo (Adpoc), carbamato de 1,1-dimetil-2-haloetilo, carbamato de 1,1-dimetil-2,2-dibromoetilo (DB-t-BOC), carbamato de 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetilo (TCBOC), carbamato de 1-metil-1-(4-bifenilil)etilo (Bpoc), Carbamato de 1-(3,5-di-t-butilfenil)-1-metiletilo (*t*-Bumeoc), carbamato de 2-(2'- y 4'-piridil)etilo (Pyoc), carbamato de 2-(*N,N*-diciclohexilcarboxamido)etilo, carbamato de *t*-butilo (BOC), carbamato de 1-adamantilo (Adoc), carbamato de vinilo (Voc), carbamato de alilo (Alloc), carbamato de 1-isopropilalilo (Ipaoc), carbamato de cinamilo (Coc), carbamato de 4-nitrocinamilo (Noc), carbamato de 8-quinolilo, carbamato de *N*-hidroxipiperidinilo, carbamato de alquilditio, carbamato de bencilo (Cbz), carbamato de *p*-metoxibencilo (Moz), carbamato de *p*-nitobencilo, carbamato de *p*-bromobencilo, carbamato de *p*-clorobencilo, carbamato de 2,4-diclorobencilo, carbamato de 4-metilsulfinilbencilo (Msz), carbamato de 9-antrilmetilo, carbamato de difenilmetilo, carbamato de 2-metiltioetilo, carbamato de 2-metilsulfoniletilo, carbamato de 2-(*p*-toluenosulfonil) etilo, carbamato de [2-(1,3-ditianil)]metilo (Dmoc), carbamato de 4-metiltiofenilo (Mtpc), carbamato de 2,4-dimetiltiofenilo (Bmpc), carbamato de 2-fosfonioetilo (Peoc), carbamato de 2-trifenilfosfonioisopropilo (Ppoc), carbamato de 1,1-dimetil-2-cianoetilo, carbamato de *m*-cloro-*p*-aciloxibencilo, carbamato de *p*-(dihidroxiboril)bencilo, carbamato de 5-benzoisoxazolilmetilo, carbamato de 2-(trifluorometil)-6-cromonilmetilo (Tcroc), carbamato de *m*-nitrofenilo, carbamato de 3,5-dimetoxibencilo, carbamato de *o*-nitrobencilo, carbamato de 3,4-dimetoxi-6-nitrobencilo, carbamato de fenil(*o*-nitrofenil) metilo, carbamato de *t*-amilo, tiocarbamato de *S*-bencilo, carbamato de *p*-cianobencilo, carbamato de ciclobutilo, carbamato de ciclohexilo, carbamato de ciclopentilo, carbamato de ciclopropilmetilo, carbamato de *p*-deciloxibencilo, carbamato de 2,2-dimetoxiacilvinilo, carbamato de *o*-(*N,N*- dimetilcarboxamido)bencilo, carbamato de 1,1-dimetil-3-(*N,N*- dimetilcarboxamido)propilo, carbamato de 1,1-dimetilpropinilo, carbamato de di(2-piridil)metilo, carbamato de 2-furanilmetilo, carbamato de 2-yodoetilo, carbamato de isoborinlo, carbamato de isobutilo, carbamato de isonicotinilo, carbamato de *p*-(*p*'-metoxifenilazo)bencilo, carbamato de 1-metilciclobutilo, carbamato de 1-metilciclohexilo, carbamato de 1-metil-1-ciclopropilmetilo, carbamato de 1-metil-1-(3,5-dimetoxifenil)etilo, carbamato de 1-metil-1-(*p*-fenilazofenil) etilo, carbamato de 1-metil-1-feniletilo, carbamato de 1-metil-1-(4-piridil)etilo, carbamato de fenilo, carbamato de *p*-(fenilazo)bencilo, carbamato de 2,4,6-tri-*t*-butilfenilo, carbamato de 4-(trimetilamonio)bencilo y carbamato de 2,4,6-trimetilbencilo.

Grupos protectores de nitrógeno tal como los grupos sulfonamida (*por ejemplo*, -S(=O)$_2R^{aa}$) incluyen, pero no se limitan a, *p*-toluenosulfonamida (Ts), bencenosulfonamida, 2,3,6,-trimetil-4-metoxibencenosulfonamida (Mtr), 2,4,6-trimetoxibencenosulfonamida (Mtb), 2,6-dimetil-4-metoxibencenosulfonamida (Pme), 2,3,5,6-tetrametil-4-metoxibencenosulfonamida (Mte), 4-metoxibencenosulfonamida (Mbs), 2,4,6-trimetilbencenosulfonamida (Mts), 2,6-dimetoxi-4-metilbencenosulfonamida (iMds), 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonamida (Pmc), metanosulfonamida (Ms), β-trimetilsililetanosulfonamida (SES), 9-antracenosulfonamida, 4-(4',8'-dimetoxinaftilmetil)bencenosulfonamida (DNMBS), bencilsulfonamida, trifluorometilsulfonamida y fenacilsulfonamida.

Otros grupos protectores de nitrógeno incluyen, pero no se limitan a, derivado de fenotiazinil-(10)-acilo, derivado de *N*'-*p*-toluenosulfonilaminoacilo, derivado de *N*'-fenilaminotioacilo, derivado de *N*-benzoilfenilalanilo, derivado de *N*-acetilmetionina, 4,5-difenil-3-oxazolin-2-ona, *N*-ftalimida, *N*-ditiasuccinimida (Dts), *N*-2,3-difenilmaleimida, *N*-2,5-dimetilpirrol, aducto de *N*-1,1,4,4-tetrametildisililazaciclopentano (STABASE), 1,3-dimetil-1,3,5-triazaciclohexan-2-ona 5-sustituido, 1,3-dibencil-1,3,5-triazaciclohexan-2-ona 5-sustituido, 3,5-dinitro-4-piridona 1-sustituida, N-metilamina, *N*-alilamina, *N*-[2-(trimetilsilil)etoxi]metilamina (SEM), *N*-3-acetoxipropilamina, *N*-(1-isopropil-4-nitro-2-oxo-3-piroolin-3-il)amina, sales de amonio cuaternario, *N*-bencilamina, *N*-di(4-metoxifenil)metilamina, *N*-5-dibenzosuberilamina, *N*-trifenilmetilamina (Tr), *N*-[(4-metoxifenil)difenilmetil]amina (MMTr), *N*-9-fenilfluorenilamina (PhF), *N*-2,7-dicloro-9-fluorenilmetilenamina, *N*-ferrocenilmetilamino (Fcm), *N*-2-picolilamino *N*'-óxido, *N*-1,1-dimetiltiometilenamina, *N*-bencilidenamina, *N*-*p*--metoxibencilidenamina, *N*-difenilmetilenamina, *N*-[(2-piridil)mesitil]metilenamina, *N*-(*N,N*-dimetilaminometilen)amina, *N,N*'-isopropilidendiamina, *N*-*p*-nitrobencilidenamina, *N*-salicilidenoamina, *N*-5-clorosalicilidenamina, *N*-(5-cloro-2-hidroxifenil)fenilmetilenamina, *N*-ciclohexilidenamina, *N*-(5,5-dimetil-3-oxo-1-ciclohexenil)amina, derivado de *N*-borano, derivado del ácido *N*-difenilborínico, *N*-[fenil(pentaacilcromo- o

tungsteno)acil]amina, quelato de *N*-cobre, quelato de *N*-zinc, *N*-nitroamina, *N*-nitrosoamina, amina *N*-óxido, difenilfosfinamida (Dpp), dimetiltiofosfinamida (Mpt), difeniltiofosfinamida (Ppt), fosforamidatos de dialquilo, fosforamidato de dibencilo, fosforamidato de difenilo, bencenosulfenamida, *o*-nitrobencenosulfenamida (Nps), 2,4-dinitrobencenosulfenamida, pentaclorobencenosulfenamida, 2-nitro-4-metoxibencenosulfenamida, trifenilmetilsulfenamida y 3-nitropiridinsulfenamida (Npys).

En determinadas realizaciones, el sustituyente presente en un átomo de oxígeno es un grupo protector de oxígeno (también denominado en la presente memoria "grupo protector de hidroxilo"). Los grupos protectores de oxígeno incluyen, pero no se limitan a, $-R^{aa}$, $-N(R^{bb})_2$, $-C(=O)SR^{aa}$, $-C(=O)R^{aa}$, $-CO_2R^{aa}$, $-C(=O)N(R^{bb})_2$, $-C(=NR^{bb})R^{aa}$, $-C(=NR^{bb})OR^{aa}$, $-C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$, $-S(=O)R^{aa}$, $-SO_2R^{aa}$, $-Si(R^{aa})_3$, $-P(R^{cc})_2$, $-P(R^{cc})_3$, $-P(=O)_2R^{aa}$, $-P(=O)(R^{aa})_2$, $-P(=O)(OR^{cc})_2$, $-P(=O)_2N(R)^{bb})_2$, y $-P(=O)(NR^{bb})_2$, en donde R^{aa}, R^{bb} y R^{cc} son como se definen en la presente memoria. Los grupos protectores de oxígeno son bien conocidos en la técnica e incluyen los descritos en detalle en Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene y P. G. M. Wuts, 3rd Edition, John Wiley & Sons, 1999.

Ejemplos de grupos protectores de oxígeno incluyen, pero no se limitan a, metilo, metoximetilo (MOM), metiltiometilo (MTM), t-butiltiometilo, (fenildimetilsilil)metoximetilo (SMOM), benciloximetilo (BOM), *p*-metoxibenciloximetilo (PMBM), (4-metoxifenoxi)metilo (*p*-AOM), guaiacolmetilo (GUM), t-butoximetilo, 4-penteniloximetilo (POM), siloximetilo, 2-metoxietoximetilo (MEM), 2,2,2-tricloroetoximetilo, bis(2-cloroetoxi)metilo, 2-(trimetilsilil) etoximetilo (SEMOR), tetrahidropiranilo (THP), 3-bromotetrahidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, 1-metoxiciclohexilo, 4-metoxitetrahidropiranilo (MTHP), 4-metoxitetrahidrotiopiranilo, 4-metoxitetrahidrotiopiranilo S,S-dióxido, 1-[(2-cloro-4-metil)fenil]-4-metoxipiperidin-4-ilo (CTMP), 1,4-dioxan-2-ilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofuranilo, 2,3,3a,4,5,6,7,7a-octahidro-7,8,8-trimetil-4,7-metanobenzofuran-2-ilo, 1-etoxietilo, 1-(2-cloroetoxi)etilo, 1-metil-1-metoxietilo, 1-metil-1-benciloxietilo, 1-metil-1-benciloxi-2-fluoroetilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2-trimetilsililetilo, 2-(fenilselenil)etilo, *t*-butilo, alilo, p-clorofenilo, p-metoxifenilo, 2,4-dinitrofenilo, bencilo (Bn), *p*-metoxibencilo, 3,4-dimetoxibencilo, *o*-nitrobencilo, *p*-nitrobencilo, *p*-halobencilo, 2,6-diclorobencilo, *p*-cianobencilo, *p*-fenilbencilo, 2-picolilo, 4-picolilo, 3-metil-2-picolilo *N*-óxido, difenilmetilo,*p,p'*--dinitrobenhidrilo, 5-dibenzosuberilo, trifenilmetilo, α-naftildifenilmetilo, *p*-metoxifenildifenilmetilo, di(*p*-metoxifenil)fenilmetilo, tri(*p*-metoxifenil)metilo, 4-(4'-bromofenaciloxifenil)difenilmetilo, 4,4',4"-tris(4,5-dicloroftalimidofenil)metilo, 4,4',4"-tris(levulinoiloxifenil)metilo, 4,4',4"-tris(benzoiloxifenil)metilo, 3-(imidazol-1-il)bis(4',4"-dimetoxifenil)metilo, 1,1-bis(4-metoxifenil)-1'-pirenilmetilo, 9-antrilo, 9-(9-fenil)xantenilo, 9-(9-fenil-10-oxo)antrilo, 1,3-benzoditiolan-2-ilo, bencisotiazolilo S,S-dióxido, trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES) , triisopropilsililo (TIPS), dimetilisopropilsililo (IPDMS), dietilisopropilsililo (DEIPS), dimetiltexilsililo, *t*-butildimetilsililo (TBDMS), *t*-butildifenilsililo (TBDPS), tribencilsililo, tri-*p*-xililsililo, trifenilsililo, difenilmetilsililo (DPMS), t-butilmetoxifenilsililo (TBMPS), formiato, benzoilformiato, acetato, cloroacetato, dicloroacetato, tricloroacetato, trifluoroacetato, metoxiacetato, trifenilmetoxiacetato, fenoxiacetato, *p*-clorofenoxiacetato, 3-fenilpropionato, 4-oxopentanoato (levulinato), 4,4-(etilenditio)pentanoato (levulinoilditioacetal), pivaloato, adamantoato, crotonato, 4-metoxicrotonato, benzoato, *p*-fenilbenzoato, 2,4,6-trimetilbenzoato (mesitoato), carbonato de alquilmetilo, carbonato de 9-fluorenilmetilo (Fmoc), carbonato de alquiletilo, carbonato de alquilo 2,2,2-tricloroetilo (Troc), carbonato de 2-(trimetilsilil)etilo (TMSEC), carbonato de 2-(fenilsulfonil)etilo (Psec), carbonato de 2-(trifenilfosfonio)etilo (Peoc), carbonato de alquilisobutilo, carbonato de alquilvinilo, carbonato de alquil alilo, carbonato de alquil *p*- nitrofenilo, carbonato de alquilbencilo, carbonato de alquil *p*- metoxibencilo, carbonato de alquil 3,4-dimetoxibencilo, carbonato de alquil *o*- nitrobencilo, carbonato de alquil *p*-nitrobencilo, tiocarbonato de alquil *S*-bencilo, carbonato de 4-etoxi-1-naftilo, ditiocarbonato de metilo, 2-yodobenzoato, 4-azidobutirato, 4-nitro-4-metilpentanoato, *o*-(dibromometil)benzoato, 2-formilbencenosulfonato, 2-(metiltiometoxi)etilo, 4-(metiltiometoxi)butirato, 2-(metiltiometoximetil)benzoato, 2,6-dicloro-4-metilfenoxiacetato, 2,6-dicloro-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenoxiacetato, 2,4-bis(1,1-dimetilpropil)fenoxiacetato, clorodifenilacetato, isobutirato, monosuccinoato, (*E*)-2-metil-2-butenoato, *o*-(metoxiacil)benzoato, α-naftoato, nitrato, *N,N,N',N'*-tetrametilfosforodiamidato de alquilo, *N*-fenilcarbamato de alquilo, borato, dimetilfosfinotioilo, 2,4-dinitrofenilsulfenato de alquilo, sulfato, metanosulfonato (mesilato), bencilsulfonato y tosilato (Ts).

Estos y otros sustituyentes ejemplares se describen con más detalle en la Descripción detallada, los Ejemplos y las reivindicaciones.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "sal" se refiere a una cualquiera y todas las sales.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que son, dentro del alcance del sano juicio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de humanos y animales inferiores sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, y son adecuadas con una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, Berge et al., describen sales farmacéuticamente aceptables en detalle en J. Pharmaceutical Sciences (1977) 66:1-19. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en la presente memoria incluyen aquellas derivadas de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos adecuados. Ejemplos de sales de adición de ácidos no tóxicas y farmacéuticamente aceptables son sales de un grupo amino formado con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico o usando otros métodos usados en la técnica tales como intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, alcanforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanpropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptonato,

glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3 fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluensulfonato, undecanoato, valerato y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables derivadas de bases apropiadas incluyen sales de metales alcalinos, metales alcalinotérreos, amonio y N^+(alquilo de $C_{1-4})_4$. Las sales representativas de metales alcalinos o alcalinotérreos incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen, cuando sea apropiado, cationes de amonio no tóxico, amonio cuaternario y amina formados usando contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, alquilsulfonato inferior y arilsulfonato.

En la presente memoria se describen procesos de regeneración de azúcares de nucleótidos recientemente desarrollados y sus usos para añadir restos de azúcar a aceptores adecuados mediante la acción de una glicosiltransferasa adecuada. Estos enfoques permiten reacciones en cadena para sintetizar moléculas glicosiladas, tales como los oligosacáridos (*por ejemplo*, Gb3, Gb4, Gb5, Globo H y SSEA4) sin la necesidad de purificar intermedios, lo que da como resultado una producción inesperadamente rápida de los productos glicosilados con rendimientos inesperadamente altos. Además, los métodos de síntesis descritos en la presente memoria se pueden utilizar para la producción a gran escala de oligosacáridos y glicoconjugados deseados.

Sistema de regeneración de UDP-Gal y su uso en galactosilación

El sistema de regeneración de UDP-Gal se ejemplifica en la Figura 2A, que implica las enzimas enumeradas en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1: Enzimas utilizadas en el sistema de regeneración de UDP-Gal

Enzima	Actividad	Ejemplos
Galactoquinasa (GalK)	Cataliza la fosforilación de alfa-D-galactosa para producir galactosa-1-fosfato (Gal-1-P) en presencia de ATP.	*E. coli* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. AP012306.1
		H. sapiens (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. NP_000145)
		M. hydrothermalis (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_004368991)
		S. sputigena (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. AEC00832)
		H. hydrosis (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_004451189)
UDP-azúcar pirofosforilasa (USP)	Cataliza la conversión de Gal-1-P a UDP-Gal en presencia de UTP	*A. thaliana* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. AF360236.1
		L. major (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. ABY79093)
		T. cruzi (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. ADD10758)
		L. donovani (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. XP_00385998)
		G. max. (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. NP_001237434)
Piruvato quinasa (PykF)	Cataliza la transferencia de un grupo fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP) al ADP, produciendo piruvato y ATP o UTP.	*E. coli* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. U00096.2)
		N. hamburgensis (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. _576506)
		R. palustris (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_7830161)
		M. ruestringensis (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_004787669)

		H. hydrosis (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_004450514)
		S. coccoides (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_00441096)
Pirofosfatasa (PPA) (Opcional)	Ácido Anhídrido hidrolasa que actúa sobre los enlaces difosfato.	*E. coli* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. U00096.2
		G. theta (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. CAI77906)
		C. butyricum (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. ZP_04525837)
		L. plantarum (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. EFK28054)
		L. suebicus (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBan. ZP_09451344)

Las enzimas que se utilizarán en el sistema de regeneración de UDP-Gal descrito en la presente memoria pueden ser una enzima de tipo nativo. Tal y como se utiliza en la presente memoria, una enzima de tipo nativo es una enzima natural que se encuentra en una especie adecuada. En algunos ejemplos, las enzimas GalK, USP, PykF y PPA pueden ser de *E. coli, A. thaliana, E. coli,* y *E. coli,* respectivamente. En la Tabla 1 anterior se enumeran ejemplos de enzimas de estas especies. Otros pueden ser fácilmente identificados por los expertos en la técnica, *por ejemplo,* buscando en una base de datos de genes disponible públicamente, tal como GenBank. En otros ejemplos, estas enzimas son homólogas de aquellas de las especies recién indicadas, que están dentro del conocimiento de los expertos en la técnica. Por ejemplo, dichos homólogos pueden identificarse buscando en GenBank usando la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos codificantes de una enzima ejemplar como consulta de búsqueda.

Alternativamente, las enzimas implicadas en el sistema de regeneración de UDP-Gal pueden ser una variante funcional de una contraparte de tipo nativo. Tal y como se usa en la presente memoria, una variante funcional de una enzima de tipo nativo posee la misma actividad enzimática que la contraparte de la parte nativa y generalmente comparte una alta homología de secuencia de aminoácidos, *por ejemplo,* al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 o 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la contraparte de tipo nativo. El "porcentaje de identidad" de dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Karlin y Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, modificado como en Karlin y Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993. Dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de interés. Cuando existen espacios entre dos secuencias, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros predeterminados de los respectivos programas (*por ejemplo*, XBLAST y NBLAST).

Una variante funcional puede tener varias mutaciones, incluyendo la adición, eliminación o sustitución de uno o más restos de aminoácidos. Una variante de este tipo a menudo contiene mutaciones en regiones que no son esenciales para la actividad enzimática de la enzima de tipo nativo y puede no contener mutaciones en dominios funcionales o contener sólo sustituciones de aminoácidos conservadoras. El experto en la técnica realizará sustituciones de aminoácidos conservadoras en mutantes de ácido lipoico ligasa para proporcionar variantes funcionalmente equivalentes, es decir, las variantes conservan las capacidades funcionales del mutante de ácido lipoico ligasa particular. Tal y como se usa en la presente memoria, una "sustitución de aminoácidos conservadora" se refiere a una sustitución de aminoácidos que no altera las características de carga relativa o tamaño de la proteína en donde se realiza la sustitución de aminoácidos. Se pueden preparar variantes según los métodos para alterar la secuencia de polipéptidos conocidas por un experto en la técnica, tales como las que se encuentran en las referencias que compilan dichos métodos, *por ejemplo* ´Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen sustituciones realizadas entre aminoácidos dentro de los siguientes grupos: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; y (g) E, D.

Cualquiera de las enzimas implicadas en el sistema de regeneración de UDP-Gal se puede preparar mediante tecnología de rutina. En un ejemplo, la enzima se aísla de una fuente natural. En otros ejemplos, la enzima se prepara mediante tecnología recombinante de rutina. Cuando sea necesario, la secuencia codificante de una enzima objetivo puede someterse a optimización de codones basado en la célula huésped utilizada para producir la enzima. Por ejemplo, cuando se utilizan células de E. coli como huésped para producir una enzima mediante tecnología recombinante, el gen que codifica esa enzima se puede modificar de modo que contenga codones comúnmente

utilizados en *E. coli.*

Como se ilustra en la Figura 2A, el sistema de regeneración de UDP-Gal se puede utilizar junto con una reacción de galactosilación mediante la actividad de una galactosiltransferasa para añadir un resto de galactosa a un sustrato adecuado. En la Tabla 2 a continuación se enumeran ejemplos de galactosiltransferasas:

Tabla 2. Galactosiltransferasas

Galactosiltransferasa	Actividad enzimatica	Ejemplos
Beta-1,4-galactosiltransferasa (B4GALT), incluyendo las isoformas 1-7 (Beta-1,4-galactosiltransferasa 1-7)	Cataliza la transferencia de galactosa de UDP-Gal a un aceptor adecuado, tal como un aceptor de glicoproteína o glicolípido que tiene un grupo 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosilo terminal, en un enlace beta-1,4.	*Homo sapiens* [*por ejemplo,* GI: 903740]
		Rattus norvegicus [*por ejemplo,* GI: 3258653]
		Zobellia galactanivorans [*por ejemplo,* GI: 340619721]
		Clostridium perfringens [*por ejemplo,* GI: 18309463]
Beta-1,3-galactosiltransferasa (B3GALNT)	Cataliza la transferencia de galactosa de UDP-Gal a un aceptor adecuado, tal como un aceptor de glicoproteína o glicolípido que tiene un grupo 2-acetamido-2-desoxi-D-glucosilo terminal, o un resto de GalNAc, en un enlace beta-1,3.	*Culex quinquefasciatus* [*por ejemplo,* GI: 167873909]
		Zea mays [*por ejemplo,* GI: 195643406]
		Brachyspira pilosicoli [por ejemplo, GI: 300871377]
		Enterococcus faecium [*por ejemplo,* GI: 257822935]
		LgtD, de, *por ejemplo, Haemophilus influenza* [L42023.1]
Alfa-1,4-galactosiltransferasa (A4GALT) *por ejemplo*: Lactosilceramida 4-alfa-galactosiltransferasa	Cataliza la transferencia de una galactosa de UDP-Gal a un aceptor adecuado tal como una glicoproteína o un glicolípido que tiene, *por ejemplo,* un resto de galactosa terminal o un resto de GlcNAc en un enlace alfa 1,4	*Homo sapiens* [*por ejemplo,* GI: 55956926]
		Mustela putorius furo [*por ejemplo,* GI: 355666115]
		Mus musculus [*por ejemplo,* GI: 51921295]
		Rattus norvegicus [*por ejemplo,* GI: 67677925]
		LgtC de, *por ejemplo, Neisseria meningitides* [*por ejemplo,* AF355193.1]
Alfa-1,3-galactosiltransferasa (A3GALT) *por ejemplo:* Alfa-1,3-galactosiltransferasa 1 Alfa-1,3-galactosiltransferasa 2	Cataliza la transferencia de una galactosa de UDP-Gal a un aceptor adecuado tal como una glicoproteína o un glicolípido que tiene, *por ejemplo,* un resto de galactosa terminal o un resto de GlcNAc en un enlace alfa 1,3	*Mus musculus* [*por ejemplo,* GI:224922807]
		Mustela putorius furo [*por ejemplo,* GI: 355690122]
		Cebus paella [*por ejemplo,* GI: 19698748]
		Rattus norvegicus [*por ejemplo,* GI: 28625949]

Tanto las galactosiltransferasas de tipo nativo como las variantes funcionales, como se describe anteriormente, están dentro del alcance de esta descripción. Dichas glicosiltransferasas se pueden preparar mediante cualquier método de rutina.

La combinación del sistema de regeneración de UDP-Gal y una o más galactosiltransferasas se puede usar para añadir un resto de galactosa a un sustrato adecuado (un aceptor) con altos rendimientos. Los expertos en la técnica conocen bien los sustratos para galactosiltransferasa, por ejemplo, los descritos en la Tabla 2 anterior. Preferiblemente, el sustrato tiene un resto de azúcar terminal (*por ejemplo*, Gal, GalNAc o GlcNAc) a los que se puede añadir el resto de galactosa. En algunos ejemplos, el sustrato es un polisacárido (que tiene > 50 unidades de monosacárido), un oligosacárido (que tiene de 2 a 50 unidades de monosacárido), una glicoproteína o glicopéptido, o un glicolípido. El tipo de galactosiltransferasa que se utilizará en los métodos de galactosilación descritos en la presente memoria depende del producto final de interés y del sustrato para sintetizar el producto final, lo cual está dentro del conocimiento de un experto en la técnica. El enfoque combinado del sistema de regeneración de UDP-Gal/galactosiltransferasa descrito en la presente memoria se puede utilizar para sintetizar glicoesfingolípidos. Los ejemplos se muestran en la Figura 3.

En otros ejemplos, el enfoque combinado del sistema de generación de UDP-Gal/galactosiltransferasa se puede utilizar para sintetizar oligosacáridos de la serie Globo, tales como la síntesis de Gb3 a partir de lactosa o la síntesis de Gb5 a partir de Gb4. Figuras 2A y 2C. Véase también las descripciones siguientes.

Sistema de regeneración de UDP-GalNAc y su uso en N-acetilgalactosaminación

Se puede utilizar un sistema de regeneración de UDP-GalNAc de manera conjunta con una N-acetilgalactosaminiltransferasa (GalNAcT), tal como una beta-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa, para la adición de un resto de GalNAc a un aceptor adecuado.

Las enzimas implicadas en un sistema de regeneración de UDP-GalNAc ejemplar se muestran en la Tabla 3 a continuación:

Tabla 3: Enzimas utilizadas en el sistema de regeneración de UDP-GalNAc

Enzima	Actividad	Ejemplos
N-Acetilhexosamina 1-quinasa (GalNAcK)	Actúa mediante un mecanismo secuencial de dos sustratos - dos productos para convertir ATP y N-acetilhexosamina en ADP y N-acetil-alfa-D-hexosamina 1-fosfato.	Nahk de *B. longum* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. CP000246.1
		B. breve (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. ZP_06596651)
		A. haemolyticum (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_003696399
		B. bifidum (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_003938776)
N-acetilglucosamina 1-fosfato uridililtransferasa (GlmU)	Cataliza la conversión de UTP y N-acetil-alfa-D-glucosamina 1-fosfato en difosfato y UDP-N-acetil-D-glucosamina.	GlmU de *E. coli* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. U00096.2
		A. thaliana (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. AEE31311)
		G. bemidjiensis (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. ACH37122)
		H. pylori (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_003 728906)
Piruvato quinasa (PykF)	Cataliza la transferencia de un grupo fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP) al ADP, produciendo piruvato y ATP o UTP.	*E. coli (por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. U00096.2)
		N. hamburgensis (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_576506)
		R. palustris (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_7830161)

		M. ruestringensis (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_004787669)
		H. hydrosis (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_004450514)
		S. coccoides (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_00441096)
Pirofosfatasa (PPA) (Opcional)	Ácido Anhídrido hidrolasa que actúa sobre los enlaces difosfato.	*E. coli* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. U00096.2
		G. theta (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. CAI77906)
		C. butyricum (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. ZP_04525837)
		L. plantarum (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. EFK28054)
		L. suebicus (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBan. ZP_09451344)

La N-acetilgalactosaminiltransferasa (por ejemplo, beta-1,3-GalNAcT o beta-1,4-GalNAcT) es una enzima que cataliza la reacción en donde se añade un resto de GAlNAc a un aceptor adecuado, tal como un péptido o un oligosacárido. Los ejemplos incluyen LgtD de *H. influenza,* (número de acceso a GenBank L42023.1). Otros ejemplos incluyen, pero no se limitan a, LgtD de *B. garinii* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. AEW68905), LgtD de *N. lactamica* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. AAN08512), y LgtD de R. *felis* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_246702).

Cualquiera de las enzimas utilizadas en el enfoque combinado del sistema de regeneración de UDP-GalNAc/GalNAcT puede ser una enzima de tipo nativo o una variante funcional de la misma, tal y como se describe en la presente memoria. Puede usarse cualquier método convencional para preparar dicha enzima. En un ejemplo, este enfoque se aplica para sintetizar Gb4 a partir de Gb3. Véase, *por ejemplo,* Figura 2B.

Sistema de regeneración de GDP-Fuc y su uso en fucosilación

Un sistema de regeneración de GDP-Fuc se puede utilizar conjuntamente con una fucosiltransferasa (*por ejemplo*, una alfa-1,2-fucosiltransferasa, una alfa-1,3-fucosiltransferasa o una alfa-2,6-fucosiltransferasa) para añadir un resto de fucosa a un aceptor adecuado, tal como un oligosacárido, que puede conjugarse con otra molécula tal como un lípido o un polipéptido.

Las enzimas implicadas en un sistema de regeneración de GDP-Fuc ejemplar se muestran en la Tabla 4 a continuación:

Tabla 4: Enzimas utilizadas en el sistema de regeneración de GDP-Fuc

Enzima	Actividad	Ejemplos
L-fucoquinasa/GDP-fucosa pirofosforilasa (FKP)	Una enzima biofuncional que genera Fuc-1-P y GDP-Fuc a partir de fucosa y ATP.	*B. fragilis* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. CR626927.1
		H. sapiens (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. NP_003829)
		R. norvegicus (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. NP_955788)
Piruvato quinasa (PykF)	Cataliza la transferencia de un grupo fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP) al ADP,	*E. coli* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. U00096.2)

	produciendo piruvato y ATP o UTP.	*N. hamburgensis* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_576506)
		R. palustris (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_7830161)
		M. ruestringensis (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_004787669)
		H. hydrosis (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_004450514)
		S. coccoides (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_00441096)
Pirofosfatasa (PPA) (Opcional)	Ácido anhídrido hidrolasa que actúa sobre los enlaces difosfato.	*E. coli* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. U00096.2
		G. theta (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. CAI77906)
		C. butyricum (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. ZP_04525837)
		L. plantarum (*por ejemplo*, número de acceso de GenBank. EFK28054)
		L. suebicus (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBan. ZP_09451344)

Una fucosiltransferasa transfiere un azúcar L-fucosa de un sustrato donante de GDP-fucosa (guanosina difosfato-fucosa) a un sustrato aceptor, que puede ser otro azúcar. La fucosiltransferasa puede añadir el resto de fucosa a un azúcar central GlcNAc (N-acetilglucosamina) como en el caso de la glicosilación unida a N, o a una proteína, como en el caso de la glicosilación unida a O. Las fucosiltransferasas incluyen alfa-1,3-fucosiltransferasa, alfa-1,2-fucosiltransferasa y alfa-1,6-fucosiltransferasa. Los ejemplos incluyen alfa-1,2-fucosiltransferasa de *E. coli* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. U00096.2), alfa-1,3-fucosiltransferasa de *B. fragilis* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_213404) y de *X. laevis* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. NP_001083664), alfa-1,6-fucosiltransferasa de *X.*

Cualquiera de las enzimas utilizadas en el enfoque combinado del sistema de regeneración de GDP-Fuc/FucT puede ser una enzima de tipo nativo o una variante funcional de la misma, como se describe en la presente memoria. Puede usarse cualquier método convencional para preparar dicha enzima. En un ejemplo, este enfoque se aplica para sintetizar Gb4 a partir de Gb3. Véase, *por ejemplo,* Figura 2D.

Sistema de regeneración de CMP-Neu5Ac y su uso en sialilación

Se puede acoplar un sistema de regeneración de CMP-Neu5Ac con una sialiltransferasa, tal como una alfa-2,3-sialiltransferasa, para añadir un resto de ácido siálico (Neu5Ac) a un sustrato aceptor adecuado, tal como un oligosacárido.

Las enzimas implicadas en un sistema de regeneración de CMP-Neu5Ac ejemplar se muestran en la Tabla 5 a continuación:

Tabla 5: Enzimas utilizadas en el sistema de regeneración de CMP-Neu5Ac

Enzima	Actividad	Ejemplos
Citidina monofosfato quinasa (CMK)	Cataliza la fosforilación de CMP para producir CDP.	*E. coli* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. U00096.2
		B. amyloliquefaciens (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank.

		ABS74466)
		M. leprae (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. CAB08279)
		M. avium (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. AAS03731)
		B. garinii (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. AEW68468)
CMP-ácido siálico sintetasa (Css)	Cataliza la síntesis de CMP-ácido siálico a partir de CTP y ácido siálico.	*P.multocida* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. AE004439.1
		N. meningitidis (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. AAB60780)
		O. mykiss (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. BAB47150)
		I. ioihiensis (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. AAV81361)
		C. jejuni (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. ABI32334)
Piruvato quinasa (PykF)	Cataliza la transferencia de un grupo fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP) al ADP, produciendo piruvato y ATP o UTP.	*E. coli* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. U00096.2)
		N. hamburgensis (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_576506)
		R. palustris (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_7830161)
		M. ruestringensis (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. _004787669)
		H. hydrosis (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_004450514)
		S. coccoides (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. YP_00441096)
Pirofosfatasa (PPA) (Opcional)	Ácido anhídrido hidrolasa que actúa sobre los enlaces difosfato.	*E. coli* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. U00096.2
		G. theta (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. CAI77906)
		C. butyricum (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. ZP_04525837)
		L. plantarum (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. EFK28054)
		Z. suebicus (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBan. ZP_09451344)

Las sialiltransferasas son enzimas que transfieren ácido siálico a oligosacáridos nacientes. Esta familia de enzimas añade ácido siálico a las porciones terminales de los glicolípidos sialilados (gangliósidos) o a las cadenas de azúcar de las glicoproteínas unidas a N u O. Hay alrededor de veinte sialiltransferasas diferentes, incluyendo las sialiltransferasas que añaden ácido siálico con un enlace alfa-2,3 a galactosa (*por ejemplo*, alfa-2,3-sialiltransferasa) y sialiltransferasas que añaden ácido siálico con un enlace alfa 2,6 a galactosa o *N*-acetilgalactosamina *(por ejemplo,* alfa-2,6-sialiltransferasa). Los ejemplos incluyen alfa-2,3-sialiltransferasa de, *por ejemplo*, *M bacteria* (Número de acceso a GenBank AB308042.1), *M. musculus* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. BAA06068), o *P.multocida* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. AET17056); y alfa-2,6-sialiltransferasa de, *por ejemplo, B. taurus* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. NP_001008668), C. *griseus* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. NP_001233744), o R. *norvegicus* (*por ejemplo,* Número de acceso a GenBank. AAC42086).

Cualquiera de las enzimas utilizadas en el enfoque combinado del sistema de regeneración de CMP-

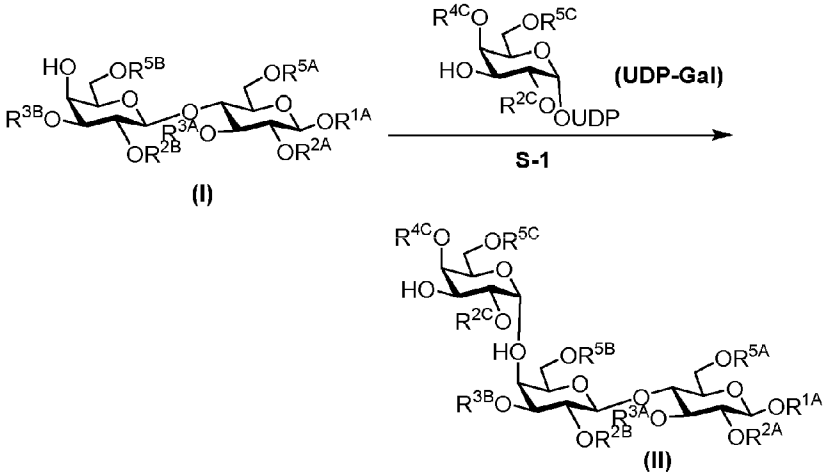
Neu5Ac/sialiltransferasa puede ser una enzima de tipo nativo o una variante funcional de la misma, como se describe en la presente memoria. Puede usarse cualquier método convencional para preparar dicha enzima. En un ejemplo, este enfoque se aplica para sintetizar Gb4 a partir de Gb3. Figura 2E.

Síntesis de oligosacáridos de la serie Globo.

Los enfoques combinados descritos anteriormente que implican regeneración de UDP-Gal/galactosiltransferasa, regeneración de UDP-GalNAc/GalNAcT, regeneración de GDP-Fuc/fucosiltransferasa y regeneración de CMP-Neu5Ac/sialiltransferasa se pueden aplicar, ya sea de forma independiente o en combinación, para sintetizar oligosacáridos de la serie Globo, incluyendo Gb3, Gb4, Gb5, Globo H (fucosil-Gb5) y SSEA4 (sialil-Gb5). Como se analiza con mayor detalle a continuación, todos estos oligosacáridos de la serie Globo pueden estar sustituidos o no sustituidos.

Etapa S-1

La primera etapa en el enfoque biosintético **(S-1)** implica la conversión enzimática de un compuesto de Fórmula **(I),** o una sal del mismo, a un compuesto de Fórmula (**II**), o una sal del mismo:



en donde R^{1A} es hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, carbociclilo sustituido o no sustituido, heterociclilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, o un grupo protector de oxígeno; y cada caso de R^{2A}, R^{3A}, R^{5A}, R^{2B}, R^{3B}, R^{5B}, R^{2C}, R^{4C} y R^{5C} es independientemente hidrógeno, alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido o un grupo protector de oxígeno.

Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona un método para sintetizar enzimáticamente un compuesto de Fórmula (**II**), o una sal del mismo, a partir de un compuesto de Fórmula **(I),** o una sal del mismo, que comprende convertir un compuesto de Fórmula (**I**) en un compuesto de Fórmula (**II**), o una sal del mismo, en presencia de uridina difosfato-Gal (UDP-Gal) y una alfa-1,4 galactosiltransferasa, y regenerar UDP-Gal a partir de galactosa en presencia del conjunto de enzimas enumeradas en la Tabla 1 anterior. Véase, por ejemplo, la Figura 2A. Para realizar esta reacción enzimática, componentes necesarios, tales como la galactosa, la galactosiltransferasa, el conjunto de enzimas de regeneración de UDP-Gal, ATP, UTP y otros (*por ejemplo,* Mg^{++}), se puede mezclar para formar una mezcla de reacción, que se puede incubar en condiciones adecuadas que permitan la producción de compuestos de Fórmula (**II**). Dichas condiciones son bien conocidas por los expertos en la técnica. Véase también los Ejemplos a continuación.

El grupo R^{1A} puede servir como un grupo funcional que permite la conjugación de los oligosacáridos de la serie Globo con otra molécula, tal como una proteína o un lípido. Alternativamente, puede servir como un grupo protector.

En ciertas realizaciones, R^{1A} es hidrógeno.

En otras realizaciones, R^{1A} es alquilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, alquilo de C_{2-6} sustituido o no sustituido, alquilo de C_{3-6} sustituido o no sustituido, alquilo de C_{4-6} sustituido o no sustituido, alquilo de C_{5-6} sustituido o no sustituido, alquilo de C_{2-5} sustituido o no sustituido, alquilo de C_{2-4} sustituido o no sustituido, alquilo de C_{2-3} sustituido o no sustituido, alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. La biotina y una ceramida, como se definen en la presente memoria, están abarcadas por alquilo sustituido. En ciertas realizaciones, R^{1A} es un alquilo no sustituido, *por ejemplo,* en ciertas realizaciones, R^{1A} es metilo, etilo, propilo, isopropilo, sec-butilo, isobutilo o terc-butilo. Alternativamente, en ciertas realizaciones, R^{1A} es un alquilo sustituido. En ciertas realizaciones, R^{1A} es un alquilo que está además sustituido con un tio sustituido o no sustituido, amino sustituido o no sustituido, carbonilo (*por ejemplo,* ácido carboxílico), azido,

alquenilo (*por ejemplo,* alilo), alquinilo *(por ejemplo,* propargilo), biotina o un grupo ceramida. En determinadas realizaciones, dichos sustituyentes están sustituidos en la posición terminal (último átomo de carbono) del grupo alquilo. En ciertas realizaciones, R^{1A} es un alquilo sustituido con uno o más grupos amino ($-NH_2$). En ciertas realizaciones, R^{1A} es un alquilo sustituido en la posición terminal (último átomo de carbono) con un grupo amino ($-NH_2$). En ciertas realizaciones, R^{1A} es $-(CH_2)_n-NH_2$ en donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En ciertas realizaciones, R^{1A} es 5-pentilamino ($-(CH_2)_5-NH_2$).

En ciertas realizaciones, R^{1A} es un alquenilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, alquenilo de C_{2-6} sustituido o no sustituido, alquenilo de C_{3-6} sustituido o no sustituido, alquenilo de C_{4-6} sustituido o no sustituido, alquenilo de C_{5-6} sustituido o no sustituido, alquenilo de C_{2-5} sustituido o no sustituido, alquenilo de C_{2-4} sustituido o no sustituido, alquenilo de C_{2-3} sustituido o no sustituido, alquenilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquenilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquenilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquenilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquenilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{1A} es $-(CH_2)_m-CH=CH_2$, en donde n es 1, 2 o 3. En ciertas realizaciones, R^{1A} es alilo ($-CH_2CH=CH_2$). En ciertas realizaciones, R^{1A} es un alquenilo que está además sustituido con un tio sustituido o no sustituido, amino sustituido o no sustituido, carbonilo *(por ejemplo,* ácido carboxílico), azido, alquenilo *(por ejemplo,* alilo), alquinilo (*por ejemplo*, propargilo), biotina o un grupo ceramida. En determinadas realizaciones, dichos sustituyentes se sustituyen en la posición terminal (último átomo de carbono) del grupo alquenilo.

En ciertas realizaciones, R^{1A} es un alquinilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, alquinilo de C_{2-6} sustituido o no sustituido, alquinilo de C_{3-6} sustituido o no sustituido, alquinilo de C_{4-6} sustituido o no sustituido, alquinilo de C_{5-6} sustituido o no sustituido, alquinilo de C_{2-5} sustituido o no sustituido, alquinilo de C_{2-4} sustituido o no sustituido, alquinilo de C_{2-3} sustituido o no sustituido, alquinilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquinilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquinilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquinilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquinilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{1A} es un alquinilo que además está sustituido con un tio sustituido o no sustituido, amino sustituido o no sustituido, carbonilo *(por ejemplo,* ácido carboxílico), azido, alquenilo *(por ejemplo,* alilo), alquinilo *(por ejemplo,* propargilo), biotina o un grupo ceramida. En determinadas realizaciones, dichos sustituyentes se sustituyen en la posición terminal (último átomo de carbono) del grupo alquinilo.

En ciertas realizaciones, R^{1A} es un heterociclilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, heterociclilo de 5 a 8 miembros sustituido o no sustituido, heterociclilo de 5 a 7 miembros sustituido o no sustituido, heterociclilo de 5 a 6 miembros sustituido o no sustituido, heterociclilo de 5 miembros sustituido o no sustituido, heterociclilo de 6 miembros sustituido o no sustituido, heterociclilo de 7 miembros sustituido o no sustituido, o heterociclilo de 8 miembros sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{1A} es un heterociclilo que además está sustituido con un tio sustituido o no sustituido, amino sustituido o no sustituido, carbonilo *(por ejemplo,* ácido carboxílico), azido, alquenilo *(por ejemplo,* alilo), alquinilo *(por ejemplo,* propargilo), biotina o un grupo ceramida.

En ciertas realizaciones, R^{1A} es un carbociclilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, carbociclilo de C_{3-6} sustituido o no sustituido, carbociclilo de C_{3-5} sustituido o no sustituido, carbociclilo de C_{3-4} sustituido o no sustituido, carbociclilo de C_3 sustituido o no sustituido, carbociclilo de C_4 sustituido o no sustituido, carbociclilo de C_5 sustituido o no sustituido, o carbociclilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{1A} es un carbociclilo que además está sustituido con un tio sustituido o no sustituido, amino sustituido o no sustituido, carbonilo *(por ejemplo,* ácido carboxílico), azido, alquenilo *(por ejemplo,* alilo), alquinilo *(por ejemplo,* propargilo), biotina o un grupo ceramida.

En ciertas realizaciones, R^{1A} es un arilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, arilo de C_6 sustituido o no sustituido (fenilo) o arilo de C_{10} sustituido o no sustituido (naftilo). En ciertas realizaciones, R^{1A} es un arilo que está además sustituido con un tio sustituido o no sustituido, amino sustituido o no sustituido, carbonilo *(por ejemplo,* ácido carboxílico), azido, alquenilo *(por ejemplo,* alilo), alquinilo (*por ejemplo*, propargilo), biotina o un grupo ceramida.

En ciertas realizaciones, R^{1A} es un heteroarilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, heteroarilo de 5 miembros sustituido o no sustituido o heteroarilo de 6 miembros sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{1A} es un heteroarilo que además está sustituido con un tio sustituido o no sustituido, amino sustituido o no sustituido, carbonilo (*por ejemplo*, ácido carboxílico), azido, alquenilo *(por ejemplo,* alilo), alquinilo *(por ejemplo,* propargilo), biotina o un grupo ceramida.

En ciertas realizaciones, R^{1A} es hidrógeno, alilo, alquilo sustituido, biotina o una ceramida.

Se contempla además en la presente memoria que R^{1A} puede ser una mezcla de cualquiera de los grupos distintos de hidrógeno mencionados anteriormente, *por ejemplo,* alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, carbociclilo sustituido o no sustituido, heterociclilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, para proporcionar un grupo enlazador que comprende 1, 2, 3, 4, 5 , 6, 7, 8, 9 o 10 combinaciones diferentes de grupos. Como ejemplo no limitante, R^{1A} puede ser un grupo enlazador que comprende una combinación de grupos alquilo y arilo, *por ejemplo,* tal como alquilo-arilo-alquilo, y que opcionalmente puede estar además sustituido en cualquier posición del grupo enlazador *(por ejemplo,* la posición terminal) con un tio sustituido o no sustituido, amino sustituido o no sustituido, carbonilo *(por ejemplo,* ácido carboxílico), azido, alquenilo *(por ejemplo,* alilo), alquinilo *(por ejemplo,* propargilo), biotina o un grupo ceramida.

En ciertas realizaciones, R^{1A} es un grupo protector de oxígeno, como se define en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, R^{2A} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{2A} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{2A} es un grupo protector de oxígeno.

En ciertas realizaciones, R^{3A} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{3A} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{3A} es un grupo protector de oxígeno.

En ciertas realizaciones, R^{5A} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{5A} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{5A} es un grupo protector de oxígeno.

En ciertas realizaciones, R^{2B} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{2B} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{2B} es un grupo protector de oxígeno.

En ciertas realizaciones, R^{3B} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{3B} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{3B} es un grupo protector de oxígeno.

En ciertas realizaciones, R^{5B} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{5B} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{5B} es un grupo protector de oxígeno.

En ciertas realizaciones, R^{2C} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{2C} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{2C} es un grupo protector de oxígeno.

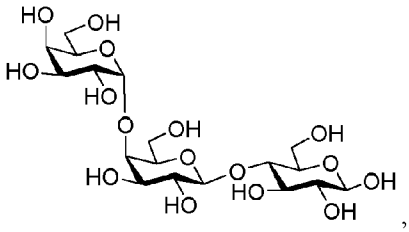
En ciertas realizaciones, R^{4C} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{4C} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{4C} es un grupo protector de oxígeno.

En ciertas realizaciones, R^{5C} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{5C} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{5C} es un grupo protector de oxígeno.

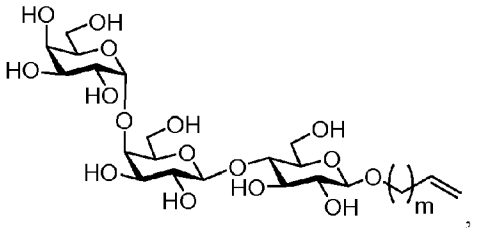
En ciertas realizaciones, cada caso de R^{2A}, R^{3A}, R^{5A}, R^{2B}, R^{3B}, R^{5B}, R^{2C}, R^{4C} y R^{5C} es independientemente hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{1A} es un alquenilo sustituido o no sustituido, y cada caso de R^{2A}, R^{3A}, R^{5A}, R^{2B}, R^{3B}, R^{5B}, R^{2C}, R^{4C} y R^{5C} es independientemente hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{1A} es un alquilo sustituido o no sustituido, y cada caso de R^{2A}, R^{3A}, R^{5A}, R^{2B}, R^{3B}, R^{5B}, R^{2C}, R^{4C} y R^{5C} es independientemente hidrógeno.

Compuestos ejemplares de Fórmula **(I)** incluyen, pero no se limitan a, y sales de los mismos.

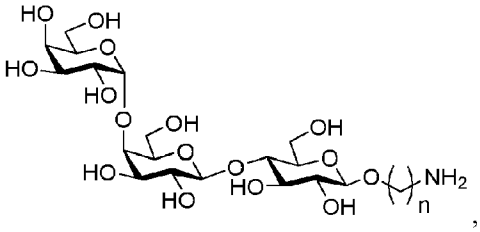
Compuestos ejemplares de Fórmula (**II**) incluyen, pero no se limitan a,



,



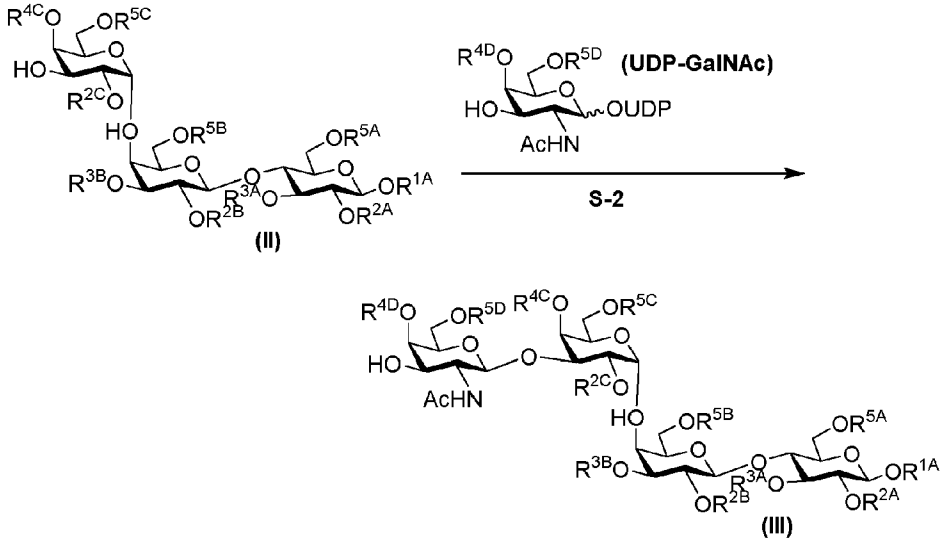
y



y sales de los mismos.

Etapa S-2

La segunda etapa en el enfoque biosintético **(S-2)** Implica la conversión enzimática de un compuesto de Fórmula (**II**), o una sal del mismo, a un compuesto de Fórmula **(III),** o una sal del mismo:



en donde R^{1A}, R^{2A} ,R^{3A} ,R^{5A} ,R^{2B} ,R^{3B} ,R^{5B},R^{2C} ,R^{4C} y R^{5C} son como se definen en la presente memoria; y cada caso de R^{4D} y R^{5D} es independientemente hidrógeno, alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido o un grupo protector de oxígeno.

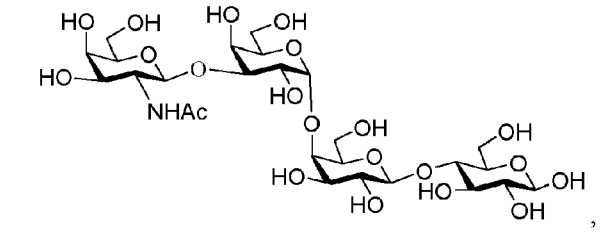
En ciertas realizaciones, R^{2D} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{2D} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo*, alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{2D} es un grupo protector de nitrógeno, *por ejemplo,* acetilo (Ac, $-C{=}OCH_3$).

En ciertas realizaciones, R^{4D} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{4D} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo*, alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{4D} es un grupo protector de oxígeno.

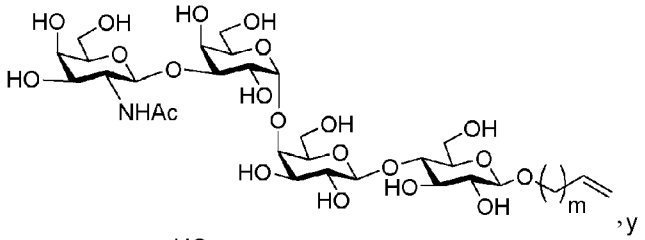
En ciertas realizaciones, R^{5D} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{5D} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo*, alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{5D} es un grupo protector de oxígeno.

En ciertas realizaciones, tanto R^{4D} como R^{5D} son hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{2D} es un grupo protector de nitrógeno, *por ejemplo,* acetilo (Ac, $-C{=}OCH_3$), y R^{4D} y R^{5D} son cada uno hidrógeno.

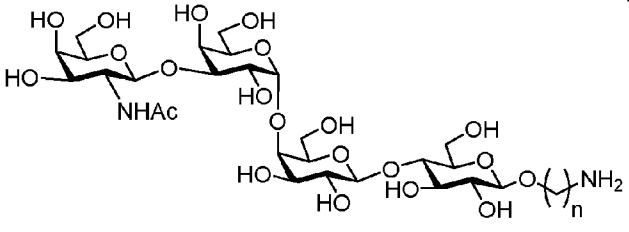
Compuestos ejemplares de Fórmula **(III)** incluyen, pero no se limitan a,



,



, y



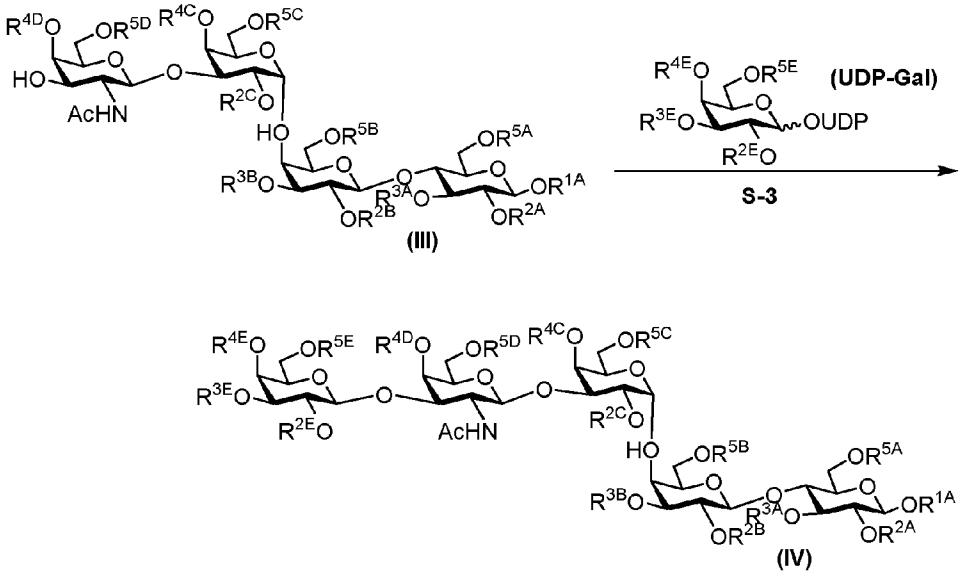
,

y sales de los mismos.

En *la Etapa S-2,* un método para sintetizar enzimáticamente un compuesto de Fórmula **(III),** o una sal del mismo, a partir de un compuesto de Fórmula (**II**), o una sal del mismo, se realiza en condiciones adecuadas. Un sustrato de Fórmula (**II**) se puede preparar mediante cualquier método conocido en la técnica o descrito en la presente memoria. En algunos ejemplos, el compuesto de Fórmula (**II**) se aísla de la mezcla de reacción descrita en la Etapa S-1 anterior. En otros ejemplos, toda la mezcla de reacción de la Etapa S-1 se usa sin purificación del compuesto de Fórmula (**II**) producido en la misma. El compuesto de Fórmula (**II**) se puede incubar con UDP-GalNAc en presencia de GalNAcT (*por ejemplo*, una beta-1,3-GalNAcT) en condiciones que permitan la conversión del compuesto de Fórmula (**II**) a un compuesto de Fórmula **(III)**. En algún ejemplo, esta reacción catalizada por GalNAcT se acopla con el proceso de regeneración de UDP-GalNAc como se describe en la presente memoria. Figura 2B. Véase también los Ejemplos a continuación.

Etapa S-3

La tercera etapa en el enfoque biosintético **(S-3)** implica la conversión enzimática de un compuesto de Fórmula **(III),** o una sal del mismo, a un compuesto de Fórmula **(IV),** o una sal del mismo:



en donde R^{1A}, R^{2A}, R^{3A}, R^{5A}, R^{2B}, R^{3B}, R^{5B}, R^{2C}, R^{4C}, R^{5C}, R^{2D}, R^{4D} y R^{5D} son como se definen en la presente memoria; y cada caso de R^{2E}, R^{3E}, R^{4E} y R^{5E} es independientemente hidrógeno, alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido o un grupo protector de oxígeno.

En ciertas realizaciones, R^{2E} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{2E} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{2E} es un grupo protector de oxígeno.

En ciertas realizaciones, R^{3E} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{3E} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{3E} es un grupo protector de oxígeno.

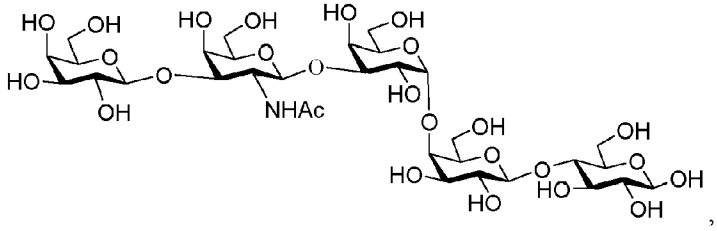
En ciertas realizaciones, R^{4E} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{4E} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{4E} es un grupo protector de oxígeno.

En ciertas realizaciones, R^{5E} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{5E} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{5E} es un grupo protector de oxígeno.

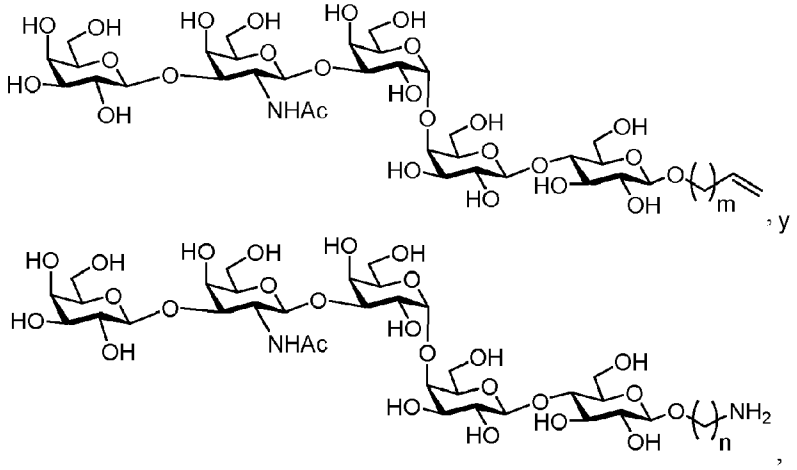
En ciertas realizaciones, R^{3E} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{3E} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{3E} es un grupo protector de oxígeno.

En ciertas realizaciones, cada caso de R^{2E}, R^{3E}, R^{4E} y R^{5E} es hidrógeno.

Compuestos ejemplares de Fórmula (**IV**) incluyen, pero no se limitan a,



,



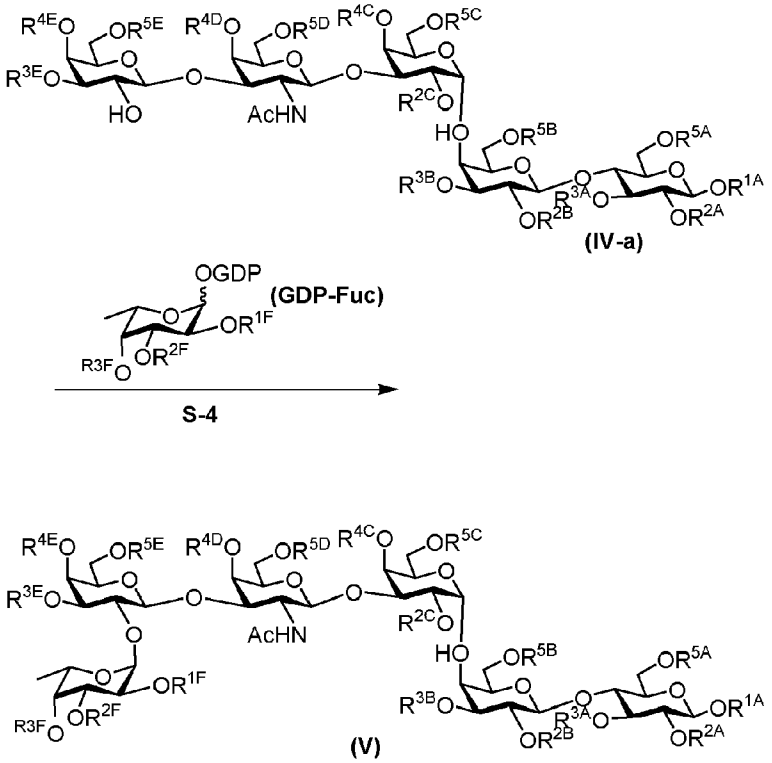
y sales de los mismos.

La *Etapa S-3* Implica una reacción enzimática mediante la actividad de una beta-1,3-galactosiltransferasa, que se realiza en condiciones adecuadas conocidas por los expertos en la técnica. Un sustrato de Fórmula (**III**), tal como Gb4, se puede preparar mediante cualquier método conocido en la técnica o descrito en la presente memoria. En algunos ejemplos, el compuesto de Fórmula (**III**) se aísla de la mezcla de reacción descrita en la *Etapa S-2* anterior. En otros ejemplos, toda la mezcla de reacción de la *Etapa S-2* se utiliza sin purificación del compuesto de Fórmula **(III)** producido en la misma. El compuesto de Fórmula **(III)** se puede incubar con UDP-Gal en presencia de una beta-1,3-galactosiltransferasa en condiciones que permitan la conversión del compuesto de Fórmula **(III)** a un compuesto de Fórmula **(IV)**. En algún ejemplo, esta reacción catalizada por GalT se acopla con el proceso de regeneración de UDP-Gal como se describe en la presente memoria. Figura 2A. Véase también los Ejemplos a continuación.

En algunas realizaciones, una enzima bifuncional beta-1,3-GalNAcT/beta-1,3-GalT, tal como LgtD de, *por ejemplo, H. influenza*, se utiliza en ambas etapas *S-2* y *S-3.*

Etapa S-4

El compuesto de Fórmula **(IV)** después puede sustituirse en varias posiciones en el anillo terminal E. Por ejemplo, en ciertas realizaciones de la Fórmula **(IV),** en donde R^{2E} es hidrógeno, una etapa opcional en el enfoque biosintético **(S-4)** implica la conversión enzimática de un compuesto de Fórmula **(IV-a),** o una sal del mismo, a un compuesto de Fórmula **(V),** o una sal del mismo:



en donde 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} y R^{5E} son como se definen en la presente memoria; y cada caso de R^{1F}, R^{2F} y R^{3F} es independientemente hidrógeno, alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido o un grupo protector de oxígeno.

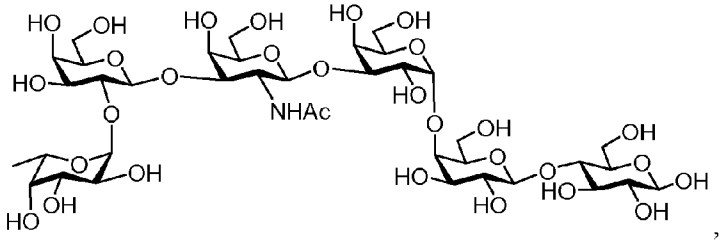
En ciertas realizaciones, R^{1F} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{1F} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{1F} es un grupo protector de oxígeno.

En ciertas realizaciones, R^{2F} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{2F} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{2F} es un grupo protector de oxígeno.

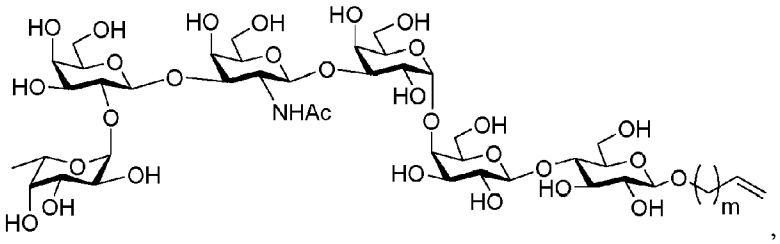
En ciertas realizaciones, R^{3F} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{3F} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{3F} es un grupo protector de oxígeno.

En ciertas realizaciones, cada caso de R^{1F}, R^{2F} y R^{3F} es hidrógeno.

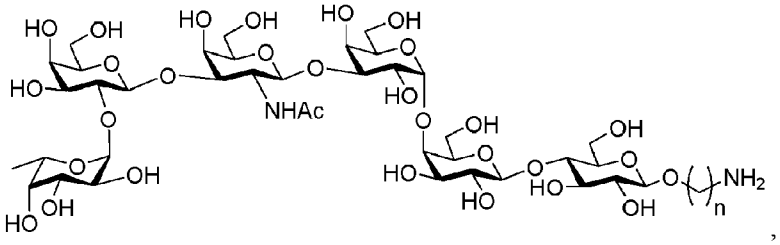
Los compuestos ejemplares de Fórmula (**V**) incluyen, pero no se limitan a,



,



y

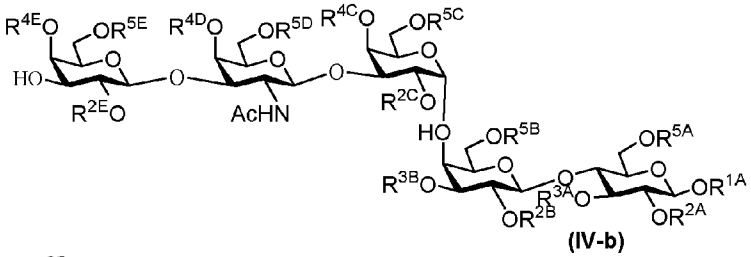


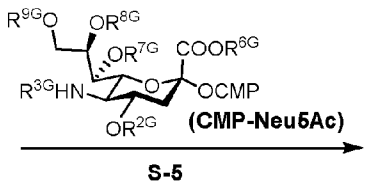
y sales de los mismos.

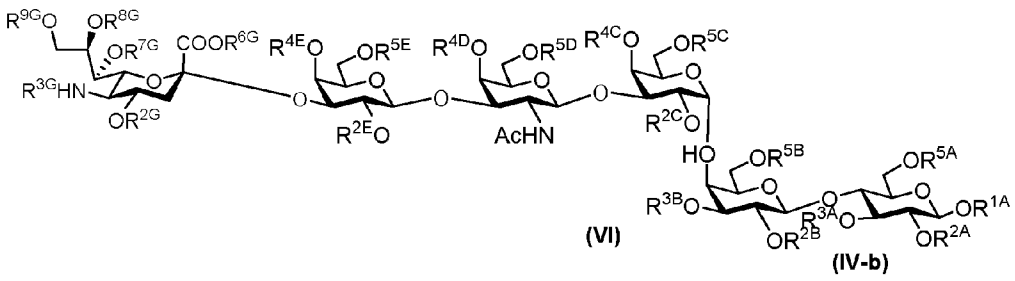
La *Etapa S-4* Implica una reacción enzimática mediante la actividad de una alfa-1,2-fucosiltransferasa, que se realiza en condiciones adecuadas conocidas por los expertos en la técnica. Un sustrato de Fórmula **(IV),** tal como Gb5, se puede preparar mediante cualquier método conocido en la técnica o descrito en la presente memoria. En algunos ejemplos, el compuesto de Fórmula **(IV)** se aísla de la mezcla de reacción descrita en la *Etapa S-3* anterior. En otros ejemplos, toda la mezcla de reacción de la *Etapa S-3* se utiliza sin purificación del compuesto de Fórmula **(V)** producido en la misma. El compuesto de Fórmula **(IV)** se puede incubar con GDP-Fuc en presencia de fucosiltransferasa en condiciones que permitan la conversión del compuesto de Fórmula **(IV)** a un compuesto de Fórmula **(V)**. En algún ejemplo, esta reacción catalizada por FucT se acopla con el proceso de regeneración de GDP-Fuc como se describe en la presente memoria. Figura 2D. Véase también los ejemplos a continuación.

Etapa S-5

En otras realizaciones de la Fórmula **(IV),** en donde R^{3E} es hidrógeno, una etapa opcional en el enfoque biosintético **(S-5)** implica la conversión enzimática de un compuesto de Fórmula **(IV-b),** o una sal del mismo, a un compuesto de Fórmula **(VI),** o una sal del mismo:







en donde 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} y R^{5E} son como se definen en la presente memoria; R^{3G} es hidrógeno, alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido o un grupo protector de nitrógeno; y cada caso de R^{6G}, R^{7G}, R^{8G} y R^{9G}, es independientemente hidrógeno, alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido o un grupo protector de oxígeno.

En ciertas realizaciones, R^{3G} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{3G} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{3G} es un grupo protector de nitrógeno, *por ejemplo,* acetilo (Ac, -C=OCH_3).

En ciertas realizaciones, R^{6G} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{6G} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{6G} es un grupo protector de oxígeno.

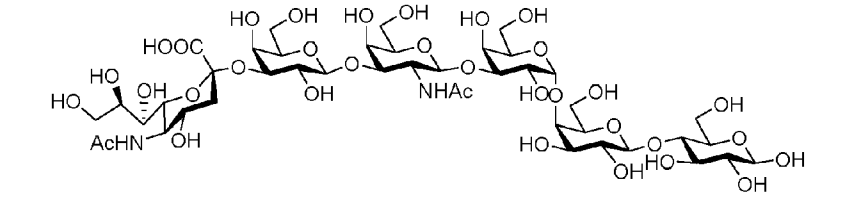
En ciertas realizaciones, R^{7G} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{7G} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{7G} es un grupo protector de oxígeno.

En ciertas realizaciones, R^{8G} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{8G} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{8G} es un grupo protector de oxígeno.

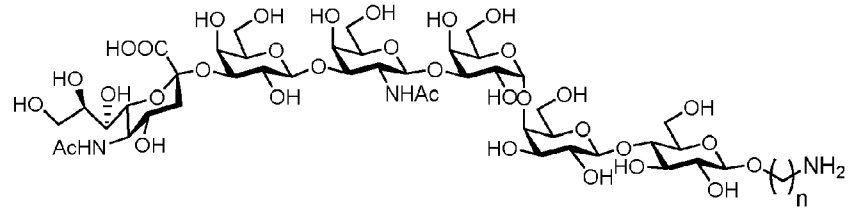
En ciertas realizaciones, R^{9G} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{9G} es un alquilo de C_{1-6} sustituido o no sustituido, *por ejemplo,* alquilo de C_1 sustituido o no sustituido, alquilo de C_2 sustituido o no sustituido, alquilo de C_3 sustituido o no sustituido, alquilo de C_4 sustituido o no sustituido, alquilo de C_5 sustituido o no sustituido, o alquilo de C_6 sustituido o no sustituido. En ciertas realizaciones, R^{9G} es un grupo protector de oxígeno.

En ciertas realizaciones, cada caso de R^{6G}, R^{7G}, R^{8G} y R^{9G} es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^{3G} es un grupo protector de nitrógeno, *por ejemplo,* acetilo (Ac, -C=OCH_3), cada caso de R^{6G}, R^{7G}, R^{8G} y R^{9G} es hidrógeno.

Los compuestos ejemplares de Fórmula (**V**) incluyen, pero no se limitan a,



, y



,

y sales de los mismos.

La *Etapa S-5* Implica una reacción enzimática mediante la actividad de una alfa-2,3-sialiltransferasa, que se realiza en condiciones adecuadas conocidas por los expertos en la técnica. Un sustrato de Fórmula **(IV),** tal como Gb5, se puede preparar mediante cualquier método conocido en la técnica o descrito en la presente memoria. En algunos ejemplos, el compuesto de Fórmula **(IV)** se aísla de la mezcla de reacción descrita en la *Etapa S-3* anterior. En otros ejemplos, toda la mezcla de reacción de la *Etapa S-3* se utiliza sin purificación del compuesto de Fórmula **(IV)** producido en la misma. El compuesto de Fórmula **(IV)** se puede incubar con CMP-Neu5Ac en presencia de sialiltransferasa en

condiciones que permitan la conversión del compuesto de Fórmula **(IV)** a un compuesto de Fórmula **(V)**. En algún ejemplo, esta reacción catalizada por sialiltransferasa se acopla con el proceso de regeneración de CMP-Neu5Ac como se describe en la presente memoria. Figura 2E. Véase también los Ejemplos a continuación.

Cada una de las etapas S1 a S5, así como cualquier combinación de etapas consecutivas como se describe anteriormente, está dentro del alcance de esta divulgación. También dentro del alcance de la presente divulgación están cualquiera de los compuestos producidos en uno cualquiera de los métodos de síntesis descritos en la presente memoria, *por ejemplo,* los descritos anteriormente.

En algunos aspectos, la presente divulgación presenta métodos para sintetizar Globo H o $SSEA_4$ a partir de lactosa mediante una reacción en cadena que comprende las Etapas S-1, S-2, S-3 y S-4 o las Etapas S-1, S-2, S-3 o S-5 descritas anteriormente. El Globo H o SSEA4 pueden ser sin cola (R^{1A} siendo hidrógeno; véase las Figuras 3 y 4), o con cola (*por ejemplo,* R^{1A} siendo alilo; véase las Figuras 5 y 6). En cada etapa, la reacción de la glicosiltransferasa se puede acoplar con el correspondiente proceso de regeneración del azúcar de nucleótido. Figuras 3-6. En un ejemplo, el método descrito anteriormente se realiza en un solo recipiente, es decir, cada mezcla de reacción anterior se usa directamente para la siguiente etapa de reacción sin la purificación del sustrato producido en la reacción anterior. En otras palabras, el enfoque de un solo recipiente no requiere ninguna etapa para purificar ningún intermediario. Alternativamente, las Etapas S-1 y S-2 se realizan en un solo recipiente sin purificación de ningún intermedio. Después de la Etapa S-2, se aísla Gb4 de la mezcla de reacción y el GB4 purificado se usa para las siguientes Etapas S3, S4 y/o S5. No se realiza ninguna etapa de purificación adicional para aislar otro intermedio.

Las enzimas utilizadas en cada etapa de reacción pueden disolverse en cada mezcla de reacción o inmovilizarse en uno o más miembros de soporte. Cuando sea necesario, se pueden añadir enzimas adicionales durante la reacción en cadena.

Reactores enzimáticos

Una reacción enzimática en cadena que comprende cualquier combinación de dos o más etapas consecutivas como se describe anteriormente se puede realizar en un reactor enzimático, que comprende una o más cámaras de reacción. Cada cámara de reacción está diseñada para realizar una etapa de la reacción en cadena. En particular, cada cámara de reacción comprende enzimas implicadas en una etapa de la reacción, incluyendo cada una de las Etapas *1-S* a *5-S* descritas anteriormente.

En algunas realizaciones, una o más enzimas, o todas las enzimas, en cada cámara de reacción están inmovilizadas en un miembro de soporte adecuado (*por ejemplo*, una membrana de soporte). Cuando sea necesario, se pueden conectar cámaras de reacción para etapas de reacción consecutivas de manera que, después de la terminación de la reacción enzimática en una cámara de reacción anterior, la mezcla de reacción resultante pueda fluir hacia la siguiente cámara de reacción para permitir que se produzca la siguiente etapa de reacción. En algunos ejemplos, el producto de la reacción anterior no se purifica y toda la mezcla de reacción, que incluye el producto, se añade a la siguiente cámara de reacción para permitir que se produzca la siguiente reacción enzimática. Véase, *por ejemplo,* Figuras 3 y 4.

Por ejemplo, la reacción de la *Etapa 1-S* se puede realizar en una primera cámara de reacción en el reactor enzimático, en donde una o las enzimas implicadas en la *Etapa 1-S* están inmovilizadas sobre un miembro de soporte. Después de la terminación de la *Etapa 1-S,* la mezcla de reacción (incluyendo el producto Gb3) en la primera cámara de reacción se coloca en una segunda cámara de reacción que contiene todas las enzimas y reactivos necesarios para la *Etapa 2-S* para la síntesis de Gb4. En un ejemplo, el Gb4 se purifica y se usa para la siguiente etapa de reacción. En otro ejemplo, toda la mezcla de reacción en la segunda cámara de reacción, incluyendo Gb4, se coloca en una tercera cámara de reacción que contiene enzimas y reactivos necesarios para la *Etapa 3-S,* en donde se sintetiza Gb5. Después, la mezcla de reacción de la tercera cámara de reacción se puede colocar en una cuarta cámara de reacción que contiene enzimas y reactivos necesarios para la *Etapa 4-S* o se coloca en una quinta cámara de reacción que contiene enzimas y reactivos necesarios para la *Etapa 5-S.*

En otros aspectos, el reactor enzimático contiene una cámara de reacción que incluye enzimas, reactivos y el sustrato adecuado, necesarios para una de las etapas de síntesis descritas anteriormente. El sustrato está inmovilizado sobre un miembro de soporte. En un ejemplo, una cámara de reacción contiene las enzimas y reactivos necesarios para la *Etapa 1-S,* en donde el sustrato, Lac-alilo, está inmovilizado sobre un miembro de soporte. Después de la *Etapa 1-S,* en donde se sintetiza Gb3-alilo, la mezcla de reacción en la cámara de reacción se sustituye con una segunda mezcla de reacción que contiene enzimas y reactivos necesarios para la *Etapa 2-S.* Después de la síntesis de Gb4-alilo en la *Etapa 2-S,* la segunda mezcla de reacción se sustituye con una tercera mezcla de reacción que contiene enzimas y reactivos para la *Etapa 3-S,* en donde se sintetiza Gb5-alilo. Después, la tercera mezcla de reacción se sustituye con una cuarta mezcla de reacción que contiene las enzimas y reactivos para la *Etapa 4-S* (para la síntesis de Globo H-alilo) o una quinta mezcla de reacción que contiene las enzimas y reactivos para la *Etapa 5-S* (para la síntesis de $SSEA_4$-alilo).

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de oligosacáridos de la serie Globo.

Nuevo método para la regeneración de UDP-Gal

En 2004, el grupo de Kotake descubrió una enzima de los brotes de guisantes, UDP-azúcar pirofosforilasa, que tiene una amplia especificidad de sustrato hacia diferentes monosacáridos-1-fosfato para formar UDP-azúcar.[19] Dos años más tarde, los grupos de Kotake y Somers publicaron de forma independiente una enzima con función similar, AtUSP, que existía en Arabidopsis.[20],[21] Muy recientemente, se demostró que las enzimas homólogas también existen en los parásitos, Leishmania y Trypanosoma.[22],[23] La enzima AtUSP es interesante debido a su capacidad intrínseca para condensar UTP no solo con Glc-1-fosfato y Gal-1-fosfato sino también con otros monosacáridos-1-P, GlcA-1-fosfato y Xil-1-fosfato. Por lo tanto, elegimos AtUSP para condensar Gal-1-fosfato con UTP directamente para realizar la regeneración de UDP-Gal y completar la tercera regeneración de la síntesis de UDP-Gal.

Síntesis de alil-Gb3

La mezcla de reacción (200 mL) contenía 10 mmol de alil-lac, 10 mmol de galactosa, 22 mmol de ácido fosfoenolpirúvico (PEP), 0,05 mmol de ATP, 0,125 mmol de UTP con $MgCl_2$ 10 mM en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7,0). La reacción se inició mediante la adición de 100 U de α-1,4-galactosiltransferasa (LgtC), 50 U de galactoquinasa (GalK), 150 U de UDP-azúcar pirofosforilasa (AtUSP), 200 U de piruvato quinasa (PK) y 200 U de pirofosfatasa (PPA). El matraz se incubó a 25°C y el progreso de la reacción se controló mediante TLC y se tiñó mediante *p*-anisaldehído. Se añadieron más enzimas si cualquiera de las reacciones estaba incompleta hasta que se completó la reacción, y los productos se confirmaron mediante TLC y ESI-MS.

Síntesis de alil-Gb4

Después de la síntesis de alil-Gb3, se añadieron componentes adicionales, incluyendo 9,9 mmol de N-acetilgalactosamina (GalNAc), 22 mmol de PEP, 100 U de β-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa (β1,3GalNAcT, LgtD), 50 U de N-acetilhexosamina 1-quinasa (NahK), 200 U de N-acetilglucosamina 1-fosfato uridililtransferasa (GlmU), 100 U de PK y 100 U de PPA, en 220mL de solución. La mezcla se incubó a 25°C y se controló mediante TLC y ESI-MS como antes hasta que se completó la reacción. El producto se purificó adicionalmente mediante una columna de gel C-18 y se caracterizó por NMR.

Síntesis de alil-Gb5

La mezcla de reacción (250 mL) contenía 9 mmol de alil-Gb4, 9 mmol de galactosa, 22 mmol de PEP, 0,05 mmol de ATP, 0,125 mmol de UTP con $MgCl_2$ 10 mM en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7,0). La reacción se inició mediante la adición de 200 U de β-1,3-galactosiltransferasa (β1,3GalT, LgtD), 50 U de GalK, 150 U de AtUSP, 100 U de PK y 100 U de PPA y se incubó a 25°C, hasta que se completó.

Síntesis de alil-Globo H

Se usó la mitad de la cantidad del producto de reacción de alil-Gb5 (~4,5 mmol) sin purificación adicional para producir alil-globo H directamente. Una solución que contiene 5 mmol de fucosa, 0,05 mmol de ATP, 0,5 mmol de GTP, 11 mmol de PEP con $MgCl_2$ 10 mM en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7,0) se añadieron 200 U de L-fucoquinasa/GDP-fucosa pirofosforilasa (FKP), 200 U de PK, 200 U de PPA y 200 U de α-1,2-fucosiltransferasa (FutC) se incubó a 25 °C hasta que se completó la reacción y el producto se purificó mediante cromatografía en gel C-18 como antes y se caracterizó.

Síntesis de alil-SSEA4

Otra mitad de la mezcla de reacción de alil-Gb5 (4,5 mmol) se usó para la síntesis de alil-SSEA4 añadiendo 5 mmol de ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), 0,05 mmol de ATP, 0,25 mmol de CTP, 11 mmol de PEP con $MgCl_2$ 10 mM en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) seguido de 50 U de citidina monofosfato quinasa (CMK), 120 U de CMP-ácido siálico sintetasa (CSS), 100 U de PK, 100 U de PPA y 150 U de α- 2,3-sialiltransferasa (JT-FAJ-16). El progreso se controló mediante TLC y el producto se purificó y caracterizó como se describe anteriormente.

Purificación y Caracterización de Oligosacáridos.

Las proteínas de la mezcla de reacción se eliminaron calentando a 90°C durante 30 minutos y seguido de centrifugación (5000 rpm, 20 min). Después, el filtrado se purificó mediante cromatografía en gel C-18 y se eluyó mediante un gradiente de 100% de H_2O a 10% de metanol en H_2O. Las fracciones se recogieron y se controlaron mediante TLC [butanol/hidróxido de amonio/agua = 5: 3: 2 (v/v/v)] y las fracciones con alil-oligosacáridos se combinaron y liofilizaron. Se pudo obtener más del 99 % de pureza del producto mediante HPLC utilizando la columna Cosmosil 5SL-II en (H_2O/ Acetonitrilo = 19/81) en modo isocrático. La estructura de alil-Lac, alil-Gb3, alil-Gb4, alil-Gb5, alil-Globo H y alil-SSEA4 se analizó mediante 1H NMR, ^{13}C NMR y espectrometría de masas (Avance 600 y APEX-ultra 9.4 T FTICR-MS, Bruker Daltonics).

Clonación de genes para la síntesis de azúcares de nucleótidos, glicosiltransferasas y regeneración de ATP.

Todos los genes obtenidos mediante PCR a partir de DNA genómico o una biblioteca de cDNA mediante el cebador respectivo (Tabla 5) y el producto de la PCR se ligaron en el vector pET47b modificado. Después de ATG, a continuación se encuentran la etiqueta His, el sitio de corte de la proteasa AcTEV y el gen de selección positiva ccdB flanqueados por enzimas de reconocimiento de restricción especiales, o pET28a en la etiqueta His C-terminal. Para aumentar el nivel de expresión del gen, las cuatro glicosiltransferasas se sintetizaron mediante optimización de codones para *E. coli.* El plásmido con secuencia correcta se transformó en la célula competente ArcticExpress/RII, mediante un método de transformación química. Se seleccionó una sola colonia y se inoculó en medio TB con antibióticos de kanamicina durante la noche, y se actualizó el cultivo celular en medio TB fresco, después se indujo la expresión de la proteína objetivo mediante una concentración final de IPTG 0,1 mM cuando la OD600 alcanzaba 0,5. Después de eso, se dejó crecer a 16°C durante 24 h. Las células de *E. coli* se recogieron y se rompieron en un tampón que contenía tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 8,0, cloruro de sodio 300 mM e imidazol 10 mM mediante un microfluidizador. Se centrifugaron las células a 10000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Después, se vertió el sobrenadante en la agarosa Ni-NTA equilibrada y se descartó el precipitado. La proteína unida se eluyó en el mismo tampón pero que contenía mayor concentración de imidazol (250 mM). La concentración de proteína se determinó mediante Qubit Protein Quantitation (Invitrogen, CA) y la pureza se confirmó mediante SDS-PAGE.

Tabla 5. Cebadores utilizados para expresiones de sialidasa en *E. coli.*

SEQ ID NO	**Cebador** [a]	**Secuencia (5'→3')**	**Sitio de la enzima de restricción**	**Fuente genética del genoma o conjunto de cDNA**
SEQ ID NO: 1	*galK-F*	CTGTATTTTCAGGGA**GCGATCGC**TATGAGTCTGAAAGAAA AAACA[b]	AsiSI	*E. coli* MG1655 ATCC 700926
SEQ ID NO: 2	*galK-R*	GCCTCGAGTCATTAC**GTTTAAAC**TCAGCACTGTCCTGCTC CTTG	PmeI	
SEQ ID NO: 3	*atusp-F*	CTGTATTTTCAGGGA**GCGATCGC**TATGGCTTCTACGGTTG ATTC	AsiSI	Conjunto de cDNA de Arabidopsis thaliana
SEQ ID NO: 4	*atusp-R*	GCCTCGAGTCATTAC**GTTTAAAC**TCAATCTTCAACAGAAA ATTTGC	PmeI	
SEQ ID NO: 5	*lgtC*-F[b]	GATATA**CCATGG**AAATGGACATCGTTTTCGCGGCG	NcoI	Optimización del gen
SEQ ID NO: 6	*lgtC*-R[b]	GTGGTG**CTCGAG**GTAGATTTTACGCAGGAAACG	XhoI	
SEQ ID NO: 7	*nahK-F*	CTGTATTTTCAGGGAGCGATCGCTATGAACAAGACTTATGA TTTTAAAAG	AsiSI	*Bifidobacterium longum* ATCC 15697
SEQ ID NO: 8	*nahK-R*	GCCTCGAGTCATTACGTTTAAACTTAAATGTATGAATATACT ATCTTC	PmeI	
SEQ ID NO: 9	*glmU*-F	CTGTATTTTCAGGGA**GCGATCGC**TATGTTGAATAATGCTAT GAGC	AsiSI	*E. coli* MG1655 ATCC 700926
SEQ ID NO: 10	*glmU*-R	GCCTCGAGTCATTAC**GTTTAAAC**TCACTTTTTCTTTACCGG ACG	PmeI	
SEQ ID NO: 11	*lgtD*-F[b]	GATATA**CCATGG**AAAACTGCCCGCTGGTTTCT	NcoI	Optimización del gen
SEQ ID NO: 12	*lgtD*-R[b]	GTGGTG**CTCGAG**GAAGATAACGTTGATTTTACGG	XhoI	

SEQ ID NO: 13	*fkp*-F	CAGGGA**GCGATCGC**TATGCAAAAACTACTATCTTTA	AsiSI	Bacteroides fragilis 9343 ATCC 25285
SEQ ID NO: 14	*fkp*-R	CATTAC**GTTTAAAC**TTATGATCGTGATACTTGGAA	PmeI	
SEQ ID NO: 15	*futC*-F[b]	CTGTATTTTCAGGGA**GCGATCGC**TATGGCGTTCAAAGTTG TTCAG	AsiSI	Optimización del gen
SEQ ID NO: 16	*futC*-R[b]	GCCTCGAGTCATTAC**GTTTAAAC**TTACGCGTTGTATTTCTG AGAT	PmeI	
SEQ ID NO: 17	*cmk-F*	CAGGGA**GCGATCGC**TATGACGGCAATTGCCCCGGTT	AsiSI	*E. coli* MG1655 ATCC 700926
SEQ ID NO: 18	*cmk-R*	CATTAC**GTTTAAAC**TTATGCGAGAGCCAATTTCTG	PmeI	
SEQ ID NO: 19	CSS-F	GATATA**CCATGG**AAACAAATATTGCGATCATTCCTG	NcoI	Pasteurella multocida 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	Optimización del gen
SEQ ID NO: 22	*jt-faj-16*-R[b]	GTGGTG**CTCGAG**GATGTCAGAGATCAGTTTGATG	XhoI	
SEQ ID NO: 23	*pykF-F*	CTGTATTTTCAGGGA**GCGATCGC**TATGAAAAAGACCAAA ATTGTTTG	AsiSI	*E. coli* MG1655 ATCC 700926
SEQ ID NO: 24	*pykF*-R	GCCTCGAGTCATTAC**GTTTAAAC**TTACAGGACGTGAACAG ATG	PmeI	
SEQ ID NO: 25	*ppa*-F	CAGGGA**GCGATCGC**TATGAGCTTACTCAACGTCCCT	AsiSI	*E. coli* MG1655 ATCC 700926
SEQ ID NO: 26	*ppa*-R	CATTAC**GTTTAAAC**TTATTTATTCTTTGCGCGCTC	PmeI	

[a] Un par de cebadores para reacciones de PCR directa (F) e inversa (R) para amplificar la secuencia codificante de cada gen.

[b] El subrayado con negrita significa el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción.

[C] Optimización de codones para *E. coli.* Véase, por ejemplo, Puigbò et al., Nucleic Acids Research (2007) 35(S2):W126-W130.

Ensayo enzimático

Para mantener condiciones de ensayo constantes, toda la actividad se midió a 37°C con $MgCl_2$ 10 mM, Tris 100 mM, y a un pH de 7,5.

(i) Medición de la actividad de galactoquinasa (GalK), N-acetilhexosamina quinasa (NahK), fucoquinasa (FKP) y citidina monofosfato quinasa (CMK)

El método de ensayo fluorométrico se basó en el seguimiento de la producción de ADP (consumo de ATP) mediante el uso del ensayo enzimático acoplado piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa para el consumo de NADH. Véase, por ejemplo, Murray et al., "Mechanism of Human α-1,3-Fucosyltransferase V: Glycosidic Cleavage Occurs Prior to Nucleophilic Attack" Biochemistry (1997) 36:823-831; y Gosselin et al., "A Continuous Spectrophotometric Assay for Glycosyltransferases" Analytical Biochemistry (1994) 220:92-97. La propiedad de fluorescencia del NADH tiene una longitud de onda de excitación de 340 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm. Se prepararon 100 µL de una mezcla de reacción que contenía la enzima de acoplamiento (5 unidades de piruvato quinasa y 7 unidades de láctico deshidrogenasa de músculo de conejo) y sustratos y cofactores (NADH 0,2 mM, PEP 0,8 mM, $MgCl_2$ 10 mM) en Tris 100 mM (pH 7,5). Las reacciones se iniciaron mediante la adición del azúcar respectivo. Los parámetros cinéticos, k_{cat} y k_m se calcularon ajustando la curva de los datos experimentales con la ecuación teórica, utilizando Grafit versión 7 (Erithacus Software, Middlesex, UK). Una unidad de actividad de azúcar quinasa se define como 1 umol de formación de azúcar-1-P por minuto a 25°C.

(ii) Medición de la actividad de UDP-azúcar pirofosforilasa (AtUSP), N-acetil glucosamina-1-fosfato uridiltransferasa (GlmU), GDP-L-fucosa pirofosforilasa (FKP) y CMP-ácido siálico sintetasas (CSS)

La producción de pirofosfato se midió utilizando el kit de ensayo de EnzCheck pirofosfato (Invitrogen, CA, EE. UU.). Componentes del ensayo que incluyen: ribonucleósido de 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina 200 uM, 1 unidad de nucleósido fosforilasa, 0,03 unidades de pirofosfatasa inorgánica, $MgCl_2$ 10 mM, Tris 50 mM, pH 7,5 a escala de 100 uL en microplacas UV-Star (Greiner Bio One, Alemania). Todos los componentes excepto FKP se mezclaron en las microplacas y se dejaron equilibrar hasta que se logró una línea base plana. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de la enzima. Una unidad de actividad enzimática se define como la producción de 1 umol de azúcar de nucleótido a partir del respectivo azúcar-1-Ps por minuto a 25°C, excepto para la CMP-ácido siálico sintetasa, que se define como 1 umol de formación de pirofosfato por minuto a 25°C.

(iii) Medición de glicosiltransferasa: α-1,4-galactosiltransferasa (LgtC), β1, 3-N-acetilgalactosaminiltransferasa (β1,3GalNAcT, LgtD), β-1,3-galactosiltransferasa (LgtD), α-1,2-fucosiltransferasa (FutC) y α-2,3-sialiltransferasa (JT-FAJ-16).

El método de ensayo fluorométrico monitoreó la producción de UDP, GDP o CDP utilizando el ensayo enzimático acoplado de piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa para el consumo de NADH. Véase, por ejemplo, Murray et al., "Mechanism of Human α-1,3-Fucosyltransferase V: Glycosidic Cleavage Occurs Prior to Nucleophilic Attack" Biochemistry (1997) 36:823-831; y Gosselin et al., "A Continuous Spectrophotometric Assay for Glycosyltransferases" Analytical Biochemistry (1994) 220:92-97. Los componentes del ensayo, excepto el azúcar de nucleótido, se incubaron simultáneamente en el fluorómetro de placas múltiples (SpectraMax M2 Readers, Molecular Devices) a 25°C. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del azúcar de nucleótido correspondiente. Los parámetros cinéticos, k_{cat} y k_m se calcularon ajustando la curva de los datos experimentales con la ecuación teórica, utilizando Grafit versión 7 (Erithacus Software, Middlesex, UK). Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que cataliza la transferencia de 1umol de azúcar desde el azúcar de nucleótido respectivo al aceptor por minuto a 25°C.

(iv) Medición de piruvato quinasa (PyrK)

El ensayo de piruvato quinasa se modificó ligeramente a partir de la medición de azúcar quinasa mencionada anteriormente, también basado en el consumo de NADH. Se preparan 100 µL de mezcla de reacción que contiene ADP 0,8 mM, PEP 0,8 mM, NADH 0,2 mM, $MgCl_2$ 10 mM y 5 unidades de láctico deshidrogenasa de músculo de conejo en Tris 100 mM (pH 7,5) en multiplacas negras. El NADH tiene una longitud de onda de excitación de 340 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm. La reacción se inicia mediante la adición de una cantidad adecuada de piruvato quinasa recombinante de *E. coli*. Una unidad de piruvato quinasa se define como la conversión de 1,0 µmol de fosfo(enol)piruvato en piruvato por minuto a 25°C.

(v) Medición de pirofosfatasa (PPA)

El ensayo de pirofosfatasa está ligeramente modificado del protocolo de piroforilasa del kit comercial EnzCheck Pyrofosfato Assay Kit (Invitrogen, CA, USA). Componentes del ensayo que incluyen: pirofosfato 1 mM, ribonucleósido de 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina 200 uM, 1 unidad de nucleósido fosforilasa, $MgCl_2$ 10 mM, Tris 50 mM, a un pH de 7,5 a una escala de 100 uL en microplacas UV-Star (Greiner Bio One, Alemania) con una cantidad adecuada de pirofosfatasa recombinante de *E. coli*. Una unidad de actividad de pirofosfatasa se define como la liberación de 1,0 µmol de pirofosfato inorgánico por minuto a 25°C.

(vi) Medición del pH óptimo

El pH óptimo para la actividad enzimática se determinó en el ensayo enzimático estándar mencionado anteriormente en el intervalo de pH de 4,0 a 10,0, incluyendo tampón acetato de sodio, MES, MOPS, HEPES, Tris-HCl y CHES. El pH del tampón se ajustó a la temperatura de incubación. Todas las reacciones se realizaron por triplicado para la evaluación estadística.

(vii) Medición del ion metálico divalente óptimo

El ensayo para determinar los requisitos de metal se realizó en condiciones de ensayo estándar. Las enzimas se mezclaron con iones metálicos (Mg^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}+Mn^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, o Ni^{2+}) en una concentración final de 10 mM, en presencia y ausencia de EDTA. Todas las reacciones se realizaron por triplicado para la evaluación estadística.

(viii) Medición de la temperatura óptima

El efecto de la temperatura sobre la actividad de las enzimas se determinó incubando una cantidad adecuada de enzima purificada en tampón MOPS (pH 7,0), $MgCl_2$ 10 mM y sustratos respectivos. Para mantener el ensayo consistente, todos los componentes se mezclaron bien y se precalentaron a la temperatura del ensayo durante 5 minutos, y la reacción se inició añadiendo la enzima y se registró mediante lectores de placas multimodo (SpectraMax M5, Molecular Devices) a temperatura constante. La temperatura osciló entre 20 y 60°C. Todas las reacciones se realizaron por triplicado para la evaluación estadística.

Composición enzimática

Regeneración/galactosilación de UDP-Gal

1. GalK: galactoquinasa, de *E. coli*
2. AtUSP: UDP-azúcar pirofosforilasa de *Arabidopsis thaliana*
3. LgtC: α1,4galactsiltransferasa, de *Neisseria meningitidis,* pero la optimización de codones para *E. coli*
4. PykF: piruvato quinasa, de *E. coli*
5. PPA: pirofosfatasa, de *E. coli*

La secuencia codificante de la enzima LgtC optimizada con codones se proporciona a continuación (SEQ ID NO: 27):

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

Regeneración/acetilgalactosaminación de UDP-GalNAc

1. GalNAcK: N-Acetilhexosamina 1-quinasas, de *B. longum*
2. GlmU: N-acetilglucosamina 1-fosfato uridililtransferasa de *E. coli*
3. LgtD: β1,3galactosiltransferasa, de *Haemophilus influenza,* pero la optimización de codones para *E. coli*
4. PykF: piruvato quinasa, de *E. coli*
5. PPA: pirofosfatasa, de *E. coli*

La secuencia codificante de la enzima LgtD optimizada con codones se proporciona a continuación (SEQ ID NO: 28):

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

Regeneración/fucosilación de GDP-FKP

1. FKP: L-fucoquinasa/GDP-fucosa pirofosforilasa, de *Bacteroides fragilis*

2. FutC: α1,2fucosiltransferasa, de *Helicobacter pylori,* pero la optimización de codones para *E. coli*

3. PykF: piruvato quinasa, de *E. coli*

4. PPA: pirofosfatasa, de *E. coli*

La secuencia codificante de la enzima FutC optimizada con codones se proporciona a continuación (SEQ ID NO: 29):

ATGGCGTTCAAAGTTGTTCAGATCTGCGGTGGTCTGGGTAACCAGATGTTCCAGTACGCGTTCGCGAA
ATCTCTGCAGAAACACTCTAACACCCCGGTTCTGCTGGACATCACCTCTTTCGACTGGTCTGACCGTA
AAATGCAGCTGGAACTGTTCCCGATCGACCTGCCGTACGCGTCTGCGAAAGAAATCGCGATCGCGAAA

ATGCAGCACCTGCCGAAACTGGTTCGTGACGCGCTGAAATGCATGGGTTTCGACCGTGTTTCTCAGGA
AATCGTTTTCGAATACGAACCGAAACTGCTGAAACCGTCTCGTCTGACCTACTTCTTCGGTTACTTCC
AGGACCCGCGTTACTTCGACGCGATCTCTCCGCTGATCAAACAGACCTTCACCCTGCCGCCGCCGCCG
GAAAACAACAAAAACAACAACAAAAAAGAAGAAGAATACCAGTGCAAACTGTCTCTGATCCTGGCGGC
GAAAAACTCTGTTTTCGTTCACATCCGTCGTGGTGACTACGTTGGTATCGGTTGCCAGCTGGGTATCG
ACTACCAGAAAAAAGCGCTGGAATACATGGCGAAACGTGTTCCGAACATGGAACTGTTCGTTTTCTGC
GAAGACCTGGAATTCACCCAGAACCTGGACCTGGGTTACCCGTTCATGGACATGACCACCCGTGACAA
AGAAGAAGAAGCGTACTGGGACATGCTGCTGATGCAGTCTTGCCAGCACGGTATCATCGCGAACTCTA
CCTACTCTTGGTGGGCGGCGTACCTGATCGAAAACCCGGAAAAAATCATCATCGGTCCGAAACACTGG
CTGTTCGGTCACGAAAACATCCTGTGCAAAGAATGGGTTAAAATCGAATCTCACTTCGAAGTTAAATC
TCAGAAATACAACGCGTAA

Regeneración/Sialilación de CMP-Neu5Ac

1. CMK: Citidina monofosfato quinasa, de *E. coli*

2. Css: CMP-ácido siálico sintetasa, de *Pasteurella multocida*

3. JT-FAJ-16: α2,3sialiltransferasa, de *marine bacteria,* pero la optimización de codones para *E. coli*

4. PykF: piruvato quinasa, de *E. coli*

5. PPA: pirofosfatasa, de *E. coli*

La secuencia codificante de la enzima JT-FAJ-16 optimizada con codones se proporciona a continuación (SEQ ID NO: 30):

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

Materiales y productos químicos

Todos los nucleótidos, azúcares, azúcares de nucleótidos y productos químicos se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La enzima de restricción y DNA ligasa T4 se adquirieron de NEB (Beverly, MA). El cebador se encargó a Proligo Singapore Pte Ltd (Singapur). Ni-NTA Agarosa se obtuvo de Qiagen (Santa Clarita, CA). El gel Bio-Gel P2 se adquirió de Bio-Rad (Hercules, CA). Los plásmidos pET28a, pET47b y las placas de TLC de vidrio pre-recubiertas cubiertas con gel de sílice 60, F254 con un espesor de capa de 0,25 mm se adquirieron de EMD Chemicals Inc (Carlsbad, CA) y se adquirieron de EMD Chemicals Inc (Carlsbad, CA). Las células competentes ArcticExpress/RII se obtuvieron de Agilent Genomics (La Jolla, CA). Todos los demás materiales no mencionados anteriormente se compraron con la mayor calidad posible.

Todas las reacciones se controlaron mediante cromatografía en capa fina. (fase móvil: Butanol:acetato:agua = 5:3:2). Tinción de la TLC mediante p-anisaldehído.

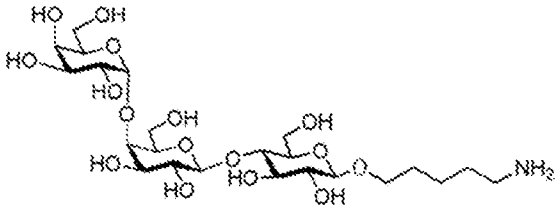
Síntesis de alil-Lac

La síntesis de diferentes lactosas con enlazador se siguió mediante el método reportado en la bibliografía [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^+) $C_{15}H_{26}O_{11}Na^+$ calculado para 405,1367, encontrado 405,1346.

Producción a gran escala de Gb3 con enlazador.

5 mmol de lactosa con enlazador, 5 mmol de galactosa, 12 mmol de ácido fosfoenolpirúvico (PEP), 0,25 mmol de ATP, 0,25 mmol de UTP y $MgCl_2$ 10mM se añadieron a una solución de tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7,5). La reacción se inició añadiendo una cantidad adecuada de α-1,4-galactosiltransferasa (LgtC), galactoquinasa (GalK), UDP-azúcar pirofosforilasa (AtUSP), piruvato quinasa (PK) y pirofosfatasa (PPA). El matraz se colocó en una incubadora a 16 ~ 50°C con agitación suave. La reacción se siguió por TLC. Se añaden más enzimas si la reacción se detiene. La reacción se para cuando no se observa más material de partida mediante TLC. El producto Gb3 se aisló mediante una columna ^{18}C de fase reversa con un rendimiento del 99 %.

Alil-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^+) $C_{21}H_{36}O_{16}Na^+$ calculado para 567,1896, encontrado 567,1858.



5-aminopentil-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.

Producción a gran escala de Gb4 con enlazador.

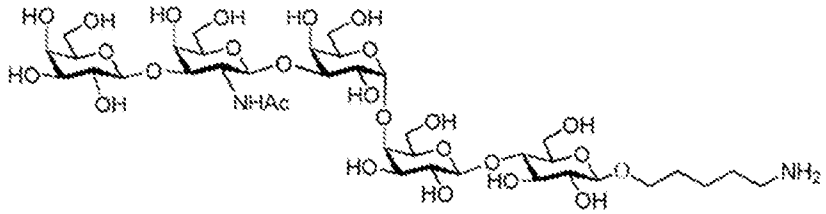
5 mmol de Gb3 con enlazador, 5 mmol de N-acetilgalactosamina (GalNAc), 12 mmol de ácido fosfoenolpirúvico (PEP), 0,25 mmol de ATP, 0,25 mmol de UTP y $MgCl_2$ 10 mM se añadieron a una solución tampón de Tris-HCl 100 mM (pH 7,5). La reacción se inició añadiendo una cantidad adecuada de β-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa (LgtD), N-acetilhexosamina 1-quinasa (NahK), N-acetilglucosamina 1-fosfato uridililtransferasa (GlmU), piruvato quinasa (PK) y pirofosfatasa. (PPA). El matraz se colocó en una incubadora a 16 ~ 50°C con agitación suave. La reacción se siguió por TLC. Se añaden más enzimas si la reacción se detiene. La reacción se para cuando no se observa más material de partida mediante TLC. El producto Gb4 se aisló mediante una columna ^{18}C de fase reversa con un rendimiento del 96 %.

Alil-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)$^+$) $C_{29}H_{49}NO_{21}Na^+$ calculado para 770,2689, encontrado 770,2654.

Producción a gran escala de Gb5 con enlazador.

5 mmol de alil-Gb4, 5 mmol de galactosa, 12 mmol de ácido fosfoenolpirúvico (PEP), 0,25 mmol de ATP, 0,25 mmol de UTP con $MgCl_2$ 10 mM se añadieron en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7,5). La reacción se inició añadiendo una cantidad adecuada de β-1,3-galactosiltransferasa, galactoquinasa (GalK), UDP-azúcar pirofosforilasa (AtUSP), piruvato quinasa (PK) y pirofosfatasa (PPA). El matraz se colocó en una incubadora a 16 ~ 50 °C con agitación suave. La reacción se siguió por TLC. Se añaden más enzimas si la reacción se detiene. La reacción se para cuando no se observa más material de partida mediante TLC. El producto Gb5 se purificó mediante una columna C^{18} de fase reversa con un rendimiento del 95 %.

Alil-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$^+$) $C_{35}H_{59}NO_{26}Na^+$ calculado para 932,3218, encontrado 932,3235.



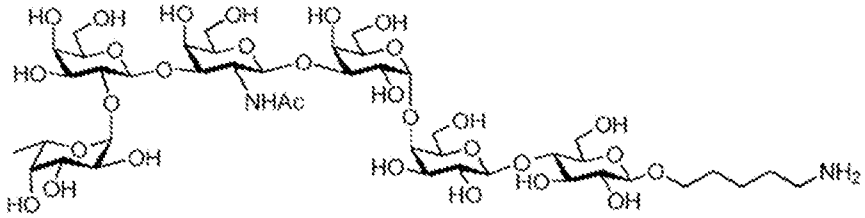
5-aminopentil-Gb5

^{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]$^+$ calculado 955,3904; encontrado 955,3972

Producción a gran escala de Globo H con enlazador

5 mmol de Gb5 con enlazador, 5 mmol de fucosa, 12 mmol de ácido fosfoenolpirúvico (PEP), 0,25 mmol de ATP, 0,25 mmol de GTP con $MgCl_2$ 10 mM se añadieron en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7,5). La reacción se inició mediante la adición de una cantidad adecuada de α-1,2-fucosiltransferasa, L-fucoquinasa/GDP-fucosa pirofosforilasa (FKP), piruvato quinasa (PK) y pirofosfatasa (PPA). El matraz se colocó en una incubadora a 16 ~ 50 °C con agitación suave. La reacción se siguió por TLC. Se añaden más enzimas si la reacción se detiene. La reacción se para cuando no se observa más material de partida mediante TLC. El producto Globo H se purificó mediante una columna ^{18}C de fase reversa con un rendimiento del 94 %.

Alil-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^+) $C_{41}H_{70}NO_{30}Na^+$ calculado para 1079,3875, encontrado 1078,4145.



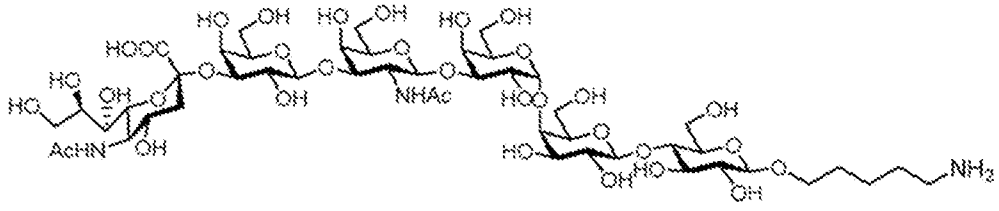
5-aminopentil-Globo H

^{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: $C_{43}H_{76}N_2O_{30}$ $[M+Na]^+$ calculado 1123,4381, encontrado 1123,4385

Producción a gran escala de SSEA4 con enlazador.

5 mmol de Gb5 con enlazador, 5 mmol de fucosa, 12 mmol de ácido fosfoenolpirúvico (PEP), 0,25 mmol de ATP, 0,25 mmol de CTP con $MgCl_2$ 10 mM se añadieron en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7,5). La reacción se inició mediante la adición de una cantidad adecuada de α-2,3-sialiltransferasa, citidina monofosfato quinasa (CMK), CMP-ácido siálico sintetasa (CSS), piruvato quinasa (PK) y pirofosfatasa (PPA). El matraz se colocó en una incubadora a 16 ~ 50°C con agitación suave. La reacción se siguió por TLC. Se añaden más enzimas si la reacción se detiene. La reacción se para cuando no se observa más material de partida mediante TLC. El producto SSEA4 se aisló mediante una columna ^{18}C de fase reversa con un rendimiento del 45 %.

Alil-$SSEA_4$: ^{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) $C_{46}H_{75}N_2O_{34}^-$ calculado para 1199,4196, encontrado 1199,4208.



5-aminopentil-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, *J* = 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^+) calculado para $C_{48}H_{83}N_3O_{34}Na$ 1268,4756, encontrado 1268,4760.

Tabla 6. Composición básica de glicoesfingolípidos

	Gal	Glc	GalNAc	GlcNAc	Neu5Ac	Fuc
Globoseries						
Globotetraosa (Gb4)	2	1	1	0	0	0
Globopentaosa (Gb5)	3	1	1	0	0	0
Globo H (Fucosil-Gb5)	3	1	1	0	0	1
SSEA4 (Sialil-Gb5)	3	1	1	0	1	0
Isoglobotetraosa	2	1	1	0	0	0
Neolactoseries	2	1	0	1	1	0
Lactoseries	2	1	0	1	1	0
Ganglioseries	2	1	1	0	2	0

Tabla 7. Rendimientos de cada etapa de glicosilación con regeneración

	Enzima implicada	Producto	Rendimiento
Etapa 1.	GalK, AtUSP, PykF, PPA, LgtC*	alil-Gb3	99%
Etapa 2.	NahK, GlmU, PykF, PPA, LgtD*	alil-Gb4	96%
Etapa 3.	GalK, AtUSP, PykF, PPA, LgtD*	alil-Gb5	95%**
Etapa 4a.	FKP, PykF, PPA, FutC*	alil-Globo H	94%
Etapa 4b.	CSS, CMK, PykF, PPA, JT-FAJ-16*	alil-SSEA4	45%

* Las secuencias de DNA se optimizaron para la expresión de *E. coli*.
** Cuando se utiliza alil-Gb4 puro como un aceptor.

<u>Ejemplo 2:</u> Síntesis en una sola etapa de Alil-Gb5 (SSEA3) a partir de Alil-lactosa

Allyl-Gb5 se sintetizó a partir de allyl-lac mediante una reacción en cadena de una sola etapa como se muestra en la Figura 6, sin purificar ninguno de los intermedios.

Se mezclaron en un matraz 5 mmol de Allyl-lac, 5 mmol de galactosa, 12 mmol de PEP, 0,25 mmol de ATP, 0,25 mmol de UTP con $MgCl_2$ 10 mM en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7,5). La reacción enzimática se inició añadiendo al matraz una α1,4-galactosiltransferasa (LgtC), GalK, AtUSP, PK y PPA adecuadas para sintetizar alil-Gb3. El matraz que contenía la mezcla de reacción se colocó en una incubadora a 16 ~ 50°C agitando suavemente. Se realizó un análisis por TLC para controlar el proceso de síntesis. Si no se observa ninguna síntesis adicional de alil-Gb3, se añadieron enzimas adicionales.

Después de la síntesis de alil-Gb3, otro conjunto de componentes, que incluye 5 mmol de GalNAc, 12 mmol de PEP y una cantidad adecuada de N-acetilhexosamina 1-quinasa (NahK-CP), N-acetilglucosamina 1-fosfato uridililtransferasa (GlmU), PK, PPA y β 1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa (LgtD) se añadieron al matraz. La mezcla de reacción así formada se incubó en las mismas condiciones en las que se sintetizó alil-Gb3. Si no se observa ninguna síntesis adicional de alil-Gb4, se pueden añadir cantidades adicionales de las enzimas.

Después de la síntesis de alil-Gb4, se añadieron al matraz 5 mmol de galactosa y 12 mmol de PEP sin purificar el alil-Gb4. La siguiente reacción de galactosilación se inició añadiendo β1,3-galactosiltransferasa (LgtD), GalK, AtUSP, PK y PPA adecuadas para sintetizar alil-Gb5. El matraz que contenía la mezcla de reacción se colocó en una incubadora a 16 ~ 50°C agitando suavemente. Se realizó TLC para controlar el proceso de síntesis. Se pueden añadir cantidades

adicionales de enzimas si no se observa ninguna síntesis adicional de alil-Gb5. El rendimiento de esta síntesis de alil-Gb5 en una sola etapa a partir de alil-lac es aproximadamente del 40%.

Referencias

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.

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 StageSpecific 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 S'-diphosphate glucose and uridine S'-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 UDPgalactosamine. 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.

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 Xglycan 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.

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.

45. Oris M. Su, et al., Enzymatic Synthesis of Tumor-Associated Carbohydrate Antigen Globo-HHexasaccharide. Organic Letters, 2008. 10(5): p. 1009-1012.

46. Musleh M. Muthana, et al., Efficient one-pot multienzyme synthesis of UDP-sugars using a promiscuous UDPsugar pyrophosphorylase from Bifidobacterium longum (BLUSP). Chemical Communications-Chemcom, 2012. 48(21):2728-2730.

REIVINDICACIONES

1. Un método para sintetizar enzimáticamente un oligosacárido, que comprende:

(i) producir UDP-Gal a partir de galactosa en presencia de un conjunto de enzimas de regeneración de UDP-Gal, galactosa, UTP, PEP y ATP, en donde el conjunto de enzimas de regeneración de UDP-Gal comprende una galactoquinasa, una UDP-azúcar pirofosforilasa, una piruvato quinasa y opcionalmente pirofosfatasa;

(ii) convertir lactosa-OR^{1A} (Lac-OR^{1A}) en Globotriosa-OR^{1A} (Gb3-OR^{1A}) en presencia de UDP-Gal y una alfa-1,4 galactosiltransferasa, en donde R^{1A} es hidrógeno, alilo, alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, carbociclilo sustituido o no sustituido, heterociclilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, un grupo protector de oxígeno, biotina o ceramida;

(iii) convertir el Gb3-OR^{1A} en globotetraosa-OR^{1A} (Gb4-OR^{1A}) en presencia de UDP-GalNAc y una beta-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa; y

(iv) convertir el Gb4-OR^{1A} en Globopentaosa-OR^{1A} (Gb5-OR^{1A}) en presencia de UDP-Gal y una beta-1,3-galactosiltransferasa.

2. El método de la reivindicación 1, en donde (i) y (ii) ocurren en una mezcla de reacción de síntesis de Gb3 que comprende la galactosa, la PEP, el ATP, la UTP, la Lac-OR^{1A}, la alfa-1,4-galactosiltransferasa y el conjunto de enzimas de regeneración de UDP-Gal, en donde, antes de que se produzca cualquier reacción enzimática, la relación molar de Lac-OR^{1A} y galactosa en la mezcla de reacción de síntesis de Gb3 es 1:1.

3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la alfa-1,4 galactosiltransferasa es LgtC de *N. meningitides,* la galactoquinasa es de *E. coli,* la UDP-azúcar pirofosforilasa es de *A. thaliana,* la piruvato quinasa es de *E. coli,* o la pirofosfatasa es de *E. coli.*

4. El método de la reivindicación 1, que comprende además:

(v) producir la UDP-GalNAc a partir de GalNAc en presencia de un conjunto de enzimas de regeneración de UDP-GalNAc, en donde el conjunto de enzimas de regeneración de UDP-GalNAc comprende una N-acetilhexosamina 1-quinasa, una N-acetilglucosamina 1-fosfato uridiltransferasa, una piruvato quinasa y, opcionalmente, una pirofosfatasa, en donde (iii) y (v) se producen en una mezcla de reacción de síntesis de Gb4 que comprende GalNAc, PEP, ATP, UTP, el Gb3-OR^{1A}, la beta-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa y el conjunto de enzimas de regeneración de UDP-GalNAc,

en donde la mezcla de reacción de síntesis de Gb4 se prepara mezclando la mezcla de reacción de síntesis de Gb3 con al menos GalNAc, la beta-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa, la N-acetilhexosamina 1-quinasa y la N-acetilglucosamina 1-fosfato uridiltransferasa.

5. El método de la reivindicación 4, en donde la beta-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa es LgtD de *H. influenza,* la N-acetilhexosamina 1-quinasa es *de B. longum,* o la N-acetilglucosamina 1-fosfato uridiltransferasa es de *E. coli.*

6. El método de la reivindicación 1, en donde (iv) ocurre en una mezcla de reacción de síntesis de Gb5 que comprende galactosa, PEP, ATP, UTP, el Gb4-OR^{1A}, la beta-1,3-N-galactosiltransferasa y el conjunto de enzimas de regeneración de UDP-Gal, y en donde la beta-1,3-N-galactosiltransferasa es LgtD de *H. influenza.*

7. El método de la reivindicación 1, que comprende además aislar el Gb3-OR^{1A}, Gb4-OR^{1A} y Gb5-OR^{1A}.

8. El método de la reivindicación 1, que comprende además:

(vi) convertir el Gb5-OR^{1A} en fucosil-Gb5-OR^{1A} en presencia de GDP-Fuc y una alfa-1,2-fucosiltransferasa, que comprende además opcionalmente:

(vii) producir GDP-Fuc a partir de fucosa en presencia de un conjunto de enzimas de regeneración de GDP-Fuc, en donde el conjunto de enzimas de regeneración de GDP-Fuc comprende una L-fucoquinasa/GDP-fucosa pirofosforilasa, una piruvato quinasa y, opcionalmente, una pirofosfatasa,

en donde (vi) y (vii) ocurren en una mezcla de reacción de síntesis de Fucosil-Gb5 que comprende fucosa, ATP, GTP, PEP, Gb5-OR, la alfa-1,2-fucosiltransferasa y el conjunto de enzimas de regeneración de GDP-Fuc, en donde la mezcla de reacción de síntesis de Fucosil-Gb5 se prepara mezclando la mezcla de reacción de síntesis de Gb5 con al menos fucosa, GTP, la alfa 1,2-fucosiltransferasa y la L-fucoquinasa/GDP-fucosa pirofosforilasa.

9. El método de la reivindicación 8, que comprende además aislar el Fucosyl-Gb5-OR^{1A} y en donde la L-fucoquinasa/GDP-fucosa pirofosforilasa es de *B. fragilis,* o la alfa1,2-fucosiltransferasa es de *H. pylori.*

10. El método de la reivindicación 1, que comprende además:

(viii) convertir el Gb5-OR^{1A} en Sialil-Gb5-OR^{1A} en presencia de CMP-Neu5Ac y una alfa-2,3-sialiltransferasa, que comprende además opcionalmente:

(ix) producir la CMP-NeuSAc a partir de Neu5Ac en presencia de un conjunto de enzimas de regeneración de CMP-Neu5Ac, en donde el conjunto de enzimas de regeneración de CMP-Neu5Ac comprende una citidina monofosfato quinasa, una CMP-ácido siálico sintetasa, una piruvato quinasa, y opcionalmente una pirofosfatasa,

en donde (viii) y (ix) ocurren en una mezcla de reacción de síntesis de Sialil-Gb5 que comprende Neu5Ac, CTP, PEP, Gb5-OR^{1A}, la alfa-2,3-sialiltransferasa y el conjunto de enzimas de regeneración de CMP-Neu5Ac, en donde la mezcla de reacción de síntesis de Sialil-Gb5 se prepara mezclando la mezcla de reacción de síntesis de Gb5 con al menos Neu5Ac, CTP, la alfa-2 ,3-sialiltransferasa, la citidina monofosfato quinasa y la CMP-ácido siálico sintetasa.

11. El método de la reivindicación 10, que comprende además aislar el Sialil-Gb5-OR^{1A} y en donde la alfa-2,3-sialiltransferasa es de *M. bacteria,* la citidina monofosfato quinasa es de *E. coli,* o la CMP-ácido siálico sintetasa es de *P. Multocida.*

12. El método de la reivindicación 2, que comprende además:

(a) mezclar la mezcla de reacción de síntesis de Gb3 con al menos GalNAc, la beta-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa, la N-acetilhexosamina 1-quinasa y la N-acetilglucosamina 1-fosfato uridiltransferasa para formar una mezcla de reacción de síntesis de Gb4,

(b) incubar la mezcla de reacción de síntesis de Gb4 en condiciones que permitan la conversión de Gb3-OR^{1A} a Gb4-OR^{1A},

(c) incubar adicionalmente la mezcla de reacción de síntesis de Gb4 en presencia de una beta-1,3-galactosiltransferasa en condiciones que permitan la conversión de Gb4-OR^{1A} a Gb5-OR^{1A},

(d) mezclar la mezcla de reacción que contiene el Gb5-OR^{1A} producida en (c) con al menos fucosa, GTP, la alfa-1,2-fucosiltransferasa y la L-fucoquinasa/GDP-fucosa pirofosforilasa para formar una mezcla de reacción de Fucosil-Gb5-OR^{1A}; y

(e) incubar la mezcla de reacción de Fucosil-Gb5-OR^{1A} en condiciones que permitan la conversión del Gb5-OR^{1A} a Fucosil-Gb5-OR^{1A}.

13. El método de la reivindicación 2, que comprende además:

(a) mezclar la mezcla de reacción de síntesis de Gb3 con al menos GalNAc, la beta-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa, la N-acetilhexosamina 1-quinasa y la N-acetilglucosamina 1-fosfato uridiltransferasa para formar una mezcla de reacción de síntesis de Gb4,

(b) incubar la mezcla de reacción de síntesis de Gb4 en condiciones que permitan la conversión de Gb3-OR^{1A} a Gb4-OR^{1A};

(c) aislar el Gb4-OR^{1A};

(d) mezclar el Gb4-OR^{1A} con una beta-1,3-galactosiltransferasa y el conjunto de enzimas de regeneración de UDP-Gal para formar una mezcla de reacción de síntesis de Gb5;

(e) incubar la mezcla de reacción de síntesis de Gb5 en condiciones que permitan la conversión de Gb4-OR^{1A} a Gb5-OR^{1A},

(f) mezclar el Gb5-OR^{1A} con al menos fucosa, GTP, la alfa-1,2-fucosiltransferasa y la L-fucoquinasa/GDP-fucosa pirofosforilasa para formar una mezcla de reacción de Fucosil-Gb5-OR^{1A}; y

(g) incubar la mezcla de reacción de Fucosil-Gb5-OR^{1A} en condiciones que permitan la conversión del Gb5-OR^{1A} a Fucosil-Gb5-OR^{1A}.

14. El método de la reivindicación 2, que comprende además:

(a) mezclar la mezcla de reacción de síntesis de Gb3 con al menos GalNAc, la beta-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa, la N-acetilhexosamina 1-quinasa y la N-acetilglucosamina 1-fosfato uridiltransferasa para formar una mezcla de reacción de síntesis de Gb4,

(b) incubar la mezcla de reacción de síntesis de Gb4 en condiciones que permitan la conversión de Gb3-OR^{1A}

a Gb4-OR^{1A},

(c) incubar adicionalmente la mezcla de reacción de síntesis de Gb4 en presencia de una beta-1,3-galactosiltransferasa en condiciones que permitan la conversión del Gb4-OR^{1A} a Gb5-OR^{1A},

(d) mezclar la mezcla de reacción que contiene Gb5-OR^{1A} producida en (c) con al menos Neu5Ac, CTP, la alfa-2,3-sialiltransferasa, la citidina monofosfato quinasa y la CMP-ácido siálico sintetasa para formar una mezcla de reacción de Sialil-Gb5-OR^{1A}; y

(e) incubar la mezcla de reacción de Sialil-Gb5-OR^{1A} en condiciones que permitan la conversión del Gb5-OR^{1A} a Sialil-Gb5-OR^{1A}.

15. El método de la reivindicación 2, que comprende además:

(a) mezclar la mezcla de reacción de síntesis de Gb3 con al menos GalNAc, la beta-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa, la N-acetilhexosamina 1-quinasa y la N-acetilglucosamina 1-fosfato uridiltransferasa para formar una mezcla de reacción de síntesis de Gb4,

(b) incubar la mezcla de reacción de síntesis de Gb4 en condiciones que permitan la conversión de Gb3-OR^{1A} a Gb4-OR^{1A};

(c) aislar el Gb4-OR^{1A};

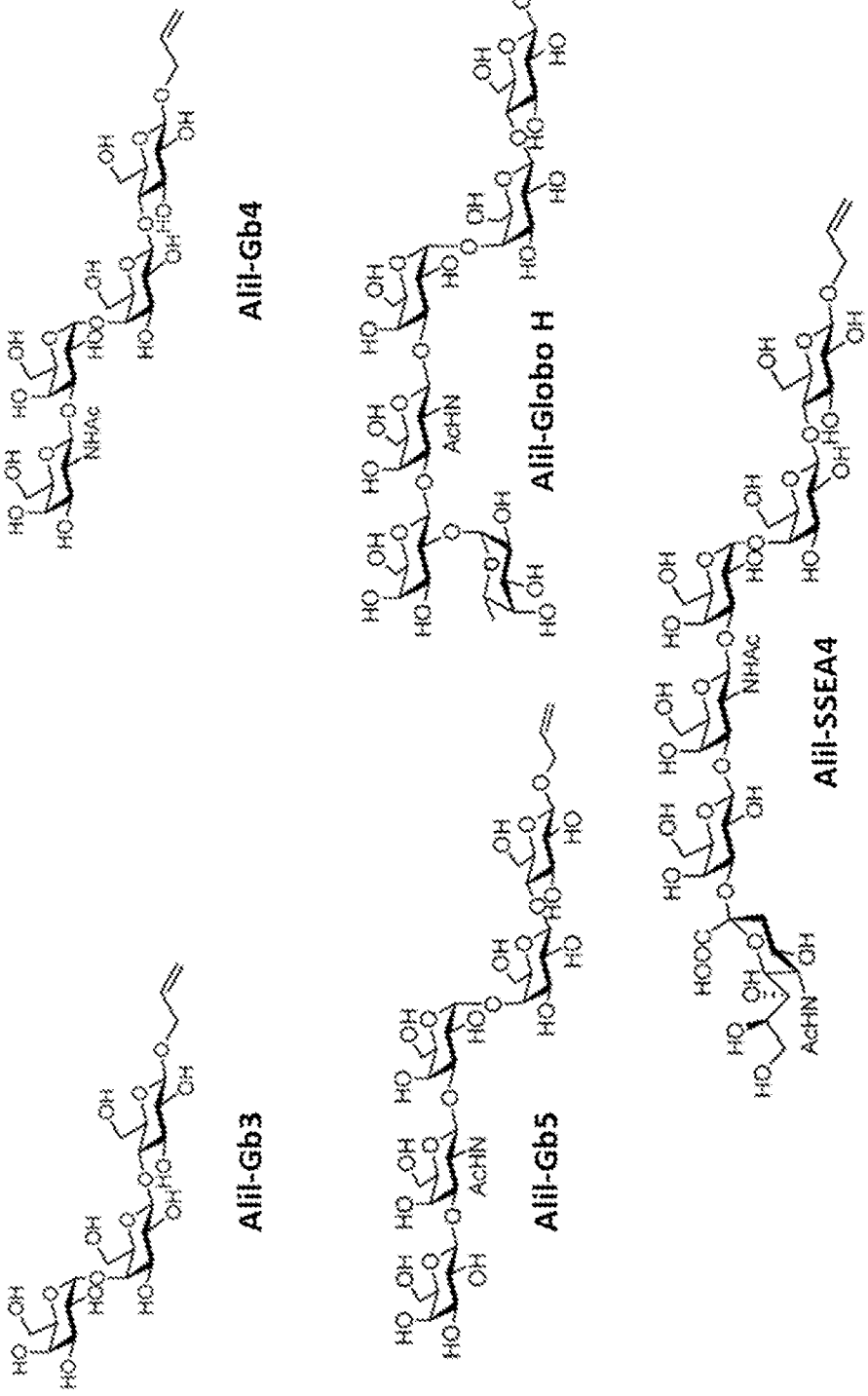
(d) mezclar el Gb4-OR^{1A} con una beta-1,3-galactosiltransferasa y el conjunto de enzimas de regeneración de UDP-Gal para formar una mezcla de reacción de síntesis de Gb5;

(e) incubar la mezcla de reacción de síntesis de Gb5 en condiciones que permitan la conversión del Gb4-OR^{1A} a Gb5-OR^{1A},

(f) mezclar el Gb5-OR^{1A} con una alfa-2,3 sialiltransferasa y un conjunto de enzimas de regeneración de CMP-Neu5Ac para formar una mezcla de reacción de síntesis de Sialil-Gb5, en donde el conjunto de enzimas de regeneración de CMP-Neu5Ac comprende una citidina monofosfato quinasa, una CMP-ácido siálico sintetasa, una piruvato quinasa y, opcionalmente, una pirofosfatasa; y

(g) incubar la mezcla de reacción de síntesis de Sialil-Gb5 en condiciones que permitan la conversión del Gb4-OR^{1A} a Sialil-Gb5-OR^{1A}.

Figura 1



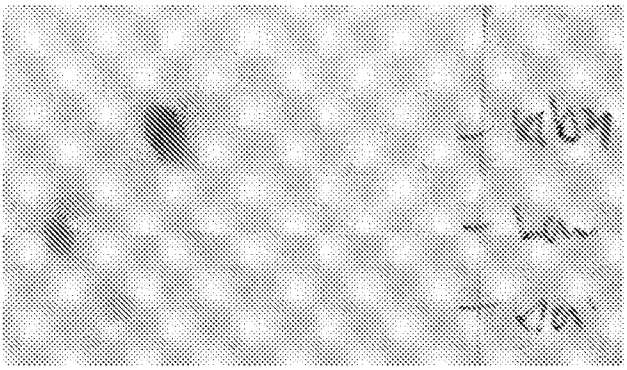

Alil-Gb3
Alil-Lac
Gal

Figura 2

A.

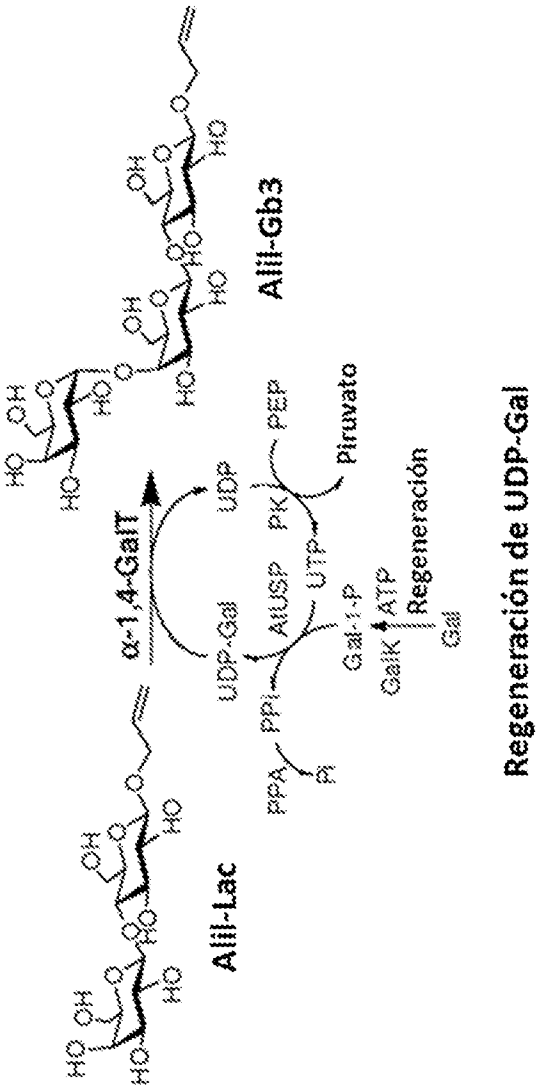
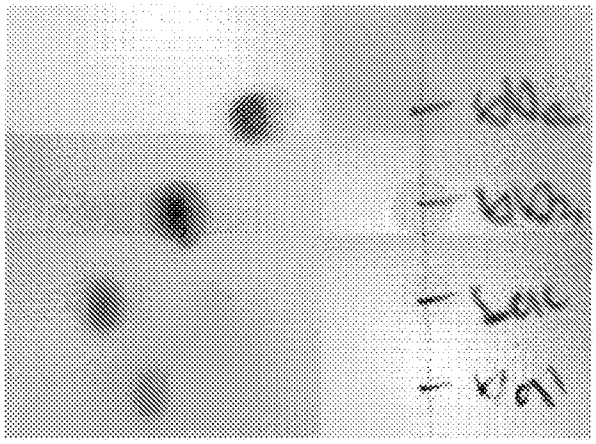

Alil-Lac
α-1,4-GalT
Alil-Gb3
UDP-Gal
UDP
AtUSP
PK
PEP
Piruvato
UTP
PPi
PPA
Pi
Gal-1-P
GalK
ATP
Regeneración
Gal
Regeneración de UDP-Gal

Figura 2


Allil-Gb4
Allil-Gb3
Allil-Lac
Gal

B.

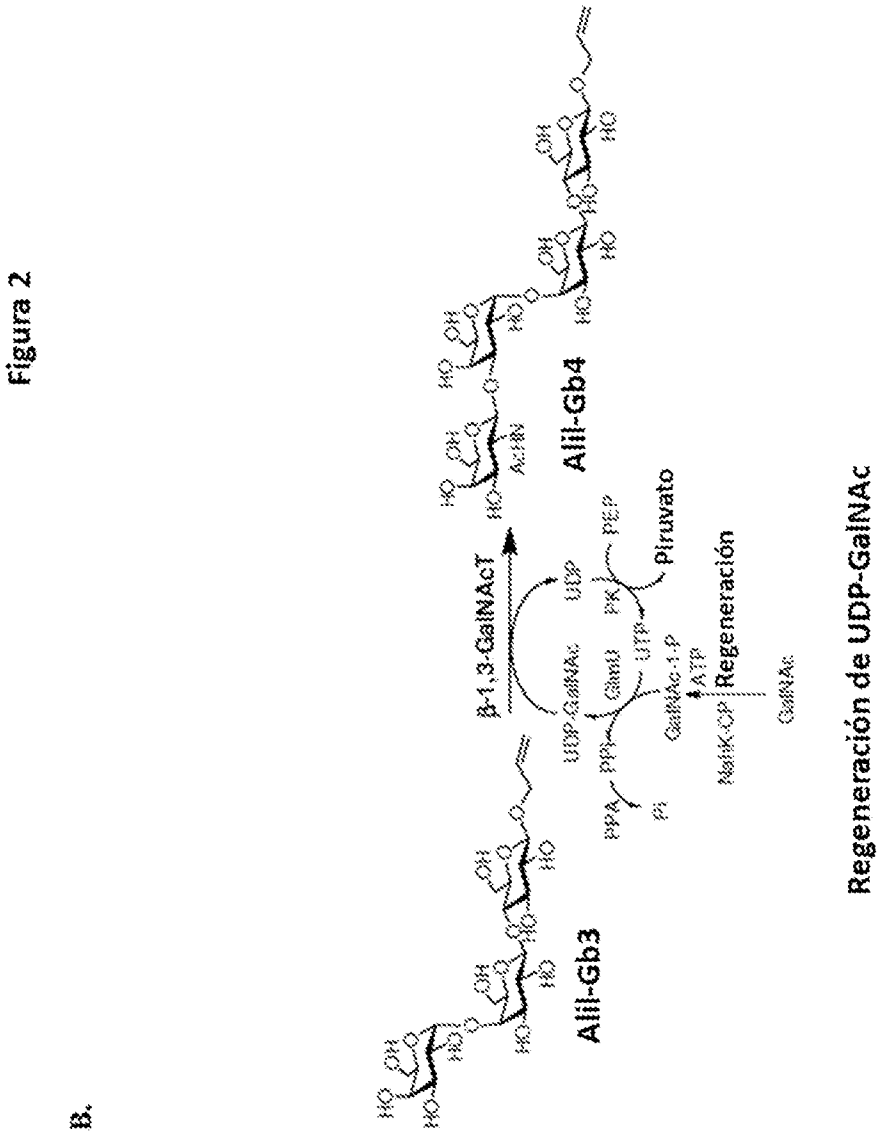

Allil-Gb3
β-1,3-GalNAcT
UDP-GalNAc
UDP
Allil-Gb4
PPA
PPi
Pi
GlmU
UTP
GalNAc-1-P
ATP
NahK/GP
PK
PEP
Piruvato
Regeneración
GalNAc
Regeneración de UDP-GalNAc

Figura 2 (Continuación)

C.

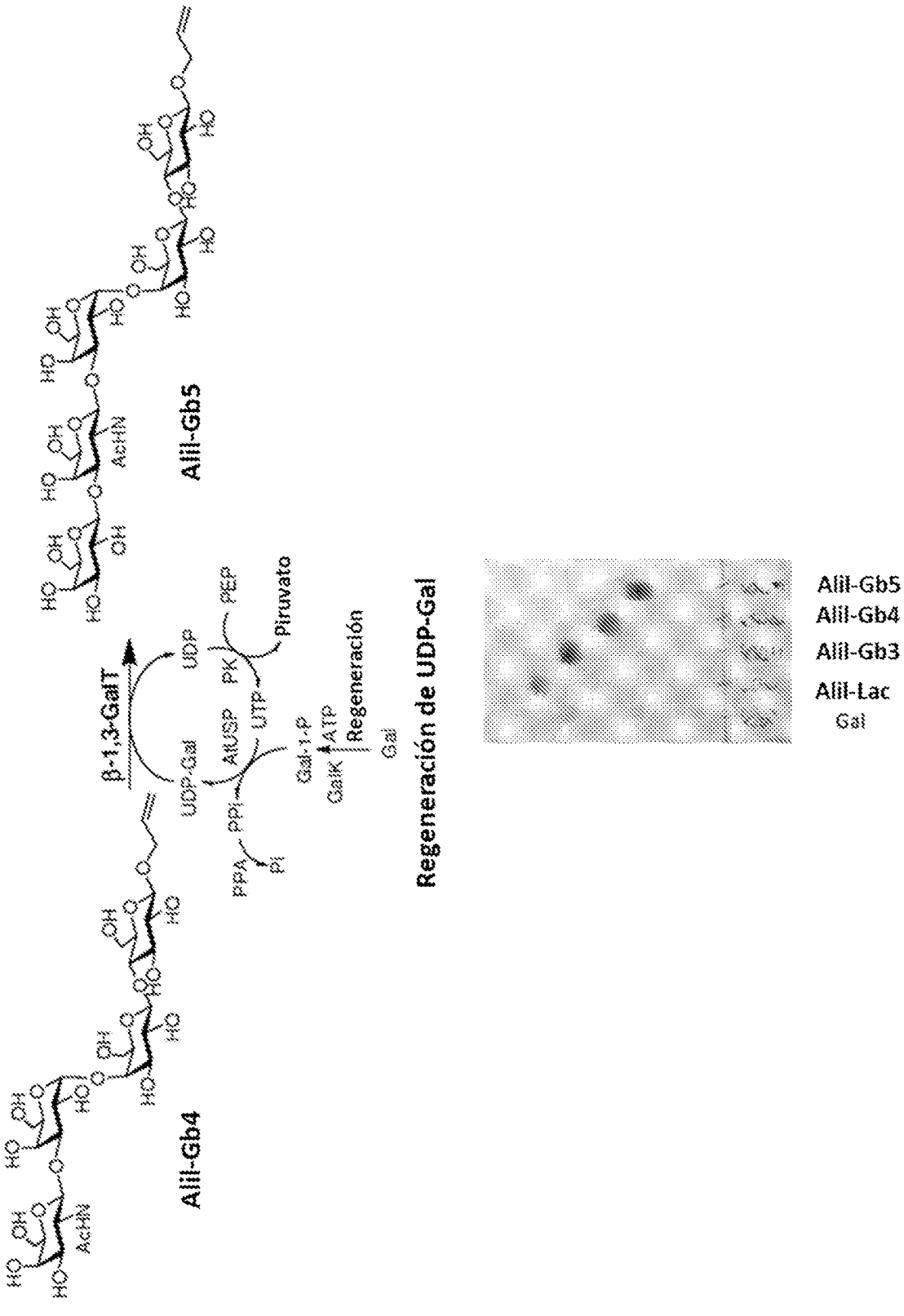


Figura 2 (Continuación)

D.

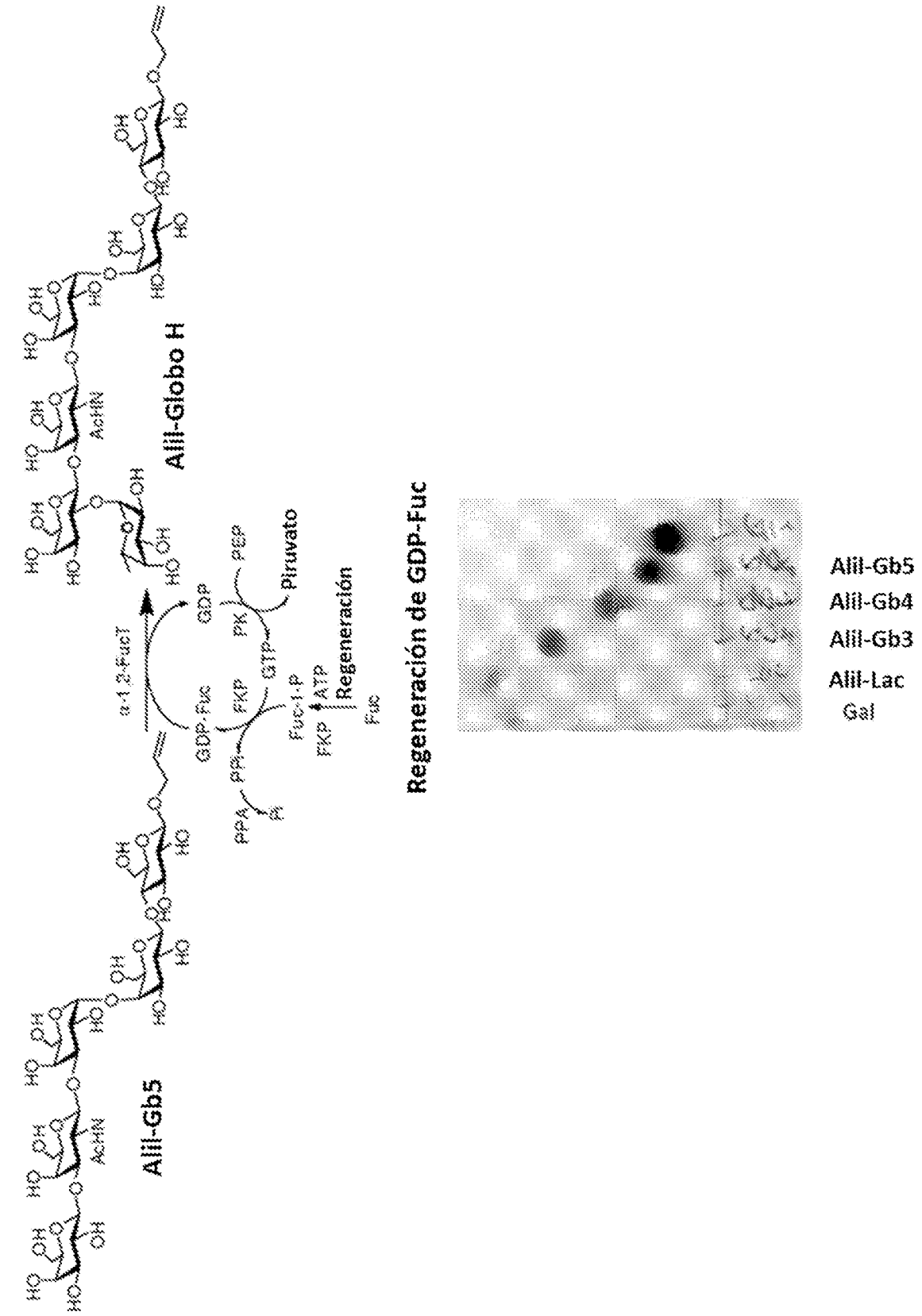


Figura 2 (Continuación)

E.

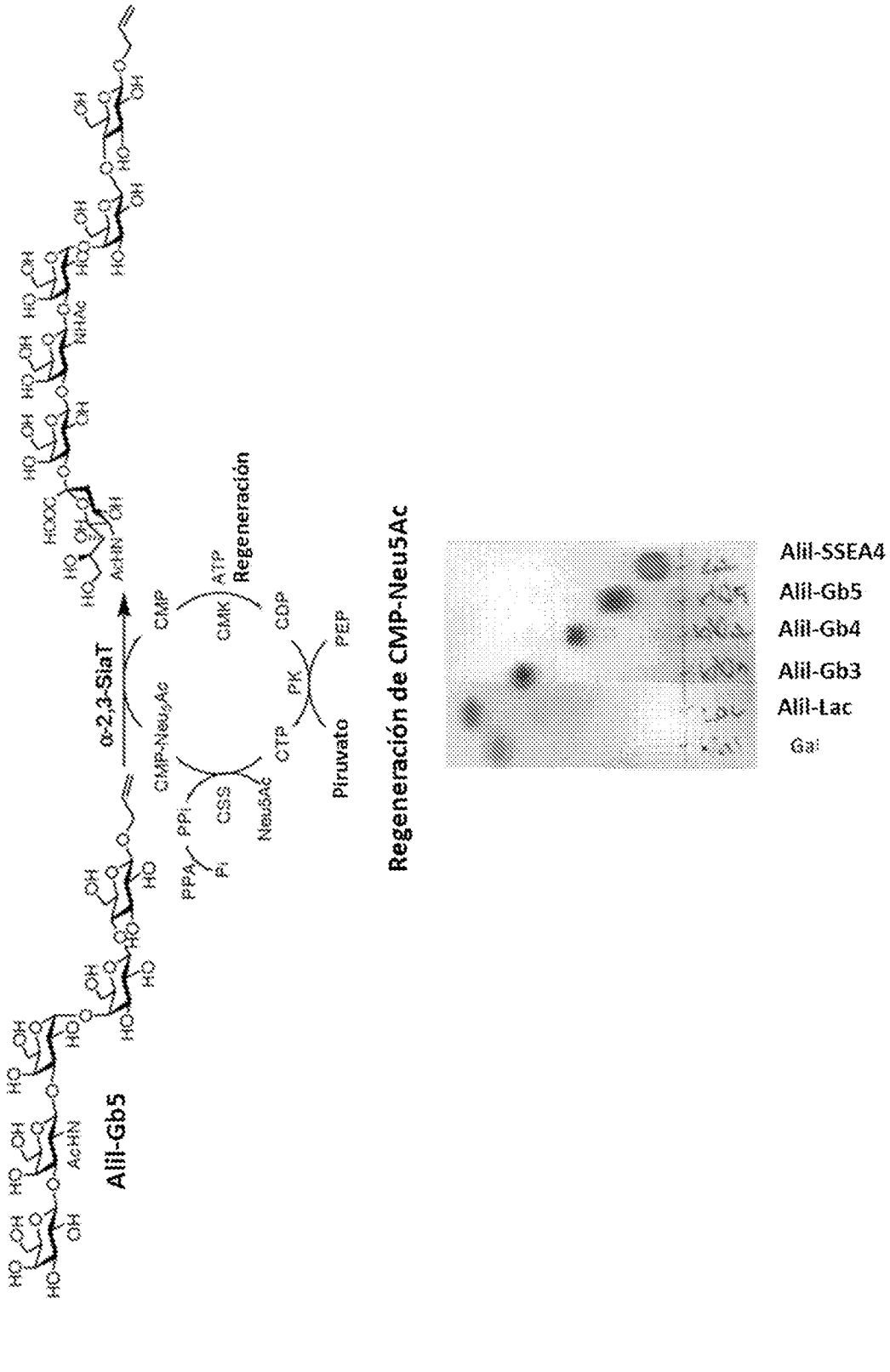


Figura 3

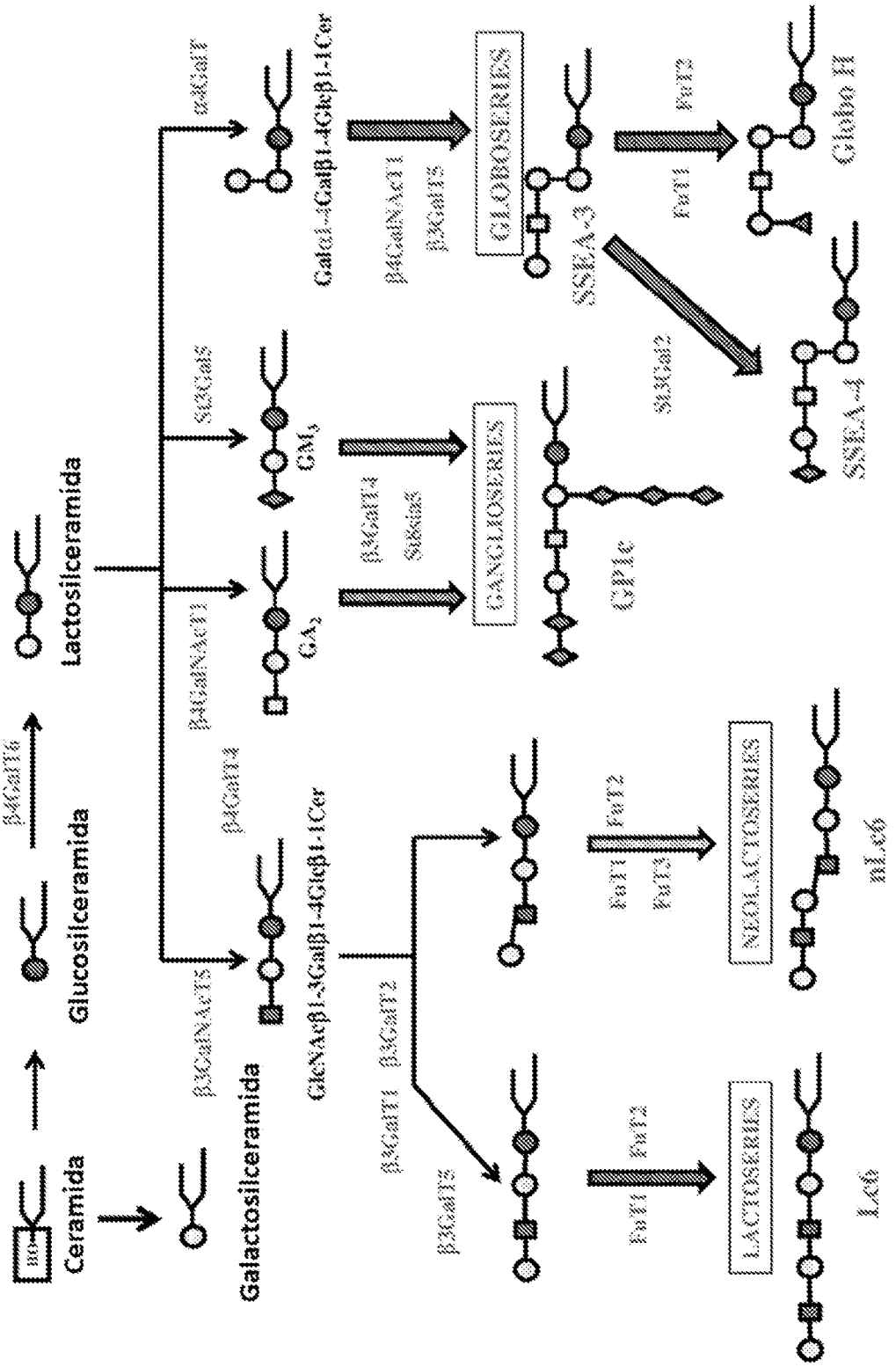

Ceramida
Glucosilceramida
Lactosilceramida
β4GalT6
β3GalNAcT5
Galactosilceramida
β4GalT4
GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-1Cer
β3GalNAcT1
GA2
ST8Sia5
GM3
α4GalT
Galα1-4Galβ1-4Glcβ1-1Cer
β4GalNAcT1
β3GalT5
GLOBOSERIES
SSEA-3
β3GalT1
β3GalT2
β3GalT5
GANGLIOSERIES
GP1c
ST3Gal2
FucT1
FucT2
Globo H
SSEA-4
FucT1
FucT2
LACTOSERIES
Le6
FucT1
FucT2
NEOLACTOSERIES
nLe6

Figura 4

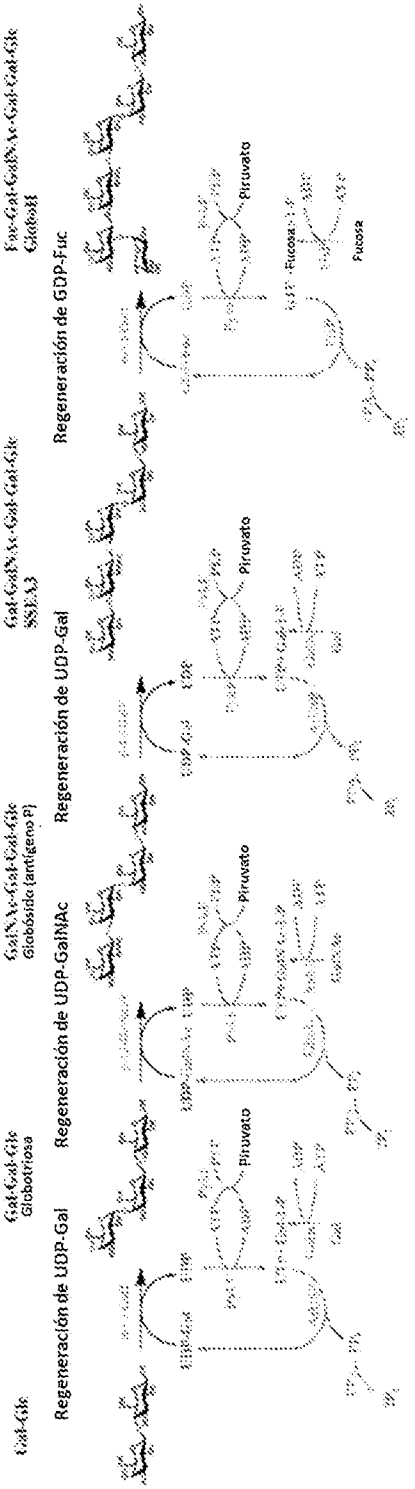

Gal-Glc
Gal-Gal-Glc
Globotriosa
GalNAc-Gal-Gal-Glc
Globósido (antígeno P)
Gal-GalNAc-Gal-Gal-Glc
SSEA3
Fuc-Gal-GalNAc-Gal-Gal-Glc
Globo H
Regeneración de UDP-Gal
Regeneración de UDP-GalNAc
Regeneración de UDP-Gal
Regeneración de GDP-Fuc
Piruvato
Piruvato
Piruvato
Fucosa

Figura 5

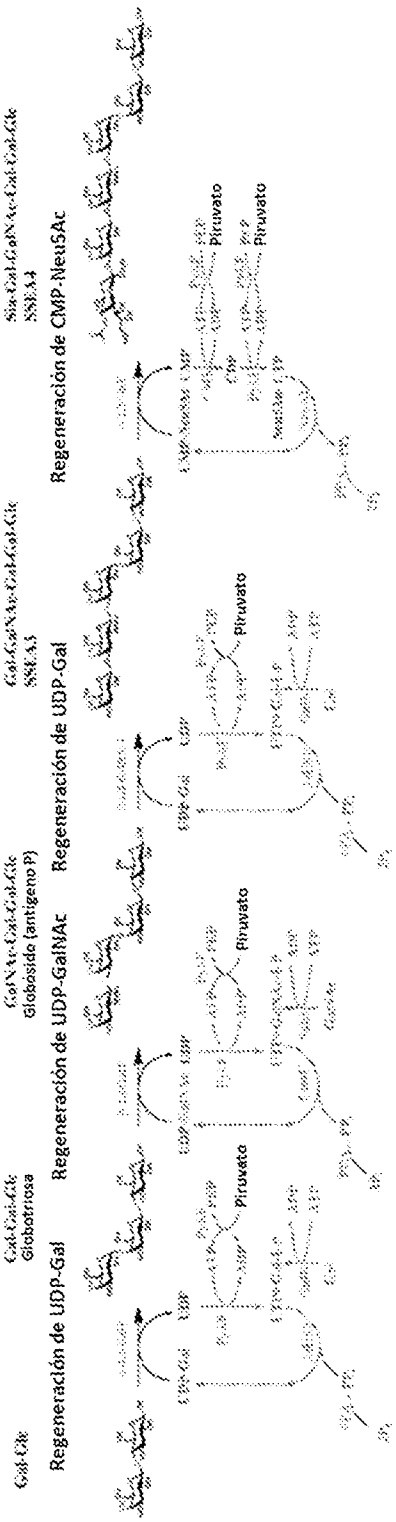

Gal-Glc
Gal-Gal-Glc
Globotriosa
GalNAc-Gal-Gal-Glc
Globósido (antígeno P)
Gal-GalNAc-Gal-Gal-Glc
SSEA3
Sia-Gal-GalNAc-Gal-Gal-Glc
SSEA4
Regeneración de UDP-Gal
Regeneración de UDP-GalNAc
Regeneración de UDP-Gal
Regeneración de CMP-Neu5Ac
Piruvato
Piruvato
Piruvato

Figura 6

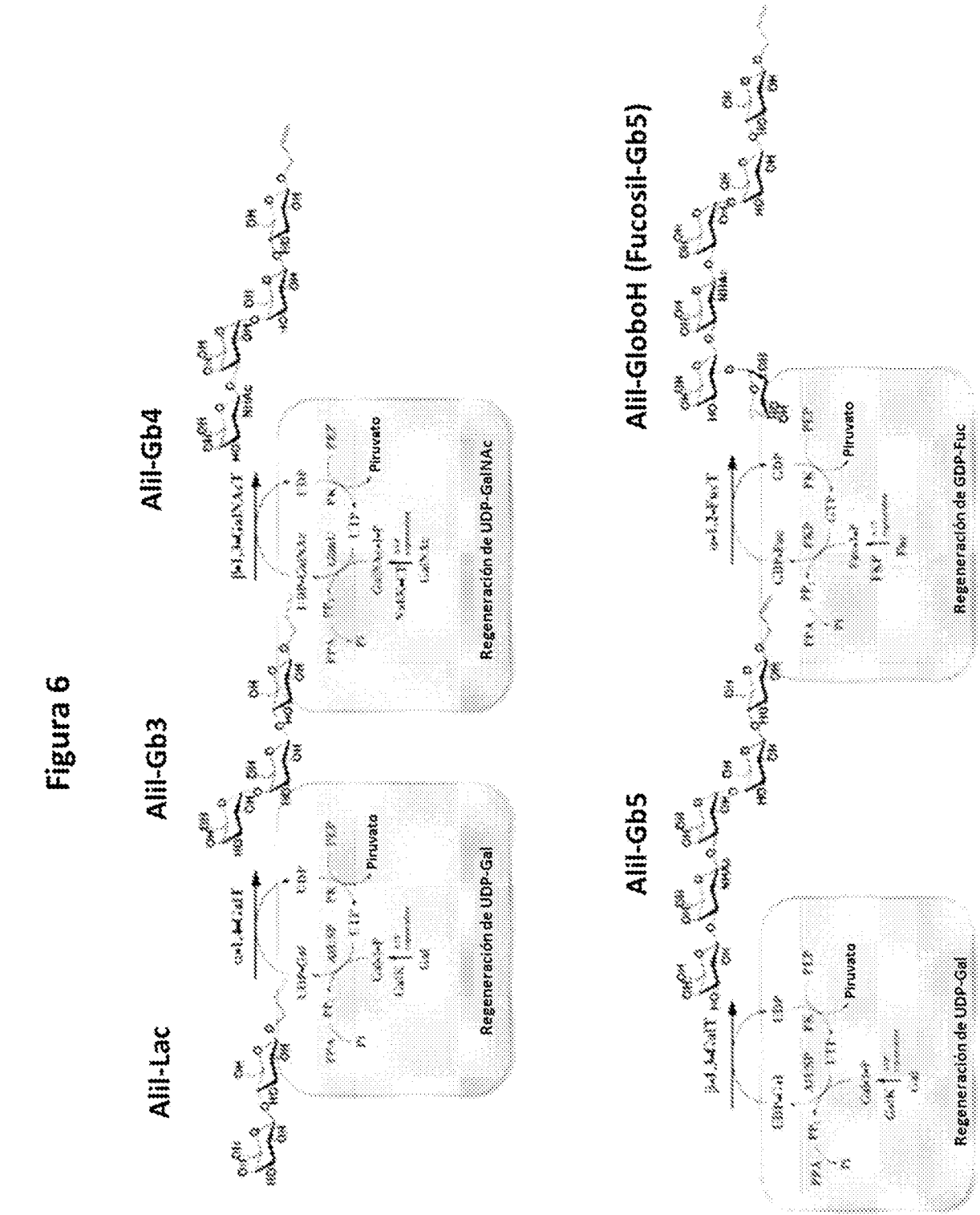

Allil-Lac
Allil-Gb3
Allil-Gb4
Piruvato
Regeneración de UDP-Gal
Regeneración de UDP-GalNAc
Allil-Gb5
Allil-GloboH (Fucosil-Gb5)
Piruvato
Regeneración de UDP-Gal
Regeneración de GDP-Fuc

Figura 7

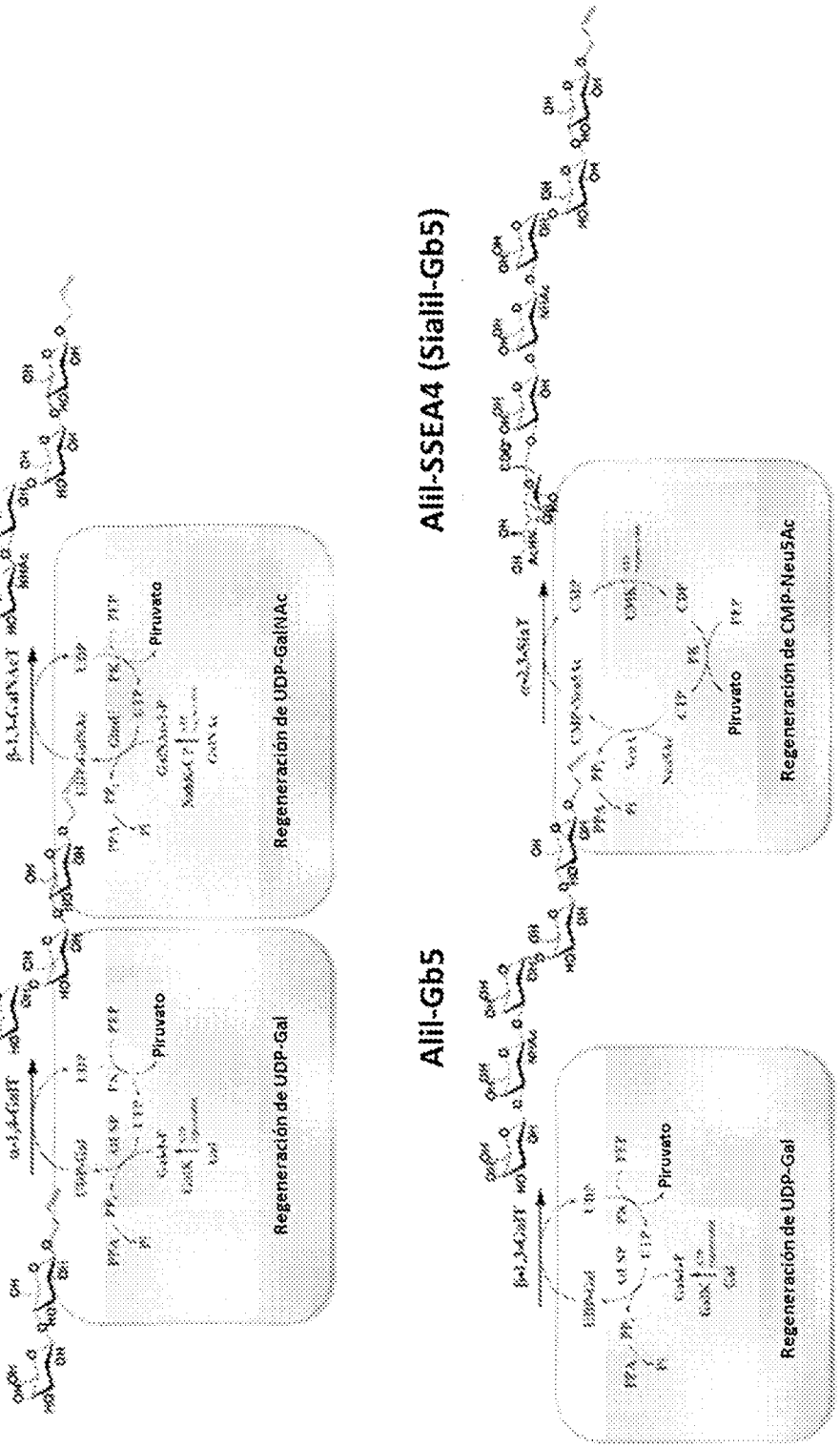

Allil-Lac
Allil-Gb3
Allil-Gb4
Piruvato
Regeneración de UDP-Gal
Regeneración de UDP-GalNAc
Allil-Gb5
Allil-SSEA4 (Siallil-Gb5)
Piruvato
Regeneración de UDP-Gal
Regeneración de CMP-Neu5Ac

Figura 8

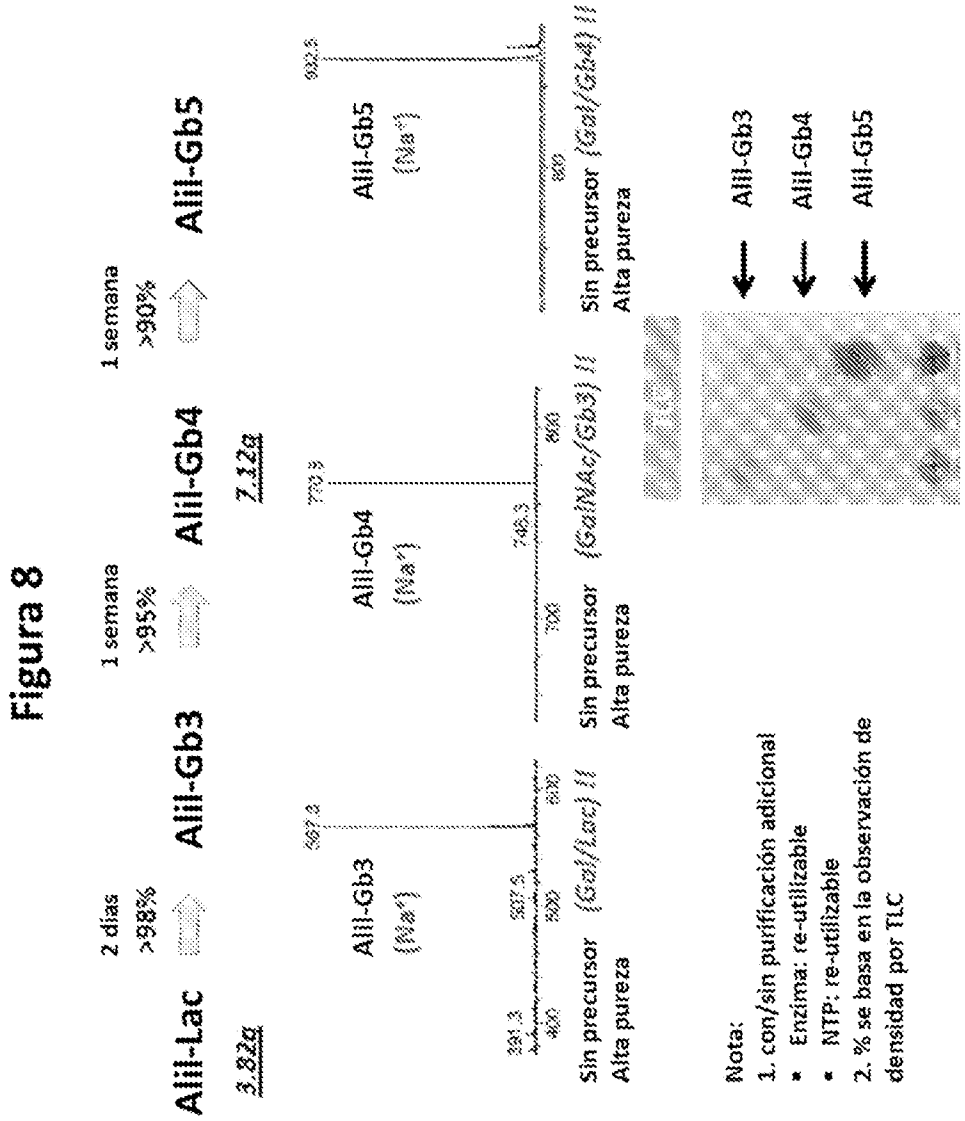

Allil-Lac
2 días
>98%
Allil-Gb3
1 semana
>95%
Allil-Gb4
1 semana
>90%
Allil-Gb5
3.82a
Z.12a
Allil-Gb3
(Ma+)
Allil-Gb4
(Ma+)
Allil-Gb5
(Ma+)
Sin precursor
Alta pureza
(Gal/Lac) II
(GalNAc/Gb3) II
(Gal/Gb4) II
Nota:
1. con/sin purificación adicional
Enzima: re-utilizable
NTP: re-utilizable
2. % se basa en la observación de densidad por TLC

Figura 9

Globo H (Fucosil-Gb5)

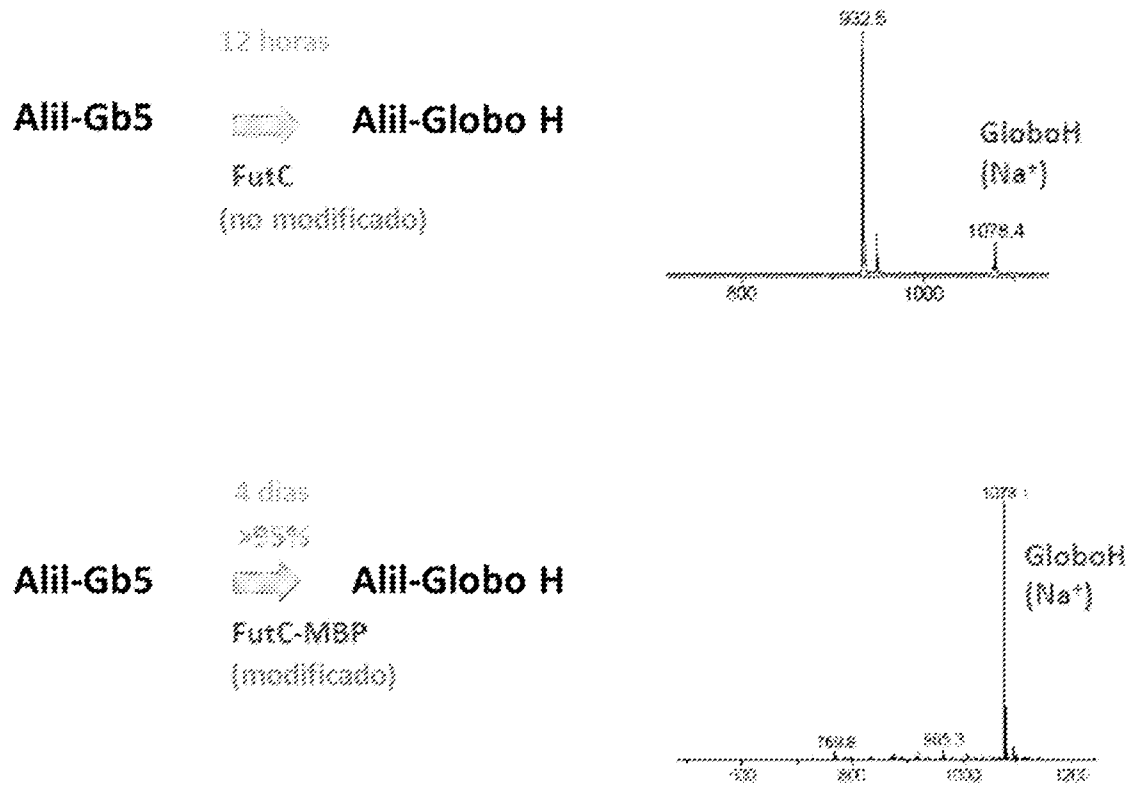
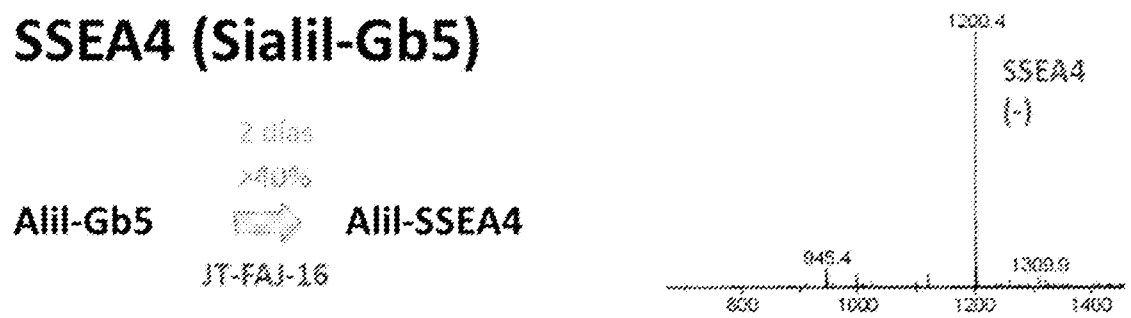


Figura 10


SSEA4 (Sialil-Gb5)
2 días
>40%
Alil-Gb5
Alil-SSEA4
JT-FAJ-16
1200.4
SSEA4
(-)
945.4
1309.9
800
1000
1200
1400