



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년03월31일
 (11) 등록번호 10-0817462
 (24) 등록일자 2008년03월21일

(51) Int. Cl.
C07H 7/027 (2006.01) *C07H 1/00* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2005-7024851
 (22) 출원일자 2005년12월23일
 심사청구일자 2005년12월23일
 번역문제출일자 2005년12월23일
 (65) 공개번호 10-2006-0091716
 (43) 공개일자 2006년08월21일
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2004/006848
 국제출원일자 2004년06월24일
 (87) 국제공개번호 WO 2004/113358
 국제공개일자 2004년12월29일
 (30) 우선권주장
 03013457.1 2003년06월24일
 유럽특허청(EPO)(EP)
 03027750.3 2003년12월02일
 유럽특허청(EPO)(EP)
 (56) 선행기술조사문헌
 US 5872247
 US 5846794
 WO 0114566

(73) 특허권자
에블로직 소시에떼 아노님
 프랑스 에프-91000 에브리 튀 앙리 로슈포르 93
마를리에르 테크놀로지스 소시에떼 시빌
 프랑스 에프-75012 파리 튀 고썩 5
 (뒷면에 계속)
 (72) 발명자
마를리에르 필리쁘
 프랑스 에프-75012 파리 튀 고썩 5
되링 폴커
 프랑스 에프-75015 파리 튀 생-아망 31
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 43 항

심사관 : 이재정

(54) 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트로부터의 2'-데옥시뉴클레오시드 및 2'-데옥시뉴클레오시드전구체들의 제조

(57) 요약

본 발명은 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루콘산 (대개 KDG 로 약자표시됨) 또는 그의 염들을 출발물질로서 사용하는, 2'-데옥시뉴클레오시드 화합물 또는 2'-데옥시뉴클레오시드 전구체들의 제조공정에 관한 것이다. 다양한 2'-데옥시뉴클레오시드 및 그들의 유사체들은 항바이러스제, 항암제 또는 안티센스제 (antisense agent)의 제조에서, 합성 또는 약물 제형을 위한 출발물질로서 사용된다.

(73) 특허권자

로디아 쉬미

프랑스 93300 오버빌러스 튀 드 라 에 꼬르 40

마를리에르 필리쁘

프랑스 에프-75012 파리 튀 고썩 5

(72) 발명자

띠보 드니

프랑스 에프-75013 파리 뿔라스 수양 15

크라이메이어 아네트

프랑스 에프-77380 콩스 라 비이으 알르 뒤 뽀띠
웬느 4

특허청구의 범위

청구항 1

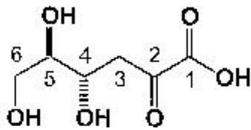
하기 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 염들 또는 그들의 4, 5 및 6 위치의 하나 이상의 히드록실기가 아세테이트 에스테르, 벤조에이트 에스테르, 알릴 에테르, 벤질 에테르, 트리틸 에테르, t-부틸디메틸실릴 에테르, 이소프로필리덴 및 벤질리덴 아세탈로 이루어진 군으로부터 선택되는 보호기로 보호된 보호 형태를 과산화수소와 반응시키거나, 또는 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 염들 또는 상기 그들의 보호 형태의 C1-C2 결합을 절단함으로써 수행되는 탈카르복실화 단계를 포함하는,

하기 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 염들, 또는 상기 그들의 보호된 형태로부터 2'-데옥시뉴클레오시드 또는 2'-데옥시뉴클레오시드 전구체를 생성하는 제조방법으로,

여기서 2'-데옥시뉴클레오시드는, 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민, 우라실, 및 하이포크산틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오베이스 또는 5-아자시토신, 2-클로로-아데닌, 5-요오도-시토신, 8-아자-구아닌, 5-요오도-우라실, 5-브로모-우라실, 5-플루오로-우라실, 5-에틸-우라실 및 5-트리플루오로메틸-우라실로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오베이스 유사체의 염기성 N-원자가 2-데옥시-D-리보오스의 아노머성 탄소에 결합되어 있는 N-글리코시드인 2'-데옥시리보뉴클레오시드이고,

2'-데옥시뉴클레오시드 전구체는 2'-데옥시-D-리보오스 또는 2'-데옥시뉴클레오시드들의 2-데옥시-D-리보실 부분으로 전환될 수 있는 탄수화물 화합물인 제조방법:

[화학식 (I)]



청구항 2

삭제

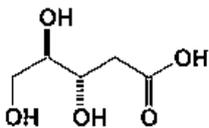
청구항 3

제 1 항에 있어서, 탈카르복실화 단계가 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 염들 또는 그의 보호 형태 상에서 직접 실시되는 제조방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 탈카르복실화 단계가, 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 염들 또는 그의 보호 형태를 과산화수소와 반응시킴에 의해 실행되어, 2'-데옥시뉴클레오시드 전구체로서의 하기 화학식 (II)의 화합물 또는 그의 염들 또는 그의 보호 형태를 생성하는 제조방법:

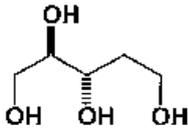
[화학식 (II)]



청구항 5

제 4 항에 있어서, 화학식 (II)의 화합물 또는 그의 염들 또는 그의 보호 형태를, 2'-데옥시뉴클레오시드 전구체로서의 하기 화학식 (IV)의 화합물 또는 그의 보호 형태로 전환시키는 것을 더 포함하는 제조방법:

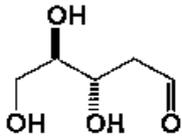
[화학식 (IV)]



청구항 6

제 4 항에 있어서, 화학식 (II)의 화합물 또는 그의 염들 또는 그의 보호 형태를, 2'-데옥시뉴클레오시드 전구체로서의 하기 화학식 (III)의 화합물 또는 그의 보호 형태로 전환시키는 것을 더 포함하는 제조방법:

[화학식 (III)]



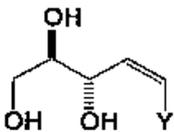
청구항 7

제 6 항에 있어서, 화학식 (II)의 화합물 또는 그의 염들 또는 그의 보호 형태를, 이후에 화학식 (III)의 화합물 또는 그의 보호 형태로 전환되는 중간체로서의 화학식 (IV)의 화합물 또는 그의 보호 형태로 전환시키는 것을 포함하는 제조방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 탈카르복실화 단계가, 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 염들 또는 그의 보호 형태를 아민 Y-H (식 중 H 는 아미노기의 질소 원자에 결합된 수소 원자를 나타낸다)와 반응시킴에 의해 실행되어, 2'-데옥시뉴클레오시드 전구체로서의 하기 화학식 (V)의 화합물 또는 그의 개별적인 트랜스 이성질체 또는 그의 보호 형태를 생성하는 것인 제조방법:

[화학식 (V)]



청구항 9

제 8 항에 있어서, Y-H 가 모르폴린, 피롤리딘, 피페리딘, N-메틸 피페라진 또는 디에틸아민을 나타내는 제조방법.

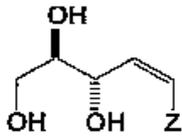
청구항 10

삭제

청구항 11

제 8 항에 있어서, 화학식 (V)의 화합물 또는 그의 트랜스 이성질체 또는 그의 보호 형태를 Z-H (식 중, H 는 수소 원자를 나타내고, Z 는 이탈기를 나타낸다)와 반응시켜, 2'-데옥시뉴클레오시드 전구체로서의 하기 화학식 (VI)의 화합물 또는 그의 개별적인 트랜스 이성질체 또는 그의 보호 형태를 제조하는 단계를 더 포함하는 제조방법:

[화학식 (VI)]



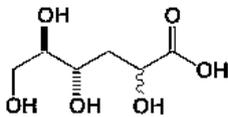
청구항 12

제 11 항에 있어서, Z-H 가 물이며, 2'-데옥시뉴클레오시드 전구체들로서의 화학식 (III)의 화합물 또는 그의 보호 형태를 제조하는 것인 제조방법.

청구항 13

제 1 항에 있어서, 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 염들 또는 그의 보호 형태가 하기 화학식 (VII)의 화합물 또는 그의 염들 또는 그의 보호 형태로 전환되며, 이는 그 후 탈카르복실화되어 2'-데옥시뉴클레오시드 전구체들로서의 화학식 (III)의 화합물 또는 그의 보호 형태를 생성하는 것인 제조방법:

[화학식 (VII)]



청구항 14

제 13 항에 있어서, 화학식 (I) 또는 그의 염들 또는 그의 보호 형태의 화학식 (VII) 또는 그의 보호 형태의 전환이, 나트륨 보로하이드라이드를 이용한 환원에 의해, 또는 니켈 라니 (Raney) 또는 백금 산화물 촉매를 사용하는 수소화에 의해 일어나는 제조방법.

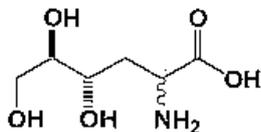
청구항 15

제 13 항에 있어서, 탈카르복실화 단계가 과산화수소와의 반응에 의해 실행되는 제조방법.

청구항 16

제 1 항에 있어서, 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 염들 또는 그의 보호 형태가 하기 화학식 (VIII)의 화합물 또는 그의 염들 또는 그의 보호 형태로 전환되며, 그 후 탈카르복실화되어 2'-데옥시뉴클레오시드 전구체로서의 화학식 (III)의 화합물 또는 그의 보호 형태를 생성하는 제조방법:

[화학식 (VIII)]



청구항 17

제 16 항에 있어서, 화학식 (VIII)의 화합물 또는 그의 보호 형태 또는 개별적인 에피머들의 혼합물을 닌히드린과 반응시켜, 그에 따라 화합물 (III) 또는 그의 보호 형태를 생성하는 제조방법.

청구항 18

제 16 항에 있어서, 화학식 (I) 또는 그의 염들 또는 그의 보호 형태의, 화학식 (VIII) 또는 그의 보호 형태의 전환이, 암모니아 및 나트륨 시아노보로하이드라이드를 사용한 환원성 아민화에 의해 실행되는 제조방법.

청구항 19

삭제

청구항 20

제 1 항에 있어서, 탈카르복실화 단계가 효소적 반응에 의한 하나의 단계로 일어나는 제조방법.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 효소적 반응이 피루베이트 디카르복실라제 (EC 4.1.1.1), 벤조일포르메이트 디카르복실라제 (EC 4.1.1.7), 인돌피루베이트 디카르복실라제 (EC 4.1.1.74), 포스포노피루베이트 디카르복실라제, 술포피루베이트 디카르복실라제 (EC 4.1.1.79), 옥살릴-코엔자임 A 디카르복실라제 (EC 4.1.1.8), 옥소글루타레이트 디카르복실라제 (EC 4.1.1.71) 또는 페닐피루베이트 디카르복실라제 (EC 4.1.1.43)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 TPP 의존성 케토산 디카르복실라제에 의해 촉매되는 제조방법.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

제 21 항에 있어서, 피루베이트 디카르복실라제가 진핵성 기원인 제조방법.

청구항 25

제 24 항에 있어서, 진핵성 유기체가 효모 유기체인 제조방법.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 효모가 사카로마이세스 세레비시에 (*Saccharomyces cerevisiae*)인 제조방법.

청구항 27

제 21 항에 있어서, 피루베이트 디카르복실라제가 원핵성 기원인 제조방법.

청구항 28

제 27 항에 있어서, 원핵성 유기체가 자이모모나스 (*Zymomonas*), 자이모박터 (*Zymobacter*) 또는 아세트박터 속인 제조방법.

청구항 29

제 28 항에 있어서, 유기체가 자이모모나스 모빌리스 (*Zymomonas mobilis*), 자이모박터 팔마에 (*Zymobacter plamae*) 또는 아세트박터 파스퇴리아누스 (*Acetobacter pasteurianus*) 종들인 제조방법.

청구항 30

제 21 항에 있어서, 벤조일포르메이트 디카르복실라제가 원핵성 기원인 제조방법.

청구항 31

제 30 항에 있어서, 원핵성 유기체가 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 속인 제조방법.

청구항 32

제 31 항에 있어서, 유기체가 슈도모나스 푸티다 (*Pseudomonas putida*) 종인 제조방법.

청구항 33

제 20 항에 있어서, pH 가 산 첨가에 의해 pH 5 내지 pH 9 사이로 조절되는 제조방법.

청구항 34

제 33 항에 있어서, pH 값이 pH 6 내지 pH 8 사이로 조절되는 제조방법.

청구항 35

제 33 항에 있어서, 산이 HCl, H₂SO₄, D-글루콘산 또는 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루콘산인 제조방법.

청구항 36

제 1 항에 있어서, 글루코네이트 탈수 효소 (dehydratase) 활성의 사용에 의해, D-글루코네이트 또는 D-글루코네이트 염으로부터 화학식 (I)의 화합물을 제조하는 예비 단계를 포함하는 제조방법.

청구항 37

제 36 항에 있어서, D-글루코네이트 염이 칼륨 또는 나트륨 D-글루코네이트인 제조방법.

청구항 38

제 36 항에 있어서, 글루코네이트 탈수 효소가 하기로 이루어지는 균으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 것인 제조방법:

- (a) 서열번호 2 의 아미노산 서열을 함유하는 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열들;
- (b) 서열번호 1 의 코딩 (coding) 서열을 함유하는 뉴클레오티드 서열들;
- (c) (a) 또는 (b)의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 절편을 암호화하는 뉴클레오티드 서열들;
- (d) (a) 내지 (c) 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열과 하이브리드화되는 뉴클레오티드 서열들; 및
- (e) 유전 암호 변성의 결과로, (d)의 뉴클레오티드 서열로부터 벗어난 (deviate) 뉴클레오티드 서열들.

청구항 39

제 1 항에 있어서, 글루코사미네이트 디아미나제 효소 활성의 사용에 의해 D-글루코사미네이트로부터 화학식 (I)의 화합물을 제조하는 예비단계를 포함하는 제조방법.

청구항 40

제 39 항에 있어서, 글루코사미네이트 디아미나제가 하기로 이루어지는 균으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 것인 제조방법:

- (a) 서열번호 4의 아미노산 서열을 함유하는 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열들;
- (b) 서열번호 3 의 코딩 서열을 함유하는 뉴클레오티드 서열들;
- (c) (a) 또는 (b)의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 절편을 암호화하는 뉴클레오티드 서열들;
- (d) (a) 내지 (c) 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열과 하이브리드화되는 뉴클레오티드 서열들; 및
- (e) 유전 암호 변성의 결과로, (d)의 뉴클레오티드 서열로부터 벗어난 뉴클레오티드 서열들.

청구항 41

D-글루코네이트 탈수 효소의 발현에 의해 효소적으로 D-글루코네이트를 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트로 전환시킬 수 있고/있거나, D-글루코사미네이트 디아미나제의 발현으로 인해 D-글루코사미네이트를 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트로 효소적으로 전환시킬 수 있고, 케토산 디카르복실라제의 발현으로 인하여 탈카르복실화에 의해 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트를 2-데옥시-D-리보오스로 효소적으로 전환시킬 수 있는, 효모 유기체인 진핵성 유기체, 또는 자이모모나스 (Zymomonas), 자이모박터 (Zymobacter) 또는 아세토박

터 속인 원핵성 유기체로부터 선택되는 유기체.

청구항 42

제 41 항에 있어서, 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트키나제 활성을 발현하지 않는, 효모 유기체인 진핵성 유기체, 또는 자이모모나스 (Zymomonas), 자이모박터 (Zymobacter) 또는 아세토박터 속인 원핵성 유기체로부터 선택되는 유기체.

청구항 43

제 41 항 또는 제 42 항에 있어서, 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트알돌라제 활성을 발현하지 않는, 효모 유기체인 진핵성 유기체, 또는 자이모모나스 (Zymomonas), 자이모박터 (Zymobacter) 또는 아세토박터 속인 원핵성 유기체로부터 선택되는 유기체.

청구항 44

제 41 항 또는 제 42 항에 있어서, 2-데옥시-D-리보오스 알돌라제 활성을 발현하지 않는, 효모 유기체인 진핵성 유기체, 또는 자이모모나스 (Zymomonas), 자이모박터 (Zymobacter) 또는 아세토박터 속인 원핵성 유기체로부터 선택되는 유기체.

청구항 45

제 20 항에 있어서, 제 41 항에 따른 유기체를 사용함에 의해 실시되는 제조방법.

청구항 46

제 38 항에 정의된 것과 같은 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 글루코네이트 탈수 효소를 제 36 항에 따른 방법에서 사용하는 방법.

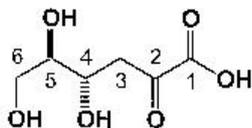
청구항 47

제 40 항에 정의된 것과 같은 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 글루코사미네이트 디아미나제를 제 39 항에 따른 방법에서 사용하는 방법.

청구항 48

화학식 (I)의 화합물을 2-데옥시-D-리보오스로 전환하는 방법에서, 피루베이트 디카르복실라제 (EC 4.1.1.1), 벤조일포르메이트 디카르복실라제 (EC 4.1.1.7), 인돌피루베이트 디카르복실라제 (EC 4.1.1.74), 포스포노피루베이트 디카르복실라제, 술폰피루베이트 디카르복실라제 (EC 4.1.1.79), 옥살릴-코엔자임 A 디카르복실라제 (EC 4.1.1.8), 옥소글루타레이트 디카르복실라제 (EC 4.1.1.71) 및 페닐피루베이트 디카르복실라제 (EC 4.1.1.43)로 이루어진 군으로부터 선택되는 TPP 의존성 케토산 디카르복실라제 또는 상기 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 사용하는 방법.

[화학식 (I)]



명세서

기술분야

<1> 본 발명은 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루콘산 (대개 KDG 로 약자표시됨) 또는 그의 염들을 출발물질로서 사용하는, 2'-데옥시뉴클레오시드 화합물 또는 2'-데옥시뉴클레오시드 전구체들의 제조방법에 관한 것이다. 다양한 2'-데옥시뉴클레오시드 및 그들의 유사체들은, 항바이러스제, 항암제 또는 안티센스제 (antisense agent) 의 제조에서, 합성 또는 약물 제형을 위한 출발물질로서 사용된다.

<2> 구체적으로, 본 발명은 KDG 또는 KDG의 유도체를 탈카르복실화 단계에 가하여 KDG의 원래의 카르복시기를 제거하는 방법에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 방법에서 사용된 KDG는 D-글루코네이트 또는 D-글루코사미네이트로부터 효소적으로 제조된다.

<3> 2-데옥시-D-리보오스를 포함하는 2'-데옥시뉴클레오시드 및 2'-데옥시뉴클레오시드 전구체들은, 예로서 항바이러스제 및 항암제의 제조에서 합성 또는 약물 제형을 위한 출발물질로서 사용된다. 2'-데옥시뉴클레오시드 또는 그의 유도체 및 2'-데옥시뉴클레오시드 전구체들은 치료용 안티센스 분자들의 조사, 진단 및 합성을 위한 시약으로서도 사용된다.

배경 기술

<4> 선행 기술의 한 방법에서, 데옥시뉴클레오시드들은, 교환 (WO 99/49074) 또는 효모 또는 어류의 정액과 같은 생물학적 물질들로부터, DNA의 효소적 절단에 의해 생성된다. 그러나, 이 방법은 몇 가지 단점들, 특히 출발 물질을 충분한 양 및 품질로 얻기 어렵다는 단점들을 포함한다.

<5> 현재 2-데옥시-D-리보오스의 주요 제조 공정은 DNA의 화학적 가수분해로 이루어진다. 이 경우에, 데옥시리보실 부분은 리보뉴클레오티드 환원효소 활성에서 비롯된다. KDG로부터 2-데옥시-D-리보오스의 합성은 아직 설명되지 않았다.

<6> 대부분의 살아있는 세포들에서, 데옥시리보뉴클레오시드들은 뉴클레오티드 대사의 "재사용 경로(salvage pathway)"로부터의 결과이다. 데옥시리보뉴클레오시드들의 데옥시리보오스 부분은, 리보뉴클레오티드 환원 효소에 의해 촉매되는, 리보실 부분의 디- 또는 트리포스페이트 리보뉴클레오티드들의 환원을 통해 획득된다. 그러나, 데옥시리보오스 부분은 순환되지 않고, 중심 대사의 반응들에 따라 D-글리세르알데히드-3-포스페이트 및 아세트알데히드로 분해된다:

<7> - 데옥시뉴클레오시드는, 티미딘 포스포릴라제 (deoA), 푸린-뉴클레오시드 포스포릴라제 (deoD), 유리딘 포스포릴라제 (udp) 또는 크산토신 포스포릴라제 (xapA)를 암호화하는 유전자들의 산물에 의해 매개되는 가인산분해를 통해, 데옥시리보오스-1-포스페이트 및 뉴클레오베이스(nucleobase)로 분해된다.

<8> - 데옥시리보오스-1-포스페이트는, 데옥시리보오스 포스페이트 뮤타제 (deoB)에 의해 촉매되는 반응을 통해 데옥시리보오스-5-포스페이트로 전환되고,

<9> - 이는 데옥시리보오스-5-포스페이트 알돌라제 (aldolase) (deoC)에 의해 촉매되는 반응을 통해 D-글리세르알데히드-3-포스페이트 및 아세트알데히드로 더 분해된다.

<10> 상기 deo 효소들은 시험관 내 역 동화 (reverse anabolic) 반응들도 촉매하는 것으로 나타났다: 데옥시리보오스-5-포스페이트는, 아세트알데히드 및 D-글리세르알데히드-3-포스페이트로부터 출발하여, 정제된 대장균 또는 락토바실러스 플랜타룸 (Lactobacillus plantarum)의 데옥시리보오스 알돌라제의 존재 하에서 시험관 내 시험으로 획득된다 (Rosen 등, J. Biol. Chem., 240, (1964), 1517-1524; Pricer, J. Biol. Chem., 235, (1960), 1292-1298). 아세트알데히드 및 글리세르알데히드를 효소 기질로서 사용하여 데옥시리보오스를 획득할 수도 있지만, 매우 낮은 수율로만 획득할 수 있다 (Barbas, J. Am. Chem. Soc. 112 (1990), 2013-2014).

<11> 특허 출원 WO 01/14566 호는 데옥시리보오스-1-포스페이트로부터 출발하여, 출발 기체로서 글리세르알데히드-3-포스페이트, 아세트알데히드 및 뉴클레오베이스를 사용한, 원-팟(one-pot) 반응에서 deo 오페론의 세 개의 효소들, 즉 데옥시리보오스 알돌라제, 데옥시리보뮤타제 및 포스포릴라제 (티미딘 또는 푸린 뉴클레오시드 포스포릴라제)들의 조합된 활성들을 통한, 데옥시뉴클레오시드들의 효소적 합성을 기재하고 있다. D-글리세르알데히드-3-포스페이트는 효소 공정에 의해 프룩토오스-1,6-비스포스페이트로부터 획득될 수 있다.

<12> 특허 출원 EP 1179598 호는, 데옥시리보오스-1-포스페이트 및 뉴클레오베이스로부터 출발하는 데옥시뉴클레오시드들의 효소적 제조를 촉매하기 위한 포스포릴라제의 사용을 기재하고 있다. 데옥시뉴클레오시드의 합성 수율이 포스페이트의 침전에 의해 개선된다.

<13> 그러나, 역방향으로 작용하는 상기 deo 오페론의 효소들을 사용하는 방법들은, 그들의 생물학적 기능에 비해 낮은 수율을 보이며, 이는 그들의 사용에 있어 중요한 결점을 나타내는 것이다.

<14> 데옥시뉴클레오시드 및 데옥시뉴클레오시드 전구체들의 제조를 위해 현재 적용되는 공정들의 상기 기재된 비효율성을 고려할 때, 본 발명의 한 목적은, 신뢰할 수 없는 천연 공급원들에 의존하지 않고, 저렴하고 상업적으로 구입가능한 화합물들로부터 출발하는 데옥시뉴클레오시드 및 데옥시뉴클레오시드 전구체들의 생합성 제조

를 위한 수단 및 방법들을 제공하는 것이다.

<15> 특히, 선행 기술의 공정들의 결점이 제거된, 데옥시리보뉴클레오시드들의 효율적이고 경제적인 합성을 가능하게 하는 데옥시뉴클레오시드들 및 데옥시뉴클레오시드 전구체들의 제조를 위한 대체적인 방법이 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

<16> 본 발명은, 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루콘산 (KDG) 또는 그의 염들로부터 출발하고, 탈카르복실화 단계를 포함하는 2'-데옥시뉴클레오시드들 및 그의 전구체들의 제조방법에 관한 것이다.

<17> 특히, 본 방법은 2-데옥시-D-리보오스 (DRI) 및 2'-데옥시뉴클레오시드 전구체들로서의 DRI 의 합성적으로 다능성인 (versatile) 엔아민 유도체들의 제조에 유용한 방법이다.

<18> 상기 탈카르복실화 단계는 직접 KDG 또는 그의 염들, 또는 KDG 의 유도체를 반응시켜 대개 상기 KDG 의 C1-C2 결합을 절단함으로써 실행된다.

<19> 본 발명의 한 구현예에서, KDG 또는 그의 염들 중 하나는 (산화적) 탈카르복실화되어 2-데옥시-D-리본산 (DRN) 또는 그의 염들로 되고, 그 자체는 2-데옥시-D-리보오스 (DRI) 또는 2-데옥시-D-리비톨 (DRL)로 더 전환된다.

<20> 본 발명의 다른 구현예에서, 탈카르복실화는 KDG 또는 그의 염들을 아민과 반응시킴에 의해 일어나서, 엔아민 유도체를 생성한다. 이 고에너지 엔아민 유도체는 가수분해에 의해 DRI 로 더 전환될 수 있다.

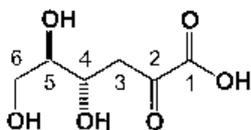
<21> 본 발명의 다른 구현예에서, (산화적) 탈카르복실화는 KDG 의 유도체들로서, 3-데옥시-D-글루콘산 (DGN) 또는 그의 염들 및/또는 3-데옥시-D-만논산 (DMN) 또는 그의 염들 상에서 실시되어 DRI 를 생성한다. DGN 및 DMN 의 혼합물의 제조는 KDG 의 환원에 의해 일어난다. 상기 탈카르복시화는 바람직하게는 과산화수소와의 반응을 통해 실시된다.

<22> 본 발명의 또 다른 구현예에서, (산화적) 탈카르복실화는 3-데옥시-D-글루코사민산 (DGM) 또는 그의 염들 및/또는 3-데옥시-D-만노사민산 (DMM) 또는 그의 염들 상에서 실시되어 DRI 를 생성한다. DGM 및 DMM 의 혼합물의 제조는 KDG로부터의 환원성 아민화에 의해 일어난다.

<23> 본 발명의 다른 측면은, 상기 방법에 사용되는 KDG 또는 그의 염들의 편리하고 비용면에서 효과적인 제조 방법이다. 이 방법은, 재조합 효소들의 사용에 의해, D-글루코네이트로부터 또는 D-글루코사미네이트로부터 출발한다. 본 발명은 D-글루코네이트 탈수 효소 (dehydratase) 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 신규 뉴클레오티드 서열 및 D-글루코사미네이트 디아미나제 (deaminase) 활성을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 제공한다.

<24> 본 발명의 방법에 사용되는 출발 물질은 하기 화학식 (I)로 표시되는 KDG 또는 그의 염들 중 하나, 또는 그의 보호된 유도체로, 식 중 4, 5 및/또는 6 위치의 하나 이상의 히드록실기들은 본 기술분야에 알려진 보호기에 의해 보호된다.

<25> [화학식 (I)]



<26>

<27> 여기 사용된 "2'-데옥시뉴클레오시드" 라는 용어는, N-글리코시드들인 2'-데옥시리보뉴클레오시드들에 관한 것이며, 여기에서 뉴클레오베이스 또는 뉴클레오베이스 유사체의 염기성 N-원자는 2-데옥시-D-리보오스 또는 그의 유도체들 중 하나의 아노머성 탄소 (anomeric carbon)에 결합되어 있다. 적합한 뉴클레오베이스들의 예들로는 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민, 우라실, 2,6-디아미노퓨린 및 하이포크산틴이 있다. 뉴클레오베이스 유사체들의 예들로는 5-아자시토신, 2-클로로-아데닌, 5-요오도-시토신, 8-아자-구아닌, 5-요오도-우라실, 5-브로모-우라실, 5-플루오로-우라실, 5-에틸-우라실 및 5-트리플루오로메틸-우라실이 있다.

<28> 여기 사용된 "2'-데옥시뉴클레오시드 전구체들" 이라는 표현은, 선행 기술에서 알려진 방법들을 적용함에 의해 2'-데옥시뉴클레오시드들로 쉽게 전환될 수 있는 화합물들에 관한 것이다. 바람직한 2'-데옥시뉴클레오시드 전구체들은 2-데옥시-D-리보오스 (DRI) 또는 2'-데옥시뉴클레오시드들의 2-데옥시-D-리보실 부분으로 전환될 수

있는 탄수화물 화합물들이며, 예를 들어 선행 기술에 의해 확립된 것들인, 1-포스포노-2-데옥시-D-리보오스, 5-포스포노-2-데옥시-D-리보오스 및 본 발명에 의해 확립된 것들인 2-데옥시-D-리비톨, 2-데옥시-D-리본산, 2-데옥시-D-리보노-1,4-락톤, 1-N-모르폴리노-3,4,5-트리히드록시-펜텐-1, 및 그들의 유도체들이 있다.

<29> 본 발명의 방법은, 탈카르복실화 단계가 KDG 또는 그의 염들 상에서, 또는 KDG 로부터 유도된 화합물들 상에서 직접 실시되는 방법들을 포괄한다. 바람직한 KDG 유도체들로는 3-데옥시-D-글루콘산, 3-데옥시-D-만논산, 3-데옥시-D-글루코사민산 및 3-데옥시-D-만노사민산 및 그들의 각 염들이 있다.

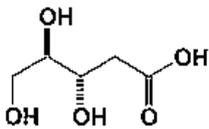
<30> 또한, KDG 및 그의 염들, 또는 4, 5 및/또는 6 위치에서의 하나 이상의 히드록실기들이 당 기술분야에서 그러한 목적으로 알려진 보호기들에 의해 대체된, 이들의 보호 형태들도 본 발명의 탈카르복실화 반응을 위한 적합한 출발 물질이다. 다르게 표현하지 않는 한, KDG 유도체들에 대한 언급이 이들 유도체들의 보호된 형태들을 포함하고자 하는 것과 같이, 이하의 명세서에서 KDG에 대한 언급은 KDG 의 보호 형태들도 포함하는 것이다. 유사하게, 본 발명의 방법들에서 수득된 생성물들에 대한 언급은 이들 생성물들의 보호 형태들도 포함하고자 하는 것이다. 본 발명의 목적을 위한 바람직한 보호기들은, 각 히드록실기들을 아세이트 에스테르, 벤조에이트 에스테르, 알릴 에테르, 벤질 에테르, 트리틸 에테르, ter-부틸디메틸실릴 (TBDMS) 에테르, 이소프로필리텐 또는 벤질리텐 아세탈로 대체하는 것들이다.

<31> 본 발명의 구현예들을 위한 적절한 반응 조건들에 따라, 반응물로서 사용되거나 또는 생성물로서 수득된 유기산들 중에 함유된 카르복실기들은 양성자화된 형태 또는 그들의 염 형태일 수 있거나, 또는 평형상태로 존재할 수 있다. 이들 산들의 예시적인 염들로는 짝이온으로서 금속 또는 암모늄 이온들, 특히 나트륨 및/또는 칼륨과 같은 알칼리 금속 이온들을 갖는 것들이 있다.

<32> 본 발명에 기재된 탄수화물 화합물들 및 그들의 유도체들의 대부분은 몇 가지 환형으로 존재하나, 간단하게 나타내기 위해, 열린 사슬 식으로 나타내었다. 본 발명이 이러한 모든 이성질체 또는 호변체들을 포괄하는 것으로 이해된다.

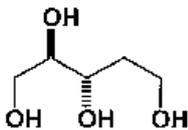
<33> 본 발명의 첫번째 구현예에서, KDG 또는 그의 염들은 과산화수소와 반응하며, (산화적인) 탈카르복실화되어 화학식 (II)의 화합물인 2-데옥시-D-리본산 (DRN) 또는 그의 염들로 된다.

<34> [화학식 (II)]



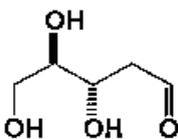
<35>
<36> 상기 생성물은 화학식 (IV) 로 표시되는 2-데옥시-D-리비톨 (DRL)

<37> [화학식 (IV)]



<38>
<39> 또는 화학식 (III) 로 표시되는 2-데옥시-D-리보오스 (DRI)로 더 전환될 수 있다.

<40> [화학식 (III)]



<41>
<42> 본 발명의 목적을 위한 2'-데옥시뉴클레오시드 전구체들 중 DRN, DRL 및 특히 DRI 가 그 중 바람직하다. DRN 에서 DRI 로의 전환은 직접 진행되거나 또는 중간체로서 DRL 을 거쳐 진행된다.

<43> 바람직하게는, DRN 의 제조는, 실시예 5 에 기재된 바와 같이 실온에서 과산화수소를 사용하여, 수용액 중 나트

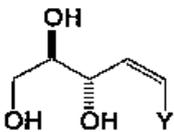
를 또는 칼륨 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트의 산화적 탈카르복실화에 의해 실시된다. 2-케토알도산들의 산화적 탈카르복실화에 의한 알도산들의 일반적인 제조방법이 특허 EP 1 038 860 A1 에 기재되어 있다.

<44> 바람직하게는, DRL 의 제조는, 실시예 6 에 기재된 바와 같이 온도 130 °C, 압력 80 바에서 탄소상 로딩 촉매를 사용하여, 수용액 중 2-데옥시-D-리보노락톤의 수소화 반응 의해 실시된다. 2-데옥시-D-리보노락톤은, 2-데옥시-D-리보네이트 (DRN 염)를, 수용액 중에서 그의 락톤 형태와 평형을 이루는 2-데옥시-D-리보산으로 전환시킴으로써 용이하게 제조할 수 있다 (Han, Tetrahedron, 1993, 49, 349-362; Han, Tetrahedron Asymmetry, 1994, 5, 2535-62).

<45> 바람직하게는, 2-데옥시-D-리보오스 (DRI)의 제조는, 예로서 피리딘 중 크롬 산화물을 사용하여, 2-데옥시-D-리비톨 (DLR)의 산화에 의해 실시된다.

<46> 본 발명의 다른 구현예에서, 탈카르복실화는 KDG 또는 그의 염들을 아미노기 함유 시약 (Y-H)과 반응시킴에 의해 일어나며, 이는 2'-데옥시뉴클레오시드 전구체로서 화학식 (V)의 화합물, 또는 그의 개별적인 트랜스형 이성질체 또는 그의 보호 형태를 생성한다.

<47> [화학식 (V)]



<48> <49> Y-H 는 아미노기의 질소에 결합된 수소 원자 H를 가진 아민을 나타낸다.

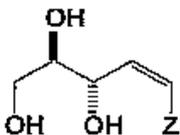
<50> 본 발명의 바람직한 구현예에서, Y-H 로 표시되는 아미노기 함유 시약은 선형 또는 환형 이차 아민; β-카르보닐기를 갖는 일차 아민, 바람직하게는 3-아미노-2-인돌리논이며, 이는 α-케토산들의 탈카르복실화에 효과적인 것으로 밝혀졌다 (Hanson, J. Chem. Education, 1987, 591-595). 이들 경우 각각에서, 화학식 (V) 의 -Y 는 이들 아미노기 함유 시약으로부터 유도된 개별적인 질소 함유 잔기를 나타낸다.

<51> 바람직하게는, 화학식 (V)의 화합물은 Y-H 로서 선형 또는 환형 이차 아민의 반응을 통해 제조된 엔아민을 나타낸다.

<52> 바람직한 환형 이차 아민들은 모르폴린, 피롤리딘, 피페리딘, 또는 N-메틸 피페라진이며; 바람직한 비환형 아민들은 화학식 R₁-NH-R₂ 의 화합물들로, 식 중 R₁ 및 R₂ 는 독립적으로 탄소수 1-8, 바람직하게는 1-4 의 선형 또는 분지형 알킬기를 나타낸다. 비환형 아민으로서 특히 바람직한 것은 디에틸아민이다. 환형 아민으로서 특히 바람직한 것은 모르폴린이다.

<53> 화학식 (V)의 화합물 또는 그의 트랜스 이성질체 또는 그의 보호 형태는 Z-H (식 중, H 는 수소 원자를 나타내고, Z 는 이탈기를 나타낸다) 와 더 반응하여, 2'-데옥시뉴클레오시드 전구체로서, 화학식 (VI)의 화합물, 또는 그의 개별적인 트랜스 이성질체 또는 그의 보호 형태를 생성할 수 있다.

<54> [화학식 (VI)]



<55> <56> Z-H 는 바람직하게는 물이고, 이 경우 화학식 (VI)의 화합물은 DRI 또는 그의 보호 형태이다 (케토-엔올 호변 이성).

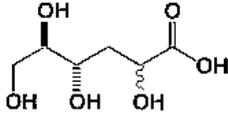
<57> 바람직하게는, 화학식 (V)의 화합물의 제조는 벤젠 중에서 KDG 를 아민, 예컨대 모르폴린과, 실시예 7 에 기재된 방법을 사용하여 환류 하에 반응시킴에 의해 실시하여 1-N-모르폴리노-3,4,5-트리히드록시-펜텐-1 을 생성할 수 있다. 물을 사용한 산 촉매된 가수분해로 2-데옥시-D-리보오스 (DRI)를 생성한다.

<58> β-수소들을 함유하는 α-옥소카르복실산으로부터 엔아민을 거친 알데히드의 일반적인 경로는 Stamos (Tetrahedron Lett. 23 (1982), 459-462)에 의해 기재되어 있다. 엔아민들의 다른 제조 및 가수분해 방법

들도 다른 곳에 기재되어 있다 (Stork, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963), 207-222; Stamhuis, J. Org. Chem. 30 (1965), 2156-2160).

<59> 본 발명의 다른 구현예에서, KDG 또는 그의 염은, 화학식 (VII)로 표시되는 3-데옥시-D-글루콘산 (DGN) 및/또는 3-데옥시-D-만논산 (DMN) 또는 이들 화합물들의 염들로 전환된다.

<60> [화학식 (VII)]



<61>

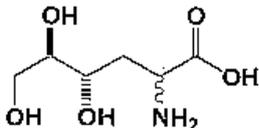
<62> 이 반응의 결과로 생성되는 생성물들은, 바람직하게는 과산화수소를 이용하여, (산화적) 탈카르복실화되어 DRI 를 생성한다. DGN 및 DMN 또는 그들의 염들의 혼합물의 제조는 KDG 또는 그의 염들로부터 환원에 의해 실행 된다.

<63> 바람직하게, 2-데옥시-D-리보오스 (DRI) 의 제조는, 실온에서 나트륨 보로하이드라이드를 사용하여, Weissbach (J. Biol. Chem. 234 (1959), 705-709)에 의해 2-케토-3-데옥시헥톤산에 대해 기재된 방법을 사용하여, 수 중 에서 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루콘산의 비입체특이적(non-stereoselective) 환원 후, 예컨대, [US 특허 3,312,683; Richards J. Chem. Soc. (1954), 3638-3640; Sowden J. Am. Chem. Soc. 76 (1954), 3541-3542]에 기재된 것과 같이, 과산화수소를 사용하여 3-데옥시-D-글루코네이트 및 3-데옥시-D-만노네이트의 산화적 탈카르복실화에 의해 실시된다.

<64> 다른 바람직한 구현예에서, DGN 및 DMN 혼합물의 제조는, 실온에서 6 바의 압력 하에 6몰% 의 니켈 라니 (Raney) 촉매 또는 백금 산화물을 사용하여, 수용액 중의 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트의 수소화에 의 해 실시된다.

<65> 본 발명의 다른 구현예에서, KDG 또는 그의 염은, 화학식 (VIII)으로 표시되는 3-데옥시-D-글루코사미네이트 (DGM) 또는 3-데옥시-D-만노사미네이트 (DMM) 또는 이들 화합물들의 염으로 전환된다.

<66> [화학식 (VIII)]



<67>

<68> 이 반응의 결과로 생성되는 생성물들은, 바람직하게는 닌히드린을 사용하여 (산화적) 탈카르복실화되어 DRI 를 생성한다. DGM 및 DMM 혼합물 또는 그들의 염들의 제조는 KDG 또는 그의 염들로부터의 환원성 아민화에 의 해 일어난다.

<69> 바람직하게, 2-데옥시-D-리보오스의 제조는, 실온에서 암모니아 및 나트륨 시아노보로하이드라이드를 사용하여, 수용액 중 나트륨 또는 칼륨 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트의 비입체특이적인 환원성 아민화에 이어, Shelton (J. Am. Chem. Soc. 118 (1996), 2117-2125; 및 Borch, J. Am. Chem. Soc. 93 (1971), 2897; Durrwachter, J. Am. Chem. Soc. 108 (1986), 7812 거기에서 참조됨)에 의해 2-데옥시-D-알로스의 합성에 대해 기재된 방법으로, 닌히드린을 사용하여 3-데옥시-D-2-글루코사미네이트 및 3-데옥시-D-2-만노사미네이트의 산화 적 탈카르복실화에 의해 실시된다.

<70> 또한, 본 발명은, 화학식 (I) 의 화합물 또는 그의 염들 중 하나 (KDG)를 하나의 단일한 단계에서 전환시킴에 의한 화학식 (III) 의 화합물 (2-데옥시-D-리보오스) 의 제조방법을 제공한다. 바람직하게 이 전환은 효소 촉매를 통해 달성된다. 이 전환은 바람직하게는 케토산 디카르복실라제에 의해 촉매된다. 바람직한 케 토산 디카르복실라제들은 티아민 피로포스페이트 (TPP) 의존성 케토산 디카르복실라제들이다. TPP 의존성 케토산 디카르복실라제들의 예들로는 피루베이트 디카르복실라제 (EC 4.1.1.1), 벤조일포르메이트 디카르복실라 제 (EC 4.1.1.7), 인돌피루베이트 디카르복실라제 (EC 4.1.1.74), 포스포노피루베이트 디카르복실라제, 술포피 루베이트 디카르복실라제 (EC 4.1.1.79), 옥살릴-코엔자임 A 디카르복실라제 (EC 4.1.1.8), 옥소글루타레이트 디카르복실라제 (EC 4.1.1.71) 또는 페닐피루베이트 디카르복실라제 (EC 4.1.1.43)가 있다. 다른 유기체들

로부터의 케토산 디카르복실라제들, 예컨대 피루베이트 디카르복실라제들은 KDG 를 2-데옥시-D-리보오스로 전환할 수 있다는 것을 나타낼 수 있었다 (실시에 8-12 참조). 원칙적으로, 임의의 케토산 디카르복실라제가 본 발명과 관련하여 사용될 수 있다.

<71> 본 발명에 따른 방법의 바람직한 구현예에서, 피루베이트 디카르복실라제 활성을 갖는 효소의 사용에 의해, KDG 는 2-데옥시-D-리보오스로 전환된다.

<72> 피루베이트 디카르복실라제는 하기 반응을 촉매한다:

<73> 피루베이트 + H⁺ --> 아세트알데히드 + CO₂

<74> 일부 피루베이트 디카르복실라제들 (PDC) 및 대응 pdc 유전자들은 특성화되었으며, 예를 들어 자이모모나스 모빌리스 (*Zymomonas mobilis*)로부터의 PDC (Genbank 수납번호 AAD19711; Neale 등, *J. Bacteriol.* 1987, 169:1024-1028), 사카로마이세스 세레비시에 (*Saccharomyces cerevisiae*)로부터의 PDC (Genbank 수납번호 NP013145; Candy 등, *J. Gen. Microbiol.* 1991, 137:2811-2815), 아세트박터 파스퇴리아누스 (*Acetobacter pasteurianus*)로부터의 PDC (Genbank 수납번호 AAM21208; Raj 등, *Arch. Microbiol.* 2001, 176:443-451), 자이모박터 팔마에 (*Zymobacter palmae*)로부터의 PDC (Genbank 수납번호 AAM49566; Raj 등, *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68:2869-2876), 사르시나 벤트리쿨리 (*Sarcina ventriculi*)로부터의 PDC (Genbank 수납번호 AAL18557; Lowe 등, *J. Gen. Microbiol.* 1992, 138:803-807) 가 있다. 많은 다른 피루베이트 디카르복실라제들이 식물들, 진균들 및 세균들에 존재하는 것으로 보이며, 이는 이들 유기체들에서, 확립된 pdc 유전자들과 서열 상동성을 공유하는 유전자들의 출현에 의해 증명된다. 이러한 추정적인 피루베이트 디카르복실라제들의 예들로는 하기가 있다:

<75> **식물들로부터의 PDC:**

<76> 아라비도시스 탈리아나 (*Arabidopsis thaliana*) (Genbank 수납번호 T48155)

<77> 에키노클로아 크루스-갈리 (*Echinochloa crus-galli*) (Genbank 수납번호 AAM18119)

<78> 오리자 사티바 (*Oryza sativa*) (Genbank 수납번호 NP922014)

<79> 리조푸스 오리자에 (*Rhizopus oryzae*) (Genbank 수납번호 AAM73540)

<80> 로투스 코르니쿨라투스 (*Lotus corniculatus*) (Genbank 수납번호 AA072533)

<81> 제아 메이스 (*Zea mays*) (Genbank 수납번호 BAA03354)

<82> 피숨 사티붐 (*Pisum sativum*) (Genbank 수납번호 CAA91445)

<83> 가든 피 (*Garden pea*) (Genbank 수납번호 S65470)

<84> 니코티아나 타바쿰 (*Nicotiana tabaccum*) (Genbank 수납번호 CAA57447)

<85> 솔라눔 투베로숨 (*Solanum tuberosum*) (Genbank 수납번호 BAC23043)

<86> 프라가리아 아나나사 (*Fragaria ananassa*) (Genbank 수납번호 AAL37492)

<87> 쿠쿠미스 멜로 (*Cucumis melo*) (Genbank 수납번호 AAL33553)

<88> 비티스 비니페라 (*Vitis vinifera*) (Genbank 수납번호 AAG22488)

<89> **진균들로부터의 PDC:**

<90> 사카룸 오피시나룸 (*Saccharum officinarum*) (Genbank 수납번호 CAB61763)

<91> 아스퍼질러스 오리자에 (*Aspergillus oryzae*) (Genbank 수납번호 AAD16178)

<92> 아스퍼질러스 파라시티쿠스 (*Aspergillus parasiticus*) (Genbank 수납번호 P51844)

<93> 사카로마이세스 세레비시에 (Genbank 수납번호 NP013145)

<94> 플라물리나 벨루티페스 (*Flammulina velutipes*) (Genbank 수납번호 AAR00231)

<95> 사카로마이세스 클루이베리 (*Saccharomyces kluyveri*) (Genbank 수납번호 AAP75899)

- <96> 스킴조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*) (Genbank 수납번호 CAB75873)
- <97> 캔디다 글라브라타 (*Candida glabrata*) (Genbank 수납번호 AAN77243)
- <98> 뉴로스포라 크라사 (*Neurospora crassa*) (Genbank 수납번호 JN0782)
- <99> 피치아 스티피스 (*Pichia stipis*) (Genbank 수납번호 AAC03164)
- <100> 쿠이버로마이세스 락티스 (*Kuyveromyces lactis*) (Genbank 수납번호 CAA61155)
- <101> 에메리셀라 니둘란스 (*Emericella nidulans*) (Genbank 수납번호 AAB63012)
- <102> **원핵생물들로부터의 PDC:**
- <103> 마이코박테리움 보비스 (*Mycobacterium bovis*) (Genbank 수납번호 CAD93738)
- <104> 마이코박테리움 레프라에 (*Mycobacterium leprae*) (Genbank 수납번호 CAC31122)
- <105> 마이코박테리움 투베르쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*) (Genbank 수납번호 NP215368)
- <106> 마이코플라스마 페네트란스 (*Mycoplasma penetrans*) (Genbank 수납번호 NP758077)
- <107> 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 (*Clostridium acetobutylicum*) (Genbank 수납번호 NP149189)
- <108> 아세토박터 파스퇴리아누스 (Genbank 수납번호 AAM21208)
- <109> 자이모박터 팔마에 (Genbank 수납번호 AAM49566)
- <110> 자이모모나스 모빌리스 (Genbank 수납번호 AAD19711)
- <111> 사르시나 벤트리쿨리 (Genbank 수납번호 AAL18557)
- <112> 노스톡 팅티포르메 (*Nostoc punctiforme*) (Genbank 수납번호 ZP00110850)
- <113> 이러한 효소들은, 대응하는 유전자를 과발현하는 재조합 미생물들에 의해 용이하게 제조될 수 있다. TPP 의 존성 케토산 디카르복실라제들을 코딩(coding)하는 유전자들의 예로는, 자이모모나스 모빌리스로부터의 pdc (Genbank 수납번호 AF124349), 사카로마이세스 세레비시에로부터의 pdc (Genbank 수납번호 NC001144), 아세토박터 파스퇴리아누스로부터의 pdc (Genbank 수납번호 AF368435), 자이모박터 팔마에로부터의 pdc (Genbank 수납번호 AF474145), 사르시나 벤트리쿨리로부터의 pdc (Genbank 수납번호 AF354297)가 있다. 다른 pdc 유전자들은 추정적인 피루베이트 디카르복실라제들의 상기 리스트에 대응하는 Genbank 에서 찾을 수 있다.
- <114> 바람직한 구현예에서, 피루베이트 디카르복실라제는 진핵성 기원의 것이며, 보다 바람직하게는, 효모로부터의 것이고, 가장 바람직하게는 사카로마이세스 세레비시에로부터의 것이다. 특히 바람직한 구현예에서, 피루베이트 디카르복실라제는, 서열번호 21 에 나타낸 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 사카로마이세스 세레비시에로부터의 피루베이트 디카르복실라제이다 (Genbank 수납번호 NP013145 도 참조).
- <115> 또 다른 바람직한 구현예에서, 피루베이트 디카르복실라제는 원핵성 기원의 것이며, 보다 바람직하게는 자이모모나스속의 유기체로부터의 것이고, 가장 바람직하게는 자이모모나스 모빌리스로부터의 것이다. 특히 바람직한 구현예에서, 피루베이트 디카르복실라제는, 서열번호 19 에 나타낸 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 자이모모나스 모빌리스로부터의 피루베이트 디카르복실라제이다 (Genbank 수납번호 AAD19711 도 참조).
- <116> 다른 바람직한 구현예에서, 원핵성 피루베이트 디카르복실라제는 아세토박터 속의 유기체로부터의 것이며, 보다 바람직하게는 아세토박터 파스퇴리아누스 종으로부터의 것이다. 특히 바람직한 피루베이트 디카르복실라제는 서열번호 25 에 주어진 것과 같은 아미노산 서열을 나타내는 아세토박터 파스퇴리아누스의 것이다 (GenBank 수납번호 AAM21208 도 참조).
- <117> 더욱 바람직한 구현예에서, 피루베이트 디카르복실라제는 자이모박터 속의, 보다 바람직하게는 자이모박터 팔마에 종의 유기체로부터의 것이다. 서열번호 29 에 주어진 아미노산 서열을 나타내는 자이모박터 팔마에로부터의 피루베이트 디카르복실라제가 특히 바람직하다 (GenBank 수납번호 AAM49566 도 참조).
- <118> 본 발명에 따른 방법의 다른 바람직한 구현예에서, 벤조일포르메이트 디카르복실라제 활성을 갖는 효소를 사용함에 의해, KDG 를 2-데옥시-D-리보오스로 전환한다.
- <119> 벤조일포르메이트 디카르복실라제는 하기 반응을 촉매한다:

- <120> 벤조일포르메이트 + H⁺ --> 벤즈알데히드 + CO₂
- <121> 슈도모나스 푸티다 (*Pseudomonas putida*) 로부터의 벤조일포르메이트 디카르복실라제 (BDC) (Genbank 수납번호 AAC15502; Tsou 등, *Biochemistry*. 1990, 29:9856-9862) 및 대응 유전자 md1C (Genbank 수납번호 AY143338)도 특성화되어 있다. 이 효소는 2-케토-4,5-디히드록시발레레이트의 D 및 L 이성질체들을 모두 3,4-디히드록시 부타날의 각각의 이성질체로 탈카르복실화시키는 것으로 나타났다 (Niu 등, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003), 12998-12999). 많은 다른 벤조일포르메이트 디카르복실라제들이 세균들 및 원시세균들에 존재하는 것으로 보이며, 이는 이들 유기체에서, 잘 확립된 BDC 를 코딩하는 유전자들과 서열 상동성을 공유하는 유전자들의 출현에 의해 증명된다. 이러한 추정적인 벤조일포르메이트 디카르복실라제들의 예들로는 하기가 있다:
- <122> **세균들로부터의 BDC:**
- <123> 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*) (Genbank 수납번호 NP_253588)
- <124> 로돕슈도모나스 팔루스트리스 (*Rhodopseudomonas palustris*) (Genbank 수납번호 NP_946955)
- <125> 스트렙토마이세스 코엘리콜러 (*Streptomyces coelicolor*) (Genbank 수납번호 NP_631486)
- <126> 크로모박테리움 비올라세움 (*Chromobacterium violaceum*) (Genbank 수납번호 NP_902771)
- <127> 브래디리조비움 자포니쿰 (*Bradyrhizobium japonicum*) (Genbank 수납번호 Nu_774243)
- <128> **원시세균들로부터의 BDC:**
- <129> 솔폴로부스 솔파타리쿠스 (*Sulfolobus solfataricus*) (Genbank 수납번호 Nu_343070)
- <130> 썬모플라스마 애시도필룸 (*Thermoplasma acidophilum*) (Genbank 수납번호 Nu_393976)
- <131> 썬모플라스마 볼카눔 (*Thermoplasma volcanium*) (Genbank 수납번호 NP_111716)
- <132> 이러한 효소들은 대응하는 bdc 유전자를 과발현하는 재조합 미생물들에 의해 용이하게 제조될 수 있다. 이러한 유전자들은, 추정적인 벤조일포르메이트 디카르복실라제들의 상기 리스트에 대응하는 Genbank 에서 찾을 수 있다.
- <133> 본 발명에 따른 방법에 사용될 수 있는 티아민 의존성 디카르복실라제에 대한 다른 예로는 포스포노피루베이트 디카르복실라제가 있다. 몇몇 포스포노피루베이트 디카르복실라제들 (PPD) 및 그 대응하는 유전자들이 특성화되어있으며, 예를 들어 박테로이데스 프라질리스 (*Bacteroides fragilis*)로부터의 PPD (Genbank 수납번호 AAG26466 ; Zhang 등, *J. Biol. Chem.* 2003, 278:41302-41308), 스트렙토마이세스 웨드모렌시스 (*Streptomyces wedmorensis*)로부터의 PPD (Genbank 수납번호 BAA32496; Nakashita 등, *J. Antibiot.* 1997, 50:212-219)가 있다. 많은 다른 포스포노피루베이트 디카르복실라제들이 세균들에 존재하는 것으로 보이며, 이는 이들 유기체에서, 잘 확립된 PPD 를 코딩하는 유전자들과 서열 상동성을 공유하는 유전자들의 출현에 의해 증명된다. 이러한 추정적인 포스포노피루베이트 디카르복실라제들의 예들로는 하기가 있다: 박테로이데스 테타이오타옴이크론 (*Bacteroides thetaiotaomicron*) 로부터의 PPD (Genbank 수납번호 NP_810632), 아미콜라톱시스 오리엔탈리스 (*Amycolatopsis orientalis*)로부터의 PPD (Genbank 수납번호 CAB45023), 클로스트리듐 테타니 E88 (*Clostridium tetani* E88)로부터의 PPD (Genbank 수납번호 NP_782297), 스트렙토마이세스 비리도크로모젠스 (*Streptomyces viridochromogenes*) 로부터의 PPD (Genbank 수납번호 CAA74722), 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 (*Streptomyces hygroscopicus*)로부터의 PPD (Genbank 수납번호 BAA07055), 스트렙토마이세스 코엘리콜러 A3 로부터의 PPD (Genbank 수납번호 NP_733715), 스트렙토마이세스 리시리엔시스 (*Streptomyces rishiriensis*) (Genbank 수납번호 AAG29796), 보르데텔라 페르투스시스 (*Bordetella pertussis*) (Genbank 수납번호 CAE 41214). 이러한 효소들은 대응 유전자를 과발현하는 재조합 미생물들에 의해 용이하게 제조될 수 있다.
- <134> 본 발명에 따른 방법에 사용될 수 있는 티아민 의존성 디카르복실라제들의 추가적인 예로는 솔포피루베이트 디카르복실라제가 있다. 두 개의 서브유닛 (subunit) ComD (Genbank 수납번호 P58415) 및 ComE (Genbank 수납번호 P58416) 로 이루어지는 메타노코쿠스 잔나시이 (*Methanococcus jannaschii*) (Graupner 등, *J. Bacteriol.* 2000, 182:4862-4867)로부터의 솔포피루베이트 디카르복실라제 (SPD) 및 그 대응 유전자들은 특성화되어 있다. 많은 다른 솔포피루베이트 디카르복실라제들이 원시세균들 및 세균들에 존재하는 것으로 보이며, 이는 이들 유기체에서, 잘 확립된 SPD 를 코딩하는 유전자들과 서열 상동성을 공유하는 유전자들의 출

현에 의해 증명된다.

- <135> 본 발명에 따른 방법에 사용될 수 있는 티아민 의존성 디카르복실라제들의 추가의 다른 예로 인돌피루베이트 디카르복실라제가 있다. 몇 가지 인돌피루베이트 디카르복실라제들 (IPD) 및 그 대응 유전자들이 특성화되어 있으며, 예를 들어 엔테로박터 클로아카에 (*Enterobacter cloacae*)로부터의 IPD (Genbank 수납번호 BAA14242; Scutz 등, 2003, *Eur. J. Biochem.* 270:2322-2331); 아조스피릴룸 브라실렌스 (*Azospirillum brasilense*)로부터의 IPD (Genbank 수납번호 AAC36886; Costacurta 등, *Mol. Gen. Genet.* 1994, 243:463-472); 어위니아 헤르비콜라 (*Erwinia herbicola*)로부터의 IPD (Genbank 수납번호 AAB06571; Brandi 등, *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62:4121-4128)가 있다. 많은 다른 인돌피루베이트 디카르복실라제들이 세균들에 존재하는 것으로 보이며, 이는 이들 유기체에서, 잘 확립된 IPD 를 코딩하는 유전자들과 서열 상동성을 공유하는 유전자들이 출현에 의해 증명된다.
- <136> 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 티아민 의존성 디카르복실라제들의 추가의 다른 예로는 페닐피루베이트 디카르복실라제가 있다. 효모 (Genbank 수납번호 NP010668; Vuralhan 등, *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69:4534-41)로부터의 페닐피루베이트 디카르복실라제 및 대응 유전자 AR010 (Genbank 수납번호 NC001136)가 특성화되어 있다.
- <137> 탈카르복실화 단계가 효소적 반응에 의해 실행되는 본 발명에 따른 방법의 바람직한 구현예에서, pH 값은 산 첨가에 의해 pH 5 내지 pH 9 사이, 바람직하게는 pH 6 내지 pH 8 사이로 조절된다. 원칙적으로, 상기 목적을 위해 임의의 적합한 산을 사용할 수 있다. 바람직한 산들로는 HCl, H₂SO₄, D-글루콘산 또는 2-테하이드로-3-테옥시-D-글루콘산이 있다.
- <138> 본 발명의 또다른 측면은 D-글루코네이트 (GCN) 또는 D-글루코사미네이트로부터, 제조합 효소들의 사용을 통한 KDG 의 편리하고 비용면에서 효과적인 제조방법이다.
- <139> 본 발명의 방법의 바람직한 구현예에서, 화학식 (I)의 화합물은, D-글루코네이트 탈수 효소 활성을 이용함에 의해 D-글루코네이트염으로부터 예비 단계에서 제조된다. 바람직한 염들은 칼륨 또는 나트륨 D-글루코네이트이다.
- <140> 바람직하게는, D-글루코네이트 탈수 효소는 하기로 이루어지는 균으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된다:
- <141> (a) 서열번호 2 의 아미노산 서열을 함유하는 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열들;
- <142> (b) 서열번호 1 의 코딩 서열을 함유하는 뉴클레오티드 서열들;
- <143> (c) (a) 또는 (b)의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 절편을 암호화하는 뉴클레오티드 서열들;
- <144> (d) (a) 내지 (c) 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열과 하이브리드화되는 뉴클레오티드 서열들; 및
- <145> (e) 유전 암호 변성의 결과로, (d)의 뉴클레오티드 서열로부터 벗어난 (deviate) 뉴클레오티드 서열들.
- <146> D-글루코네이트 탈수 효소를 사용한 KDB 또는 그의 염들의 효소적 합성은 하기 반응에 따라 진행된다: 물 한 분자의 제거에 의해 D-글루코네이트가 KDG 로 전환된다. D-글루코네이트 탈수 효소의 활성은 다른 세균종들, 예컨대 알칼리제네스 (*Alcaligenes*) (Kerstens, *Methods in Enzymology* 42 (1975), 301-304); 클로스트리움 파스퇴리아눔 (*Clostridium pasteurianum*), (Gottschalk, *Methods in Enzymology* 90 (1982), 283-287); 썬모폴라스마 애시도필룸 (Budgen, *FEBS Letters* 196 (1986), 207-210) 및 솔포로부스 솔파타리쿠스 (*Sulfolobus solfataricus*) (Nicolaus, *Biotechnology Letters* 8 (7) (1986), 497-500)에서 특성화되어 있다. 바람직한 D-글루코네이트 탈수 효소는 몇 개의 수집 균주(collection strains)를 D-글루코네이트 탈수 효소 활성에 대해 스크리닝 (screening)함에 의해 확인하였다. *gcnD*로 명명되는, D-글루코네이트 탈수 효소를 암호화하는 유전자를 아그로박테리움 튜메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 균주 C58 의 게놈 라이브러리로부터 선별하고, 발현을 위해 최적화된 다복제 (multi copy) 벡터에 삽입하였다. 상기 *gcnD* 유전자를 과발현하는 대장균 세포들로부터의 조추출물이 D-글루코네이트의 KDG 로의 총 전환을 촉매하는 것으로 나타났다 (실시예 2 참조).
- <147> 본 발명의 방법의 추가의 바람직한 구현예에서, 화학식 (I)의 화합물은 D-글루코사미네이트 디아미나제 활성을 이용함에 의해, 예비 단계에서 D-글루코사미네이트로부터 제조된다. 바람직하게는, 상기 D-글루코사미네이트 디아미나제는 하기로 이루어지는 균으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드에 의해

암호화된다:

- <148> (f) 서열번호 4의 아미노산 서열을 함유하는 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열들;
- <149> (g) 서열번호 3의 코딩 서열을 함유하는 뉴클레오티드 서열들;
- <150> (h) (a) 또는 (b)의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 절편을 암호화하는 뉴클레오티드 서열들;
- <151> (i) (a) 내지 (c) 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열과 하이브리드화되는 뉴클레오티드 서열들; 및
- <152> (j) 유전 암호 변성의 결과로, (d)의 뉴클레오티드 서열로부터 벗어난 뉴클레오티드 서열들.
- <153> D-글루코사미네이트 디아미나제를 사용한 KDG 또는 그의 염들의 효소적 합성은 하기 반응에 따라 진행된다: 한 분자의 물 및 한 분자의 암모니아의 제거에 의해 D-글루코사미네이트가 KDG로 전환된다. D-글루코사미네이트 디아미나제의 활성은 다른 세균 종들, 예컨대 슈도모나스 플루오레센스 (*Pseudomonas fluorescens*) (Iwamoto, Agric. Biol. Chem. 53 (1989), 2563-2569), 아그로박테리움 라디오박터 (*Agrobacterium radiobacter*) (Iwamoto, FEBS Letters 104 (1979), 131-134; Iwamoto, J. Biochem. 91 (1982), 283-289)에서 특성화되어 있고, 그의 Mn^{2+} 이온에 대한 요구는 (Iwamoto, Biosci. Biotech. Biochem. 59 (1995), 408-411)에 나타나 있다.
- <154> 바람직한 D-글루코사미네이트 디아미나제는 몇 개의 수집 균주들을 D-글루코사미네이트 디아미나제 활성에 대해 스크리닝함에 의해 확인하였다. *gmaA* 로 명명된, D-글루코사미네이트 디아미나제를 암호화하는 유전자는, 추정적인 D-세린 디아미나제로서 표시되는 (annotated) 유전자를 클로닝함에 의해 아그로박테리움 튜메파시엔스 균주 C58로부터 단리되었다. 또한, 상기 *gmaA* 유전자는 발현을 위해 최적화된 다중 복제 벡터 내로 삽입되었다. *gmaA* 유전자를 과발현하는 대장균 세포들로부터의 조추출물이 D-글루코사미네이트의 KDG로의 전환을 촉매하는 것으로 나타났다 (실시예 4 참조).
- <155> 바람직한 구현예에서, 본 발명은 화학식 III의 화합물의 제조방법에 관한 것이며, 특히 D-글루코네이트 또는 D-글루코사미네이트로부터 출발하여 효소 반응들에 의해 2-데옥시-D-리보오스를 생성하는 방법에 관한 것으로, 첫 번째 단계에서 D-글루코네이트 또는 D-글루코사미네이트가 상기 기재된 바와 같이 KDG로 전환되고, 두 번째 단계에서 KDG가 상기 기재된 바와 같이 2-데옥시-D-리보오스로 전환된다.
- <156> 따라서, D-글루코네이트의 KDG로의 효소적 전환은 D-글루코네이트 탈수 효소의 사용에 의해 달성될 수 있다. D-글루코사미네이트의 KDG로의 효소적 전환은 D-글루코사미네이트 디아미나제의 사용에 의해 달성될 수 있다. 바람직한 구현예들에 대해, 상기에서 이미 설명된 것들이 동일하게 적용된다.
- <157> 생성된 KDG의 2-데옥시-D-리보오스로의 효소적 전환은 케토산 디카르복실라제의 사용에 의해 달성될 수 있다. 바람직한 구현예들에 대해, 상기에서 설명된 것들이 동일하게 적용된다.
- <158> D-글루코네이트 또는 D-글루코사미네이트를, KDG를 거쳐 2-데옥시-D-리보오스로 전환하는 효소적 2단계 방법은 대응 효소들을 발현하는 세포들의 세포 추출물들을 사용함에 의해, 또는 정제되거나 부분적으로 정제된 효소들을 사용함에 의해 시험관 내에서 실시될 수 있다. 상기 효소들은 유기체 내에서 천연적으로 발현되는 효소들이거나 또는 재조합적으로 제조될 수 있는 효소들일 수 있다. 대응 (재조합) 효소들의 제조 및 분리 방법들은 본 기술분야의 당업자에게 공지이다.
- <159> 바람직한 구현예에서, D-글루코네이트 또는 D-글루코사미네이트를, KDG를 거쳐 2-데옥시-D-리보오스로 전환하는 효소적 2단계 방법은 요구되는 효소 활성들을 발현하는 적당한 유기체를 사용함에 의해 생체 내에서 실시될 수 있다. 이러한 유기체는 임의의 유형의 유기체일 수 있으며, 바람직하게는 세포, 예로서 식물, 동물, 진균성 세포 또는 세균성 세포이다. 가장 바람직하게는 진균성 또는 세균성 세포들이 사용된다. 바람직한 진균들은 사카로마이세스 세레비시에와 같은 효모이고; 바람직한 세균성 세포들은, 예로서 대장균, 자이모모나스 모빌리스, 자이모박터 팔마에, 아세토박터 파스퇴리아누스, 아시네토박터 칼코아세티쿠스 (*Acinetobacter calcoaceticus*), 아그로박테리움 튜메파시엔스 및 바실러스 서브틸리스이다. 상기 유기체는, 상기 효소적 활성들 중 하나, 즉 KDG 제조를 위한 D-글루코네이트 탈수 효소 또는 D-글루코사미네이트 디아미나제, 또는 KDG의 2-데옥시-D-리보오스로의 전환을 위한 케토산 디카르복실라제를 이미 내생적으로 발현하는 유기체일 수 있고, 여기에서 개별적인 다른 효소적 활성은, 대응 효소를 암호화하는 대응하는 외생의 핵산 분자의 도입으로 인해 발현된다. 다르게는, 상기 유기체는 D-글루코네이트 또는 D-글루코사미네이트를 KDG로 전환하고, 2-데옥시-D-리보오스로 더욱 전환하는데 요구되는 효소 활성들을 천연적으로 발현하지 않는 유기체일 수도 있으며,

여기에서 D-글루코네이트 탈수 효소 또는 D-글루코사미네이트 디아미나제 및 케토산 디카르복실라제를 각각 암호화하는 대응 외래 핵산 분자들이 도입되었다.

- <160> 특히 바람직한 구현예에서, 상기 유기체는 KDG 키나제 (kdgK) 활성을 발현하지 않는 유기체이다. 이러한 효소 활성은 KDG 를 KDPG 로 인산화시킬 수 있으며, KDPG 는 그 후 알돌라제에 의해 피루베이트와 글리세르알데히드-포스페이트로 절단되어, 그에 따라 KDG 를 다른 원하지 않는 대사 경로로 전환시킬 수 있다. 본 발명의 방법을 위해 kdgK 유전자를 천연적으로 발현하지 않는 유기체를 사용할 수 있다. 사용된 유기체가 kdgK 를 천연적으로 발현하는 경우, 대응 kdgK 유전자가 불활성화된 상기 유기체의 돌연변이체 또는 변형체들을 제조하는 수단 및 방법들은 당업자에게 공지이다. 본 발명에 따라 기재된 방법을, D-글루코네이트의 KDG 로의 전환을 위한 D-글루코네이트 탈수 효소들 및 KDG 의 2-데옥시-D-리보오스로의 전환을 위한 케토산 디카르복실라제를 발현하는 유기체를 사용함에 의해 생체 내에서 실시하는 경우, 그 유기체를 배양하는데 사용된 배양매지 중에서 D-글루코네이트를 기질로서 제공할 수 있다는 장점이 있다. D-글루코네이트는 그 유기체에 의해 섭취되고, 2-데옥시-D-리보오스로 전환된다.
- <161> 또 다른 특히 바람직한 구현예에서, 상기 유기체는 KDG 알돌라제 (대장균의 eda 유전자에 의해 암호화됨) 활성을 발현하지 않는 유기체이다. 이러한 효소 활성은 KDG 를 피루베이트와 글리세르알데히드로 절단하여, 그에 따라 KDG 를 다른 원하지 않는 대사 경로로 전환시킬 것이다. 본 발명에 따른 방법에 eda 유전자를 천연적으로 발현하지 않는 유기체들을 사용하는 것이 가능하다. 사용된 유기체가 eda 유전자를 발현하는 경우, 대응 eda 유전자가 불활성화된, 상기 유기체의 돌연변이체 또는 변형체들을 제조하는 수단 및 방법들은 당업자에게 공지이다.
- <162> 다른 특히 바람직한 구현예에서, 상기 유기체는 2-데옥시-D-리보오스 알돌라제 (대장균에서 deoC 유전자에 의해 암호화됨) 활성을 발현하지 않는 유기체이다. 이러한 효소 활성은 2-데옥시-D-리보오스를 아세트알데히드와 글리세르알데히드로 절단하여, 그에 따라 2-데옥시-D-리보오스를 다른 원하지 않는 대사 경로로 전환시킬 것이다. 본 발명에 따른 방법에 deoC 유전자를 천연적으로 발현하지 않는 유기체들을 사용하는 것이 가능하다. 사용된 유기체가 deoC 유전자를 발현하는 경우, 대응 deoC 유전자가 불활성화된, 상기 유기체의 돌연변이체 또는 변형체들을 제조하는 수단 및 방법들은 당업자에게 공지이다. 예로서, 대장균의 한 deoC 돌연변이체 (Valentin-Hansen, EMBO J. 1 (1982), 317-322) 및 대장균의 deo 오페론의 멸실 방법 (Kaminski, J. Biol. Chem. 277 (2002), 14400- 14407; Valentin-Hansen, Molec. Gen. Genet. 159 (1978), 191-202)이 보고되었다.
- <163> 또한, 본 발명은, D-글루코네이트 탈수 효소의 발현에 의해 D-글루코네이트를 KDG 로 효소적으로 전환시킬 수 있고/있거나, D-글루코사미네이트 디아미나제의 발현에 의해 D-글루코사미네이트를 KDG 로 효소적으로 전환시킬 수 있고, 또한 케토산 디카르복실라제에 의해 촉매되는 탈카르복실화 반응에 의해 KDG 를 2-데옥시-D-리보오스로 효소적으로 전환할 수 있는 유기체에 관한 것이다. 상기 유기체는 원칙적으로 임의의 적당한 유기체일 수 있으며, 바람직하게는 세포, 예로서 식물세포, 동물세포, 진균성 세포 또는 세균성 세포이다. 보다 바람직하게는, 이는 진균성 또는 세균성 세포이다. 바람직한 진균들은 효모, 예로서 사카로마이세스 세레비시에이다. 바람직한 세균들은 대장균, 자이모모나스 모빌리스, 자이모박터 팔마에, 아세토박터 파스퇴리아누스, 아시네토박터 칼코아세티쿠스, 아그로박테리움 튜메파시엔스 및 바실러스 서브틸리스이다. 한 측면에서, 상기 유기체는 D-글루코네이트 탈수 효소 또는 D-글루코사미네이트 디아미나제를 이미 내생적으로 발현하고, 그 안으로 KDG 의 2-데옥시-D-리보오스로의 탈카르복실화를 촉매할 수 있는 케토산 디카르복실라제를 암호화하는 외래의 핵산 분자가 도입된 유기체이다. 케토산 디카르복실라제의 바람직한 구현예들에 대해, 이전에 설명된 것들이 동일하게 적용된다.
- <164> 다른 측면에서, 상기 유기체는 탈카르복실화 반응에 의해 KDG 를 2-데옥시-D-리보오스로 전환시킬 수 있는 케토산 디카르복실라제는 이미 발현하지만, D-글루코네이트 탈수 효소 또는 D-글루코사미네이트 디아미나제를 천연적으로 발현하지는 않고, 그 안으로 D-글루코네이트 탈수 효소를 암호화 및/또는 D-글루코사미네이트 디아미나제를 암호화하는 외래의 핵산 분자가 도입된 유기체이다. 즉, 상기 유기체는 D-글루코네이트 탈수 효소 또는 D-글루코사미네이트 디아미나제 또는 이들 효소 모두를 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있다.
- <165> 다른 측면에서, 상기 유기체는, D-글루코네이트 탈수 효소, D-글루코사미네이트 디아미나제 및 KDG 를 탈카르복실화에 의해 2-데옥시-D-리보오스로 전환할 수 있는 케토산 디카르복실라제를 천연적으로 발현하지 않고, 그 안으로 D-글루코네이트 탈수 효소 또는 D-글루코사미네이트 디아미나제, 또는 이들 모두를 암호화하는 외래의 핵산 분자들, 및 KDG 를 탈카르복실화에 의해 2-데옥시-D-리보오스로 전환할 수 있는 케토산 디카르복실라제를 암호화하는 핵산 분자가 도입된 유기체이다.

- <166> 본 발명에 따른 유기체들에서 발현되는 D-글루코네이트 탈수화제, D-글루코사민 디아미나제 및 케토산 디카르복실라제의 바람직한 구현예에 대해, 본 발명에 따른 방법과 관련하여 상기 설명된 것들이 동일하게 적용된다.
- <167> 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 유기체는 KDG 키나제 (kdgK) 활성을 발현하지 않는다. 이는 천연적으로 kdgK를 발현하지 못하는 유기체이거나 또는 천연적으로는 kdgK를 발현하지만, 그 안에서 예컨대, 유전자 붕괴 또는 본 기술분야의 당업자에게 공지된 다른 적합한 방법들에 의해 대응 유전자가 불활성화된 유기체일 수 있다.
- <168> 본 발명은 KDG의 2-데옥시-D-리보오스로의 전환방법에서, 케토산 디카르복실라제 활성을 갖는 효소 또는 그러한 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 사용에도 관한 것이다. 바람직한 구현예에 대해, 본 발명에 따른 방법과 관련하여 이미 설명된 것들이 동일하게 적용된다.
- <169> 이들 및 다른 구현예들이 본 발명의 상세한 설명 및 실시예에 의해 개시되고 포함된다. 상기 또는 하기 인용된 어떤 참고문헌들의 개시 내용은 본 출원 내에 포함된다. 또한, 본 발명에 따라 사용되는 방법, 용도 및 화합물들 중 어느 하나에 관한 추가적 문헌은 공공도서관에서, 예컨대 전자 장치들을 이용하여 검색할 수 있다. 예로서, 인터넷 상의 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html> 에서 사용가능한 공공 데이터베이스 "Medline" 을 이용할 수 있다. 다른, 데이터베이스들 및 주소들, 예컨대 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.infobiogen.fr/>, http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html, <http://www.tigr.org/> 들이 본 기술분야의 당업자에게 알려져 있으며, 예컨대 <http://www.google.de> 를 이용하여 검색가능하다.
- <170> 생물공학에서의 특허 정보의 개괄 및 과거의 조사 및 현재 지식에 대해 유용한 관련 특허 정보원들의 조사가 [Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364] 에서 주어졌다.
- <171> 또한, 여기 나타나는 "및/또는" 이라는 표현은 "및", "또는" 및 "상기 표현에 의해 연결되는 요소들의 모든 또는 임의의 다른 조합"의 의미를 포함한다.

실시예

- <172> **실시예 1: 아그로박테리움 튜메파시엔스 균주 C58 (CIP 104333)로부터 D-글루코네이트 탈수 효소를 암호화하는 유전자의 클로닝**
- <173> 아그로박테리움 튜메파시엔스 균주 C58 (CIP 104333)을 파스퇴르 균주 보존 연구소 (Institut Pasteur Collection: CIP, 프랑스 파리)로부터 수득하였다. 염색체 DNA를 추출하고, D-글루코네이트 탈수 효소 유전자를 하기 프라이머들(primers)을 사용하여 표준 실험방법 (protocol)에 따라 PCR에 의해 증폭하였다:
- <174> 5'-CCCTTAATTAATGACGACATCTGATAATCTTC-3', 서열번호 5에 나타냄;
- <175> 5'-TTTGCGCCGCTTAGTGGTTATCGCGCGGC-3', 서열번호 6에 나타냄;
- <176> 5'-CCCGGTACCATGACGACATCTGATAATCTTC-3', 서열번호 7에 나타냄;
- <177> 서열번호 5 및 서열번호 6에 나타낸 두 개의 프라이머들을 사용하여 증폭된 제 1 DNA 절편을, PacI 및 NotI에 의해 예비소화시킨 pUC18-유래된 벡터 내로 결찰시켜 플라스미드 pVDM80을 생성하였다. 서열번호 6 및 서열번호 7에 나타낸 두 개의 프라이머들을 사용하여 증폭된 제 2 DNA 절편을, KpnI 및 NotI에 의해 예비소화시킨 pET29a 벡터 (Novagen) 내로 결찰시켜 플라스미드 pVDM82를 생성하였다. 클로닝된 유전자의 뉴클레오티드 서열을 서열번호 1에 나타내었고, 이 유전자에 의해 암호화된 폴리펩티드의 서열을 서열번호 2에 나타내었다.
- <178> **실시예 2: D-글루코네이트 탈수 효소 활성의 대장균 내 발현 및 D-글루코네이트로부터의 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트의 제조**
- <179> 대장균 BL21의 수용능 세포들 (competent cells)을, 실시예 1에 기재된 것과 같이 구축된 pVDM82 플라스미드를 사용하여 형질변환하여 균주 +1289를 생성하였다. 균주 +1289를, 30 mg/l의 카나마이신을 함유하는 루리아-베르타니 (Luria-Bertani: LB) 배지 (Difco)에서, OD (600 nm) 값이 0.6에 도달할 때까지 30°C에서 배양하였다. 그 후, 이소프로필-β-D-티오갈락토포라노시드 (IPTG)를 0.5 mM 최종 농도로 첨가하였다. 2시간 30분의 추가 배양 후, 세포들을 원심분리하여 수집하고, pH 7.2의 20 mM 나트륨 포스페이트 버퍼로 일회 세척하였다. 10000 유닛의 리소자임을 함유하는 50 mM, pH 8.5의 Tris-HCl 버퍼 (Ready-Lyse, Epicentre,

Madison, Wisconsin) 및 1 mM EDTA 의 10 ml 중에 세포 약 5 g 을 현탁시키고, 그 현탁액을 30℃ 에서 15 분간 인큐베이션하여 세포 추출물을 제조하였다. 그 후, 10000 킬로유닛의 데옥시리보뉴클레아제 I (DNase I, Sigma) 및 5 mM 의 MgCl₂ 를, 30℃ 에서 추가 15 분 동안 인큐베이션된 제제에 첨가하였다. 이렇게 수득된 세포 추출물을 사용전에 -20℃ 에 보관하였다.

<180> 1.5 ml 의 세포 추출물을 2M 의 나트륨 또는 칼륨 D-글루코네이트와 총 부피 10 ml 로 혼합하였다. 이 제제의 pH 를 8.5로 조정 한 후, 이를 37 °C 에서 인큐베이션 하였다. 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트 (KDG) 합성의 진행 후, 증가된 기간의 인큐베이션 후 분취액을 분석하였다. 이들 분취액의 몇 가지 희석부들을 실리카 플레이트 상에 놓고 하기 용매계로 크로마토그래피하였다: 이소프로판올/물 (90/10). p-아니스알데히드로 발색 (revelation) 후, KDG (Rf ~0.40)의 황색 반점이 검출되었다. 또한, Mac Gee (J. Biol. Chem. 1954. 210,617-626)에 의해 기재된 바와 같이, 세미카르바지드 염산염과의 반응을 기초로 한 분광광도계 분석을 사용하여 KDG 를 정량화하였다. 전형적으로, 30 시간의 인큐베이션 후 분광광도계 분석을 사용시, KDG 농도는 1.5 내지 2 M 이었다.

<181> 이렇게 수득된 나트륨 또는 칼륨 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트 용액은 더 나아간 합성 단계에 사용될 수 있다. 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루콘산도, 발표된 시험방법들 (Bender, Anal. Biochem. 1974. 61, 275-279)을 적용하여 상기 용액으로부터 제조될 수 있다. 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루콘산 및 KCl 의 혼합물의 조성의 제제는 1 당량의 HCl을 이후 증발되는 칼륨 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트 용액에 첨가에 의해 수득될 수도 있다.

<182> **실시예 3: 아그로박테리움 튜메파시엔스 균주 C58 (CIP 104333) 로부터 D-글루코사미네이트 디아미나제를 암호화하는 유전자의 클로닝**

<183> 아그로박테리움 튜메파시엔스 균주 C58 (CIP 104333)을 파스퇴르 균주 보관 연구소 (CIP, 프랑스, 파리)로부터 수득하였다. 염색체 DNA 를 추출하고, 하기 프라이머들을 사용하는 표준 시험방법에 따라 PCR 에 의해 D-글루코사미네이트 디아미나제 유전자를 증폭하였다:

<184> 5'-CCCTTAATTAATGCAGTCTTCTTCAGCTCTTC-3', 서열번호 8 에 나타냄;

<185> 5'-TTGCGGCCCTAGTGAAAGAAGGTTGTGTAGAT-3', 서열번호 9 에 나타냄;

<186> 5'-AAATCATGACTATGCAGTCTTCTTCAGCTCTTCG-3', 서열번호 10 에 나타냄;

<187> 5'-TATAGATCTCTAGTGAAAGAAGGTTGTGTAGAT-3', 서열번호 11 에 나타냄.

<188> 서열번호 8 및 서열번호 9에 나타낸 두 개의 프라이머들을 사용하여 증폭된 제 1 의 DNA 절편을 PacI 및 NotI 에 의해 예비소화시킨 pUC18-유래된 벡터 내로 결합시켜 플라스미드 pKDGb1 을 생성하였다. 서열번호 10 및 서열번호 11 에 나타낸 두 개의 프라이머들을 사용하여 증폭된 제 2 DNA 절편을, BspHI 및 BgIII 에 의해 예비소화시킨 pQE60 벡터 (Qiagen) 내로 결합시켜 플라스미드 pEP18 을 생성하였다. 클로닝된 유전자의 뉴클레오티드 서열을 서열번호 3 에 나타내었고, 이 유전자에 의해 암호화된 폴리펩티드의 서열을 서열번호 4 에 나타내었다.

<189> **실시예 4: D-글루코사미네이트 디아미나제 활성의 대장균 내 발현 및 D-글루코사미네이트로부터의 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루콘산의 제조**

<190> 대장균 MG1655 의 수용성 세포들을, 실시예 1 에 기재된 것과 같이 구축된 pEP18 플라스미드 및 pREP4 (Qiagen) 를 사용하여 형질변환하여 균주 +1068 을 생성하였다. 균주 +1068 을, 30 mg/l 의 카나마이신 및 100 mg/l 의 암피실린을 함유하는 LB 배지에서, OD (600 nm) 값이 0.6 에 도달할 때까지 37℃ 에서 배양하였다. 그 후, IPTG 를 0.5 mM 최종 농도로 첨가하였다. 2 시간 30분의 추가 배양 후, 세포들을 원심분리하여 수집하고, pH 7.2 의 20 mM 나트륨 포스페이트 버퍼로 일 회 세척하였다. 실시예 2 에 기재된 시험방법을 사용하여 세포 추출물을 제조하였다.

<191> 2 ml 의 세포 추출물을 100 mM 의 나트륨 또는 칼륨 D-글루코사미네이트 및 0.1 mM 의 피리독살 포스페이트와 함께 총 부피 5 ml로 혼합하였다. 이 제제의 pH 를 7.5 로 조정 한 후, 37 °C 에서 인큐베이션하였다.

<192> 그 후, 실시예 2 에 기재된 시험방법을 따라, 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트 (KDG) 합성을 진행하였다. 전형적으로, 30 시간의 인큐베이션 후 실시예 2 에 기재된 분광광도계 분석 사용시 KDG 농도는 50 내지 100 mM 이었다.

<193> **실시예 5: 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트로부터 2-데옥시-D-리보네이트의 제조**

<194> 0.5 ml 의 31% 과산화수소 용액을, 25 °C 에서 5 ml 의 1M 칼륨 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트 (KDG) 용액에 첨가하였다. KDG 의 탈카르복실화의 진행 후, 이산화탄소의 유리로 인해 생성되는 거품들의 생성 및 실시예 2 에 기재된 박막 크로마토그래피 시험방법을 사용한 KDG 의 소실이 일어났다. 전형적으로, 3 시간의 반응 후 잔류 KDG 의 농도는 10 mM 미만이었다.

<195> **실시예 6: 2-데옥시-D-리보노락톤으로부터의 2-데옥시-D-리비톨의 제조**

<196> 0.2 g 의 로덤 (탄소 상 5 %) 촉매를, 2-데옥시-L-리보노락톤의 합성을 위한 Deriaz (J. Chem. Soc. (1949), 1879-1883)에 의해 기재된 방법에 따라 제조된 1 g 의 2-데옥시-D-리보노락톤의 수용액에 첨가하였다. 2-데옥시-D-리보노락톤의 수소화는 130 °C, 80 바의 압력 하에 수행되었다. 반응 혼합물의 여과 후 수득된 용액을 증발시켰다. 잔류물을 에틸 아세테이트에 용해시키고, 실리카 컬럼 상의 크로마토그래피에 의해 더 정제하였다. 용매를 진공 제거하여 황색 오일을 생성하였다 (수율 85%). 이렇게 수득된 화합물은 Rabow (J. Am. Chem. Soc. 122 (1999), 3196-3203)에 의해 기재된 것과 같이, 2-데옥시-D-리보오스의 환원에 의해 수득된 2-데옥시-D-리비톨과 동일하였다.

<197> **실시예 7: 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트로부터 1-N-모르폴리노-3,4,5-트리히드록시펜텐-1의 제조**

<198> 2 g 의 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루콘산을 150 ml 의 벤젠에 현탁시켰다. 1.1 ml 의 모르폴린 및 100 mg 의 p-톨루엔술폰산을 이 현탁액에 첨가하고, 반응 혼합물을 3 시간 동안 환류하였다. 이 반응에 의해 형성된 물을 증류하여 제거하였다. 벤젠을 따라내었다. 용기에 부착된 고체 화합물들을 수집하고, 아세톤으로 세척하여 건조시켰다. 이 제제에 존재하는 주 화합물 (수율40%)을, 클로로포름 중 메탄올의 농도구배를 사용하여 실리카 컬럼 상의 컬럼 크로마토그래피에 의해 더 정제하였다. 1-N-모르폴리노-3,4,5-트리히드록시펜텐-1 을 함유하는 분획들을 합하고 용매를 진공 제거하였다.

<199> ¹H-NMR (D₂O): δ = 3.15 ppm (4H, t, 모르폴린), 3.8 ppm (4H, t, 모르폴린), 3.4 내지 4 ppm, (4H, m, 5a-H, 5b-H, 4-H, 3-H), 6.3 및 6.8 ppm (2H, 2d, 1-H 및 2-H, J = 4 Hz).

<200> **실시예 8: 자이모모나스 모빌리스로부터 피루베이트 디카르복실라제를 암호화하는 유전자의 클로닝**

<201> 파스티르 균주보관 연구소 (CIP, 프랑스 파리)로부터 자이모모나스 모빌리스 균주 B-806 (CIP 102538T)을 수득하였다. 염색체 DNA 를 추출하고, 하기 프라이머들을 사용하는 표준 시험방법에 따라 PCR 에 의해 피루베이트 디카르복실라제 유전자를 증폭하였다:

<202> 5'-GCGTTAATTAATGAGTTATACTGTCGGTACC-3', 서열번호 12 에 나타냄;

<203> 5'-TATGCGGCCGCTTAGAGGAGCTTGTTAACAGG-3', 서열번호 13 에 나타냄.

<204> 서열번호 12 및 서열번호 13에 나타난 두 개의 프라이머들을 사용하여 증폭된 DNA 절편을 PacI 및 NotI 에 의해 예비소화시킨 pSP100 또는 pEVL5 (하기 기재된 것과 같이 각각 pUC18-유래된 또는 pQE70-유래된 벡터) 내로 결합시켜 각각 플라스미드 pEVL107 및 플라스미드 pEVL420을 생성하였다. 클로닝된 유전자의 뉴클레오티드 서열 및 대응하는 폴리펩티드의 암호화된 서열은 GenBank (수납번호 AF124349) 에서 찾을 수 있으며, 서열번호 18 및 서열번호 19 에 각각 나타내었다.

<205> 플라스미드 pSP100 은, 리보솜 결합 부위, PacI 및 NotI 제한 부위들을 표준 시험방법을 사용하여 EcoRI 및 BamHI에 의해 예비소화시킨 pUC18 벡터 내로 도입함에 의해 수득되었다. pSP100 의 완전한 뉴클레오티드 서열을 서열번호 14에 나타내었다.

<206> 플라스미드 pEVL5 는, 리보솜 결합 부위, PacI 및 NotI 제한부위들을 표준 시험방법을 사용하여 EcoRI 및 BamHI 에 의해 예비소화시킨 pQE70 벡터 (Qiagen) 내로 도입함에 의해 수득되었다. pEVL5 의 완전한 뉴클레오티드 서열을 서열번호 15에 나타내었다.

<207> **실시예 9: 사카로마이세스 세레비시에로부터의 피루베이트 디카르복실라제를 암호화하는 유전자의 클로닝**

<208> 사카로마이세스 세레비시에 균주 S288C (ATCC 204508)로부터 염색체 DNA 를 추출하고, 하기 프라이머들을 사용하는 표준 시험방법에 따라 PCR 에 의해 피루베이트 디카르복실라제 유전자를 증폭하였다:

<209> 5'-ATATTTAATTAATGTCTGAAATTACTTTGG-3', 서열번호 16 에 나타냄;

- <210> 5'-ATATGCGGCCGCTTATTGCTTAGCGTTGGT-3', 서열번호 17 에 나타냄.
- <211> 서열번호 16 및 서열번호 17에 나타난 두 개의 프라이머들을 사용하여 증폭된 DNA 절편을 PacI 및 NotI 에 의해 예비소화시킨 pSP100 또는 pEVL5 (실시예 8에 기재된 것과 같이 각각 pUC18-유래된 또는 pQE70-유래된 벡터) 내로 절찰시켜 각각 플라스미드 pVDM61 및 플라스미드 pEVL419 를 생성하였다. 클로닝된 유전자의 뉴클레오타이드 서열 및 대응하는 폴리펩티드의 암호화된 서열은 GenBank (수납번호 NC001144) 에서 찾을 수 있으며, 서열번호 20 및 서열번호 21 에 각각 나타내었다.
- <212> **실시예 10: 대장균에서 피루베이트 디카르복실라제 활성의 발현 및 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트로부터의 2-데옥시-D-리보오스의 효소적 합성**
- <213> 피루베이트 디카르복실라제의 발현 및 무세포 (cell-free) 추출물의 제조
- <214> 대장균 MG1655 균주의 수용능 세포들을 pEVL107 또는 pVDM61 (실시예 8 및 9에 기재된 것과 같이 구축됨)을 사용하여 형질변환하여 각각 균주 +1735 및 균주 +844 를 생성하였다. 이들 균주들을 100 mg/l 의 암피실린을 함유하는 루리아 베르타니 (LB) 배지 (Difco)에서 OD (600 nm) 값이 1.5 정도에 도달할 때까지 37°C 에서 배양하였다.
- <215> pREP4 플라스미드(Qiagen)를 품은 (harbouring) 대장균 MG1655 균주의 수용능 세포들을 pEVL420 또는 pEVL419 (실시예 8 및 9에 기재된 것과 같이 구축됨)를 사용하여 형질변환하여 각각 균주 +3150 및 균주 +3148 을 생성하였다. 이들 균주들을 100 mg/l 의 암피실린 및 30 mg/l 의 카나마이신을 함유하는 루리아 베르타니 (LB) 배지 (Difco)에서 OD (600 nm) 값이 0.6 에 도달할 때까지 37°C 에서 배양하였다. 그 후, 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드 (IPTG)를 최종농도 0.5 mM 로 첨가하였다. 2 시간 30 분 추가 배양한 후, 세포들을 원심분리하여 수집하고, pH 7.2, 20 mM 의 나트륨 포스페이트 버퍼로 일 회 세척하였다.
- <216> 실시예 2 에 기재된 것과 동일한 시험방법을 사용하여, 각 균주에 대한 무세포 추출물을 제조하였다. 그 후, 조생의 무세포 추출물들을, pH 6, 50 mM 의 Tris-아세테이트 버퍼로 평형화된 PD-10 컬럼 (Amersham)을 통과시키고 -20°C 에 보관하였다.
- <217> 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트로부터 2-데옥시-D-리보오스의 효소적 합성
- <218> 1.0 ml 의 무세포 추출물을, 총 부피 1.5 ml 의 pH 6의 50 mM tris-아세테이트 버퍼 중에서 20 mM 나트륨 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트, 0.5 mM 티아민 피로포스페이트 및 5 mM MgCl₂ 과 혼합하였다. 2-데옥시-D-리보오스 (DRI) 합성의 진행 후, 37 °C 에서 증가된 기간의 인큐베이션 후 취한 분취액을 분석하였다. 증발에 의해 미리 5 배 농축시킨 각 분취액 약 1 μl 를 실리카 플레이트에 놓고 다음의 용매계로 크로마토그래피하였다: 부탄올/트리에틸아민/물 (10/2/5). 65 시간 인큐베이션 후 균주 +3150 또는 +3148의 무세포 추출물을 사용한 경우, 오르시놀로 발색한 후, DRI (Rf ~0.50)의 푸른 반점이 검출되었다. DRI 에 대응하는 반점을 함유하는 조생의 제제를 농축하고, 이소프로판올로 평형화된 1.5 ml 실리카 컬럼을 통과시켰다. 예측된 DRI 화합물을 함유하는 분획들을 수집, 농축하고, 결과의 샘플을 질량 분광계에 의해 분석하였다. 이러한 분석 결과, 단리된 화합물의 DRI 과의 동일성 및 자이모모나스 모빌리스 또는 사카로마이세스 세레비시에로부터의 피루베이트 디카르복실라제에 의해 촉매되는 KDG 로부터의 DRI 의 제조를 확인하였다.
- <219> **실시예 11: 아세트박터 파스퇴리아누스로부터의 피루베이트 디카르복실라제를 암호화하는 유전자의 클로닝, 암호화된 피루베이트 디카르복실라제 활성의 대장균에서의 발현 및 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트로부터의 2-데옥시-D-리보오스의 효소적 합성**
- <220> 아세트박터 파스퇴리아누스 균주 NCIB 8618 (DSMZ 2347)을 DSMZ 균주보관소 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, 독일)로부터 수득하였다. 염색체 DNA 를 세포들로부터 추출하고, 하기 프라이머들을 사용하는 표준 시험방법에 따라 PCR 에 의해 피루베이트 디카르복실라제 유전자를 증폭하였다:
- <221> 5'-TCTTTAATTAATGGGTTGTCGTCATTCATATA-3', 서열번호 22 에 나타냄;
- <222> 5'-CTAAAGCTTTTAGGCCAGAGTGGTCTTGCGCG-3', 서열번호 23 에 나타냄.
- <223> 서열번호 22 및 서열번호 23에 나타난 두 개의 프라이머들을 사용하여 증폭된 DNA 절편을 PacI 및 NotI 에 의해 예비소화시킨 pSP100 또는 pEVL5 (실시예 8에 기재된 것과 같이 각각 pUC18-유래된 또는 pQE70-유래된 벡터) 내로 절찰시켜 각각 플라스미드 pEVL541 및 플라스미드 pEVL560 을 생성하였다. 클로닝된 유전자의 뉴클레오타이드

티드 서열인 서열번호 24 및 대응하는 폴리펩티드의 암호화된 서열인 서열번호 25는 GenBank (수납번호 AF368435) 에서 찾을 수 있다.

- <224> 대장균 MG1655 균주의 수용능 세포들을 pEVL541 를 사용하여 형질변환하여 균주 +3559 를 생성하였다. pREP4 플라스미드(Qiagen)를 품은 대장균 균주 MG1655 의 수용능 세포들을 pEVL560 을 사용하여 형질변환하여 균주 +3924 를 생성하였다. 이들 균주들을 실시예 10 에 기재된 것과 같이 배양하고, 무세포 추출물들을 제조하였다. 무세포 추출물들을 KDG 와 함께 인큐베이션하고, 2-데옥시-D-리보오스 (DRI) 합성의 진행을 실시예 10 에 기재된 바와 같이 하였다. DRI 에 대응하는 반점이 관찰되었으며, 이는 아세트박터 파스티리아누스로부터의 피루베이트 디카르복실라제가 KDG 를 DRI 로 탈카르복실화시킬 수 있었음을 나타낸다.
- <225> **실시예 12: 자이모박터 팔마에로부터의 피루베이트 디카르복실라제를 암호화하는 유전자의 클로닝, 암호화된 피루베이트 디카르복실라제 활성의 대장균에서의 발현 및 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트로부터 2-데옥시-D-리보오스의 효소적 합성**
- <226> 자이모박터 팔마에 균주 T109 (DSMZ10491) 를 DSMZ 균주 보관소(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, 독일)로부터 취득하였다. 염색체 DNA 를 세포들로부터 추출하고, 하기 프라이머들을 사용하는 표준 시험방법에 따라 PCR 에 의해 피루베이트 디카르복실라제 유전자를 증폭하였다:
- <227> 5'-ATCTTAATTAATGTATACCGTTGGTATGTACT-3', 서열번호 26에 나타냄;
- <228> 5'-TATGCGGCCGCTTACGCTTGTGGTTGCGAGAGT-3', 서열번호 27에 나타냄.
- <229> 서열번호 26 및 서열번호 27에 나타낸 두 개의 프라이머들을 사용하여 증폭된 DNA 절편을 PacI 및 NotI 에 의해 예비소화시킨 pSP100 또는 pEVL5 (실시예 8에 기재된 것과 같이 각각 pUC18-유래된 또는 pQE70-유래된 벡터) 내로 결찰시켜 각각 플라스미드 pEVL546 및 플라스미드 pEVL561 을 생성하였다. 클로닝된 유전자의 뉴클레오티드 서열 및 대응하는 폴리펩티드의 암호화된 서열을 서열번호 28 및 서열번호 29 에 각각 나타내었으며, 이는 GenBank (수납번호 AF474145) 에서 찾을 수 있다.
- <230> 대장균 MG1655 균주의 수용능 세포들을 pEVL546 을 사용하여 형질변환하여 균주 +3568 을 생성하였다. pREP4 플라스미드(Qiagen) 를 품은 대장균 MG1655 의 수용능 세포들을 pEVL560 을 사용하여 형질변환하여 균주 +3923 을 생성하였다. 이들 균주들을 실시예 10 에 기재된 것과 같이 배양하고, 무세포 추출물들을 제조하였다. 무세포 추출물들을 KDG 와 함께 인큐베이션하고, 2-데옥시-D-리보오스 (DRI) 합성의 진행을 실시예 10 에 기재된 바와 같이 하였다. DRI 에 대응하는 반점이 관찰되었으며, 이는 자이모박터 팔마에로부터의 피루베이트 디카르복실라제가 KDG 를 DRI 로 탈카르복실화시킬 수 있었음을 나타낸다.
- <231> **실시예 13: 슈도모나스 푸티다로부터 벤조일포르메이트 디카르복실라제를 암호화하는 유전자의 클로닝, 암호화된 벤조일 포르메이트 디카르복실라제 활성의 대장균 내 발현 및 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트로부터 2-데옥시-D-리보오스의 효소적 합성.**
- <232> 슈도모나스 푸티다 균주 미굴라 (Migula) (DSMZ 291) 를 DSMZ 균주 보관소 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, 독일)로부터 취득하였다. 염색체 DNA 를 추출하고, 하기 프라이머들을 사용하는 표준 시험방법에 따라 PCR 에 의해 벤조일포르메이트 디카르복실라제 유전자를 증폭하였다:
- <233> 5'-CTATTAATTAATGGCTTCGGTACACGGCACCA-3', 서열번호 30에 나타냄;
- <234> 5'-TATGCGGCCGCTTACTTCACCGGCTTACGGTGC-3', 서열번호 31에 나타냄.
- <235> 서열번호 30 및 서열번호 31에 나타낸 두 개의 프라이머들을 사용하여 증폭된 DNA 절편을 PacI 및 NotI 에 의해 예비소화시킨 pSP100 또는 pEVL5 (실시예 8에 기재된 것과 같이 각각 pUC18-유래된 또는 pQE70-유래된 벡터) 내로 결찰시켜 각각 플라스미드 pEVL681 및 플라스미드 pEVL670 을 생성하였다. 클로닝된 유전자의 뉴클레오티드 서열인 서열번호 32 및 대응하는 폴리펩티드의 암호화된 서열인 서열번호 33 은 GenBank (수납번호 AY143338) 에서 찾을 수 있다.
- <236> 대장균 MG1655 균주의 수용능 세포들을 pEVL681 을 사용하여 형질변환하여 균주 +4050 을 생성하였다. pREP4 플라스미드(Qiagen) 를 품은 대장균 MG1655 균주의 수용능 세포들을 pEVL560 을 사용하여 형질변환하여 균주 +3927 을 생성하였다. 이들 균주들을 실시예 10 에 기재된 것과 같이 배양하고, 무세포 추출물들을 제조하였다. 무세포 추출물들을 KDG 와 함께 인큐베이션하고, 2-데옥시-D-리보오스 (DRI) 합성의 진행을 실시

예 10 에 기재된 바와 같이 하였다. DRI 에 대응하는 반점이 관찰되었으며, 이는 슈도모나스 푸티다로부터의 벤조일포르메이트 디카르복실라제가 KDG 를 DRI 로 탈카르복실화시킬 수 있었음을 나타낸다.

- <237> 2-데옥시-D-리보오스의 예비적인 효소적 합성
- <238> 균주 +3927 로부터의 무세포 추출물 100 μ l (2.5 mg 의 세균성 단백질 함유)을, 총 부피 0.5 ml 의 pH 6 의 80 mM 포타슘 포스페이트 버퍼 중에서, 300 mM 나트륨 2-데하이드로-3-데옥시-D 글루코네이트, 0.5 mM 티아민 피로포스페이트 및 5 mM MgCl₂ 와 혼합하였다. 16 및 40 시간 동안 인큐베이션 한 후, HCl 2N 용액 몇 μ l 를 pH 값이 6에 도달할 때까지 상기 인큐베이션 혼합물에 첨가하였다. 2-데옥시-D-리보오스 (DRI) 합성의 진행 후, 37 °C 에서 증가된 기간의 인큐베이션 후 취한 분취액을 분석하였다. 약 1 μ l 의 각 분취액을 실리카 플레이트 상에 놓고, 실시예 10 에 기재된 바와 같이 크로마토그래피하였다. 2-데옥시-D-리보오스의 농도는, 표준 용액에 비해 약 200 mM 으로 평가되었다. 상기 조 혼합물의 13C NMR 분석으로, 2-데하이드로-3-데옥시-D-글루코네이트로부터 형성된 화합물이 2-데옥시-D-리보오스였고, 2-데옥시-D-리보오스의 농도가 25 g/l 와 근사하였음을 확인하였다.
- <239> 인큐베이션 기간 도중 산 첨가를 하지 않은 것을 제외하고, 동일한 조건들로 다른 예비적인 효소적 합성을 수행하였다. 이들 조건들에서, 2-데옥시-D-리보오스의 농도는 10 g/l에 근사하여, pH 가 제어되어 6 의 값으로 일정하게 조정된 앞의 시험에서 도달된 농도보다 매우 낮았다.
- <240> **실시예 14: D-글루코네이트로부터의 2-데옥시-D-리보오스의 효소적 합성**
- <241> D-글루코네이트로부터의 2-데옥시-D-리보오스의 원-팟 효소적 합성을, 아그로박테리움 튜메파시엔스의 gcnD 유전자에 의해 암호화된 D-글루코네이트 탈수 효소 및 자이모모나스 모빌리스로부터의 피루베이트 디카르복실라제를 이용하여, 다음과 같이 수행하였다:
- <242> 각각 실시예 2 및 실시예 10에 기재된 바와 같이 제조된, 균주 +1289 로부터의 50 μ l 의 무세포 추출물(1.5 mg 의 세균성 단백질 함유) 및 균주 +3150 으로부터의 400 μ l 의 무세포 추출물 (한외여과에 의한 농축 후, 17 mg 의 세균성 단백질 함유)을, 총 부피 0.5 ml 의 pH 7, 50 mM 의 N-(2-히드록시에틸)피페라진-N'-(2-에탄술폰산) (HEPES) 버퍼 중에서, 50 mM 칼륨 D-글루코네이트, 0.5 mM 티아민 피로포스페이트 및 5 mM MgCl₂ 과 혼합하였다. 2-데옥시-D-리보오스 (DRI) 합성의 진행 후, 37 °C 에서의 증가된 기간의 인큐베이션 후에 취한 분취액을 분석하였다. 18 시간의 인큐베이션 기간 후, 약 1 μ l 의 그 인큐베이션 혼합물을 실리카 플레이트에 놓고, 실시예 10 에 기재된 바와 같이 크로마토그래피하였다. 2-데옥시-D-리보오스의 농도는 표준 용액과 비교해 약 1 g/l 인 것으로 추정되었다.

서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)