



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102369023 A

(43) 申请公布日 2012. 03. 07

(21) 申请号 200980156896. X

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

(22) 申请日 2009. 12. 11

11105

代理人 史悦

(30) 优先权数据

61/122, 851 2008. 12. 16 US

(51) Int. Cl.

A61K 47/48(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61P 3/00(2006. 01)

2011. 08. 16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/067775 2009. 12. 11

(87) PCT申请的公布数据

W02010/075010 EN 2010. 07. 01

(71) 申请人 建新公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 C·潘 P·A·科诺维兹

L·Z·阿维拉 J·E·斯特法诺

M·R·里尔登 J·哈拉西 周群

L·扬 P·芬 郑晓阳 R·J·米勒

J·库茨科 朱云翔 D·帕特森

A·皮尔

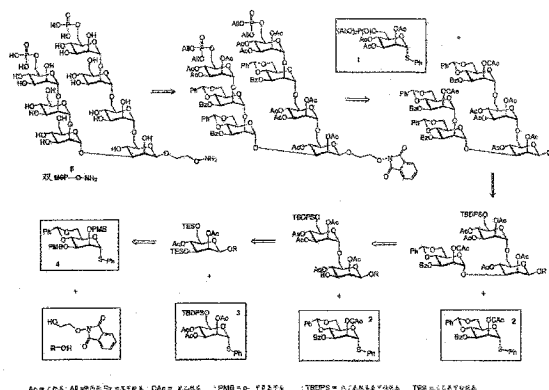
权利要求书 5 页 说明书 71 页 附图 30 页

(54) 发明名称

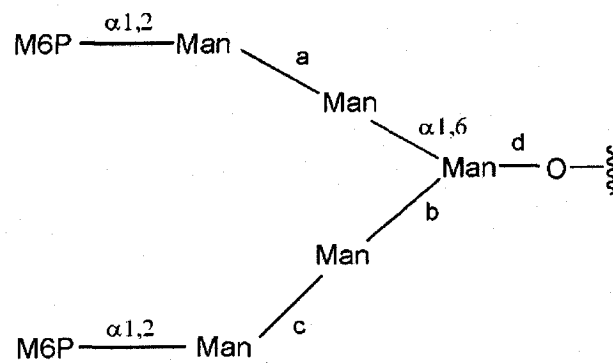
寡糖-蛋白缀合物

(57) 摘要

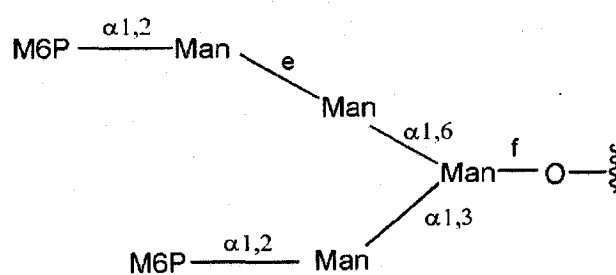
本文中提供包含蛋白和式 I-VI 中之一的寡糖的缀合物。本文还提供包含这种缀合物的药物组合物。本文中进一步提供通过施用寡糖-糖蛋白缀合物而在哺乳动物中治疗溶酶体贮积症的方法。



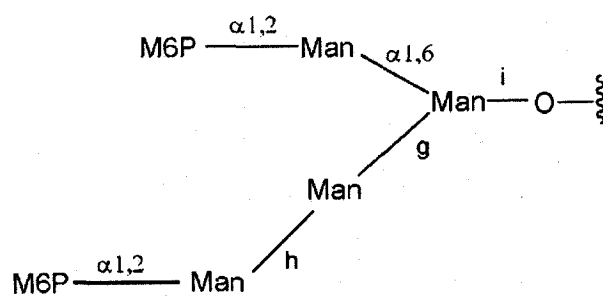
1. 一种寡糖-蛋白缀合物, 包含: (1) 蛋白和 (2) 式 I-VI 中任一者的寡糖:



式 I



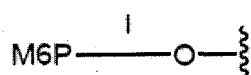
式 II



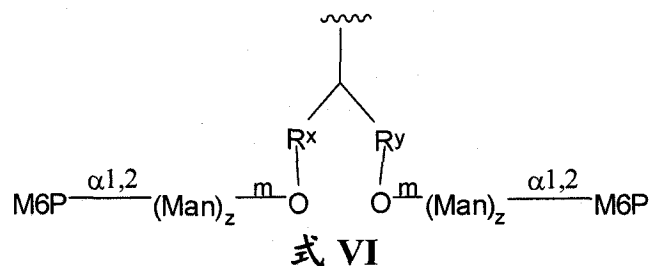
式 III



式 IV



式 V



其中：

a 选自 $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; $\alpha 1,4$; 和 $\alpha 1,6$;

b 选自 $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; 和 $\alpha 1,4$;

c 选自 $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; $\alpha 1,4$; 和 $\alpha 1,6$;

d 选自 α , β 与 α 和 β 的混合物 ;

e 选自 $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; $\alpha 1,4$; 和 $\alpha 1,6$;

f 选自 α , β 与 α 和 β 的混合物 ;

g 选自 $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; 和 $\alpha 1,4$;

h 选自 $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; $\alpha 1,4$; 和 $\alpha 1,6$;

i 选自 α , β 与 α 和 β 的混合物 ;

j 是 $\alpha 1,2$;

k 选自 α , β 与 α 和 β 的混合物 ;

x 是 1,2 或 3 ;

l 选自 α , β 与 α 和 β 的混合物 ;

m 选自 α , β 与 α 和 β 的混合物 ;

R^x 和 R^y 各自独立地选自聚乙二醇和 C_1-C_{10} 烷基, 所述 C_1-C_{10} 烷基任选地被氧代、硝基、卤代、羧基、氰基或低级烷基取代并且任选地夹杂选自 N、O 或 S 中的一种或多种杂原子 ;

z 是 0,1,2,3 或 4 ; 以及

当 x 是 2 或 3, 或 y 是 2,3 或 4 时, 式 IV 或式 VI 的各甘露糖之间的连接选自 $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; $\alpha 1,4$; 和 $\alpha 1,6$;

前提条件是当 e 是 $\alpha 1,6$ 时, f 选自 α 与 α 和 β 的混合物。

2. 权利要求 1 所述的寡糖 - 蛋白缀合物, 其中所述寡糖具有两个甘露糖 -6- 磷酸酯残基。

3. 权利要求 1 所述的寡糖 - 蛋白缀合物, 其中所述寡糖具有三个甘露糖 -6- 磷酸酯残基。

4. 权利要求 1 所述的寡糖 - 蛋白缀合物, 其中所述寡糖是寡糖 82。

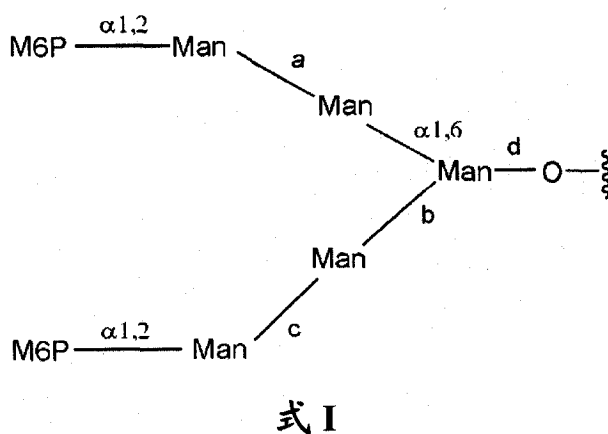
5. 权利要求 1 所述的寡糖 - 蛋白缀合物, 其中所述寡糖是寡糖 128、寡糖 129 或其混合物。

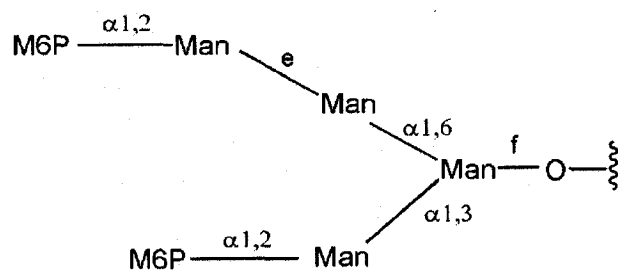
6. 权利要求 1 所述的寡糖 - 蛋白缀合物, 其中所述寡糖是寡糖 130、寡糖 131 或其混合物。

7. 权利要求 1 所述的寡糖 - 蛋白缀合物, 其中所述寡糖是寡糖 132、寡糖 133 或其混合物。

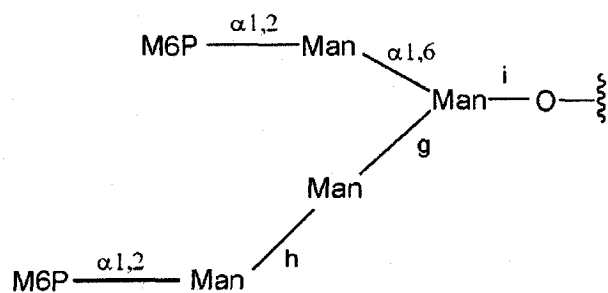
8. 权利要求 1 所述的寡糖 - 蛋白缀合物, 其中所述寡糖是寡糖 136。

9. 权利要求 1 所述的寡糖 - 蛋白缀合物, 其中所述蛋白是糖蛋白。
10. 权利要求 9 所述的寡糖 - 蛋白缀合物, 其中所述糖蛋白是溶酶体酶。
11. 根据权利要求 10 所述的寡糖 - 蛋白缀合物, 其中所述溶酶体酶是酸性 α -葡萄糖苷酶、 α -半乳糖苷酶 A、酸性神经磷脂酶、 α -L-艾杜糖苷酸酶、艾杜糖酸酯-2-硫酸酯酶或 N-乙酰半乳糖胺-4-硫酸酯酶。
12. 根据权利要求 10 所述的寡糖 - 蛋白缀合物, 其中所述溶酶体酶是酸性 α -葡萄糖苷酶。
13. 一种药物组合物, 包含权利要求 1 所述的寡糖 - 蛋白缀合物和赋形剂。
14. 权利要求 1 所述的缀合物在制备用于在需要的受试者中治疗溶酶体贮积症的药物中的用途。
15. 一种治疗溶酶体贮积症的方法, 包括向哺乳动物施用寡糖 - 糖蛋白缀合物, 所述寡糖 - 糖蛋白缀合物包含: (1) 溶酶体酶和 (2) 式 I-VI 中任一者的寡糖:





式 II



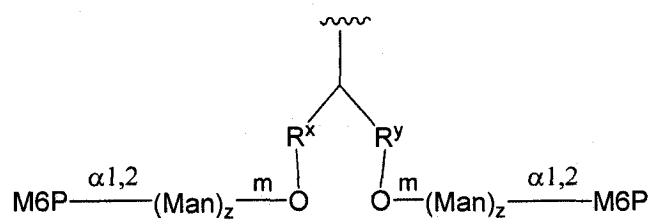
式 III



式 IV



式 V



式 VI

其中：

a 选自 $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; $\alpha 1,4$; 和 $\alpha 1,6$;

b 选自 $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; 和 $\alpha 1,4$;

c 选自 $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; $\alpha 1,4$; 和 $\alpha 1,6$;

d 选自 α , β 与 α 和 β 的混合物 ;

e 选自 $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; $\alpha 1,4$; 和 $\alpha 1,6$;

f 选自 α , β 与 α 和 β 的混合物;

g 选自 $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; 和 $\alpha 1,4$;

h 选自 $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; $\alpha 1,4$; 和 $\alpha 1,6$;

i 选自 α , β 与 α 和 β 的混合物;

j 是 $\alpha 1,2$;

k 选自 α , β 与 α 和 β 的混合物;

x 是 1,2 或 3;

l 选自 α , β 与 α 和 β 的混合物;

m 选自 α , β 与 α 和 β 的混合物;

R^x 和 R^y 各自独立地选自聚乙二醇和 C_1-C_{10} 烷基, 所述 C_1-C_{10} 烷基任选地被氧代、硝基、卤代、羧基、氰基或低级烷基取代, 并且任选地夹杂选自 N、O 或 S 中的一种或多种杂原子;

z 是 0, 1, 2, 3 或 4; 以及

当 x 是 2 或 3, 或 y 是 2, 3 或 4 时, 式 IV 或式 VI 的各甘露糖之间的连接选自 $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; $\alpha 1,4$; 和 $\alpha 1,6$;

前提条件是当 e 是 $\alpha 1,6$ 时, f 选自 α 与 α 和 β 的混合物。

16. 权利要求 15 所述的方法, 其中所述溶酶体贮积症选自法布里病、蓬佩病、尼曼 - 匹克氏 A 病、尼曼 - 匹克氏 B 病、粘多糖增多症 I、粘多糖增多症 II 和粘多糖增多症 VI。

17. 权利要求 16 所述的方法, 其中所述溶酶体贮积症是蓬佩病。

18. 权利要求 15 所述的方法, 还包括在使用所述寡糖 - 糖蛋白缀合物治疗之前、之后或过程中向所述哺乳动物施用甲氨蝶呤。

寡糖 - 蛋白缀合物

[0001] 该申请要求美国临时申请 No. 61/122, 851 的优先权的权益, 其通过引用全部并入本文中。

技术领域

[0002] 本发明总体上涉及包含特定寡糖的寡糖 - 蛋白缀合物, 以及包含这种缀合物的组合物。本发明还涉及使用寡糖 - 溶酶体酶缀合物治疗溶酶体贮积症的方法。

背景技术

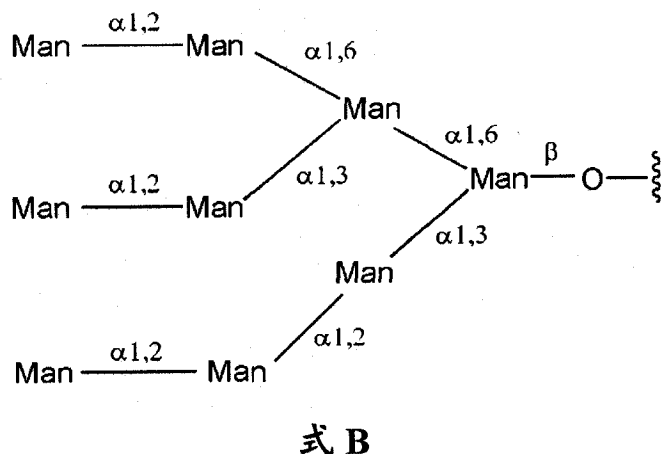
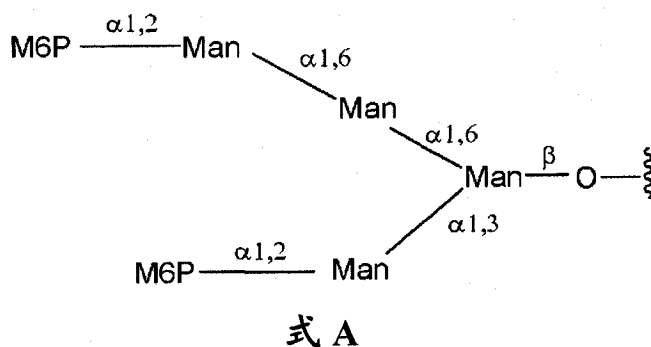
[0003] 溶酶体贮积症 (LSD) 是一类稀少代谢疾患, 其包括四十多种基因疾病, 包括溶酶体水解酶的活性的缺陷。LSD 的标志性特征是溶酶体代谢物的异常积蓄, 这导致形成大量肿胀的溶酶体。

[0004] LSD 可通过施用受试者中缺少的活性形式的酶来进行治疗, 该方法称为酶替代疗法 (ERT)。施用的具有末端甘露糖 -6- 磷酸酯 (M6P) 的替代酶通过细胞 - 表面 - 相关的阳离子依赖性 M6P 受体 (CI-MPR) - 介导的内吞作用而被靶细胞摄取并导向至溶酶体。

[0005] 通常, 较差磷酸化的替代酶无法有效地被细胞表面上的 M6P 受体内化, 因此不能定向至它们发挥作用的溶酶体。因此, 较低程度的甘露糖磷酸化对于替代酶的治疗效果可具有明显不利的影响。

[0006] 已经开发了多种方法来增加替代酶的 M6P 含量。例如, 美国专利 No. 6, 534, 300 ; 6, 670, 165 ; 和 6, 861, 242 描述了末端甘露糖残基的酶磷酸化。在另外的例子中, 美国专利 No. 7, 001, 994 描述了偶联包含 M6P 的寡糖和糖蛋白的方法。发现溶酶体酶酸性 α - 葡萄糖苷酶 (GAA) 和通过该方法制备的双 -M6P 寡糖的缀合, 在蓬佩病的鼠模型中比重组人 GAA 更有效地减少骨骼和心肌糖原, 蓬佩病是常染色体隐性遗传的肌肉疾病, 源自 GAA 的代谢缺失, 并且特征在于溶酶体糖原的积蓄。类似地, Zhu 等描述了合成双 -M6P 寡糖 (式 A) 和 GAA 的偶联。Zhu 等, *Biochem. J.* 389 :619-628 (2005)。式 A 通过下列方式从 N- 连接的聚糖 (式 B) 的天然三线式 Man_9 核心结构来设计: 除去一个支链, 缩短另一个支链, 并且磷酸化末端甘露糖残基。

[0007]



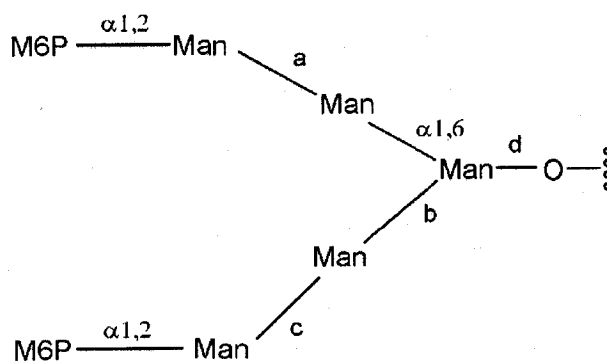
[0008] 以增强的亲和性结合 CI-MPR 的所得缀合物被 L6 成肌细胞更有效地内在化,并且具有大致正常的酶活性。然而,尽管取得了这样的成功,但是其保持重要的是鉴定新的这样的寡糖,当缀合溶酶体酶时该寡糖可导致 CI-MPR 改善的亲和性和 / 或更有效的细胞内在化,同时保持正常或接近正常的酶活性。然而仅改善摄取不是必需导致更好的治疗结果。某些缀合策略和寡糖导致具有更低酶活性的缀合物。因此期望鉴定可改善患有 LSD 的受试者的治疗结果的寡糖和缀合物。

[0009] 另外,某些寡糖例如式 A 和 B 中所示的那些合成是困难和昂贵的。另外,以立体选择性方式来制备 β -连接的糖在碳水化合物化学中是个难题。可选的寡糖和合成方法可在商业规模上更加实用。另外需要存在优化的方法用来制备寡糖-蛋白缀合物。特定地,为了治疗目的,缀合物制剂不应该是盖度异源的,因为这可导致不一致的生物功能。缀合物的多个方面可影响治疗效果,包括使用的寡糖和接头、缀合方法、纯化方法和配制。

发明内容

[0010] 因此,本发明的某些实施方案提供包含 (1) 蛋白和 (2) 式 I 的寡糖的寡糖-蛋白缀合物:

[0011]



式 I

[0012] 其中：

[0013] $a = \alpha 1,2 ; \alpha 1,3 ; \alpha 1,4 ;$ 或 $\alpha 1,6 ;$

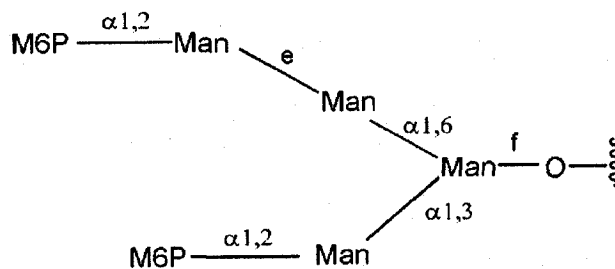
[0014] $b = \alpha 1,2 ; \alpha 1,3 ;$ 或 $\alpha 1,4 ;$

[0015] $c = \alpha 1,2 ; \alpha 1,3 ; \alpha 1,4 ;$ 或 $\alpha 1,6 ;$ 以及

[0016] $d = \alpha , \beta$ 或 α 和 β 的混合物。

[0017] 本发明的其他实施方案提供包含 (1) 蛋白和 (2) 式 II 的寡糖的寡糖 - 蛋白缀合物：

[0018]



式 II

[0019] 其中：

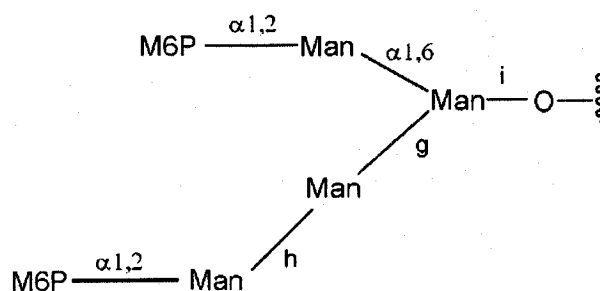
[0020] $e = \alpha 1,2 ; \alpha 1,3 ; \alpha 1,4 ;$ 或 $\alpha 1,6$ 以及

[0021] $f = \alpha , \beta$ 或 α 和 β 的混合物，

[0022] 前提条件是当 $e = \alpha 1,6$ 时， $f = \alpha$ 或 α 和 β 的混合物。

[0023] 本发明的甚至其他实施方案提供包含 (1) 蛋白和 (2) 式 III 的寡糖的寡糖 - 蛋白缀合物：

[0024]



式 III

[0025] 其中：

[0026] $g = \alpha 1,2 ; \alpha 1,3 ;$ 或 $\alpha 1,4 ;$

[0027] $h = \alpha 1,2 ; \alpha 1,3 ; \alpha 1,4 ;$ 或 $\alpha 1,6 ;$ 以及

[0028] $i = \alpha , \beta$ 或 α 和 β 的混合物。

[0029] 本发明的另外实施方案提供包含 (1) 蛋白和 (2) 式 IV 的寡糖的寡糖 - 蛋白缀合物：

[0030]



式 IV

[0031] 其中：

[0032] j 是 $\alpha 1,2 ;$

[0033] k 选自 α , β 与 α 和 β 的混合物；

[0034] x 是 1,2 或 3；以及

[0035] 当 x 是 2 或 3 时,各甘露糖之间的连接选自 $\alpha 1,2 ; \alpha 1,3 ; \alpha 1,4 ;$ 和 $\alpha 1,6$ 。

[0036] 进一步的实施方案提供包含 (1) 蛋白和 (2) 式 V 的寡糖的寡糖 - 蛋白缀合物：

[0037]



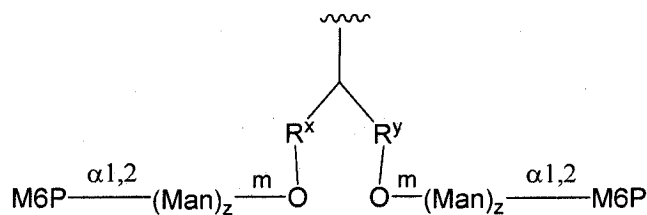
式 V

[0038] 其中：

[0039] l 选自 α , β 与 α 和 β 的混合物。

[0040] 另外实施方案提供包含 (1) 蛋白和 (2) 式 VI 的寡糖的寡糖 - 蛋白缀合物：

[0041]



式 VI

[0042] 其中：

[0043] R^x 和 R^y 各自独立地选自聚乙二醇和 $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 烷基,所述 $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 烷基任选地被氧代、硝基、卤代、羧基、氰基或低级烷基取代并且任选地夹杂选自 N、O 或 S 中的一种或多种杂原子；

[0044] z 选自 0,1,2,3 或 4；

[0045] m 选自 α , β 与 α 和 β 的混合物；以及

[0046] 当 y 是 2,3 或 4 时,各甘露糖之间的连接选自 $\alpha 1,2 ; \alpha 1,3 ; \alpha 1,4 ;$ 和 $\alpha 1,6$ 。

[0047] 在另外的实施方案中,本发明提供包含(1)蛋白和(2)式A的寡糖的寡糖-蛋白缀合物。

[0048] 在某些实施方案中,缀合物包含至少2,3,4或5摩尔的式A的寡糖/摩尔蛋白。

[0049] 在一些实施方案中,本发明的寡糖-蛋白缀合物包含缀合物的寡糖和蛋白组分之间的接头。

[0050] 本发明提供药物组合物,包含:式I,II,III,IV,V或VI的寡糖-蛋白缀合物;以及填料、填充剂、崩解剂、缓冲剂、稳定剂或赋形剂。本发明还提供使用式I,II,III,IV,V或VI的寡糖-蛋白缀合物、或包含这种寡糖-蛋白缀合物的药物组合物来治疗溶酶体贮积症(例如如下文表1中公开的那些)的方法。溶酶体贮积症可选自例如法布里病、蓬佩病、尼曼-匹克氏A病、尼曼-匹克氏B病和粘多糖增多症I。在进一步实施方案中,本发明提供寡糖-蛋白缀合物在制备治疗需要的受试者中的溶酶体贮积症的药物中的用途,所述寡糖-蛋白缀合物包含(1)蛋白和(2)式I,II,III,IV,V或VI的寡糖。

[0051] 在该申请中讨论了本发明的另外实施方案。从下列详细描述中,本发明的其他方面、特征和优点将显而易见。涉及本发明的一个方面而讨论的实施方案适用于本发明的其他方面,反之亦然。实施例章节中的实施方案理解为适用于本发明的所有方面的本发明的实施方案。

[0052] 然而,应该理解,仅通过示例方式给出本发明的详细说明和特定实施例,同时指出本发明的特定实施方案,因为本发明精神和范围内的各种修改和改变对于本领域普通技术人员来说从该申请中将是显而易见的。

[0053] 附图简述

[0054] 图1示出寡糖82的合成步骤中阐述的示例性逆合成路线。

[0055] 图2示出在本文中所述的寡糖的合成中可使用的单糖构建单元2a的示例性合成。

[0056] 图3示出在本文中所述的寡糖的合成中可使用的单糖构建单元1、2、3和4的示例性合成。

[0057] 图4示出合成亚乙基接头的合成路线。

[0058] 图5示出使用构建单元2、3和4将三糖前体装配至寡糖82的合成路线。

[0059] 图6示出从图4中所述的三糖前体装配保护的七糖的合成路线。

[0060] 图7示出去构建图5中所述的保护的七糖以产生寡糖82的合成路线。

[0061] 图8A-E示出使用二丁基锡以形成立体选择性中间体并且可选择地使用硫醇-反应基团形成以制备式A的 β -连接的己糖的合成路线。

[0062] 图9示出氧化水平对于NeoGAA β SAM6的缀合性的影响。图9A示出以变化的摩尔比和GAA缀合的SAM2、SAM3、SAM4、线性SAM4、 α SAM6和 β SAM6寡糖的量。图9B示出使用不同量的高碘酸盐和氧化的rhGAA缀合的己糖(聚糖)的量。

[0063] 图10示出使用改变量的高碘酸盐的唾液酸、岩藻糖、半乳糖和甘露糖的氧化。图10A示出通过单糖组成分析监控的氧化(氧化基于定量的单糖的量的减少而推断)。图10B示出正影式AA⁻标记的SAM6寡糖的LTQ MS检测。图10C和10D示出对应于AA⁻标记的氧化寡糖的MS/MS谱。图10E示出使用各种量的GAO滴定的GAM缀合物的单糖分析。

[0064] 图11示出从rhGAA和NeoGAA释放的寡糖的HPLC分析。

[0065] 图12示出使用2和22.5mM高碘酸盐处理的rhGAA的肽映射LC/MS分析。箱体中

强调的是未氧化的、与单和双氧化的胰蛋白酶肽 T13(含有甲硫氨酸 172 和 173) 的洗脱位置。

[0066] 图 13 示出 NeoGAA 和 rhGAA 至 sCIMPR 的 Biacore 结合分析。图 13A 感应图示出各样品注射的缔合、解离、M6P 洗脱和再生阶段。图 13B 示出 NeoGAA 样品和 rhGAA 对照样品的感应图数据的代表性 4- 参数拟合。图 13C 示出使用 2mM vs. 7.5mM 高碘酸盐制备的 NeoGAA 样品的 M6P 受体亲和性,对于各种制备跨越不同的缀合水平。

[0067] 图 14 示出各种 NeoGAA 缀合物的特定活性。

[0068] 图 15A-E 示出 NeoGAA 缀合物从 M6P 受体柱的洗脱。图 15F 示出在施用 4- 周剂量的 SAM6 缀合物后在 GAAKO 小鼠中的组织糖原水平。

[0069] 图 16 示出 L6 成肌细胞摄取测定的结果,从而证实各种 NeoGAA 缀合物的内在化。

[0070] 图 17 示出在使用 SAM2 治疗后从 GAA 敲除的小鼠的心脏、四头肌和三头肌的糖原清除。

[0071] 图 18 示出在使用 SAM4 治疗后从 GAA 敲除的小鼠的心脏和四头肌的糖原清除。

[0072] 图 19 示出在使用 SAM6 治疗后从 GAA 敲除的小鼠的心脏和四头肌的糖原清除。

[0073] 图 20 示出在使用 SAM6 和 GAM6 治疗后从 GAA 敲除的小鼠的心脏和四头肌的糖原清除。

[0074] 发明详述

[0075] 为了帮助理解本发明,首先定义某些术语。在本申请全文中提供另外的定义。

[0076] 如该说明书和所附权利要求书中所使用的,除非内容清楚地指示其他方式单数形式,“一个”、“一种”和“所述”包括复数对象。因此,例如,涉及含有“化合物”的方法包括两种或多种化合物的混合物。除非内容清楚地指示其他方式单数形式,以其意义使用的术语“或”通常包括“和 / 或”。

[0077] I. 寡糖 - 蛋白缀合物

[0078] 在一个实施方案中,本发明提供寡糖 - 蛋白缀合物,其还可包含接头。公开了示例性寡糖、蛋白、接头、缀合方法和缀合物。

[0079] A. 寡糖

[0080] 寡糖可选自式 B 或式 VI 的二线式寡糖衍生物,如上所示或如式 IV 和 V 中所示的线性寡糖衍生物。二线式寡糖通常具有两个末端 M6P 残基,在一些实施方案中还可包含一个或多个倒数第二的 M6P 残基。线性寡糖具有至少一个 M6P 残基,并且可包含末端 M6P 残基。通常,末端 M6P 残基可通过 α 1,2 连接而连接(参见 Distler 等, J. Biol. Chem. 266 : 21687-21692(1991),观察到相比于 α 1,3 或 α 1,6 连接,末端 M6P 处的 α 1,2 连接导致更好地结合 CI-MPR 和阳离子 - 依赖性 MPR(CD-MPR))。在一些实施方案中,末端 M6P 残基在它们各自的还原端通过 α 1,2 连接而连接相邻残基。在一些实施方案中,两个末端 M6P 残基大于 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 或 40 Å 间隔,这通过例如 X- 射线结晶法、NMR 和 / 或分子建模法来测定。例如,分子建模法可如 Balaji 等, Glycobiology 4 : 497-515(1994) 中所述来进行。在一些实施方案中,寡糖被选择为使得末端 M6P 残基具有相对较小立体阻碍。在一些实施方案中,相比于末端 M6P 残基阻碍的寡糖,末端 M6P 残基相对未阻碍的寡糖以更大的亲和性结合 CI-MPR。

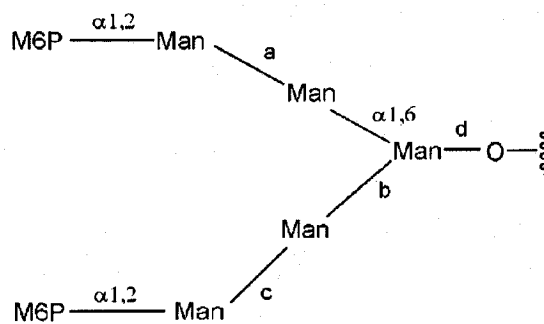
[0081] 通常,寡糖将结合 CI-MPR。例如,寡糖可以解离常数小于例如 500, 100, 50, 10,

5,1 或 0.1nM 或小于例如 100,50,10,5,2 或 1 μ M 结合 CI-MPR。CI-MPR 的 N-末端结构域 1-3 的晶体结构的配体 - 结合和未结合形式都是已知的。Olson 等, J. Biol. Chem. 279 : 34000-34009 (2004) ;Olson 等,EMBO J. 23 :2019-2028 (2004)。此外,结构相关的 CD-MPR 的配体 - 结合和未结合形式也都是已知的。Olson 等, J. Biol. Chem. 274 :29889-29886 (1999) ; Olson 等 J. Biol. Chem. 277 :10156-10161 (2002)。因此,熟练技术人员能够使用受体结构信息来选择合适的寡糖。

[0082] 寡糖可选自例如上述式 I, II, III, IV, V 或 VI 的寡糖中的任一者,包括下面所述的寡糖 1-127。式 I-III 的寡糖通过下列方式从式 B 正式地衍生:除去支链,除去和 / 或置换单糖残基,和 / 或相邻单糖残基之间的连接(例如, α 1,2 ; α 1,3 ; α 1,4 ;或 α 1,6) 的修饰。在某些实施方案中,寡糖可在一个或两个臂中具有例如 1,2 或 3 个另外的甘露糖残基,相对于式 I-VI 中的任一者其通过 α 1,2 ; α 1,3 ;或 α 1,6 连接而连接。

[0083] 寡糖可具有例如 1,2 或 3 个 M6P 残基。寡糖可总共具有例如 1,2,3,4,5,6,7,8,9 或 10 个单糖残基。在其他实施方案中,寡糖可具有 1,2,3,4,5,6,7,8,9 或 10 个甘露糖残基,其中的任一者可磷酸化或未磷酸化。

[0084] 在一些实施方案中,寡糖选自寡糖 1-96,其是式 I 的物质:



式 I

[0085]

寡糖	a	b	c	d
1	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	α
2	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	β
3	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,3$	α
4	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,3$	β
5	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,4$	α
6	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,4$	β
7	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,6$	α
8	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,6$	β
9	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,2$	α
10	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,2$	β
11	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,3$	α
12	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,3$	β
13	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,4$	α
14	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,4$	β
15	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,6$	α
16	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,6$	β
17	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,2$	α
18	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,2$	β
19	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,3$	α
20	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,3$	β
21	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,4$	α
22	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,4$	β

[0086]

23	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{1,4}$	$\alpha_{1,6}$	α
24	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{1,4}$	$\alpha_{1,6}$	β
25	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	α
26	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	β
27	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{1,3}$	α
28	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{1,3}$	β
29	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{1,4}$	α
30	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{1,4}$	β
31	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{1,6}$	α
32	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{1,6}$	β
33	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,2}$	α
34	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,2}$	β
35	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,3}$	α
36	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,3}$	β
37	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,4}$	α
38	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,4}$	β
39	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,6}$	α
40	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,6}$	β
41	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,4}$	$\alpha_{1,2}$	α
42	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,4}$	$\alpha_{1,2}$	β
43	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,4}$	$\alpha_{1,3}$	α
44	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,4}$	$\alpha_{1,3}$	β
45	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,4}$	$\alpha_{1,4}$	α
46	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,4}$	$\alpha_{1,4}$	β
47	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,4}$	$\alpha_{1,6}$	α
48	$\alpha_{1,3}$	$\alpha_{1,4}$	$\alpha_{1,6}$	β
49	$\alpha_{1,4}$	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	α
50	$\alpha_{1,4}$	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	β
51	$\alpha_{1,4}$	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{1,3}$	α
52	$\alpha_{1,4}$	$\alpha_{1,2}$	$\alpha_{1,3}$	β

[0087]

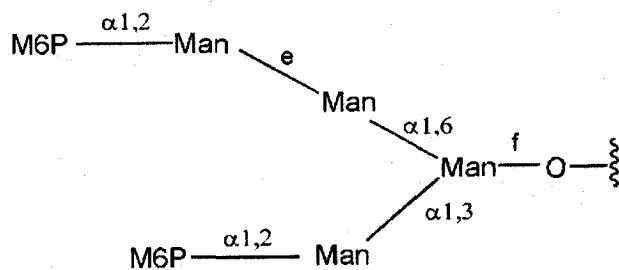
53	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,4$	α
54	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,4$	β
55	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,6$	α
56	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,6$	β
57	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,2$	α
58	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,2$	β
59	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,3$	α
60	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,3$	β
61	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,4$	α
62	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,4$	β
63	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,6$	α
64	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,6$	β
65	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,2$	α
66	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,2$	β
67	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,3$	α
68	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,3$	β
69	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,4$	α
70	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,4$	β
71	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,6$	α
72	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,6$	β
73	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	α
74	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	β
75	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,3$	α
76	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,3$	β
77	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,4$	α
78	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,4$	β
79	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,6$	α
80	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,6$	β
81	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,2$	α
82	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,2$	β

[0088]

83	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,3$	α
84	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,3$	β
85	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,4$	α
86	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,4$	β
87	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,6$	α
88	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,6$	β
89	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,2$	α
90	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,2$	β
91	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,3$	α
92	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,3$	β
93	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,4$	α
94	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,4$	β
95	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,6$	α
96	$\alpha 1,6$	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,6$	β

[0089] 在一些实施方案中,d 是 α 和 β 的混合物(即,寡糖是例如寡糖 1 和 2、3 和 4 或 95 和 96 的混合物)。

[0090] 在一些实施方案中,寡糖选自寡糖 97-103,其是式 II 的物质:



式 II

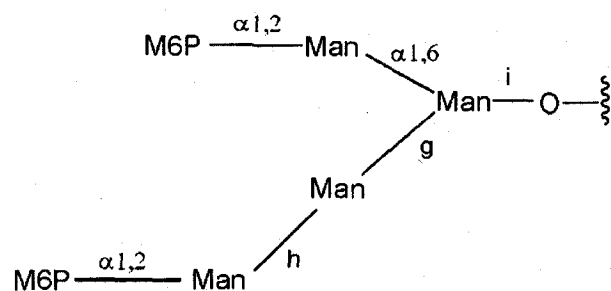
[0091]

寡糖	e	f
97	$\alpha 1,2$	α
98	$\alpha 1,2$	β
99	$\alpha 1,3$	α
100	$\alpha 1,3$	β
101	$\alpha 1,4$	α
102	$\alpha 1,4$	β
103	$\alpha 1,6$	α
式 B	$\alpha 1,6$	β

[0092]

[0093] 在一些实施方案中, f 是 α 和 β 的混合物 (即, 寡糖是例如寡糖 97 和 98, 99 和 100 或 101 和 102 的混合物)。

[0094] 在一些实施方案中, 寡糖选自寡糖 104-127, 其是式 III 的物质:



式 III

寡糖	g	h	i
104	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	α
105	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	β
106	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,3$	α
107	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,3$	β
108	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,4$	α
109	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,4$	β
110	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,6$	α
111	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,6$	β
112	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,2$	α
113	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,2$	β
114	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,3$	α
115	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,3$	β
116	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,4$	α
117	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,4$	β
118	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,6$	α
119	$\alpha 1,3$	$\alpha 1,6$	β
120	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,2$	α

[0095]

[0096]

121	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,2$	β
122	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,3$	α
123	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,3$	β
124	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,4$	α
125	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,4$	β
126	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,6$	α
127	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,6$	β

[0097] 在一些实施方案中, i 是 α 和 β 的混合物 (即, 寡糖是例如寡糖 104 和 105、106 和 107 或 126 和 127 的混合物)。

[0098] 在一些实施方案中, 寡糖选自寡糖 128-133, 其是式 IV 的物质:

[0099]



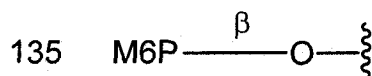
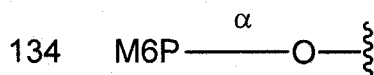
式 IV

寡糖		k
128	$\text{M6P} \xrightarrow{\alpha 1,2} \text{Man} \xrightarrow{k} \text{O} \text{---} \text{~}$	α
129	$\text{M6P} \xrightarrow{\alpha 1,2} \text{Man} \xrightarrow{k} \text{O} \text{---} \text{~}$	β
130	$\text{M6P} \xrightarrow{\alpha 1,2} \text{Man} \xrightarrow{\alpha 1,6} \text{Man} \xrightarrow{k} \text{O} \text{---} \text{~}$	α
131	$\text{M6P} \xrightarrow{\alpha 1,2} \text{Man} \xrightarrow{\alpha 1,6} \text{Man} \xrightarrow{k} \text{O} \text{---} \text{~}$	β
132	$\text{M6P} \xrightarrow{\alpha 1,2} \text{Man} \xrightarrow{\alpha 1,6} \text{Man} \xrightarrow{\alpha 1,6} \text{Man} \xrightarrow{k} \text{O} \text{---} \text{~}$	α
133	$\text{M6P} \xrightarrow{\alpha 1,2} \text{Man} \xrightarrow{\alpha 1,6} \text{Man} \xrightarrow{\alpha 1,6} \text{Man} \xrightarrow{k} \text{O} \text{---} \text{~}$	β

[0100] 在一些实施方案中, k 是 α 和 β 的混合物 (即, 寡糖是例如寡糖 128 和 129、130 和 131 或 132 和 133 的混合物)。

[0101] 在一些实施方案中, 寡糖选自寡糖 134 和 135, 其是式 V 的物质:

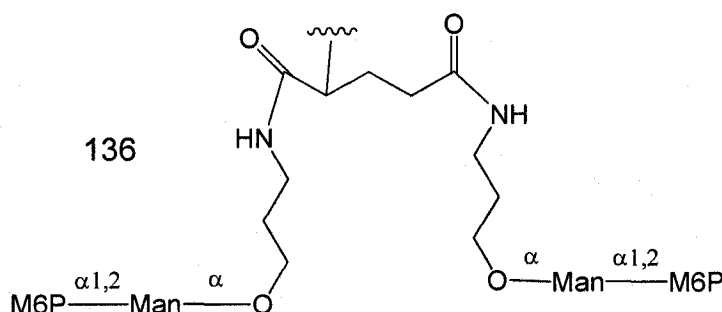
[0102]



[0103] 在一些实施方案中,寡糖是寡糖 134 和 135 的混合物。

[0104] 在一些实施方案中,寡糖是寡糖 136,其是式 VI 的物质:

[0105]



[0106] 在一些实施方案中,寡糖可从天然来源分离。从天然来源分离的寡糖可以是同源的或可以是相关寡糖的异源混合物。

[0107] 在某些实施方案中,寡糖通过化学和/或酶合成来制备。在一些实施方案中,寡糖可通过从天然源分离的寡糖的化学或酶修饰(“半合成”)来制备。

[0108] 寡糖可如下列所教导而化学和/或酶合成:例如如图 1-7, Osborn 等, *Oligosaccharides: Their Synthesis and Biological Roles*, Oxford University Press, 2000; Wang 等 (eds), *Synthesis of Carbohydrates through Biotechnology*, American Chemical Society, 2004; Seeberger, *Solid Support Oligosaccharide Synthesis and Combinatorial Carbohydrate Libraries*, Wiley-Interscience, 2001; Driguez 等, *Glycoscience: Synthesis of Oligosaccharides and Glycoconjugates*, Springer, 1999; Düffels 等, *Chem. Eur. J.* 6:1416-1430 (2000); Hojo 等, *Current Prot. Peptide Sci.* 1:23-48 (2000); Seeberger et al., *Nature* 446:1046-1051 (2007); Seeberger 等, *Nature Rev. Drug Discov.* 4:751-763 (2005); Srivastana 等, *Carbohydrate Res.* 161:195-210 (1987); and Hagihara 等, *Chem. Rec.* 6:290-302 (2006) 和美国专利 No. 5, 324, 663; 6, 156, 547; 6, 573, 337; 6, 723, 843; 7, 019, 131; 7, 160, 517。

[0109] 在一些实施方案中,寡糖可通过依次引入单糖而合成。在某些实施方案中,单糖可通过选择性保护和脱保护而引入现有糖的特定位置(例如,2-O, 3-O, 4-O 或 6-O)。例如,寡糖 82 可如图 1 中的逆合成分析和图 2-7 中所阐述的合成路线所述来合成。在一些实施方案中,构建单元 2a 可置换图 3, 5 和 6 的合成路线中的构建单元 2。如果使用构建单元 2a, 可以避免在七糖阶段除去构建单元 2 的苯亚甲基。

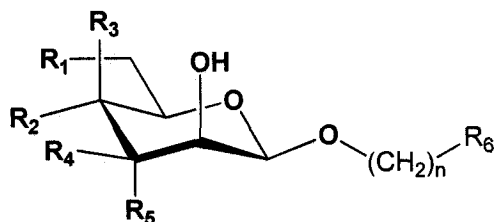
[0110] 甘露糖残基可例如如美国专利 No. 6, 905, 856 中教导来酶磷酸化。在某些实施方案中,1, 2 或 3 个 M6P 残基可被耐水解酶 M6P 模拟物取代,例如如,丙二酰基醚、丙二酸酯和磷酸酯,如 Berkowitz 等, *Org. Lett.* 6:4921-4924 (2004) 中所教导。

[0111] 在某些实施方案中,接头可通过 α 或 β 连接而附接糖。在一些实施方案中, $\alpha\beta$ 连接可通过下列中所述的方法来形成: Crich 等, *Tetrahedron*, 54:8321-8348 (1998);

Kim 等, J. Am. Chem. Soc., 130 :8537-8547 (2008) ;Srivasta 等, Tetrahedron Letters, 35 : 3269-3272 (1979) ;Hodosi 等, J. Am. Chem. Soc., 119 :2335-2336 (1997) ;Nicolaou 等, J. Am. Chem. Soc., 119 :9057-9058 (1997)。在一个实施方案中, $\alpha\beta$ 连接可使用二丁基锡氧化物从而形成可和含有未活化的离去基团的接头反应的中间体而形成。

[0112] 一个实施方案提供制备具有式 VII 的化合物的方法 :

[0113]



式 VII

[0114] 其中 :

[0115] R_1 选自氢, 羟基, 任选地取代的低级烷基, 磷酸酯, 硫酸酯, $-OR_7$, 保护基团和糖 ;

[0116] R_2, R_3, R_4 和 R_5 各自独立地选自氢, 硫酸酯, 羟基, $-OR_8$, 保护基团和糖 ;

[0117] R_6 选自氢, 羟基, 羧基, 烷氧基羰基, 氨基, 酰胺, 烷基氨基, 氨基烷基, 氨氧基, 酰肼, 肼, 任选地取代的烯基和任选地取代的 C_2-C_6 烷基 ;

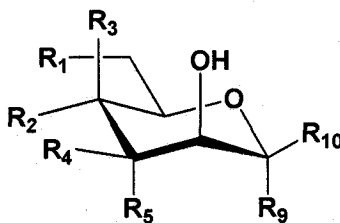
[0118] R_7 和 R_8 各自独立地选自乙酰基和任选地取代的低级烷基 ; 以及

[0119] n 是 1 至 10 的整数 ;

[0120] 包括 :

[0121] a) 处理具有式 VIII 的化合物 :

[0122]



式 VIII

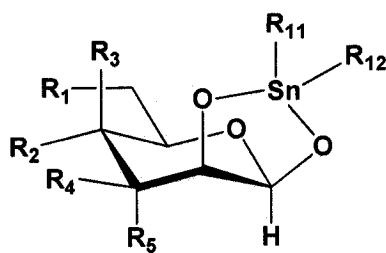
[0123] 其中 :

[0124] R_1 至 R_5 如上所定义 ; 和

[0125] R_9 和 R_{10} 选自氢和羟基, 使得当 R_9 和 R_{10} 中的一者是羟基时, 另一者是氢 ;

[0126] 和具有式 $R_{11}R_{12}(Sn = O)$ 的化合物, 以形成具有式 IX 的化合物 :

[0127]



式IX

[0128] 其中：

[0129] R_1 至 R_5 如上所定义；和

[0130] R_{11} 和 R_{12} 各自独立地选自未取代的烷基或者 R_{11} 和 R_{12} 连接在一起选自未取代的亚烷基；

[0131] 以及

[0132] b) 任选地在存在金属卤化物的情况下，处理式 IX 的化合物和具有式 $R_6-(CH_2)_n-L$ 的化合物，以形成式 VII 的化合物，

[0133] 其中：

[0134] R_6 和 n 如上所定义；和

[0135] L 是卤素。

[0136] “任选的”或“任选地”之意是后来描述的事件或情况可能会或可能不会发生，这说明包括情况下发生的事件或情况和实例中，它没有。例如，“任选地取代的烷基”既包括“烷基”和“取代烷基”的定义如下。这将是了解这些领域的技术人员，对于任何组包含一个或多个取代，这些团体不打算提出任何替代或取代不切实际的图案，立体，综合不可行和 / 或内在的不稳定性。

[0137] “烷基”包括直链和支链，具有指定数量的碳原子，通常 1 至 20 个碳原子，例如 1 至 8 个碳原子，例如 1 至 6 个碳原子。例如 C_1 - C_6 烷基包括 1 至 6 个碳原子的直链和支链烷基。烷基例子包括甲基，乙基，丙基，异丙基， n -丁基，仲-丁基，叔-丁基，戊基，2-戊基，异戊基，新戊基，己基，2-己基，3-己基，3-甲基戊基等。亚烷基是烷基的另外子集，称为烷基的相同残基，但具有两个附接点。亚烷基通常具有 2 至 20 个碳原子，例如 2 至 8 个碳原子，例如 2 至 6 个碳原子。例如， C_0 亚烷基表示共价键和 C_1 亚烷基是亚甲基。当有特定数量的碳原子的烷基残基命名时，所有的碳原子数目有几何异构体的本意是涵盖，因此，例如，“丁基”是指包括 n -丁基，仲-丁基，异丁基和 t -丁基；“丙基”包括 n -丙基和异丙基。“低级烷基”是指具有 1 至 4 个碳原子的烷基。

[0138] “烯基”表示不饱和支链或直链烷基组有至少一个碳碳双键由一个氢分子从邻近个碳原子的母体烷基去除而得。本集团可能在任或即将双键的顺反式构。典型烯基包括但不限于乙烯基；丙烯基例如丙-1-烯-1-基，丙-1-烯-2-基，丙-2-烯-1-基（烯丙基），丙-2-烯-2-基；丁烯基例如丁-1-烯-1-基，丁-1-烯-2-基，2-甲基-丙-1-烯-1-基，丁-2-烯-1-基，丁-2-烯-1-基，丁-2-烯-2-基，丁-1,3-二烯-1-基，丁-1,3-二烯-2-基；等。在一些实施方案中，烯基具有 2 至 20 个碳原子，并且在其他实施方案中，具有 2 至 6 个碳原子。

[0139] 如本文中使用的，术语“取代”是指任何一个或多个指定的氢原子或组 S 是同一个

集团所表示的规定,指定原子的价不超过正常,选择替代的手段。当取代基氧代(即, $=O$)的 2 个氢原子上的 S 是取代。取代基的组合和 / 或变量是允许的,如果这样的组合只有在稳定的化合物 s 或有用的合成中间体结果第一个稳定的化合物或稳定的结构是为了暗示一个化合物是足够强大的生存从反应混合物分离,作为一个有实用价值至少剂后制定。除非另有说明,取代被命名为核心的结构。例如,它是可以理解,当(环烷基)烷基取代基是作为一个可能的上市,本取代的核心结构连接处的烷基部分。

[0140] 除非另有清晰地定义,术语“取代的烷基”是指这样的烷基,其中一个或多个氢原子被取代基取代,所述取代基独立地选自:

[0141] $-R^a$, $-OR^b$, $-O(C_1-C_2 \text{ 烷基})O-$ (例如,亚甲基二氧基-), $-SR^b$, $-NR^bR^c$, 卤代,氰基,氧代,硝基,硫酸酯,磷酸酯, $-COR^b$, $-CO_2R^b$, $-CONR^bR^c$, $-OCOR^b$, $-OCO_2R^a$, $-OCONR^bR^c$, $-NR^cCOR^b$, $-NR^cCO_2R^a$, $-NR^cCONR^bR^c$, $-SOR^a$, $-SO_2R^a$, $-SO_2NR^bR^c$, $-NR^cSO_2R^a$, 乙二醇和聚乙二醇(PEG)。

[0142] 如果 R^a 选自任选地取代的 C_1-C_6 烷基、任选地取代的芳基和任选地取代的杂芳基;

[0143] R^b 选自氢, $-NH_2$, $-NHR^c$, 任选地取代的 C_1-C_6 烷基, 任选地取代的芳基, 和任选地取代的杂芳基; 和

[0144] R^c 选自氢和任选地取代的 C_1-C_4 烷基; 或

[0145] R^b 和 R^c 以及它们附接的氮形成任选地取代的杂环烷基; 以及

[0146] 其中各任选地取代的基团可未取代或被一种或多种取代基独立地取代, 所述取代基独立地选自 C_1-C_4 烷基, 芳基, 杂芳基, 芳基 $-C_1-C_4$ 烷基-, 杂芳基 $-C_1-C_4$ 烷基-, C_1-C_4 卤代烷基-, $-OC_1-C_4$ 烷基, $-OC_1-C_4$ 烷基苯基, $-C_1-C_4$ 烷基 $-OH$, $-OC_1-C_4$ 卤代烷基, 卤代, $-OH$, $-NH_2$, $-C_1-C_4$ 烷基 $-NH_2$, $-N(C_1-C_4 \text{ 烷基})(C_1-C_4 \text{ 烷基})$, $-NH(C_1-C_4 \text{ 烷基})$, $-N(C_1-C_4 \text{ 烷基})(C_1-C_4 \text{ 烷基苯基})$, $-NH(C_1-C_4 \text{ 烷基苯基})$, 氰基, 硝基, 氧代(杂芳基的取代基), $-CO_2H$, $-C(O)OC_1-C_4$ 烷基, $-CON(C_1-C_4 \text{ 烷基})(C_1-C_4 \text{ 烷基})$, $-CONH(C_1-C_4 \text{ 烷基})$, $-CONH_2$, $-NHC(O)(C_1-C_4 \text{ 烷基})$, $-NHC(O)(\text{苯基})$, $-N(C_1-C_4 \text{ 烷基})C(O)(C_1-C_4 \text{ 烷基})$, $-N(C_1-C_4 \text{ 烷基})C(O)(\text{苯基})$, $-C(O)C_1-C_4$ 烷基, $-C(O)C_1-C_4$ 苯基, $-C(O)C_1-C_4$ 卤代烷基, $-OC(O)C_1-C_4$ 烷基, $-SO_2(C_1-C_4 \text{ 烷基})$, $-SO_2(\text{苯基})$, $-SO_2(C_1-C_4 \text{ 卤代烷基})$, $-SO_2NH_2$, $-SO_2NH(C_1-C_4 \text{ 烷基})$, $-SO_2NH(\text{苯基})$, $-NHSO_2(C_1-C_4 \text{ 烷基})$, $-NHSO_2(\text{苯基})$ 和 $-NHSO_2(C_1-C_4 \text{ 卤代烷基})$ 。

[0147] 在一些实施方案中, R_1 选自氢, 任选地取代的低级烷基, 磷酸酯, 硫酸酯, $-OR_7$, 保护基团和糖。另外的实施方案中, R_2 , R_3 , R_4 和 R_5 各自独立地选自氢, 硫酸酯, 羟基, $-OR_8$, 保护基团和糖。在某些实施方案中, R_7 和 R_8 各自独立地选自乙酰基和任选地取代的低级烷基。在一些实施方案中可以是, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 和 R_5 的任意或全部, 可选自保护基团, 其可选择性除去, 包括苄基, 甲硅烷基, 和三苯甲基醚和酯(除了乙酸酯)。在一些实施方案中, R_1 至 R_5 中的两个连接形成保护基团。在一个实施方案中, R_1 选自 $-O-$ 苄基和 $-OCPH_3$ 。在另外的实施方案中, R_1 至 R_5 中的至少一种是 $-O-$ 苄基。在一些实施方案中, R_1 , R_2 和 R_4 均是 $-O-$ 苄基。在又一实施方案中, R_1 是 $-OCPH_3$ 和 R_4 是 $-O-$ 苄基。在一个实施方案中, R_{11} 和 R_{12} 连接形成环己烷。在另外的实施方案中, R_{11} 和 R_{12} 都是异丙基。在又一实施方案中, R_{11} 和 R_{12} 都是己基。

[0148] 在另外的实施方案中, 式 VIII 的化合物选自任选地保护的甘露糖, 鼠李糖, 艾杜糖和阿卓糖。在一个实施方案中, 式 VIII 的化合物是任选地保护的甘露糖。在某些情况下, 甘露糖可保护在 C-3, C-4 或 C-6 位中的一个或多个。在一些情况下, 单一保护基团可附接

两个位置。例如,苯亚甲基可用于保护 C-4 和 C-6 位置。

[0149] 通常,糖上的任何保护基团没有强烈电亲电性或交叉与化合物的反应式九世也可以使用。合适的保护基团包括醚例如任选地取代的苄基二甲醚,三苯甲基醚,烯丙基醚或甲硅烷基醚,酯例如任选地取代的乙酸酯苯甲酸酯,氯乙酸,特戊酸盐或乙酰;及包括苯亚甲基,异丙基,丁烷双缩醛,缩醛等。另外,保护基团可以选择从氨基甲酸酯和聚氨酯。在一些实施方案中,保护基团可以有选择地删除,例如,如,苄基,甲硅烷基和三苯甲基醚和醋酸酯比其他。的位置和保护基团恒等式,可根据不同需要的最终产品。额外的保护基团已探明的以本领域普通技术人员,可按照实施方案的规定使用所述。

[0150] 在一个实施方案中,式 VIII 的化合物用化合物处理,其具有式 $R_{11}R_{12}(Sn = O)$, 其中 R_{11} 和 R_{12} 各自独立地选自未取代的烷基或 R_{11} 和 R_{12} , 连接,选自未取代的亚烷基。在一些实施方案中, R_{11} 和 R_{12} 是丁基。在一个实施方案中,具有式 $R_{11}R_{12}(Sn = O)$ 的化合物和式 VIII 的化合物反应,其在溶剂中,例如甲苯、苯、二甲基甲酰胺,异丙醇,甲醇或二甲苯。在一些实施方案中,反应在高温下进行,任选地回流,以形成式 IX 化合物。在一些实施方案中,反应混合物加热至至少 40, 50, 60, 70 或 80°C。在另外的实施方案中,具有式 $R_{11}R_{12}(Sn = O)$ 的化合物和式 VIII 的化合物反应至少 1, 2, 5, 10, 15 或 20 小时。

[0151] 在一个实施方案中,式 IX 的化合物用式 $R_6-(CH_2)_n-L$ 化合物处理,任选在金属卤化物存在下。在一些实施方案中, R_6 选自氢,羟基,羧基,烷氧基羰基,氨基,酰胺,烷基氨基,氨基烷基,氨氧基,酰肼,肼,任选地取代的烯基和任选地取代的 C_2-C_6 烷基。在另外的实施方案中, n 是 1 至 10 的整数。在某些实施方案中, n 是 2, 3, 4, 5 或 6, R_6 是 C_1-C_4 烷氧基羰基。在一个实施方案中, n 是 3 并且 R_6 是甲氧基羰基。在一些实施方案中, L 是未活化的离去基团。活化的离去基团的例子包括三氟甲酸盐、磺酸盐、甲磺酸盐和其他类型的基团。在一些情况下,较少反应性的离去基团可被邻近基团活化,例如烯丙基。在某些实施方案中, R_6 不含活化离去基团的取代基。在一些实施方案中, L 是溴化物、氯化物或碘化物。在一个实施方案中, L 是溴化物。在另外的实施方案中,式 $R_6-(CH_2)_n-L$ 化合物是 4- 溴丁酸甲酯。

[0152] 在一个实施方案中,式 VIII 的化合物是任选地保护的甘露糖,并且式 $R_6-(CH_2)_n-L$ 的化合物是 4- 溴丁酸甲酯。在另外的实施方案中,式 VIII 的化合物选自 3, 4, 6- 三 -O- 苄基 -D- 甘露糖和 3-O- 烯丙基 -6-O- 三苯甲基 -D- 甘露糖。

[0153] 在一些实施方案中,式 IX 的化合物用具有式 $R_6-(CH_2)_n-L$ 化合物在存在金属卤化物下处理。金属卤化物的某些实施方案包括金属氟化物。在一些实施方案中,金属氟化物选自氟化铯,氟化钠,氟化钙,氟化镁,氟化锂和氟化钾。在一个实施方案中,金属氟化物是氟化铯。在一些实施方案中,式 IX 化合物用式 $R_6-(CH_2)_n-L$ 化合物处理还包括加入四烷基卤化铵。在一些情况下,四烷基卤化铵是四丁基碘化铵。在另外的实施方案中,反应中可使用金属卤化物。金属卤化物的例子包括碱金属碘化物例如碘化钠。

[0154] 在一个实施方案中,式 IX 的化合物可联合式 $R_6-(CH_2)_n-L$ 化合物在极性非质子溶剂。这些溶剂包括二甲基甲酰胺,二甲基乙酰胺,二甲基亚砷,硝基甲烷,六甲基磷酰胺, N - 甲基吡咯烷酮,丙酮,乙腈,乙酸乙酯,和甲基乙基酮,其他本领域普通技术人员已知的。

[0155] 在某些实施方案中,式 IX 的化合物可在室温下联合式 $R_6-(CH_2)_n-L$ 化合物。在其他实施方案中,反应物联合并加热至至少 50, 60, 70 或 80°C,以形成式 VII 化合物。在进一步实施方案中,混合物加热至少 1, 2, 5, 10, 15 或 20 小时。

[0156] 在一些实施方案中,本文中所述的方法导致至少 50,60,70,80,90,95 或 99% 立体特异性产物。在另外的实施方案中,立体特异性产物的收率是最大可能收率的至少 50,60,70,75,80,85,90,95 或 99%。在某些实施方案中, β 与 α 连接的产物的比例是至少 10 : 1, 20 : 1, 30 : 1, 40 : 1, 50 : 1 或 100 : 1。

[0157] 在一个实施方案中,式 VII 的化合物可以大规模制备。在一些实施方案中,“大规模”是指施用至少 50,100,500 或 1000 克起始材料、中间体或试剂。在另外的实施方案中,“大规模”包括使用至少 10,25,50,100,250 或 500kg 的起始材料、中间体或试剂。

[0158] 使用二丁基锡氧化试剂制备式 A 的化合物的示例性合成路线示于图 8 中。

[0159] B. 蛋白

[0160] 本文中所述的寡糖-蛋白缀合物可包含任何纯蛋白,部分纯化的蛋白或其片段,包括分离的蛋白以及重组或合成制备的蛋白。术语“纯的”,“纯化的”和“分离的”是指一种分子,其基本上不在其自然的环境中。例如,一个纯的蛋白基本上不含细胞物质和/或来自得到所述蛋白的细胞或组织来源的其他蛋白。该术语指,例如,至少 70%至 80%,80%至 90%,90 至 95%,或至少 95%,96%,97%,98%,99%或 100% (w/w) 纯的制备物。

[0161] 在其他实施方案中,蛋白可为在 1-7,例如 1-3,2-5,3-6,4-5,5-6 或 4-6 的 pH 值具有最佳活性的酶,如通过活性测定法测量的。例如,酶可在 4-6 的 pH 具有最佳 pH。

[0162] 在一些实施方案中,蛋白可为具有 1 至 8,如 1-3,2-5,3-8,4-5,5-6,4-6,5-8,6-8 或 7-8 的等电点 (pI) 的酶。可使用,例如,等电聚焦凝胶电泳一个测量蛋白的 PI。

[0163] 在某些实施方案中,蛋白本身具有至少一个寡糖(即,其是糖蛋白)。在特定实施方案中,蛋白是治疗性糖蛋白。例如,治疗性糖蛋白可以是溶酶体酶,包括 ERT 酶,例如如表 1 中所列的溶酶体水解酶中的一种。在某些实施方案中,溶酶体酶选自例如 α -葡萄糖苷酶(GAA)、 α -半乳糖苷酶 A、酸性神经磷脂酶和 α -L-艾杜糖苷酸酶。在特定实施方案中,溶酶体酶是 GAA。

[0164] 表 1 :LSD 和对应的溶酶体水解酶的例子

[0165]

溶酶体贮积症	有缺陷的酶
法布里氏病	α -半乳糖苷酶 A
法布里氏病	酸性神经酰胺酶
岩藻糖代谢病	酸性 α -L-岩藻糖苷酶
Gaucher 型 1, 2 和 3	酸性 β -葡萄糖苷酶
GM1 神经节苷脂贮积病	酸性 β -半乳糖苷酶
Hunter (粘多糖增多症(MPS) II)	艾杜糖酸酯-2-硫酸酯酶
Hurler-Scheie, Hurler, Scheie 氏症 (MPS I)	α -L-艾杜糖苷酸酶
Krabbe	半乳糖脑苷脂酶
α -甘露糖苷过多症	酸性 α -甘露糖苷酶
β -甘露糖苷过多症	酸性 β -甘露糖苷酶
Maroteaux-Lamy 氏症(MPS VI)	芳基硫酸酯酶 B
异染性白质营养不良	芳基硫酸酯酶 A
莫奎欧氏 A (MPS IV)	N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸酯硫酸酯酶

[0166]

溶酶体贮积症	有缺陷的酶
	(N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸酯酶) (半乳糖-6-硫酸酯酶)
莫奎欧氏 B (MPS IV)	酸性 α -半乳糖苷酶
尼曼-匹克氏 A 和 B	酸性神经磷脂酶
Pompe	酸性 α -葡萄糖苷酶 (α -葡萄糖苷酶)
Sandhoff	β -氨基己糖苷酶 B
桑菲列普氏 A (MPS III)	乙酰肝素 N-硫酸酯酶
桑菲列普氏 B (MPS III)	α -N-乙酰基氨基葡萄糖苷酶
桑菲列普氏 C (MPS III)	乙酰基-CoA: α -氨基葡萄糖苷 N-乙酰转移酶
桑菲列普氏 D (MPS III)	N-乙酰氨基葡萄糖-6-硫酸酯硫酸酯酶
Schindler-Kanzaki	α -N-乙酰基半乳糖苷酶
Sialidosis	唾液酸酶
Sly (MPS VII)	β -葡萄糖苷酸酶
Tay-Sachs	β -氨基己糖苷酶 A

[0167] 在一些实施方案中,蛋白可是糖蛋白,具有至少 1,2,3,4,5 或更多 N-连接的或

O-连接的寡糖。在其他实施方案中,蛋白可具有1,2,3,4,5或更多一致位点以用于N-连接的或O-连接的糖基化,至少一种糖基化。

[0168] 在某些实施方案中,蛋白可以是受体的配体。例如,在一些实施方案中,蛋白可以是结合这样的受体的糖蛋白,该受体识别糖,例如甘露糖或甘露糖-6-磷酸酯。在特定实施方案中,糖蛋白可结合例如,唾液酸糖蛋白受体,CI-MPR, CD-MPR 或甘露糖受体。

[0169] 合适的蛋白序列是本领域熟知的。熟练技术人员可以很容易地识别保守区,通过比较显著的功能主题相关序列和包括例如,来自不同物种的序列。保守的氨基酸更可能是重要的活动,相反,这表明不保守氨基酸的多肽,更有可能容忍变异地区。以下这些指导方针,熟练技术人员可以通过不超过常规识别功能更强大的变种努力。此外,这里的晶体结构是已知的,熟练技术人员可以研究晶体结构,并确定氨基酸可能是重要的结构和/或功能,从而减少耐突变。熟练技术人员也将能够识别氨基酸的变化可能会容忍。此外,熟练技术人员可以评估在已知的结构与功能的关系光线可能突变。

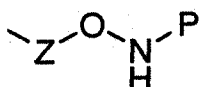
[0170] 例如, α -半乳糖苷酶的序列和结构是熟知的。例如参见 Garman 等, *J. Mol. Biol.*, 337 :319-335 (2004) ;Garman 等, *Mol. Genet. Metabol.*, 77 :3-11 (2002) ;Matsuzawa 等, *Hum. Genet.* 117 :317-328 (2005)。还参见 GenBank Accession No. X05790。在另外的例子中, GAA 的序列是熟知的 (例如参见 Martiniuk 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 :9641-9644 (1986) ;Hoefsloot 等, *Biochem. J.* 272 :493-497 (1990) ;Moreland 等, *J. Biol. Chem.* 280 :6780-6791 (2005)。还参见 GenBank Accession No. NM_000152。此外,来自 *E. coli* 同源 α -糖苷酶的晶体结构被测定,并且可提供对于其他 α -糖苷酶的结构观点。参见 Lovering 等, *J. Biol. Chem.* 280 :2105-2115 (2005)。在第三例子中,酸性神经磷脂酶序列是熟知的 (例如参见 Lansmann 等, *Eur. J. Biochem.* 270 :1076-1088 (2003)), 其是酸性神经磷脂酶的序列和结构的关键特征。例如参见 Seto 等, *Protein Sci.* 13 :3172-3186 (2004) ;Qiu 等, *J. Biol. Chem.* 278 :32744-32752 (2003) ;Takahashi 等, *Tokohu J. Exp. Med.* 206 :333-340 (2005)。还参见 GenBank Accession No. AI587087。在又一例子中, α -L-艾杜糖苷酸酶的序列是熟知的 (例如参见 Scott 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 :9695-9699 (1991) ;Scott 等, *Genomics* 13 :1311-1313 (1992)), 是 α -L-艾杜糖苷酸酶的关键特征。例如参见 Scott 等, *Hum. Mutat.* 6 :288-302 (1995) ;Rempel 等, *Mol. Genet. Metab.* 85 :28-37 (2005) ;Durand 等, *Glycobiology* 7 :277-284 (1997) ;Beesley 等, *Hum. Genet.* 109 :503-511 (2001) ;Brooks 等, *Glycobiology* 11 :741-750 (2001) ;Nieman 等, *Biochemistry* 42 :8054-8065 (2003)。在进一步的例子中,艾杜糖酸酯-2-硫酸酯酶的序列是熟知的,并且是疾病引起的突变。例如参见 Flomen 等, *Hum. Mol. Genet.* 2 :5-10 (1993) ;Roberts 等, *J. Med. Genet.* 26 :309-313 (1989) ;Wilson 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 :8531-8535 (1990) ;Wilson 等, *Genomics* 17 :773-775 (1993) ;Sukegawa-Hayasaka 等, *J. Inherit. Metab. Dis* 29 :755-761 (2006) 并引入本文。艾杜糖酸酯-2-硫酸酯酶的结构已经建模。例如参见 Kim 等, *Hum. Mutat.* 21 :193-201 (2003)。在另外的例子中, N-乙酰半乳糖胺-4-硫酸酯酶 (芳基硫酸酯酶 B) 的序列和结构是已知的,这是疾病引起的突变。例如参见 Litjens 等, *Hum. Mut.* 1 :397-402 (1992) ;Peters 等, *J. Biol. Chem.* 265 :3374-3381 (1990) ;Schuchman 等, *Genomics* 6 :149-158 (1990) ;Bond 等, *Structure* 15 :277-289 (1997)。

[0171] C. 接头

[0172] 在某些实施方案中,本发明的寡糖-蛋白缀合物包含缀合物的寡糖和蛋白组分之间的接头。在其他实施方案中,缀合物不包含接头。在包含接头的实施方案中,可以使用本领域技术人员已知的任何合适的接头,只要其不干涉寡糖和 CI-MPR 的结合和/或阻碍蛋白的活性(包括例如酶活性)。例如,接头可以是美国专利 No. 4,671,958 ;4,867,973 ;5,691,154 ;5,846,728 ;6,472,506 ;6,541,669 ;7,141,676 ;7,176,185 或 7,232,805 或者美国专利申请公开 No. 2006/0228348 中公开的接头中的一者。在一些实施方案中,接头选自 W02008/089403 中公开的接头。

[0173] 在一些实施方案中,接头可具有下式:

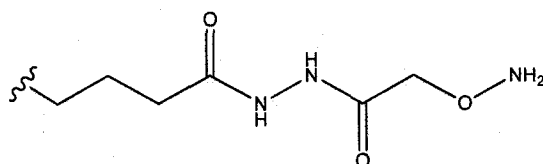
[0174]



[0175] 其中 Z 选自任选地取代的烷基、烯基、炔基、芳基、乙二醇、聚乙二醇 (PEG)、杂芳基和杂环基,并且选自氢或氨基保护基团。如本文中使用的,任何氨基氧基化合物(例如如烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、杂环基、酰基氧基、烷氧基、芳基氧基和杂环基氧基)上的化学基团可取代或未取代,可夹杂一个或多个杂原子或化学基团,除非另外说明。夹杂杂原子包括氮、氧和硫。取代基和夹杂化学基团可选自例如酰基,酰基氨基,酰基氧基,烯基,烷氧基,烷基,炔基,酰氨基,氨基,芳基,芳基氧基,叠氮基,氨基甲酰基,碳烷氧基,碳氧基,氰基,环烷基,甲酰基,胍基,卤代,杂芳基,杂环基,羟基,亚氨基,硝基,氧代,磷酰氨基,亚磺酰基,硫氨基,磺酸酯,磺酰基,硫代,硫代酰基氨基,硫代脒基和脒基。取代基本身可取代或未取代,并且可夹杂或封端一个或多个杂原子,例如如氮、硫和氧。

[0176] 在一个实施方案中,接头可通过和下列反应和形成:

[0177]



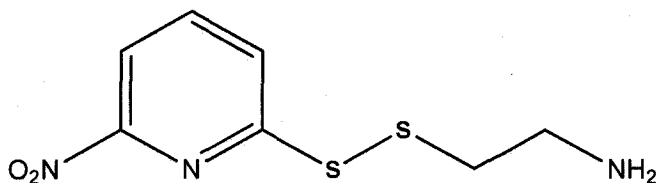
[0178] 在另外的实施方案中,接头可具有式:

[0179] ---Z---NH---P

[0180] 其中 Z 和 P 如上所定义。

[0181] 在另外的实施方案中,接头可含有二硫化物连接。二硫化物接头可用于使寡糖通过例如半胱氨酸附接蛋白主链。在一个实施方案中,接头可包含或和从下列物质的反应形成:

[0182]



[0183] 通常,接头合适的长度是这样的:它避免了与寡糖及缀合物的蛋白成分立体阻碍,

不干预结合的寡糖与活动（包括对 CI- 多平面重建和 / 或例如酶活性）的蛋白。例如，接头可包括 1-100, 1-60, 5-60, 5-40, 2-50, 2-20, 5-10 或 5-20 线性原子，其中接头是通过一个附加的方式来酯蛋白和对寡糖，酰胺，脲，脲，脲，缩氨基脲，醚，硫代醚，磷酰硫代，磷酸酯，硫代酯，和 / 或二硫化物连接。在接头其余线性原子，例如选择碳，氧，氮和硫，选择其中任何原子可能在碳环，杂环，芳基或杂芳基环中。在接头线性碳原子可作替代选择从卤代，羟基，硝基，卤代烷基，烷基，芳基碱，芳基，炔烷基，烷氧基，芳基氧基取代基选择了，氨基，酰基氨基，烷基氨基甲酰基，芳基氨基甲酰基，氨基烷基，烷氧基羰基，碳水化合物氧基，羟基烷基，烷烃磺酰基、砷磺酰、烷烃磺酰氨基，砷磺酰氨基烷基，和硫酰氨基，烷基羰基，酰基氧基，氰基，和脲。线性硝基根原子在接头可任选地取代的与酰基，磺酸，烷基，芳基碱，芳基烷氧基，烷氧基羰基。一个线性的接头硫原子可以有选择地氧化。

[0184] 在某些实施方案中，接头可切割，如例如美国专利申请公开 No. 2006/0228348 和美国专利 No. 4,867,973 ;7,176,185 ;7,232,805 中公开。在一些实施方案中，接头可以在溶酶体条件下裂开。

[0185] D. 制备寡糖 - 蛋白缀合物的方法

[0186] 本发明的缀合物例如如缀合物包含式 I, II, III, IV, V 或 VI 的寡糖，可通过本领域普通技术人员已知的任何方法来制备。在任何这些方法中，合适的接头可存在于寡糖和蛋白中的一者或两者。例如，缀合物可如下列所述制备：例如，Zhu 等，Biochem. J. 389 :619-628 (2005) ;Zhu 等，J. Biol. Chem. 279 :50336-50341 (2004) ; 美国专利 No. 5,153,312 ;5,212,298 ;5,280,113 ;5,306,492 ;5,521,290 ;7,001,994 ;美国临时专利申请 No. 60/885,457 或 60/885,471。

[0187] 在某些实施方案中，寡糖可缀合蛋白的氨基酸，例如半胱氨酸或赖氨酸。例如，糖可通过下列方式通过赖氨酸缀合：使用具有琥珀酰亚胺基 4- 甲酰基苯甲酸酯的蛋白修饰赖氨酸残基。另外，糖可通过赖氨酸缀合，使用赖氨酸和 Traut' s 试剂或接头包括二硫化物例如 N- 琥珀酰亚胺基 -3-(2- 吡啶基二巯基) 丙酸酯 (SPDP) 或保护的硫醇例如 N- 琥珀酰亚胺基 -S- 乙酰基硫代乙酸酯 (SATA) 来修饰。

[0188] 在另外的实施方案中，寡糖可缀合糖蛋白上的聚糖。在一个实施方案中，寡糖可缀合聚糖上的唾液酸残基。在其他实施方案中，寡糖可缀合聚糖上的甘露糖，岩藻糖，半乳糖和 / 或唾液酸残基。为了通过半乳糖缀合，糖蛋白可首先用唾液酸酶处理以除去唾液酸残基，然后在和寡糖反应之前用半乳糖氧化酶处理。

[0189] 例如，寡糖 - 蛋白缀合物，可制备出任何功能组可能存在的（包括例如胺，硫醇，羧酸，羟基）和 / 或蛋白引入到一个合适的反应第二个功能组上一寡糖。对于功能组别本领域熟知的。例如，糖蛋白有至少一羰基介绍的方法可以得到由该糖蛋白氧化，例如，高碘酸盐（例如，高碘酸钠）或半乳糖氧化酶。在另外的例子中，一个羰基集团可能被引入一个表达式有一个扩大的遗传密码系统，在使用中所述例如，Wang 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 :56-61 (2003)。还参见例如，美国专利申请公开 No. 2006/0228348，其描述引入反应基团到糖蛋白中。

[0190] 在一些实施方案中，糖蛋白是与高碘酸盐氧化前作为与含有羰基接头修改了寡糖共轭 - 反应基团。的羰基范例 - 反应基团的 INCLUDE 氨基，除其他肼或酰肼。在某些实施方案中，糖蛋白被氧化约 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10 或 22.5 毫米高碘酸盐。在某些实施方案中，

该 glyco 蛋白被氧化的条件下充分氧化唾液酸残的糖蛋白聚糖基,减少岩藻糖和甘露糖氧化。在示例性实施方案中,高碘酸盐含量使用不到 2,3,4 或 5 毫米。在一个实施方案中,高碘酸盐是高碘酸钠。

[0191] 在某些实施方案中,期间共轭形式可使用各种色谱方法蛋白聚合。在一个实施方案中,疏水作用层析 (HIC) 的可受聘。HIC 的列的例子包括丁基 650C 和 650 米,己基 650C,苯基 6FF 的,满 Capto 辛满 Capto 苯基。在其他实施方案中,总量可能会被金属螯合层析,例如铜,镍,钴或汞。在一个实施方案中,一铜列可用于绑定和 - 洗脱或流通模式。示例性洗脱缓冲包括甘氨酸或咪唑。在一些实施方案中,聚集是减少 10,20,30,40,50,60,70,80 或 90%。在另外的实施方案中,包含的缀合物小于 0.5,1,1.5,2,2.5 或 3% 的总和。

[0192] E. 缀合物

[0193] 缀合物的寡糖和蛋白组分可例如是本文中所述的任何寡糖和蛋白。在某些实施方案中,寡糖 - 蛋白缀合物是寡糖 - 糖蛋白缀合物。在一些实施方案中,寡糖 - 蛋白缀合物是寡糖 - 溶酶体酶缀合物。

[0194] 在一些实施方案中,缀合物包含寡糖,选自式 I-VI 的寡糖。在某些实施方案中,缀合物包含平均 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20 或 1-2,1-3,1-4,1-6,2-4,2-10,2-12,4-6,3-8,5-6,5-10,5-15,5-20,10-15,10-20,12-15,12-18 或 15-20 分子的寡糖 / 糖蛋白。在一些实施方案中,缀合物包含至少 4,5,6,7,8,9 或 10 分子的寡糖 / 分子的蛋白。在另外的实施方案中,缀合物包含至少 2,3,4,5,6,7,8,9 或 10 摩尔的 M6P / 摩尔蛋白。

[0195] 在某些实施方案中,缀合物展现充分的活动 (例如酶活性),相对于未缀合的蛋白。在其他实施方案中,缀合物可能会出现至少,例如,50,60,70,75,80,85,90,92,94,95,96,97,98 或 99% 的活性相对于未缀合的蛋白。实验测量活动,包括酶活性,本领域熟知的。例如参见 Eisenthal 等, *Enzyme Assays: A Practical Approach*, Oxford University Press: New York, 2002.。测量溶酶体酶活性的试验描述于例如, Li 等, *Clin. Chem.* 50 : 1785-1796 (2004); Civallo 等, *Clin. Chim. Acta* 372 : 98-102 (2006)。测量 GAA 活性的示例性试验描述于实施例 6。还参见 van Diggelen 等, *J. Inherit. Metab. Dis.* 28 : 733-741 (2005) (描述酸性神经磷脂酶活性的试验); Downing 等, *Plant Biotechnol.* 4 : 169-181 (2006) (描述 α l-艾杜糖苷酸酶活性试验); Voznyi 等, *J. Inherit. Metab. Dis.* 24 : 675-80 (2001) (描述艾杜糖酸酯-2-硫酸酯酶活性试验); Murray 等, *Mol. Genet. Metab.* 90 : 307-312 (2007) (描述 α -半乳糖苷酶 A 活性试验); Brooks 等, *J. Inher. Metab. Dis.* 14 : 5-12 (1991) (描述 N-乙酰半乳糖胺-4-硫酸酯酶活性试验)。

[0196] 在某些实施方案中,缀合物被靶细胞更有效内在化 (例如,通过 CI-MPR-介导的内吞作用),相比于对应的未缀合的蛋白。例如,缀合物可比未缀合的蛋白更有效内在化例如,至少 10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,93%,95%,96%,97%,98%,99%,100%,110%,120%,130%,140%,150% 或 200% (mol/mol),其在给定的期限内。在其他实施方案中,至少 2,3,4,5,6,7,8,9,10,20,30,40,50,100 或 1000fold (mol/mol) 的缀合物可被目标类型细胞内在化 (例如,如, L6 成肌细胞或人 Pompe 纤维化细胞 (NIGMS Human Genetic Cell Repository, Cat. No. GM20005),相对于未缀合的蛋白,其在给定的期限内。参考时间可为例如,10,30,45 分钟或 1,2,3,5,6,12,24,48

或 72 小时或更多。L6 成肌细胞的体外摄取可如实施例 6 和 Zhu 等, J. Biol. Chem. 279 : 50336-50341 (2004) 中所述进行测定。

[0197] 在某些实施方案中,缀合物展现上升到 CI 结合多平面重建相对于未缀合的蛋白。例如,缀合物可能会出现至少,例如,2,3,4,5,10,20,30,40,50,100,1000 或 10000 倍提高到 CI-MPR,相对于未缀合的蛋白,所确定的,例如,由该缔合或解离的缀合的和未缀合的蛋白常数比较。结合 CI-MPR 可如,实施例 5 和 Zhu 等, J. Biol. Chem. 279 :50336-50341 (2004) 中所述进行测定。

[0198] 在某些实施方案中,缀合物可能会出现无吸收的甘露糖受体相对于未缀合的蛋白或小于 5,10,15,20,30,由甘露糖受体摄取 40%或 50 相对于未缀合的蛋白增加。甘露糖受体在大鼠肺泡巨噬细胞中的摄取可体外例如 Zhu 等, Biochem. J. 389 :619-628 (2005) 中所述进行测定。

[0199] 在某些实施方案中,缀合物可表现出例如至少 2,3,4,5,10,20,30,40,50,100 或 1000- 倍积累的底物水平的减少,其使用合适的动物模型的代谢有缺陷的酶。例如,糖原水平在 Pompe 小鼠模型中的减少可如 Zhu 等, J. Biol. Chem. 279 :50336-50341 (2004) 中所述进行测定。可替换地, Pompe quail 模型描述在例如, Kikuchi 等, J. Clin. Invest. 101 : 827-33 (1998), 其可使用。在另外的例子中,储存的糖氨基聚糖在肝脏和脾脏中的减少可在粘多糖增多症的猫模型中使用,如 Kakkis 等, Mol. Genet. Metab. 72 :199-208 (2001) 中所示。此外, globotriaosylcer 酰胺水平的减少可在 Fabry 小鼠模型中使用,如例如, Ioannou 等, Am. J. Hum. Genet. 68 :14-25 (2001) 中所述。在又一例子中,鞘磷脂水平的减少可在 A 和尼曼 - 匹克氏病类型的小鼠模型中测定,例如, Horinouchi 等, Nat. Genet. 10 : 288-293 (1995) 中所述。

[0200] II. 药物组合物

[0201] 在一些实施方案中,本发明提供寡糖 - 蛋白缀合物,包含 (1) a 蛋白和 (2) 式 I-VI 的任意寡糖,在制备需要的受试者的溶酶体贮积症中的用途。

[0202] 本文中所述的药物组合物包含上文所述的寡糖 - 蛋白缀合物和至少一种添加剂,例如填料、填充剂、崩解剂、缓冲剂、稳定剂或赋形剂。在一些实施方案中,本发明的药物组合物包含缀合物,所述缀合物包含式 I-VI 中任一者的寡糖和溶酶体酶。

[0203] 标准药物制剂技术是本领域技术人员熟知的 (例如参见 2005 Physicians' Desk Reference®, Thomson Healthcare :Montvale, NJ, 2004 ;Remington :The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Gennado 等, Eds. Lippincott Williams & Wilkins : Philadelphia, PA, 2000)。合适的药物添加剂包括例如甘露醇,淀粉,葡萄糖,乳糖,蔗糖,明胶,麦芽,大米,面粉,粉笔,硅胶,硬脂酸钠,甘油硬脂酸,滑石粉,氯化钠,脱脂牛奶,甘油,丙烯酸,乙二醇,水,乙醇,等。的成分可能还包含 pH 缓冲试剂和润湿剂或乳化剂成分可能会或可能不包含防腐剂。

[0204] 在一些实施方案中,药物组合物包含 α - 半乳糖苷酶 A 缀合物,可包含一种或多种赋形剂例如,如,甘露醇,磷酸钠一元一水合物,和 / 或磷酸钠二元七水合物。在一些实施方案中,药物组合物,包括缀合物的 α - 葡萄糖苷酶可包括一个或多个以下:甘露醇,聚山梨酯 80,磷酸钠二元七水,一元一水合物和磷酸钠。在另外的实施方案中,药物组合物,包括缀合物 - 葡萄糖苷酶可能包括高达 2% 的甘氨酸,高达 2% 甘露醇,高达 0.01% 聚山梨酯 80 为

10mm 组氨酸 pH 值 6.5。

[0205] 药物组合物可以包括任何的缀合物所述无论是作为唯一有效化合物或与其他化合物,成分或生物材料的组合。例如,药物组合物还可以包括一个或更多的小分子为一个 LSD 和 / 或治疗的副作用与 LSD 相关的有用。在一些实施方案中,组合物可包括 / 或一个或多个化合物 miglustat 和 S 的,例如,描述美国专利申请公开号 2003/0050299, 2003/0153768, 2005/0222244 ;或 2005/0267094 在一些实施方案中,药物组合物还可以包括一个或多个免疫抑制剂。

[0206] 药物组合物的配制可取决于下列因素而改变:期望的施用路径和其他参数(例如参见 Rowe 等, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4th ed., APhA Publications, 2003.)。在一些实施方案中的组成可能是一个无菌,无热原,白色或类白色冻干粉,蛋糕或由静脉注射重组后,用无菌注射,美国药典管理。在其他实施方案中的组成可能是无菌,无热原的解决方案。

[0207] 药物组合物当局所述并不局限于任何特定的传输系统,并可能包括但不限于胃肠(包括皮下,静脉,颅内,髓内,关节内,肌内,鞘内或腹腔注射),经皮或口服(例如在胶囊剂,悬浮剂或片)。政府对个人可能发生在单剂量或重复主管部门,并在生理上可接受的盐的形式,和任何种类 / 或可以接受的药物载体和 / 或添加剂作为药物组合物的一部分。

[0208] 药学上可接受的盐包括,例如,醋酸,苯,苯甲酸酯,碳酸氢盐,酒石酸氢盐,溴化物,依地酸钙,樟脑磺酸盐,碳酸盐,氯化物,柠檬酸,二氢氯化物,依地酸盐,乙二磺酸盐,丙酸酯月桂硫酸酯,乙磺酸盐,富马酸,葡庚糖酸盐,葡萄糖酸,谷氨酸酯,乙醇酰谷胱甘肽,己基间苯二酚樟脑, hydrabamine, 氢溴酸,盐酸盐,羟基萘,碘,伊势硫代内特,乳酸,乳糖,苹果酸,马来酸,扁桃,甲磺酸,甲基溴化物,甲基硝酸盐,甲基硫酸酯,粘酸盐,萘磺酸盐,硝酸盐,扑酸盐(双羟萘酸盐),泛酸,磷酸酯 / 双磷酸酯,聚半乳糖醛酸盐,水杨酸,硬脂酸,次醋酸盐,琥珀酸,硫酸酯,单宁酸盐,酒石酸和氯茶碱 / 三硫代二阴离子;苄星,氯普鲁卡因,胆碱,乙醇胺,乙二胺,葡胺和普鲁卡因(有机)阳离子秒;和铝,钙,锂,镁,钾,钠,锌(金属)阳离子,例如, Berge 等, J. Pharm. Sci. 66 :1-19 (1977) 中所述。

[0209] 缀合物中所述的治疗有效施用的用量。一般来说,治疗有效量可能会有所不同主体的年龄,一般状况,性别,以及对这个问题的病情严重程度。剂量可确定由医生和调整,必要时,以适应观察治疗效果。这类化合物的毒性和治疗用功效,可确定在体外和 / 或标准的药品在体内的程序。之间的毒性和疗效的治疗剂量率指数(或治疗的比例),并且可以作为比例 LD50/ED50,其中致死剂量 LD50 为 50% 的人口和剂量的 ED50 是治疗有效表达在人口的 50%。本发明的缀合物的治疗指数可能会出现至少,例如,1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 和 20。

[0210] 从体外试验和动物实验,例如,获得的数据可用于制定人类使用的剂量范围。这种化合物的用量最好在一个谎言的循环浓度,其中包括低,毒性小或没有的 ED50 范围。剂量可能会有所不同剂量后在此就业形式和不同的给药途径使用范围。缀合物的任何治疗有效剂量可初步估计,从体外实验。可以制定一个剂量在动物模型,实现了循环血中浓度范围,包括其 IC50(即,测试的缀合物的一半,达到了症状的最大抑制浓度)所确定的体外实验研究。血浆中可测得,例如,用高效液相色谱法或由适当的酶活性测定。任何特定剂量的影响可以监测端点的合适的生物活性。

[0211] 除非另有说明,缀合物可能是施用在大约 1 克 / 公斤至 500 毫克 / 公斤,根据症状的严重程度和疾病的进展剂量。例如,缀合物,可缓慢静脉输液施用中的每一个设置,例如,1,2,3,4,5,6,7,8,9,靠,例如,每周或 10 天以上或门诊,双周刊,每月或每两个月一次的施用。适当的治疗有效的化合物剂量的选择经由临床治疗,并将范围从 1 μ 大约克 / 公斤至 500 毫克 / 公斤,从 1 μ 克 / 公斤至 10 毫克 / 公斤,从 1 μ 克 / 公斤至 1 毫克 / 公斤从 10 μ 克 / 公斤至 1 毫克 / 公斤从 10 μ 克 / 公斤至 100 克 / 公斤,从 100 μ 克到 1 毫克 / 公斤,从 500 μ 克 / 公斤至 5 毫克 / 公斤。在一些实施方案中,适当的治疗剂量选自,例如 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 和 100 毫克 / 公斤。

[0212] α 半乳糖苷酶缀合物,可通过静脉输注施用的,例如,1.0 毫克剂量 / kg,每两个星期或四个星期了,例如输液速度,小于或等于 10 体重,13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 或 33 毫克 / 小时)。在另外的例子中,缀合物包括葡糖苷酶可能是通过静脉注射管的,例如,20 毫克 / 公斤或 40 毫克 / 公斤每两个或四个星期的剂量,超过约,例如,1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 或 10 小时。在一些实施方案中,在对葡糖苷酶施用率可能会开始,例如,1 毫克 / 公斤 / 小时,然后增加了,例如,2 毫克 / 公斤 / 小时后,建立学科容忍每 30 分钟,输液速度,直到有一个,例如,7 最大毫克 / 公斤 / 小时。缀合物组成的 N-乙酰半乳糖胺-4-硫酸酯酶,可通过静脉输液给予的剂量,大约毫克 / 公斤体重每星期,例如,1, 2, 3, 例如,1.0, 4, 5, 6, 7, 8, 9 或 10 小时。此外,特定剂量的例子中可以找到 Physicians' Desk Reference[®]。

[0213] III. 治疗溶酶体贮积症的方法

[0214] 在一些实施方案中,本发明提供治疗溶酶体贮积症例如如表 1 中公开的那些的方法。在一些实施方案中,本发明还提供靶向蛋白溶酶体的方法,通过寡糖包含甘露糖-6-磷酸酯的缀合。

[0215] 在某些实施方案中,方法包括施用的一个主题(其中包括一个主题,例如,人类的哺乳动物例如,猫,狗,鼠或老鼠或鸟例如,如,鹌鹑)有溶酶体贮积症一寡糖-发明的蛋白缀在治疗有效量合物。该寡糖-蛋白缀合物可能是一糖蛋白,例如溶酶体酶(例如,溶酶体酶表 1 所列)缀合物与寡糖组成甘露糖-6-磷酸酯,例如一对式 I-VI 的任何寡糖。在一个实施方案中,该方法包括施用到需要的受试者一药物组合物包括至少的缀合物的发明之一。

[0216] 在某些实施方案中,所述方法包括施用缀合物包括:(1) 蛋白和(2) 寡糖由甘露糖-6-磷酸酯,例如一对式 I-VI 的任何寡糖与一个或多个其他疗法。一个或多个其他疗法,可同时与施用(包括联合制定并发施用),之前或之后的缀合物的施用。

[0217] 在一些实施方案中,所述方法包括治疗主题(之前,之后在与一缀合物治疗或所述),具有解热,抗组织胺,和/或免疫抑制剂。在一些实施方案中,一个主题可以被视为具有解热,抗组织胺,和/或免疫抑制剂,与治疗前的寡糖-为了糖蛋白缀合物,以减少或避免输注相关反应。例如,主题可能是一个或预处理咪氨基丙酮,氮硫代普赖恩,环磷酰胺,环孢素 A,苯海拉明,甲氨蝶呤,霉酚酸酯,雷帕霉素口服类固醇或更多。

[0218] 在一些实施方案中,所述方法包括处理与一个或丙酮氨基咪,氮硫代普赖恩,环磷酰胺,环孢素 A,苯海拉明,甲氨蝶呤,霉酚酸酯,雷帕霉素口服类固醇或更多时或有关科目,例如,= 0 和/或= 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120 和 144 小时的,例如,第 1, 2 条(施用的缀

合物的时间), 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 或更多的治疗发生了缀合物。例如, 在一些实施方案中, 与法布里病或蓬佩病学科可视为与甲氨蝶呤 0.1 (例如, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80 毫克/公斤甲氨蝶呤或以上) 或思考, 例如, $t = 0$ 时, 24 和 48 小时的, 例如, 第 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 一缀合物 8 周的治疗。在一些实施方案中, 对缀合物诱导免疫耐受的可能在某一学科的治疗与环孢素 A 和氮杂硫代普赖恩与溶酶体贮积症例如, 如, 粘多糖增多症我。例如, 物体可能被视为与环孢素 A 和氮杂硫代描述于 Kakkis 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 :829-834 (2004)。

[0219] 在一些实施方案中, 所述方法包括治疗主题 (之前, 之后或在治疗过程中与一缀合物) 与小分子疗法和 / 或基因治疗, 包括小分子疗法和基因疗法对治疗的指导溶酶体贮积症。小分子疗法可能包含 miglustat 和 / 或一个或多个化合物制度的视野中, 例如描述美国专利申请公开 No. 2003/0050299, 2003/0153768 ; 2005/0222244 ; 和 2005/0267094。基因疗法可如所述进行例如, 美国专利 No. 5, 952, 516 ; 6, 066, 626 ; 6, 071, 890 ; 和 6, 287, 857 ; 和美国专利申请公开 No. 2003/0087868。

[0220] 术语“治疗”, “治疗方法”, 和他们的同源词既指治疗和预防治疗 / 预防措施。因此, 在治疗需要时可包括个人已经有一个特定的溶酶体贮积症, 以及在这种疾病的风险者 (即, 这些谁都有可能最终获得紊乱或某些疾病的症状)。

[0221] 治疗方法的结果, 预防或症状或其他所需的生物改良的结果, 并可能被改善临床症状或迟发性疾病的评估, 增加了代谢有缺陷的酶的活性, 和 / 或降低积累水平衬底的代谢有缺陷的酶。

[0222] 在一些实施方案中, 方法包括施用缀合物包括: (1) 溶酶体酶和 (2) 对式 I-VI 的任何寡糖的一个主题, 从而增加不足的溶酶体酶活动这一议题的, 例如, 至少 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 或 100%, 相对于内源性活性。在一些实施方案中, 所述方法包括施用缀合物包括: (1) 溶酶体酶和 (2) 对式 I-VI 的任何寡糖的一个主题, 从而增加了问题的缺陷酶活性由, 例如, 至少 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100 或 1000 倍, 相对于内源性活性酶活性的增加可能会决定, 例如, 在临床症状, 或由适当的临床试验或生物减少。

[0223] 在一些实施方案中, 方法包括施用缀 GAA 的一科, 包括发明合物, 因此治疗蓬佩病 (也称酸性葡糖苷酶缺陷, 酸性麦芽糖酶缺陷, 糖原贮积症 II 型, 糖已知原尘埃沉着病 II 和溶酶体 α -葡糖苷酶缺陷) 在某些实施方案中, 重组人 GAA 解酶 (rhGAA) 在中国仓鼠卵巢准备 (CHO 细胞) 细胞在另外的实施方案中, 可能会 rhGAA 缀合的, 由寡糖 103 选择了寡糖, 一个 103 式的混合物; 寡糖 128, 129, 130, 131, 132, 133 或 136 ; 和任何组合。在一个实施方案中, 寡糖选自寡糖 128 和 136。在另外的实施方案中, 缀合物含有至少 5GAA 摩尔 / 每一个被执行病人。

[0224] 在某些实施方案中, 患者是患有蓬佩病的成人。在其他实施方案中, 患者是幼儿或儿童。

[0225] 增加的 GAA 活性可生物测定 (例如参见, Zhu 等, *J. Biol. Chem.* 279 : 50336-50341 (2004)) 或组织观察减少溶酶体糖原积累在例如心肌细胞, 骨骼肌细胞或皮肤成纤维细胞。GAA 活性也可检测中, 例如, 肌肉活检样品, 在培养的皮肤成纤维细胞的淋巴细胞, 并在干血点。干血点检测中描述例如, Umpathysivam 等。临床。化学。47 :

1378-1383(2001 年),李等。临床。化学。50 :1785-1796(2004 年)。蓬佩病的治疗也可以评估,例如,血清肌酐激酶,在运动功能的收益(例如,由阿尔伯塔婴儿运动指数评估),左心室质量指数的变化来衡量的超声心动图,心脏电活动中,作为衡量心电图。棉酚缀合物的政府也可能导致在蓬佩病例如心脏扩大症,心肌症,白天呼吸困难,呼吸困难,生长迟滞的一个或多个症状减轻了,喂养困难,“纤维化”步态异常,头痛,肌张力低下,脏器肿大(例如,对心脏,舌,肝脏肿大),前凸,平衡,下背痛,早上头痛,肌肉无力,呼吸功能不全,翼状肩胛,脊柱侧弯,深部肌腱反射降低损失,睡眠呼吸暂停,易患呼吸道感染和呕吐。

[0226] 在其他实施方案中,所述方法包括施用缀合物组成的 α -半乳糖苷酶 A 到一个主题,因此治疗法布里病。法布里病或安德森,法布里病,是一种罕见的 X-连锁,溶酶体贮积症由缺陷标记 α -半乳糖苷酶 A,并在护环磷酸胺 (GL3) 积累的结果和在溶酶体其他中性鞘糖脂的内脏和血管内皮组织,腹部和肌肉细胞。积累在缩小和血管扩张,血管结果的中性鞘糖脂,并最终缺血和梗死。

[0227] 施用本发明的包含 α -半乳糖苷酶的缀合物可导致在一个或更多的法布里病包括例如, acroparesthesia,心绞痛, angiokeratoma,心律失常,步态不稳,临床症状减轻了燃烧和 / 或刺痛的手和脚,白内障,畏寒,传导异常,角膜 whorling,冠状动脉疾病,老年痴呆症,抑郁症,腹泻,心腔扩张,眩晕,心脏扩大症,心肌症,复视,构音障碍,疲劳,发热血沉升高,听力问题,心脏病,心脏瓣膜问题,怕热,偏侧失动症,轻偏瘫,少汗症,受损出汗,心肌梗死,心肌缺血,关节痛,肾疾病,左心室肥大,光栅异常,透镜状混浊, lipiduria,肌肉无力,心肌梗死,恶心,眼球震颤,疼痛(例如,剧烈的疼痛遍布全身辐射),多饮,蛋白城乡结合部,餐后疼痛,肾功能衰竭,视网膜异常,耳鸣,胃痛,ST 段 -T 波改变,中风,尿毒症,瓣膜病,眩晕,呕吐和虚弱。对半乳糖苷酶当局甲缀合物可能导致增加半乳糖苷酶中,例如,等离子,眼泪,白细胞,或活检组织培养皮肤成纤维细胞活性。施用半乳糖苷酶甲缀合物也可能导致一个减少(例如,至少 10%)或增加的双折射脂质球缺乏组织学发现。它也可能导致在尿沉渣脂质球减少,改善肾功能的血清肌酐水平或肌酐清除率来衡量,并减少蛋白城乡结合部。施用半乳糖苷酶甲缀合物也可能导致在 GL3 包裹体中的肾脏,心脏,皮肤毛细血管内皮细胞减少。用于测量法布里病治疗效果的其他实验中可以找到,例如,MacDermott 等, J. Med. Genet. 38 :750-760(2001)。

[0228] 在其他实施方案中,所述方法包括施用缀了包括酸性神经磷脂酶为主体的发明合物,因此治疗尼曼-匹克氏 A 或尼曼-匹克氏乙病或酸性神经磷脂酶缺陷。对酸性神经磷脂酶缀合物政府可能会导致在一个或更多的临床症状减轻了尼曼-匹克氏甲或尼曼-匹克氏乙病包括例如异常胆固醇水平,血脂异常,运动失调,血液异常,在眼睛,频繁肺部感染,生长迟缓,肝脾大,血小板,淋巴结肿大,周围神经病变,与肺功能,呼吸急促问题的人数很少,樱桃红点,皮肤色素变化或黄瘤。在一些实施方案中,缀合物可颅内施用。

[0229] 在其他实施方案中,所述方法包括施用缀了包括 L 艾杜糖苷酸酶的一个主题的发明合物,因此治疗粘多糖增多症我(包括例如,分为 Hurler 和分为 Hurler-Scheie 形式的计划 I)。对 L 艾杜糖苷酸酶缀合物政府可能会导致在一个或更多的 MPS 临床症状减轻了我包括例如,主动脉回流,主动脉狭窄,腕管综合征,慢性鼻炎,传导性听力缺失,便秘,角膜混浊,发展迟滞发展迟滞,腹泻,腹胀, dorsolumbar 驼背,背部有 gibbus 畸形,肝脾大,脑积水,腹股沟疝,驼背,智力缺陷,二尖瓣回流,二尖瓣狭窄,夜盲症,开角型青光眼,手部功能

不佳,渐进性关节病,反复呼吸道感染,呼吸功能不全,视网膜变性,脊柱侧弯,神经性听力损失,严重的背部疼痛,流鼻涕,睡眠呼吸中止症,脊髓压迫,大鱼际萎缩,脐疝,和上呼吸道顺应性阳离子。

[0230] 在进一步在实施方案中,所述方法包括施用缀的组成艾杜糖酸酯-2 发明合物-硫酸酯酶的一个主题,因此治疗粘多糖增多症二(猎人疾病)。艾杜糖酸酯-2 的施用-硫酸酯酶缀合物可能导致在 MPS II 的包括例如,心脏瓣膜疾病,心肺功能衰竭,腕管综合症,慢性腹泻,慢性乳头一个或更多的临床症状减轻了,粗大的面部特征,角膜混浊,冠状动脉狭窄,耳聋,异形,发育不全,耳部感染,听力损伤,肝脾大,脑积水,腹股沟疝,关节僵直,脊柱后侧凸,智力缺陷,心肌症,心肌肥厚,肺高压,视网膜功能障碍,骨骼畸形,脐疝形成,上呼吸道感染和瓣膜功能不全。

[0231] 还有一些实施例,所述方法包括施用缀以组成的 N-乙酰半乳糖胺-4 发明合物-硫酸酯酶(芳基硫酸酯酶 B),以一个主题,因此治疗粘多糖增多症六(Maroteaux-拉米综合征)。对 N-乙酰半乳糖胺-4 施用-硫酸酯酶缀合物可能导致在 MPS 的第六包括例如,失明,心脏异常,心肺疾病,粗大的面部特征,角膜混浊一个或更多的临床症状减轻了,耳部感染,生长迟缓,肝脏肿大,肝脾大,关节畸形,神经压迫症状,呼吸困难,骨骼畸形,脊髓压迫,脾肿大,关节僵硬,和上气道阻塞。

[0232] 上述及以下是示例性的描述和解释而已,不是请求保护的发明,限制性。

实施例

[0233] 实施例 1. 寡糖合成中的通用方法

[0234] A. 糖基化:

[0235] 通过联合供体糖和受体糖使用标准方法来进行糖基化反应。简言之,除非另有说明,在干燥氮气中在存在热活化的 4A 分子筛的条件下将供体和受体化合物溶解于无水 DCM 中。将溶液冷却并在 0°C 保持 ~ 30 分钟,然后缓慢加入 TMSOTf (1eq)。使用己烷/EtOAc 通过 TLC(硅胶)来检查反应,并使用 TEA 或 Hünig's 碱 (1.05eq) 淬灭。将混合物过滤并浓缩至浆料,除非另有说明,使用己烷/EtOAc 梯度通过快速柱层析进行纯化,

[0236] B. 酸催化的去乙酰化:

[0237] 在某些例子中,在糖基化或其他修饰例如磷酸化之前,将乙酰化化合物去乙酰化。在下面提供的实施例中,通过向冷 (0°C) 干甲醇中加入乙酰氯而产生氯化氢。将浓缩的溶液加入乙酰化的化合物在 DCM/ 甲醇中的 1 : 3 的溶液。相对于溶液的甲醇组分,最终浓度为 3% w/v。进行去乙酰化反应:a) 对于一取代乙酸酯 ~ 18h 以及 b) 对于二取代乙酸酯 ~ 48-64h。除非另有说明,将反应用 TEA 或 Hünig's 碱淬灭,接着从 DCM 或 EtOAc 水性萃取。

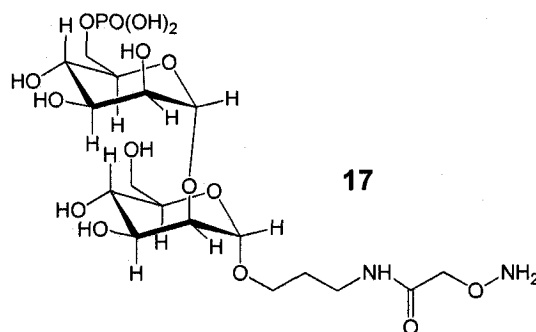
[0238] C. 磷酸化:

[0239] 在一些例子中使糖经历位点特异性磷酸化。在室温下向糖在干燥乙腈的溶液中加入 5-甲基四唑 (3.4eq),并且在干燥氮气下将混合物搅拌 30 分钟。将二苄基二异丙基亚磷酸胺 (1.7eq/OH 基团) 加入并搅拌直到反应完全 (~ 60 分钟)。使用己烷/EtOAc 通过 TLC(硅胶)检查反应。将溶液在冰/水中冷却 15 分钟并且加入 30% w/v 过氧化氢 (2eq)。在 ~ 60 分钟后反应完全并且夹入过量饱和的硫代硫酸钠。将混合物浓缩至胶状物并溶解于 EtOAc 中,使用半饱和盐水洗涤和经硫酸钠干燥。除非另有说明,将残渣使用己烷/EtOAc

梯度通过快速柱层析纯化。

[0240] 实施例 2: 二糖氨基氧基乙酰氨基丙基 2-O-[6-O-磷酸基- α -D-甘露糖基]- α -D-甘露糖苷 (17) 的合成

[0241]



[0242] 根据 Pekari 等, J. Org. Chem. 66 :7432(2001) 中所述的方法来制备烯丙基 α -D-甘露糖苷。向在无水甲醇 (100mL) 的烯丙基- α -D-甘露糖苷 (8.68g, 39.4mmol) 中加入 2,3-丁二酮 (3.63mL, 86.1mmol)、原甲酸三甲酯 (16mL, 146mmol) 和 10-(+)-樟脑磺酸 (1.37g, 5.9mmol)。将混合物在干燥氮气下回流加热 9h。将反应混合物用 TEA (1mL) 淬灭并浓缩至红色浆料, 使用在己烷中 40-80% 的 EtOAc 通过硅胶快速柱层析纯化, 从而得到烯丙基 3-O,4-O-[二甲氧基丁-2',3'-二基]- α -D-甘露糖苷 1 的白色固体 (3.89g, 29.4%)。

[0243] 将化合物 1 (2.65g, 8mmol) 溶解于干燥吡啶 (20mL), 将溶液在冰/水浴中冷却, 并且加入 t-丁基联苯基甲硅烷基氯化物 (2.28mL, 8.7mmol)。在 18h 后, 加入吡啶 (20mL) 和乙酸酐 (1.6mL, 16mmol), 并且将溶液加热至 50°C 16h, 然后浓缩成浆料并用甲苯脱离。残渣溶解于 EtOAc (60mL) 并用 1M HCl (2x50mL)、饱和碳酸氢钠 (50mL) 洗涤, 经硫酸钠干燥。将混合物过滤并真空浓缩, 将溶液浓缩, 从而得到烯丙基 2-O-乙酰基-6-O-t-丁基联苯基甲硅烷基-3-O,4-O-[二甲氧基丁-2',3'-二基]- α -D-甘露糖苷 2 的浆料 (5.0g)。

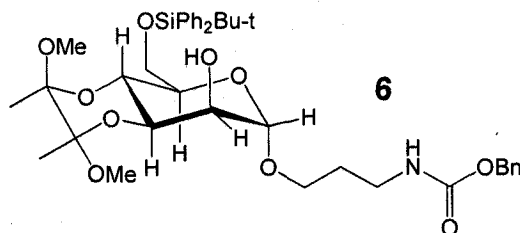
[0244] 将氯化钡 (II) (0.425g, 2.4mmol) 加入 2 (5.0g, 8mmol) 在无水甲醇 (25mL) 的溶液中, 同时进行搅拌。在 ~ 3h 后, 将反应用 TEA (0.75mL, 4.8mmol) 淬灭。甲醇在减压下除去, 残渣使用在己烷中 10-50% 的 EtOAc 通过硅胶快速柱层析纯化, 从而得到 2-O-乙酰基-6-O-t-丁基联苯基甲硅烷基-3-O,4-O-[二甲氧基丁-2',3'-二基]- α -D-甘露糖苷 3 的白色泡沫 (2.72g, 59.2%)。

[0245] 将三氯乙腈 (1.75mL, 17.4mmol) 和 DBU (0.05mL, 0.35mmol) 加入 3 (1.0g, 1.74mmol) 在干燥 DCM (1mL) 的溶液中。在 ~ 75 后, 将溶液直接使用在己烷中 (0 至 30%) 的 EtOAc 通过硅胶快速柱层析进行纯化, 从而得到 2-O-乙酰基-6-O-t-丁基联苯基甲硅烷基-3-O,4-O-[二甲氧基丁-2',3'-二基]- α -D-甘露糖三氯乙酰亚氨酸酯 4 的白色泡沫 (0.98g, 78.2%)。根据实施例 1 的通常糖基化方法, 供体 4 (0.98g, 1.36mmol) 和受体 3-N-苄基氧基羰基氨基丙醇 (0.284g, 1.36mmol) 被转化, 从而得到 N-苄基氧基羰基氨基丙基 2-O-乙酰基-6-O-t-丁基联苯基甲硅烷基-3-O,4-O-[二甲氧基丁-2',3'-二基]- α -D-甘露糖苷 5 的白色泡沫 (0.66g, 64%)。

[0246] 向 5 (0.66g, 0.87mmol) 在无水甲醇 (5mL) 的溶液中加入在甲醇 (0.05mL, 0.22mmol) 中 25% w/v 的甲醇钠。在 ~ 1h 后, 反应用冰醋酸 (0.025mL) 淬灭并浓缩成浆料。产物溶解于 DCM (10mL), 用半饱和盐水 (5mL) 洗涤并经硫酸钠干燥, 从而得到白色泡沫

N-苄基氧基羰基氨基丙基 6-O-t-丁基联苯基甲硅烷基-3-O,4-O[二甲氧基丁-2',3'-二基]- α -D-甘露糖苷 6 (0.58g, 92%)。

[0247]



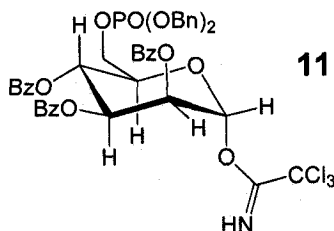
[0248] 将烯丙基 α -D-甘露糖苷 (3.15g, 14.3mmol) 溶解在干燥吡啶 (20mL) 中, 并且在冰/水浴中冷却。加入 t-丁基联苯基甲硅烷基氯化物 (4.03mL, 15.7mmol), 并且使溶液达到室温。在搅拌 18h 后加入苯甲酰氯 (5.93mL, 51.5mmol), 在 24h 后将反应用水 (3mL) 淬灭并搅拌 30min。溶液真空下浓缩并用甲苯脱离 (3x50mL)。残渣溶解于 EtOAc (100mL), 并用冷 1M HCl (50mL)、半饱和盐水 (50mL)、半饱和碳酸氢钠 (50mL)、半饱和盐水 (50mL) 洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤和浓缩成浆料。将其使用在己烷中 0-50% 的 EtOAc 通过硅胶快速柱层析进行纯化, 从而得到烯丙基 2,3,4-三-O-苯甲酰基-6-O-t-丁基联苯基甲硅烷基- α -D-甘露糖苷 7 的白色泡沫 (8.62g, 78.2%)。

[0249] 将冰醋酸 (11.1mL, 18.26mmol) 和 1M 四丁基氟化铵 (18.26mL, 18.26mmol) 加入 7 (12.77g, 16.6mmol) 在干燥 THF (50mL) 的溶液中。在 80 分钟, 加入冰醋酸 (0.15mL, 2.5mmol) 和 1M 四丁基氟化铵 (2.5mL, 2.5mmol), 接着在 90 分钟加入更多冰醋酸 (0.25mL, 4.15mmol) 和 1M 四丁基氟化铵 (4.15mL, 4.15mmol)。在 2h 后, 溶液浓缩至一半体积并用 EtOAc (150mL) 稀释。将溶液用半饱和盐水 (2x150mL) 和半饱和碳酸氢钠 (200mL) 洗涤, 浓缩, 残渣使用在己烷中 10-50% 的 EtOAc 通过硅胶快速柱层析来进行纯化, 从而得到烯丙基 2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖苷 8 的白色泡沫 (6.75g, 76.4%)。根据用于磷酸化的通常方法化合物 8 (6.75g, y mmol) 被转化, 从而得到烯丙基 2,3,4-三-O-苯甲酰基-6-O-二苄基磷酸基- α -D-甘露糖苷 9 的白色泡沫 (9.52g, 95%)。

[0250] 将氯化钪 (II) (0.638g, 3.6mmol) 加入 9 (9.52g, 12.1mmol) 在干燥甲醇 (50mL) 的溶液中。在 ~5h 后加入更多的钪 (II) (0.145g), 并将混合物储存 18h。溶液过滤, 浓缩, 并且残渣通过硅胶快速柱层析使用在己烷中 20-70% 的 EtOAc 来纯化, 从而得到 2,3,4-三-O-苯甲酰基-6-O-二苄基磷酸基- α -D-甘露糖 10 的白色泡沫 (3.8g, 42.5%)。

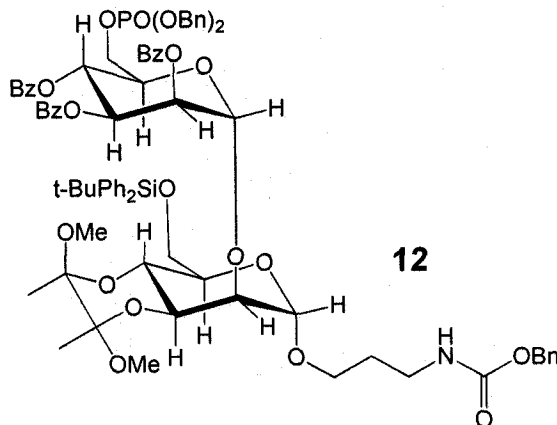
[0251] 在干燥氮气下在 0°C 将三氯乙腈 (5.06mL, 5.1mmol) 和 DBU (0.15mL, 1mmol) 加入 10 (3.8g) 在干燥 DCM 的溶液中。在 ~90 分钟后, 将溶液直接通过硅胶快速柱层析使用在己烷中 10-60% 的 EtOAc 来纯化, 从而得到 2,3,4-三-O-苯甲酰基-6-O-二苄基磷酸基- α -D-甘露糖三氯乙酰亚氨酸酯 11 的白色泡沫 (3.3g, 72.1%)。

[0252]



[0253] 根据实施例 1 的通常糖基化方法, 供体 6 (2.62g, 2.97mmol) 和受体 11 (1.92g, 2.7mmol) 被转化, 从而得到 N-苄基氧基羰基氨基丙基 2-O-[2,3,4-三-O-苯甲酰基-6-O-二苄基磷酰基- α -D-甘露糖基]-6-O-t-丁基联苯基甲硅烷基-3-O,4-O[二甲氧基丁-2',3'-二基]- α -D-甘露糖苷 12 的白色泡沫 (1.27g, 32.2%)。

[0254]

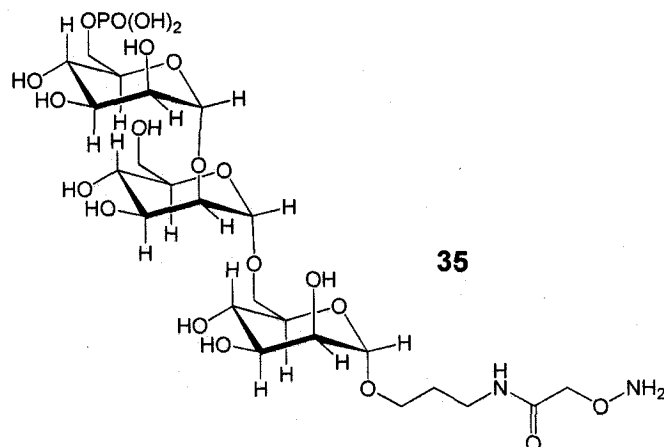


[0255] 将 TFA/水 19 : 1v/v (8.4mL) 加入 12 (2.1g, 1.44mmol) 在冰/水浴中冷却的 DCM (8mL) 的溶液中。在 ~2h 后通过 TLC 示出起始材料消耗。将乙醇 (25mL) 加入溶液, 然后浓缩, 并用乙醇 (3x25mL) 脱离。残渣溶解于干燥甲醇 (10mL) 并在冰/水浴中冷却。加入乙酰氯 (0.4mL), 从而得到在 HCl 中的 3% w/v 的溶液。使溶液达到室温。在 ~2h 后, 通过 TLC 示出起始材料消耗。将反应用三乙胺 (1mL) 淬灭, 浓缩, 残渣通过硅胶快速柱层析使用在己烷中 30-100% 的 EtOAc 进行纯化, 从而得到 13 的白色泡沫 (0.758g, 47.9%)。向在无水甲醇 (10mL) 中的 13 (0.758g, 0.69mmol) 中加入在甲醇 (0.15mL) 中 25% w/v 的甲醇钠。在 ~1h 后, 通过 TLC 示出起始材料消耗。将反应用 1M HCl 淬灭。从而得到 14。向溶液中加入冰醋酸 (25 μ L)、润湿的 10% Pd/C (0.1g) 并且附接氢气气球。在 6h 反应后, 产物用 5% 硫酸/EtOH 碳化但不是 UV 活性的。将混合物过滤并浓缩至油状物, 然后溶解于水 (10mL) 中, 冻干以得到 3-氨基丙基 2-O-[6-O-磷酰基- α -D-甘露糖基]- α -D-甘露糖苷 15 (0.300g, 91.3%, 来自 13)。

[0256] 将 0.1M NaOH (.2mL) 的溶液加入 15 (0.1g, 0.21mmol) 在水 (8.5mL) 中的溶液, 然后加入在 THF (8.5mL) 中的 N-t-丁氧基羰基-氨基氧基乙酰基 2,3,5,6-四氟苯醚 (0.14g, 0.42mmol)。在 18h 后, 将溶液用 2M HCl 调节至 pH 4, 并且将溶液用 DCM (3x10mL) 萃取。水相冻干, 从而得到 N-t-丁氧基羰基-氨基氧基乙酰氨基丙基 2-O-[6-O-磷酰基- α -D-甘露糖基]- α -D-甘露糖苷 16 (0.12g)。将化合物 16 (0.12g) 溶解于 TFA/DCM 1 : 1 (10mL), 并且将溶液搅拌 ~30 分钟, 然后浓缩至油状物。将其溶解于水 (5mL) 中并将产物冻干, 从而得到固体 (0.45g)。将固体使用 Biogel [®] P2 纯化, 并且使用水洗脱以得到 17 (0.063g)。

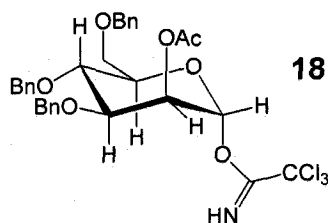
[0257] 实施例 3 : 三糖 (35) 的合成

[0258]



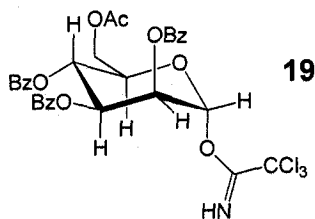
[0259] 如 Yamazaki 等, Carb. Res. 201 :31(1990) 中所述, 制备 2-O-乙酰基-3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖三氯乙酰亚氨酸酯 18。

[0260]



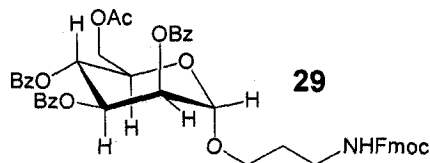
[0261] 如 Heng 等, J. Carb. Chem. 20 :285(2001) 中所述, 制备 6-O-乙酰基-3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖三氯乙酰亚氨酸酯 19。

[0262]



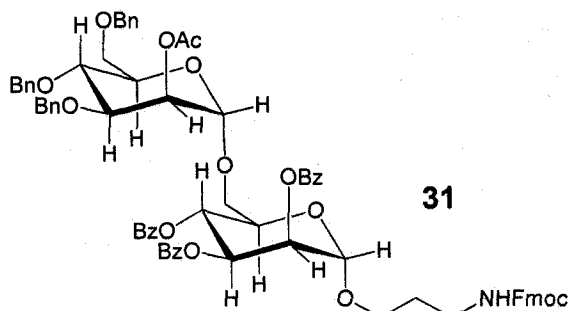
[0263] 根据通常糖基化方法, 供体 19(5.0g, 7.4mmol) 和受体 N-9-苄基甲基羰基氨基丙醇(2.41g, 8.1mmol) 被转化, 从而得到 N-9-苄基甲基羰基氨基丙基 6-O-乙酰基-2,3,4-三-O-苄基- α -D-甘露糖苷 29 的白色泡沫(4.0g, 66.4%)。

[0264]



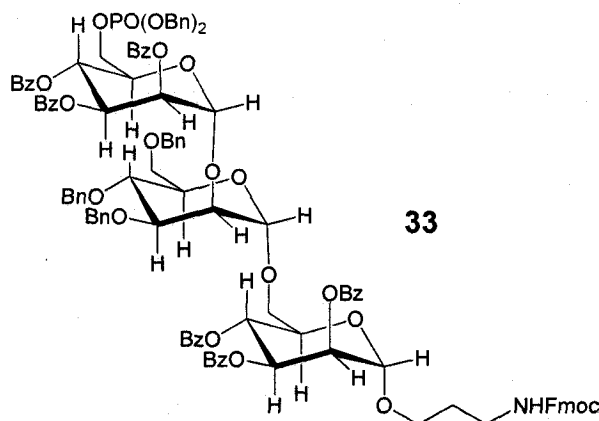
[0265] 根据用于二取代乙酸酯(b)的酸催化的去乙酰化的通常方法, 化合物 29(4.0g, 4.9mmol) 被转化, 从而得到 N-9-苄基甲基羰基氨基丙基 2,3,4-三-O-苄基- α -D-甘露糖苷 30 的白色泡沫(3.3g, 87.3%)。根据通常糖基化方法, 供体 18(3.27g, 5.16mmol) 和受体 30(3.3g, 4.3mmol) 被转化, 从而得到 N-9-苄基甲基羰基氨基丙基 6-O-[2-O-乙酰基-3,4,6-三-O-苄基甘露糖基]-2,3,4-三-O-苄基- α -D-甘露糖苷 31 的白色泡沫(4.94g, 92.7%)。

[0266]



[0267] 根据用于二取代乙酸酯 (b) 的酸催化的去乙酰化的通常方法, 化合物 31 (4.94g, 3.96mmol) 被转化, 从而得到 N-9- 苄基甲基羰基氨基丙基 6-O-[3,4,6-三-O-苄基甘露糖基]-2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖苷 32 的白色泡沫 (1.73g, 36%)。根据实施例 2 的方法制备化合物 11。根据通常糖基化方法, 供体 11 (3.37g, 3.74mmol) 和受体 32 (1.73g, 1.44mmol) 被转化, 从而得到 33 的白色泡沫 (1.2g, 43.1%)。

[0268]



[0269] 向 33 (1.2g, 0.62mmol) 在无水 THF (10mL) 的溶液中加入十二烷基硫醇 (1.48mL, 6.2mmol) 和二氮杂双环十一碳-7-烯 (DBU) (0.093mL, 0.62mmol)。在 ~18h 后通过 TLC 示出起始材料消耗。将溶液浓缩成浆料, 并使用在 DCM 中 0-20% 的甲醇通过硅胶快速柱层析纯化。向产物中加入甲醇/水 1:1 (20mL) 和乙酸 (25 μ L) 与 Pd/C (0.1g), 并附接氢气气球。在 18h 后, 将溶液通过 Celite 过滤并浓缩至白色泡沫。将泡沫溶解于干燥甲醇 (10mL), 在甲醇 (0.15mL,) 中 25% w/v 的甲醇钠, 在 6h 后将溶液浓缩到水 (10mL) 中并用 DCM (10mL) 洗涤。水相冻干, 从而得到氨基丙基 6-O-([α -D-甘露糖基]-2-O-[6-O-磷酸基- α -D-甘露糖基])- α -D-甘露糖苷 34 (0.27g, 63.5%, 来自 33) 的二钠盐。

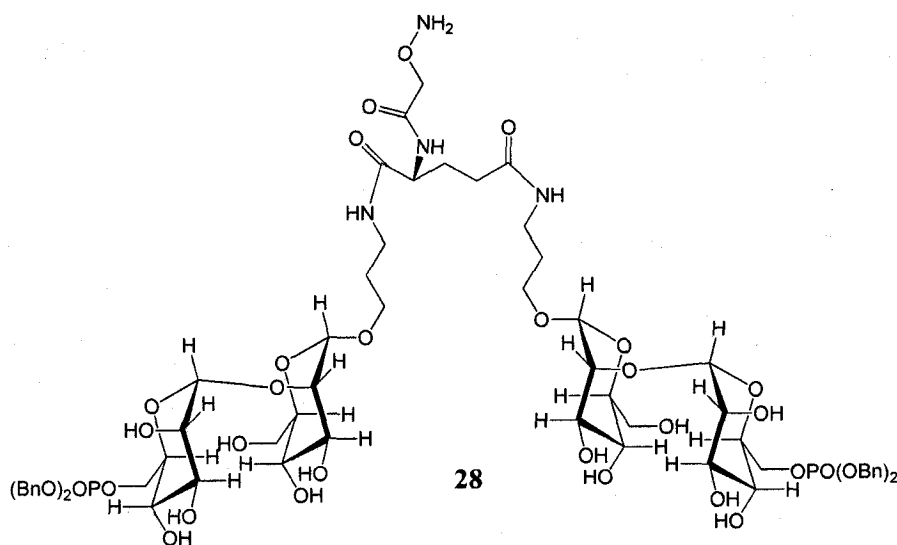
[0270] 向 34 (0.17g, 0.3mmol) 在水/DMSO 1:1 (10mL) 的溶液加入在 DMSO (2mL) 中的 N-t-丁氧基羰基氨基-氧基乙酰基 2,3,5,6-四氟苯醚 (0.34g, 1.14mmol), 然后加入在 DMSO (1mL) 中的 3-羟基-1,2,3-苯并三嗪-4(3H)-酮 (DHBT) (0.09g, 0.6mmol)。在 24h 后将溶液在 sephadex 排阻树脂上纯化。通过焦化在硅胶板上检查级分, 并且将选择的级分汇集和冻干, 从而得到固体。将其溶解于 TFA/DCM (8mL) 并且搅拌 60 分钟, 然后浓缩至油状物。加入水 (5mL), 并将产物在 sephadex 排阻树脂上纯化。通过焦化在硅胶板上检查级分, 并且将选择的级分汇集和冻干, 从而得到 35 (0.033g, 16.4%, 来自 34)。

[0271] 实施例 4: 四糖的合成

[0272] A. 氨基氧基乙酰氨基 1,5-二-3-酰氨基丙基 [2-O-[6-O-磷酸基- α -D-甘露糖

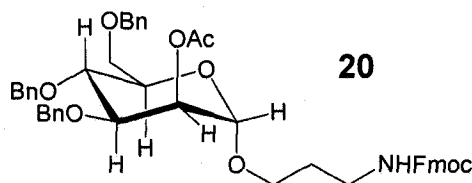
基]- α -D-甘露糖基]谷氨酸酯(28)

[0273]



[0274] 根据实施例3中所述的方法制备化合物19。根据通常糖基化方法,供体19(15.49g,24.3mmol)和受体3-N-9-苄基甲氧基羰基氨基丙醇(8.7g,29.19mmol)被转化,从而得到N-9-苄基甲氧基羰基氨基丙基2-O-乙酰基-3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖苷20的白色泡沫(10.55g,55%)。

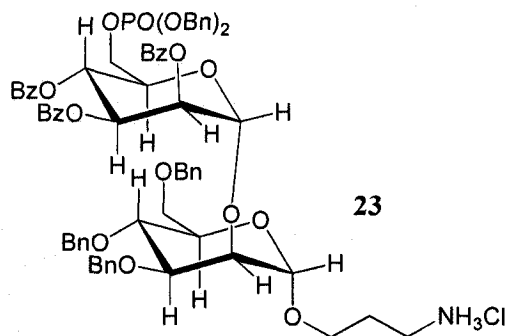
[0275]



[0276] 在~30分钟内将乙酰氯(4.8mL,63mmol)滴加至20(10.5g,y mmol)在干燥DCM(50mL)和无水甲醇(100mL)的溶液中,从而得到在甲醇中HCl的2.3%w/v的溶液。在~18h后将反应用Hünig's碱(9.81mL,63mmol)淬灭,并且另外加入1.5mL。将溶液浓缩成浆料,用氯仿(2x50mL)脱离,溶解于DCM(100mL),并用半饱和盐水(100mL)洗涤,经硫酸钠干燥。将溶液浓缩,并使用在己烷中0-100%的EtOAc通过硅胶快速柱层析纯化,从而得到白色泡沫N-9-苄基甲氧基羰基氨基丙基3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖苷21(6.11g,61.2%)。根据通常糖基化方法,供体21(6.11g,13.4mmol)和受体11(7.1g,7.9mmol)被转化,从而得到N-9-苄基甲氧基羰基氨基丙基2-O-[6-O-二苄基磷酰基-2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基]-3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖苷22的白色泡沫(5.8g,50.1%)。

[0277] 向22(5.8g,3.96mmol)在无水THF(75mL)的溶液中加入十二烷基硫醇(9.53mL,40mmol)和DBU(0.6mL,4mmol)。在~4h后将反应用甲醇HCl(5.6mL,8mmol)淬灭,浓缩成浆料。将产物用乙醚研磨,从而得到3-氨基丙基2-O-[2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基]-3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖苷盐酸盐23的胶状物(3.77g,74.5%)。

[0278]



[0279] 向 23 (3.77g, 2.95mmol) 在干燥乙腈 (50mL) 的溶液中加入 N-苄基氧基羰基谷氨酸 (0.3661g, 1.3mmol)、N-羟基苯并三唑 (HOBt) (0.4g, 2.95mmol), DBU (4.6mL, 4mmol) 和 1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳化二亚胺 (EDC) (0.75g, 8.85mmol)。在 16h 后加入 Hünig's 碱 (0.25mL), 然后加入更多的 EDC (0.75g, 8.85mmol)。在 21h 后将溶液浓缩成浆料, 并使用在 DCM 相对于 DCM 0-50% 的 10% 2-丙醇通过硅胶快速柱层析纯化, 从而得到 N-苄基氧基羰基氨基 1,5-二-[3-酰氨基丙基 2-O-[2,3,4-三-O-苯甲酰基-6-O-二苄基磷酰基- α -D-甘露糖基]-3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖基]谷氨酸酯 24 的白色泡沫 (0.97g, 11.2%)。

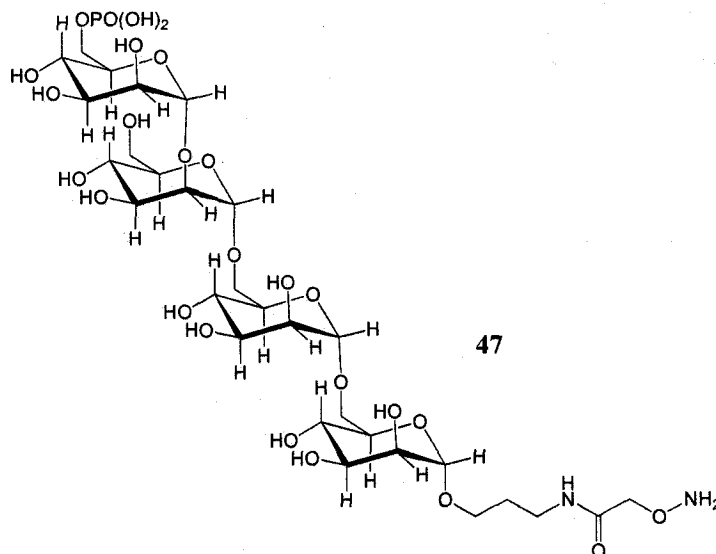
[0280] 向 24 (0.912g, 0.33mmol) 在无水 DCM (20mL) 和甲醇 (25mL) 的溶液中加入在甲醇 (0.09mL, 0.41mmol) 中的 25% w/v 的甲醇钠。在 ~6.5h 后将反应用 1M HCl (0.41mL, 0.41mmol) 淬灭, 浓缩成浆料, 并使用在 DCM 相对于 DCM 0-100% 的 10% 2-丙醇通过硅胶快速柱层析纯化, 从而得到 N-苄基氧基羰基氨基 1,5-二-3-酰氨基丙基 [2-O-[6-O-二苄基磷酰基- α -D-甘露糖基]-3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖基]谷氨酸酯 25 (0.306g, 44.4%)。

[0281] 向 25 (0.3g, 0.144mmol) 在 THF/水 2:1v/v (75mL) 的搅拌溶液中加入湿润的 10% Pd/C (0.052g) 并附接氢气气球。在 16h 后加入冰醋酸 (25 μ L) 并附接新鲜氢气气球。在 6h 后加入更多的 10% Pd/C (0.04g) 和更多的氢气。在 18h 后加入新鲜 5% Pd/C (0.05g) 和更多的氢气。在 24h 后, 将产物用 5% 硫酸/EtOH 碳化但不是 UV 活性的。将混合物通过 celite 过滤, 并且将滤垫洗涤, 浓缩至 ~30% 以除去 THF, 然后冻干从而得到 1,5-二-3-酰氨基丙基 [2-O-[6-O-磷酰基- α -D-甘露糖基]- α -D-甘露糖基]谷氨酸酯 26 (0.121g, 77.9%)。

[0282] 将在 DMSO (1mL) 中的 N-t-丁氧基羰基氨基氧基乙酰基 2,3,5,6-四氟苯醚 (0.19g, 0.57mmol) 和在 DMSO (1mL) 中的 3,4-二氢-3-羟基-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪 (DHBT) (0.052g, 0.3mmol) 加入 26 (0.16g, 0.15mmol) 在水/DMSO 1:1 (7.5mL) 的溶液中。在 18h 后, 将溶液在 sephadex 排阻树脂上纯化。通过焦化在硅胶板上检查级分, 并且将选择的级分汇集和冻干, 从而得到 N-t-丁氧基羰基氨基氧基乙酰基 1,5-二-3-酰氨基丙基 [2-O-[6-O-磷酰基- α -D-甘露糖基]- α -D-甘露糖基]谷氨酸酯 27 (0.095g, 42.1%)。向化合物 27 中加入 TFA/DCM 1:1 (8mL), 并且将混合物搅拌直到溶解 (~60 分钟), 然后浓缩至油状物。加入水 (10mL) 并将产物在 sephadex 排阻树脂上纯化。通过焦化在硅胶板上检查级分, 并且将选择的级分汇集和冻干, 从而得到 28 (0.048g, 54.2%)。

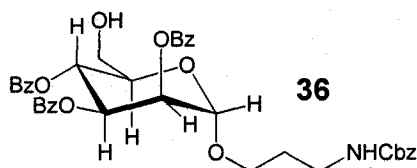
[0283] B. 氨基氧基乙酰氨基丙基 6-O-([α -D-甘露糖基]-6-O-[α -D-甘露糖基]-2-O-[6-O-磷酰基- α -D-甘露糖基])- α -D-甘露糖苷 (47)

[0284]



[0285] 如实施例 2 中所述制备化合物 11。根据实施例 1 的通常糖基化方法, 供体 11 (5.0g, 7.4mmol) 和受体 3-N-苄基氧基羰基氨基丙醇 (1.93g, 9.25mmol) 被转化, 从而得到白色泡沫。根据用于一取代乙酸酯的酸催化的去乙酰化的通常方法, 产物被转化, 从而得到 N-苄基氧基羰基氨基丙基 2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖苷 36 的白色泡沫。

[0286]

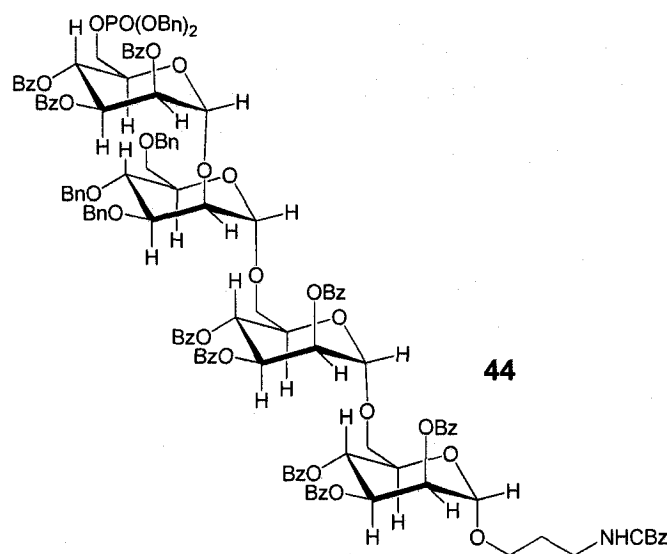


[0287] 根据实施例 1 的通常糖基化方法, 供体 19 (4.47g, 6.6mmol) 和受体 36 (3.6g, 5.3mmol) 被转化, 从而得到 N-苄基氧基羰基氨基丙基 6-O-([6-O-乙酰基-2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基])-2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖苷 37 的白色泡沫 (3.8g, 63.3%)。根据用于一取代乙酸酯的酸催化的去乙酰化的通常方法, 化合物 37 (3.8g, 3.17mmol) 被转化, 从而得到 N-苄基氧基羰基氨基丙基 6-O-[2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基]-2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖苷 38 的白色泡沫 (3.5g, 95.3%)。

[0288] 根据 Yamazaki 等, Carb. Res. 201:31 (1990) 中所述的方法制备化合物 18。根据实施例 1 的通常糖基化方法, 供体 18 (2.41g, 3.75mmol) 和受体 38 (3.5g, 3mmol) 被转化, 从而得到 N-苄基氧基羰基氨基丙基 6-O-([2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基])-6-O-[2-O-乙酰基-3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖基])-2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖苷 39 的油状物 (5.63g)。根据用于二取代乙酸酯的酸催化的去乙酰化的通常方法 (参见实施例 1), 化合物 39 (5.83g) 被转化, 从而得到 N-苄基氧基羰基-氨基丙基 6-O-([2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基])-6-O-[3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖基])-2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖苷 40 的白色泡沫 (2.0g, 41.9%, 来自 38)。根据通常糖基化方法, 供体 19 (1.07g, 1.63mmol) 和受体 41 (2.0g, 1.3mmol) 被转化, 从而得到 N-苄基氧基羰基氨基丙基 6-O-([2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基])-6-O-[3,4,

6-三-O-苄基- α -D-甘露糖基]-2-O-[6-O-乙酰基-2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基])-2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖苷 42 的白色泡沫 (1.4g, 50.8%)。根据用于一取代乙酸酯的酸催化的去乙酰化的通常方法, 化合物 42 (1.4g, 0.066mmol) 被转化, 从而得到 N-苄基氧基羰基-氨基丙基 6-O-([2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基]-6-O-[3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖基]-2-O-[2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基])-2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖苷 43 的白色泡沫 (1.0g, 80%)。根据用于磷酸化的通常方法, 化合物 43 (1.0g, 0.048mmol) 被转化, 从而得到 N-苄基氧基羰基氨基丙基 6-O-([2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基]-6-O-[3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖基]-2-O-[6-O-二苄基磷酸基-2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基])-2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖苷 44 的白色泡沫 (0.9g, 80.7%)。

[0289]



[0290] 向 44 (0.9g, 0.039mmol) 在无水甲醇 (20mL) 的溶液中加入在甲醇 (0.09mL, 0.4mmol) 中的 25% w/v 的甲醇钠。在 ~7h 后将反应用 1M HCl (0.5mL)、10% Pd/C (0.2g) 和水 (10mL) 淬灭。使用气球将混合物在氢气中保持 24h。将混合物通过 celite 过滤, 并用 EtOAc (20mL) 洗涤。将溶液冻干, 以得到白色固体 N-苄基氧基羰基-氨基丙基 6-O-([α -D-甘露糖基]-6-O-[3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖基]-2-O-[6-O-二苄基-磷酸基- α -D-甘露糖基])- α -D-甘露糖苷 45 (0.23g, 74.7%, 来自 44)。

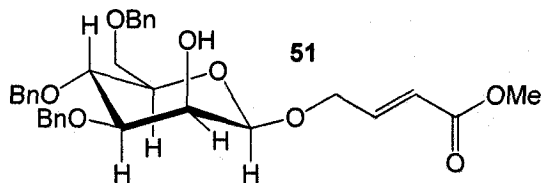
[0291] 将在 DMSO (2mL) 中的 N-t-丁氧基羰基氨基氧基乙酰基 2,3,5,6-四氟苯醚 (0.375g, 1.14mmol) 和在 DMSO (1mL) 中的 DHBT (0.1g, 0.6mmol) 加入 45 (0.23g, 0.3mmol) 在水/DMSO 1:1 (10mL) 的溶液中。在 24h 后将溶液在 sephadex 排阻树脂上纯化。通过焦化在硅胶板上检查级分, 并且将选择的级分汇集和冻干。使用在 DMSO (2mL) 中的 N-t-丁氧基羰基氨基氧基乙酰基 2,3,5,6-四氟苯醚 (0.375g, 1.14mmol) 和在 DMSO (1mL) 中的 DHBT (0.1g, 0.6mmol) 将产物在水/DMSO 1:1 (10mL) 中再酰化。在 24h 后将溶液在 sephadex 排阻树脂上纯化。通过焦化在硅胶板上检查级分, 并且将选择的级分汇集和冻干, 从而得到 N-t-丁氧基羰基氨基氧基乙酰氨基丙基 6-O-([α -D-甘露糖基]-6-O-[α -D-甘露糖基]-2-O-[6-O-磷酸基- α -D-甘露糖基])- α -D-甘露糖苷 46 (0.11g, 37.5%)。加入溶解于 TFA/DCM (8mL) 的化合物 46。将溶液搅拌 60 分钟, 然后浓缩至油状物。加入水

(5mL), 并且将产物在 sephadex 排阻树脂上纯化。通过焦化在硅胶板上检查级分, 并且将选择的级分汇集和冻干, 从而得到 47 (0.07g, 70.7%)。

[0292] 实施例 5: β -连接的己糖的合成

[0293] A. 甲基巴豆酰基 3,4,6-三-O-苄基- β -D-甘露糖苷 (51)

[0294]

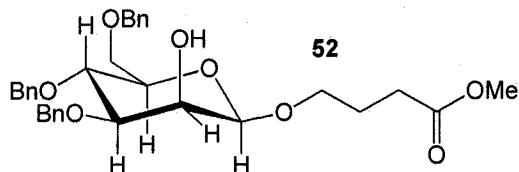


[0295] 如 Mayer 等, Eur. J. Org. Chem. 10:2563 (1999) 中所述制备 2-O-乙酰基-3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖。将在甲醇 (0.5mL) 中的 25% w/v 的甲醇钠加入 2-O-乙酰基-3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖 (8.0g, 23.3mmol) 在无水甲醇 (50mL) 中的溶液中。在 ~2 小时后, 通过薄层色谱法 (TLC) 显示起始材料消耗。将反应用 Amberlite IR120(H+) 树脂淬灭, 过滤, 并浓缩成浆料, 从而得到 3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖 50 (6.67g, 99%)。向化合物 50 中加入甲苯 (150mL), 然后加入二丁基氧化锡 (3.88g, 16.28mmol), 并且使用 Dean-Stark 冷凝器将混合物回流加热 3h。将所得溶液冷却, 浓缩成浆料, 并且溶解于干燥 DMF (50mL)。向混合物中加入氟化铯 (2.28g, 12.1mmol)、四丁基碘化铵 (5.47g, 14.8mmol) 和 4-溴巴豆酸甲酯 (2.46mL, 22.2mmol, 工业级), 并加热至 ~60°C 18 小时。使混合物冷却并且过滤掉固体。将其用异丙基醚/EtOAc 3.7:1 (380mL) 稀释, 并且用半饱和硫代硫酸钠 (240mL) 洗涤。将水相用异丙基醚/EtOAc 3.7:1 (2x190mL) 萃取, 并且将有机层汇集和浓缩。将浆料用异丙醇 (2x25mL) 脱离, 并使用在己烷中 0-50% 的 EtOAc 通过快速柱层析纯化, 从而得到 51 的浆料 (4.58g, 56.4%)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz) $^1\text{J}_{\text{C},\text{H}}$ (100MHz), 157Hz ($\beta < 160\text{Hz}$, $\alpha > 170\text{Hz}$)

[0296] B. 甲基丁酰基 3,4,6-三-O-苄基- β -D-甘露糖苷 (52)

[0297] 如实施例 2 中所述制备化合物 50。向化合物 50 (9.4g, 21mmol) 中加入甲苯 (200mL), 然后加入二丁基氧化锡 (5.49g, 22mmol), 并且使用 Dean-Stark 冷凝器将混合物回流加热 23h。将所得溶液冷却, 浓缩成浆料, 并且溶解于干燥 DMF (100mL)。加入 4-溴丁酸甲酯 (4.23mL, 32mmol)、四丁基碘化铵 (1.94g, 5.25mmol) 和氟化铯 (3.91g, 25.5mmol), 并且将混合物加热至 60°C 2h, 接着在周围温度下 18h。将混合物冷却, 并通过 celite 过滤, 用 EtOAc (50mL) 洗涤。将其浓缩至胶状物, 用甲苯 (3x40mL) 脱离, 吸附到二氧化硅上, 并使用在己烷中 0-70% 的 EtOAc 通过快速柱层析纯化, 从而得到 52 的油状物 (9.11g, 78.6%)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz) $^1\text{J}_{\text{C},\text{H}}$ (100MHz), 157.2Hz ($\beta < 160\text{Hz}$, $\alpha > 170\text{Hz}$)。未观测到 α -连接的产物。

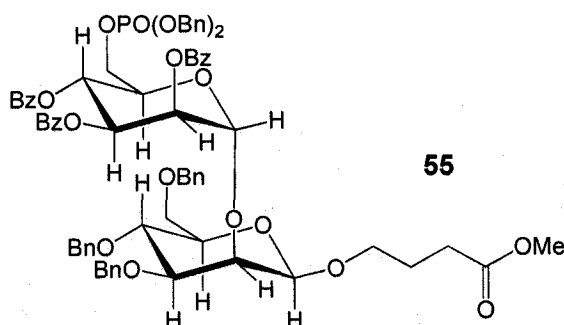
[0298]



[0299] C. 甲基丁酰基 2-O-[6-O-磷酸基- α -D-甘露糖基]- β -D-甘露糖苷 (57)

[0300] 如实施例 2 中所述制备化合物 52, 并且根据 Heng 等, J. Carb. Chem. 20 :285 (2001) 的方法制备 6-O-乙酰基-3,4,6-三-O-苄甲酰基- α -D-甘露糖三氯乙酰亚氨酸酯 19。根据实施例 1 的通常糖基化方法, 供体 19 (4.29g, 6.36mmol) 和受体 52 (2.9g, 5.3mmol) 被转化, 从而得到甲基丁酰基 2-O-[6-O-乙酰基-2,3,4-三-O-苄甲酰基- α -D-甘露糖基]-3,4,6-三-O-苄基- β -D-甘露糖苷 53 的白色泡沫 (4.41g, 78.5%)。根据用于一取代乙酸酯的酸催化的去乙酰化的通常方法 (实施例 1 中所述), 化合物 53 (4.41g, 4.1mmol) 被转化, 从而得到甲基丁酰基 2-O-[2,3,4-三-O-苄甲酰基- α -D-甘露糖基]-3,4,6-三-O-苄基- β -D-甘露糖苷 54 的白色泡沫 (2.25g, 53.7%)。根据实施例 1 的用于磷酸化的通常方法, 化合物 54 (2.25g, 2.2mmol) 被转化, 从而得到从而得到甲基丁酰基 2-O-[2,3,4-三-O-苄甲酰基-6-O-二苄基磷酸基- α -D-甘露糖基]-3,4,6-三-O-苄基- β -D-甘露糖苷 55 的白色泡沫 (2.2g, 77.7%)。

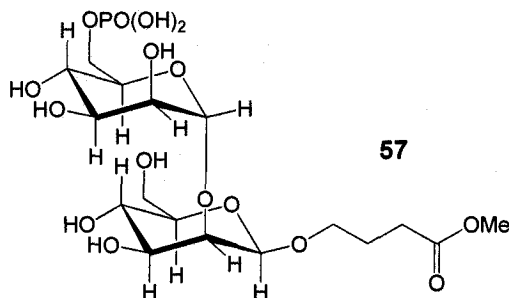
[0301]



[0302] 为了脱保护 55, 将在甲醇 (0.2mL) 中的 25% w/v 的甲醇钠加入 55 (2.2g, 1.7mmol) 在无水甲醇 (20mL) 中的溶液。在 ~24h 后通过 TLC 示出起始材料消耗。将反应用 Amberlite IR120 (H+) 淬灭, 浓缩成浆料。将溶液浓缩, 并通过硅胶快速柱层析纯化, 从而得到甲基丁酰基 2-O-[6-O-二苄基磷酸基- α -D-甘露糖基]-3,4,6-三-O-苄基- β -D-甘露糖苷 56 的白色泡沫 (1.10g, 67%)。

[0303] 向 56 (1.10g, 1.15mmol) 在 THF/水 (20mL) 的搅拌溶液中加入冰醋酸 (25 μ L)、湿润的 10% Pd/C (0.1g) 并附接氢气气球。在 24h 反应后, 将产物用 5% 硫酸/EtOH 碳化但在 UV 下无法看到。将混合物通过 celite 过滤, 并且将滤垫用水 (20mL) 洗涤。将溶液浓缩, 并真空干燥, 从而得到甲基丁酰基 2-O-[6-O-磷酸基- α -D-甘露糖基]- β -D-甘露糖苷 57 (0.6g, 98%)。

[0304]



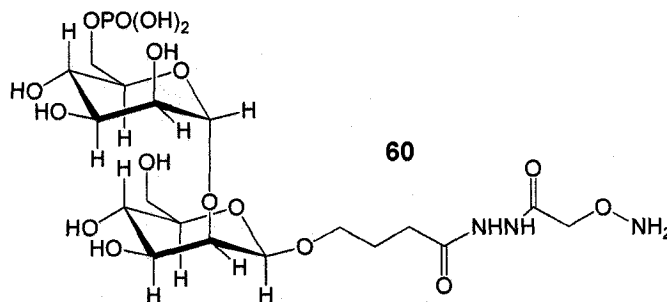
[0305] D. 氨基氧基乙酰氨基酰肼基丁基 2-O-[6-O-磷酸基- α -D-甘露糖基]- β -D-甘露糖苷 (60)

[0306] 将水合肼 (0.44mL, 5.75mmol) 加入在甲醇 (20mL) 中的 57 (0.6g, 1.15mmol), 同时

进行搅拌。在 30 分钟后加入水 (5mL), 并将溶液搅拌 18h。加入更多胍 (0.44mL, 5.75mmol), 将混合物搅拌 120h。将溶液浓缩至 ~25% 的体积, 用水 (2x10mL) 脱离, 并且将产物冻干, 从而得到酰胍基丁基 2-O-[6-O-磷酸基- α -D-甘露糖基]- β -D-甘露糖苷 58 的米色固体 (0.6g, 99%)。

[0307] 向在 DMSO/水 1 : 1 (10mL) 的 58 (0.2g, 0.38mmol) 中加入在 DMSO (2mL) 中的 N-t-丁氧基羰基氨基氧基乙酰基 2,3,5,6-四氟苯醚 (0.49g, 1.52mmol) 和在 DMSO (2mL) 中的 DHBT (0.125g, 0.76mmol) 的溶液。在 18h 后将溶液在 sephadex 排阻树脂上纯化。通过焦化在硅胶板上检查级分, 并且将选择的级分汇集和冻干, 从而得到 N-t-丁氧基羰基氨基-氧基乙酰氨基酰胍基丁基 2-O-[6-O-磷酸基- α -D-甘露糖基]- β -D-甘露糖苷 59 的米色固体 (0.1g, 37.8%)。将化合物 59 溶解于 TFA/DCM 1 : 1 (8mL)。将溶液搅拌 ~60 分钟, 然后浓缩至油状物。加入水 (10mL), 并将产物在 sephadex 排阻树脂上纯化。通过焦化在硅胶板上检查级分, 并且将选择的级分汇集和冻干, 从而得到 60 的米色固体 (0.045g, 52.5%)。

[0308]



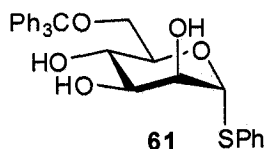
[0309] E. 甲基丁酰基 3-O-烯丙基-6-O-三苯甲基- β -D-甘露糖苷 (64) 的大规模合成

[0310] 将 50.0kg (128.09mol) d-甘露糖五乙酸酯在 100L CH_2Cl_2 中的溶液用 26.8kg (243.2mol, 1.90eq.) 硫酚和 27.3kg (192.3mol, 1.50eq.) 三氟化硼乙醚处理, 并且将所得溶液在 22℃ 搅拌 40h, 然后通过 HPLC 分析判断反应进行完全。然后将 115L 5N 水性 NaOH 仔细地加入搅拌的反应容器, 相分离并且将有机相用 46L 5N NaOH 洗涤多于一次。将 CH_2Cl_2 通过减压蒸馏除去, 并且在 60℃ 下将残渣重新溶解于 100kg 异丙醇。在冷却至 9℃ 后, 将产物 F1 结晶并且可通过过滤来分离, 然后用异丙醇洗涤从而得到 35.8kg (63%)。

[0311] 在 22℃ 将 35.80kg 的 F1 (88.28mol) 混悬于 143kg 的 MeOH, 并且用 0.73kg 的 30% 甲醇-甲醇钠溶液 (4.05mol, 0.046eq.) 处理, 然后获得透明的溶液。在通过 TLC 分析判断反应进行完全后, 加入 0.49kg 的乙酸 (8.14mol, 0.09eq.), 并且减压除去溶剂。将残渣混悬于甲苯, 再次在减压下浓缩, 并且最终用丙酮处理, 然后将产物苯基- α -D-硫代甘露糖苷结晶。在过滤后, 洗涤和干燥, 从而得到 19.65kg (89%) 的收率。

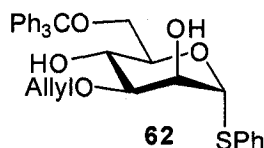
[0312] 在 40℃ 下, 将在吡啶 (43.8kg) 中的苯基- α -D-硫代甘露糖苷 (19.25kg, 70.69mol) 加入三苯基甲基氯化物 (19.7kg, 70.66mol) 在甲苯 (89kg) 的溶液中并且搅拌 22h。在通过 HPLC 分析判断反应进行完全后, 将溶剂在减压下蒸馏, 并且将残渣溶解于甲苯中和重新浓缩。在使用更多的甲苯稀释后, 将溶液用水洗涤一次。在过滤和干燥后, 通过将甲苯溶液加入己烷 (840L) 和二异丙基醚 (250L) 的混合物中而使产物析出, 从而得到苯基 6-O-三苯甲基-1-硫代- α -D-甘露糖苷 61 (32.30kg, 89%)。

[0313]



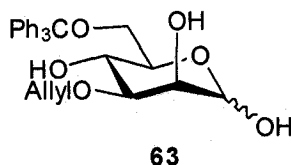
[0314] 将 61 (30.0kg, 58.29mol) 和二丁基氧化锡 (20.3kg, 81.5mol) 在甲苯 (500kg) 中的混合物回流加热 2 小时, 直到无进一步水从冷凝的溶剂蒸汽中分离。将溶液冷却至 40℃ 并且加入 DMF (34kg)。减压下蒸馏掉总溶剂的大约一半, 然后加入 DMF (216kg), 并且将溶液再次浓缩至其体积的大约一半。加入更多 DMF (250kg), 然后加入氟化铯 (8.9kg, 58.59mol)、在 DMF (65kg) 中的四丁基碘化铵 (23.6kg, 63.89mol)、和烯丙基溴化物 (21.1kg, 174.4mol)。将所得混合物在 50℃ 搅拌 15h。在通过 HPLC 分析判断反应进行完全后, 通过过滤将固体从反应混合物中除去, 并且将滤液用二异丙基醚 (136kg) 和乙酸乙酯 (30kg)、10% w/w 硫代硫酸钠水溶液 (300kg) 的混合物进行处理。在相分离后, 将下层相用二异丙基醚 (136kg) 和乙酸乙酯 (30kg) 的混合物重新萃取 4 次, 并且将合并的上层相用水 (150kg) 洗涤三次。将上层相在减压下浓缩, 并且在 75℃ 将残渣溶解于乙醇 (160kg)。在冷却至 0℃ 后, 将产物结晶并可通过过滤分离。在将滤饼洗涤和干燥后, 获得苯基 3-O- 烯丙基 -6-O- 三苯甲基 -1- 硫代 - α -D- 甘露糖苷 62 (15kg, 46%)。

[0315]



[0316] 在 15℃, 将 62 (12.5kg, 22.53mol) 在 THF (63kg) 和吡啶 (18kg, 227.5mol) 的混合物中的溶液用甲苯磺酸一水合物 (16.7kg, 87.79mol) 在水 (10.7kg) 中的溶液、然后用 N- 氯代琥珀酰亚胺 (9.6kg, 71.89mol) 在水 (17kg) 和 THF (83kg) 的混合物中的溶液进行处理。将所得混合物加热至 22℃ 并搅拌 3h。在通过 HPLC 分析判断反应进行完全后, 将硫代硫酸钠 (4.6kg, 29.11mol) 在水 (15kg) 中的溶液加入反应混合物。相分离, 上层相在减压下浓缩, 并且将残渣溶解于甲苯并再次浓缩。将残渣重新溶解于乙酸乙酯, 用水洗涤, 然后用 16% w/w 氯化钠水溶液洗涤。在蒸发乙酸乙酯后, 将粗产物在 52kg 硅胶上通过柱层析法来纯化, 并用 3-10% v/v 梯度的乙酸乙酯洗脱, 从而得到 3-O- 烯丙基 -6-O- 三苯甲基 - α -D- 甘露糖 63 (7.7kg, 73%)。

[0317]



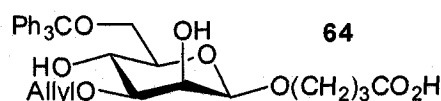
[0318] 将在甲醇 (61kg) 中的 63 (7.7kg, 16.65mol) 和二丁基氧化锡 (4.56kg, 18.32mol) 的混合物回流加热, 直到获得浑浊的溶液, 然后进行另外 1h。将溶液冷却至 25℃, 减压下蒸馏掉总溶剂的大约一半, 然后加入 DMF (33kg), 并且将溶液再次浓缩至其体积的大约一半。加入更多 DMF (15kg), 然后加入氟化铯 (2.53kg, 16.65mol)、在 DMF (17kg) 中的四丁基碘化铵 (6.15kg, 16.65mol)、和 4- 溴丁酸甲酯 (4.52kg, 24.97mol)。将所得混合物在 80℃ 搅拌 5h。通过过滤将固体从反应混合物中除去, 并且将滤液用二异丙基醚 (41kg)、乙酸乙

酯 (14kg) 和 10% w/w 硫代硫酸钠水溶液 (77kg) 的混合物进行处理。在相分离后,将下层相用二异丙基醚 (41kg) 和乙酸乙酯 (51kg) 的混合物重新萃取,并且将合并的上层相用水 (39kg) 洗涤。将上层相在减压下浓缩,并且将残渣溶解于甲醇 (35kg)。

[0319] 为了改善反应收率,重复连接反应过程。将溶解的残渣再次在减压下浓缩,然后用甲醇 (122kg) 稀释。将甲醇 (60L) 再次蒸馏,并且将所得溶液用二丁基氧化锡 (2.28kg, 9.16mol) 处理,将混合物加热回流 2h。将溶液冷却至 29℃,减压下蒸馏掉总溶剂的大约一半,然后加入 DMF (37kg),并且将溶液再次浓缩至其体积的大约一半。加入更多 DMF (15kg),然后加入氟化铯 (1.26kg, 8.29mol)、在 DMF (17kg) 中的四丁基碘化铵 (3.7kg, 10.02mol)、和 4-溴丁酸甲酯 (3.06kg, 16.90mol),并且将所得混合物在 80℃ 搅拌 5h。在通过 HPLC 分析判断反应进行完全后,通过过滤将固体从反应混合物中除去,并且将滤液用二异丙基醚 (25kg)、乙酸乙酯 (32kg) 和 10% w/w 硫代硫酸钠水溶液 (77kg) 的混合物进行处理。在相分离后,将下层相用二异丙基醚 (25kg) 和乙酸乙酯 (32kg) 的混合物重新萃取,并且将合并的上层相用水 (39kg) 洗涤。溶液在减压下浓缩,并且将残渣重新溶解于甲苯 (43kg),并且最终浓缩至最终体积大约 30L。然后 64 的粗甲酯在 50kg 硅胶上通过柱层析法来纯化,并用在甲苯中的 5% -30% v/v 梯度的乙酸乙酯洗脱。

[0320] 将纯化的甲酯在甲醇 (50kg) 中的溶液用 30% w/w 水性氢氧化钠 (3.29kg) 和甲醇 (7.7kg) 的混合物处理,将所得溶液搅拌 14h。在通过 HPLC 分析判断反应进行完全后,将反应混合物用二异丙基醚 (41kg) 和乙酸乙酯 (14kg) 的混合物、然后用水 (77kg) 处理。将双相混合物通过 1.2 μm 过滤柱并进行相分离。将下层相用二异丙基醚 (41kg) 和乙酸乙酯 (14kg) 的混合物处理,并且通过加入 5% w/w 的柠檬酸水溶液 (38L) 使下层相的 pH 降至 4.5-5。相分离,并且将下层相用二异丙基醚 (41kg) 和乙酸乙酯 (14kg) 的混合物萃取。将合并的上层相用水 (39kg) 洗涤,然后在减压下浓缩。将残渣混合二异丙基醚 (39kg),并且将溶剂部分浓缩以得到最终体积大致 20L,然后产物结晶,并且可通过过滤来分离。在滤饼洗涤和干燥后,获得 (3-O-烯丙基-6-O-三苯甲基-β-D-甘露糖基)-4-丁酸 64 (4.7kg, 51.5%)。

[0321]

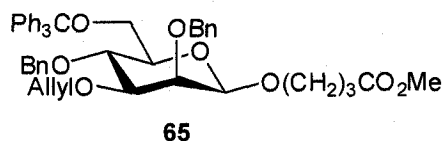


[0322] F. 四糖中间体 (69) 的大规模合成

[0323] 根据部分的方法来制备化合物 64。在进一步糖基化反应之间将 64 的保护基团进行修饰。将 64 (4.25kg, 7.75mol) 在 THF (14kg) 中的溶液仔细地加入 60% 氢化钠分散体 (1.55kg, 38.75mol) 在 THF (45kg) 中的搅拌浆料中,并且将所得混悬物搅拌直到停止产生氢气。将四丁基碘化铵 (0.29kg, 0.78mol) 在 THF (2kg) 中的混悬液加入反应容器,接着加入苄基溴 (9.2kg, 53.79mol)。将混合物在 22℃ 搅拌 46h,然后在 30℃ 搅拌 12h,并且在 35℃ 搅拌 48h。在通过 HPLC 分析判断反应进行完全后,将混合物冷去至 0℃,仔细地加入无水甲醇 (0.7kg, 21.87mol)、30% w/w 甲醇-甲醇钠 (2.1kg, 11.66mol)。然后加入乙酸 (1.4kg)、三乙胺 (9.4kg, 92.89mol),并且将混合物搅拌 18h。向所得混悬液中加入水 (31kg),并且将两相分离。上层相在减压下浓缩,将残渣溶解于甲苯,并且在此浓缩至最终体积为大约 20L。将粗产物在 42kg 硅胶上通过柱层析法来纯化,并用在己烷中的 5-15% 梯度的乙酸乙酯洗

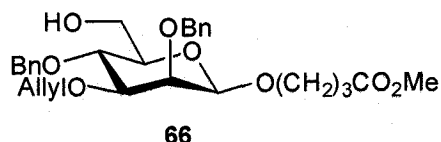
脱,从而得到甲基丁酰基 3-O-烯丙基-2,4-二-O-苄基-6-O-三苯甲基-β-D-甘露糖苷 65(4.4kg,77%) 在乙酸乙酯中的溶液。

[0324]



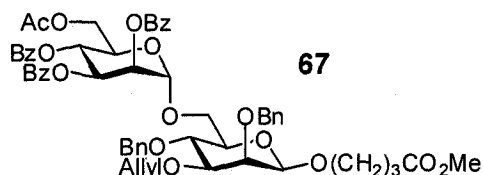
[0325] 在 37℃ 向 65(4.4kg,5.92mol) 在甲醇(19kg) 的溶液中加入甲苯磺酸一水合物(0.9kg,4.73mol) 在甲醇(6.3kg) 中的溶液,并且将所得混合物搅拌 1h。在通过 HPLC 分析判断反应进行完全后,加入三乙胺(1.5kg,14.82mol) 并将溶液在减压下浓缩。然后加入甲苯(28kg) 并将溶液用水(32kg) 洗涤。相分离,上层相在减压下浓缩。将粗产物在硅胶(32kg) 上通过硅胶层析法进行纯化,并用在甲苯中的 9%、然后 17%、然后 50% v/v 梯度的乙酸乙酯洗脱,从而得到甲基丁酰基 3-O-烯丙基-2,4-二-O-苄基-β-D-甘露糖苷 66(2.67kg,90%) 在甲苯中的溶液。

[0326]



[0327] 将 3.73kg(5.49mol,1.10eq.) 19 和 2.50kg(4.99mol) 66 溶解于 34kg 干燥甲苯,其中的~10L 在减压下蒸发。然后将溶液冷却至 0℃,用 22g(0.099mol,0.02eq.) TMSOTf 滴加处理,使得反应温度保持在<5℃,在完成加入后在 0℃ 搅拌 1h。在通过 HPLC 分析判断反应进行完全后,通过加入 30g(0.296mol,0.06eq.) Et₃N 中和混合物。加入己烷(22L),将所得混悬液过滤,并且将滤液用 33L 水洗涤,在减压下浓缩。将残渣溶解于 10L 甲苯并再次浓缩,重复该过程两次多。在 50kg 硅胶上进行粗产物的柱层析纯化,并且用在己烷:甲苯 1:1 中的 9-13% v/v 梯度的乙酸乙酯洗脱,从而得到 4.23kg,83% 的化合物 67 在甲苯中的溶液。

[0328]

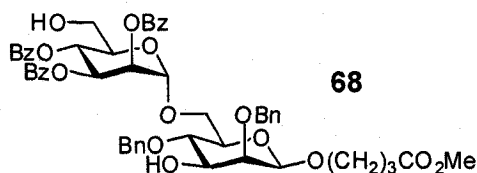


[0329] 向 4.23kg(4.16mol) 67 在 5.6L CH₂Cl₂ 和 40L MeOH 的溶液中加入 0.72kg 10% Pd/C, 然后加入 0.12kg(0.63mmol,0.15eq.) 甲苯磺酸一水合物的溶液,并且将混合物在 22℃ 搅拌 24h。在通过 HPLC 分析判断反应进行完全后,通过过滤除去钯/碳,并且在后续步骤中使用滤液而无需进一步纯化。

[0330] 向滤液中加入 2.97kg(15.6mol,3.75eq.) 甲苯磺酸在 4L MeOH 中的溶液,并且将所得混合物在 22℃ 搅拌 16h。在通过 HPLC 分析判断反应进行完全后,将混合物冷却至 0℃,通过加入 1.64kg(16.2mol,3.89eq.) 三乙胺来进行中和。溶液在减压下浓缩,并且将残渣分配在 82L MTBE 和 32L 水之间。将有机相在减压下浓缩,用 10L 甲苯稀释并且重新浓缩。

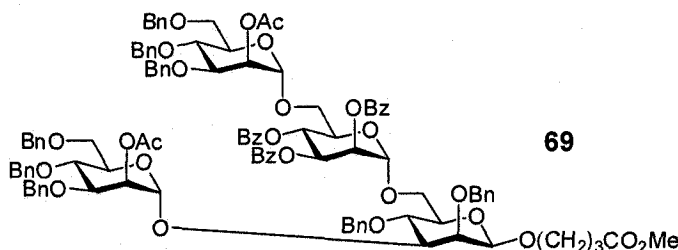
重复该过程两次多。在 38kg 硅胶上进行粗产物的柱层析纯化,并且用在己烷:甲苯 1:1 中的 23-26% v/v 梯度的乙酸乙酯洗脱,从而得到 2.59kg 化合物 68(67%来自 67) 在甲苯中的溶液。

[0331]



[0332] 在 0℃ 将 2.90kg (3.10mol) of 68 和 5.24kg (8.23mol, 2.65eq.) 18 在 30kg 干燥甲苯中的溶液用 0.049kg (0.185mol, 0.06eq.) TBDMSOTf 处理, 并且在 0℃ 搅拌 4h。在通过 HPLC 分析判断反应进行完全后, 加入 0.104kg (1.03mol, 0.128eq.) 三乙胺, 然后加入 33L 己烷。将所得混悬液过滤, 并且将滤液用 28L 水、然后用 28L 5% 水性 Na_2CO_3 洗涤。甲苯相在减压下浓缩, 粗产物在 58kg 硅胶上通过柱层析法来纯化, 并且用在己烷: 甲苯 1:1 中的 9-20% v/v 梯度的乙酸乙酯洗脱, 从而得到 4.40kg 的四糖中间体 69 (75%) 在甲苯中的溶液。

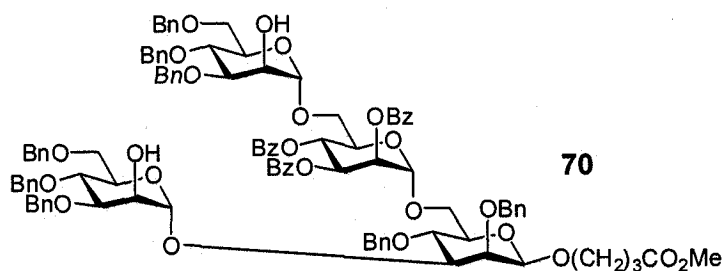
[0333]



[0334] G. 保护的己糖 (73) 的合成

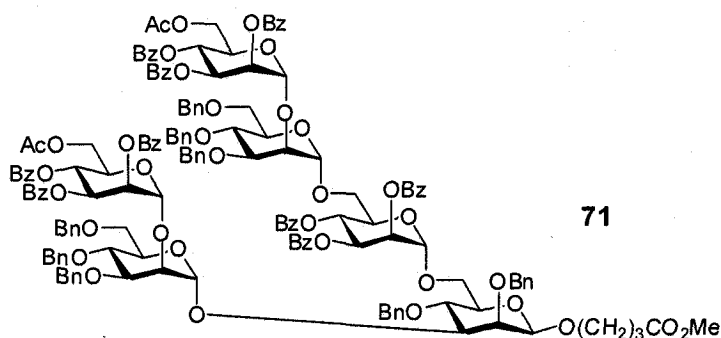
[0335] 根据实施例 7 中所述的方法来准备四糖中间体 69。向 9.7g (5.15mmol) 69 在 60ml CH_2Cl_2 的溶液中加入 100ml MeOH, 然后滴加 HCl 在 1,4-二噁烷 (0.154mol, 30eq.) 中的 27ml 的 5.7N 溶液, 使得混合物的温度保持低于 30°C。然后将反应混合物在 22°C 搅拌 40h。在通过 HPLC 分析判断反应进行完全后, 仔细地加入 32ml (22.9mmol, 44.7eq.) 三乙胺, 使得混合物的温度保持低于 25°C。加入水 (250ml) 和甲苯 (200ml), 将混合物振摇, 并且相分离。将下层相用 50ml 甲苯重新萃取, 并且将合并的上层相用 50ml 水洗涤, 在减压下浓缩。粗产物在 100g 硅胶上通过柱层析法来纯化, 并且用在己烷中的 30-50% v/v 梯度的乙酸乙酯洗脱, 从而得到甲基丁酰基 3-O-([3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖基])-(6-O-[2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基]-6-O-[3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖基])-2,4-二-O-苄基- β -D-甘露糖苷 70 (6.35g, 69%)。

[0336]



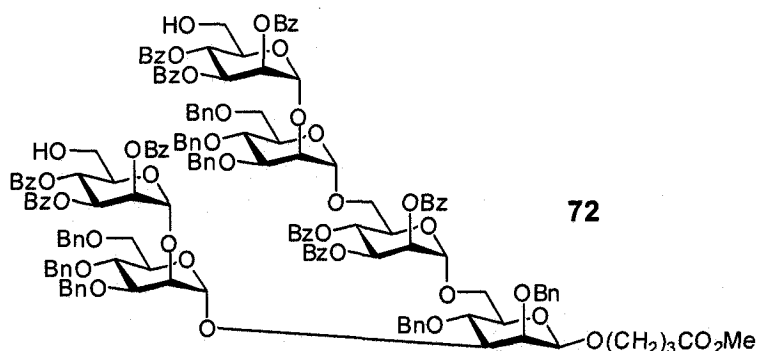
[0337] 在 0℃ 将 1.0g (0.56mmol) 的 70 和 0.95g (1.40mmol, 2.5eq.) 19 在 9ml 干燥甲苯中的溶液用 0.02g (0.075mmol, 0.14eq.) TBDMSOTf 处理, 并且在 0℃ 搅拌 1h。在通过 HPLC 分析判断反应进行完全后, 加入 22ml (0.158mmol, 0.28eq.) 三乙胺。将所得混合物用 10ml 水洗涤两次, 并在减压下浓缩。粗产物在 15g 硅胶上通过柱层析法来纯化, 并且用在己烷: 甲苯 1 : 1 中的 15-25% v/v 梯度的乙酸乙酯洗脱, 从而得到 1.75g 化合物甲基丁酰基 3-O-([3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖基]-2-O-[6-O-乙酰基-2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基])-(6-O-[2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基]-6-O-[3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖基]-2-O-[6-O-乙酰基-2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基])-2,4-二-O-苯甲酰基- β -D-甘露糖苷 71 的油状物, 其含有残留甲苯。

[0338]



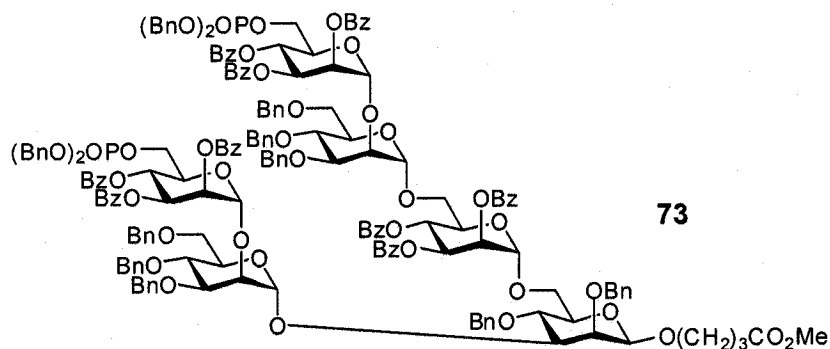
[0339] 将 10.0g (3.5mmol) 71 在 40ml 1,4-二噁烷的溶液用 60ml MeOH、接着 3.25g (14.0mmol, 4eq.) (+)-樟脑磺酸处理, 将所得溶液在 22℃ 搅拌 100h。在通过 HPLC 分析判断反应进行完全后, 加入 3ml (21.5mmol, 6.2eq.) 三乙胺, 并且在减压下除去溶剂。将残渣溶解于 200ml MTBE 并且和 200ml H₂O 一起振摇。相分离, 上层相在减压下浓缩。粗产物在 114g 硅胶上通过层析法来纯化, 并且用在甲苯中的 14-25% v/v 梯度的乙酸乙酯洗脱, 从而得到 8.24g 甲基丁酰基 3-O-([3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖基]-2-O-[2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基])-(6-O-[2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基]-6-O-[3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖基]-2-O-[2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基])-2,4-二-O-苯甲酰基- β -D-甘露糖苷 72 的油状物, 其含有残留甲苯。

[0340]



[0341] 向 0.965g (0.35mmol) 72 在 4g 干燥乙腈的溶液中加入 0.083g (0.70mmol, 2eq.) 4,5-二氰基咪唑, 接着加入 0.315g (0.91mmol, 2.6eq.) 二苄基二异丙基亚磷酰胺, 并且将混合物在 23℃ 搅拌 1h。在通过 TLC 分析判断反应进行完全后, 加入 0.5ml 水并且将溶液搅拌 15min。加入水 (9.5ml) 和 10ml MTBE, 并且将所得混合物振摇, 相分离, 将下层相和 10ml MTBE 一起振摇。将上层相合并, 并且在减压下浓缩以得到无色油状物。将该残渣溶解于 CH_2Cl_2 , 并且冷却至 -20℃, 用 0.247g (1.13mmol, 3.2eq.) 70% 3-氯过苯甲酸处理。在通过 TLC 分析判断反应进行完全后, 加入 10ml 的 10% 硫代硫酸钠水溶液, 并且将混合物加热至 23℃。将下层相分离并和 10ml 水一起振摇, 在减压下浓缩。粗产物在 19g 硅胶上通过柱层析法来纯化, 并且用在己烷中的 25-50% v/v 梯度的乙酸乙酯洗脱, 从而得到 0.83g (72%) 甲基丁酰基 3-O-([3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖基]-2-O-[6-O-二苄基磷酰基-2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基])-(6-O-[2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基]-6-O-[3,4,6-三-O-苄基- α -D-甘露糖基]-2-O-[6-O-二苄基磷酰基-2,3,4-三-O-苯甲酰基- α -D-甘露糖基])-2,4-二-O-苯甲酰基- β -D-甘露糖苷 73 的无色油状物。

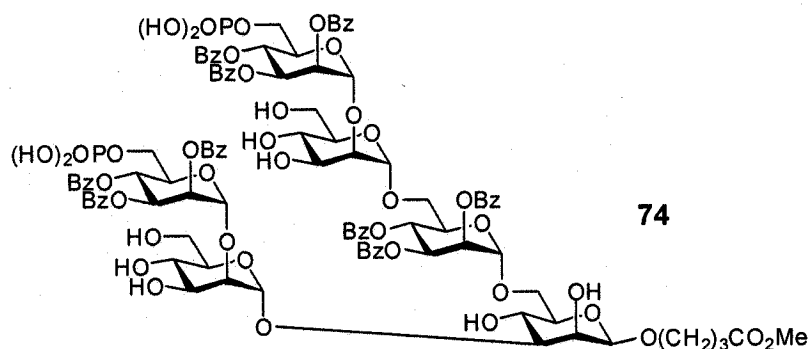
[0342]



[0343] H. 氨基乙酰氨基酰肼基 3-O-([α -D-甘露糖基]-2-O-[6-O-磷酰基- α -D-甘露糖基])-(6-O-[α -D-甘露糖基]-6-O-[α -D-甘露糖基]-2-O-[6-O-磷酰基- α -D-甘露糖基])- β -D-甘露糖苷 (77) 的合成

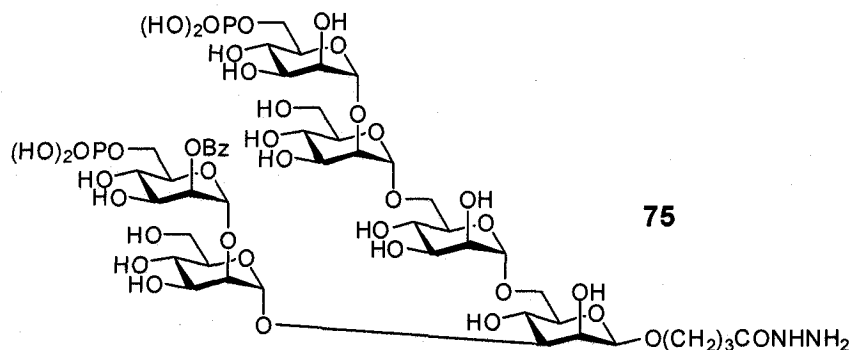
[0344] 根据实施例 8 中所述的方法来制备化合物 73。将冰醋酸 (100 μL) 加入在甲醇 / THF 1 : 1 (600mL) 中的 73 (64g, 19.6mmol), 并且在 50℃ 使用的 H-cube® 将产物氢化, 其在 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ 上, 50 巴 H_2 压力, 流速 6mL/min, 并且在催化剂上循环。在 20h 后, 通过 TLC 检查反应基本上完全, 并且将溶液浓缩以得到 74 的泡沫 (39.88g, 93%)。

[0345]



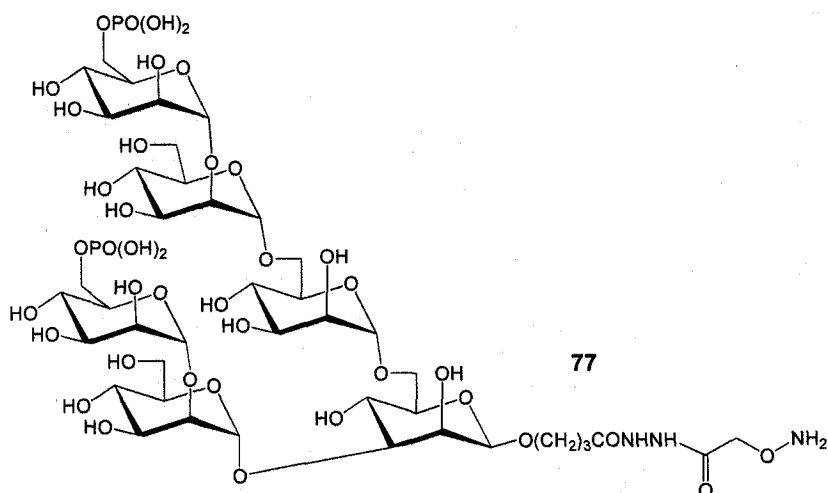
[0346] 在搅拌的同时将甲醇 (180mL) 加入 74 (33.8g, 15.5mmol) 直到溶解, 将溶液在冰 / 水浴中冷却 15 分钟。向溶液中加入 64% 胍一水合物 (94mL, 1.24mol), 同时进行搅拌。在 30 分钟后加入水 (120mL), 并且使溶液达到室温并储存 18h。将溶液浓缩至 $\sim 100\text{mL}$ 并且用水 ($2 \times 100\text{mL}$) 脱离, 用水将最终溶液调节至 $\sim 180\text{mL}$ 。将溶液用 DCM ($2 \times 100\text{mL}$) 萃取, 然后 60mL 的 3 种部分在 sephadex 排阻柱上分离。将含有最纯物质的级分汇集和冻干, 从而得到 75 (15.5g, 80%)。

[0347]



[0348] 将 DMSO (20mL) 缓慢加入在水 (30mL) 中的 75 (2.5g, 2.0mmol), 然后加入在 DMSO (6mL) 中的 N-t-丁氧基羰基氨基氧基乙酰基 2,3,5,6-四氟苯醚 (2.58g, 7.6mmol) 和在 DMSO (4mL) 中的 DHBT (0.65g, 4mmol)。在 18h 后将溶液在 sephadex 排阻树脂上纯化, 通过焦化在硅胶板上检查级分, 并且将选择的级分汇集和冻干, 从而得到 N-t-丁氧基羰基氨基氧基乙酰氨基酰肼基丁酰基 3-O-([α -D-甘露糖基]-2-O-[6-O-磷酸基- α -D-甘露糖基])-(6-O-[α -D-甘露糖基]-6-O-[α -D-甘露糖基]-2-O-[6-O-磷酸基- α -D-甘露糖基])-[β -D-甘露糖基] 76 (2.57g, 90%)。将 DCM (30mL)、然后 TFA (16mL) 加入化合物 76 (2.57g, 1.8mmol)。将混合物搅拌直到溶解 (~ 60 分钟), 然后浓缩至油状物。加入水 (20mL), 将产物在 sephadex 排阻树脂上纯化, 通过焦化在硅胶板上检查级分, 并且将选择的级分汇集和冻干, 从而得到 77 (1.6g, 67.1%)。

[0349]

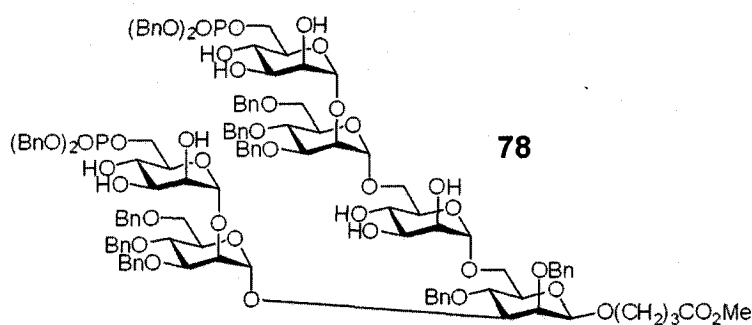


[0350] 实施例 6 : 具有二硫化物接头的己糖的合成

[0351] A. 游离酸形式的己糖的制备

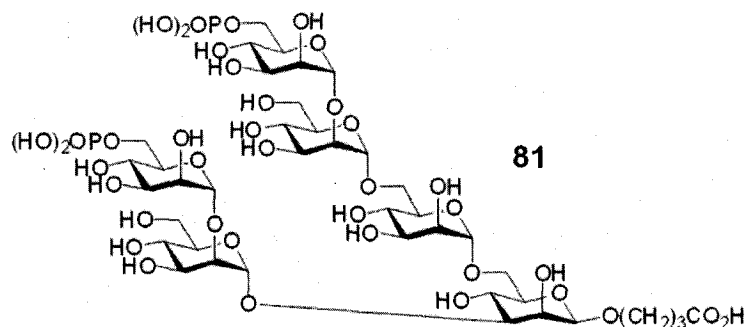
[0352] 将无水 MeOH 加入化合物 73, 接着加入 NaOMe 并且温育 4-18h。将反应用冰醋酸淬灭, 并且将溶液浓缩成浆料以得到 78。

[0353]



[0354] 将化合物 78 溶解于 THF/ 甲醇 1 : 1 和氢化的 Pd/C-H₂ 中。将溶液浓缩至固体并溶解于水中, 用水性 NaOH 皂化, 将 pH 调节至 ~ 4, 并且在 Sephadex G-10 上纯化以得到游离酸 81。

[0355]

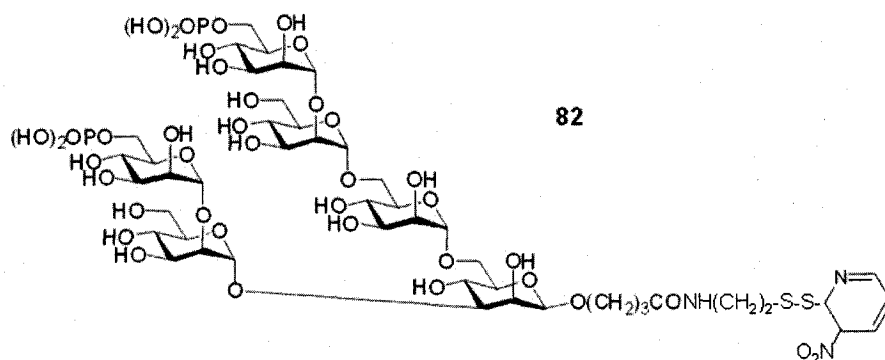


[0356] B. 二硫化物接头的附接

[0357] 将通过不同方法 (得自 Biomira) 制备的化合物 81 的粗级分通过混合过量 TEA 转化为三乙胺 (TEA) 盐, 接着使用 30% 乙腈, 0.1% TEA 碳酸氢盐作为流动相、在 Superdex Peptide (GE Healthcare) 上进行层析。将汇集的级分冻干, 并且在下列反应中缀合 NEA : 含有聚糖 : NEA : EDAC : NHS : HOBT : TEA (1 : 1 : 1.5 : 1 : 1 : 1 mol : mol), 温育

过夜,同时进行轻柔地真要。如前所述将一部分 (0.5mg) 产物在 Superdex Peptide 上进行层析并且冻干以得到 82 (0.28mg)。

[0358]



[0359] 实施例 7: α -葡萄糖苷酶缀合物的合成和氧化优化

[0360] A. 缀合

[0361] 寡糖缀合重组人酸性 α -葡萄糖苷酶 (rhGAA) 以形成 NeoGAA。通过 rhGAA 上的唾液酸残基首先附接寡糖的缀合物称为“SAM”,而通过半乳糖残基附接的那些称为“GAM”。

[0362] 如 Zhu 等, Biochem J, 389(Pt 3):619-628 (2005) 所述基本上制备 NeoGAA β SAM6。用于该试验的 rhGAA (Genzyme Corp.) 缓冲-交换到 100mM 乙酸钠 pH 5.6 中,然后在暗处和冰上的高碘酸钠 (2, 7.5 或 22.5mM) 反应 30 分钟。通过加入甘油至 2% (vol/vol) 将反应淬灭。将氧化的 rhGAA 缓冲-交换以从氧化反应中除去小分子量副产物,并且在 37°C 和化合物 77 (0-120-倍摩尔比 vs. 蛋白,如图 9 中所示) 缀合 6 小时。将所有缀合物缓冲-交换到 25mM 磷酸钠 pH 6.25 中,其含有 2% 甘露醇和 0.005% Tween-80。

[0363] 使用 SAM2 (化合物 17, 实施例 2), SAM3 (化合物 35, 实施例 3), SAM4 (化合物 28, 实施例 4A), 线性 SAM4 (化合物 47, 实施例 4B) 和 α SAM6 (寡糖 103)、利用 7.5mM 高碘酸盐和寡糖至 rhGAA 的改变的摩尔比,制备类似 NeoGAA 缀合物。

[0364] 还进行可替换的缀合方法。具体而言,具有氨基、酰肼或硫醇-反应接头的己糖通过 Cys374、赖氨酸、唾液酸或半乳糖残基附接 rhGAA。

[0365] 通过使用琥珀酰亚胺基 4-甲酰基苯甲酸酯 (SFB; Solulink Corp.) 修饰 rhGAA 中的赖氨酸残基、接着缀合寡糖来进行赖氨酸缀合。简言之,将 rhGAA 首先缓冲-交换到 50mM 磷酸钠, pH 7.2, 其含有 150mM 氯化钠。然后将缓冲的 rhGAA 用新鲜制备的 (SFB) 以 SFB 与 GAA 20 : 1 摩尔比来进行处理。将混合物在室温下温育 30min, 之后将其缓冲-交换到 100mM 乙酸钠, pH 5.5, 用于在室温缀合酰肼己糖 2 小时, 或将用 SFB 修饰的 GAA 缓冲-交换到 100mM 乙酸钠, pH 5.6, 用于在 37°C 缀合氨基己糖 6 小时。

[0366] 通过和硫醇-反应性 NEA-己糖 82 (实施例 6I) 反应来进行半胱氨酸-基缀合。将 NEA-修饰的己糖 82 重新构建在水中, 并且和 rhGAA (新聚糖与 rhGAA 的 15 : 1 摩尔比) 在 50mM 磷酸钠与 50mM 羟基胺 pH 7.2 中在 25°C 下温育 2 小时。使用 50mM 磷酸钠 pH 4.1 将 pH 调节至 6.2, 并且温育持续过夜。将产物通过离心渗滤针对 25mM 磷酸钠 pH 6.2 来进行纯化。引入少于 1mol : mol M6P。

[0367] 尽管通过 Cys374 的直接缀合不成功,但是测试间隔臂 19.9Å 的同型双官能团硫

醇-特异性试剂 1,4-二-(3'-[2-吡啶基二巯基]-丙酰氨基)丁烷(DPDPB)以在和寡糖缀合之前在 374 位提供更加溶剂易接近的巯基。将 60-倍摩尔过量的 DPDPB 和 rhGAA 在 10% DMSO 或 10% 丙醇作为共溶剂的条件下进行反应。该产生强烈的聚集,如通过光散射所检测的。在 20% 乙腈存在下的反应也显示聚集,但是反应混合物的超滤液在 344nm 处的吸光度一致于半胱氨酸的定量修饰。乙腈浓度降低至 10% 减少聚集的量,但是产生更低程度的修饰。

[0368] 通过在赖氨酸残基引入巯基来进行可替换的硫醇-基方案。通过下列方式保护的硫醇引入到赖氨酸残基上:在 25°C 使酶和 100-f 倍摩尔过量的 SATA-dPEG4-NHS(Quanta Biodesign)在磷酸钠 pH 6.2 中反应 4 小时,并且通过整夜透析针对相同缓冲液来纯化。然后使纯化的产物和 NEA-寡糖 82 在上述用于半胱氨酸-基缀合的条件下进行反应,从而得到赖氨酸-硫醇缀合物。这显示 Man-6P 含量(缀合~5 聚糖)~10-倍增加。

[0369] 通过测量完整蛋白分子量和 M6P 含量,将具有酰肼的赖氨酸缀合物的稳定性在 37°C 评价至多 14 天。缀合物不是稳定的,因为超过 50% 的新聚糖在 14 天内损失。如上所述,使用相对于 rhGAA 0, 16.6, 25, 33 和 40 摩尔过量的己糖通过赖氨酸制备氨氧基缀合物。缀合物在 16.6-倍摩尔过量下是可饱和的。尽管只有~31% (或缀合 5 新聚糖)的总赖氨酸缀合。在数种制剂中也观察到高聚集水平。检测 SFB 的 PEG 化形式,聚集没有减少。

[0370] 通过在 37°C 首先使用来自 *clostridium perfringens* 的唾液酸酶(20mU/mg)进行预处理 rhGAA 6 小时(在 25mM 磷酸钠, pH 6.25 中,含有 2% 甘露醇和 0.005% Tween-80)来进行半乳糖缀合(GAM)。在去涎酸后,将蛋白用半乳糖氧化酶(GAO)在 1-10 μ g/mg 下处理,并用过氧化氢酶(Sigma)在 2U/mg 下在相同缓冲液中在 37°C 处理过夜,之后使用 Poros 50D(阴离子-交换)色谱法来进行重新纯化,以除去神经氨酸苷酶和过氧化氢酶。将用两种酶处理的产物用相同体积的 dH₂O 稀释,然后施加于 Poros 50D 柱,其使用 10mM 磷酸钠缓冲液, pH 6.9 预先平衡。在将柱用 10mM 乙酸钠缓冲液, pH 5.0 洗涤后,将 rhGAA 用 150mM 乙酸钠缓冲液, pH 5.0 洗脱,并且在 37°C 以各种摩尔比缀合氨氧基己糖 6 小时。

[0371] 将 GAM 缀合物以 16.6-f 倍摩尔过量的己糖与 GAA 用缀合~6-7 聚糖饱和。聚集水平较低。在去涎酸后未检测到唾液酸,同时,在半乳糖氧化酶处理后测定少量半乳糖。在一些情况下,20-30% 的半乳糖残基过氧化,从而产生半乳糖醛酸,其不缀合寡糖。滴定 GAO,这显示在 1 μ g/mg 之上,GAO 减少聚糖缀合。在 2 μ g/mg GAO 之上半乳糖醛酸过氧化产物的量有明显增加。在用 GAO 滴定后,在 1-2 μ g GAO/mg rhGAA(图 10E-单糖,包括 Man-6P, Gal, GAM 缀合物的 GalA 内容物)实现最大量的缀合。当使用 0.5 至 2 μ g GAO/mg GAA 时,蛋白中的 Man-6P 含量观察到较高缀合。当使用较低或较高 GAO 产生较低半乳糖或较高 GalA。

[0372] 双-M6P 己糖聚糖缀合 NeoGAA 的量通过 M6P 含量分析和 MAL 二-TOF 来定量。对于 M6P 定量,使用 Amicon 4,50,000MWC0 离心式过滤器单元(具有 5 个过滤循环)将样品缓冲交换,以除去任何潜在过量的聚糖。在 100°C 下将 80 微克的各 rhGAA 或 NeoGAA 样品在 6.75M TFA 中水解 1.5 小时。将样品冷却,在 Speed Vac 中干燥,并且在 200 μ L 蒸馏水中重新构建。将重新构建的样品再次在 Speed Vac 中干燥,并且用 200 μ L 50mM 柠檬酸盐 pH 2.0 重新构建。将样品通过在柠檬酸钠 pH 2.0 中平衡的 S Mini H 柱(Sartorius)过滤,以从水解产物中除去杂质。对于所有样品和标准品,加入核糖-5-磷酸酯作为内标。将 50 μ L 的水解产物注射到 Dionex HPLC 上,并且通过高 pH 阴离子交换色谱法利用脉冲安培

检测 (HPAEC-PAD) 进行分析。使用用 M6P 的水解标准构建的标准曲线来进行定量。然后基于已知 2 摩尔的 M6P/ 摩尔的聚糖的摩尔比来计算缀合程度。

[0373] 以线性方式使用 Voyager DE-PRO 质谱仪来进行 MAL 二 -TOF MS 分析。对于所有样品和标准品 1 : 5 稀释到在水中的 0.1% 甲酸中,接着 1 : 1 稀释到在 50% 乙腈 /0.1% TFA 中的饱和芥子酸中。1 μ L 的该混合物施加于靶。将样品、参照和 BSA 校准对照分三次进行分析。使用 BSA 的 (M+H)⁺ 和二聚体离子来进行两点校准。考虑到测量的聚糖分子量为 1323g/ 摩尔,各 NeoGAA 样品的缀合程度基于样品和氧化的 rhGAA 对照 (未引入聚糖) 之间分子量的差别来评价。

[0374] 图 9A 示出使用上述二 -, 三 -, 四 - 和己糖缀合物的试验结果。

[0375] 图 9B 提供使用不同量的高碘酸盐制备的 β SAM6 缀合物的结果。需要实现缀合反应的饱和的寡糖的水平正比于在氧化步骤中使用的高碘酸盐的量 (图 9B, 上组)。使用 2mM 高碘酸盐,具有 ~ 5.2 摩尔唾液酸的 rhGAA 样品在大约 25- 倍摩尔过量的己糖 vs. 蛋白 (4.8- 倍摩尔过量的 vs. 唾液酸) 处达到饱和。使用 7.5mM 高碘酸盐,在 33- 倍摩尔过量的聚糖处实现饱和。对于用 22.5mM 高碘酸盐氧化的、具有 120- 倍摩尔过量的聚糖的 rhGAA, 接近但未实现饱和。对于使用不同水平的高碘酸盐制备的样品,实现的最大缀合水平也不同。使用 7.5 和 22.5mM 高碘酸盐,分别引入大约 8.5 和 10.5 摩尔的聚糖 / 摩尔的蛋白。在用 2mM 高碘酸盐氧化后,可实现的缀合水平为大约 5 摩尔的聚糖 / 摩尔蛋白,这类似于起始材料中唾液酸残基的数量。

[0376] 使用 2mM 高碘酸盐、利用具有 ~ 7.2 摩尔 / 摩尔蛋白的起始唾液酸水平的 rhGAA 重复聚糖滴定试验 (图 9B, 下组)。在 ≥ 33 - 倍摩尔过量的聚糖与蛋白 (相比于唾液酸, ~ 4.6 - 倍摩尔过量), 缀合水平大约 7 摩尔的聚糖 / 摩尔蛋白。

[0377] B. 聚集减少

[0378] 某些缀合方法导致蛋白聚集。开发了两种减低 neoGAA 中的聚集的方法: 1) 使用多种 HIC 色谱介质的疏水作用色谱法 (HIC) 和 2) 金属螯合法。

[0379] 制备 3g 批次的 NeoGAA 并用于评价 HIC 和用于除去聚集的铜柱。以流通方式来评价 HIC 柱: 丁基 650C 和 650M, 己基 650C, 苯基 6FF, Capto 辛基和 Capto 苯基。己基和 Capto 苯基给出可比较的结果,回收率为 87.5% 和 90.4%, 并且聚集分别从 3.2% (初始水平) 减少至 1.4% 和从 3.9% (初始) 减少至 1.6%。参见表 2。

[0380] 表 2: 使用 HIC 柱 (8 $^{\circ}$ C) 从缀合的 GAA (3.2% agg) 降低聚集

[0381]

柱	mg 负载的 neoGAA/ml 树脂	洗涤缓冲液的 [NaOAc]	回收率	聚集
	(mg/ml)	mM	(%)	(%)
丁基 650C	21.1	100	98.1	3.3
苯基 6FF	18.1	100	94.3	1.6
己基 650C	8.7	100	78.2	1.0
		10	91.4	1.5
己基 650C	21.4	100	87.5	1.4
Capto 苯基	12.4	100	84.7	1.1
		50	92.3	1.3
丁基 650M	15.7	100	92.5	1.9
Capto 辛基	8.5	100	95.6	1.8

[0382] 用于铜螯合柱 (GE 或 Tosoh) 运行的条件也以流通方式或结合-洗脱方式来建立。将加有铜的 7ml 金属螯合 FF 柱 (I. D., 7ml) 首先以结合-洗脱方式用 10mg/ml 负载的缀合 GAA 来评价。当将柱用 175mM 甘氨酸, 100mM 乙酸酯, pH 5.5 作为洗脱缓冲液在 RT 下进行洗脱时, 87% NeoGAA 被回收, 其中 1.2% 聚集。在 8°C, 需要高于 175mM 的甘氨酸洗脱柱以达到令人满意的回收。以流通方式 (表 3) 实现良好的回收率 92%, 其中聚集从 3.2 降低至 1.2%。使用 150mM 甘氨酸, 100mM 乙酸盐, pH 5.5 作为洗脱缓冲液。

[0383] 表 3. 使用铜 6FF 柱 (RT, Ft 方式) 从缀合的 GAA (3.2% agg) 除去聚集物

[0384]

mg neoGAA 负 载的/ml 树脂	负载的[甘氨酸]	洗脱缓冲液的[甘 氨酸]	回收率	Aggr.
(mg/ml)	mM	mM	(%)	(%)
36.6	0	125	76.5	1.1
10	50	175	80.8	1.0
10	150	150	79.6	1.3
10	100	175	84.7	0.9
30	100	150	92.0	1.2
30	50	150	92.3	1.3

[0385] 咪唑 (7.5, 8 和 10mM) 也用作洗脱缓冲液用于金属螯合 6FF 柱。需要约 8mM 咪唑来洗脱柱。因为咪唑不从柱上洗脱铜, 其不必调节柱或使柱上部的 EDTA 达到透明空间。实现 15mg/ml NeoGAA 的柱容量。

[0386] Toso AF-螯合物 650M 柱加载铜并且也进行评价。以结合-和洗脱模式, 实现 15mg/ml 的柱容量, 使用 8mM 甘氨酸来达到 94.1% 洗脱和 1.2% 聚集。以流通方式, 实现 33.6mg/ml 容量。使用在洗脱缓冲液中的 50mM 甘氨酸获得 90.6% 回收和 1.2% 聚集。

[0387] C. 寡糖的分析

[0388] 根据这些试验,使用 $> 2\text{mM}$ 高碘酸盐导致引入 NeoGAA 聚糖,其超过蛋白中的唾液酸的起始水平,这指示非-唾液酸部分氧化。为了确定通过高碘酸盐在其他碳水化合物位点的氧化水平,进行一系列高碘酸盐滴定试验,从而监控其他单糖残基的水平。

[0389] 为了测定唾液酸含量,将样品使用 0.5M 甲酸在 80°C 进行酸性水解一小时。释放的唾液酸通过高 pH 阴离子交换色谱法来进行分析,其偶联脉冲电流检测 (HPAEC-PAD) 并且在 Dionex CarboPac PA1 柱上,使用在 100mM 氢氧化钠中的 $50\text{--}180\text{mM}$ 乙酸钠梯度进行 20 分钟。结果表示为唾液酸 (NANA 或 NGNA) 摩尔 / rhGAA 或 NeoGAA 摩尔,并且从可靠市售可得唾液酸标准品的标准曲线测定。

[0390] 中性单糖的水平,包括岩藻糖,半乳糖, GlcNAc 和甘露糖,通过在 1M TFA 中在 110°C 下水解 $100\text{ }\mu\text{g}$ 的 rhGAA 或 NeoGAA 2 小时来测定。在水解后,将试管在冰上冷却,并以 $10,000\text{rpm}$ 离心 1 分钟,通过 Speed Vac 蒸发至干。释放的单糖重新混悬在 $250\text{ }\mu\text{L}$ 水中,并且涡旋,使用 Millipore Ultrafree-MC 过滤管 ($10,000\text{MWCO}$) 来过滤。释放的单糖通过高 pH 阴离子交换色谱法来进行分析,其偶联脉冲电流检测 (HPAEC-PAD) 并且在 CarboPac PA1 柱上。按照使用相同的方式水解的单糖的标准曲线来进行定量。

[0391] 上述试验的结果示于图 10A。结果表明,唾液酸是最容易氧化的单糖。以 2mM 高碘酸盐检测低水平的岩藻糖破坏物,并且含量更加可测,并且在 $\geq 5\text{mM}$ 下可重现。仅在 $\geq 7.5\text{mM}$ 高碘酸盐可检测轻微氧化的甘露糖。

[0392] 为了证实氧化的唾液酸、岩藻糖和甘露糖的存在,在从使用 7.5mM 高碘酸盐氧化的 rhGAA 释放的寡糖进行碎片质谱。rhGAA 和 NeoGAA 中 N-连接的寡糖使用在 50mM 磷酸钠 pH 7.0 和 10mM B-巯基乙醇的 PNGase F 整夜消化而释放。释放的寡糖通过生物透析 ($\text{MWCO } 500\text{Da}$) 清除,其中交换数次水。透析的样品在高速浓缩器中干燥,并且使用 50% 乙腈和 50% 水中的 $110\text{ }\mu\text{L}$ 的 10mM 甲酸铵 pH 4.0 来重新构建。样品使用 TSK Ge1 酰胺-80 柱 ($100\text{ }\mu\text{L}$ 注射到 $2\times 100\text{mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$ 粒径) 分析,使用在线 MS 检测 (QStar 四极管飞行时间, LCT Premier 飞行时间,和 LTQ 线性离子捕获装置),使用乙腈-水梯度和 10mM 甲酸铵 pH 4.0。

[0393] 对于寡糖结构分析,寡糖干燥和使用邻氨基苯甲酸 (AA) 荧光标记。AA-标记的寡糖通过在 TSK 凝胶酰胺 80 柱上的正向 HPLC 来解析,使用荧光检测并使用乙腈/水梯度。MS 碎片分析在线进行,并使用阳离子方式 LTQ XL 线性离子捕获质谱仪。光谱扫描从 400 至 $2,000\text{m/z}$,归一化碰撞能量设定在 35 (误差,除非文中说明) 和激活 Q 设定在 0.25 。

[0394] **唾液酸:**唾液酸的完全氧化 (C7,8 和 C8,9 键) 将导致质量减少 62 道尔顿。岩藻糖和甘露糖的氧化将初始导致减少 2 道尔顿 (C2,3 或 C3,4 键氧化),接着在剩余邻位二醇氧化时减少 30 道尔顿。糖醛使用 AA 的还原性氨化将导致氧的损失,净加入 121.1 道尔顿分子量 / 加入 AA。在唾液酸,岩藻糖和甘露糖氧化后 rhGAA 寡糖的理论和测定的分子量改变示于表 4。

[0395] 表 4. AA-标记的 SAM6 寡糖的靶离子的概述,其用于 ms2 和 ms3 分析“ $1+$ ”和“ $2+$ ”,分别对应于单电荷和双电荷阳离子物质。“ $2-$ ”和“ $3-$ ”分别对应于双电荷和三电荷阴离子物质。

[0396]

检测的氧化	检查的寡糖结构	理论质量 (Da)	MS 的测定的前体离子(m/z)	MS3 测定的前体离子 (m/z)
唾液酸氧化 (1 Ox. 唾液酸+ 2 AA)	Monosial., Biant.(A1)	2111	1057(2+)	716, 1032, 1235, 1397, 1585, 1747
	Monosial, Bianten., 核心岩藻糖化 (A1F)	2258	1130(2+)	716, 878, 1178, 1381, 1543, 1893
	Bisial., Biant. (A2)	2462	1232(2+)	—
	Bisial, Bianten., 核心岩藻糖化 (A2F)	2608	1305(2+)	—
甘露糖 氧化(1 Ox. 甘露糖+3 AA)	寡甘露糖 5	1595.5	1596.5 (1+)	1194, 1395
	寡甘露糖 6	1758	1758(1+)	1356, 1547
岩 藻 糖 oxidation (1 Ox S.A. + Ox. 岩 藻 糖 +4AA)	Monosial, Bianten., 核心岩藻糖化 (A1F)	2498	1250(2+)	716, 1397, 1621, 1783
	Bisial, Bianten., 核心岩藻糖化 (A2F)	2848	1426 (2+)	—

[0397] 观察到一些离子对应于氧化的和 AA- 衍生氧化的唾液酸, 岩藻糖和甘露糖寡糖物质。除了在所有释放的寡糖的还原 GlcNAc 的衍生化, AA 的衍生化对应于存在的还原性醛物质的数量, 即, 以 1 : 1 比例使用氧化的唾液酸, 和以 2 : 1 比例 / 氧化的甘露糖和岩藻糖。

[0398] 图 10B 的质谱示出 4 种离子的检测, 其对应于 rhGAA 寡糖, 具有在 C7 的唾液酸的氧化和 AA- 衍生化。对于唾液酸氧化的两种目标离子 (m/z 1057 和 1130) 选择同于另外的 MS/MS 碎片分析。m/z 1057 的碎片图案示于图 10C, 各离子具有假设的鉴定。碎片离子 m/z 716, 1032, 1235, 1397, 1584, 和 1747 选择用于 MS3 分析。和假设的寡糖结构匹配的 MS³ 谱含有在二线式聚糖的末端上氧化和 AA- 标记的唾液酸。特别地, 碎片 m/z 351 的释放证实 AA 附接 C7 形式的唾液酸。在所有分析的样品中, 只观察到 C7 形式的氧化的唾液酸; 没有证据显示在 C8 存在氧化的唾液酸。

[0399] 岩藻糖氧化: 表 5 列出 AA- 衍生的、氧化的 A1F 和 A2F 的理论和测定的质量的列表

[0400] 表 5. AA- 衍生的 A1F 和 A2F 的理论和测定的质量, 然后是 1 岩藻糖残基和高碘酸盐的氧化。“2+”对应于双电荷的阳离子物质。理论质量基于 4AA 分子的缀合 /A1F 寡糖, 和 5AA 分子 /A2F

[0401]

衍生的寡糖	理论质量(Da)*	检测的离子(m/z)
A1F, 具有 AA-标记的和氧化的唾液酸 和岩藻糖	2498.1	1250.4 (2+)
A2F, 具有 AA-标记的和氧化的唾液酸 和岩藻糖	2848.3	1426.0 (2+)

[0402] 母离子 m/z 1250.4 的碎片图案示于图 10D, 并且一致于 AA- 标记的单唾液酸单线式核心岩藻糖化寡糖所预期的, 其含有氧化的唾液酸和氧化的岩藻糖。测定主要碎片离子 m/z 716, 1397, 1621 和 1783。这些离子选择用于 MS^3 分析以证实假设的鉴定。在 m/z 1621 和 1783 的 MS^3 谱中, 测定离子碎片图案, 从母离子 (1426 和 1588, 分别来自母离子 1621 和 1783) 损失 195 道尔顿。分子量改变一致于氧化的岩藻糖的 C1 和氧原子之间的切割, 从而导致附接 C4 的衍生的邻氨基苯甲酸的损失。另外, 结合 C3 的第二衍生的邻氨基苯甲酸的进一步碎片和损失观测为从母离子损失 386 道尔顿 (1235 和 1397 m/z , 分别从母离子 1621 和 1783)。

[0403] 氧化的 rhGAA 寡糖 A1F 的 MS 碎片图案显示在具有邻氨基苯甲酸的岩藻糖中 C3,4 的衍生化, 从而证实产生高碘酸盐氧化。没有证据显示 C2-C3 键氧化。双 -M6P 己糖聚糖缀合氧化 rhGAA 导致在缩合反应的过程净增加 1305.3 道尔顿。

[0404] 为了证实缀合的寡糖结构的鉴定, 进行天然、释放的寡糖的高质量精度 MS 分析。来自 rhGAA 和 NeoGAA SAM6 的寡糖使用 2 和 7.5mM 高碘酸盐制备, 其使用 PNGase F 释放, 通过正向 HPLC (TSK 凝胶酰胺 -80 柱) 解析, 使用乙腈 - 水梯度和 10mM 甲酸铵 pH 4.0。在线进行聚糖的质谱检测, 以阴离子方式, 使用 QStar 或 LCT 飞行时间质谱仪。

[0405] 下表提供来自用 2 和 7.5mM 高碘酸盐氧化的 rhGAA 的天然 N- 连接的寡糖峰鉴定 SAM6, 这基于高精度 MS/TOF 分析。“Ox” 是指氧化位点的数量, “Conj” 缀合的双 -M6P 己糖聚糖的数量。理论质量从理论寡糖结构的单同位素分子量来计算, 并且对应电荷状态的理论 and 测定的 m/z 如下所示。

[0406]

基础 结构	寡	理论 Mw (单)	理论 m/z (2-)	理论 m/z (3-)	理论 m/z (4-)	测定的2 mM 高碘 酸盐-处理 的SAM6 Mw	测定的7.5 mM 高碘 酸盐-处理 的SAM6 Mw	测定的 2mM 高碘 酸盐-处理 的 GAA Mw	测定的 7.5mM 高 碘酸盐-处 理的GAA Mw
Man5	天然	1234.43	616.21			1233.45(1-)	1233.45(1-)	1233.45(1-)	1233.45(1-)
	1 Ox 甘露糖	1232.42	615.20			N/D	N/D	1231.44(1-)	1231.40(1-)
	2 Ox 甘露糖	1230.40	614.19			N/D	N/D	1229.45(1-)	1229.45(1-)
	1 Ox 甘露糖 + 1 Conj	2537.75	1267.87	844.91	633.43	1267.91(2-)	1267.91(2-)	N/D	N/D
	2 Ox 甘露糖 + 1 Conj	2535.73	1266.86	844.24	632.93	N/D	N/D	N/D	N/D
	1 Ox 甘露糖 + 2 Conj	3843.08	1920.53	1280.02	959.76	N/D	1280.01(3-)	N/D	N/D
	2 Ox 甘露糖 + 2 Conj	3841.06	1919.52	1279.35	959.26	N/D	1279.41(2-)	N/D	N/D
	2 Ox 甘露糖 + 3 Conj	5146.39	2572.19	1714.46	1285.59	N/D	N/D	N/D	N/D
Man6	天然	1396.49	697.24			1395.49(1-); 697.26(2-)	1395.49(1-); 697.26(2-)	1395.47(1-); 697.24(2-)	1395.47(1-); 697.26(2-)
	1 Ox 甘露糖	1394.47	696.23			N/D	N/D	1393.47(1-); 696.23(2-)	1393.47(1-); 696.27(2-)
	2 Ox 甘露糖	1392.46	695.22			N/D	N/D	N/D	1391.44(1-); 695.24(2-)
	1 Ox 甘露糖 + 1 Conj	2699.80	1348.89	898.93	673.94	1348.88(2-)	1348.88(2-)	N/D	N/D
	2 Ox 甘露糖 + 1 Conj	2697.78	1347.88	898.25	673.44	N/D	N/D	N/D	N/D
	1 Ox 甘露糖	4005.13	2001.56	1334.04	1000.27	2001.48(2-);	2001.48(2-);	N/D	N/D

[0407]

基础 结构	寡	理论 Mw (单)	理论 m/z (2-)	理论 m/z (3-)	理论 m/z (4-)	测定的2 mM 高碘 酸盐-处理 的SAM6 Mw	测定的7.5 mM 高碘 酸盐-处理 的SAM6 Mw	测定的 2mM 高碘 酸盐-处理 的 GAA Mw	测定的 7.5mM 高 碘酸盐-处 理的GAA Mw
	+ 2 Conj					1333.99(3-)	1334.04(3-)		
	2 Ox 甘露糖 + 2 Conj	4003.11	2000.55	1333.36	999.77	N/D	1333.45(3-)	N/D	N/D
	2 Ox 甘露糖 + 3 Conj	5308.44	2653.21	1768.47	1326.10	N/D	N/D	N/D	N/D
NA2	天然	1640.59	819.29			1639.55(1-); 819.33(2-)	1639.55(1-); 819.33(2-)	1639.55(1-); 819.33(2-)	1639.55(1-); 819.33(2-)
	1 Ox Gal/Man	1638.58	818.28			N/D	N/D	N/D	818.30(2-)
	2 Ox Gal/Man	1636.56	817.27			N/D	N/D	N/D	N/D
	3 Ox Gal/Man	1634.55	816.26			N/D	N/D	N/D	N/D
	4 Ox Gal/Man	1632.53	815.26			N/D	N/D	N/D	N/D
	1 Ox Gal/Man + 1 Conj	2943.91	1470.95	980.29	734.97	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox Gal/Man + 1 Conj	2941.89	1469.94	979.62	734.46	N/D	N/D	N/D	N/D
	1 Ox Gal/Man + 2 Conj	4249.24	2123.61	1415.40	1061.30	N/D	1415.42(3-)	N/D	N/D
	2 Ox Gal/Man + 2 Conj	4247.22	2122.60	1414.73	1060.80	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox Gal/Man + 3	5552.55	2775.27	1849.84	1387.13	N/D	N/D	N/D	N/D

[0408]

基础 结构	寡	理论 Mw (单)	理论 m/z (2-)	理论 m/z (3-)	理论 m/z (4-)	测定的2 mM 高碘 酸盐-处理 的SAM6 Mw	测定的7.5 mM 高碘 酸盐-处理 的SAM6 Mw	测定的 2mM 高碘 酸盐-处理 的 GAA Mw	测定的 7.5mM 高 碘酸盐-处 理的GAA Mw
	Conj								
NA2F	天然	1786.65	892.32			892.34(2-)	892.34(2-)	892.34(2-)	892.34(2-)
	1 Ox Gal/Man/Fuc	1784.63	891.31			N/D	N/D	891.36(2-)	891.31(2-)
	2 Ox Gal/Man/Fuc	1782.62	890.30			N/D	N/D	N/D	890.33(2-)
	3 Ox Gal/Man/Fuc	1780.60	889.29			N/D	N/D	N/D	N/D
	4 Ox Gal/Man/Fuc	1778.59	888.29			N/D	N/D	N/D	N/D
	1 Ox Gal/Man/Fuc + 1 Conj	3089.96	1543.97	1028.98	771.48	N/D	N/D	N/D	N/D
	1 Ox Gal/Man/Fuc + 2 Conj	4395.29	2196.64	1464.09	1097.82	1464.06(3-)	1464.06(3-)	N/D	N/D
	2 Ox Gal/Man/Fuc + 2 Conj	4393.28	2195.63	1463.42	1097.31	N/D	N/D	N/D	N/D
	3 Ox Gal/Man/Fuc + 2 Conj	4391.26	2194.62	1462.75	1096.81	N/D	N/D	N/D	N/D
	3 Ox Gal/Man/Fuc + 3 Conj	5696.59	2847.29	1897.86	1423.14	N/D	N/D	N/D	N/D
A1	天然	1931.69	964.84			N/D	N/D	N/D	N/D
	Ox 唾液酸	1869.65	933.82			933.84(2-)	933.84(2-)	933.84(2-)	933.84(2-)
	Ox 唾液酸+	1867.64	932.81			N/D	N/D	N/D	932.84(2-)

[0409]

基础 结构	寡	理论 Mw (单)	理论 m/z (2-)	理论 m/z (3-)	理论 m/z (4-)	测定的2 mM 高碘 酸盐-处理 的SAM6 Mw	测定的7.5 mM 高碘 酸盐-处理 的SAM6 Mw	测定的 2mM 高碘 酸盐-处理 的 GAA Mw	测定的 7.5mM 高 碘酸盐-处 理的GAA Mw
	1Ox Gal/Man								
	Ox 唾液酸+ 2 Ox Gal/Man	1865.62	931.80			N/D	N/D	N/D	N/D
	Ox 唾液酸+ 3 Ox Gal/Man	1863.60	930.79			N/D	N/D	N/D	N/D
	Ox 唾液酸+ 4 Ox Gal/Man	1861.59	929.79			N/D	N/D	N/D	N/D
	Ox 唾液酸+ 1 Conj	3174.98	1586.48	1057.32	792.74	1586.49(2-); 1057.31(3-)	1586.49(2-); 1057.31(3-)	N/D	N/D
	Ox 唾液酸+ 1 Ox Gal/Man + 1 Conj	3172.96	1585.47	1056.65	792.23	N/D	N/D	N/D	N/D
	Ox 唾液酸+ 1 Ox Gal/Man + 2 Conj	4478.29	2238.14	1491.76	1118.57	N/D	1491.73(3-)	N/D	N/D
	Ox 唾液酸+ 2 Ox Gal/Man/Fuc + 2 Conj	4476.28	2237.13	1491.08	1118.06	N/D	N/D	N/D	N/D
	Ox 唾液酸+ 3 Ox Gal/Man/Fuc + 2 Conj	4474.26	2236.12	1490.41	1117.56	N/D	N/D	N/D	N/D
	Ox 唾液酸+ 1 Ox	5783.62	2890.80	1926.87	1444.90	N/D	1926.86(3-); 1444.89 (4-)	N/D	N/D

[0410]

基础 结构	寡	理论 Mw (单)	理论 m/z (2-)	理论 m/z (3-)	理论 m/z (4-)	测定的2 mM 高碘 酸盐-处理 的SAM6 Mw	测定的7.5 mM 高碘 酸盐-处理 的SAM6 Mw	测定的 2mM 高碘 酸盐-处理 的 GAA Mw	测定的 7.5mM 高 碘酸盐-处 理的GAA Mw
	Gal/Man + 3 Conj								
	Ox 唾液酸+ 2 Ox Gal/Man/Fuc + 3 Conj	5781.61	2889.80	1926.19	1444.39	N/D	N/D	N/D	N/D
A1F	天然	2077.75	1037.87	691.57	518.43	N/D	N/D	N/D	N/D
	Ox 唾液酸	2015.71	1006.85	670.90	502.92	1006.88(2-)	1006.82(2-)	1006.88(2-)	1006.88(2-)
	Ox 唾液酸+ 1 Ox Gal/Man/Fuc	2013.69	1005.84	670.22	502.42	N/D	1005.82(2-)	1005.88(2-)	1005.88(2-)
	Ox 唾液酸+ 2 Ox Gal/Man/Fuc	2011.68	1004.83	669.55	501.91	N/D	N/D	N/D	1004.83(2-)
	Ox 唾液酸+ 3 Ox Gal/Man/Fuc	2009.66	1003.82	668.88	501.41	N/D	N/D	N/D	N/D
	Ox 唾液酸+ 4 Ox Gal/Man/Fuc	2007.65	1002.82	668.21	500.90	N/D	N/D	N/D	N/D
	Ox 唾液酸+ 1 Conj	3321.04	1659.51	1106.00	829.25	1659.56(2-); 1106.02(3-)	1659.51(2-); 1106.03(3-)	N/D	N/D
	Ox 唾液酸+ 1 Ox Gal/Man + 1 Conj	3319.02	1658.50	1105.33	828.75	N/D	1658.50(2-)	N/D	N/D
	Ox 唾液酸+ 1 Ox Gal/Man/Fuc	4624.35	2311.17	1540.44	1155.08	1540.45(3-)	1540.45(3-)	N/D	N/D

[0411]

基础 结构	寡	理论 Mw (单)	理论 m/z (2-)	理论 m/z (3-)	理论 m/z (4-)	测定的2 mM 高碘 酸盐-处理 的SAM6 Mw	测定的7.5 mM 高碘 酸盐-处理 的SAM6 Mw	测定的 2mM 高碘 酸盐-处理 的 GAA Mw	测定的 7.5mM 高 碘酸盐-处 理的GAA Mw
	+ 2 Conj								
	Ox 唾液酸 + 1 Ox Gal/Man/Fuc + 3 Conj	5929.68	2963.83	1975.55	1481.41	N/D	1481.40(4-)	N/D	N/D
A2	天然	2222.78	1110.38	739.92	554.69	N/D	N/D	N/D	N/D
	1 Ox 唾液酸	2160.75	1079.37	719.24	539.18	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox 唾液酸	2098.71	1048.35	698.56	523.67	N/D	1048.33(2-)	1048.36(2-)	N/D
	2 Ox 唾液酸 + 1 Ox Gal/Man	2096.69	1047.34	697.89	523.17	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox 唾液酸 + 2 Ox Gal/Man	2094.68	1046.33	697.22	522.66	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox 唾液酸 + 3 Ox Gal/Man	2092.66	1045.32	696.55	522.16	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox 唾液酸 + 4 Ox Gal/Man	2090.65	1044.32	695.87	521.65	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox 唾液酸 + 1 Conj	3404.04	1701.01	1133.67	850.00	N/D	1700.98(2-); 1133.67(3-)	N/D	N/D
	2 Ox 唾液酸 + 2 Conj	4709.37	2353.68	1568.78	1176.33	1568.77(3-)	1568.77(3-)	N/D	N/D
	2 Ox 唾液酸 + 1 Ox Gal/Man + 1 Conj	3402.02	1700.00	1133.00	849.50	N/D	N/D	N/D	N/D

[0412]

基础 结构	寡	理论 Mw (单)	理论 m/z (2-)	理论 m/z (3-)	理论 m/z (4-)	测定的2 mM 高碘 酸盐-处理 的SAM6 Mw	测定的7.5 mM 高碘 酸盐-处理 的SAM6 Mw	测定的 2mM 高碘 酸盐-处理 的 GAA Mw	测定的 7.5mM 高 碘酸盐-处 理的GAA Mw
	2 Ox 唾液酸 + 1 Ox Gal/Man + 2 Conj	4707.35	2352.67	1568.11	1175.83	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox 唾液酸 + 2 Ox Gal/Man/Fuc + 2 Conj	4705.34	2351.66	1567.44	1175.33	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox 唾液酸 + 3 Ox Gal/Man/Fuc + 2 Conj	4703.32	2350.65	1566.77	1174.82	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox 唾液酸 + 1 Ox Gal/Man + 3 Conj	6012.68	3005.33	2003.22	1502.16	N/D	N/D	N/D	N/D
A2F	天然	2368.84	1183.41	788.61	591.20	N/D	N/D	N/D	N/D
	1 Ox 唾液酸	2306.80	1152.39	767.93	575.69	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox 唾液酸	2244.77	1121.38	747.25	560.18	N/D	1121.36(2-)	1121.38(2-)	1121.38(2-)
	2 Ox 唾液酸 + 1 Ox Gal/Man/Fuc	2242.75	1120.37	746.58	559.68	N/D	1120.36(2-)	N/D	1120.36(2-)
	2 Ox 唾液酸 + 2 Ox Gal/Man/Fuc	2240.74	1119.36	745.90	559.18	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox 唾液酸 + 3 Ox Gal/Man/Fuc	2238.72	1118.35	745.23	558.67	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox 唾液酸	2236.71	1117.34	744.56	558.17	N/D	N/D	N/D	N/D

[0413]

基础 结构	寡	理论 Mw (单)	理论 m/z (2-)	理论 m/z (3-)	理论 m/z (4-)	测定的2 mM 高碘 酸盐-处理 的SAM6 Mw	测定的7.5 mM 高碘 酸盐-处理 的SAM6 Mw	测定的 2mM 高碘 酸盐-处理 的 GAA Mw	测定的 7.5mM 高 碘酸盐-处 理的GAA Mw
	+ 4 Ox Gal/Man/Fuc								
	2 Ox 唾液酸 + 1 Conj	3550.10	1774.04	1182.36	886.52	1182.33(3-)	1774.00(2-); 1182.33(3-)	N/D	N/D
	2 Ox 唾液酸 + 2 Conj	4855.43	2426.71	1617.47	1212.85	1617.47(3-)	1617.44(3-)	N/D	N/D
	2 Ox 唾液酸 + 1 Ox Gal/Man/Fuc + 2 Conj	4851.40	2424.69	1616.12	1211.84	N/D	1616.77(3-)	N/D	N/D
	2 Ox 唾液酸 + 2 Ox Gal/Man/Fuc + 2 Conj	4849.38	2423.68	1615.45	1211.34	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox 唾液酸 + 1 Ox Gal/Man/Fuc + 3 Conj	6158.74	3078.36	2051.91	1538.68	N/D	2051.89(3-); 1538.66(4-)	N/D	N/D
	2 Ox 唾液酸 + 1 Ox Gal/Man/Fuc + 4 Conj	7624.11	3811.05	2540.36	1905.02	N/D	N/D	N/D	N/D

[0414] 质量精度 > 20ppm 测定用于所有寡糖物质。MS 结果一致于单糖组成分析,这显示唾液酸的氧化在 ≥ 1 mM 高碘酸盐完成。甘露糖和岩藻糖的一些氧化也出现。对应于 1 和 2 摩尔的聚糖 / 氧化的甘露糖和 / 或岩藻糖的缀合的离子也测得,这表明各种的两种醛物质都还原为聚糖,如用于 AA 测定的。

[0415] 高甘露糖结构 (寡甘露糖 5 和 6) 的一些缀合在 2 和 7.5mM 高碘酸盐 - 处理的物质中检测。在用 2mM 高碘酸盐缀合的物质中,在 A1 (单唾液酸) 物质中观察到 0 或 1 缀合的聚糖,同时对应于 0, 1, 2 和 3 缀合的聚糖的离子测定在 A1 物质中,其在 7.5mM SAM6 中。该结果暗示使用 7.5mM 高碘酸盐 (但不是 2mM),核心甘露糖和 / 或半乳糖残基的一些氧化和缀合发生在 A1 结构。

[0416] 对于 A2 和 A2F 物质 (双唾液酸化,二线式,± 岩藻糖),单 - 和双 - 缀合的物质

测定在 2 和 7.5mM 高碘酸盐样品。三-缀合氧化的甘露糖的证据观察到仅在 7.5mM 高碘酸盐-处理的样品中,而不是在 2mM 处理中,这一致于以增高的高碘酸盐浓度通过岩藻糖的缀合。

[0417] 图 11A 示出从 rhGAA 和 NeoGAA 释放的寡糖的 HPLC 分析。对于 rhGAA 对照,大部分 N-连接的寡糖物质在 11-13 分钟洗脱,该区域对应于没有磷酸化或缀合的寡糖。对于 NeoGAA 寡糖,双-缀合的寡糖物质在 19-20 分洗脱,单-缀合的寡糖物质在 15-18 分钟洗脱,氧化/未修饰的寡糖在 10-13 分钟洗脱。在使用 7.5mM 高碘酸盐制备的 SAM6 样品中,大约一半的寡糖发现在这样的区域洗脱,该区域对应于双-缀合的物质,而来自 2mM 高碘酸盐-处理的样品的大约 1/3 的寡糖是双-缀合。这些样品的洗脱特性一致于它们的缀合水平(~7 和 9 摩尔聚糖缀合物/摩尔 NeoGAA,分别对于 2 和 7.5mM 高碘酸盐产生的 SAM6),这通过 MAL 二-TOF 和甘露糖-6-磷酸酯含量分析来测定。

[0418] 为了提高更好的可视化和定量比较寡糖存在的结构,释放的寡糖通过高 pH 阴离子交换色谱法来进行分析,其具有脉冲电流检测 (HPAEC-PAD)。样品通过 HPAEC-PAD 在 Dionex CarboPac PA100 柱上进行,使用在 100mM 氢氧化钠中的乙酸钠梯度。寡糖峰鉴定通过下列方式来证实:离线部分收集,透析 vs. 水,使用在线 MS 分析通过正向 HPLC 来分析。

[0419] 图 11B 示出代表性 HPAEC-PAD 曲线,其具有鉴定的峰(通过 MS 测定)。图 11C 示出通过 2 和 7.5mM 高碘酸盐-处理的 rhGAA 和 NeoGAA SAM6 样品的 HPAEC-PAD 的寡糖曲线。

[0420] D. rhGAA 蛋白主链分析、接着用高碘酸盐处理

[0421] 为了观察 NeoGAA 的蛋白主链的潜在修饰,进行肽映射 LC/MS。使用 0, 2, 7.5 和 22.5mM 高碘酸盐产生的 NeoGAA SAM6 利用胰蛋白酶来制备,并且通过具有 LCT 飞行时间质谱仪的反相 HPLC 来分析。潜在的肽修饰例如半胱氨酸,甲硫氨酸,色氨酸,酪氨酸和组氨酸残基的氧化以及天冬酰胺的去酰胺化使用 BioPharmalynx 软件来评价。检测的仅有明显的修饰是数个不同的位点的甲硫氨酸的氧化。肽 T13(含有甲硫氨酸 172 和 173)的氧化水平,然后用 0, 2 和 22.5mM 高碘酸盐处理示于图 12。

[0422] 显著水平的氧化发现在甲硫氨酸残基 122, 172 和 173。这些甲硫氨酸残基的氧化通过 LC/MS/MS 分析来证实。低水平的氧化也观察到以高碘酸盐依赖性方式在甲硫氨酸 363 发生,在试图最小化高碘酸盐氧化时,高碘酸盐浓度滴定至 1 和 7.5mM 的水平,其氧化在最容易受影响的位点(肽 T13)并通过 LC/MS 监控。明显水平的甲硫氨酸氧化观察在高碘酸盐浓度大于 1mM,从而表明 rhGAA 中的甲硫氨酸易于氧化为唾液酸残基。

[0423] 在 GAM 缀合的过程中,由 GAO 氧化的半乳糖导致 Met172/173 的~26%氧化。当过氧化氢酶以 2 和 50 单位/mg GAA 包含在氧化反应中时,消除甲硫氨酸氧化。

[0424] 实施例 8 :GAA 缀合物的体外特性

[0425] 如实施例 7 中所述使用来自实施例 2 的化合物 17 和 7.5mM 高碘酸盐来制备 NeoGAA SAM2。在和二糖 17 缀合之前,通过用半乳糖氧化酶处理 rhGAA 来制备半乳糖-缀合的 NeoGAA GAM2。类似地,还制备三糖 NeoGAA SAM3(化合物 35,实施例 3)、四糖 NeoGAAs SAM4(化合物 28,实施例 4A)和线性 SAM4(化合物 47,实施例 4B)。另外,使用实施例 7 中所述的化合物 77、利用 2 和 7.5mM 高碘酸盐来制备己糖 NeoGAA β SAM6。还制备另外的己糖缀合物 α SAM6(α 连接,通过唾液酸残基缀合)和 GAM6(通过半乳糖残基缀合)。

[0426] A. 比活性:

[0427] 活性分析是通过监测合成底物 p- 硝基苯基 -D- α - 吡喃葡萄糖苷 (p-NP), 如由 rhGAA 和 NeoGAA 催化的水解速率来进行的。释放的发色团是衡量在碱性条件下在 400 纳米的吸收。一个活性单位定义为在定义的测定条件下在 37°C 每分钟将 1 μ mol 的 p- 硝基苯基 -D- α - 吡喃葡萄糖苷水解为 p- 硝基苯酚所需的酶量。

[0428] NeoGAAs SAM2, SAM3, SAM4, 线性 SAM4, α SAM6 和 β SAM6 的比活性示于图 13。另外, 使用 SAM 法 vs. GAM 法制备的缀合物的比活性进行了评价。在 M6P 数量 /GAA 和 NeoGAA 缀合物的比活性之间有负相关关系, NeoGAA 缀合物在小规模的制备, 并且 16.6- 倍摩尔过量的寡糖 /GAA。损失的 GAA 活性也观察到越来越多的 SAM 或 GAM 缀合物的 M6P 含量分别在 NeoGAA 浓度滴定实验期间共轭 (从 2.5 到 33- 倍摩尔过量的寡糖)。对于 SAM, GAA 活性 49-81% (相比于对照), 各种 NeoGAAs 载 6-8 寡糖分子 / 蛋白。SAM, 并且具有 4-6 寡糖 / 蛋白。

[0429] B. M6P 受体结合:

[0430] 功能的共轭效应进行了评价监测 NeoGAA 结合的水溶性阳离子独立甘露糖 -6- 由 Biacore 和 M6P 受体柱亲和高效液相色谱法, 磷酸酯受体 (sCIMPR) 和在 L6 成肌细胞细胞吸收。sCIMPR, 从牛血清纯化, 包含 AX 的外域, 而缺乏跨膜部分。

[0431] 为了 Biacore 分析, sCIMPR 胺耦合 CM-5 芯片, 10 微克 / 毫升的 NeoGAA 装上样品的表面和提高甘露糖 -6 浓度洗脱 - 磷酸酯。亲和力是量化的 M6P 所需浓度, 以取代 50NeoGAA% 约束 (EC50 值)。该方法是用来监测对受体亲和力共轭和氧化作用。

[0432] 图 14 显示了 Biacore 分析结果。注射到 sCIMPR 固定化 Biacore 导致了 ~ 250 芯片反应增加 10 微克 / 毫升 NeoGAA, 而同样数量的 rhGAA 造成约 100 茹偏转。另外, 约 10 倍的 M6P 要求洗脱浓度比 rhGAA NeoGAA (约 0.1 对比 1.0 毫米的 EC50 值 rhGAA 和 NeoGAA, 分别)。线性关系 ($R^2 > 0.95$) 之间的 EC50 值和共轭水平 NeoGAA 准备用 2 个和 7.5 毫米高碘酸盐。在整个检查共轭范围 (1.6-2 毫米高碘酸盐的制备和 1.0 4.7 摩尔聚糖 / 摩尔 NeoGAA-8.5 摩尔聚糖 / 摩尔为 7.5 毫米高碘酸钠制剂), 共轭级别的亲和力的影响类似与 2 和 7.5 毫米高碘酸盐准备 NeoGAA。

[0433] M6P 受体结合高效液相色谱法进行了评估使用 M6P 受体柱固载于 PorosEP 树脂, 然后将其纳入分析 HPLC 柱包装。rhGAA 和 NeoGAA 洗脱利用 0.25, 0.85, 5 和 20mM M6P 制备 (图 15A 和 B)。在一个试验中, 将 SAM2 和 GAM2 比较于 β SAM6 和 GAM6 (图 15C)。SAM6 和 GAM6 要求 20 毫米 M6P 前的材料大部分是洗脱 (> 95% 的缀合物结合到柱上)。SAM2 和约束较少紧密结合在 5mm M6P (> 95% 结合到柱上) 洗脱多数 GAM2。

[0434] 另外, NeoGAA 缀合物 SAM2, SAM3, SAM4, 线性 SAM4 和 α SAM6 进行了评价 M6P 受体结合 (图 15D)。大多数的 SAM2, SAM3, 都 SAM4 缀合物与 5mm 的 M6P 洗脱, 而同时 SAM6 缀合物需要 20mm 的 M6P。

[0435] NeoGAA 缀以不同数量的共轭合物进行了评价 (图 15E)。该 NeoGAA 在束缚分数比例是一贯 > 95% 与 > 2.0 摩尔每摩尔 NeoGAA 缀合物聚糖这些准备工作四在这共轭水平较低 (1.0-1.7 摩尔聚糖) 数分数, 绑定的分数为 75-90% 之间。为 NeoGAA M6P 列剖面也显示比 rhGAA 高亲和力的物种数量最大。具体而言, 将大部分结合的 rhGAA 用 0.2 毫米 M6P 洗脱, 而 20 毫米 M6P 需要从柱上洗脱 NeoGAA。共轭对高亲和力物种的百分比水平的整体效果之间是相似的 2.0 和 7.5 毫米高碘酸盐处理。

[0436] 图 15F 示出改变量的 M6P 的效果。下列量的 M6P 的含有的 SAM6 缀合物：SAM6-1 (4.9mol M6P/mol rhGAA)，SAM6-2 (7.4mol M6P/mol rhGAA)，SAM6-3 (10.5mol M6P/mol rhGAA)，SAM6-4 (11.2mol M6P/mol rhGAA) 和 SAM6-5 (16.6mol M6P/mol rhGAA)。统计学差异由下列表示：[^]、* 和 ***, 并且表示 $p < 0.05$ 分别比较于 100mg/kg rhGAA, SAM6-1 和 SAM6-3。

[0437] C. L6 成肌细胞的内在化

[0438] 进行 L6 成肌细胞摄取测定, 如 Zhu 等, J. Biol. Chem. 279 :50336-50341 (2004) 中所述, 以证实 rhGAA 和 NeoGAA 通过阳离子非依赖性甘露糖-6-磷酸酯受体 (CIMPR) 途径靶向于成肌细胞。在 L6 成肌细胞摄取测定中, rhGAA 和 NeoGAA 加入 +/-5mM M6P 至孔中的培养基, 含有 L6 成肌细胞, 并且温育预定过夜。在温育后, 细胞裂解并使用 4-MU 配糖体底物来测定活性, 通过微-BCA 测定来测定蛋白浓度, 从而产生酶剂量应答曲线。

[0439] L6 成肌细胞摄取测定的结果示于图 16。SAM2 和 GAM2 缀合物显示比未修饰的 rhGAA 明显更好的摄取, 但不如双-磷酸化 SAM6 或 GAM6 缀合物 (图 16, 上组) 那样高。还测试 NeoGAAs SAM2, SAM3, SAM4, 线性 SAM4 和 α SAM6 的摄取 (图 16, 下组)。在类似的试验中, 实施例 7 的赖氨酸-硫醇缀合物产生 ~ 8- 倍增加的摄取。

[0440] 实施例 9 : 新 GAA 缀合物的体内效果

[0441] 某些 NeoGAA 缀合物的体内效果在 GAA 敲除小鼠模型中进行, 如 Raben 等 J. Biol. Chem. 273 (30) :19086-92 (1998) 中所述。六只小鼠的组均每周处理一次, 共四周, 如下所示:

[0442]

组	GAA	剂量 (mg/kg)
1	媒介物 (重复 SAM2, SAM4 和 SAM6 试验)	--
2	Myozyme (重复 SAM2, SAM4 和 SAM6 试验)	20
3	Myozyme (重复 SAM2, SAM4 和 SAM6 试验)	100
4	SAM2	4
5	SAM2	20
6	SAM4	4
7	SAM4	20
8	α SAM6	4
9	α SAM6	20
10	β SAM6 (7.5mM 高碘酸盐)	4

11	β SAM6 (7.5mM 高碘酸盐)	20
12	β SAM6 (2mM 高碘酸盐)	4
13	β SAM6 (2mM 高碘酸盐)	20

[0443]

[0444] 样品采自心脏, 四头肌, 和三头肌, 并组织糖原含量测量了 SAM2, SAM4。结果和 SAM6 动物都分别显示在图 17, 18 和 19。实验重复使用为 12SAM6 缀合物的动物群体, 确认 SAM6 缀合物以上五倍, 比未经改造的 rhGAA 更有效的。

[0445] SAM 和 GAM 己糖缀合物进行了比较, 采用六组小鼠接受媒介物, 20, 60 或 100 毫克 / rhGAA 或 4 个, 12 公斤或 20 毫克 / 公斤一次, 四周 SAM6 或 GAM6。心脏, 四头肌, 三头肌隔膜和腰肌收获和糖原含量进行分析。图 20 显示了本研究的结果。药代动力学和药效学研究: 30GAA 敲除小鼠 (雄 15 例, 雌 15), 3-6 个月的年龄 (获得自 Charles River Laboratories, Wilmington, MA)。动物进行分组住在 25°C 下一个 12 小时的光 / 暗周期湿度保持。所有的动物都可以免费获得食物 (PicoLab [®] Rodent Diet 20) 和水。动物随机分成 3 组, 5 雄 5 雌 / 组剂量为 10 组, 每剂量组小鼠总计。收到 20 个团体的 rhGAA, 自由亚齐运动和 SAM 缀合物单一静脉注射毫克 / 公斤。对药代动力学分析血液样本收集 5, 15, 30, 60, 120, 240 和 480 分钟通过对清醒小鼠眼窝丛后剂量。血清 rhGAA 浓度, 确定使用的 GAA 活性测定。结果显示在图 20B。

[0446] 实施例 10 : 酸性神经磷脂酶的缀合物的合成

[0447] 在杆状病毒表达体系或中华仓鼠卵巢细胞中表达的重组人酸性神经磷脂酶 (rhASM) 具有带游离的巯基的 C- 末端半胱氨酸。参见 Lansmann 等, Eur. J. Biochem. 270 : 1076-1088 (2003) ; Qiu 等, J. Biol. Chem. 278 : 32744-32752 (2003)。rhASM 可通过该游离巯基偶联任何寡糖 1-127, 其中寡糖包含接头和硫醇 - 反应基团, 根据美国临时专利申请 No. 60/885, 457 或实施例 6 中所述的方法。

[0448] 实施例 11 : α -L- 艾杜糖苷酸酶的缀合物的合成

[0449] α -L- 艾杜糖苷酸酶偶联寡糖 1-127 中的任一者, 其中寡糖包含接头, 含丙二醛反应基团, 根据 Lee 等, Pharm. Res. 20 : 818-825 (2003) 中所述的方法。 α -L- 艾杜糖苷酸酶和寡糖在氰基硼氢化钠作为还原剂存在下在室温 pH 5.5 下偶联 1 天。然后通过透析或超滤从反应混合物除去小分子。

[0450] 此处引用的所有参考文献通过提述以其整体并入本文。当通过提述并入的出版物和专利或专利申请与说明书所包含的发明达到矛盾的程度时, 本说明书将替代任何矛盾的材料。

[0451] 说明书和权利要求书中使用的所有表达成分的量, 反应条件等的数字被理解为在所有情况下被术语“约”修饰, 其中约表示, 例如, $\pm 5\%$ 。因此, 除非有相反表示, 说明书和所附权利要求书中所列的数值参数为近似值, 其可依赖于寻求通过本发明获得的理想性质而变化。至少, 没有任何意图将等同原则的应用限制于权利要求的范围, 每个数值参数应该参照有效数字的数目和普通圆整的近似值来加以理解。

[0452] 可对本发明进行许多修改和变化, 而不背离它的精神和范围, 这对于本领域的那

些技术人员是显而易见的。本文所述的具体实施方案仅通过举例方式提供,并不意味着以任何方式限制。意指本说明书和实施例被视为仅仅是示例性的,而本发明的真实范围和精神由所附权利要求书限定。

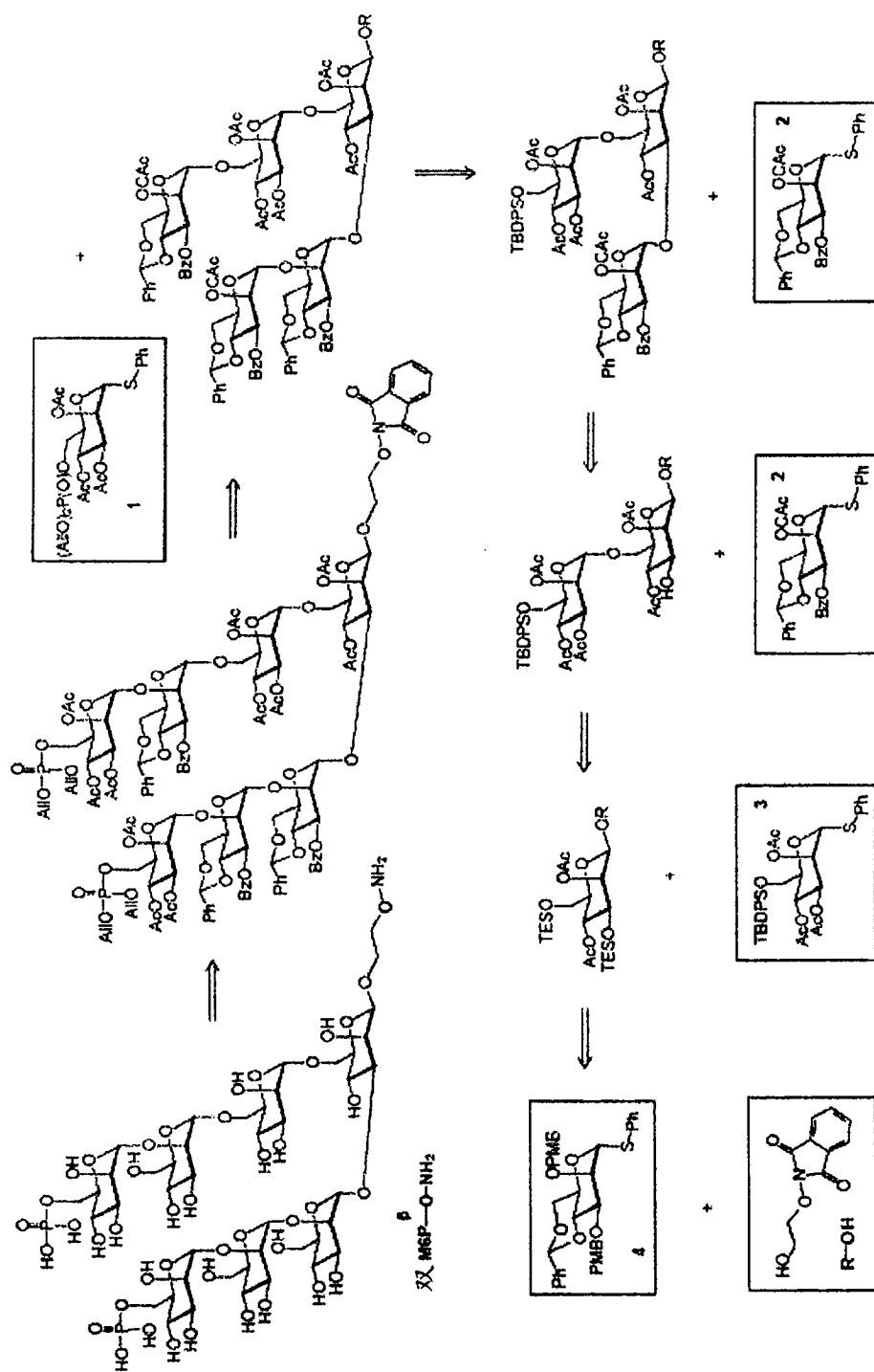


图 1

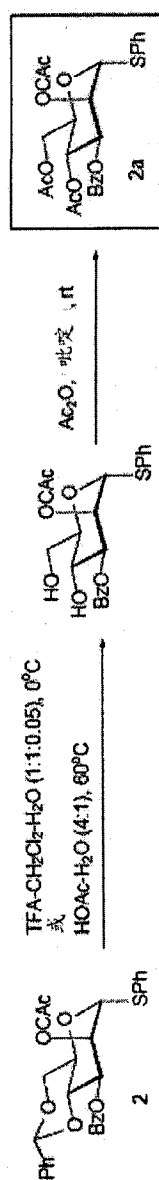


图 2

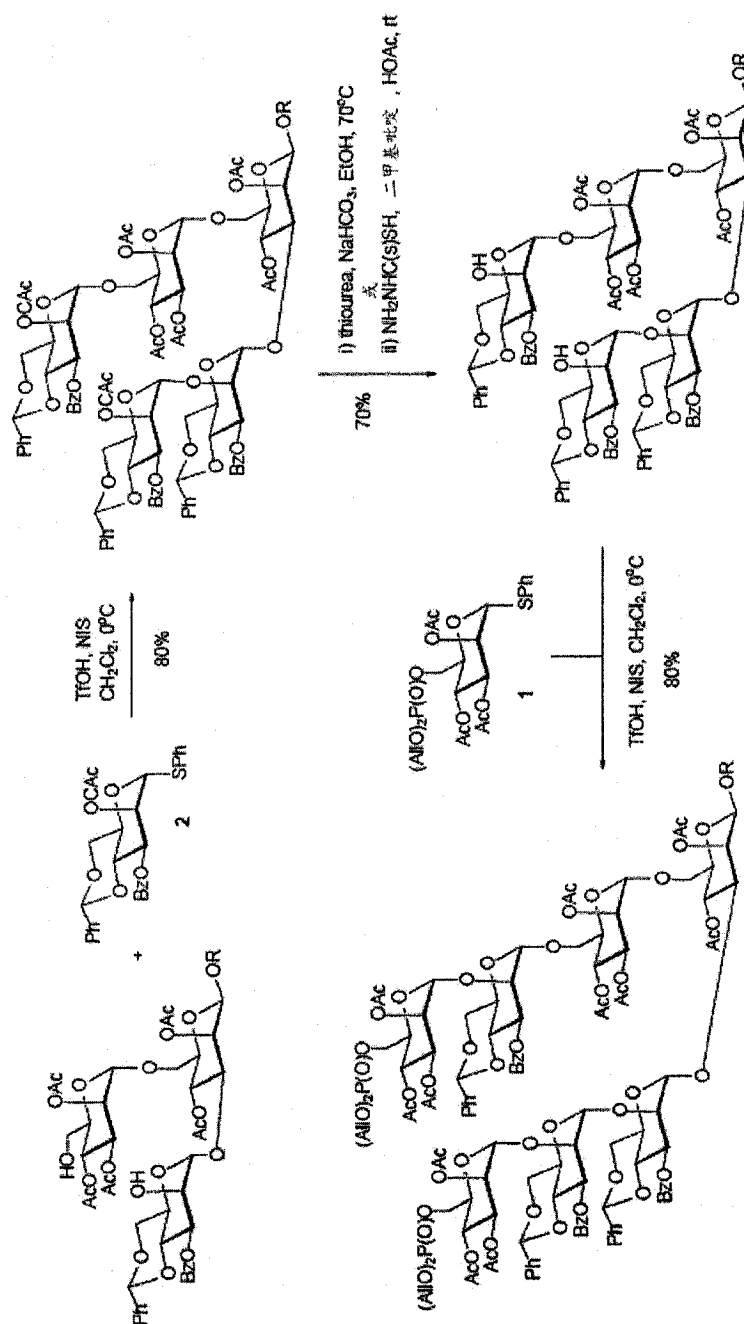


图 6

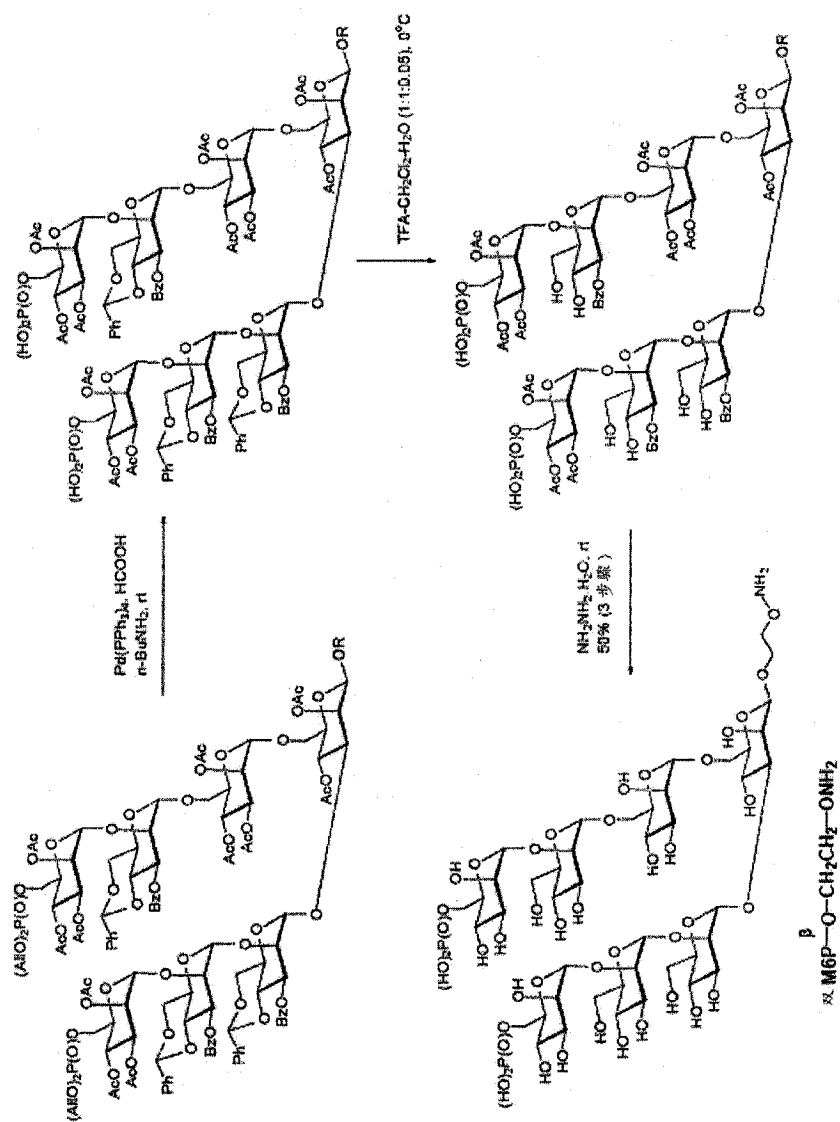


图 7

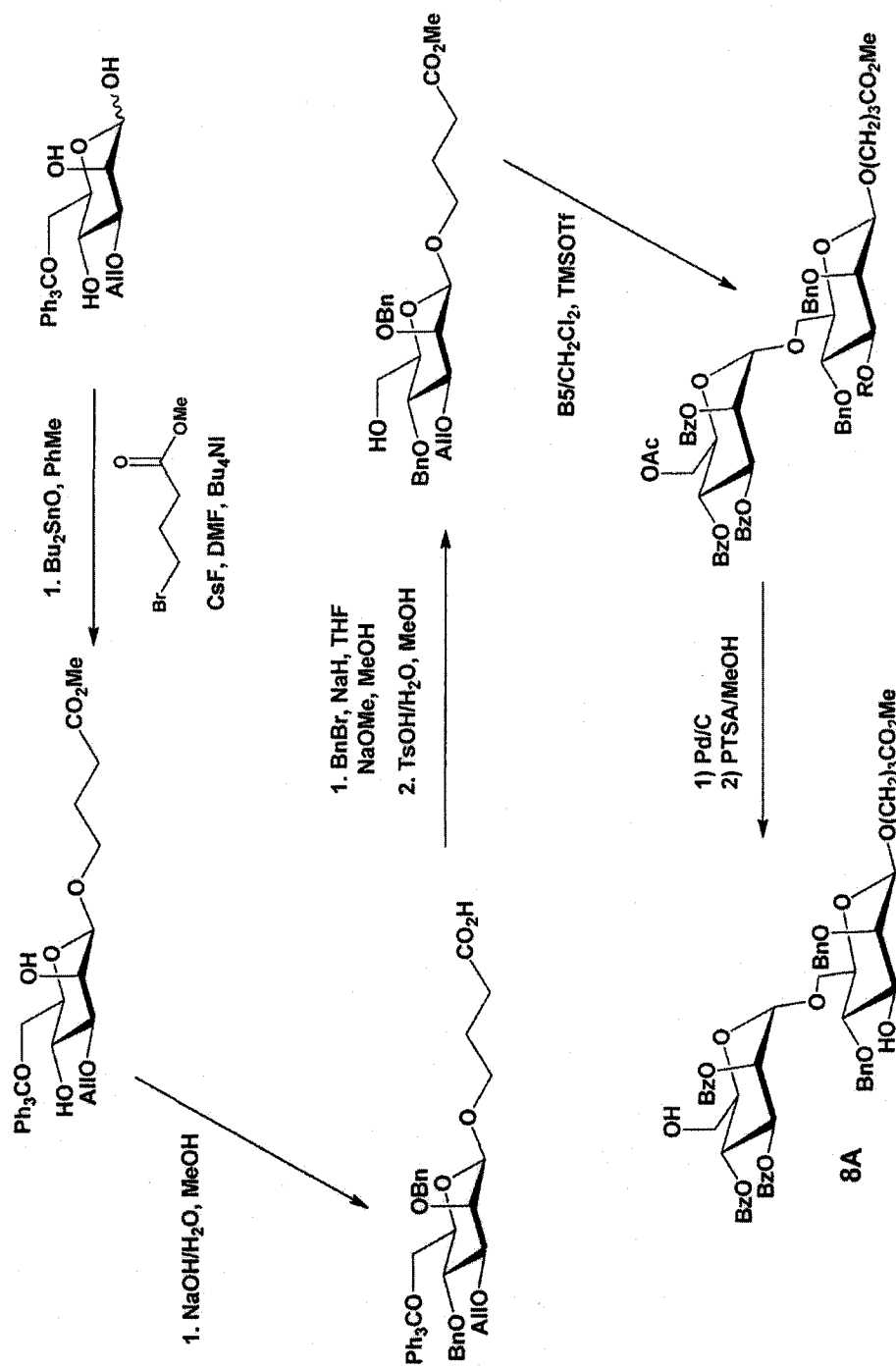


图 8A

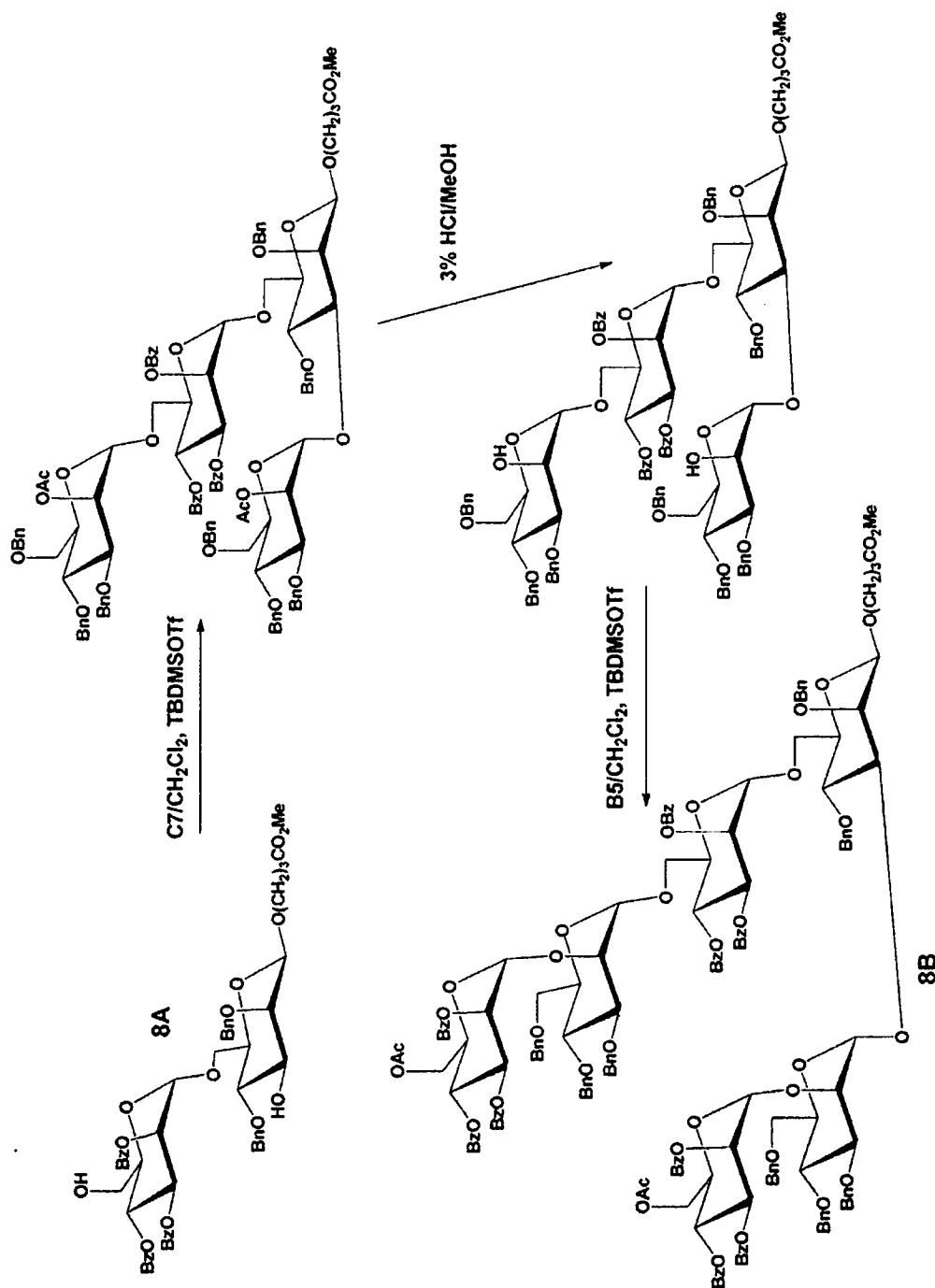


图 8B

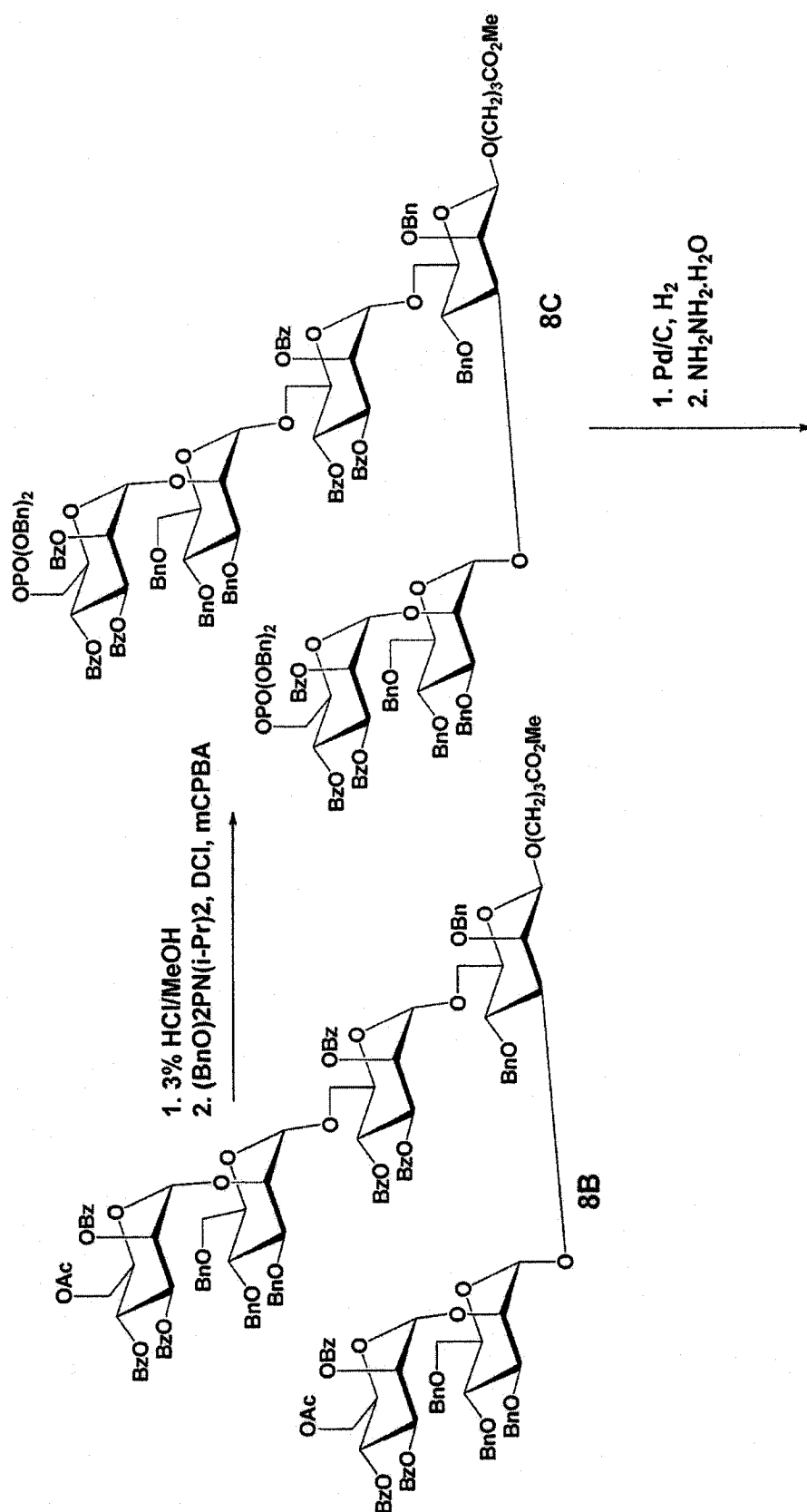


图 8C

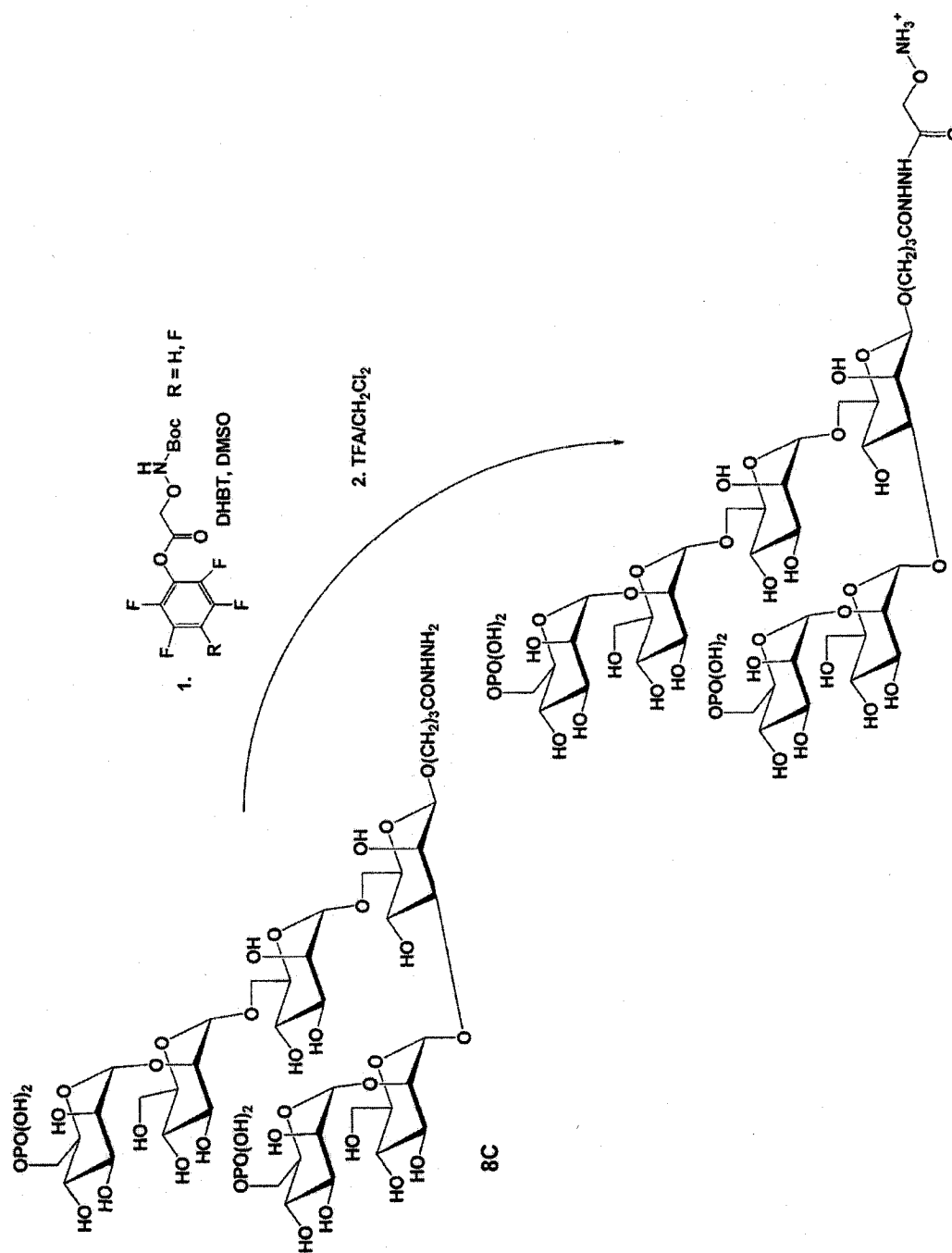


图 8D

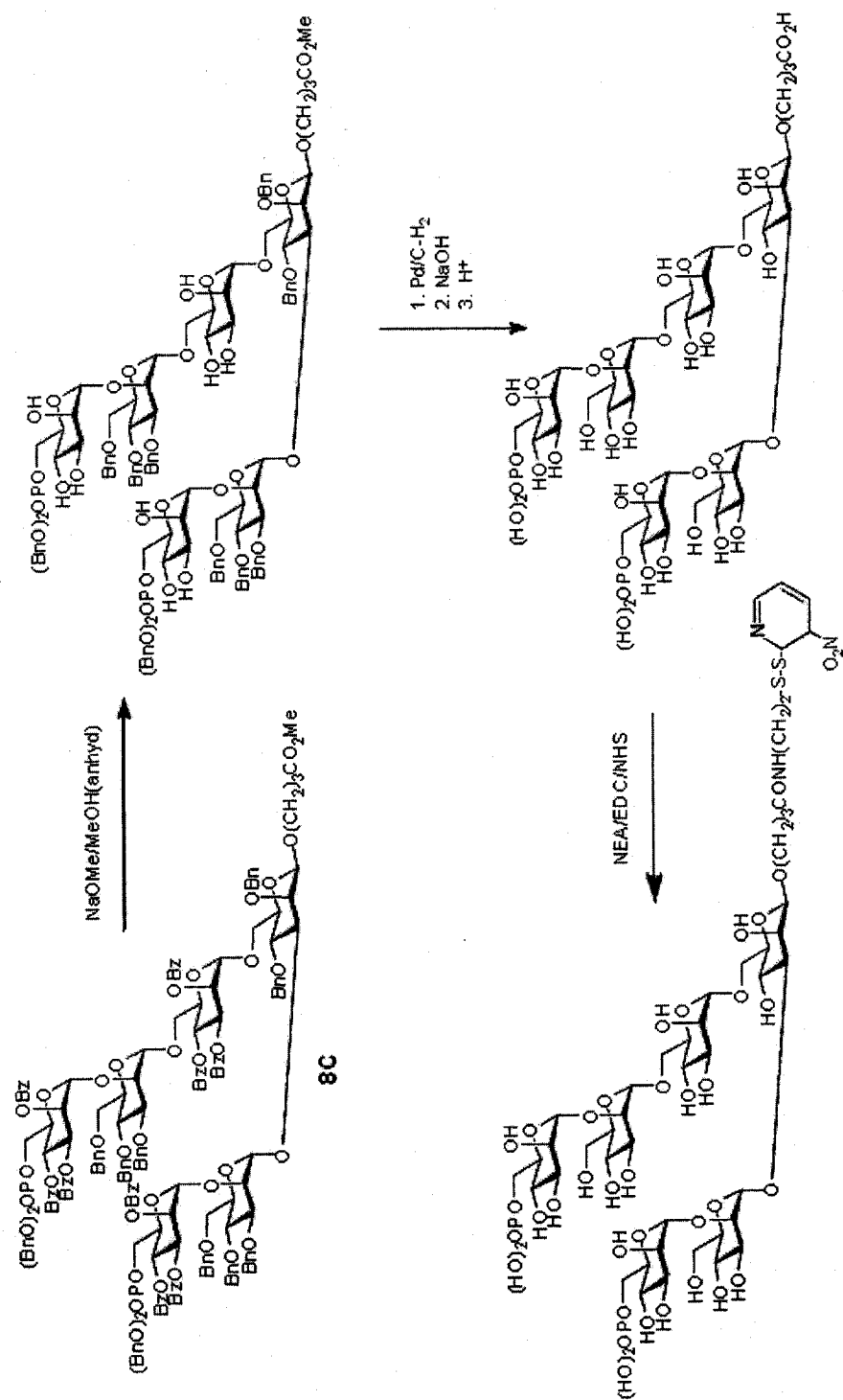


图 8E

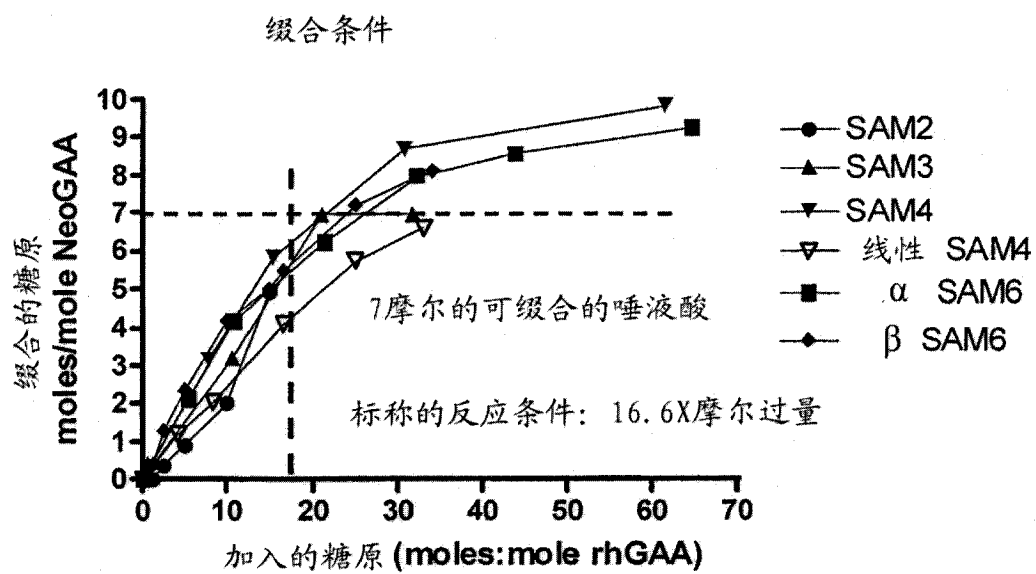


图 9A

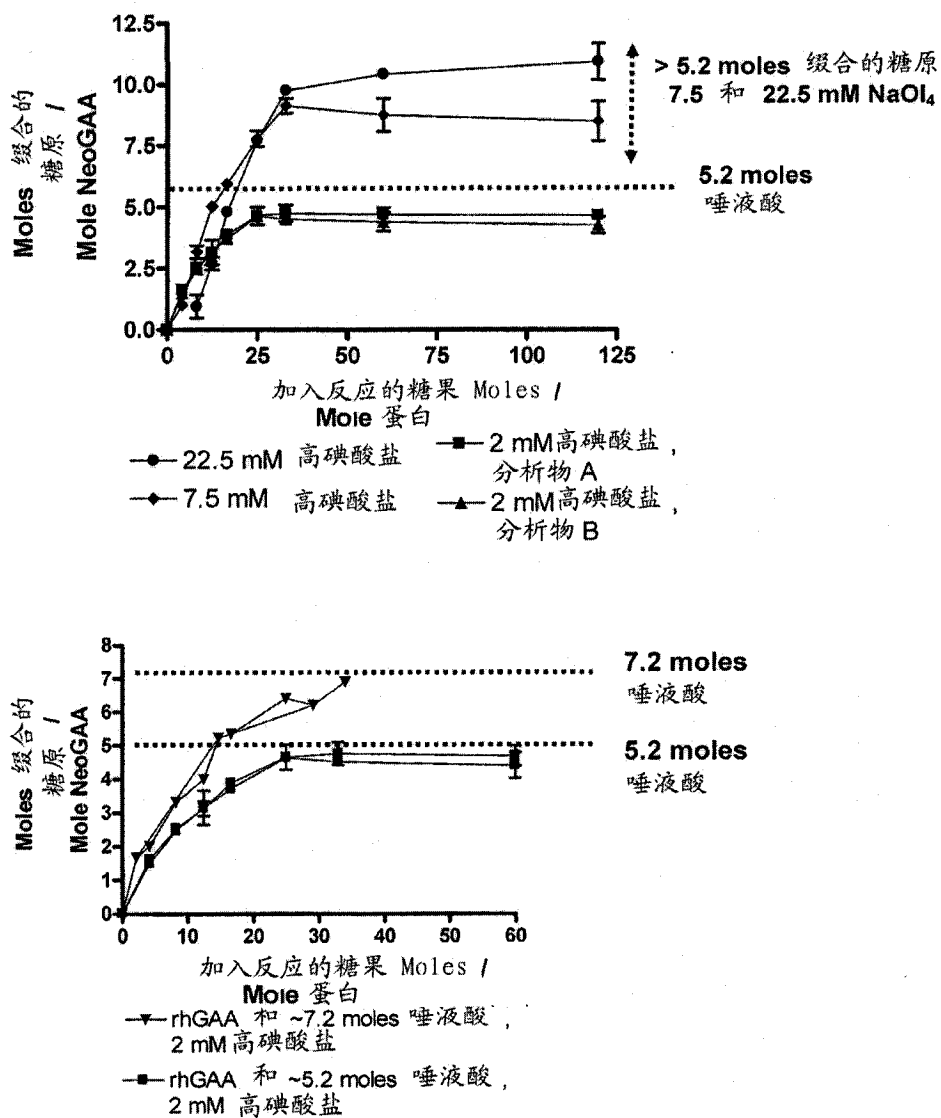


图 9B

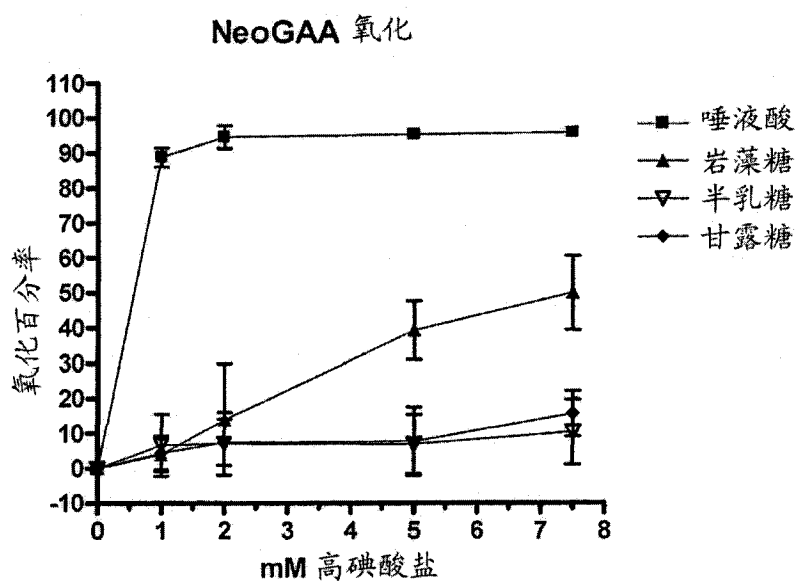


图 10A

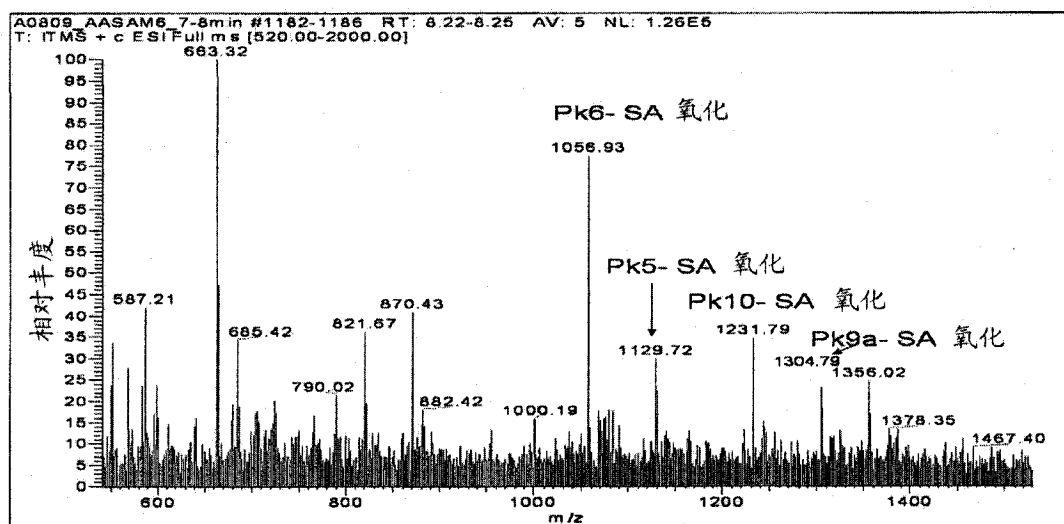
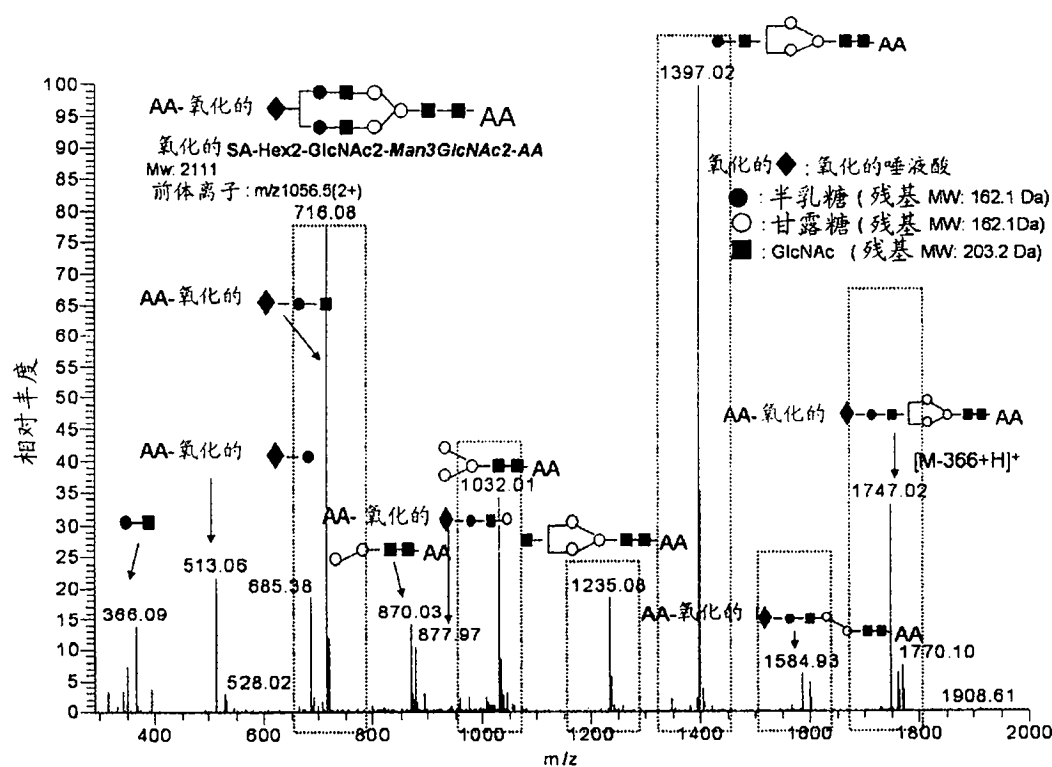


图 10B



注：“”表示氧化的唾液酸；“”表示半乳糖
(残基 MW: 162.1Da); “”表示甘露糖 (残基 MW: 162.1Da); “”
表示GlcNAc (残基 MW: 203.2Da); “AA”表示邻氨基苯甲酸
(残基 MW: 120.1Da)

图 10C

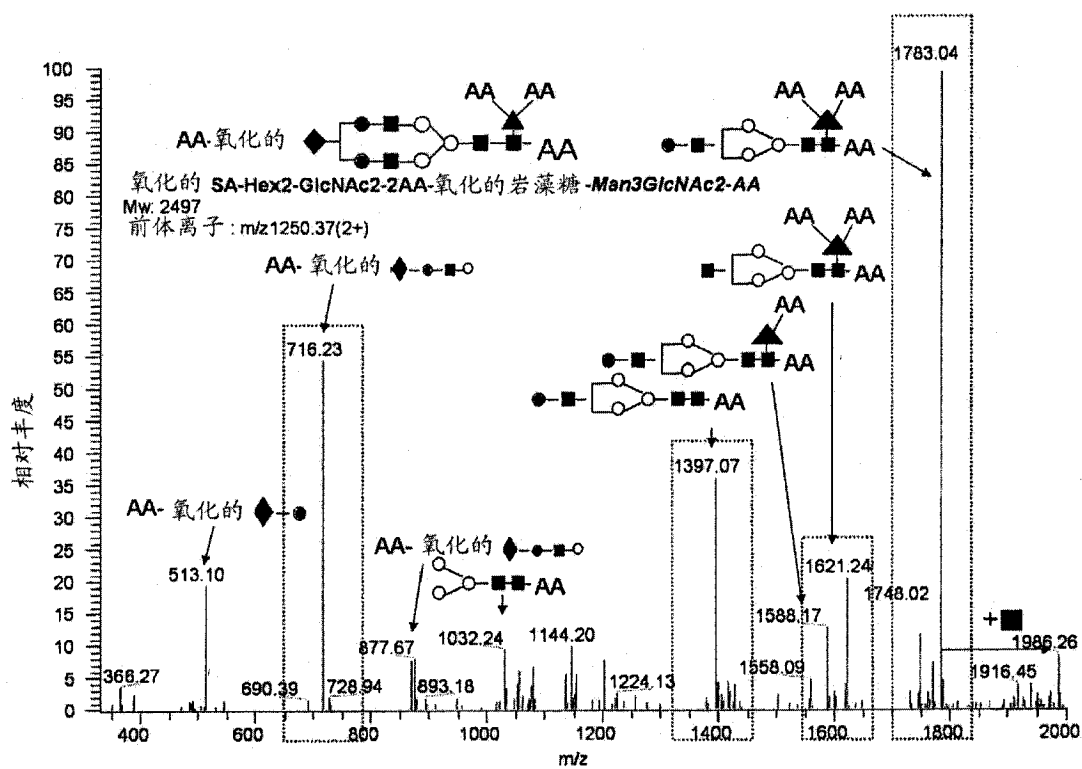


图 10D

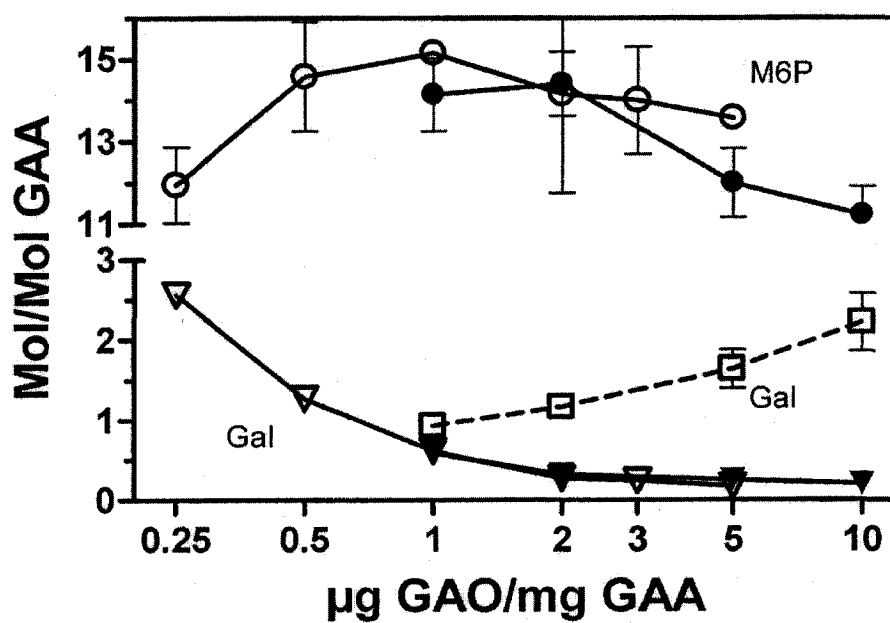
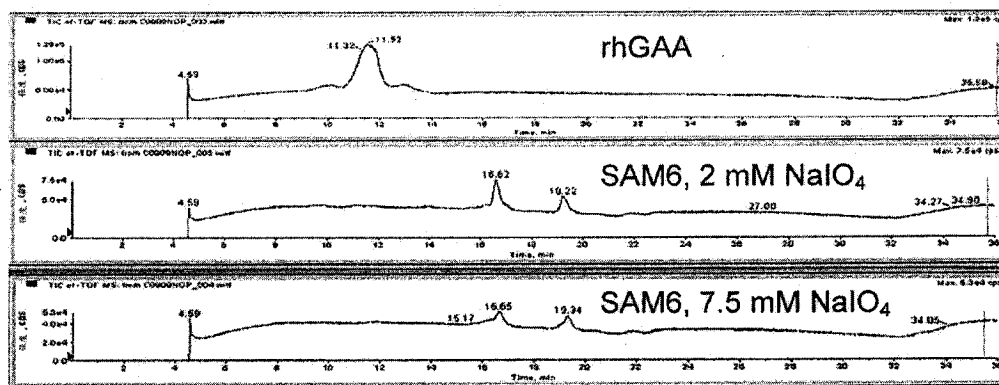


图 10E



PNase F释放的天然寡糖的正向HPLC分析的总离子色谱(TIC)，所述寡糖来自使用2和7.5 mM的高碘酸盐制备的rhGAA和NeoGAA SAM6。

图 11A

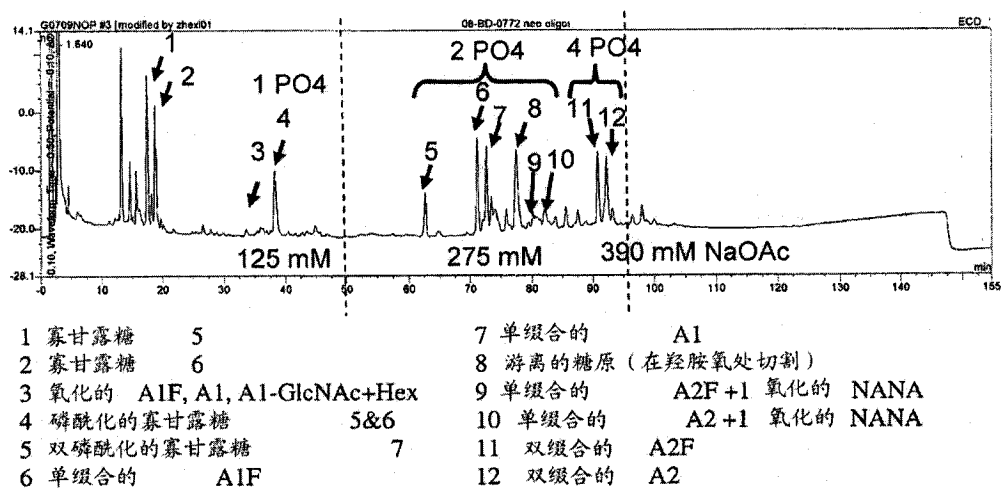


图 11B

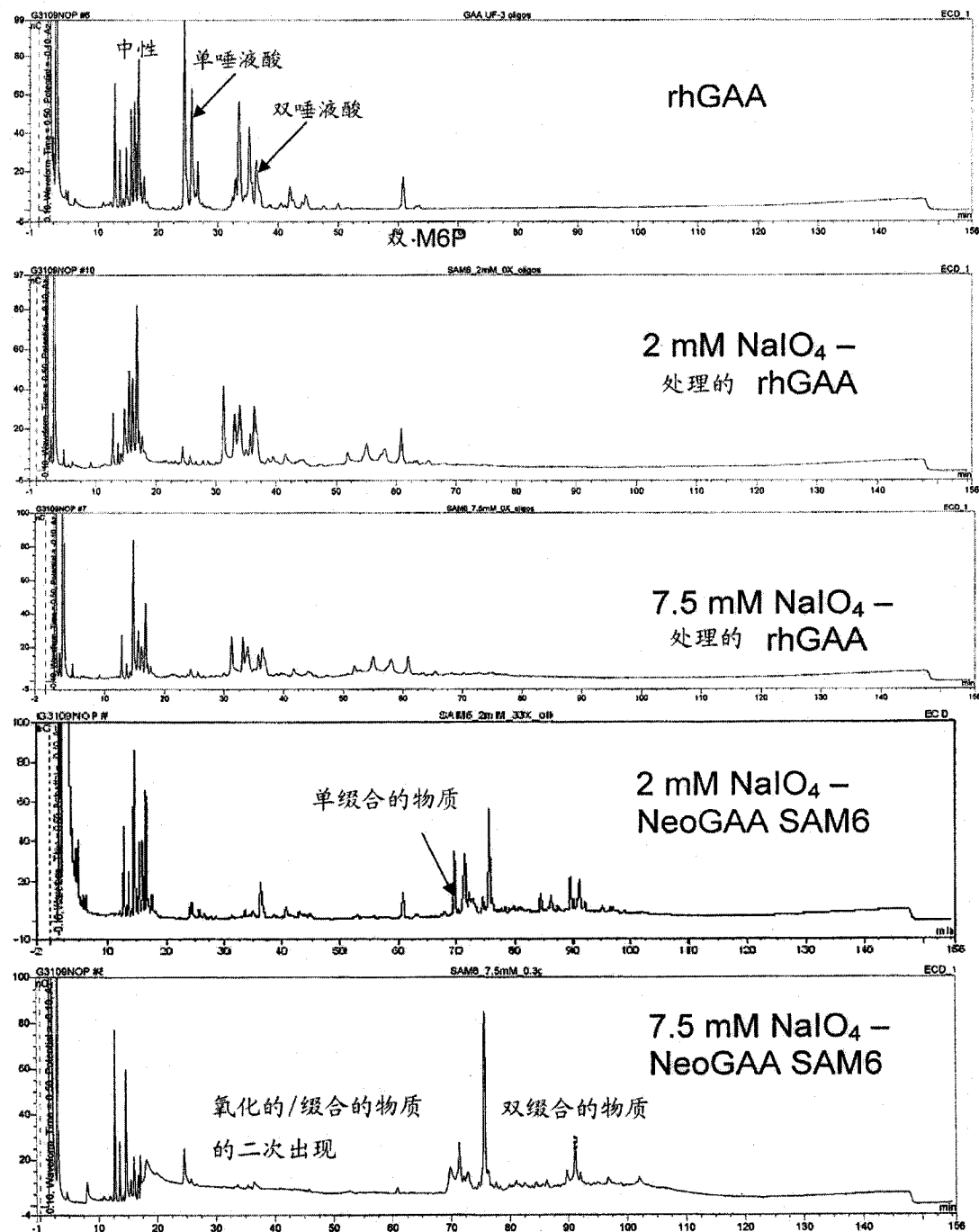


图 11C

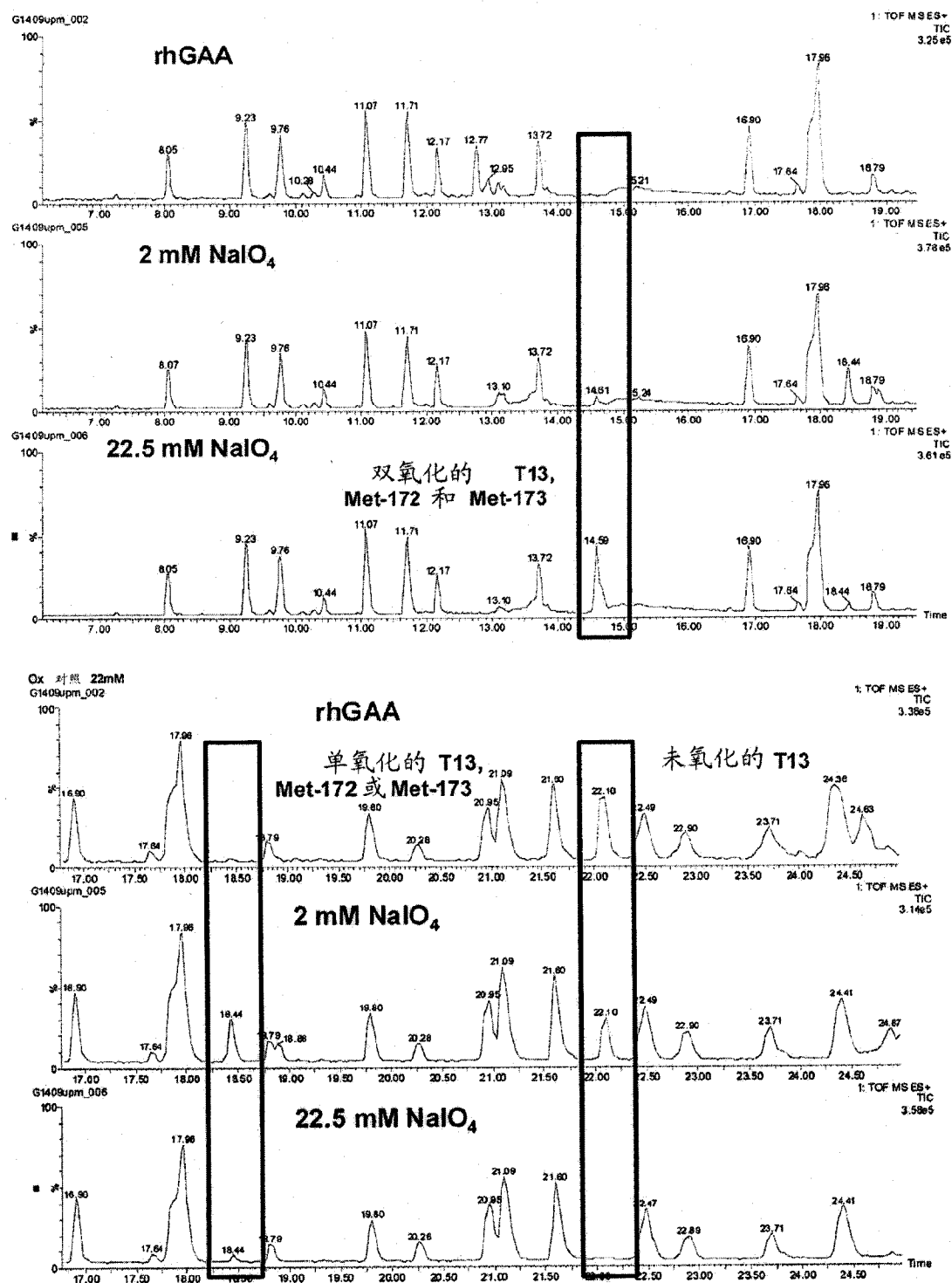


图 12

(C) Biacore M6P 受体亲和性

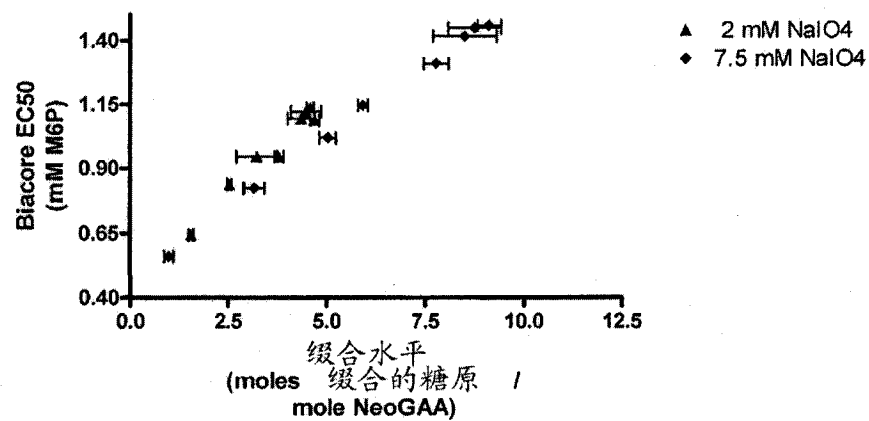


图 13C

缀合程度
vs. 特异性活性

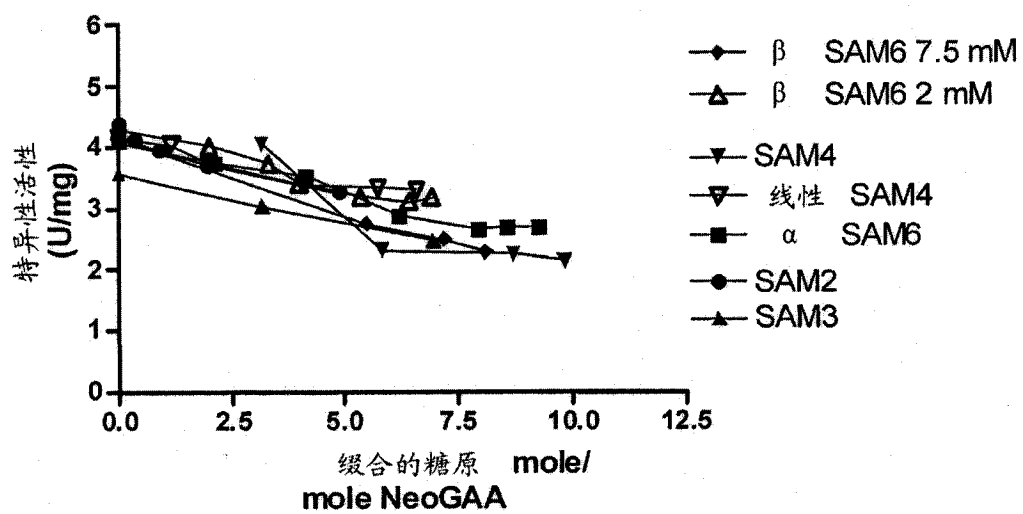


图 14

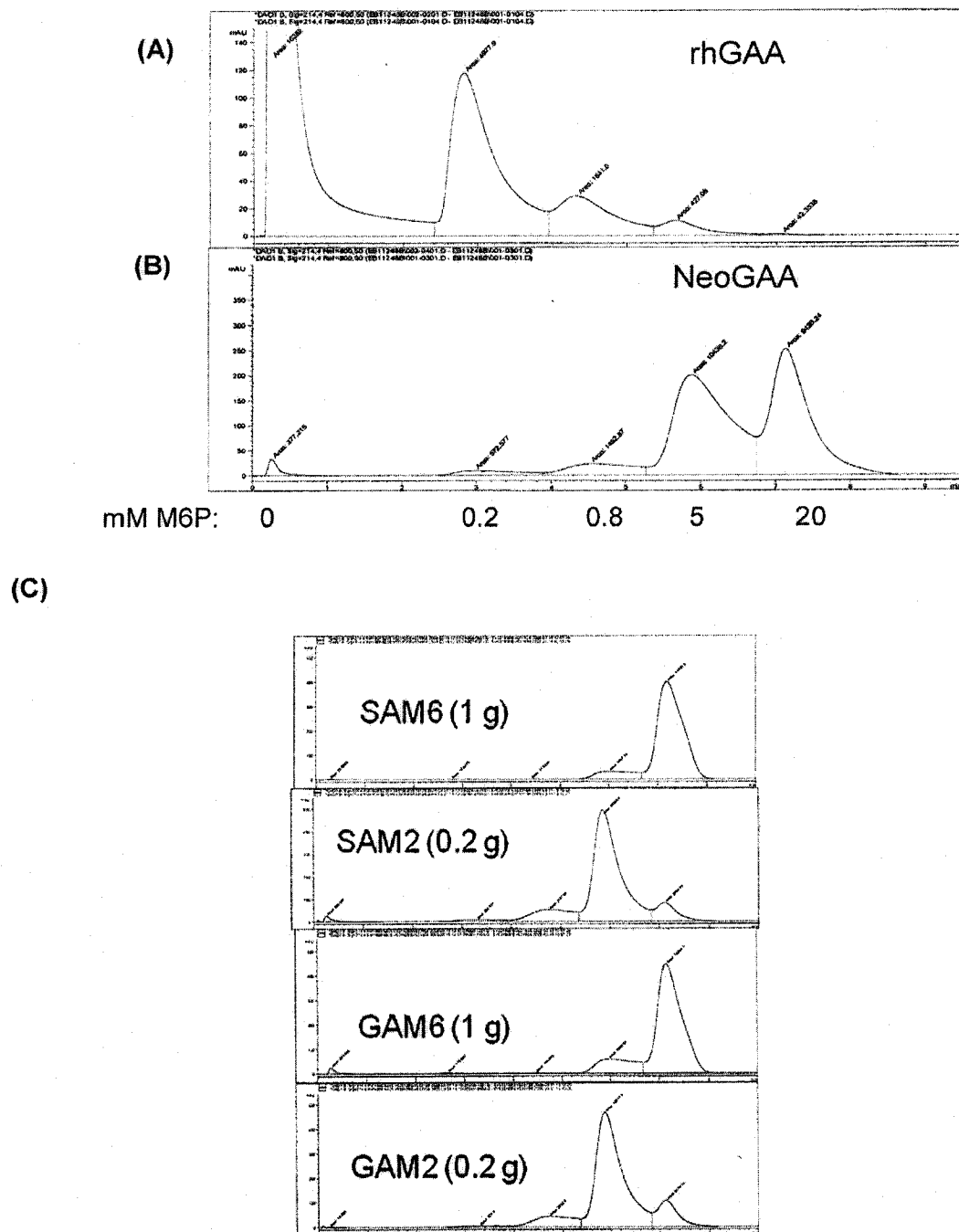


图 15A-C

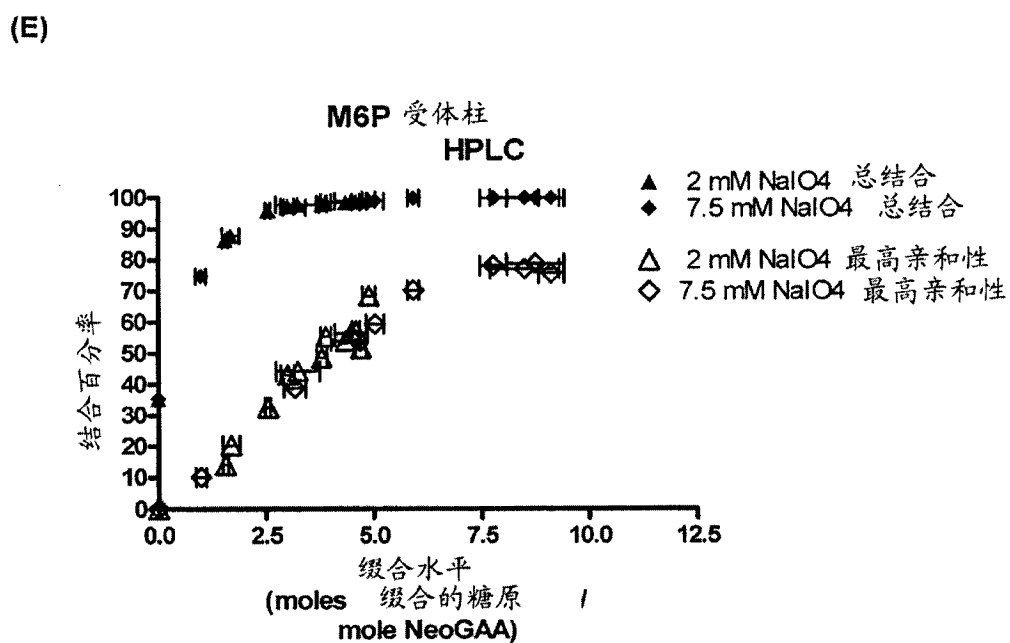
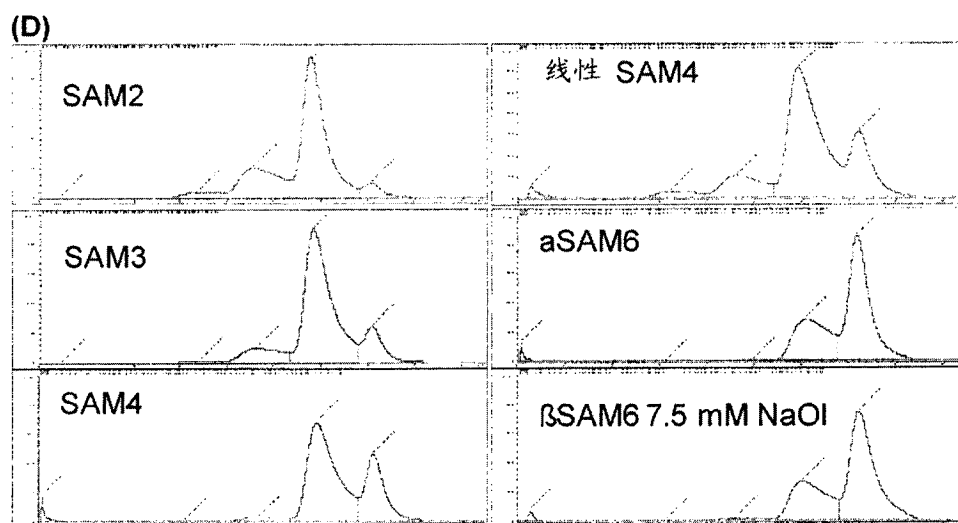


图 15D-E

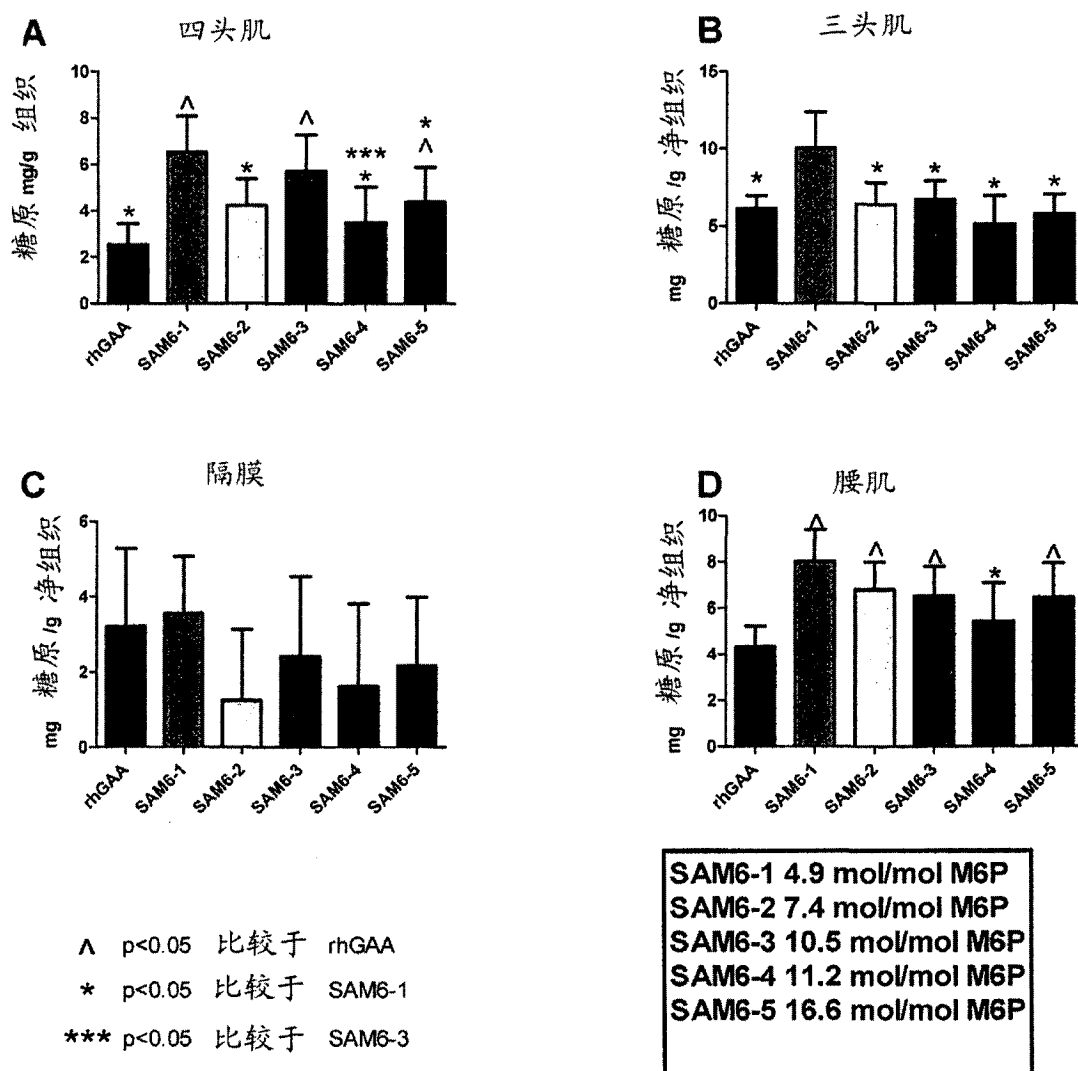
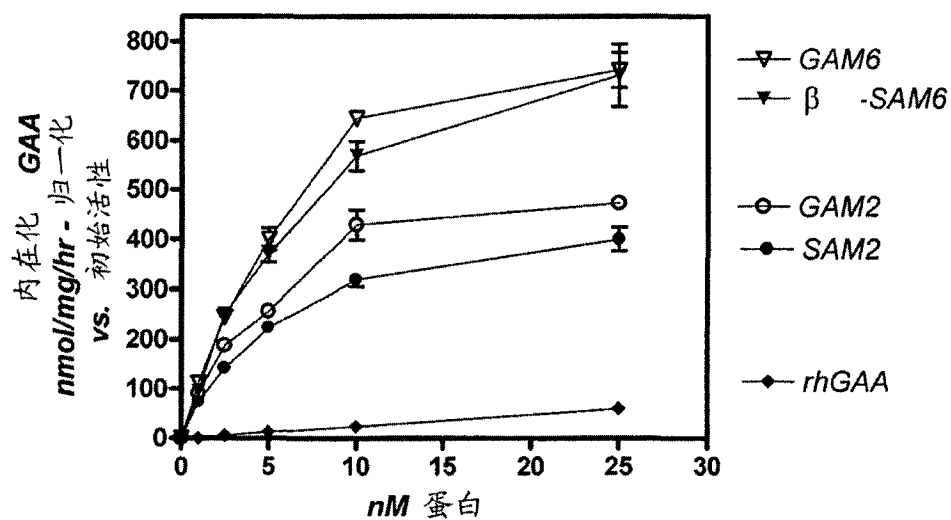


图 15F

L6 成肌细胞摄取



L6 成肌细胞摄取

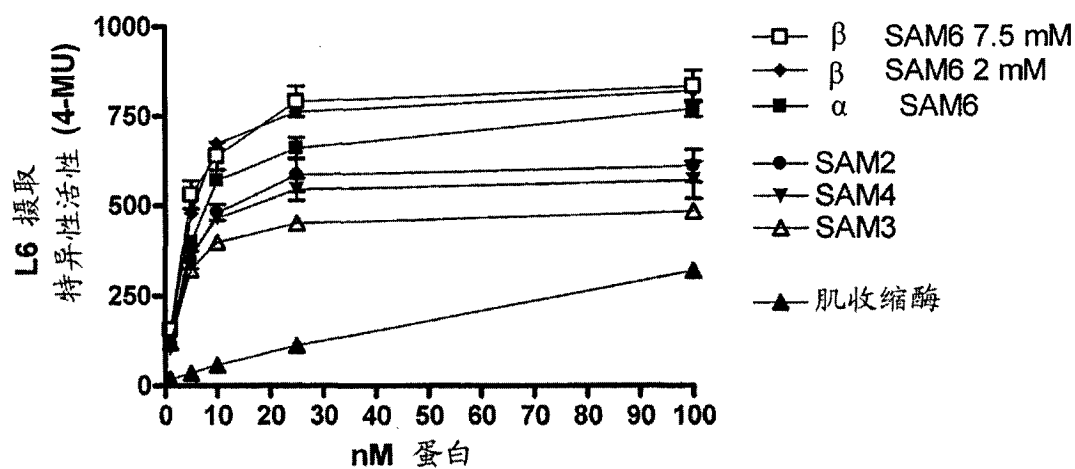
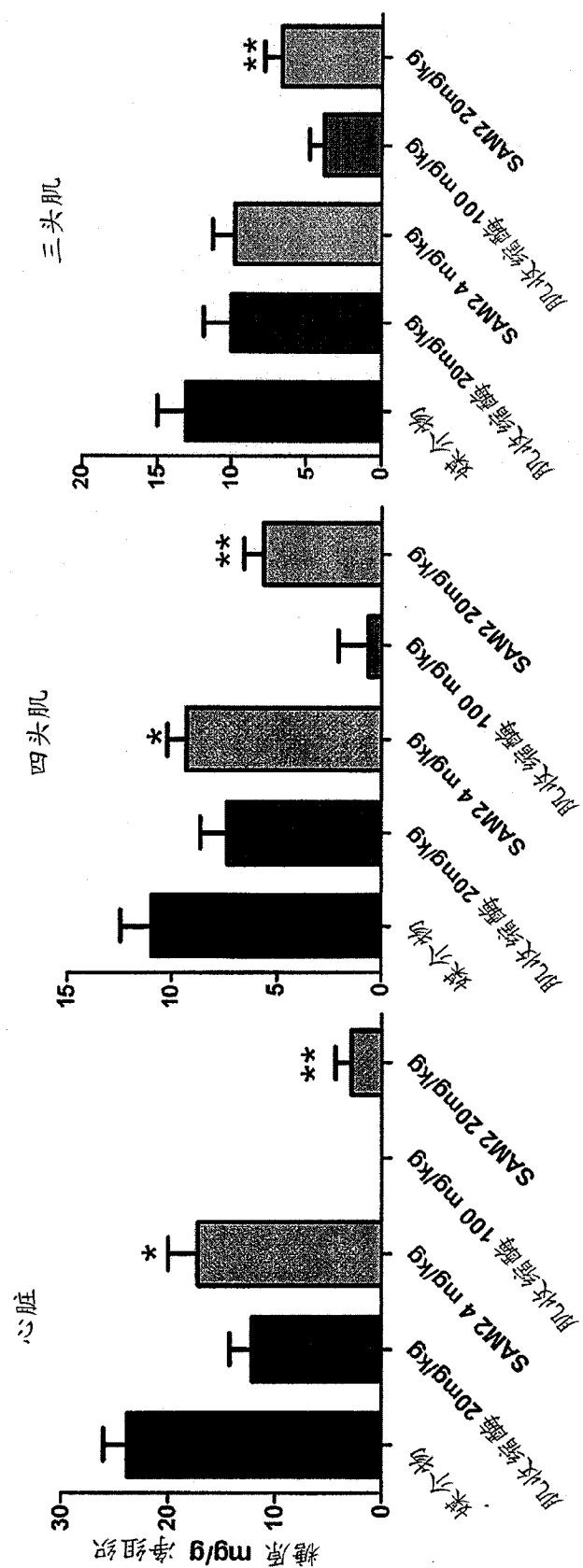


图 16



*, ** = p<0.05 分别比较于 20, 和 100 mg/kg 肌收缩酶

rhGAA: 0.9 M6P/GAA
0.2g 规格 SAM2: 8.9 M6P/GAA

图 17

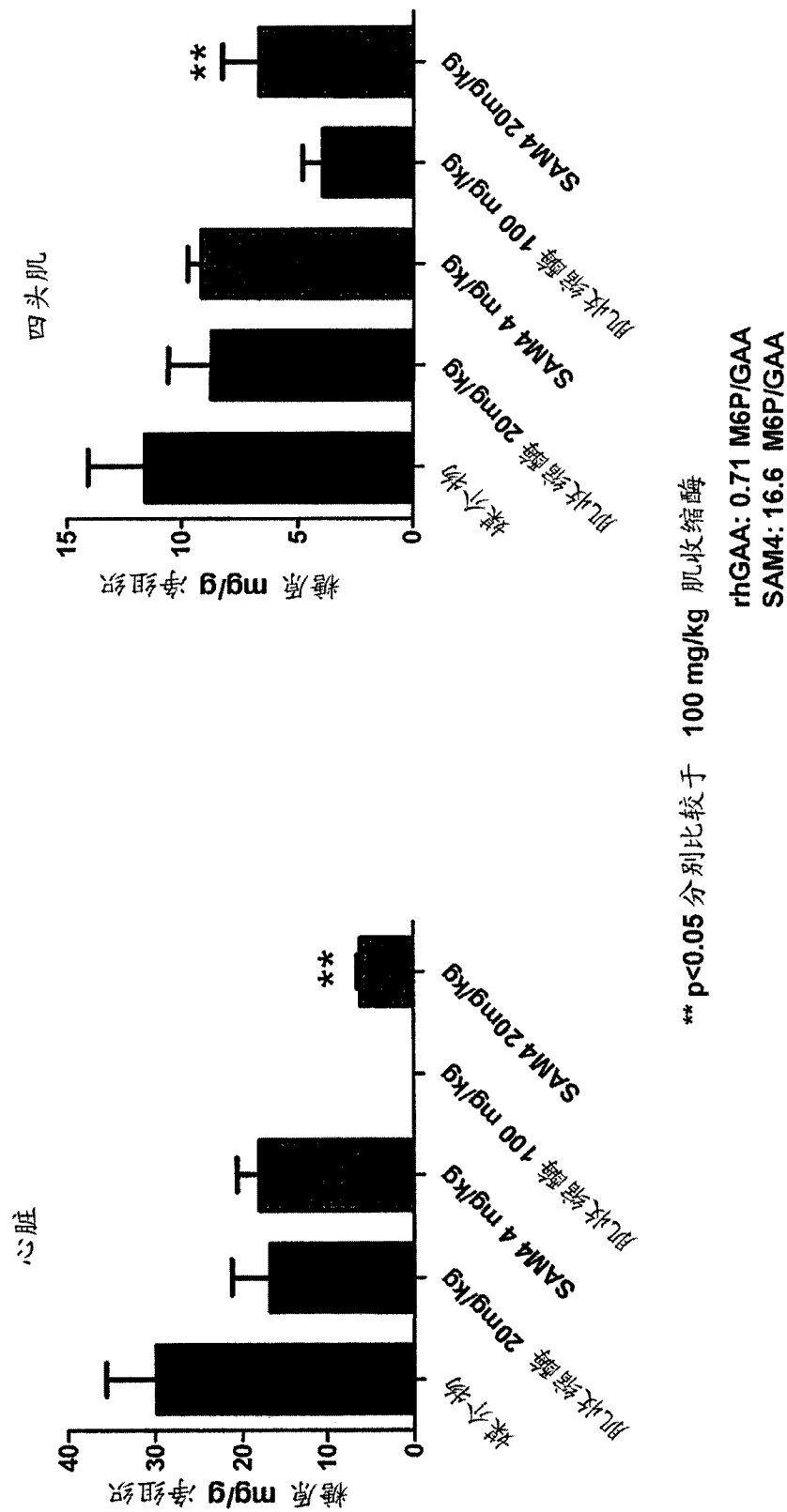


图 18

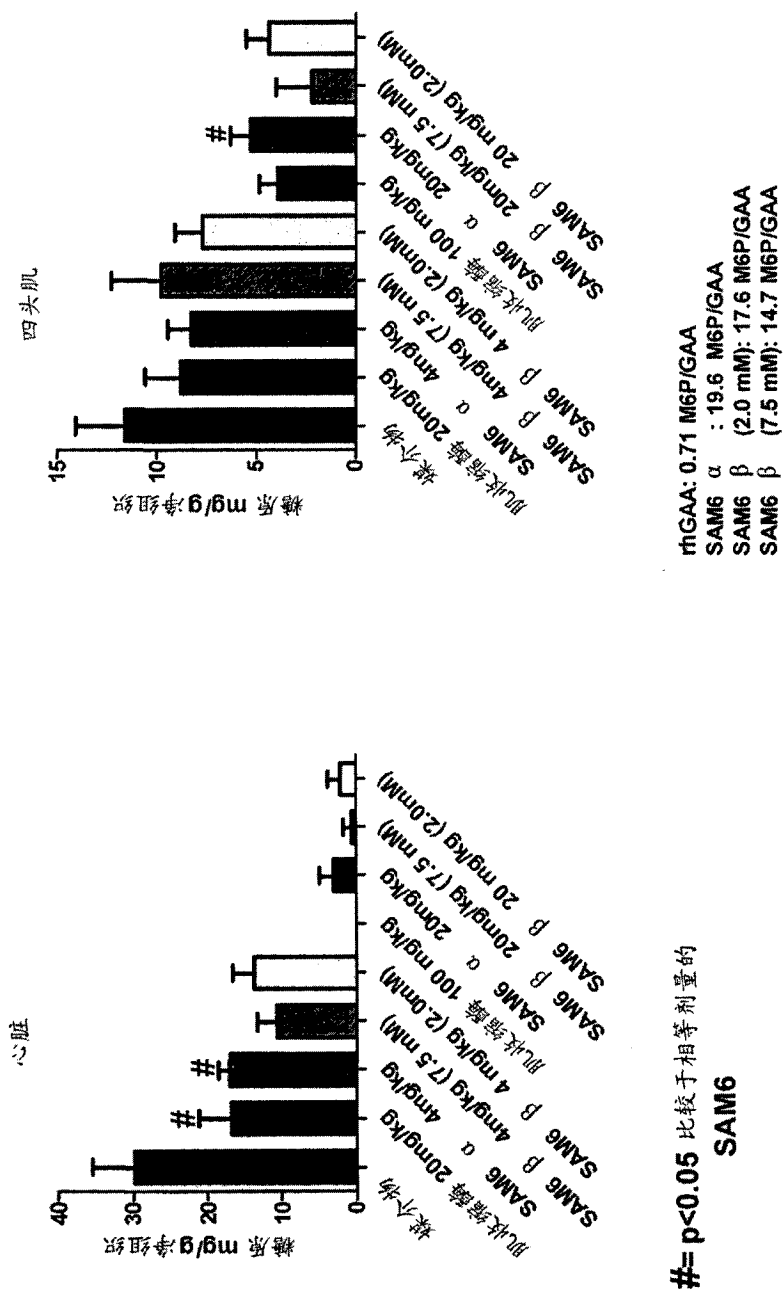


图 19

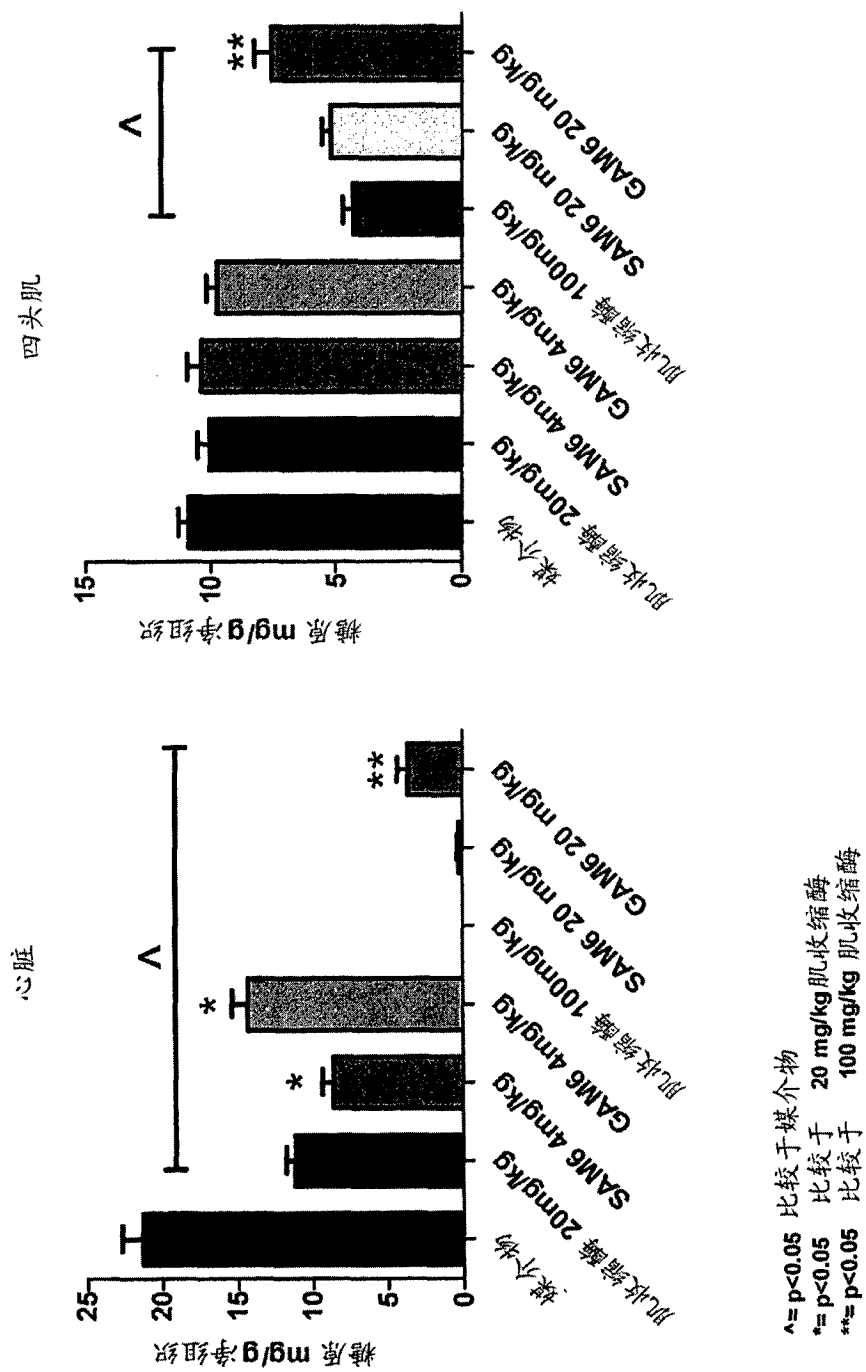


图 20

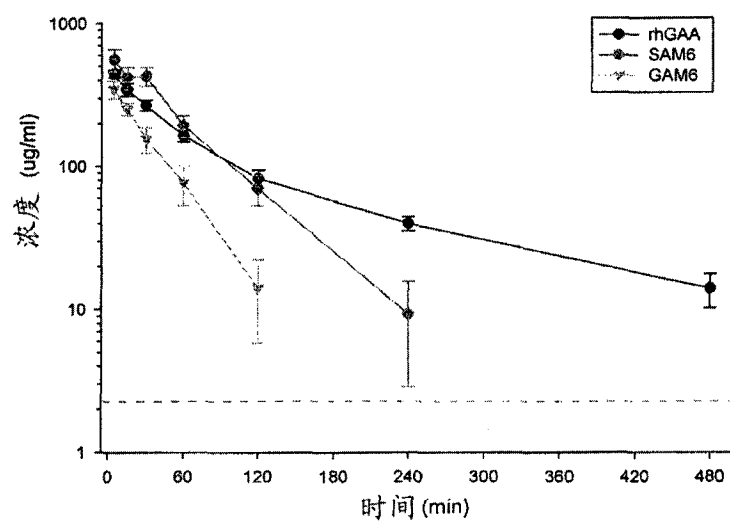


图 20B