

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 937 017**

51 Int. Cl.:

C07H 15/04 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

A61K 47/61 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2009 E 19167964 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2022 EP 3608330**

54 Título: **Compuestos intermedios sintéticos para preparar conjugados de oligosacáridos-proteínas**

30 Prioridad:

16.12.2008 US 12285108 P

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

23.03.2023

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.0%)

50 Binney Street

Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

PAN, CLARK Q.;
ZHENG, XIAOYANG;
MILLER, ROBERT J.;
KUTZKO, JOSEPH P.;
ZHU, YUNXIANG;
PATTERSON, DUNCAN E.;
PEER, ANDREAS;
KONOWICZ, PAUL A.;
AVILA, LUIS Z.;
STEFANO, JAMES E.;
REARDON, MICHAEL R.;
HARRAHY, JOHN;
ZHOU, QUN;
YOUNG, LAUREN y
FINN, PATRICK

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 937 017 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos intermedios sintéticos para preparar conjugados de oligosacáridos-proteínas

La divulgación se refiere generalmente a conjugados de oligosacáridos-proteínas que comprende oligosacáridos particulares, y a composiciones que comprenden dichos conjugados. La divulgación se refiere, además, a métodos de

5 tratar trastornos por almacenamiento lisosomal utilizando conjugados de oligosacáridos- enzimas lisosomales.

Trastornos por almacenamiento lisosomal (LSDs - siglas en inglés) son una clase de trastornos metabólicos raros que comprenden más de cuarenta enfermedades genéticas que implican una deficiencia en la actividad de hidrolasas lisosomales. Una característica distintiva de los LSDs es la acumulación anormal de metabolitos lisosomales, lo que conduce a la formación de grandes números de lisosomas distendidos.

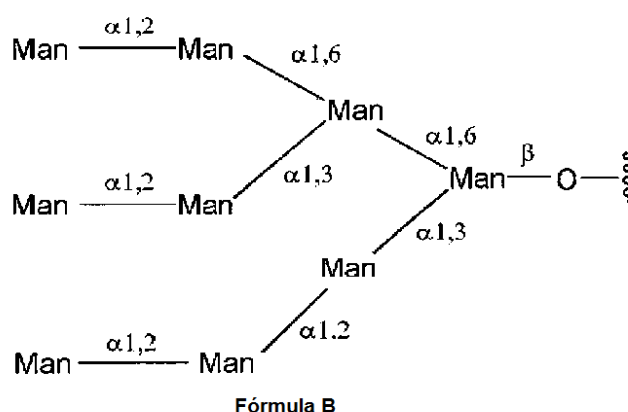
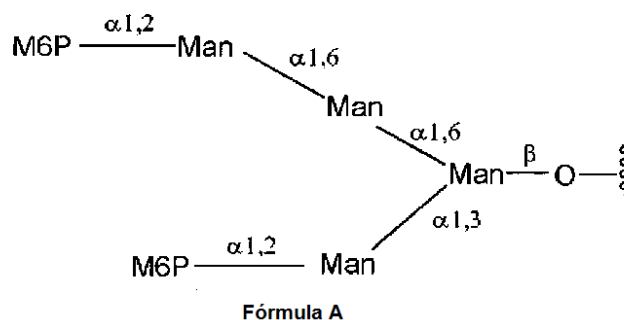
10 Los LSDs pueden ser tratados mediante la administración de la versión activa de la enzima deficiente en el sujeto, un proceso denominado terapia de reemplazo de enzimas (ERT - siglas en inglés). La enzima de reemplazo administrada que porta un manosa-6-fosfato (M6P) terminal es absorbida por células diana a través de endocitosis mediada por un receptor de M6P independiente de cationes (CI-MPPR) asociado a la superficie celular y dirigida a los lisosomas.

15 En general, las enzimas de reemplazo fosforiladas de manera deficiente no son internalizadas de manera eficaz por el receptor de M6P en la superficie celular y, por lo tanto, no pueden ser dirigidas a los lisosomas en donde ejercen su función. Por consiguiente, un bajo grado de fosforilación de manosa puede tener un efecto significativo y perjudicial sobre la eficacia terapéutica de una enzima de reemplazo.

Se han desarrollado métodos para incrementar el contenido en M6P de enzimas de reemplazo. Por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N° 6.534.300; 6.670.165; y 6.861.242 describen la fosforilación enzimática de residuos de manosa

20 terminales. En otro ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 7.001.994 describe un método para el acoplamiento de oligosacáridos que comprenden M6P con glicoproteínas. Se encontró que un conjugado de la enzima lisosomal α -glucosidasa ácida (GAA- siglas en inglés) con un oligosacárido bis-M6P preparado por ese método era más eficaz en reducir glucógeno del músculo esquelético y cardíaco que GAA humana recombinante en un modelo murino de la enfermedad de Pompe, una enfermedad muscular autosómica recesiva que resulta de una deficiencia metabólica de

25 GAA, y se caracteriza por la acumulación de glucógeno lisosomal. De manera similar, Zhu et al. describen el acoplamiento de un oligosacárido bis-M6P sintético (Fórmula A) con GAA. Zhu et al., *Biochem. J.* 389:619-628 (2005). La Fórmula A fue diseñada a partir de la estructura del núcleo Man₉ triantenaria natural de glicanos enlazados a N (Fórmula B) eliminando una de las ramas, acortando otra rama, y fosforilando los residuos de manosa terminales.



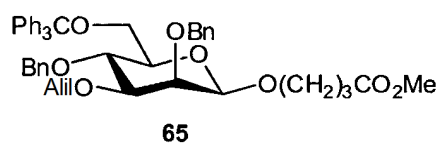
El conjugado resultante unido a CI-MPR con una afinidad incrementada, fue interiorizado de manera más eficaz por parte de mioblastos L6, y tenía una actividad enzimática aproximadamente normal. A pesar de este éxito, sin embargo, sigue siendo importante identificar nuevos oligosacáridos que puedan resultar en una afinidad mejorada para CI-MPR y/o una internalización celular más eficaz cuando se conjuga con enzimas lisosomales, al tiempo que se mantiene una actividad enzimática normal o casi normal. Sin embargo, la absorción mejorada sola no resultará necesariamente en un mejor resultado terapéutico. Determinadas estrategias de conjugación y oligosacáridos resultan en conjugados con una actividad enzimática menor. Por lo tanto, es deseable identificar oligosacáridos y conjugados que puedan mejorar los resultados terapéuticos para sujetos con LSDs.

Además, determinados oligosacáridos tales como los mostrados en las Fórmulas A y B pueden ser difíciles y caros de sintetizar. Además, la preparación de sacáridos β -enlazados de una manera estereoselectiva ha sido un problema difícil en la química de los hidratos de carbono. Oligosacáridos alternativos y métodos de síntesis pueden ser más prácticos para su uso a escala comercial. Existe una necesidad adicional de optimizar métodos utilizados para preparar conjugados de oligosacáridos-proteínas. En particular, para fines terapéuticos, preparaciones de conjugados no deberían ser altamente heterogéneas, ya que esto puede resultar en una función biológica inconsistente. Múltiples aspectos de los conjugados pueden afectar a la eficacia terapéutica, incluyendo los oligosacáridos y enlazadores utilizados, métodos de conjugación, métodos de purificación, y formulaciones.

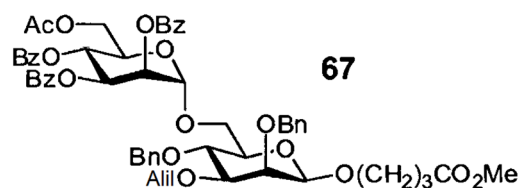
Sumario de la invención

La presente invención proporciona compuestos útiles como compuestos intermedios en la preparación de oligosacáridos que pueden conjugarse con proteínas para formar conjugados oligosacárido-proteína del tipo descrito en el presente documento.

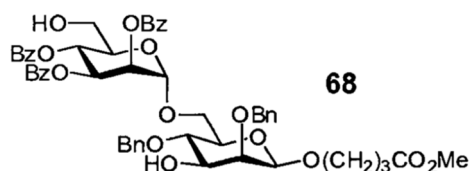
La presente invención proporciona compuestos de Fórmula:



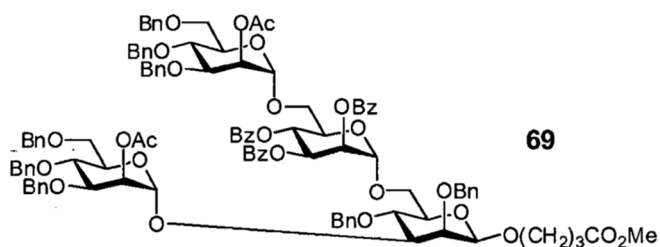
La presente invención también proporciona compuestos de Fórmula:



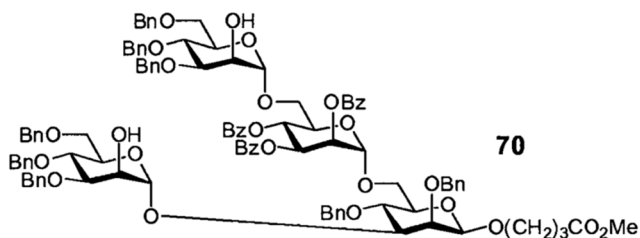
5 La presente invención también proporciona compuestos de Fórmula:



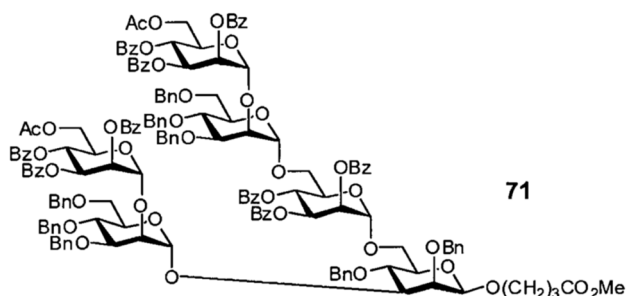
La presente invención también proporciona compuestos de Fórmula:



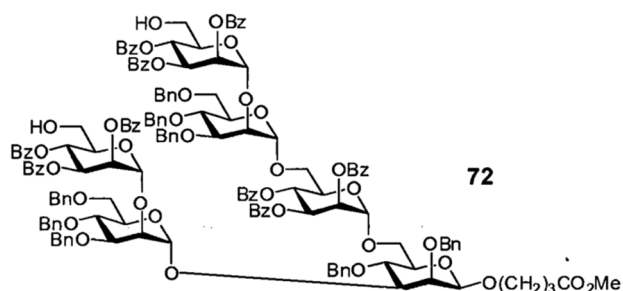
La presente invención también proporciona compuestos de Fórmula:



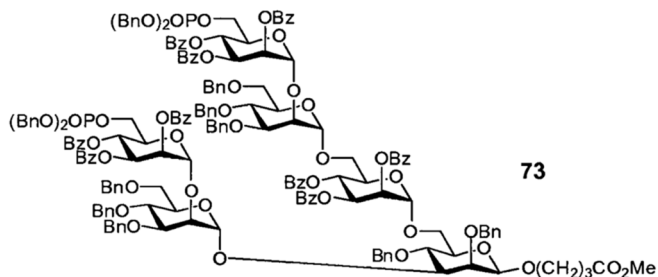
La presente invención también proporciona compuestos de Fórmula:



La presente invención también proporciona compuestos de Fórmula:



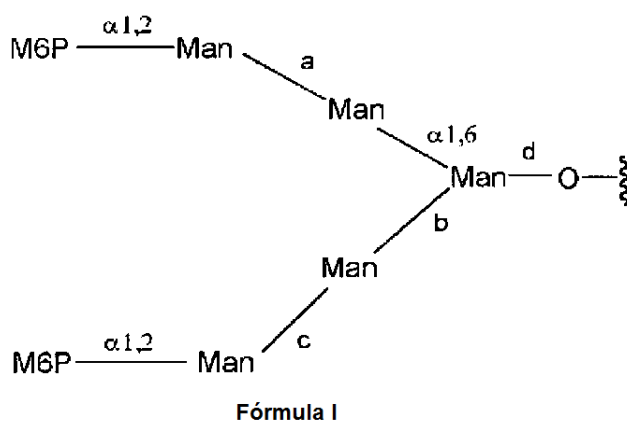
5 La presente invención también proporciona compuestos de Fórmula:



Descripción detallada

La información técnica que se expone a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá del alcance de la invención, que se define mediante las reivindicaciones adjuntas. La información técnica adicional se proporciona para situar la invención reivindicada en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados. Por ejemplo, la presente divulgación proporciona información sobre cómo los oligosacáridos preparados utilizando los compuestos reivindicados pueden conjugarse con proteínas para formar conjugados oligosacárido-proteína.

15 La presente divulgación proporciona conjugados de oligosacáridos-proteínas que comprenden (1) una proteína y (2) un oligosacárido de Fórmula I:



en donde:

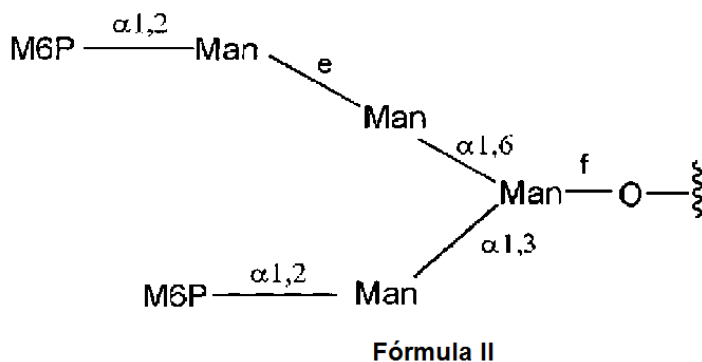
a = $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; $\alpha 1,4$; o $\alpha 1,6$;

b = $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; o $\alpha 1,4$;

5 c = $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; $\alpha 1,4$; o $\alpha 1,6$; y

d = α , β , o una mezcla de α y β .

También se proporcionan conjugados de oligosacáridos-proteínas que comprenden (1) una proteína y (2) un oligosacárido de Fórmula II:



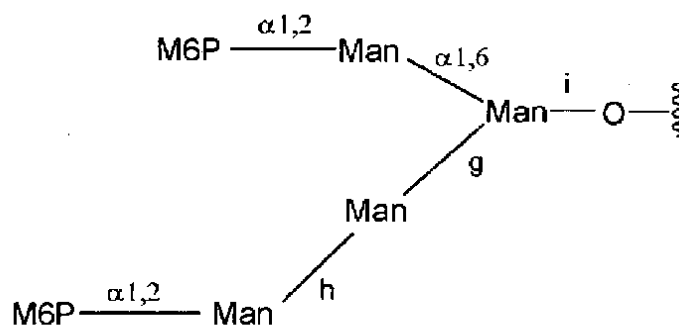
10 en donde:

e = $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; $\alpha 1,4$; o $\alpha 1,6$ y

f = α , β , o una mezcla de α y β ,

con la condición de que f = α o una mezcla de α y β cuando e = $\alpha 1,6$.

15 También se proporcionan conjugados de oligosacáridos-proteínas que comprenden (1) una proteína y (2) un oligosacárido de Fórmula III:



Fórmula III

en donde:

$g = \alpha 1,2; \alpha 1,3; \text{ o } \alpha 1,4;$

$h = \alpha 1,2; \alpha 1,3; \alpha 1,4; \text{ o } \alpha 1,6; \text{ e}$

5 $i = \alpha, \beta, \text{ o una mezcla de } \alpha \text{ y } \beta.$

También se proporcionan conjugados de oligosacáridos-proteínas que comprenden (1) una proteína y (2) un oligosacárido de Fórmula IV:



Fórmula IV

en donde:

10 j es $\alpha 1,2;$

k se selecciona de $\alpha, \beta;$ y una mezcla de α y $\beta;$

x es 1, 2 ó 3; y

cuando x es 2 ó 3, el enlace entre cada una de las manosas se selecciona de $\alpha 1,2; \alpha 1,3; \alpha 1,4; \text{ y } \alpha 1,6.$

15 También se proporcionan conjugados de oligosacáridos-proteínas que comprenden (1) una proteína y (2) un oligosacárido de Fórmula V:

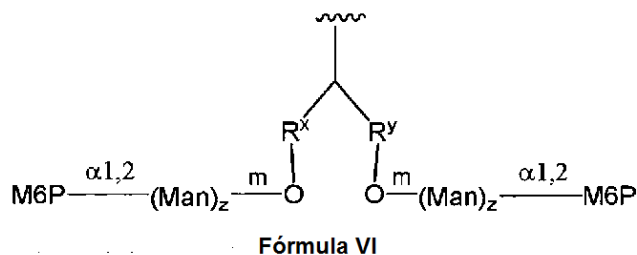


Fórmula V

en donde:

I se selecciona de α , β , y una mezcla de α y β .

También se proporcionan conjugados de oligosacáridos-proteínas que comprenden (1) una proteína y (2) un oligosacárido de Fórmula VI:



5 en donde:

R^x y R^y se eligen, cada uno independientemente, de polietilenglicol y alquilo C_1 - C_{10} , opcionalmente sustituido con oxo, nitro, halo, carboxilo, ciano, o alquilo inferior, y opcionalmente interrumpido con uno o más heteroátomos seleccionados de N, O o S;

z se selecciona de 0, 1, 2, 3 ó 4;

10 m se selecciona de α , β , y una mezcla de α y β ; y

cuando y es 2, 3 ó 4, la unión entre cada una de las manosas se selecciona de $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; $\alpha 1,4$; y $\alpha 1,6$.

La divulgación también proporciona conjugados de oligosacáridos-proteínas que comprenden (1) una proteína y (2) un oligosacárido de Fórmula A.

El conjugado puede comprender al menos 2, 3, 4 ó 5 moles de oligosacárido de la fórmula A por mol de la proteína.

15 Los conjugados de oligosacáridos-proteínas de la presente divulgación comprenden un enlazador entre los componentes oligosacárido y proteína del conjugado.

La divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden conjugados de oligosacáridos-proteínas de Fórmula I, II, III, IV, V o VI y una carga, agente conferidor de consistencia, desintegrante, tampón, estabilizador o excipiente. La divulgación proporciona, además, métodos de tratar un trastorno por almacenamiento lisosomal tal como, p. ej., los descritos en la Tabla 1 *infra*, con un conjugado de oligosacárido-proteína de Fórmula I, II, III, IV, V o VI, o una composición farmacéutica que comprende un conjugado de oligosacárido-proteína de este tipo. El trastorno por almacenamiento lisosomal se puede elegir, p. ej., de la enfermedad de Fabry, la enfermedad de Pompe, la enfermedad de Niemann-Pick A, la enfermedad de Niemann-Pick B y mucopolisacaridosis I. En realizaciones adicionales, la divulgación proporciona el uso de un conjugado de oligosacárido-proteína que comprende (1) una proteína y (2) un oligosacárido de Fórmula I, II, III, IV, V o VI en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno por almacenamiento lisosomal en un sujeto en necesidad del mismo.

Realizaciones y casos adicionales se discuten a lo largo de esta solicitud. Otros objetos, características y ventajas de la presente divulgación resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Casos y realizaciones descritas con respecto a un aspecto de la divulgación se aplica igualmente a otros aspectos de la divulgación, y viceversa.

Se debe entender, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, se dan solamente a modo de ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta solicitud.

Breve Descripción de las Figuras

35 La **Figura 1** representa un esquema retrosintético ilustrativo que recoge las etapas para la síntesis de Oligosacárido 82.

La **Figura 2** representa una síntesis ejemplar de un bloque de construcción de monosacáridos **2a** que puede emplearse en la síntesis de oligosacáridos descritos en esta memoria.

La **Figura 3** representa síntesis ilustrativas de bloques de construcción de monosacáridos **1, 2, 3 y 4** que se pueden emplear en la síntesis de oligosacáridos descritos en esta memoria.

5 La **Figura 4** representa un esquema sintético para la preparación de un enlazador de etileno.

La **Figura 5** representa un esquema sintético para el ensamblaje de un precursor trisacárido del Oligosacárido 82 utilizando bloques de construcción **2, 3 y 4**.

La **Figura 6** representa un esquema sintético para el ensamblaje de un heptasacárido protegido a partir del precursor trisacárido descrito en la Figura 4.

10 La **Figura 7** representa un esquema sintético para desbloquear el heptasacárido protegido descrito en la Figura 5, para proporcionar el Oligosacárido 82.

Las **Figuras 8A-E** representan un esquema sintético para la preparación de un hexasacárido β -enlazado de Fórmula A utilizando dibutil-estaño para formar un compuesto intermedio estereoselectivo, y una forma alternativa con un grupo reactivo con tiol.

15 La **Figura 9** muestra el efecto del nivel de oxidación sobre la capacidad de conjugación de NeoGAA β SAM6. La Fig. **9A** muestra la cantidad de oligosacáridos SAM2, SAM3, SAM4, SAM4 lineal, α SAM6 y β SAM6 conjugados con GAA en relaciones molares variables. La Fig. **9B** muestra la cantidad de hexasacárido (glicano) conjugado con rhGAAs oxidado utilizando diferentes cantidades de peryodato.

20 La **Figura 10** muestra la oxidación de ácido siálico, fucosa, galactosa y manosa con cantidades variables de peryodato. La Fig. **10A** muestra la oxidación, monitorizada mediante análisis de la composición de monosacáridos (oxidación inferida sobre la base de la reducción de cantidades cuantificadas de monosacáridos). La Fig. **10B** muestra la detección LTQ MS de oligosacáridos marcados con AA SAM6 en modo positivo. Las Figs. **10C y 10D** muestran un espectro MS/MS correspondiente a oligosacáridos oxidados marcados con AA. La Fig. **10E** muestra análisis de monosacáridos de conjugado GAM titulado con diversas cantidades de GAO.

25 La **Figura 11** muestra el análisis por HPLC de oligosacáridos liberados de rhGAA y NeoGAA.

La **Figura 12** muestra el análisis LC/MS por representación en mapa de péptidos de rhGAA tratados con peryodato 2 y 22,5 mM. En las cajas se destacan son las posiciones de elución de péptido triptico T13 no oxidado y sencilla y doblemente oxidado (que contiene metioninas 172 y 173).

30 La **Figura 13** muestra el análisis de unión Biacore de NeoGAA y rhGAA a sCIMPR. Fig. **13A**, sensograma que muestra la asociación, disociación, elución de M6P y fases de regeneración para cada una de las inyecciones de muestra. Fig. **13B**, representativa del ajuste de 4 parámetros de datos del sensograma para muestras NeoGAA y muestra de control rhGAA. Fig. **13C**, afinidad por el receptor de M6P de muestras NeoGAA preparado utilizando peryodato 2 mM frente a 7,5 mM, a través de diferentes niveles de conjugación para cada una de las preparaciones.

La **Figura 14** muestra la actividad específica de diversos conjugados de NeoGAA.

35 La **Figura 15A-E** muestra la elución de conjugados de NeoGAA de una columna de receptor de M6P. La Fig. **15F** muestra de Niveles de Glucógeno en Tejido en ratones GAAKO tras la administración de 4 dosis semanales de conjugados de SAM6.

La **Figura 16** muestra los resultados de un ensayo de captación de mioblastos L6, que demuestra la internalización de diversos conjugados de NeoGAA.

40 La **Figura 17** muestra el aclaramiento de glucógeno desde el corazón, cuádriceps y tríceps de ratones inactivados con GAA después de tratamiento con SAM2.

La **Figura 18** muestra el aclaramiento de glucógeno desde el corazón y el cuádriceps de ratones inactivados con GAA después de tratamiento con SAM4.

La **Figura 19** muestra el aclaramiento de glucógeno desde el corazón y el cuádriceps de ratones inactivados con GAA después de tratamiento con GAM6.

La **Figura 20** muestra el aclaramiento de glucógeno desde el corazón y el cuádriceps de ratones inactivados con GAA después de tratamiento con SAM46 y GAM6.

5 DEFINICIONES

Para ayudar en la comprensión de la presente divulgación, se definen primero ciertos términos. A lo largo de la solicitud se proporcionan definiciones adicionales.

10 Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a un método que contiene "un compuesto" incluye una mezcla de dos o más compuestos. El término "o" se emplea generalmente en su sentido que incluye "y/o", a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

I. Conjugados de Oligosacáridos-Proteínas

En el presente documento se divulgan conjugados de oligosacáridos-proteínas, que pueden comprender, además, un enlazador. Se describen oligosacáridos, proteínas, enlazadores, métodos de conjugación y conjugados ilustrativos.

15 A. Oligosacárido

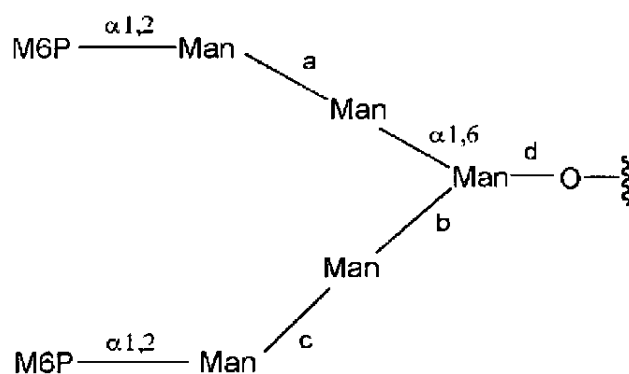
El oligosacárido puede elegirse de derivados de oligosacáridos biantenarios de Fórmula B o Fórmula VI, como se representa anteriormente, o de derivados de oligosacáridos lineales como se muestra en las Fórmulas IV y V. Los oligosacáridos biantenarios, en general, tienen dos residuos de M6P terminales, y pueden comprender, además, uno o más residuos de M6P penúltimos. Oligosacáridos lineales tienen al menos un residuo de M6P y pueden comprender un residuo de M6P terminal. En general, los residuos de M6P terminales pueden estar conectados por un enlace $\alpha 1,2$. (Véase Distler et al., *J. Biol. Chem.* 266:21687-21692 (1991), observando que un enlace $\alpha 1,2$ en el M6P terminal resultó en una mayor unión a CI-MPR y MPR dependiente de cationes (CD-MPR) que cualquiera de los enlaces $\alpha 1,3$ o $\alpha 1,6$). En algunos casos, los residuos de M6P terminales están conectados, en sus respectivos extremos reductores, al residuo adyacente por un enlace $\alpha 1,2$. En algunos casos, dos residuos de M6P terminales están separados más de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ó 40 Å, tal como se determina, p. ej., mediante cristalografía de rayos X, RMN y/o modelado molecular. Por ejemplo, el modelado molecular puede llevarse a cabo según se describe en Balaji et al, *Glycobiology* 4:497-515 (1994). En algunos casos, el oligosacárido se elige de tal manera que los residuos de M6P terminales tienen un impedimento estérico relativamente bajo. En algunos casos, los oligosacáridos en los que los residuos de M6P terminales están relativamente no impedidos estéricamente se unen a CI-MPR con mayor afinidad que los oligosacáridos en los que los residuos de M6P terminales están impedidos estéricamente.

En general, el oligosacárido se unirá a CI-MPR. Por ejemplo, el oligosacárido puede unirse a CI-MPR con una constante de disociación menor que, p. ej., 500, 100, 50, 10, 5, 1 ó 0,1 nM, o menor que, p. ej., 100, 50, 10, 5, 2 ó 1 μ M. La estructura cristalina de los dominios N-terminales 1-3 de CI-MPR es conocida, tanto en la forma unida a ligando como no unida. Olson et al., *J. Biol. Chem.* 279:34000-34009 (2004); Olson et al, *EMBO J.* 23:2019-2028 (2004). Además, el CD-MPR estructuralmente relacionado también es conocido tanto en la forma unida a ligando como no unida. Olson et al., *J. Biol. Chem.* 274:29889-29886 (1999); Olson et al. *J. Biol. Chem.* 277:10156-10161 (2002). Por consiguiente, el experto en la técnica sería capaz de utilizar esa información estructural del receptor para seleccionar un oligosacárido apropiado.

40 El oligosacárido se puede elegir, por ejemplo, de cualquiera de los oligosacáridos de las Fórmulas I, II, III, IV, V o VI, como se representa anteriormente, incluidos los Oligosacáridos 1-127 que se describen más adelante. Los oligosacáridos de Fórmulas I-III se derivan formalmente de Fórmula B mediante la separación de una rama, la separación y/o sustitución de un residuo monosacárido, y/o la modificación del enlace (p. ej., $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; $\alpha 1,4$; o $\alpha 1,6$) entre residuos de monosacáridos adyacentes. El oligosacárido puede tener, p. ej., 1, 2 ó 3 residuos manosa adicionales en uno o ambos brazos, conectados a través de un enlace $\alpha 1,2$; $\alpha 1,3$; o $\alpha 1,6$, con relación a cualquiera de las Fórmulas I-VI.

El oligosacárido puede tener, p. ej., uno, dos o tres residuos M6P. El oligosacárido puede tener, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 residuos monosacárido en total. El oligosacárido puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 residuos manosa, cualquiera de los cuales puede estar fosforilado o no fosforilado.

En algunos casos, el oligosacárido se elige de los Oligosacáridos 1-96, que son especies de Fórmula I:



Fórmula I

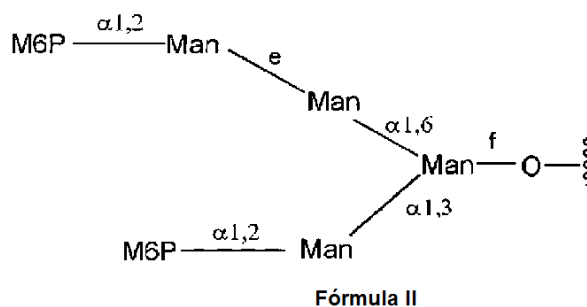
Oligosacárido	a	b	c	d
1	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	α
2	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	β
3	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,3$	α
4	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,3$	β
5	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,4$	α
6	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,4$	β
7	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,2$	$\alpha 1,6$	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
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

ES 2 937 017 T3

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
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
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

En algunos casos, d es una mezcla de α y β (es decir, el oligosacárido es una mezcla de, p. ej., los Oligosacáridos 1 y 2, 3 y 4, o 95 y 96).

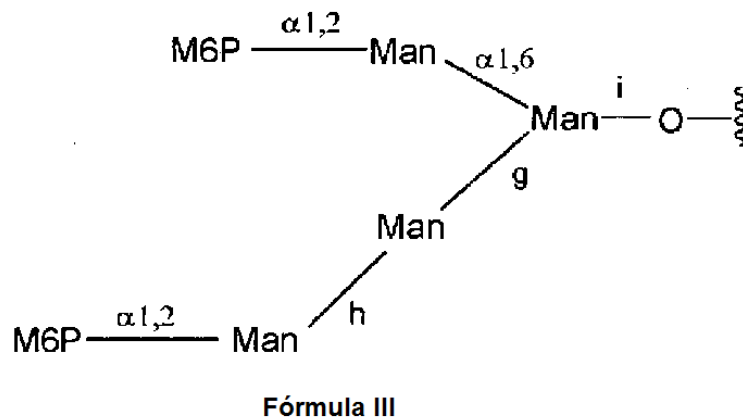
En algunos casos, el oligosacárido se elige de los Oligosacáridos 97-103, que son especies de Fórmula II:



Oligosacárido	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
Fórmula B	$\alpha 1,6$	β

5 En algunos casos, f es una mezcla de α y β (es decir, el oligosacárido es una mezcla de, p. ej., los Oligosacáridos 97 y 98, 99 y 100, o 101 y 102).

En algunos casos, el oligosacárido se elige de los Oligosacáridos 104-127 oligosacáridos, que son especies de Fórmula III:



Oligosacárido	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
121	$\alpha 1,4$	$\alpha 1,2$	β
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

En algunos casos, i es una mezcla de α y β (es decir, el oligosacárido es una mezcla de, p. ej., los Oligosacáridos 104 y 105, 106 y 107, o 126 y 127).

- 5 En algunos casos, el oligosacárido se elige de los Oligosacáridos 128-133, que son especies de Fórmula IV:

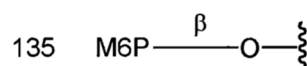
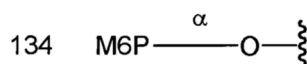


Fórmula IV

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

En algunos casos, k es una mezcla de α y β (es decir, el oligosacárido es una mezcla de, p. ej., los Oligosacáridos 128 y 129, 130 y 131, o 132 y 133).

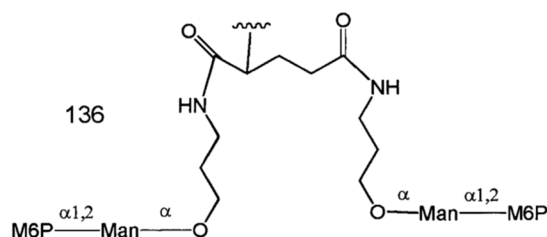
En algunos casos, el oligosacárido se elige de los Oligosacáridos 134 y 135, que son especies de Fórmula V:



5

En algunos casos, el oligosacárido es una mezcla de los Oligosacáridos 134 y 135.

En algunos casos, el oligosacárido es el Oligosacárido 136, que es una especie de Fórmula VI:



10 En algunos casos, el oligosacárido puede ser aislado de una fuente natural. Un oligosacárido aislado de una fuente natural puede ser homogéneo o puede ser una mezcla heterogénea de oligosacáridos relacionados.

En ciertos casos, el oligosacárido se prepara por síntesis química y/o enzimática. En algunos casos, un oligosacárido se puede preparar mediante modificación química o enzimática de un oligosacárido aislado de una fuente natural ("semi-síntesis").

15 Los oligosacáridos se pueden sintetizar química y/o enzimáticamente según se enseña, p. ej., en las Figuras 1-7, Osborn et al, *Oligosaccharides: Their Synthesis and Biological Roles*, Oxford University Press, 2000; Wang et al. (comps.), *Synthesis of Carbohydrates through Biotechnology*, American Chemical Society, 2004; Seeberger, *Solid Support Oligosaccharide Synthesis and Combinatorial Carbohydrate Libraries*, Wiley-Interscience, 2001; Dríguez et

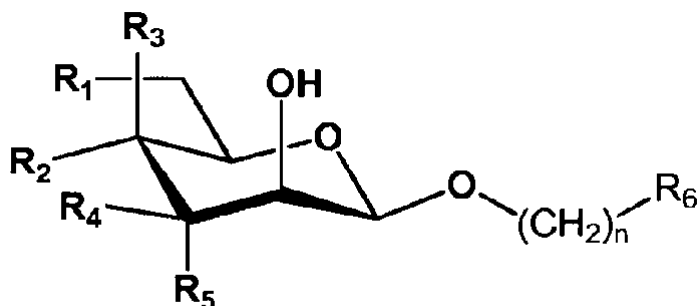
al., *Glycoscience: Synthesis of Oligosaccharides and Glycoconjugates*, Springer, 1999; Düffels et al., *Chem. Eur. J.* 6:1416-1430 (2000); Hojo et al., *Current Prot. Peptide Sci.* 1: 23-48 (2000); Seeberger et al., *Nature* 446:1046-1051 (2007); Seeberger et al., *Nature Rev. Drug Discov.* 4: 751-763 (2005); Srivastana et al., *Carbohydrate Res.* 161:195-210 (1987); y Hagihara et al., *Chem. Rec.* 6: 290-302 (2006), y en las Patentes de EE.UU. N^{os} 5.324.663; 6.156.547; 6.573.337; 6.723.843; 7.019.131; 7.160.517.

En algunos casos, un oligosacárido se puede sintetizar mediante la adición secuencial monosacáridos. En ciertos casos, los monosacáridos se pueden añadir a una posición específica (p. ej., 2-O, 3-O, 4-O o 6-O) de un sacárido existente mediante protección y desprotección selectiva. Por ejemplo, los oligosacáridos 82 se pueden sintetizar según se describe en el análisis retrosintético en la Figura 1, y en los esquemas sintéticos indicados en las Figuras 2-7. En algunos casos, el bloque de construcción **2a** puede ser sustituido por el bloque de construcción **2** en los esquemas sintéticos de las Figuras 3, 5 y 6. Si se utiliza un bloque de construcción **2a**, se puede evitar la separación del grupo bencilideno del bloque de construcción **2** en la etapa de heptasacárido.

Residuos manosa pueden ser enzimáticamente fosforilados según se enseña, p. ej., en la Patente de EE.UU. N^o 6.905.856. En ciertos casos, 1, 2 ó 3 de los residuos de M6P pueden ser reemplazados por miméticos de M6P resistentes a hidrolasa tales como, p. ej., éteres de malonilo, malonatos y fosfonatos, según se enseña en Berkowitz et al., *Org. Lett.* 6:4921-4924 (2004).

En ciertos casos, un enlazador puede estar unido a un sacárido a través de un enlace α o β . En algunos casos, un enlace β puede formarse por los métodos descritos en Crich et al., *Tetrahedron*, 54:8321-8348 (1998); Kim et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 130:8537-8547 (2008); Srivasta et al., *Tetrahedron Letters*, 35:3269-3272 (1979); Hodosi et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 119:2335-2336 (1997); Nicolaou et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 119:9057-9058 (1997). En un caso, se puede formar un enlace β utilizando un óxido de dibutil-estaño para formar un compuesto intermedio que puede hacerse reaccionar con un enlazador que contiene un grupo lábil no activado.

En el presente documento se proporciona un método de preparar un compuesto que tiene la Fórmula VII:



Fórmula VII

en donde:

R₁ se elige de hidrógeno, hidroxilo, alquilo inferior, opcionalmente sustituido, fosfato, sulfato, -OR₇, un grupo protector, y un sacárido;

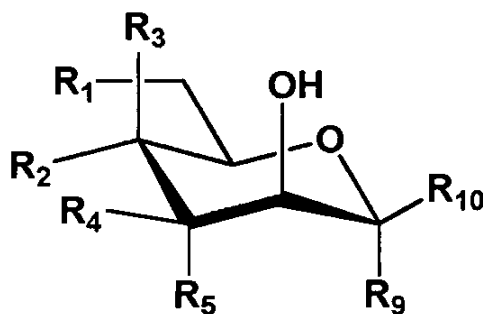
R₂, R₃, R₄ y R₅ se eligen, cada uno independientemente, de hidrógeno, sulfato, hidroxilo, -OR₈, un grupo protector y un sacárido;

R₆ se elige de hidrógeno, hidroxilo, carboxilo, alcoxicarbonilo, amino, amida, alquilamino, aminoalquilo, aminoxi, hidrazida, hidrazina, alquenilo opcionalmente sustituido y alquilo C₂-C₆ opcionalmente sustituido;

R₇ y R₈ se eligen, cada uno independientemente, de acetilo y un grupo alquilo inferior, opcionalmente sustituido; y

n es un número entero de 1 a 10; que comprende:

a) tratar un compuesto que tiene la Fórmula VIII:



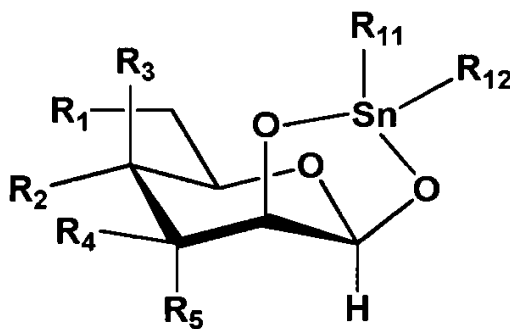
Fórmula VIII

en donde:

R₁ a R₅ son como se definen arriba; y

R₉ y R₁₀ se eligen de hidrógeno e hidroxilo, de manera que cuando uno de R₉ y R₁₀ es hidroxilo, el otro es hidrógeno;

con un compuesto que tiene la Fórmula R₁₁R₁₂(Sn=O) para formar un compuesto que tiene la Fórmula IX:



Fórmula IX

en donde:

R₁ a R₅ son como se definen arriba; y

R₁₁ y R₁₂ se eligen, cada uno independientemente, de alquilo no sustituido, o R₁₁ y R₁₂, tomados juntos, se eligen de alquileno no sustituido;

y

b) tratar el compuesto de Fórmula IX, opcionalmente en presencia de un haluro de metal, con un compuesto que tiene la Fórmula R₆-(CH₂)_n-L,

en donde:

R₆ y n son como se definen arriba; y

L es un halógeno; para formar el compuesto de Fórmula VII.

Por "opcional" u "opcionalmente" se quiere dar a entender que puede o no producirse el evento o circunstancia descrito subsiguientemente, y que la descripción incluye casos en los que no se produce el evento o circunstancia. Por ejemplo, "alquilo opcionalmente sustituido" abarca tanto "alquilo" como "alquilo sustituido" tal como se define más adelante. Se entenderá por parte de los expertos en la técnica, con respecto a cualquier grupo que contiene uno o más sustituyentes, que tales grupos no pretende introducir sustitución o patrones de sustitución algunos que sean estéricamente poco prácticos, sintéticamente no viables y/o inherentemente inestables.

"Alquilo" abarca cadena lineal y cadena ramificada que tiene el número indicado de átomos de carbono, habitualmente de 1 a 20 átomos de carbono, por ejemplo 1 a 8 átomos de carbono tal como 1 a 6 átomos de carbono. Por ejemplo alquilo C₁-C₆ abarca alquilo de 1 a 6 átomos de carbono de cadena tanto lineal como ramificada. Ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, 2-pentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 3-metilpentilo, y similares. Alquileno es otro subconjunto de alquilo, refiriéndose a los mismos residuos que alquilo, pero teniendo dos puntos de unión. Los grupos alquileno tendrán, habitualmente, de 2 a 20 átomos de carbono, por ejemplo 2 a 8 átomos de carbono tal como de 2 a 6 átomos de carbono. Por ejemplo, alquileno C₀ indica un enlace covalente y alquileno C₁ es un grupo metileno. Cuando se nombra un residuo alquilo que tiene un número específico de carbonos, están destinados a estar comprendidos todos los isómeros geométricos que tienen

ese número de carbonos; así, por ejemplo, "butilo" pretende incluir n-butilo, sec-butilo, isobutilo y t-butilo; "propilo" incluye n-propilo e isopropilo. "Alquilo inferior" se refiere a grupos alquilo que tienen de 1 a 4 carbonos.

"Alquenilo" indica un grupo alquilo ramificado o de cadena lineal, insaturado, que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono derivado de la separación de una molécula de hidrógeno de átomos de carbono adyacentes del alquilo parental. El grupo puede estar en la configuración cis o trans alrededor del o de los dobles enlaces. Grupos alquenilo típicos incluyen, pero no se limitan a, etenilo; propenilos tales como prop-1-en-1-ilo, prop-1-en-2-ilo, prop-2-en-1-ilo (alilo), prop-2-en-2-ilo; butenilos tales como, but-1-en-1-ilo, but-1-en-2-ilo, 2-metil-prop-1-en-1-ilo, but-2-en-1-ilo, but-2-en-2-ilo, buta-1,3-dien-1-ilo, buta-1,3-dien-2-ilo; y similares. En algunos casos un grupo alquenilo tiene de 2 a 20 átomos de carbono y en otros casos, de 2 a 6 átomos de carbono.

El término "sustituido", tal como se utiliza en esta memoria, significa que uno cualquiera o más hidrógenos en el átomo o grupo designado está reemplazado por una selección del grupo indicado, con la condición de que no se supere la valencia normal del átomo designado. Cuando un sustituyente es oxo (es decir, =O), están reemplazados 2 hidrógenos en el átomo. Combinaciones de sustituyentes y/o variables son permisibles sólo si tales combinaciones resultan en compuestos estables o intermedios sintéticos útiles. Un compuesto estable o una estructura estable pretende implicar un compuesto que es suficientemente robusto para sobrevivir al aislamiento a partir de una mezcla de reacción, y a la subsiguiente formulación como un agente que tiene utilidad al menos práctica. A menos que se especifique de otra manera, los sustituyentes se nombran en la estructura del núcleo. Por ejemplo, se debe entender que cuando (cicloalquil)alquilo se lista como un posible sustituyente, el punto de unión de este sustituyente a la estructura de núcleo está en la porción alquilo.

El término "alquilo sustituido", a menos que se defina expresamente de otro modo, se refiere a alquilo en el que uno o más átomos de hidrógeno están reemplazados por un sustituyente independientemente seleccionado entre:

-R^a, -OR^b, -O-(alquil C₁-C₂)O- (p. ej., metilendioxi-), -SR^b, -NR^bR^c, halo, ciano, oxo, nitro, sulfato, fosfato, -COR^b, -CO₂R^b, -CONR^bR^c, -OCOR^b, -OCO₂R^a, -OCONR^bR^c, -NR^cCOR^b, -NR^cCO₂R^a, -NR^cCONR^bR^c, -SOR^a, -SO₂R^a, -SO₂NR^bR^c, -NR^cSO₂R^a, etilenglicol, y polietilenglicol (PEG),

en que R^a se elige de alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido;

R^b se elige de hidrógeno, -NH₂, -NHR^c, alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido; y

R^c se elige entre hidrógeno y alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido;

R^b y R^c, y el nitrógeno al que están unidos, forman un grupo heterocicloalquilo opcionalmente sustituido; y en que cada uno de los grupos opcionalmente sustituido puede estar no sustituido o sustituido independientemente con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente de alquilo C₁-C₄, arilo, heteroarilo, aril-alquilo C₁-C₄, heteroaril-alquilo C₁-C₄, haloalquilo C₁-C₄, -Oalquilo C₁-C₄, -O alquil C₁-C₄fenilo, -alquil C₁-C₄-OH, -Ohaloalquilo C₁-C₄, halo, -OH, -NH₂, -alquil C₁-C₄-NH₂, -N(alquil C₁-C₄)(alquilo C₁-C₄), -NH(alquilo C₁-C₄),

-N(alquil C₁-C₄)(alquil C₁-C₄fenilo), -NH(alquil C₁-C₄fenilo), ciano, nitro, oxo (como sustituyente para heteroarilo), -CO₂H, -C(O)Oalquilo C₁-C₄, -CON(alquil C₁-C₄)(alquilo C₁-C₄), -CONH(alquilo C₁-C₄), -CONH₂, -NHC(O)(alquilo C₁-C₄), -NHC(O)(fenilo), -N(alquil C₁-C₄)C(O)(alquilo C₁-C₄), -N(alquil C₁-C₄)C(O)(fenilo), -C(O)alquilo C₁-C₄, -C(O)feniloC₁-C₄, -C(O)haloalquilo C₁-C₄, -OC(O)alquilo C₁-C₄, -SO₂(alquilo C₁-C₄), -SO₂(fenilo), -SO₂(haloalquilo C₁-C₄), -SO₂NH₂, -SO₂NH(alquilo C₁-C₄), -SO₂NH(fenilo), -NHSO₂(alquilo C₁-C₄), -NHSO₂(fenilo) y -NHSO₂(haloalquilo C₁-C₄).

En algunos casos, R₁ se selecciona de hidrógeno, alquilo inferior opcionalmente sustituido, fosfato, sulfato, -OR₇, un grupo protector y un sacárido. En casos adicionales, R₂, R₃, R₄ y R₅ se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, sulfato, hidroxilo, -OR₈, un grupo protector y un sacárido. En ciertos casos, R₇ y R₈ se eligen, cada uno independientemente, de acetilo y alquilo inferior opcionalmente sustituido. En algunos casos, cualquiera o todos los R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ se pueden elegir de grupos protectores que pueden separarse selectivamente, incluidos bencil-, silil- y tritil-éteres, y ésteres que no sean acetato. En algunos casos, dos de R₁ a R₅, tomados juntos, forman un grupo protector. En un caso, R₁ se selecciona de -O-bencilo y -OCPh₃. En otro caso, al menos uno de R₂ a R₅ es -O-bencilo. En algunos casos, R₁, R₂ y R₄ son cada uno -O-bencilo. En un caso adicional, R₁ es -OCPh₃ y R₄ es -O-bencilo. En un caso, R₁₁ y R₁₂, tomados juntos, forman hexametileno. En otro caso, R₁₁ y R₁₂ son cada uno isopropilo. En aún otro caso, R₁₁ y R₁₂ son cada uno hexilo.

En casos adicionales, el compuesto de Fórmula VIII se selecciona de manosa, ramnosa, idosa y altrosa opcionalmente protegida. En un caso, el compuesto de Fórmula VIII es manosa opcionalmente protegida. En determinadas circunstancias, la manosa puede estar protegida en una o más de las posiciones C-3, C-4 o C-6. En algunos casos, un solo grupo protector puede estar unido a dos posiciones. Por ejemplo, se puede utilizar un grupo bencilideno para proteger las posiciones tanto C-4 como C-6.

En general, se puede utilizar cualquier grupo protector en el azúcar que no sea fuertemente electrofílico ni reaccione de forma cruzada con compuestos de la Fórmula IX. Grupos protectores adecuados incluyen éteres tales como bencil-éter, tritil-éter, alil-éter o silil-éter opcionalmente sustituido; ésteres tales como acetato, benzoato, cloroacetato, pivalato o levulinato opcionalmente sustituido; y acetales, incluyendo bencilideno, isopropilideno y butano diacetal, entre otros.

5 Además, los grupos protectores se pueden seleccionar de carbamatos y uretanos. En algunos casos, los grupos protectores pueden ser separados selectivamente tal como, p. ej., bencil-, silil- y tritil-éteres, ésteres y otros que no sean acetato. Las posiciones e identidades de los grupos protectores se pueden variar dependiendo de los productos finales deseados. Grupos protectores adicionales conocidos por los expertos en la técnica pueden utilizarse de acuerdo con los casos descritos en esta memoria.

10 En un caso, el compuesto de la Fórmula VIII se trata con un compuesto que tiene la Fórmula $R_{11}R_{12}(Sn=O)$, en donde R_{11} y R_{12} se seleccionan, cada uno independientemente, de alquilo no sustituido, o R_{11} y R_{12} , tomados juntos, se eligen de alquileo no sustituido. En algunos casos, R_{11} y R_{12} son butilo. En un caso, el compuesto que tiene la Fórmula $R_{11}R_{12}(Sn=O)$ se hace reaccionar con el compuesto de Fórmula VIII en un disolvente tal como tolueno, benceno, dimetilformamida, isopropanol, metanol o xileno. En algunos casos, la reacción se realiza a temperatura elevada, opcionalmente bajo reflujo, para formar el compuesto de Fórmula IX. En algunos casos, la mezcla de reacción se calienta a al menos 40, 50, 60, 70 u 80 °C. En casos adicionales, el compuesto que tiene la Fórmula $R_{11}R_{12}(Sn=O)$ se hace reaccionar con el compuesto de Fórmula VIII durante al menos 1, 2, 5, 10, 15 ó 20 horas.

20 En un caso, el compuesto de Fórmula IX se trata con un compuesto que tiene la Fórmula $R_6-(CH_2)_n-L$, opcionalmente en presencia de un haluro de metal. En algunos casos, R_6 se elige de hidrógeno, hidroxilo, carboxilo, alcóxicarbonilo, amino, amida, alquilamino, aminoalquilo, aminoxi, hidrazida, hidrazina, alquileo opcionalmente sustituido, y alquilo C_2-C_6 opcionalmente sustituido. En casos adicionales, n es un número entero de 1 a 10. En ciertos casos, n es 2, 3, 4, 5 ó 6, y R_6 es un alcóxi C_1-C_4 -carbonilo. En un caso, n es 3, y R_6 es metoxycarbonilo. En algunos casos, L es un grupo lábil que no está activado. Ejemplos de grupos lábiles activados incluyen triflatos, sulfonatos, tosilatos, y otros grupos similares. En algunas circunstancias, un grupo lábil menos reactivo puede ser activado por grupos vecinos tales como grupos alilo. En ciertos casos, R_6 no contiene un sustituyente que activa el grupo lábil. En algunos casos, L es bromuro, cloruro o yoduro. En un caso, L es bromuro. En casos adicionales, el compuesto de Fórmula $R_6-(CH_2)_n-L$ es 4-bromobutirato de metilo.

25 En un caso, el compuesto de Fórmula VIII es manosa opcionalmente protegida, y el compuesto de Fórmula $R_6-(CH_2)_n-L$ es 4-bromobutirato de metilo. En otro caso, el compuesto de Fórmula VIII se selecciona de 3,4,6-tri-O-bencil-D-manosa y 3-O-alil-6-O-tritil-D-manosa.

30 En algunos casos, el compuesto de Fórmula IX se trata con un compuesto que tiene la Fórmula $R_6-(CH_2)_n-L$ en presencia de un haluro de metal. Determinados casos de haluros de metales incluyen fluoruros de metales. En algunos casos, el fluoruro de metal se selecciona de fluoruro de cesio, fluoruro de sodio, fluoruro de calcio, fluoruro de magnesio, fluoruro de litio y fluoruro de potasio. En un caso, el fluoruro de metal es fluoruro de cesio. En algunos casos, el tratamiento del compuesto de Fórmula IX con el compuesto de Fórmula $R_6-(CH_2)_n-L$ comprende, además, la adición de haluro de tetraalquilamonio. En algunos casos, el haluro de tetraalquilamonio es yoduro de tetrabutilamonio. En casos adicionales, en la reacción se puede utilizar un haluro de metal. Ejemplos de haluros de metales incluyen yoduros de metales alcalinos tales como yoduro de sodio.

35 En un caso, el compuesto de Fórmula IX se puede combinar con el compuesto de Fórmula $R_6-(CH_2)_n-L$ en un disolvente aprótico polar. Disolventes de este tipo incluyen dimetilformamida, dimetilacetamida, dimetilsulfóxido, nitrometano, hexametilfosforamida, N-metilpirrolidona, acetona, acetonitrilo, acetato de etilo y metil-etil-cetona, entre otros conocidos por los expertos en la técnica.

40 En ciertos casos, el compuesto de Fórmula IX se puede combinar con el compuesto de Fórmula $R_6-(CH_2)_n-L$ a temperatura ambiente. En otros casos, los reaccionantes se combinan y se calientan a al menos 50, 60, 70 u 80 °C para formar un compuesto de Fórmula VII. En casos adicionales, la mezcla se calienta durante al menos 1, 2, 5, 10, 15 ó 20 horas.

45 En algunos casos, los métodos descritos en esta memoria resultan en al menos 50, 60, 70, 80, 90, 95 ó 99% de producto estereoespecífico. En casos adicionales, el rendimiento de producto estereoespecífico es al menos 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 99% del máximo rendimiento posible. En ciertos casos, la relación de producto beta- a alfa-enlazado es de al menos 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1 o 100:1.

50 En un caso, un compuesto de Fórmula VII se puede preparar a gran escala. En algunos casos, "gran escala" se refiere al uso de al menos 50, 100, 500 ó 1000 gramos de un material de partida, compuesto intermedio o reactivo. En casos adicionales, "gran escala" incluye el uso de al menos 10, 25, 50, 100, 250 ó 500 kg de material de partida, compuesto intermedio o reactivo.

En la Figura 8 se muestra un esquema sintético ilustrativo para la preparación de un compuesto de Fórmula A utilizando un reactivo de óxido de dibutil-estaño.

B. Proteína

Los conjugados de oligosacáridos-proteínas descritos en esta memoria pueden comprender cualquier proteína pura, proteína parcialmente purificada o fragmento de la misma, incluyendo proteínas aisladas y proteínas producidos de forma recombinante o sintética. Los términos "pura", "purificada" y "aislada" se refieren a una molécula que está sustancialmente libre de su entorno natural. Por ejemplo, una proteína pura está sustancialmente libre de material celular y/u otras proteínas de la fuente de células o tejido de la que se deriva. El término se refiere a preparaciones que, por ejemplo, son al menos 70% a 80%, 80% a 90%, 90 a 95%; o al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% (p/p) puras.

En otros casos, la proteína puede ser una enzima que tiene actividad óptima, medida por un ensayo de actividad, a un pH que oscila entre 1-7 tal como, p. ej., 1-3, 2-5, 3-6, 4-5, 5-6 ó 4-6. Por ejemplo, la enzima puede tener un pH óptimo a un pH que oscila entre 4-6.

En algunos casos, la proteína puede ser una enzima que tiene un punto isoeléctrico (pI) que oscila entre 1 y 8, tal como, p. ej., 1-3, 2-5, 3-8, 4-5, 5-6, 4-6, 5-8, 6-8 ó 7-8. El pI de una proteína se puede medir utilizando, p. ej., electroforesis en gel de enfoque isoeléctrico.

En ciertos casos, la proteína en sí tiene al menos un oligosacárido (es decir, es una glicoproteína). En casos particulares, la proteína es una glicoproteína terapéutica. Por ejemplo, la glicoproteína terapéutica puede ser una enzima lisosomal, incluida una enzima ERT tal como, p. ej., una de las hidrolasas lisosomales listadas en la Tabla 1. En ciertos casos, la enzima lisosomal se elige de, p. ej., α -glucosidasa (GAA), α -galactosidasa A, esfingomielinasa ácida y α -L-iduronidasa. En casos particulares, la enzima lisosomal es GAA.

Tabla 1: Ejemplos de LSDs y Correspondiente Hidrolasas Lisosomales

Trastorno de almacenamiento lisosomal	Enzima defectuosa
Fabry	α -galactosidasa A
Farber	Ceramidasa ácida
Fucosidosis	α -L-fucosidasa ácida
Gaucher tipos 1, 2 y 3	β -glucosidasa ácida
Gangliosidosis GM ₁	β -galactosidasa ácida
Hunter (mucopolisacaridosis (MPS) II)	Iduronato-2-sulfatasa
Hurler-Scheie, Hurler, Scheie (MPS I)	α -L-iduronidasa
Krabbe	Galactocerebrosidasa
α -Manosidosis	α -manosidasa ácida
β -Manosidosis	β -manosidasa ácida
Maroteaux-Lamy (MPS VI)	Arilsulfatasa B
Leucodistrofia metacromática	Arilsulfatasa A
Morquio A (MPS IV)	N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa) (galactosa-6-sulfatasa)
Morquio B (MPS IV)	β -galactosidasa ácida
Niemann-Pick A y B	Esfingomielinasa ácida
Pompe	α -glucosidasa ácida (α -glucosidasa)
Sandhoff	β -hexosaminidasa B
Sanfilippo A (MPS III)	Heparan N-sulfatasa
Sanfilippo B (MPS III)	α -N-acetilglucosaminidasa
Sanfilippo C (MPS III)	Acetil-CoA: α -glucosaminida N-acetiltransferasa
Sanfilippo D (MPS III)	N-acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa
Schindler-Kanzaki	α -N-acetilgalactosaminidasa
Sialidosis	Sialidasa
Sly (MPS VII)	β -glucuronidasa
Tay-Sachs	β -hexosaminidasa A

En algunos casos, la proteína puede ser una glicoproteína que tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más ligada a oligosacáridos N-enlazados u O-enlazados. En otros casos, la proteína puede tener 1, 2, 3, 4, 5 o más sitios de consenso para la glicosilación N-enlazada u O-enlazada, al menos uno de los cuales está glicosilado.

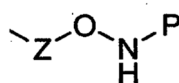
En ciertos casos, la proteína puede ser un ligando para un receptor. Por ejemplo, en algunos casos, la proteína puede ser una glicoproteína que se une a un receptor que reconoce un azúcar tal como, p. ej., manosa o manosa-6-fosfato. En casos particulares, la glicoproteína se puede unir, p. ej., al receptor de asialoglicoproteína, CI-MPR, CD-MPR o el receptor de manosa.

- 5 Secuencias de proteínas adecuadas son bien conocidas en la técnica. Un experto en la técnica puede identificar fácilmente regiones conservadas y motivo(s) funcional(es) significativo(s) comparando secuencias relacionadas, que incluyen, p. ej., secuencias de diferentes especies. Es más probable que los aminoácidos conservados sean importantes para la actividad; a la inversa, aminoácidos que no están conservados indican regiones del polipéptido que son más propensas a tolerar una variación. Siguiendo estas directrices, el experto puede identificar variantes
- 10 funcionales a través de apenas un esfuerzo rutinario. Además, cuando se conoce la estructura cristalina, un experto en la técnica puede examinar la estructura cristalina e identificar los aminoácidos que puedan ser importantes para la estructura y/o función y, por lo tanto, menos tolerantes a la mutación. El experto en la técnica también sería capaz de identificar aminoácidos que puedan tolerar una variación. Además de ello, el experto puede evaluar las posibles mutaciones a la vista de las relaciones estructura-función conocidas.
- 15 Por ejemplo, la secuencia y estructura de α -galactosidasa son bien conocidas. Véase, p. ej., Garman et al., *J. Mol. Biol.*, 337:319-335 (2004); Garman et al., *Mol. Genet. Metabol.*, 77:3-11 (2002); Matsuzawa et al., *Hum. Genet.* 117:317-328 (2005). Véase también GenBank N° de Acceso X05790. En otro ejemplo, la secuencia de GAA es bien conocida (véase, p. ej., Martiniuk et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9641-9644 (1986); Hoefsloot et al., *Biochem. J.* 272:493-497 (1990); Moreland et al., *J. Biol. Chem.* 280:6780-6791 (2005). Véase también GenBank N° de Acceso
- 20 NM_000152. Además, se ha determinado la estructura cristalina de una α -glucosidasa homóloga de *E. coli*, y puede proporcionar conocimientos estructurales en otras α -glucosidasas. Véase Lovering et al., *J. Biol. Chem.* 280:2105-2115 (2005). En un tercer ejemplo, la secuencia de esfingomielinasa ácida es bien conocida (véase, p. ej., Lansmann et al., *Eur. J. Biochem.* 270:1076-1088 (2003)), como son las características clave de la secuencia y la estructura de la esfingomielinasa ácida. Véase, p. ej., Seto et al., *Protein Sci.* 13:3172-3186 (2004); Qiu et al., *J. Biol. Chem.* 278:32744-32752 (2003); Takahashi et al., *Tokohu J. Exp. Med.* 206:333-340 (2005). Véase también GenBank N° de
- 25 Acceso AI587087. Todavía en otro ejemplo, la secuencia de α -L-iduronidasa es bien conocida (véase, p. ej., Scott et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9695-9699 (1991); Scott et al., *Genomics* 13:1311-1313 (1992)), como son características clave de α -L-iduronidasa. Véase, p. ej., Scott et al., *Hum. Mutat.* 6:288-302 (1995); Rempel et al., *Mol. Genet. Metab.* 85:28-37 (2005); Durand et al., *Glycobiology* 7:277-284 (1997); Beesley et al., *Hum. Genet.* 109:503-511 (2001); Brooks et al., *Glycobiology* 11:741-750 (2001); Nieman et al., *Biochemistry* 42:8054-8065 (2003). En un ejemplo adicional, la secuencia de iduronato-2-sulfatasa es bien conocida, como lo son las mutaciones que causan enfermedades. Véase, p. ej., Flomen et al., *Hum. Mol. Genet.* 2:5-10 (1993); Roberts et al., *J. Med. Genet.* 26:309-313 (1989); Wilson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8531-8535 (1990); Wilson et al., *Genomics* 17:773-775 (1993); Sukegwa-Hayasaka et al., *J. Inherit. Metab. Dis* 29: 755-761 (2006) y las referencias en él. La estructura de iduronato-
- 30 2-sulfatasa ha sido modelada. Véase, p. ej., Kim et al., *Hum. Mutat.* 21:193-201 (2003). En otro ejemplo, la secuencia y la estructura de *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (arilsulfatasa B) son conocidas, como lo son las mutaciones que causan enfermedades. Véase, p. ej., Litjens et al., *Hum. Mut.* 1:397-402 (1992); Peters et al., *J. Biol. Chem.* 265:3374-3381 (1990); Schuchman et al., *Genomics* 6: 149-158 (1990); Bond et al., *Structure* 15:277-289 (1997).

C. Enlazador

- 40 En ciertos casos, los conjugados de oligosacáridos-proteínas de la presente divulgación comprenden un enlazador entre los componentes oligosacárido y proteína del conjugado. En otros casos, los conjugados no incluyen un enlazador. En casos que comprenden un enlazador, se puede utilizar cualquier enlazador adecuado conocido para un experto en la técnica, siempre que no interfiera con la unión del oligosacárido a CI-MPR y/o no bloquee la actividad (incluyendo, p. ej., actividad enzimática) de la proteína. Por ejemplo, el enlazador puede ser uno de los enlazadores
- 45 descritos en las patentes de EE.UU. n° 4.671.958; 4.867.973; 5.691.154; 5.846.728; 6.472.506; 6.541.669; 7.141.676; 7.176.185; o 7.232.805 o en la solicitud de patente de EE.UU. N° de Publicación 2006/0228348. En algunos casos, el enlazador se elige de los enlazadores descritos en el documento WO2008/089403.

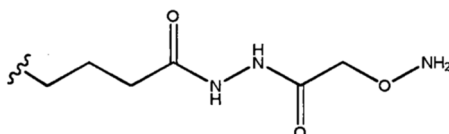
En algunos casos, el enlazador puede tener la fórmula:



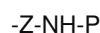
- 50 en donde Z se elige de alquilo opcionalmente sustituido, alqueniilo, alquinilo, arilo, etilenglicol, polietilenglicol (PEG), heteroarilo y heterocicliilo, y P se elige de hidrógeno o un grupo protector de amino. Tal como se utiliza en esta memoria, cualquier grupo químico en el compuesto amino-oxi (tal como, p. ej., alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, heterocicliilo, aciloxi, alcoxi, ariloxi y heterocicliiloxi) puede estar sustituido o no sustituido, y puede estar interrumpido

5 por uno o más heteroátomos o grupos químicos, a menos que se indique lo contrario. Heteroátomos interruptores incluyen nitrógeno, oxígeno y azufre. Los sustituyentes y grupos interruptores químicos se pueden seleccionar, p. ej., de acilo, acilamino, aciloxi, alqueno, alcoxi, alquilo, alquino, amido, amino, arilo, ariloxi, azido, carbamoilo, carboalcoxi, carboxi, ciano, cicloalquilo, formilo, guanidino, halo, heteroarilo, heterociclilo, hidroxilo, iminoamino, nitro, oxo, fosfonamino, sulfinilo, sulfonamino, sulfonato, sulfonilo, tio, tioacilamino, tioureido y ureido. Los sustituyentes pueden estar sustituidos o no sustituidos, y pueden estar interrumpidos o terminados por uno o más heteroátomos tales como, p. ej., nitrógeno, azufre y oxígeno.

En un caso, el enlazador puede formarse por reacción con:

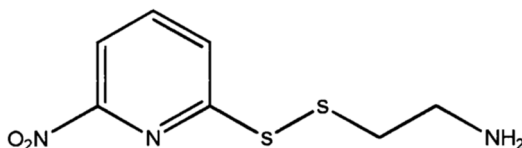


10 En realizaciones adicionales, el enlazador puede tener la fórmula:



en donde Z y P son como se definen anteriormente.

15 En otro caso, el enlazador puede contener un enlace disulfuro. Enlazadores disulfuro se pueden utilizar para unir oligosacáridos a una cadena principal de la proteína, por ejemplo a través de una cisteína. En un caso, el enlazador puede comprender o puede formarse a partir de la reacción con:



20 En general, el enlazador puede ser de una longitud adecuada de manera que evite el impedimento estérico entre los componentes oligosacárido y proteína del conjugado, y no interfiere con la unión del oligosacárido a CI-MPR y/o con la actividad (incluyendo, p. ej., la actividad enzimática) de la proteína. Por ejemplo, el enlazador puede comprender 1-100, 1-60, 5-60, 5-40, 2-50, 2-20, 5-10 ó 5-20 átomos lineales, en donde el enlazador se une a la proteína y al oligosacárido por medio de un éster, amida, hidrazona, oxima, semicarbazona, éter, tioéter, fosforotioato, fosfonato, tioéster y/o enlace disulfuro. Los átomos lineales restantes en el enlazador se eligen, p. ej., de carbono, oxígeno, nitrógeno y azufre, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente incluido en un anillo carbocíclico, heterocíclico, arilo o heteroarilo. Los átomos de carbono lineales en el enlazador pueden estar opcionalmente sustituidos con un sustituyente elegido de halo, hidroxilo, nitro, haloalquilo, alquilo, alcarilo, arilo, aralquilo, alcoxi, ariloxi, amino, acilamino, alquilcarbamoilo, arilcarbamoilo, aminoalquilo, alcocarbonilo, carboxi, hidroxialquilo, alcanosulfonilo, arenosulfonilo, alcanosulfonamido, arenosulfonamido, aralquilsulfonamido, alquilcarbonilo, aciloxi, ciano y ureido. Un átomo de nitrógeno lineal en el enlazador puede estar opcionalmente sustituido con acilo, sulfonilo, alquilo, alcarilo, arilo, aralquilo, alcocarbonilo. Un átomo de azufre lineal en el enlazador puede estar opcionalmente oxidado.

30 En ciertos casos, el enlazador puede ser escindible, según se describe, p. ej., en la Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Publicación 2006/0228348 y las patentes de EE.UU. n°s. 4.867.973; 7.176.185; 7.232.805. En algunos casos, el enlazador puede ser escindible bajo condiciones lisosomales.

D. Métodos de Preparación de un Conjugado de Oligosacárido-Proteína

35 Los conjugados de la presente divulgación tales como, p. ej., los conjugados que comprenden oligosacáridos de Fórmula I, II, III, IV, V o VI se pueden preparar por cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la técnica. En cualquiera de estos métodos, un enlazador adecuado puede estar presente en cualquiera del oligosacárido y la proteína, o en ambos. Por ejemplo, los conjugados se pueden preparar según se describe, p. ej., en Zhu et al., *Biochem. J.* 389:619-628 (2005); Zhu et al., *J. Biol. Chem.* 279:50336-50341 (2004); Patentes de EE.UU. N°s 5.153.312; 5.212.298; 5.280.113; 5.306.492; 5.521.290; 7.001.994; Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N° 60/885.457 ó 60/885.471.

En ciertos casos, el oligosacárido se puede conjugar a un aminoácido de una proteína tal como una cisteína o lisina. Por ejemplo, el sacárido se puede conjugar a través de una lisina modificando los residuos lisina en la proteína con 4-formilbenzoato de succinimidilo. Adicionalmente, el sacárido se puede conjugar a través de una lisina mediante la modificación de lisinas con el reactivo de Traut o enlazadores que incluyen disulfuros tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) o tioles protegidos tales como N-succinimidil-S-acetiltoacetato (SATA).

En casos adicionales, el oligosacárido se puede conjugar a un glicano sobre una glicoproteína. En un caso, el oligosacárido se puede conjugar a un residuo ácido siálico en un glicano. En otros casos, el oligosacárido se puede conjugar a manosa, fucosa, galactosa y/o residuos ácido siálico en un glicano. Para la conjugación a través de galactosa, la glicoproteína primero puede tratarse con sialidasa para separar residuos ácido siálico, después tratarse con galactosa oxidasa antes de la reacción con el oligosacárido.

Por ejemplo, el conjugado de oligosacárido-proteína se puede preparar mediante la reacción de cualquier grupo funcional que pueda estar presente (incluyendo, p. ej., una amina, un tiol, un ácido carboxílico, un hidroxilo) y/o se puede introducir en una proteína con un segundo grupo funcional adecuado en un oligosacárido. Métodos para la introducción de grupos funcionales son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una glicoproteína que tiene al menos un grupo carbonilo se puede obtener mediante oxidación de la glicoproteína con, p. ej., peryodato (p. ej., peryodato de sodio) o con galactosa oxidasa. En otro ejemplo, un grupo carbonilo se puede introducir mediante el uso de un sistema de expresión que tiene un código genético expandido según se describe, p. ej., en Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 56-61 (2003). Véase también, p. ej., la Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Publicación 2006/0228348, que describe la introducción de grupos reactivos en una glicoproteína.

En algunos casos, la glicoproteína se oxida con peryodato antes de la conjugación con un oligosacárido modificado con un enlazador que contiene un grupo reactivo con carbonilo. Ejemplos de grupos reactivos con carbonilo incluyen aminoxi, hidrazina o hidrazida, entre otros. En ciertos casos, la glicoproteína se oxida con peryodato aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10 ó 22,5 mM. En ciertos casos, la glicoproteína se oxida bajo condiciones suficientes para oxidar residuos ácido siálico en los glicanos de glicoproteínas, y minimizan la oxidación de fucosa y manosa.

En casos ilustrativos, la concentración de peryodato utilizada es menor que aproximadamente 2, 3, 4 ó 5 mM. En un caso, el peryodato es peryodato de sodio.

En ciertos casos, se pueden separar agregados de proteínas que se forman durante la conjugación utilizando diversos métodos de cromatografía. En un caso, se puede emplear la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Ejemplos de columnas de HIC incluyen Butyl 650C y 650M, Hexyl 650C, Phenyl 6FF, Capto Octyl y Capto Phenyl. En otros casos, los agregados pueden separarse por cromatografía de quelación de metales tales como cobre, níquel, cobalto o mercurio. En un caso, se puede utilizar una columna de cobre en modo de unir-y-eluir o en modo de flujo continuo. Tampones de elución ilustrativos incluyen glicina o imidazol. En algunos casos, la agregación se reduce en un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ó 90%. En casos adicionales, el conjugado contiene menos de 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 ó 3% de agregado.

E. Conjugados

Los componentes oligosacárido y proteína del conjugado pueden ser, por ejemplo, cualquier oligosacárido y proteína descritos en esta memoria. En ciertos casos, el conjugado de oligosacárido-proteína es un conjugado de oligosacárido-glicoproteína. En algunos casos, el conjugado de oligosacárido-proteína es un conjugado de oligosacárido-enzima lisosomal.

En algunos casos, el conjugado comprende un oligosacárido elegido de los oligosacáridos de Fórmulas I-VI. En ciertos casos, el conjugado comprende una media de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ó 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 ó 15-20 moléculas de oligosacárido por glicoproteína.

En algunos casos, el conjugado comprende al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 moléculas de oligosacárido por molécula de proteína. En casos adicionales, el conjugado comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 moles de M6P por mol de proteína.

En ciertos casos, el conjugado exhibe actividad completa (tal como actividad enzimática), en comparación con la proteína no conjugada. En otros casos, el conjugado puede exhibir al menos, p. ej., 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de actividad relativa a la proteína no conjugada. Ensayos para medir la actividad, incluida la actividad enzimática, son bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Eisenthal et al., *Enzyme Assays: A practical Approach*, Oxford University Press: Nueva York, 2002. Ensayos para medir la actividad de enzimas lisosomales se describen, p. ej., en Li et al., *Clin. Chem.* 50:1785-1796 (2004); Civallero et al., *Clin. Chim. Acta* 372:98-102 (2006).

Un ensayo ilustrativo para medir la actividad de GAA se describe en el Ejemplo 6. Véase también van Diggelen et al., *J. Inherit. Metab. Dis.* 28:733-741 (2005) (que describen un ensayo para la actividad de esfingomielinasa ácida); Downing et al., *Plant Biotechnol.* 4:169-181 (2006) (que describen un ensayo para la actividad de α -L-iduronidasa); Voznyi et al., *J. Inherit. Metab. Dis.* 24:675-80 (2001) (que describen un ensayo para la actividad iduronato-2-sulfatasa); Murray et al., *Mol. Genet. Metab.* 90:307-312 (2007) (que describen un ensayo para la actividad A de α -galactosidasa); Brooks et al., *J. Inher. Metab. Dis.* 14:5-12 (1991) (que describen un ensayo para la actividad de N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa).

En ciertos casos, el conjugado es internalizado más eficazmente mediante una célula diana (p. ej., a través de endocitosis mediada por CI-MPR) que es la proteína no conjugada correspondiente. Por ejemplo, el conjugado puede ser internalizado más eficazmente que la proteína no conjugada, p. ej., en al menos un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150% o 200% (mol/mol) en un período de tiempo dado. En otros casos, tantas como al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100 ó 1000 veces (mol/mol) del conjugado pueden ser internalizadas por un tipo de célula de interés (tal como, p. ej., células de mioblasto L6 o células de fibroblasto de Pompe humanas (NIGMS Human Genetic Cell Repository, N° de Cat. GM20005) con relación a la proteína no conjugada, en un período de tiempo dado. El período de tiempo de referencia puede ser, por ejemplo, 10, 30, 45 minutos o 1, 2, 3, 5, 6, 12, 24, 48 ó 72 horas, o más. La absorción *in vitro* en células de mioblasto L6 se puede determinar según se describe, p. ej., en el Ejemplo 6 y Zhu et al., *J. Biol. Chem.* 279:50336-50341 (2004).

En ciertos casos, el conjugado exhibe una unión incrementada a CI-MPR con relación a la proteína no conjugada. Por ejemplo, el conjugado puede exhibir al menos, p. ej., 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 1.000 ó 10.000 veces afinidad mejorada por CI-MPR, con relación a la proteína no conjugada, según se determina, p. ej., mediante la comparación de las constantes de asociación o disociación de la proteína conjugada y no conjugada. La unión a CI-MPR puede medirse según se describe, p. ej., en el Ejemplo 5 y en Zhu et al., *J. Biol. Chem.* 279:50336-50341 (2004).

En ciertos casos, el conjugado puede exhibir ningún aumento en la absorción por el receptor de manosa con respecto a la proteína no conjugada, o menos de 5, 10, 15, 20, 30, 40 ó 50% de captación por el receptor de manosa con respecto a la proteína no conjugada. La captación por el receptor de manosa en células de macrófagos alveolares de rata se puede determinar *in vitro* según se describe, p. ej., en Zhu et al., *Biochem. J.* 389:619-628 (2005).

En ciertos casos, el conjugado puede exhibir, p. ej., una reducción de al menos 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, ó 1.000 veces de los niveles de un sustrato acumulado de una enzima metabólicamente defectuosa en un modelo animal adecuado. Por ejemplo, la reducción de los niveles de glucógeno en un modelo de ratón de Pompe se puede medir según se describe, p. ej., en Zhu et al., *J. Biol. Chem.* 279: 50336-50341 (2004). Alternativamente, se puede utilizar un modelo de codorniz de Pompe descrito, p. ej., en Kikuchi et al., *J. Clin. Invest.* 101:827-33 (1998). En otro ejemplo, la reducción de glicosaminoglicanos almacenados en el hígado y el bazo se puede determinar en un modelo felino de mucopolisacaridosis I según se describe en Kakkis et al., *Mol. Genet. Metab.* 72:199-208 (2001). Además, la reducción de los niveles de globotriaosilceramida se puede determinar en un modelo de ratón Fabry, según se describe, p. ej., en Ioannou et al., *Am. J. Hum. Genet.* 68: 14-25 (2001). Todavía en otro ejemplo, la reducción de los niveles de esfingomielina se puede determinar en el modelo murino de la enfermedad de Niemann-Pick de los tipos A y B, según se describe, p. ej., en Horinouchi et al., *Nat. Genet.* 10: 288-293 (1995).

II. Composiciones farmacéuticas

La divulgación también proporciona el uso de un conjugado de oligosacárido-proteína que comprende (1) una proteína y (2) un oligosacárido de cualquiera de las Fórmulas I-VI en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno de almacenamiento lisosomal en un sujeto en necesidad del mismo.

Las composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria comprenden un conjugado de oligosacárido-proteína, según se describe arriba, y al menos un aditivo tal como una carga, agente conferidor de consistencia, desintegrante, tampón, estabilizador o excipiente.

Las composiciones farmacéuticas puede comprender un conjugado que comprende un oligosacárido de cualquiera de las Fórmulas I-VI y una enzima lisosomal.

Técnicas de formulación farmacéutica estándar son bien conocidas por los expertos en la técnica (véase, p. ej., 2005 Physicians' Desk Reference®, Thomson Healthcare: Montvale, NJ, 2004; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª ed., Gennado et al., comps. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000). Aditivos farmacéuticos adecuados incluyen, p. ej., manitol, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, greda, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche descremada en polvo,

glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Las composiciones también pueden contener reactivos tampón del pH y agentes humectantes o emulsionantes. Las composiciones pueden o pueden no contener conservantes.

5 Las composiciones farmacéuticas que comprenden conjugados de α -galactosidasa A pueden comprender uno o más excipientes tales como, p. ej., manitol, fosfato sódico monobásico monohidrato y/o fosfato sódico dibásico heptahidrato. Las composiciones farmacéuticas que comprenden conjugados de α -glucosidasa pueden comprender uno o más de los siguientes: manitol, polisorbato 80, fosfato sódico dibásico heptahidrato y fosfato sódico monobásico monohidrato. Las composiciones farmacéuticas que comprenden conjugados de α -glucosidasa pueden comprender histidina 10 mM pH 6,5 con hasta glicina al 2%, manitol al 2% y polisorbato 80 hasta al 0,01%.

10 La composición farmacéutica puede comprender cualquiera de los conjugados descritos en esta memoria, ya sea como el único compuesto activo o en combinación con otro compuesto, composición o material biológico. Por ejemplo, la composición farmacéutica también puede comprender una o más moléculas pequeñas, útiles para el tratamiento de un LSD y/o un efecto secundario asociado con el LSD. En algunos casos, la composición puede comprender miglustat y/o uno o más compuestos descritos, p. ej., en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2003/0050299, 2003/0153768; 2005/0222244; o 2005/0267094.

15 La composición farmacéutica también puede comprender uno o más inmunosupresores.

La formulación de composiciones farmacéuticas puede variar dependiendo de la vía pretendida de las administraciones y otros parámetros (véase, p. ej., Rowe et al., *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 4ª ed., APHA Publications, 2003). En algunos casos, la composición puede ser una disolución estéril, no pirógena, torta liofilizada o polvo de blanco a blancuzco a ser administrado mediante inyección intravenosa después de la reconstitución con agua estéril para inyección, USP.

La composición puede ser una disolución estéril, no pirógena.

25 La administración de una composición farmacéutica descrita en esta memoria no se limita a cualquier sistema de administración particular y puede incluir, sin limitación, la parenteral (incluyendo inyección subcutánea, intravenosa, intracraneal, intramedular, intraarticular, intramuscular, intratecal o intraperitoneal), transdérmica, o por vía oral (por ejemplo, en cápsulas, suspensiones o comprimidos). La administración a un individuo puede producirse en una dosis única o en administraciones repetidas, y en cualquiera de una diversidad de formas de sales fisiológicamente aceptables, y/o con un soporte y/o aditivo farmacéuticamente aceptable como parte de una composición farmacéutica.

30 Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las de aniones, p. ej., acetato, bencenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio, camsilato, carbonato, cloruro, citrato, dihidrocloruro, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, hidrobrouro, hidrocloreuro, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, bromuro de metilo, nitrato de metilo, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, pamoato (embonato), pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartrato y aniones teoclate/trietoduro; de cationes (orgánicos) benzatrina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina y procaina; y de cationes (metálicos) aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio y zinc. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen también aquellas sales descritas, p. ej., en Berge et al., *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19 (1977).

40 Los conjugados descritos en esta memoria se administran en cantidades terapéuticamente eficaces. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar con la edad, el estado general y el sexo del sujeto, así como la gravedad de la afección médica en el sujeto. La dosificación se puede determinar por un médico y ajustar, según sea necesario, para adaptarse a los efectos observados del tratamiento. La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos se pueden determinar mediante procesos farmacéuticos estándares *in vitro* y/o *in vivo*. La relación de la dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico (o relación terapéutica), y puede expresarse como la relación DL_{50}/DE_{50} , en donde la DL_{50} es la dosis letal para el 50% de la población y la DE_{50} es la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población. Los conjugados pueden exhibir índices terapéuticos de al menos, p. ej., 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 20.

50 Los datos obtenidos a partir de ensayos *in vitro* y estudios en animales, por ejemplo, se pueden utilizar en formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con baja, poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La dosis terapéuticamente eficaz de cualquier conjugado se puede estimar inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Una dosis puede formularse en modelos con animales para conseguir un intervalo de concentraciones en plasma circulante que incluye la CI_{50} (es decir, la concentración del conjugado de

ensayo que consigue una inhibición semi-máxima de los síntomas) según se determina en experimentos *in vitro*. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento o mediante un ensayo de actividad enzimática apropiado. Los efectos de cualquier dosificación particular se pueden monitorizar mediante un bioensayo adecuado de puntos finales.

- 5 A menos que se indique lo contrario, los conjugados se pueden administrar en una dosis aproximada de 1 µg/kg a 500 mg/kg, dependiendo de la gravedad de los síntomas y de la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, los conjugados se pueden administrar mediante infusión intravenosa lenta en un ajuste de paciente externo cada, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más días, o, p. ej., mediante administración semanal, quincenal, mensual o bimensual. La dosis terapéuticamente eficaz apropiada de un compuesto se selecciona por un médico que realiza el tratamiento y oscilaría entre aproximadamente 1 µg/kg a 500 mg/kg, de 1 µg/kg a 10 mg/kg, de 1 µg/kg a 1 mg / kg, de 10 µg/kg a 1 mg/kg, de 10 µg/kg a 100 µg/kg, de 100 µg a 1 mg/kg, y de 500 µg/kg a 5 mg/kg. En algunos casos la dosis terapéutica apropiada se elige, p. ej., de 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 100 mg / kg.

- 15 Conjugados que comprenden α-galactosidasa A se pueden administrar mediante infusión intravenosa a una dosis de, p. ej., 1,0 mg/kg de peso corporal cada dos semanas o cuatro semanas a una velocidad de infusión de, p. ej., menos de o igual a 10, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 ó 33 mg/hora). En otro ejemplo, conjugados que comprenden α-glucosidasa se pueden administrar mediante inyección intravenosa a una dosis de, p. ej., 20 mg/kg o 40 mg/kg cada dos o cuatro semanas, a lo largo de aproximadamente, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 horas. La velocidad de administración de α-glucosidasa se puede iniciar, p. ej., en 1 mg/kg/h y luego incrementar, p. ej., en 2 mg/kg/h cada 30 minutos, después de establecer la tolerancia del sujeto a la velocidad de infusión, hasta un máximo de, p. ej., 7 mg/kg/h. Conjugados que comprenden N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa se pueden administrar mediante infusión intravenosa a una dosis de, p. ej., 1,0 mg/kg de peso corporal cada semana durante aproximadamente, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 horas. Adicionalmente, ejemplos de dosis específicas pueden encontrarse en Physicians' Desk Reference®.

III. Métodos de Tratar Trastornos de Almacenamiento Lisosomal

- 25 La divulgación también proporciona métodos de tratar trastornos de almacenamiento lisosomal tales como, p. ej., los descritos en la Tabla 1. La divulgación proporciona, además, métodos de fijar como objetivo proteínas al lisosoma mediante conjugación con oligosacáridos que comprenden manosa-6-fosfato.

- 30 En ciertos casos, los métodos comprenden administrar a un sujeto (en que un sujeto incluye, p. ej., un mamífero tal como un ser humano, gato, perro, ratón o rata, o un pájaro tal como, p. ej., una codorniz) que tiene un trastorno de almacenamiento lisosomal un conjugado de oligosacárido-proteína en una cantidad terapéuticamente eficaz. El conjugado de oligosacárido-proteína puede ser un conjugado de una glicoproteína tal como una enzima lisosomal (p. ej., una enzima lisosomal listada en la Tabla 1), con un oligosacárido que comprende manosa-6-fosfato tal como un oligosacárido de cualquiera de las Fórmulas I- VI. En un caso, el método comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los conjugados divulgados en el presente documento.

- 40 En ciertos casos, los métodos comprenden administrar conjugados, que comprenden (1) una proteína y (2) un oligosacárido que comprende manosa-6-fosfato tal como un oligosacárido de cualquiera de las Fórmulas I-VI con una o más de otras terapias. Las una o más de otras terapias pueden administrarse concurrentemente con (incluyendo la administración concurrente como una formulación combinada), antes de, o después de la administración de los conjugados.

- 45 En algunos casos, los métodos comprenden tratar a un sujeto (antes, después o durante el tratamiento con un conjugado descrito en esta memoria) con un antipirético, antihistamínico y/o inmunosupresor. En algunos casos, un sujeto puede ser tratado con un antipirético, antihistamínico y/o inmunosupresor antes del tratamiento con un conjugado de oligosacárido-glicoproteína con el fin de disminuir o prevenir reacciones asociadas con la infusión. Por ejemplo, los sujetos pueden ser tratados previamente con uno o más de acetaminofeno, azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina A, difenhidramina, metotrexato, micofenolato mofetil, esteroides orales o rapamicina.

- 50 En algunos casos, los métodos comprenden tratar sujetos con uno o más de acetaminofeno, azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina A, difenhidramina, metotrexato, micofenolato mofetil, esteroides orales, o rapamicina a o aproximadamente, p. ej., $t = 0$ (el tiempo de administración del conjugado) y/o $t = 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120$ y 144 horas para, p. ej., las primeras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más incidencias de tratamiento con un conjugado. Por ejemplo, un sujeto con la enfermedad de Fabry o la enfermedad de Pompe puede ser tratado con metotrexato (p. ej. con 0,1, 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 mg/kg de metotrexato, o más) a o aproximadamente, p. ej., $t = 0, 24$ y 48 horas durante, p. ej., las primeras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 semanas de tratamiento con un conjugado. La tolerancia inmunológica a conjugados puede ser inducida en un sujeto

con un trastorno de almacenamiento lisosomal tal como, p. ej., mucopolisacaridosis I, mediante tratamiento con ciclosporina A y azatioprina. Por ejemplo, el sujeto puede ser tratado con ciclosporina A y azatioprina según se describe en Kakkis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:829-834 (2004).

En algunos casos, los métodos comprenden tratar a un sujeto (antes, después, o durante el tratamiento con un conjugado) con una terapia de moléculas pequeñas y/o terapia génica, incluyendo la terapia de moléculas pequeñas y la terapia génica dirigida hacia el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosomal. La terapia de moléculas pequeñas puede comprender la administración de miglustat y/o uno o más compuestos descritos, p. ej., en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N°s 2003/0050299, 2003/0153768; 2005/0222244; y 2005/0267094. La terapia génica puede realizarse según se describe, p. ej., en las patentes de EE.UU. N°s 5.952.516.; 6.066.626; 6.071.890; y 6.287.857; y la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N°. 2003/0087868.

Los términos y expresiones "tratamiento", "método terapéutico" y sus cognatos se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas/preventivas. Por lo tanto, las personas que necesitan tratamiento pueden incluir individuos que ya tienen una enfermedad de almacenamiento lisosomal particular, así como aquellos en riesgo de la enfermedad (es decir, aquellos que son propensos a adquirir finalmente el trastorno o ciertos síntomas del trastorno).

Los métodos terapéuticos resultan en la prevención o mejora de los síntomas o en un resultado biológico deseado de otra manera, y pueden ser evaluados por los signos clínicos mejorados o aparición de la enfermedad con retraso, actividad incrementada de la enzima metabólicamente defectuosa y/o niveles disminuidos del sustrato acumulado de la enzima metabólicamente defectuosa.

En algunos casos, los métodos comprenden administrar conjugados que comprenden (1) una enzima lisosomal y (2) un oligosacárido de cualquiera de las Fórmulas I-VI a un sujeto, aumentando con ello la actividad de la enzima lisosomal deficiente en el sujeto mediante, p. ej., al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 100%, en relación con la actividad endógena. En algunos casos, los métodos comprenden administrar conjugados que comprenden (1) una enzima lisosomal y (2) un oligosacárido de cualquiera de las Fórmulas I-VI a un sujeto, aumentando de este modo la actividad enzimática deficiente en el sujeto, p. ej., en al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100 ó 1000 veces, en relación con la actividad endógena. La actividad enzimática incrementada puede ser determinada, p. ej., mediante una reducción en los síntomas clínicos o mediante un ensayo clínico o biológico adecuado.

En algunos casos, los métodos comprenden administrar conjugados de la divulgación que comprenden GAA a un sujeto, tratando de este modo la enfermedad de Pompe (también conocida como deficiencia de α -glucosidasa ácida, deficiencia de maltasa ácida, enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo II, glucogenosis II y deficiencia de α -glucosidasa lisosomal). La GAA humana recombinante (rhGAA) se puede preparar en células de ovario de hámster chino (CHO). En casos adicionales, rhGAA se puede conjugar con un oligosacárido elegido del Oligosacárido 103; una mezcla de 103 y la Fórmula A; Oligosacáridos 128, 129, 130, 131, 132, 133 ó 136; y cualquier combinación de los mismos. En un caso, el oligosacárido se elige de los Oligosacáridos 128 y 136. En casos adicionales, se administra a un paciente un conjugado que contiene al menos 5 moles de Fórmula A por mol de GAA. En ciertos casos, el paciente es un adulto a quien se ha diagnosticado la enfermedad de Pompe. En otros casos, el paciente es un bebé o un niño.

La actividad incrementada de GAA puede determinarse mediante observación bioquímica (véase, p. ej., Zhu et al., *J. Biol. Chem.* 279: 50336-50341 (2004)) o histológica de la acumulación reducida de glucógeno lisosomal en, p. ej., miocitos cardiacos, miocitos del esqueleto o fibroblastos de la piel. La actividad de GAA también puede ensayarse en, p. ej., una muestra de biopsia muscular, en fibroblastos de piel cultivados, en linfocitos y en manchas de sangre seca. Ensayos de mancha de sangre seca se describen en, p. ej., Umpathysivam et al., *Clin. Chem.* 47: 1378-1383 (2001) y Li et al., *Clin. Chem.* 50:1785-1796 (2004). El tratamiento de la enfermedad de Pompe también se puede evaluar mediante, p. ej., los niveles en suero de creatinina quinasa, las ganancias en la función motriz (p. ej., tal como se evalúa por la Escala Motriz del Infante de Alberta), los cambios en el índice de masa ventricular izquierda medidos por ecocardiograma, y la actividad eléctrica cardíaca, medida por electrocardiograma. La administración de conjugados de GAA también puede resultar en una reducción de uno o más síntomas de la enfermedad de Pompe tales como cardiomegalia, cardiomiopatía, somnolencia diurna, disnea por ejercicio, fallo en el desarrollo, dificultades para alimentarse, "flacidez", alteraciones de la marcha, dolores de cabeza, hipotonía, organomegalia (p. ej., ensanchamiento del corazón, lengua, hígado), lordosis, pérdida del equilibrio, dolor de la zona lumbar, dolores de cabeza matutinos, debilidad muscular, insuficiencia respiratoria, alamiento escapular, escoliosis, reflejos tendinosos profundos reducidos, apnea del sueño, la susceptibilidad a las infecciones respiratorias y vómitos.

En otros casos, los métodos comprenden administrar conjugados que comprenden α -galactosidasa A a un sujeto, tratando de este modo la enfermedad de Fabry. La enfermedad de Fabry, o enfermedad de Anderson-Fabry, es un trastorno del almacenamiento lisosomal raro, ligado al cromosoma X, marcado por una deficiencia de α -galactosidasa

A, y da como resultado la acumulación de globotriaosilceramida (GL3) y otros glucoesfingolípidos neutros en los lisosomas de tejidos viscerales y de células endoteliales, periteliales y musculares. La acumulación de los glucoesfingolípidos neutros en la vasculatura resulta en el estrechamiento y la dilatación de los vasos sanguíneos, y en última instancia en isquemia e infarto.

5 La administración de conjugados que comprende α -galactosidasa A puede resultar en una reducción de uno o más síntomas clínicos de la enfermedad de Fabry, incluyendo, p. ej., acroparestesia, angina, angioqueratoma, arritmia, ataxia de la marcha, dolor ardiente y/o dolor por hormigueo en las manos y los pies, cataratas, intolerancia al frío, alteraciones de la conducción, verticilado de la córnea, enfermedad de la arteria coronaria, demencia, depresión, diarrea, cámaras cardíacas dilatadas, mareos, cardiomegalia, cardiomiopatía, diplopía, disartria, fatiga, fiebre con tasa
10 de sedimentación de eritrocitos elevada, problemas de audición, enfermedades del corazón, problemas de válvulas cardíacas, intolerancia al calor, hemiataxia, hemiparesia, hipohidrosis, alteración de la sudoración, infarto, isquemia, dolor en las articulaciones, enfermedad renal, hipertrofia ventricular izquierda, anomalías lenticulares, opacidad lenticular, lipiduria, debilidad muscular, infarto de miocardio, náuseas, nistagmo, dolor (p. ej., dolor intenso que irradia por todo el cuerpo), polidipsia, proteinuria, dolor post-prandial, insuficiencia renal, alteraciones retinianas, zumbido en los oídos, dolor de estómago, cambios en las ondas ST-T, accidente cerebrovascular, uremia, enfermedad valvular, vértigo, vómitos y debilidad. La administración de conjugados de α -galactosidasa A puede dar lugar a un actividad incrementada de la α -galactosidasa A, p. ej., en plasma, lágrimas, leucocitos, tejidos biopsiados o fibroblastos de piel cultivados. La administración de conjugados de α -galactosidasa A también puede resultar en un hallazgo histológico de una reducción (p. ej., de al menos 10%) o la falta de aumento de los glóbulos de lípidos birrefringentes. También
15 puede resultar en una disminución en los glóbulos de lípidos en el sedimento urinario, función renal mejorada, medida por los niveles de creatinina en suero o el aclaramiento de creatinina, y proteinuria reducida. La administración de conjugados de α -galactosidasa A también puede resultar en una reducción en inclusiones de GL3 en el endotelio capilar del riñón, corazón y piel. Ensayos adicionales para medir la eficacia del tratamiento de la enfermedad de Fabry se pueden encontrar en, p. ej., MacDermott et al., *J. Med. Genet.* 38: 750-760 (2001).

25 En otros casos, los métodos comprenden administrar conjugados que comprenden esfingomielinasa ácida a un sujeto, tratando de este modo la enfermedad de Niemann-Pick A o de Niemann-Pick B, o deficiencia de la esfingomielinasa ácida. La administración de conjugados de esfingomielinasa ácida puede resultar en una reducción de uno o más de los síntomas clínicos de la enfermedad de Niemann-Pick A o de Niemann-Pick B que incluyen, p. ej., niveles anormales de colesterol, niveles anormales de lípidos, ataxia, alteraciones de la sangre, manchas rojas cerezas en el ojo,
30 infecciones pulmonares frecuentes, retraso del crecimiento, hepatoesplenomegalia, bajo número de plaquetas, linfadenopatía, neuropatía periférica, problemas con la función pulmonar, falta de aliento, cambios en la pigmentación de la piel o xantomas. En algunos casos, los conjugados pueden administrarse por vía intracraneal.

En otros casos, los métodos comprenden administrar conjugados que comprenden α -L-iduronidasa a un sujeto, tratando de este modo la mucopolisacaridosis I (incluidas, p. ej., formas de Hurler y Hurler-Scheie de MPS I). La administración de conjugados de α -L-iduronidasa puede resultar en una reducción de uno o más síntomas clínicos de
35 MPS I, incluyendo, p. ej., la regurgitación aórtica, estenosis aórtica, síndrome del túnel carpiano, rinitis crónica, pérdida de audición conductiva, estreñimiento, opacidad corneal, retraso en el desarrollo, diarrea, distensión abdominal, cifosis dorso-lumbar, deformidad de Gibbus de la espalda, hepatoesplenomegalia, hidrocefalia, hernia inguinal, cifosis, retraso mental, regurgitación mitral, estenosis mitral, ceguera nocturna, glaucoma de ángulo abierto, función de la mano mala, artropatía progresiva, infecciones respiratorias recurrentes, insuficiencia respiratoria, degeneración de la retina, escoliosis, pérdida auditiva neurosensorial, dolor de espalda intenso, rinorrea, apnea del sueño, compresión de la médula espinal, atrofia tenar, hernia umbilical y complicaciones de las vías respiratorias superiores.

Todavía en otros casos, los métodos comprenden administrar conjugados que comprenden iduronato-2-sulfatasa a un sujeto, tratando de este modo la mucopolisacaridosis II (enfermedad de Hunter). La administración de conjugados
45 de iduronato-2-sulfatasa puede resultar en una reducción de uno o más síntomas clínicos de MPS II, incluyendo, p. ej., enfermedad valvular cardíaca, insuficiencia cardiopulmonar, síndrome del túnel carpiano, diarrea crónica, edema de papila crónica, rasgos faciales toscos, opacidades de la córnea, estrechamiento de la arteria coronaria, sordera, dismorfia, disostosis, infecciones del oído, deterioro de la audición, hepatoesplenomegalia, hidrocefalia, hernia inguinal, rigidez en las articulaciones, cifoescoliosis, retraso mental, enfermedad miocárdica, engrosamiento del miocardio, hipertensión pulmonar, disfunción de la retina, anomalías del esqueleto, hernia umbilical, infecciones de las
50 vías respiratorias superiores y disfunción valvular.

En aún otros casos, los métodos comprenden administrar conjugados que comprenden *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (arilsulfatasa B) a un sujeto, tratando de este modo la mucopolisacaridosis VI (síndrome de Maroteaux-Lamy). La administración de conjugados de *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa puede resultar en una reducción de uno
55 o más síntomas clínicos de MPS VI, incluyendo, p. ej., ceguera, anomalías cardíacas, enfermedades cardiopulmonares, rasgos faciales toscos, opacidad corneal, infecciones del oído, retraso del crecimiento, hepatomegalia, hepatoesplenomegalia, deformaciones de las articulaciones, síndromes de atrapamiento del nervio,

dificultades respiratorias, deformaciones del esqueleto, compresión de la médula espinal, esplenomegalia, rigidez en las articulaciones y obstrucción de las vías respiratorias superiores.

La descripción que antecede y la siguiente son ilustrativas y explicativas solamente y no son restrictivas de la divulgación. Los compuestos marcados con * en los siguientes Ejemplos preparatorios son compuestos de las reivindicaciones actuales.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Procesos Generales en la Síntesis de Oligosacáridos

A. Glicosilación:

Se llevaron a cabo reacciones de glicosilación utilizando métodos estándares mediante la combinación de un sacárido donante y un sacárido receptor. En síntesis, los compuestos donantes y aceptores se disolvieron en DCM anhidro bajo nitrógeno seco en presencia de tamices moleculares de 4A activados por calor a menos que se indique lo contrario. La disolución se enfrió y se mantuvo a 0 °C durante ~ 30 min, seguido de la adición lenta de TMSOTf (1 eq). Las reacciones se comprobaron por CCF (gel de sílice) utilizando hexanos/EtOAc y se enfrió rápidamente con TEA o base de Hünig (1,05 eq). Las mezclas se filtraron y se concentraron para formar jarabes y se purificaron por cromatografía en columna de resolución instantánea utilizando gradientes de hexanos/EtOAc a menos que se indique.

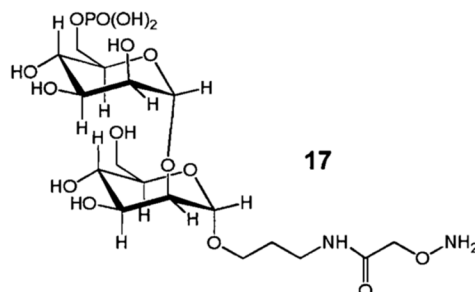
B. Desacetilación catalizada por ácido:

En ciertos ejemplos, los compuestos acetilados son deacetilados antes de la glicosilación o de otras modificaciones tales como fosforilación. En los ejemplos proporcionados más adelante, se generó cloruro de hidrógeno mediante la adición de cloruro de acetilo a metanol seco frío (0 °C). La disolución concentrada se añadió a una disolución 1:3 del compuesto acetilado en DCM/metanol. La concentración final fue de 3% p/v con respecto al componente de metanol de la disolución. Reacciones de desacetilación se realizaron durante: a) ~ 18 h para acetatos primarios y b) ~ 48-64 h para acetatos secundarios. Las reacciones se enfriaron rápidamente con TEA o base de Hünig seguido de una extracción acuosa en DCM o EtOAc, a menos que se indique.

C. Fosforilación:

En algunos ejemplos, los sacáridos se someten a fosforilación específica del sitio. A una disolución del sacárido en acetonitrilo seco a temperatura ambiente se añadió 5-metiltetrazol (3,4 eq), y la mezcla se agitó durante 30 min bajo nitrógeno seco. Se añadió dibencildiisopropilfosforamida (1,7 eq por grupo OH) y se agitó hasta que la reacción se completó (~ 60 min). Las reacciones fueron verificadas por CCF (gel de sílice) utilizando hexanos/EtOAc. La disolución se enfrió en hielo/agua durante 15 min y se añadió peróxido de hidrógeno (2 eq) al 30% p/v. Después de ~ 60 min se completó la reacción, y se añadió un exceso de tiosulfato de sodio saturado. La mezcla se concentró hasta formar una goma, se disolvió en EtOAc, se lavó con salmuera semi-saturada y se secó sobre sulfato de sodio. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de resolución instantánea utilizando gradientes de hexanos/EtOAc, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 2: Síntesis de disacárido aminooxiacetamido propil 2-O-[6-O-fosforil- α -D-manosil]- α -D-manósido (17)



Alil α -D-manósido se preparó de acuerdo con el método descrito en Pekari et al., *J. Org. Chem.* 66: 7432 (2001). A alil- α -D-manósido (8,68 g, 39,4 mmol) en metanol anhidro (100 mL) se añadió 2,3-butanodiona (3,63 mL, 86,1 mmol), ortoformiato de trimetilo (16 mL, 146 mmol) y ácido 10-(+)-canfosulfónico (1,37 g, 5,9 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 9 h bajo nitrógeno seco. La mezcla de reacción se enfrió rápidamente con TEA (1 mL) y se concentró hasta formar un jarabe de color rojo y se purificó mediante cromatografía en columna de resolución instantánea en gel

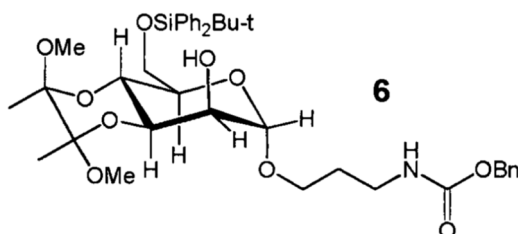
de sílice utilizando EtOAc en hexanos 40-80%, proporcionando alil 3-O,4-O-[dimetoxibutan-2',3'-diil]- α -D-manósido **1** en forma de un sólido blanco (3,89 g, 29,4%).

El compuesto **1** (2,65 g, 8 mmol) se disolvió en piridina seca (20 mL), la disolución se enfrió en un baño de hielo/agua, y se añadió cloruro de *t*-butildifenilsililo (2,28 mL, 8,7 mmol). Después de 18 h, se añadieron piridina (20 mL) y anhídrido acético (1,6 mL, 16 mmol), y la disolución se calentó a 50 °C durante 16 h, después se concentró hasta formar un jarabe y se destiló con tolueno. El residuo se disolvió en EtOAc (60 mL) y se lavó con HCl 1M (2 x 50 mL), bicarbonato sódico saturado (50 mL) y se secó sobre sulfato de sodio. La mezcla se filtró y se concentró en vacío y la disolución se concentró, proporcionando alil 2-O-acetil-6-O-*t*-butildifenilsilil-3-O,4-O[dimetoxibutan-2',3'-diil]- α -D-manósido **2** en forma de un jarabe (5,0 g).

Cloruro de paladio (II) (0,425 g, 2,4 mmol) se añadió a una disolución de **2** (5,0 g, 8 mmol) en metanol anhidro (25 mL), con agitación. Después de ~ 3 h, la reacción se enfrió rápidamente con TEA (0,75 mL, 4,8 mmol). El metanol se separó a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de resolución instantánea en gel de sílice utilizando EtOAc en hexanos 10-50%, proporcionando 2-O-acetil-6-O-*t*-butildifenilsilil-3-O,4-O[dimetoxibutan-2',3'-diil]- α -D-manósido **3** en forma de una espuma blanca (2,72 g, 59,2%).

Tricloroacetnitrilo (1,75 mL, 17,4 mmol) y DBU (0,05 mL, 0,35 mmol) se añadieron a una disolución de **3** (1,0 g 1,74 mmol) en DCM seco (1 mL). Después de ~ 75 min, la disolución se purificó directamente mediante cromatografía en columna de resolución instantánea en gel de sílice utilizando EtOAc en hexanos (0 a 30%), proporcionando tricloroacetimidato de 2-O-acetil-6-O-*t*-butildifenilsilil-3-O,4-O[dimetoxibutan-2',3'-diil]- α -D-manosa **4** en forma de una espuma blanca (0,98 g, 78,2%). Donante **4** (0,98 g, 1,36 mmol) y aceptor 3-*N*-benciloxicarbonilaminopropanol (0,284 g, 1,36 mmol) se convirtieron acuerdo con el proceso general de glicosilación del Ejemplo 1, proporcionando *N*-benciloxicarbonilaminopropil 2-O-acetil-6-O-*t*-butildifenilsilil-3-O,4-O[dimetoxibutan-2',3'-diil]- α -D-manósido **5** en forma de una espuma blanca (0,66 g, 64%).

A una disolución de **5** (0,66 g, 0,87 mmol) en metanol anhidro (5 mL) se añadió metóxido de sodio al 25% p/v en metanol (0,05 mL, 0,22 mmol). Después de ~ 1 h, la reacción se enfrió rápidamente con ácido acético glacial (0,025 mL) y se concentró hasta formar un jarabe. El producto se disolvió en DCM (10 mL), se lavó con salmuera semi-saturada (5 mL) y se secó sobre sulfato de sodio para dar una espuma blanca *N*-benciloxicarbonilaminopropil 6-O-*t*-butildifenilsilil-3-O,4-O[dimetoxibutan-2',3'-diil]- α -D-manósido **6** (0,58 g, 92%).

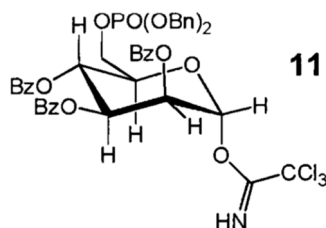


Se disolvieron alil α -D-manósido (3,15 g, 14,3 mmol) en piridina seca (20 mL) y se enfrió en un baño de hielo/agua. Se añadió cloruro de *t*-butildifenilsililo (4,03 mL, 15,7 mmol) y se dejó que la disolución llegara a temperatura ambiente. Después de agitar durante 18 h, se añadió cloruro de benzoilo (5,93 mL, 51,5 mmol), y después de 24 h la reacción se enfrió rápidamente con agua (3 mL) y se agitó durante 30 min. La disolución se concentró en vacío y se destiló por arrastre con tolueno (3 x 50 mL). El residuo se disolvió en EtOAc (100 mL), se lavó con HCl 1M frío (50 mL), salmuera semi-saturada (50 mL), hidrógeno-carbonato de sodio semi-saturado (50 mL), salmuera semi-saturada (50 mL), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró hasta formar un jarabe. Se purificó mediante cromatografía en columna de resolución instantánea en gel de sílice utilizando EtOAc en hexanos 0 - 50%, proporcionando alil 2,3,4-tri-O-benzoil-6-O-*t*-butildifenilsilil- α -D-manósido **7** en forma de una espuma blanca (8,62 g, 78,2%).

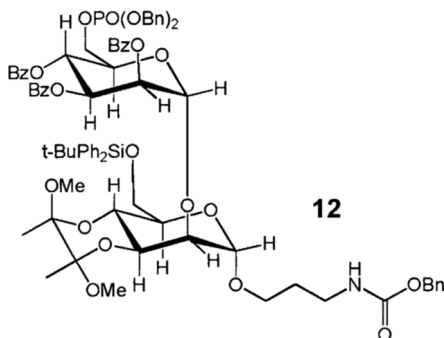
Ácido acético glacial (11,1 mL, 18,26 mmol) y fluoruro de tetrabutilamonio 1M (18,26 mL, 18,26 mmol) se añadieron a una disolución de **7** (12,77 g, 16,6 mmol) en THF seco (50 mL). A los 80 min, se añadieron ácido acético glacial (0,15 mL, 2,5 mmol) y fluoruro de tetrabutilamonio 1M (2,5 mL, 2,5 mmol), seguido a los 90 min por más ácido acético glacial (0,25 mL, 4,15 mmol) y fluoruro de tetrabutilamonio 1M (4,15 mL, 4,15 mmol). Después de 2 h, la disolución se concentró hasta la mitad del volumen y se diluyó con EtOAc (150 mL). La disolución se lavó con salmuera semi-saturada (2 x 150 mL) y bicarbonato sódico semi-saturado (200 mL), se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de resolución instantánea en gel de sílice con EtOAc en hexanos 10 - 50%, proporcionando alil 2,3,4-tri-O-benzoil- α -D-manósido **8** en forma de una espuma blanca (6,75 g, 76,4%). Compuesto **8** (6,75 g, y mmol) se convirtió de acuerdo con el proceso general para la fosforilación proporcionando alil 2,3,4-tri-O-benzoil-6-O-dibencilfosforil- α -D-manósido **9** en forma de una espuma blanca (9,52 g, 95%).

(II) Cloruro de paladio (0,638 g, 3,6 mmol) se añadió a una disolución de **9** (9,52 g, 12,1 mmol) en metanol seco (50 mL). Después de ~ 5 h se añadió más paladio (II) (0,145 g) y la mezcla se almacenó durante 18 h. La disolución se filtró, se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de resolución instantánea en gel de sílice con EtOAc en hexanos 20-70%, proporcionando 2,3,4-tri-O-benzoil-6-O-dibencilfosforilo- α -D-manosa **10** en forma de una espuma blanca (3,8 g, 42,5%).

Tricloroacetoniitrilo (5,06 mL, 5,1 mmol) y DBU (0,15 mL, 1 mmol) se añadieron a una disolución de **10** (3,8 g) en DCM seco bajo nitrógeno seco a 0 °C. Después de ~ 90 min, la disolución se purificó directamente mediante cromatografía en columna de resolución instantánea en gel de sílice con EtOAc en hexanos 10-60%, proporcionando tricloroacetimidato de 2,3,4-tri-O-benzoil-6-O-dibencilfosforil- α -D-manósido **11** en forma de una espuma blanca (3,3 g, 72,1%).



Donante **6** (2,62 g, 2,97 mmol) y aceptor **11** (1,92 g, 2,7 mmol) se convirtieron acuerdo con el proceso general de glicosilación del Ejemplo 1, proporcionando *N*-benciloxycarbonilaminopropil 2-O-[2,3,4-tri-O-benzoil-6-O-dibencilfosforil- α -D-manosil]-6-O-*t*-butildifenilsilil-3-O,4-O[dimetoxibutan-2',3'-diil]- α -D-manósido **12** en forma de una espuma blanca (1,27 g, 32,2%).

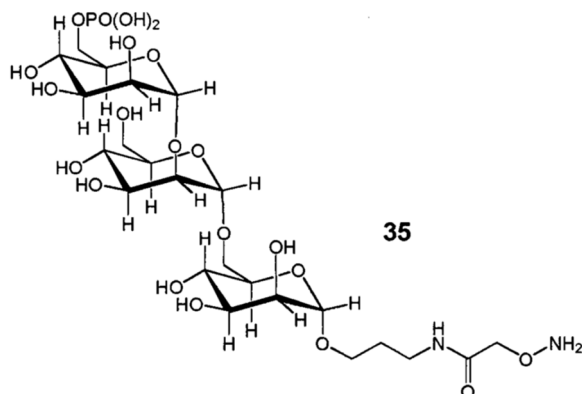


TFA/agua 19:1 v/v (8,4 mL) se añadió a una disolución de **12** (2,1 g, 1,44 mmol) en DCM (8 mL) enfriada en un baño de hielo/agua. Después de ~ 2 h el material de partida se había consumido tal como se muestra por CCF. Etanol (25 mL) se añadió a la disolución, después se concentró y se destiló por arrastre con etanol (3 x 25 mL). El residuo se disolvió en metanol seco (10 mL) y se enfrió en un baño de hielo/agua. Se añadió cloruro de acetilo (0,4 mL), proporcionando una disolución al 3% en p/v en HCl. La disolución se dejó calentar a la temperatura ambiente. Después de ~ 2 h, el material de partida se había consumido tal como se muestra por CCF. La reacción se enfrió rápidamente con trietilamina (1 mL), se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de resolución instantánea en gel de sílice con EtOAc en hexanos desde 30 - 100% para dar **13** en forma de una espuma blanca (0,758 g, 47,9%). A **13** (0,758 g, 0,69 mmol) en metanol anhidro (10 mL) se añadió metóxido de sodio al 25% p/v en metanol (0,15 mL). Después de ~ 1 h, el material de partida se había consumido tal como se muestra por CCF. La reacción se enfrió rápidamente con HCl 1M, proporcionando **14**. A la disolución se añadió ácido acético glacial (25 μ L), se humedeció con Pd al 10%/C (0,1 g), y se fijó un globo de hidrógeno. Después de 6 h de reacción el producto se carbonizó con ácido sulfúrico al 5%/EtOH, pero no era UV activo. La mezcla se filtró y se concentró hasta formar un aceite, luego se disolvió en agua (10 mL) y se liofilizó para dar 3-aminopropil 2-O-[6-O-fosforil- α -D-manosil]- α -D-manósido **15** (0,300 g, 91,3% de **13**).

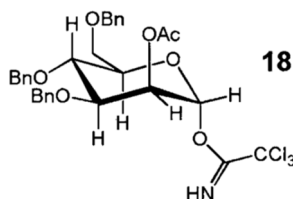
Una disolución de NaOH 0,1 M (0,2 mL) se añadió a una disolución de **15** (0,1 g, 0,21 mmol) en agua (8,5 mL), seguido de 2,3,5,6-tetrafluorofenilato de *N*-*t*-butoxicarbonil-aminoxiacetilo (0,14 g, 0,42 mmol) en THF (8,5 mL). Después de 18 h, la disolución se ajustó a pH 4 con HCl 2M, y la disolución se extrajo con DCM (3 x 10 mL). La fase acuosa se liofilizó, proporcionando *N*-*t*-butoxicarbonilaminooxiacetamidopropil 2-O-[6-O-fosforil- α -D-manosil]- α -D-manósido **16** (0,12 g). El compuesto **16** (0,12 g) se disolvió en TFA/DCM 1:1 (10 mL) y la disolución se agitó durante ~ 30 min,

después se concentró hasta formar un aceite. Se disolvió en agua (5 mL) y el producto se liofilizó, dando un sólido (0,45 g). El sólido se purificó utilizando Biogel® P2 y se eluyó con agua para proporcionar **17** (0,063 g).

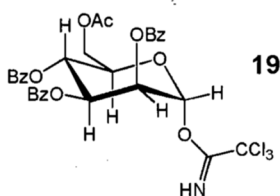
Ejemplo 3: Síntesis de trisacárido (35)



- 5 Tricloroacetimidato de 2-O-acetil-3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manosa **18** se preparó según se describe en Yamazaki et al., *Carb. Res.* 201:31 (1990).

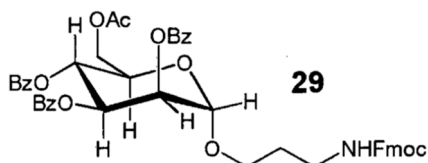


Tricloroacetimidato de 6-O-acetil-3,4,6-tri-O-benzoil- α -D-manosa **19** se preparó según se describe en Heng et al., *J. Carb. Chem.* 20:285 (2001).



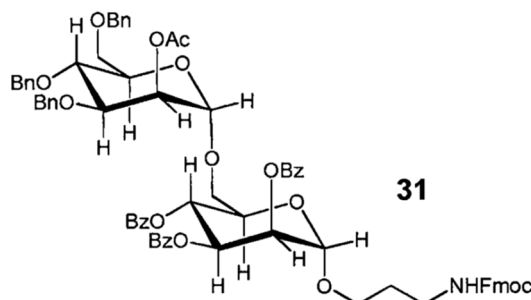
10

El donante **19** (5,0 g, 7,4 mmol) y el aceptor *N*-9-fluorenilmetilcarbonilamino propanol (2,41 g, 8,1 mmol) se convirtieron de acuerdo con el proceso de glicosilación general, proporcionando *N*-9-fluorenilmetilcarbonilaminopropil 6-O-acetil-2,3,4-tri-O-benzoil- α -D-manósido **29** en forma de una espuma blanca (4,0 g, 66,4%).

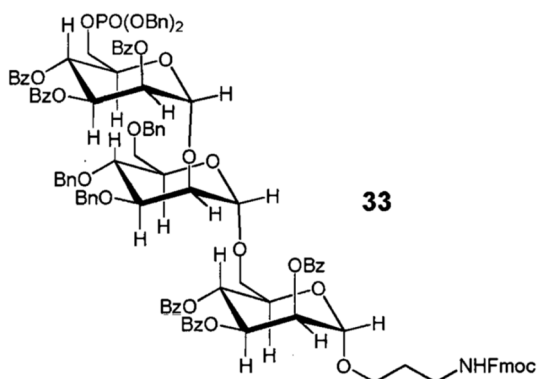


- 15 El compuesto **29** (4,0 g, 4,9 mmol) se convirtió de acuerdo con el proceso general para la desacetilación catalizada con ácido de acetatos secundarios (b), proporcionando *N*-9-fluorenilmetilcarbonilaminopropil 2,3,4-tri-O-benzoil- α -D-manósido **30** en forma de una espuma blanca (3,3 g, 87,3%). El donante **18** (3,27 g, 5,16 mmol) y el aceptor **30** (3,3 g, 4,3 mmol) se convierte de acuerdo con el proceso de glicosilación general, proporcionando *N*-9-

fluorenilmetilcarbonilaminopropil 6-O-[2-O-acetil-3,4,6-tri-O-bencilmanosil]-2,3,4-tri-O-benzoil- α -D-manósido **31** en forma de una espuma blanca (4,94 g, 92,7%).



5 El compuesto **31** (4,94 g, 3,96 mmol) se convirtió de acuerdo con el proceso general para la desacetilación catalizada con ácido de acetatos secundarios (b), proporcionando *N*-9-fluorenilmetilcarbonilaminopropil 6-O-[3,4,6-tri-O-bencilmanosil]-2,3,4-tri-O-benzoil- α -D-manósido **32** en forma de una espuma blanca (1,73 g, 36%). El Compuesto **11** se preparó de acuerdo con el método del Ejemplo 2. El donante **11** (3,37 g, 3,74 mmol) y el aceptor **32** (1,73 g, 1,44 mmol) se convirtieron de acuerdo con el proceso general de glicosilación, proporcionando **33** en forma de una espuma blanca (1,2 g, 43,1%).

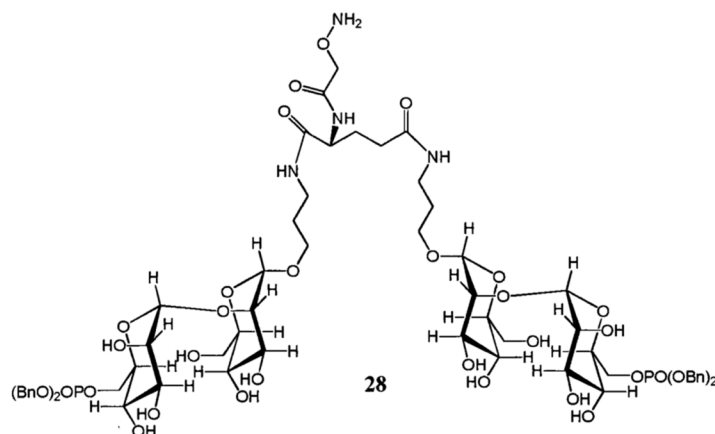


10 A una disolución de **33** (1,2 g, 0,62 mmol) en THF anhidro (10 mL) se añadió dodeciltiol (1,48 mL, 6,2 mmol) y diazabicycloundec-7-eno (DBU) (0,093 mL, 0,62 mmol). Después de ~ 18 h, el material de partida se había consumido, según se muestra por CCF. La disolución se concentró hasta formar un jarabe y se purificó mediante cromatografía en columna de resolución instantánea en gel de sílice utilizando metanol en DCM al 0 - 20%. Al producto se añadió metanol/agua 1:1 (20 mL) y ácido acético (25 μ L) y Pd/C (0,1 g) y se fijó un globo de hidrógeno. Después de 18 h, la disolución se filtró a través de Celite y se concentró hasta formar una espuma blanca. La espuma se disolvió en metanol seco (10 mL) y metóxido de sodio al 25% p/v en metanol (0,15 mL), después de 6 h la disolución concentrada se recogió en agua (10 mL) y se lavó con DCM (10 mL). La fase acuosa se liofilizó, proporcionando aminopropil 6-O-([α -D-manosil]-2-O-[6-O-fosforil- α -D-manosil])- α -D-manósido **34** (0,27 g, 63,5% a partir de **33**) en forma de la sal disódica.

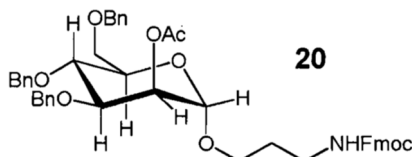
20 A una disolución de **34** (0,17 g, 0,3 mmol) en agua/DMSO 1:1 (10 mL) se añadieron 2,3,5,6-tetrafluorofenilato de *N*-*t*-butoxicarbonilamino-oxiacetilo (0,34 g, 1,14 mmol) en DMSO (2 mL) y 3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona (DHBT) (0,09 g, 0,6 mmol) en DMSO (1 mL). Después de 24 h, la disolución se purificó en resina de exclusión por tamaño Sephadex. Las fracciones se verificaron en placas de gel de sílice mediante carbonización y se combinaron las fracciones seleccionadas y se liofilizaron proporcionando un sólido. Se disolvió en TFA/DCM (8 mL) y se agitó durante 60 min y después se concentró hasta formar un aceite. Se añadió agua (5 mL) y el producto se purificó sobre resina de exclusión por tamaño Sephadex. Las fracciones se verificaron en placas de gel de sílice mediante carbonización y se combinaron las fracciones seleccionadas y se liofilizaron proporcionando **35** (0,033 g, 16,4% a partir de **34**).

Ejemplo 4: Síntesis de Tetrasacáridos

30 A. [2-O-[6-O-fosforil- α -D-manosil]- α -D-manosil]-glutamato de amino-oxiacetamido 1,5-di-3-amidopropilo (**28**)

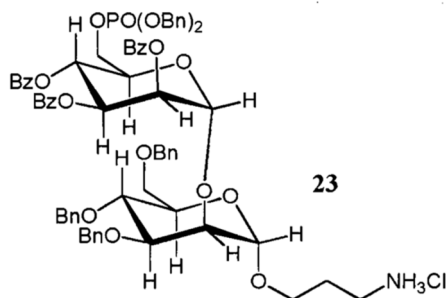


El compuesto **19** se preparó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 3. Donante **19** (15,49 g, 24,3 mmol) y aceptor 3-*N*-9-fluorenilmetoxycarbonilaminopropanol (8,7 g, 29,19 mmol) se convirtieron de acuerdo con el proceso general de glicosilación, proporcionando *N*-9-fluorenilmetoxycarbonilaminopropil 2-*O*-acetil-3,4,6-tri-*O*-bencil-α-*D*-manósido **20** en forma de una espuma blanca (10,55 g, 55%).



Cloruro de acetilo (4,8 mL, 63 mmol) se añadió gota a gota a una disolución de **20** (10,5 g, y mmol) en DCM seco (50 mL) y metanol anhidro (100 mL) durante ~ 30 min, proporcionando una disolución al 2,3% de HCl en metanol. Después de ~ 18 h, la reacción se enfrió rápidamente con base de Hünig (9,81 mL, 63 mmol) y se añadieron 1,5 mL adicionales. La disolución se concentró hasta formar un jarabe, se destiló por arrastre con cloroformo (2 x 50 mL), se disolvió en DCM (100 mL) y se lavó con disolución salina semi-saturada (100 mL) y se secó sobre sulfato de sodio. La disolución se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna de resolución instantánea en gel de sílice con EtOAc en hexanos 0 - 100% para dar una espuma blanca de *N*-9-fluorenilmetoxycarbonilaminopropil 3,4,6-tri-*O*-bencil-α-*D*-manósido **21** (6,11 g, 61,2%). El donante **21** (6,11 g, 13,4 mmol) y aceptor **11** (7,1 g, 7,9 mmol) se convirtieron de acuerdo con el proceso general de glicosilación, proporcionando *N*-9-fluorenilmetoxycarbonilaminopropil 2-*O*-[6-*O*-dibencilfosforil-2,3,4-tri-*O*-benzoil-α-*D*-manosil]-3,4,6-tri-*O*-bencil-α-*D*-manósido **22** en forma de una espuma blanca (5,8 g, 50,1%).

A una disolución de **22** (5,8 g, 3,96 mmol) en THF anhidro (75 mL) se añadió dodeciltiol (9,53 mL, 40 mmol) y DBU (0,6 mL, 4 mmol). Después de ~ 4 h, la reacción se enfrió rápidamente con HCl metanólico (5,6 mL, 8 mmol) y se concentró hasta formar un jarabe. El producto se trituró con éter dietílico, proporcionando hidrocloreto de 3-aminopropil 2-*O*-[2,3,4-tri-*O*-benzoil-α-*D*-manosil]-3,4,6-tri-*O*-bencil-α-*D*-manósido **23** en forma de una goma (3,77 g, 74,5%).



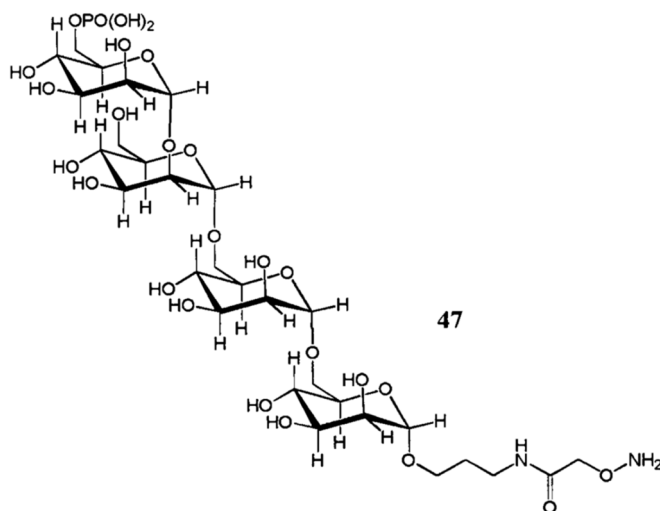
A una disolución de **23** (3,77 g, 2,95 mmol) en acetonitrilo seco (50 mL) se añadió ácido N-benciloxycarbonil-glutámico (0,3661 g, 1,3 mmol), N-hidroxibenzotriazol (HOBt) (0,4 g, 2,95 mmol), DBU (4,6 mL, 4 mmol) y 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) (0,75 g, 8,85 mmol). Después de 16 h, se añadió base de Hünig (0,25 mL), seguido de más EDC (0,75 g, 8,85 mmol). Después de 21 h, la disolución se concentró hasta formar un jarabe y se purificó mediante cromatografía en columna de resolución instantánea en gel de sílice utilizando 2-propanol al 10% en DCM frente a DCM 0 - 50%, proporcionando 2-O-[2,3,4-tri-O-benzoil-6-O-dibencilfosforil- α -D-manosil]-3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manosil]-glutamato de N-benciloxycarbonilamino 1,5-di-[3-amidopropilo **24** en forma de una espuma blanca (0,97 g, 11,2%).

A una disolución de **24** (0,912 g, 0,33 mmol) en DCM anhidro (20 mL) y metanol (25 mL) se añadió metóxido de sodio al 25% p/v en metanol (0,09 mL, 0,41 mmol). Después de ~ 6,5 h, la reacción se enfrió rápidamente con HCl 1M (0,41 mL, 0,41 mmol) y se concentró hasta formar un jarabe y se purificó mediante cromatografía en columna de resolución instantánea en gel de sílice utilizando 2-propanol al 10% en DCM frente a DCM 0 - 100%, proporcionando [2-O-[6-O-dibencilfosforil- α -D-manosil]-3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manosil]-glutamato de N-benciloxycarbonilamino 1,5-di-3-amidopropilo **25** (0,306 g, 44,4%).

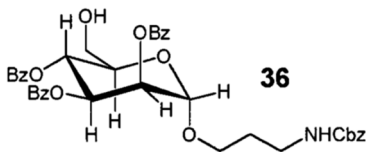
A una disolución agitada de **25** (0,3 g, 0,144 mmol) en THF/agua 2:1 v/v (75 mL), se añadió Pd al 10%/C humedecido (0,052 g) y se fijó un globo de hidrógeno. Después de 16 h, se añadió ácido acético glacial (25 μ L), y se fijó un globo de hidrógeno reciente. Después de 6 h, se añadió más Pd al 10%/C (0,04 g) y más hidrógeno. Después de 18 h, se añadió Pd al 5%/C reciente (0,05 g) y más hidrógeno. Después de 24 h, el producto se carbonizó con ácido sulfúrico al 5%/EtOH, pero no era UV activo. La mezcla se filtró a través de celite, y la almohadilla se lavó y se concentró a ~ 30% para separar el THF, a continuación se liofilizó para dar [2-O-[6-O-fosforil- α -D-manosil]- α -D-manosil]-glutamato de 1,5-di-3-amidopropilo **26** (0,121 g, 77,9%).

2,3,5,6-tetrafluorofenilato de N-t-butoxicarbonilaminooxiacetilo (0,19 g, 0,57 mmol) en DMSO (1 mL) y 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (DHBT) (0,052 g, 0,3 mmol) en DMSO (1 mL) se añadieron a una disolución de **26** (0,16 g, 0,15 mmol) en agua/DMSO 1:1 (7,5 mL). Después de 18 h, la disolución se purificó sobre resina de exclusión por tamaño Sephadex. Las fracciones se verificaron en placas de gel de sílice mediante carbonización y las fracciones seleccionadas se agruparon y liofilizaron, proporcionando [2-O-[6-O-fosforil- α -D-manosil]- α -D-manosil]-glutamato de N-t-butoxicarbonilaminooxiacetamido 1,5-di-3-amidopropilo **27** (0,095 g, 42,1%). Al compuesto **27** se añadió TFA/DCM 1:1 (8 mL) y la mezcla se agitó hasta que se disolvió (~ 60 min) y después se concentró hasta formar un aceite. Se añadió agua (10 mL) y el producto se purificó sobre resina de exclusión por tamaño Sephadex. Las fracciones se verificaron sobre placas de gel de sílice mediante carbonización y las fracciones seleccionadas se agruparon y liofilizaron, proporcionando **28** (0,048 g, 54,2%).

B. Aminooxiacetamidopropil 6-O-([α -D-manosil]-6-O-[α -D-manosil]-2-O-[6-O-fosforil- α -D-manosil])- α -D-manósido (**47**)



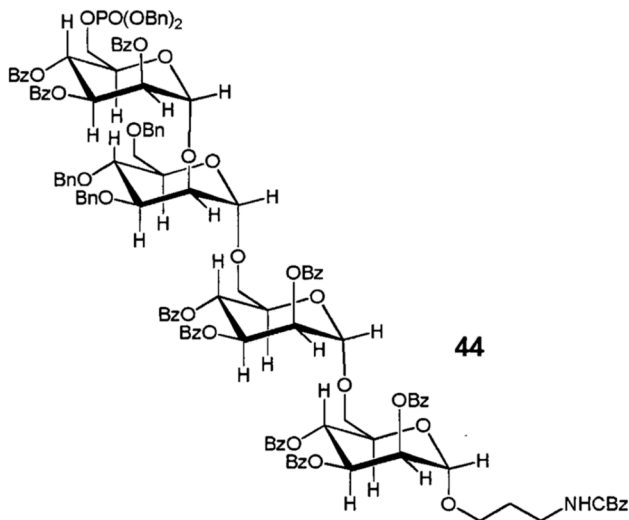
El compuesto **11** se preparó según se describe en el Ejemplo 2. Donante **11** (5,0 g, 7,4 mmol) y aceptor 3-N-benciloxycarbonilaminopropanol (1,93 g, 9,25 mmol) se convirtieron de acuerdo con el proceso general de glicosilación del Ejemplo 1, proporcionando una espuma blanca. El producto se convirtió de acuerdo con el proceso general para la desacetilación catalizada por ácido de acetatos primarios, proporcionando N-benciloxycarbonilaminopropil 2,3,4-tri-O-benzoil- α -D-manósido **36** en forma de una espuma blanca.



5

10

una espuma blanca (0,9 g, 80,7%).



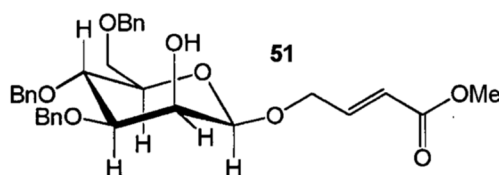
30

0,6 mmol) en DMSO (1 mL) se añadieron a una disolución de **45** (0,23 g, 0,3 mmol) en agua/DMSO 1:1 (10 mL).

Después de 24 h, la disolución se purificó sobre resina de exclusión por tamaño Sephadex. Las fracciones se verificaron en placas de gel de sílice mediante carbonización, y fracciones seleccionadas se agruparon y liofilizaron. El producto se re-aciló en agua/DMSO 1:1 (10 mL) utilizando 2,3,5,6-tetrafluorofenilato de *N*-*t*-butoxicarbonilaminooxiacetilo (0,375 g, 1,14 mmol) en DMSO (2 mL) y DHBT (0,1 g, 0,6 mmol) en DMSO (1 mL). Después de 24 h, la disolución se purificó sobre resina de exclusión por tamaño Sephadex, y las fracciones se agruparon y liofilizaron, proporcionando *N*-*t*-butoxicarbonilaminooxiacetamidopropil 6-O-([α -D-manosil]-6-O-[α -D-manosil]-2-O-[6-O-fosforil- α -D-manósido]- α -D-manósido **46** (0,11 g, 37,5%). Se añadió compuesto **46** y se disolvió en TFA/DCM (8 mL). La disolución se agitó durante 60 min y después se concentró hasta formar un aceite. Se añadió agua (5 mL) y el producto se purificó sobre resina de exclusión por tamaño Sephadex. Las fracciones se verificaron en placas de gel de sílice mediante carbonización, y fracciones seleccionadas se agruparon y liofilizaron, proporcionando **47** (0,07 g, 70,7%).

Ejemplo 5: Síntesis de hexasacárido β -enlazado

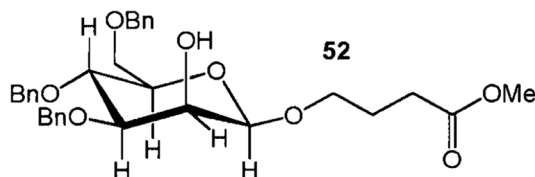
A. Metilcrotonil 3,4,6-tri-O-bencil- β -D-manósido (**51**)



2-O-acetil-3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manosa se preparó según se describe en Mayer et al., *Eur J. Org. Chem.* 10:2563 (1999). Metóxido de sodio al 25% p/v en metanol (0,5 mL) se añadió a una disolución de 2-O-acetil-3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manosa (8,0 g, 23,3 mmol) en metanol anhidro (50 mL). Después de ~ 2 horas, el material de partida se había consumido como se muestra por cromatografía en capa fina (CCF). La reacción se enfrió rápidamente con resina Amberlite IR120 (H+), se filtró y se concentró hasta formar un jarabe para dar 3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manosa **50** (6,67 g, 99%). Al compuesto **50** se añadió tolueno (150 mL) seguido de óxido de dibutil-estaño (3,88 g, 16,28 mmol), y la mezcla se calentó a reflujo durante 3 h utilizando un condensador Dean-Stark. La disolución resultante se enfrió, se concentró hasta formar un jarabe y se disolvió en DMF seca (50 mL). Fluoruro de cesio (2,28 g, 12,1 mmol), yoduro de tetrabutilamonio (5,47 g, 14,8 mmol) y 4-bromocrotonato de metilo (2,46 mL, 22,2 mmol, calidad técnica) se añadieron a la mezcla y se calentó a ~ 60 °C durante 18 horas. La mezcla se dejó enfriar y el sólido se separó por filtración. Se diluyó con éter isopropílico/EtOAc 3,7:1 (380 mL) y se lavó con tiosulfato de sodio semi-saturado (240 mL). La fase acuosa se extrajo con éter isopropílico/EtOAc 3,7:1 (2 x 190 mL) y las capas orgánicas se agruparon y concentraron. El jarabe se destiló por arrastre con isopropanol (2 x 25 mL) y se purificó mediante cromatografía en columna de resolución instantánea utilizando EtOAc en hexanos 0 - 50% para proporcionar **51** en forma de un jarabe (4,58 g, 56,4%). ^{13}C -RMN (100 MHz) 1 $J_{1\text{C},1\text{H}}$ (100 MHz), 157 Hz (β < 160 Hz, α > 170 Hz)

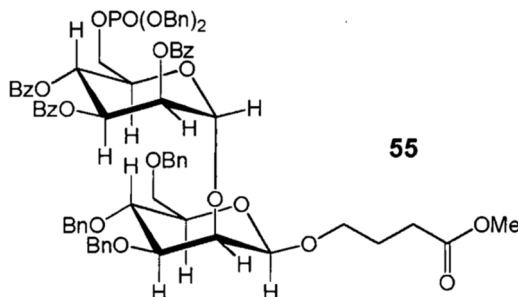
B. Metilbutiril 3,4,6-tri-O-bencil- β -D-manósido (**52**)

El compuesto **50** se preparó según se describe en el Ejemplo 2. Al compuesto **50** (9,4 g, 21 mmol) se añadió tolueno (200 mL), seguido de óxido de dibutilestaño (5,49 g, 22 mmol), y la mezcla se calentó a reflujo durante 23 h utilizando un condensador Dean-Stark. La disolución resultante se enfrió, se concentró hasta formar un jarabe y se disolvió en DMF seca (100 mL). Se añadieron 4-bromobutirato de metilo (4,23 mL, 32 mmol), yoduro de tetrabutilamonio (1,94 g, 5,25 mmol) y fluoruro de cesio (3,91 g, 25,5 mmol), y la mezcla se calentó a 60 °C durante 2 h, seguido de 18 h a temperatura ambiente. La mezcla se dejó enfriar y se filtró a través de celite y se lavó con EtOAc (50 mL). Se concentró hasta formar una goma, se destiló por arrastre con tolueno (3 x 40 mL), se absorbió sobre sílice y se purificó mediante cromatografía en columna de resolución instantánea utilizando EtOAc en hexanos 0 - 70% para proporcionar **52** en forma de un aceite (9,11 g, 78,6%). ^{13}C -RMN (100 MHz) 1 $J_{1\text{C},1\text{H}}$ (100 MHz), 157,2 Hz (β < 160 Hz, α > 170 Hz). No se observó producto α -enlazado.



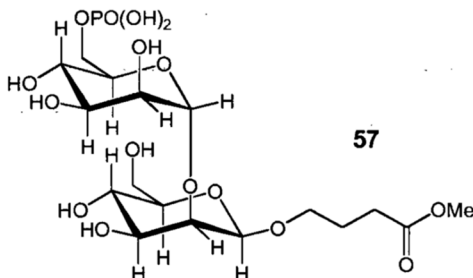
C. Metilbutiril 2-O-[6-O-fosforil- α -D-manosil]- β -D-manósido (**57**)

El compuesto **52** se preparó según se describe en el Ejemplo 2, y tricloroacetimidato de 6-O-acetil-3,4,6-tri-O-benzoil- α -D-manosa **19** se hizo de acuerdo con el método de Heng et al., *J. Carb. Chem.* 20:285 (2001). Donante **19** (4,29 g, 6,36 mmol) y aceptor **52** (2,9 g, 5,3 mmol) se convirtieron de acuerdo con el proceso general de glicosilación del Ejemplo 1, proporcionando metilbutiril 2-O-[6-O-acetil-2,3,4-tri-O-benzoil- α -D-manosil]-3,4,6-tri-O-bencil- β -D-manósido **53** en forma de una espuma blanca (4,41 g, 78,5%). El compuesto **53** (4,41 g, 4,1 mmol) se convirtió de acuerdo con el proceso general para la desacetilación catalizada con ácido de acetatos primarios descrito en el Ejemplo 1, proporcionando metilbutiril 2-O-[2,3,4-tri-O-benzoil- α -D-manosil]-3,4,6-tri-O-bencil- β -D-manósido **54** en forma de una espuma blanca (2,25 g, 53,7%). El compuesto **54** (2,25 g, 2,2 mmol) se convirtió de acuerdo con el proceso general para la fosforilación del Ejemplo 1, proporcionando metilbutiril 2-O-[2,3,4-tri-O-benzoil-6-O-dibencilfosforil- α -D-manosil]-3,4,6-tri-O-bencil- β -D-manósido **55** en forma de una espuma blanca (2,2 g, 77,7%).



Para desproteger **55**, se añadió metóxido de sodio al 25% p/v en metanol (0,2 mL) a una disolución de **55** (2,2 g, 1,7 mmol) en metanol anhidro (20 mL). Después de ~ 24 h, el material de partida se había consumido como se muestra por CCF. La reacción se enfrió rápidamente con Amberlite IR120 (H+) y se concentró hasta formar un jarabe. La disolución se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna de resolución instantánea en gel de sílice para dar metilbutiril 2-O-[6-O-dibencilfosforil- α -D-manosil]-3,4,6-tri-O-bencil- β -D-manósido **56** en forma de una espuma blanca (1,10 g, 67%).

A una disolución agitada de **56** (1,10 g, 1,15 mmol) en THF/agua (20 mL) se añadió ácido acético glacial (25 μ L), Pd al 10%/C humedecido (0,1 g) y se fijó un globo de hidrógeno. Después de reacción durante 24 h, el producto se carbonizó con ácido sulfúrico al 5%/EtOH, pero no se observó bajo UV. La mezcla se filtró a través de celite y la almohadilla se lavó con agua (20 mL). La disolución se concentró y se secó bajo vacío para dar metilbutiril 2-O-[6-O-fosforil- α -D-manosil]- β -D-manósido **57** (0,6 g, 98%).

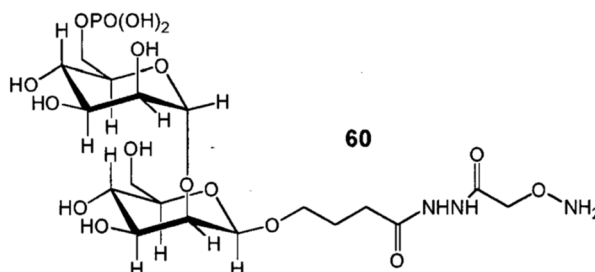


D. Aminooxiacetamidohidrazidobutil 2-O-[6-O-fosforil- α -D-manosil]- β -D-manósido (**60**)

Hidrato de hidrazina (0,44 mL, 5,75 mmol) se añadió a **57** (0,6 g, 1,15 mmol) en metanol (20 mL), con agitación. Después de 30 min, se añadió agua (5 mL) y la disolución se agitó durante 18 h. Se añadió más hidrazina (0,44 mL, 5,75 mmol) y la mezcla se agitó durante 120 h. La disolución se concentró a ~ 25% en volumen, se destiló por arrastre con agua (2 x 10 mL) y el producto se liofilizó, proporcionando hidrazidobutil 2-O-[6-O-fosforil- α -D-manosil]- β -D-manósido **58** en forma de un sólido blanco (0,6 g, 99%).

A **58** (0,2 g, 0,38 mmol) en DMSO/agua 1:1 (10 mL) se añadió una disolución de 2,3,5,6-tetrafluorofenilato de *N*-*t*-butoxicarbonilaminooxiacetilo (0,49 g, 1,52 mmol) en DMSO (2 mL) y DHBt (0,125 g, 0,76 mmol) en DMSO (2 mL). Después de 18 h, la disolución se purificó sobre resina de exclusión por tamaño Sephadex. Las fracciones se verificaron en placas de gel de sílice mediante carbonización, y las fracciones seleccionadas se agruparon y liofilizaron, proporcionando *N*-*t*-butoxicarbonilamino-oxiacetamidohidrazidobutil 2-O-[6-O-fosforil- α -D-manosil]- β -D-manósido **59** en forma de un sólido blanquecino (0,1 g, 37,8%). El compuesto **59** se disolvió en TFA/DCM 1:1 (8 mL). La disolución

se agitó durante ~ 60 min y después se concentró hasta formar un aceite. Se añadió agua (10 mL) y el producto se purificó sobre resina de exclusión por tamaño Sephadex. Las fracciones se verificaron en placas de gel de sílice mediante carbonización, y las fracciones seleccionadas se agruparon y liofilizaron, proporcionando **60** en forma de un sólido (0,045 g, 52,5%) de color blanquecino.



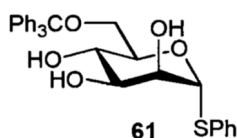
5

E. Síntesis a gran escala de metilbutiril 3-O-alil-6-O-tritil-β-D-manósido (**64**)

Una disolución de 50,0 kg (128,09 mol) pentaacetato de d-manosa en 100 L de CH₂Cl₂ se trató con 26,8 kg (243,2 mol, 1,90 eq.) de tiofenol y 27,3 kg (192,3 mol, 1,50 eq.) dietileterato de trifluoruro de boro y la disolución resultante se agitó a 22 °C durante 40 h, después de lo cual se juzgó que la reacción se había completado mediante análisis por HPLC. A continuación, 115 L de NaOH 5N acuoso se introdujeron cuidadosamente en el recipiente de reacción agitado, se separaron las fases y la fase orgánica se lavó una vez más con 46 L de NaOH 5N. El CH₂Cl₂ se separó mediante destilación a presión reducida y el residuo se volvió a disolver en 100 kg de isopropanol a 60 °C. Después de enfriar a 9 °C, el producto **F1** cristalizó y pudo ser aislado mediante filtración seguido de lavado con isopropanol para proporcionar 35,8 kg (63%).

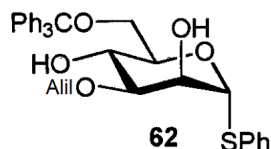
35,80 kg de **F1** (88,28 mol) se suspendieron en 143 kg de MeOH a 22 °C y se trataron con 0,73 kg de disolución de metóxido de sodio metanólica al 30% (4,05 mol, 0,046 eq.), tras lo cual se obtuvo una disolución transparente. Después de haber juzgado que la reacción se había completado mediante análisis por CCF, se añadieron 0,49 kg de ácido acético (8,14 mol, 0,09 eq.) y el disolvente se separó bajo presión reducida. El residuo se suspendió en tolueno, se concentró de nuevo a presión reducida y, finalmente, se trató con acetona, tras lo cual cristalizó el producto fenil-α-D-tiomanósido. Después de filtración, lavado y secado se obtuvo un rendimiento de 19,65 kg (89%).

Se añadió fenil-α-D-tiomanósido (19,25 kg, 70,69 mol) en piridina (43,8 kg) a una disolución de cloruro de trifenilmetilo (19,7 kg, 70,66 mol) en tolueno (89 kg) a 40 °C y se agitó durante 22 h. Después de juzgar que la reacción se había completado mediante análisis por HPLC, el disolvente se separó por destilación a presión reducida, el residuo se recogió en tolueno y se concentró de nuevo. Después de la dilución con más tolueno, la disolución se lavó una vez con agua. El producto se precipitó mediante la adición de la disolución de tolueno a una mezcla de hexano (840 L) y éter diisopropílico (250 L) para proporcionar, después de filtración y secado, fenil 6-O-tritil-1-tio-α-D-manósido **61** (32,30 kg, 89%).

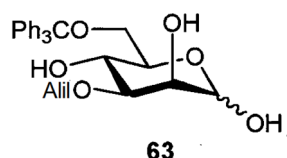


Una mezcla de **61** (30,0 kg, 58,29 mol) y óxido de dibutilestaño (20,3 kg, 81,5 mol) en tolueno (500 kg) se calentó a reflujo durante 2 horas hasta que no se separaba más agua de los vapores de los disolventes condensados. La disolución se enfrió a 40 °C y se añadió DMF (34 kg). Aproximadamente la mitad del total de disolvente se separó por destilación a presión reducida, después de lo cual se añadió DMF (216 kg) y la disolución se concentró de nuevo a aproximadamente la mitad de su volumen. Se añadió más DMF (250 kg), seguido de fluoruro de cesio (8,9 kg, 58,59 mol), yoduro de tetrabutilamonio (23,6 kg, 63,89 mol) en DMF (65 kg) y bromuro de alilo (21,1 kg, 174,4 mol). La mezcla resultante se agitó a 50 °C durante 15 h. Después de juzgar que la reacción se había completado mediante análisis por HPLC, los sólidos se separaron de la mezcla de reacción mediante filtración y el filtrado se trató con una mezcla de éter diisopropílico (136 kg) y acetato de etilo (30 kg), seguido de disolución acuosa al 10% p/v de tiosulfato de sodio (300 kg). Después de la separación de las fases, la fase inferior se volvió a extraer 4 veces con una mezcla de éter diisopropílico (136 kg) y acetato de etilo (30 kg), y las fases superiores reunidas se lavaron tres veces con agua (150 kg). La fase superior se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en etanol (160 kg) a 75 °C.

Después de enfriar a 0 °C, el producto cristalizó y se pudo aislar mediante filtración. Después del lavado y secado de la torta de filtración, se obtuvo fenil 3-O-alil-6-O-tritil-1-tio- α -D-manósido **62** (15 kg, 46%).



- 5 Una disolución de **62** (12,5 kg, 22,53 mol) en una mezcla de THF (63 kg) y piridina (18 kg, 227,5 mol) se trató con una disolución de ácido toluenosulfónico monohidrato (16,7 kg, 87,79 mol) en agua (10,7 kg), seguido por una disolución de N-clorosuccinimida (9,6 kg, 71,89 mol) en una mezcla de agua (17 kg) y THF (83 kg) a 15 °C. La mezcla resultante se calentó a 22 °C y se agitó durante 3 h. Después de haber juzgado que la reacción se había completado mediante análisis por HPLC, se añadió una disolución de tiosulfato de sodio (4,6 kg, 29,11 mol) en agua (15 kg) a la mezcla de reacción. Las fases se separaron, la fase superior se concentró a presión reducida y el residuo se recogió en tolueno y se concentró de nuevo. El residuo se volvió a disolver en acetato de etilo, se lavó con agua y luego con disolución acuosa al 16% p/p de cloruro de sodio. Después de la evaporación del acetato de etilo, el producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre 52 kg de gel de sílice y se eluyó con un gradiente de 3-10% v/v de acetato de etilo en tolueno para proporcionar 3-O-alil-6-O-tritil- α -D-manosa **63** (7,7 kg, 73%).

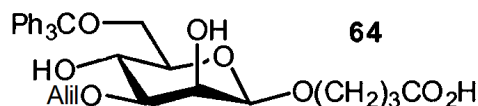


- 15 Una mezcla de **63** (7,7 kg, 16,65 mol) y óxido de dibutilestaño (4,56 kg, 18,32 mol) en metanol (61 kg) se calentó a reflujo hasta que se obtuvo una disolución turbia, y luego durante 1 h adicional. La disolución se enfrió a 25 °C y aproximadamente la mitad del disolvente total se separó mediante destilación a presión reducida, tras lo cual se añadió DMF (33 kg) y la disolución se concentró de nuevo hasta aproximadamente la mitad de su volumen. Se añadió más DMF (15 kg), seguido de fluoruro de cesio (2,53 kg, 16,65 mol), yoduro de tetrabutilamonio (6,15 kg, 16,65 mol) en DMF (17 kg) y 4-bromobutirato de metilo (4,52 kg, 24,97 mol). La mezcla resultante se agitó a 80 °C durante 5 h. Los sólidos se separaron de la mezcla de reacción mediante filtración, y el filtrado se trató con una mezcla de éter diisopropílico (41 kg), acetato de etilo (14 kg) y disolución acuosa al 10% p/p de tiosulfato de sodio (77 kg). Después de la separación de las fases, la fase inferior se extrajo de nuevo con una mezcla de éter diisopropílico (41 kg) y acetato de etilo (51 kg), y las fases superiores reunidas se lavaron con agua (39 kg). La fase superior se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en metanol (35 kg).

- Para mejorar el rendimiento de la reacción, se repitió el proceso de reacción de enlace. El residuo disuelto se concentró de nuevo a presión reducida y después se diluyó con metanol (122 kg). El metanol (60 L) se separó de nuevo mediante destilación, la disolución resultante se trató con óxido de dibutilestaño (2,28 kg, 9,16 mol), y la mezcla se calentó a reflujo durante 2 h. La disolución se enfrió a 29 °C, y aproximadamente la mitad del disolvente total se separó mediante destilación a presión reducida, tras lo cual se añadió DMF (37 kg) y la disolución se concentró de nuevo a aproximadamente la mitad de su volumen. Se añadió más DMF (15 kg) seguido de fluoruro de cesio (1,26 kg, 8,29 mol), yoduro de tetrabutilamonio (3,7 kg, 10,02 mol) en DMF (17 kg) y 4-bromobutirato de metilo (3,06 kg, 16,90 mol) y la mezcla resultante se agitó a 80 °C durante 2 h. Después de haber juzgado que la reacción se había completado mediante análisis por HPLC, los sólidos se separaron de la mezcla de reacción mediante filtración, y el filtrado se trató con una mezcla de éter diisopropílico (25 kg), acetato de etilo (32 kg) y disolución acuosa al 10% p/p de tiosulfato de sodio (77 kg). Después de la separación de las fases, la fase inferior se extrajo de nuevo con una mezcla de éter diisopropílico (25 kg) y acetato de etilo (32 kg) y las fases superiores reunidas se lavaron con agua (39 kg). La disolución se concentró bajo presión reducida y el residuo se volvió a disolver en tolueno (43 kg) y finalmente se concentró hasta un volumen final de aproximadamente 30 L. El éster metílico bruto de **64** se purificó mediante cromatografía en columna sobre 50 kg de gel de sílice y se eluyó con un gradiente de 5% - 30% v/v de acetato de etilo en tolueno.

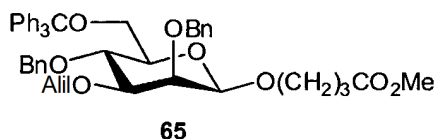
- Una disolución del éster metílico purificado en metanol (50 kg) se trató con una mezcla de hidróxido de sodio acuoso al 30% p/p (3,29 kg) y metanol (7,7 kg) y la disolución resultante se agitó durante 14 h. Después de haber juzgado que la reacción se había completado mediante análisis por HPLC, la mezcla de reacción se trató con una mezcla de éter diisopropílico (41 kg) y acetato de etilo (14 kg), seguido de agua (77 kg). La mezcla bifásica se hizo pasar a través de

un cartucho de filtro de 1,2 μm y las fases se separaron. La fase inferior se trató con una mezcla de éter diisopropílico (41 kg) y acetato de etilo (14 kg), y el pH de la fase inferior se redujo a 4,5-5 mediante la adición de disolución acuosa al 5% p/p de ácido cítrico (38 L). Las fases se separaron y la fase inferior se extrajo con una mezcla de éter diisopropílico (41 kg) y acetato de etilo (14 kg). Las fases superiores reunidas se lavaron con agua (39 kg) y después se concentró a presión reducida. El residuo se mezcló con éter diisopropílico (39 kg) y el disolvente se concentró parcialmente para dar un volumen final de aproximadamente 20 L, tras lo cual el producto cristalizó y se pudo aislar por filtración. Después de lavar la torta de filtración y de secar, se obtuvo ácido (3-O-alil-6-O-tritil- β -D-manosil)-4-butanoico **64** (4,7 kg, 51,5%).

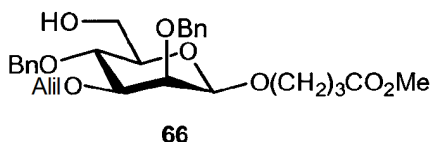


F. Síntesis a gran escala del compuesto intermedio tetrasacárido (**69**)

El compuesto **64** se preparó de acuerdo con los métodos de la Parte E. Los grupos protectores de **64** se modificaron antes de posteriores reacciones de glicosilación. Una disolución de **64** (4,25 kg, 7,75 mol) en THF (14 kg) se añadió cuidadosamente a una suspensión agitada de dispersión al 60% de hidruro de sodio (1,55 kg, 38,75 mol) en THF (45 kg) y la suspensión resultante se agitó hasta haber cesado el desprendimiento de hidrógeno. Una suspensión de yoduro de tetrabutilamonio (0,29 kg, 0,78 mol) en THF (2 kg) se introdujo en el recipiente de reacción, seguido por bromuro de bencilo (9,2 kg, 53,79 mol). La mezcla se agitó a 22 °C durante 46 h, luego a 30 °C durante 12 h y a 35 °C durante 48 h. Cuando se había juzgado que la reacción se había completado mediante análisis por HPLC, la mezcla se enfrió a 0 °C y se introdujeron cuidadosamente metanol anhidro (0,7 kg, 21,87 mol) seguido de metóxido de sodio metanólico al 30% p/p (2,1 kg, 11,66 mol). Luego se cargaron ácido acético (1,4 kg) seguido de trietilamina (9,4 kg, 92,89 mol) y la mezcla se agitó durante 18 h. A la suspensión resultante se añadió agua (31 kg) y las dos fases se separaron. La fase superior se concentró a presión reducida, el residuo se recogió en tolueno y se concentró de nuevo hasta el volumen final de aproximadamente 20 L. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre 42 kg de gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 5-15% de acetato de etilo en hexano para dar metilbutiril 3-O-alil-2,4-di-O-bencil-6-O-tritil- β -D-manósido **65** (4,4 kg, 77%) en forma de una disolución en acetato de etilo.

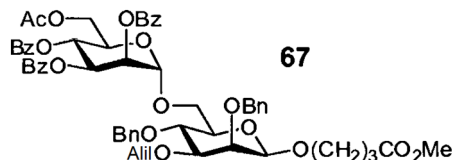


A una disolución de **65** (4,4 kg, 5,92 mol) en metanol (19 kg) a 37 °C se añadió una disolución de ácido toluenosulfónico monohidrato (0,9 kg, 4,73 mol) en metanol (6,3 kg) y la mezcla resultante se agitó durante 1 h. Cuando se había juzgado que la reacción se había completado mediante análisis por HPLC, se cargó trietilamina (1,5 kg, 14,82 mol) y la disolución se concentró a presión reducida. A continuación, se añadió tolueno (28 kg) y la disolución se lavó con agua (32 kg). Las fases se separaron y la fase superior se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice sobre gel de sílice (32 kg), eluyendo con un gradiente de 9%, después 17%, después 50% v/v de acetato de etilo en tolueno para proporcionar metilbutiril 3-O-alil-2,4-di-O-bencil- β -D-manósido **66** (2,67 kg, 90%) en forma de una disolución en tolueno.



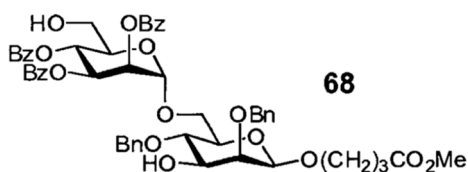
3,73 kg (5,49 mol, 1,10 eq.) de **19** y 2,50 kg (4,99 mol) de **66** se disolvieron en 34 kg de tolueno seco, a partir del cual se evaporaron ~ 10 L bajo presión reducida. Después, la disolución se enfrió a 0 °C y se trató, gota a gota, con 22 g (0,099 mol, 0,02 eq.) de TMSOTf, de modo que la temperatura de reacción se mantuvo < 5 °C, y se agitó a 0 °C durante 1 h después del final de la adición. Cuando se había juzgado que la reacción se había completado mediante análisis por HPLC, la mezcla se neutralizó mediante la adición de 30 g (0,296 mol, 0,06 eq.) de Et₃N. Se añadió hexano (22 L) y la suspensión resultante se filtró y el filtrado se lavó con 33 L de agua y se concentró a presión reducida. El residuo se recogió en 10 L de tolueno y se concentró de nuevo, y el proceso se repitió dos veces más. La purificación

cromatográfica en columna del producto bruto en 50 kg de gel de sílice y eluyendo con un gradiente de 9-13% v/v de EtOAc en hexano:tolueno 1:1 proporcionaron 4,23 kg, 83%, de compuesto **67** en forma de una disolución en tolueno.

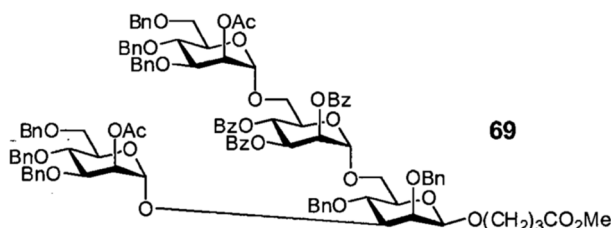


A una disolución de 4,23 kg (4,16 mol) de **67** en 5,6 L de CH_2Cl_2 y 40 L de MeOH se añadieron 0,72 kg de Pd al 10%/C seguido de una disolución de 0,12 kg (0,63 mmol, 0,15 eq.) de ácido toluenosulfónico monohidrato y la mezcla se agitó a 22 °C durante 24 h. Cuando se había juzgado que la reacción se había completado mediante análisis por HPLC, el paladio/carbono se separó mediante filtración y el filtrado se utilizó sin purificación adicional en la siguiente etapa.

Al filtrado se añadió una disolución de 2,97 kg (15,6 mol, 3,75 eq.) de ácido toluensulfónico en 4 L de MeOH y la mezcla resultante se agitó durante 16 h a 22 °C. Cuando se había juzgado que la reacción se había completado mediante análisis por HPLC, la mezcla se enfrió a 0 °C y se neutralizó mediante la adición de 1,64 kg (16,2 mol, 3,89 eq.) de trietilamina. La disolución se concentró bajo presión reducida y el residuo se repartió entre 82 L de MTBE y 32 L de agua. La fase orgánica se concentró bajo presión reducida, se diluyó con 10 L de tolueno y se reconcentró. Este proceso se repitió dos veces más. La purificación por cromatografía en columna del producto bruto en 38 kg de gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 23-26% v/v de EtOAc en hexano:tolueno 1:1, proporcionó 2,59 kg de compuesto **68** (67% a partir de **67**) en forma de una disolución en tolueno.



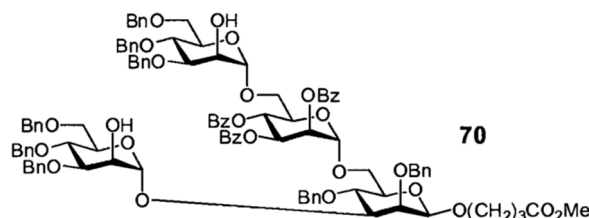
Una disolución de 2,90 kg (3,10 mol) de **68** y 5,24 kg (8,23 mol, 2,65 eq.) de **18** en 30 kg de tolueno seco a 0 °C se trató con 0,049 kg (0,185 mol, 0,06 eq.) de TBDMSOTf y se agitó a 0 °C durante 4 h. Cuando se había juzgado que la reacción se había completado mediante análisis por HPLC, se añadieron 0,104 kg (1,03 mol, 0,128 eq.) de trietilamina, seguido de 33 L de hexano. La suspensión resultante se filtró y el filtrado se lavó con 28 L de agua y luego con 28 L de Na_2CO_3 acuoso al 5%. La fase en tolueno se concentró a presión reducida y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre 58 kg de gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 9-20% v/v de EtOAc en hexano:tolueno 1:1, proporcionó 4,40 kg de compuesto intermedio tetrasacárido **69** (75%) en forma de una disolución en tolueno.



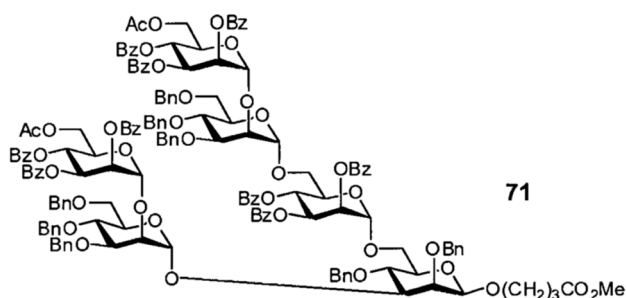
G. Síntesis de Hexasacárido Protegido (**73**)

Compuesto intermedio tetrasacárido **69** se preparó de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 7. A una disolución de 9,7 g (5,15 mmol) de **69** en 60 ml de CH_2Cl_2 se añadieron 100 ml de MeOH seguido, gota a gota, de 27 ml de una disolución de HCl 5,7 N en 1,4-dioxano (0,154 mol, 30 eq.), de modo que la temperatura de la mezcla se mantuvo por debajo de 30 °C. La mezcla de reacción se agitó después a 22 °C durante 40 h. Cuando se había juzgado que la reacción se había completado mediante análisis por HPLC, 32 ml (22,9 mmol, 44,7 eq.) de trietilamina se añadieron cuidadosamente de modo que la temperatura de la mezcla se mantuvo por debajo de 25 °C. Se añadieron agua (250 ml) y tolueno (200 ml), la mezcla se agitó y se separaron las fases. La fase inferior se extrajo de nuevo con 50 ml de tolueno, las fases superiores reunidas se lavaron con 50 ml de agua y se concentraron a presión reducida.

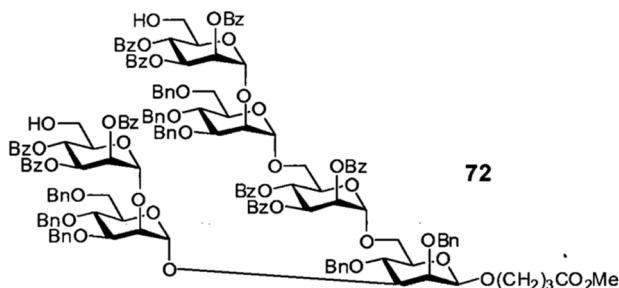
El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre 100 g de gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 30-50% v/v de EtOAc en hexano para dar metilbutiril 3-O-([3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manosil])-(6-O-[2,3,4-tri-O-benzoil- α -D-manosil]-6-O-[3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manosil])-2,4-di-O-benzyl- β -D-manósido **70** (6,35 g, 69%).



- 5 Una disolución de 1,0 g (0,56 mmol) de **70** y 0,95 g (1,40 mmol, 2,5 eq.) de **19** en 9 ml de tolueno seco a 0 °C se trató con 0,02 g (0,075 mmol, 0,14 eq.) de TBDMSOTf y se agitó a 0 °C durante 1 h. Cuando se había juzgado que la reacción se había completado mediante análisis por HPLC, se añadieron 22 ml (0,158 mmol, 0,28 eq.) de trietilamina. La mezcla resultante se lavó dos veces con 10 ml de agua y se concentró bajo presión reducida. La purificación del producto bruto mediante cromatografía en columna sobre 15 g de gel de sílice, eluyendo con un gradiente de 15-25% v/v de EtOAc en hexano:tolueno 1:1, proporcionó 1,75 g de compuesto metilbutiril 3-O-([3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manosil])-2-O-[6-O-acetil-2,3,4-tri-O-benzoil- α -D-manosil])-(6-O-[2,3,4-tri-O-benzoil- α -D-manosil]-6-O-[3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manosil])-2-O-[6-O-acetil-2,3,4-tri-O-benzoil- α -D-manosil])-2,4-di-O-benzoil- β -D-manósido **71** en forma de un aceite que contiene tolueno residual.

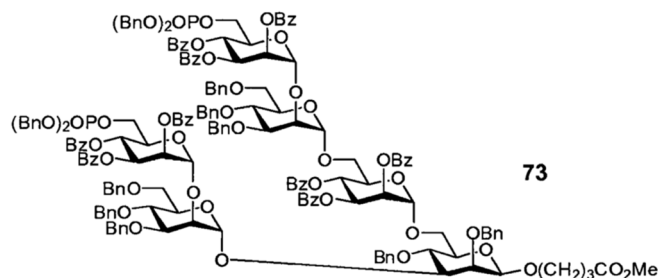


- 15 Una disolución de 10,0 g (3,5 mmol) de **71** en 40 ml de 1,4-dioxano se trató con 60 ml de MeOH, seguido de 3,25 g (14,0 mmol, 4 eq.) de ácido (+)-canfosulfónico, y la disolución resultante se agitó durante 100 horas a 22 °C. Cuando se había juzgado que la reacción se había completado mediante análisis por HPLC, se añadieron 3 ml (21,5 mmol, 6,2 eq.) de trietilamina y el disolvente se separó bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 200 ml de MTBE y se agitó con 200 ml de H₂O. Las fases se separaron y la fase superior se concentró a presión reducida. La purificación cromatográfica del producto bruto sobre 114 g de gel de sílice y eluyendo con un gradiente de 14-25% v/v de EtOAc en tolueno proporcionó 8,24 g de metilbutiril 3-O-([3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manosil])-2-O-[2,3,4-tri-O-benzoil- α -D-manosil])-(6-O-[2,3,4-tri-O-benzoil- α -D-manosil]-6-O-[3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manosil])-2-O-[2,3,4-tri-O-benzoil- α -D-manosil])-2,4-di-O-benzoil- β -D-manósido **72** en forma de un aceite que contiene tolueno residual.



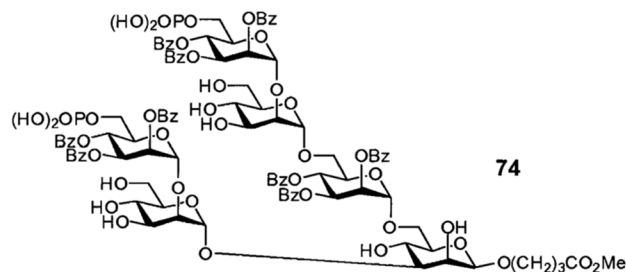
- 25 A una disolución de 0,965 g (0,35 mmol) de **72** en 4 g de acetonitrilo seco se añadieron 0,083 g (0,70 mmol, 2 eq.) de 4,5-dicianimidazol seguido de 0,315 g (0,91 mmol, 2,6 eq.) de diisopropilfosforamidita de dibencilo, y la mezcla se agitó a 23 °C durante 1 h. Cuando se había juzgado que la reacción se había completado mediante análisis por CCF, se añadieron 0,5 ml de agua y la disolución se agitó durante 15 min. Se añadieron agua (9,5 ml) y 10 ml de MTBE y

la mezcla resultante se sacudió, se separaron las fases, y la fase inferior se sacudió con 10 ml de MTBE. Las fases superiores se reunieron y se concentraron a presión reducida para dar un aceite incoloro. Este residuo se disolvió en CH_2Cl_2 , se enfrió a -20°C , y se trató con 0,247 g (1,13 mmol, 3,2 eq.) de ácido 3-cloroperbenzoico al 70%. Después de haber juzgado que la reacción se había completado mediante análisis por CCF, se añadieron 10 ml de tiosulfato sódico acuoso al 10% y la mezcla se calentó a 23°C . La fase inferior se separó, se sacudió con 10 ml de agua y se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre 19 g de gel de sílice y eluyendo con un gradiente de 25-50% v/v de EtOAc en hexano, para proporcionar 0,83 g (72%) de metilbutiril 3-O-([3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manosil]-2-O-[6-O-dibencilfosforil-2,3,4-tri-O-benzoil- α -D-manosil])-(6-O-[2,3,4-tri-O-benzoil- α -D-manosil]-6-O-[3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manosil]-2-O-[6-O-dibencilfosforil-2,3,4-tri-O-benzoil- α -D-manosil])-2,4-di-O-benzoil- β -D-manósido **73** en forma de un aceite incoloro.

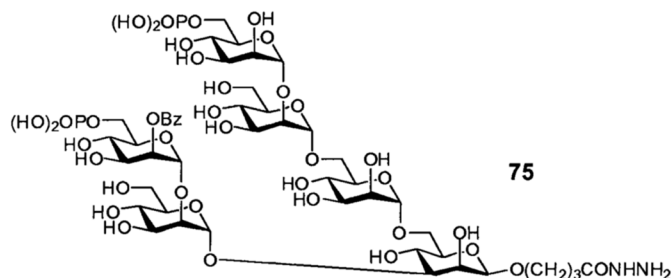


H. Síntesis de aminoxiacetamidohidrazido 3-O-([α -D-manosil-2-O-[6-O-fosforil- α -D-manosil])-(6-O-[α -D-manosil-6-O-[α -D-manosil-2-O-[6-O-fosforil- α -D-manosil]- β -D-manósido (**77**))

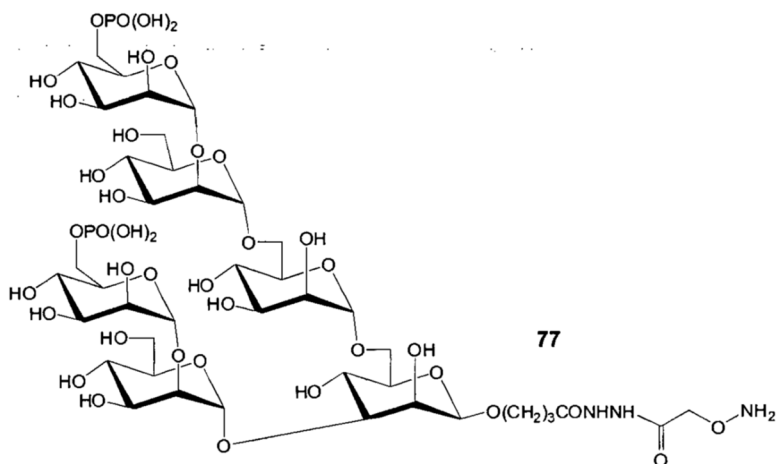
El compuesto **73** se preparó de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 8. Ácido acético glacial (100 μL) se añadió a **73** (64 g, 19,6 mmol) en metanol/THF 1:1 (600 mL), y el producto se hidrogenó utilizando H-cube® sobre $\text{Pd}(\text{OH})_2$ al 20%/C a 50°C , presión de 50 bar de H_2 y a un caudal de 6 mL/min con recirculación sobre el catalizador. Después de 20 h la reacción se había completado esencialmente mediante CCF, y la disolución se concentró para proporcionar **74** en forma de una espuma (39,88 g, 93%).



Metanol (180 mL) se añadió a **74** (33,8 g, 15,5 mmol) con agitación hasta que se disolvió, y la disolución se enfrió en un baño de hielo/agua durante 15 min. A la disolución se añadió monohidrato de hidrazina al 64% (94 mL, 1,24 mol), con agitación. Después de 30 min, se añadió agua (120 mL) y la disolución se dejó volver a la temperatura ambiente y se almacenó durante 18 h. La disolución se concentró hasta ~ 100 mL y se destiló por arrastre con agua (2 x 100 mL) y la disolución final se ajustó a ~ 180 mL con agua. La disolución se extrajo con DCM (2 x 100 mL) y después 3 porciones de 60 mL se separaron en una columna de exclusión por tamaño Sephadex. Las fracciones que contenían el material más puro se reunieron y liofilizaron, proporcionando **75** (15,5 g, 80%).



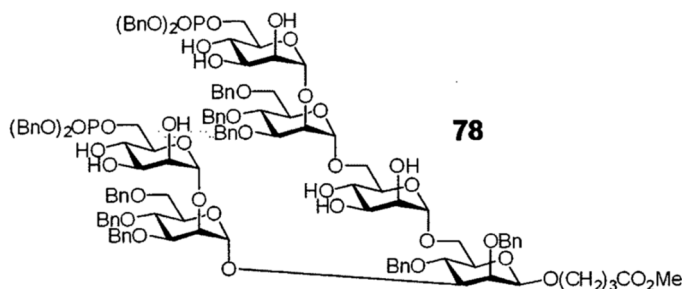
DMSO (20 mL) se añadió lentamente a **75** (2,5 g, 2,0 mmol) en agua (30 mL) y luego se añadieron 2,3,5,6-tetrafluorofenilato de *N*-*t*-butoxicarbonilaminoxiacetilo (2,58 g, 7,6 mmol) en DMSO (6 mL) y DHBt (0,65 g, 4 mmol) en DMSO (4 mL). Después de 18 h, la disolución se purificó sobre resina de exclusión por tamaño Sephadex. Las fracciones se verificaron en placas de gel de sílice mediante carbonización, y las fracciones seleccionadas se reunieron y liofilizaron, proporcionando *N*-*t*-butoxicarbonilaminoxiacetamidohidrazidobutiril 3-O-([α -D-manosil]-2-O-[6-O-fosforil- α -D-manosil])-(6-O-[α -D-manosil]-6-O-[α -D-manosil]-2-O-[6-O-fosforil- α -D-manosil])- β -D-manósido **76** (2,57 g, 90%). DCM (30 mL) y después TFA (16 mL) se añadieron al compuesto **76** (2,57 g, 1,8 mmol). La mezcla se agitó hasta que se disolvió (~ 60 min) y después se concentró hasta formar un aceite. Se añadió agua (20 mL) y el producto se purificó sobre resina de exclusión por tamaño Sephadex. Las fracciones se verificaron en placas de gel de sílice mediante carbonización y fracciones seleccionadas se reunieron y liofilizaron, proporcionando **77** (1,6 g, 67,1%).



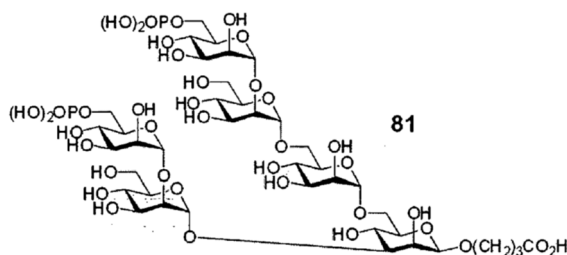
Ejemplo 6: Síntesis de hexasacárido con enlazador disulfuro

A. Preparación de hexasacárido en forma de ácido libre

MeOH anhidro se añade al compuesto **73**, seguido de NaOMe, y se incubó durante 4 -18 h. La reacción se enfrió rápidamente con ácido acético glacial y la disolución se concentró hasta formar un jarabe para proporcionar **78**.

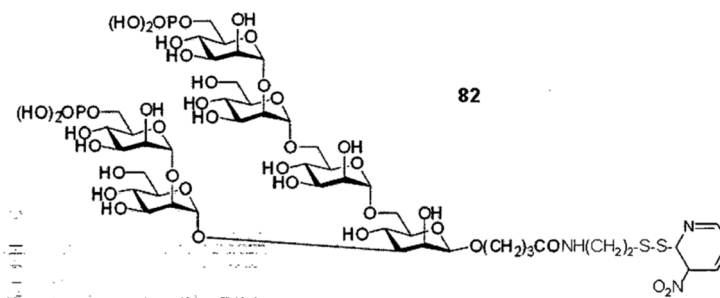


El compuesto **78** se disuelve en THF/metanol 1:1 y se hidrogena con Pd/C-H₂. La disolución se concentra hasta formar un sólido y se disuelve en agua, se saponifica con NaOH acuoso, el pH se ajusta a ~ 4 y se purifica en una columna Sephadex G-10 para proporcionar el ácido libre **81**.



B. Unión de enlazador disulfuro

Una fracción bruta de compuesto **81**, preparada por un método diferente (obtenido de Biomira), se convirtió en la sal trietilamina (TEA) mezclando con exceso de TEA, seguido de cromatografía sobre Peptide Superdex (GE Healthcare) utilizando acetonitrilo al 30%, bicarbonato de TEA al 0,1% como una fase móvil. Las fracciones reunidas se liofilizaron y se conjugaron con NEA en una reacción que contiene glicano:NEA:EDAC:NHS:HOBt:TEA (1:1:1,5:1:1:1 mol:mol) incubada durante la noche con agitación suave. Una parte (0,5 mg) de producto se cromatografió sobre Superdex Peptide como antes y liofilizó para proporcionar **82** (0,28 mg).



Ejemplo 7: Síntesis de conjugados de α -glucosidasa y optimización de la oxidación

A. Conjugación

Los oligosacáridos se conjugaron con α -glucosidasa ácida humana recombinante (rhGAA) para formar NeoGAAs. Los conjugados con oligosacáridos unidos principalmente a través de residuos de ácido siálico en rhGAA se denominan "SAM", mientras que los que están unidos a través de residuos galactosa se denominan "GAM".

NeoGAA β SAM6 se preparó esencialmente como se ha descrito por Zhu et al, *Biochem J*, 389 (Pt 3): 619-628 (2005). Se encontró que la muestra de rhGAA utilizada para el experimento, mediante análisis de la composición de monosacáridos, tenía ~ 5,2 moles de ácido siálico/mol de proteína. En síntesis, rhGAA (Genzyme Corp.) a 5 mg/mL se intercambió en tampón en acetato de sodio 100 mM, pH 5,6, después se hizo reaccionar con peryodato de sodio (2, 7,5 ó 22,5 mM) en hielo en la oscuridad durante 30 minutos. La reacción se enfrió rápidamente mediante la adición de glicerol al 2% (vol/vol). La rhGAA oxidada se intercambió en tampón para separar subproductos de bajo peso molecular de la reacción de oxidación, y se conjugó con el compuesto **77** (relación molar 0-120 veces frente a proteína, tal como se muestra en la Fig. 9) a 37 °C durante 6 h. Todos los conjugados fueron intercambiados en tampón en fosfato de sodio 25 mM, pH 6,25, que contenía manitol al 2% y Tween-80 al 0,005%.

Conjugados de NeoGAA similares se prepararon con SAM2 (Compuesto **17**, Ejemplo 2), SAM3 (Compuesto **35**, Ejemplo 3), SAM4 (Compuesto **28**, Ejemplo 4A), SAM4 lineal (Compuesto **47**, Ejemplo 4B) y α SAM6 (Oligosacárido 103), utilizando peryodato 7,5 mM y relaciones molares variables de oligosacárido a rhGAA.

También se realizaron métodos de conjugación alternos. Específicamente, hexasacárido con un enlazador reactivo con aminoxi, hidrazida o tiol se fijó a rhGAA a través de residuos Cys374, lisinas, ácidos siálicos o galactosa.

La conjugación de lisina se realizó modificando los residuos de lisina en rhGAA con 4-formilbenzoato de succinimidilo (SFB; Solulink Corp.), seguido de conjugación con el oligosacárido. En síntesis, la rhGAA fue primero intercambiada en tampón en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,2, que contenía cloruro de sodio 150 mM. A continuación, la rhGAA tamponada se trató con (SFB) recién preparado a una relación molar 20:1 de SFB a GAA. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min antes de ser intercambiada en tampón acetato de sodio 100 mM, pH 5,5, para la conjugación al hexasacárido hidrazida a temperatura ambiente durante 2 h, o la GAA modificada con SFB se intercambió en tampón en acetato de sodio 100 mM, pH 5,6, para la conjugación a aminoxi hexasacárido a 37 °C durante 6 h.

La conjugación basada en cisteína se llevó a cabo mediante reacción con el NEA-hexasacárido tiol-reactivo **82** (Ejemplo 6 I). El hexasacárido modificado con NEA **82** se reconstituyó en agua y se incubó con rhGAA (relación molar 15:1 de neoglicano a rhGAA) en fosfato de sodio 50 mM e hidroxilamina 50 mM, pH 7,2 durante 2 h a 25 °C. El pH se ajustó a 6,2 con fosfato de sodio 50 mM pH 4,1 y la incubación continuó durante la noche. El producto se purificó mediante diafiltración centrífuga frente a fosfato de sodio 25 mM, pH 6,2. Se introdujo menos de 1 mol:mol de M6P.

Mientras que la conjugación directa a través de Cys374 no tuvo éxito, un reactivo específico para tiol, homobifuncional, 1.4-(3'-[2-piridilditio]-propionamido)butano (DPDPB) con un brazo espaciador de 19.9 Å, fue sometido a ensayo para proporcionar un grupo tiol más accesible al disolvente en la posición 374 antes de la conjugación con el oligosacárido. Un exceso molar de 60 veces de DPDPB se hizo reaccionar con rhGAA en presencia de cualquiera de DMSO al 10% o propanol al 10% como co-disolventes. Esto provocó una fuerte agregación tal como se detectó por la dispersión de la luz. La reacción en presencia de acetonitrilo al 20% también mostró agregación, pero una absorbancia a 344 nm de un ultrafiltrado de la mezcla de reacción consistente con la modificación cuantitativa de la cisteína. Una reducción en la concentración de acetonitrilo al 10% reducía la cantidad de agregación, pero producía un grado inferior de modificación.

Se realizó un enfoque basado en tiol alternativo mediante la introducción de grupos tiol en los residuos de lisina. Tioles protegidos se introducen en los residuos de lisina mediante reacción de la enzima con un exceso molar de 100 veces de SATA-dPEG4-NHS (Quanta Biodesign) en fosfato de sodio, pH 6,2 durante 4 h a 25 °C y se purificaron mediante diálisis durante la noche frente al mismo tampón. A continuación, el producto purificado se hizo reaccionar con el NEA-oligosacárido **82** bajo las condiciones descritas anteriormente para la conjugación basada en cisteína para proporcionar un conjugado de lisina-tiol. Esto mostró un aumento de ~ 10 veces en el contenido en Man-6 P (~ 5 glicanos conjugados)

La estabilidad de conjugados de lisina con hidrazida se evaluó a 37 °C durante un máximo de 14 días, midiendo el peso molecular de la proteína intacta y el contenido en M6P. El conjugado no es estable, ya que más del 50% del neoglicano se perdió a lo largo de 14 días. Se prepararon conjugados aminoxi a través de la lisina utilizando un exceso molar de 0, 16,6, 25, 33, 40 de hexasacárido a rhGAA, según se describe arriba. La conjugación era saturable a un exceso molar de 16,6 veces, aunque sólo se conjugó ~31% (o 5 neoglicanos conjugados) de lisinas totales. También se observó un alto nivel de agregación en varias preparaciones. Se sometió a ensayo una versión PEGilada de SFB, sin reducción en la agregación.

La conjugación de galactosa (GAM) se realizó pretratando primero rhGAA con sialidasa de *Clostridium perfringens* a 20 mU/mg a 37 °C durante 6 h en fosfato de sodio 25 mM, pH 6,25, que contiene manitol al 2% y Tween-80 al 0,005%. Después de la disialilación, la proteína se trató con galactosa oxidasa (GAO) a 1-10 µg/mg y catalasa (Sigma) a 2 U/mg en el mismo tampón a 37 °C durante la noche antes de volver a purificar utilizando la cromatografía Poros 50D (de intercambio de aniones) para separar la neuraminidasa y catalasa. El producto tratado con las dos enzimas se diluyó con igual volumen de dH₂O, luego se aplicó a la columna de Poros 50D, que se pre-equilibró con tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 6,9. Después se lavó la columna con tampón acetato de sodio 10 mM, pH 5,0, la rhGAA se eluyó con tampón acetato de sodio 150 mM, pH 5,0, y se conjugó con el hexasacárido aminoxi a diversas relaciones molares a 37 °C durante 6 h.

La conjugación de GAM se saturó a un exceso molar de 16,6 veces de hexasacárido a GAA, con ~6-7 glicanos conjugados. Los niveles de agregación eran bajos. No se detectó ácido siálico alguno después la desialilación, mientras que poca galactosa se encontró después del tratamiento con galactosa oxidasa. En algunos casos, el 20-30% de los residuos galactosa se sobre-oxidaron, produciendo ácido galacturónico, que no se conjuga a oligosacáridos. La GAO se tituló, demostrando que por encima de 1µg/mg, la GAO disminuyó la conjugación a glicanos. Hubo un claro incremento en la cantidad de sobre-oxidación de ácido galacturónico producto por encima de 2 µg/mg de GAO. La cantidad máxima de conjugación se alcanzó a 1-2 µg de GAO por mg de rhGAA (Figura 10E - Los monosacáridos, incluido el contenido en Man-6 P, Gal, GalA de conjugado de GAM después de la titulación con GAO. Se observa una alta conjugación como contenido en Man-6 P en la proteína cuando se utiliza 0,5 a 2 µg de GAO/mg de GAA. Menor galactosa o mayor GalA generadas cuando se utiliza una GAO más baja o más alta.

La cantidad del glicano hexasacárido bis-M6P conjugado a NeoGAA se cuantificó mediante el análisis del contenido en M6P y MALDI-TOF. Para la cuantificación de M6P, las muestras fueron intercambiadas en tampón utilizando Amicon 4, 50.000 peso molecular nominal límite, unidades de filtro centrífugo con 5 rondas de filtración para separar cualquier exceso potencial de glicanos. Ochenta microgramos de cada una de las muestras de rhGAA o NeoGAA se hidrolizaron en TFA 6,75 M durante 1,5 horas a 100 °C. Las muestras se enfriaron, se secaron en un Speed Vac y se reconstituyeron en 200 µL de agua destilada. Las muestras reconstituidas se secaron de nuevo en un Speed Vac y se reconstituyeron con 200 µL de citrato 50 mM, pH 2,0. Las muestras se filtraron a través de cartuchos S Mini H (Sartorius), que se equilibraron en citrato de sodio pH 2,0, para separar impurezas del hidrolizado. Ribosa-5-fosfato se añadió como un patrón interno a todas las muestras y patrones. 50 µL de hidrolizado se inyectaron en una HPLC Dionex y se analizaron mediante cromatografía de intercambio de aniones de alto pH con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD). La cuantificación se llevó a cabo con una curva patrón construida con los patrones hidrolizados de M6P. A continuación, se calculó el grado de conjugación basado en la relación molar conocida de 2 moles de M6P por mol de glicano.

Se realizó un análisis MALDI-TOF MS utilizando un espectrómetro de masas Voyager DE-PRO en modo lineal. En todas las muestras y patrones se realizó una dilución 1:5 en ácido fórmico al 0,1% en agua, seguido de una dilución

1:1 en ácido sinapínico saturado en acetonitrilo al 50%/TFA al 0,1%. Un μL de esta mezcla se aplicó a una diana. El control de la muestra, de referencia y de calibración BSA se analizaron por triplicado. Se realizó una calibración de dos puntos utilizando $(M + H)^+$ y los iones dímeros de BSA. El grado de conjugación de cada una de las muestras de NeoGAA se estimó en base a la diferencia en pesos moleculares entre la muestra y un control rhGAA oxidado (sin glicanos añadidos), dado un peso molecular de glicano medido de 1323 g/mol.

La Fig. 9A muestra los resultados de experimentos utilizando los conjugados de di-, tri-, tetra- y hexa-sacáridos descritos anteriormente.

La Fig. 9B proporciona resultados de conjugados de βSAM6 preparados con diferentes cantidades de peryodato. Los niveles de oligosacárido necesarios para lograr la saturación de la reacción de conjugación eran proporcionales a la cantidad de peryodato utilizado durante la etapa de oxidación (Fig. 9B, panel superior). Con peryodato 2 mM, una muestra de rhGAA con $\sim 5,2$ moles de ácido siálico alcanzó la saturación en aproximadamente un exceso molar de 25 veces de hexasacárido frente a la proteína (exceso molar de 4,8 veces frente a ácido siálico). Con peryodato 7,5 mM, la saturación se alcanzó en un exceso molar de 33 veces de glicano. La saturación se acercó, pero no se alcanzó para la rhGAA oxidada con peryodato 22,5 mM, con un exceso molar de 120 veces de glicano. Los niveles máximos de conjugación alcanzados eran también diferentes para muestras preparadas con diferentes niveles de peryodato. Con peryodato 7,5 y 22,5 mM, se incorporaron aproximadamente 8,5 y 10,5 moles de glicano/mol de proteína, respectivamente. Después de la oxidación con peryodato 2 mM, el nivel de conjugación alcanzable era de aproximadamente 5 moles de glicano/mol de proteína, que es similar al número de residuos de ácido siálico en el material de partida.

El experimento de titulación con glicano se repitió con peryodato 2 mM utilizando rhGAA con un nivel de ácido siálico de partida de $\sim 7,2$ moles/mol de proteína (Fig. 9B, panel inferior). Se alcanzó un nivel de conjugación de aproximadamente 7 moles de glicano/mol de proteína a un exceso molar de ≥ 33 veces de glicano a proteína (exceso molar $\sim 4,6$ veces en comparación con ácido siálico).

B. Reducción de la agregación

Determinados métodos de conjugación dan como resultado la agregación de proteínas. Se han desarrollado dos métodos para la reducción de la agregación en neoGAA: 1) cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) utilizando una diversidad de medios de cromatografía HIC y 2) quelación de metales.

Se preparó una tanda de 3 g de NeoGAA y se utilizó para evaluar columnas de HIC y de cobre para la eliminación de la agregación. Las columnas de HIC evaluadas en modo de flujo continuo eran: Butyl 650C y 650M, Hexyl 650C, Phenyl 6FF, Capto Octyl y Capto Phenyl. Hexyl y Capto Phenyl dieron resultados equiparables con recuperaciones de 87,5% y 90,4%, y una reducción global del 3,2% (nivel inicial) hasta el 1,4% y del 3,9% (inicial) hasta el 1,6%, respectivamente. Véase la Tabla 2.

Tabla 2: Separación de agregados de GAA conjugada (3,2% ag.) utilizando la columna HIC (8°C)

Columna	mg de neoGAA cargada/ml resina	[NaOAc] de tampón de lavado	Recuperación	Agregación
	(mg/ml)	mM	(%)	(%)
Butyl 650C	21,1	100	98,1	3,3
Phenyl 6FF	18,1	100	94,3	1,6
Hexyl 650C	8,7	100	78,2	1,0
		10	91,4	1,5
Hexyl 650 C	21,4	100	87,5	1,4
Capto Phenyl	12,4	100	84,7	1,1
		50	92,3	1,3
Butyl 650M	15,7	100	92,5	1,9
Capto Octyl	8,5	100	95,6	1,8

También se establecieron las condiciones para el funcionamiento de columnas de quelato de cobre (GE o Tosoh) ya sea en flujo continuo o se en modo unir-eluir. Una columna FF quelante de metal de 7 ml (D.I., 7 ml) cargada con cobre se evaluó primero en el modo de unir-y-eluir con 10 mg/ml de GAA conjugada cargada. 87% de NeoGAA se recuperó con 1,2% de agregados cuando la columna se eluye con glicina 175 mM, acetato 100 mM, pH 5,5 como tampón de elución a TA. A 8 °C, se requirió glicina a una concentración más alta que 175 mM para eluir la columna para una recuperación satisfactoria. En el modo de flujo continuo (Tabla 3), se alcanzó una buena recuperación de 92% con el agregado reducido de 3,2 a 1,2% utilizando glicina 150 mM, acetato 100 mM, pH 5,5 como tampón de elución.

Tabla 3. Separación de agregados a partir de GAA conjugada (3,2% ag.) utilizando una columna 6FF de cobre (TA, modo flujo continuo)

mg de neoGAA cargada/ml resina	[glicina] en la carga	[glicina] de tampón de elución	Recuperación	Agregación
(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

Imidazol (7,5, 8, y 10 mM) también fue probado como tampón de elución para la columna 6FF de quelantes de metales. Imidazol aproximadamente 8 mM se necesitó para eluir la columna. Dado a que imidazol no eluye cobre de la columna, no era necesario acondicionar la columna ni dejar libre un espacio con EDTA en la parte superior de la columna. Se alcanzó una capacidad de la columna de 15 mg/ml de NeoGAA.

También se evaluó una columna Toso AF-quelato 650M cargada con cobre. En el modo de unir-y-eluir, se alcanzó una capacidad de la columna de 15 mg/ml, con 94,1% de elución y 1.2% de agregado utilizando glicina 8 mM. En el modo de flujo continuo, se alcanzó una capacidad de 33,6 mg/ml. Se obtuvo una recuperación de 90,6% con 1,2% de agregado con glicina 50 mM en el tampón de elución.

C. Análisis de oligosacáridos

De acuerdo con estos experimentos, el uso de peryodato > 2 mM dio como resultado la incorporación de NeoGAA glicano que superó el nivel de partida de ácido siálico en la proteína, lo que indica que se estaban oxidando restos no ácido siálico. Para determinar los niveles de oxidación en otros sitios de hidratos de carbono por parte de peryodato, se realizaron una serie de experimentos de titulación con peryodato, vigilando los niveles de otros residuos monosacáridos.

Para la determinación del contenido en ácido siálico, las muestras fueron sometidas a hidrólisis ácida con ácido fórmico 0,5 M a 80 °C durante una hora. El ácido siálico liberado se analizó mediante cromatografía de intercambio de aniones a pH alto, acoplada con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) en una columna Dionex CarboPac PA1 utilizando un gradiente de acetato de sodio 50-180 mM en hidróxido de sodio 100 mM a lo largo de 20 minutos. Los resultados se expresan como moles de ácido siálico (NANA o NGNA)/mol de rhGAA o NeoGAA, y se determinaron a partir de curvas patrón de patrones de ácido siálico auténticos comercialmente disponibles.

Los niveles de monosacáridos neutros, incluidas fucosa, galactosa, GlcNAc y manosa, se determinaron hidrolizando 100 µg de rhGAA o NeoGAA en TFA 1 M a 110 °C durante 2 horas. Después de la hidrólisis, los tubos se enfriaron en hielo, se centrifugaron durante 1 minuto a 10.000 rpm y se evaporaron hasta sequedad mediante un Speed Vac. Los monosacáridos liberados se resuspendieron en 250 µL de agua, se vortizaron y se filtraron utilizando tubos de filtro Millipore Ultrafree-MC (10.000 peso molecular nominal límite).

Los monosacáridos liberados se analizaron mediante cromatografía de intercambio de aniones a pH alto utilizando la detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) en una columna CarboPac PA1. La cuantificación se realizó utilizando curvas patrón de monosacáridos hidrolizados de la misma manera.

Los resultados de los experimentos anteriores se muestran en la Fig. 10A. Los resultados sugirieron que el ácido siálico es el más susceptible de los monosacáridos a la oxidación. Bajos niveles de destrucción fucosa eran detectables en peryodato 2 mM, y las cantidades eran más mensurables y reproducibles a ≥ 5 mM. Una ligera oxidación de manosa era detectable solamente en peryodato ≥ 7,5 mM.

Para confirmar la presencia de ácido siálico oxidado, fucosa, y manosa, se realizó una espectrometría de masas de fragmentación en oligosacáridos liberados de rhGAA oxidada utilizando peryodato 7,5 mM. Los oligosacáridos enlazados a N en rhGAA y NeoGAA fueron liberados utilizando la digestión durante la noche con PNGasa F en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0 y B-mercaptoetanol 10 mM. Los oligosacáridos liberados se limpiaron mediante bio-dialisis (peso molecular nominal límite 500 Da) con varios cambios de agua. Las muestras dializadas se secaron en un concentrador Speed-Vac y se reconstituyeron con 110 µL de formiato de amonio 10 mM, pH 4,0, en 50% de acetonitrilo y 50% de agua. Las muestras se analizaron utilizando una columna TSK Gel Amide 80 (100 µL de inyección sobre 2x100 mm, tamaño de partícula de 5 µm) con detección MS en línea (cuadrupolo-tiempo de vuelo QStar, tiempo de vuelo LCT Premier e instrumentos de trampa de iones lineal LTQ) en un gradiente de acetonitrilo-agua y formato de amonio 10 mM, pH 4.0.

Para el análisis de la estructura de oligosacáridos, los oligosacáridos se secaron y se marcaron de modo fluorescente utilizando ácido antranílico (AA). Los oligosacáridos marcados con AA se resolvieron mediante HPLC de fase normal en una columna de TSK Gel Amide 80 con detección de fluorescencia utilizando un gradiente de acetonitrilo / agua. El análisis de fragmentación MS se realizó en línea utilizando un espectrómetro de masas de trampa de iones lineal LTQ XL en modo de iones positivos. Los espectros se escanearon desde 400 a 2000 m/z, con energía de colisión normalizada fijada en 35 (por defecto, a menos que se indique en el texto) y la activación Q se fijó en 0,25.

Ácido siálico: La oxidación completa de ácido siálico (en los dos enlaces C7,8 y C8,9) daría como resultado una reducción en la masa de 62 Dalton. La oxidación de fucosa y manosa conduciría inicialmente a una reducción de 2 Dalton (oxidación de los enlaces C2,3 o C3,4), seguido de la reducción de 30 Dalton tras la oxidación de dioles vecinales restantes. La aminación reductora de aldehídos de hidratos de carbono con AA resulta en una pérdida de oxígeno, con una adición neta de un peso molecular de 121,1 Dalton por adición de AA. Cambios teóricos y observados en el peso molecular de oligosacáridos rhGAA tras oxidación del ácido siálico, fucosa y manosa se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Resumen de iones focalizados de oligosacáridos SAM6 marcados con AA para el análisis de MS2 y MS3 "1+" y "2+" corresponde a las especies positivas cargadas de manera sencilla y doble, respectivamente. "2-" y "3-" corresponde a especies negativas cargadas doble y triplemente, respectivamente

Oxidación detectada	Estructuras de oligosacáridos examinadas	Masa teórica (Da)	Iones precursores observados de MS2 (m/z)	Iones precursores observados de MS3 (m/z)
Oxidación de ácido siálico (1 Ox. ácido siálico + 2 AA)	Monosíal, Biant. (A1)	2111	1057(2+)	716, 1032, 1235, 1397, 1585, 1747
	Monosíal. Bianten. núcleo fucosilado (A1F)	2258	1130(2+)	716, 878, 1178, 1381, 1543, 1893
	Bisíal, Biant. (A2)	2462	1232(2+)	--
	Bisíal. Bianten. núcleo fucosilado (A2F)	2608	1305(2+)	--
Oxidación de manosa (1 Ox. manosa + 3AA)	Oligomanosa 5	1595,5	1596,5(1+)	1194, 1395
	Oligomanosa 6	1758	1758(1+)	1356, 1547
Oxidación de fucosa (1 Ox. S.A. + Ox. fucosa + 4AA)	Monosíal. Bianten. núcleo fucosilado (A1F)	2498	1250(2+)	716, 1397, 1621, 1783
	Bisíal. Bianten. núcleo fucosilado (A2F)	2848	1426(2+)	--

- 5 Se observaron varios iones correspondientes a ácido siálico oxidado y oxidado por derivatización de AA, fucosa y especies de oligosacáridos de manosa. Además de la derivatización para reducir GlcNAc de todos los oligosacáridos liberados, AA se derivatizó en proporción al número de especies de aldehído reactivas presentes, es decir, en una relación 1:1 con ácido siálico oxidado y en una relación 2:1 por manosa y fucosa oxidada.

- 10 El espectro de masas de la Fig. 10B muestra la detección de 4 iones correspondientes a oligosacáridos de rhGAA con oxidación y derivatización de AA en C7 de ácido siálico. Se seleccionaron dos iones de interés para la oxidación de ácido siálico (m/z 1057 y 1130) para su posterior análisis de fragmentación MS/MS. El patrón de fragmentación de m/z 1057 se muestra en la Fig. 10C, con cada uno de los iones anotados con identidades hipotéticas. Los iones de fragmentación m/z 716, 1032, 1235, 1397, 1584 y 1747 fueron seleccionados para el análisis de MS3. Los espectros MS³ coincidían con la estructura de oligosacáridos hipotética que contiene ácido siálico oxidado y marcado con AA en el extremo de un glicano biantenarico. En particular, la liberación de un fragmento de m/z 351 confirmó la unión de AA a una forma C7 de ácido siálico. En todas las muestras analizadas, sólo se observó la forma C7 de ácido siálico oxidado; no se observó evidencia alguna de la presencia de ácido siálico oxidado en C8.

Oxidación de fucosa: La Tabla 5 lista masas teóricas y observadas de A1F y A2F derivatizados con AA y oxidados.

- 20 **Tabla 5.** Masas teóricas y observadas de A1F y A2F derivatizados con AA, tras la oxidación de 1 residuo de fucosa con peryodato. "2+" corresponde a las especies de iones positivos doblemente cargados. Las masas teóricas se basan en la conjugación de 4 moléculas de AA por oligosacárido A1F y 5 moléculas de AA por A2F

Oligosacárido Derivatizado	Masa Teórica (Da)*	Iones detectados (m/z)
A1F, ácido siálico y fucosa marcados con AA y oxidados	2498,1	1250,4 (2+)
A2F, ácido siálico y fucosa marcados con AA y oxidados	2848,3	1426,0 (2+)

- 25 El patrón de fragmentación del ion parental m/z 1250,4 se muestra en la Fig. 10D, y es consistente con lo que se esperaría para un oligosacárido monoantenarico monosialilado marcado con AA, fucosilado en el núcleo, que contiene ácido siálico oxidado y fucosa oxidada. Se observaron fragmentos de iones principales m/z 716, 1397, 1621 y 1783. Estos iones fueron seleccionados para el análisis de MS³ para confirmar las identidades hipotéticas. En los espectros MS³ de m/z 1621 y 1783, se observaron patrones de fragmentación de iones con una pérdida de 195 Dalton respecto de los iones parentales (a 1426 y 1588 respecto de los iones parentales 1621 y 1783, respectivamente). Este cambio del peso molecular es coherente con la escisión entre el C1 y átomos de oxígeno de fucosa oxidada, resultando en la pérdida del ácido antranílico derivatizado unido a C4. Además, se observó una fragmentación adicional y una pérdida

del segundo ácido antranílico derivatizado unido a C3 como una pérdida de 386 Dalton respecto de los iones parentales (1235 y 1397 m/z, respecto de los iones parentales 1621 y 1783, respectivamente).

5 El patrón de fragmentación MS del oligosacárido A1F oxidado de rhGAA mostró una derivatización de C3,4 en fucosa con ácido antranílico, lo que confirma que se ha producido una oxidación del peryodato. No se observó evidencia de la oxidación del enlace C2-C3. La conjugación del glicano hexasacárido Bis-M6P a rhGAA oxidada resultó en una adición neta de 1305,3 Dalton durante la reacción de condensación.

10 Para confirmar las identidades de las estructuras de oligosacáridos conjugados, se realizó un análisis MS análisis de alta precisión de masa de oligosacáridos nativos liberados. Los oligosacáridos de rhGAA y NeoGAA SAM6 preparados con peryodato 2 y 7,5 mM fueron liberados utilizando PNGasa F, resueltos mediante HPLC en fase normal (columna TSK Gel Amide-80) en un gradiente de acetonitrilo-agua con formiato de amonio 10 mM pH 4,0. Detección por espectrometría de masas de glicanos se realizó en línea, en el modo de ion negativo, utilizando espectrómetros de masas de tiempo de vuelo QStar o LCT.

15 La siguiente Tabla proporciona un resumen de identidades pico de oligosacáridos enlazados a N nativos de rhGAA oxidados con peryodato 2 y 7,5 mM, y en SAM6 preparado con peryodato 2 y 7,5 mM, sobre la base de análisis MS/TOF de alta precisión. "Ox" se refiere al número de sitios de oxidación, "Conj" al número de glicanos hexasacárido Bis-M6P conjugados. Las masas teóricas se calculan a partir de pesos moleculares monoisotópicos de estructuras de oligosacáridos teóricas y se muestran m/z teóricos y observados para estados de cargo correspondientes.

Estructura base	Oligo	PM (mono) teor.	m/z (2-) teor.	m/z (3-) teor.	mz/(4-) teor.	SAM6 tratado con peroxidato 2 mM PM observado	SAM6 tratado con peroxidato 7,5 mM PM observado	GAA tratada con peroxidato 2 mM PM observado	GAA tratada con peroxidato 7,5 mM PM observado
Man5	Nativo	1234,43				1233,45(1-)	1233,45(1-)	1233,45(1-)	1233,45(1-)
	1 Ox manosa	1232,42	616,21 615,20			N/D	N/D	1231,44(1-)	1231,40(1-)
	2 Ox manosa	1230,40	6615,20 615,20 6 614,19			N/D	N/D	1229,45(1-)	1229,45(1-)
	1 Ox manosa + 1 Conj	2537,75	1267,87	844,91	633,43	1267,91(2-)	1267,91(2-)	N/D	N/D
	2 Ox manosa + 1 Conj	2535,73	1266,86	844,24	632,93	N/D	N/D	N/D	N/D
	1 Ox manosa + 2 Conj	3843,08	1920,53	1280,02	959,76	N/D	1280,01(3-)	N/D	N/D
	2 Ox manosa + 2 Conj	3841,06	1919,52	1279,35	959,26	N/D	1279,41(2-)	N/D	N/D
	2 Ox manosa + 3 Conj	5146,39	2572,19	1714,46	1285,59	N/D	N/D	N/D	N/D
Man6	Nativo	1396,49	697,24			1395,49(1-); 697,26(2-)	1395,49(1-); 697,26(2-)	1395,47(1-); 697,26(2-)	1395,47(1-); 697,26(2-)
	1 Ox manosa	1394,47	696,23			N/D	N/D	1393,47(1-); 696,23(2-)	1393,47(1-); 696,27(2-)
	2 Ox manosa	1392,46	695,22			N/D	N/D	N/D	1391,44(1-); 695,24(2-)
	1 Ox manosa + 1 Conj	2699,80	1348,89	898,93	673,94	1348,88(2-)	1348,88(2-)	N/D	N/D
	2 Ox manosa + 1 Conj	2697,78	1347,88	898,25	673,44	N/D	N/D	N/D	N/D
	1 Ox manosa + 2 Conj	4005,13	2001,56	1334,04	1000,27	2001,48(2-); 1333,99(3-)	2001,48(2-); 1334,04(3-)	N/D	N/D

	2 Ox manosa +2 Conj	4003,11	2000,55	1333,36	999,77	N/D	1333,45(3-)	N/D	N/D
	2 Ox manosa + 3 Conj	5308,44	2653,21	1768,47	1326,10	N/D	N/D	N/D	N/D
NA2	Nativo	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	N/D
	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 Conj	5552,55	2775,27	1849,84	1387,13	N/D	N/D	N/D	N/D
NA2F	Nativo	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	891,31(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	Nativo	1931,69	964,84			N/D	N/D	N/D	N/D

	Ox ácido siálico	1869,65	933,82				933,84(2-)	933,84(2-)	933,84(2-)
	Ox ácido siálico + 1	1867,64	932,81				N/D	N/D	932,84(2-)
	Ox Gal/Man								
	Ox ácido siálico + 2	1865,62	931,80				N/D	N/D	N/D
	Ox Gal/Man								
	Ox ácido siálico + 3	1863,60	930,79				N/D	N/D	N/D
	Ox Gal/Man								
	Ox ácido siálico + 4	1861,59	929,79				N/D	N/D	N/D
	Ox Gal/Man								
	Ox ácido siálico + 1	3174,98	1586,48	1057,32	792,74	1586,49(2-); 1057,31(3-)	N/D	N/D	N/D
	Conj								
	Ox ácido siálico + 1	3172,96	1585,47	1056,65	792,23	N/D	N/D	N/D	N/D
	Ox Gal/Man + 1								
	Conj								
	Ox ácido siálico + 1	4478,29	2238,14	1491,76	1118,57	1491,73(3-)	N/D	N/D	N/D
	Ox Gal/Man + 2								
	Conj								
	Ox ácido siálico + 2	4476,28	2237,13	1491,08	1118,06	N/D	N/D	N/D	N/D
	Ox Gal/Man/Fuc +								
	2 Conj								
	Ox ácido siálico + 3	4474,26	2236,12	1490,41	1117,56	N/D	N/D	N/D	N/D
	Ox Gal/Man/Fuc +								
	2 Conj								
	Ox ácido siálico + 1	5783,62	2890,80	1926,87	1444,90	1926,86(3-); 1444,89(4-)	N/D	N/D	N/D
	Ox Gal/Man + 3								
	Conj								
	Ox ácido siálico + 2	5781,61	2889,80	1926,19	1444,39	N/D	N/D	N/D	N/D
	Ox Gal/Man/Fuc +								
	3 Conj								
A1F	Native	2077,75	1037,87	691,57	518,43	N/D	N/D	N/D	N/D
	Ox ácido siálico	2015,71	1006,85	670,90	502,92	1006,82(2-)	1006,88(2-)	1006,88(2-)	1006,88(2-)
	Ox ácido siálico + 1	2013,69	1005,84	670,22	502,42	N/D	1005,82(2-)	1005,88(2-)	1005,88(2-)
	Ox Gal/Man/Fuc								
	Ox ácido siálico + 2	2011,68	1004,83	669,55	501,91	N/D	N/D	N/D	1004,83(2-)
	Ox Gal/Man/Fuc								
	Ox ácido siálico + 3	2009,66	1003,82	668,88	501,41	N/D	N/D	N/D	N/D
	Ox Gal/Man/Fuc								

	Ox ácido siálico + 4 Ox Gal/Man/Fuc	2007,65	1002,82	668,21	500,90	N/D	N/D	N/D	N/D
	Ox ácido siálico + 1 Conj	3321,04	1659,51	1106,00	829,25	1659,51(-2-); 1106,03(3-)	N/D	N/D	N/D
	Ox ácido siálico + 1 Ox Gal/Man + 1 Conj	3319,02	1658,50	1105,33	828,75	N/D	N/D	N/D	N/D
	Ox ácido siálico + 1 Ox Gal/Man/Fuc + 2 Conj	4624,35	2311,17	1540,44	1155,08	1540,45(3-)	N/D	N/D	N/D
	Ox ácido siálico + 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	Native	2222,78	1110,38	739,92	554,69	N/D	N/D	N/D	N/D
	1 Ox ácido siálico	2160,75	1079,37	719,24	539,18	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox ácido siálico	2098,71	1048,35	698,56	523,67	N/D	1048,36(2-)	N/D	N/D
	2 Ox ácido siálico + 1 Ox Gal/Man	2096,69	1047,34	697,89	523,17	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox ácido siálico + 2 Ox Gal/Man	2094,68	1046,33	697,22	522,66	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox ácido siálico + 3 Ox Gal/Man	2092,66	1045,32	696,55	522,16	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox ácido siálico + 4 Ox Gal/Man	2090,65	1044,32	695,87	521,65	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox ácido siálico + 1 Conj	3404,04	1701,01	1133,67	850,00	N/D	1700,98(2-); 1133,67(3-)	N/D	N/D
	2 Ox ácido siálico +2 Conj	4709,37	2353,68	1568,78	1176,33	1568,77(3-)	N/D	N/D	N/D
	2 Ox ácido siálico + 1 Ox Gal/Man + 1 Conj	3402,02	1700,00	1133,00	849,50	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox ácido siálico + 1 Ox Gal/Man + 2 Conj	4707,35	2352,67	1568,11	1175,83	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox ácido siálico + 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 ácido siálico + 3 Ox Gal/Man/Fuc + 2 Conj	4703,32	2350,65	1566,77	1174,82	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox ácido siálico + 1 Ox Gal/Man + 3 Conj	6012,68	3005,33	2003,22	1502,16	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
A2F	Nativo	2368,84	1183,41	788,61	591,20	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	1 Ox ácido siálico	2306,80	1152,39	767,93	575,69	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox ácido siálico	2244,77	1121,38	747,25	560,18	N/D	1121,38(2-)	1121,38(2-)	1121,38(2-)	1121,38(2-)
	2 Ox ácido siálico + 1 Ox Gal/Man/Fuc	2242,75	1120,37	746,58	559,68	N/D	1120,36(2-)	1120,36(2-)	1120,36(2-)	1120,36(2-)
	2 Ox ácido siálico + 2 Ox Gal/Man/Fuc	2240,74	1119,36	745,90	559,18	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox ácido siálico + 3 Ox Gal/Man/Fuc	2238,72	1118,35	745,23	558,67	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox ácido siálico + 4 Ox Gal/Man/Fuc	2236,71	1117,34	744,56	558,17	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox ácido siálico + 1 Conj	3550,10	1774,04	1182,36	886,52	1182,33(3-)	1774,00(2-); 1182,33(3-)	N/D	N/D	N/D
	2 Ox ácido siálico + 2 Conj	4855,43	2426,71	1617,47	1212,85	1617,47(3-)	1617,44(3-)	N/D	N/D	N/D
	2 Ox ácido siálico + 1 Ox Gal/Man/Fuc + 2 Conj	4851,40	2424,69	1616,12	1211,84	N/D	1616,77(3-)	N/D	N/D	N/D
	2 Ox ácido siálico + 2 Ox Gal/Man/Fuc + 2 Conj	4849,38	2423,68	1615,45	1211,34	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	2 Ox ácido siálico + 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	N/D
	2 Ox ácido siálico + 1 Ox Gal/Man/Fuc + 4 Conj	7624,11	3811,05	2540,36	1905,02	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

Se observó una precisión de masa de > 20 ppm para todas las especies de oligosacáridos. Los resultados de MS eran consistentes con el análisis de la composición de monosacáridos que demostró que la oxidación de ácido siálico es completa en peryodato ≥ 1 mM. También era evidente una cierta oxidación de manosa y fucosa. Se observaron iones correspondientes a la conjugación de 1 y 2 moles de glicano por manosa y/o fucosa oxidada, sugiriendo que ambas especies de aldehído de cada uno son reactivas frente a glicano, según se observó para AA.

Una cierta conjugación de estructuras de alto contenido en manosa (oligomanosa 5 y 6) se detectó tanto en el material tratado con peryodato 2 mM como 7,5 mM. En el material conjugado con peryodato 2 mM, se observaron 0 o 1 glicano conjugado en las especies A1 (monosialiladas), mientras que los iones que corresponden a 0,1, 2 y 3 glicanos conjugados se observaron en las especies A1 en SAM6 7,5 mM. Este resultado implica que con peryodato 7,5 mM (pero no 2 mM), se producía en las estructuras A1 una cierta oxidación y conjugación de residuos de manosa y/o galactosa en el núcleo.

Para las especies A2 y A2F (bisialiladas, biantenarias, \pm fucosa), se observaron especies tanto mono- como bi-conjugados en las muestras de peryodato 2 y 7,5 mM. Se observó una evidencia de tri-conjugación con manosa oxidada sólo en la muestra tratada con peryodato 7,5 mM, y no en el tratamiento con 2 mM, en consonancia con la conjugación a través de fucosa a una concentración de peryodato elevada.

La Fig. 11A muestra el análisis de HPLC de oligosacáridos liberados a partir de rhGAA y NeoGAA. Para el control de rhGAA, la mayoría de las especies de oligosacáridos enlazadas a N eluyeron entre 11-13 minutos, una región correspondiente a oligosacáridos sin fosforilación o conjugación. Para los oligosacáridos NeoGAA, especies de oligosacáridos bi-conjugadas eluyeron entre 19-20 minutos, especies de oligosacáridos monoconjugadas eluyeron entre 15-18 minutos, y oligosacáridos oxidados/no modificados eluyeron entre 10-13 minutos. En la muestra SAM6 hecha con peryodato 7,5 mM, se encontró que aproximadamente la mitad de los oligosacáridos eluían en la región correspondiente a las especies bi-conjugadas, mientras que aproximadamente 1/3 de los oligosacáridos de las muestras tratadas con peryodato 2 mM eran bi-conjugados. Los perfiles de elución de estas muestras son consistentes con sus niveles de conjugación (~ 7 y 9 moles de glicano conjugado/mol de NeoGAA para SAM6 generado con peryodato 2 y 7,5 mM, respectivamente) medida mediante análisis MALDI-TOF y del contenido en manosa-6-fosfato.

Para proporcionar una mejor visualización y comparación cualitativa de las estructuras de oligosacáridos presentes, oligosacáridos liberados se analizaron mediante cromatografía de intercambio de aniones de alto pH con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD). Las muestras se analizaron mediante HPAEC-PAD en una columna Dionex CarboPac PA100 utilizando un gradiente de acetato de sodio en hidróxido sódico 100 mM. Las identidades pico de oligosacáridos fueron confirmadas mediante recogida de fracción fuera de línea, diálisis frente a agua y análisis mediante HPLC de fase normal con análisis de MS en línea.

La Fig. 11B muestra un perfil de HPAEC-PAD representativo con la identificación de los picos (según se determina mediante MS). La Fig. 11C muestra el perfilado de oligosacáridos mediante HPAEC-PAD de las muestras SAM6 de rhGAA y NeoGAA tratadas con peryodato 2 y 7,5 mM.

D. Análisis de la cadena principal de la proteína de rhGAA después de tratamiento con peryodato

Para estudiar la modificación potencial de la cadena principal de la proteína de NeoGAA, se realizó una representación en mapa de péptidos por LC/MS. SAM6 de NeoGAA, producida utilizando peryodato 0, 2, 7,5 y 22,5 mM, se preparó utilizando tripsina, y se analizó mediante HPLC de fase inversa con un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo LCT. Modificaciones potenciales de péptidos, tales como oxidación en residuos cisteína, metionina, triptófano, tirosina e histidina, así como la desamidación de asparagina, fueron evaluadas utilizando el software BioPharmalynx. La única modificación significativa detectada era la oxidación de metionina en varios sitios diferentes. Los niveles de oxidación en el péptido T13 (que contiene metionina 172 y 173) después del tratamiento con peryodato 0, 2 y 22,5 mM se ilustran en la Fig. 12.

Se encontraron importantes niveles de oxidación en los residuos metionina 122, 172 y 173. La oxidación en estos residuos metionina fue confirmada mediante análisis LC/MS/MS. También se observó que se producía un bajo nivel de oxidación de una manera dependiente de peryodato en metionina 363. En un intento de minimizar la oxidación con peryodato, las concentraciones de peryodato se titularon a niveles entre 1 y 7,5 mM, monitorizándose la oxidación en el sitio más susceptible (péptido T13) mediante LC/MS. Se observaron niveles significativos de oxidación de metionina a concentraciones de peryodato mayores que 1 mM, sugiriendo que metioninas en rhGAA son tan susceptibles a la oxidación como lo son residuos de ácido siálico.

Durante la conjugación de GAM, la oxidación de galactosa GAO resultó en ~26% de oxidación de Met172/173. Cuando la catalasa se incluyó en la reacción de oxidación a 2 y 50 unidades/mg de GAA, se eliminó la oxidación de metionina.

Ejemplo 8: Caracterización *In Vitro* de conjugados de GAA

SAM2 de NeoGAA se preparó como se describe en el Ejemplo 7, utilizando el Compuesto **17** del Ejemplo 2 y peryodato 7,5 mM. Un GAM2 de NeoGAA conjugado con galactosa se preparó tratando rhGAA con galactosa oxidasa antes de la conjugación con el disacárido **17**. De manera similar también se prepararon el trisacárido SAM3 de NeoGAA (Compuesto **35**, Ejemplo 3), el tetrasacárido SAM4 de NeoGAAs (Compuesto **28**, Ejemplo 4A) y SAM4 lineal (Compuesto **47**, Ejemplo 4B). Además, el hexasacárido β SAM6 de NeoGAA se preparó con el Compuesto **77** según se describe en el Ejemplo 7, utilizando peryodato 2 y 7,5 mM. Se prepararon también conjugados de hexasacáridos adicionales α SAM6 (enlace α , conjugado a través de residuos ácido siálico) y GAM6 (conjugado a través de residuos galactosa).

A. Actividad Específica:

El análisis de actividad se llevó a cabo monitorizando la tasa de hidrólisis del sustrato sintético p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (p-NP) tal como es catalizado por rhGAA y NeoGAA. El cromóforo liberado se mide mediante absorbancia a 400 nm bajo condiciones alcalinas. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima requerida para hidrolizar un μ mol de p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido en p-nitrofenol por minuto a 37 °C bajo las condiciones de ensayo definidas.

Las actividades específicas de SAM2, SAM3, SAM4, SAM4 lineal, α SAM6 y β SAM6 de NeoGAAs se muestran en la Figura 13. Además, se evaluó la actividad específica de los conjugados preparados utilizando el método SAM frente al método GAM. Existía una correlación inversa ($p < 0,001$) entre el número de M6P por GAA y la actividad específica de los conjugados de NeoGAA preparados a escala pequeña y grande, y un exceso molar de 16,6 veces de oligosacárido/GAA. La pérdida de actividad de GAA también se observó con cantidades crecientes de contenido en M6P en conjugados de SAM o GAM en experimentos separados en los que se titularon concentraciones de NeoGAA durante la conjugación (2,5 a 33 veces el exceso molar de oligosacárido). Para SAM con una actividad de GAA de 49-81% (en comparación con el control), los diversos NeoGAAs contenían 6-8 moléculas de oligosacáridos por proteína. Conjugados GAM tenían un 67-92% de actividad, y 4-6 oligosacáridos por proteína.

B. Unión al receptor de M6P:

Los efectos funcionales de conjugación se evaluaron monitorizando la unión de NeoGAA al receptor de manosa-6-fosfato catión independiente soluble (sCIMPR) mediante HPLC de afinidad en columna del receptor de M6P Biacore, y mediante la absorción en células de mioblastos L6. sCIMPR, tal como se purifica a partir de suero bovino, contiene dominios extracelulares A-X, mientras que carece de la porción de transmembrana.

Para el análisis Biacore, sCIMPR se acopló con amina a un chip CM-5, 10 μ g/mL de muestra NeoGAA se cargaron en la superficie y se eluyó con concentraciones crecientes de manosa-6-fosfato. La afinidad se cuantificó como la concentración de M6P necesaria para desplazar el 50% de NeoGAA unido (CE50). El método se utilizó para vigilar los efectos de conjugación y oxidación sobre la afinidad del receptor.

La Fig. 14 muestra los resultados del análisis Biacore. La inyección de 10 μ g/mL de NeoGAA en un chip de Biacore inmovilizado con sCIMPR condujo a un incremento en la respuesta de ~ 250 RU, mientras que la misma cantidad de rhGAA provocaba una deflexión de ~ 100 RU. Además, se requería una concentración de M6P aproximadamente 10 veces mayor para eluir NeoGAA que rhGAA (valores CE50 de aproximadamente 0,1 frente a 1,0 mM para rhGAA y NeoGAA, respectivamente). Existía una relación lineal (r -cuadrado $> 0,95$) entre los valores de CE50 y el nivel de conjugación para NeoGAA preparada utilizando peryodato 2 y 7,5 mM. A través de los intervalos de conjugación examinados (1,6-4,7 moles de glicano/mol de NeoGAA para la preparación de peryodato 2 mM, y 1,0-8,5 moles de glicano/mol de NeoGAA para la preparación NaIO₄ 7,5 mM), el efecto del nivel de conjugación en las afinidades de unión eran similares para NeoGAA preparado con peryodato 2 y 7,5 mM.

La unión al receptor de M6P se evaluó mediante HPLC usando una columna de receptor de M6P preparada al inmovilizar sCIMPR en una resina Poros EP, que luego se empaqueta en una columna de HPLC analítica. rhGAA y NeoGAA se eluyeron utilizando M6P 0,25, 0,85, 5 y 20 mM (Fig. 15 A y B). En un experimento, SAM2 y GAM2 se compararon con β S3AM6 y GAM6 (Fig. 15C). SAM6 y GAM6 requerían M6P 20 mM antes de que se eluyera la mayor parte del material ($> 95\%$ del conjugado unido a la columna). SAM2 y GAM2 se unían menos estrechamente, eluyendo la mayoría a M6P 5 mM ($> 95\%$ unido a la columna).

Además, los conjugados de NeoGAA SAM2, SAM3, SAM4, SAM4 lineal y α SAM6 se evaluaron en cuanto a la unión al receptor de M6P (Fig. 15 D). La mayoría de los conjugados SAM2, SAM3, y los dos conjugados SAM4 eluían con M6P 5 mM, mientras que los dos conjugados SAM6 requerían M6P 20 mM.

Se evaluaron conjugados de NeoGAA con cantidades variables de conjugación (Fig 15E). El porcentaje de NeoGAA en la fracción unida era consistentemente > 95% para aquellas preparaciones con > 2,0 moles de glicano por mol de conjugado de NeoGAA. En las pocas fracciones que tenían niveles más bajos de conjugación (1,0-1,7 moles de glicano), la fracción unida oscilaba entre 75-90%. Perfiles de la columna M6P para NeoGAA también mostraron cantidades de especies de alta afinidad mayores que en rhGAA. Específicamente, la mayoría de la rhGAA unida se eluyó con M6P 0,2 mM, mientras que se requería M6P 20 mM para eluir NeoGAA de la columna. Los efectos globales de nivel de conjugación en los porcentajes de las especies de alta afinidad eran similares entre los tratamientos con peryodato 2,0 y 7,5 mM.

La Figura 15F muestra los efectos de variar la cantidad de M6P. Conjugados SAM6 contenían la siguiente cantidad de M6P: SAM6-1 (4,9 mol de M6P/mol de rhGAA), SAM6-2 (7,4 mol de M6P/mol de rhGAA), SAM6-3 (10,5 mol de M6P/mol de rhGAA), SAM6-4 (11,2 mol de M6P/mol de rhGAA) y SAM6-5 (16,6 mol de M6P/mol de rhGAA). La significancia estadística se indica por [^], * y ^{***}, y representa p < 0,05 en comparación con 100 mg/kg de rhGAA, SAM6-1 y SAM6-3, respectivamente.

C. Internalización Por Parte de Mioblastos L6.

Se realizó un ensayo de captación de mioblastos L6 según se describe en Zhu et al., *J. Biol. Chem.* 279: 50336-50341 (2004), para demostrar la fijación como objetivo de rhGAA y NeoGAA de mioblastos a través de la vía del receptor de manosa-6-fosfato catión independiente (CIMPR). En el ensayo de captación de mioblastos L6, se añadieron rhGAA y NeoGAA M6P +/- 5 mM a los medios en los pocillos que contenían mioblastos L6, y se incubaron durante un periodo pre-determinado de una noche. Después de la incubación, las células se lisaron y se sometieron a ensayo en cuanto a la actividad utilizando sustrato 4-MU glucósido, y en cuanto a la concentración de proteína a través de un ensayo micro-BCA, para generar una curva de respuesta enzima-dosis.

En la Fig. 16 se muestran los resultados del ensayo de absorción de mioblastos L6. Conjugados SAM2 y GAM2 mostraron una absorción significativamente mayor que rhGAA no modificada, pero no tan alta como los conjugados SAM6 o GAM6 bis-fosforilados (Fig. 16, panel superior). También se sometió a ensayo la captación de SAM2, SAM3, SAM4, SAM4 lineal y α SAM6 de NeoGAAs (Fig. 16, panel inferior). En un experimento similar, el conjugado de lisinaiol del Ejemplo 7 producía un aumento de ~ 8 veces en la absorción.

Ejemplo 9: Efectos *In Vivo* de Nuevos Conjugados de GAA

Efectos *in vivo* de determinados conjugados de NeoGAA se investigaron en un modelo de ratón inactivado con GAA descrito en Raben et al. *J. Biol. Chem.* 273 (30):19086-92 (1998). Cada uno de grupos de seis ratones fue tratado una vez por semana durante cuatro semanas como sigue:

Grupo	GAA	Dosis (mg/kg)
1	Vehículo (repetido con cada uno de experimentos con SAM2, SAM4 y SAM6)	--
2	Myozyme (repetido con cada uno de experimentos con SAM2, SAM4 y SAM6)	20
3	Myozyme (repetido con cada uno de experimentos con SAM2, SAM4 y SAM6)	100
4	SAM2	4
5	SAM2	20
6	SAM4	4
7	SAM4	20
8	α SAM6	4
9	α SAM6	20
10	β SAM6 (peryodato 7,5 mM)	4
11	β SAM6 (peryodato 7,5 mM)	20
12	β SAM6 (peryodato 2 mM)	4
13	β SAM6 (peryodato 2 mM)	20

Se recogieron muestras de corazón, cuádriceps y tríceps, y se midieron en cuanto al contenido de glucógeno del tejido. Resultados para los animales SAM2, SAM4 y SAM6 se muestran en las Figs. 17, 18 y 19, respectivamente. El

experimento se repitió con grupos de 12 animales utilizando conjugados SAM6, que confirma que los conjugados SAM6 eran más de cinco veces más potentes que rhGAA no modificada.

Conjugados de hexasacáridos SAM y GAM también se compararon utilizando grupos de seis ratones que recibieron vehículo, 20, 60 ó 100 mg/kg de rhGAA, o 4, 12 ó 20 mg/kg de SAM6 o GAM6 una vez por semana durante cuatro semanas. Corazón, cuádriceps, tríceps, diafragma y psoas se recogieron y se analizó el contenido en glucógeno. La Figura 20 muestra los resultados de este estudio. Estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos: Treinta ratones inactivados con GAA (15 machos y 15 hembras), de 3-6 meses de edad, se obtuvieron de Charles River Laboratories, Wilmington, MA. Cada uno de los grupos de dosis contenía 5 machos y 5 hembras. Los animales se alojaron en grupos y se mantuvieron a 25 °C con humedad con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad. Todos los animales tuvieron libre acceso a los alimentos (PicoLab® Rodent Diet 20) y agua. Los animales se dividieron al azar en grupos de 3 dosis de 5 machos y 5 hembras/grupo para un total de 10 ratones por grupo de dosis. Los grupos recibieron una sola administración intravenosa de conjugados de rhGAA, GAM y SAM a razón de 20 mg/kg. Se recogieron muestras de sangre para análisis de farmacocinética a los 5, 15, 30, 60, 120, 240 y 480 minutos post-dosis a través del plexo retro-orbital en ratones conscientes. Se determinaron concentraciones de rhGAA en suero utilizando el ensayo de actividad de GAA. Los resultados se muestran en la Figura 20B.

Ejemplo 10: Síntesis de un Conjugado de Esfingomielinasa Ácida

Esfingomielinasa ácida recombinante humana (rhASM) expresada en un sistema de expresión de baculovirus o en células de ovario de hámster chino tiene una cisteína C-terminal con un grupo tiol libre. Véase Lansmann et al., *Eur. J. Biochem.* 270: 1070.6-1088 (2003); Qiu et al, *J. Biol. Chem.* 278: 32744-32752 (2003). rhASM puede ser acoplada, a través de ese grupo tiol libre, con cualquiera de los Oligosacáridos 1-127, en donde el oligosacárido comprende un enlazador y un grupo reactivo con tiol, de acuerdo con el método descrito en la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. Nº. 60/885.457 o el Ejemplo 6.

Ejemplo 11: Síntesis de un Conjugado de α -L-iduronidasa

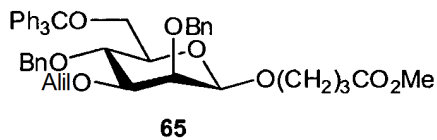
α -L-iduronidasa se acopla con cualquiera de los oligosacáridos 1-127, en donde el oligosacárido comprende un enlazador que comprende un grupo reactivo propionaldehído, de acuerdo con el método descrito en Lee et al., *Pharm. Res.* 20:818-825 (2003). α -L-iduronidasa y oligosacárido se acoplan, en presencia de cianoborohidruro de sodio como un agente reductor, a temperatura ambiente, pH 5,5, durante 1 día. Las moléculas pequeñas se separan de la mezcla de reacción mediante diálisis o diafiltración.

En la medida en que las publicaciones y patentes o solicitudes de patente citadas en esta memoria contradigan la divulgación contenida en la memoria descriptiva, la memoria descriptiva reemplazará a todo material contradictorio.

Todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, etcétera, utilizados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente", en donde aproximadamente significa, p. ej., $\pm 5\%$. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos recogidos en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas buscadas para ser obtenidas mediante la presente divulgación. Como poco, sin ninguna intención de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada uno de los parámetros numéricos debe ser interpretado a la vista del número de dígitos significativos y aproximaciones de redondeo ordinarias.

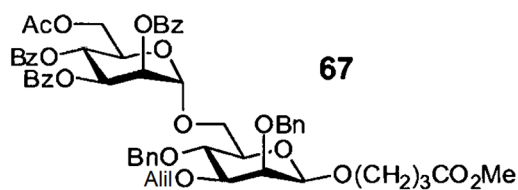
REIVINDICACIONES

1.- El compuesto de Fórmula :

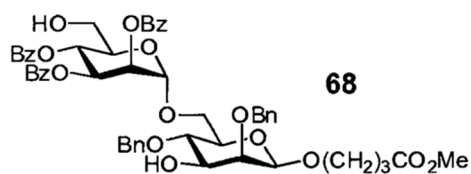


5

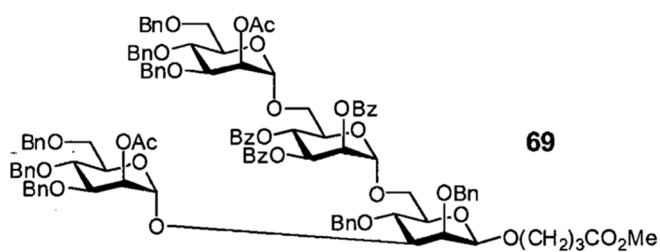
2.- El compuesto de Fórmula:



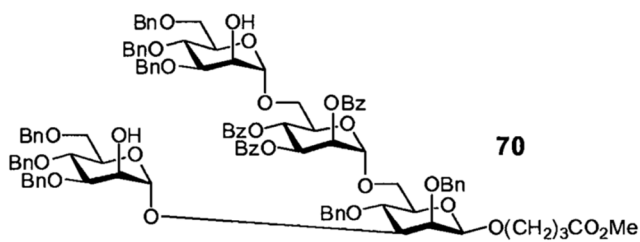
3.- El compuesto de Fórmula:



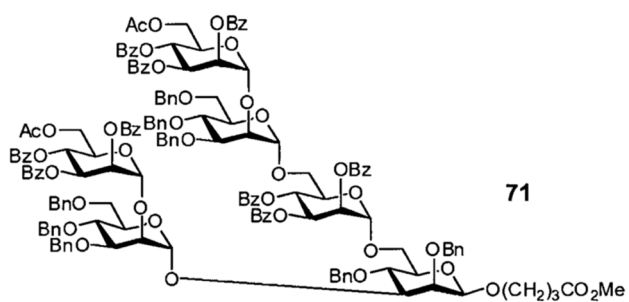
10 4.- El compuesto de Fórmula:



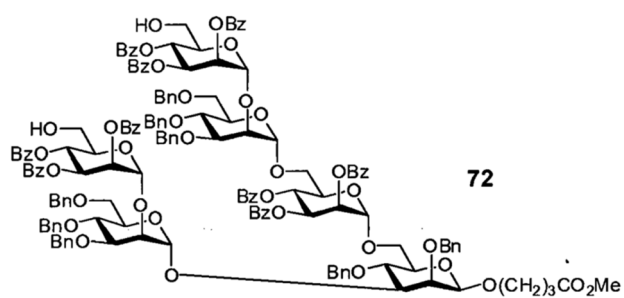
5.- El compuesto de Fórmula:



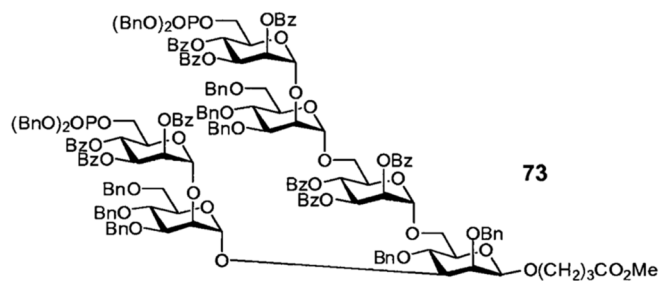
6.- El compuesto de Fórmula:



7.- El compuesto de Fórmula:



5 8.- El compuesto de Fórmula:



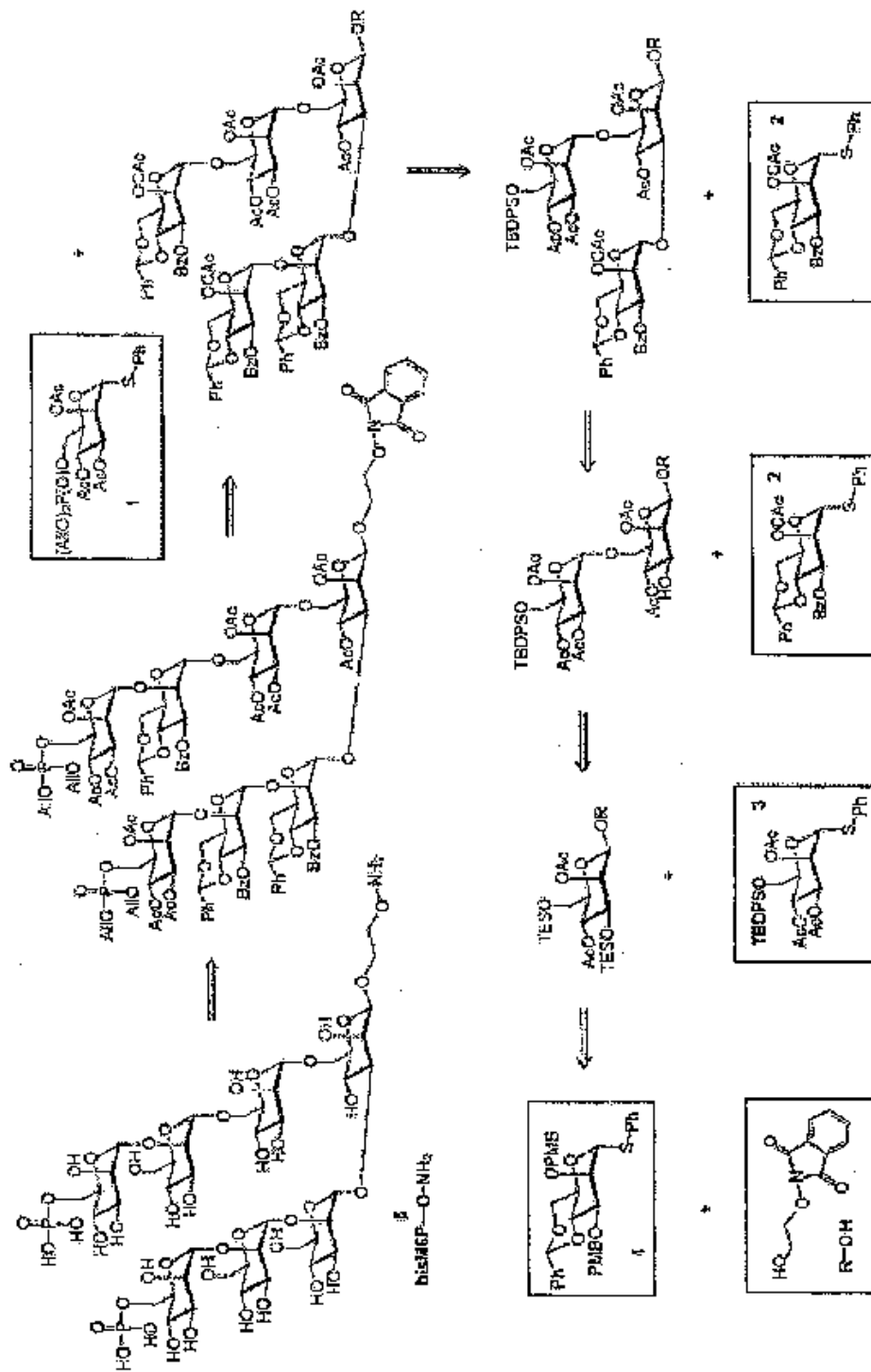


FIG. 1

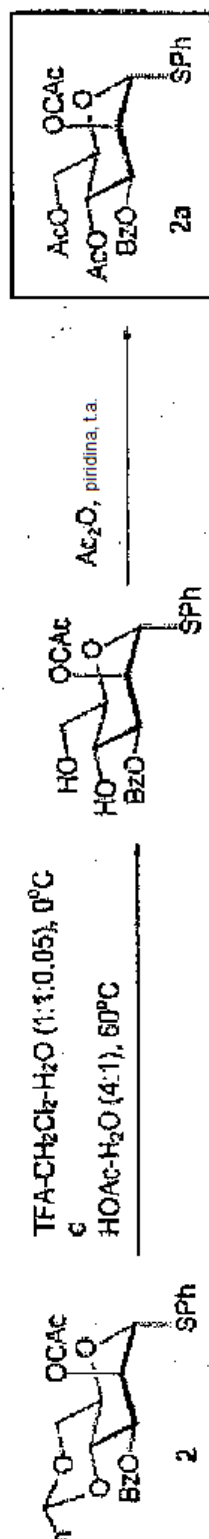


FIG. 2

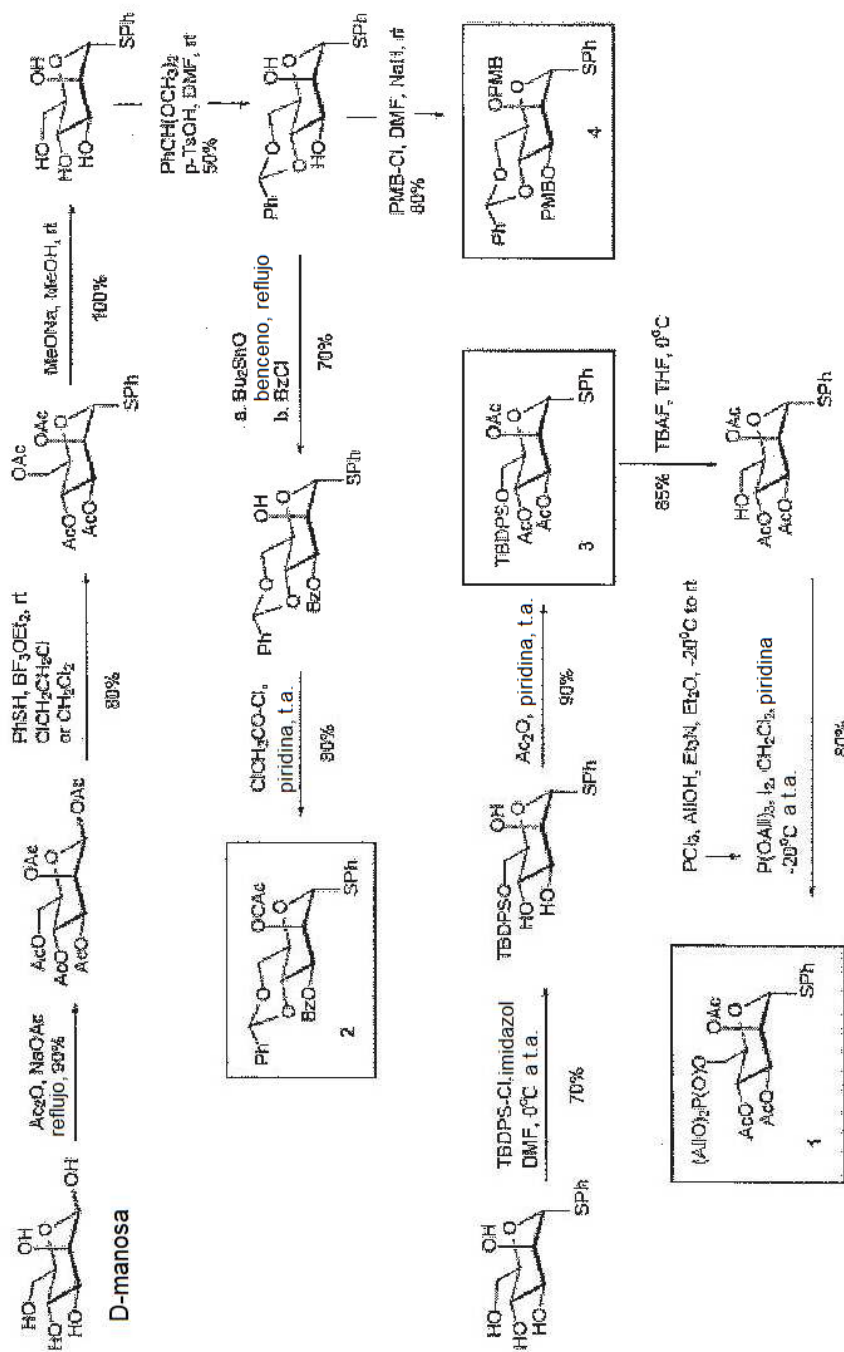


FIG. 3

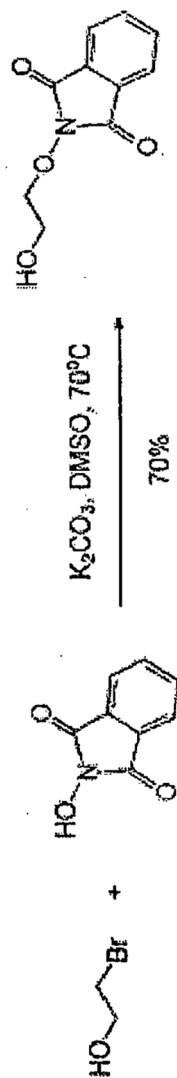


FIG. 4

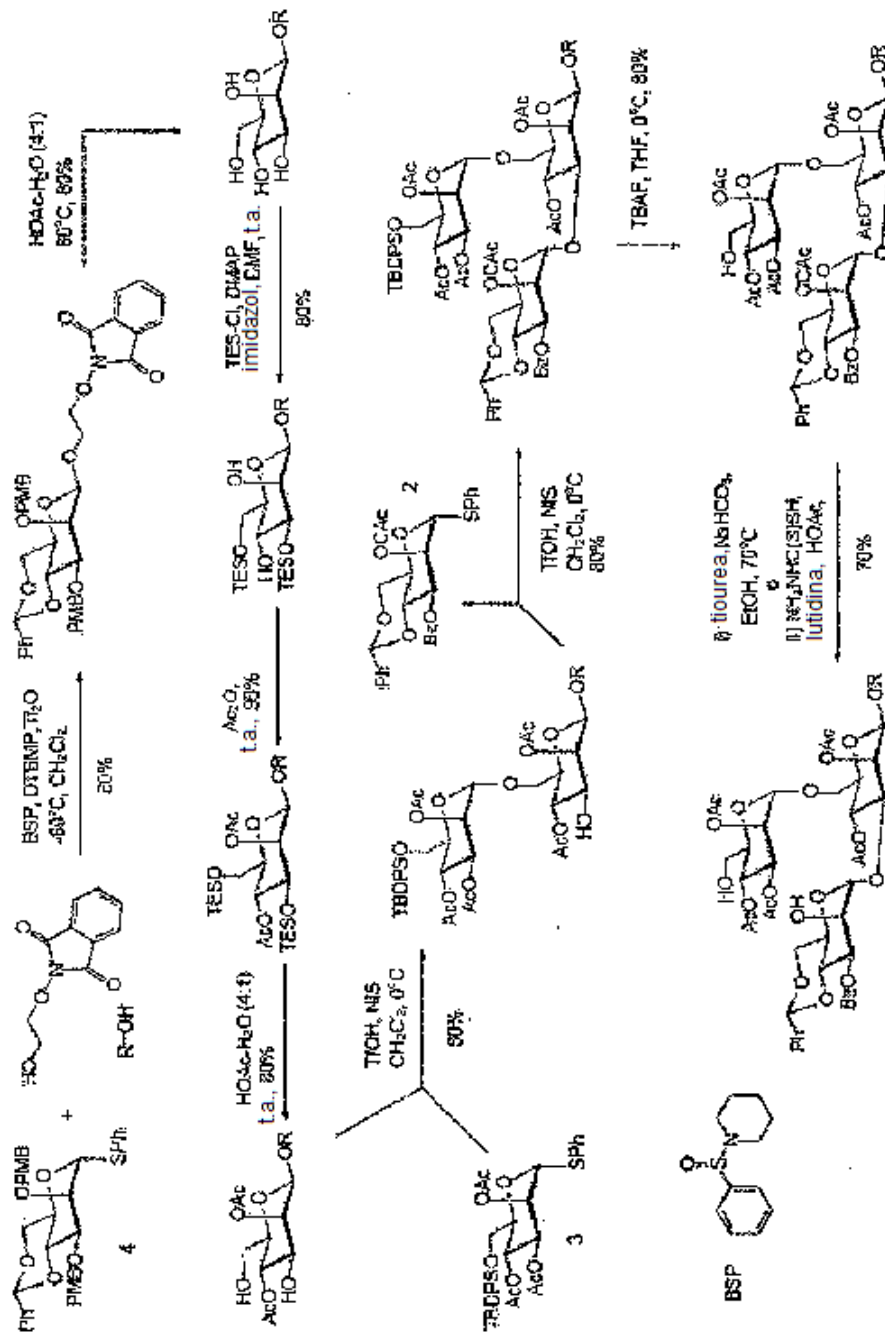


FIG. 5

DTBMP = di-*tert*-butil-4-metilpiridina; NIS = N-yodosuccinimida; TBAF = fluoruro de tetrabutilamonio; TfOH = ácido trifílico

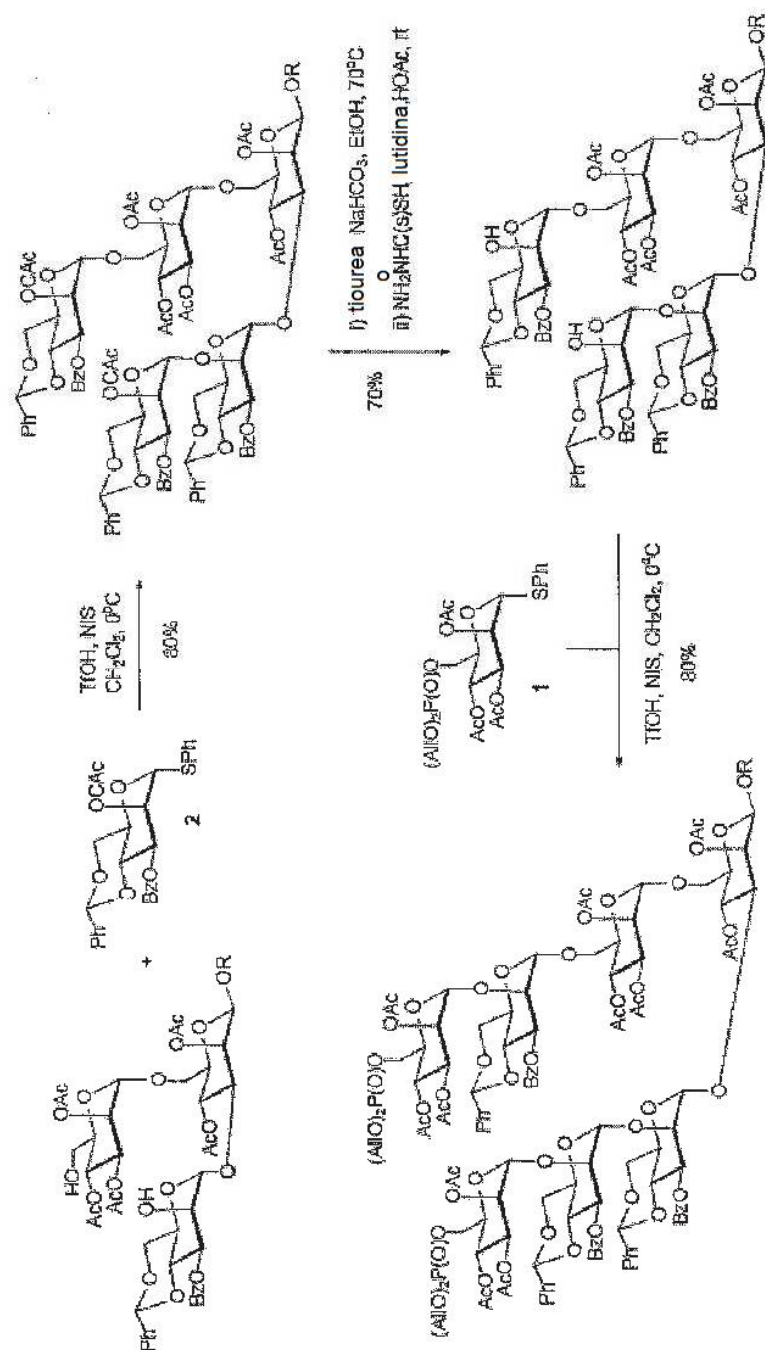


FIG. 6

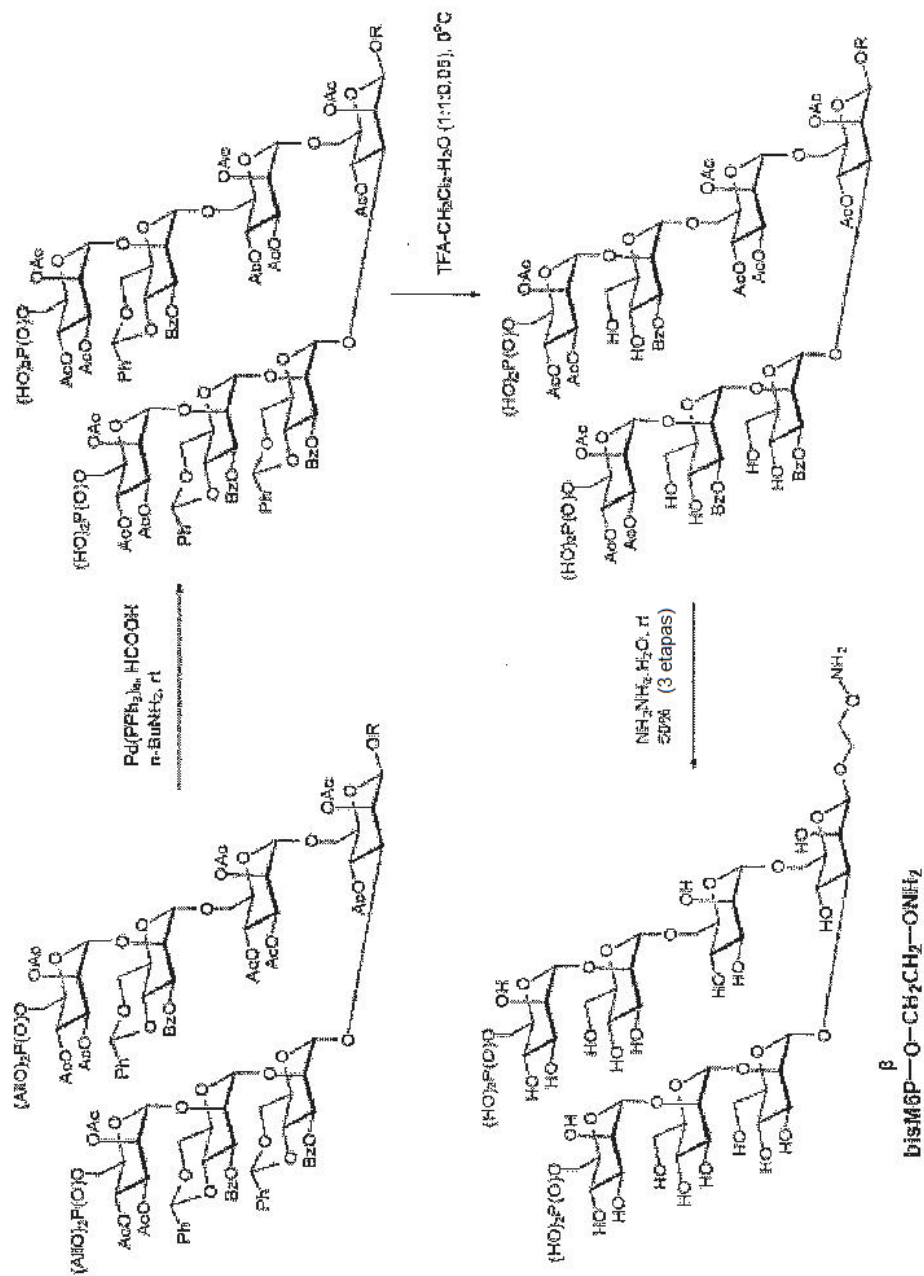


FIG. 7

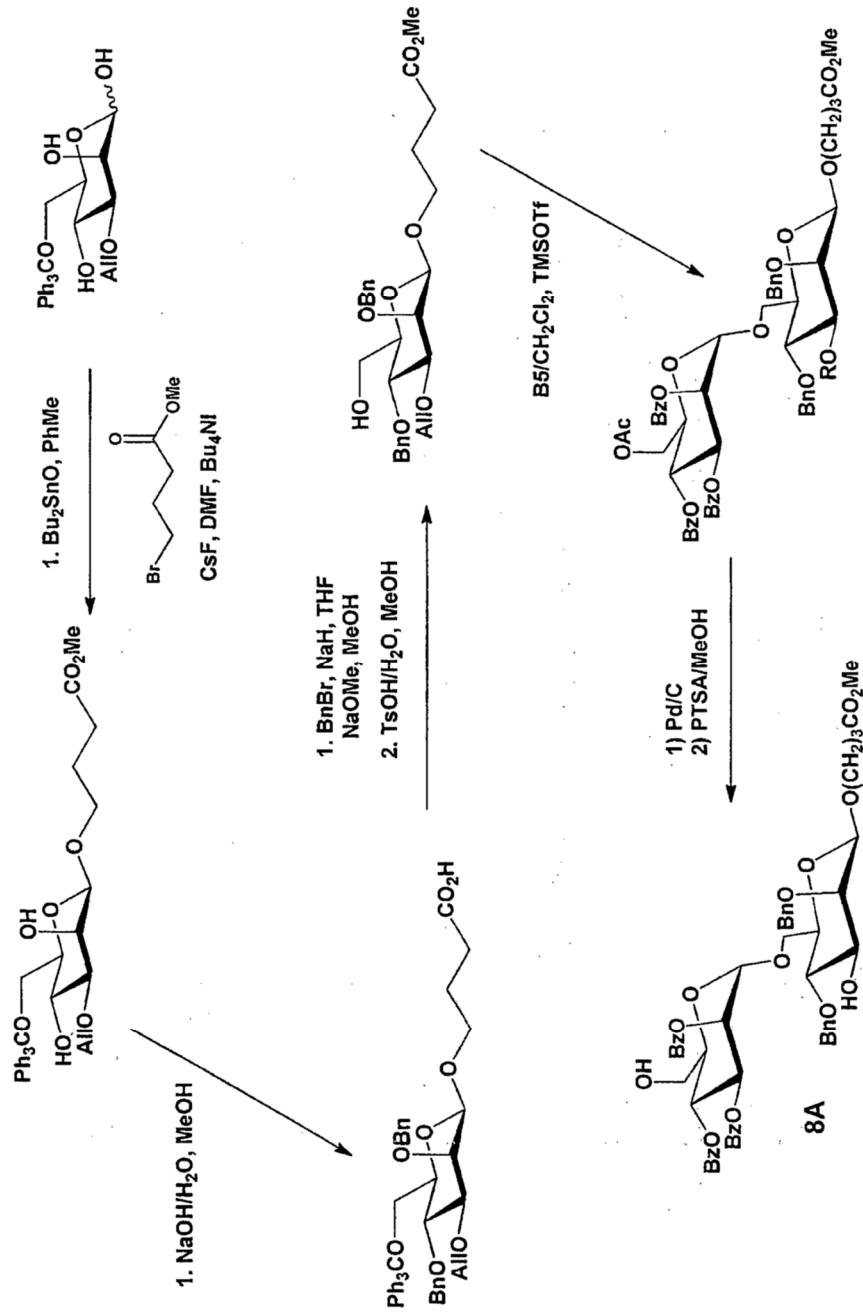


FIG. 8A

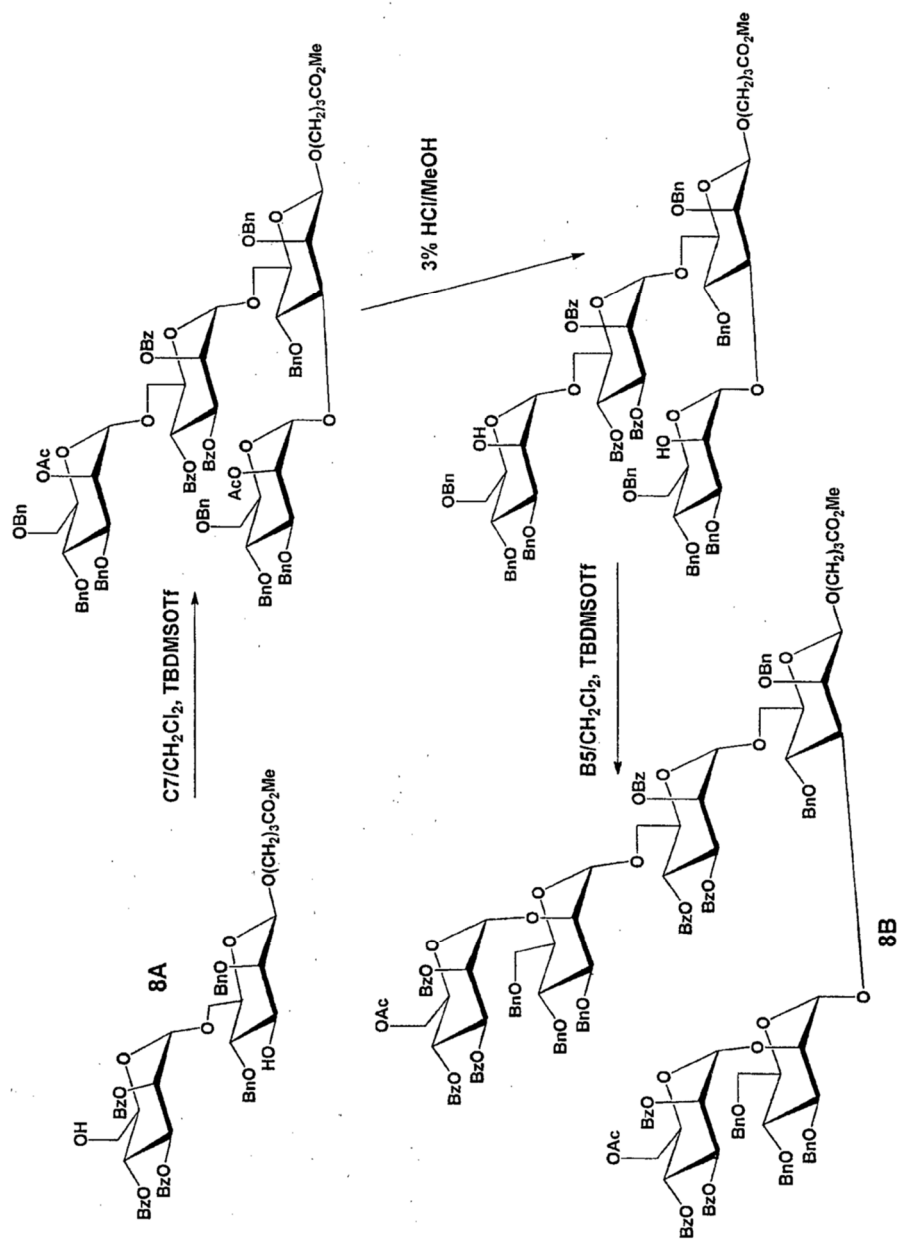


FIG. 8B

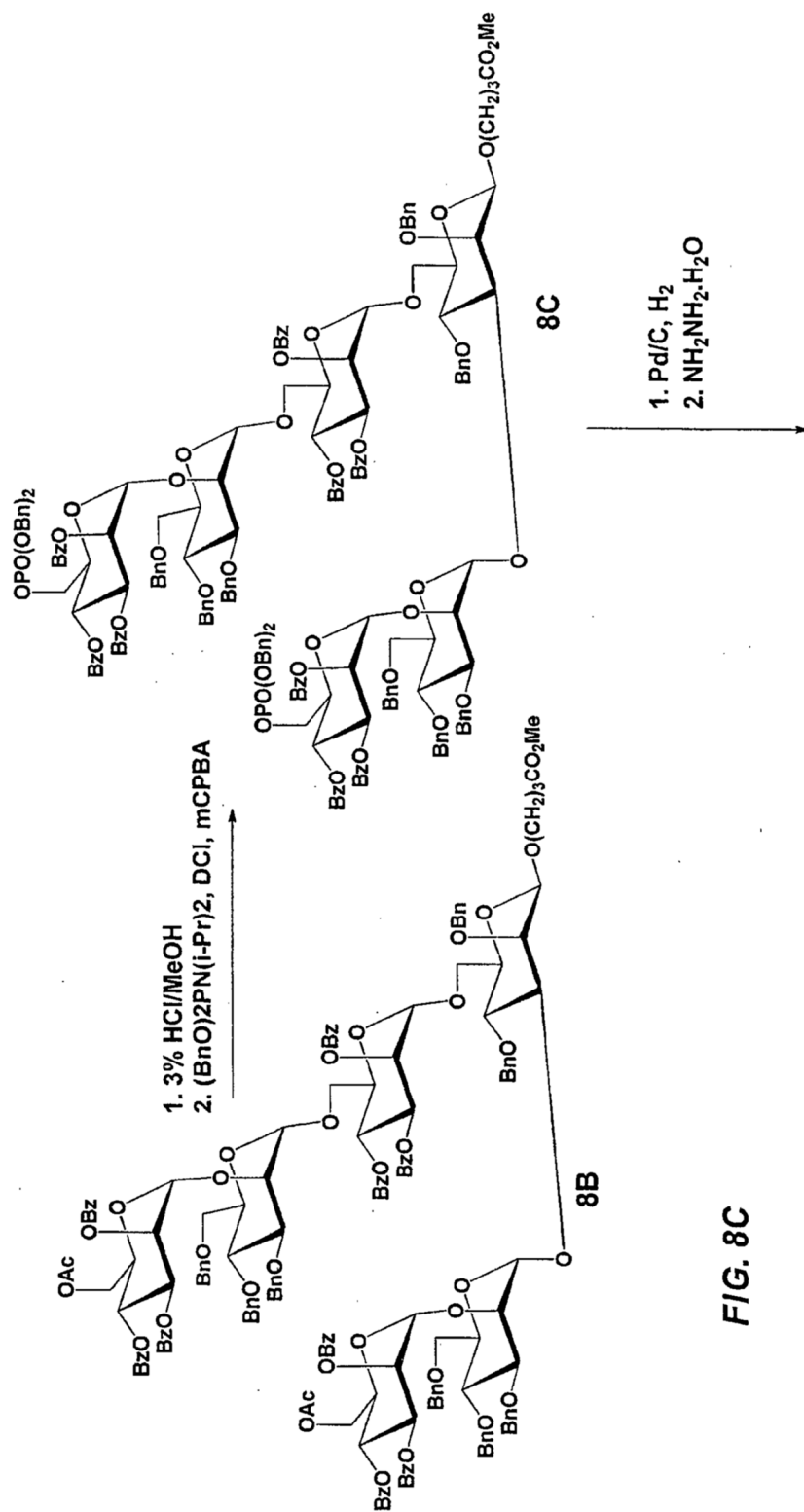


FIG. 8C

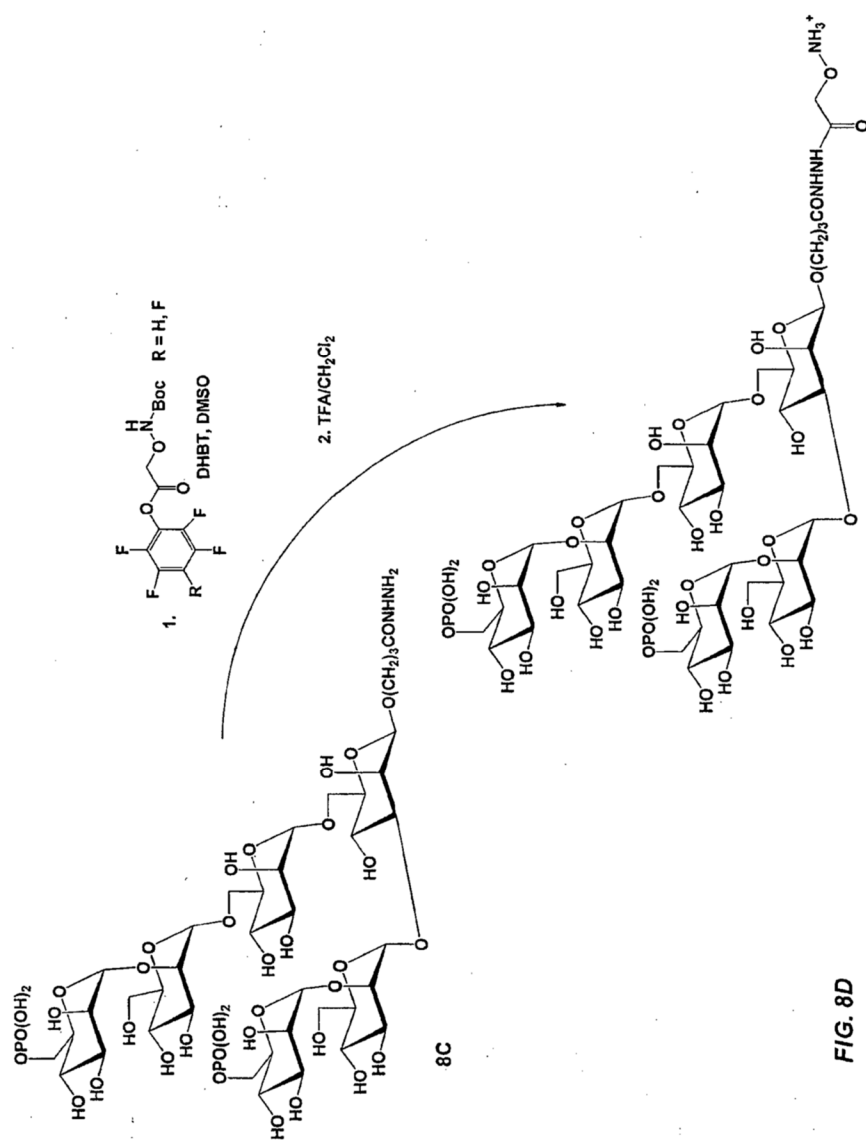


FIG. 8D

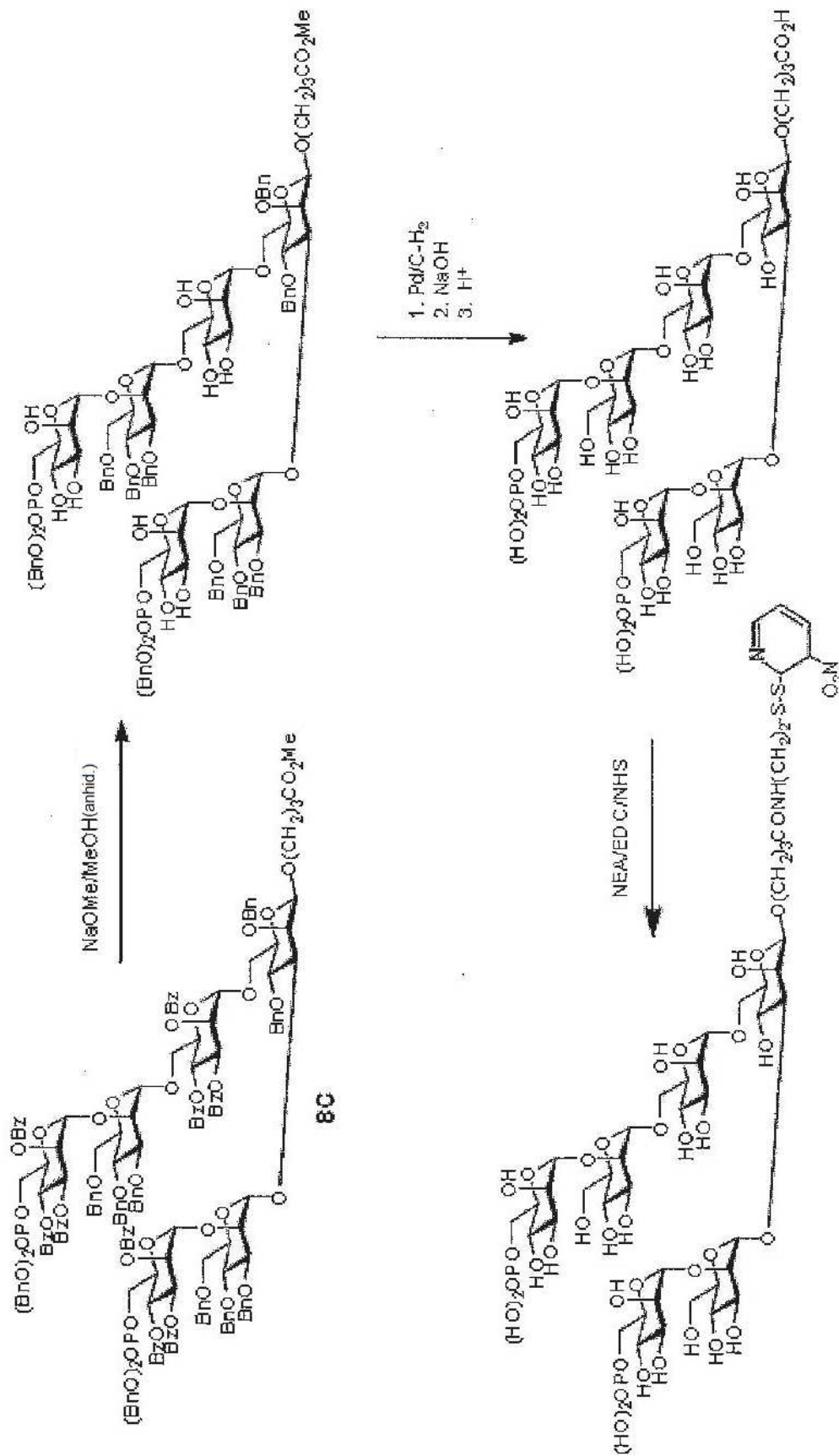


FIG. 8E

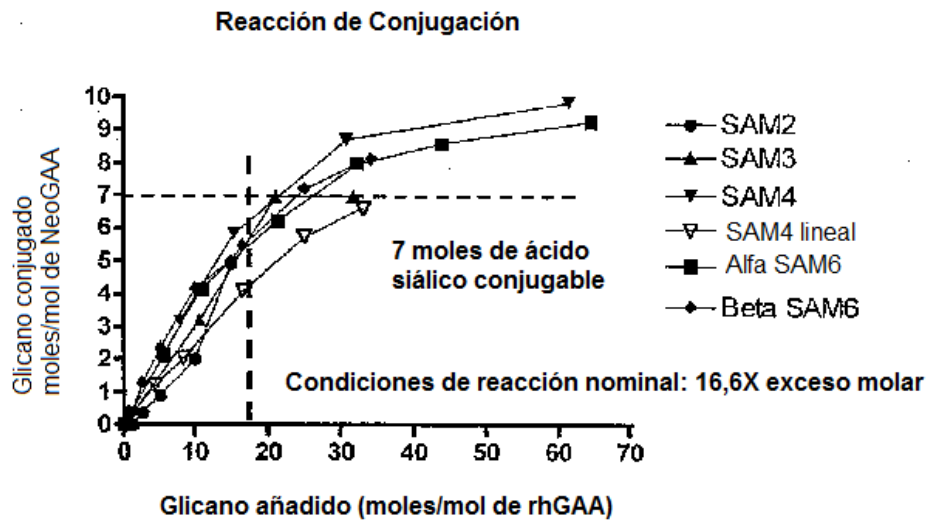


FIG. 9A

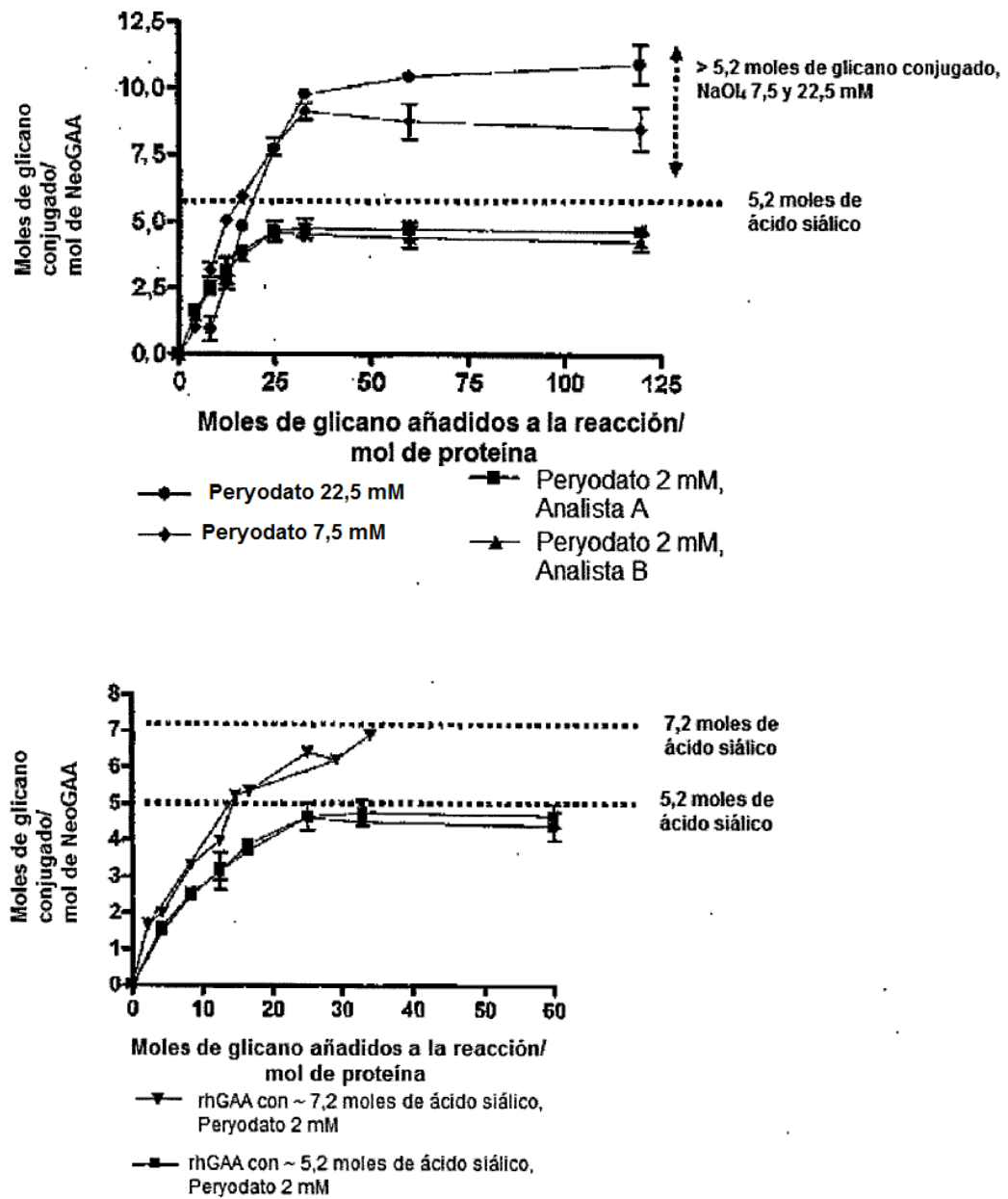


FIG. 9B

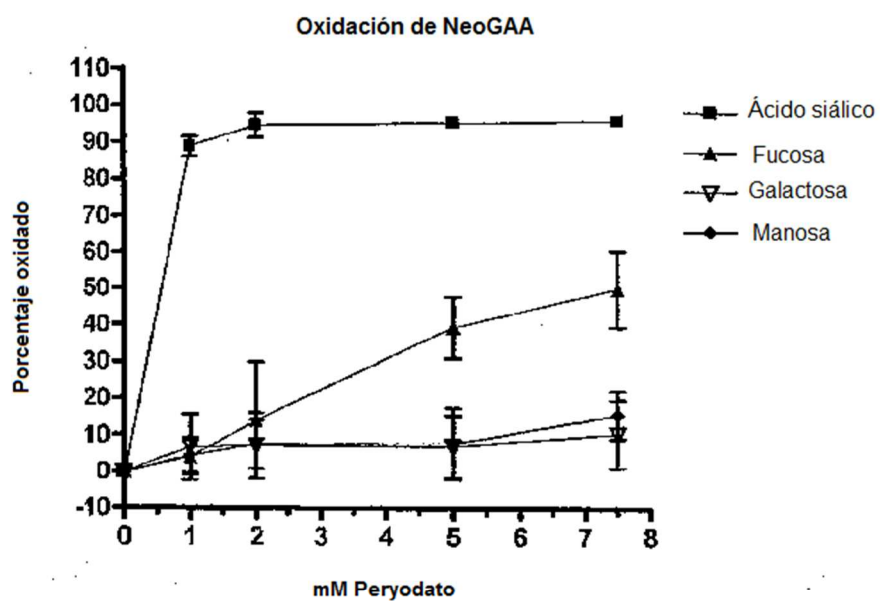


FIG. 10A

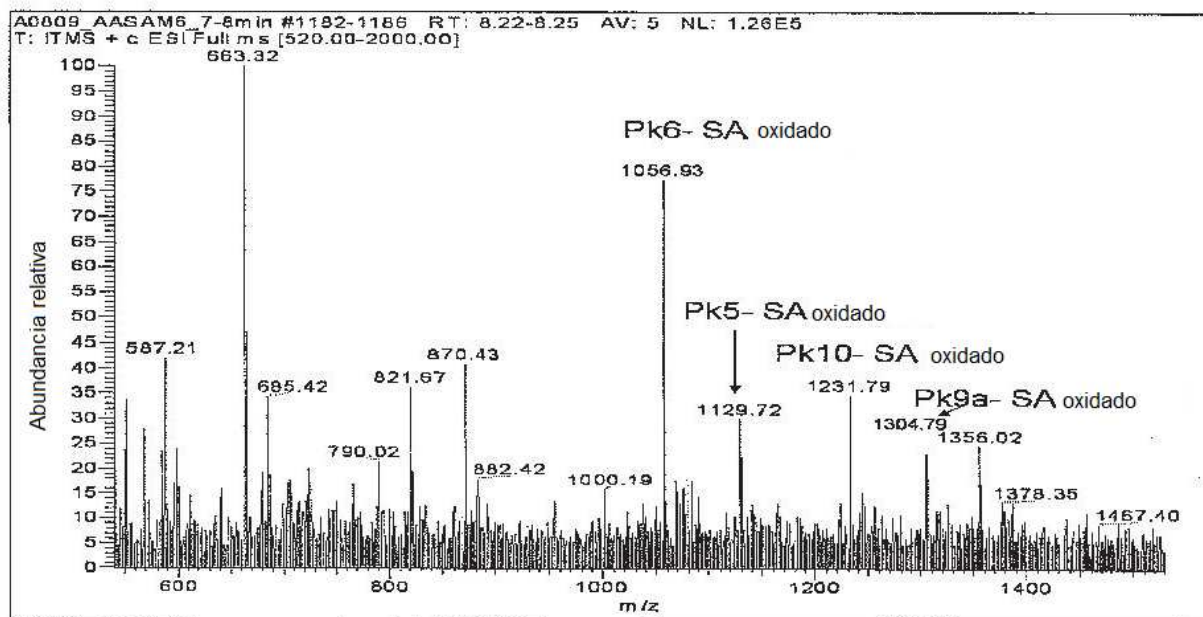
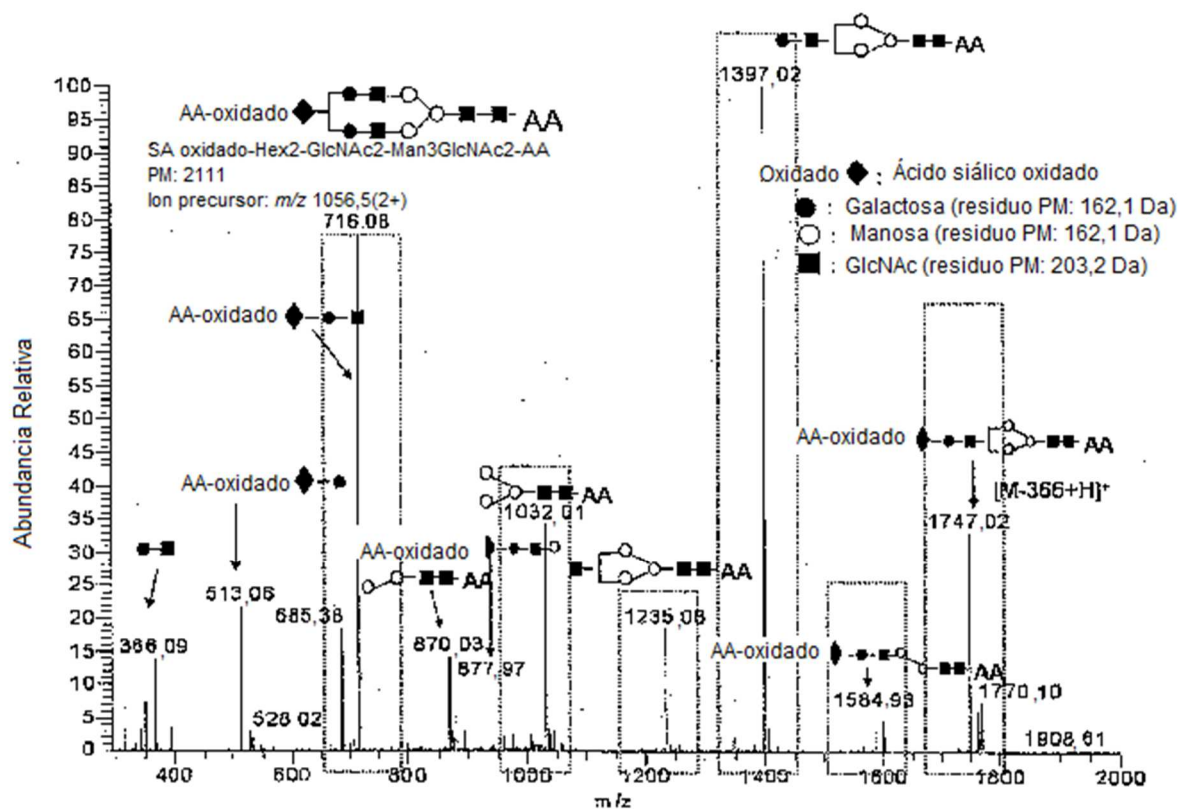


FIG. 10B



Nota: " Oxidado '◆' designa ácido siálico oxidado; "●" designa galactosa (resíduo PM: 162,1 Da); "O" designa manosa (resíduo PM: 162,1 Da); "■" designa GlcNAc (resíduo PM: 203,2 Da); "AA" designa ácido antranílico (resíduo PM: 120,1 Da)

FIG. 10C

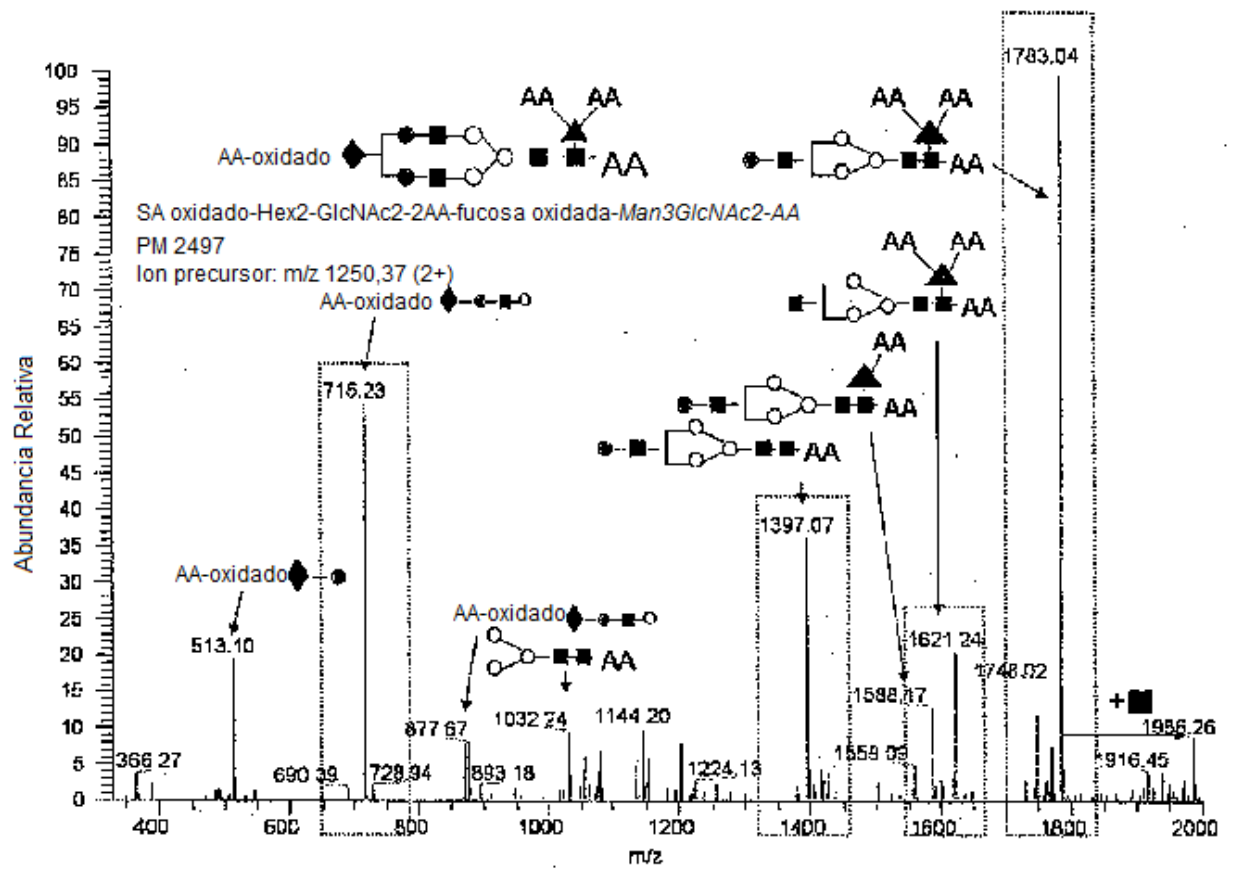
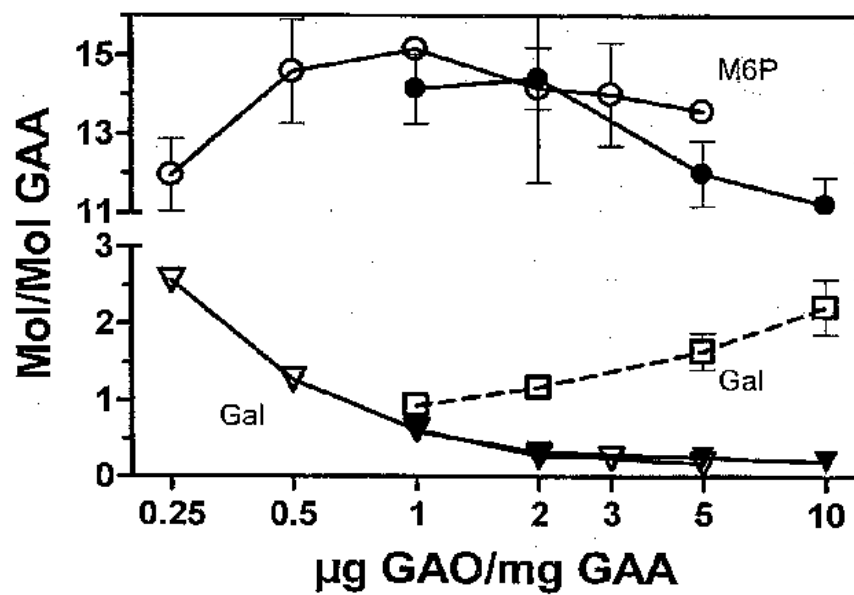
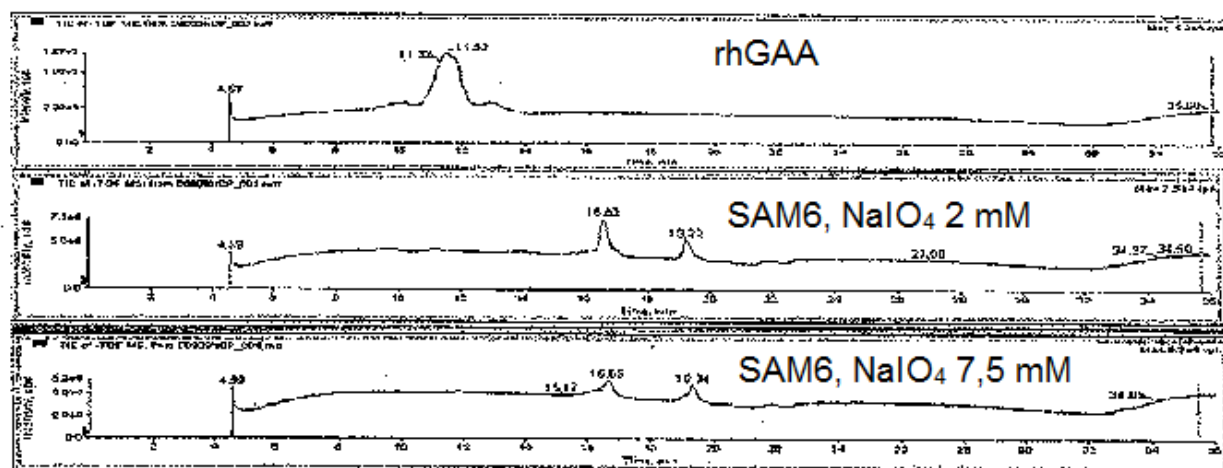


FIG. 10D

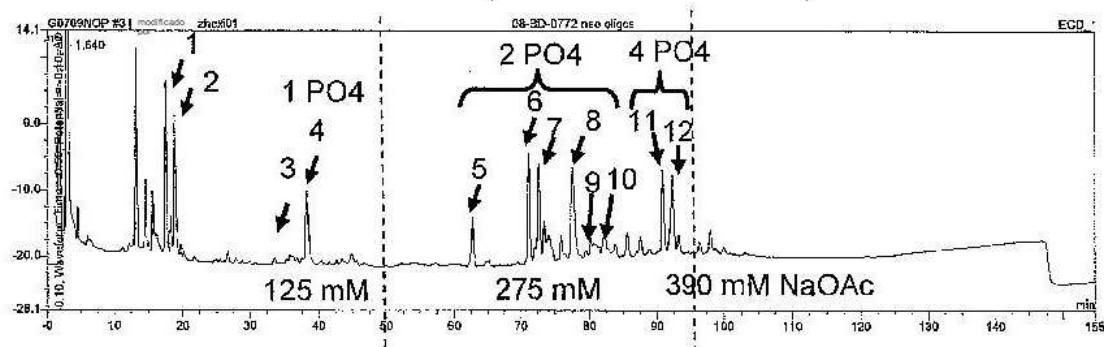
Figura 10E





Cromatogramas de iones totales (TIC) a partir de análisis por HPLC de fase normal de oligosacáridos nativos liberados de PNGasa F de rhGAA y SAM6 de NeoGAA, preparados utilizando peryodato 2 mM y 7,5 mM

FIG. 11A



- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1 Oligomanosa 5 | 7 A1 monoconjugado |
| 2 Oligomanosa 6 | 8 Glicano libre (escisión en oxígeno de hidroxilamina) |
| 3 A1F, A1, A1-Glc-Nac+Hex oxidado | 9 A2F monoconjugado + 1 NANA oxidada |
| 4 Oligomanosas 5 y 6 fosforiladas | 10 A2 monoconjugado + 1 NANA oxidada |
| 5 Oligomanosa 7 bis-fosforilada | 11 A2F conjugada |
| 6 A1F monoconjugada | 12 biconjugada |

FIG. 11B

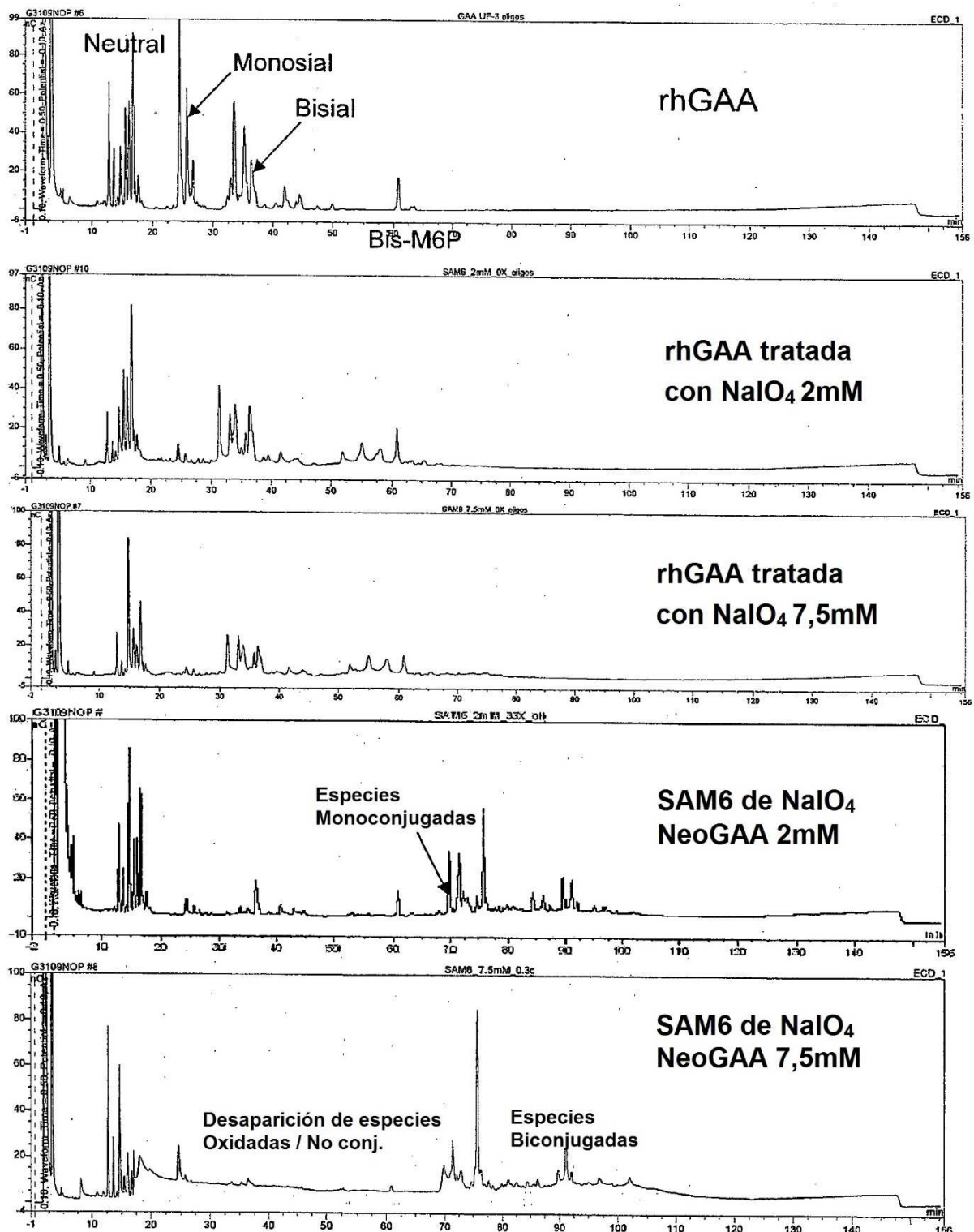


FIG. 11C

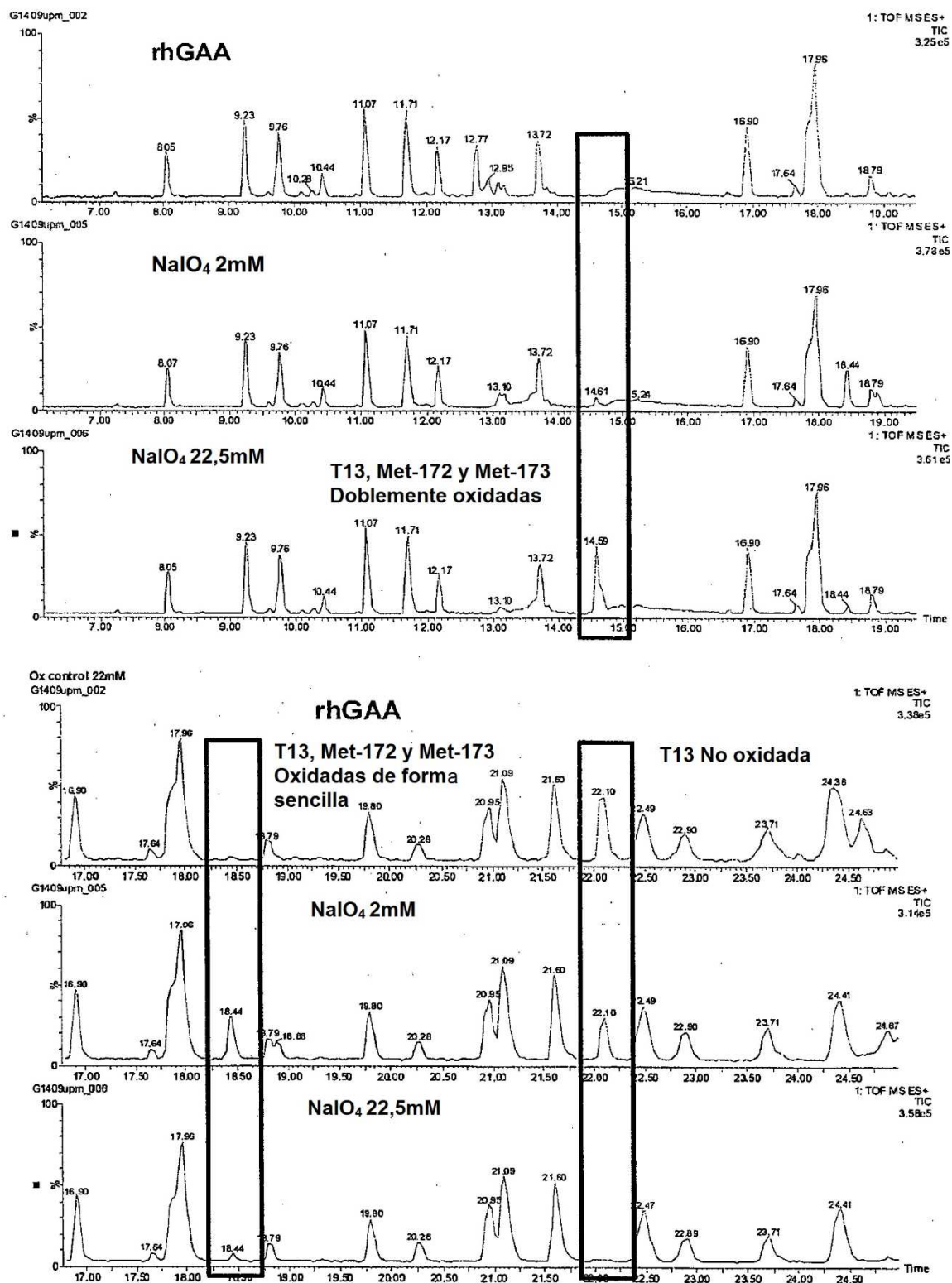


Fig. 12

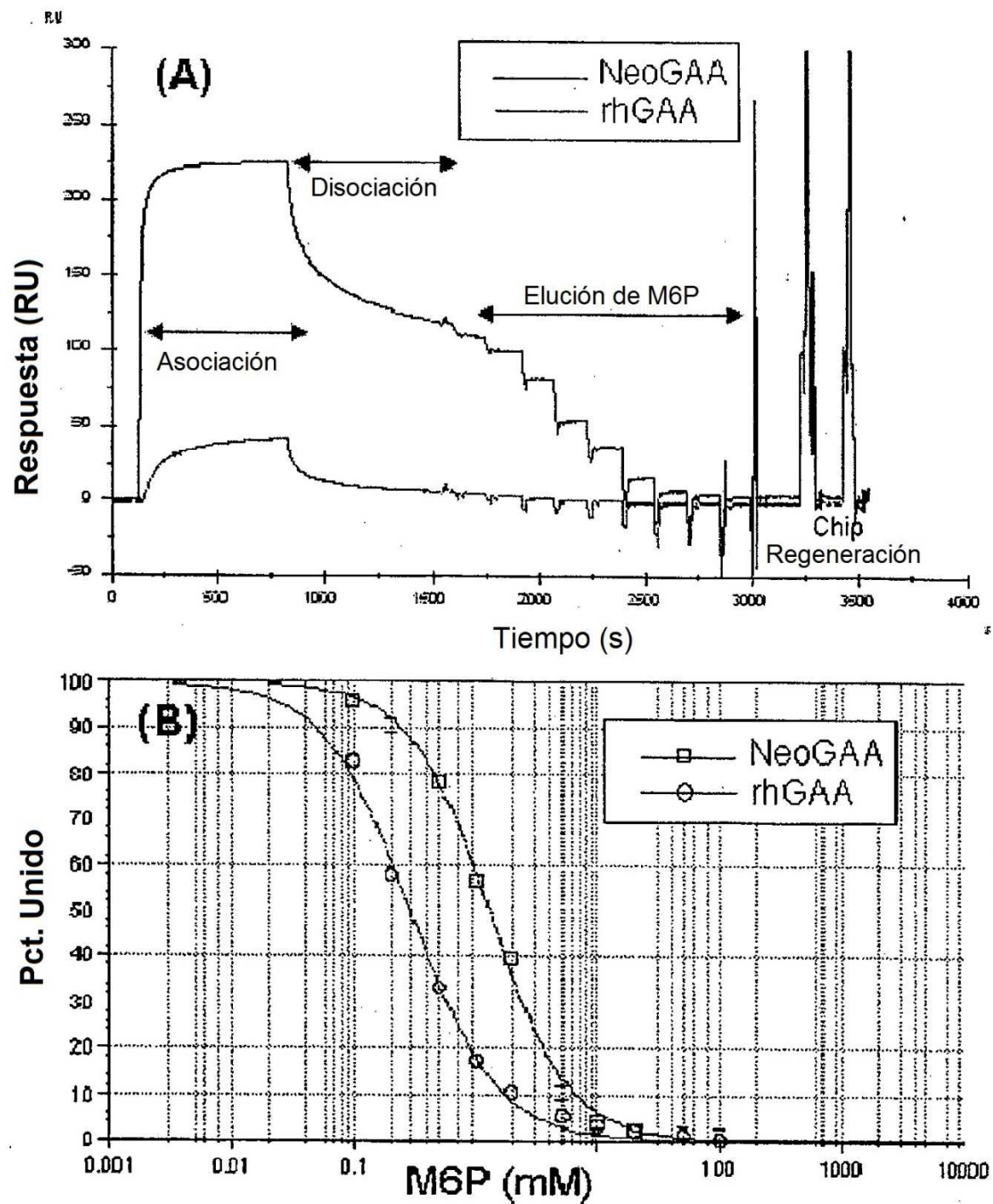


FIG. 13A-B

(C)

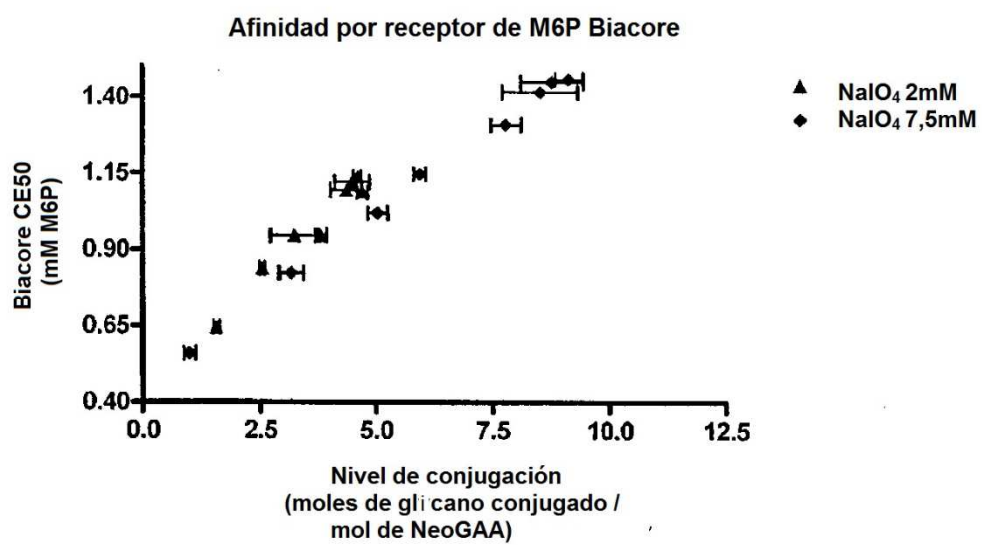


FIG. 13C

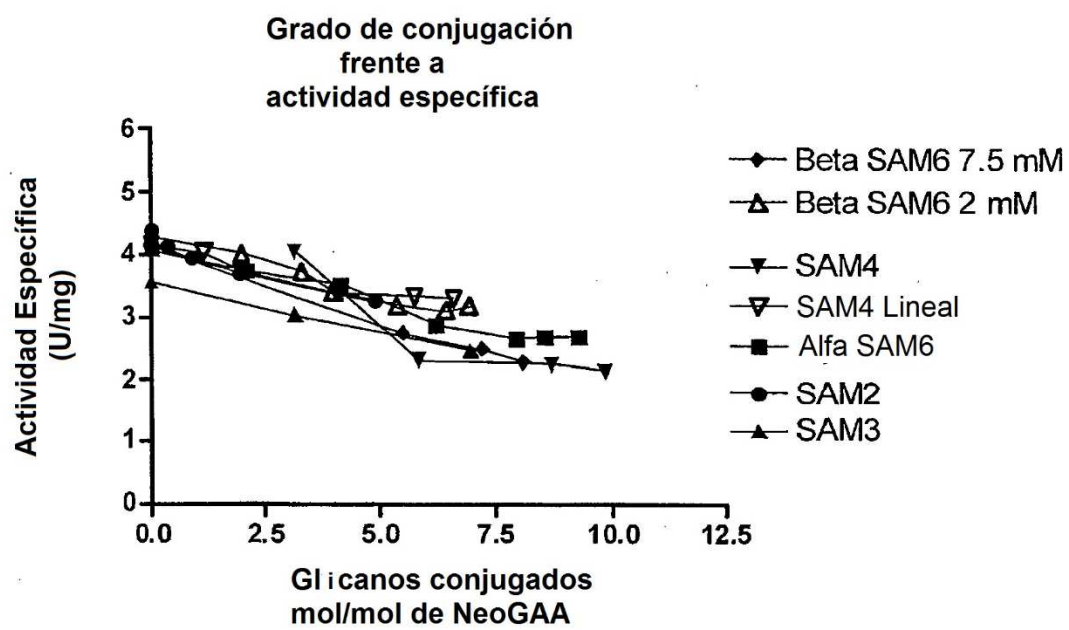
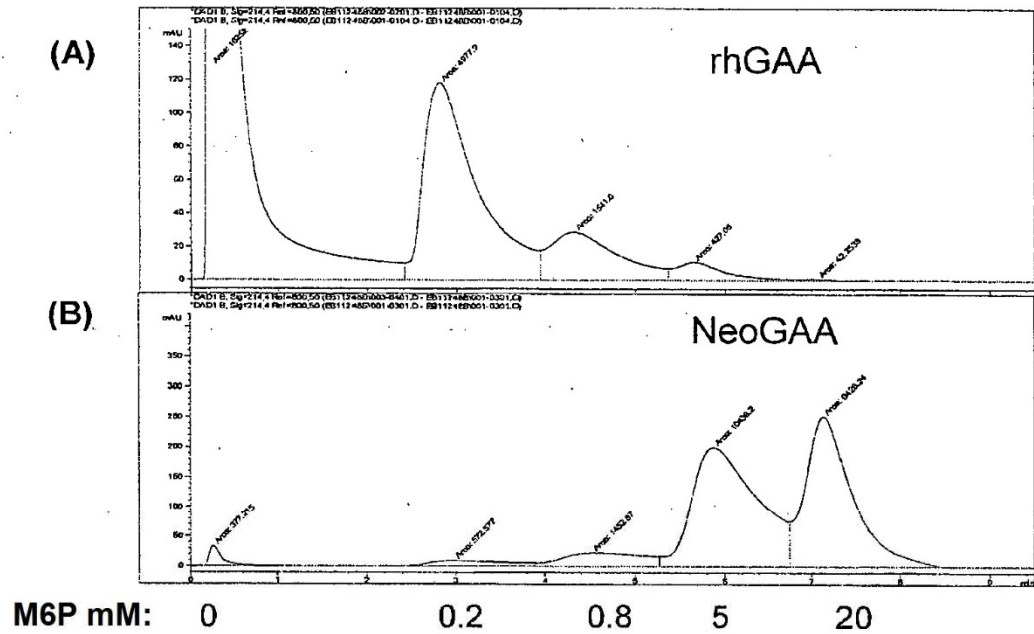


FIG. 14



(C)

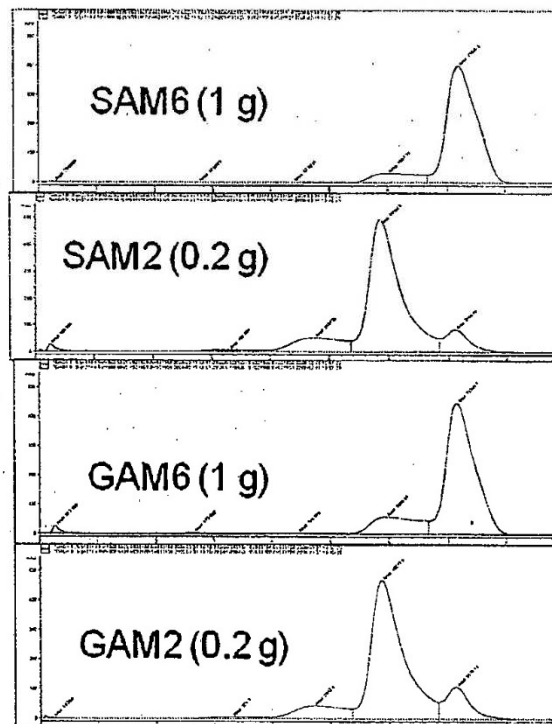
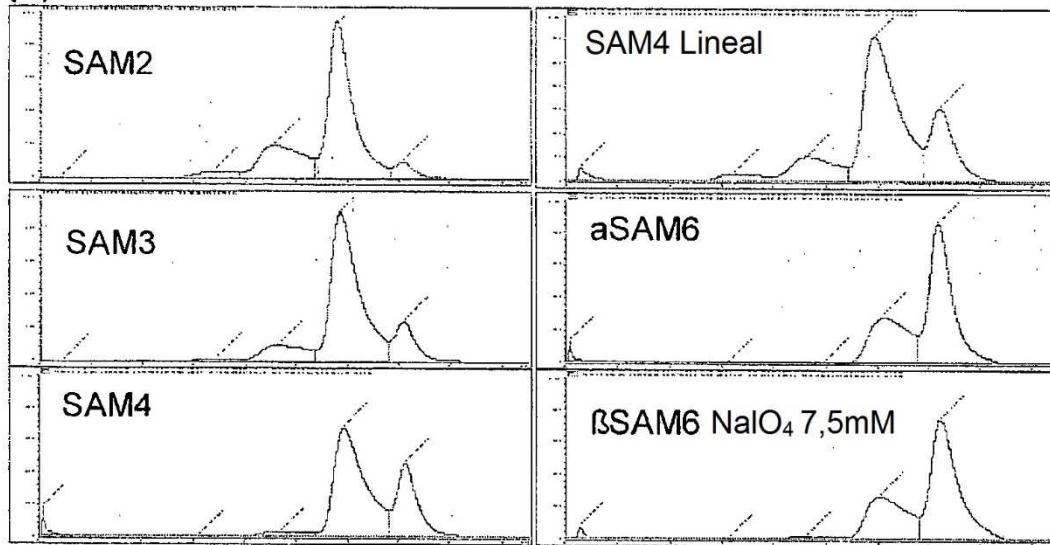


FIG. 15A-C

(D)



(E)

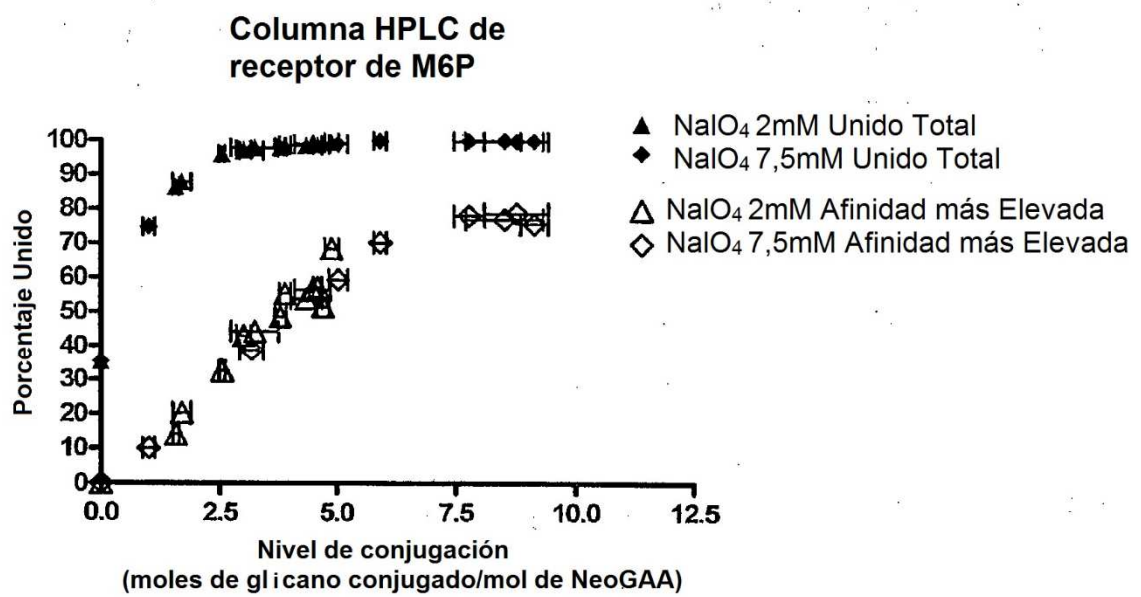


FIG. 15D-E

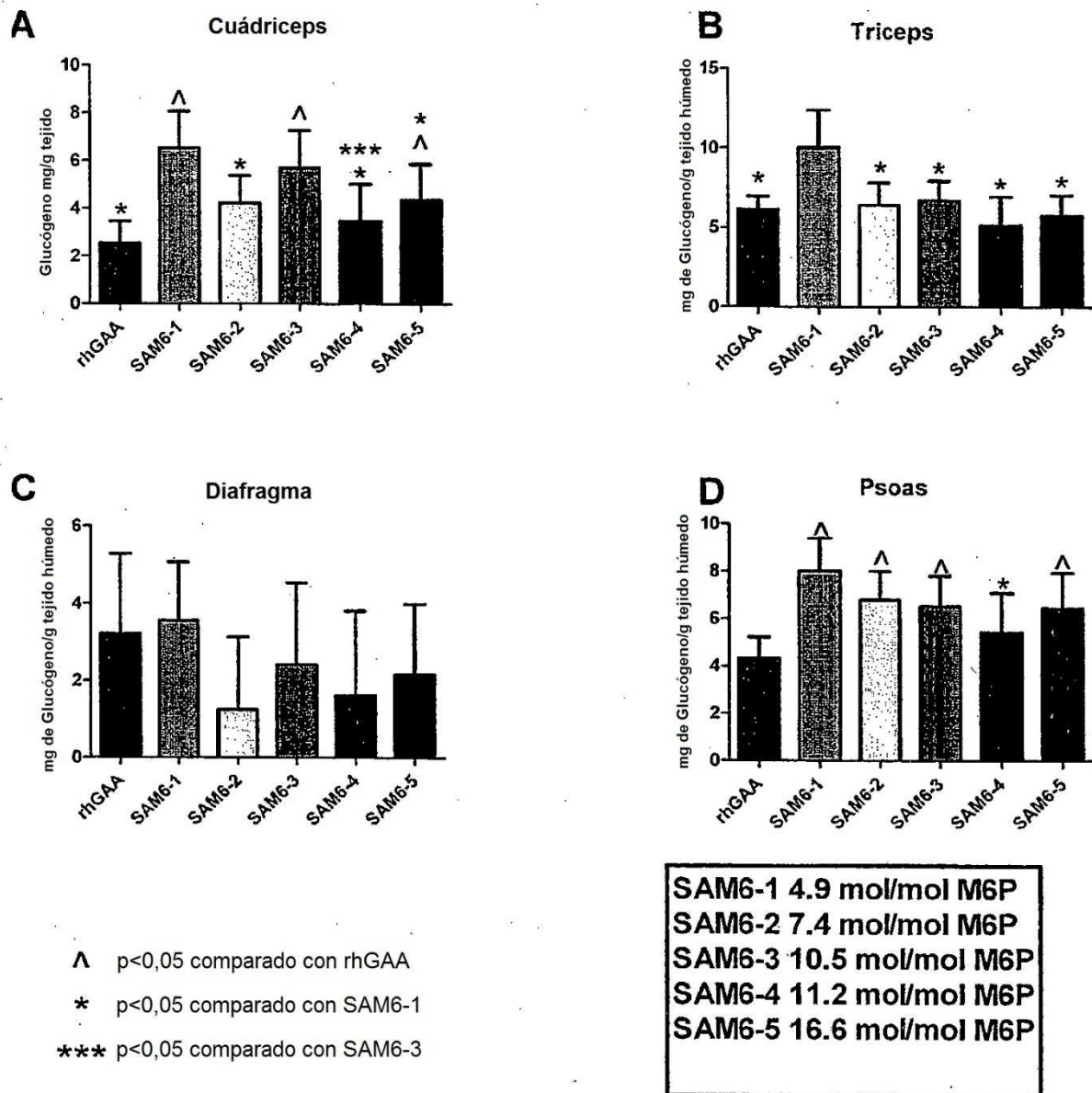
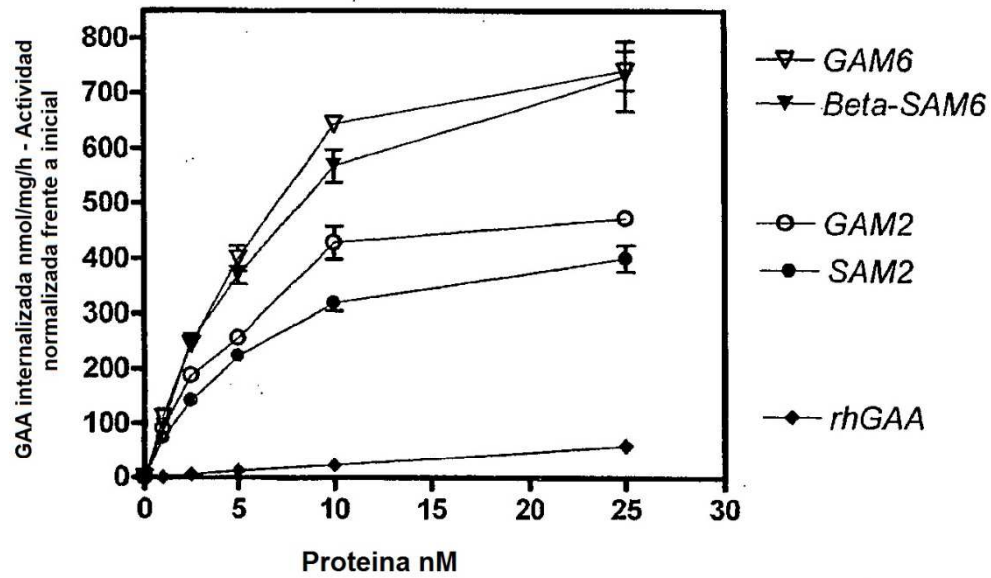


FIG 15F

Absorción de Mioblastos L6



Absorción de Mioblastos L6

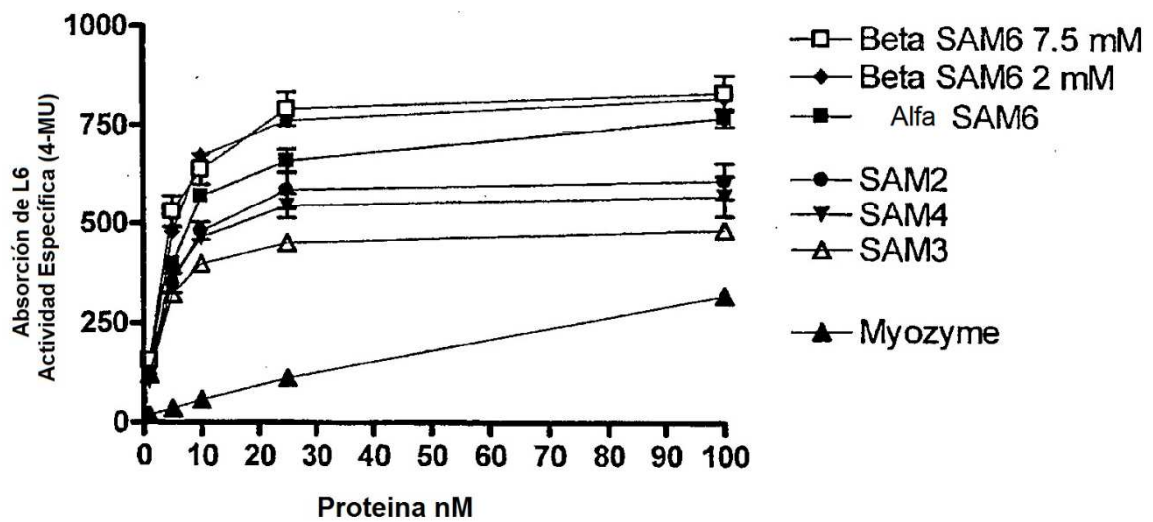
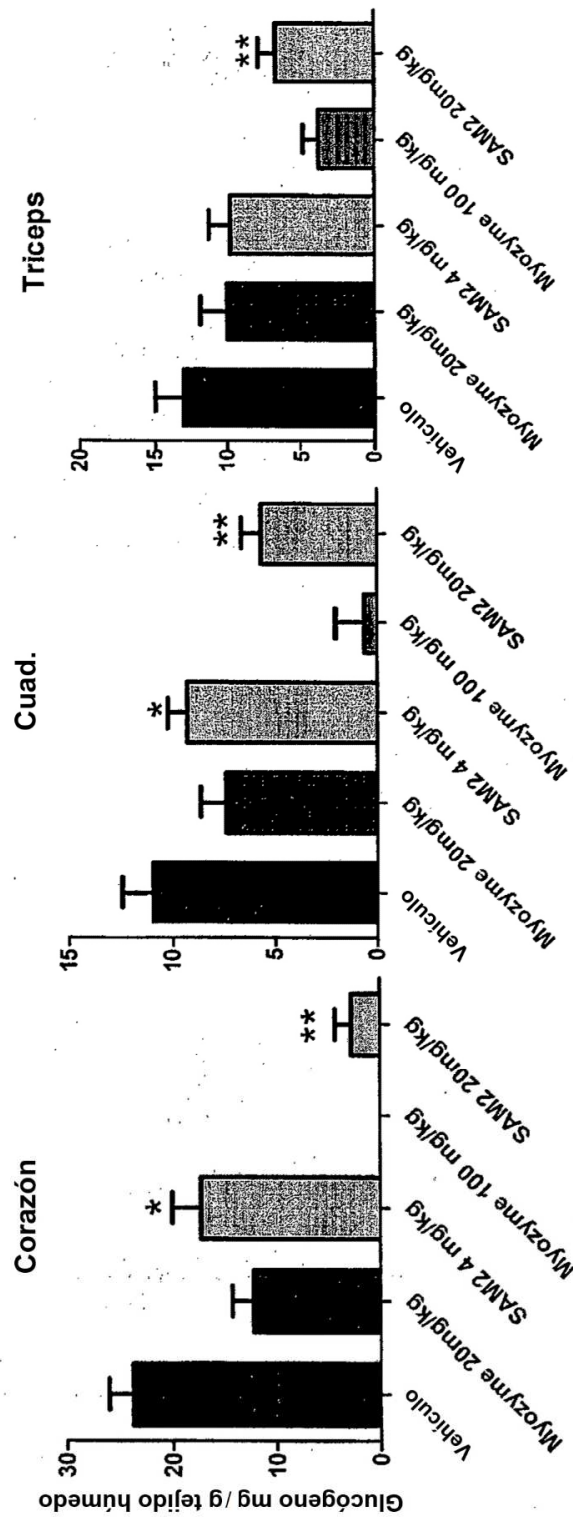


FIG. 16



*, **, * = p < 0,05 comparado con 20 y 100mg/kg de Myozyme respectivamente

rhGAA: 0,9 M6P/GAA
0,2 escala SAM2: 8,9 M6P/GAA

FIG. 17

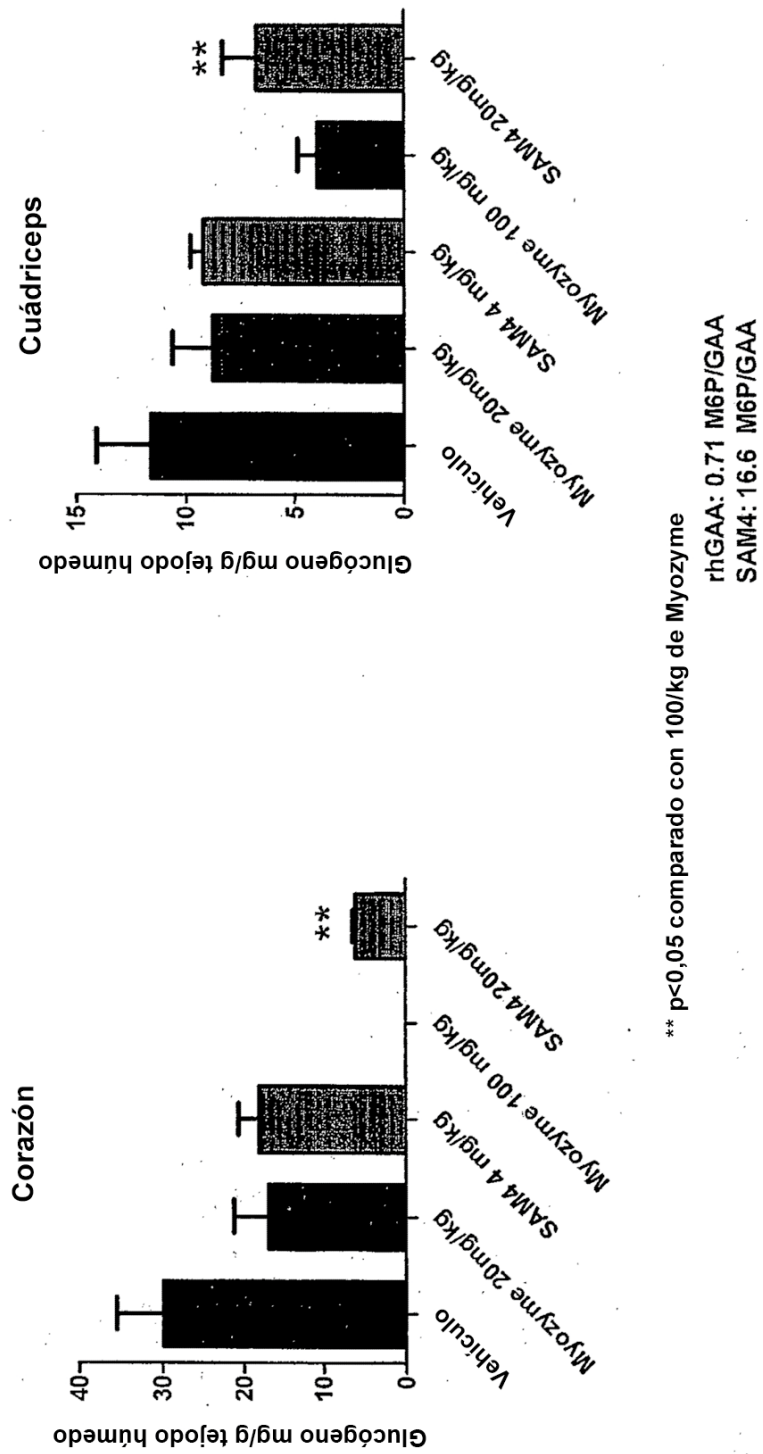


FIG. 18

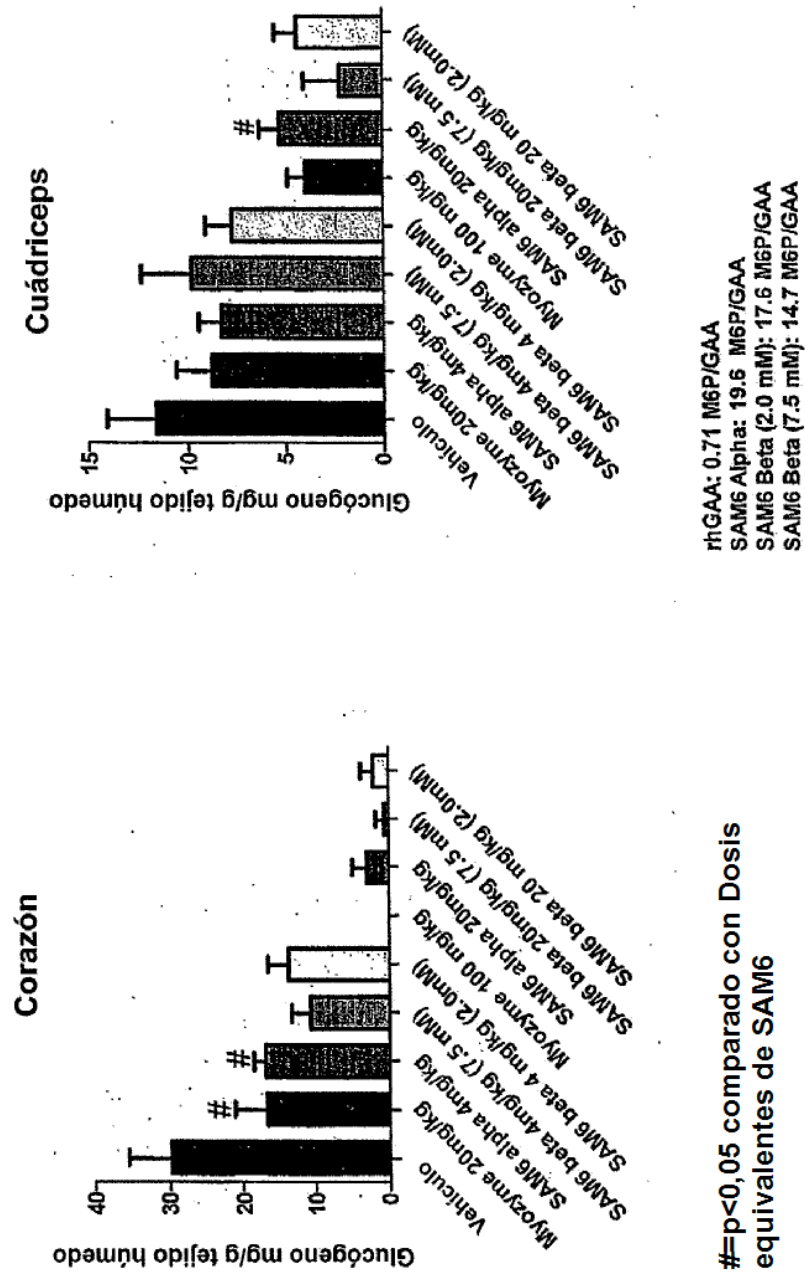
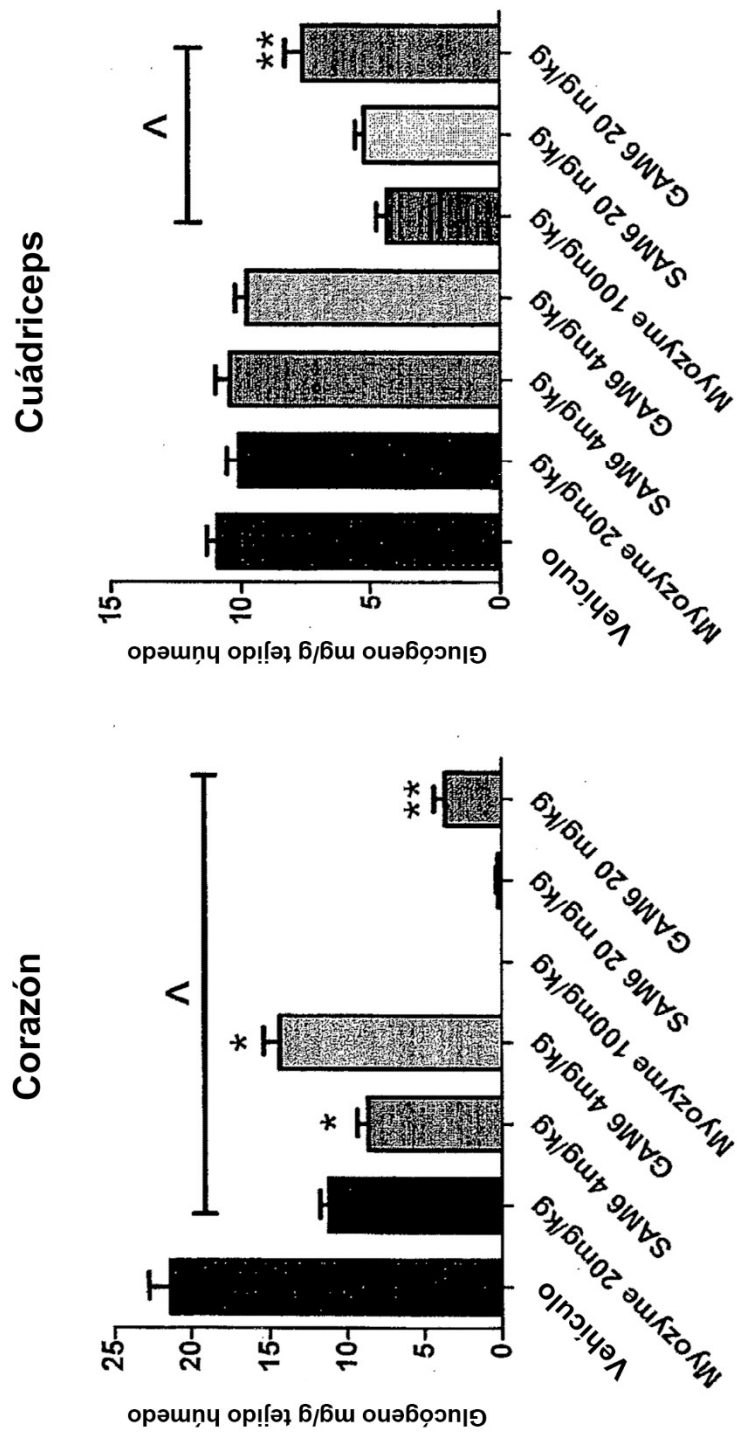


FIG. 19

#=p<0,05 comparado con Dosis
 equivalentes de SAM6



\wedge = $p < 0,05$ comparado con vehículo
 $*$ = $p < 0,05$ comparado con 20 mg/kg de Myozyne
 $**$ = $p < 0,05$ comparado con 100 mg/kg de Myozyne

Fig. 20

Figura 20B

