

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 089**

51 Int. Cl.:

C07H 13/10 (2006.01)
C07H 15/12 (2006.01)
C07H 5/06 (2006.01)
C07H 7/027 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
C12P 13/04 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2002 E 02743643 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 1405858**

54 Título: **Procedimiento para producir derivado de asparagina de la cadena de azúcar**

30 Prioridad:

19.06.2001 JP 2001185685

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

26.04.2013

73 Titular/es:

GLYTECH, INC. (50.0%)
134 Chudoji-minamimachi, Shimogyo-ku, Kyoto-
shi
Kyoto 600-8813 , JP y
KAJIHARA, YASUHIRO (50.0%)

72 Inventor/es:

KAJIHARA, YASUHIRO y
SASAKI, KEN

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 402 089 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

Procedimiento para producir derivado de asparagina de la cadena de azúcar

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un derivado de asparagina de la cadena de azúcar.

TÉCNICA ANTERIOR

10 Convencionalmente, una técnica para degradar una cadena de azúcar por una glucosidasa para derivatizar la cadena de azúcar se ha utilizado en los estudios analíticos a una escala de varios miligramos tal como análisis estructural de una cadena de azúcar. Sin embargo, como los derivados de cadenas de azúcar individuales no podían obtenerse en una gran cantidad, se ha retrasado el desarrollo de los estudios a una escala de gramos. Por tanto, ha sido difícil aplicar un derivado de la cadena de azúcar a los estudios de síntesis tales como la fabricación de productos farmacéuticos.

15 Por otra parte, se sabe que un glucopéptido se obtiene en una gran cantidad a partir de una yema de huevo (*Biochimica et Biophysica Acta* **1335** (1997) p23-32). Sin embargo, no se ha informado de un caso en el que un derivado de la cadena de (Fmoc-)azúcar fluorenilmetoxicarbonilado de un compuesto 1 mostrado en la Figura 1, o una serie de compuestos que tienen deleciones de varios residuos de azúcar tales como ácido siálico o galactosa sobre uno de los extremos no reductores de una cadena de azúcar ramificada en el compuesto 1, se obtienen en una gran cantidad. Además, hay algunos casos en los que varias cadenas de azúcar se aíslan en una pequeña cantidad de una proteína o similares en sangre humana. Sin embargo, cuando la cadena de azúcar se emplea en la fabricación de un producto farmacéutico, hay un riesgo de permitir que el producto farmacéutico se contamine por el virus del SIDA, virus de la hepatitis o similares. Por tanto, ha habido una controversia sobre la técnica de aplicar la cadena de azúcar a un producto farmacéutico.

20 Mientras tanto, hay numerosos ejemplos de procedimientos para preparar cadenas de azúcar de las que restos ramificados tienen la misma estructura para una cadena de azúcar ramificada. Como técnicas convencionales hay tres tipos de procedimientos. Un primer es un procedimiento para aislar y purificar un complejo de cadena de azúcar tipo asparagina de una glucoproteína que se produce naturalmente. Ejemplos representativos de este tipo son aquellos informados en T. Tamura y col., *Anal. Biochem.*, 1994, **216**, p335-344, V. H. Thomas y col., *Carbohydr. Res.*, 1998, **306**, p387-400, K. G. Rice y col., *Biochemistry*, 1993, **32**, p7264-7270 y similares. La ventaja de estos procedimientos es que la síntesis de la cadena de azúcar no es necesaria. Sin embargo, hay varios defectos. Por ejemplo, la cadena de azúcar derivada de la glucoproteína anterior se obtiene como una mezcla de las cadenas de azúcar que tienen deleciones al azar de varios residuos de azúcar en restos terminales no reductores, y las cadenas de azúcar contenidas en la mezcla anterior son similares entre sí en sus características físicas y químicas, de manera que es muy difícil separarlas en cadenas de azúcar individuales, haciendo así que sea sustancialmente imposible obtener una única cadena de azúcar en una gran cantidad. Por tanto, hay un caso en el que una cadena de azúcar ha sido aislada de una proteína en sangre humana (aislamiento de fibrinógeno: C. H. Hokke y col., *Carbohydr. Res.*, **305** (1997), p463-468, aislamiento de transferrina de suero humano: M. Mizuno y col., *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, p284-290) con el fin de obtener la cadena de azúcar en una cantidad relativamente grande. Como se ha mencionado anteriormente, una proteína en sangre humana debe manipularse cuidadosamente debido a que la proteína puede contaminarse con un virus del SIDA o virus de la hepatitis. Por tanto, es difícil utilizar las cadenas de azúcar resultantes y derivados de las mismas en el desarrollo de productos farmacéuticos. Incluso si las cadenas de azúcar se obtuvieran en una gran cantidad, sus estructuras estarían limitadas, y sustancialmente no existen muchos casos en los que se obtenga cadenas de azúcar y derivados de las mismas que tengan muchos tipos de estructuras.

45 En K. G. Rice y col., *Biochemistry*, 1993, **32**, p7264-7270, o Rice y col., *Neoglycoconjugate*, Academic Press, 1994, ISBN 0-12-440585-1 p286-321, un residuo de azúcar se elimina de un extremo no reductor de una cadena de azúcar con una glucosidasa. Sin embargo, como una cadena de azúcar que tiene una única estructura usada como material de partida no puede obtenerse en una gran cantidad, el procedimiento sólo puede llevarse a cabo a una escala analítica. E. Meinjohanns (*J. Chem. Soc. Perkin Trans* **1**, 1998, p549-560) y col. han obtenido un compuesto 56 mostrado en la Figura 5 de una fetuina bovina (glucoproteína derivada de bovino) y luego sintetizado un compuesto 10 mostrado en la Figura 1 mediante un compuesto 33 mostrado en la Figura 3. Con el fin de obtener el compuesto 56, que es un primer material de partida, se ha utilizado una reacción de degradación de hidracina. Esta hidracina es altamente tóxica, de manera que hay un problema en la seguridad cuando el derivado de la cadena de azúcar resultante se aplica a un producto farmacéutico debido a la contaminación de una cantidad traza de la hidracina. Además, los derivados de la cadena de azúcar de los compuestos 56, 33 y 10 a los que el ácido siálico no está unido pueden obtenerse sólo en una pequeña cantidad.

55 Un segundo procedimiento es un procedimiento de síntesis de una cadena de azúcar químicamente. Actualmente, una construcción de aproximadamente 10 azúcares preparada combinando monosacáridos según un procedimiento de síntesis química puede prepararse como se muestra en un caso informado de J. Seifert y col., *Angew Chem Int. Ed.* 2000, **39**, p531-534. La ventaja de este procedimiento es que todos los derivados de la cadena de azúcar pueden obtenerse teóricamente. Sin embargo, como sus etapas de preparación son enormes, hay un defecto de que una síntesis en una gran cantidad es difícil. Además, incluso en el caso en el que una cadena de azúcar en la que aproximadamente 10 residuos de azúcar están unidos se sintetice en una cantidad de varios miligramos, se requiere un periodo de tiempo tan largo como de aproximadamente un año. Aunque hasta la fecha se han observado algunos casos en los que varias cadenas de azúcar se sintetizan químicamente, la mayoría de los casos podrían sintetizar en realidad la cadena de azúcar prevista sólo en una cantidad de tan solo varios miligramos.

65 Un tercer procedimiento es un procedimiento de síntesis de una cadena de azúcar combinando una reacción enzimática y una reacción química. Como ejemplo representativo hay un procedimiento como se informa por Carlo

Unverzagt, *Angew Chem Int. Ed.* 1996, **35**, p2350-2353. Este procedimiento emplea una técnica en la que una cadena de azúcar se construye a una cierta longitud por síntesis química, y después un residuo de azúcar se añade a la cadena de azúcar por una reacción enzimática, extendiéndose así la cadena de azúcar. Sin embargo, como la enzima usada en la extensión de cadena tiene especificidad por sustrato, los tipos de azúcar que pueden introducirse en la cadena de azúcar están limitados. Además, como las etapas de preparación son enormes en la síntesis química, es difícil una síntesis a escala industrial, de manera que el producto final puede obtenerse sólo en una pequeña cantidad. Alternativamente, en C. H. Lin y col. (*Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1995, p1625-1630), un siailoligoglucopéptido se obtiene a partir de una yema de huevo empleando un procedimiento informado por M. Koketsu y col. (*J. Carbohydrate Chemistry*, 1995, **14(6)**, p833-841), y la estructura de los restos terminales no reductores de la cadena de azúcar se modifica con una glucosidasa y una azúcar transferasa. Una cadena de azúcar que tiene sólo un residuo de asparagina (Asn) unido a su resto terminal no reductor se muestra en un dibujo de este artículo. Sin embargo, según el procedimiento informado en *J. Carbohydrate Chemistry*, 1995, **14(6)**, p833-841, una mezcla de cadenas de azúcar que tiene cada una en promedio aproximadamente 2,5 aminoácidos distintos de asparagina, tales como lisina, que están unidos a un extremo no reductor de la cadena de azúcar. Por tanto, un derivado de la cadena de azúcar no puede obtenerse como un único compuesto. Por tanto, no hay obtención sugerida de derivados individuales de los compuestos que tienen delecciones arbitrarias de los residuos de azúcar en la cadena de azúcar ramificada de las cadenas de azúcar en ramificación en una gran cantidad. Un artículo por C. H. Lin y col. no da ninguna prueba de que una cadena de azúcar se obtenga como un único producto. Y. Ichikawa menciona en *Glycopeptide and Related Compounds* (Marcel Dekker, Inc., 1997, ISBN 0-8247-9531-8, pág. 79-205) que si el complejo de cadena de azúcar trifurcado se trata secuencialmente desde un extremo con una glucosidasa, las cadenas de azúcar pueden eliminarse secuencialmente de un extremo no reductor de la cadena de azúcar, dando así diversos derivados de la cadena de azúcar. Sin embargo, cómo las cadenas de azúcar individuales se separan después del tratamiento enzimático no se describe, y la síntesis está limitada sólo a aquellas que tienen ramificación uniforme. Por tanto, incluso con este procedimiento, se cree que los derivados individuales de los compuestos que tienen delecciones arbitrarias de residuos de azúcar en la cadena de azúcar ramificada de las cadenas de azúcar en ramificación no pueden obtenerse en una gran cantidad.

Además, el documento JP 07 224082 A desvela compuestos de asparagina de la cadena de azúcar que se preparan haciendo reaccionar una pentoglucosilazida con anhídrido aspártico en presencia de un catalizador reductor de hidrogenación catalítica, seguido de desprotección.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCIÓN

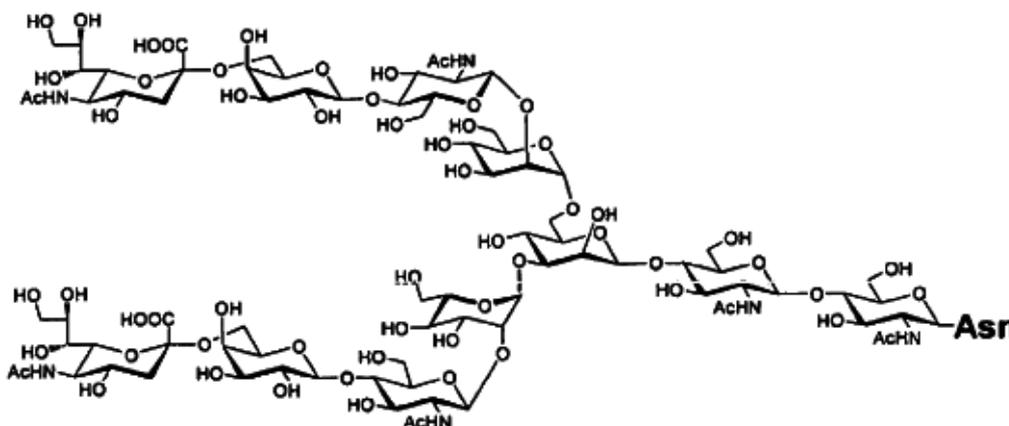
Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar un derivado de asparagina de la cadena de azúcar, por el cual diversos derivados de asparagina de la cadena de azúcar aislados útiles en el campo del desarrollo de productos farmacéuticos y similares pueden obtenerse convenientemente en una gran cantidad con respecto a aquellos de la técnica anterior. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar una asparagina de la cadena de azúcar y un procedimiento para preparar una cadena de azúcar mediante una etapa para preparar un derivado de asparagina de la cadena de azúcar, por el cual diversas asparaginas de la cadena de azúcar aisladas y cadenas de azúcar, que son útiles igual que los derivados de asparagina de la cadena de azúcar, pueden obtenerse convenientemente en una gran cantidad con respecto a aquellas de la técnica anterior.

Concretamente, la presente invención se refiere a:

(1) un procedimiento para preparar un derivado de asparagina de la cadena de azúcar derivado de una asparagina de la cadena de azúcar, que comprende las etapas de:

(a) introducir un grupo protector soluble en grasa seleccionado de grupo Fmoc, grupo t-butiloxicarbonilo (Boc), grupo bencilo, grupo alilo, grupo aliloxicarbonato y grupo acetilo en la asparagina de la cadena de azúcar contenida en una mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar, dando una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar,

en el que la mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar comprende:



y/o un compuesto que tiene una o más delecciones de residuos de azúcar en el compuesto anterior; y

(b) someter la mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar o una mezcla obtenible hidrolizando un derivado de asparagina de la cadena de azúcar contenida en la mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar a cromatografía, para separar cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar de los mismos;

- 5 (2) el procedimiento según (1) anterior, que comprende además la etapa de (b'): hidrolizar el derivado de asparagina de la cadena de azúcar separado en la etapa (b) con una glucosidasa;
- (3) el procedimiento según uno cualquiera de (1) a (2) anterior, en el que el grupo protector soluble en grasa es grupo fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc);
- (4) el procedimiento según uno cualquiera de (1) a (2) anterior, en el que la etapa
- 10 (a) es una etapa de introducir grupo Fmoc en la asparagina de la cadena de azúcar contenida en una mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar que tiene un residuo de ácido siálico en un extremo no reductor, e introducir grupo bencilo en el residuo de ácido siálico, dando una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar;
- (5) un procedimiento para preparar una asparagina de la cadena de azúcar, que comprende las etapas de:
- 15 (a) introducir un grupo protector soluble en grasa en una asparagina de la cadena de azúcar contenida en una mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar, dando una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar;
- (b) someter la mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar o una mezcla obtenible hidrolizando un derivado de asparagina de la cadena de azúcar contenida en la mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar a cromatografía, para separar cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar de los mismos; y
- 20 (c) eliminar el grupo protector del derivado de asparagina de la cadena de azúcar separado en la etapa (b), dando la asparagina de la cadena de azúcar;
- (6) el procedimiento según (5) anterior, que comprende además la etapa de:
- 25 (b') hidrolizar el derivado de asparagina de la cadena de azúcar separado en la etapa (b) con una glucosidasa; y/o
- (c') hidrolizar la asparagina de la cadena de azúcar obtenida en la etapa (c) con una glucosidasa;
- (7) el procedimiento según uno cualquiera de (5) a (6) anterior, en el que el grupo protector soluble en grasa es grupo Fmoc;
- 30 (8) el procedimiento según uno cualquiera de (5) a (6) anterior, en el que la etapa
- (a) es una etapa de introducir grupo Fmoc en la asparagina de la cadena de azúcar contenida en una mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar que tiene un residuo de ácido siálico en un extremo no reductor, e introducir grupo bencilo en el residuo de ácido siálico, dando una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar;
- 35 (9) un procedimiento para preparar una cadena de azúcar, que comprende las etapas de:
- (a) introducir un grupo protector soluble en grasa en una asparagina de la cadena de azúcar contenida en una mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar, dando una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar;
- 40 (b) someter la mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar o una mezcla obtenible hidrolizando un derivado de asparagina de la cadena de azúcar contenida en la mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar a cromatografía, para separar cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar de los mismos;
- (c) eliminar el grupo protector del derivado de asparagina de la cadena de azúcar separado en la etapa (b), dando una asparagina de la cadena de azúcar; y
- 45 (d) eliminar un residuo de asparagina de la asparagina de la cadena de azúcar obtenida en la etapa (c), dando la cadena de azúcar;
- (10) el procedimiento (9) anterior, que comprende además la etapa de:
- (b') hidrolizar el derivado de asparagina de la cadena de azúcar separado en la etapa (b) con una glucosidasa; y/o
- 50 (c') hidrolizar la asparagina de la cadena de azúcar obtenida en la etapa (c) con una glucosidasa; y/o
- (d') hidrolizar la cadena de azúcar obtenida en la etapa (d) con una glucosidasa;
- (11) el procedimiento según uno cualquiera de (9) a (10) anterior, en el que el grupo protector soluble en grasa es grupo Fmoc;

5

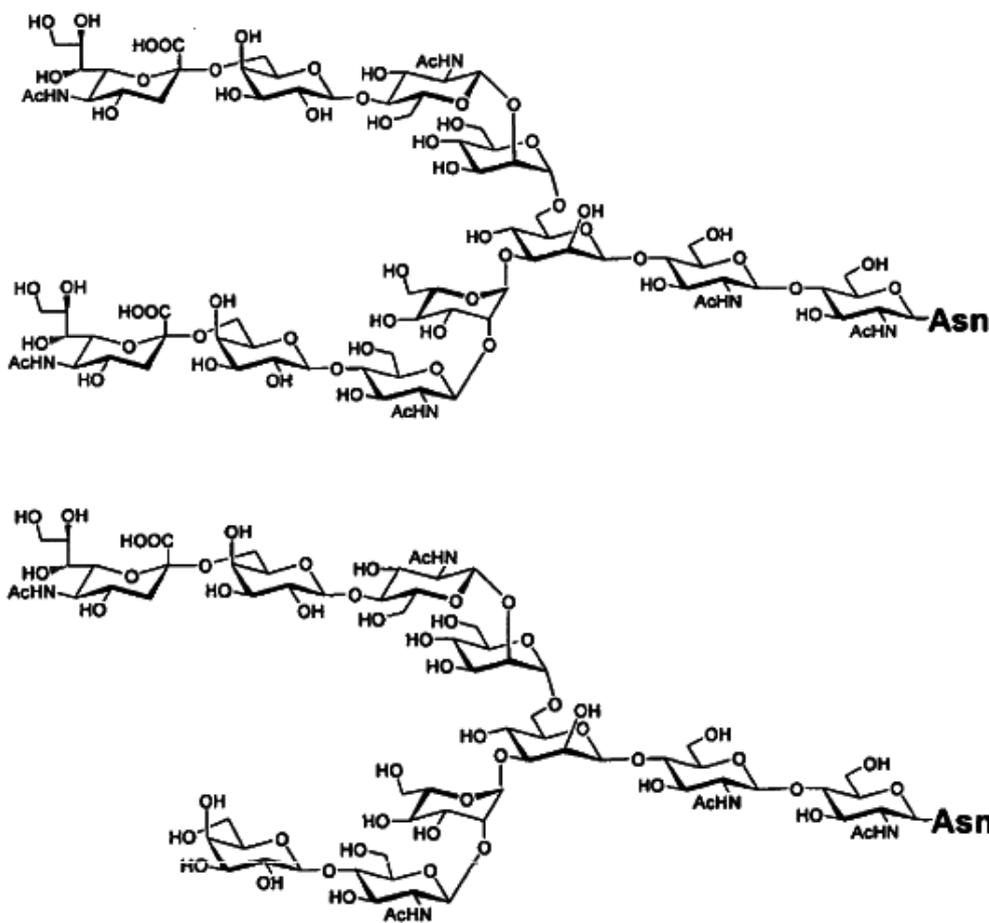
(12) el procedimiento según uno cualquiera de (9) a (10) anterior, en el que la etapa (a) es una etapa de introducir grupo Fmoc en la asparagina de la cadena de azúcar contenida en una mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar que tiene un residuo de ácido siálico en un extremo no reductor, e introducir grupo bencilo en el residuo de ácido siálico, dando una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar;

10

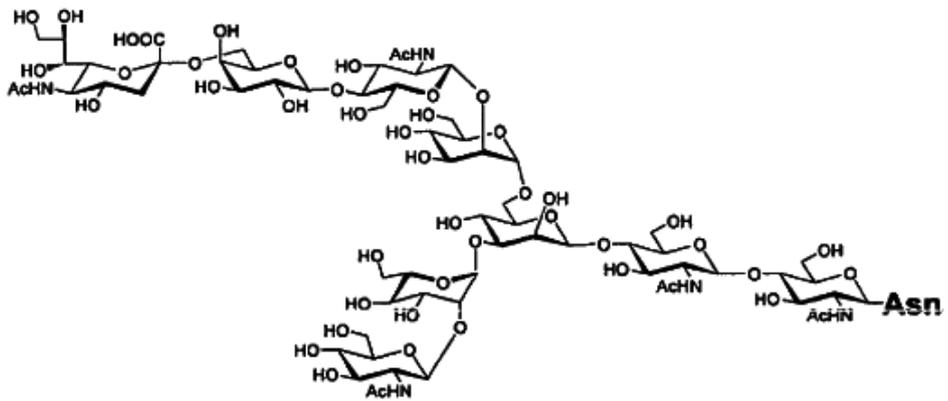
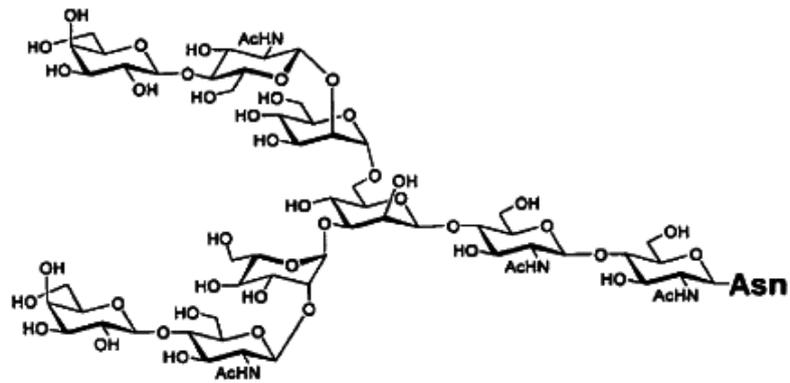
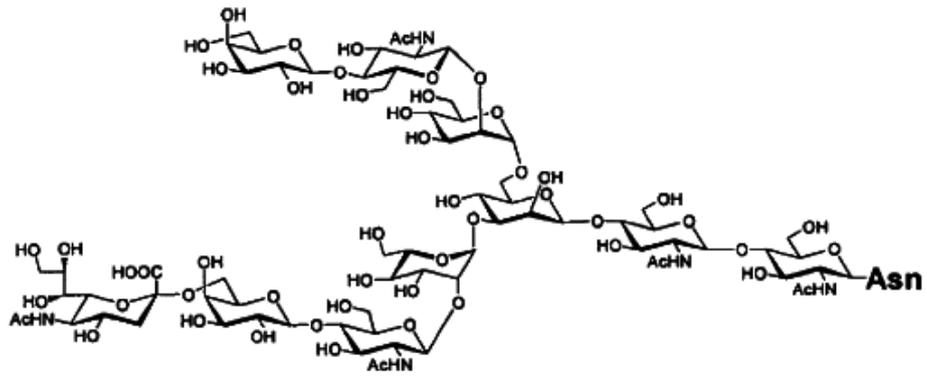
(13) el procedimiento para preparar un derivado de asparagina de la cadena de azúcar según (1) anterior, que comprende las etapas de

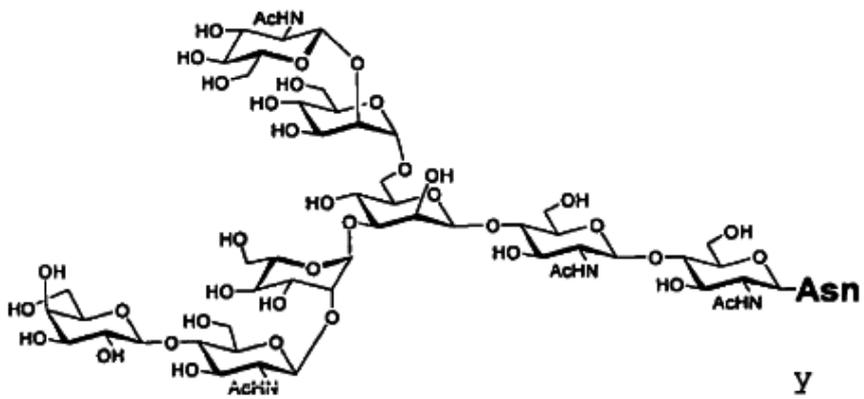
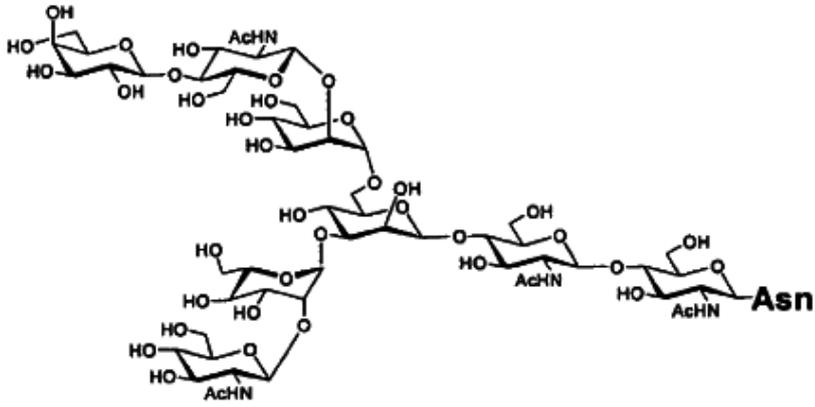
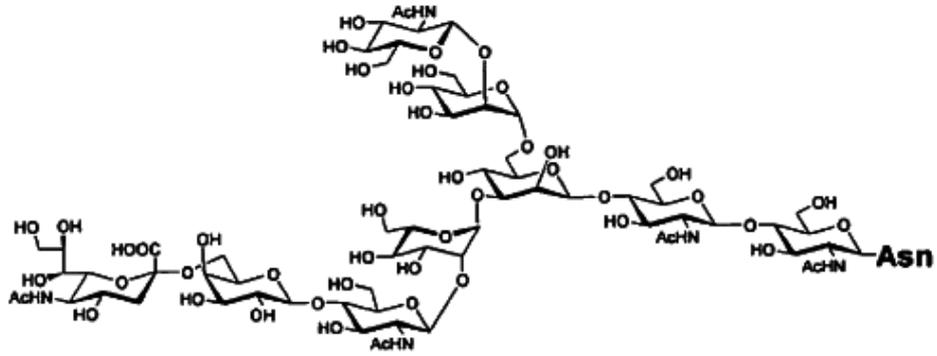
(a) introducir un grupo protector soluble en grasa seleccionado de grupo Fmoc, grupo t-butiloxicarbonilo (Boc), grupo bencilo, grupo alilo, grupo aliloxicarbonato y grupo acetilo en la asparagina de la cadena de azúcar contenida en una mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar, dando una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar,

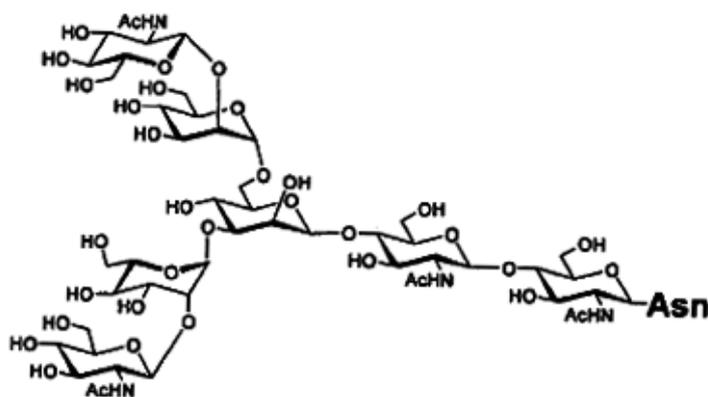
en el que la mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar comprende asparaginas de la cadena de azúcar seleccionadas del grupo que consiste en:



15







; y

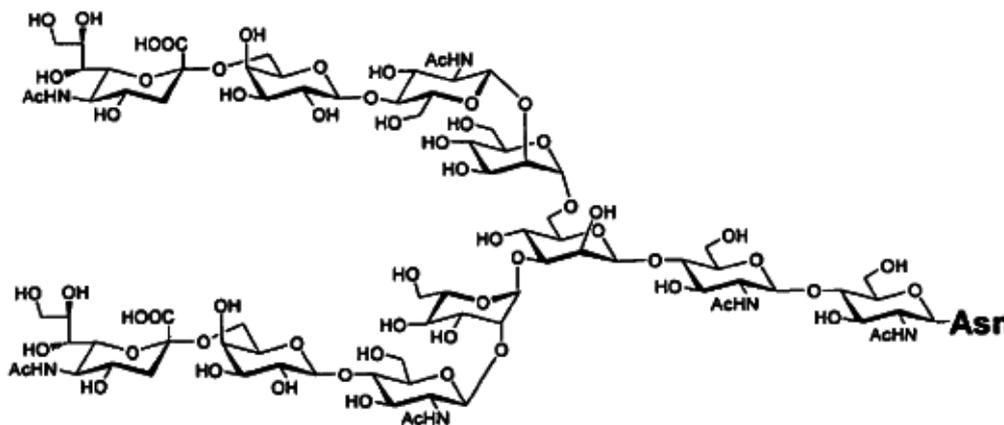
(b) someter la mezcla de uno o más derivados de asparagina de la cadena de azúcar a cromatografía, para separar cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar de los mismos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 La Figura 1 muestra un grupo de estructuras de derivados de asparagina de la cadena de azúcar obtenibles según la presente invención.
- La Figura 2 muestra un grupo de estructuras de derivados de asparagina de la cadena de azúcar obtenibles según la presente invención.
- 10 La Figura 3 muestra un grupo de estructuras de asparaginas de la cadena de azúcar obtenibles según la presente invención.
- La Figura 4 muestra un grupo de estructuras de asparaginas de la cadena de azúcar obtenibles según la presente invención.
- La Figura 5 muestra un grupo de estructuras de cadenas de azúcar obtenibles según la presente invención.
- La Figura 6 muestra un grupo de estructuras de cadenas de azúcar obtenibles según la presente invención.
- 15 La Figura 7 muestra un ejemplo de una etapa en el procedimiento para preparar un derivado de asparagina de la cadena de azúcar según la presente invención.
- La Figura 8 muestra un ejemplo de una etapa de conversión de un derivado de asparagina de la cadena de azúcar con diversas glucosidasas.
- 20 La Figura 9 muestra un ejemplo de una etapa de conversión de un derivado de asparagina de la cadena de azúcar con diversas glucosidasas.
- La Figura 10 muestra un ejemplo de una etapa de conversión de un derivado de asparagina de la cadena de azúcar con diversas glucosidasas.
- La Figura 11 muestra un ejemplo de una etapa de conversión de un derivado de asparagina de la cadena de azúcar con diversas glucosidasas.
- 25 La Figura 12 muestra un ejemplo de una etapa de eliminar un grupo protector (grupo Fmoc) de un derivado de asparagina de la cadena de azúcar y un ejemplo de una etapa de eliminar un residuo de asparagina de una asparagina de la cadena de azúcar.

MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

- 30 Una de las características del procedimiento para preparar un derivado de asparagina de la cadena de azúcar de la presente invención reside en que el procedimiento comprende introducir (unir) un grupo protector soluble en grasa seleccionado de grupo Fmoc, grupo t-butiloxicarbonilo (Boc), grupo bencilo, grupo alilo, grupo aliloxicarbonato y grupo acetilo en (a) una asparagina de la cadena de azúcar derivada de, por ejemplo, una glucoproteína que se produce naturalmente, específicamente una asparagina de la cadena de azúcar contenida en una mezcla de asparaginas de la
- 35 cadena de azúcar obtenidas de cadenas de azúcar tipo asparagina, en el que la mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar comprende:



5 y/o un compuesto que tiene una o más deleciones de residuos de azúcar en el compuesto anterior, dando una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar, y después separar la mezcla en cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar. El término “asparagina de la cadena de azúcar” como se usa en el presente documento se refiere a una cadena de azúcar que tiene asparagina en un estado de unión. Por tanto, el término “cadena de azúcar tipo asparagina” se refiere a un grupo de cadenas de azúcar en cada una de las cuales la N-acetilglucosamina que existe en un extremo reductor está unida por enlace de N-glucósido a un grupo aminoácido de asparagina (Asn) en un polipéptido de una proteína, en el que el grupo de cadenas de azúcar tiene Man- β -(1-4)-GlcNAc- β -(1-4)-GlcNAc como núcleo madre. El término “derivado de asparagina de la cadena de azúcar” se refiere a una asparagina de la cadena de azúcar que tiene un grupo protector soluble en grasa en un estado de unión a un residuo de asparagina. Por tanto, en la fórmula estructural del compuesto, “AcHN” denota grupo acetamida.

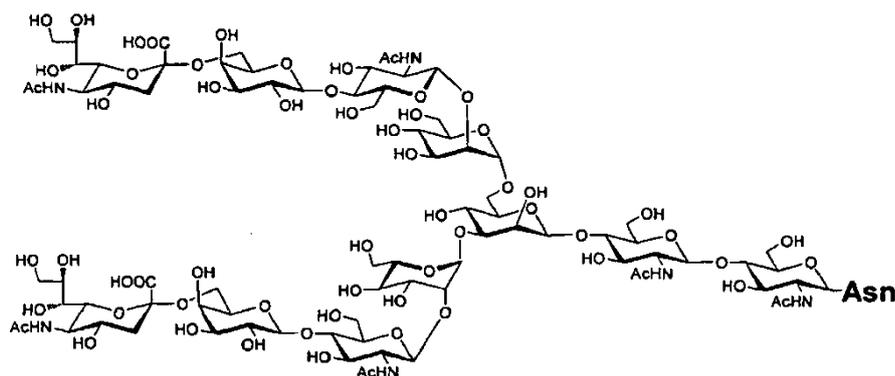
15 Como se ha mencionado anteriormente, la cadena de azúcar derivada de una glucoproteína que se produce naturalmente es una mezcla de cadenas de azúcar que tienen deleciones al azar de residuos de azúcar en extremos no reductores. Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que un grupo protector soluble en grasa se introduce en una cadena de azúcar derivada de una glucoproteína que se produce naturalmente. Concretamente una asparagina de la cadena de azúcar contenida en una mezcla de asparaginas de la cadena de azúcar, de manera que una mezcla de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar resultantes en la que los grupos protectores se introducen puede ser fácilmente separada en derivados de asparagina de la cadena de azúcar individuales por medio de una cromatografía conocida. Como resultado, cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar que tienen una diversidad de estructuras puede prepararse en una gran cantidad. Por ejemplo, los derivados de asparagina de la cadena de azúcar que tienen estructuras análogas, que convencionalmente han sido difíciles de separar, tal como los compuestos 2 y 6 mostrados en la Figura 1 y los compuestos 3 y 7 mostrados en la Figura 2, pueden separarse, de manera que cada uno de aquellos compuestos pueden prepararse fácilmente en una gran cantidad. Además, muchos tipos de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar pueden sintetizarse más, por ejemplo, eliminando los residuos de azúcar del derivado de asparagina de la cadena de azúcar resultante secuencialmente con glucosidasas.

25 Como se ha descrito anteriormente, los derivados de asparagina de la cadena de azúcar individuales pueden separarse introduciendo un grupo protector soluble en grasa en una asparagina de la cadena de azúcar para derivatizar la asparagina de la cadena de azúcar. Esto es supuestamente debido al hecho de que la solubilidad en grasa de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar globales se eleva por la introducción del grupo protector soluble en grasa, de manera que una interacción con, por ejemplo, una columna de fase inversa preferentemente empleada es sustancialmente mejorada, produciendo así derivados de asparagina de la cadena de azúcar individuales que incluso se separan más sensiblemente que reflejan la diferencia en las estructuras de la cadena de azúcar. Por ejemplo, la solubilidad en grasa del grupo Fmoc, que es un grupo protector soluble en grasa usado preferentemente en la presente invención, es muy alta. En otras palabras, el esqueleto de fluorenilo en el grupo Fmoc tiene una estructura muy altamente soluble en grasa en la que dos anillos de benceno están unidos al centro del anillo de 5 miembros. Por ejemplo, se cree que se genera una interacción muy fuerte con el grupo octadecilo en la columna ODS, siendo la columna ODS una de las columnas de fase inversa, por lo cual pueden separarse los derivados de asparagina de la cadena de azúcar que tienen estructuras análogas.

30 Además, según la presente invención, pueden obtenerse convenientemente en una gran cantidad diversas asparaginas de la cadena de azúcar eliminando el grupo protector de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar resultantes, y también diversas cadenas de azúcar eliminando los residuos de asparagina de las asparaginas de la cadena de azúcar resultantes, como se describe más adelante.

35 Concretamente, el procedimiento para preparar un derivado de asparagina de la cadena de azúcar según la presente invención comprende las etapas de:

- 45 (a) introducir un grupo protector soluble en grasa seleccionado de grupo Fmoc, grupo t-butiloxicarbonilo (Boc), grupo bencilo, grupo aliilo, grupo aliloxicarbonato y grupo acetilo en la asparagina de la cadena de azúcar contenida en una mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar, en el que la mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar comprende:



dando una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar; y

- (b) someter la mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar o una mezcla obtenible hidrolizando un derivado de asparagina de la cadena de azúcar contenida en la mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar a cromatografía, para separar cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar de los mismos.

5

10

La mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar usable en la etapa (a) no está particularmente limitada, en tanto que la mezcla sea una mezcla de una o más cadenas de azúcar que tienen cada una una asparagina en un estado de unión. Por ejemplo, la mezcla puede ser una mezcla de una o más cadenas de azúcar a las que una o más asparaginas están unidas. Entre ellas, la mezcla de una o más cadenas de azúcar que tienen asparaginas unidas en extremos reductores se prefiere desde el punto de vista de la facilitación de la disponibilidad. El término "cadena de azúcar" como se usa en el presente documento se refiere a una cadena de azúcar en la que dos o más monosacáridos están unidos.

15

20

25

La mezcla de las asparaginas de la cadena de azúcar puede obtenerse por un procedimiento conocido, preferentemente obteniendo una mezcla de glucoproteínas y/o glucopéptidos de materiales de partida que se producen naturalmente tales como leche, fetuína derivada de bovino o huevo, y añadiendo a la mezcla una enzima tal como proteasa, por ejemplo, pronasa (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), actinasa-E (fabricada por Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.) o una carboxipeptidasa o aminopeptidasa general para llevar a cabo una reacción bajo condiciones de reacción conocidas para escindir un resto de péptido, dando así la mezcla de las asparaginas de la cadena de azúcar como una mezcla de reacción después de la reacción, o adicionalmente eliminando los componentes distintos de las asparaginas de la cadena de azúcar de la mezcla de reacción por un procedimiento conocido, tal como procedimiento de purificación usando diversos procedimientos cromatográficos usando columnas de filtración en gel, columnas de intercambio iónico y similares, y una cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), dando así la mezcla de las asparaginas de la cadena de azúcar como producto resultante. Desde el punto de vista de la facilitación en la preparación, es preferible que la mezcla anterior se prepare usando un glucopéptido derivado de huevo conocido [*Biochimica et Biophysica Acta* 1335 (1997) p23-32; SGP bruta (una mezcla que contiene proteínas en yema de huevo, una sal inorgánica y similares, en el que el glucopéptido está contenido en una cantidad de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 80% en peso)].

30

35

Por tanto, es más preferible que las asparaginas de la cadena de azúcar contenidas en la mezcla se hidrolicen para escindir previamente una parte de residuos de azúcar de las mismas, desde el punto de vista de obtener eficientemente los derivados de asparagina de la cadena de azúcar que tienen estructuras de la cadena de azúcar deseadas. El grado de la escisión no está particularmente limitado en tanto que la estructura sea retenida dentro del alcance del término "cadena de azúcar" como se usa en el presente documento. La mezcla obtenida como se ha descrito anteriormente incluye, por ejemplo, una mezcla que contiene un compuesto 24 mostrado en la Figura 3 y/o un compuesto que tiene una o más deleciones de residuos de azúcar en el compuesto anterior. En este caso, el límite superior de deleciones de residuos de azúcar del compuesto es 9, desde el punto de vista de la retención de la estructura de la "cadena de azúcar" como se usa en el presente documento en el compuesto.

40

Por ejemplo, los compuestos 25 y 29 mostrados en la Figura 3 pueden obtenerse eficientemente en una mezcla de las asparaginas de la cadena de azúcar que contienen el compuesto 24 (denominado en lo sucesivo una mezcla del compuesto 24) sometiendo la mezcla a una hidrólisis ácida en el modo que se describe más adelante, y además los compuestos 2 y 6 mostrados en la Figura 1, que son derivados de asparagina de la cadena de azúcar correspondientes, pueden obtenerse eficientemente.

45

50

Por ejemplo, una cantidad apropiada de una disolución ácida acuosa aproximadamente 0,1 N se añade a la mezcla de compuesto 24 para llevar a cabo una reacción, por ejemplo, a 4° a 100°C. Durante la reacción, monitorizando el progreso de la reacción hidrolítica por cromatografía en capa fina (por ejemplo, gel de sílice 60F254 (fabricado por Merck), acetato de etilo : metanol : agua = 4:4:3 que se usa como eluyente), la reacción se detiene en un punto en el que los compuestos 25 y 29 pueden obtenerse en la mayor cantidad. Por ejemplo, la reacción puede detenerse después de aproximadamente 5 a 10 horas bajo la condición de 25°C, o después de aproximadamente varios minutos bajo la condición de 100°C. Preferentemente, la reacción se lleva a cabo a 70°C, la reacción se detiene 35 minutos después del comienzo de la reacción y la mezcla se enfría sobre hielo rápidamente. La reacción puede detenerse neutralizando la disolución de reacción. Además, el ácido anterior no está particularmente limitado. Por ejemplo, pueden usarse ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido trifluoroacético, una resina de intercambio catiónico, un reactivo sólido insoluble y similares.

Similarmente, un compuesto 33 puede obtenerse eficientemente a partir del compuesto 24 en la mezcla

anterior. Por ejemplo, una cantidad apropiada de la disolución ácida acuosa anterior se añade a la mezcla de compuesto 24, la reacción se lleva a cabo preferentemente a 80°C y la reacción se detiene en preferentemente 60 minutos después del comienzo de la reacción.

5 La hidrólisis también puede llevarse a cabo enzimáticamente. La enzima usada en la reacción es preferentemente una glucosidasa, y puede usarse una enzima de formas de reacción tanto endo como exo. Por ejemplo, cuando los compuestos 25 y 29 se obtienen a partir del compuesto 24 del mismo modo que se ha descrito anteriormente, puede usarse un ácido siálico hidrolasa que tiene una actividad de escindir ácido siálico en un extremo. La enzima no está particularmente limitada, y la enzima puede ser cualquiera de las enzimas comercialmente disponibles, enzimas recientemente aisladas, enzimas generadas por medio de ingeniería genética y similares, en tanto que la enzima tenga la actividad anterior. La reacción enzimática puede llevarse a cabo según una condición conocida. Durante la reacción, el progreso se monitoriza por cromatografía en capa fina del mismo modo que se ha descrito anteriormente, y la reacción puede detenerse apropiadamente en un punto en el que los compuestos 25 y 29 se obtienen en las mayores cantidades.

10 El grupo protector soluble en grasa se introduce en la asparagina de la cadena de azúcar contenida en la mezcla de asparaginas de la cadena de azúcar usando la mezcla obtenida como se ha descrito anteriormente. Como grupo protector pueden usarse grupo Fmoc, grupo t-butiloxicarbonilo (Boc), grupo bencilo, grupo alilo, grupo aliloxicarbonato o grupo acetilo. Desde el punto de vista de que el derivado de asparagina de la cadena de azúcar resultante puede usarse inmediatamente en la síntesis de un glucopeptido deseado, el grupo protector anterior es preferentemente grupo Fmoc, grupo Boc o similares, más preferentemente grupo Fmoc. El grupo Fmoc es especialmente eficaz cuando en la cadena de azúcar existe un azúcar, tal como ácido siálico, que es relativamente inestable en condiciones ácidas. La introducción del grupo protector puede llevarse a cabo según un procedimiento conocido (por ejemplo, *Protecting Groups in Organic Chemistry*, John Wiley & Sons INC., Nueva York 1991, ISBN 0-471-62301-6).

15 Por ejemplo, cuando se usa el grupo Fmoc, una cantidad apropiada de acetona se añade a la mezcla que contiene asparaginas de la cadena de azúcar, carbonato de 9-fluorenilmetil-N-succinimidilo e hidrogenocarbonato de sodio se añaden adicionalmente a la misma y se disuelven, y después la mezcla resultante se somete a una reacción de unión del grupo Fmoc a un residuo de asparagina a 25°C, por la cual el grupo Fmoc puede introducirse en el residuo de asparagina de la asparagina de la cadena de azúcar anterior.

20 Según los procedimientos descritos anteriormente se obtiene una mezcla de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar en cada uno de los cuales se introduce un grupo protector soluble en grasa.

25 A continuación, en la etapa (b), la mezcla de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar se somete a una cromatografía conocida, especialmente una cromatografía fraccionada, para separar cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar de los mismos. En esta etapa, la mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar obtenida en la etapa anterior (a) puede usarse directamente. Alternativamente, puede usarse una mezcla de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar obtenidos sometiendo adicionalmente los derivados de asparagina de la cadena de azúcar contenida en la mezcla anterior a hidrólisis para escindir previamente una parte de los residuos de azúcar de la misma, desde el punto de vista de obtener eficientemente derivados de asparagina de la cadena de azúcar que tienen las estructuras de la cadena de azúcar deseadas. El grado de la escisión de los residuos de azúcar es el mismo que el descrito anteriormente. Además, la hidrólisis puede llevarse a cabo del mismo modo que se ha descrito anteriormente.

30 Por ejemplo, cuando se obtienen los compuestos 3 y 7, la mezcla que contiene los compuestos 2 y 6 se somete a tratamiento hidrolítico con una galactosidasa, en lugar de separar los compuestos 3 y 7 de la mezcla, por lo cual los compuestos 3 y 7 pueden separarse adicionalmente fácilmente de la mezcla resultante por HPLC, y cada uno de los compuestos puede obtenerse como un producto aislado en una gran cantidad.

35 La separación de cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar por cromatografía puede llevarse a cabo apropiadamente usando cromatografías conocidas, individualmente o en una combinación de múltiples cromatografías.

40 Por ejemplo, la mezcla resultante de derivados de asparagina de la cadena de azúcar se purifica por una cromatografía en columna de filtración en gel, y luego se purifica usando HPLC. La columna que puede usarse en HPLC es preferentemente una columna de fase inversa, por ejemplo, columna ODS, basada en fenilo, basada en nitrilo o basada en intercambio aniónico, y concretamente puede utilizarse una columna monoQ fabricada por Pharmacia, columna latro-beads fabricada por latron. Las condiciones de separación y similares pueden ajustarse con referencia a una condición conocida. Según los procedimientos anteriores, cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar deseados puede obtenerse a partir de la mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar. La Figura 7 muestra esquemáticamente un ejemplo de una etapa en el procedimiento de preparación de un derivado de asparagina de la cadena de azúcar de la presente invención.

45 Además, el derivado de asparagina de la cadena de azúcar que tiene una estructura de cadena de azúcar deseada puede obtenerse eficientemente hidrolizando los derivados de asparagina de la cadena de azúcar separados en la etapa (b) [etapa (b')]. Por ejemplo, en la etapa de separar los derivados de asparagina de la cadena de azúcar, los derivados de asparagina de la cadena de azúcar pueden separarse aproximadamente limitando los tipos de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar contenidos en la mezcla, y después los derivados de asparagina de la cadena de azúcar se someten a hidrólisis, por ejemplo, hidrólisis con una glucosidasa, por lo cual los derivados de asparagina de la cadena de azúcar que tienen las estructuras de la cadena de azúcar deseadas pueden obtenerse eficientemente. Aquí, la hidrólisis puede llevarse a cabo del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Especialmente, es preferible que la hidrólisis se lleve a cabo con una glucosidasa de la cual el modo de escisión de los residuos de azúcar es claro, desde el punto de vista de obtener más eficientemente los derivados de asparagina de la cadena de azúcar que tienen las estructuras de la cadena de azúcar deseadas.

Por ejemplo, la conversión de los compuestos 2 y 6 en los compuestos 3 y 7 por la eliminación de los residuos de galactosa (Figura 8) puede llevarse a cabo disolviendo los compuestos 2 y 6 en un tampón (por ejemplo, tampón fosfato, tampón acetato, tampón Good o similares), y llevando a cabo la reacción de escisión de los residuos de galactosa con una galactosidasa según una condición conocida. Los compuestos 2 y 6 pueden ser una mezcla de estos compuestos o compuestos individualmente aislados. Es preferible que una enzima de forma exo conocida comercialmente disponible se utilice para la galactosidasa usada en esta reacción. Por tanto, la enzima puede ser una enzima recientemente aislada o una enzima generada por ingeniería genética, en tanto que la enzima tenga una actividad fosilar. A continuación, del mismo modo que se ha descrito anteriormente, la disolución de reacción obtenida después de la reacción (una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar de la que se escinden los residuos de azúcar) puede someterse a cromatografía dando cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar. Por ejemplo, es preferible que la separación se lleve a cabo por HPLC (columna ODS, siendo el eluyente acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 82:15).

La conversión de los compuestos 3 y 7 en los compuestos 4 y 8 por la eliminación de los residuos de N-acetilglucosamina (Figura 8) puede llevarse a cabo disolviendo los compuestos 3 y 7 en un tampón (por ejemplo, tampón fosfato, tampón acetato, tampón Good o similares), y llevando a cabo la reacción de escisión de los residuos de N-acetilglucosamina con una N-acetilglucosaminidasa según una condición conocida. Por tanto, puede usarse una N-acetilhexosaminidasa. Los compuestos 3 y 7 pueden ser mezclas de estos compuestos o compuestos individualmente aislados. Es preferible que una enzima de forma exo conocida comercialmente disponible se utilice para cada enzima usada en esta reacción. Por tanto, la enzima puede ser una enzima recientemente aislada o una enzima generada por ingeniería genética, en tanto que la enzima tenga una actividad similar. A continuación, del mismo modo que se ha descrito anteriormente, la disolución de reacción obtenida después de la reacción (una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar de la que se escinden residuos de azúcar) se somete a cromatografía dando cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar. Por ejemplo, es preferible que la separación se lleve a cabo por HPLC (columna ODS, siendo el eluyente un acetato de amonio acuoso 50 mM : metanol = 65:35 o un acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 82:15).

La conversión de los compuestos 4 y 8 en los compuestos 5 y 9 por la eliminación de los residuos de manosa (Figura 8) puede llevarse a cabo disolviendo los compuestos 4 y 8 en un tampón (por ejemplo, tampón fosfato, tampón acetato, tampón Good o similares), y llevando a cabo la reacción de escisión de los residuos de manosa con una manosidasa bajo una condición conocida. Los compuestos 4 y 8 pueden ser una mezcla de estos compuestos o individualmente aislados. Es preferible que una enzima de forma exo conocida comercialmente disponible se utilice para la manosidasa usada en esta reacción. Por tanto, la enzima puede ser una enzima recientemente aislada o una enzima generada por ingeniería genética, en tanto que la enzima tenga una actividad similar. A continuación, del mismo modo que se ha descrito anteriormente, la disolución de reacción obtenida después de la reacción (una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar de la que se escinden residuos de azúcar) se somete a cromatografía dando cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar. Por ejemplo, es preferible que la separación se lleve a cabo por HPLC (columna ODS, eluyente: pueden usarse, por ejemplo, una disolución mixta de un tampón tal como un acetato de amonio aproximadamente 10 a aproximadamente 200 mM y un disolvente orgánico soluble en agua con solubilidad en grasa tal como acetonitrilo, o etanol, o metanol, o butanol, o propanol en cantidades apropiadas; cuando se ejemplifica en el presente documento, es preferible que el eluyente sea un acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 82:18).

La conversión del compuesto 10 en el compuesto 11 por la eliminación de los residuos de galactosa (Figura 9) puede llevarse a cabo disolviendo un compuesto 10 en un tampón (por ejemplo, tampón fosfato, tampón acetato, tampón Good o similares), y llevando a cabo la reacción de escisión de los residuos de galactosa con una galactosidasa según una condición conocida del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Es preferible que la separación de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar de la disolución de reacción obtenida después de la reacción (una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar de la que se escinden residuos de azúcar) se lleve a cabo por, por ejemplo, HPLC (columna ODS, siendo el eluyente un acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 85:15).

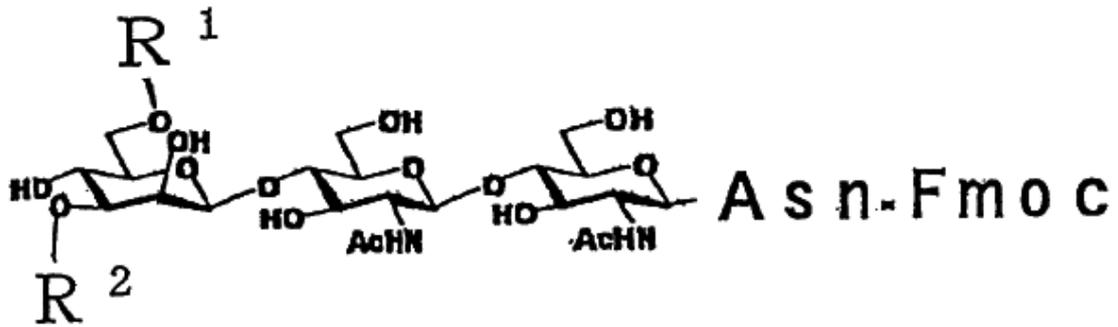
Por tanto, hidrolizando adicionalmente el compuesto 11 con una glucosidasa arbitraria, el compuesto puede convertirse en diversos derivados de asparagina de la cadena de azúcar (por ejemplo, compuestos 11, 12, 13 y similares).

La conversión del compuesto 11 en el compuesto 12 por la eliminación de los residuos de N-acetilglucosamina (Figura 9) puede llevarse a cabo disolviendo el compuesto 11 en un tampón (por ejemplo, tampón fosfato, tampón acetato, tampón Good o similares), y llevando a cabo la reacción de escisión de los residuos de N-acetilglucosamina con una N-acetilglucosamidasa bajo una condición conocida del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Es preferible que la separación de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar de la disolución de reacción obtenida después de la reacción (una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar de la que se escinden residuos de azúcar) se lleve a cabo por, por ejemplo, HPLC (columna ODS, siendo el eluyente un acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 85:18).

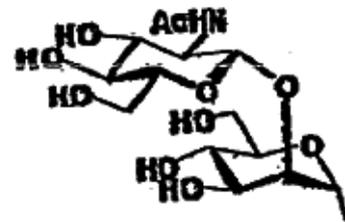
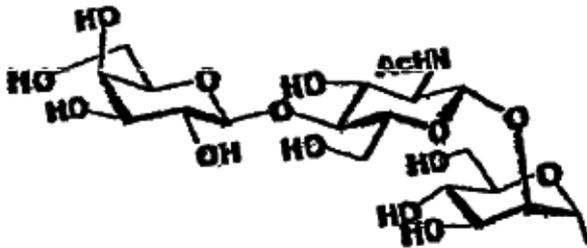
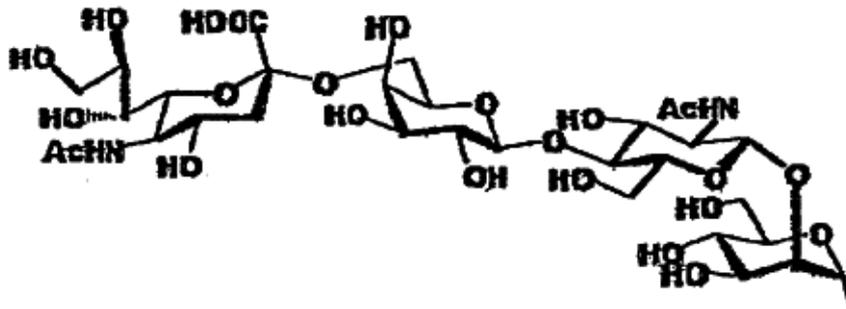
La conversión del compuesto 12 en el compuesto 13 por la eliminación de los residuos de manosa (Figura 9) puede llevarse a cabo disolviendo el compuesto 12 en un tampón (por ejemplo, tampón fosfato, tampón acetato, tampón Good o similares), y llevando a cabo la reacción de escisión de los residuos de manosa con una manosidasa según una condición conocida del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Es preferible que la separación de cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar de la disolución de reacción obtenida después de la reacción (una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar de la que se escinden residuos de azúcar) se lleve a cabo por, por ejemplo, cromatografía de líquidos de alta resolución en columna (columna ODS, siendo el eluyente un acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 82:18).

La conversión de los compuestos 3 y 7 en los compuestos 14 y 19 (Figura 10) puede llevarse a cabo disolviendo los compuestos 3 y 7 en un tampón (por ejemplo, tampón fosfato, tampón acetato, tampón Good o similares), y llevando a cabo la reacción de escisión de los residuos de ácido siálico con una neuraminidasa según una

- condición conocida. Los compuestos 3 y 7 pueden ser una mezcla de estos compuestos o individualmente aislados. Es preferible que una enzima de forma exo conocida comercialmente disponible se utilice para la ácido siálico hidrolasa usada en esta reacción. Por tanto, la enzima puede ser una enzima recientemente aislada o una enzima generada por ingeniería genética, en tanto que la enzima tenga una actividad similar. Después, del mismo modo que se ha descrito
- 5 anteriormente, la disolución de reacción obtenida después de la reacción (una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar de la que se escinden residuos de azúcar) se somete a cromatografía dando cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar. Por ejemplo, es preferible que la separación se lleve a cabo por cromatografía de líquidos de alta resolución en columna (columna ODS, siendo el eluyente un acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 85:15).
- 10 La conversión de los compuestos 14 y 19 en los compuestos 15 y 20 por la eliminación de los residuos de N-acetilglucosamina (Figura 10) puede llevarse a cabo disolviendo los compuestos 14 y 19 en un tampón (por ejemplo, tampón fosfato, tampón acetato, tampón Good o similares), y llevando a cabo la reacción de escisión de los residuos de N-acetilglucosamina con una N-acetilglucosaminidasa o similares según una condición conocida del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Es preferible que la separación de cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar de la disolución de reacción obtenida después de la reacción (una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar de la que se escinden residuos de azúcar) se lleve a cabo por, por ejemplo, cromatografía de líquidos de alta resolución en columna (columna ODS, siendo el eluyente un acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 82:18).
- 15 La conversión de los compuestos 15 y 20 en los compuestos 16 y 21 por la eliminación de los residuos de manosa (Figura 10) puede llevarse a cabo disolviendo los compuestos 15 y 20 en un tampón (por ejemplo, tampón fosfato, tampón acetato, tampón Good o similares), y llevando a cabo la reacción de escisión de los residuos de manosa con una manosidasa según una condición conocida del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Es preferible que la separación de cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar de la disolución de reacción obtenida después de la reacción (una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar de la que se escinden residuos de azúcar) se lleve a cabo por, por ejemplo, cromatografía de líquidos de alta resolución en columna (columna ODS, siendo el eluyente un acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 82:18).
- 20 La conversión de los compuestos 16 y 21 a los compuestos 17 y 22 por la eliminación de los residuos de galactosa (Figura 11) puede llevarse a cabo disolviendo los compuestos 16 y 21 en un tampón (por ejemplo, tampón fosfato, tampón acetato, tampón Good o similares), y llevando a cabo la reacción de escisión de los residuos de galactosa con una galactosidasa según una condición conocida del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Es preferible que la separación de cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar de la disolución de reacción obtenida después de la reacción (una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar de la que se escinden residuos de azúcar) se lleve a cabo por, por ejemplo, cromatografía de líquidos de alta resolución en columna (columna ODS, siendo el eluyente un acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 85:15).
- 25 La conversión de los compuestos 17 y 22 en los compuestos 18 y 23 por la eliminación de los residuos de N-acetilglucosamina (Figura 11) puede llevarse a cabo disolviendo los compuestos 17 y 22 en un tampón (por ejemplo, tampón fosfato, tampón acetato, tampón Good o similares), y llevando a cabo la reacción de escisión de los residuos de N-acetilglucosamina con una N-acetilglucosaminidasa o similares según una condición conocida del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Es preferible que la separación de cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar de la disolución de reacción obtenida después de la reacción (una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar de la que se escinden residuos de azúcar) se lleve a cabo por, por ejemplo, cromatografía de líquidos de alta resolución en columna (columna ODS, siendo el eluyente un acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 82:18).
- 30 Como se ha descrito anteriormente, cada uno de los diversos derivados de asparagina de la cadena de azúcar de los que las estructuras de ramificación en los extremos de las cadenas de azúcar no son uniformes puede obtenerse como compuestos aislados individuales hidrolizando adicionalmente los derivados con diversas glucosidasas y similares para eliminar los residuos de azúcar en extremos no reductores de las cadenas de azúcar después de la obtención de cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar. Además, incluso un mayor número de tipos de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar puede prepararse cambiando el orden o el tipo de hidrólisis con diversas glucosidasas.
- 35 Según un procedimiento convencional, enormes cantidades de tiempo y coste para obtener los derivados de asparagina de la cadena de azúcar que tienen estructuras muy limitadas de la cadena de azúcar se requieren incluso a una escala analítica. Por el contrario, según la presente invención, aproximadamente 1 gramo de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar que tienen estructuras de la cadena de azúcar deseadas pueden prepararse en un periodo de aproximadamente 2 semanas usando una columna de filtración en gel convencional, columna HPLC y al menos tres tipos de glucosidasas (por ejemplo, galactosidasa, manosidasa y N-acetilglucosamidasa) sin necesitar ningún dispositivo o reactivo particular.
- 40 Según los procedimientos descritos anteriormente, cuando el grupo protector, por ejemplo, es grupo Fmoc, puede obtenerse eficientemente un derivado de asparagina de la cadena de azúcar representado por la fórmula general:
- 45
- 50
- 55



en la que R^1 y R^2 , que pueden ser idénticos o diferentes, son H,

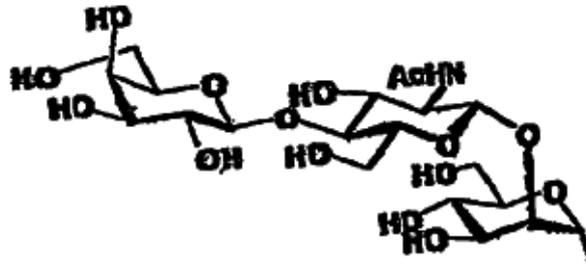


o



5

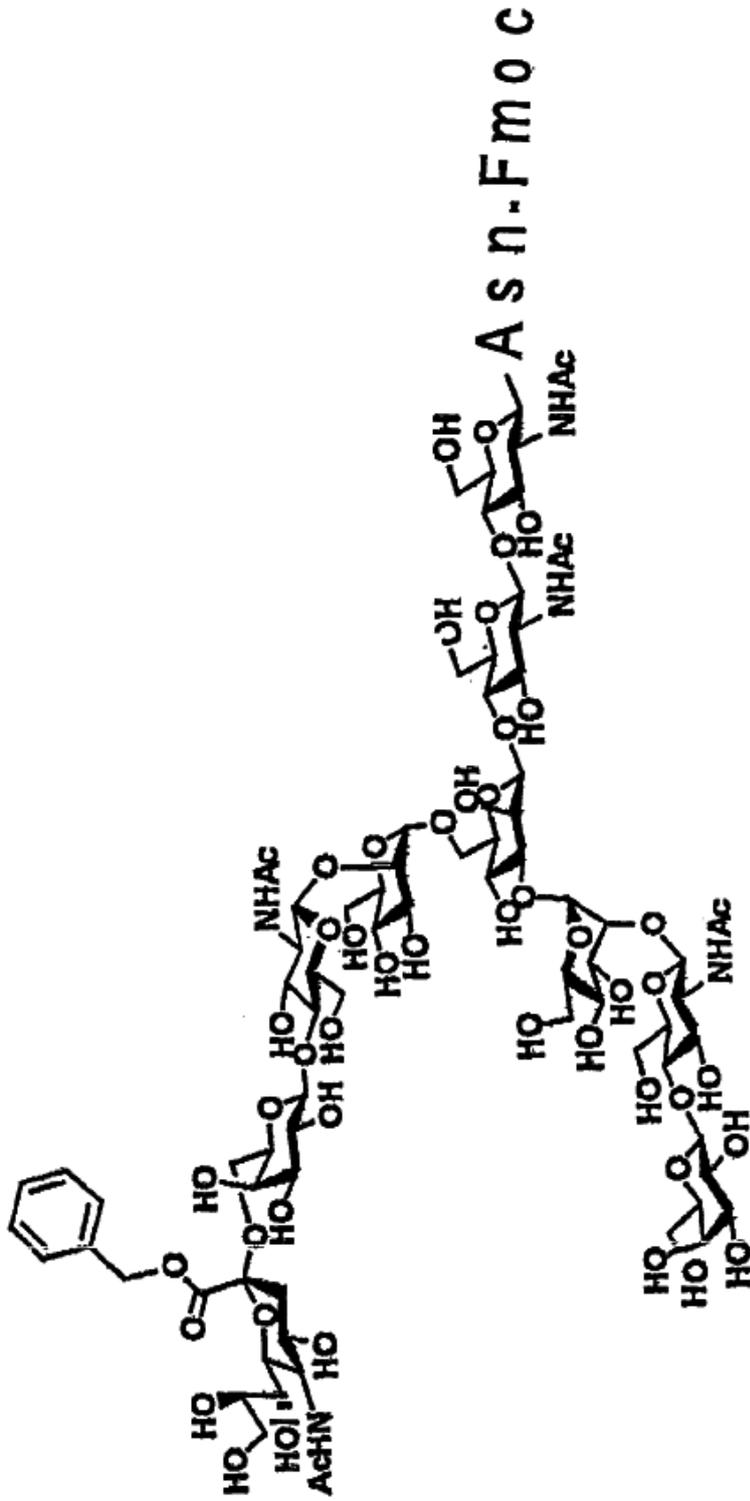
con la condición de que se excluya un caso en el que R^1 y R^2 son ambos



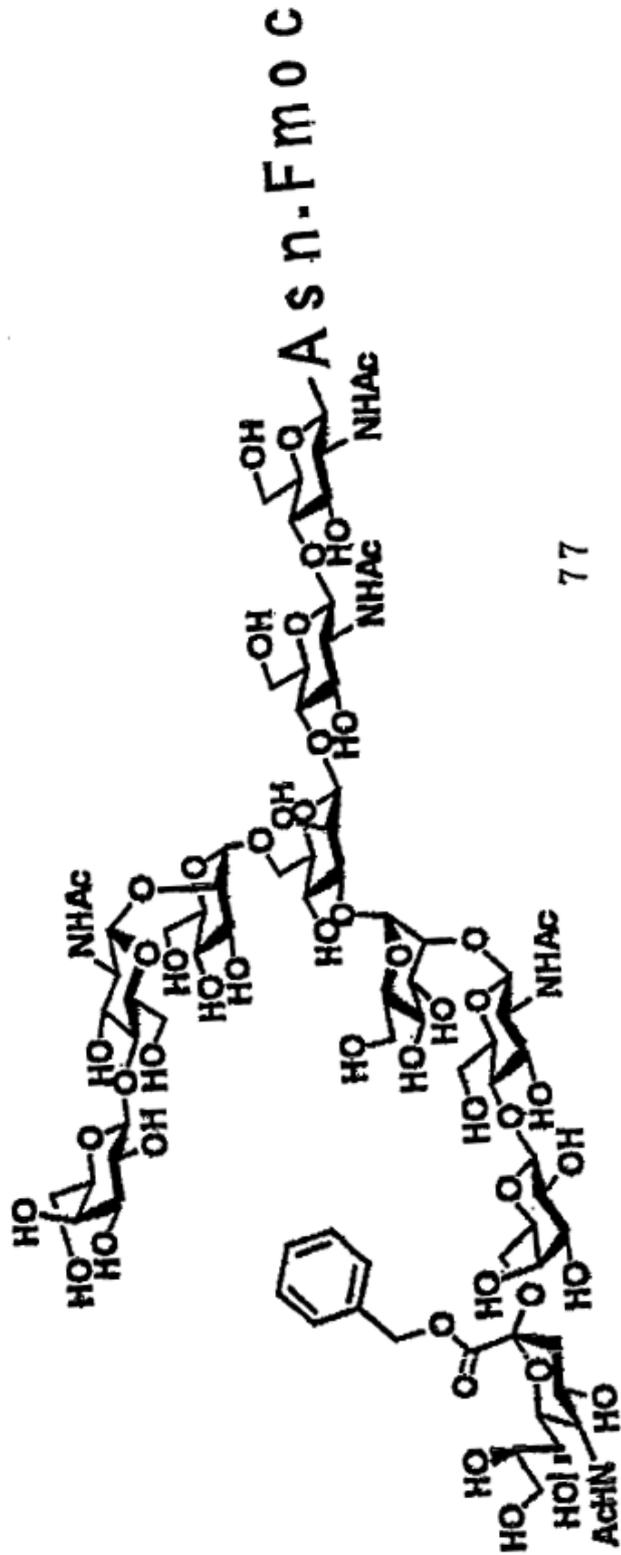
Concretamente, el derivado de asparagina de la cadena de azúcar anterior incluye, por ejemplo, cada uno de los compuestos mostrados en la Figura 1 y la Figura 2. Entre ellos, el compuesto 1, los compuestos 2 a 9, 11 a 23, 70 y 71 son compuestos preparados por primera vez en la presente invención.

5 Además, como una realización preferida del procedimiento para preparar un derivado de asparagina de la cadena de azúcar de la presente invención, se proporciona un procedimiento para preparar un derivado de asparagina de la cadena de azúcar en el que la etapa (a) es una etapa de proporcionar una mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar que tiene cada una un residuo de ácido siálico en un extremo no reductor, introducir grupo Fmoc en las asparaginas de la cadena de azúcar contenidas en la mezcla anterior, e introducir grupo bencilo en el residuo de ácido siálico, dando una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar. Según el procedimiento anterior, 10 diversas formas de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar pueden obtenerse más eficientemente en una gran cantidad. Por ejemplo, la eficiencia de separación de los compuestos 2 y 6 mostrados en la Figura 1 puede aumentarse, por lo que ambos compuestos pueden prepararse eficientemente. En otras palabras, aunque hay una desventaja en separar eficientemente directamente los compuestos 2 y 6 definitivamente de una mezcla de ambos compuestos, en esta realización, ambos compuestos pueden obtenerse eficientemente de la mezcla introduciendo grupo bencilo en un residuo de ácido siálico de ambos compuestos y sometiendo a la etapa (b) anterior antes que nada como una mezcla de los siguientes compuestos 76 y 77:

15



76



Por tanto, como los compuestos 76 y 77 pueden separarse relativamente fácilmente, los compuestos pueden separarse, y después la eliminación del grupo bencilo de los compuestos 76 y 77 mediante un procedimiento descrito más adelante permite que los compuestos 2 y 6 se separen eficientemente y se obtengan de la mezcla de los compuestos.

5 A diferencia de la un poco difícil separación de los compuestos 2 y 6, se cree que el motivo por el cual la separación de los compuestos 76 y 77, que se obtienen introduciendo grupo bencilo en un residuo de ácido siálico de los compuestos 2 y 6, puede llevarse a cabo fácilmente es que un grupo bencilo altamente soluble en grasa se introduce en grupo carboxilo del residuo de ácido siálico, de manera que aumenta adicionalmente una interacción hidrófoba con una columna de fase inversa de HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución). Por tanto, se deduce que la interacción con la columna de fase inversa preferentemente empleada en la etapa de separación (b) puede mejorarse sustancialmente, por lo que por consiguiente la separación de ambos compuestos puede llevarse a cabo reflejando más sensiblemente la diferencia en la estructura de la cadena de azúcar.

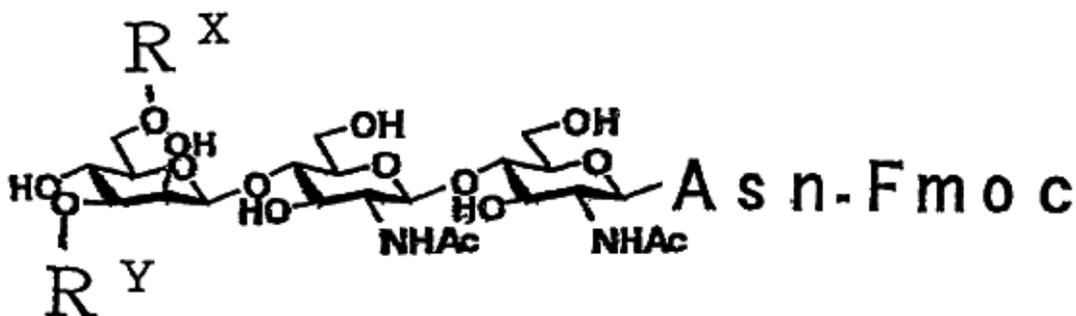
15 La mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar que tienen cada una un residuo de ácido siálico en un extremo no reductor no está particularmente limitada, en tanto que la mezcla sea una mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar que tiene la estructura anterior. Una mezcla de una o más cadenas de azúcar que tienen cada una un residuo de ácido siálico en un extremo no reductor y que también tienen asparagina unida en un extremo reductor se prefiere desde el punto de vista de la fácil disponibilidad. Como la mezcla anterior, se prefiere una mezcla que contiene el compuesto 24 mostrado en la Figura 3 y/o un compuesto que tiene una o más deleciones de residuos de azúcar en el compuesto anterior.

20 Es preferible llevar a cabo la etapa anterior (b'), desde el punto de vista de obtener adicionalmente eficientemente un derivado de asparagina de la cadena de azúcar que tiene la estructura de la cadena de azúcar deseada.

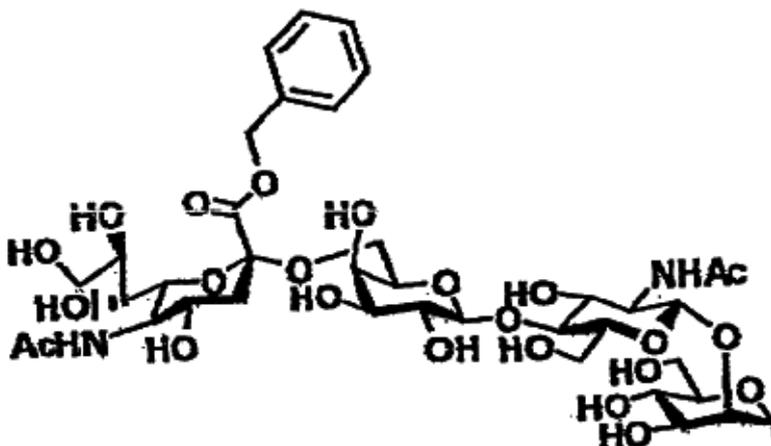
25 En esta realización, como los derivados de asparagina de la cadena de azúcar, aquí se obtienen aquellos preparados introduciendo grupo bencilo y grupo Fmoc en su interior, y aquellos preparados introduciendo sólo grupo Fmoc en su interior.

La introducción del grupo bencilo en un residuo de ácido siálico de la asparagina de la cadena de azúcar puede llevarse a cabo según un procedimiento conocido (por ejemplo, véase *Protecting Groups in Organic Chemistry*, John Wiley & Sons INC., Nueva York 1991, ISBN 0-471-62301-6).

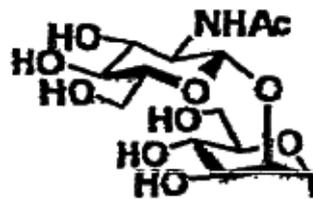
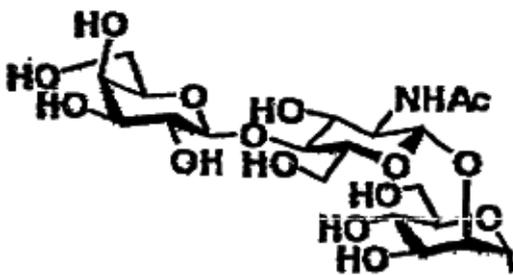
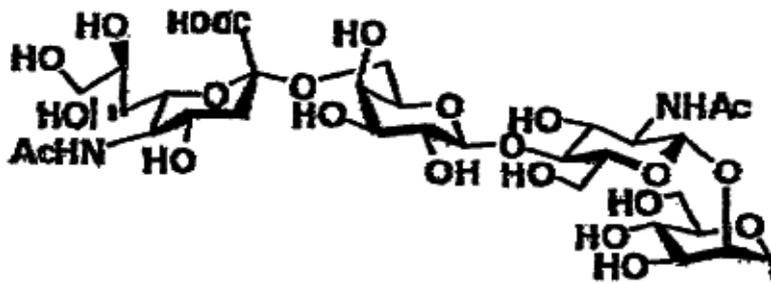
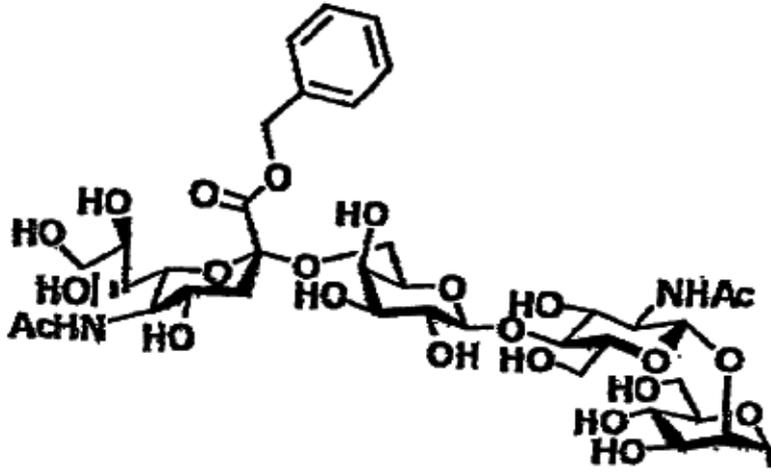
30 Según los procedimientos anteriores, por ejemplo, puede obtenerse eficientemente un derivado de asparagina de la cadena de azúcar que tiene grupo bencilo y grupo Fmoc introducido en su interior, respectivamente, que se representa por la fórmula general:



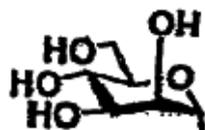
en la que uno de R^x y R^y es



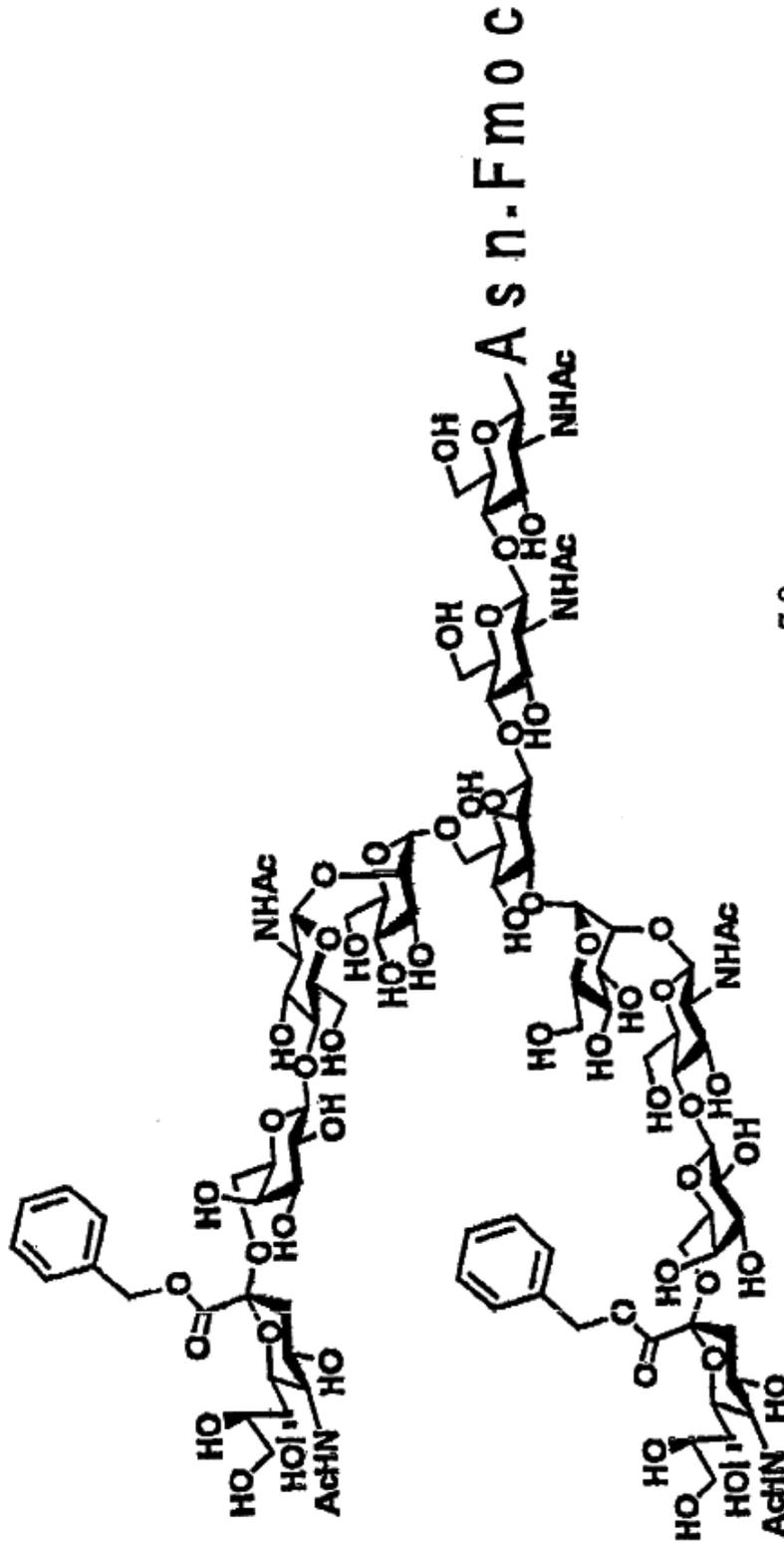
y el otro es H,



o



Concretamente, el derivado de asparagina de la cadena de azúcar incluye los compuestos anteriores 76 y 77, y el siguiente compuesto 78:



78

5 El derivado de asparagina de la cadena de azúcar obtenido según esta realización puede usarse directamente en la síntesis en fase sólida de un glucopéptido. Como el grupo carboxilo que existe en un residuo de ácido siálico del derivado de asparagina de la cadena de azúcar está protegido por un grupo bencilo, hay algunas ventajas de que el péptido de azúcar deseado pueda obtenerse eficientemente sin causar reacciones laterales que impliquen al grupo carboxilo en la síntesis en fase sólida del glucopéptido, con respecto al derivado de asparagina de la cadena de azúcar sin introducción del grupo bencilo.

10 Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una asparagina de la cadena de azúcar que puede obtener cada una de las diversas asparaginas de la cadena de azúcar aisladas en una gran cantidad. El procedimiento anterior comprende además, posterior a la etapa de preparación de un derivado de asparagina de la cadena de azúcar según el procedimiento anterior para preparar un derivado de asparagina de la cadena de azúcar, una etapa de eliminar el grupo protector del derivado de asparagina de la cadena de azúcar resultante.

En otras palabras, el procedimiento para preparar una asparagina de la cadena de azúcar según la presente invención comprende las etapas de:

15 (a) introducir un grupo protector soluble en grasa en una asparagina de la cadena de azúcar contenida en una mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar, dando una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar;

20 (b) someter la mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar o una mezcla obtenible hidrolizando un derivado de asparagina de la cadena de azúcar contenida en la mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar a cromatografía, para separar cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar de los mismos; y

(c) eliminar el grupo protector del derivado de asparagina de la cadena de azúcar separado en la etapa (b), dando una asparagina de la cadena de azúcar.

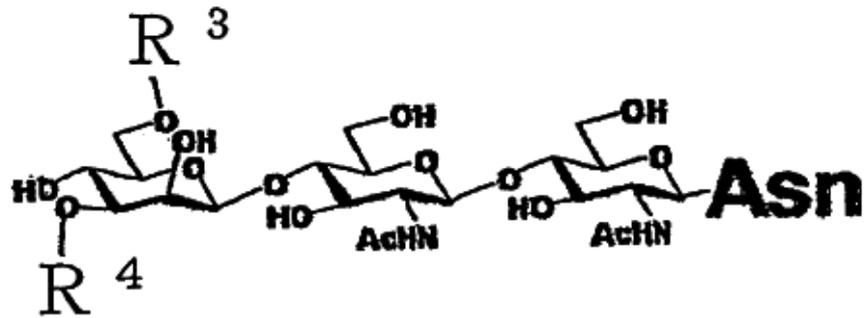
25 Las etapas (a) y (b) son las mismas que aquellas en el procedimiento anterior para preparar un derivado de asparagina de la cadena de azúcar, y la mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar usada y el grupo protector soluble en grasa usado también son los mismos que aquellos descritos anteriormente.

30 La eliminación del grupo protector del derivado de asparagina de la cadena de azúcar en la etapa (c) puede llevarse a cabo según un procedimiento conocido (por ejemplo, véase *Protecting Groups in Organic Chemistry*, John Wiley & Sons INC., Nueva York 1991, ISBN 0-471-62301-6). Por ejemplo, cuando el grupo protector es grupo Fmoc, el grupo Fmoc puede eliminarse añadiendo morfolina al derivado de asparagina de la cadena de azúcar en N,N-dimetilformamida (DMF) para llevar a cabo la reacción, como se ha mostrado esquemáticamente en la Figura 12. Por otra parte, el grupo Boc puede eliminarse por una reacción con un ácido débil. Después de la eliminación del grupo protector, una asparagina de la cadena de azúcar puede obtenerse apropiadamente purificando una mezcla de reacción por un procedimiento conocido tal como diversas cromatografías empleando una columna de filtración en gel, una columna de intercambio iónico o similares, o un procedimiento de separación por HPLC según se desee.

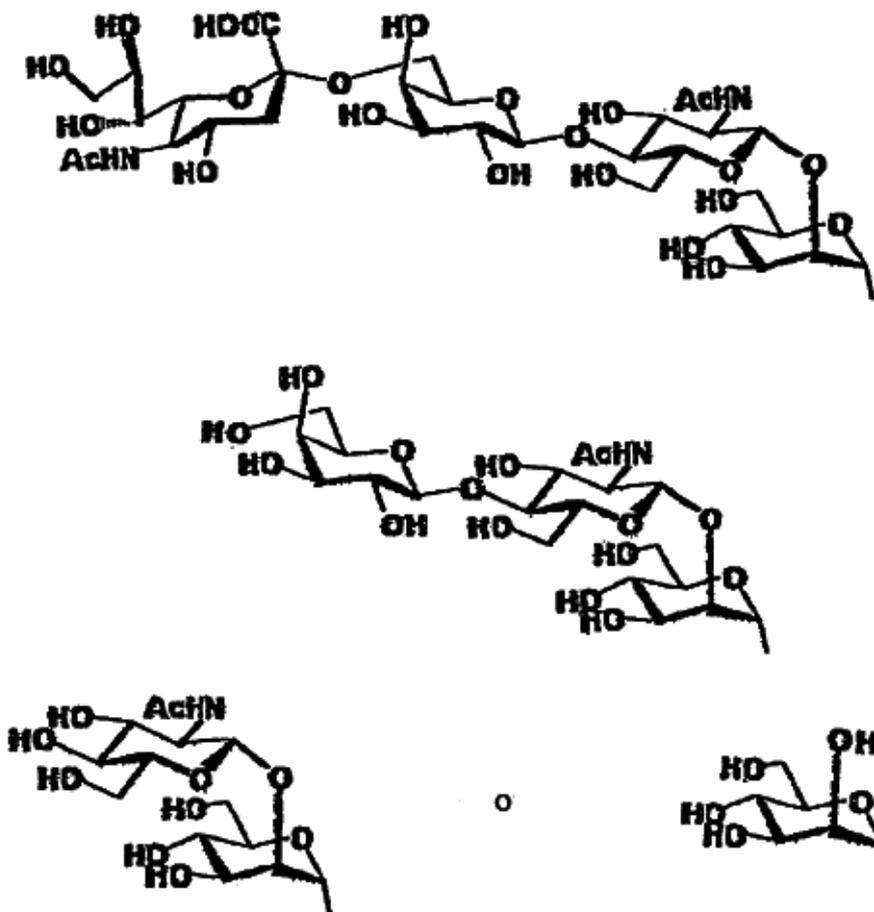
35 Además, similarmente al procedimiento anterior para preparar un derivado de asparagina de la cadena de azúcar, como una realización preferida del procedimiento para preparar una asparagina de la cadena de azúcar de la presente invención se proporciona un procedimiento para preparar una asparagina de la cadena de azúcar, en el que la etapa (a) es una etapa de proporcionar una mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar que tiene cada una un residuo de ácido siálico en un extremo no reductor, introducir grupo Fmoc en las asparaginas de la cadena de azúcar contenidas en la mezcla anterior e introducir grupo bencilo en el residuo de ácido siálico, dando una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar. En esta realización, en la etapa (c), se lleva a cabo la eliminación del grupo bencilo, además de la eliminación de grupo Fmoc. La eliminación del grupo bencilo puede llevarse a cabo según un procedimiento conocido (por ejemplo, véase *Protecting Groups in Organic Chemistry*, John Wiley & Sons INC., Nueva York 1991, ISBN 0-471-62301-6).

45 Además, del mismo modo que se ha mencionado anteriormente, es preferible hidrolizar los derivados de asparagina de la cadena de azúcar separados en la etapa (b) y/o hidrolizar la asparagina de la cadena de azúcar obtenida en la etapa (c), desde el punto de vista de obtener eficientemente una asparagina de la cadena de azúcar que tiene una estructura de la cadena de azúcar deseada. La hidrólisis puede llevarse a cabo del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Es más preferible llevar a cabo la hidrólisis con una glucosidasa [etapa (b') y/o etapa (c')], desde el punto de vista de obtener más eficientemente una asparagina de la cadena de azúcar que tiene una estructura de la cadena de azúcar deseada.

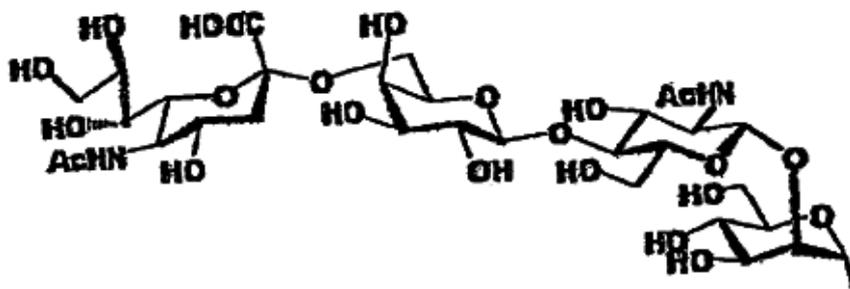
50 Según los procedimientos anteriores, por ejemplo, pueden obtenerse eficientemente una asparagina de la cadena de azúcar representada por la fórmula general:



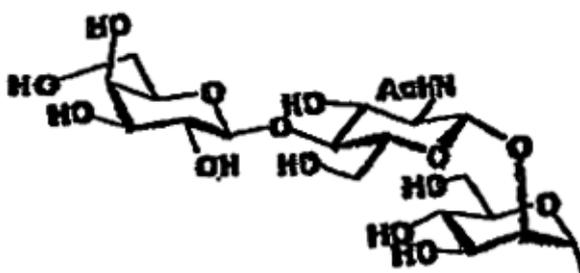
en la que R^3 y R^4 , que pueden ser idénticos o diferentes, son H,



con la condición de que se excluya un caso en el que R^3 y R^4 son ambos



o



5 Concretamente, la asparagina de la cadena de azúcar incluye, por ejemplo, cada uno de los compuestos mostrados en la Figura 3 y la Figura 4. Entre ellos, los compuestos 25 a 32, 34 a 46, 72 y 73 son los compuestos preparados por primera vez en la presente invención.

10 Además, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una cadena de azúcar que puede obtener las diversas cadenas de azúcar aisladas en una gran cantidad. El procedimiento anterior comprende además, posterior a la etapa de preparación de una asparagina de la cadena de azúcar según el procedimiento anterior para preparar una asparagina de la cadena de azúcar, una etapa de eliminar un residuo de asparagina de la asparagina de la cadena de azúcar resultante.

En otras palabras, el procedimiento para preparar una cadena de azúcar de la presente invención comprende la etapa de:

- 15 (a) introducir un grupo protector soluble en grasa en una asparagina de la cadena de azúcar contenida en una mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar, dando una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar;
- 20 (b) someter la mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar o una mezcla obtenible hidrolizando un derivado de asparagina de la cadena de azúcar contenida en la mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar a cromatografía, para separar cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar de los mismos;
- (c) eliminar el grupo protector del derivado de asparagina de la cadena de azúcar separado en la etapa (b), dando una asparagina de la cadena de azúcar; y
- (d) eliminar un residuo de asparagina de la asparagina de la cadena de azúcar obtenida en la etapa (c), dando la cadena de azúcar.

25 Las etapas (a) a (c) son las mismas que aquellas en el procedimiento anterior para preparar una asparagina de la cadena de azúcar, y la mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar usada y el grupo protector soluble en grasa usado también son los mismos que aquellos mencionados anteriormente.

30 Además, en el procedimiento para preparar una cadena de azúcar de la presente invención, como una realización preferida, se proporciona un procedimiento para preparar una asparagina de la cadena de azúcar, en el que la etapa (a) es una etapa de proporcionar una mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar que tiene cada una un residuo de ácido siálico en un extremo no reductor, introducir grupo Fmoc en las asparaginas de la cadena de azúcar contenidas en la mezcla anterior e introducir grupo bencilo en el residuo de ácido siálico dando una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar. En esta realización, en la etapa (c), se lleva a cabo la eliminación del grupo bencilo, además de la eliminación del grupo Fmoc. La eliminación del grupo bencilo puede llevarse a cabo según el procedimiento anterior.

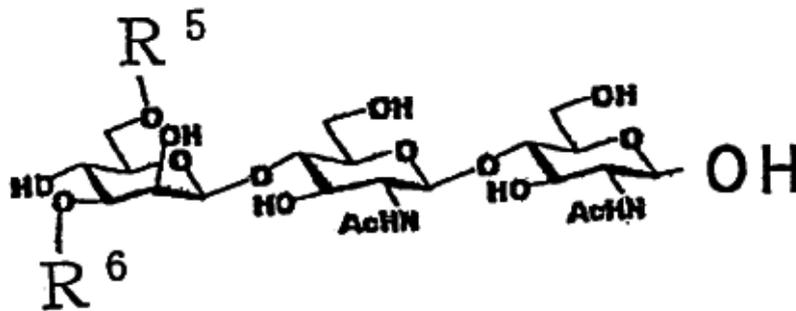
35

La eliminación del residuo de asparagina de la asparagina de la cadena de azúcar en la etapa (d) puede llevarse a cabo según un procedimiento conocido. Por ejemplo, la asparagina de la cadena de azúcar se hace reaccionar con hidracina anhidra y luego se acetila para eliminar el residuo de asparagina, por lo que puede obtenerse

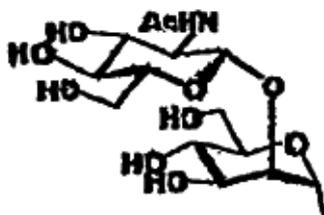
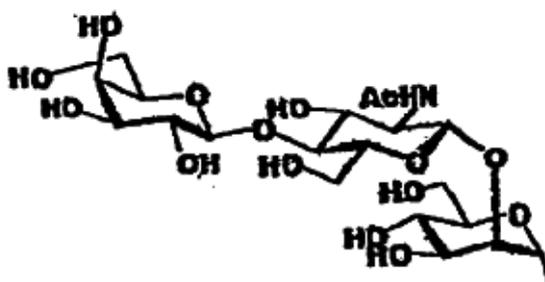
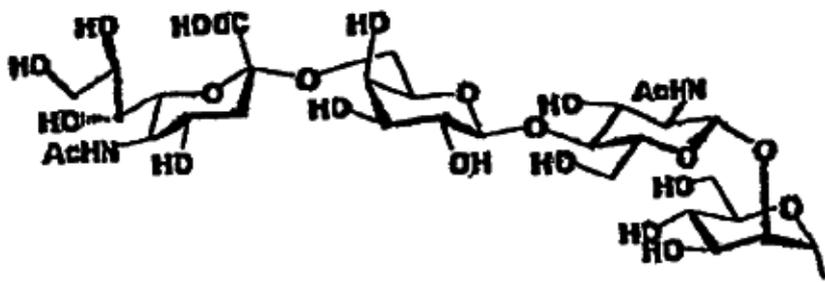
5 una cadena de azúcar, como se ha mostrado esquemáticamente en la Figura 12. Por tanto, una cadena de azúcar también puede obtenerse sometiendo a reflujo la asparagina de la cadena de azúcar calentando en una disolución acuosa básica y después acetilando la asparagina de la cadena de azúcar para eliminar el residuo de asparagina. Después de la eliminación del residuo de asparagina, la cadena de azúcar puede purificarse apropiadamente por un procedimiento conocido tal como diversas cromatografías empleando una columna de filtración en gel, una columna de intercambio iónico o similares, y un procedimiento de separación por HPLC según se desee.

10 Además, del mismo modo que se ha mencionado anteriormente, es preferible hidrolizar los derivados de asparagina de la cadena de azúcar separados en la etapa (b) y/o hidrolizar las asparaginas de la cadena de azúcar obtenidas en la etapa (c), y/o hidrolizar la cadena de azúcar obtenida en la etapa (d), desde el punto de vista de obtener eficientemente una cadena de azúcar que tiene una estructura de la cadena de azúcar deseada. La hidrólisis puede llevarse a cabo del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Es más preferible llevar a cabo la hidrólisis con una glucosidasa [la etapa (b') y/o la etapa (c') y/o la etapa (d')], desde el punto de vista de obtener más eficientemente una cadena de azúcar que tiene una estructura de la cadena de azúcar deseada.

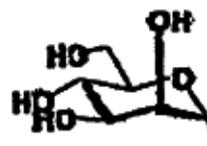
15 Según los procedimientos anteriores, por ejemplo, puede obtenerse eficientemente una cadena de azúcar representada por la fórmula general:



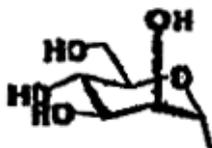
en la que R⁵ y R⁶ son diferentes y están seleccionados de H,



y



con la condición de que se excluya en un caso en el que uno de R^5 y R^6 sea H y el otro sea



5 Concretamente, la cadena de azúcar incluye, por ejemplo, cada uno de los compuestos mostrados en la Figura 5 y la Figura 6. Entre ellos, los compuestos 48 a 55, 60 a 69, 74 y 75 son los compuestos preparados por primera vez en la presente invención.

10 Como se ha descrito anteriormente, según la presente invención, el derivado de asparagina de la cadena de azúcar, la asparagina de la cadena de azúcar y la cadena de azúcar (en lo sucesivo estos tres términos se denominan en conjunto "series de la cadena de azúcar" en algunos casos) que tienen cada uno una estructura de la cadena de azúcar deseada pueden prepararse con un bajo coste, eficientemente y en una gran cantidad.

15 Las series de la cadena de azúcar anteriores son muy útiles en el campo del desarrollo de productos farmacéuticos y similares. Un ejemplo de aplicación en el desarrollo de productos farmacéuticos incluye, por ejemplo, una síntesis de vacuna contra el cáncer. Se sabe que cuando la célula se cancera, una cadena de azúcar que no está inicialmente existente en un cuerpo se expresa. También se sabe que cuando la cadena de azúcar se sintetiza químicamente y se administra a un individuo como una vacuna, la proliferación del cáncer se suprime. Por tanto, si puede prepararse una serie de la cadena de azúcar deseada según la presente invención, puede sintetizarse una vacuna eficaz en el tratamiento del cáncer. Por tanto, puede sintetizarse una vacuna novedosa derivatizando series de la cadena de azúcar obtenidas según la presente invención uniendo adicionalmente nuevos residuos de azúcar usando una combinación de una reacción química y una reacción de azúcar transferasa y similares.

20 Además, por ejemplo, la eritropoyetina (EPO), una glucoproteína, se ha usado como agente terapéutico para

5 una anemia debido a su capacidad proliferante de eritrocitos, pero se ha encontrado que la EPO no tiene ninguna actividad, a menos que la EPO tenga una cadena de azúcar unida a la misma. Como se ha descrito anteriormente, algunas proteínas presentan sus efectos fisiológicos sólo bajo la unión de cadenas de azúcar. Por tanto, por ejemplo, una glucoproteína novedosa que tiene un efecto fisiológico novedoso puede sintetizarse preparando una propia proteína en una gran cantidad en un sistema de expresión de *E. coli* sin unir la capacidad de una cadena de azúcar a la proteína, y posteriormente introducir en la proteína la cadena de azúcar que tiene una estructura de la cadena de azúcar deseada, que se prepara según la presente invención, dando una actividad fisiológica novedosa a la proteína, o introduciendo en una proteína dada las cadenas de azúcar que tienen diversas estructuras de la cadena de azúcar, que se preparan según la presente invención.

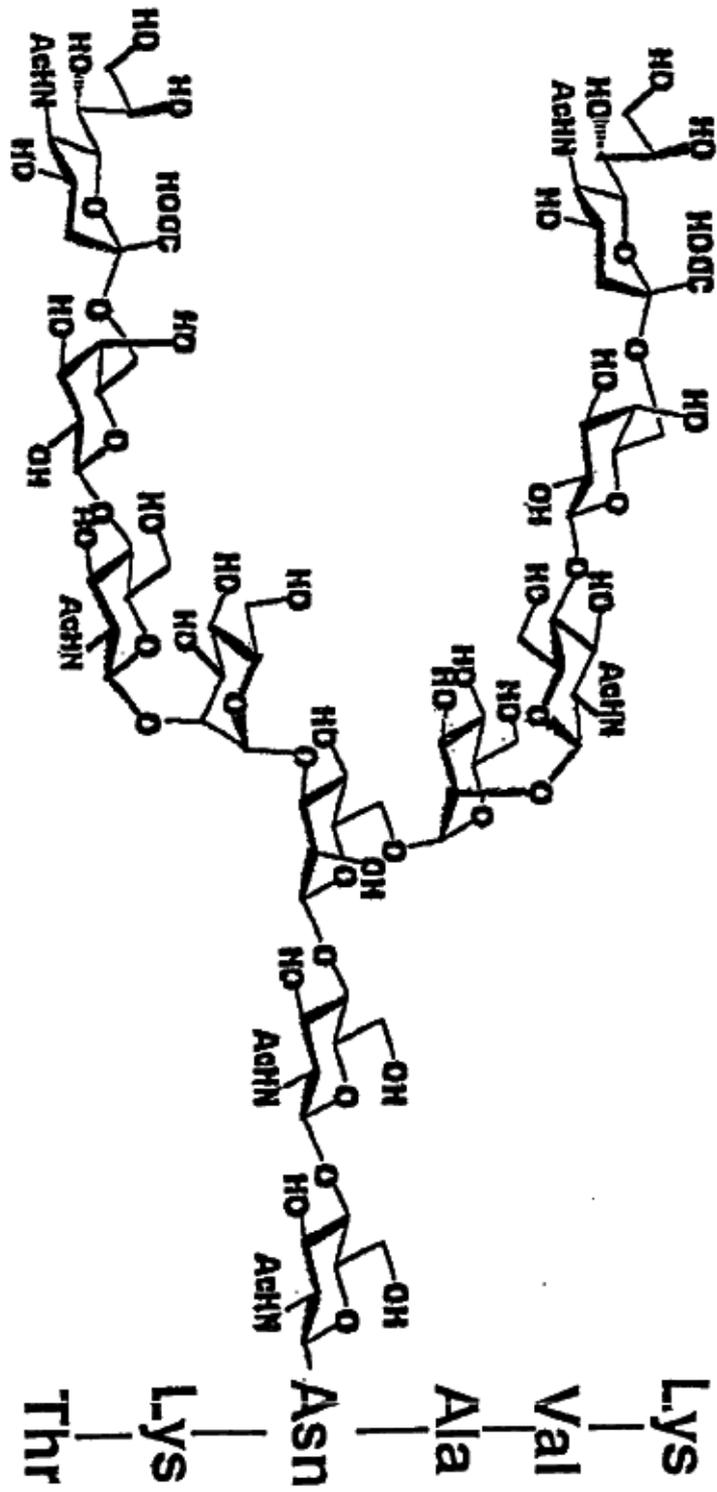
10 Además, puede conferirse una actividad fisiológica novedosa sustituyendo una cadena de azúcar que existe en una glucoproteína que se produce naturalmente con una cadena de azúcar preparada según la presente invención. Una técnica de sustituir una cadena de azúcar poseída por una glucoproteína con una cadena de azúcar obtenida según la presente invención incluye, por ejemplo, un procedimiento descrito en P. Sears y C. H. Wong, *Science*, 2001, vol. 291, pág. 2344-2350. En otras palabras, el procedimiento incluye un procedimiento para tratar una glucoproteína con una β -N-acetilglucosaminidasa (endo-H) para poner la glucoproteína en un estado en el que sólo un residuo de N-acetilglucosamina esté unido al residuo de asparagina sobre la superficie de la proteína, y posteriormente unir una cadena de azúcar deseada en la asparagina de la cadena de azúcar obtenida según la presente invención (por ejemplo, cada uno de los compuestos mostrados en la Figura 3 y la Figura 4) al residuo de N-acetilglucosamina descrito anteriormente con una β -N-acetilglucosaminidasa (endo-M). Alternativamente, puede llevarse a cabo un procedimiento de proporcionar un ARNt unido a N-acetilglucosamina, sintetizar una glucoproteína que tiene un residuo de N-acetilglucosamina utilizando, por ejemplo, un sistema de expresión de *E. coli* y después introducir una cadena de azúcar deseada en la asparagina de la cadena de azúcar obtenida según la presente invención en la glucoproteína con endo-M.

25 Además, el problema encontrado actualmente cuando una glucoproteína se utiliza como agente terapéutico incluye una rápida velocidad metabólica de la glucoproteína administrada. Esto es debido al hecho de que la glucoproteína es metabolizada por el hígado inmediatamente después de la eliminación del ácido siálico que existe en el extremo de la cadena de azúcar de la glucoproteína en un cuerpo vivo. Por tanto, es necesario que la glucoproteína se administre en una cierta dosis. En vista de lo anterior, si una cadena de azúcar se prepara según la presente invención, en la que el ácido siálico se introduce recientemente en un extremo de la cadena de azúcar de manera que sea menos eliminado, y la cadena de azúcar se introduce en una proteína diana con endo-M, la velocidad metabólica de la glucoproteína en un cuerpo vivo puede controlarse, de manera que la cantidad de la glucoproteína a administrar pueda ser reducida.

35 La presente invención se describirá más específicamente por medio de los ejemplos, sin pretender limitar la presente invención a estos ejemplos. Las fórmulas estructurales y los números para cada uno de los compuestos se muestran en las Figuras 1 a 6. Los datos de RMN ^1H se obtuvieron por la medición con HOD a 4,8 ppm a 30°C en los Ejemplos 1 a 7 y con una señal del grupo metilo de la acetona como patrón interno a 2,225 ppm y HOD a 4,718 ppm a 30°C en los Ejemplos 8 a 45. Por tanto, los compuestos de los que se han eliminado los grupos Fmoc se midieron en la co-existencia de un hidrogenocarbonato de amonio 50 mM en un disolvente de medida.

Ejemplo 1 Síntesis del compuesto 24

40 En 100 ml de un tampón de tris-ácido clorhídrico-cloruro de calcio (TRIZMA BASE 0,05 mol/l, cloruro de calcio 0,01 mol/l, pH 7,5) se disolvieron 2,6 g de una SGP bruta derivada de huevo (sialilglucopéptido). Se añadieron cincuenta y ocho miligramos (772 μmoles) de azida de sodio y 526 mg de actinasa-E (fabricada por Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.) a esta disolución, y la mezcla se dejó reposar a 37°C. Después de 65 horas se añadieron de nuevo 263 mg de actinasa-E, y la mezcla se dejó reposar a 37°C durante 24 horas adicionales. Esta disolución se liofilizó, y después el residuo se purificó dos veces por cromatografía en columna de filtración en gel (Sephadex G-25, 2,5 ϕ x 1 m, eluyente: agua, velocidad de flujo: 1,0 ml/min), dando 1,3 g (555 μmoles) de un compuesto deseado 24 mostrado en la Figura 3. La estructura de la cadena de azúcar contenida en SGP se muestra del siguiente modo.



Además, los datos físicos para el compuesto resultante 24 son del siguiente modo.

RMN ¹H (D₂O, 30°C)

5,15 (1H, s, Man4-H₁), 5,06 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4,95 (1H, s, Man4'-H₁), 4,82 (1H, s, Man3-H₁), 4,69 (1H, d, GlcNAc2-H₁),

5 4,67 (2H, d, GlcNAc5,5'-H₁), 4,53 (2H, d, Gal6,6'-H₁),

4,34 (1H, d, Man3-H₂), 4,27 (1H, d, Man4'-H₂), 4,19 (1H, d, Man4-H₂),

3,03 (1H, dd, Asn-βCH), 3,00 (1H, dd, Asn-βCH),

2,76 (2H, dd, NeuAc7,7'-H_{3eq}), 2,15 (18H, s x6, -Ac),

1,79 (2H, dd, NeuAc7,7'-H_{3ax})

10 Ejemplo 2 Síntesis de los compuestos 1, 2, 6 y 10

El compuesto 24 (609 mg, 261 μmoles) obtenido en el Ejemplo 1 se disolvió en 20,7 ml de agua, y a la misma se añadieron 13,8 ml de ácido clorhídrico 0,1 N. Inmediatamente después de calentar esta disolución a 70°C durante 35 minutos, la disolución se enfrió sobre hielo, y a la misma se añadió un hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado para ajustar su pH a 7. La disolución se liofilizó, y después el residuo se purificó por cromatografía en columna de filtración en gel (Sephadex G-25, 2,5 φ x 1 m, eluyente: agua, velocidad de flujo: 1,0 ml/min), dando 534 mg de una mezcla de un compuesto 24, compuestos 25 y 29 y un compuesto 33 cada uno mostrado en la Figura 3. Estos cuatro componentes se pasaron a la siguiente etapa sin aislarse entre sí.

15

Los datos físicos para la mezcla de cadenas de azúcar resultante son del siguiente modo. RMN ¹H (D₂O, 30°C)

5,13 (s, Man4-H₁), 5,12 (s, Man4-H₁), 5,01 (d, GlcNAc1-H₁),

20 4,94 (s, Man4'-H₁), 4,93 (s, Man4'-H₁), 4,82 (s, Man3-H₁),

4,60 (d, GlcNAc2-H₁), 4,58 (d, GlcNAc5,5'-H₁), 4,47 (dd, Gal6,6'-H₁),

4,44 (d, Gal6,6'-H₁), 4,24 (d, Man3-H₂), 4,19 (d, Man4'-H₂),

4,11 (d, Man4-H₂), 2,97 (dda, Asn-βCH), 2,72 (dd, NeuAc7-H_{3eq}, NeuAc7'-H_{3eq}), 2,64 (dda, Asn-βCH), 2,15 (s x5, -Ac), 1,79 (dd, NeuAc7-H_{3ax}, NeuAc7'-H_{3ax})

25

Cuatrocientos veintinueve miligramos de la mezcla de la cadena de azúcar resultante se disolvieron en 16,3 ml de acetona y 11,2 ml de agua. A esta disolución se añadieron carbonato de 9-fluorenil-metil-N-succinimidilo (155,7 mg, 461,7 μmoles) e hidrogenocarbonato de sodio (80,4 mg, 957 μmoles), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Esta disolución se aplicó a un evaporador para eliminar acetona, y la disolución restante se purificó por cromatografía en columna de filtración en gel (Sephadex G-25, 2,5 φ x 1 m, eluyente: agua, velocidad de flujo: 1,0 ml/min), dando 309 mg de una mezcla de un compuesto 1, compuestos 2 y 6 y un compuesto 10 cada uno mostrado en la Figura 1. Esta mezcla se purificó por HPLC (columna ODS, eluyente: acetato de amonio acuoso 50 mM : metanol = 65:35, 2,0 φ x 25 cm, velocidad de flujo: 3 ml/min). Como resultado, el compuesto 1 se eluyó después de 51 minutos, una mezcla de los compuestos 2 y 6 se eluyó después de 67 minutos y el compuesto 10 se eluyó después de 93 minutos. Cada una de las fracciones se recogieron y se liofilizaron, y después se desalaron por cromatografía en columna de filtración en gel (Sephadex G-25, 2,5 φ x 30 cm, eluyente: agua, velocidad de flujo: 1,0 ml/min), dando así 150 mg de una mezcla deseada de los compuestos 2 y 6.

30

35

Los datos físicos para el compuesto resultante 1 son del siguiente modo.

RMN ¹H (D₂O, 30°C)

7,99 (2H, d, Fmoc), 7,79 (2H, d, Fmoc), 7,55 (4H, m, Fmoc),

40 5,15 (1H, s, Man4-H₁), 5,06 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4,95 (1H, s, Man4'-H₁),

4,82 (1H, s, Man3-H₁), 4,69 (1H, d, GlcNAc2-H₁), 4,67 (2H, d, GlcNAc5,5'-H₁),

4,53 (2H, d, Gal6,6'-H₁), 4,34 (1H, d, Man3-H₂), 4,27 (1H, d, Man4'-H₂),

4,19 (1H, d, Man4-H₂), 3,03 (1H, dda, Asn-βCH), 3,00 (1H, dda, Asn-βCH),

2,76 (2H, dd, NeuAc7,7'-H_{3eq}), 2,15 (18H, s x6, -Ac),

45 1,79 (2H, dd, NeuAc7,7'-H_{3ax}); HRMS Calcd para C₁₀₃H₁₅₄N₈NaO₆₆[M+Na⁺] 2581,8838, hallada 2581,8821.

Los datos físicos para la mezcla resultante de los compuestos 2 y 6 son del siguiente modo.

RMN ¹H (D₂O, 30°C)

7,99 (d, Fmoc), 7,79 (d, Fmoc), 7,55 (m, Fmoc), 5,14 (s, Man4-H₁),

5,12 (s, Man4-H), 5,00 (d, GlcNAc1-H₁), 4,94 (s, Man4'-H₁),

4,93 (s, Man4'-H₁), 4,82 (s, Man3-H₁), 4,60 (d, GlcNAc2-H₁),
 4,58 (d, GlcNAc5,5'-H₁), 4,46 (dd, Gal6,6'-H₁), 4,44 (d, Gal6,6'-H₁),
 4,24 (d, Man3-H₂), 4,19 (d, Man4'-H₂), 4,11 (d, Man4-H₂),
 2,97 (dda, Asn-βCH), 2,72 (dd, NeuAc7-H_{3eq}, NeuAc7-H_{3eq}),
 5 2,64 (dda, Asn-βCH), 2,15 (s x5, -Ac), 1,79 (dd, NeuAc7-H_{3ax}, NeuAc7'-H_{3ax})

Los datos físicos para el compuesto resultante 10 son del siguiente modo.

RMN ¹H (D₂O, 30°C)

7,99 (2H, d, Fmoc), 7,79 (2H, d, Fmoc), 7,55 (4H, m, Fmoc),

5,12 (1H, s, Man4-H₁), 5,06 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4,93 (1H, s, Man4'-H₁),

10 4,82 (1H, s, Man3-H₁), 4,69 (1H, d, GlcNAc2-H₁), 4,67 (2H, d, GlcNAc5-5'-H₁),

4,53 (2H, d, Gal6,6'-H₁), 4,34 (1H, d, Man3-H₂), 4,27 (1H, d, Man4'-H₂),

4,19 (1H, d, Man4-H₂), 3,03 (1H, dda, Asn-βCH), 3,00 (1H, dda, Asn-βCH),

2,15 (12H, s x4, -Ac); HRMS Calcd para C₈₁H₁₂₀N₆NaO₅₀[M+Na⁺] 1999,6930, hallada 1999,6939.

Ejemplo 3 Síntesis de los compuestos 3 y 7

15 La mezcla (224 mg, 97 μmoles) de los compuestos 2 y 6 obtenida en el Ejemplo 2 y 24 mg de albúmina de suero bovino se disolvieron en 22 ml de tampón HEPES (50 mM, pH 6,0), y a la misma se añadió β-galactosidasa derivada de *Diplococcus pneumoniae* (1,35 U). Esta disolución se dejó reposar a 37°C durante 15 horas, y después se liofilizó. El residuo se purificó por HPLC (columna ODS, 2,0 φ × 25 cm, eluyente: acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 85 : 15, velocidad de flujo: 3 ml/min), y un compuesto 3 mostrado en la Figura 2 se eluyó después de 129 minutos, y un compuesto 7 se eluyó después de 134 minutos. Cada una de las fracciones se recogió y se liofilizó. Posteriormente, la fracción se desaló por HPLC (columna ODS, 2,0 φ × 25 cm, eluyente: agua durante los primeros 15 minutos, y se aplicó a un gradiente de agua : acetonitrilo de 10:0 a 85:15 (relación de volumen) durante un periodo de 16 a 30 minutos, y luego a un gradiente de agua : acetonitrilo de 85:15 a 80:20 durante un periodo de 31 a 45 minutos; velocidad de flujo: 3,0 ml/min), dando un compuesto deseado 3 en una cantidad de 81 mg y un compuesto 7 en una cantidad de 75 mg.

Los datos físicos para el compuesto resultante 3 son del siguiente modo.

RMN ¹H (D₂O, 30°C)

7,99 (2H, d, Fmoc), 7,79 (2H, d, Fmoc), 7,55 (4H, m, Fmoc),

5,15 (1H, s, Man4-H₁), 5,06 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4,95 (1H, s, Man4'-H₁),

30 4,82 (1H, s, Man3-H₁), 4,69 (1H, d, GlcNAc2-H₁), 4,67 (2H, d, GlcNAc5,5'-H₁),

4,53 (1H, d, Gal6'-H₁), 4,34 (1H, d, Man3-H₂), 4,27 (1H, d, Man4'-H₂),

4,19 (1H, d, Man4-H₂), 2,97 (1H, dda, Asn-βCH), 2,76 (1H, dd, NeuAc7'-H_{3eq}),

2,61 (1H, dda, Asn-βCH), 2,15 (15H, s x5, -Ac), 1,79 (1H, dd, NeuAc7'-H_{3ax});

HRMS Calcd para C₈₆H₁₂₇N₇NaO₅₃ [M+Na⁺] 2128,7356, hallada 2128,7363.

35 Los datos físicos para el compuesto resultante 7 son del siguiente modo. RMN ¹H (D₂O, 30°C)

7,99 (2H, d, Fmoc), 7,79 (2H, d, Fmoc), 7,55 (4H, m, Fmoc),

5,15 (1H, s, Man4-H₁), 5,06 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4,95 (1H, s, Man4'-H₁),

4,82 (1H, s, Man3-H₁), 4,69 (1H, d, GlcNAc2-H₁), 4,67 (2H, d, GlcNAc5,5'-H₁),

4,53 (1H, d, Gal6-H₁), 4,34 (1H, d, Man3-H₂), 4,27 (1H, d, Man4'-H₂),

40 4,19 (1H, d, Man4-H₂), 2,97 (1H, dda, Asn-βCH), 2,76 (1H, dd, NeuAc7-H_{3eq}),

2,60 (1H, b dd, Asn-βCH), 2,15 (15H, s x5, -Ac), 1,79 (1H, dd, NeuAc7-H_{3ax});

HRMS Calcd para C₈₆H₁₂₅N₇Na₃O₅₃[M+Na⁺] 2172,6995, hallada 2172,7084.

Ejemplo 4 Síntesis de los compuestos 4 y 8

45 Una mezcla (90 mg, 47,3 μmoles) de los compuestos 3 y 7 obtenida en el Ejemplo 3 se disolvió en 8,1 ml de tampón HEPES (50 mM, pH 6,0) junto con 8 mg de albúmina de suero bovino sin separar los compuestos entre sí, y a la

- 5 misma se añadieron 2,88 U de una β -glucosaminidasa derivada de riñón bovino (fabricada por Sigma-Aldrich Corporation, de riñón bovino). Esta disolución se dejó reposar a 37°C durante 18 horas, y después se liofilizó. El residuo se purificó por HPLC (columna ODS, 2,0 ϕ \times 25 cm, eluyente: acetato de amonio acuoso 50 mM : metanol = 65:35, velocidad de flujo: 3 ml/min), y un compuesto 4 mostrado en la Figura 2 se eluyó después de 117 minutos, y un compuesto 8 se eluyó después de 127 minutos. Cada una de las fracciones se recogió y se liofilizó. Posteriormente, la fracción se desaló por HPLC (columna ODS, 2,0 ϕ \times 25 cm, eluyente: agua durante los primeros 15 minutos, y se aplicó a un gradiente de agua : acetonitrilo de 10:0 a 85:15 durante un periodo de 16 a 30 minutos, y luego a un gradiente de agua : acetonitrilo de 85:15 a 80:20 durante un periodo de 31 a 45 minutos; velocidad de flujo: 3,0 ml/min), dando un compuesto deseado 4 en una cantidad de 40 mg y un compuesto 8 en una cantidad de 37 mg.
- 10 Los datos físicos para el compuesto resultante 4 son del siguiente modo.
- RMN ^1H (D_2O , 30°C)
- 8,01 (2H, d, Fmoc), 7,80 (2H, d, Fmoc), 7,56 (4H, m, Fmoc),
 5,22 (1H, s, Man4'-H₁), 5,08 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4,94 (1H, s, Man4'-H₁),
 4,84 (1H, s, Man3-H₁), 4,69 (1H, d, GlcNAc2-H₁), 4,67 (1H, d, GlcNAc5-H₁),
 15 4,55 (1H, d, Gal6-H₁), 4,33 (1H, dd, Man3-H₂), 4,20 (1H, dd, Man4'-H₂),
 4,15 (1H, dd, Man4'-H₂), 2,97 (1H, dda, Asn- β CH),
 2,76 (2H, dd, NeuAc7,7'-H_{3eq}), 2,62 (1H, dda, Asn- β CH), 2,15 (12H, s x4, -Ac),
 1,79 (2H, dd, NeuAc7, 7'-H_{3ax}); HRMS Calcd para C₇₈H₁₁₄N₆NaO₄₈[M+Na⁺]
 1925,6562, hallada 1925,6539.
- 20 Los datos físicos para el compuesto resultante 8 son del siguiente modo.
- RMN ^1H (D_2O , 30°C)
- 7,99 (2H, d, Fmoc), 7,79 (2H, d, Fmoc), 7,55 (4H, m, Fmoc),
 5,15 (1H, s, Man4'-H₁), 5,06 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4,95 (1H, s, Man4'-H₁),
 4,82 (1H, s, Man3-H₁), 4,69 (1H, d, GlcNAc2-H₁), 4,67 (2H, d, GlcNAc5,5'-H₁),
 25 4,53 (2H, d, Gal6,6'-H₁), 4,34 (1H, d, Man3-H₂), 4,27 (1H, d, Man4'-H₂),
 2,97 (1H, dda, Asn- β CH₂), 2,76 (1H, dd, NeuAc7'-H_{3eq}),
 2,61 (1H, dda, Asn- β CH₂), 2,15 (12H, s x4, -Ac),
 1,79 (1H, dd, NeuAc7'-H_{3ax}); HRMS Calcd para C₇₈H₁₁₄N₆NaO₄₈[M+Na⁺]
 1925,6562, hallada 1925,6533.
- 30 Ejemplo 5 Síntesis del compuesto 5
- El compuesto 4 (30 mg, 473 μ moles) obtenido en el Ejemplo 4 y 3 mg de albúmina de suero bovino se disolvió en 6 ml de tampón HEPES (50 mM, pH 6,0), y a la misma se añadieron 10 U de α -manosidasa derivada de Jack Beans. Esta disolución se dejó reposar a 37°C durante 21 horas, y luego se liofilizó. Posteriormente, el residuo se purificó por HPLC (columna ODS, 2,0 ϕ \times 25 cm, eluyente: agua durante los primeros 15 minutos, y se aplicó a un gradiente de agua : acetonitrilo de 10:0 a 85:15 durante un periodo de 16 a 30 minutos, y luego a un gradiente de agua : acetonitrilo de 85:15 a 80:20 durante un periodo de 31 a 45 minutos; velocidad de flujo: 3,0 ml/min), dando 20 mg de un compuesto deseado 5 mostrado en la Figura 1.
- 35 Los datos físicos para el compuesto resultante 5 son del siguiente modo.
- RMN ^1H (D_2O , 30°C)
- 40 8,01 (2H, d, Fmoc), 7,80 (2H, d, Fmoc), 7,56 (4H, m, Fmoc),
 5,00 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4,95 (1H, s, Man4'-H₁), 4,84 (1H, s, Man3-H₁),
 4,67 (1H, d, GlcNAc2-H₁), 4,56 (1H, d, GlcNAc5-H₁), 4,44 (1H, d, Gal6-H₁),
 4,11 (1H, dd, Man4'-H₂), 4,07 (1H, dd; Man3-H₂), 2,97 (1H, dda, Asn- β CH),
 2,76 (1H, dd, NeuAc7'-H_{3eq}), 2,62 (1H, dda, Asn- β CH), 2,15 (12H, s x4, -Ac),
 45 1,79 (2H, dd, NeuAc7'-H_{3ax}); HRMS Calcd para C₇₂H₁₀₄N₆NaO₄₃[M+Na⁺]
 1763,6034, hallada 1763,6074.

Ejemplo 6 Síntesis del compuesto 9

5 El compuesto 8 (40 mg, 630 μ moles) obtenido en el Ejemplo 4 y 5 mg de albúmina de suero bovino se disolvieron en 7,8 ml de tampón HEPES (50 mM, pH 6,0), y a la misma se añadieron 38 U de una α -manosidasa derivada de Jack Beans. Esta disolución se dejó reposar a 37°C durante 63 horas, y luego se liofilizó. Posteriormente, el residuo se purificó por HPLC (columna ODS, 2,0 ϕ \times 25 cm, eluyente: agua durante los primeros 15 minutos, y se aplicó a un gradiente de agua : acetonitrilo de 10:0 a 85:15 durante un periodo de 16 a 30 minutos, y luego a un gradiente de agua : acetonitrilo de 85:15 a 80:20 durante un periodo de 31 a 45 minutos; velocidad de flujo: 3,0 ml/min), dando 30 mg de un compuesto deseado 9.

Los datos físicos para el compuesto resultante 9 son del siguiente modo.

10 RMN ^1H (D_2O , 30°C)

8,01 (2H, d, Fmoc), 7,80 (2H, d, Fmoc), 7,56 (4H, m, Fmoc),
5,23 (1H, s, Man4-H₁), 5,08 (1H, d, GlcNAc1-H₁), 4,53 (1H, d, Gal6-H₁),
4,32 (1H, dd, Man3-H₂), 4,28 (1H, dd, Man4-H₂), 2,81 (1H, dda, Asn- β CH),
2,76 (1H, dd, NeuAc7-H_{3eq}), 2,59 (1H, dda, Asn- β CH), 2,13 (12H, s x4, -Ac),

15 1,80 (1H, dd, NeuAc7H_{3ax}) ; HRMS Calcd para $\text{C}_{72}\text{H}_{104}\text{N}_6\text{NaO}_{43}[\text{M}+\text{Na}^+]$
1763,6034, hallada 1763,6041.

Ejemplo 7 Desprotección del grupo Fmoc (síntesis del compuesto 33)

20 El compuesto 10 (10,5 mg, 5,27 μ moles) obtenido en el Ejemplo 2 se disolvió en 1,4 ml de una disolución al 50% de morfolina/N,N-dimetilformamida, y la disolución se hizo reaccionar durante 2 horas bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente. Se añadieron tres mililitros de tolueno a esta disolución, y la mezcla se aplicó a un evaporador a 35°C. Los procedimientos se repitieron tres veces para eliminar el disolvente de reacción. El residuo se purificó por cromatografía en columna de filtración en gel (Sephadex G-25, 2,5 ϕ \times 30 cm, eluyente: agua, velocidad de flujo: 1,0 ml/min), dando 7 mg de un compuesto deseado 33 mostrado en la Figura 3 (rendimiento: 76%). La estructura del compuesto resultante se confirmó a partir del hallazgo de que su espectro de RMN ^1H era idéntico al del compuesto resultante 33 del Ejemplo 2.

Los datos físicos para el compuesto resultante 33 son del siguiente modo.

RMN ^1H (30°C)

8,12 (s, 1H, Man4-H-1), 5,07 (d, 1H, $J = 9,7$ Hz, GlcNAc1-H-1),
4,92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4,76 (s, 1H, Man3-H-1),
30 4,62 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, GlcNAc2-H-1),
4,58 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz, GlcNAc5,5'-H-1), 4,47 (d, 2H, $J = 7,9$ Hz, Gal6,6'-H-1),
4,24 (da, 1H, Man3-H-2), 4,19 (dda, 1H, $J = 3,2$ Hz, 1,4 Hz, Man4'-H-2),
4,12 (dda, 1H, $J = 3,2$ Hz, 1,4 Hz, Man4-H-2),
2,93 (dd, 1H, $J = 4,5$ Hz, 17,0 Hz, Asn- β CH),

35 2,93 (dd, 1H, $J = 6,8$ Hz, 17,0 Hz, Asn- β CH), 2,08 (s, 3H, Ac), 2,05 (s, 6H, Acx2), 2,01 (s, 3H, Ac)

Ejemplo 8 Síntesis del compuesto 14

40 El compuesto 3 (28 mg, 21,3 μ moles) y 1,0 mg de albúmina de suero bovino se disolvieron en tampón HEPES (50 mM, pH 5,0, 454 μ l), y a la misma se añadió neuraminidasa (fabricada por Sigma-Aldrich Corporation, de *Vibrio cholerae*, 198 mU). Esta disolución se dejó reposar a 37°C durante 20 horas, y después la finalización de la reacción se confirmó por análisis de HPLC. La disolución de reacción se purificó por HPLC (columna empaquetada de YMC D-ODS-5 S-5 120A ODS n° 2020178, 20 \times 250 mm, eluyente: acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 80:20, velocidad de flujo: 4 ml/min). Además, el residuo se desaló sobre columna ODS (Cosmosil 75C₁₈-OPN, 15 \times 100 mm, se eluyó primero con 50 ml de H₂O y luego con 25% de acetonitrilo), dando un compuesto deseado 14 (17 mg, rendimiento: 70%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

45 RMN ^1H (30°C)

8,71 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc), 7,71 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc),
7,51 (dd, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc), 7,43 (dd, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc),
5,12 (s, 1H, Man4-H-1), 4,99 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, GlcNAc1-H-1),
4,92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4,76 (s, 1H, Man3-H-1),

4,58 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, GlcNAc2-H-1), 4,55 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, GlcNAc5'-H-1),

4,47 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, Gal6'-H-1), 4,34 (t, 1H, Fmoc),

4,24 (da, 1H, $J = 1,9$ Hz, Man3-H-2),

4,18 (dda, 1H, $J = 1,4$ Hz, 3,3 Hz, Man4-H-2),

5 4,11 (dda, 1H, $J = 1,4$ Hz, 3,5 Hz, Man4'-H-2),

2,72 (dda, 1H, $J = 3,0$ Hz, 15,7 Hz, Asn- β CH),

2,52 (dda, 1H, $J = 8,7$ Hz, 15,7 Hz, Asn- β CH),

2,06, 2,05, 2,04, 1,89 (cada uno s, cada uno 3H, Ac); HRMS Calcd para

$C_{75}H_{110}N_6NaO_{45}[M+Na^+]$ 1837,6402, hallada 1837,6471.

10 Ejemplo 9 Síntesis del compuesto 19

El compuesto 7 (20 mg, 9,4 μ moles) y 1,6 mg de albúmina de suero bovino se disolvieron en tampón HEPES (50 mM, pH 5,0, 323 μ l), y a la misma se añadió neuraminidasa (fabricada por Sigma-Aldrich Corporation, de *Vibrio cholerae*, 141 mU). Esta disolución se dejó reposar a 37°C durante 18 horas, y después la finalización de la reacción se confirmó por análisis de HPLC. Posteriormente, la disolución de reacción se purificó por HPLC (columna empaquetada de YMC D-ODS-5 S-5 120A ODS n° 2020178, 20 \times 250 mm, eluyente: acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 80:20, velocidad de flujo: 4 ml/min). Además, el residuo se desaló sobre una columna ODS (Cosmosil 75C₁₈-OPN, 15 \times 100 mm, se eluyó primero con 50 ml de H₂O y luego con 25% de acetonitrilo), dando un compuesto deseado 19 (13 mg, rendimiento: 76%). La estructura del compuesto resultante se confirmó a partir del hallazgo de que su RMN ¹H era idéntica a la de la preparación.

20 Ejemplo 10 Síntesis del compuesto 15

El compuesto 4 (45 mg, 24 μ moles) y 1,7 mg de albúmina de suero bovino se disolvieron en tampón HEPES (50 mM, pH 5,0, 820 μ l), y a la misma se añadió neuraminidasa (fabricada por Sigma-Aldrich Corporation, de *Vibrio cholerae*, 134 mU). Esta disolución se dejó reposar a 37°C durante 14 horas, y después la finalización de la reacción se confirmó por análisis de HPLC. Posteriormente, la disolución de reacción se purificó por HPLC (columna empaquetada de YMC D-ODS-5 S-5 120A ODS n° 2020178, 20 \times 250 mm, eluyente: acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 80:20, velocidad de flujo: 4 ml/min). Además, el residuo se desaló sobre una columna ODS (Cosmosil 75C₁₈-OPN, 15 \times 100 mm, se eluyó primero con 50 ml de H₂O y luego con 25% de acetonitrilo), dando un compuesto deseado 15 (28 mg, rendimiento: 74%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN ¹H (30°C)

30 δ 7,92 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc), 7,71 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc),

7,51 (dd, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc), 7,44 (dd, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc),

5,10 (s, 1H, Man4-H-1), 4,99 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, GlcNAc1-H-1),

4,92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4,76 (s, 1H, Man3-H-1), 4,58 (d, 2H, GlcNAc2,5'-H-1),

4,47 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, Gal6'-H-1), 4,35 (t, 1H, Fmoc),

35 4,24 (da, 1H, $J = 1,9$ Hz, Man3-H-2), 4,11 (sa, 1H, Man4'-H-2),

4,07 (sa, 1H, Man4-H-2), 2,72 (da, 1H, $J = 15,5$ Hz, Asn- β CH),

2,52 (dda, 1H, $J = 8,7$ Hz, 15,5 Hz, Asn- β CH),

2,06, 2,04, 1,89 (cada uno s, cada uno 3H, Ac); HRMS Calcd para

$C_{67}H_{97}N_5NaO_{40}[M+Na^+]$ 1634,5608, hallada 1634,5564

40 Ejemplo 11 Síntesis del compuesto 70

El compuesto 15 (11 mg, 6,8 μ moles) y 1,5 mg de albúmina de suero bovino se disolvieron en tampón HEPES (50 mM, pH 5,0, 269 μ l), y a la misma se añadió β -galactosidasa (fabricada por Seikagaku Corporation, de Jack Beans, 11 μ l, 275 mU). Esta disolución se dejó reposar a 37°C durante 14 horas, y después la finalización de la reacción se confirmó por análisis de HPLC. La disolución de reacción se purificó por HPLC (columna empaquetada de YMC D-ODS-5 S-5 120A ODS n° 2020178, 20 \times 250 mm, eluyente: acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 80:20, velocidad de flujo: 4 ml/min). Además, el residuo se desaló sobre una columna ODS (Cosmosil 75C₁₈-OPN, 15 \times 100 mm, se eluyó primero con 50 ml de H₂O y luego con 25% de acetonitrilo), dando un compuesto deseado 70 (6,3 mg, rendimiento: 64%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN ¹H (30°C)

50 δ 7,91 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc), 7,70 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc),

7,50 (dd, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc), 7,43 (dd, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc),
 5,10 (s, 1H, Man4-H-1), 4,99 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, GlcNAc1-H-1),
 4,91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4,76 (s, 1H, Man3-H-1), 4,55 (d, 2H, GlcNAc2,5'-H-1),
 4,32 (t, 1H, Fmoc), 4,24 (sa, 1H, Man3-H-2), 4,10 (sa, 1H, Man4-H-2),
 5 4,06 (sa, 1H, $J = 1,3$ Hz, Man4'-H-2), 2,72 (da, 1H, $J = 14,0$ Hz, Asn- β CH),
 2,52 (dda, 1H, $J = 9,5$ Hz, 14,8 Hz, Asn- β CH),
 2,06, 2,05, 1,89 (cada uno s, cada uno 3H, Ac); EM(Fab) Calcd para
 $C_{61}H_{88}N_5O_{35}[M+H^+]$ 1450,5, hallada 1450,4.

Ejemplo 12 Síntesis del compuesto 20

10 El compuesto 8 (47 mg, 25 μ moles) y 1,9 mg de albúmina de suero bovino se disolvieron en tampón HEPES
 (50 mM, pH 5,0, 840 μ l), y a la misma se añadió neuraminidasa (fabricada por Sigma-Aldrich Corporation, de *Vibrio*
 15 *cholerae*, 369 mU). Esta disolución se dejó reposar a 37°C durante 37 horas, y después la finalización de la reacción se
 confirmó por análisis de HPLC. La disolución de reacción se liofilizó, y el producto liofilizado se purificó posteriormente
 por HPLC (columna empaquetada de YMC D-ODS-5 S-5 120A ODS n° 2020178, 20 \times 250 mm, eluyente: acetato de
 amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 80:20, velocidad de flujo: 4 ml/min). Además, el residuo se desaló sobre una
 columna ODS (Cosmosil 75C₁₈-OPN, 15 \times 100 mm, se eluyó primero con 50 ml de H₂O y luego con 25% de
 acetonitrilo), dando un compuesto deseado 20 (26 mg, rendimiento: 65%). Los datos físicos para el compuesto
 resultante son del siguiente modo. RMN ¹H (30°C)

δ 7,92 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc), 7,71 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc),

20 7,51 (dd, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc), 7,43 (dd, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc),
 5,12 (s, 1H, Man4-H-1), 4,99 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, GlcNAc1-H-1),
 4,91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4,77 (s, 1H, Man3-H-1), 4,57 (da, 2H, GlcNAc2,5'-H-1),
 4,46 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, Gal6'-H-1), 4,34 (t, 3H, Fmoc), 4,24 (sa, 1H, Man4'-H-2),
 4,19 (sa, 1H, Man4-H-2), 2,72 (da, 1H, $J = 15,5$ Hz, Asn- β CH),
 25 2,52 (dda, 1H, $J = 9,2$ Hz, 15,5 Hz, Asn- β CH),
 2,06, 2,05, 1,89 (cada uno s, cada uno 3H, Ac); HRMS Calcd para
 $C_{67}H_{97}N_5NaO_{40}[M+Na^+]$ 1634,5608, hallada 1634,5644.

Ejemplo 13 Síntesis del compuesto 71

30 El compuesto 20 (12 mg, 7,4 μ moles) y 1,0 mg de albúmina de suero bovino se disolvieron en tampón HEPES
 (50 mM, pH 5,0, 330 μ l), y a la misma se añadió β -galactosidasa (fabricada por Seikagaku Corporation, de Jack Beans,
 12 μ l, 297 mU). Esta disolución se dejó reposar a 37°C durante 46 horas, y después la finalización de la reacción se
 35 confirmó por análisis de HPLC. La disolución de reacción se purificó por HPLC (columna empaquetada de YMC D-ODS-
 5 S-5 120A ODS n° 2020178, 20 \times 250 mm, eluyente: acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 80:20, velocidad
 de flujo: 4 ml/min). Además, el residuo se desaló sobre una columna ODS (Cosmosil 75C₁₈-OPN, 15 \times 100 mm, se
 eluyó primero con 50 ml de H₂O y luego con 25% de acetonitrilo), dando un compuesto deseado 71 (6,6 mg,
 rendimiento: 61%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN ¹H (30°C)

δ 7,90 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc), 7,70 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc),

7,49 (dd, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc), 7,42 (dd, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc),

40 5,11 (s, 1H, Man4-H-1), 4,99 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, GlcNAc1-H-1),
 4,91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4,76 (s, 1H, Man3-H-1), 4,55 (d, 2H, GlcNAc2,5-H-1),
 4,31 (a, 1H, Fmoc), 4,24 (sa, 1H, Man3-H-2), 4,18 (sa, 1H, Man4-H-2),
 3,97 (dd, 1H, $J = 1,8$ Hz, 3,3 Hz, Man4'-H-2),
 2,72 (da, 1H, $J = 15,5$ Hz, Asn- β CH),
 45 2,52 (dda, 1H, $J = 8,0$ Hz, 15,5 Hz, Asn- β CH),
 2,06, 2,05, 1,88 (cada uno s, cada uno 3H, Ac); EM(Fab) Calcd para
 $C_{61}H_{88}N_5O_{35}[M+H^+]$ 1450,5, hallada 1450,3

Ejemplo 14 Síntesis del compuesto 16

5 El compuesto 5 (32 mg, 18,4 μ moles) y 2,5 mg de albúmina de suero bovino se disolvieron en tampón HEPES (50 mM, pH 5,0, 713 μ l), y a la misma se añadió neuraminidasa (fabricada por Sigma-Aldrich Corporation, de *Vibrio cholerae*, 134 mU). Esta disolución se dejó reposar a 37°C durante 17 horas, y después la finalización de la reacción se confirmó por análisis de HPLC. Posteriormente, la disolución de reacción se purificó por HPLC (columna empaquetada de YMC D-ODS-5 S-5 120A ODS n° 2020178, 20 \times 250 mm, eluyente: acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 80:20, velocidad de flujo: 4 ml/min). Además, el residuo se desaló sobre una columna ODS (Cosmosil 75C₁₈-OPN, 15 \times 100 mm, se eluyó primero con 50 ml de H₂O y luego con 25% de acetonitrilo), dando un compuesto deseado 16 (13 mg, rendimiento: 52%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

10 RMN ¹H (30°C)
 δ 7,92 (d, 2H, J = 7,5 Hz, Fmoc), 7,71 (d, 2H, J = 7,5 Hz, Fmoc),
 7,51 (dd, 2H, J = 7,5 Hz, Fmoc), 7,44 (dd, 2H, J = 7,5 Hz, Fmoc),
 5,00 (d, 1H, J = 9,9 Hz, GlcNAc1-H-1), 4,92 (s, 1H, Man4'-H-1),
 4,75 (s, 1H, Man3-H-1), 4,58 (d, 2H, J = 7,5 Hz, GlcNAc2,5'-H-1),
 15 4,47 (d, 1H, J = 7,8 Hz, Gal6'-H-1), 4,34 (t, 1H, Fmoc), 4,10 (da, 1H, Man3-H-2),
 4,07 (sa, 1H, Man4'-H-2), 2,72 (dda, 1H, J = 15,5 Hz, Asn- β CH),
 2,52 (dda, 1H, J = 9,2 Hz, 15,5 Hz, Asn- β CH),
 2,07, 2,05, 1,89 (cada uno s, cada uno 3H, Ac); EM(Fab) Calcd para C₆₁H₈₈N₅O₃₅[M+H⁺]
 1450,5, hallada 1450,3.

Ejemplo 15 Síntesis del compuesto 17

25 El compuesto 16 (9 mg, 6,2 μ moles) y 1,6 mg de albúmina de suero bovino se disolvieron en tampón HEPES (50 mM, pH 5,0, 613 μ l), y a la misma se añadió β -galactosidasa (fabricada por Seikagaku Corporation, de Jack Beans, 186 mU). Esta disolución se dejó reposar a 37°C durante 32 horas, y después la finalización de la reacción se confirmó por análisis de HPLC. La disolución de reacción se purificó por HPLC (columna empaquetada de YMC D-ODS-5 S-5 120A ODS n° 2020178, 20 \times 250 mm, eluyente: acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 80:20, velocidad de flujo: 4 ml/min). Además, el residuo se desaló sobre una columna ODS (Cosmosil 75C₁₈-OPN, 15 \times 100 mm, se eluyó primero con 50 ml de H₂O y luego con 25% de acetonitrilo), dando un compuesto deseado 17 (5,4 mg, rendimiento: 68%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo. RMN ¹H (30°C)

30 δ 7,89 (d, 2H, J = 7,5 Hz, Fmoc), 7,68 (d, 2H, J = 7,5 Hz, Fmoc),
 7,49 (dd, 2H, J = 7,5 Hz, Fmoc), 7,42 (dd, 2H, J = 7,5 Hz, Fmoc),
 4,99 (d, 1H, J = 9,7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4,91 (s, 1H, Man4'-H-1),
 4,55 (d, 1H, J = 8,1 Hz, GlcNAc2,5'-H-1),
 4,09, 4,07 (s, 1H, Man4'-H-2, Man3-H-2), 2,72 (da, 1H, J = 15,5 Hz Asn- β CH),
 2,56 (dda, 1H, J = 8,1 Hz, 15,5 Hz, Asn- β CH),
 35 2,07, 2,05, 1,89 (cada uno s, cada uno 3H, Ac); EM(Fab) Calcd para
 C₅₅H₇₇N₅NaO₃₀[M+Na⁺] 1310,5, hallada 1310,2

Ejemplo 16 Síntesis del compuesto 18

40 El compuesto 17 (3,4 mg, 2,6 μ moles) y 1,1 mg de albúmina de suero bovino se disolvieron en tampón HEPES (50 mM, pH 5,0, 257 μ l), y a la misma se añadió N-acetil- β -D-glucosaminidasa (Sigma-Aldrich Corporation, de Jack Beans, 144 mU). Esta disolución se dejó reposar a 37°C durante 24 horas, y después la finalización de la reacción se confirmó por análisis de HPLC. La disolución de reacción se purificó por HPLC (columna empaquetada de YMC D-ODS-5 S-5 120A ODS n° 2020178, 20 \times 250 mm, eluyente: acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 80:20, velocidad de flujo: 4 ml/min). Además, el residuo se desaló sobre una columna ODS (Cosmosil 75C₁₈-OPN, 15 \times 100 mm, se eluyó primero con 50 ml de H₂O y luego con 25% de acetonitrilo), dando un compuesto deseado 18 (2,1 mg, rendimiento: 75%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

45 RMN ¹H (30°C)
 δ 7,91 (d, 2H, J = 7,5 Hz, Fmoc), 7,71 (d, 2H, J = 7,5 Hz, Fmoc),
 7,51 (dd, 2H, J = 7,5 Hz, 7,5 Hz, Fmoc), 7,43 (dd, 2H, J = 7,5 Hz, 7,5 Hz, Fmoc),
 5,00 (d, 1H, J = 9,7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4,91 (d, 1H, J = 1,6 Hz, Man4'-H-1),
 50 4,76(s 1H, Man3-H-1), 4,58 (d, 1H, J = 7,8 Hz, GlcNAc2-H-1),

4,34 (t, 1H, Fmoc), 4,07 (d, 1H, $J = 2,7$ Hz, Man4'-H-2),
 3,97 (dd, 1H, $J = 1,6$ Hz, 3,7 Hz, Man3-H-2), 2,72 (dda, 1H, $J = 3,2$ Hz, 15,1 Hz, Asn- β CH),
 2,52 (dda, 1H, $J = 8,9$ Hz, 15,1 Hz, Asn- β CH), 2,07, 1,89 (cada uno s, cada uno 3H, Ac);
 EM(Fab) Calcd para $C_{47}H_{65}N_4O_{25}[M+Na^+]$ 1085,4, hallada 1085,3

5 Ejemplo 17 Síntesis del compuesto 21

10 El compuesto 9 (28 mg, 16 μ moles) y 1,7 mg de albúmina de suero bovino se disolvieron en tampón HEPES (50 mM, pH 5,0, 624 μ l), y a la misma se añadió neuraminidasa (fabricada por Sigma-Aldrich Corporation, de *Vibrio cholerae*, 117 mU). Esta disolución se dejó reposar a 37°C durante 17 horas, y después la finalización de la reacción se confirmó por análisis de HPLC. Posteriormente, la disolución de reacción se purificó por HPLC (columna empaquetada de YMC D-ODS-5 S-5 120A ODS n° 2020178, 20 \times 250 mm, eluyente: acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 80:20, velocidad de flujo: 4 ml/min). Además, el residuo se desaló sobre una columna ODS (Cosmosil 75C₁₈-OPN, 15 \times 100 mm, se eluyó primero con 50 ml de H₂O y luego con 25% de acetonitrilo), dando un compuesto deseado 21 (14,6 mg, rendimiento: 68%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN ¹H (30°C)

15 δ 7,92 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc), 7,71 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc),
 7,50 (dd, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc), 7,43 (dd, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc),
 5,12 (s, 1H, Man4-H-1), 4,99 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, GlcNAc1-H-1),
 4,77 (s, 1H, Man3-H-1), 4,57 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz, GlcNAc2-H-1),
 4,46 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, Gal6-H-1), 4,34 (t, 1H Fmoc),
 20 4,22 (da, 1H, $J = 2,7$ Hz, Man3-H-2), 4,19 (a, 1H, Man4-H-2),
 2,72 (dda, 1H, $J = 15,5$ Hz, Asn- β CH),
 2,52 (dda, 1H, $J = 9,8$ Hz, 15,5 Hz, Asn- β CH), 2,05 (s, 6H, Acx2),
 1,89 (s, 3H, Ac); EM(Fab) Calcd para $C_{61}H_{88}N_5O_{35}[M+H^+]$ 1450,5, hallada 1450,3.

Ejemplo 18 Síntesis del compuesto 22

25 El compuesto 21 (10 mg, 6,9 μ moles) y 1,6 mg de albúmina de suero bovino se disolvieron en tampón HEPES (50 mM, pH 5,0, 672 μ l), y a la misma se añadió β -galactosidasa (fabricada por Seikagaku Corporation, de Jack Beans, 205 mU). Esta disolución se dejó reposar a 37°C durante 20 horas, y después la finalización de la reacción se confirmó por análisis de HPLC. La disolución de reacción se purificó por HPLC (columna empaquetada de YMC D-ODS-5 S-5 120A ODS n° 2020178, 20 \times 250 mm, eluyente: acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 80:20, velocidad de flujo: 4 ml/min). Además, el residuo se desaló sobre una columna ODS (Cosmosil 75C₁₈-OPN, 15 \times 100 mm, se eluyó primero con 50 ml de H₂O y luego con 25% de acetonitrilo), dando un compuesto deseado 22 (5,6 mg, rendimiento: 64%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN ¹H (30°C)

35 δ 7,87 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc), 7,67 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc),
 7,48 (dd, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc), 7,41 (dd, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc),
 5,12 (s, 1H, Man4-H-1), 4,99 (d, 1H, $J = 9,7$ Hz, GlcNAc1-H-1),
 4,76 (s, 1H, Man3-H-1), 4,55 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, GlcNAc2,5-H-1),
 4,26 (t, 1H, Fmoc), 4,22 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz, Man3-H-2),
 4,18 (dda, 1H, $J = 1,3$ Hz, 3,3 Hz, Man4-H-2),
 40 2,72 (da, 1H, $J = 15,5$ Hz, Asn- β CH),
 2,54 (dda, 1H, $J = 9,5$ Hz, 15,5 Hz, Asn- β CH), 2,05 (s, 6H, Acx2),
 1,88 (s, 3H, Ac); EM(Fab) Calcd para $C_{55}H_{78}N_5O_{30}[M+H^+]$ 1288,5, hallada 1288,3.

Ejemplo 19 Síntesis del compuesto 23

45 El compuesto 22 (3,6 mg, 2,8 μ moles) y 1,2 mg de albúmina de suero bovino se disolvieron en tampón HEPES (50 mM, pH 5,0, 277 μ l), y a la misma se añadió N-acetil- β -D-glucosaminidasa (Sigma-Aldrich Corporation, de Jack Beans, 195 mU). Esta disolución se dejó reposar a 37°C durante 24 horas, y después la finalización de la reacción se confirmó por análisis de HPLC. La disolución de reacción se purificó por HPLC (columna empaquetada de YMC D-ODS-5 S-5 120A ODS n° 2020178, 20 \times 250 mm, eluyente: acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 80:20, velocidad de flujo: 4 ml/min). Además, el residuo se desaló sobre una columna ODS (Cosmosil 75C₁₈-OPN, 15 \times 100 mm, se

eluyó primero con 50 ml de H₂O y luego con 25% de acetonitrilo), dando un compuesto deseado 23 (2,3 mg, rendimiento: 77%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN ¹H (30°C)

δ7,91 (d, 2H, *J* = 7,5 Hz, Fmoc), 7,70 (d, 2H, *J* = 7,5 Hz, Fmoc),

5 7,50 (dd, 2H, *J* = 7,5 Hz, Fmoc), 7,43 (dd, 2H, *J* = 7,5 Hz, Fmoc),

5,11 (s, 1H, Man4-H-1), 4,99 (d, 1H, *J* = 9,7 Hz, GlcNAc1-H-1),

4,77 (s, 1H, Man3-H-1), 4,57 (d, 1H, *J* = 6,5 Hz, GlcNAc-H-1),

4,33 (t, 1H, Fmoc), 4,22 (d, 1H, *J* = 3,0 Hz, Man3-H-2),

4,07 (dda, 1H, *J* = 2,1 Hz, Man4-H-2), 2,72 (dda, 1H, *J* = 15,5 Hz, Asn-βCH),

10 2,52 (dda, 1H, *J* = 8,9 Hz, 15,5 Hz, Asn-βCH), 2,05, 1,89 (cada uno s, cada uno 3H, Ac);

EM(Fab) Calcd para C₄₇H₆₅N₄O₂₅[M+H⁺] 1085,4, hallada 1085,3.

Ejemplo 20 Síntesis del compuesto 11

15 El compuesto 10 (123 mg, 62 μmoles) y albúmina de suero bovino (1,1 mg) se disolvieron en tampón HEPES (50 mM, pH 5,0, 2,5 ml), y a la misma se añadió β-galactosidasa (fabricada por Seikagaku Corporation, de Jack Beans, 24 μl, 612 mU). Esta disolución se dejó reposar a 37°C durante 61 horas, y después la finalización de la reacción se confirmó por análisis de HPLC. La disolución de reacción se liofilizó, y posteriormente se purificó por HPLC (columna empaquetada de YMC D-ODS-5 S-5 120A ODS n° 2020178, 20 × 250 mm, eluyente: acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 80:20, velocidad de flujo: 3,5 ml/min). Además, el residuo se desaló sobre una columna ODS (Cosmosil 75C₁₈-OPN, 15 × 100 mm, se eluyó primero con 50 ml de H₂O y luego con 25% de acetonitrilo), dando un compuesto deseado 11 (71 mg, rendimiento: 70%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

20 RMN ¹H (30°C)

δ7,91 (d, 2H, *J* = 7,5 Hz, Fmoc), 7,71 (d, 2H, *J* = 7,5 Hz, Fmoc),

7,50 (dd, 2H, *J* = 7,5 Hz, Fmoc), 7,43 (dd, 2H, *J* = 7,5 Hz, Fmoc),

5,11 (s, 1H, Man4-H-1), 4,99 (1H, d, *J* = 9,9 Hz, GlcNAc1-H-1),

25 4,91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4,76 (s, 1H, Man3-H-1),

4,55 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz, GlcNAc2,5-H-1), 4,34 (t, 1H, Fmoc),

4,24 (s, 1H, Man3-H-2), 4,18 (s, 1H, Man4-H-2), 4,10 (s, 1H, Man4'-H-2),

2,72 (da, 1H, *J* = 15,5 Hz, Asn-βCH),

2,51 (dda, 1H, *J* = 9,0 Hz, 15,5 Hz, Asn-βCH), 2,06 (s, 3H, Ac),

30 20,5 (s, 6H, Ac×2), 1,88 (s, 3H, Ac); HRMS Calcd para

C₆₉H₁₀₀N₆NaO₄₀[M+Na⁺] 1675,5873, hallada 1675,5841.

Ejemplo 21 Síntesis del compuesto 12

35 El compuesto 11 (50 mg, 30 μmoles) y 2,0 mg de albúmina de suero bovino se disolvieron en tampón HEPES (50 mM, pH 5,0, 920 μl), y a la misma se añadió N-acetil-β-D-glucosaminidasa (fabricada por Sigma-Aldrich Corporation, de Jack Beans, 2,1 U). Esta disolución se dejó reposar a 37°C durante 48 horas, y después la finalización de la reacción se confirmó por análisis de HPLC. La disolución de reacción se purificó por HPLC (columna empaquetada de YMC D-ODS-5 S-5 120A ODS n° 2020178, 20 × 250 mm, eluyente: acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 80:20, velocidad de flujo: 4 ml/min), y se liofilizó. Este residuo se desaló sobre una columna ODS (Cosmosil 75C₁₈-OPN, 15 × 100 mm, se eluyó primero con 50 ml de H₂O y luego con 25% de acetonitrilo), dando un compuesto deseado 12 (25 mg, rendimiento: 66%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

40 RMN ¹H (30°C)

δ7,91 (d, 2H, *J* = 7,5 Hz, Fmoc), 7,70 (d, 2H, *J* = 7,5 Hz, Fmoc),

7,50 (dd, 2H, *J* = 7,5 Hz, Fmoc), 7,43 (dd, 2H, *J* = 7,5 Hz, Fmoc),

5,10 (s, 1H, Man4-H-1), 4,99 (d, 1H, *J* = 9,7 Hz, GlcNAc1-H-1),

45 4,91 (da, 1H, *J* = 1,6 Hz, Man4'-H-1), 4,77 (s, 1H, Man3-H-1),

4,58-4,52 (a, 1H, GlcNAc2-H-1), 4,33 (t, 1H, Fmoc), 4,24 (sa, 1H, Man3-H-2),

4,06 (dd, 1H, *J* = 1,6 Hz, 3,2 Hz, Man4-H-2),

3,97 (dd, 1H, $J = 1,6$ Hz, 3,5 Hz, Man4'-H-2),

2,72 (da, 1H, $J = 15,5$ Hz, Asn- β CH),

2,53 (dda, 1H, $J = 9,0$ Hz, 15,5 Hz, Asn- β CH), 2,05, 1,88 (cada uno s, cada uno 3H, Ac).

Ejemplo 22 Síntesis del compuesto 13

- 5 El compuesto 12 (10 mg, 11 μ moles) y 0,9 mg de albúmina de suero bovino se disolvieron en tampón HEPES (50 mM, pH 5,0, 440 μ l), y a la misma se añadió α -manosidasa (fabricada por Sigma-Aldrich Corporation, de Jack Beans, 30 μ l, 3,2 U). Esta disolución se dejó reposar a 37°C durante 21 horas, y después la finalización de la reacción se confirmó por análisis de HPLC. Posteriormente, la disolución de reacción se purificó por HPLC (columna empaquetada de YMC D-ODS-5 S-5 120A ODS n° 2020178, 20 \times 250 mm, eluyente: acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 80:20, velocidad de flujo: 4 ml/min). Además, el residuo se desaló sobre una columna ODS (Cosmosil 75C₁₈-OPN, 15 \times 100 mm, se eluyó primero con 50 ml de H₂O y luego con 25% de acetonitrilo), dando un compuesto deseado 13 (3 mg, rendimiento: 43%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN ¹H (30°C)

δ7,92 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc), 7,71 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc),

- 15 7,51 (dd, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc), 7,43 (dd, 2H, $J = 7,5$ Hz, Fmoc),

4,99 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4,76 (s, 1H, Man3-H-1),

4,57 (1H, GlcNAc2-H-1), 4,06 (d, 1H, $J = 3,2$ Hz, Man3-H-2),

2,72 (da, 1H, $J = 15,5$ Hz, Asn- β CH),

2,52 (dda, 1H, $J = 8,3$ Hz, 15,5 Hz, Asn- β CH), 2,05, 1,89 (cada uno s, cada uno 3H, Ac).

- 20 (Desprotección del grupo Fmoc de derivado de asparagina de la cadena de azúcar)

25 Todos los derivados de asparagina de la cadena de azúcar se sometieron a la desprotección del grupo Fmoc según los siguientes procedimientos. Primero, se añadieron 240 μ l de N,N-dimetilformamida y 160 μ l de morfolina por 1 μ mol de la forma Fmoc de la asparagina de la cadena de azúcar, y la mezcla resultante se sometió a reacción a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. La terminación de la reacción se confirmó por CCF (eluyente: acetato de amonio 1 M: isopropanol=8:5), y después la mezcla se enfrió con agua con hielo. A esta mezcla se añadió éter dietílico en una cantidad de 10 veces la de la disolución de reacción, agitando la mezcla durante 15 minutos, y después los precipitados formados se filtraron. El residuo obtenido se disolvió en agua, y se evaporó a 35°C. Además, un procedimiento de añadir 3 ml de tolueno a la misma y evaporar la mezcla se repitió tres veces. El residuo se purificó por cromatografía en columna de fase inversa (Cosmosil 75C₁₈-OPN, 15 \times 100 mm, eluyente: agua).

- 30 Ejemplo 23 Síntesis del compuesto 33

El compuesto 10 (10,5 mg, 5,3 μ moles) se hizo reaccionar durante 7 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 33 (7 mg, rendimiento: 76%). El compuesto resultante se confirmó a partir del hallazgo de que su RMN ¹H era idéntica a la de la preparación.

Ejemplo 24 Síntesis del compuesto 26

- 35 El compuesto 3 (8,0 mg, 3,8 μ moles) se sometió a reacción durante 21 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 26 (6,3 mg, rendimiento: 88%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN ¹H (30°C)

δ5,13 (s, 1H, Man4-H-1), 5,07 (d, 1H, $J = 9,9$ Hz, GlcNAc1-H-1),

- 40 4,95 (s, 1H, Man4'-H-1), 4,78 (s, 1H, Man3-H-1), 4,62 (2H, GlcNAc2,5'-H-1),

4,56 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, GlcNAc5-H-1), 4,52 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, Gal6'-H-1),

4,25 (sa, 1H, Man3-H-2), 4,19 (sa, 1H, Man4'-H-2), 4,12 (sa, 1H, Man4-H-2),

2,94 (dd, 1H, $J = 4,5$ Hz, 17,0 Hz, Asn- β CH),

2,85 (dd, 1H, $J = 6,8$ Hz, 17,0 Hz, Asn- β CH),

- 45 2,68 (dd, 1H, $J = 4,6$ Hz, 12,4 Hz, NeuAc7'-H-3_{eq}),

2,08, 2,07, 2,06, 2,04, 2,02 (cada uno s, cada uno 3H, Ac),

1,72 (dd, 1H, $J = 12,1$ Hz, 12,1 Hz, NeuAc7'-H-3_{ax}); EM(Fab) Calcd para

C₇₁H₁₁₈N₇O₅₁[M+H⁺] 1884,7, hallada 1884,5.

Ejemplo 25 Síntesis del compuesto 27

El compuesto 4 (11,0 mg, 5,8 μ moles) se sometió a reacción durante 23 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 27 (8,5 mg, rendimiento: 88%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN ^1H (30°C)

- 5 δ 5,11 (s, 1H, Man4'-H-1), 5,08 (d, 1H, $J = 9,7$ Hz, GlcNAc1-H-1),
 4,95 (s, 1H, Man4'-H-1), 4,78 (s, 1H, Man3-H-1), 4,62 (d, 2H, GlcNAc2,5'-H-1),
 4,45 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, Gal6'-H-1), 4,26 (da, 1H, Man3-H-2),
 4,12 (da, 1H, Man4'-H-2), 4,08 (dda, 1H, $J = 1,6$ Hz, 3,3 Hz, Man4'-H-2),
 2,94 (dd, 1H, $J = 4,0$ Hz, 17,2 Hz, Asn- β CH),
 10 2,85 (dd, 1H, $J = 7,2$ Hz, 17,2 Hz, Asn- β CH),
 2,68 (dd, 1H, $J = 4,1$ Hz, 12,1 Hz, NeuAc7'-H-3_{eq}),
 2,09, 2,07, 2,04, 2,02 (cada uno s, cada uno 3H, Ac),
 1,72 (dd, 1H, $J = 12,1$ Hz, 12,1 Hz, NeuAc7'-H-3_{ax}); EM(Fab) Calcd para
 $\text{C}_{63}\text{H}_{104}\text{N}_6\text{NaO}_{46}[\text{M}+\text{Na}^+]$ 1703,6, hallada 1703,1.

15 Ejemplo 26 Síntesis del compuesto 28

El compuesto 5 (7,0 mg, 4,0 μ moles) se sometió a reacción durante 21 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 28 (5,3 mg, rendimiento: 87%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN ^1H (30°C)

- 20 δ 5,07 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4,94 (s, 1H, Man4'-H-1),
 4,76 (s, 1H, Man3-H-1), 4,61, 4,59 (cada uno d, cada uno 1H, GlcNAc2,5'-H-1),
 4,44 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, Gal6'-H-1), 4,10, 4,07 (cada uno 1H, Man4',3-H-2),
 2,93 (dd, 1H, $J = 4,6$ Hz, 17,5 Hz, Asn- β CH),
 2,85 (dd, 1H, $J = 7,0$ Hz, 17,5 Hz, Asn- β CH),
 25 2,67 (dd, 1H, $J = 4,6$ Hz, 12,2 Hz, NeuAc7'-H-3_{eq});
 2,08, 2,06, 2,02, 2,01 (cada uno s, cada uno 3H, Ac),
 1,71 (2H, dd, $J = 12,2$ Hz, 12,2 Hz, NeuAc7'-H-3_{ax}); EM(Fab) Calcd para
 $\text{C}_{57}\text{H}_{94}\text{N}_6\text{NaO}_{41}[\text{M}+\text{Na}^+]$ 1541,5, hallada 1541,3.

Ejemplo 27 Síntesis del compuesto 30

- 30 El compuesto 7 (13,9 mg, 6,6 μ moles) se sometió a reacción durante 7 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 30 (8,0 mg, rendimiento: 64%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN ^1H (30°C)

- δ 5,13 (s, 1H, Man4'-H-1), 5,06 (d, 1H, $J = 9,9$ Hz, GlcNAc1-H-1),
 35 4,91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4,77 (s, 1H, Man3-H-1), 4,61, 4,60 (cada uno d, cada uno 1H, $J = 8,0$ Hz, GlcNAc2,5'-H-1),
 4,55 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, GlcNAc5'-H-1), 4,44 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, Gal6-H-1),
 4,24 (da, 1H, Man3-H-2), 4,19 (dda, 1H, $J = 1,3$ Hz, 3,2 Hz, Man4'-H-2),
 4,10 (dda, 1H, $J = 1,4$ Hz, 3,2 Hz, Man4-H-2),
 2,90 (dd, 1H, $J = 4,5$ Hz, 16,7 Hz, Asn- β CH),
 40 2,80 (dd, 1H, $J = 7,5$ Hz, 16,7 Hz, Asn- β CH),
 2,66 (dd, 1H, $J = 4,6$ Hz, 12,4 Hz, NeuAc7'-H-3_{eq}),
 2,07, 2,06, 2,05, 2,02, 2,01 (cada uno s, cada uno 3H, Ac),

1,71 (dd, 1H, $J = 12,4$ Hz, 12,4 Hz, NeuAc7-H-3_{ax}); EM(Fab) Calcd para

$C_{71}H_{117}N_7NaO_{51}[M+Na^+]$ 1906,7, hallada 1906,1

Ejemplo 28 Síntesis del compuesto 31

- 5 El compuesto 8 (8,0 mg, 4,2 μ moles) se sometió a reacción durante 12 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 31 (6,0 mg, rendimiento: 86%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN 1H (30°C)

δ 5,12 (s, 1H, Man4-H-1), 5,06 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, GlcNAc1-H-1),

4,91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4,77 (s, 1H, Man3-H-1),

- 10 4,61, 4,59 (cada uno d, cada uno 1H, GlcNAc2,5-H-1), 4,43 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, Gal6-H-1),

4,24 (da, 1H, Man3-H-2), 4,18 (dda, 1H, Man4'-H-2),

2,91 (da, 1H, $J = 17,0$ Hz, Asn- β CH),

2,81 (dd, 1H, $J = 6,5$ Hz, 17,0 Hz, Asn- β CH),

2,66 (dd, 1H, $J = 4,6$ Hz, 12,6 Hz, NeuAc7-H-3_{eq}),

- 15 2,06, 2,06, 2,02, 2,00 (cada uno s, cada uno 3H, Ac),

1,70 (dd, 1H, $J = 12,6$ Hz, 12,6 Hz, NeuAc7-H-3_{ax}); EM(Fab) Calcd para

$C_{63}H_{104}N_6NaO_{46}[M+Na^+]$ 1703,6, hallada 1703,0.

Ejemplo 29 Síntesis del compuesto 32

- 20 El compuesto 9 (7,7 mg, 4,4 μ moles) se sometió a reacción durante 23 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 32 (5,2 mg, rendimiento: 78%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN 1H (30°C)

δ 5,14 (s, 1H, Man4-H-1), 5,07 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, GlcNAc1-H-1),

4,78 (s, 1H, Man3-H-1), 4,61, 4,60 (cada uno d, cada uno 1H, GlcNAc2,5-H-1),

- 25 4,44 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, Gal6-H-1), 4,23 (d, 1H, $J = 3,0$ Hz, Man3-H-2),

4,19 (dda, 1H, $J = 1,3$ Hz, 2,9 Hz, Man4-H-2),

2,92 (dd, 1H, $J = 4,1$ Hz, 17,2 Hz, Asn- β CH),

2,83 (dd, 1H, $J = 7,5$ Hz, 12,7 Hz, Asn- β CH),

2,67 (dd, 1H, $J = 4,6$ Hz, 12,7 Hz, NeuAc7-H-3_{eq}), 2,06 (s, 6H, Acx2),

- 30 2,03, 2,01 (cada uno s, cada uno 3H, Ac),

1,71 (dd, 1H, $J = 12,7$ Hz, 12,7 Hz, NeuAc7-H-3_{ax}); EM(Fab) Calcd para

$C_{57}H_{94}N_6NaO_{41}[M+Na^+]$ 1541,5, hallada 1541,2.

Ejemplo 30 Síntesis del compuesto 37

- 35 El compuesto 14 (9,1 mg, 5,0 μ moles) se sometió a reacción durante 13 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 37 (6,5 mg, rendimiento: 77%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN 1H (30°C)

δ 5,11 (s, 1H, Man4-H-1), 5,06 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, GlcNAc1-H-1),

4,92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4,75 (s, 1H, Man3-H-1),

- 40 4,61, 4,57, 4,55 (cada uno d, cada uno 1H, $J = 7,5$ Hz, GlcNAc2,5,5'-H-1),

4,46 (d, 1H, $J = 7,3$ Hz, Gal6'-H-1), 4,23 (sa, 1H, Man3-H-2),

4,18 (sa, 1H, Man4'-H-2), 4,10 (sa, 1H, Man4-H-2),

2,87 (dd, 1H, $J = 4,8$ Hz, 17,0 Hz, Asn- β CH),
 2,76 (dd, 1H, $J = 7,2$ Hz, 17,0 Hz, Asn- β CH), 2,07 (s, 3H, Ac), 2,04 (s, 6H, Ac \times 2),
 2,00 (s, 3H, Ac); EM(Fab) Calcd para $C_{60}H_{100}N_6NaO_{43}[M+Na^+]$ 1615,6, hallada 1615,0.

Ejemplo 31 Síntesis del compuesto 42

5 El compuesto 19 (9,8 mg, 5,4 μ moles) se sometió a reacción durante 13 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 42 (8,0 mg, rendimiento: 88%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN 1H (30°C)

δ 5,11 (s, 1H, Man4'-H-1), 5,06 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, GlcNAc1-H-1),

10 4,91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4,76 (s, 1H, Man3-H-1),

4,60,4,57,4,55 (cada uno d, cada uno 1H, GlcNAc2,5,5'-H-1),

4,46 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, Gal6-H-1), 4,28 (s, 1H, Man3-H-2),

4,18 (s, 1H, Man4'-H-2), 4,10 (s, 1H, Man4-H-2),

2,88 (dd, 1H, $J = 4,0$ Hz, 16,6 Hz, Asn- β CH),

15 2,77 (dd, 1H, $J = 7,5$ Hz, 16,6 Hz, Asn- β CH), 2,07 (s, 3H, Ac), 2,04 (s, 6H, Ac \times 2),

2,00 (s, 3H, Ac); EM(Fab) Calcd para $C_{60}H_{101}N_6O_{43}[M+H^+]$ 1593,6, hallada 1593,8.

Ejemplo 32 Síntesis del compuesto 38

20 El compuesto 15 (5,1 mg, 3,2 μ moles) se sometió a reacción durante 11 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 38 (4,0 mg, rendimiento: 91%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN 1H (30°C)

δ 5,10 (s, 1H, Man4'-H-1), 5,07 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, GlcNAc1-H-1),

4,92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4,76 (s, 1H, Man3-H-1),

4,61, 4,57 (cada uno d, cada uno 1H, $J = 7,8$ Hz, GlcNAc2,5'-H-1),

25 4,47 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, Gal6'-H-1), 4,24 (d, 1H, $J = 2,3$ Hz, Man3-H-2),

4,10, 4,06 (cada uno da, cada uno 1H, Man4',4-H-2),

2,90 (dd, 1H, $J = 4,2$ Hz, 16,8 Hz, Asn- β CH),

2,81 (dd, 1H, $J = 7,3$ Hz, 16,8 Hz, Asn- β CH),

2,07, 2,04, 2,01 (cada uno s, cada uno 3H, Ac); EM(Fab) Calcd para $C_{52}H_{88}N_5O_{38}[M+H^+]$

30 1390,5, hallada 1390,1.

Ejemplo 33 Síntesis del compuesto 72

El compuesto 70 (4,0 mg, 2,8 μ moles) se sometió a reacción durante 13 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 72 (2,9 mg, rendimiento: 85%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

35 RMN 1H (30°C)

δ 5,09 (s, 1H, Man4'-H-1), 5,06 (d, 1H, $J = 9,8$ Hz, GlcNAc1-H-1),

4,91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4,76 (s, 1H, Man3-H-1),

4,61, 4,54 (cada uno d, cada uno 1H, GlcNAc2,5-H-1), 4,24 (s, 1H, Man3-H-2),

4,10, 4,06 (cada uno sa, cada uno 1H, Man4,4'-H-2),

40 2,87 (dd, 1H, $J = 17,2$ Hz, Asn- β CH),

2,76 (dd, 1H, $J = 6,5$ Hz, 17,2 Hz, Asn- β CH),

2,07, 2,04, 2,00 (cada uno s, cada uno 3H, Ac); EM(Fab) Calcd para $C_{46}H_{78}N_5O_{33}[M+H^+]$ 1228,5, hallada 1228,3.

Ejemplo 34 Síntesis del compuesto 43

El compuesto 20 (5,4 mg, 3,3 μ moles) se sometió a reacción durante 11 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 43 (4,1 mg, rendimiento: 87%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

5 RMN ^1H (30°C)

δ 5,11 (s, 1H, Man4-H-1), 5,07 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, GlcNAc1-H-1),
4,91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4,77 (s, 1H, Man3-H-1),
4,61, 4,57 (cada uno d, cada uno 1H, GlcNAc2,5-H-1), 4,46 (d, 1H, Gal6-H-1),
4,24 (s, 1H, Man3-H-2), 4,18 (sa, 1H, Man4-H-2),

10 2,90 (dd, 1H, $J = 4,0$ Hz, 17,0 Hz, Asn- β CH),
2,80 (dd, 1H, $J = 7,3$ Hz, 17,0 Hz, Asn- β CH),
2,07, 2,04, 2,01 (cada uno s, cada uno 3H, Ac); EM(Fab) Calcd para
 $\text{C}_{52}\text{H}_{88}\text{N}_5\text{O}_{38}[\text{M}+\text{H}^+]$ 1390,5, hallada 1390,2.

Ejemplo 35 Síntesis del compuesto 73

15 El compuesto 71 (4,0 mg, 2,8 μ moles) se sometió a reacción durante 13 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 73 (2,9 mg, rendimiento: 85%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN ^1H (30°C)

δ 5,11 (s, 1H, Man4-H-1), 5,06 (d, 1H, $J = 9,9$ Hz, GlcNAc1-H-1),
20 4,91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4,77 (s, 1H, Man3-H-1),
4,60, 4,54 (cada uno d, cada uno 1H, $J = 7,9$ Hz, GlcNAc2,5-H-1),
4,24 (s, 1H, Man3-H-2), 4,18 (dd, 1H, $J = 1,6$ Hz, 1,6 Hz, Man4-H-2),
3,96 (1H, dd, $J = 1,6$ Hz, 1,6 Hz, Man4-H-2),
2,88 (dd, 1H, $J = 4,3$ Hz, 16,8 Hz, Asn- β CH),

25 2,77 (dd, 1H, $J = 7,2$ Hz, 16,8 Hz, Asn- β CH),
2,06, 2,04, 2,00 (cada uno s, cada uno 3H, Ac); EM(Fab) Calcd para
 $\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{N}_5\text{O}_{33}[\text{M}+\text{H}^+]$ 1228,5, hallada 1228,3.

Ejemplo 36 Síntesis del compuesto 39

30 El compuesto 16 (2,2 mg, 1,5 μ moles) se sometió a reacción durante 7 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 39 (1,6 mg, rendimiento: 84%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN ^1H (30°C)

δ 5,07 (d, 1H, $J = 9,7$ Hz, GlcNAc1-H-1), 4,92 (s, 1H, Man4'-H-1),
4,75 (s, 1H, Man3-H-1), 4,62, 4,58 (cada uno d, cada uno 1H, GlcNAc2,5-H-1),

35 4,09, 4,08 (cada uno s, cada uno 1H, Man3,4'-H-2),
2,91 (dd, 1H, $J = 4,1$ Hz, 16,9 Hz, Asn- β CH),
2,81 (dd, 1H, $J = 6,8$ Hz, 16,9 Hz, Asn- β CH),
2,08, 2,04, 2,01 (cada uno s, cada uno 3H, Ac); EM(Fab) Calcd para
 $\text{C}_{46}\text{H}_{77}\text{N}_5\text{NaO}_{33}[\text{M}+\text{Na}^+]$ 1250,4, hallada 1250,3.

40 Ejemplo 37 Síntesis del compuesto 40

El compuesto 17 (1,5 mg, 1,2 μ moles) se sometió a reacción durante 14 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 40 (1,1 mg, rendimiento: 89%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN ¹H (30°C)

δ5,07 (d, 1H, *J* = 9,5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4,91 (s, 1H, Man4'-H-1),
4,76 (s, 1H, Man3-H-1), 4,62, 4,55 (cada uno d, cada uno 1H, GlcNAc2,5-H-1),
4,10, 4,07 (cada uno s, cada uno 1H, Man4',3-H-2),

- 5 2,89 (dd, 1H, *J* = 3,7 Hz, 17,0 Hz, Asn-βCH),
2,79 (dd, 1H, *J* = 7,0 Hz, 17,0 Hz, Asn-βCH),
2,07, 2,05, 2,01 (cada uno s, cada uno 3H, Ac); EM(Fab) Calcd para
C₄₀H₆₇N₅NaO₂₈[M+Na⁺] 1088,4, hallada 1088,2.

Ejemplo 38 Síntesis del compuesto 41

- 10 El compuesto 18 (1,3 mg, 1,2 μmoles) se sometió a reacción durante 14 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 41 (0,8 mg, rendimiento: 80%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN ¹H (30°C)

δ5,07 (d, 1H, *J* = 9,5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4,91 (s, 1H, Man4'-H-1),

- 15 4,76 (s, 1H, Man3-H-1), 4,62 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz, GlcNAc2-H-1),
4,08 (d, 1H, *J* = 2,9 Hz, Man3-H-2), 2,92 (dd, 1H, *J* = 3,9 Hz, 17,3 Hz, Asn-βCH),
2,83 (dd, 1H, *J* = 7,0 Hz, 17,3 Hz, Asn-βCH), 2,07, 2,01 (cada uno s, cada uno 3H, Ac);
EM(Fab) Calcd para C₃₂H₅₅N₄O₂₇[M+H⁺] 863,3, hallada 863,2.

Ejemplo 39 Síntesis del compuesto 44

- 20 El compuesto 21 (2,3 mg, 1,6 μmoles) se sometió a reacción durante 7 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 44 (1,6 mg, rendimiento: 84%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

RMN ¹H (30°C)

δ5,11 (s, 1H, Man4-H-1), 5,06 (d, 1H, *J* = 9,8 Hz, GlcNAc1-H-1),

- 25 4,77 (s, 1H, Man3-H-1), 4,61, 4,57 (cada uno d, cada uno 1H, GlcNAc2,5-H-1),
4,46 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz, Gal-H-1), 4,22, 4,18 (cada uno sa, cada uno 1H, Man3,4-H-2),
2,91 (dd, 1H, *J* = 4,1 Hz, 17,3 Hz, Asn-βCH),
2,82 (dd, 1H, *J* = 7,0 Hz, 17,3 Hz, Asn-βCH),
2,05, 2,04, 2,01 (cada uno s, cada uno 3H, Ac); EM(Fab) Calcd para

- 30 C₄₆H₇₈NsO₃₃[M+H⁺] 1228,5, hallada 1228,3.

Ejemplo 40 Síntesis del compuesto 45

El compuesto 22 (1,6 mg, 1,3 μmoles) se sometió a reacción durante 14 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 45 (1,1 mg, rendimiento: 85%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

- 35 RMN ¹H (30°C)

δ5,12 (s, 1H, Man4-H-1), 5,07 (d, 1H, *J* = 9,7 Hz, GlcNAc1-H-1),

- 4,77 (s, 1H, Man3-H-1), 4,61, 4,54 (cada uno d, cada uno 1H, GlcNAc2,5-H-1),
4,22 (d, 1H, *J* = 2,5 Hz, Man3-H-2), 4,18 (dd, 1H, *J* = 1,4 Hz, 3,0 Hz, Man4'-H-2),
2,89 (dd, 1H, *J* = 4,3 Hz, 16,9 Hz, Asn-βCH),
2,78 (dd, 1H, *J* = 7,5 Hz, 16,9 Hz, Asn-βCH),

- 40 2,06, 2,05, 2,01 (cada uno s, cada uno 3H, Ac); EM(Fab) Calcd para
C₄₀H₆₇N₅NaO₂₈[M+Na⁺] 1088,4, hallada 1088,3.

Ejemplo 41 Síntesis del compuesto 46

El compuesto 23 (1,6 mg, 1,5 μ moles) se sometió a reacción durante 14 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 46 (1,1 mg, 6,4 μ moles, rendimiento: 85%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

- 5 RMN ^1H (30°C)
 δ 5,10 (s, 1H, Man4-H-1), 5,06 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, GlcNAc1-H-1),
 4,77 (s, 1H, Man3-H-1), 4,61 (d, 1H, $J = 7,3$ Hz, GlcNAc2-H-1),
 4,22 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz, Man3-H-2), 4,07 (dd, 1H, $J = 1,6$ Hz, 3,0 Hz, Man4'-H-2),
 2,90 (dd, 1H, $J = 4,3$ Hz, 17,0 Hz, Asn- β CH),
 10 2,80 (dd, 1H, $J = 7,0$ Hz, 17,2 Hz, Asn- β CH),
 2,05, 2,01 (cada uno s, cada uno 3H, Ac); EM(Fab) Calcd para
 $\text{C}_{32}\text{H}_{55}\text{N}_4\text{O}_{23}[\text{M}+\text{H}^+]$ 863,3, hallada 863,3.

Ejemplo 42 Síntesis del compuesto 34

- 15 El compuesto 11 (12,4 mg, 7,5 μ moles) se sometió a reacción durante 11 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 34 (9,2 mg, rendimiento: 86%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

- RMN ^1H (30°C)
 δ 5,11 (s, 1H, Man4-H-1), 5,07 (d, 1H, $J = 10,0$ Hz, GlcNAc1-H-1),
 4,91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4,77 (s, 1H, Man3-H-1),
 20 4,61 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz, GlcNAc2-H-1), 4,55 (d, 2H, GlcNAc5,5'-H-1),
 4,24 (sa, 1H, Man3-H-2), 4,18 (sa, 1H, Man4'-H-2), 4,10 (sa, 1H, Man4-H-2),
 2,80 (dd, 1H, $J = 3,8$ Hz, 15,6 Hz, Asn- β CH),
 2,63 (dd, 1H, $J = 8,2$ Hz, 15,6 Hz, Asn- β CH), 2,07 (s, 3H, Ac), 2,05 (s, 6H, Acx2),
 2,01 (s, 3H, Ac); EM(Fab) Calcd para $\text{C}_{54}\text{H}_{90}\text{N}_6\text{NaO}_{38}[\text{M}+\text{Na}^+]$ 1453,5,
 25 hallada 1453,2.

Ejemplo 43 Síntesis del compuesto 35

El compuesto 12 (12,0 mg, 8,4 μ moles) se sometió a reacción durante 11 horas según los procedimientos anteriores, dando un compuesto deseado 35 (7,0 mg, rendimiento: 81%). Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

- 30 RMN ^1H (30°C)
 δ 5,10 (s, 1H, Man4-H-1), 5,07 (d, 1H, $J = 9,7$ Hz, GlcNAc1-H-1),
 4,91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4,78 (s, 1H, Man3-H-1),
 4,61 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, GlcNAc2-H-1), 4,25 (sa, 1H, Man3-H-2),
 4,06 (sa, 1H, Man4'-H-2), 3,97 (sa, 1H, Man4-H-2),
 35 2,79 (dd, 1H, $J = 5,0$ Hz, 17,0 Hz, Asn- β CH),
 2,61 (dd, 1H, $J = 7,3$ Hz, 17,0 Hz, Asn- β CH),
 2,07, 2,01 (cada uno s, cada uno 3H, Ac); EM(Fab) Calcd para
 $\text{C}_{38}\text{H}_{65}\text{N}_4\text{O}_{28}[\text{M}+\text{H}^+]$ 1025,4, hallada 1025,2.

Ejemplo 44 Síntesis y aislamiento de Compuestos 76 y 77

- 40 Los compuestos 2 y 6 (5,0 mg, 2,2 μ moles) se disolvieron en 220 μ l de agua, y 100 μ l de un carbonato de cesio acuoso 22 mM se añadieron a la misma para ajustar su pH a 7,0. Esta disolución se liofilizó. Cuatrocientos treinta microlitros de N,N-dimetilformamida se añadieron al sólido obtenido después de secar, y a la misma se añadieron adicionalmente 20 μ l de una disolución de 6,6 μ moles de bromuro de bencilo/N,N-dimetilformamida. Esta disolución se agitó bajo atmósfera de argón. Después de 48 horas, la desaparición del material de partida se confirmó por CCF
 45 (eluyente: NH_4OAc 1 M: isopropanol = 2:1), y después se añadieron 4,4 ml de éter dietílico a la disolución para permitir

- que el compuesto precipite en la misma. Las cadenas de azúcar precipitadas se filtraron, y la cadena de azúcar residual se disolvió en agua y se liofilizó. El residuo después de la liofilización se purificó por HPLC fraccionada (columna empaquetada de YMC D-ODS-5 S-5 120A ODS n° 2020178, 20 × 250 mm, eluyente: acetato de amonio acuoso 50 mM : acetonitrilo = 78:22, velocidad de flujo: 4 ml/min), y un compuesto 77 se eluyó después de 88 minutos y un compuesto 76 se eluyó después de 91 minutos. Las fracciones se recogieron, y adicionalmente se desalaron sobre una columna ODS (Cosmosil 75C₁₈-OPN, 15 × 100 mm, se eluyó primero con 50 ml de H₂O y luego con 25% de acetonitrilo), dando un compuesto deseado 76 en una cantidad de 1,6 mg y un compuesto deseado 77 en una cantidad de 1,8 mg. Los datos físicos para el compuesto resultante son del siguiente modo.

Datos para el compuesto 76

- 10 RMN ¹H (30°C)
 δ7,92 (d, 2H, *J* = 7,5 Hz, Fmoc), 7,71 (d, 2H, *J* = 7,5 Hz, Fmoc),
 7,53-7,40 (m, 9H, Fmoc, -CH₂-Ph), 5,38 (d, 1H, *J* = 12,1 Hz, -CH₂-Ph),
 5,31 (d, 1H, *J* = 12,1 Hz, -CH₂-Ph), 5,12 (s, 1H, Man4-H-1),
 4,99 (d, 1H, *J* = 9,5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4,92 (s, 1H, Man4'-H-1),
 15 4,76 (s, 1H, Man3-H-1), 4,58 (m, 3H, GlcNAc2,5,5'-H-1),
 4,47 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz, Gal6'-H-1), 4,33 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz, Gal6-H-1),
 4,24 (sa, 1H, Man3-H-2), 4,19 (sa, 1H, Man4'-H-2), 4,11 (sa, 1H, Man4-H-2),
 2,72 (da, 1H, Asn-βCH), 2,68 (dd, 1H, *J* = 4,6 Hz, 12,7 Hz, NeuAc7-H-3_{eq}),
 2,52 (dd, 1H, *J* = 8,7 Hz, 15,0 Hz, Asn-βCH),
 20 2,07, 2,04, 2,03, 2,02, 1,89 (cada uno s, cada uno 3H, Ac),
 1,84 (dd, 1H, *J* = 12,7 Hz, 12,7 Hz, NeuAc7-H3_{ax}); EM(Fab) Calcd para
 C₉₉H₁₄₃N₁₇NaO₅₈[M+H⁺] 2380,8, hallada 2380,0.

Datos para el compuesto 77

- RMN ¹H (30°C)
 25 δ7,91 (d, 2H, *J* = 7,5 Hz, Fmoc), 7,71 (d, 2H, *J* = 7,5 Hz, Fmoc),
 7,53-7,41 (m, 9H, Fmoc, -CH₂-Ph), 5,37 (d, 1H, *J* = 12,1 Hz, -CH₂-Ph),
 5,31 (d, 1H, *J* = 12,1 Hz, -CH₂-Ph), 5,12 (s, 1H, Man4-H-1),
 4,99 (d, 1H, *J* = 9,8 Hz, GlcNAc1-H-1), 4,93 (s, 1H, Man4'-H-1),
 4,76 (s, 1H, Man3-H-1), 4,58 (m, 3H, GlcNAc2,5,5'-H-1),
 30 4,46 (1H, d, *J* = 7,8 Hz, Gal6-H-1), 4,33 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz, Gal6'-H-1),
 4,24 (sa, 1H, Man3-H-2), 4,19 (sa, 1H, Man4'-H-2), 4,11 (sa, 1H, Man4-H-2),
 2,72 (da, 1H, Asn-βCH), 2,68 (dd, 1H, *J* = 4,8 Hz, 13,0 Hz, NeuAc7-H-3_{eq}),
 2,52 (dda, 1H, *J* = 9,7 Hz, 14,1 Hz, Asn-βCH),
 2,06, 2,05, 2,04, 2,02, 1,89 (cada uno s, cada uno 3H, Ac),
 35 1,84 (dd, 1H, *J* = 13,0 Hz, 13,0 Hz, NeuAc7-H-3_{ax}); EM(Fab) Calcd para
 C₉₉H₁₄₃N₇NaO₅₈[M+H⁺] 2380,8, hallada 2380,5

Ejemplo 45 Síntesis del compuesto 78

- Una disolución acuosa enfriada del compuesto 1 (20 mg) se aplicó sobre una columna Dowex-50Wx8 (H⁺) (φ 0,5 cm × 5 cm) enfriada a 4°C, y la disolución acuosa eluida se liofilizó. El producto liofilizado resultante se disolvió en un agua enfriada a 4°C, a la misma se añadió Cs₂CO₃ acuoso (2,5 mg/1 ml) para ajustar el pH de la disolución acuosa a 5 a 6, y luego se liofilizó la disolución acuosa. La muestra de cadenas de Fmoc-disialo-azúcar después de la liofilización se disolvió en una DMF seca (1,3 ml), y a la misma se añadió bromuro de bencilo (5,1 μl) agitando la mezcla a temperatura ambiente durante 45 minutos bajo corriente de gas argón. La terminación de la reacción se confirmó por CCF, después la disolución de reacción se enfrió a 0°C, y 10 ml de éter dietílico se añadieron a la disolución de reacción para precipitar el producto deseado. Esta sustancia se filtró con un papel de filtro. Se añadió agua destilada al producto deseado residual, y se eluyó como un filtrado, y posteriormente se concentró bajo una presión reducida. El residuo resultante se purificó aplicando a una columna ODS (φ 1,6 cm × 14 cm, eluyente: H₂O → 40% de MeOH acuoso), dando un compuesto 78 (18,2 mg, rendimiento: 85%). Los datos físicos para el compuesto resultante 78 son del siguiente

modo.

RMN ¹H (30°C)

7,90 (d, 2H, Fmoc), 7,70 (d, 2H, Fmoc), 7,53-7,40 (m, 9H, Bn, Fmoc),

5,36 (d, 2H, J = 11,6 Hz, CH₂), 5,30 (d, 2H, J = 11,6 Hz, CH₂),

5 5,12 (s, 1H, Man4-H₁), 4,99 (d, 1H, J = 9,7 Hz, GlcNAc1-H₁),

4,93 (s, 1H, Man4'-H₁), 4,75 (s, 1H, Man3-H₁),

4,57 (m, 3H, GlcNAc2-H₁, GlcNAc5,5'-H₁), 4,32 (d, 2H, Gal6,6'-H₁),

4,24 (d, 1H, Man3-H₂), 4,18 (d, 1H, Man4'-H₂), 4,10 (1H, d, Man4-H₂),

2,72 (da, 1H, Asn-βCH), 2,67 (dd, 2H, NeuAc7,7'-H_{3eq}),

10 2,51 (dda, 1H, Asn-βCH), 2,06 (s, 3H, Ac), 2,03, 2,01 (cada uno s, cada uno 6H, Ac × 2),

1,89 (s, 3H, Ac), 1,83 (2H, dd, J = 12,2, 12,2 Hz, NeuAc7,7'-H_{3ax}); HRMS Calcd

para C₁₁₇H₁₆₅N₈Na₂O₆₆[M+Na⁺] 2783,9597, hallada 2783,9501.

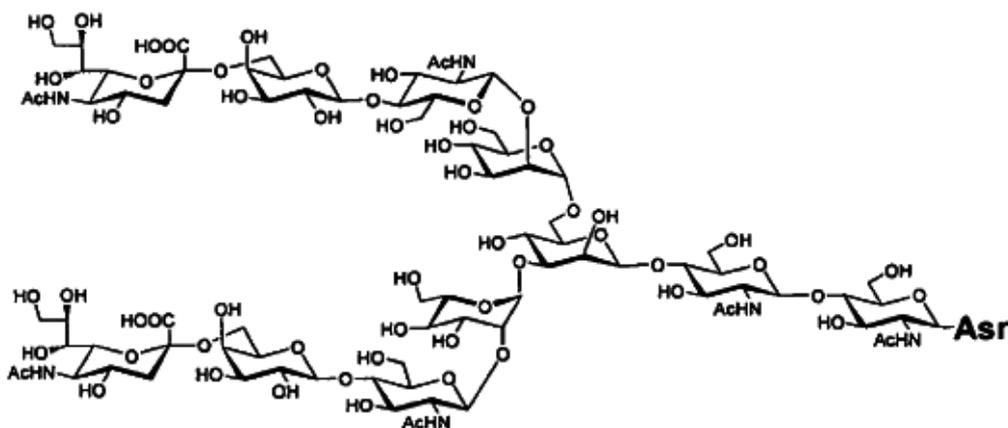
APLICABILIDAD INDUSTRIAL

15 Según la presente invención, diversas cadenas de azúcar que tienen estructuras de la cadena de azúcar deseadas pueden obtenerse en grandes cantidades muy convenientemente. Por tanto, se espera que se utilicen para agentes terapéuticos contra el cáncer, inflamación, gripe y similares. Especialmente, el derivado de asparagina de la cadena de azúcar y la asparagina de la cadena de azúcar que pueden obtenerse en la presente invención son excelentes en seguridad sin ningún riesgo tal como mezcla de sustancias tóxicas durante los procedimientos de preparación.

20

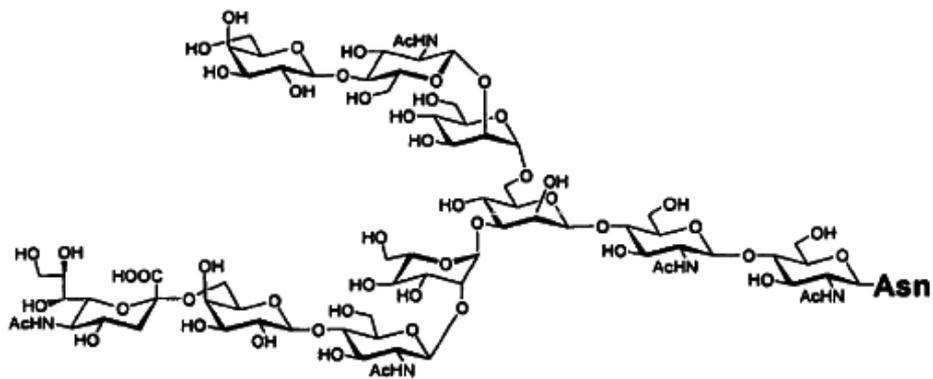
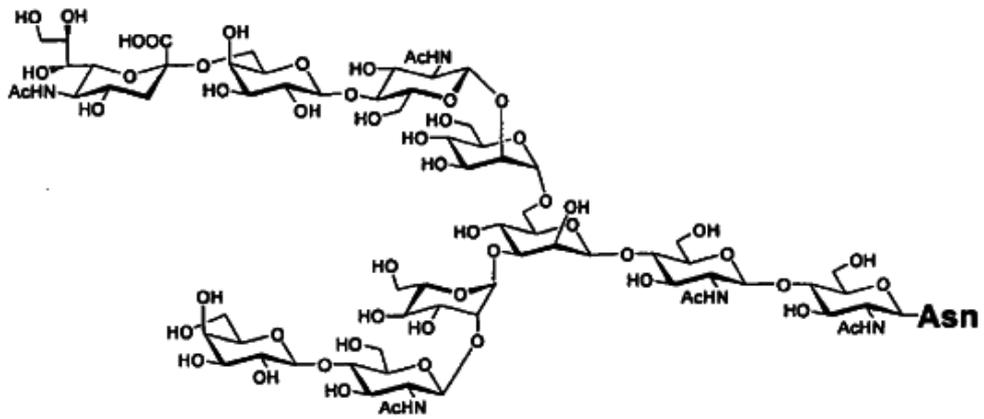
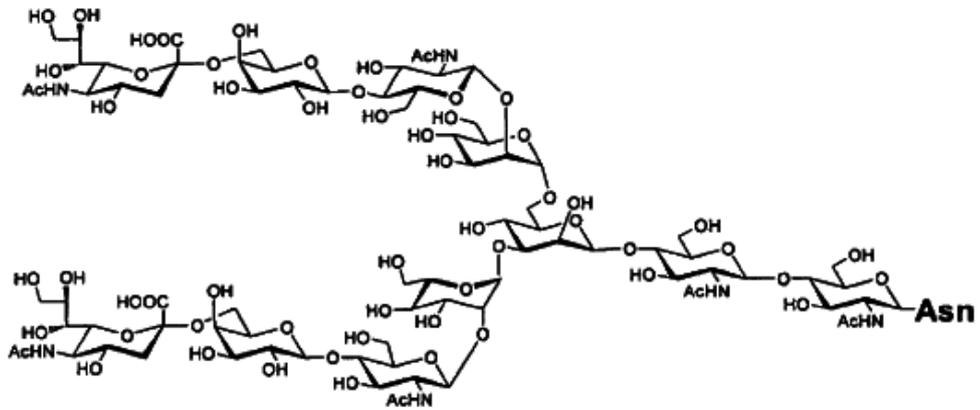
REIVINDICACIONES

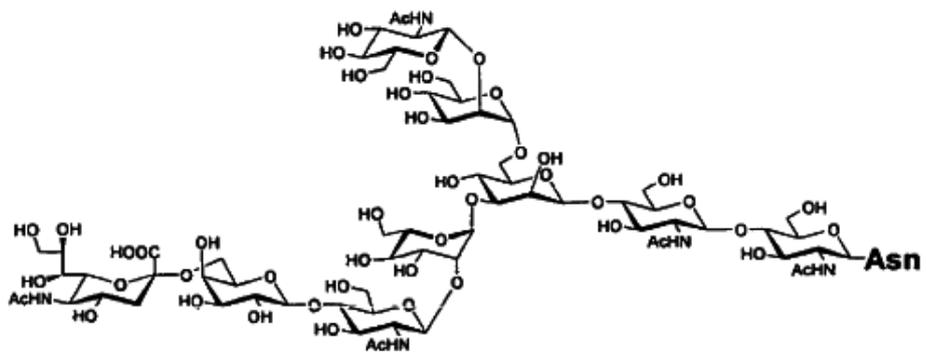
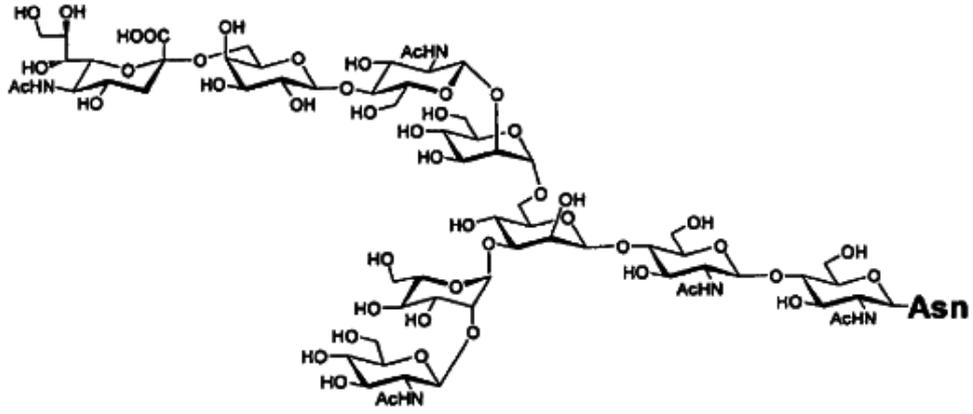
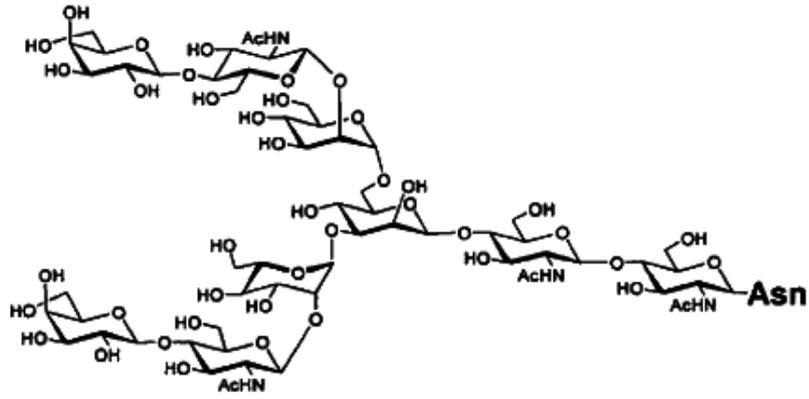
1. Un procedimiento para preparar un derivado de asparagina de la cadena de azúcar derivado de una asparagina de la cadena de azúcar, que comprende las etapas de
- 5 (a) introducir un grupo protector soluble en grasa seleccionado de grupo Fmoc, grupo t-butiloxicarbonilo (Boc), grupo bencilo, grupo alilo, grupo aliloxicarbonato y grupo acetilo en la asparagina de la cadena de azúcar contenida en una mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar, dando una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar, en el que la mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar comprende:

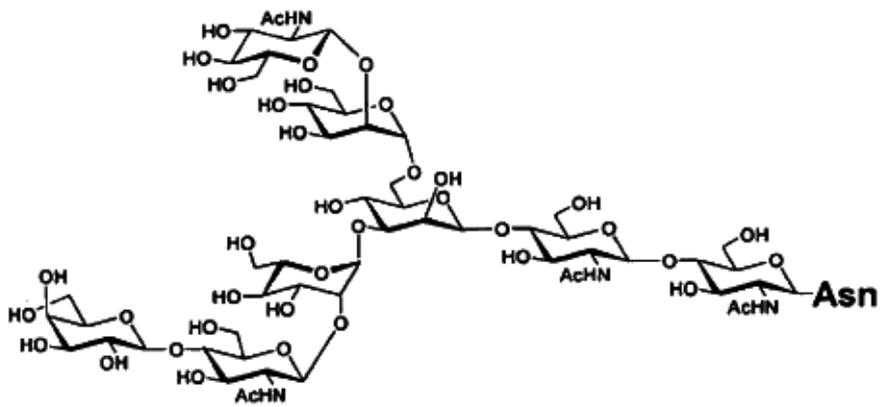
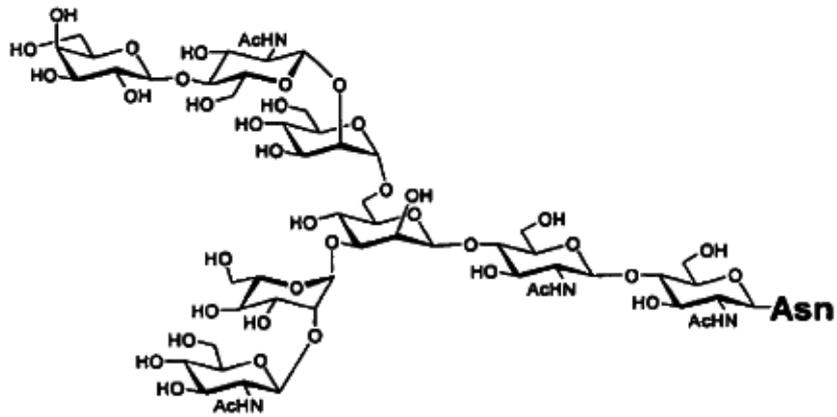


- y/o un compuesto que tiene una o más deleciones de residuos de azúcar en el compuesto anterior; y
- 10 (b) someter la mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar o una mezcla obtenible hidrolizando un derivado de asparagina de la cadena de azúcar contenida en la mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar a cromatografía, para separar cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar de los mismos.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de (b') hidrolizar el derivado de asparagina de la cadena de azúcar separado en la etapa (b) con una glucosidasa.
- 15 3. El procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el grupo protector soluble en grasa es un grupo fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc).
4. El procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la etapa (a) es una etapa de introducir Fmoc en la asparagina de la cadena de azúcar contenida en una mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar que tiene un residuo de ácido siálico en un extremo no reductor, e introducir un grupo bencilo en el residuo de ácido siálico, dando una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar.
- 20 5. El procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de
- (c) eliminar el grupo protector del derivado de asparagina de la cadena de azúcar separado en la etapa (b) dando la asparagina de la cadena de azúcar.
6. El procedimiento según la reivindicación 5, que comprende además la etapa de
- 25 (b') hidrolizar el derivado de asparagina de la cadena de azúcar separado en la etapa (b) con una glucosidasa; y/o
- (c') hidrolizar la asparagina de la cadena de azúcar obtenida en la etapa (c) con una glucosidasa.
7. El procedimiento según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que el grupo protector soluble en grasa es Fmoc.
- 30 8. El procedimiento según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que la etapa (a) es una etapa de introducir Fmoc en la asparagina de la cadena de azúcar contenida en una mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar que tiene un residuo de ácido siálico en un extremo no reductor, e introducir un grupo bencilo en el residuo de ácido siálico, dando una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además las etapas de
- 35 (c) eliminar el grupo protector del derivado de asparagina de la cadena de azúcar separado en la etapa (b), dando una asparagina de la cadena de azúcar; y
- (d) eliminar un residuo de asparagina de la asparagina de la cadena de azúcar obtenida en la etapa (c), dando la cadena de azúcar.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, que comprende además la(s) etapa(s) de:

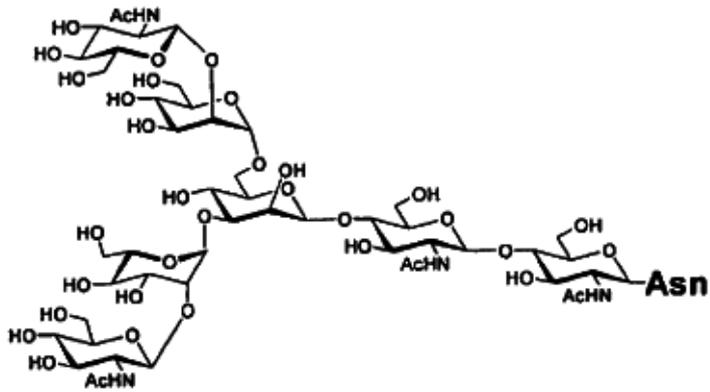
- y/o
- (b') hidrolizar el derivado de asparagina de la cadena de azúcar separado en la etapa (b) con una glucosidasa;
- (c') hidrolizar la asparagina de la cadena de azúcar obtenida en la etapa (c) con una glucosidasa; y/o
- (d') hidrolizar la cadena de azúcar obtenida en la etapa (d) con una glucosidasa.
- 5 11. El procedimiento según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que el grupo protector soluble en grasa es Fmoc.
- 10 12. El procedimiento según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que la etapa (a) es una etapa de introducir Fmoc en la asparagina de la cadena de azúcar contenida en una mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar que tiene un residuo de ácido siálico en un extremo no reductor, e introducir un grupo bencilo en el residuo de ácido siálico, dando una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar.
13. El procedimiento para preparar un derivado de asparagina de la cadena de azúcar según la reivindicación 1, que comprende las etapas de
- 15 (a) introducir un grupo protector soluble en grasa seleccionado de grupo Fmoc, grupo t-butiloxicarbonilo (Boc), grupo bencilo, grupo alilo, grupo aliloxicarbonato y grupo acetilo en la asparagina de la cadena de azúcar contenida en una mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar, dando una mezcla de derivados de asparagina de la cadena de azúcar, en el que la mezcla de una o más asparaginas de la cadena de azúcar comprende asparaginas de la cadena de azúcar seleccionadas del grupo que consiste en:







y



i y

(b) someter la mezcla de uno o más derivados de asparagina de la cadena de azúcar a cromatografía, para separar cada uno de los derivados de asparagina de la cadena de azúcar de los mismos.

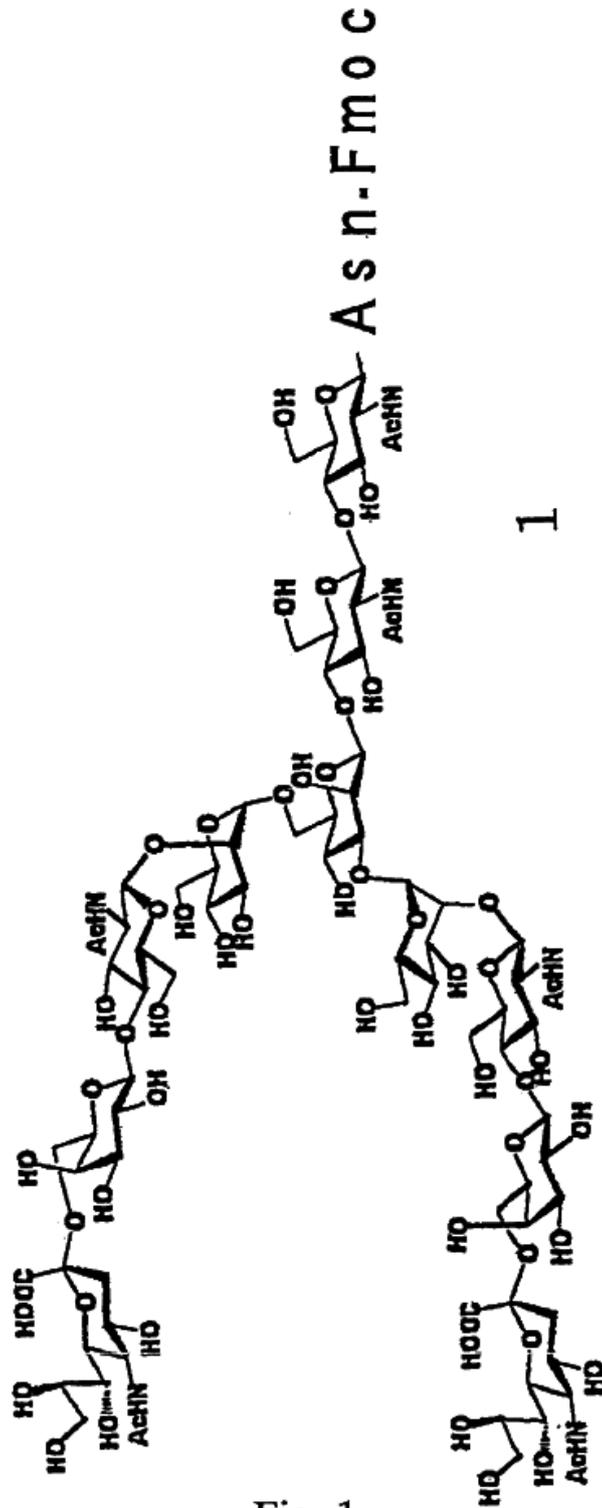
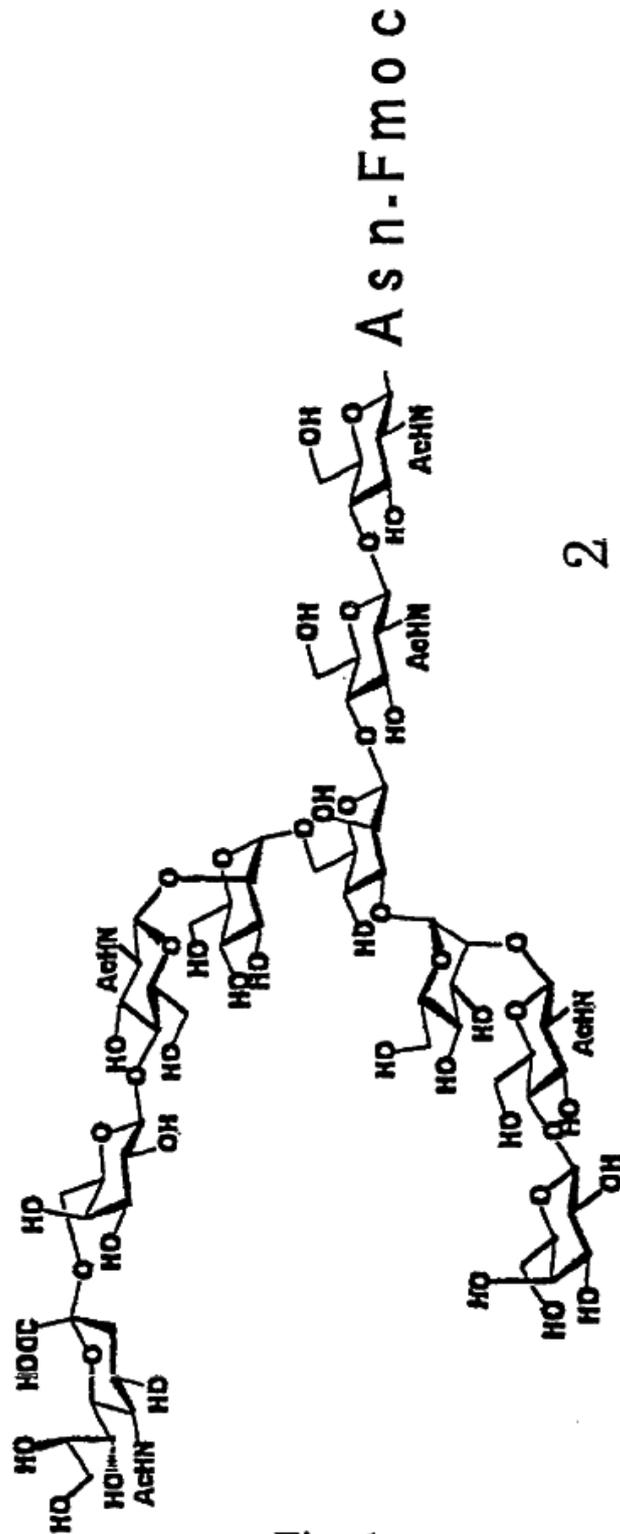


Fig. 1



2

Fig. 1

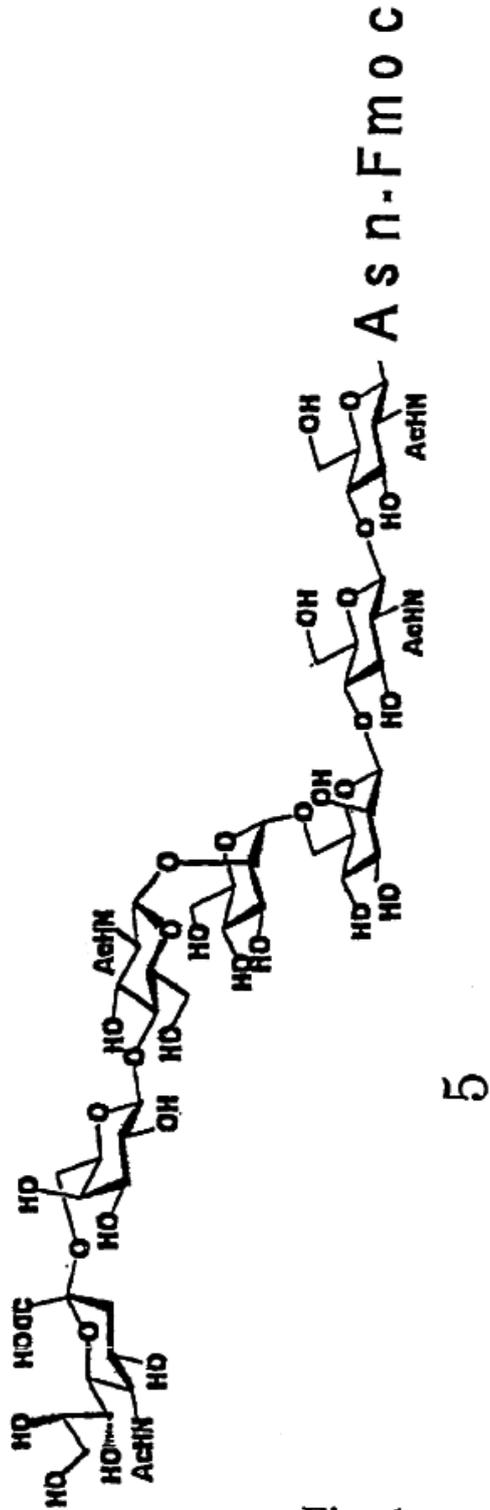


Fig. 1

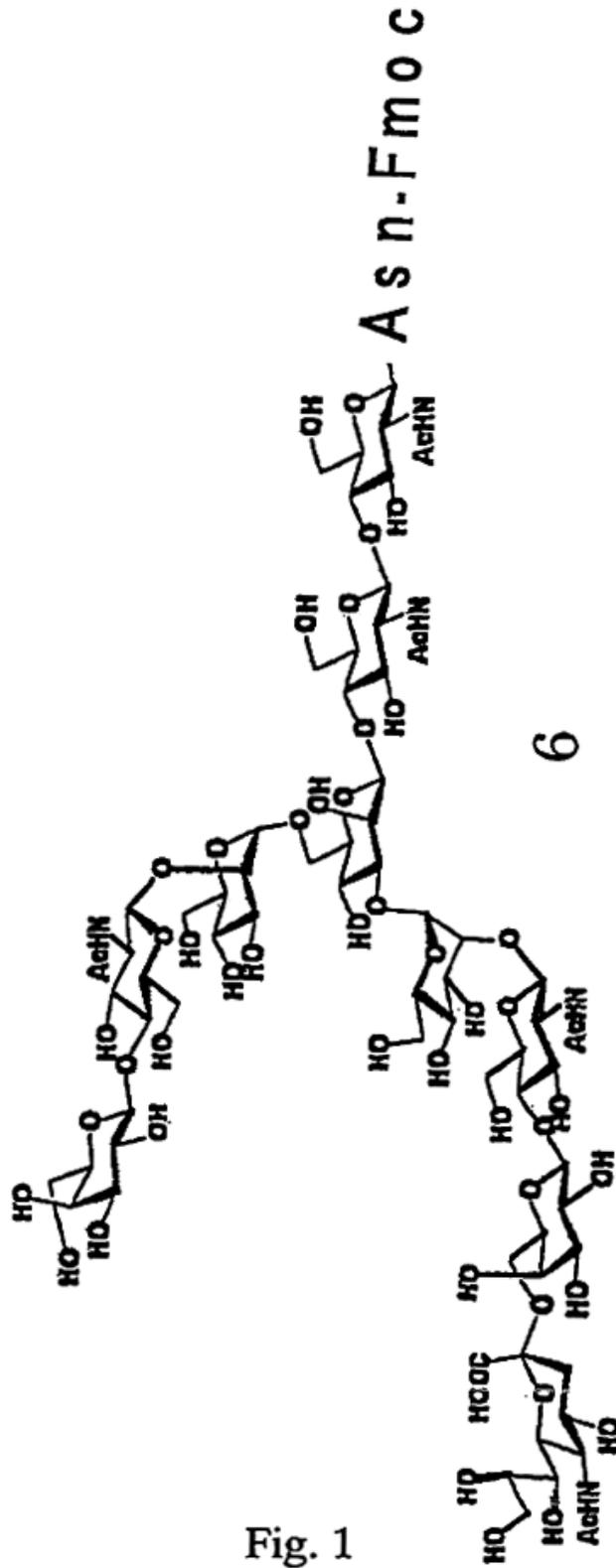


Fig. 1

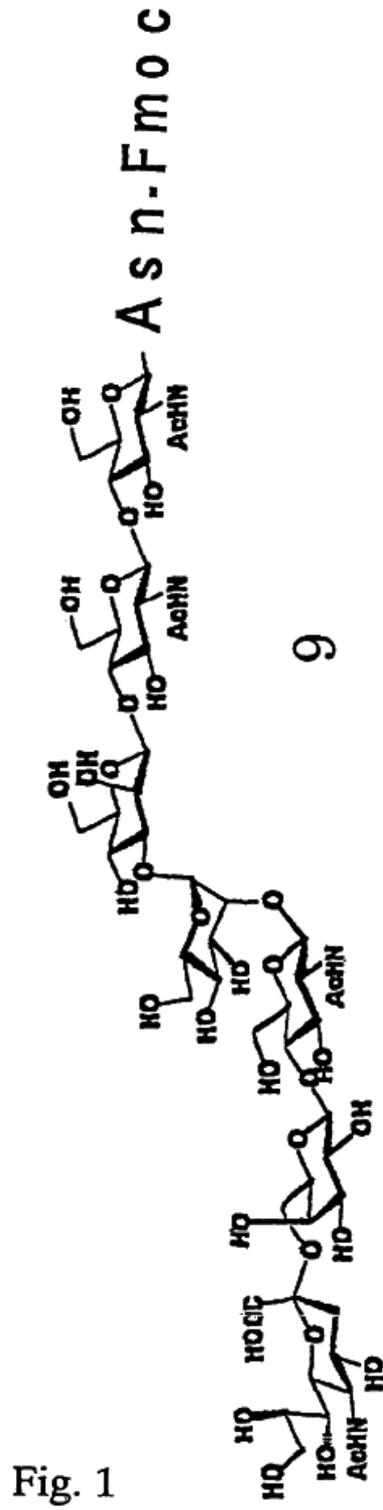


Fig. 1

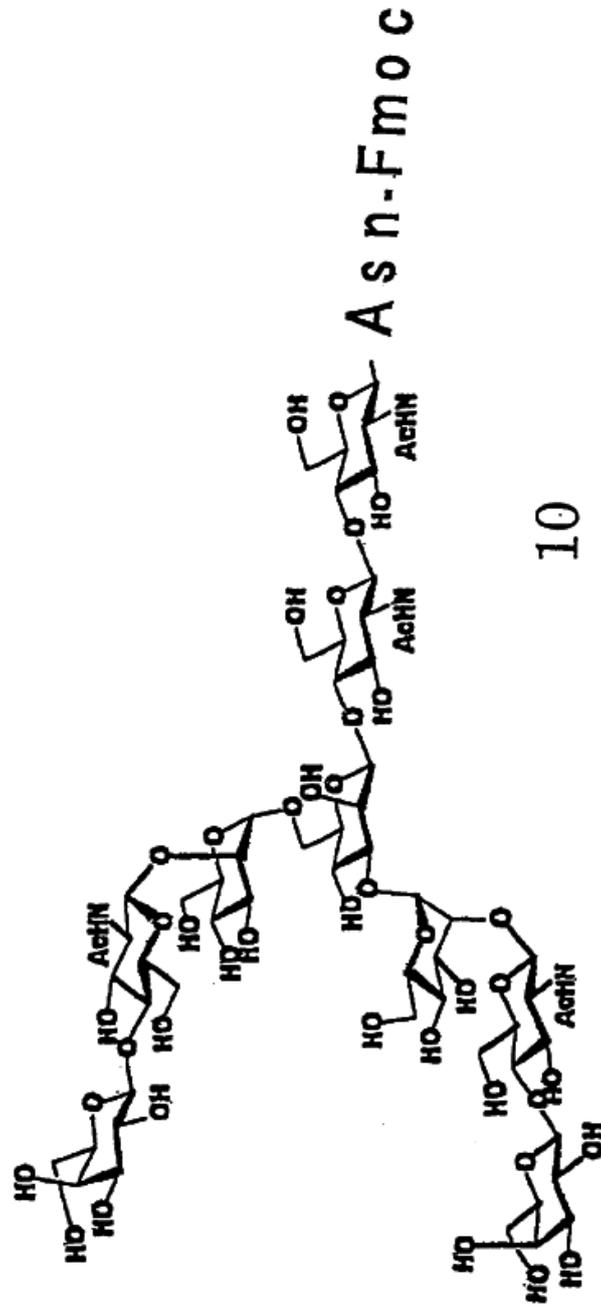
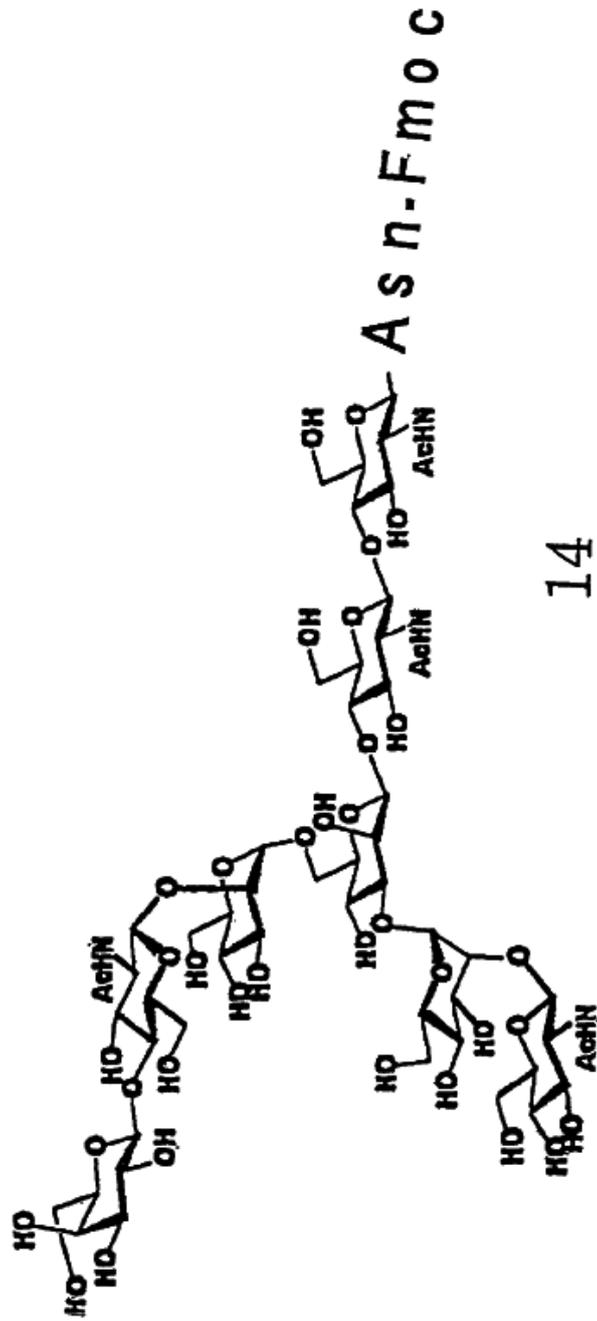


Fig. 1



14

Fig. 1

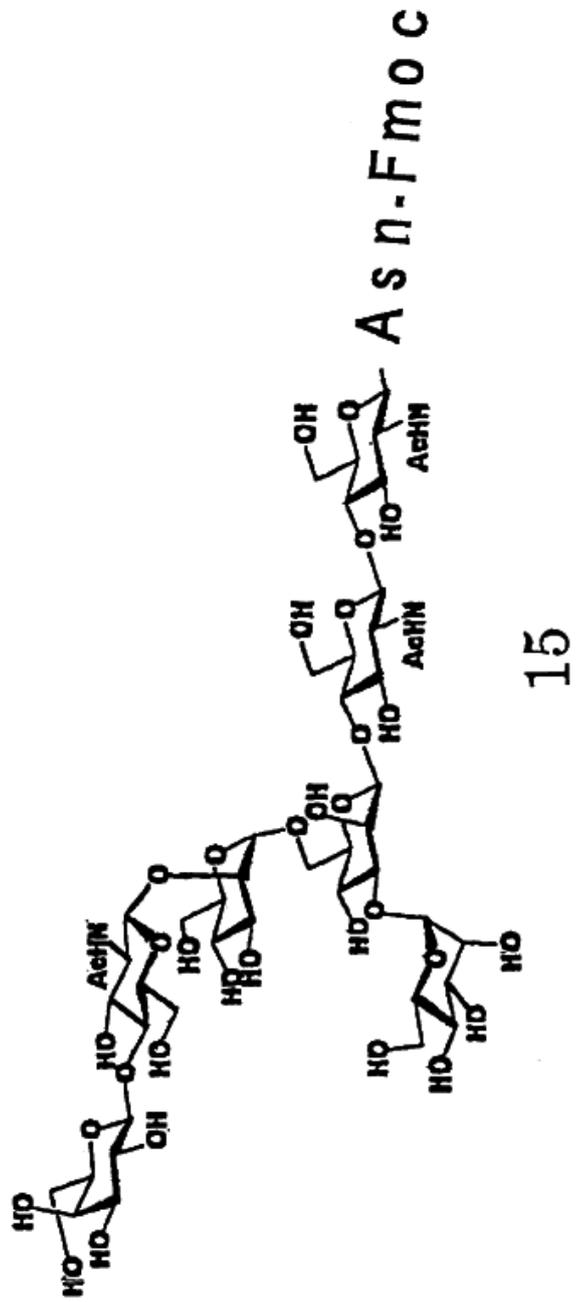
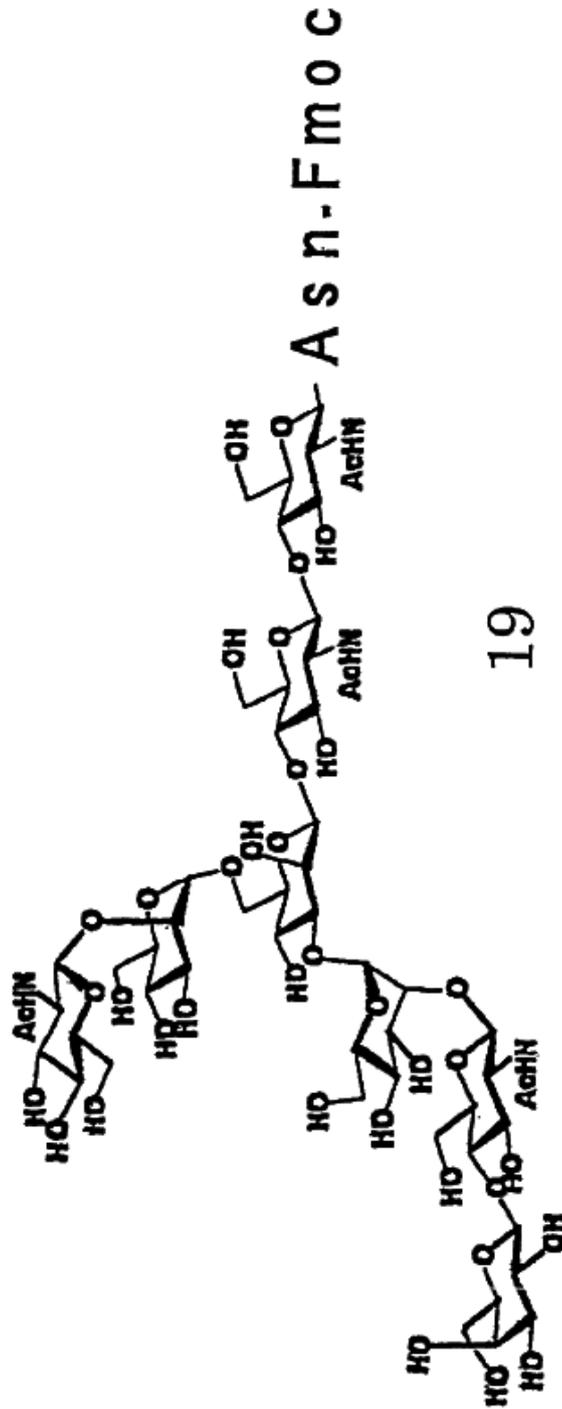
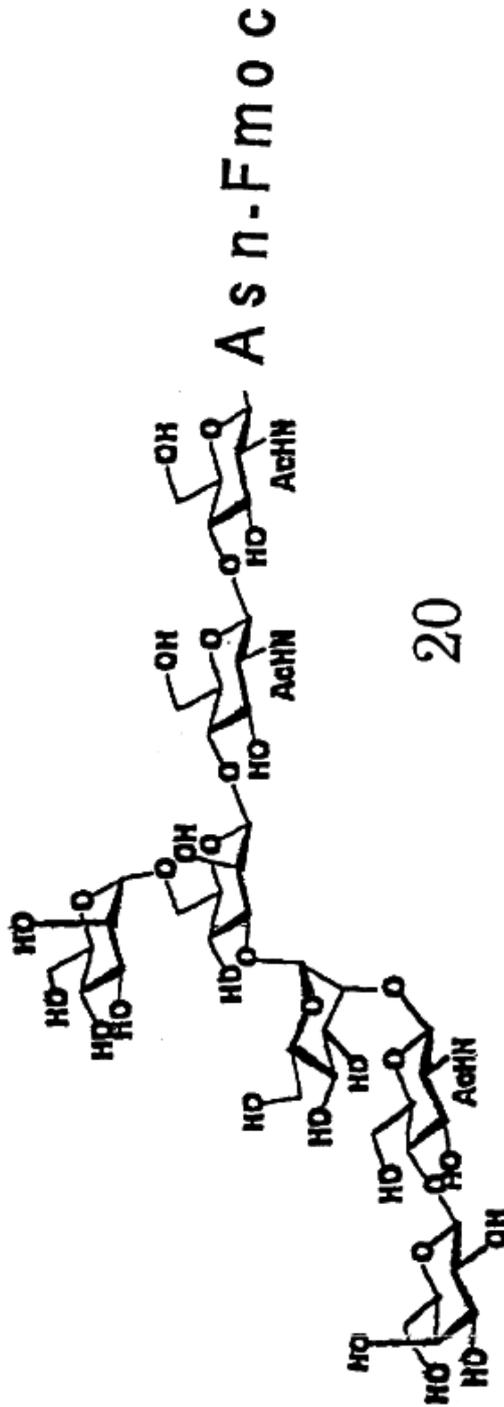


Fig. 1



19

Fig. 1



20

Fig. 1

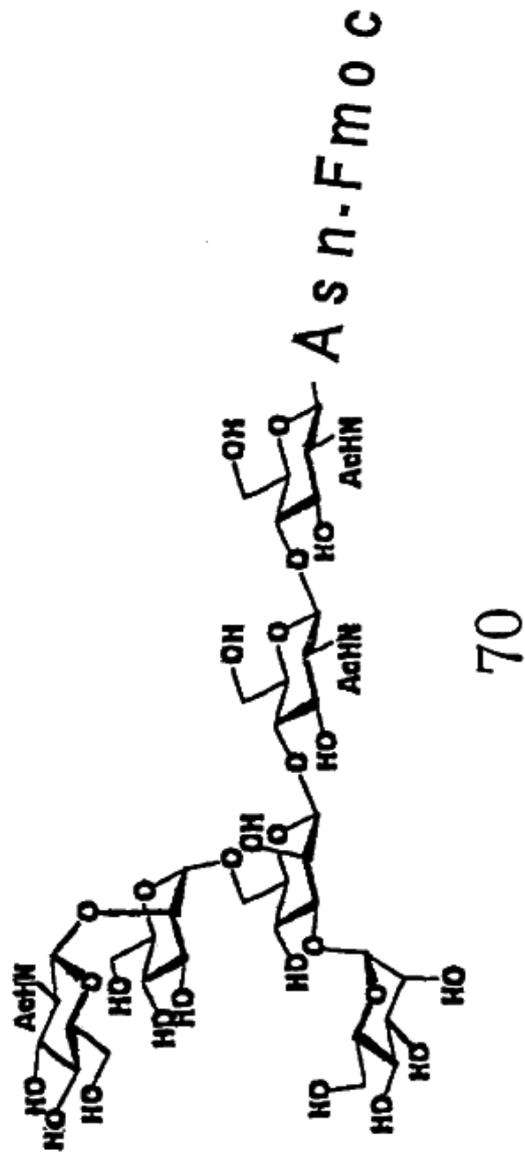
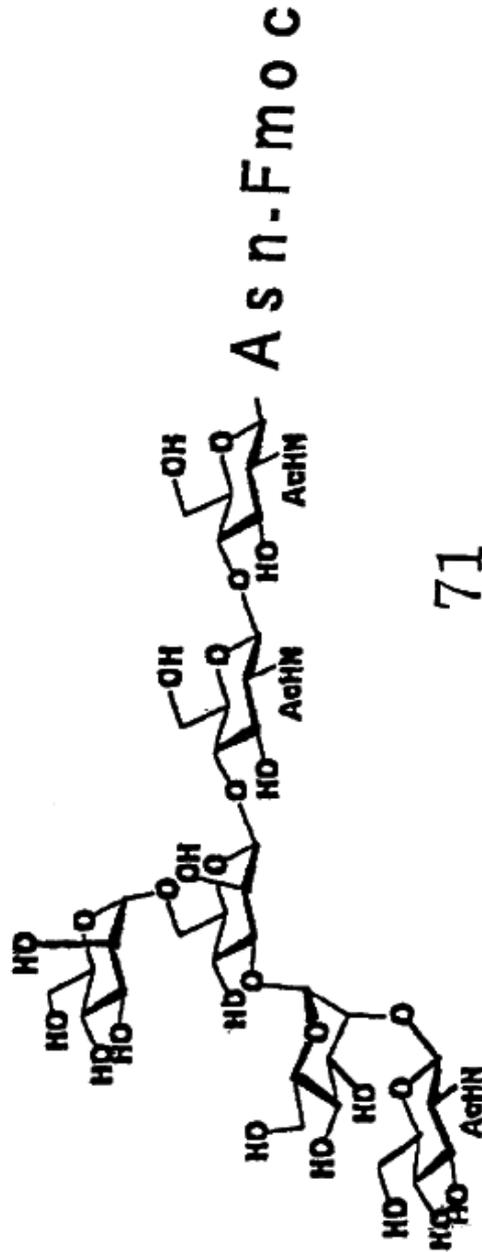


Fig. 1



71

Fig. 1

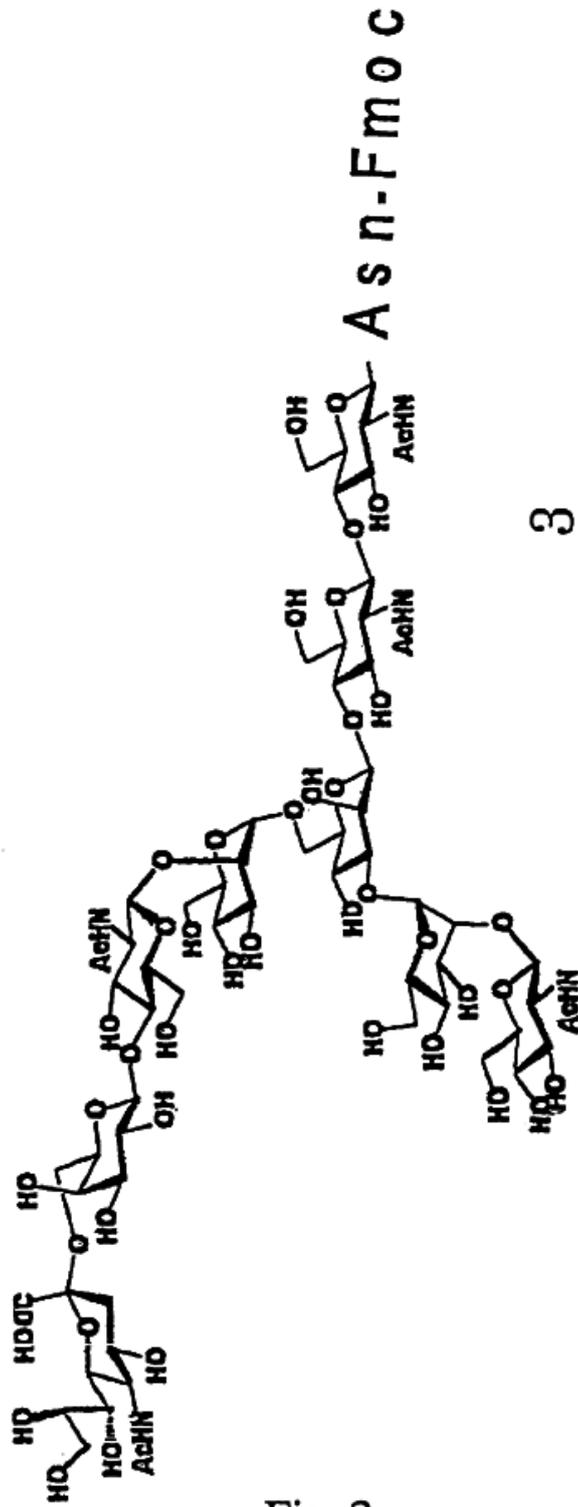


Fig. 2

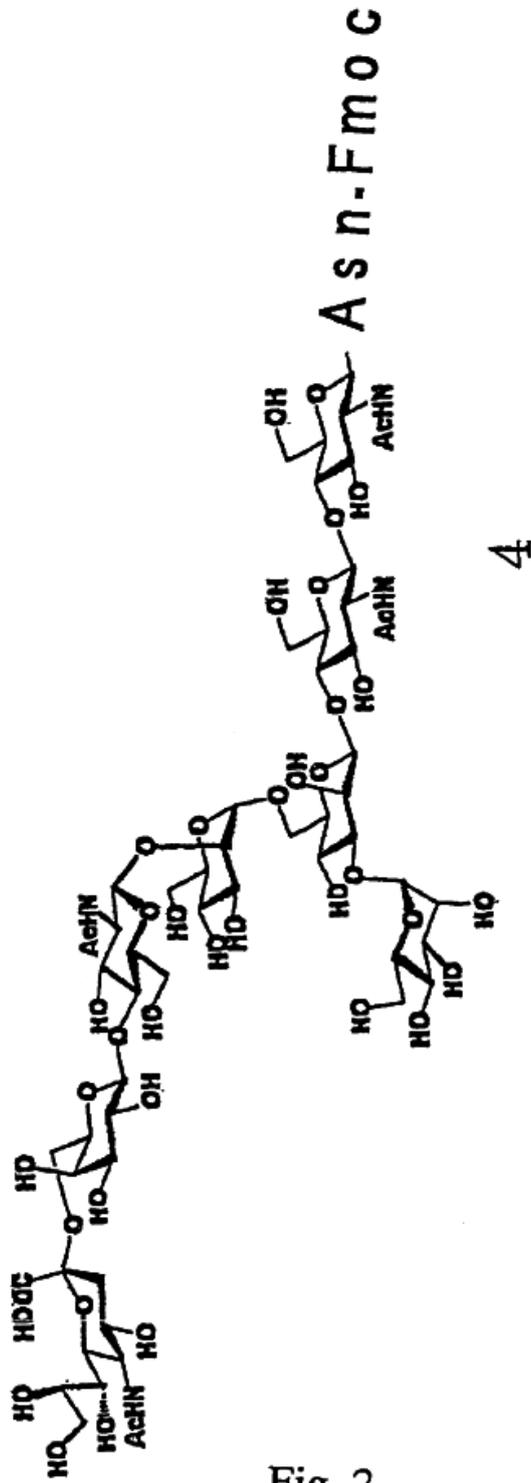


Fig. 2

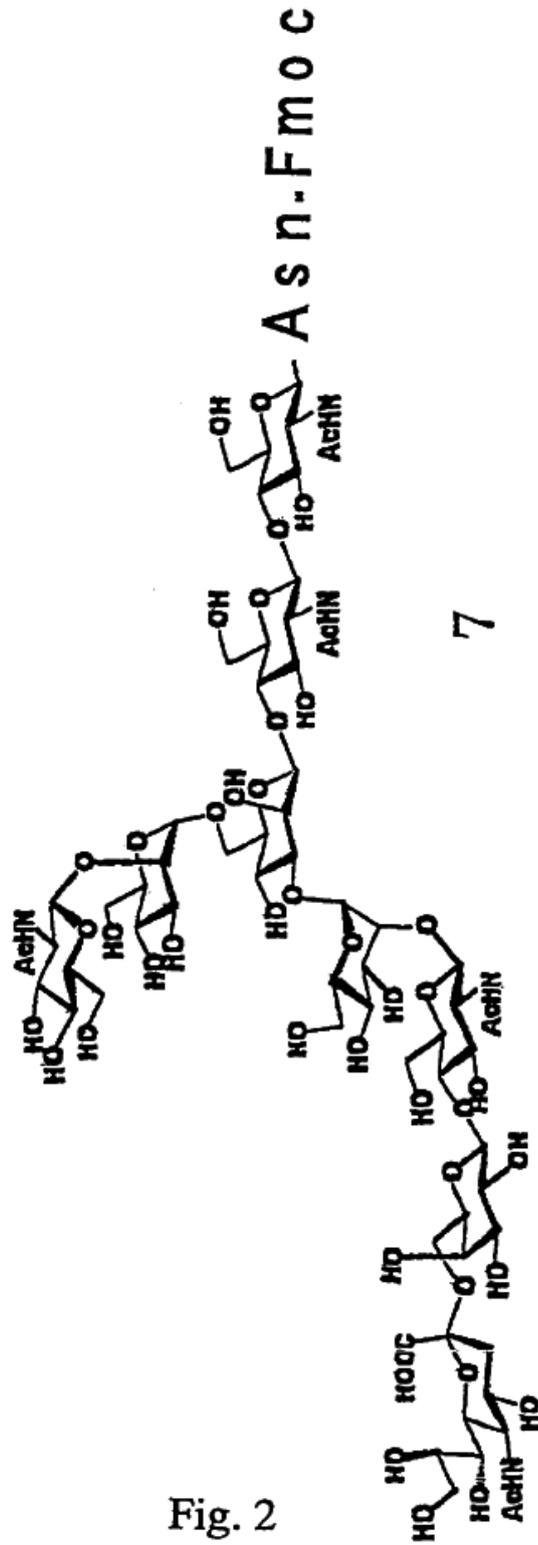
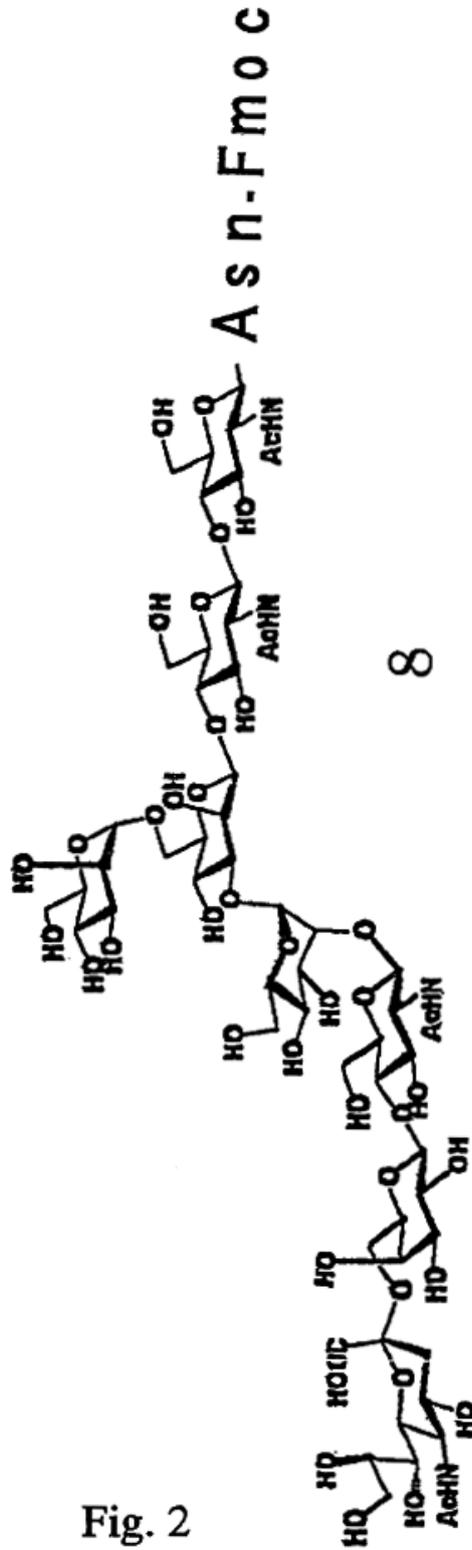


Fig. 2



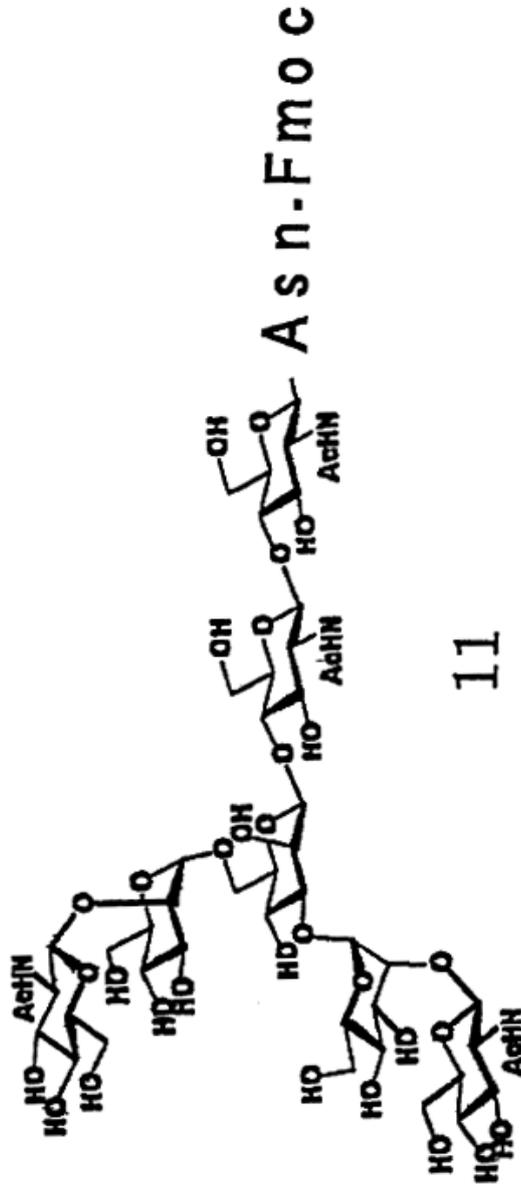
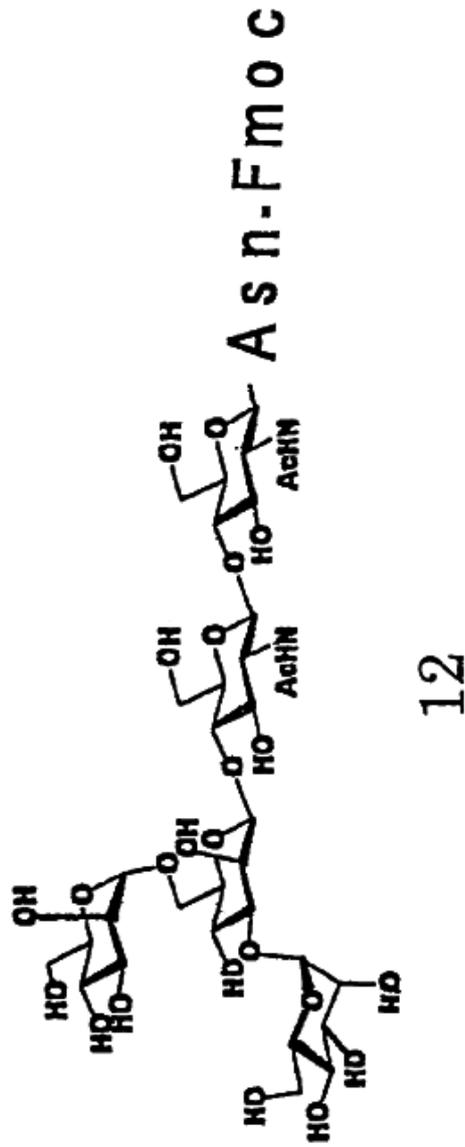
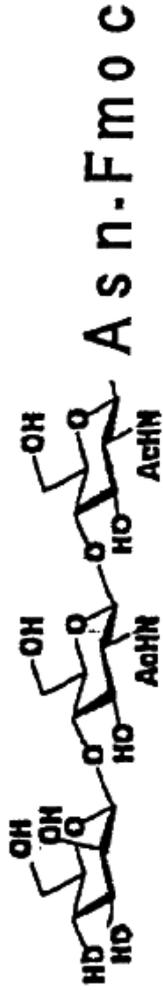


Fig. 2



12

Fig. 2



13

Fig. 2

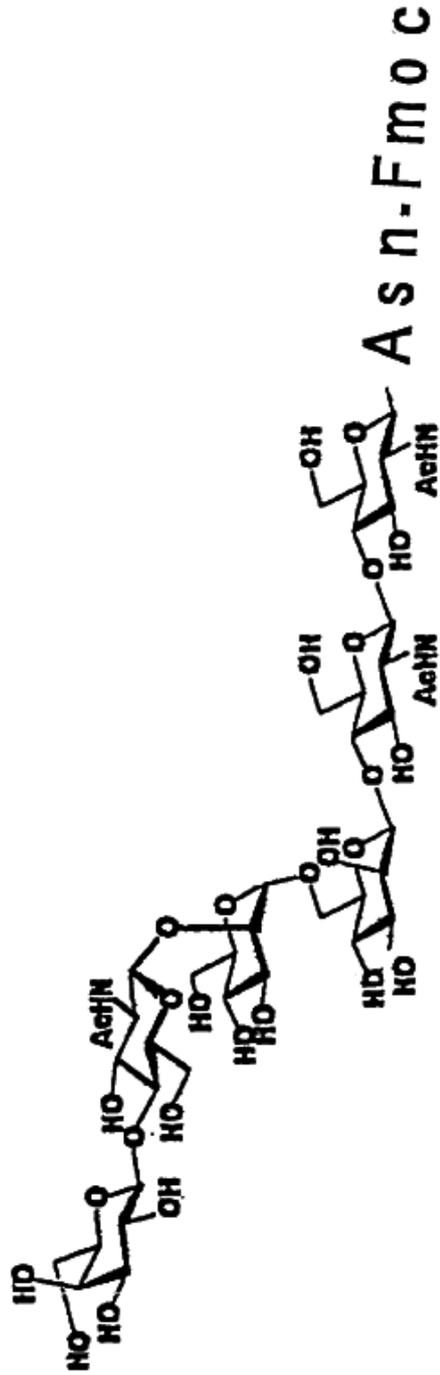


Fig. 2

16

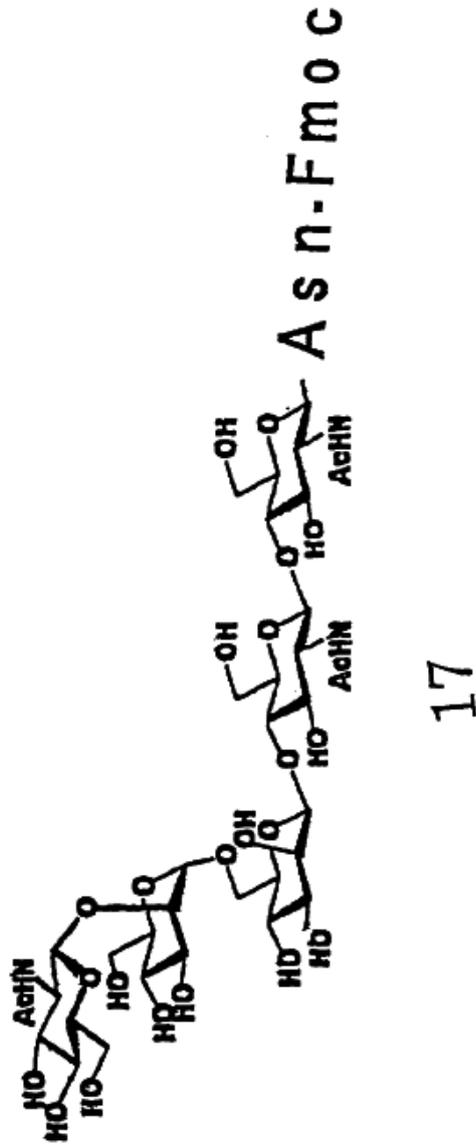
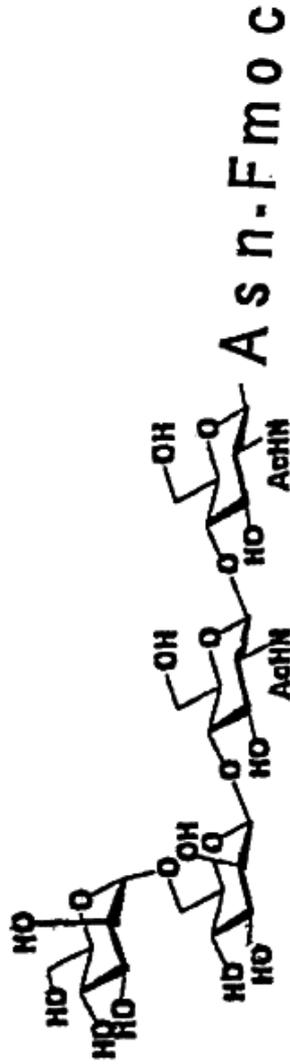
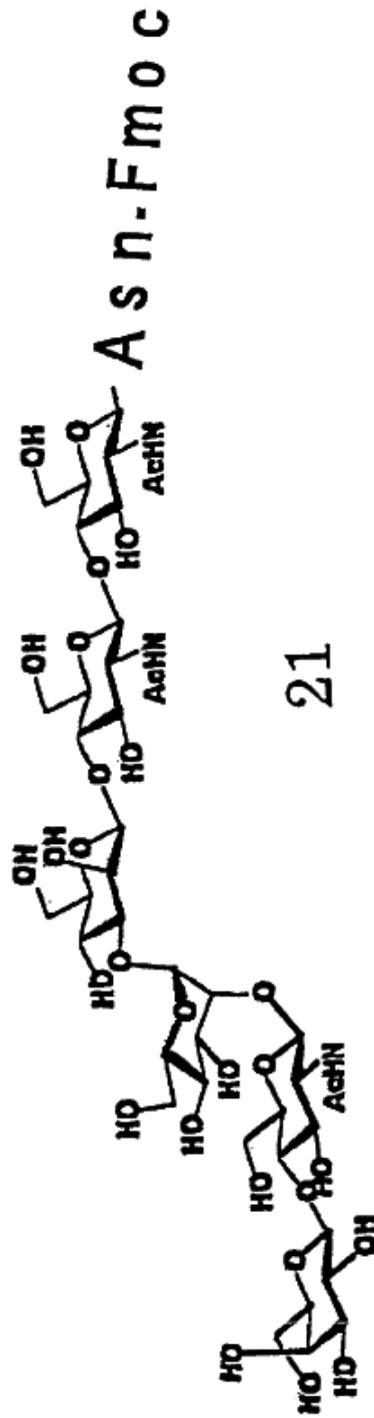


Fig. 2



18

Fig. 2



21

Fig. 2

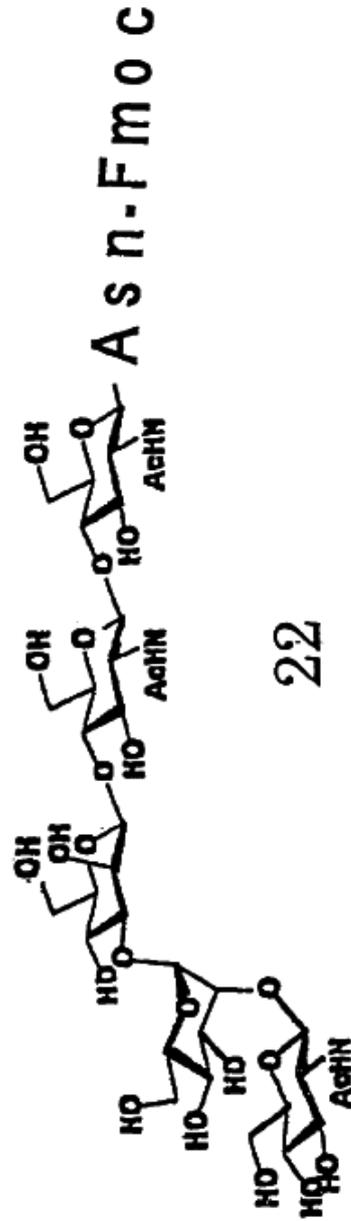
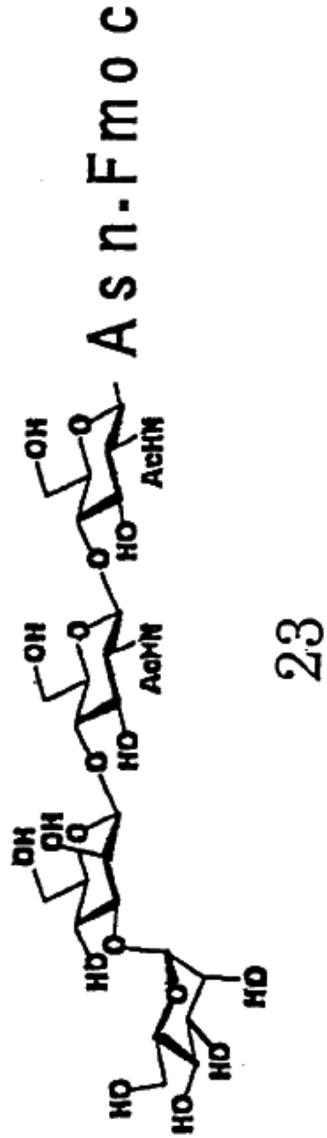
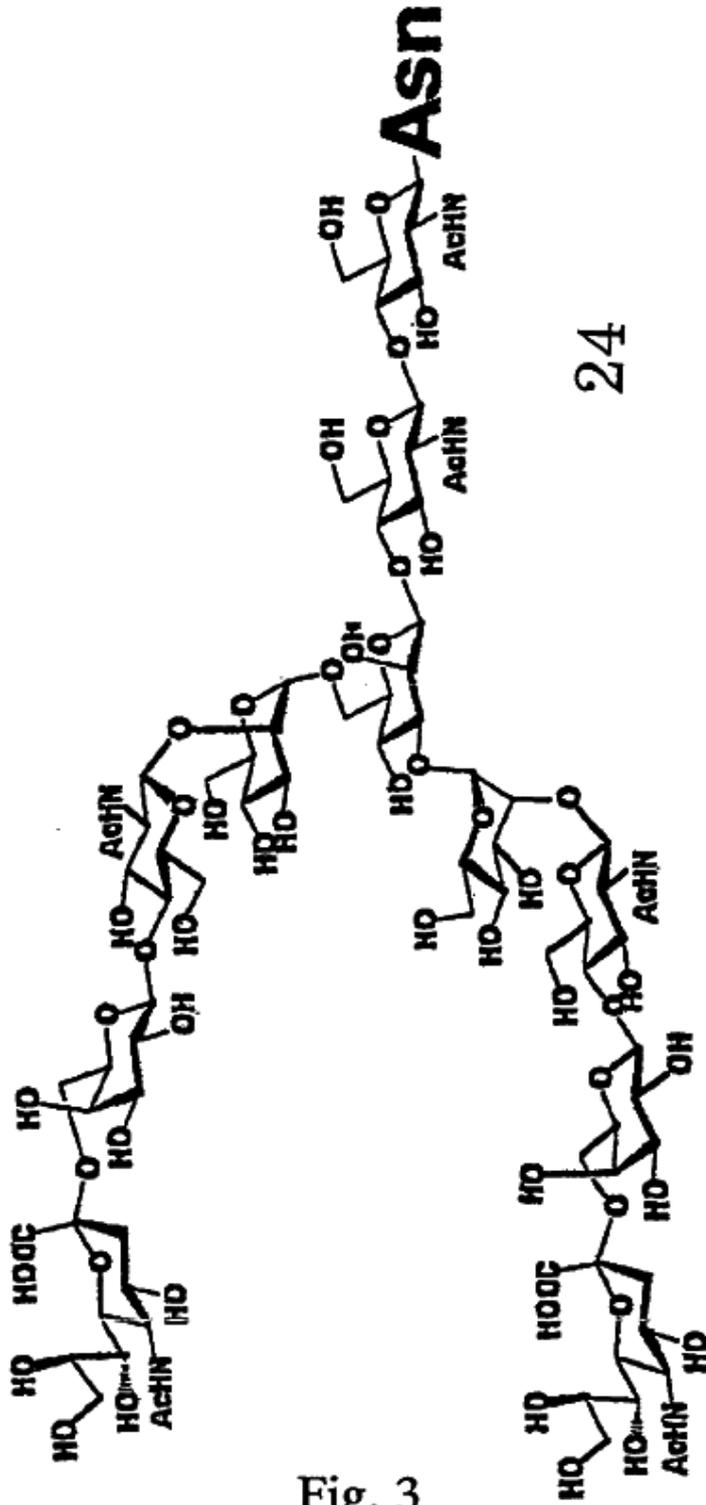


Fig. 2



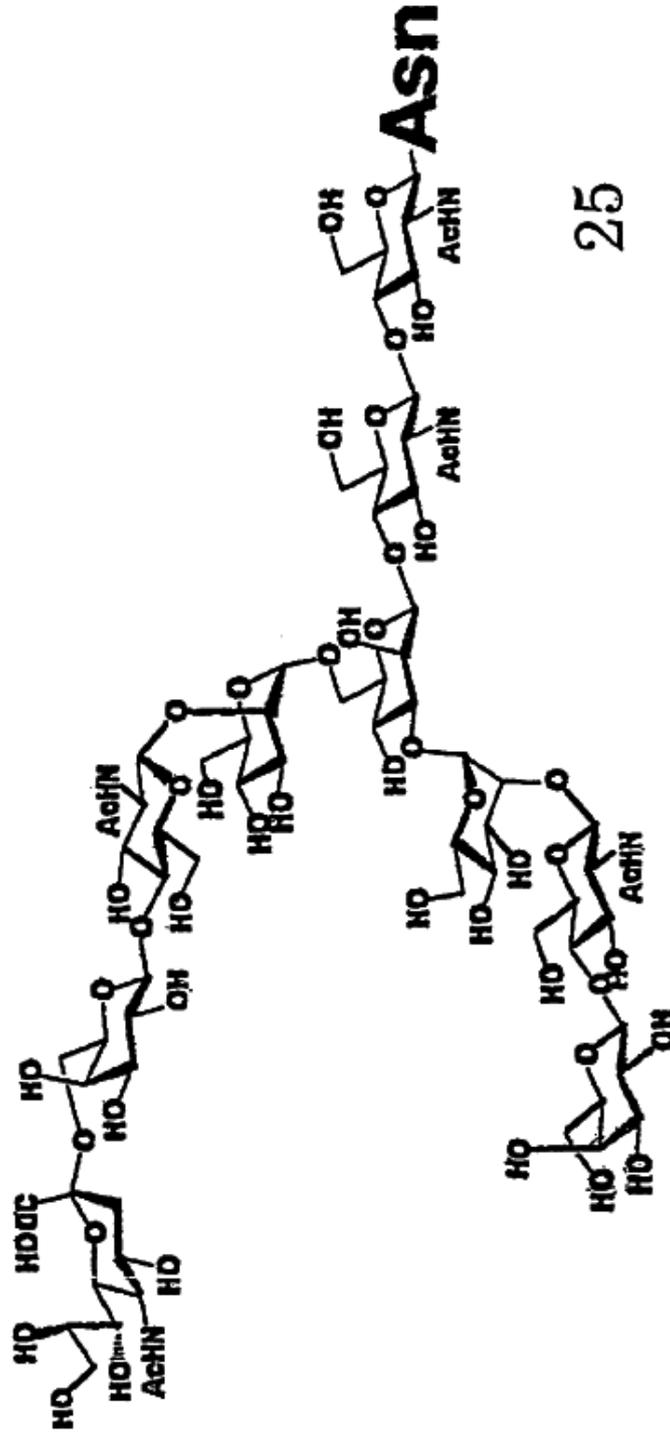
23

Fig. 2



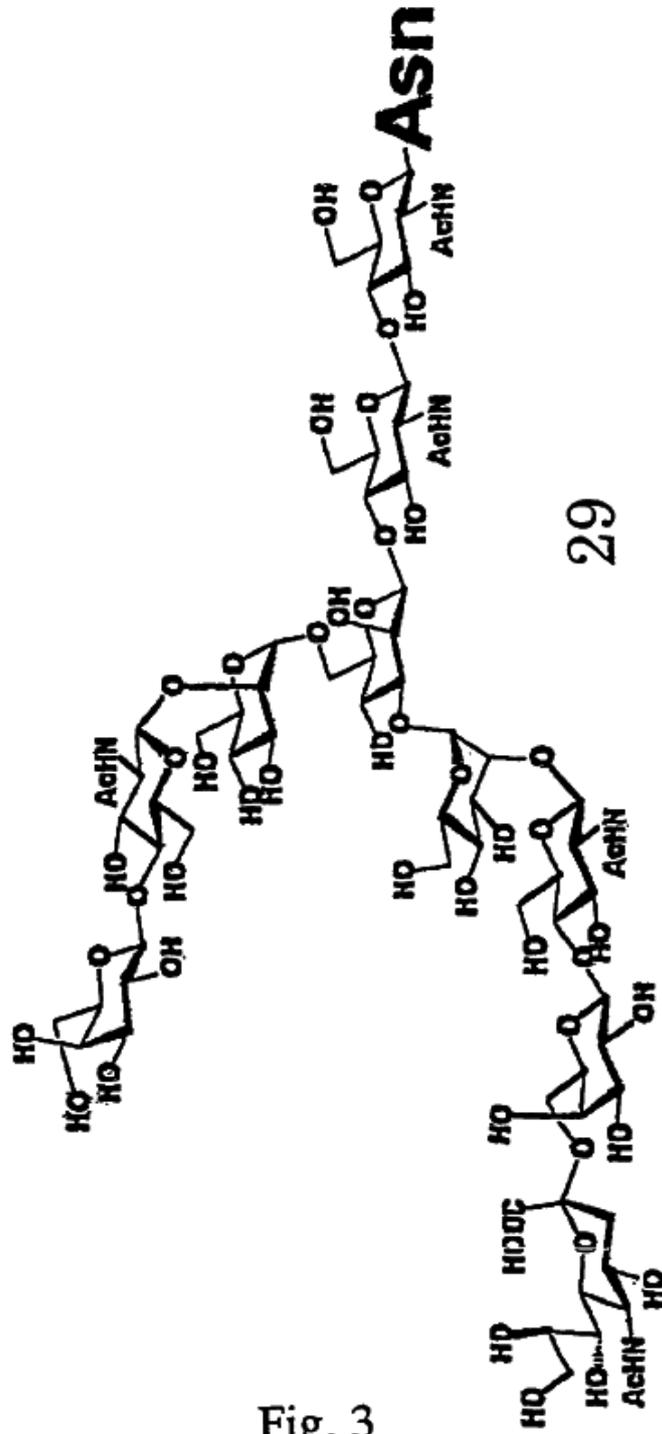
24

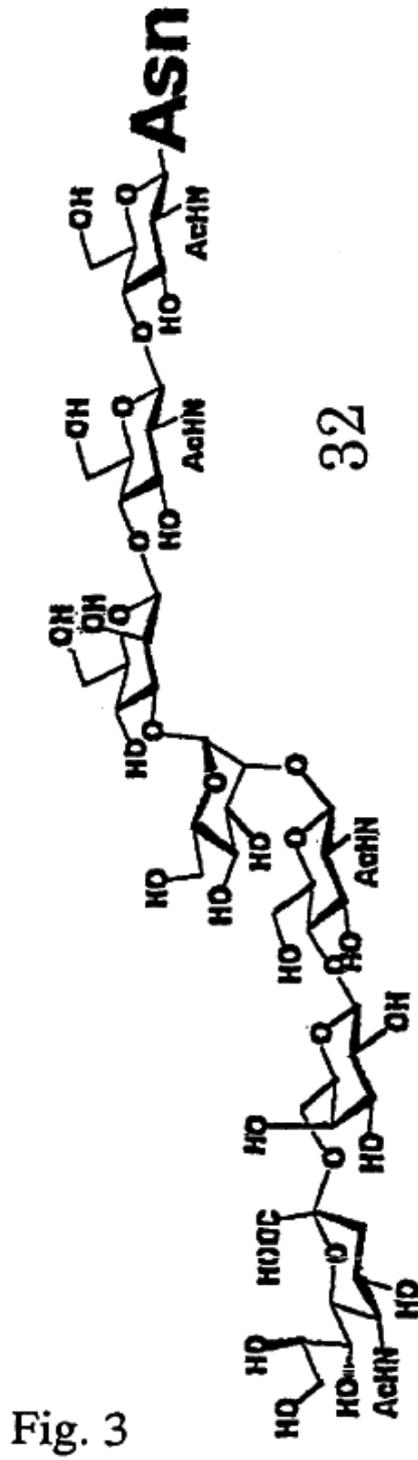
Fig. 3

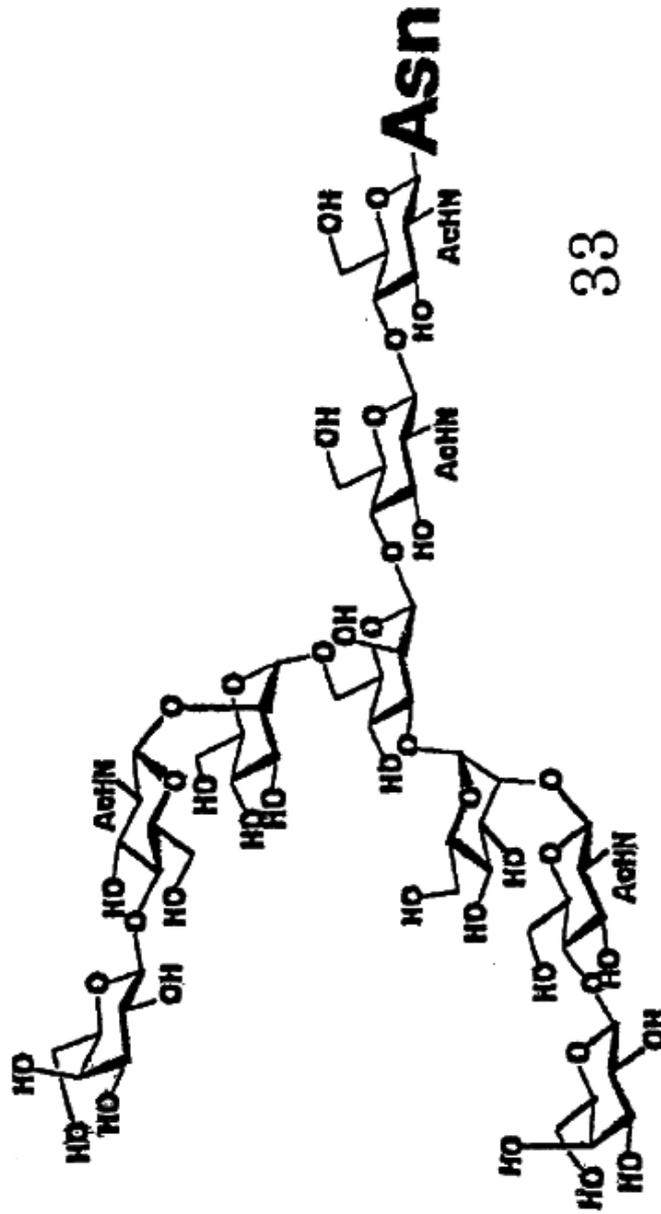


25

Fig. 3

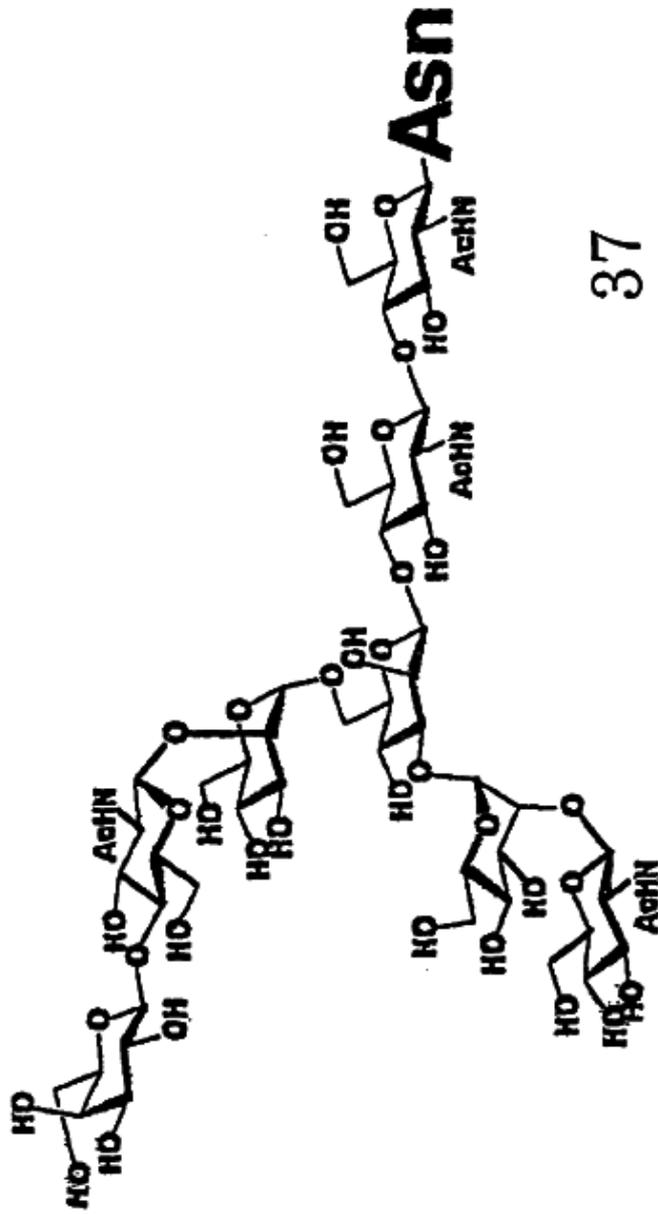






33

Fig. 3



37

Fig. 3

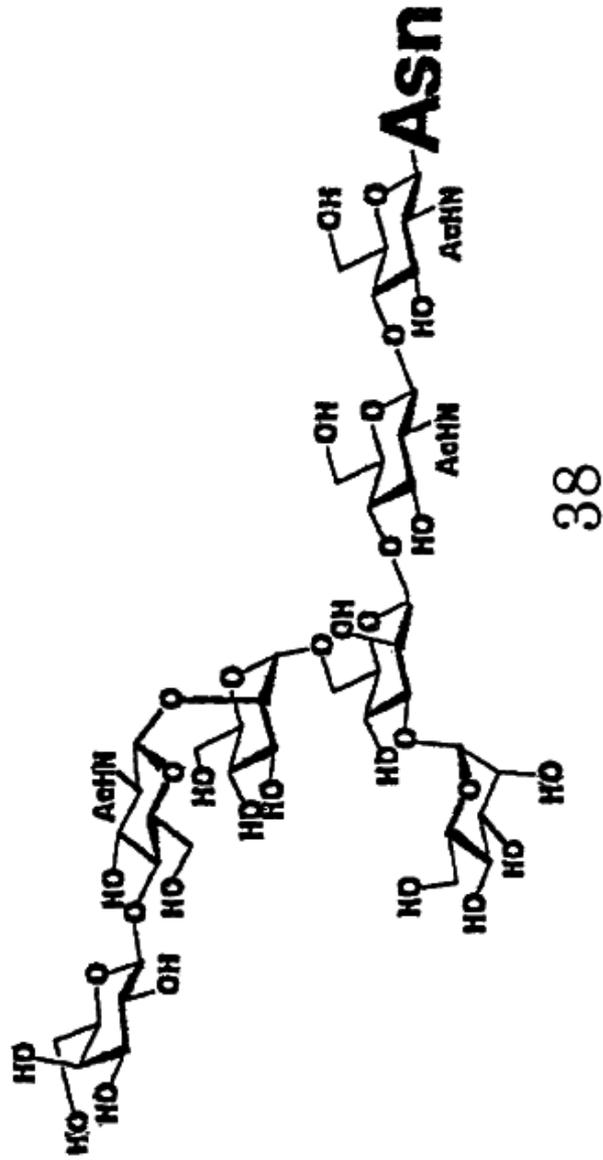
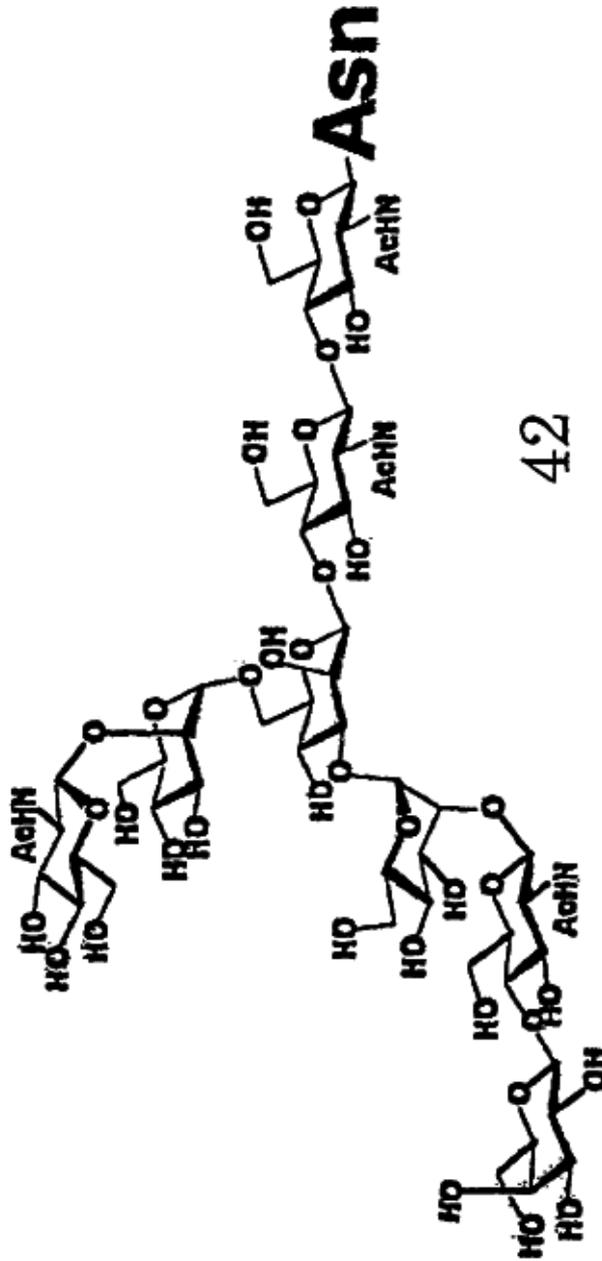
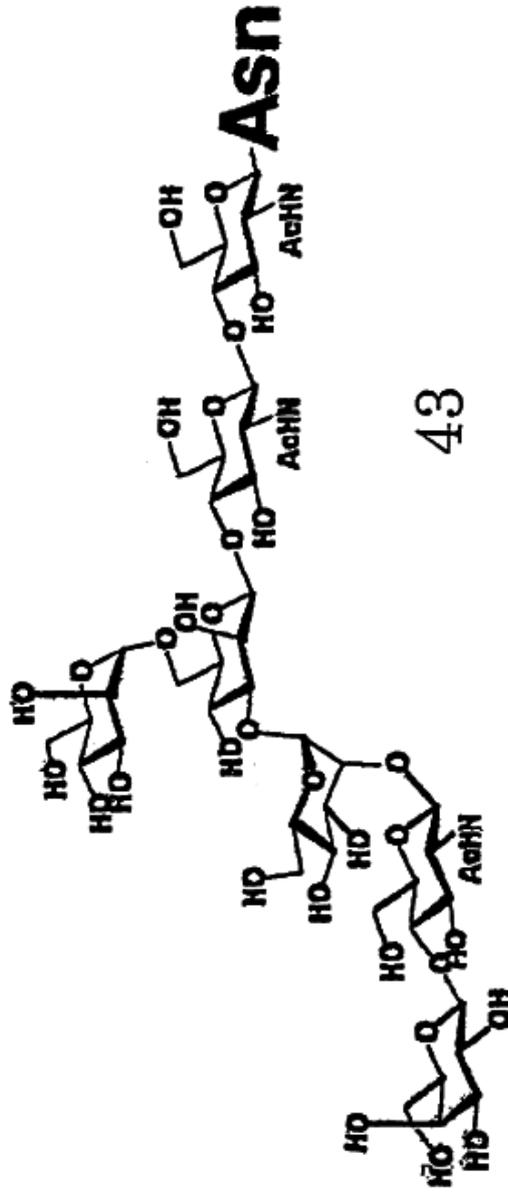


Fig. 3



42

Fig. 3



43

Fig. 3

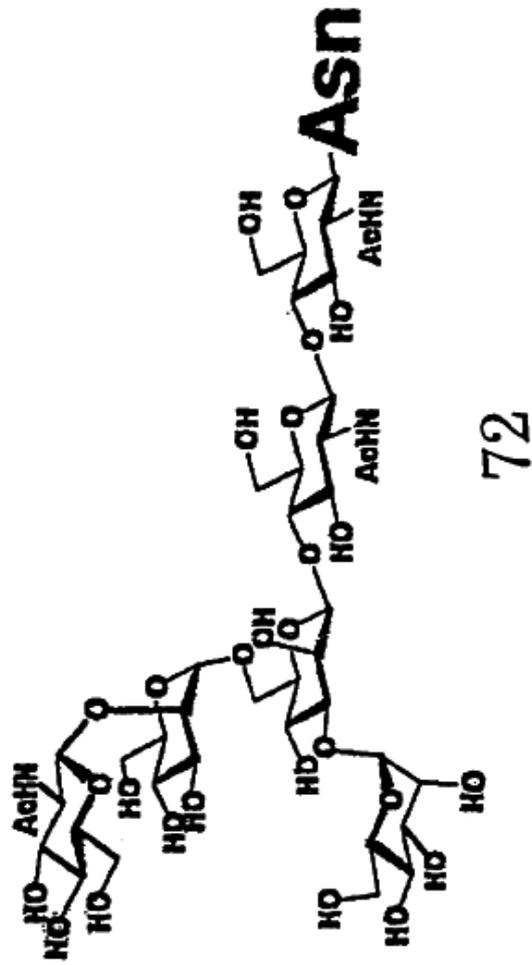
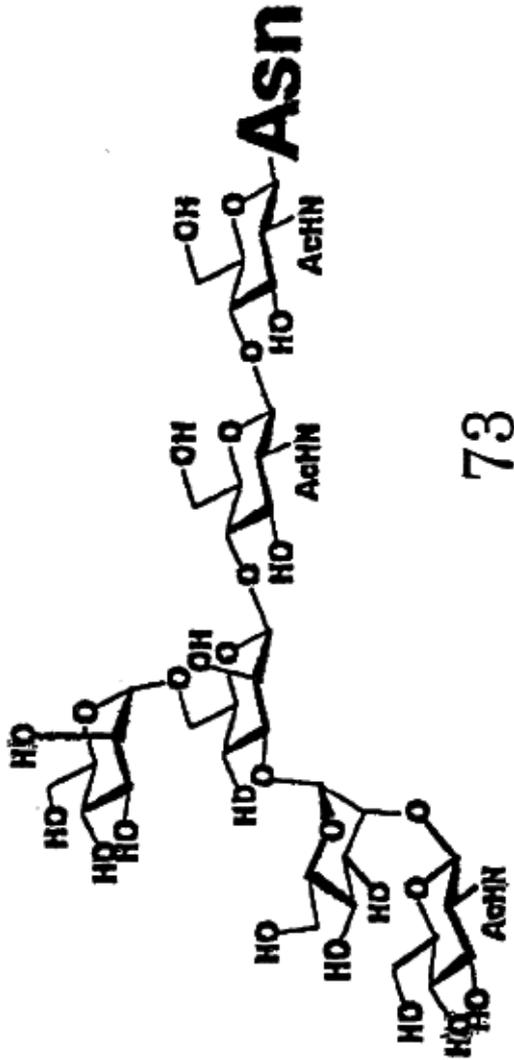
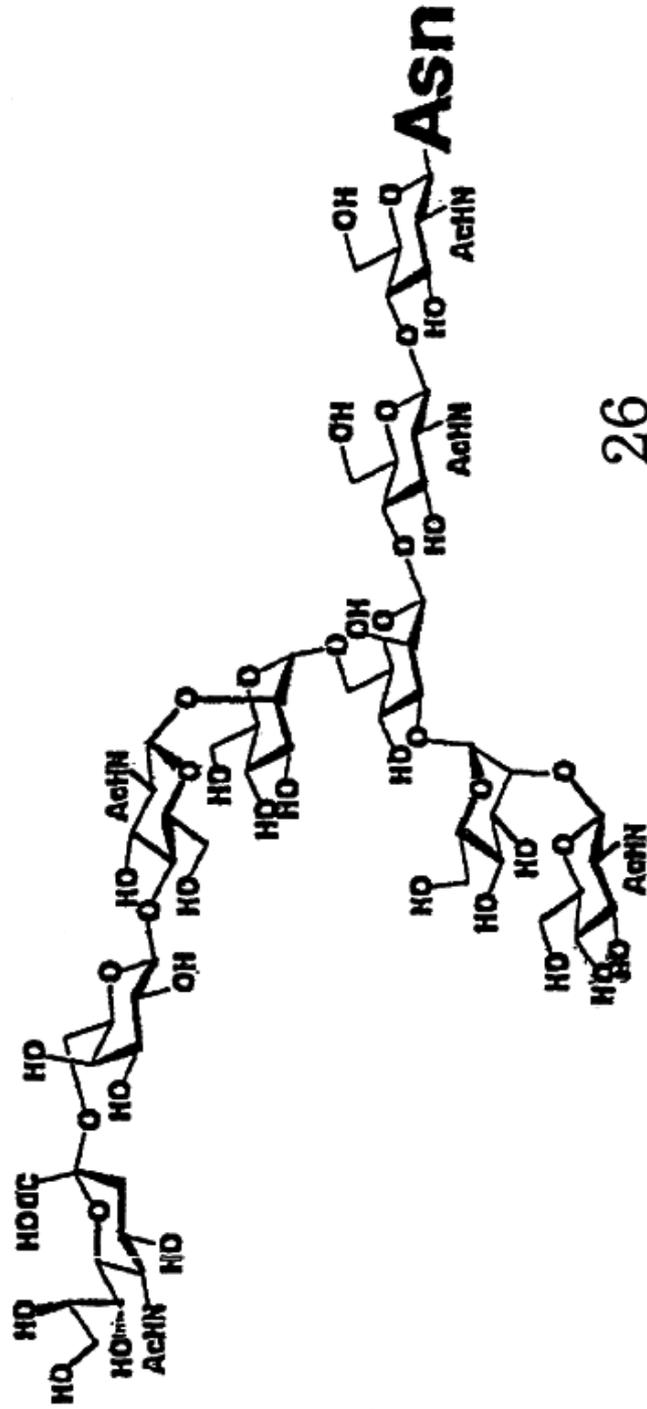


Fig. 3



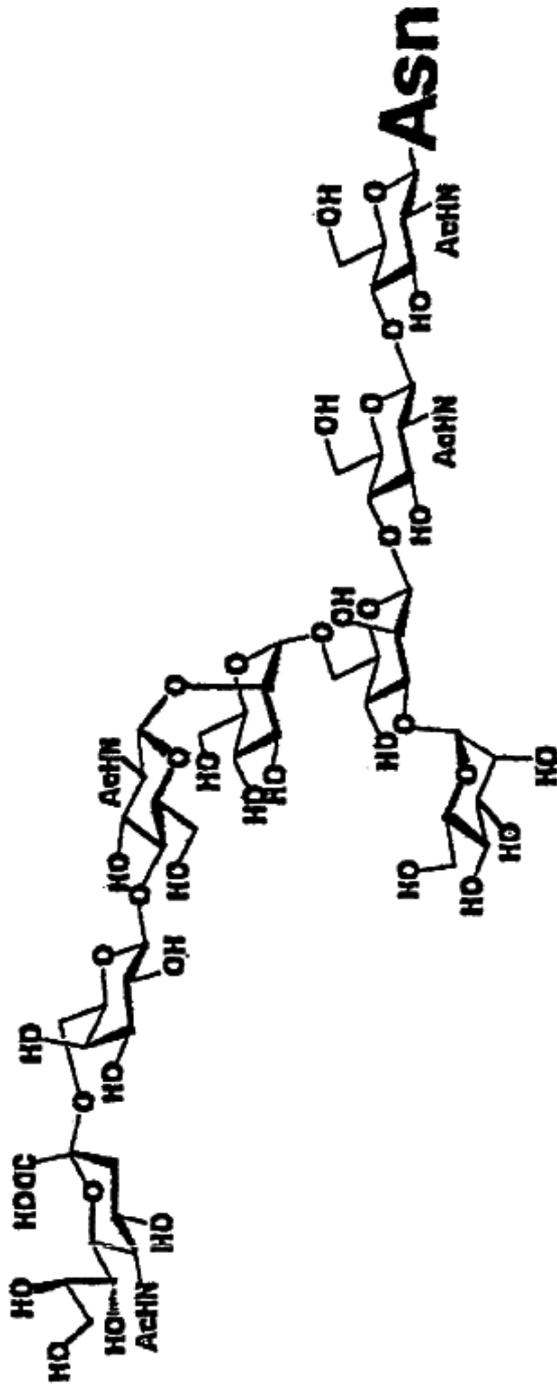
73

Fig. 3



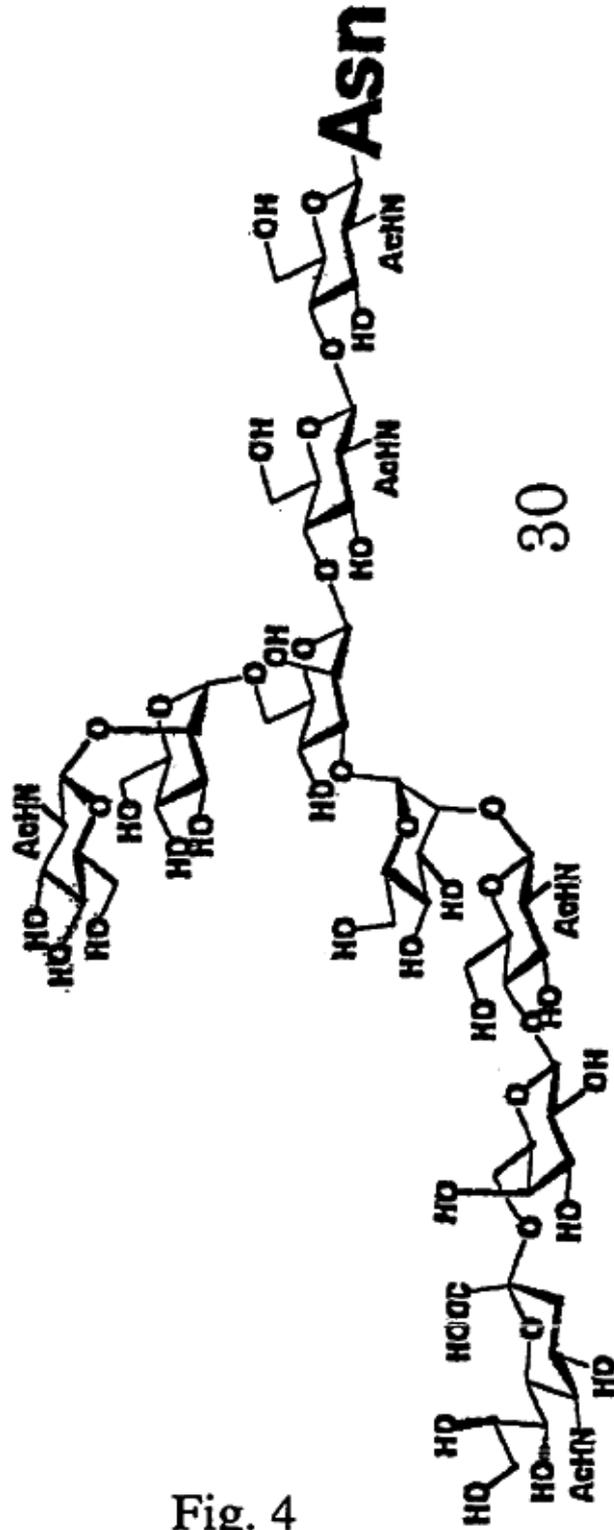
26

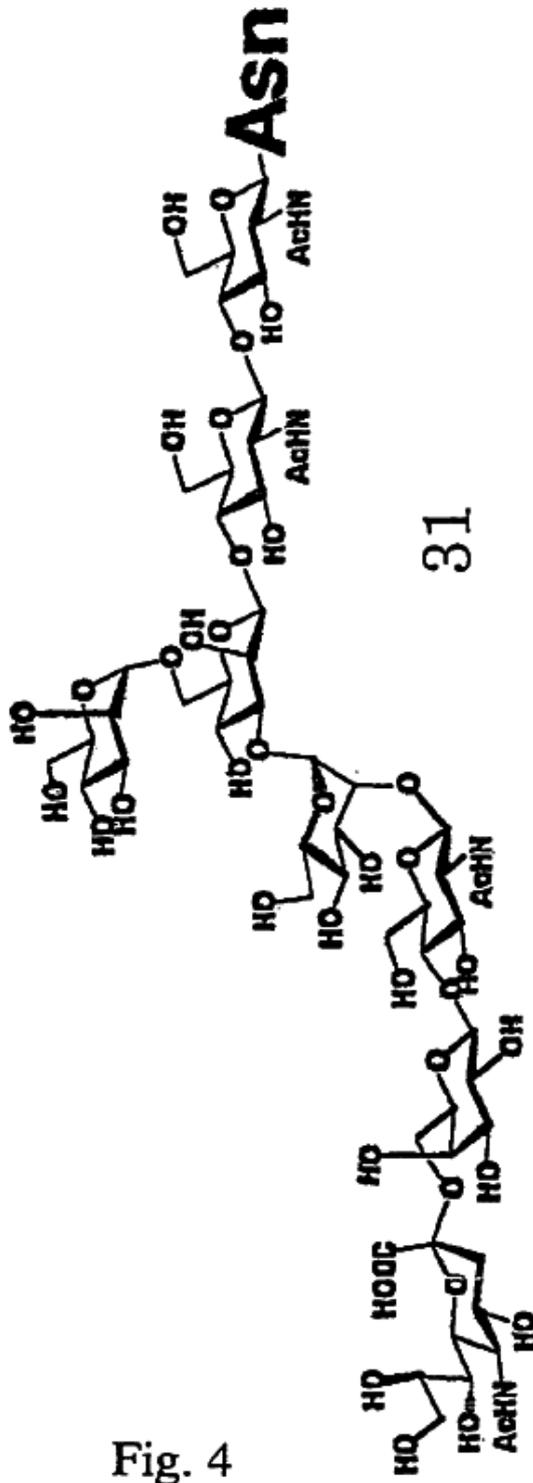
Fig. 4



27

Fig. 4





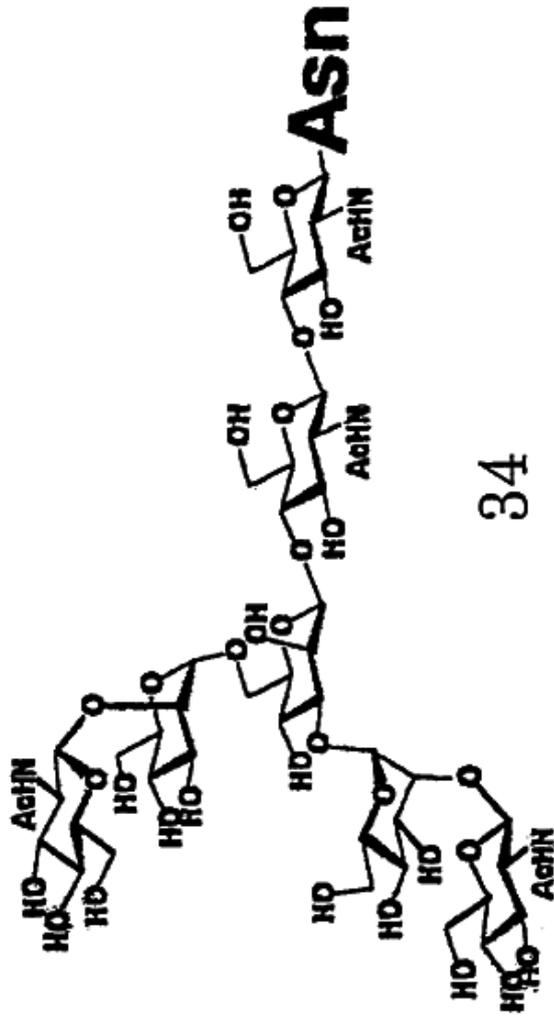


Fig. 4

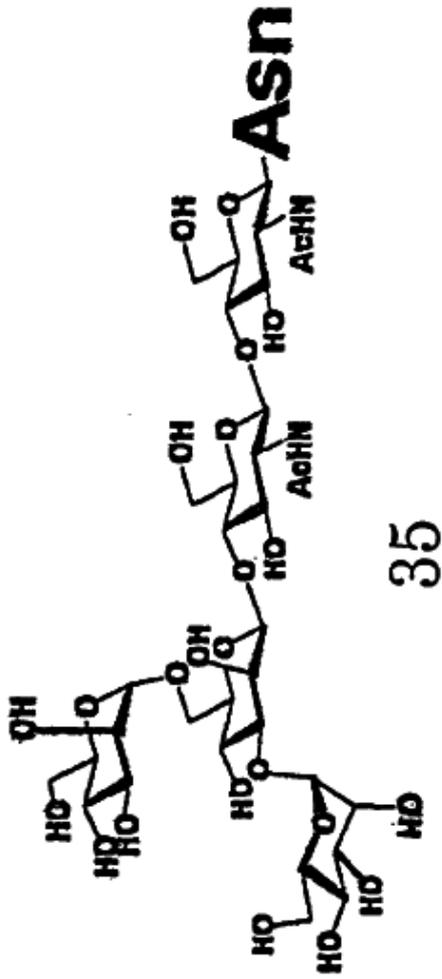


Fig. 4



36

Fig. 4

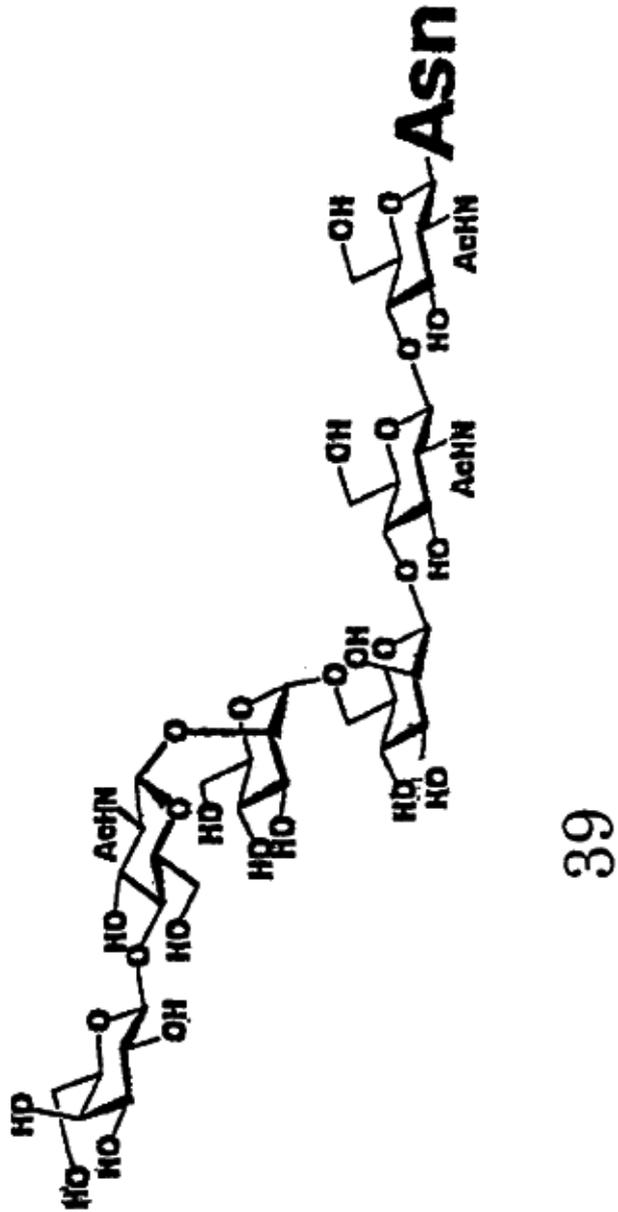
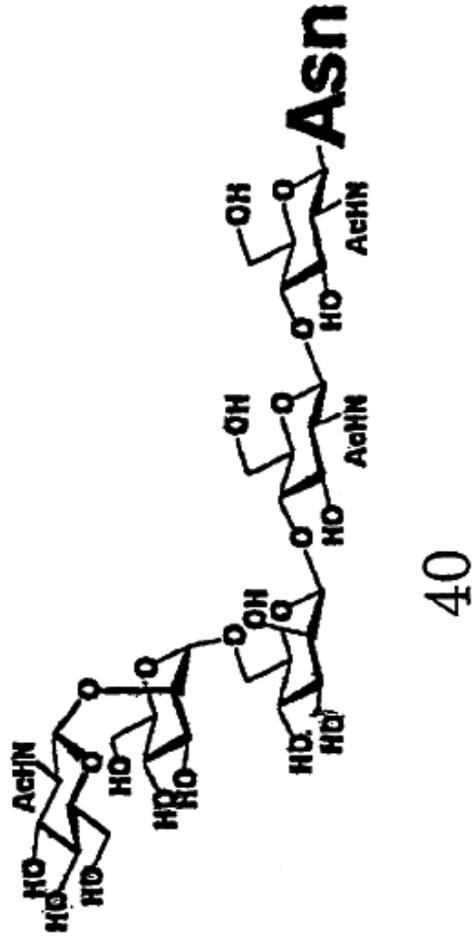
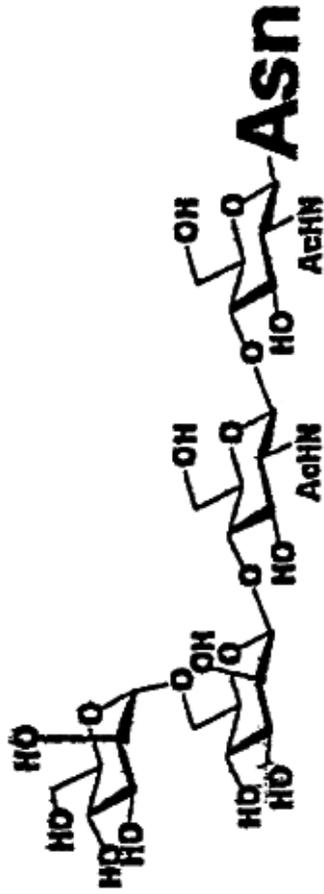


Fig. 4



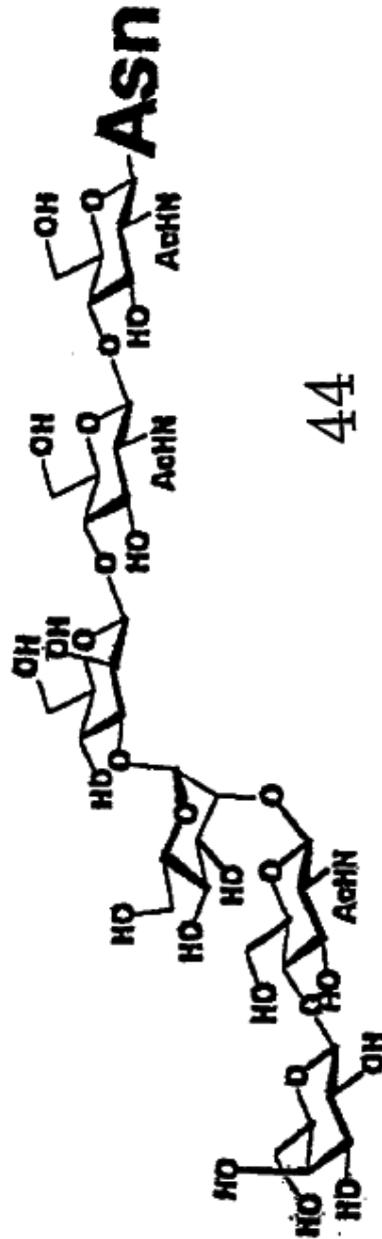
40

Fig. 4



41

Fig. 4



44

Fig. 4

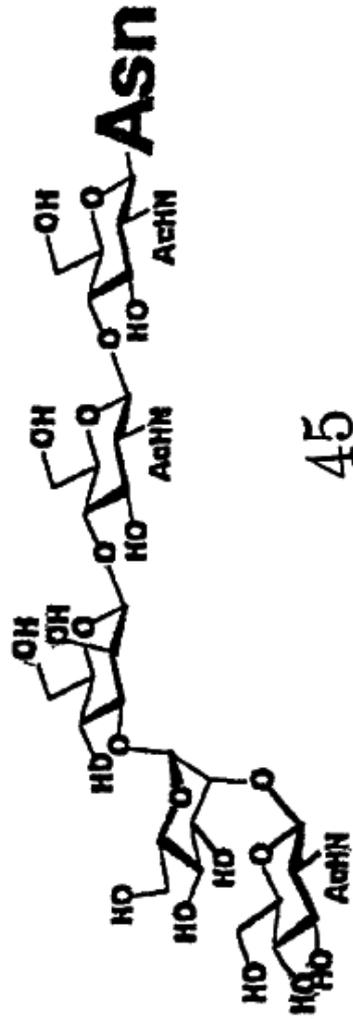


Fig. 4

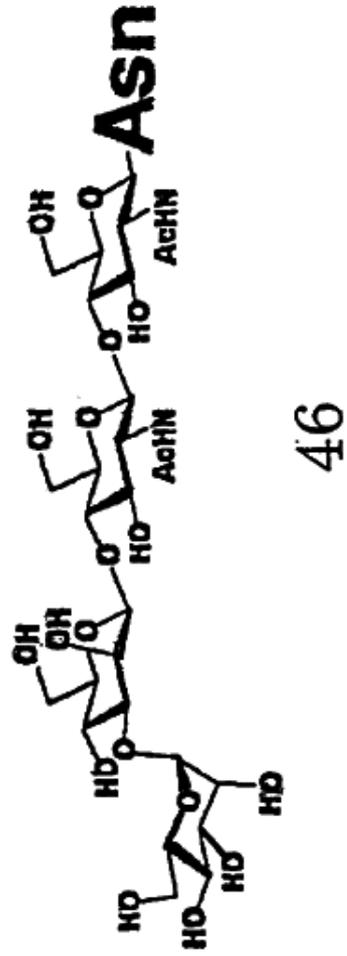
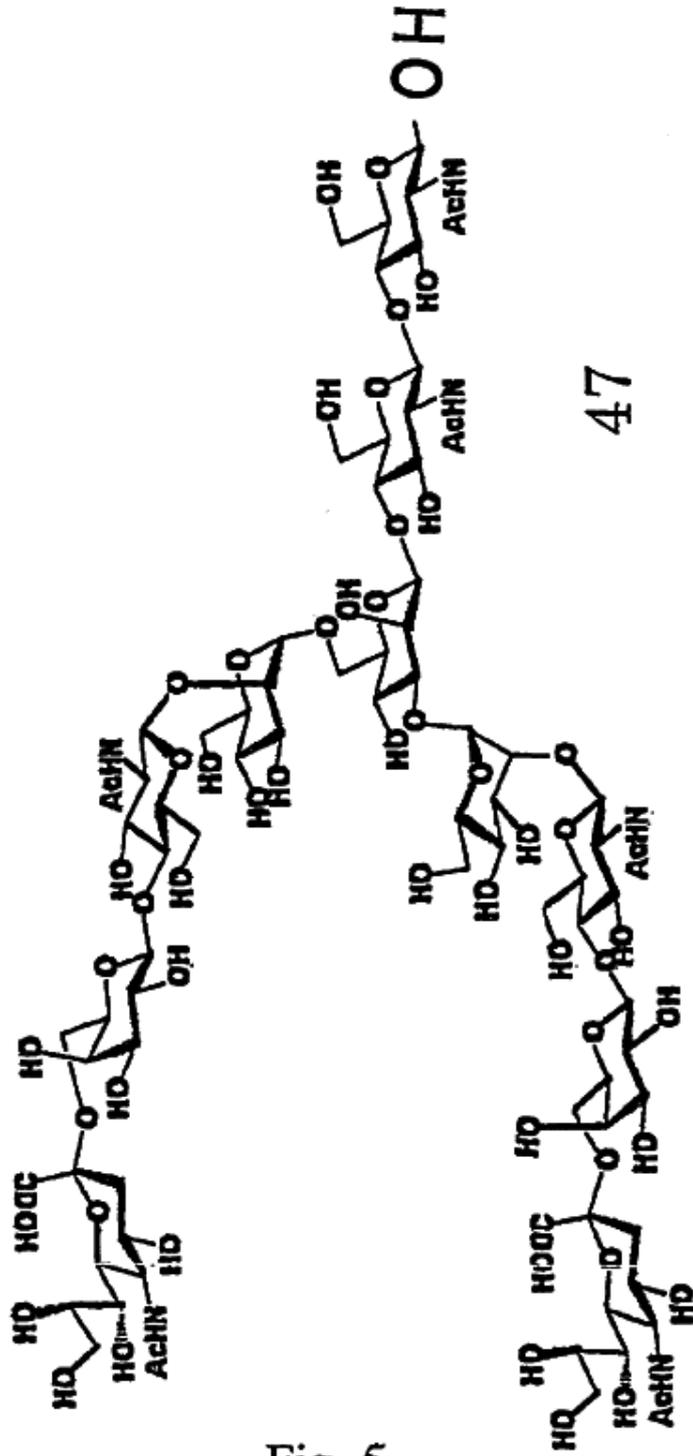
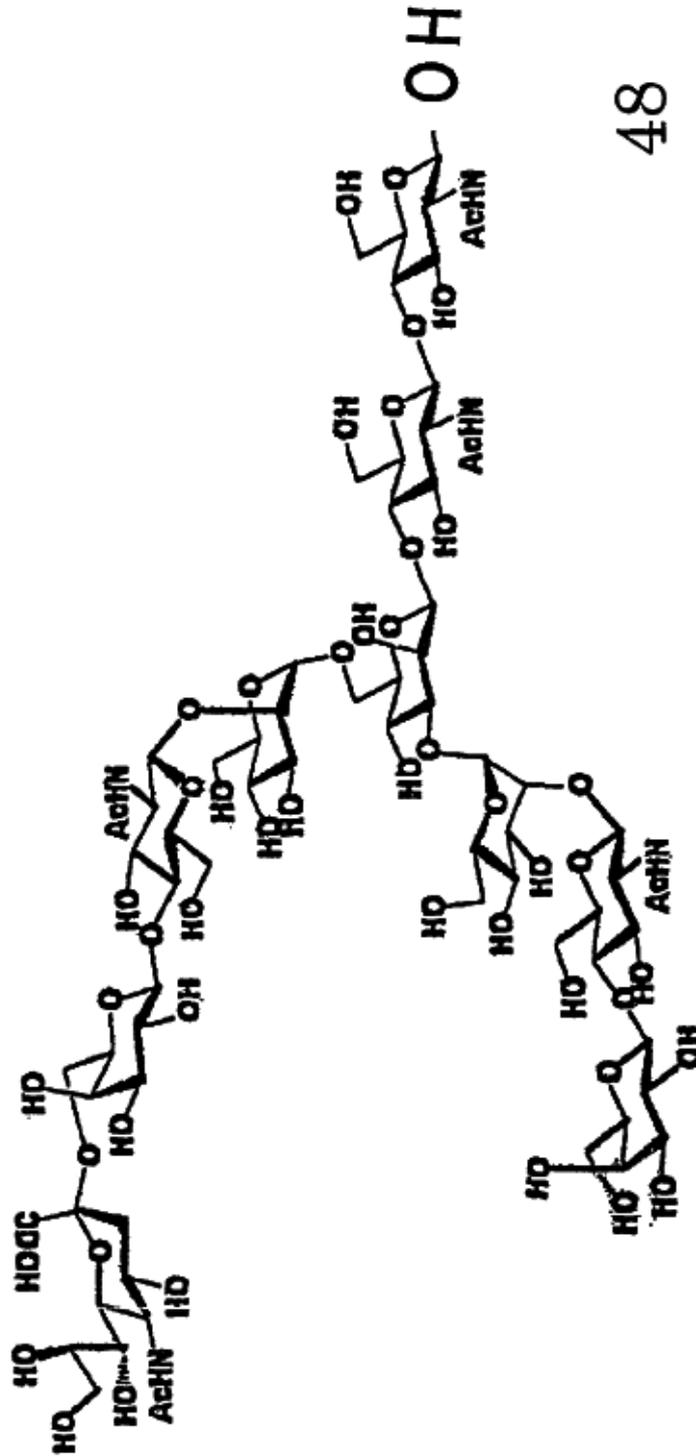


Fig. 4



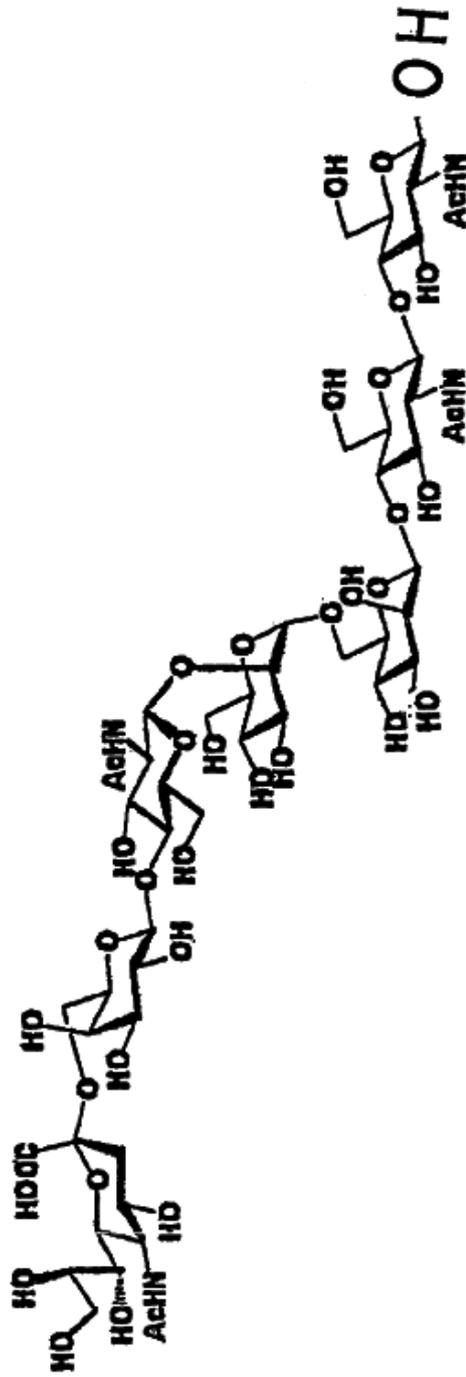
47

Fig. 5



48

Fig. 5



51

Fig. 5

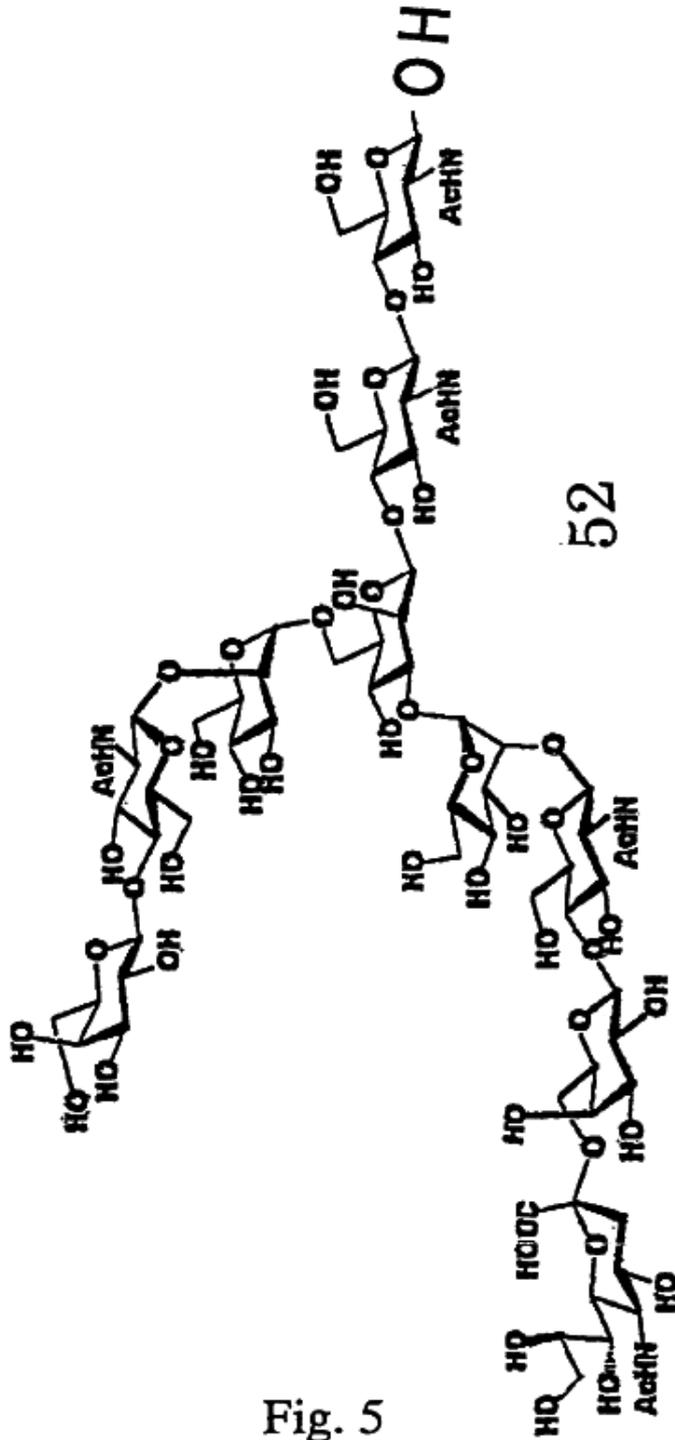
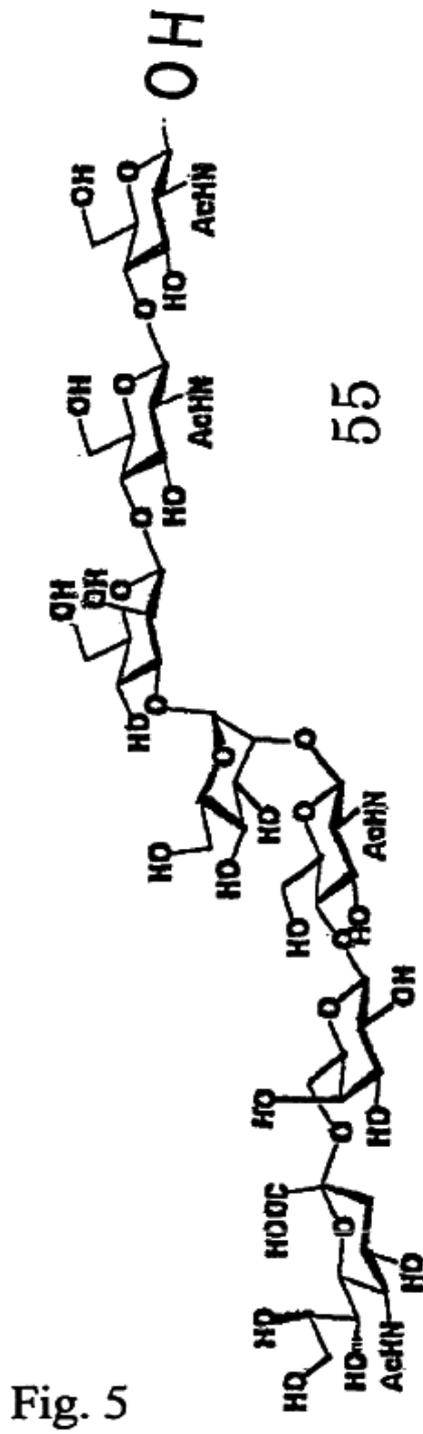
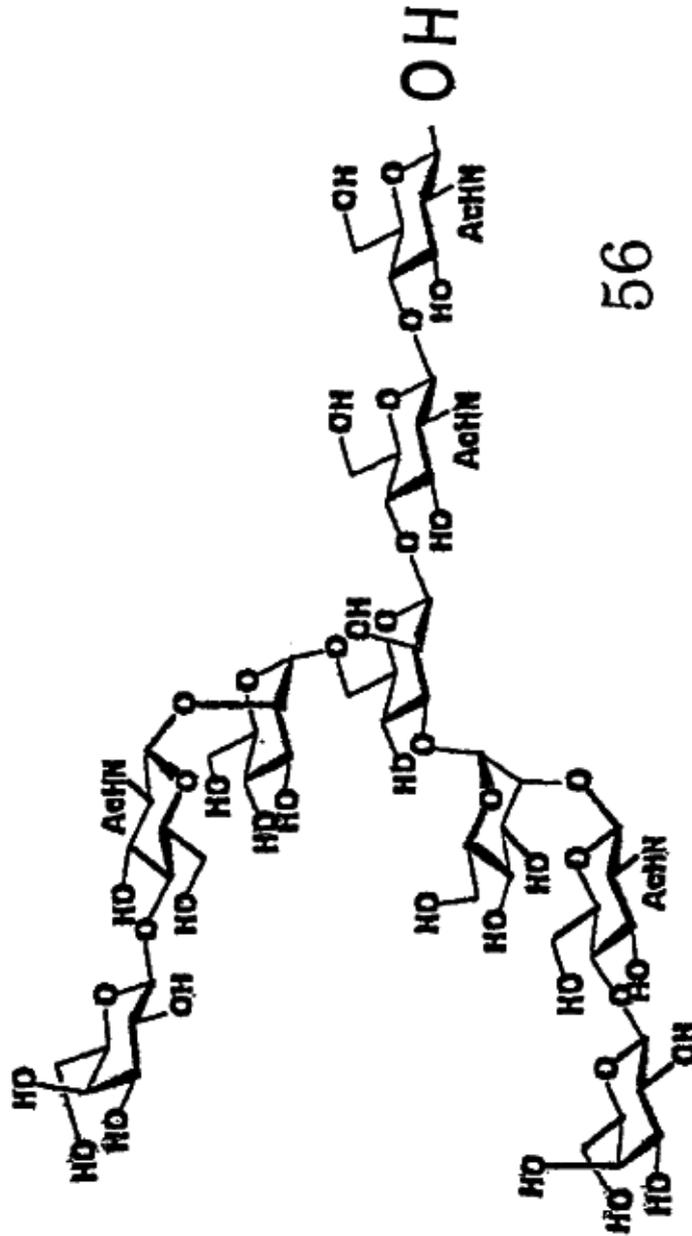


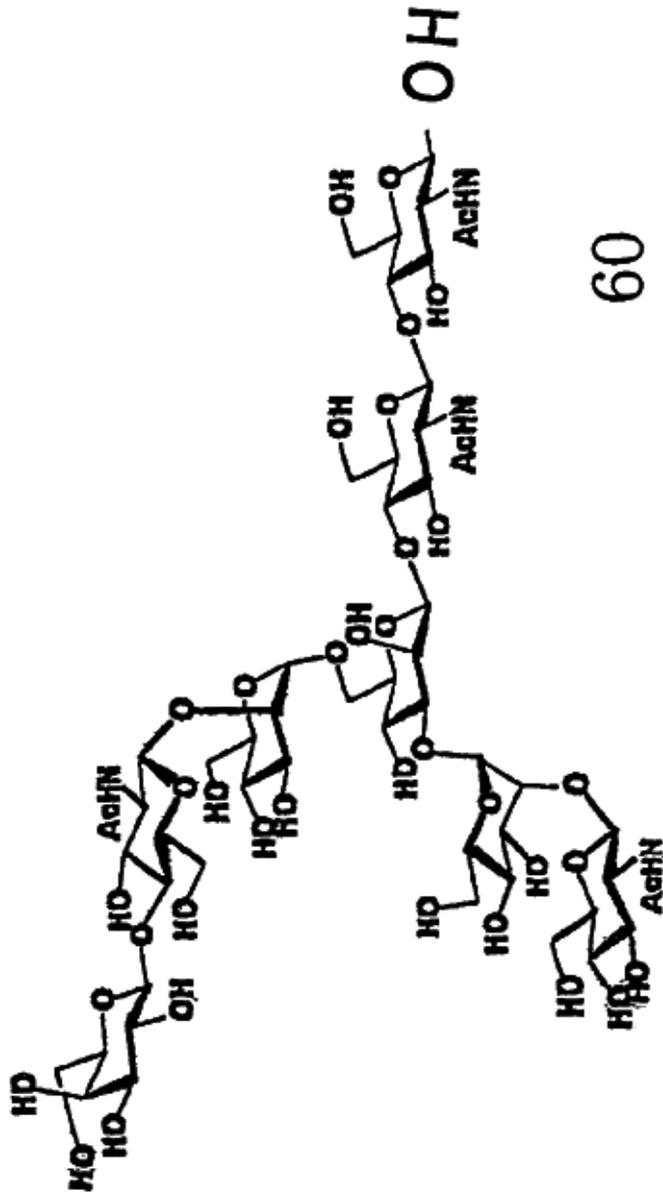
Fig. 5





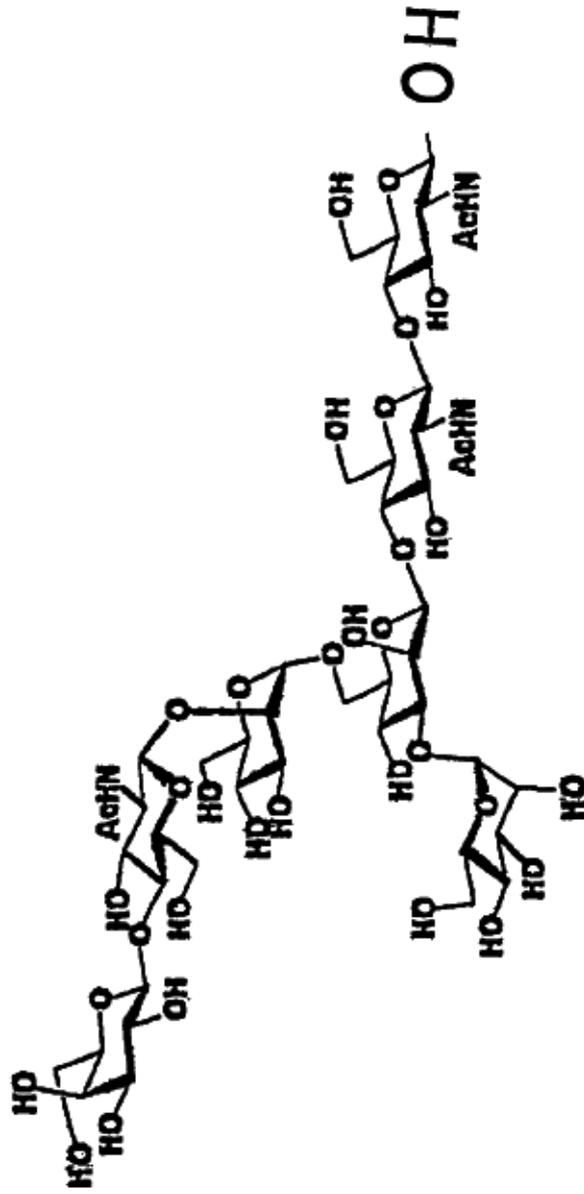
56

Fig. 5



60

Fig. 5



61

Fig. 5

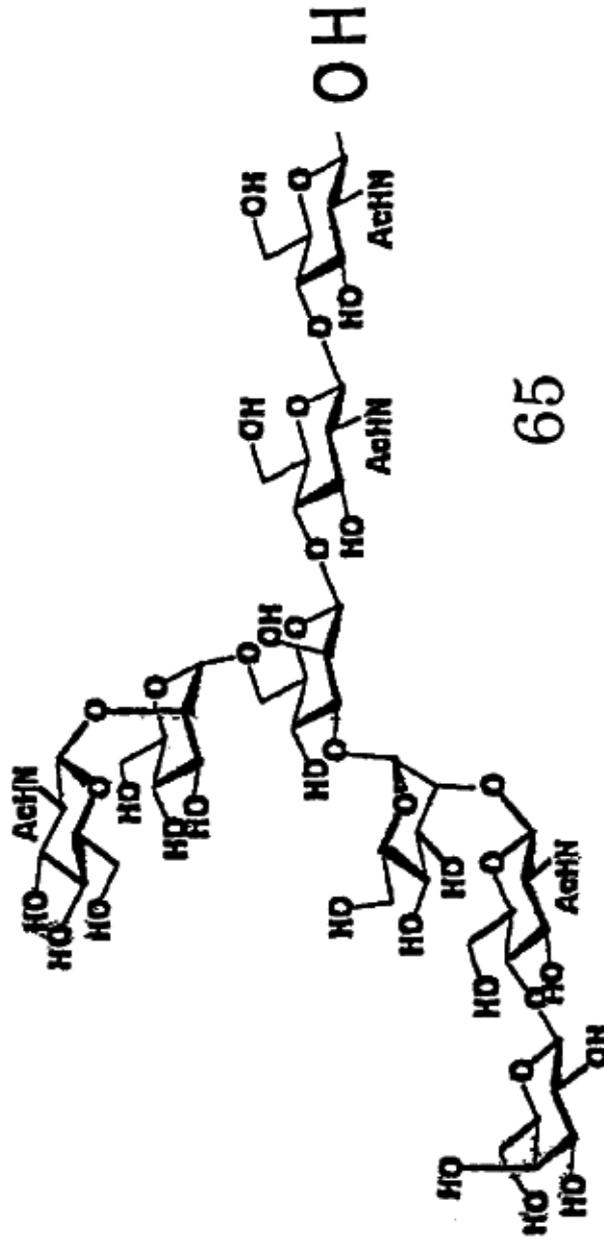
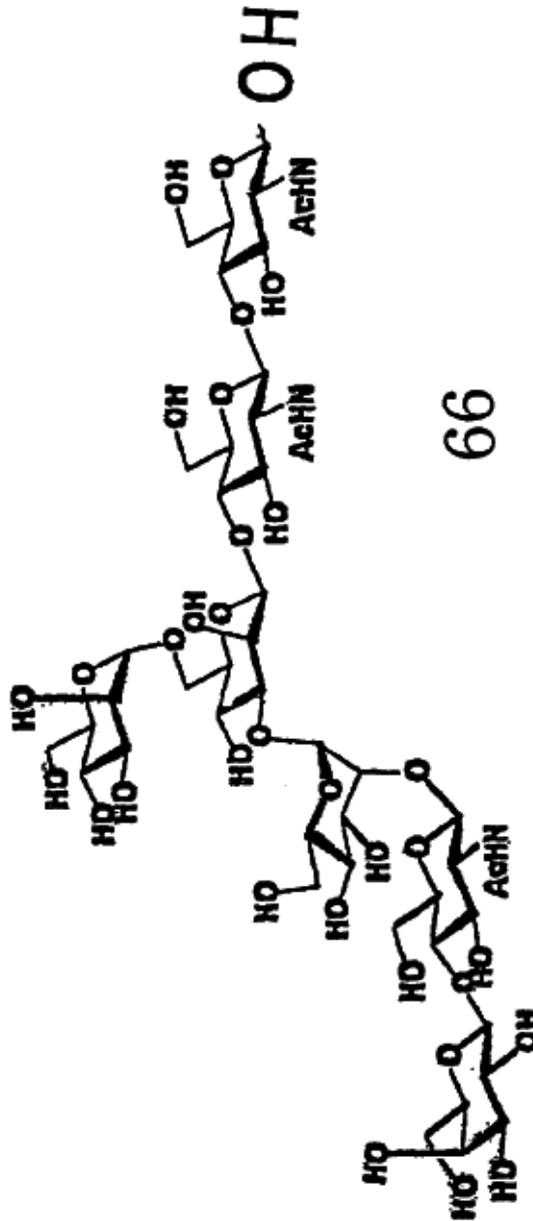


Fig. 5



66

Fig. 5

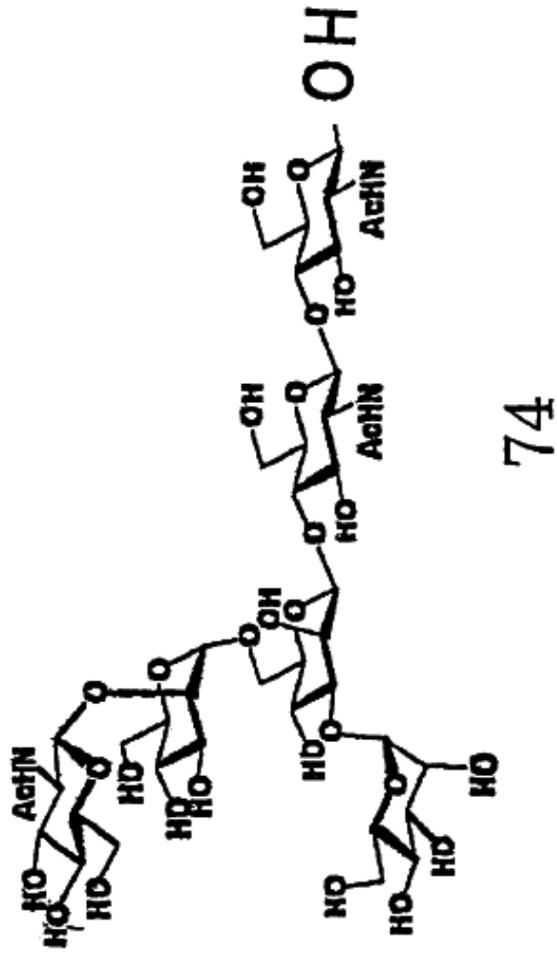


Fig. 5

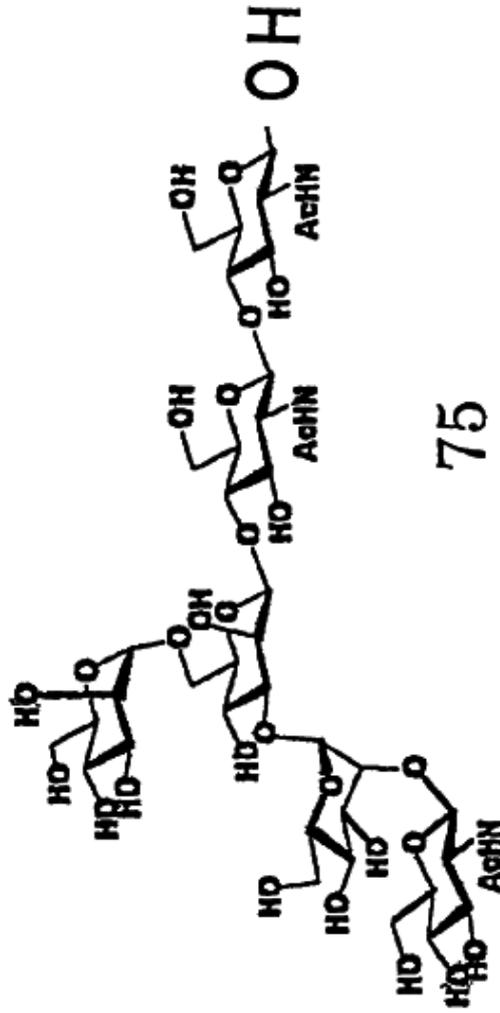
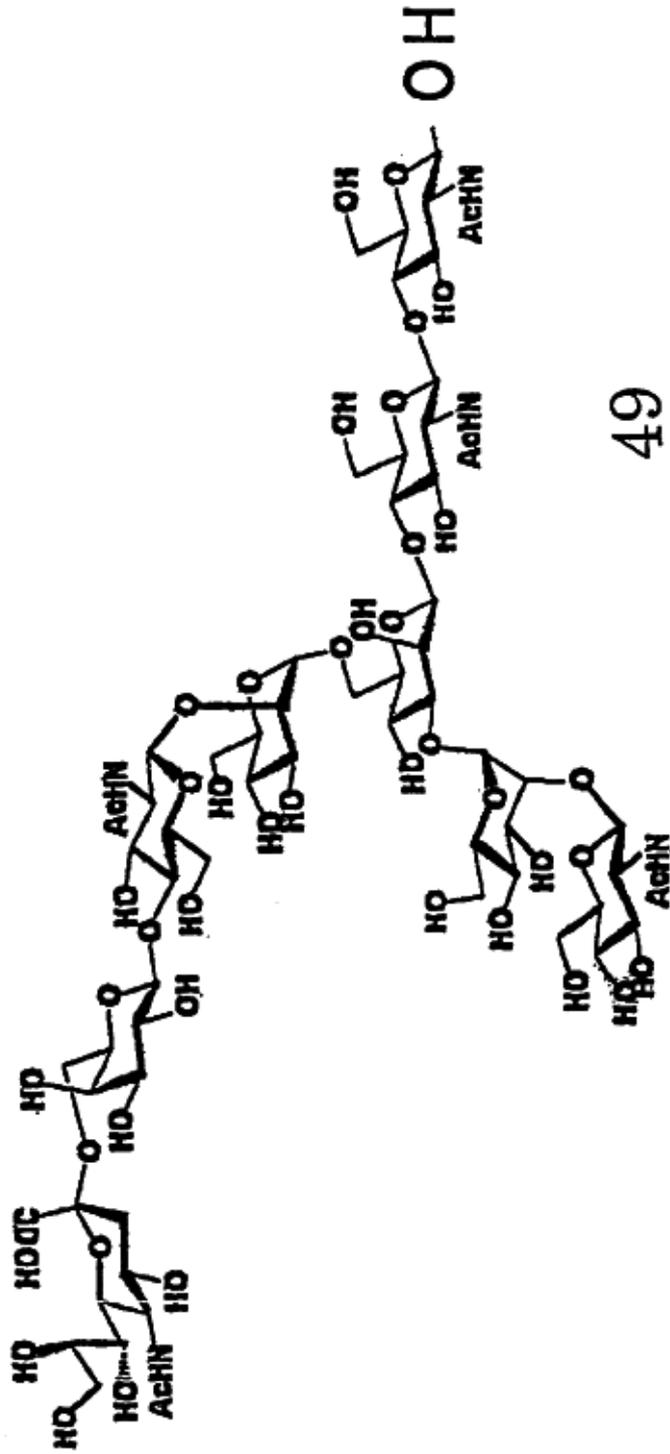


Fig. 5



49

Fig. 6

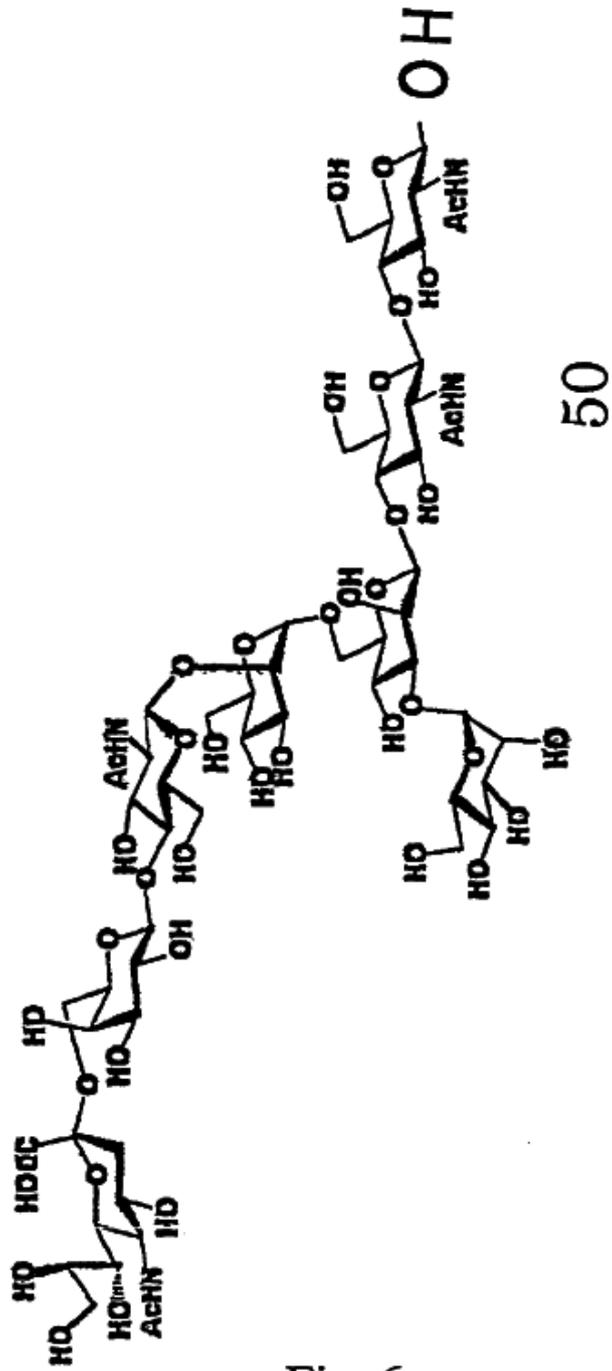


Fig. 6

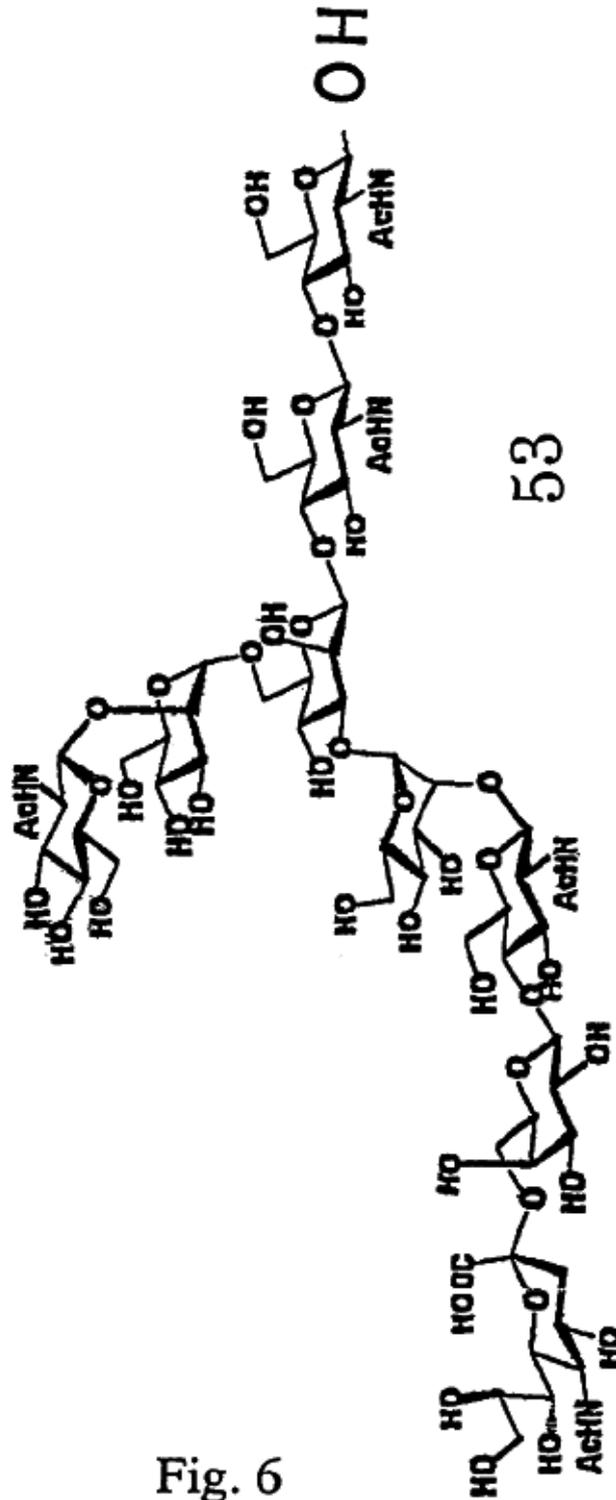
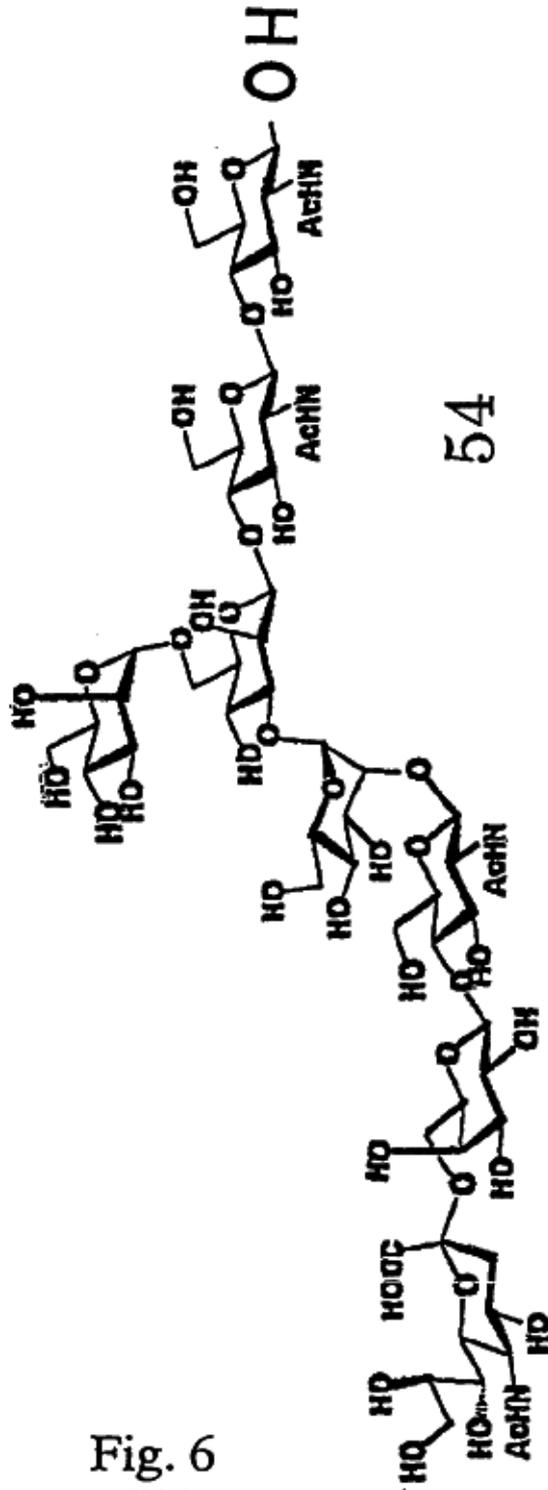
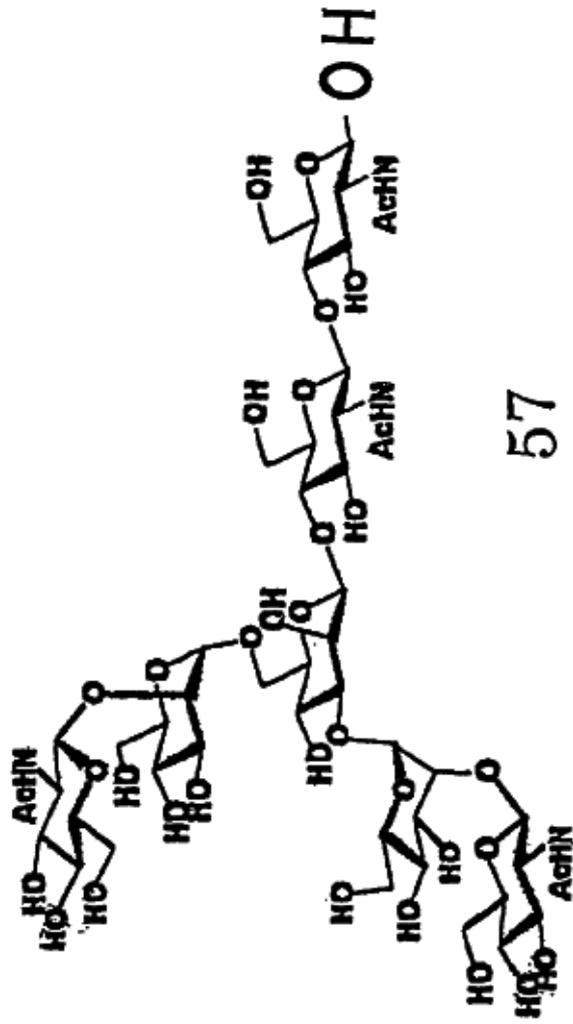


Fig. 6



54

Fig. 6



57

Fig. 6

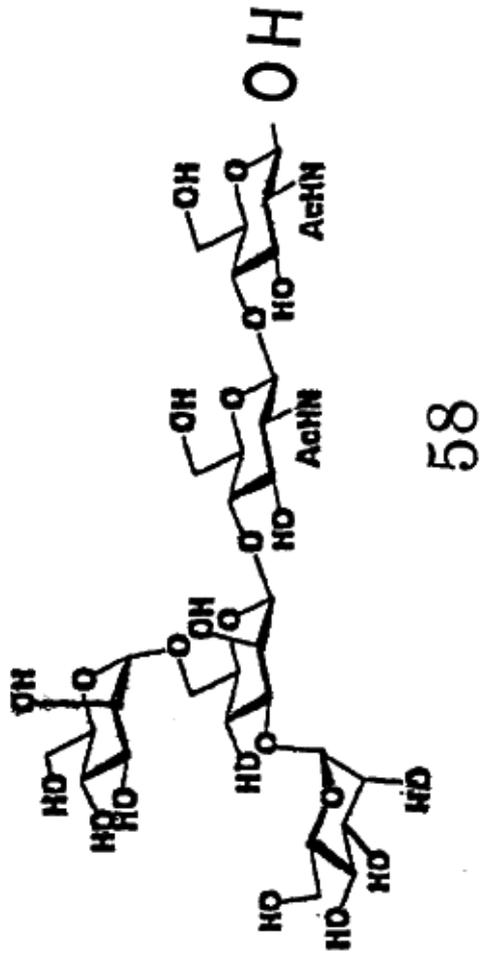


Fig. 6



59

Fig. 6

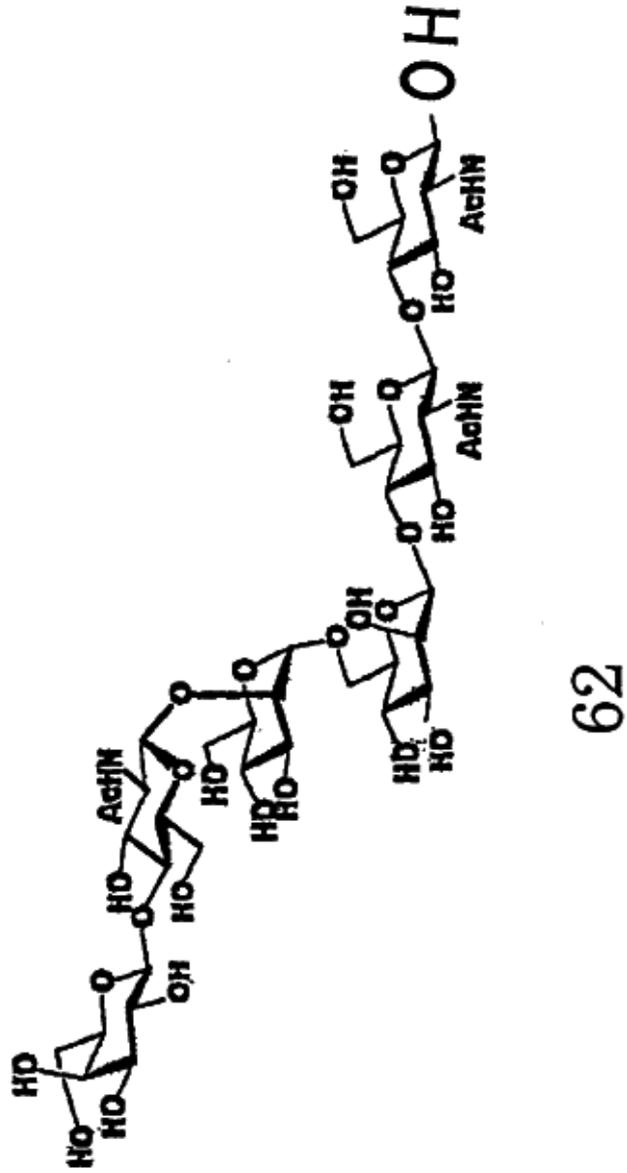
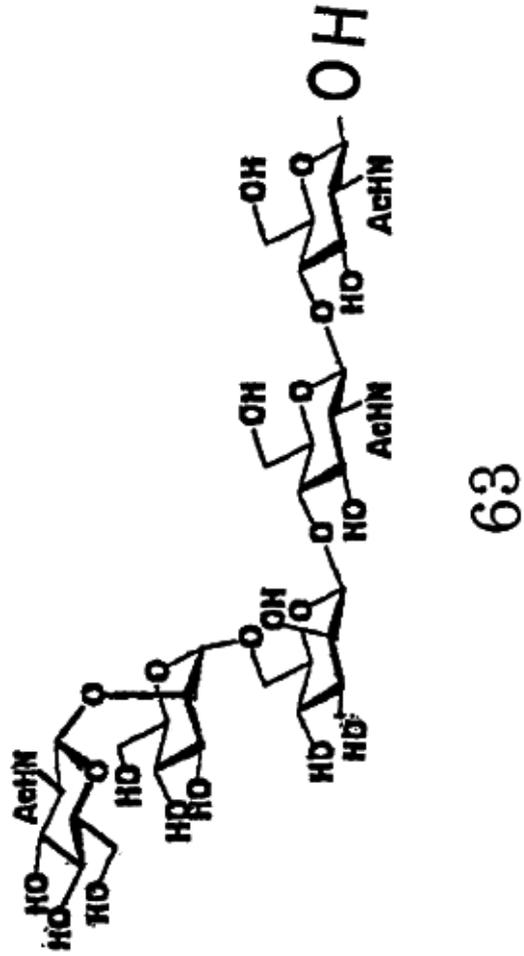


Fig. 6



63

Fig. 6

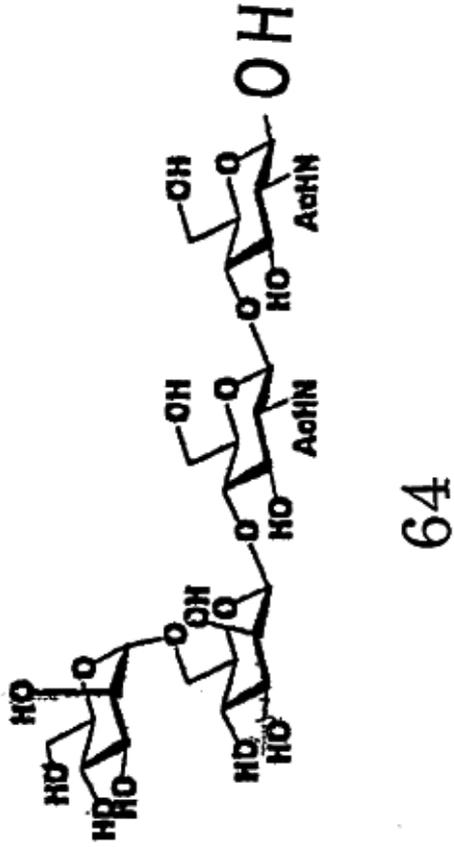


Fig. 6

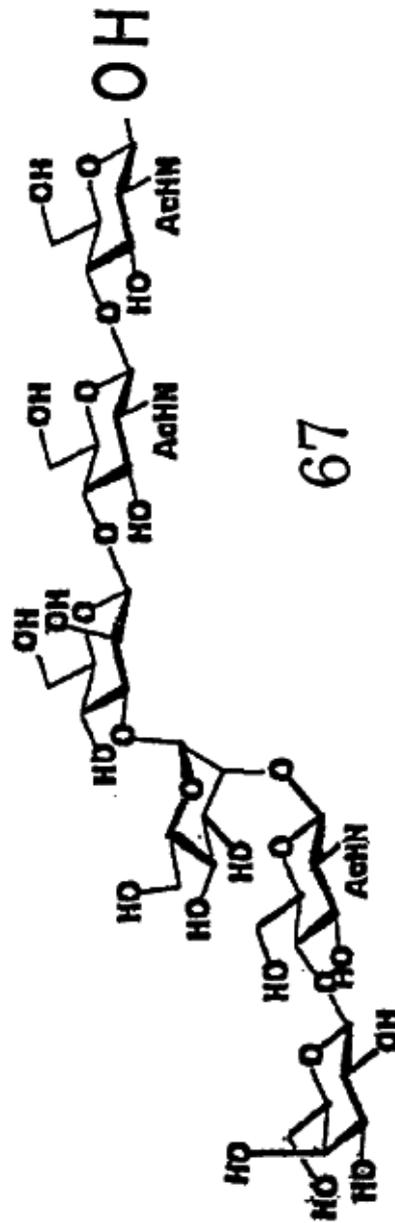


Fig. 6

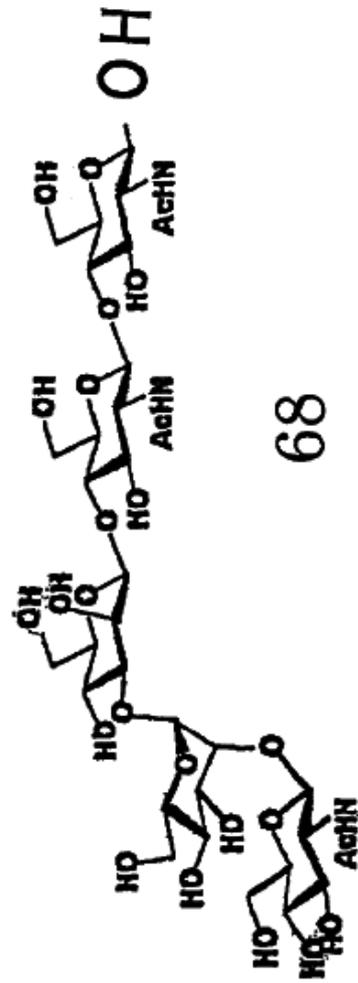


Fig. 6

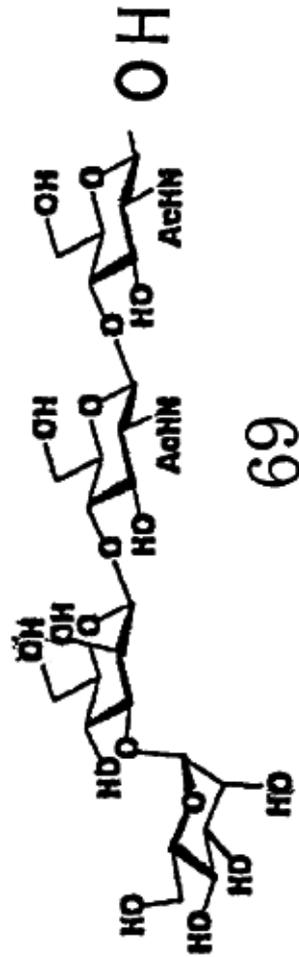


Fig. 6

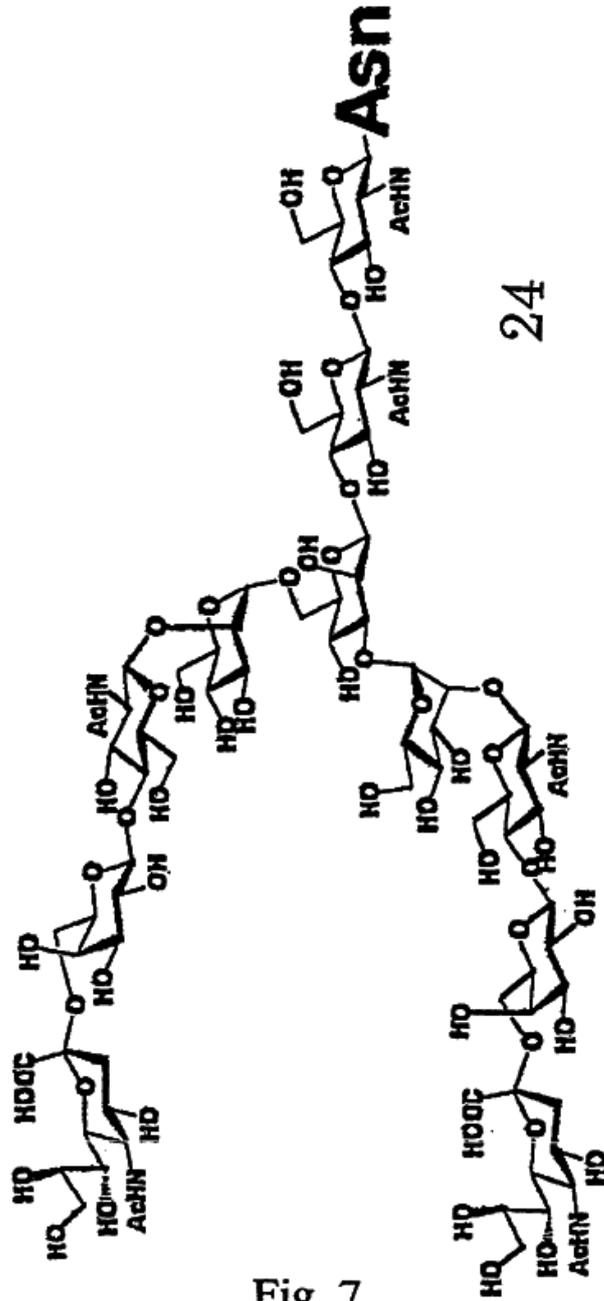
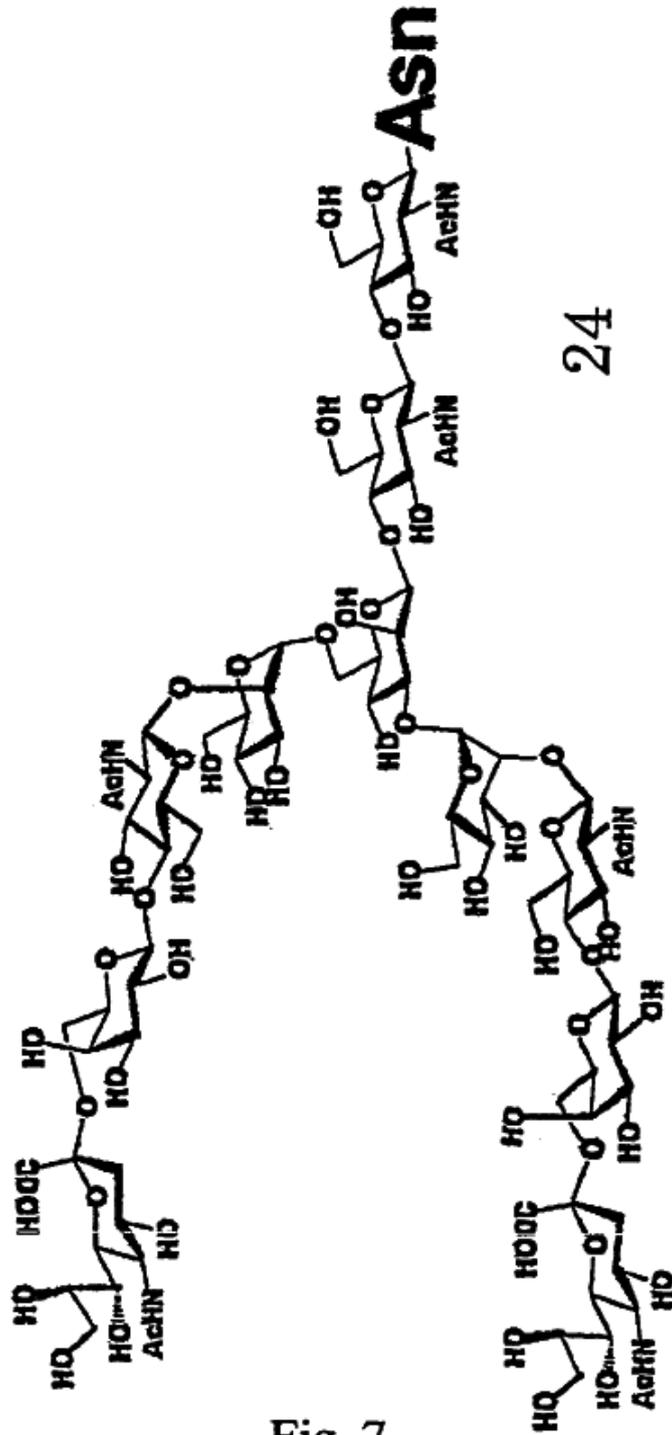
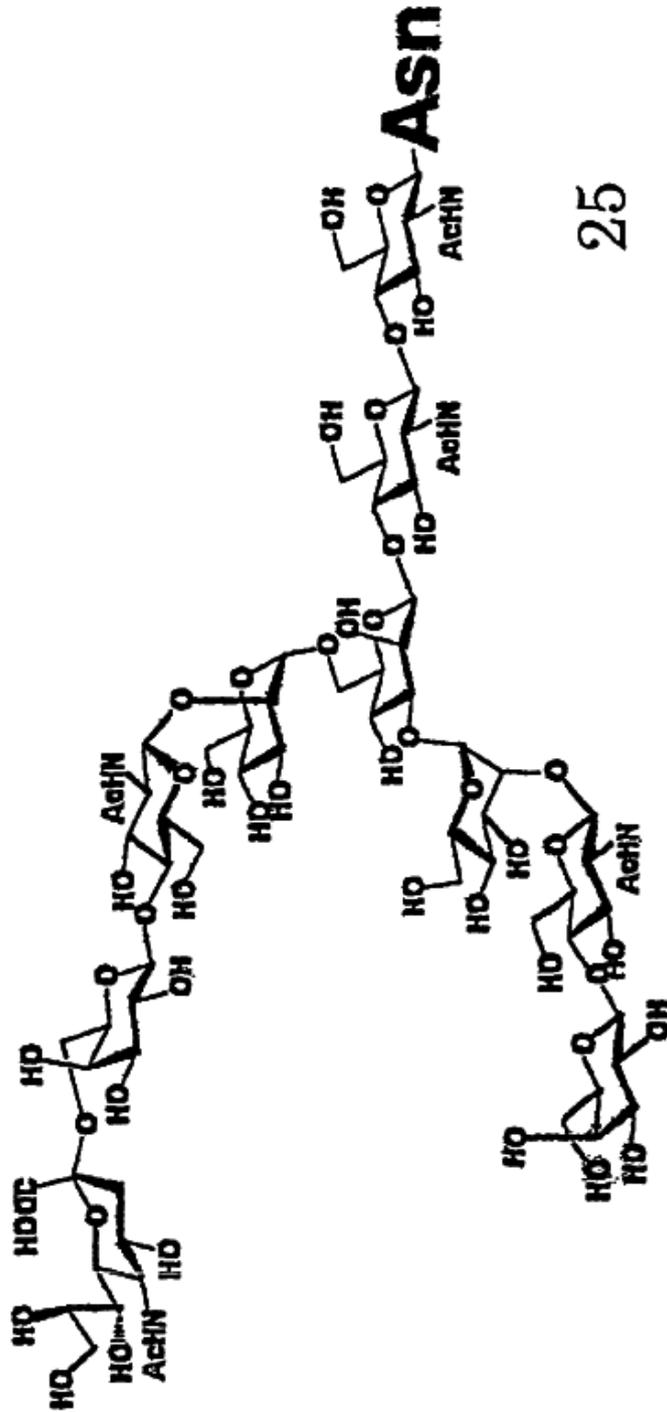


Fig. 7



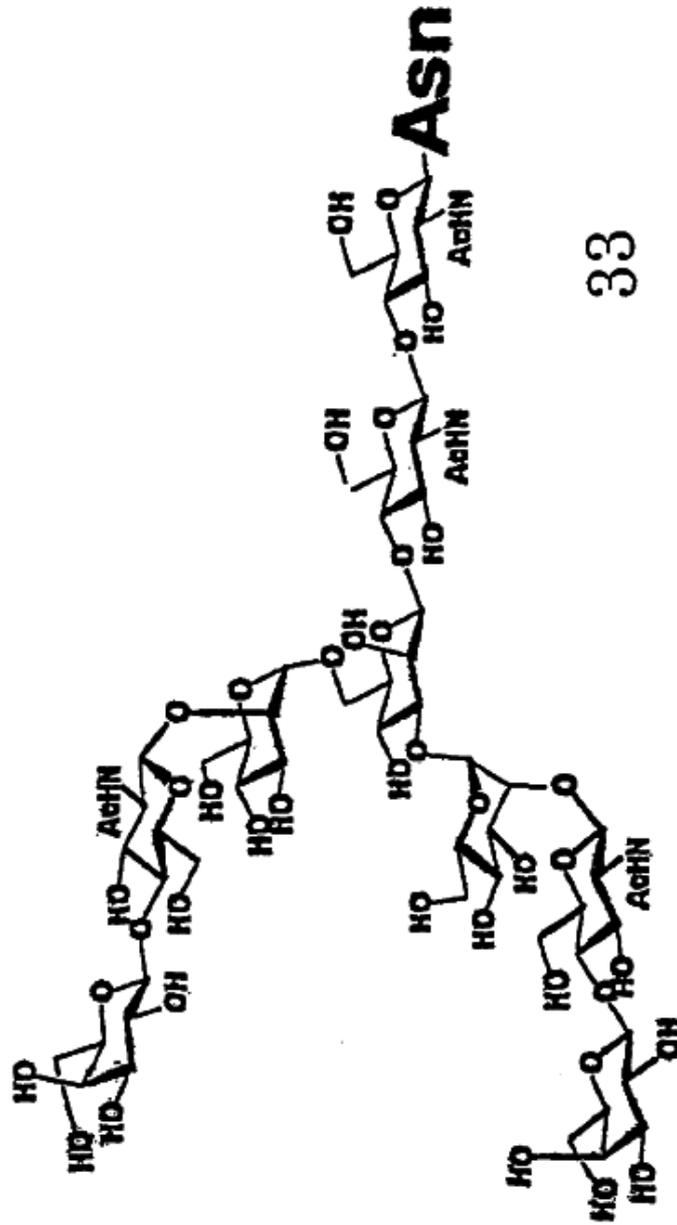
24

Fig. 7



25

Fig. 7



33

Fig. 7

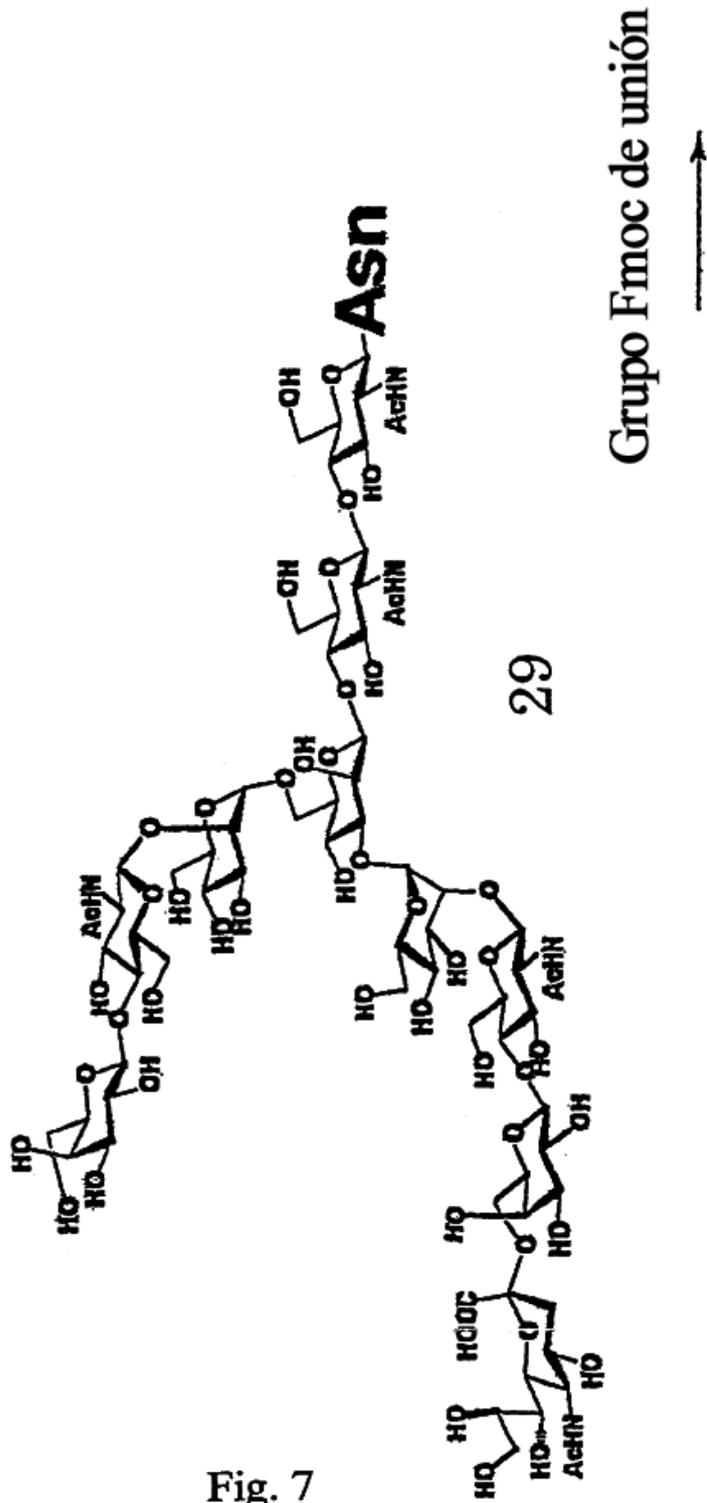


Fig. 7

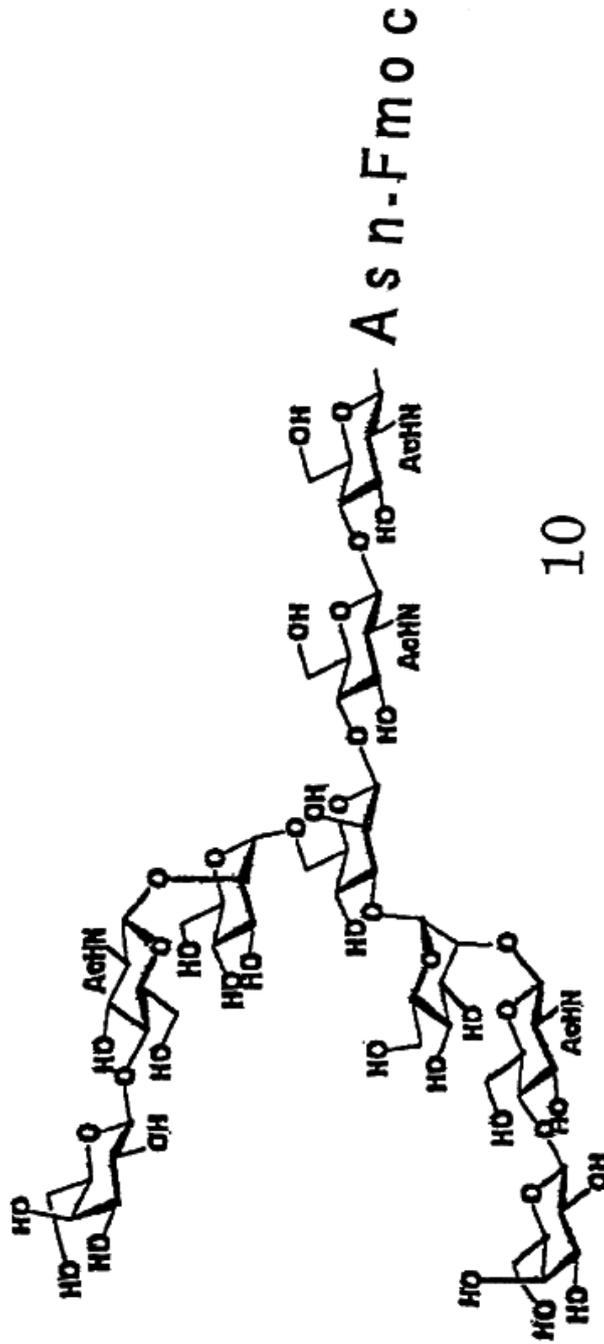


Fig. 7

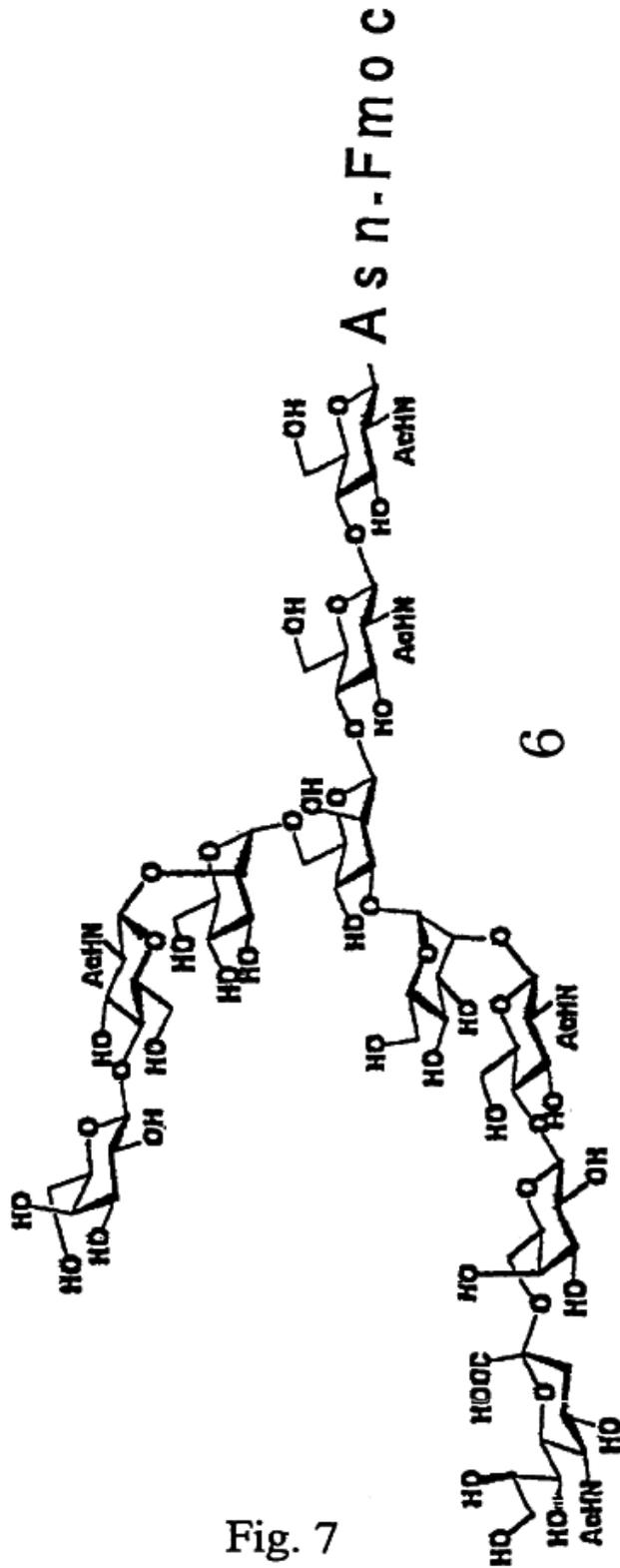


Fig. 7

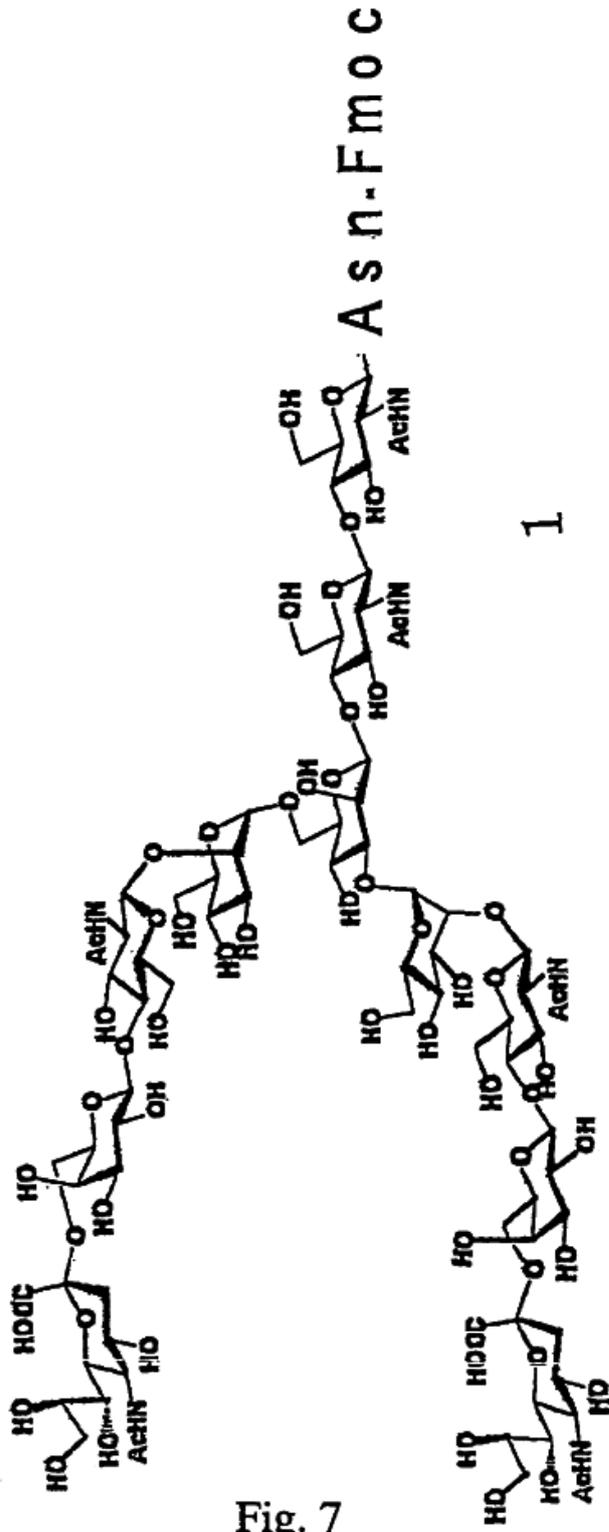


Fig. 7

Aislamiento y purificación



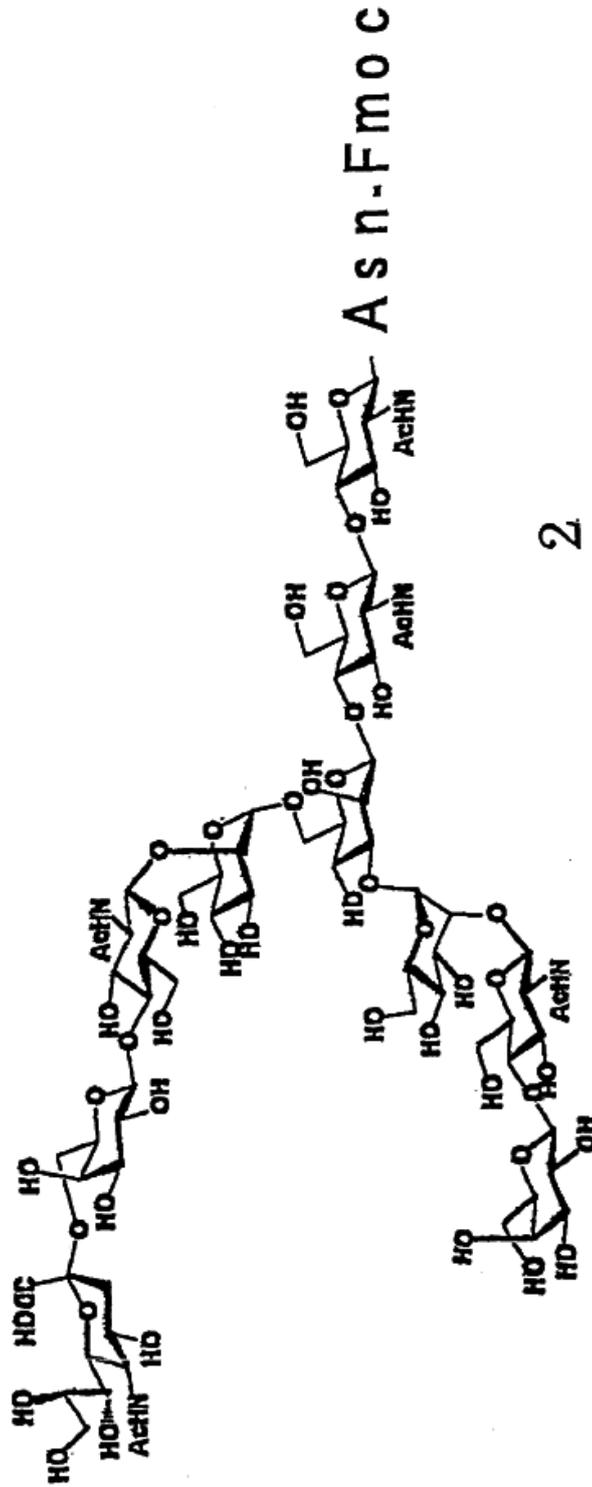
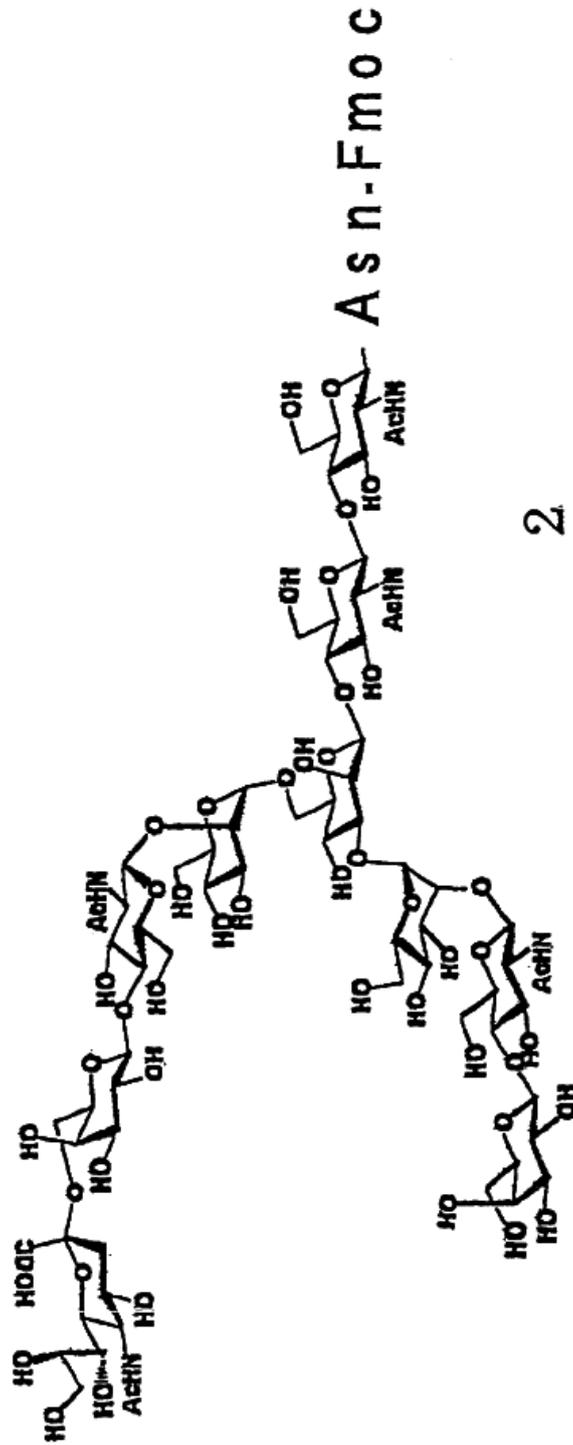


Fig. 7



2

Fig. 8

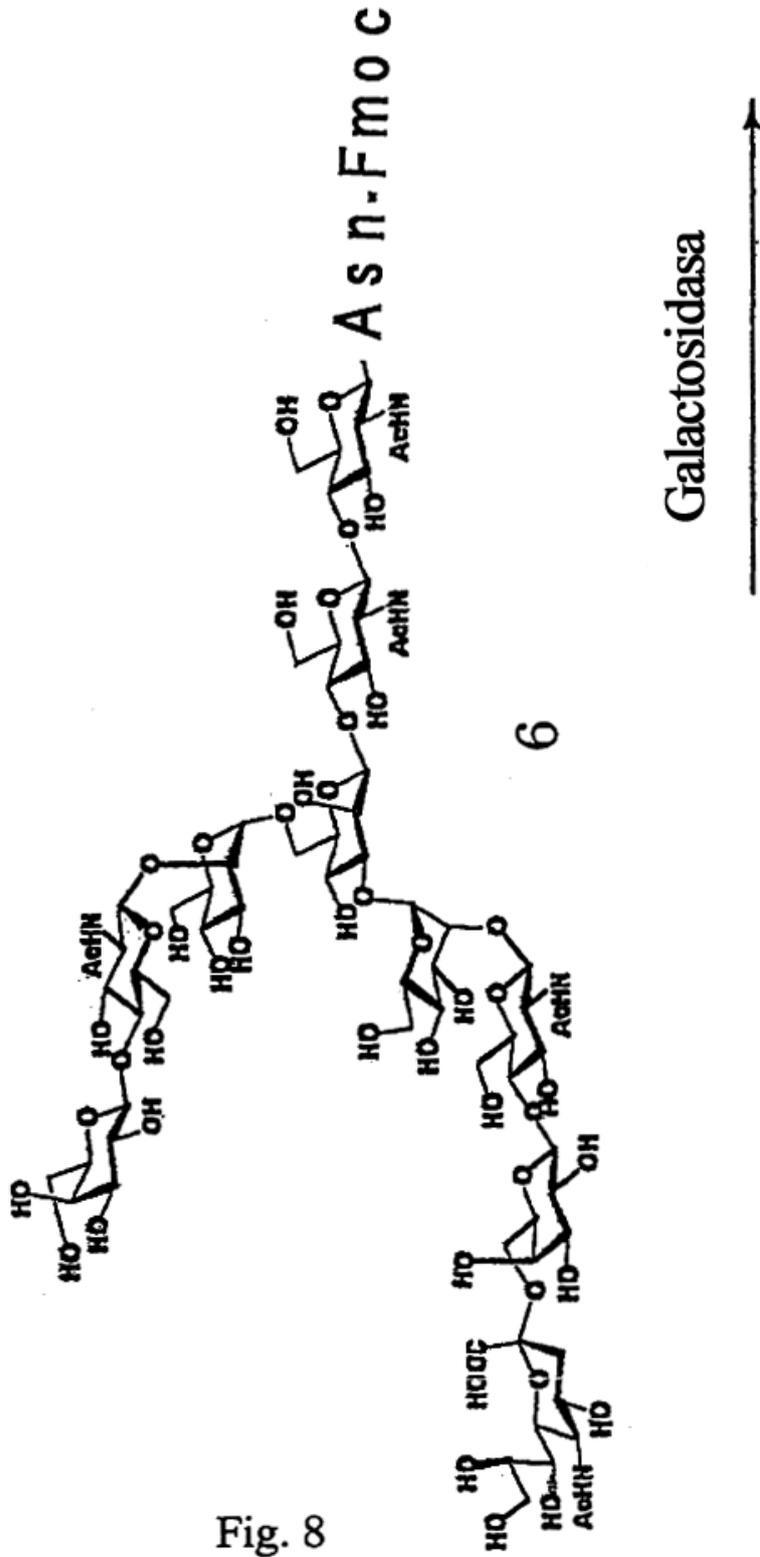
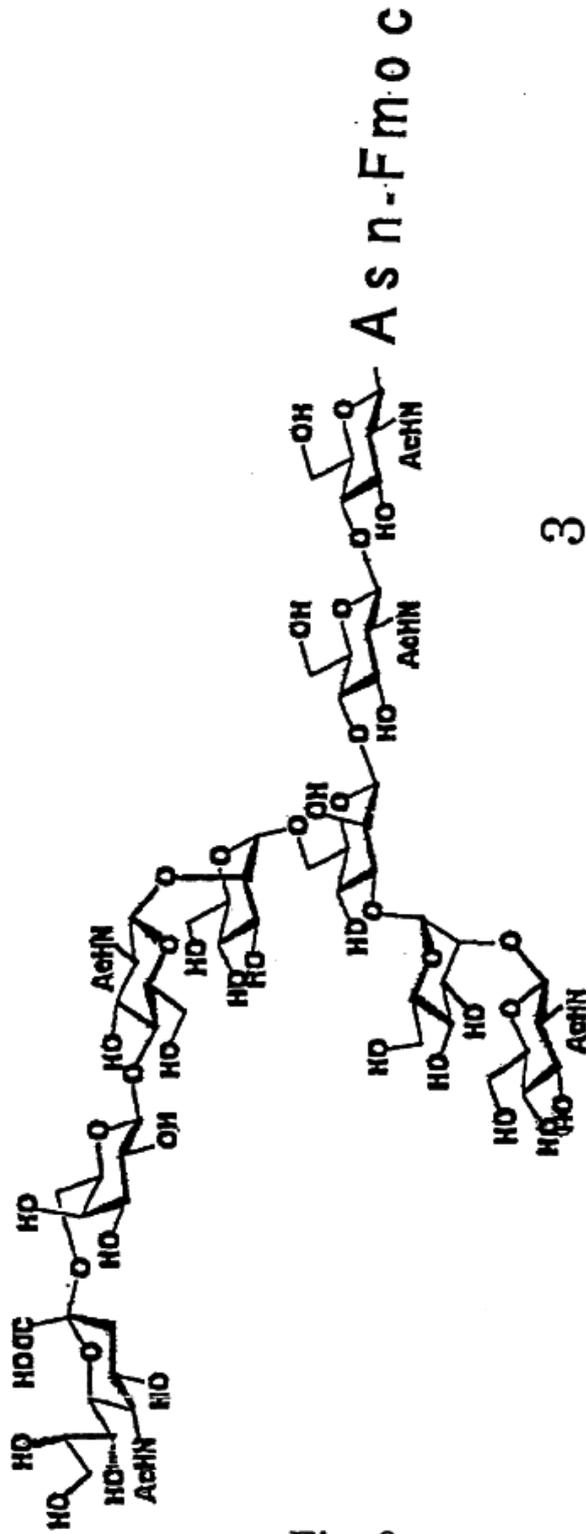


Fig. 8



3

Fig. 8

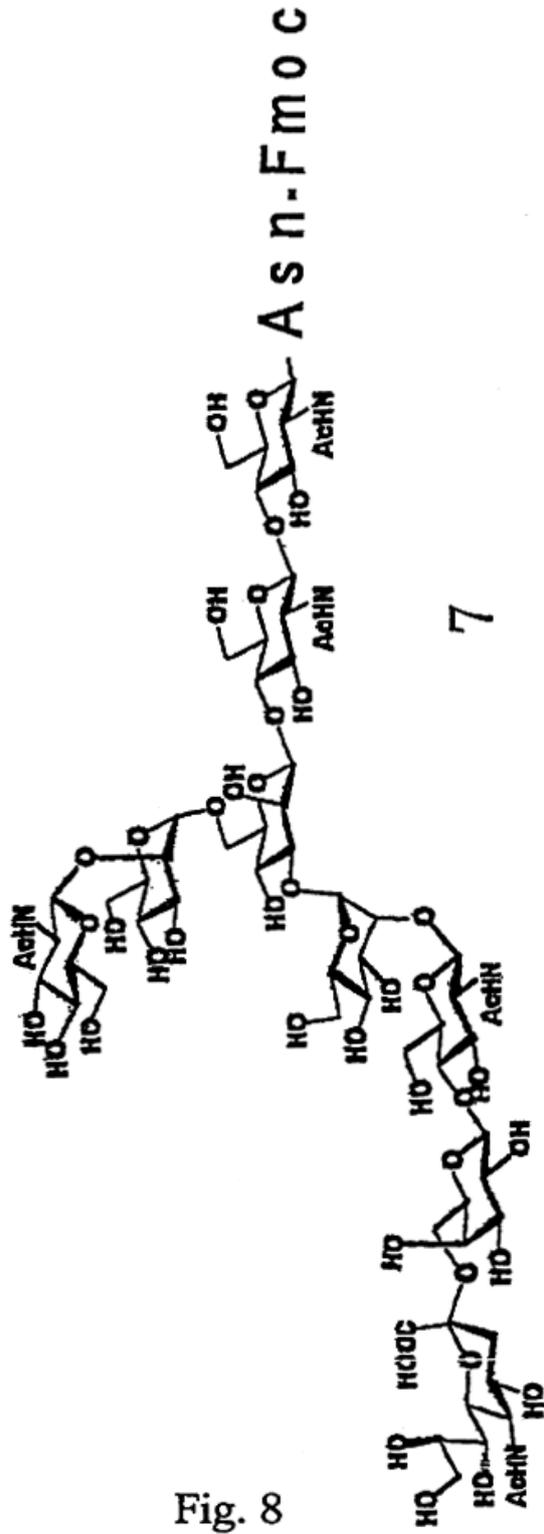


Fig. 8

N-acetylglucosaminidasa



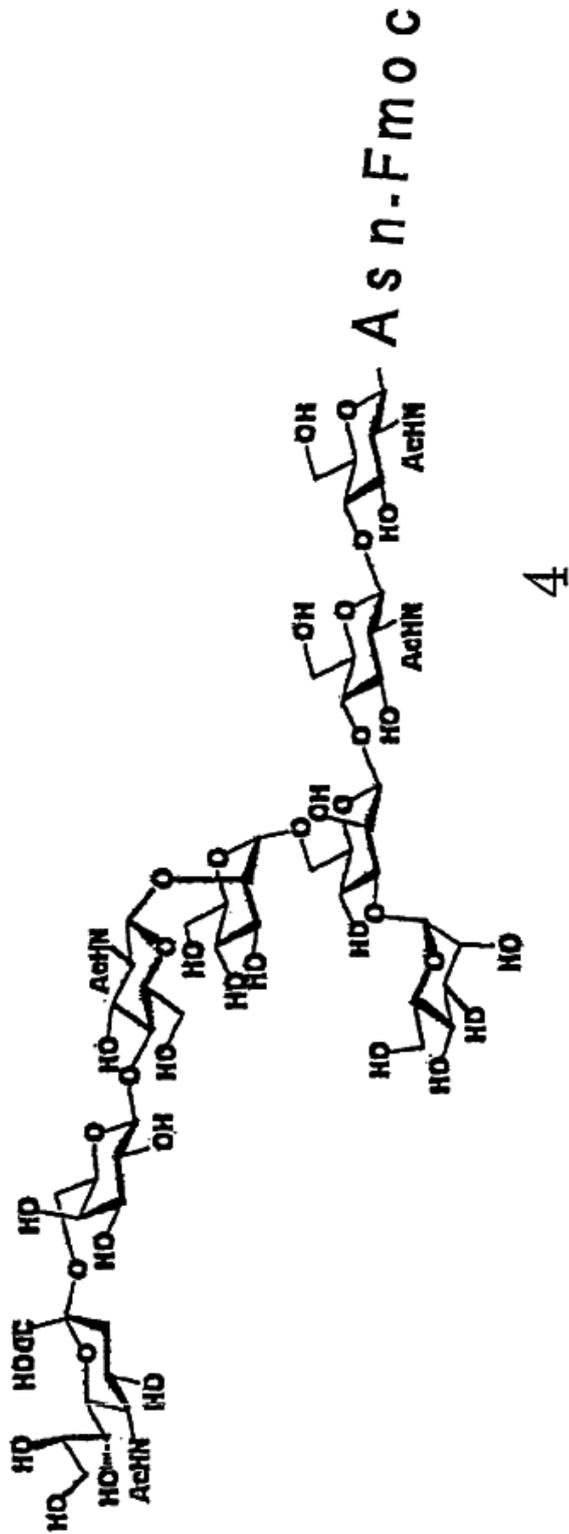


Fig. 8

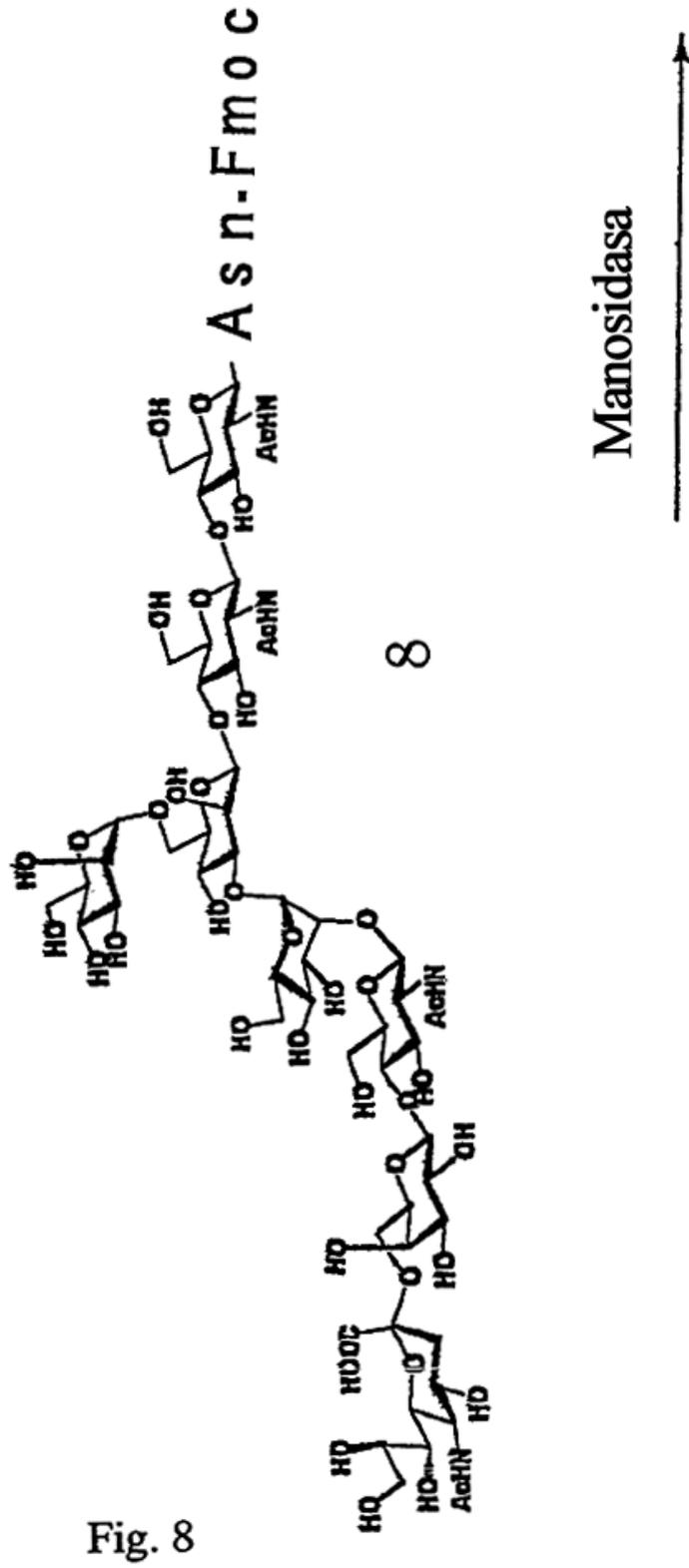


Fig. 8

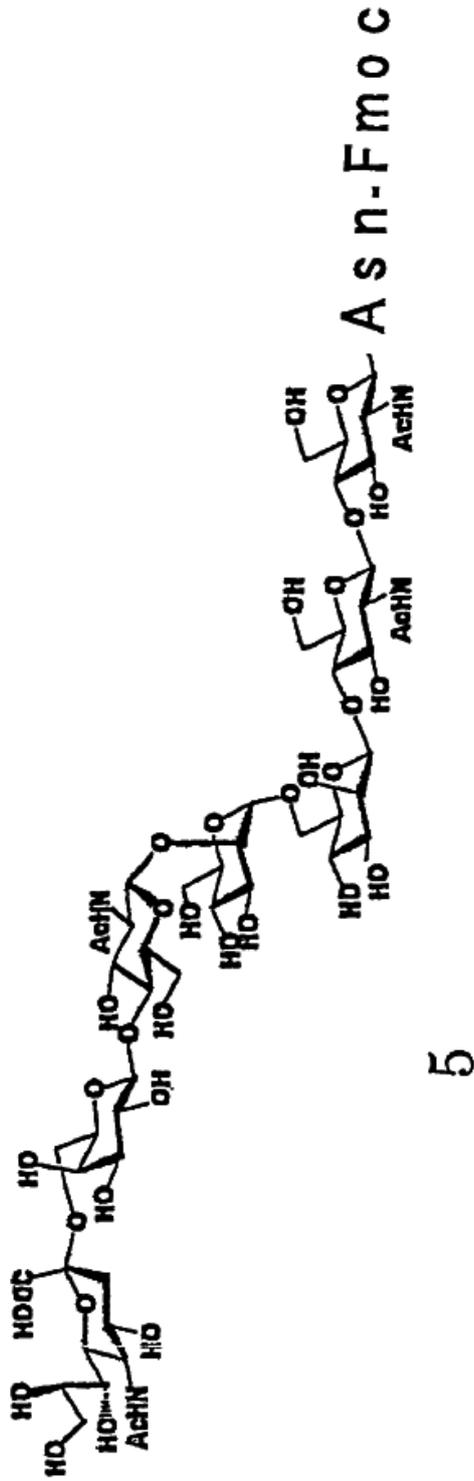


Fig. 8

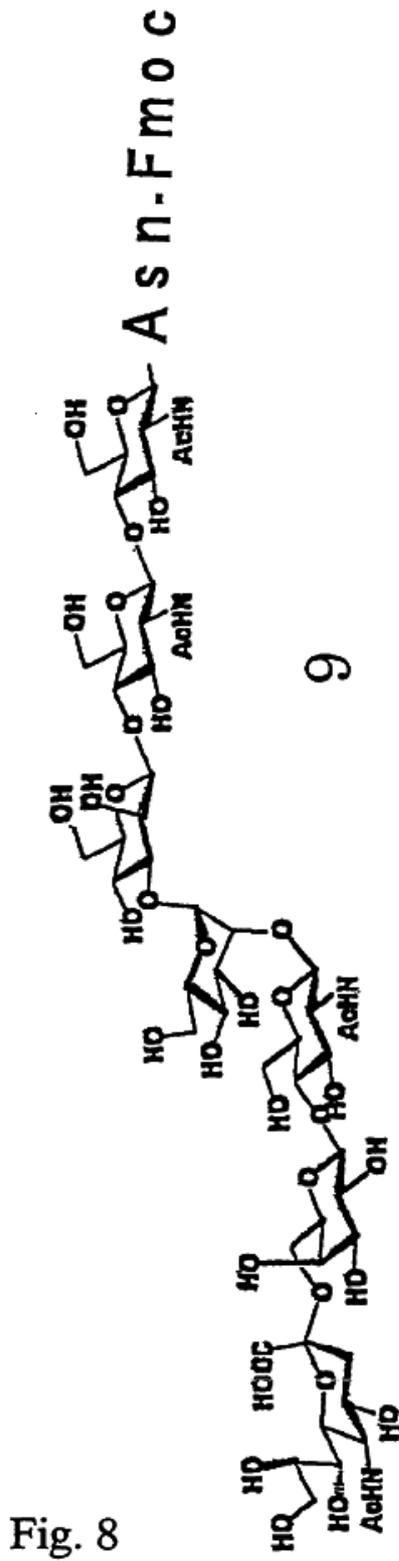


Fig. 8

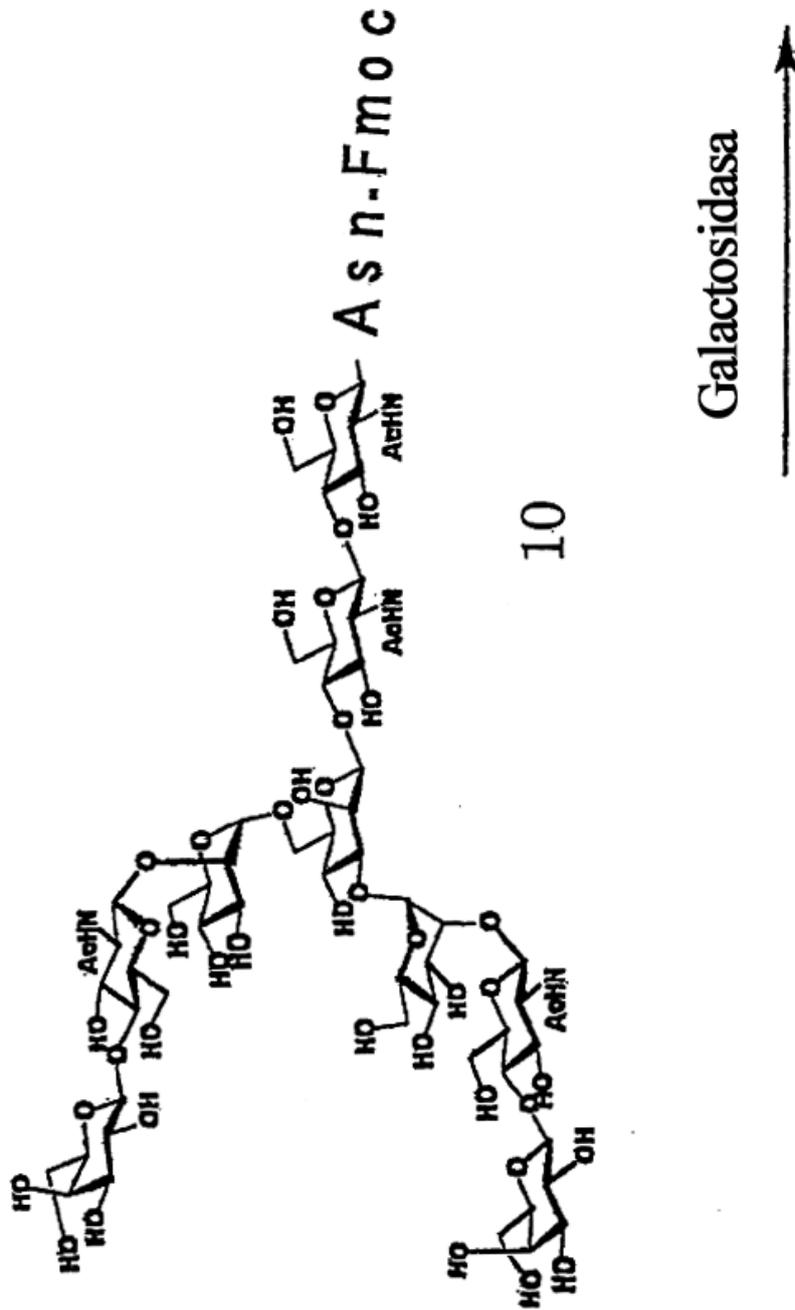
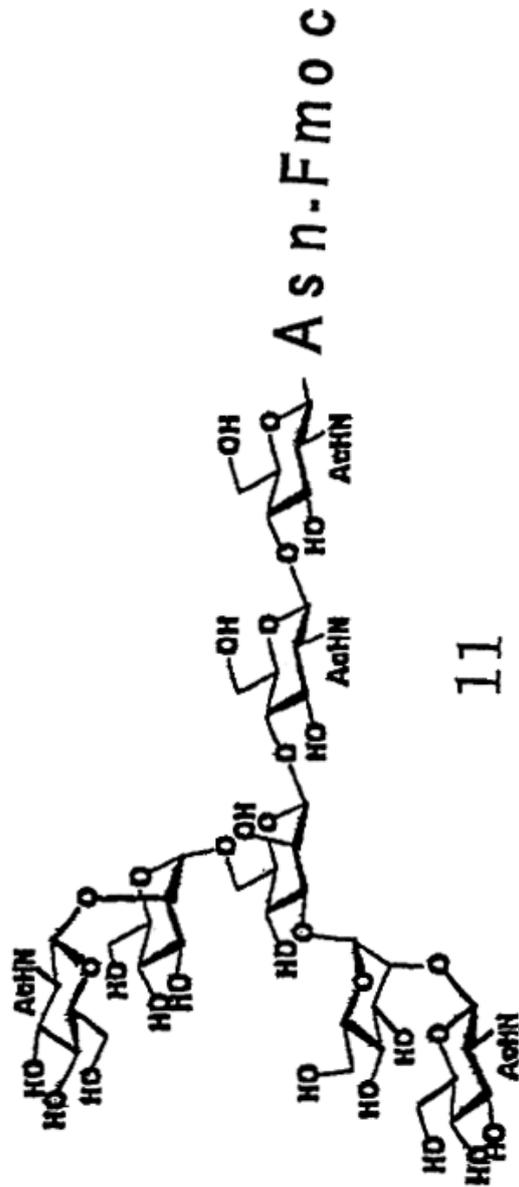


Fig. 9



N-acetilglucosaminidasa



Fig. 9

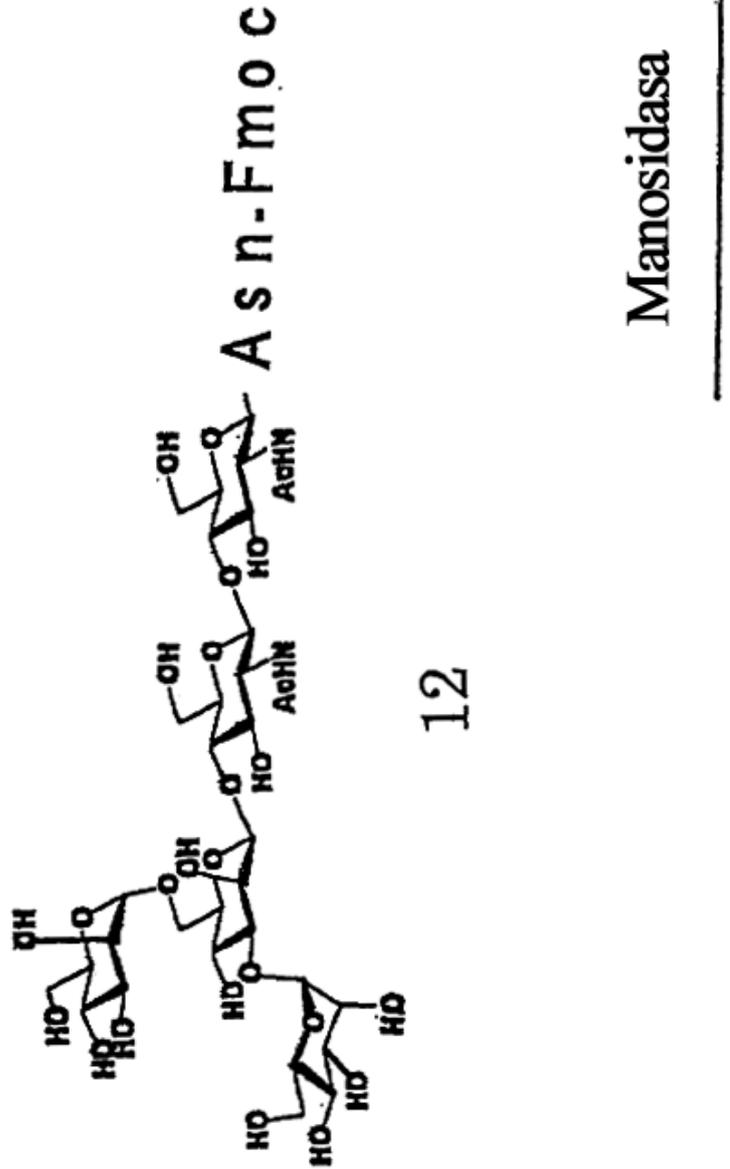
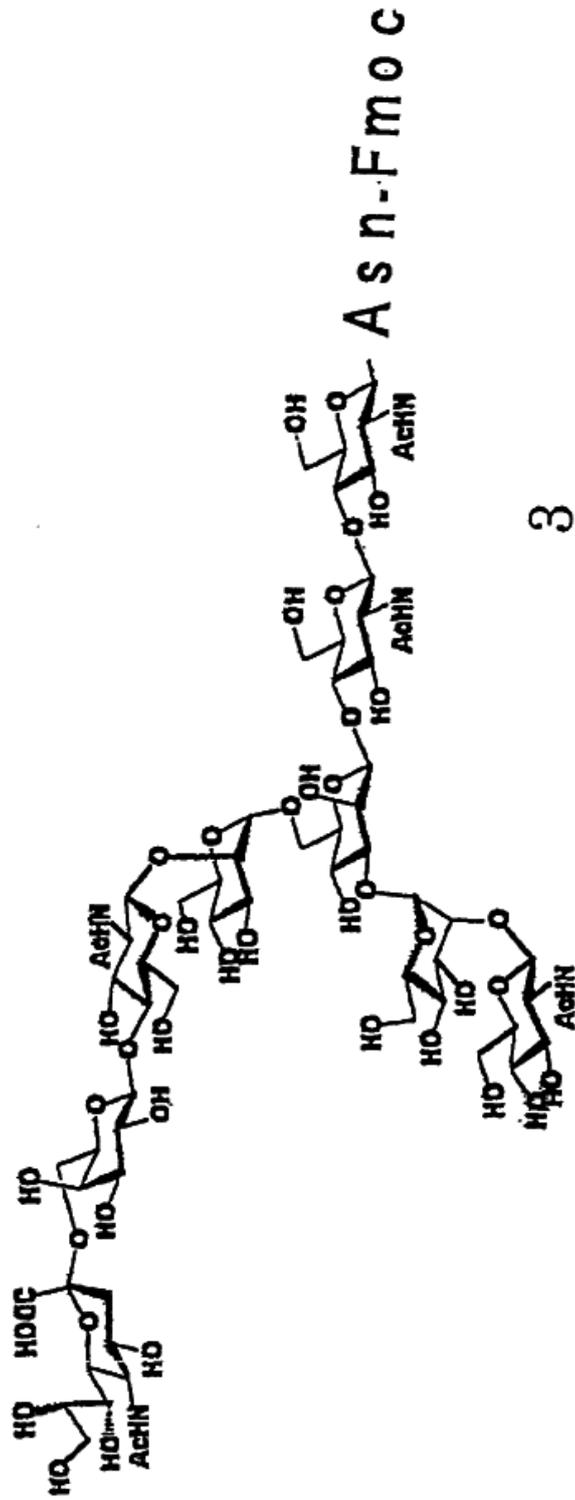


Fig. 9



13

Fig. 9



3

Fig. 10

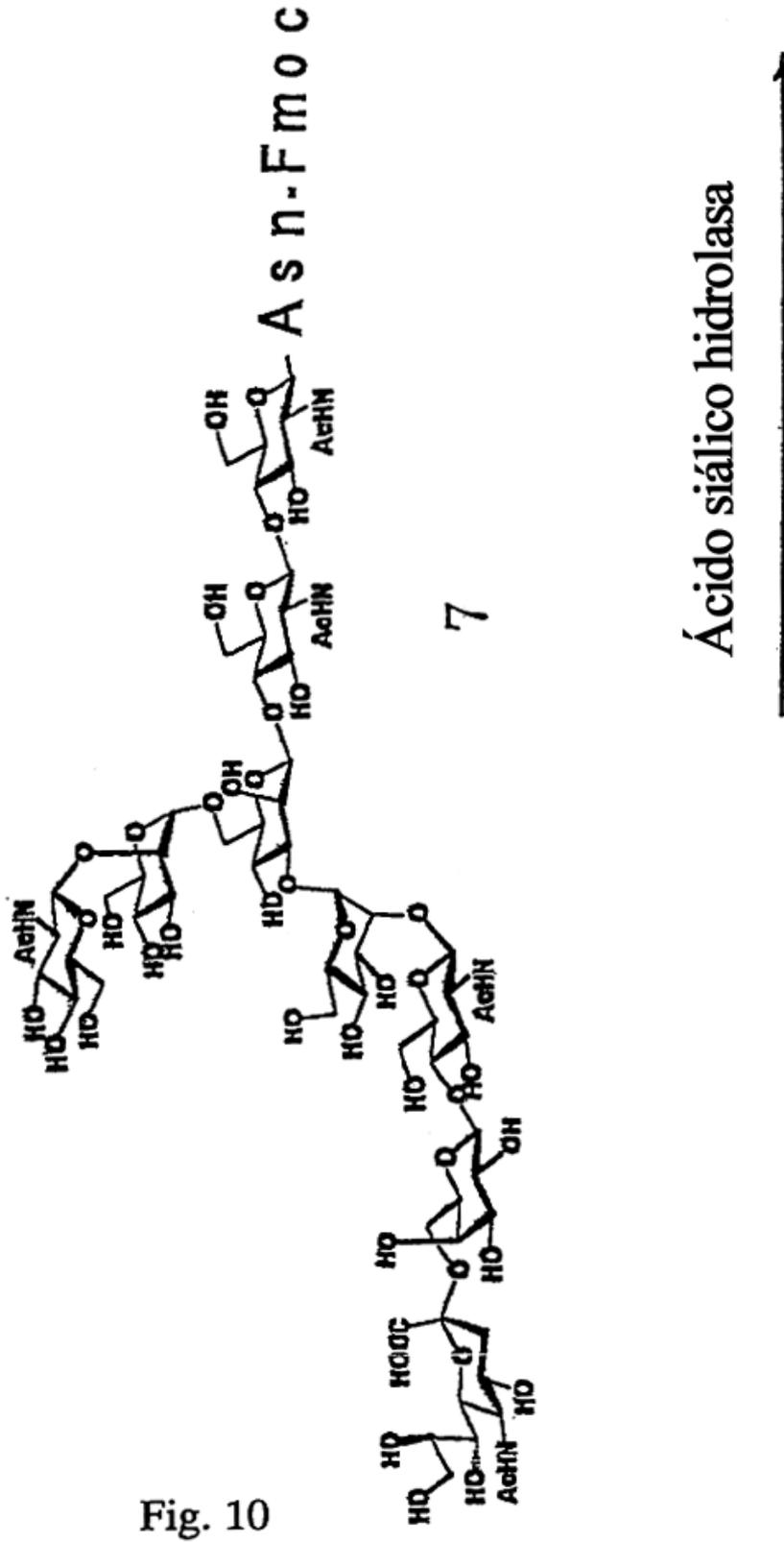
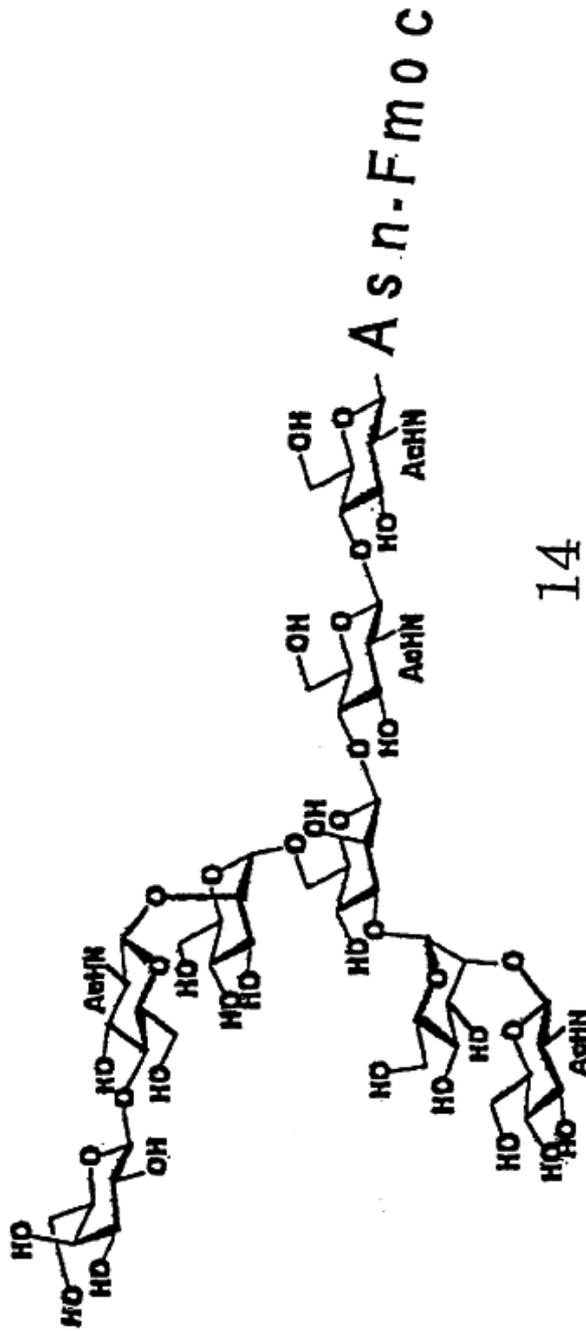
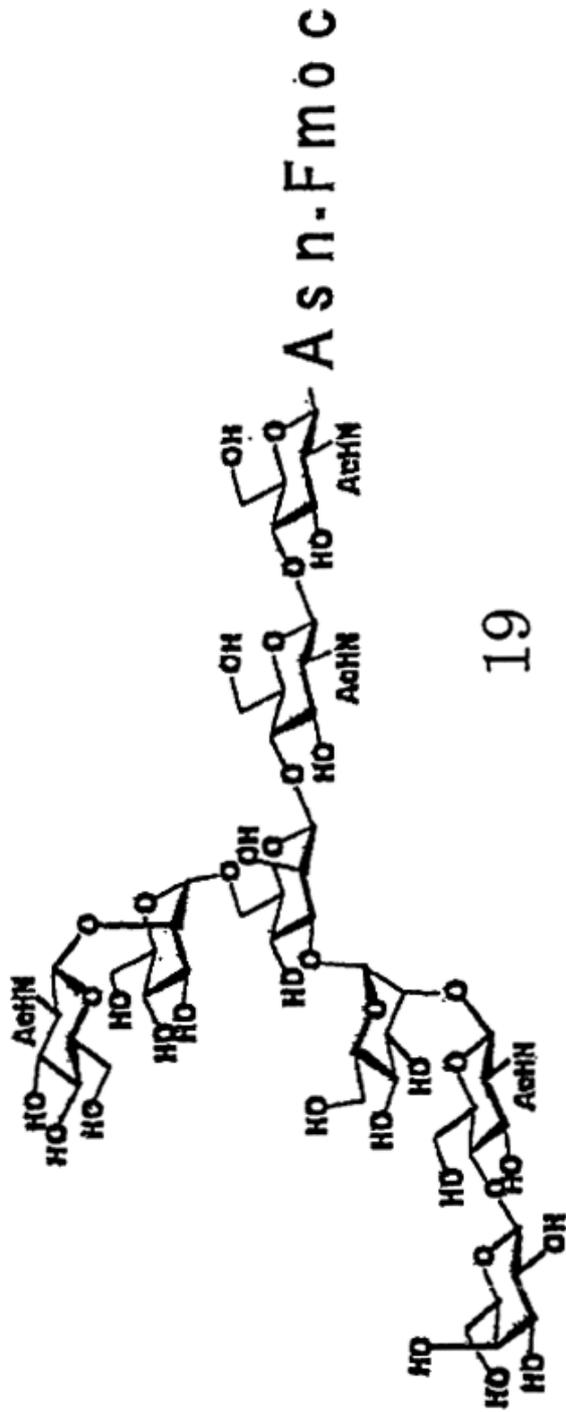


Fig. 10



14

Fig. 10



19

Fig. 10

N-acetylglucosaminidasa



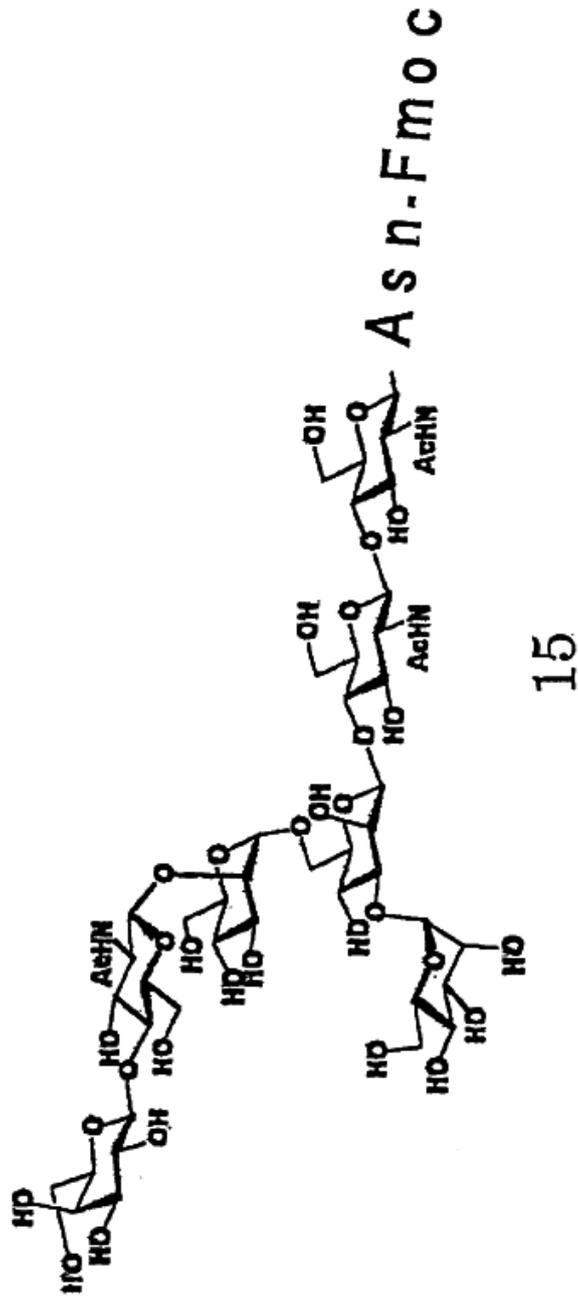


Fig. 10

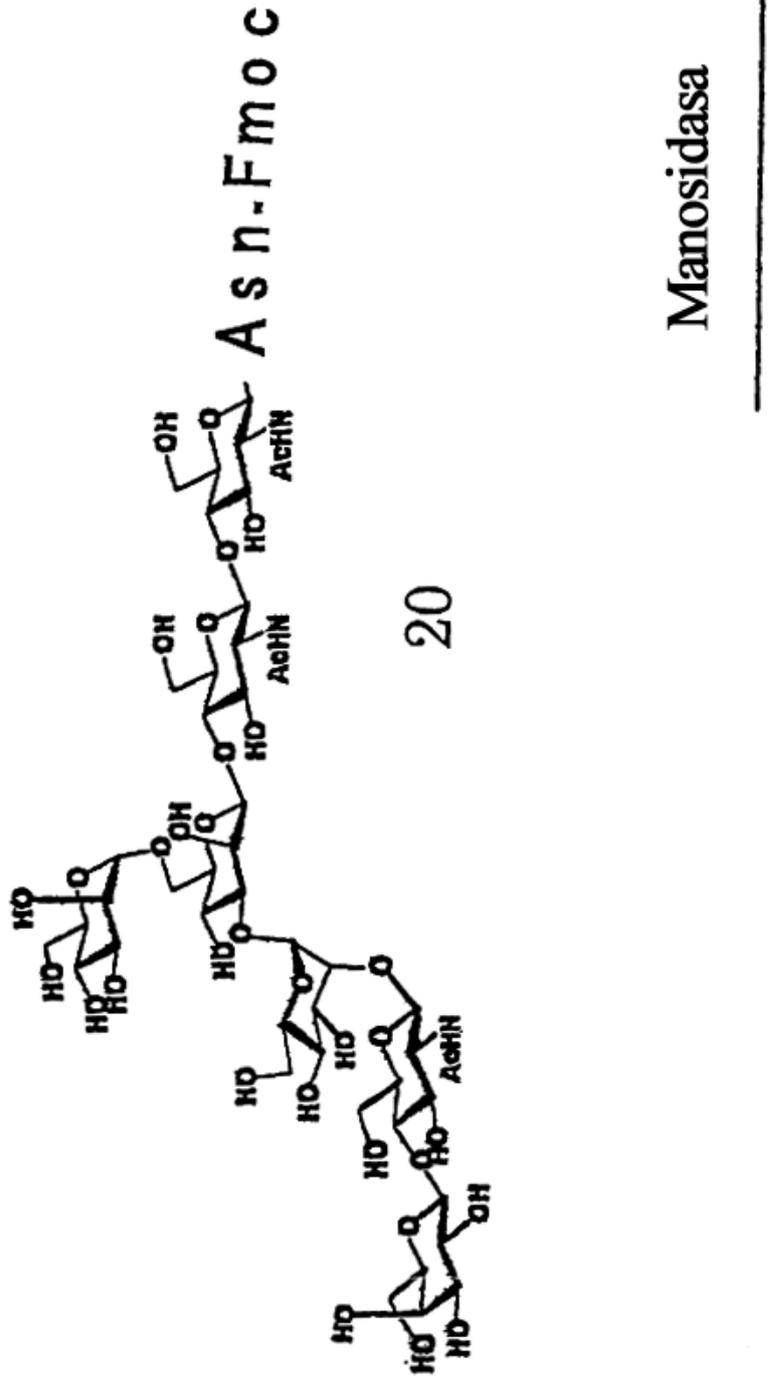


Fig. 10

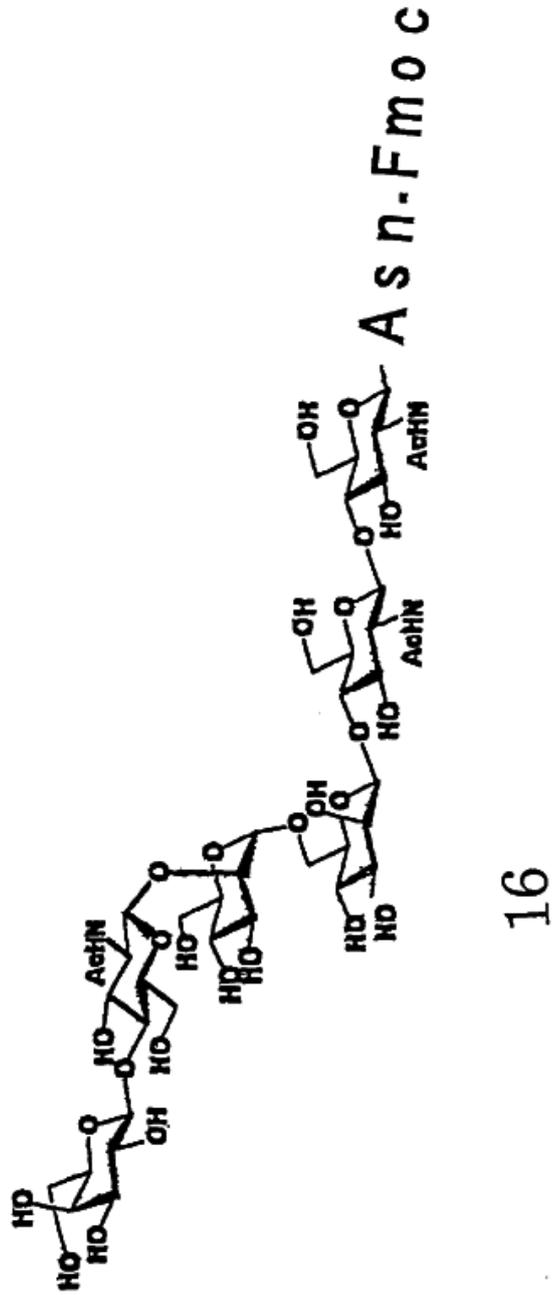


Fig. 10

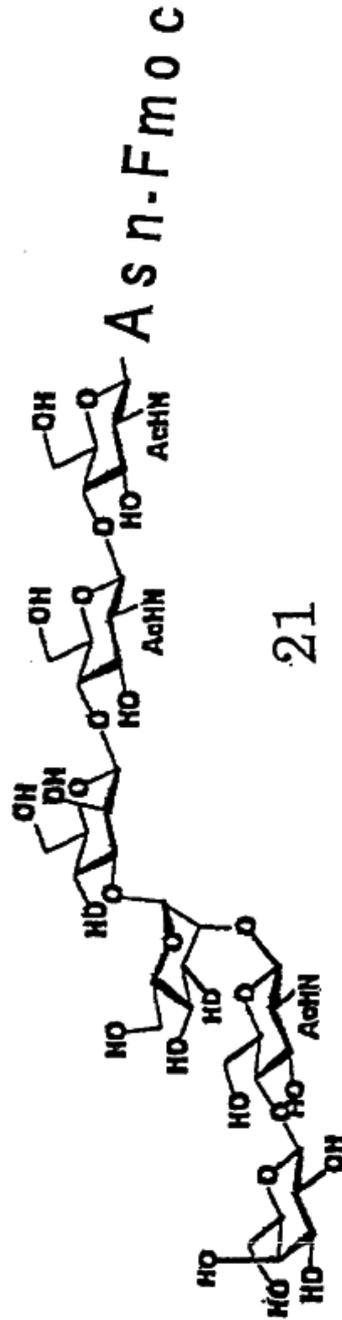


Fig. 10

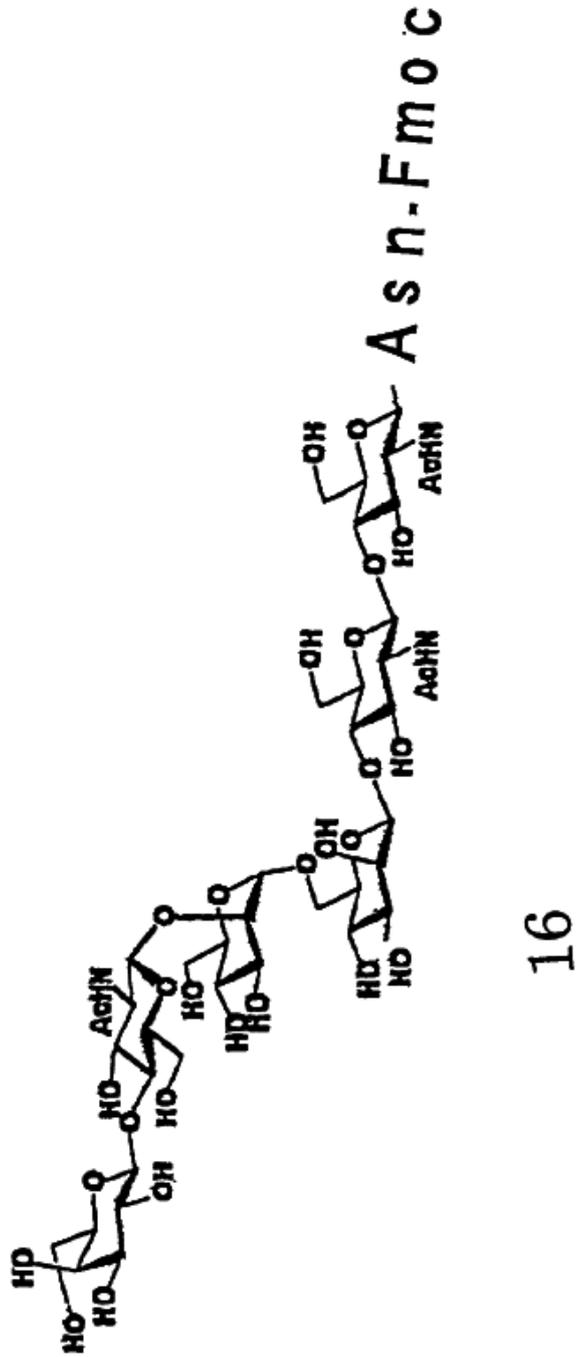


Fig. 11

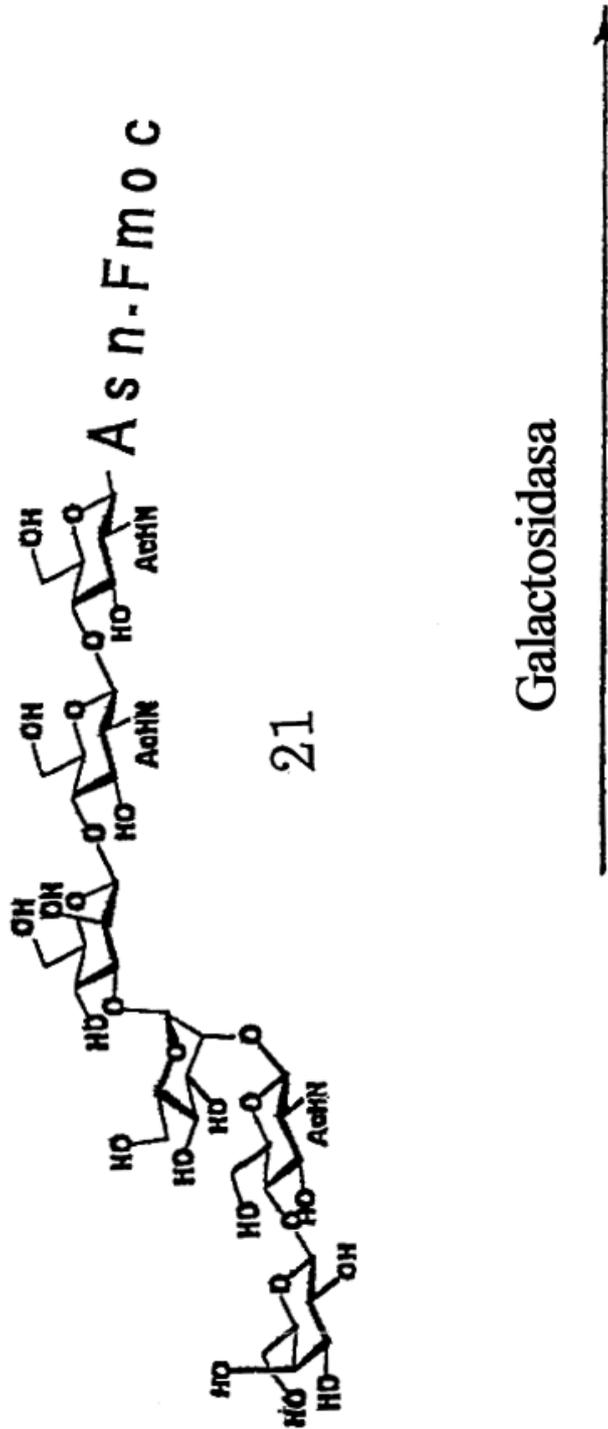
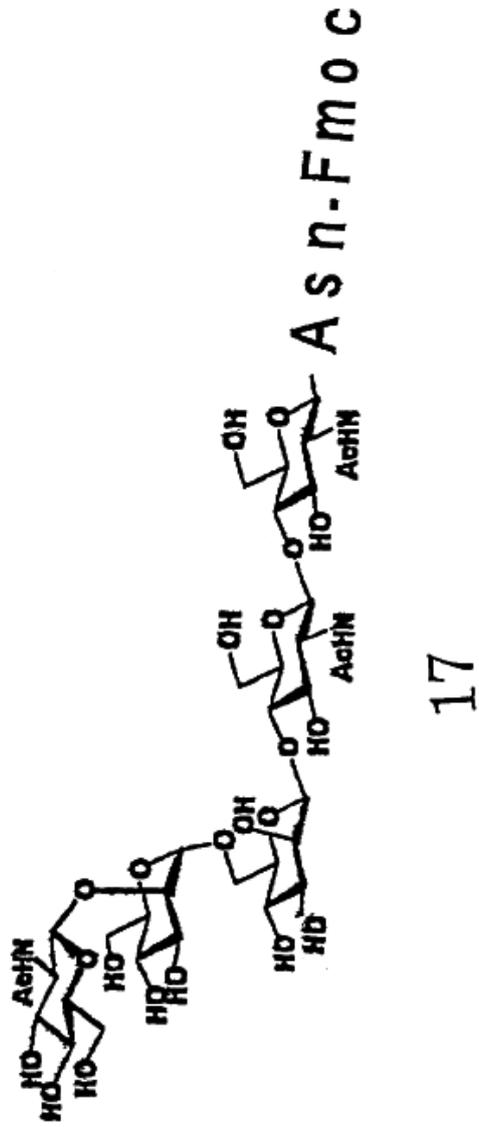
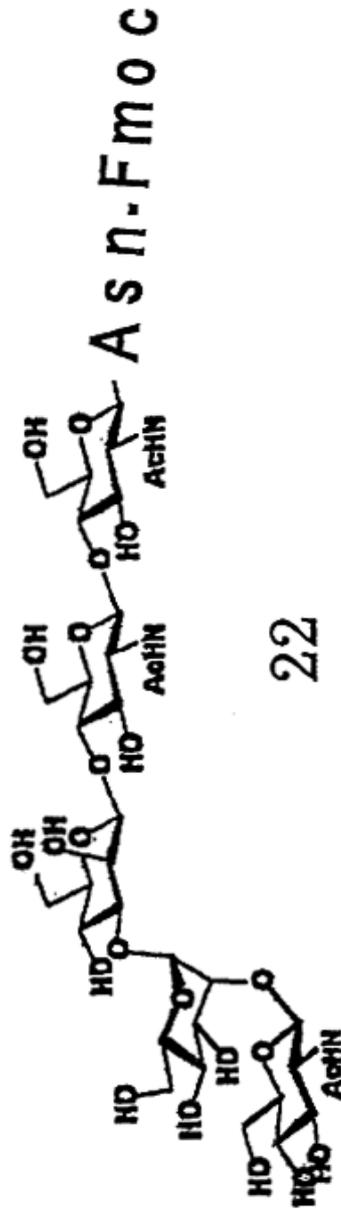


Fig. 11



17

Fig. 11



N-acetilglucosaminidasa



Fig. 11

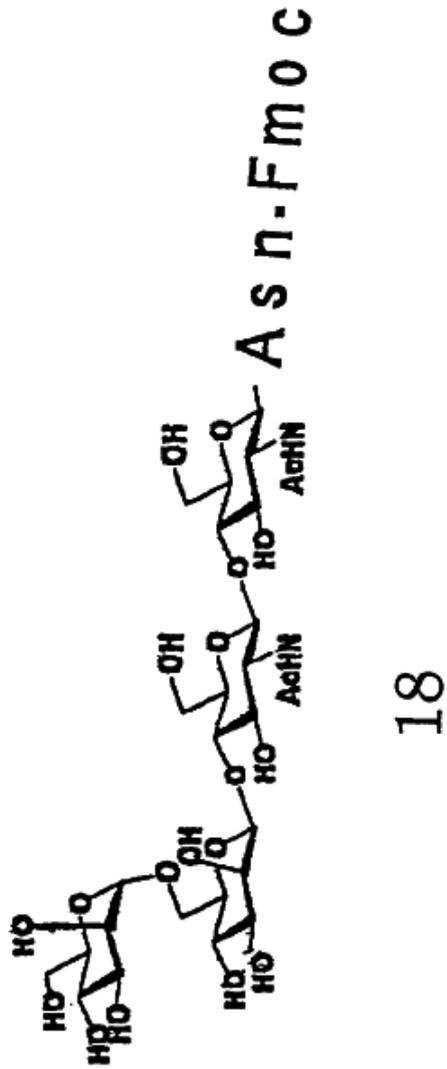


Fig. 11

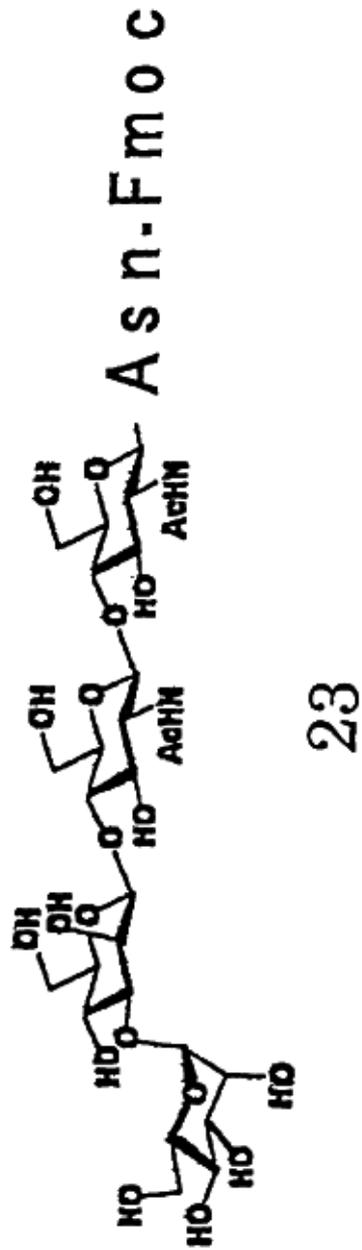


Fig. 11

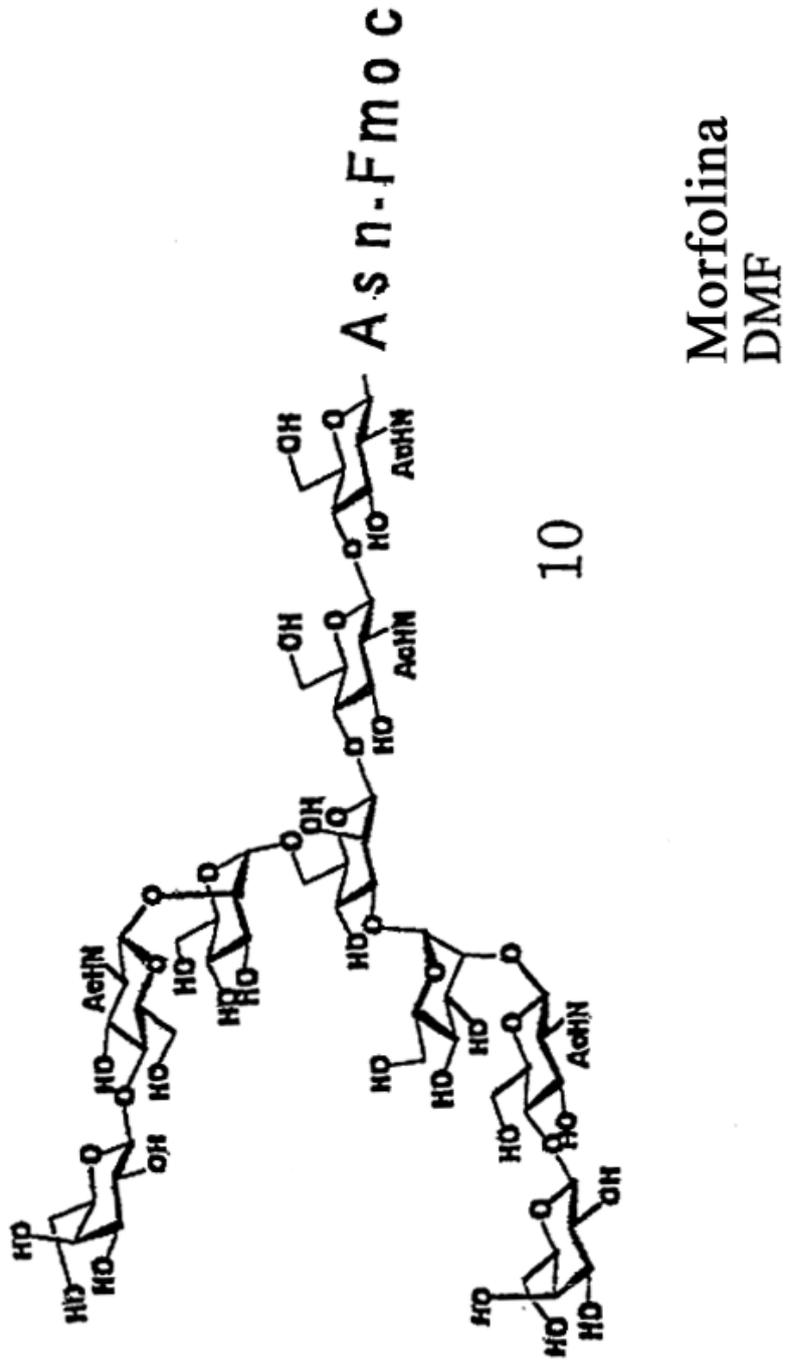
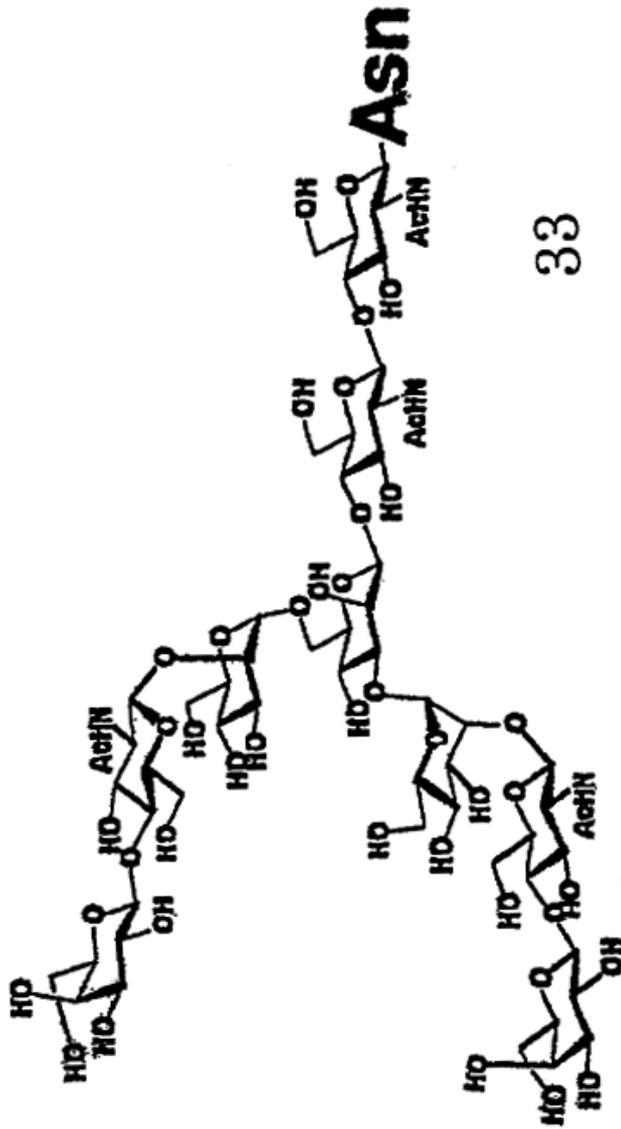


Fig. 12



33

- 1) Hidracina
- 2) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NaHCO}_3/\text{H}_2\text{O}$



Fig. 12

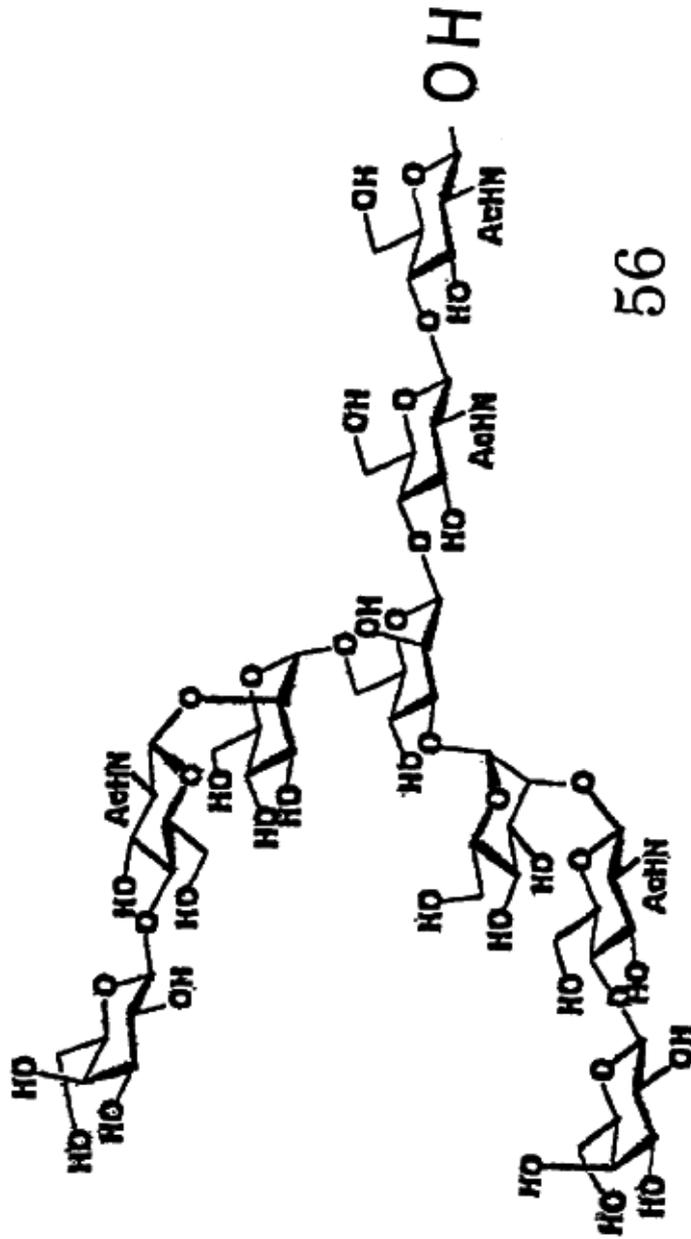


Fig. 12