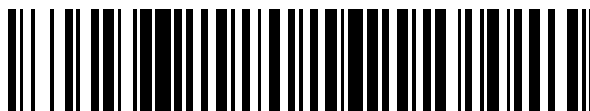


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 417 146**

51 Int. Cl.:

C07H 15/04 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

A61K 31/738 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2008 E 08727910 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2013 EP 2121713**

54 Título: **Oligosacáridos que comprenden un grupo aminoxi y conjugados de los mismos**

30 Prioridad:

18.01.2007 US 885471 P

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

06.08.2013

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)
500 KENDALL STREET
CAMBRIDGE, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**ZHU, YUNXIANG;
CHENG, SENG, H.;
JIANG, CANWEN y
AVILA, LUIS, Z.**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 417 146 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

Oligosacáridos que comprenden un grupo aminoxi y conjugados de los mismos.

5 **[0001]** La descripción se refiere generalmente a procedimientos para la síntesis de oligosacáridos que comprenden un grupo aminoxi a partir de oligosacáridos que comprenden un grupo reactivo. En otra realización, la invención se refiere además a oligosacáridos que comprenden un grupo aminoxi. La descripción también se refiere a procedimientos para la conjugación de oligosacáridos que comprenden un grupo aminoxi con proteínas, incluidas glucoproteínas (como, por ejemplo, enzimas lisosómicas) y a composiciones de conjugados de oligosacáridos y proteínas, incluidos conjugados de oligosacáridos y glucoproteínas. Otra realización de la invención se refiere a procedimientos para el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico mediante tales conjugados de oligosacáridos y enzimas lisosómicas.

15 **[0002]** Los trastornos de almacenamiento lisosómico (LSD) son una clase de trastornos metabólicos poco frecuentes que comprenden más de cuarenta enfermedades genéticas que suponen una deficiencia en la actividad de las hidrolasas lisosómicas. Una característica distintiva de los LSD es la anormal acumulación de metabolitos lisosómicos, la cual conduce a la formación de numerosos lisosomas dilatados.

20 **[0003]** Los LSD pueden tratarse por administración de la versión activa de la enzima deficiente en el paciente, un procedimiento que se denomina tratamiento de sustitución enzimática (TSE). La enzima de sustitución administrada, que porta un resto de manosa-6-fosfato terminal (M6P), es absorbida por las células diana por endocitosis mediada por un receptor de M6P independiente de cationes (CI-MPR) asociado a la superficie celular y dirigida a los lisosomas

25 **[0004]** En general, las enzimas de sustitución poco fosforiladas no son internalizadas por el receptor de M6P en las superficies celulares y, por lo tanto, no pueden dirigirse a los lisosomas, en los que son funcionales. En consecuencia, un bajo grado de fosforilación de la manosa puede tener un efecto significativo y perjudicial en la eficacia terapéutica de una enzima de sustitución.

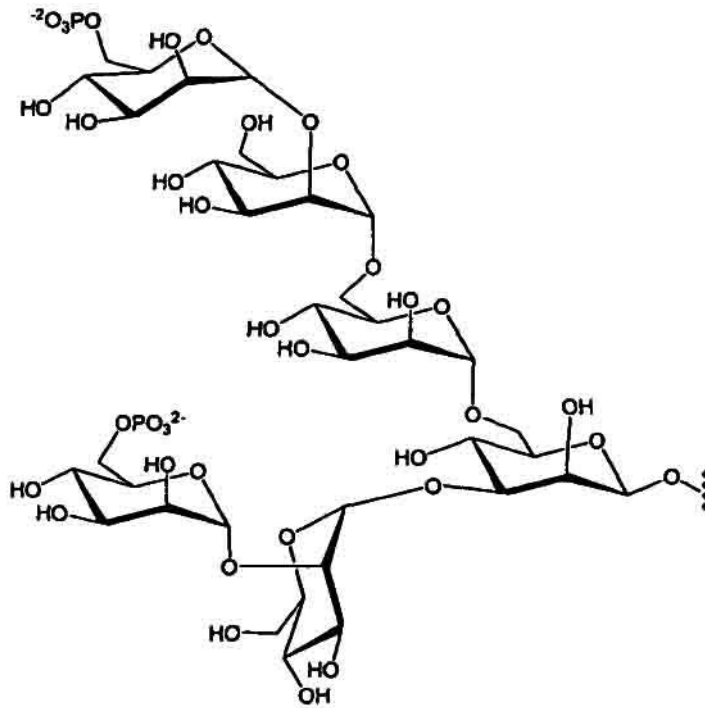
30 **[0005]** Por lo tanto, se han desarrollado procedimientos para aumentar el contenido de M6P de las enzimas de sustitución. Por ejemplo, la patente de los EE. UU. n° 7.001.994 describe un procedimiento para el acoplamiento de oligosacáridos que comprenden M6P con glucoproteínas. Los oligosacáridos de las glucoproteínas se oxidan primeramente con peryodato o galactosa-oxidasa para dar lugar a la formación de grupos carbonilo, los cuales se conjugan después químicamente con un oligosacárido funcionalizado en el extremo reductor con un grupo reactivo frente a carbonilo (como, por ejemplo, un grupo hidracina, hidrazida, aminoxi, tiosemicarbazida, semicarbazida o amina) para producir un conjugado de oligosacárido y glucoproteína.

35 **[0006]** Mediante el procedimiento descrito anteriormente, se preparó un conjugado de la enzima lisosómica α -glucosidasa (GAA) y un bis-M6P-oligosacárido y se encontró que era más eficaz en la reducción del glucógeno del músculo esquelético y del músculo cardíaco que la GAA humana recombinante en un modelo murino de la enfermedad de Pompe, una enfermedad muscular recesiva autosómica que resulta de una deficiencia metabólica de la GAA y se caracteriza por la acumulación de glucógeno lisosómico.

45 **[0007]** El documento US 20050169941 desvela un conjugado que comprende un reactivo homofuncional o heterofuncional con respecto a grupos aminoxi y una entidad elegida entre polisacáridos, oligosacáridos, carbohidratos y moléculas que contienen carbohidratos con al menos un grupo carbonilo, para formar un polisacárido, un oligosacárido, un carbohidrato o una molécula que contiene carbohidratos funcionalizados por medio de al menos un enlace oxima. El documento US 200220137125 desvela derivados de manopiranosiloligosacáridos con un alto grado de fosforilación que contienen manosa-6-fosfato (M6P) u otros oligosacáridos que portan otras hexosas terminales. El documento US 20050048047 se refiere a la administración por vía intratecal (IT) de una enzima recombinante para el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico.

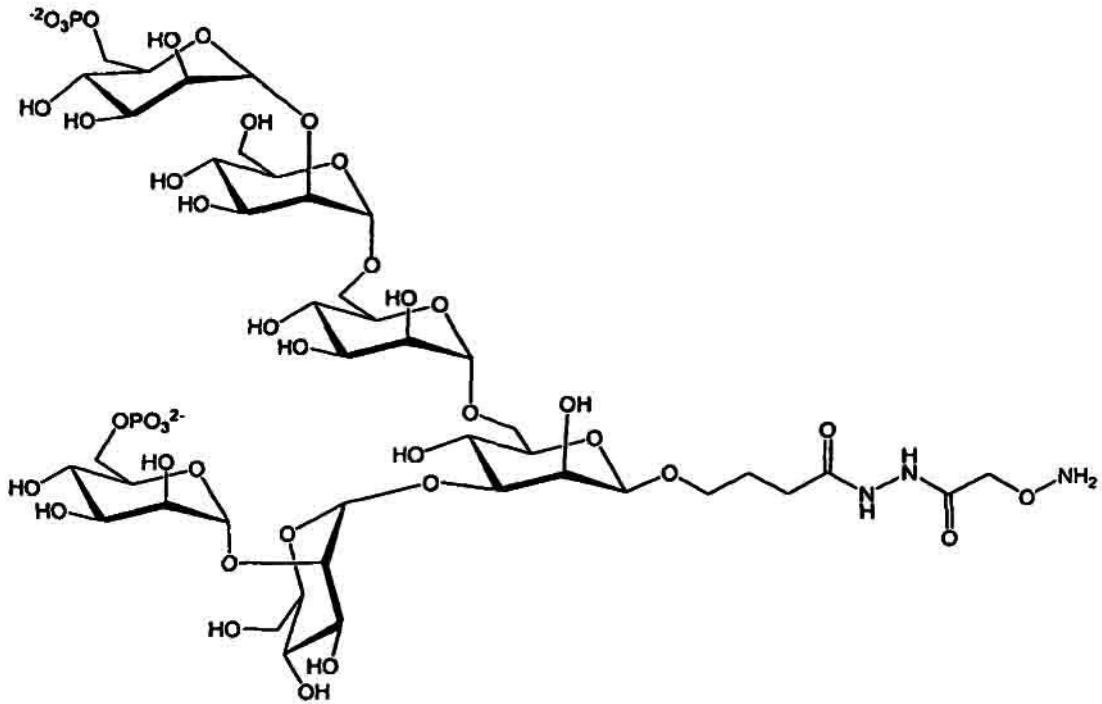
50 **[0008]** Los grupos aminoxi son grupos reactivos frente a carbonilo especialmente útiles para las reacciones de conjugación descritas anteriormente, ya que los conjugados resultantes comprenden un enlace oxima relativamente estable. Por lo tanto, se necesitan procedimientos para la preparación de oligosacáridos funcionalizados con grupos aminoxi.

55 **[0009]** Por consiguiente, la presente invención proporciona un conjugado de oligosacárido y enzima lisosómica que comprende (1) una enzima lisosómica, (2) un oligosacárido y (3) un grupo oxima que conecta la enzima lisosómica y el oligosacárido, en que el oligosacárido es un oligosacárido de la fórmula VI:



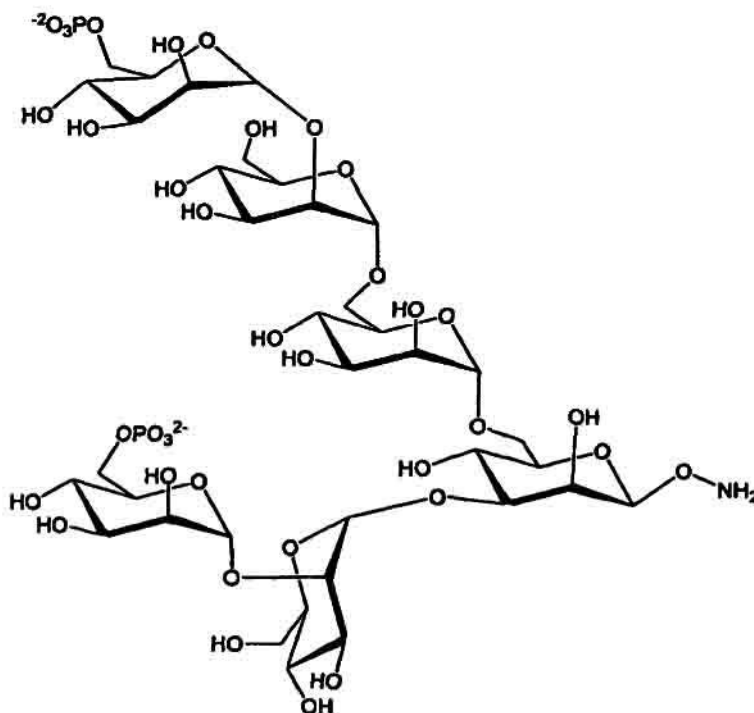
Fórmula VI

- 5 **[0010]** La invención proporciona también un procedimiento para la preparación del conjugado mediante el acoplamiento de un oligosacárido a una enzima lisosómica que comprende:
- (a) proporcionar un oligosacárido que comprende un grupo aminoxi;
- 10 (b) proporcionar una enzima lisosómica con al menos un grupo carbonilo; y
- (c) hacer reaccionar el grupo aminoxi del oligosacárido con el, al menos un grupo carbonilo de la enzima lisosómica y de este modo acoplar el oligosacárido a la enzima lisosómica, en que el oligosacárido que comprende un grupo aminoxi es
- 15



[0011] La invención proporciona además un procedimiento para la preparación del conjugado mediante el acoplamiento de un oligosacárido a una enzima lisosómica que comprende:

- 5
- (a) proporcionar un oligosacárido que comprende un grupo aminoxi;
 - (b) proporcionar una enzima lisosómica con al menos un grupo carbonilo; y
- 10
- (c) hacer reaccionar el grupo aminoxi del oligosacárido con el, al menos un grupo carbonilo de la enzima lisosómica y de este modo acoplar el oligosacárido a la enzima lisosómica, en que el oligosacárido que comprende un grupo aminoxi es



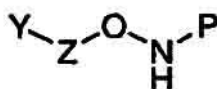
[0012] Por lo tanto, la presente descripción proporciona procedimientos para la preparación de oligosacáridos que comprenden un grupo aminorxi. Estos procedimientos pueden aplicarse generalmente a una amplia gama de oligosacáridos protegidos y desprotegidos como, por ejemplo, oligosacáridos ramificados y sin ramificar y fosforilados y sin fosforilar. En ciertas realizaciones, el oligosacárido puede ser un disacárido, trisacárido, tetrasacárido, pentasacárido, hexasacárido, heptasacárido o de mayor tamaño. En ciertas realizaciones, el oligosacárido comprende al menos un resto de M6P. En algunas realizaciones, el oligosacárido puede comprender al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete restos de M6P terminales.

[0013] La descripción proporciona un procedimiento para la preparación de un oligosacárido que comprende un grupo aminorxi a partir de un oligosacárido que comprende un grupo reactivo. El procedimiento comprende:

- (a) proporcionar un oligosacárido que comprende un primer grupo reactivo;
- (b) proporcionar un compuesto aminorxi que comprende un grupo aminorxi y un segundo grupo reactivo; y
- (c) hacer reaccionar el primer grupo reactivo del oligosacárido con el segundo grupo reactivo del compuesto aminorxi, y de este modo preparar el oligosacárido que comprende un grupo aminorxi.

[0014] Los grupos reactivos primero y segundo pueden elegirse, por ejemplo, entre grupos hidrazina, hidrazida, tiosemicarbazida, semicarbazida, amina, carboxilo, éster activado, haluro de acilo, azida de acilo, haluro de alquilo, anhídrido, isotiocianato, isocianato y haluro de sulfonilo.

[0015] En algunas realizaciones, el compuesto aminorxi se elige entre compuestos de la fórmula II:

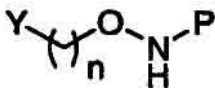


Fórmula II

en la que Y es el segundo grupo reactivo, Z se elige entre alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo y heterociclilo y P se elige entre grupos protectores de aminas (como, por ejemplo, grupos protectores carbamato). Por ejemplo, en algunas realizaciones, Y puede ser un carboxilo, éster activado, haluro de acilo (como por ejemplo, un fluoruro de acilo o cloruro de acilo), azida de acilo, haluro de alquilo, anhídrido, isotiocianato, isocianato o haluro de sulfonilo

(como, por ejemplo, un cloruro de sulfonilo o bromuro de sulfonilo). En otras realizaciones, Y puede ser, por ejemplo, un grupo hidrazina, hidrazida, tiosemicarbazida, semicarbazida o amina.

5 **[0016]** En ciertas realizaciones, el compuesto aminoxi de la fórmula II se elige entre compuestos de la fórmula III:

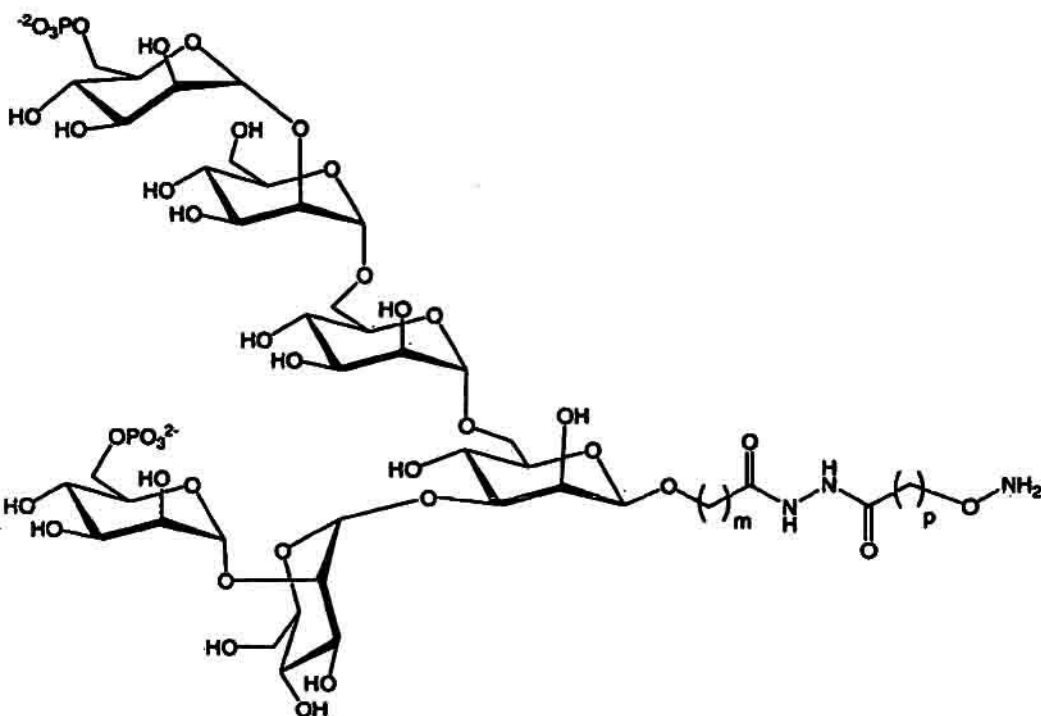


Fórmula III

10 en la que Y es el segundo grupo reactivo, n se elige entre números enteros en el intervalo de 1 a 10 y P se elige entre grupos protectores de aminas.

15 **[0017]** En ciertas realizaciones, el compuesto aminoxi comprende un grupo protector de aminas y el procedimiento comprende además una etapa (d) de desprotección del oligosacárido que comprende un grupo aminoxi.

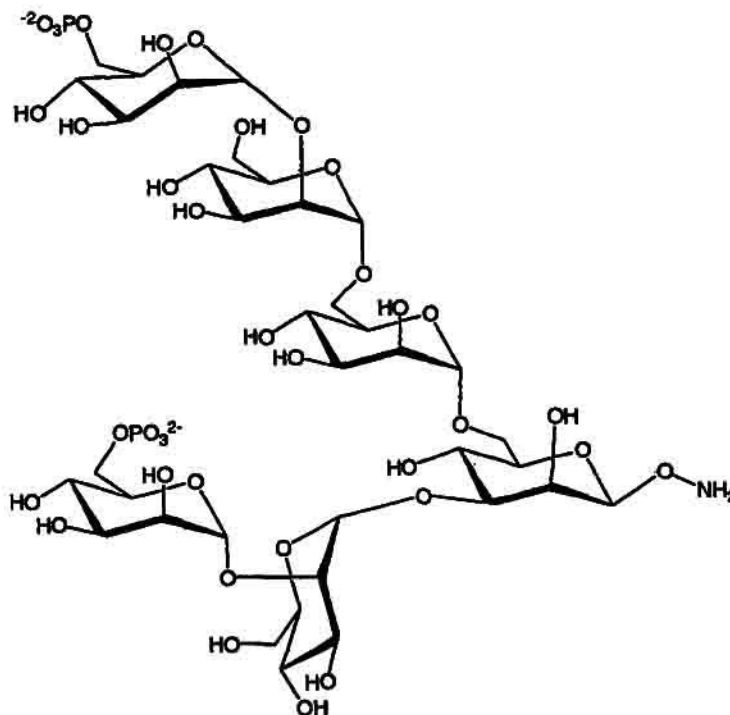
20 **[0018]** La descripción proporciona además un oligosacárido que comprende (1) un grupo aminoxi y (2) manosa-6-fosfato. En algunas realizaciones, este oligosacárido se prepara por los procedimientos descritos anteriormente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la realización proporciona un oligosacárido que comprende un grupo aminoxi de la fórmula IV:



Fórmula IV

25 en la que m y p se eligen independientemente entre números enteros en el intervalo de 1 a 10.

30 **[0019]** En otra realización, la invención proporciona un oligosacárido de la fórmula V:



Fórmula V

5 **[0020]** En otra realización, la descripción proporciona procedimientos para el acoplamiento de un oligosacárido a una proteína. En una realización, el procedimiento comprende:

(a) proporcionar un oligosacárido que comprende un grupo aminoxi;

10 (b) proporcionar una proteína con al menos un grupo carbonilo; y

(c) hacer reaccionar el grupo aminoxi del oligosacárido con el, al menos un grupo carbonilo de la proteína y de este modo acoplar el oligosacárido a la proteína.

15 **[0021]** En otras realizaciones, la descripción proporciona además un conjugado de oligosacárido y proteína que comprende (1) una proteína, (2) un oligosacárido y (3) un grupo oxima que conecta la proteína y el oligosacárido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la descripción proporciona un conjugado de oligosacárido y proteína preparado por los procedimientos desvelados anteriormente. En ciertas realizaciones, el conjugado de oligosacárido y proteína es un conjugado de oligosacárido y glucoproteína. En ciertas realizaciones, el conjugado de oligosacárido y glucoproteína es el conjugado de un oligosacárido que comprende al menos un resto de M6P y una enzima lisosómica como, por ejemplo, una hidrolasa lisosómica. En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de oligosacárido y proteína de la invención.

25 **[0022]** Otra realización de la descripción proporciona procedimientos para el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico como, por ejemplo, aquellos desvelados en la tabla 1. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden la administración a un mamífero de un conjugado de oligosacárido y proteína de la invención, en que el oligosacárido comprende al menos un resto de M6P y la glucoproteína es una hidrolasa lisosómica. La invención proporciona además un conjugado de la invención para uso en el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico en un sujeto que lo necesita y en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico.

30 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

35 **[0023]** La figura 1 es un esquema de reacción que representa una realización ilustrativa de los procedimientos de la descripción. El oligosacárido 1, que tiene un primer grupo reactivo (un grupo hidrazida), se hace reaccionar con un compuesto aminoxi 2 en presencia del catalizador 3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona (DHBt-OH) para producir el oligosacárido 3. A continuación, el grupo protector de aminas *tert*-butiloxycarbonilo (*t*-Boc) del oligosacárido 3 se elimina con ácido trifluoroacético/diclorometano (TFA/DCM) al 50% para producir el oligosacárido 4.

[0024] La figura 2 representa los resultados de una serie de cromatografías en gel de intermedios del esquema de síntesis descrito en la figura 1. La figura 2A es el resultado de una cromatografía analítica en un aparato Dionex del oligosacárido de partida 1. La figura 2B es el resultado de una cromatografía analítica en un aparato Dionex del oligosacárido 3. La figura 2C es el resultado de una cromatografía analítica en un aparato Dionex del oligosacárido 4.

[0025] La figura 3A es un espectro de masas del oligosacárido 1 (peso molecular calculado = 1.250; peso molecular calculado de la sal de sodio = 1.338). La figura 3B es un espectro de masas del oligosacárido 4 (peso molecular calculado = 1.323; peso molecular calculado de la sal de sodio = 1.411).

[0026] La figura 4 es un esquema de reacción que representa una realización ilustrativa de los procedimientos de la descripción de la invención. El oligosacárido 5, que tiene un primer grupo reactivo (un grupo carboxilo), se hace reaccionar con un compuesto aminoxi 6 en presencia del agente de acoplamiento 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y el catalizador *N*-hidroxisuccinimida (NHS), para producir el oligosacárido 3 que contiene un grupo aminoxi. A continuación, el grupo protector de aminas Boc del oligosacárido 3 se elimina con TFA/DCM al 50% para producir el oligosacárido 4.

I. Preparación de un oligosacárido que comprende un grupo aminoxi

A. Oligosacárido que comprende un grupo reactivo

[0027] Los procedimientos de la descripción pueden aplicarse a una amplia gama de oligosacáridos que comprenden un grupo reactivo. Según se usa en este documento, un oligosacárido se refiere a un disacárido, trisacárido, tetrasacárido, pentasacárido, hexasacárido, heptasacárido o oligosacárido de mayor tamaño (como, por ejemplo, un oligosacárido que comprende 2-50, 2-10, 8-25 o 8-50 unidades de sacáridos). Por consiguiente, en diversas realizaciones, un oligosacárido puede ser, por ejemplo, un disacárido, un trisacárido, un tetrasacárido, un pentasacárido, un hexasacárido, un heptasacárido o un oligosacárido de mayor tamaño. Un oligosacárido puede tener una estructura con una, dos, tres, cuatro o cinco antenas. Un oligosacárido puede comprender ninguno, uno, dos, tres, cuatro o más puntos de ramificación.

[0028] En algunas realizaciones, el grupo reactivo en el oligosacárido, que también se denomina primer grupo reactivo, puede ser, por ejemplo, un grupo hidrazina, un grupo hidrazida, un grupo semicarbazida, un grupo tiosemicarbazida o un grupo amina. En algunas realizaciones, el primer grupo reactivo puede ser, por ejemplo, un grupo carboxilo, éster (como, por ejemplo, un éster activado), haluro de acilo (como, por ejemplo, fluoruro de acilo o cloruro de acilo), azida de acilo, haluro de alquilo, anhídrido, isotiocianato, isocianato o haluro de sulfonilo (como, por ejemplo, cloruro de sulfonilo o bromuro de sulfonilo).

[0029] El primer grupo reactivo puede conectarse al extremo reductor del oligosacárido o puede localizarse en cualquier punto del oligosacárido. En algunas realizaciones, el primer grupo reactivo puede conectarse a través de uno o más enlazantes con el oligosacárido. Un enlazante, según se usa en este documento, puede elegirse, por ejemplo, entre una combinación de grupos alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, aciloxi, alcoxi, ariloxi y heterociclioxi opcionalmente sustituidos. Un enlazante puede estar interrumpido o terminado por uno o más heteroátomos como, por ejemplo, nitrógeno, azufre y oxígeno. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un enlazante puede comprender uno o más grupos éter, éster o amida.

[0030] Cualquier grupo químico del enlazante (como, por ejemplo, alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, aciloxi, alcoxi, ariloxi y heterociclioxi) puede estar sustituido o sin sustituir, a menos que se indique lo contrario. Los sustituyentes pueden elegirse, por ejemplo, entre acilo, acilamino, aciloxi, alquenoilo, alcoxi, alquilo, alquinoilo, amido, amino, aril, ariloxi, azido, carbamoilo, carboalcoxi, carboxi, ciano, cicloalquilo, formilo, guanidino, halo, heteroarilo, heterociclilo, hidroxilo, iminoamino, nitro, oxo, fosfonamino, sulfino, sulfonamino, sulfonato, sulfonilo, tio, tioacilamino, tioureido y ureido. A su vez, los sustituyentes pueden estar sustituidos o sin sustituir y pueden estar interrumpidos o terminados por uno o más heteroátomos como, por ejemplo, nitrógeno, azufre y oxígeno.

[0031] En algunas realizaciones, un oligosacárido puede comprender al menos un grupo protector. El término "grupo protector" se refiere a cualquier sustituyente que puede usarse para impedir que un grupo funcional (como, por ejemplo, un grupo amina, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un grupo hidrazina, un grupo hidrazida, un grupo semicarbazida o un grupo tiosemicarbazida) en una molécula reaccione químicamente mientras tiene lugar un cambio químico en otra parte de la molécula. Un grupo protector puede eliminarse en las condiciones químicas apropiadas. Los expertos en la técnica conocen numerosos grupos protectores y ejemplos de grupos protectores, procedimientos para su adición y procedimientos para su eliminación pueden encontrarse, por ejemplo, en Greene y col., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3^a edición, John Wiley and Sons: Nueva York, EE. UU., 1999 y Kocienski, *Protecting Groups*, 3^a edición, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, Alemania, 2005, cuyas descripciones se

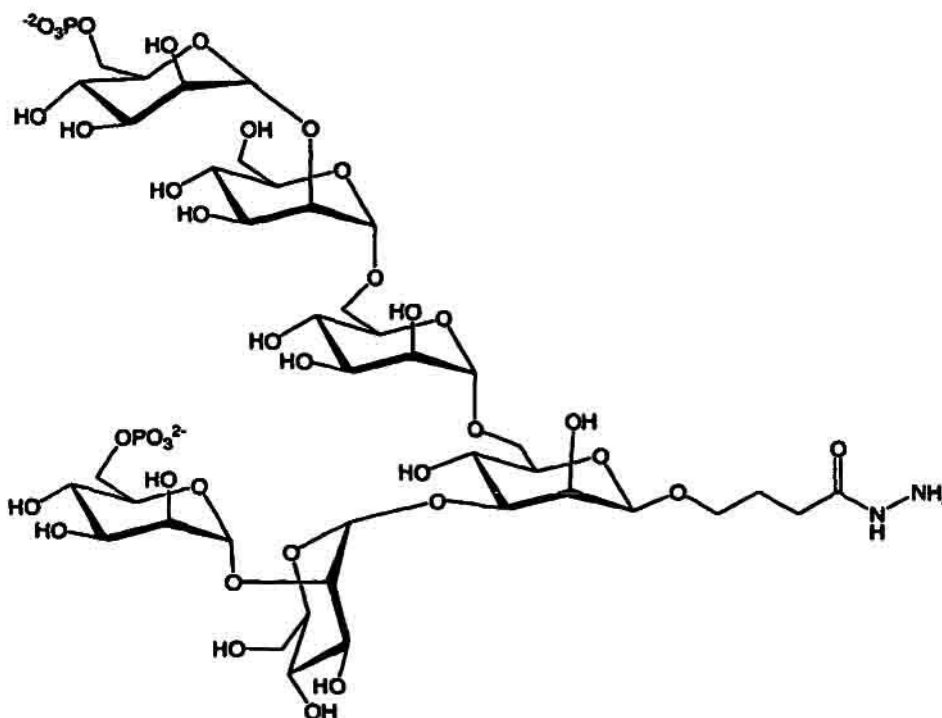
incorporan en este documento por referencia. En ciertas realizaciones, el oligosacárido puede comprender al menos un grupo protector elegido entre grupos protectores de hidroxilos, grupos protectores de carboxilos y grupos protectores de aminas. En otras realizaciones, un oligosacárido puede estar "desprotegido" y puede no comprender ningún grupo protector.

5
[0032] Un oligosacárido puede aislarse de una fuente natural o puede prepararse por síntesis química o enzimática. Un oligosacárido aislado de una fuente natural puede ser homogéneo o puede ser una mezcla heterogénea de oligosacáridos relacionados. En algunas realizaciones, un oligosacárido puede prepararse por modificación química o enzimática de un oligosacárido aislado de una fuente natural ("semisíntesis"). En algunas
 10 realizaciones, el oligosacárido puede ser un oligosacárido sintético con la estructura química de un oligosacárido de origen natural.

[0033] En algunas realizaciones, un oligosacárido puede comprender un monosacárido que es reconocido por un receptor concreto. El monosacárido reconocido por un receptor concreto puede elegirse, por ejemplo, entre un resto de galactosa, GalNAc, manosa, M6P, glucosa, GlcNAc, ácido siálico o ácido siálico sulfatado. En algunas
 15 realizaciones, un oligosacárido puede comprender al menos un resto de M6P, como, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez restos de M6P.

[0034] En algunas realizaciones, el monosacárido reconocido por un receptor concreto puede ser un penúltimo monosacárido o un monosacárido terminal. En algunas realizaciones, el monosacárido reconocido por un receptor concreto puede ser un resto de galactosa, manosa, M6P, glucosa, GlcNAc o ácido siálico terminal. En algunas realizaciones, un oligosacárido puede contener al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete restos de
 20 M6P terminales.

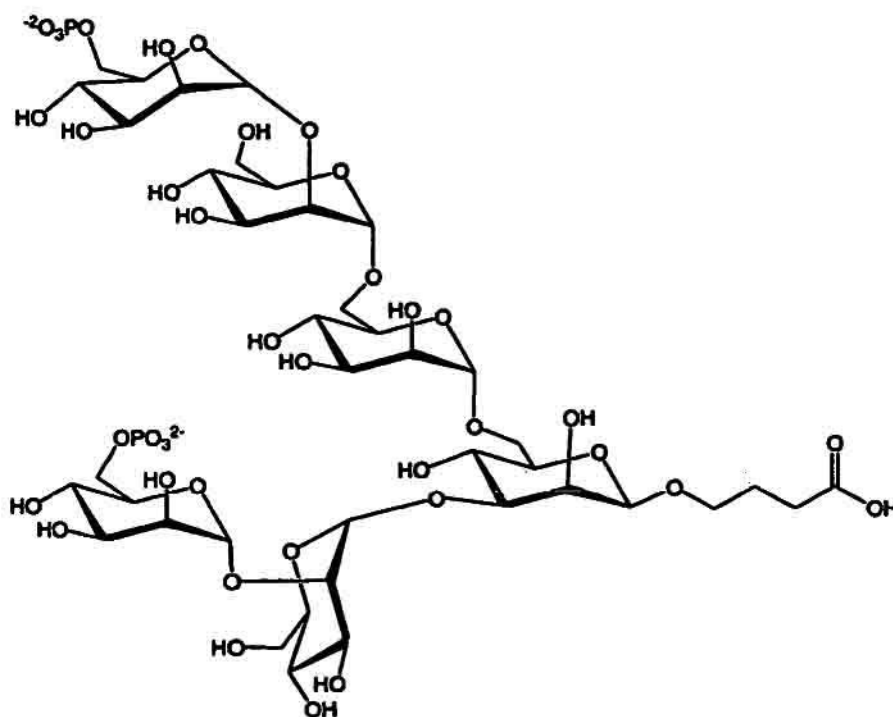
[0035] En ciertas realizaciones, el oligosacárido que comprende un grupo reactivo puede ser un hexasacárido que contiene M6P de la fórmula la:



30 Fórmula la

[0036] El oligosacárido de la fórmula la puede describirse como butirilhidrazino-4-il-6-O-fosfono- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 6)-[6-O-fosfono-- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)]- β -D-manopiranosido.

35 **[0037]** En ciertas realizaciones, el oligosacárido que comprende un grupo reactivo puede ser un hexasacárido que contiene M6P de la fórmula lb:



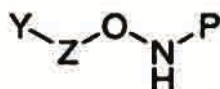
Fórmula Ib

5 B. Compuesto aminoxi

[0038] Según se usa en este documento, un compuesto aminoxi puede ser cualquier compuesto que comprende un grupo aminoxi y un segundo grupo reactivo, en que el segundo grupo reactivo puede reaccionar con un primer grupo reactivo en un oligosacárido para formar un enlace covalente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el segundo grupo reactivo puede ser un grupo carboxilo, éster (como, por ejemplo, un éster activado), haluro de acilo (como, por ejemplo, un fluoruro de acilo o cloruro de acilo), azida de acilo, anhídrido, isotiocianato, isocianato o haluro de sulfonilo (como, por ejemplo, un cloruro de sulfonilo o bromuro de sulfonilo). En otras realizaciones, el segundo grupo reactivo puede ser, por ejemplo, un grupo hidrazina, un grupo hidrazida, un grupo semicarbazida, un grupo tiosemicarbazida o un grupo amina.

[0039] En ciertas realizaciones, el nitrógeno del grupo aminoxi del compuesto aminoxi está protegido con un grupo protector de aminas. Los expertos en la técnica conocen numerosos grupos protectores de aminas y ejemplos de grupos protectores de aminas, procedimientos para su adición y procedimientos para su eliminación pueden encontrarse en las págs. 494-653 de Greene y col., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3^a edición, John Wiley and Sons: Nueva York, EE. UU., 1999; el capítulo 8 de Kocienski, *Protecting Groups*, 3^a edición, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, Alemania, 2005; Bodanszky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag: Nueva York, EE. UU., 1993; Lloyd-Williams y col., *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press: Boca Raton, FL, EE. UU., 1997; y Stewart y col., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2^a edición, Pierce Chemical Co.: Rockford, IL, EE. UU., 1984, cuyas invenciones se incorporan en este documento por referencia.

[0040] En algunas realizaciones, el compuesto aminoxi se elige entre compuestos de la fórmula II:



Fórmula II

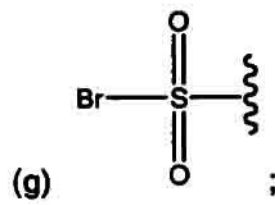
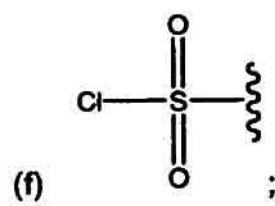
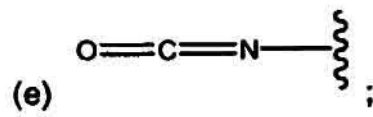
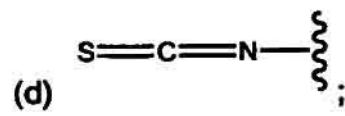
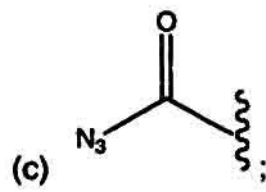
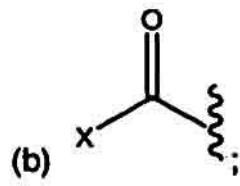
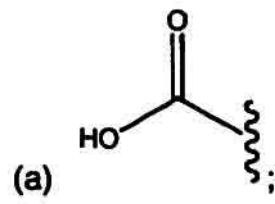
en la que Y es el segundo grupo reactivo, Z se elige entre alquilo, alqueno, alquino, heteroarilo, arilo y heterocíclico y P se elige entre grupos protectores de aminas.

[0041] Según se usa en este documento, cualquier grupo químico en el compuesto aminoxi (como, por ejemplo, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, aciloxi, alcoxi, ariloxi y heterociciloxi) puede estar sustituido o sin sustituir y puede estar interrumpido por uno o más grupos químicos, a menos que se indique lo contrario. Los sustituyentes y los grupos químicos de interrupción pueden elegirse, por ejemplo, entre acilo, acilamino, aciloxi, alquenilo, alcoxi, alquilo, alquinilo, amido, amino, arilo, ariloxi, azido, carbamoilo, carboalcoxi, carboxi, ciano, cicloalquilo, formilo, guanidino, halo, heteroarilo, heterociclilo, hidroxí, iminoamino, nitro, oxo, fosfonamino, sulfinilo, sulfonamino, sulfonato, sulfonilo, tio, tioacilamino, tioureido y ureido. A su vez, los sustituyentes pueden estar sustituidos o sin sustituir y pueden estar interrumpidos o terminados por uno o más heteroátomos como, por ejemplo, nitrógeno, azufre y oxígeno.

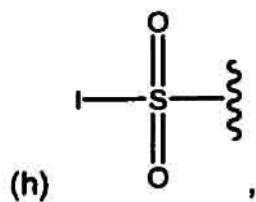
5

10

[0042] En ciertas realizaciones, Y puede elegirse, por ejemplo, entre:

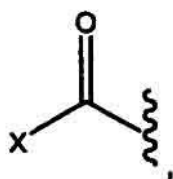


y



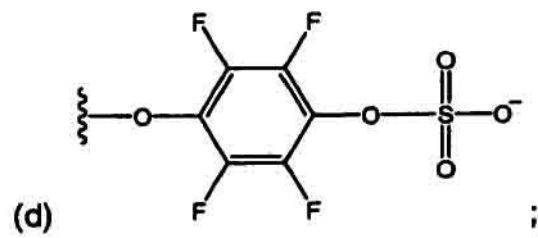
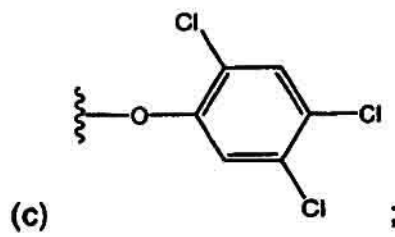
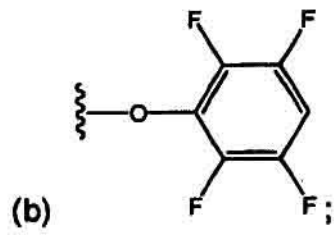
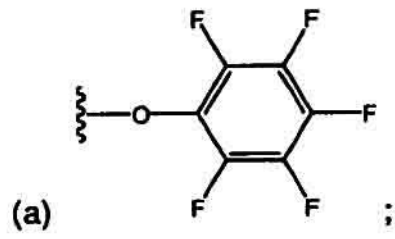
en que X se elige entre halógenos, azida, aciloxi, alcoxi, ariloxi, heteroariloxi y heterociciloxi.

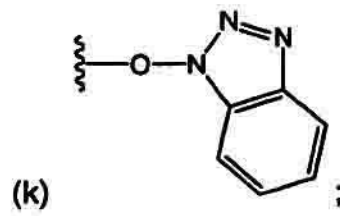
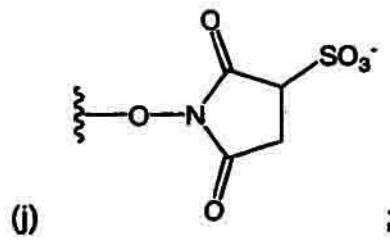
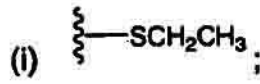
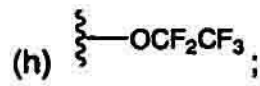
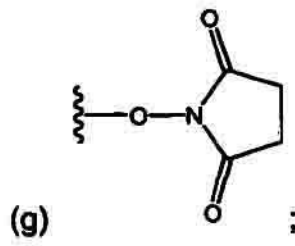
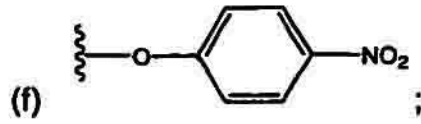
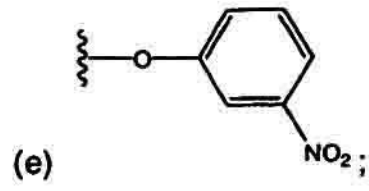
- 5 **[0043]** En ciertas realizaciones, el compuesto aminoxi es un éster activado. Según se usa en este documento, un éster activado es un éster que reacciona para formar un enlace amida en condiciones suaves. En general, un éster activado es un éster de un alcohol relativamente ácido. En ciertas realizaciones, el compuesto aminoxi de la fórmula II es un éster activado de la fórmula



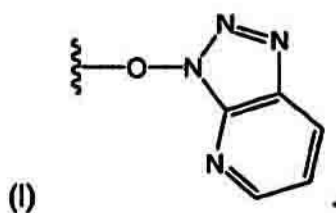
10

y X se elige entre alcoxi, ariloxi, heteroariloxi y heterociciloxi. Por ejemplo, X puede elegirse entre:





y



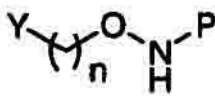
[0044] En otras realizaciones, Y se elige, por ejemplo, entre grupos hidrazida, hidrazina, tiosemicarbazida, semicarbazida y amina.

[0045] En algunas realizaciones, Z puede comprender, por ejemplo, un grupo carbonilo, éter, éster o amida. En algunas realizaciones, Z puede ser, por ejemplo, un alquilo interrumpido por uno o más heteroátomos, como un oligoetilenglicol. Por ejemplo, Z puede ser monoetilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol, tetraetilenglicol o un oligoetilenglicol de mayor tamaño.

[0046] En algunas realizaciones, Z puede ser, por ejemplo, un alquilo sustituido con oxo e interrumpido por uno o más heteroátomos, como un oligopéptido. Por ejemplo, el oligopéptido puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más componentes aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser, por ejemplo, α -aminoácidos, β -aminoácidos, γ -aminoácidos, δ -aminoácidos y ω -aminoácidos. Un aminoácido puede tener quiralidad R o S en cualquier átomo quiral. Un aminoácido puede elegirse, por ejemplo, entre alanina, β -alanina, ácido α -aminoadípico, ácido 2-aminobutanoico, ácido 4-aminobutanoico, ácido 1-aminociclopentanocarboxílico, ácido 6-aminohexanoico, ácido 2-aminoheptanodioico, ácido 7-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido aminometilpirrolcarboxílico, ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico, ácido aminopiperidincarboxílico, ácido 3-aminopropiónico, aminoserina, ácido aminotetrahidropirano-4-carboxílico, arginina, asparragina, ácido aspártico, ácido azetidincarboxílico, benzotiazolilalanina, butilglicina, carnitina, 4-clorofenilalanina, citrulina, ciclohexilalanina, ciclohexilestatina, cisteína, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 2,3-diaminopropiónico, dihidroxifenilalanina, ácido dimetiltiazolidinocarboxílico, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, hornoserina, hidroxiprolina, isoleucina, ácido isonipecóico, leucina, lisina, metanoprolina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, ácido *p*-aminobenzoico, penicilamina, fenilalanina, fenilglicina, piperidinilalanina, piperidinilglicina, prolina, pirrolidinilalanina, sarcosina, selenocisteína, serina, estatina, tetrahidropirano-glicina, tienilalanina, treonina, triptófano, tirosina, valina, aloisoleucina, alotreonina, ácido 2,6-diamino-4-hexanoico, ácido 2,6-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, dicarboxidina, homoarginina, homocitrulina, homocisteína, homocistina, homofenilalanina, homoprolina y ácido 4-hidrazinobenzoico.

[0047] P puede elegirse entre los grupos protectores de aminas conocidos por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, P puede ser un grupo protector carbamato como, por ejemplo, un grupo carbamato de 9-fluorenilmetilo (Fmoc), carbamato de *tert*-butilo (*t*-Boc), carbamato de tricloroetilo (Troc) o carbamato de alilo (Alloc). En otras realizaciones, P puede ser un grupo protector distinto de un carbamato como, por ejemplo, un grupo protector amida como un grupo protector ftalamida o trifluoroacetamida.

[0048] En algunas realizaciones, el compuesto aminoxi de la fórmula II se elige entre los compuestos de la fórmula III:

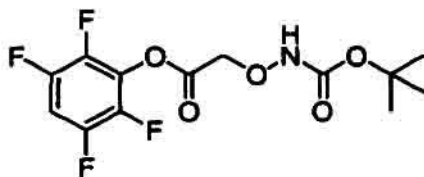


Fórmula III

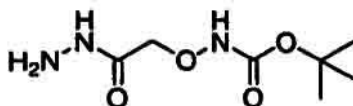
en la que Y y P son según se desvela anteriormente y n se elige entre números enteros en el intervalo de 1 a 10.

[0049] En ciertas realizaciones, n puede elegirse entre números enteros en los intervalos siguientes: 1-4, 2-6, 2-8, 3-6 y 4-10. En realizaciones ilustrativas, n es 1.

[0050] En una realización ilustrativa, el compuesto aminoxi es el éster tetrafluorofenílico del ácido *t*-Boc-aminoxiacético, cuya estructura se representa a continuación.



[0051] En otra realización ilustrativa, el compuesto aminoxi tiene la estructura representada a continuación.



5

C. Procedimientos para la preparación de un oligosacárido que comprende un grupo aminoxi

[0052] En otra realización, la descripción proporciona un procedimiento para la preparación de un oligosacárido que comprende un grupo aminoxi a partir de un oligosacárido que comprende un grupo reactivo. El procedimiento comprende:

- (a) proporcionar un oligosacárido que comprende un primer grupo reactivo;
- (b) proporcionar un compuesto aminoxi que comprende un segundo grupo reactivo; y
- (c) hacer reaccionar el primer grupo reactivo del oligosacárido con el segundo grupo reactivo del compuesto aminoxi y de este modo preparar el oligosacárido que comprende un grupo aminoxi.

[0053] El oligosacárido que comprende un primer compuesto reactivo puede ser, por ejemplo, cualquier oligosacárido que comprende un grupo reactivo, según se describe anteriormente. En ejemplos ilustrativos, el oligosacárido que comprende un primer grupo reactivo es un oligosacárido de la fórmula Ia o un oligosacárido de la fórmula Ib. El compuesto aminoxi que comprende un segundo grupo reactivo puede ser cualquier compuesto aminoxi que comprende un grupo reactivo, según se describe anteriormente.

[0054] Los términos “primer grupo reactivo” y “segundo grupo reactivo”, según se usan en este documento, no denotan ninguna secuencia experimental concreta. Es decir, en la etapa (c), la reacción del primer grupo reactivo del oligosacárido con el segundo grupo reactivo del compuesto aminoxi puede llevarse a cabo con cualquier orden de adición de los reactivos. Por ejemplo, el oligosacárido que contiene un primer grupo reactivo puede añadirse al compuesto aminoxi que comprende el segundo grupo reactivo o viceversa. En otro ejemplo, el oligosacárido y el compuesto aminoxi pueden añadirse simultáneamente a un recipiente de reacción.

[0055] La etapa (c) puede tener lugar en cualquiera de las condiciones adecuadas (por ejemplo, de disolvente y temperatura) conocidas por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones puede haber uno o más reactivos adicionales, como, por ejemplo, reactivos de acoplamiento y catalizadores, presentes durante la etapa (c). Un reactivo de acoplamiento, según se usa en este documento, es un reactivo que puede usarse para formar un enlace covalente entre el primer grupo reactivo y el segundo grupo reactivo.

[0056] En algunas realizaciones, como, por ejemplo, cuando el primero o el segundo grupo reactivo es un grupo carboxilo, las condiciones de reacción pueden comprender un reactivo de acoplamiento. Los reactivos de acoplamiento pueden elegirse, por ejemplo, entre reactivos de acoplamiento de fosfonio como, por ejemplo, BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio), PyBOP® (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitrispirrolidinofosfonio) y PyBroP® (hexafluorofosfato de bromotrispirrolidinofosfonio) y reactivos de acoplamiento de amonio (uronio) como, por ejemplo, HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio), HATU (hexafluorofosfato de 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio), TBTU (tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio). Los reactivos de acoplamiento pueden elegirse también, por ejemplo, entre reactivos de acoplamiento de carbodiimida como, por ejemplo, DIC (1,3-diisopropilcarbodiimida), CDI (1,1'-carbonildiimidazol) y EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida). Por ejemplo, en algunos ejemplos ilustrativos, el reactivo de acoplamiento es EDC. En ciertas realizaciones, las condiciones de reacción comprenden a la vez un reactivo de acoplamiento y un catalizador.

[0057] En ciertas realizaciones, las condiciones de reacción pueden comprender un catalizador. El catalizador puede elegirse entre cualquier catalizador adecuado conocido por los expertos en la técnica como, por ejemplo, DHBt-OH (3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona), HOBt (*N*-hidroxibenzotriazol), DMAP (4-dimetilaminopiridina), NHS (*N*-hidroxisuccinimida), *N*-hidroxisulfosuccinimida, HONB (*N*-hidroxi-5-norbonenoendo-2,3-dicarboximida) o una

55

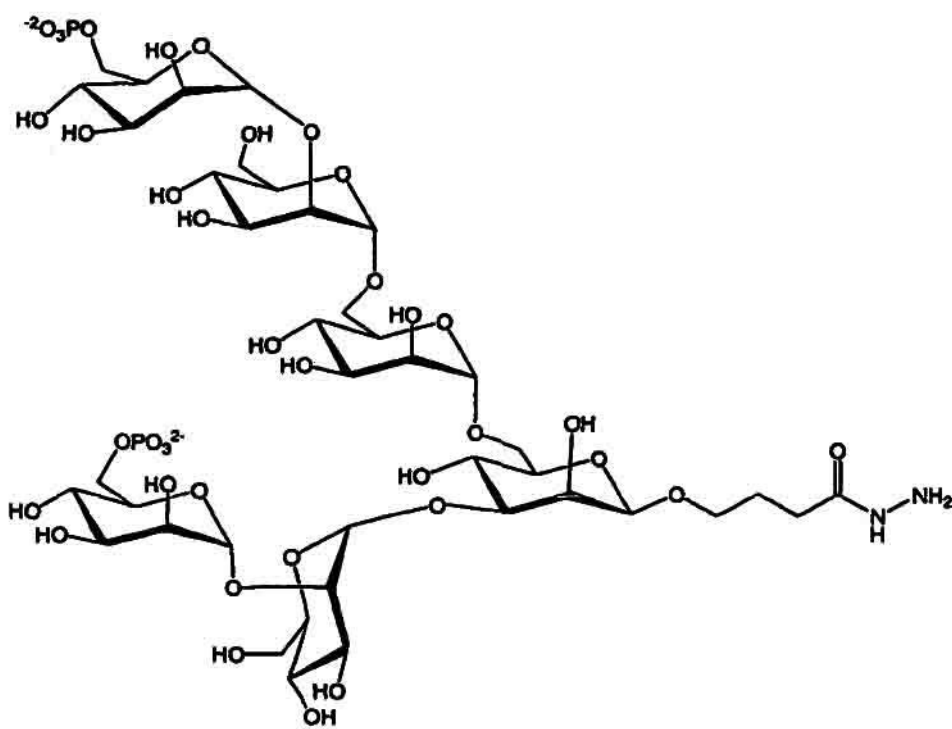
sal de tetrabutilamonio como, por ejemplo, TBAI (yoduro de tetrabutilamonio). En algunos ejemplos ilustrativos, las condiciones de reacción comprenden el catalizador DHBt-OH o el catalizador NHS.

5 [0058] En algunas realizaciones, la etapa (c) de reacción del primer grupo reactivo del oligosacárido con el segundo grupo reactivo del compuesto aminoxi resulta en la formación de un enlace amida. Las condiciones adecuadas para la formación de un enlace amida son bien conocidas por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Chan y col., eds., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Oxford University Press: Nueva York, EE. UU., 2000; Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag: Nueva York, EE. UU., 1993; Lloyd-Williams y col., Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, CRC Press: Boca Raton, FL, EE. UU., 1997; y en el catálogo de Novabiochem® (San Diego, CA, EE. UU.).

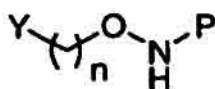
15 [0059] En ciertas realizaciones, el compuesto aminoxi comprende un grupo protector de aminas y el procedimiento comprende una etapa adicional (d) de desprotección del oligosacárido que comprende un grupo aminoxi para eliminar el grupo protector de aminas. La desprotección puede tener lugar en cualquiera de las condiciones adecuadas conocidas por los expertos en la técnica como, por ejemplo, aquellas expuestas en las págs. 494-653 de Greene y col., Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª edición, John Wiley and Sons: Nueva York, EE. UU., 1999 y Kocienski, Protecting Groups, 3ª edición, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, Alemania, 2005, cuyas invenciones se incorporan en este documento por referencia.

20 [0060] Una realización ilustrativa del procedimiento de la descripción proporciona un procedimiento para la preparación de un oligosacárido que contiene M6P y comprende un grupo aminoxi. El procedimiento comprende:

(a) proporcionar un oligosacárido que comprende un primer grupo reactivo, en que el oligosacárido es



25 (b) proporcionar un compuesto aminoxi que comprende un segundo grupo reactivo, en que el compuesto aminoxi se elige entre compuestos de la fórmula III:

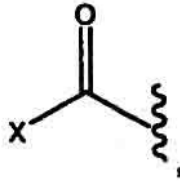


30 Fórmula III

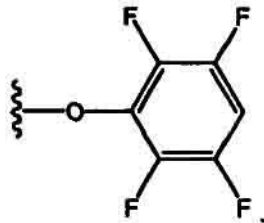
en la que n se elige entre números enteros en el intervalo de 1 a 10, P se elige entre grupos protectores de aminas e Y es un segundo grupo reactivo; y

(c) hacer reaccionar el primer grupo reactivo del oligosacárido con el segundo grupo reactivo del compuesto aminoxi y de este modo preparar el oligosacárido que comprende un grupo aminoxi.

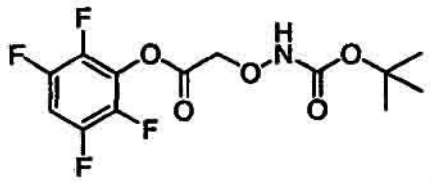
5 **[0061]** En ciertas realizaciones, Y en la fórmula III es



10 en que X se elige entre hidroxilo, ariloxi, heteroariloxi y heterocicliloxi. Por ejemplo, en ciertas realizaciones ilustrativas, X es



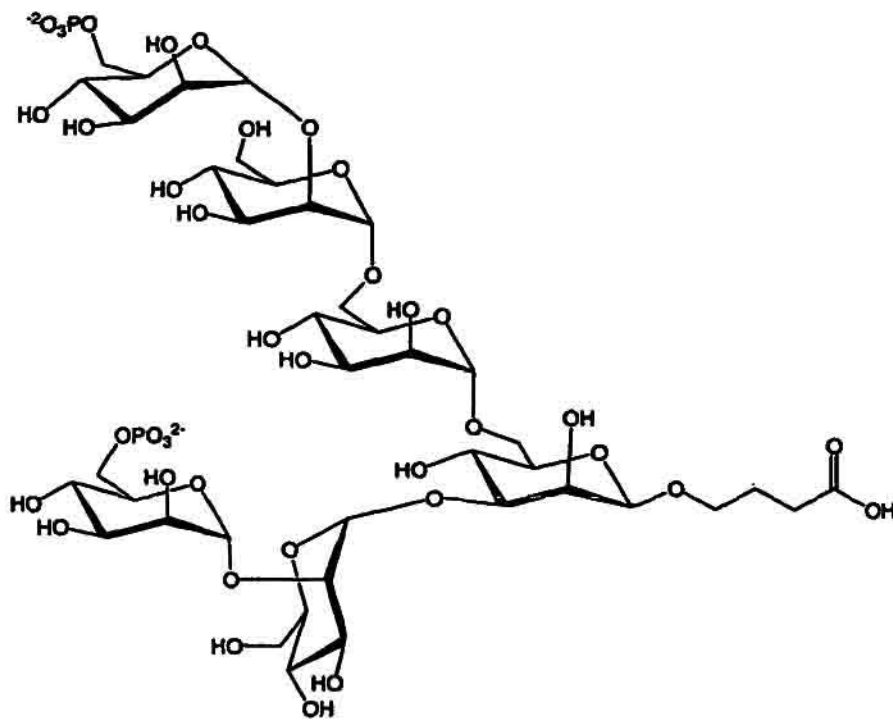
15 **[0062]** En realizaciones ilustrativas, el compuesto aminoxi es



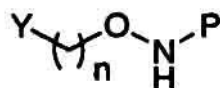
20 En ciertas realizaciones, el primer grupo reactivo del oligosacárido puede hacerse reaccionar con el segundo grupo reactivo del compuesto aminoxi en presencia de un agente de acoplamiento como, por ejemplo, EDC y/o un catalizador como, por ejemplo DHBt-OH.

[0063] Otra realización ilustrativa del procedimiento de la descripción comprende:

(a) proporcionar un oligosacárido que comprende un primer grupo reactivo, en que el oligosacárido es



(b) proporcionar un compuesto aminoxi que comprende un segundo grupo reactivo, en que el compuesto aminoxi se elige entre compuestos de la fórmula III:



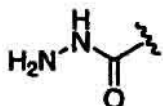
5

Fórmula III

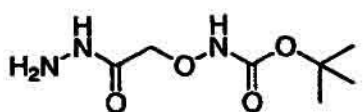
10 en la que n se elige entre números enteros en el intervalo de 1 a 10, P se elige entre grupos protectores de aminas e Y es un segundo grupo reactivo; y

(c) hacer reaccionar el primer grupo reactivo del oligosacárido con el segundo grupo reactivo del compuesto aminoxi y de este modo preparar el oligosacárido que comprende un grupo aminoxi.

15 **[0064]** En ciertas realizaciones, Y en la fórmula III es un grupo hidrazina, hidrazida, aminoxi, tiosemicarbámina, semicarbámina o amina. En ciertas realizaciones, Y en la fórmula III es



20 **[0065]** En realizaciones ilustrativas, el compuesto aminoxi es



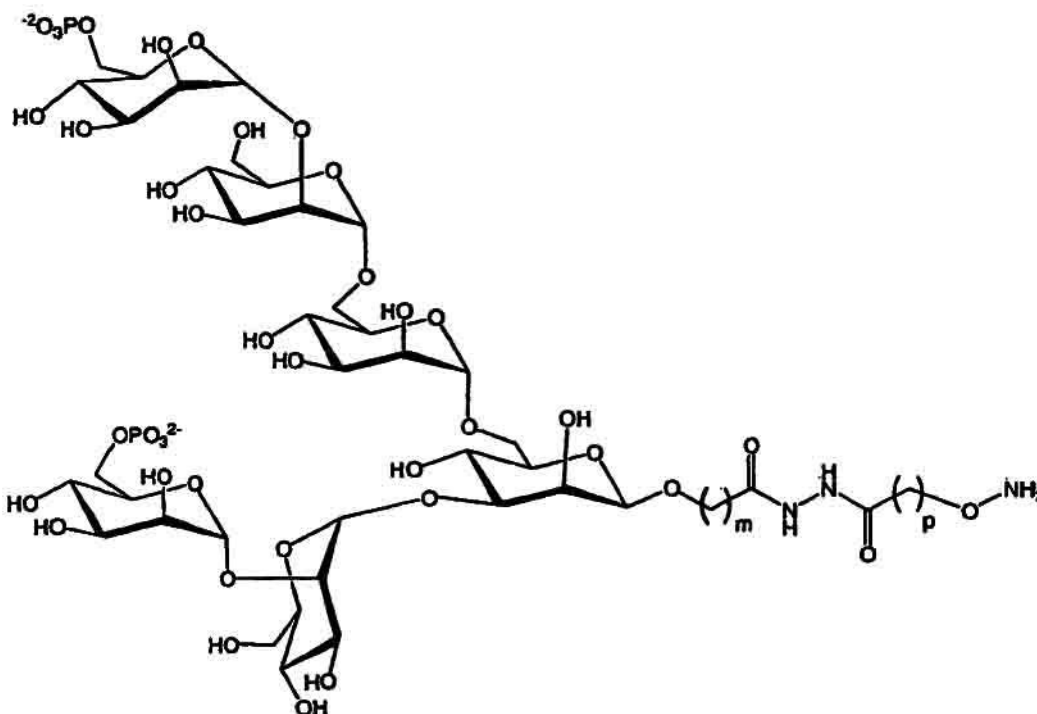
25 En ciertas realizaciones, el primer grupo reactivo del oligosacárido puede hacerse reaccionar con el segundo grupo reactivo del compuesto aminoxi en presencia de un agente de acoplamiento como, por ejemplo, EDC y/o un catalizador como, por ejemplo NHS.

II. Oligosacáridos que comprenden un grupo aminoxi

[0066] La presente descripción proporciona también oligosacáridos que comprenden un grupo aminoxi. En algunas realizaciones, la descripción proporciona oligosacáridos que comprenden un grupo aminoxi preparado por los procedimientos desvelados anteriormente. El oligosacárido que comprende un grupo aminoxi puede comprender, por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis o más monosacáridos, incluidos, por ejemplo al menos un resto de galactosa, GalNAc, manosa, M6P, glucosa, GlcNAc, ácido siálico o ácido siálico sulfatado. Un oligosacárido tal puede tener una estructura con una, dos, tres, cuatro o cinco antenas. Un oligosacárido puede comprender ninguno, uno, dos, tres, cuatro o más puntos de ramificación.

[0067] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un oligosacárido que comprende (1) un grupo aminoxi y (2) manosa-6-fosfato. En algunas realizaciones, el oligosacárido que comprende un grupo aminoxi puede comprender al menos uno, dos, tres, cuatro o más restos de M6P terminales o penúltimos.

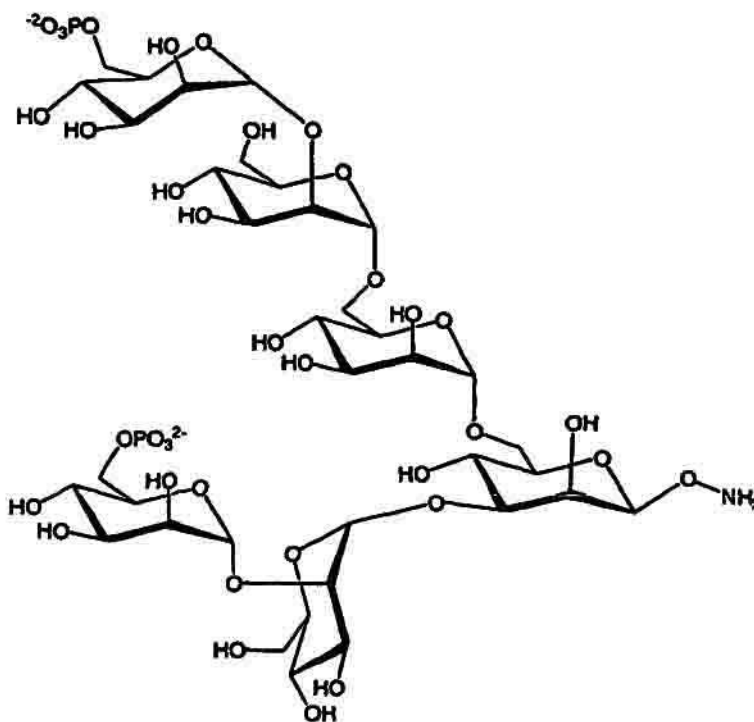
[0068] En ciertas realizaciones de la presente invención, los oligosacáridos que comprenden un grupo aminoxi se eligen entre oligosacáridos de la fórmula IV:



Fórmula IV

en la que m y p se eligen independientemente entre números enteros en el intervalo de 1 a 10. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, m y p pueden elegirse independientemente entre números enteros seleccionados de los intervalos siguientes: 1-4, 2-6, 2-8, 3-6 y 4-10. En ejemplos ilustrativos, m es 3 y p es 1.

[0069] En otras realizaciones, el grupo aminoxi está directamente enlazado al extremo reductor del oligosacárido. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente invención, el oligosacárido que comprende un grupo aminoxi puede ser un oligosacárido de la fórmula V:



Fórmula V

5 III. Conjugación de un oligosacárido que comprende un grupo aminoxi con una proteína

A. Oligosacárido

10 **[0070]** El oligosacárido que ha de conjugarse con una proteína puede elegirse entre cualquier oligosacárido que comprende un grupo reactivo, según se discute anteriormente, y cualquier oligosacárido que comprende un grupo aminoxi, según se discute anteriormente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el oligosacárido que ha de conjugarse puede ser un oligosacárido de la fórmula Ia, la fórmula Ib, la fórmula IV o la fórmula V.

B. Proteína

15 **[0071]** Los procedimientos de conjugación descritos en este documento pueden aplicarse ampliamente a cualquier proteína pura, proteína parcialmente purificada o fragmento de estas con al menos un grupo carbonilo (en que el grupo carbonilo es una cetona o un aldehído), incluidas proteínas aisladas y proteínas producidas de manera recombinante o sintética. Los términos “pura”, “purificada” y “aislada” se refieren a una molécula que no contiene sustancialmente nada de su entorno natural. Por ejemplo, una proteína pura no contiene sustancialmente material celular ni/u otras proteínas de la fuente de células o tejido de la que se deriva. El término se refiere a preparaciones de una pureza, por ejemplo, de al menos el 70% al 80%, el 80% al 90%, el 90 al 95%; o al menos del 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% (p/p).

25 **[0072]** En otras realizaciones, la proteína puede ser una enzima que tiene una actividad óptima, según se mide por un ensayo de actividad, a un pH en el intervalo de 1-7 como, por ejemplo, 1-3, 2-5, 3-6, 4-5, 5-6 o 4-6. Por ejemplo, la enzima puede tener un óptimo de pH a un pH en el intervalo de 4-6.

30 **[0073]** En algunas realizaciones, la proteína puede ser una enzima con un punto isoeléctrico (p_i) en el intervalo de 1 a 8 como, por ejemplo, de 1-3, 2-5, 3-8, 4-5, 5-6, 4-6, 5-8, 6-8 o 7-8. El p_i de una proteína puede medirse, por ejemplo, mediante electroforesis de isoelectroenfoque en gel.

35 **[0074]** En algunas realizaciones, la proteína que contiene un grupo carbonilo se obtiene mediante el uso de un sistema de expresión con un código genético ampliado, según se describe en Wang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 56-61 (2003). En tal caso, el grupo carbonilo puede localizarse en la cadena lateral de un aminoácido, según se traduce.

[0075] En ciertas realizaciones, la proteína con al menos un grupo carbonilo es una proteína que tiene al menos un oligosacárido (es decir, una glucoproteína). Por ejemplo, una glucoproteína con al menos un grupo carbonilo puede obtenerse por oxidación de esta glucoproteína de cualquier manera conocida por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, por ejemplo, una glucoproteína con al menos un grupo carbonilo puede obtenerse por oxidación de esta glucoproteína con peryodato (por ejemplo, peryodato de sodio) o con galactosa-oxidasa. En tal caso, el grupo carbonilo puede localizarse en un sitio de glucosilación de la proteína.

[0076] En ciertas realizaciones, la proteína con al menos un grupo carbonilo es una glucoproteína, como una glucoproteína terapéutica. Una glucoproteína terapéutica puede dirigirse específicamente a los lisosomas por conjugación con un oligosacárido que comprende manosa-6-fosfato. Por ejemplo, la glucoproteína puede ser una enzima lisosómica, incluida una enzima de TSE. La enzima puede ser una hidrolasa lisosómica, incluidas las listadas en la tabla 1. En ciertas realizaciones, la hidrolasa lisosómica se elige, por ejemplo, entre α -glucosidasa, α -galactosidasa A y esfingomielinasa ácida. En ciertas realizaciones, la hidrolasa lisosómica es GAA.

Tabla 1: Ejemplos de LSD e hidrolasas lisosómicas correspondientes

Trastorno de almacenamiento lisosómico	Enzima defectuosa
Fabry	α -galactosidasa A
Farber	ceramidasa ácida
Fucosidosis	α -L-fucosidasa ácida
Gaucher de tipos 1, 2 y 3	β -glucosidasa ácida
Gangliosidosis GM ₁	β -galactosidasa ácida
Hunter (mucopolisacaridosis (MPS) II)	iduronato-2-sulfatasa
Hurler-Scheie, Hurler, Scheie (MPS I)	α -L-iduronidasa
Krabbe	galactocerebrosidasa
α -manosidosis	α -manosidasa ácida
β -manosidosis	β -manosidasa ácida
Maroteaux-Lamy (MPS VI)	arilsulfatasa B
Leucodistrofia metacromática	arilsulfatasa A
Morquio A (MPS IV)	N-acetilgalactosamina-6-sulfato-sulfatasa
Morquio B (MPS IV)	β -galactosidasa ácida
Niemann-Pick A y B	esfingomielinasa ácida (ASM)
Pompe	α -glucosidasa ácida (α -glucosidasa; GAA)
Sandhoff	β -hexosaminidasa B
Sanfilippo A (MPS III)	heparán-N-sulfatasa
Sanfilippo B (MPS III)	α -N-acetilglucosaminidasa
Sanfilippo C (MPS III)	acetil-CoA: α -glucosaminido-N-acetiltransferasa
Sanfilippo D (MPS III)	N-acetilglucosamina-6-sulfato-sulfatasa
Schindler-Kanzaki	α -N-acetilgalactosaminidasa
Sialidosis	sialidasa
Sly (MPS VII)	β -glucuronidasa
Tay-Sachs	β -hexosaminidasa A

[0077] En ciertas realizaciones, la glucoproteína puede ser una glucoproteína con al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o más restos aminoácidos N-glucosilados u O-glucosilados. En otras realizaciones, la proteína puede tener uno, dos, tres, cuatro, cinco o más sitios consenso para N-glucosilación u O-glucosilación, al menos uno de los cuales está glucosilado.

[0078] En ciertas realizaciones, la proteína puede ser un ligando para un receptor. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína puede ser una glucoproteína que se une a un receptor que reconoce un azúcar como, por ejemplo, manosa o manosa-6-fosfato. En algunas realizaciones, la glucoproteína puede unirse, por ejemplo, al receptor de la asialoglucoproteína, al receptor de manosa-6-fosfato dependiente de cationes, al receptor del factor de crecimiento insulinoide II / manosa-6-fosfato independiente de cationes o al receptor macrofágico de manosa.

[0079] En ciertas realizaciones, la proteína es una glucoproteína que, cuando está conjugada con un oligosacárido que comprende manosa-6-fosfato, es internalizada más eficazmente por una célula diana (por ejemplo, por medio de endocitosis mediada por CI-MPR) que la correspondiente glucoproteína sin conjugar. Por ejemplo, la glucoproteína conjugada puede ser internalizada más eficazmente que la glucoproteína sin conjugar, por ejemplo, en al menos el 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o el 90% (p/p) en un periodo de tiempo dado. En otras realizaciones, puede internalizarse al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez veces (p/p) más de la glucoproteína conjugada con respecto a la glucoproteína sin conjugar en un periodo de tiempo dado. El periodo de referencia puede ser, por ejemplo, de 10, 30, 45 minutos o de 1, 2, 3, 5, 12, 24, 48 o 72 horas o más.

C. Procedimientos para el acoplamiento de un oligosacárido a una proteína

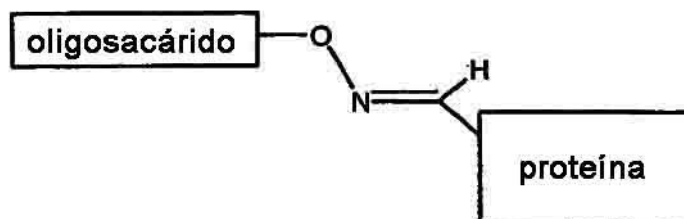
[0080] La descripción proporciona procedimientos para el acoplamiento de un oligosacárido a una proteína como, por ejemplo, una glucoproteína. En una realización, el procedimiento comprende:

- (a) proporcionar un oligosacárido que comprende un grupo amino;
- (b) proporcionar una proteína con al menos un grupo carbonilo; y
- (c) hacer reaccionar el grupo amino del oligosacárido con el, al menos un grupo carbonilo de la proteína y de este modo acoplar el oligosacárido a la proteína.

[0081] En ciertas realizaciones, los procedimientos comprenden además la adición de un agente reductor a la enzima lisosómica acoplada. El agente reductor puede ser cualquier agente reductor conocido por los expertos en la técnica como, por ejemplo, cianoborohidruro de sodio o triacetoxiborohidruro de sodio (STAB).

IV. Conjugados de oligosacárido y proteína

[0082] La descripción proporciona además un conjugado de oligosacárido y proteína que comprende (1) una proteína, (2) un oligosacárido y (3) un grupo oxima que conecta la proteína y el oligosacárido. En algunas realizaciones, la invención proporciona un conjugado de oligosacárido y proteína preparado por los procedimientos desvelados anteriormente. Los componentes oligosacárido y proteína del conjugado pueden ser, por ejemplo, cualquier oligosacárido y cualquier proteína descritos en este documento, en que un conjugado de los mismos comprende un grupo oxima; según se representa a continuación. (El grupo oxima representado a continuación se deriva formalmente por la reacción de un grupo amino y un grupo aldehído; los grupos oxima derivados formalmente por la reacción de un grupo amino y un grupo cetona, también están abarcados por esta invención).



[0083] En ciertas realizaciones, el conjugado de oligosacárido y proteína es un conjugado de oligosacárido y glucoproteína. En ciertas realizaciones, el conjugado de oligosacárido y proteína es el conjugado de un oligosacárido que comprende al menos un resto de M6P y una hidrolasa lisosómica.

V. Composiciones farmacéuticas

[0084] La descripción proporciona el uso de un conjugado de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico. También proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de oligosacárido y proteína de la invención. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la descripción comprenden un conjugado de un oligosacárido que comprende al menos un resto de M6P y una enzima lisosómica.

[0085] Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender uno o más excipientes farmacéuticos adecuados. Las técnicas de formulación farmacéutica y los excipientes estándar son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, 2005 Physicians' Desk Reference®, Thomson Healthcare: Montvale, NJ, EE. UU. 2004; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, Gennado y col., eds. Lippincott Williams & Wilkins: Filadelfia, PA, EE. UU. 2000). Las composiciones pueden contener conservantes o no. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden conjugados de α -galactosidasa A pueden comprender uno o más excipientes como, por ejemplo, manitol, fosfato monobásico de sodio monohidratado y/o fosfato dibásico de sodio heptahidratado. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden conjugados de α -glucosidasa pueden comprender uno o más excipientes como, por ejemplo, manitol, polisorbato 80, fosfato dibásico de sodio heptahidratado y fosfato monobásico de sodio monohidratado.

[0086] La composición farmacéutica puede comprender cualquiera de los conjugados descritos en este documento, bien como el único compuesto activo o bien en combinación con otro compuesto, composición o material biológico. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede comprender también una o más moléculas pequeñas útiles para el tratamiento de un LSD y/o un efecto secundario asociado con el LSD. En algunas

realizaciones, la composición puede comprender miglustat y/o uno o más compuestos descritos, por ejemplo en las publicaciones de solicitud de patente de los EE. UU. n^{os} 2003/0050299, 2003/0153768, 2005/0222244; 2005/0267094.

5 **[0087]** La formulación de las composiciones farmacéuticas puede variar dependiendo de la vía de administración deseada y de otros parámetros (véase, por ejemplo, Rowe y col., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4^a ed., APhA Publications, 2003). En algunas realizaciones, la composición puede ser una torta o polvo liofilizado estéril, apirógeno y de color blanco a blanquecino para administración por inyección intravenosa tras su reconstitución con agua estéril para inyección, USP.

10 **[0088]** La administración de una composición farmacéutica de la invención no se limita a ningún sistema de administración concreto y puede incluir, sin limitación, la vía parenteral (incluidas las inyecciones subcutánea, intravenosa, intracraneal, intramedular, intrarticular, intramuscular, intratecal o intraperitoneal), transdérmica u oral (por ejemplo, en cápsulas, suspensiones o comprimidos). La administración a un individuo puede tener lugar en una única dosis o en administraciones repetidas y en cualquiera de una diversidad de formas de sales fisiológicamente aceptables y/o con un vehículo y/o aditivo farmacéutico aceptable como parte de una composición farmacéutica.

15 **[0089]** Los conjugados descritos en este documento se administran en cantidades terapéuticamente eficaces. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar con la edad, estado y sexo del sujeto, así como con la gravedad de la enfermedad del sujeto. La dosis puede ser determinada por un médico y ajustarse según sea necesario para su adecuación a los efectos del tratamiento observados. La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro* (es decir, cultivos celulares) o *in vivo* (es decir, modelos animales experimentales), por ejemplo, mediante determinación de la DL₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación entre las dosis con efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico (o relación terapéutica) y puede expresarse como la relación DL₅₀/DE₅₀. En este documento se describen conjugados que muestran índices terapéuticos de al menos 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 20. Se prefieren los conjugados que muestran un mayor índice terapéutico.

20 **[0090]** Los datos obtenidos de los ensayos *in vitro* y los estudios en animales, por ejemplo, pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para uso en humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE₅₀ con poca, baja o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier conjugado usado en la presente invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de los ensayos *in vitro*. Es posible formular una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentraciones plasmáticas circulantes que incluye la CI₅₀ (es decir, la concentración del conjugado de prueba que consigue una inhibición semimáxima de los síntomas), según se determina en experimentos *in vitro*. Las concentraciones plasmáticas pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento o mediante un ensayo de actividad enzimática apropiado. Los efectos de cualquier dosis concreta pueden supervisarse mediante un bioensayo de criterios de valoración adecuado.

25 **[0091]** A menos que se indique lo contrario, los conjugados de la invención pueden administrarse a una dosis de aproximadamente 1 µg/kg a 500 mg/kg, dependiendo de la gravedad de los síntomas y de la evolución de la enfermedad. Por ejemplo, los compuestos proteínicos pueden administrarse mediante una infusión intravenosa lenta de manera ambulatoria, por ejemplo, cada uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más días o, por ejemplo, por administración semanal, bisemanal, mensual o bimensual. La dosis terapéuticamente eficaz apropiada de un compuesto es seleccionada por el médico a cargo y estará aproximadamente en el intervalo de 1 µg/kg a 500 mg/kg, de 1 µg/kg a 10 mg/kg, de 1 µg/kg a 1 mg/kg, de 10 µg/kg a 1 mg/kg, de 10 µg/kg a 100 µg/kg, de 100 µg a 1 mg/kg y de 500 µg/kg a 5 mg/kg.

30 **[0092]** Por ejemplo, los conjugados de α-galactosidasa A pueden administrarse por infusión intravenosa a una dosis, por ejemplo, de 1,0 mg/kg de peso corporal cada dos semanas con una velocidad de infusión, por ejemplo, de menos de o igual a 10, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 ó 33 mg/h. En otro ejemplo, los conjugados de α-glucosidasa pueden administrarse mediante inyección intravenosa a una dosis, por ejemplo, de 20 mg/kg o de 40 mg/kg cada dos semanas, durante aproximadamente, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez horas. En algunas realizaciones, la velocidad de administración de α-glucosidasa puede iniciarse, por ejemplo, a 1 mg/kg/h y después aumentarse, por ejemplo, a 2 mg/kg/h cada 30 minutos, después de establecer la tolerancia del paciente a la velocidad de infusión, hasta un máximo de, por ejemplo, 7 mg/kg/h. Adicionalmente, pueden encontrarse ejemplos de dosificaciones específicas en la publicación Physicians' Desk Reference®.

VI. Procedimientos para el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico

[0093] La descripción proporciona procedimientos para el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico como, por ejemplo, aquellos desvelados en la tabla 1. En algunas realizaciones, la invención proporciona un conjugado de la invención para uso en el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico en un sujeto que lo necesita. La descripción proporciona además procedimientos para dirigir específicamente proteínas a los lisosomas por conjugación con oligosacáridos que comprenden manosa-6-fosfato.

[0094] En una realización, el procedimiento comprende la administración a un mamífero con un trastorno lisosómico de un conjugado de oligosacárido y glucoproteína de la invención en una cantidad terapéuticamente eficaz. El conjugado de oligosacárido y glucoproteína puede ser un conjugado de una enzima lisosómica, como una enzima lisosómica listada en la tabla 1, con un oligosacárido que comprende manosa-6-fosfato. En una realización, el procedimiento comprende la administración a un sujeto que lo necesita de una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los conjugados descritos en este documento.

[0095] En ciertas realizaciones, los conjugados de la invención pueden administrarse con uno o más tratamientos adicionales. Estos uno o más tratamientos adicionales pueden administrarse simultáneamente (incluida la administración simultánea como una formulación combinada), antes o después de la administración de los conjugados de la invención.

[0096] En algunas realizaciones, un paciente puede ser tratado (antes, después o durante el tratamiento con un conjugado de la invención) con un antipirético, un antihistamínico y/o un inmunosupresor. En algunas realizaciones, un paciente puede ser tratado con un antipirético, un antihistamínico y/o un inmunosupresor antes del tratamiento con un conjugado de oligosacárido y glucoproteína de la invención con el fin de disminuir o impedir reacciones asociadas con la infusión. Por ejemplo, los pacientes pueden ser tratados con uno o más de entre acetaminofeno, azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina A, metotrexato, micofenolato de mofetilo, esteroides orales o rapamicina.

[0097] En algunas realizaciones, los pacientes pueden ser tratados con uno o más de entre acetaminofeno, azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina A, metotrexato, micofenolato de mofetilo, esteroides orales o rapamicina, por ejemplo, a o aproximadamente a $t = 0$ (el momento de la administración del conjugado de la invención) y/o $t = 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120$ y 144 horas, por ejemplo, durante las primeras una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más incidencias del tratamiento con un conjugado de la invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un paciente con la enfermedad de Fabry o la enfermedad de Pompe puede ser tratado con metotrexato (por ejemplo, con $0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80$ mg/kg de metotrexato o más), por ejemplo, a o aproximadamente a $t = 0, 24$ y 48 horas, durante las primeras una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho semanas del tratamiento con un conjugado de la invención. En algunas realizaciones, puede inducirse tolerancia inmunitaria frente a los conjugados de la invención en un paciente con un trastorno de almacenamiento lisosómico, como, por ejemplo, mucopolisacaridosis I, mediante el tratamiento con ciclosporina A y azatioprina. Por ejemplo, el paciente puede ser tratado con ciclosporina A y azatioprina, según se describe en Kakkis y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 829-834 (2004).

[0098] En algunas realizaciones, un paciente puede ser tratado (antes, después o durante el tratamiento con un conjugado de la invención), por ejemplo, con un tratamiento con moléculas pequeñas y/o terapia génica, incluido un tratamiento con moléculas pequeñas y terapia génica dirigidos al tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico. El tratamiento con moléculas pequeñas puede comprender la administración de uno o más de los compuestos descritos, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente de los EE. UU. n^{os} 2003/0050299, 2003/0153768, 2005/0222244 y 2005/0267094. La terapia génica puede llevarse a cabo según se describe, por ejemplo en las patentes de los EE. UU. n^{os} 5.952.516, 6.066.626, 6.071.890 y 6.287.857 y en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n^o 2003/0087868.

[0099] Los términos "tratamiento", "procedimiento terapéutico" y sus afines se refieren tanto a medidas de tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas/preventivas. Por lo tanto, aquellos que necesitan tratamiento pueden incluir individuos que ya padecen una enfermedad de almacenamiento lisosómico concreta, así como aquellos con riesgo de padecer la enfermedad (es decir, aquellos que tienen probabilidades de adquirir finalmente la enfermedad o ciertos síntomas de la enfermedad).

[0100] Un procedimiento terapéutico resulta en la prevención o la mejora de los síntomas o en otro resultado biológico deseado y puede evaluarse por la mejora de los signos clínicos o por un retraso en la aparición de la enfermedad, un aumento de la actividad de la enzima metabólicamente defectuosa y/o una disminución de la cantidad del sustrato acumulado de la enzima metabólicamente defectuosa.

[0101] Los conjugados de la presente invención son útiles para el tratamiento de diversos trastornos de almacenamiento lisosómico en humanos o animales. Por ejemplo, la administración de los conjugados puede usarse para aumentar la actividad enzimática deficiente en un paciente, por ejemplo, al menos en el 10%. El aumento de la

actividad enzimática deficiente puede determinarse, por ejemplo, por una reducción de los síntomas clínicos o por un ensayo clínico o biológico apropiado.

[0102] Para el tratamiento de la enfermedad de Pompe (también conocida como deficiencia de α -glucosidasa ácida, deficiencia de maltasa ácida, enfermedad del almacenamiento de glucógeno de tipo II, glucogenosis II y deficiencia de α -glucosidasa lisosómica) pueden administrarse conjugados de GAA. Un aumento en la actividad de GAA puede determinarse por observación bioquímica (véase, por ejemplo, Zhu y col., *J. Biol. Chem.* 279: 50336-50341 (2004)) o histológica de la acumulación de glucógeno lisosómico reducido, por ejemplo, en miocitos cardíacos, miocitos del músculo esquelético o fibroblastos de la piel. La actividad de GAA puede ensayarse también, por ejemplo, en una muestra de biopsia muscular, en un cultivo de fibroblastos de la piel, en linfocitos y en manchas de sangre seca. Los ensayos con manchas de sangre seca se describen, por ejemplo, en Umpathysivam y col., *Clin. Chem.* 47: 1378-1383 (2001) y Li y col., *Clin. Chem.* 50: 1785-1796 (2004). El tratamiento de la enfermedad de Pompe puede evaluarse también, por ejemplo, por las concentraciones de creatinina-cinasa, ganancias en la funcionalidad motora (por ejemplo, según se evalúa por la escala de motricidad infantil de Alberta), cambios en el índice de masa del ventrículo izquierdo, según se mide por ecocardiograma y la actividad eléctrica cardíaca, según se mide por electrocardiograma. La administración de conjugados de GAA puede resultar en una reducción de uno o más de los síntomas de la enfermedad de Pompe, como cardiomegalia, miocardiopatía, somnolencia diurna, disnea de esfuerzo, falta de desarrollo, dificultades de alimentación, "flacidez", anormalidades en la marcha, dolores de cabeza, hipotonía, organomegalia (por ejemplo, agrandamiento del corazón, la lengua, el hígado), lordosis, pérdida del equilibrio, dolor en la zona inferior de la espalda, dolores de cabeza matinales, debilidad muscular, insuficiencia respiratoria, aleteo escapular, escoliosis, reflejos de los tendones profundos reducidos, apnea del sueño, propensión a infecciones respiratorias y vómitos.

[0103] En otro aspecto, se administran conjugados de α -galactosidasa A con oligosacáridos que comprenden M6P para el tratamiento de la enfermedad de Fabry. La enfermedad de Fabry o enfermedad de Anderson-Fabry es un trastorno de almacenamiento lisosómico poco frecuente ligado al cromosoma X y marcado por una deficiencia de α -galactosidasa A que resulta en la acumulación de globotriaosilceramida (GL3) y otros glucoesfingolípidos neutros en los lisosomas de los tejidos viscerales y de las células endoteliales, periteliales y musculares. La acumulación de los glucoesfingolípidos neutros en la vasculatura resulta en el estrechamiento y la dilatación de los vasos sanguíneos y conduce en último término a isquemia e infarto.

[0104] La administración de conjugados de α -galactosidasa A puede resultar en una reducción de uno o más de los síntomas clínicos de la enfermedad de Fabry, incluidos, por ejemplo, acroparestesia, angina, angioqueratoma, arritmia, ataxia de la marcha, quemazón y/o hormigueo en las manos y los pies, cataratas, intolerancia al frío, anormalidades de la conducción, córnea verticilada, arteriopatía coronaria, demencia, depresión, diarrea, dilatación de las cámaras cardíacas, mareos, cardiomegalia, miocardiopatía, diplopía, disartia, fatiga, fiebre con una alta velocidad de sedimentación de eritrocitos, problemas auditivos, cardiopatía, problemas de las válvulas cardíacas, intolerancia al calor, hemiataxia, hemiparesia, hipohidrosis, sudoración reducida, infarto, isquemia, dolor en las articulaciones, nefropatía, hipertrofia del ventrículo izquierdo, anormalidades del cristalino, opacidad del cristalino, lipiduria, debilidad muscular, infarto de miocardio, náusea, nistagmo, dolor (por ejemplo, dolor intenso radiante en todo el cuerpo), polidipsia, proteinuria, dolor postprandial, insuficiencia renal, anormalidades de la retina, tinitus, dolor de estómago, variaciones de las ondas ST-T, derrame cerebral, uremia, valvulopatía, vértigo, vómitos y debilidad. La administración de conjugados de α -galactosidasa A puede resultar en un aumento de la actividad de la α -galactosidasa A, por ejemplo, en plasma, lágrimas, leucocitos, biopsias de tejidos o cultivos de fibroblastos de la piel. La administración de conjugados de α -galactosidasa A puede resultar también en el resultado histológico de una reducción (por ejemplo, de al menos el 10%) o de la falta de aumento de los glóbulos lipídicos birrefringentes. También puede resultar en una disminución de los glóbulos lipídicos en el sedimento urinario, una mejora de la funcionalidad renal, según se mide por la concentración de creatinina en el suero o el aclaramiento de creatinina, y una reducción de la proteinuria. La administración de conjugados de α -galactosidasa A puede resultar también en una reducción de las inclusiones de GL3 en el endotelio capilar de los riñones, el corazón y la piel. Otros ensayos adicionales para medir la eficacia del tratamiento de la enfermedad de Fabry pueden encontrarse, por ejemplo, en MacDermott y col., *J. Med. Genet.* 38: 750-760 (2001).

[0105] En otro aspecto más, se administran conjugados de esfingomielinasa ácida para el tratamiento de la enfermedad de Niemann-Pick o deficiencia de esfingomielinasa ácida. La administración de conjugados de esfingomielinasa ácida puede resultar en una reducción de uno o más de los síntomas clínicos de la enfermedad de Niemann-Pick, incluidos, por ejemplo, concentraciones anormales de colesterol, concentraciones anormales de lípidos, ataxia, anormalidades sanguíneas, manchas rojo cereza en los ojos, infecciones pulmonares frecuentes, retraso del crecimiento, hepatoesplenomegalia, bajo número de plaquetas, linfadenopatía, neuropatía periférica, problemas de la funcionalidad pulmonar, falta de aliento, cambios de la pigmentación de la piel o xantomas. En algunas realizaciones, los conjugados pueden administrarse por vía intracraneal.

[0106] Una realización alternativa se refiere al tratamiento de la mucopolisacaridosis I (incluidas, por ejemplo las formas de Hurler y de Hurler-Scheie de la MPS I) con conjugados que comprenden α -L-iduronidasa. La

administración de conjugados de α -L-iduronidasa puede resultar en una reducción de uno o más de los síntomas clínicos de la MPS I, incluidos, por ejemplo, regurgitación aórtica, estenosis aórtica, síndrome del túnel carpiano, rinitis crónica, pérdida auditiva conductiva, estreñimiento, córnea nublada, retraso del desarrollo, diarrea, abdomen distendido, cifosis dorsolumbar, deformidad gibosa de la espalda, hepatoesplenomegalia, hidrocefalia, hernia inguinal, cifosis, retraso mental, regurgitación mitral, estenosis mitral, ceguera nocturna, glaucoma de ángulo abierto, pobre funcionalidad manual, artropatía progresiva, infecciones respiratorias recurrentes, insuficiencia respiratoria, degeneración de la retina, escoliosis, pérdida auditiva sensorineural, dolor de espalda intenso, rinorrea, apnea del sueño, compresión de la médula espinal, atrofia tenar, hernia umbilical y complicaciones de las vías respiratorias superiores.

[0107] Las descripciones anterior y siguiente solamente son ejemplares y explicativas y no son restrictivas de la invención, según se reivindica.

EJEMPLOS

[0108] Los ejemplos 1-4 a continuación describen la ruta de síntesis representada en la figura 1. Los compuestos 1, 2, 3 y 4, según se usan a continuación, tienen las estructuras químicas representadas en la figura 1.

Ejemplo 1: Síntesis del oligosacárido 3

[0109] Se disolvieron 100 mg del oligosacárido 1 (PM = 1.250; hidrazida de bis-M6P, suministrada por Biomira Inc., Edmonton, Canadá) en 15 ml de DMSO/H₂O (50:50 en volumen), con lo que se obtuvo una disolución de 5,3 μ mol/ml. Se disolvieron 100 mg de éster tetrafluorofenílico del ácido t-Boc-aminoxiacético 2 (Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA, EE. UU. n^o de catálogo B3030) en 7,5 ml de DMSO. Un volumen de 15 ml de la disolución del oligosacárido se mezcló entonces con 7,5 ml de la disolución del compuesto 2 en una botella de vidrio, de modo que la relación molar entre el compuesto 2 y el compuesto 1 en la disolución resultante fue de 4:1. Se añadieron 744 μ l de DHBt-OH (de una disolución madre de 32,06 mg/ml en DMSO) a la mezcla de reacción en una botella de vidrio, de modo que la relación final entre el compuesto 2 y DHBt-OH fue de 1:0,5. La mezcla se agitó suavemente a temperatura ambiente (25°C) y 100 rpm hasta el día siguiente durante aproximadamente 18 horas.

[0110] A la mañana siguiente, se extrajeron 10 μ l de la mezcla de reacción para el análisis en un aparato Dionex, para confirmar la terminación de la reacción. Los resultados, representados en la figura 2, indicaron una conversión del 100% de 1 a 3.

Ejemplo 2: Purificación del oligosacárido 3

[0111] Procedimiento A. La mezcla de reacción se diluyó con un igual volumen de H₂O y se dializó en un tubo de diálisis con un corte de peso molecular de 1.000 Da (SpectraPor Inc.) dos veces frente a 4 l de H₂O a 4°C durante al menos tres horas cada vez. A continuación, las muestras se liofilizaron.

[0112] Procedimiento B. Se rellenó una columna para cromatografía de exclusión molecular en gel con un volumen de lecho de 225 ml con Sephadex G-10 y se equilibró con agua desionizada. La mezcla de reacción se cargó en la columna, se dejó fluir por gravedad y después se eluyó con agua desionizada con una velocidad de flujo de 75 ml por hora. Se recogieron fracciones de 4,5 ml con un colector de fracciones. Las fracciones 10-23, que contenían el oligosacárido 3, se recogieron, combinaron y liofilizaron. Las otras moléculas pequeñas, incluidas t-Boc-AOAA, DHBt-OH y DMSO, se eluyeron en las fracciones posteriores y se desecharon.

Ejemplo 3: Desprotección del oligosacárido 3

[0113] El grupo t-Boc de la muestra liofilizada se eliminó con 5 ml de ácido trifluoroacético (TFA) al 50% en diclorometano (DCM) en una botella de vidrio durante 30 minutos con agitación suave a 100 rpm. Después, el TFA/DCM se eliminó con una corriente de N₂ en una campana de gases.

Ejemplo 4: Purificación del oligosacárido 4

[0114] Procedimiento A. Después de eliminar el TFA/DCM, el residuo se disolvió en 10 ml de un tampón de acetato de sodio 0,5 M, pH 5, y se transfirió a un tubo de diálisis con un corte de peso molecular de 1.000 Da. La botella se lavó con 4 ml del mismo tampón, que después se transfirieron al tubo de diálisis. La muestra se dializó dos veces frente a 3 l de un tampón de acetato de sodio 25 mM, pH 7, durante al menos tres horas y después se transfirió a 4 l de agua helada para su diálisis durante la noche. La muestra se recuperó del tubo de diálisis y se liofilizó.

[0115] Procedimiento B. Después de eliminar el TFA/DCM, el residuo se disolvió en 5 ml de un tampón de acetato de sodio 0,5 M, pH 7,5 y se cargó en una columna para cromatografía de exclusión molecular de Sephadex

G-10 como en el procedimiento B del ejemplo 2. La mezcla de reacción se cargó en la columna, se dejó fluir por gravedad y después se eluyó con agua desionizada a una velocidad de flujo de 75 ml por hora. Se recogieron fracciones de 4,5 ml con un colector de fracciones. Las fracciones 10-23, que contenían el oligosacárido 4 purificado, se recogieron y liofilizaron. Se obtuvo un mayor rendimiento del oligosacárido 4 en la purificación por el procedimiento B que por el procedimiento A.

[0116] El producto final obtenido por el procedimiento B se analizó por cromatografía con un aparato Dionex (figura 2C) y la identidad del producto se confirmó por espectrometría de masas (figura 3B). En los espectros de las figuras 2C y 3B había algunas impurezas presentes.

Ejemplo 5: Acoplamiento del oligosacárido 4 a GAA

[0117] Oxidación de GAA. La GAA recombinante humana (rhGAA) liofilizada se reconstituyó en H₂O y se dializó frente a 4 l de tampón de acetato 100mM (pH 5,6) cuatro veces para eliminar completamente el manitol. Después de la diálisis, la rhGAA se oxidó con peryodato de sodio 7,5 mM de una disolución madre 100 mM en tampón acetato 100 mM. Después de 30 minutos a 4°C en hielo, se añadió glicerol y la muestra se mezcló en hielo durante 10 minutos para la descomposición del exceso de peryodato de sodio. A continuación, el material oxidado se dializó frente a un tampón acuoso (por ejemplo, acetato de sodio 100 mM) durante la noche.

[0118] Acoplamiento. Una disolución del oligosacárido 4 en un tampón acuoso (por ejemplo, acetato de sodio 100 mM, pH 5,6) se mezcló con la GAA oxidada y la mezcla se incubó a 37°C durante 4 horas para dar lugar al conjugado de oligosacárido y GAA 5. Después, la mezcla de reacción se diafiltró frente a un tampón de fosfato de sodio 25 mM, pH 6,25, para eliminar el bis-M6P-glucano sin conjugar y entonces se ajustó con el tampón de formulación de la GAA (tampón de fosfato de sodio 25 mM, pH 6,25, manitol al 2%, Tween-80 al 0,005%).

Ejemplo 6: Caracterización del conjugado de GAA

[0119] Detección de M6P. El grado de conjugación del oligosacárido se midió por ensayo del conjugado 5 con respecto a la unión a una columna con un receptor de M6P, a la que no se unen las glucoproteínas que no contienen M6P. Se cargaron 5 µg del conjugado 5 en una columna preequilibrada de CI-MPR-Sepharose (la columna se preparó por acoplamiento de CI-MPR aislado de suero bovino fetal a Affigel-10), que después se lavó con un tampón de unión a CI-MPR para 11 fracciones de 2 ml y se eluyó con el tampón de unión a CI-MPR con M6P 5 mM para siete fracciones de 2 ml. Se recogieron un total de 18 fracciones, que se ensayaron con respecto a su actividad enzimática.

[0120] Análisis de monosacáridos. El conjugado 5 se trató con ácido trifluoroacético 4 N para hidrolizar los oligosacáridos, a lo que siguió una cromatografía de intercambio iónico a pH alto con detección amperométrica pulsada (PAD) en un sistema de cromatografía líquida BioLC (Dionex). El contenido de monosacáridos se extrapola a partir de una curva estándar de monosacáridos con el uso de estándares de monosacáridos premezclados (Dionex).

[0121] Actividad específica. La actividad de GAA se mide mediante un ensayo fluorométrico en microplacas negras de 96 pocillos con 4-metilumbeliferil- α -D-glucósido como sustrato. Se añaden diluciones del conjugado 5 por triplicado a una placa de microtitulación. A cada muestra se le añade 4-metilumbeliferil- α -D-glucósido. La placa de 96 pocillos se incuba en un incubador a 37°C durante 30 minutos. La producción del producto se detecta fluorométricamente y se compara con curvas estándar generadas por medida de la fluorescencia de una cantidad conocida de un estándar. La reacción se inactiva por la adición de 125 µl de un tampón de carbonato de glicina 1,0 M, pH 10,5 a todos los pocillos. La actividad específica se define como nmol de producto producido por hora y mg.

[0122] Internalización por mioblastos L6. Se sembraron las células (ATCC CRL-1458) en placas de seis pocillos a una densidad de $5,0 \times 10^5$ células por pocillo en medio de cultivo (DMEM + FBS al 10%) y se dejaron crecer hasta confluencia. Las células se incubaron con GAA 0-100 nM (conjugado 5 o rhGAA sin conjugar) durante 16 horas en DMEM + FBS al 1% inactivado por calor + Hepes 10 mM, pH 6,7. Después de la absorción, las células se lavaron con 3 x PBS con M6P 5 mM y se lisaron con Triton X-100 al 0,25% durante una hora en hielo. Los lisados se centrifugaron a 18.000 g durante 5 minutos y se ensayó su actividad específica. Véase, por ejemplo, Zhu y col., J. Biol. Chem. 279: 50336-50341 (2004); Zhu y col., Biochem. J. 389: 619-628 (2005).

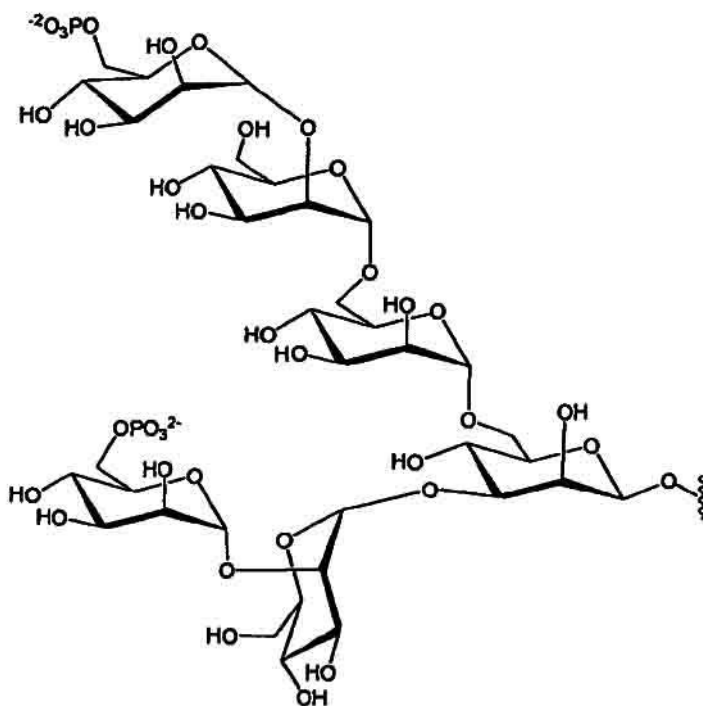
[0123] Todas las referencias citadas se incorporan en este documento por referencia en su totalidad. En la medida en que las publicaciones y patentes o solicitudes de patente incorporadas por referencia contradigan a la invención contenida en la memoria descriptiva, se pretende que la memoria descriptiva sustituya y/o tenga prioridad sobre cualquier material contradictorio semejante.

[0124] Todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción y demás usados en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones han de entenderse como modificados en todo caso por el término

5 “aproximadamente”. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretenden obtener por la presente invención. Por último y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, todos los parámetros numéricos deberán interpretarse teniendo en cuenta el número de cifras significativas y las aproximaciones de redondeo ordinarias.

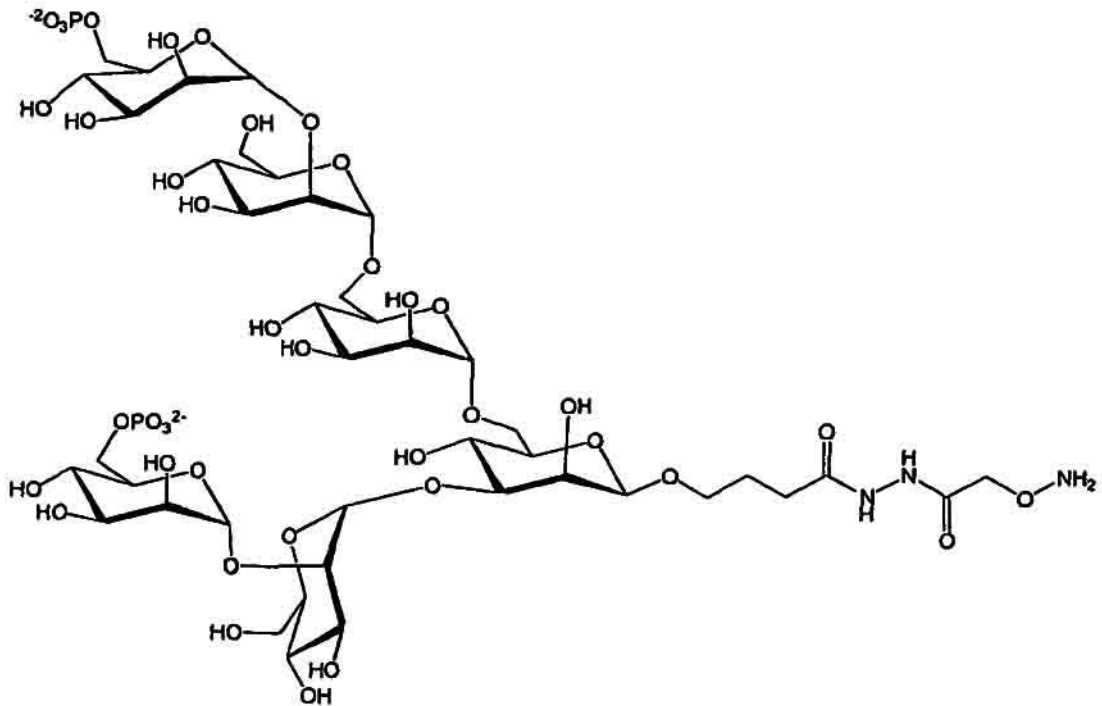
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de oligosacárido y enzima lisosómica que comprende (1) una enzima lisosómica, (2) un oligosacárido y (3) un grupo oxima que conecta la enzima lisosómica y el oligosacárido, en que el oligosacárido es un oligosacárido de la fórmula VI:



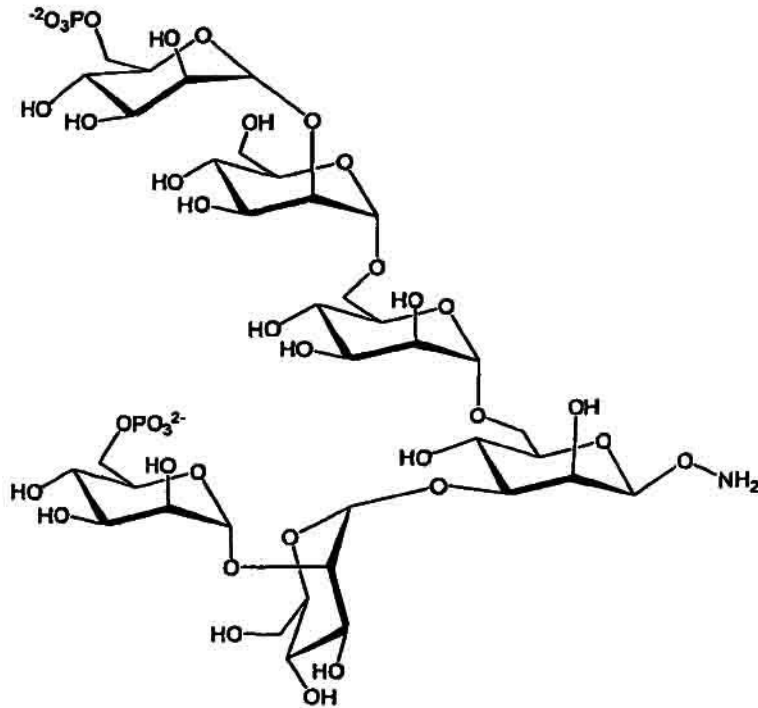
Fórmula VI

2. El conjugado de oligosacárido y proteína de la reivindicación 1, en que la enzima lisosómica es α -glucosidasa ácida, α -galactosidasa A, esfingomielinasa ácida o α -L-iduronidasa.
3. El conjugado de oligosacárido y proteína de la reivindicación 2, en que la enzima lisosómica es α -glucosidasa ácida.
4. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de oligosacárido y enzima lisosómica de la reivindicación 1 y un excipiente.
5. El conjugado de la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico en un sujeto que lo necesita.
6. Uso de un conjugado de la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico.
7. Un procedimiento para la preparación de un conjugado de la reivindicación 1 por acoplamiento de un oligosacárido a una enzima lisosómica que comprende:
- (a) proporcionar un oligosacárido que comprende un grupo aminoxi;
- (b) proporcionar una enzima lisosómica con al menos un grupo carbonilo; y
- (c) hacer reaccionar el grupo aminoxi del oligosacárido con el, al menos un grupo carbonilo de la enzima lisosómica y de este modo acoplar el oligosacárido a la enzima lisosómica, en que el oligosacárido que comprende un grupo aminoxi es



8. Un procedimiento para la preparación de un conjugado de la reivindicación 1 por acoplamiento de un oligosacárido a una enzima lisosómica que comprende:

- 5
- (a) proporcionar un oligosacárido que comprende un grupo aminoxi;
 - (b) proporcionar una enzima lisosómica con al menos un grupo carbonilo; y
- 10
- (c) hacer reaccionar el grupo aminoxi del oligosacárido con el, al menos un grupo carbonilo de la enzima lisosómica y de este modo acoplar el oligosacárido a la enzima lisosómica, en que el oligosacárido que comprende un grupo aminoxi es

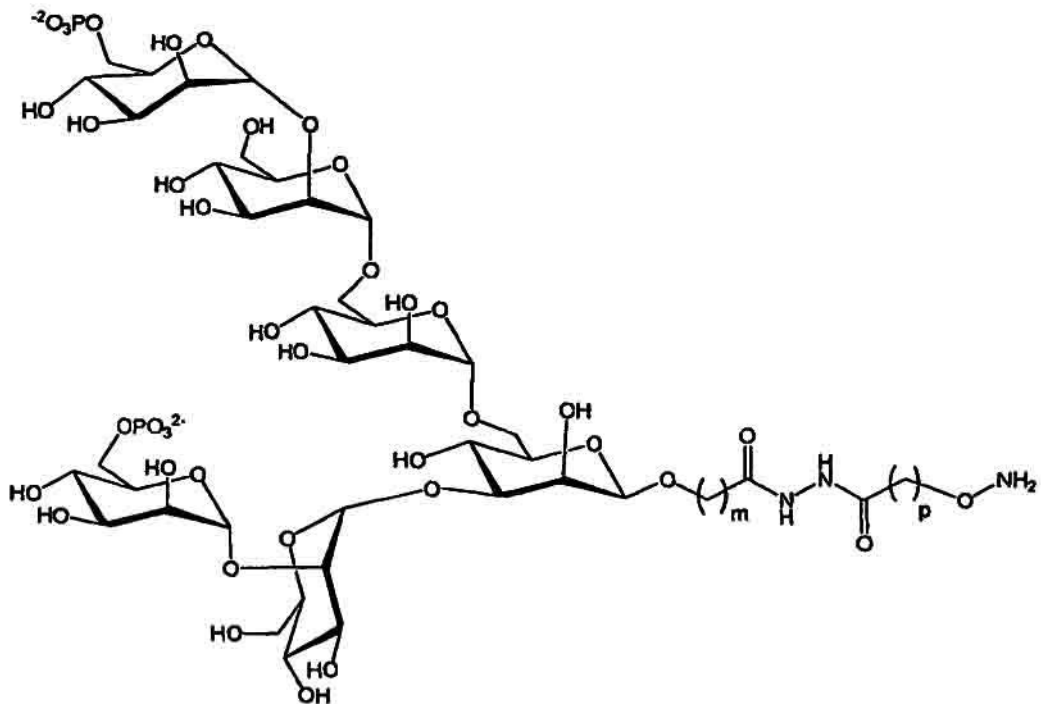


9. El procedimiento de la reivindicación 7, en que la enzima lisosómica es α -glucosidasa ácida, α -galactosidasa A, esfingomielinasa ácida o α -L-iduronidasa.

5

10. El procedimiento de la reivindicación 9, en que la enzima lisosómica es α -glucosidasa ácida.

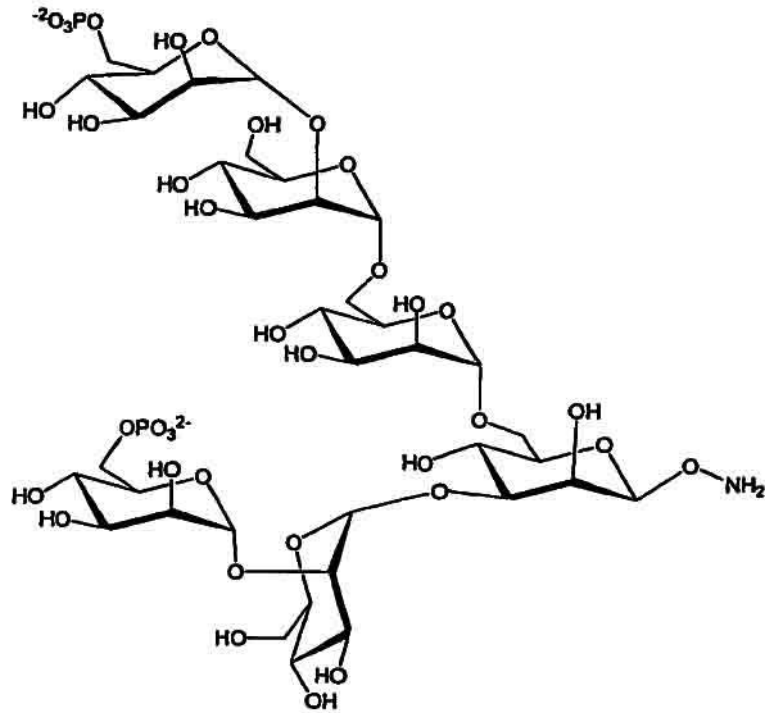
11. Un oligosacárido de la fórmula IV:



Fórmula IV

en la que m y p se eligen independientemente entre números enteros en el intervalo de 1 a 10.

12. El oligosacárido de la reivindicación 11, en que m es 3.
- 5 13. El oligosacárido de la reivindicación 11, en que p es 1.
14. El oligosacárido de la reivindicación 11, en que m es 3 y p es 1.
15. Un oligosacárido de la fórmula V:



Fórmula V

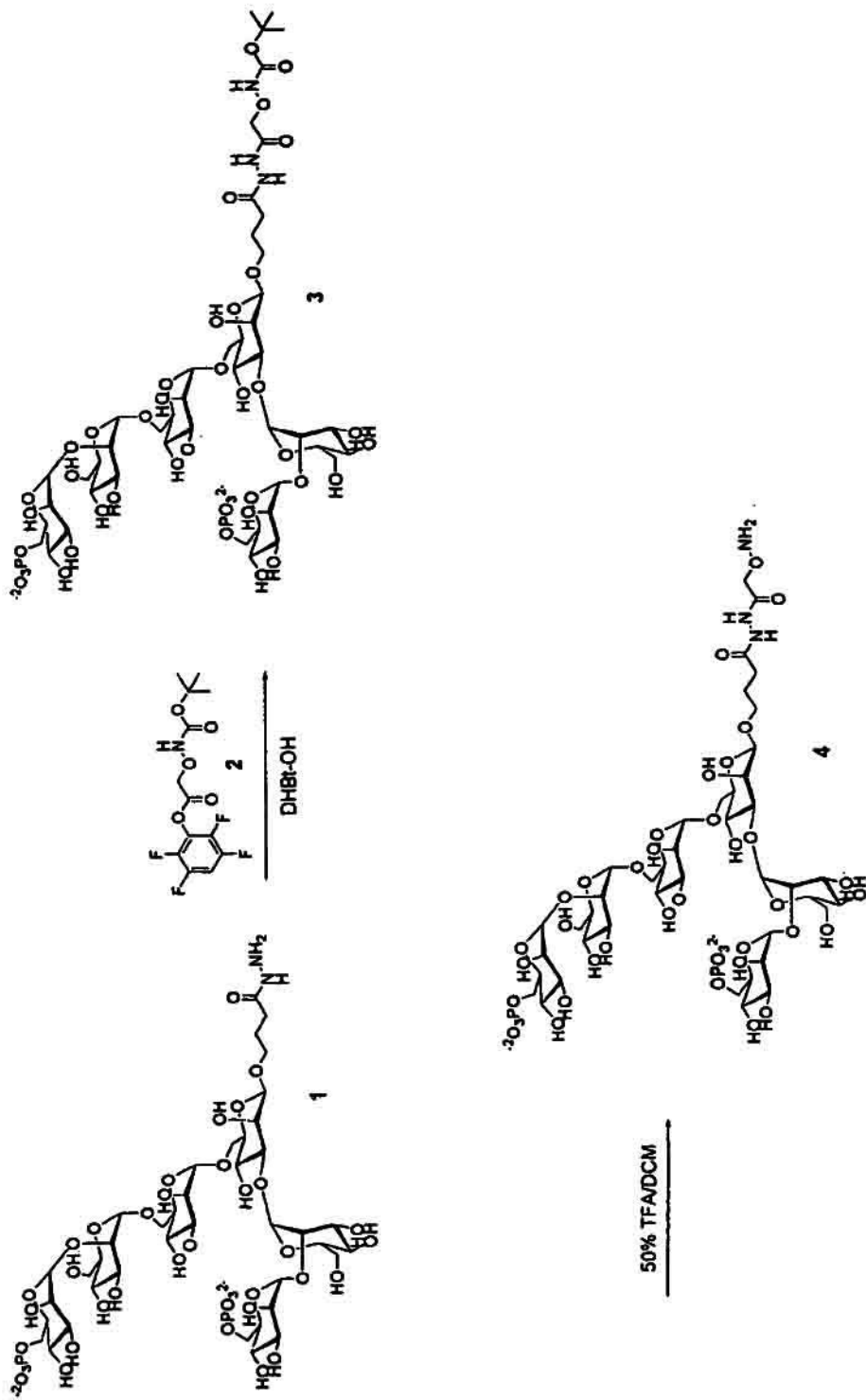


FIG. 1

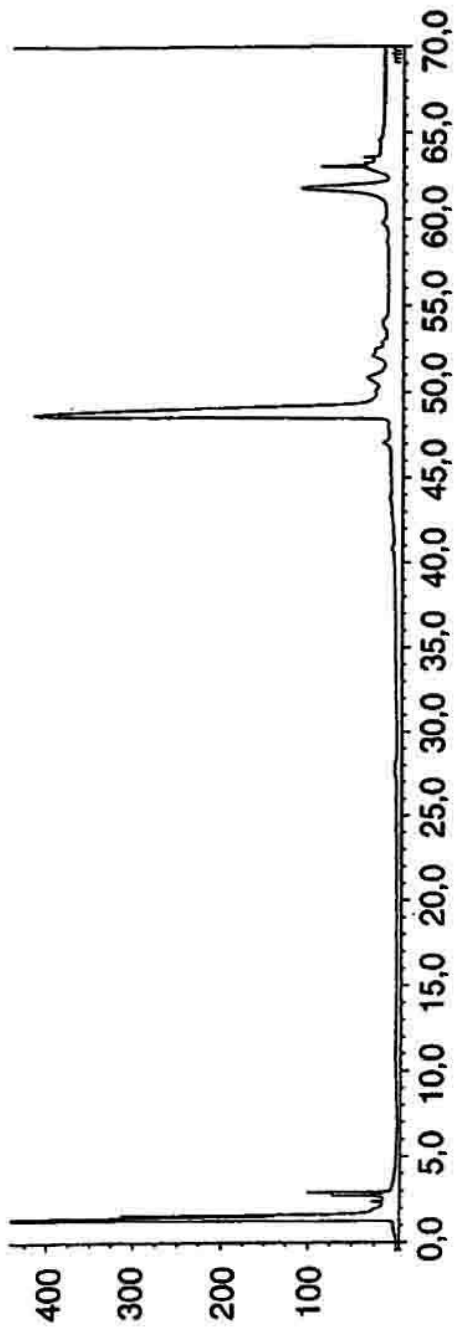


FIG. 2A

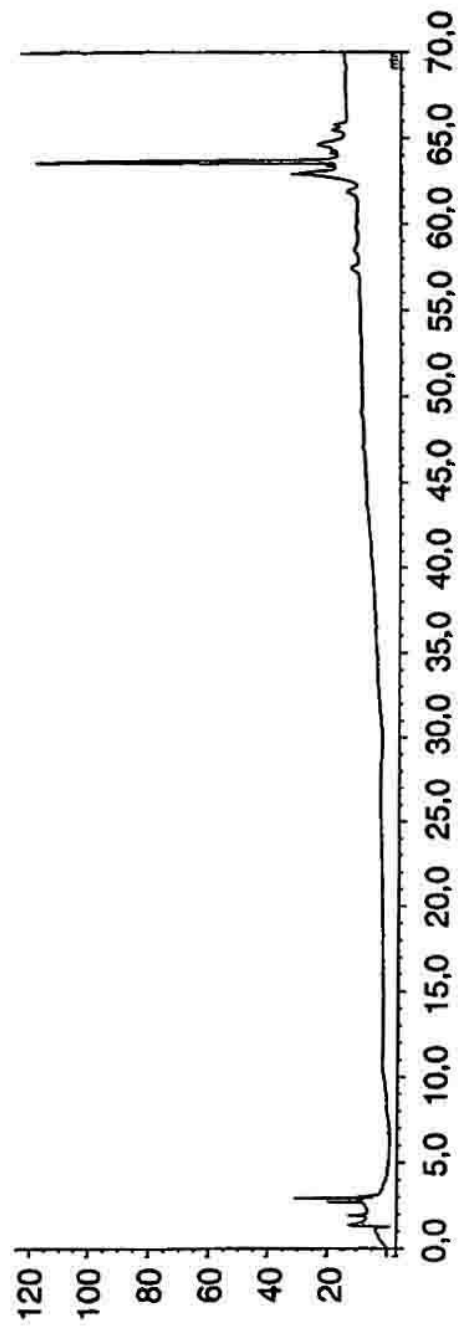


FIG. 2B

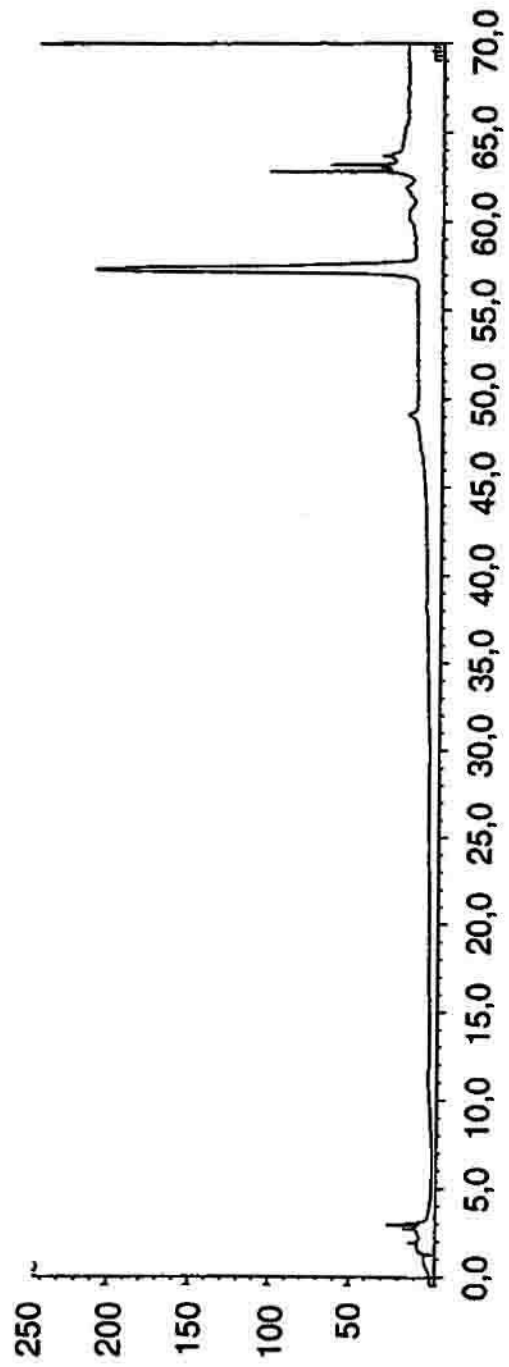


FIG. 2C

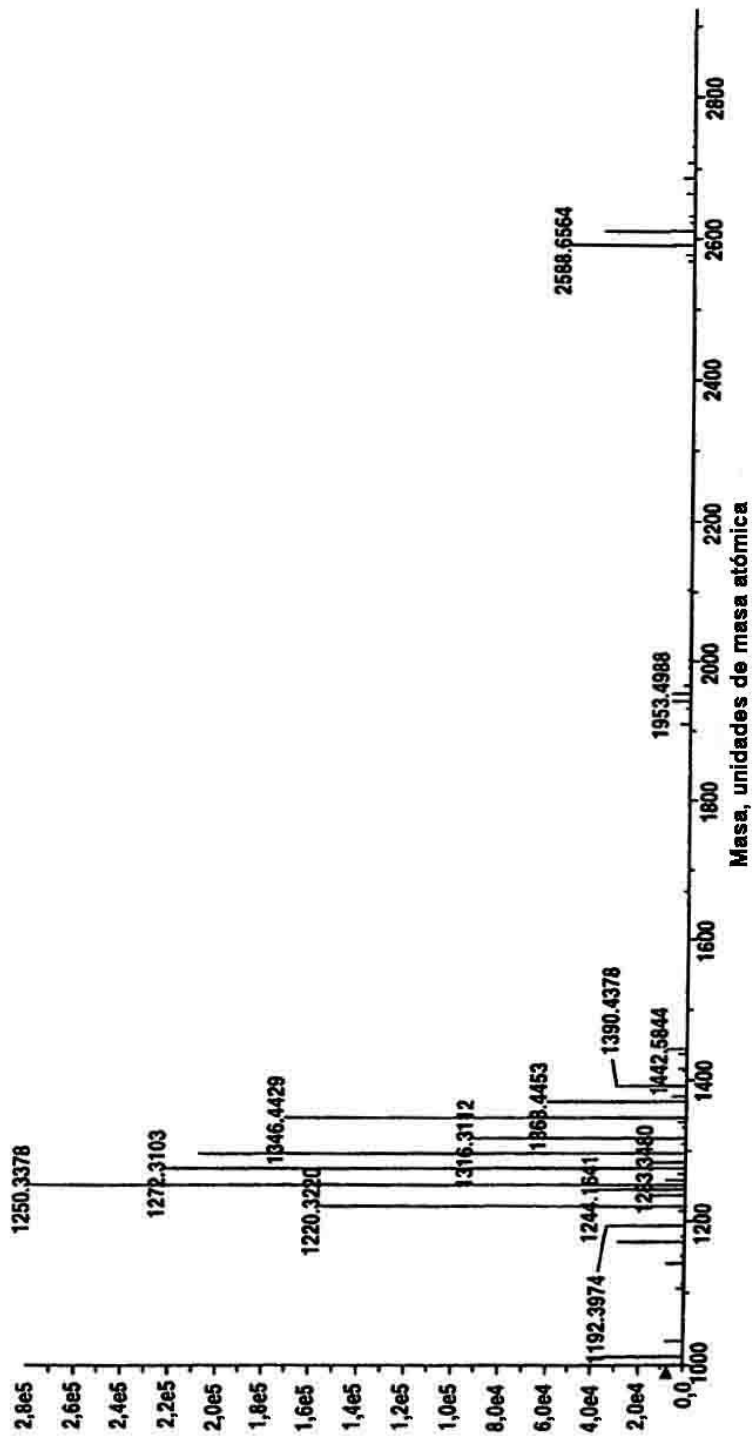


FIG. 3A

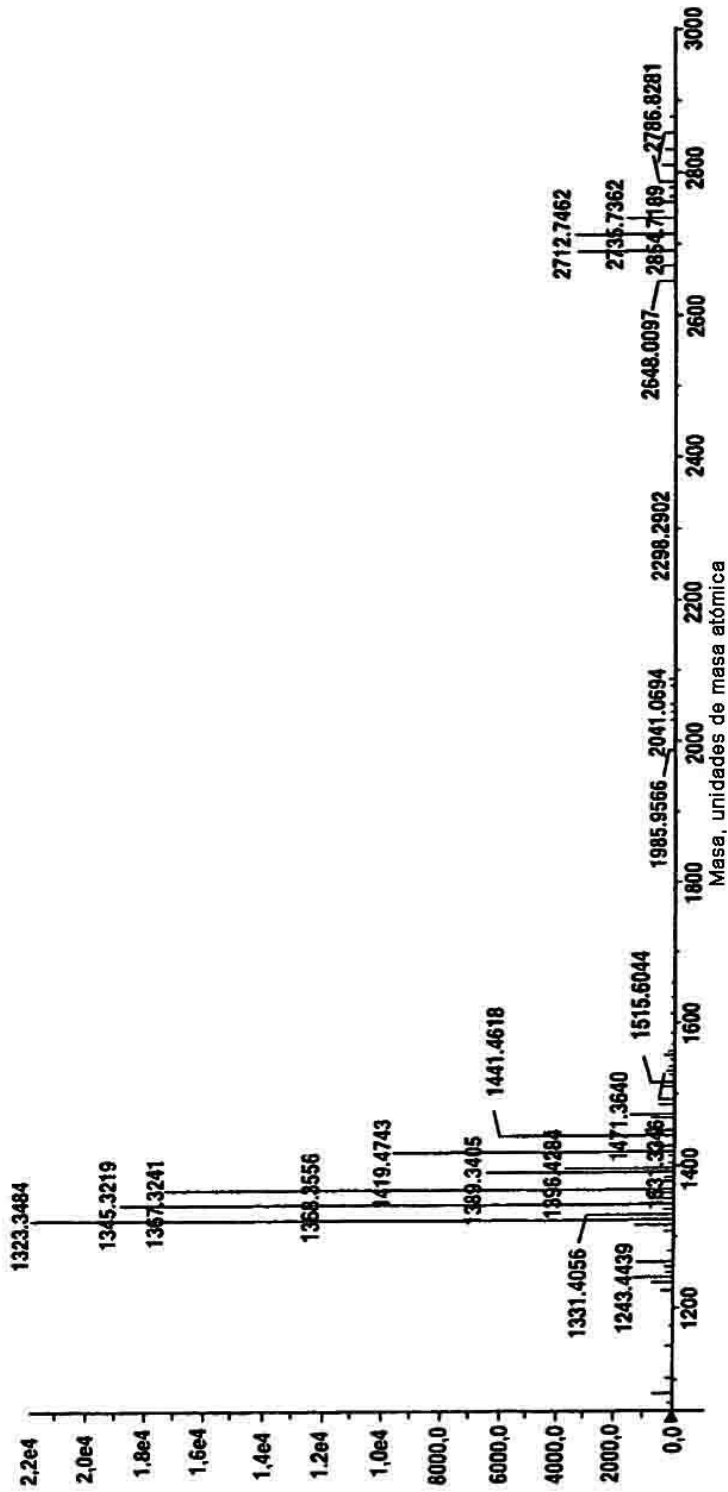


FIG. 3B

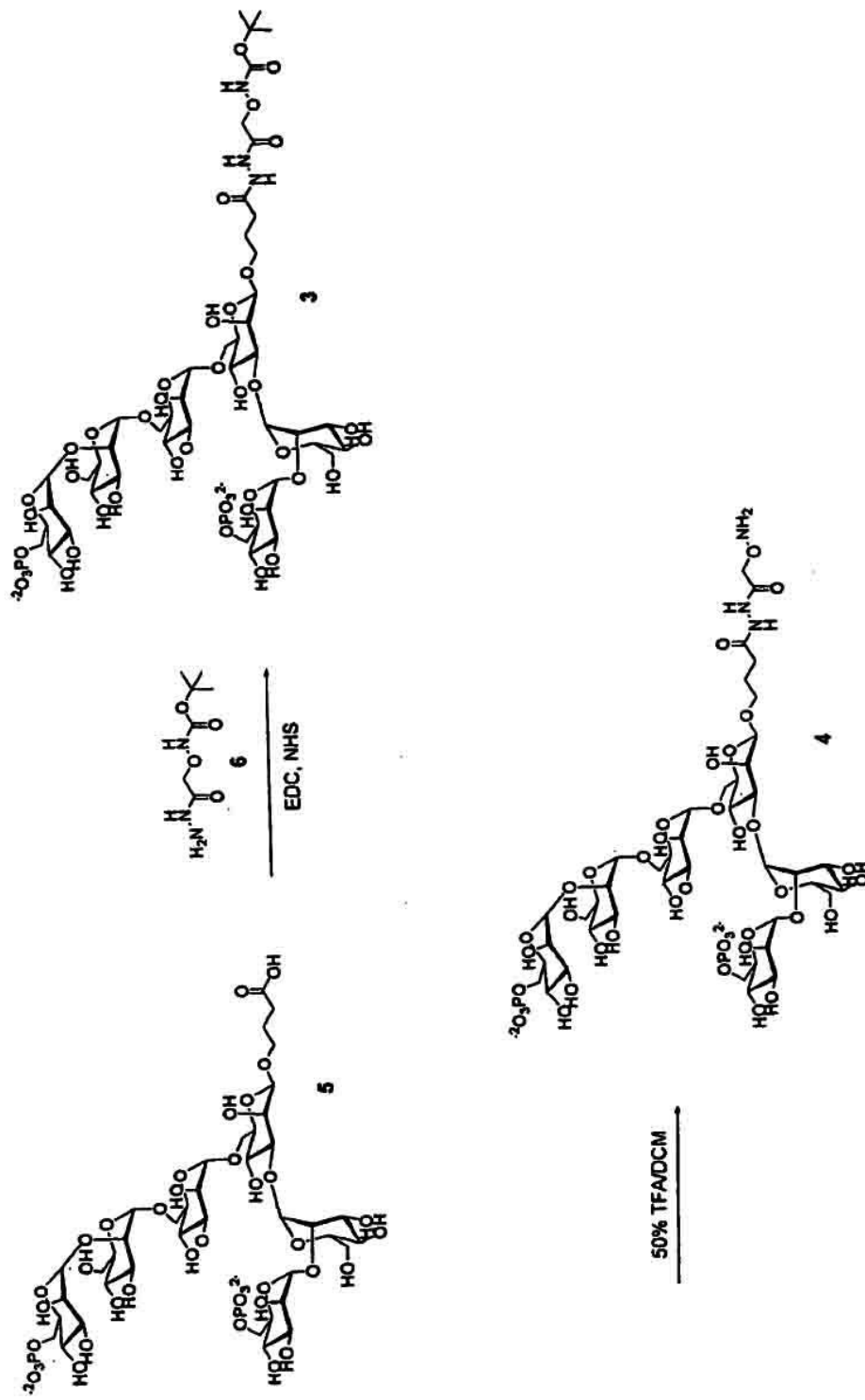


FIG. 4