

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 495**

51 Int. Cl.:

**C07K 9/00** (2006.01)

**C07K 1/04** (2006.01)

**C07K 1/06** (2006.01)

**C08B 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2003 E 03741203 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 1520858**

54 Título: **Proceso para la preparación de glicopéptidos que tienen oligosacáridos unidos a asparagina**

30 Prioridad:

**05.07.2002 JP 2002196821**

**29.11.2002 JP 2002349166**

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

**20.03.2014**

73 Titular/es:

**GLYTECH, INC. (50.0%)**

**134, Chudoji minami-machi, Shimogyo-ku, Kyoto-shi**

**Kyoto 600-8813, JP y**

**KAJIHARA, YASUHIRO (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KAJIHARA, YASUHIRO**

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

ES 2 449 495 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

Proceso para la preparación de glicopéptidos que tienen oligosacáridos unidos a asparagina

## ÁREA TÉCNICA

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un proceso para preparar glicopéptidos que tienen oligosacáridos unidos a asparagina en la cadena peptídica de los mismos, y a glicopéptidos que pueden obtenerse mediante el proceso.

## ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

10 **[0002]** En los últimos años, las moléculas de oligosacáridos han llamado la atención como moléculas de vida de cadena tercera seguidas de ácidos nucleicos (ADN) y proteínas. El cuerpo humano es una sociedad de células enorme que comprende aproximadamente 60 trillones de células, y las superficies de todas las células están cubiertas con moléculas de oligosacáridos. Por ejemplo, los grupos sanguíneos ABO se determinan según la diferencia de oligosacáridos sobre las superficies de las células.

15 **[0003]** Los oligosacáridos funcionan en relación con el reconocimiento de células e interacción de células y son sustancias claves para el establecimiento de la sociedad celular. El ruido en la sociedad celular conlleva, por ejemplo, cánceres, enfermedades crónicas, enfermedades infecciosas y envejecimiento.

**[0004]** Por ejemplo, se sabe que, cuando las células desarrollan cáncer, tienen lugar cambios en la estructura de los oligosacáridos. También se sabe que el *Vibrio cholerae*, los virus gripales, etc. acceden a las células y provocan infecciones al reconocer y unirse a un oligosacárido específico.

20 **[0005]** La aclaración de las funciones de los oligosacáridos conlleva el desarrollo de productos farmacéuticos y alimentos basados en nuevos principios, lo que contribuye a la prevención y terapia de las enfermedades, y se espera una amplia variedad de aplicaciones de los oligosacáridos.

25 **[0006]** La estructura de los oligosacáridos es mucho más compleja que la de los ácidos nucleicos o proteínas por la diversidad de disposiciones de los azúcares simples, modos o sitios de enlaces, longitud de las cadenas, formas de las ramas y de las estructuras globales de nivel superior. En consecuencia, la información biológica derivada de las estructuras de los mismos es más diversificada que en el caso de los ácidos nucleicos y proteínas. Aunque se ha reconocido la importancia de la investigación sobre los oligosacáridos, la complejidad y variedad de las estructuras de los mismos han retrasado el progreso en la investigación de oligosacáridos a diferencia de los estudios sobre los ácidos nucleicos y las proteínas.

30 **[0007]** Muchas de las proteínas presentes en las superficies de las membranas celulares o en el suero tienen oligosacáridos unidos a las mismas como se describe anteriormente. Las moléculas en las que se combinan de manera covalente los oligosacáridos con proteínas se denominan glicoproteínas, que pueden dividirse en dos grupos según la diferencia en el modo de enlace entre el oligosacárido y la proteína. Los oligosacáridos de un tipo son oligosacáridos unidos a asparagina (tipo de enlace N-glicósido) donde un grupo amino de la cadena lateral de asparagina (Asn) está unido al oligosacárido. Los oligosacáridos de otro tipo son oligosacáridos unidos a mucina (tipo de enlace O-glicósido) donde el oligosacárido está unido al alcohol de serina (Ser) o treonina (Thr). Todos los oligosacáridos unidos a asparagina tienen una estructura principal básica que comprende cinco residuos de azúcar, y están divididos en subgrupos de tipo alta manosa, de tipo compuesto y de tipo mezcla, de acuerdo con el tipo de residuo de azúcar terminal no reductor del oligosacárido unido. Por otro lado, los oligosacáridos unidos a mucina se dividen en cuatro grupos según la diferencia de la estructura principal básica.

40 **[0008]** El proceso para preparar péptidos de uso generalizado en la actualidad es el proceso de síntesis en fase sólida desarrollado por R. B. Merrifield en 1963. El proceso de síntesis en fase sólida es en el que los aminoácidos están unidos a una fase sólida llamada resina para proporcionar una cadena peptídica alargada. Cuando está completamente extendida, la cadena de péptidos se corta desde la fase sólida para obtener el producto deseado. Como aplicación de este proceso, puede prepararse una cadena de glicopéptidos incorporando un aminoácido que tenga un oligosacárido unido al mismo en la cadena peptídica para ser alargada.

50 **[0009]** En consecuencia, las cadenas de glicopéptidos se preparan ampliamente mediante el uso de oligosacáridos unidos a aminoácidos donde un oligosacárido está unido a Asn o Ser (Thr) para la preparación de péptidos. No obstante, hay pocos ejemplos de cadenas peptídicas preparadas químicamente que tienen una gran cadena de azúcar a pesar del progreso técnico en la síntesis química.

**[0010]** Uno de los problemas que se genera son las cantidades absolutas insuficientes de oligosacáridos para ser unidos con el residuo de asparagina. Los métodos para obtener oligosacáridos incluyen el aislamiento de

oligosacáridos solo a partir de glicoproteínas que están presentes en un organismo vivo. No obstante, utilizar hidracina para cortar oligosacáridos a partir de glicoproteínas es arriesgado, presenta dificultad en la preparación de grandes cantidades de oligosacáridos. Además, en el organismo vivo hay muchos oligosacáridos que se parecen mucho en la estructura, y es difícil obtener sólo un oligosacárido único. Por otro lado, puesto que la

5

**[0011]** En la síntesis química de oligosacáridos, hay ejemplos de preparar oligosacáridos en los que se unen 10 residuos de azúcar, mientras que muchos de estos casos son así que el oligosacárido deseado puede prepararse en una cantidad de sólo varios miligramos durante un año. Por esta razón, surgen dificultades en la preparación química de oligosacáridos.

10

**[0012]** El segundo de los problemas está relacionado con el tratamiento llevado a cabo con el uso de TFA (ácido trifluoroacético) para cortar la cadena peptídica a partir de la fase sólida. Por ejemplo, el ácido siálico presente en los extremos no reductores de los oligosacáridos se hidroliza fácilmente en condiciones ácidas, de modo que existe la posibilidad de que el tratamiento con TFA cortará el ácido siálico del glicopéptido preparado. En consecuencia, no existe casi ningún caso en el que los oligosacáridos que tienen ácido siálico sean usados para la síntesis en fase sólida. Con el fin de resolver este problema, se ha expuesto un proceso en el que el ácido siálico es transferido a un oligosacárido con transferasa de ácido siálico después de la síntesis de péptidos. Aunque es útil para introducir ácido siálico, este proceso todavía presenta el problema de que surgen dificultades al preparar glicopéptidos en grandes cantidades porque la transferasa es cara.

15

**[0013]** No obstante, como se describe a continuación, la presente invención ha posibilitado la preparación de modo artificial de glicopéptidos en grandes cantidades. Por tanto, hace posible introducir de modo industrial ácido siálico o derivados del mismo en oligosacáridos empleando transferasa de ácido siálico.

20

**[0014]** Aunque existen oligosacáridos de origen natural que tienen ácido siálico enlazado a los mismos, los oligosacáridos que presentan derivados de ácido siálico unidos a estos no están disponibles de modo natural. Por eso, es a través del uso de transferasa de ácido siálico como los derivados de ácido siálico pueden introducirse en los oligosacáridos de cualquiera modo.

25

**[0015]** E. Meinjohanns *et al.*, *J. Chem. Soc.*, Perkin Trans.1.,1, 549-560 (1998) describe la síntesis de glicopéptidos N-ligados empleando métodos estándares de síntesis en fase sólida y empleando componentes básicos de aminoácidos Fmoc-Asn (azúcar) y una resina HPMA-PEGA. Después de liberarse de la resina, los glicopéptidos obtenidos pueden ser modificados por una sialil-transferasa.

30

**[0016]** También se presentan métodos similares que emplean resina funcionalizada con amino en lugar de resina funcionalizada con hidroxilo y que lleva a glicopéptidos que tienen un grupo amido de extremo C-terminal, p.ej., en L. Otvos Jr. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 31, 5889-5892 (1991); L. Urge *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 32, 3445-3448 (1991); L. Urge *et al.*, *Carbohydrate Res.* 235, 83-93 (1992); I. Laczko *et al.*, *Biochemistry* 31, 4282-4288 (1992) y L. Urge *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 35, 2373-2390 (1994).

35

**[0017]** T. Inazu *et al.*, *Peptide Sci.*, 153-156 (1998) describe un método para la síntesis de glicopéptidos en el que el acoplamiento se lleva a cabo en solución y la unidad estructural resultante Fmoc-Asn (azúcar) de extremo N-terminal se utiliza como un marcador de purificación.

**[0018]** Lai-Xi Wang *et al.*, *JACS* 119, 11137-11146 (1997) también están utilizando un componente Fmoc-Asn (azúcar) en la preparación de glicopéptidos con los grupos hidroxilos de la fracción de sacárido bloqueados, p.ej., con grupos acetilos.

40

**[0019]** WO 03/008431 expone la preparación de componentes Fmoc-Asn(glico) que puede utilizarse en la síntesis en fase sólida de glicopéptidos.

**[0020]** Los métodos de síntesis en fase sólida para la preparación de polipéptidos glicosilados con O que comprenden la provisión de componentes estructurales Fmoc-Thr (O-glico) o Fmoc-Ser (O-glico), y donde el grupo carboxi del grupo de ácido siálico de dicha porción glico y todos los grupos hidroxilos están protegidos, se exponen en S. Komba *et al.*, *J. Peptide Sci.* 12, 585-593 (2000) y N. Bezay *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 2292-2295 (2001). Después de la síntesis, los polipéptidos se liberan del soporte sólido y se eliminan los grupos protectores.

45

**[0021]** A partir de estas publicaciones, es evidente que los grupos hidroxilos de la cadena de azúcar son conocidos por ser muy reactivos y, por lo tanto, normalmente se protegen antes de su uso para la síntesis en fase sólida. A menudo, el grupo bencilo se utiliza como grupo protector para el oligosacárido; véase Guo *et al.*, *Bioorganic & Med. Chem.* 5, 1917-1924 (1997).

50

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

5 **[0022]** Los inventores actuales han descubierto sorprendentemente ahora que los oligosacáridos sialilados unidos a Asn que tienen un grupo protector sobre el grupo carboxi del ácido siálico puede utilizarse sin proteger el grupo hidroxilo de la cadena del azúcar. Por tanto, al contrario de lo que se piensa, en el proceso de la presente invención no es necesario proteger los grupos hidroxilos de la cadena del azúcar.

**[0023]** Un objeto de la presente invención es proporcionar un proceso para la síntesis en fase sólida de un glicopéptido que tiene al menos un oligosacárido unido a Asn en una posición deseada de la cadena peptídica del mismo que permite la fácil producción de los glicopéptidos en grandes cantidades.

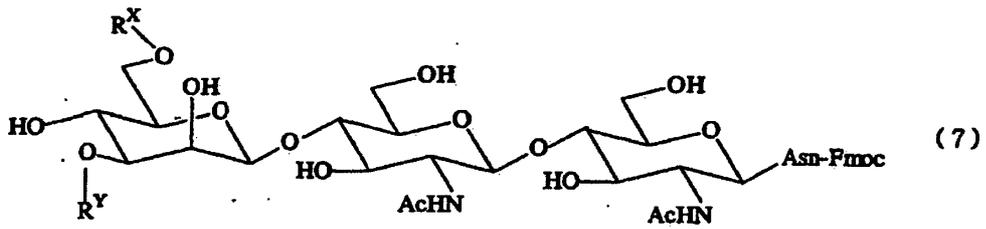
10 **[0024]** Otro objeto de la invención es ofrecer nuevos glicopéptidos que puedan obtenerse con el proceso anterior.

**[0025]** De acuerdo con la presente invención, se proporciona un proceso para la síntesis en fase sólida de un glicopéptido que tiene al menos un oligosacárido unido a una asparagina en una posición deseada de la cadena peptídica del mismo, el proceso comprende las etapas de:

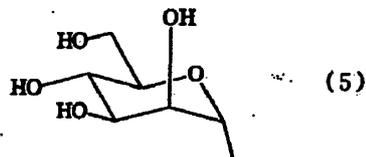
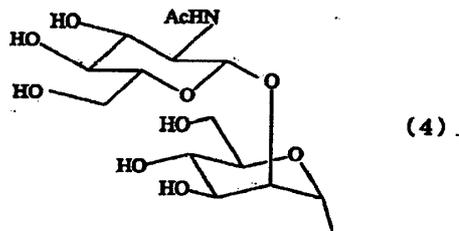
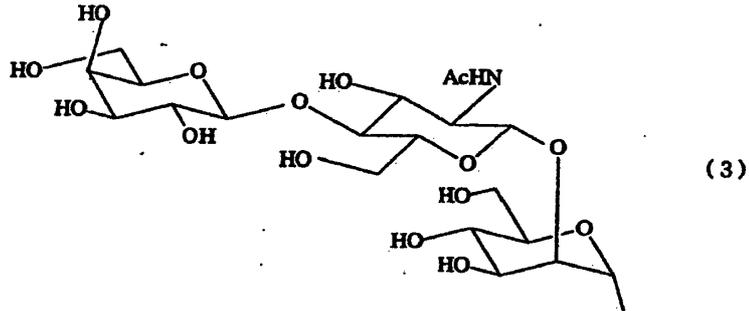
- 15 (1) esterificación de un grupo hidroxilo de una resina que tiene el grupo hidroxilo y un grupo carboxilo de un aminoácido que tiene un nitrógeno del grupo amino protegido por un grupo protector liposoluble,
- (2) eliminación del grupo protector liposoluble para formar un grupo amino libre,
- (3) amidación del grupo amino libre y de un grupo carboxilo de un aminoácido que tiene un nitrógeno de grupo amino protegido por un grupo protector liposoluble,
- 20 (4) eliminación del grupo protector liposoluble para formar un grupo amino libre,
- (5) repetición de las etapas (3) y (4) al menos una vez,
- (6) preparación de un disialooligosacárido unido a una asparagina o un monosialooligosacárido unido a una asparagina que tiene los grupos hidroxilos no protegidos y que tiene un nitrógeno del grupo amino protegido por un grupo protector liposoluble y el grupo carboxilo del ácido siálico protegido por un grupo bencilo, alilo o difenilmetilo,
- 25 (7) amidación del grupo de amino libre y un grupo carboxilo de la porción asparagina del disialooligosacárido unido a una asparagina o del monosialooligosacárido unido a una asparagina que tiene un nitrógeno del grupo amino protegido por un grupo protector liposoluble y el grupo carboxilo del ácido siálico protegido por un grupo bencilo, alilo o difenilmetilo,
- 30 (8) eliminación del grupo protector liposoluble para formar un grupo amino libre,
- (9) amidación del grupo amino libre y un grupo carboxilo de un aminoácido que tiene un nitrógeno del grupo amino protegido por un grupo protector liposoluble,
- 35 (10) repetición de las etapas (8) y (9) al menos una vez,
- (11) eliminación del grupo protector liposoluble para formar un grupo amino libre,
- (12) corte de la resina con un ácido.

40 **[0026]** En un modo de realización específico, el disialooligosacárido unido a una asparagina o el monosialooligosacárido unido a una asparagina tiene el grupo carboxilo del ácido siálico protegido por un grupo bencilo, en el que el grupo bencilo se introduce en el grupo carboxilo del ácido siálico ajustando una solución de disialooligosacárido unida a una asparagina o de monosialooligosacárido unido a una asparagina a un pH de 5 a 6, liofilizando la solución, disolviendo el producto liofilizado en dimetilformamida seca y haciéndolo reaccionar con bromuro de bencilo.

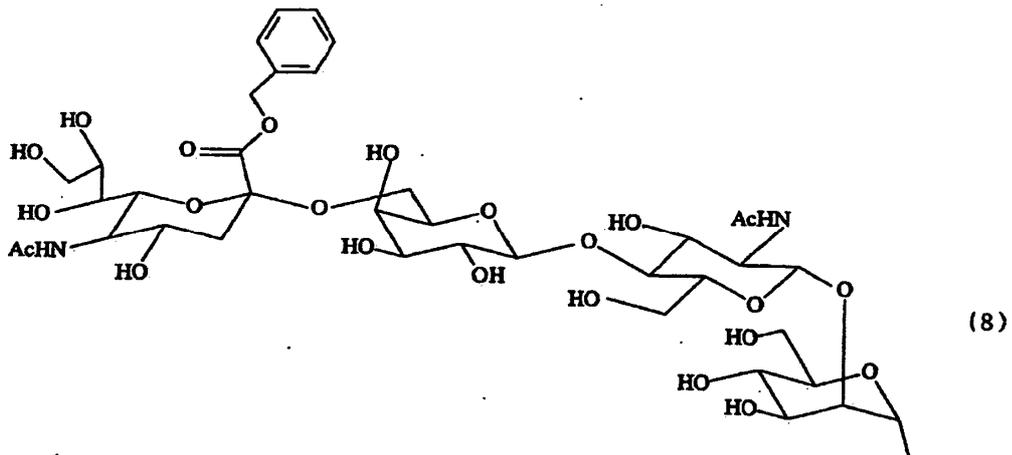
45 **[0027]** En otro modo de realización, el disialooligosacárido unido a asparagina o el monosialooligosacárido unido a una asparagina está representado por la fórmula (7)



en la que uno de  $R^X$  y  $R^Y$  es un grupo representado por la fórmula (8), y el otro es un átomo de hidrógeno o un grupo representado por una de las fórmulas de la (3) a la (5) y la (8):



5



10

**[0028]** La presente invención también ofrece un proceso como el anterior, en el que el disialooligosacárido unido a una asparagina o el monosialooligosacárido unido a una asparagina de la etapa (6) tiene al menos 6 residuos de azúcar, por ejemplo, de 9 a 11 residuos de azúcar.

**[0029]** La presente invención también proporciona un proceso en el que el disialooligosacárido unido a una asparagina o el monosialooligosacárido unido a una asparagina de la etapa (6) tiene un oligosacárido bifurcado unido al mismo.

15

**[0030]** En un modo de realización preferido del proceso de la presente invención, el grupo protector para el grupo protector liposoluble es un grupo 9-fluorenil-metoxicarbonil (Fmoc).

**[0031]** En otro modo de realización preferido del proceso de esta invención, el grupo protector para el grupo carboxilo del ácido siálico es un grupo bencilo.

**[0032]** La presente invención también expone un proceso como el anterior, que además comprende la eliminación del grupo bencilo, alilo o difenilmetilo del grupo carboxilo del ácido siálico después de la etapa (12).

5 **[0033]** En otro aspecto más, la presente invención expone un glicopéptido que se puede obtener mediante un proceso como se define anteriormente y que tiene al menos un oligosacárido unido a una asparagina en una posición deseada de la cadena peptídica del mismo, el glicopéptido que tiene al menos un oligosacárido seleccionado entre un disialooligosacárido unido a una asparagina y un monosialooligosacárido unido a una asparagina unido como el oligosacárido unido a una asparagina y un grupo carboxílico del ácido siálico protegido por un grupo bencilo, alilo o difenilmetilo.

10 **[0034]** El inventor actual ya ha desarrollado, como se expone en la solicitud de patente japonesa núm. 2001-185685 (= WO 03/008431) (de aquí en adelante denominada "solicitud anterior"), procesos para preparar derivados de oligosacáridos unidos a asparagina, oligosacáridos unidos a asparagina y oligosacáridos cuyos procesos son capaces de producir varios derivados de oligosacáridos unidos a asparagina aislados con mayor facilidad y en cantidades mayores de lo normal, y derivados de oligosacáridos unidos a asparagina nuevos, donde los oligosacáridos deficientes en residuos de azúcar como se desee están unidos.

**[0035]** Los procesos de la solicitud anterior incluyen:

(1) un proceso para preparar un derivado de oligosacárido unido a una asparagina derivado de un oligosacárido unido a una asparagina cuyo proceso incluye las etapas de:

20 (a) introducir un grupo protector liposoluble en un oligosacárido unido a una asparagina o al menos dos oligosacáridos unidos a asparagina incluidos en una mezcla que comprende el oligosacárido o al menos esos dos oligosacáridos para obtener una mezcla de derivados de oligosacáridos unidos a asparagina, y

25 (b) hidrolizar la mezcla de derivados de oligosacáridos unidos a asparagina o los derivados de oligosacáridos unidos a asparagina incluidos en esta mezcla y someter la mezcla resultante a cromatografía para separar los derivados de oligosacáridos unidos a asparagina,

(2) un proceso para preparar un derivado de oligosacárido unido a una asparagina según (1) que además incluye la etapa (b') de hidrolizar los derivados de oligosacáridos unidos a asparagina separados en la etapa (b) con una hidrolasa de azúcar,

30 (3) un proceso para preparar un derivado de oligosacárido unido a una asparagina según (1) o (2) en el que la mezcla que comprende el oligosacárido o al menos esos dos oligosacáridos incluye un compuesto de la siguiente fórmula (A) y/o un compuesto que se corresponde con ese compuesto en el que al menos un residuo de azúcar es deficiente,

35 (4) un proceso para preparar un derivado de oligosacárido unido a una asparagina según cualquiera de las etapas (1) a (3) en el que el grupo protector liposoluble es un grupo fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc),

40 (5) un proceso para preparar un derivado de oligosacárido unido a una asparagina según cualquiera de las etapas (1) a (3) en el que la etapa (a) es la etapa de introducir un grupo Fmoc en el oligosacárido unido a asparagina o al menos esos dos oligosacáridos unidos a asparagina que tienen un residuo siálico en un extremo no reductor e incluido en la mezcla, e introducir el grupo bencilo en el residuo siálico para obtener la mezcla de derivados de oligosacáridos unidos a asparagina,

(6) un proceso para preparar un oligosacárido unido a asparagina que incluye las etapas de:

45 (a) introducir un grupo protector liposoluble en un oligosacárido unido a una asparagina o al menos en dos oligosacáridos unidos a asparagina incluidos en una mezcla que comprende el oligosacárido o al menos esos dos oligosacáridos para obtener una mezcla de derivados de oligosacáridos unidos a asparagina,

(b) hidrolizar la mezcla de derivados de oligosacáridos unidos a asparagina o los derivados de oligosacáridos unidos a asparagina incluidos en esta mezcla y someter la mezcla resultante a cromatografía para separar derivados de oligosacáridos unidos a asparagina; y

50 (c) eliminar el grupo protector de los derivados de oligosacáridos unidos a asparagina separados en la etapa (b) para obtener oligosacáridos unidos a asparagina,

(7) un proceso para preparar un oligosacárido unido a asparagina según la etapa (6) que además incluye:

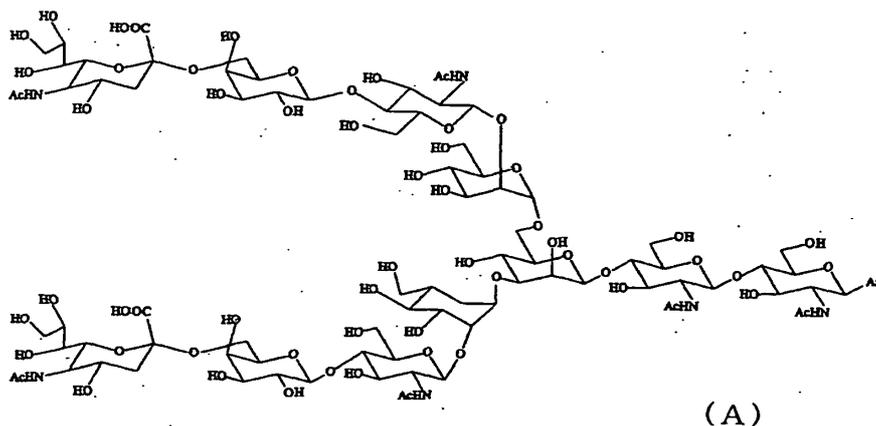
la etapa (b') de hidrolizar el derivado de oligosacáridos unidos a asparagina separados por la etapa (b) con una hidrolasa de azúcar, y/o

5 la etapa (c') de hidrolizar los oligosacáridos unidos a asparagina obtenidos mediante la etapa (c) con una hidrolasa de azúcar,

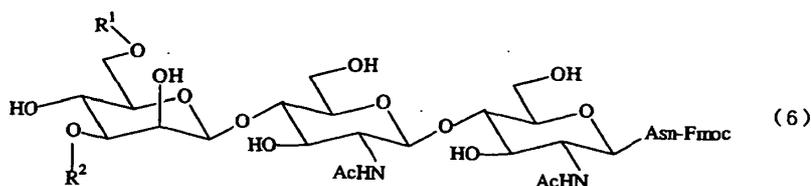
(8) un proceso para preparar un oligosacárido unido a una asparagina según la etapa (6) o (7) en el que la mezcla que comprende el oligosacárido o al menos esos dos oligosacáridos incluye un compuesto de la siguiente fórmula (A) y/o un compuesto que se corresponde con dicho compuesto en el que al menos un residuo de azúcar es deficiente,

(9) un proceso para preparar un oligosacárido unido a una asparagina según cualquiera de las etapas (6) a (8) en el que el grupo protector liposoluble es un grupo Fmoc.

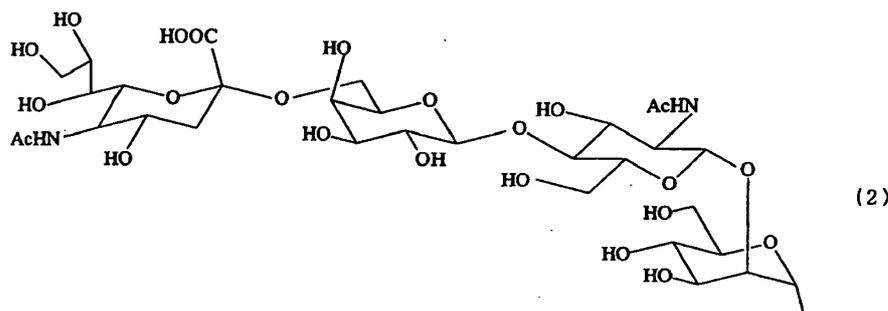
(10) un proceso para preparar un oligosacárido unido a una asparagina según cualquiera de las etapas (6) a (8) en el que la etapa (a) es la etapa de introducción del grupo Fmoc en el oligosacárido unido a una asparagina o en al menos esos dos oligosacáridos unidos a asparagina que tienen un residuo siálico en un extremo no reductor e incluido en la mezcla, y de introducción de un grupo bencilo en el residuo siálico para obtener la mezcla de derivados de oligosacárido unido a asparagina, etc.

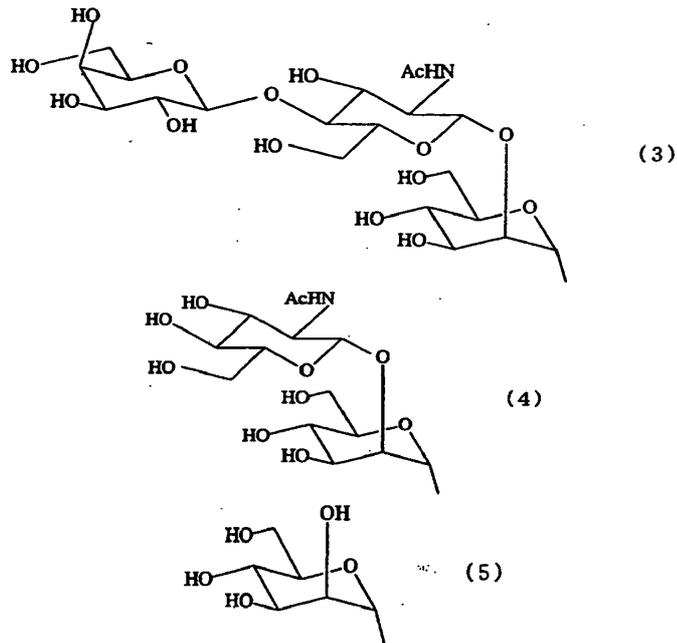


20 [0036] El anterior derivado de oligosacárido unido a una asparagina está representado, por ejemplo, mediante la fórmula (6).

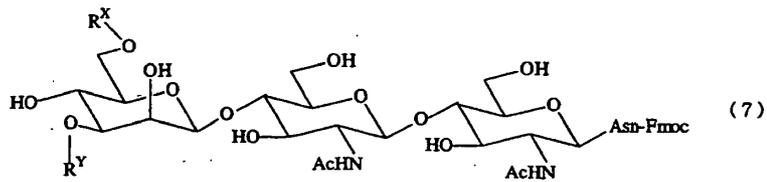


en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo representado por uno de la fórmula (2) a la (5), y puede ser el mismo o diferente a excepción de que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> sean cada uno el grupo de la fórmula (3).

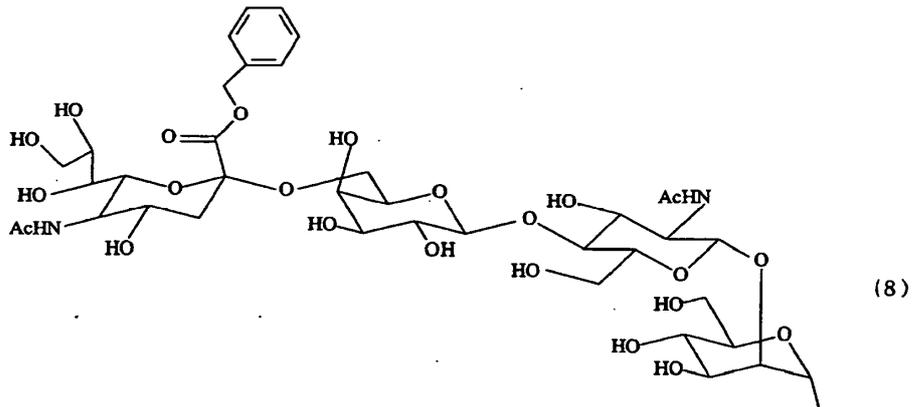




- 5 [0037] Otro derivado de oligosacárido unido a una asparagina está representado, por ejemplo, mediante la fórmula (7).

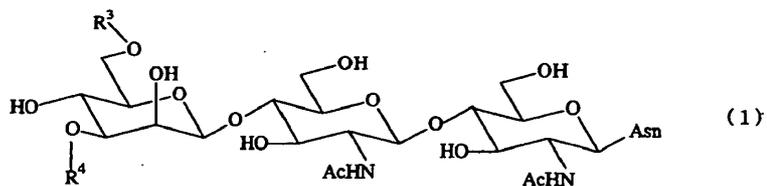


en la que uno de  $R^x$  y  $R^y$  es un grupo representado por la fórmula (8), y el otro es un átomo de hidrógeno o un grupo representado por una de las fórmulas de la (2) a la (5) y la (8).



10

- [0038] El anterior oligosacárido unido a una asparagina está representado, por ejemplo, mediante la fórmula (1).



en la que  $R^3$  y  $R^4$  son cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo representado por una de las fórmulas de la (2) a la (5), y puede ser igual o diferente, a excepción de que  $R^3$  y  $R^4$  sean cada uno el grupo de la fórmula (2) o de la fórmula (3).

5 **[0039]** Puesto que se presenta una descripción detallada en la solicitud anterior sobre la preparación de estos derivados de oligosacáridos unidos a asparagina y oligosacáridos unidos a asparagina, se hará referencia a la solicitud. No obstante, lo que se expone en la solicitud anterior se describirá en cierta medida. El proceso de la solicitud anterior para preparar derivados de oligosacáridos unidos a asparagina está caracterizado claramente porque se introduce un grupo protector liposoluble en (unido con) un oligosacárido unido a asparagina derivado de una glicoproteína de origen natural, preferentemente oligosacáridos unidos a asparagina incluidos en una  
10 mezcla de oligosacáridos unidos a asparagina obtenida de oligosacáridos que pueden unirse a asparagina, para obtener una mezcla de derivados de oligosacáridos unidos a asparagina, seguido de la separación de la mezcla en derivados de oligosacáridos unidos a asparagina individuales. El término "oligosacárido unido a una asparagina" como se utiliza en este documento se refiere a un oligosacárido que tiene asparagina unida al mismo. Además, el término "oligosacáridos que pueden unirse a asparagina" hace referencia a un grupo de  
15 oligosacáridos en el que la N-acetilglucosamina presente en un extremo reductor está unido por un enlace de N-glucósido al grupo de aminoácido de asparagina (Asn) en el polipéptido de una proteína y que tiene Man( $\beta$ -4)GlcNac( $\beta$ -4)GlcNac como núcleo matriz. El término "derivado de oligosacárido unido a asparagina" hace referencia a un oligosacárido unido a una asparagina en el que un grupo protector liposoluble está unido a un residuo de asparagina. Asimismo, "A<sub>CHN</sub>" en las fórmulas estructurales de compuestos se refiere a un grupo  
20 acetamido.

**[0040]** Como se ha descrito anteriormente, los oligosacáridos derivados de glicoproteínas de origen natural son una mezcla de oligosacáridos que son deficientes aleatoriamente en el residuo de azúcar en el extremo no reductor. Los inventores actuales han descubierto inesperadamente que la introducción de un grupo protector liposoluble en un oligosacárido derivado de una glicoproteína de origen natural, preferentemente en  
25 oligosacáridos unidos a asparagina incluidos en una mezcla de los mismos, posibilita separar fácilmente una mezcla de derivados de oligosacáridos unidos a asparagina que tienen el grupo protector introducido en los mismos en derivado individual de oligosacáridos unidos a asparagina mediante un procedimiento cromatográfico conocido. En consecuencia, el derivado de oligosacáridos unidos a asparagina que tiene diferentes estructuras puede prepararse individualmente en grandes cantidades. Por ejemplo, los derivados de oligosacáridos unidos a  
30 asparagina que se asemejan en estructura y que son convencionalmente difíciles de separar se pueden separar unos de otros, y estos compuestos pueden prepararse fácilmente en grandes cantidades. Asimismo, puede hacerse actuar una hidrolasa de azúcar en los derivados de oligosacáridos unidos a asparagina resultantes y, de este modo, preparar varios derivados de oligosacáridos unidos a asparagina.

**[0041]** Por tanto, la introducción de un grupo protector liposoluble en oligosacáridos unidos a asparagina ofrece derivados y posibilita la separación de los derivados de oligosacáridos unidos a asparagina unos de otros. Es de suponer que esto es atribuible al hecho de que la introducción del grupo protector liposoluble proporciona liposolubilidad mejorada a los derivados de oligosacáridos unidos a asparagina por completo para asegurar la interacción extraordinariamente mejorada entre el oligosacárido y la columna de fase reversa para ser utilizada favorablemente, por consiguiente, separa los derivados de oligosacáridos unidos a asparagina unos de otros  
40 reflejando así la diferencia de estructura entre los oligosacáridos con alta sensibilidad.

**[0042]** Además al eliminar el grupo protector obtenido del derivado de oligosacáridos unidos a asparagina, se pueden preparar de modo artificial fácilmente varios oligosacáridos unidos a asparagina en grandes cantidades según la solicitud anterior.

**[0043]** El proceso de la presente invención ofrece los glicopéptidos deseados empleando varios oligosacáridos unidos a asparagina obtenidos mediante la solicitud anterior.  
45

**[0044]** En el proceso de la presente invención, (1) un grupo hidroxilo de una resina que tiene el grupo hidroxilo y un grupo carboxilo de un aminoácido que presenta un nitrógeno de grupo amino protegido por un grupo protector liposoluble está sometido a una reacción esterificante.

**[0045]** Puesto que el nitrógeno del grupo amino del aminoácido está protegido por un grupo protector liposoluble, el grupo hidroxilo de la resina se hace reaccionar con el grupo carboxilo del aminoácido, de ese modo se evita la autocondensación del aminoácido.  
50

**[0046]** Después, (2) el grupo protector liposoluble es retirado del ester resultante para formar un grupo amino libre,  
55

(3) el grupo amino libre es amidado con un grupo carboxilo de un aminoácido deseado que presenta un nitrógeno del grupo amino protegido por un grupo protector liposoluble,

- (4) el grupo protector liposoluble es eliminado para formar un grupo amino libre, y
- (5) se repiten las etapas (3) y (4) al menos una vez para obtener de este modo un péptido que tenga un número deseado de aminoácidos deseados como unidos y que tenga la resina unida a un extremo del mismo y un grupo amino libre en el otro extremo del mismo.
- 5 (6) Se prepara un disialooligosacárido unido a asparagina o un monosialooligosacárido unido a asparagina que tiene los grupos hidroxilos no protegidos y que presenta un nitrógeno de grupo amino protegido por un grupo protector liposoluble y el grupo carboxilo del ácido siálico protegido por un grupo bencilo, alilo o difenilmetilo.
- 10 (7) Después, se amidan el grupo amino libre y un grupo carboxilo de la porción asparagina del disialooligosacárido unido a asparagina o el monosialooligosacárido unido a asparagina que presenta un nitrógeno de grupo amino protegido por un grupo protector liposoluble y el grupo carboxilo del ácido siálico protegido por un grupo bencilo, alilo o difenilmetilo,
- (8) el grupo protector liposoluble es eliminado para formar un grupo amino libre,
- 15 (9) el grupo amino libre es amidado con un grupo carboxilo de un aminoácido deseado que presenta un nitrógeno de grupo amino protegido por un grupo protector liposoluble,
- (10) las etapas (8) y (9) se repiten al menos una vez, y
- (11) se elimina el grupo protector liposoluble para formar un grupo amino libre y, de este modo, obtener un glicopéptido que tiene un número deseado de aminoácidos deseados como enlazados y que tiene la resina unida a un extremo del mismo, un grupo amino libre en el otro extremo del mismo y un oligosacárido unido a una asparagina en una posición intermedia.
- 20 (12) La resina se escinde con un ácido, a través de la cual puede prepararse un glicopéptido que tiene un oligosacárido unido a una asparagina en una posición deseada de la cadena peptídica del mismo.
- 25 **[0047]** Asimismo, un glicopéptido que tiene al menos dos oligosacáridos unidos a asparagina en una posición deseada de la cadena peptídica del mismo puede prepararse añadiendo de modo adecuado la etapa (7) de amidar el grupo amino libre y un grupo carboxilo de la porción asparagina de un oligosacárido unido a una asparagina que presenta un nitrógeno de grupo amino protegido por un grupo protector liposoluble. En este momento, un glicopéptido que tiene al menos dos tipos de oligosacáridos unidos a asparagina en una posición deseada de la cadena peptídica del mismo puede prepararse empleando un oligosacárido unido a una asparagina diferente.
- 30 **[0048]** Como alternativa, el oligosacárido unido a asparagina puede ser introducido en una porción de extremo de la cadena peptídica.
- [0049]** La resina que tiene un grupo hidroxilo para su uso en la presente invención puede ser normalmente una resina que tiene hidroxilo útil para la síntesis en fase sólida. Ejemplos de resinas que pueden utilizarse son la resina de Wang (producto de Merk), la resina HMPA-PEGA (producto de Merk), etc.
- 35 **[0050]** Todos los aminoácidos pueden utilizarse como tales. Los ejemplos de aminoácidos que pueden utilizarse son: serina (Ser), asparagina (Asn), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), alanina (Ala), tirosina (Tyr), glicina (Gly), lisina (Lys), arginina (Arg), histidina (His), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), glutamina (Gln), treonina (Thr), cisteína (Cys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), triptófano (Trp) y prolina (Pro).
- 40 **[0051]** Entre los ejemplos de grupos protectores liposolubles se encuentran: el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), el grupo tert-butiloxicarbonilo (Boc), el grupo bencilo, el grupo alilo, el grupo aliloxicarbonilo, el grupo acetilo y grupos protectores del tipo amido o del tipo carbonato similares. El grupo protector liposoluble, p.ej. el grupo Fmoc, puede ser introducido mediante la adición de 9-fluorenilmetilo-N-succinimidilo carbonato e hidrogenocarbonato de sodio al compuesto contemplado para la reacción. La reacción se lleva a cabo de 0 a 50 °C, preferentemente a temperatura ambiente, durante aproximadamente 1 a aproximadamente 5 horas.
- 45 **[0052]** Los aminoácidos anteriores pueden protegerse por un grupo protector liposoluble mediante el método descrito anteriormente. Los aminoácidos anteriores protegidos pueden ser aquellos disponibles en el mercado. Entre los ejemplos se encuentran: Fmoc-Ser, Fmoc-Asn, Fmoc-Val, Fmoc-Leu, Fmoc-Ile, Fmoc-Ala, Fmoc-Tyr, Fmoc-Gly, Fmoc-Lys, Fmoc-Arg, Fmoc-His, Fmoc-Asp, Fmoc-Glu, Fmoc-Gln, Fmoc-Thr, Fmoc-Cys, Fmoc-Met, Fmoc-Phe, Fmoc-Trp y Fmoc-Pro.

- [0053]** Se pueden utilizar como catalizadores de esterificación agentes de condensación deshidratantes como 1-mesitileno sulfonil-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT), dicitclohexilcarbodiimida (DCC) y diisopropilcarbodiimida (DIPCDI). La reacción de esterificación se lleva a cabo preferentemente colocando una resina, por ejemplo, en una columna en fase sólida, lavando la resina con un solvente y añadiendo a continuación una solución de aminoácido en un solvente a la resina. Ejemplos de solventes para el lavado son la dimetilformamida (DMF), el 2-propanol, el cloruro de metileno, etc. Ejemplos de solventes para disolver aminoácidos son el dimetilsulfóxido (DMSO), la DMF, el cloruro de metileno, etc. La reacción se lleva a cabo a 0-50 °C, preferentemente a temperatura ambiente, durante un periodo de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 horas, preferentemente de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 24 horas.
- [0054]** Preferentemente, el grupo hidroxilo no reaccionado que queda en la fase sólida en este momento está acetilado, por ejemplo, con anhídrido acético para recubrimiento.
- [0055]** El grupo protector liposoluble puede ser retirado, por ejemplo, mediante un tratamiento con una base. Son ejemplos de bases que se pueden utilizar la piperidina, morfolina, etc. Este tratamiento se lleva a cabo preferentemente en presencia de un disolvente. Ejemplos de solventes que se pueden utilizar son el DMSO, la DMF, el metanol, etc.
- [0056]** La reacción de amidar el grupo amino libre con un grupo carboxilo de un aminoácido deseado que presenta un nitrógeno del grupo amino protegido por el grupo liposoluble tiene lugar, preferentemente en presencia de un solvente o un activador.
- [0057]** Entre los ejemplos de activadores útiles se encuentran: dicitclohexilcarbodiimida (DCC), clorhidrato de 1-etilo-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (WSC/HCl), difenilfosforilacida (DPPA), carbonildiimidazol (CDI), dietilcianofosfonato (DEPC), benzotriazol-1-iloxi-trispirrolidinofosfonio (DIPCI), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-trispirrolidinofosfonio (PyBOP), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), hidroxisuccinimida (HOSu), dimetilaminopiridina (DMAP), 1-hidroxil-7-azabenzotriazol (HOAt), hidroxifitalimida (HOPht), pentafluorofenol (Pfp-OH), hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), hexafluorofosfonato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU), tetrafluoroborato de O-benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), 3,4-dihidro-3-hidrodi-4-oxa-1,2,3-benzotriacina (Dhbt).
- [0058]** El activador se utiliza en una cantidad de 1 a 20 equivalentes, preferentemente de 1 a 10 equivalentes, más preferentemente de 1 a 5 equivalentes, en base a un aminoácido que presenta un nitrógeno de grupo amino protegido por un grupo protector liposoluble.
- [0059]** Son ejemplos de solventes útiles: el DMSO, la DMF, el cloruro de metileno, etc. Se prefiere que la reacción se lleve a cabo a una temperatura de 0 a 50 °C, preferentemente a temperatura ambiente, durante un periodo de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 horas, preferentemente de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 24 horas. Es deseable que el grupo hidroxilo no reaccionado que quede en la fase sólida en este momento esté acetilado, por ejemplo, con anhídrido acético para recubrimiento. El grupo protector liposoluble puede ser eliminado del mismo modo en que se describe anteriormente.
- [0060]** La cadena peptídica se escinde a partir de la resina, preferentemente por medio de un tratamiento con un ácido. Ejemplos de ácidos que pueden utilizarse son el ácido trifluoroacético (TFA), el fluoruro de hidrógeno (HF), etc.
- [0061]** Según la invención, un glicopéptido que tiene al menos dos oligosacáridos unidos a asparagina en una posición deseada de la cadena peptídica del mismo puede ser preparado mediante el desarrollo de modo adicional adecuadamente las etapas (7) de amidar el grupo amino libre y un grupo carboxilo de la parte asparagina de un oligosacárido unido a una asparagina que presenta nitrógeno de grupo amino protegido por un grupo protector liposoluble, y (8) de retirar el grupo protector liposoluble para formar un grupo amino libre.
- [0062]** Además según la invención, un glicopéptido que tiene al menos un oligosacárido unido a una asparagina en una posición deseada de la cadena peptídica del mismo puede ser preparado llevando a cabo como etapas finales las etapas (7) de amidar el grupo amino libre y el grupo carboxilo de la parte asparagina de un oligosacárido de unión a una asparagina que presenta nitrógeno de grupo amino protegido por un grupo protector liposoluble, y (8) de retirar el grupo protector liposoluble para formar un grupo amino libre.
- [0063]** Además según la presente invención, un glicopéptido que tiene un oligosacárido unido a una asparagina en una parte del extremo puede ser preparado realizando la etapa (1) de esterificar un grupo hidroxilo de una resina que tiene el grupo hidroxilo y un grupo carboxilo de un aminoácido que presenta nitrógeno de grupo amino protegido por un grupo protector liposoluble, en lugar de la etapa (7) o además de la etapa (7).
- [0064]** Los oligosacáridos unidos a asparagina que pueden utilizarse en la presente invención pueden ser los que tienen un número deseado de residuos de azúcar. Un oligosacárido unido a asparagina del tipo bifurcado es

especialmente útil, el que tiene al menos seis residuos de azúcar y que no ha sido utilizado convencionalmente. Esta es una característica única de la invención. También es posible utilizar oligosacáridos unidos a asparagina que tienen entre 9 y 11 residuos de azúcar.

5 **[0065]** El oligosacárido unido a una asparagina que debe utilizarse es un disialooligosacárido unido a asparagina o un monosialooligosacárido unido a asparagina en el que el grupo carboxilo de ácido siálico está protegido por un grupo protector seleccionado de un grupo bencilo, alilo o difenilmetilo.

10 **[0066]** En el caso en el que el oligosacárido unido a asparagina es un disialooligosacárido unido a asparagina o un monosialooligosacárido unido a asparagina, existe la posibilidad de que el ácido siálico será escindido con un ácido. Por tanto, en esos oligosacáridos el grupo carboxilo de ácido siálico está protegido por un grupo protector seleccionado de un grupo bencilo, alilo o difenilmetilo.

**[0067]** La reacción para introducir un grupo protector en el grupo carboxilo de ácido siálico puede llevarse a cabo de un modo conocido, por ejemplo, como se expone en "Protective Groups in Organic Chemistry", John Wiley & Sons INC, Nueva York 1991, ISBN 0-471-62301-6.

15 **[0068]** Según la invención, los derivados de ácido siálico son aquellos en los que el grupo hidroxilo enlazado al átomo de carbono en la posición 7, posición 8 o posición 9 del ácido siálico está reemplazado por un átomo de hidrógeno o átomo de halógeno. Ejemplos de átomos de halógeno son el flúor, el cloro, el bromo y similares, entre los que se prefiere el flúor.

20 **[0069]** La transferasa de ácido siálico que debe utilizarse en la presente invención puede ser aquella normalmente disponible en el mercado. Una transferasa adecuada es seleccionada según el tipo de ácido siálico contemplado o derivado de ácido siálico y el modo de enlace. Los ejemplos de transferasas útiles son aquellas derivadas de un recombinante de rata e hígado de rata. Puede utilizarse sialitasa para el ajuste de pH para cambiar el equilibrio y llevar a cabo una reacción de transferencia para el ácido siálico o un derivado del mismo.

25 **[0070]** Los glicopéptidos según la invención son muy útiles en el área de los productos farmacéuticos. Por ejemplo, las vacunas para los cánceres son un ejemplo de aplicación para el desarrollo de fármacos. Se sabe que las células que desarrollan cáncer producen un oligosacárido que no se encuentra en el organismo vivo. También se sabe que cuando está preparado químicamente y se facilita al cuerpo humano como una vacuna, ese oligosacárido inhibe el crecimiento del cáncer. Si se puede producir el glicopéptido deseado según la invención, es posible preparar una vacuna que sea eficaz para el tratamiento del cáncer. El glicopéptido obtenido mediante la invención puede dividirse además en derivados uniendo residuos nuevos de azúcar al mismo a través de combinaciones de reacciones químicas y reacciones de transferasas de azúcar para la preparación de nuevas vacunas.

30

**[0071]** Los glicopéptidos muestran solubilidad superior en agua que los péptidos que no están combinados con oligosacáridos, mientras que son altamente estables cuando están en forma de soluciones acuosas y cuando están presentes en la sangre.

35 **[0072]** El ácido siálico del extremo no reductor, cuando se transforma en derivado, evita la descomposición del oligosacárido por sí mismo, de este modo se proporciona estabilidad mejorada al glicopéptido.

**[0073]** Además, el ácido siálico del extremo no reductor, cuando se transforma en derivado, es un oligosacárido de tipo no natural y que puede, por tanto, ser eficaz para la preparación de vacunas.

#### MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

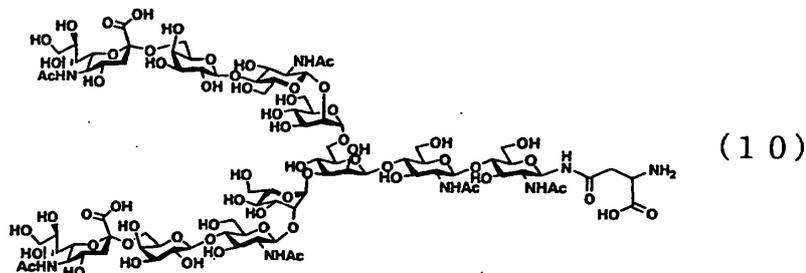
40 **[0074]** La presente invención se describirá a continuación con referencia a los ejemplos, a los que la invención no está limitada.

45 **[0075]** En los siguientes ejemplos se utilizan Fmoc-Val, Fmoc-Leu, Fmoc-Leu-Opfp, Fmoc-Ala, Fmoc-Ala-Opfp, Fmoc-Val-Opfp, Fmoc-Ser(Bzl)-OH y Fmoc-Ser(OtBu) que son sustancias conocidas. Los productos comerciales se utilizan como estas sustancias. Por ejemplo, Opfp en Leu-Opfp significa leucina (Leu) que tiene el grupo carboxilo de la misma protegido por pentafluorofenil (pfp), Ser(Bzl)-OH para serina (Ser) que tiene el hidroxilo de la misma protegido por bencilo (Bzl) y Ser(OtBu)-OH para serina (Ser) que tiene el hidroxilo de la misma protegido por t-butilo (tBu).

Ejemplo de referencia 1

Preparación de un disialooligosacárido unido a asparagina (10)

**[0076]** Una cantidad de 500 mg de SGP (sialilglicopéptido) purificada en términos generales y 10 mg (319  $\mu$ moles) de azida de sodio se disolvió en 25 ml de una disolución amortiguadora de cloruro de calcio ácido tris-clorhídrico (0,05 mol/l de TRIZMA BASE, 0,01 mol/l de cloruro de calcio, pH=7,5). A la solución se le añadió una solución de 50 mg de actinasa E (proteasa, producto fabricado por Kaken Seiyaku) en 5 ml de disolución amortiguadora de cloruro de calcio ácido tris-clorhídrico, seguido de exposición a 37 °C. La solución fue liofilizada 115 horas después. El residuo fue purificado por cromatografía en columna de gel dos veces, ofreciendo 252 mg del producto deseado, es decir, un disialooligosacárido unido a asparagina (10).

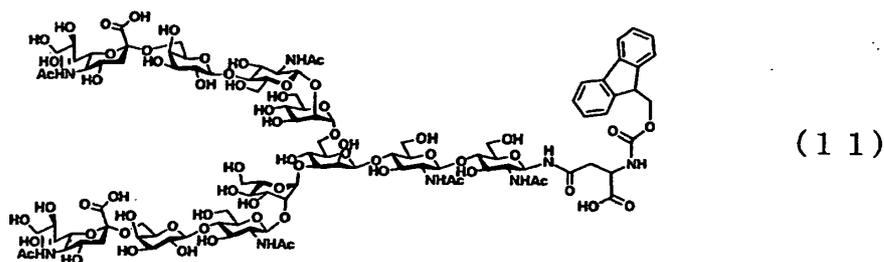


$^1\text{H-NMR}$  (30 °C)  $\delta$ 5,13 (s, 1H, Man4-H-1), 5,07(d, 1H, J=9,5Hz, GlcNAc1-H-1), 4,95(s, 1H, Man4-H-1), 4,77(s, 1H, Man3-H-1), 4,61(d, 1H, J=7,6Hz, GlcNAc2-H-1), 4,60(d, 2H, J=7,6Hz, GlcNAc5, 5'-H-1), 4,44(d, 2H, J=8,0Hz, Ga16, 6-H-1), 4,25(bd, 1H, Man3-H-2), 4,20(bdd, 1H, Man4-H-2), 4,12(bd, 1H, Man4-H-2), 2,94(dd, 1H, J=4,5Hz, 17,2Hz, Asn- $\beta$ CH), 2,85(dd, 1H, J=7,0Hz, 17,2Hz, Asn- $\beta$ CH), 2,67, 2,66(dd, 2H, J=4,6Hz, 12,4Hz, NeuAc7, 7-H-3<sub>eq</sub>), 2,07(s, 3H, Ac), 2,06(s, 6H, Ac $\times$ 2), 2,02(s, 6H, Ac $\times$ 2), 2,01(s, 3H, Ac), 1,71(dd, 2H, J=12,4Hz, 12,4Hz, NeuAc7, 7-H-3<sub>ax</sub>).

15 Ejemplo de referencia 2

Preparación de disialooligosacárido unido a asparagina (11) en el que el nitrógeno de grupo amino de asparagina está protegido por el grupo Fmoc.

**[0077]** Una cantidad de 80 mg (0,034 mmoles) del disialooligosacárido unido a una asparagina obtenido en el Ejemplo de referencia 1 se disolvió en una solución de 2,7 ml de agua destilada y 4,1 ml de acetona, y a la solución se le añadieron 34,7 mg (0,103 mmoles) de 9-fluorenilmetilo-N-succinimidilo carbonato (Fmoc-OSn) y 11,5 mg (0,137 mmoles) de hidrogenocarbonato de sodio. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de reconocer la finalización de la reacción mediante TLC, la solución resultante se concentró al vacío para retirar la acetona. El residuo se aplicó a una columna (columna ODS) rellena con un gen de sílice que tiene un grupo ocatadecilsilano unido al mismo) para la purificación, ofreciendo 60,1 mg del producto deseado, es decir, disialooligosacárido unido a Fmoc-asparagina (11) con un rendimiento del 68%.



14 (18:

$^1\text{H-NMR}$  (30 °C)

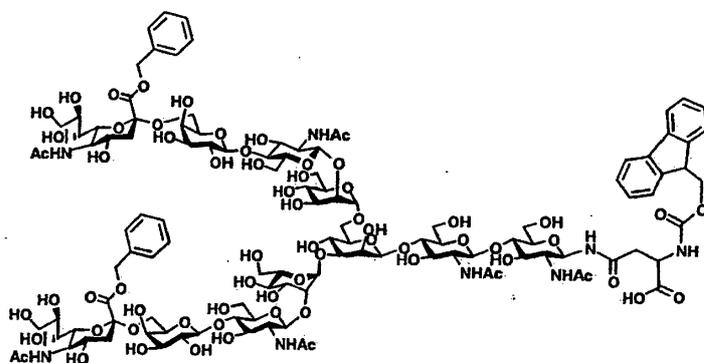
8,01(2H, d, J=7,5Hz, Fmoc), 7,80(2H, d, J=7,5Hz, Fmoc), 7,60(2H, dd, J=7,5Hz, Fmoc), 7,53(2H, dd, J=7,5Hz, Fmoc), 5,23(1H, s, Man4-H<sub>1</sub>), 5,09(1H, d, J=9,4Hz, GlcNAc1-H<sub>1</sub>), 5,04(1H, s, Man4'-H<sub>1</sub>), 4,86(1H, s, Man3-H<sub>1</sub>), 4,70~4,66(m, GlcNAc2-H<sub>1</sub>, GlcNAc5, 5'-H<sub>1</sub>), 4,54(2H, d, J=7,9Hz, Gal6, 6'-H<sub>1</sub>), 4,44(1H, d, FmocCH), 4,34(1H, bd, Man3-H<sub>2</sub>), 4,29, (1H, bd, Man4'-H<sub>2</sub>), 4,20 (1H, bd, Man4-H<sub>2</sub>), 2,77(2H, dd, NeuAc7, 7'-H<sub>3eq</sub>), 2,80(1H, bdd, Asn- $\beta$ CH), 2,62 (1H, bdd, Asn- $\beta$ CH), 2,14(18H, s $\times$ 6, -Ac), 1,80(2H, dd, NeuAc7, 7'-H<sub>3ax</sub>)

Ejemplo de referencia 3

**[0078]** Preparación de un disialooligosacárido unido a una asparagina (12) en el que el nitrógeno del grupo amino de asparagina está protegido por un grupo Fmoc, y el grupo carboxilo de ácido siálico está protegido por el grupo bencilo.

5 **[0079]** Una solución acuosa fría de disialooligosacárido bifurcado unido a Fmoc-asparagina (20 mg) se pasó a través de una columna [Φ0,5 cm × 5 cm] de Dowex-50wx8 (H<sup>+</sup>), y el eluato de la solución acuosa fue liofilizado.

10 **[0080]** El disialooligosacárido bifurcado unido a Fmoc-asparagina obtenido se disolvió en agua fría a 4 °C, una solución acuosa de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,5 mg/ml) se añadió a la solución para obtener un pH ajustado de 5 a 6, y se liofilizó la solución de oligosacárido. La muestra resultante de disialooligosacárido de Fmoc se disolvía en DMF seca (1,3 ml), se añadió bromuro de bencilo (5,1 μl) a la solución, y se agitó la mezcla a temperatura ambiente bajo una corriente de argón durante 45 horas. Después el resultado de la reacción fue reconocido mediante TLC, la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, y se añadieron 10 ml de éter dietílico a la mezcla para separar el producto deseado. El producto se filtró con papel de filtro. Se añadió agua destilada al producto deseado restante, y se obtuvo un filtrado a partir de la mezcla y se concentró posteriormente al vacío. El residuo obtenido fue purificado mediante una columna ODS para obtener 18,2 mg (85% de rendimiento) del producto deseado, es decir, disialooligosacárido unido a Fmoc-asparagina (12).



( 1 2 )

<sup>1</sup>H-NMR (30 °C),

20 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, CH<sub>2</sub>), 5,30(d, 2H, J=11,6 Hz, CH<sub>2</sub>), 5,12(s, 1H, Man4-H<sub>1</sub>), 4,99(d, 1H, J=9,7 Hz, GlcNAc1-H<sub>1</sub>), 4,93(s, 1H, Man4'-H<sub>1</sub>), 4,75(s, 1H, Man3-H<sub>1</sub>), 4,57 (m, 3H, GlcNAc2-H<sub>2</sub>, GlcNAc5, 5' -H<sub>1</sub>), 4,32(d, 2H, Ga16, 6' -H<sub>1</sub>), 4,24(d, 1H, Man3-H<sub>2</sub>), 4,18(d, 1H, Man4' - H<sub>2</sub>), 4,10(1H, d, Man4-H<sub>2</sub>), 2,72(bd, 1H, Asn-βCH), 2,67(dd, 2H,

NeuAc7, 7' -H<sub>3eq</sub>), 2,51(bdd, 1H, Asn-βCH), 2,06(s, 3H, Ac), 2,03, 2,01(cada s, cada 6H, Ac×2), 1,89(s, 3H, Ac), 1,83(2H, dd, J=12,2, 12,2 Hz, NeuAc7, 7' H<sub>3ax</sub>)

HRMS calculado para C<sub>117</sub>H<sub>165</sub>N<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>66</sub> [M+Na<sup>+</sup>] 2783.9597, hallado 2783.9501

25 Ejemplo de referencia 4

**[0081]** El monosialooligosacárido unido a una asparagina se preparó según la solicitud de patente japonesa núm. 2001-185685 (= WO 03/008431).

Ejemplo de referencia 5

Preparación de HOOC-Val-Leu-Leu-Ala-NH<sub>2</sub> (13)

30 I: Introducción en la resina

35 **[0082]** Se colocó resina de Wang (1,6 g) en una columna de síntesis en fase sólida, y se lavó por completo la resina con cloruro de metileno y después con metanol y se secó. Una cantidad de 409,2 mg (1,2 mmoles) de Fmoc-Val y 121,5 mg (0,9 mmoles) de hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt·H<sub>2</sub>O) se disolvieron en 4,5 ml de N,N-dimetilacetamida (DMA), 247,5 mg (1,2 mmoles) de diciclohexilcarbodiimida (DCC) se añadieron a la solución y la mezcla se agitó a 0 °C durante 15 minutos para obtener una solución de aminoácidos. La resina se hinchó con DMF. La solución de aminoácidos se colocó en una columna de síntesis en fase sólida y se agitó a temperatura ambiente durante 17 horas. A continuación, la resina se lavó con cloruro de metileno, después con isopropanol, y a continuación con metanol, y se secó.

**[0083]** La resina secada se hinchó con DMF en una columna, a continuación se añadieron 10 ml de una solución

de 20% piperidina/DMF, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos para eliminar el grupo Fmoc protector y obtener resina-Val-NH<sub>2</sub>. Entonces la resina se lavó con DMF y se secó.

II: Extensión de la cadena peptídica

5 **[0084]** La resina secada (resina-Val-NH<sub>2</sub>) se hinchó con DMF en una columna, 318,6 mg (0,9 mmoles) de Fmoc-Leu y 121,5 mg (0,9 mmoles) de HOBT·H<sub>2</sub>O se añadieron a continuación a la resina, y se añadió más DMF en una cantidad suficiente para sumergir la resina. Con la adición de 138,5  $\mu$ l (0,9 mmoles) de diisopropilcarbodiimida (DIPCDI), la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, la resina se lavó con DMF y se secó.

10 **[0085]** La resina secada se hinchó con DMF en una columna, a continuación se añadieron aproximadamente 10 ml de una solución de 20% piperidina/DMF a la resina, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos para eliminar el grupo Fmoc protector y obtener resina-Val-Leu-NH<sub>2</sub>. A continuación, se lavó la resina con DMF y se secó.

15 **[0086]** La resina secada se hinchó con DMF en una columna, 318,6 mg (0,9 mmoles) de Fmoc-Leu y 121,5 mg (0,9 mmoles) de HOBT – H<sub>2</sub>O se añadieron a la resina, y además se añadió DMF en una cantidad suficiente para sumergir la resina. Con la adición de 138,5  $\mu$ l (0,9 mmoles) de DIPCDI, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después, la resina se lavó con DMF y se secó.

20 La resina secada se hinchó con DMF en una columna, a continuación se añadieron aproximadamente 10 ml de una solución de 20% piperidina/DMF a la resina, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos para eliminar el grupo Fmoc protector y obtener resina-Val-Leu-Leu-NH<sub>2</sub>. A continuación, se lavó la resina con DMF y se secó.

**[0087]** La resina secada se hinchó con DMF en una columna, 293,4 mg (0,9 mmoles) de Fmoc-Ala y 121,5 mg (0,9 mmoles) de HOBT – H<sub>2</sub>O se añadieron a la resina, y además se añadió DMF en una cantidad para sumergir la resina. Con la adición de 138,5  $\mu$ l (0,9 mmoles) de DIPCDI, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después, la resina fue lavada con DMF y secada.

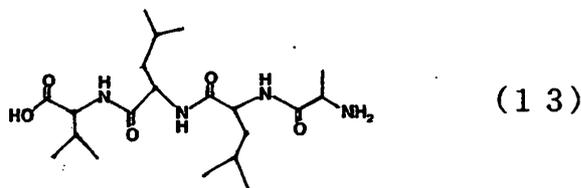
25 **[0088]** La resina secada se hinchó con DMF en una columna, a continuación se añadieron aproximadamente 10 ml de una solución de 20% piperidina/DMF a la resina, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos para obtener resina-Val-Leu-Leu-Ala-NH<sub>2</sub> eliminando el grupo Fmoc protector. A continuación, se lavó la resina con DMF y se secó.

III: Separación de la resina

30 Preparación de HOOC-Val-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>

**[0089]** Un 5% de solución acuosa de TFA se añadió a la resina secada, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación la solución se transfirió a un frasco en forma de huevo y se añadió éter de dietílico a la solución con el frasco colocado en hielo para precipitar el producto deseado, seguido de filtración. <sup>1</sup>H-NMR (30 °C)

35 8,56(1H, d, J=6,5Hz, Leu-2NH), 8,42(1H, d, J=7,4Hz, Leu-1NH), 8,25(1H, d, J=8,3Hz, Val NH), 4,34(1H, d, J=6,7Hz, Val- $\alpha$ ), 4,16(1H, d, J=7.1Hz, Ala- $\alpha$ ), 2,27(1H, ddd, Val- $\beta$ ), 1,69~1,58(m, 11H, Leu-1, Leu-2), 1,59(3H, d, J=7,2Hz, Ala- $\beta$ ), 1,01~0,96(m, 25H, Leu-1, Leu-2, Val)



### Ejemplo 1

40 **[0090]** La resina (17 mg) en forma de resina -Val-Leu-Leu-Ala-NH<sub>2</sub> seca preparada en el Ejemplo de referencia 4 y antes de la separación de la fase sólida se coloca en un tubo Eppen. Una cantidad de 35 mg (14,8 moles) de disialooligosacárido unido a Dibencil-Fmoc-asparagina (12) obtenido en el Ejemplo de referencia 3 y 0,64 mg (2,7  $\mu$ moles) de hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,3,3-tetrametiluronio (HATU) se añadieron a la resina, y se añadieron 150 ml de DMF. Con la adición de 0,31  $\mu$ l de diisopropiletamina (DIPEA), la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla resultante se lavó a continuación con DMF y se secó.

**[0091]** La resina secada se hinchó con DMF en un tubo Eppen, a continuación se añadió aproximadamente 1 ml de una solución de 20% piperidina/DMF a la resina, después se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos para eliminar el grupo Fmoc protector y obtener resina-Val-Leu-Leu-Ala-Asn(oligo)-NH<sub>2</sub>. A continuación, se lavó la resina con DMF y se secó. La Asn(oligo) mencionada representa un disialooligosacárido unido a dibencil-asparaginal obtenido al retirar el grupo Fmoc del disialooligosacárido unido a dibencil-Fmoc-asparagina, (12) obtenido en el Ejemplo de referencia 3.

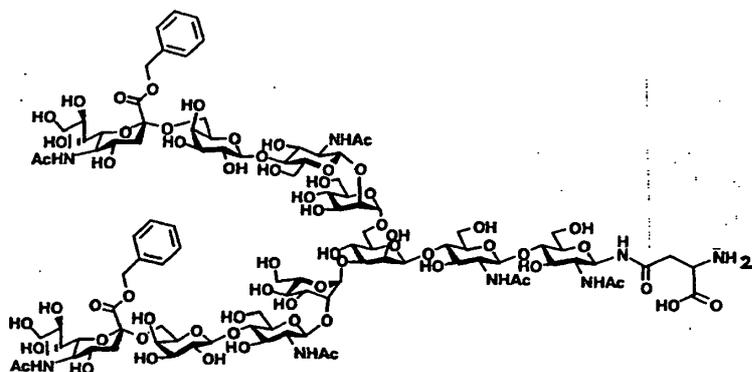
(Separación de la fase sólida)

Preparación de HOOC-Val-Leu-Leu-Ala-Asn(oligo)-NH<sub>2</sub>

**[0092]** Una solución acuosa (95%) de ácido trifluoroacético (TFA) se añadió a la resina secada anterior, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación, la solución se transfirió a un tubo Eppen, se añadió éter dietílico a la solución con el tubo colocado en hielo para precipitar el producto deseado. El precipitado fue disuelto en 0,1% de solución acuosa de TFA, y la solución fue purificada por cromatografía en columna en fase reversa.

(YMC-Pack ODS-A 250 × 3,0 mm, caudal 0,45 ml/min, solventes de desarrollo A: solución acuosa TFA 0,1%, B: acetonitrilo TFA 0,1%:agua=90:10, gradiente sólo A 10 min, A100% → B100% 30 min).

**[0093]** La estructura de Asn(oligo) se muestra a continuación.



(14)

<sup>1</sup>H-NMR(30 °C)

7,59~7,55(m, 10H, Bn), 5,45(4H, dd, Bn-CH<sub>2</sub>×2), 5,23(1H, s, Man4-H<sub>1</sub>), 5,15(1H, d, GlcNAc1-H<sub>1</sub>), 5,03(1H, s, Man4'-H<sub>1</sub>), 4,87(1H, s, Man3-H<sub>1</sub>), 4,67(3H, d, GlcNAc2-H<sub>1</sub>, GlcNAc5, 5'-H<sub>1</sub>), 4,42(2H, d, Gal6, 6'-H<sub>1</sub>), 4,34(1H, d, Man3-H<sub>2</sub>), 4,28(1H, d, Man4'-H<sub>2</sub>), 4,20(1H, d, Man4-H<sub>2</sub>), 2,82(2H, dd, J=6,68Hz, NeuAc7, 7'-H<sub>3eq</sub>), 2,65(1H, dd, J=16,69Hz, 6,83Hz, Asn-βCH), 2,13(18H, s×6, -Ac), 1,94(2H, dd, J=12,24Hz, NeuAc7, 7'-H<sub>3ax</sub>), 1,41~1,26(m, 25H, Leu-1, Leu-2, Val)

## Ejemplo 2

Preparación de HOOC-Ser-Ser-Asn(oligo)-NH<sub>2</sub>

I: Introducción en la resina

**[0094]** La resina PEGA (50 mg) se colocó en una columna de síntesis en fase sólida y se lavó concienzudamente con cloruro de metileno y después con metanol y se secó.

**[0095]** Una cantidad de 80 mg (180 μmoles) de Fmoc-Ser(Bzl)-OH y 19 mg de HOBt·H<sub>2</sub>O se disolvió en 10 ml de DMF, 37 mg (180 μmoles) de DCC se añadieron a la solución y la mezcla se agitó a 0 °C durante 15 minutos para obtener una solución de aminoácidos. Una resina se hinchó con DMF. La solución de aminoácidos se colocó en una columna de síntesis en fase sólida, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 17 horas. A continuación, la resina se lavó con cloruro de metileno, después con isopropanol y acto seguido con metanol y se secó.

La resina secada se hinchó con DMF en una columna, a continuación se añadieron aproximadamente 2,0 ml de una solución de 20% piperidina/DMF a la resina, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos para retirar el grupo Fmoc protector y obtener la resina-Ser-NH<sub>2</sub>. La resina se lavó entonces con isopropanol y DMF y se secó.

## II: Extensión de la cadena peptídica

5 **[0096]** La resina secada se hinchó con DMF en una columna, 40,0 mg (89,8  $\mu$ moles) de Fmoc-Ser(Bz1)-OH y 12 mg (89,8  $\mu$ moles) de HOBt-H<sub>2</sub>O se añadieron entonces a la resina y además se añadieron 2,0 ml de DMF. Con la adición de 14  $\mu$ l (89,8  $\mu$ moles) de DIPCDI, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, la resina se lavó con DMF y se secó.

**[0097]** La resina secada se hinchó con DMF en una columna, a continuación se añadieron aproximadamente 2,0 ml de una solución de 20% piperidina/DMF a la resina, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos para retirar el grupo Fmoc protector y obtener resina-Ser-Ser-NH<sub>2</sub>. La resina se lavó entonces con isopropanol y DMF y se secó.

10 **[0098]** La resina secada se hinchó con dimetil sulfóxido (DMSO) en una columna, 13,5 mg (5,7  $\mu$ moles) de disialooligosacárido unido a Dibencil-Fmoc-asparagina obtenido en el Ejemplo de referencia 3, como disuelto en DMF, se transfirió a la columna. A la mezcla se le añadieron 1,6 mg (6,8  $\mu$ moles) de HATU y 0,83  $\mu$ l de DIPEA, y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La resina se lavó a continuación con isopropanol y DMF y se secó.

15 **[0099]** La resina secada se hinchó en un tubo Eppen, aproximadamente 1 ml de una solución de 20% piperidina/DMF se añadió a continuación a la resina, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos para retirar el grupo Fmoc protector y obtener resina-Val-Ser-Ser-Asn(oligo)-NH<sub>2</sub>. La resina se lavó entonces con DMF y se secó. La Asn(oligo) anterior era la misma que la del Ejemplo 1.

## III: Separación de la fase sólida

20 **[0100]** Una solución acuosa de TFA 95% se añadió a la resina secada, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía en columna en fase reversa. (YMC-Pack ODS-A 250  $\times$  3,0 mm, caudal 0,35 ml/min, solventes de desarrollo A: solución acuosa TFA 0,1%, B: acetonitrilo TFA 0,1%:agua=90:10, gradiente A 100%  $\rightarrow$  B 100% 120 min). <sup>1</sup>H - NMR (30 °C)

25 7,60~7,45(m, 20H, Bn), 5,35 (4H, dd, J=11,8Hz, Bn-CH<sub>2</sub>-), 5,21(1H, s, Man4-H<sub>1</sub>), 5,13(1H, d, J=9,2Hz, GlcNAc1-H<sub>1</sub>), 5,03 (1H, s, Man4' -H<sub>1</sub>), 4,34(1H, d, Man3-H<sub>2</sub>), 4,28(1H, d, Man4' -H<sub>2</sub>), 4,20(1H, d, Man4-H<sub>2</sub>), 2,82(2H, dd, J=6,68Hz, NeuAc7, 7' -H<sub>3eq</sub>), 2,13(18H, s $\times$ 6, -Ac), 1,93(2H, dd, J=12,24Hz, NeuAc7, 7' -H<sub>3ax</sub>)

**Ejemplo 3**

Preparación de HOOC-Ser-Ser-Asn(disialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>

30 **[0101]** La Asn(disialooligo) en el glicopéptido deseado anteriormente mencionado se refiere a un disialooligoasparagina que tiene ácido siálico que no está protegido por el grupo bencilo.

**[0102]** En una columna de síntesis en fase sólida se colocaron 50 mg de resina HMPA-PEGA, que se lavó concienzudamente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y DMF.

35 **[0103]** Fmoc-Ser(OtBu)-OH, 1-mesitilenesulfonil-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) y N-metilimidazol se disolvieron en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y la solución se agitó durante 5 minutos y después se colocó en la columna de síntesis en fase sólida que contenía la resina, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. La resina se lavó entonces con cloruro de metileno, isopropanol y DMF y se secó. El grupo ? amino que no reaccionó en la fase sólida se acetiló a continuación empleando una solución de 20% DMF de anhídrido acético durante 20 minutos para recubrimiento. La resina se lavó con DMF y se agitó junto con una solución de 20% piperidina/DMF durante 20 minutos para eliminar el grupo Fmoc protector, a través de lo que se obtuvo resina-Ser-NH<sub>2</sub>. El producto se lavó con DMF y se secó.

40 **[0104]** Después, Fmoc-Ser(OtBu)-OH se utilizó con HOBt-H<sub>2</sub>O y DIPCDI para la condensación.

45 **[0105]** Con posterioridad, el disialooligosacárido unido a Dibencil-Fmoc-asparagina (12) obtenido en el Ejemplo de referencia 3 se disolvió en una mezcla de solvente 1:1 de DMSO y DMF, y la solución, HATU y DIPEA se agitaron a temperatura ambiente durante 24 horas para la condensación. La resina resultante se lavó con DMF y a continuación se agitó junto con 10% anhídrido acético/2-propanol:metanol=: durante 20 minutos para recubrimiento. La resina se lavó con 2-propanol y DMF, y después se agitó junto con 20% piperidina/DMF durante 20 minutos para eliminar el grupo Fmoc protector. La resina se lavó con DMF.

50 **[0106]** La resina resultante y la valina (Val), leucina (Leu), leucina (Leu) y alanina (Ala) se sometieron de modo similar a condensación, seguido de extracción del grupo Fmoc protector para obtener resina-Ser-Ser-Asn(dibencildisialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>. La Asn(dibencildisialooligo) mencionada se refiere a un

disialooligoasparagina que tiene ácido siálico protegido por el grupo bencilo.

[0107] Utilizados como los aminoácidos de valina (Val), leucina (Leu) y alanina (Ala) fueron cada uno de los Fmoc-AA-Opfp (AA: aminoácido) donde el grupo carboxilo era esterificado con pfp, y 3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriacín-3-il (Dhbt) se utilizó para la condensación. Todas las reacciones de condensación se llevaron a cabo en una solución de DMF.

[0108] La resina resultante de la condensación se secó concienzudamente, y después se agitó junto con una solución acuosa de TFA 95% a temperatura ambiente durante tres horas para aislar la resina. La resina fue filtrada. La mezcla de reacción se concentró al vacío a temperatura ambiente, a continuación se disolvió en agua y se liofilizó. El producto resultante se disolvió en una solución acuosa de hidróxido de sodio que tiene un pH de 11 para hidrolizar el éster bencilo para la extracción del grupo bencilo, seguido de neutralización con ácido acético. El producto se liofilizó como estaba y se purificó mediante HPLC para obtener el producto deseado, es decir, HOOC-Ser-Ser-Asn(disialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>.

[0109] (YMC-Pack ODS-A 250 × 3,0 mm, solventes de desarrollo A: solución acuosa de TFA 0,1%, B: acetonitrilo TFA 0,1%:agua=90:10, gradiente A 100% 0,35 ml/min → B 100% 0,40 ml/min 90 min, caudal de 0,35 ml/min a 0,40 ml/min).

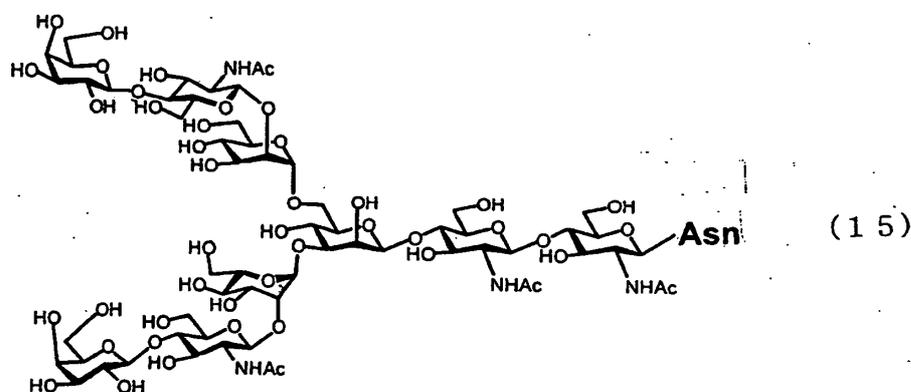
<sup>1</sup>H-NMR (30 °C)

δ 5,22(s, 1H, Man4-H1), 5,11(d, 1H, GlcNAc1-H1), 5,04(s, 1H, Man4' -H1), 4,86(1H, Asnα), 4,70(bd, 3H, GlcNAc2, 5, 5' -H1), 4,62-4,57(m, 2H, Serα×2), 4,53(d, 2H, Gal6, 6' -H1), 4,52-4,48(m, 2H, Leu α×2), 4,34(bs, 1H, Man3-H2), 4,28(bs, 1H, Man4-H2), 4,21-4,15(m, 3H, Man4' -H2, Val α, Ala α), 2,98(dd, 1H, Asn β), 2,86(dd, 1H, Asn β), 2,75(bdd, 2H, NeuAc7, 7' -H3eq), 2,16-2,10(Ac×6, Val β), 1,82(dd, 2H, NeuAc7, 7' -H3ax), 1,76-1,68(bd, 6H, LeuβCH<sub>2</sub>×2, Leu γ CH×2), 1,60(d, 3H, Ala β CH<sub>3</sub>), 1,03-0,97(m, 18H, Leu-CH<sub>3</sub>×4, Val-CH<sub>3</sub> ×2)

#### Ejemplo 4

Preparación de HOOC-Ser-Ser-Asn(disialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-Asn(asialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>

[0110] La Asn(asialooligo) en el glicopéptido deseado es un oligosacárido unido a una asparagina mostrado a continuación.



[0111] La resina-Ser-Ser-Asn(dibencildisialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-NH<sub>2</sub> antes de ser separada de la fase sólida, y Asn(asialooligo), valina (Val), leucina (Leu), leucina (Leu) y alanina (Ala), se sometieron a condensación. La cadena peptídica resultante se escindió de la fase sólida del mismo modo que en el Ejemplo 3, seguido de eliminación del grupo bencilo, ofreciendo un glicopéptido en la forma de HOOC-Ser-Ser-Asn(disialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-Asn(asialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>.

[0112] Utilizados como los aminoácidos de valina (Val), leucina (Leu) y alanina (Ala) fueron cada uno de los Fmoc-AA-Opfp (AA: aminoácido) donde el grupo carboxilo era esterificado con pfp, y 3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriacín-3-il (Dhbt) se utilizó para la condensación. Todas las reacciones de condensación se llevaron a cabo en una solución de DMF. La resina resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos con la adición de una solución de 20% piperidina/DMF para retirar el grupo Fmoc protector.

[0113] Después de la introducción del aminoácido (Val) para posicionarlo después del oligosacárido unido a una asparagina, se utilizó una solución 1:1=20% anhídrido acético/2-propanol:metanol para recubrimiento el grupo amino no reaccionado del oligosacárido unido a una asparagina y después se retiró el grupo Fmoc protector. La resina se lavó con isopropanol y DMF y se secó. La condensación del asialooligosacárido unido a Fmoc-

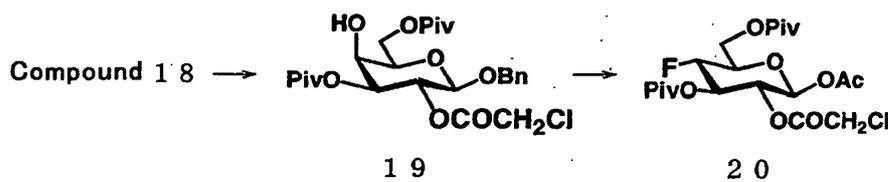


reconociera la finalización de la reacción mediante TLC (hexano: acetato de etilo=1:1), la mezcla de reacción se vertió en una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio, seguido de extracción con cloruro de metileno. La superficie de cloruro de metileno se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, después se filtró y concentró al vacío. El residuo se secó en un desecador, a continuación se disolvió en metanol destilado (80 ml), se añadió metóxido de sodio (431 mg, 5,5 mmoles) a la solución, y la mezcla se agitó con corriente de argón. Después de reconocer la finalización de la reacción mediante TLC (acetato de etilo:metanol:agua=10:5:1), la mezcla de reacción se neutralizó con una resina de intercambio de cationes IR-120(+) para terminar la reacción. La resina se filtró para la extracción, y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se secó en un desecador, a continuación se disolvió en piridina (44 ml) y la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C. El cloruro de pivaloil (4,6 g, 38,5 mmoles) se añadió a la mezcla de reacción, y la mezcla se devolvió a temperatura ambiente y se agitó bajo corriente de argón durante 1 hora. Después de reconocer la finalización de la reacción mediante TLC (hexano:acetato de etilo=2:1), la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, y a continuación se añadió metanol a la mezcla para terminar la reacción. La mezcla de reacción se concentró puesto que estaba al vacío, entonces se disolvió el residuo en acetato de etilo, la solución se lavó con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio y agua, y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro para evaporar el acetato de etilo. Después de retirar el sulfato de magnesio por filtración, el filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (solvente de desarrollo: hexano:acetato de etilo=2:1), ofreciendo el compuesto (18) (2,8 g, 58% de rendimiento).

Ejemplo de referencia 8

Preparación de bencilo 2-O-cloroacetilo-4-deoxi-5-fluoro-3,6-di-o-pivaloil-β-D-glucapiranosida (20)

[0120]



(1) Preparación de 2-O-cloroacetilo-3,6-di-O-pivaloil-β-D-glucapiranosida (20)

[0121] El compuesto (18) (200 mg, 0,455 mmoles) se disolvió en diclorometano (7,8 ml) y piridina (1,3 ml), se añadió anhídrido cloroacético (155 mg, 0,91 mmoles) a la solución, y la mezcla se hizo reaccionar mediante agitación a -15 °C bajo corriente de argón durante 15 minutos. Después de reconocer la finalización de la reacción, el anhídrido cloroacético fue desactivado con metanol (5 ml) y la mezcla de reacción se hirvió azeotrópicamente con tolueno tres veces para la concentración al vacío. El residuo se extrajo con acetato de etilo, y el extracto se lavó con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio. La superficie orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, seguido de filtración y concentración. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo:hexano=1:4), ofreciendo el compuesto (19) (en una cantidad de 172 mg, 73,5% de rendimiento).

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  7,37-7,29(m, 5H, Ph), 5,39(dd, 1H,  $J_{1,2}=8,0\text{Hz}$ ,  $J_{2,3}=10,4\text{Hz}$ , H-2), 4,89(dd, 1H,  $J_{3,4}=3,4\text{Hz}$ , H-3), 4,89, 4,62(2d, 2H,  $J=12,5\text{Hz}$ ,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 4,53 (d, 1H, H-1), 4,37 (dd, 1H,  $J_{6a,6b}=11,5\text{Hz}$ ,  $J_{6a,5}=6,0\text{Hz}$ , H-6a), 4,32(dd, 1H,  $J_{6b,5}=6,6\text{Hz}$ , H-6b), 4,00(m, 1H, H-4), 3,92(s, 2H,  $\text{COCH}_2\text{Cl}$ ), 3,75(dd, 1H, H-5), 1,23, 1,19 [2s, 18H,  $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ]

$^{13}\text{C-NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$  178,33, 177,57, 165,92, (C=O), 136,66, 128,48, 128,07, 127,89(Ph), 99,16(C-1), 72,82(C-3), 72,35(C-5), 70,92(C-2), 70,49( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 67,29(C-4), 62,30(C-6), 40,40( $\text{COCH}_2\text{Cl}$ ), 38,95, 38,80 ( $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ ), 27,14, 26,98 ( $\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ )

[0122]  $^1\text{H-NMR}$  y  $^{13}\text{C-NMR}$  se midieron mediante AVANCE 400 de Bruker (mencionado como 400 MHz). Cuando el solvente era deuteriocloroformo, se utilizaba trimetilsilano como estándar interno. Cuando se utilizaban otros solventes deuterados, el pico del solvente se utilizaba como referencia. Los desplazamientos químicos se indicaron con  $\delta$  (ppm) y las constantes de acoplamiento con J (Hz). Se utilizaban para la cromatografía en gel de sílice: el Silicage Merck 160, 70-230 malla 70-230 o 230-400 malla y gel de sílice esférica que era el Silica Gel 60 (Esférica), producto de Kanto Chemical Co., Ltd. Para detectar reacciones (para TLC) se utilizó DC-Platten Kieselgel 60 F254 (Artl, 05715), producto de E. Merk. Las columnas utilizadas para cromatografía de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés) fueron la columna preparada COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR [ $\Phi 4,6 \times 150$  mm], producto de Nakaraitesuku Co., Ltd. El espectrofotofluorómetro utilizado fue el espectrofluorómetro FP-210,



compuesto (21) en diclorometano (1ml) se añadió gota a gota a la mezcla a 0 °C. La desaparición del material se confirmó mediante TLC y la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano. La superficie orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio, solución acuosa de cloruro de sodio y agua, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y después se concentró. El residuo además se secó con una bomba de vacío, y después se disolvió en benceno (1 ml). Se añadieron azida de sodio (13 mg, 0,206 mmoles) y cloruro de tetraamonio (57 mg, 0,206 mmoles) a la solución bajo corriente de argón a temperatura ambiente y se hizo reaccionar la mezcla a 40 °C. La desaparición del material se confirmó mediante TLC y la mezcla de reacción se concentró a continuación al vacío. El residuo se sometió a la extracción con acetato de etilo, y el extracto se lavó con una solución acuosa de cloruro de sodio saturado y agua, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y después se concentró. El residuo fue purificado mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo:hexano=1:4), ofreciendo el compuesto (22) (en una cantidad de 30,4 mg, 95% de rendimiento).

<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ 7,39-7,32(m, 5H, Ph), 4,99(ddd, 1H, J<sub>3, F</sub>=13,18Hz, J<sub>3, 4</sub>=9,27Hz, J<sub>2, 3</sub>=3,87Hz, H-3), 4,93(d, 1H, J=12,07Hz, OCH<sub>2</sub>Ph), 4,67(d, 1H, J<sub>1, 2</sub>=1,18Hz, H-1), 4,63(d, 1H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4,51(ddd, 1H, J<sub>6a, 6b</sub>=11,95Hz, J<sub>6a, 5</sub>=2,54Hz, J<sub>6a, F</sub>=2,08Hz, H-6a), 4,23(ddd, 1H, J<sub>6b, 5</sub>=6,14Hz, J<sub>6b, F</sub>=1,14Hz, H-6b), 4,08(m, 1H, H-2), 3,64(m, 1H, H-5), 1,26 [2s, 18H, OCOC (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]

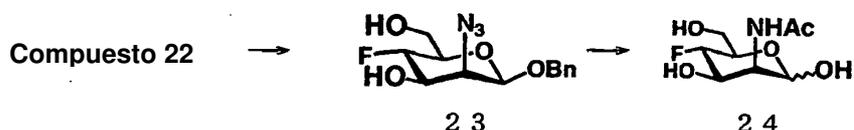
<sup>13</sup>C-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ 178,01, 177,68(C=O), 136,06, 128,63, 128,31, 128,14(Ph), 97,25(C-1), 85,51(d, J<sub>4, F</sub>=183,97, C-4), 72,01(d, J<sub>5, F</sub>=23,89, C-5), 71,73(d, J<sub>3, F</sub>=18,98, C-3)  
70,57(OCH<sub>2</sub>Ph), 62,42(C-2, C-6), 39,08, 38,90 (OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27,18, 26,95 [OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]

Ejemplo de referencia 10

Preparación de N-Acetil-4-deoxi-4-fluoro-D-mannosamina 24

[0127]



(1) Preparación de Bencilo 2-azida-2,4-dideoxi-4-fluoro-β-D-mannopiranosida (23)

[0128] El compuesto (22) (180 mg, 0,387 mmoles) se disolvió en metanol (8 ml), se añadió metóxido de sodio (922 mg, 9,67 mmoles) a la solución y la mezcla se hizo reaccionar con agitación a 40 °C. El TLC reveló 4,5 horas después que la mezcla de reacción recogida en un punto y la mezcla se neutralizó con una resina de intercambio de cationes IR-120(+) seguido de filtración y concentración. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo:hexano=1:1), ofreciendo el compuesto (23) (en una cantidad de 105,3 mg, 91,6% de rendimiento).

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ 7,40-7,31(m, 5H, Ph), 4,96(d, 1H, J=12,13Hz, OCH<sub>2</sub>Ph), 4,71(d, 1H, J<sub>1, 2</sub>=1,33Hz, H-1), 4,69(d, 1H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4,49(ddd, 1H, J<sub>4, F</sub>=51,06Hz, J<sub>4, 5</sub>=9,19Hz, J<sub>3, 4</sub>=9,20Hz, H-4), 4,02(m, 1H, H-2), 3,93(dddd, 1H, J<sub>6a, 6b</sub>=12,19Hz, J<sub>6a, 5</sub>=2,31Hz, J<sub>6a, F</sub>=2,32Hz, J<sub>6a, OH</sub>=6,20Hz, H-6a), 3,89-3,77(m, 2H, H-3, H-6b), 3,39(m, 1H, H-5)

<sup>13</sup>C-NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>)

δ 136,39, 128,62, 128,24, 127,83(Ph), 98,63(C-1), 88,19(d, J<sub>4, F</sub>=178,91Hz, C-4), 73,95(d, J<sub>5, F</sub>=25,48Hz, C-5), 71,18 (OCH<sub>2</sub>Ph), 71,16(d, J<sub>3, F</sub>=19,69Hz, C-3), 64,48(d, J<sub>2, F</sub>=8,42Hz, C-2), 61,39(C-6)

(2) Preparación de N-Acetil-4-deoxi-4-fluoro-D-mannosamina (24)

[0129] El compuesto (23) (105 mg, 0,353 mmoles) se disolvió en metanol (7 ml), se añadió anhídrido acético (333 μl, 3,53 moles) a la solución, a continuación se añadió una cantidad catalítica del 10% Pd/C a la mezcla y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente después de reemplazar la atmosfera en el reactor con hidrógeno. El TLC indicó la desaparición del material 2 horas después, seguido de filtración con carbono activado y concentración. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo:metanol=5,1), ofreciendo el compuesto (24) (en una cantidad de 57 mg, 72% de rendimiento).

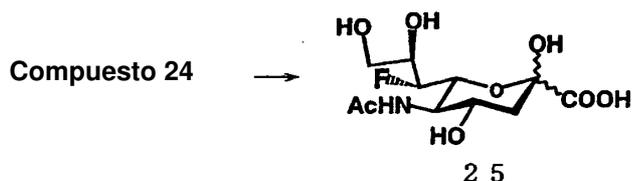
<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, D<sub>2</sub>O)

δ 5,23(dd, 1H, J<sub>1,2</sub>=2,69Hz, J<sub>1,F</sub>=1,44Hz, H-1-α), 4,65(ddd, 1H, J<sub>4,F</sub>=50,94Hz, J<sub>3,4</sub>=9,06Hz, J<sub>4,5</sub>=9,58Hz, H-4-α), 4,47(m, 1H, H-2-α), 4,43(ddd, 1H, J<sub>3,F</sub>=14,28Hz, J<sub>2,3</sub>=4,9Hz, H-3-α), 4,16(m, 1H, H-5-α), 3,95(m, 2H, H-6a-α, H-6b-α), 2,14(s, 3H, NHCOCH<sub>3</sub>-α) <sup>13</sup>C-NMR(400MHz, D<sub>2</sub>O)

- 5 δ 175,27 (C=O-α), 93,46(C-1-α), 88,30(d, J<sub>4,F</sub>=177,00Hz, C-4-α), 69,91(d, J<sub>5,F</sub>=24,41Hz, C-5-α), 67,60(d, J<sub>3,F</sub>=18,74Hz, C-3-α), 60,36(C-6), 54,12(d, J<sub>2,F</sub>=8,68Hz, C-2-α), 22,31(NHCOCH<sub>3</sub>-α) Ejemplo de referencia 11

Preparación de ácido 5-Acetamido-3,5,7-trideoxi-7-fluoro-D-glicero-β-D-galacto-2-nonulopiranosidónico (25)

[0130]



- 10 [0131] El compuesto (24) (50 mg, 0,224 mmoles), el piruvato de sodio (123 mg, 1,12 mmoles) y la albumina de suero bovino (5 mg) se disolvieron en una solución amortiguadora de fosfato de sodio (100mM, pH 7,5, 3,4 ml) y a continuación se añadió sialato de aldolasa a la solución para empezar una reacción a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se liofilizó 24 horas después. El producto se disolvió en una pequeña cantidad de agua y se aplicó a una columna de resina de intercambio de aniones (AG 1-X8, 200-400 malla, forma de formiato).  
15 Después de pasar 300 ml de agua a través de la columna, el producto deseado se eluyó con 1M de ácido fórmico, y el eluato se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante una columna de filtración de gel (Sephadex G-15, agua), ofreciendo el compuesto (25) (en una cantidad de 40 mg, 58,9% de rendimiento). <sup>1</sup>H-NMR(400MHz, D<sub>2</sub>O) δ 4,61(dd, 1H, J<sub>7,8</sub>=8,97Hz, J<sub>7,F</sub>=45,56Hz, H-7), 4,18 (dd, 1H, J<sub>5,6</sub>=10,63Hz, J<sub>6,F</sub>=29,86Hz, H-6), 4,15(m, 1H, H-4), 4,07(m, 1H, H-8), 4,02(dd, 1H, J<sub>4,5</sub>=10,10Hz, H-5), 3,90 (ddd, 1H, J<sub>9a9b</sub>=12,18Hz, J<sub>9a,8</sub>=2,77Hz, J<sub>9a,F</sub>=2,86Hz, H-9a), 3,76(ddd, 1H, J<sub>9b,8</sub>=5,33Hz, J<sub>9b,F</sub>=2,06Hz, H-9b), 2,40(dd, 1H, J<sub>3eq,3ax</sub>=13,00, J<sub>3eq,4</sub>=4,88Hz, H-3eq), 2,15(s, 3H, OCOCH<sub>3</sub>), 2,00(dd, 1H, J<sub>3ax,4</sub>=11,70Hz, H-3ax)

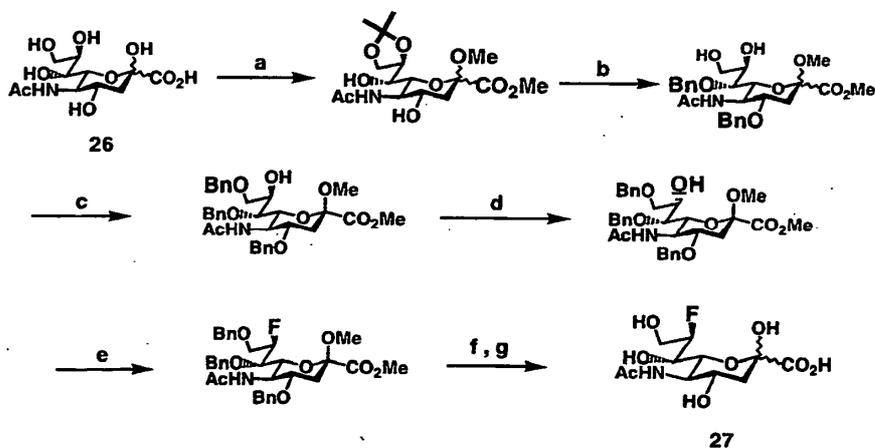
<sup>13</sup>C-NMR(400MHz, D<sub>2</sub>O)

δ 175,17, 173,68(C=O), 96,01(C-1), 89,12(d, J<sub>7,F</sub>=179,23Hz, C-7), 69,67 (d, J<sub>6,F</sub>=17,41Hz, C-6), 68,31(d, J<sub>8,F</sub>=26,50Hz, C-8), 67,26(C-4), 62,70(C-6), 52,17(C-5), 39,19(C-3), 22,61(NHCOCH<sub>3</sub>) Ejemplo de referencia 12

- 25 Preparación de ácido 5-Acetamido-3,5,8-fluoro-D-glicero-β-D-galacto-2-nonulopiranosidónico (27)

El ácido de 5-Acetamido-3,5,8-trideoxi-8-fluoro-D-glicero-β-D-galacto-2-nonulopiranosidónico (27) se preparó a partir de ácido siálico (26) según el esquema presentado a continuación.

[0132]



- 30 (a) (1) Dowex 50-X8, dist. MeOH, (2) Acetona dimetil acetal, ácido sulfónico canfor, MeCN, rendimiento=73%;

(b) (1) BaO, Ba(OH)<sub>2</sub>, BnBr, DMF, (2) CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>, (3) 60% AcOH, rendimiento=61,8%;

(c) (1) Óxido de dibutilestaño, tolueno : MeOH=5:1, (2) bromuro de amonio tetra-n-butil, BnBr, tolueno, rendimiento=74,3%;

(d) (1) DMSO, cloruro de oxalil, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (2) BH<sub>3</sub>NH<sub>3</sub>, MeOH, rendimiento=73,2%;

5 (e) DAST, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rendimiento=29,8%;

(f) Pd/C, AcOH, rendimiento=74,2%;

(g) (1) 0,3N NaOH, (2) Amberlyst 15H(+), 0,016N HCl, rendimiento=72,6%

(a)

10 (1) El ácido siálico (26) (1,02 g, 3,31 mmoles) se disolvió en metanol destilado (150 ml), una resina de intercambio de cationes, DOWex 50W-X8, (2,0 g) se añadió a la solución y la mezcla se refluxo con calentamiento durante 24 horas para la reacción. El punto final de la reacción se confirmó sometiendo una porción de la mezcla de reacción a espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR). La mezcla de reacción se filtró y se añadió de nuevo metanol (100 ml) a la resina, seguido de agitación durante 1 hora para recoger el compuesto absorbido por la resina. La solución resultante se filtró de nuevo y el filtrado se combinó con el filtrado obtenido primero y el filtrado combinado se concentró al vacío para obtener un compuesto.

15 (2) El compuesto (5,05 g, 14,97 mmoles) obtenido anteriormente se disolvió en acetona destilada y se añadió ácido canforsulfónico (498 mg, 2,14 mmoles) a la solución con agitación bajo corriente de argón a temperatura ambiente. Acetona dimetil acetal (2,75 ml, 22,36 mmoles) se añadió a continuación gota a gota en pequeñas porciones a la mezcla para llevar a cabo una reacción durante 30 minutos. Después de confirmar la finalización de la reacción, se terminó la reacción añadiendo trietilamina (2 ml) y la mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo:metanol=20:1) para obtener un derivado de acetónido ( $\alpha$ : $\beta$ =1:10, 5,29 g de rendimiento).

25 (b)

(1) El derivado de acetónido (3,2 g, 8,48 mmoles) obtenido anteriormente se disolvió en N,N-dimetilformamida (43 ml) y se añadió óxido de bario (9,3 g, 60,65 mmoles) y octahidrato de hidróxido de bario (2,4 g, 7,61 mmoles) a la solución. Posteriormente, la mezcla se agitó a temperatura ambiente, con bromuro de bencilo (10 ml, 84,1 mmoles) añadido a la misma. Después de confirmarse la desaparición del material mediante TLC, la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y se lavó con una solución acuosa de ácido fórmico 1% y agua, y la superficie orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El sulfato de magnesio se filtró y la superficie orgánica se concentró al vacío.

30 (2) El residuo se disolvió en una mezcla de solvente de etanol (25 ml) y benceno (50 ml), y una solución de diazometano (42,5 mmoles) en eter se añadió a la solución. El diazometano utilizado se produjo mediante la adición de amida de p-toluenosulfonil-N-nitroso a una solución de mezcla de éter y etanol, y la adición de un 50% de hidróxido de potasio gota a gota a la mezcla. Después de añadir el diazometano, se hizo reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de confirmar la desaparición del material mediante TLC, un exceso de diazometano se desactivó con ácido acético (12 ml), seguido directamente de la concentración al vacío.

35 (3) Posteriormente, el residuo se disolvió en una solución acuosa de ácido acético 60%, seguido por una reacción a 60 °C durante 12 horas. Después de confirmar la desaparición del material mediante TLC, la mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo:metanol=15:1) para obtener un compuesto ( $\alpha$ : $\beta$ =1:24, 2,7 g de rendimiento).

40

45 (c)

(1) El compuesto (1,08 g, 2,08 mmoles) se disolvió en tolueno (30 ml) y metanol (6,5 ml), y se añadió óxido de dibutilestaño (780 mg, 3,48 mmoles) a la solución, y la mezcla se hizo reaccionar a 85 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró a continuación al vacío y el residuo se hirvió azeotrópicamente con tolueno deshidratado concienzudamente tres

50

veces.

(2) El residuo se disolvió en tolueno (24 ml) de nuevo, se añadió bromuro de tetrabutilamonio (1,00 g, 3,48 mmoles) y bromuro de bencilo (977 ml, 10,4 mmoles) a la solución y se hizo reaccionar la mezcla a 80 °C durante cuatro horas. Después de confirmar la desaparición del material mediante TLC, la mezcla de reacción se devolvió a temperatura ambiente y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo:hexano=4:1) para obtener un compuesto de 4,7,9-bencilo ( $\alpha:\beta=1:10$ , 1,15 g de rendimiento).

(d)

(1) el cloruro de oxalil (1,82 g, 14,3 mmoles) se añadió al diclorometano (13 ml) y la mezcla se enfrió a -78 °C. Una solución de mezcla de dimetilsulfóxido (1,3 ml, 17,9 mmoles) y diclorometano (5 ml) se añadió a la mezcla 15 minutos después, seguido de agitación de nuevo a -78 °C. Una solución del compuesto 4,7,9-bencilo (2,18 mg, 3,59 mmoles) obtenida anteriormente en diclorometano (18 ml) se añadió lentamente a la mezcla resultante 20 minutos después. La mezcla se agitó a -78 °C durante 20 minutos, a continuación se añadió trietilamina (4,00 ml, 28,7 mmoles) a la mezcla, seguido de agitación durante 10 minutos, y la temperatura de reacción se devolvió a temperatura ambiente. La apariencia del material se confirmó mediante TLC, la mezcla de reacción se diluyó entonces con diclorometano y se lavó con una solución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio y solución saturada de cloruro de sodio, y la superficie orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Después de eliminar el sulfato de magnesio mediante filtración, la superficie orgánica se concentró al vacío.

(2) El residuo se disolvió directamente en metanol (16 ml) sin purificación, la solución se enfrió a -15 °C,  $\text{BH}_3\text{NH}_3$  (122 mg, 3,95 mmoles) se añadió a la solución, y la temperatura de la reacción se devolvió a temperatura ambiente. Se confirmó la desaparición del material mediante TLC y a continuación se concentró la mezcla de reacción como estaba al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo:hexano=2:1), ofreciendo un 8-epímero (1,05 g de rendimiento)

(e) El 8-epímero (533 mg, 0,87 mmoles) obtenido anteriormente se disolvió en diclorometano (13 ml), y después se enfrió a -15 °C bajo corriente de argón. Se añadió trifluoruro de dimetilaminosulfuro (580 ml, 3,51 mmoles) lentamente a la solución, seguido de agitación durante 30 minutos y se aumentó la temperatura de reacción a 40 °C, seguido además de agitación durante 16 horas. Después de finalizar la reacción con la adición de metanol, la mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo:hexano=2:3), ofreciendo un compuesto de 8-fluoro (144 mg de rendimiento).

(f) El compuesto de 8-fluoro (120 mg, 0,197 mmoles) obtenido anteriormente se disolvió en ácido acético (4 ml), Pd/C 10% (120 mg) se añadió a la solución bajo corriente de argón, la atmósfera se reemplazó por hidrógeno, y la mezcla se agitó a continuación a temperatura ambiente. La finalización de la reacción se confirmó mediante TLC 2 horas después, la mezcla de reacción se filtró con carbono activado y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo:metanol=6:1) para obtener un compuesto (57 mg de rendimiento).

(g)

(1) El compuesto (50 mg, 0,147 mmoles) obtenido anteriormente se disolvió en metanol (2 ml), una solución acuosa de hidróxido de sodio 0,3 N (2 ml) se añadió a la solución, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. La finalización de la reacción se confirmó mediante TLC, y la mezcla de reacción se neutralizó a continuación con IR-120(+). IR-120(+) se eliminó por filtración y el filtrado se concentró al vacío.

(2) El residuo se disolvió como estaba en una solución acuosa de clorhídrico 0,016 N (5 ml), se añadió Amberlyst 15 (H+) (150 mg) a la solución, y se hizo reaccionar la mezcla a 75 °C durante 24 horas. La finalización de la reacción se confirmó mediante espectroscopia de NMR y la mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo se colocó sobre AG1xX8 (200-400 malla, forma de formiato), 150 ml de agua se pasaron a través de la columna y una solución acuosa de ácido fórmico 1M se aplicó a continuación para la elución, proporcionando el ácido 8-fluorosiálico (27) (33 mg de rendimiento).

Los datos de la NMR para ácido 8-fluorosiálico se proporcionan a continuación.

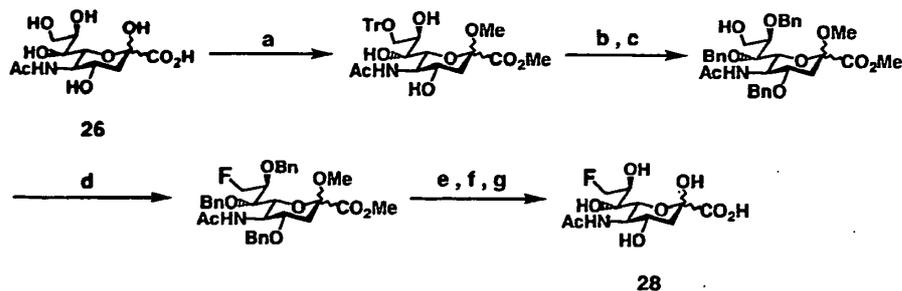
<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O)

δ 4,69 (dddd, 1H, J<sub>8,F</sub>=48,7Hz, J<sub>8,9a</sub>=5,0Hz, J<sub>8,9b</sub>=3,5Hz, H-8), 4,03(ddd, 1H, J<sub>4,5</sub>=10,0Hz, J<sub>3ax,4</sub>=11,1Hz, J<sub>3eq,4</sub>=4,7Hz, H-4), 3,95(dd, 1H, J<sub>4,5</sub>=10,0Hz, J<sub>5,6</sub>=9,9Hz, H-5), 3,94(ddd, 1H, J<sub>6,7</sub>=~0Hz, J<sub>7,8</sub>=6,8Hz, J<sub>7,p</sub>=14,0Hz, H-7), 3,88(ddd, 1H, J<sub>9a,9b</sub>=13,3Hz, J<sub>9a,8</sub>=3,5Hz, J<sub>9b,F</sub>=28,0Hz, H-9b), 3,86 (dd, 1H, J<sub>5,6</sub>=9,9Hz, J<sub>6,7</sub>=~0Hz, H-6), 3,72(ddd, 1H, J<sub>9a,9b</sub>=5,33Hz, J<sub>9a,8</sub>=5,0Hz, J<sub>9a,F</sub>=30,6Hz, H-9a), 2,28(dd, 1H, J<sub>3eq,3ax</sub>=13,00, J<sub>3eq,4</sub>=4,6Hz, H-3eq), 2,05(s, 3H, Ac), 1,87 (dd, 1H, J<sub>3ax,4</sub>=11,1Hz, J<sub>3eq,3ax</sub>=13,00, H-3ax)

Ejemplo de referencia 13

Preparación de ácido 5-Acetamido-3,5,9-trideoxi-9-fluoro-D-glicero-β-D-galacto-2-nonulopiranosidónico (28)

[0133] El ácido 5-Acetamido-3,5,9-trideoxi-9-fluoro-D-glicero-β-D-galacto-2-nonulopiranosidónico (28) se preparó a partir de ácido siálico (26) según el esquema proporcionando a continuación.



(a) (1)Dowex 50W-X8, MeOH, reflujo, (2)TrCl, piridina,72%

(b) (1) BaO, Ba(OH), (2) DMF, (3) CH<sub>2</sub>CN<sub>2</sub>, 88%

(c) AcOH, 100°C, 78%

(d) (1) Tf<sub>2</sub>O, piridina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (2)TASF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 52%

(e) H<sub>2</sub>, Pd/C(10%), AcOH, 86%

(f) NaOHaq.

(g) 0,02N HClaq., Amberlyst 15(H+), 86%

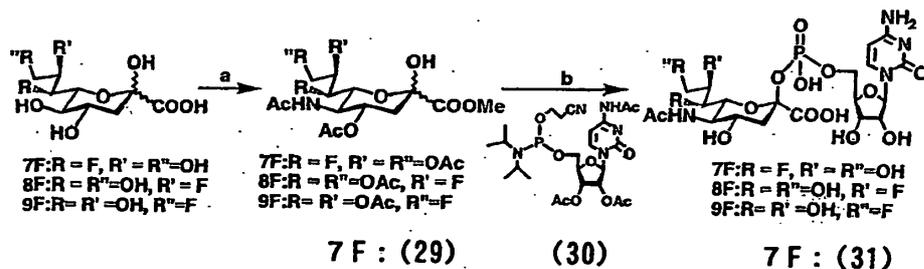
[0134] Las reacciones anteriores se llevaron a cabo según la siguiente referencia. .

[0135] T. Miyazaki, T. Sakakibara, H. Sato, Y. Kajihara; *Chemoenzymatic Synthesis of the 9-Deoxy-9-fluoro-[3-13C]-NeuAc-a-(2,6)-[U-13C]-Gal-b- Sequence on An Intact Glycoprotein* . *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 1411-1412 (1999).

Ejemplo de referencia 14

Preparación del derivado de CMP-7-ácido fluorosiálico

[0136]



(a) (1) Dowex 50-X8, MeOH, (2) Ac<sub>2</sub>O, 60% HClO<sub>4</sub>;

(b) (1) 1H-Tetrazol, CH<sub>3</sub>CN, (2) t-BuOOH, CH<sub>3</sub>CN, (3) DBU, CH<sub>3</sub>CN, (4) NaOMe, MeOH, H<sub>2</sub>O

**[0137]** Una cantidad de 0,074 mmoles de compuesto (25), que es un derivado de ácido fluorosilícico, se disolvió en metanol destilado (3 ml), se añadió Dowex -50W-X8 (65 mg) a la solución con agitación bajo corriente de argón y se hizo reaccionar la mezcla durante 3 horas. Después de reconocer la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se filtró y concentró al vacío. El residuo se disolvió en anhídrido acético (200 µl), se añadió una solución (22 µl) de anhídrido acético y ácido perclórico 60% (15:1) a la solución con agitación a -20 °C, y la mezcla se hizo reaccionar a 0 °C durante 40 minutos. Después de reconocer la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio. La superficie orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, seguido de filtración y concentración posterior al vacío para obtener un residuo que contiene el compuesto (29). El residuo y el derivado de CMP-5'-fosfoamidita (30) (136 mg, 0,23 mmoles) se hirvieron azeotrópicamente con las respectivas porciones de benceno tres veces, el residuo se disolvió en acetonitrilo destilado (100 µl) cada vez, y las soluciones resultantes se mezclaron juntas. A la solución resultante, se le añadió 1H-tetrazol (17 mg, 0,23 mmoles) con agitación en agua helada sometida a corriente de argón. La mezcla se devolvió a temperatura ambiente 5 minutos después, seguido de una reacción más durante 10 minutos. Después de finalizar la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y solución acuosa saturada de cloruro de sodio. La superficie orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, seguido de filtración y concentración a una temperatura de hasta 30 °C y a continuación se hirvió azeotrópicamente con tolueno dos veces para eliminar el agua. El acetonitrilo destilado (400 µl) se añadió al residuo, y una solución de tolueno t-BuOOH 2,5M (290 µl) se añadió gota a gota a la mezcla con enfriamiento en hielo bajo corriente de argón. La mezcla se devolvió a temperatura ambiente 5 minutos después, seguido de agitación durante 20 minutos. Después de reconocer la finalización de la reacción, se añadió sulfuro de dimetilo (53 µl) gota a gota a la mezcla y se desactivó el t-BuOOH. El DBU (18 µl) se añadió a continuación gota a gota a la mezcla, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de reconocer la finalización de la reacción, se añadieron metanol (0,67 ml), agua (1,35 ml) y metóxido de sodio (360 mg) a la mezcla de reacción, seguido de la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Después de reconocer la finalización de la reacción, la mezcla de reacción fue sometida a extracción con agua y el extracto se lavó con diclorometano. La superficie acuosa se concentró al vacío a aproximadamente 8 ml a una temperatura de hasta 25 C. La solución acuosa resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (solvente de desarrollo: agua de amonio 20mM, caudal: 0,3 ml/min), ofreciendo derivado de CMP-ácido fluorosilícico (31).

**[0138]** Los datos de la NMR de CMP-7"-deoxi-7"- ácido fluorosilícico (31) se ofrecen a continuación.

<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, 50mM ND<sub>4</sub>DCO<sub>3</sub> en D<sub>2</sub>O),

δ 8,04 (d, 1H, J<sub>5,6</sub>=7,6Hz, H-6), 6,20(d, 1H, J<sub>6,5</sub>=7,6Hz, H-5), 6,06(d, 1H, J<sub>1',2'</sub>=4,5Hz, H-1'), 4,54(dd, 1H, J<sub>1",8"</sub>=9,5Hz, J<sub>7",F</sub>=45,9Hz, H-7"), 4,42~4,20(m, 7H, H-2', H-3', H-4', H-5' a, H-5' b, H-6", H-8"), 4,16(ddd, 1H, J<sub>4",3" eq</sub>=4,7Hz, J<sub>4",3" ax</sub>=11,3Hz, J<sub>a,5</sub>=10,3Hz, H-4"), 4,03(dd, 1H, J<sub>5",4"</sub>=J<sub>5",6"</sub>=10,3Hz, H-5"), 3,91(ddd, 1H, J<sub>9" a,9" b</sub>=12,2Hz, J<sub>9" a,8"</sub>=2,8Hz, J<sub>9" a,F</sub>=2,8Hz, H-9" a), 3,75 (ddd, 1H, J<sub>9" a,9" b</sub>=12,2Hz, J<sub>9" b,8"</sub>=5,4Hz, J<sub>9" b,F</sub>=2,1Hz, H-9"b), 2,61(dd, 1H, J<sub>3" eq,4"</sub>=4,7Hz, J<sub>gem</sub>=13,3Hz, H-3 eq), 2,14(s, 3H, Ac), 1,76 (ddd, 1H, J<sub>3" ax,4"</sub>=11,5Hz, J<sub>gem</sub>=13,3Hz, J<sub>3" ax,p</sub>=5,6Hz, H-3" ax)

Ejemplo de referencia 15

**[0139]** La preparación de ácido CMP-8"-deoxi-8"-ácido fluorosilícico CMP-8"-deoxi-8"-ácido fluosilícico se preparó del mismo modo que en el Ejemplo de referencia 14 a excepción del uso del compuesto (27) en lugar del compuesto (25). Los datos de la NMR se ofrecen a continuación.

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, 50mM ND<sub>4</sub>DCO<sub>3</sub> en D<sub>2</sub>O)

δ 8,08 (d, 1H, J<sub>5,6</sub>=7,6Hz, H-6), 6,20(d, 1H, J<sub>6,5</sub>=7,6Hz, H-5), 6,09(d, 1H, J<sub>1',2'</sub>=4,1Hz, H-1'), 4,90 (m, 1H, H-8"), 4,42 (dd, 1H, J<sub>3',2'</sub>=J<sub>3',4'</sub>=4,9Hz, H-3'), 4,39(dd, 1H, J<sub>2',1'</sub>=4,1Hz, J<sub>2',3'</sub>=4,9Hz, H-2'), 4,31-4,28(m, 3H, H-4' , H-5' a, H-5' b), 4,15(ddd, 1H, J<sub>4",3" eq</sub>=4,4Hz, J<sub>4",3" ax</sub>=11,5Hz, J<sub>4,5</sub>=10,5Hz, H-4"), 4,10-3,90 (m, 5H, H-5" , H-6", H-7" , H-9" a, H-9"b), 2,60(dd, 1H, J<sub>3" eq,4"</sub>=4,4Hz, J<sub>gem</sub>=13,1Hz, H-3" eq), 2,13 (s, 3H, Ac), 1,77 (ddd, 1H, J<sub>3" ax,4"</sub>=11,5Hz, J<sub>gem</sub>=13,1Hz, J<sub>3" ax,p</sub>=4,5Hz, H-3" ax)

Ejemplo de referencia 16

**[0140]** La preparación de CMP-9"-deoxi-9"-ácido fluorosilícico CMP-9"-deoxi-9-ácido fluorosilícico se preparó del mismo modo que en el Ejemplo de referencia 14 a excepción del uso del compuesto (28) en lugar del compuesto (25).

**Ejemplo 5**

Preparación de HOOC-Ser-Ser-Asn(asialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-NH-Dansilo

**[0141]** En una columna de síntesis en fase sólida se colocaron 370 mg de resina HMPA-PEGA, que se lavó concienzudamente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y DMF.

- 5 **[0142]** Fmoc-Ser(OtBu)-OH, 1-mesitileno-sulfonil-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) y N-metilimidazol se disolvieron en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y la solución se agitó durante 5 minutos y a continuación se colocó en la columna de síntesis en fase sólida que contenía la resina, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. La resina se lavó a continuación con cloruro de metileno, isopropanol y DMF y se secó. El hidroxilo sin reaccionar en la fase sólida se acetiló entonces empleando una solución 20% DMF de anhídrido acético durante 20 minutos para recubrimiento. La resina se lavó con DMF y se agitó junto con una solución 20% piperidina/DMF durante 20 minutos para eliminar el grupo Fmoc protector, a través de lo cual se obtuvo la resina-Ser-NH<sub>2</sub>. El producto se lavó con DMF y se secó.

**[0143]** A continuación, Fmoc-Ser(OtBu)-OH se utilizó con HOBT·H<sub>2</sub>O y DIPCDI para la condensación.

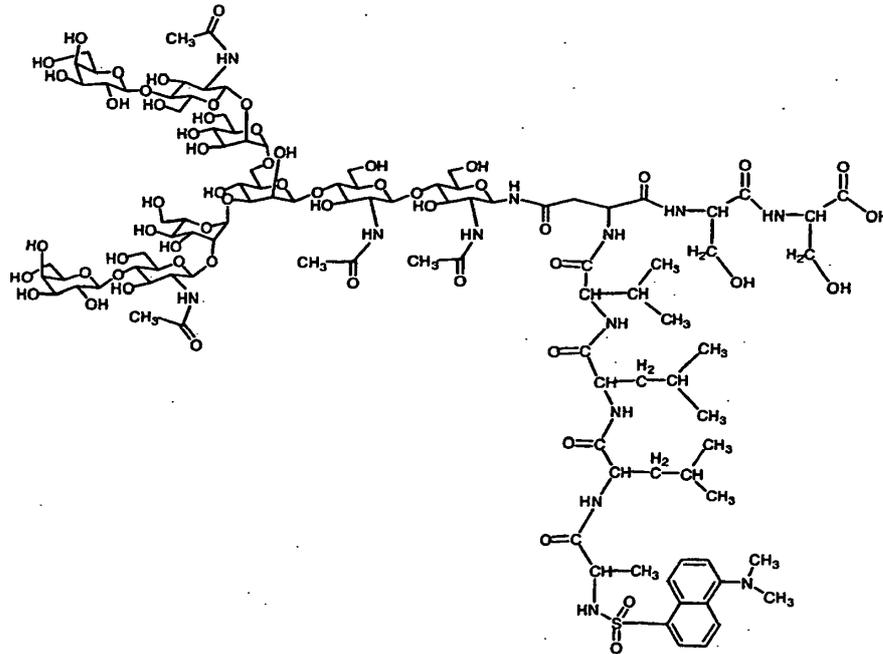
- 15 **[0144]** Posteriormente, asialooligosacárido unido a Fmoc-asparagina se disolvió en una mezcla de solvente 1:1 de DMSO y DMF, y se agitaron la solución, HATU y DIPEA a temperatura ambiente durante 24 horas para la condensación. La resina resultante se lavó con DMF y a continuación se agitó junto con 10% anhídrido acético/2-propanol:metanol durante 20 minutos para recubrimiento. La resina se lavó con 2-propanol y DMF, y a continuación se agitó junto con 20% piperidina/DMF durante 20 minutos para eliminar el grupo Fmoc protector. La resina se lavó con DMF.

- 20 **[0145]** La resina resultante, y valina (Val), leucina (Leu), leucina (Leu) y alanina (Ala) se sometieron de modo similar a condensación, y después se eliminó el grupo Fmoc protector para obtener resina-Ser-Ser-Asn(asialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>.

- 25 **[0146]** Se utilizaron como los aminoácidos de valina (Val), leucina (Leu) y alanina (Ala) cada Fmoc-AA-Opfp (AA=aminoácido) donde el carboxilo era esterificado con pfp, y se utilizó 3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-il (Dhbt) para la condensación. Todas las reacciones de condensación se llevaron a cabo en una solución de DMF. Para el marcado de fluorescencia, la resina se hizo reaccionar con cloruro de dansilo y diisopropiletilamina en DMF durante 30 minutos. Después de la finalización de dansilación, la resina se lavó con DMF y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

- 30 **[0147]** A la resina lavada se añadió una solución acuosa de TFA 95%, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 3 horas para cortar la resina. La resina se filtró. La mezcla de reacción se concentró al vacío a temperatura ambiente, a continuación se disolvió en agua y se liofilizó. El producto resultante se purificó mediante HPLC para obtener el producto deseado, es decir, HOOC-Ser-Ser-Asn(asialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-NH-Dansilo.

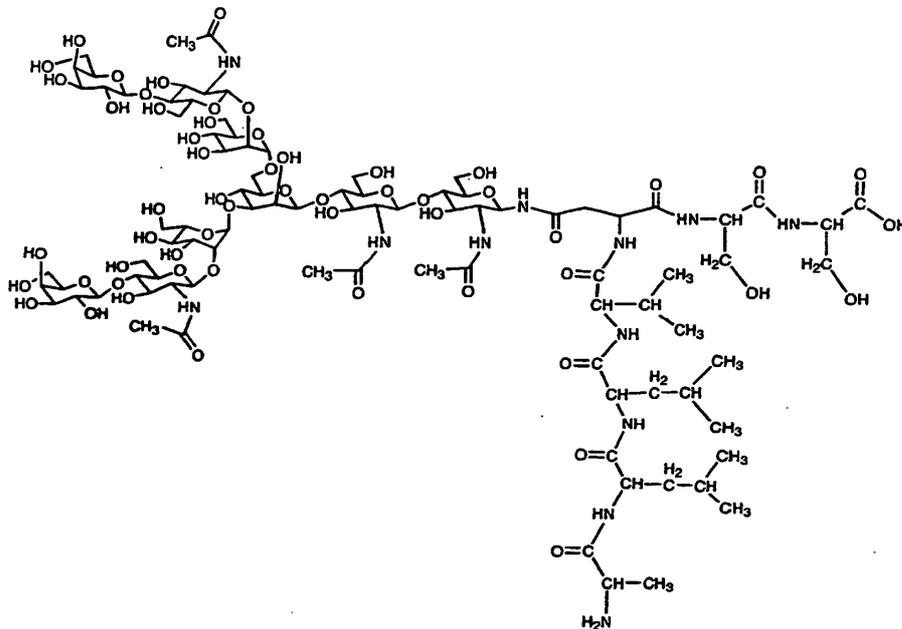
**[0148]** (YMC-Pack A-314 S-5 ODS 300 × 6,0 mm, solventes de desarrollo A: solución acuosa de TFA 0,1%, B: acetonitrilo de TFA 0,1%:agua=90:10, gradiente A 100% 0,60 ml/min→B 100% 0,60 ml/min 60 min).



**Ejemplo 6**

Preparación de HOOC-Ser-Ser-Asn(asialooligo)-Val-Leu-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>

- 5 [0149] HOOC-Ser-Ser-Asn(asialooligo) -Val-Leu-Leu-Ala-NH<sub>2</sub> se preparó del mismo modo que en el Ejemplo 5 a excepción de que no se llevó a cabo la dansilación para el marcado de fluorescencia.



**Ejemplo 7**

[0150] El derivado de ácido siálico del Ejemplo de referencia 14 se transfirió al péptido de asialooligosacárido dansilado obtenido en el Ejemplo 5, empleando una transferasa de ácido siálico.

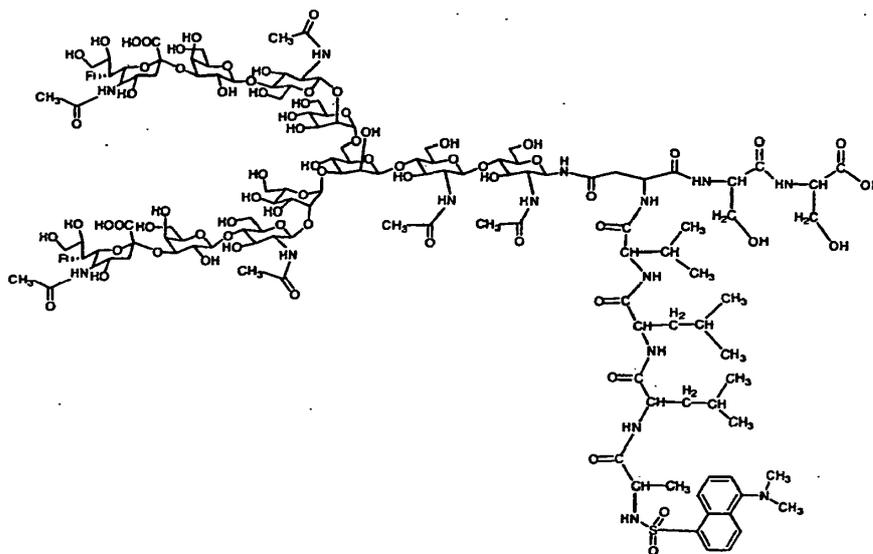
- 10 [0151] Como transferasa de ácido siálico se utilizó un producto comercial derivado de un recombinante de rata y que se utilizaba como una  $\alpha$ -2,3-transferasa.

[0152] La reacción enzimática se llevó a cabo empleando el derivado de CMP-ácido siálico en cuatro

equivalentes del péptido de asialooligosacárido dansilado, tampón de ácido cacodílico 50mM (pH 5,0) utilizado como solvente de reacción y una hidrolasa de ácido fosfórico y albúmina de suero bovino como añadido a la solución que ha de reaccionarse.

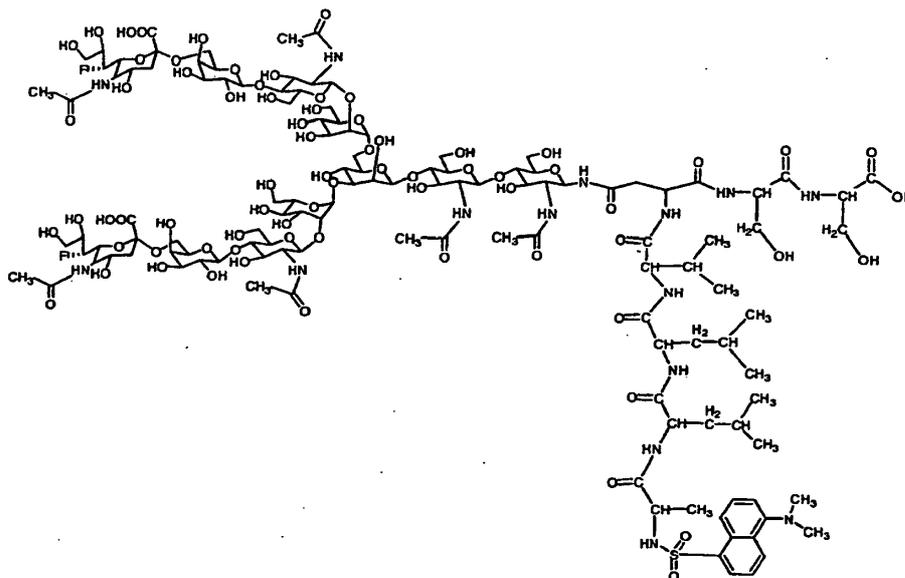
5 **[0153]** La mezcla de reacción obtenida en la finalización de la reacción se liofilizó como estaba. El producto secado se purificó mediante HPLC, facilitando un glicopéptido que presenta un derivado de di-7-sialo dansilado unido al mismo, como se muestra a continuación.

**[0154]** (YMC-Pack A-314 S-5 ODS 300 × 6,0 mm, solventes de desarrollo A: solución acuosa de TFA 0,1%, B: acetonitrilo de TFA 0,1%:agua=90:10, gradiente A 100% 0,60 ml/min→B 100% 0,60 ml/min 60 min)



## 10 Ejemplo 8

**[0155]** Un glicopéptido que presenta un derivado di-7-sialo dansilado como enlace 2,6 al mismo, como se muestra a continuación, se obtuvo del mismo modo que en el Ejemplo 7 a excepción del uso como transferasa de ácido siálico de un producto comercial derivado de hígado de rata y que se utilizó como  $\alpha$ 2,6-transferasa y que empleó un tampón amortiguador ajustado a un pH de 6,0.

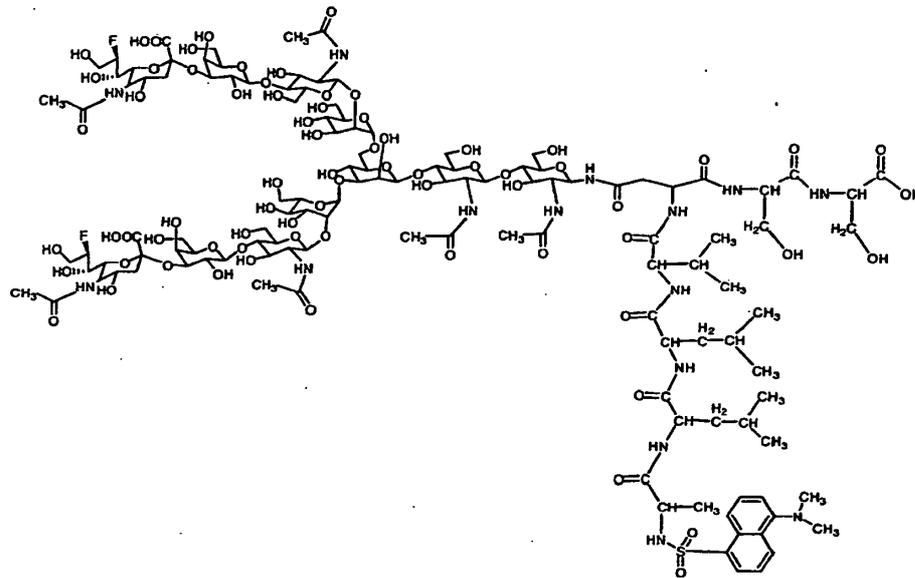


15

## Ejemplo 9

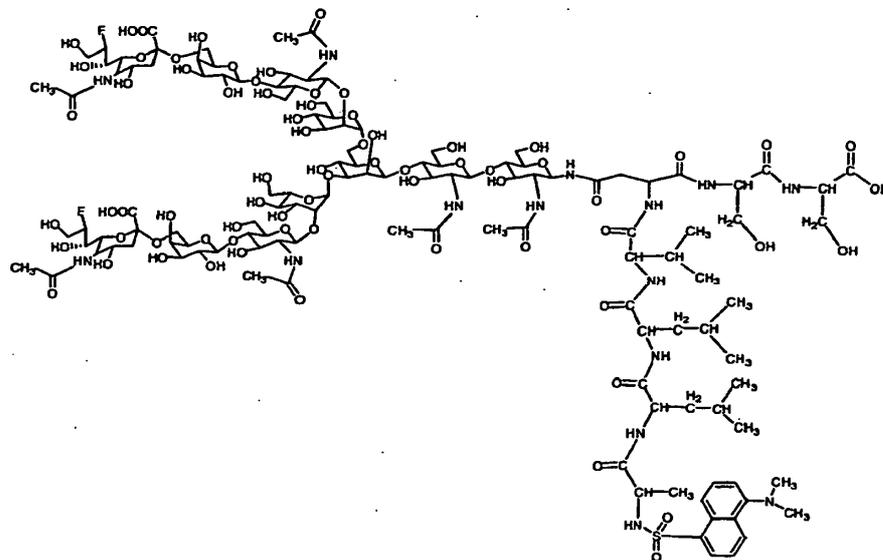
**[0156]** Un glicopéptido que tiene un derivado di-8-sialo como enlace 2,3 al mismo, como se muestra a continuación, se obtuvo del mismo modo que en el Ejemplo 7 a excepción del uso del derivado del ácido siálico

del Ejemplo de referencia 15 en lugar del derivado de ácido siálico del Ejemplo de referencia 14.



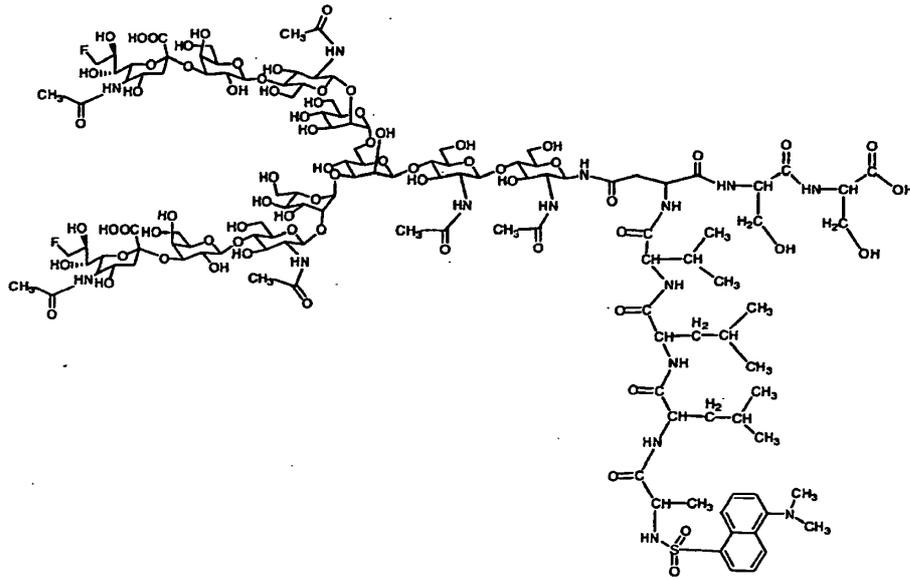
**Ejemplo 10**

5 [0157] Un glicopéptido que tiene un derivado di-8-sialo como enlace 2,6 al mismo, mostrado a continuación, se obtuvo del mismo modo que en el Ejemplo 8 a excepción del uso del derivado de ácido siálico del Ejemplo de referencia 15 en lugar del derivado de ácido siálico del Ejemplo de referencia 14.



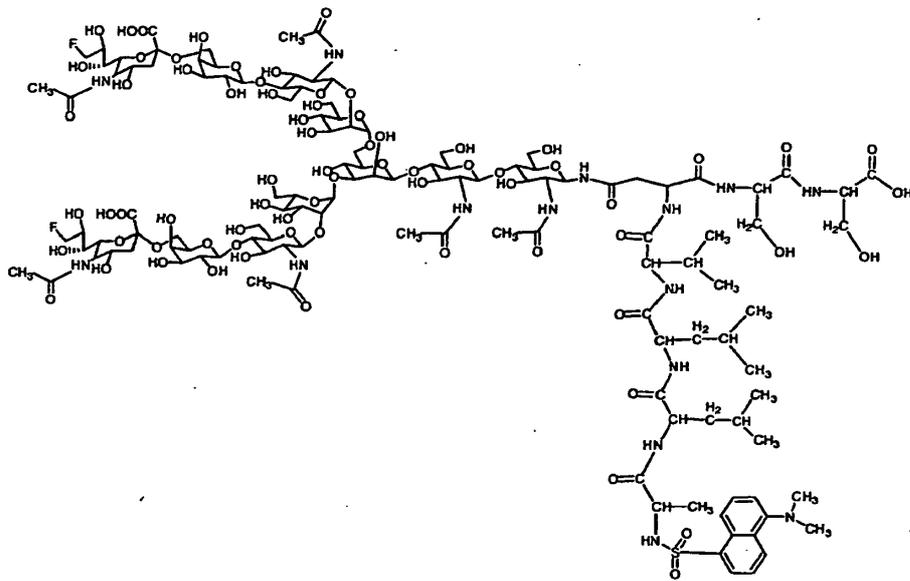
**Ejemplo 11**

10 [0158] Un glicopéptido que tiene un derivado di-9-sialo como enlaces 2,3 al mismo, mostrado a continuación, se obtuvo del mismo modo que en el Ejemplo 7 a excepción del uso del derivado de ácido siálico del Ejemplo de referencia 16 en lugar del derivado de ácido siálico del Ejemplo de referencia 14.



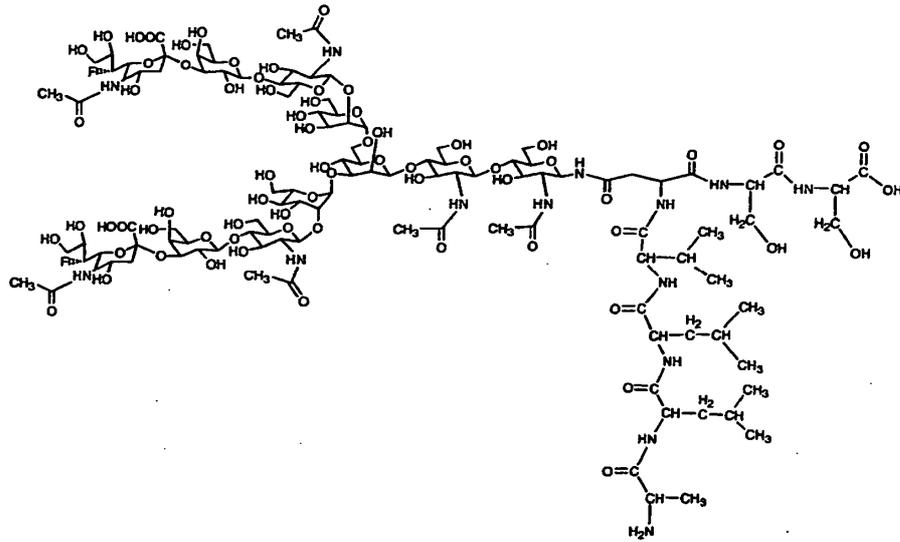
**Ejemplo 12**

[0159] Un glicopéptido que tiene un derivado di-9-sialo como enlace 2,6 al mismo, mostrado a continuación, se obtuvo del mismo modo que en el Ejemplo 8 a excepción del uso del derivado de ácido siálico del Ejemplo de referencia 16 en lugar del derivado de ácido siálico del Ejemplo de referencia 14.



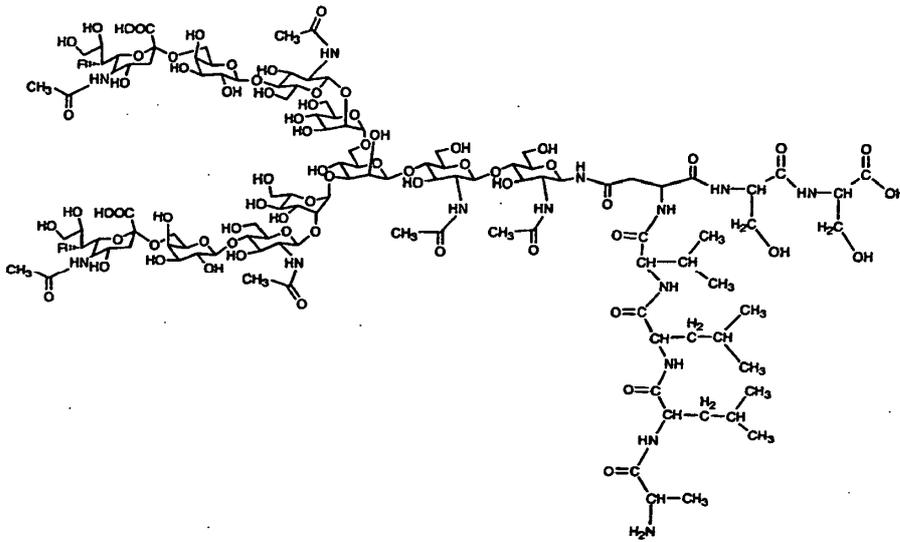
**Ejemplo 13**

[0160] Un glicopéptido que tiene un derivado di-7-sialo como enlaces 2,3 al mismo, mostrado a continuación, se obtuvo del mismo modo que en el Ejemplo 7 a excepción del uso del asialooligosacárido péptido no dansilado y obtenido en el Ejemplo 6.



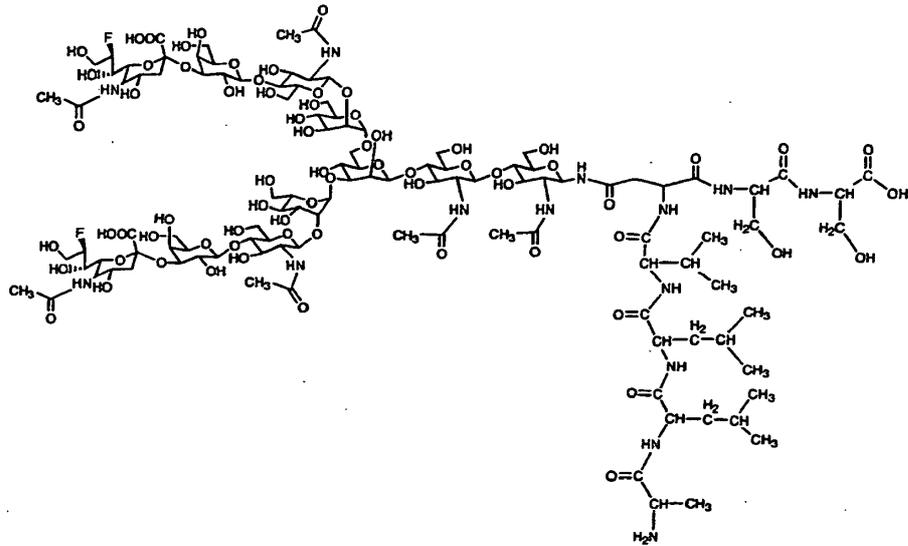
**Ejemplo 14**

[0161] Un glicopéptido que tiene un derivado di-7-sialo como enlace 2,6 al mismo, mostrado a continuación, se obtuvo del mismo modo que en el Ejemplo 8 a excepción del uso del asialooligosacárido péptido no dansilado y obtenido en el Ejemplo 6.



**Ejemplo 15**

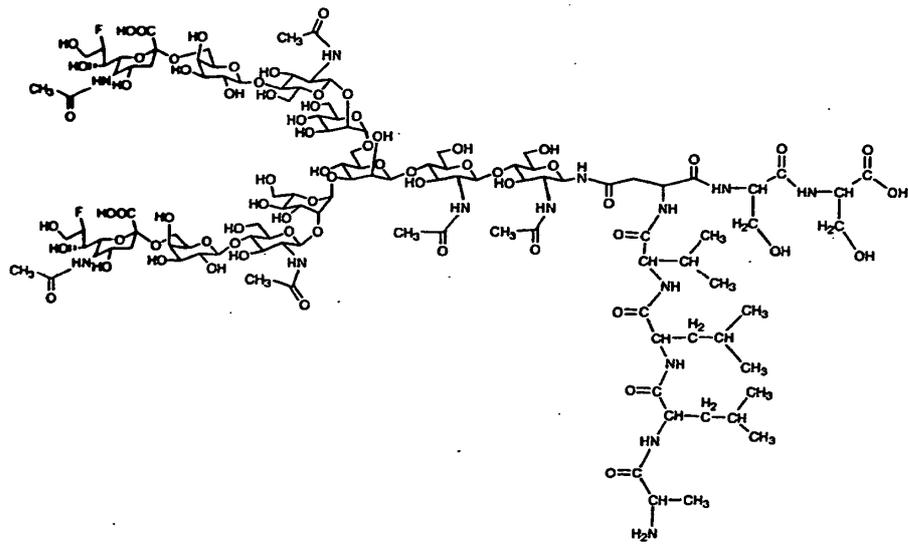
[0162] Un glicopéptido que tiene un derivado de di-8-sialo como enlace 2,3 al mismo, mostrado a continuación, se obtuvo del mismo modo que en el Ejemplo 9 a excepción del uso del asialooligosacárido péptido no dansilado y obtenido en el Ejemplo 6.



**Ejemplo 16**

[0163] Un glicopéptido que tiene un derivado di-8-sialo como enlaces 2,6 al mismo, mostrado a continuación, se obtuvo del mismo modo que en el Ejemplo 10 a excepción del uso del asialooligosacárido péptido no dansilado y obtenido en el Ejemplo 6.

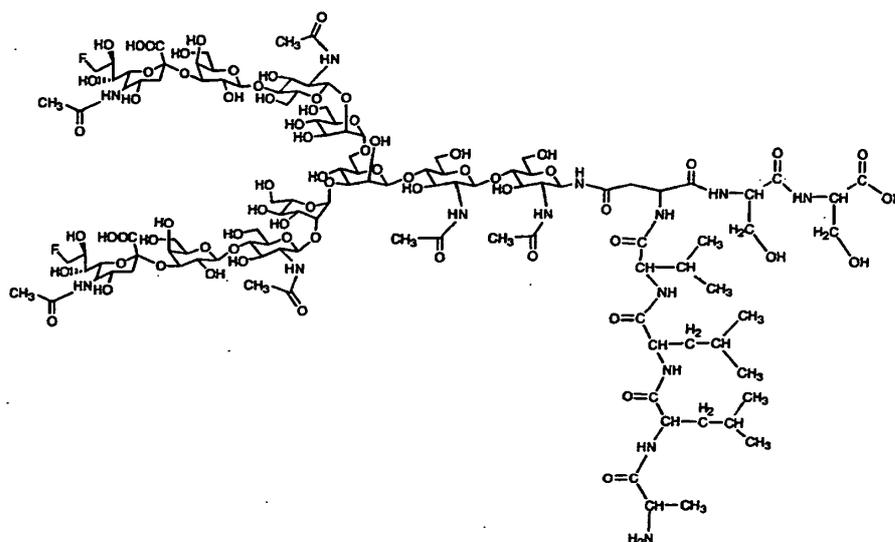
5



**Ejemplo 17**

[0164] Un glicopéptido que tiene un derivado di-9-sialo como enlace 2,3 al mismo, mostrado a continuación, se obtuvo del mismo modo que en el Ejemplo 11 a excepción del uso del asialooligosacárido péptido no dansilado y obtenido en el Ejemplo 6.

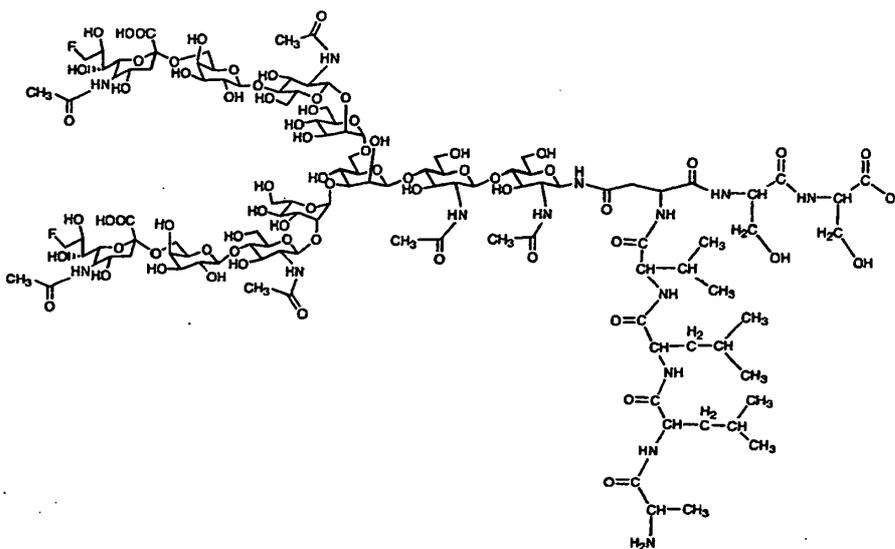
10



### Ejemplo 18

[0165] Un glicopéptido que tiene un derivado di-9-sialo como enlaces 2,6 al mismo, mostrado a continuación, se obtuvo del mismo modo que en el Ejemplo 12 a excepción del uso del asialooligosacárido péptido no dansilado y obtenido en el Ejemplo 6.

5



### Ejemplo 19

Preparación de HOOC-Ser-Thr-Thr-Asn(disialooligo)-Asp-Ile-Pro-NH<sub>2</sub>

[0166] La Asn(disialooligo) en el glicopéptido deseado mencionado anteriormente se refiere a una disialooligoasparagina que presenta ácido siálico no protegido por el grupo bencilo.

10

[0167] En una columna de síntesis en fase sólida se colocaron 50 mg de resina HMPA-PEGA, que fue lavada concienzudamente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y DMF.

[0168] Fmoc-Ser(OtBu)-OH, 1-mesitilensulfonil-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) y N-metilimidazol se disolvieron en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y la solución se agitó durante 5 minutos y a continuación se colocó en la columna de síntesis en fase sólida que contiene la resina, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. La resina se lavó a continuación con cloruro de metileno, isopropanol y DMF y se secó. El grupo hidroxilo no reaccionado en la fase sólida se acetiló a continuación empleando una solución de 20% DMF de anhídrido acético durante 20 minutos para recubrimiento. La resina se lavó con DMF y se agitó junto con una solución de 20% piperidina/DMF durante 20 minutos para eliminar el grupo Fmoc protector, mediante lo cual se obtuvo la resina-Ser-NH<sub>2</sub>. El producto se

15

lavó con DMF y se secó.

[0169] Después, Fmoc-Thr(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(OtBu)-OH y Fmoc-Asp(OtBu)-OH fueron sometidos a condensación en este orden empleando HOBt-H<sub>2</sub>O y PyBOP-DIPEA. Después de la condensación de los aminoácidos, la mezcla de reacción resultante se agitó junto con una solución de 20% piperidina/DMF (1:1) para eliminar el grupo Fmoc protector.

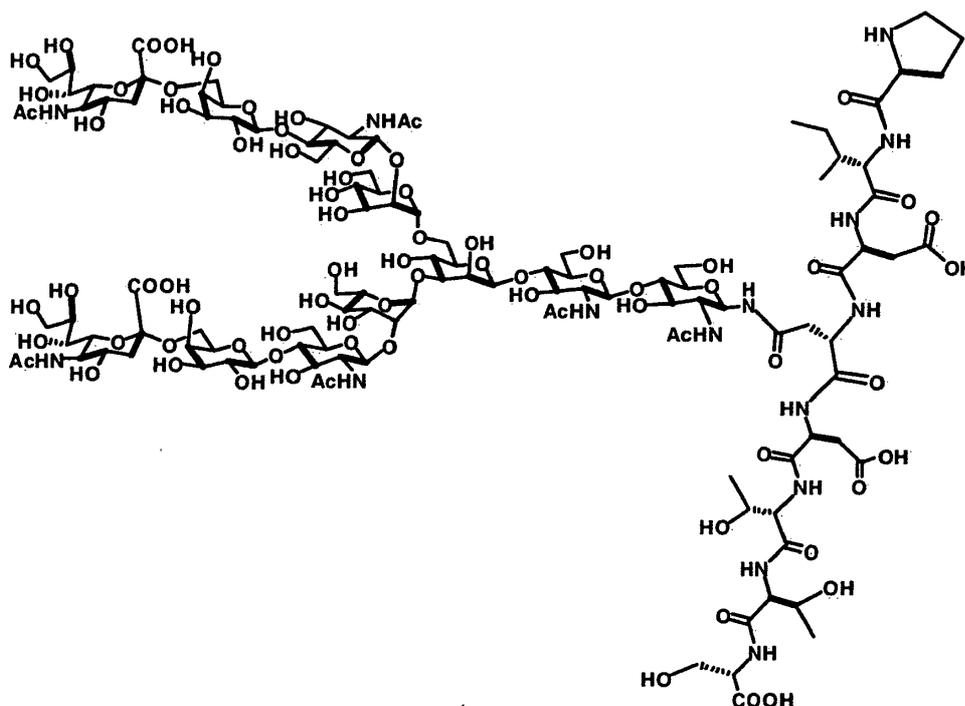
[0170] Posteriormente, el disialooligosacárido unido a dibencil-Fmoc-asparagina se disolvió en una mezcla solvente 1:1 de DMSO y DMF, y se agitaron la solución, HATU y DIPEA a temperatura ambiente durante 24 horas para la condensación. La resina resultante se lavó con DMF y a continuación se agitó junto con anhídrido acético 10% /2-propanol:metanol durante 20 minutos para recubrimiento. La resina se lavó con DMF, una mezcla solvente de DMF y 2,6-lutidina (1:1) se añadió entonces a la resina, y TESOTf se añadió además en una cantidad de 3 equiv. en peso por grupo hidroxilo de oligosacárido, seguido de reacción durante 1 hora para proteger cada grupo hidroxilo de oligosacárido con un grupo TES (triethylsilyl).

[0171] La resina se lavó con DMF y THF, y a continuación se agitó junto con 20% piperidina/DMF durante 20 minutos para eliminar el grupo Fmoc protector. La resina se lavó con THF.

[0172] La resina resultante, y ácido aspártico (Asp), isoleucina (Ile) y prolina (Pro) se sometieron a condensación en solvente THF empleando HOBt-H<sub>2</sub>O y PyBOP-DIPEA, y el grupo Fmoc protector se eliminó con un 20% piperidina/THF para obtener resina-Ser-Thr-Thr-Asp-Asn (dibencildisialooligo protegido con TES)-Asn-Ile-Pro-NH<sub>2</sub>. Asn(dibencildisialooligo protegido con TES) mencionado hace referencia a un diasialooligoasparagina que tiene un ácido siálico con carboxilo protegido por bencilo y que tiene un grupo hidroxilo de oligosacárido protegido por TES.

[0173] La resina resultante de la condensación se secó concienzudamente, y a continuación se agitó junto con una solución acuosa de TFA 95% a temperatura ambiente durante 3 horas para cortar el grupo protector para aminoácido-TES y la resina. La resina fue filtrada. La mezcla de reacción se concentró al vacío a temperatura ambiente, a continuación se disolvió en agua y se liofilizó. El producto resultante se disolvió en una solución acuosa de hidróxido de sodio que tiene un pH de 11 para hidrolizar el ester de bencilo, seguido de neutralización con ácido acético. El producto se liofilizó como estaba, y se purificó mediante HPLC para obtener el producto deseado, es decir, HOOC-Ser-Thr-Thr-Asp-Asn(disialooligo)-Asp-Ile-Pro-NH<sub>2</sub>.

[0174] (Mightsyl ODS-C18 250×20 mm, solventes de desarrollo A: solución acuosa de TFA 0,1%, B: acetonitrila de TFA 0,1%:agua=90:10, gradiente A 100% 0 → B 100% 60 min, caudal 2,50 ml/min).



APLICABILIDAD INDUSTRIAL

**[0175]** Según la presente invención, es posible ofrecer un proceso que puede preparar de modo artificial y fácil una gran cantidad de un glicopéptido que presenta al menos un oligosacárido unido a asparagina en una posición deseada de la cadena peptídica del mismo.

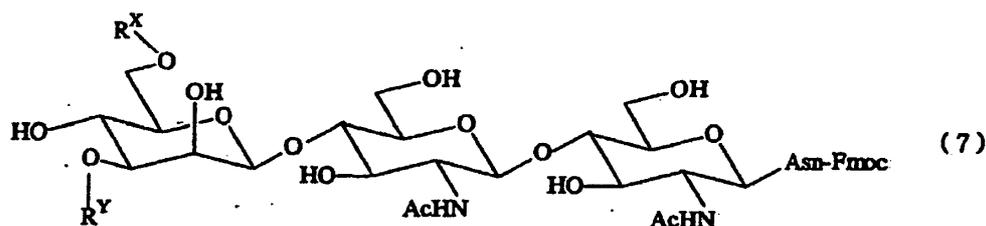
5 **[0176]** Además, según la presente invención, es posible obtener un sialilglicopéptido que comprende un oligosacárido unido a asparagina que tiene un ácido siálico y en el que el ácido siálico no está escindido del glicopéptido por un tratamiento ácido.

10 **[0177]** Además, según la presente invención, es posible obtener de modo artificial y fácil una gran cantidad de un glicopéptido que tiene al menos un oligosacárido unido a una asparagina en una posición deseada de la cadena peptídica del mismo, con residuos de azúcar eliminados del mismo como se desea.

**[0178]** Además, según la presente invención, es posible obtener un glicopéptido que tiene ácido siálico o un derivado del mismo introducido en el péptido con el uso de una transferasa de ácido siálico.

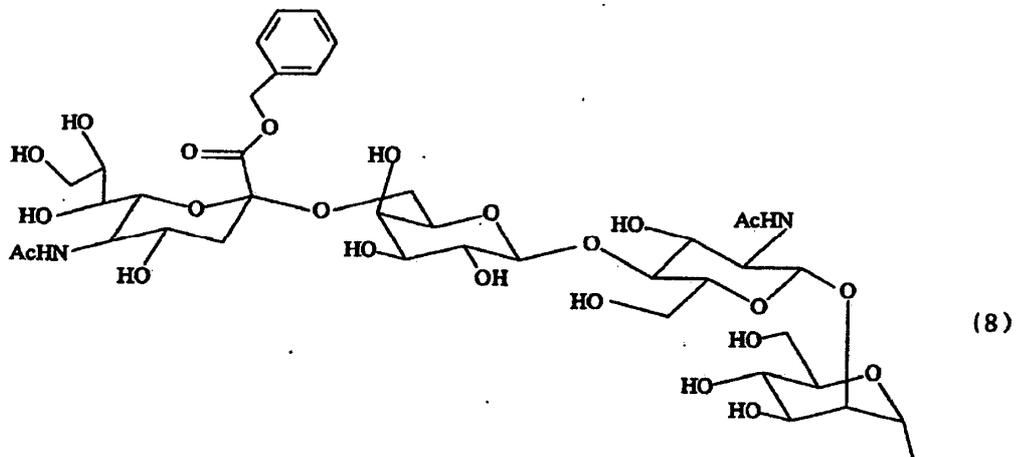
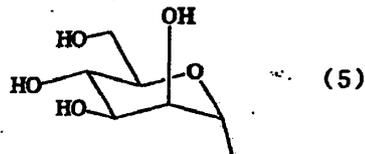
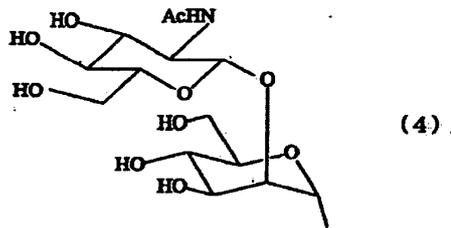
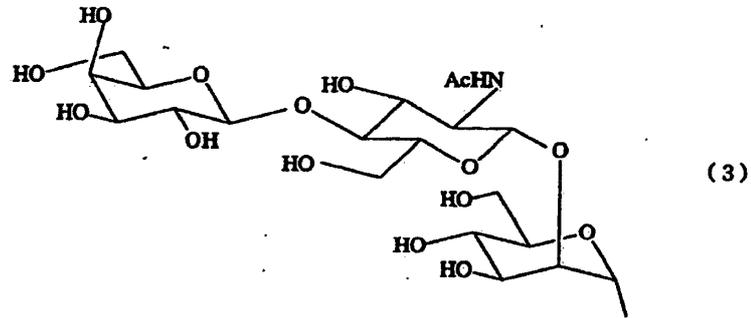
## Reivindicaciones

- 5 1. Proceso para la síntesis en fase sólida de un glicopéptido que tiene al menos un oligosacárido unido a una asparagina en una posición deseada de la cadena peptídica del mismo, el proceso comprende las etapas de:
- 10 (1) esterificación de un grupo hidroxilo de una resina que tiene el grupo hidroxilo y un grupo carboxilo de un aminoácido que tiene un nitrógeno del grupo amino protegido por un grupo protector liposoluble,
- (2) eliminación del grupo protector liposoluble para formar un grupo amino libre,
- 15 (3) amidación del grupo amino libre y de un grupo carboxilo de un aminoácido que tiene un nitrógeno de grupo amino protegido por un grupo protector liposoluble,
- (4) eliminación del grupo protector liposoluble para formar un grupo amino libre,
- (5) repetición de las etapas (3) y (4) al menos una vez,
- 20 (6) preparación de un disialooligosacárido unido a una asparagina o un monosialooligosacárido unido a una asparagina que tiene los grupos hidroxilos no protegidos y que tiene un nitrógeno del grupo amino protegido por un grupo protector liposoluble y el grupo carboxilo del ácido siálico protegido por un grupo bencilo, alilo o difenilmetilo,
- (7) amidación del grupo amino libre y de un grupo carboxilo de la porción asparagina del disialooligosacárido unido a una asparagina o del monosialooligosacárido unido a una asparagina que tiene un nitrógeno del grupo amino protegido por un grupo protector liposoluble y el grupo carboxilo del ácido siálico protegido por un grupo bencilo, alilo o difenilmetilo,
- 25 (8) eliminación del grupo protector liposoluble para formar un grupo amino libre,
- (9) amidación del grupo amino libre y un grupo carboxilo de un aminoácido que tiene un nitrógeno del grupo amino protegido por un grupo protector liposoluble,
- (10) repetición de las etapas (8) y (9) al menos una vez,
- (11) eliminación del grupo protector liposoluble para formar un grupo amino libre,
- 30 (12) corte de la resina con un ácido.
2. Proceso según la reivindicación 1, en el que el disialooligosacárido unido a una asparagina o el monosialooligosacárido unido a una asparagina tienen el grupo carboxilo del ácido siálico protegido por un grupo bencilo, en el que el grupo bencilo se introduce en el grupo carboxilo del ácido siálico ajustando una solución de disialooligosacárido unido a una asparagina o de monosialooligosacárido unido a una asparagina a un pH de 5 a 6, liofilizando la solución, disolviendo el producto liofilizado en dimetilformamida seca y haciéndolo reaccionar con bromuro de bencilo.
- 35 3. Proceso según la reivindicación 1, en el que el disialooligosacárido unido a una asparagina o el monosialooligosacárido unido a una asparagina está representado por la fórmula (7)



en la que uno de  $R^x$  y de  $R^y$  es un grupo representado por la fórmula (8) y el otro es un átomo de

hidrógeno o un grupo representado por una de las fórmulas (3) a (5) y (8):



5

4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, en el que el disialooligosacárido unido a una asparagina o el monosialooligosacárido unido a una asparagina de la etapa (6) tiene al menos 6 residuos de azúcar.

10

5. Proceso según la reivindicación 4, en el que el disialooligosacárido unido a una asparagina o el monosialooligosacárido unido a una asparagina de la etapa (6) tiene de 9 a 11 residuos de azúcar.

6. Proceso según la reivindicación 4 o 5, en el que el disialooligosacárido unido a una asparagina o el monosialooligosacárido unido a una asparagina de la etapa (6) tiene un oligosacárido bifurcado unido al mismo.

15

7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6, en el que el grupo protector liposoluble es un grupo 9-fluorenil-metoxicarbonil (Fmoc).

- 5
8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, en el que el grupo protector del grupo carboxilo del ácido siálico es un grupo bencilo.
9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 8, que además comprende (1) la eliminación del grupo bencilo, alilo o difenilmetilo del grupo carboxilo del ácido siálico después de la etapa (12).
- 10
10. Glicopéptido que puede obtenerse mediante un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 8 y que tiene al menos un oligosacárido unido a una asparagina en una posición deseada de la cadena peptídica del mismo, el glicopéptido que tiene al menos un oligosacárido seleccionado entre un disialooligosacárido unido a una asparagina y un monosialooligosacárido unido a una asparagina unido como el oligosacárido unido a una asparagina y un grupo carboxílico del ácido siálico protegido por un grupo bencilo, alilo o difenilmetilo.