

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 220**

51 Int. Cl.:

C07H 13/04 (2006.01)

C07H 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2010** **E 10756991 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015** **EP 2411528**

54 Título: **Donantes de sialil-fosfato selectivos para la preparación de sialósidos y matrices de sialósidos para la detección del virus de la gripe**

30 Prioridad:

27.03.2009 US 164375 P

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

29.12.2015

73 Titular/es:

**ACADEMIA SINICA (100.0%)
128, Academia Road, Section 2, Nankang
Taipei 11529, TW**

72 Inventor/es:

**WONG, CHI-HUEY;
WU, CHUNG-YI;
CHENG, TING-JEN R. y
HSU, CHE-HSIUNG**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 555 220 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

Donantes de sialil-fosfato selectivos para la preparación de sialósidos y matrices de sialósidos para la detección del virus de la gripe

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

- 5 La invención se refiere en general a la síntesis de sialósidos. En particular, la invención se refiere a la síntesis de disialidas utilizando nuevos compuestos donantes de sialil-fosfato. Específicamente, la invención se refiere a la síntesis de ácidos polisiálicos utilizando nuevos compuestos donantes de sialil-fosfato y a su uso en la detección y análisis de las reacciones de unión.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Ácido *N*-acetil-neuramínico (Neu5Ac) es el derivado de ácido siálico más abundante que se encuentra en el extremo terminal de glicoproteínas o glicolípidos. Conjugados con contenido en Neu5Ac en la superficie de la célula son a menudo los receptores para virus y bacterias y también están implicados en una diversidad de procesos biológicos tales como metástasis de tumores, diferenciación celular e interacciones célula-célula¹. La hemaglutinina (HA) de la gripe, por ejemplo, es la proteína principal responsable de la interacción con los sialósidos en la membrana de la célula huésped para dirigir la entrada viral².

- En los sialósidos que se producen de forma natural, Neu5Ac está a menudo enlazado a galactósidos a través del enlace $\alpha(2\rightarrow3)$ o $\alpha(2\rightarrow6)$ en glicoproteínas *N*-enlazadas y *O*-enlazadas, y también a *N*-acetilgalactosamina a través del enlace $\alpha(2\rightarrow6)$ en glicoproteínas *O*-enlazadas. Además, Neu5Ac puede estar enlazado a otro residuo de Neu5Ac a través del enlace $\alpha(2\rightarrow8)$ o $\alpha(2\rightarrow9)$ como un constituyente de glicoconjugados³. La preparación de sialósidos con enlace α -glicosídico, sin embargo, todavía representa un desafío importante, debido principalmente a la presencia del grupo carboxilo eliminador de electrones en el centro anomérico terciario y la falta de un grupo participante en C-3. Como resultado, se produce una eliminación 2,3 de bajo rendimiento, no deseada, y la formación de enlaces β -glicosídicos no naturales. Además, la separación de isómeros α y β es tediosa y, a veces muy desafiante. Aunque la sialilación enzimática proporciona sialósidos α -enlazados estereo-específicos, se limita, con algunas excepciones, a la síntesis de sialósidos que se producen de forma natural⁴.

- A lo largo de los últimos años, los principales esfuerzos se han dirigido hacia el desarrollo de los donantes de ácido siálico para una α -sialilación eficiente⁵, incluyendo el uso de donantes de sialilo con haluros⁶, fosfitos⁷, sulfuros⁸, xantatos⁹ o feniltrifluoroacetimidatos como grupos lábiles¹⁰, o con un grupo auxiliar en C-1¹¹ y C-3¹², o con un grupo funcional *N*-acetil-modificado en C-5¹³. Otro tipo de donantes de sialilo combina el mejor grupo lábil con la mejor modificación posicional para la α -sialilación selectiva¹⁴. Hasta la fecha, sin embargo, no existe un donante general de sialilo disponibles para su uso en la preparación de todos los sialósidos que se producen de forma natural con enlaces $\alpha(2\rightarrow3)$, $\alpha(2\rightarrow6)$, $\alpha(2\rightarrow8)$ o $\alpha(2\rightarrow9)$.

- Se ha reseñado que el desarrollo de síntesis eficientes de oligosacáridos, utilizando métodos de armado-desarmado¹⁵, en un solo recipiente¹⁶, en un solo recipiente programable basado en reactividad^{8b, 17} en fase sólida¹⁸, ortogonal¹⁹ y de pre-activación²⁰, reduce la complejidad de la manipulación de grupos protectores¹⁷⁻¹⁸. Sin embargo, la síntesis en un solo recipiente de sialósidos todavía presenta un problema importante debido a la baja reactividad y selectividad de los reactivos de sialilación^{14a, 21-22}. Una estrategia basada en el uso de grupos lábiles ortogonales apropiados ha sido demostrada para la síntesis estereoselectiva de ácidos pentasiálicos $\alpha(2\rightarrow9)$, en la que se eligió sialil-fosfito como donante y tiosialósido como aceptor para los ajustes de acoplamiento repetitivo y de grupos salientes anoméricos^{14b}. Además, la preparación de sialo-trisacáridos $\alpha(2\rightarrow6)$ -enlazados se logró por el conjunto secuencial de tres bloques de construcción compuestos de un donante de sialilo con un grupo saliente de *S*-benzoxazolilo (caja S), un tiogalactósido como primer aceptor y un 1-*O*-metil-glucósido como segundo aceptor²³, para dar el producto α -selectivo (relación α/β de 2,2:1 a 2,7:1). Takahashi y colaboradores describieron un estudio de un solo recipiente relacionado utilizando donantes de sialilo de la caja S con protección adicional de 5*N*,4*O*-oxazolidinona, y lograron una elegante síntesis de trisiálico $\alpha(2\rightarrow9)$ α -selectividad mejorada^{14e}. Otra excelente estrategia ortogonal de la síntesis en un solo recipiente de ácidos *N*-glicolilneuramínicos $\alpha(2\rightarrow3)$ -enlazados es utilizar admantalil-tiosialósido como donante de sialilo^{14f}. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar un nuevo donante de ácido siálico con un grupo lábil eficiente que pueda ser utilizado como donante general en una estrategia ortogonal para la síntesis convergente de diversos sialósidos con diferentes enlaces.

Sialil-fosfita^{7a-d}, se ha utilizado para la α -sialilación selectiva, pero se ha prestado menos atención al correspondiente fosfato debido a su deficiente α -selectividad en reacciones de glicosidación^{7a, 7d}.

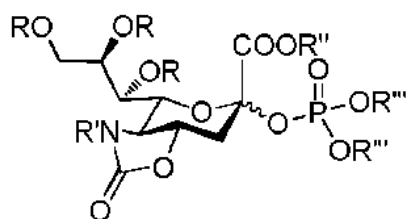
SUMARIO DE LA INVENCION

Un nuevo conjunto de reactivos de sialilación altamente α -selectivos, con la combinación de la modificación C-4/C-5 y grupo lábil de fosfato de dibutilo, se sintetizó y se utilizó para la síntesis eficiente de α -sialósidos. El donante de sialil-fosfato con grupo protector *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonilo se utilizó para crear cinco bloques de construcción de disacáridos sialilados que se encuentran comúnmente en productos naturales, incluyendo Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 3)Gal, Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)Gal, Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)GalNAc, Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 9)Neu5Ac y Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac, con excelentes rendimientos y α -estereoselectividad. Mediante el uso de los disacáridos sialilados como donantes, se han desarrollado protocolos de un solo recipiente para la síntesis de α (2 $\rightarrow$ 3) y α (2 $\rightarrow$ 6) sialósidos, incluyendo ligandos de hemaglutinina (HA) de la gripe, tetrasacárido de epítipo DSGG de antígeno asociado a carcinoma de células renales y antígeno embrionario específico de fase-4 (SSEA-4). Además, se reseña una síntesis convergente de ácidos tetrasialícos α (2,9)-enlazados a octasialícos α (2,9)-enlazados.

Además de ello, estos sialósidos sintetizados se esparcen sobre un sustrato para generar una matriz de sialósidos para la HA de la gripe y el perfilado de unión al virus real. Un banco de 27 sialósidos, incluyendo diecisiete α (2 $\rightarrow$ 3) glicanos y diez α (2 $\rightarrow$ 6) glicanos utilizando los bloques de construcción de "disacáridos sialilado" se ha sintetizado y se ha utilizado para la preparación de una matriz de glicanos, que contiene diferentes longitudes de glicano, enlaces, tipos de azúcar y sulfatación adicional. Esta matriz se utilizó para perfilar la especificidad de unión de diferentes hemaglutininas de la gripe expresadas a partir de sistemas de células de mamíferos e insectos para examinar el efecto de la glicosilación de HA en la unión al receptor. Se encontró que las HAs de células de insecto se unen a receptores de sialósido más fuertemente que las de células humanas con diferencias en la especificidad de unión y que la glicosilación en Asn27 es importante para la interacción HA-receptor.

La invención proporciona un compuesto donante de sialil-fosfato para la síntesis de sialósidos tal como se recoge en la reivindicación 1, y un método para sintetizar un sialósido tal como se recoge en la reivindicación 2 y las reivindicaciones dependientes subsiguientes.

La invención proporciona un compuesto donante de sialil-fosfato para la síntesis de sialósidos tal como se recoge en la reivindicación 1. También se describe un compuesto donante de sialil-fosfato para la síntesis de sialósidos que comprende: un grupo protector de *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonilo, de 5-*N*,4-*O*-carbonilo, de 5-*N*-trifluoroacetilo, de 5-*N*-acetilo o de 5-azido; y un grupo lábil de fosfato alquilo, arilo o de alquil-arilo mixto. En un aspecto, el compuesto tiene la estructura:



R = Ac, ClAc etc.

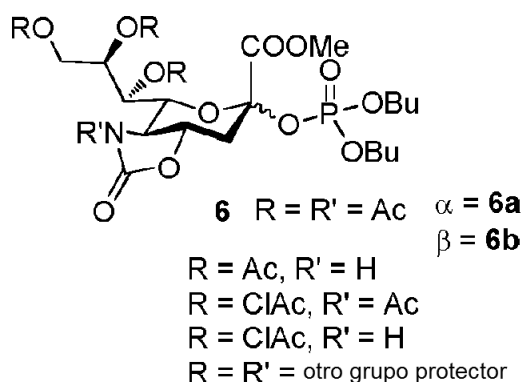
R' = H, Ac etc.

R'' = Alquilo o Arilo, p. ej., Me, Et, Ph, Bn,...

R''' = Alquilo o Arilo, p. ej., Butilo, Fenilo, Arilo, ...

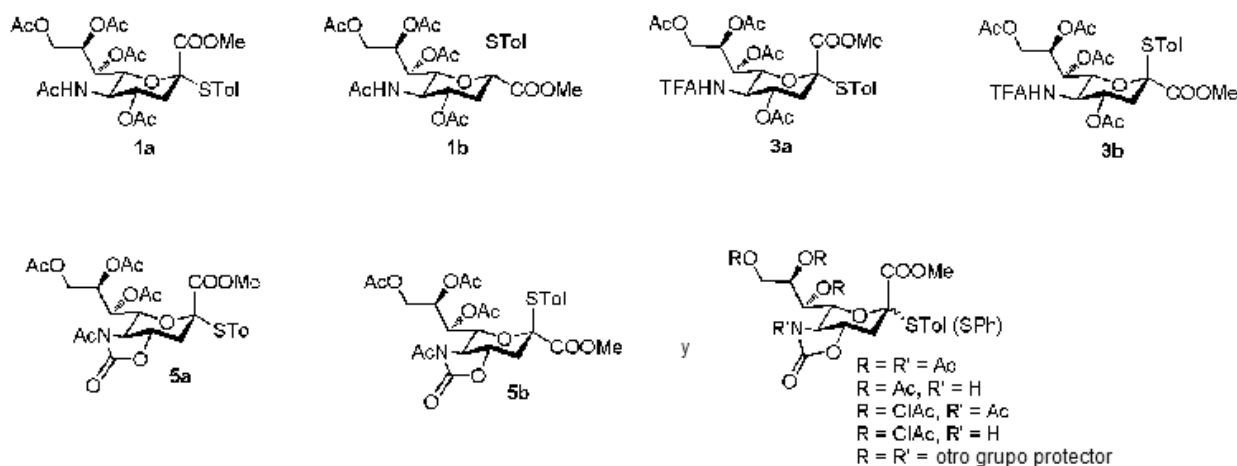
en donde R es independientemente H o un grupo seleccionado de: acetilo, cloroacetilo, bencilo, tiobencilo, bencilidina y fenacilo; R' es independientemente H o acetilo; R'' es independientemente H o se selecciona del grupo que consiste en: alquilo C₁-C₂₀, arilo C₆-C₂₀, alquenilo C₂-C₂₀, alquinilo C₂-C₂₀, cicloalquilo C₃-C₂₀, cicloarilo C₃-C₂₀, cicloalquenilo C₃-C₂₀, heteroarilo, aralquilo y heteroaralquilo; cada uno de los R''' se selecciona independientemente del grupo que consiste en: alquilo C₁-C₂₀, arilo C₆-C₂₀, alquenilo C₂-C₂₀, alquinilo C₂-C₂₀, cicloalquilo C₃-C₂₀, cicloarilo C₃-C₂₀, cicloalquenilo C₃-C₂₀, heteroarilo, aralquilo y heteroaralquilo, y cualquier sal o estereoisómero del mismo.

También se describe que el compuesto tiene la siguiente estructura 6:



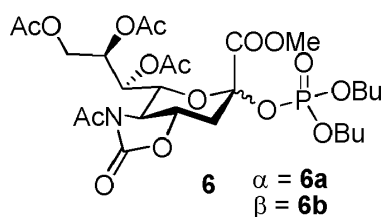
La invención proporciona un método para sintetizar un sialósido, de acuerdo con la reivindicación 2. El método comprende: acoplar un tiosialósido con un fosfato de dibutilo en presencia de *N*-yodosuccinimida y ácido trifluorometanosulfónico catalítico (triflico) bajo condiciones adecuadas; y aislar un donante de sialil-fosfato de dibutilo *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonilo-prottegido de acuerdo con la reivindicación 1. En algunos aspectos, el sialósido comprende un enlace α -glicosídico.

Se describe que el tiosialósido se selecciona del grupo que consiste en:

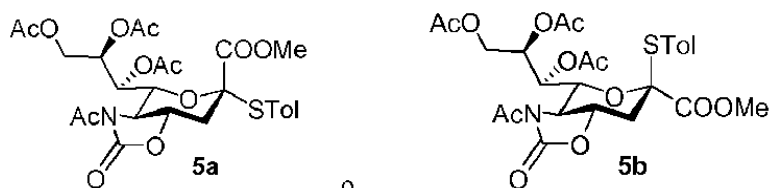


En algunos aspectos, el método comprende separar sialil- α -fosfato de sialil- β -fosfato mediante un procedimiento que comprende cromatografía.

En una realización, el donante de sialil-fosfato de dibutilo *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonilo-prottegido comprende sialil- α -fosfato **6a** o sialil- β -fosfato **6b** que tiene la fórmula:

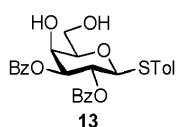


y el tiosialósido *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonilo-prottegido es:

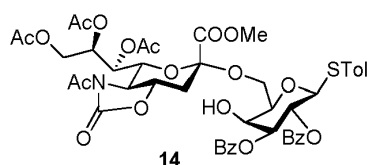


En un aspecto, el método comprende las etapas de la síntesis α -selectiva de un bloque de construcción disacárido de sialilo que comprende ácido *N*-acetil-neuramínico (Neu5Ac): mediante acoplamiento del donante de sialil-fosfato de dibutilo *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonilo-protégido con un aceptor de tiogalactósido adecuado. En una realización, el bloque de construcción disacárido que comprende ácido *N*-acetil-neuramínico (Neu5Ac) es principalmente α -anomérico. En una realización, el acoplamiento está fomentado por el reactivo trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (TMSOTf).

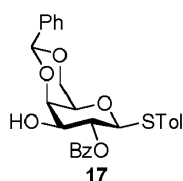
En algunos aspectos, el bloque de construcción disacárido de sialilo es Neu5Aca(2 $\rightarrow$ 6)Gal y un aceptor de 4,6-dihidroxi-tiogalactósido de la fórmula:



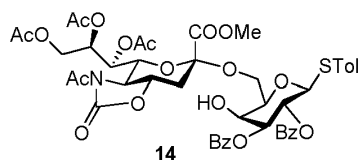
10 **13** está acoplado con el donante de sialil-fosfato de dibutilo *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonilo-protégido **6a** para producir un Neu5Aca(2 $\rightarrow$ 6)Gal de la fórmula:



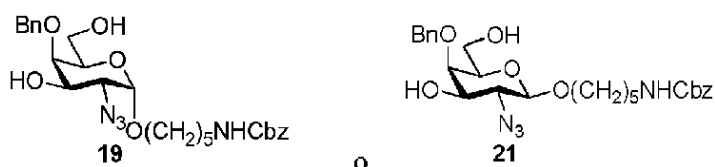
En algunos aspectos, el bloque de construcción disacárido de sialilo es Neu5Aca(2 $\rightarrow$ 3)Gal, y un aceptor de tolil-2-*O*-benzoil-4,6-bencilidina-1-tio- β -D-galactopiranosido **17** de la fórmula:



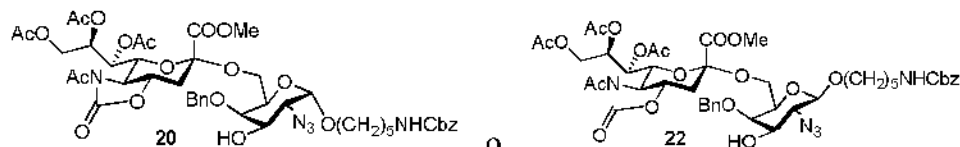
15 **17** está acoplado con el donante de sialil-fosfato de dibutilo *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonilo-protégido **6a** para producir un Neu5Aca(2 $\rightarrow$ 3)Gal de la fórmula:



20 En algunos aspectos, el bloque de construcción disacárido de sialilo es Neu5Aca(2 $\rightarrow$ 6)GalNAc y un aceptor de tolil-2-*O*-benzoil-4,6-bencilidina-1-tio- β -D-galactopiranosido **19** ó **21** de la fórmula:



está acoplado con el donante de sialil-fosfato de dibutilo N-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonilo-prottegido **6a** para producir un Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)GalNAc de la fórmula:



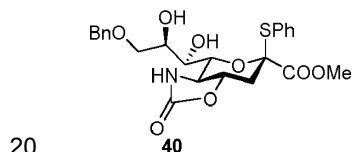
5 respectivamente.

En algunos aspectos, el bloque de construcción disacárido Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)GalNAc se utiliza para la síntesis de un antígeno O-sialilado STn, 2,6-STF, 2,3-STF o glicoforina.

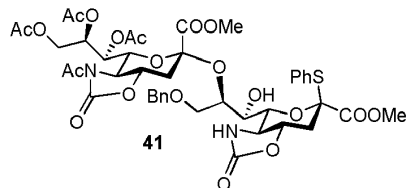
10 En algunas formas de realización, el método comprende, además, las etapas de una síntesis α -selectiva en un solo recipiente de un bloque de construcción de trisacárido de sialilo que comprende ácido *N*-acetil-neuramínico (Neu5Ac): acoplando primero el donante de sialil-fosfato de dibutilo *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonilo-prottegido con un primer aceptor de tiogalactósido en una reacción durante un tiempo adecuado para producir un disacárido; y luego añadiendo un segundo aceptor a la mezcla de reacción y permitiendo que una segunda reacción de acoplamiento produzca un trisacárido.

15 En algunos aspectos, el trisacárido comprende un trisacárido $\alpha(2\rightarrow3)$ -enlazado o $\alpha(2\rightarrow6)$ -enlazado al receptor de hemaglutinina (HA) de la gripe. En algunos aspectos, la reacción en un solo recipiente es como se muestra en el Esquema 1 o el Esquema 2. En algunos aspectos, el segundo aceptor es un trisacárido. La reacción en un solo recipiente produce una monosialosil globopentaosilceramida, antígeno embrionario específico de fase-4 (SSEA-4).

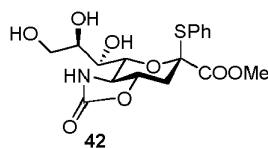
En algunos aspectos, el bloque de construcción disacárido de sialilo es Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac y un aceptor tiogalactósido 7.8-dihidroxi de la fórmula **40**:



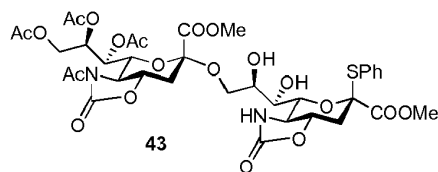
está acoplado con el donante de sialil-fosfato de dibutilo N-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonilo-protégido **6a** para producir un Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac de la fórmula **41**:



En algunos aspectos, el bloque de construcción disacárido de sialilo es Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 9)Neu5Ac y un aceptor de tiogalactósido 7,8,9-trihidroxi de la fórmula **42**:



está acoplado con el donante de sialil-fosfato de dibutilo N-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonilo-prottegido **6a** para producir un Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 9)Neu5Ac de la fórmula **43**:



En algunos aspectos, el método comprende, además, la síntesis α -selectiva de un tetrasacárido de sialilo α (2 $\rightarrow$ 9) que comprende ácido *N*-acetil-neuramínico (Neu5Ac): poniendo en contacto primero el donante de sialil-fosfato de dibutilo N-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonilo-prottegido con un aceptor de tiosialósido adecuado en una reacción durante un tiempo adecuado para producir un primer disacárido Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 9)Neu5Ac con un grupo lábil SPh en el extremo reductor; a continuación, transfiriendo este ácido tiofenil-disialico al donante sialil-fosfato de dibutilo; y luego añadiendo un segundo disacárido Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 9)Neu5Ac a la mezcla de reacción y permitiendo que una segunda reacción de acoplamiento produzca un tetrasialósido (Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 9)Neu5Ac) $_2$.

La invención comprende la preparación de un octosialósido (Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 9)Neu5Ac) $_4$. En algunos aspectos, el octosialósido comprende un antígeno sintético para *Neisserian meningitidis*. En algunos aspectos, el octosialósido comprende, además, un grupo azido alquil-pentilo en el extremo reductor adecuado para conjugar el octosialósido a una proteína o péptido.

El método comprende la síntesis α -selectiva de ácidos polisialílicos α (2 $\rightarrow$ 8)/ α (2 $\rightarrow$ 9) alternativos: poniendo en contacto primero el donante de sialil-fosfato de dibutilo N-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonilo-prottegido con un aceptor de tiosialósido adecuado en una reacción durante un tiempo adecuado para producir un primer ácido disialico α (2 $\rightarrow$ 8) con un grupo lábil SPh en el extremo reductor; a continuación transfiriendo este ácido tiofenil-disialico al donante sialil-fosfato de dibutilo; y luego añadiendo uno o más disacáridos que comprenden ácido disialico α (2 $\rightarrow$ 9) y, opcionalmente, un segundo ácido disialico α (2 $\rightarrow$ 8) a la mezcla de reacción y permitiendo que una serie de reacciones de acoplamiento adicionales produzcan uno o más ácidos tetra-, hexa-, octa- u otros ácidos poli-sialílicos α (2 $\rightarrow$ 8)/ α (2 $\rightarrow$ 9) alternativos.

También se describe un método que comprende una síntesis programable en un solo recipiente de oligosacáridos: determinando un valor reactivo relativo (RRV) de un disacárido sialilado sintético; y programando una secuencia para la síntesis de un polisacárido sialilado, en el que la reactividad de un disacárido sialilado se determina por el segundo residuo del disacárido. Los bloques de construcción de disacáridos de sialilo comprenden uno o más del grupo que consiste en Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 3)Gal, Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)Gal, Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)GalNAc, Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 9)Neu5Ac y Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac.

También se describe un método que comprende el ensamblaje de un banco de sialósidos utilizando bloques de construcción de disacáridos de sialilo que comprende ácido *N*-acetil neuramínico (Neu5Ac). El banco de sialósidos comprende receptores de proteínas hemaglutinina (HA) del virus de la gripe. El método comprende además: inmovilizar una pluralidad de miembros del banco de sialósidos en una matriz.

También se describe un banco que comprende una pluralidad de polisacáridos de sialilo, en donde los polisacáridos se sintetizan a partir de bloques de construcción de disacáridos de sialilo generados por acoplamiento del donante de sialil-fosfato de dibutilo N-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonilo-prottegido con un aceptor adecuado.

En algunos aspectos, los bloques de construcción de disacáridos de sialilo comprenden uno o más del grupo que consiste en Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 3)Gal, Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)Gal, Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)GalNAc, Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 9)Neu5Ac y Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac. Uno o más de los polisacáridos de sialilo corresponden a sialósidos α (2 $\rightarrow$ 3) o α (2 $\rightarrow$ 6) que se producen de forma natural. Los polisacáridos de sialilo se unen a proteínas hemaglutinina (HA) del virus de la gripe. En algunos aspectos, los polisacáridos de sialilo se unen a un patógeno, un agente infeccioso, un marcador de células cancerígenas, un virus, una bacteria o un hongo.

También se describe un método para detectar la unión a un sialósido, comprendiendo el método inmovilizar una pluralidad de polisacáridos de sialilo, en el que los polisacáridos se sintetizan a partir de bloques de construcción de disacáridos de sialilo generados por acoplamiento del donante de sialil-fosfato de dibutilo N-acetil-5-*N*, 4-*O*-carbonilo-*protegido* con un aceptor adecuado, en sitios discretos en una matriz; poner en contacto la matriz con una muestra de la que se sospecha que contiene un agente que se une a un sialósido en la matriz; detectar una reacción de unión en la matriz; y determinar la presencia o ausencia del agente basado en la detección de una reacción de unión en la matriz. En algunos aspectos, el sialósido en la matriz comprende un glicano que se encuentra en un receptor de la superficie celular. En algunos aspectos, el agente comprende una glicoproteína de superficie de un patógeno o un fragmento activo de la misma.

En algunos aspectos, el agente comprende una proteína hemaglutinina de la gripe o un fragmento activo de la misma. La proteína hemaglutinina de la gripe o un fragmento activo de la misma comprende un virus natural. La proteína hemaglutinina de la gripe o un fragmento activo de la misma comprende una proteína HA recombinante, un polipéptido o una variante activa de la misma.

En algunos aspectos, la matriz comprende α (2 $\rightarrow$ 3) y α (2 $\rightarrow$ 6) sialósidos de longitudes variables. El patrón de unión en la matriz es distintivo de una cepa de virus de la gripe. La cepa del virus de la gripe se selecciona del grupo que consiste en H1N1, H3N1, H3N2, H5N1, H5N2, H7N7 y H9N2. El perfil de unión de la proteína HA o fragmento de una cepa del virus de la gripe depende de la secuencia o la longitud de los α (2 $\rightarrow$ 3) y α (2 $\rightarrow$ 6) sialósidos. En algunos aspectos, la cepa del virus de la gripe se selecciona del grupo que consiste en Cal/09 H1N1 pandémica, Brisbane/59/2007 (Br/59/07) estacional, H1N1/New Caledonia/1999 (NC/99), Brisbane H3N1 y NIBRG-14 (H5N1), Br10 (H3N2), Cal07 (H1N1) H5 (Vietnam 1194/2004 y CHA5), WSN (H1N1) 1933 y A/Puerto Rico/8/34 (H1N1):virus de la gripe cepa PR8.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos de esquemas y figuras forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente descripción, cuyas invenciones se puede entender mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en esta memoria.

El Esquema 1 muestra la Síntesis escalonada del trisacárido **28** α (2 $\rightarrow$ 6)-enlazado al receptor de HA de la gripe. ^aReactivos y Condiciones: (a) 6a (1,5 equiv), 13 (1,0 equiv), TMSOTf (1,5 equiv), 4Å MS, CH₂Cl₂, -78°C; (b) 14 (1,2 equiv), 27 (1,0 equiv), NIS (2,0 equiv), TMSOTf (0,5 equiv), 4Å MS, CH₂Cl₂, -40°C.

El Esquema 2 muestra la Síntesis en un Solo Recipiente de los Trisacáridos α (2 $\rightarrow$ 3)- y α (2 $\rightarrow$ 6)-Enlazados a Receptores de HA de la Gripe y Tetrasacárido del Epítipo DSGG. Reactivos y Condiciones: (a) 6a (1,5 equiv), 4Å MS, TMSOTf (1,5 equiv), -78°C, CH₂Cl₂; (b) -78°C $\rightarrow$ -40°C. (c) NIS (1,2 equiv), global 80% para **28**, α solamente; 79% para **29**, α solamente; 57% para **30**, α solamente.

El Esquema 3 muestra la Síntesis en un Solo Recipiente de los Hexasacárido SSEA-4. Reactivos y Condiciones: (i) TMSOTf, MS 4Å, CH₂Cl₂, -78°C; (ii) NIS, global 78%; (iii) (a) NaOMe, MeOH (b) Zn, AcOH, THF; (c) Ac₂O, piridina, DMAP (d) NaOH 0,1 N, (e) Pd(OH)₂, H₂, THF: MeOH:AcOH:H₂O = 10:8:1:0,7 (v/v)

El Esquema 4 muestra la síntesis del Disacárido **33**. Reactivos y Condiciones: (a) TMSOTf, NIS, CH₂Cl₂/H₂O (9:1), 0°C, 75%; (b) K₂CO₃, CCl₃CN, 65%; (c) TMSOTf, MS 4Å, -40°C, 60%; (d) DDQ, CH₂Cl₂/H₂O (9:1), 96%.

El Esquema 5 muestra la síntesis de Bloques de Construcción de Disacáridos α (2 $\rightarrow$ 9)-enlazados. Reactivos y Condiciones: (a) fosfato de dibutilo, NIS, TFOH, CH₂Cl₂, 0°C, 96%; (b) TMSOTf, CH₂Cl₂/MeCN, -78°C, 1 h, 80%; (c) tiourea, 2,6-lutidina, DMF, 60°C, 12 h, 82%; (d) Ac₂O, Piridina, DMAP, CH₂Cl₂, -50°C, 5 h, 80%; (e) fosfato de dibutilo, NIS, TFOH, CH₂Cl₂, 0°C, 3 d, 73%.

El Esquema 6 muestra la síntesis de Ácido Octasiálico $\alpha(2\rightarrow9)$.

El Esquema 7 muestra la síntesis de derivados de ácido di-, tri-, tetra-, hexa-, octa-siálico.

El Esquema 8 muestra la síntesis de ácidos polisiálicos $\alpha(2\rightarrow8)/\alpha(2\rightarrow9)$ alternativos.

- 5 El Esquema 9 muestra la Glicosilación en un Solo Recipiente basada en la reactividad de Pentasacárido **75**.
Reactivos y Condiciones: (1). NIS, TfOH, tamices moleculares 4Å, CH₂Cl₂, -78°C; (2). NIS, TfOH, -20°C a TA.

La Figura 1A muestra las estructuras de O-glicanos Sialilados STn, 2,3-STF, Glicoforina y 2,6-STF. La Fig. 1B muestra estructuras de sialósidos que fueron esparcidos sobre el portaobjetos de vidrio para crear una matriz de sialósidos para estudios de unión a HA de la gripe.

La Figura 2 muestra patrones de unión diferenciales de HA de los virus H1N1, H3N2, H5N1, H7N7 y H9N2.

- 10 La Figura 3 análisis de las matrices de glicanos de los cuatro virus investigados. Las señales de unión se muestran como medias de manchas duplicadas 100 μ M por mancha. Cada uno de los experimentos se repitió dos veces. Las matrices consistían en veintisiete sondas de oligosacáridos sialilados, impresos en portaobjetos de vidrio recubiertos con NHS (NHS: N-Hidroxi-Succinimida). Los diversos tipos de enlace de ácido siálico terminal se indican mediante los paneles de colores según se define en la parte inferior de la figura.
- 15 Las Figuras 4A-4B muestran perfiles de unión de mutante HA de glicosilación. (4A) Se predijeron nueve sitios de glicosilación utilizando H5 como un ejemplo. Se confirmó que los sitios de glicosilación predichos en recuadros grises estaban glicosilados utilizando LCMS. Se confirmó que los sitios en recuadros en blanco no estaban glicosilados y el del recuadro rayado puede estar parcialmente glicosilado. Mutantes de glicosilación fueron creados cambiando Nx(T/S) por NXA. (4B) Patrones de unión de azúcar de mutantes de glicosilación individuales.
- 20 La Figura 5 muestra espectros de CD que demostraron que $\Delta 170$ exhibe una estructura secundaria similar a la de HA de tipo salvaje, mientras que la estructura secundaria de $\Delta 27$ se cambia.

La Figura 6 muestra la K_D de HA de la gripe de SOV y gripe estacional hacia $\alpha 2,6$ -sialósidos.

Figura 7 muestra sialósidos en la matriz y los valores K_D (nM) de mutantes de glicosilación de HA para sialósidos individuales.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- En la siguiente descripción detallada de realizaciones de la presente descripción, se hace referencia a los dibujos adjuntos, en los que referencias similares indican elementos similares, y en los que se muestra a modo de ilustración realizaciones específicas en las que puede ponerse en práctica la presente descripción. Estas realizaciones se describen con suficiente detalle para permitir a los expertos en la técnica poner en práctica la presente descripción.
- 30 La siguiente descripción detallada no debe tomarse, por lo tanto, en un sentido limitativo.

- La memoria descriptiva describe un método eficiente para la síntesis de un donante de sialil-fosfato a partir de tioglicósido de sialilo y su uso para la preparación de bloques de construcción de disacáridos estereoquímicamente definidos, incluyendo Neu5Ac $\alpha(2\rightarrow3)$ Gal, Neu5Ac $\alpha(2\rightarrow6)$ Gal, Neu5Ac $\alpha(2\rightarrow6)$ GalNAc, Neu5Ac $\alpha(2\rightarrow9)$ Neu5Ac y Neu5Ac $\alpha(2\rightarrow8)$ Neu5Ac, que fueron utilizados subsiguientemente para la síntesis eficiente de sialósidos $\alpha(2\rightarrow3)$ y α -enlazados, incluyendo receptores de hemaglutininas, tetrasacárido de epítipo DSGG de antígeno asociado a carcinoma de células renales, antígeno embrionario específico de fase-4 (SSEA-4) y ácidos oligosiálicos. Este nuevo donante de sialilo y bloques de construcción de disacárido de sialilo se utilizaron adicionalmente en el ensamblaje de un banco de sialósidos, que después se utilizó para preparar una matriz de glicanos para estudiar el perfil real de unión del virus de la gripe y el efecto de glicosilación de la hemaglutinina (HA) de su interacción con aceptores de sialósidos.
- 40

Donante de N-acetil Sialil Fosfato de Dibutilo.

Tal como se ha descrito previamente, la preparación de donantes de sialil-fosfato provino de la oxidación del correspondiente sialil-fosfito^{7a,7d}. Desafortunadamente, se observó una deficiente eficiencia cuando estos compuestos de fosfato fueron investigados como donantes de sialilo, que resultaron en un bajo rendimiento y una selectividad α disminuida^{7a,7d}. Por otra parte, en contraposición con el donante de sialil-fosfato, se han utilizado otros donantes de fosfatos de glicosilo tales como los de fucosa, manosa, galactosa, glucosa y glucosamina en la construcción de O-glicósidos²⁴ y C-glicósidos²⁵, y especialmente en la síntesis en fase sólida automatizada de oligosacáridos^{18,26}. Debido a que grupos lábiles a base de fosfato pueden ser activados selectivamente en presencia de tioglicósido, es deseable explorar la síntesis y la utilidad de donantes de sialil-fosfato. Sorprendentemente, sialil-fosfato de dibutilo **2** se puede sintetizar con un alto rendimiento (94%) mediante el tratamiento de donante de tiosialósido **1** y fosfato de dibutilo comercialmente disponible en presencia de *N*-yodosuccinimida y ácido trifluorometanosulfónico (triflico) catalítico (NIS/cat. TfOH) a 0°C en CH₂Cl₂ (Tabla 1, entrada 1-2). La reacción se completó en 5 h para dar una mezcla de anómeros α y β . El sialil- α -fosfato **2a** y sialil- β -fosfato **2b** se pueden separar fácilmente por cromatografía en columna de gel de sílice y ambos son estables a -20°C durante varios meses.

Tabla 1. Síntesis de Donantes de Sialil-Fosfato N-acetilo, N-TFA, N-acetil-5N,4O-carbonilo-protectados

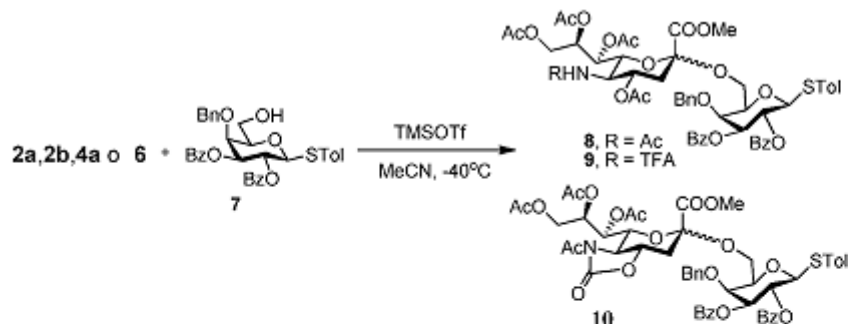
Tiosialósido		$\xrightarrow[\text{NIS, TfOH}]{\text{HOPO(Obu)}_2}$			Sialil-fosfato
$\text{CH}_2\text{Cl}_2, 4\text{\AA MS}, 4^\circ\text{C}$					
Entrada	Tiosialósido	Producto	Rendimiento ^a	α : β ^b	
1	 1a	 2 $\alpha = 2a$ $\beta = 2b$	89%	1.5:1	
2	 1b	 2 $\alpha = 2a$ $\beta = 2b$	94%	1.2:1	
3	 3a	 4 $\alpha = 4a$ $\beta = 4b$	98%	1.4:1	
4	 3b	 4 $\alpha = 4a$ $\beta = 4b$	91%	1.1:1	
5	 5a	 6 $\alpha = 6a$ $\beta = 6b$	94%	10:1	
6	 5b	 6 $\alpha = 6a$ $\beta = 6b$	96%	3:1	

^a Rendimiento aislado. ^b Determinado mediante análisis ¹H-RMN de la mezcla de reacción

Las propiedades de los donantes de glicosilo de sialil- α -fosfato **2a** se sometieron inicialmente a ensayo mediante acoplamiento con aceptor de galactopiranosido **7**²³ que porta un grupo OH libre en la posición **6** y un grupo lábil tiocresol (Tabla 2). A una mezcla en agitación de **2a** (1,5 equiv), **7** (1,0 equiv) y MS 4Å en CH₃CN a -40°C bajo argón, se añadió trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (TMSOTf; 1,5 equiv). La reacción se completó en 5 min, y el producto de glicosilación **8** se obtuvo en un rendimiento de 74% con una relación α / β de 5:1 (entrada 1). A

continuación, también se evaluó la glicosilación de sialil-β-fosfato **2b** y aceptor **7** en las mismas condiciones de reacción. Sin embargo, cuando se utilizó un equivalente de TMSOTf, una parte de β-fosfato **2b** no se activó, incluso con un tiempo de reacción prolongado. Después de la adición de otro equivalente de TMSOTf, el donante de β-fosfato **2b** se consumió completamente y produjo el disacárido deseado **8** en un rendimiento de 75%, aunque con una ligera disminución en la selectividad α (entrada 2). Estos resultados son consistentes con el hecho de que el donante de glicosilo ecuatorial es más reactivo que su contraparte axial^{24f}.

Tabla 2. Glicosilación de Donantes de Sialil-Fosfato N-acetil-, N-TFA, N-acetil-5N,4O-carbonilo-protectidos



Entrada	donante de sialil-fosfato	disacárido	TMSOTf(equiv)	relación α/β ^a	rendimiento ^b
1	2a	8	1.0	5:1	74%
2	2b	8	2.0	4:1	75%
3	4a	9	1.0	8:1	97%
4	6	10	1.0	15:1	96%

^aRendimiento aislado. ^bDeterminado mediante análisis ¹H-RMN de la mezcla de reacción

Donantes de Sialil-Fosfato de Dibutilo N-trifluoroacetil y N-acetil-5-N,4-O-Carbonilo-Protectidos

Se ha reseñado que el reemplazo del grupo acetamido C-5 de sialil-fosfato con el grupo azida^{14a} o trifluoroacetamido^{14b} mejoró en gran medida tanto la selectividad α como la reactividad. Utilizando esta estrategia, los autores de la invención sintetizaron N-TFA sialil-fosfato **4** a partir del tiosialósido **3**^{15b} bajo las condiciones arriba mencionadas (Tabla 1, entrada 3-4). Para la comparación con **2a**, α-**4a** y β-**4b** los anómeros se separaron y aceptor **7** se glicosiló con **4a** bajo promoción de TMSOTf a -40°C en MeCN. Los resultados demostraron de hecho un rendimiento (97%) y selectividad α muy mejorados (relación α/β de 8:1) (Tabla 2, entrada 3). Dado que se demostró que los tiosialósidos con protecciones N-acetil-5-N,4-O-carbonilo²⁷ o 5-N,4-O-carbonilo²⁸, dan una alta selectividad α y excelentes rendimientos hacia diferentes aceptores, los autores de la invención decidieron someter a ensayo un nuevo donante de sialil-fosfato con protección N-acetil-5-N,4-O-carbonilo, ya que el grupo oxazolidinona podría ser escindido bajo condiciones suaves dejando intacta la acetamida^{27a}. El compuesto **5** se transformó en donante de fosfato de dibutilo **6** en un rendimiento casi cuantitativo (Tabla 1, entrada 5-6); el anómero α de tiosialósido dio más producto α fosfato (Tabla 1, entrada 1-4).

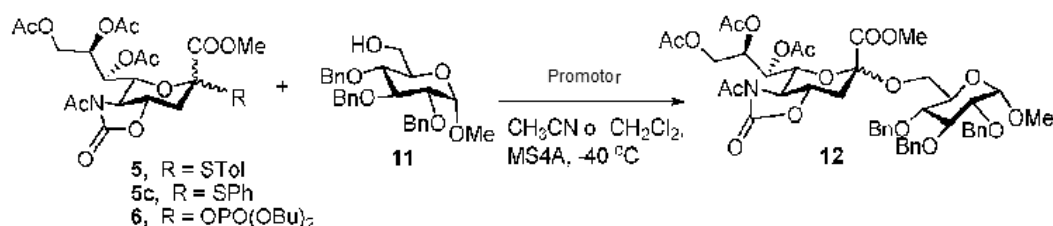
El compuesto **6**, sin separación de la mezcla α, β, se acopló al aceptor **7** bajo promoción de TMSOTf en CH₃CN a -40°C para dar el disacárido **10** con un rendimiento muy alto (96%) y selectividad α marcadamente mejorada (relación α/β de 15:1) (Tabla 2, entrada 4). Los autores de la invención también observaron que la protección N-acetil-5-N,4-O-carbonilo potenciaba la reactividad de **6**, dado que la mezcla de α- y β-fosfato fue completamente activada con solamente un equivalente de TMSOTf.

Efectos de los Grupos Lábil y Sistemas de Disolventes en Selectividad α de Donantes de Sialilo N-acetil-5N,4O-carbonilo-protectidos

Para estudiar la influencia de diferentes grupos lábiles en el donante de sialil-fosfato N-acetil-5-N,4-O-carbonilo-protectido **6** y sus homólogos toliltio y feniltio, **5** y **5c**^{27a} fueron examinados mediante acoplamiento con el hidroxilo

primario del aceptor de glucosa **11** en CH_2Cl_2 a -40°C (Tabla 3). A partir de los resultados de la Tabla 3, el donante de fosfato **6** mostró una mayor selectividad α (entrada 3) que **5** (entrada 1) y **5c** (entrada 2). Además, sólo se requieren 5 min para la compleción de la reacción en comparación con 30 min y 2 h para **5** y **5c**, respectivamente. A continuación, con el fin de conocer el efecto del disolvente sobre las propiedades donantes de glicosilo del donante de fosfato **6**, los autores de la invención sometieron a ensayo su reacción con el aceptor **11** en MeCN y CH_2Cl_2 , respectivamente (entradas 3 y 4), y se encontró que cuando el disolvente se cambió de MeCN a CH_2Cl_2 , el rendimiento mejoró de 80% a 92% y la relación α/β también se mejoró en gran medida de 7:1 a 13:1. Un efecto nitrilo no se observó en este caso. En resumen, estos resultados demostraron que la conversión del grupo lábil sulfuro de **6** en fosfato de dibutilo mejoró la selectividad α y la reactividad.

Tabla 3. Comparación de la Glicosilación Utilizando Donantes de Ácido Siálico *N*-acetil-5-*N*, 4-*O*-Carbonilo Protegido con Grupos Lábil Tiofenilo, Tioresol y Fosfato de Dibutilo



Entrada	Donante ^a	Disolvente	Promotor ^b	Tiempo	Rendimiento ^c	Relación α/β ^d
1	5	CH_2Cl_2	NIS/TfOH	30 min	92%	3.3:1
2	5c	CH_2Cl_2	NIS/TfOH	2 h	91%	9.4:1
3	6	CH_2Cl_2	TMSOTf	5 min	92%	13:1
4	6	MeCN	TMSOTf	5 min	80%	7:1

^aDonante (1,3 equiv), aceptor (1,0 equiv); ^b NIS (2,0 equiv), TfOH (1,0 equiv), TMSOTf (1,3 equiv); la Glicosilación de **5** fue lenta cuando se utilizó una cantidad catalítica de TfOH; ^c Rendimiento aislado; ^d Determinado mediante análisis ¹H-RMN de la mezcla de reacción

Síntesis alfa-selectiva de Bloques de Construcción de Disacáridos Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)Gal y Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 3)Gal.

Los autores de la invención centraron primero su estudio sobre la identificación de aceptores adecuados para la síntesis α -selectiva de bloques de construcción de disacáridos con enlace Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)Gal. Con el fin de facilitar la formación del enlace β deseado mediante la utilización de la participación del grupo vecino en la glicosilación subsiguiente, era deseable instalar el grupo éster de benzoilo en C-2 de los aceptores de galactosa. Para su sorpresa, la glicosilación del aceptor tiogalactósido 4,6-dihidroxi **13**²⁹ con donante de sialil-fosfato **6a** en presencia de TMSOTf (1 eq de donante) en CH_2Cl_2 a -78°C dio el disacárido Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)Gal **14** como un único producto α en un rendimiento de 85% (Tabla 4, entrada 1). La configuración α se confirmó mediante el acoplamiento constante de ³J_{C1-Heq}. Los autores de la invención centraron luego su atención a la síntesis del disacárido Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 3)Gal, que es más difícil, debido a la posición C-3 menos reactiva del aceptor de galactosa. Al principio, se utilizó tolil-4,6-bencilidina-1-tio- β -D-galactopiranosido **15**³⁰ (Tabla 4, entrada 2) como aceptor debido a que se demostró previamente una mejor selectividad α ^{14d,31}. Bajo promoción de TMSOTf a -78°C en CH_2Cl_2 , la glicosilación del aceptor **15** (1.5 equiv) con donante de sialil-fosfato **6a** (1,0 equiv) dio el producto α principal **16** en un 41%, junto con 39% de producto secundario (compuesto **5**) que se formó a partir de una reacción de transferencia de aglicona. Para eliminar la transferencia de aglicona, los autores de la invención introdujeron el grupo benzoilo eliminador de electrones en C-2 de **15** para reducir la reacción secundaria³². Además, el éster de benzoilo en la posición C-2 debería fomentar la glicosilación β -selectiva a través de la participación de grupos vecinos. De hecho, se obtuvieron un alto rendimiento (83%) y el producto α -anomérico cuando se utilizó el aceptor tolil-2-*O*-benzoil-4,6-bencilidina-1-tio- β -D-galactopiranosido **17**^{3b}, con sólo el 5% del producto de transferencia (entrada 3). Este bloque de construcción

de disacárido $\alpha(2\rightarrow3)$ -enlazado con un grupo lábil adecuado en el centro anomérico de galactosa se puede utilizar directamente en la siguiente glicosilación sin la necesidad de proteger la manipulación de grupo.

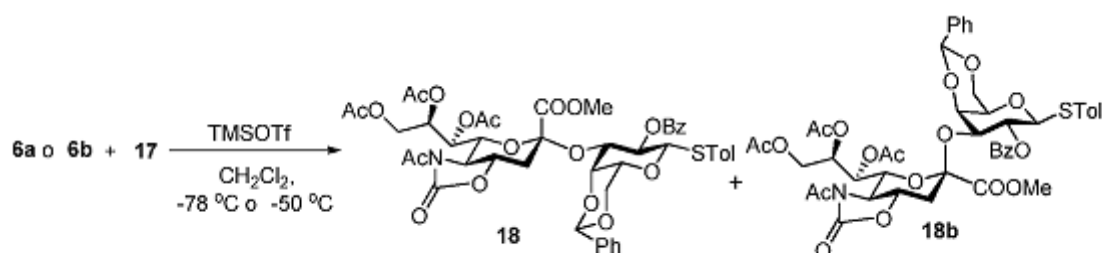
Tabla 4. Resultados de la Sialilación Utilizando Sialil-Fosfato *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-Carbonilo Protegido **6a**

Entrada	Aceptor	Producto	Rendimiento ^a	Relación $\alpha:\beta^b$	δ_{Cl} (ppm)	$^3J_{CH-3eq}$ (Hz)
1			85	α sólo	168.4	5.7
2			41	α sólo	168.6	6.3
3			83	α sólo	168.9	5.5
4			71	α sólo	168.3	6.2
5			70	α sólo	168.3	6.0
6			67	α sólo	168.7	6.0
7			82	α sólo	168.5	6.0
8			91	α sólo	168.8	6.0
9			90	α sólo	168.3	6.4

^a Rendimiento aislado. ^b Resultado bruto

Los autores de la invención también observaron que la reactividad entre **6a** y **6b** no se percibía a -40°C , mientras que la diferencia es notable a -78°C . Para investigar las diferencias de reactividad entre α - y β -fosfatos, los autores de la invención separaron entonces la mezcla de **6a** y **6b** y los acoplaron con aceptor de galactosa **17**, respectivamente (Tabla 5). En presencia de 1,0 equivalente de TMSOTf, el β -fosfato **6b** no prosiguió a una activación completa hasta que la temperatura se incrementó a -50°C (entrada 2), mientras que el donante de α -fosfato fue completamente activado a -78°C (entrada 1). En ambos casos, el rendimiento del producto de glicosilación **18** es similar, pero la selectividad α disminuyó en el caso de β -fosfato **6b**. Los resultados demostraron que la temperatura es un factor importante para controlar la selectividad α de sialilación con donante de sialil-fosfato **6**. Además de ello, la diferencia en la reactividad entre sialil α -fosfato **6a** y β -fosfato **6b** es menor que otros fosfatos de glicosilo; por ejemplo, el galactosil α -fosfato solamente se activó a una temperatura superior a -20°C , mientras que galactosil β -fosfato se activó fácilmente a -78°C ^{24f}.

Tabla 5. Comparación de las Reactividades entre Sialil- α -Fosfato **6a** y Sialil- β -Fosfato **6b**



Entrada	Donante	Tiempo de Reacción	T($^{\circ}\text{C}$)	Rendimiento ^a	18:18b ^b
1	6a	5 min	-78°C	83%	18 sólo
2	6b	5 min	-50°C	82%	10:1

^a Rendimiento aislado; ^b Determinado mediante análisis ^1H -RMN de la mezcla de reacción

Síntesis α -Selectiva del Bloque de Construcción de Disacárido Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)GalNAc.

Las versiones sialiladas de las estructuras de núcleo O-glicano Tn (GalNAc α (1 $\rightarrow$ 1)Ser/Thr) y TF (Gal β (1 $\rightarrow$ 3)GalNAc α (1 $\rightarrow$ 1)Ser/Thr) están altamente expresadas en muchos tipos de tumores humanos, incluyendo el de colon, mama, páncreas, ovario y estómago³³. La síntesis de antígenos sialilados O-enlazados tales como STn, 2,6-STF, 2,3-STF y glicoforina (Figura 1) es un reto, porque la reacción de sialilación a menudo da mezclas α y β , y son indispensables separaciones tediosas para obtener el producto α deseado³⁴. Después del análisis de sus estructuras, son esenciales dos bloques de construcción **L** y **M** (Figura 1). Después de haber llevado a cabo la síntesis del bloque de construcción NeuAc α (2 $\rightarrow$ 3)Gal **M**, los autores de la invención están interesados en la síntesis del bloque de construcción NeuA5c α (2 $\rightarrow$ 6)GalNAc **L**. Al utilizar el concepto de "síntesis de casete", tal como se ha descrito previamente³⁴⁻³⁵, los autores de la invención sintetizaron el aceptor GalNAc **19** y **21** con los grupos OH C-3 y C-6 y fijaron el espaciador en el centro anomérico a través de enlaces α y β , respectivamente (Tabla 4, entrada 4 y 5). Así, después de la sialilación en 6-OH, el producto se alargaría directamente desde la posición C-3 sin proteger la manipulación del grupo. Por consiguiente, la sialilación de **19** (1,0 equiv) con donante de sialil- α -fosfato **6a** (1,0 equiv) a -78°C proporcionó el disacárido **20** en un rendimiento de 71% y sólo se obtuvo producto α , junto con 13% de trisacárido 3,6-disialilado y 9% de subproducto de 2,3-eliminación (Tabla 4, entrada 4). Otra sialilación utilizando **21** como el aceptor, el disacárido **22** se logró en un rendimiento de 70%, junto con 14% de trisacárido 3,6-disialilado y 8% de subproducto de 2,3-eliminación (Tabla 4, entrada 5). Esta reacción de acoplamiento altamente α -selectivo eliminó la separación de estereoisómero que consume tiempo. Lo más importante, bloques de construcción de disacáridos de este tipo podrían utilizarse como materiales de partida para la preparación de otros antígenos sialilados O-enlazados.

Protocolo de un solo recipiente α -estereoselectivo.

Al lograr con éxito la síntesis estereoselectiva de disacáridos Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 3)Gal, Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)Gal y Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)GalNAc, los autores de la invención dirigieron su atención hacia el desarrollo de un protocolo de un solo recipiente para la síntesis convergente y α -selectiva de sialósidos. La síntesis escalonada del trisacárido de

unión **28** al virus de la gripe con el enlace Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)Gal se investigó primero (Esquema 1). Después de la síntesis de disacárido **14** con un rendimiento del 85% de acuerdo con las condiciones antes mencionadas, la glicosilación de C-4 OH del aceptor de GlcNAc **27** se logró con un rendimiento de 77% bajo la promoción de NIS/TMSOTf, junto con 16% de subproducto ortoéster **35**. El rendimiento total de las dos reacciones es de aproximadamente 66%. En esta etapa, diversos promotores tales como NIS/TfOH³⁶, DMTST³⁷, BSP/Tf₂O³⁸, *p*-TolSCI^{20c} fueron sometidos a ensayo y NIS/TfOH dio el mayor rendimiento. Como resultado, los autores de la invención seleccionaron NIS/TfOH como el promotor para la segunda glicosilación en el desarrollo del protocolo de un solo recipiente.

A continuación, se examinó una síntesis en un solo recipiente de trisacáridos **28** (Esquema 2). El tratamiento del primer aceptor **13** (1,0 equiv) con donante de sialil- α -fosfato **6a** (1,5 equiv) bajo condiciones mencionadas anteriormente dio el disacárido **14**. A continuación, añadiendo el segundo aceptor **27** sin la necesidad de añadir TfOH, la segunda reacción de acoplamiento prosiguió en el espacio de 30 min con la adición de sólo 1,2 equiv de NIS para proporcionar el trisacárido **28** con un rendimiento (80% basado en el segundo aceptor) y selectividad α excelentes. Se realizó un estudio paralelo mediante el ensamblaje de trisacáridos α (2 $\rightarrow$ 3)-enlazados **29**. También se obtuvo un rendimiento y una selectividad α excelentes (79%). De manera notable, el rendimiento de la reacción global aumentó en estas reacciones de glicosilación de un solo recipiente en comparación con el proceso escalonado, probablemente debido a una menor cantidad de subproducto ortoéster **35** encontrado en estas reacciones de un solo recipiente y, por otra parte, se omitió el aislamiento de los disacáridos intermedios **14** y **18**. Esta es la primera glicosilación α -selectiva de sialilaciones (2 $\rightarrow$ 6) y (2 $\rightarrow$ 3). Además, el tetrasacárido epítipo DSGG³⁹ de antígeno asociado a carcinoma de células renales **30** también fue ensamblado utilizando el mismo protocolo en un solo recipiente, en el que el disacárido Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)GalNAc **22** con hidroxilo C-3 se utilizó como el segundo aceptor. Del mismo modo, la reacción transcurrió sin problemas y proporcionó el tetrasacárido **30** en rendimientos de 57% con producto α . El rendimiento disminuido era debido a la hidrólisis del enlace glicosídico entre GalNAc y el enlazador de disacárido **22**.

Síntesis en un Solo Recipiente de Antígeno Embrionario Específico de fase-4 (SSEA-4, **31**).

Monosialosil globopentaosilceramida, SSEA-4, que funciona como antígeno asociado a tumores⁴⁰ y receptor bacteriana o viral⁴¹ contiene un resto Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 3)Gal en su extremo no reductor. Aunque la síntesis de SSEA-4 ha sido lograda por el grupo de Hasegawa⁴² y Schmidt⁴³ a través del método químico y el grupo de Huang⁴⁴ a través del método quimio-enzimático, el hexasacárido **32** protegido se puede ensamblar de manera más eficiente aquí a partir de sialil-fosfato **6a** (1,5 eq.), disacárido **33** (1,0 eq.) y trisacárido **34** (0,6 eq.) de una manera en un solo recipiente (Esquema 3). Esta estrategia utilizaba disacárido **33** como el primer aceptor en el que el galactósido no reductor poseía los mismos grupos protectores que el compuesto **17** con el fin de preservar la estereoselectividad α tras la sialilación. El trisacárido **34** ha sido descrito por este grupo previamente en el que el difícil enlace Gal β (1 $\rightarrow$ 4)Gal se instaló con antelación⁴⁵.

El Esquema 4 muestra el proceso para la preparación de disacárido **33**. El donante de glicosilo **37** 3-O-PMB- protegido se puede preparar fácilmente a partir de **35**. La glicosilación de tioglicósido **38** por **37** produjo el disacárido **39** con un rendimiento de 60%, y después de la separación del grupo *p*-metoxibencilo en C-3 por DDQ condujo al aceptor de disacárido **33**.

Síntesis α -Selectiva de Bloques de Construcción de Disacáridos Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac y Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 9)Neu5Ac.

Los dímeros Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac y Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 9)Neu5Ac son unidades de ácidos polisiálicos lineales que desempeñan papeles importantes en las funciones biológicas en la superficie celular⁴⁶; el dímero Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac es también un constituyente importante de los gangliósidos tales como GD2, que es un antígeno de cáncer bien conocido y ha sido considerado como un objetivo atractivo para el diseño de vacunas⁴⁷. Es valioso el desarrollo de un proceso eficaz para la síntesis de los bloques de construcción de disacáridos α (2 $\rightarrow$ 8) y α (2 $\rightarrow$ 9) para la construcción de estructuras más complejas. Recientemente, Takahashi y colaboradores informaron que el acoplamiento de un donante de ácido siálico 5-*N*,4-*O*-carbonilo protegido y un aceptor mostró una excelente selectividad α ^{28a, 28c}. Al utilizar el enfoque relacionado, Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 8)Neu5Ac estereoquímicamente puro fue sintetizado mediante el acoplamiento del donante de sialil- α -fosfato (1,0 equiv) **6a** con aceptor de 7,8-dihidroxi tiosialósido **40**^{28a} (1,0 equiv) bajo la promoción de TMSOTf a -78°C (Tabla 4, entrada 6). Se observa que el disacárido **41** se descompuso fácilmente cuando la reacción se inactivó mediante la adición de Et₃N (rendimiento sólo el 15%). Por otro lado, utilizando una base suave tal como NaHCO₃ no causaría el problema y daría lugar a un mejor rendimiento. Además, bajo las mismas condiciones, Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 9)Neu5Ac **43** (Tabla 4, entrada 7) se obtuvo un rendimiento elevado mediante el acoplamiento de **6a** con el aceptor 7,8,9-trihidroxi tiosialósido **42**^{27a}. Para esta

reacción, los autores de la invención observaron solamente un solo producto en la placa de TLC, cuando se terminó la reacción. Pero después de cromatografía en columna de gel de sílice, el rendimiento se redujo debido a la descomposición de algunos productos en productos secundarios no caracterizados.

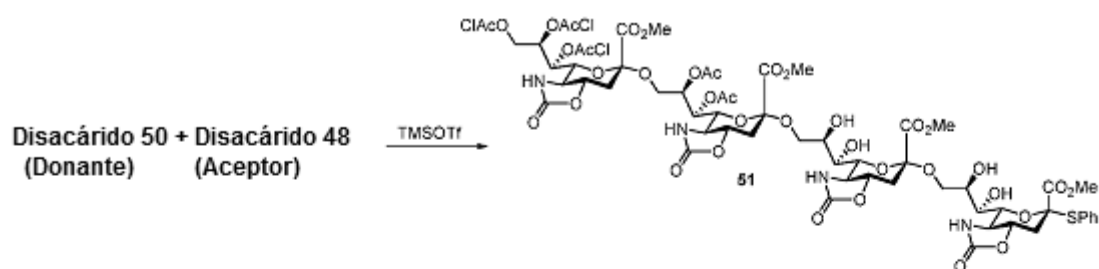
Síntesis de Tetrasialósidos $\alpha(2\rightarrow9)$.

5 Los autores de la invención han informado previamente de una síntesis α -específica de ácido trisialico $\alpha(2\rightarrow9)$ -
enlazado mediante el uso de C5-azido sialil fosfito como donante y C5-azido tiosialósido como aceptor para
proporcionar el disacárido $\alpha(2\rightarrow9)$ que se sialiló adicionalmente mediante glicosilación ortogonal para dar el
trímero^{14a}. Sin embargo, la amplia aplicabilidad de este método estaba limitada debido a las propiedades inestables
del compuesto C5-azido sialil fosfito. Por otro lado, Lin y colaboradores desarrollaron otra estrategia de síntesis
10 utilizando el donante C5-TFA sialil fosfito y el aceptor C5-TFA tiosialósido para la síntesis de ácido oligosialico
 $\alpha(2,9)$ ^{14b}. Después de una sialilación iterativa, acetilación, desprotección de tiocresol y la formación de fosfito, se
sintetizó el pentasialósido. Sin embargo, la selectividad α disminuyó cuando se alargaba la cadena de azúcar.
Recientemente, Takahashi también informó de un método alternativo para la síntesis α -específica de trisialósido
 $\alpha(2\rightarrow9)$ ^{14e} o tetrasialósido $\alpha(2\rightarrow9)$ ⁴⁸ utilizando tiosialósidos 5*N*,4*O*-carbonilo protegidos. La secuencia del
15 ensamblaje era del extremo reductor al extremo no reductor, y esta estrategia proporcionó la oportunidad de alargar
estereoselectivamente la cadena de azúcar de un residuo a la vez con el producto que se está utilizando
directamente en la siguiente glicosilación después de la desprotección selectiva del grupo protector en la posición
C8 o C9.

En esta memoria, los autores de la invención desarrollaron una estrategia alternativa para la síntesis de
20 tetrasialósidos $\alpha(2\rightarrow9)$ a octasialósidos $\alpha(2\rightarrow9)$ a través del donante de sialil-fosfato 5*N*,4*O*-carbonilo protegido.
Debido a la razón mencionada anteriormente de que el disialósido $\alpha(2\rightarrow9)$ **43** se descompuso después de
cromatografía en gel de sílice, los autores de la invención sintetizaron el compuesto **45** a partir del donante **44**. Las
posiciones C7, C8 y C9 de **44** fueron protegidas por el grupo cloroacetilo que se demostró previamente que potencia
la reactividad del donante ácido siálico^{14e,48,49}. La reacción se realizó sin problemas y proporcionó el producto
25 disialósido **47** como único isómero α en un rendimiento de 80%, y no se observó el problema de la descomposición.
Los grupos cloroacetilo de los sialósidos $\alpha(2\rightarrow9)$ **47** en el C7, C8 y C9 se separaron para producir **48** como aceptor
para la siguiente glicosilación. Además, el tiofenol anomérico del disacárido acetilado **49** se cambió a fosfato de
dibutilo, para producir el disacárido **50** como donante para la siguiente glicosilación (Esquema 5). Esta conversión
prosiguió hasta la compleción en 3 días con un rendimiento de 73%.

30 Los disacáridos de **48** y **50** se acoplaron para formar el derivado tetrasialósido la $\alpha(2\rightarrow9)$. La Tabla 6 muestra los
resultados de la glicosilación llevada a cabo en diferentes condiciones de reacción. Se obtuvo el mayor rendimiento
cuando se utilizó el co-disolvente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$. Sorprendentemente, los autores de la invención sólo detectaron el
isómero α en estas reacciones, y el producto secundario principal es el aceptor no consumido que puede ser
recuperado para su reutilización. Este es el primer ejemplo de que el donante de ácido disialico proporcionó el
35 producto de glicosilación α sólo. La ventaja de este método es que el producto del derivado tetrasialósido $\alpha(2\rightarrow9)$
puede ser directamente objeto de derivaciones similares a las anteriores para sintetizar octasialósido $\alpha(2\rightarrow9)$.

Tabla 6. Síntesis de Ácido Tetrasialico $\alpha(2\rightarrow9)$ **51** en diferentes condiciones.



Entrada	Donante (equiv)	Aceptor (equiv)	Promotor (equiv)	Disolvente	Temperatura (°C)	Tiempo (hora)	Rendimiento de 51
1	1.0	2.0	1.0	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ CN	-60	3	38
2	1.0	1.5	1.0	CH ₃ CN	-40	1	n/d
3	1.0	1.1	1.0	C ₂ H ₅ CN	-78	1	-
4	1.0	1.1	1.0	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ CN	-78	1.5	68
5	1.0	1.3	2.0	CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ CN	-78	4	56
6	1.0	1.5	1.0	CH ₂ Cl ₂	-78	2	38

Síntesis de ácidos polisiálicos $\alpha(2\rightarrow9)$ como candidato de vacuna contra *Neisseria meningitidis*.

Alentados por los resultados anteriores, los autores de la invención se interesaron por la síntesis de ácidos polisiálicos más largos, ya que este tipo de glicanos es un objetivo importante para la vacuna contra *Neisseria meningitidis*. *Neisseria meningitidis* es una bacteria diplococcus gram-negativa, que provoca aproximadamente el 60% de las enfermedades meningocócicas. En base a sus antígenos de superficie del polisacárido capsular, *Neisseria meningitidis* se puede clasificar en 13 serogrupos. Entre estos 13 serogrupos, A, B, C, Y y W135 son las principales cepas patógenas, mientras que algunos informes recientes indicaban el aumento de los casos de grupo X⁵⁰. El grupo A es la causa principal de las enfermedades epidémicas en el mundo y a menudo provoca epidemias a gran escala en los países de Asia y África por estaciones⁵¹. Los grupos B y C provocan con frecuencia casos esporádicos en países industrializados tales como Estados Unidos de América y el Reino Unido⁵². Además de ello, la prevalencia del grupo Y y W135 revela la tendencia creciente en América del Norte y Arabia Saudita en los últimos años^{50,53}. El polisacárido capsular juega un papel importante en la patogénesis bacteriana. Las propiedades antifagocíticas ayudan a que las bacterias se escapen de la deposición del anticuerpo y complemento⁵⁴⁻⁵⁶. Sin embargo, debido a que el polisacárido capsular es el escudo más externo de las bacterias, se ha considerado que es el antígeno diana para el diseño de vacunas. Las estructuras de unidades repetitivas del polisacárido capsular de los grupos A, B, C, Y y W135 se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Estructuras de unidades repetitivas del polisacárido capsular de *N. meningitidis* de cinco cepas principales patógenas.

Serotipos de <i>Neisseria meningitidis</i>	Estructuras de polisacárido capsular
Grupo A	$\rightarrow 6$)- α -D-ManpNAc(3/4OAc)-(1 $\rightarrow$ OPO ₃ $\rightarrow$
Grupo B	$\rightarrow 8$)- α -D-Neup5Ac-(2 $\rightarrow$
Grupo C	$\rightarrow 9$)- α -D-Neup5Ac(7/8OAc)-(2 $\rightarrow$
Grupo W135	$\rightarrow 6$)- α -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-Neup5Ac(9OAc)-(2 $\rightarrow$
Grupo Y	$\rightarrow 6$)- α -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-Neup5Ac(9OAc)-(2 $\rightarrow$

Para evaluar las funciones de la vacuna molecular bien definida contra *N. meningitidis*. Síntesis de vacunas basadas en ácido polisiálico $\alpha(2\rightarrow 9)$ o $\alpha(2\rightarrow 8)$ bien definidas eran un buen modelo para el estudio de la vacunación. Los autores de la invención utilizaron la estrategia [4 + 4] convenida para construir ácido octasiálico $\alpha(2\rightarrow 9)$. El donante de ácido tetra-siálico **52** y el aceptor **53** pueden sintetizarse de forma similar a la utilizada para construir el donante de ácido disíálico **50** y el aceptor **48**. Los procedimientos detallados y el rendimiento se muestran en el Esquema 6.

Para la conjugación de ácido polisiálico a la proteína portadora objetivo, los autores de la invención conjugaron un grupo azido alquil-pentilo en el extremo reductor, y luego alargaron la longitud del ácido siálico utilizando los métodos mencionados anteriores. Los autores de la invención han sintetizado compuestos de ácido di-, tri-, tetra-, hexa-, octa-siálico con un grupo azido alquil-pentilo en el extremo reductor (Esquema 7).

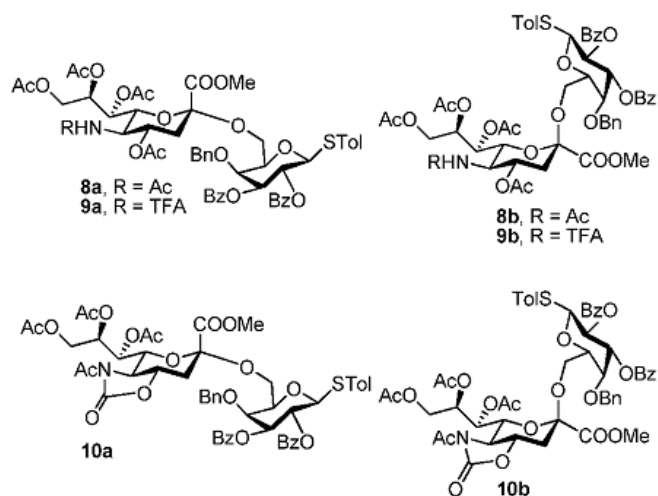
Síntesis de ácidos polisiálicos $\alpha(2\rightarrow 8)/\alpha(2\rightarrow 9)$ alternativos.

En comparación con ácidos polisiálicos $\alpha(2\rightarrow 9)$, la síntesis química de ácidos polisiálicos $\alpha(2\rightarrow 8)/\alpha(2\rightarrow 9)$ alternativos era más desafiante, ya que es muy difícil purificar este tipo de glicanos de la naturaleza. Los autores de la invención utilizaron la síntesis química para abordar este problema. En primer lugar, los autores de la invención utilizaron el mismo donante de sialil-fosfato **45** y el mismo aceptor **63** para sintetizar ácido disíálico **64** $\alpha(2\rightarrow 8)$ en el 83% con $\alpha/\beta = 13:1$. El producto α puede ser purificado por cromatografía en gel de sílice. De manera similar a los métodos mencionados anteriores. El compuesto **64** se puede cambiar a donante de fosfato **65** y aceptor de ácido disíálico **66** en un rendimiento de 78% y 84%, respectivamente. Mediante el uso de procesos de glicosilación similares, se puede obtener ácido tetra-, hexa- y octasiálico $\alpha(2\rightarrow 8)/\alpha(2\rightarrow 9)$ alternativo en un sólo producto. Su proceso detallado, la condición y los rendimientos se muestran en el Esquema 8.

Asignación de Configuración Anomérica.

La configuración anomérica de los sialósidos resultantes se determinó mediante análisis de espectros de ^1H RMN basados en el desplazamiento químico del grupo H-3 eq (los α -glicósidos están más campo abajo que los β -glicósidos), las señales H-4 (los β -glicósidos están más campo abajo que los α -glicósidos), la constante de acoplamiento $J_{7,8}$ (los α -glicósidos son más grandes que los β -glicósidos), el valor de $\Delta\delta(\text{H}-9' - \text{H}-9)$ (α -glicósidos: $\sim 0,2$ ppm $\Delta\delta$, β -glicósidos: $\Delta\delta > 0,3$) (Tabla 8)^{14a, 35a, 57} y las constantes de acoplamiento $^3J_{\text{C1-H3ax}}$ (α -glicósidos > 5 Hz, β -glicósidos < 1 Hz) (Tabla 4)^{27a, 58}.

Tabla 8. Análisis Parcial por ^1H RMN para la Determinación de la Configuración Anomérica



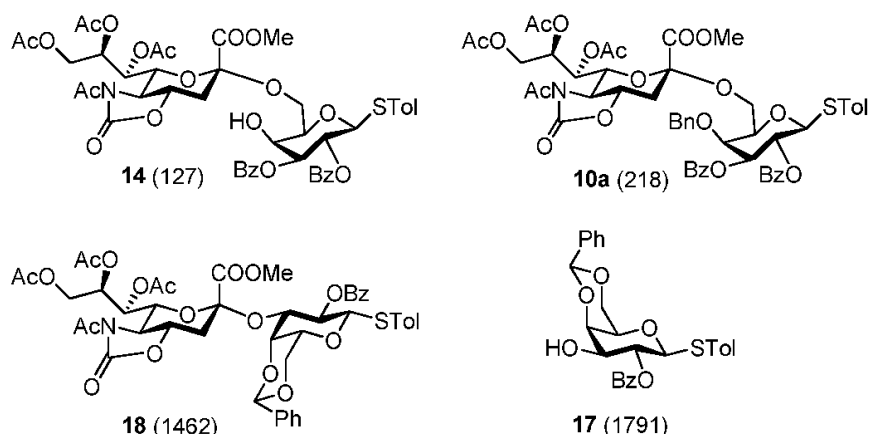
Compuesto	δ_{H3eq}	δ_{H4}	$J_{7,8}$	$\Delta\delta$ H9'-H9
2a	2.68	4.97	7.8	0.24
2b	2.60	5.26	n	0.34
4a	2.73	5.13	8.0	0.18
4b	2.61	5.51	2.5	0.31
6a	2.98	4.15	7.5	n
6b	2.86	4.54	4.3	0.39
8a	2.58	4.86	8.5	0.26
8b	2.28	4.76	n	0.61
9a	2.62	5.00	8.0	0.20
9b	2.36	4.85	5.6	0.58
10a	2.85	3.99	7.6	0.33
10b	2.69	4.20	3.2	0.61

Síntesis Programable en un Solo Recipiente Basada en Valores de Reactividad Relativos (RRVs).

5 El concepto básico de estrategia programable en un solo recipiente es que un oligosacárido se ensambla desde el extremo no reductor al extremo reductor con el bloque de construcción más reactivo que se añade primero^{8b,17}. Por lo tanto, debido al hecho de que el ácido siálico se encuentra a menudo en el extremo no reductor, la síntesis de sialósidos por este protocolo en un solo recipiente requiere el uso de bloques de construcción de ácido siálico como el primer componente. Sin embargo, tioglicósidos de ácido siálico son mucho menos reactivos y se ven menos influenciados por los grupos protectores que otros tioglicósidos. Para resolver este problema, los autores de la

invención utilizan disacáridos sialilados como bloques de construcción en su síntesis programable en un solo recipiente, ya que la reactividad de los disacáridos sialilados se determina por el segundo residuo. Los autores de la invención midieron en primer lugar los RRVs de los disacáridos sialilados sintetizados **10a**, **14** y **18**, utilizando el método de HPLC descrito previamente (Tabla 8)^{bb}. El disacárido **18** mostró la mayor reactividad entre los tres bloques de construcción. El compuesto **10a** con la O-bencilación extra en C-4 es 1,7 veces más reactivo que **14**. En general, la sialilación de un tioglicósido tal como **17** ha desactivado sólo ligeramente la reactividad anomérica de **17**.

Tabla 9: Valores de Reactividad Relativa de Disacáridos Sialilados



Para demostrar la aplicación sintética de disacáridos sialilados como bloques de construcción, los autores de la invención llevaron a cabo una síntesis en un solo recipiente basada en la reactividad representativa del pentasacárido sialilado **75** utilizando los tres bloques de construcción que se muestran en el Esquema 9. El rendimiento global de la síntesis en un solo recipiente era 48 %, revelando que los disacáridos sialilados pueden utilizarse como bloques de construcción para la síntesis programable en un solo recipiente de oligosacáridos con Neu5Ac como residuo terminal.

La Tabla 9 resume los resultados de glicosilación utilizando diversos donantes de ácido siálico con diferentes grupos lábiles y modificaciones en C5. Los autores de la invención seleccionaron los aceptores que se utilizan con frecuencia para la comparación directa. Dos resultados de glicosilación, uno con aceptores primarios y el otro con aceptores secundarios, se incluyeron para cada uno de los donantes de sialilo. Generalmente, los rendimientos de sialilación mediante el uso de donantes con diferentes grupos lábiles (entradas 1-10) no excedieron de 70%, y se obtuvo una mayor selectividad α cuando se utilizó un aceptor de glicosilo menos impedido estéricamente (entradas 2, 5, 6 y 8). También, la mayoría de estas reacciones necesitan ser llevadas a cabo en acetonitrilo. Un segundo tipo de donante de ácido siálico es con la modificación en C5, que a menudo potenciaba mucho no sólo la selectividad α , sino también el rendimiento hacia aceptores primarios o secundarios (entradas 11-21). Después de comparar los resultados de glicosilación de donantes *N*-modificados mediante el acoplamiento con el aceptor primario **II** (entradas 11-13 y 17-20), donantes protegidos con 5*N*,4*O*-oxazolidinona mostraron el mejor resultado (entradas 17-20). Por otro lado, para el aceptor secundario **XIV** menos estéricamente impedido (entradas 11, 12 y 17), el donante de *N,N*-diacetil-sialilo dio el mejor resultado. Además, para el aceptor secundario **XV** más estéricamente impedido (entradas 13, 18, 19 y 20), el donante de *N*-TFA-sialilo parece ser una buena elección, y la conversión del grupo lábil al grupo adamantanilitio del donante protegido con *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-oxazolidinona mostró una mejora adicional (entrada 20). A continuación, se alcanzó una mayor mejora utilizando una combinación de modificación en C-5 y el grupo lábil eficiente (entradas 15 y 16). Los productos dieron una selectividad α y un rendimiento excelentes hacia los alcoholes tanto primarios como secundarios. El donante protegido con *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-oxazolidinona mostró de hecho una excelente selectividad α , así como un alto rendimiento hacia los aceptores tanto primarios como secundarios, y el grupo lábil fosfato parece ser una elección excelente (entrada 21).

Tabla 9. Revisión de Donantes de Ácido Siálico con Diferentes Grupos Lábil y Modificaciones en C-5

Entrada	Donante	Aceptor	Rendimiento (%)		Promotor	Disolvente ^a	Ref.
			α	β			

1	R = Cl	I (1°)	67	0	Ag ₂ CO ₃	e	6c
		X (2°)	6	9	Hg(CN) ₂ / HgBr ₂	f	57c
2	R = OP(OBn) ₂	II (1°)	67	13	TMSOTf	a	7a
		XI (2°)	67	11	TMSOTf	a	7a
3	R = OP(OEt) ₂	II (1°)	56	14	TMSOTf	a	7c
		XII (2°)	55		TMSOTf	a	7c
4	R =	III (1°)	48	16	DMTST	a	9a
		XIII (2°)	70	4	PhSOTf	c	9b
5	R = SMe	IV (1°)	70	0	DMTST	a	59
		XIV (2°)	52	0	DMTST	a	59
6	R = SPh	II (1°)	47	8	NIS/TfOH	a	35a
		XIV (2°)	70	0	NIS/TfOH	a	36
7	R =	II (1°)	69	10	TMSOTf	c	10a
		XV (2°)	61	20	TMSOTf	c	10a

8	R = SCaja	I (1°)	60	30	MeOTf	a	8d
		XIV (2°)	71	4	MeOTf	a	8d
9	R = OPO(OBn) ₂	II (1°)	26	9	TMSOTf	a	7a
10	R = OPO(OEt) ₂	XII (2°)	11	11	TMSOTf	a	7d

^a Disolv. : a = MeCN; b = CH₂Cl₂; c = MeCN+CH₂Cl₂; d = EtCN; e = CHCl₃; f = Cl(CH₂)₂Cl

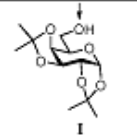
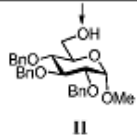
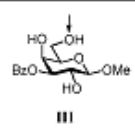
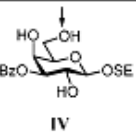
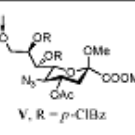
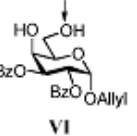
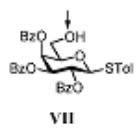
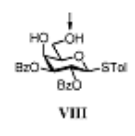
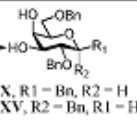
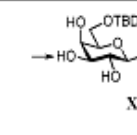
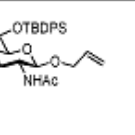
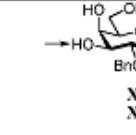
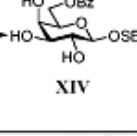
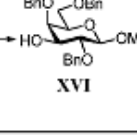
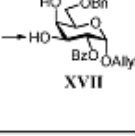
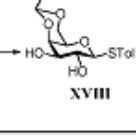
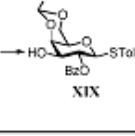
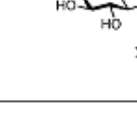
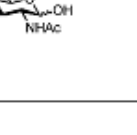
Entrada	Donante	Aceptor	Rendimiento (%)		Promotor	Disolv. ^a	Ref.
			α	β			

11	X = NAc ₂ , Y = SPh	II (1°)	40	25	NIS/TfOH	a	35a
	X = NAc ₂ , Y = SMe	XIV (2°)	72		NIS/TfOH	a	60
12	X = NHTroc, Y = SPh	II (1°)	81	10	NIS/TfOH	a	35a
		XIV (2°)	35	8	NIS/TfOH	a	61
13	X = NHTFA, Y = SPh	II (1°)	85	7	NIS/TfOH	a	35a
	X = NHTFA, Y = SMe	XVI (2°)	84	0	NIS/TfOH	a	62
14	X = N ₃ , Y = STol	V (1°)	65	0	NIS/TfOH	a	14a
15	X = NPhth,	VII (1°)	92	0	TMSOTf	d	14c
	Y =	XVII (2°)	74	2	TMSOTf	d	14c
16	X = TCA,	VIII (1°)	77	0	TMSOTf	c	14d
	Y =	XVIII (2°)	68	0	TMSOTf	c	14d

17	X = H, Y = SPh	II (1°)	100	0	NIS/TfOH	b	28a
		XIV (2°)	50	0	NIS/TfOH	a	28b
18	X = Ac, Y = SPh	II (1°)	92	0	NIS/TfOH	b	27a

		XVI (2°)	10	75	NIS/TfOH	b	27a
19	X = Ac, Y = STol	II (1°)	72	18	NIS/TfOH	b	27c
		XVI (2°)	44	37	NIS/TfOH	c	27c
20	X = Ac, Y = 	II (1°)	91	0	NIS/TfOH	b	27b
		XVI (2°)	64	21	NIS/TfOH	c	27b
21	X=Ac, Y= OPO(OBu) ₂	IX	85	0	TMSOTf	b	
	(presente descripción)	XIX	83	0	TMSOTf	b	

^a Disolv. : a = MeCN; b = CH₂Cl₂; c = MeCN+CH₂Cl₂; d = EtCN; e = CHCl₃; f = Cl(CH₂)₂Cl

1° OH					
					
2° OH					
					
para SiaT					

El concepto de estrategia de glicosilación ortogonal implica condensar donantes de glicosilo con diferentes tipos de grupos lábiles, por lo que los productos resultantes se pueden utilizar directamente en la siguiente glicosilación sin ajustes de grupos lábiles anoméricos. La mayoría de las glicosilaciones ortogonales emplean tioglicósidos como uno de los participantes en la reacción⁶³. La estrategia ortogonal es adecuada para la síntesis convergente de sialósidos porque permite el acoplamiento de bloques de construcción independientemente de su reactividad relativa. Tal como se resume en la Tabla 9, diferentes tipos de modificaciones C-5 potenciarían todos grandemente las propiedades de los donantes de ácido siálico. Por esta razón, sería beneficioso el desarrollo de donantes de sialilo modificados en C5 que se pueden utilizar en la glicosilación ortogonal. Dado que el sialil-fosfato de dibutilo es relativamente más fácil de preparar y más estable que el sialil-fosfito, es una mejor opción para la síntesis ortogonal.

Otra ventaja de la metodología basada en fosfatos incluye el uso de toilitio-glicósidos como aceptores con valores de relatividad relativa (RRV) definidos para la sialilación dar disacáridos de sialilo como bloques de construcción para la subsiguiente síntesis programable en un solo recipiente basada en la reactividad. De esta manera, se podría resolver la limitación de la reactividad relativamente baja del donante tiosialósido y el difícil control de la estereoselectividad de sialilación. Además de ello, los RRVs de disacáridos sialilados se pueden programar mediante la manipulación de los grupos protectores del segundo residuo azúcar en el extremo reductor.

Matriz de Sialósidos para Actividades Diferenciales de Unión al Azúcar de Sialilo de Hemagglutininas de la Gripe y Virus Real de la Gripe.

Brotos de gripe pandémica representan una amenaza importante para la salud pública tal como se destacó en la reciente aparición de H5N1⁶⁴ de la gripe aviar altamente patógena y los últimos brotes en 2009 de virus H1N1 orientados a cerdos (2009 H1N1)^{65,66}. La infección por el virus de la gripe se inicia por la fijación del virus a receptores de la célula a través de hemagglutina (HA) de la gripe. La unión de HA es seguida entonces por la escisión de la neuraminidasa del ácido siálico terminal sobre los receptores, y la endocitosis mediada por los receptores va acompañada por cambios conformacionales inducidos por pH de HA que conducen a la fusión de membranas de virus-célula, permitiendo que el virus penetre en las células para la replicación del virus⁶⁷.

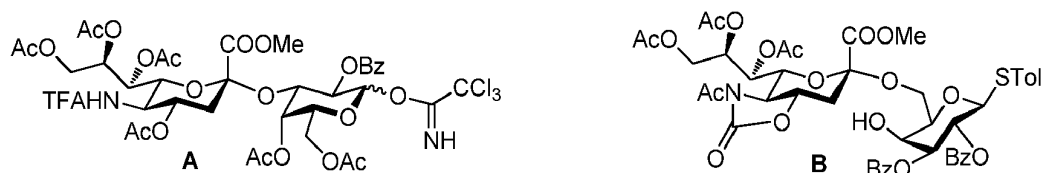
La HA de la gripe es una glicoproteína que forma trímeros sobre la superficie del virus⁶⁸. A diferencia de las interacciones proteína-proteína, la unión de HA a receptores celulares está dominada por las interacciones proteína-oligosacárido mediadas por el ácido *N*-acetil-neuramínico (Neu5Ac), el derivado de ácido siálico más abundante que se encuentra en el extremo terminal de glicoproteínas o glicolípidos en la superficie celular⁶⁹. Amplios estudios de diversos subtipos del virus de la gripe, así como HAs recombinantes han establecido una correlación de las preferencias de unión de sialósidos con orígenes de especies: el enlace $\alpha(2\rightarrow6)$ con galactosa es el preferido por HA de aislados humanos, el enlace $\alpha(2\rightarrow3)$ por HA de aislados de aves y el enlace tanto $\alpha(2\rightarrow6)$ como $\alpha(2\rightarrow3)$ con galactosa o glucosa puede ser unido por HA de virus porcinos⁷⁰⁻⁷⁴. En general se cree que la adquisición de la capacidad de reconocimiento de sialósidos $\alpha(2\rightarrow6)$ de un virus de la gripe es un requisito previo para sus transmisiones entre seres humanos. Por lo tanto, la comprensión de la especificidad de unión al receptor de virus de la gripe puede conducir al desarrollo de herramientas de diagnóstico sensibles y rápidas para su uso para detectar y diferenciar los diferentes subtipos de virus de la gripe, y proporcionar un enfoque alternativo a los métodos actuales basados en RT-PCR (que son de alta precisión, pero requieren mucho tiempo)⁷⁵ y ELISA basado en la interacción anticuerpo-nucleoproteína (que es rápido, pero menos preciso)⁷⁶.

En contraposición a las preferencias de unión de diversos subtipos de HA, todavía no se ha dilucidado el efecto de la glicosilación de HA en las actividades de unión a sialósido de funciones HA. Se ha implicado que la adición y el procesamiento de oligosacáridos a los sitios de N-glicosilación desempeñan papeles críticos en el plegamiento y la translocación de proteínas de la membrana y de secreción adecuados. La N-glicosilación también es importante en el mantenimiento de la conformación y la estabilidad de la proteína y en la modulación de actividades biológicas⁷⁷. Además, los glicanos pueden proteger a las proteínas frente a un aclaramiento y la proteólisis. Para las glicoproteínas del virus, éstas pueden actuar como un escudo de glicano para proteger a virus de los ataques inmunológicos, sin embargo, puede influir negativamente en la supervivencia de los virus al impedir el reconocimiento y la interacción de proteínas de la superficie del virus con receptores de las células durante la infección. En el caso de los virus de la gripe, numerosos informes han demostrado que la pérdida de hidratos de carbono en HA pueden modular sus funciones biológicas. Por ejemplo, Deom et al.⁷⁸ informó que la pérdida de un oligosacárido complejo de la punta de la HA aumentaría la interacción virus-célula y haría que fuese más fácil que el virus mutante sobreviviera en las células infectadas. La interacción incrementada de HA menos glicosilada con sialósidos también fue demostrada por estudios recientes de los autores de la invención en los que éstos compararon las afinidades de unión a sialósido de HA soluble que portan diversas longitudes de glicano utilizando micro-matrices de azúcar⁷⁹. Los resultados demostraron que HA digerida con endoglicosidasa H separa la mayor parte de los glicanos, excepto que el primer GlcNAc mostró las mayores afinidades de unión a sialósidos¹⁶. Además de los cambios globales en los patrones de glicosilación de HA como los que los autores de la invención hicieron previamente, se investigó la contribución de los glicanos individuales de HA de longitud completa en las actividades de unión a sialósidos. Para diseccionar aún más la contribución de oligosacáridos en la unión de HA a sialósidos, este informe se centra en las evocaciones de la contribución de los sitios de glicosilación individuales de HA.

Preparación de la Matriz de Sialósidos para la Evaluación de la Unión al Azúcar de HA.

Los autores de la invención han demostrado que un nuevo donante de sialil-fosfato crea algunos sialósidos que se producen de forma natural. Con el fin de aumentar la eficiencia sintética para la creación de una matriz de sialósido,

la estrategia era utilizar "disacárido sialilado" como bloques de construcción⁸⁰. Al utilizar el disacárido **A**⁸¹⁻⁸³ como un bloque de construcción, se sintetizaron diecisiete sialósidos $\alpha(2\rightarrow3)$ -enlazados (**1-17**) de disacáridos a hexasacárido. Utilizando el disacárido **B** como un bloque de construcción básico, se puede utilizar la misma estrategia para construir con eficacia hasta diez sialósidos $\alpha(2\rightarrow6)$ -enlazados (**21-30**). Para investigar las especificidades y afinidades de unión de HA, estos sialósidos se sintetizaron con diferentes enlaces de ácido siálico y longitudes de glicano, y diferentes tipos de azúcar y sulfatación adicional, pero con el mismo enlazador del grupo amino (Figura 1; véase *Información de apoyo* para la síntesis de los compuestos). Estos glicanos fueron esparcidos sobre el portaobjetos de vidrio activado por NHS a través de la formación de enlaces amida para crear una matriz de sialósidos para la evaluación de la unión de HA.



Establecimiento de una plataforma de detección para la Determinación de K_D de Unión de Sialósidos.

Las actividades de unión de HA fueron controladas convencionalmente utilizando pre-complejos de anticuerpos específicos para HA o etiquetas peptídicas y anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforo⁸⁴. La estrategia indudablemente amplificaría las señales para facilitar la detección y la elaboración de perfiles, pero puede imponer complicaciones para el análisis cuantitativo⁸⁵. Por lo tanto, los autores de la invención concibieron incorporar una etiqueta neutra de estreptavidina (SA) en el extremo C de HA recombinante. Para la detección de la matriz, los autores de la invención probaron estrategias de pre-complejos (para formar complejos de HA-SA-Cy3 primero siguieron con análisis de unión de azúcar), así como la unión secuencial. Los resultados (datos no presentados) revelaron que la incubación de HA recombinante con SA-Cy3 en la relación molar 1:1 antes de la unión del azúcar para la detección proporcionó los resultados más reproducibles. Además, esta estrategia puede proporcionar una unión clara y consistente de HA de baja concentración, que se puede utilizar para el análisis bioquímico cuantitativo⁸⁵.

Preferencias de Unión al Receptor Diferencial de HAs de gripe estacional y pandémica.

El objetivo de los autores de la invención es seleccionar números mínimos de glicano para proporcionar un sistema de perfiles conveniente y eficiente para diferenciar los subtipos de virus de la gripe. Los autores de la invención compararon las preferencias de unión de HA recombinante a partir de los virus que provocan la gripe estacional y pandémica. Los resultados indicaron que HA del virus H1N1 de la gripe tanto pandémica (California/07/2009) (**Figura 2A**) como del virus H1N1 estacional Brisbane/59/2007 (Br/59/07) (**Figura 2B**) mostraron perfiles de unión similares, con actividades de unión hacia sialósidos $\alpha(2\rightarrow6)$ mayores. Sin embargo, se observó que H1 2009 pandémico parecía haber alcanzado las actividades máximas de unión hacia el sialósido $\alpha(2\rightarrow6)$ que contiene 5 unidades de azúcar, pero H1 de cepas Brisbane mostró las actividades de unión más altas hacia el sialósido $\alpha(2\rightarrow6)$ que contiene 7 azúcares. Además, el análisis de K_D (**Fig. 6**) reveló que H1 de Br/59/07 tiene mayores afinidades hacia los azúcares **24** y **28** que las que tenía H1 de la cepa pandémica 2009. Para los azúcares **29** y **30**, H1 de Br/59/07 mostró altas actividades de unión, incluso cuando se utilizó la proteína a baja nM y, por lo tanto, la determinación de K_D no tuvo éxito. En comparación con cepas H1N1/New Caledonia/1999 (NC/99) circulantes previas (**Figura 2C**), estaba claro que las cepas recientes de H1N1 sólo mostraron capacidades de unión a sialósidos $\alpha 2\rightarrow 6$ largos, lo que implica que las cepas recientes no han adquirido una fuerte unión hacia receptores humanos, por lo tanto transmisibilidades eficientes entre seres humanos. Por otro lado, H3 de Brisbane/10/2007 (Br/10/07) mostró perfiles de unión más estrechos hacia sólo dos sialósidos $\alpha 2\rightarrow 6$, **28** y **30**. Fue sorprendente que la unión sólo puede ser observada a **30**, el sialósido la $\alpha 2\rightarrow 6$ que contiene tres repeticiones de LacNAc, pero no a **29**, con dos repeticiones LacNAc (**Figura 2D**).

La misma matriz se utilizó también para perfilar el patrón de unión de H5 (**Figura 2E**), H7 (**Figura 2F**) y H9 (**Figura 2G**). Como era de esperar, HA de virus humanos y aviares mostró perfiles de unión respectivos. Los resultados también sugieren que la unión a **28** y **30** es única para los virus humanos, pero no los virus aviares. Además, la unión a **24** se puede utilizar para diferenciar H1 que puede unirse a este azúcar específico frente a. H3 que no puede. Además, la unión a disacárido (**22** ó **23**) puede implicar un fuerte punto de apoyo entre las poblaciones humanas. Estos azúcares, junto con el trisacárido $\alpha 2,3$, se puede utilizar para diferenciar los subtipos HA y puede tener un potencial como para proporcionar un ensayo rápido tras la aparición de un brote de gripe.

Perfiles de Unión a Virus Reales de la Gripe.

Se investigó la relación de virus reales y proteínas HA a la unión a sialósidos. Las características de unión al receptor de cuatro aislados de virus de la gripe mediante el análisis de la matriz de glicanos se compararon directamente utilizando la misma matriz de sialósidos. Se observó una clara distinción entre el repertorio de unión al receptor de H1N1 Cal/09, H1N1 Brisbane, H3N1 Brisbane y H5N1 RG14 (**Figura 3**). H1N1Cal/09 (**Figura 3A**) y los virus H1N1 Brisbane (**Figura 3B**) no sólo se unían a la mayoría de las secuencias de sialilo $\alpha(2\rightarrow6)$ -enlazadas, sino también a una gama considerable de secuencias de sialilo $\alpha(2\rightarrow3)$ -enlazadas. En contraposición, H5N1 (**Figura 3D**) se unía exclusivamente a secuencias de sialilo $\alpha(2\rightarrow3)$ -enlazadas. Y el patrón de unión de H3N1 mostró una unión preferencial a secuencias de sialilo $\alpha(2\rightarrow6)$ -enlazadas y $\alpha(2\rightarrow3)$ -enlazadas (**Figura 3C**). La especificidad más amplia, a saber, la capacidad de unirse a receptores $\alpha(2\rightarrow3)$ además de a $\alpha(2\rightarrow6)$ -enlazados, también es pertinente para la mayor virulencia del virus pandémico, y su capacidad para provocar una enfermedad grave y fatal en seres humanos. Se cree que la unión a receptores $\alpha(2\rightarrow3)$ -enlazados está asociada con la capacidad de los virus de la gripe de infectar el tracto respiratorio inferior, en donde hay una mayor proporción de sialil glicanos $\alpha(2\rightarrow3)$ con relación a $\alpha(2\rightarrow6)$ -enlazados. Las diferencias en la unión al receptor entre los virus, por tanto, pueden llegar a ser un buen candidato para clasificar el serotipo del virus de la gripe.

La preferencia de unión de RG14 es la misma que las preferencias de H5 recombinante. En el caso del virus H1N1, los perfiles de unión utilizando el virus completo es ligeramente diferente del perfil obtenido con proteínas recombinantes. Como las HAs recombinantes, los virus mostraron la unión más fuerte hacia los sialósidos $\alpha(2\rightarrow6)$ largos. Sin embargo, los virus también mostraron una unión significativa a sialósidos $\alpha(2\rightarrow3)$, que los autores de la invención no suelen ver con HAs recombinantes. La afinidad de unión intrínseca de sialósidos para la hemaglutinina está dominada a través de interacciones polivalentes en la superficie celular. Por lo tanto, las características de presentación de proteínas en la superficie celular pueden tener un impacto importante en el reconocimiento del receptor; éstas incluyen la orientación y densidad de la HA. Además de ello, la punta de la región globular alberga el bolsillo de unión al receptor, que se sabe que es de crucial importancia para el proceso de la unión del virus a su receptor. La orientación, el número y la estructura de N-glicanos vecinos al bolsillo de unión al receptor parecen ser reguladores potentes de la especificidad del receptor, que pueden provocar la diferencia de las preferencias de unión entre HA recombinante y virus completo también.

Efectos de la Glicosilación Específica para el Sitio sobre las Actividades de Unión a Sialósidos de Hemaglutinina de la Gripe.

Se cree que la HA de la gripe necesita ser glicosilada para tener una función apropiada, es decir, para unirse a receptores huéspedes sialilados para mediar en la entrada del virus. Los sitios de glicosilación en determinadas regiones de la HA están altamente conservados⁸⁶. También se ha informado que cambios en el patrón de glicosilación de HA pueden ser ventajosos o perjudiciales para las actividades de unión a HA y, finalmente, para la supervivencia del virus⁸⁷. Para dilucidar los efectos de la glicosilación específica para el sitio sobre las actividades de unión a sialósidos, los autores de la invención produjeron mutantes de HA en los que la secuencia de glicosilación Nx(S/T) predicha individual fue cambiada a NXA para bloquear la N-glicosilación en los sitios específicos (**Figura 4A**). Excepto para $\Delta 26$, $\Delta 170$, $\Delta 209$ y $\Delta 559$, los mutantes de HA mostraron una tasa incrementada de movilidad en comparación con WT, correspondiente a la pérdida de una cadena de hidratos de carbono en los sitios designados (datos no mostrados). El resultado es consistente con el análisis de la secuenciación de masas, en donde se identificó que los hidratos de carbono se unen al sitio N26/27, N39, N170, N181, N302, N500 y N559 (datos no mostrados). El análisis de unión de azúcar subsiguiente sugirió que las mutaciones $\Delta 39$, $\Delta 302$, $\Delta 500$, así como $\Delta 209$ no cambiaron significativamente el perfil de unión a sialósidos de HA WT (**Figura 4B**). En contraposición, la mutación $\Delta 27$ para bloquear la glicosilación en N27 parece ser perjudicial para las actividades de unión de azúcares.

La glicosilación en los sitios de N-glicosilación amino-terminales, es decir, N27, ha sido implicada en las etapas de transporte y plegamiento de proteínas. La pérdida de N20/21 de H2 demostró que disminuye las actividades de hemadsorción y de fusión celular⁸⁸. También se informó que la HA sin glicosilación en el extremo N quedaría atrapada en el retículo endoplásmico y no puede ser transportada a la membrana celular⁸⁹. Los resultados obtenidos por los autores de la invención demostraron que la eliminación de sitios de glicosilación N27 casi demoló las actividades del azúcar de HA WT. Para diseccionar adicionalmente si la pérdida de las actividades de unión se debe a un plegamiento incorrecto como sugirieron otros informes, se llevó a cabo un análisis de espectroscopia de dicroísmo circular (CD). Los resultados demostraron que cambió la estructura secundaria de $\Delta 27$, mientras que otro mutante de glicosilación con unión similar ($\Delta 170$) mostró el mismo espectro que la HA de tipo salvaje (Figura 5). Los resultados confirmaron que $\Delta 27$ no puede mantener estructuras adecuadas, lo que implica que la N-glicosilación en N27 se produce conjuntamente con la traducción y es importante para el plegamiento correcto. La glicosilación en N27 es, de hecho, crítica para la estructura de HA y, por lo tanto, para actividades de unión de azúcar. Por otro lado,

aunque los hidratos de carbono que se encuentran en el dominio de unión al receptor demostraron modular las propiedades antigénicas, las actividades de hemadsorción y las actividades de fusión celular⁹⁰, los estudios de los autores de la invención de la matriz revelaron que los patrones de unión no cambiaron mucho para los mutantes de glicosilación, sin embargo las afinidades de unión del mutante de glicosilación disminuyeron ligeramente (Fig. 7).

Los autores de la invención han desarrollado un enfoque eficaz para la preparación de donantes de sialil-fosfato de dibutilo con protección *N*-TFA y *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonilo o 5-*N*,4-*O*-carbonilo. Las propiedades de los donantes de glicosilo de sialil-fosfato protegido con *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonilo se han utilizado para preparar los bloques de construcción de disacáridos el $\alpha(2\rightarrow6)$ -, $\alpha(2\rightarrow3)$ -, $\alpha(2\rightarrow8)$ - y $\alpha(2\rightarrow9)$ -enlazados esenciales, que pueden servir como materiales de partida para la preparación de sialósidos más complejos. Además, el protocolo de un solo recipiente descrito en esta memoria ofrece un enfoque versátil para la síntesis α -selectiva de sialósidos $\alpha(2\rightarrow6)$ - y $\alpha(2\rightarrow3)$ -enlazados. Utilizando estas estrategias, se han sintetizado varios glicanos de sialilo biológicamente significativos.

Actividades de unión a sialósidos de HA recombinante y de virus reales fueron rastreadas con 27 sialósidos. La preferencia de unión es idéntica entre el virus H5N1 y H5 recombinante. Se observó una ligera diferencia en la actividades de unión a sialósidos $\alpha(2\rightarrow3)$ entre el virus H1N1 Cal/09 y la HA recombinante Cal/09. La diferencia de las preferencias de unión entre HA recombinante y virus reales puede resultar de la diversa orientación y densidad de la presentación de HA en la superficie celular del virus.

En el estudio del papel de los sitios de N-glicosilación para la unión del azúcar, se mutó el sitio de glicosilación N27. Análisis de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) confirmaron que la N-glicosilación en N27 se produce conjuntamente con la traducción con el plegamiento de proteínas y no puede mantener la estructura de las proteínas. Las mutaciones de determinadas secuencias de N-glicosilación en HA sugirieron que ciertas secuencias de glicosilación tales como N₂₇ST tienen un efecto determinado sobre la función de HA. Los estudios que utilizan mutantes de glicosilación específicos del lugar para dilucidar la relación entre la glicosilación de HA y sus actividades de unión a azúcares también arrojan luz sobre la importancia de la glicosilación de HA. Además de ello, el número 24, 28, y 30 de glicanos, junto con el trisacárido $\alpha 2,3$, se puede utilizar para diferenciar subtipos de HA y tienen un gran potencial para proporcionar una prueba rápida sobre la aparición de un brote de gripe.

Utilizando la estrategia del disacárido sialilado, se han sintetizado 27 sialósidos para preparar una micromatriz de sialósidos en portaobjetos de vidrio que se pueden utilizar para perfilar no sólo la especificidad de unión al receptor de diversos subtipos de HA, sino también con diferentes patrones de glicosilación y virus reales de la gripe.

Se ha sabido que los oligosacáridos de la hemaglutinina de la gripe tienen algunas funciones biológicas importantes⁹¹. Por ejemplo, los oligosacáridos en la región de la cabeza del bloque de hemaglutinina el sitio antigénico. Además, la especificidad de unión del receptor de HA se vio afectada por la ausencia de una cadena de glicano compleja cerca del sitio de unión al receptor⁸⁷. Con el fin de abordar la forma en la que la glicosilación afecta a la especificidad de HA, los autores de la invención adoptaron la potente tecnología de micro-matrices de glicano en combinación con HAs producidas a partir de diferentes sistemas de expresión que generan diferentes patrones de N-glicosilación en la superficie de la proteína. En los resultados obtenidos por los autores de la invención, HAs con glicosilación de tipo complejo o de tipo de alto contenido en manosa mostraron diferencias sutiles en la especificidad (perfiles de resultados).

Los sialósidos de la invención comprenden los que se encuentran en la superficie de diversos patógenos virales, bacterianos, fúngicos u otros patógenos. Los sialósidos de acuerdo con la invención también comprenden los que se encuentran en receptores de la superficie celular que se unen a los patógenos. Sialósidos que participan en este tipo de interacciones se encuentran en glicoproteínas de la superficie de virus de la gripe neuraminidasa, hemaglutinina del virus de la gripe, la proteína M2 del virus de la gripe, proteínas virales del virus sincitial respiratorio humano (RSV), glicoproteína F de RSV, glicoproteína G de RSV, proteínas virales del virus herpes simplex (HSV), glicoproteínas del virus del herpes simplex gB, gC, gD y gE, antígenos MOMP y PorB de Chlamydia, proteína del núcleo, proteína de la matriz u otra proteína del virus del dengue, hemaglutinina del virus del sarampión, glicoproteína gB del virus herpes simplex tipo 2, poliovirus I VP1, glicoproteínas de la envoltura del VIH 1, antígeno de superficie de la hepatitis B, toxina de la difteria, epítipo 24M de Streptococcus, pilina gonocócica, virus g50 de la pseudorrabia (gpD), virus de la pseudorrabia II (gpB), virus de la pseudorrabia III (gpC), glicoproteína H del virus de la pseudorrabia, glicoproteína E del virus de la pseudorrabia, glicoproteína 195 de la gastroenteritis transmisible, proteínas de la matriz de la gastroenteritis transmisible, glicoproteína 38 del rotavirus porcino, proteína de la cápside del parvovirus porcino, antígeno protector de Serpulina hydodysenteriae, glicoproteína 55 de la diarrea viral bovina, hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle, hemaglutinina de la gripe porcina, neuraminidasa de la gripe porcina, virus de la enfermedad de la fiebre aftosa, virus del cólera porcino, virus de la

gripe porcina, virus de la peste porcina africana, *Mycoplasma mycoides*, virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina, glicoproteína E del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina, glicoproteína G, virus de la laringotraqueitis infecciosa, glicoproteína G del virus de laringotraqueitis infecciosa o glicoproteína I, una glicoproteína del virus La Crosse, virus de la diarrea neonatal de terneros, virus de la encefalomiелitis equina venezolana, virus Punta Toro, virus de la leucemia murina, virus del tumor mamario de ratón, la proteína del núcleo del virus de la hepatitis B y el antígeno de la superficie del virus de la hepatitis B o un fragmento o derivado del mismo, el antígeno del virus de la gripe equina o del virus del herpes equino, incluyendo virus tipo A de la gripe equina/Alaska 91 neuraminidasa, virus de la gripe equina tipo A/Miami 63 neuraminidasa, virus tipo A de la gripe equina/Kentucky 81 neuraminidasa, glicoproteína B del virus tipo 1 del herpes equino y la glicoproteína D del virus tipo 1 del herpes equino, el antígeno del virus sincitial respiratorio bovino o virus de parainfluenza bovina, proteína de fusión del virus sincitial respiratorio bovino (BRSV G), proteína de fusión del virus sincitial respiratorio bovino (BRSV F), la proteína de la nucleocápside del virus sincitial respiratorio bovino (BRSVN), proteína de fusión del virus tipo 3 de la parainfluenza bovina, hemaglutinina neuraminidasa del virus de parainfluenza bovina tipo 3, glicoproteína 48 y glicoproteína 53 del virus de la diarrea viral bovina, glicoproteína E del virus dengue y la glicoproteína E1 o E2 del virus de la hepatitis C humana.

EJEMPLOS

Sin intención de limitar el alcance de la invención, se dan a continuación los instrumentos, aparatos, métodos a modo de ejemplo y sus resultados relacionados acuerdo con las realizaciones de la presente invención. Se ha de tener en cuenta que los títulos o subtítulos pueden utilizarse en los ejemplos para la conveniencia de un lector, que de ningún modo deben limitar el alcance de la invención. Además de ello, se proponen y describen aquí determinadas teorías; pero de ninguna manera, ya sean correctas o incorrectas, deben limitar el alcance de la invención siempre y cuando la invención se ponga en práctica de acuerdo con la invención sin tener en cuenta teoría o esquema de acción particular alguno.

Materiales. Portaobjetos de vidrio recubiertos de NHS se obtuvieron de SCHOTT (Nexterion H), anticuerpos monoclonales para hemaglutinina de la gripe fueron amablemente proporcionados por NIH Biodefense and Emerging Infections Research Repository, NIAID, NIH, y los anticuerpos secundarios anti-ratón marcados con Cy3, así como estreptavidina marcada con Cy3 fueron adquiridos de Jackson ImmunoResearch. Productos químicos y reactivos estándares se adquirieron de proveedores comerciales y se utilizaron tal como se recibieron.

Construcción de Plásmidos de Expresión de Hemaglutinina. Los genes de longitud completa que codifican HA de virus H1N1 de la gripe incluyendo SOV California/07/2009, Brisbane/59/2007, New Caledonia/20/1999 (ABF21272.1), H3N2 Brisbane/10/2007 (ABW23422.1), H5N1 Vietnam/1194/2004 (ABP51976.1), H7N7 Netherlands/219/03 (AAR02640.1) o H9N2 Hong-Kong/1073/1099 (CAB95856.1) fusionados con una Strep (Estreptavidina) C-terminal (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) y etiqueta (His)₆ se clonaron en pcDNA (Invitrogen) para la expresión en células 293T humanas. Las secuencias se confirmaron por secuenciación de ADN y se prepararon en alta calidad para la expresión. Los genes fueron clonados en pcDNA para la expresión en células 293T humanas.

Construcción de Mutantes de Glicosilación de Hemaglutinina. La secuencia de nucleótidos de hemaglutinina H5 consenso (CHA5⁹²) fue clonada en pcDNA con una etiqueta Strep C-terminal y el plásmido resultante se utilizó como los moldes para la mutagénesis dirigida al sitio. Los sitios de N-glicosilación de CHA5 se predijeron con el servidor NetNGly proporcionado por Expasy (www.expasy.org). Las supuestas secuencias N-X-S/T fueron mutadas luego a N-X-A utilizando mutagénesis dirigida al sitio con el Kit de Mutagénesis Dirigida al Sitio QuikChange[®] II (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.). La mutagénesis se confirmó mediante secuenciación de ADN y las inactivaciones de glicosilación se confirmaron mediante análisis de SDS-PAGE.

Expresión de Hemaglutinina Recombinante de Longitud Completa a partir de Células Expresadas. Para la expresión en células 293T humanas, pcDNA que porta el gen de interés se preparó de alta calidad y se transfectó con los lípidos catiónicos DOTAP/DOPE (1:1) (Avanti Lipids) para la expresión transitoria. La expresión de hemaglutinina se confirmó con borrones de inmunotransferencia utilizando anticuerpos anti-(His)₆ (Qiagen) o anticuerpos anti-hemaglutinina específicos, y los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (PerkinElmer).

Purificación del Hemaglutinina Recombinante. Las células que contienen HA recombinante de longitud completa se lisaron en tampón Hepes 20 mM (pH 7,4) utilizando un microfluidizador. Los lisados se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se recogió para una segunda centrifugación a 40.000 rpm durante 1 hora. A continuación, los sedimentos se extrajeron con tampón Hepes 20 mM que contenía dodecil-maltósido al 1% durante

2 horas, seguido de una breve centrifugación a 12.000 rpm. El sobrenadante se hizo pasar luego a través de una columna de afinidad empaquetada con níquel Sepharose Hi Performance (GE Healthcare). Después de lavados con tampón Hepes 20 mM que contiene dodecil-maltósido al 0,5%, la HA recombinante se eluyó con imidazol 500 mM en tampón Hepes 20 mM. Para la purificación del ectodominio de HA, el medio de células se recogió y se hizo pasar a través de una columna de afinidad Ni^{2+} tal como se describe. El ectodominio de HA recombinante se eluyó con imidazol 500 mM en tampón Hepes 20 mM. Las proteínas purificadas se concentraron utilizando Amicon (Millipore) y se almacenaron a 4°C. Las concentraciones se determinaron utilizando borrones de inmunotransferencia con anti-hemaglutinina y con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP).

Análisis de Micro-matrices de Actividades de Unión a Azúcar de Hemaglutinina. Las micro-matrices se imprimieron (AD3200, BioDot) mediante un pin robótico (SMP2B, TeleChem International Inc.). Portaobjetos Nexterion H fueron esparcidos con disoluciones de azúcar **1-17** y **21-30** a 100 μM de abajo hacia arriba con 12 réplicas horizontalmente en cada cuadrícula y se secaron al vacío. Los portaobjetos manchados se bloquearon con etanolamina en borato de sodio durante 1 hora justo antes del uso, seguido de tres lavados de Tween 20 al 0,05% en tampón PBS (pH 7,4) (PBST). Una disolución de hemaglutinina a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBST se pre-mezcló con estreptavidina marcada con Cy3 en una relación molar 1:1 1 hora antes de la incubación de los complejos pre-conformados con los portaobjetos durante otra hora. Después de seis lavados con PBST, un lavado con PBS y tres lavados con agua destilada, los portaobjetos se secaron al aire y se escanearon con un láser 532 utilizando un escáner de fluorescencia de micro-matrices (GenePix 4000B, Molecular Devices). La ganancia PMT se estableció en 600. Las imágenes resultantes se analizaron con GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices) para localizar y cuantificar la intensidad de fluorescencia de todos los puntos dentro de la cuadrícula. Se tomó la mediana de la intensidad de fluorescencia de cada uno de los puntos para calcular el valor de la mediana de las actividades de unión hacia cada uno de los azúcares (12 repeticiones para cada uno de los azúcares). Las medianas de al menos tres experimentos independientes se promediaron para las figuras. Para la determinación de K_D , los complejos pre-conformados se diluyeron en serie para la reacción de unión⁸⁵ y las intensidades de unión se cuantificaron tal como se describió anteriormente. Las intensidades de unión a diversas concentraciones de los complejos fueron luego ajustadas a las isothermas Langumir utilizando el Prism (GraphPad, San Diego, CA)⁹³.

Determinación de los Sitios de Glicosilación y Desglicosilación de Mutantes de Glicosilación. Proteínas HA purificadas disueltas en trifluoroetanol/bicarbonato de amonio 100 mM (pH 8,5) (1:1 (v:v)) se redujeron con ditiotreitolo 10 mM durante 1 hora a 37°C, se alquilaron con yodoacetamida 20 mM durante otra 1h en la oscuridad a 37°C, y subsiguientemente se digirieron con tripsina modificada (calidad de secuenciación, Promega) durante la noche a 37°C. Todos los reactivos se prepararon en tampón bicarbonato de amonio 50 mM, pH 8,5. Después de detener la digestión con tripsina por calentamiento a 95°C durante 10 min, los glicanos se separaron por incubación con 500 U de PNGasa F (exenta de glicerol, New England Biolabs) durante la noche a 37°C. Todas las muestras se secaron a vacío, se volvió a disolver en ácido fórmico al 0,1% y se inyectó en el espectrómetro de masas de trampa de iones lineal nano-LC/ESI LTQ FT (Bruker Daltonics). Los espectros MS/MS fueron adquiridos en un modo de adquisición dependiente de datos que selecciona automáticamente y fragmenta los cinco picos más intensos de cada uno de los espectros MS generados. Los datos en bruto MS y MS/MS fueron procesados por el software Raw2msm y fueron investigados frente a una base de datos NCBI generada internamente que comprende HA WT y diversos mutantes de glicosilación, utilizando la máquina de búsqueda Mascot Daemon. Los criterios de búsqueda fueron digestión con tripsina y modificaciones de variables tales como carbamidometilo (C), oxidación (M), desamidación (D) y N-glicosilación (Asn-Gly). Para el análisis de datos se permitió que quedaran incluidos hasta 1 escisión perdida, exactitud de masas de 3 ppm en el ion parental y 0,60 Da en los iones de fragmentos. Todos los impactos significativos de proteínas de Mascot ($p < 0,05$) así obtenidos no contenían impactos falsos positivos de la base de datos inversa.

Preparación de virus. Las muestras de diversos virus se recogen del Center for Disease Control and Prevention en TAIWAN. Los virus se inactivaron mediante tratamiento con β -propiolactona (BPL; 0,05% v/v) durante 60 minutos a 33°C, y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato 0,01 M pH 7,4 (PBS) y se almacenaron a -80°C. La comparación de muestras de virus vivo e inactivado demostró que la inactivación con BPL no alteró la especificidad de unión del receptor⁹⁴.

Procedimiento de Ensayo de Unión al Virus. Portaobjetos impresos fueron analizados sin modificación adicional alguna. El virus completo inactivado se aplicó a una concentración en torno a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de virus (peso de virus inactivado) en tampón PBS que contiene el inhibidor de neuraminidasa carboxilato de oseltamivir 10 μM . Las suspensiones de los virus inactivados con carboxilato de oseltamivir se dispusieron sobre las matrices y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Los portaobjetos se lavaron posteriormente mediante enjuagues sucesivos en PBS-Tween al 0,05%, PBS y agua desionizada tres veces. Los virus unidos se detectaron utilizando los siguientes anticuerpos: anticuerpo anti-H1 de conejo preparado en la casa, tanto para SOV California/07/2009

como para H1N1 Brisbane; anticuerpo anti-H3 (TC16) preparado en la casa para H3N1 Brisbane; y anticuerpo de la gripe aviar Anti-H5 preparado en la casa (α -293s) anticuerpos para H5N1 (RG14). Los portaobjetos se sacudieron suavemente a temperatura ambiente durante 60 min. Después de repetir la etapa de lavado, la unión se detectó por superposición con anticuerpos secundarios marcados.

5 Tabla 10: Referencias

1. (a) Schauer, R., Ed. *Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function*; Springer-Verlag: New York, 1982; Vol. 10. (b) Rosenberg, A., Ed. *Biology of the Sialic Acids*; Plenum: New York, London, 1995. (c) Simanek, E. E.; McGarvey, G. J.; Jablonowski, J. A.; Wong, C.-H. *Chem. Rev.* 1998, 98, 833-862. (d) Varki, A. *Nature* 2007, 446, 1023-1029.
2. Subbarao, K.; Katz, J. *Cell. Mol. Life Sci.* 2000, 57, 1770-1784.
3. (a) Reglero, A.; Rodriguez-Aparicio, L. B.; Luengo, J. M. *Int. J. Biochem.* 1993, 25, 1517-1527. (b) Varki, A. *Glycobiology* 1993, 3, 97-130. (c) Inoue, Y.; Inoue, S. *Pure Appl. Chem.* 1999, 71, 789-800.
4. (a) Muthana, S.; Yu, H.; Cao, H.-Z.; Cheng, J.-S.; Chen, X. J. *Org. Chem.* 2009, 74, 2928-2936 and citations there in. (b) Koeller, K. M.; Wong, C.-H. *Nature* 2001, 409, 232-240 and citations therein.
5. For reviews on chemical sialylations, see: (a) Boons, G. J.; Demchenko, K. V. *Chem. Rev.* 2000, 100, 4539-4565. (b) Ando, H.; Imanura, A. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 2004, 16, 293-303. (c) Boons, G. J.; Demchenko, A. V. In *Carbohydrate-based Drug Discovery*; Wong, C.-H., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2003; Vol. 1, pp 55-102.
6. (a) Okamoto, K.; Goto, T. *Tetrahedron* 1990, 46, 5835-5857. (b) DeNinno, M. P. *Synthesis* 1991, 583-593. (c) Ogawa, T.; Sugimoto, M. *Carbohydr. Res.* 1985, 135, C5-C9.
7. (a) Kondo, H.; Ichikawa, Y.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 8748-8750; (b) Sim, M. M.; Kondo, H.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 2260-2267. (c) Martin, T. J.; Schmidt, R. R. *Tetrahedron Lett.* 1992, 33, 6123-6126. (d) Martin, T. J.; Brescello, R.; Toepfer, A.; Schmidt, R. R.; *Glycoconjugate J.* 1993, 10, 16-25.
8. (a) Hasegawa, A. In *Modern Methods in Carbohydrate Synthesis*; Khan, S. H.; O'Neill, R. A., Eds.; Harwood Academic Publishers: New York, 1996; pp. 277-300. (b) Zhang, Z.; Ollmann, I. R.; Ye, X.-S.; Wischant, R.; Baasov, T.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 734-753. (c) Nicolaou, K. C.;
- Ueno, H. In *Preparative Carbohydrate Chemistry*, Hanessian, S. Ed.; Marcel Dekker Inc: New York, 1997; pp. 313-338. (d) De Meo, C.; Parker, O. *Tetrahedron Asymmetry*. 2005, 16, 303-307.
9. (a) Marra, A.; Sinay, P. *Carbohydr. Res.* 1990, 195, 303-308. (b) Martichonok, V.; Whitesides, G. M. *J. Org. Chem.* 1996, 61, 1702-1706. (c) Dziadek, S.; Brocke, C.; Kunz, H. *Chem. Eur. J.* 2004, 10, 4150-4162.
10. (a) Cai, S.; Yu, B. *Org. Lett.* 2003, 5, 3827-3830. (b) Tanaka, S.-I.; Goi, T.; Tanaka, K.; Fukase, K. *J. Carbohydr. Chem.* 2007, 26, 369-394. (c) Liu, Y.; Ruan, X.; Li, X.; Li, Y. *J. Org. Chem.* 2008, 73, 4287-4290.
11. (a) Danishefsky, S. J.; DeNinno, M. P.; Chen, S. J. *Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 3929-3940. (b) Takahashi, T.; Tsukamoto, H.; Yamada, H. *Tetrahedron Lett.* 1997, 38, 8223-8226. (c) Haberman, J. M.; Gin, D. Y. *Org. Lett.* 2001, 3, 1665-1668. (d) Haberman, J. M.; Gin, D. Y. *Org. Lett.* 2003, 5, 2539-2541. (e) Hanashima, S.; Akai, S.; Sato, K. *Tetrahedron Lett.* 2008, 49, 5111-5114.
12. (a) Okamoto, K.; Kondo, T.; Goto, T. *Tetrahedron* 1987, 43, 5909-5918. (b) Ito, Y.; Ogawa, T. *Tetrahedron Lett.* 1988, 29, 3987-3990. (c) Okamoto, K.; Goto, T. *Tetrahedron* 1990, 46, 5835-5857. (d) Ito, Y.; Ogawa, T. *Tetrahedron* 1990, 46, 89-102. (e) Erce'govec, T.; Magnusson, G. J. *Org. Chem.* 1995, 60, 3378-3384. (f) Martichonok, V.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 8187-8191. (g) Erce'govec, T.; Magnusson, G. J. *Org. Chem.* 1996, 61, 179-184. (h) Castro-Palomino, J. C.; Tsvetkov, Y. E.; Schmidt, R. R. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 5434-5440; (i)

Hossain, N.; Magnusson, G. *Tetrahedron Lett.* 1999, 40, 2217-2220.

13. For reviews on C-5 modifications, see: (a) De Meo, C. In *Frontiers in Modern Carbohydrate Chemistry*, Demchenko, A. V. Ed.; American Chemical Society: Washington, DC, 2007; pp.118-131. (b) De Meo, C. *Carbohydr. Res.* 2008, 343, 1540-1552.

14. (a) Yu, C.-S.; Niikura, K.; Lin, C.-C.; Wong, C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 2900-2903. (b) Lin, C.-C.; Huang, K.-T.; Lin, C.-C. *Org. Lett.* 2005, 7, 4169-4172. (c) Tanaka, K.; Takashi, G.; Fukase, K. *Synlett.* 2005, 2958-2962. (d) Sun, B.; Srinivasan, B.; Huang, X.-F. *Chem. Eur. J.* 2008, 14, 7072-7081. (e) Tanaka, H.; Tatenno, Y.; Nishiura, Y.; Takahashi, T. *Org. Lett.* 2008, 10, 5597-5600. (f) Crich, D.; Wu, B. *Org. Lett.* 2008, 10, 4033-4035. 15. (a) Mootoo, D. R.; Konradsson, P.; Udodong, U.; Fraser-Reid, B. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 5583-5584. (b) Fraser-Reid, B.; Wu, Z.; Udodong, U. E.; Ottoson, H. *J. Org. Chem.* 1990, 55, 6068-6070.

16. (a) Raghavan, S.; Kahne, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 1580-1581.

17. (a) Koeller, K. M.; Wong, C.-H. *Chem. Rev.* 2000, 100, 4465-4493. (b) Lee, J.-C.; Greenberg, W. A.; Wong, C.-H. *Nat. Protoc.* 2006, 1, 3143-3152.

18. (a) Seeberger, P. H.; Haase, W. C. *Chem. Rev.* 2000, 100, 4349-4393. (b) Plante, O. J.; Palmacci, E. R.; Seeberger, P. H. *Science* 2001, 291, 1523-1527.

19. (a) Kanie, O.; Ito, Y.; Ogawa, T. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 12073-12074. (b) Yamada, H.; Harada, T.; Miyazaki, H.; Takahashi, T. *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 3979-3982. (c) Demchenko, A. V.; De Meo, C. *Tetrahedron Lett.* 2002, 43, 8819. (d) Kaeothip, S.; Pornsuriyasak, P.; Rath, N. P.; Demchenko, A. V. *Org. Lett.* 2009, 11, 799-802.

20. (a) Nguyen, H. M.; Poole, J. L.; Gin, D. Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 414-417. (b) Yamago, S.; Yamada, T.; Maruyama, T.; Yoshida, J. I. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 2145-2148. (c) Huang, X.; Huang, L.; Wang, H.; Ye, X.-S. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 5221-5224.

21. Ye, X.-S.; Huang, X.; Wong, C.-H. *Chem. Commun.* 2001, 974-975.

22. Zhang, Z.; Niikura, K.; Huang, X.-F.; Wong, C.-H. *Can. J. Chem.* 2002, 80, 1051-1054.

23. Wang, C.-C.; Lee, J.-C.; Luo, S.-Y.; Kulkarni, S. S.; Huang, Y.-W.; Lee, C.-C.; Chang, K.-L.; Hung, S.-C. *Nature* 2007, 446, 896-899.

24. (a) Hashimoto, S.; Honda, T.; Ikegami, S. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1989, 685-687. (b) Boger, D. L.; Honda, T. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 5647-5656. (c) Duynstee, H. I.; Wijsman, E. R.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Synlett.* 1996, 313-314. (d) Vankayalapati, H.; Singh, G.; Tranoy, I. *Chem. Commun.* 1998, 2129-2130. (e) Vankayalapati, H.; Singh, G. *Tetrahedron Lett.* 1999, 40, 3925-3928. (f)

Plante, O. J.; Andrade, R. B.; Seeberger, P. H. *Org. Lett.* 1999, 1, 211-214. (g) Singh, G.; Vankayalapati, H. *Tetrahedron: Asymmetry* 2000, 11, 125-138. (h) Plante, O. J.; Buchwald, S. L.; Seeberger, P. H. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 7148-7149. (i) Plante, O. J.; Palmacci, E. R.; Seeberger, P. H. *Org. Lett.* 2000, 2, 3841-3843. (j) Plante, O. J.; Palmacci, E. R.; Andrade, R. B.; Seeberger, P. H. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 9545-9554. (k) Tsuda, T.; Nakamura, S.; Hashimoto, S. *Tetrahedron* 2004, 60, 10711-10737.

25. (a) Hung, S.-C.; Wong, C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1996, 35, 2671-2674. (b) Palmacci, E. R.; Seeberger, P. H. *Org. Lett.* 2001, 3, 1547-1550.

26. (a) Seeberger, P. H. *Chem. Commun.* 2003, 1115-1121. (b) Love, K. R.; Seeberger, P. H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2004, 43, 602-605. (c) Werz, D. B.; Seeberger, P. H. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2005, 4, 751-763.

27. (a) Crich, D.; Li, W. J. *J. Org. Chem.* 2007, 72, 2387-2391. (b) Crich, D.; Li, W. J. *J. Org. Chem.* 2007, 72, 7794-7797. (c) Liang, F.-F.; Chen, L.; Xing, G.-W. *Synlett.* 2009, 3, 425-428
28. (a) Tanaka, H.; Nishiura, Y.; Takahashi, T. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 7124-7125. (b) Farris, M. D.; De Meo, C. *Tetrahedron Lett.* 2007, 48, 1225-1227. (c) Tanaka, H.; Nishiura, Y.; Takahashi, T. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 17244-17245.
29. Fridman, M.; Belakhov, V.; Yaron, S.; Bassov, T. *Org. Lett.* 2003, 5, 3575
30. Donohoe, T. J.; Logan, J. G.; Laffan, D. D. P. *Org. Lett.* 2003, 5, 4995-4998. 31. (a) Komba, S.; Galustian, C.; Ishida, H.; Feizi, T.; Kannagi, R.; Kiso, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, 1131-1133. (b) Komba, S.; Yamaguchi, M.; Ishida, H.; Kiso, M. *Biol. Chem.* 2001, 382, 233-240.
32. (a) Li, Z.; Gildersleeve, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 11612-11619. (b) Li, Z.; Gildersleeve, J. C. *Tetrahedron Lett.* 2007, 48, 559-562.
33. (a) Itzkowitz, S. H.; Yuan, M.; Montgomery, C. K.; Kjeldsen, T.; Takahashi, H. K.; Bigbee, W. L.; Kim, Y. S. *Cancer Res.* 1989, 49, 197-204. (b) Dabelsteen, E. *J. Pathol.* 1996, 179, 358-369.
34. Schwarz, J. B.; Kuduk, S. D.; Chen, X. T.; Sames, D.; Glunz, P. W.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 2662-2673.
35. (a) Tanaka, H.; Adachi, M.; Takahashi, T. *Chem. Eur. J.* 2005, 11, 849-862. (b) Mathieux, N.; Paulsen, H.; Meldal, M.; Bock, K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1997, 2359-2368.
36. Hasegawa, A.; Nagahama, T.; Ohki, H.; Hotta, K.; Ishida, H.; Kiso, M. *J. Carbohydr. Chem.* 1991, 10, 493-498
37. Nagao, Y.; Nekado, T.; Ikeda, K.; Achiwa, K. *Chem. Pharm. Bull.* 1995, 43, 1536-1542.
38. Crich, D.; Smith, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 9015-9020.
39. (a) Satoh, M.; Handa, K.; Saito, S.; Tokuyama, S.; Ito, A.; Miyao, N.; Orikasa, S.; Hakomori, S. *Cancer Res.* 1996, 56, 1932-1938. (b) Satoh, M.; Nejad, F. M.; Ohtani, H.; Ito, A.; Ohyama, C.; Saito, S.; Orikasa, S.; Hakomori, S. *Int. J. Oncol.* 2000, 16, 529-536.
40. (a) Katagiri, Y. U.; Ohmi, K.; Katagiri, C.; Sekino, T.; Nakajima, h.; Ebata, T.; Kiyokawa, N.; Fujimoto, J. *Glycoconjugate J.* 2001, 18, 347-353. (b) Wenk, J.; Andrews, P. W.; Casper, J.; Hata, J.; Pera, M. F.; von Keitz, A.; Damjanov, I.; Fenderson, B. A. *Int. J. Cancer* 1994, 58, 108-115. (c) Krupnick, J. G.; Damjanov, I.; Damjanov, A.; Zhu, Z. M.; Fenderson, B. A. *Int. J. Cancer* 1994, 59, 692-698. (d) Kannagi, R.; Levery, S. B.; Ishigami, F.; Hakomori, S.; Shevinsky, L. H.; Knowles, B. B.; Solter, D. J. *Biol. Chem.* 1983, 258, 8934-8942.
41. (a) Stapleton, A. E.; Stroud, M. R.; Hakomori, S.; Stamm, W. E. *Infect. Immun.* 1998, 66, 3856-3861. (b) Stroud, M. R.; Stapleton, A. E.; Levery, S. B. *Biochemistry* 1998, 37, 17420-17428. (c) Stapleton, A. E.; Nudelman, E.; Clausen, H.; Hakomori, S.; Stamm, W. E. *J. Clin. Invest.* 1992, 90, 965-972. (d) Cooling, L. L. W.; Koerner, T. A. W.; Naides, S. J. *J. Infect. Dis.* 1995, 172, 1198-1205.
42. Ishida, H.; Miyawaki, R.; Kiso, M.; Hasegawa, A. *J. Carbohydr. Chem.* 1996, 15, 163-182.
43. Lassaletta, J. M.; Carlsson, K.; Garegg, P. J.; Schmidt, R. R. *J. Org. Chem.* 1996, 61, 6873-6880.

44. Wang, Z.; Gilbert, M.; Eguchi, H.; Yu, H.; Cheng, J.; Muthana, S.; Zhou, L.; Wang, P. G.; Chen, X.; Huang, X. *Adv. Syn. Cat.* 2008, 350, 1717-1728.
45. Huang, C.-Y.; Thayer, D. A.; Chang, A. Y.; Best, M. D.; Hoffmann, J.; Head, S.; Wong, C.-H. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 2006, 103, 15-20.
46. Angat, T.; Varki, A. *Chem. Rev.* 2002, 102, 439-470.
47. Dube, D. H.; Bertozzi, C. R. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2005, 4, 477-488.
48. Tanaka, H.; Nishiura, Y.; Takahashi, T. *J. Org. Chem.* 2009, 74, 4383-4386.
49. Bouhroum, S.; Vottero, P. J. A. *Tetrahedron. Lett.* 1990, 31, 7441-7444.
50. Stephens, D. S. *FEMS Microbiol. Rev.* 2007, 31, 3-14.
51. Achtman, M. *Trends Microbiol* 1995, 3, 186-192.
52. Stephens, D. S.; Greenwood, B.; Brandtzaeg, P., *Lancet* 2007, 369, 2196-2210.
53. Taha, M. K.; Achtman, M.; Alonso, J. M.; Greenwood, B.; Ramsay, M.; Fox, A.; Gray, S.; Kaczmarek, E. *Lancet* 2000, 356, 2159.
54. Spinosa, M. R.; Progida, C.; Tala, A.; Cogli, L.; Alifano, P.; Bucci, C. *Infect. Immun.* 2007, 75, 3594-3603.
55. Schneider, M. C.; Exley, R. M.; Ram, S.; Sim, R. B.; Tang, C. M. *Trends Microbiol.* 2007, 15, 233-240.
56. Kugelberg, E.; Gollan, B.; Tang, C. M. *Vaccine* 2008, 26, 1134-1139.
57. (a) Dabrowski, U.; Friebohn, H.; Brossmer, R.; Supp, M. *Tetrahedron Lett.* 1979, 4637-4640. (b) Vandervleugel, D. J. M.; Vanheeswijk, W. A. R.; Vliegthart, J. F. G. *Carbohydr. Res.* 1982, 102, 121-130. (c) Paulsen, H.; Tietz, H. *Carbohydr. Res.* 1984, 125, 47-64. (d) Okamoto, K.; Kondo, T.; Goto, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1987, 60, 637-643. (e) Kanie, O.; Kiso, M.; Hasegawa, A. *J. Carbohydr. Chem.* 1988, 7, 501-506.
58. Prytulla, S.; Lauterwein, J.; Klessinger, M.; Thiem, J. *Carbohydr. Res.* 1991, 215, 345-349.
59. Hasegawa, A.; Ohki, H.; Nagahama, T.; Ishida, H.; Kiso, M. *Carbohydr. Res.* 1991, 212, 277-281.
60. Demchenko, A. V.; Boons, G. J. *Tetrahedron Lett.* 1998, 39, 3065-3068.
61. Ando, H.; Koike, Y.; Ishida, H.; Kiso, M. *Tetrahedron Lett.* 2003, 44, 6883-6886.
62. De Meo, C.; Demchenko, A. V.; Boons, G. J. *Aust. J. Chem.* 2002, 55, 131-134.
63. Codee, J. D. C.; Litjens, R. E. J. N.; van den Bos, L. J.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A. *Chem. Soc. Rev.* 2005, 34, 769-782.
64. Ferguson, N. M.; Fraser, C.; Donnelly, C. A.; Ghani, A. C.; Anderson, R. M. *Science* 2004, 304, 968-9.

65. Garten, R. J.; Davis, C. T.; Russell, C. A.; Shu, B.; Lindstrom, S.; Balish, A.; Sessions, W. M.; Xu, X.; Skepner, E.; Deyde, V.; Okomo-Adhiambo, M.; Gubareva, L.; Barnes, J.; Smith, C. B.; Emery, S. L.; Hillman, M. J.; Rivaller, P.; Smagala, J.; de Graaf, M.; Burke, D. F.; Fouchier, R. A.; Pappas, C.; Alpuche-Aranda, C. M.; Lopez-Gatell, H.; Olivera, H.; Lopez, I.; Myers, C. A.; Faix, D.; Blair, P. J.; Yu, C.; Keene, K. M.; Dotson, P. D., Jr.; Boxrud, D.; Sambol, A. R.; Abid, S. H.; St George, K.; Bannerman, T.; Moore, A. L.; Stringer, D. J.; Blevins, P.; Demmler-Harrison, G. J.; Ginsberg, M.; Kriner, P.; Waterman, S.; Smole, S.; Guevara, H. F.; Belongia, E. A.; Clark, P. A.; Beatrice, S. T.; Donis, R.; Katz, J.; Finelli, L.; Bridges, C. B.; Shaw, M.; Jernigan, D. B.; Uyeki, T. M.; Smith, D. J.; Klimov, A. I.; Cox, N. J. *Science* 2009, 325, 197-201.
66. Smith, G. J.; Vijaykrishna, D.; Bahl, J.; Lycett, S. J.; Worobey, M.; Pybus, O. G.; Ma, S. K.; Cheung, C. L.; Raghvani, J.; Bhatt, S.; Peiris, J. S.; Guan, Y.; Rambaut, A. *Nature* 2009, 459, 1122-5.
67. Skehel, J. J.; Wiley, D. C. *Annu Rev Biochem* 2000, 69, 531-69.
68. Wilson, I. A.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C. *Nature* 1981, 289, 366-73.
69. Varki, A. *Nature* 2007, 446, 1023-9.
70. Rogers, G. N.; Pritchett, T. J.; Lane, J. L.; Paulson, J. C. *Virology* 1983, 131, 394-408.
71. Gambaryan, A. S.; Karasin, A. I.; Tuzikov, A. B.; Chinarev, A. A.; Pazynina, G. V.; Bovin, N. V.; Matrosovich, M. N.; Olsen, C. W.; Klimov, A. I. *Virus Res* 2005, 114, 15-22.
72. Rogers, G. N.; Paulson, J. C. *Virology* 1983, 127, 361-73.
73. Kumari, K.; Gulati, S.; Smith, D. F.; Gulati, U.; Cummings, R. D.; Air, G. M. *Virol J* 2007, 4, 42.
74. Yen, H. L.; Aldridge, J. R.; Boon, A. C.; Ilyushina, N. A.; Salomon, R.; Hulse-Post, D. J.; Marjuki, H.; Franks, J.; Boltz, D. A.; Bush, D.; Lipatov, A. S.; Webby, R. J.; Rehg, J. E.; Webster, R. G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106, 286-91.
75. Vinikoor, M.; Stevens, J.; Nawrocki, J.; Singh, K. *J Clin Microbiol* 2009, 47, 3055-6.
76. de Boer, G. F.; Back, W.; Osterhaus, A. D. *Arch Virol* 1990, 115, 47-61.
77. Skropeta, D. *Bioorg Med Chem* 2009, 17, 2645-53.
78. Deom, C. M.; Caton, A. J.; Schulze, I. T. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, 83, 3771-5.
79. Wang, C. C.; Chen, J. R.; Tseng, Y. C.; Hsu, C. H.; Hung, Y. F.; Chen, S. W.; Chen, C. M.; Khoo, K. H.; Cheng, T. J.; Cheng, Y. S.; Jan, J. T.; Wu, C. Y.; Ma, C.; Wong, C. H. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106, 18137-42.
80. Hsu, C. H.; Chu, K. C.; Lin, Y. S.; Han, J. L.; Peng, Y. S.; Ren, C. T.; Wu, C. Y.; Wong, C. H. *Chem. Eur. J.* 2010, 16, 1754-60.
81. Komba, S.; Galustian, C.; Ishida, H.; Feizi, T.; Kannagi, R.; Kiso, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, 1131-1133.
82. Komba, S.; Yamaguchi, M.; Ishida, H.; Kiso, M. *Biol Chem* 2001, 382, 233-40.

83. Yamaguchi, M.; Ishida, H.; Kanamori, A.; Kannagi, R.; Kiso, M. J. Carbohydrat. Chem. 2004, 23, 201-215.
84. Stevens, J.; Corper, A. L.; Basler, C. F.; Taubenberger, J. K.; Palese, P.; Wilson, I. A. Science 2004, 303, 1866-70.
85. Srinivasan, A.; Viswanathan, K.; Raman, R.; Chandrasekaran, A.; Raguram, S.; Tumpey, T. M.; Sasisekharan, V.; Sasisekharan, R. Proc Natl Acad Sci U S A 2008, 105, 2800-5.
86. Inkster, M. D.; Hinshaw, V. S.; Schulze, I. T. J Virol 1993, 67, 7436-43.
87. Gunther, I.; Glatthaar, B.; Doller, G.; Garten, W. Virus Res 1993, 27, 147-60.
88. Tsuchiya, E.; Sugawara, K.; Hongo, S.; Matsuzaki, Y.; Muraki, Y.; Nakamura, K. J Gen Virol 2002, 83, 3067-74.
89. Roberts, P. C.; Garten, W.; Klenk, H. D. J Virol 1993, 67, 3048-60.
90. Tsuchiya, E.; Sugawara, K.; Hongo, S.; Matsuzaki, Y.; Muraki, Y.; Li, Z. N.; Nakamura, K. J Gen Virol 2002, 83, 1137-46.
91. Vigerust, D. J.; Shepherd, V. L. Trends Microbiol 2007, 15, 211-8.
92. Chen, M. W.; Cheng, T. J.; Huang, Y.; Jan, J. T.; Ma, S. H.; Yu, A. L.; Wong, C. H.; Ho, D. D. Proc Natl Acad Sci USA 2008, 105, 13538-43.
93. Liang, P. H.; Imamura, M.; Li, X.; Wu, D.; Fujio, M.; Guy, R. T.; Wu, B. C.; Tsuji, M.; Wong, C. H. J Am Chem Soc 2008, 130, 12348-54.
94. Matrosovich M, et al. J. Virol. 1999, 73, 1146-1155.

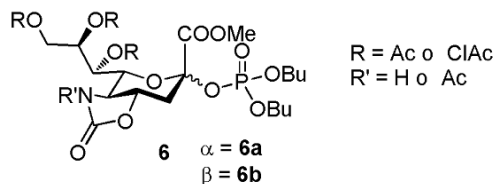
Por consiguiente, la invención no está limitada excepto por las reivindicaciones adjuntas.

Aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción que antecede pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

La bibliografía de patentes y científica mencionada en esta memoria establece el conocimiento que está disponible para los expertos en la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto donante de sialil-fosfato para la síntesis de sialósidos, en donde el compuesto tiene la estructura:

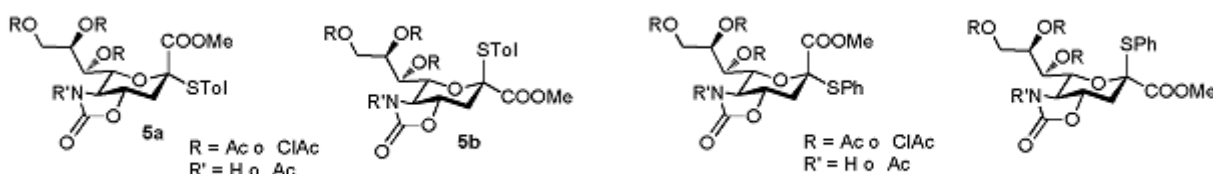


2. Un método para sintetizar un sialósido, comprendiendo el método:

- 5 acoplar un tiosialósido *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonil- o 5-*N*,4-*O*-carbonil-protégido con un fosfato de dibutilo en presencia de yodosuccinimida y ácido trifluorometanosulfónico (triflico) catalítico bajo condiciones adecuadas; aislar un donante de sialil-fosfato de dibutilo *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonil-protégido o 5-*N*,4-*O*-carbonil-protégido de acuerdo con la reivindicación 1.

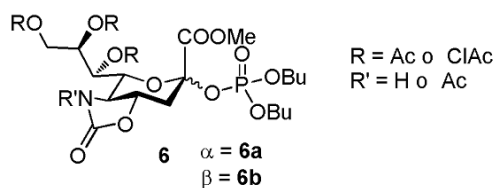
3. El método de la reivindicación 2, en el que el sialósido comprende un enlace α -glicosídico.

- 10 4. El método de la reivindicación 2, en el que el tiosialósido se selecciona del grupo que consiste en:



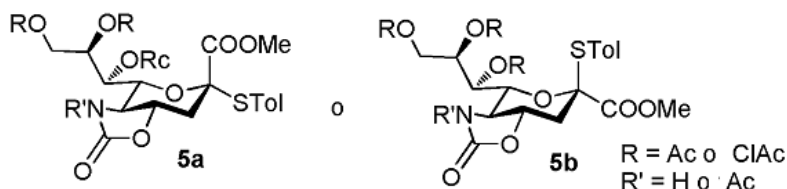
5. El método de la reivindicación 2, que comprende, además: separar sialil α -fosfato de sialil β -fosfato mediante un proceso que comprende cromatografía.

- 15 6. El método de la reivindicación 2, en el que el donante de sialil-fosfato de dibutilo *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonil- o 5-*N*,4-*O*-carbonil-protégido comprende sialil α -fosfato **6a** o sialil β -fosfato **6b** que tiene la fórmula:



,y

en el que el tiosialósido *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonil- o 5-*N*,4-*O*-carbonil-protégido es:



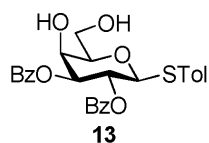
- 20 7. El método de la reivindicación 2, que comprende, además, las etapas de la síntesis α -selectiva de un bloque de construcción de disacárido de sialilo que comprende ácido *N*-acetil-neuramínico (Neu5Ac):

acoplado el donante de sialil-fosfato de dibutilo *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonil- o 5-*N*,4-*O*-carbonil-protegido con un aceptor de tiogalactósido adecuado.

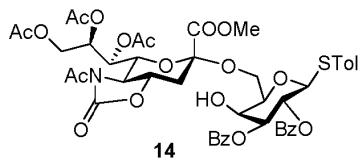
8. El método de la reivindicación 7, en el que el bloque de construcción de disacárido que comprende ácido *N*-acetil-neuramínico (Neu5Ac) es principalmente α -anómico.

5 9. El método de la reivindicación 7, en el que el acoplamiento se fomenta mediante el reactivo trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (TMSOTf).

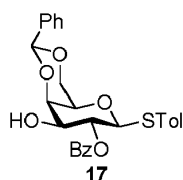
10. El método de la reivindicación 7, en el que el bloque de construcción de disacárido de sialilo es Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)Gal y un aceptor de tiogalactósido 4,6-dihidroxi de la fórmula:



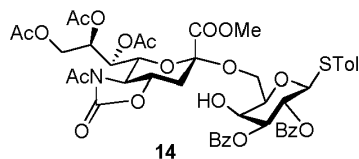
10 se acopla con el donante de sialil-fosfato de dibutilo *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonil-protegido **6a** para producir un Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)Gal de la fórmula:



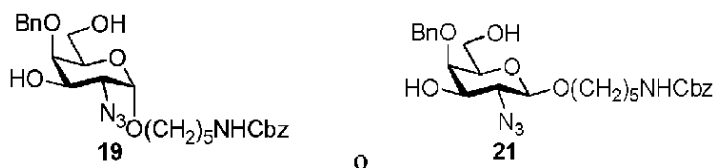
11. El método de la reivindicación 7, en el que el bloque de construcción de disacárido de sialilo es Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 3)Gal y un aceptor de tolil-2-*O*-benzoil-4,6-bencilidina-1-tio- β -D-galactopiranosido **17** de la fórmula:



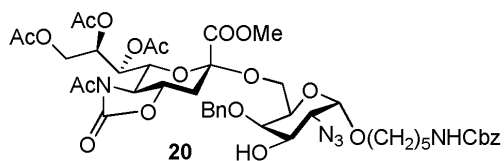
15 está acoplado con el donante de sialil-fosfato de dibutilo *N*-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonilo-protegido **6a** para producir un Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 3)Gal de la fórmula:



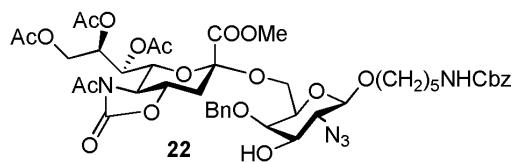
20 12. El método de la reivindicación 7, en el que el bloque de construcción de disacárido de sialilo es Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)GalNAc y un aceptor de tolil-2-*O*-benzoil-4,6-bencilidina-1-tio- β -D-galactopiranosido **19** ó **21** de la fórmula:



está acoplado con el donante de sialil-fosfato de dibutilo N-acetil-5-*N*,4-*O*-carbonilo-protégido **6a** para producir un Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)GalNAc de la fórmula:



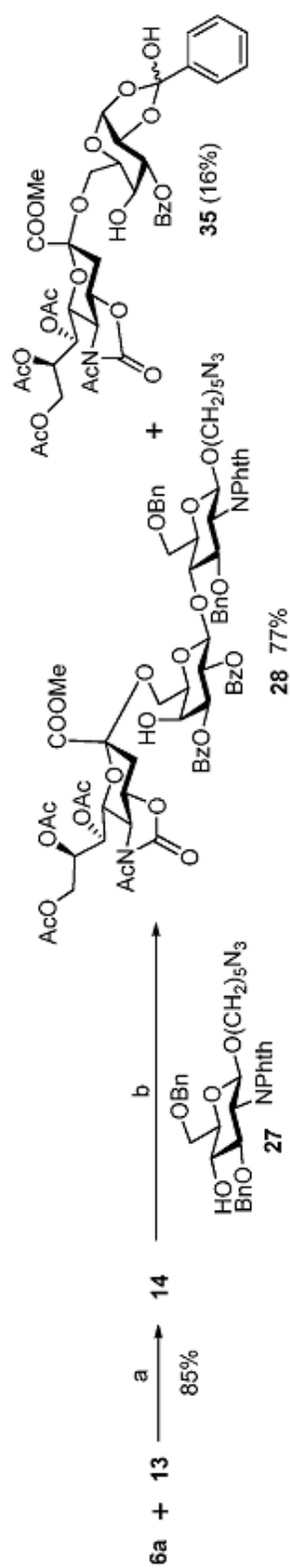
5 o



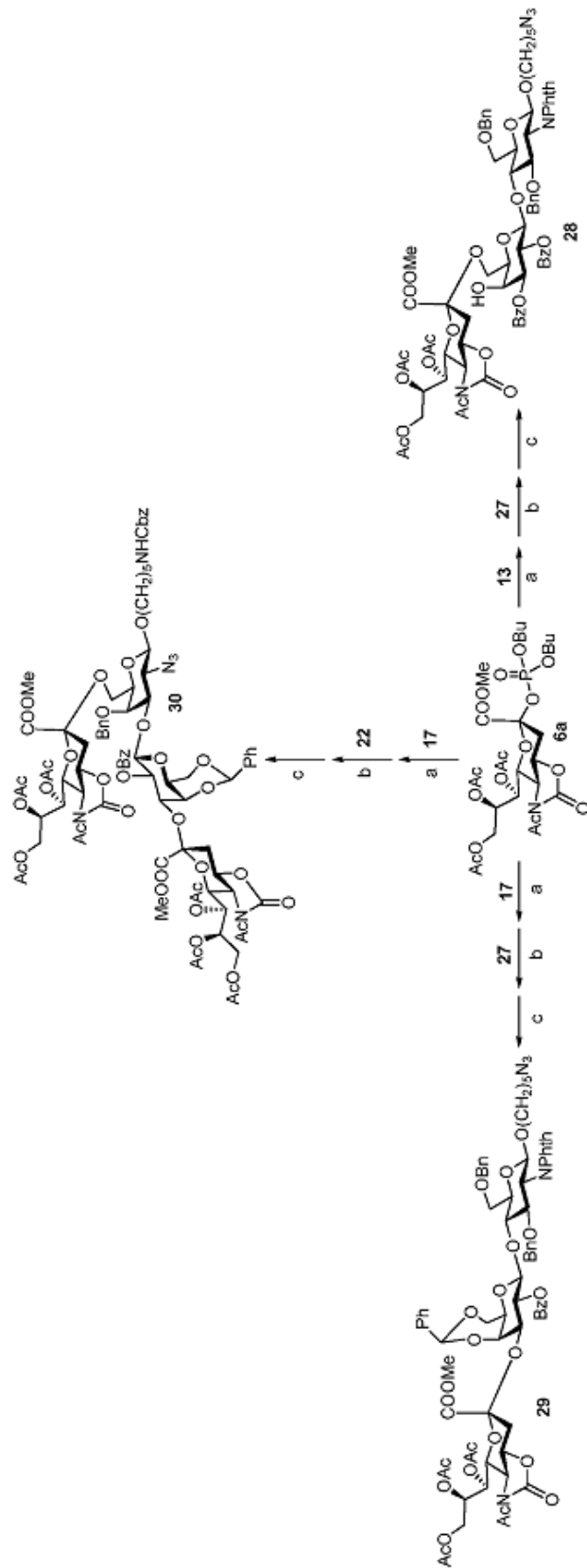
respectivamente.

13. El método de la reivindicación 12, en el que el bloque de construcción disacárido Neu5Ac α (2 $\rightarrow$ 6)GalNAc se utiliza para la síntesis de un antígeno *O*-sialilado ST_n, 2,6-STF, 2,3-STF o glicoforina.

10

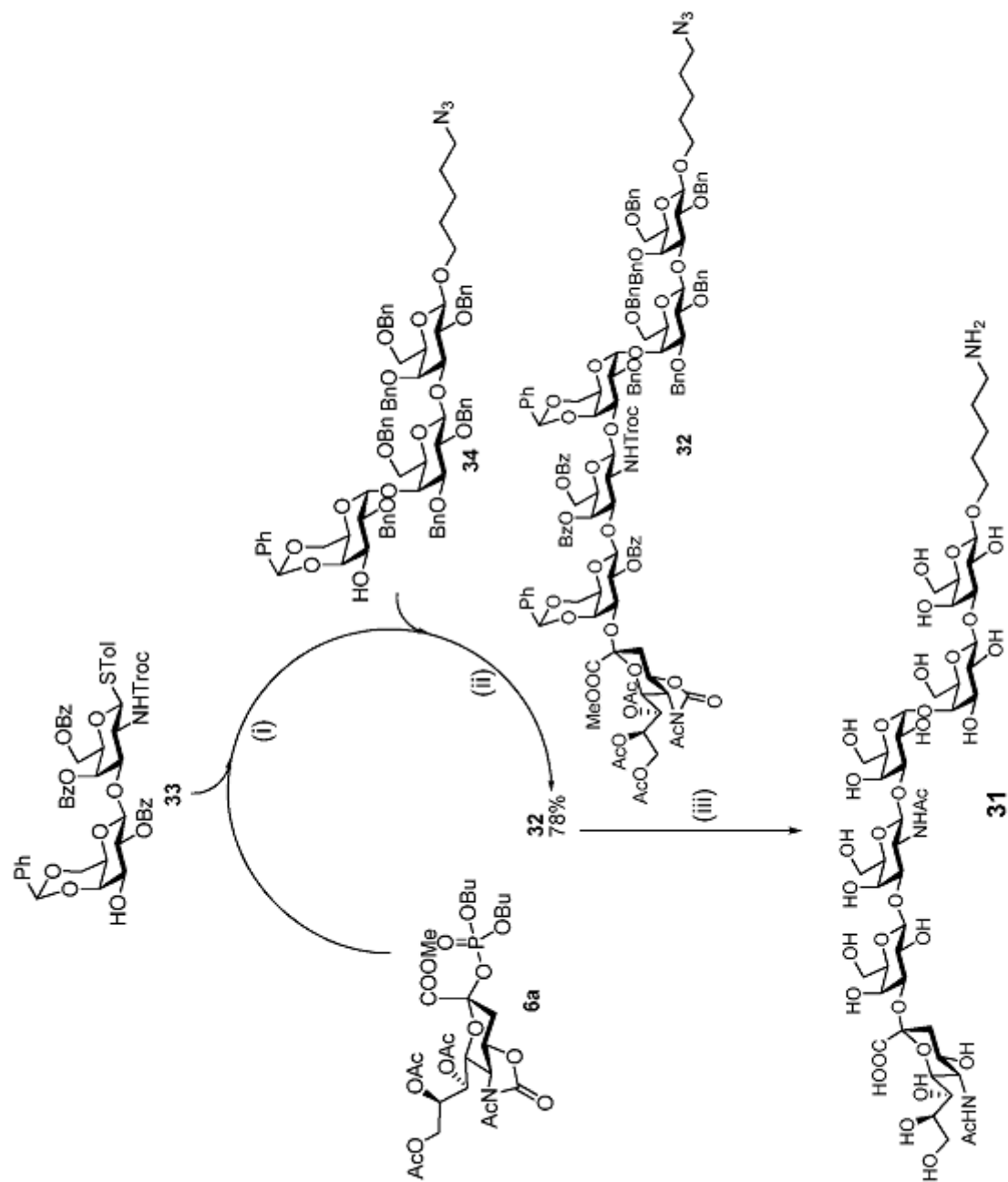


Esquema 1. Síntesis Escalonada del Trisacárido **28** $\alpha(2\rightarrow6)$ -enlazado del Receptor de HA de la Gripe.

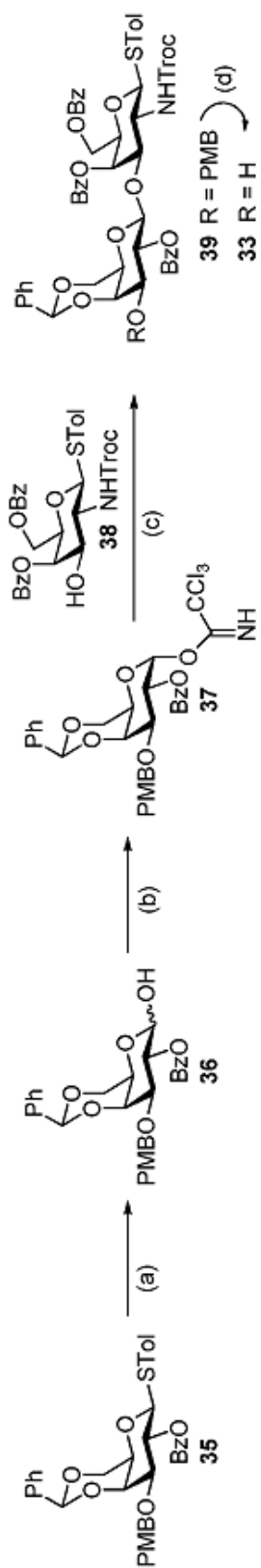


Esquema 2:

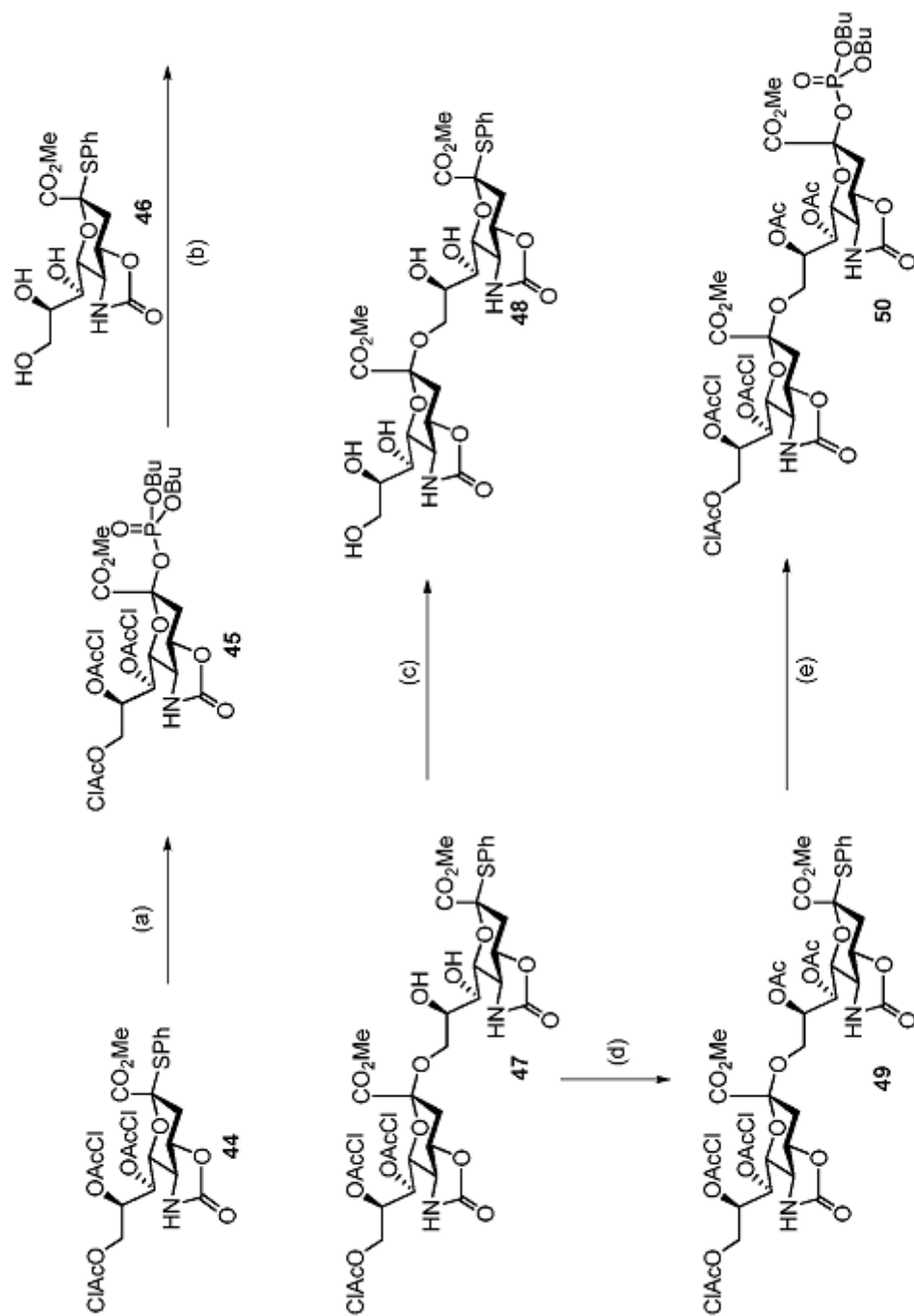
Síntesis en un Solo Recipiente de Trisacáridos $\alpha(2 \rightarrow 3)$ y $\alpha(2 \rightarrow 6)$ -enlazados a Receptores de HA de la Gripe y Tetrasacárido del Epítipo DSGG



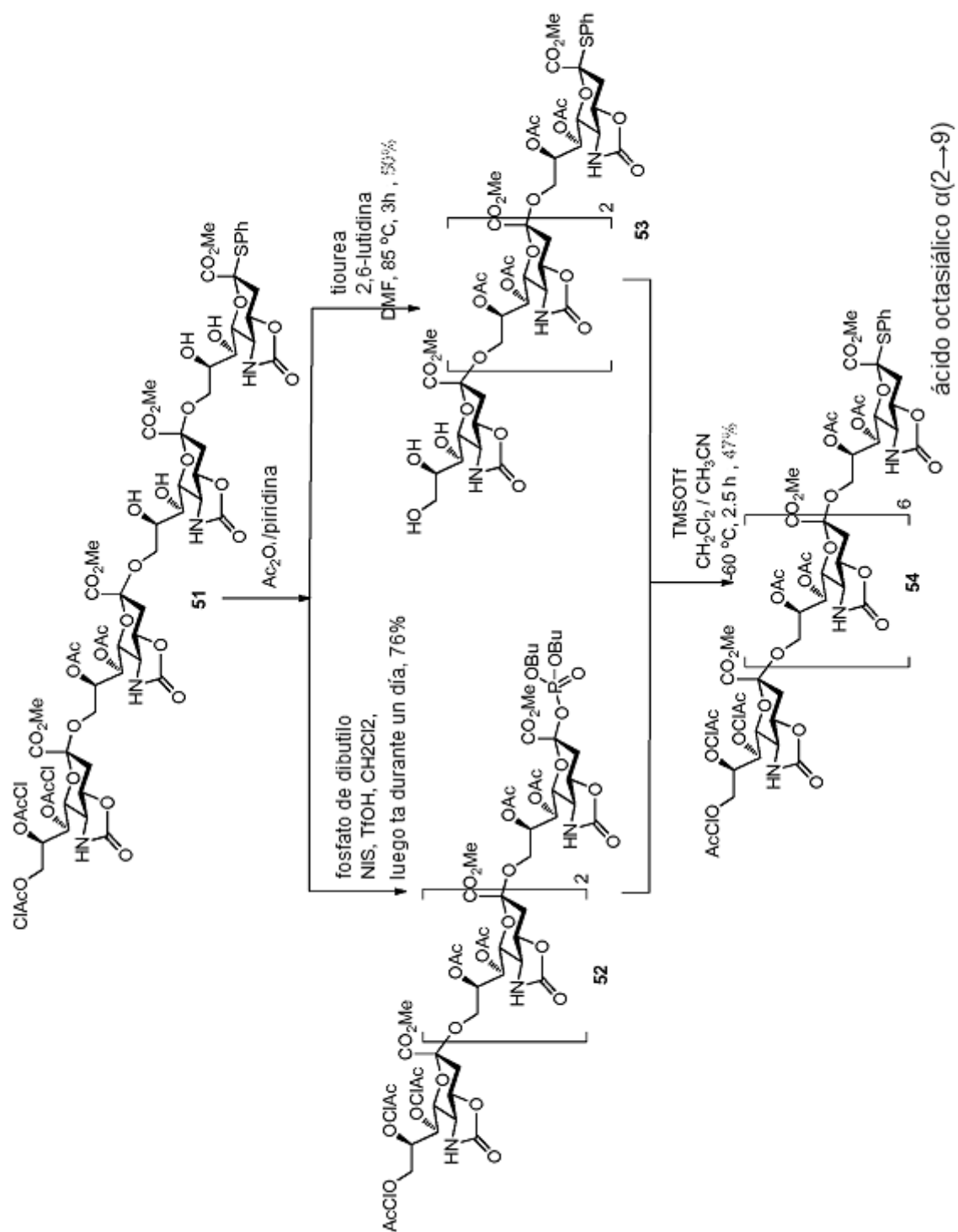
Esquema 3: Síntesis en un Solo Recipiente de Hexasacárido SSEA-4



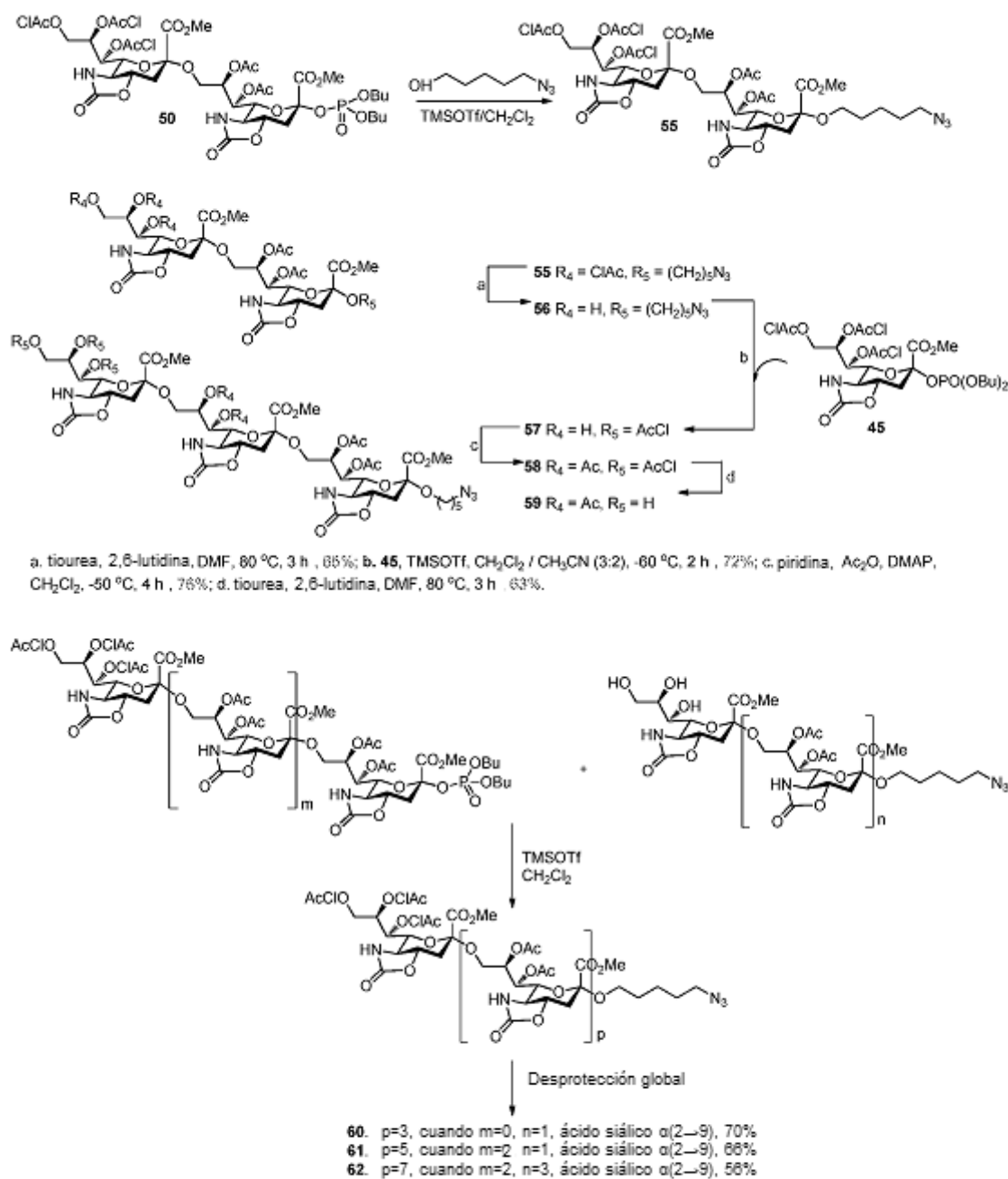
Esquema 4: Síntesis de Disacárido **33**



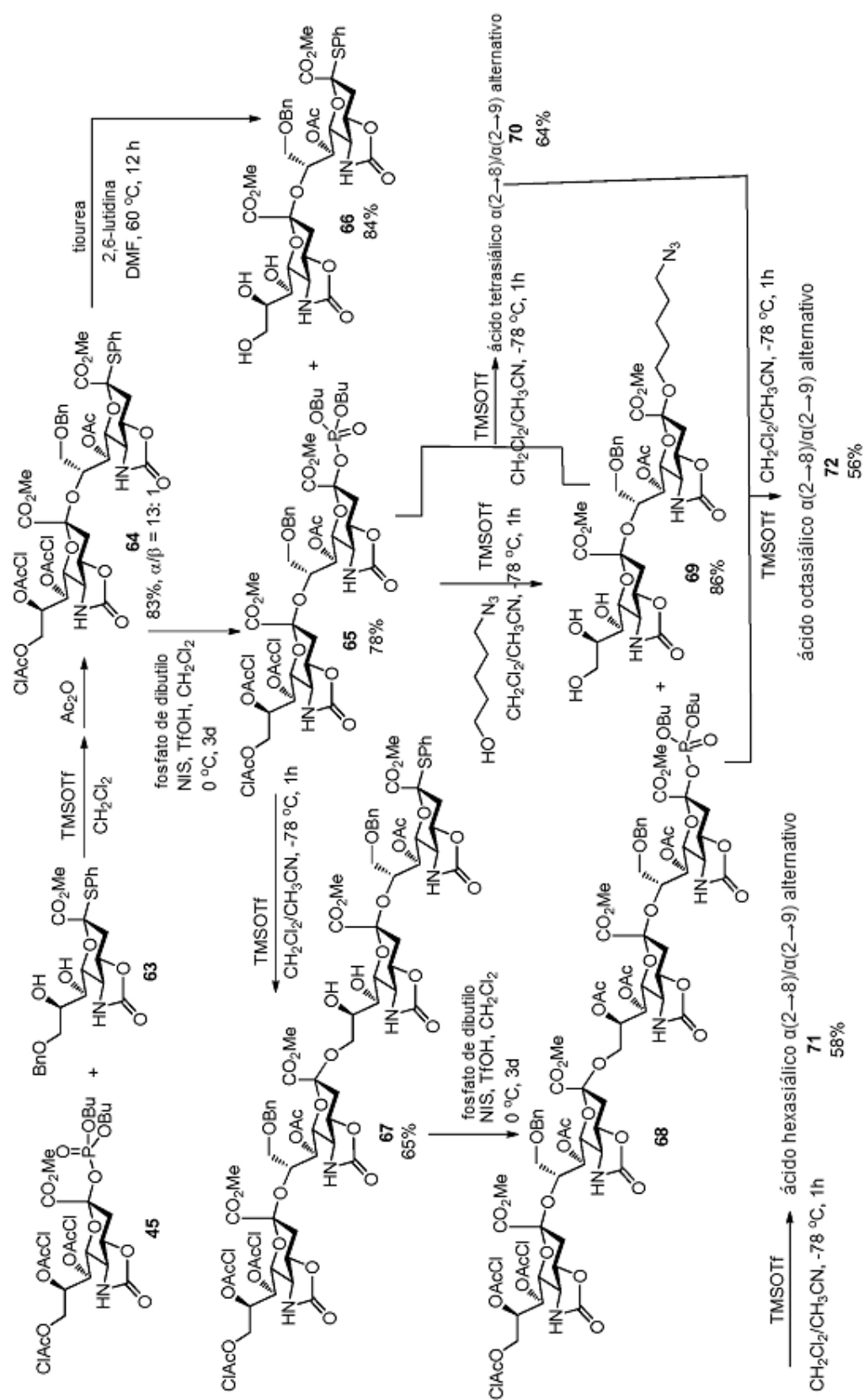
Esquema 5: Síntesis de Bloques de Construcción de Disacárido $\alpha(2\rightarrow9)$ -enlazado



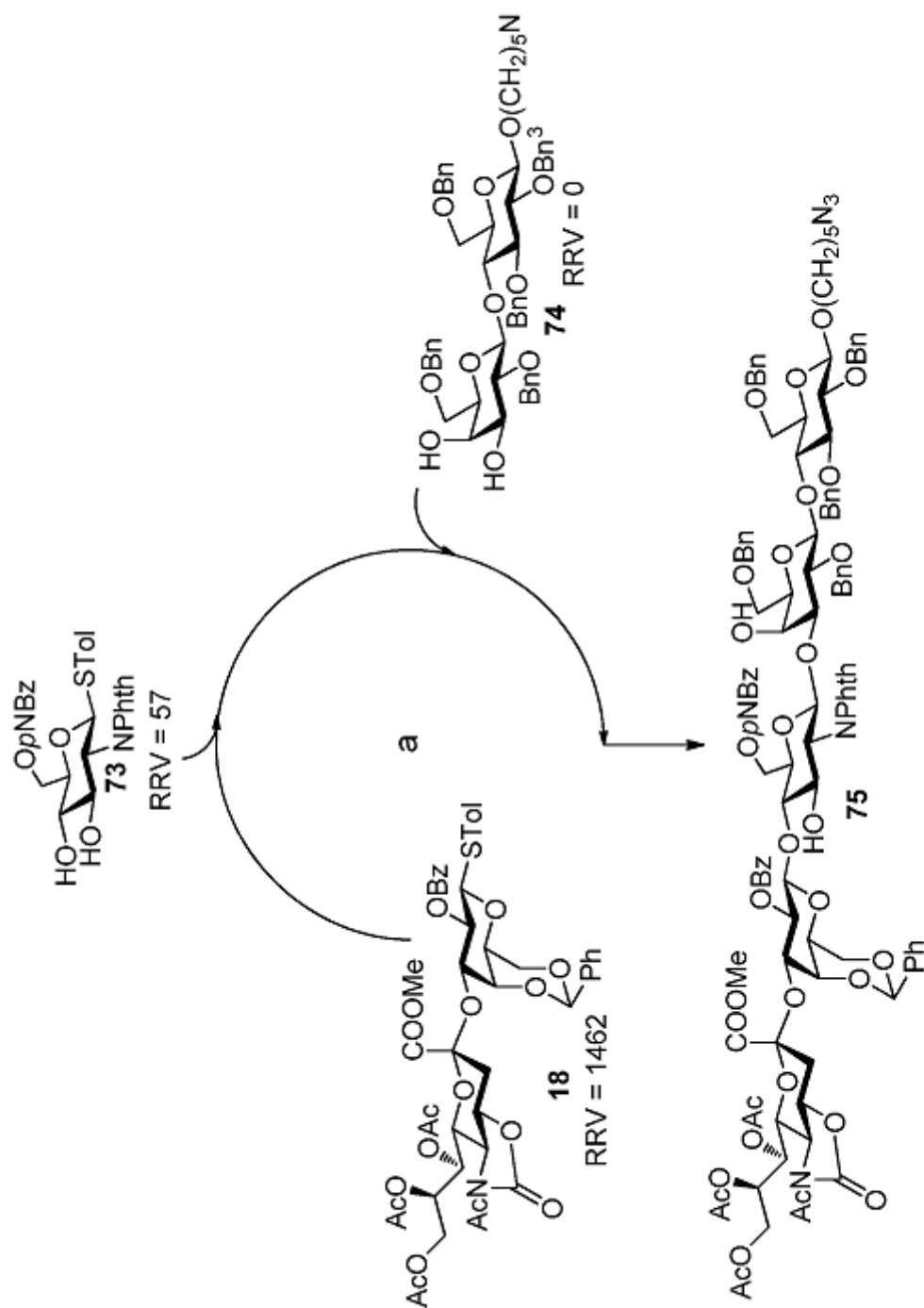
Esquema 6. Síntesis de Ácido Octasialico $\alpha(2\rightarrow9)$



Esquema 7. Síntesis de derivados de ácido di-, tri-, tetra-, hexa-, octa-siálico



Esquema 8. Síntesis de ácidos polisacáricos $\alpha(2\rightarrow8)$, $\alpha(2\rightarrow9)$ alternativos



Esquema 9. Glicosilación en un Solo Recipiente Basada en Reactividad de Pentasacárido **75**.

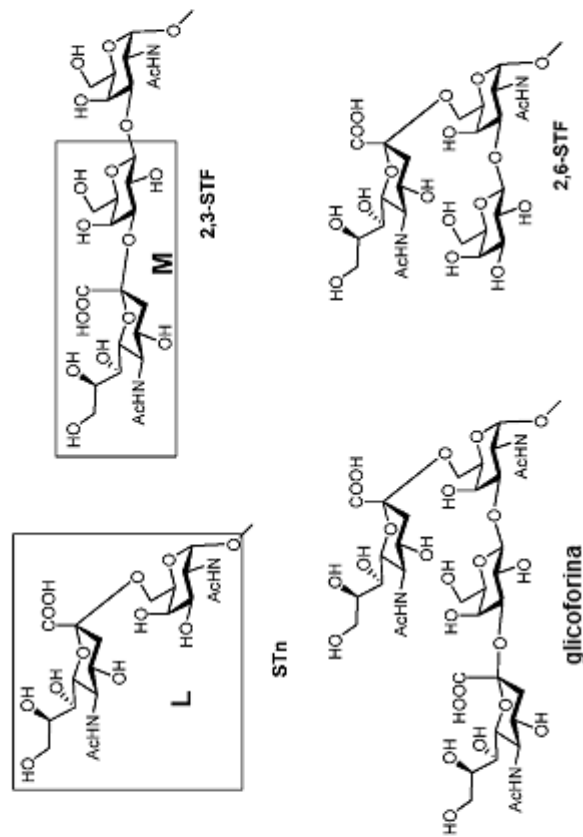


Figura 1A

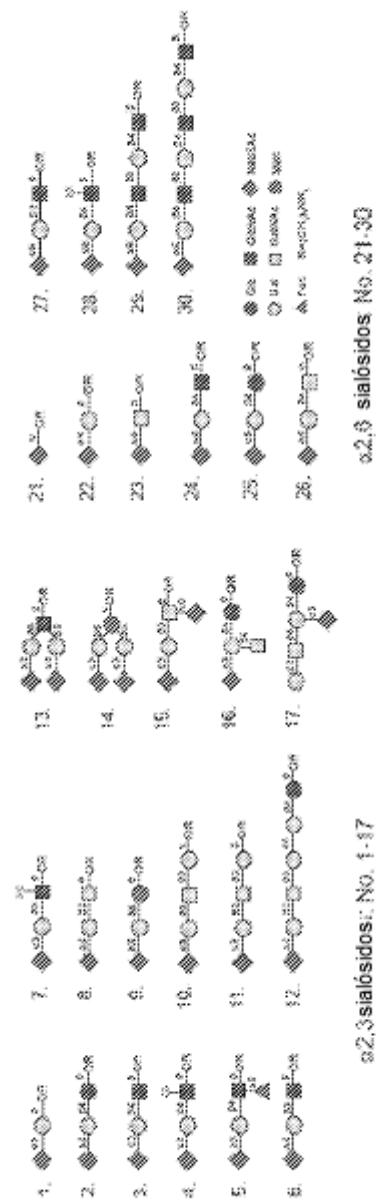


Figura 1B

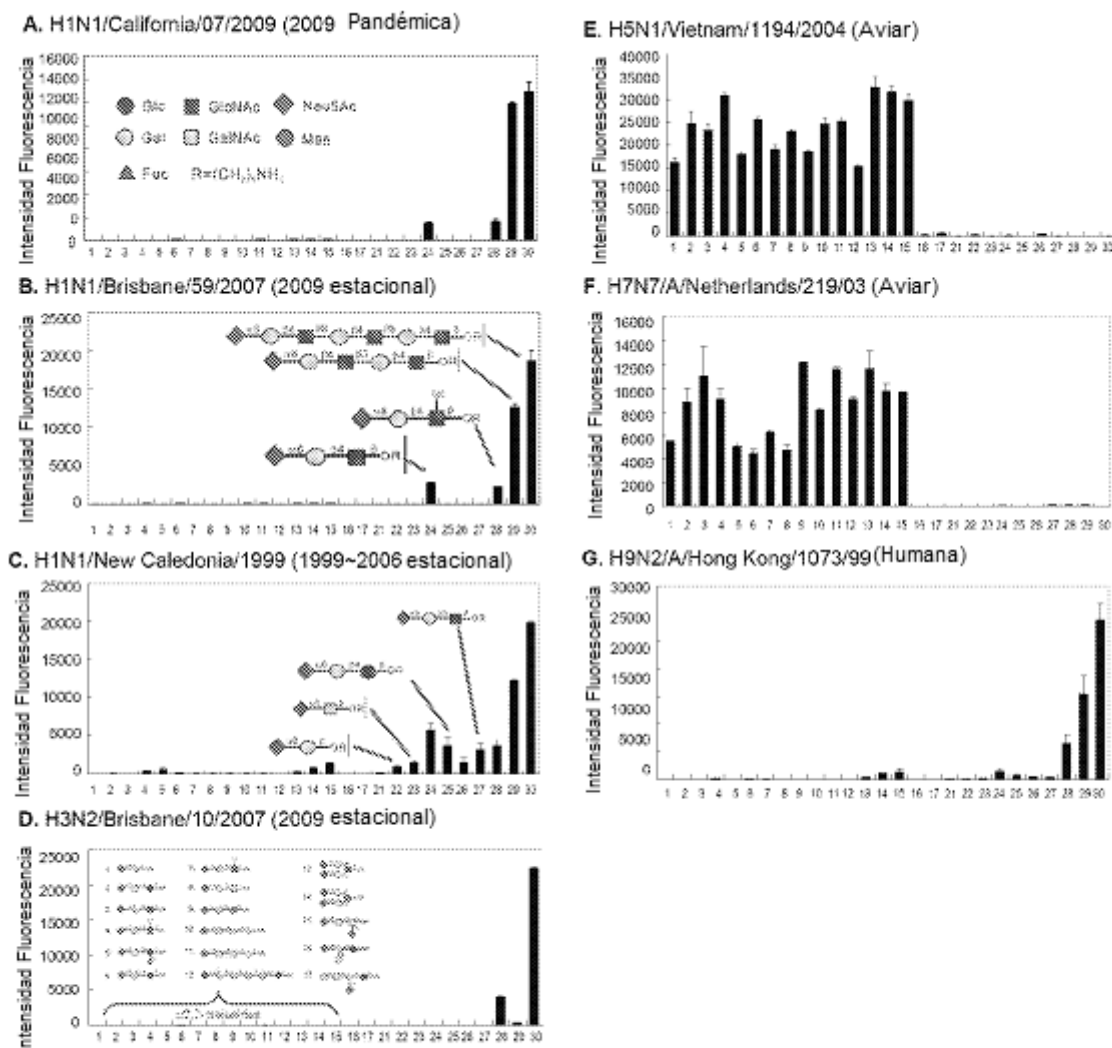


Figura 2

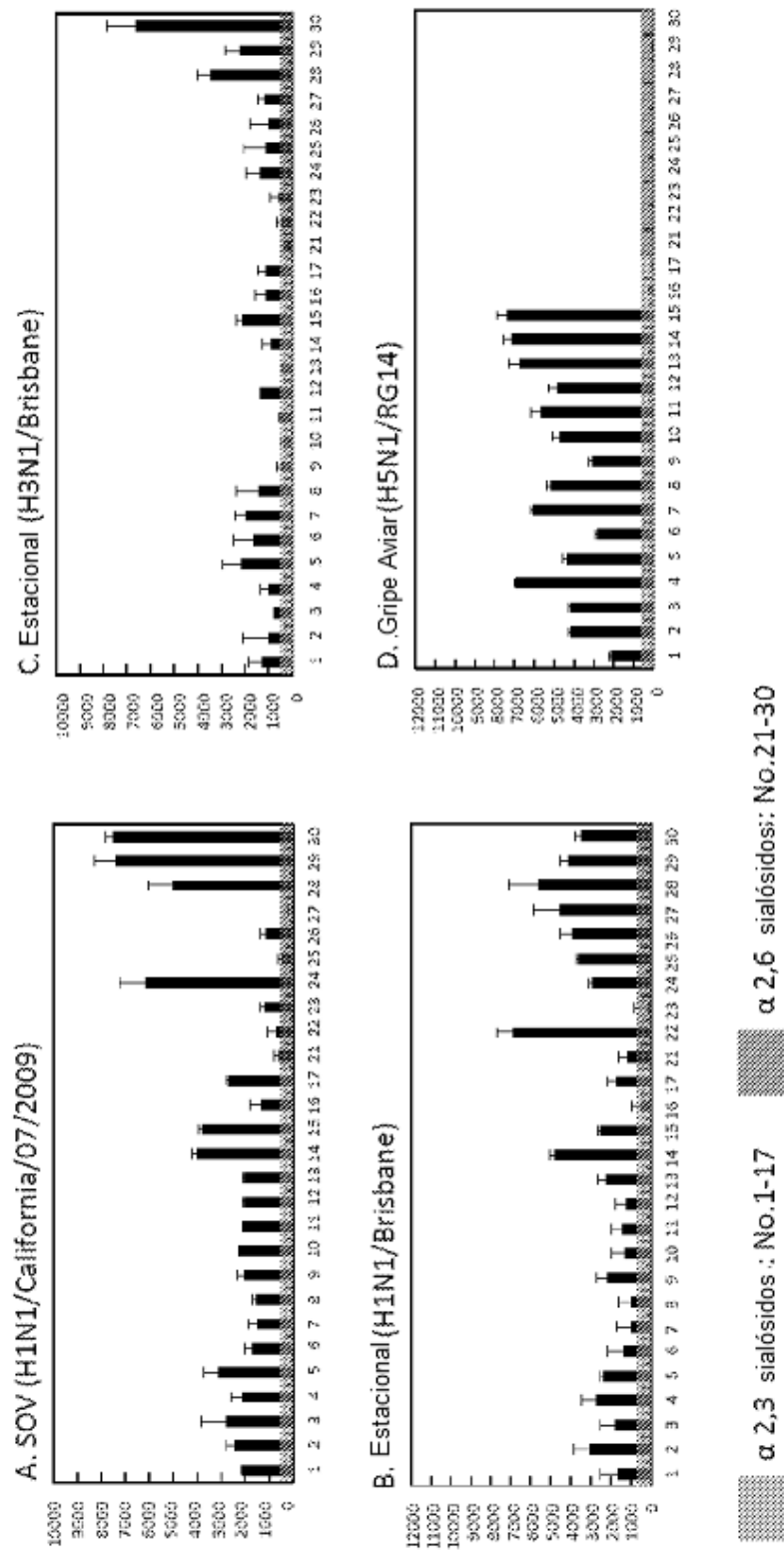


Figura 3

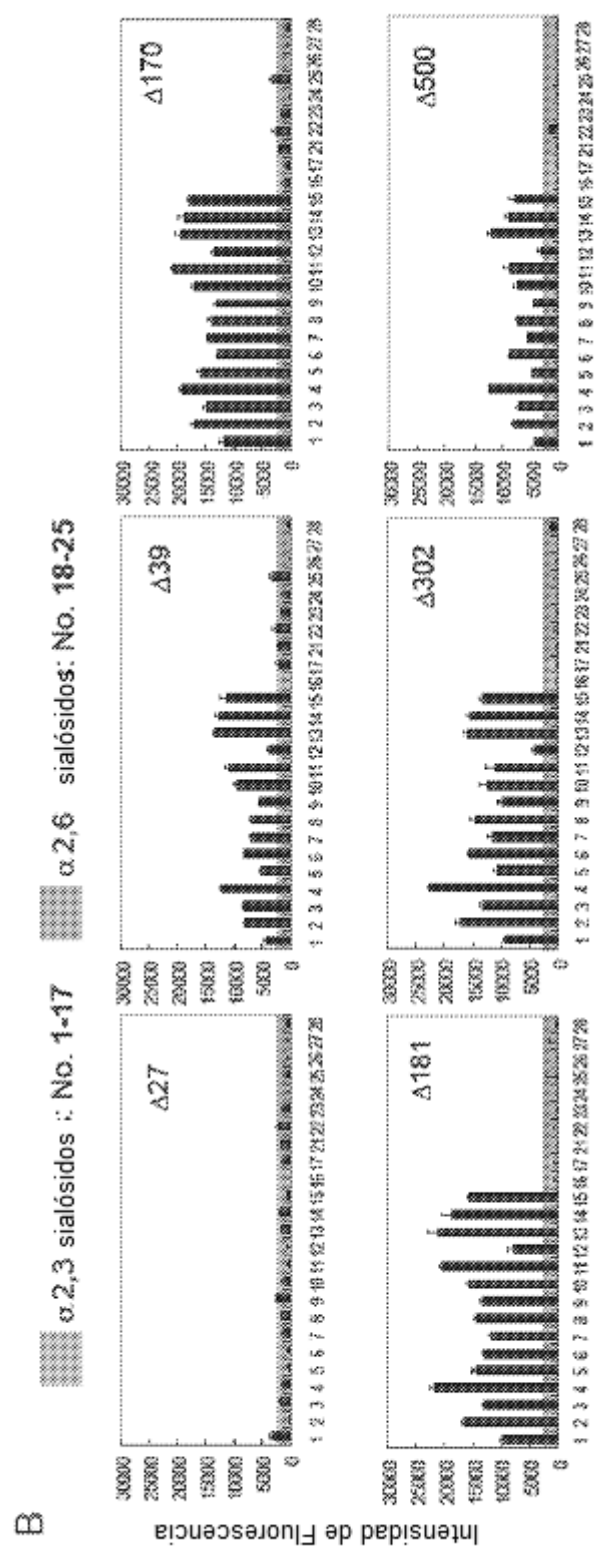
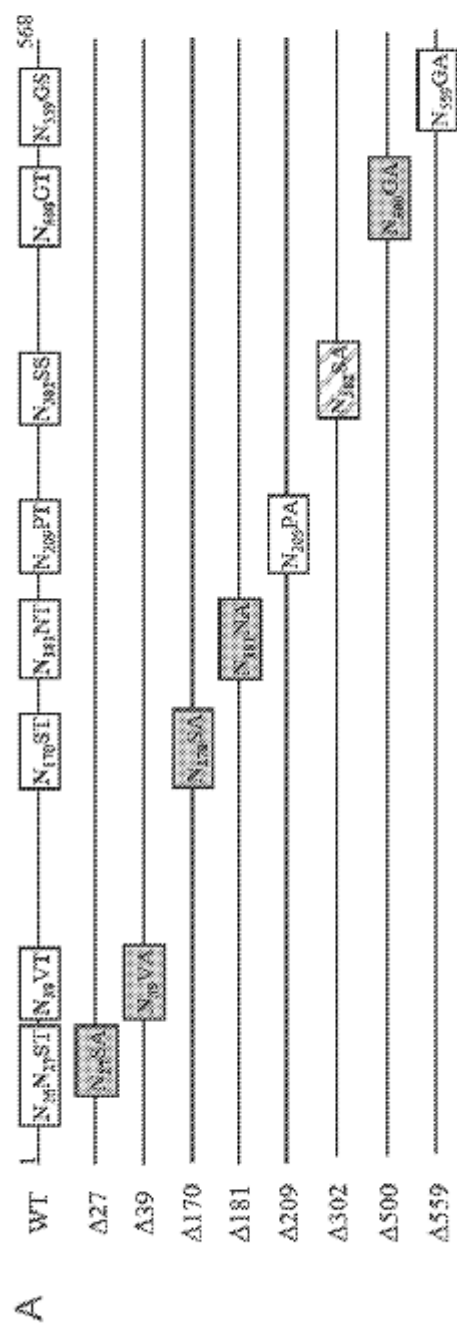


Figura 4

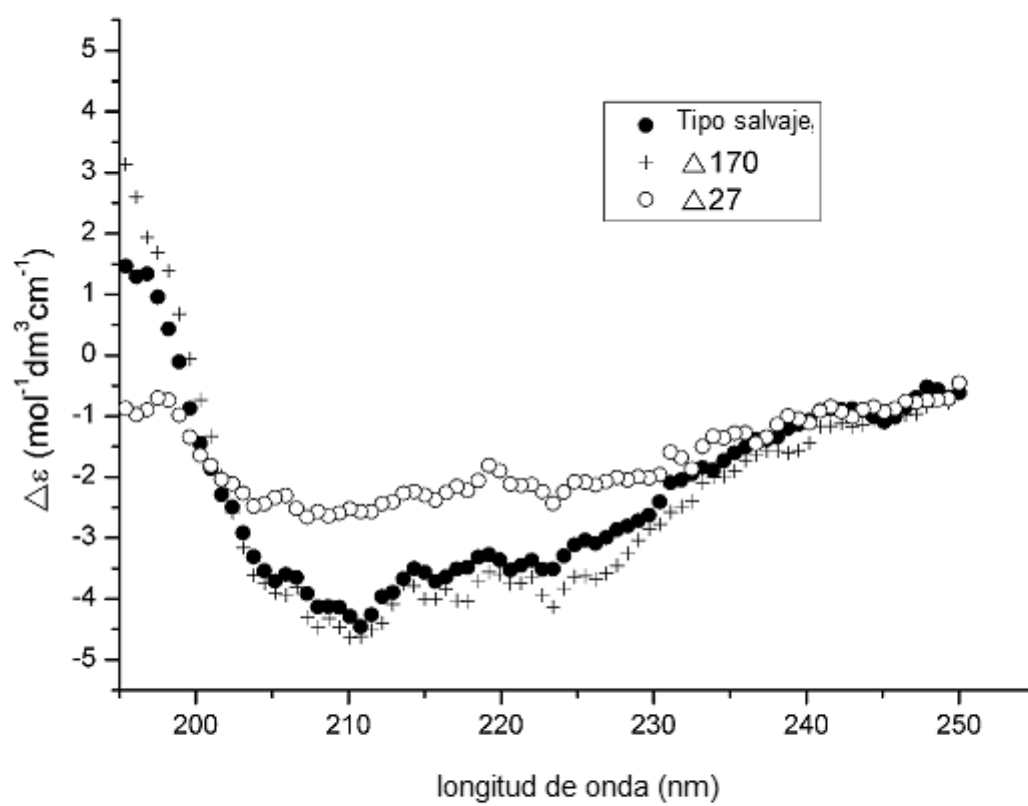


Figura 5

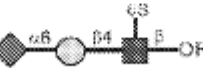
Sugar	K _D de Hemaglutinina (nM)		
	Cal07(H1N1)	Br59 (H1N1)	Br10 (H3N2)
24 	376 ± 40	233 ± 23	6350 ± 110
28 	1307 ± 533	443 ± 156	2011 ± 746
29 	383 ± 9	N.D.*	>10 ⁵
30 	686 ± 230	N.D.*	836 ± 96
*: Altas actividades de unión, pero no se observó dependencia de la concentración			

Figura 6

^a Sialósidos	wt	Δ39	Δ170	Δ181	Δ302
1	293 ± 130	540 ± 240	594 ± 157	1797 ± 848	657 ± 580
2	212 ± 19	792 ± 63	443 ± 56	902 ± 110	499 ± 278
3	249 ± 67	783 ± 77	527 ± 252	919 ± 63	528 ± 183
4	207 ± 52	497 ± 81	494 ± 79	795 ± 194	290 ± 118
5	276 ± 79	905 ± 261	1044 ± 244	1783 ± 1270	339 ± 228
6	237 ± 33	493 ± 64	675 ± 183	852 ± 35	353 ± 174
7	372 ± 327	774 ± 173	579 ± 245	889 ± 45	485 ± 217
8	351 ± 192	732 ± 95	588 ± 376	1372 ± 333	552 ± 185
9	300 ± 94	738 ± 214	1000 ± 545	2021 ± 374	339 ± 30
10	220 ± 130	509 ± 130	349 ± 197	653 ± 35	346 ± 136
11	199 ± 83	381 ± 169	338 ± 345	691 ± 213	348 ± 7
12	336 ± 301	690 ± 211	411 ± 17	1563 ± 718	526 ± 49
13	190 ± 87	368 ± 84	424 ± 416	603 ± 381	323 ± 127
14	171 ± 30	440 ± 13	355 ± 162	506 ± 249	286 ± 138
15	145 ± 44	398 ± 42	342 ± 312	990 ± 433	358 ± 53

^aSímbolos estándar usados ● Glc; ■ GlcNAc, ◆ Neu5Ac, ○ Gal, □ GalNAc, ● Man, ▲ Fuc, R = (CH₂)₅NH₂

Figura 7