

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 557**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2010 E 10727485 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2442831**

54 Título: **Materiales y métodos con relación a la glicosilación de polipéptidos terapéuticos**

30 Prioridad:

16.06.2009 US 187434 P

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

19.02.2016

73 Titular/es:

**GLYTHERA LIMITED (100.0%)
Herschel Annex, Kings Road
Newcastle upon Tyne NE1 7RU, GB**

72 Inventor/es:

**WATTS, ANDREW GRAHAM;
MACKENZIE, AMANDA BARBARA y
KANTNER, TERRENCE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 560 557 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

Materiales y métodos con relación a la glicosilación de polipéptidos terapéuticos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a materiales y métodos con relación a la glicosilación, y más particularmente a la producción de estructuras de glicosilación que son resistentes a la degradación enzimática, modulando de esta manera una o más de sus propiedades biológicas o las de los restos terapéuticos que se incorporan a ellas. Más específicamente, la presente invención implica hacer reaccionar sustratos de carbohidrato activados que contienen flúor, tal como compuestos del ácido 3-fluorosiálico, con aceptores de azúcar para producir conjugados covalentes del aceptor de azúcar y uno o más de los compuestos de ácido siálico.

10 La materia del sujeto que no está recogida por el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la presente invención reivindicada.

Antecedentes de la invención

15 La mayoría de los polipéptidos de origen natural contienen restos de carbohidratos unidos covalentemente al polipéptido en alguno de los residuos de aminoácidos de la cadena polipeptídica primaria. Estos polipéptidos se denominan generalmente en la técnica como glicopéptidos o glicoproteínas. También se sabe que la naturaleza del patrón de glicosilación en cualquier polipéptido dado puede afectar a sus propiedades, incluyendo la resistencia a las proteasas, el tráfico intracelular, la secreción, la orientación al tejido, la semivida biológica y la antigenicidad cuando el polipéptido está presente en un sistema biológico tal como una célula o un individuo.

20 La glicosilación de polipéptidos es una forma natural de modificación post-translacional que altera la estructura y función de los polipéptidos. En la naturaleza, la glicosilación es introducida por procesos enzimáticos que conducen a una modificación específica del sitio de diferentes tipos de polipéptidos glicosilados. En la glicosilación unida a N, los glicanos están unidos a un nitrógeno de amida de las cadenas laterales de asparagina y en la glicosilación unida a O, los glicanos están unidos al oxígeno del hidroxilo de las cadenas laterales de serina y treonina. Otras formas de glicosilación incluyen glicosaminoglicanos que se unen al oxígeno del hidroxilo de la serina, glicolípidos en la que los glicanos están unidos a la ceramida, hialuronano que no está unido ni a proteínas ni a lípidos, y anclajes GPI que unen proteínas a los lípidos a través de enlaces de glicano.

25 Hay un problema en general en la técnica consistente en que a menudo se añade la glicosilación a polipéptidos en células eucariotas, pero raramente se añade a polipéptidos expresados en hospedantes procarriotas a menudo usados para la expresión recombinante de polipéptidos terapéuticos. Esta ausencia de glicosilación en polipéptidos producidos en hospedantes procarriotas puede conducir a que los polipéptidos se reconozcan como extraños o significar que tengan propiedades que de otra manera difieren de sus formas nativas. Hay también un problema consistente en la dificultad para fabricar la glicosilación en los polipéptidos en los lugares donde no hay glicosilación nativa, en un intento de usar esto para modular las propiedades de los polipéptidos.

30 Por lo tanto, ha habido intentos en la técnica para introducir o modificar el patrón de glicosilación de polipéptidos, por ejemplo, en situaciones en las que la expresión del polipéptido podría causar un cambio en el patrón de glicosilación natural del polipéptido (por ejemplo, expresión en hospedantes bacterianos) o donde se desea modificar el patrón de glicosilación del polipéptido con la esperanza de mejorar una o más de las características del polipéptido, especialmente cuando el polipéptido es una proteína terapéutica. Por ejemplo, véase la modificación del interferón beta descrita en el documento de patente de los Estados Unidos N^o: 7226903 o los métodos para fabricar glicoproteínas descritos en el documento de patente internacional WO 2004/035605.

35 Las moléculas de glicano que se unen a los polipéptidos tienen una gama de estructuras lineales y ramificadas y diferentes longitudes de cadena de glicano y las moléculas de glicano específicas presentes en un polipéptido afectan a las características del polipéptido. Muchos tipos de moléculas de glicano incluyen ácidos siálicos terminales. Se sabe que estos azúcares de nueve carbonos, que llevan una carga negativa a pH fisiológico, están implicados en las interacciones ligando-receptor que pueden afectar en gran medida las comunicaciones específicas célula-célula, patógeno-célula, o fármaco-célula. Una característica particular de las cadenas de glicano que incluyen residuos de ácido siálico terminales es que aumentan la semivida de los polipéptidos glicosilados terapéuticos con ellos. Esto se conoce a partir de observaciones de que los polipéptidos que comprenden glicanos sin residuos de ácido siálico terminales se eliminan rápidamente de la circulación por el hígado, reduciendo de este modo la semivida del polipéptido terapéutico.

40 Azúcares sustituidos con flúor han sido utilizados como sustratos no procesables para su uso en la cristalización de enzimas tales como CstII (Chiu et al., Nat. Struct. Mol. Biol. (2004) 11, 163-170). En este contexto, los sacáridos que contienen flúor son conocidos por ser resistentes al procesamiento enzimático donde la glicosiltransferasa está actuando sobre el enlace glicosídico del carbohidrato que contiene flúor.

55 Un derivado del ácido 2,3-difluorosiálico ha sido sintetizado y usado como un inactivador de las sialidasas de los parásitos *Trypanosoma cruzi* (Watts et al., J. Am. Chem. Soc. (2003) 125, 7532-7533) y *Trypanosoma rangeli* (Watts

et al., Can. J. Chem. (2004) 82, 1581-1588). Este trabajo inicial condujo al descubrimiento de que estas sialidasas operan a través de la participación de un intermedio de enzima sialosilo covalente y se estableció que los compuestos tales como este derivado actuaban como inhibidores covalentes dependientes del tiempo de las sialidasas del tripanosoma.

- 5 Posteriormente también se ha demostrado que un derivado del ácido 2,3-difluoro neuramínico que tiene un grupo hidroxilo en C-5 en lugar del grupo natural de N-acetilo también actúa como un inactivador covalente de la sialidasa de *T. rangeli*, pero muestra un comportamiento muy diferente cinético (k_{inact} y k_{react}) al inhibidor original (Watts et al., J. Biol. Chem. (2006) 281, 4149-4155).

10 En resumen, la modificación de la glicosilación de polipéptidos, especialmente para modificar sus propiedades biológicas, sigue siendo un problema difícil y uno que no ha sido abordado de manera satisfactoria en la técnica anterior.

Compendio de la invención

15 En términos generales, la presente invención se basa en el reconocimiento de que los compuestos de ácido fluorosialico, tales como los compuestos de ácido 3-fluorosialico, pueden usarse para formar conjugados con aceptores de azúcar que modulan una o más de las propiedades biológicas del conjugado o del resto terapéutico que incorpora el conjugado. Por lo tanto, las estructuras de glicosilación modificadas producidas utilizando estos métodos pueden ser introducidas en o ser una parte de restos terapéuticos, tales como polipéptidos. Así, en un aspecto, la presente invención se refiere a métodos para hacer reaccionar un compuesto de ácido 3-fluorosialico activado con un grupo aceptor de azúcar, en el que el compuesto del ácido 3-fluorosialico no está unido a un grupo

20 CMP, como se usa convencionalmente en la técnica anterior. Los métodos pueden llevarse a cabo enzimáticamente, por ejemplo, utilizando una sialiltransferasa, una trans-sialidasa o usando técnicas sintéticas del campo de la química de los azúcares.

25 Las sialiltransferasas se han utilizado para transferir los derivados de ácido siálico a los azúcares aceptores, utilizando donantes que son sustratos naturales o sustratos naturales modificados para las enzimas (es decir, ácidos siálicos de CMP o derivados de los mismos). Se ha demostrado que la sialiltransferasa de inversión PmST1 transfiere ácido 3-fluoro-CMP-sialico al aceptor galactosilo, sin embargo esta reacción usa un método de un solo recipiente y dos enzimas para generar el análogo de 3-fluoro del azúcar donante natural, *in situ* (Harshal et al., J. Am. Chem. Soc. (2007) 129, 10630-10631. Sin embargo, los ácidos 3-fluorosialicos activados no naturales nunca han sido transferidos a un aceptor de azúcar utilizando una sialiltransferasa, y no se ha propuesto antes de ahora

30 incorporar las propiedades de los ácidos 3-fluorosialicos en las estructuras de glicosilación de los polipéptidos.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para glicosilar un polipéptido terapéutico que comprende formar un conjugado covalente entre un aceptor de un azúcar y un compuesto de ácido 3-fluorosialico, el método comprende poner en contacto el aceptor de azúcar y el compuesto de ácido 3-fluorosialico, la etapa de contacto tiene lugar bajo condiciones adecuadas para hacer reaccionar y covalentemente unir el ácido 3-fluorosialico al aceptor de azúcar, en donde el compuesto de ácido 3-fluorosialico no comprende un grupo de citidina monofosfato (CMP)

35

El método comprende poner en contacto el aceptor de azúcar, el compuesto de ácido 3-fluorosialico y una enzima capaz de transferir el compuesto de ácido 3-fluorosialico al aceptor de azúcar, la etapa de contacto tiene lugar en condiciones adecuadas para la transferencia y unión covalente del compuesto de ácido 3-fluorosialico al aceptor de

40 azúcar. la enzima puede incluir una sialil transferasa o una trans-sialidasa. En una forma de realización alternativa, que no forma parte de la invención, la unión covalente del compuesto de ácido 3-fluorosialico al aceptor de azúcar se lleva a cabo por reacción de química sintética.

Típicamente, la formación del conjugado covalente con el compuesto de ácido 3-fluorosialico modula una propiedad biológica del aceptor del azúcar o de un resto terapéutico que comprende el aceptor de azúcar, por ejemplo una propiedad biológica tal como la resistencia a la hidrólisis enzimática (por ejemplo, por exo-sialidasas o neuraminidasas), estabilidad biológica o una propiedad farmacocinética.

45

Preferiblemente, el método se lleva a cabo como un método libre de células *in vitro*. Cuando la reacción de transferencia es enzimática, puede tener lugar con inversión en el enlace anomérico entre el compuesto de ácido 3-fluorosialico y el grupo aceptor del carbohidrato. A diferencia de los métodos basados en la técnica anterior de CMP, los métodos de la presente invención pueden llevarse a cabo utilizando una enzima. La presente invención también ayuda a superar el problema que existía en la técnica anterior consistente en que los pocos ejemplos conocidos de compuestos de CMP del ácido 3-fluorosialico han mostrado ser muy estables a las sialiltransferasas, y no son por tanto de uso práctico en la síntesis de conjugados del ácido fluorosialico.

50

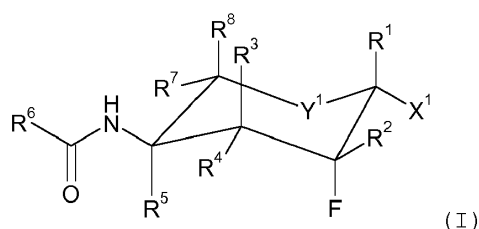
En algunas formas de realización, el método puede comprender la etapa de modificación de las estructuras de glicosilación que ya están presentes en el polipéptido, por ejemplo en virtud de la forma en que se ha expresado o que se ha hecho anteriormente sintéticamente. En una situación típica, esto puede comprender la etapa adicional de eliminación de uno o más grupos glicosilo terminales de una estructura de glicosilación inicialmente presente en el polipéptido para formar el grupo aceptor y/o reemplazar el grupo glicosilo terminal de la estructura de glicosilación

55

con uno o más grupos de ácido 3-fluorosialílico. Convenientemente, la etapa de retirar el grupo glicosilo terminal se lleva a cabo enzimáticamente, por ejemplo mediante el uso de una sialidasa. Alternativamente, una estructura de glicosilación existente puede ser sometido a escisión adicional o alteración, por ejemplo la eliminación de más de un grupo glicosilo terminal, para proporcionar el aceptor de azúcar que puede usarse según la presente invención.

- 5 Además, en algunas formas de realización, los métodos de la presente invención pueden comprender transferir varios grupos de ácido 3-fluorosialílico a grupos aceptores del polipéptido. Esto podría hacerse con el fin de proporcionar una protección adicional a la estructura de glicosilación del núcleo a la degradación. A modo de ejemplo, dos, tres o más grupos de ácido 3-fluorosialílico pueden estar unidos covalentemente a un grupo aceptor, ya sea repitiendo el método para unir grupos de ácido 3-fluorosialílico sucesivos, o por unión covalente de un oligómero de los grupos de ácido 3-fluorosialílico a un aceptor. En algunas formas de realización, los grupos de ácido 3-fluorosialílico se pueden conjugar con el residuo de glicosilo terminal de una estructura de glicosilación presente en el polipéptido.

Los métodos descritos en la presente solicitud emplean un compuesto de ácido 3-fluorosialílico representado por la fórmula general (I):



- 15 en donde:
 Y¹ se selecciona de -O-, -S-, o -NR-, en donde R se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₇, heterociclilo C₃₋₁₀, o arilo C₅₋₂₀;

- 20 R¹ es un buen grupo saliente capaz de soportar y estabilizar una carga negativa, con la condición de que no sea un grupo de citidina monofosfato (CMP);

X¹ es -CO₂R, en donde R es como se definió anteriormente;

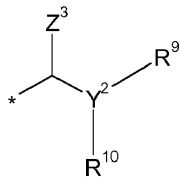
R² se selecciona de H, haluro o OH;

- 25 R³ y R⁴ son cada uno independientemente seleccionado de H, -OR, -NR₂ o -Z¹(CH₂)_mZ², donde R es como se definió anteriormente, Z¹ se selecciona de -O-, -NR-, -CR₂- y -S-, m es de 0 a 5 y Z² se selecciona de -OR, -NR₂ o -CN; con la condición de que R³ y R⁴ no pueden ambos ser H;

R⁵ es H;

R⁶ se selecciona de alquilo C₁₋₇; hidroxialquilo C₁₋₇, aminoalquilo C₁₋₇ o tioalquilo C₁₋₇;

R⁷ es un grupo de fórmula:



- 30 donde Y² se selecciona de N, O, S, y CH; Z³ se selecciona de H, hidroxilo, haluro, alquilo C₁₋₇, aminoalquilo C₁₋₇, hidroxialquilo C₁₋₇, o tioalquilo C₁₋₇; R⁹ y R¹⁰ se selecciona independientemente de H, hidroxilo, hidroxialquilo C₁₋₇, alquilo C₁₋₇, arilo C₅₋₂₀, C(O)Z⁴, en donde Z⁴ se selecciona de alquilo C₁₋₇ o arilo C₅₋₂₀, con la condición de que si Y² es O o S, R¹⁰ está ausente;

o en donde R⁴ es distinto de hidroxilo, R⁷ puede adicionalmente ser hidroxialquilo C₁₋₇;

- 35 R⁸ es hidrógeno;

o un oligómero de dos o más moléculas de fórmula (I);

y estereoisómeros, formas tautómeras, sales, solvatos o formas químicamente protegidas de los mismos, en donde el término C₁₋₇ pertenece a un resto monovalente obtenido por eliminación de un átomo de hidrógeno de un hidrocarburo C₁₋₇, que puede ser alifático o alicíclico, o una combinación de los mismos,

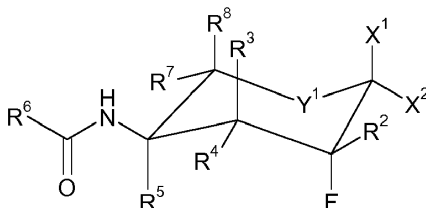
5 y en donde el aceptor del azúcar es parte de una estructura de glicosilación, la estructura de glicosilación comprende un polisacárido sintético o que ocurre de forma natural

y que comprende la etapa de unir el conjugado al polipéptido terapéutico cuando la estructura de glicosilación no está ligada al polipéptido terapéutico.

10 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un conjugado de un resto terapéutico que comprende una estructura de glicosilación, en donde la estructura de glicosilación esta covalentemente unida a uno o más grupos del ácido 3-fluorosiálico, en donde los grupos de ácido 3-fluorosiálico forman el grupo glicosilo terminal de la estructura de glicosilación. El resto terapéutico será un polipéptido y la estructura de glicosilación puede estar unida al polipéptido en un sitio de glicosilación y/o a uno de los residuos de aminoácido, opcionalmente vía un grupo de unión. El uso de los grupos de unión se discuten más ampliamente a continuación.

15 En un aspecto adicional que no forma parte de la presente invención, se proporciona una estructura de glicosilación, en donde la estructura de glicosilación comprende uno o más grupos de ácido 3-fluorosiálico y en donde los grupos de ácido 3-fluorosiálico están covalentemente unidos a uno o más grupos glicosilo terminales de la estructura de glicosilación. Como se describe a continuación, la estructura de glicosilación generalmente comprende al menos un grupo de ácido 3-fluorosiálico y dos unidades de sacárido adicionales que pueden ser grupos de ácido 3-fluorosiálico o un tipo diferente de unidades de sacárido.

20 En un aspecto adicional que no forma parte de la presente invención, se proporciona una estructura de glicosilación que comprende uno o más grupos 3-fluorosiálico terminales, en donde la estructura se representa por la fórmula:



en donde:

25 Y¹ se selecciona de -O-, -S-, o -NR-, en donde R se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₇, heterociclilo C₃₋₁₀, o arilo C₅₋₂₀;

X¹ es -CO₂R, en donde R es como se definió anteriormente;

X² representa la parte remanente de la estructura de glicosilación y comprende al menos dos unidades de sacáridos;

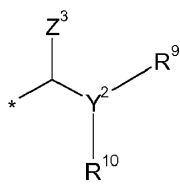
R² se selecciona de H, haluro o OH;

30 R³ y R⁴ son cada uno independientemente seleccionado de H, -OR, -NR₂ o -Z¹(CH₂)_mZ², donde R es como se definió anteriormente, Z¹ se selecciona de -O-, -NR-, -CR₂- y -S-, m es de 0 a 5 y Z² se selecciona de -OR, -NR₂ o -CN; con la condición de que R³ y R⁴ no pueden ambos ser H;

R⁵ es H;

R⁶ se selecciona de alquilo C₁₋₇; hidroxialquilo C₁₋₇; aminoalquilo C₁₋₇ o tioalquilo C₁₋₇;

R⁷ es un grupo de fórmula:



35 donde Y² se selecciona de N, O, S, y CH; Z³ se selecciona de H, hidroxilo, haluro, alquilo C₁₋₇, aminoalquilo C₁₋₇, hidroxialquilo C₁₋₇, o tioalquilo C₁₋₇; R⁹ y R¹⁰ se seleccionan independientemente de H, hidroxilo, hidroxialquilo C₁₋₇, alquilo C₁₋₇, arilo C₅₋₂₀, C(O)Z⁴, en donde Z⁴ se selecciona de alquilo C₁₋₇ o arilo C₅₋₂₀, con la condición de que si Y² es O o S, R¹⁰ está ausente;

o en donde R^4 es distinto de hidroxilo, R^7 puede adicionalmente ser hidroxialquilo C_{1-7} ;

R^8 es hidrógeno;

o un oligómero de dos o más moléculas de fórmula (I);

e isómeros, sales, solvatos, o formas químicamente protegidas de los mismos.

- 5 En esta fórmula, el grupo X^2 representa dos o más unidades de sacárido, que forman una estructura de glicosilación o una porción de la misma. Las unidades pueden ser uno o más grupos de ácido 3-fluorosiálico adicionales, por ejemplo si varios de tales grupos están incluidos en la estructura, o pueden ser cualquier grupo de sacárido que ocurre en la naturaleza o que ha sido modificado. Como se establece en más detalle a continuación, la estructura de glicosilación puede estar basado en un glicano sintético o que ocurre en la naturaleza y tiene una estructura monoanténaria, una estructura bianténaria, una estructura trianténaria o una estructura de glicosilación compleja.

10 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un conjugado como se describe en el presente documento para su uso en un método de tratamiento médico.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un conjugado para su uso en un método de tratamiento como se describe en el presente documento, en donde el tratamiento es de terapia o diagnóstico.

- 15 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un conjugado como se describe en el presente documento en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una condición que responde a la administración del polipéptido.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado como se describe en este documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 20 Las formas de realización de la presente invención se describirán a continuación a modo de ejemplo.

Descripción detallada

Compuestos de ácido fluorosiálico

- 25 Como se mencionó anteriormente, la presente invención hace uso de compuestos de ácido fluorosiálico, y más especialmente de ácido 3-fluorosiálico, para producir conjugados con propiedades biológicas útiles, tal como una resistencia aumentada a la degradación enzimática. Los compuestos preferidos útiles según la presente invención están representados por la fórmula general I y/o tienen los sustituyentes de los compuestos descritos en los ejemplos en sus diversas combinaciones y permutaciones. En general los compuestos difieren de aquellos descritos en la técnica anterior puesto que incluyen un sustituyente de flúor en la posición 3 para mejorar su resistencia a la degradación enzimática y la presencia de un grupo saliente diferente de CMP en la posición 2 del compuesto,
- 30 en el caso de la fórmula I, el sustituyente R^1 en la posición 2 axial. Glucósidos de ácido 3-fluorosiálico adecuados para su uso según la presente invención pueden ser generados químicamente como se ejemplifica en Sun et. al., Eur. J. Org. Chem (2000), 2643-2653.

- El término "grupo saliente" es bien conocido y comúnmente usado en la técnica, y se refiere a un átomo o grupo funcional que puede ser expelido de una molécula en una reacción química. Como se usa en este documento, el término "grupo saliente" se refiere a un grupo que es lábil en una reacción de sustitución nucleófila. La labilidad/habilidad del grupo saliente de un grupo funcional particular depende del pK_a de su ácido conjugado, generalmente hablando, cuanto más bajo es, mejor es el grupo saliente. Preferiblemente, el grupo saliente es capaz de soportar y estabilizar una carga negativa, es decir, el grupo es capaz de salir como un anión. Muchos de tales grupos salientes son conocidos en la técnica, incluyendo, haluros (F^- , Cl^- , Br^- , I^-), hidróxido (HO^-), alcóxidos (RO^- , donde R es un sustituyente de éter tal como se define a continuación), carboxilatos ($RC(O)O^-$, donde R es un sustituyente de aciloxi como se define a continuación; por ejemplo AcO^-), azida (N_3^-), tiocianato (SCN^-), nitro (NO_2^-), amina (NH_2^-). Los expertos en la técnica serán capaces de seleccionar un buen grupo saliente adecuado según la práctica normal en química orgánica. Los ejemplos preferidos de grupos salientes buenos incluyen metanosulfonato, 4-toluenosulfonato, trifluorometilsulfonato, trifluorometiltoluenosulfonato, imidazoilsulfonato, o haluro (es decir, F, Cl, Br, I).

- Otros sustituyentes que pueden estar presentes en los compuestos descritos en este documento incluyen los siguientes.

- Alquilo C_{1-7} : El término "alquilo C_{1-7} ", como se usa en este documento, se refiere a un resto monovalente obtenido por eliminación de un átomo de hidrógeno de un compuesto de hidrocarburo C_{1-7} que tiene de 1 a 7 átomos de carbono que puede ser alifático o alicíclico, o una combinación de los mismos, y que puede ser saturado, parcialmente insaturado, o totalmente insaturado.

Ejemplos de grupos alquilo C_{1-7} saturados lineales incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, y n-pentilo (amilo). Ejemplos de grupos alquilo C_{1-7} saturados ramificados incluyen iso-propilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, y neo-pentilo.

5 Ejemplos de grupos alquilo C_{1-7} saturados alicíclicos (también referidos como grupos "cicloalquilo C_{3-7} ") incluyen grupos tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, y ciclohexilo, así como grupos sustituidos (o sea grupos que comprenden tales grupos), tales como metilciclopropilo, dimetilciclopropilo, metilciclobutilo, dimetilciclobutilo, metilciclopentilo, dimetilciclopentilo, metilciclohexilo, dimetilciclohexilo, ciclopropilmetilo y ciclohexilmetilo.

10 Ejemplos de grupos alquilo C_{1-7} insaturados que tienen uno o más enlaces dobles carbono-carbono (también referidos como grupos "alquilenos C_{2-7} ") incluyen etenilo (vinilo, $-CH=CH_2$), 2-propenil o (alilo, $-CH=CH=CH_2$), isopropenilo ($-C(CH_3)=CH_2$), butenilo, pentenilo, y hexenilo.

Ejemplos de grupos alquilo C_{1-7} insaturados que tienen uno o más enlaces triples carbono-carbono (también referidos como grupos "alquinilo C_{2-7} ") incluyen etinilo (etinilo) y 2-propinilo (propargilo).

15 Ejemplos de grupos alquilo C_{1-7} alicíclicos insaturados (carbocíclicos) que tienen uno o más dobles enlaces carbono-carbono (también referidos como grupos "cicloalquilenos C_{3-7} ") incluyen grupos no sustituidos tales como ciclopropenilo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, y ciclohexenilo, así como grupos sustituidos (por ejemplo, grupos que comprenden dichos grupos) tales como ciclopropenilmetilo y ciclohexenilmetilo.

20 Heterociclilo C_{3-10} : el término "heterociclilo C_{3-10} ", como se usa en este documento, se refiere a un resto monovalente obtenido por eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo del anillo de un compuesto heterocíclico C_{3-10} , dicho compuesto tiene un anillo, o dos o más anillos (por ejemplo, espiro, fusionado, en puente), y tiene de 3 a 10 átomos en el anillo, de los cuales de 1 a 10 son heteroátomos del anillo y en donde al menos uno de dicho(s) anillo(s) es un anillo heterocíclico. Preferiblemente, cada anillo tiene de 3 a 7 átomos en el anillo, de los que de 1 a 4 son heteroátomos del anillo. Los heteroátomos del anillo pueden preferiblemente seleccionarse del grupo que consiste en O, N, S y P. " C_{3-10} " denota átomos del anillo, ya sean átomos de carbono o heteroátomos. Similarmente, el término "heterociclilo C_{3-10} " se entenderá como que pertenece a un resto equivalente de 3 a 10 átomos del anillo, y así sucesivamente.

30 Arilo C_{5-20} : el término "arilo C_{5-20} ", como se usa en este documento, pertenece a un resto monovalente obtenido por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo del anillo aromático de un compuesto aromático C_{5-20} , dicho compuesto tiene un anillo, o dos o más anillos (por ejemplo fusionados), y tiene de 5 a 20 átomos en el anillo, y en donde al menos uno de dicho(s) anillo(s) es un anillo aromático. Preferiblemente, cada anillo tiene de 5 a 7 átomos en el anillo. Los átomos en el anillo pueden ser todos átomos de carbono, como en los "grupos carboarilos", en cuyo caso el grupo puede convenientemente ser referido como un grupo "carboarilo C_{5-20} ".

Los grupos alquilo, heterociclilo, y arilo anteriores, ya sean solos o como parte de otro sustituyente, pueden ellos mismos estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados entre ellos mismos y de sustituyentes adicionales enumerados y definidos a continuación.

35 Halo: -F, -Cl, -Br, y -I.

Hidroxilo: -OH.

40 Éter: -OR, en donde R es un sustituyente de éter, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} (también referido como un grupo alcoxi C_{1-7} , comentado a continuación), un grupo heterociclilo C_{3-20} (también referido como un grupo heterociclioxi C_{3-20}), o un grupo arilo C_{5-20} (también referido como un grupo ariloxi C_{5-20}), preferiblemente un grupo alquilo C_{1-7} .

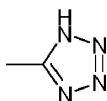
Alcoxi C_{1-7} : -OR, en donde R es un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos alcoxi C_{1-7} incluyen $-OCH_3$ (metoxi), $-OCH_2CH_3$ (etoxi) y $-OC(CH_3)_3$ (terc-butoxi).

45 Oxo (ceto, -ona): =O. Ejemplos de compuestos cíclicos y/o grupos que tienen, como sustituyente, un grupo oxo (=O) incluyen, carbocíclicos, tales como ciclopentanona y ciclohexanona; heterociclos, tales como pirona, pirrolidona, pirazolona, pirazolinona, piperidona, piperidindiona, piperazindiona, e imidazolidona; anhídridos cíclicos, que incluyen anhídrido maleico y anhídrido succínico; carbonatos cíclicos, tales como carbonato de propileno; imidas, que incluyen succinimida y maleimida; lactonas (ésteres cíclicos, $-O-C(=O)-$ en un anillo), que incluyen β -propiolactona, γ -butirolactona, δ -valerolactona, y ϵ -caprolactona; y lactamas (amidas cíclicas, $-NH-C(=O)-$ en un anillo), que incluyen β -propiolactama, γ -butirolactama (2-pirrolidona), δ -valerolactama, y ϵ -caprolactama.

50 Imino (imina): =NR, en donde R es un sustituyente de imino, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos éster incluyen =NH, =NMe, =NEt, y =N-fenilo.

Formilo (carbaldehído, carboxaldehído): $-C(=O)H$.

- 5 Acilo (ceto): $-C(=O)R$, en donde R es un sustituyente de acilo, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} (también referido como alquilacilo C_{1-7} o alcanóilo C_{1-7}), un grupo heterociclilo C_{3-20} (también referido como heterocicliacilo C_{3-20}), o un grupo arilo C_{5-20} (también referido como arilacilo C_{5-20}), preferiblemente un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos acilo incluyen $-C(=O)CH_3$ (acetilo), $-C(=O)CH_2CH_3$ (propionilo), $-C(=O)C(CH_3)_3$ (butirilo), y $-C(=O)$ fenilo (benzoilo, fenona).
- Carboxi (ácido carboxílico): $-COOH$.
- Éster (carboxilato, éster del ácido carboxílico, oxicarbonilo): $-C(=O)OR$, en donde R es un sustituyente de éster, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos éster incluyen $-C(=O)OCH_3$, $-C(=O)OCH_2CH_3$, $-C(=O)OC(CH_3)_3$, y $-C(=O)Ofenilo$.
- 10 Aciloxi (éster reverso): $-OC(=O)R$, en donde R es un sustituyente aciloxi, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos aciloxi incluyen $-OC(=O)CH_3$ (acetoxi), $-OC(=O)CH_2CH_3$, $-OC(=O)C(CH_3)_3$, $-OC(=O)$ fenilo, y $-OC(=O)CH_2$ fenilo.
- 15 Amido (carbamoilo, carbamilo, aminocarbonilo, carboxamida): $-C(=O)NR^1R^2$, en donde R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, como se definió para los grupos amino. Ejemplos de grupos de amido incluyen $-C(=O)NH_2$, $-C(=O)NHCH_3$, $-C(=O)N(CH_3)_2$, $-C(=O)NHCH_2CH_3$, y $-C(=O)N(CH_2CH_3)_2$, así como grupos amido en los que R^1 y R^2 , junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, forman una estructura heterocíclica como en, por ejemplo, piperidinocarbonilo, morfolinocarbonilo, tiomorfolinocarbonilo, y piperazinocarbonilo.
- 20 Acilamida (acilamina): $-NR^1C(=O)R^2$, en donde R^1 es un sustituyente de amido, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7} , y R^2 es un sustituyente acilo, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos de acilamida incluyen $-NHC(=O)CH_3$, $-NHC(=O)CH_2CH_3$, y $-NHC(=O)$ fenilo. R^1 y R^2 pueden juntos formar una estructura cíclica, como en, por ejemplo succinimidilo, maleinimidilo y ftalimidilo.
- 25 Acilureido: $-N(R^1)C(O)NR^2C(O)R^3$ en donde R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes ureido, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7} . R^3 es un grupo acilo como el definido para los grupos acilo. Ejemplos de grupos acilureido incluyen $-NHCONHC(O)H$, $-NHCONMeC(O)H$, $-NHCONEtC(O)H$, $-NHCONMeC(O)Me$, $-NHCONEtC(O)Et$, $-NMeCONHC(O)Et$, $-NMeCONHC(O)Me$, $-NMeCONHC(O)Et$, $-NMeCONMeC(O)Me$, $-NMeCONEtC(O)Et$, y $-NMeCONHC(O)$ fenilo.
- 30 Carbamato: $-NR^1-C(O)-OR^2$ en donde R^1 es un sustituyente de amino como se definió para los grupos de amino y R^2 es un grupo éster como se definió para los grupos éster. Ejemplos de grupos carbamato incluyen $-NH-C(O)-O-Me$, $-NMe-C(O)-O-Me$, $-NH-C(O)-O-Et$, $-NMe-C(O)-O-t$ butilo, y $-NH-C(O)-O$ fenilo.
- 35 Tioamido (tiocarbamilo): $-C(=S)NR^1R^2$, en donde R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, como se definió para grupos amino. Ejemplos de grupos amido incluyen $-C(=S)NH_2$, $-C(=S)NHCH_3$, $-C(=S)N(CH_3)_2$, y $-C(=S)NHCH_2CH_3$.
- Tetrazolilo: un anillo aromático de cinco miembros que tiene cuatro átomos de nitrógeno y un átomo de carbono,



- 40 Amino: $-NR^1R^2$, en donde R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} (también referido como alquilamino C_{1-7} o dialquilamino C_{1-7}), un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente H o un grupo alquilo C_{1-7} , o en el caso de un grupo amino "cíclico", R^1 y R^2 , tomados juntos con el átomo de nitrógeno al que ellos están unidos, forman un anillo heterocíclico que tiene de 4 a 8 átomos en el anillo. Ejemplos de grupos amino incluye $-NH_2$, $-NHCH_3$, $-NHC(CH_3)_2$, $-N(CH_3)_2$, $-N(CH_2CH_3)_2$, y $-NH$ fenilo. Ejemplos de grupos amino cíclicos incluyen aziridino, azetidino, pirrolidino, piperidino, piperazino, morfolino, y tiomorfolino.
- 45 Imino: $=NR$, en donde R es un sustituyente de imino, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7} .
- Amidina: $-C(=NR)NR_2$, en donde cada R es un sustituyente de amidina, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente H o un grupo alquilo C_{1-7} . Un ejemplo de un grupo de amidina es $-C(=NH)NH_2$.
- 50 Carbazoilo (hidrazinocarbonilo): $-C(O)-NN-R^1$ en donde R^1 es un sustituyente de amino como se definió para grupos amino. Ejemplos de grupos azino incluyen $-C(O)-NN-H$, $-C(O)-NN-Me$, $-C(O)-NN-Et$, $-C(O)-NN$ fenilo, y $-C(O)-NN-CH_2$ fenilo.

- Nitro: $-\text{NO}_2$.
- Nitroso: $-\text{NO}$.
- Azido: $-\text{N}_3$.
- Ciano (nitrilo, carbonitrilo): $-\text{CN}$.
- 5 Isociano: $-\text{NC}$.
- Cianato: $-\text{OCN}$.
- Isocianato: $-\text{NCO}$.
- Tiociano (tiocianato): $-\text{SCN}$.
- Isotiociano (isotiocianato): $-\text{NCS}$.
- 10 Tio:(sulfidrido, tiol, mercapto): $-\text{SH}$.
- Tioéter (sulfuro): $-\text{SR}$, en donde R es un sustituyente de tioéter, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} (también referido como un grupo alquiltio C_{1-7}), un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos alquiltio C_{1-7} incluyen $-\text{SCH}_3$ y $-\text{SCH}_2\text{CH}_3$.
- 15 Disulfuro: $-\text{SS-R}$, en donde R es un sustituyente de disulfuro, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente un grupo alquilo C_{1-7} (también referido en este documento como alquilo C_{1-7} disulfuro). Ejemplos de grupos alquilo C_{1-7} disulfuro incluyen $-\text{SSCH}_3$ y $-\text{SSCH}_2\text{CH}_3$.
- 20 Sulfona (sulfonilo): $-\text{S}(=\text{O})_2\text{R}$, en donde R es un sustituyente de sulfona, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos sulfona incluyen $-\text{S}(=\text{O})_2\text{CH}_3$ (metanosulfonilo, mesilo), $-\text{S}(=\text{O})_2\text{CF}_3$ (triflilo), $-\text{S}(=\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{C}_4\text{F}_9$ (nonaflilo), $-\text{S}(=\text{O})_2\text{CH}_2\text{CF}_3$ (tresilo), $-\text{S}(=\text{O})_2$ fenil (fenilsulfonilo), 4-metilfenilsulfonilo (tosilo), 4-bromofenilsulfonilo (brosilo), y 4-nitrofenilo (nosilo).
- 25 Sulfina (sulfino, sulfóxido): $-\text{S}(=\text{O})\text{R}$, en donde R es un sustituyente de sulfina, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos sulfina incluyen $-\text{S}(=\text{O})\text{CH}_3$ y $-\text{S}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$. Sulfoniloxi: $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{R}$, en donde R es un sustituyente de sulfoniloxi, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos sulfoniloxi incluyen $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{CH}_3$ y $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_3$.
- 30 Sulfiniloxi: $-\text{OS}(=\text{O})\text{R}$, en donde R es un sustituyente de sulfiniloxi, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos sulfiniloxi incluyen $-\text{OS}(=\text{O})\text{CH}_3$ y $-\text{OS}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$.
- Sulfamino: $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})_2\text{OH}$, en donde R^1 es un sustituyente de amino como se definió para grupos amino. Ejemplos de grupos sulfamino incluyen $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{OH}$ y $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})_2\text{OH}$.
- Sulfnamino: $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})\text{R}$, en donde R^1 es un sustituyente de amino como se definió para grupos amino, y R es un sustituyente de sulfnamino, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos sulfnamino incluyen $-\text{NHS}(=\text{O})\text{CH}_3$ y $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})\text{C}_6\text{H}_5$.
- 35 Sulfamilo: $-\text{S}(=\text{O})\text{NR}^1\text{R}^2$, en donde R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes de amino, como se definió para los grupos amino. Ejemplos de grupos sulfamilo incluyen $-\text{S}(=\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{S}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_3)$, $-\text{S}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{S}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{S}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, y $-\text{S}(=\text{O})\text{NH}$ fenilo.
- 40 Sulfonamino: $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})_2\text{R}$, en donde R^1 es un sustituyente de amino como se definió para grupos amino, y R es un sustituyente de sulfonamino, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente un grupo alquilo C_{1-7} . Ejemplos de grupos sulfonamino incluyen $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{CH}_3$ y $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_5$.
- 45 Fosforamidita: $-\text{OP}(\text{OR}^1)-\text{NR}^2_2$, donde R^1 y R^2 son sustituyentes de fosforamidita, por ejemplo, $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} (opcionalmente sustituido), un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} , o un grupo arilo C_{5-20} . Ejemplos de grupos de fosforamidita incluyen $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{i-Pr})_2$, y $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})-\text{N}(\text{i-Pr})_2$.
- Fosforamidato: $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR}^1)-\text{NR}^2_2$, donde R^1 y R^2 son sustituyentes de fosforamidato, por ejemplo, $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} (opcionalmente sustituido), un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferiblemente $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} , o un grupo arilo C_{5-20} . Ejemplos de grupos fosforamidato incluyen $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{i-Pr})_2$, y $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})-\text{N}(\text{i-Pr})_2$.

En muchos casos, los sustituyentes pueden ellos mismos estar sustituidos. Por ejemplo, un grupo alcoxi C₁₋₇ puede estar sustituido con, por ejemplo, un alquilo C₁₋₇ (también referido como un grupo alquilo C₁₋₇-alcoxi C₁₋₇), por ejemplo, ciclohexilmetoxi, un grupo heterocíclico C₃₋₂₀ (también referido como un grupo arilo C₅₋₂₀-alcoxi C₁₋₇), por ejemplo ftalimidoetoxi, o un grupo arilo C₅₋₂₀ (también referido como un grupo arilo C₅₋₂₀-alcoxi C₁₋₇), por ejemplo, benciloxi.

Alquilenos C₁₋₁₂: El término "alquilenos C₁₋₁₂", como se usa en este documento, pertenece a un resto bidentado obtenido por la eliminación de dos átomos de hidrógeno, ambos del mismo átomo de carbono, o uno de cada átomo de carbono diferente, de un compuesto de hidrocarburo lineal que tiene de 1 a 12 átomos (a menos que se especifique de otra forma), que puede ser saturado, parcialmente saturado, o totalmente insaturado. Así, el término "alquilenos" incluye las subclases de alquilenos, alquilenos, etc., descritas a continuación.

Ejemplos de grupos alquilenos C₁₋₁₂ saturados incluyen -(CH₂)_n- donde n es un número entero de 1 a 12, por ejemplo, -CH₂- (metileno), -CH₂CH₂- (etileno), -CH₂CH₂CH₂- (propileno), -CH₂CH₂CH₂CH₂- (butileno), y -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- (pentileno).

Ejemplos de grupos alquilenos C₁₋₁₂ parcialmente insaturados incluyen -CH=CH- (vinileno), -CH=CH-CH₂-, -CH₂-CH=CH₂-, -CH=CH-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH=CH- y -CH=CH-CH=CH-CH₂-.

Los grupos alquilenos pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes incluidos aquellos listados anteriormente. La cadena de alquilenos C₁₋₁₂ puede estar interrumpida con uno o más grupos de heteroátomos divalentes tales como, por ejemplo, oxígeno, nitrógeno (el cual puede estar sustituido con por ejemplo alquilo C₁₋₇), o azufre.

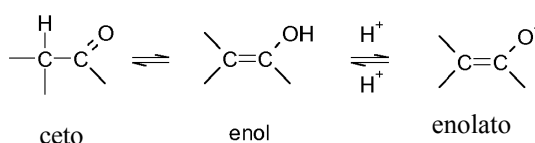
Cuando una etiqueta particular o definición (por ejemplo R) se aplica a más de un sustituyente en uno o más compuestos, cada incidencia de este sustituyente es independiente de los otros, y puede ser igual o diferente a cualquier otro sustituyente con esa etiqueta.

Incluye otras formas: Incluido en lo anterior están los bien conocidos sustituyentes iónicos, sales, solvatos, y formas protegidas de estos sustituyentes. Por ejemplo, una referencia para ácido carboxílico (-COOH) también incluye la forma aniónica (carboxilato) (-COO⁻), una sal o solvato del mismo, así como formas protegidas convencionales. Similarmente, una referencia a un grupo amino incluye la forma protonada (-N⁺HR¹R²), una sal o solvato del grupo amino, por ejemplo, una sal de hidrocloreto, así como también las formas protegidas convencionales del grupo amino. Similarmente, una referencia a un grupo hidroxilo también incluye la forma iónica (-O⁻), una sal o solvato del mismo, así como también las formas protegidas convencionales del grupo hidroxilo.

Estereoisómeros o formas tautómeras, sales, solvatos, formas protegidas, y profármacos: Ciertos compuestos pueden existir en una o más formas particulares geométricas, ópticas, enantioméricas, diastereómeras, epímeras estereoisómeras, tautómeras, conformacionales o anoméricas, incluyendo formas cis y trans; Formas E- y Z-; formas c-, t-, y r-; formas endo- y exo-; formas R-, S-, y meso-; formas D- y L-; formas d- y l-; formas (+) y (-); formas ceto-, enol-, y enolato; formas sin- y anti-; formas sinclinales- y anticlinales-; formas α- y β-; formas axial y equatorial; formas bote-, silla-, torcida-, sobre-, y mitad silla-; y combinaciones de las mismas, en este documento colectivamente denominadas como "formas estereoisómeras o tautómeras" (o "formas isómeras").

Nótese que, excepto como se comenta a continuación para las formas tautómeras, específicamente excluidas del término "formas estereoisómeras o formas tautómeras", como se usa en este documento, son isómeros estructurales (o constitucionales) (o sea isómeros que difieren en las conexiones entre átomos más que meramente por la posición de los átomos en el espacio). Por ejemplo, una referencia a un grupo metoxi, -OCH₃, no es para ser construido como una referencia a su isómero estructural, un grupo hidroximetilo, -CH₂OH. Similarmente, una referencia a ortoclorofenilo no es para ser construido como una referencia a su isómero estructural, meta-clorofenilo. Sin embargo, una referencia a una clase de estructuras o a una fórmula general incluye formas isómeras que estructuralmente caen dentro de esa clase o fórmula (por ejemplo, alquilo C₁₋₇ incluye n-propilo e iso-propilo; butilo incluye n-, iso-, sec-, y terc-butilo; metoxifenilo incluye orto-, meta-, y para-metoxifenilo) y, excepto donde específicamente se establezca o indique, todas las conformaciones posibles y configuraciones posibles del(los) compuesto(s) en este documento se intenta que sean incluidas en la(s) fórmula(s) general(es).

La exclusión anterior no pertenece a las formas tautómeras, por ejemplo, formas ceto-, enol-, y enolato-, como en, por ejemplo, los siguientes pares de tautómeros: ceto/enol (ilustrado a continuación), imina/enamina, amida/imino alcohol, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/tioenol, N-nitroso/azohidroxi, y nitro/aci-nitro.



Nótese que específicamente incluidas en el término "formas estereoisómeras o formas tautómeras" están los compuestos con una o más sustituciones de isótopos. Por ejemplo, H puede estar en cualquier forma de isótopo,

incluyendo ^1H , ^2H (D), y ^3H (T); C puede estar en cualquier forma de isótopo, incluyendo ^{12}C , ^{13}C , y ^{14}C ; O puede estar en cualquier forma de isótopo, incluyendo ^{16}O y ^{18}O ; y similares.

5 A menos que se especifique de otra forma, una referencia a un compuesto particular incluye todas de tales formas isómeras, incluyendo (entera o parcialmente), mezclas racémicas y otras mezclas de las mismas. Métodos para la preparación (por ejemplo síntesis asimétrica) y separación (por ejemplo, cristalización fraccionada y medios cromatográficos) de dichas formas isómeras son o conocidos en la técnica o son fácilmente obtenibles mediante la adaptación de los métodos mostrados en este documento, o métodos conocidos, en una forma conocida.

A menos que de otra forma se especifique, una referencia a un compuesto particular también incluye formas iónicas de sales, solvatos, y formas protegidas de los mismos, por ejemplo, como se comenta a continuación.

10 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar, y/o manejar la sal correspondiente del compuesto activo, por ejemplo una sal farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se describen en Berge, et al., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977).

15 Por ejemplo, si el compuesto es aniónico, o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo, $-\text{COOH}$ puede ser COO^-), entonces se puede formar una sal con un catión adecuado. Ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen iones de metales alcalinos tal como Na^+ y K^+ , cationes alcalino térreos tal como Ca^{2+} y Mg^{2+} , y otros cationes tales como Al^{3+} . Ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen el ión amonio (o sea, NH_4^+) e iones amonio sustituidos (por ejemplo, NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Ejemplos de algunos iones amonio sustituidos adecuados son aquellos derivados de: etilamina, dietilamina, dicitclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilenodiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina, y trometamina, así como de aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ion cuaternario de amonio común es $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

25 Si el compuesto es catiónico, o tiene un grupo funcional que puede ser catiónico (por ejemplo $-\text{NH}_2$ puede ser $-\text{NH}_3^+$), entonces se puede formar una sal con un anión adecuado. Ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen aquellos derivados de los siguientes ácidos inorgánicos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico, y fosforoso. Ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen aquellos derivados de los siguientes ácidos orgánicos: acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, palmítico, láctico, málico, pamoico, tartárico, cítrico, glucónico, ascórbico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, aspártico, benzoico, cinámico, pirúvico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, fenilsulfónico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, pantoténico, isetiónico, valérico, lactobiónico, y glucónico. Ejemplos de aniones poliméricos adecuados incluyen aquellos derivados de los siguientes ácidos poliméricos: ácido tánico, carboximetil celulosa.

30 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar, y/o manejar un solvato correspondiente del compuesto activo. El término "solvato" se usa en este documento en el sentido convencional para referirse a un complejo de soluto (por ejemplo el compuesto activo, sal del compuesto activo) y el disolvente. Si el disolvente es agua, el solvato puede ser convenientemente referido como un hidrato, por ejemplo, un monohidrato, un dihidrato, un trihidrato, etc.

35 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar, y/o manejar el compuesto activo en una forma químicamente protegida. El término "forma químicamente protegida", como se usa en este documento, se refiere a un compuesto en el que uno o más de los grupos funcionales reactivos están protegidos de las reacciones químicas indeseables, esto es, están en la forma de un grupo que protege o protegido (también conocido como un grupo enmascarante o enmascarado o un grupo bloqueante o bloqueado). Protegiendo un grupo funcional reactivo, las reacciones que envuelven otros grupos funcionales reactivos no protegidos pueden ser llevadas a cabo, sin afectar el grupo protegido; el grupo protegido puede eliminarse, usualmente en una etapa posterior, sin sustancialmente afectar al resto de la molécula. Véase, por ejemplo, 'Protective Groups in Organic Synthesis' (T. Green and P. Wuts, Wiley, 1999).

45 Por ejemplo, un grupo hidroxilo puede estar protegido como un éter ($-\text{OR}$) o un éster ($-\text{OC}(=\text{O})\text{R}$), por ejemplo, como: un t-butil éter; un bencil, bencidril (difenilmetil), or tritil (trifenilmetil) éter; un trimetilsilil o t-butildimetilsilil éter; o un acetil éster ($-\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{OAc}$).

50 Por ejemplo, un grupo aldehído o cetona puede ser protegido como un acetal o quetal, respectivamente, en el que el grupo carbonilo ($>\text{C}=\text{O}$) se convierte en un diéter ($>\text{C}(\text{OR})_2$), por reacción con, por ejemplo, un alcohol primario. El grupo aldehído o cetona se regenera fácilmente por hidrólisis usando un exceso grande de agua en presencia de un ácido.

55 Por ejemplo, un grupo amino puede ser protegido, por ejemplo, como una amida o un uretano, por ejemplo, como: una metilamida ($-\text{NHCO}-\text{CH}_3$); una benciloxiamida ($-\text{NHCO}-\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $-\text{NH}-\text{Cbz}$); como una t-butoxiamida ($-\text{NHCO}-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{NH}-\text{Boc}$); una 2-bifenil-2-propoxiamida ($-\text{NHCO}-\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4\text{C}_6\text{H}_5$, $-\text{NH}-\text{Bpoc}$), como una 9-fluorenilmetoxiamida ($-\text{NH}-\text{Fmoc}$), como una 6-nitroveratriloxiamida ($-\text{NH}-\text{Nvoc}$), como una 2-trimetilsilililetiloxiamida ($-\text{NH}-\text{Teoc}$), como una 2,2,2-tricloroetiloxiamida ($-\text{NH}-\text{Troc}$), como una aliloxiamida ($-\text{NH}-\text{Alloc}$), como una 2-(fenilsulfonil)etiloxiamida ($-\text{NH}-\text{Psec}$); o, en casos adecuados, como un N-óxido ($>\text{NO}$).

Por ejemplo, un grupo de ácido carboxílico puede ser protegido como un éster por ejemplo, como: un éster de alquilo C₁₋₇ (por ejemplo, un éster de metilo; un éster de t-butilo; un éster haloalquilo C₁₋₇ (por ejemplo, un éster trihaloalquilo C₁₋₇; un éster de trialquilililo C₁₋₇-alquilo C₁₋₇; o un éster de arilo C₅₋₂₀-alquilo C₁₋₇ (por ejemplo un éster de bencilo; un éster de nitrobenzilo); o como una amida, por ejemplo, como una metilamida.

- 5 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar, y/o manejar el compuesto activo en la forma de un profármaco. El término "profármaco", como se usa en este documento, se refiere a un compuesto que, cuando se metaboliza (es decir *in vivo*), proporciona el compuesto activo deseado. Típicamente, el profármaco es inactivo, o menos activo que el compuesto activo, pero puede proporcionar propiedades ventajosas de manejo, administración, o metabólicas.
- 10 Por ejemplo, algunos profármacos son ésteres del compuesto activo (por ejemplo un éster fisiológicamente aceptable metabólicamente lábil). Durante el metabolismo, el grupo éster (-C(=O)OR) se escinde para proporcionar el fármaco activo. Dichos ésteres pueden formarse por esterificación, por ejemplo, de cualquiera de los grupos de ácido carboxílico (-C(=O)OH) en el compuesto inicial, con, donde apropiado, protección anterior de otros grupos reactivos presentes en el compuesto inicial, seguido de la desprotección si se requiere. Ejemplos de dichos ésteres metabólicamente lábiles incluyen aquellos en donde R es alquilo C₁₋₇ (por ejemplo -Me, -Et); aminoalquilo C₁₋₇ (por ejemplo aminoetilo; 2-(N,N-dietilamino)etilo; 2-(4-morfolino)etilo); y aciloxi-alquilo C₁₋₇ (por ejemplo aciloximetilo; aciloxietilo; por ejemplo pivaloioximetilo; acetoximetilo; 1-acetoxietilo; 1-(1-metoxi-1-metil)etil-carboniloxietilo; 1-(benzoiloxi)etilo; isopropoxicarboniloximetilo; 1-isopropoxi-carboniloxietilo; ciclohexil-carboniloximetilo; 1-ciclohexil-carboniloxietilo; ciclohexiloxi-carboniloximetilo; 1-ciclohexiloxi-carboniloxietilo; (4-tetrahidropirani)carboniloximetilo; 1-(4-tetrahidropirani)carboniloxietilo; (4-tetrahidropirani)carboniloximetilo; y 1-(4-tetrahidropirani)carboniloxietilo).
- 15
- 20

Además, algunos profármacos se activan enzimáticamente para proporcionar el compuesto activo, o un compuesto que, con una reacción química adicional, proporciona el compuesto activo. Por ejemplo, el profármaco puede ser un derivado de un azúcar u otro conjugado de glicósido, o puede ser un derivado de éster de aminoácido.

25 *Producción de glicosil transferasas*

A fin de optimizar la transferencia de compuestos de ácido fluorosilícico activados puede ser deseable identificar y/o optimizar las propiedades de una glicosil transferasa para uso según los métodos divulgados en este documento. Los ejemplos en este documento muestran que una α -2,3-(O)-sialil transferasa de *S. frugiperda* puede usarse para formar conjugados entre un azúcar aceptor y los compuestos de ácido fluorosilícico de la presente invención. Sin embargo, para mejorar la eficiencia de esta reacción, pueden desarrollarse enzimas candidatas, por ejemplo para mejorar una o más propiedades de los enzimas tales como una constante de unión mejorada (K_m) y tasa de realización catalítica mejorada (k_{cat}) y/o especificidad del sustrato mejorada. El desarrollo de glicosil transferasas puede implicar el uso de técnicas tales como la evolución dirigida como se ejemplifica en Aharoni et al, Nature Methods, 2003, 3, 609-614.

30

35 *Glicosilación*

La habilidad para controlar la glicosilación en sitios definidos usando la presente invención representa una herramienta útil para la fabricación de estructuras de glicosilación. Esto se puede hacer haciendo al azúcar aceptor parte de una estructura de glicosilación que después reacciona con el compuesto de ácido fluorosilícico activado. La estructura de glicosilación es generalmente un sacárido y puede comprender una estructura monoanténaria, una estructura bianténaria, una estructura trianténaria o una estructura compleja de glicosilación. La química divulgada en este documento se puede emplear con monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos de origen natural o sintético, y puede usarse para modificar estructuras de glicosilación unidas a N o unidas a O.

40

Los métodos de la presente invención pueden incluir uno o más pasos adicionales llevados a cabo como parte de la síntesis de las estructuras de glicosilación o de su introducción dentro de un resto terapéutico tal como un polipéptido terapéutico. Estos pasos pueden llevarse a cabo en el resto terapéutico que comprende la estructura de glicosilación o en una estructura de glicosilación antes de su unión al resto terapéutico. Estos pasos incluyen la eliminación de un grupo glicosilo terminal de una estructura de glicosilación para formar el grupo aceptor del azúcar, por ejemplo en una reacción enzimática usando una sialidasa. En formas de realización en las que la estructura de glicosilación no está unida al resto terapéutico cuando la reacción de conjugación se lleva a cabo, los métodos incluyen el paso adicional de unir el conjugado al resto terapéutico. Los métodos también pueden incluir un paso inicial de introducir una estructura de glicosilación en un lugar de un polipéptido.

45

50

Alternativamente o adicionalmente, los métodos de la presente invención pueden usarse para transferir una variedad de compuestos de ácido 3-fluorosilícico a un azúcar aceptor. Esto puede hacerse por la transferencia de un oligómero que comprende una variedad de compuestos de ácido 3-fluorosilícico o por la repetición de la reacción de conjugación.

55

Alternativamente o adicionalmente, la estructura de glicosilación puede comprender un grupo de unión y/o otros restos tales como una o más moléculas de poli(alquilenglicol). En un ejemplo preferido, el polipéptido está representado por la fórmula esquemática:

Polipéptido-AA-L¹-Gly

en donde:

AA es un resto de aminoácido terminal o interno del polipéptido;

L¹ es un grupo de unión opcional unido covalentemente al aminoácido AA;

- 5 Gly representa el grupo aceptor de azúcar que es opcionalmente parte de una estructura de glicosilación.

El resto terapéutico será un polipéptido, aunque la presente invención es generalmente aplicable a cualquier tipo de resto terapéutico que incluye la glicosilación o en el que se desea introducir glicosilación. Los polipéptidos incluyen las proteínas y anticuerpos terapéuticos, y fragmentos de los mismos, por ejemplo para controlar su inmunogenicidad y propiedades farmacológicas tales como la semivida. Actualmente, la fabricación de proteínas terapéuticas recombinantes es cara y lenta ya que se usan a menudo líneas celulares de mamífero para la fabricación a fin de asegurarse de que las proteínas están glicosiladas. Los métodos divulgados en este documento pueden usarse para añadir glicosilación a un polipéptido después de su producción en líneas celulares bacterianas, en las que la expresión es generalmente más eficiente, por lo tanto ayudando a mejorar la velocidad y/o la economía de la producción de proteínas, mientras que se mantiene la glicosilación. Alternativamente, para los polipéptidos expresados en líneas celulares que glicosilan los productos de expresión, la presente invención puede usarse para modificar o añadir glicosilación.

En formas de realización preferidas, los carbohidratos empleados pueden comprender derivados modificados químicamente de oligosacáridos ramificados de origen natural comúnmente mostrados en glicoproteínas N- o O-unidos o productos de degradación de los mismos. Los grupos de carbohidrato que pueden usarse en la presente invención son bien conocidos en la técnica e incluyen grupos de carbohidrato encontrados en la glicosilación unida en N- y O- de proteínas eucarióticas y grupos de carbohidrato hechos por el hombre, por ejemplo véase los grupos de carbohidrato y métodos de producción e identificación divulgados en los documentos de patente internacional WO 2003/025133 y WO 2004/083807.

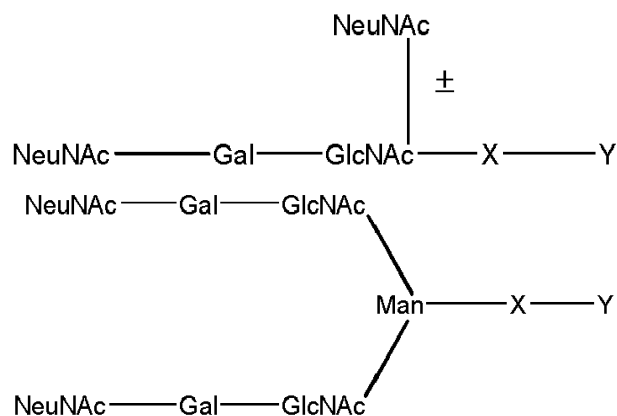
Glicanos unidos por N se encuentran unidos al nitrógeno (N) del grupo R de la asparagina en el sequon. El sequon es una secuencia Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina y puede estar compuesto de N-acetil galactosamina, galactosa, ácido neuramínico, N-acetilglucosamina, fructosa, manosa, fucosa y otros monosacáridos.

En eucariotas, los glicanos unidos a N se derivan de una unidad núcleo de 14 azúcares ensamblada en el citoplasma y el retículo endoplasmático. Primero, dos restos de N-acetil glucosamina se unen al fosfato de dolicol, un lípido, en el lado externo de la membrana del retículo endoplasmático. Entonces se añaden cinco restos de manosa a esta estructura. En este punto, el núcleo de glicano parcialmente acabado se voltea a través de la membrana del retículo endoplasmático, de manera que ahora está situado dentro del lumen reticular. El ensamblaje continúa entonces dentro del retículo endoplasmático, con la adición de cuatro más restos de manosa. Finalmente, se añaden tres restos de glucosa a esta estructura. Después del ensamblaje total, el glicano es transferido en bloque por la glicosiltransferasa oligosacariltransferasa a una cadena péptida naciente, dentro del lumen reticular. Esta estructura de núcleo de glicanos unidos a N consiste así de 14 restos (3 de glucosa, 9 de manosa, y 2 de N-acetilglucosamina).

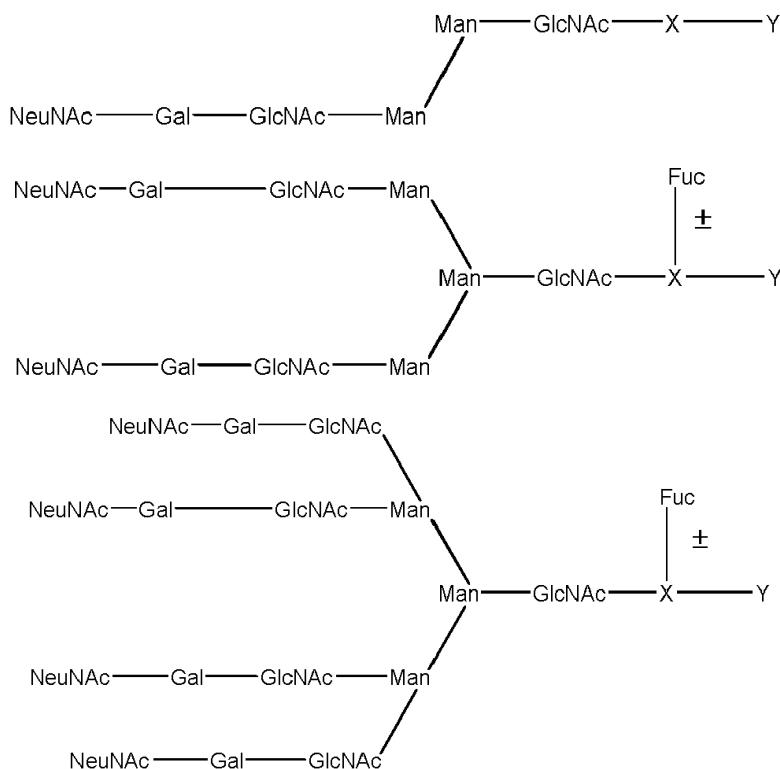
En eucariotas, glicanos unidos a O, son ensamblados de azúcar en azúcar en un resto de serina o treonina de una cadena peptídica en el aparato de Golgi. Al contrario que con los glicanos unidos a N, todavía no hay una secuencia de consenso conocida. Sin embargo, la colocación de un resto de prolina tanto a -1 como a +3 en relación a la serina o treonina es favorable a la glicosilación unida a O.

El primer monosacárido unido en la síntesis de glicanos unidos a O es la N-acetil-galactosamina. Después de esto, varias vías diferentes son posibles. Una estructura de núcleo 1 se genera por la adición de galactosa. Una estructura de núcleo 2 se genera por la adición de N-acetil-glucosamina a la N-acetil-galactosamina de la estructura de núcleo 1. Las estructuras de núcleo 3 se generan por la adición de una N-acetil-glucosamina única a la N-acetil-galactosamina original. Las estructuras de núcleo 4 se generan por la adición de una segunda N-acetil-glucosamina a la estructura de núcleo 3. Otras estructuras de núcleo son posibles, aunque son menos corrientes. Un tema estructural común en los glicanos unidos por O es la adición de unidades de polilactosamina a las varias estructuras de núcleo. Estas se forman por la adición repetitiva de unidades de galactosa y N-acetil-glucosamina. Las cadenas de polilactosamina en glicanos unidos por O están a menudo tapadas con la adición de un resto de ácido siálico (similar al ácido neuramínico). Si también se añade un resto de fucosa, al resto anterior al penúltimo, se forma una estructura sialil-lewis-X (SLe^x).

Ejemplos de estructuras de glicosilación incluyen las siguientes estructuras unidas por O y por N:



en donde X es una unión como se describe en este documento e Y es hidrógeno o una proteína o polipéptido.



5

en donde X es un grupo glicano o una unión como se describe en este documento e Y es hidrógeno o una proteína o polipéptido.

Polipéptidos

- 10 Los métodos de la presente invención son generalmente aplicables a un rango de aplicaciones basado en que la reacción es capaz de modificar la glicosilación de, y en particular añadir grupos de ácido siálico a, restos terapéuticos tales como polipéptidos. Los polipéptidos como se usa en este documento incluyen polímeros en los que los monómeros son aminoácidos y están unidos entre sí a través de enlaces amida. Los aminoácidos que forman polipéptidos pueden incluir aminoácidos no naturales, tales como β-alanina, fenilglicina y homoarginina, o
- 15 aminoácidos que no son codificados por ácidos nucleicos, y/o aminoácidos que han sido modificados para incluir grupos reactivos, lugares de glicosilación, polímeros, restos terapéuticos, biomoléculas y similares también pueden usarse en la invención. Todos los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser de la forma D- o L-. En general se prefiere el uso del isómero L que es el que ocurre naturalmente. Los polipéptidos que se pueden usar en la presente invención pueden inicialmente ser polipéptidos glicosilados o no glicosilados, y esto incluye polipéptidos que están glicosilados de forma incompleta por un sistema que los expresa.
- 20

Los métodos descritos son aplicables a cualquier tamaño y tipo de polipéptido desde aminoácidos individuales y péptidos a polipéptidos y proteínas que tienen pesos moleculares de hasta o más de 100 kDa. En consecuencia, aunque por conveniencia, los métodos en este documento se describen generalmente por la referencia a

"polipéptidos", esto debe ser tomado como que se incluyen secuencias más cortas de aminoácidos (por ejemplo, de 2, 3, 4, 5 o 10 aminoácidos de longitud a 30, 40 o 50 aminoácidos de longitud), a veces referidos en la técnica como péptidos. El término también debería tomarse como que incluye polipéptidos que tienen una estructura secundaria, terciaria o cuaternaria generalmente referidos como proteínas, así como proteínas multidominio.

- 5 Los métodos y reactivos divulgados en este documento son particularmente útiles para funcionalizar polipéptidos terapéuticos, por ejemplo para modificar sus propiedades farmacológicas tales como la estabilidad, semivida biológica o solubilidad en agua, o las características inmunológicas del polipéptido.

Ejemplos de clases adecuadas de polipéptidos que pueden ser modificados según la presente invención incluyen eritropoyetinas (EPO), interferones, interleuquinas, quimioquinas, linfoquinas, citoquinas, insulina, anticuerpos monoclonales y fragmentos, anticuerpos recombinantes y fragmentos, factores de coagulación sanguínea, factores de estimulación de colonias (CSFs), hormonas de crecimiento, activadores del plasminógeno, péptidos derivados de virus, hormonas de la reproducción y enzimas terapéuticas. Ejemplos específicos de polipéptidos que se pueden emplear incluyen factores de estimulación de colonias (CSFs), factores de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSFs), factores de estimulación de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSFs), Factor VIIa, Factor VIII, Factor IX, hormona de crecimiento humana (hGH), DNasa, insulina, glucagón, VEGF, receptor de VEGF, TNF, receptor de TNF, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), activador del plasminógeno tisular (tPA), eritropoyetina (EPO), enfurvirtida, factor de crecimiento tipo insulina (IGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-24, interferón beta-1a, interferón beta-1b, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa, o interferón gamma.

- 20 En la presente invención, las referencias a polipéptidos que son anticuerpos incluyen las inmunoglobulinas ya sean naturales o producidas parcial o totalmente de forma sintética. El término también cubre cualquier polipéptido o proteína que comprende un dominio de unión al antígeno. Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un dominio de unión al antígeno incluyen Fab, scFv, Fv, dAb, fragmentos de Fd, diacuerpos, triacuerpos o nanocuerpos. Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos y usando técnicas de tecnología de ADN recombinante producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que retienen la especificidad del anticuerpo original. Dichas técnicas pueden implicar la introducción del ADN que codifica la región variable de la inmunoglobulina, o las regiones determinantes de la complementaridad (CDRs), de un anticuerpo a las regiones constantes, o regiones constantes más regiones de marco, de una inmunoglobulina diferente. Véase, por ejemplo, el documento de patente europea EP 0 184 187 A, el documento de patente del Reino Unido GB 2.188.638 A o el documento de patente europea EP 0 239 400 A. Los anticuerpos pueden ser modificados en un número de formas y el término debe interpretarse como que cubre cualquier miembro o sustancia de unión específica que tiene un dominio de unión de anticuerpo antígeno con la especificidad requerida. Por lo tanto, este término cubre fragmentos de anticuerpos y derivados, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión a la inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a la inmunoglobulina, o equivalente, fusionadas a otro polipéptido están por lo tanto incluidas. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describe en los documentos de patente europea EP 0 120 694 A y EP 0 125 023 A.

- Se ha mostrado que fragmentos de un anticuerpo pueden realizar la función de unión con los antígenos. Ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios de VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios de VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios de VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546 (1989)) que consiste en un dominio de VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; (vii) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL están unidos por un péptido de unión que permite a los dos dominios asociarse para formar un lugar de unión al antígeno (Bird et al, Science, 242: 423-426, 1988; Huston et al, PNAS USA, 85: 5879-5883, 1988); (viii) dímeros Fv biespecíficos de cadena única (documento de patente PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica (documento de patente internacional WO 94/13804; Holliger et al, P.N.A.S. USA, 90: 6444-6448, 1993). Fv, scFv o moléculas diacuerpo pueden estabilizarse por la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL (Reiter et al., Nature Biotech., 14: 1239-1245, 1996). También pueden hacerse minicuerpos que comprenden un dominio scFv unido a un dominio CH3 (Hu et al, Cancer Res., 56: 3055-3061, 1996).

Pegilación

- Los métodos divulgados en este documento alternativamente o en adición a la presente invención que los emplea para modificar la glicosilación de polipéptidos, pueden usarse como parte de un procedimiento para pegar un polipéptido dado. La pegilación es un enfoque que también se puede emplear para diseñar proteínas terapéuticas de manera que contengan otros restos útiles para la modificación de sus propiedades farmacológicas. Un ejemplo preferido es la conjugación de polipéptidos a moléculas de poli(alquilenglicol), en particular moléculas de polietilenglicol (PEG), que puede usarse para mejorar la semivida u otras propiedades farmacológicas de los polipéptidos terapéuticos. Los métodos presentes proporcionan la oportunidad de pegar proteínas de interés de una forma selectiva dependiendo de dónde estén presentes los grupos de tiol en la proteína. Las moléculas de poli(alquilenglicol) se denominan de forma intercambiable en la técnica como moléculas de poli(óxido de alquileo) y

son poliéteres. Las moléculas de poli(alquilenglicol) pueden tener estructuras lineales, ramificadas, de peine o en estrella y en general son muy solubles en agua.

Según la presente invención, la estructura de glicosilación puede comprender o estar unida a uno o más grupos de poli(alquilenglicol). Estos grupos pueden servir como una unión entre el resto terapéutico y la estructura de glicosilación.

Además, la estructura básica de poli(alquilenglicol) puede ser proporcionada con uno o más grupos funcionales reactivos tales como grupos hidroxilo, amino, de ácido carboxílico, de haluro de alquilo o de tiol para facilitar la reacción de la molécula de poli(alquilenglicol) con otras especies tales como polipéptidos. Moléculas de poli(alquilenglicol) preferidas incluyen aquellas sustituidas en una o más posiciones de hidroxilo con un grupo químico, tal como un grupo alquilo que tiene entre uno y cuatro átomos de carbono. Las más preferidas para uso según la presente invención son moléculas de polietilenglicol ("PEG"), aunque la persona experta en la técnica será capaz de usar las técnicas divulgadas en este documento en combinación con otras moléculas de poli(alquilenglicol), tal como polipropilenglicol o copolímeros de polietileno-polipropilenglicol. Las moléculas de poli(alquilenglicol), incluyendo PEGs, típicamente tienen pesos moleculares entre aproximadamente 400 kDa y aproximadamente 80 kDa, más preferiblemente entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 60 kDa, y más preferiblemente entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 50 kDa, es decir pesos moleculares de 10 kDa, 20 kDa, 30 kDa o 40 kDa. Las moléculas de poli(alquilenglicol) que pueden usarse según la presente invención son bien conocidas en la técnica y disponibles públicamente, por ejemplo a partir de fuentes disponibles comercialmente tales como SigmaAldrich.

La pegilación es una estrategia conocida para la modificación de las propiedades de los polipéptidos terapéuticos, tales como los péptidos, proteínas y anticuerpos. En general, la unión de moléculas de PEG a los polipéptidos se usa para alterar su conformación, propiedades electrostáticas o hidrófobas, y conducir a mejoras en sus propiedades biológicas y farmacológicas, tales como un aumento de la solubilidad del fármaco, reducción de la frecuencia de dosificación, modulación (especialmente en aumento) de la semivida de circulación, aumento de la estabilidad del fármaco y aumento de la resistencia a la degradación proteolítica. La pegilación funciona aumentando el peso molecular del polipéptido terapéutico conjugando el polipéptido a una o más moléculas de polímero de PEG. Los métodos de la presente invención tienen la ventaja de que el sitio de introducción de las moléculas de PEG en el polipéptido está definido por la presencia de grupos de tiol.

Uniones y su uso

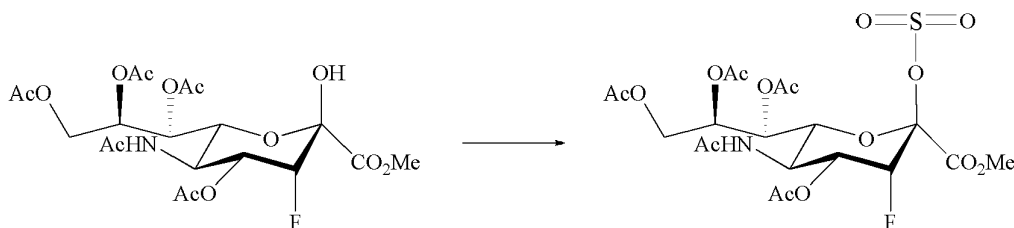
En algunas formas de realización de la presente invención, la glicosilación del polipéptido puede estar ligada a un resto de aminoácido terminal o interno del polipéptido por medio de un grupo de unión. En un aspecto preferido de la presente invención, este grupo de unión puede comprender un anillo aromático heterocíclico que contiene nitrógeno que tiene un sustituyente de vinilo para la reacción con uno o más grupos de tiol que están presentes de forma natural, o que han sido introducidos en el polipéptido, por ejemplo, un grupo de tiol con uno o más restos de cisteína. Estos grupos de unión tienen posiciones que pueden estar adicionalmente unidas a un espacio de acoplamiento que es capaz de alterar las propiedades del polipéptido tales como una molécula de poli(alquilenglicol) o un grupo de glicano. Ejemplos de este tipo de grupo de unión y los métodos para acoplarlos a los aminoácidos en los polipéptidos donde se desea introducir la glicosilación se describen en el documento de patente del Reino Unido GB-A-0823309.0, que se incorpora expresamente como referencia en su totalidad.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen a fin de proporcionar a aquellos expertos en la técnica una exposición y descripción completas de cómo poner en práctica la invención.

Experimental

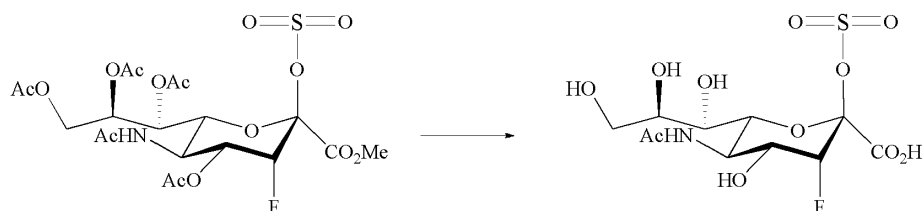
Síntesis de un donante de ácido 3-fluorosiálico activado.



Fórmula química: $C_{20}H_{28}FNO_{13}$
Masa exacta: 509,1545
Peso molecular: 509,4336

Fórmula química: $C_{21}H_{30}FNO_{15}S$
Masa exacta: 587,1320
Peso molecular: 587,5240

Se disolvió el hemiacetal (173 mg) en 5 ml de CH₂Cl₂ y se mantuvo bajo N₂ gas. Se añadió a la solución piridina (164,8 µl, 6 equivalentes) y cloruro de mesilo (79,2 µl, 3 equivalentes). Se dejó la reacción con agitación a temperatura ambiente durante 5 horas. La reacción se concentró y se purificó por cromatografía en gel de sílice (10% EtOAc/éter de petróleo → 10% MeOH/EtOAc) para dar un producto blanco (152 mg, 76 % de rendimiento). ¹H RMN, 400 MHz (CDCl₃): 5,66 (s ancho, 1H), 5,47 (dd, 1H, J = 1,6 y 4,7 Hz), 5,40-5,21 (m, 2H), 4,92 (dd, 1H, H-3, J = 2,3, y 48,9 Hz), 4,66 (dd, 1H, J = 2,3 y 12,5 Hz), 4,49-4,43 (m, 2H), 4,17 (dd, 1H, J = 6,7 y 12,5 Hz), 3,91 (s, 3H), 3,18 (s, 3H), 2,15 (s, 3H), 2,10 (s, 3H), 2,07 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 1,90 (s, 3H). ¹⁹F RMN 400 MHz (CDCl₃): -206,00 (dd, J = 28,8 y 48,9 Hz). ESI-MS: Esperado para el ion molecular C₂₁H₃₀FN₂O₁₅S = 587,1320. Encontrado M+Na⁺ = 610,1235.



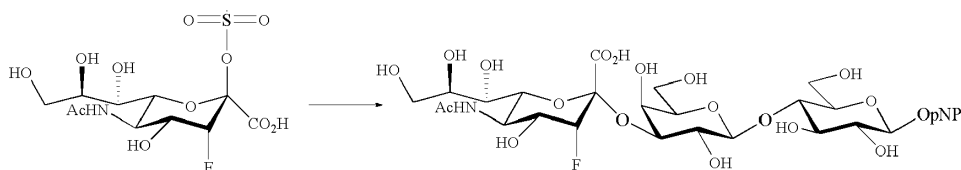
Fórmula química: C₂₁H₃₀FN₂O₁₅S
Masa exacta: 587,1320
Peso molecular: 587,5240

Fórmula química: C₁₂H₂₀FN₂O₁₁S
Masa exacta: 405,0741
Peso molecular: 403,3507

10

El ácido mesil-sialico de mesilo totalmente protegido (72 mg, 0,1233 moles) se disolvió en THF (4 ml). A esto se añadió NaOH 1 M (7,5 equivalentes, 0,92 ml). La reacción se sonicó durante 30 segundos y se dejó con agitación a 4° C durante la noche. La reacción se neutralizó con amberlita IR 120⁺, se filtró y se redujo el volumen *in vacuo*. La solución restante se liofilizó para dar el mesilato desprotegido como un polvo blanco (30 mg), que se usó sin purificación adicional. ESI-MS: Esperado para el ion molecular C₁₂H₂₀FN₂O₁₁S = 405,0741. Encontrado M-H⁺ = 404,0683.

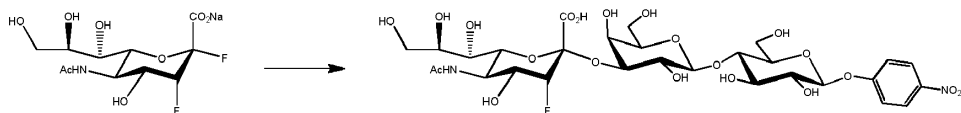
15



Fórmula química: C₂₉H₄₁FN₂O₂₁
Masa exacta: 772,2186
Peso molecular: 772,6350

El ácido mesil-sialico (3 mg, 7,4 µmoles) se añadió a una solución que contenía cloruro de manganeso 1 mM, pNP-lactosa 10 mM, tampón de citrato de sodio 50 mM [pH = 6,0, con 5% (v/v) de Triton-X y 0,5% (p/v) de albúmina de suero bovino], citosina 5 mM, citidina 5 mM y 20 µl de α-2,3-(O)-sialil transferasa (recombinante de rata, *S. frugiperda*, 0,8 mg/ml). La reacción se incubó a 37° C durante 18 horas y después se analizó por espectrometría de masas. Esperado para el ion molecular C₂₉H₄₁F₁N₂O₂₁ = 772,2186. Encontrado M-H⁺ = 771,2123.

20



Se añadió el ácido difluoro-sialico (3 mg, 9,1 µmoles) a una solución que contenía pNP-lactosa 10 mM, cloruro sódico 30 mM, tampón Tris-HCl 20 mM [pH = 7,6] y 40 µl de trans-sialidasa de *T. cruzi* (1,0 mg/ml). La reacción se incubó a 37° C durante 18 horas y después se analizó por espectrometría de masas confirmando la producción del producto 3-fluorosialil lactosa. Esperado para el ion molecular C₂₉H₄₁F₁N₂O₂₁ = 772,2186. Encontrado M-H⁺ = 771,2117.

25

30 Referencias:

Documento de patente de Estados Unidos N° 7226903

Chiu et al., Nat. Struct. Mol. Biol. (2004) 11, 163-170

Watts et al., J. Am. Chem. Soc. (2003) 125, 7532-7533

Watts et al., Can. J. Chem. (2004) 82, 1581-1588

Watts et al., J. Biol. Chem. (2006) 281, 4149-4155

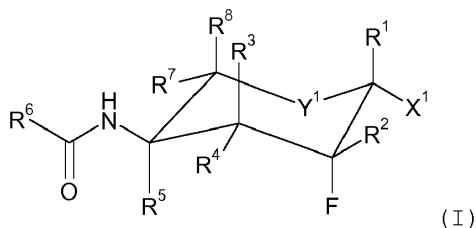
Harshal et al., J. Am. Chem. Soc. (2007) 129, 10630-10631

Aharoni et al., Nature Methods, 2003, 3, 609-614

Sun et al., Eur. J. Org. Chem (2000), 2643-2653

REIVINDICACIONES

1. Un método para la glicosilación de un polipéptido terapéutico, en donde el método comprende formar un conjugado covalente entre un azúcar aceptor y un compuesto de ácido 3-fluorosiálico, el método comprende poner en contacto el azúcar aceptor, el compuesto de ácido 3-fluorosiálico y una enzima capaz de transferir el compuesto de ácido 3-fluorosiálico al azúcar aceptor, el paso de contacto tiene lugar en condiciones adecuadas para la transferencia y unión covalente del compuesto de ácido 3-fluorosiálico al azúcar aceptor, en donde el compuesto de ácido 3-fluorosiálico no comprende un grupo de citidina monofosfato (CMP), y en donde el azúcar aceptor está presente en, o para unirse a, el polipéptido terapéutico, y, en donde el compuesto de ácido 3-fluorosiálico está representado por la fórmula general (I):



en donde:

Y¹ se selecciona de -O-, -S-, o -NR-, en donde R se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₇, heterociclilo C₃₋₁₀, o arilo C₅₋₂₀;

R¹ es un buen grupo saliente capaz de soportar y estabilizar una carga negativa, con la condición de que no sea un grupo de citidina monofosfato (CMP);

X¹ es -CO₂R, en donde R es como se definió anteriormente;

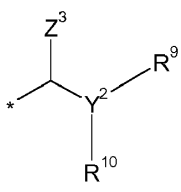
R² se selecciona de H, OH o haluro;

R³ y R⁴ son cada uno seleccionados independientemente de H, -OR, -NR₂ o -Z¹(CH₂)_mZ², donde R es como se definió anteriormente, Z¹ se selecciona de -O-, -NR-, -CR₂- y -S-, m es de 0 a 5 y Z² se selecciona de -OR, -NR₂ o -CN; con la condición de que R³ y R⁴ no pueden ambos ser H;

R⁵ es H;

R⁶ se selecciona de alquilo C₁₋₇; hidroxialquilo C₁₋₇, aminoalquilo C₁₋₇ o tioalquilo C₁₋₇;

R⁷ es un grupo de fórmula:



en donde Y² se selecciona de N, O, S, y CH; Z³ se selecciona de H, hidroxilo, haluro, alquilo C₁₋₇, aminoalquilo C₁₋₇, hidroxialquilo C₁₋₇, o tioalquilo C₁₋₇; R⁹ y R¹⁰ se seleccionan independientemente de H, hidroxilo, hidroxialquilo C₁₋₇, alquilo C₁₋₇, arilo C₅₋₂₀, C(O)Z⁴, en donde Z⁴ se selecciona de alquilo C₁₋₇ o arilo C₅₋₂₀, con la condición de que si Y² es O o S, R¹⁰ está ausente;

o donde R⁴ es distinto de hidroxilo, R⁷ puede adicionalmente ser hidroxialquilo C₁₋₇;

R⁸ es hidrógeno;

o un oligómero de dos o más moléculas de fórmula (I);

y estereoisómeros, formas tautómeras, sales, solvatos o formas químicamente protegidas de los mismos, en donde el término C₁₋₇ pertenece a un resto monovalente obtenido por eliminación de un hidrógeno de un hidrocarburo C₁₋₇, que puede ser alifático o alicíclico, o una combinación de los mismos,

y donde el aceptor del azúcar es parte de una estructura de glicosilación, la estructura de glicosilación comprende un polisacárido sintético o que ocurre de forma natural.

y que comprende la etapa de unir el conjugado al polipéptido terapéutico cuando la estructura de glicosilación no está ligada a un polipéptido terapéutico.

- 5 2. El método de la reivindicación 1, en donde la formación del conjugado covalente con el compuesto de ácido 3-fluorosiálico modula una propiedad biológica del azúcar aceptor o de un resto terapéutico que comprende el azúcar aceptor, opcionalmente en donde la propiedad biológica es la resistencia a la hidrólisis enzimática, estabilidad biológica o una propiedad farmacocinética.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método es un método libre de células *in vitro*.
- 10 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde R¹ es metanosulfonato, 4-toluenosulfonato, trifluorometilsulfonato, trifluorometiltoluenosulfonato, imidazolsulfonato, o un haluro (F, Cl, Br, I).
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la reacción de transferencia es enzimática con inversión en el enlace anomérico entre el compuesto de ácido 3-fluorosiálico y el aceptor de azúcar.
- 15 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende además la eliminación de un grupo glicosilo terminal desde una estructura de glicosilación para formar el grupo de aceptor de azúcar, y opcionalmente en donde la eliminación del grupo glicosilo terminal se lleva a cabo enzimáticamente usando una sialidasa.
- 20 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende la transferencia de varios compuestos de ácido 3-fluorosiálico al aceptor de azúcar y opcionalmente en donde los varios compuestos de ácido 3-fluorosiálico se transfieren como un oligómero o mediante la repetición de la reacción de conjugación .
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende la transferencia de varios grupos de ácido 3-fluorosiálico a uno o más restos de glicosilo terminales de una estructura de glicosilación presente en un polipéptido.
- 25 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la enzima para transferir el grupo de ácido 3-fluorosiálico es una sialiltransferasa o una trans-sialidasa, y opcionalmente en donde la enzima es una sialiltransferasa o una trans-sialidasa que ha sido manipulada genéticamente para mejorar la velocidad de la reacción de transferencia y/o mejorar la unión de la molécula donante de ácido 3-fluoro siálico.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la etapa inicial de introducir una estructura de glicosilación en un lugar de un polipéptido.
- 30 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la estructura de glicosilación comprende una molécula de poli(alquilenglicol).
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido está representado por la fórmula esquemática:



35 en donde:

AA es un resto de aminoácido terminal o interno del polipéptido;

L¹ es un grupo de unión opcional unido covalentemente al aminoácido AA;

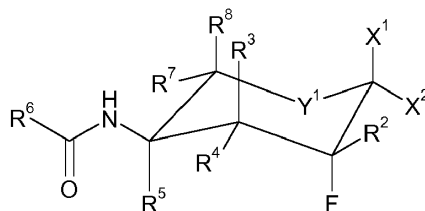
Gly representa el grupo aceptor de azúcar que es parte de una estructura de glicosilación.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:
 - 40 (a) la conjugación del compuesto de ácido 3-fluorosiálico al aceptor de azúcar presente en el polipéptido modifica la estabilidad, semivida biológica, propiedades de aclaramiento, solubilidad en agua y/o características inmunológicas del polipéptido; y/o
 - (b) el método es para mejorar la resistencia de la estructura de glicosilación del polipéptido a la hidrólisis por sialidasas; y/o
 - 45 (c) el polipéptido es una eritropoyetina, un interferón, una interleuquina, una quimioquina, una linfoquina, una citoquina, insulina, un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo, un anticuerpo recombinante o fragmento del mismo, un factor de coagulación de la sangre, un factor de estimulación de colonias, una hormona de crecimiento, un activador del plasminógeno, un péptido derivado de virus, una hormona de reproducción o una enzima terapéutica.

14. Un conjugado de un polipéptido terapéutico como se obtiene por el método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

15. Un conjugado de una estructura de glicosilación y un polipéptido terapéutico, la estructura de glicosilación comprende uno o más grupos terminales de ácido 3-fluorosialílico, en donde la estructura está representada por la fórmula:

5



en donde:

Y¹ se selecciona de -O-, -S-, o -NR-, en donde R se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₇, heterociclilo C₃₋₁₀, o arilo C₅₋₂₀;

10 X¹ es -CO₂R, en donde R es como se definió anteriormente;

X² representa la parte remanente de la estructura de glicosilación y comprende al menos dos unidades de sacáridos;

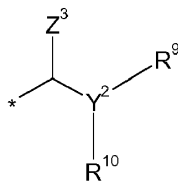
R² se selecciona de H, OH o haluro;

15 R³ y R⁴ son cada uno independientemente seleccionados de H, -OR, -NR₂ o -Z¹(CH₂)_mZ², donde R es como se definió anteriormente, Z¹ se selecciona de -O-, -NR-, -CR₂- y -S-, m es de 0 a 5 y Z² se selecciona de -OR, -NR₂ o -CN; con la condición de que R³ y R⁴ no pueden ambos ser H;

R⁵ es H;

R⁶ se selecciona de alquilo C₁₋₇; hidroxialquilo C₁₋₇, aminoalquilo C₁₋₇ o tioalquilo C₁₋₇;

R⁷ es un grupo de fórmula:



20 en donde Y² se selecciona de N, O, S, y CH; Z³ se selecciona de H, hidroxilo, haluro, alquilo C₁₋₇, aminoalquilo C₁₋₇, hidroxialquilo C₁₋₇, o tioalquilo C₁₋₇; y R⁹ y R¹⁰ son independientemente seleccionados de H, hidroxilo, hidroxialquilo C₁₋₇, alquilo C₁₋₇, arilo C₅₋₂₀, C(O)Z⁴, en donde -Z⁴ se selecciona de alquilo C₁₋₇ o arilo C₅₋₂₀, con la condición que si Y² es O o S, R¹⁰ está ausente;

o en donde R⁴ es distinto de hidroxilo, R⁷ puede adicionalmente ser hidroxialquilo C₁₋₇;

25 R⁸ es hidrógeno;

o un oligómero de dos o más moléculas de fórmula (I);

y los estereoisómeros, formas tautómeras, sales, solvatos, o formas de los mismos protegidas químicamente,

en donde el término C₁₋₇ se refiere a un resto monovalente obtenido por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un hidrocarburo C₁₋₇, que puede ser alifático o alicíclico, o una combinación de los mismos y,

30 la estructura de glicosilación comprende un polisacárido de origen natural o sintético,

en donde la estructura de glicosilación está unida de forma covalente a uno o más de los grupos de ácido 3-fluorosialílico, en donde los grupos de ácido 3-fluorosialílico forman el grupo de glicosilo terminal de la estructura de glicosilación.

16. El conjugado de la reivindicación 15, en donde la estructura de glicosilación está unida al polipéptido en un lugar de glicosilación y/o por medio de un resto de aminoácido del polipéptido, opcionalmente por medio de un grupo de unión.
 17. Un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 para uso en terapia.
- 5 18. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.