

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 763**

51 Int. Cl.:

**C07H 13/00** (2006.01)

**A61K 31/715** (2006.01)

**C08B 37/00** (2006.01)

**G01N 33/532** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.04.2014 PCT/EP2014/056737**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014 WO14161960**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2014 E 14715584 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2981541**

54 Título: **Síntesis y uso de glicanos marcados isotópicamente**

30 Prioridad:

**03.04.2013 GB 201305986**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.11.2017**

73 Titular/es:

**ASOCIACIÓN CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
COOPERATIVA EN BIOMATERIALES (100.0%)  
Parque Tecnológico de San Sebastián, Paseo  
Miramón, 182, Edificio Empresarial C  
20009 San Sebastián (Gipuzkoa), ES**

72 Inventor/es:

**REICHARDT, NIELS-CHRISTIAN;  
ECHEVERRÍA BEISTEGUI, BEGOÑA-MARIA;  
ETXEARRIA, JUAN;  
CALVO, JAVIER y  
RUIZ, NEREA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 644 763 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

Síntesis y uso de glicanos marcados isotópicamente

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a isotopólogos de oligosacáridos y polisacáridos. En particular, la presente invención se refiere a la síntesis de glicanos marcados isotópicamente y su uso como patrones en el análisis por espectrometría de masas de mezclas de glicanos.

10

**Antecedentes de la invención**

La glicosilación es una de las modificaciones más comunes de la proteína postraducciona en los sistemas eucariotas. Se ha estimado que más de la mitad de todas las proteínas de mamífero están glicosiladas en algún momento durante su existencia y virtualmente todas las proteínas de membrana y secretadas están glicosiladas. La glicosilación es un proceso no basado en plantillas y se cree que introduce el alto nivel de variabilidad necesario para procesos complejos en organismos superiores. Además de participar en interacciones macromoleculares clave, se ha demostrado que los glicanos contribuyen al plegamiento, tráfico y estabilidad de proteínas.

15

20

Los N-glicanos están unidos a la cadena principal proteica a través de residuos de asparagina que forman parte de las secuencias tripeptídicas Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, siendo X cualquier aminoácido, excepto prolina. Dependiendo de los residuos de azúcar terminales, los N-glicanos se clasifican en N-glicanos complejos, de alto contenido de manosa e híbridos. Esta clasificación se basa en el motivo pentasacárido común compartido por la mayoría de los N-glicanos. Los O-glicanos están unidos a través de residuos de serina o treonina a la proteína. Existen varias estructuras de núcleo de O-glicano, siendo las más comunes Núcleo 1, Núcleo 2, Núcleo 3 y Núcleo 4.

25

Se sabe que numerosas enfermedades implican cambios adquiridos en la glicosilación y/o en el reconocimiento de glicanos. Por ejemplo, la glucosilación alterada es una característica universal de las células cancerosas y algunas estructuras de glicano son marcadores bien conocidos para los tumores y la progresión tumoral. Como resultado, los métodos para el análisis completo de la glicosilación de proteínas y la composición de glicanos son de interés para la comunidad científica.

30

Para la mayoría de los métodos de perfilación de glicol, los glicanos se eliminan de la proteína bien mediante hidrazinólisis o tratamiento con un péptido glicosidasa específico (por ejemplo, PNGasa F). Debido a su alta sensibilidad a bajas concentraciones, la espectrometría de masas se utiliza a menudo en el análisis de las mezclas complejas resultantes. Sin embargo, la intensidad de señal de analitos particulares depende, entre muchos otros factores, de las propiedades físicas (probabilidad de ionización, tendencia a fragmentarse, etc.) del analito, haciendo muy difícil cualquier cuantificación relativa, e incluso a veces la identificación.

35

La identificación de glicanos comunes a dos muestras y su cuantificación relativa puede facilitarse mediante el uso de la derivatización de las mezclas de glicanos para incorporar marcas isotópicas. Las dos muestras se etiquetan con la forma ligera y pesada del reactivo de marcado y después se mezclan antes del análisis usando espectrometría de masas. La derivatización para incorporar marcadores isotópicos en mezclas de glicanos aisladas a partir de glicoproteínas se ha realizado usando técnicas de pemetilación o marcado de isótopos reductores de glicano, en el que la etiqueta se introduce usando aminación reductora (Atwood, 2007; Bowman, 2007, 2010; Botelho, 2008; Hitchcock, 2006; Hsu, 2006; Kang, 2007; Lawrence, 2008; Ridlova, 2008; Yuan, 2005; Zhang, 2003).

40

45

Los siguientes documentos describen oligosacáridos marcados y usos de los mismos:

50

Documento 1: Mark A. Breidenbach, Krishnan K. Palaniappan, Austin A. Pitcher, y Carolyn R. Bertozzi, (2012) Mapping Yeast N-glycosites with isotopically recorded glycans. *Mol. Cell. Proteomics* 11(6): M111.015339. DOI: 10.1074/mcp.M111.015339.

55

Documento 2: WO2008/130924, publicado el 30 de octubre de 2008.

Documento 3: Jin Yuan, Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Torn Kawanishi, y Takao Hayakawa, (disponible en línea desde 2004) Isotope tag method for quantitative analysis of carbohydrates by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1067 (2005) 145-152.

60

El documento 1 describe el mapeo de N-glicósidos de levadura usando una isomezcla de GlcNAc. El documento 2 describe métodos de fabricación de glicanos aminados marcados isotópicamente mediante aminación reductora. El documento 3 describe el uso de etiquetas de piridilamino para perfiles de oligosacáridos.

65

La aminación reductora normalmente se produce en el extremo reductor de los glicanos y puede usar anilina isotópicamente marcada, aminopiridina o ácido antranílico. Por ejemplo, Xia et al. (2009) han demostrado el uso de etiquetas de anilina marcadas isotópicamente para comparar las diferencias en mezclas de glicanos liberados de

- suero humano y de ratón. Los glicanos fueron liberados por la PNGasa F, después las mezclas resultantes se derivaron por separado por aminación reductora con  $^{12}\text{C}_6$ -anilina o  $^{13}\text{C}_6$ -anilina. Analizando una combinación equimolar de la mezcla derivatizada con  $^{12}\text{C}_6$ -anilina de glicanos de suero de ratón y la mezcla derivatizada con  $^{13}\text{C}_6$ -anilina de glicanos de suero humano, los autores informaron que fueron capaces de identificar picos de masa pareados separados por una diferencia de masa de 6 Da y asignar estructuras plausibles para glicanos comunes a ambas muestras. Los autores informaron que una comparación de las intensidades relativas de estos picos permitió una determinación de la cantidad de un glicano común particular presente en una muestra comparada con la otra.
- Sin embargo, estos métodos proporcionan solo resultados semicuantitativos. Además, los resultados se ven afectados por la reproducibilidad de los procedimientos de marcado y los problemas causados por reacciones secundarias, degradación oxidativa y "reacciones de desprendimiento" (que pueden producirse debido a ciertas condiciones de reacción en soluciones acuosas), y la funcionalización importante puede perderse durante la etapa de derivatización.
- Las etiquetas isotópicas también se han utilizado en proteómica. Breidenbach et al. (2012) han demostrado la incorporación metabólica de GlcNAc marcado isotópicamente en N-glicanos de levadura usando una metodología de preparación de muestras asistida por filtro. Se utilizó una isomezcla de GlcNAc que comprendía la abundancia de isótopos naturales GlcNAc,  $^{13}\text{C}_2$ -GlcNAc y  $^{13}\text{C}_4^{15}\text{N}_1$ -GlcNAc en una relación 1:2:1 para imitar el patrón de triplete de isótopos de dibromuro. Los conjugados de glicol resultantes que contenían la isomezcla se sometieron a digestión FASP y desglucosilación EndoH y se analizaron utilizando una búsqueda de patrón de envoltura isotópica automatizada (en experimentos de LC-MS/MS) para facilitar la identificación de glucósidos. El método permitió a los autores poner la prioridad de fragmentación en los iones glucopéptidos, independientemente de sus intensidades relativas con respecto a otros iones en la muestra.
- Existe una necesidad no satisfecha de métodos mejorados para analizar rápida y fácilmente el contenido de mezclas de glicanos liberados, y en particular uno que no tenga los inconvenientes de la técnica anterior descrita.

### Sumario de la invención

- La presente invención se basa en la idea de los inventores de que isotopólogos estables de glicanos individuales y glicoconjugados usados como patrones en espectrometría de masas pueden tener utilidad en el análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas complejas. En particular, la presente invención aborda los problemas de reproducibilidad y pérdida de información funcional asociados a los procedimientos isotópicos de etiquetado de glicanos conocidos en la técnica, en los que se derivan mezclas de glicanos para incorporar la etiqueta durante o después de la eliminación de la proteína. Los presentes inventores han proporcionado métodos para la generación sintética de glicanos marcados isotópicamente que luego pueden ser dopados en una muestra de analito y analizados por espectrometría de masas. Estos métodos permiten la identificación de glicanos de estructura conocida en la muestra de analito a través de la comparación de la envoltura o envolturas de espectrometría de masas asociadas a los picos de espectrometría de masa restantes (asociados a la muestra).
- Además, la presente invención permite la cuantificación de glicanos particulares dentro de la muestra en términos absolutos mediante la adición de una cantidad conocida del estándar, representando una ventaja significativa sobre los métodos conocidos en la técnica que proporcionan solo datos semicuantitativos. La presente invención proporciona bibliotecas de estándares de glicano marcados isotópicamente (los denominados "estándares marcados") para su uso en el análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas complejas de glicanos usando espectrometría de masas. Además se proporcionan métodos para usar estos estándares para analizar cualitativa y/o cuantitativamente la composición de mezclas complejas de glicanos. Estos métodos de análisis pueden tener utilidad en la identificación de marcadores de glicano asociados a trastornos particulares y patologías y otros procesos biológicos.
- En términos generales, la presente invención incluye métodos para la síntesis de glicanos marcados isotópicamente (incluyendo glicoconjugados) que comprende tratar un glicano que comprende al menos dos unidades de azúcar con un agente de acilación marcado isotópicamente para incorporar marcadores isotópicos en estructuras de glicano.
- Estos oligosacáridos marcados isotópicamente son estructuras de núcleo de oligosacárido que pueden usarse entonces para sintetizar bibliotecas de estándares de glicano marcados isotópicamente a través de etapas de derivación enzimática, es decir, diversificación por una o más etapas catalizadas por enzimas. Esto representa un avance significativo en los métodos para la detección cualitativa (y cuantitativa) de glicanos particulares.
- Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la síntesis de un oligosacárido marcado isotópicamente, comprendiendo el método:
- acilar un oligosacárido con un agente de acilación marcado isotópicamente, en el que el oligosacárido está opcionalmente protegido con uno o más grupos protectores.
- En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para la síntesis de un glicano marcado

isotópicamente para su uso como patrón interno de espectrometría de masas, comprendiendo el método:

5 acilar una estructura de núcleo de oligosacárido con un agente de acilación marcado isotópicamente, en el que la estructura de núcleo de oligosacárido está opcionalmente protegida con uno o más grupos protectores, para obtener una estructura de núcleo de oligosacárido marcada isotópicamente; y derivar enzimáticamente el oligosacárido isotópicamente marcado resultante para obtener el glicano marcado isotópicamente.

10 La derivación enzimática, que también se puede denominar diversificación enzimática, como se usa en el presente documento, se refiere a someter un oligosacárido como se describe en el presente documento a una reacción catalizada por enzimas. Las reacciones de derivación/diversificación enzimática adecuadas incluyen:

- 15 - Elongación: la adición de (a) una o más unidades de azúcar adicionales al oligosacárido, normalmente a través de una reacción de condensación con un donante de azúcar adecuado usando una glicosiltransferasa. La elongación puede producirse en un extremo del oligosacárido, o en una unidad de azúcar intermedio.
- Truncamiento: la eliminación de (a) una o más unidades de azúcar de un extremo del oligosacárido. Esto es normalmente a través de una reacción de hidrólisis con una hidrolasa.
- Epimerización: la inversión total o parcial de un estereocentro en la molécula. Esto es normalmente catalizado por una epimerasa.
- 20 - Transglicosilación (reacciones de transferencia de glicosilo): la transferencia de una unidad de azúcar de un donante a un aceptor; es decir, un oligosacárido pierde una unidad de azúcar, es decir, se trunca, mientras que otro oligosacárido gana una unidad de azúcar (es decir, se alarga). Estas reacciones pueden estar catalizadas por una sintetasa o transglicosidasa.
- 25 - Modificación postraducciona: se puede incorporar otra funcionalización durante la derivación enzimática. Las modificaciones postraduccionales comunes son conocidas en la técnica, y pueden incluir, sin limitación, fosforilación, sulfatación y acilación.

30 Normalmente, tales etapas de derivación catalizada por enzimas son quimio-selectivas. Se apreciará que el primer aspecto de la presente invención proporciona métodos para la generación conveniente de un gran número de estructuras de glicano marcadas isotópicamente para su uso como patrones internos de espectrometría de masas a partir de oligosacáridos de núcleo "relativamente pequeños", como se describe en el presente documento.

35 En algunas realizaciones, la etapa de derivación enzimática comprende una etapa de hidrólisis enzimática para eliminar una unidad terminal de azúcar. Esto permite el acceso a patrones asimétricos derivados, por ejemplo, del núcleo de N-glicano heptasacárido biantenarico, sintetizado como se describe en el presente documento.

40 En algunas realizaciones, la etapa de derivación enzimática comprende una etapa de elongación enzimática del glicano resultante con una glicosiltransferasa y un donante de azúcar adecuado. En la técnica se conocen métodos convenientes de elongación enzimática (Blixt, 2006; Ruiz, 2001; Serna, 2010, Zou, 2011) y se describen adicionalmente a continuación. Los donantes de azúcar adecuados pueden ser mono, oligo o polisacáridos. En algunas realizaciones, la etapa de elongación enzimática se repite una o más veces. En realizaciones en las que se repite la etapa de elongación enzimática, preferiblemente el donante de azúcar en cada etapa es un donante de azúcar monosacárido adecuado.

45 En algunas realizaciones, el donante de azúcar en la etapa de elongación enzimática está marcado isotópicamente. En realizaciones en las que se repite la etapa de elongación enzimática, el donante de azúcar en una etapa de elongación enzimática puede marcarse isotópicamente independientemente de si el donante de azúcar en cualquier otra etapa de elongación enzimática está o no marcado isotópicamente. El donante de azúcar puede marcarse isotópicamente con cualquier forma isotópica adecuada de un átomo en cualquier posición adecuada. De esta manera, se pueden incorporar unidades de monosacárido marcadas isotópicamente adicionales en el oligosacárido marcado isotópicamente. Esto puede tener utilidad en el análisis de glicanos usando patrones de fragmentación obtenidos en métodos MS-MS y para generar diferentes isotopólogos de una estructura de glicano particular para ayudar al análisis cuantitativo preciso como se describe a continuación.

50 Se apreciará que la etapa de derivación enzimática puede comprender una única etapa catalizada por enzimas, o puede incluir más de una etapa catalizada por enzimas en secuencia. Por ejemplo, la etapa de derivación enzimática puede ser una sola etapa de hidrólisis o elongación, o puede incluir más de una etapa de hidrólisis y/o elongación para generar las estructuras de glicano deseadas. Por ejemplo, un núcleo de oligosacárido marcado isotópicamente puede elongarse secuencialmente, o truncarse y después elongarse (secuencialmente). Un oligosacárido marcado isotópicamente también puede elongarse y después truncarse en una posición diferente. Puede ser deseable un ordenamiento diferente de las etapas para adaptarse a la especificidad de las enzimas utilizadas. En el presente documento se proporcionan ejemplos representativos no limitantes.

65 Tal como se usa en el presente documento, el término oligosacárido pertenece a polímeros sacáridos que comprenden al menos dos azúcares simples (unidades monosacárido). En algunas realizaciones, el oligosacárido es un disacárido. En algunas realizaciones, el oligosacárido es un trisacárido. En algunas realizaciones, el oligosacárido

es un tetrasacárido. En algunas realizaciones, el oligosacárido es un pentasacárido. En algunas realizaciones, el oligosacárido es un hexasacárido. En algunas realizaciones, el oligosacárido es un heptasacárido. En algunas realizaciones, el oligosacárido es un oligómero superior. El oligosacárido puede ser lineal o ramificado (también denominado antenarío).

5 El oligosacárido puede comprender uno o más grupos hidroxilo o amino, cada uno de los cuales puede protegerse independientemente con un grupo protector. En algunas realizaciones, los grupos hidroxilo y/o amino libres no están protegidos. En otras realizaciones, algunos o todos los grupos hidroxilo presentes están protegidos. En algunas realizaciones, está presente al menos un grupo amino primario y/o secundario protegido.

10 Los grupos protectores adecuados para grupos hidroxilo y amino son conocidos en la técnica. Puramente a modo de ejemplo, y sin limitación, los grupos protectores adecuados para su uso en la presente invención se analizan a continuación. En algunas realizaciones, los grupos protectores se seleccionan para ser ortogonales entre sí para facilitar la desprotección selectiva y la manipulación química en las posiciones deseadas sobre el oligosacárido.

15 Preferentemente, el oligosacárido comprende al menos un grupo  $-NH_2$  libre y la acilación se produce en el grupo  $-NH_2$  libre. Cuando está presente más de un grupo  $NH_2$  libre, puede producirse acilación en cada grupo  $-NH_2$  libre.

20 Los presentes inventores han encontrado que los motivos de núcleo semi-protegidos son sustratos adecuados para la derivación enzimática quimioselectiva. Además, la presencia de los grupos protectores puede tener ventajas particulares. Por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, los grupos bencílicos pueden actuar como cromóforos para la detección de picos durante el análisis y la purificación por HPLC, y pueden facilitar la separación de diferentes productos, por ejemplo, glicanos isoméricos.

25 Por consiguiente, en algunos métodos descritos en el presente documento, los oligosacáridos de núcleo marcados isotópicamente están parcialmente protegidos durante la etapa de derivación enzimática. De manera adecuada, los grupos protectores son grupos bencilo opcionalmente sustituidos, preferiblemente grupos  $-CH_2Ph$ , presentes en uno o más grupos hidroxilo.

30 Por ejemplo, los métodos descritos en el presente documento pueden incluir al menos una etapa de derivación enzimática en un oligosacárido parcialmente protegido marcado isotópicamente, seguido de una etapa de desprotección. Seguidamente pueden seguirse entonces etapas adicionales de derivación enzimática. Por ejemplo, el oligosacárido parcialmente protegido puede estar parcialmente bencilado. De manera adecuada, cuando el oligosacárido tiene uno o más grupos bencilo, la etapa de desprotección puede ser hidrogenación.

35 En algunas realizaciones, En algunas realizaciones, el oligosacárido comprende un motivo de disacárido, comprendiendo el motivo de disacárido una primera unidad de monosacárido y una segunda unidad de monosacárido, en el que al menos una de la primera unidad de monosacárido y/o segunda unidad de monosacárido comprende un grupo amino y se produce acilación en el grupo o grupos amino. En realizaciones en las que el oligosacárido comprende más de dos unidades de monosacárido, el motivo disacárido puede estar situado en un extremo de la cadena sacárida, que puede ser un extremo reductor o no reductor. En realizaciones en las que el oligosacárido comprende más de cuatro unidades de monosacárido, el motivo disacárido puede estar situado en un extremo o en una posición intermedia dentro de la cadena sacárida.

45 El monosacárido que comprende un grupo amino es preferiblemente un monosacárido de amino azúcar. En términos generales, cualquier monosacárido de amino azúcar que tenga al menos un grupo  $-NH_2$  puede ser adecuado como al menos una de la primera unidad de monosacárido y/o segunda unidad de monosacárido en los métodos del primer aspecto de la presente invención. Los ejemplos de amino azúcares adecuados incluyen, pero no se limitan a, hexosaminas y derivados de las mismas. Los ejemplos de monosacáridos de amino azúcar adecuados incluyen, pero no se limitan a, glucosamina (GlcN), galactosamina (GalN), manosamina (ManN), fructosamina (FruN), fucosamina (FucN), ácido murámico (Mur), ácido neuramínico (Neu), daunosamina, y perosamina.

50 Otros derivados de amino azúcares también pueden ser adecuados para su uso de acuerdo con la presente invención. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la primera unidad de monosacárido y/o segunda unidad de monosacárido es un derivado desacetilo de un N-acetilamino azúcar. Los ejemplos adecuados, además de los enumerados anteriormente, incluyen, por ejemplo, desacetil aspartilglucosamina. Las unidades de monosacárido pueden estar además sustituidas y comprender una parte de, por ejemplo, un glicósido.

60 La segunda unidad de monosacárido puede ser un segundo amino azúcar, un N-acetilamino azúcar u otra unidad de azúcar. Por ejemplo, y no a modo de limitación, la segunda unidad de monosacárido puede ser una hexosa o pentosa o amino azúcar de la misma, y puede estar además sustituida con, por ejemplo, cadenas de ácidos grasos (por ejemplo, la segunda unidad de monosacárido puede ser el lípido A).

65 En algunas realizaciones en las que el oligosacárido comprende un motivo disacárido, la primera unidad de monosacárido se selecciona de:

GlcN, GalN, ManN, FruN, FucN, Mur, o Neu;

y la segunda unidad de monosacárido se selecciona de:

- 5       Glc, Gal, Man, Rha, Fru, Fuc, GlcN, GalN, ManN, FruN, FucN, Mur, Neu, GlcNAc, GalNAc, ManNAc, FruNAc, FucNAc, MurNAc, NeuNAc, ácido siálico, o inositol.

10       La primera unidad de azúcar monosacárido y la segunda unidad de azúcar monosacárido se pueden disponer en las secuencias, desde el extremo no reductor al extremo no reductor, la primera unidad de monosacárido seguida de la segunda unidad de monosacárido, o la segunda unidad de monosacárido seguida de la primera unidad de monosacárido.

En una realización, la secuencia es:

- 15       primer monosacárido - segundo monosacárido.

En una realización, la secuencia es:

- 20       segundo monosacárido - primer monosacárido.

25       En algunas realizaciones preferidas, la primera y segunda unidades de monosacárido del motivo disacárido del oligosacárido se seleccionan de entre las unidades de monosacárido asociadas a núcleos de N- y -O-glicano y sus formas des-acetilo. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la primera unidad de monosacárido es glucosamina o galactosamina y la segunda unidad de monosacárido se selecciona de manosa, galactosa, glucosamina, galactosamina, N-acetil-glucosamina, o N-acetil-galactosamina. En algunas realizaciones, la primera unidad de monosacárido es glucosamina y la segunda unidad de monosacárido se selecciona de manosa, galactosa, glucosamina, galactosamina, N-acetil-glucosamina, o N-acetil-galactosamina, preferiblemente de entre manosa o glucosamina. En algunas realizaciones, la primera unidad de monosacárido es galactosamina y la segunda unidad de monosacárido se selecciona de entre manosa, galactosa, glucosamina, galactosamina, N-acetil-glucosamina, o N-acetil-galactosamina, preferiblemente de entre manosa o glucosamina.

En algunas realizaciones, el método comprende hacer reaccionar un oligosacárido que comprende un motivo seleccionado de:

- 35       GlcN-GlcN

Gal-GalN

GalN-GlcN

40       con un agente de acilación marcado isotópicamente. Pueden estar presentes unidades de monosacárido adicionales en los extremos reductores y/o no reductores.

En algunas realizaciones, el método comprende hacer reaccionar un oligosacárido que comprende el motivo:

- 45       Man-GlcN-GlcN

con un agente de acilación marcado isotópicamente. Pueden estar presentes unidades de monosacárido adicionales en los extremos reductores y/o no reductores.

50       En una realización preferida, el método comprende hacer reaccionar un oligosacárido que comprende el motivo:

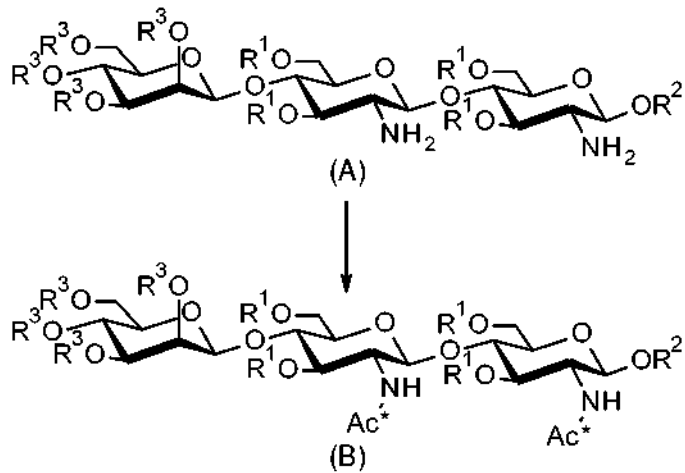
Man-GlcN-GlcN

55       con un agente de acetilación marcado isotópicamente para obtener un oligosacárido que comprende el motivo:

Man-GlcNAc\*-GlcNAc\*

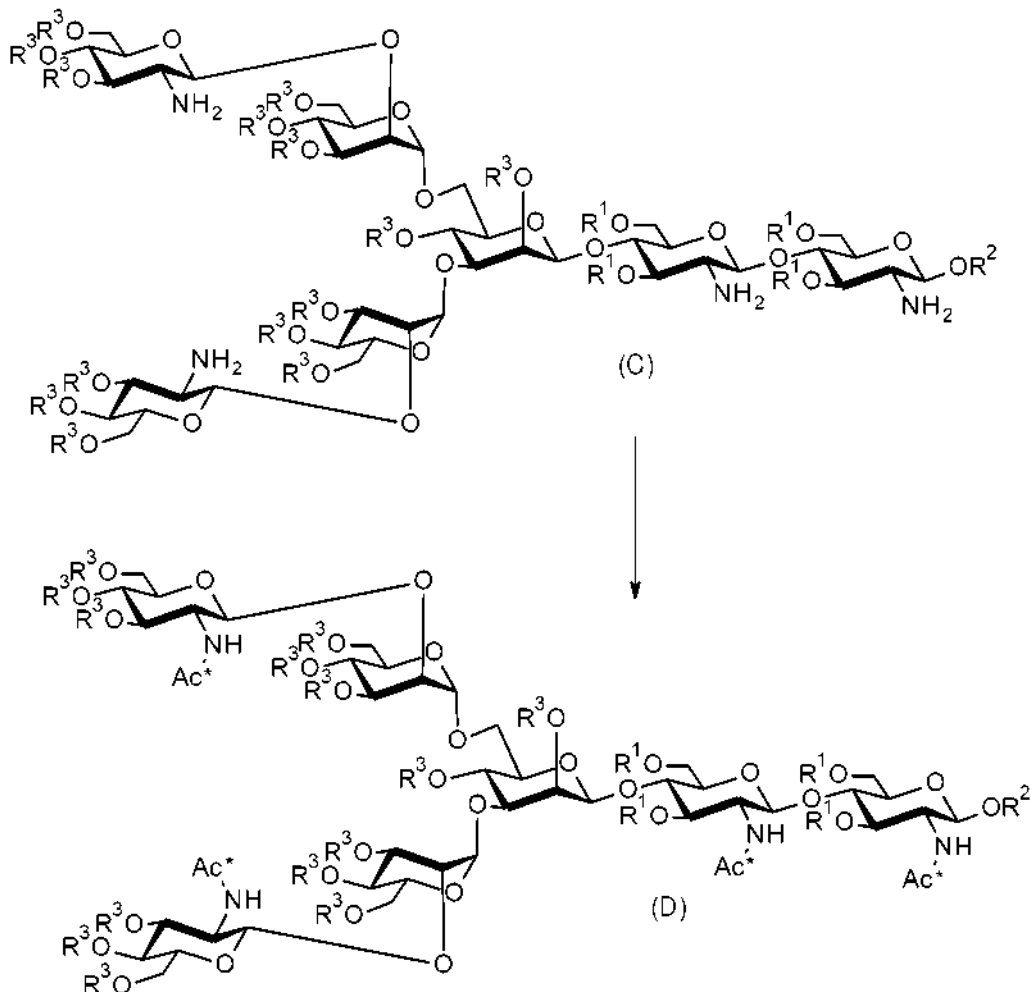
en el que Ac\* es un grupo acetilo marcado isotópicamente.

60       En algunas realizaciones, el método comprende hacer reaccionar un oligosacárido de fórmula (A) con un agente de acetilación marcado isotópicamente en condiciones adecuadas para formar un oligosacárido de fórmula (B):



en la que:

- 5 cada  $R^1$  es independientemente H o un grupo protector;  
 $R^2$  es independientemente H o un grupo protector;  
 cada  $R^3$  independientemente es H, un grupo protector, o  $(\text{Sac})_m$ , en la que cada Sac es una unidad de monosacárido y m es un número entre 1 y 50.
- 10 En algunas realizaciones, el método comprende hacer reaccionar un oligosacárido de fórmula (C) con un agente de acetilación marcado isotópicamente en condiciones adecuadas para formar un oligosacárido de fórmula (D):



15 en la que:

cada  $R^1$  es independientemente H o un grupo protector;  
 $R^2$  es independientemente H o un grupo protector;  
 cada  $R^3$  es independientemente H, un grupo protector, o  $(\text{Sac})_m$  en la que cada  
 Sac es una unidad de monosacárido y m es un número entre 1 y 50.

5 Como se ha definido anteriormente, en algunas realizaciones, cada  $R^1$ ,  $R^2$  y  $R^3$  puede ser independientemente un grupo protector. Los grupos protectores pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, si más de un  $R^3$  es un grupo protector, cada  $R^3$  puede ser igual que, o diferente de, cualquier otro grupo protector. En algunas realizaciones, al menos un  $R^3$  es  $(\text{Sac})_m$ , en la que m es un número entre 1 y 50. En realizaciones en las que más de un  $R^3$  es  $(\text{Sac})_m$ , cada  $(\text{Sac})_m$  puede ser independientemente igual o diferente de cualquier otro  $(\text{Sac})_m$  en la molécula.

En algunas realizaciones, m es un número entre 1 y 20.

En algunas realizaciones, m es un número entre 1 y 10.

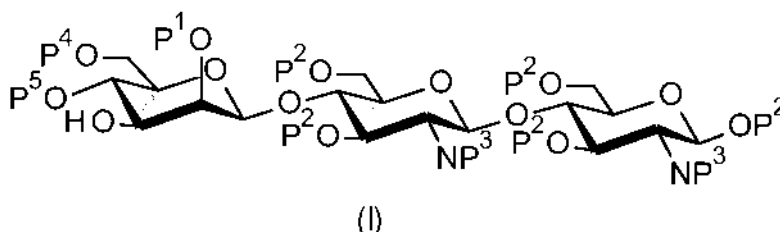
En algunas realizaciones, m es un número entre 1 y 5.

15 En algunas realizaciones, m es 1 o 2.

En algunas realizaciones,  $R^2$  es H. En algunas realizaciones, cada  $R^3$  es H. En una realización preferida, cada  $R^1$  es bencilo,  $R^2$  es H, y cada  $R^3$  es H.

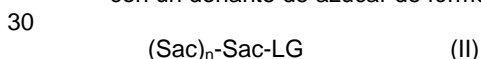
20 En algunas realizaciones, el método comprende:

glicosilar un oligosacárido de fórmula (I):



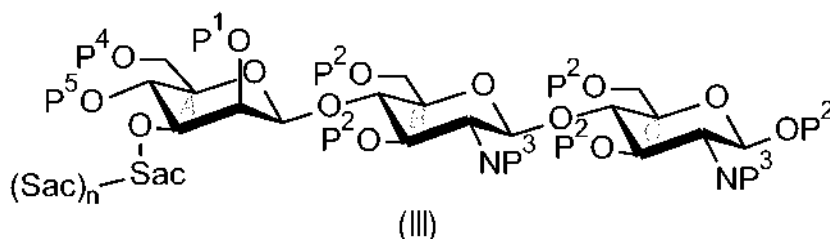
25 en la que cada uno de  $P^1$ ,  $P^2$ ,  $P^3$ ,  $P^4$ , y  $P^5$  es independientemente un grupo protector, u opcionalmente  $P^4$  y  $P^5$  juntos forman un grupo acetal;

con un donante de azúcar de fórmula general (II):



en la que cada Sac es una unidad de monosacárido, n es un número entre 0 y 50, y -LG representa la posición anomérica no glicosilada del donante de azúcar cebado con un grupo saliente adecuado;

35 para dar un oligosacárido de fórmula (III):



40 eliminar  $P^4$  para revelar un grupo hidroxilo y glicosilar el grupo hidroxilo resultante con un donante de azúcar de fórmula general (II);

eliminar cada grupo  $P^3$  para revelar un grupo amino libre y acetilar cada grupo amino libre resultante con un agente de acetilación marcado isotópicamente.

45 En algunas realizaciones, n es un número entre 0 y 20.

En algunas realizaciones, n es un número entre 0 y 10.

En algunas realizaciones, n es un número entre 0 y 5.

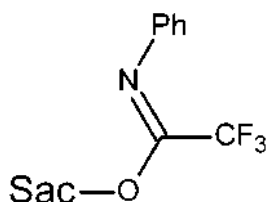
En algunas realizaciones, n es 0 o 1.

50



Se conocen en la técnica donantes de azúcar adecuados y pueden incluir, sin limitación, haluros de glicosilo, por ejemplo, fluoruros y bromuros de glicosilo; fosfatos de glicosilo, trihaloacetimidatos de glicosilo, n-pentenil glucósidos (y más generalmente, hemiacetales adecuados, ortoésteres y donantes de glicosilo sustituidos con 1-oxígeno) y tio-glucósidos. La reactividad de un donador de azúcar puede depender de la naturaleza de cualquier grupo protector presente. Los donantes de azúcar pueden estar desarmados (por ejemplo, mediante protección con grupos acetilo), armados (por ejemplo, mediante protección con grupos bencilo) o súper armados (por ejemplo, mediante protección con grupos sililo voluminosos).

En algunas realizaciones preferidas, el grupo saliente donador de azúcar comprende un grupo trihaloacetimidato, preferiblemente un grupo trifluoroacetimidato, tal como, por ejemplo:



En algunas realizaciones, el método comprende la etapa de glicosilar la posición C2 de la unidad de monosacárido A para obtener un glicano bi-anterior. En algunas realizaciones, el método comprende la etapa de glicosilar la posición C4 de la unidad de monosacárido A. La glicosilación en la posición C4 puede seguir a la glicosilación en la posición C2 para producir un glicano tri-antenario, o puede ocurrir sin una etapa de C2-glicosilación anterior para producir un glicano bi-anterior. En realizaciones en las que el método comprende glicosilación tanto en C2 como en C4 de la unidad de monosacárido A, las etapas de glicosilación pueden producirse en cualquier orden.

La glicosilación quimio-selectiva puede ser catalizada enzimáticamente y/o puede ser facilitada por estrategias de protección selectiva y/o protección de grupos.

Preferentemente, el núcleo de oligosacárido utilizado para la derivación enzimática comprende de 3 a 9 unidades de monosacárido.

En algunas realizaciones de los métodos de la presente invención, el agente de acilación marcado isotópicamente puede ser un haluro de acilo o un anhídrido de un ácido carboxílico adecuado. En algunas realizaciones preferidas, el agente de acilación marcado isotópicamente es anhídrido acético isotópicamente marcado, preferiblemente  $(^{13}\text{CH}_3\text{C}=\text{O})_2\text{O}$ ,  $(^{13}\text{CH}_3\text{C}=\text{O})_2\text{O}$ ,  $(\text{CH}_3\text{C}=\text{O})_2\text{O}$ ,  $(\text{CD}_3\text{C}=\text{O})_2\text{O}$ ,  $(^{13}\text{CD}_3\text{C}=\text{O})_2\text{O}$ ,  $(^{13}\text{CD}_3\text{C}=\text{O})_2\text{O}$ , o  $(\text{CD}_3\text{C}=\text{O})_2\text{O}$ . En algunas realizaciones, el agente de acilación marcado isotópicamente es  $(^{13}\text{CH}_3\text{C}=\text{O})_2\text{O}$ .

En algunas realizaciones de la presente invención, cada  $\text{Ac}^*$ , si está presente, se selecciona de entre -  $(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ ,  $-(^{13}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})\text{CD}_3$ ,  $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CD}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CD}_3$ ,  $-(^{13}\text{C}=\text{O})\text{CD}_3$ ,  $-(^{14}\text{C}=\text{O})^{14}\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{14}\text{CH}_3$ ,  $-(^{14}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{17}\text{CH}_3$ ,  $-(^{17}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{17}\text{CH}_3$ ,  $-(^{17}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{18}\text{CH}_3$ ,  $-(^{18}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{18}\text{CH}_3$ ,  $-(^{18}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ .

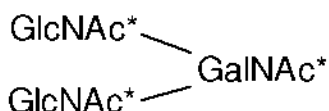
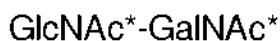
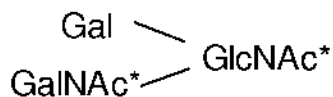
En algunas realizaciones de la presente invención, cada  $\text{Ac}^*$ , si está presente, se selecciona de entre  $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ ,  $-(^{13}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})\text{CD}_3$ ,  $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CD}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CD}_3$ ,  $-(^{13}\text{C}=\text{O})\text{CD}_3$ ,  $-(^{14}\text{C}=\text{O})^{14}\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{14}\text{CH}_3$ ,  $-(^{14}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{17}\text{CH}_3$ , o  $-(\text{C}=\text{O})^{18}\text{CH}_3$ .

En algunas realizaciones de la presente invención, cada  $\text{Ac}^*$ , si está presente, se selecciona de entre  $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ ,  $-(^{13}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})\text{CD}_3$ ,  $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CD}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CD}_3$  o  $-(^{13}\text{C}=\text{O})\text{CD}_3$ . En algunas realizaciones de la presente invención, cada  $\text{Ac}^*$ , si está presente, se selecciona de entre  $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ , o  $-(^{13}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ . En algunas realizaciones de los métodos, cada  $\text{Ac}^*$ , si está presente, es  $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ .

En algunas realizaciones, los métodos de acuerdo con el primer aspecto comprenden además la formación de una oxazolina en una posición anomérica libre de una unidad de acetil-hexosamina en el oligosacárido marcado isotópicamente. La glicosil oxazolina marcada isotópicamente resultante se puede usar entonces para preparar un glicoconjugado marcado isotópicamente.

En algunas realizaciones, los métodos de acuerdo con el primer aspecto comprenden además la glicosilación de un péptido, lípido o proteína para obtener un glicopéptido marcado isotópicamente, peptidoglicano, glicolípido, glicoproteína que comprende el oligosacárido marcado isotópicamente.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un glicano que comprende un motivo seleccionado de entre:



5 en el que cada Ac\* está marcado isotópicamente. El término glicano, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sacárido en forma libre o que forma una porción de carbohidrato de un glicoconjugado.

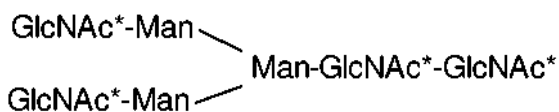
En algunas realizaciones, el motivo es:



10

en el que cada Ac\* está marcado isotópicamente.

En algunas realizaciones, el glicano comprende el motivo:



15

en el que cada Ac\* está marcado isotópicamente.

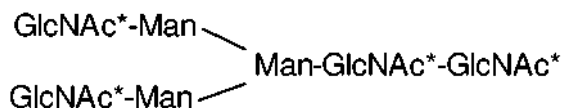
En algunas realizaciones, cada Ac\*, si está presente, se selecciona de entre - (<sup>13</sup>C=O)<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>, -(C=O)<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>, - (<sup>13</sup>C=O)CH<sub>3</sub>, -(C=O)CD<sub>3</sub>, -(<sup>13</sup>C=O)<sup>13</sup>CD<sub>3</sub>, -(C=O)<sup>13</sup>CD<sub>3</sub>, -(<sup>13</sup>C=O)CD<sub>3</sub>, -(<sup>14</sup>C=O)<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>, -(C=O)<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>, -(<sup>14</sup>C=O)CH<sub>3</sub>, - (C=<sup>17</sup>O)CH<sub>3</sub>, o -(C=<sup>18</sup>O)CH<sub>3</sub>

20

En algunas realizaciones, el glicano comprende una o más unidades de monosacárido adicionales, en las que cada monosacárido adicional, si está presente, puede estar marcado isotópicamente de forma independiente.

- 25 En algunas realizaciones, el número de unidades monosacárido adicionales es mayor de 10.
- En algunas realizaciones, el número de unidades monosacárido adicionales es mayor de 30.
- En algunas realizaciones, el número de unidades monosacárido adicionales es mayor de 50.
- En algunas realizaciones, el número de unidades monosacárido adicionales es mayor de 100.

30 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un glicano que tiene la estructura:



35 Esta estructura es un sustrato de oligosacárido de núcleo especialmente adecuado para la derivación enzimática para proporcionar diversos N-glicanos marcados isotópicamente.

Cuando cada Ac\* es -(<sup>13</sup>C=O)<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>, esta estructura se denomina en el presente documento <sup>13</sup>C<sub>8</sub>-G0. Como se describe en este documento, puede haber ventajas en el uso de un oligosacárido de núcleo semi-prottegido como sustrato para la derivación enzimática. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los cinco restos hidroxilo en el extremo reductor GlcNAc\*-GlcNAc\* llevan grupos bencilo opcionalmente sustituidos. Cuando cada Ac\* es - (<sup>13</sup>C=O)<sup>13</sup>CH<sub>3</sub> y estos cinco hidroxilo llevan cada uno un resto PhCH<sub>2</sub>-, la estructura se denomina en el presente documento <sup>13</sup>C<sub>8</sub>-G0 (Bn<sub>5</sub>).

40

45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para identificar un glicano en una muestra, comprendiendo el método la adición de un patrón etiquetado que comprende un glicano marcado isotópicamente a la muestra para obtener una muestra dopada, y analizar la muestra dopada usando espectrometría de masas. En

realizaciones preferentes, el glicano marcado isotópicamente es un glicano marcado isotópicamente de acuerdo con la presente invención y/o puede obtenerse como se describe en el presente documento.

5 Preferentemente, el patrón etiquetado comprende un glicano marcado isotópicamente que es un isotopólogo de un glicano sospechoso de estar presente en la muestra. En algunas realizaciones, el patrón etiquetado comprende más de un glicano marcado isotópicamente. En algunas realizaciones, pueden añadirse más de un patrón etiquetado a la muestra para obtener la muestra dopada. En algunas realizaciones, se pueden añadir más de un glicano marcado isotópicamente para facilitar la identificación simultánea de glicanos múltiples en una muestra.

10 Una ventaja de los métodos de la presente invención sobre los métodos conocidos en la técnica anterior es que el marcado del glicano o glicanos en la muestra para incorporar una etiqueta no es necesario, evitando problemas de reproducibilidad de procedimientos de marcado y reacciones secundarias. Además, las fuentes de variabilidad experimental que pueden estar presentes en métodos conocidos en la técnica se anulan, ya que tanto el glicano o los glicanos marcados isotópicamente (en el patrón etiquetado) como el analito o analitos se analizan en el mismo  
15 experimento y se tratan usando los mismos procedimientos. Cada glicano marcado isotópicamente ioniza con la misma eficacia que el analito correspondiente, pero es fácilmente identificable por su aumento de masa fijo. En algunas realizaciones, el patrón marcado tiene un espectro de espectrometría de masas predeterminado, que puede facilitar el análisis de la muestra dopada permitiendo que los picos de iones asociados al glicano marcado isotópicamente sean identificados fácilmente.

20 En realizaciones preferentes, se añade una cantidad conocida del glicano marcado isotópicamente a la muestra de tal manera que el contenido de glicano de la muestra se puede cuantificar por comparación de la intensidad relativa de los picos de iones asociados al glicano y el glicano marcado isotópicamente. A continuación se proporcionan detalles adicionales con respecto a la cuantificación del contenido de glicano. Por consiguiente, a través de la  
25 adición de una cantidad conocida del glicano marcado isotópicamente, un analito puede cuantificarse en términos absolutos incluso en un biofluido complejo. En algunas realizaciones, pueden añadirse cantidades conocidas de más de un glicano marcado isotópicamente para facilitar la identificación y cuantificación simultáneas de glicanos múltiples en una muestra.

30 En algunas realizaciones, el método comprende:

- (i) seleccionar un patrón etiquetado que comprende uno o más glicanos marcados isotópicamente;
- (ii) añadir el patrón etiquetado a la muestra para obtener una muestra dopada;
- (iii) analizar la muestra dopada usando espectrometría de masas para obtener picos de iones;
- 35 (iv) comparar la identidad y la intensidad de los picos de iones asociados al patrón etiquetado con los picos de iones adicionales en el espectro de la muestra dopada.

En algunas realizaciones preferidas, el patrón etiquetado se selecciona para corresponder con el contenido de glicano que se sospecha de la muestra. Por ejemplo, y no a modo de limitación, si se sospecha que una muestra  
40 comprende una combinación de tres especies de glicano, se puede seleccionar un patrón etiquetado que comprende isotopólogos de estos tres glicanos.

El glicano o glicanos pueden derivarse antes del análisis de la muestra dopada. Las etapas de derivación pueden incluir, por ejemplo, permetilación o derivación de residuos de ácido siálico, si están presentes, y pueden comprender una etapa de limpieza. En algunas realizaciones, la derivación comprende tratamiento con glicosidasa para la eliminación de ácidos siálicos u otras unidades de azúcares terminales.  
45

En algunas realizaciones preferidas, la espectrometría de masas es MALDI-ToF, ESI-ToF por infusión directa o LC-MS, y puede comprender además fragmentación por espectrometría de masas en tándem (a veces llamada MS-MS), que puede facilitar la identificación del analito y permitir que los analitos isobáricos se distingan en mezclas complejas. La fragmentación puede conseguirse usando, por ejemplo, disociación inducida por colisión (CID), disociación por captura de electrones (ECD), disociación por transferencia de electrones (ETD), disociación infrarroja multifotónica (IRMPD), disociación radiactiva infrarroja del cuerpo negro (BIRD), disociación de separación de electrones (EDD) o disociación inducida por la superficie (SID), o cualquier otro método adecuado.  
50

En algunas realizaciones, la muestra es un biofluido complejo, y el glicano en la muestra puede ser, por ejemplo, un glicano liberado a partir de una glicoproteína o anticuerpo recombinante. El glicano en la muestra puede ser un biomarcador asociado a una enfermedad o trastorno médico, o un proceso biológico, y en algunas realizaciones preferidas, el método comprende además correlacionar la presencia o cantidad de uno o más glicanos como un  
55 indicador de una enfermedad o trastorno médico, o un proceso biológico. Sin limitación, la enfermedad o trastorno médico puede seleccionarse de entre cáncer, un trastorno cardiovascular, una enfermedad inflamatoria de la piel, diabetes mellitus, un trastorno gastrointestinal, un trastorno hepático, anemia, una enfermedad o trastorno inmunológico, enfermedad autoinmune, artritis, incluyendo artritis reumatoide, una enfermedad infecciosa, nefropatía, un trastorno neurológico, un trastorno pulmonar o un trastorno congénito de la glicosilación.

65 Estos métodos pueden realizarse *in vitro*.

También se describe en el presente documento un método para diagnosticar un paciente sospechoso de tener una enfermedad asociada a un glicano, comprendiendo el método:

- 5 (i) obtener una muestra sospechosa de contener el glicano;
- (ii) seleccionar un patrón etiquetado que comprende un glicano marcado isotópicamente correspondiente al glicano asociado a la enfermedad;
- (iii) añadir el patrón etiquetado a la muestra para obtener una muestra dopada;
- (iv) analizar la muestra dopada usando espectrometría de masas para obtener picos de iones;
- 10 (v) comparar la identidad y la intensidad de los picos de iones asociados al patrón etiquetado con los picos de iones adicionales en el espectro de la muestra dopada;
- (vi) usar la presencia de dicho glicano para ayudar al diagnóstico de la enfermedad o trastorno.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un glicano marcado isotópicamente como se describe en el presente documento para su uso en un método de diagnóstico, comprendiendo el método:

- 15 (i) obtener una muestra sospechosa de contener un glicano asociado a una enfermedad o trastorno de un paciente;
- (ii) seleccionar un patrón etiquetado que comprende un glicano marcado isotópicamente correspondiente al glicano asociado a la enfermedad o trastorno;
- 20 (iii) añadir el patrón etiquetado a la muestra para obtener una muestra dopada;
- (iv) analizar la muestra dopada usando espectrometría de masas para obtener picos de iones;
- (v) comparar la identidad y la intensidad de los picos de iones asociados al patrón etiquetado con los picos de iones adicionales en el espectro de la muestra dopada para identificar, y opcionalmente cuantificar, la presencia de uno o más glicanos en la muestra;
- 25 (vi) usar la presencia de dichos uno o más glicanos para diagnosticar la enfermedad o trastorno.

También se describe en el presente documento un glicano marcado isotópicamente como se describe en el presente documento para su uso en un método de diagnóstico, y métodos de diagnóstico, comprendiendo el método:

- 30 (i) seleccionar un patrón etiquetado que comprende un glicano marcado isotópicamente correspondiente a un glicano asociado a una enfermedad o trastorno;
- (iii) añadir el patrón etiquetado a una muestra que se ha obtenido de un paciente para obtener una muestra dopada;
- (iv) analizar la muestra dopada usando espectrometría de masas para obtener picos de iones;
- 35 (v) comparar la identidad y la intensidad de los picos de iones asociados al patrón etiquetado con los picos de iones adicionales en el espectro de la muestra dopada para identificar, y opcionalmente cuantificar, la presencia de uno o más glicanos en la muestra;
- (vi) usar la presencia de dichos uno o más glicanos para diagnosticar la enfermedad o trastorno.

40 Las muestras obtenidas de pacientes pueden obtenerse usando métodos conocidos en la técnica. De manera adecuada, dado que el glicano o los glicanos en el material biológico tomado del paciente pueden conjugarse con una cadena principal proteica, la muestra puede obtenerse tomando material biológico de un paciente y eliminando el material de glicano de la cadena principal proteica por tratamiento enzimático o químico (hidrazinólisis). De manera adecuada, el material resultante puede purificarse.

45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit para identificar un glicano en una muestra, comprendiendo el kit:

- 50 (a) un patrón etiquetado, comprendiendo el patrón etiquetado uno o más glicanos marcados isotópicamente;
- (b) instrucciones para dopar una muestra sospechosa de contener un glicano con el patrón etiquetado para obtener una muestra dopada y analizar la muestra dopada usando espectrometría de masas.

Opcionalmente, el kit puede incluir datos de espectrometría de masas para el patrón etiquetado que puede facilitar la identificación de analitos en la muestra a través de la fácil identificación de los picos de iones asociados al patrón etiquetado.

Las instrucciones pueden comprender además la etapa de comparar los picos de iones asociados al patrón etiquetado con los picos de iones adicionales en el espectro de masas.

60 En algunas realizaciones, el patrón etiquetado es una mezcla de glicanos marcados isotópicamente que se sabe que es una combinación asociada a una enfermedad, trastorno o proceso biológico particular.

A continuación se describirán realizaciones de la presente invención a modo de ejemplo y no de limitación con referencia a las figuras adjuntas.

65 "y/o" cuando se usa en el presente documento debe tomarse como descripción específica de cada una de las dos

características o componentes especificados con o sin la otra. Por ejemplo, "A y/o B" debe tomarse como una descripción específica de cada uno de (i) A, (ii) B e (iii) A y B, como si cada uno de ellos se expusiera individualmente en el presente documento.

- 5 A menos que el contexto indique otra cosa, las descripciones y definiciones de las características expuestas anteriormente no se limitan a ningún aspecto o realización particular de la invención, y se aplican igualmente a todos los aspectos y realizaciones que se describen.

### Breve descripción de las Figuras

10 **Figura 1.** Una porción representativa de un espectro de masas de una muestra dopada que muestra los picos de iones asociados a un glicano marcado isotópicamente y un analito correspondiente. Los picos indican la intensidad medida de los picos de iones asociados a los glicanos marcados isotópicamente del patrón etiquetado y los glicanos de analito correspondientes de la muestra.

15 **Figura 2.** Una representación esquemática de posibles combinaciones de etapas de elongación enzimática para proporcionar N-glicanos marcados isotópicamente.

20 **Figura 3.** La síntesis de [(2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-D-mannopiranosil)-(1→6)]-[2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-D-mannopiranosil-(1→3)]-β-D-mannopiranosil-(1→4)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→4)-2-acetamido-2-desoxi-α,β-D-glucopiranososa marcada isotópicamente, en la que cada grupo acetilo está marcado isotópicamente con  $^{13}\text{C}_2$

25 **Figura 4.** La síntesis de [(2-acetamido-β-D-glucopiranosil)-(1→2)-α-D-mannopiranosil)-(1→6)-[di-(2-acetamido-β-D-glucopiranosil)-(1→2)-(1→4)-α-D-mannopiranosil]-(1→3)]-β-D-mannopiranosil-(1→4)-2-acetamido-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→4)-2-acetamido-1,3,6-tri-O-bencil-2-desoxi-β-D-glucopiranosido marcado isotópicamente triantenario, en la que cada grupo acetilo está marcado isotópicamente con  $^{13}\text{C}_2$

30 **Figura 5.** Glicanos obtenidos por síntesis quimio-enzimática: truncamiento enzimático de  $^{13}\text{C}_8$ -G0.

**Figura 6.** Glicanos obtenidos por síntesis quimio-enzimática: fucosilación de  $^{13}\text{C}_6$ -MGN3.

### Descripción detallada

#### 35 Definiciones

##### *Marcado isotópicamente*

40 Tal como se usa en el presente documento, marcaje isotópico, marcado isotópicamente, y otros términos similares se usan como se entiende en la técnica. Concretamente, un compuesto marcado isotópicamente es un compuesto en el que al menos un átomo de posición conocida se enriquece con un isótopo distinto del isótopo natural más abundante para ese elemento. Por ejemplo, metano puede estar marcado isotópicamente con  $^{13}\text{C}$ , y tiene la estructura  $^{13}\text{CH}_4$ , o está marcado con deuterio. Metano marcado con deuterio puede referirse a un compuesto en el que una o más de las cuatro posiciones de átomo de hidrógeno asociadas a un metano están enriquecidas con  $^2\text{H}$  (D).  
45 Las estructuras de metanol marcadas con deuterio comunes incluyen  $\text{CDH}_3$  y  $\text{CD}_4$ .

50 Marcaje isotópico se refiere a un enriquecimiento isotópico por encima de la abundancia natural. Preferentemente, la pureza isotópica en la posición enriquecida es mayor del 50%. Por ejemplo, en metano marcado isotópicamente con  $^{13}\text{C}$ , esto significa que el 50 % o más de las moléculas individuales comprenden un átomo de  $^{13}\text{C}$ . En las realizaciones de la presente invención, la pureza isotópica en la posición o posiciones enriquecidas es preferiblemente mayor del 80 %. Más preferentemente, la pureza isotópica en la posición o posiciones enriquecidas es mayor del 90%.

55 En algunas realizaciones preferidas, la pureza isotópica en la posición o posiciones enriquecidas es mayor del 95%.  
En algunas realizaciones preferidas, la pureza isotópica en la posición o posiciones enriquecidas es mayor del 97%.  
En algunas realizaciones preferidas, la pureza isotópica en la posición o posiciones enriquecidas es mayor del 98%.  
En algunas realizaciones preferidas, la pureza isotópica en la posición o posiciones enriquecidas es mayor del 99%.

##### *Grupo acilo*

60 Tal como se usa en el presente documento, un grupo acilo es un grupo funcional derivado de la eliminación de un grupo hidroxilo de un ácido carboxílico. Los grupos acilo comunes incluyen formilo (metanoilo), acetilo (etanoilo), propionilo (propanoilo), benzoilo, y acrililo (propenoilo). Otros grupos acilo de relevancia biológica incluyen, pero no se limitan a, hidroxietanoilo (glicolilo) y grupos acilo obtenidos a partir de ácidos grasos  $\text{C}_{4-18}$  (por ejemplo, butanoilo, hexanoilo, octanoilo, y decanoilo) y ácidos grasos hidroxilados.

65

La acilación es el proceso de adición de un grupo acilo a un compuesto que utiliza un agente de acilación. En el contexto de la presente invención, la acilación tiene lugar en un grupo funcional nucleófilo, por ejemplo, un grupo amino o un grupo hidroxilo. Cuando está presente más de un grupo nucleófilo, el orden en el que los grupos están acilados se determina por la nucleofilicidad y factores estéricos. Los agentes de acilación comunes incluyen cloruros de acilo y anhídridos de ácido.

Los grupos acilo marcados isotópicamente son aquellos en los que al menos un átomo de posición conocida se enriquece con un isótopo distinto del isótopo natural más abundante para ese elemento, como se define en el presente documento. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, todas las combinaciones de  $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ , H y D de grupos formilo, acetilo, propionilo, benzoílo, y acrililo disponibles. Otros grupos acilo marcados isotópicamente también se pueden usar en los métodos de la presente invención según sea apropiado. Por ejemplo, se puede usar un grupo hidroxietanoílo marcado isotópicamente (tal como, por ejemplo, 1- $^{13}\text{C}_1$ -o  $^{13}\text{C}_2$ -hidroxietanolilo) para proporcionar un isotopólogo de un glicano que contiene una unidad de ácido N-glicolilneurámico. De manera similar, se pueden usar grupos acilo marcados isotópicamente derivados de ácidos grasos para proporcionar isotopólogos de, por ejemplo, Lípido A.

En algunas realizaciones, el grupo acilo marcado isotópicamente es un grupo acetilo marcado isotópicamente. Los grupos acetilo Ac\* preferiblemente marcados isotópicamente incluyen:

- ( $^{13}\text{C}=\text{O}$ ) $^{13}\text{CH}_3$ , -(C=O) $^{13}\text{CH}_3$ , -( $^{13}\text{C}=\text{O}$ )CH<sub>3</sub>,
- (C=O)CD<sub>3</sub>, -( $^{13}\text{C}=\text{O}$ ) $^{13}\text{CD}_3$ , -(C=O) $^{13}\text{CD}_3$ , -( $^{13}\text{C}=\text{O}$ )CD<sub>3</sub>,
- ( $^{14}\text{C}=\text{O}$ ) $^{14}\text{CH}_3$ , -(C=O) $^{14}\text{CH}_3$ , -( $^{14}\text{C}=\text{O}$ )CH<sub>3</sub>,
- (C= $^{17}\text{O}$ )CH<sub>3</sub>, o -(C= $^{18}\text{O}$ )CH<sub>3</sub>.

En realizaciones preferidas de la presente invención, el grupo acetilo Ac\* marcado isotópicamente se selecciona de: -( $^{13}\text{C}=\text{O}$ ) $^{13}\text{CH}_3$ , -(C=O) $^{13}\text{CH}_3$ , o -( $^{13}\text{C}=\text{O}$ )CH<sub>3</sub>. En realizaciones particularmente preferidas de la presente invención, el grupo acetilo marcado isotópicamente Ac\* es - ( $^{13}\text{C}=\text{O}$ ) $^{13}\text{CH}_3$ .

El agente de acilación como se usa en el presente documento se usa tal como se entiende en la técnica, es decir, como un reactivo químico que proporciona un grupo acilo. Los agentes de acilación comúnmente utilizados incluyen cloruro de acilo y anhídridos de ácidos carboxílicos, aunque otros agentes y métodos de acilación serán evidentes para un experto en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, el producto de una reacción entre un reactivo de acoplamiento carboxílico y un reactivo de acoplamiento adecuado. En algunas realizaciones, el agente de acilación marcado isotópicamente es un cloruro de acilo. Los cloruros de acilo adecuados pueden estar comercialmente disponibles, o pueden obtenerse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el tratamiento del correspondiente ácido carboxílico con cloruro de tionilo o cloruro de oxalilo.

En otras realizaciones, el agente de acilación marcado isotópicamente es un anhídrido de un ácido carboxílico, preferiblemente un anhídrido de ácido acético. En algunas realizaciones, el agente de acetilación marcado isotópicamente se selecciona de:

( $^{13}\text{CH}_3$   $^{13}\text{C}=\text{O}$ )<sub>2</sub>O, ( $^{13}\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$ )<sub>2</sub>O, (CH<sub>3</sub>  $^{13}\text{C}=\text{O}$ )<sub>2</sub>O, (CD<sub>3</sub>  $^{13}\text{C}=\text{O}$ )<sub>2</sub>O, ( $^{13}\text{CD}_3$   $^{13}\text{C}=\text{O}$ )<sub>2</sub>O, ( $^{13}\text{CD}_3\text{C}=\text{O}$ )<sub>2</sub>O, o (CD<sub>3</sub>  $^{13}\text{C}=\text{O}$ )<sub>2</sub>O.

En algunas realizaciones preferidas, el agente de acetilación marcado isotópicamente es (13CH<sub>3</sub>  $^{13}\text{C}=\text{O}$ )<sub>2</sub>O.

En algunas realizaciones, puede usarse un agente de acilación con  $^{14}\text{C}$ , preferiblemente un anhídrido acético marcado con  $^{14}\text{C}$ . Los glicanos resultantes, marcados con  $^{14}\text{C}$ , pueden tener utilidad como patrones para la cuantificación de glicanos usando autorradiografía.

#### Grupo protector

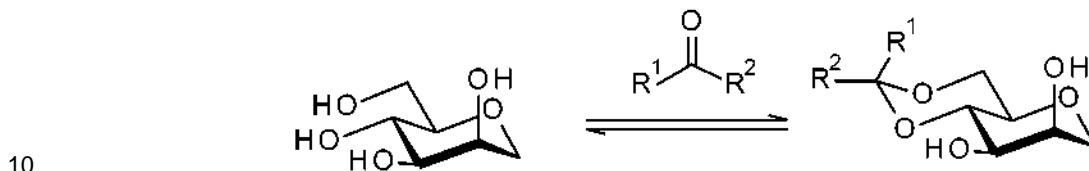
Tal como se usa en el presente documento, grupo protector se refiere a un resto que se introduce en una molécula por modificación química de un grupo funcional con el fin de obtener la quimio-selectividad durante una reacción posterior o prevenir la degradación no deseada o reacciones secundarias durante la reacción posterior. Un grupo protector también puede referirse a un grupo enmascarado o enmascarante o un grupo bloqueado o de bloqueo. Mediante la protección de un grupo funcional reactivo, pueden realizarse reacciones que implican otros grupos funcionales reactivos no protegidos, sin afectar al grupo protegido; el grupo protector puede ser eliminado, usualmente en una etapa posterior, sin afectar sustancialmente al resto de la molécula. Véase, por ejemplo, "Protective Groups in Organic Synthesis" (T. Green y P. Wuts, Wiley, 1999).

Los ejemplos de grupos protectores se conocen bien en la técnica, y los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustración y no a modo de limitación.

Por ejemplo, un grupo hidroxilo puede estar protegido como un éter (-OR) o un éster (-OC(=O)R), por ejemplo, como: un éter t-butílico; a metoximetilo (MOM) o metoxietoximetil (MEM) éter; un bencilo (Bn), benzhidrido (difenilmetilo), o tritil (trifenilmetilo) éter; un trimetilsililo o t-butildimetilsilil éter; o un acetil éster (-OC(=O)CH<sub>3</sub>, -OAc) o benzoil éster (-OC(=O)Ph, Bz).

Por ejemplo, un grupo aldehído o cetona puede estar protegido como acetal o cetal, respectivamente, en el que el grupo carbonilo ( $>C=O$ ) se convierte en un diéter ( $>C(OR)_2$ ), por reacción con, por ejemplo, un alcohol primario. Se conocen también en la técnica tio-acetales y tio-cetales.

- 5 Por ejemplo, un resto polihidroxílico puede estar protegido como un grupo acetal, en el que, por ejemplo, dos grupos hidroxilo en átomos de carbono adyacentes entre sí ( $HO-CR_2CR_2-OH$ ; a menudo denominado grupo glicol) reaccionan con un aldehído o cetona para formar un anillo que comprende una unión  $-O-CR_2-O-$ , como se muestra a continuación.



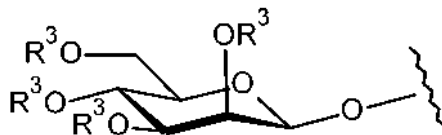
Los acetales se forman normalmente bajo condiciones de deshidratación (por ejemplo, en condiciones de Dean-Stark o usando un extractor de Soxhlet) con catálisis ácida y pueden eliminarse por catálisis ácida y un exceso de agua, o por otros métodos conocidos en la técnica.

- 15 Por ejemplo, un grupo amina puede estar protegido como una amida o un uretano, por ejemplo, como: una metil amida ( $-NHCO-CH_3$ ); una benciloxi amida ( $-NHCO-OCH_2C_6H_5$ ,  $-NH-Cbz$ ); en forma de una t-butoxi amida ( $-NHCO-OC(CH_3)_3$ ,  $-NH-Boc$ ); una 2-bifenil-2-propoxi amida ( $-NHCO-OC(CH_3)_2C_6H_4C_6H_5$ ,  $-NH-Bpoc$ ), en forma de una 9-fluorenilmetoxi amida ( $-NH-Fmoc$ ), en forma de una 6-nitroveratriloxi amida ( $-NH-Nvoc$ ), en forma de una 2-trimetilsililetiloxi amida ( $-NH-Teoc$ ), en forma de una 2,2,2-tricloroetiloxi amida ( $-NH-Troc$ ), en forma de una aliloxi amida ( $-NH-Alloc$ ), en forma de una 2(-fenilsulfonil)etiloxi amida ( $-NH-Psec$ ); o, en casos adecuados, en forma de un N-óxido ( $>NO^-$ ) o azida.
- 20

- 25 En algunas realizaciones de la presente invención, las funciones amina en donantes de azúcar de hexosamina están protegidas por grupos de ftalimida, TRoc, tricloroacetilo, dimetilacetilo. Esto facilita la formación  $\beta$ -selectiva de enlaces glucosídicos y evita la formación indeseada de oxazolona en estas reacciones. En algunas realizaciones, las funciones amina pueden estar protegidas como azidas, que pueden facilitar la formación estereoselectiva de enlaces  $\alpha$ -glicosídicos.

- 30 Por ejemplo, un grupo ácido carboxílico puede estar protegido como un éster, por ejemplo, como: un éster alquílico  $C_{1-7}$  (por ejemplo, un metil éster; un éster t-butílico); un haloalquilo  $C_{1-7}$  éster (por ejemplo, un trihaloalquilo  $C_{1-7}$  éster); un tri alquilsilil  $C_{1-7}$ -alquilo  $C_{1-7}$  éster; o un aril  $C_{5-20}$ -alquil  $C_{1-7}$  éster (por ejemplo, un éster bencílico; un éster nitrobencílico); o en forma de una amida, por ejemplo, en forma de una metil amida.

- 35 En algunas realizaciones, la presente invención utiliza estrategias de grupos protectores ortogonales para ensamblar oligosacáridos y estructuras que contienen oligosacáridos. La protección ortogonal es una estrategia conocida en la técnica, e implica la selección juiciosa de múltiples grupos protectores para permitir la desprotección de uno o más grupos funcionales de una molécula usando un conjunto dedicado de condiciones de reacción que afectan a otros grupos protectores en otras partes de la molécula. Por ejemplo, un grupo protector utilizado puede ser lábil a los ácidos (por ejemplo, un acetal), otro grupo protector usado puede ser lábil a las bases (por ejemplo, un grupo FMOC), mientras que un grupo protector adicional usado puede eliminarse usando condiciones de hidrogenación (por ejemplo, un éter bencílico). Como se describe en este documento, cuando múltiples posiciones dentro de una estructura pueden ser cada una independientemente un grupo protector, dichos grupos protectores pueden ser iguales o diferentes. Los diferentes grupos protectores pueden ser ortogonales entre sí y, en consecuencia, facilitar la reacción quimio-selectiva mediante la desprotección selectiva de un grupo protector en presencia de otro.
- 45 Puramente a modo de ejemplo, en un oligosacárido que comprende el motivo



- 50 en el que cada  $R^3$  es independientemente un grupo protector, cada  $R^3$  puede ser un grupo protector del mismo tipo, o cada  $R^3$  puede ser independientemente igual o diferente a cualquier otro grupo  $R^3$ . A través del uso de grupos protectores  $R^3$  que son ortogonales, puede producirse una desprotección selectiva y reacción en C2, C3, C4 o C6.

*Cálculo de concentraciones usando dilución isotópica*

- 55 Los métodos de acuerdo con la presente invención y glicanos marcados isotópicamente proporcionados por la

presente invención se pueden usar para determinar la concentración de un analito de interés, por ejemplo, un glicano natural, en una muestra. Las muestras adecuadas pueden incluir glicanos liberados de proteínas, glicoconjugados naturales, y los productos de la producción de proteínas recombinantes.

5 En algunos métodos de acuerdo con la presente invención, se obtiene una muestra sospechosa de contener al menos un glicano después de, por ejemplo, la liberación de una proteína mediante hidrazinólisis o escisión enzimática con péptido glicosidasa. A esta muestra, se le añade una cantidad conocida de un "patrón etiquetado" para obtener una muestra dopada. El patrón etiquetado comprende al menos un glicano marcado isotópicamente de concentración conocida, y en algunas realizaciones comprende una mezcla de glicanos marcados isotópicamente  
10 con concentraciones conocidas de todos los componentes.

La muestra dopada se analiza entonces mediante espectrometría de masas para adquirir espectros. Opcionalmente, durante el análisis y la adquisición, se puede obtener información relativa a la fragmentación de iones seleccionados. Este análisis de fragmentación puede ayudar a determinar tanto la estructura global del glicano de interés como las debilidades relativa y absoluta de los enlaces presentes. Esto es de especial relevancia para los métodos y realizaciones de la presente invención en los que se han introducido unidades de monosacárido marcadas isotópicamente en el glicano marcado isotópicamente en una o más posiciones predeterminadas en la secuencia de oligosacárido, por ejemplo, usando métodos quimioenzimáticos como se describe en el presente documento.  
15

20 A continuación se asignan picos de iones en los espectros adquiridos (que son identificables debido a aumentos de masa fijos) y pueden cuantificarse a través de la comparación con los picos de iones conocidos por estar asociados al patrón etiquetado.

Por ejemplo, un N-glicano natural particular que tiene un motivo [(2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-D-mannopiranosil)-(1→6)]-[2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-D-mannopiranosil-(1→3)]-β-D-mannopiranosil-(1→4)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→4)-2-acetamido-2-desoxi-α,β-D-glucopiranosil puede identificarse a través del uso de un patrón etiquetado que comprende un isotópologo en el que los grupos acetilo en este motivo heptasacárido están cada uno marcado isotópicamente con <sup>13</sup>C<sub>2</sub>, que puede obtenerse como se describe en el presente documento. Esto da como resultado un N-glicano marcado isotópicamente que tiene una masa aumentada de 8 Da con relación al N-glicano natural, pero con la correspondiente envoltura de iones de espectrometría de masas asociada (como se muestra en la **Figura 1**).  
25  
30

Además, la cantidad del glicano del analito puede cuantificarse mediante la comparación de las intensidades de los picos iónicos, permitiendo así que se cuantifique la cantidad del glicano de analito (las intensidades de los picos de cada isotópologo son proporcionales a sus cantidades en la muestra). Dado que el glicano marcado isotópicamente ioniza con la misma eficacia que el glicano del analito correspondiente, las intensidades relativas son proporcionales a sus concentraciones relativas (Ecuación 1). El método permite además la cuantificación de un analito en mezclas complejas que comprenden glicanos múltiples, tanto en términos de cantidad como de abundancia relativa (Ecuaciones 2, 3 y 4). Usando los métodos de la invención y estas ecuaciones, se pueden cuantificar analitos en mezclas complejas. Se entenderá que el uso de las Ecuaciones 1 a 4 es generalmente aplicable a los métodos de la presente invención, y que las Ecuaciones 1 a 4 se explican sin limitación con referencia a este método de ejemplo. Por simplicidad, "ligero" se refiere a glicanos no marcados isotópicamente y "pesado" a los correspondientes glicanos marcados isotópicamente de mayor peso molecular.  
35  
40

45  $I_i$  Intensidad de pico del isotópologo "ligero" i

$I_j$  Intensidad de pico del isotópologo "pesado" j

$m_i$  Cantidad del isotópologo "ligero" i

50  $m_j$  Cantidad del isotópologo "pesado" j

$m_T$  Cantidad total del glicano "ligero" en la muestra

55  $m_{T^*}$  Cantidad total del glicano "pesado" en la muestra

$X_i$  Abundancia relativa del isotópologo "ligero" i en el glicano del analito no marcado isotópicamente

$X_j^*$  Abundancia relativa del isotópologo "pesado" j en el glicano marcado isotópicamente  
60

$$\frac{I_i}{m_i} = \frac{I_j^*}{m_j^*}$$

[Ecuación 1]



$$m_i = m_z \times X_i$$

[Ecuación 2]

$$m_j^* = m_z^* \times X_j^*$$

[Ecuación 3]

$$m_z = \frac{I_i \times m_j^* \times X_j^*}{I_j^* \times m_i}$$

[Ecuación 4]

Se apreciará que mientras que las ecuaciones anteriores proporcionan una cuantificación razonable de los glicanos en una muestra en comparación con su patrón de isotopólogo correspondiente "pesado", para mezclas complejas y espectros en los que se detectan ciertos picos a concentración saturada, pueden ser deseables métodos más detallados. Por ejemplo, si el pico más abundante de un patrón está saturado, simplemente el uso de ese pico en las ecuaciones anteriores puede dar una cuantificación incorrecta. Para abordar este problema, a continuación se proporcionan detalles del análisis de dilución isotópica (estudio de la linealidad y selección de isotopólogos de patrón interno para el cálculo de la concentración de glicanos en una muestra). Este método utiliza los picos de iones asociados a diferentes isotopólogos "pesados" para calcular una función. Esta función se puede usar para relacionar la intensidad de pico del pico a cuantificar con la cantidad del isotopólogo asociado a ese pico, mitigando de este modo esta imprecisión potencial. Una vez más, se proporciona lo siguiente para ilustración y sin limitación.

**1. Determinación de linealidad**

Conociendo la cantidad total de isotopólogos "pesados" para un glicano dado ( $m_i^*$ ) añadido a la muestra y la correspondiente abundancia relativa ( $X_j^*$ ) de cada uno de sus isotopólogos "pesados", es posible calcular la cantidad de cada isotopólogo "pesado" ( $m_j^*$ ) en la muestra usando la ecuación 3. Esto puede explicar diferentes isotopólogos sintéticos "pesados", por ejemplo, que tienen grupos acetilo marcados isotópicamente de forma diferente, y/o los diversos picos asociados a la envoltura isotópica para un glicano "pesado" dado. De manera adecuada, se utilizan los diversos picos asociados a la envoltura isotópica. Las abundancias teóricas de estos picos de envoltura isotópica pueden derivarse de las abundancias naturales conocidas de los diversos isótopos, calculadas como probabilidad dada la fórmula empírica de la molécula.

Mediante el uso de las intensidades de pico iónico obtenidas para estos diferentes isotopólogos "pesados" de un glicano en el estándar marcado isotópicamente ( $I_j^*$ ) y sus abundancias relativas ( $m_j^*$ ), se puede calcular una función que correlaciona las intensidades de pico y la cantidad de glicano por regresión lineal (siendo  $I$  una función de  $m$ ):

$$I = b m + a$$

[Ecuación 5]:

donde los coeficientes  $b$  y  $a$  corresponden a la pendiente y a la intersección, respectivamente, que se han calculado por ajuste mínimo de mínimos cuadrados (Ecuaciones 6 y 7).

$$b = \frac{\sum(m_j^* - \overline{m_j^*})(I_j^* - \overline{I_j^*})}{\sum(m_j^* - \overline{m_j^*})^2}$$

[Ecuación 6]:

$$a = \overline{I_j^*} - b \overline{m_j^*}$$

[Ecuación 7]:

El coeficiente de determinación  $R^2$  también se puede calcular y utilizar como una medida de la calidad de ajuste. Si  $R^2$  es inferior a un valor dado, por ejemplo, si  $R^2$  es menor de 0,99, el punto de datos correspondiente al isotopólogo "pesado" más abundante puede ser descartado y la función y  $R^2$  se calculan de nuevo mediante regresión lineal. Este proceso puede repetirse hasta que todas las condiciones de linealidad definidas para  $R^2$  sean igualadas. Este proceso iterativo mejora la precisión de la función.

Una vez que se obtiene una función con el  $R^2$  apropiado, el intervalo de linealidad definido es los límites de la intensidad máxima y mínima del pico y los valores correspondientes de la cantidad de isotopólogos del glicano. Todos los picos dentro de este intervalo lineal pueden considerarse de calidad suficiente para permitir una cuantificación muy precisa.

**II. Cálculo de la cantidad de glicano no marcado en la muestra**

5 Como se ha descrito, puede obtenerse una función lineal utilizando las propiedades conocidas de una mezcla de isotopólogos de glicanos "pesados" de patrón etiquetado. Estos glicanos "pesados" deben dar intensidades de pico en el intervalo lineal previamente establecido y con una relación de señal a ruido mínima adecuada, por ejemplo, superior a cinco.

10 De esta manera, la cantidad de un isotopólogo de glicano "ligero" individual que satisface los criterios anteriores (dentro de las intensidades máximas y mínimas de los picos) ( $m_i$ ) puede calcularse a partir de la función obtenida como se ha descrito anteriormente y mejorarse por la iterativa mejora de la regresión lineal descrita anteriormente.

[Ecuación 8]: 
$$m_i = \frac{(I_i - a)}{b}$$

15 Debido a que el propio glicano "ligero" tiene una envoltura isotópica asociada a su pico de espectrometría de masa de partida (por ejemplo, la abundancia natural de  $^{13}\text{C}$ , un análisis más preciso de la cantidad total del glicano del analito corrige esto usando la abundancia natural teórica de ese isotopólogos de "masa exacta" ( $X_i$ ), que se pueden calcular fácilmente teóricamente usando la probabilidad estadística de que estos isótopos estén presentes.

20 Por lo tanto, una vez que se ha calculado la cantidad de un isotopólogo del "ligero" ( $m_i$ ), y conociendo la abundancia relativa de este isotopólogo ( $X_i$ ), puede calcularse el glicano del analito en la muestra ( $m_T$ ):

[Ecuación 9]: 
$$m_T = \frac{(I_T - a)}{b \times X_i}$$

25 Por consiguiente, en algunas realizaciones, los métodos para determinar cuantitativamente el contenido de glicano del analito de una muestra pueden utilizar un patrón etiquetado que comprende una pluralidad de isotopólogos "pesados" de dicho glicano del analito, incluyendo el método las etapas de

- 30 (i) correlacionar las intensidades relativas de los picos de iones asociados a cada isotopólogo "pesado" ( $I_j^*$ ) con la abundancia conocida de ese glicano en el patrón ( $m_j^*$ ) para obtener  $I_j$  como h como una función lineal de  $m_j$ ;
- (ii) calcular opcionalmente el coeficiente de determinación  $R^2$  para la correlación y descontar el pico iónico más abundante si el valor  $R^2$  es mayor que un valor predeterminado;
- (iii) repetir opcionalmente la etapa (ii) una o más veces;
- (iv) usar dicha función para calcular la cantidad de un isotopólogo "ligero" del glicano del analito;
- 35 (v) opcionalmente usando la cantidad total del isotopólogo "ligero" del glicano del analito para determinar la cantidad total de glicano del analito presente.

De manera adecuada, el valor  $R^2$  puede ser mayor de o igual a 0,99.

40 Además, la presente invención también proporciona un método para identificar un isotopólogo "ligero" en una muestra, comprendiendo el método la adición de una cantidad conocida de un patrón etiquetado que comprende una pluralidad de isotopólogos "pesados" correspondientes (estando dichos isotopólogos "pesados" isotópicamente marcados), analizar la mezcla por espectrometría de masas y cuantificar la cantidad de isotopólogos "ligeros" por comparación de la intensidad relativa de los picos iónicos asociados a los isotopólogos "pesados" y con el isotopólogo "ligero".

Esta cuantificación pueden incluir las etapas de:

- 50 (a) correlacionar las intensidades relativas de los picos de iones asociados a cada isotopólogo "pesado" ( $I_j^*$ ) con la abundancia conocida de los isotopólogos en el patrón ( $m_j^*$ ) para obtener  $I_j$  en forma de una función lineal de  $m_j$ ;
- (b) calcular opcionalmente el coeficiente de determinación  $R^2$  para la correlación y descontar el pico iónico más abundante si el valor  $R^2$  es mayor que un valor predeterminado;
- (c) repetir opcionalmente la etapa (ii) una o más veces;
- 55 (d) usando dicha función para calcular la cantidad del isotopólogo "ligero" del analito en la muestra de analito;
- (v) opcionalmente usando la cantidad total del isotopólogo "ligero" para determinar la cantidad total de glicano del analito presente.

Se apreciará que el método puede aplicarse a cualquier molécula adecuada disponible en forma marcada isotópicamente, siendo el método adecuado para los patrones de glicano descritos en el presente documento, pero no necesariamente limitado a moléculas de glicano.

## 5 Fragmentación

La generación y análisis de iones de fragmentos moleculares durante experimentos de espectrometría de masas es de uso considerable en la determinación estructural. Se conocen en la técnica diversas técnicas para la generación y detección de dichos iones de fragmentos e incluyen, pero no se limitan a, disociación inducida por colisión (CID) y espectrometría de masas en tándem (también denominada MS/MS y MS<sup>2</sup>). El análisis y la cuantificación de estos fragmentos pueden ayudar a la determinación estructural parcial o completa, y pueden ser especialmente útiles para detectar una molécula dada en presencia de otras moléculas del mismo peso molecular nominal. En el contexto del campo de la presente invención, el análisis de fragmentos puede usarse también para identificar enlaces de enlace más débiles en analitos y para discriminar entre estructuras isobáricas.

En algunas realizaciones de la presente invención, las unidades de monosacárido marcadas isotópicamente se incorporan quimio-enzimáticamente en estructuras de glicano, por ejemplo, utilizando los métodos de elongación enzimática descritos en el presente documento. El uso de estos glicanos para la generación de patrones de fragmentación es de particular valor para discriminar entre estructuras de glicano isobárico usando técnicas de espectrometría de masas. Esto puede conseguirse a través de la identificación y/o asignación de fragmentos de diagnóstico y/o determinación de los enlaces más débiles en un isómero particular.

### Abreviaturas de azúcar

Tal como se usa en el presente documento, se usan abreviaturas de sacáridos como se entiende comúnmente en la técnica. El sufijo "N" indica el amino azúcar correspondiente, mientras que "NAc" indica el N-acetilamino azúcar correspondiente.

Glc - glucosa  
Gal - galactosa  
Man - manosa  
Rha - ramnosa  
Fru - fructosa  
Fuc - fucosa  
Mur - ácido murámico  
Neu - ácido neuramínico  
Kdo - ceto-desoxioctulosonato

### Glicanos

El término glicano puede usarse para referirse a cualquier sacárido (mono, oligo o poli) en forma libre o formando una porción de carbohidrato de una molécula de glicoconjugado tal como una glicoproteína, proteoglicano o glicolípido. Los glicanos son moléculas importantes implicadas en virtualmente cada estructura y proceso biológicos. Los monosacáridos constituyentes generan una diversidad combinatoria mucho mayor que los ácidos nucleicos o aminoácidos, y la diversidad adicional surge de la modificación covalente de los glicanos. El repertorio total de glicanos (glicoma) de un organismo dado es, por lo tanto, mucho más complejo y dinámico que el genoma o proteoma.

Los enlaces entre monosacáridos pueden estar en forma  $\alpha$  o  $\beta$ , las cadenas pueden ser lineales o ramificadas y las modificaciones de glicano pueden incluir acetilación y sulfatación. Las glicoproteínas llevan uno o más glicanos unidos covalentemente a un polipéptido mediante enlaces N u O.

Los O-glicanos están unidos a grupos hidroxilo de residuos de serina o treonina. Los N-glicanos son cadenas de azúcar unidas a través de un nitrógeno de cadena lateral (N) a un residuo de asparagina. Comparten una región de pentasacárido común de dos residuos de manosa, unidos por separado por las uniones  $\alpha$ 1-3 y  $\alpha$ 1-6 a una manosa central, que a su vez está unida por un enlace  $\beta$ 1-4 a un núcleo de quitobiosa que consiste en dos de GlcNAc unidos a  $\beta$ 1-4. Basándose en el procesamiento adicional del pentasacárido, los N-glicanos se dividen en tres clases principales: tipos de (i) alta manosa (ii) complejos (iii) híbridos.

Los N-glicanos de alto contenido de manosa tienen únicamente restos de manosa no sustituidos (normalmente 5-9) unidos al núcleo de quitobiosa. Los N-glicanos híbridos contienen tanto residuos de manosa terminales no sustituidos como residuos de manosa con GlcNAc, que inician "antenas" a las que se pueden añadir monosacáridos adicionales. Los N-glicanos complejos tienen residuos de GlcNAc añadidos en sitios de manosa tanto  $\alpha$ 3 como  $\alpha$ 6, no tienen residuos de manosa de extrapentasacárido y se encuentran en formas bi, tri y tetraantennarias.

Los proteoglicanos tienen una o más cadenas de glicosaminoglicano (GAG) unidas a través de una región de núcleo que termina con una xilosa a los grupos hidroxilo de un resto de serina. Los glicolípidos más importantes son los

glicosfingolípidos, que consisten en un glicano normalmente unido a través de una glucosa o galactosa al grupo hidroxilo terminal de un resto lipídico de ceramida, que está compuesto por el alcohol amino de cadena larga esfingosina y un ácido graso.

#### 5 *Proteínas de unión a glicano*

Muchas de las funciones biológicas específicas de los glicanos están mediadas por el reconocimiento de las proteínas de unión a glicanos (GBP). Las GBP incluyen lectinas, proteínas de unión a glicosaminoglicanos y anticuerpos específicos de glicano. Las lectinas a menudo se unen a regiones terminales de cadenas de glicanos a través de dominios de reconocimiento de carbohidratos. Debido a la baja afinidad de unión, las interacciones multivalentes de CRD-glicano a menudo son necesarias para las interacciones con relevancia biológica.

#### *Procesamiento de glicanos*

15 Los glicanos se sintetizan principalmente mediante enzimas glicosiltransferasa que ensamblan restos monosacáridos en cadenas de glicanos.

Las enzimas glicosiltransferasa tienen en común la propiedad de ser capaces de catalizar la transferencia de un monosacárido de un donante de azúcar de nucleótido simple (por ejemplo, UDP-Gal, GDP-Fuc o CMP-Sia) a un sustrato aceptor.

20 La biosíntesis de glicoconjugado se inicia mediante enzimas glicosiltransferasa que unen sacáridos a una cadena lateral polipeptídica o base esfingolípida. Por ejemplo, en el caso de N-glicanos, la oligosacariiltransferasa transfiere el glicano Glc3Man9GlcNAc2 a la cadena lateral de asparagina.

25 La mayoría de las glicosiltransferasas son cadenas de glicanos alargadas. Las cadenas lineales o ramificadas se construyen por glicosilación secuencial, a menudo por glicosiltransferasas distintas. Es decir, el producto de la glicosilación por una enzima produce el sustrato preferido para otro. Los ejemplos de glicosiltransferasas incluyen galactosa-1-fosfato uridil-transferasa (GalT), N-acetilgalatosaminil-transferasa (GalNAcT), fucosil transferasa (FuT) y sialiltransferasa (SialT, que catalizan la adición de residuos de galactosa, N-acetilglucosamina, fucosa y ácido siálico respectivamente.

30 Las glicosidasas son enzimas de procesamiento de glicano que eliminan los restos de monosacárido para formar intermedios que luego son sometidos a la acción de las glicosiltransferasas. Este tipo de procesamiento es particularmente importante en la biosíntesis de N-glicanos; la acción de las enzimas glicosidasas en el Glc3Man9GlcNAc2 permite la formación de intermedios necesarios para el procesamiento en última instancia a N-glicanos de alta manosa, complejos e híbridos descritos anteriormente.

#### *Síntesis quimio-enzimática de glicanos marcados isotópicamente*

40 Los avances en la exploración de recursos microbianos y la mejora de la producción de enzimas de mamíferos han establecido el uso de glicosiltransferasas como una herramienta eficaz para la síntesis de glicanos (Blixt, 2006; Ruiz, 2001; Serna, 2010, Zou, 2011). Usando la secuencia apropiada de enzimas transferasa de regio y estereo específicas y construcciones básicas de donantes de azúcar, las estructuras complejas de glicanos pueden ser ensambladas mediante elongación enzimática secuencial. De manera similar, puede ser deseable truncar primero un motivo de núcleo, por ejemplo, para facilitar la preparación de patrones de glicano marcados isotópicamente asimétricos derivados del heptasacárido biantenarico **18 <sup>13</sup>C<sub>8</sub>G0(Bn<sub>5</sub>)**. Este truncamiento puede conseguirse mediante hidrólisis enzimática.

50 Por consiguiente, los métodos descritos en el presente documento para la síntesis de glicanos marcados isotópicamente para su uso como patrones de espectrometría de masas incluyen una etapa de derivación enzimática.

55 En algunas realizaciones, los métodos para la síntesis de glicanos marcados isotópicamente incluyen el uso de una hidrolasa apropiada en un oligosacárido marcado isotópicamente como se describe en el presente documento para truncar el oligosacárido marcado isotópicamente. En otras palabras, la presente invención puede proporcionar métodos para el truncamiento enzimático de una o más unidades de azúcar de un motivo de núcleo de oligosacárido marcado isotópicamente.

60 El oligosacárido truncado resultante puede entonces someterse por sí mismo a una elongación enzimática para incorporar una o más unidades de azúcar adicionales. En algunas realizaciones de la presente invención, las transferasas apropiadas junto con donantes de azúcar adecuados se utilizan secuencialmente de una manera escalonada para ensamblar glicanos marcados isotópicamente. Las transferasas pueden ser glicosiltransferasas recombinantes, transglicosidasas, endoglicosidasas o glicosidasas mutadas. Los glicanos resultantes pueden tener utilidad en los métodos de la presente invención descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la etapa o etapas de elongación enzimática se producen en un oligosacárido que comprende un motivo marcado isotópicamente como se describe en el presente documento, que se puede denominar de manera diversa un

oligosacárido de núcleo, un motivo de núcleo, y un oligosacárido de partida marcado isotópicamente. En otras palabras, en algunos métodos de la presente invención, un oligosacárido de partida marcado isotópicamente está alargado quimioselectivamente para incorporar unidades de azúcar adicionales, proporcionando así estándares de glicano marcados isotópicamente adicionales para su uso en espectrometría de masas.

5 El donante de azúcar usado en cada etapa de elongación puede estar opcionalmente marcado isotópicamente. En algunas realizaciones, solo el motivo original marcado isotópicamente está marcado isotópicamente en el glicano resultante. En otras realizaciones, se incorpora al menos una unidad de azúcar marcada isotópicamente durante la etapa o etapas de elongación enzimática. Tal como se ha discutido anteriormente, la incorporación de unidades de  
10 azúcar marcadas isotópicamente específicas en posiciones específicas tiene utilidad en el análisis de patrones de fragmentación en espectrometría de masas.

15 Como alternativa, la elongación enzimática se produce en un motivo que no está marcado isotópicamente. En su lugar, se incorpora una o más unidades de azúcar marcadas isotópicamente durante la etapa o etapas de elongación enzimática para proporcionar un glicano marcado isotópicamente que puede usarse según sea apropiado en los métodos de identificación de un glicano en una muestra como se describe en el presente documento.

20 La etapa de elongación quimioenzimática puede repetirse varias veces. Por ejemplo, usando donantes de azúcar monosacárido, 20 ciclos de elongación quimioenzimática pueden introducir 20 unidades adicionales de monosacáridos. Se apreciará que se pueden incorporar unidades adicionales en los extremos de las antenas, o pueden incorporarse a una de las unidades de azúcar del oligosacárido de núcleo.

25 En algunas realizaciones, la etapa de elongación quimioenzimática puede utilizar un donante de azúcar que es un disacárido u oligosacárido y/o que está conjugado con un lípido, péptido o proteína.

30 En algunas realizaciones, la etapa de derivación enzimática puede comprender una o más de una etapa de epimerización, una etapa de transglicosilación o una etapa de modificación postraduccional. Estas pueden ser además la elongación o truncamiento.

35 La **Figura 2** demuestra el uso del método para ensamblar diversos glicanos y mezclas de glicanos. Cualquier unidad de azúcar puede estar marcada isotópicamente. En algunas realizaciones preferidas, cada grupo acetilo en el heptasacárido de partida, [(2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-D-mannopiranosil)-(1→6)]-[2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-D-mannopiranosil-(1→3)]-β-D-mannopiranosil-(1→4)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→4)-2-acetamido-2-desoxi-α,β-D-glucopiranosil está marcado isotópicamente. A  
40 continuación se describe una síntesis química de este material de partida marcado isotópicamente. Este oligosacárido de núcleo de partida marcado isotópicamente se denomina en el presente documento <sup>13</sup>C<sub>8</sub>-G0.

45 La **Figura 2** muestra una serie de secuencias que comienzan con este heptasacárido de partida <sup>13</sup>C<sub>8</sub>-G0. La incubación con una α1,6 fucosiltransferasa de núcleo recombinante proporciona la estructura de núcleo fucosilada A, que puede estar galactosilada adicionalmente (panel C) y sialilada (panel D). La galactosilación directa del heptasacárido de partida con una galactosil-transferasa de leche bovina en presencia de UDP-galactosa accede tanto a los isómeros mono-galactosilados como el N-glicano completamente galactosilado (panel E). El tratamiento posterior con un α2,6 SialilT recombinante proporciona el panel del compuesto F. Se puede introducir un residuo de GlcNAc bisectriz en virtud de un GnTIII recombinante (compuesto B). La galactosilación de este producto conduce entonces a los compuestos en bisectriz del panel G, y la sialilación posterior proporciona el panel del compuesto H. La fucosilación α-1,6 del compuesto en bisectriz A conduce al glicano I en bisectriz y fucosilado de núcleo, que puede galactosialilarse hacia el panel J y finalmente sialilarse para proporcionar el compuesto (panel K).

50 Los oligosacáridos de núcleo marcados isotópicamente proporcionados sintéticamente pueden estar protegidos durante la etapa de derivación enzimática, es decir, pueden tener uno o más grupos protectores. Por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, <sup>13</sup>C<sub>8</sub>-G0 puede obtenerse a través de <sup>13</sup>C<sub>8</sub>-bencilo [(2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-D-mannopiranosil)-(1→6)]-[2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-D-mannopiranosil-(1→3)]-β-D-mannopiranosil-(1→4)-2-acetamido-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→4)-2-acetamido-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-β-D-glucopiranosil, denominado en el presente documento <sup>13</sup>C<sub>8</sub>-G0(Bn<sub>5</sub>). Este  
55 heptasacárido bencilado puede usarse como un motivo de núcleo marcado isotópicamente para la etapa o etapas de derivación enzimática. Como se describe en este documento, los motivos de núcleo semi-protegidos pueden ser sustratos adecuados para la elongación enzimática quimioselectiva y la presencia de los grupos protectores puede tener ventajas particulares, por ejemplo, actuando como cromóforos para la detección de picos durante el análisis y purificación de HPLC y ayudando a la separación de diferentes productos, por ejemplo, glicanos isoméricos.

60 Se apreciará que otros glicanos no humanos, por ejemplo, específicos de plantas o parásitos, pueden evaluarse de una manera similar y, partiendo con un motivo marcado isotópicamente como se ha descrito anteriormente, obtenido como compuestos marcados isotópicamente con un aumento de masa fijo que es fácilmente detectable en experimentos de espectrometría de masas. De la misma manera, se puede obtener la preparación quimiosintética de una biblioteca más grande de N-glicanos incluyendo glicanos de tipo complejo superiores, híbridos y de alto contenido de manosa con variaciones sistemáticas del número de antenas, patrón de ramificación y modificaciones  
65

de núcleo, a partir de un número muy reducido de estructuras de núcleo, que están preferiblemente marcadas isotópicamente y pueden obtenerse usando métodos de acuerdo con la presente invención. Una biblioteca basada en estas estructuras de núcleo refleja la variación estructural de N-glicanos que se encuentra en glicoproteínas eucariotas y las estructuras de glicano más comunes presentadas en glicoproteínas recombinantes.

5 El siguiente análisis se refiere a la modificación del núcleo de N-glicano de heptasacárido denominado en el presente documento como  $^{13}\text{C}_8\text{-G0}$ . Se proporciona para ilustración, y no pretende limitar la invención. También pueden preverse otros núcleos de glicano.

10 El N-glicano marcado con  $^{13}\text{C}$  parcialmente desprotegido  $^{13}\text{C}_8\text{-G0(Bn}_5\text{)}$  (**13**) se evaluó como precursor para la preparación y aislamiento de estructuras de N-glicano asimétricas. Aprovechando la hidrofobicidad y la absorbancia UV de los glicanos penta-bencilados, los presentes inventores han encontrado que la presencia de estos 5 grupos bencilo en la estructura N-glicano central facilita la separación cromatográfica de diferentes glicanos e incluso estructuras isoméricas después de una reacción parcial elongación enzimática.

15 Se realizó una serie de experimentos para controlar una galactosilación parcial del sustrato con  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa de leche bovina, mostrando no solo que el N-glicano semi-protegido  $^{13}\text{C}_8\text{-G0(Bn}_5\text{)}$  era un sustrato adecuado para la enzima, sino también la posibilidad de obtener una mezcla de estructuras **G0-G1-G2**, todas ellas marcadas con  $^{13}\text{C}$ . El análisis de esta mezcla por UPLC-MS, en fase inversa utilizando una columna C18, permitió la separación de los diferentes compuestos y también los dos isómeros del N-glicano mono-galactosilado  $^{13}\text{C}_8\text{-G1(Bn}_5\text{)}$ , y cuantifica también su composición relativa por el uso del detector UV. El uso de las condiciones apropiadas durante la transformación enzimática de  $^{13}\text{C}_8\text{-G0(Bn}_5\text{)}$  produjo el N-glicano biantenarico mono-galactosilado  $^{13}\text{C}_8\text{-G1(Bn}_5\text{)}$  en más del 45 % en forma de sus dos isómeros diferentes 3-LacNAc y 6- LacNAc.

25 La purificación de ambos isómeros mono-galactosilados separadamente por HPLC semipreparativa en escala de miligramos se consiguió como se confirmó mediante análisis MALDI y análisis por RMN. La desprotección completa del núcleo mediante hidrogenólisis proporcionó dos patrones isoméricos marcados con  $^{13}\text{C}$   $^{13}\text{C}_8\text{-G13}$  y  $^{13}\text{C}_8\text{-G16}$  para su uso en análisis cuantitativo de N-glicano. El isómero  $^{13}\text{C}_8\text{-G1}^6$  también podría fucosilarse enzimáticamente para la preparación del patrón  $^{13}\text{C}_8\text{-G1}^6\text{F}$ , según se confirmó por MALDI-Tof MS.

30 Otra estrategia para obtener N-glicanos isómeros asimétricos isotópicamente marcados para su uso como patrones de espectrometría de masas consistió en el uso de una  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* en el compuesto bis-galactosilado  $^{13}\text{C}_8\text{-G2(Bn}_5\text{)}$  (Tabla 1). Durante esta transformación se observó una distribución diferente de glicanos, en la que los inventores pudieron determinar una actividad diferente de la hidrolasa sobre las dos estructuras mono-galactosiladas isoméricas. Esta especificidad diferente de la enzima proporcionó solo uno del compuesto mono-galactosilado con un rendimiento cercano al 50 % y el compuesto no galactosilado  $^{13}\text{C}_8\text{-G0(Bn}_5\text{)}$ .

Tabla 1

	BE4-61-G2	Galasa	Tiempo	T (°C)	G2	G1	G1 (*)	g0
1	5 $\mu\text{g}$	30 mU	5h	30	14	9	44	33
2	5 $\mu\text{g}$	15 mU	5h	30	18	10	46	25
3	5 $\mu\text{g}$	8 mU	5h	30	35	10	43	12
4	5 $\mu\text{g}$	15 mU	18 h	30	6	4	38	52

40 La misma estrategia se empleó para la preparación de diversos patrones sialilados marcados con  $^{13}\text{C}$  a partir del  $^{13}\text{C}_8\text{-G2(Bn}_5\text{)}$  bis-galactosilado usando una  $\alpha$ -2,3-sialiltransferasa de *Pasteurella multocida* expresada en *E. coli* para dar los dos glicanos, el mono-sialilado y el bis-sialilado obtenidos a partir de la estructura biantenarica. Esta mezcla de compuestos semi-protegidos se resolvió mediante UPLC-MS, lo que permitió a los inventores determinar su composición relativa (Tabla 2).

45

Tabla 2

	G2 (Bn <sub>5</sub> )	CMP-NeuNAc	2, 3-SialT (nuevo)	Tiempo	T (°C)	G2	G2A1	G2A1 (*)	G2A2
1	10 $\mu\text{g}/5$ nmol	4 equiv.	5 mU	30 min	37	16	25	23	36
2	20 $\mu\text{g}/10$ nmol	4 equiv.	10 mU	30 min	37	22	23	23	32

50 Esta reacción también se aplicó a la mezcla de compuestos parcialmente galactosilados G0/G1/G2 obtenidos previamente. La  $\alpha$ -2,3-sialilación parcial de esta mezcla produjo una mezcla de 9 estructuras que podrían ser resueltas por UPLC-MS, identificando la presencia de  $^{13}\text{C}_8\text{-G0(Bn}_5\text{)}$  y  $^{13}\text{C}_8\text{-G2(Bn}_5\text{)}$ , ambos isómeros del compuesto mono-galactosilado  $^{13}\text{C}_8\text{-G1(Bn}_5\text{)}$ , ambos isómeros del compuesto mono-sialilado  $^{13}\text{C}_8\text{-G1A1(Bn}_5\text{)}$ , ambos isómeros del compuesto monosialilado  $^{13}\text{C}_8\text{-G2A1(Bn}_5\text{)}$  y la estructura biantenarica bis-sialilada  $^{13}\text{C}_8\text{-G2A2(Bn}_5\text{)}$ . Por lo tanto, esta estrategia puede utilizarse para obtener hasta 5 nuevos N-glicanos marcados con  $^{13}\text{C}$  sialilados después de la purificación y la desprotección.

55

La reacción de sialilación se realizó entonces en la escala de mg para obtener los patrones sialilados correspondientes. El  $^{13}\text{C}_8\text{-G1}^3\text{Bn}_5$  semi-protegido previamente se sialiló con  $\alpha$ -2, 3-sialiltransferasa de *P. multocida*

obteniendo el compuesto sialilado  $^{13}\text{C}_8\text{-G1}^3\text{Bn}_5$ . La reacción no fue completa, pero el compuesto sialilado se pudo aislar por HPLC semipreparativa. Además, la sialilación de  $^{13}\text{C}_8\text{-G2}(\text{Bn}_5)$  en escala de mg proporcionó una mezcla de los patrones sialilados  $^{13}\text{C}_8\text{-G2A1}^3(\text{Bn}_5)$ ,  $^{13}\text{C}_8\text{-G2A1}^6(\text{Bn}_5)$  y  $^{13}\text{C}_8\text{-G2A2}(\text{Bn}_5)$  que pudo separarse por HPLC semipreparativa.

5 La reacción de sialilación de  $^{13}\text{C}_8\text{-G2}(\text{Bn}_5)$  con una  $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa humana expresada en células CHO recombinantes se controló también para obtener las estructuras mono y bis-sialiladas correspondientes. La reacción usando el  $^{13}\text{C}_8\text{-G2}(\text{Bn}_5)$  parcialmente protegido como sustrato y solamente un equivalente de donante de ácido siálico produjo el 26 % del compuesto monosialilado. Por el contrario, el uso de un exceso de donante dio el  
10 compuesto bis-sialilado como el único producto. Ambos compuestos, mono y bis-sialilado, podrían resolverse por UPLC-MS. Esta reacción también se realizó sobre la mezcla G0/G1/G2 obtenida previamente por galactosilación parcial. Análogamente a los resultados anteriores con la  $\alpha$ -2,3-sialiltransferasa, la sialilación parcial de la mezcla que contenía 3 compuestos galactosilados proporcionó una mezcla de 4 nuevos N-glicanos 2,6-sialilados marcados con  $^{13}\text{C}$ , que pudieron resolverse por UPLC-MS. Se determinó la composición relativa de la mezcla identificando el N-glicano bis-2,6-sialilado biantenarico  $^{13}\text{C}_8\text{-G2S2}(\text{Bn}_5)$ , el compuesto mono-2,6-sialilado  $^{13}\text{C}_8\text{-G1S1}(\text{Bn}_5)$  en sus dos  
15 formas isoméricas por separado, y el otro compuesto mono-sialilado  $^{13}\text{C}_8\text{-G2S1}(\text{Bn}_5)$  (Tabla 3).

Tabla 3

	G2 (Bn <sub>5</sub> )	CMP-NeuNAc	2,6-SialIT	tiempo	G2S2	G2S1	G2
1	10 µg/5 mmol	4 equiv.	1 mU	2h	98	1	1
2	10 µg/5 mmol	1 equiv.	0,25 mU (0,25 nmol/min)	30 min	-	10	90
				1 h	-	15	85
				4 h	2	26	72
				24 h	7	40	53

20 El oligosacárido de núcleo  $^{13}\text{C}_8\text{-G0}(\text{Bn}_5)$  puede modificarse también para la preparación de otros patrones de glicano asimétricos derivados de la estructura biantenaria pero con solo un GlcNAc terminal. Estas estructuras mono-antenarias truncadas pueden obtenerse por hidrólisis enzimática de las glucosaminas terminales en  $^{13}\text{C}_8\text{-G0}(\text{Bn}_5)$ . Los grupos bencilo presentes en la molécula de partida ayudan de nuevo a la purificación de las estructuras resultantes después de la hidrólisis enzimática. Con este fin, se utilizó una N-acetil glucosaminidasa de *Conavalia ensiformis* sobre el sustrato parcialmente protegido  $^{13}\text{C}_8\text{-G0}(\text{Bn}_5)$ . La optimización de la reacción permitió a los  
25 inventores obtener una mezcla del material de partida, los dos isómeros de la estructura monoantenaria  $^{13}\text{C}_6\text{-MGn}^3(\text{Bn}_5)$  y  $^{13}\text{C}_6\text{-MGn}^6(\text{Bn}_5)$  respectivamente y el producto de doble hidrólisis  $^{13}\text{C}_4\text{-Man3}(\text{Bn}_5)$ . A medida que la glucosaminidasa elimina los restos de GlcNAc marcados con  $^{13}\text{C}$ , los glicanos resultantes tienen un grado distinto de marcado, obteniendo las dos estructuras mono-antenarias isoméricas que llevan 6 átomos de  $^{13}\text{C}$  y el glicano trimanosa con 4 átomos de  $^{13}\text{C}$  en lugar de los 8 átomos de carbono originales.

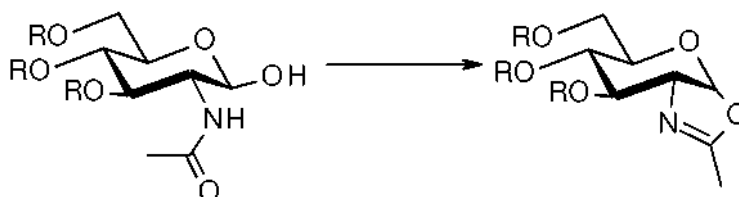
La reacción de hidrólisis se aumentó usando 3 mg de  $^{13}\text{C}_8\text{-G0}(\text{Bn}_5)$ . Esta mezcla se pudo resolver por HPLC semipreparativa y los 3 nuevos compuestos se aislaron en escala de mg. Estos compuestos se sometieron a  
35 hidrogenólisis para la eliminación de los grupos bencilo proporcionando los correspondientes glicanos marcados con  $^{13}\text{C}$   $^{13}\text{C}_6\text{-MGn}^3$ ,  $^{13}\text{C}_6\text{-MGn}^6$  y  $^{13}\text{C}_4\text{-Man3}$  (Figura 5). Además, la fucosilación enzimática de  $^{13}\text{C}_6\text{-MGn}^3$  produjo el patrón  $^{13}\text{C}_6\text{-MGn}^3\text{F}$  cuantitativamente (Figura 6).

Como se ha descrito previamente, los compuestos parcialmente bencilados pueden derivatizarse mediante reacciones enzimáticas. Esta protección parcial es especialmente útil cuando la reacción correspondiente da más de  
40 un producto, por ejemplo, en una galactosilación parcial, ya que esta protección parcial permite la separación de mezclas resultantes por HPLC.

El N-glicano triantenarico **22** tiene tres posiciones diferentes que pueden galactosilarse. Una galactosilación parcial produce siete nuevos glicanos marcados isotópicamente en una única reacción: el N-glicano completamente galactosilado (G3), tres compuestos con dos residuos de galactosa (G2a, G2b, G2c) y tres compuestos un solo  
45 residuo de galactosa (G1a, G1b, G1c).

#### Formación opcional de oxazolina

50 En algunas realizaciones de la presente invención, el método de síntesis comprende además la etapa de formación de oxazolina en una posición anomérica libre de una unidad de acetil-hexosamina en un oligosacárido.



Los métodos adecuados para esta etapa de síntesis son conocidos en la técnica e incluyen el uso de reactivos de acoplamiento tales como CDI, DCC, EDC, y DMC; o el uso de reactivos de ácido de Lewis adecuados. También pueden usarse otros reactivos o condiciones deshidratantes, incluyendo, pero sin limitación, reactivos de tipo cloroformamidio y combinaciones de ácidos.

La glicosil oxazolina marcada isotópicamente resultante se puede usar entonces para preparar un glicoconjugado marcado isotópicamente. Se conocen protocolos adecuados en la técnica (véase, por ejemplo, Rising, 2008). Los glicoconjugados preferidos incluyen glicoproteínas, glicofomas, glicopéptidos, peptidoglicanos, glicolípidos, glicósidos y lipopolisacáridos.

En algunas realizaciones preferidas, el método de síntesis implica un glicano que comprende el motivo [(2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-D-mannopiranosil)-(1→6)]-[2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-D-mannopiranosil-(1→3)]-β-D-mannopiranosil-(1→4)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→4)-2-acetamido-2-desoxi-α,β-D-glucopiranosil en el que cada grupo acetilo en el motivo está marcado isotópicamente. El glicano puede comprender otras unidades de azúcar antenarias. La formación de oxazolina en la posición anomérica libre de este glicano permite la preparación de isotopólogos de glicoconjugado que tienen un aumento de masa fijo de al menos 8 Da con respecto al glicoconjugado natural. En algunas realizaciones preferidas, ninguna de las unidades de azúcar antenarias adicionales está marcada isotópicamente y el glicoconjugado marcado isotópicamente resultante tiene un aumento de masa fijo de 8 Da con relación al glicoconjugado natural.

#### *Marcadores de glicanos en enfermedades y trastornos*

La biosíntesis de los glicanos se basa en numerosos procesos altamente competitivos que implican glicosiltransferasas. Como resultado, la glicosilación es altamente sensible a la naturaleza del medio bioquímico, y la glicosilación y los cambios en la glicosilación se han visto implicados en muchas enfermedades y trastornos. Por consiguiente, en algunos aspectos, la presente invención se refiere a métodos para la identificación conveniente de los denominados marcadores de glicano (estructuras de glicanos particulares conocidas por estar asociadas a una enfermedad o trastorno). Aunque en algunas realizaciones la presente invención proporciona la identificación y cuantificación de un solo marcador de glicano en una mezcla compleja, en otras realizaciones se pueden identificar y cuantificar una serie de marcadores de glicano asociados a una o más enfermedades o trastornos en un solo experimento.

Con el fin de ayudar en la identificación de combinaciones de firmas de marcadores de glicano asociados a una enfermedad o trastorno particular, en algunas realizaciones preferidas el patrón etiquetado es una mezcla que comprende isotopólogos isotópicamente marcados de una combinación y opcionalmente en las cantidades proporcionales apropiadas, que se sabe están asociados a una enfermedad o trastorno. De esta manera, se pueden usar patrones etiquetados premezclados que comprenden uno o más glicanos marcados isotópicamente en los métodos de la invención para la determinación de la presencia de firmas particulares de glicanos y, por consiguiente, en métodos de diagnóstico de enfermedades y trastornos asociados a dichas firmas.

Las enfermedades y trastornos para los que se pueden usar patrones etiquetados adecuados que comprenden uno o más glicanos marcados isotópicamente incluyen: cáncer; trastornos cardiovasculares, por ejemplo, ictus, infarto de miocardio, ictus hipovolémico, aterosclerosis; enfermedades inflamatorias de la piel; diabetes mellitus; trastornos gastrointestinales, incluyendo colitis ulcerosa; trastornos y enfermedades hepáticas; anemia; enfermedades y trastornos inmunológicos, por ejemplo, síndrome de Wiskott-Aldrich; enfermedades autoinmunitarias; artritis, incluyendo artritis reumatoide; enfermedades infecciosas; nefropatía; trastornos neurológicos, incluyendo enfermedad de Alzheimer; trastornos pulmonares; y trastornos congénitos de la glicosilación.

La lista anterior no se proporciona a modo de limitación y se entenderá que los métodos descritos en el presente documento son relevantes para la detección, identificación y/o cuantificación de cualquier biomarcador de glicano conocido por estar asociado a una enfermedad o trastorno.

Se apreciará que la presente invención proporciona muchas aplicaciones útiles en el perfil de glicol biofarmacéutico. Los siguientes ejemplos ilustrativos se proporcionan para ilustrar la diversidad de usos a los cuales pueden aplicarse los isotopólogos y métodos descritos en el presente documento:



- Rápida identificación de lotes de producción y sitios de producción a través de una huella de glicano singular cuantitativa para un producto dado. Esto podría ayudar a identificar biosimilares empaquetados como originales y rastrear el original y la identidad del lote.
- Detección precisa y cuantitativa de mAb glicanos con funciones efectoras conocidas (que influyen en la unión de la parte Fc al receptor Fc) o efectos importantes en la semivida circulatoria. Estos incluyen glicanos con fucosa de núcleo, galactosa terminal, ácido siálico terminal y glicanos de alto contenido de manosa (estos últimos se acoplarán preferiblemente con el receptor de manosa de, por ejemplo, macrófagos, lo que conduce a la eliminación del fármaco de la circulación).
- Perfiles generales de glicano rápidos y cuantitativos, y la composición de monosacáridos, grado de ramificación, sialilación, contenido de fucosa, etc. en aplicaciones de alto rendimiento en la industria biofarmacéutica como la selección de clones, el desarrollo de procesos, la liberación de lotes a través de presentación IND.
- El uso particular de patrones de glicanos fucosilados y sialilados o cualquier otro glicano lábil como patrones internos en el perfil de glicanos por MALDI-Tof MS para cuantificar y monitorizar la pérdida o migración de estos monosacáridos y optimizar los parámetros de adquisición para evitar la pérdida de estos residuos.
- La producción de kits con la composición exacta de glicanos de un mAb terapéutico originador o glicoproteínas para guiar al productor biosimilar en la selección de clones y el desarrollo del proceso.
- El uso de patrones internos para la cuantificación absoluta de glicofomas en mezclas para ayudar a relacionar los experimentos de eficacia con la glicosilación y, en última instancia, determinar la eficacia de una glicofoma particular.

### Ejemplos

#### Síntesis de un núcleo de heptasacárido N-glicano

La siguiente síntesis está numerada con respecto a las estructuras químicas correspondientes mostradas en la **Figura 3**.

**Bencil 4-O-acetil-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosido (2)**. Una solución de alcohol bencílico (54 µl, 0,525 mmol, 1,5 equiv.) y **1** (250 mg, 0,350 mmol, sintetizada de acuerdo con Serna S., Kardak B., Reichardt N., Martin-Lomas M., Tetrahedron Asymmetry, 2009, 20, 851-856) con tamices moleculares en DCM seco se agitó durante 45 min a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió TMSOTf (6 µl, 0,035 mmol, 0,1 equiv.). Después de 1 h, la reacción se interrumpió con trietilamina, se filtró a través de un lecho de celite y se concentró. El residuo en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en 9:1 de hexano:EtOAc para dar el compuesto del título (198 mg, 90%).

Fr 0,39 (9:1 de tolueno:EtOAc);  $[\alpha]_D^{20} = +9,2$  (c = 0,5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,87-7,48 (m, 4H, Phth), 7,40-7,27 (m, 5H, Ph), 7,13-6,96 (m, 7H, Ph), 6,95-6,85 (m, 3H, Ph), 5,19-5,09 (m, 2H, H-1, H-4), 4,81 (d, J = 12,3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Bn), 4,61-4,54 (m, 3H, CH<sub>2</sub> Bn), 4,50 (d, J = 12,4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Bn), 4,42 (dd, J = 10,7, 8,9 Hz, 1H, H-3), 4,34-4,27 (m, 2H, H-2, CH<sub>2</sub> Bn), 3,75 (dt, J = 9,7, 4,6 Hz, 1H, H-5), 3,68-3,60 (m, 2H, h-6), 1,94 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ac); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ: 169,8, 138,1, 137,9, 137,1, 133,9, 131,7, 128,5, 128,3, 128,2, 128,0, 127,9, 127,8, 127,8, 127,8, 127,5, 123,4, 123,4, 97,3 (C-1), 73,9, 73,8, 73,6, 72,6, 71,0, 69,9, 55,6, 21,0; HRMS (ESI): m/z: calc. C<sub>37</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>8</sub>Na: 644,2260 [M+Na]<sup>+</sup>, observado 644,2294.

#### **Bencil 3,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosido (3)**.

A una solución de **2** (608 mg, 0,978 mmol) en 2:1 de MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 ml) se le añadió NaOMe 0,25 M (300 µl, 20%). Después de agitar durante 1 h, se añadió resina de intercambio iónico ácida hasta pH 7. La solución se filtró, se concentró y se purificó por cromatografía ultrarrápida para dar el compuesto del título (430 mg, 76%).

Fr (hexano:EtOAc);  $[\alpha]_D^{20} = +9,4$  (c = 0,5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,89-7,50 (m, 4H, Phth), 7,42-7,29 (m, 5H, Ph), 7,13-7,01 (m, 7H, Ph), 6,98-6,89 (m, 3H, Ph), 5,20-5,12 (m, 1H, H-1), 4,79 (d, J = 12,3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Bn), 4,73 (d, J = 12,2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Bn), 4,67 (d, J = 11,9 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Bn), 4,61 (d, J = 12,0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Bn), 4,52 (d, J = 12,3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Bn), 4,48 (d, J = 12,3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Bn), 4,29-4,19 (m, 2H, H-2, H-3), 3,90-3,78 (m, 3H, H-6, H-6, H-4), 3,65 (dt, J = 9,7, 4,9 Hz, 1H, H-5), 2,96 (s a, 1H, OH); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ: 168,1, 167,8, 138,3, 137,8, 137,2, 133,8, 131,7, 128,6, 128,2, 128,0, 128,0, 127,9, 127,7, 127,7, 127,5, 123,4, 123,3, 97,5 (C-1), 78,7, 74,4, 73,9, 73,7, 70,9, 70,8, 55,5; HRMS (ESI): m/z: calc. C<sub>35</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>7</sub>Na: 602,2155 [M+Na]<sup>+</sup>, observado 602,2128.

**Bencil 2-O-acetil-4,6-O-bencilideno-3-O-(2-naftilmetil)-β-D-mannopiranosil-(1→4)-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosil-(1→4)-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosido (5).**

Una solución de **1** (400 mg, 0,69 mmol) y **4** (905 mg, 0,83 mmol, 1,2 equiv., sintetizada de acuerdo con Serna S., Kardak B., Reichardt N., Martin-Lomas M., Tetrahedron Asymmetry, 2009, 20, 851-856) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco con 3 Å de tamices moleculares se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. A esta mezcla se le añadió TMSOTf (12 µl, 0,07 nmol, 10%) a temperatura ambiente y la reacción se agitó hasta que el análisis por TLC mostró una conversión completa del material de partida (1 h). La reacción se interrumpió añadiendo trietilamina (20 µl), se filtró a través de un lecho de celite y se concentró. El residuo en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida para obtener el compuesto del título (750 mg, 73%).

Fr 0,17 (3:1 de hexano:EtOAc); [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -4,9 (c = 0,5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,91-7,58 (m, 10H), 7,57-7,28 (m, 12H), 7,23-7,13 (m, 4H), 7,12-6,87 (m, 13H), 6,81-6,68 (m, 3H), 5,53 (s, 1H, CHPh), 5,51 (dd, J = 3,3, 1,3 Hz, 1H, H-2C), 5,27 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H-1B), 4,95 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-1A), 4,88 (d, J = 12,1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Bn), 4,83 (d, J = 12,8 Hz, 2H, 2 x CH<sub>2</sub> Bn), 4,7-4,67 (m, 3H, 2 x CH<sub>2</sub> Bn, H-1C), 4,57-4,47 (m, 4H, 2 x CH<sub>2</sub> Bn), 4,42 (d, J = 12,1 Hz, 1H, 1 x CH<sub>2</sub> Bn), 4,40-4,35 (m, 2H, 2 x CH<sub>2</sub> Bn), 4,29 (dd, J = 10,7, 8,5 Hz, 1H, H-3B), 4,25-4,08 (m, 6H, H<sub>2</sub>A, H<sub>2</sub>B, H-4A, H-4B, H-3A, H-6Ca), 3,90 (t, J = 9,6 Hz, 1H, H-4C), 3,68-3,59 (m, 2H, H-6Ba, H-6Bb), 3,59-3,50 (m, 3H, H-6C-b, H-6Aa, H-3C), 3,43 (dd, J = 11,1, 3,8 Hz, 1H, H-6Ab), 3,30 (ddd, J = 9,9, 3,9, 1,7 Hz, 1H, H-5A), 3,23 (dt, J = 9,9, 2,2 Hz, 1H, H-5B), 3,13 (td, J = 9,7, 4,9 Hz, 1H, H-5C), 2,22 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ac); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ: 170,3, 168,6, 167,7, 167,6, 138,7, 138,7, 138,5, 137,9, 137,6, 137,3, 135,4, 134,1, 133,9, 133,5, 133,4, 133,1, 131,9, 131,8, 131,5, 129,1, 128,6, 128,4, 128,3, 128,2, 128,1, 128,1, 127,9, 127,8, 127,7, 127,7, 127,6, 127,6, 127,5, 127,3, 126,9, 126,3, 126,1, 126,0, 125,5, 123,8, 123,2, 101,7, 99,4 (C-1C), 97,2 (C-1A), 97,1 (C-1B), 79,0, 77,9, 77,0, 76,6, 75,9, 75,8, 74,7, 74,6, 74,4, 74,3, 73,2, 72,9, 71,6, 70,6, 69,2, 68,5, 68,3, 67,9, 67,0, 56,6, 55,8, 21,2; HRMS (ESI): m/z: calc. C<sub>89</sub>H<sub>82</sub>N<sub>2</sub>O<sub>19</sub>Na: 1506,5443 [M+Na]<sup>+</sup>, observado 1506,5481.

**Bencil 2-O-acetil-4,6-O-bencilideno-β-D-mannopiranosil-(1→4)-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosil-(1→4)-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosido (6).**

A una solución de **5** (300 mg, 0,202 mmol) en 4:1 de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (1,2 ml), se le añadió DDQ (138 mg, 0,606 mmol, 3 equiv.). Después de 2 h, la mezcla se diluyó con EtOAc y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado, agua y salmuera. La solución se concentró y se purificó por cromatografía ultrarrápida para dar el compuesto del título (176 mg, 65%).

Fr 0,37 (3:2 de hexano:EtOAc); [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -4,6 (c = 1, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,94-7,57 (m, 8H, Phth), 7,50-7,27 (m, 15H, Ph), 7,11-6,88 (m, 12H, Ph), 6,82-6,68 (m, 3H, Ph), 5,47 (s, 1H, CHPh), 5,31 (dd, J = 3,1, 1,2 Hz, 1H, H-2C), 5,26 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H-1B), 4,95 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-1A), 4,85 (t, J = 12,4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4,76 (d, J = 1,3 Hz, 1H, H-1C), 4,70 (d, J = 12,4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph anomérico), 4,62 (d, J = 12,0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4,50 (d, J = 13,3 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>Ph), 4,47 (d, J = 12,0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4,41 (d, J = 12,1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph anomérico), 4,37 (d, J = 12,4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4,30-4,23 (m, 1H, H-3B), 4,23-4,08 (m, 6H, H-2B, H-4A, H-2A, H-4B, H-3A, H-6Ca), 3,75-3,67 (m, 2H, H-4C, H-3C), 3,63 (dd, J = 7,2, 2,3 Hz, 2H, H-6Ba, H-ABb), 3,59-3,50 (m, 2H, H-6Cb, H-6Aa), 3,43 (dd, J = 11,1, 3,8 Hz, 1H, H-6Ab), 3,33-3,27 (m, 1H, H-5A), 3,23-3,18 (m, 1H, H-5B), 3,15 (dd, J = 15,0, 8,2 Hz, 1H, H-5C), 2,20 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ac); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ: 170,6, 168,5, 167,7, 138,7, 138,4, 138,0, 137,3, 137,1, 134,1, 133,9, 133,5, 131,8, 131,5, 129,3, 128,6, 128,4, 128,4, 128,1, 128,1, 127,9, 127,9, 127,7, 127,6, 127,5, 127,3, 126,9, 126,3, 123,7, 123,2, 102,1, 99,3(C-1C), 97,2(C-1A), 97,0(C-1B), 79,1, 78,6, 76,6, 75,7, 74,6, 74,6, 74,4, 74,4, 73,3, 72,9, 71,4, 70,5, 69,9, 68,5, 68,3, 67,8, 66,7, 56,6, 55,8, 21,1; HRMS (ESI): m/z: calc. C<sub>78</sub>H<sub>74</sub>N<sub>2</sub>O<sub>19</sub>Na: 1365,4784 [M+Na]<sup>+</sup>, observado 1365,4840.

**Bencil (3,4,6-tri-O-acetil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-mannopiranosil)-(1→3)-2-O-acetil-4,6-O-bencilideno-β-D-mannopiranosil-(1→4)-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosil-(1→4)-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosido (8).**

Una solución de **6** (100 mg, 0,074 mmol) y **7** (80 mg, 0,089 mmol, 1,2 equiv., sintetizada de acuerdo con Unverzagt, C.; Eller, S.; Mezzato, S.; Schuberth, R. Chem. Eur. J. 2007, 14, 1304-1311) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco con tamices moleculares se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. A esta mezcla, se le añadió TMSOTf (1,6 µl, 0,007 mmol, 10%) y se agitó hasta que el análisis por TLC mostró una conversión completa del material de partida (1 h). La reacción se interrumpió por la adición de trietilamina (20 µl), se filtró a través de un lecho de celite y el filtrado se concentró. El residuo en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida para dar el compuesto del título (116 mg, 76%).

Fr 0,13 (1:1 de hexano:EtOAc); [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -15,8 (c = 0,5, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,95-7,51 (m, 16H), 7,51-7,27 (m, 11H), 7,08-6,89 (m, 12H), 6,84-6,68 (m, 3H), 5,48-5,40 (m, 2H, H-3E, CHPh), 5,23 (d, J = 7,9 Hz, 1H, H-1B), 5,16 (d, J = 4,0 Hz, 1H, H-2C), 5,02 (t, J = 10,2 Hz, 1H, H-4D), 4,99-4,89 (m, 3H, H-4D, H-1A, H-1D), 4,89-4,77 (m, 4H, H-1E, 2 x CH<sub>2</sub>Ph, H-3D), 4,68 (d, J = 12,2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph anomérico, CH<sub>2</sub>Ph), 4,54-4,46 (m, 4H, 3x CH<sub>2</sub>Ph, H-1C), 4,41-4,30 (m, 3H, CH<sub>2</sub>Ph anomérico, 2 x CH<sub>2</sub>Ph), 4,28-4,05 (m, 8H, H-2E, H-3B, H-4A, H-2B, H-2A, H-3A, H-4B, H-6Ca), 4,00 (dd, J = 3,0, 1,7 Hz, 1H, H-2D), 3,93 (dd, J = 12,3, 3,3 Hz, 1H, H-6Ea), 3,83 (dt, J = 9,8, 3,7 Hz, 1H, H-5D), 3,73 (t, J = 9,6 Hz, 1H, H-4C), 3,70-3,62 (m, 4H, H-6Eb, H-6Da, H-6Db, H-6Ba), 3,60-3,51 (m, 3H, H-6Bb, H-6Aa, H-3C), 3,48 (t, J = 10,3 Hz, 1H, H-6Cb), 3,38 (dd, J = 11,1, 3,6 Hz, 1H, H-6Ab), 3,29 (dd, J = 9,8, 3,1 Hz, 1H, H-5A), 3,15 (dd, J = 9,9, 2,1 Hz, 1H, H-5B), 3,00 (td, J = 9,7, 5,0 Hz, 1H, H-5C), 2,15 (s, 4H, CH<sub>3</sub> Ac, H-5E), 2,05 (d, J = 5,8 Hz, 6H, CH<sub>3</sub> Ac), 1,99 (d, J = 11,5 Hz, 5H, CH<sub>3</sub> Ac), 1,86 (d, J = 4,8 Hz, 6H, CH<sub>3</sub> Ac); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ: 170,6, 170,6, 170,5, 170,2, 170,1, 169,5, 169,2, 167,7, 167,6, 138,8, 138,7, 138,5, 137,9, 137,4, 137,3, 134,3, 134,1, 133,9, 133,5, 131,8, 131,8, 131,5, 130,2, 129,0, 128,8, 128,6, 128,3, 128,1, 128,1, 127,9, 127,7, 127,6, 127,6, 127,6, 127,3,

127,0, 126,9, 123,8, 123,7, 123,2, 102,4, 98,5 (C-1C), 98,0 (C-1D), 97,2 (C-1A, C-1B), 95,8 (C-1E), 78,8, 78,3, 76,7, 76,5, 75,9, 75,3, 74,6, 74,5, 74,4, 74,3, 73,5, 72,9, 71,2, 70,6, 70,6, 70,5, 69,4, 68,9, 68,6, 68,5, 68,3, 67,5, 66,2, 65,5, 62,9, 61,1,56,6, 55,8, 54,1, 20,9, 20,7, 20,6, 20,6; HRMS (ESI):  $m/z$ : calc.  $C_{110}H_{109}N_3O_{36}Na$ : 2070,6689  $[M+Na]^+$ , observado 2070,6689.

5 **Bencil (3,4,6-tri-O-acetil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosil-(1→2)-3, 4, 6-tri-O-acetil-α-D-mannopiranosil)-(1→3)-2-O-acetil-β-D-mannopiranosil-(1→9)-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosil-(1→9)-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosido (9).**

10 A una solución de **8** (100 mg, 0,046 mmol) en  $CH_2Cl_2$  (1 ml) a 0 °C, se le añadieron etanolol (17 μl, 0,244 mmol, 5 equiv.) y dietileterato de trifluoruro de boro (1 μl, 20%). Después de 2 h, se añadió trietilamina. La mezcla se concentró y se purificó por cromatografía ultrarrápida (hexano:EtOAc, 3:1) para dar el compuesto del título (75 mg, 83%).

15 Fr 0,1 (1:2 de hexano:EtOAc);  $[\alpha]_D^{20} = -3,9$  ( $c = 0,5$ ,  $CHCl_3$ );  $^1H$  RMN (500 MHz,  $CDCl_3$ ) δ 7,94 - 7,41 (m, 12H, Phth), 7,35-7,22 (m, 10H, Phth, Ph), 7,16 (m, 1H, Ph), 7,07-6,93 (m, 12H, Ph), 6,74 (m, 3H, Ph), 5,72 (dd,  $J = 10,7, 9,1$  Hz, 1H, H-3E), 5,36 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H, H-1E), 5,25 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H, H-1B), 5,18-5,10 (m, 3H, H-4D, H-4E, H-2C), 4,96-4,91 (m, 2H, H-1D, H-1A), 4,91-4,81 (m, 3H, 2 x  $CH_2$  Bn, H-3D), 4,68 (d,  $J = 12,4$  Hz, 1H,  $CH_2$ Ph), 4,60 (d,  $J = 12,1$  Hz, 1H,  $CH_2$ Ph), 4,54 (s, 1H, H-1D), 4,53-4,46 (m, 3H, 3 x  $CH_2$  Bn), 4,43-4,34 (m, 4H, 3 x  $CH_2$  Bn, H-2E), 4,29 (dd,  $J = 12,3, 4,8$  Hz, 1H, H-6E), 4,27-4,13 (m, 5H, H-2B, H-3B, H-4A, H-2D, H-2A), 4,13-4,06 (m, 3H, H-6E, H-3A, H-4B), 20 3,85-3,77 (m, 4H, H-5E, H-5D, H-6Da, H-6Db), 3,75 (t,  $J = 9,5$  Hz, 1H, H-4C), 3,68 (dd,  $J = 11,8, 3,4$  Hz, 1H, H-6Ca), 3,62 (dd,  $J = 11,6, 1,7$  Hz, 1H, H-6Ba), 3,57-3,50 (m, 3H, H-6Aa, H-6Bb, H-6Cb), 3,42 (dd,  $J = 11,1, 3,8$  Hz, 1H, H-6Ab), 3,34 (dd,  $J = 9,4, 3,5$  Hz, 1H, H-3C), 3,31-3,26 (m, 1H, H-5A), 3,22-3,16 (m, 1H, H-5B), 2,98 (dt,  $J = 8,9, 4,1$  Hz, 1H, H-5C), 2,11 (2 x s,  $J = 1,3$  Hz, 6H, 2 x  $CH_3$  Ac), 2,06-2,00 (3 x s, 9H, 3 x  $CH_3$  Ac), 1,98 (s, 3H,  $CH_3$  Ac), 1,86 (s, 3H,  $CH_3$  Ac);  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ ) δ: 170,9, 170,8, 170,7, 170,3, 170,2, 169,5, 169,5, 168,6, 167,7, 138,7, 138,5, 25 138,4, 137,8, 137,3, 134,5, 133,5, 131,8, 131,4, 128,7, 128,4, 128,3, 128,2, 128,2, 128,1, 127,9, 127,6, 127,6, 127,5, 127,4, 126,9, 123,8, 123,7, 123,3, 123,2, 98,4 (C-1D), 97,7 (C-1C), 97,2 (C-1E), 97,2 (C-1A), 97,1(C-1B), 77,6, 77,5, 76,7, 75,4, 74,6, 74,6, 74,5, 74,5, 74,4, 73,4, 72,9, 72,0, 70,7, 70,6, 70,5, 69,9, 69,1,69,0, 68,5, 68,2, 65,5, 62,5, 62,1,62,1,56,5, 55,8, 54,4, 21,0, 20,9, 20,8, 20,7, 20,7, 20,5; HRMS (ESI):  $m/z$ : calc.  $C_{103}H_{105}N_3O_{36}Na$ : 1982,6376  $[M+Na]^+$ , observado 1982,6331.

30 **Bencil [(3,9,6-tri-O-acetil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-mannopiranosil)-(1→6)]-[(3,4,6-tri-O-acetil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosil-(1→2)-3A6-tri-O-acetil-α-D-mannopiranosil)-(1→3)]-2-O-acetil-β-D-mannopiranosil-(1→4)-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosil-(1→4)-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosido (11).**

35 Una solución de **9** (45 mg, 0,023 mmol) y **10** (30 mg, 0,034 mmol, 1,2 equiv., sintetizada de acuerdo con Unverzagt, C.; Eller, S.; Mezzato, S.; Schuberth, R. Chem. Eur. J. 2007, 14, 1304-1311) en  $CH_2Cl_2$  seco (6 ml) con tamices moleculares se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Esta mezcla se enfrió a -40 °C, se añadió TMSOTf (1 μl, 0,007 mmol, 25%) y la reacción se agitó a esta temperatura hasta que el análisis por TLC mostró una conversión completa del material de partida (1 h). La reacción se interrumpió añadiendo trietilamina (5 μl), se filtró a través de un lecho de celite y se concentró. El residuo en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida y la placa preparativa dio el compuesto del título (45 mg, 74%).

45 Fr 0,28 (1:1 de hexano:acetona);  $[\alpha]_D^{20} = -2,8$  ( $c = 0,5$ ,  $CHCl_3$ );  $^1H$  RMN (500 MHz,  $CDCl_3$ ) δ 7,88-7,55 (m, 15H, Phth), 7,40 (m,  $J = 7,1$  Hz, 1H Phth), 7,33-7,20 (m, 9H, Ph), 7,14 (m,  $J = 5,3, 2,8$  Hz, 1H, Ph), 7,06-6,97 (m, 3H, Ph), 6,98-6,88 (m, 6H, Ph), 6,84 (m,  $J = 7,3$  Hz, 2H, Ph), 6,81-6,67 (m, 4H, Ph), 5,69 (dd,  $J = 10,8, 9,1$  Hz, 1H, H-1E), 5,61 (dd,  $J = 10,8, 9,2$  Hz, 1H, H-1E'), 5,40 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H, H-1E), 5,22-5,14 (m, 4H, H-4D, H-4E, H-1B, H-1E'), 5,14-5,05 (m, 3H, H-4D', H-2C, H-4E'), 4,94 (dd,  $J = 10,2, 3,4$  Hz, 1H, H-3D'), 4,90-4,86 (m, 2H, H-1D, H-1A), 4,83 (dd,  $J = 10,2, 3,2$  Hz, 1H, H-3D), 4,78 (d,  $J = 12,9$  Hz, 1H,  $CH_2$  Bn), 4,72 (d,  $J = 12,7$  Hz, 1H,  $CH_2$  Bn), 4,68-4,60 (m, 2H,  $CH_2$  Bn), 4,53 (s, 1H, H-1C), 4,52-4,36 (m, 7H, 5 x  $CH_2$  Bn, H-2E, H-1D'), 4,36-4,25 (m, 4H, H-2E', H-6aE  $CH_2$  Bn anomérico, H-4D), 4,23-4,14 (m, 3H, H-3B, H-4A, H-6aE'), 4,14-4,00 (m, 6H, H-2A, H-2B, H-2D', H-3A, H-4B, H-6bE), 3,90-3,83 (m, 2H, H-5E, H-6aD), 3,84-3,70 (m, 7H, H-6bE', H-4C, H-5D, H-6bD, H-6aD', H-6bD', H-6aC), 3,67 (d,  $J = 9,9$  Hz, 1H, H-5D), 3,62-3,45 (m, 3H, H-6aB, H-6bB, H-6aA), 3,36-3,27 (m, 4H, H-6BA, H-6BC, H-3C, H-5E'), 3,24 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, H-5A), 3,15 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H, H-5B), 3,10 (dt,  $J = 8,4, 3,9$  Hz, 1H, H-5C), 2,13 (s, 3H,  $CH_3$  Ac), 2,09 (s, 3H,  $CH_3$  Ac), 2,02 (3 x s, 9H, 3 x  $CH_3$  Ac), 2,01-1,97 (m, 15H, 5 x  $CH_3$  Ac), 1,93 (s, 3H,  $CH_3$  Ac), 1,85 (d,  $J = 2,3$  Hz, 6H,  $CH_3$  Ac);  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ ) δ: 171,0, 170,9, 170,8, 170,8, 170,7, 170,4, 170,3, 170,2, 169,5, 169,4, 168,3, 167,7, 167,5, 138,8, 138,7, 138,4, 138,0, 137,2, 134,5, 134,1, 133,8, 133,5, 131,8, 131,7, 131,5, 131,4, 128,7, 128,3, 128,2, 128,1, 128,0, 127,9, 127,6, 127,5, 127,3, 126,9, 123,7, 123,6, 123,2, 99,0 (C-1D), 98,1 (C-1C), 97,8 (C-1D'), 97,2 (C-1E), 97,2, 97,1, 97,0, (C-1A, C-1B, C-1E') 78,2, 78,1, 76,7, 75,8, 74,5, 74,4, 74,4, 74,3, 60 73,3, 73,2, 72,8, 71,8, 71,7, 70,7, 70,6, 70,5, 70,4, 70,0, 69,3, 69,1,68,9, 68,5, 68,1, 68,1,67,3, 65,7, 65,4, 62,5, 62,4, 61,8, 61,6, 56,5, 55,7, 54,5, 20,9, 20,9, 20,8, 20,7, 20,7, 20,5; HRMS (ESI):  $m/z$ : calc.  $C_{135}H_{140}N_4O_{53}Na$ : 2687,8275  $[M+Na]^+$ , observado 2687,8379.

65 **Bencil [(2-amino-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-D-mannopiranosil)-(1→6)]-[2-amino-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-D-manno-piranosil-(1→3)]-β-D-mannopiranosil-(1→4)-2-amino-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→4)-2-amino-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-β-D-glucopiranosido (12).**

A una solución de heptasacárido **11** (32 mg, 12  $\mu$ mol) en 2:1 de MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se le añadió NaOMe (30  $\mu$ l, 0,5 M, 1,25 equiv.). Después de agitar durante 1 h a temperatura ambiente, se añadieron MeOH (400  $\mu$ l) y etilendiamina (300  $\mu$ l) y la mezcla se calentó durante 3 ciclos de 30 min a 120 °C en un microondas. La mezcla se concentró a sequedad usando tolueno y etanol. El residuo en bruto se purificó por columna Sephadex LH-2 (2:1 de MeOH:DCM) para dar el compuesto del título (17 mg, 83%).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, MeOD)  $\delta$  7,52 (d,  $J$  = 7,1 Hz, 2H, Ph), 7,46-7,25 (m, 21, Ph), 7,21 (dd,  $J$  = 4,7, 2,0 Hz, 2H, Ph), 5,22 (dd,  $J$  = 6,8, 4,8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Bn, H-1 Man), 5,17 (d,  $J$  = 11,5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Bn), 4,98 (d,  $J$  = 1,9 Hz, 1H, H-1 Man), 4,70-4,56 (m, 5H, 4 CH<sub>2</sub>Bn, H-1 Man), 4,50 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Bn), 4,47 (d,  $J$  = 8,2 Hz, 1H, H-1 GlcN), 4,43 (d,  $J$  = 7,8 Hz, 1H, H-1 GlcN), 4,39 (d,  $J$  = 7,9 Hz, 1H, H-1 GlcN), 4,30 (d,  $J$  = 8,1 Hz, 1H, H-1 GlcN), 4,25-4,12 (m, 3H), 4,08 (t,  $J$  = 9,2 Hz, 1H, H-4 GlcN), 4,02-3,96 (m, 1H, H-6 Glc), 3,96-3,76 (m, 12H), 3,76-3,61 (m, 10H), 3,58 (m, 2H), 3,52 (m, 1H), 3,48-3,42 (m, 1H), 3,41-3,32 (m, 5H), 3,31-3,19 (m, 4H), 2,83 (td,  $J$  = 10,7, 8,1 Hz, 2H, H-2 GlcN), 2,77 (d,  $J$  = 8,4 Hz, 1H, H-2, GlcN), 2,67 (dd,  $J$  = 9,7, 8,0 Hz, 1H, H-2 GlcN); <sup>13</sup>C RMN del experimento por HSQC (126 MHz, MeOD)  $\delta$  128,48, 127,90, 127,93, 127,38, 127,89, 100,48, 74,34, 74,41, 97,67, 70,66, 74,24, 72,70, 99,85, 70,73, 74,33, 72,71, 72,90, 101,50, 101,71, 101,96, 101,48, 77,11, 74,70, 70,40, 76,35, 77,63, 70,20, 66,17, 61,22, 73,63, 70,36, 66,15, 68,17, 61,02, 68,29, 66,25, 60,84, 67,52, 72,89, 68,48, 75,01, 82,05, 82,63, 82,33, 76,99, 70,04, 75,54, 75,27, 76,85, 56,82, 56,18, 56,16, 56,22.

**Bencil [(2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 6)]-[2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-mannopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-mannopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-3,6-di-O-bencil-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-3,6-di-O-bencil-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido (<sup>13</sup>C<sub>8</sub>) **13** (<sup>13</sup>C<sub>8</sub>-G0(Bn<sub>5</sub>)).**

A una solución de heptasacárido **12** (100 mg, 62,5  $\mu$ mol) en MeOH seco (2 ml) a 0 °C, se le añadieron anhídrido acético <sup>13</sup>C<sub>4</sub> (42  $\mu$ l, 444  $\mu$ mol) y NaOMe 0,5 M (0,8 ml). Después de 2 h a 0 °C, la mezcla se concentró y se purificó por HPLC Sepadex LH-20 (MeOH) para dar el compuesto del título (80 mg, 72%). <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, MeOD)  $\delta$  7,40 -7,21 (m, 22H, arom), 7,21 -7,14 (m, 3H, arom), 5,07 (d,  $J$  = 1,9 Hz, 1H, H-1D), 4,99 (dd,  $J$  = 16,3, 12,0 Hz, 2H, 2 CH<sub>2</sub>Bn), 4,82 (d,  $J$  = 12,5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Bn), 4,79 (d,  $J$  = 1,8 Hz, 1H, H-1D'), 4,75 (d,  $J$  = 12,1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Bn), 4,70 -4,66 (m, 2H, H-1C, H-1B), 4,66 -4,54 (m, 4H, CH<sub>2</sub>Bn), 4,46 (dd,  $J$  = 13,9, 8,2 Hz, 4H, H-1A, H-1E, 2 CH<sub>2</sub>Bn), 4,31 (d,  $J$  = 8,4 Hz, 1H, H-1E), 4,11 (d,  $J$  = 3,1 Hz, 1H, H-2C), 4,08 (dd,  $J$  = 3,4, 1,8 Hz, 1H, H-2D), 3,99 (t,  $J$  = 8,5 Hz, 2H, H-4A, H-4B), 3,96 -3,86 (m, 3H, H-2A, H-6Ca, H-6Da), 3,86 -3,75 (m, 9H, H-6Ea, H-2B, H-4C, H-6Aa, H-6Ab, H-3D, H-3D', H-2D', H-5D), 3,75 -3,53 (m, 14H, H-6E'a, H-6E'b, H-6Eb, H-6D'a, H-6Ba, H-3B, H-2E', H-2E, H-6Db, H-6D'b, H-6Cb, H-6Bb, H-5D', H-3A), 3,53 -3,41 (m, 6H, H-4D', H-4D, H-5A, H-3E, H-3E', H-3C), 3,37 -3,24 (m, 4H, H-4E', H-4E, H-5B, H-5E), 3,20 -3,13 (m, 2H, H-3E', H-5C), 2,11 (t,  $J$  = 5,7 Hz, 3H, Ac), 1,95 (dd,  $J$  = 18,2, 6,1 Hz, 3H, Ac), 1,88 -1,83 (m, 3H, Ac), 1,70 (dd,  $J$  = 18,1, 5,9 Hz, 3H, Ac); <sup>13</sup>C RMN del experimento por HSQC (126 MHz, MeOD): 127,9, 127,8, 127,7, 127,4, 100,5 (C-1E'), 100,1 (C-1A, C-1B, C-1C, C-1E), 99,6 (C-1D), 97,2 (C-1D'), 81,5, 80,8, 80,4, 77,6, 77,1, 76,6, 76,1, 75,9, 74,9, 74,9, 74,0, 73,9, 73,8, 73,5, 73,1, 73,0, 72,9, 70,5, 70,3, 70,3, 70,2, 70,2, 68,5, 68,4, 67,8, 65,8, 61,9, 61,7, 61,5, 61,0, 55,8, 55,8, 54,5, 22,1, 22,1, 21,6.

**[(2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 6)]-[2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manno-piranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-mannopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 9)-2-acetamido-2-desoxi- $\alpha$ ,  $\beta$ -D-glucopiranosida (<sup>13</sup>C<sub>8</sub>) **(14)** (<sup>13</sup>C<sub>8</sub>-G0(Bn<sub>5</sub>)).**

Se disolvió el heptasacárido **13** (13 mg, 7,3  $\mu$ mol) en 1 ml de MeOH y se pasó a través del hidrogenador usando un cartucho de Pd al 10%/C y MeOH como disolvente con un caudal de 1 ml/min, a 50°C usando condiciones de hidrógeno completo. La mezcla resultante se concentró, se disolvió de nuevo en agua y se purificó en un cartucho de grafito para dar el compuesto del título (7 mg, 72%).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  5,20 (d,  $J$  = 2,5 Hz, 0,6H, H-1A  $\alpha$ -GlcNAc), 5,13 (d,  $J$  = 1,8 Hz, 1H, H-1D  $\alpha$ -1,3-Man), 4,93 (d,  $J$  = 1,8 Hz, 1H, H-1D'  $\alpha$ -1,6-Man), 4,71 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 0,4H, H-1A  $\beta$ -GlcNAc), 4,62 (dd,  $J$  = 7,8, 4,4 Hz, 1H, H-1B  $\beta$ -GlcNAc), 4,57 (d,  $J$  = 8,4 Hz, 2H, H-1E  $\beta$ -GlcNAc, H-1E'  $\beta$ -GlcNAc), 4,26 (d,  $J$  = 2,5 Hz, 1H, H-2C), 4,20 (dd,  $J$  = 3,4, 1,6 Hz, 1H, H-2D), 4,12 (dd,  $J$  = 3,4, 1,7 Hz, 1H, H-2D'), 4,04-3,85 (m, 10H), 3,85-3,39 (m, 30H), 2,25-2,13 (m, 6H, 2Ac), 1,98-1,88 (m, 6H, 2Ac). <sup>13</sup>C RMN (126 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  101,4 (C-1B  $\beta$ -GlcNAc), 100,4 (C-1C  $\beta$ -1,4-Man), 99,6 (C-1D  $\alpha$ -1,3-Man, C-1E  $\beta$ -GlcNAc, C-1E'  $\beta$ -GlcNAc), 97,0 (C-1D'  $\alpha$ -1,6-Man), 94,8 (C-1A  $\beta$ -GlcNAc), 90,4 (C-1A  $\alpha$ -GlcNAc), 80,4, 79,6, 79,5, 79,2, 76,4, 76,3, 75,8, 75,8, 74,6, 74,4, 74,3, 73,5, 73,4, 73,3, 72,8, 72,5, 72,0, 70,2, 70,0, 69,9, 69,6, 69,4, 69,4, 69,2, 67,3, 67,3, 65,8, 65,7, 61,7, 61,6, 60,6, 60,1, 60,0, 59,9, 56,1, 55,3, 54,9, 53,6; HRMS (ESI):  $m/z$  calculado para C<sub>42</sub><sup>13</sup>C<sub>8</sub>H<sub>84</sub>N<sub>4</sub>O<sub>36</sub>Na: 1347,5031 [M+Na]<sup>+</sup>, observado 1347,5131.

#### Síntesis de un núcleo de N-glicano de complejo triantenario

La siguiente síntesis está numerada con respecto a las estructuras químicas correspondientes mostradas en la **Figura 4**.

**Bencil [di-(O-3,4,6-tri-O-acetil-2-desoxi-2-ftalimido- $\beta$ -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 2)-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-di-O-acetil- $\alpha$ -D-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-2-O-acetil-4,6-O-bencilideno- $\beta$ -D-mannopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-ftalimido- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-ftalimido- $\beta$ -D-glucopiranosido **(18)**.**

Una solución del aceptor **7** (0,18 g, 0,13 mmol) y el donante **17** (0,21 g, 0,16 mmol, 1,2 equiv.) en DCM seco (2 ml), con tamices moleculares se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadió TMSOTf (2 µl, 13 µmol, 10%) y la reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La reacción se interrumpió mediante la adición de Et<sub>3</sub>N (25 µl), se filtró a través de un lecho de celite y el filtrado se concentró. El residuo en bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (2:3 de Hexano:EtOAc), para dar el compuesto del título (0,27 g, 82%).  $[\alpha]_D^{20}$ : -24,0 (c 1,05, CH<sub>3</sub>Cl). RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7,90-7,65 (m, 17H, H-arom), 7,54 (m, 2H, H-arom), 7,42-7,26 (m, 13H, H-arom), 7,06-6,96 (m, 11H, H-arom), 6,79 (m, 3H, H-arom), 5,76 (dd, *J* = 9,0, 10,7 Hz, 1H, H-3E'), 5,44 (m, 3H, H-1E', H-3E, CHPh), 5,27 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, H-1A), 5,18 (m, 2H, H-2C, H-4E'), 4,96 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, H-1B), 4,83 (m, 6H, H-4E, 2xCH<sub>2</sub> Bn, H-3D, H-1D, H-1E), 4,71, 4,65 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub> Bn), 4,52 (m, 4H, H-1C, 3xCH<sub>2</sub> Bn), 4,39 (m, 3H, 3xCH<sub>2</sub> Bn), 4,29-4,07 (m, 13H, H-2E', 2xH-6E', H-2A, H-2B, H-3A, H-3B, H-4A, H-4B, H-6Ca, H-5E', H-2E, H-6Da), 3,98 (m, 3H, H-5D, H-6Ea, H-2D), 3,82 (t, *J* = 10,3 Hz, 1H, H-4D), 3,73 (t, *j* = 8,5 Hz, 1H, H-4C), 3,75-3,39 (m, 8H, 2xH-6A, H-6Eb, 2xH-6B, H-3C, H-6Cb, H-6Db), 3,32 (m, 1H, H-5B), 3,19 (m, 1H, H-5A), 2,99 (m, 1H, H-5C), 2,26, 2,12 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ac), 2,08 (m, 1H, H-5E), 2,04, 2,03, 2,02, 1,84, 1,83, 1,72, 1,54 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ac). <sup>13</sup>C RMN (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170,8, 170,5, 170,4, 170,2, 170,1, 170,0, 169,5, 169,2, 167,3, 138,7, 138,6, 138,4, 137,8, 137,3, 137,2, 134,3, 134,0, 133,5, 131,7, 131,4, 128,9, 128,7, 128,5, 128,2, 128,1, 127,0, 127,7, 127,6, 127,5, 127,4, 127,2, 126,9, 126,8, 123,8, 123,4, 102,3, 98,1 (C-1C), 97,6 (C-1D), 97,1 (C-1A, C-1B), 95,8 (C-1E), 94,8 (C-1E'), 78,8, 77,8, 76,6, 75,9, 75,1, 74,5, 74,3, 74,2, 73,3, 72,8, 72,7, 71,8, 71,0, 70,8, 70,5, 70,4, 68,6, 68,5, 68,4, 68,1, 67,4, 66,0, 63,6, 61,6, 61,1, 56,5, 55,7, 54,8, 54,0, 20,9, 20,7, 20,6, 20,4, 20,2.

**20 Bencil [di-(O-3,4,6-tri-O-acetil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosil)-(1→2)-(1→4)-3,6-di-O-acetil-α-D-mannopiranosil]-(1→3)-2-O-acetil-β-D-mannopiranosil-(1→4)-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosil-(1→4)-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosido (19)].**

Se añadieron EtSH (31 µl, 0,25 mmol, 5 equiv.) y BF<sub>3</sub>OEt<sub>2</sub> (2 µl, 10 µmol, 20%) a 0 °C a una solución de hexasacárido **18** (0,14 g, 0,05 mmol) en DCM (2 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta una conversión completa (2 horas). A continuación, se inactivó con Et<sub>3</sub>N, se concentró y se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (1:3 de Hexano:EtOAc), obteniendo el compuesto del título (0,12 g, 88%).

$[\alpha]_D^{20}$ : +1,9 (c 0,93, CDCl<sub>3</sub>). RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7,90-7,66 (m, 15H, H-arom), 7,32-7,24 (m, 12H, H-arom), 7,17 (m, 1H, H-arom), 7,02-6,98 (m, 10H, H-arom), 6,76 (m, 3H, H-arom), 5,78 (dd, *J* = 9,1, 10,7 Hz, 1H, H-3E), 5,73 (m, dd, *J* = 9,1, 10,8 Hz, 1H, H-3E'), 5,48 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, H-1E'), 5,27 (m, 2H, H-1E, H-1A), 5,22 (t, *J* = 9,8 Hz, 1H, H-4E'), 5,15 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H, H-2C), 5,10 (t, *J* = 9,7 Hz, 1H, H-4E), 5,05 (dd, *J* = 3,0, 8,5 Hz, 1H, H-3D), 4,96 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, H-1B), 4,86 (m, 3H, CH<sub>2</sub> Bn, H-1D), 4,70 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H, 1xCH<sub>2</sub> Bn), 4,58 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H, 1xCH<sub>2</sub> Bn), 4,52 (m, 4H, H-1C, 3xCH<sub>2</sub> Bn), 4,45 (m, 1H, H-6E'a), 4,39 (m, 3H, 3xCH<sub>2</sub> Bn), 4,34-4,04 (m, 15H, H-2E, H-2E', 2xH-6E, H-6E'b, H-2A, H-2B, H-3A, H-3B, H-4A, H-4B, H-2D, H-5E', H-6Da, H-4D), 3,82 (m, 1H, H-5E), 3,78 (m, 1H, H-5D), 3,69 (m, 2H, H-4C, H-6Ca), 3,62-3,48 (m, 5H, H-6Aa, H-6Ba, H-6Cb, H-6Ab, H-6Db), 3,44 (dd, *J* = 3,9, 11,3 Hz, 1H, H-6Bb), 3,31 (m, 2H, H-5B, H-3C), 3,20 (m, 1H, H-5A), 2,94 (m, 1H, H-5C), 2,19, 2,15, 2,11, 2,07, 2,04, 2,02, 1,88, 1,85 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ac). <sup>13</sup>C RMN (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170,7, 170,2, 170,1, 170,0, 169,5, 167,6, 138,6, 138,5, 138,3, 137,8, 137,2, 134,4, 134,3, 131,6, 131,3, 128,6, 128,2, 128,1, 128,0, 127,9, 127,8, 127,5, 127,4, 127,3, 127,2, 126,8, 123,7, 123,1, 98,1 (C-1D), 97,4 (C-1E, C-1C), 97,1 (C-1A, C-1B), 95,9 (C-1E'), 77,2, 76,5, 75,9, 75,3, 75,2, 74,5, 74,4, 74,3, 73,1, 72,8, 71,8, 71,3, 70,7, 70,5, 70,4, 68,9, 68,8, 68,5, 68,3, 68,1, 67,1, 62,7, 62,0, 61,1, 56,5, 55,7, 54,8, 54,4, 20,8, 20,7, 20,6, 20,4.

**45 Bencil [di-(O-3,9,6-tri-O-acetil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosil)-(1→2)-(1→4)-3,6-di-O-acetil-α-D-mannopiranosil]-(1-3)-[O-3,4,6-tri-O-acetil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-mannopiranosil]-(1→6)-2-O-acetil-β-D-mannopiranosil-(1→4)-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosil-(1→4)-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-2-ftalimido-β-D-glucopiranosido (20)].**

Una suspensión del aceptor **19** (75 mg, 0,03 mmol), el donante **11** (41 mg, 0,05 mmol, 1,5 equiv., sintetizada de acuerdo con Unverzagt, C.; Eller, S.; Mezzato, S.; Schuberth, R. *Chem. Eur. J.* **2007**, *14*, 1304-1311) y tamices moleculares en DCM seco (9,8 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se enfrió a -40 °C y se añadió TfOH (1 µl, 0,01 µmol, 33%). La mezcla de reacción se agitó a -40 °C hasta que el donante desapareció (1 h). A continuación, la reacción se interrumpió con Et<sub>3</sub>N, se filtró sobre un lecho de celite y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida, obteniendo el compuesto del título (60 mg, 62%).

$[\alpha]_D^{20}$ : +2,1 (c 0,53, CH<sub>3</sub>Cl). RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7,88-7,61 (m, 19H, H-arom), 7,30-7,23 (m, 11H, H-arom), 7,18, 7,04 (m, 1H, H-arom), 7,01-6,93 (m, 7H, H-arom), 6,85, 6,75 (m, 3H, H-arom), 5,79 (dd, *J* = 9,0, 10,7 Hz, 1H, H-3E), 5,70 (m, 2H, H-3E, H-3E'), 5,45 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, H-1E'), 5,33 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, H-1E), 5,24-5,09 (m, 7H, H-1E'', H-1A, H-4E', H-4D', H-2C, H-4E, H-4E''), 4,98 (m, 2H, H-3D, H-3D'), 4,94 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, H-1B), 4,83 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H, 1xCH<sub>2</sub> Bn), 4,78 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H, H-1D), 4,71 (m, 2H, 2xCH<sub>2</sub> Bn), 4,59 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H, 1xCH<sub>2</sub> Bn), 4,51-3,98 (m, 27H, H-1C, 6xCH<sub>2</sub> Bn, 2xH-6E', H-1D', H-2E'', H-2E, 2xH-6E, H-2E', H-6E'' a, H-2D, H-2D', H-2B, H-3B, H-4B, H-2A, H-3A, H-4A, H-5E', H-6Da, H-4D), 3,87 (m, 2H, H-6E''b, H-5E), 3,81-3,69 (m, 6H, H-5D, H-6D'a, H-4C, H-6Ca, H-6Db, H-5D'), 3,59-3,45 (m, 5H, 2xH-6Aa, H-6Ba, H-6D'b, H-5E''), 3,39 (dd, *J* = 4,0, 11,5 Hz, 1H, H-6Bb), 3,33 (dd, *J* = 5,0, 10,3 Hz, 1H, H-6Cb), 3,26 (m, 2H, H-5B, H-3C), 3,17 (m, 1H, H-5A), 3,01 (m, 1H, H-5C), 2,15, 2,09, 2,09, 2,05, 2,04, 2,01, 2,01, 2,00, 1,95, 1,89, 1,88, 1,87, 1,85, 1,85 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ac). <sup>13</sup>C RMN (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170,8, 170,7, 170,6, 170,5, 170,3, 170,2, 170,1, 170,0, 169,9, 169,4, 169,3, 169,2, 167,6, 167,4, 138,8, 138,6, 138,3, 138,0, 137,2, 134,3, 133,4, 131,7, 131,3, 128,5, 128,2, 128,1, 128,0, 127,9, 127,8, 127,7, 127,4, 127,2, 126,8, 123,7, 123,5, 123,0, 98,6 (C-1D), 97,7 (C-1C, C-1D'), 97,3 (C-1E), 97,2 (C-1E''), 97,1 (C-1A, C-1B), 95,9 (C-1E'), 77,7, 76,5,

75,8, 75,0, 74,5, 74,3, 73,0, 72,8, 72,4, 71,7, 71,2, 70,7, 70,6, 70,4, 70,2, 70,0, 69,6, 69,0, 68,9, 68,8, 68,6, 68,3, 68,1, 65,5, 62,7, 62,4, 61,9, 61,7, 61,5, 61,2, 56,5, 55,7, 54,9, 54,4, 20,7, 20,6, 20,5, 20,4, 20,3.

**5 [(2-acetamido-β-D-glucopiranosil)-(1→2)-α-D-mannopiranosil]-(1→6)-[di-(2-acetamido-β-D-glucopiranosil)-(1→2)-(1→4) -α-D-mannopiranosil]-(1→3)-β-D-mannopiranosil-(1→4)-2-acetamido-3,6-di-O-bencil-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→4)-2-acetamido-1,3,6-tri-O-bencil-2-desoxi-β-D-glucopiranosido (<sup>13</sup>C<sub>10</sub>) (22).**

A una solución del compuesto **20** (43 mg, 14,1 μmol) en 2:1 de MeOH:DCM (300:150 μl), se le añadió NaOMe (42 μl, 21,2 μl, 1,5 equiv.). Después de agitar 1 h a temperatura ambiente, se añadieron MeOH (300 μl) y etilendiamina (300 μl) y la mezcla se calentó durante 3 ciclos de 30 min a 120 °C en un microondas. La mezcla se concentró a sequedad usando tolueno y etanol. El residuo en bruto se purificó por columna Sephadex LH-20 (MeOH) para dar el compuesto **21**. El compuesto **21** se disolvió en MeOH (200 μl) a 0 °C y se añadió anhídrido acético <sup>13</sup>C<sub>4</sub>. Después de 2 h, se añadió EtOH y la mezcla se concentró y se purificó por columna Sephadex LH-20 (MeOH) para dar el compuesto del título (11 mg, 40%, 2 etapas).

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, MeOD): 7,41-7,27 (m, 22H, H-arom), 7,19 (m, 3H, H-arom), 5,03 (m, 3H, H-1D, 2xCH<sub>2</sub> Bn), 4,85 (d, J = 12,0 Hz, 1H, 1xCH<sub>2</sub> Bn), 4,80 (d, J = 1,9Hz, 1H, H-1D'), 4,77 (d, J = 12,0 Hz, 1H, 1xCH<sub>2</sub> Bn), 4,68-4,57 (m, 6H, H-1C, H-1B, 4xCH<sub>2</sub> Bn), 5,50 (m, 2H, H-1E", H-1A), 4,46 (s, 2H, 2xCH<sub>2</sub> Bn), 4,43 (d, J = 8,3Hz, 1H, H-1E), 4,32 (d, J = 8. 3Hz, 1H, H-1E'), 4,13 (m, 1H, H-2D), 4,08 (m, 2H, H-3D, H-2C), 4,02 (m, 2H, H-4A, H-4B), 3,95-3,58 (m, 30H, H-2A, 2xH-6C, 2xH-6E, 2xH-6E", 2xH-6E', 2xH-6D, 2xH-6D', H-5D, H-2D', H-2B, H-4C, H-3D', 2xH-6B, 2xH-6A, H-2E, H-4D, H-3B, H-2B, H-3A, H-2E', H-5D', H-4D'), 3,52-3,43 (m, 5H, H-5A, H-3E, H-3E", H-3C), 3,36 (m, 3H, H-5E", H-4E', H-4E"), 3,33 (m, 2H, H-5B, H-4E), 3,26 (m, 1H, H-5E), 3,18 (m, 2H, H-5C, H-5E'), 2,14 (m, 4,5H, <sup>13</sup>CH<sub>3</sub> Ac), 1,97 (dd, J = 6,4, 17,8 Hz, 3H, <sup>13</sup>CH<sub>3</sub> Ac), 1,89 (m, 4,5H, <sup>13</sup>CH<sub>3</sub> Ac), 1,72 (dd, J = 6,4, 17. 8Hz, 3H, <sup>13</sup>CH<sub>3</sub> Ac). <sup>13</sup>C RMN (126 MHz, MeOD, HSQC): 128,2-126,6, 101,6 (C-1E"), 100,5 (C-1E, C-1E"), 100,2 (C-1A), 100,0 (C-1C, C-1B), 99,6 (C-1D), 97,1 (C-1D'), 82,0, 81,0, 80,4, 78,1,77,7, 76,5, 75,6, 75,2, 74,7, 73,9, 73,1,72,2, 70,3, 68,3, 67,6, 65,8, 61,2, 55,7, 54,6, 22,3 (<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>).

#### Elongación enzimática

**30 [β-D-galactopiranosil-(1→4)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-D-mannopiranosil-(1→6)]-[β-D-galactopiranosil-(1→4)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-D-mannopiranosil-(1→3)]-β-D-mannopiranosil-(1→4)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→4)-2-acetamido-2-desoxi-α,β-D-glucopiranososa (15).** Una solución (1 ml) de **14** (2,126 mg, 1,6 μmol), sal disódica de uridina 5'-difosfo-α-D-galactosa UDP-Gal (2,280 mg, 3,74 μmol, 2,4 equiv.), albúmina sérica bovina BSA (1 mg), 200 mU de leche de vaca β-1,4-galactosiltransferasa 2,4,4,22, 9,2 U de fosfatasa alcalina 3,1,3,1, y MnCl<sub>2</sub> (10 mM) en 770 μl de tampón Hepes (50 mM, pH = 7,4) se incubó a 37 °C durante 18 h. La mezcla resultante se calentó a 95 °C durante 5 min para precipitar la enzima. Después de la centrifugación, el sobrenadante se purificó a través de un cartucho de grafito para dar el compuesto del título (2,09, 78%). <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 5,12 (d, J = 2,7 Hz, 0,6H, H-1 α-GlcNAc), 5,05 (d, J = 1,4 Hz, 1H, H-1 α-1,3-Man), 4,86 (d, J = 1,6 Hz, 1H, H-1 α-1,6-Man), 4,66-4,59 (m, 0,4H, H-1 β-GlcNAc), 4,53 (dd, J = 15,9, 7,9 Hz, 3H, H-1 β-GlcNAc), 4,40 (dd, J = 7,8, 3,1 Hz, 2H, H-1 β-Gal), 4,18 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 4,12 (dd, J = 3,3, 1,6 Hz, 1H), 4,08-4,00 (m, 1H), 3,95-3,36 (m, 60H), 2,17-2,04 (m, 6H, Ac), 1,93-1,78 (m, 6H, Ac). Picos de <sup>13</sup>C RMN seleccionados del experimento por HSQC (126 MHz, D<sub>2</sub>O) δ = 102,9 (C-1 β-Gal), 101,3 (H-1 β-GlcNAc), 100,4 (C-1 β-Man), 99,6(C-1 α-1,3-Man), 99,5 (C-1 β-GlcNAc), 97,1(C-1 α-1,6-Man), 94,8(C-1 β-GlcNAc), 90,4 (C-1 α-GlcNAc).

**45 [(2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-D-mannopiranosil-(1→6)]-[2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-D-mannopiranosil-(1→3)]-β-D-mannopiranosil-(1→4)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→4)-[α-L-fucopiranosil-(1→6)]-2-acetamido-2-desoxi-α,β-D-glucopiranososa (16).** Una solución (1 ml) de **14** (3,030, mg, 2,28 μmol), sal disódica de guanosina 5'-difosfo-β-L-fucosa GDP-Fuc (1,760 mg, 2,77 μmol, 1,2 equiv.), albúmina sérica bovina BSA (1 mg), una α-1,6-fucosiltransferasa de núcleo (50 μl, 0,66 mg/ml) y MnCl<sub>2</sub> (20 mM) en 770 μl de tampón MES (80 mM, pH = 6,5) se incubó a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla resultante se calentó a 95 °C durante 5 min para precipitar la enzima. Después de la centrifugación, el sobrenadante se purificó a través de un cartucho de grafito para dar el compuesto del título (2,73 mg, 82%). <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 5,11 (d, J = 3,2 Hz, 0,6H, H-1 α-GlcNAc), 5,04 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H-1 α-1,3-Man), 4,88-4,79 (m, 2H, H-1 α-1,6-Man, H-1 α-fuc), 4,64-4,55 (m, 0,4H+1H, H-1 β-GlcNAc), 4,48 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-1 β-GlcNAc), 4,18 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 4,11 (dd, J = 3,3, 1,6 Hz, 1H), 4. 09-3. 98 (m, 2H), 3,98-3,75 (m, 11H), 3,75-3,31 (m, 33H), 2,25-2,04 (m, 6H, Ac), 1,95-1,78 (m, 6H, Ac), 1,14 (dd, J = 6,6, 4,8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Fuc). <sup>13</sup>C RMN seleccionado del experimento por HSQC (126 MHz, D<sub>2</sub>O) δ = 101,0 (C-1 β-GlcNAc), 100,3 (C-1 β-Man), 99,6 (C-1 β-GlcNAc), 99,5 (C-1 α-1,3-Man), 99,5 (C-1 α-Fuc), 97,0(C-1 α-1,6-Man), 94,8 (C-1 β-GlcNAc), 90,4 (C-1 α-GlcNAc, 15,4 (CH<sub>3</sub> FUC).

**60 [β-D-galactopiranosil-(1→4)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-D-mannopiranosil-(1→6)]-[β-D-galactopiranosil-(1→4)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→2)-α-D-mannopiranosil-(1→3)]-β-D-mannopiranosil-(1→4)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→4)-[α-L-fucopiranosil-(1→6)]-2-acetamido-2-desoxi-α,β-D-glucopiranososa (17).** Una solución (0,5 ml) de **16** (1,836 mg, 1,6 μmol), sal disódica de uridina 5'-difosfo-α-D-galactosa UDP-Gal (2,210 mg, 3,62 μmol, 2,9 equiv.), albúmina sérica bovina BSA (1 mg), 200 mU de leche de vaca β-1,4-galactosiltransferasa 2,4,4,22, 9,2 U de fosfatasa alcalina 3,1,3,1, y MnCl<sub>2</sub> (10 mM) en 450 μl de tampón Hepes (50 mM, pH = 7,4) se incubó a 37 °C durante 18 h. La mezcla resultante se calentó a 95 °C durante 5 min para precipitar la enzima. Después de la centrifugación, el sobrenadante se purificó a través de un

cartucho de grafito, para dar el compuesto del título (1,80 mg, 80%).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  5,11 (d,  $J = 3,1$  Hz, 0,6H, H-1 $_{\alpha}$ -GlcNAc), 5,05 (d,  $J = 1,5$  Hz, 1H, H-1 $_{\alpha-1,3}$ -Man), 4,85 (s, 1H, H-1 $_{\alpha-1,6}$ -Man), 4,82 (t,  $J = 3,7$  Hz, 1H, H-1 $_{\alpha}$ -Fuc), 4,62 (d,  $J = 7,9$  Hz, 0,4H, H-1 $_{\beta}$ -GlcNAc), 4,59 (d,  $J = 7,7$  Hz, 1H, H-1 $_{\beta}$ -GlcNAc), 4,51 (d,  $J = 7,7$  Hz, 2H, H-1 $_{\beta}$ -GlcNAc), 4,40 (dd,  $J = 7,8, 2,7$  Hz, 2H, H-1 $_{\beta}$ -Gal), 4,18 (s, 1H), 4,12 (d,  $J = 3,3$  Hz, 1H), 4,08-4,00 (m, 2H), 3,97-3,39 (m, 54H), 2,18-2,07 (m, 6H), 1,92-1,81 (m, 6H, Ac), 1,14 (dd,  $J = 6,6, 5,0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$  Fuc). Picos de  $^{13}\text{C}$  RMN seleccionados del experimento por HSQC (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 102,9$  (H-1 $_{\beta}$ -Gal), 101,0 (H-1 $_{\beta}$ -GlcNAc), 100,4 (H-1 $_{\beta}$ -Man), 99,5 (H-1 $_{\beta}$ -GlcNAc), 99,5 (H-1 $_{\alpha-1,3}$ -Man), 99,3 (H-1 $_{\alpha}$ -Fuc), 96,8 (H-1 $_{\alpha-1,6}$ -Man), 94,8 (H-1 $_{\beta}$ -GlcNAc), 90,4 (C-1 $_{\alpha}$ -GlcNAc), 15,5  $\text{CH}_3$ , Fuc).

#### 10 Preparación de patrones de glicano mono-galactosidados asimétricos *Galactosilación de $^{13}\text{C}_8\text{-G0(Bn}_5\text{)}$*

El patrón  $^{13}\text{C}_8\text{-G0(Bn}_5\text{)}$  parcialmente desprotegido 13 (1,1 mg) se trató con  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa (200 mU) y uridina difosfato galactosa (UDP-Gal, 1,25 equivalentes) en tampón HEPES 50 mM a pH 7,4, que contenía  $\text{MnCl}_2$  2 mM y BSA. Después de 1 h de reacción a 37 °C, la fracción proteica se precipitó por calentamiento a 95 °C durante 5 minutos y se eliminó por filtración. Esta solución se analizó directamente por UPLC-MS mostrando una conversión del 23 % y del 26% en  $^{13}\text{C}_8\text{-G1}^6\text{(Bn}_5\text{)}$  y  $^{13}\text{C}_8\text{-G1}^3\text{(Bn}_5\text{)}$  respectivamente. Esta reacción puso aumentarse hasta el uso de 10 mg de  $^{13}\text{C}_8\text{-G0(Bn}_5\text{)}$  como aceptor.

La reacción en bruto después de la precipitación de proteínas a partir de la elongación enzimática de 10 mg de  $^{13}\text{C}_8\text{-G0(Bn}_5\text{)}$  se evaporó, y después los diferentes compuestos se purificaron por HPLC en una columna semipreparativa C18 en agua/ACN de fase inversa para producir los compuestos  $^{13}\text{C}_8\text{-G1}^3\text{(Bn}_5\text{)}$  (2,4 mg),  $^{13}\text{C}_8\text{-G1}^6\text{(Bn}_5\text{)}$  (2,2 mg) y  $^{13}\text{C}_8\text{-G2(Bn}_5\text{)}$  (2,0 mg) en forma pura (en los que G1 $^3$  y G1 $^6$  representan los compuestos mono-galactosilados respectivos y G2 el compuesto bis-galactosilado).

Ambos compuestos mono-galactosilados isoméricos se sometieron a hidrogenólisis en MeOH usando 1 atm de gas  $\text{H}_2$  en un reactor de flujo H-Cube con un cartucho de Pd al 10%/C, obteniendo los N-glicanos marcados con  $^{13}\text{C}$   $^{13}\text{C}_8\text{-G1}^3$  (1,2 mg) y  $^{13}\text{C}_8\text{-G1}^6$  (1,1 mg) en forma pura.

#### 30 *Fucosilación de $^{13}\text{C}_8\text{-G1}^6$*

El compuesto  $^{13}\text{C}_8\text{-G1}^6$  (1,1 mg) se trató con una  $\alpha$ -1,6-fucosiltransferasa de núcleo y guanosina difosfato fucosa (GDP-Fuc, 1,10 equivalentes) en tampón MES 50 mM a pH 6,5, que contenía  $\text{MgCl}_2$  2 mM. Después de 18 h de reacción a 30 °C, la fracción proteica se precipitó por calentamiento a 95 °C durante 5 minutos y se eliminó por filtración. El glicano  $^{13}\text{C}_8\text{-G1}^6\text{F}$  se purificó con un cartucho de carbono grafitizado.

#### 35 *Galactosilación de $^{13}\text{C}_8\text{-G0(Bn}_5\text{)}$*

El patrón  $^{13}\text{C}_8\text{-G0(Bn}_5\text{)}$  parcialmente protegido (20  $\mu\text{g}$ ) se trató con  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa (200 mU) y uridina difosfato galactosa (UDP-Gal, 6,0 equivalentes) en tampón HEPES 50 mM a pH 7,4, que contenía  $\text{MnCl}_2$  2 mM y BSA. Después de 1 h de reacción a 37 °C, la fracción proteica se precipitó por calentamiento a 95 °C durante 5 minutos y se eliminó por filtración. Esta solución se analizó directamente por UPLC-MS mostrando una conversión completa en  $^{13}\text{C}_8\text{-G2(Bn}_5\text{)}$ .

El compuesto bis-galactosilado  $^{13}\text{C}_8\text{-G2(Bn}_5\text{)}$  (20  $\mu\text{g}$ ) se trató con  $\beta$ -1,4-galactosidasa de *A. oryzae* (15 mU) en tampón fosfato/citrato 50 mM a pH 4,5 durante 18 h a 30 °C y la reacción se interrumpió mediante la adición de MeOH (20  $\mu\text{l}$ ). Esta solución se analizó directamente por UPLC-MS mostrando conversiones del 10% y del 46% en los compuestos monogalactosilados  $^{13}\text{C}_8\text{-G1}^6\text{(Bn}_5\text{)}$  y  $^{13}\text{C}_8\text{-G1}^3\text{(Bn}_5\text{)}$  respectivamente.

#### 50 *Preparación de patrones de glicano $\alpha$ -2,3-sililados asimétricos*

##### *Sililación de $^{13}\text{C}_8\text{-G2(Bn}_5\text{)}$*

La reacción se realizó a escala analítica a partir del  $^{13}\text{C}_8\text{-G2(Bn}_5\text{)}$  biantenarico bis-galactosilado preparado previamente (10 nmol). Este compuesto se trató con 10 mU de  $\alpha$ -2,3-sialiltransferasa de *P. multocida* y ácido N-acetilneuramínico de citidina monofosfato (CMP-NeuNAc, 4 equivalentes) en tampón Tris.HCl 100 mM a pH 8,0, que contenía  $\text{MgCl}_2$  20 mM a 37 °C durante 30 minutos. La reacción se interrumpió mediante la adición de MeOH (20  $\mu\text{l}$ ). Esta solución se analizó directamente por UPLC-MS mostrando una conversión del 46 % en el compuesto mono-sialilado  $^{13}\text{C}_8\text{-G2A1(Bn}_5\text{)}$ , separado en dos picos isoméricos (siendo estos los productos 3- y 6-mono-sililados correspondientes), y una conversión del 32% en el compuesto bis-sialilado  $^{13}\text{C}_8\text{-G2A2(Bn}_5\text{)}$ .

La reacción se realizó a escala preparativa a partir de  $^{13}\text{C}_8\text{-G2(Bn}_5\text{)}$  biantenarico bis-galactosilado preparado previamente. Una solución (100  $\mu\text{l}$ ) de  $^{13}\text{C}_8\text{-G2Bn}_5$  (1,0 mg, 0,48  $\mu\text{mol}$ ), sal del ácido N-acetilneuramínico de citidina-5'-monofosfo CMP-NeuAc (0,72 mg, 0,96  $\mu\text{mol}$ , 2 equiv.), 100 mU de  $\alpha$ -2,3-Sialiltransferasa de *Pasteurella multocida* 2-4-99.4 y  $\text{MgCl}_2$  (100 mM) en 500  $\mu\text{l}$  de tampón Tris-HCl (1 M, pH = 8) se incubó a 37 °C durante 30 min. Se añadió MeOH (500  $\mu\text{l}$ ) a la mezcla resultante para precipitar la enzima. Después de la centrifugación, el sobrenadante se purificó por HPLC en una columna semipreparativa C18 en agua/ACN de fase inversa para dar tres nuevos patrones

de glicano marcado isotópicamente, los dos compuestos  $^{13}\text{C}_8\text{-G2A1}(\text{Bn}_5)$  y  $^{13}\text{C}_8\text{-G2A2}(\text{Bn}_5)$ .

#### Síntesis de $^{13}\text{C}_8\text{-G1A1}^3\text{Bn}_5$

- 5 Una solución (100  $\mu\text{l}$ ) de  $^{13}\text{C}_8\text{-G1}^3(\text{Bn}_5)$  (1,0 mg, 0,52  $\mu\text{mol}$ ), sal del ácido N-acetilneuraminínico de citidina-5'-monofosfo CMP-NeuAc (0,78 mg, 1,04  $\mu\text{mol}$ , 2 equiv.), 100 mU de  $\alpha$ -2,3-Sialiltransferasa de *Pasteurella multocida* 2-4-99.4 y  $\text{MgCl}_2$  (100 mM) en 500  $\mu\text{l}$  de tampón Tris-HCl (1 M, pH = 8) se incubó a 37 °C durante 30 min. Se añadió MeOH (500  $\mu\text{l}$ ) a la mezcla resultante para precipitar la enzima. Después de la centrifugación, el sobrenadante se purificó por HPLC en una columna semipreparativa C18 en agua/ACN de fase inversa obteniendo el compuesto
- 10  $^{13}\text{C}_8\text{-G1A1}^3(\text{Bn}_5)$  (0,68 mg, rendimiento del 59 %).

#### Preparación de patrones de glicano $\alpha$ -2,6-sililados

- 15 La reacción se realizó a escala analítica a partir del  $^{13}\text{C}_8\text{-G2}(\text{Bn}_5)$  biantenarico bis-galactosilado preparado previamente (5 nmol). Este compuesto se trató con 0,25 mU de  $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa humana y ácido N-acetilneuraminínico de citidina monofosfato (CMP-NeuNAc, 1-4 equivalentes) en tampón cacodilato 50 mM a pH 6,1, que contenía  $\text{MnCl}_2$  2 mM a 37 °C durante 2-4 horas. La reacción se interrumpió mediante la adición de MeOH (20  $\mu\text{l}$ ). Esta solución se analizó directamente por UPLC-MS y los resultados se presentan en la **Tabla 3**.

#### 20 Preparación de patrones de N-glicano truncados

- $^{13}\text{C}_8\text{-G0}(\text{Bn}_5)$  (3 mg) se trató con 100 mU de N-acetil glucosaminidasa de *Conavalia ensiformis* en tampón acetato amónico 50 mM a pH 4,5 a t.a. durante 6 h. La reacción se interrumpió mediante la adición de MeOH (20  $\mu\text{l}$ ). Esta solución se analizó directamente por UPLC-MS obteniendo conversiones del 20%, del 26% y del 25% de  $^{13}\text{C}_6\text{-MGN}^3(\text{Bn}_5)$ ,  $^{13}\text{C}_6\text{-MGN}^6(\text{Bn}_5)$  y  $^{13}\text{C}_4\text{-Man3}(\text{Bn}_5)$  respectivamente. Después de la purificación por HPLC semipreparativa, se obtuvieron los compuestos puros  $^{13}\text{C}_6\text{-MGN}^3(\text{Bn}_5)$  (2,2 mg),  $^{13}\text{C}_6\text{-MGN}^6(\text{Bn}_5)$  (2,0 mg) y  $^{13}\text{C}_4\text{-Man3}(\text{Bn}_5)$  (1,7 mg).
- 25

- Los tres compuestos aislados se sometieron a hidrogenólisis en MeOH usando 1 atm de gas  $\text{H}_2$  en un reactor de flujo H-Cube con un cartucho de Pd al 10%/C, obteniendo los N-glicanos marcados con  $^{13}\text{C}$   $^{13}\text{C}_6\text{-MGN}^3$  (1,2 mg) y  $^{13}\text{C}_6\text{-MGN}^6$  (1,1 mg) y  $^{13}\text{C}_4\text{-Man3}$  (0,7 mg) en forma pura.
- 30

#### Fucosilación de $^{13}\text{C}_6\text{-MGN}^3$

- 35 El compuesto  $^{13}\text{C}_6\text{-MGN}^3$  (1,2 mg) se trató con una  $\alpha$ -1,6-fucosiltransferasa de núcleo y guanosina difosfato fucosa (GDP-Fuc, 1,10 equivalentes) en tampón MES 50 mM a pH 6,5, que contenía  $\text{MgCl}_2$  2 mM. Después de 18 h de reacción a 30 °C, la fracción proteica se precipitó por calentamiento a 95 °C durante 5 minutos y se eliminó por filtración. El glicano  $^{13}\text{C}_6\text{-MGN}^3\text{F}$  se purificó con un cartucho de carbono grafitizado.

#### 40 Galactosilación del núcleo triantenarico parcialmente protegido 22

- Una solución (24  $\mu\text{l}$ ) de **22** triantenarico (120  $\mu\text{g}$ , 0,06  $\mu\text{mol}$ ), sal uridina 5'-difosfo- $\alpha$ -D-galactosa disódica UDP-Gal (55  $\mu\text{g}$ , 0,09  $\mu\text{mol}$ , 1,5 equiv.), 24 mU de  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa de leche bovina 2.4.4.22 y  $\text{MnCl}_2$  (10 mM) en 300  $\mu\text{l}$  de tampón HEPES (50 mM, pH = 7,4) se incubó a 37 °C durante 1 h. La mezcla resultante se calentó a 95 °C durante 5 min para precipitar la enzima. Después de la centrifugación, el sobrenadante se analizó directamente por UPLC-MS. Los siete productos galactosilados posibles se detectaron (tris, los tres bis y los tres mono), además del material de partida no galactosilado.
- 45

#### Bibliografía:

- 50 J. A. Atwood III, L. Cheng, G. Alvarez-Manilla, N. L. Warren, W. S. York, R. Orlando, Journal of proteome research 2007, 7, 367-374.  
O. Blixt, N. Razi, Method in Enzymology 2006, 415, 137-153.  
J. C. Botelho, J. a. Atwood III, L. Cheng, G. Alvaez-Manilla, W. S. York, R. Orlando, International Journal of Mass Spectrometry 2008, 278, 137-142.
- 55 M. J. Bowman, J. Zaia, Analytical chemistry 2007, 79, 5777-5784.  
M. J. Bowman, J. Zaia, Analytical chemistry 2010, 82, 3023-3031.  
M. A. Breidenbach, K. K. Palaniappan, A. a. Pitcher, C. R. Bertozzi, Molecular & Cellular Proteomics 11.6, 2012.  
A. M. Hitchcock, C. E. Costello, J. Zaia, Biochemistry 2006, 45, 2350-2361.
- 60 J. Hsu, S. J. Chang, A. H. Franz, American Society for Mass Spectrometry 2006, 17, 194-204.  
P. Kang, Y. Mechref, Z. Kyselova, J. A. Goetz, M. V. Novotny, Analytical chemistry 2007, 79, 6064-6073.  
R. Lawrence, S. K. Olson, R. E. Steele, L. Wang, R. Warrior, R. D. Cummings, J. D., Esko Journal of biological chemistry 2008, 283, 33674-33684.
- 65 G. Ridlova, J. C. Mortimer, S. L. Maslen, P. Dupree, e. Stephens, Rapid Communications in Mass Spectrometry 2008, 22, 2723-2730.  
T. W. D. F. Rising, C. D. Heidecke, J. W. B. Moir, Z. Ling, A. J. Fairbanks, Chemistry - A European Journal 2008,



- 14, 6444-6464.  
N. Ruiz, S. S. Ferreira, D. Padro, N.-C. Reichardt, M. Martin-Lomas, *Carbohydrate Research* 2011,246, 1581-1591.
- 5 S. Serna, J. Etxebarria, N. Ruiz, M. Martin-Lomas, N.-C. Reichardt, *Chemistry - A European Journal* 2010, 16, 13163-13175.
- B. Xia, C. L. Feasley, G. P. Sachdev, D. F. Smith, R. D. Cummings, *Analytical biochemistry* 2009, 387, 162-170.
- J. Yuan, N. Hashii, N. Kawasaki, S. Itoh, T. Kawanishi, T. Hayakawa, *journal of chromatography A* 2005, 1067, 145-152.
- 10 H. Zhang, X.-J. Li, D. B. Martin, R. Aebersold, *Nature biotechnology* 2003, 21,660-6.
- G. Zou, H. Ochiai, W. Huang, Q. Yang, C. Li, L.-X. Wang, *Journal of the American Chemical Society* 2011, 133, 18975-18991.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para la síntesis de un glicano marcado isotópicamente para su uso como patrón interno de espectrometría de masas, comprendiendo el método:

5 acilar una estructura de núcleo de oligosacárido con un agente de acilación marcado isotópicamente, en donde la estructura de núcleo de oligosacárido está opcionalmente protegida con uno o más grupos protectores, para obtener una estructura de núcleo de oligosacárido marcada isotópicamente; y  
10 derivar enzimáticamente el oligosacárido isotópicamente marcado resultante para obtener el glicano marcado isotópicamente.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la derivación enzimática comprende una etapa de hidrólisis enzimática para eliminar una unidad de azúcar terminal  
y/o

15 en el que la derivación enzimática comprende una etapa de elongación enzimática con una glicosiltransferasa y un donante de azúcar adecuado, opcionalmente en el que la etapa de elongación enzimática incorpora una unidad de azúcar que está marcada isotópicamente.

3. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que la estructura de núcleo de oligosacárido marcada isotópicamente está protegida con uno o más grupos protectores durante la derivación enzimática, opcionalmente en el que la estructura de núcleo de oligosacárido marcado isotópicamente está protegida con uno o más grupos bencilo opcionalmente sustituidos.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la estructura de núcleo de oligosacárido comprende un motivo disacárido, comprendiendo el motivo de disacárido una primera unidad de monosacárido y una segunda unidad de monosacárido, en el que al menos una de la primera unidad de monosacárido y/o la segunda unidad de monosacárido comprende un grupo amino y se produce acilación en el grupo o grupos amino.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la estructura de núcleo de oligosacárido comprende un motivo disacárido, comprendiendo el motivo de disacárido una primera unidad de monosacárido y una segunda unidad de monosacárido, en el que la primera unidad de monosacárido se selecciona de entre:

GlcN, GalN, ManN, FruN, FucN, Mur o Neu;

35 y la segunda unidad de monosacárido se selecciona de:

Glc, Gal, Man, Rha, Fru, Fuc, GlcN, GalN, ManN, FruN, FucN, Mur, Neu, GlcNAc, GalNAc, ManNAc, FruNAc, FucNAc, MurNAc, NeuNAc, ácido siálico o inositol;

40 en el que la primera unidad de azúcar de monosacárido y la segunda unidad de azúcar de monosacárido están conectadas en la secuencia:

primer monosacárido - segundo monosacárido; o  
segundo monosacárido - primer monosacárido.

45 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el método hacer reaccionar una estructura de núcleo de oligosacárido que comprende un motivo seleccionado de:

GlcN-GlcN

50 Gal-GalN

GalN-GlcN

55 con un agente de acilación marcado isotópicamente; comprendiendo el método opcionalmente hacer reaccionar una estructura de núcleo de oligosacárido que comprende el motivo:

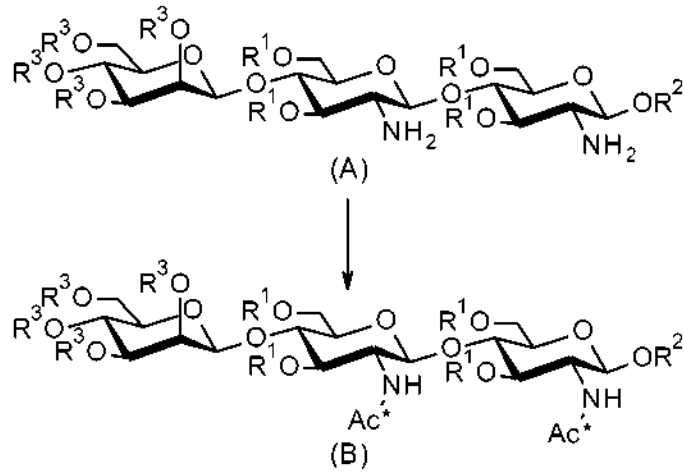
Man-GlcN-GlcN

60 con un agente de acetilación marcado isotópicamente para obtener un oligosacárido que comprende el motivo:

Man-GlcNAc\*-GlcNAc\*

65 en el que Ac\* es un grupo acetilo marcado isotópicamente.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el método hacer reaccionar un oligosacárido de fórmula (A) con un agente de acetilación marcado isotópicamente en condiciones adecuadas para formar una estructura de núcleo de oligosacárido marcada isotópicamente de fórmula (B):

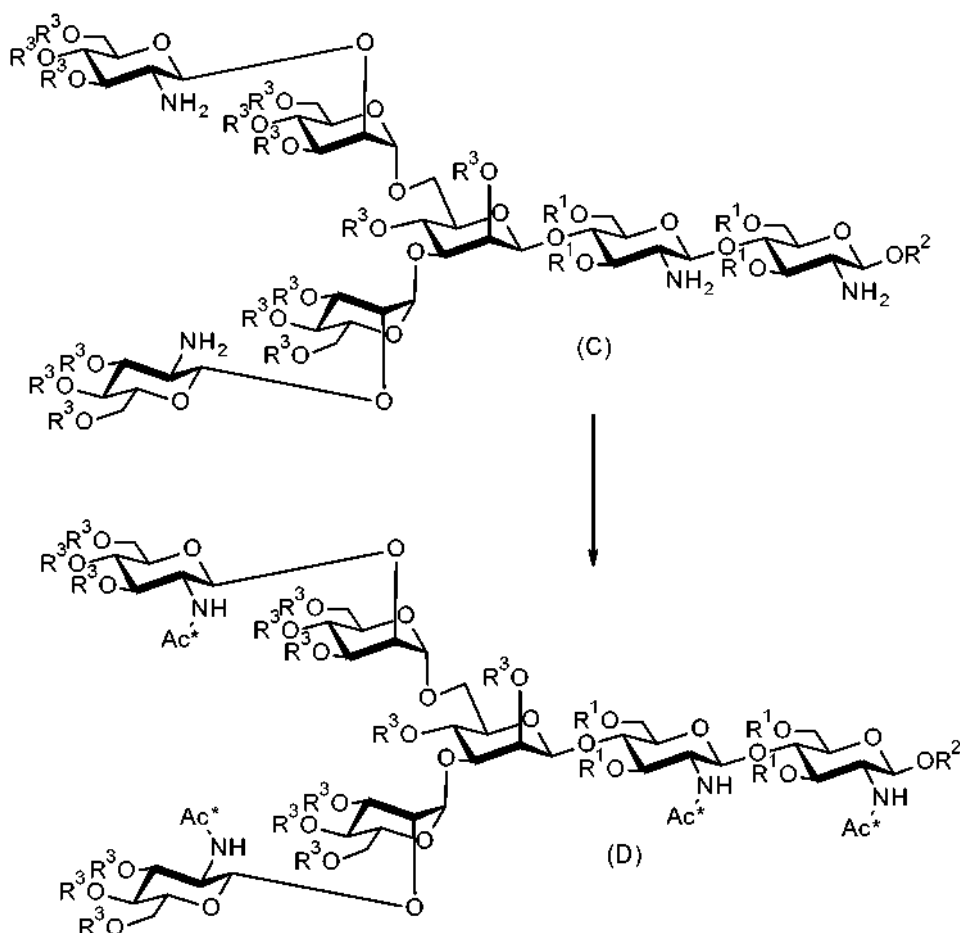


5

en las que:

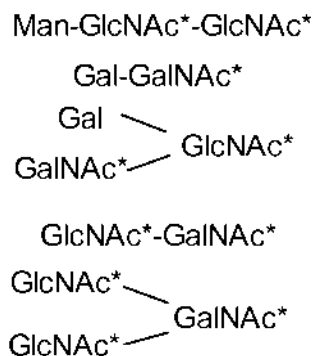
- 10 cada  $R^1$  es independientemente H o un grupo protector;  
 cada  $R^2$  es independientemente H o un grupo protector;  
 cada  $R^3$  independientemente es H, un grupo protector o  $(\text{Sac})_m$  en donde  
 cada Sac es una unidad de monosacárido y m es un número entre 1 y 5;

- 15 opcionalmente en el que el método comprende hacer reaccionar un oligosacárido de fórmula (C) con un agente de acetilación marcado isotópicamente en condiciones adecuadas para formar una estructura de núcleo de oligosacárido marcada isotópicamente de fórmula (D):



en las que:

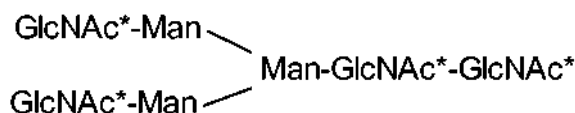
- 5 cada  $R^1$  es independientemente H o un grupo protector;  
 $R^2$  es independientemente H o un grupo protector;  
 cada  $R^3$  es independientemente H, un grupo protector o  $(\text{Sac})_m$  en donde  
 cada Sac es una unidad de monosacárido y m es un número entre 1 y 5; y/o  
 opcionalmente en las que  $R^2$  es H; opcionalmente en la que cada  $R^1$  es bencilo,  $R^2$  es H y cada  $R^3$  es H.
- 10 8. El método según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que el agente de acetilación marcado isotópicamente es anhídrido acético isotópicamente marcado; opcionalmente en el que el agente de acetilación marcado isotópicamente se selecciona de:
- 15  $(^{13}\text{CH}_3\ ^{13}\text{C}=\text{O})_2\text{O}$ ,  $(^{13}\text{CH}_3\text{C}=\text{O})_2\text{O}$ ,  $(\text{CH}_3\ ^{13}\text{C}=\text{O})_2\text{O}$ ,  $(\text{CD}_3\text{C}=\text{O})_2\text{O}$ ,  $(^{13}\text{CD}_3\ ^{13}\text{C}=\text{O})_2\text{O}$ ,  $(^{13}\text{CD}_3\text{C}=\text{O})_2\text{O}$  o  $(\text{CD}_3\ ^{13}\text{C}=\text{O})_2\text{O}$ .
- 20 9. El método según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que cada  $\text{Ac}^*$  se selecciona de entre -  
 $(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ ,  $-(^{13}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})\text{CD}_3$ ,  $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CD}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CD}_3$ ,  $-(^{13}\text{C}=\text{O})\text{CD}_3$ ,  $-(^{14}\text{C}=\text{O})^{14}\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{14}\text{CH}_3$ ,  $-(^{14}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})\text{CD}_3$  o  $-(\text{C}=\text{O})\text{CD}_3$ .
- 25 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende además la formación de una oxazolina en una posición anomérica libre de una unidad de acetil-hexosamina en el oligosacárido marcado isotópicamente  
 y/o  
 en donde el método comprende además la glicosilación de un péptido, un lípido o una proteína para obtener un glicopéptido marcado isotópicamente, un peptidoglucano, un glicolípido, una glicoproteína que comprenden el oligosacárido marcado isotópicamente.
- 30 11. Un glicano que comprende un motivo seleccionado de entre:



en el que cada Ac\* está marcado isotópicamente; opcionalmente en el que el motivo es:

5      Man-GlcNAc\*<sup>-</sup>-GlcNAc\*<sup>-</sup>;

opcionalmente en donde el glicano comprende el motivo:



10

en el que cada Ac\* está marcado isotópicamente.

12. El glicano de la reivindicación 11, en el que cada Ac\* se selecciona de entre  $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ ,  $-(^{13}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})\text{CD}_3$ ,  $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CD}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CD}_3$ ,  $-(^{13}\text{C}=\text{O})\text{CD}_3$ ,  $-(^{14}\text{C}=\text{O})^{14}\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{14}\text{CH}_3$ ,  $-(^{14}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ ,  $-(^{17}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ ,  $-(^{13}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ ,  $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ ,  $-(^{18}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ ,  $-(^{13}\text{C}=\text{O})\text{CH}_3$ ,  $-(\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ ,  $-(^{13}\text{C}=\text{O})^{13}\text{CH}_3$ ; opcionalmente en donde el glicano comprende una o más unidades de monosacárido adicionales.

15

13. Un método para identificar un glicano en una muestra, comprendiendo el método la adición de un patrón etiquetado, que comprende un glicano marcado isotópicamente de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, a la muestra para obtener una muestra dopada y analizar la muestra dopada usando espectrometría de masas;

20

opcionalmente en el que se añade una cantidad conocida del glicano marcado isotópicamente a la muestra de tal manera que el glicano en la muestra se puede cuantificar por comparación de la intensidad relativa de los picos de iones asociados al glicano del analito y al glicano marcado isotópicamente.

25

14. El método de la reivindicación 13, comprendiendo el método:

- (i) seleccionar un patrón etiquetado que comprende uno o más glicanos marcados isotópicamente;
- (ii) añadir el patrón etiquetado a la muestra para obtener una muestra dopada;
- (iii) analizar la muestra dopada usando espectrometría de masas para obtener picos de iones;
- (iv) comparar la identidad y la intensidad de los picos de iones asociados al patrón etiquetado con los picos de iones adicionales en el espectro de la muestra dopada.

30

15. El método de la reivindicación 14, en el que el patrón etiquetado comprende una pluralidad de isotopólogos marcados isotópicamente de mayor peso molecular del glicano del analito, y en donde la etapa (iv) del método incluye las siguientes etapas:

35

- (a) correlacionar las intensidades relativas de los picos de iones asociados a cada isotopólogo marcado isotópicamente de mayor peso molecular ( $I_j^*$ ) con la abundancia conocida de ese glicano en el patrón ( $m_j^*$ ) para obtener  $I_j$  como una función lineal de  $m_j$ ;
- (b) calcular opcionalmente el coeficiente de determinación  $R^2$  para la correlación y descontar el pico iónico más abundante si el valor  $R^2$  es mayor que un valor predeterminado;
- (c) repetir opcionalmente una o más veces la etapa (ii);
- (d) usar dicha función para calcular la cantidad de un isotopólogo no marcado isotópicamente del glicano del analito;
- (e) usar opcionalmente la cantidad total de este isotopólogo no marcado isotópicamente del glicano del analito para determinar la cantidad total del glicano del analito presente;

40

45

opcionalmente en donde el método comprende además derivar el glicano o glicanos antes del análisis de la muestra dopada;

50

y/o

opcionalmente en donde la espectrometría de masas es MALDI-ToF, ESI-ToF de infusión directa o LC-MS;

y/o

5 opcionalmente en donde el método comprende además la fragmentación por espectrometría de masas en tándem durante el análisis usando espectrometría de masas.

16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el glicano en la muestra es un glicano liberado de una glicoproteína recombinante o de un anticuerpo y/o en el que el glicano en la muestra es un biomarcador asociado a una enfermedad o un trastorno médico o a un proceso biológico.

10 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, comprendiendo el método además correlacionar la presencia o la cantidad de uno o más glicanos como un indicador de una enfermedad o un trastorno médico o de un proceso biológico;

15 opcionalmente en donde la enfermedad o el trastorno médico se seleccionan de entre cáncer, un trastorno cardiovascular, una enfermedad inflamatoria de la piel, diabetes mellitus, un trastorno gastrointestinal, un trastorno hepático, anemia, una enfermedad o un trastorno inmunológicos, enfermedad autoinmune, artritis, incluyendo artritis reumatoide, una enfermedad infecciosa, nefropatía, un trastorno neurológico, un trastorno pulmonar o un trastorno congénito de la glicosilación.

20 18. Un glicano marcado isotópicamente de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12 para su uso en un método de diagnóstico, comprendiendo el método:

(i) obtener una muestra sospechosa de contener un glicano asociado a una enfermedad o un trastorno de un paciente;

25 (ii) seleccionar un patrón etiquetado que comprende un glicano marcado isotópicamente correspondiente al glicano asociado a la enfermedad o al trastorno;

(iii) añadir el patrón etiquetado a la muestra para obtener una muestra dopada;

(iv) analizar la muestra dopada usando espectrometría de masas para obtener picos de iones;

30 (v) comparar la identidad y la intensidad de los picos de iones asociados al patrón etiquetado con los picos de iones adicionales en el espectro de la muestra dopada para identificar, y opcionalmente cuantificar, la presencia de uno o más glicanos en la muestra;

(vi) usar la presencia de dichos uno o más glicanos para diagnosticar la enfermedad o el trastorno;

35 opcionalmente en donde la enfermedad o el trastorno médico se seleccionan de entre cáncer, un trastorno cardiovascular, una enfermedad inflamatoria de la piel, diabetes mellitus, un trastorno gastrointestinal, un trastorno hepático, anemia, una enfermedad o un trastorno inmunológicos, enfermedad autoinmune, artritis, incluyendo artritis reumatoide, una enfermedad infecciosa, nefropatía, un trastorno neurológico, un trastorno pulmonar o un trastorno congénito de la glicosilación.

40 19. Un kit para identificar un glicano en una muestra, comprendiendo el kit:

(a) un patrón etiquetado, comprendiendo el patrón etiquetado uno o más glicanos marcados isotópicamente de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12; y

45 (b) instrucciones para dopar una muestra sospechosa de contener un glicano con el patrón etiquetado para obtener una muestra dopada y analizar la muestra dopada usando espectrometría de masas; opcionalmente en donde las instrucciones incluyen datos de espectrometría de masas para el patrón etiquetado

y/o

50 opcionalmente en donde las instrucciones incluyen la etapa de comparar los picos de iones asociados al patrón etiquetado con los picos de iones adicionales en el espectro de masas.

Figura 1

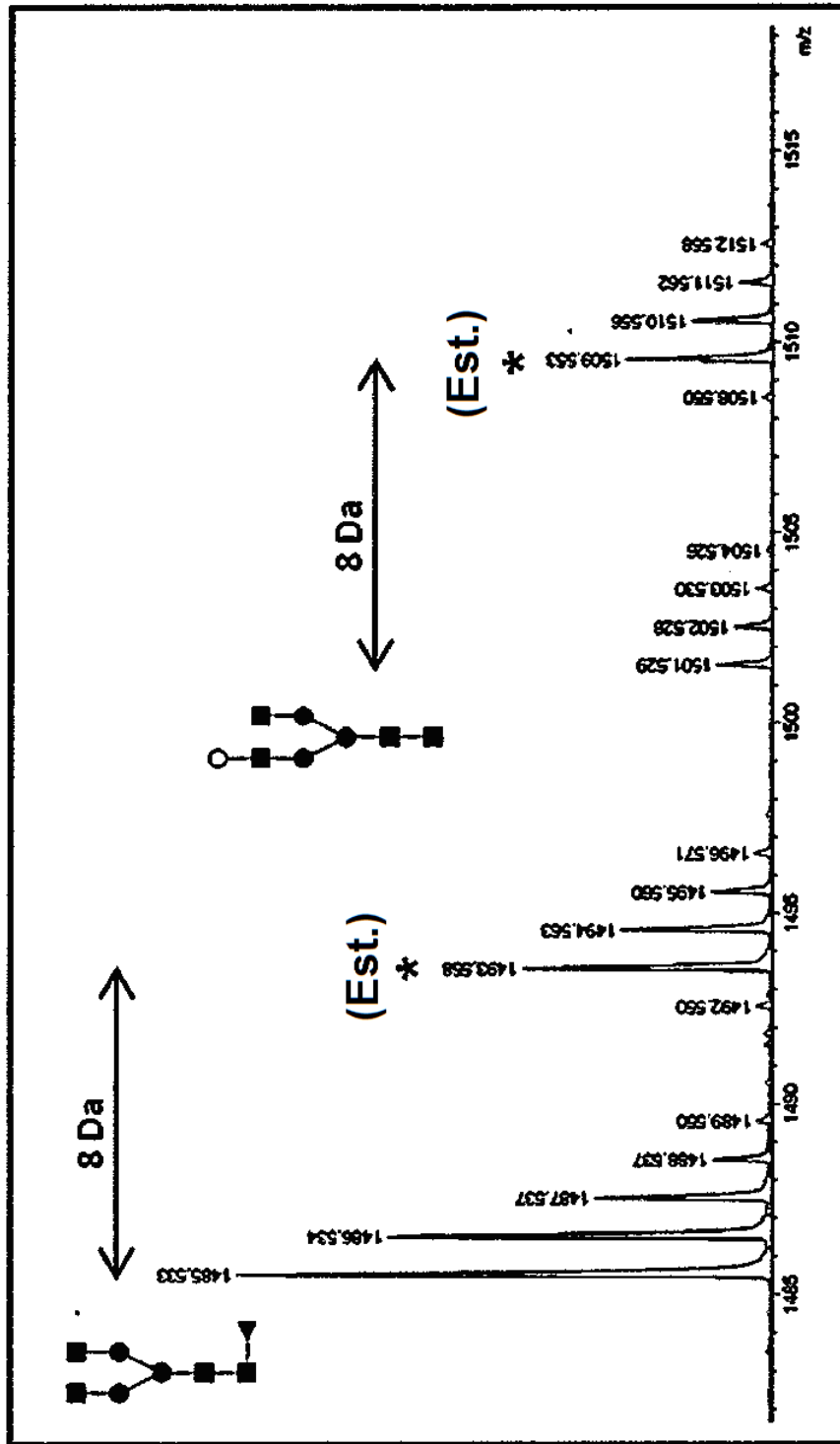


Figura 2

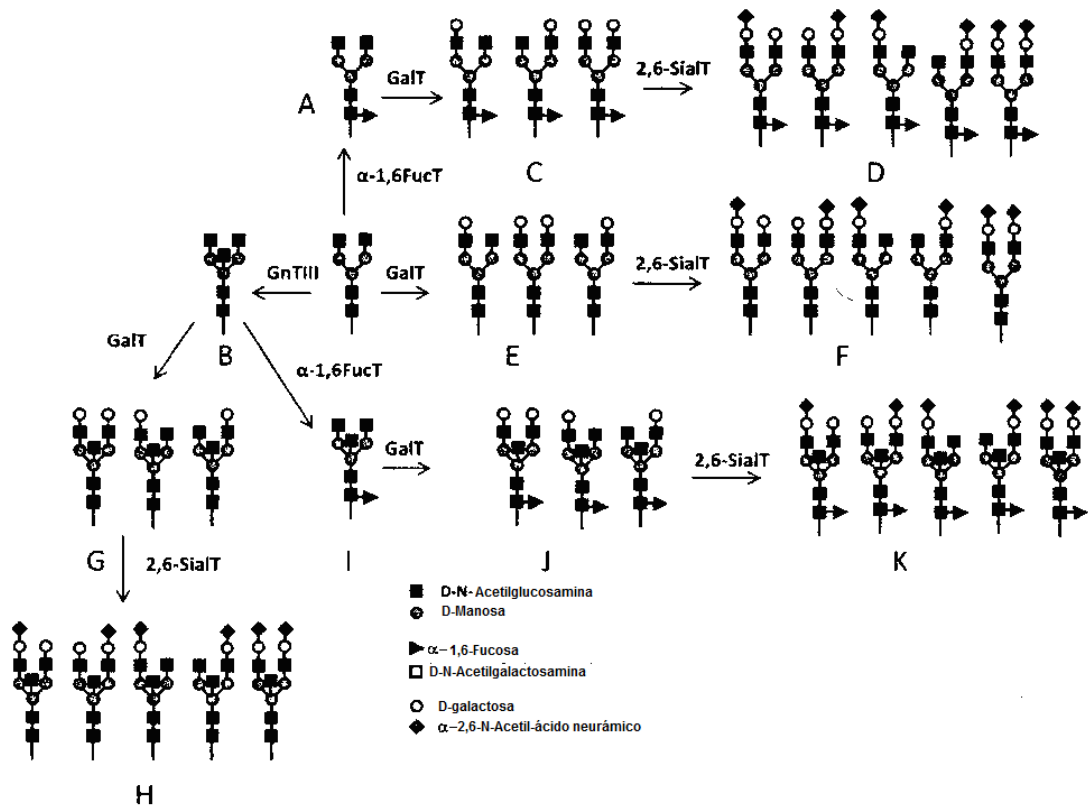




Figura 3a

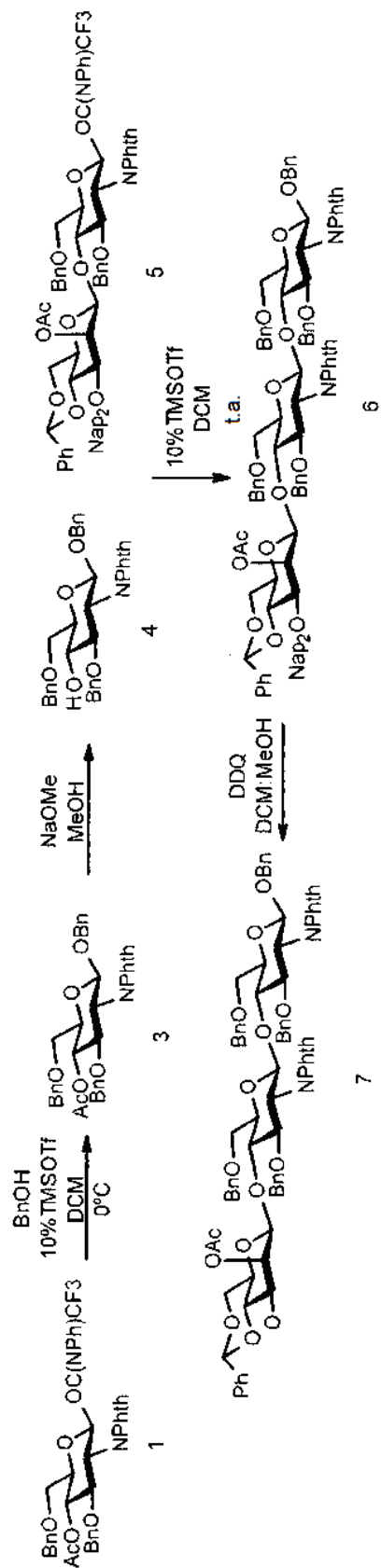


Figure 3b

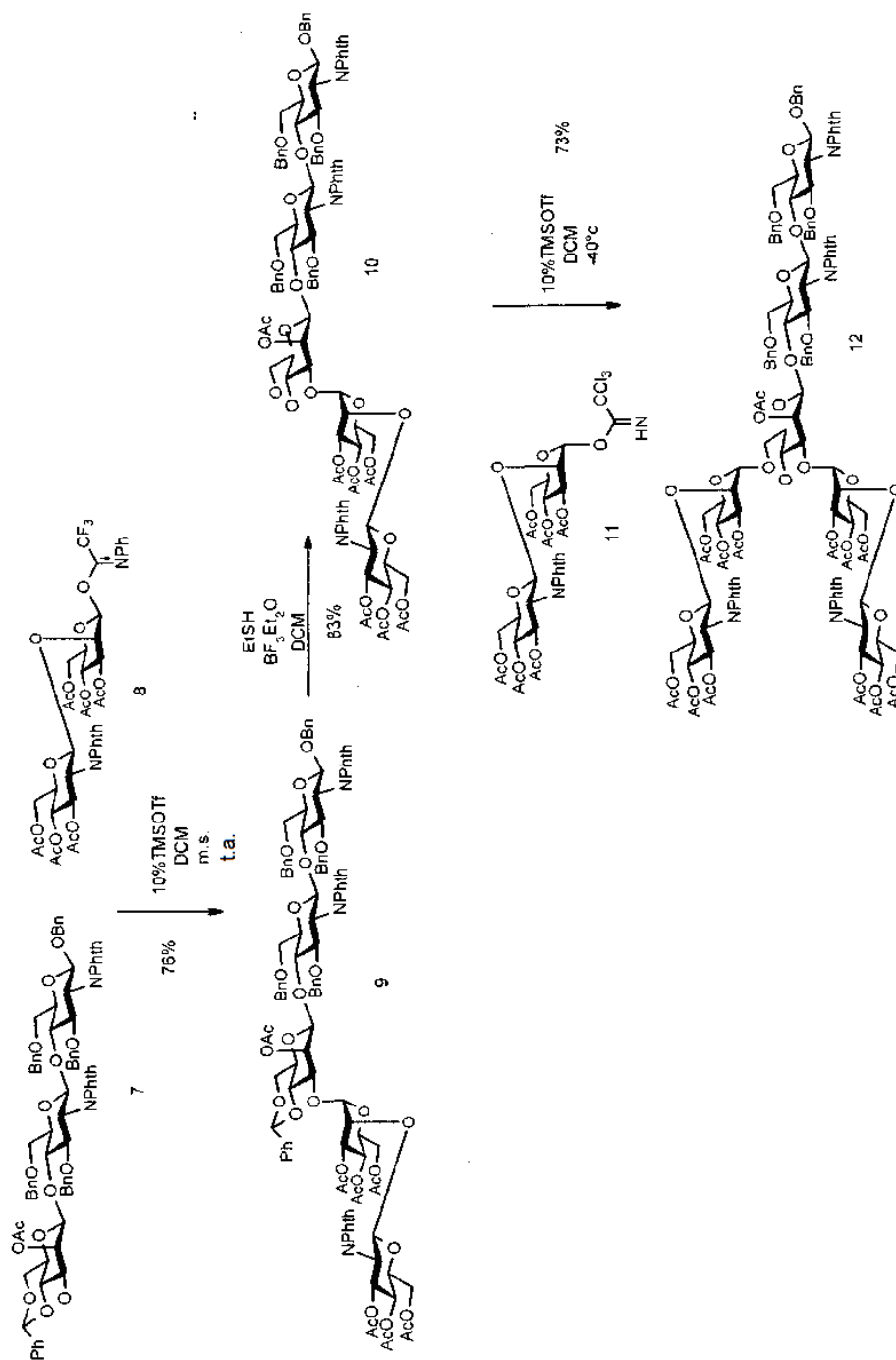


Figura 3c

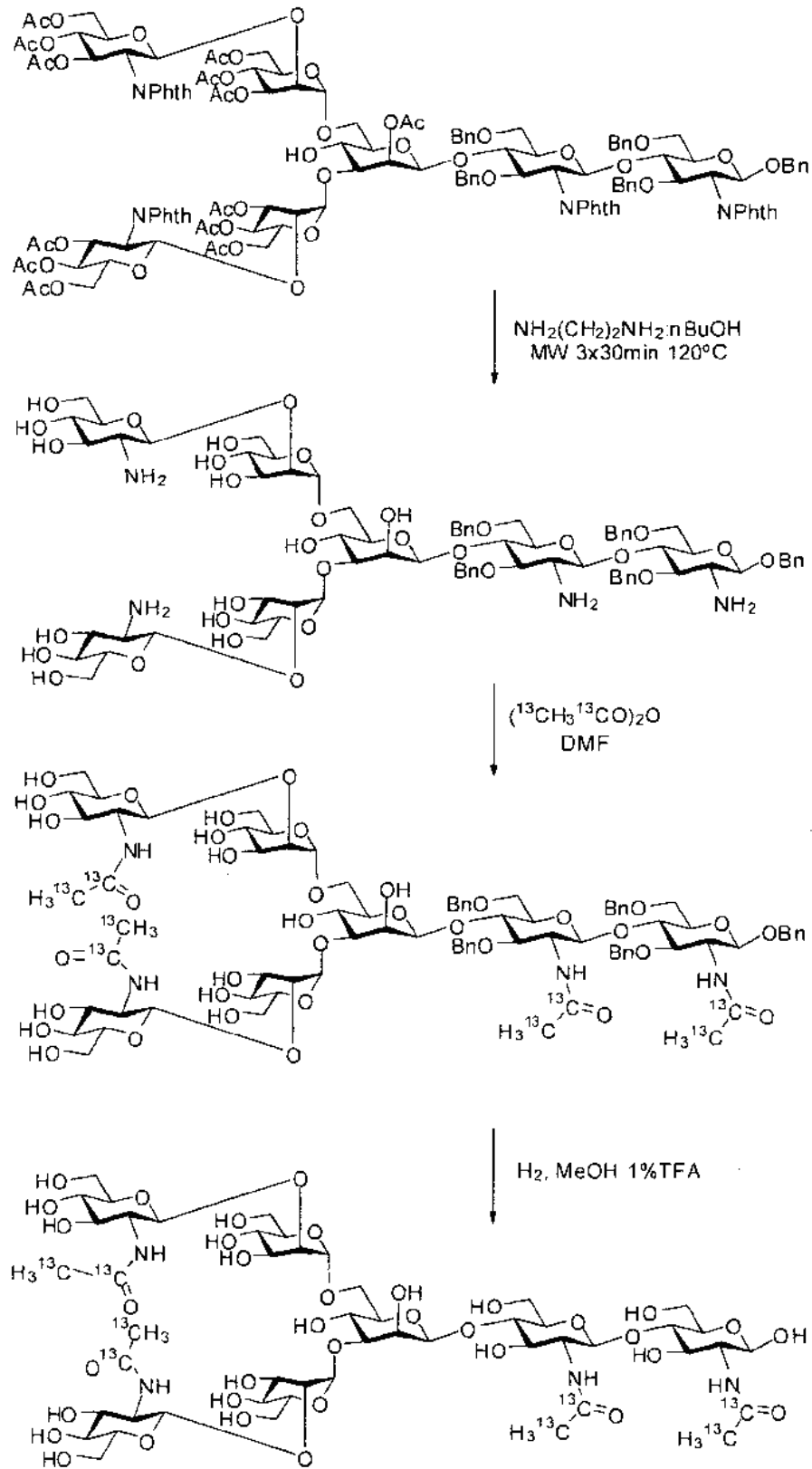


Figura 4a

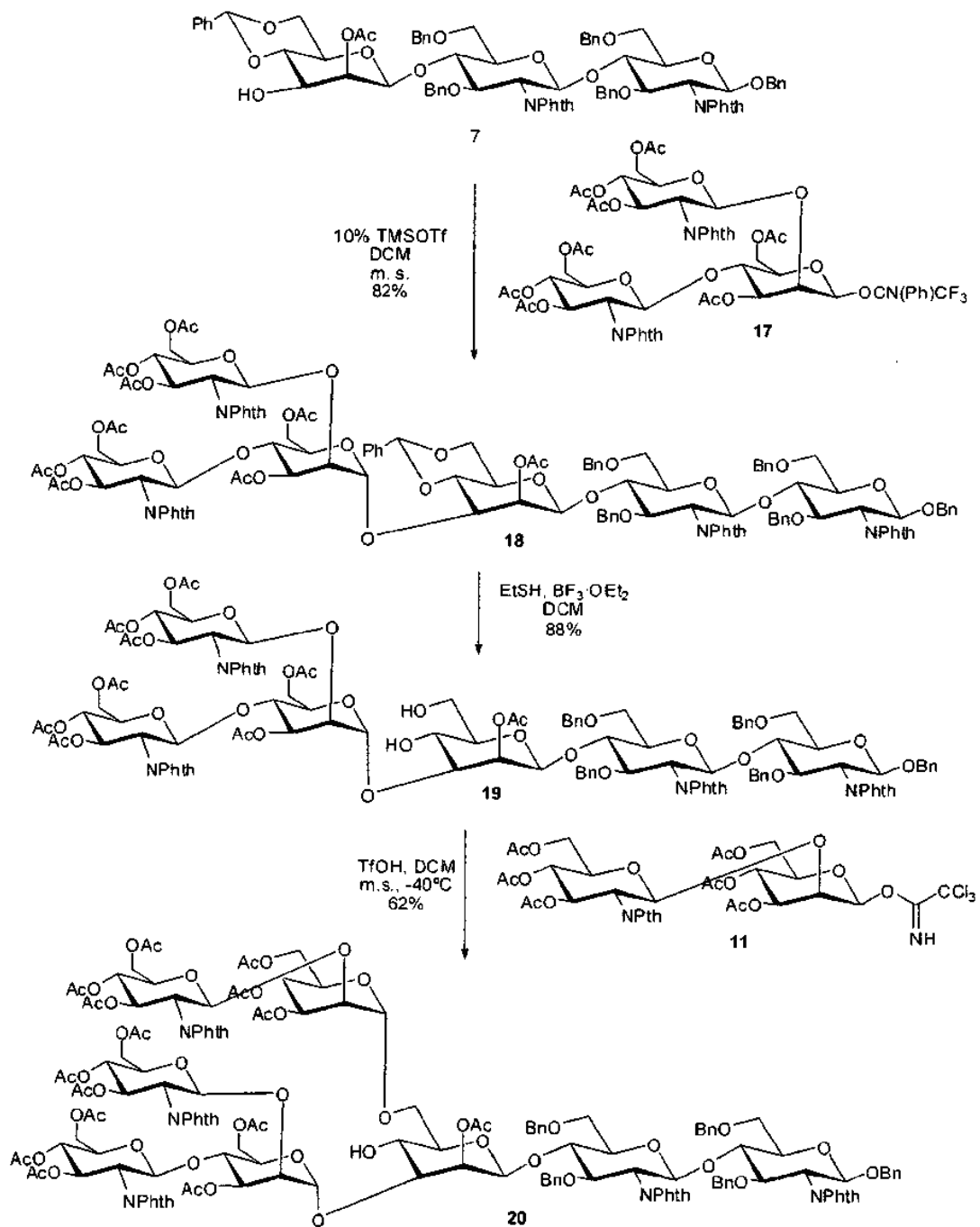


Figura 4b

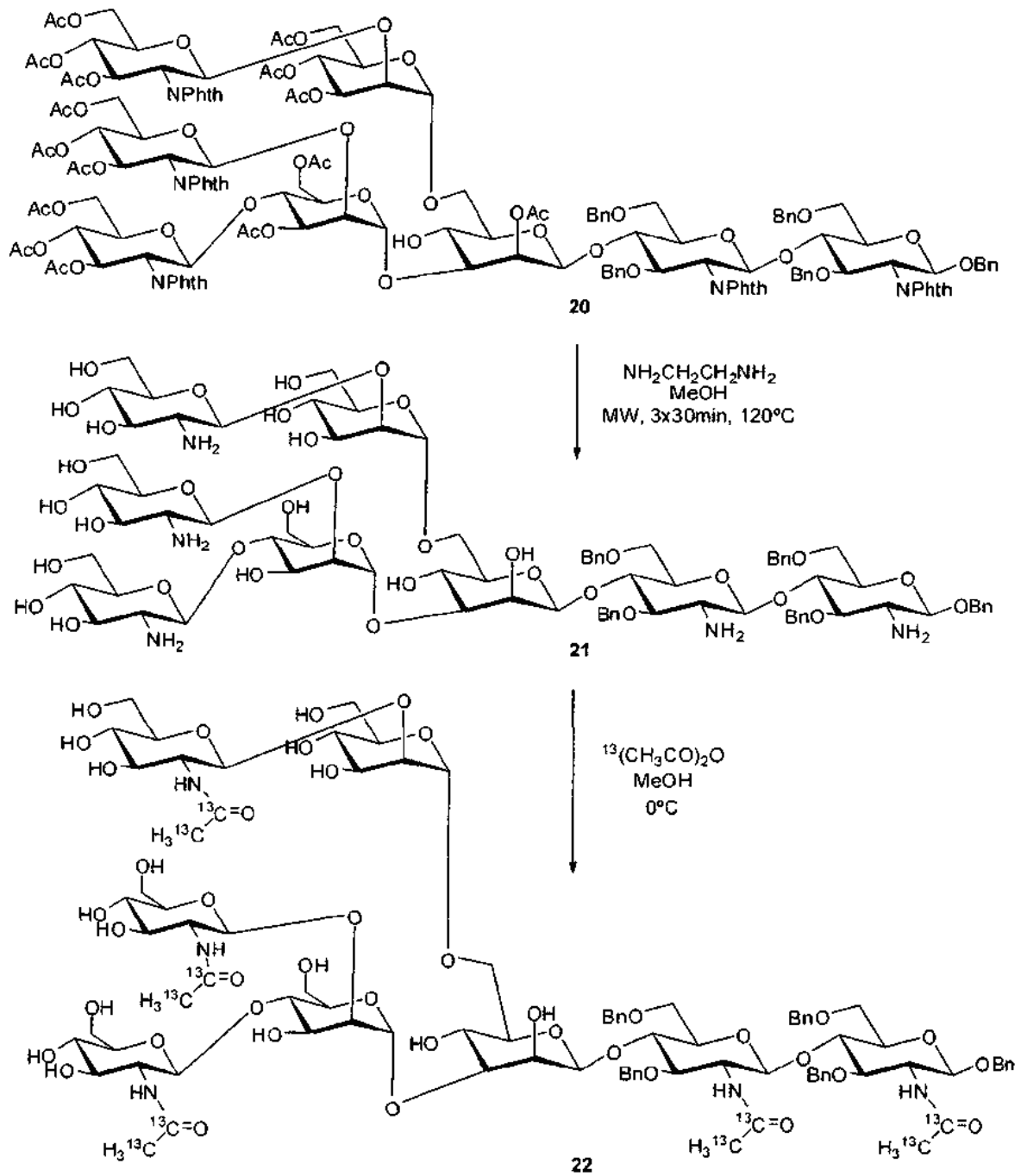
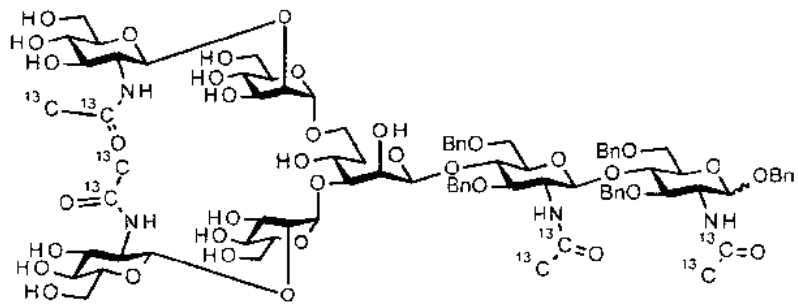
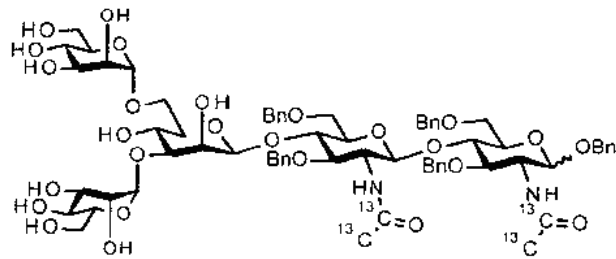


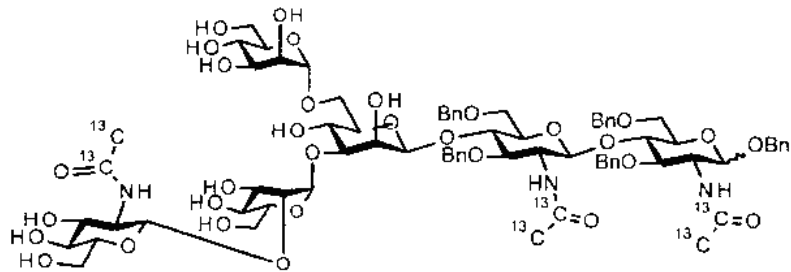
Figura 5



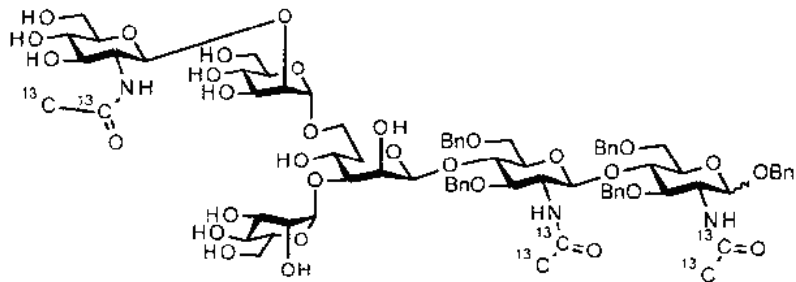
$^{13}\text{C}_8$ -G0(Bn<sub>5</sub>)



$^{13}\text{C}_4$ -Man3(Bn<sub>5</sub>)



$^{13}\text{C}_6$ -MGn3(Bn<sub>5</sub>)



$^{13}\text{C}_6$ -MGn6(Bn<sub>5</sub>)

Figura 6

