

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 314**

51 Int. Cl.:

**C07H 15/04** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 31/738** (2006.01)

**A61K 47/26** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2008** **E 11188506 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017** **EP 2457920**

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

30 Prioridad:

**18.01.2007 US 885471 P**

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

**26.02.2018**

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)**  
**500 Kendall Street**  
**Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 656 314 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Oligosacáridos que comprenden un grupo aminooxi y conjugados de los mismos

5 La divulgación se refiere en líneas generales a métodos para la síntesis de oligosacáridos que comprenden un grupo aminooxi a partir de oligosacáridos que comprende un grupo reactivo. En otra realización, la invención se refiere además a oligosacáridos que comprenden un grupo aminooxi. La divulgación también se refiere a métodos de conjugación de oligosacáridos que comprenden un grupo aminooxi con proteínas, incluyendo glucoproteínas (tales como, por ejemplo, enzimas lisosómicas) y a composiciones de conjugados de oligosacárido-proteína, incluyendo  
10 conjugados de oligosacárido-glucoproteína. Otra realización de la invención se refiere a métodos de tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico usando dichos conjugados de oligosacárido-enzima lisosómica.

Los trastornos de almacenamiento lisosómico (LSD) son una clase de trastornos metabólicos raros que comprenden más de cuarenta enfermedades genéticas que implican una deficiencia en la actividad de las hidrolasas lisosómicas.  
15 Una característica distintiva de los LSD es la acumulación anómala de metabolitos lisosómicos, que da lugar a la formación de grandes cantidades de lisosomas distendidos.

Los LSD pueden tratarse por la administración de la versión activa de la enzima defectuosa en el paciente, un proceso llamado terapia de remplazo enzimático (ERT). La enzima de remplazo administrada que alberga un manosa-6-fosfato (M6P) terminal se capta por las células diana a través de endocitosis mediada por el receptor de M6P independiente de cationes (CI-MPR) asociado a la superficie celular, y se dirige al lisosoma.  
20

En general, las enzimas de remplazo poco fosforiladas no se internalizan por el receptor de M6P sobre las superficies celulares y, por lo tanto, no puede dirigirse al liposoma donde funcionan. Por consiguiente, un bajo grado de fosforilación de manosa puede tener un efecto significativo y perjudicial sobre la eficacia terapéutica de una enzima de remplazo.  
25

Por tanto, se han desarrollado métodos para aumentar el contenido de M6P de las enzimas de remplazo. La patente de Estados Unidos n.º 7.001.994, por ejemplo, describe un método para acoplar oligosacáridos que comprenden M6P con glucoproteínas. Los oligosacáridos de las glucoproteínas primero se oxidan con peryodato o galactosa oxidasa para provocar la formación de grupos carbonilo, que después se conjugan químicamente con un oligosacárido funcionalizado en el extremo reductor con un grupo reactivo de carbonilo (tal como, por ejemplo, un grupo hidrazina, hidrazida, aminooxi, tiosemicarbazida, semicarbazida o amina) para producir un conjugado de oligosacárido-glucoproteína.  
30

Un conjugado de la enzima lisosómica  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA) con un oligosacárido bis-M6P se preparó por el método descrito anteriormente, y se descubrió que es más eficaz en reducir el glucógeno de músculo esquelético y cardíaco que la GAA humana recombinante en un modelo murino de enfermedad de Pompe, una enfermedad muscular recesiva autosómica resultante de una deficiencia metabólica de GAA, y caracterizada por la acumulación de glucógeno lisosómico.  
35

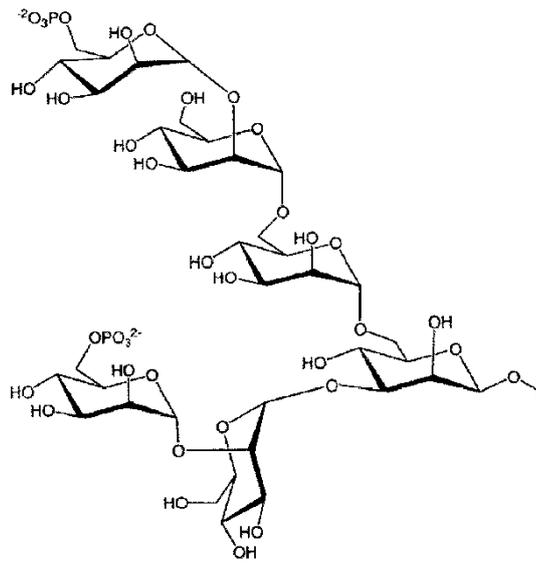
El documento US 20050169941 divulga un conjugado que comprende un reactivo aminooxi homofuncional o heterofuncional y una entidad elegida de polisacáridos, oligosacáridos, carbohidratos y moléculas que contienen carbohidrato que contienen al menos un grupo carbonilo, para formar un polisacárido, oligosacárido, carbohidrato o molécula que contiene carbohidrato funcionalizado mediante al menos un enlace oxima.  
40

El documento US 20020137125 divulga derivados de oligosacárido de manopiranosilo muy fosforilados que contienen manosa-6-fosfato (MGP), u otros oligosacáridos que albergan otras hexosas terminales.  
45

El documento US20050048047 se refiere a la administración intratecal (IT) de enzima recombinante para tratar trastornos de almacenamiento lisosómico.  
50

Los grupos aminooxi son grupos reactivo de carbonilo particularmente útiles para las reacciones de conjugación descritas anteriormente, ya que los conjugados resultantes comprenden un enlace oxima relativamente estable. Por lo tanto, existe la necesidad de métodos para la preparación de oligosacáridos funcionalizados con aminooxi.  
55

Basándose en la divulgación presentada en este documento, en un aspecto, la presente invención proporciona un conjugado de oligosacárido-proteína, que comprende (1) una proteína, (2) un oligosacárido y (3) un grupo oxima que conecta la proteína y el oligosacárido, donde el oligosacárido es un oligosacárido de fórmula **VI**:  
60



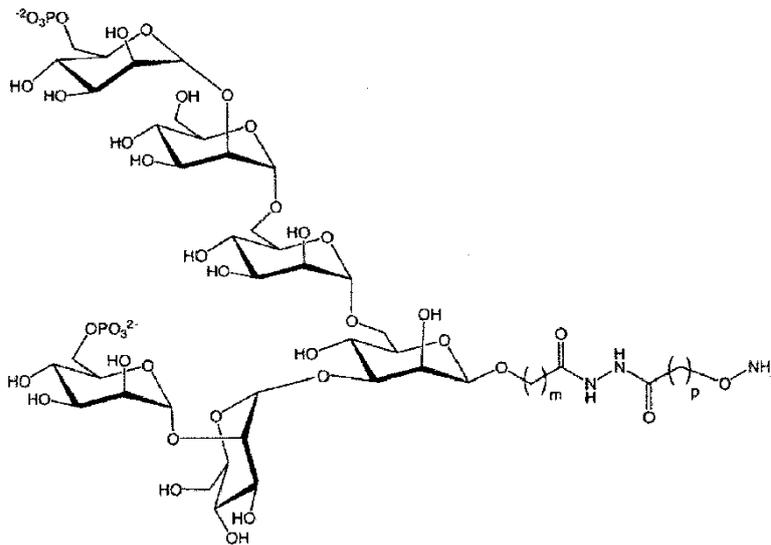
Fórmula VI

5 En otro aspecto, la invención proporciona un método de acoplamiento de un oligosacárido a una proteína, que comprende:

- (a) proporcionar un oligosacárido que comprende un grupo aminooxi;
- (b) proporcionar una proteína que tiene al menos un grupo carbonilo; y
- (c) hacer reaccionar el grupo aminooxi del oligosacárido con el al menos un grupo carbonilo de la proteína,

10

donde el oligosacárido es un oligosacárido de fórmula IV:



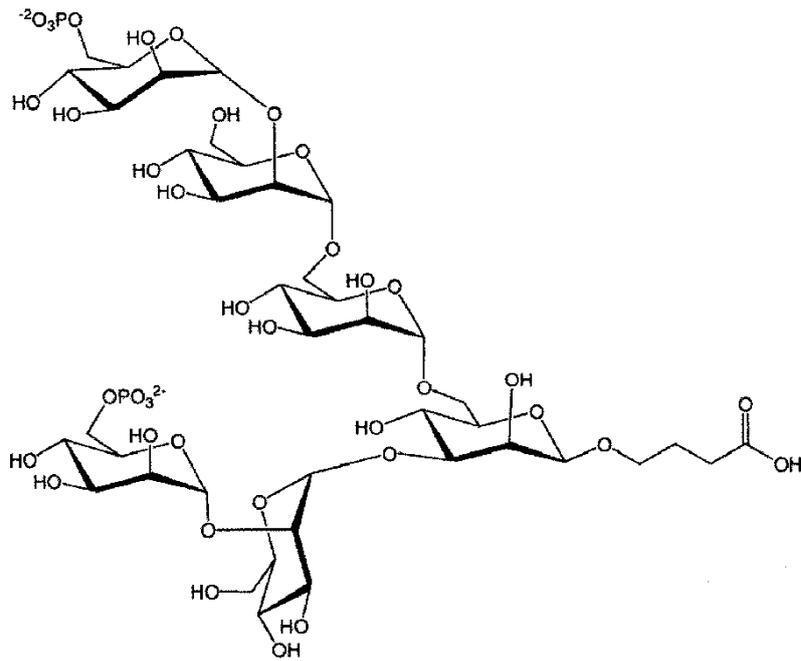
15

Fórmula IV

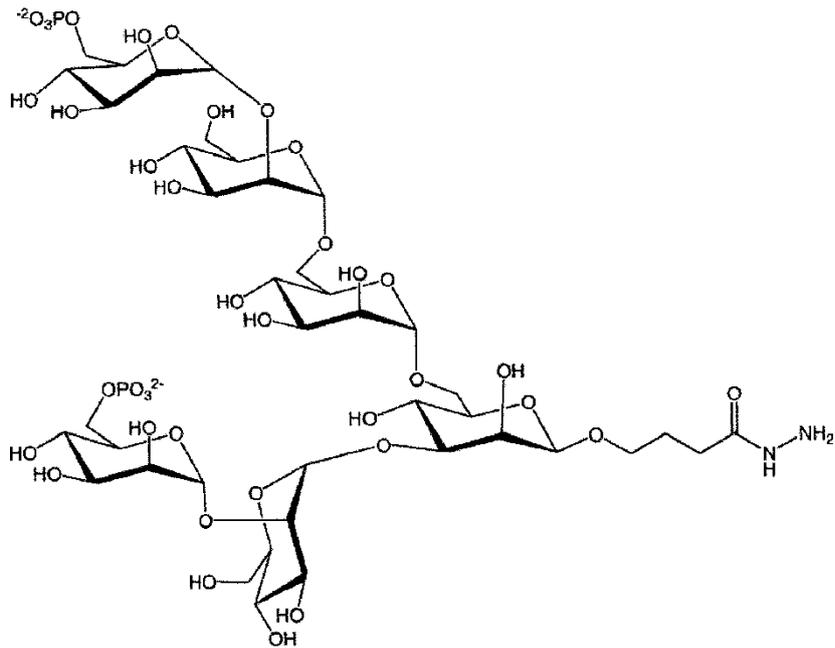
donde m y p se eligen independientemente de números enteros que varían de 1 a 10.

20 En un aspecto adicional, la invención proporciona un oligosacárido que comprende un grupo aminooxi preparado por un método que comprende las etapas de:

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

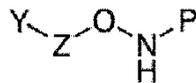


o



5

(b) proporcionar un compuesto aminooxi que comprende un segundo grupo reactivo, donde el compuesto aminooxi se elige de compuestos de fórmula II:



10

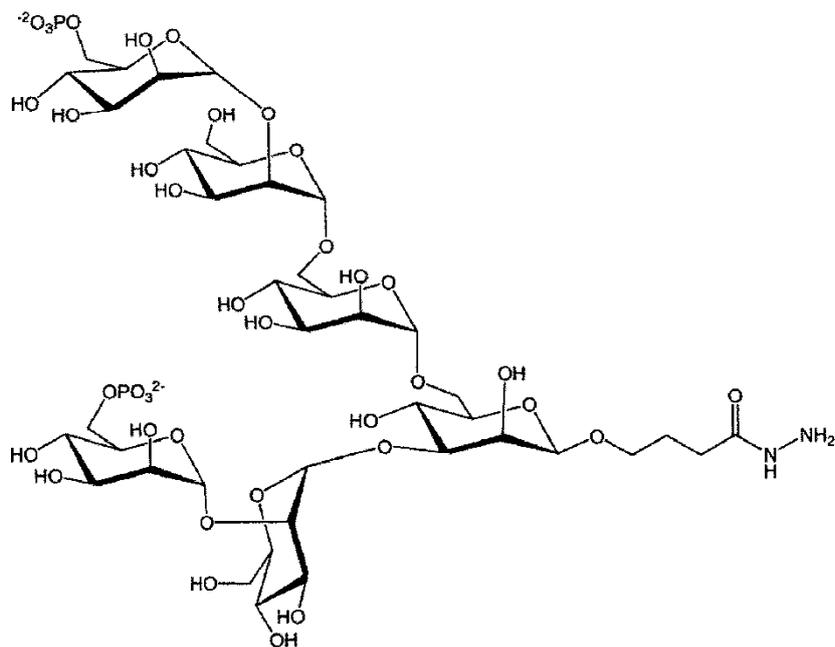
Fórmula II

donde Y es el segundo grupo reactivo, Z se elige de alquilo, alqueniilo, alquinilo, heteroarilo, arilo y heterociclilo, y P se elige de grupos protectores de amino; y

15

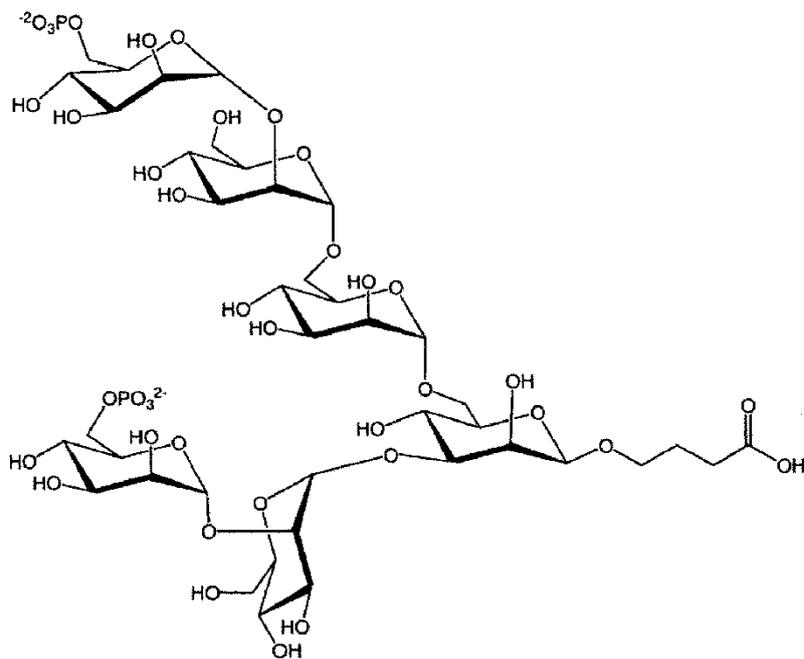
(c) hacer reaccionar el primer grupo reactivo del oligosacárido con el segundo grupo reactivo del compuesto aminooxi, preparando de ese modo el oligosacárido que comprende un grupo aminooxi.

En un aspecto adicional más, la invención proporciona un oligosacárido de fórmula Ia:



Fórmula Ia

5 o de fórmula Ib:

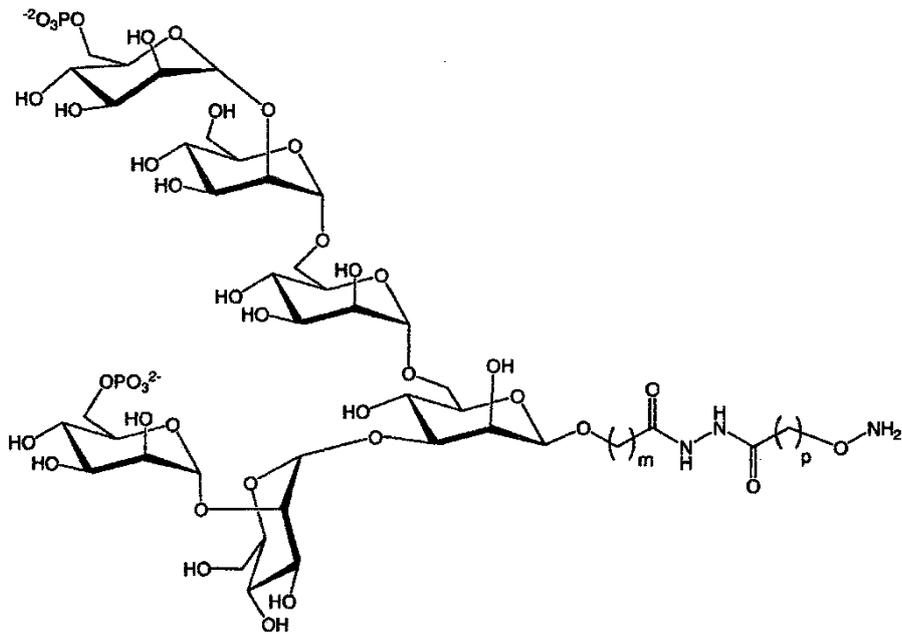


Fórmula Ib.

10 Aspectos adicionales y realizaciones de la presente invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la divulgación presentada en este documento se aplican a aspectos de la divulgación y/o de la invención, según lo apropiado.

15 La presente divulgación, por tanto, proporciona métodos de preparación de oligosacáridos que comprenden un grupo aminooxi. Estos métodos generalmente son aplicables a una amplia gama de oligosacáridos protegidos y no protegidos, tales como, por ejemplo, oligosacáridos ramificados y no ramificados, y fosforilados y no fosforilados. En ciertas realizaciones, los oligosacáridos pueden ser un disacárido, trisacárido, tetrasacárido, pentasacárido, hexasacárido, heptasacárido, o mayor. El oligosacárido puede comprender, en ciertas realizaciones, al menos un resto M6P. en algunas realizaciones, el oligosacárido puede comprender al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 restos M6P  
20 terminales.

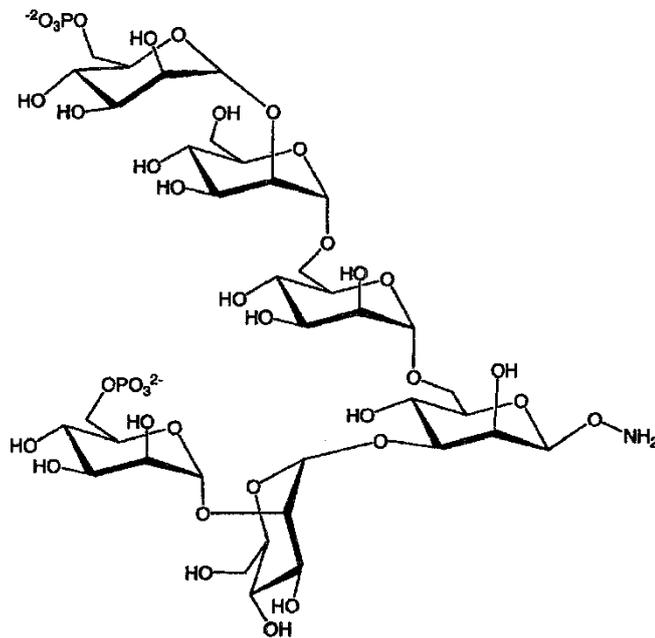




Fórmula IV

5 donde m y p se eligen independientemente de números enteros que varían de 1 a 10.

En otra realización, la divulgación proporciona un oligosacárido de fórmula V:



Fórmula V

En otra realización, la divulgación proporciona métodos de acoplamiento de un oligosacárido a una proteína. En una realización, el método comprende:

- 15 (a) proporcionar un oligosacárido que comprende un grupo aminooxi;
- (b) proporcionar una proteína que tiene al menos un grupo carbonilo; y
- 20 (c) hacer reaccionar el grupo aminooxi del oligosacárido con el al menos un grupo carbonilo de la proteína,

acoplado de ese modo el oligosacárido a la proteína.

En otras realizaciones, la divulgación proporciona además un conjugado de oligosacárido-proteína que comprende (1) una proteína, (2) un oligosacárido y (3) un grupo oxima que conecta la proteína y el oligosacárido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la divulgación proporciona un conjugado de oligosacárido-proteína preparado por los métodos divulgados anteriormente. En ciertas realizaciones, el conjugado de oligosacárido-proteína es un conjugado de oligosacárido-glucoproteína. En ciertas realizaciones, el conjugado de oligosacárido-glucoproteína es el conjugado de un oligosacárido que comprende al menos un M6P y de una enzima lisosómica tal como, por ejemplo, una hidrolasa lisosómica. En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de oligosacárido-proteína de la invención.

Otra realización de la invención proporciona métodos de tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico tal como, por ejemplo, los divulgados en la tabla 1. En algunas realizaciones, los métodos comprenden administrar a un mamífero un conjugado de oligosacárido-glucoproteína de la invención, donde el oligosacárido comprende al menos un M6P y la glucoproteína es una hidrolasa lisosómica. La invención proporciona además un conjugado de la invención para su uso en el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico en un sujeto que lo necesita, y en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno de almacenamiento lisosómico.

### Breve descripción de las figuras

La **figura 1** es un esquema de reacción que representa una realización ilustrativa de los métodos de la divulgación. El oligosacárido **1**, que tiene un primer grupo reactivo (un grupo hidrazida), se hace reaccionar con el compuesto aminooxi **2** en presencia del catalizador 3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona (DHBt-OH), para producir el oligosacárido **3**. El grupo protector de amino terc-butiloxicarbonilo (t-Boc) del oligosacárido **3** entonces se elimina con ácido trifluoroacético al 50 %/diclorometano (TFA/DCM) para producir el oligosacárido **4**.

La **figura 2** representa una serie de cromatografías en gel de los intermedios del esquema sintético descrito en la figura 1. La **figura 2A** es una cromatografía analítica Dionex del oligosacárido **1** de partida. La **figura 2B** es una cromatografía analítica Dionex del oligosacárido **3**. La **figura 2C** es una cromatografía analítica Dionex del oligosacárido **4**.

La **figura 3A** es un espectro de masas del oligosacárido **1** (peso molecular calculado = 1250; peso molecular calculado de sal de sodio = 1338). La **figura 3B** es un espectro de masas del oligosacárido **4** (peso molecular calculado = 1323; peso molecular calculado de sal de sodio = 1411).

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

## I. Preparación de un oligosacárido que comprende un grupo aminooxi

### A. Oligosacárido que comprende un grupo reactivo

Los métodos de la divulgación son aplicables a una amplia gama de oligosacáridos que comprenden un grupo reactivo. Como se usa en este documento, un oligosacárido se refiere a un disacárido, trisacárido, tetrasacárido, pentasacárido, hexasacárido, heptasacárido u oligosacárido mayor (tal como, por ejemplo, un oligosacárido que comprende 2-50, 2-10, 8-25 o 8-50 unidades de sacárido). Por consiguiente, en diversas realizaciones, un oligosacárido puede ser, por ejemplo, un disacárido, trisacárido, tetrasacárido, pentasacárido, hexasacárido, heptasacárido o un oligosacárido mayor. Un oligosacárido puede ser de estructura mono, bi, tri, tetra o penta-antenar. Un oligosacárido puede comprender 0, 1, 2, 3, 4 o más puntos de ramificación.

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

El primer grupo reactivo puede conectarse al extremo reductor del oligosacárido o puede estar localizado en cualquier otra parte del oligosacárido. El primer grupo reactivo puede conectarse, en ciertas realizaciones, a través de uno o más conectores al oligosacárido. Un conector, como se usa en este documento, puede elegirse de, por ejemplo, una combinación de grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, aciloxi, alcoxi, ariloxi y heterocicliloxi opcionalmente sustituidos. Un conector puede estar interrumpido o terminado por uno o más heteroátomos tales como, por ejemplo, nitrógeno, azufre y oxígeno. Por ejemplo, un conector, en algunas

realizaciones, puede comprender uno o más grupos éter, éster o amida.

Cualquier grupo químico del conector (tal como, por ejemplo, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, aciloxi, alcoxi, ariloxi y heterocicliloxi) puede estar sustituido o sin sustituir, salvo que se indique de otro modo. Los sustituyentes pueden elegirse de, por ejemplo, acilo, acilamino, aciloxi, alquenilo, alcoxi, alquilo, alquinilo, amido, amino, arilo, ariloxi, azido, carbamoilo, carboalcoxi, carboxi, ciano, cicloalquilo, formilo, guanidino, halo, heteroarilo, heterociclilo, hidroxilo, iminoamino, nitro, oxo, fosfonamino, sulfínico, sulfonamino, sulfonato, sulfonilo, tio, tioacilamino, tioureido y ureido. Los sustituyentes pueden estar en sí mismo sustituidos o sin sustituir, o pueden estar interrumpidos o terminados por uno o más heteroátomos tales como, por ejemplo, nitrógeno, azufre y oxígeno.

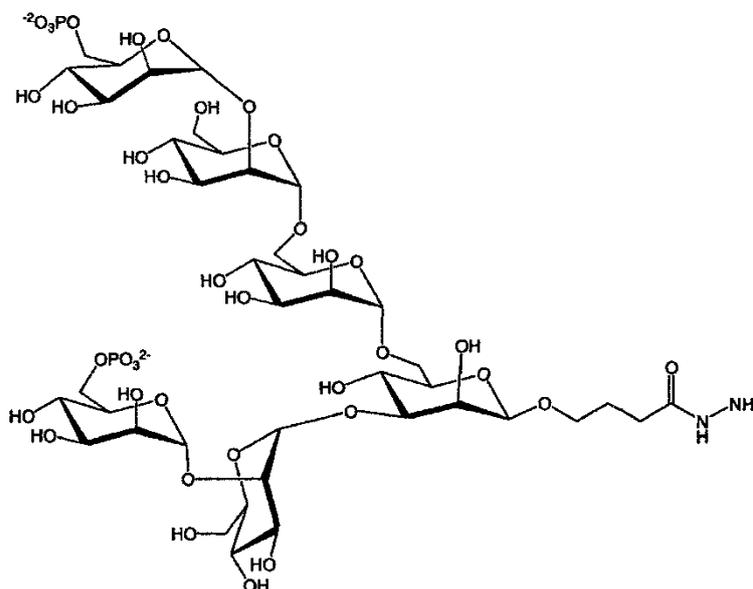
En ciertas realizaciones, un oligosacárido puede comprender al menos un grupo protector. La expresión "grupo protector" se refiere a cualquier sustituyente que puede usarse para prevenir que un grupo funcional (tal como, por ejemplo, un grupo amina, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un grupo hidrazina, un grupo hidrazida, un grupo semicarbazida o un grupo tiosemicarbazida) en una molécula experimente una reacción química mientras se produce un cambio químico en otra parte en la molécula. Un grupo protector puede eliminarse en las condiciones químicas apropiadas. Los expertos en la materia conocen numerosos grupos protectores, y pueden encontrarse ejemplos de grupos protectores, métodos para su adición y métodos para su eliminación en, por ejemplo, Greene et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3.<sup>a</sup> ed., John Wiley y Sons: Nueva York, 1999 y Kocienski, *Protecting Groups*, 3.<sup>a</sup> ed., Georg Thieme Verlag: Stuttgart, Alemania, 2005, cuyas divulgaciones se incorporan en este documento por referencia. En ciertas realizaciones, el oligosacárido puede comprender al menos un grupo protector elegido de grupos protectores de hidroxilo, grupos protectores de carboxilo y grupos protectores de amino. En otras realizaciones, un oligosacárido puede estar "desprotegido" y puede no comprender ningún grupo protector.

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

En algunas realizaciones, un oligosacárido puede comprender un monosacárido que se reconoce por un receptor particular. El monosacárido reconocido por un receptor particular puede elegirse de, por ejemplo, galactosa, manosa, M6P, glucosa, GlcNAc, ácido siálico o resto de ácido siálico sulfatado. Un oligosacárido puede comprender, en ciertas realizaciones, al menos un resto de M6P, tal como, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 restos de M6P.

El monosacárido reconocido por un receptor particular puede ser, en algunas realizaciones, un monosacárido penúltimo o un monosacárido terminal. En algunas realizaciones, el monosacárido reconocido por un receptor particular puede ser una galactosa, manosa, M6P, glucosa, GlcNAc o un resto de ácido siálico terminal. Un oligosacárido puede contener, en algunas realizaciones, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 restos de M6P terminales.

En ciertas realizaciones, el oligosacárido que comprende un grupo reactivo puede ser un hexasacárido que contiene M6P de fórmula Ia:

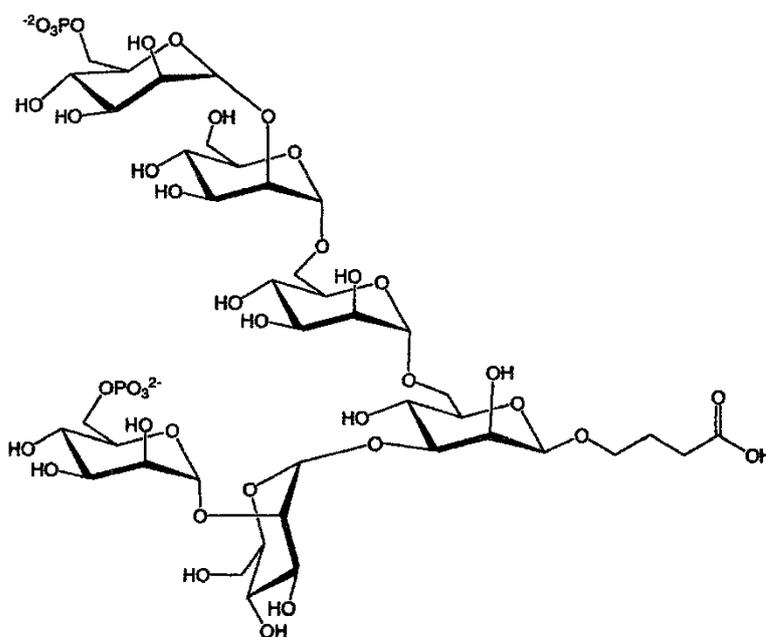


45

## Fórmula Ia

El oligosacárido de fórmula Ia puede describirse como 6-O-fosfona- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)-[6-O-fosfona- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-manopiranosido de butirilhidrazin-4-ilo.

En ciertas realizaciones, el oligosacárido que comprende un grupo reactivo puede ser un hexasacárido que contiene M6P de fórmula Ib:



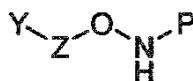
Fórmula Ib

## B. Compuesto aminooxi

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

En ciertas realizaciones, el nitrógeno del grupo aminooxi del compuesto aminooxi se protege con un grupo protector de amino. Los expertos en la materia conocen numerosos grupos protectores de amino, y pueden encontrarse ejemplos de grupos protectores de amino, métodos para su adición y métodos para su eliminación en las páginas 494-653 de Greene et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3.<sup>a</sup> ed., John Wiley y Sons: Nueva York, 1999; Capítulo 8 de Kocienski, *Protecting Groups*, 3.<sup>a</sup> ed., Georg Thieme Verlag: Stuttgart, Alemania, 2005; Bodanszky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag: Nueva York, 1993; Lloyd-Williams et al., *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press: Boca Ratón, FL, 1997; y Stewart et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2.<sup>a</sup> ed., Pierce Chemical Co.: Rockford, IL, 1984, cuyas invenciones se incorporan en este documento por referencia.

En algunas realizaciones, el compuesto aminooxi se elige de compuestos de fórmula II:



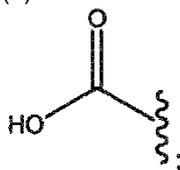
Fórmula II

donde Y es el segundo grupo reactivo, Z se elige de alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroarilo, arilo y heterociclilo y P se elige entre grupos protectores de amino.

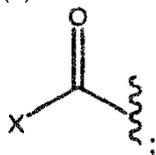
5 Como se usa en este documento, cualquier grupo químico en el compuesto aminooxi (tal como, por ejemplo, alquilo, alquenoilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, aciloxi, alcoxi, ariloxi y heterociclioxi) puede estar sustituido o sin sustituir, y puede estar interrumpido por uno o más grupos químicos, salvo que se indique de otro modo. Los sustituyentes y los grupos químicos de interrupción pueden elegirse de, por ejemplo, acilo, acilamino, aciloxi, alquenoilo, alcoxi, alquilo, alquinilo, amido, amino, arilo, ariloxi, azido, carbamoilo, carboalcoxi, carboxi, ciano, cicloalquilo, formilo, guanidino, halo, heteroarilo, heterociclilo, hidroxilo, iminoamino, nitro, oxo, fosfonamino, sulfinilo, sulfonamino, sulfonato, sulfonilo, tio, tioacilamino, tioureido y ureido. Los sustituyentes pueden estar en sí mismos sustituidos o sin sustituir, y pueden estar interrumpidos o terminados por uno o más heteroátomos tales como, por ejemplo, nitrógeno, azufre y oxígeno.

10 En ciertas realizaciones, Y puede elegirse de, por ejemplo:

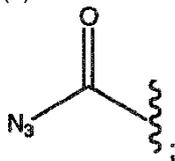
(a)



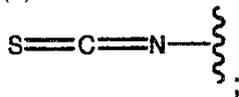
(b)



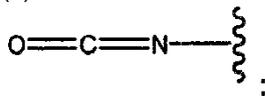
(c)



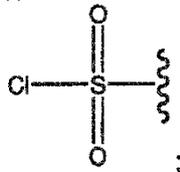
(d)



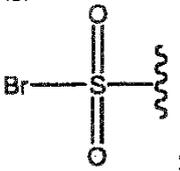
(e)



(f)



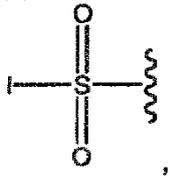
(g)



y

35

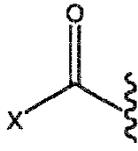
(h)



donde X se elige de halógenos, azida, aciloxi, alcoxi, ariloxi, heteroariloxi y heterocicliloxi.

5

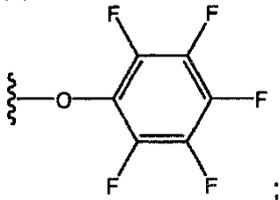
En ciertas realizaciones, el compuesto aminooxi es un éster activado. Como se usa en este documento, un éster activado es un éster que reacciona para formar un enlace amida en condiciones suaves. En general, un éster activado es un éster de un alcohol relativamente ácido. En ciertas realizaciones, el compuesto aminooxi de fórmula II



es un éster activado de fórmula  $X-C(=O)-R$ , y X se elige de alcoxi, ariloxi, heteroariloxi y heterocicliloxi. Por ejemplo, X puede elegirse de:

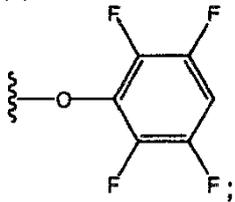
10

(a)

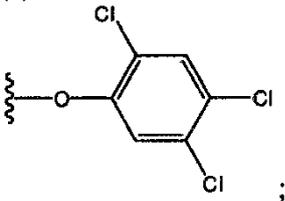


15

(b)

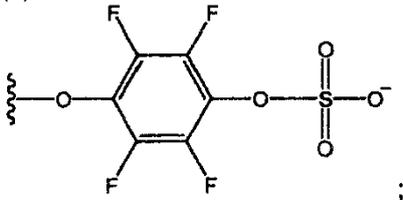


(c)

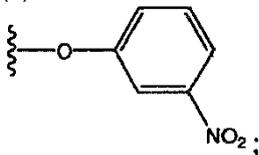


20

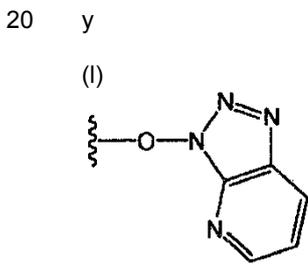
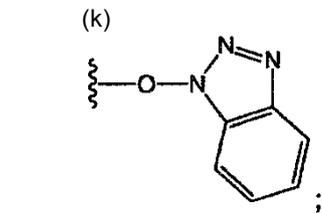
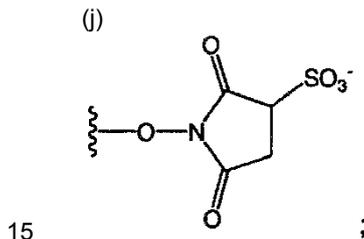
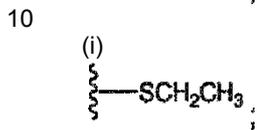
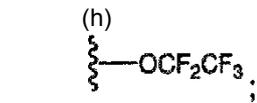
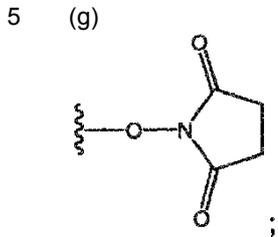
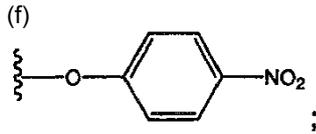
(d)



(e)



25



25 En otras realizaciones, Y se elige de, por ejemplo, grupos hidrazida, hidrazina, tiosemicarbazida, semicarbazida y amina.

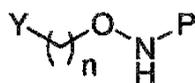
En algunas realizaciones, Z puede comprender, por ejemplo, un grupo carbonilo, éter, éster o amida. En algunas realizaciones, Z puede ser, por ejemplo, alquilo interrumpido por uno o más heteroátomos, tal como un oligoetilenglicol. Por ejemplo, Z puede ser monoetilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol,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

En algunas realizaciones, Z puede ser, por ejemplo, alquilo sustituido con oxo e interrumpido por uno o más heteroátomos, tal como un oligopéptido. Por ejemplo, el oligopéptido puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más aminoácidos componentes. Los aminoácidos pueden ser, por ejemplo,  $\alpha$ -aminoácidos,  $\beta$ -aminoácidos,  $\gamma$ -

aminoácidos,  $\delta$ -aminoácidos y  $\omega$ -aminoácidos. Un aminoácido puede tener quiralidad R o S en cualquier átomo quiral. Un aminoácido puede elegirse de por ejemplo, alanina,  $\beta$ -alanina, ácido  $\alpha$ -aminoadípico, ácido 2-aminobutanoico, ácido 4-aminobutanoico, ácido 1-aminociclopentanocarboxílico, ácido 6-aminohexanoico, ácido 2-aminooctanoico, ácido 7-aminooctanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido aminometilpirrol carboxílico, ácido 8-amino-3,6-dioxa-octanoico, ácido aminopiperidincarboxílico, ácido 3-amino-propiónico, aminoserina, ácido aminotetrahidropiran-4-carboxílico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido azetidín carboxílico, benzotiazolilalanina, butilglicina, carnitina, 4-clorofenilalanina, citrulina, ciclohexilalanina, ciclohexilestatina, cisteína, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 2,3-diaminopropiónico, dihidroxifenilalanina, ácido dimetiltiazolidina carboxílico, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, homoserina, hidroxiprolina, isoleucina, ácido isonipecótico, leucina, lisina, metanoprolina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, ácido p-aminobenzoico, penicilamina, fenilalanina, fenilglicina, piperidinilalanina, piperidinilglicina, prolina, pirrolidinilalanina, sarcosina, selenocisteína, serina, estatina, tetrahidropiranglicina, tienilalanina, treonina, triptófano, tirosina, valina, alo-isoleucina, alo-treonina, ácido 2,6-diamino-4-hexanoico, ácido 2,6-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, dicarboxidina, homoarginina, homocitrulina, homocisteína, homocistina, homofenilalanina, homoprolina y ácido 4-hidrazinobenzoico.

P puede elegirse de grupos protectores de amino conocidos para los expertos en la materia. En algunas realizaciones, P puede ser un grupo protector de carbamato, tal como, por ejemplo, un grupo protector de (9-fluorenilmetil)carbamato (Fmoc), (terc-butiloxi)carbamato (t-Boc), (tricloroetil)carbamato (Troc) o alilcarbamato (Alloc). En otras realizaciones, P puede ser un grupo protector no de carbamato, tal como, por ejemplo, un grupo protector de amida tal como un grupo protector de ftalimida o trifluoroacetamida.

En algunas realizaciones, el compuesto aminooxi de fórmula II se elige de compuestos de fórmula III:

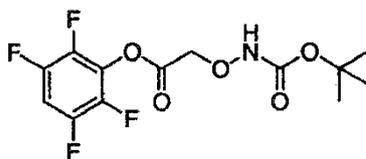


Fórmula III

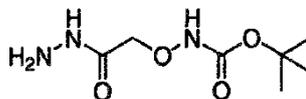
donde Y y P son como se divulga anteriormente, y n se elige de números enteros que varían de 1 a 10.

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

En una realización ilustrativa, el compuesto aminooxi es tetrafluorofenil éster del ácido t-Boc-aminooxi acético, cuya estructura se representa a continuación.



En otra realización ilustrativa, el compuesto aminooxi tiene la estructura representada a continuación.



### C. Métodos de preparación de un oligosacárido que comprende un grupo aminooxi

En otra realización, la divulgación proporciona un método de preparación de un oligosacárido que comprende un grupo aminooxi a partir de un oligosacárido que comprende un grupo reactivo. El método comprende:

- proporcionar un oligosacárido que comprende un primer grupo reactivo;
- proporcionar un compuesto aminooxi que comprende un segundo grupo reactivo; y
- hacer reaccionar el primer grupo reactivo del oligosacárido con el segundo grupo reactivo del compuesto aminooxi,

preparando de ese modo el oligosacárido que comprende un grupo aminooxi.

El oligosacárido que comprende un primer compuesto reactivo puede ser, por ejemplo, cualquier oligosacárido que comprende un grupo reactivo como se describe *supra*. En realizaciones ilustrativas, el oligosacárido que comprende un primer grupo reactivo es un oligosacárido de fórmula Ia o un oligosacárido de fórmula Ib. El compuesto aminooxi que comprende un segundo grupo reactivo puede ser cualquier compuesto aminooxi que comprende un grupo

reactivo, como se describe *supra*.

Las expresiones "primer grupo reactivo" y "segundo grupo reactivo", como se usan en este documento, no indican ninguna secuencia experimental particular. Es decir, la etapa (c), hacer reaccionar el primer grupo reactivo del oligosacárido con el segundo grupo reactivo del compuesto aminooxi, puede conseguirse por cualquier orden de adición de los reactivos. Por ejemplo, el oligosacárido que comprende un primer grupo reactivo puede añadirse al compuesto aminooxi que comprende el segundo grupo reactivo o viceversa. En otro ejemplo, tanto el polisacárido como el compuesto aminooxi pueden añadirse de forma simultánea a un recipiente de reacción.

La etapa (c) se puede producir en cualquier condición adecuada (por ejemplo, disolvente y temperatura) conocida para los expertos en la materia. En ciertas realizaciones, uno o más reactivos adicionales, tales como, por ejemplo, reactivos de acoplamiento y catalizadores pueden estar presentes durante la etapa (c). Un agente de acoplamiento, como se usa en este documento, es un reactivo que puede usarse para formar un enlace covalente entre el primer grupo reactivo y el segundo grupo reactivo.

En algunas realizaciones, tales como, por ejemplo, cuando el primer o el segundo grupo reactivo es un grupo carboxilo, las condiciones de reacción pueden comprender un reactivo de acoplamiento. Los reactivos de acoplamiento pueden elegirse de, por ejemplo, reactivos de acoplamiento de fosfonio tales como, por ejemplo, BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)-fosfonio), PyBOP® (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio), y PyBroP® (hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino-fosfonio) y reactivos de acoplamiento de amino (uronio) tales como, por ejemplo, HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio), HATU (hexafluorofosfato de 2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio), TBTU (2-(tetrafluoroborato de 1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio). Los reactivos de acoplamiento también pueden elegirse de, por ejemplo, reactivos de acoplamiento de carbodiimida tales como, por ejemplo, DIC (1,3-diisopropilcarbodiimida), CDI (1,1' carbonil diimidazol) y EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida). Por ejemplo, en algunas realizaciones ilustrativas, el reactivo de acoplamiento es EDC. En ciertas realizaciones, las condiciones de reacción comprenden tanto un reactivo de acoplamiento como un catalizador.

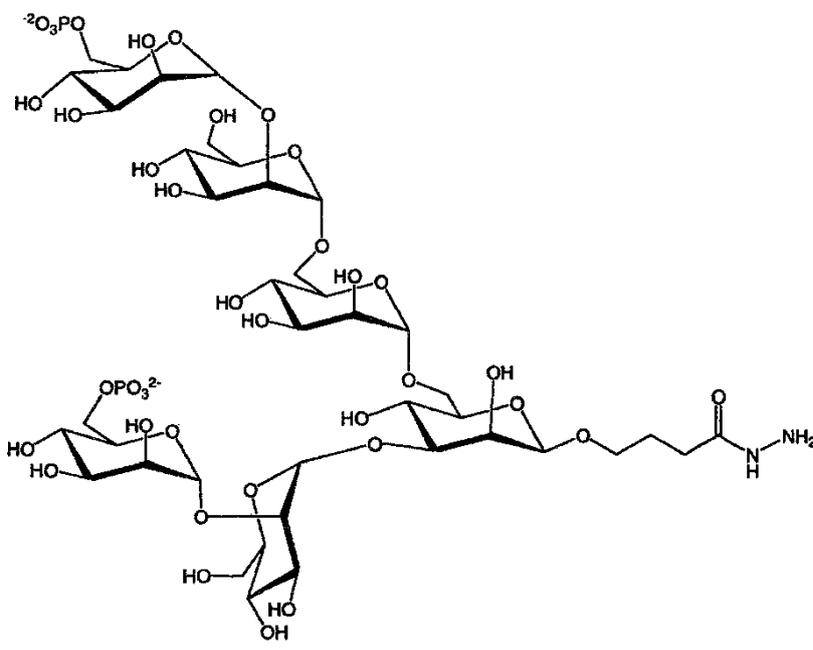
Las condiciones de reacción pueden comprender, en ciertas realizaciones, un catalizador. Un catalizador puede elegirse de cualquier catalizador adecuado conocido para los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, DHBt-OH (3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona), HOBt (N-hidroxibenzotriazol), DMAP (4-dimetilaminopiridina), NHS (N-hidroxisuccinimida), N-hidroxisulfosuccinimida, HONB (N-hidroxi-5-norborneno-endo-2,3-dicarboximida) o una sal de tetrabutilamonio tal como, por ejemplo, TBAI (yoduro de tetrabutilamonio). En algunas realizaciones ilustrativas, las condiciones de reacción comprenden el catalizador DHBt-OH o el catalizador NHS.

En algunas realizaciones, la etapa (c), hacer reaccionar el primer grupo reactivo del oligosacárido con un segundo grupo reactivo del compuesto aminooxi provoca la formación de un enlace amida. Las condiciones adecuadas para la formación de un enlace amida son bien conocidas para los expertos en la materia y se describen en, por ejemplo, Chan et al., eds., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Oxford University Press: Nueva York, 2000; Bodanszky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag: Nueva York, 1993; Lloyd-Williams et al., *Chemical Approaches to the Síntesis of Peptides and Proteins*, CRC Press: Boca Ratón, FL, 1997; y el catálogo Novabiochem® (San Diego, CA).

En ciertas realizaciones, el compuesto aminooxi comprende un grupo protector de amino y el método comprende una etapa adicional (d), desproteger el oligosacárido que comprende un grupo aminooxi para eliminar el grupo protector de amino. La desprotección se puede producir en cualquier condición adecuada conocida para los expertos en la materia, tal como, por ejemplo, las mostradas en las páginas 494-653 de Greene et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3.<sup>a</sup> ed., John Wiley y Sons: Nueva York, 1999 y Kocienski, *Protecting Groups*, 3.<sup>a</sup> ed., Georg Thieme Verlag: Stuttgart, Alemania, 2005, cuyas invenciones se incorporan en este documento por referencia.

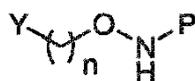
Una realización ilustrativa del método de la divulgación proporciona un método de preparación de un oligosacárido que contiene M6P que comprende un grupo aminooxi. El método comprende:

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



5

(b) proporcionar un compuesto aminooxi que comprende un segundo grupo reactivo, donde el compuesto aminooxi se elige de compuestos de fórmula III:



Fórmula III

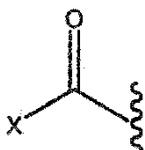
10

donde n se elige de números enteros que varían de 1 a 10, P se elige de grupos protectores de amino e Y es un segundo grupo reactivo; y

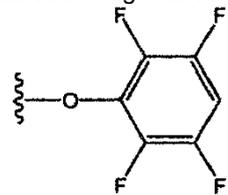
15

(c) hacer reaccionar el primer grupo reactivo del oligosacárido con el segundo grupo reactivo del compuesto aminooxi,

preparando de ese modo el oligosacárido que comprende un grupo aminooxi.

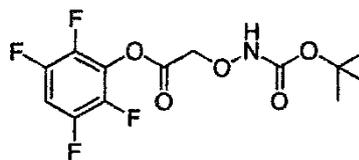


En ciertas realizaciones, Y en la fórmula III es , donde X se elige de hidroxilo, ariloxi, heteroariloxi y



20

heterocicliloxi. Por ejemplo, en ciertas realizaciones ilustrativas, X es



En realizaciones ilustrativas, el compuesto aminooxi es .

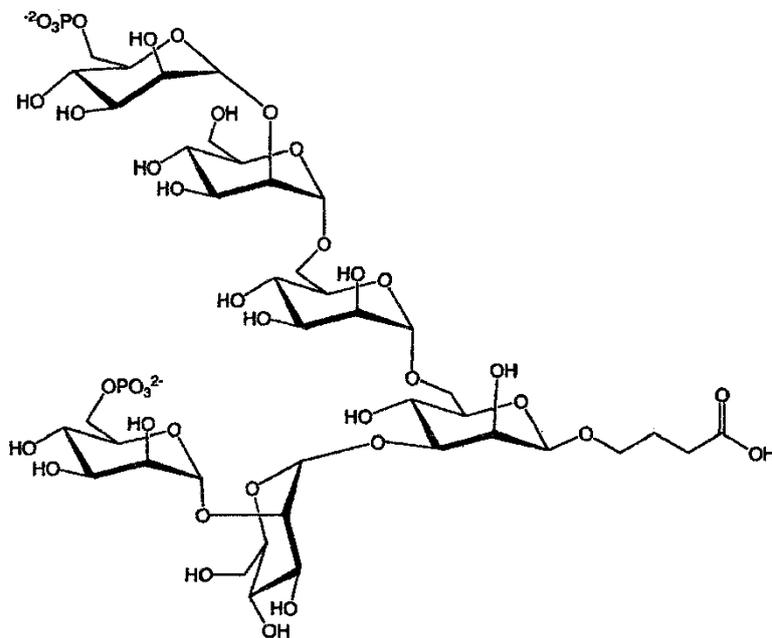
25

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

Otra realización ilustrativa del método de la divulgación comprende:

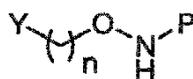
(a) proporcionar un oligosacárido que comprende un primer grupo reactivo, donde el oligosacárido es

5



(b) proporcionar un compuesto aminooxi que comprende un segundo grupo reactivo, donde el compuesto aminooxi se elige de compuestos de fórmula III:

10



Fórmula III

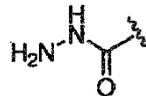
15 donde n se elige de números enteros que varían de 1 a 10, P se elige de grupos protectores de amino e Y es un segundo grupo reactivo; y

(c) hacer reaccionar el primer grupo reactivo del oligosacárido con el segundo reactivo del compuesto aminooxi,

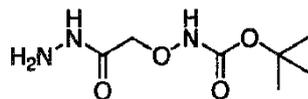
20 preparando de ese modo el oligosacárido que comprende un grupo aminooxi.

En ciertas realizaciones, Y en la fórmula III es un grupo hidrazina, hidrazida, aminooxi, tiosemicarbazida,

semicarbazida o amina. En ciertas realizaciones, Y en la fórmula III es



25 En realizaciones ilustrativas, el compuesto aminooxi es



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

30

## II. Oligosacáridos que comprenden un grupo aminooxi

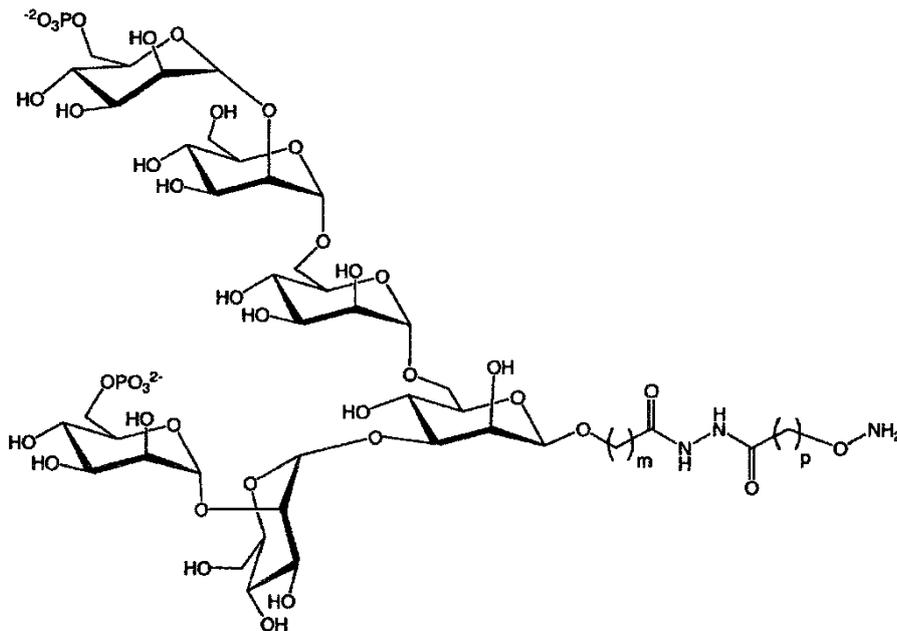
La presente divulgación también proporciona oligosacáridos que comprenden un grupo aminooxi. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona oligosacáridos que comprenden un grupo aminooxi preparados por los métodos divulgados anteriormente. El oligosacárido que comprende un grupo aminooxi puede comprender, por

35

ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6 o más monosacáridos, incluyendo, por ejemplo, al menos un resto de galactosa, GalNAc, manosa, M6P, glucosa, GlcNAc, ácido siálico o ácido siálico sulfatado. Dicho oligosacárido puede ser de estructura mono, bi, tri, tetra o penta-antena y puede contener 0, 1, 2, 3, 4 o más puntos de ramificación.

5 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un oligosacárido que comprende (1) un grupo aminooxi y (2) manosa-6-fosfato. El oligosacárido que comprende un grupo aminooxi puede comprender, en algunas realizaciones, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 restos de M6P. En algunas realizaciones, el oligosacárido que comprende un grupo aminooxi puede comprender al menos 1, 2, 3, 4 o más restos de M6P terminales o penúltimos.

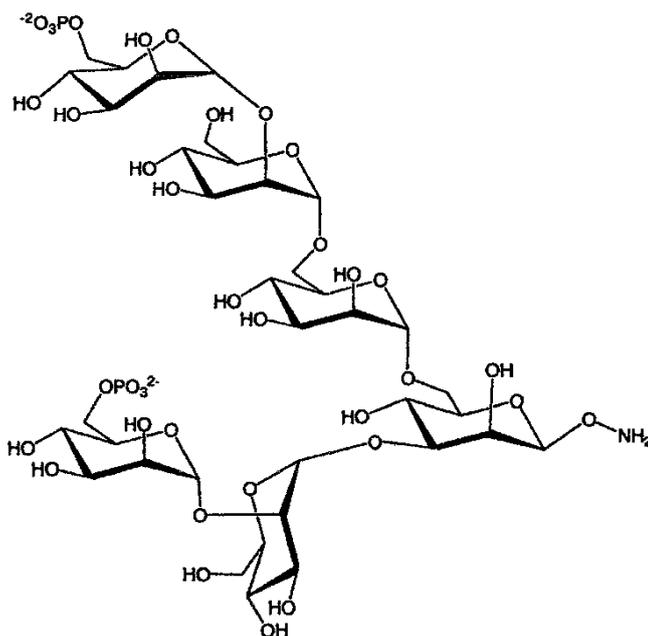
10 Los oligosacáridos que comprenden un grupo aminooxi se eligen, en ciertas realizaciones, de oligosacárido de fórmula IV:



15 **Fórmula IV**

donde m y p se eligen independientemente de números enteros que varían de 1 a 10. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, m y p pueden elegirse independientemente de números enteros seleccionados de los siguientes intervalos: 1-4, 2-6, 2-8, 3-6 y 4-10. En realizaciones ilustrativas, m es 3 y p es 1.

20 En otras realizaciones, el grupo aminooxi se une directamente al extremo reductor del oligosacárido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el oligosacárido que comprende un grupo aminooxi puede ser un oligosacárido de fórmula V:



Fórmula V

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

#### A. Oligosacárido

10 El oligosacárido a conjugar con una proteína puede elegirse de cualquier oligosacárido que comprende un grupo reactivo, como se analiza *supra* y de cualquier oligosacárido que comprende un grupo aminooxi, como se analiza *supra*. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el oligosacárido a conjugar puede ser un oligosacárido de fórmula Ia, fórmula Ib, fórmula IV o fórmula V.

#### B. Proteína

15 Los métodos de conjugación descritos en este documento son ampliamente aplicables a cualquier proteína pura, proteína parcialmente purificada o fragmento de la misma, que tiene al menos un grupo carbonilo (donde un grupo carbonilo es una acetona o un aldehído), incluyendo proteínas aisladas y proteínas producidas de forma recombinante o sintética. Los términos "puro", "purificado" y "aislado" se refieren a una molécula que está sustancialmente libre de su entorno natural. Por ejemplo, una proteína pura está sustancialmente libre de material celular y/o de otras proteínas de la fuente de célula o tejido de la que se obtiene. El término se refiere a preparaciones que son, por ejemplo, al menos de un 70 % a un 80 %, de un 80 % a un 90 %, de un 90 a un 95 % o de al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % (p/p) puras.

25 En otras realizaciones, la proteína puede ser una enzima que tiene actividad óptima, medida por un ensayo de actividad, a un pH que varía de 1-7, tal como, por ejemplo, 1-3, 2-5, 3-6, 4-5, 5-6 o 4-6. Por ejemplo, la enzima puede tener un pH óptimo a un intervalo de pH de 4-6.

30 En algunas realizaciones, la proteína puede ser una enzima que tiene un punto isoelectrico (pI) que varía de 1 a 8, tal como, por ejemplo, de 1-3, 2-5, 3-8, 4-5, 5-6, 4-6, 5-8, 6-8 o 7-8. El pI de una proteína puede medirse usando, por ejemplo, electroforesis en gel de enfoque isoelectrico.

35 En algunas realizaciones, la proteína que contiene un grupo carbonilo se obtiene por el uso de un sistema de expresión que tiene un código genético expandido, como se describe en, por ejemplo, Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:56-61 (2003). En dicho caso, el grupo carbonilo puede estar localizado en la cadena lateral del aminoácido, según se traduce.

40 En ciertas realizaciones, la proteína que tiene al menos un grupo carbonilo es una proteína que tiene al menos un oligosacárido (es decir, una glucoproteína). Por ejemplo, una glucoproteína que tiene al menos un grupo carbonilo puede obtenerse por oxidación de esa glucoproteína por cualquier medio conocido para los expertos en la materia. En algunas realizaciones, por ejemplo, una glucoproteína que tiene al menos un grupo carbonilo puede obtenerse por oxidación de esa glucoproteína con peryodato (por ejemplo, peryodato de sodio) o con galactosa oxidasa. En dicho caso, el grupo carbonilo puede estar localizado en un sitio de glucosilación de la glucoproteína.

5 En ciertas realizaciones, la proteína que tiene al menos un grupo carbonilo es una glucoproteína, tal como una glucoproteína terapéutica. Una glucoproteína terapéutica puede dirigirse al lisosoma por conjugación con un oligosacárido que comprende manosa-6-fosfato. Por ejemplo, la glucoproteína puede ser una enzima lisosómica, incluyendo una enzima ERT. La enzima puede ser una hidrolasa lisosómica, incluyendo las enumeradas en la tabla 1. En ciertas realizaciones, la hidrolasa lisosómica se elige, por ejemplo,  $\alpha$ -glucosidasa,  $\alpha$ -galactosidasa A y esfingomielinasa ácida. En ciertas realizaciones, la hidrolasa lisosómica es GAA.

**Tabla 1:** Ejemplos de LSD y las correspondientes hidrolasas lisosómicas

Trastorno de almacenamiento lisosómico	Enzima defectuosa
Fabry	$\alpha$ -Galactosidasa A
Farber	Ceramidasa ácida
Fucosidosis	$\alpha$ -L-fucosidasa ácida
Gaucher tipos 1, 2, y 3	$\beta$ -glucosidasa ácida
Gangliosidosis $G_{M1}$	$\beta$ -galactosidasa ácida
Hunter (Mucopolisacaridosis (MPS) II)	Iduronato-2-sulfatasa
Hurler-Scheie, Hurler, Scheie (MPS I)	$\alpha$ -L-iduronidasa
Krabbe	Galactocerebrosidasa
$\alpha$ -Manosidosis	$\alpha$ -manosidasa ácida
$\beta$ -Manosidosis	$\beta$ -manosidasa ácida
Maroteaux-Lamy (MPS VI)	Ari sulfatasa B
Leucodistrofia metacromática	Ari sulfatasa A
Morquio A (MPS IV)	<i>N</i> -Acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa
Morquio B (MPS IV)	$\beta$ -galactosidasa ácida
Niemann-Pick A y B	Esfingomielinasa ácida (ASM)
Pompe	$\alpha$ -glucosidasa ácida ( $\alpha$ -glucosidasa; GAA)
Sandhoff	$\beta$ -hexosaminidasa B
Sanfilippo A (MPS III)	Heparano <i>N</i> -sulfatasa
Sanfilippo B (MPS III)	$\alpha$ - <i>N</i> -acetilglucosaminidasa
Sanfilippo C (MPS III)	Acetil-CoA: $\alpha$ -glucosaminido <i>N</i> -acetiltransferasa
Sanfilippo D (MPS III)	<i>N</i> -acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa
Schindler-Kanzaki	$\alpha$ - <i>N</i> -acetilgalactosaminidasa
Sialidosis	Sialidasa
Sly (MPS VII)	$\beta$ -glucuronidasa
Tay-Sachs	$\beta$ -hexosaminidasa A

10 En ciertas realizaciones, la glucoproteína puede ser una glucoproteína que tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más restos de aminoácido glucosilados unidos a *N* o unidos a *O*. En otras realizaciones, la proteína puede tener 1, 2, 3, 4, 5 o más sitios consenso de glucosilación unida a *N* o unida a *O*, al menos uno de los cuales está glucosilado.

15 En ciertas realizaciones, la proteína puede ser un ligando para un receptor. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína puede ser una glucoproteína que se une a un receptor que reconoce un azúcar tal como, por ejemplo, manosa o manosa-6-fosfato. En algunas realizaciones, la glucoproteína puede unirse a, por ejemplo, el receptor de asialoglucoproteína, el receptor de manosa-6-fosfato dependiente de cationes, el receptor de factor II de crecimiento de tipo insulina/manosa-6-fosfato independiente de cationes o el receptor de manosa de macrófagos.

20 En ciertas realizaciones, la proteína es una glucoproteína que, cuando se conjuga con un oligosacárido que comprende manosa-6-fosfato, se internaliza de forma más eficaz por una célula diana (por ejemplo, mediante endocitosis mediada por CI-MPR) que es la glucoproteína no conjugada correspondiente. Por ejemplo, la glucoproteína conjugada puede internalizarse de forma más eficaz que la glucoproteína no conjugada en, por ejemplo, al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % (p/p) en un periodo de tiempo dado. En otras realizaciones, puede internalizarse como mucho al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces (p/p) de la glucoproteína conjugada, respecto a la glucoproteína no conjugada en un periodo de tiempo dado. El periodo de tiempo de referencia puede ser, por ejemplo, 10, 30, 45 minutos o 1, 2, 3, 5, 6, 12, 24, 48 o 72 horas, o más.

30 **C. Métodos de acoplamiento de un oligosacárido a una proteína**

La divulgación proporciona métodos de acoplamiento de un oligosacárido a una proteína, tal como, por ejemplo, a una glucoproteína. En una realización, el método comprende:

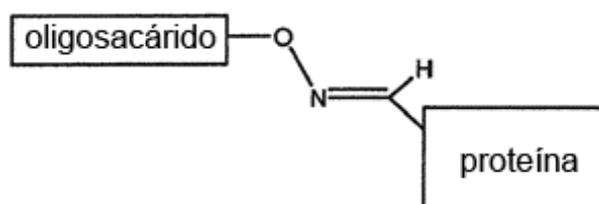
- 35
- (a) proporcionar un oligosacárido que comprende un grupo aminooxi;
  - (b) proporcionar una proteína que tiene al menos un grupo carbonilo; y
  - (c) hacer reaccionar el grupo aminooxi del oligosacárido con el al menos un grupo carbonilo de la proteína,

acoplado de ese modo el oligosacárido a la proteína.

5 En ciertas realizaciones, los métodos comprenden además añadir un agente reductor a la enzima lisosómica acoplada. El agente reductor puede ser cualquier agente reductor conocido para los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, cianoborohidruro de sodio o triacetoxiborohidruro de sodio (STAB).

#### IV. Conjugados de oligosacárido-proteína

10 La divulgación proporciona además un conjugado de oligosacárido-proteína, que comprende (1) una proteína, (2) un oligosacárido y (3) un grupo oxima que conecta la proteína y el oligosacárido. En algunas realizaciones, la invención proporciona un conjugado de oligosacárido-proteína preparado por los métodos divulgados anteriormente. Los componentes de oligosacárido y de proteína del conjugado pueden ser, por ejemplo, cualquier oligosacárido y proteína descritos en este documento, donde un conjugado de los mismos comprende un grupo oxima, como se  
15 representa a continuación. (El grupo oxima representado a continuación se obtiene de manera correcta por reacción de un grupo aminooxi y un grupo aldehído; los grupos oxima obtenidos de manera correcta por reacción de un grupo aminooxi y un grupo cetona también quedan abarcados por esta invención).



20 En ciertas realizaciones, el de conjugado oligosacárido-proteína es un conjugado de oligosacárido-glicoproteína. En ciertas realizaciones, el conjugado de oligosacárido-proteína es el conjugado de un oligosacárido que comprende al menos un M6P y una hidrolasa lisosómica.

#### 25 V. Composiciones farmacéuticas

La divulgación proporciona el uso de un conjugado de esta invención en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno de almacenamiento lisosómico. También proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de oligosacárido-proteína de la invención. En algunas realizaciones, las composiciones  
30 farmacéuticas de la divulgación comprenden un conjugado de un oligosacárido que comprende al menos un M6P y una enzima lisosómica.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender uno o más excipientes farmacéuticos adecuados. Las técnicas de formulación farmacéutica y excipientes convencionales son bien conocidos para los  
35 expertos en la materia (véase, por ejemplo, 2005 Physicians' Desk Reference®, Thomson Healthcare: Montvale, NJ, 2004; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20.ª ed., Gennado et al., Eds. Lippincott Williams & Wilkins: Filadelfia, PA, 2000). Las composiciones pueden contener o no conservantes. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden conjugados de  $\alpha$ -galactosidasa A pueden comprender uno o más excipientes tales como, por ejemplo, manitol, fosfato de sodio monobásico monohidrato y/o fosfato de sodio dibásico heptahidrato. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden conjugados de  $\alpha$ -glucosidasa pueden comprender uno o más excipientes tales como, por ejemplo, manitol, polisorbato 80, fosfato de sodio dibásico heptahidrato y fosfato de sodio monobásico monohidrato.

La composición farmacéutica puede comprender cualquiera de los conjugados descritos en este documento como el  
45 único compuesto activo o en combinación con otro compuesto, composición o material biológico. Por ejemplo, la composición farmacéutica también puede comprender una o más moléculas pequeñas útiles para el tratamiento de un LSD y/o un efecto secundario asociado con el LSD. En algunas realizaciones, la composición puede comprender miglustat y/o uno o más compuestos descritos en, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0050299, 2003/0153768; 2005/0222244; 2005/0267094.

La formulación de composiciones farmacéuticas puede variar dependiendo de la vía pretendida de administración y de otros parámetros (véase, por ejemplo, Rowe et al. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4.ª ed., APhA Publications, 2003). En algunas realizaciones, la composición puede ser una torta o polvo liofilizado de blanco a  
55 blanquecino, estéril y apirógeno a administrar por inyección intravenosa tras su reconstitución con agua estéril para inyección, USP.

La administración de una composición farmacéutica de la invención no está limitada a ningún sistema de suministro particular y puede incluir, sin limitación, parenteral (incluyendo inyección subcutánea, intravenosa, intracraneal, intramedular, intraarticular, intramuscular, intratecal o intraperitoneal), transdérmica u oral (por ejemplo, en cápsulas,

suspensiones o comprimidos). La administración a un individuo puede producirse en una única dosis o en administraciones repetidas, y en cualquiera de una diversidad de formas salinas fisiológicamente aceptables y/o con un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o aditivo como parte de una composición farmacéutica.

5 Los conjugados descritos en este documento se administran en cantidades terapéuticamente eficaces. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar con la edad, estado y género del sujeto, así como la gravedad de la afección médica del sujeto. La dosificación puede determinarse por un médico y ajustarse, según lo necesario, para adecuar los efectos observados del tratamiento. La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos puede determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro* (es decir, cultivos celulares) o *in vivo* (es decir, modelos animales experimentales), por ejemplo, para determinar la DL<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico (o relación terapéutica) y puede expresarse como la relación de DL<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>. En este documento se describen conjugados que muestran índices terapéuticos de al menos 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 20. Se prefieren conjugados que muestran un índice terapéutico grande.

15 Los datos obtenidos de los ensayos *in vitro* y los estudios en animales, por ejemplo, pueden usarse en formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos recae preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE<sub>50</sub> con baja, poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier conjugado usado en la presente invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración plasmática en circulación que incluye la CI<sub>50</sub> (es decir, la concentración del conjugado de ensayo que consigue la mitad de la inhibición máxima de los síntomas) determinada en experimentos *in vitro*. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento o por un ensayo de actividad enzimática apropiado. Los efectos de cualquier dosificación particular pueden controlarse por un bioensayo adecuado de criterios de valoración.

20 Salvo que se indique de otro modo, los conjugados de la invención pueden administrarse a una dosis de aproximadamente 1 µg/kg a 500 mg/kg, dependiendo de la gravedad de los síntomas y de la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, los compuestos proteínicos pueden administrarse por infusión intravenosa lenta en un entorno extrahospitalario cada, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más días, o por administración, por ejemplo, semanal, bisemanal, mensual o bimensual. La dosis terapéuticamente eficaz apropiada de un compuesto se selecciona por un médico a cargo y variaría aproximadamente de 1 µg/kg a 500 mg/kg, de 1 µg/kg a 10 mg/kg, de 1 µg/kg a 1 mg/kg, de 10 µg/kg a 1 mg/kg, de 10 µg/kg a 100 µg/kg, de 100 µg a 1 mg/kg y de 500 µg/kg a 5 mg/kg.

35 Por ejemplo, los conjugados de α-galactosidasa A pueden administrarse por infusión intravenosa a una dosis de, por ejemplo, 1,0 mg/kg de peso corporal cada dos semanas a una tasa de infusión de, por ejemplo, menos de o igual a 10, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 o 33 mg/hora. En otro ejemplo, los conjugados de α-glucosidasa pueden administrarse por inyección intravenosa a una dosis de, por ejemplo, 20 mg/kg o 40 mg/kg cada dos semanas, durante aproximadamente, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 horas. En algunas realizaciones, la tasa de administración de α-glucosidasa puede empezarse en, por ejemplo, 1 mg/kg/h y después aumentarse en, por ejemplo, 2 mg/kg/h cada 30 minutos, después de establecer la tolerancia del paciente a la tasa de infusión, hasta un máximo de, por ejemplo, 7 mg/kg/h. Adicionalmente, pueden encontrarse ejemplos de dosificaciones específicas en *Physicians' Desk Reference*®.

## 45 VI. Métodos de tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico

La divulgación proporciona métodos de tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico tales como, por ejemplo, los divulgados en la tabla 1. En algunas realizaciones, la invención proporciona un conjugado de la invención para su uso en el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico en un sujeto que lo necesita. La divulgación proporciona además métodos de dirección de proteínas al lisosoma por conjugación con oligosacáridos que comprenden manosa-6-fosfato.

55 En una realización, el método comprende administrar a un mamífero que tiene un trastorno de almacenamiento lisosómico un conjugado de oligosacárido-glucoproteína de la invención en una cantidad terapéuticamente eficaz. El conjugado de oligosacárido-glucoproteína puede ser un conjugado de una enzima lisosómica, tal como una enzima lisosómica enumerada en la tabla 1, con un oligosacárido que comprende manosa-6-fosfato. En una realización, el método comprender administrar a un sujeto que lo necesita una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los conjugados descritos en este documento.

60 En ciertas realizaciones, los conjugados de la invención pueden administrarse con uno o más tratamientos diferentes. El uno o más tratamientos diferentes pueden administrarse de forma simultánea con (incluyendo administración simultánea como una formulación combinada), antes o después de la administración de los conjugados de la invención.

65 En algunas realizaciones, un paciente puede tratarse (antes, después o durante el tratamiento con un conjugado de

la invención) con un antipirético, antihistamínico y/o inmunosupresor. En algunas realizaciones, un paciente puede tratarse con un antipirético, antihistamínico y/o inmunosupresor antes del tratamiento con un conjugado de oligosacárido-glucoproteína de la invención para disminuir o prevenir las reacciones asociadas con la infusión. Por ejemplo, los pacientes pueden pretratarse con uno o más de acetaminofeno, azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina A, metotrexato, micofenolato mofetilo, esteroides orales o rapamicina.

En algunas realizaciones, los pacientes pueden tratarse con uno o más de acetaminofeno, azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina A, metotrexato, micofenolato mofetilo, esteroides orales o rapamicina en o aproximadamente en, por ejemplo,  $t = 0$  (el momento de la administración del conjugado de la invención) y/o  $t = 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120,$  y  $144$  horas durante, por ejemplo, los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más episodios de tratamiento con un conjugado de la invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un paciente con enfermedad de Fabry o enfermedad de Pompe puede tratarse con metotrexato (por ejemplo, con 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80 mg/kg de metotrexato, o más) en o aproximadamente en, por ejemplo,  $t = 0, 24$  y  $48$  horas durante, por ejemplo, las primeras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 semanas de tratamiento con un conjugado de la invención. En algunas realizaciones, puede inducirse tolerancia inmunitaria hacia los conjugados de la invención en un paciente con un trastorno de almacenamiento lisosómico tal como, por ejemplo, mucopolisacaridosis I, por tratamiento con ciclosporina A y azatioprina. Por ejemplo, el paciente puede tratarse con ciclosporina A y azatioprina como se describe en Kakkis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:829-834 (2004).

En algunas realizaciones, un paciente puede tratarse (antes, después o durante el tratamiento con un conjugado de la invención) con, por ejemplo, tratamiento con moléculas pequeñas y/o terapia génica, incluyendo tratamiento con moléculas pequeñas y terapia génica dirigida hacia el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico. El tratamiento con moléculas pequeñas puede comprender la administración de uno o más compuestos descritos en, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0050299, 2003/0153768; 2005/0222244; y 2005/0267094. La terapia génica puede realizarse como se describe en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.952.516; 6.066.626; 6.071.890; y 6.287.857 y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0087868.

Las expresiones "tratamiento", "método terapéutico" y sus análogos se refieren tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas/preventivas. Por tanto, los que necesitan tratamiento pueden incluir individuos que ya tienen una enfermedad de almacenamiento lisosómico particular, así como los que están en riesgo de la enfermedad (es decir, los que tienen probabilidad de adquirir finalmente el trastorno o ciertos síntomas del trastorno).

Un método terapéutico provoca la prevención o la mejora de los síntomas o un resultado biológico deseado diferente, y puede evaluarse por signos clínicos mejorados o aparición retardada de la enfermedad, actividad aumentada de la enzima metabólicamente defectuosa y/o niveles disminuidos del sustrato acumulado de la enzima metabólicamente defectuosa.

Los conjugados de la presente invención son útiles para tratar diversos trastornos de almacenamiento lisosómico en seres humanos o en animales. Por ejemplo, la administración de los conjugados puede usarse para aumentar la actividad enzimática defectuosa en un paciente, por ejemplo, en al menos un 10 %. La actividad enzimática aumentada puede determinarse por, por ejemplo, una reducción en los síntomas clínicos o por un ensayo clínico o biológico apropiado.

Los conjugados de GAA pueden administrarse para el tratamiento de la enfermedad de Pompe (también conocida como deficiencia de  $\alpha$ -glucosidasa ácida, deficiencia de maltasa ácida, enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo II, glucogenosis II y deficiencia de  $\alpha$ -glucosidasa lisosómica). La actividad de GAA aumentada puede determinarse por observación bioquímica (véase, por ejemplo, Zhu et al., J. Biol. Chem. 279: 50336-50341 (2004)) o histológica de la acumulación reducida de glucógeno lisosómico en, por ejemplo, miocitos cardíacos, miocitos esqueléticos o fibroblastos de la piel. La actividad de GAA también puede ensayarse en, por ejemplo, una muestra de biopsia muscular, en fibroblastos de la piel cultivados, en linfocitos y en manchas de sangre seca. Los ensayos en manchas de sangre seca se describen en, por ejemplo, Umpathysivam et al., Clin. Chem. 47:1378-1383 (2001) y Li et al., Clin. Chem. 50:1785-1796 (2004). El tratamiento de la enfermedad de Pompe también puede evaluarse por, por ejemplo, los niveles en suero de creatinina cinasa, el aumento en la función motora (por ejemplo, evaluada por la escala motora en bebés de Alberta), cambios en el índice de masa del ventrículo izquierdo medido por ecocardiograma y actividad eléctrica cardíaca, medida por electrocardiograma. La administración de conjugados de GAA puede provocar una reducción en uno o más síntomas de la enfermedad de Pompe tales como cardiomegalia, cardiomiopatía, somnolencia diurna, disnea de esfuerzo, retraso en el desarrollo, dificultades de alimentación, "flacidez", anomalías en la marcha, cefaleas, hipotonía, organomegalia (por ejemplo, agrandamiento del corazón, la lengua, el hígado), lordosis, pérdida de equilibrio, lumbalgia, cefaleas matinales, debilidad muscular, insuficiencia respiratoria, escápulas aladas, escoliosis, reflejos osteotendinosos disminuidos, apnea del sueño, susceptibilidad a infecciones respiratorias y vómitos.

En otro aspecto, los conjugados de  $\alpha$ -galactosidasa A con oligosacáridos que comprenden M6P se administran para el tratamiento de la enfermedad de Fabry. La enfermedad de Fabry o la enfermedad de Anderson-Fabry, es un

trastorno de almacenamiento lisosómico raro ligado al cromosoma X, caracterizado por una deficiencia de  $\alpha$ -galactosidasa A y provoca la acumulación de globotriaosilceramida (GL3) y otros glucoesfingilípidos neutros en los lisosomas de tejidos viscerales y células endoteliales, periteliales y musculares. La acumulación de los glucoesfingilípidos neutros en la vasculatura provoca el estrechamiento y la dilatación de los vasos sanguíneos y finalmente isquemia e infarto.

La administración de conjugados de  $\alpha$ -galactosidasa A puede provocar una reducción en uno o más síntomas clínicos de la enfermedad de Farby incluyendo, por ejemplo, acroparestesia, angina, angioqueratoma, arritmia, marcha atáxica, dolor urente y/o hormigueo en las manos y los pies, cataratas, intolerancia al frío, anomalías en la conducción, córnea verticilada, arteriopatía coronaria, demencia, depresión, diarrea, cámaras cardíacas dilatadas, vértigo, cardiomegalia, cardiomiopatía, diplopia, disartria, fatiga, fiebre con una tasa elevada de sedimentación de eritrocitos, problemas de audición, cardiopatía, problemas de las válvulas cardíacas, intolerancia al calor, hemiataxia, hemiparesia, hipohidrosis, sudoración alterada, infarto, isquemia, dolor articular, enfermedad renal, hipertrofia del ventrículo izquierdo, anomalías lenticulares, opacidad lenticular, lipiduria, debilidad muscular, infarto de miocardio, náuseas, nistagmo, dolor (por ejemplo, dolor intenso que se radia a todo el cuerpo), polidipsia, proteinuria, dolor posprandial, insuficiencia renal, anomalías de la retinal, zumbido de oídos, dolor de estómago, cambios en la onda ST-T, apoplejía, uremia, enfermedad valvular, vértigo, vómitos y debilidad. La administración de conjugados de  $\alpha$ -galactosidasa A puede provocar una actividad aumentada de  $\alpha$ -galactosidasa A en, por ejemplo, plasma, lágrimas, leucocitos, biopsias de tejidos o fibroblastos de la piel cultivados. La administración de conjugados de  $\alpha$ -galactosidasa A también puede provocar un hallazgo histológico de reducción (por ejemplo, de al menos un 10 %) o ausencia del aumento de glóbulos lipídicos birrefringentes. También puede provocar una disminución en los glóbulos lipídicos en sedimento urinario, función renal mejorada medida por los niveles de creatinina en suero o eliminación de creatinina, y proteinuria reducida. La administración de conjugados de  $\alpha$ -galactosidasa A también puede provocar una reducción en las inclusiones de GL3 en el endotelio capilar del riñón, el corazón y la piel. Pueden encontrarse ensayos adicionales para medir la eficacia del tratamiento para la enfermedad de Fabry en, por ejemplo, MacDermott et al., J. Med. Genet. 38:750-760 (2001).

En otro aspecto más los conjugados de esfingomielinasa ácida se administran para el tratamiento de la enfermedad de Niemann-Pick o deficiencia de esfingomielinasa ácida. La administración de conjugados de esfingomielinasa ácida puede provocar una reducción en uno o más síntomas clínicos de la enfermedad de Niemann-Pick incluyendo, por ejemplo, niveles anómalos de colesterol, niveles anómalos de lípidos, ataxia, anomalías sanguíneas, puntos de color rojo cereza en el ojo, infecciones pulmonares frecuentes, retardo en el crecimiento, hepatoesplenomegalia, bajos recuentos de plaquetas, linfadenopatía, neuropatía periférica, problemas con la función pulmonar, falta de aliento, cambios en la pigmentación de la piel o xantomas. En algunas realizaciones, los conjugados pueden administrarse por vía intracraneal.

Una realización alternativa se refiere al tratamiento de la mucopolisacaridosis I (incluyendo, por ejemplo, las formas de Hurler y Hurler-Scheie de MPS I) con conjugados que comprenden  $\alpha$ -L-iduronidasa. La administración de conjugados de  $\alpha$ -L-iduronidasa puede provocar una reducción en uno o más síntomas clínicos de MPS I incluyendo, por ejemplo, regurgitación aórtica, estenosis aórtica, síndrome del túnel carpiano, rinitis crónica, pérdida auditiva conductiva, estreñimiento, opacificación de la córnea, retraso del desarrollo, diarrea, distensión abdominal, cifosis dorsolumbar, deformidad en joroba de la espalda, hepatoesplenomegalia, hidrocefalo, hernia inguinal, cifosis, retraso mental, regurgitación mitral, estenosis mitral, ceguera nocturna, glaucoma de ángulo abierto, escasa función manual, artropatía progresiva, infecciones respiratorias recidivantes, insuficiencia respiratoria, degeneración de la retina, escoliosis, pérdida auditiva sensorial, fuerte dolor de espalda, rinorrea, apnea del sueño, compresión de la médula espinal, artropatía tenar, hernia umbilical y complicaciones de las vías respiratorias superiores.

Lo anterior y la siguiente descripción son ejemplares y explicativos únicamente y no son restrictivos de la invención, que se reivindica.

## Ejemplos

Los ejemplos 1-4 siguientes describen la ruta sintética representada en la figura 1. Los compuestos **1**, **2**, **3** y **4**, que se usan a continuación, tienen las estructuras químicas representadas en la figura 1.

### Ejemplo 1: síntesis de oligosacárido 3

Se disolvieron 100 mg de oligosacárido **1** (PM=1250; bisM6P-hidrazida, suministrada por Biomira Inc., Edmonton, Canadá) en 15 ml de DMSO/H<sub>2</sub>O (50:50 en volumen), produciendo una solución de 5,3  $\mu$ mol/ml. Se disolvieron 100 mg de tetrafluorofenil éster del ácido t-Boc-aminooxi acético **2** (Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA; n.º de catálogo B3030) en 7,5 ml de DMSO. Después se mezclaron 15 ml de la solución de oligosacárido con 7,5 ml de la solución de **2** en un frasco de vidrio, de modo que la relación molar del compuesto **2**:compuesto **1** en la solución resultante fuera 4:1. Se añadieron 744  $\mu$ l de DHBt-OH (de una solución madre de 32,06 mg/ml en DMSO) a la mezcla de reacción en un frasco de vidrio, de modo que la relación final del compuesto **2**:DHBt-OH sea 1:0,5. La mezcla se agitó suavemente a temperatura ambiente (25 °C) a 100 rpm durante una noche durante aproximadamente 18 horas.

La siguiente mañana, se retiraron 10 µl de la mezcla de reacción para el análisis Dionex para confirmar que la reacción se había completado. Los resultados, representados en la fig. 2, indicaron una conversión del 100 % de 1 en 3.

5

### Ejemplo 2: purificación de oligosacárido 3

Método A. La mezcla de reacción se diluyó con un volumen de H<sub>2</sub>O y se dializó en tubos de diálisis con punto de corte de peso molecular de 1000 Dalton (SpectraPor Inc.) dos veces frente a 4 l de H<sub>2</sub>O a 4 °C durante al menos 3 horas cada uno. Las muestras entonces se liofilizaron.

10

Método B. Se compactó una columna de cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-10 con un volumen de lecho de 225 ml y se equilibró con agua desionizada. La mezcla de reacción se cargó en la columna, se drenó por gravedad y después se eluyó con agua desionizada a un caudal de 75 ml por hora. Se recogieron fracciones de 4,5 ml con un colector de fracciones. Las fracciones 10-23, que contenían oligosacárido 3, se recogieron, se combinaron y se liofilizaron. Las otras moléculas pequeñas, incluyendo t-Boc-AOAA, DHBt-OH y DMSO, se eluyeron en las últimas fracciones y se descartaron.

15

### Ejemplo 3: desprotección de oligosacárido 3

20

El grupo t-Boc de la muestra liofilizada se desprotegió en 5 ml de ácido trifluoroacético (TFA) al 50 % en diclorometano (DCM) en un frasco de vidrio durante 30 min con agitación suave a 100 rpm. El TFA/DCM entonces se eliminó por una corriente de N<sub>2</sub> en una campana química.

### Ejemplo 4: purificación de oligosacárido 4

25

Método A. Después de eliminar el TFA/DCM, el residuo se disolvió en 10 ml de tampón acetato de sodio 0,5 M, pH 5, y se transfirió a tubos de diálisis con un punto de corte de peso molecular de 1000 Dalton. El frasco se lavó con 4 ml del mismo tampón, que después se transfirió a los tubos de diálisis. La muestra se dializó dos veces frente a 3 l de tampón acetato de sodio 25 mM, pH 7, durante al menos 3 horas, y después se transfirió a 4 l de H<sub>2</sub>O enfriada en hielo durante una noche de diálisis. La muestra se recuperó de los tubos de diálisis y se liofilizó.

30

Método B. Después de eliminar el TFA/DCM, el residuo se disolvió en 5 ml de tampón acetato de sodio 0,5 M, pH 7,5, y se cargó en una columna de cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-10 como en el ejemplo 2, método B. La mezcla de reacción se cargó en la columna, se drenó por gravedad y después se eluyó con agua desionizada a un caudal de 75 ml por hora. Se recogieron fracciones de 4,5 ml con un colector de fracciones. Las fracciones 10-23, que contenían el oligosacárido 4 purificado, se recogieron y liofilizaron. Se obtuvo un rendimiento mayor de oligosacárido 4 tras la purificación por el método B que por el método A.

35

El producto final obtenido del método B se analizó por cromatografía Dionex (fig. 2C) y se confirmó la identidad del producto por espectrometría de masas (fig. 3B). Algunas impurezas estaban presentes en los espectros de la fig. 2C y fig. 3B.

40

### Ejemplo 5: acoplamiento de oligosacárido 4 a GAA

45

Oxidación de GAA. Se reconstituyó GAA humana recombinante (rhGAA) liofilizada en H<sub>2</sub>O y se dializó frente a 4 l de tampón acetato 100 mM (pH 5,6) 4 veces hasta eliminar completamente el manitol. Después de la diálisis, la rhGAA se oxidó con peryodato de sodio 7,5 mM de una solución madre 100 mM en tampón acetato 100 mM. Después de 30 minutos a 4 °C en hielo, se añadió glicerol y la muestra se mezcló en hielo durante 10 minutos para descomponer el exceso de peryodato de sodio. El material oxidado entonces se dializó frente a tampón acuoso (por ejemplo, acetato de sodio 100 mM) durante una noche.

50

Acoplamiento. Una solución de oligosacárido 4 en tampón acuoso (por ejemplo, acetato de sodio 100 mM, pH 5,6) se mezcló con GAA oxidada y se incubó a 37 °C durante 4 horas para producir el conjugado de oligosacárido-GAA 5. La mezcla de reacción entonces se diafiltró frente a tampón fosfato de sodio 25 mM, pH 6,25, para eliminar el bisM6P glucano no conjugado, y después se ajustó con tampón de formulación de GAA (tampón fosfato de sodio 25 mM, pH 6,25, manitol al 2 %, Tween-80 al 0,005 %).

55

### Ejemplo 6: caracterización del conjugado de GAA

60

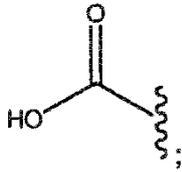
Detección de M6P. Se midió el grado de conjugación de oligosacárido ensayando el conjugado 5 para la unión a una columna de receptor de M6P a la que no se unen las glucoproteínas que carecen de M6P. Se cargaron cinco microgramos de conjugado 5 en una columna de CI-MPR-sepharose preequilibrada (la columna se preparó por acoplamiento de CI-MPR aislado de suero bovino fetal a Affigel-10), que después se lavó con tampón de unión de CI-MPR para 11 fracciones de 2 ml y se eluyó con tampón de unión de CI-MPR que contenía M6P 5 mM para 7 fracciones de 2 ml. Se recogió un total de 18 fracciones y se ensayaron para la actividad enzimática.

65



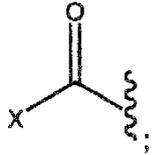
E8. El método de E5, donde Y se elige de:

(d)

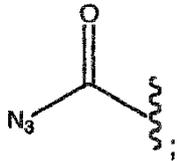


5

(e)

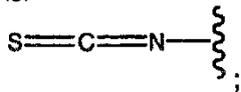


(f)



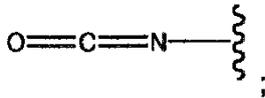
10

(g)

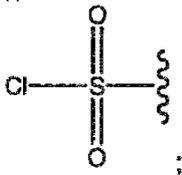


15

(h)

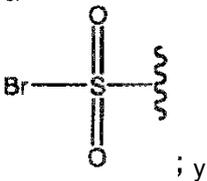


(i)

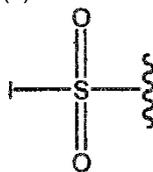


20

(j)

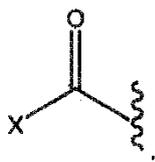


(k)



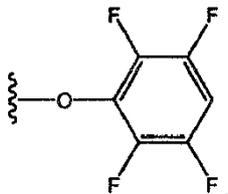
25

donde X se elige de halógenos, azida, aciloxi, alcoxi, ariloxi, heteroariloxi y heterociciloxi.



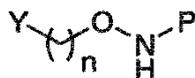
E9. El método de E8, donde Y es (b)

E10. El método de E9, donde X se elige de ariloxi, heteroariloxi y heterocicliloxi.



5 E11. El método de E10, donde X es

E12. El método de E5, donde el compuesto aminooxi se elige de compuestos de fórmula III:



10

Fórmula III

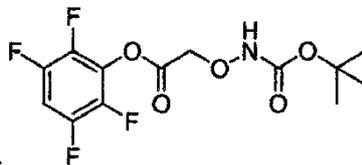
donde Y es el segundo grupo reactivo, n se elige de números enteros que varían de 1 a 10 y P se elige de grupos protectores de amino.

15

E13. El método de E12, donde n es 1.

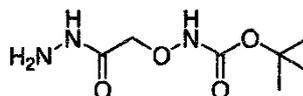
E14. El método de E12, donde Y es un grupo carboxilo, éster, haluro de acilo, azida de acilo, haluro de alquilo, anhídrido, isotiocianato, isocianato o haluro de sulfonilo.

20



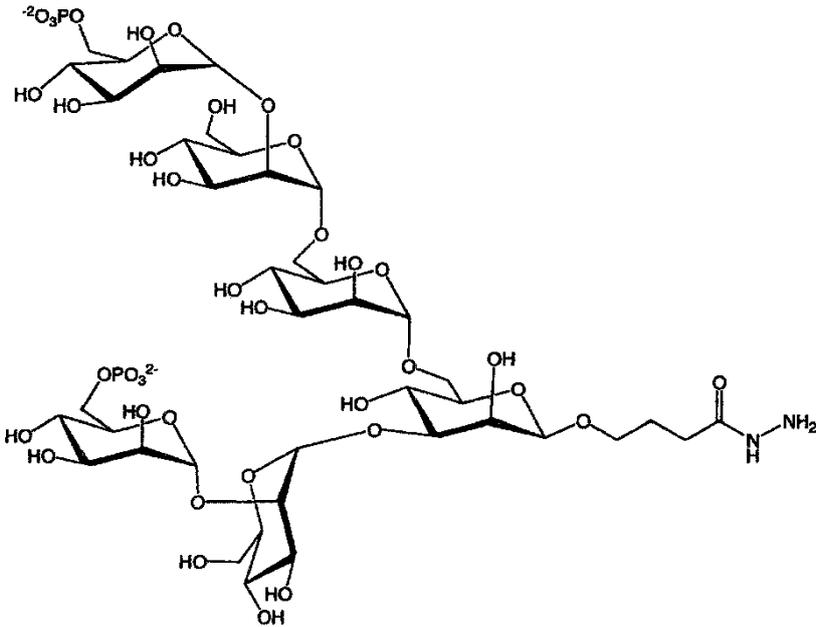
E15. El método de E14, donde el compuesto aminooxi es

E16. El método de E12, donde Y es un grupo hidrazina, hidrazida, semicarbazida, tiosemicarbazida o amina.

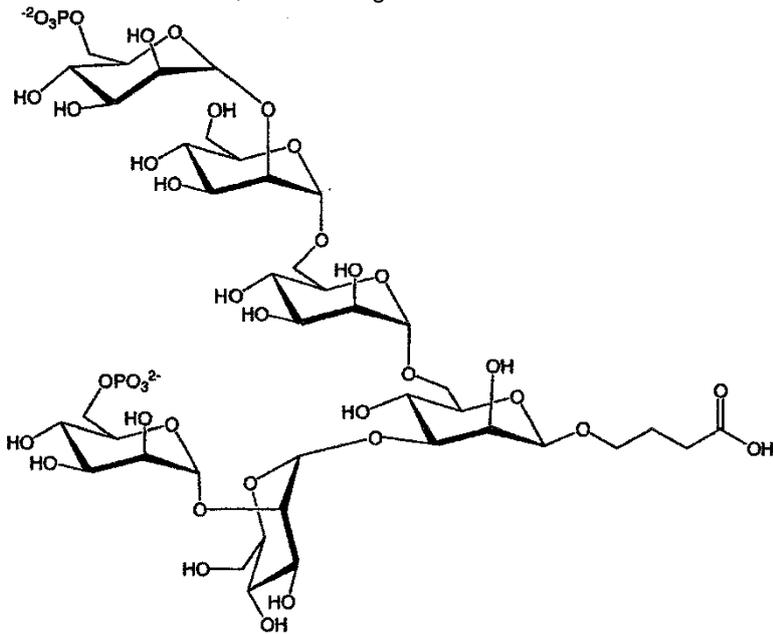


25 E17. El método de E16, donde el compuesto aminooxi es

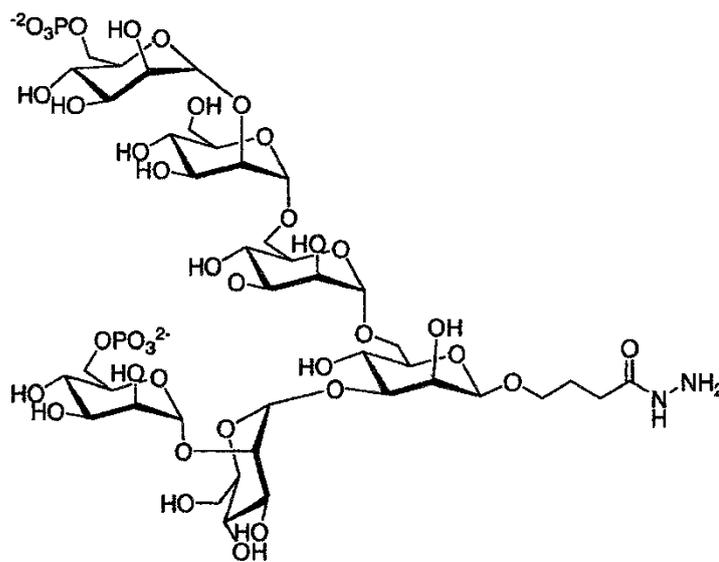
E18. El método de E1, donde el oligosacárido es



E19. El método de E1, donde el oligosacárido es



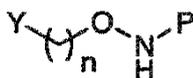
- 5 E20. El método de E1, donde el compuesto aminooxi comprende un grupo protector de amino, comprendiendo adicionalmente el método (d) desproteger el oligosacárido que comprende un grupo aminooxi.
- 10 E21. Un oligosacárido que comprende un grupo aminooxi producido por el método de E1.
- E22. Un método de un oligosacárido que comprende un grupo aminooxi, comprendiendo el método:
- (a) proporcionar un oligosacárido que comprende un primer grupo reactivo, donde el oligosacárido es



;

(b) proporcionar un compuesto aminooxi que comprende un grupo aminooxi y un segundo grupo reactivo, donde el compuesto aminooxi se elige de compuesto de fórmula III:

5



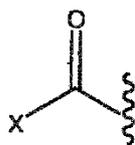
Fórmula III

10 donde n se elige de números enteros que varían de 1 a 10, P se elige de grupos protectores de amino e Y es el segundo grupo reactivo; y

(c) hacer reaccionar el primer grupo reactivo del oligosacárido con el segundo grupo reactivo del compuesto aminooxi,

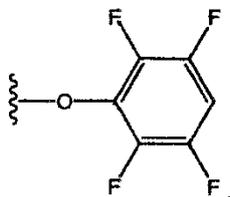
15

preparando de ese modo el oligosacárido que comprende un grupo aminooxi.

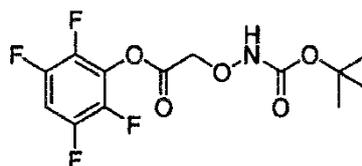


E23. El método de E22, donde Y es  $X-C(=O)-S$ , y donde X se elige de hidroxilo, arilo, heteroarilo y heterociclico.

20

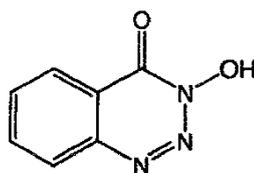


E24. El método de E23, donde X es



E25. El método de E24, donde el compuesto aminooxi es

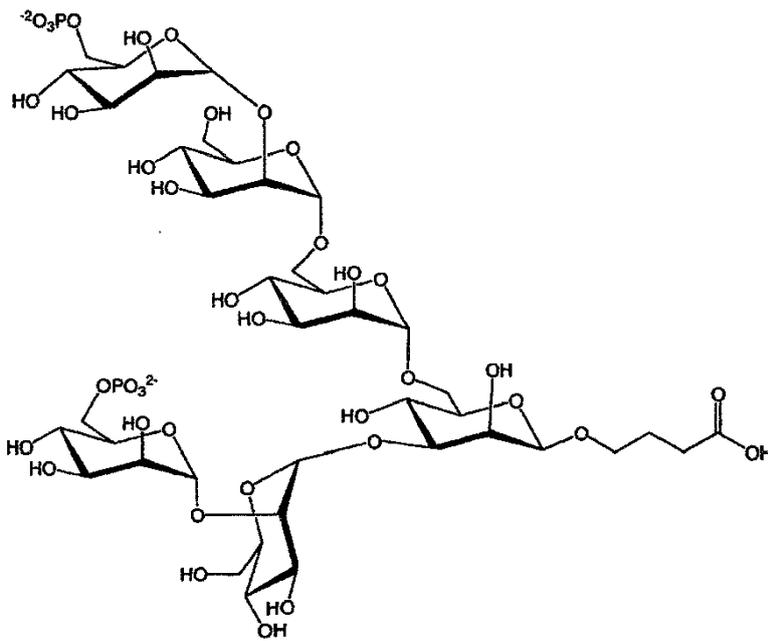
25 E26. El método de E25, donde la epata (c) comprende hacer reaccionar el primer grupo reactivo del oligosacárido con el segundo grupo reactivo del compuesto aminooxi en presencia de un reactivo de acoplamiento y/o de un catalizador.



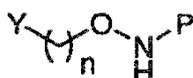
E27. El método de E26, donde el catalizador es

E28. Un método de preparación de un oligosacárido que comprende un grupo aminooxi, comprendiendo el método:

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



10 (b) proporcionar un compuesto aminooxi que comprende un grupo aminooxi y un segundo grupo reactivo, donde el compuesto aminooxi se elige de compuestos de fórmula III:



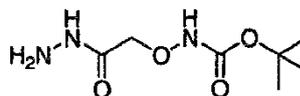
Fórmula III

15 donde n se elige de números enteros que varían de 1 a 10, P se elige de grupos protectores de amino e Y es el segundo grupo reactivo; y

20 (c) hacer reaccionar el primer grupo reactivo del oligosacárido con el segundo grupo reactivo del compuesto aminooxi,

preparando de ese modo el oligosacárido que comprende un grupo aminooxi.

25 E29. El método de E28, donde Y es un grupo hidrazina, hidrazida, aminooxi, tiosemicarbazida, semicarbazida o amina.



E30. El método de E29, donde el compuesto aminooxi es

30 E31. El método de E30, donde la etapa (c) comprende hacer reaccionar el primer grupo reactivo del oligosacárido con el segundo grupo reactivo del compuesto aminooxi en presencia de un reactivo de acoplamiento y/o de un catalizador.

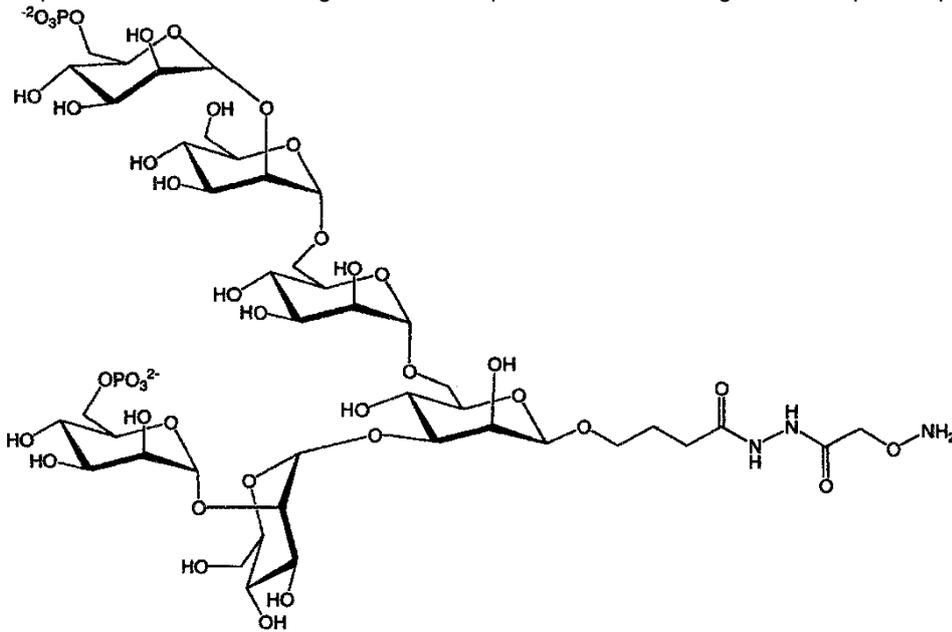
E32. El método de E31, donde el reactivo de acoplamiento es 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y el

catalizador es N-hidroxisuccinimida (NHS).

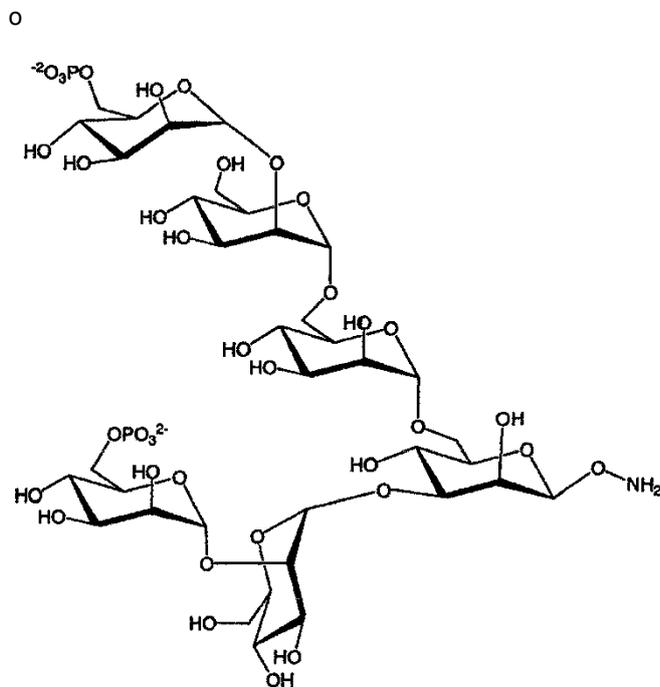
E33. Un método de acoplamiento de un oligosacárido a una proteína, que comprende:

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

acoplado de ese modo el oligosacárido a la proteína, donde el oligosacárido que comprende un grupo amino es



10



15

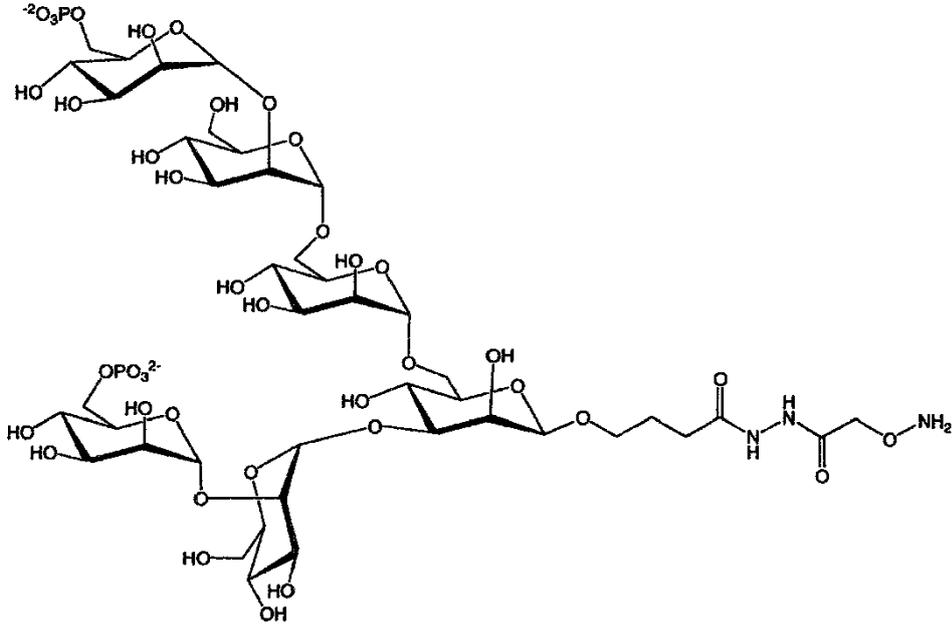
E34. El método de E33, donde la proteína es una glucoproteína.

E35. El método de E34, donde la glucoproteína es una enzima lisosómica.

20 E36. El método de E35, donde la enzima lisosómica es  $\alpha$ -glucosidasa ácida,  $\alpha$ -galactosidasa A, esfingomielinasa ácida o  $\alpha$ -L-iduronidasa.

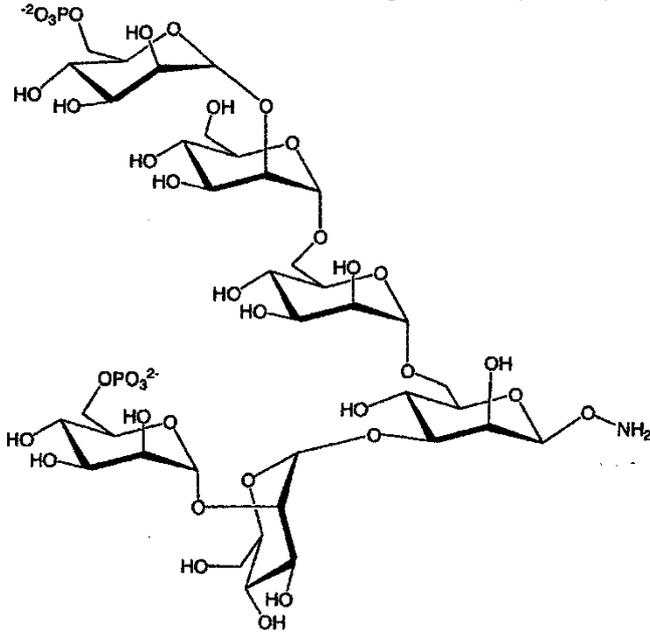
E37. El método de E36, donde la enzima lisosómica es  $\alpha$ -glucosidasa ácida.

E38. El método de E33, donde el oligosacárido que comprende un grupo amino es



5

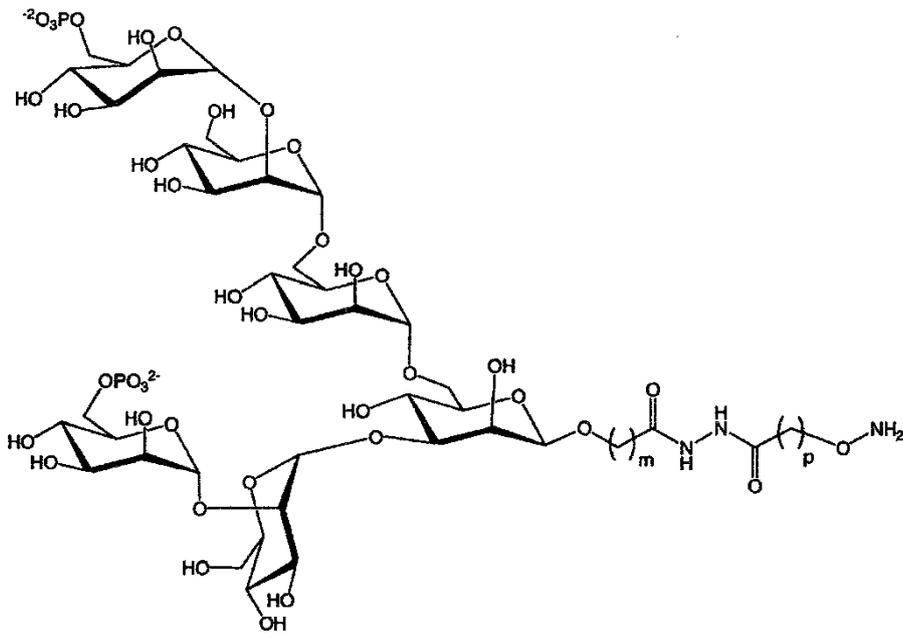
E39. El método de E33, donde el oligosacárido que comprende un grupo amino es



10

E40. Un conjugado de oligosacárido-proteína producido por el método de E33.

E41. Un oligosacárido de fórmula IV:



Fórmula IV

5 donde m y p se eligen independientemente de números enteros que varían de 1 a 10.

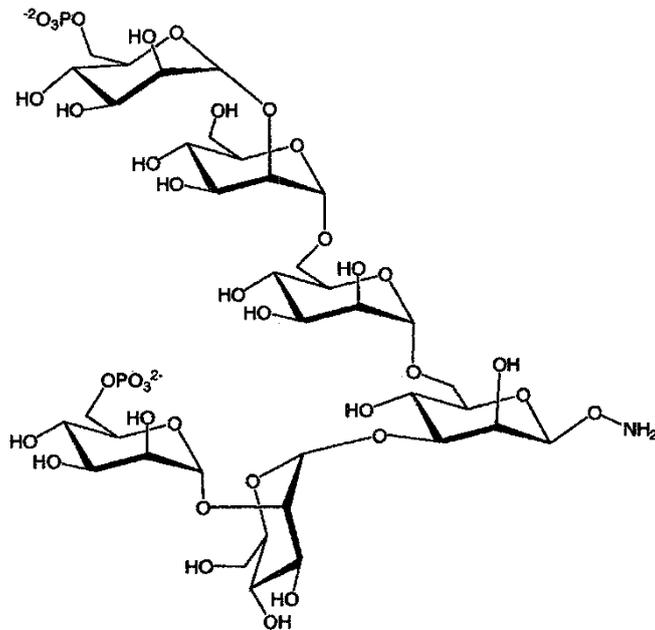
E42. El oligosacárido de E41, donde m es 3.

E43. El oligosacárido de E41, donde p es 1.

10

E44. El oligosacárido de E41, donde m es 3 y p es 1.

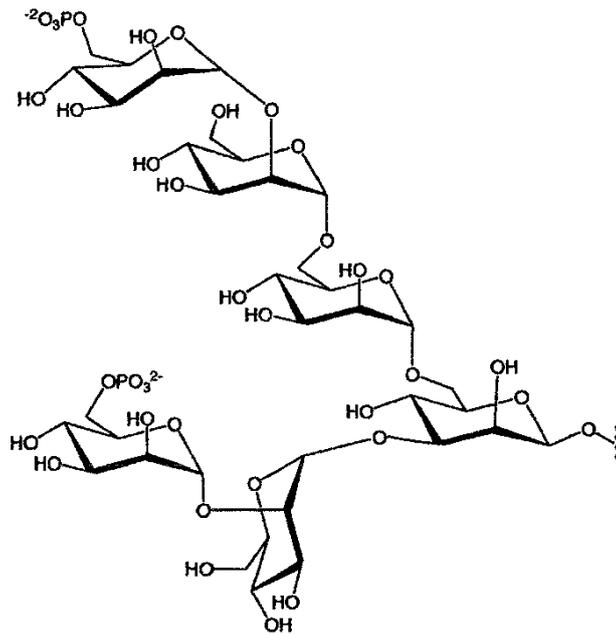
E45. Un oligosacárido de fórmula V:



15

Fórmula V

20 E46. Un conjugado de oligosacárido-proteína, que comprende (1) una proteína, (2) un oligosacárido y (3) un grupo oxima que conecta la proteína y el oligosacárido, donde el oligosacárido es un oligosacárido de fórmula VI:



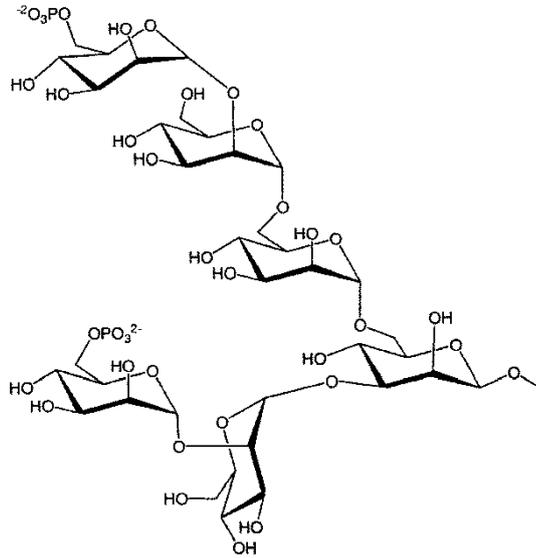
Fórmula VI

- 5 E47. El conjugado de oligosacárido-proteína de E46, donde la proteína es una glucoproteína.
- E48. El conjugado de oligosacárido-proteína de E47, donde la glucoproteína es una enzima lisosómica.
- 10 E49. El conjugado de oligosacárido-proteína de E48, donde la enzima lisosómica es  $\alpha$ -glucosidasa ácida,  $\alpha$ -galactosidasa A, esfingomielinasa ácida o  $\alpha$ -L-iduronidasa.
- E50. El conjugado de oligosacárido-proteína de E49, donde la enzima lisosómica es  $\alpha$ -glucosidasa ácida.
- 15 E51. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de oligosacárido-glucoproteína de E48 y un excipiente.
- E52. Un método de tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico, que comprende administrar a un mamífero un conjugado de oligosacárido-glucoproteína de E48, donde la proteína es una enzima lisosómica.
- 20 E53. El método de E52, que comprende además administrar metotrexato al mamífero antes, después o durante el tratamiento con el conjugado de oligosacárido-glucoproteína.
- E54. Uso de un conjugado de E48 para tratar un trastorno de almacenamiento lisosómico en un sujeto que lo necesita.
- 25 E55. Uso de un conjugado de E48 en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno de almacenamiento lisosómico.

REIVINDICACIONES

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

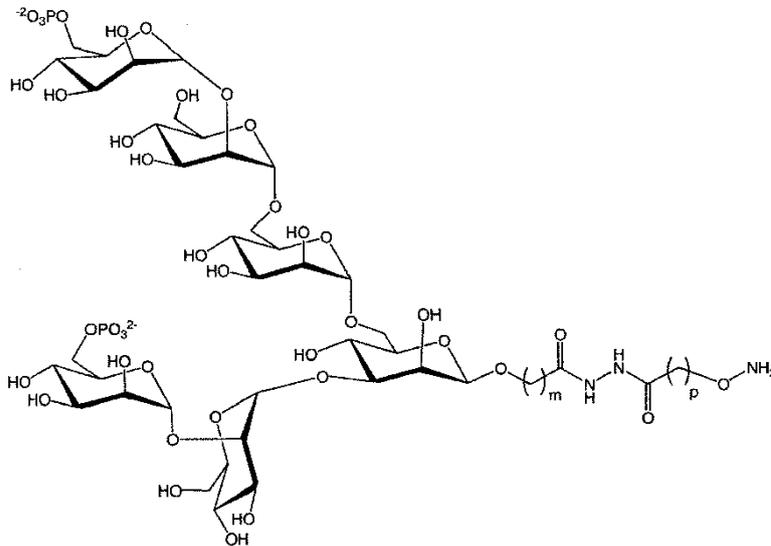
5



Fórmula VI.

2. Un conjugado de oligosacárido-proteína, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el oligosacárido es un oligosacárido de fórmula IV:

10



Fórmula IV

15

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

3. El conjugado de oligosacárido-proteína de la reivindicación 2, en el que m es 3.

20

4. El conjugado de oligosacárido-proteína de la reivindicación 2, en el que p es 1.

5. El conjugado de oligosacárido-proteína de la reivindicación 2, en el que m es 3 y p es 1.

25

6. El conjugado de oligosacárido-proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la proteína es una glucoproteína.

7. El conjugado de oligosacárido-proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que la proteína es

una enzima lisosómica.

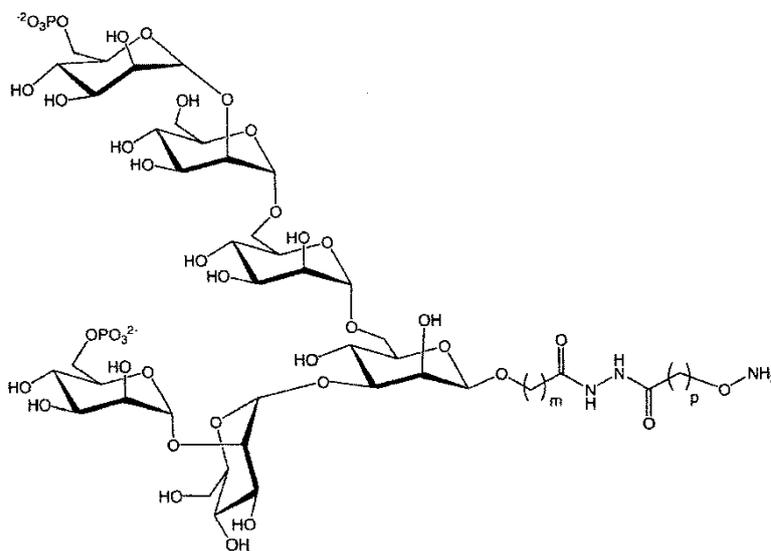
8. El conjugado de oligosacárido-proteína de la reivindicación 7, en el que la proteína lisosómica es  $\alpha$ -glucosidasa ácida,  $\alpha$ -galactosidasa A, esfingomielinasa ácida o  $\alpha$ -L-iduronidasa.

9. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de oligosacárido-proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un excipiente.

10. El conjugado de oligosacárido-proteína de la reivindicación 7 o de la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico en un sujeto que lo necesita.

11. Un método de acoplamiento de un oligosacárido a una proteína, que comprende:

- (a) proporcionar un oligosacárido que comprende un grupo aminooxi;
- (b) proporcionar una proteína que tiene al menos un grupo carbonilo; y
- (c) hacer reaccionar el grupo aminooxi del oligosacárido con el al menos un grupo carbonilo de la proteína, acoplado de ese modo el oligosacárido a la proteína, en el que el oligosacárido es un oligosacárido de fórmula IV:



Fórmula IV

en el que  $m$  y  $p$  se eligen independientemente de números enteros que varían de 1 a 10.

12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la proteína es una glucoproteína y el al menos un grupo carbonilo se obtiene por oxidación de la glucoproteína con peryodato.

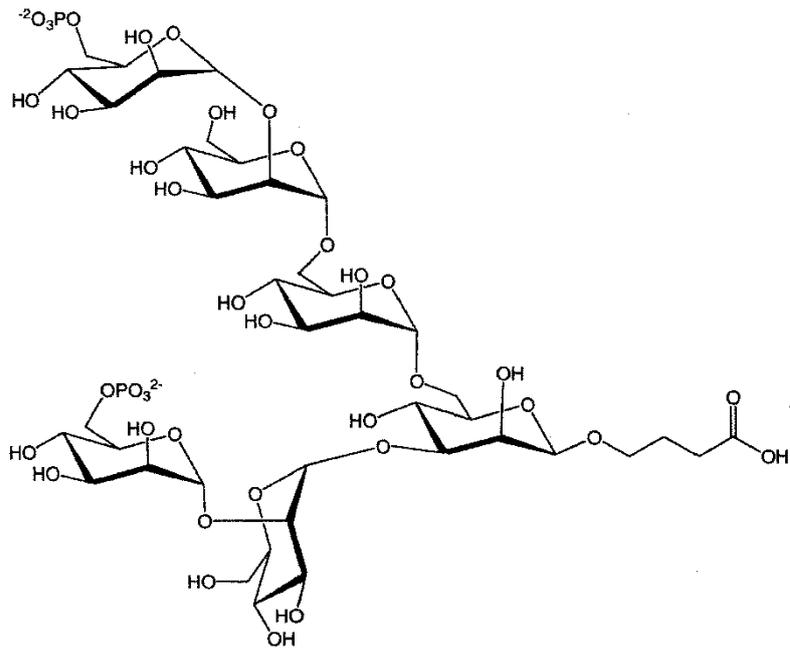
13. El método de la reivindicación 11, en el que  $m$  es 3 y/o en el que  $p$  es 1.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que la proteína es una enzima lisosómica.

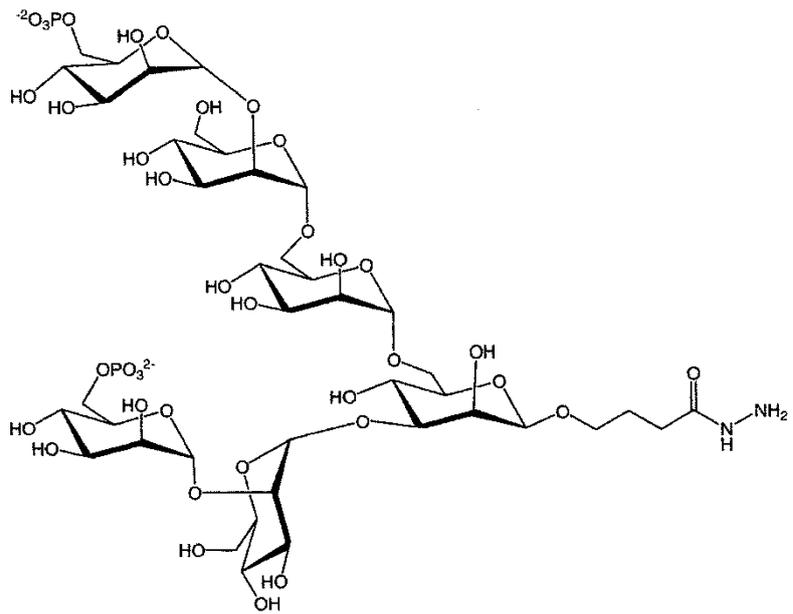
15. El método de la reivindicación 14, en el que la enzima lisosómica es  $\alpha$ -glucosidasa ácida,  $\alpha$ -galactosidasa A, esfingomielinasa ácida o  $\alpha$ -L-iduronidasa.

16. Un oligosacárido que comprende un grupo aminooxi preparado por un método que comprende las etapas de:

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

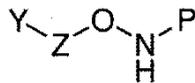


0



5

(b) proporcionar un compuesto aminooxi que comprende un segundo grupo reactivo, en el que el compuesto aminooxi se elige de compuestos de fórmula II:



10

Fórmula II

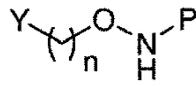
en el que Y es el segundo grupo reactivo, Z se elige de alquilo, alquenoilo, alquiniilo, heteroarilo, arilo, y heterociclilo, y P se elige de grupos protectores de amino; y

15

(c) hacer reaccionar el primer grupo reactivo del oligosacárido con el segundo grupo reactivo del compuesto aminooxi, preparando de ese modo el oligosacárido que comprender un grupo aminooxi.

17. Un oligosacárido que comprende un grupo aminooxi preparado por un método que comprende las etapas de la reivindicación 16, en el que el compuesto aminooxi se elige de compuestos de fórmula III:

20

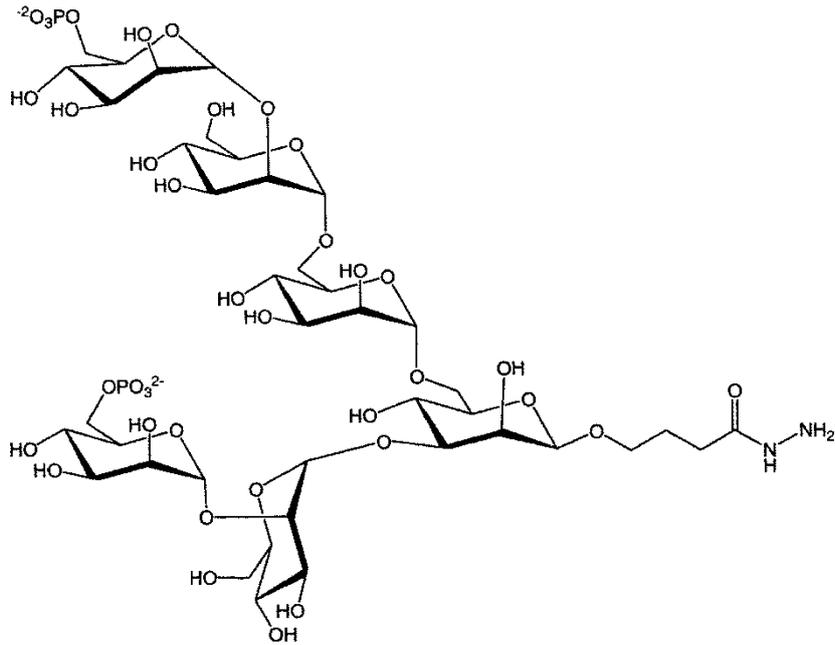


Fórmula III

5

en el que n se elige de números enteros que varían de 1 a 10.

18. Un oligosacárido de fórmula Ia:

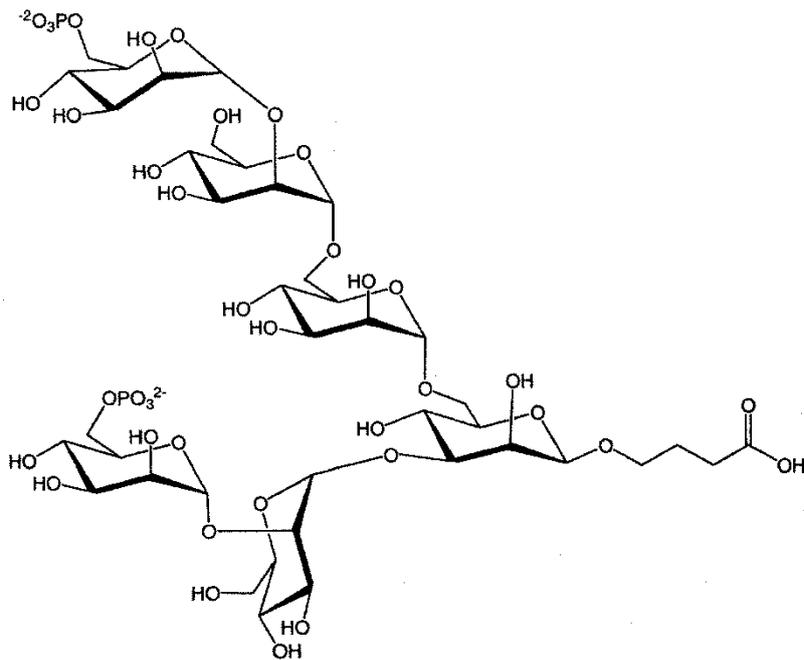


10

Fórmula Ia

o fórmula Ib:

15



Fórmula Ib

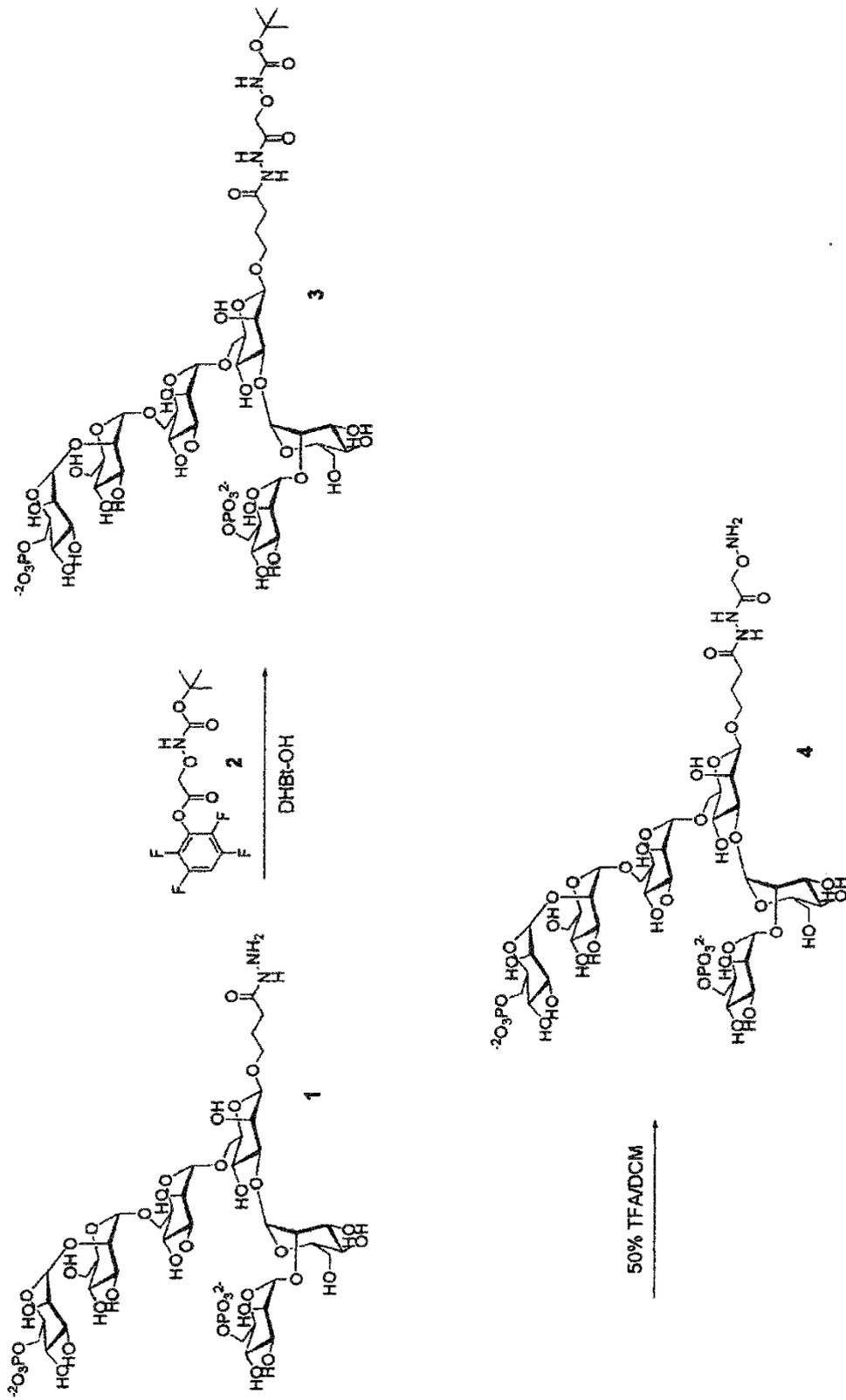
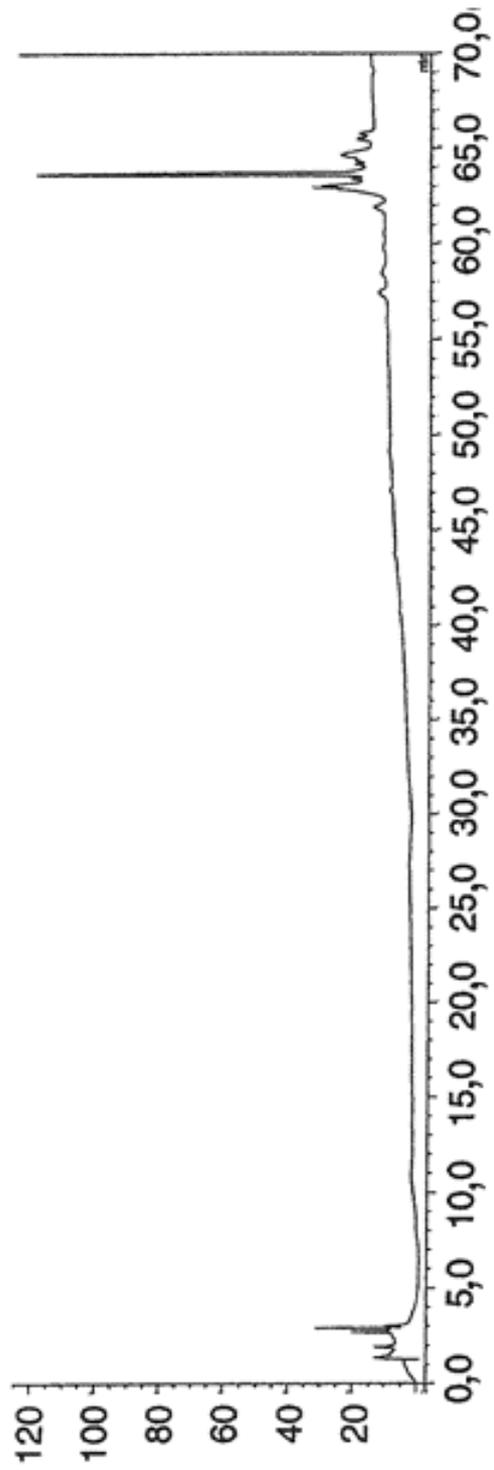
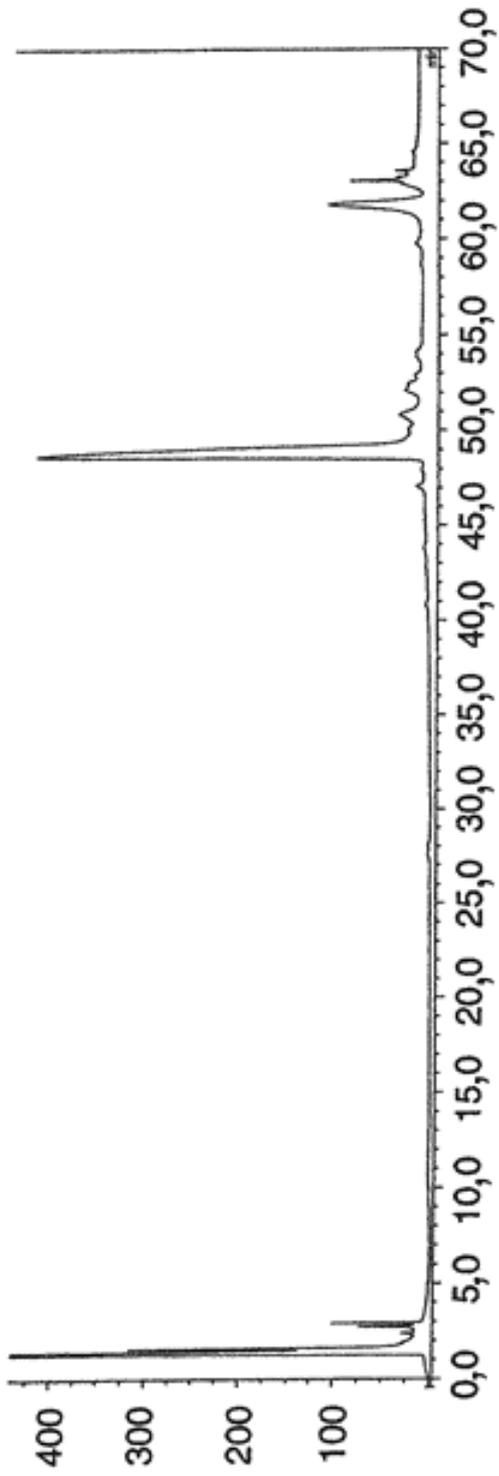


FIG. 1



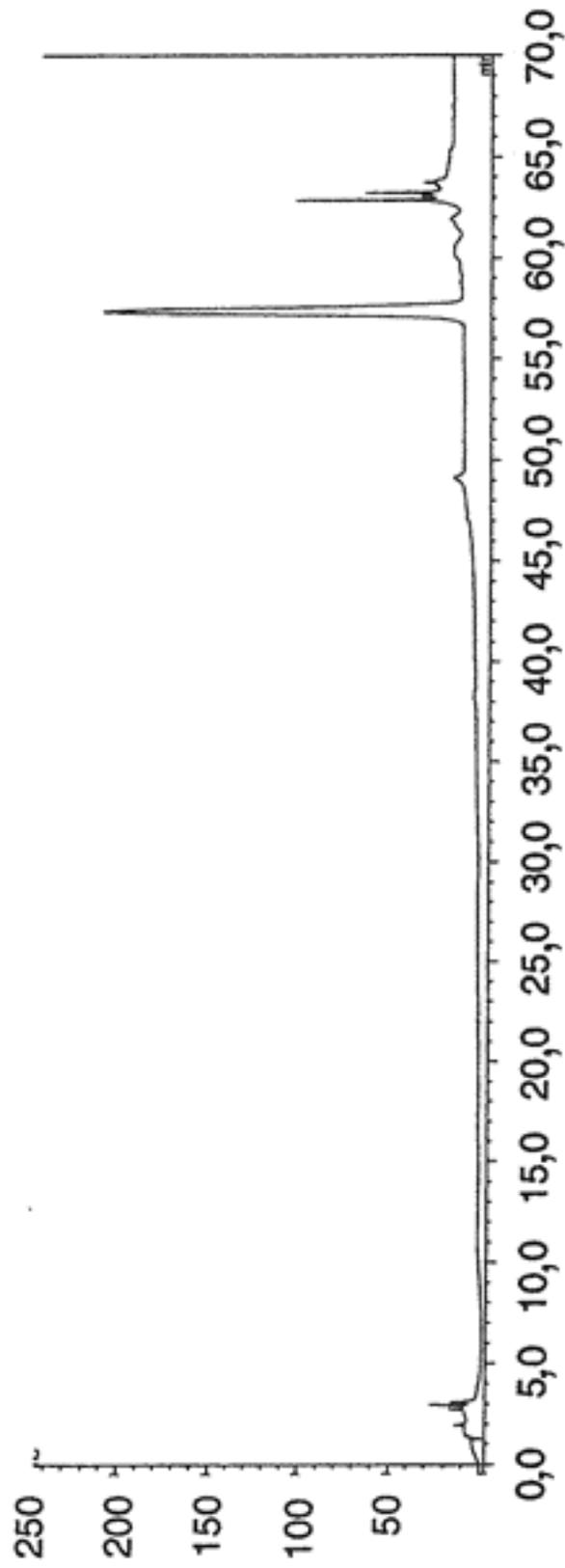


FIG. 2C

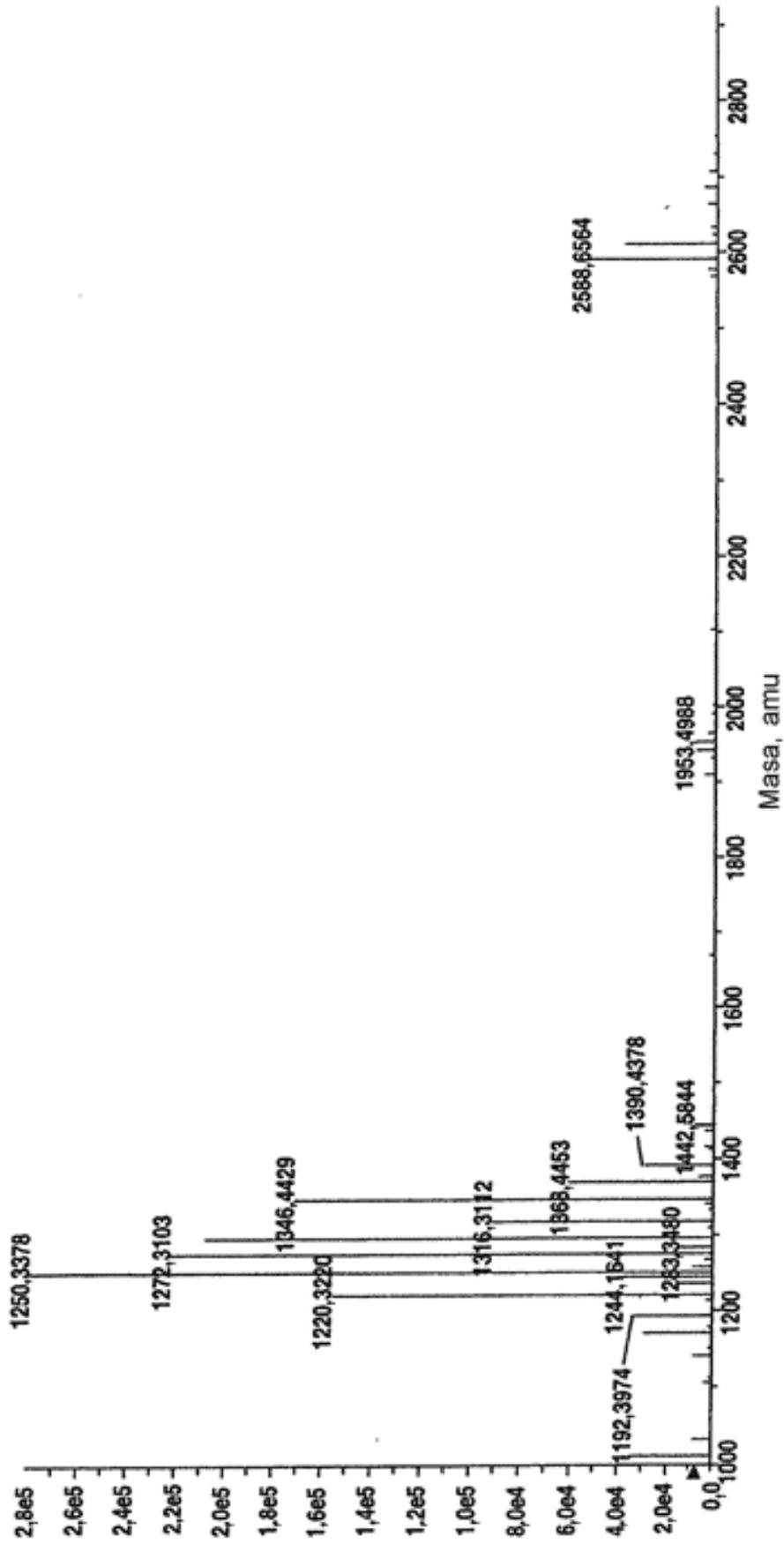


FIG. 3A

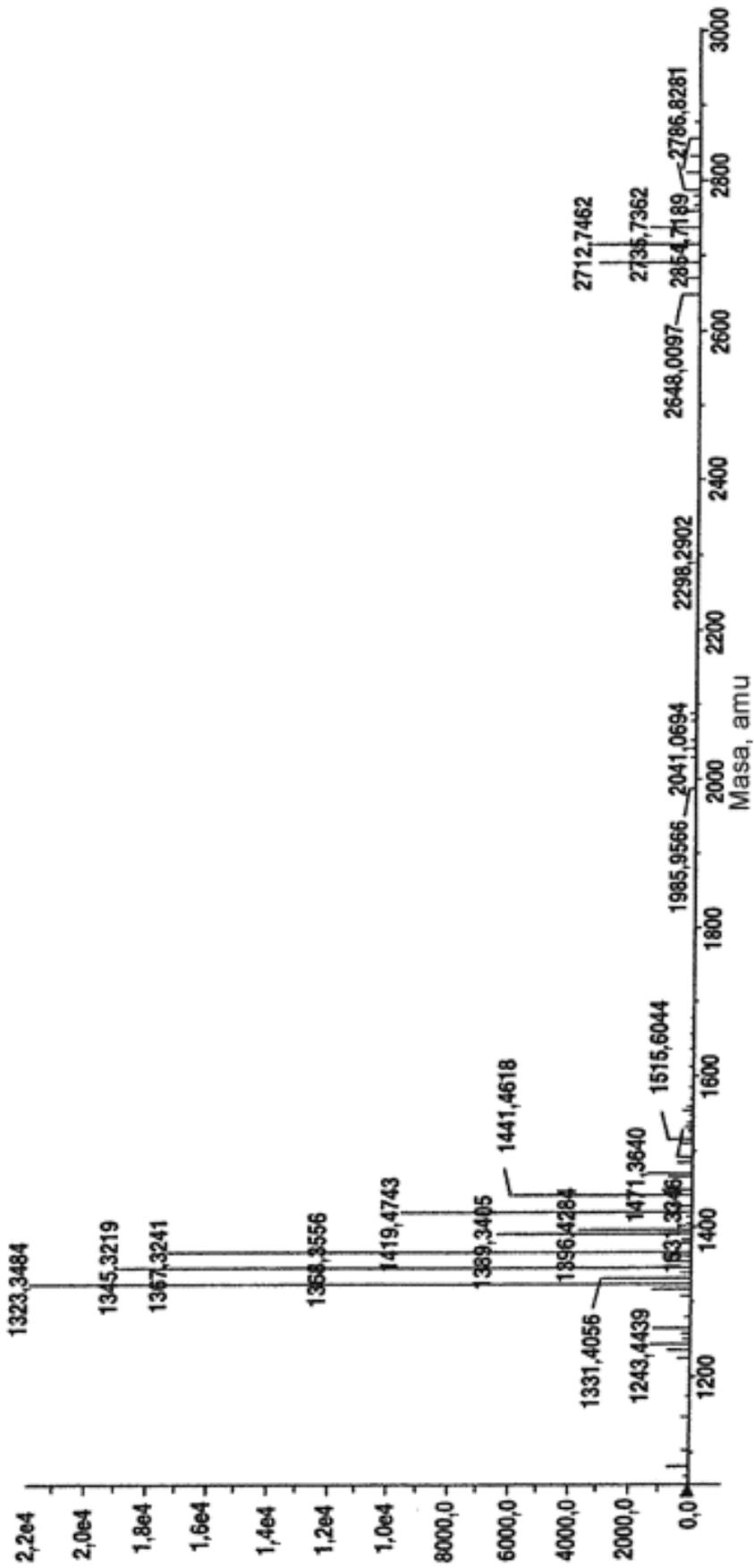


FIG. 3B

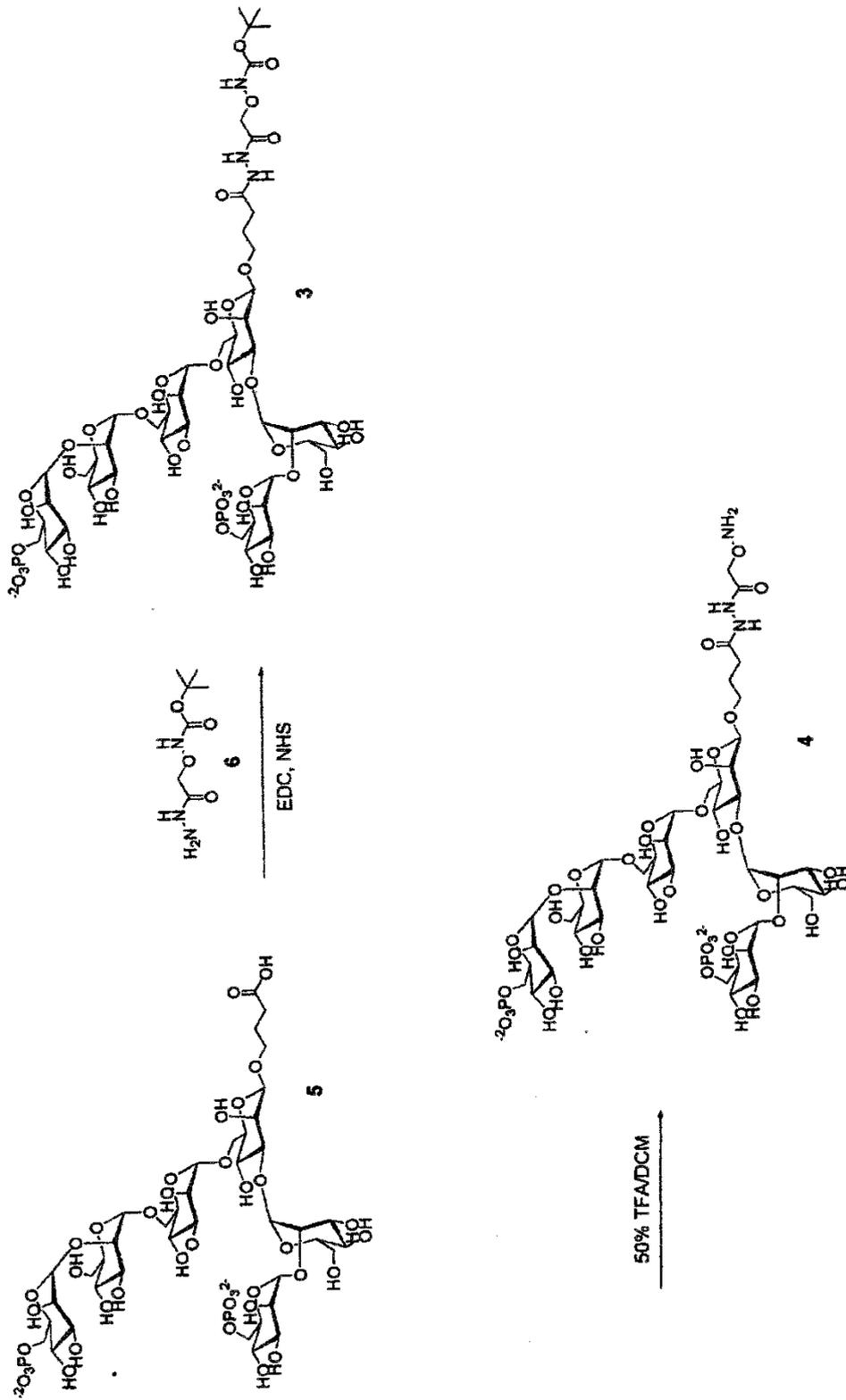


FIG. 4