

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 175**

51 Int. Cl.:

C12P 19/28 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2004 PCT/JP2004/001048**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.08.2004 WO04070046**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2004 E 04707645 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 1591532**

54 Título: **Proceso para producir derivado de asparagina de cadena de azúcar**

30 Prioridad:

04.02.2003 JP 2003026609

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

21.02.2019

73 Titular/es:

**GLYTECH, INC. (100.0%)
134, Chudoji minami-machi Shimogyo-ku Kyoto-shi
Kyoto 600-8813, JP**

72 Inventor/es:

FUKAE, KAZUHIRO

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 701 175 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso para producir derivado de asparagina de cadena de azúcar

CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención hace referencia a un proceso para preparar oligosacáridos unidos a asparagina.

5 **ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA**

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

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

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

[0005] La estructura de los oligosacáridos es mucho más compleja que la del ADN o las proteínas por la diversidad de disposiciones de los monosacáridos, modos o sitios de enlaces, longitud de las cadenas, formas de las ramas y de las estructuras globales de nivel superior. En consecuencia, la información biológica derivada de las estructuras de los mismos es más diversificada que en el caso del ADN y las proteínas. Aunque se ha reconocido la importancia de la investigación sobre los oligosacáridos, la complejidad y variedad de las estructuras de los mismos han retrasado el progreso en la investigación de oligosacáridos a diferencia de los estudios sobre el ADN y las proteínas.

[0006] Asimismo, se sabe que los oligosacáridos unidos a asparagina se obtienen de la yema de huevo deslipidada (véase, por ejemplo, la literatura de patente 1). De acuerdo con la literatura de patente 1, los oligosacáridos unidos a asparagina se obtienen en cantidades mayores que tradicionalmente mediante la adición de semilla de almendra o de albaricoque a yema de huevo deslipidada. No obstante, este proceso proporciona oligosacáridos unidos a asparagina que tienen una pureza de un 95 % o un 92 %, y no consigue aislar oligosacáridos unidos a asparagina puros. En cuanto al rendimiento, con 100 kg de yema de huevo deslipidada se obtienen 29,5 g o 27,2 g de un disialiloligosacárido (disialilundecasacárido).

[0007] También se sabe que un glicopéptido (SGP: sialilglicopéptido) extraído de una fracción soluble de huevos de gallina permite obtener oligosacáridos unidos a asparagina. El SGP es un compuesto en el que una fracción de asparagina de una cadena peptídica que comprende seis fracciones de aminoácidos se une al extremo reductor de un oligosacárido compuesto que comprende once fracciones de azúcar. Sin embargo, el proceso de Seko *et al* [Biochemica Biophysica Acta, Vol. 1335, pp. 23(1997)], por ejemplo, tenía un rendimiento solo de aproximadamente 8 mg de SGP a partir de una yema de huevo de gallina.

[0008] [Literatura de patente 1] WO96/02255 (reivindicaciones 8 y 10)

[0009] El documento de patente WO 03/0008431 A1 se refiere a un proceso para producir un derivado de asparagina de cadena de azúcar.

[0010] En el documento de patente JP 08-099988 A, se describe un proceso para preparar un oligosacárido que contiene ácidos siálicos, donde se añade agua o una solución salina a una yema de huevo desgrasada de un huevo aviar y se revuelve, después de lo cual se filtra la mezcla resultante para separar las proteínas insolubles y una o varias proteasas de tipo endo, tal como la actinasa E, la quimotripsina, la tripsina o la termolisina son añadidas al filtrado de extracto para digerir la mezcla resultante, se ultrafiltra el líquido digerido enzimáticamente y, a continuación, el líquido digerido se desala con una membrana de osmosis inversa y se liofiliza.

[0011] Un objeto de la presente invención consiste en proporcionar un proceso para preparar derivados de oligosacárido unidos a asparagina por medio del que pueden obtenerse diversos derivados de oligosacárido unidos a asparagina aislados en cantidades mayores y mucho más fácilmente que tradicionalmente para su utilización en el campo del desarrollo de productos farmacéuticos o similares.

50 **EXPOSICIÓN DE LA INVENCION**

[0012] La presente invención da a conocer una invención con las siguientes características:

1. Un proceso para preparar derivados de oligosacárido unidos a asparagina que incluye las etapas de:

- (a) tratar una yema de huevo deslipidada con Pronase u Orientase para obtener una mezcla de oligosacáridos unidos a péptido,
- (b) eliminar los componentes que no sean oligosacáridos unidos a péptido de la mezcla de oligosacáridos unidos a péptido,
- (c) tratar la mezcla purificada de oligosacáridos unidos a péptido con actinasa para obtener una mezcla de oligosacáridos unidos a asparagina,
- (d) introducir un grupo protector lipofílico en los oligosacáridos unidos a asparagina en la mezcla para obtener una mezcla de derivados de oligosacárido unidos a asparagina, donde dicho grupo protector lipofílico se selecciona del grupo que consiste en el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc), el grupo t-butiloxicarbonil (Boc), el grupo aliloxicarbonato (Alloc), el grupo acetilo (Ac), el grupo alilo o el grupo bencilo, y
- (e) someter la mezcla de derivados de oligosacárido unidos a asparagina a una cromatografía fraccionante mediante la utilización de una columna de fase inversa para separar la mezcla en derivados de oligosacárido unidos a asparagina individuales.

2. El proceso descrito anteriormente para preparar derivados de oligosacárido unidos a asparagina, donde la yema de huevo deslipidada se obtiene mediante la deslipidación de una yema de huevo aviar con un disolvente orgánico.

3. El proceso descrito anteriormente para preparar derivados de oligosacárido unidos a asparagina, donde los derivados de oligosacárido unidos a asparagina son derivados undeca- a pentasacáridos unidos a asparagina.

4. El proceso descrito anteriormente para preparar derivados de oligosacárido unidos a asparagina, donde los derivados de oligosacárido unidos a asparagina son derivados undeca- a heptasacáridos unidos a asparagina.

5. El proceso descrito anteriormente para preparar derivados de oligosacárido unidos a asparagina, donde los derivados de oligosacárido unidos a asparagina son derivados undeca- a nonasacáridos unidos a asparagina.

6. El proceso descrito anteriormente para preparar derivados de oligosacárido unidos a asparagina, donde los derivados de oligosacárido unidos a asparagina son derivados undecasacáridos unidos a asparagina.

7. El proceso descrito anteriormente para preparar derivados de oligosacárido unidos a asparagina, donde los oligosacáridos unidos a asparagina contenidos en la mezcla de oligosacáridos unidos a asparagina obtenidos mediante la etapa (c) son hidrolizados antes de la etapa siguiente de corte de diversas fracciones de azúcar.

8. El proceso descrito anteriormente para preparar derivados de oligosacárido unidos a asparagina, donde los derivados de oligosacárido unidos a asparagina contenidos en la mezcla de derivados de oligosacárido unidos a asparagina obtenidos mediante la etapa (d) son hidrolizados antes de la etapa siguiente de corte de diversas fracciones de azúcar.

[0013] El proceso de la invención para preparar derivados de oligosacárido unidos a asparagina se caracteriza, claramente, por tratar una yema de huevo deslipidada obtenida a partir de una yema de huevo, por ejemplo, una yema de huevo aviar, con una proteasa para obtener una mezcla de oligosacáridos unidos a péptido y, a continuación, tratar la mezcla con una peptidasa para obtener una mezcla de oligosacáridos unidos a asparagina y, posteriormente, introducir (para enlace) un grupo protector lipofílico en los oligosacáridos unidos a asparagina en la mezcla para obtener una mezcla de derivados de oligosacárido unidos a asparagina y, después, separar la mezcla en derivados de oligosacárido unidos a asparagina individuales. El término "oligosacárido unido a asparagina", como se utiliza en este documento, se refiere a un oligosacárido que tiene asparagina unida al mismo. Además, el término "oligosacáridos que pueden unirse a asparagina" hace referencia a un grupo de oligosacáridos en el que la N-acetilglucosamina presente en un extremo reductor está unido por un enlace N-glucósido al grupo aminoácido de asparagina (Asn) en el polipéptido de una proteína y que tiene Man(β 1-4)GlcNac(β 1-4)GlcNac como estructura de núcleo. El término "derivado de oligosacárido unido a asparagina" hace referencia a un oligosacárido unido a asparagina en el que un grupo protector lipofílico está unido a una fracción de asparagina. Asimismo, "AcHN" en las fórmulas estructurales de compuestos se refiere a un grupo acetamido.

[0014] Expuesto de manera más específica, el proceso de la invención para producir derivados de oligosacárido unidos a asparagina incluye:

- (a) la etapa de preparar una mezcla de oligosacáridos unidos a péptido a partir de una yema de huevo deslipidada con una proteasa,
- (a) la etapa de preparar una mezcla de oligosacáridos unidos a asparagina a partir de la mezcla de oligosacáridos unidos a péptido con una peptidasa,

- (d) la etapa de introducir un grupo protector lipofílico en los oligosacáridos unidos a asparagina en la mezcla para obtener una mezcla de derivados de oligosacárido unidos a asparagina, y
 (e) la etapa de someter la mezcla de derivados de oligosacárido unidos a asparagina a cromatografía para separar la mezcla en derivados de oligosacárido unidos a asparagina individuales.

5 **[0015]** El proceso de la invención para preparar derivados de oligosacárido unidos a asparagina a partir de yema de huevo deslipidada se describirá a continuación en detalle.

10 **[0016]** La yema de huevo deslipidada que se utiliza en la presente invención no está limitada particularmente. Por ejemplo, es deseable una yema de huevo deslipidada aviar obtenida mediante deslipidación con un disolvente orgánico. Algunos ejemplos de yemas de huevo aviares deseables son las de las gallinas, codornices, patos, patos silvestres, palomas, etc. Especialmente deseable es la yema de huevo de las gallinas teniendo en cuenta la cantidad de oligosacáridos unidos a asparagina de tipo humano, particularmente de oligosacáridos unidos a asparagina con 2 ramificaciones de tipo humano, contenidos en la yema de huevo). Algunos ejemplos de disolventes orgánicos preferidos son el metanol, el etanol, el éter dietílico, etc.

15 **[0017]** En la etapa (a), las proteínas se cortan de la yema de huevo deslipidada con una proteasa para obtener una mezcla de oligosacáridos unidos a péptido (péptidos de oligosacárido unidos a asparagina) contenida en la yema de huevo deslipidada. La proteasa que se ha de utilizar en esta etapa es la que se encuentra, por lo general, disponible, a saber Pronase (producto de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y Orientase (producto de Hankyu Bioindustry Co., Ltd.).

20 **[0018]** En la etapa (b), los componentes que no sean oligosacáridos unidos a péptido de la mezcla de oligosacáridos unidos a péptido son eliminados mediante un método conocido, por ejemplo, mediante diversos procedimientos cromatográficos con una columna de filtración de gel o columna de intercambio iónico, entre otros, o un método de purificación con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés).

25 **[0019]** En la etapa (c), los péptidos de los oligosacáridos unidos a péptido obtenidos en la etapa (a) se descomponen con una peptidasa para obtener una mezcla de oligosacáridos unidos a asparagina contenidos en los oligosacáridos unidos a péptido. La peptidasa utilizada que está ampliamente disponible es la actinasa.

[0020] Es deseable eliminar los componentes que no sean oligosacáridos unidos a asparagina de la mezcla de oligosacáridos unidos a asparagina mediante un método conocido, por ejemplo, mediante diversos procedimientos cromatográficos con una columna de filtración de gel o columna de intercambio iónico, entre otros, o un método de purificación con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

30 **[0021]** Además, desde el punto de vista de obtener de forma eficaz derivados de oligosacárido unidos a asparagina con la estructura de oligosacárido deseada, es deseable hidrolizar los oligosacáridos unidos a asparagina contenidos en la mezcla y cortar algunas fracciones de azúcar antes de llevar a cabo la siguiente etapa. Algunos métodos útiles de hidrólisis incluyen un método en el que se utiliza un ácido y un método en el que se utiliza una enzima.

35 **[0022]** El ácido que se ha de utilizar no se limita de forma específica; algunos ejemplos útiles son ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos, tales como el ácido clorhídrico, el ácido sulfúrico, el ácido nítrico y el ácido trifluoroacético, las resinas de intercambio de cationes, los reactivos sólidos insolubles (tal como el gel de sílice), etc. Algunos ejemplos de enzimas útiles son la glucosidasa, que puede ser tanto del tipo endo como del tipo exo en cuanto al modo de reacción de la enzima. Dicha enzima no se limita particularmente; las enzimas comerciales, las enzimas aisladas de nuevo y las creadas mediante técnicas de ingeniería genética son útiles en tanto que presentan la actividad deseada.

[0023] La reacción enzimática puede llevarse a cabo en condiciones conocidas. El progreso de la reacción puede monitorizarse mediante cromatografía de capa fina para terminar la reacción en la fase en la que el compuesto contemplado está disponible en una mayor cantidad.

45 **[0024]** En la etapa (d), un grupo protector lipofílico se introduce en los oligosacáridos unidos a asparagina contenidos en la mezcla resultante de la etapa (c).

50 **[0025]** El grupo protector se selecciona del grupo que consiste en el grupo 9-fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc), el grupo t-butiloxycarbonil (Boc) o el grupo aliloxycarbonato (Alloc), el grupo acetilo (Ac), el grupo alilo o el grupo bencilo. Teniendo en cuenta la eficacia de síntesis y la eficacia de aislamiento/purificación en una etapa posterior, el grupo protector anterior es, preferiblemente, un grupo que contiene carbonato, tal como el grupo 9-fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc), el grupo t-butiloxycarbonil (Boc) o el grupo aliloxycarbonato y el grupo acetilo. Desde el punto de vista de que el derivado de oligosacárido unido a asparagina resultante puede utilizarse inmediatamente en la síntesis de un glicopéptido deseado, el grupo protector anterior es, preferiblemente, un grupo Fmoc y un grupo Boc, que son ampliamente utilizados en la síntesis peptídica. El grupo Fmoc es especialmente eficaz cuando hay un azúcar en el oligosacárido, tal como ácido siálico, que es relativamente

inestable en condiciones ácidas. La introducción del grupo protector puede llevarse a cabo de acuerdo con un proceso conocido (por ejemplo, Protecting Groups in Organic Chemistry, John Wiley & Sons INC., Nueva York 1991, ISBN 0-471-62301-6).

5 **[0026]** Por ejemplo, cuando se utiliza un grupo Fmoc, se añade una cantidad adecuada de acetona o DMF a la mezcla que contiene oligosacáridos unidos a asparagina, y también se añade 9-fluorenilmetil-N-succinimidil carbonato e hidrogenocarbonato de sodio a la misma y se disuelve, y más adelante, la mezcla resultante se somete a una reacción de unión del grupo Fmoc a una fracción de asparagina a 25 °C, por medio de la cual el grupo Fmoc puede introducirse en la fracción de asparagina del oligosacárido unido a asparagina anterior.

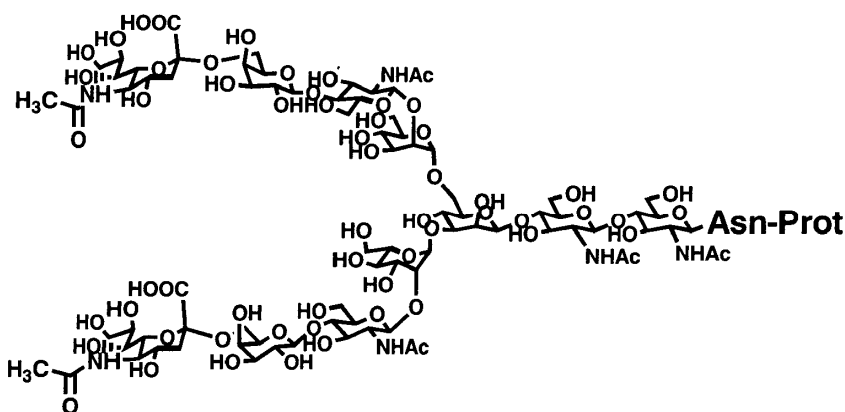
10 **[0027]** De acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente, se obtienen los derivados de oligosacárido unidos a asparagina en los que se introduce un grupo protector lipofílico.

15 **[0028]** En la etapa (e), la mezcla de derivados de oligosacárido unidos a asparagina obtenidos mediante la etapa (d) se separa en derivados de oligosacárido unidos a asparagina individuales mediante cromatografía conocida, a saber cromatografía fraccionante. La mezcla de derivados de oligosacárido unidos a asparagina obtenidos se utiliza directamente en esta etapa, mientras que desde el punto de vista de la obtención de derivados de oligosacárido unidos a asparagina que presentan la estructura de oligosacárido deseada de forma eficaz, los derivados de oligosacárido unidos a asparagina contenidos en la mezcla pueden hidrolizarse antes de esta etapa para cortar algunas fracciones de azúcar y para utilizar la mezcla resultante de derivados de oligosacárido unidos a asparagina. El alcance de residuos de azúcar que se han de cortar es el mismo que en el caso anterior. La hidrólisis puede llevarse a cabo de la misma manera que se ha expuesto anteriormente.

20 **[0029]** La separación de cada uno de los derivados de oligosacárido unidos a asparagina mediante cromatografía puede llevarse a cabo mediante la utilización adecuada de cromatografías conocidas, por separado o en una combinación de diversas cromatografías.

25 **[0030]** Por ejemplo, la mezcla resultante de derivados de oligosacárido unidos a asparagina se purifica con una cromatografía de columna de filtración de gel y, a continuación, se purifica mediante HPLC. La columna que puede utilizarse en HPLC es, preferiblemente, una columna de fase inversa, por ejemplo, una columna de ODS, a base de fenilo, a base de nitrilo o a base de intercambio de aniones y, concretamente, puede utilizarse una columna mono Q elaborada por Pharmacia o una columna Iatro-beads, elaborada por Iatron. Las condiciones de separación y similares pueden ajustarse haciendo referencia a una condición conocida. De acuerdo con los procedimientos anteriores, cada uno de los derivados de oligosacárido unidos a asparagina deseados pueden obtenerse a partir de la mezcla de derivados de oligosacárido unidos a asparagina.

30 **[0031]** Algunos ejemplos de derivados de oligosacárido unidos a asparagina preparados mediante el proceso anterior son derivados undeca- a pentasacáridos unidos a asparagina, preferiblemente derivados undeca- a heptasacáridos unidos a asparagina, más preferiblemente derivados undeca- a nonasacáridos unidos a asparagina. El más preferible es el derivado undecasacárido unido a asparagina de la siguiente fórmula, en la que Prot es un grupo protector.



40 **[0032]** Asimismo, el derivado de oligosacárido unido a asparagina que presenta una estructura de oligosacárido deseada puede obtenerse, de forma eficaz, mediante la hidrólisis de los derivados de oligosacárido unidos a asparagina separados en la etapa anterior. Por ejemplo, en la fase de separación de los derivados de oligosacárido unidos a asparagina, los derivados de oligosacárido unidos a asparagina pueden separarse aproximadamente mediante la limitación de las clases de los derivados de oligosacárido unidos a asparagina contenidos en la mezcla y, a continuación, los derivados de oligosacárido unidos a asparagina se someten a hidrólisis, por ejemplo, hidrólisis con una glucosidasa, por medio de la cual pueden obtenerse de forma eficaz los derivados de oligosacárido unidos a asparagina que presentan las estructuras de oligosacárido deseadas. En la

presente memoria, la hidrólisis puede llevarse a cabo de la misma manera que se ha expuesto anteriormente. Especialmente, es preferible que la hidrólisis se lleve a cabo con una glucosidasa de la cual esté definido el modo de escisión de las fracciones de oligosacárido, desde el punto de vista de la obtención más eficaz de los derivados de oligosacárido unidos a asparagina que presentan las estructuras de oligosacárido deseadas.

- 5 **[0033]** Tal y como se ha descrito anteriormente, cada uno de los diversos derivados de oligosacárido unidos a asparagina de los cuales las estructuras de ramificación en los extremos de los oligosacáridos no son uniformes, pueden obtenerse como compuestos aislados individuales mediante la hidrólisis adicional de los derivados con diversas glucosidasas y similares para eliminar las fracciones de azúcar en los extremos no reductores de los oligosacáridos después de la obtención de cada uno de los derivados de oligosacárido unidos a asparagina.
10 Además, puede prepararse incluso un número mayor de las clases de los derivados de oligosacárido unidos a asparagina mediante el cambio del orden o la clase de hidrólisis con diversas glucosidasas.

- [0034]** La presente invención da a conocer además un proceso para preparar diversos oligosacáridos unidos a asparagina aislados en cantidades grandes. Este proceso incluye, posteriormente a la etapa de preparación del derivado o los derivados de oligosacárido unido(s) a asparagina del proceso anterior para preparar dicho derivado, la etapa de eliminar el grupo protector del derivado o los derivados de oligosacárido unido(s) a asparagina resultante(s).
15

- [0035]** La eliminación del grupo protector del derivado de oligosacárido unido a asparagina puede llevarse a cabo de acuerdo con un proceso conocido (por ejemplo, véase *Protecting Groups in Organic Chemistry*, John Wiley & Sons INC., Nueva York 1991, ISBN 0-471-62301-6). Por ejemplo, cuando el grupo protector es un grupo Fmoc, el grupo Fmoc puede eliminarse mediante la adición de morfina al derivado de oligosacárido unido a asparagina en N,N-dimetilformamida (DMF) para llevar a cabo la reacción. Asimismo, el grupo Boc puede eliminarse mediante una reacción con un ácido débil. Después de la eliminación del grupo protector, un oligosacárido unido a asparagina puede obtenerse de forma adecuada mediante la purificación de una mezcla de reacción con un proceso conocido, tal como diversas cromatografías, con el empleo de una columna de filtración de gel o una columna de intercambio iónico, entre otros, o de un proceso de separación mediante HPLC, como se prefiera.
20
25

- [0036]** En el caso de que el grupo protector sea un grupo bencilo, la eliminación del grupo bencilo del derivado de oligosacárido unido a asparagina puede llevarse a cabo de acuerdo con un proceso conocido (por ejemplo, véase *Protecting Groups in Organic Chemistry*, John Wiley & Sons INC., Nueva York 1991, ISBN 0-471-62301-6).
30

- [0037]** Además, la eliminación de la fracción de asparagina del oligosacárido unido a asparagina puede llevarse a cabo de acuerdo con un proceso conocido. Por ejemplo, el oligosacárido unido a asparagina se somete a reacción con hidracina anhidra y, a continuación, se acetila para eliminar la fracción de asparagina, por medio de lo cual puede obtenerse el oligosacárido. Además, el oligosacárido puede obtenerse también al someter a reflujo el oligosacárido unido a asparagina con calor en una solución acuosa básica y, a continuación, al acetilar el oligosacárido unido a asparagina para eliminar la fracción de asparagina. Después de la eliminación de la fracción de asparagina, el oligosacárido puede purificarse de manera adecuada con un proceso conocido, tal como diversas cromatografías, con el empleo de una columna de filtración de gel o una columna de intercambio iónico, entre otros, y de un proceso de separación mediante HPLC, como se prefiera.
35

- [0038]** Tal y como se ha descrito anteriormente, de acuerdo con la presente invención, el derivado de oligosacárido unido a asparagina, el oligosacárido unido a asparagina y el oligosacárido (de ahora en adelante, a estos tres términos se les hace referencia conjuntamente como "series de oligosacárido", en algún caso) presentando cada uno una estructura de oligosacárido deseada, pueden prepararse con un coste bajo, de forma eficaz y en grandes cantidades.
40

- [0039]** Las series de oligosacárido según la invención son muy útiles en el campo del desarrollo de productos farmacéuticos. Por ejemplo, las vacunas para los cánceres son un ejemplo de aplicación para el desarrollo de fármacos. Se sabe que las células que desarrollan cáncer producen un oligosacárido que no se encuentra en el organismo vivo. También se sabe que cuando está preparado químicamente y se facilita al cuerpo humano a modo de vacuna, dicho oligosacárido inhibe el crecimiento del cáncer. Si se pueden producir las series de oligosacárido deseadas según la invención, es posible preparar una vacuna que sea eficaz para el tratamiento del cáncer. Las series de oligosacárido obtenidas mediante la invención pueden dividirse además en derivados uniendo fracciones nuevas de azúcar a las mismas a través de combinaciones de reacciones químicas y reacciones de transferasas de azúcar para la preparación de nuevas vacunas.
45
50

- [0040]** Si bien, por ejemplo, la eritropoyetina (EPO), que es una glicoproteína, se utiliza como fármaco para tratar la anemia debido a su capacidad para proliferar eritrocitos, se ha descubierto que la EPO no presenta actividad cuando no presenta ningún oligosacárido unido a la misma. Por lo tanto, las proteínas incluyen las que presentan actividad fisiológica cuando tienen un oligosacárido unido a las mismas, de tal forma que es posible preparar una proteína en grandes cantidades mediante un sistema de expresión E.coli, que no puede unir oligosacáridos a la
55

proteína y, posteriormente, introducir un oligosacárido preparado por la invención y que presenta una estructura deseada en la proteína para hacer que la proteína presente una actividad fisiológica. Alternativamente, una glicoproteína innovadora que presenta una actividad fisiológica innovadora puede sintetizarse mediante la introducción de oligosacáridos preparados por la invención y que presentan diversas estructuras en una proteína deseada.

[0041] Asimismo, los oligosacáridos presentes en glicoproteínas naturales pueden sustituirse por oligosacáridos preparados por la invención para, de esta manera, proporcionar una actividad fisiológica innovadora a la glicoproteína. Por ejemplo, el proceso que se expone en P. Sears y C.H. Wong, Science, 2001, vol. 291, pp. 2344-2350, es útil como técnica para sustituir el oligosacárido presente en las glicoproteínas por el oligosacárido obtenido por la invención. Con este proceso, la glicoproteína se trata con β -N-acetilglucosaminidasa (Endo-H) con el fin de permitir que solamente una fracción de N-acetilglucosamina siga unida a la fracción de asparagina sobre la superficie de la glicoproteína. Posteriormente, un oligosacárido deseado en el oligosacárido unido a asparagina obtenido mediante la invención se une a la fracción de N-acetilglucosamina con el empleo de β -N-acetilglucosaminidasa (Endo-M). También es posible preparar una glicoproteína que presenta una fracción de N-acetilglucosamina con la utilización de un sistema de expresión E.coli y la utilización de ARNt con N-acetilglucosamina unida al mismo y, a continuación, introducir un oligosacárido deseado en el oligosacárido unido a asparagina obtenido de acuerdo con la presente invención en la glicoproteína con el uso de Endo-M.

[0042] Actualmente, la utilización de glicoproteínas como fármacos terapéuticos supone el problema de que la glicoproteína administrada se metaboliza rápidamente, puesto que cuando se elimina el ácido siálico del extremo de oligosacárido de la glicoproteína *in vivo*, la glicoproteína se metaboliza de inmediato en el hígado. Por este motivo, se necesita proporcionar la glicoproteína en una cantidad considerable. Por consiguiente, es posible controlar la velocidad del metabolismo en el organismo vivo y reducir la dosis de glicoproteína que se ha de proporcionar mediante la preparación de un oligosacárido de acuerdo con la invención, con ácido siálico que es difícil eliminar incorporado en el mismo en su extremo, y la introducción del oligosacárido en la glicoproteína contemplada con el uso de Endo-M.

MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

[0043] La presente invención se describirá, a continuación, con referencia a los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1

[0044] Una yema de huevo se colocó, rota, en 67 ml de etanol (EtOH) con agitación. La mezcla se revolvió durante aproximadamente 5 horas y, a continuación, se filtró, seguido de lavado con 30 ml de EtOH. A los cristales resultantes, se añadieron 83 ml de EtOH de nuevo, y la mezcla se revolvió durante la noche. La mezcla se filtró a continuación, seguido de lavado con 30 ml de EtOH. Los cristales obtenidos se secaron y proporcionaron aproximadamente 3 g de yema de huevo deslipidada.

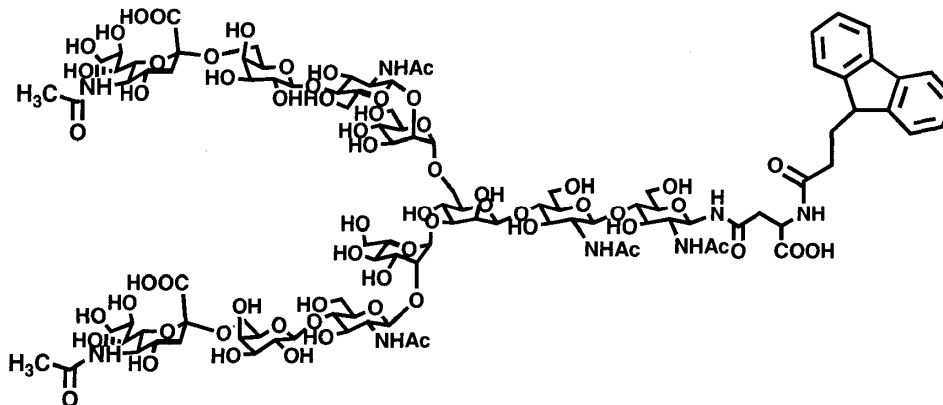
(a) La yema de huevo deslipidada se disolvió en un tampón fosfato (7,0 en pH, 30 ml) y NaN_3 (10 mg) se añadió a la solución. También se añadió Orientase ONS (producto de Hankyu Bioindustry Co., Ltd., 1,0 g) a la solución, y la mezcla se dejó reposar a 50 °C durante aproximadamente 24 horas. Después de confirmarse la finalización de la reacción mediante TLC, la mezcla de reacción se filtró con Celite. El filtrado se concentró y se purificó mediante cromatografía de columna de filtración de gel (Sephadex G-25, 2,5 × 100 cm, H_2O). Las fracciones que contenían los sacáridos deseados fueron recogidas, concentradas y, a continuación, liofilizadas.

(B) Al residuo (aproximadamente 430 mg) obtenido se le añadió solución tampón de cloruro de calcio de ácido Tris-clorhídrico (7,5 de pH, 43 ml) y NaN_3 (21 mg) para obtener una solución. Se añadió actinasa E (43 mg) a la solución y la mezcla se dejó reposar durante 24 horas al tiempo que se comprobaba el pH cada 12 horas. Se añadió actinasa E (21,5 mg) a la mezcla de reacción de nuevo 24 horas después, seguido de una reacción de nuevo durante aproximadamente 48 horas al tiempo que se comprobaba el pH. Después de confirmarse la finalización de la reacción mediante TLC, la mezcla de reacción se filtró con Celite y el filtrado se concentró y se purificó mediante cromatografía de columna de filtración de gel (Sephadex G-25, 2,5 × 100 cm, H_2O). Las fracciones que contenían los sacáridos deseados fueron recogidas, concentradas y, a continuación, liofilizadas.

(c) El residuo (aproximadamente 120 mg) obtenido se disolvió en 1,5 ml de agua, y se añadieron 26 mg de bicarbonato sódico a la solución. A la mezcla, se añadió una solución de 68 mg de Fmoc-Osu [N-(9-fluorenilmetiloxicarbonil)oxisuccinimida] en 2,5 ml de dimetilformamida y se sometió a reacción la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de confirmarse la desaparición del material mediante TLC (isopropanol: solución acuosa 1M de acetato de amonio=3:2), la mezcla de reacción se concentró mediante un evaporador. Al residuo, se le añadieron 15 ml de agua y 25 ml de éter dietílico y la mezcla se revolvió durante 10 minutos, seguido de un procedimiento de separación. La capa acuosa se lavó a continuación con 15 ml de éter dietílico y, más adelante, se concentró y se liofilizó. Se purificó el

producto con una columna de ODS (Wako-Gel 100C18) para la elución en gradiente. Las fracciones que contenían los oligosacáridos fueron recogidas, concentradas y liofilizadas.

- 5 (d) El residuo se purificó mediante una columna fraccionante HPLC (YMC-Pack R&D ODS, D-ODS-5-A, 20 × 250 mm, AN/25 mM AcONH₄ tampón=20/80, 7,5 ml/min., longitud de onda 274 nm). Una fracción de pico principal eluida aproximadamente 15 minutos más tarde fue recogida y, a continuación, concentrada y desalada en una columna de ODS. Cuando se liofilizó, el producto permitió obtener aproximadamente 13,3 mg del derivado de disialo oligosacárido Fmoc deseado.



[0045] Los datos de RMN-H¹ en cuanto a los compuestos se proporciona a continuación.

- 10 RMN-H¹ (400MHz, D₂O, 30 °C, HOD=4,81)
 8,01(2H, d, J=7,5 Hz, Fmoc), 7,80(2H, d, J=7,5Hz, Fmoc), 7,60(2H, dd, J=7,5Hz, Fmoc), 7,53(2H, dd, J=7,5Hz, Fmoc), 5,23(1H, s, Man4-H1), 5,09(1H, d, J=9,4Hz, GlcNAc1-H1), 5,04(1H, s, Man4' -H1), 4,86(1H, s, Man3-H₁), 4,70~4,66(m, GlcNAc2-H₁ GlcNAc5, 5' -H₁), 4,54(2H, d, J=7,9Hz, Gal6, 6' -H₁), 4,44(1H, d, FmocCH), 4,34(1H, bd, Man3-H₂), 4,29, (1H, bd, Man4' -H₂), 4,20 (1H, bd, Man4-H₂), 2,77(2H, dd, NeuAc7, 7'-H_{3eq}), 2,80(1H, bdd, Asn-βCH), 2,62 (1H, bdd, Asn-βCH), 2,14(18H, s×6, -Ac), 1,80(2H, dd, NeuAc7, 7'-H_{3ax})
- 15

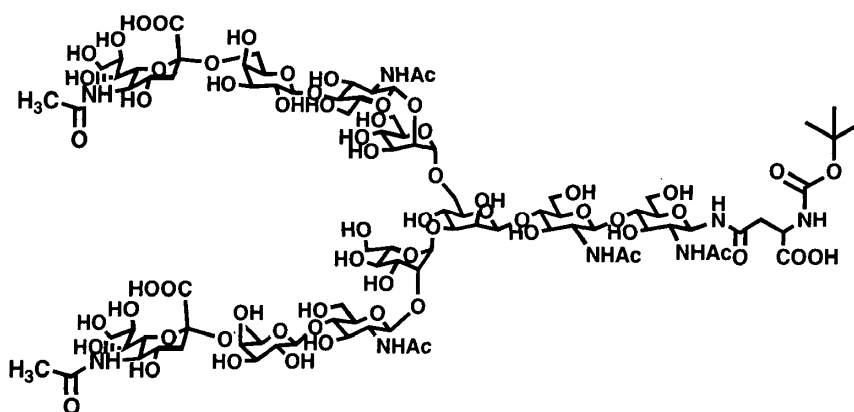
Ejemplo 2 [derivado de disialooligosacárido-Boc

(undecasacárido)]

[0046]

Las etapas (a) y (b) se llevaron a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

- 20 (c) El residuo (aproximadamente 120 mg) obtenido se disolvió en 1 ml de 0,1N NaOH aq. A la solución, se añadió (Boc)₂O (4 ml, producto de Tokyo Kasei Co., Ltd.) y se sometió la mezcla a reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de confirmarse la desaparición del material mediante TLC (isopropanol: solución acuosa 1M de acetato de amonio=3:2), 2,5 ml de diclorometano se añadieron a la mezcla de reacción para la separación. La capa acuosa se lavó adicionalmente con 2,5 ml de diclorometano y, a
- 25 continuación, se ajustó a un pH de 7,0 con 40 mM de HCl. La capa acuosa se concentró y se purificó el residuo mediante una columna de ODS (gradiente H₂O 100 % → H₂O/AN=99/1 → H₂O/AN=95/5 → H₂O/AN=90/10). La fracción que contiene el derivado de disialooligosacárido Boc deseado (confirmado mediante HPLC) fue recogida, concentrada y liofilizada.
- 30 (d) El residuo se aisló y se purificó mediante HPLC. (YMC-Pack ODS-AM, SH-343-5AM, 20 × 250 mm, AN/25 mM AcONH₄ tampón=5/95, 7,0 ml/min., longitud de onda 215 nm). Una fracción de pico principal eluida aproximadamente 11 minutos más tarde fue recogida, concentrada y, a continuación, desalada mediante cromatografía en columna de gel (Sephadex G-25, H₂O). Cuando se liofilizó, el producto produjo aproximadamente 10,0 mg del derivado de disialooligosacárido Boc deseado.



RMN- ^1H (400MHz, D_2O , 30 °C, HOD=4,81)

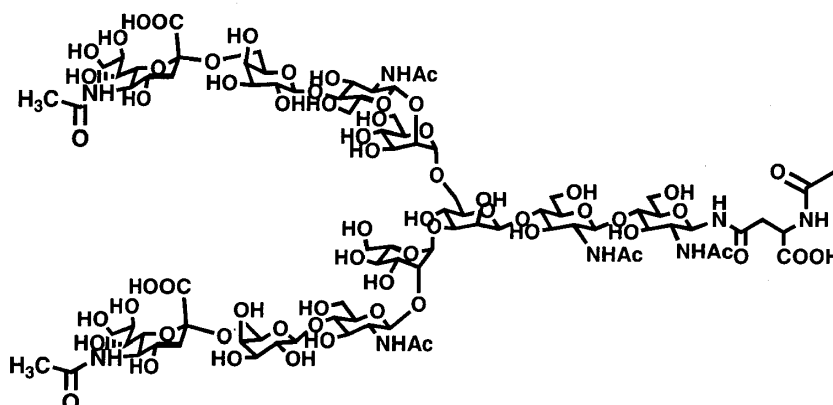
- 5 δ 5,19(s, 1H, Man4-H₁), 5,12(d, 1H, J=9,6, GlcNAc1-H₁), 5,00(s, 1H, Man4'-H₁), 4,61-4,71(m, 3H), 4,49(d, 2H, J=7,6), 4,30-4,40(bs, 1H, Asn- α CH), 4,31(s, 1H, Man3-H₂), 4,25(bs, 1H, Man4-H₂), 4,17(bs, 1H, Man4-H₂), 2,84(dd, 1H, J_a=15,6, J_b=4,4, Asn- β CH), 2,72(dd, 2H, J_a=12,4, J_b=2,8, NeuAc7-H_{3ex}), 2,60-2,75 (m, 1H, Asn- β CH), 2,13, 2,12, 2,11(cada uno, 18H, Acx6), 1,77(dd, 2H, J_a=12,0, J_b=12,4, NeuAc7-H_{3ax}), 1,48(s, 9H, Boc).

Ejemplo 3 [derivado de disialooligosacárido Ac (undecasacárido)]

[0047]

Las etapas (a) y (b) se llevan a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

- 10 (c) El residuo (aproximadamente 120 mg) obtenido se disolvió en 1 ml de agua purificada. A la solución, se le añadió K_2CO_3 (72 mg) y, a continuación, anhídrido acético (99 ml) y se agitó la mezcla durante aproximadamente 2 horas. Después de someterse la mezcla a reacción a temperatura ambiente durante 2 horas, se confirmó la desaparición del material mediante TLC (isopropanol: solución acuosa 1M de acetato de amonio=3:2), y los 2,5 ml de diclorometano se añadieron a la mezcla de reacción para la separación. La capa acuosa se lavó adicionalmente con 2,5 ml de diclorometano y, a continuación, se ajustó a un pH de 7,0 con sat. NaHCO_3 aq. La capa acuosa se concentró y, a continuación, se purificó mediante una columna de ODS (gradiente H_2O 100 % \rightarrow $\text{H}_2\text{O}/\text{AN}=99/1 \rightarrow \text{H}_2\text{O}/\text{AN}=95/5$). Una fracción que contiene el derivado de disialooligosacárido Ac deseado (confirmado mediante HPLC) fue recogida y, posteriormente, liofilizada.
- 15 (d) El residuo se aisló y se purificó mediante HPLC. (YMC-Pack ODS-AM, SH-343-5AM, 20 \times 250 mm, AN/25 mM AcONH_4 tampón=1/99, 7,0 ml/min., longitud de onda 215 nm). Una fracción de pico principal eluida aproximadamente 11 minutos más tarde fue recogida, concentrada y, a continuación, desalada mediante cromatografía en columna de gel (Sephadex G-25, H_2O). Cuando se liofilizó, el concentrado produjo aproximadamente 8,5 mg del derivado de disialooligosacárido Ac deseado.
- 20



- 25 RMN- ^1H (400MHz, D_2O , 30 °C, HOD=4,81)
 δ 5,19(s, 1H, Man4-H₁), 5,11(d, 1H, J=9,6, GlcNAc1-H₁), 5,00(s, 1H, Man4'-H₁), 4,66(bs, 3H), 4,54-4,57(dd, 1H, J_a=8,1, J_b=4,5), 4,50(d, 2H, J=7,8), 4,31(s, 1H, Man3-H₂), 4,25(bs, 1H, Man4-H₂), 4,17(bs, 1H, Man4-H₂), 2,85(dd, 1H, J_a=15,8, J_b=4,3, Asn- β CH), 2,65-2,75(m, 3H, NeuAc7-H_{3ex}, Asn- β CH), 2,13, 2,12, 2,08, 2,06(cada uno, 21H, Acx7), 1,77(dd, 2H, J_a=12,1, J_b=12,1, NeuAc7-H_{3ax}).

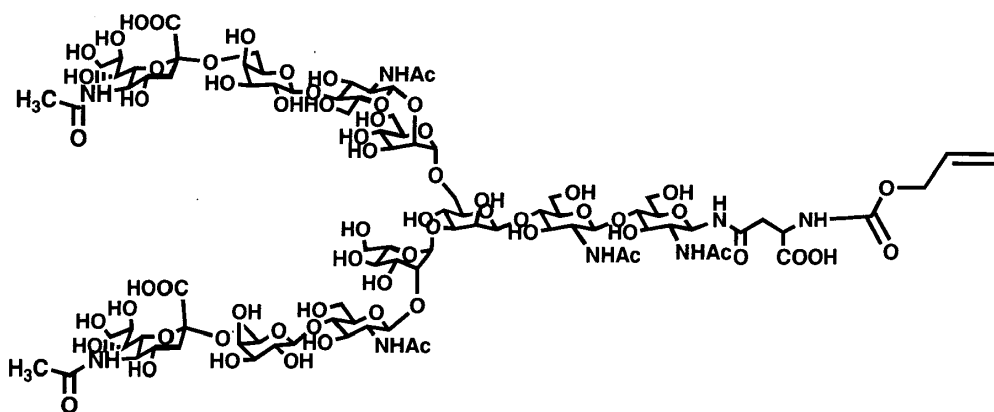
Ejemplo 4 [derivado de disialooligosacárido-Alloc (undecasacárido)]

[0048]

Las etapas (a) y (b) se llevaron a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

5 (c) El residuo (aproximadamente 120 mg) obtenido se disolvió en 6 ml de 0,1N NaOH aq. A la solución, se añadió (AllylOCO)₂O (573 ml, producto de Tokyo Kasei Co., Ltd.), y se sometió la mezcla a reacción a temperatura ambiente durante 12 horas. Después de confirmarse la desaparición del material mediante TLC (isopropanol: solución acuosa 1M de acetato de amonio=3:2), 12 ml de diclorometano se añadieron a la mezcla de reacción para la separación. La capa acuosa se lavó adicionalmente con 12 ml de diclorometano y, a continuación, se ajustó a un pH de 7,0 con 40 mM de HCl. La capa acuosa se concentró y se purificó el residuo mediante una columna de ODS (gradiente H₂O 100 % → H₂O/AN=99/1 → H₂O/AN=95/5). La fracción que contiene el derivado de disialooligosacárido Alloc deseado (confirmado mediante HPLC) fue recogida, concentrada y liofilizada.

15 (d) El residuo se aisló y se purificó mediante HPLC. (YMC-Pack ODS-AM, SH-343-5AM, 20 × 250 mm, AN/25 mM AcONH₄ tampón=2/98, 7,5 ml/min., longitud de onda 215 nm). Una fracción de pico principal eluida aproximadamente 18 minutos más tarde fue recogida, concentrada y, a continuación, desalada mediante cromatografía en columna de gel (Sephadex G-25, H₂O). Cuando se liofilizó, el concentrado produjo aproximadamente 8,7 mg del derivado de disialooligosacárido Alloc deseado.



20 RMN-H¹(400MHz, D₂O, 30 °C, HOD=4,81)
 δ 6,01(ddd, 1H, Ja=17,2, Jb=10,4, Jc=5,2, -CH₂-CH=CH₂), 5,37(d, 1H, J=17,2, -CH₂-CH=CH₂), 5,30(dd, 1H, Ja=10,4, Jb=1,6, -CH₂-CH=CH₂), 5,19(s, 1H, Man4-H₁), 5,12(d, 1H, J=9,6, GlcNAc1-H₁), 5,00(s, 1H, Man4'-H₁), 4,60-4,71(m), 4,50(d, 2H, J=7,6), 4,35-4,45(bm, 1H, Asn-αCH), 4,31(s, 1H, Man3-H₂), 4,25(d, 1H, J=2,0, Man4-H₂), 4,17(d, 1H, J=2,4, Man4-H₂), 2,87(dd, 1H, Ja=15,6, Jb=4,0, Asn-βCH), 2,72(bdd, 2H, Ja=12,4, Jb=2,4, NeuAc7-H_{3ex}), 2,64(dd, 1H, Ja=15,6, Jb=10,0, Asn-βCH), 2,13, 2,12, 2,11, 2,08, 2,05(cada uno, 18H, Acx6), 1,77(dd, 2H, Ja=12,4, Jb=12,0, NeuAc7-H_{3ax}), 1,48(s, 9H, Boc).

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

[0049] La presente invención puede proporcionar diversos derivados de oligosacárido unidos a asparagina aislados en cantidades mayores y mucho más fácilmente que tradicionalmente para su utilización en el campo del desarrollo de productos farmacéuticos o similares.

30

REIVINDICACIONES

1. Proceso para preparar derivados de oligosacárido unidos a asparagina que incluye las etapas de:
 - (a) tratar una yema de huevo deslipidada con Pronase u Orientase para obtener una mezcla de oligosacáridos unidos a péptido,
 - 5 (b) eliminar los componentes que no sean oligosacáridos unidos a péptido de la mezcla de oligosacáridos unidos a péptido,
 - (c) tratar la mezcla purificada de oligosacáridos unidos a péptido con actinasa para obtener una mezcla de oligosacáridos unidos a asparagina,
 - 10 (d) introducir un grupo protector lipofílico en los oligosacáridos unidos a asparagina en la mezcla para obtener una mezcla de derivados de oligosacárido unidos a asparagina, donde dicho grupo protector lipofílico se selecciona del grupo que consiste en el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc), el grupo t-butiloxicarbonil (Boc), el grupo aliloxicarbonato (Alloc), el grupo acetilo (Ac), el grupo alilo o el grupo bencilo, y
 - 15 (e) someter la mezcla de derivados de oligosacárido unidos a asparagina a una cromatografía fraccionante mediante la utilización de una columna de fase inversa para separar la mezcla en derivados de oligosacárido unidos a asparagina individuales.
2. Proceso para preparar derivados de oligosacárido unidos a asparagina de acuerdo con la reivindicación 1 donde la yema de huevo deslipidada se obtiene mediante la deslipidación de una yema de huevo aviar con un disolvente orgánico.
- 20 3. Proceso para preparar derivados de oligosacárido unidos a asparagina de acuerdo con la reivindicación 1 donde los derivados de oligosacárido unidos a asparagina son derivados undeca- a pentasacáridos unidos a asparagina.
4. Proceso para preparar derivados de oligosacárido unidos a asparagina de acuerdo con la reivindicación 3 donde los derivados de oligosacárido unidos a asparagina son derivados undeca- a heptasacáridos unidos a asparagina.
- 25 5. Proceso para preparar derivados de oligosacárido unidos a asparagina de acuerdo con la reivindicación 4 donde los derivados de oligosacárido unidos a asparagina son derivados undeca- a nonasacáridos unidos a asparagina.
6. Proceso para preparar derivados de oligosacárido unidos a asparagina de acuerdo con la reivindicación 5 donde los derivados de oligosacárido unidos a asparagina son derivados undecasacáridos unidos a asparagina.
- 30 7. Proceso para preparar derivados de oligosacárido unidos a asparagina de acuerdo con la reivindicación 1 donde los oligosacáridos unidos a asparagina contenidos en la mezcla de oligosacáridos unidos a asparagina obtenidos mediante la etapa (c) son hidrolizados antes de la etapa siguiente de corte de diversas fracciones de azúcar.
- 35 8. Proceso para preparar derivados de oligosacárido unidos a asparagina de acuerdo con la reivindicación 1 donde los derivados de oligosacárido unidos a asparagina contenidos en la mezcla de derivados de oligosacárido unidos a asparagina obtenidos mediante la etapa (d) son hidrolizados antes de la etapa siguiente de corte de diversas fracciones de azúcar.