

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 820 303**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/33 (2006.01)

C07K 14/34 (2006.01)

A61K 47/64 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.08.2015 PCT/US2015/046197**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2016 WO16029071**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2015 E 15833684 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 3183262**

54 Título: **Conjugados de glicanos y uso de los mismos**

30 Prioridad:

22.08.2014 US 201462040756 P

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

20.04.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WONG, CHI-HUEY;
WU, CHUNG-YI y
LEE, HSIN-YU**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 820 303 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

Conjugados de glicanos y uso de los mismos

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los antígenos de carbohidratos asociados a tumores (TACA) se sobreexpresan en la superficie de las células cancerosas y se relacionan con la adhesión y metástasis de las células tumorales. ¹ Por tanto, los TACA son objetivos potenciales para el desarrollo de vacunas contra el cáncer. ² Sin embargo, la mayoría de los TACA tienen una pobre inmunogenicidad y se han desarrollado muchos enfoques para aumentar la respuesta inmune de las vacunas a base de carbohidratos, incluyendo la conjugación con una proteína transportadora ³, la administración con un adyuvante inmunológico⁴, usando un enlace glicosídico no natural⁵, antígenos agrupados⁶, vacuna polivalente unimolecular⁷ o vacuna multivalente de heteroglicano⁸. Usando estas estrategias, se diseñaron unas pocas vacunas basadas en carbohidratos que podrían provocar respuestas inmunes significativas a las estructuras de glicanos objetivo para terapia contra el cáncer y entraron en ensayos clínicos. ^{3,9} Entre ellos, los ensayos clínicos de Theratope y GMK con adyuvante QS-21 no lograron producir una diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo hasta la enfermedad y la tasa de supervivencia general. Probablemente, estas dos vacunas no podrían provocar una sólida respuesta inmune dependiente de células T en los pacientes. ¹⁰ Específicamente, Theratope y GMK indujeron un nivel más alto de IgM en los pacientes, pero no pudieron inducir una fuerte respuesta inmune de IgG, que es un problema importante en el desarrollo de vacunas basadas en carbohidratos.¹¹

Globo H (GH; Fuca1→2Galβ1→3GalNacβ1→3Galα1→4Galβ1→4Glc) es un miembro de los glicoesfingolípidos de la serie globo. Se encontró y caracterizó por primera vez en células de teratocarcinoma humano y células MCF-7 de cáncer de mama en 1983, ¹² y posteriormente se encontró sobreexpresado en muchos tipos de células cancerosas humanas, incluyendo cánceres de mama, próstata, ovario, páncreas, cerebro, endometrio, estómago, colon y pulmón. ¹³ Una vacuna Globo H que usa KLH como portador y QS-21 como adyuvante preparada por Livingston y Danishefsky mostró un resultado positivo en un estudio de fase I contra pacientes con cáncer de mama metastásico. ¹⁴ Con mejora en síntesis ¹⁵, se encuentra ahora en un ensayo clínico de fase III en Taiwán y en un ensayo clínico de fase II en los Estados Unidos, Corea, Hong-Kong e India para pacientes con cáncer de mama en etapa tardía y en un ensayo clínico de fase II para pacientes con cáncer de ovario en Taiwán. Sin embargo, estos resultados clínicos en las primeras etapas mostraron que los anticuerpos IgM inducidos eran todavía mucho más altos que los anticuerpos IgG. ^{14,16} Recientemente, nuestro grupo ha desarrollado una vacuna mejor usando material de reactividad cruzada de toxoide diftérico (CRM) 197 (DT) como portador y un glicolípido C34 como adyuvante para inducir un cambio de clase con una sólida respuesta de anticuerpos IgG contra GH, su fragmento Gb5 y SSEA4, todos encontrados en las células de cáncer de mama y las células madre del cáncer únicamente.^{13b}

Estudios anteriores mostraron que la modificación de las estructuras de antígenos de carbohidratos (MCAS) podría provocar de manera efectiva un nivel más alto de respuesta inmune. ¹⁷ Por ejemplo, en el estudio de modificación del polisacárido capsular de meningococos del grupo B, los grupos *N*-acetilo de ácido polisialico (PSA) α-(2,8)-ligado fue reemplazado con el grupo *N*-propinoilo y tal modificación provocó una alta respuesta de anticuerpos para reconocer no solo el *N*-propinoilo PSA, sino también el *N*-acetilo PSA natural. ¹⁸ Se aplicaron enfoques similares a los antígenos STn¹⁹ y GM3²⁰ para producir altos títulos de anticuerpos contra formas modificadas y naturales. Los resultados indicaron que las modificaciones de *N*-fenilacetilo, N₃, *N*-fluoroacetilo o *N*-difluoroacetilo en antígenos de glicano podría mejorar la inmunogenicidad. ^{19a, c} Además, el grupo de Schultz informó que la incorporación de una *p*-nitrofenilalanina en el factor de necrosis tumoral-α (TNF-α) podría romper la tolerancia inmune e inducir una mayor respuesta de anticuerpos al TNF-α. ²¹ Usando glicanos como antígenos, aunque se han logrado algunos avances, la mayoría de los casos son la modificación N de disacárido (STn), trisacárido (GM3) y ácido polisialico (PSA) y algunos se basan en antígenos de glicopéptido MUC1 fluorados. ^{18a, 19a, d, 20,22} Hay una falta de una estrategia general para la preparación de vacunas basadas en carbohidratos para inducir la respuesta de IgG con memoria a largo plazo.

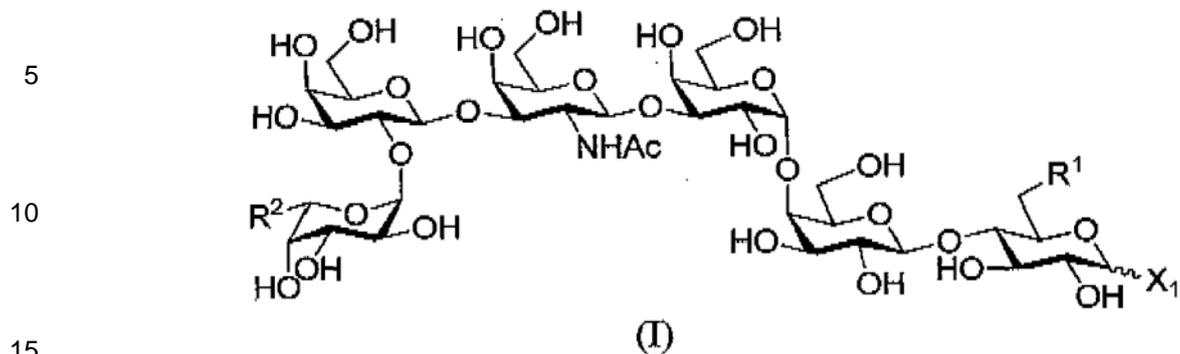
SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a los descubrimientos inesperados de que la modificación en el extremo reductor de la glucosa o del extremo no reductor de la fucosa de Globo H con ciertos grupos divulgados en la presente provocó una sólida respuesta de anticuerpos IgG para reconocer específicamente Globo H (GH), Gb5 y SSEA4. Se descubrió que los anticuerpos inducidos por una composición inmunogénica que comprende tal fracción de glicano no natural reconocen las células tumorales que expresan GH (MCF-7) y median la citotoxicidad celular dependiente del complemento contra las células tumorales.

Por consiguiente, la invención se refiere a conjugados de glicanos sintéticos, composiciones inmunogénicas que los comprenden y vacunas de los mismos. La invención también se refiere a métodos de uso de conjugados de glicanos sintéticos y composiciones inmunogénicas de los mismos para tratar o reducir el riesgo de cánceres.

65

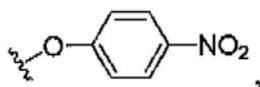
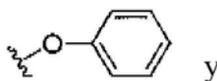
En un aspecto, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I)



o una sal del mismo,
en el que:

20
25

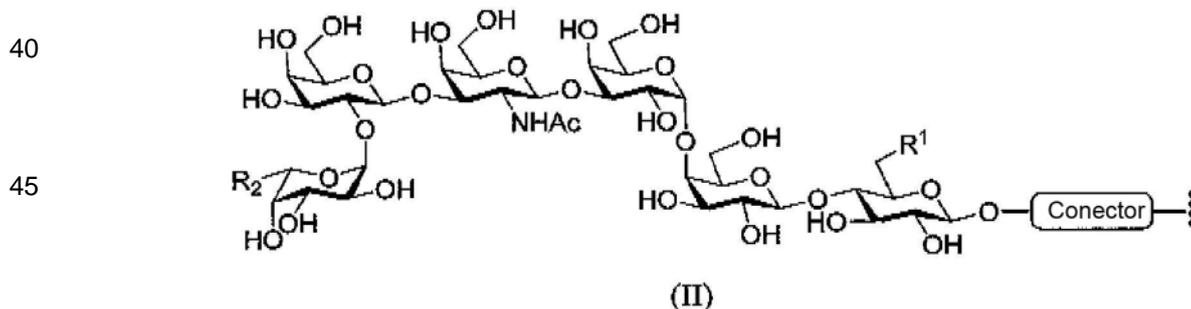
X_1 es -OR o -SR, en donde R es $-(CH_2)_5NH_2$; y
R¹ se selecciona del grupo que consiste de -F, -N₃, -NO₂,



y R² es -CH₃; o R¹ es -OH, y R² se selecciona del grupo que consiste de -CH₂F, -CH₂N₃, -CH₂OH y -C≡CH.

35
40

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica, que comprende (a) un conjugado de glicanos que comprende por lo menos un glicano con un conector y un portador, el por lo menos un glicano estando conjugado con el portador a través del conector; y (b) un adyuvante, en donde el por lo menos un glicano con el conector tiene una estructura química de fórmula (II):



en donde:

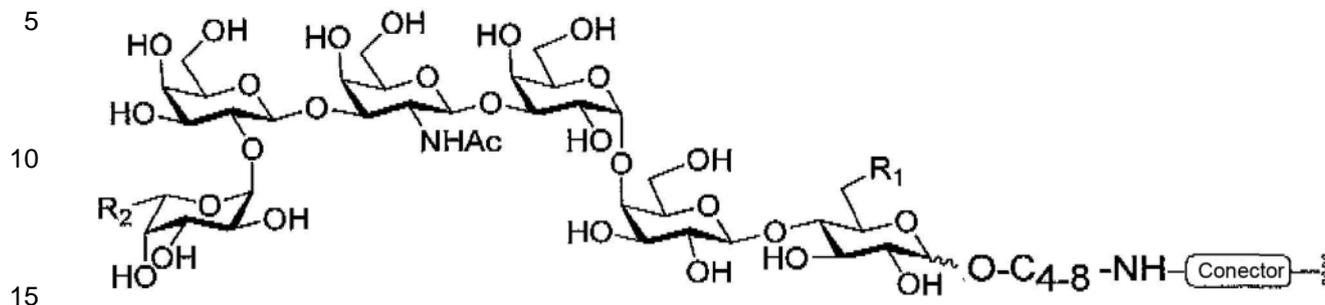
R¹ se selecciona del grupo que consiste de -F, -N₃, -NO₂,



65 y R² es -CH₃; o

R¹ es -OH, y R² se selecciona del grupo que consiste de -CH₂F, -CH₂N₃, -CH₂OH y -C≡CH.

En un ejemplo, el por lo menos un glicano con el conector tiene una estructura química de Fórmula (IV):



Formula (IV)

20 donde R¹ y R² son como se han definido anteriormente en la Fórmula (II).

En una realización, R¹ es -F, -N₃, -NO₂,



30 y R² es -CH₃.

En otra realización, R¹ es -OH y R² es -CH₂F, -CH₂N₃, -CH₂OH o -C≡CH.

En otro ejemplo de la divulgación, el conector es un conector hetero- u homo-bifuncional.

35 En otro ejemplo de la divulgación, el conector es -L¹-L²-, en donde L¹ es un enlace, -O-, -S-, -NR^{L1a}-, -C(=O)-, -NR^{L1a}C(=O)-, -NR^{L1a}C(=O)O-, -C(=O)NRL^{L1a}-, -OC(=O)N^{L1a}-, -SC(=O)-, -C(=O)S-, -OC(=O)-, -C(=O)O-, -NR^{L1a}C(=S)-, -C(=S)NR^{L1a}-, *trans*-CR^{L1b}=CR^{L1b}-, *cis*-CR^{L1b}=CR^{L1b}-, -C≡C-, -OC(R^{L1b})₂-, -C(R^{L1b})₂O-, -NR^{L1a}C(R^{L1b})₂-, -C(R^{L1b})₂NR^{L1a}-, -SC(R^{L1b})₂-, -C(R^{L1b})₂S-, -S(O)₂O--OS(=O)₂-, -S(=O)₂NR^{L1a}-, -NR^{L1a}S(=O)₂-, o una cadena de hidrocarburos C₁₋₂₀ opcionalmente sustituida, opcionalmente en donde una o más unidades de carbono de la cadena de hidrocarburos se reemplaza con-O-, -S-, -NR^{L1a}-, -C(=O)-, NR^{L1a}C(=O)-, -NR^{L1a}C(=O)O-, -C(=O)NR^{L1a}-, -OC(=O)NR^{L1a}-, -SC(=O)-, -C(=O)S-, -OC(=O)-, -C(=O)O-, -NR^{L1a}C(=S)-, -C(=S)NR^{L1a}-, *trans*-CR^{L1b}=CR^{L1b}-, *cis*-CR^{L1b}=CR^{L1b}-, -C≡C-, -S(=O)₂O-, -OS(=O)₂-, -S(=O)₂NR^{L1a}-, o -NR^{L1a}S(=O)₂-, donde R^{L1a} es hidrógeno, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido o un grupo protector de nitrógeno, o R^{L1a} está unido con el átomo de carbono adyacente para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido, y en donde cada aparición de R^{L1b} se selecciona independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, halógeno, alquilo C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido, o R^{L1b} se une con el átomo de carbono o nitrógeno u oxígeno adyacente para formar un anillo carbocíclico o heterocíclico opcionalmente sustituido, o dos grupos R^{L1b} se unen para formar un anillo carbocíclico opcionalmente sustituido o heterocíclico opcionalmente sustituido; y L² es una fracción derivada de un reactivo de reticulación capaz de reticular el portador y L¹.

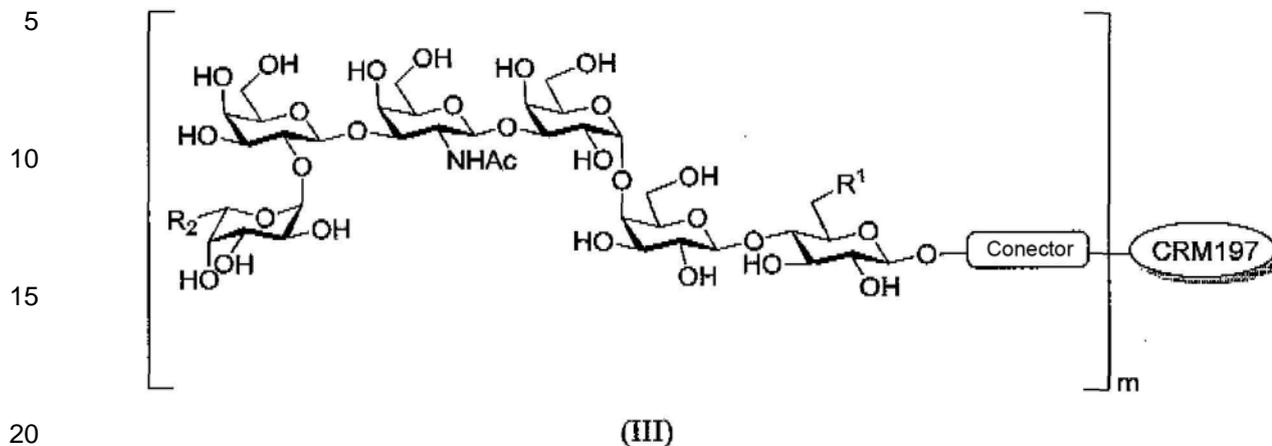
En otro ejemplo de la divulgación, el conector comprende por lo menos un átomo de azufre, grupo carboxilato, grupo amida, grupo carbamato, grupo carbonato, grupo tiocarbamato, grupo tiocarbonato, grupo tioéter, grupo succinamida, grupo n-hidroxisuccinamida o cualquier combinación de los mismos.

En otro ejemplo de la divulgación, el portador es una proteína, un lípido, una proteína lipolizada, un virus, un péptido o un dendrímero de glicopéptidos. En ciertos ejemplos de la divulgación, el portador es un péptido que comprende un epítipo de células T.

60 El portador puede ser una proteína seleccionada del grupo que consiste de toxoide tetánico (TT), toxoide diftérico (DT), material de reacción cruzada de toxina diftérica 197 (CRM197), fragmento C de TT, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA), proteína D, proteína de membrana externa (OMP) y neumolisina.

65

En otro ejemplo de la divulgación, la proteína portadora se selecciona del grupo que consiste de TT, DT y CRM197. En otro ejemplo de la divulgación, la proteína portadora es CRM197, y el conjugado de glicanos es de fórmula (III):



en donde
m es un número entero de 1 a 38.

25 El término "m" representa un número entero de 1 a 38. En un ejemplo de la divulgación, m es un número entero de 1 a 30, o de 1 a 20. Por ejemplo, m puede ser 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30 o 38.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a una mezcla de conjugado de glicanos que comprende por lo menos dos de los conjugados de glicanos como se describe en la presente. En ciertos ejemplos de la divulgación, el valor medio de w en la mezcla de glicanos puede variar de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 38,0, o de aproximadamente 1,0 a 10,0, o puede ser aproximadamente 5,7, 4,9, 2,9, 2,8 o 3,1.

35 Las composiciones inmunogénicas comprenden un adyuvante. El adyuvante puede ser un glicolípido capaz de unirse a una molécula de CD1d en una célula dendrítica. En ciertas realizaciones, el adyuvante es sal de aluminio, escualeno, MF59 o QS-21.

La composición inmunogénica comprende una cantidad inmunogénica o farmacéuticamente eficaz del conjugado de glicanos como se ha mencionado anteriormente.

40 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica para su uso en la provocación de una respuesta inmune contra el cáncer en un sujeto. El cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste de cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer oral, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de vías biliares, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de hueso, cáncer de piel, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario y cáncer de próstata. Alternativamente, la invención se refiere al uso de una composición inmunogénica como se ha mencionado anteriormente en la fabricación de un medicamento para tratar a un paciente con cáncer para inducir la citotoxicidad de las células cancerosas, provocar una respuesta inmune contra el cáncer, generar anticuerpos que se unan específicamente y/o neutralicen uno o más antígenos de superficie de células cancerosas seleccionados del grupo que consiste de Globo H, SSEA-3 y SSEA-4.

50 En un ejemplo de la divulgación, los anticuerpos son predominantemente anticuerpos IgG. La composición inmunogénica puede usarse para inducir principalmente IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3.

Además, en otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal generado contra la composición inmunogénica descrita en la presente.

55 En otro aspecto, la invención se refiere a una vacuna contra el cáncer que comprende una composición inmunogénica como se ha mencionado anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable. La vacuna contra el cáncer puede comprender una dosis única o múltiples dosis de conjugados de glicanos de la invención, una mezcla de conjugados de glicanos de los mismos o composiciones inmunogénicas de los mismos. Las vacunas contra el cáncer se usan para tratar o reducir el riesgo de cáncer. Las vacunas contra el cáncer pueden comprender información de envase que describe el uso o información de prescripción para el sujeto o un profesional de la salud. Dicha información puede ser requerida por una agencia reguladora como la U.S. Food and Drug Administration.

65 (FDA). La vacuna contra el cáncer también puede incluir opcionalmente un dispositivo para la administración del compuesto o composición, por ejemplo, una jeringuilla para administración parenteral.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a métodos para tratar y/o reducir el riesgo de cáncer en un sujeto que comprenden administrar a un sujeto con necesidad de ello una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inmunogénica o una vacuna contra el cáncer como se ha mencionado anteriormente.

El tratamiento da como resultado la reducción del tamaño del tumor, la eliminación de células malignas, la prevención de la metástasis, la prevención de la recaída, la reducción o muerte de cáncer diseminado, la prolongación de la supervivencia y/o la prolongación del tiempo hasta la progresión del cáncer tumoral.

El tratamiento puede comprender además administrar una terapia adicional a dicho sujeto antes de, durante o después de dicha administración de la composición inmunogénica o la vacuna contra el cáncer como se ha mencionado anteriormente. La terapia adicional puede usar un agente quimioterapéutico o una radioterapia.

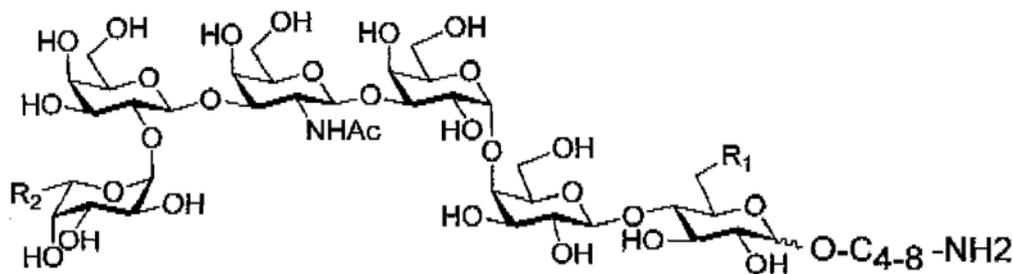
En otro aspecto, la invención se refiere a un método para vacunar a un mamífero como un paciente humano contra cánceres, que comprende administrar al mamífero una cantidad farmacológicamente eficaz de una composición inmunogénica o una vacuna contra el cáncer como se describe en la presente. La composición inmunogénica o la vacuna contra el cáncer mencionada anteriormente puede administrarse por vía subcutánea.

El cáncer incluye, pero no está limitado a, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer oral, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de vías biliares, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario y cáncer de próstata.

En otro aspecto, la invención se refiere a métodos para sintetizar glicanos como se ha mencionado anteriormente.

En otro aspecto, la invención se refiere a un proceso para elaborar una composición inmunogénica o una vacuna contra el cáncer como se ha mencionado anteriormente. En un ejemplo de la divulgación, un proceso de preparación de la composición inmunogénica como se ha mencionado anteriormente comprende los siguientes pasos:

(i) proporcionar un compuesto de fórmula (X):



Formula (X)

en donde R¹ y R² son como se han definido anteriormente en la Fórmula (II);

(ii) hacer reaccionar el compuesto de Fórmula (X) con un conector bifuncional aminoactivo para proporcionar un primer producto de reacción; y

(iii) hacer reaccionar el primer producto de reacción con una proteína portadora para proporcionar un conjugado de glicanos; y

(iv) mezclar un adyuvante para proporcionar la composición.

En un ejemplo de la divulgación, el conector bifuncional aminoactivo es un ácido dicarboxílico que tiene de 4 a 6 carbonos.

Los detalles de ciertos ejemplos de la divulgación se exponen en la presente. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada, las figuras, los ejemplos y las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las FIG. 1A-C son gráficos que muestran el anticuerpo IgG provocado por conjugados DT de derivados de GH contra GH, Gb5 y SSEA4, respectivamente.

La FIG. 2 muestra que los anticuerpos de ratón inducidos por conjugados DT de derivados de GH reconocen

células tumorales que expresan GH (MCF-7).

La FIG. 3 muestra que los anticuerpos provocados por los derivados de GH median la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) para eliminar las células tumorales que expresan GH.

5 DEFINICIONES

Definiciones químicas

Los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75ª Ed., cubierta interior, y los grupos funcionales específicos se definen generalmente como se describe en el mismo. Además, los principios generales de la química orgánica y las fracciones funcionales específicas y la reactividad se describen en Thomas Sorrell, Organic Chemistry, University Science Books, Sausalito, 1999; Smith y March, March's Advanced Organic Chemistry, 5ª Edición, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2001; Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Inc., Nueva York, 1989; y Carruthers, Some Modern Methods of Organic Synthesis, 3ª Edición, Cambridge University Press, Cambridge, 1987.

Los compuestos descritos en la presente pueden comprender uno o más centros asimétricos y, por tanto, pueden existir en varias formas isoméricas, por ejemplo, enantiómeros y/o diastereómeros. Por ejemplo, los compuestos descritos en la presente pueden estar en forma de un enantiómero, diastereoisómero o isómero geométrico individual, o pueden estar en forma de una mezcla de estereoisómeros, incluyendo mezclas racémicas y mezclas enriquecidas en uno o más estereoisómeros. Los isómeros pueden aislarse de mezclas mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo cromatografía líquida de alta presión (HPLC) quiral y la formación y cristalización de sales quirales; o los isómeros preferidos pueden prepararse mediante síntesis asimétrica. Ver, por ejemplo, Jacques et al., Enantiomers, Racemates and Resolutions (Wiley Interscience, Nueva York, 1981); Wilen et al., Tetrahedron 33:2725 (1977); Eliel, Stereochemistry of Carbon Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962); y Wilen, Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions, pág. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. De Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972). La invención comprende adicionalmente compuestos descritos en la presente como isómeros individuales sustancialmente libres de otros isómeros y, alternativamente, como mezclas de varios isómeros.

Quando se enumera un intervalo de valores, se pretende que abarque cada valor y subintervalo dentro del intervalo. Por ejemplo, "C₁₋₆" se pretende que abarque C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₁₋₆, C₁₋₅, C₁₋₄, C₁₋₃, C₁₋₂, C₂₋₆, C₂₋₅, C₂₋₄, C₂₋₃, C₃₋₆, C₃₋₅, C₃₋₄, C₄₋₆, C₄₋₅, y C₅₋₆.

"Alquilo" se refiere a un radical de un grupo hidrocarbonado saturado de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 20 átomos de carbono ("alquilo C₁₋₂₀"). En algunos ejemplos de la divulgación, un grupo alquilo tiene de 1 a 10 ("alquilo C₁₋₁₀"), de 1 a 9 ("alquilo C₁₋₉"), de 1 a 8 ("alquilo C₁₋₈"), de 1 a 7 ("alquilo C₁₋₇"), de 1 a 6 ("alquilo C₁₋₆"), de 1 a 5 ("alquilo C₁₋₅"), de 1 a 4 ("alquilo C₁₋₄"), de 1 a 3 ("alquilo C₁₋₃"), de 1 a 2 ("alquilo C₁₋₂") átomos de carbón. El grupo alquilo también puede referirse a 1 átomo de carbono ("alquilo C₁").

En algunos ejemplos de la divulgación, un grupo alquilo tiene de 2 a 6 átomos de carbono ("alquilo C₂₋₆"). Ejemplos de grupos alquilo C₁₋₆ son metilo (C₁), etilo (C₂), *n*-propilo (C₃), *iso*-propilo (C₃), *n*-butilo (C₄), *terc*-butilo (C₄), *sec*-butilo (C₄), *iso*-butilo (C₄), *n*-pentilo (C₅), 3-pentanilo (C₅), amilo (C₅), neopentilo (C₅), 3-metil-2-butanilo (C₅), amilo terciario (C₅), *n*-hexilo (C₆), *n*-heptilo (C₇), *n*-octilo (C₈) y similares. A menos que se especifique lo contrario, cada caso de un grupo alquilo está independientemente opcionalmente sustituido, es decir, no sustituido (un "alquilo no sustituido") o sustituido (un "alquilo sustituido") con uno o más sustituyentes. En ciertos ejemplos de la divulgación, el grupo alquilo es alquilo C₁₋₁₀ no sustituido (por ejemplo, -CH₃). En ciertos ejemplos de la divulgación, el grupo alquilo es alquilo C₁₋₁₀ sustituido.

"Alquenilo" se refiere a un radical de un grupo hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que tiene de 2 a 20 átomos de carbono, uno o más enlaces dobles carbono-carbono y ningún enlace triple ("alquenilo C₂₋₂₀"). Un grupo alquenilo puede tener de 2 a 10 ("alquenilo C₂₋₁₀"), de 2 a 9 ("alquenilo C₂₋₉"), de 2 a 8 ("alquenilo C₂₋₈"), de 2 a 7 ("alquenilo C₂₋₇"), de 2 a 6 ("alquenilo C₂₋₆"), de 2 a 5 ("alquenilo C₂₋₅"), de 2 a 4 ("alquenilo C₂₋₄"), de 2 a 3 ("alquenilo C₂₋₃"), o 2 átomos de carbono ("alquenilo C₂"). El uno o más enlaces dobles carbono-carbono pueden ser internos (como en 2-butenilo) o terminales (como en 1-butenilo). Ejemplos de grupos alquenilo C₂₋₄ son etenilo (C₂), 1-propenilo (C₃), 2-propenilo (C₃), 1-butenilo (C₄), 2-butenilo (C₄), butadienilo (C₄), y similares. Ejemplos de grupos alquenilo C₂₋₆ incluyen alquenilo C₂₋₄, pentenilo (C₅), pentadienilo (C₅), hexenilo (C₆), heptenilo (C₇), octenilo (C₈), octatrienilo (C₈), y similares. A menos que se especifique lo contrario, cada caso de un grupo alquenilo está opcionalmente sustituido de forma independiente, es decir, no sustituido (un "alquenilo no sustituido") o sustituido (un "alquenilo sustituido") con uno o más sustituyentes. Por ejemplo, el grupo alquenilo puede ser alquenilo C₂₋₁₀ no sustituido o alquenilo C₂₋₁₀ sustituido.

"Alquinilo" se refiere a un radical de un grupo hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que tiene de 2 a 20 átomos de carbono, uno o más enlaces triples carbono-carbono y opcionalmente uno o más enlaces dobles

5 ("alquinilo C₂₋₂₀"). En algunos ejemplos de la divulgación, un grupo alquinilo tiene de 2 a 10 ("alquinilo C₂₋₁₀"), de 2 a 9 ("alquinilo C₂₋₉"), de 2 a 8 ("alquinilo C₂₋₈"), de 2 a 7 ("alquinilo C₂₋₇"), de 2 a 6 ("alquinilo C₂₋₆"), de 2 a 5 ("alquinilo C₂₋₅"), de 2 a 4 ("alquinilo C₂₋₄"), de 2 a 3 ("alquinilo C₂₋₃") o 2 átomos de carbono ("alquinilo C₂"). El uno o más enlaces triples carbono-carbono pueden ser internos (como en 2-butinilo) o terminales (como en 1-butinilo). Ejemplos de grupos alquinilo C₂₋₄ incluyen, sin limitación, etinilo (C₂), 1-propinilo (C₃), 2-propinilo (C₃), 1-butinilo (C₄), 2-butinilo (C₄), y similares. Ejemplos de grupos alquenilo C₂₋₆ incluyen los grupos alquinilo C₂₋₄ anteriormente mencionados, pentinilo (C₅), hexinilo (C₆), heptinilo (C₇), octinilo (C₈), y similares. A menos que se especifique lo contrario, cada caso de un grupo alquinilo está opcionalmente independientemente sustituido, es decir, no sustituido (un "alquinilo no sustituido") o sustituido (un "alquinilo sustituido") con uno o más sustituyentes. Por ejemplo, el grupo alquinilo puede ser alquinilo C₂₋₁₀ no sustituido o alquinilo C₂₋₁₀ sustituido.

15 "Heterociclilo" o "heterocíclico" se refiere a un radical de un sistema de anillo no aromático de 3 a 10 miembros que tiene átomos de carbono en el anillo y de 1 a 4 heteroátomos en el anillo, en donde cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno, azufre, boro, fósforo y silicio ("heterociclilo de 3-10 miembros"). En ciertos ejemplos de la divulgación, el heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, azufre y oxígeno. En los grupos heterociclilo que contienen uno o más átomos de nitrógeno, el punto de unión puede ser un átomo de carbono o nitrógeno, como lo permita la valencia. Un grupo heterociclilo puede ser monocíclico ("heterociclilo monocíclico") o un sistema de anillo fusionado, puenteado o espiro como un sistema bicíclico ("heterociclilo bicíclico"), y puede estar saturado o parcialmente insaturado. Los sistemas de anillos heterociclilo bicíclicos pueden incluir uno o más heteroátomos en uno o ambos anillos. "Heterociclilo" también incluye sistemas de anillo en donde el anillo heterocíclico está fusionado con uno o más grupos carbociclilo en donde el punto de unión está o en el anillo carbociclilo o en el heterocíclico, o sistemas de anillo en donde el anillo heterocíclico está fusionado con uno o más grupos arilo o heteroarilo, en donde el punto de unión está en el anillo heterocíclico y, en tales casos, el número de miembros del anillo continúa designando el número de miembros del anillo en el sistema de anillo heterocíclico. A menos que se especifique lo contrario, cada caso de heterociclilo está opcionalmente sustituido independientemente, es decir, no sustituido (un "heterociclilo no sustituido") o sustituido (un "heterociclilo sustituido") con uno o más sustituyentes. Por ejemplo, el grupo heterociclilo puede ser heterociclilo de 3-10 miembros no sustituido o heterociclilo de 3-10 miembros sustituido.

30 "Arilo" se refiere a un radical de un sistema de anillo aromático $4n + 2$ monocíclico o policíclico (por ejemplo, bicíclico o tricíclico) (por ejemplo, que tiene 6, 10 o 14 electrones π compartidos en una matriz cíclica) que tiene 6-14 anillos de carbono átomos y cero heteroátomos en el sistema de anillo aromático ("arilo C₆₋₁₄"). En algunos ejemplos de la divulgación, un grupo arilo tiene seis átomos de carbono en el anillo ("arilo C₆"; por ejemplo, fenilo), diez átomos de carbono en el anillo ("arilo C₁₀"; por ejemplo, naftilo como 1-naftilo y 2-naftilo), o catorce átomos de carbono en el anillo ("arilo C₁₄"; por ejemplo, antracilo). "Arilo" también incluye sistemas de anillo en donde el anillo de arilo está fusionado con uno

40 o más grupos carbociclilo o heterociclilo en donde el radical o punto de unión está en el anillo arilo y, en tales casos, el número de átomos de carbono continúa designando el número de átomos de carbono en el sistema de anillo arilo. A menos que se especifique lo contrario, cada caso de un grupo arilo está opcionalmente sustituido independientemente, es decir, no sustituido (un "arilo no sustituido") o sustituido (un "arilo sustituido") con uno o más sustituyentes. Por ejemplo, el grupo arilo puede ser arilo C₆₋₁₄ no sustituido o arilo C₆₋₁₄ sustituido.

45 Los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo, como se definen en la presente, que son grupos puente divalentes, son referidos usando el sufijo -eno, por ejemplo, alquileno, alquenileno, alquinileno, carbociclileno, heterociclileno, arileno, y heteroarileno.

50 El término "alcoxi" o "alquiloxi" se refiere a un radical -O-alquilo, en donde el alquilo es alquilo opcionalmente sustituido. Los ejemplos de alcoxi incluyen, pero no están limitados a, metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, iso-butoxi, sec-butoxi y terc-butoxi.

El término "ariloxi" se refiere a un -O-arilo, en donde el arilo es arilo opcionalmente sustituido.

55 Como se usa en la presente, el término "opcionalmente sustituido" se refiere a una fracción sustituida o no sustituida.

60 Los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo, como se definen en la presente, están opcionalmente sustituidos (por ejemplo, grupo alquilo "sustituido" o "no sustituido", alquenilo "sustituido" o "no sustituido", alquinilo "sustituido" o "no sustituido", carbociclilo "sustituido" o "no sustituido", heterociclilo "sustituido" o "no sustituido", arilo "sustituido" o "no sustituido" o heteroarilo "sustituido" o "no sustituido"). En general, el término "sustituido", ya sea precedido por el término "opcionalmente" o no, significa que por lo menos un hidrógeno presente en un grupo (por ejemplo, un átomo de carbono o nitrógeno) está reemplazado con un sustituyente permitido, por ejemplo, un sustituyente que tras su sustitución da como resultado un compuesto estable, por ejemplo, un compuesto que no sufre una transformación espontánea como por reordenamiento, ciclación, eliminación u otra reacción. A menos que se indique lo contrario, un grupo "sustituido" tiene un sustituyente

en una o más posiciones sustituibles del grupo, y cuando se sustituye más de una posición en cualquier estructura dada, el sustituyente es el mismo o diferente en cada posición. Se contempla que el término "sustituido" incluya la sustitución con todos los sustituyentes permitidos de compuestos orgánicos, cualquiera de los sustituyentes descritos en la presente que dé como resultado la formación de un compuesto estable. La presente invención contempla todas y cada una de estas combinaciones para llegar a un compuesto estable. Para los propósitos de esta invención, los heteroátomos como el nitrógeno pueden tener sustituyentes de hidrógeno y/o cualquier sustituyente adecuado como se describe en la presente que satisfaga las valencias de los heteroátomos y de como resultado la formación de una fracción estable.

10 "Halo" o "halógeno" se refiere a flúor (flúor, -F), cloro (cloro, -Cl), bromo (bromo, -Br) o yodo (yodo, -I).

"Acilo" se refiere a una fracción seleccionada del grupo que consiste de -C(=O)R^{aa}, -CHO, -CO₂R^{aa}, -C(O)N(R^{bb})₂, -C(=NR^{bb})R^{aa}, -C(=NR^{bb})O^{aa}, -C(=NR^{bb})N(R^{bb})₂, -C(=O)NR^{bb}SO₂R^{aa}, -C(=S)N(R^{bb})₂, -C(=O)SR^{aa}, y -C(=S)SR^{aa}, en donde R^{aa} y R^{bb} son como se definen en la presente.

15 Los átomos de nitrógeno pueden estar sustituidos o no sustituidos según lo permita la valencia, e incluyen átomos de nitrógeno primarios, secundarios, terciarios y cuaternarios. Ejemplos de sustituyentes de átomos de nitrógeno incluyen, pero no están limitados a, hidrógeno, -OH, -OR^{aa}, -N(R^{cc})₂, -CN, -C(=O)R^{aa}, -C(=O)N(R^{cc})₂, -CO₂R^{aa}, -SO₂R^{aa}, -C(=NR^{bb})R^{aa}, -C(=NR^{cc})O^{aa}, -C(=NR^{cc})N(R^{cc})₂, -SO₂N(R^{cc})₂, -SO₂R^{cc}, -SO₂OR^{cc}, -SOR^{aa}, -C(=S)N(R^{cc})₂, -C(=O)SR^{cc}, -C(=S)SR^{cc}, -P(=O)₂R^{aa}, -P(=O)(R^{aa})₂, -P(=O)₂N(R^{cc})₂, -P(=O)(NR^{cc})₂, alquilo C₁₋₁₀, perhaloalquilo C₁₋₁₀, alquenilo C₂₋₁₀, alquinilo C₂₋₁₀, carbociclilo C₃₋₁₀, heterociclilo de 3-14 miembros, Arilo C₆₋₁₄ y heteroarilo de miembros 5-14 miembros, o dos grupos R^{cc} unidos a un átomo de nitrógeno se unen para formar un anillo de heterociclilo de 3-14 miembros o heteroarilo de 5-14 miembros, donde cada alquilo, alquenilo, alquinilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo está sustituido independientemente con 0, 1, 2, 3, 4, o 5 grupos R^{dd}, y en donde R^{aa}, R^{bb}, R^{cc}, y R^{dd} son como se han definido anteriormente.

25 En ciertos ejemplos de la divulgación, el sustituyente presente en un átomo de oxígeno es un grupo protector de oxígeno (también referido como grupo protector de hidroxilo). Los grupos protectores de oxígeno incluyen, pero no están limitados a, -R^{aa}, -N(R^{bb})₂, -C(=O)SR^{aa}, -C(=O)R^{aa}, -CO₂R^{aa}, -C(=O)N(R^{bb})₂, -C(=NR^{bb})R^{aa}, -C(=NR^{bb})O^{aa}, -C(=NR^{bb})N(R^{bb})₂, -S(=O)R^{aa}, -SO₂R^{aa}, -Si(R^{aa})₃, -P(R^{cc})₂, -P(R^{cc})₃, -P(=O)₂R^{aa}, -P(=O)(R^{aa})₂, -P(=O)(OR^{cc})₂, -P(=O)₂N(R^{bb})₂, y -P(=O)(NR^{bb})₂, en donde R^{aa}, R^{bb}, y R^{cc} son como se definen en la presente. Los grupos protectores de oxígeno son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Protecting Groups in Organic Synthesis, T.W. Greene y P.G.M. Wuts, 3^a edición, John Wiley & Sons, 1999.

35 Los grupos protectores de oxígeno ejemplares incluyen, pero no están limitados a, metilo, metoximetilo (MOM), metiltiometilo (MTM), *t*-butilblometilo, (fenildimetilsilil)metoximetilo (SMOM), benciloximetilo (BOM), *p*-metoxi-benciloximetilo (PMBM), (4-metoxifenoxi)metil (*p*-AOM), guaiacolmetilo (GUM), *t*-butoximetilo, 4-penteniloximetilo (POM), siloximetilo, 2-metoxietoximetilo (MEM), 2,2,2-tricloroetoximetilo, bis(2-cloroetoxi)metilo, 2-(trimetilsilil)etoximetilo (SEMOR), tetrahidropiranilo (THP), 3-bromotetrahidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, 1-metoxiciclohexilo, 4-metoxitetrahidropiranilo (MTHP), 4-metoxitetrahidrotiopiranilo, 4-metoxitetrahidrotiopiranil S,S-dióxido, 1-[(2-cloro-4-metil)fenil]-4-metoxipiperidin-4-ilo (CTMP), 1,4-dioxan-2-ilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofuranilo, 2,3,3a,4,5,6,7,7a-octahidro-7,8,8-trimetil-4,7-metanobenzofuran-2-ilo, 1-etoxietilo, 1-(2-cloroetoxi)etilo, 1-metil-1-metoxietilo, 1-metil-1-benciloxietilo, 1-metil-1-benciloxi-2-fluoroetilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2-trimetilsililetilo, 2-(fenilselenil)etilo, *t*-butilo, alilo, *p*-clorofenilo, *p*-metoxifenilo, 2,4-dinitrofenilo, bencilo (Bn), *p*-metoxibencilo, 3,4-dimetoxibencilo, *o*-nitrobencilo, *p*-nitrobencilo, *p*-halobencilo, 2,6-diclorobencilo, *p*-cianobencilo, *p*-fenilbencilo, 2-picolilo, 4-picolilo, 3-metil-2-picolil N-óxido, difenilmetilo, *p,p'*-dinitrobencilidrido, 5-dibenzosuberilo, trifenilmetilo, α -naftildifenilmetilo, *p*-metoxifenildifenilmetilo, di(*p*-metoxifenil)fenilmetilo, tri(*p*-metoxifenil)metilo, 4-(4'-bromofenaciloxifenil)difenilmetilo, 4,4',4"-tris(4,5-dicloroftalimidofenil)metilo, 4,4',4"-tris(levulinoiloxifenil)metilo, 4,4',4"-tris(benzoiloxifenil)metilo, 3-(imidazol-1-il)bis(4',4"-dimetoxifenil)metilo, 1,1-bis(4-metoxifenil)-1'-pirenilmetilo, 9-antrilo, 9-(9-fenil)xantenilo, 9-(9-fenil-10-oxo)antrilo, 1,3-benzodiazol-2-ilo, bencisotiazolil S,S-dióxido, trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES), triisopropilsililo (TIPS), dimetilsopropilsililo (IPDMS), dietilsopropilsililo (DEIPS), dimetilhexilsililo, *t*-butildimetilsililo (TBDMS), *t*-butildifenilsililo (TBDPS), tribencilsililo, tri-*p*-xililsililo, trifenilsililo, difenilmetilsililo (DPMS), *t*-butilmtoxifenilsililo (TBMPS), formiato, benzoilformiato, acetato, cloroacetato, dicloroacetato, tricloroacetato, trifluoroacetato, metoxiacetato, trifenilmetoxiacetato, fenoxiacetato, *p*-clorofenoxiacetato, 3-fenilpropionato, 4-oxopentanoato (levulinato), 4,4-(etilenditio)pentanoato (levulinoilditioacetal), pivaloato, adamantanoato, crotonato, 4-metoxicrotonato, benzoato, *p*-fenilbenzoato, 2,4,6-trimetilbenzoato (mesitoato), metilcarbonato, 9-fluorenilmetilcarbonato (Fmoc), etilcarbonato, 2,2,2-tricloroetilo carbonato (Troc), 2-(trimetilsilil)etil carbonato (TMSEC), 2-(fenilsulfonil)etil carbonato (Psec), 2-(trifenilfosfonio)etil carbonato (Peoc), isobutil carbonato, vinil carbonato, alil carbonato, *t*-butil carbonato (BOC), *p*-nitrofenil carbonato, bencil carbonato, *p*-metoxibencil carbonato, 3,4-dimetoxibencil carbonato, *o*-nitrobencil carbonato, *p*-nitrobencil carbonato, *S*-bencil tiocarbonato, 4-etoxi-1-naftil carbonato, metil ditiocarbonato, 2-yodobenzoato, 4-azidobutirato, 4-nitro-4-metilpentanoato, *o*-(dibromometil)benzoato, 2-formilbencenosulfonato, 2-(metiltiometoxi)etilo, 4-(metiltiometoxi)butirato, 2-(metiltiometoxiretil)benzoato, 2,6-dicloro-4-metilfenoxiacetato, 2,6-dicloro-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenoxiacetato, 2,4-bis(1,1-dimetilpropil)fenoxiacetato, clorodifenilacetato, isobutirato, monosuccinato, (*E*)-2-metil-2-butenato, *o*-(metoxiacil)benzoato, α -naftoato, nitrato, alquil *N,N,N'*-tetrametilfosforodiamidato, alquil *N*-fenilcarbarnato, borato,

dimetilfosfinitoilo, alquil 2,4-dinitrofenilsulfenato, sulfato, metanosulfonato (mesilsulfonato), y tosilato (Ts).

Otras definiciones

5 Las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Los términos "un" (o "uno"), "uno o más" y "por lo menos uno" pueden usarse indistintamente en la presente. Los términos "que comprende", "que incluye" y "que tiene" son intercambiables.

10 La puesta en práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que se encuentran dentro del conocimiento de la técnica. Estas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Ver, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª Ed., Ed. por Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); DNA Cloning, volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); Culture Of Animal Cells (R. L. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Volúmenes. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Antibodies: A Laboratory Manual, por Harlow and Lanés (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988); y Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986).

20 Como se usa en la presente, el término "glicano" se refiere a un polisacárido u oligosacárido. El glicano también se usa en la presente para referirse a la porción de carbohidrato de un glicoconjugado, como una glicoproteína, glicolípido, glicopéptido, glicoproteoma, peptidoglicano, lipopolisacárido o un proteoglicano. Los glicanos habitualmente consisten únicamente en enlaces O-glicosídicos entre monosacáridos. Por ejemplo, la celulosa es un glicano (o más específicamente un glucano) compuesto de D-glucosa β -1,4 enlazada, y la quitina es un glicano compuesto de N-acetil-D-glucosamina β -1,4 enlazada. Los glicanos pueden ser homo o heteropolímeros de residuos de monosacáridos y pueden ser lineales o ramificados. Los glicanos pueden encontrarse unidos a proteínas como en las glicoproteínas y proteoglicanos. Generalmente se encuentran en la superficie exterior de las células. Los glicanos O- y N-enlazados son muy comunes en eucariotas, pero también pueden encontrarse, aunque con menos frecuencia, en procariotas. Los glicanos N-enlazados se encuentran unidos al nitrógeno (N) del grupo R de la asparagina en el sequon. El sequon es una secuencia Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, donde X es cualquier aminoácido excepto pralina.

35 El término "antígeno" se define como cualquier sustancia capaz de provocar una respuesta inmune.

El término "inmunogenicidad" se refiere a la capacidad de un inmunógeno, antígeno o vacuna para estimular una respuesta inmune.

40 El término "CD1d" se refiere a un miembro de la familia de glicoproteínas CD1 (grupo de diferenciación 1) expresadas en la superficie de varias células presentadoras de antígenos humanos. CD1d presentó antígenos lipídicos que activan las células T asesinas naturales. CD1d tiene un surco profundo de unión al antígeno en el que se unen los antígenos glicolípidos. Las moléculas CD1d expresadas en células dendríticas pueden unirse y presentar glicolípidos, incluyendo los análogos de α -GalCer como C34.

45 El término "epítipo" se define como las partes de una molécula de antígeno que contactan con el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo o un receptor de células T.

50 El término "vacuna" se refiere a una preparación que contiene un antígeno, que consiste de organismos completos que provocan enfermedades (muertos o debilitados) o componentes de tales organismos, como proteínas, péptidos o polisacáridos, que se usa para conferir inmunidad contra la enfermedad que provocan los organismos. Las preparaciones de vacunas pueden ser naturales, sintéticas o derivadas mediante tecnología de ADN recombinante.

55 El término "específico de antígeno" se refiere a una propiedad de una población celular tal que la administración de un antígeno particular, o un fragmento del antígeno, da como resultado una proliferación celular específica.

60 El término "se une específicamente" se refiere a la interacción entre pares de unión (por ejemplo, un anticuerpo y un antígeno). En varios casos, la unión específica puede implementarse mediante una constante de afinidad de aproximadamente 10^{-6} moles/litro, aproximadamente 10^{-7} moles/litro o aproximadamente 10^{-8} moles/litro o menos.

65 El término "citometría de flujo" o "FACS" significa una técnica para examinar las propiedades físicas y químicas de partículas o células suspendidas en una corriente de fluido, a través de dispositivos de detección

ópticos y electrónicos.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente en la puesta en práctica o ensayo de la presente invención, se describen ahora los métodos y materiales preferidos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE EL INVENTO

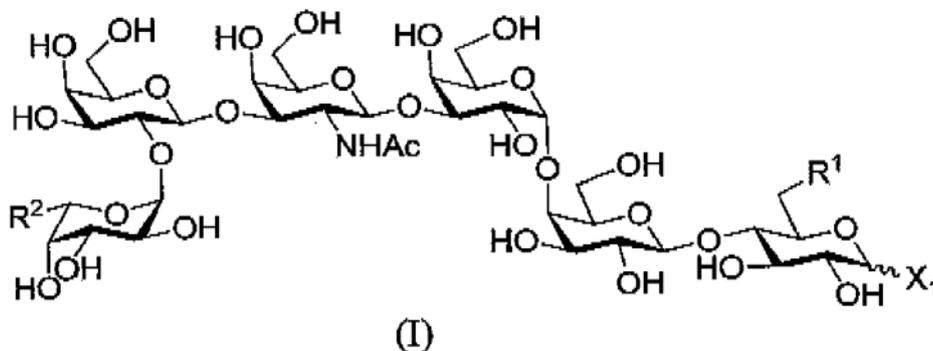
La presente invención se refiere al hallazgo sorprendente de que los antígenos derivados de Globo H modificados conjugados con el material de reacción cruzada del toxoide diftérico de la proteína portadora (CRM197), y combinados con un glicolípido C34 como adyuvante provocan una fuerte respuesta inmune IgG para reconocer específicamente a Globo H (GH), Gb5 y SSEA4. En algunos ejemplos de la divulgación, la modificación de Globo H comprende un grupo fluoro, azido u O-fenilo en la posición C-6 de la glucosa del extremo reductor de Globo H. En algunos ejemplos de la divulgación, la modificación de Globo H comprende un grupo azido en la posición C-6 de la fucosa del extremo no reductor. Los anticuerpos inducidos por estas vacunas demostraron reconocer las células tumorales que expresan GH (MCF-7) y median la citotoxicidad celular dependiente del complemento contra las células tumorales. La invención proporciona un nuevo enfoque para el desarrollo de vacunas contra el cáncer.

En la presente se describen derivados de Globo H, cada uno de los cuales tiene modificación en el extremo reductor y/o no reductor. Se descubrió inesperadamente que tales derivados de Globo H pueden provocar una respuesta inmune más fuerte (por ejemplo, inducción de anticuerpos IgG contra Globo H, Gb5 y SSEA4) en comparación con el Globo H nativo.

Compuestos

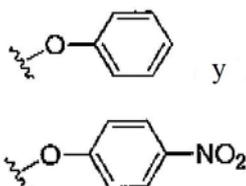
La presente invención presenta nuevos compuestos que tienen un antígeno de carbohidrato modificado (Globo H) y conjugados de glicano que lo comprenden, y composiciones inmunogénicas y vacunas de los mismos.

En un aspecto, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I):



o una sal del mismo, en el que:

X_1 es -OR o -SR, en donde R es $-(CH_2)_5NH_2$; y R^1 se selecciona del grupo que consiste de -F, $-N_3$, $-NO_2$,



, y R^5 es $-CH_3$; o R^1 es -OH, y R^2 se selecciona del grupo que consiste de $-CH_2F$, $-CH_2N_3$, $-CH_2OH$ y $-C\equiv CH$.

En un ejemplo de la divulgación, X₁ está en una configuración alfa. En otro ejemplo de la divulgación, X₁ está en una configuración beta.

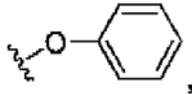
5 En otro ejemplo de la divulgación, R¹ es -OH. En una realización de la invención, R¹ es -OH y R² es -CH₂F, -CH₂N₃, -CH₂OH o -C≡CH.

En otro ejemplo de la divulgación, R¹ es -F y R² es -CH₃, o R¹ es -N₃ y R² es -CH₃, o R¹ es -NO₂ y R² es -CH₃.

10

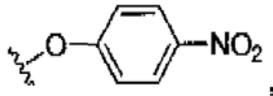
En otra realización de la invención, R¹ es

15



y R² es -CH₃, o R¹ es

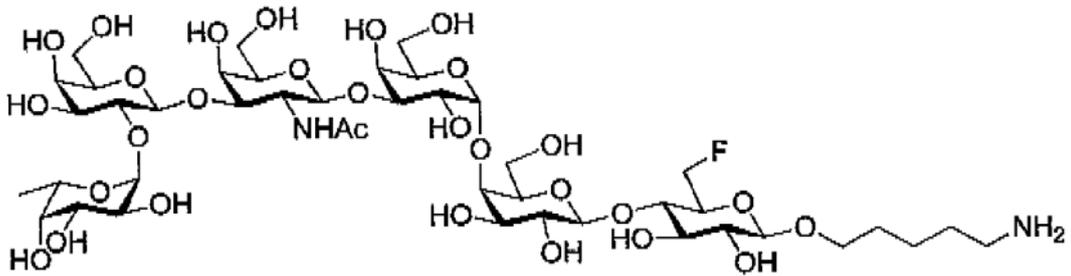
20



25 y R² es -CH₃.

Los ejemplos de compuestos de fórmula (I) incluyen, pero no están limitados a,

30



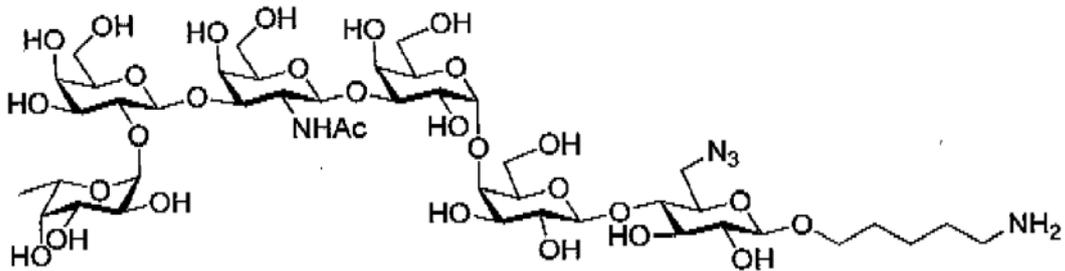
35

2

;

40

45



50

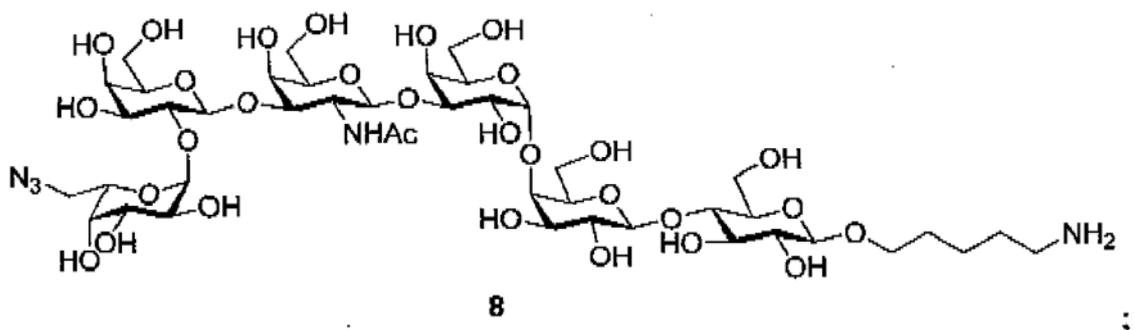
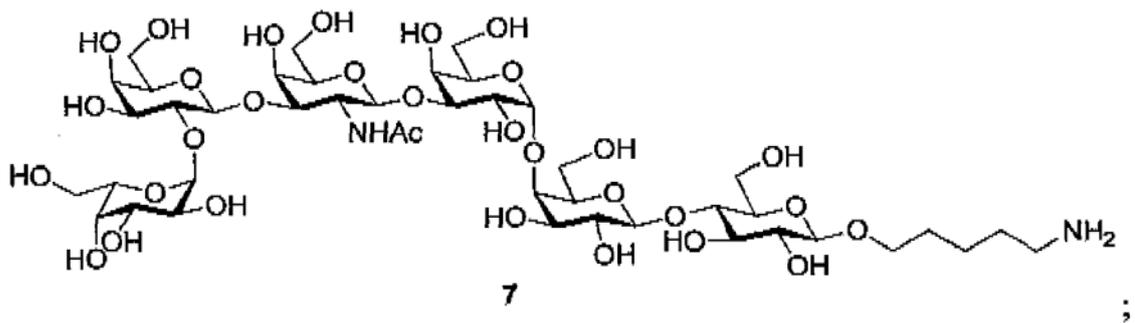
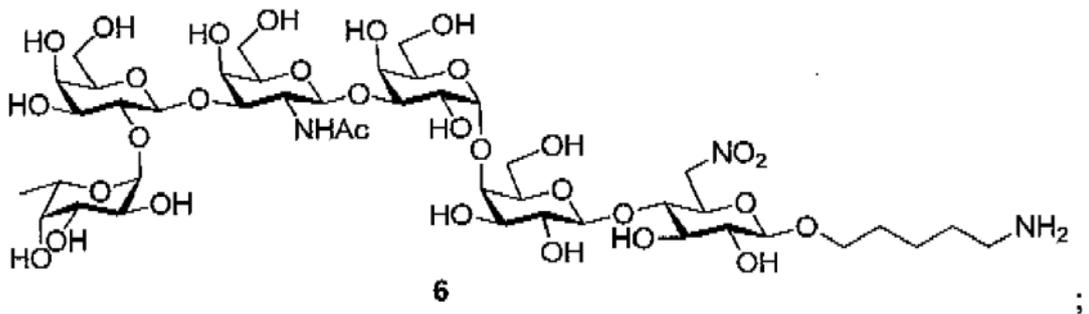
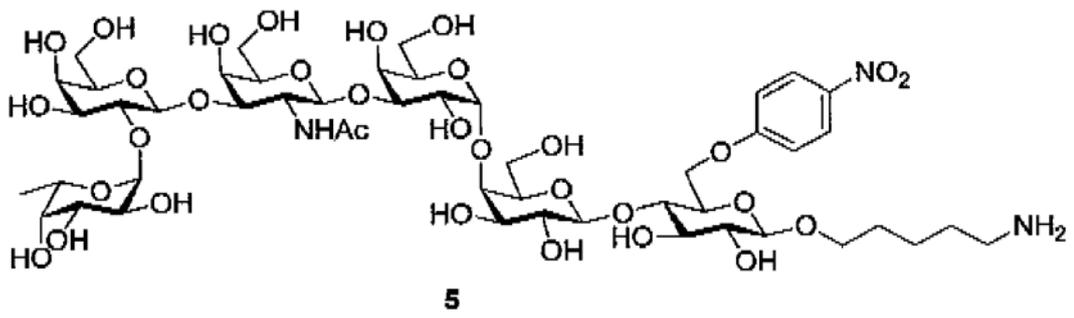
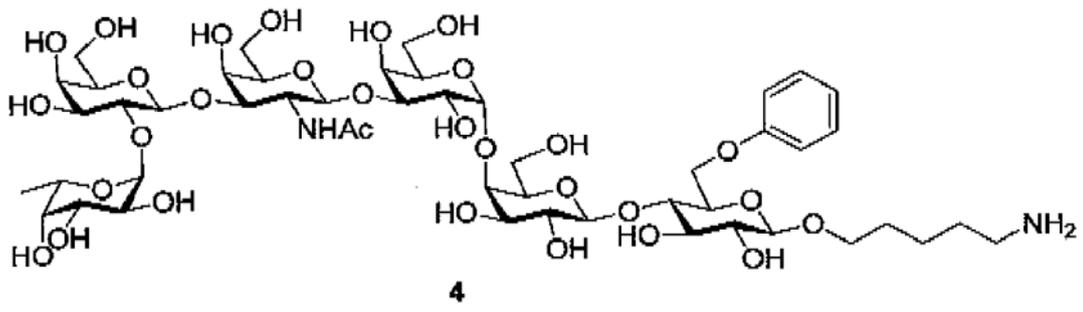
3

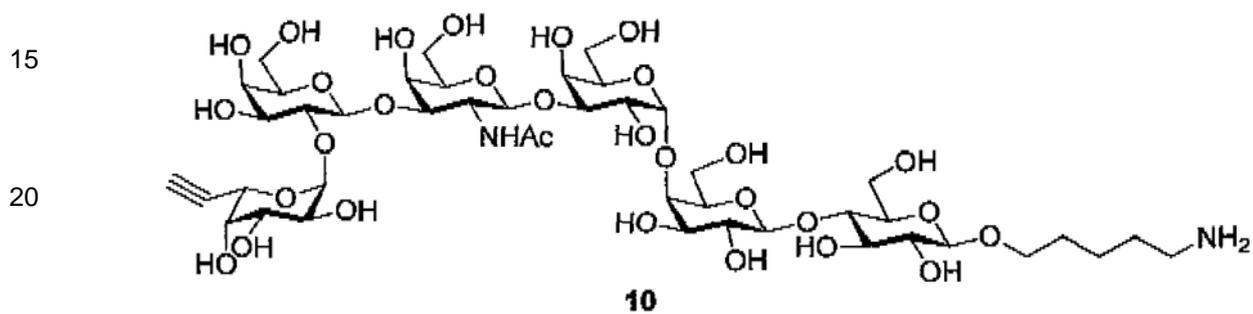
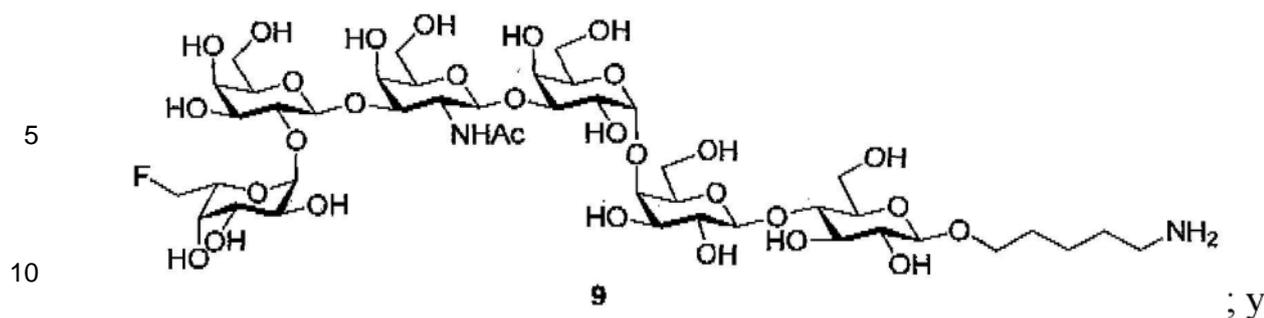
;

55

60

65

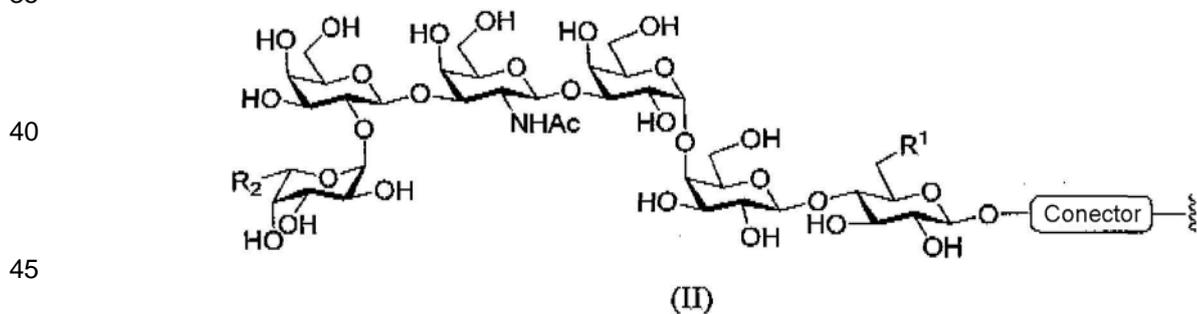




Los derivados de Globo H pueden sintetizarse usando procedimientos conocidos en la técnica o descritos en la presente. Ver también I aUS20140051127.

Composiciones inmunogénicas

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica, que comprende (a) un conjugado de glicanos que comprende por lo menos un glicano (es decir, uno o más glicanos) con un conector y un portador, el por lo menos un glicano estando conjugado con el portador a través del conector; y (b) un adyuvante, en donde el por lo menos un glicano con el conector tiene una estructura química de fórmula (II):



en donde R¹ y R² son como se han descrito anteriormente.

En un ejemplo de la divulgación, el conector es un conector hetero- u homo-bifuncional.

En otro ejemplo de la divulgación, el conector comprende por lo menos un átomo de azufre, grupo carboxilato, grupo amida, grupo carbamato, grupo carbonato, grupo tiocarbamato, grupo tiocarbonato, grupo tioéter, grupo succinamida, grupo n-hidroxisuccinamida o cualquier combinación de los mismos.

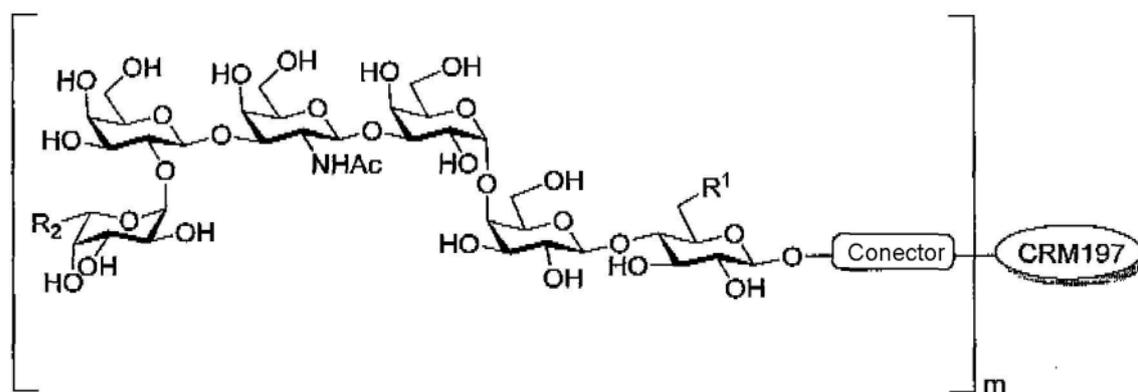
En otro ejemplo de la divulgación, el conector es -L¹-L²-, en donde L¹ es un enlace, -O-, -S-, -NR^{L1a}-, -C(=O)-, -NR^{L1a}C(=O)-, -NR^{L1a}C(=O)O-C(=O)NR^{L1a}-, -OC(=O)NR^{L1a}-, -SC(=O)-, -C(=O)S-, OC(=O)-, -C(=O)O-, -NR^{L1a}C(=S)-, -C(=S)NR^{L1a}-, *trans*-CR^{L1b}=CR^{L1b}-, *cis*-CR^{L1b}=CR^{L1b}-, -C≡C-, -OC(R^{L1b})₂-, -C(R^{L1b})₂O-, -NR^{L1a}C(R^{L1b})₂-, -C(R^{L1b})₂NR^{L1a}-, -SC(R^{L1b})₂-, -C(R^{L1b})₂S-, -S(=O)₂O-, -OS(=O)₂-S(=O)₂NR^{L1a}-, -NR^{L1a}S(=O)₂-, o una cadena hidrocarbonada C₁₋₂₀ opcionalmente sustituida, en donde opcionalmente una o más unidades de carbono de la cadena hidrocarbonada se reemplaza por -O-, -S-, -NR^{L1a}-, -C(=O)-, NR^{L1a}C(=O)-, -NR^{L1a}C(=O)O-, -C(=O)NR^{L1a}-, -OC(=O)NR^{L1a}-, -SC(=O)-, -C(=O)S-, -OC(O)-, -C(=O)O-, -NR^{L1a}C(=S)-, -C(=S)NR^{L1a}-, *trans*-CR^{L1b}=CR^{L1b}-, *cis*-CR^{L1b}=CR^{L1b}-, -C≡C-, -S(=O)₂O-, -OS(=O)₂-, -S(=O)₂NR^{L1a}-, o -NR^{L1a}S(=O)₂-, en donde R^{L1a} es hidrógeno, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido o un grupo protector de nitrógeno, o R^{L1a} está unido con el átomo de carbono adyacente para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido, y en donde cada aparición de R^{L1b} se selecciona

independientemente del grupo que consiste de hidrógeno, halógeno, alquilo C₁₋₁₀ opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y heteroarilo opcionalmente sustituido, o R^{L1b} se une con el átomo de carbono o nitrógeno u oxígeno adyacente para formar un anillo carbocíclico o heterocíclico opcionalmente sustituido, o dos grupos R^{L1b} se unen para formar un anillo carbocíclico opcionalmente sustituido o heterocíclico opcionalmente sustituido; y L² es una fracción derivada de un reactivo de reticulación capaz de reticular el portador y L¹.

El portador puede ser una proteína, un lípido, una proteína lipolizada, un virus, un péptido o un dendrímero de glicopéptidos. En ciertos ejemplos de la divulgación, el portador es un péptido que comprende un epítipo de células T.

Ejemplos de proteínas portadoras son toxoide tetánico (TT), toxoide diftérico (DT), material de reacción cruzada de toxina diftérica 197 (CRM197), fragmento C de TT, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA), proteína D, proteína de membrana externa (OMP) y neumolisina, material de reacción cruzada de toxina diftérica 197 (CRM197) u otros mutantes puntuales de DT como CRM176, CRM228, CRM 45 (Uchida et al J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 y CRM107 y otras mutaciones descritas en la técnica.

En otro ejemplo de la divulgación, el conjugado de glicano es de fórmula (IV-a) o (IV-b):



(III)

donde m es un número entero de 1 a 40.

En otro ejemplo de la divulgación, m es un número entero de 1 a 38, o de 1 a 20 inclusive. En otro ejemplo de la divulgación, m es 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30 o 38.

En otro aspecto, la invención se refiere a una mezcla de conjugados de glicanos que comprende por lo menos dos de los conjugados de glicanos mencionados anteriormente.

En otro ejemplo de la divulgación, el derivado de Globo H puede conjugarse con un portador a través de un conector para generar un conjugado de glicanos. Cada conjugado puede incluir una o más moléculas (por ejemplo, 1-40, 1-20, 1-25, 1-30, 5-20, 5-25, 5-30 o 5-35) del mismo derivado de Globo H o uno diferente. Los procedimientos para generar conjugados de glicanos se conocen en la técnica y se describen a continuación. Ver también Patente de Estados Unidos N° 8.268.969.

Las composiciones inmunogénicas descritas en la presente pueden comprender una cantidad inmunogénicamente eficaz de un conjugado de glicanos de la invención.

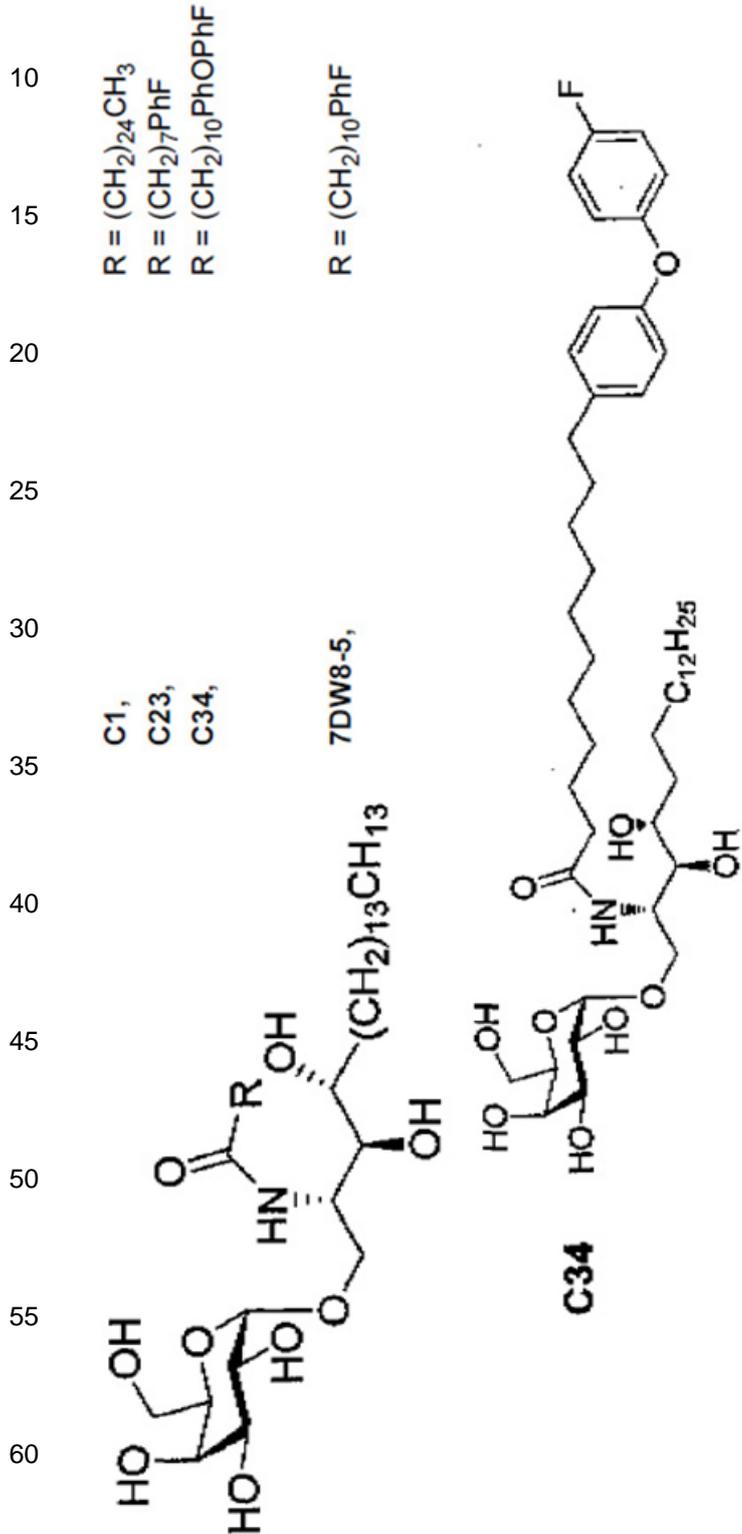
Los compuestos de la invención pueden sintetizarse usando procedimientos conocidos en la técnica o descritos en la presente. Ver también la US20140051127.

La composición inmunogénica de la invención puede comprender uno o más adyuvantes. En la técnica se conocen adyuvantes adecuados (por ejemplo, sal de aluminio, escualeno, MF59 y QS-21).

El término "adyuvante de alumbre" se refiere a una sal de aluminio con actividad adyuvante inmune. Este agente adsorbe y precipita antígenos proteicos en solución; el precipitado resultante mejora la inmunogenicidad de la vacuna facilitando la liberación lenta de antígeno del depósito de vacuna formado en el sitio de inoculación.

El término "adyuvante inmunológico" se refiere a una sustancia usada junto con un inmunógeno que potencia o modifica la respuesta inmune al inmunógeno. El término "glicolípido" se refiere a un lípido unido a carbohidratos que sirve como marcador para el reconocimiento celular.

5 Los glicolípidos C34, C23 y 7DW8-5 tienen las siguientes estructuras:



La composición inmunogénica puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las

composiciones inmunogénicas mencionadas anteriormente pueden comprender una cantidad farmacéuticamente eficaz de un conjugado de glicanos de la invención.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a una vacuna contra el cáncer que comprende una composición inmunogénica como se ha mencionado anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 Las vacunas contra el cáncer de la invención pueden incluir una única dosis o múltiples dosis de los conjugados de glicanos de la invención, una mezcla de conjugados de glicanos de los mismos, o composiciones inmunogénicas de los mismos. Puede usarse para tratar o reducir el riesgo de cáncer. También puede incluir información de envase que describa el uso o información de prescripción para el sujeto o un profesional del cuidado de la salud. Dicha información puede ser requerida por una agencia reguladora como la U.S. Food and Drug Administration (FDA). También puede incluir opcionalmente un dispositivo para la administración del compuesto o composición, por ejemplo, una jeringuilla para administración parenteral.

15 **Formulaciones farmacéuticas**

20 La composición inmunitaria se administra de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz, protectora e inmunogénica. La cantidad a administrar depende del sujeto a tratar, incluyendo, por ejemplo, la capacidad del sistema inmunológico del individuo de sintetizar anticuerpos y, si es necesario, de producir una respuesta inmune mediada por células. Las cantidades precisas de ingrediente activo requeridas para administrar dependen del criterio del practicante médico. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica. Los regímenes adecuados para la administración inicial y las dosis de refuerzo también son variables, pero pueden incluir una administración inicial seguida de administraciones posteriores. La dosificación de la vacuna también puede depender de la vía de administración y varía de acuerdo con el tamaño del huésped.

30 La composición inmunogénica de la invención también puede usarse para generar anticuerpos en animales para la producción de anticuerpos, que pueden usarse tanto en el tratamiento como en el diagnóstico del cáncer. Los métodos para elaborar anticuerpos monoclonales y policlonales y fragmentos de los mismos en animales (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, oveja o caballo) son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Harlow y Lane, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York. El término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina intactas, así como fragmentos de las mismas, como Fab, F(ab')₂, Fv, scFv (anticuerpo de cadena sencilla) y dAb (anticuerpo de dominio; Ward, et. Al. (1989) *Nature*, 341, 544).

35 Las composiciones divulgadas en la presente pueden incluirse en una composición farmacéutica junto con agentes activos, portadores, vehículos, excipientes o agentes auxiliares adicionales identificables por un experto en la técnica tras la lectura de la presente divulgación.

40 Las composiciones farmacéuticas comprenden preferiblemente por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable. En tales composiciones farmacéuticas, las composiciones divulgadas en la presente forman el "compuesto activo", también referido como "agente activo". Un portador farmacéuticamente aceptable incluye solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios a las composiciones. Una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con su vía de administración pretendida. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes como ácido etilendiaminotetraacético; tampones como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringuillas desechables o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.

55 **Aplicaciones clínicas**

60 La invención se refiere a conjugados de glicanos, composiciones inmunogénicas o vacunas útiles para el tratamiento de una enfermedad proliferativa como el cáncer (por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer de intestino grueso, cáncer de páncreas, cáncer de vías biliares o cáncer de endometrio), neoplasias benignas o angiogénesis en un sujeto.

65 Las composiciones inmunogénicas o vacunas de la invención también pueden usarse para generar anticuerpos en humanos o animales para la producción de anticuerpos, que pueden usarse tanto en el tratamiento como en el diagnóstico del cáncer. También pueden usarse para generar anticuerpos para la producción de

anticuerpos Globo H, SSEA-3 y/o SSEA-4. Los métodos para elaborar anticuerpos monoclonales y policlonales y fragmentos de los mismos en humanos y/o animales (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, oveja o caballo) son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Harlow y Lane, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York. El término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina intactas así como fragmentos de las mismas, como Fab, F(ab').sub.2, Fv, scFv (anticuerpo de cadena sencilla) y dAb (anticuerpo de dominio); Ward, et. al. (1989) *Nature*, 341, 544).

Los conjugados de glicanos, composiciones inmunogénicas o vacunas de la invención pueden usarse para tratar o diagnosticar cáncer, que incluye, pero no está limitado a, neuroma acústico, adenocarcinoma, cáncer de glándula suprarrenal, cáncer anal, angiosarcoma (por ejemplo, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, hemangiosarcoma), cáncer de apéndice, gammapatía monoclonal benigna, cáncer biliar (por ejemplo, colangiocarcinoma), cáncer de vejiga, cáncer de mama (por ejemplo, adenocarcinoma de mama, carcinoma papilar de mama, cáncer de mama, carcinoma medular de mama), cáncer de cerebro (por ejemplo, meningioma; glioma, por ejemplo, astrocitoma, oligodendroglioma; meduloblastoma), cáncer de bronquios, tumor carcinoide, cáncer de cuello uterino (por ejemplo, adenocarcinoma de cuello uterino), coriocarcinoma, cordoma, craneofaringioma, cáncer colorrectal (por ejemplo, cáncer de colon, cáncer rectal, adenocarcinoma colorrectal), carcinoma epitelial, ependimoma, endoteliosarcoma (por ejemplo, sarcoma de Kaposi, sarcoma hemorrágico idiopático múltiple), cáncer endometrial (por ejemplo, cáncer de útero, sarcoma de útero), cáncer de esófago (por ejemplo, adenocarcinoma de esófago, adenocarcinoma de Barrett), sarcoma de Ewing, cáncer de ojo (por ejemplo, melanoma intraocular, retinoblastoma), hipereosinofilia familiar, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (por ejemplo, adenocarcinoma de estómago), tumor del estroma gastrointestinal (GIST), cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer oral (por ejemplo, carcinoma oral de células escamosas (OSCC), cáncer de garganta (por ejemplo, cáncer de laringe, cáncer de faringe, cáncer de nasofaringe, cáncer de orofaringe)), cánceres hematopoyéticos (por ejemplo, leucemia como leucemia linfocítica aguda (ALL) (por ejemplo, ALL de células B, ALL de células T), leucemia mielocítica aguda (AML) (por ejemplo, AML de células B, AML de células T), leucemia mielocítica crónica (CML) (por ejemplo, CML de células B, CML de células T) y leucemia linfocítica crónica (CLL) (por ejemplo, CLL de células B, CLL de células T); linfoma como linfoma de Hodgkin (HL) (por ejemplo, HL de células B, HL de células T) y linfoma no de Hodgkin (NHL) (por ejemplo, NHL de células B como linfoma difuso de células grandes (DLCL) (por ejemplo, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL)), linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño (CLL/SLL), linfoma de células del manto (MCL), linfomas de células B de zona marginal (por ejemplo, linfomas de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), linfoma de células B de zona marginal nodal, linfoma de células B de zona marginal esplénica), linfoma de células B mediastínico primario, linfoma de Burkitt, linfoma linfoplasmocítico (es decir, "macroglubulinemia de Waldenström"), leucemia de células pilosas (HCL), linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico B precursor y linfoma primario del sistema nervioso central (CNS); y LNH de células T como linfoma/leucemia linfoblástica T precursora, linfoma periférico de células T (PTCL) (por ejemplo, linfoma cutáneo de células T (CTCL) (por ejemplo, micosis fungoides, síndrome de Sezary), linfoma angioinmunoblástico de células T, linfoma extraganglionar de células T asesinas naturales, linfoma de células T de tipo enteropatía, linfoma de células T tipo paniculitis subcutánea, linfoma anaplásico de células grandes); una mezcla de uno o más leucemia/linfoma como se ha descrito anteriormente; y mieloma múltiple (MM)), enfermedad de cadenas pesadas (por ejemplo, enfermedad de la cadena alfa, enfermedad de la cadena gamma, enfermedad de la cadena mu), hemangioblastoma, tumores miofibroblásticos inflamatorios, amiloidosis inmunocítica, cáncer de riñón (por ejemplo, nefroblastoma también conocido como tumor de Wilms, carcinoma de células renales), cáncer de hígado (por ejemplo, cáncer hepatocelular (HCC), hepatoma maligno), cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma broncogénico, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), adenocarcinoma de pulmón), leiomioma (LMS), mastocitosis (por ejemplo, mastocitosis sistémica), síndrome mielodisplásico (MDS), mesotelioma, trastorno mieloproliferativo (MPD) (por ejemplo, policitemia vera (PV), trombocitosis esencial (ET), metaplasia mieloides agnógena (AMM), también conocida como mielofibrosis (MF), mielofibrosis idiopática crónica, leucemia mielocítica crónica (CML), leucemia neutrofilica crónica (CNL), síndrome hipereosinofílico (HES)), neuroblastoma, neurofibroma (por ejemplo, neurofibromatosis (NF) tipo 1 o tipo 2, schwannomatosis), cáncer neuroendocrino (por ejemplo, tumor neuroendocrino gastroenteropancreático (GEP-NET), tumor carcinoide), osteosarcoma, cáncer de ovarios (por ejemplo, cistoadenocarcinoma, carcinoma embrionario de ovario, adenocarcinoma de ovario), adenocarcinoma papilar, cáncer de páncreas (por ejemplo, adenocarcinoma de páncreas, neoplasia mucinosa papilar intraductal (IPMN), tumores de células de los islotes), cáncer de pene (por ejemplo, enfermedad de Paget del pene y escroto), pinealoma, tumor neuroectodérmico primitivo (PNT), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata), cáncer de recto, rhabdomioma, cáncer de glándulas salivales, cáncer de piel (por ejemplo, carcinoma de células escamosas (SCC), queratoacantoma (KA), melanoma, carcinoma de células basales (BCC)), cáncer de intestino delgado (por ejemplo, cáncer de apéndice), sarcoma de tejido blando (por ejemplo, histiocitoma fibroso maligno (MFH), liposarcoma, tumor maligno de la vaina del nervio periférico (MPNST), condrosarcoma, fibrosarcoma, mixosarcoma), carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma de glándulas sudoríparas, sinovioma, cáncer de testículo (por ejemplo, seminoma, carcinoma embrionario testicular), cáncer de tiroides (por ejemplo, carcinoma papilar de tiroides, carcinoma papilar de tiroides (PTC), cáncer de tiroides medular), cáncer de uretra, cáncer de vagina y cáncer de vulva (por ejemplo, enfermedad de Paget de la vulva). En ciertos ejemplos de la divulgación, los conjugados de glicano, s las composiciones inmunogénicas o las vacunas proporcionados son útiles para tratar el cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer oral, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de vías

biliares, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de huesos, cáncer de piel, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario y cáncer de próstata.

5 Puede administrarse una cantidad eficaz de cualquiera de los conjugados de glicanos o de las composiciones inmunogénicas o vacunas de la invención a un sujeto con necesidad de tratamiento a través de una vía adecuada, como se ha mencionado anteriormente. El sujeto, como un humano, puede ser un paciente con cáncer, sospechoso de tener cáncer o susceptible de padecer cáncer. La cantidad eficaz puede ser eficaz para provocar respuestas inmunes específicas para la fracción de glicano en el conjugado o composición, o suficiente para provocar respuestas inmunes que lleven a la inhibición del crecimiento del cáncer y/o la reducción de la masa tumoral, o eficaz para retrasar la aparición del cáncer objetivo o reducir el riesgo de desarrollar el cáncer. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro dependiendo, por ejemplo, de la especie, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de los efectos secundarios o el trastorno, identidad de los compuestos particulares, el modo de administración y similares. La dosificación deseada puede administrarse tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, cada dos días, cada tres días, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas o cada cuatro semanas. Puede administrarse mediante múltiples administraciones (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o más administraciones).

20 Una cantidad eficaz de conjugados de glicanos, composiciones inmunogénicas o vacunas de la invención para un ser humano adulto de 70 kg puede comprender de aproximadamente 0,0001 mg a aproximadamente 3000 mg, de aproximadamente 0,0001 mg a aproximadamente 2000 mg, de aproximadamente 0,0001 mg a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1000 mg, o de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1000 mg, de un compuesto por forma de dosificación unitaria.

30 Los conjugados de glicanos, composiciones inmunogénicas o vacunas de la invención pueden administrarse por vía oral o parenteral a niveles de dosificación suficientes para administrar de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, y más preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal del sujeto por día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado.

35 Se apreciará que los intervalos de dosis como se describen en la presente proporcionan una guía para la administración de los conjugados de glicanos, composiciones inmunogénicas o vacunas de la invención a un adulto. La cantidad a administrar a un niño o adolescente puede ser determinada por un practicante médico o una persona experta en la técnica y puede ser menor o igual a la administrada a un adulto.

40 Los conjugados de glicanos, las composiciones inmunogénicas o las vacunas de la invención pueden administrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticamente activos adicionales. Pueden administrarse en combinación con agentes terapéuticamente activos adicionales que mejoran su biodisponibilidad, reducen y/o modifican su metabolismo, inhiben su excreción y/o modifican su distribución dentro del cuerpo. También se apreciará que la terapia empleada puede lograr un efecto deseado para el mismo trastorno y/o puede lograr efectos diferentes.

45 Los conjugados de glicanos, las composiciones inmunogénicas o las vacunas de la invención pueden administrarse concurrentemente con, antes o después de, uno o más agentes terapéuticamente activos adicionales. En general, cada agente se administrará a una dosis y/o en un horario determinado para ese agente. El agente terapéuticamente activo adicional utilizado en la combinación puede administrarse junto en una única composición o administrarse por separado en diferentes composiciones. La combinación particular a emplear en un régimen tendrá en cuenta la compatibilidad del compuesto de la invención con el agente terapéuticamente activo adicional y/o el efecto terapéutico deseado a lograr. Se espera que se utilicen agentes terapéuticamente activos adicionales en la terapia de combinación a niveles que no excedan los niveles a los que se utilizan individualmente. En algunos casos, los niveles utilizados en combinación pueden ser más bajos que los utilizados individualmente.

50 El conjugado de glicanos, la composición inmunogénica o la vacuna de la invención puede administrarse en combinación con uno o más agentes farmacéuticos adicionales como un agente contra el cáncer, que incluye un agente contra el cáncer bioterapéutico y agentes quimioterapéuticos.

60 Los agentes contra el cáncer bioterapéuticos incluyen, pero no están limitados a, interferones, citoquinas (por ejemplo, factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón γ), vacunas, factores de crecimiento hematopoyético, seroterapia monoclonal, inmunoestimulantes y/o agentes inmunomoduladores (por ejemplo, IL-1, 2, 4, 6 o 12), factores de crecimiento de células inmunitarias (por ejemplo, GM-CSF) y anticuerpos (por ejemplo, HERCEPTIN

65

(trastuzumab), T-DM1, AVASTIN (bevacizumab), ERBITUX (cetuximab), VECTIBIX (panitumumab), RITUXAN (rituximab), BEXXAR (tositumomab)).

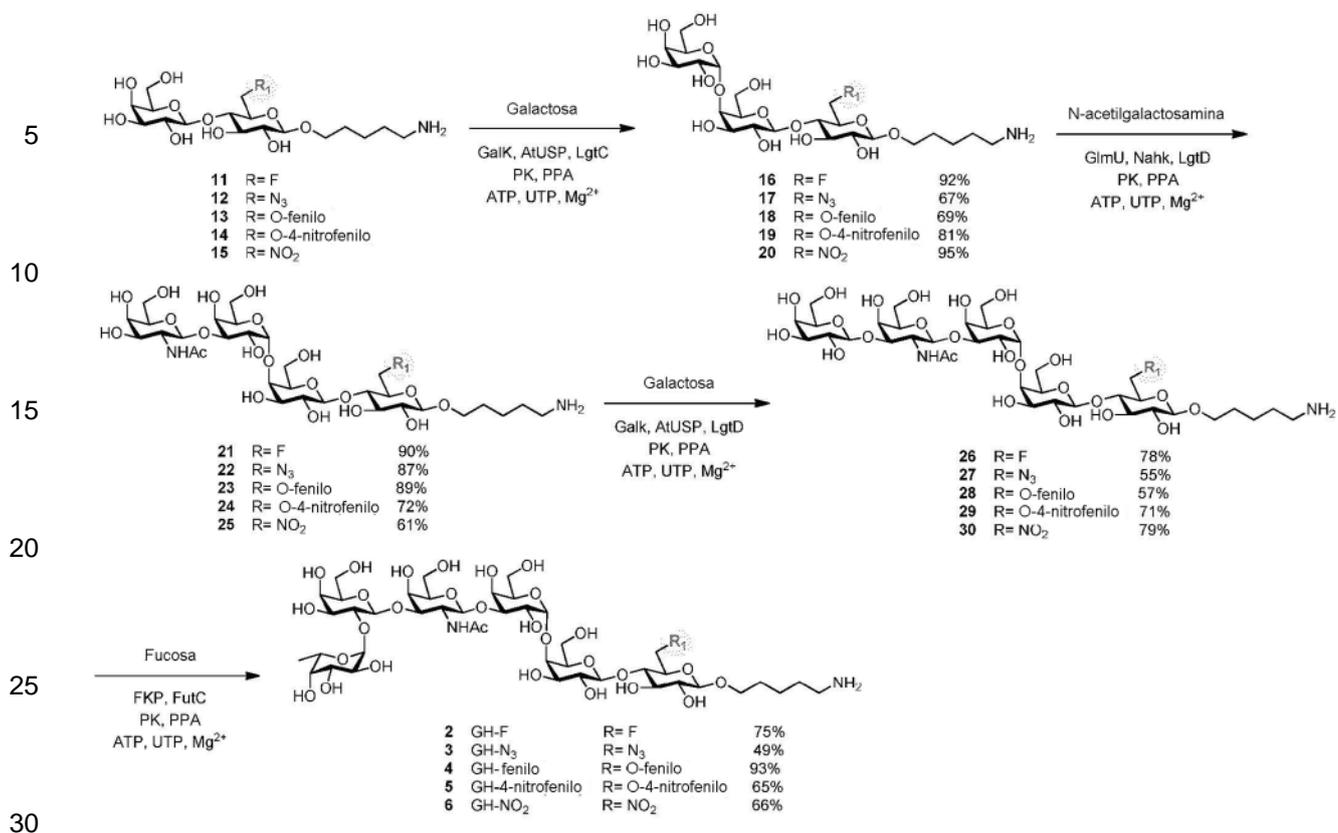
Los agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no están limitados a, antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno y megestrol), agonistas de LHRH (por ejemplo, goserclín y leuprolida), antiandrógenos (por ejemplo, flutamida y bicalutamida), terapias fotodinámicas (por ejemplo, vertoporfina (BPD-MA), ftalocianina, fotosensibilizador Pc4 y demetoxi-hipocrellina A (2BA-2-DMHA)), mostazas nitrogenadas (por ejemplo, ciclofosfamida, ifosfamida, trofosfamida, clorambucilo, estramustina y melfalán), nitrosoureas (por ejemplo, BCNU) y lomustina (CCNU)), alquilsulfonatos (por ejemplo, busulfán y treosulfán), triazenos (por ejemplo, dacarbazina, temozolomida), compuestos que contienen platino (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino), alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina), taxoides (por ejemplo, paclitaxel o un equivalente de paclitaxel como paclitaxel unido a nanopartículas de albúmina (Abraxane), paclitaxel unido a ácido docosahexaenoico (DHA-paclitaxel, Taxoprexin), paclitaxel unido a poliglutamato (PG-paclitaxel, paclitaxel poliglumex, CT-2103, XYOTAX), el profármaco activado por tumores (TAP) ANG1005 (Angiopep-2 unido a tres moléculas de paclitaxel), paclitaxel-EC-1 (paclitaxel unido al péptido EC-1 de reconocimiento de erbB2) y paclitaxel conjugado con glucosa, por ejemplo, 2'-paclitaxel metil 2-glucopiranosil succinato; docetaxel, taxol), epipodofilinas (por ejemplo, etopósido, etopósido fosfato, tenipósido, topotecán, 9-aminocamptotecina, camptoirinotecán, irinotecán, crisnatol, mitomicina C), antimetabolitos, inhibidores de la DHFR (por ejemplo, metotrexato, diclorometotrexato, trimetrexato, edatrexato), inhibidores de deshidrogenasa de IMP (por ejemplo, ácido micofenólico, tiazofurina, ribavirina, e ICAR), inhibidores de la ribonucleótido reductasa (por ejemplo, hidroxiurea y deferroxamina), análogos de uracilo (por ejemplo 5-fluorouracilo (5-FU), floxuridina, doxifluridina, ratitrexed, tegafur-uracilo, caperabicitabina), análogos de citosina (por ejemplo, citarabina (ara C), citosina arabinosida, y fludarabina), análogos de purina (por ejemplo, mercaptopurina y tioguanina), análogos de vitamina D3 (por ejemplo, EB 1089, CB 1093 y KH 1060), inhibidores de isoprenilación (por ejemplo, lovastatina), neurotoxinas dopaminérgicas (por ejemplo, lon 1-metil-4-fenilpiridinio), inhibidores del ciclo celular (por ejemplo, estaurosporina), actinomicina (por ejemplo, actinomicina D, dactinomicina), bleomicina (por ejemplo, bleomicina A2, bleomicina B2, peplomicina), antraciclina (por ejemplo, daunorrubicina, doxorrubicina, doxorrubicina liposinomal pegilada, idarrubicina, epirubicina, pirarubicina, zorrubicina, mitoxantrona), inhibidores de MDR (por ejemplo, verapamilo), inhibidores de Ca²⁺ ATPasa (por ejemplo, tapsigargina), imatinib, talidomida, lenalidomida, inhibidores de tirosina quinasa (por ejemplo, axitinib (AG013736), bosutinib (SKI-606), cediranib (RECENTIN™, AZD2171), dasatinib (SPRYCEL®, BMS-354825), erlotinib (TARCEVA®), gefitinib (IRESSA®), imatinib (Gleevec®, CGP57148B, STI-571), lapatinib (TYKERB®, TYVERB®), lestaurinib (CEP-701), neratinib (HKI-272), nilotinib (TASIGNA®), semaxanib (semaxinib, SU5416), sunitinib (SUTENT®, SU11248), toceranib (PALLADIA®), vandetanib (ZACTIMA®, ZD6474), vatalanib (PTK787, PTK/ZK), trastuzumab (HERCEPTIN®), bevacizumab (AVASTIN®), rituximab (RITUXAN®), cetuximab (ERBITUX®), panitumumab (VECTIBIX®), ranibizumab (Lucentis®), nilotinib (TASIGNA®), sorafenib (NEXAVAR®), everolimus (AFINITOR®), alemtuzumab (CAMPATH®), gemtuzumab ozogamicin (MYLOTARG®), temsirolimus (TORISEL®), ENMD-2076, PCI-32765, AC220, lactato de dovitinib (TKI258, CHIR-258), BIBW 2992 (TOVOK™), SGX523, PF-04217903, PF-02341066, PF-299804, BMS-777607, ABT-869, MP470, BIBF 1120 (VARGATEF®), AP24534, JNJ-26483327, MGCD265, DCC-2036, BMS-690154, CEP-11981, tivozanib (AV-951), OSI-930, MM-121, XL-184, XL-647, y/o XL228), inhibidores del proteasoma (por ejemplo, bortezomib (VELCADE)), inhibidores de mTOR (por ejemplo, rapamicina, temsirolimus (CCI-779), everolimus (RAD-001), ridaforolimus, AP23573 (Ariad), AZD8055 (AstraZeneca), BEZ235 (Novartis), BGT226 (Novartis226), XL765 (Sanofi Aventis), PF-4691502 (Pfizer), GDC0980 (Genetech), SF1126 (Semafoe) y OSI-027 (OSI)), oblimersen, gemcitabina, carminomicina, leucovorina, pemetrexed, ciclofosfamida, dacarbazina, procarbina, prednisolona, dexametasona, campatecina, plicamicina, asparaginasa, aminopterina, metopterina, porfiromicina, melfalán, leurosidina, leurosina, clorambucilo, trabectedina, procarbina, discodermolida, carminomicina, aminopterina y hexametilmelamina.

El sujeto que se está tratando es un mamífero, como un humano, o un animal domesticado, como un perro, gato, vaca, cerdo, caballo, oveja o cabra. El sujeto también puede ser un animal transgénico no humano como un ratón transgénico o un cerdo transgénico.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Síntesis de derivados de GH-Lac

El esquema 1 muestra la síntesis de derivados de GH-Lac **2-6**. Enzimas: GalK, galactoquinasa; AtUSP, UDP-pirofosforilasa de azúcar; LgtC, α 1,4-galactosiltransferasa; PK, piruvato quinasa; PPA, pirofosfatasa inorgánica; GlmU, *N*-acetilglucosamina-1-fosfato uridiltransferasa; NahK, *N*-acetilhexosamina quinasa; LgtD, β 1,3-*N*-acetilgalactosaminiltransferasa; FKP, fucoquinasa bifuncional/GDP-L-fucosa pirofosforilasa; FutC, α -1,2-fucosiltransferasa.



Esquema 1

La síntesis de los derivados de GH-Lac 2-6 (derivados terminales reductores) (Esquema 1) se inició a partir de los derivados de Lac 11-15 siguiendo el procedimiento enzimático descrito anteriormente.^{15a} Los derivados de Gb3-Lac 16-20 se sintetizaron con galactosa, α 1,4-galactosiltransferasa (LgtC) y el sistema de regeneración UDP-Gal que incluye UDP-azúcar pirofosforilasa (AtUSP), galactoquinasa (GalK), piruvato quinasa (PK) y pirofosfatasa inorgánica (PPA). La LgtC se ha caracterizado y utilizado cuidadosamente en la síntesis de derivados α -(1 \rightarrow 4)-galactosilados.³¹ Aquí, también se descubrió que LgtC muestra buenas actividades con los derivados de Lac (11-15). Los rendimientos de Gb3-F 16, Gb3-fenil NO₂ 19 y Gb3-NO₂ 20 fueron del 92, 81 y 95%, respectivamente, y los rendimientos de Gb3-N₃ 17 y Gb3-fenilo 18 fueron del 67 y 69%, respectivamente.

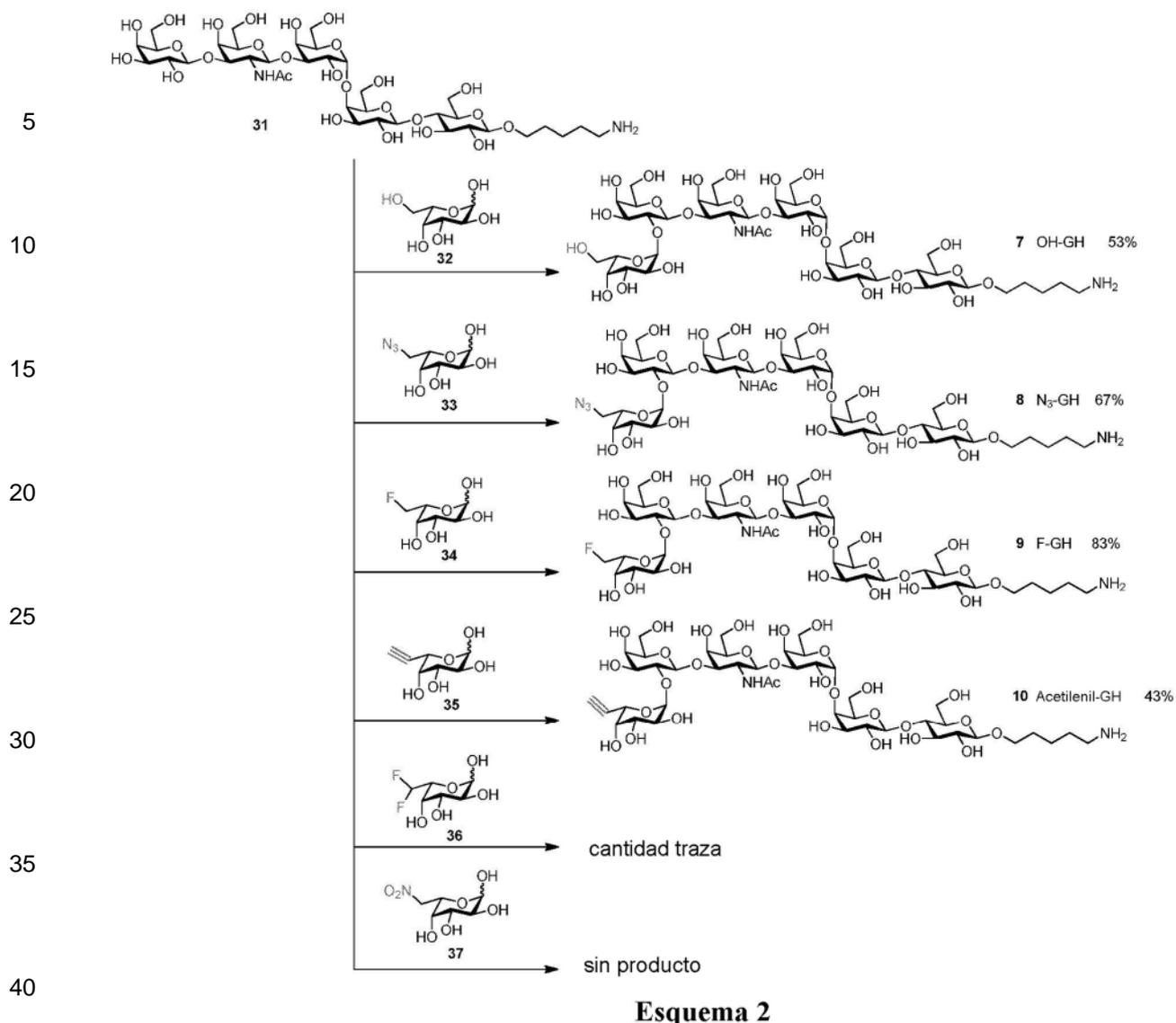
Los derivados de Gb3-Lac 16-20 se usaron como aceptores para la síntesis de los derivados de Gb4 21-25 usando galactosamina, β 1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa (LgtD) y el sistema de regeneración UDP-GalNac que incluye N-acetilhexosamina quinasa (NahK), N-acetil glucosamina-1-fosfato uridiltransferasa (GImU), piruvato quinasa (PK) y pirofosfatasa inorgánica (PPA).^{15a} Después de la sobreexpresión y caracterización bioquímica,³² se usó LgtD para glicosilar Gb3-F16, Gb3-N₃ 17 y Gb3-fenilo 18 como aceptores para obtener Gb4-F 21, Gb4-N₃ 22 y Gb4-fenilo 23 con rendimientos del 90, 87 y 89%, respectivamente. A partir de Gb3-fenilNO₂ 19 y Gb3-NO₂ 20, se obtuvieron Gb4-fenilNO₂ 24 y Gb4-NO₂, 25 con rendimientos del 72 y 61%, respectivamente.

Los derivados de Gb5-Lac 26-30 se obtuvieron a partir de los derivados de Gb4 21-25 y galactosa usando β 1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa (LgtD) y el sistema de regeneración UDP-gal como se ha descrito anteriormente.^{15a} Se obtuvieron GB5-F 26, GB5-N₃ 27, GB5-fenilo 28, GB5-fenilNO₂ 29 y GB5 NO₂ 30 con rendimientos del 55% a 79%.

Los derivados de GH-Lac 2-6 se sintetizaron a partir de los derivados de Gb5-Lac 26-30 usando α -1,2-fucosiltransferasa (FutC), fucoquinasa bifuncional/GDP-L-fucosa pirofosforilasa (FKP), pirofosfatasa (PPA), piruvato quinasa (PK) y fucosa.^{15a} Se prepararon GH-F 2 y GH-fenilo 4 a partir de los aceptores Gb5-F 26 y Gb5-fenilo 28 con rendimientos del 75 y 93%, respectivamente. Usando Gb5-N₃ 27, Gb5-fenilNO₂ 29 y Gb5-NO₂ 30 como aceptores se obtuvieron GH-N₃ 3, GH-fenilNO₂ 5 y GH-NO₂ 6 con rendimientos del 49, 65 y 66%, respectivamente.

EJEMPLO 2: Síntesis de derivados de GH-Fuc

El esquema 2 muestra la síntesis quimioenzimática de derivados de GH-Fuc. Condición de reacción: FKP, Fut C, PPA, PK, Mg²⁺, ATP, GTP.



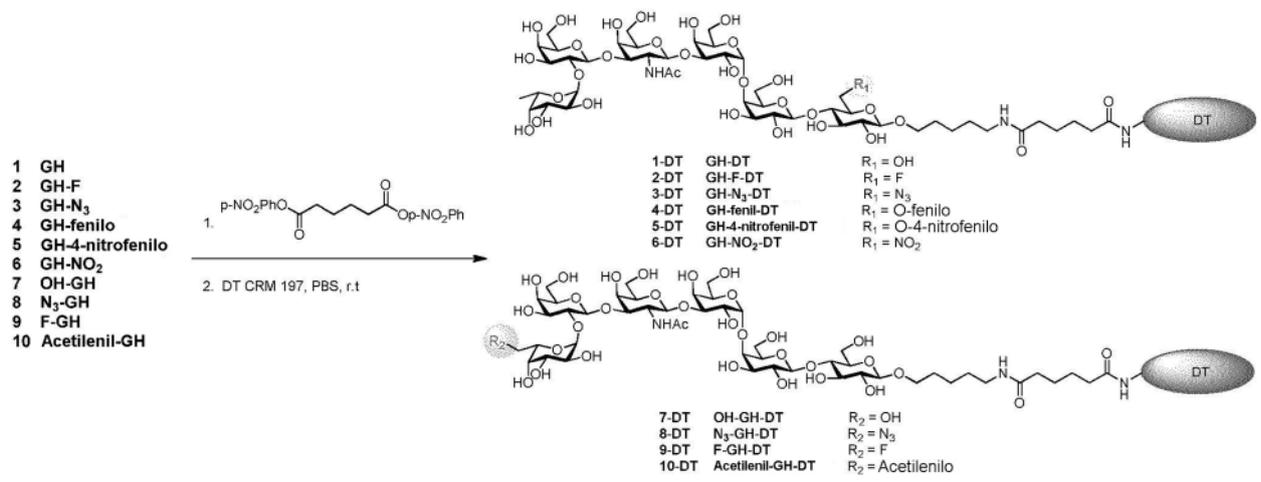
La síntesis de los derivados de GH-Fuc **7-10** (derivados terminales no reductores) (**Esquema 2**) también siguió el método descrito anteriormente ^{15a} combinando el derivado de fucosa y el oligosacárido aceptor Gb5 con FKP recombinante, α -1,2-fucosiltransferasa (FutC), PPA y PK. El oligosacárido Gb5 de material de partida con pentil amina **31** se sintetizó usando un método químico descrito anteriormente. ²⁹ Usando este método quimioenzimático, se sintetizaron una serie de derivados de GH-Fuc **7-10** con rendimientos del 43% al 83%. Aunque el compuesto **36** se hizo reaccionar con FKP para formar **GDP-36**, no fue un donante adecuado para FutC y se formó una cantidad de traza del producto. Además, el compuesto **37** no es un sustrato para FKP y no se formó el producto intermedio **GDP-37**.

Las estructuras de todos los derivados de GH purificados y las formas truncadas se confirmaron mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) y espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) para su uso posterior.

EJEMPLO 3: Síntesis de conjugados DT de derivados de GH

El esquema 3 muestra la síntesis de vacunas modificadas con GH-Lac y GH-Fuc.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50



Esquema 3

Para sintetizar los conjugados de GH-Lac y GH-Fuc DT (1-DT a 10-DT), los derivados de GH Lac terminados en amina 2-6 o los derivados de GH Fuc 7-10 se hicieron reaccionar con el conector de p-nitrofenilo homobifuncional para producir los semiésteres correspondientes con buenos rendimientos (información de apoyo). Después de la purificación mediante cromatografía de fase inversa, los semiésteres y DT se acoplaron en tampón PBS (pH 7,8) durante la noche (Esquema 3). El número de derivados de GH incorporados en DT se caracterizó por MALDI-TOF MS. La Tabla 1 muestra los resultados del análisis MALDI-TOF de la incorporación media de carbohidratos. ^aPico m/z.

Tabla 1

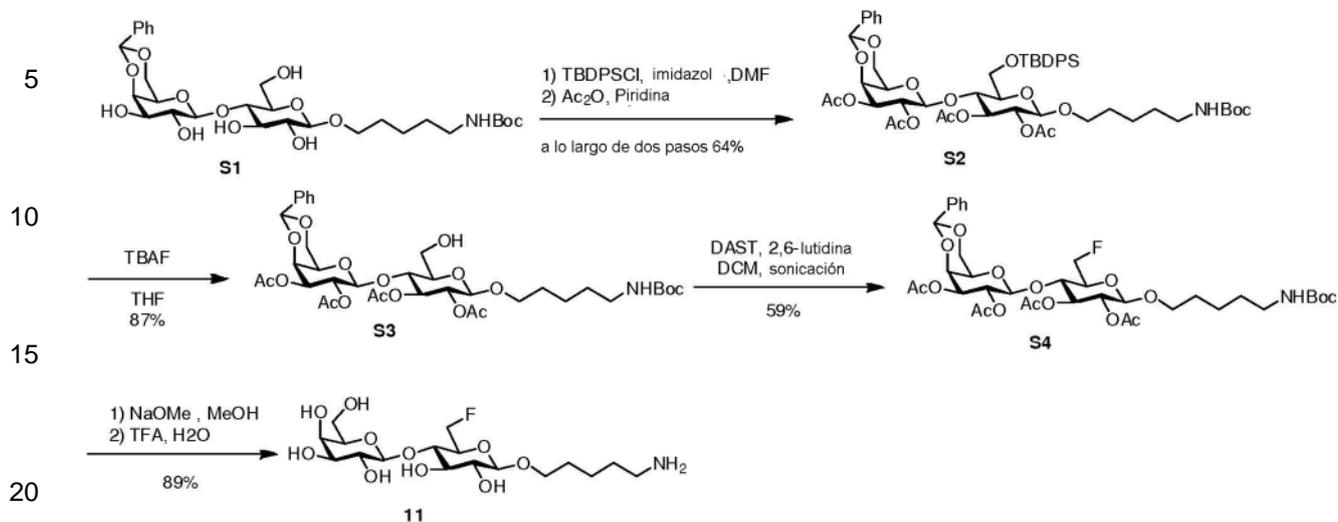
| Glicoconjugado | Después de glicosilación ^a | (n)Incorporación media | Porcentaje de carbohidratos |
|----------------------------|---------------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| (1) GH-DT | 66943 | 7.10 | 12.9% |
| (2) GH-F-DT | 67406 | 7.47 | 13.4% |
| (3) GH-N ₃ -DT | 66505 | 6.60 | 12.2% |
| (4) GH-fenil-DT | 66057 | 5.99 | 11.7% |
| (5) GH-4-nitrofenil-DT | 67588 | 6.94 | 13.7% |
| (6) GH-NO ₂ -DT | 66119 | 6.12 | 11.7% |
| (7) OH-GH-DT | 64308 | 4.86 | 9.3 % |
| (8) N ₃ -GH-DT | 64742 | 5.11 | 9.9% |
| (9) F-GH-DT | 68869 | 8.56 | 15.3% |
| (10) acetilnil-GH-DT | 65881 | 6.17 | 11.5% |

EJEMPLO 4: Síntesis de precursores de derivados de GH-Lac y GH-Fuc

Usando un método basado en el uso de enzimas ³⁰ junto con la regeneración efectiva de nucleótidos de azúcar, ^{15a} los derivados de GH-Lac y GH-Fuc pueden prepararse fácilmente usando glicosiltransferasas (LgtC, LgtD, Futc) y sistemas de regeneración de cofactores (UDP-Gal, UDP -GalNAc, GDP-Fuc). Los derivados de Lac de partida 11-15 y los derivados de Fuc 32-37 se sintetizaron mediante métodos químicos (Esquemas 4-8).

60
65

Esquema 4: Síntesis de bloques de construcción de lactosa (11)

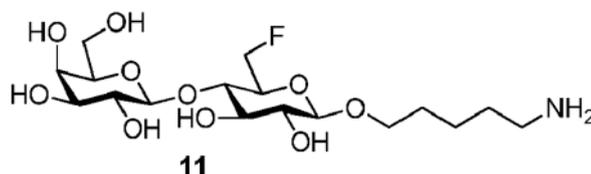


El compuesto S1 se sintetizó mediante los procedimientos descritos. ¹ A una solución de S1 (630 mg, 1,02 mmol) en DMF (30 ml) se le añadió imidazol (208 mg, 3,07 mmol) a 0° C y se le añadieron 291 µl (1,13 mmol) de *tert*-butil(cloro)difenilsilano. La mezcla de la reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente. Después de agitar durante 13 h, se concentró la solución de la reacción. El residuo se disolvió en piridina (20 ml) a 0° C y se añadió anhídrido acético (401 µl, 3,93 mmol). La mezcla de la reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente. Después de agitarse durante 10 h, la reacción se inactivó mediante la adición lenta de metanol (1 ml) a 0° C y los materiales volátiles se eliminaron a presión reducida. El residuo se extrajo con acetato de etilo (80 ml), se lavó con solución acuosa de NaHCO₃ saturada, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice (EtOAc al 0-40% en hexano) para producir S2 (667 mg, 64%). ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.78 - 7.71 (m, 4H), 7.46 - 7.25 (m, 11H), 5.43 (s, 1H), 5.23 - 5.15 (m, 2H), 4.95 (m, 1H), 4.87 - 4.81 (m, 2H), 4.42 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.32 - 4.30 (dd, *J* = 1.4, 12.5 Hz, 1H), 4.25 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.14 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H), 4.07 (d, *J* = 1.5, 12.5 Hz, 1H), 3.96 - 3.90 (m, 2H), 3.85 - 3.81 (m, 1H), 3.44 - 3.40 (m, 1H), 3.31 - 3.30 (m, 2H), 3.08 (m, 2H), 2.08 - 2.00 (m, 9H), 1.77 (s, 3H), 1.60 - 1.58 (m, 2H), 1.48 - 1.45 (m, 2H), 1.41 (s, 9H), 1.35 - 1.33 (m, 2H), 1.05 (s, 9H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 170.69, 170.66, 169.83, 168.64, 155.99, 137.55, 136.02, 135.43, 133.50, 132.20, 129.95, 129.92, 129.20, 128.26, 127.93, 127.67, 126.54, 101.40, 100.60, 100.26, 75.23, 74.26, 73.36, 72.36, 72.21, 71.68, 69.22, 68.99, 68.62, 66.27, 61.12, 29.77, 29.08, 28.44, 26.84, 23.30, 20.90, 20.82, 20.80, 20.59, 19.45. HRMS (ESI-TOF, MNa⁺) calculado para C₅₃H₇₁NO₁₇SiNa⁺ 1044.4383, encontrado 1044.4404.

A una solución de S2 (425 mg, 0,41 mmol) en THF se le añadió AcOH (246 µl, 4,10 mmol) a 0° C. Se añadieron 4,1 ml (4,10 mmol) de solución de fluoruro de tetrabutilamonio 1,0 M en THF. La mezcla de la reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente. Después de agitar durante 7 h, la solución de la reacción se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo con acetato de etilo (70 ml), se lavó con solución acuosa de NaHCO₃ saturada, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (EtOAc al 50-80% en hexano) para producir S3 (279 mg, 87%). ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.47 - 7.42 (m, 2H), 7.40 - 7.32 (m, 3H), 5.44 (s, 1H), 5.26 - 5.15 (m, 2H), 4.92 - 4.83 (m, 2H), 4.57 (m, 2H), 4.45 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.31 - 4.23 (m, 2H), 4.01 (dd, *J* = 12.4, 1.5 Hz, 1H), 3.90 (m, 2H), 3.83 - 3.74 (m, 2H), 3.48 - 3.44 (m, 2H), 3.37 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 3.06 (m, 2H), 2.01 (dd, *J* = 6.4, 2.8 Hz, 12H), 1.56 - 1.54 (m, 2H), 1.48 - 1.30 (m, 13H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 170.94, 170.60, 169.88, 169.05, 156.21, 137.74, 129.37, 128.44, 126.72, 101.54, 101.14, 100.86, 79.35, 75.30, 74.68, 73.49, 72.64, 72.31, 71.84, 70.11, 69.40, 68.78, 66.47, 60.46, 40.63, 29.78, 29.20, 28.63, 23.21, 21.06, 20.95. HRMS (ESI-TOF, MNa⁺) calculado para C₃₇H₅₃NO₁₇Na⁺ 806.3206, encontrado 806.3212.

A una solución de S3 (221 mg, 0,28 mmol) en DCM seco (10 ml) se le añadieron 130 µl (1,2 mmol) de 2,6-lutidina a 0° C. Se añadieron 150 µl (1,2 mmol) de trifluoruro de dietilaminosulfuro. La mezcla se sonicó durante 8 horas y luego se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en columna de gel de sílice (EtOAc al 10-50% en hexano) para producir S4 (129 mg, 59%). ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.47 - 7.39 (m, 2H), 7.39 - 7.32 (m, 3H), 5.45 (s, 1H), 5.28 - 5.18 (m, 2H), 4.92 - 4.85 (m, 2H), 4.72 - 4.55 (m, 2H), 4.55 - 4.41 (m, 2H), 4.32 - 4.24 (m, 2H), 4.02 (dd, *J* = 12.4, 1.4 Hz, 1H), 3.90 - 3.80 (m, 2H), 3.51 - 3.41 (m, 3H), 3.07 (dd, *J* = 12.9, 6.4 Hz, 2H), 2.01 (dd, *J* = 5.9, 4.3 Hz, 12H), 1.58 - 1.51 (m, 2H), 1.51 - 1.38 (m, 11H), 1.38 - 1.26 (m, 2H). ¹⁹F NMR (470 MHz, CDCl₃) δ -234.24 (td, *J* = 47.2, 29.6 Hz). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 170.97, 170.43, 169.85, 169.06, 156.16, 137.62, 129.41, 128.45, 126.68, 101.49, 100.99, 100.92, 81.51, 80.36, 79.28, 74.67, 74.64, 74.03, 73.90, 73.39, 72.72, 72.21, 71.71, 69.99, 69.32, 68.68, 66.59, 40.63, 29.86, 29.18, 28.62, 23.32, 21.08, 20.94. HRMS (ESI-TOF, MNa⁺) calculado para C₃₇H₅₂FNO₁₆Na⁺ 808.3162, encontrado 808.3185.

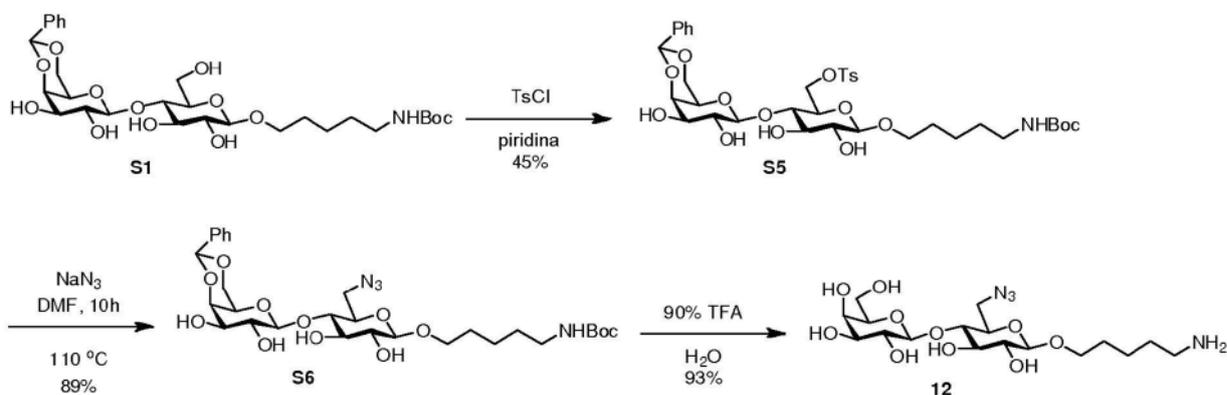
A una solución de **S4** (105 mg, 0,13 mmol) en MeOH (10 ml) se le añadió NaOMe (5 mg) y se agitó durante 6 h. La solución de la reacción se neutralizó con Amberlite IR-120, se filtró y se concentró. El residuo se trató con 5 ml de 90% de TFA en H₂O. Después de agitar durante 2 h, la solución de la reacción se concentró y se purificó por cromatografía en columna de fase inversa (RP-18) para producir el derivado de lactosa **11** (49 mg, 89 %)



5-aminopentil β-D-galactopiranosil-(1→4)-6-desoxi-6-fluoro-β-D-glucopiranosido (Compuesto 11)

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 4.88-4.71 (m, 1H), 4.54 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.46 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.93 - 3.90 (m, 2H), 3.84 - 3.65 (m, 8H), 3.56 (dd, *J* = 10.0, 7.8 Hz, 1H), 3.34 (dd, *J* = 9.3, 8.1 Hz, 1H), 3.02 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.75 - 1.65 (m, 4H), 1.51 - 1.43 (m, 2H). ¹⁹F NMR (471 MHz, D₂O) δ -234.79 (td, *J* = 47.8, 31.6 Hz). ¹³C NMR (150 MHz, D₂O) δ 105.60, 104.84, 84.54, 83.43, 79.71, 79.67, 78.00, 76.88, 75.96, 75.84, 75.42, 75.14, 73.56, 72.90, 71.19, 63.71, 41.98, 30.82, 29.05, 24.73. HRMS (ESI-TOF, MH⁺) calculado para C₁₇H₃₂FNO₁₀H⁺ 430.2083, encontrado 430.2092.

Esquema 5: Síntesis de bloques de construcción de lactosa (12)

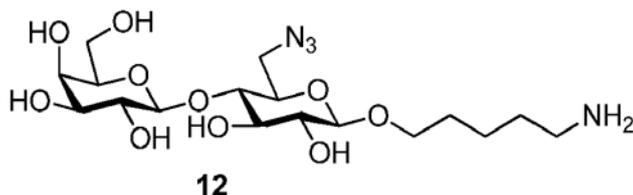


A una solución de **S1** (1,9 g, 3,51 mmol) en piridina (30 ml) se le añadió cloruro de 4-toluenosulfonilo (0,8 g, 4,23 mmol) a 0° C. La mezcla de la reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente. Después de agitarse durante 8 h, la solución de la reacción se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (MeOH al 2-8% en DCM) para producir **S5** (1,2 g, 45%); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.78 - 7.76 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.44 - 7.42 (m, 2H), 7.34 (m, 3H), 7.24 - 7.23 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 5.49 (s, 1H), 4.61 (m, 1H), 4.52 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 4.38 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.28 - 4.17 (m, 2H), 4.15 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.02 - 4.00 (m, 1H), 3.77 - 3.72 (m, 2H), 3.61 - 3.55 (m, 4H), 3.49 - 3.41 (m, 3H), 3.32 (m, 1H), 2.38 (s, 3H), 1.58 - 1.55 (m, 2H), 1.47 - 1.44 (m, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.36 - 1.33 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 156.26, 137.72, 132.87, 130.03, 129.45, 128.52, 128.24, 126.63, 102.79, 102.46, 101.49, 79.29, 77.76, 75.35, 74.77, 73.44, 72.77, 72.61, 70.33, 70.11, 69.47, 69.05, 67.14, 40.61, 29.85, 29.25, 28.64, 23.38, 21.82. HRMS (ESI-TOF, MNa⁺) calculado para C₃₆H₅₁NO₁₅SNa⁺ 792.2872, encontrado 792.2798.

A una solución de **S5** (204 mg, 0,26 mmol) en DMF (5 ml) se le añadió azida sódica (169 mg, 2,60 mmol) a 110° C. Después de agitar durante 14 h, la solución de la reacción se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (MeOH al 2-8% en DCM) para producir **S6** (148 mg, 89%). ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.44 (m, 2H), 7.33 - 7.31 (m, 3H), 5.46 (s, 1H), 4.29 - 4.24 (m, 2H), 4.20 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 4.04 (m Hz, 1H), 3.97 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 3.84 (m, 1H), 3.72 - 3.63 (m, 1H), 3.60 - 3.33 (m, 10H), 3.26 (s, 1H), 3.04 (m, 2H), 1.59 - 1.57 (m, 2H), 1.45 - 1.19 (m, 13H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 137.57, 129.45, 128.47, 126.48, 103.37, 102.58, 101.42, 79.91, 79.34, 75.46, 74.62, 74.53, 73.47, 72.58, 70.47, 69.96, 69.12, 67.05, 51.17, 40.43, 29.73, 29.24, 28.56, 23.33. HRMS (ESI-TOF, MNa⁺) calculado para C₂₉H₄₄N₄O₁₂Na⁺ 663.2848, encontrado 663.2859.

Se trató **S6** (122 mg) con 5 ml de 90% de TFA en H₂O y se agitó durante 2 h, la solución de la reacción se concentró y se purificó por cromatografía en columna de fase inversa (RP-18) para producir el derivado de lactosa **12** (80 mg, 93%)

5



10

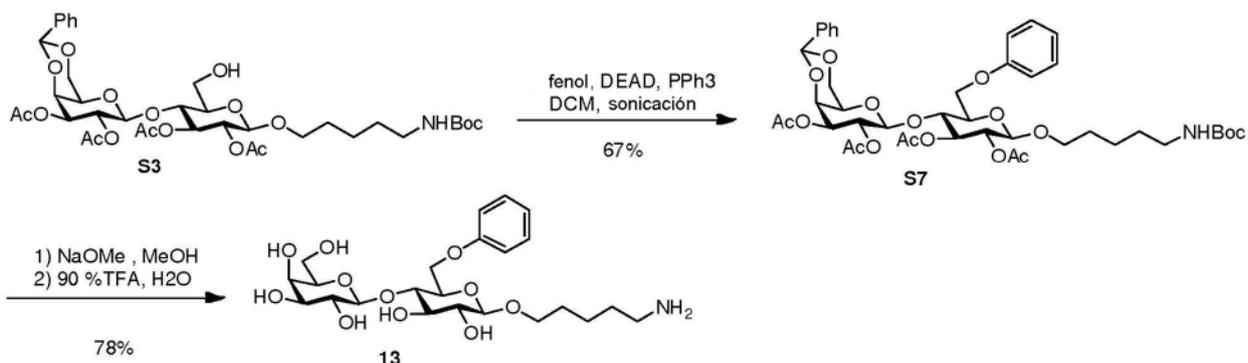
5-aminopentil β-D-galactopiranosil-(1→4)-6-azido-6-desoxi-β-D-glucopiranosido (Compuesto 12)

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 4.54 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.44 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.98 - 3.91 (m, 2H), 3.85 - 3.60 (m, 10H), 3.55 (dd, *J* = 9.9, 7.8 Hz, 1H), 3.38 - 3.32 (m, 1H), 3.06 - 2.99 (m, 2H), 1.76 - 1.65 (m, 4H), 1.52 - 1.43 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, D₂O) δ 105.84, 104.76, 82.08, 78.14, 76.98, 76.40, 75.54, 75.25, 73.64, 72.93, 71.26, 63.76, 53.14, 42.09, 30.92, 29.13, 24.83. HRMS (ESI-TOF, MH⁺) calculado para C₁₇H₃₂N₄O₁₀H⁺ 453.2191, encontrado 453.2201.

20

Esquema 6: Síntesis de bloques de construcción de lactosa (13)

25



35

A una solución de **S3** (190 mg, 0,24 mmol) en DCM seco (10 ml) se le añadieron 25 μl (0,27 mmol) de fenol y 70 mg (0,27 mmol) de trifetilfosfina a 0° C. Se añadieron 38 μl (0,27 mmol) de azodicarboxilato de dietilo. La mezcla se sonicó durante 4 horas y luego se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en columna de gel de sílice (EtOAc al 10-50% en hexano) para producir **S7** (138 mg, 67%). ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.43 - 7.42 (dd, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 2H), 7.36 - 7.31 (m, 3H), 7.31 - 7.26 (m, 2H), 6.98 - 6.90 (m, 3H), 5.42 (s, 1H), 5.26 - 5.17 (m, 2H), 4.94 (dd, *J* = 9.7, 8.0 Hz, 1H), 4.67 (dd, *J* = 10.3, 3.7 Hz, 1H), 4.49 - 4.44 (m, 3H), 4.26 - 4.23 (m, 3H), 4.17 (m, 1H), 4.06 - 3.96 (m, 2H), 3.80 (dt, *J* = 9.7, 6.3 Hz, 1H), 3.66 (m, 1H), 3.43 (dt, *J* = 9.6, 6.6 Hz, 1H), 3.34 (s, 1H), 3.05 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.01 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.88 (s, 3H), 1.59 - 1.48 (m, 2H), 1.48 - 1.38 (m, 11H), 1.36 - 1.19 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 170.89, 170.56, 169.88, 168.91, 158.56, 156.15, 137.67, 129.82, 129.37, 128.42, 126.67, 121.71, 115.00, 101.49, 101.01, 100.79, 79.23, 75.35, 74.07, 73.28, 72.80, 72.36, 71.83, 69.83, 69.26, 68.68, 66.51, 65.92, 40.63, 29.81, 29.17, 28.62, 23.28, 21.02, 20.94, 20.93, 20.84. HRMS (ESI-TOF, MNa⁺) calculado para C₄₃H₅₇NO₁₇Na⁺ 882.3519, encontrado 882.3542.

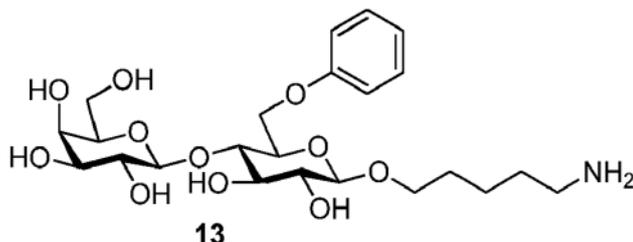
40

45

50

A una solución de **S7** (110 mg, 0,12 mmol) en MeOH (5 ml) se le añadió NaOMe (3 mg) y se agitó durante 6 h. La solución de la reacción se neutralizó con Amberlite IR-120, se filtró y se concentró. El residuo se trató con 5 ml de 90% de TFA en H₂O. Después de agitar durante 2 h, la solución de la reacción se concentró y se purificó por cromatografía en columna de fase inversa (RP-18) para producir el derivado de lactosa **13** (45 mg, 78 %)

55



60

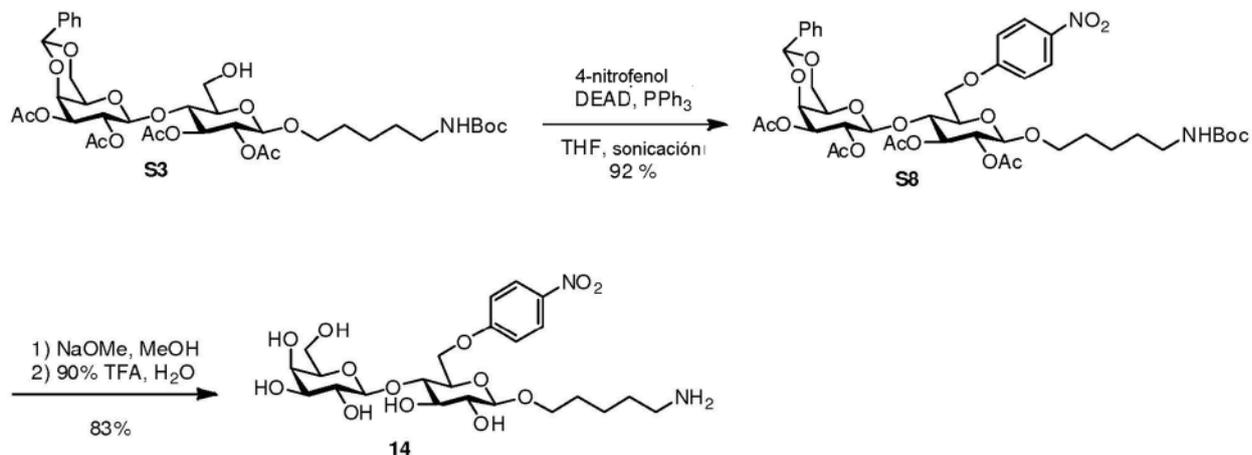
5-aminopentil β-D-galactopiranosil-(1→4)-6-O-fenil-β-D-glucopiranosido (Compuesto 13)

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 7.42 (dd, *J* = 8.7, 7.4 Hz, 2H), 7.12 - 7.07 (m, 3H), 4.55 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.46

65

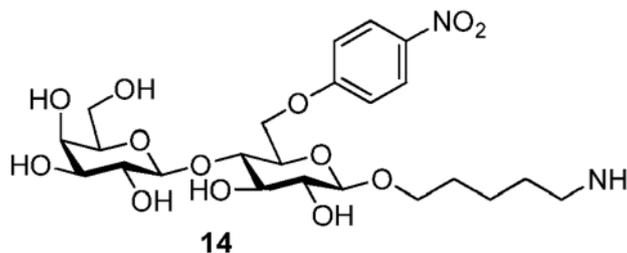
(dd, $J = 11.1, 1.6$ Hz, 1H), 4.37 (dd, $J = 11.1, 4.0$ Hz, 1H), 4.30 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 3.96 - 3.87 (m, 3H), 3.84 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 3.79 - 3.67 (m, 4H), 3.56 (dd, $J = 4.0, 8.3$ Hz, 1H), 3.52 (m, 1H), 3.45 - 3.35 (m, 2H), 3.02 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.73 - 1.63 (m, 4H), 1.50 - 1.41 (m, 2H). ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 163.11, 135.23, 135.21, 127.09, 120.35, 108.11, 107.54, 82.71, 80.68, 79.65, 78.32, 78.17, 77.73, 76.06, 75.44, 73.81, 71.22, 66.35, 44.62, 33.46, 31.66, 27.34. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{NO}_{11}\text{H}^+$ 504.2439, encontrado 504.2450.

Esquema 7: Síntesis de bloques de construcción de lactosa (14)



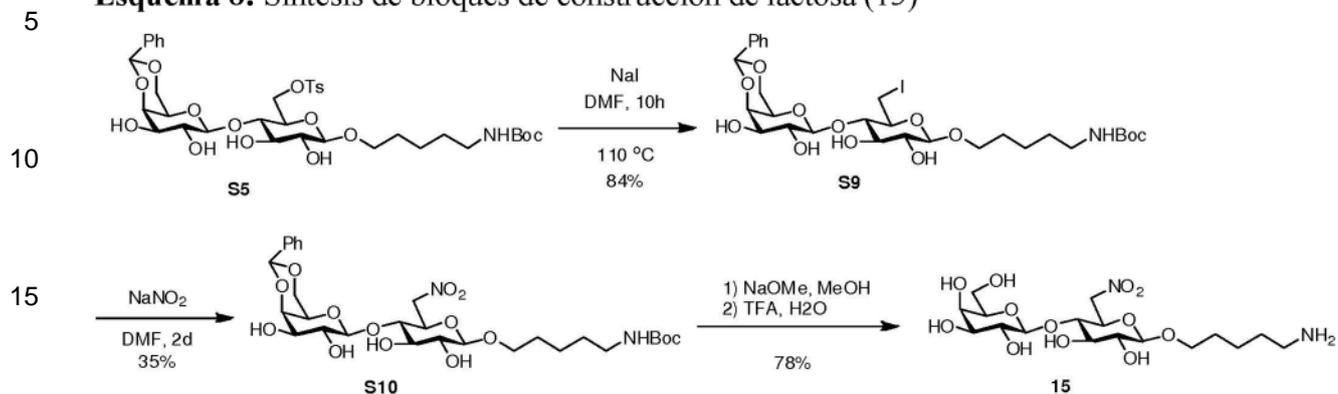
A una solución de **S3** (220 mg, 0,28 mmol) en DCM seco (10 ml) se le añadieron 42 mg (0,30 mmol) de 4-nitrofenol y 81 mg (0,30 mmol) de trifetilfosfina a temperatura ambiente. Se añadieron 43 μl (0,30 mmol) de azodicarboxilato de dietilo. La mezcla se sonicó durante 5 h, luego se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en columna de gel de sílice (EtOAc al 20-60% en hexano) para producir **S8** (235 mg, 92%). ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.19 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.41 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 7.33 (m, 3H), 7.00 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 5.43 (s, 1H), 5.23 - 5.19 (m, 2H), 4.90 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.76 (dd, $J = 10.3, 2.7$ Hz, 1H), 4.52 (s, 1H), 4.47 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 4.36 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H), 4.26 - 4.24 (m, 3H), 4.04 - 3.93 (m, 2H), 3.78 - 3.73 (m, 2H), 3.41 (m, 2H), 3.03 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 2.05 - 1.94 (m, 9H), 1.87 (s, 3H), 1.56 - 1.35 (m, 13H), 1.29 - 1.91 (m, 2H). ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 170.72, 170.26, 169.73, 168.72, 163.43, 156.06, 142.12, 137.53, 129.30, 128.33, 126.53, 126.13, 114.89, 101.33, 100.93, 100.61, 79.13, 77.43, 75.31, 73.60, 73.18, 72.54, 72.00, 71.72, 69.99, 69.34, 68.53, 66.71, 66.56, 40.50, 29.75, 29.06, 28.52, 23.16, 20.89, 20.82, 20.81, 20.80. HRMS (ESI-TOF, MNa^+) calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_{19}\text{Na}^+$ 927.3369, encontrado 927.3377.

A una solución de **S8** (155 mg, 0,17 mmol) en MeOH (5 ml) se le añadió NaOMe (3 mg) y se agitó durante 6 h. La solución de la reacción se neutralizó con Amberlite IR-120, se filtró y se concentró. El residuo se trató con 5 ml de 90% de TFA en H_2O . Después de agitar durante 2 h, la solución de la reacción se concentró y se purificó por cromatografía en columna de fase inversa (RP-18) para producir el derivado de lactosa **14** (78 mg, 83 %).



5-aminopentil β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-6-O-p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (**14**)

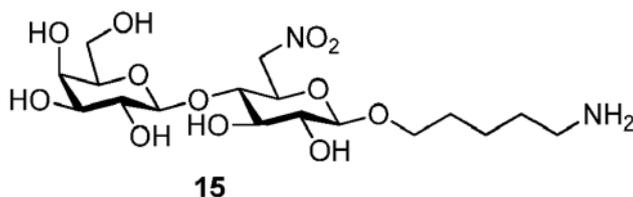
^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 8.29 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 7.20 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 4.57 - 4.53 (m, 3H), 4.32 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 3.97 - 3.84 (m, 4H), 3.84 - 3.66 (m, 4H), 3.60 (dt, $J = 11.7, 5.8$ Hz, 1H), 3.53 (dd, $J = 9.9, 7.7$ Hz, 1H), 3.47 (dd, $J = 9.9, 3.4$ Hz, 1H), 3.41 - 3.35 (m, 1H), 2.97 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.69 - 1.63 (m, 4H), 1.45 - 1.41 (m, 2H). ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ 163.56, 141.49, 126.22, 115.08, 103.07, 102.25, 77.72, 75.43, 74.34, 72.85, 72.78, 72.45, 70.74, 70.16, 68.47, 66.40, 61.03, 39.34, 28.17, 26.48, 22.07. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{H}^+$ 549.2290, encontrado 549.2294.

Esquema 8: Síntesis de bloques de construcción de lactosa (15)

A una solución de **S3** (188 mg, 0,24 mmol) en DMF (se le añadieron 5 ml de yoduro de sodio (363 mg, 2,40 mmol) a 110° C. Después de agitar durante 14 h, la solución de la reacción se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (MeOH al 2-8% en DCM) para proporcionar **S9** (146 mg, 84%). ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.52 - 7.46 (m, 2H), 7.30 - 7.28 (m, 3H), 5.58 (s, 1H), 4.48 - 4.43 (m, 1H), 4.27 (dd, *J* = 7.8, 4.0 Hz, 1H), 4.20 - 4.09 (m, 3H), 3.89 - 3.78 (m, 2H), 3.66 - 3.49 (m, 5H), 3.42 - 3.13 (m, 4H), 3.00 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.69 - 1.55 (m, 2H), 1.49 - 1.28 (m, 13H). ¹³C NMR (150 MHz, MeOD) δ 157.17, 138.13, 128.51, 127.64, 126.08, 103.78, 102.62, 100.81, 83.24, 78.43, 75.91, 74.32, 73.84, 73.45, 72.09, 70.48, 69.57, 68.78, 66.92, 46.63, 39.93, 29.27, 29.05, 27.44, 22.94, HRMS (ESI-TOF, MNa⁺) calculado para C₂₉H₄₄INO₁₂Na⁺ 748.1800, encontrado 748.1758.

A una solución de **S9** (133 mg, 0,18 mmol) en DMF (5 ml) se le añadió nitrito de sodio (124 mg, 1,80 mmol) a temperatura ambiente durante 2 d. La solución de la reacción se concentró y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (MeOH al 2-8% en DCM) para producir **S10** (40 mg, 35%). ¹H NMR (600 MHz, MeOD) δ 7.45 (dt, *J* = 4.3, 2.3 Hz, 2H), 7.27 - 7.25 (m, 3H), 5.55 (s, 1H), 5.12 (dd, *J* = 13.6, 2.5 Hz, 1H), 4.59 - 4.44 (m, 6H), 4.36 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.23 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.14 - 4.07 (m, 4H), 3.67 - 3.49 (m, 5H), 3.48 - 3.39 (m, 2H), 3.18 - 3.14 (m, 1H), 2.93 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.56 - 1.45 (m, 2H), 1.39 - 1.32 (m, 11H), 1.32 - 1.24 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, MeOD) δ 157.20, 138.17, 128.56, 127.69, 126.10, 103.60, 102.87, 100.86, 79.81, 78.45, 75.91, 75.74, 74.62, 73.23, 72.10, 71.38, 70.17, 69.68, 68.78, 67.01, 39.91, 29.25, 29.02, 27.44, 22.90. HRMS (ESI-TOF, MNa⁺) calculado para C₂₉H₄₄N₂O₁₄Na⁺ 667.2685, encontrado 667.2726.

Se trató **S10** (40 mg, 0,06 mmol) con 5 ml de 90% de TFA en H₂O y se agitó durante 2 h, la solución de la reacción se concentró y se purificó por cromatografía en columna de fase inversa (RP-18) para producir el derivado de lactosa **15** (22 mg, 78%)

**5-aminopentil β-D-galactopiranosil-(1→4)-6-desoxi-6-nitro-β-D-glucopiranosido (15)**

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 4.56 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.47 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.34 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 3.95 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 3.86 - 3.65 (m, 8H), 3.57 (dd, *J* = 9.9, 7.9 Hz, 1H), 3.35 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.04 - 2.97 (m, 2H), 1.66 (m, 4H), 1.47 - 1.38 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, D₂O) δ 105.84, 104.88, 82.22, 78.46, 78.25, 76.89, 75.36, 75.24, 73.91, 73.53, 73.37, 71.21, 63.71, 42.06, 30.93, 29.09, 24.76. HRMS (ESI-TOF, MH⁺) calculado para C₁₇H₃₂N₂O₁₂H⁺ 457.2028, encontrado 457.2036. Los compuestos **33**, **34**, **35**, **36**, **37** se sintetizaron mediante los procedimientos informados.²

Síntesis de derivados de Gb3-Lac

Las reacciones se realizaron en tubos de centrifuga de 15 ml con 5,0 ml de tampón Tris-HCl (100 mM, pH 7,0) que contenía derivados de Lac (10-15 mg), galactosa (1,0 equiv.), PEP (4,4 equiv.), sal disódica de ATP (0,1 equiv.), sal disódica de UTP (0,1 equiv.), MgCl₂ (10 mM), α-1,4-galactosiltransferasa (LgtC, 3,0 unidades), galactoquinasa (GalK, 2,0 unidades), UDP-azúcar pirofosforilasa (AtUSP, 2,8 unidades), piruvato cinasa (PK, 2,5

unidades) y pirofosfatasa (PPA, 2,5 unidades). La mezcla de la reacción se incubó a temperatura ambiente durante la noche con agitación (300 rpm). La reacción se monitorizó mediante análisis TLC usando butanol/acetato/agua 5:3:2 como solvente de desarrollo y las placas se tiñeron con anisaldehído en etanol. El tubo se puso en el baño caliente (80° C) durante 10 min, seguido de centrifugación (10000 rpm, 15 min) y el sobrenadante se concentró al vacío. Luego, se purificó el residuo acuoso mediante cromatografía en gel C-18 y se eluyó mediante un gradiente de 100% de H₂O a 80% de metanol en H₂O. Solo se recogieron las fracciones que contenían el producto, se liofilizaron y se caracterizaron por espectroscopia de NMR y HRMS.

Síntesis de derivados de Gb4-Lac

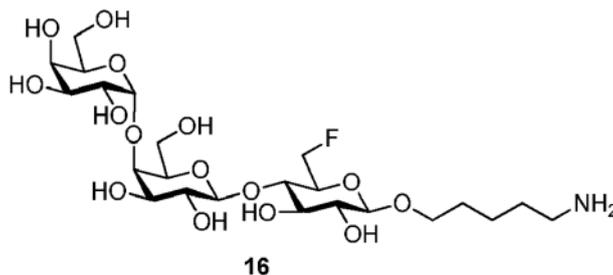
Las reacciones se lograron en tubos de centrifuga de 15 ml con 3,0 ml de tampón Tris-HCl (100 mM, pH 7.0) que contenía derivados de Gb3 (8-12 mg), N-acetilgalactosamina (GAINAc, 1,1 equiv), PEP (4,4 equiv), sal disódica de ATP (0,1 equiv.), sal disódica de UTP (0,1 equiv.), MgCl₂ (10 mM), β-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa (β1,3GalNAcT, LgtD, 3,5 unidades), N-acetilhexosamina 1-quinasa (NahK, 5,0 unidades), N-acetilglucosamina 1-fosfato uridililtransferasa (GlmU, 3,0 unidades), PK (2,5 unidades), PPA (2,5 unidades). La mezcla de la reacción se incubó a temperatura ambiente durante la noche con agitación (300 rpm). La reacción se monitorizó mediante análisis TLC usando butanol/acetato/agua 5:3:2 como solvente de desarrollo y las placas se tiñeron con anisaldehído en etanol. El tubo se puso en el baño caliente (80° C) durante 10 min, seguido de centrifugación (10000 rpm, 15 min) y el sobrenadante se concentró al vacío. Luego, el residuo acuoso se purificó mediante cromatografía en gel C-18 y se eluyó mediante un gradiente de 100% de H₂O a 80% de metanol en H₂O. Solo se recogieron las fracciones que contenían el producto, se liofilizaron y se caracterizaron por espectroscopia de RMN y HRMS.

Síntesis de derivados de Gb5-Lac

Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de centrifuga de 15 ml con 3,0 ml de tampón Tris-HCl (100 mM, pH 7.0) que contenía derivados de Gb4 (5-8 mg), galactosa (1.1 equiv.), PEP (4.4 equiv.), sal disódica de ATP (0,1 equiv), sal disódica de UTP (0,1 equiv), MgCl₂ (10 mM), β-1,3-galactosiltransferasa (β1,3GalT, LgtD, 5,0 unidades), GalK (2,5 unidades), AtUSP (4,0 unidades), PK (2,5 unidades) y PPA (2,5 unidades). La mezcla de la reacción se incubó a temperatura ambiente durante la noche con agitación (300 rpm). La reacción se monitorizó mediante análisis TLC usando butanol/acetato/agua 3:2:2 como solvente de desarrollo y las placas se tiñeron con anisaldehído en etanol. El tubo se puso en el baño caliente (80° C) durante 10 min, seguido de centrifugación (10000 rpm, 15 min) y el sobrenadante se concentró al vacío. El residuo acuoso se purificó por cromatografía sobre gel de C-18 y se eluyó por un gradiente de 100% de H₂O a 70% de metanol en H₂O. Sólo se recogieron las fracciones que contenían el producto, se liofilizaron y se caracterizaron por espectroscopia de NMR y HRMS.

Síntesis de derivados de Globo H-Lac o derivados de Globo H-Fuc

Las reacciones se realizaron en tubos de centrifuga de 15 ml con 3,0 ml de tampón Tris-HCl (100 mM, pH 7.0) que contenía derivados de Gb5 (4-6 mg), L-fucosa o sus derivados (1,2 equiv), PEP (4,4 equiv), sal disódica de ATP (0,1 equiv.), sal disódica de GTP (0,1 equiv.), MgCl₂ (10 mM), α-1,2-fucosiltransferasa (FutC, 3,0 unidades), L-fucoquinasa/GDP-fucosa pirofosforilasa (FKP, PK (2,5 unidades) y PPA (2,5 unidades). La mezcla de la reacción se incubó a temperatura ambiente durante la noche con agitación (300 rpm). La reacción se monitorizó mediante análisis TLC usando butanol/acetato/agua 3:2:2 como solvente de desarrollo y las placas se tiñeron con anisaldehído en etanol. El tubo se puso en el baño caliente (80° C) durante 10 min, seguido de centrifugación (10000 rpm, 15 min) y el sobrenadante se concentró al vacío. El residuo acuoso se purificó por cromatografía sobre gel de C-18 y se eluyó por un gradiente de 100% de H₂O a 80% de metanol en H₂O. Sólo se recogieron las fracciones que contenían el producto, se liofilizaron y se caracterizaron por espectroscopia de NMR y HRMS.



5-aminopentil α-D-galactopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-6-desoxi-6-fluoro-β-D-glucopiranosido (16)

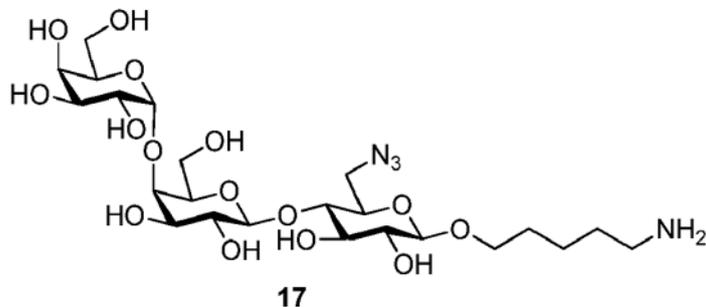
¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 4.97 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 4.94 - 4.70 (m, 1H), 4.53 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.53 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 4.37 (t, J = 6.5 Hz, 1H), 4.05 (dd, J = 7.9, 3.2 Hz, 2H), 3.98 - 3.64 (m, 14H), 3.60 (dd, J = 10.3, 7.8 Hz,

1H), 3.33 (dd, $J = 9.3, 8.1$ Hz, 1H), 2.92 (m, 2H), 1.76 - 1.64 (m, 4H), 1.52 - 1.42 (m, 2H). ^{19}F NMR (470 MHz, CDCl_3) δ -234.92 (td, $J = 47.0, 32.9$ Hz). ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ 103.29, 102.15, 100.31, 81.94, 80.82, 77.40, 77.36, 75.40, 74.29, 73.35, 73.23, 72.87, 72.15, 70.87, 70.81, 70.25, 69.13, 68.92, 68.53, 60.49, 60.38, 39.37, 28.17, 26.55, 22.07. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{FNO}_{15}\text{H}^+$ 592.2611, encontrado 592.2620.

5

10

15



17

5-aminopentil α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-6-azido-6-desoxi- β -D-glucopiranosido (17)

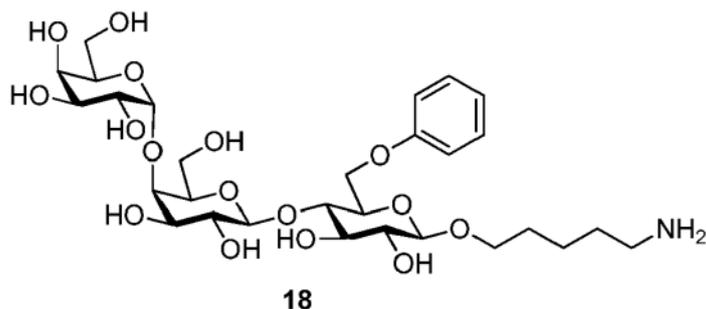
20

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 4.97 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 4.55 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.49 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.37 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 4.06 (dd, $J = 7.6, 3.0$ Hz, 2H), 4.00 - 3.56 (m, 16H), 3.34 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 3.01 - 2.94 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.72 - 1.66 (m, 4H), 1.49 - 1.43 (m, 2H). ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ 106.16, 104.71, 103.03, 82.33, 80.03, 78.20, 77.04, 76.44, 75.62, 74.89, 73.61, 73.55, 72.99, 71.87, 71.66, 71.28, 63.23, 63.10, 53.12, 42.21, 30.97, 29.78, 24.88. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_{15}\text{H}^+$ 615.2719, encontrado 615.2734.

25

30

35



18

5-aminopentil α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-6-O-fenil- β -D-glucopiranosido (18)

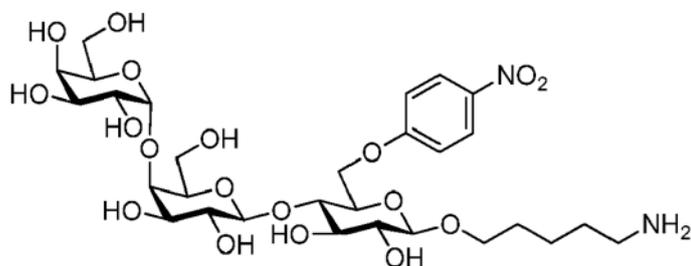
40

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 7.43 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.11 (m, 3H), 4.94 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 4.56 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.48 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 4.42 (dd, $J = 10.9, 3.5$ Hz, 1H), 4.35 (m, 2H), 4.04 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 3.97 - 3.81 (m, 8H), 3.79 - 3.65 (m, 4H), 3.65 - 3.48 (m, 3H), 3.37 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 2.98 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.68 (s, 4H), 1.47 (dd, $J = 14.6, 7.4$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ 160.54, 132.68, 124.56, 117.82, 105.93, 104.97, 103.00, 80.47, 80.05, 78.23, 77.13, 75.83, 75.73, 74.84, 73.54, 73.43, 72.92, 71.85, 71.65, 71.26, 68.62, 63.23, 63.15, 42.12, 30.93, 29.34, 24.81. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{NO}_{16}\text{H}^+$ 666.2968, encontrado 666.2979.

45

50

55



19

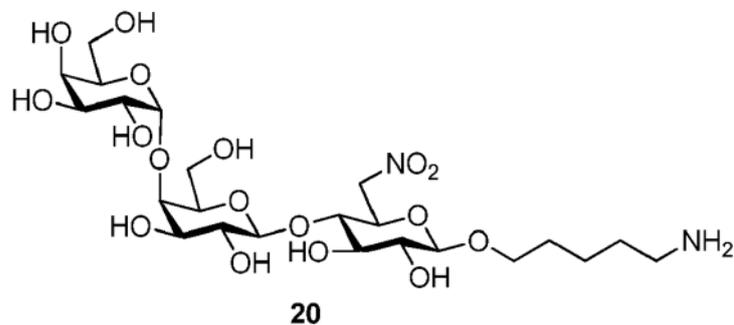
5-aminopentil α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-6-O-*p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (19)

60

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 8.29 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 7.20 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 4.94 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 4.59 - 4.50 (m, 3H), 4.37 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.34 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.04 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 3.99 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 3.97 - 3.84 (m, 4H), 3.84 - 3.66 (m, 4H), 3.73 - 3.66 (m, 5H), 3.60 - 3.53 (m, 2H), 3.39 - 3.36 (m, 1H), , 2.97 (t, $J = 7.5$ Hz,

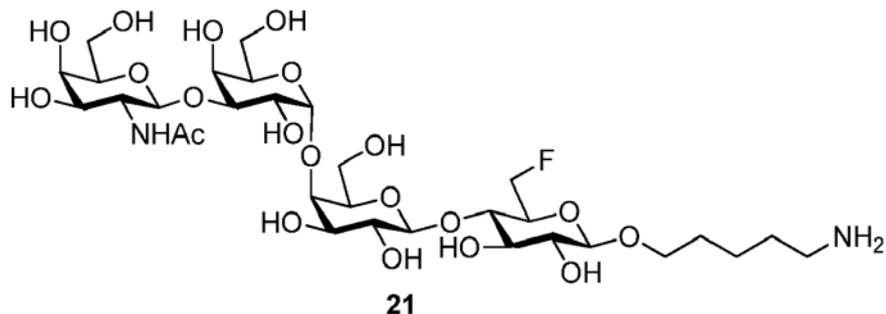
65

2H), 1.68 - 1.63 (m, 4H), 1.46 - 1.41 (m, 2H). ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ 166.28, 144.25, 128.97, 117.83, 106.20, 104.97, 102.99, 80.82, 79.96, 78.25, 77.13, 75.68, 75.56, 74.86, 73.54, 73.43, 72.93, 71.85, 71.65, 71.25, 69.09, 63.22, 63.12, 42.15, 30.94, 29.56, 24.84. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_{18}\text{H}^+$ 711.2818, encontrado 711.2800.



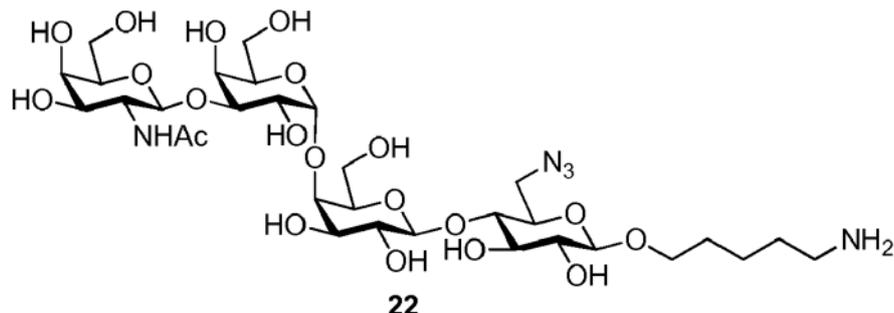
5-aminopentil α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-6-desoxi-6-nitro- β -D-glucopiranosido (20)

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 4.96 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 4.54 (m, 2H), 4.36 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 4.31 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 4.05 - 4.03 (m, 2H), 3.99 - 3.51 (m, 15H), 3.32 (m, 1H), 3.00 (m, 2H), 1.68 - 1.60 (m, 4H), 1.46 - 1.40 (m, 2H). ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ 102.70, 101.73, 100.04, 79.37, 76.98, 75.20, 73.91, 72.59, 71.80, 70.45, 70.40, 70.34, 69.95, 68.86, 68.61, 68.32, 65.87, 60.19, 60.13, 52.12, 39.71, 29.10, 28.16, 22.00. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{H}^+$ 619.2556, encontrado 619.2559.



5-aminopentil 2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-6-desoxi-6-fluoro- β -D-glucopiranosido (21)

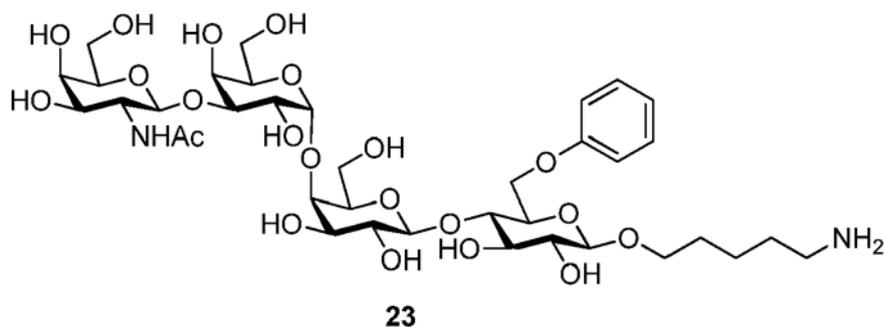
^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 4.93 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 4.92-4.74 (m, 2H), 4.75 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 4.66 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.55 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.53 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.41 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.28 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 4.07 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 4.02 - 3.64 (m, 18H), 3.62 (dd, $J = 10.2, 7.8$ Hz, 1H), 3.34 (m, 1H), 2.99 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.75 - 1.64 (m, 4H), 1.55 - 1.43 (m, 2H). ^{19}F NMR (471 MHz, D_2O) δ -234.84 (td, $J = 47.0, 32.9$ Hz). ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ 177.91, 106.06, 105.95, 104.89, 103.15, 84.69, 83.57, 81.42, 80.22, 80.18, 79.97, 78.16, 77.68, 77.05, 76.10, 75.98, 75.65, 74.85, 73.59, 73.52, 73.03, 71.67, 70.50, 70.35, 63.74, 63.11, 63.07, 55.35, 42.19, 30.95, 29.68, 24.99, 24.85. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{55}\text{FN}_2\text{O}_{20}\text{H}^+$ 795.3405, encontrado 795.3429.



5-aminopentil 2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-6-azido-6-desoxi- β -D-glucopiranosido (22)

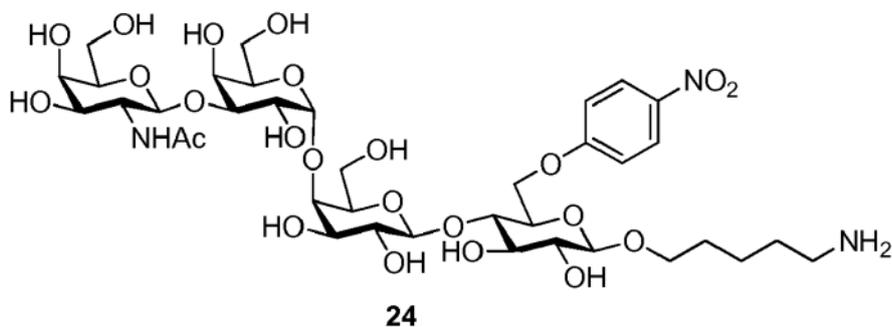
^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 4.94 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 4.66 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.56 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.51

(d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.40 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 4.28 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 4.07 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 4.02 - 3.57 (m, 22H), 3.35 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H), 2.99 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.76 - 1.63 (m, 4H), 1.48 (dt, $J = 15.5, 7.7$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ 177.91, 106.19, 105.95, 104.72, 103.13, 82.41, 81.43, 79.90, 78.23, 77.68, 77.07, 76.44, 75.66, 74.85, 73.59, 73.53, 73.00, 72.99, 71.67, 70.50, 70.34, 63.74, 63.11, 63.05, 55.36, 53.13, 42.17, 30.97, 29.57, 24.99, 24.88. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{55}\text{N}_5\text{O}_{20}\text{H}^+$ 818.3513, encontrado 818.3543.



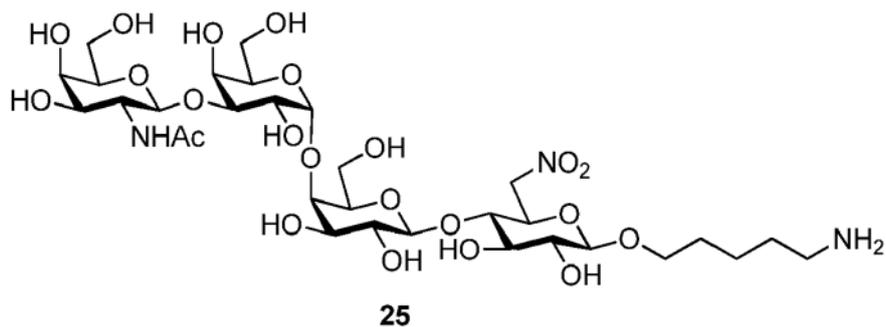
5-aminopentil 2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1→3)-α-D-galactopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-6-O-fenil-β-D-glucopiranosido (23)

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 7.40 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.08 (m, 3H), 4.89 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 4.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.54 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.47 - 4.31 (m, 4H), 4.25 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 4.00 - 3.84 (m, 9H), 3.84 - 3.67 (m, 9H), 3.67 - 3.45 (m, 3H), 3.43 - 3.34 (m, 1H), 2.98 (m, 2H), 2.05 (s, 3H), 1.66 (m, 4H), 1.44 (m, 2H). ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ 177.92, 160.53, 132.66, 124.54, 117.79, 105.96, 105.95, 104.96, 103.10, 81.41, 80.58, 79.91, 78.24, 77.67, 77.15, 75.83, 75.77, 75.58, 74.80, 73.52, 73.40, 72.99, 72.90, 71.67, 70.50, 70.33, 68.64, 63.74, 63.10, 55.34, 42.06, 30.92, 29.13, 25.00, 24.80. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{37}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_{21}\text{H}^+$ 869.3761, encontrado 869.3795.



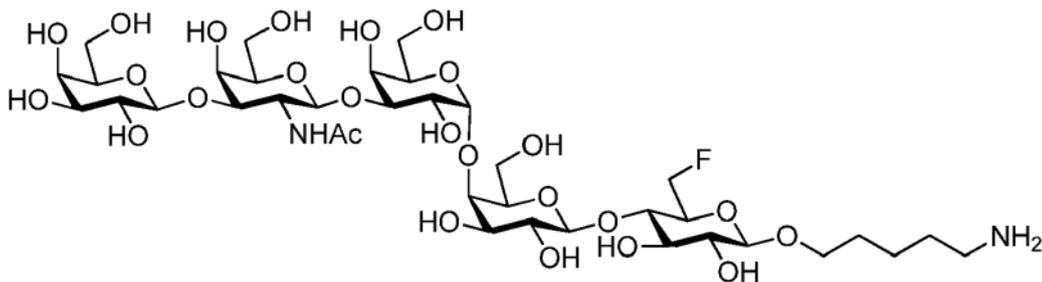
5-aminopentil 2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1→3)-α-D-Galactopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-6-O-p-nitrofenil-β-D-glucopiranosido (24)

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 8.29 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 7.20 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 4.90 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.56 (m, 3H), 4.41 - 4.33 (m, 2H), 4.25 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 4.02 - 3.74 (m, 13H), 3.73 - 3.63 (m, 7H), 3.61 - 3.52 (m, 2H), 3.38 (t, $J = 8.7$ Hz, 1H), 2.87 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.06 (s, 3H), 1.66 - 1.59 (m, 4H), 1.44 - 1.40 (m, 2H). ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ 177.90, 166.28, 144.25, 128.97, 117.83, 106.20, 105.93, 104.97, 103.10, 81.39, 80.92, 79.85, 78.27, 77.68, 77.16, 75.72, 75.57, 74.83, 73.52, 73.42, 73.00, 72.89, 71.66, 70.50, 70.32, 69.11, 63.74, 63.10, 55.36, 42.08, 30.94, 29.20, 24.99, 24.82. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{37}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_{23}\text{H}^+$ 914.3612, encontrado 914.3609.



5-aminopentil **2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1→3)-α-D-galactopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-6-desoxi-6-nitro-β-D-glucopiranosido (25)**

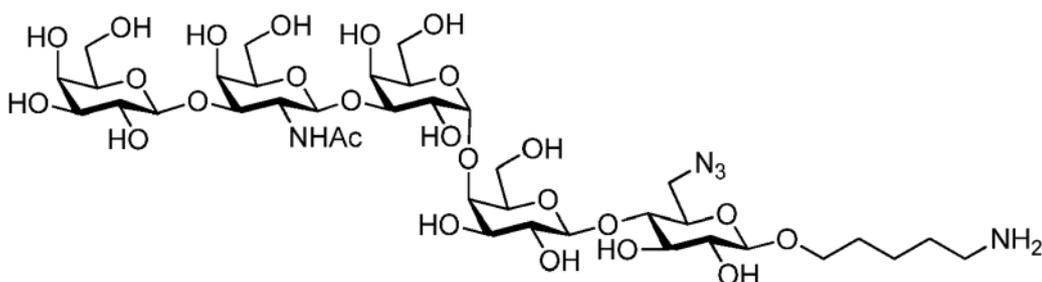
¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 4.96 - 4.90 (m, 1H), 4.68 - 4.50 (m, 4H), 4.39 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 4.32 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 4.27 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 4.05 (dd, *J* = 9.6, 2.9 Hz, 1H), 4.01 - 3.64 (m, 19H), 3.64 - 3.53 (m, 1H), 3.38 - 3.29 (m, 1H), 3.07 - 2.91 (m, 2H), 2.05 (s, 3H), 1.70 - 1.60 (m, 4H), 1.47 - 1.40 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, D₂O) δ 175.16, 103.45, 103.22, 102.10, 100.37, 79.82, 78.70, 77.08, 75.53, 74.92, 74.24, 72.71, 72.08, 71.09, 70.77, 70.75, 70.60, 70.25, 68.91, 67.74, 67.58, 60.98, 60.35, 60.24, 52.59, 39.31, 39.29, 28.18, 26.37, 22.23, 22.01. HRMS (ESI-TOF, MH⁺) calculado para C₃₁H₅₅N₃O₂₂H⁺ 822.3350, encontrado 822.3357.



26

5-aminopentil **β-D-galactopiranosil-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1→3)-α-D-Galactopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-6-desoxi-6-fluoro-β-D-glucopiranosido (26)**

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 4.97 - 4.84 (m, 2H), 4.71 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.54 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.51 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.46 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.40 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.26 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 4.19 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 4.11 - 4.03 (m, 2H), 3.95 (m, 6H), 3.91 - 3.50 (m, 18H), 3.33 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H), 2.98 (m, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.70-1.67 (m, 4H), 1.54 - 1.33 (m, 2H). ¹⁹F NMR (471 MHz, D₂O) δ -234.85 (td, *J* = 47.0, 28.2 Hz). ¹³C NMR (150 MHz, D₂O) δ 175.11, 104.79, 103.31, 102.89, 102.13, 100.38, 81.92, 80.80, 79.55, 78.63, 77.45, 77.41, 77.19, 75.40, 74.98, 74.59, 74.29, 73.34, 73.22, 72.89, 72.43, 72.08, 72.03, 70.82, 70.57, 70.28, 70.25, 68.90, 68.55, 67.97, 67.58, 62.45, 60.98, 60.94, 60.34, 60.31, 51.48, 39.43, 28.19, 26.91, 22.25, 22.09. HRMS (ESI-TOF, MH⁺) calculado para C₃₇H₆₅FN₂O₂₅H⁺ 957.3933, encontrado 957.3969.



27

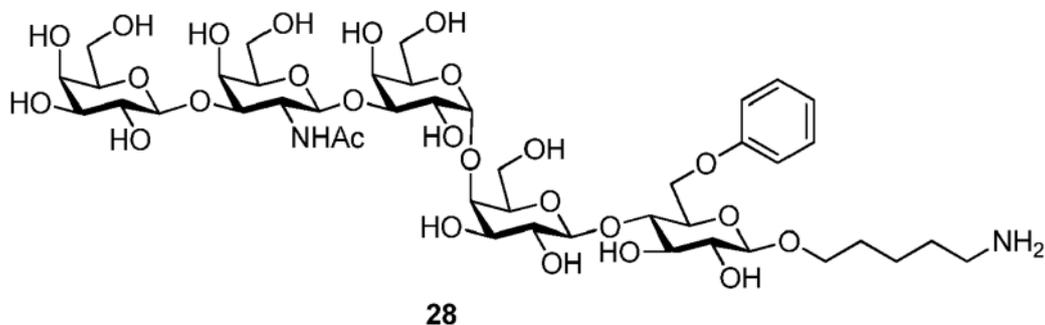
5-aminopentil **β-D-galactopiranosil-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1→3)-α-D-Galactopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-6-azido-6-desoxi-β-D-glucopiranosido (27)**

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 4.94 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.72 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.56 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.48 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.40 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.28 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 4.21 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 4.16 - 4.04 (m, 2H), 4.04 - 3.89 (m, 7H), 3.89 - 3.51 (m, 19H), 3.35 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.02 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.05 (s, 3H), 1.79 - 1.68 (m, 4H), 1.49 - 1.47 (m, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 180.40, 110.09, 108.73, 108.18, 107.26, 105.66, 84.95, 84.85, 83.94, 82.43, 80.76, 80.27, 79.89, 79.61, 78.98, 78.20, 77.73, 77.38, 76.13, 75.87, 75.55, 75.50, 74.20, 73.85, 73.26, 72.87, 66.28, 66.23, 65.64, 65.59, 56.78, 55.67, 44.64, 33.48, 31.75, 27.55, 27.39. HRMS (ESI-TOF, MH⁺) calculado para C₃₇H₆₅N₅O₂₅H⁺ 980.4041, encontrado 980.4080.

5

10

15



20 **5-aminopentil** β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-6-O-fenil- β -D-glucopiranosido (28)

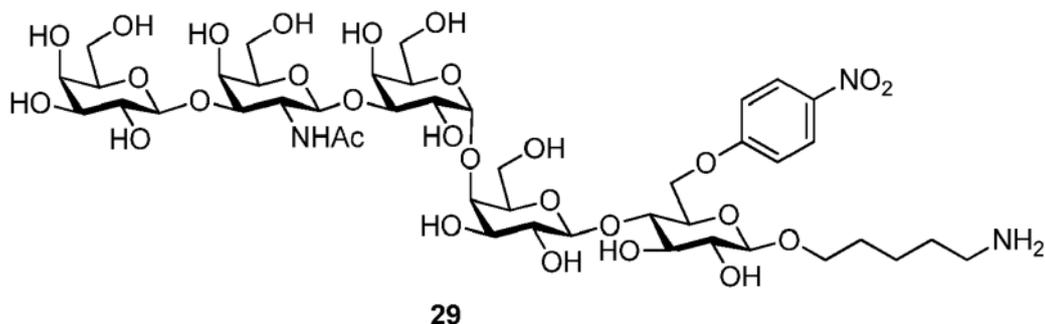
25

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 7.43 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.11 (d, J = 8.2 Hz, 3H), 4.91 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 4.71 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 4.56 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 4.48 - 4.36 (m, 5H), 4.26 (s, 1H), 4.20 (a, 1H), 4.09 (t, J = 10.1 Hz, 1H), 3.98 - 3.63 (m, 22H), 3.59 - 3.51 (m, 3H), 3.39 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 2.91 (m, 2H), 2.05 (s, 3H), 1.67 (m, 4H), 1.45 (m, 2H). ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ 177.87, 160.55, 132.68, 124.57, 117.82, 107.55, 105.96, 105.64, 104.97, 103.10, 82.31, 81.37, 80.57, 79.91, 78.24, 77.74, 77.34, 77.15, 75.83, 75.77, 75.20, 74.79, 73.40, 73.33, 73.00, 71.66, 71.31, 70.72, 70.32, 68.65, 65.21, 63.74, 63.69, 63.10, 54.23, 42.28, 31.01, 30.15, 25.01, 24.87. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{70}\text{N}_2\text{O}_{26} + \text{H}$: 1031.4290, encontrado 1031.4300.

30

35

40



45 **5-aminopentil** β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-6-O-p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (29)

45

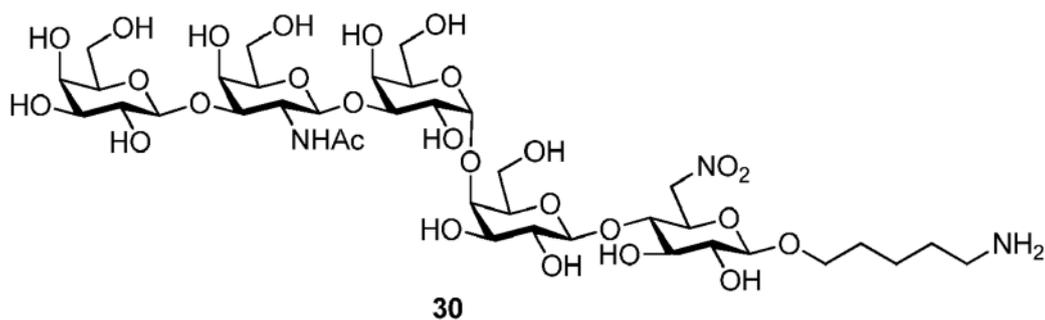
50

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 8.30 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 7.20 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 4.91 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 4.71 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 4.57 (d, J = 5.8 Hz, 3H), 4.47 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 4.41 - 4.33 (m, 2H), 4.26 (s, 1H), 4.20 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.93 - 3.62 (m, 21H), 3.59 - 3.53 (m, 3H), 3.38 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 2.88 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.58 (m, 4H), 1.42 - 1.25 (m, 2H). ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ 175.10, 163.52, 141.49, 126.21, 115.07, 104.80, 103.47, 102.87, 102.22, 100.34, 79.55, 78.60, 78.15, 77.07, 75.52, 74.98, 74.59, 74.39, 72.97, 72.81, 72.44, 72.06, 70.65, 70.57, 70.24, 70.20, 68.90, 68.55, 67.97, 67.56, 66.35, 60.98, 60.94, 60.33, 51.49, 39.41, 28.21, 26.92, 22.26, 22.10. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{69}\text{N}_3\text{O}_{28}\text{H}^+$ 1076.4140, encontrado 1076.4135.

55

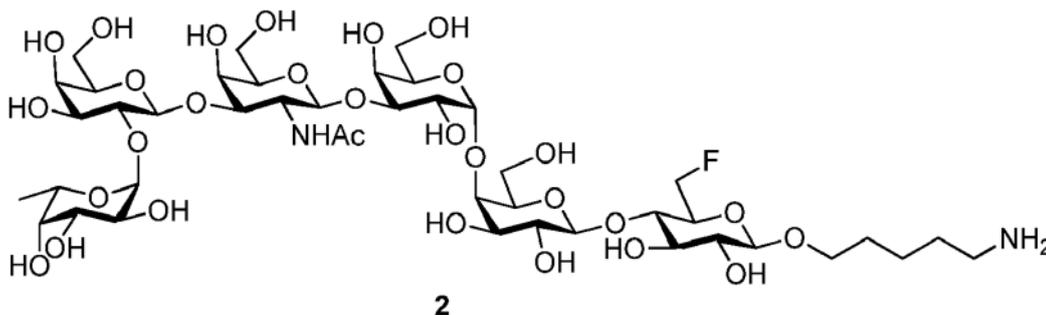
60

65



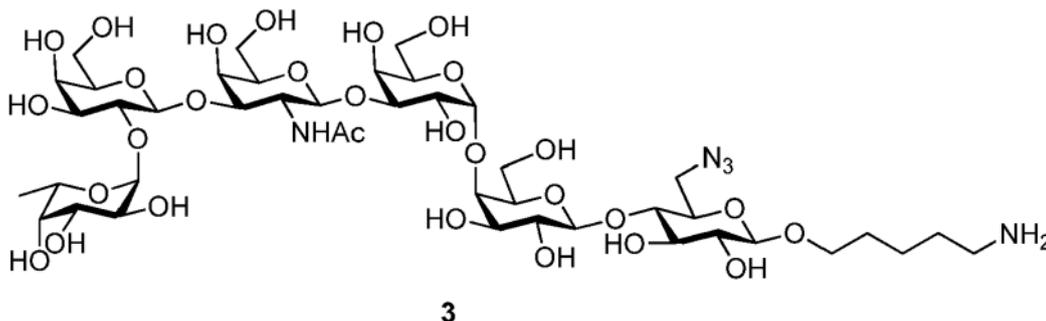
5-aminopentil β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-6-desoxi-6-nitro- β -D-glucopiranosido (30)

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 4.93 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 4.70 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 4.60 - 4.51 (m, 2H), 4.47 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.43 - 4.28 (m, 2H), 4.27 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.20 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 4.17 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 4.07 - 3.97 (m, 3H), 3.97 - 3.49 (m, 22H), 3.41 - 3.28 (m, 1H), 3.01 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.86 - 1.55 (m, 4H), 1.63 - 1.25 (m, 3H). ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ 175.10, 104.79, 103.45, 102.91, 102.09, 100.36, 79.83, 79.54, 78.67, 77.06, 75.53, 74.98, 74.59, 74.24, 72.71, 72.43, 72.08, 71.15, 71.09, 70.78, 70.61, 70.57, 70.26, 68.89, 68.54, 67.96, 67.58, 60.97, 60.93, 60.34, 60.23, 51.47, 39.29, 28.19, 26.35, 22.26, 22.01. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{37}\text{H}_{65}\text{N}_3\text{O}_{27}\text{H}^+$ 984.3878, encontrado 984.3864.



5-aminopentil α -L-fucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-6-desoxi-6-fluoro- β -D-glucopiranosido (Compuesto 2)

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 5.25 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 4.92 (d, J = 3.7 Hz, 2H), 4.84-4.74 (m, 1H), 4.65 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.56 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.55 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 4.52 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 4.41 (t, J = 6.5 Hz, 1H), 4.28 (m, 2H), 4.07 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 4.13 - 3.64 (m, 32H), 3.34 (t, J = 8.5 Hz, 1H), 2.99 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.75 - 1.64 (m, 4H), 1.55 - 1.43 (m, 2H). ^{19}F NMR (470 MHz, CDCl_3) δ -234.87 (td, J = 47.0, 32.9 Hz). ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ 174.28, 103.95, 103.33, 102.15, 102.04, 100.45, 99.27, 81.94, 81.72, 80.83, 78.23, 77.49, 77.46, 77.21, 76.36, 76.11, 75.46, 75.07, 74.63, 74.31, 73.58, 73.36, 73.24, 72.91, 72.10, 71.85, 70.83, 70.29, 70.16, 69.52, 69.18, 69.11, 68.48, 68.02, 67.83, 66.79, 60.98, 60.96, 60.36, 51.65, 39.43, 28.21, 26.84, 22.25, 22.10, 15.31. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{75}\text{FN}_2\text{O}_{29}\text{H}^+$ 1103.4512, encontrado 1103.4549.



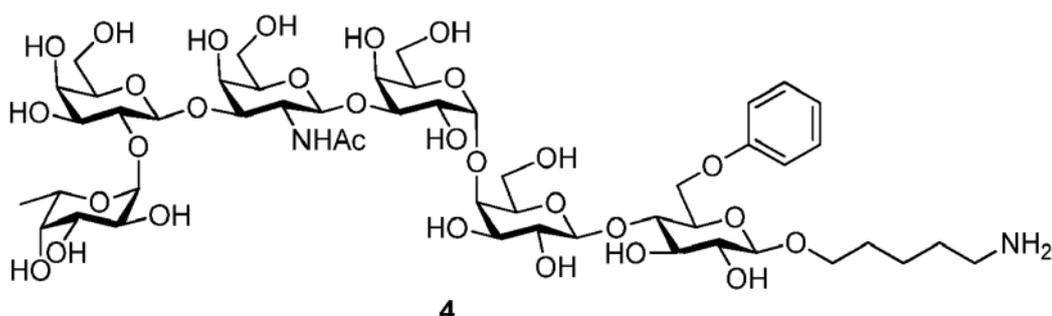
5-aminopentil α -L-fucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-6-azido-6-desoxi- β -D-glucopiranosido (Compuesto 3)

^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 5.26 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 4.92 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 4.64 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 4.57 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.55 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.50 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 4.41 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 4.34 - 4.23 (m, 2H), 4.13 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 4.09 - 3.57 (m, 31H), 3.35 (t, J = 8.5 Hz, 1H), 3.06 - 2.99 (m, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.77 - 1.63 (m, 4H), 1.53 - 1.41 (m, 2H), 1.24 (d, J = 6.6 Hz, 3H). ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ 177.02, 106.70, 106.20, 104.79, 104.72, 103.18, 102.02, 82.42, 80.99, 79.88, 79.11, 78.85, 78.27, 77.81, 77.37, 77.07, 76.44, 76.33, 75.66, 74.84, 74.59, 73.57, 72.96, 72.89, 72.26, 71.91, 71.85, 71.22, 70.77, 70.56, 69.53, 63.73, 63.70, 63.10, 54.39, 53.13, 42.09, 30.94, 29.17, 24.99, 24.85, 18.05. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{75}\text{N}_5\text{O}_{29}\text{H}^+$ 1126.4620, encontrado 1126.4639.

5

10

15



4

20

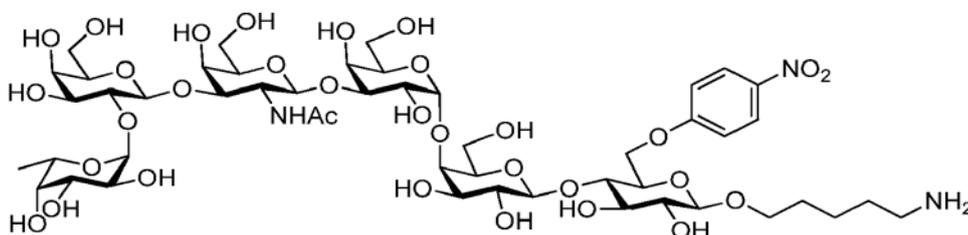
5-aminopentil α-L-fucopiranosil-(1→2)-β-D-galactopiranosil-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1→3)-α-D-Galactopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-6-O-fenil-β-D-glucopiranosido (Compuesto 4)

25

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, D_2O) δ 7.43 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.11 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H), 5.26 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 4.89 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 4.64 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.57 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.55 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.48 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 4.45 - 4.34 (m, 3H), 4.27 - 4.24 (m, 2H), 4.13 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 4.06 - 3.62 (m, 27H), 3.58 - 3.50 (m, 2H), 3.39 (dd, $J = 9.3, 8.2$ Hz, 1H), 2.91 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.73 - 1.60 (m, 4H), 1.51 - 1.39 (m, 2H), 1.24 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, D_2O) δ 174.28, 157.80, 129.93, 121.82, 115.08, 103.95, 103.24, 102.23, 102.05, 100.40, 99.28, 78.22, 77.85, 77.14, 76.36, 76.11, 75.54, 75.07, 74.62, 74.42, 73.58, 73.09, 73.04, 72.05, 71.85, 70.64, 70.28, 70.13, 69.52, 69.17, 69.11, 68.48, 68.02, 67.81, 66.78, 65.91, 60.98, 60.95, 60.38, 60.35, 51.64, 39.56, 28.27, 27.49, 22.25, 22.13, 15.31. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{49}\text{H}_{80}\text{N}_2\text{O}_{30}\text{H}^+$ 1177.4869, encontrado 1177.4918.

35

40



5

45

5-aminopentil α-L-fucopiranosil-(1→2)-β-D-galactopiranosil-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1→3)-α-D-Galactopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-6-O-p-nitrofenil-β-D-glucopiranosido (Compuesto 5)

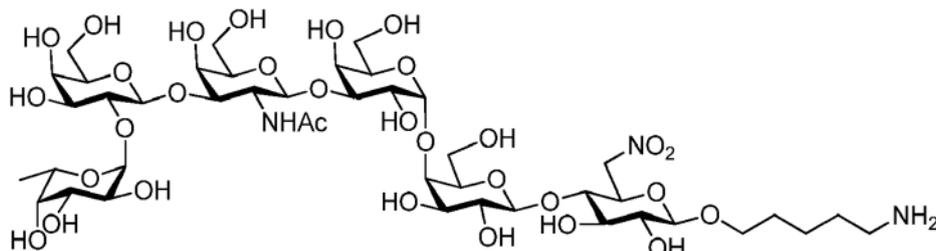
50

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, D_2O) δ 8.30 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.21 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 5.26 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 4.89 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.60 (m, 3H), 4.39 (m, 2H), 4.25 - 4.21 (m, 1H), 4.13 (s, 1H), 4.01 - 3.65 (m, 28H), 3.59 - 3.56 (m, 3H), 3.45 - 3.35 (m, 1H), 2.94 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.66 - 1.62 (m, 4H), 1.44 - 1.42 (m, 2H), 1.24 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, D_2O) δ 177.03, 166.29, 144.26, 128.97, 117.83, 106.69, 106.25, 104.98, 104.79, 103.15, 102.02, 80.94, 79.82, 79.10, 78.85, 78.31, 77.81, 77.37, 77.16, 76.32, 75.73, 75.56, 74.82, 74.78, 74.59, 73.40, 72.97, 72.88, 72.26, 71.91, 71.86, 71.22, 70.77, 70.55, 69.53, 69.12, 65.21, 63.73, 63.70, 63.09, 54.39, 42.19, 30.97, 24.99, 24.86, 18.05. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{49}\text{H}_{79}\text{N}_3\text{O}_{32}\text{H}^+$ 1222.4719, encontrado 1222.4729.

55

60

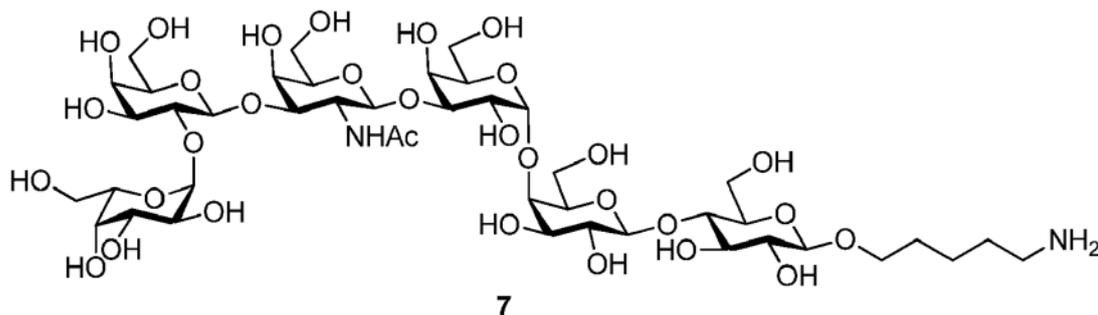
65



6

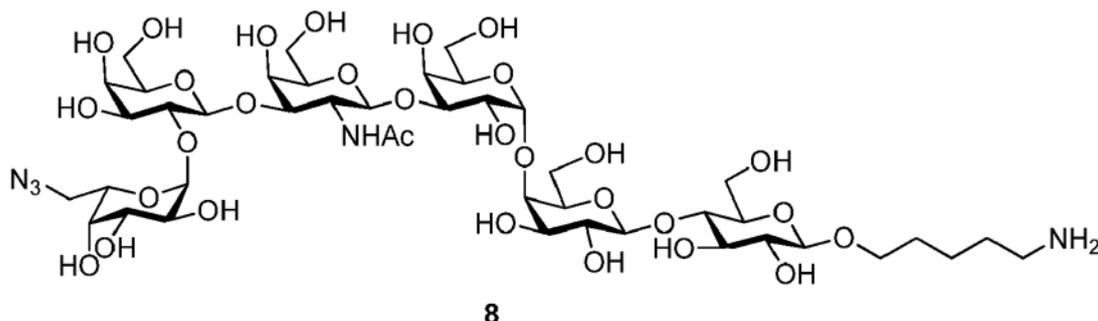
5-aminopentil α -L-fucopiranosil-(1→2)- β -D-galactopiranosil-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1→3)- α -D-Galactopiranosil-(1→4)- β -D-galactopiranosil-(1→4)-6-desoxi-6-nitro- β -D-glucopiranosido (Compuesto 6)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, D_2O) δ 5.26 (s, 1H), 4.91 (s, 1H), 4.69 - 4.52 (m, 5H), 4.42 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 4.34 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.26 (m, 2H), 4.13 (s, 1H), 4.12 - 3.62 (m, 28H), 3.57 (m, 1H), 3.34 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 3.02 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.80 - 1.62 (m, 4H), 1.47 (dt, $J = 22.4, 7.5$ Hz, 2H), 1.24 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H). HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{75}\text{N}_3\text{O}_{31}\text{H}^+$ 1130.4457, encontrado 1130.4438.



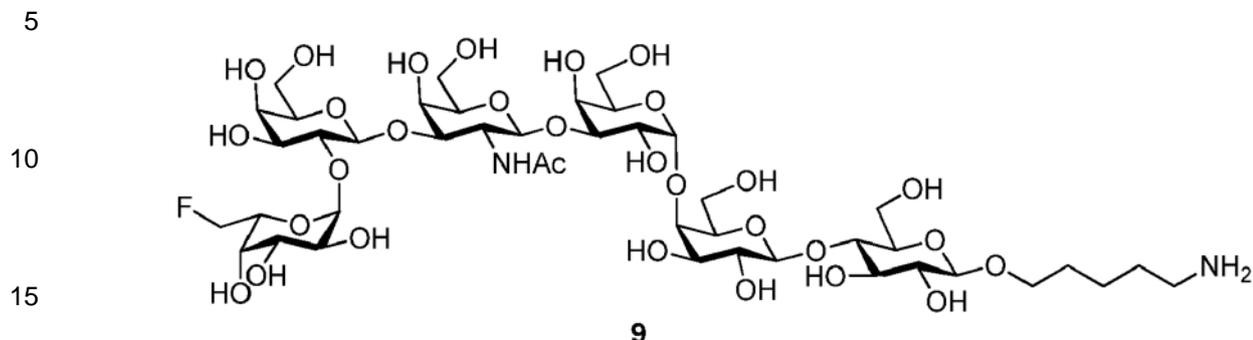
5-aminopentil α -L-galactopiranosil-(1→2)- β -D-galactopiranosil-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1→3)- α -D-Galactopiranosil-(1→4)- β -D-galactopiranosil-(1→4)- β -D-glucopiranosido (Compuesto 7)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, D_2O) δ 5.40 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 4.92 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.61 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.53 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.41 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 4.34 - 4.24 (m, 2H), 4.15 - 3.56 (m, 34H), 3.33 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 2.97 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.09 (s, 3H), 1.74 - 1.66 (m, 4H), 1.49 - 1.42 (m, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, D_2O) δ 174.45, 103.70, 103.30, 102.02, 101.95, 100.42, 98.45, 78.77, 78.40, 77.16, 76.09, 75.47, 75.15, 74.79, 74.58, 74.52, 74.50, 73.71, 72.93, 72.09, 70.85, 70.24, 70.14(2C), 69.44, 69.20, 69.17, 69.06, 68.43, 68.28, 67.75, 61.76, 60.96, 60.89, 60.33, 60.03, 51.49, 39.47, 28.20, 27.12, 22.30, 22.12. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_{31}\text{H}^+$ 1117.4505, encontrado 1117.4488.



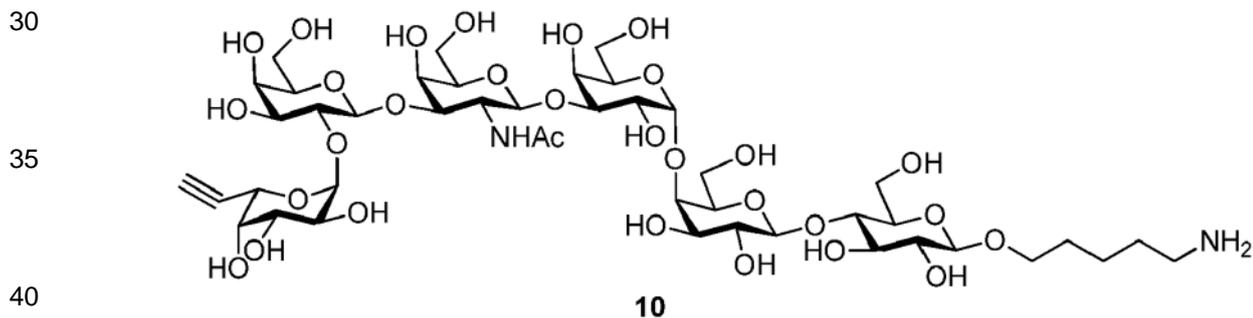
5-aminopentil 6-azido-6-desoxi- α -L-galactopiranosil-(1→2)- β -D-galactopiranosil-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-galactopiranosil-(1→3)- α -D-Galactopiranosil-(1→4)- β -D-galactopiranosil-(1→4)- β -D-glucopiranosido (Compuesto 8)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, D_2O) δ 5.46 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 4.92 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.60 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 4.53 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.53 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.41 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 4.34 - 4.24 (m, 2H), 4.18 (s, 1H), 4.09 - 3.59 (m, 32H), 3.33 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H), 2.99 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.08 (s, 3H), 1.78 - 1.64 (m, 4H), 1.55 - 1.44 (m, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, D_2O) δ 174.36, 103.87, 103.30, 102.29, 101.95, 100.42, 98.41, 78.79, 78.35, 77.17, 76.95, 75.48, 75.11, 74.79, 74.67, 74.53, 74.43, 73.85, 72.93, 72.09, 70.85, 70.15, 70.12, 69.67, 69.61, 69.14, 69.08, 69.05, 68.56, 68.02, 67.78, 60.95, 60.91, 60.33, 60.04, 51.40, 51.25, 39.44, 28.19, 26.96, 22.32, 22.10. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{75}\text{N}_5\text{O}_{30}\text{H}^+$ 1142.4570, encontrado 1142.4569.



20 **5-aminopentil 6-desoxi-6-fluoro-α-L-galactopiranosil-(1→2)-β-D-galactopiranosil-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1→3)-α-D-Galactopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosido (Compuesto 9)**

25 ^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 5.40 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 4.91 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 4.69 (m, 1H), 4.64 - 4.60 (m, 2H), 4.57 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 4.52 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.49 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.39 (m, 2H), 4.26 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.12 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 4.09 - 3.56 (m, 31H), 3.32 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H), 2.99 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.71 - 1.66 (m, 4H), 1.49 - 1.44 (m, 2H). ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ 174.38, 103.84, 103.30, 102.05, 101.95, 100.43, 98.98, 83.96, 82.86, 78.79, 78.27, 77.16, 76.69, 75.65, 75.48, 75.09, 74.79, 74.52, 74.47, 73.65, 72.93, 72.09, 70.85, 70.14, 70.12, 69.11, 68.96, 68.36, 68.05, 67.80, 60.95, 60.90, 60.34, 60.03, 51.45, 39.43, 28.18, 26.89, 22.28, 22.10. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{43}\text{H}_{75}\text{FN}_2\text{O}_{30}\text{H}^+$ 1119.4461, encontrado 1119.4459.



45 **5-aminopentil 6-acetilenil-6-desoxi-α-L-galactopiranosil-(1→2)-β-D-galactopiranosil-(1→3)-2-acetamido-2-desoxi-β-D-galactopiranosil-(1→3)-α-D-Galactopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosido (Compuesto 10)**

50 ^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 5.32 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 4.91 (d, $J = 3.0$ Hz, 2H), 4.64 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.59 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.53 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.40 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.26 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 4.17 - 4.13 (m, 2H), 4.05 - 3.58 (m, 32H), 3.32 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H), 3.02 (m, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.77 - 1.64 (m, 4H), 1.53 - 1.43 (m, 2H). ^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) δ 177.06, 106.53, 106.04, 104.69, 104.60, 103.17, 102.13, 81.52, 80.89, 79.91, 79.26, 78.87, 78.79, 78.22, 77.88, 77.54, 77.27, 77.19, 76.13, 75.67, 74.83, 74.77, 73.69, 73.59, 72.89, 72.81, 71.86, 71.83, 71.28, 71.19, 70.59, 70.21, 65.69, 65.19, 63.68, 63.64, 63.08, 62.77, 54.26, 42.06, 30.89, 29.13, 25.00, 24.81. HRMS (ESI-TOF, MH^+) calculado para $\text{C}_{44}\text{H}_{74}\text{N}_2\text{O}_{30}\text{H}^+$ 1111.4399, encontrado 1111.4397.

55 **EJEMPLO 5: Estudio de inmunogenicidad de los conjugados DT de derivados de GH**

60 Para investigar la inmunogenicidad de los conjugados DT de derivados de GH (**1-DT** a **10-DT**), se inmunizaron cinco ratones hembra BALB/c por vía intramuscular con 2 μg de conjugados DT de derivados de GH y 2 μg del adyuvante de glicolípidos C34 tres veces a intervalos de dos veces por semana. En el estudio anterior, el título de anticuerpos anti-GH fue bajo con conjugados GH-proteína solos sin adyuvantes. ^{13b} Los antisueros de cada inmunógeno se obtuvieron diez días después de la tercera inmunización y se probaron en la micromatriz de glicanos que contenía 94 glicanos sintetizados químicamente, incluyendo GH **1**, derivados de GH **2-10**, fragmentos de derivados de GH **11-30** y otros antígenos de carbohidratos asociados a tumores (Tabla S1 en SI). Como se llevaron a cabo algunas modificaciones químicas en el glicano, también se incluyeron algunos conectores funcionales en la matriz de glicanos para verificar la reactividad cruzada.

65

Los anticuerpos inducidos por los conjugados DT de derivados de GH (**1-DT** a **10-DT**) fueron reconocidos específicamente por GH, derivados de GH y fragmentos de GH pero no por otros TACA y conectores funcionales. Se seleccionaron GH, Gb5 y SSEA4 como antígenos estándar para todos los conjugados DT (FIG. 1A-C). Los sueros obtenidos de estos glicoconjugados indujeron altos títulos de anticuerpos IgG, indicando una respuesta inmune dependiente de células T. Curiosamente, no se observó una producción significativa de IgM para todos los derivados de GH-Lac o Fuc. Con respecto al nivel de IgG contra GH, los títulos de anticuerpos inducidos por GH-N₃-DT (**3-DT**) y N₃-GH-DT (**8-DT**) fueron mucho más altos que los de la forma natural del conjugado GH-DT (**1-DT**), y los títulos de anticuerpos inducidos por GH-F-DT (**2-DT**) y GH-fenil-DT (**4-DT**) fueron comparables a la forma natural del conjugado GH-DT (**1-DT**). El grupo azido parece ser un inmunomodulador como GH-N₃-DT (**3-DT**) y N₃-GH-DT (**8-DT**) proporcionan buenos títulos. Se desconoce la razón del aumento de la inmunogenicidad, pero la propiedad del N₃ en el glicano de GH-N₃ **3** o N₃-GH **8** en comparación con GH natural puede desempeñar un papel crítico. La modulación de la inmunogenicidad por el grupo fluoro (F) en la GH es regioselectiva.^{19c, 33} La fracción F en la posición C-6 de Glc en el extremo reductor de GH podría inducir un título comparable al de GH natural, pero el título inducido por el grupo F en la posición C-6 de Fuc en el extremo no reductor de GH mostró una menor reacción con GH. Curiosamente, los anticuerpos inducidos por GH-fenil-DT (**4-DT**) puede reaccionar de forma cruzada con GH. Esta inmunogenicidad cruzada es incompatible con el informe anterior de que no se formó ninguna reacción cruzada con GM3 natural y STn con el uso de vacunas basadas en N-fenilacetil GM3 o STn.^{19a, 20} El inmunógeno GH-fenilNO₂-DT (**5-DT**), GH-NO₂-DT (**6-DT**), OH-GH-DT (**7-DT**), F-GH-DT (**9-DT**) y acetilfenil-GH-DT (**10-DT**) dio una respuesta débil a GH. Además, GH-fenilNO₂-DT (**5-DT**) y GH-NO₂-DT (**6-DT**) provocaron una fuerte respuesta inmune a los análogos de azúcar fenilNO₂ y NO₂, pero no a las formas naturales de los análogos de GH. Este resultado también es incompatible con el informe anterior de que una sola mutación de p-fenilNO₂ en TNF- α induce anticuerpos robustos para reconocer el TNF- α de tipo salvaje.^{21a} Curiosamente, los anticuerpos inducidos por estos glicoconjugados también mostraron el mismo patrón en el reconocimiento de Gb5 y SSEA4 (FIGS. 1B-C). Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que la modificación en la posición C-6 de la glucosa del extremo reductor de Globo H con el grupo fluoro, azido o fenilo provocó una sólida respuesta de anticuerpos IgG para reconocer específicamente a Globo H, Gb5 y SSEA. Sin embargo, solo la modificación de Globo H con el grupo azido en la posición C-6 de la fucosa del extremo no reductor podría provocar una fuerte respuesta inmune de IgG (ver Lee et al., J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 16844-16853).

Un análisis adicional de los isotipos de anticuerpos de las subclases de IgG de antisueros de estas vacunas usando la matriz de glicanos mostró que los anticuerpos tienen una cantidad significativa de IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3 y un nivel bajo de IgG2a. Además, la subclase IgG1 fue la más alta en los antisueros con un alto nivel de anticuerpo IgG3, que es una respuesta anti-carbohidratos típica y es consistente con una inmunidad mediada por células T.

Las capacidades de los antisueros de ratón inducidos por GH-DT (**1-DT**), GH-F-DT (**2-DT**), GH-N₃-DT (**3-DT**), GH-fenil-DT (**4-DT**) y N₃-GH-DT (**8-DT**) para reconocer las líneas celulares de cáncer de mama humano MCF7 que expresan GH se examinaron mediante citometría de flujo (FIG. 2). Como se esperaba, el antisuero provocado por GH-DT (**1-DT**) fue significativamente reactivo con células MCF7 positivas para GH en comparación con el antisuero de ratón no tratado. Las células MCF7 también fueron reconocidas específicamente por los antisueros provocados por los derivados de GH-DT (**2-DT**, **3-DT**, **4-DT** y **8-DT**).

EJEMPLO 6: Citotoxicidad dependiente del complemento de los conjugados DT de derivados de GH

La citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) fue estudiada por células cancerosas MCF7 que expresan GH (FIG. 3). Se sembraron células MCF-7 en placa de cultivo celular de 96 pocillos con una densidad de 10⁴ células por pocillo. Después de un cultivo durante la noche a 37° C, el medio de cultivo se reemplazó por 100 μ l de mezcla de antisuero/complemento y luego se incubó a 37° C durante 2 horas. Para preparar la mezcla de antisuero/complemento, el antisuero se diluyó 20 veces en medio de cultivo suplementado con 20% de complemento de conejo (Life Technologies). Después de la incubación, se determinó la citotoxicidad inducida por el antisuero usando el kit de ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Fitchburg, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El aumento relativo de citotoxicidad inducida por el antisuero se normalizó con respecto a la citotoxicidad provocada por el suero del ratón Blab/c no tratado.

Los antisueros obtenidos de la inmunización con GH-DT (**1-DT**), GH-F-DT (**2-DT**), GH-N₃-DT (**3-DT**), GH-fenil-DT (**4-DT**) y N₃-GH-DT (**8-DT**) fueron capaces de inducir significativamente la citotoxicidad de las células cancerosas en comparación con los sueros de ratones no tratados. La citotoxicidad celular de los antisueros obtenidos de GH-fenil-DT (**4-DT**) y N₃-GH-DT (**8-DT**) fueron comparables a la forma natural de GH-DT (**1-DT**). Curiosamente, los antisueros derivados de la vacuna GH-F-DT (**2-DT**) o GH-N₃-DT (**3-DT**) podían inducir una citotoxicidad en células cancerosas más de un 15% superior en comparación con la GH-DT (**1-DT**), lo que sugiere que estos derivados tienen el potencial de usarse como una mejor vacuna terapéutica.

Esta invención ha establecido una estrategia para la síntesis quimioenzimática de derivados de GH y sus conjugados inmunogénicos. Las propiedades inmunológicas de los conjugados de derivados de GH se evaluaron usando una matriz de glicanos y se compararon con la forma natural de GH-DT (**1-DT**). Los resultados mostraron

que la modificación en el extremo reductor de Globo H con el grupo fluoro, azido o fenilo provocó una fuerte respuesta de anticuerpos IgG para reconocer específicamente a Globo H, Gb5 y SSEA4, pero solo el derivado azido-fucosa de Globo H podía provocar una fuerte respuesta inmune de IgG. Además, los anticuerpos inducidos por GH-DT (**1-DT**), GH-F-DT (**2-DT**), GH-N₃-DT (**3-DT**), GH-fenil-DT (**4-DT**) y N₃-GH-DT (**8-DT**) reconocieron las células tumorales que expresan GH (MCF-7) y podían mediar en la citotoxicidad celular dependiente del complemento contra las células tumorales. Las vacunas de GH-F-DT (**2-DT**) y GH-N₃-DT (**3-DT**) tienen una mayor citotoxicidad de células cancerosas en comparación con GH-DT (**1-DT**), proporcionando una nueva generación de vacunas basadas en la modificación de estructuras de antígenos de carbohidratos.

10 **Métodos generales, materiales e instrumentación**

Todos los productos químicos y reactivos se adquirieron de Acros, Echo chemical, Merck Sigma-Aldrich, Fluka y se usaron sin purificación adicional. Todas las reacciones que implicaban reactivos o productos intermedios sensibles al aire o la humedad se realizaron bajo una atmósfera de argón. El tamiz de moléculas 4Å (Acros) se secó con un calentador a vacío alto. El progreso de las reacciones se monitorizó mediante cromatografía en capa fina sobre placa de gel de sílice 60 F₂₅₄ (2 mm, Merck) y se visualizó bajo iluminación UV y mediante tinción con molibdato de amonio cérico de ácido o p-anisaldehído. La cromatografía en columna ultrarrápida se realizó sobre gel de sílice (40-63 µm, Merck) o LiChrorep RP-18 (40-63 µm, Merck). La membrana de diálisis (éster de celulosa, MCCO = 10.000) se lavó con ddH₂O antes de su uso. Los espectros de NMR se registraron a 600 MHz (¹H NMR) y 150 MHz (¹³C HMR) en un Bruker Advance 600. El desplazamiento químico se informó en ppm (escala δ) y se calibró contra la señal de protones y carbonos residual de cloroformo deuterado (δ = 7,24 ppm), agua deuterada (δ = 4,80 ppm) o metanol deuterado (δ = 3,31 ppm). Las constantes de acoplamiento en Hz se calcularon a partir del desplazamiento químico de ¹H NMR o espectros. Los datos se representan de la siguiente manera: desplazamiento químico, multiplicidad (s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuarteto, m = multiplete, br = anchura), constante de integración y acoplamiento (J) en Hz. Los espectros de masas ESI de alta resolución se registraron en un APEX-ultra 9.4 T FTICR-MS (Bruker Daltonics). Los espectros MALDI-TOF se registraron en el espectrómetro Bruker Ultraflex II TOF/TOF200 usando ácido sinapínico como matriz. Se adquirieron anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado con Alexa Fluor 647, anticuerpo IgM anti-ratón de cabra conjugado con DyLight 649, anticuerpo IgG1 anti-ratón de cabra conjugado con Alexa Fluor 488, anticuerpo IgG2a anti-ratón de cabra conjugado con Alexa Fluor 594, anticuerpo IgG2b anti-ratón de cabra conjugado con Cy3, anticuerpo IgG2c anti-ratón conjugado con R-PE y anticuerpo IgG3 anti-ratón de cabra conjugado con Alexa Fluor 647 de Jackson ImmunoResearch. Los portaobjetos de micromatrices se escanearon a 635 nm, 594 nm, 532 nm o 488 nm de longitud de onda con un lector de chips de fluorescencia de micromatrices (GenePix 4300A; Molecular Devices Corporation). Los datos de fluorescencia se analizaron mediante el software GenePix Pro-6.0 (Axon Instruments, Union City, CA, USA). El toxoide diftérico (CRM 197) se adquirió de Pfenex Incorporation.

Todos los nucleótidos, azúcares, nucleótidos de azúcar y productos químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El ensayo de clonación, sobreexpresión, purificación y actividad las enzimas All se describió de acuerdo con los procedimientos informados.³

40 **Procedimiento general para la síntesis de monoéster derivado de GH**

Se disolvió un derivado de GH (2-3 mg, 1 equiv.) en una solución de dimetilformamida anhidra (DMF). Luego, se añadió conector de éster de p-nitrofenilo (5-6 mg, 5 equiv.) y se agitó durante 1-5 h a temperatura ambiente. La reacción se monitorizó mediante cromatografía en capa fina usando butanol/acetato/agua 3:2:2 como solvente de desarrollo. Cuando se logró un rendimiento óptimo, la mezcla de la reacción se concentró al vacío sin calentar para eliminar la DMF. Se purificó por cromatografía de columna de fase inversa (C18) y se eluyó gradualmente con H₂O que contiene ácido acético al 1% a MeOH:H₂O = 7:3. La solución se liofilizó hasta un monoéster de derivados de GH sólido amarillo claro (1,5-2 mg, 60-80%).

50 **Procedimiento general para glicoconjugados derivados de GH**

Se disolvió DT en tampón PBS 100 mM, pH 7,9 (5 mg/ml), y se añadieron 30-40 equivalentes de monoéster derivado de GH a la solución. La mezcla se agitó suavemente durante 24 h a temperatura ambiente. Después, la mezcla se diluyó con ddH₂O y se centrifugó frente a 10 cambios de agua desionizada con Amicon Ultra-0.5, 10 kDa. La solución se liofilizó hasta obtener un polvo blanco. Los conjugados DT derivados de GH obtenidos pueden caracterizarse por análisis MALDI-TOF (modo positivo, ácido sinapínico matriz, H₂O) para determinar el número de incorporación de oligosacáridos.

60 **Fabricación y detección de micromatrices**

Para fabricar la micromatriz, se prepararon los compuestos **1-30**, 9 tipos de conectores funcionales y 55 tipos de otros oligosacáridos con conector aminopentilo (Tabla S1) disolviéndolos en el tampón de impresión (tampón de fosfato 300 mM, Tween 20 al 0,005%, pH 8,5) en concentración de 10 mM. Los glicanos se imprimieron (BioDot; Cartesian Technologies) mediante la depósito de un pin robótico (SMP3; TeleChem International) de ~0,6 nl

de varias soluciones de una placa de 96 pocillos en un portaobjetos de vidrio recubierto con NHS (portaobjetos Nexterion H; SCHOTT North America). La micromatriz se diseñó con 16 cuadrículas en un portaobjetos y 20 columnas x 10 filas en una cuadrícula. Los portaobjetos impresos se dejaron reaccionar en una atmósfera del 80% de humedad durante una hora seguido de desecación durante la noche. Estos portaobjetos se almacenaron a temperatura ambiente en un desecador antes de su uso.

Líneas celulares y análisis de citometría de flujo

La línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 se mantuvo en medio de Eagle modificado de Dulbecco (Life Technologies, Carlsbad, CA) suplementado con FBS al 10%, 1X Antibiótico-Antimicótico (Life Technologies) e insulina (50 mg/ml). Para el análisis de citometría de flujo, las células se recogieron, se centrifugaron a 500 g durante 3 min, y se resuspendieron en FACS de tinción/tampón de lavado (1% de FBS, 0,1% de NaN₃ en PBS). Las células (2,5 x 10⁵) se incubaron luego con antisuero (dilución 1/10 en 50 µl de tampón de tinción/lavado FACS) de ratones Balb/c inmunizados con derivados de GH durante 2 horas a 4° C. Aquí se usó como control el suero de ratón Balb/c no tratado. Después de lavar dos veces con 1 ml de tampón de tinción/lavado FACS, las células se incubaron con anticuerpo IgG/IgM anti-ratón marcado con FITC (dilución 1/20, BD Biosciences, San Jose, CA) durante 30 min a 4° C. Después de otro ciclo de lavado, las células se sometieron a análisis de citometría de flujo. Todas las muestras se analizaron con FACSCanto (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) usando el software FACSDiva (Becton Dickinson) y FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

Dosificación de ratones y programa de vacunación

Para comparar la inmunogenicidad de las vacunas derivadas de GH (**1-DT** a **10-DT**), se inmunizaron diez grupos de cinco ratones (ratones Balb/c hembra de 8 semanas de edad, BioLASCO, Taiwán) por vía intramuscular con glicolípido C34. Se administraron tres inmunizaciones a intervalos de 2 semanas. Cada vacuna contenía 2 µg de derivados de GH y 2 µg de C34. A los ratones de control se les inyectó solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se extrajo sangre de los ratones antes de la primera inmunización (preimmune) y 10 días después de la tercera inmunización. Todos los sueros se obtuvieron por centrifugación a 4.000 x g durante 10 min. Las respuestas serológicas se analizaron mediante micromatrices de glicanos.

Ensayo serológico con matriz de glicanos

Los sueros de ratón se diluyeron con tampón BSA/PBST al 1% (tampón PBST: PBS y Tween-20 al 0,05%, pH 7,4). La micromatriz de glicanos se bloqueó con tampón de bloqueo Superblock (Pierce) durante 1 h a 4° C y se lavó tres veces con tampón PBST antes de su uso. Luego, se introdujeron las diluciones de suero en la micromatriz de glicanos y se incubaron a 4° C durante 1 h. Se lavó el exceso de anticuerpos en suero y las micromatrices se incubaron individualmente con anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado con Alexa Fluor 647 o anticuerpo IgM anti-ratón de cabra conjugado con DyLight 649 como el 2º anticuerpo a 4° C en oscuridad durante 1 h. Luego, los portaobjetos se lavaron tres veces con PBST y se escanearon a una longitud de onda de 635 nm con un lector de chips de fluorescencia de micromatrices (GenePix 4300A; Molecular Devices Corporation) y las imágenes escaneadas se analizaron con el software de análisis GenePix Pro-6.0 (Axon Instruments, Union City, CA, USA).

Análisis de subclases de anticuerpos.

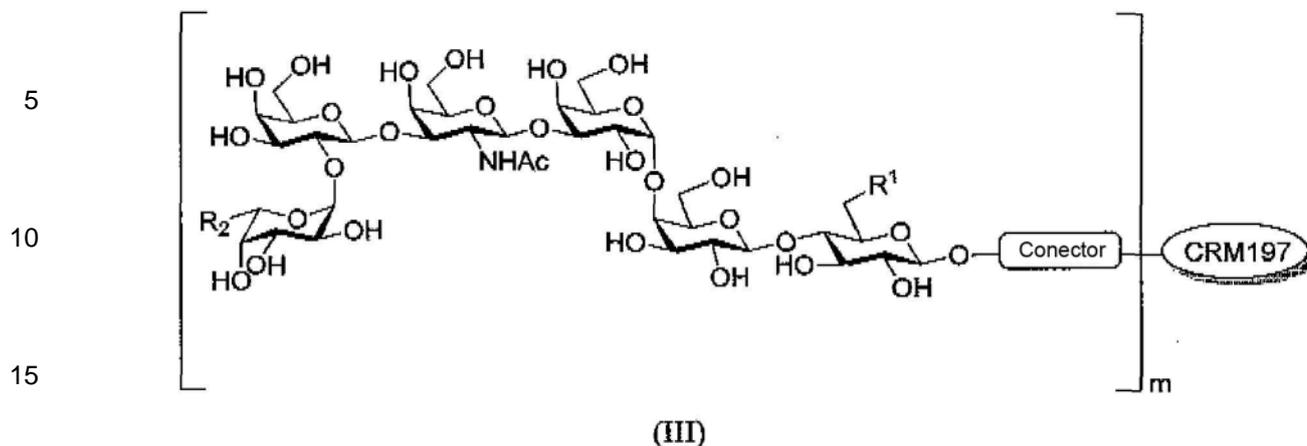
Los procedimientos para el análisis de subclases de anticuerpos fueron los mismos que los mencionados anteriormente. El anticuerpo IgG2a anti-ratón de cabra conjugado con Alexa Fluor 594, el anticuerpo IgG2b anti-ratón de cabra conjugado con Cy3, el anticuerpo IgG2c anti-ratón conjugado con R-PE y el anticuerpo IgG3 anti-ratón de cabra conjugado con Alexa Fluor 647 se añadieron por separado a la micromatriz con una dilución de 400 veces, seguido de incubación y lavado.

REFERENCIAS

- (1) Hakomori, S. Adv Cancer Res 1989, 52, 257.
- (2) Hakomori, S. Curr. Opin. Immunol. 1991, 3, 646.
- (3) (a) Astronomo, R. D.; Burton, D. R. Nat. Rev. Drug Discovery 2010, 9, 308. (b) Buskas, T.; Thompson, P.; Boons, G. J. Chem. Commun. 2009, 5335. (c) Wilson, R. M.; Danishefsky, S. J. J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 14462.
- (4) Berti, F.; Adamo, R. ACS Chem. Biol. 2013, 8, 1653.
- (5) (a) Bundle, D. R.; Rich, J. R.; Jacques, S.; Yu, H. N.; Nitz, M.; Ling, C. C. Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 7725. (b) Wu, X.; Lipinski, T.; Paszkiewicz, E.; Bundle, D. R. Chemistry 2008, 14, 6474.
- (6) (a) Lo-Man, R.; Vichier-Guerre, S.; Perraut, R.; Deriaud, E.; Huteau, V.; BenMohamed, L.; Diop, O. M.; Livingston, P. O.; Bay, S.; Leclerc, C. Cancer Res. 2004, 64, 4987. (b) Kagan, E.; Ragupathi, G.; Yi, S. S.; Reis, C. A.; Gildersleeve, J.; Kahne, D.; Clausen, H.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O. Cancer Immunol. Immunother. 2005, 54, 424.
- (7) Ragupathi, G.; Koide, F.; Livingston, P. O.; Cho, Y. S.; Endo, A.; Wan, Q.; Spassova, M. K.; Keding, S. J.;

- Allen, J.; Ouerfelli, O.; Wilson, R. M.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 2715.
- (8) (a) Ingale, S.; Wolfert, M. A.; Gaekwad, J.; Buskas, T.; Boons, G. J. *Nat. Chem. Biol.* 2007, 3, 663. (b) Buskas, T.; Ingale, S.; Boons, G. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 5985.
- 5 (9) (a) Liu, C. C.; Ye, X. S. *Glycoconj J* 2012, 29, 259. (b) Yin, Z.; Huang, X. *J. Carbohydr. Chem.* 2012, 31, 143.
- (10) (a) Miles, D.; Roche, H.; Martin, M.; Perren, T. J.; Cameron, D. A.; Glaspy, J.; Dodwell, D.; Parker, J.; Mayordomo, J.; Tres, A.; Murray, J. L.; Ibrahim, N. K.; Theratope Study, G. *Oncologist* 2011, 16, 1092. (b) Holmberg, L. A.; Sandmaier, B. M. *Expert Rev. Vaccines.* 2004, 3, 655. (c) Kirkwood, J. M.; Ibrahim, J.; Lawson, D. H.; Atkins, M. B.; Agarwala, S. S.; Collins, K.; Mascari, R.; Morrissey, D. M.; Chapman, P. B. *J Clin Oncol* 2001, 19, 1430. (d) Eggermont, A. M. *Nat Rev Clin Oncol* 2009, 6, 256.
- 10 (11) Bundle, D. R. *Nat. Chem. Biol.* 2007, 3, 605.
- (12) (a) Kannagi, R.; Levery, S. B.; Ishigami, F.; Hakomori, S.; Shevinsky, L. H.; Knowles, B. B.; Solter, D. J. *Biol. Chem.* 1983, 258, 8934. (b) Menard, S.; Tagliabue, E.; Canevari, S.; Fossati, G.; Colnaghi, M. I. *Cancer Res.* 1983, 43, 1295. (c) Bremer, E. G.; Levery, S. B.; Sonnino, S.; Ghidoni, R.; Canevari, S.; Kannagi, R.; Hakomori, S. *J. Biol. Chem.* 1984, 259, 14773.
- 15 (13) (a) Canevari, S.; Fossati, G.; Balsari, A.; Sonnino, S.; Colnaghi, M. I. *Cancer Res.* 1983, 43, 1301. (b) Huang, Y. L.; Hung, J. T.; Cheung, S. K.; Lee, H. Y.; Chu, K. C.; Li, S. T.; Lin, Y. C.; Ren, C. T.; Cheng, T. J.; Hsu, T. L.; Yu, A. L.; Wu, C. Y.; Wong, C. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013, 110, 2517. (c) Lou, Y. W.; Wang, P. Y.; Yeh, S. C.; Chuang, P. K.; Li, S. T.; Wu, C. Y.; Khoo, K. H.; Hsiao, M.; Hsu, T. L.; Wong, C. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014, 111, 2482.
- 20 (14) Gilewski, T.; Ragupathi, G.; Bhuta, S.; Williams, L. J.; Musselli, C.; Zhang, X. F.; Bornmann, W. G.; Spassova, M.; Bencsath, K. P.; Panageas, K. S.; Chin, J.; Hudis, C. A.; Norton, L.; Houghton, A. N.; Livingston, P. O.; Danishefsky, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001, 98, 3270.
- (15) (a) Tsai, T. I.; Lee, H. Y.; Chang, S. H.; Wang, C. H.; Tu, Y. C.; Lin, Y. C.; Hwang, D. R.; Wu, C. Y.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 14831. (b) Burkhardt, F.; Zhang, Z.; Wacowich-Sgarbi, S.; Wong, C. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 1274.
- 25 (16) (a) Slovin, S. F.; Ragupathi, G.; Adluri, S.; Ungers, G.; Terry, K.; Kim, S.; Spassova, M.; Bornmann, W. G.; Fazzari, M.; Dantis, L.; Olkiewicz, K.; Lloyd, K. O.; Livingston, P. O.; Danishefsky, S. J.; Scher, H. I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999, 96, 5710. (b) Wang, Z. G.; Williams, L. J.; Zhang, X. F.; Zatorski, A.; Kudryashov, V.; Ragupathi, G.; Spassova, M.; Bornmann, W.; Slovin, S. F.; Scher, H. I.; Livingston, P. O.; Lloyd, K. O.; Danishefsky, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000, 97, 2719.
- 30 (17) (a) Yin, Z. J.; Huang, X. F. *J. Carbohydr. Chem.* 2012, 31, 143. (b) Liu, C. C.; Ye, X. S. *Glycoconjugate J.* 2012, 29, 259.
- (18) (a) Jennings, H. J.; Roy, R.; Gamian, A. J. *Immunol.* 1986, 137, 1708. (b) Krug, L. M.; Ragupathi, G.; Ng, K. K.; Hood, C.; Jennings, H. J.; Guo, Z.; Kris, M. G.; Miller, V.; Pizzo, B.; Tyson, L.; Baez, V.; Livingston, P. O. *Clin Cancer Res* 2004, 10, 916. (c) Krug, L. M.; Ragupathi, G.; Hood, C.; George, C.; Hong, F.; Shen, R.; Abrey, L.; Jennings, H. J.; Kris, M. G.; Livingston, P. O. *Cancer Immunol. Immunother.* 2012, 61, 9.
- 35 (19) (a) Wu, J.; Guo, Z. *Bioconjugate Chem.* 2006, 17, 1537. (b) Wang, Q.; Ekanayaka, S. A.; Wu, J.; Zhang, J.; Guo, Z. *Bioconjugate Chem.* 2008, 19, 2060. (c) Yang, F.; Zheng, X. J.; Huo, C. X.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Ye, X. S. *ACS Chem. Biol.* 2011, 6, 252. (d) Sahabuddin, S.; Chang, T. C.; Lin, C. C.; Jan, F. D.; Hsiao, H. Y.; Huang, K. T.; Chen, J. H.; Horng, J. C.; Ho, J. A. A.; Lin, C. C. *Tetrahedron* 2010, 66, 7510.
- 40 (20) Pan, Y.; Chefalo, P.; Nagy, N.; Harding, C.; Guo, Z. *J. Med. Chem.* 2005, 48, 875.
- (21) (a) Grunewald, J.; Tsao, M. L.; Perera, R.; Dong, L.; Niessen, F.; Wen, B. G.; Kubitz, D. M.; Smider, V. V.; Ruf, W.; Nasoff, M.; Lerner, R. A.; Schultz, P. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008, 105, 11276. (b) Grunewald, J.; Hunt, G. S.; Dong, L.; Niessen, F.; Wen, B. G.; Tsao, M. L.; Perera, R.; Kang, M.; Laffitte, B. A.; Azarian, S.; Ruf, W.; Nasoff, M.; Lerner, R. A.; Schultz, P. G.; Smider, V. V. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009, 106, 4337.
- 45 (22) (a) Hoffmann-Roder, A.; Johannes, M. *Chem. Commun.* 2011, 47, 9903. (b) Hoffmann-Roder, A.; Kaiser, A.; Wagner, S.; Gaidzik, N.; Kowalczyk, D.; Westerlind, U.; Gerlitzki, B.; Schmitt, E.; Kunz, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 8498. (c) Oberbillig, T.; Mersch, C.; Wagner, S.; Hoffmann-Roder, A. *Chem. Commun.* 2012, 48, 1487.
- 50 (23) (a) Park, T. K.; Kim, I. J.; Hu, S. H.; Bilodeau, M. T.; Randolph, J. T.; Kwon, O.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 11488. (b) Bilodeau, M. T.; Park, T. K.; Hu, S. H.; Randolph, J. T.; Danishefsky, S. J.; Livingston, P. O.; Zhang, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 7840.
- 55 (24) Lassaletta, J. M.; Schmidt, R. R. *Liebigs Ann.* 1996, 1417.
- (25) Zhu, T.; Boons, G. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, 3495.
- (26) Bosse, F.; Marcaurette, L. A.; Seeberger, P. H. *J. Org. Chem.* 2002, 67, 6659.
- (27) Werz, D. B.; Castagner, B.; Seeberger, P. H. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 2770.
- (28) Wang, Z.; Zhou, L.; El-Boubbou, K.; Ye, X. S.; Huang, X. *J. Org. Chem.* 2007, 72, 6409.
- 60 (29) Huang, C. Y.; Thayer, D. A.; Chang, A. Y.; Best, M. D.; Hoffmann, J.; Head, S.; Wong, C. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006, 103, 15.
- (30) Su, D. M.; Eguchi, H.; Yi, W.; Li, L.; Wang, P. G.; Xia, C. *Org. Lett.* 2008, 10, 1009.
- (31) Zhang, J.; Kowal, P.; Fang, J.; Andreana, P.; Wang, P. G. *Carbohydr. Res.* 2002, 337, 969.

- (32) Shao, J.; Zhang, J.; Kowal, P.; Lu, Y.; Wang, P. G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 295, 1.
(33) Cai, X. Q.; Tsuchikama, K.; Janda, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 2971.

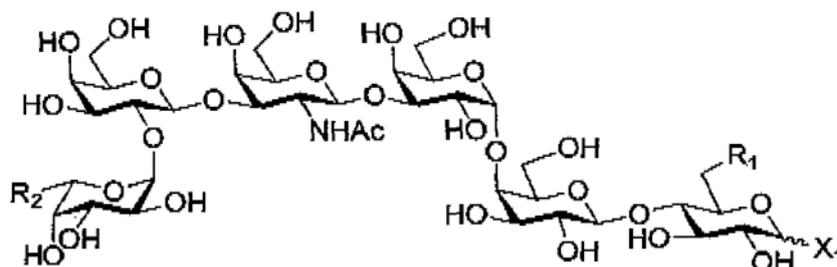


20 en donde
m es un número entero de 1 a 38.

- 25 **7.** La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que el conector es un conector hetero- u homo-bifuncional.
- 30 **8.** La composición inmunogénica de la reivindicación 7, en la que el conector es un conector homo-bifuncional amino-activo con 2-20 carbonos que puede formar un enlace amida con el por lo menos un glicano y la proteína portadora, respectivamente.
- 35 **9.** La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que el adyuvante es un glicolípido capaz de unirse a una molécula CD1d en una célula dendrítica.
- 40 **10.** La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que el adyuvante es sal de aluminio, escualeno, MF59 o QS-21.
- 45 **11.** Una vacuna contra el cáncer, que comprende la composición inmunogénica de la reivindicación 1 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 50 **12.** Un anticuerpo monoclonal producido contra la composición inmunogénica de la reivindicación 1.
- 55 **13.** Una composición inmunogénica como se reivindica en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un cáncer, en donde la composición inmunogénica induce la citotoxicidad de las células cancerosas, provoca una respuesta inmune contra el cáncer, genera anticuerpos que se unen específicamente a uno o más antígenos de superficie de las células cancerosas y/o neutraliza una o más células cancerosas seleccionadas del grupo formado por Globo H, SSEA-3 y SSEA-4.
- 60 **14.** La composición inmunogénica para el uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que los anticuerpos son predominantemente anticuerpos IgG.
- 65 **15.** La composición inmunogénica para el uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste de cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer oral, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de vías biliares, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de huesos, cáncer de piel, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario y cáncer de próstata.
- 16.** La composición inmunogénica para el uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el cáncer expresa el antígeno Globo H, SSEA3 y/o SSEA4.
- 17.** Un proceso para elaborar la composición inmunogénica de la reivindicación 1, que comprende: proporcionar el portador; y conjugar el por lo menos un glicano con el portador a través del conector mediante una reacción de conjugación.
- 18.** El proceso de la reivindicación 17, en donde el conector comprende por lo menos un átomo de azufre, grupo carboxilato, grupo amida, grupo carbamato, grupo carbonato, grupo tiocarbamato, grupo tiocarbonato, grupo tioéter, grupo succinamida, grupo n-hidroxisuccinamida o cualquier combinación de los mismos.
- 19.** Un compuesto de fórmula (I):

5

10

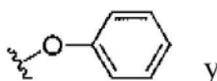


(I)

15 en el que:

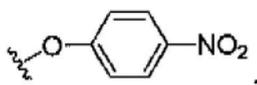
X_1 es -OR o -SR, en donde R es $-(CH_2)_5NH_2$; y
 R^1 se selecciona del grupo que consiste de -F, $-N_3$, $-NO_2$,

20



y

25



y R^2 es $-CH_3$; o

R^1 es -OH, y R^2 se selecciona del grupo que consiste de $-CH_2F$, $-CH_2N_3$, $-CH_2OH$ y $-C\equiv CH$.

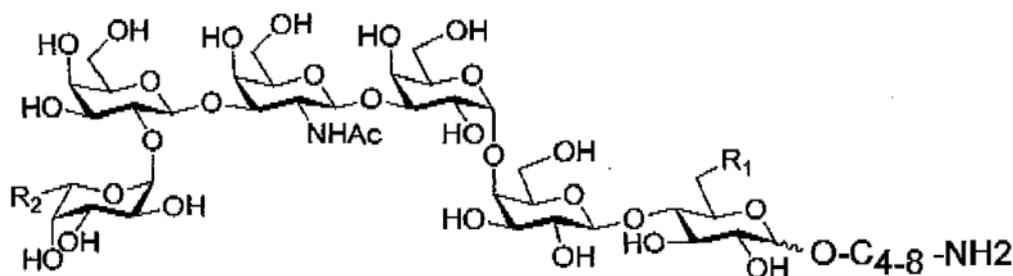
30

20. Un proceso para preparar la composición inmunogénica de la reivindicación 1, que comprende:

(i) proporcionar un compuesto de fórmula (X):

35

40



45

Formula (X)

en el que:

R^1 y R^2 son como se han definido anteriormente en la Fórmula (II);

50

(ii) hacer reaccionar el compuesto de Fórmula (X) con un conector bifuncional aminoactivo para proporcionar un primer producto de reacción; y

(iii) hacer reaccionar el primer producto de reacción con una proteína portadora para producir un conjugado de glicanos; y

55

(iv) mezclar un adyuvante para producir la composición de la reivindicación 1.

21. El proceso de la reivindicación 20, en el que el conector bifuncional aminoactivo es un ácido dicarboxílico que tiene de 4 a 6 carbonos.

60

22. El proceso de la reivindicación 20, en el que el portador es una proteína, un lípido, una proteína lipolizada, un virus, un péptido o un dendrímero de glicopéptidos.

65

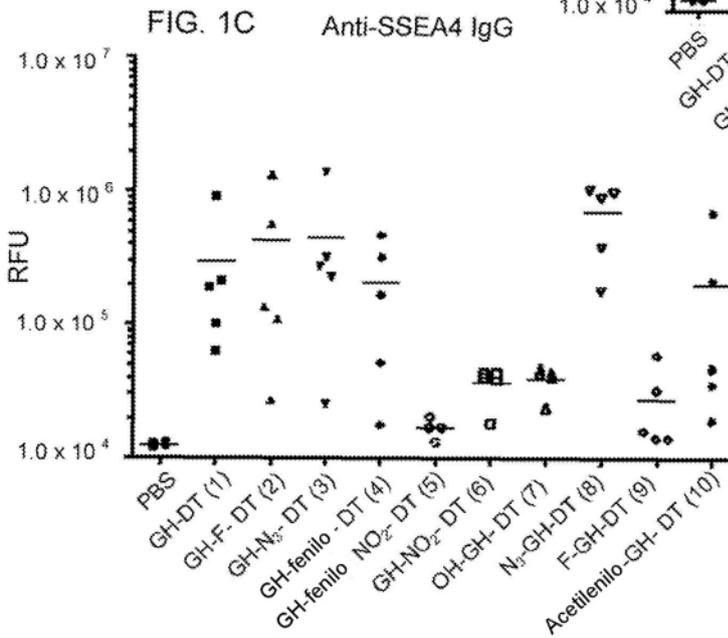
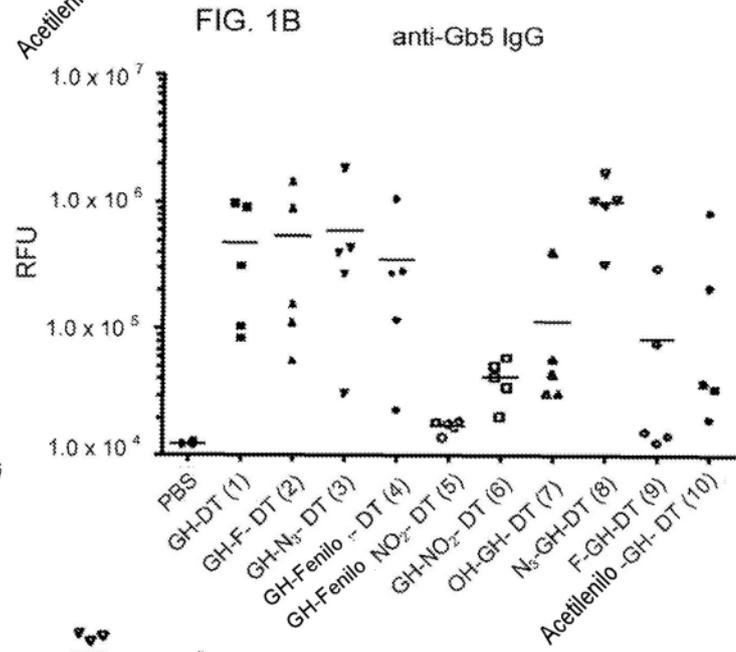
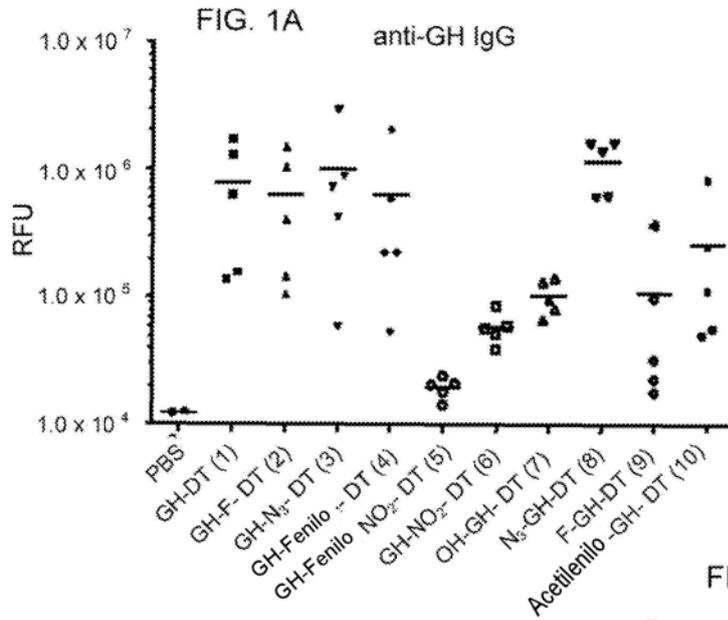


FIG. 2

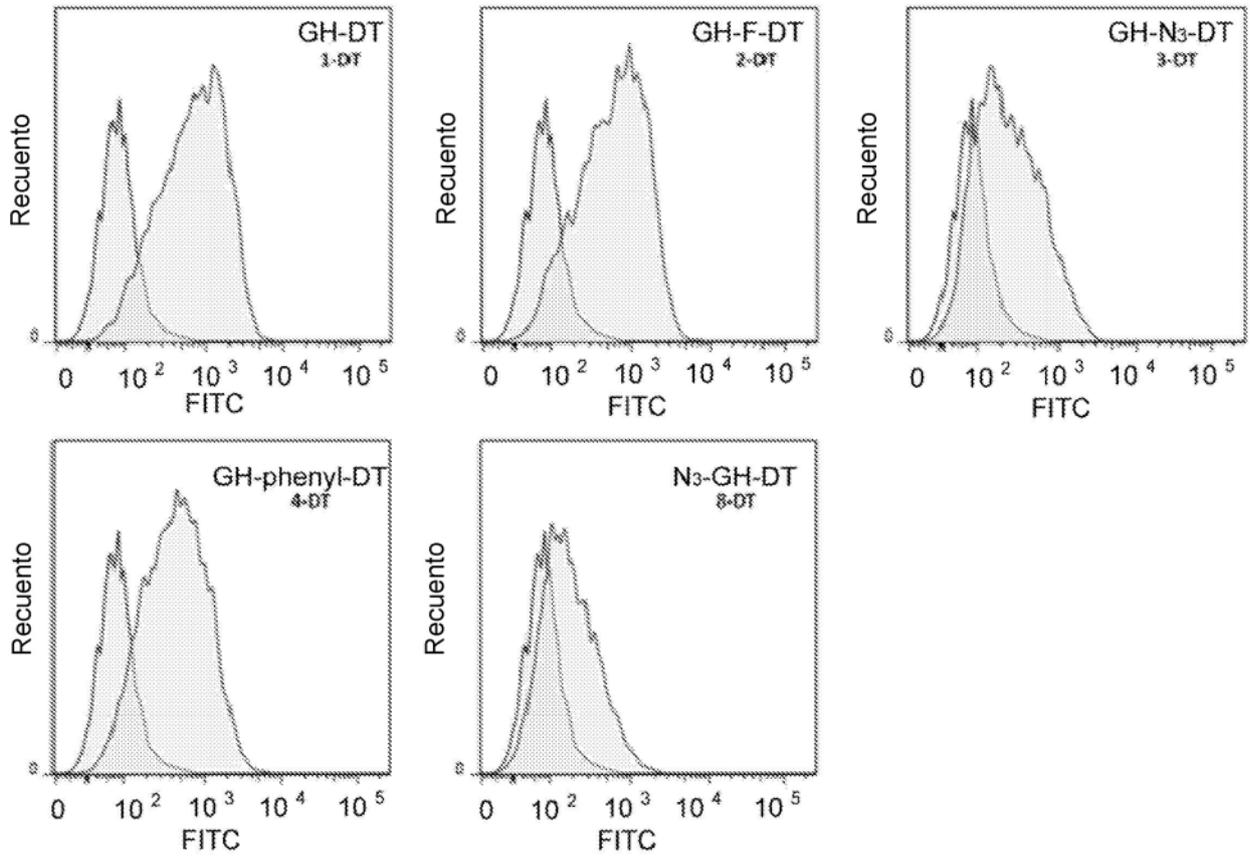


FIG. 3

